

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-511423

(P2024-511423A)

(43)公表日 令和6年3月13日(2024.3.13)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード(参考)	
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12		4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 C 0 8 7
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00		4 H 0 4 5
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全132頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2023-558163(P2023-558163)	(71)出願人	506115514
(86)(22)出願日	令和4年3月23日(2022.3.23)		ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシテ
(85)翻訳文提出日	令和5年11月20日(2023.11.20)		ィ オブ カリフォルニア
(86)国際出願番号	PCT/US2022/021605		The Regents of the U
(87)国際公開番号	WO2022/204324		niversity of Califo
(87)国際公開日	令和4年9月29日(2022.9.29)		rnia
(31)優先権主張番号	63/165,428		アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9
(32)優先日	令和3年3月24日(2021.3.24)		4 6 0 7 - 5 2 0 0, オークランド, フ
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		ランクリン ストリート 1 1 1 1, 1 2
			番 フロア
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA	(74)代理人	100099759
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(弁理士 青木 篤
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A	(74)代理人	100123582
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR		弁理士 三橋 真二
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,	(74)代理人	100117019
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 複数の転写調節因子をもつハイブリッド受容体

(57)【要約】

本開示は全体として免疫学の分野に関し、詳細には、速い時間スケールの細胞内シグナル伝達と長い時間スケールの転写調節を兼ね備えるように設計されたハイブリッドキメラ抗原受容体に関する。本開示はまた、そのような受容体、それをコードする核酸、その核酸を用いて遺伝子改変された宿主細胞を作製するのに有用な組成物及び方法、並びに細胞の活性を調節するための方法及び/又はがんなどの様々な健康状態若しくは疾患の治療のための方法を提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

キメラ受容体であって、N末端からC末端に、

a) 選択されたりガンドに対する結合親和性を有する細胞外リガンド結合ドメイン

;

b) 連結ポリペプチド;

c) 1つ又は複数のリガンド誘導性タンパク質分解切断部位を含む膜貫通ドメイン (TMD); 並びに

d) 細胞内ドメイン (ICD) であって、任意の順序で:

(i) シグナル伝達分子に由来する少なくとも1つの共刺激ドメイン及び活性化ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメイン (SD)、及び

(ii) 転写調節因子、を含む細胞内ドメイン

を含み、

前記選択されたりガンドの前記細胞外リガンド結合ドメインへの結合が、前記ICDと前記連結ポリペプチドの間に配置されたりガンド誘導性タンパク質分解切断部位での切断を誘導し、

前記選択されたりガンドの前記細胞外リガンド結合ドメインへの結合が、前記細胞内SDを通して近位シグナル伝達カスケードを誘導し、

Notch受容体のLIN-12-Notchリピート(LNR)及び/又はヘテロ二量体化ドメイン(HD)を含まない

キメラ受容体。

【請求項 2】

前記細胞外ドメインが、細胞の表面のリガンドに結合できる抗原結合部分を含む、請求項1に記載のキメラ受容体。

【請求項 3】

前記細胞が病原細胞である、請求項2に記載のキメラ受容体。

【請求項 4】

前記細胞がヒト細胞である、請求項3に記載のキメラ受容体。

【請求項 5】

前記ヒト細胞が腫瘍細胞である、請求項4に記載のキメラ受容体。

【請求項 6】

前記ヒト細胞が最終分化細胞である、請求項4に記載のキメラ受容体。

【請求項 7】

前記リガンドが、タンパク質又は炭水化物を含む、請求項1~6のいずれか一項に記載のキメラ受容体。

【請求項 8】

前記リガンドが、CD1、CD1a、CD1b、CD1c、CD1d、CD1e、CD2、CD3d、CD3e、CD3g、CD4、CD5、CD7、CD8a、CD8b、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD27、CD28、CD33、CD34、CD40、CD45、CD48、CD52、CD59、CD66、CD70、CD71、CD72、CD73、CD79A、CD79B、CD80(B7.1)、CD86(B7.2)、CD94、CD95、CD134、CD140(PDGFR4)、CD152、CD154、CD158、CD178、CD181(CXCR1)、CD182(CXCR2)、CD183(CXCR3)、CD210、CD246、CD252、CD253、CD261、CD262、CD273(PD-L2)、CD274(PD-L1)、CD276(B7H3)、CD279、CD295、CD339(JAG1)、CD340(HER2)、EGFR、FGFR2、CEA、AFP、CA125、MUC-1、MAGE、アルカリホスファターゼ、胎盤様2(ALPPL2)、B細胞成熟抗原(BCMA)、緑色蛍光タンパク質(GFP)、青色蛍光タンパク質(BFP)強化緑色蛍光タンパク質(EGFP)、及びシグナル調節タンパク質(SIRP)か

10

20

30

40

50

らなる群から選択される、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のキメラ受容体。

【請求項 9】

前記リガンドが、細胞表面受容体、接着タンパク質、インテグリン、ムチン、レクチン、腫瘍関連抗原、及び腫瘍特異的抗原から選択される、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のキメラ受容体。

【請求項 10】

前記リガンドが、腫瘍関連抗原又は腫瘍特異的抗原である、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のキメラ受容体。

【請求項 11】

前記細胞外リガンド結合ドメインが、受容体のリガンド結合部分を含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載のキメラ受容体。 10

【請求項 12】

前記抗原結合部分が、抗体、ナノボディ、ダイアボディ、トリアボディ、ミニボディ、F (a b ') 2 フラグメント、F (a b) v フラグメント、一本鎖可変フラグメント (s c F v)、シングルドメイン抗体 (s d A b)、及びそれらの機能性断片からなる群から選択される、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載のキメラ受容体。

【請求項 13】

前記抗原結合部分が s c F v を含む、請求項 12 に記載のキメラ受容体。

【請求項 14】

前記抗原結合部分が、CD 19、B7H3 (CD 276)、BCMA (CD 269)、ALPPL2、CD 123、CD 171、CD 179 a、CD 20、CD 213 A2、CD 22、CD 24、CD 246、CD 272、CD 30、CD 33、CD 38、CD 44 v 6、CD 46、CD 71、CD 97、CEA、CLDN6、CLECL1、CS - 1、EGFR、EGFRvIII、ELF2M、EPCAM、EphA2、エフリンB2、FAP、FLT3、GD2、GD3、GM3、GPCR5D、HER2 (ERBB2 / neu)、IGLL1、IL - 11R、KIT (CD 117)、MUC1、NCAM、PAP、PDGFR -、PRSS21、PSCA、PSMA、ROR1、SIRP、SSEA - 4、TAG72、TEM1 / CD 248、TEM7R、TSHR、VEGFR2、ALPI、シトルリン化ビメンチン、cMet、及びAx1からなる群から選択される腫瘍関連抗原に特異的に結合する、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載のキメラ受容体。 30

【請求項 15】

前記腫瘍関連抗原が、CD 19、BCMA、CEA、HER2、MUC1、CD 20、ALPPL2、SIRP、又はEGFRである、請求項 14 に記載のキメラ受容体。

【請求項 16】

前記腫瘍関連抗原が、CD 19、BCMA、HER2、又はALPPL2である、請求項 15 に記載のキメラ受容体。

【請求項 17】

前記連結ポリペプチドがヒンジドメインを含む、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載のキメラ受容体。

【請求項 18】

前記ヒンジドメインが、分子間ジスルフィド結合を介して前記キメラポリペプチドのオリゴマー形成を促進することができる、請求項 17 に記載のキメラ受容体。 40

【請求項 19】

前記ヒンジドメインが、CD 8 ヒンジドメイン、CD 28 ヒンジドメイン、CD 152 ヒンジドメイン、PD - 1 ヒンジドメイン、CTLA4 ヒンジドメイン、OX40 ヒンジドメイン、IgG1 ヒンジドメイン、IgG2 ヒンジドメイン、IgG3 ヒンジドメイン、及びIgG4 ヒンジドメイン、又はそれらのいずれかの機能性バリエーションに由来する、請求項 17 に記載のキメラ受容体。

【請求項 20】

前記連結ポリペプチドが、CD 8 ヒンジドメイン又はその機能性バリエーション、CD 2 50

8 ヒンジドメイン又はその機能性バリエーション、OX40 ヒンジドメイン又はその機能性バリエーション、及び IgG4 ヒンジドメイン又はその機能性バリエーションから選択される群に由来する、請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載のキメラ受容体。

【請求項 21】

前記連結ポリペプチドが、CD8 ヒンジドメイン又はその機能性バリエーションに由来する、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載のキメラ受容体。

【請求項 22】

前記連結ポリペプチドが、CD28 ヒンジドメイン又はその機能性バリエーションに由来する、請求項 1 ~ 21 のいずれか一項に記載のキメラ受容体。

【請求項 23】

前記連結ポリペプチドが、配列番号 3 と少なくとも 80% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 22 のいずれか一項に記載のキメラ受容体。

10

【請求項 24】

前記 1 つ又は複数のリガンド誘導性タンパク質分解切断部位が、セクレターゼ切断部位を含む、請求項 1 ~ 23 のいずれか一項に記載のキメラ受容体。

【請求項 25】

前記 TMD が、配列番号 4 と少なくとも 80% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 24 のいずれか一項に記載のキメラ受容体。

【請求項 26】

前記 TMD と前記 ICD の間に置かれたストップトランスファーシーケンス (STS) をさらに含む、請求項 1 ~ 25 のいずれか一項に記載のキメラ受容体。

20

【請求項 27】

前記ストップトランスファーシーケンスが、配列番号 5 と少なくとも 80% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 26 のいずれか一項に記載のキメラ受容体。

【請求項 28】

前記シグナル伝達分子が、クラス 1 又はクラス 3 ヒト膜タンパク質を含む、請求項 1 ~ 27 のいずれか一項に記載のキメラ受容体。

【請求項 29】

前記シグナル伝達分子が、CD28、ICOS、CTLA4、PD1、PD1H、BTLA、B71、B7H1、CD226、CRTAM、TIGIT、CD96、TIM1、TIM2、TIM3、TIM4、CD2、SLAM、2B4、Ly108、CD84、Ly9、CRACC、BTN1、BTN2、BTN3、LAIR1、LAG3、CD160、4-1BB、OX40、CD27、GITR、CD30、TNFR1、TNFR2、HVEM、LT_αR、DR3、DCR3、FAS、CD40、RANK、OPG、TRAILR1、TACI、BAFFR、BCMA、TWEAKR、EDAR、XEDAR、RELT、DR6、TROY、NGFR、CD22、シグレック-3、シグレック-5、シグレック-7、KLRG1、NKR-P1A、ILT2、KIR2DL1、KIR3DL1、CD94-NKG2A、CD300b、CD300e、TREM1、TREM2、ILT7、ILT3、ILT4、TLT-1、CD200R、CD300a、CD300f、DC-SIGN、B7-2、アラジン-1、LAT、BLNK、LAYN、SLP76、EMB-LMP1、HIV-NEF、HVS-TIP、HVS-ORF5、及び HVS-stpC からなる群から選択される、請求項 1 ~ 28 のいずれか一項に記載のキメラ受容体。

30

40

【請求項 30】

前記シグナル伝達分子が、OX40、ICOS、4-1BB、CTLA4、CD28、CD30、CD2、CD27、及び CD226 からなるリストから選択される、請求項 1 ~ 29 のいずれか一項に記載のキメラ受容体。

【請求項 31】

前記活性化ドメインが、1 つ又は複数の免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ (ITAM) を含む、請求項 1 ~ 30 のいずれか一項に記載のキメラ受容体。

50

【請求項 3 2】

前記 1 つ又は複数の I T A M が、C D 3 、 C D 3 、 C D 3 /、及び C D 3 に由来する、請求項 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載のキメラ受容体。

【請求項 3 3】

前記 1 つ又は複数の I T A M が、C D 3 I T A M に対して、少なくとも約 8 0、8 5、9 0、9 5、9 6、9 7、9 8、9 9、又は 1 0 0 % の配列同一性を有する、請求項 1 ~ 3 2 のいずれか一項に記載のキメラ受容体。

【請求項 3 4】

前記転写調節因子が、転写活性化因子又は転写抑制因子を含む、請求項 1 ~ 3 3 のいずれか一項に記載のキメラ受容体。

10

【請求項 3 5】

前記転写調節因子が、G a l 4、t e t R、Z F H D 1、及び H A P 1 からなる群から選択されるタンパク質に由来する核局在化配列 (N L S) をさらに含み、前記転写調節因子が、V P 6 4、V P 6 5、K R A B、及び V P 1 6 からなる群から選択されるタンパク質に由来するトランス活性化ドメインを含む、請求項 1 ~ 3 4 のいずれか一項に記載のキメラ受容体。

【請求項 3 6】

配列番号 1 5 ~ 3 2、3 4 ~ 4 4、4 7 ~ 4 8、5 4 ~ 5 8、及び 6 3 ~ 6 8 のいずれか 1 つと少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 3 5 のいずれか一項に記載のキメラ受容体。

20

【請求項 3 7】

シグナル配列、検出可能な標識、腫瘍特異的切断部位、疾患特異的切断部位、又はそれらの組み合わせをさらに含む、請求項 1 ~ 3 6 のいずれか一項に記載のキメラ受容体。

【請求項 3 8】

請求項 1 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の前記キメラ受容体をコードするヌクレオチド配列を含む、組み換え核酸。

【請求項 3 9】

前記ヌクレオチド配列が、発現カセット又は発現ベクターに組み込まれる、請求項 3 8 に記載の組み換え核酸。

【請求項 4 0】

前記発現ベクターがウイルスベクターである、請求項 3 9 に記載の組み換え核酸。

30

【請求項 4 1】

前記ウイルスベクターが、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、又はレトロウイルスベクターである、請求項 4 0 に記載の組み換え核酸。

【請求項 4 2】

請求項 1 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の前記キメラ受容体及び / 又は前記組み換え核酸を含む組み換え細胞。

【請求項 4 3】

前記組み換え細胞が真核細胞である、請求項 4 2 に記載の組み換え細胞。

40

【請求項 4 4】

前記真核細胞が哺乳類細胞である、請求項 4 3 に記載の組み換え細胞。

【請求項 4 5】

前記哺乳類細胞が、免疫細胞、神経細胞、上皮細胞、及び内皮細胞、又は幹細胞である、請求項 4 4 に記載の組み換え細胞。

【請求項 4 6】

前記免疫細胞が、B 細胞、単球、ナチュラルキラー細胞、好塩基球、好酸球、好中球、樹状細胞、マクロファージ、制御性 T 細胞、ヘルパー T 細胞、細胞傷害性 T 細胞、又は他の T 細胞である、請求項 4 5 に記載の組み換え細胞。

【請求項 4 7】

50

請求項 1 ~ 4 6 のいずれか一項に記載の組み換え細胞であって、

a) 請求項 1 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の第 1 のキメラ受容体及び第 2 のキメラ受容体；及び / 又は

b) 請求項 3 8 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の第 1 の核酸及び第 2 の核酸；

を含み、

前記第 1 のキメラ受容体及び前記第 2 のキメラ受容体が、同じ配列を有しない、且つ / 又は前記第 1 の核酸若しくは (o r) 前記第 2 の核酸が、同じ配列を有しない

組み換え細胞。

【請求項 4 8】

前記第 1 のキメラ受容体が、第 2 のキメラ受容体の発現及び / 又は活性を調節する、請求項 4 7 に記載の組み換え細胞。

10

【請求項 4 9】

プロモーターに動作可能に連結されたタンパク質をコードする発現カセットをさらに含み、前記タンパク質の発現が転写調節因子によって調節される、請求項 4 2 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の組み換え細胞。

【請求項 5 0】

前記タンパク質が細胞に対して異種である、請求項 4 9 に記載の組み換え細胞。

【請求項 5 1】

前記プロモーターが酵母 G A L 4 プロモーターである、請求項 4 9 に記載の組み換え細胞。

20

【請求項 5 2】

前記タンパク質が、サイトカイン、細胞毒、ケモカイン、免疫調節因子、プロアポトーシス因子、抗アポトーシス因子、ホルモン、分化因子、脱分化因子、免疫細胞受容体（例えば、T C R 若しくは C A R）、又はレポーターである、請求項 4 9 ~ 5 1 のいずれか一項に記載の組み換え細胞。

【請求項 5 3】

請求項 4 2 ~ 5 2 のいずれか一項に記載の前記組み換え細胞を作るための方法であって、

a) タンパク質発現能を有する細胞を用意すること；

b) 前記用意された細胞内に (i n t o t h e p r o v i d e d c e l l)

、前記用意された細胞と請求項 3 8 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の組み換え核酸を接触させること

30

を含む方法。

【請求項 5 4】

前記細胞が、対象から得られた試料に対して行われた白血球除去によって得られ、前記細胞が生体外で接触する、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記組み換え核酸が、ウイルスカプシド又は脂質ナノ粒子に封入されている、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 6】

40

薬学的に許容される担体、並びに以下：

a) 請求項 3 8 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の前記組み換え核酸；及び

b) 請求項 4 2 ~ 5 2 のいずれか一項に記載の前記組み換え細胞

の 1 つ又は複数を含む医薬組成物。

【請求項 5 7】

請求項 3 8 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の組み換え核酸及び薬学的に許容される担体を含む、請求項 5 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 5 8】

前記組み換え核酸が、ウイルスカプシド又は脂質ナノ粒子に封入されている、請求項 5 6 に記載の医薬組成物。

50

【請求項 59】

細胞の活性を調節する、標的がん細胞を阻害する、又は治療を必要とする個体の健康状態を治療するためのシステムであって、以下：

- a) 請求項 1 ~ 37 のいずれか一項に記載のキメラ受容体；
- b) 請求項 38 ~ 41 のいずれか一項に記載の組み換え核酸；
- c) 請求項 42 ~ 52 のいずれか一項に記載の組み換え細胞；及び
- d) 請求項 56 ~ 58 のいずれか一項に記載の医薬組成物

の 1 つ又は複数を含むシステム。

【請求項 60】

細胞の活性を調節するための方法であって、

- a) 請求項 42 ~ 52 のいずれか一項に記載の組み換え細胞を用意すること；及び
- b) 前記組み換え細胞と、選択されたリガンドを接触させること；

を含み、前記選択されたリガンドの前記細胞外リガンド結合ドメインへの結合が、リガンド誘導性タンパク質分解切断部位の切断を誘導して前記転写調節因子を放出させ、前記放出された転写調節因子が前記組み換え細胞の活性を調節する方法。

【請求項 61】

前記接触が、生体内、生体外、又はインビトロで実施される、請求項 60 に記載の方法。

【請求項 62】

調節される前記細胞の前記活性が、選択された遺伝子の発現、増殖、アポトーシス、非アポトーシス死、分化、脱分化、遊走、分子の分泌、細胞接着、及び細胞溶解活性からなる群から選択される、請求項 1 ~ 61 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 63】

前記放出された転写調節因子が、前記細胞の遺伝子産物の発現を調節する、請求項 1 ~ 62 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 64】

前記放出された転写調節因子が、異種遺伝子産物の発現を調節する、請求項 1 ~ 63 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 65】

前記細胞の前記遺伝子産物が、ケモカイン、ケモカイン受容体、キメラ抗原受容体、サイトカイン、サイトカイン受容体、分化因子、成長因子、成長因子受容体、ホルモン、代謝酵素、病原体由来タンパク質、増殖誘導物質、受容体、RNA 誘導型ヌクレアーゼ、部位特異的ヌクレアーゼ、T細胞受容体、毒素、毒素由来タンパク質、転写調節因子、転写活性化因子、転写抑制因子、翻訳調節因子、翻訳活性化因子、翻訳抑制因子、活性化免疫受容体、抗体、アポトーシス阻害剤、アポトーシス誘導因子、改変T細胞受容体、免疫活性化因子、免疫阻害剤、及び抑制性免疫受容体からなる群から選択される、請求項 1 ~ 64 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 66】

前記放出された転写調節因子が前記細胞の分化を調節し、前記細胞が、免疫細胞、幹細胞、前駆 (p r o g e n i t o r) 細胞、又は前駆 (p r e c u r s o r) 細胞である、請求項 1 ~ 65 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 67】

個体における標的細胞の活性を阻害するための方法であって、前記個体に、有効数の請求項 42 ~ 52 のいずれか一項に記載の前記組み換え細胞を投与することを含み、前記組み換え細胞が、前記個体における前記標的細胞の活性を阻害する方法。

【請求項 68】

前記標的細胞が病原細胞である、請求項 67 に記載の方法。

【請求項 69】

前記病原細胞ががん細胞である、請求項 68 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 70】

前記標的細胞が、急性骨髄腫白血球細胞、未分化リンパ腫細胞、星細胞腫細胞、B細胞がん細胞、乳がん細胞、結腸がん細胞、上皮腫細胞、食道がん細胞、膠芽腫細胞、神経膠腫細胞、平滑筋肉腫細胞、脂肪肉腫細胞、肝がん細胞、肺がん細胞、マントル細胞リンパ腫細胞、メラノーマ細胞、神経芽腫細胞、非小細胞肺がん細胞、乏突起膠腫細胞、卵巣がん細胞、膵がん細胞、末梢T細胞リンパ腫細胞、腎がん細胞、肉腫細胞、胃がん細胞、がん腫細胞、中皮腫細胞、又は肉腫細胞である、請求項 63 ~ 69 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 71】

治療に必要な個体の健康状態を治療するための方法であって、前記個体に、有効数の請求項 42 ~ 52 のいずれか一項に記載の前記組み換え細胞を含む第1の療法を施すことを含み、前記組み換え細胞が前記個体における前記健康状態を治療する方法。

10

【請求項 72】

前記個体に第2の療法を施すことをさらに含む、請求項 71 に記載の方法。

【請求項 73】

前記第2の療法が、化学療法、放射線療法、免疫療法、ホルモン療法、及び毒素療法からなる群から選択される、請求項 72 に記載の方法。

【請求項 74】

前記第1の療法及び前記第2の療法が、同じ組成物又は別々の組成物と一緒に施される、請求項 71 ~ 73 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 75】

前記第1の療法及び前記第2の療法が、同時に施される、請求項 74 に記載の方法。

【請求項 76】

前記第1の療法及び前記第2の療法が順次施される、請求項 71 ~ 75 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 77】

前記第1の療法が、前記第2の療法の前に施される、請求項 76 に記載の方法。

【請求項 78】

前記第1の療法が、前記第2の療法の後に施される、請求項 76 に記載の方法。

【請求項 79】

前記第1の療法及び前記第2の療法が、交替に施される、請求項 76 に記載の方法。

30

【請求項 80】

健康状態の前記治療のための、以下：

- a) 請求項 1 ~ 37 のいずれか一項に記載のキメラ受容体；
- b) 請求項 38 ~ 41 のいずれか一項に記載の組み換え核酸；
- c) 請求項 42 ~ 52 のいずれか一項に記載の組み換え細胞；及び
- d) 請求項 56 ~ 58 のいずれか一項に記載の組成物

の1つ又は複数の使用。

【請求項 81】

健康状態の前記治療に向けた医薬品の製造のための、請求項 1 ~ 80 のいずれか一項に記載の本発明の使用。

40

【請求項 82】

前記健康状態ががんである、請求項 80 又は 81 に記載の使用。

【請求項 83】

前記がんが、固形腫瘍、軟部組織腫瘍、又は転移巣である、請求項 82 に記載の使用。

【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、2021年3月24日に提出された米国仮出願第 63 / 165 , 428 号の

50

利益を主張するものであり、該仮出願は、参照によりその全体がすべての目的のために本明細書に援用される。

【0002】

連邦政府による資金提供を受けた研究開発の記載

本発明は、国立衛生研究所から受けた助成金番号OD025751のもとで政府の支援を受けて行われた。政府は本発明に一定の権利を有する。

【0003】

本開示は全体として免疫学の分野に関し、詳細には、速い時間スケール (fast time-scale) の細胞内シグナル伝達と長い時間スケール (long time-scale) の転写調節を兼ね備えるように設計されたハイブリッドキメラ抗原受容体に関する。本開示はまた、そのような受容体、そのコードする核酸、その核酸を用いて遺伝子改変された宿主細胞を作製するのに有用な組成物及び方法、並びに細胞の活性を調節するための方法及び/又はがんなどの様々な健康状態若しくは疾患の治療のための方法を提供する。

10

【背景技術】

【0004】

Notch受容体は、細胞間の接触シグナル伝達を仲介する膜貫通タンパク質であり、発生や他の細胞間コミュニケーションにおいて中心的な役割を果たす。Notch受容体は、発生過程の様々な細胞機能に関与し、また必要とされており、種を超えて膨大な数の細胞型の機能に重要である。

20

【0005】

Notch受容体の既存の第1世代合成誘導体は、多くの場合「SynNotch」と呼ばれ、近年、野生型Notchでは複数のEGF様リピートを含む細胞外リガンド結合ドメインを抗体誘導体に置き換えることや、細胞質ドメインを、選ばれた転写活性化因子に置き換えることによって多数開発されているが、依然としてNotch NRR (L. Morsut et al., Cell (2016) 164:780-91) 及び標準的な2段階タンパク質分解に依存している。しかし、NRRは約160個のアミノ酸にわたり、このドメインだけでインスリンや上皮成長因子(EGF)などの一部の成熟タンパク質の約3倍の大きさになる。このため、受容体の発現効率が低く、広く使用されている一部のクローニングベクター及びトランスフェクションベクターの能力を超えることがある。

30

【0006】

さらに、これらの第1世代SynNotch受容体及び第2世代SynNotch受容体は、キメラ抗原受容体(CAR)とは対照的に、キナーゼカスケードを介した膜近位シグナル伝達を誘発しない。代わりに、受容体はリガンド結合を翻訳して、受容体につながっていた転写因子を放出し、それが核に運ばれて、ユーザー定義の(user-defined)転写回路を調節する。

【0007】

特に、これらの受容体は、代謝リプログラミング、増殖、成長因子産生、又は細胞毒性などの細胞プロセスを調節する速い時間スケールのシグナル伝達を開始する能力を欠いている。

40

【0008】

本開示は、とりわけ、カスタマイズされた転写調節と併せてT細胞の活性化の開始が可能な細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、CARの刺激ドメイン並びに共刺激ドメイン、例えば、4-1BB、CD28、及びCD3ゼータの細胞質側末端などからの共刺激ドメイン)を組み込んだ新しいクラスのハイブリッドSynNotch受容体を提供する。

【発明の概要】

【0009】

本明細書において提供されるのは、とりわけ、キメラ受容体であって、N末端からC末端に、a) 選択されたりガンドに対する結合親和性を有する細胞外リガンド結合ドメイン

50

； b) 連結ポリペプチド； c) 1つ又は複数のリガンド誘導性タンパク質分解切断部位を含む膜貫通ドメイン (T M D)；及び d) 細胞内ドメイン (I C D) を含むキメラ受容体である。いくつかの実施形態では、 I C D は、任意の順序で (i) シグナル伝達分子に由来する少なくとも1つの共刺激ドメイン及び活性化ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメイン (S D) 並びに (i i) 転写調節因子を含む。ある特定の実施形態では、選択されたリガンドの細胞外リガンド結合ドメインへの結合は、 I C D と連結ポリペプチドの間に配置されたリガンド誘導性タンパク質分解切断部位での切断を誘導する。他の実施形態では、選択されたリガンドの細胞外リガンド結合ドメインへの結合は、細胞内 S D を通して近位シグナル伝達カスケードを誘導する。いくつかの実施形態では、キメラ受容体は、 N o t c h 受容体の L I N - 1 2 - N o t c h リピート (L N R) 及び / 又はヘテロ二量体化ドメイン (H D) を含まない。

10

【 0 0 1 0 】

いくつかの実施形態では、細胞外ドメインは、細胞の表面のリガンドに結合できる抗原結合部分を含む。いくつかの実施形態では、細胞は病原細胞である。いくつかの実施形態では、細胞はヒト細胞である。いくつかの実施形態では、ヒト細胞は腫瘍細胞である。いくつかの実施形態では、ヒト細胞は最終分化細胞である。

【 0 0 1 1 】

いくつかの実施形態では、リガンドはタンパク質又は炭水化物を含む。ある特定の実施形態では、リガンドは、 C D 1、 C D 1 a、 C D 1 b、 C D 1 c、 C D 1 d、 C D 1 e、 C D 2、 C D 3 d、 C D 3 e、 C D 3 g、 C D 4、 C D 5、 C D 7、 C D 8 a、 C D 8 b、 C D 1 9、 C D 2 0、 C D 2 1、 C D 2 2、 C D 2 3、 C D 2 5、 C D 2 7、 C D 2 8、 C D 3 3、 C D 3 4、 C D 4 0、 C D 4 5、 C D 4 8、 C D 5 2、 C D 5 9、 C D 6 6、 C D 7 0、 C D 7 1、 C D 7 2、 C D 7 3、 C D 7 9 A、 C D 7 9 B、 C D 8 0 (B 7 . 1)、 C D 8 6 (B 7 . 2)、 C D 9 4、 C D 9 5、 C D 1 3 4、 C D 1 4 0 (P D G F R 4)、 C D 1 5 2、 C D 1 5 4、 C D 1 5 8、 C D 1 7 8、 C D 1 8 1 (C X C R 1)、 C D 1 8 2 (C X C R 2)、 C D 1 8 3 (C X C R 3)、 C D 2 1 0、 C D 2 4 6、 C D 2 5 2、 C D 2 5 3、 C D 2 6 1、 C D 2 6 2、 C D 2 7 3 (P D - L 2)、 C D 2 7 4 (P D - L 1)、 C D 2 7 6 (B 7 H 3)、 C D 2 7 9、 C D 2 9 5、 C D 3 3 9 (J A G 1)、 C D 3 4 0 (H E R 2)、 E G F R、 F G F R 2、 C E A、 A F P、 C A 1 2 5、 M U C - 1、 M A G E、アルカリホスファターゼ、胎盤様 2 (A L P P L 2)、 B 細胞成熟抗原 (B C M A)、緑色蛍光タンパク質 (G F P)、青色蛍光タンパク質 (B F P) 強化緑色蛍光タンパク質 (E G F P)、及びシグナル調節タンパク質 (S I R P) からなる群から選択される。

20

30

【 0 0 1 2 】

いくつかの実施形態では、リガンドは、細胞表面受容体、接着タンパク質、インテグリン、ムチン、レクチン、腫瘍関連抗原、及び腫瘍特異的抗原から選択される。いくつかの実施形態では、リガンドは、腫瘍関連抗原又は腫瘍特異的抗原である。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、受容体のリガンド結合部分を含む。いくつかの実施形態では、抗原結合部分は、抗体、ナノボディ、ダイアボディ、トリアボディ、ミニボディ、 F (a b ') 2 フラグメント、 F (a b) v フラグメント、一本鎖可変フラグメント (s c F v)、シングルドメイン抗体 (s d A b)、及びそれらの機能性断片からなる群から選択される。いくつかの好ましい実施形態では、抗原結合部分は s c F v を含む。

40

【 0 0 1 3 】

ある特定の実施形態では、抗原結合部分は、 C D 1 9、 B 7 H 3 (C D 2 7 6)、 B C M A (C D 2 6 9)、 A L P P L 2、 C D 1 2 3、 C D 1 7 1、 C D 1 7 9 a、 C D 2 0、 C D 2 1 3 A 2、 C D 2 2、 C D 2 4、 C D 2 4 6、 C D 2 7 2、 C D 3 0、 C D 3 3、 C D 3 8、 C D 4 4 v 6、 C D 4 6、 C D 7 1、 C D 9 7、 C E A、 C L D N 6、 C L E C L 1、 C S - 1、 E G F R、 E G F R v I I I、 E L F 2 M、 E p C A M、 E p h A 2、 エフリン B 2、 F A P、 F L T 3、 G D 2、 G D 3、 G M 3、 G P R C 5 D、 H E R

50

2 (ERBB2/neu)、IGLL1、IL-11R、KIT(CD117)、MUC1、NCAM、PAP、PDGFR、PRSS21、PSCA、PSMA、ROR1、SIRP、SSEA-4、TAG72、TEM1/CD248、TEM7R、TSHR、VEGFR2、ALPI、シトルリン化ビメンチン、cMet、及びAx1からなる群から選択される腫瘍関連抗原に特異的に結合する。いくつかの好ましい実施形態では、腫瘍関連抗原は、CD19、BCMA、CEA、HER2、MUC1、CD20、ALPPL2、SIRP、又はEGFRである。

【0014】

他の好ましい実施形態では、腫瘍関連抗原は、CD19、BCMA、HER2、又はALPPL2である。

10

【0015】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるキメラ受容体の連結ポリペプチドは、ヒンジドメインを含む。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、分子間ジスルフィド結合を介してキメラポリペプチドのオリゴマー形成を促進することができる。

【0016】

いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、CD8 ヒンジドメイン、CD28ヒンジドメイン、CD152ヒンジドメイン、PD-1ヒンジドメイン、CTLA4ヒンジドメイン、OX40ヒンジドメイン、IgG1ヒンジドメイン、IgG2ヒンジドメイン、IgG3ヒンジドメイン、及びIgG4ヒンジドメイン、又はそれらのいずれかの機能性バリエーションに由来する。ある特定の好ましい実施形態では、連結ポリペプチドは、CD8 ヒンジドメイン又はその機能性バリエーション、CD28ヒンジドメイン又はその機能性バリエーション、OX40ヒンジドメイン又はその機能性バリエーション、及びIgG4ヒンジドメイン又はその機能性バリエーションから選択される群に由来する。

20

【0017】

いくつかの実施形態では、連結ポリペプチドは、CD8 ヒンジドメイン又はその機能性バリエーションに由来する。他の実施形態では、連結ポリペプチドは、CD28ヒンジドメイン又はその機能性バリエーションに由来する。いくつかの特定の好ましい実施形態では、連結ポリペプチドは、配列番号3と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0018】

いくつかの実施形態では、1つ又は複数のリガンド誘導性タンパク質分解切断部位は、セクレターゼ切断部位を含む。いくつかの実施形態では、TMDは、配列番号4と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。ある特定の好ましい実施形態では、本開示のキメラ受容体は、TMDとICDの間に置かれたストップトランスファーシーケンス(stop-transfer-sequence)(STS)をさらに含む。いくつかの好ましい実施形態では、ストップトランスファーシーケンスは、配列番号5と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

30

【0019】

いくつかの実施形態では、シグナル伝達分子は、クラス1(class 1)又はクラス3ヒト膜タンパク質を含む。ある特定の好ましい実施形態では、シグナル伝達分子は、CD28、ICOS、CTLA4、PD1、PD1H、BTLA、B71、B7H1、CD226、CRTAM、TIGIT、CD96、TIM1、TIM2、TIM3、TIM4、CD2、SLAMF2、2B4、Ly108、CD84、Ly9、CRACC、BTN1、BTN2、BTN3、LAIR1、LAG3、CD160、4-1BB、OX40、CD27、GITR、CD30、TNFR1、TNFR2、HVEM、LT α R、DR3、DCR3、FAS、CD40、RANK、OPG、TRAILR1、TACI、BAFFR、BCMA、TWEAKR、EDAR、XEDAR、RELT、DR6、TROY、NGFR、CD22、シグレック-3、シグレック-5、シグレック-7、KLRG1、NKR-P1A、ILT2、KIR2DL1、KIR3DL1、CD94-NKG2A、CD300b、CD300e、TREM1、TREM2、ILT7、ILT3、ILT4、TLT-1、CD200R、CD300a、CD300f、DC-SIGN、B7-2、アラジン

40

50

(Allergin) - 1、LAT、BLNK、LAYN、SLP76、EMB-LMP1、HIV-NEF、HVS-TIP、HVS-ORF5、及びHVS-stpCからなる群から選択される。いくつかの好ましい実施形態では、シグナル伝達分子は、OX40、ICOS、4-1BB、CTLA4、CD28、CD30、CD2、CD27、及びCD226からなるリストから選択される。

【0020】

いくつかの実施形態では、活性化ドメインは、1つ又は複数の免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ(ITAM)を含む。いくつかの実施形態では、1つ又は複数のITAMは、CD3、CD3、CD3/、及びCD3に由来する。ある特定の実施形態では、1つ又は複数のITAMは、CD3 ITAMに対して、少なくとも約80、85、90、95、96、97、98、99、又は100%の配列同一性を有する。

10

【0021】

いくつかの実施形態では、転写調節因子は、転写活性化因子又は転写抑制因子を含む。いくつかの実施形態では、転写調節因子は、Gal4、tetR、ZFHD1、及びHAP1からなる群から選択されるタンパク質に由来する核局在化配列(NLS)をさらに含み、転写調節因子は、VP64、VP65、KRAB、及びVP16からなる群から選択されるタンパク質に由来するトランス活性化ドメインを含む。

【0022】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるキメラ受容体は、配列番号15~31及び34~45のいずれか1つと少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

20

【0023】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるキメラ受容体は、シグナル配列、検出可能な標識、腫瘍特異的切断部位、疾患特異的切断部位、又はそれらの組み合わせをさらに含む。

【0024】

他の態様では、本開示はまた、本明細書に記載のキメラ受容体をコードするヌクレオチド配列を含む組み換え核酸も含む。ある特定の実施形態では、ヌクレオチド配列は、発現カセット又は発現ベクターに組み込まれる。ある特定の実施形態では、発現ベクターはウイルスベクターである。ある特定の実施形態では、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、又はレトロウイルスベクターである。

30

【0025】

さらに、本開示は、本明細書に記載のキメラ受容体及び/又は組み換え核酸を含む組み換え細胞を含む。いくつかの実施形態では、組み換え細胞は真核細胞である。いくつかの実施形態では、真核細胞は哺乳類細胞である。いくつかの実施形態では、哺乳類細胞は、免疫細胞、神経細胞、上皮細胞、及び内皮細胞、又は幹細胞である。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、B細胞、単球、ナチュラルキラー細胞、好塩基球、好酸球、好中球、樹状細胞、マクロファージ、制御性T細胞、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、又は他のT細胞である。

40

【0026】

いくつかの実施形態では、本開示の組み換え細胞は、a)本明細書に記載の第1のキメラ受容体及び第2のキメラ受容体；並びに/又はb)本明細書に記載の第1の核酸及び第2の核酸を含む。いくつかの実施形態では、第1のキメラ受容体及び第2のキメラ受容体は、同じ配列を有しない。他の実施形態では、第1の核酸又は第2の核酸は、同じ配列を有しない。いくつかの実施形態では、第1のキメラ受容体は、第2のキメラ受容体の発現及び/又は活性を調節する。

【0027】

いくつかの実施形態では、本開示の組み換え細胞は、プロモーターに動作可能に連結されたタンパク質をコードする発現カセットをさらに含み、タンパク質の発現は転写調節因

50

子によって調節される。いくつかの実施形態では、タンパク質は細胞に対して異種である。いくつかの実施形態では、プロモーターは酵母 GAL4 プロモーターである。いくつかの実施形態では、タンパク質は、サイトカイン、細胞毒、ケモカイン、免疫調節因子、プロアポトーシス因子、抗アポトーシス因子、ホルモン、分化因子、脱分化因子、免疫細胞受容体（例えば、TCR 若しくは CAR）、又はレポーターである。

【0028】

本明細書でさらに提供されるのは、本明細書に記載の組み換え細胞を作るための方法であって、a) タンパク質発現能を有する細胞を用意すること；及び b) 用意された細胞内に (into the provided cell)、用意された細胞と本明細書に記載の組み換え核酸を接触させることを含む方法である。いくつかの実施形態では、細胞は、対象から得られた試料に対して行われた白血球除去によって得られ、細胞は生体外で接触する。いくつかの実施形態では、組み換え核酸は、ウイルスカプシド又は脂質ナノ粒子に封入される。

10

【0029】

本開示の別の態様は、薬学的に許容される担体、並びに以下：a) 本明細書に記載の組み換え核酸；及び b) 本明細書に記載の組み換え細胞の1つ又は複数を含む医薬組成物に関する。いくつかの実施形態では、組成物は、本明細書に記載の組み換え核酸及び薬学的に許容される担体を含む。ある特定の実施形態では、組み換え核酸は、ウイルスカプシド又は脂質ナノ粒子に封入される。

【0030】

本明細書でさらに提供されるのは、とりわけ、細胞の活性を調節する、標的がん細胞を阻害する、又は治療を必要とする個体の健康状態を治療するためのシステムである。いくつかの実施形態では、システムは、以下：a) 本明細書に記載のキメラ受容体；b) 本明細書に記載の組み換え核酸；c) 本明細書に記載の組み換え細胞；及び d) 本明細書に記載の医薬組成物の1つ又は複数を含む。

20

【0031】

他の態様では、本開示はまた、細胞の活性を調節するための方法であって、a) 本明細書に記載の組み換え細胞を用意すること；及び b) 組み換え細胞と、選択されたリガンドを接触させること（選択されたリガンドの細胞外リガンド結合ドメインへの結合が、リガンド誘導性タンパク質分解切断部位の切断を誘導し、転写調節因子を放出し、放出された転写調節因子は組み換え細胞の活性を調節する）を含む方法も提供した。

30

【0032】

いくつかの実施形態では、接触させることは、生体内、生体外、又はインビトロで実施される。

【0033】

いくつかの実施形態では、調節される細胞の活性は、選択された遺伝子の発現、増殖、アポトーシス、非アポトーシス死、分化、脱分化、遊走、分子の分泌、細胞接着、及び細胞溶解活性からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、放出された転写調節因子は、細胞の遺伝子産物の発現を調節する。

【0034】

いくつかの実施形態では、放出された転写調節因子は、異種遺伝子産物の発現を調節する。いくつかの実施形態では、細胞の遺伝子産物は、ケモカイン、ケモカイン受容体、キメラ抗原受容体、サイトカイン、サイトカイン受容体、分化因子、成長因子、成長因子受容体、ホルモン、代謝酵素、病原体由来タンパク質、増殖誘導物質、受容体、RNA 誘導型 (RNA guided)ヌクレアーゼ、部位特異的ヌクレアーゼ、T細胞受容体、毒素、毒素由来タンパク質、転写調節因子、転写活性化因子、転写抑制因子、翻訳調節因子、翻訳活性化因子、翻訳抑制因子、活性化免疫受容体 (an activating immunoreceptor)、抗体、アポトーシス阻害剤、アポトーシス誘導因子、改変T細胞受容体、免疫活性化因子、免疫阻害剤、及び抑制性免疫受容体 (an inhibiting immunoreceptor) からなる群から選択される。

40

50

【 0 0 3 5 】

いくつかの実施形態では、放出された転写調節因子は細胞の分化を調節し、細胞は、免疫細胞、幹細胞、前駆 (p r o g e n i t o r) 細胞、又は前駆 (p r e c u r s o r) 細胞である。

【 0 0 3 6 】

本明細書でさらに提供されるのは、とりわけ、個体における標的細胞の活性を阻害するための方法であって、個体に、有効数の本明細書に記載の組み換え細胞を投与することを含む方法である。いくつかの実施形態では、組み換え細胞は、個体における標的細胞の活性を阻害する。

【 0 0 3 7 】

いくつかの実施形態では、標的細胞は病原細胞である。いくつかの実施形態では、病原細胞はがん細胞である。いくつかの実施形態では、標的細胞は、急性骨髄腫白血球細胞、未分化リンパ腫細胞、星細胞腫細胞、B細胞がん細胞、乳がん細胞、結腸がん細胞、上衣腫細胞、食道がん細胞、膠芽腫細胞、神経膠腫細胞、平滑筋肉腫細胞、脂肪肉腫細胞、肝がん細胞、肺がん細胞、マンツル細胞リンパ腫細胞、メラノーマ細胞、神経芽腫細胞、非小細胞肺がん細胞、乏突起膠腫細胞、卵巣がん細胞、膝がん細胞、末梢T細胞リンパ腫細胞、腎がん細胞、肉腫細胞、胃がん細胞、がん腫細胞、中皮腫細胞、又は肉腫細胞である。

【 0 0 3 8 】

他の態様では、本開示は、治療に必要な個体の健康状態を治療するための方法であって、個体に、有効数の本明細書に記載の組み換え細胞を含む第1の療法を施すことを含み、組み換え細胞が個体の健康状態を治療する方法を提供する。

【 0 0 3 9 】

いくつかの実施形態では、治療に必要な個体の健康状態を治療するための方法は、個体に第2の療法を施すことをさらにさらに含む。

【 0 0 4 0 】

いくつかの実施形態では、第2の療法は、化学療法、放射線療法、免疫療法、ホルモン療法、及び毒素療法からなる群から選択される。

【 0 0 4 1 】

いくつかの実施形態では、第1の療法及び第2の療法は、同じ組成物又は別々の組成物と一緒に施される。いくつかの実施形態では、第1の療法及び第2の療法は、同時に施される。他の実施形態では、第1の療法及び第2の療法は順次施される。ある特定の実施形態では、第1の療法は、第2の療法の前に施される。他の実施形態では、第1の療法は、第2の療法の後に施される。さらに他の実施形態では、第1の療法及び第2の療法は交替に施される。

【 0 0 4 2 】

本開示はまた、健康状態の治療のための、以下：a) 本明細書に記載のキメラ受容体；b) 本明細書に記載の組み換え核酸；c) 本明細書に記載の組み換え細胞；及びd) 本明細書に記載の組成物の1つ又は複数の使用も提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、健康状態の治療用の医薬品 (m e d i c a m e n t) の製造のための前述のいずれかの使用に関する。いくつかの実施形態では、健康状態はがんである。ある特定の実施形態では、がんは、固形腫瘍、軟部組織腫瘍、又は転移巣である。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 4 3 】

【 図 1 A 】 図 1 A ~ 1 C は、本開示のいくつかの実施形態による例示的なハイブリッド S y n N o t c h C A R の設計及びハイブリッド S y n N o t c h C A R 回路の予測機能を示す。図 1 A は、すべての可能な細胞内ドメイン立体配置の図である。

【 図 1 B 】 図 1 B は、ハイブリッド S y n N o t c h C A R ドメインの詳細図である。

【 図 1 C 】 図 1 C は、ハイブリッド S y n N o t c h C A R によって誘導される、短期近位シグナル伝達及び長期転写シグナル伝達の仮説を示す。

10

20

30

40

50

【図2A】図2A～2Dは、様々な例示的なハイブリッドSynNotch CARの発現及び回路誘導を示すために行った実験の結果を概略的にまとめたものである。初代ヒトT細胞を抗CD3/抗CD28 ダイナビーズ（ギブコ）で活性化し、受容体又は転写レポーターコンストラクトのいずれかを発現する2つのレンチウイルスコンストラクトで形質導入した。41BB共刺激ドメイン（図2A）又はCD28共刺激ドメイン（図2C）をもつハイブリッドSynNotch CARを、最初のT細胞刺激の5日後に選別し、受容体とレポーターの二重陽性集団を精製した。回路誘導を評価するために、最初のT細胞刺激の14日後に、41BB共刺激ドメイン（図2B）又はCD28共刺激ドメイン（図2D）をもつ抗CD19受容体及びBFプレポーターを発現するT細胞を、K562細胞（青）、又はCD19+K562細胞（赤）と48時間共培養した。その後、誘導性BFプレポーター遺伝子の転写活性化を、Fortessa X-50（BD）を使用して測定した。

10

【図2B】図2A～2Dは、様々な例示的なハイブリッドSynNotch CARの発現及び回路誘導を示すために行った実験の結果を概略的にまとめたものである。初代ヒトT細胞を抗CD3/抗CD28 ダイナビーズ（ギブコ）で活性化し、受容体又は転写レポーターコンストラクトのいずれかを発現する2つのレンチウイルスコンストラクトで形質導入した。41BB共刺激ドメイン（図2A）又はCD28共刺激ドメイン（図2C）をもつハイブリッドSynNotch CARを、最初のT細胞刺激の5日後に選別し、受容体とレポーターの二重陽性集団を精製した。回路誘導を評価するために、最初のT細胞刺激の14日後に、41BB共刺激ドメイン（図2B）又はCD28共刺激ドメイン（図2D）をもつ抗CD19受容体及びBFプレポーターを発現するT細胞を、K562細胞（青）、又はCD19+K562細胞（赤）と48時間共培養した。その後、誘導性BFプレポーター遺伝子の転写活性化を、Fortessa X-50（BD）を使用して測定した。

20

【図2C】図2A～2Dは、様々な例示的なハイブリッドSynNotch CARの発現及び回路誘導を示すために行った実験の結果を概略的にまとめたものである。初代ヒトT細胞を抗CD3/抗CD28 ダイナビーズ（ギブコ）で活性化し、受容体又は転写レポーターコンストラクトのいずれかを発現する2つのレンチウイルスコンストラクトで形質導入した。41BB共刺激ドメイン（図2A）又はCD28共刺激ドメイン（図2C）をもつハイブリッドSynNotch CARを、最初のT細胞刺激の5日後に選別し、受容体とレポーターの二重陽性集団を精製した。回路誘導を評価するために、最初のT細胞刺激の14日後に、41BB共刺激ドメイン（図2B）又はCD28共刺激ドメイン（図2D）をもつ抗CD19受容体及びBFプレポーターを発現するT細胞を、K562細胞（青）、又はCD19+K562細胞（赤）と48時間共培養した。その後、誘導性BFプレポーター遺伝子の転写活性化を、Fortessa X-50（BD）を使用して測定した。

30

【図2D】図2A～2Dは、様々な例示的なハイブリッドSynNotch CARの発現及び回路誘導を示すために行った実験の結果を概略的にまとめたものである。初代ヒトT細胞を抗CD3/抗CD28 ダイナビーズ（ギブコ）で活性化し、受容体又は転写レポーターコンストラクトのいずれかを発現する2つのレンチウイルスコンストラクトで形質導入した。41BB共刺激ドメイン（図2A）又はCD28共刺激ドメイン（図2C）をもつハイブリッドSynNotch CARを、最初のT細胞刺激の5日後に選別し、受容体とレポーターの二重陽性集団を精製した。回路誘導を評価するために、最初のT細胞刺激の14日後に、41BB共刺激ドメイン（図2B）又はCD28共刺激ドメイン（図2D）をもつ抗CD19受容体及びBFプレポーターを発現するT細胞を、K562細胞（青）、又はCD19+K562細胞（赤）と48時間共培養した。その後、誘導性BFプレポーター遺伝子の転写活性化を、Fortessa X-50（BD）を使用して測定した。

40

【図3A】図3A～3Bは、ハイブリッドSynNotch CAR活性化マーカーの発現を示す。41BB共刺激ドメイン（図3A）又はCD28共刺激ドメイン（図3B）を

50

もつ抗CD19受容体及びBFプレポーターを発現するT細胞を図2のように作製した。形質導入した細胞を、K562細胞（灰色）又はCD19+K562細胞（青若しくは赤）と48時間共培養した。その後、活性化マーカーCD25、CD39、CD69及びPD-1の発現を、Fortessa X-50（BD）を使用して測定した。

【図3B】図3A～3Bは、ハイブリッドSynNotch CAR活性化マーカーの発現を示す。41BB共刺激ドメイン（図3A）又はCD28共刺激ドメイン（図3B）をもつ抗CD19受容体及びBFプレポーターを発現するT細胞を図2のように作製した。形質導入した細胞を、K562細胞（灰色）又はCD19+K562細胞（青若しくは赤）と48時間共培養した。その後、活性化マーカーCD25、CD39、CD69及びPD-1の発現を、Fortessa X-50（BD）を使用して測定した。

10

【図4】図4は、例示的なハイブリッドSynNotch CARの増殖を示すために行った実験の結果を概略的にまとめたものである。41BB共刺激ドメイン又はCD28共刺激ドメインをもつ抗CD19受容体及びBFプレポーターを発現するT細胞を図2のように作製した。形質導入した細胞をCell Trace Far Red（CTFR）で染色し、K562細胞（灰色）又はCD19+K562細胞（青若しくは赤）と5日間共培養した。その後、CTFR色素の希釈度を、Fortessa X-50（BD）を使用して測定した。

【図5A】図5A～5Bは、例示的なハイブリッドSynNotch CARのサイトカイン分泌を示すために行った実験の結果を概略的にまとめたものである。41BB共刺激ドメイン（図5A）又はCD28共刺激ドメイン（図5B）をもつ抗CD19受容体及びBFプレポーターを発現するT細胞を図2のように作製した。形質導入した細胞を、K562細胞（灰色）又はCD19+K562細胞（青若しくは赤）と共培養した。48時間後、プレフェルジンA、モネンシン、及びK562細胞（CD19+発現の有無は問わない）の2回目のボラスを共培養に加えた。共培養をさらに6時間インキュベートし、次いで形質導入細胞をFortessa X50（BD）を使用して、サイトカイングランザイムB、IFN γ 、IL-2及びTNF α の細胞内発現を評価した。なお、ICD CD28-CD3-Gal4VP64をもつハイブリッドSynNotch CARのデータは収集されていないことに留意されたい。

20

【図5B】図5A～5Bは、例示的なハイブリッドSynNotch CARのサイトカイン分泌を示すために行った実験の結果を概略的にまとめたものである。41BB共刺激ドメイン（図5A）又はCD28共刺激ドメイン（図5B）をもつ抗CD19受容体及びBFプレポーターを発現するT細胞を図2のように作製した。形質導入した細胞を、K562細胞（灰色）又はCD19+K562細胞（青若しくは赤）と共培養した。48時間後、プレフェルジンA、モネンシン、及びK562細胞（CD19+発現の有無は問わない）の2回目のボラスを共培養に加えた。共培養をさらに6時間インキュベートし、次いで形質導入細胞をFortessa X50（BD）を使用して、サイトカイングランザイムB、IFN γ 、IL-2及びTNF α の細胞内発現を評価した。なお、ICD CD28-CD3-Gal4VP64をもつハイブリッドSynNotch CARのデータは収集されていないことに留意されたい。

30

【図6A】図6A～6Bは、例示的なハイブリッドSynNotch CARによる標的殺傷を示すために行った実験の結果を概略的にまとめたものである。41BB共刺激ドメイン（図6A）又はCD28共刺激ドメイン（図6B）をもつ抗CD19受容体及びBFプレポーターを発現するT細胞を図2のように作製した。CD19リガンド及び核染色mKate2を発現するA549細胞を、96ウェル平底プレートに24時間附着させ、次いで形質導入T細胞を1：1の比で加えた。プレートをIncucyteでインキュベートし、プレートの画像及び蛍光を2時間ごとに5日間撮影した。イメージングソフトウェアを使用して、各時点における培養中のA549 CD19+mKate2+細胞の数を算出した。各実験群について、A549細胞カウントをヒンジNotch実験群のものに対して正規化した。

40

【図6B】図6A～6Bは、例示的なハイブリッドSynNotch CARによる標的

50

殺傷を示すために行った実験の結果を概略的にまとめたものである。41BB共刺激ドメイン(図6A)又はCD28共刺激ドメイン(図6B)をもつ抗CD19受容体及びBFPレポーターを発現するT細胞を図2のように作製した。CD19リガンド及び核染色mkate2を発現するA549細胞を、96ウェル平底プレートに24時間附着させ、次いで形質導入T細胞を1:1の比で加えた。プレートをIncucyteでインキュベートし、プレートの画像及び蛍光を2時間ごとに5日間撮影した。イメージングソフトウェアを使用して、各時点における培養中のA549 CD19+mkate2+細胞の数を算出した。各実験群について、A549細胞カウントをヒンジNotch実験群のものに対して正規化した。

【図7】図7A~7Cは、ハイブリッドSynNotch CARの生体内での有効性を示す。図7Aは、実験のタイムラインの説明である。NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rgtm1Wjl/SzJ(NSG)マウスに、 0.5×10^6 個のNALM6-Luc-GFP腫瘍細胞を静脈内投与した。図2のように、バルクCD3+T細胞を、ICD CD3-Gal4VP64-CD28をもつ抗CD19ハイブリッドSynNotch CAR及びBFPレポーターで形質導入した。腫瘍注射の4日後に、 0.5×10^6 個の形質導入CD3+T細胞を動物に眼窩後方注射で投与した。図7Bは、IVIS Spectrumを使用してルシフェラーゼ分泌腫瘍細胞の生物発光イメージングを介して測定した腫瘍量を示す。図7Cは生存曲線を示す。

【図8A】図8A~8Dは、最小化された(minimized)4-1BBバリエーションがNF-kBシグナル伝達を向上させ、ノイズを減らすことを示す。図8Aは、41BBバリエーションの説明であり、「noSTS」及び「trunc」41BB共刺激ドメインを作るために削除したアミノ酸を示す。

【図8B】図8Bは、図2に記載のように、T細胞を、41BBバリエーションをもつ抗CD19ハイブリッドSynNotch CAR及びBFPレポーターを発現するように同時形質導入(co-transduced)したことを示す。

【図8C】図8Cは、回路誘導が図2に記載のように評価されたことを示す。

【図8D】図8Dは、NFkBの共通プロモーター下でmCherryレポーターを発現するように形質導入されたJurkat細胞株を示す。次いで、このNFkBレポーター細胞株を抗CD19ハイブリッドSynNotch CARで形質導入し、CD19を発現するK562細胞と共培養した。共培養の24、48、72時間後に、フローサイトメトリーによって、NFkB活性の代用としてmCherry発現を評価した。

【図9A】図9A~9Dは、最小化された41BBバリエーションのさらなる反復を示す。図9Aは、41BBバリエーションの説明であり、「min」41BB共刺激ドメインを作るために削除したアミノ酸、及び「trunc41BBtrunc41BB」共刺激ドメインを作るために削除したアミノ酸領域を示す。

【図9B】図9Bは、図2に記載のように、T細胞を、41BBバリエーションをもつ抗CD19ハイブリッドSynNotch CAR及びBFPレポーターを発現するように同時形質導入したことを示す。

【図9C】図9Cは、回路誘導が図2に記載のように評価されたことを示す。

【図9D】図9Dは、Jurkat細胞株が、NFkBの共通プロモーター下でmCherryレポーターを発現するように形質導入されたことを示す。次いで、このNFkBレポーター細胞株を抗CD19ハイブリッドSynNotch CARで形質導入し、CD19を発現するK562細胞と共培養した。共培養の24、48、72時間後に、フローサイトメトリーによって、NFkB活性の代用としてmCherry発現を評価した。

【図10A】図10A~10Bは、Trunc41BBハイブリッドSynNotch CARの生体内での有効性を示す。図10Aは、実験のタイムラインの説明である。NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rgtm1Wjl/SzJ(NSG)マウスに、 4×10^6 個のCD19リガンド発現M28腫瘍細胞を皮下投与した。バルクCD3+T細胞を、10Bに示されているICDをもつ抗CD19ハイブリッドSynNotch CAR及びBFPレポーターで、図2に記載のように同時形質導入した。腫瘍注射の7日後に

、 6×10^6 個の形質導入 CD3 + T細胞を動物に眼窩後方注射で投与した。

【図10B】図10Bは、ノギスでの測定によって週1回評価した腫瘍体積を示す。

【図11A】図11A~11Cは、最小化されたCD28バリエントがノイズを減らすことを示す。図11Aは、CD28バリエントの説明であり、「no STS」及び「trunc」CD28共刺激ドメインを作るために削除したアミノ酸を示す。

【図11B】図11Bは、図2に記載のように、CD28バリエントをもつ抗CD19ハイブリッドSynNotch CAR及びBFPreporterを発現するように同時形質導入したT細胞を示す。

【図11C】図11Cは、図2に記載のように評価した回路誘導を示す。

【図12A】図12A~12Cは、最小化されたCD28バリエントのさらなる反復を示す。図12Aは、CD28バリエントの説明であり、「CD28 TPRRP」、「trunc CD28 TPRRP」及び「完全 (fully) trunc CD28」共刺激ドメインを作るために削除したアミノ酸を示す。

【図12B】図12Bは、図2に記載のように、CD28バリエントをもつ抗CD19ハイブリッドSynNotch CAR及びBFPreporterを発現するように同時形質導入したT細胞を示す。

【図12C】図12Cは、図2に記載のように評価した回路誘導を示す。

【図13A】図13A~13Cは「第3世代」バリエントを示す。図13Aは、trunc 41BB共刺激ドメインのC末端に付加されたCD28シグナル伝達モチーフの1つを含む「第3世代」バリエントの説明である。

【図13B】図13Bは、図2に記載のように、第3世代バリエントをもつ抗CD19ハイブリッドSynNotch CAR及びBFPreporterを発現するように同時形質導入したT細胞を示す。

【図13C】図13Cは、図2に記載のように評価した回路誘導を示す。

【図14A】図14A~14Bは、Trunc 41BBハイブリッドSynNotch CARの生体内での有効性を示す。図14Aは、実験のタイムラインの説明である。NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) マウスに、 4×10^6 個のCD19リガンド発現M28腫瘍細胞を皮下投与した。バルクCD3 + T細胞に、14Bに示されているICDをもつ抗CD19ハイブリッドSynNotch CAR及びBFPreporterを、図2に記載のように同時形質導入した。腫瘍注射の7日後に、 3×10^6 個の形質導入CD3 + T細胞を動物に眼窩後方注射で投与した。

【図14B】図14Bは、ノギスでの測定によって週1回評価した腫瘍体積を示す。

【図15A】図15A~15Bは、BCMA及びALPPL2標的ハイブリッドSynNotch CARの発現及び回路誘導を示す。41BB共刺激ドメインをもつ抗BCMA及び抗ALPPL2受容体並びにBFPreporterを発現するT細胞を図2に記載のように作製した(図15A)。形質導入細胞を、K562細胞(青)、又は抗原陽性(BCMA若しくはALPPL2のいずれか)K562細胞(赤)と48時間共培養した(図15B)。

【図15B】図15A~15Bは、BCMA及びALPPL2標的ハイブリッドSynNotch CARの発現及び回路誘導を示す。41BB共刺激ドメインをもつ抗BCMA及び抗ALPPL2受容体並びにBFPreporterを発現するT細胞を図2に記載のように作製した(図15A)。形質導入細胞を、K562細胞(青)、又は抗原陽性(BCMA若しくはALPPL2のいずれか)K562細胞(赤)と48時間共培養した(図15B)。

【図16】図16は、ALPPL2標的ハイブリッドSynNotch CARの生体内での有効性を示す。NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) マウスに、 4×10^6 個のM28腫瘍細胞を図14に記載のように皮下投与した。バルクCD3 + T細胞を、図に示されているICDをもつ抗ALPPL2 CAR又は抗ALPPL2ハイブリッドSynNotch CAR及びBFPreporterで、図2に記載のように同時形質導入した。腫瘍注射の7日後に、 3×10^6 個の形質導入CD3 +

T細胞を動物に眼窩後方注射で投与した。ノギスでの測定によって腫瘍体積を週1回評価した。

【発明を実施するための形態】

【0044】

本開示は全体として、速い時間スケールの細胞内シグナル伝達及び長い時間スケールの転写制御を兼ね備えるように設計された、新しいクラスのキメラ受容体に関する。特に、本開示のいくつかの実施形態は、(i) CARの共刺激ドメイン及び刺激ドメイン、例えばCD3ゼータ鎖の細胞質側末端(cytoplasmic tail)、並びに転写調節因子を組み込んだ例示的なキメラ受容体(本明細書では「ハイブリッドSynNotch CAR」と呼ぶ)を提供する。これらの新しい受容体の細胞質側末端の構造(共刺激ドメイン、CD3ゼータ、転写因子)は、様々な形で構成されうる。下でさらに詳しく記載されるように、本開示はまた、初代ヒトT細胞などの標的細胞型において、近位T細胞受容体共刺激シグナル及び遺伝子制御を確実に誘導するハイブリッド受容体構造を明らかにする。本明細書で提供される新しいハイブリッドSynNotch CARは、(i) 速い時間スケール(例えば、数秒から数分)の近位シグナル伝達、及び(ii)通常は細胞の状態の変化を観察するのに十分なレベルまで誘導するのに数時間かかる、長い時間スケールの転写調節を同時に刺激することができる。

10

【0045】

本開示において下でより詳細に示されるように、ハイブリッドSynNotch CARの(例えば、4-1BB又はCD28共刺激ドメインをもつ)特定の細胞内立体配置は、誘導性転写レポーターエレメントの抗原非依存的誘導を示すが、他の立体配置はそれを示さない。さらに、本開示は、細胞内ドメインの立体配置が、リガンドの存在下及び非存在下の両方において受容体の挙動に影響を及ぼすことを示す。くわえて、本開示は、標的抗原と結合すると、ハイブリッドSynNotch CARが、その細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、4-1BB又はCD28、及びCD3ゼータ)を通じたシグナル伝達を機能的に誘導し、活性化マーカーの発現につながることを例示している。いくつかの好ましい実施形態では、本開示は、標的抗原と結合すると、本明細書で提供されるハイブリッドSynNotch CARが、その細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、4-1BB又はCD28、及びCD3ゼータ)を通して短期間のシグナル伝達カスケードを機能的に誘導し、T細胞の増殖につながることを示す。くわえて、本開示は、本開示のハイブリッドSynNotch CARの共刺激ドメイン及び活性化ドメイン(例えば、CD3ゼータ)によって誘導されるシグナル伝達は、CARに対して(to the CARs)、種類又は機序、強さ、強度、又は時間の長さが異なることを示す。一方、本開示は、本明細書に開示のハイブリッドSynNotch CAR T細胞が、CAR T細胞と同様の速度で標的細胞を殺傷できることを示す。したがって、本開示は、ハイブリッドSynNotch CARが、より長い期間(複数日など)にわたって標的細胞の殺傷を引き起こすのに十分なT細胞活性化及び細胞傷害性プログラムを誘導することを提供する。さらに、本開示は、ハイブリッドSynNotch CAR T細胞が生体内で腫瘍量を制御及び除去するのに有効であることを示す。

20

30

【0046】

本開示はさらに、とりわけ、共刺激ドメイン(例えば、4-1BB共刺激ドメイン)の改変により、抗原非依存性活性をもつ本明細書に記載のハイブリッドSynNotch CARを最適化することができ、その結果、抗原依存性転写回路誘導とT細胞シグナル伝達の両方が可能な、より良い設計が得られることを提供する。

40

【0047】

本開示の様々な特徴は、単一の実施形態の文脈で記載することができるが、それらの特徴は、別個に、又は任意の好適な組み合わせで提供することもできる。逆に、本開示は明確化のために別個の実施形態の文脈で本明細書に記載することができるが、本開示は単一の実施形態で実行することもできる。本明細書に引用されている公開された特許出願及びその他の公開された参考文献、文書、原稿、及び科学文献は、いかなる目的のためにもそ

50

の内容を参照により本明細書に援用される。さらに、材料、方法、及び例は例示に過ぎず、限定することを意図していない。

【0048】

以下の詳細な説明では、その一部を構成する添付図面を参照する。図面では、文脈からそうでないことが示されていない限り、類似の記号は一般に類似の構成要素を特定する。詳細な説明、図面、及び請求項に記載の例示的な代替物は、限定することを意図していない。本明細書に提示されている主題の趣旨又は範囲を逸脱せずに、他の代替物を使用することができ、他の変更を行うこともできる。本明細書に全体として記載され、図に示されている態様は、多種多様な異なる立体配置で配置、置換、組み合わせ、及び設計でき、そのすべてが明示的に企図され、この出願の一部となることは容易に理解されるであろう。

10

【0049】

定義

単数形の「a」、「an」、及び「the」は、文脈上明らかにそうでない限り、複数形の言及を含む。例えば、「1つの細胞 (a cell)」という用語は、その混合物を含む1つ又は複数の細胞を含む。本明細書において「A及び/又はB」は、以下の選択肢のすべてを含むように使用される: 「A」、「B」、「A又はB」、並びに「A及びB」。

【0050】

本明細書で使用される場合、「投与」及び「投与する」という用語は、静脈内、動脈内、脳内、髄腔内、筋肉内、腹腔内、皮下、筋肉内、及びそれらの組み合わせを含むがそれらに限定されない投与経路による組成物又は製剤の送達を意味する。この用語には、医療専門家 (medical professional) による投与及び自己投与が含まれるが、それらに限定されない。

20

【0051】

「異種」という用語は、隣接配列にネイティブでないポリペプチド配列又はドメインを意味し、例えば、異種配列は自然界において、一方又は両方の末端に存在するポリペプチド配列に結びついて見出されない。

【0052】

タンパク質又はポリペプチドに関して本明細書で使用される「に由来する」という用語は、起源又は供給源を意味し、供給源又は元のタンパク質又はポリペプチドから得られる、それに基づいて得られる、天然に存在し、組み換えられた、未精製の又は精製されたポリペプチドを含みうる。したがって、元のタンパク質又はポリペプチドに由来するタンパク質又はポリペプチドは、元のタンパク質又はポリペプチドを一部又は全体として含んでもよく、元のタンパク質又はポリペプチドの断片又はバリエーションであってもよい。ある例では、供給源又は起源に由来するポリペプチド配列又はドメインは、遺伝学的又は化学的に改変することができる。

30

【0053】

「宿主細胞」及び「組み換え細胞」という用語は、本明細書において交換可能に用いられる。そのような用語は、「細胞」、「細胞培養物」、「細胞株」と同様に、特定の対象細胞又は細胞株だけでなく、移し替えられた (transfers) 回数に関係なく、そのような細胞又は細胞株の子孫又は潜在的な子孫をも指すと理解される。すべての子孫が親細胞と完全に同一であるわけではないことが理解されるべきである。これは、変異 (例えば、故意若しくは偶発性の変異) 又は環境の影響のいずれかに起因して、後代に特定の改変が起こる可能性があるからであり、そのような子孫は、実際には親細胞と同一でない可能性があるが、子孫が元の細胞又は細胞株と同じ機能性を保持する限り、本明細書において使用される用語の範囲内に包含される。

40

【0054】

本明細書で使用される「動作可能に連結された」という用語は、2つ以上の要素、例えばポリペプチド配列又はポリヌクレオチド配列が意図された様式で動作することを可能にする、それらの間の物理的又は機能的な連結を意味する。

【0055】

50

本明細書において2つ以上の核酸又はタンパク質の文脈で使用される「パーセント同一性」という用語は、以下に記載のデフォルトパラメータを用いてBLAST若しくはBLAST2.0配列比較アルゴリズムを使用して、又は手作業によるアラインメント及び目視による検証によって測定して、同一であるか、又は特定の割合の同一なヌクレオチド若しくはアミノ酸（例えば、比較ウィンドウ又は指定された領域にわたって最大限に対応するように比較し、整列させた場合とき、特定の領域にわたって約60%の配列同一性、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれより高い同一デフォルトパラメータの2つ以上の配列又はサブシーケンスを意味する。例えば、NCBIのウェブサイト `ncbi.nlm.nih.gov/BLAST` を参照されたい。そのような配列は「実質的に同一」と言われる。この定義はまた、この定義は、試験配列の相補体を指すこともあり、それに適用されることもある。この定義には、欠失及び/又は追加を有する配列並びに、置換を有する配列も含まれる。配列同一性は、長さが少なくとも約20個のアミノ酸若しくはヌクレオチドの領域にわたって、又は長さが10~100アミノ酸若しくはヌクレオチドの領域にわたって、又は所与の配列の全長にわたって計算することができる。配列同一性は、GCSプログラムパッケージ(Devereux et al, *Nucleic Acids Res.* 12:387, 1984)、BLASTP、BLASTN、FASTA(Atschul et al., *J Mol Biol* 215:403, 1990)など、公表された技術及び広く利用可能なコンピュータプログラムを用いて計算することができる。配列同一性は、ウィスコンシン大学バイオテクノロジーセンター(1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705)のGenetics Computer GroupのSequence Analysis Software Packageなどの配列解析ソフトウェアを使用して、そのデフォルトパラメータを用いて測定することができる。

10

20

30

40

50

【0056】

本明細書で使用される場合、別段の指定がない限り、薬剤の「治療上有効な量」は、疾患（例えばがん）などの健康状態の治療又は管理において治療効果(therapeutic benefit)をもたらすのに十分な量、又はがんに関連する1つ若しくは複数の症状を遅延させる、若しくは最小限に抑えるのに十分な量である。治療有効量の化合物とは、単独で又は他の治療薬(therapeutic agent)と組み合わせて、がんの治療又は管理において治療効果をもたらす治療薬の量を意味する。「治療有効量」という用語は、治療全体をより良くする量、がんの症状若しくは原因を軽減若しくは回避する量、又は別の治療薬の治療有効性を増強する量を包含することができる。「有効量」の例としては、疾患の症状又は複数の症状の治療、予防、又は軽減に寄与するのに十分な量があり、これは「治療有効量」とも呼ばれうる。症状の「軽減」とは、症状(複数可)の重篤度若しくは頻度が減少すること、又は症状(複数可)が消失することを意味する。「治療上有効な量」を含む組成物の正確な量は、治療の目的に依存することになり、当業者であれば公知の技術を用いて確認可能である(例えば、Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 2010); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (2016); Pickar, *Dosage Calculations* (2012); 及び Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 22nd Edition, 2012, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkinsを参照)。

【0057】

本明細書で使用される場合、「対象」又は「個体」は、ヒト(例えばヒト個体)及びヒト以外の動物などの動物を包含する。いくつかの実施形態では、「対象」又は「個体」は、医師の管理下にある個体である。したがって、対象は、対象の疾患(例えばがん)及び/又はその疾患の1つ又は複数の症状を有する、有する危険性がある、又は有する疑いが

あるヒト個人又は個体であることができる。対象は、診断時又はそれ以降に、対象の病態のリスクをもつと診断された個体であることもできる。「非ヒト動物」という用語は、すべての脊椎動物、例えば哺乳動物、例えばげっ歯類、例えばマウス、及び非哺乳動物、例えば非ヒト霊長類、例えばヒツジ、イヌ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類、及び同種のものを含む。

【0058】

値の範囲が提供されている場合には、文脈上明らかにそうでないと指示されない限り、その範囲の上限と下限の間に、下限の単位の10分の1までのそれぞれの介在する値、及びその記載された範囲内の他の記載された値又は介在する値が、本開示内に包含されることが理解される。これらのより小さな範囲の上限と下限は、独立してより小さな範囲に含まれることがあり、また、記載の範囲内で特に除外された限界を条件として、開示の範囲内に包含される。記載の範囲が限界の一方又は両方を含む場合、それらの含まれている限界の一方又は両方を除く範囲も開示に包含される。

10

【0059】

本明細書に開示のすべての範囲はまた、あらゆる可能なサブ範囲及びそのサブ範囲の組み合わせを包含する。列挙されたいずれの範囲も、同じ範囲を少なくとも半分、3分の1、4分の1、5分の1、10分の1などに分割することを十分に説明し、可能にするものとして認識することができる。非限定的な例として、本明細書で議論される各範囲は、下位3分の1、中位3分の1、上位3分の1及び同種のものに容易に分けることができる。また、当業者であれば理解するであろうように、「最大で」、「少なくとも」、「より大きい」、「より小さい」及び同種のもの言語はすべて、言及された数を含み、上で論じたように、その後サブ範囲に分割できる範囲を意味する。そして、当業者であれば理解するであろうように、範囲は個々のメンバーを含む。したがって、例えば1~3個の物品を有するグループとは、1個、2個、又は3個の物品を有するグループを意味する。同様に、1~5個の物品を有するグループとは、1個、2個、3個、4個、又は5個の物品を有するグループを意味するなどである。

20

【0060】

別々の実施形態の文脈で記載されている本開示の特定の特徴が、明確にするために単一の実施形態において組み合わせ提供されることもあることが理解される。逆に、単一の実施形態の文脈で記載されている開示の様々な特徴が、簡潔にするために別個に又は任意の好適なサブコンビネーションで提供することもできる。本開示に関する実施形態のすべての組み合わせは、本開示によって具体的に包含され、それぞれの組み合わせが個別に且つ明示的に開示された場合と同様に、本明細書に開示される。くわえて、様々な実施形態とその要素のすべてのサブコンビネーションもまた、本開示によって具体的に包含され、そのようなすべてのサブコンビネーションがそれぞれ個別に明示的にここに開示された場合と同様に、本明細書に開示される。

30

【0061】

当業者であれば、本明細書に開示のキメラ受容体が、様々な特性、低い~高いリガンド誘導性形質導入及び(独立して)低~中程度の非誘導性シグナル伝達を有するシグナルをもたらすことを理解するであろう。この範囲の活性は、改変細胞の作用を増強及び調整するために利用できる新しい特徴である。さらに、以下でより詳しく記載されるように、本明細書に開示の多くの受容体バリエーションは、既存の Syn Notch 受容体と比較してより良い発現を示す。

40

【0062】

Notch 受容体

Notch 受容体は、通常、隣接する細胞に発現している表面結合リガンドに結合するとシグナルを伝達する大きな膜貫通タンパク質である。Notch シグナルは細胞間コミュニケーションに依存しており、例えば2つの接触する細胞間のコミュニケーションでは、一方の接触細胞は「レシーバー(receiver)」細胞であり、もう一方の接触細胞は「セNDER(sender)」細胞である。レシーバー細胞で発現する Notch 受

50

容体は、セクター細胞で発現するリガンド (delta/serrate/lag (DSL) タンパク質ファミリー) を認識する。これらの接触細胞上の Notch と delta の結合は、Notch 受容体の 2 段階のタンパク質分解につながり、最終的に受容体の細胞内部分 (「ICD」) を膜から細胞質へと放出させる。Notch にはマトリックスメタロプロテアーゼ切断部位 (「S2」と表記される) があり、受容体が活性化されないとき、Notch の負の調節領域 (「NRR」) によって切断から保護される。NRR は、3 つの LIN-12-Notch リピート (「LNR」) モジュール及びヘテロ二量体化ドメイン (「HD」) からなる。このタンパク質分解は送出 (sending) 細胞が発揮する力によって調節されていると考えられており、DSL リガンドが Notch 受容体を引き寄せ、NRR の立体構造を変化させ、メタロプロテアーゼ部位を露出させる。これは、構成的に活性なプロテアーゼ (ADAM10 など) によって切断され、受容体の細胞外結合部分と負の調節領域を放出する。受容体のリガンド結合部分が放出されると、今度は別の切断部位 (「S3」と表記される) が露出し、これが細胞膜内の セクレターゼによって切断される。この切断によって細胞膜から核ホーミング ICD が解放される。W. R. Gordon et al., Dev Cell (2015) 33:729-36。この放出されたドメインは転写を調節することによってレシーバー細胞の挙動を変化させる。脊椎動物と無脊椎動物の進化的分岐は、Notch 系統で少なくとも 2 回の遺伝子重複を伴っていた: ハエは 1 つの Notch 遺伝子を持ち、線虫は 2 つ (GLP-1 及び LIN-12)、哺乳動物は 4 つ (NOTCH1~4)。Notch シグナルの伝達は 3 つの重要なイベントに依存している: (i) リガンド認識; (ii) リガンド依存性切断部位の立体構造露出; 及び (iii) 核転写活性化複合体の構築。

【0063】

古典的な Notch シグナルは、調節された膜内タンパク質分解と呼ばれるプロセスによって伝達される。Notch 受容体は通常、細胞表面上でタンパク質分解に抵抗性の静止した立体構造で維持されているが、リガンド結合によりタンパク質分解カスケードが開始され、受容体の細胞内ドメイン (ICD) が膜から放出される。重要な調節された切断ステップは ADAM メタロプロテアーゼによって生じ、細胞膜のすぐ外側の S2 と呼ばれる部位で起こる。NEXT (Notch 細胞外トランケーション (Notch extracellular truncation) の略) と呼ばれるこの短縮化された受容体は、多タンパク質酵素複合体である セクレターゼによって S3 部位でプロセッシングされるまで、膜につながれたままである。

【0064】

セクレターゼ切断後、ICD は最終的に核に入り、そこで DNA 結合転写因子及び Mastermind ファミリーの転写コアクチベーターを含有する転写活性化複合体の集合体の核になる。次いで、この複合体は、p300 などの 1 つ又は複数のさらなるコアクチベータータンパク質と結合して、基本転写機構を動員し、下流の標的遺伝子の発現を活性化する。

【0065】

Notch 受容体はモジュラードメイン構造 (organization) を有する。Notch 受容体の外部ドメインは、リガンド結合を担う一連の N 末端上皮成長因子 (EGF) 様リピートからなる。O-フコース、Fringe、Rumi グリコシルトランスフェラーゼによる修飾を含むこれらの EGF リピートの O-結合型グリコシル化は、ハエ及び哺乳動物で異なるリガンドサブタイプに応答する Notch 受容体の活性も調節する。

【0066】

EGF リピートの後ろには、Notch 受容体に特有の 3 つの LIN-12/Notch リピート (LNR) モジュールが続く、受容体の時期尚早な (premature) 活性化を防ぐのに関与していることが広く報告されている。Notch1 のヘテロ二量体化 (HD) ドメインは、フォーリン切断によって分割され、その結果その N 末端部分が細胞外サブユニットの末端となり、C 末端の半分が膜貫通サブユニットの始まりとなる。細胞外

領域に続いて、受容体は膜貫通セグメント及び、転写調節因子を含む細胞内ドメイン（ICD）を有する。

【0067】

本開示の組成物

本開示は、とりわけ、速い時間スケールの細胞内シグナル伝達及び長い時間スケールの転写調節を組み合わせるように設計された新しいクラスのキメラ受容体を提供する。特に、本開示のいくつかの実施形態は、カスタマイズされた転写調節と併せてT細胞の活性化の開始が可能なシグナル伝達ドメイン（例えば、共刺激、CD3ゼータなど）を組み込んだ新しいハイブリッドSynNotch受容体構造を提供する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される新しい受容体は、SynNotch受容体の細胞質側末端に付加されたT細胞におけるシグナル伝達を仲介する直鎖アミノ酸シグナル伝達モチーフを有する。実施例及び図で示されているように、これらの新しい受容体は、速い時間スケール（例えば、数秒から1分）の近位シグナル伝達も、細胞状態の変化を観察するのに十分なレベルに誘導するのに数時間かかる長い時間スケールの転写調節も刺激することができる。

10

【0068】

1つの態様では、本開示は、N末端からC末端に：a) 選択されたリガンドに対する結合親和性を有する細胞外リガンド結合ドメイン；b) 連結ポリペプチド；c) 1つ又は複数のリガンド誘導性タンパク質分解切断部位を含む膜貫通ドメイン；並びにd) 任意の順序で、(i) (1) シグナル伝達分子に由来する少なくとも1つの共刺激ドメイン及び(2) 活性化ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメイン（SD）、及び(ii) 転写調節因子を含む細胞内ドメインを含むキメラ受容体を提供する。いくつかの実施形態では、選択されたリガンドの細胞外リガンド結合ドメインへの結合は、細胞内ドメインと連結ポリペプチドの間に配置されたリガンド誘導性タンパク質分解切断部位での切断を誘導する。さらに、選択されたリガンドの細胞外リガンド結合ドメインへの結合はまた、細胞内SDを通して近位シグナル伝達カスケードも誘導することができる。いくつかの実施形態では、近位シグナル伝達カスケードは、速い時間スケールのシグナル伝達を意味する。例えば、シグナル伝達カスケードは数秒から数分で誘導することができる。あるいは、シグナル伝達カスケードは数秒から数分間続くこともできる。いくつかの実施形態では、そのような近位シグナル伝達カスケードはT細胞受容体共刺激シグナルを通して誘導される。さらに、本明細書で提供されるキメラ受容体は、Notch受容体のLIN-12-Notchリピート（LNR）及び/又はヘテロ二量体化ドメイン（HD）を含まない。いくつかの実施形態では、連結ポリペプチドは、分子間ジスルフィド結合を介してキメラ受容体のオリゴマー形成を促進することができる。

20

30

【0069】

細胞外ドメイン（ECD）及びリガンド

いくつかの実施形態では、本明細書に開示のキメラ受容体（例えば、ハイブリッドSynNotch CAR）のECDは、1つ又は複数の標的リガンドに対する結合親和性を有する。標的リガンドは細胞表面で発現させる、又はそれ以外の場合には、キメラ受容体に機械的な力を作用できるように固定、固定化、若しくは拘束（restrained）することができる。細胞は、病原細胞又はヒト細胞であることができる。いくつかの実施形態では、ヒト細胞は腫瘍細胞であることができる。いくつかの実施形態では、ヒト細胞は最終分化細胞であることができる。したがって、いずれの特定の理論にも束縛されるものではないが、本明細書で提供されるキメラ受容体のECDが細胞表面リガンドに結合しても、必ずしも標的細胞表面から標的リガンドが除去されるとは限らず、その代わりにキメラ受容体に機械的な引っ張り力（pulling force）が生じる。通常は可溶性のリガンドであっても、それが表面又は細胞外マトリックス中の分子に結合していれば、標的とすることができる。いくつかの実施形態では、標的リガンドは細胞表面リガンドである。好適なリガンドの種類の新規な例としては、細胞表面受容体；接着タンパク質；表面に結合している炭水化物、脂質、糖脂質、リポタンパク質、リポ多糖；インテグリン；ムチン；及びレクチンが挙げられる。いくつかの実施形態では、リガンドはタンパ

40

50

ク質である。いくつかの実施形態では、リガンドは炭水化物である。

【0070】

いくつかの実施形態では、リガンドは分化抗原群(CD)マーカーである。いくつかの実施形態では、CDマーカーは、CD1、CD1a、CD1b、CD1c、CD1d、CD1e、CD2、CD3d、CD3e、CD3g、CD4、CD5、CD7、CD8a、CD8b、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD27、CD28、CD33、CD34、CD40、CD45、CD48、CD52、CD59、CD66、CD70、CD71、CD72、CD73、CD79A、CD79B、CD80(B7.1)、CD86(B7.2)、CD94、CD95、CD134、CD140(PDGFR4)、CD152、CD154、CD158、CD178、CD181(CXCR1)、CD182(CXCR2)、CD183(CXCR3)、CD210、CD246、CD252、CD253、CD261、CD262、CD273(PD-L2)、CD274(PD-L1)、CD276(B7H3)、CD279、CD295、CD339(JAG1)、CD340(HER2)、EGFR、FGFR2、CEA、AFP、CA125、MUC-1、及びMAGEからなる群から選択される。

10

【0071】

いくつかの実施形態では、細胞外ドメインは受容体のリガンド結合部分を含む。いくつかの実施形態では、細胞外ドメインは、1つ又は複数の標的抗原に結合する抗原結合部分を含む。いくつかの実施形態では、抗原結合部分は、抗体又はその機能的抗原結合断片の1つ又は複数の抗原結合決定基(determinant)を含む。当業者であれば、本開示を読むと、「その機能性断片」又は「その機能性バリエーション」という用語が、断片又はバリエーションが由来する野生型分子と共通する定量的及び/又は定性的な生物活性を有する分子を意味することを容易に理解するであろう。例えば、抗体の機能性断片又は機能性バリエーションは、その機能性断片又は機能性バリエーションが由来する抗体と本質的に同じエピトープに結合する同一の能力を保持するものである。例えば、細胞表面受容体のエピトープに結合できる抗体は、N末端及び/又はC末端を短くし、当業者に公知のアッセイを使用してエピトープ結合活性の保持を評価することができる。いくつかの実施形態では、抗原結合部分は、抗体、ナノボディ、ダイアボディ、トリアボディ、又はミニボディ、F(ab')₂フラグメント、F(ab)フラグメント、一本鎖可変フラグメント(scFv)、及びシングルドメイン抗体(sdAb)、及び(or)それらの機能性断片からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、抗原結合部分はscFvを含む。

20

30

【0072】

抗原結合部分は、天然に存在するアミノ酸配列を含むことができる、又は所望の、且つ/若しくは向上した特性、例えば、結合親和性などをもたらすように操作、設計、若しくは改変することができる。一般に、抗原結合部分、例えば、抗体の標的抗原(例えば、CD19抗原)に対する結合親和性は、Frankel et al., Mol. Immunol, 16:101-06, 1979に記載のスキッチャード法で算出することができる。いくつかの実施形態では、結合親和性は抗原/抗体解離速度によって測定される。いくつかの実施形態では、結合親和性は競合ラジオイムノアッセイによって測定される。いくつかの実施形態では、結合親和性はELISAによって測定される。いくつかの実施形態では、抗体親和性はフローサイトメトリーによって測定される。抗原(CD19など)と「選択的に結合する」抗体は、その抗原と高い親和性、例えば、100nM以下、例えば60nM以下、例えば、30nM以下、例えば、15nM以下、又は10nM以下、又は5nM以下、又は1nM以下、又は500pM以下、又は400pM以下、又は300pM以下、又は200pM以下、又は100pM以下の平衡定数(KD)で結合するが、他の抗原とは有意に結合しない抗原結合部分である。

40

【0073】

当業者は、本開示のキメラ受容体又はハイブリッドSynNotch CARを発現するように遺伝子改変された細胞の所望の局在又は機能に基づいて、ECDを選択することができる。例えば、HER2抗原に特異的な抗体を含むECDをもつキメラ受容体又は八

50

イブリッドSynNotch CARは、細胞をHER2発現乳がん細胞に向けることができる。いくつかの実施形態では、本開示のイブリッドSynNotch CARのECDは、腫瘍関連抗原(TAA)又は腫瘍特異的抗原(TSA)に結合することができる。当業者であれば、TAAとしては、腫瘍細胞及び、腫瘍細胞よりもはるかに低濃度で正常細胞又は多くの正常細胞に存在する、例えばタンパク質などの分子が挙げられることを理解するであろう。対照的に、TSAとしては、一般に、例えば、腫瘍細胞には存在するが正常細胞には存在しないタンパク質などの分子が挙げられる。

【0074】

場合によっては、抗原結合部分は、腫瘍細胞によって発現される抗原、すなわち腫瘍関連抗原に存在するエピトープに特異的である。腫瘍関連抗原は、例えば、乳がん細胞、B細胞リンパ腫、膵臓がん、ホジキンリンパ腫細胞、卵巣がん細胞、前立腺がん細胞、中皮腫、肺がん細胞、非ホジキンB細胞リンパ腫(B-NHL)細胞、卵巣がん細胞、前立腺がん細胞、中皮腫細胞、メラノーマ細胞、慢性リンパ性白血病細胞、急性リンパ性白血病細胞、骨髄性白血病細胞、神経芽腫細胞、神経膠腫、膠芽腫、大腸(colorectal)がん細胞などに関連する抗原でありうる。また、腫瘍関連抗原は非がん性細胞によっても発現されうることも理解されるであろう。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、組織特異的抗原に存在するエピトープに特異的である。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、疾患関連抗原に存在するエピトープに特異的である。

10

【0075】

好適な標的抗原の非限定的な例としては、CD19、B7H3(CD276)、BCMA(CD269)、アルカリホスファターゼ、胎盤様2(ALPPL2)、緑色蛍光タンパク質(GFP)、強化緑色蛍光タンパク質(EGFP)、シグナル調節タンパク質(SIRP)、CD123、CD171、CD179、CD20、CD213A2、CD22、CD24、CD246、CD272、CD30、CD33、CD38、CD44v6、CD46、CD71、CD97、CEA、CLDN6、CLECL1、CS-1、EGFR、EGFRvIII、ELF2M、EpCAM、EphA2、エフリンB2、FAP、FLT3、GD2、GD3、GM3、GPC5D、HER2(ERBB2/neu)、IGLL1、IL-11R、KIT(CD117)、MUC1、NCAM、PAP、PDGFR、PRSS21、PSCA、PSMA、ROR1、SSEA-4、TAG72、TEM1/CD248、TEM7R、TSHR、VEGFR2、ALPI、シトルリン化ビメンチン、cMet、及びAx1が挙げられる。

20

30

【0076】

いくつかの実施形態では、標的抗原は、CD19、B7H3(CD276)、BCMA(CD269)、ALPPL2、CD123、CD171、CD179、CD20、CD213A2、CD22、CD24、CD246、CD272、CD30、CD33、CD38、CD44v6、CD46、CD71、CD97、CEA、CLDN6、CLECL1、CS-1、EGFR、EGFRvIII、ELF2M、EpCAM、EphA2、エフリンB2、FAP、FLT3、GD2、GD3、GM3、GPC5D、HER2(ERBB2/neu)、IGLL1、IL-11Ra、KIT(CD117)、MUC1、NCAM、PAP、PDGFR、PRSS21、PSCA、PSMA、ROR1、SSEA-4、TAG72、TEM1/CD248、TEM7R、TSHR、VEGFR2、ALPI、シトルリン化ビメンチン、cMet、Ax1、GPC2、ヒト上皮成長因子受容体2(HER2/neu)、CD276(B7H3)、IL-13R1、IL-13R2、 α -フェトプロテイン(AFP)、がん胎児性抗原(CEA)、がん抗原-125(CA-125)、CA19-9、カルレチニン、MUC-1、上皮膜タンパク質(EMA)、上皮腫瘍抗原(ETA)、チロシナーゼ、メラノーマ関連抗原(MAGE)、CD34、CD45、CD123、CD93、CD99、CD117、クロモグラニン、サイトケラチン、デスミン、グリア線維性酸性タンパク質(GFAP)、グロス嚢胞性疾患液タンパク質(gross cystic disease fluid protein)(GCDFP-15)、ALK、DLK1、FAP、NY-ESO、WT1、H

40

50

MB - 45 抗原、タンパク質 melan - A (Tリンパ球に認識されるメラノーマ抗原 ; MART - 1)、myo - D1、筋特異的アクチン (MSA)、ニューロフィラメント、神経細胞特異的エノラーゼ (NSE)、胎盤アルカリホスファターゼ、シナプトフィジン、サイログロブリン、甲状腺転写因子 - 1、AOC3 (VAP - 1)、CAM - 3001、CCL11 (エオタキシン - 1)、CD125、CD147 (ベイシジン)、CD154 (CD40L)、CD2、CD20、CD23 (IgE受容体)、CD25 (ヘテロ二量体IL - 2受容体のサブユニット)、CD3、CD4、CD5、IFN - 、IFN - 、IgE、IgE Fc領域、IL - 1、IL - 12、IL - 23、IL - 13、IL - 17、IL - 17A、IL - 22、IL - 4、IL - 5、IL - 5、IL - 6、IL - 6受容体、インテグリン 4、インテグリン 4 7、LFA - 1 (CD11)、ミオスタチン、OX - 40、スクレロスチン、SOST、TGF 1、TNF - 、VEGF - A、ピルビン酸キナーゼアイソザイムM2型 (腫瘍M2 - PK)、CD20、CD5、CD7、CD3、TRBC1、TRBC2、BCMA、CD38、CD123、CD93、CD34、CD1 、SLAMF7 / CS1、FLT3、CD33、CD123、TALLA - 1、CSPG4、DLL3、カップ軽鎖、ラムダ軽鎖、CD16 / Fc RII I、CD64、FITC、CD22、CD27、CD30、CD70、GD2 (ガングリオシドG2)、GD3、EGFRvIII (上皮成長因子パリアントIII)、EGFR及びそのイソパリアント (isovariants)、TEM - 8、精子タンパク質 (sperm protein) 17 (Sp17)、メソテリンから選択される。

10

【0077】

20

好適な抗原のさらなる非限定的な例としては、PAP (前立腺性酸性ホスファターゼ)、前立腺幹細胞抗原 (PSCA)、プロステイン、NKGD2、TARP (T細胞受容体ガンマ代替リーディングフレーム (gamma alternate reading frame) タンパク質)、Trp - p8、STEAP1 (前立腺の6回膜貫通上皮抗原1)、異常rasタンパク質、異常p53タンパク質、インテグリン 3 (CD61)、ガラクトシン、K - Ras (V - Ki - ras2キルステインラット肉腫ウイルスがん遺伝子)、Ral - B、GPC2、CD276 (B7H3)、又はIL - 13R が挙げられる。いくつかの実施形態では、抗原はHer2である。いくつかの実施形態では、抗原はALPPL2である。いくつかの実施形態では、抗原はBCMAである。いくつかの実施形態では、ECDの抗原結合部分は、BFPや、GFP、eGFPなどのレポータータンパク質に特異的である。そのような抗原結合部分の非限定的な例としては、LaG17抗GFPナノボディが挙げられる。いくつかの実施形態では、ECDの抗原結合部分は、抗BCMA完全ヒト化VHドメイン (FHVH) を含む。いくつかの実施形態では、抗原はシグナル調節タンパク質 (SIRP) である。

30

【0078】

本明細書に開示のキメラ受容体によるターゲティングに適したさらなる抗原としては、GPC2、ヒト上皮成長因子受容体2 (Her2 / neu)、CD276 (B7H3)、IL - 13R 1、IL - 13R 2、 - フェトプロテイン (AFP)、がん胎児性抗原 (CEA)、がん抗原 - 125 (CA - 125)、CA19 - 9、カルレチニン、MUC - 1、上皮膜タンパク質 (EMA)、上皮腫瘍抗原 (ETA) が挙げられるが、これらに限定されない。他の好適な標的抗原としては、チロシナーゼ、メラノーマ関連抗原 (MAGE)、CD34、CD45、CD123、CD93、CD99、CD117、クロモグラニン、サイトケラチン、デスミン、グリア線維性酸性タンパク質 (GFAP)、グロス嚢胞性疾患液タンパク質 (GCDFP - 15)、ALK、DLK1、FAP、NY - ESO、WT1、HMB - 45 抗原、タンパク質 melan - A (Tリンパ球に認識されるメラノーマ抗原 ; MART - 1)、myo - D1、筋特異的アクチン (MSA)、ニューロフィラメント、神経細胞特異的エノラーゼ (NSE)、胎盤アルカリホスファターゼ、シナプトフィジン、サイログロブリン、甲状腺転写因子 - 1が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0079】

50

本明細書に開示のキメラ受容体によるターゲティングに適した追加の抗原としては、AOC3 (VAP-1)、CAM-3001、CCL11 (エオタキシン-1)、CD125、CD147 (ペイシジン)、CD154 (CD40L)、CD2、CD20、CD23 (IgE受容体)、CD25 (ヘテロマーのIL-2受容体のサブユニット)、CD3、CD4、CD5、IFN-、IFN-、IgE、IgE Fc領域、IL-1、IL-12、IL-23、IL-13、IL-17、IL-17A、IL-22、IL-4、IL-5、IL-5、IL-6、IL-6受容体、インテグリン 4、インテグリン 4 7、LFA-1 (CD11)、ミオスタチン、OX-40、スクレロスチン、SOST、TGF 1、TNF-、及びVEGF-Aなどの炎症性疾患に関連するものが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0080】

本明細書に開示のキメラ受容体及びハイブリッドSynNotch CARによるターゲティングに適したさらなる抗原としては、ピルビン酸キナーゼアイソザイムM2型 (腫瘍M2-PK)、CD20、CD5、CD7、CD3、TRBC1、TRBC2、BCMA、CD38、CD123、CD93、CD34、CD1、SLAMF7/CS1、FLT3、CD33、CD123、TALLA-1、CSPG4、DLL3、カップ軽鎖、ラムダ軽鎖、CD16/FcRIII、CD64、FITC、CD22、CD27、CD30、CD70、GD2 (ガングリオシドG2)、GD3、EGFRvIII (上皮成長因子バリエーションIII)、EGFR及びそのイソバリエーション、TEM-8、精子タンパク質17 (Sp17)、メソテリンが挙げられるが、これらに限定されない。好適な抗原のさらなる非限定的な例としては、PAP (前立腺性酸性ホスファターゼ)、前立腺幹細胞抗原 (PSCA)、プロステイン、NKGD2、TARP (T細胞受容体ガンマ代替リーディングフレームタンパク質)、Trp-p8、STEAP1 (前立腺の6回膜貫通上皮抗原1)、異常rasタンパク質、異常p53タンパク質、インテグリン 3 (CD61)、ガラクチン、K-Ras (V-Ki-ras2キルスティンラット肉腫ウイルスがん遺伝子)、及びRal-Bが挙げられる。いくつかの実施形態では、抗原は、GPC2、CD19、Her2/neu、CD276 (B7H3)、IL-13R 1、又はIL-13R 2である。いくつかの実施形態では、抗原はHer2である。いくつかの実施形態では、抗原はALPPL2である。いくつかの実施形態では、抗原はBCMAである。いくつかの実施形態では、ECDの抗原結合部分は、GFPやeGFPなどのレポータータンパク質に特異的である。そのような抗原結合部分の非限定的な例としては、LAG17抗GFPナノボディが挙げられる。いくつかの実施形態では、ECDの抗原結合部分は、抗BCMA完全ヒト化VHドメイン (FHVH) を含む。

20

30

【0081】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示のキメラ受容体及びハイブリッドSynNotch CARによるターゲティングに適した抗原には、病原体由来のリガンドが含まれる。例えば、抗原は、HER2陽性乳がん細胞によって産生されるHER2であることができる。いくつかの実施形態では、抗原はB細胞白血病に発現しているCD19であることができる。いくつかの実施形態では、抗原は、多形膠芽腫 (GBM) に発現しているが、健康なCNS組織にはあまり発現していないEGFRであることができる。いくつかの実施形態では、抗原は、成人のがん、例えば結腸がんに関連するCEAであることができる。

40

【0082】

いくつかの実施形態では、ECDの抗原結合部分は細胞表面標的に特異的であり、細胞表面標的の非限定的な例としては、CD19、CD30、Her2、CD22、ENPP3、EGFR、CD20、CD52、CD11、及び -インテグリンが挙げられる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示のキメラ受容体及びハイブリッドSynNotch CARは、CD19、CEA、HER2、MUC1、CD20、ALPPL2、BCMA、又はEGFRに結合する抗原結合部分を有する細胞外ドメインを含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるキメラ受容体 (例えば、ハイブリッドSynNo

50

tch CAR)は、CD19に結合する抗原結合部分を含む細胞外ドメインを含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるキメラ受容体(例えば、ハイブリッドSynNotch CAR)は、ALPPL2に結合する抗原結合部分を含む細胞外ドメインを含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるキメラ受容体(例えば、ハイブリッドSynNotch CAR)は、BCMAに結合する抗原結合部分を含む細胞外ドメインを含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるキメラ受容体(例えば、ハイブリッドSynNotch CAR)は、Her2に結合する抗原結合部分を含む細胞外ドメインを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示のキメラ受容体及びハイブリッドSynNotch CARは、CD19、ALPPL2、BCMA、又はHer2に結合する抗原結合部分を含む細胞外ドメインを含む。

10

【0083】

いくつかの実施形態では、細胞外ドメインは、配列番号1、2、46、及び47に記載の配列と、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、細胞外ドメインは、配列番号1、2、46、及び47に記載の配列と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、細胞外ドメインは、配列番号1、2、46、及び47に記載の配列と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、細胞外ドメインは、配列番号1、2、46、及び47に記載の配列と100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、細胞外ドメインは、配列番号1、2、46、及び47に記載のアミノ酸配列を含み、配列番号1、2、46、及び47のいずれか1つのアミノ酸残基の1つ、2つ、3つ、4つ、又は5つは、異なるアミノ酸残基で置換される。

20

【0084】

連結ポリペプチド

上記のように、本開示のキメラ受容体は、細胞外結合ドメイン(ECD)と膜貫通ドメイン(TMD)の間に配置された連結ポリペプチド配列を含む。既存の「SynNotch」受容体は、異種細胞外リガンド結合ドメイン、NRRを含むNotch受容体JMDと実質的な(substantial)配列同一性を有する連結ポリペプチド、TMD、及びICDを含む。対照的に、キメラ受容体及びハイブリッドSynNotch CARは、異種細胞外リガンド結合ドメイン、Notch受容体JMDと実質的な配列同一性を有するが、NRR(LIN-12-Notchリピート(LNR)モジュール、及びヘテロ二量体化ドメイン)を欠く連結ポリペプチド、TMD、及びICDを含む。別の言い方をすれば、ハイブリッドSynNotch CARにおいて、連結ポリペプチドは、ネイティブNotchの負の調節領域(NRR)及びヘテロ二量体化(HD)ドメインを置換する。ポリペプチドリンカーとして、3~50個のアミノ酸残基(例えば、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個などのアミノ酸残基)を使用することができる。いくつかの実施形態では、リンカーポリペプチド配列の長さ及びアミノ酸組成は、本開示のキメラ受容体の所望の活性を達成するために、ECD及びTMDの互いに対する配向及び/又は近接性を変化させるように最適化することができる。これらの配列はすべて、本開示のキメラ受容体の連結ポリペプチドとして使用することができる。

30

40

【0085】

いくつかの実施形態では、本開示によって包含される連結ポリペプチドは、分子間ジスルフィド結合を介してキメラ受容体のオリゴマー形成を促進できるポリペプチド、例えば、ヒンジリンカーを含むことができる。いくつかの実施形態では、本開示のヒンジリンカーは、分子間ジスルフィド結合を介してキメラ受容体のオリゴマー形成を促進する1つ又は複数のポリペプチドモチーフを含有するオリゴマー化ドメイン(例えば、ヒンジドメイン)を含む。これらの例では、本明細書に開示のキメラ受容体内で、ヒンジドメインは一般に、ECDとTMDの間に配置された柔軟なポリペプチドコネクタ領域を含む。した

50

がって、ヒンジドメインはECDとTMDの間に柔軟性を与え、さらに、2つ以上のキメラ受容体モノマー間の分子間ジスルフィド結合のための部位をもたらしてオリゴマー複合体を形成する。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、本明細書に開示のキメラ受容体の二量体形成を促進するモチーフを含む。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、本明細書に開示のキメラ受容体の三量体形成を促進するモチーフ（例えば、OX40に由来するヒンジドメイン）を含む。本開示の組成物及び方法に適したヒンジポリペプチド配列は、天然に存在するヒンジポリペプチド配列（例えば、天然に存在する免疫グロブリン由来のもの）であることができる、又は所望の、且つ/若しくはより良い特性、例えば、転写を調節する特性をもたらすように操作、設計、若しくは改変することができる。好適なヒンジポリペプチド配列としては、IgA、IgD、及びIgG1ヒンジドメイン、IgG2ヒンジドメイン、IgG3ヒンジドメイン、IgG4ヒンジドメインなどのIgGサブクラス、又はそれらの機能性バリエーションに由来するものが挙げられるが、それらに限定されない。いくつかの実施形態では、ヒンジポリペプチド配列は、1つ又は複数のCXXCモチーフを含有する。いくつかの実施形態では、ヒンジポリペプチド配列は、1つ又は複数のCPPCモチーフを含有する。この点に関する追加の情報は、例えば、G. Vidarsson et al. による最近の総説、Frontiers Immunol (2014) 5:520 (doi: 10.3389/fimmu.2014.00520)に見出すことができ、その総説は参照によりその全体が本明細書に援用される。

10

20

30

40

50

【0086】

ヒンジポリペプチド配列はまた、CD8 ヒンジドメイン、CD28ヒンジドメイン、CD152ヒンジドメイン、PD-1ヒンジドメイン、CTLA4ヒンジドメイン、OX40ヒンジドメイン、及びそれらの機能性バリエーションに由来することもできる。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、CD8aヒンジドメイン又はその機能性バリエーションに由来するヒンジポリペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、CD28ヒンジドメイン又はその機能性バリエーションに由来するヒンジポリペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、OX40ヒンジドメイン又はその機能性バリエーションに由来するヒンジポリペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、IgG4ヒンジドメイン又はその機能性バリエーションに由来するヒンジポリペプチド配列を含む。

【0087】

ヒンジリンカーは、選択されたヒンジドメインに由来する、又は選択されたヒンジドメインと重複する約5～約60個のアミノ酸、例えば少なくとも約5個、少なくとも約6個、少なくとも約7個、少なくとも約8個、少なくとも約9個、少なくとも約10個、少なくとも約12個、少なくとも約15個、少なくとも約17個、少なくとも約20個、少なくとも約22個、少なくとも約24個、少なくとも約26個、少なくとも約28個、少なくとも約30個、少なくとも約35個、少なくとも約40個、少なくとも約45個、少なくとも約50個、少なくとも約55個、又は、少なくとも約60個のアミノ酸を含むことができる。本発明の実施形態では、ヒンジリンカーは、わずか(nomorethan)約60個のアミノ酸、約55個未満、約50個未満、約45個未満、約40個未満、約35個未満、約32個未満、約30個未満、約29個未満、約28個未満、約27個未満、約26個未満、約25個未満、約24個未満、約23個未満、約22個未満、約21個未満、約20個未満、約18個未満、約16個未満、約14個未満、約12個未満、又は約10個未満のアミノ酸を有する。

【0088】

いくつかの実施形態では、連結ポリペプチド配列は、配列番号3に記載の配列と、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は99%の配列同一性など、少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、連結ポリペプチド配列は、配列番号3に記載の配列と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を

含む。いくつかの実施形態では、連結ポリペプチド配列は、配列番号3に記載の配列と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、連結ポリペプチド配列は、配列番号3に記載の配列と少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、連結ポリペプチド配列は、配列番号3に記載の配列と同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、連結ポリペプチド配列は配列番号3に記載のアミノ酸配列を含み、配列番号3のいずれか1つのアミノ酸残基の1つ、2つ、3つ、4つ、又は5つは、異なるアミノ酸残基で置換される。

【0089】

膜貫通ドメイン (TMD)

上記のように、本開示のキメラ受容体は、1つ又は複数のリガンド誘導性タンパク質分解切断部位を含むTMDを含む。

10

【0090】

Notch受容体(例えば、S2又はS3)のタンパク質分解性切断部位の例は、上記の通りである。本明細書に開示の組成物及び方法に適したさらなるタンパク質分解的切断部位としては、コラゲナーゼ-1、-2、及び-3(MMP-1、-8、及び-13)、ゼラチナーゼA及びB(MMP-2及び-9)、ストロメライシン1、2、及び3(MMP-3、-10、及び-11)、マトリライシン(MMP-7)、並びに膜メタロプロテイナーゼs(MT1-MMP及びMT2-MMP)から選択されたMMPのメタロプロテイナーゼ切断部位が挙げられるが、それらに限定されない。例えば、MMP-9の切断配列は、Pro-X-X-Hy(ここで、Xは任意の残基;HyはLeu、Ile、Val、Phe、Trp、Tyr、Val、Met、Proなどの疎水性残基を表す)、例えば、Pro-X-X-Hy-(Ser/Thr)、例えば、Pro-Leu/Gln-Gly-Met-Thr-Ser又はPro-Leu/Gln-Gly-Met-Thrである。好適なプロテアーゼ切断部位の別の例は、プラスミノゲン活性化因子切断部位、例えば、ウロキナーゼプラスミノゲン活性化因子(uPA)又は組織プラスミノゲン活性化因子(tPA)切断部位である。好適なプロテアーゼ切断部位の別の例は、プロラクチン切断部位である。uPA及びtPAの切断配列の具体例としては、Val-Gly-Argを含む配列が挙げられる。タンパク質分解的に切断可能なリンカーに含めることができるプロテアーゼ切断部位の別の例は、タバコエッチウイルス(TEV)プロテアーゼ切断部位、例えば、Glu-Asn-Leu-Tyr-Thr-Gln-Serであり、プロテアーゼはグルタミンとセリンの間を切断する。タンパク質分解的に切断可能なリンカーに含めることができるプロテアーゼ切断部位の別の例は、エンテロキナーゼ切断部位、例えば、Asp-Asp-Asp-Asp-Lysであり、切断はリジン残基の後ろで起こる。タンパク質分解的に切断可能なリンカーに含めることができるプロテアーゼ切断部位の別の例は、トロンピン切断部位、例えば、Leu-Val-Pro-Argである。プロテアーゼ切断部位を含むさらなる好適なリンカーは、以下のプロテアーゼによって切断可能な配列を含む: Prescission(商標)プロテアーゼ(ヒトライノウイルス3Cプロテアーゼとグルタチオン-S-トランスフェラーゼを含む融合タンパク質)、トロンピン、カテプシンB、エプスタイン-バーウイルスプロテアーゼ、MMP-3(ストロメライシン)、MMP-7(マトリライシン)、MMP-9;サーモリシン様MMP、マトリックスメタロプロテイナーゼ2(MMP-2)、カテプシンL;カテプシンD、マトリックスメタロプロテイナーゼ1(MMP-1)、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子、膜1型(membrane type 1)マトリックスメタロプロテイナーゼ(MT-MMP)、ストロメライシン3(又はMMP-11)、サーモリシン、線維芽細胞コラゲナーゼ及びストロメライシン-1、マトリックスメタロプロテイナーゼ13(コラゲナーゼ-3)、組織型プラスミノゲン活性化因子(tPA)、ヒト前立腺特異抗原、カリクレイン(hK3)、好中球エラスターゼ、及びカルパイン(カルシウム活性化中性プロテアーゼ)。受容体が発現している宿主細胞にネイティブでないプロテアーゼ(例えば、TEV)は、さらなる調節機構として使用でき、そこにおいて受容体の活性化は、プロテアーゼが発現されるまで、又はその他の方法で供給されるまで減少する。さらに

20

30

40

50

、プロテアーゼは、腫瘍関連又は疾患関連（正常組織よりも有意に高い程度に発現）で、独立した調節機構として機能することもある。例えば、マトリックスメタロプロテアーゼのなかには、ある特定のがん種で高発現するものがある。

【0091】

一般に、本明細書に開示のキメラ受容体に適したTMDは、少なくとも1つの -セクレターゼ切断部位を含むI型膜貫通受容体の任意の膜貫通ドメインでありうる。 -セクレターゼ複合体の構造及び機能並びにアミロイド前駆体タンパク質（APP）及びNotchを含む基質タンパク質の詳細な説明は、例えば、Zhang et al. による最近の総説、Frontiers Cell Neurosci（2014）に見出すことができる。I型膜貫通受容体に由来する非限定的な好適なTMDとしては、CLSTN1、CLSTN2、APLP1、APLP2、LRP8、APP、BTC、TGBR3、SPN、CD44、CSF1R、CXCL16、CX3CL1、DCC、DLL1、DSG2、DAG1、CDH1、EPCAM、EPHA4、EPHB2、EFNB1、EFNB2、Erbb4、GHR、HLA-A、及びIFNAR2に由来するものが挙げられ、TMDは少なくとも1つの -セクレターゼ切断部位を含む。本明細書に記載の組成物及び方法に適したさらなるTMDとしては、I型膜貫通受容体IL1R1、IL1R2、IL6R、INSR、ERN1、ERN2、JAG2、KCNE1、KCNE2、KCNE3、KCNE4、KL、CHL1、PTPRF、SCN1B、SCN3B、NPR3、NNGFR、PLXDC2、PAM、AGER、ROBO1、SORCS3、SORCS1、SORL1、SDC1、SDC2、SPN、TYR、TYRP1、DCT、VASN、FLT1、CDH5、PKHD1、NECTIN1、PCDHGC3、NRG1、LRP1B、CDH2、NRG2、PTPRK、SCN2B、Nradd、及びPTPRMからの膜貫通ドメインが挙げられるが、それらに限定されない。いくつかの実施形態では、本開示のキメラ受容体のTMDは、アルカデイン 及びアルカデイン などのカルシニンファミリーのメンバーのTMDに由来するTMDである。いくつかの実施形態では、本開示のキメラ受容体のTMDは、Notch受容体で知られているTMDである。いくつかの実施形態では、本開示のキメラ受容体のTMDは、異なるNotch受容体由来のTMDである。例えば、ヒトNotch1に基づくMini Notchでは、Notch1 TMDは、h2 TMD、Notch3 TMD、Notch4 TMD、又はゼブラフィッシュ（Danio rerio）、キイロショウジョウバエ（Drosophila melanogaster）、アフリカツメガエル（Xenopus laevis）、セキショクヤケイ（Gallus gallus）などの非ヒト動物由来のNotch TMDで置換することができる。

【0092】

いくつかの実施形態では、TMD内のアミノ酸置換（複数可）は、TMDの「GV」モチーフ内の1つ又は複数の置換を含む。いくつかの実施形態では、そのような置換（複数可）の少なくとも1つは、アラニンへの置換を含む。例えば、FMYVAAA AFVLL FFGCGVLL（配列番号4）の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、又はそれより多いアミノ酸残基は、異なるアミノ酸残基で置換されてもよい。いくつかの実施形態では、配列番号4内の「GV」モチーフの18位及び/又は19位のアミノ酸残基は、異なるアミノ酸残基で置換される。いくつかの実施形態では、配列番号4の18位のグリシン残基は、異なるアミノ酸残基で置換される。いくつかの実施形態では、配列番号4の19位のバリン残基は、異なるアミノ酸残基で置換される。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、G18A変異などの配列番号4の18位に対応する位置に変異をもつ配列番号4に対応する配列を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、V19A変異などの配列番号4の19位に対応する位置に変異をもつ配列番号4に対応する配列を有するアミノ酸配列を含む。TMDは、配列番号4に由来しうるが、それよりも長くても短くてもよい。例えば、例えば、TMDは、配列番号4よりもアミノ酸が1、2、3、4つ、又はそれよりも多く長くても短くてもよい。いくつかの実施形態では、TMDは、配列番号4と、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少な

くとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、又は 99% の配列同一性など、少なくとも 80% の配列同一性を有する配列を含む。

【0093】

ストップトランスファーシーケンス (STS)

本開示のキメラ受容体は、TMDとICDの間に位置する荷電した親水性ドメインを含むSTSを含む。いずれの特定の理論にも束縛されるものではないが、TMDとICDの間に配置されたこのドメインは、ICDが細胞膜に入るのを防ぐ。いくつかの実施形態では、生理的条件下でほとんどの残基が荷電側鎖を有する、約1~約40個のアミノ酸残基（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個、又はより多いアミノ酸残基）を含む単鎖ペプチドをSTSとして使用することができる。短いSTS実施形態（例えば、約6つ未満のアミノ酸）では、アミノ酸の約5又は6つが荷電側鎖を有することになる。いくつかの実施形態では、STSは、約1~15、約5~20、約8~25、約10~30、約12~35、約14~40、約5~40、約10~35、約15~30、約20~25、約20~40、約10~30、約4~20、又は約5~25個のアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態では、STSは、約4~10、約5~12、約6~14、約7~18、約8~20、約9~22、約10~24、又は約11~26個のアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態では、STSは、4、5、6、7、8、9、又は10個のアミノ酸残基など、約4~10個の残基を含む。

10

【0094】

いくつかの実施形態では、STSは、1型受容体のSTSドメインと、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は99%の配列同一性など、少なくとも約80%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、STSは、1型受容体のSTSドメインと少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、STSは、Notch1、Notch2、Notch3、Notch4、CSF1R、CXCL16、DAG1、GHR、PTPRF、AGER、KL、NRG1、LRP1B、Jag2、EPCAM、KCNE3、CDH2、NRG2、PTPRK、BTC、EPHA3、IL1R2、又はPTPRMからのSTS配列と、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は99%の配列同一性など、少なくとも70%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、STSは、最初の4残基においてLys(K)又はArg(R)のみを含む配列を含む。いくつかの実施形態では、STSは、1、2、3、4、5つ、又はそれより多い塩基性残基を含む。いくつかの実施形態では、STSは、5、4、3、2、1、又は0個の芳香族残基、又は疎水性側鎖及び/若しくは嵩高い側鎖をもつ残基を含む。

20

30

【0095】

いくつかの実施形態では、STSは、SKRKRKH（配列番号5）と、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は99%の配列同一性など、少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、STSは、配列番号5と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。STSは、配列番号5に由来しうるが、それよりも長くても短くてもよい。例えば、例えば、STSは、配列番号5よりもアミノ酸が1、2、3、4つ、又はそれよりも多く長くても短くてもよい。いくつかの実施形態では、STSは、配列番号5と、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は99%の配列同一性など、少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、STSは、配列番号5と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、STSは、配列番号5と少なくとも100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、STSは配

40

50

列番号5のアミノ酸配列を含み、配列番号5のアミノ酸残基の1、2、3、4、又は5つは、異なるアミノ酸残基で置換される。

【0096】

細胞内ドメイン (ICD)

本開示のキメラ受容体は、細胞内ドメイン (ICD) であって、任意の順序で：(i) シグナル伝達分子に由来する少なくとも1つの共刺激ドメイン及び活性化ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメイン (SD)、及び(ii) 転写調節因子を含む細胞内ドメインを含む。言い換えれば、本開示のキメラ受容体のICDは、図1A~1Bに示されているように、少なくとも3つの異なるドメインを有することができる。その3つの異なるドメインは、特定の順序で配置でき、1つ又は複数のリンカーを介して互いに動作可能に連結することができる。いくつかの実施形態では、図1Bに示されているように、3つの異なるドメインは、(GS)_nリンカーを介して連結される。nは1~100から選択される任意の数であることができる。例えば、nは、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10であることができる。他の実施形態では、nは、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20であることができる。例示的なGSリンカーは、3つのGSリピート及びGS₂GS₂GS₂ (配列番号6)の配列を有することができる。当業者であれば、特定の用途に適するようにどのようにリンカーを改変する方法を知っているだろう。

10

【0097】

いくつかの実施形態では、本開示のキメラ受容体の細胞内ドメインは、細胞内シグナル伝達ドメインをさらに含む。細胞内シグナル伝達ドメインは、少なくとも2つの異なるドメイン、すなわち少なくとも1つの共刺激ドメイン及び活性化ドメインを有することができる。

20

【0098】

いくつかの実施形態では、共刺激ドメインは、シグナル伝達分子に由来する配列を含む。シグナル伝達分子は、クラス1及び(or)クラス3のヒト膜タンパク質から選択されるタンパク質であることができる。いくつかの実施形態では、シグナル伝達分子は、CD28、ICOS、CTLA4、PD1、PD1H、BTLA、B71、B7H1、CD226、CRTAM、TIGIT、CD96、TIM1、TIM2、TIM3、TIM4、CD2、SLAMF2、2B4、Ly108、CD84、Ly9、CRACC、BTN1、BTN2、BTN3、LAIR1、LAG3、CD160、4-1BB、OX40、CD27、GITR、CD30、TNFR1、TNFR2、HVEM、LT α R、DR3、DCR3、FAS、CD40、RANK、OPG、TRAILR1、TACI、BAFFR、BCMA、TWEAKR、EDAR、XEDAR、RELT、DR6、TROY、NGFR、CD22、シグレック-3、シグレック-5、シグレック-7、KLRG1、NKR-P1A、ILT2、KIR2DL1、KIR3DL1、CD94-NKG2A、CD300b、CD300e、TREM1、TREM2、ILT7、ILT3、ILT4、TLT-1、CD200R、CD300a、CD300f、DC-SIGN、B7-2、アラジン-1、LAT、BLNK、LAYN、SLP76、EMB-LMP1、HIV-NEF、HVS-TIP、HVS-ORF5、及びHVS-stpC、並びにそれらの誘導体、変異体、バリエーション、断片及び組み合わせから選択される。他の実施形態では、シグナル伝達分子は、OX40、ICOS、4-1BB、CTLA4、CD28、CD30、CD2、CD27、及びCD226からなるリスト、並びにそれらの誘導体、変異体、バリエーション、断片及び組み合わせから選択される。いくつかの実施形態では、シグナル伝達分子は、4-1BB、BAFFR、BCMA、BTLA、CD2、CD200R、CD244、CD28、CD300a、CD300f、CD40、CD7、CD72、CD96、CRACC、CRTAM、CTLA4、CXADR、DC-SIGN、GITR、HAVCR2、ICOS、ILT2、ILT3、ILT4、KIR2DL1、KIR3DL1、KLRG1、LAG3、LAIR1、NKG2D、NKR-P1A、NTB-A、PD1、シグレック-3、TACI、TIGIT、TLT-1、及びTNR8 (CD30)、

30

40

50

並びにそれらの誘導体、変異体、バリエーション、断片及び組み合わせからなる群から選択される。他の実施形態では、シグナル伝達分子は、CD28又は4-1BBである。1つの好ましい実施形態では、共刺激ドメインは、CD28に由来する配列を含む。別の好ましい実施形態では、共刺激ドメインは、4-1BBに由来する配列を含む。別の実施形態では、共刺激ドメインは、trunc41BB共刺激ドメインのC末端に付加されたCD28シグナル伝達モチーフの1つを含む。

【0099】

いくつかの実施形態では、活性化ドメインは、例えば、免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ(ITAM)など、リン酸化の基質として機能する1つ又は複数の保存アミノ酸モチーフを含む。いくつかの実施形態では、活性化ドメインは、ITAMモチーフ、ITIMモチーフ、及び(or)リン酸化の基質として機能する関連細胞内モチーフから選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、又は少なくとも5つの特定のチロシンベースモチーフを含む。本開示のいくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインの活性化ドメインは、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、又は少なくとも5つのITAMを含む。一般に、ITAMを含むいずれの活性化ドメインも、本明細書に記載のキメラ受容体の構築に好適に使用することができる。ITAMは一般に、多くの免疫細胞で発現するシグナル伝達分子の末端部分(tail portion)にしばしば存在する、保存タンパク質モチーフを含む。モチーフは、6~8つのアミノ酸で隔てられたアミノ酸配列YxxL/Iの2つのリピートを含むことができ、xはそれぞれ独立して任意のアミノ酸であり、保存モチーフYxxL/Ix(6-8)YxxL/Iを作る。シグナル伝達分子内のITAMは、シグナル伝達分子の活性化後に続くITAM内のチロシン残基のリン酸化によって少なくとも部分的に仲介される、細胞内のシグナル伝達に重要である。ITAMはまた、シグナル伝達経路に關与する他のタンパク質のドッキング部位としても機能しうる。

【0100】

いくつかの実施形態では、活性化ドメインは、CD3、CD3、CD3/、及びCD3に由来する。例えば、いくつかの実施形態では、ITAMは、CD3、CD3、CD3/、及びCD3に由来する。1つの好ましい実施形態では、ITAMはCD3に由来する。ある特定の実施形態では、ITAMは、CD3 ITAMと、少なくとも約80、85、90、95、96、97、98、99、又は100%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、活性化ドメインは、CD3、FcR、及びそれらの組み合わせに由来するITAMから独立して選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、又は少なくとも5つのITAMを含む。いくつかの実施形態では、活性化ドメインはCD3 ITAMを含む。

【0101】

いくつかの実施形態では、本開示のキメラ受容体の細胞内ドメインは転写調節因子をさらに含む。転写調節因子は、プロモーターによって駆動されるDNA配列の転写を活性化又は抑制するように作用する生化学的要素である。本開示の組成物及び方法に適した転写調節因子は、天然に存在する転写調節因子でありうる、又は所望の、且つ/若しくはより良い特性、例えば転写を調節する特性をもたらすように、操作、設計、又は改変されうる。いくつかの実施形態では、転写調節因子は、細胞の分化に關与する1つ又は複数の遺伝子の発現を直接調節する。いくつかの実施形態では、転写調節因子は、第2の転写因子の発現を調節し、そして次に細胞の分化に關与する1つ又は複数の遺伝子の発現を調節することによって、細胞の分化に關与する1つ又は複数の遺伝子の発現を間接的に調節する。転写調節因子が転写活性化因子又は転写抑制因子でありうることは、当業者に理解されるであろう。いくつかの実施形態では、転写調節因子は転写抑制因子である。いくつかの実施形態では、転写調節因子は転写活性化因子である。いくつかの実施形態では、転写調節因子は核局在化シグナルをさらに含むことができる。いくつかの実施形態では、転写調節因子は、Gal4、tetR、ZFHD1、又はHAP1に由来する核局在化配列を含む。他の実施形態では、転写調節因子は、VP64、VP65、KRAB、又はVP16に

10

20

30

40

50

由来する転写調節因子配列を含む。ある特定の実施形態では、転写調節因子は、Gal4 - VP16、Gal4 - VP64、tetR - VP64、ZFHD1 - VP64、Gal4 - KRAB、及びHAP1 - VP16から選択される。いくつかの実施形態では、転写調節因子はGal4 - VP64である。

【0102】

いくつかの実施形態では、ICDは、配列番号7～14、33、49～53、及び59～62の1つ又は複数と、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は99%の配列同一性など、少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ICDは、配列番号7～14、33、49～53、及び59～62の1つ又は複数と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ICDは、配列番号7～14、33、49～53、及び59～62の1つ又は複数と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ICDは、配列番号7～14、33、49～53、及び59～62の1つ又は複数と少なくとも100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ICDは、配列番号7～14、33、49～53、及び59～62の1つ又は複数のアミノ酸配列を含み、配列番号7～14、33、49～53、及び59～62の1つ又は複数のアミノ酸残基の1つ、2つ、3つ、4つ、又は5つは、異なるアミノ酸残基で置換される。

10

【0103】

追加ドメイン

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるキメラ受容体は、追加の領域又はドメインをさらに含むことができる。例えば、いくつかの実施形態では、TMDに対してN末端に位置する細胞外ドメインは、CD8Aシグナルなどの膜局在化シグナルを含むことができる。他の実施形態では、キメラ受容体は、mycタグやHisタグなどの検出可能な標識及び同種のものを含むことができる。さらなる実施形態では、本明細書で提供されるキメラ受容体はまた、腫瘍特異的切断部位、又は疾患特異的切断部位も含むことができる。さらなる実施形態では、本明細書で提供されるキメラ受容体は、これらの追加領域の組み合わせを含むことができる。

20

【0104】

いくつかの実施形態では、本開示のキメラ受容体は、(a)配列番号3と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む連結ポリペプチド；(b)配列番号4と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む膜貫通ドメイン；及び(c)配列番号5と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むストップトランスファーシケンスドメインを含む。

30

【0105】

いくつかの実施形態では、本開示のキメラ受容体は、(a)配列番号1、2、45、及び46のいずれか1つと少なくとも80%の配列同一性を有する細胞外リガンド結合ドメイン；(b)配列番号3と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む連結ポリペプチド；(c)配列番号4と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む膜貫通ドメイン；(d)配列番号5と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むストップトランスファーシケンスドメイン；並びに(e)配列番号7～14、33、49～53、及び59～62の1つ又は複数と少なくとも80%の配列同一性を有する1つ又は複数のアミノ酸配列を含むことを含む細胞内ドメインを含む。

40

【0106】

いくつかの実施形態では、本開示のキメラ受容体は、(a)配列番号1、2、45、及び46のいずれか1つと少なくとも80%の配列同一性を有する細胞外リガンド結合ドメイン；(b)配列番号3と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む連結ポリペプチド；(c)配列番号4と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む膜貫通ドメイン；(d)配列番号5と少なくとも80%の配列同一性を有するア

50

ミノ酸配列を含むストップトランスファーシーケンスドメイン；並びに（e）GSリンカーによって連結された、配列番号7～14、33、49～53、及び59～62のいずれか1つと、それぞれが少なくとも80%の配列同一性を有する3つのアミノ酸配列を含む細胞内ドメインを含む。

【0107】

いくつかの好ましい実施形態では、本開示のキメラ受容体は、（a）配列番号1、2、45、及び46に記載の配列を有する細胞外リガンド結合ドメイン；（b）配列番号3に記載の配列を有するアミノ酸配列を含む連結ポリペプチド；（c）配列番号4に記載の配列を有するアミノ酸配列を含む膜貫通ドメイン；（d）配列番号5に記載の配列を有するアミノ酸配列を含むストップトランスファーシーケンスドメイン；並びに（e）GSリン

10

【0108】

いくつかの実施形態では、本開示のキメラ受容体は、（a）配列番号1、2、45、及び46のいずれか1つと少なくとも80%の配列同一性を有する細胞外リガンド結合ドメイン；（b）配列番号3と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む連結ポリペプチド；（c）配列番号4と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む膜貫通ドメイン；並びに（d）配列番号7～14、33、49～53、及び59～62の1つ又は複数と少なくとも80%の配列同一性を有する1つ又は複数のアミノ酸配列を含むことを含む細胞内ドメインを含む。

20

【0109】

いくつかの実施形態では、本開示のキメラ受容体は、本明細書に開示のキメラ受容体と、少なくとも約80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、配列番号15～31、32～44、47～48、54～58、及び63～68のいずれか1つと、少なくとも約80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むキメラ受容体である。

【0110】

核酸分子

別の態様では、本明細書で提供されるのは、本開示のキメラ受容体及びハイブリッドSynNotch受容体をコードするヌクレオチド配列を含み、発現カセット、及び例えば、宿主細胞における受容体の生体内発現を容易にする調節配列などの異種核酸配列に動作可能に連結されたこれらの核酸分子を含有する発現ベクターを含む様々な核酸分子である。

30

【0111】

本開示の核酸分子は、例えば、約1.5Kb～約50Kb、約5Kb～約40Kb、約5Kb～約30Kb、約5Kb～約20Kb、又は約10Kb～約50Kb、例えば約15Kb～30Kb、約20Kb～約50Kb、約20Kb～約40Kb、約5Kb～約25Kb、又は約30Kb～約50Kbを含む任意の長さであることができる。

【0112】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、N末端からC末端に：（a）選択されたりガンドに対する結合親和性を有する細胞外リガンド結合ドメイン；（b）連結配列；（c）1つ又は複数のリガンド誘導性タンパク質分解切断部位を含む膜貫通ドメイン；並びに（d）（i）シグナル伝達分子に由来する少なくとも1つの共刺激ドメイン及び活性化ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメイン（SD）、及び（ii）転写調節因子を含む細胞内ドメインを含み、選択されたりガンドの細胞外リガンド結合ドメインへの結合が、転写調節因子とヒンジドメインの間に配置されたりガンド誘導性タンパク質分解切断部位において誘導される、キメラ受容体又はハイブリッドSynNotch受容体をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子である。

40

【0113】

50

いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、発現カセット又は発現ベクターに組み込まれる。発現カセットは一般に、コード配列並びに生体内及び/又は生体外で、レシピエント細胞におけるコード配列の適切な転写及び/又は翻訳を導くのに十分な調節情報を含む遺伝子材料のコンストラクトを含むことが理解されるであろう。一般に、発現カセットは、所望の宿主細胞及び/又は個体を標的とするようにベクターに挿入することができる。したがって、いくつかの実施形態では、本開示の発現カセットは、本明細書に開示のキメラ受容体のコード配列を含み、そのコード配列は、プロモーターなどの発現制御エレメント、及び任意選択で、コード配列の転写又は翻訳に影響を及ぼす他の核酸配列のいずれか又は組み合わせに動作可能に連結される。

【0114】

10

いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は発現ベクターに組み込まれる。「ベクター」という用語は、一般に、宿主細胞間の移動のために設計された組み換えポリヌクレオチドコンストラクトを意味し、形質転換、例えば、宿主細胞への異種DNAの導入の目的で使用されることが、当業者に理解されるであろう。したがって、いくつかの実施形態では、ベクターは、プラスミドや、ファージ、コスミドなどのレプリコンであることができ、その中に別のDNAセグメントが挿入され、その挿入されたセグメントの複製を引き起こすことができる。いくつかの実施形態では、発現ベクターは組み込み型ベクター (i n t e g r a t i n g v e c t o r) であることができる。

【0115】

いくつかの実施形態では、発現ベクターはウイルスベクターであることができる。当業者であれば理解するであろうように、「ウイルスベクター」という用語は、一般に核酸分子の導入 (t r a n s f e r) 若しくは細胞のゲノムへの統合を容易にするウイルス由来の核酸要素を含む核酸分子 (例えば、導入プラスミド (t r a n s f e r p l a s m i d)) 又は核酸導入を仲介するウイルス粒子のいずれかを意味するのに広く使用されている。ウイルス粒子は一般に、核酸 (複数可) にくわえて様々なウイルス成分、時には宿主細胞成分を含むことになる。ウイルスベクターという用語は、核酸を細胞に導入することができるウイルス若しくはウイルス粒子、又は導入された核酸そのものを意味しうる。ウイルスベクター及び導入プラスミドは、主にウイルスに由来する構造的及び/又は機能的な遺伝要素を含む。「レトロウイルスベクター」という用語は、主にレトロウイルスに由来する構造的及び機能的な遺伝要素、又はその一部を含むウイルスベクター又は 30 プラスミドを意味する。「レンチウイルスベクター」という用語は、主にレトロウイルス属であるレンチウイルスに由来するLTRを含む、構造的及び機能的な遺伝要素、又はその一部を含むウイルスベクター又はプラスミドを意味する。

【0116】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、本明細書に開示のキメラ受容体と、少なくとも約80%、90%、95%、96%、97、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するアミノ酸配列をもつポリペプチドをコードする核酸分子である。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、配列番号1~68のいずれか1つと、少なくとも約80%、90%、95%、96%、97、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するアミノ酸配列をもつポリペプチドをコードする核酸分子である。 40 いくつかの実施形態では、核酸分子は、配列番号15~32、34~44、47~48、54~58、及び63~68のいずれか1つと、少なくとも約80%、90%、95%、96%、97、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するアミノ酸配列をもつポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、配列番号1及び2のいずれか1つと、少なくとも約80%、90%、95%、96%、97、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するアミノ酸配列をもつポリペプチドをコードする核酸分子である。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、配列番号3と、少なくとも約80%、90%、95%、96%、97、98%、99%、又は 50 100%の配列同一性を有するアミノ酸配列をもつポリペプチドをコードする核酸分子である。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、配列番号4と、少なくとも

約 80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列をもつポリペプチドをコードする核酸分子である。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、配列番号 5 と、少なくとも約 80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列をもつポリペプチドをコードする核酸分子である。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、配列番号 7 ~ 14、33、49 ~ 53、及び 59 ~ 62 のいずれか 1 つと、少なくとも約 80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列をもつポリペプチドをコードする核酸分子である。

【0117】

キメラ受容体をコードする核酸配列は、目的の宿主細胞での発現に最適化することができる。例えば、配列の GC 含量は、宿主細胞で発現される既知の遺伝子を参照して計算した、所与の細胞宿主の平均レベルに調整することができる。コドン使用を最適化する方法は当技術分野で公知である。本明細書に開示のキメラ受容体のコード配列内のコドン使用は、宿主細胞での発現を増強するように最適化ことができ、その結果コード配列内のコドンの約 1%、約 5%、約 10%、約 25%、約 50%、約 75%、又は最大で 100% が、特定の宿主細胞での発現のために最適化されている。

【0118】

本明細書に開示のいくつかの実施形態は、本明細書に開示のキメラ受容体をコードする組み換え核酸分子を含むベクター又は発現カセットに関する。発現カセットは一般に、コード配列並びに生体内及び/又は生体外で、レシピエント細胞におけるコード配列の適切な転写及び/又は翻訳を導くのに十分な調節情報を含む。発現カセットは、所望の宿主細胞及び/又は個体を標的とするようにベクターに挿入することができる。発現カセットは、1 つ又は複数の核酸配列が機能的に動作可能な状態で連結された、すなわち動作可能に連結された核酸分子を含む、任意の源に由来する、ゲノム取り込み又は自律複製が可能な、直鎖又は環状の一本鎖又は二本鎖の DNA 又は RNA ポリヌクレオチド分子として、プラスミド、コスミド、ウイルス、自律複製ポリヌクレオチド分子、ファージに挿入することができる。

【0119】

また、本明細書で提供されるのは、本明細書に開示の任意のキメラ受容体又はハイブリッド SynNotch 受容体をコードする 1 つ又は複数の核酸分子を含むベクター、プラスミド、又はウイルスである。核酸分子は、例えば、ベクターで形質転換/形質導入された細胞において発現を導くことができるベクター内に含めることができる。真核細胞及び原核細胞で使用するのに適したベクターは当技術分野で公知であり、市販されている、又は当業者によって容易に調製される。例えば、 Sambrook, J., & Russell, D. W. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4th ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory and Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory (本明細書ではあわせて「Sambrook」と呼ぶ); Ausubel, F. M. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York, NY: Wiley (2014年までの追補 (supplements) を含む); Bollag, D. M. et al. (1996). *Protein Methods*. New York, NY: Wiley-Liss; Huang, L. et al. (2005). *Nonviral Vectors for Gene Therapy*. San Diego: Academic Press; Kaplitt, M. G. et al. (1995). *Viral Vectors: Gene Therapy and Neuroscience A*

10

20

30

40

50

pplications. San Diego, CA: Academic Press; Lefkovits, I. (1997). The Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques. San Diego, CA: Academic Press; Doyle, A. et al. (1998). Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology. New York, NY: Wiley; Mullis, K. B., Ferre, F. & Gibbs, R. (1994). PCR: The Polymerase Chain Reaction. Boston: Birkhauser Publisher; Greenfield, E. A. (2014). Antibodies: A Laboratory Manual (2nd ed.). New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; Beaucage, S. L. et al. (2000). Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry. New York, NY: Wiley, (including supplements through 2014) 及び Makrides, S. C. (2003). Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells. Amsterdam, NL: Elsevier Sciences B.V. を参照。これらの開示は参照により本明細書に援用される。 10

【0120】

DNAベクターは、従来の形質転換技術又はトランスフェクション技術によって真核細胞に導入することができる。宿主細胞を形質転換又はトランスフェクションするのに適した方法は、Sambrook et al. (2012、上掲) 及び他の標準的な分子生物学実験マニュアルに見出すことができ、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストランを介したトランスフェクション、トランスフェクション、マイクロインジェクション、カチオン性脂質を介したトランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレイプローディング、バリスティック導入 (ballistic introduction)、ヌクレオポレーション (nucleoporation)、ハイドロダイナミックショック (hydrodynamic shock)、及び感染である。 30

【0121】

本開示で使用できるウイルスベクターとしては、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ヘルペスウイルス、シミアンウイルス40 (SV40)、及びウシパピローマウイルスベクターが挙げられる。(例えば、Gluzman (Ed.), Eukaryotic Viral Vectors, CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. を参照)。例えば、本明細書に開示のキメラ受容体は、哺乳類細胞 (例えば、COS細胞、NIH3T3細胞、又はHeLa細胞) などの真核宿主で生成することができる。これらの細胞は、アメリカンタイプカルチャーコレクション (バージニア州マナサス) を含む多くの供給源から入手可能である。発現系を選択する際には、構成要素が互いに適合性があることを確実にするように配慮されるべきである。当業者はそのような判断を下すことができる。さらに、発現系の選択に指針が必要な場合、当業者はP. Jones, "Vectors: Cloning Applications", John Wiley and Sons, New York, N.Y., 2009を参考にすることができる。 40

【0122】

提供される核酸分子は、天然に存在する配列、又は天然に存在するものとは異なるが遺伝コードの縮重により同じポリペプチド、例えば抗体をコードする配列を含有することができる。これらの核酸分子は、RNA又はDNA (例えば、ゲノムDNA、cDNA、若 50

しくは合成DNA、例えばホスホルアミダイトベースの合成によって作られるものなど）、又はこれらのタイプの核酸内のヌクレオチドの組み合わせ若しくは改変からなることができる。さらに、核酸分子は二本鎖であることもでき、又は一本鎖（例えば、センス鎖又はアンチセンス鎖のいずれか）であることもできる。

【0123】

核酸分子は、ポリペプチド（例えば、抗体）をコードする配列に限定されず、コード配列（例えば、キメラ受容体のコード配列）の上流又は下流にある非コード配列の一部又はすべてを含むこともできる。分子生物学の当業者は、核酸分子を単離するための慣用的な（*routine*）手順を熟知している。例えば、ゲノムDNAを制限エンドヌクレアーゼで処理すること、又はポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行うことによって作り出すことができる。核酸分子がリボ核酸（RNA）である場合、分子は例えばインビトロ転写によって作製することができる。

10

【0124】**組み換え細胞及び細胞培養**

本開示の核酸は、例えばヒトTリンパ球などの宿主細胞に導入して、核酸分子を含有する組み換え細胞又は改変細胞を作製することができる。したがって、本開示のいくつかの実施形態は、（a）タンパク質発現が可能な細胞を提供すること、及び（b）提供された細胞を本開示の組み換え核酸と接触させることを含む、組み換え細胞又は改変細胞を作るための方法に関する。

【0125】

本開示の核酸分子の細胞への導入は、例えば、ウイルス感染、トランスフェクション、コンジュゲーション（*conjugation*）、プロトプラスト融合、リポフェクション、エレクトロポレーション、ヌクレオフェクション（*nucleofection*）、リン酸カルシウム沈殿、ポリエチレンイミン（PEI）を介したトランスフェクション、DEAE-デキストランを介したトランスフェクション、リポソームを介したトランスフェクション、パーティクルガン技術、リン酸カルシウム沈殿、直接マイクロインジェクション、ナノ粒子を介した核酸送達及び同種のものなど、当業者に公知の方法によって達成することができる。

20

【0126】

したがって、いくつかの実施形態では、核酸分子は、当該技術分野で公知のウイルス又は非ウイルス送達ビヒクルによって送達することができる。例えば、核酸分子は、核酸分子は宿主ゲノムに安定に組み込むことができる、又はエピソーム的に複製することができる、又は一過性発現のためのミニサークル（*mini-circle*）発現ベクターとして組み換え宿主細胞に存在することができる。したがって、いくつかの実施形態では、核酸分子は、エピソーム単位として組み換え宿主細胞に維持され、及び複製される。いくつかの実施形態では、核酸分子は組み換え細胞のゲノムに安定に組み込まれる。安定した組み込みは、古典的ランダムゲノム組み換え技術を使用して、又はガイドRNA依存性（*RNA-directed*）CRISPR/Cas9ゲノム編集や、NgAgo（*Natronobacterium gregoryi*）アルゴノート）を用いたDNA誘導（*DNA-guided*）エンドヌクレアーゼゲノム編集、TALENゲノム編集（転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ）など、より精度の高い技術を用いて達成することができる。いくつかの実施形態では、核酸分子は、一過性発現のためのミニサークル発現ベクターとして組み換え宿主細胞に存在する。

30

40

【0127】

核酸分子は、ウイルスカプシド若しくは脂質ナノ粒子に封入することができる、又はウイルス性若しくは非ウイルス性の送達手段及びエレクトロポレーションなどの当該技術分野で公知の方法によって送達することができる。例えば、核酸の細胞への導入は、ウイルス形質導入によって達成することができる。非限定的な例では、アデノ随伴ウイルス（AAV）は、ウイルス形質導入によって標的細胞に核酸を送達するように改変される。いくつかのAAV血清型が報告されており、既知の血清型はすべて、複数の多様な組織型の細

50

胞に感染することができる。AAVは生体内で、毒性を示すことなく、様々な種及び組織を形質導入することができ、比較的穏やかな自然免疫反応及び適応免疫反応を引き起こす。

【0128】

レンチウイルス由来のベクター系は、ウイルス形質導入による核酸送達及び遺伝子治療にも有用である。レンチウイルスベクターは、遺伝子導入ベクターとして、以下を含むいくつかの魅力的な特性を備えている：(i) 宿主ゲノムへのベクターの安定した組み込みを通じた持続的な遺伝子送達；(ii) 分裂している細胞にも分裂していない細胞にも感染する能力；(iii) 重要な遺伝子治療及び細胞治療標的細胞種を含む幅広い組織指向性；(iv) ベクター形質導入後のウイルスタンパク質の発現がない；(v) ポリシストロニック配列やイントロン含有配列などの複雑遺伝要素を送達する能力；(vi) より安全な可能性のある組み込み部位プロファイル；並びに(vii) ベクターの操作及び作製のための比較的容易な系。

10

【0129】

いくつかの実施形態では、宿主細胞は、例えば、ウイルスベクター若しくは宿主細胞のゲノムの一部と相同な核酸配列を含む相同組み換え用のベクターでありうる、又は目的のポリペプチドの発現のための発現ベクターでありうる、例えば本出願のベクターコンストラクトで、遺伝子操作（例えば、形質導入又は形質転換又はトランスフェクト）することができる。宿主細胞は、形質転換されていない細胞、又は少なくとも1つの核酸分子で既にトランスフェクトされた細胞のいずれでもあることができる。

20

【0130】

いくつかの実施形態では、組み換え細胞は、原核細胞又は真核細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は生体内にある。いくつかの実施形態では、細胞は生体外にある。いくつかの実施形態では、細胞はインビトロにある。いくつかの実施形態では、組み換え細胞は真核細胞である。いくつかの実施形態では、組み換え細胞は動物細胞である。いくつかの実施形態では、動物細胞は哺乳類細胞である。いくつかの実施形態では、動物細胞はヒト細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は非ヒト霊長類細胞である。いくつかの実施形態では、哺乳類細胞は、免疫細胞、神経細胞、上皮細胞、及び内皮細胞、又は幹細胞である。いくつかの実施形態では、組み換え細胞は、免疫系細胞、例えば、リンパ球（例えば、T細胞若しくはNK細胞）、又は樹状細胞である。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、B細胞、単球、ナチュラルキラー（NK）細胞、好塩基球、好酸球、好中球、樹状細胞、マクロファージ、制御性T細胞、ヘルパーT細胞（TH）、細胞傷害性T細胞（CTL）、又は他のT細胞である。いくつかの実施形態では、免疫系細胞はTリンパ球である。

30

【0131】

いくつかの実施形態では、細胞は幹細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は造血幹細胞である。細胞のいくつかの実施形態では、細胞はリンパ球である。いくつかの実施形態では、細胞は、前駆T細胞又は制御性T（Treg）細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、CD34+、CD8+、又はCD4+細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、ナイーブCD8+T細胞、セントラルメモリーCD8+T細胞、エフェクターメモリーCD8+T細胞、及びバルクCD8+T細胞からなる群から選択されるCD8+T細胞傷害性リンパ球細胞である。細胞のいくつかの実施形態では、細胞は、ナイーブCD4+T細胞、セントラルメモリーCD4+T細胞、エフェクターメモリーCD4+T細胞、及びバルクCD4+T細胞からなる群から選択されるCD4+Tヘルパーリンパ球細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、対象から得られた試料に対して行われた白血球除去によって得ることができる。いくつかの実施形態では、対象はヒト患者である。

40

【0132】

いくつかの実施形態では、組み換え細胞は、本明細書に開示の第1及び第2の核酸分子をさらに含み、第1の核酸分子と第2の核酸分子は同じ配列を有しない。いくつかの実施

50

形態では、組み換え細胞は、本明細書に開示の第1及び第2のキメラ受容体又はハイブリッドSynNotch受容体をさらに含み、第1のキメラ受容体又はハイブリッドSynNotch受容体と第2のキメラ受容体又はハイブリッドSynNotch受容体は同じ配列を有しない。いくつかの実施形態では、第1のキメラ受容体又はハイブリッドSynNotch受容体は、第2のキメラ受容体又はハイブリッドSynNotch受容体の発現及び/又は活性を調節する。

【0133】

いくつかの実施形態では、組み換え細胞は、プロモーターに動作可能に連結された目的のタンパク質をコードする発現カセットをさらに含み、目的のタンパク質の発現はキメラ受容体転写調節因子によって調節される。本開示に関連して、任意の好適なプロモーターを使用することができる。いくつかの実施形態では、プロモーターは酵母GAL4プロモーターを含む。いくつかの実施形態では、目的のタンパク質は組み換え細胞に対して異種である。異種タンパク質は、通常細胞内に見られない、例えば、通常細胞で作られないタンパク質である。原則として、キメラ受容体転写調節因子によって発現が調節できる好適なタンパク質に関して、特に制限はない。本明細書に開示の組成物及び方法とともに使用するのに適したタンパク質の例示的な種類としては、サイトカイン、細胞毒、ケモカイン、免疫調節因子、プロアポトーシス因子、抗アポトーシス因子、ホルモン、分化因子、脱分化因子、免疫細胞受容体、又はレポーターが挙げられる。いくつかの実施形態では、免疫細胞受容体はT細胞受容体(TCR)である。いくつかの実施形態では、免疫細胞受容体はキメラ抗原受容体(CAR)である。いくつかの実施形態では、目的のタンパク質をコードする発現カセットは、本開示のキメラ受容体をコードするのと同じ核酸分子に組み込まれる。いくつかの実施形態では、目的のタンパク質をコードする発現カセットは、本開示のキメラ受容体をコードする核酸分子とは別の第2の発現ベクターに組み込まれる。

10

20

【0134】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、少なくとも1つの本明細書に開示の組み換え細胞及び培養培地を含む細胞培養物である。一般に、培養培地は、本明細書に記載の細胞を培養するための任意の好適な培養培地であることができる。多種多様な上記宿主細胞及び種を形質転換するための技術は当該技術分野で公知であり、技術文献及び科学文献に記載されている。したがって、少なくとも1つの本明細書に開示の組み換え細胞を含む細胞培養物も本出願の範囲内である。細胞培養物を生成及び維持するのに適した方法と系は、当該技術分野で公知である。

30

【0135】

医薬組成物

いくつかの実施形態では、本開示の核酸及び組み換え細胞は、医薬組成物を含む組成物に組み込むことができる。そのような組成物は一般に、核酸及び/又は組み換え細胞、並びに薬学的に許容される賦形剤、例えば担体を含む。

【0136】

注射での使用に適している医薬組成物としては、無菌水溶液(水溶性の場合)又は分散液、及び無菌注射液又は分散液を即座に調製するための無菌粉末が挙げられる。静脈内投与の場合、好適な担体としては、生理食塩水、静菌水、クレモフォルEL(商標)(BASF、ニュージャージー州パーシッパニー)、又はリン酸緩衝生理食塩水(PBS)が挙げられる。いずれの場合も、組成物は無菌であるべきであり、容易な通針性(easy syringability)が存在する程度に流動性があるべきである。製造及び保管の条件下で安定したものであるべきであり、細菌や真菌などの微生物の汚染作用に対して保存されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液状ポリエチレングリコール、及び同種のもの)、並びにそれらの好適な混合物を含有する溶媒又は分散媒であることができる。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用、分散液の場合、必要な粒径の維持、及び界面活性剤、例えばドデシル硫酸ナトリウムの使用によって維持することができる。微生物の作用の防止は、様々な抗菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロ

40

50

ブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサル及び同種のものによって達成することができる。多くの場合、等張剤、例えば、糖、マンニトール、ソルビトールなどの多価アルコール、及び塩化ナトリウムを組成物に含めるのが一般的であることになる。注射用組成物の長期吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを組成物に含めることによってもたすことができる。

【0137】

無菌注射液は、必要量の活性化化合物を適切な溶媒に、必要に応じて上記に列挙した成分の1つ又は組み合わせと配合し、その後濾過滅菌することによって調製することができる。一般に、分散液は、基本分散媒及び上記に列挙した成分のうち必要な他の成分を含有する無菌ビヒクルに、活性化化合物を配合することによって調製される。

10

【0138】

いくつかの実施形態では、本開示のキメラ受容体及びNotch受容体はまた、当該技術分野で公知の方法を用いてトランスフェクション又は感染によって投与することもでき、例えば、McCaffrey et al. (Nature 418:6893, 2002), Xia et al. (Nature Biotechnol. 20:1006-10, 2002)又はPutnam (Am. J. Health Syst. Pharm. 53:151-60, 1996, erratum at Am. J. Health Syst. Pharm. 53:325, 1996)に記載の方法が挙げられるが、それらに限定されない。

20

【0139】

本開示の方法

本明細書に記載の治療用組成物、例えば、核酸、組み換え細胞、及び医薬組成物のいずれか1つの投与を用いて、がんや慢性感染症など、関連する健康状態又は疾患に対して患者を治療することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の核酸、組み換え細胞、及び医薬組成物は、チェックポイント阻害に関連する1つ又は複数の自己免疫障害及び疾患を発症している、発症している疑いがある、又は発症するリスクが高い可能性がある個体を治療する方法において使用するための治療薬に組み込むことができる。例示的な自己免疫障害及び疾患としては、セリアック病、1型糖尿病、バセドウ病、炎症性腸疾患、多発性硬化症、乾癬、関節リウマチ、及び全身性エリテマトーデスが挙げられるが、それらに限定されない。

30

【0140】

したがって、1つの態様では、本開示のいくつかの実施形態は、個体における標的細胞の活性を阻害するための方法に関し、その方法は、本明細書に開示の核酸、組み換え細胞、及び医薬組成物の1つ又は複数を含む第1の療法を個体に施すことを含み、第1の療法は標的細胞を阻害する。例えば、標的細胞は、その増殖が減少した場合、その病的又は病原性挙動 (pathologic or pathogenic behavior) が減った場合、それが破壊又は死滅した場合などに阻害されうる。阻害には、少なくとも約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、又は約95%の、測定された病的又は病原性挙動の減少が含まれる。いくつかの実施形態では、本方法は、有効な数の本明細書に開示の組み換え細胞を個体に投与することを含み、その組み換え細胞は個体における標的細胞の活性を阻害する。一般に、開示の方法の標的細胞は、個体におけるいずれの細胞型でもあることができ、例えば、急性骨髄腫白血球細胞、未分化リンパ腫細胞、星細胞腫細胞、B細胞がん細胞、乳がん細胞、結腸がん細胞、上衣腫細胞、食道がん細胞、膠芽腫細胞、神経膠腫細胞、平滑筋肉腫細胞、脂肪肉腫細胞、肝がん細胞、肺がん細胞、マントル細胞リンパ腫細胞、メラノーマ細胞、神経芽腫細胞、非小細胞肺がん細胞、乏突起膠腫細胞、卵巣がん細胞、膵がん細胞、末梢性T細胞リンパ腫細胞、腎がん細胞、肉腫細胞、胃がん細胞、がん腫細胞、中皮腫細胞、又は肉腫細胞であることができる。いくつかの実施形態では、標的細胞は病原細胞である。

40

50

【0141】

別の態様では、本開示のいくつかの実施形態は、治療を必要とする個体の健康状態（例えば、疾患）の治療のための方法に関し、その方法は、個体に、本明細書に開示のキメラ受容体を含む組み換え細胞の1つ若しくは複数、及び/又は本明細書に開示の医薬組成物を含む第1の療法を施すことを含み、その第1の療法は個体の健康状態を治療する。いくつかの実施形態では、本方法は、個体に、有効な数の本明細書に開示の組み換え細胞を含む第1の療法を施すことを含み、組み換え細胞は健康状態を治療する。

【0142】

別の態様では、本開示のいくつかの実施形態は、治療を必要とする個体の健康状態（例えば、疾患）の治療を補助するための方法に関し、その方法は、その個体に、本明細書に開示のキメラ受容体、ヒンジ Notch 受容体、核酸、組み換え細胞、及び医薬組成物の1つ又は複数を含む第1の療法並びに第2の療法を施すことを含み、第1及び第2の療法は一緒に、個体の疾患を治療する。いくつかの実施形態では、本方法は、個体に、有効な数の本明細書に開示の組み換え細胞を含む第1の療法を施すことを含み、組み換え細胞は健康状態を治療する。

10

【0143】

個体への組み換え細胞の投与

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、有効量の本開示の組み換え細胞を、それを必要とする個体に投与するものである。この投与ステップは、当該技術分野におけるインプラント送達 (implantation delivery) の任意の方法を用いて達成することができる。例えば、本開示の組み換え細胞は、個体の血流中に直接注入する、又は他の方法で個体に投与することができる。

20

【0144】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示の方法は、所望の効果が発揮されるように、導入された細胞の所望の部位への少なくとも部分的な局在化をもたらす方法又は経路によって、組み換え細胞を個体に投与すること（この用語は、「導入すること」、「埋め込むこと (implanting) 」及び「移植すること (transplanting) 」という用語と交換可能に使用される）を含む。組み換え細胞又はその分化した子孫は、投与された細胞又はその構成成分の少なくとも一部が生存可能な個体の所望の場所への送達をもたらす任意の適切な経路で投与することができる。個体への投与後の細胞の生存期間は、数時間、例えば24時間と短いものから、数日、数年もの長いもの、それどころか個体の一生、すなわち長期の生着まで可能である。

30

【0145】

予防的に与えられる場合、本明細書に記載の組み換え細胞は、治療すべき疾患又は病態の何らかの症状が現れる前に、個体に投与することができる。したがって、いくつかの実施形態では、組み換え細胞集団の予防的投与は、疾患又は病態の症状の発生を予防する。

【0146】

治療的に与えられる場合、いくつかの実施形態では、組み換え細胞は、疾患又は病態の症状又は徴候の発現時（又は発現後）、例えば、疾患又は病態の発症時点で与えられる。

【0147】

本明細書に記載の様々な実施形態における使用のために、本明細書に開示の組み換え細胞の有効量は、少なくとも 10^2 個の細胞、少なくとも 5×10^2 個の細胞、少なくとも 10^3 個の細胞、少なくとも 5×10^3 個の細胞、少なくとも 10^4 個の細胞、少なくとも 5×10^4 個の細胞、少なくとも 10^5 個の細胞、少なくとも 2×10^5 個の細胞、少なくとも 3×10^5 個の細胞、少なくとも 4×10^5 個の細胞、少なくとも 5×10^5 個の細胞、少なくとも 6×10^5 個の細胞、少なくとも 7×10^5 個の細胞、少なくとも 8×10^5 個の細胞、少なくとも 9×10^5 個の細胞、少なくとも 1×10^6 個の細胞、少なくとも 2×10^6 個の細胞、少なくとも 3×10^6 個の細胞、少なくとも 4×10^6 個の細胞、少なくとも 5×10^6 個の細胞、少なくとも 6×10^6 個の細胞、少なくとも 7×10^6 個の細胞、少なくとも 8×10^6 個の細胞、少なくとも 9×10^6 個の細胞、又

40

50

はそれらの倍数 (multiples thereof) であることができる。組み換え細胞は、1又は複数のドナーに由来することもでき、自己供給源から得ることもできる。いくつかの実施形態では、組み換え細胞は、それを必要とする個体に投与する前に、培養で増殖させる。

【0148】

いくつかの実施形態では、組み換え細胞組成物 (例えば、本明細書に記載の細胞のいずれかによる複数の組み換え細胞を含む組成物) の個体への、方法又は経路による送達は、所望の部位における細胞組成物の少なくとも部分的な局在化をもたらす。組み換え細胞を含む組成物は、個体に有効な治療をもたらす任意の適切な経路で投与することができ、例えば、投与は、送達された組成物の少なくとも一部、例えば、少なくとも 1×10^4 個の細胞が、一定期間、所望の部位に送達される、個体の所望の部位への送達をもたらす。投与方法としては、注射、注入、滴下注入 (instillation) が挙げられる。「注射」としては、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、脳室内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、嚢下、くも膜下、脊髄内、脳脊髄内、胸骨内の注射及び吸入が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、経路は静脈内である。細胞の送達では、注射又は注入による送達が好ましい投与方法である。

【0149】

いくつかの実施形態では、組み換え細胞は全身的に、例えば注入又は注射で投与される。例えば、組み換え細胞の集団は、標的部位、組織、又は臓器に直接投与される以外に、個体の循環系に入り、したがって代謝及び他の類似の生物学的プロセスの対象となるように投与される。

【0150】

疾患又は病態の治療のための本明細書で提供される組成物のいずれかを含む治療の有効性は、熟練した臨床医によって判定されうる。しかし、当業者であれば、疾患の徴候又は症状又はマーカーのいずれか1つ又はすべてが改善 (improved) 又は改善 (ameliorated) すれば、治療が有効であるとみなされることを理解するであろう。有効性はまた、入院又は医療介入の必要性の減少によって評価し、個体が悪化していないこと (例えば、病気の進行が止まる、又は少なくとも遅くなる) によって測定することもできる。これらの指標を測定する方法は、当業者に公知であり、且つ/又は本明細書に記載されている。治療には、個体又は動物 (いくつかの非限定的な例では、ヒト又は哺乳動物が含まれる) における疾患のいずれの治療も含まれ、以下が挙げられる: (1) 疾患を抑制すること、例えば、症状の進行を止めること、若しくは遅らせること; 又は (2) 疾患を軽減すること、例えば、症状の消退を引き起こすこと; 及び (3) 症状の発症を予防する、又は発症の可能性を低減すること。

【0151】

前述のように、治療効果量は、疾患を有する、有する疑いがある、又はそのリスクがあるなどの個体に投与されたときに、特定の有益な効果を促進するのに十分な量の治療用組成物を含む。いくつかの実施形態では、有効量は、疾患の症状がでるのを予防又は遅延させる、疾患の症状の経過を変化させる (例えば、疾患の症状の進行を遅らせるが、これらに限定されない)、疾患の症状を逆転させるのに十分な量を含む。いずれの所要の症例でも、いずれの所与の場合でも、適切な有効量は、慣用的な実験を使用して当業者が決定できることが理解される。

【0152】

開示の方法のいくつかの実施形態では、個体は哺乳動物である。いくつかの実施形態では、哺乳動物はヒトである。いくつかの実施形態では、個体は、細胞表面リガンド又は抗原を介する細胞シグナル伝達の阻害に関連する疾患を有する、又は有する疑いがある。本開示の組成物及び方法によって治療されるのに適した疾患としては、がん、自己免疫疾患、炎症性疾患、及び感染性疾患が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、疾患は、がん又は慢性感染症である。

【0153】

10

20

30

40

50

T細胞におけるCARの設計、送達及び発現、並びに臨床グレードのCAR-T細胞集団の製造のための方法は、当該技術分野で公知である。例えば、Lee et al., Clin Cancer Res (2012) 18(10): 2780-90を参照。これは、参照によりその全体が本明細書に援用される。例えば、改変されたCARは、キメラ抗原受容体をコードする核酸配列を標的細胞ゲノムに効率的且つ安定的に組み込むレトロウイルスを用いてT細胞に導入することができる。例示的な方法は下の実施例2に記載されている。

【0154】

当該技術分野で公知の他の方法としては、レンチウイルス形質導入、トランスポゾンに基づく系、直接RNAトランスフェクション、及びCRISPR/Casシステム（例えば、Cas3、Cas4、Cas5、Cas5e（又はCasD）、Cas6、Cas6e、Cas6f、Cas7、Cas8a1、Cas8a2、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas10d、Cas12a（Cpf1）、Cas13a（C2c2）、Cas13b、Cas13d、CasF、CasG、CasH、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1（又はCasA）、Cse2（又はCasB）、Cse3（又はCasE）、CasX、CasY、Cse4（又はCasC）、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csz1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4、及びCu1966など、好適なCasタンパク質を用いたタイプI、タイプII、又はタイプIIIのシステム）が挙げられるが、それらに限定されない。

【0155】

いくつかの実施形態では、組み換えアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを送達に使用することができる。送達されるポリヌクレオチド、rep及びcap遺伝子、並びにヘルパーウイルス機能を含む、パッケージングされるAAVゲノムが細胞に提供されるrAAV粒子を生成する技術は、当該技術分野において標準的である。rAAVの作製には、以下の構成要素が単一の細胞（本明細書においてパッケージング細胞と呼ぶ）内に存在する必要がある：rAAVゲノム、rAAVゲノムとは別の（例えば、rAAVゲノムの中にはない）AAV rep及びcap遺伝子、並びにヘルパーウイルス機能。AAV rep及びcap遺伝子は、組み換えウイルスを誘導できる任意のAAV血清型に由来することができる。AAV血清型AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、AAV-12、AAV-13及びAAV rh.74を含むが、これらに限定されないrAAVゲノムITRとは異なるAAV血清型に由来することができる。偽型rAAVの作製は、例えば国際公開第01/83692号パンフレットに開示されている。

【0156】

CAR-T細胞は、例えば自己免疫疾患抗原に応答して生体外で増殖させた後、対象に治療有効量で再注入することができる。

【0157】

投与されるCAR-T細胞の正確な量は、対象の年齢、体重、疾患及び病態の程度の個体差を考慮して、医師によって決定されうる。

【0158】

T細胞療法の投与は、注入1回あたりの総細胞数、又は特に小児対象（例えば、患者）の場合、体重1kgあたりの細胞数で定めることができる。T細胞は移植（transfer）後に複製及び増殖するので、投与された細胞量は最終的な定常状態の細胞数とは異なる（not resemble）可能性がある。いくつかの実施形態では、本開示のCAR-T細胞を含む医薬組成物は、104~1010個の総細胞の投与量で投与することができる。別の実施形態では、本開示のCAR-T細胞を含む医薬組成物は、103~108（これらの範囲内のすべての整数値を含む）個の細胞/kg体重の投与量で投与する

10

20

30

40

50

ことができる。

【0159】

本開示のCAR-T細胞を含む組成物はまた、これらの投与量で複数回投与することもできる。細胞は、当該技術分野で公知の注入技術を用いて投与することができる（例えば、Rosenberg et al., New Engl J Med, (1988) 319:1676を参照）。特定の対象に対する最適な投与量及び治療レジメンは、疾患の徴候についてその対象をモニターし、それに応じて治療を調整することによって当業者が決めることができる。

【0160】

いくつかの実施形態では、例えば自己免疫疾患又は炎症性疾患の治療のための、本明細書で具体化されている組成物のいずれの投与も、例えば幹細胞、抗原提示細胞、脾臓などの他の細胞ベースの療法と組み合わせることができる。

10

【0161】

本開示の組成物は、当該技術分野で公知の方法で、且つ哺乳動物、特にヒトへの非経口投与に適した方法で調製することができ、組成物単独での治療有効量を、1つ又は複数の薬学的に許容される担体又は希釈剤とともに含む。

【0162】

本明細書で使用される「薬学的に許容される担体」という用語は、任意の好適な担体、希釈剤又は賦形剤を意味する。これらには、抗酸化剤、緩衝剤及び溶質を含有しうる、意図するレシピエントの血液と組成物を等張にするすべての水性及び非水性等張無菌注射液；懸濁剤及び増粘剤を含む水性及び非水性無菌懸濁液、分散媒、抗真菌及び抗菌剤、等張（isotonic）及び吸収剤並びに同種のもが含まれる。本開示の組成物は、他の補助的な生理活性剤も含みうるということが理解されるであろう。

20

【0163】

担体は、組成物の他の成分と適合性があり、対象に害を与えないという意味で、薬学的に「許容され」なければならない。組成物には、皮下、筋肉内、静脈内及び皮内投与を含む非経口投与に適したものが含まれる。組成物は、単位投与形態で簡便に提供ことができ、薬学の技術分野で周知の任意の方法によって調製することができる。そのような方法には、CAR-T細胞との結合のための担体を調製することが含まれる。一般に、組成物は、任意の有効成分を液体担体と均一に且つよく混合することによって調製される。

30

【0164】

いくつかの実施形態では、組成物は非経口投与に好適である。別の実施形態では、組成物は静脈内投与に好適である。

【0165】

非経口投与に適した組成物としては、抗酸化剤、緩衝剤、殺菌剤及び溶質を含有しうる、意図するレシピエントの血液と組成物を等張にする水性及び非水性等張無菌注射液；並びに懸濁剤及び増粘剤を含みうる水性及び非水性無菌懸濁液が挙げられる。

【0166】

追加療法

上述したように、本明細書に開示の組成物、例えば、本明細書に開示のキメラ受容体、組み換え核酸、組み換え細胞、細胞培養物、及び医薬組成物のいずれか1つは、単一療法（single therapy）（例えば、単剤療法）として、それを必要とする対象に投与することができる。追加として又は代替として、本開示のいくつかの実施形態では、本明細書に記載のキメラ受容体、組み換え核酸、組み換え細胞、細胞培養物、及び医薬組成物は、1つ又は複数の追加の療法、例えば、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、又は5つの追加の療法と併用して対象に投与することができる。本開示の組成物と併用して投与される好適な療法としては、化学療法、放射線療法、免疫療法、ホルモン療法、毒素療法、標的療法、及び手術が挙げられるが、それらに限定されない。他の好適な療法としては、化学療法剤、抗がん剤などの治療薬及び抗がん療法が挙げられる。

40

【0167】

50

1つ又は複数の追加の療法と「併用」投与には、同時（*simultaneous*）（同時（*concurrent*））投与及び任意の順序での連続投与が含まれる。いくつかの実施形態では、1つ又は複数の追加の療法は、化学療法、放射線療法、免疫療法、ホルモン療法、毒素療法、及び手術からなる群から選択される。本明細書で使用される化学療法という用語は、抗がん剤を包含する。本明細書に開示の方法には、様々なクラスの抗がん剤を適宜使用することができる。抗がん剤の非限定的な例としては、アルキル化剤、代謝拮抗剤、アントラサイクリン、植物アルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤、ポドフィロトキシン、抗体（例えば、モノクローナル又はポリクローナル）、チロシンキナーゼ阻害剤（例えば、メシル酸イマチニブ（グリーベック（登録商標）又はグリベック（登録商標）））、ホルモン治療、可溶性受容体及び他の抗悪性腫瘍剤が挙げられる。

10

【0168】

本開示はまた、他の薬物とともに、且つ/又は手術などの他の治療レジメン若しくはモダリティ（*modalities*）にくわえて、本開示の組成物を併用することも企図する。本開示の組成物を既知の治療薬と併用する場合、その併用は、順次（連続的に、若しくは無治療期間で分けて）、又は同時に（*concurrently*）、又は混合物として投与することができる。例えば、自己免疫疾患の場合、治療には、本明細書で具体化されている組成物、例えば、本明細書で具体化されているCARで形質導入した、又はそれと接触させた自己T細胞、並びに1つ又は複数の抗炎症剤及び/又は治療薬を、対象に投与することが含まれる。抗炎症剤には、炎症促進性サイトカイン、例えば、IL-1や、TNF、IL-6、GM-CSF、IFN- などの炎症促進性サイトカインに特異的に結合する1つ又は複数の抗体が含まれる。いくつかの実施形態では、抗体は、抗TNF、抗IL-6又はそれらの組み合わせである。いくつかの実施形態では、抗体以外の、炎症促進性サイトカインを減少させる1つ又は複数の薬剤、例えば非ステロイド性抗炎症薬（NSAID）を投与することができる。炎症促進性サイトカインを減少させる抗体と1つ又は複数の薬剤の任意の組み合わせを投与することができる。

20

【0169】

併用治療はまた、本開示の組成物による治療の後に既知の治療を行う、又は既知の薬剤による治療の後に、例えば維持療法として本開示の組成物による治療を行うことを包含することも企図される。例えば、自己免疫疾患の治療では、Tリンパ球やBリンパ球などの免疫細胞の過剰で且つ長期の活性化、及び主要な炎症促進性サイトカインである腫瘍壊死因子（TNF）の過剰発現は、インターロイキン-6（IL-6）や、インターロイキン-1（IL-1）、インターフェロンガンマ（IFN- ）などの他のメディエーターと一緒に、関節リウマチ（RA）、炎症性腸疾患（IBD）、クローン病（CD）、及び強直性脊椎炎（AS）の自己免疫性炎症反応の病理発生において中心的な役割を果たす。

30

【0170】

非ステロイド性抗炎症薬（NSAID）、グルココルチコイド、疾患修飾性疾患修飾性抗リウマチ薬（DMARD）は従来から自己免疫性炎症性疾患の治療に使用されている。NSAID及びグルココルチコイドは疼痛の緩和と炎症の抑制に有効であり、DMARDは炎症反応によって引き起こされる組織及び臓器の損傷を軽減する能力を有する。さらに最近では、RA及びその他の自己免疫疾患の治療は、TNFが疾患の発症に決定的に重要であることが発見され、大きく変わってきている。抗TNF生物製剤（インフリキシマブや、アダリムマブ、エタネルセプト、ゴリムマブ、セルトリズマブペゴルなど）は、自己免疫性炎症性疾患の管理の成果を著しく向上させた。

40

【0171】

非ステロイド性抗炎症薬は、鎮痛、解熱、及び抗炎症作用を有し、関節炎や頭痛のような状態の治療にしばしば使われる。NSAIDはシクロオキシゲナーゼ（COX）酵素を遮断することを通して痛みを和らげる。COXは、炎症及び痛みを引き起こすメディエーターであるプロスタグランジンの生成を促進する。NSAIDは様々な化学構造を有するが、それらのいずれも、類似した治療効果、例えば自己免疫性炎症反応の抑制を有する。

50

一般に、NSAIDは、従来の非選択的NSAIDと選択的シクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) 阻害剤の2つに大別される(総説については、P. Li et al., Front Pharmacol (2017) 8:460を参照)。

【0172】

抗TNF薬にくわえ、他の炎症性サイトカイン又は正常な免疫能をもつ(immunocompetent)分子を標的とする生物製剤も広く研究され、活発に開発されている。例えば、アバタセプトは、CTLA-4の細胞外ドメイン及びIgG1のFc画分との完全ヒト化融合タンパク質であり、抗TNF療法に対する反応が不十分なRA患者に対して承認されている。アバタセプトの主な免疫学的機序は、共刺激経路(CD80及びCD86)の選択的阻害とT細胞の活性化である。トシリズマブは、ヒト化抗IL-6受容体モノクローナル抗体であり、DMARD及び/又は抗TNF生物製剤に不耐容のRA患者に対して承認された。この治療mAbは、IL-6受容体の可溶性形態及び膜形態と結合することを通して、IL-6の膜貫通シグナル伝達を遮断する。IL-1(アナキンラ)、Th1免疫応答(IL-12/IL-23、ウステキヌマブ)、Th17免疫応答(IL-17、セクキヌマブ)及びCD20(リツキシマブ)を標的とする生物学的薬剤も、自己免疫疾患の治療に承認されている(総説については、P. Li et al., Front Pharmacol (2017) 8:460)を参照)。

10

【0173】

したがって、いくつかの実施形態では、本開示の方法は、本明細書に開示の組成物を単一療法(例えば、単剤療法)として対象に別々に投与することを含む。いくつかの実施形態では、本開示の組成物は、第2の療法と組み合わせた第1の療法として対象に施される。いくつかの実施形態では、第2の療法は、化学療法、放射線療法、免疫療法、ホルモン療法、毒素療法、及び手術からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、第1の療法及び第2の療法は同時に(concomitantly)施される。いくつかの実施形態では、第1の療法は第2の療法と同時に(at the same time)施される。いくつかの実施形態では、第1の療法及び第2の療法は順次施される。いくつかの実施形態では、第1の療法は第2の療法の前に施される。いくつかの実施形態では、第1の療法は第2の療法の後に施される。いくつかの実施形態では、第1の療法は第2の療法の前及び/又は後に施される。いくつかの実施形態では、第1の療法及び第2の療法は交替で施される。いくつかの実施形態では、第1の療法及び第2の療法は単一の製剤で一緒に施される。

20

30

【0174】

細胞の活性を調節するための方法

別の態様では、本明細書で提供されるのは、細胞の活性を調節するための様々な方法である。この方法は、(a)本明細書で提供されるいずれかの組み換え細胞の有効量を供給するステップ、及び(b)それと、選択されたリガンドを接触させるステップを含み、選択されたリガンドの細胞外リガンド結合ドメインへの結合は、リガンド誘導性タンパク質分解切断部位の切断を誘導し、細胞内シグナル伝達ドメイン及び転写調節因子を含む細胞内ドメインを放出し、放出された細胞内シグナル伝達ドメイン及び転写調節因子は組み換え細胞の活性を調節する。当業者は、本開示を読めば、開示の方法が生体内、生体外、又はインビトロで実施できることを理解するであろう。

40

【0175】

本明細書で提供される方法を用いて調節できる非限定的な例示的細胞活性は、遺伝子発現、増殖、アポトーシス、非アポトーシス死、分化、脱分化、遊走、遺伝子産物の分泌、細胞接着、及び細胞溶解活性が挙げられるが、それらに限定されない。

【0176】

いくつかの実施形態では、放出された転写調節因子は、細胞の遺伝子産物の発現を調節する。いくつかの実施形態では、放出された転写調節因子は、細胞における異種遺伝子産物の発現を調節する。異種遺伝子産物は、ネイティブ細胞には通常みられないもの、例えば、細胞によって通常産生されないものである。例えば、細胞は、異種遺伝子産物をコー

50

ドするヌクレオチド配列を含む核酸で遺伝子改変することができる。

【0177】

いくつかの実施形態では、異種遺伝子産物は、分泌遺伝子産物である。いくつかの実施形態では、異種遺伝子産物は細胞表面遺伝子産物である。場合によっては、異種遺伝子産物は細胞内遺伝子産物である。いくつかの実施形態では、放出された転写調節因子は、細胞における2つ以上の異種遺伝子産物を同時に調節する。

【0178】

いくつかの実施形態では、細胞における異種遺伝子産物は、ケモカイン、ケモカイン受容体、キメラ抗原受容体、サイトカイン、サイトカイン受容体、分化因子、成長因子、成長因子受容体、ホルモン、代謝酵素、病原体由来タンパク質、増殖誘導物質、受容体、RNA誘導型ヌクレアーゼ、部位特異的ヌクレアーゼ、T細胞受容体(TCR)、キメラ抗原受容体(CAR)、毒素、毒素由来タンパク質、転写調節因子、転写活性化因子、転写抑制因子、翻訳調節因子(translation regulator)、翻訳活性化因子、翻訳抑制因子、活性化免疫受容体、抗体、アポトーシス阻害剤、アポトーシス誘導因子、改変T細胞受容体、免疫活性化因子、免疫阻害剤、及び抑制性免疫受容体からなる群から選択される。

10

【0179】

いくつかの実施形態では、放出された転写調節因子は細胞の分化を調節し、その細胞は、免疫細胞、幹細胞、前駆(progenitor)細胞、又は前駆(predecessor)細胞である。

20

【0180】

本開示のキメラ受容体は、同一の結合ドメイン及びICDを用いたとき、標準的なSynNotch受容体よりも高い発現をもたらす。リガンド/結合ドメイン対及びそれらの親和性に依存して、本開示のキメラ受容体又はヒンジNotch受容体は、対応するSynNotch受容体よりも約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、又は約50%高い発現増強をもたらすことができる。

【0181】

さらに、本開示のキメラ受容体は、リガンド結合とは無関係に、T細胞の活性化の程度に応答する転写調節をもたらすことができる。例えば、T細胞で発現されたとき、本開示の受容体の一部は、T細胞が活性化されていないときのリガンド誘導シグナルと比較して、T細胞が活性化されたときに、より強いリガンド誘導シグナルをもたらす。これにより、例えばキメラ受容体リガンドが存在しないにもかかわらず活性化されたときに、T細胞応答を増強又は抑制することが望まれる場合、さらに柔軟な使用が可能になる。

30

【0182】

システム及びキット

また、本明細書で提供されるでは、本明細書で提供及び記載されるキメラ受容体、ヒンジNotch受容体、組み換え核酸、組み換え細胞、又は医薬組成物を含むシステム及びキット、並びにそれらを作製及び使用するための文書による説明書(written instructions)である。例えば、本明細書で提供される、いくつかの実施形態では、本明細書に記載のキメラ受容体、本明細書に記載のヒンジNotch受容体、本明細書に記載の組み換え核酸、本明細書に記載の組み換え細胞、本明細書に記載の医薬組成物の1つ又は複数を含むシステム及び/又はキットである。いくつかの実施形態では、本開示のシステム及び/又はキットは、提供されているキメラ受容体、ヒンジNotch受容体、組み換え核酸、組み換え細胞、又は医薬組成物のいずれかを個体に投与するのに使用される1つ又は複数のシリンジ(予め充填されたシリンジ)及び/又はカテーテル(予め充填されたシリンジを含む)をさらに含む。いくつかの実施形態では、キットは、所望の目的、例えば、細胞の活性を調節するため、標的がん細胞を阻害するため、又は治療を必要とする個体の健康状態(例えば、疾患)を治療するために、他のキット成分と同時(simultaneously)又は順次投与できる1つ又は複数の追加の治療剤を有することができる。

40

50

【0183】

上記のシステム及びキットのいずれかは、1つ又は複数の追加の試薬をさらに含むことができ、そのような追加の試薬は、希釈バッファー；再溶解溶液、洗浄バッファー、対照試薬、対照発現ベクター、陰性対照ポリペプチド、陽性対照ポリペプチド、キメラ受容体ポリペプチドをインビトロで作製するための試薬から選択することができる。

【0184】

いくつかの実施形態では、システム又はキットの構成要素は、別々の容器に入れることができる。いくつかの他の実施形態では、システム又はキットの構成要素は、単一の容器にまとめることができる。

【0185】

いくつかの実施形態では、システム又はキットは、本発明の方法を実行するためにキットの構成要素を使用するための説明書をさらに含むことができる。本発明の方法を実行するための説明書は、一般に好適な記録媒体に記録される。例えば、説明書は紙やプラスチックなどの基材に印刷することができる。説明書は、キットに添付文書として、キットの容器又はその構成要素のラベル（すなわち、包装又は副包装に伴って）などに提示することができる。説明書は、CD-ROM、ディスク、フラッシュドライブなど、好適なコンピュータ可読記憶媒体上に存在する電子記憶データファイルとして存在することができる。場合によっては、実際の説明書はキットに存在しないが、遠隔の情報源から（例えば、インターネットを介して）説明書を入手する手段を提供することができる。この実施形態の例としては、説明書を閲覧できる、且つ/又は説明書をダウンロードできるウェブアドレスを含むキットがある。説明書の場合と同様に、説明書を入手する手段は好適な基材に記録することができる。

【0186】

本開示で言及されている刊行物及び特許出願はすべて、個々の刊行物又は特許出願がそれぞれ参照により援用されることが具体的且つ個別に示されている場合と同程度に、参照により本明細書に援用される。

【0187】

本明細書に引用されているいずれ文献も先行技術であることを認めるものではない。参考文献の考察は、その著者が主張することを述べたものであり、本発明の発明者らは引用文献の正確性及び妥当性に異議を唱える権利を留保する。本明細書において、科学雑誌の論文、特許文献、及び教科書を含む多くの情報源を参照しているが、この参照は、それらの文献のいずれかが当該技術分野の一般的な知識の一部を形成していることを認めるものではないことが明確に理解されるであろう。

【0188】

本明細書で示されている一般的な方法の説明は、例示のみを目的としたものである。他の代替方法及び代替物は、本開示を検討すれば当業者には明らかであり、本出願の趣旨及び範囲に含まれるものとする。

【0189】

本明細書全体を通して、様々な特許、特許出願、及び他の種類の刊行物（例えば、雑誌論文、電子データベースエントリなど）が参照されている。本明細書で引用されているすべての特許、特許出願、及びその他の刊行物の開示は、すべての目的のために参照によりその全体が本明細書に引用される。

【0190】

本明細書に引用されているいずれ文献も先行技術であることを認めるものではない。参考文献の考察は、その著者が主張することを述べたものであり、本発明の発明者らは引用文献の正確性及び妥当性に異議を唱える権利を留保する。本明細書において、科学雑誌の論文、特許文献、及び教科書を含む多くの情報源を参照しているが、この参照は、それらの文献のいずれかが当該技術分野の一般的な知識の一部を形成していることを認めるものではないことが明確に理解されるであろう。

【実施例】

10

20

30

40

50

【0191】

本開示の実行には、別段の指示がない限り、当業者に周知の分子生物学、微生物学、細胞生物学、生化学、核酸化学、及び免疫学の従来技術が使われることになる。そのような技術は、上で引用した文献で十分に説明されている。

【0192】

さらなる実施形態は、以下の例においてさらに詳細に開示され、それらは例示として与えられるものであり、本開示又は特許請求の範囲を限定することを決して意図するものではない。

【0193】

実施例1：ハイブリッドSYNNOTCH CAR回路の設計

10

この実施例は、本明細書で提供される例示的なハイブリッドSynNotch CARの設計及び構築を示す。

【0194】

適切な共刺激ドメイン、CD3ゼータドメイン、Gal4-VP64及びGSリンカーを含む細胞内ドメインを、Twist製の遺伝子断片として合成した。受容体は、CD19、BCMA又はALPPL2を標的とするscFvを対応する受容体スカフォールド及び細胞内末端に融合させることによって構築した。すべての受容体は、膜ターゲティングのためのn末端CD8シグナルペプチド(MALPVTALLPLALLLHAARP、配列番号69)及び-flagPE(Biolegend 637310)を用いて表面発現を容易に決定するためのflagタグ(DYKDDDDK、配列番号70)を含有する。すべての初代T細胞実験のために、PGKプロモーターを含有する改変pHR'SIN:CSWベクターに受容体をクローニングした。

20

【0195】

また、pHR'SIN:CSWベクターを改変して、応答エレメントプラスミドを作った。5コピーのGal4 DNA結合ドメイン標的配列(GGAGCACTGTCCTCCGAACG、配列番号71)をミニマルpybTATAプロモーターの5'にクローニングした。応答エレメントプラスミドには、形質導入されたT細胞を容易に同定するために、mCitrine発現を恒常的に駆動するPGKプロモーターも含めた。すべての誘導性BFPベクターについて、BFPはGal4応答エレメントの3'にあるマルチプルクローニングサイトのBamHIサイトを介してクローニングした。すべてのコンストラクトはIn-fusionクローニング(クロンテック #ST0345)でクローニングした。

30

【0196】

図1Aは、考えられるすべての細胞内ドメインの構成の図である。ハイブリッドSynNotch CARドメインの詳細な図を図1Bに示す。さらに、理論に束縛されるものではないが、ハイブリッドSynNotch CARによって誘導される短期近位シグナル伝達及び長期転写シグナル伝達の原理を図1Cに示す。

【0197】

4-1BB共刺激ドメインを含むハイブリッドSynNotch CARの構成要素を下表1に記載する。本明細書において試験したハイブリッドSynNotch CARのN-JMDは、典型的なCD8aヒンジドメインのN末端断片から構成されるCD8aヒンジの短縮形態(truncated form)を含んだ。

40

【表 1 - 1】

表 1 4-1BB ハイブリッドSynNotch CARの受容体構成要素の説明

プラス ミドID	受容体の説明	ECD	N-JMD	TMD	STS	ICD 1	ICD 2	ICD 3
pRL_20 73	4-1BBハイブリッドSyn Notch CAR 立体構造1: 最初に4-1BB、それに 続いてGal4VP64、次に CD3ゼータで構成され る、4-1BB及びCD3ゼ ータ細胞内ドメインを付 加したヒンジNotch受 容体スキファールド	CD8aシグ ナルペプ チド、 my cタグ、抗 CD19 scFv	CD8a ヒン ジ	Notc h 1	Notc h 2	4-1BB	Gal4、 VP64	CD3ゼ ータ
pRL_20 74	4-1BBハイブリッドSyn Notch CAR 立体構造2: 最初にCD3ゼータ、そ れに続いて4-1BB、次 にGal4VP64で構成され る、4-1BB及びCD3ゼ ータ細胞内ドメインを付 加したヒンジNotch受 容体スキファールド	CD8aシグ ナルペプ チド、 my cタグ、抗 CD19 scFv	CD8a ヒン ジ	Notc h 1	Notc h 2	CD3ゼ ータ	4-1BB	Gal4 、VP6 4
pRL_20 75	4-1BBハイブリッドSyn Notch CAR 立体構造3: 最初にCD3ゼータ、そ れに続いてGal4VP64、 次に4-1BBで構成され る、4-1BB及びCD3ゼ ータ細胞内ドメインを付 加したヒンジNotch受 容体スキファールド	CD8aシグ ナルペプ チド、 my cタグ、抗 CD19 scFv	CD8a ヒン ジ	Notc h 1	Notc h 2	CD3ゼ ータ	Gal4、 VP64	4-1BB

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

pRL_20 76	4-1BBハイブリッドSyn Notch CAR 立体構造4: 最初に4-1BB、それに 続いてCD3ゼータ、次 にGal4VP64で構成され る、4-1BB及びCD3ゼ ータ細胞内ドメインを付 加したヒンジNotch受 容体スキファールド	CD8aシグ ナルペプ チド、 my cタグ、抗 CD19 scFv	CD8a ヒン ジ	Notc h 1	Notc h 2	4-1BB	CD3ゼ ータ	Gal4 、VP6 4
pRL_20 77	4-1BBハイブリッドSyn Notch CAR 立体構造5: 最初にGal4VP64、そ れに続いて4-1BB、次 にCD3ゼータで構成さ れる、4-1BB及びCD3ゼ ータ細胞内ドメインを 付加したヒンジNotch 受容体スキファールド	CD8aシグ ナルペプ チド、 my cタグ、抗 CD19 scFv	CD8a ヒン ジ	Notc h 1	Notc h 2	Gal4、 VP64	4-1BB	CD3ゼ ータ
pRL_20 78	4-1BBハイブリッドSyn Notch CAR 立体構造6: 最初にGal4VP64、そ れに続いてCD3ゼータ 、次に4-1BBで構成さ れる、4-1BB及びCD3ゼ ータ細胞内ドメインを 付加したヒンジNotch 受容体スキファールド	CD8aシグ ナルペプ チド、 my cタグ、抗 CD19 scFv	CD8a ヒン ジ	Notc h 1	Notc h 2	Gal4、 VP64	CD3ゼ ータ	4-1BB
pRL_20 97	Mycタグの代わりにFla gタグを用いた4-1BBハ イブリッドSynNotch C AR 立体構造1	CD8aシグ ナルペプ チド、 fl agタグ、 抗CD19 sc Fv	CD8a ヒン ジ	Notc h 1	Notc h 2	4-1BB	Gal4、 VP64	CD3ゼ ータ

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

pRL_2098	4 Mycタグの代わりにFLAGタグを用いた4-1BBハイブリッドSynNotch CAR 立体構造2	CD8aシグナルペプチド、FLAGタグ、抗CD19 scFv	CD8aヒンジ	Notch 1	Notch 2	CD3ゼータ	4-1BB	Gal4、VP64
pRL_2099	Mycタグの代わりにFLAGタグを用いた4-1BBハイブリッドSynNotch CAR 立体構造3	CD8aシグナルペプチド、FLAGタグ、抗CD19 scFv	CD8aヒンジ	Notch 1	Notch 2	CD3ゼータ	Gal4、VP64	4-1BB
pRL_2100	Mycタグの代わりにFLAGタグを用いた4-1BBハイブリッドSynNotch CAR 立体構造4	CD8aシグナルペプチド、FLAGタグ、抗CD19 scFv	CD8aヒンジ	Notch 1	Notch 2	4-1BB	CD3ゼータ	Gal4、VP64
pRL_2101	Mycタグの代わりにFLAGタグを用いた4-1BBハイブリッドSynNotch CAR 立体構造5	CD8aシグナルペプチド、FLAGタグ、抗CD19 scFv	CD8aヒンジ	Notch 1	Notch 2	Gal4、VP64	4-1BB	CD3ゼータ
pRL_2102	Mycタグの代わりにFLAGタグを用いた4-1BBハイブリッドSynNotch CAR 立体構造6	CD8aシグナルペプチド、FLAGタグ、抗CD19 scFv	CD8aヒンジ	Notch 1	Notch 2	Gal4、VP64	CD3ゼータ	4-1BB
pRL_2140	STSを除去した4-1BBを用いた4-1BBハイブリッドSynNotch CAR 立体構造4 (pRL_2100からUniprot Q07011: AA214-219を除去)	CD8aシグナルペプチド、FLAGタグ、抗CD19 scFv	CD8aヒンジ	Notch 1	Notch 2	noSTS 4-1BB	CD3ゼータ	Gal4、VP64

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

pRL_21 42	短縮4-1BBをもつ4-1BB ハイブリッドSynNotch CAR 立体構造4(2100 からUniprot Q07011: AA214-230を除去)	CD8aシグ ナルペプ チド、 fl agタグ、 抗CD19 sc Fv	CD8a ヒンジ	Notc h 1	Notc h 2	短縮4- 1BB	CD3ゼ ータ	Gal4 、VP6 4
pRL_21 84	2つの短縮4-1BB断片 をもつ4-1BBハイブリ ッドSynNotch CAR 立 体構造4	CD8aシグ ナルペプ チド、 fl agタグ、 抗CD19 sc Fv	CD8a ヒンジ	Notc h 1	Notc h 2	短縮4- 1BB、 短縮4- 1BB	CD3ゼ ータ	Gal4V P64
pRL_21 85	3つの短縮4-1BB断片 をもつ4-1BBハイブリ ッドSynNotch CAR 立 体構造4	CD8aシグ ナルペプ チド、 fl agタグ、 抗CD19 sc Fv	CD8a ヒンジ	Notc h 1	Notc h 2	短縮4- 1BB、 短縮4- 1BB、 短縮4- 1BB	CD3ゼ ータ	Gal4V P64
pRL_21 86	最小限4-1BBをもつ4-1 BBハイブリッドSynNot ch CAR 立体構造4(PRL _2100からUniprot Q07 011: AA214-230及びUn iprot Q07011: AA243- 255を除去)	CD8aシグ ナルペプ チド、 fl agタグ、 抗CD19 sc Fv	CD8a ヒンジ	Notc h 1	Notc h 2	最小限 4-1BB	CD3ゼ ータ	Gal4V P64
pRL_22 32	短縮4-1BBをもつ41BB ハイブリッドSynNotch CAR 立体構造4(pRL_2 100からUniprot Q0701 1: AA214-230を除去)	CD8aシグ ナルペプ チド、 fl agタグ、 抗BCMA sc Fv	CD8a ヒンジ	Notc h 1	Notc h 2	短縮4- 1BB	CD3ゼ ータ	Gal4 、VP6 4
pRL_22 34	短縮4-1BBをもつ41BB ハイブリッドSynNotch CAR 立体構造4(pRL_2 100からUniprot Q0701 1: AA214-230を除去)	CD8aシグ ナルペプ チド、 fl agタグ、 抗ALPPL2 scFv	CD8a ヒンジ	Notc h 1	Notc h 2	短縮4- 1BB	CD3ゼ ータ	Gal4 、VP6 4

10

20

30

40

【 0 1 9 8 】

さらに、表 1 に載せたそれぞれの構成要素が由来する参照配列を下の表 2 に示す。

50

【表 2 - 1】

表 2 : 4-1BB ハイブリッドSynNotch CARの配列参照 (sequence references)

プラスミドID	受容体	ECD	N-J MD	TMD	ICD (S TS)	ICD 1	ICD 2	ICD 3
PRL-2073	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-4-1BB-Gal4VP64-CD3ゼータ	Uniprot P01732: AA1-21、Uniprot P01106: AA410-419、FMC63 scFv配列 (ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566763/)	Uniproto1732: AA1-21、Uniproto1106: AA410-419、FMC63 scFv配列 (ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566763/)	Uniproto1732: AA1-21、Uniproto1106: AA410-419、FMC63 scFv配列 (ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566763/)	Uniproto1732: AA1-21、Uniproto1106: AA410-419、FMC63 scFv配列 (ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566763/)	Uniprot Q07011: AA214-255	Uniprot P04386: AA1-147、Uniprot P06492: AA437-447と、全部で4回反復するGSリンカー	Uniprot P20963-3: AA52-164
PRL-2074	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-CD3ゼータ-4-1BB-Gal4VP64	Uniprot P01732: AA1-21、Uniprot P01106: AA410-419、FMC63 scFv配列 (ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566763/)	Uniproto1732: AA1-21、Uniproto1106: AA410-419、FMC63 scFv配列 (ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566763/)	Uniproto1732: AA1-21、Uniproto1106: AA410-419、FMC63 scFv配列 (ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566763/)	Uniproto1732: AA1-21、Uniproto1106: AA410-419、FMC63 scFv配列 (ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566763/)	Uniprot P20963-3: AA52-164	Uniprot Q07011: AA214-255	Uniprot P04386: AA1-147、Uniprot P06492: AA437-447と、全部で4回反復するGSリンカー
PRL-2075	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-CD3ゼータ-Gal4VP64-4-1BB	Uniprot P01732: AA1-21、Uniprot P01106: AA410-419、FMC63 scFv配列 (ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566763/)	Uniproto1732: AA1-21、Uniproto1106: AA410-419、FMC63 scFv配列 (ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566763/)	Uniproto1732: AA1-21、Uniproto1106: AA410-419、FMC63 scFv配列 (ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566763/)	Uniproto1732: AA1-21、Uniproto1106: AA410-419、FMC63 scFv配列 (ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566763/)	Uniprot P20963-3: AA52-164	Uniprot P04386: AA1-147、Uniprot P06492: AA437-447と、全部で4回反復するGSリンカー	Uniprot Q07011: AA214-255

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

p R L - 2 0 7 6	抗CD19scFv- CD8ヒンジ2- Notch1TMD-N otch2STS-4- 1BB-CD3ゼー ター-Gal4VP64	Uniprot P0173 2: AA1-21、Un iprot P01106: AA410-419、F MC63 scFv配列 (ncbi.nlm.ni h.gov/pubmed/ 9566763/)	Uni pro t P 017 32: AA 138 -16 4	Uni pro t P 465 31: AA 173 6-1 757	Uni pro t Q 047 21: AA 170 1-1 706	Uniprot Q0 7011: AA21 4-255	Uniprot P2 0963-3 : A A52-164	Uniprot P0 4386: AA1- 147、Unipr ot P06492: AA437-447 と、全部で 4回反復す るGSリンカ ー	10
p R L - 2 0 7 7	抗CD19scFv- CD8ヒンジ2- Notch1TMD-N otch2STS-Ga l4VP64-4-1B B-CD3ゼータ	Uniprot P0173 2: AA1-21、Un iprot P01106: AA410-419、F MC63 scFv配列 (ncbi.nlm.ni h.gov/pubmed/ 9566763/)	Uni pro t P 017 32: AA 138 -16 4	Uni pro t P 465 31: AA 173 6-1 757	Uni pro t Q 047 21: AA 170 1-1 706	Uniprot P0 4386: AA1- 147、Unipr ot P06492: AA437-447 と、全部で 4回反復す るGSリンカ ー	Uniprot Q0 7011: AA21 4-255	Uniprot P2 0963-3 : A A52-164	20
p R L - 2 0 7 8	抗CD19scFv- CD8ヒンジ2- Notch1TMD-N otch2STS-Ga l4VP64-CD3 ゼータ-4-1B B	Uniprot P0173 2: AA1-21、Un iprot P01106: AA410-419、F MC63 scFv配列 (ncbi.nlm.ni h.gov/pubmed/ 9566763/)	Uni pro t P 017 32: AA 138 -16 4	Uni pro t P 465 31: AA 173 6-1 757	Uni pro t Q 047 21: AA 170 1-1 706	Uniprot P0 4386: AA1- 147、Unipr ot P06492: AA437-447 と、全部で 4回反復す るGSリンカ ー	Uniprot P2 0963-3 : A A52-164	Uniprot Q0 7011: AA21 4-255	30
p R L - 2 0 9 7	抗CD19scFv- CD8ヒンジ2- Notch1TMD-N otch2STS-4- 1BB-Gal4VP6 4-CD3ゼータ	Uniprot P0173 2: AA1-21、FL AGタグ?、FMC6 3 scFv配列 (n cbi.nlm.nih.g ov/pubmed/956 6763/)	Uni pro t P 017 32: AA 138 -16 4	Uni pro t P 465 31: AA 173 6-1 757	Uni pro t Q 047 21: AA 170 1-1 706	Uniprot Q0 7011: AA21 4-255	Uniprot P0 4386: AA1- 147、Unipr ot P06492: AA437-447 と、全部で 4回反復す るGSリンカ ー	Uniprot P2 0963-3 : A A52-164	40

【表 2 - 3】

PRL-201908	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-CD3ゼータ-4-1BB-Gal4VP64	Uniprot P01732: AA1-21、FLAGタグ?、FMC63 scFv配列 (ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566763/)	Uni pro t P 017 32: AA 138 -16 4	Uni pro t P 465 31: AA 173 6-1 757	Uni pro t Q 047 21: AA 170 1-1 706	Uniprot P20963-3 : AA52-164	Uniprot Q07011: AA214-255	Uniprot P04386: AA1-147、Uniprot P06492: AA437-447と、全部で4回反復するGSリンカー	10
PRL-20190909	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-CD3ゼータ-Gal4VP64-4-1BB	Uniprot P01732: AA1-21、FLAGタグ?、FMC63 scFv配列 (ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566763/)	Uni pro t P 017 32: AA 138 -16 4	Uni pro t P 465 31: AA 173 6-1 757	Uni pro t Q 047 21: AA 170 1-1 706	Uniprot P20963-3 : AA52-164	Uniprot Q07011: AA214-255	Uniprot Q04386: AA1-147、Uniprot P06492: AA437-447と、全部で4回反復するGSリンカー	20
PRL-20190900	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-4-1BB-CD3ゼータ-Gal4VP64	Uniprot P01732: AA1-21、FLAGタグ?、FMC63 scFv配列 (ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566763/)	Uni pro t P 017 32: AA 138 -16 4	Uni pro t P 465 31: AA 173 6-1 757	Uni pro t Q 047 21: AA 170 1-1 706	Uniprot Q07011: AA214-255	Uniprot P20963-3 : AA52-164	Uniprot P04386: AA1-147、Uniprot P06492: AA437-447と、全部で4回反復するGSリンカー	30
PRL-20190901	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-Gal4VP64-4-1BB-CD3ゼータ	Uniprot P01732: AA1-21、FLAGタグ?、FMC63 scFv配列 (ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566763/)	Uni pro t P 017 32: AA 138 -16 4	Uni pro t P 465 31: AA 173 6-1 757	Uni pro t Q 047 21: AA 170 1-1 706	Uniprot P04386: AA1-147、Uniprot P06492: AA437-447と、全部で4回反復するGSリンカー	Uniprot Q07011: AA214-255	Uniprot P20963-3 : AA52-164	40

10

20

30

40

50

【表 2 - 4】

p R L - 2 1 0 2	抗CD19scFv- CD8ヒンジ2- Notch1TMD-N otch2STS-Ga 14VP64-CD3 ゼータ-4-1B B	Uniprot P0173 2: AA1-21、FL AGタグ?、FMC6 3 scFv配列 (n cbi.nlm.nih.g ov/pubmed/956 6763/)	Uni pro t P 017 32: AA 138 -16 4	Uni pro t P 465 31: AA 173 6-1 757	Uni pro t Q 047 21: AA 170 1-1 706	Uniprot P0 4386: AA1- 147、Unipr ot P06492: AA437-447 と、全部で 4回反復す るGSリンカ ー	Uniprot P2 0963-3 : A A52-164	Uniprot Q0 7011: AA21 4-255
p R L - 2 1 4 0	抗CD19scFv- CD8ヒンジ2- Notch1TMD-N otch2STS-no STS4-1BB-CD 3ゼータ-Gal 4VP64	Uniprot P0173 2: AA1-21、FL AGタグ?、FMC6 3 scFv配列 (n cbi.nlm.nih.g ov/pubmed/956 6763/)	Uni pro t P 017 32: AA 138 -16 4	Uni pro t P 465 31: AA 173 6-1 757	Uni pro t Q 047 21: AA 170 1-1 706	Uniprot Q0 7011: AA22 0-255	Uniprot P2 0963-3 : A A52-164	Uniprot P0 4386: AA1- 147、Unipr ot P06492: AA437-447 と、全部で 4回反復す るGSリンカ ー
p R L - 2 1 4 2	抗CD19scFv- CD8ヒンジ2- Notch1TMD-N otch2STS-tr unc4-1BB-CD 3ゼータ-Gal 4VP64	Uniprot P0173 2: AA1-21、FL AGタグ?、FMC6 3 scFv配列 (n cbi.nlm.nih.g ov/pubmed/956 6763/)	Uni pro t P 017 32: AA 138 -16 4	Uni pro t P 465 31: AA 173 6-1 757	Uni pro t Q 047 21: AA 170 1-1 706	Uniprot Q0 7011: AA23 1-255	Uniprot P2 0963-3 : A A52-164	Uniprot P0 4386: AA1- 147、Unipr ot P06492: AA437-447 と、全部で 4回反復す るGSリンカ ー
p R L - 2 1 8 4	抗CD19scFv- CD8ヒンジ2- Notch1TMD-N otch2STS-tr unc4-1BBtru nc4-1BB-CD3 ゼータ-Gal4 VP64	Uniprot P0173 2: AA1-21、FL AGタグ?、FMC6 3 scFv配列 (n cbi.nlm.nih.g ov/pubmed/956 6763/)	Uni pro t P 017 32: AA 138 -16 4	Uni pro t P 465 31: AA 173 6-1 757	Uni pro t Q 047 21: AA 170 1-1 706	Uniprot Q0 7011: AA23 1-255、Uni prot Q0701 1: AA231-2 55	Uniprot P2 0963-3 : A A52-164	Uniprot P0 4386: AA1- 147、Unipr ot P06492: AA437-447 と、全部で 4回反復す るGSリンカ ー

10

20

30

40

50

【表 2 - 5】

p R L - 2 1 8 5	抗CD19scFv- CD8ヒンジ2- Notch1TMD-N otch2STS-tr unc4-1BBtru nc4-1BBtrun c4-1BB-CD3 ゼータ-Gal4 VP64	Uniprot P0173 2: AA1-21、FL AGタグ?、FMC6 3 scFv配列 (n cbi.nlm.nih.g ov/pubmed/956 6763/)	Uni pro t P 017 32: AA 138 -16 4	Uni pro t P 465 31: AA 173 6-1 757	Uni pro t Q 047 21: AA 170 1-1 706	Uniprot Q0 7011: AA23 1-255、Uni prot Q0701 1: AA231-2 55、Unipro t Q07011: AA231-255	Uniprot P2 0963-3 : A A52-164	Uniprot P0 4386: AA1- 147、Unipr ot P06492: AA437-447 と、全部で 4回反復す るGSリンカ ー	10
p R L - 2 1 8 6	抗CD19scFv- CD8ヒンジ2- Notch1TMD-N otch2STS-mi n4-1BB-CD3 ゼータ-Gal4 VP64	Uniprot P0173 2: AA1-21、FL AGタグ?、FMC6 3 scFv配列 (n cbi.nlm.nih.g ov/pubmed/956 6763/)	Uni pro t P 017 32: AA 138 -16 4	Uni pro t P 465 31: AA 173 6-1 757	Uni pro t Q 047 21: AA 170 1-1 706	Uniprot Q0 7011: AA23 1-242	Uniprot P2 0963-3 : A A52-164	Uniprot P0 4386: AA1- 147、Unipr ot P06492: AA437-447 と、全部で 4回反復す るGSリンカ ー	20
p R L - 2 2 3 2	抗BCMAscFv- CD8ヒンジ2- Notch1TMD-N otch2STS-tr unc41BB-CD3 z-Gal4VP64	Uniprot P0173 2: AA1-21、FL AGタグ?、BCMA -50 scFv配列 (米国特許出願 公開第2017/01 834.18 (A1) 号明細書)	Uni pro t P 017 32: AA 138 -16 4	Uni pro t P 465 31: AA 173 6-1 757	Uni pro t Q 047 21: AA 170 1-1 706	Uniprot Q0 7011: AA23 1-255	Uniprot P2 0963-3 : A A52-164	Uniprot P0 4386: AA1- 147、Unipr ot P06492: AA437-447 と、全部で 4回反復す るGSリンカ ー	30
p R L - 2 2 3 4	抗ALPPL2scF v-CD8ヒンジ 2-Notch1TMD -Notch2STS- trunc41BB-C D3z-Gal4VP6 4	Uniprot P0173 2: AA1-21、FL AGタグ?、M25 FYIA scFv配列 (https://pub med.ncbi.nlm. nih.gov/32868 383/)	Uni pro t P 017 32: AA 138 -16 4	Uni pro t P 465 31: AA 173 6-1 757	Uni pro t Q 047 21: AA 170 1-1 706	Uniprot Q0 7011: AA23 1-255	Uniprot P2 0963-3 : A A52-164	Uniprot P0 4386: AA1- 147、Unipr ot P06492: AA437-447 と、全部で 4回反復す るGSリンカ ー	40

【0199】

さらに、CD28共刺激ドメインを含む例示的なハイブリッドSynNotchCARを下の表3に記載する。

【表 3 - 1】

表 3 : CD28 ハイブリッドSynNotch CARの受容体構成要素の説明

プラスミドID	受容体の説明	ECD	N-JMD	TMD	ICD (S TS)
pRL_2080	CD28ハイブリッドSynNotch CAR 立体構造1: 最初にCD28、それに続いてGal4VP64、次にCD3ゼータで構成される、CD28及びCD3ゼータ細胞内ドメインを付加したヒンジNotch受容体スキファールド	CD8aシグナルペプチド、mycタグ、抗CD19 scFv	CD8a ヒンジ	Notch 1	Notch 2
pRL_2081	CD28ハイブリッドSynNotch CAR 立体構造2: 最初にCD3ゼータ、それに続いてCD28、次にGal4VP64で構成される、CD28及びCD3ゼータ細胞内ドメインを付加したヒンジNotch受容体スキファールド	CD8aシグナルペプチド、mycタグ、抗CD19 scFv	CD8a ヒンジ	Notch 1	Notch 2
pRL_2082	CD28ハイブリッドSynNotch CAR 立体構造3: 最初にCD3ゼータ、それに続いてGal4VP64、次にCD28で構成される、CD28及びCD3ゼータ細胞内ドメインを付加したヒンジNotch受容体スキファールド	CD8aシグナルペプチド、mycタグ、抗CD19 scFv	CD8a ヒンジ	Notch 1	Notch 2
pRL_2083	CD28ハイブリッドSynNotch CAR 立体構造4: 最初にCD28、それに続いてCD3ゼータ、次にGal4VP64で構成される、CD28及びCD3ゼータ細胞内ドメインを付加したヒンジNotch受容体スキファールド	CD8aシグナルペプチド、mycタグ、抗CD19 scFv	CD8a ヒンジ	Notch 1	Notch 2
pRL_2084	CD28ハイブリッドSynNotch CAR 立体構造5: 最初にGal4VP64、それに続いてCD28、次にCD3ゼータで構成される、CD28及びCD3ゼータ細胞内ドメインを付加したヒンジNotch受容体スキファールド	CD8aシグナルペプチド、mycタグ、抗CD19 scFv	CD8a ヒンジ	Notch 1	Notch 2

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

プラスミドID	受容体の説明	ECD	N-JMD	TMD	ICD (STS)
pRL_2085	CD28ハイブリッドSynNotch CAR 立体構造6: 最初にGal4VP64、それに続いてCD3ゼータ、次にCD28で構成される、CD28及びCD3ゼータ細胞内ドメインを付加したヒンジNotch受容体スキヤフォールド	CD8aシグナルペプチド、mycタグ、抗CD19 scFv	CD8a ヒンジ	Notch 1	Notch 2
pRL_2103	Mycタグの代わりにFlagタグを用いたCD28ハイブリッドSynNotch CAR 立体構造1	CD8aシグナルペプチド、flagタグ、抗CD19 scFv	CD8a ヒンジ	Notch 1	Notch 2
pRL_2104	Mycタグの代わりにFlagタグを用いたCD28ハイブリッドSynNotch CAR 立体構造2	CD8aシグナルペプチド、flagタグ、抗CD19 scFv	CD8a ヒンジ	Notch 1	Notch 2
pRL_2105	Mycタグの代わりにFlagタグを用いたCD28ハイブリッドSynNotch CAR 立体構造3	CD8aシグナルペプチド、flagタグ、抗CD19 scFv	CD8a ヒンジ	Notch 1	Notch 2
pRL_2106	Mycタグの代わりにFlagタグを用いたCD28ハイブリッドSynNotch CAR 立体構造4	CD8aシグナルペプチド、flagタグ、抗CD19 scFv	CD8a ヒンジ	Notch 1	Notch 2
pRL_2107	Mycタグの代わりにFlagタグを用いたCD28ハイブリッドSynNotch CAR 立体構造5	CD8aシグナルペプチド、flagタグ、抗CD19 scFv	CD8a ヒンジ	Notch 1	Notch 2
pRL_2108	Mycタグの代わりにFlagタグを用いたCD28ハイブリッドSynNotch CAR 立体構造6	CD8aシグナルペプチド、flagタグ、抗CD19 scFv	CD8a ヒンジ	Notch 1	Notch 2

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

プラスミドID	受容体の説明	ECD	N-JMD	TMD	ICD (S TS)
pRL_2144	STSを除去したCD28を用いたCD28ハイブリッドSynNotch CAR 立体構造4 (pRL_2106からUniprot P10747 : A A180-185を除去)	CD8aシグナルペプチド、flagタグ、抗CD19 scFv	CD8a ヒンジ	Notch 1	Notch 2
pRL_2146	短縮CD28を用いたCD28ハイブリッドSynNotch CAR 立体構造4 (pRL_2106からUniprot P10747 : AA180-188を除去)	CD8aシグナルペプチド、flagタグ、抗CD19 scFv	CD8a ヒンジ	Notch 1	Notch 2
pRL_2205	AA 配列 TPRRPを欠失したCD28を用いたCD28ハイブリッドSynNotch CAR 立体構造4 (pRL_2106からUniprot P10747 : AA195-199を除去)	CD8aシグナルペプチド、flagタグ、抗CD19 scFv	CD8a ヒンジ	Notch 1	Notch 2
pRL_2206	短縮し、且つAA 配列 TPRRPを欠失したCD28を用いたCD28ハイブリッドSynNotch CAR 立体構造4 (pRL_2106からUniprot P10747 : AA180-188及びAA195-199を除去)	CD8aシグナルペプチド、flagタグ、抗CD19 scFv	CD8a ヒンジ	Notch 1	Notch 2
pRL_2207	さらに短縮したCD28を用いたCD28ハイブリッドSynNotch CAR 立体構造4 (pRL_2106からUniprot P10747 : A A180-199を除去)	CD8aシグナルペプチド、flagタグ、抗CD19 scFv	CD8a ヒンジ	Notch 1	Notch 2

10

20

30

40

50

【表 4】

表 3 (続き)

プラスミドID	細胞内ドメイン1	細胞内ドメイン2	細胞内ドメイン3
pRL_2080	CD28	Gal4、VP64	CD3ゼータ
pRL_2081	CD3ゼータ	CD28	Gal4、VP64
pRL_2082	CD3ゼータ	Gal4、VP64	CD28
pRL_2083	CD28	CD3ゼータ	Gal4、VP64
pRL_2084	Gal4、VP64	CD28	CD3ゼータ
pRL_2085	Gal4、VP64	CD3ゼータ	CD28
pRL_2103	CD28	Gal4、VP64	CD3ゼータ
pRL_2104	CD3ゼータ	CD28	Gal4、VP64
pRL_2105	CD3ゼータ	Gal4、VP64	CD28
pRL_2106	CD28	CD3ゼータ	Gal4、VP64
pRL_2107	Gal4、VP64	CD28	CD3ゼータ
pRL_2108	Gal4、VP64	CD3ゼータ	CD28
pRL_2144	noSTS CD28	CD3ゼータ	Gal4、VP64
pRL_2146	短縮CD28	CD3ゼータ	Gal4、VP64
pRL_2205	TPRRPが欠失した CD28	CD3ゼータ	Gal4、VP64
pRL_2206	TPRRPが欠失した 短縮CD28	CD3ゼータ	Gal4、VP64
pRL_2207	完全に短縮したC D28	CD3ゼータ	Gal4、VP64

10

20

30

【0200】

さらに、CD28 ハイブリッドSynNotch CARの受容体構成要素の配列参照を下の表4に示す。

40

50

【表 5 - 1】

表 4. CD28 ハイブリッドSynNotch CARの配列参照

プラスミドID	受容体	ECD	N-JMD	TMD	ICD (STS)
pRL_2080	抗CD19scFv-CD8 ヒンジ2-Notch1 TMD-Notch2STS- CD28-Gal4VP64- CD3ゼータ	Uniprot P01732: AA1-21、Uniprot P01106: AA410-419、FMC63 scFv配列 (ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566763/)	Uniprot P01732: AA13 8-164	Uniprot P465 31: AA 1736-1 757	Uniprot Q047 21: AA 1701-1 706
pRL_2081	抗CD19scFv-CD8 ヒンジ2-Notch1 TMD-Notch2STS- CD3ゼータ-CD28 -Gal4VP64	Uniprot P01732: AA1-21、Uniprot P01106: AA410-419、FMC63 scFv配列 (ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566763/)	Uniprot P01732: AA13 8-164	Uniprot P465 31: AA 1736-1 757	Uniprot Q047 21: AA 1701-1 706
pRL_2082	抗CD19scFv-CD8 ヒンジ2-Notch1 TMD-Notch2STS- CD3ゼータ-Gal4 VP64-CD28	Uniprot P01732: AA1-21、Uniprot P01106: AA410-419、FMC63 scFv配列 (ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566763/)	Uniprot P01732: AA13 8-164	Uniprot P465 31: AA 1736-1 757	Uniprot Q047 21: AA 1701-1 706
pRL_2083	抗CD19scFv-CD8 ヒンジ2-Notch1 TMD-Notch2STS- CD28-CD3ゼータ -Gal4VP64	Uniprot P01732: AA1-21、Uniprot P01106: AA410-419、FMC63 scFv配列 (ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566763/)	Uniprot P01732: AA13 8-164	Uniprot P465 31: AA 1736-1 757	Uniprot Q047 21: AA 1701-1 706
pRL_2084	抗CD19scFv-CD8 ヒンジ2-Notch1 TMD-Notch2STS- Gal4VP64-CD28- CD3ゼータ	Uniprot P01732: AA1-21、Uniprot P01106: AA410-419、FMC63 scFv配列 (ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566763/)	Uniprot P01732: AA13 8-164	Uniprot P465 31: AA 1736-1 757	Uniprot Q047 21: AA 1701-1 706
pRL_2085	抗CD19scFv-CD8 ヒンジ2-Notch1 TMD-Notch2STS- Gal4VP64-CD3ゼ ータ-CD28	Uniprot P01732: AA1-21、Uniprot P01106: AA410-419、FMC63 scFv配列 (ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566763/)	Uniprot P01732: AA13 8-164	Uniprot P465 31: AA 1736-1 757	Uniprot Q047 21: AA 1701-1 706

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

pRL_21 03	抗CD19scFv-CD8 ヒンジ2-Notch1 TMD-Notch2STS- CD28-Gal4VP64- CD3ゼータ	Uniprot P01732: AA1-21、FLAGタグ? 、FMC63 scFv配列 (ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566763/)	Uniprot P01732: AA13 8-164	Unipro t P465 1736-1 757	Unipro t Q047 21: AA 1701-1 706
pRL_21 04	抗CD19scFv-CD8 ヒンジ2-Notch1 TMD-Notch2STS- CD3ゼータ-CD28 -Gal4VP64	Uniprot P01732: AA1-21、FLAGタグ? 、FMC63 scFv配列 (ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566763/)	Uniprot P01732: AA13 8-164	Unipro t P465 1736-1 757	Unipro t Q047 21: AA 1701-1 706
pRL_21 05	抗CD19scFv-CD8 ヒンジ2-Notch1 TMD-Notch2STS- CD3ゼータ-Gal4 VP64-CD28	Uniprot P01732: AA1-21、FLAGタグ? 、FMC63 scFv配列 (ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566763/)	Uniprot P01732: AA13 8-164	Unipro t P465 1736-1 757	Unipro t Q047 21: AA 1701-1 706
pRL_21 06	抗CD19scFv-CD8 ヒンジ2-Notch1 TMD-Notch2STS- CD28-CD3ゼータ -Gal4VP64	Uniprot P01732: AA1-21、FLAGタグ? 、FMC63 scFv配列 (ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566763/)	Uniprot P01732: AA13 8-164	Unipro t P465 1736-1 757	Unipro t Q047 21: AA 1701-1 706
pRL_21 07	抗CD19scFv-CD8 ヒンジ2-Notch1 TMD-Notch2STS- Gal4VP64-CD28- CD3ゼータ	Uniprot P01732: AA1-21、FLAGタグ? 9、FMC63 scFv配列 (ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566763/)	Uniprot P01732: AA13 8-164	Unipro t P465 1736-1 757	Unipro t Q047 21: AA 1701-1 706
pRL_21 08	抗CD19scFv-CD8 ヒンジ2-Notch1 TMD-Notch2STS- Gal4VP64-CD3ゼ ータ-CD28	Uniprot P01732: AA1-21、FLAGタグ? 、FMC63 scFv配列 (ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566763/)	Uniprot P01732: AA13 8-164	Unipro t P465 1736-1 757	Unipro t Q047 21: AA 1701-1 706
pRL_21 44	抗CD19scFv-CD8 ヒンジ2-Notch1 TMD-Notch2STS- noSTSCD28-CD3- Gal4VP64	Uniprot P01732: AA1-21、FLAGタグ? 、FMC63 scFv配列 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566763/)	Uniprot P01732: AA13 8-164	Unipro t P465 1736-1 757	Unipro t Q047 21: AA 1701-1 706

10

20

30

40

50

【表 5 - 3】

pRL_21 46	抗CD19scFv-CD8 ヒンジ2-Notch1 TMD-Notch2STS- truncCD28-CD3- Gal4VP64	Uniprot P01732: AA1-21、FLAGタグ? 、FMC63 scFv配列 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566763/)	Uniprot P01732: AA13 8-164	Uniprot P465 1736-1 757	Uniprot Q047 21: AA 1701-1 706
pRL_22 05	抗CD19scFv-CD8 ヒンジ2-Notch1 TMD-Notch2STS- CD28delTPRRP- CD3-Gal4VP64	Uniprot P01732: AA1-21、FLAGタグ? 、FMC63 scFv配列 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566763/)	Uniprot P01732: AA13 8-164	Uniprot P465 1736-1 757	Uniprot Q047 21: AA 1701-1 706
pRL_22 06	抗CD19scFv-CD8 ヒンジ2-Notch1 TMD-Notch2STS- truncCD28delTP RRP-CD3-Gal4VP 64	Uniprot P01732: AA1-21、FLAGタグ? 、FMC63 scFv配列 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566763/)	Uniprot P01732: AA13 8-164	Uniprot P465 1736-1 757	Uniprot Q047 21: AA 1701-1 706
pRL_22 07	抗CD19scFv-CD8 ヒンジ2-Notch1 TMD-Notch2STS- 完全truncCD28- CD3-Gal4VP64	Uniprot P01732: AA1-21、FLAGタグ? 、FMC63 scFv配列 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566763/)	Uniprot P01732: AA13 8-164	Uniprot P465 1736-1 757	Uniprot Q047 21: AA 1701-1 706

10

20

30

40

50

【表 6 - 1】

表 4. 続き

プラス ミドID	細胞内ドメイン1	細胞内ドメイン2	細胞内ドメイン3
pRL_208 0	Uniprot P10747 : AA180-2 20	Uniprot P04386: AA1-147 、Uniprot P06492: AA437- 447と、全部で4回反復す るGSリンカー	Uniprot P20963-3 : AA52-164
pRL_208 1	Uniprot P20963-3 : AA52- 164	Uniprot P10747 : AA180-2 20	Uniprot P04386: AA1 -147、Uniprot P0649 2: AA437-447と、全 部で4回反復するGS リンカー
pRL_208 2	Uniprot P20963-3 : AA52- 164	Uniprot P04386: AA1-147 、Uniprot P06492: AA437- 447と、全部で4回反復す るGSリンカー	Uniprot P10747 : AA 180-220
pRL_208 3	Uniprot P10747 : AA180-2 20	Uniprot P20963-3 : AA52- 164	Uniprot P04386: AA1 -147、Uniprot P0649 2: AA437-447と、全 部で4回反復するGS リンカー
pRL_208 4	Uniprot P04386: AA1-147 、Uniprot P06492: AA437- 447と、全部で4回反復す るGSリンカー	Uniprot P10747 : AA180-2 20	Uniprot P20963-3 : AA52-164
pRL_208 5	Uniprot P04386: AA1-147 、Uniprot P06492: AA437- 447と、全部で4回反復す るGSリンカー	Uniprot P20963-3 : AA52- 164	Uniprot P10747 : AA 180-220
pRL_210 3	Uniprot P10747 : AA180-2 20	Uniprot P04386: AA1-147 、Uniprot P06492: AA437- 447と、全部で4回反復す るGSリンカー	Uniprot P20963-3 : AA52-164

10

20

30

40

50

【表 6 - 2】

pRL_210 4	Uniprot P20963-3 : AA52-164	Uniprot P10747 : AA180-220	Uniprot P04386: AA1-147、Uniprot P06492: AA437-447と、全部で4回反復するGSリンカー
pRL_210 5	Uniprot P20963-3 : AA52-164	Uniprot P04386: AA1-147、Uniprot P06492: AA437-447と、全部で4回反復するGSリンカー	Uniprot P10747 : AA180-220
pRL_210 6	Uniprot P10747 : AA180-220	Uniprot P20963-3 : AA52-164	Uniprot P04386: AA1-147、Uniprot P06492: AA437-447と、全部で4回反復するGSリンカー
pRL_210 7	Uniprot P04386: AA1-147、Uniprot P06492: AA437-447と、全部で4回反復するGSリンカー	Uniprot P10747 : AA180-220	Uniprot P20963-3 : AA52-164
pRL_210 8	Uniprot P04386: AA1-147、Uniprot P06492: AA437-447と、全部で4回反復するGSリンカー	Uniprot P20963-3 : AA52-164	Uniprot P10747 : AA180-220
pRL_214 4	Uniprot P10747 : AA186-220	Uniprot P20963-3 : AA52-164	Uniprot P04386: AA1-147、Uniprot P06492: AA437-447と、全部で4回反復するGSリンカー
pRL_214 6	Uniprot P10747 : AA189-220	Uniprot P20963-3 : AA52-164	Uniprot P04386: AA1-147、Uniprot P06492: AA437-447と、全部で4回反復するGSリンカー
pRL_220 5	Uniprot P10747 : AA180-194、AA200-220	Uniprot P20963-3 : AA52-164	Uniprot P04386: AA1-147、Uniprot P06492: AA437-447と、全部で4回反復するGSリンカー

10

20

30

40

50

【表 6 - 3】

pRL_220 6	Uniprot P10747 : AA189-194、AA200-220	Uniprot P20963-3 : AA52-164	Uniprot P04386: AA1-147、Uniprot P06492: AA437-447と、全部で4回反復するGSリンカー
pRL_220 7	Uniprot P10747 : AA200-220	Uniprot P20963-3 : AA52-164	Uniprot P04386: AA1-147、Uniprot P06492: AA437-447と、全部で4回反復するGSリンカー

10

【 0 2 0 1】

さらに、41BB及びCD28共刺激ドメインを含む例示的なハイブリッドSynNotch CARを下を表5に記載する。

20

30

40

50

【表 7 - 1】

表 5 : 4 1 B B / C D 2 8 ハイブリッドSynNotch CARの受容体構成要素の説明。

プラスミドID	受容体の説明	ECD	N-JMD	TMD	STS	ICD 1	ICD 2	ICD 3
pRL_2194	短縮4-1BB (pRL_2100からUniprot Q07011: AA214-230を除去)及びCD28由来のPYAPモチーフ (Uniprot P10747: AA208-211)をもつ41BBハイブリッドSynNotch CAR 立体構造4	CD8aシグナルペプチド、flagタグ、抗CD19 scFv	CD8aヒンジ	Notch 1	Notch 2	CD28由来のPYAPモチーフをもつ短縮4-1BB	CD3ゼータ	Gal4、VP64
pRL_2195	短縮4-1BB (pRL_2100からUniprot Q07011: AA214-230を除去)及びCD28由来のYMNモチーフ (AA193をNからFに変異させたUniprot P10747: AA191-194)をもつ41BBハイブリッドSynNotch CAR 立体構造4	CD8aシグナルペプチド、flagタグ、抗CD19 scFv	CD8aヒンジ	Notch 1	Notch 2	CD28由来のYMN (NがFに変異)モチーフをもつ短縮41BB	CD3ゼータ	Gal4、VP64
pRL_2196	短縮4-1BB (pRL_2100からUniprot Q07011: AA214-230を除去)及びCD28由来のYMNTPRRPモチーフ (AA193をNからFに変異させたUniprot P10747: AA191-199)をもつ41BBハイブリッドSynNotch CAR 立体構造4	CD8aシグナルペプチド、flagタグ、抗CD19 scFv	CD8aヒンジ	Notch 1	Notch 2	CD28由来のYMNTPRRP (NがFに変異)モチーフをもつ短縮41BB	CD3ゼータ	Gal4、VP64

10

20

30

40

50

【表 7 - 2】

pRL_21 97	短縮4-1BB (pRL_2100 からUniprot Q07011: AA214-230を除去)及び CD28由来のAAYRSモチ ーフ(Uniprot P10747 : AA216-220)をもつ41 BBハイブリッドSynNot ch CAR 立体構造4	CD8aシグ ナルペプ チド、 fl agタグ、 抗CD19 sc Fv	CD8a ヒン ジ	Notc h 1	Notc h 2	CD28由 来のAA YRSモ チーフ をもつ 短縮4- 1BB	CD3ゼ ータ	Gal4 、VP6 4	10
pRL_22 33	短縮4-1BB (pRL_2100 からUniprot Q07011: AA214-230を除去)及び CD28由来のPYAPモチ ーフ (Uniprot P10747 : AA208-211)をもつ41B BハイブリッドSynNotc h CAR 立体構造4	CD8aシグ ナルペプ チド、 fl agタグ、 抗BCMA sc Fv	CD8a ヒン ジ	Notc h 1	Notc h 2	CD28由 来のPY APモチ ーフを もつ短 縮4-1B B	CD3ゼ ータ	Gal4 、VP6 4	20
pRL_22 35	短縮4-1BB (pRL_2100 からUniprot Q07011: AA214-230を除去)及び CD28由来のPYAPモチ ーフ (Uniprot P10747 : AA208-211)をもつ41B BハイブリッドSynNotc h CAR 立体構造4	CD8aシグ ナルペプ チド、 fl agタグ、 抗ALPPL2 scFv	CD8a ヒン ジ	Notc h 1	Notc h 2	CD28由 来のPY APモチ ーフを もつ短 縮4-1B B	CD3ゼ ータ	Gal4 、VP6 4	30

【 0 2 0 2 】

さらに、4 1 B B / C D 2 8 ハイブリッド S y n N o t c h C A R の受容体構成要素の配列参照を下の表 6 に示す。

【表 8】

表 6 41BB/CD28 ハイブリッドSynNotch CARの配列参照

プラスミド	受容体	ECD	N-JMD	TMD	ICD (STS)
pRL_21_94	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-trunc41BB-PYAP-CD3z-Gal4VP64	Uniprot P01732: AA1-21、FLAG TAG?、FMC63 scFv配列 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566763/)	Uniprot P01732 : AA138-164	Uniprot P46531 : AA1736-1757	Uniprot Q04721 : AA1701-1706
pRL_21_95	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-trunc41BB-YMFM-CD3z-Gal4VP64	Uniprot P01732: AA1-21、FLAG TAG?、FMC63 scFv配列 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566763/)	Uniprot P01732 : AA138-164	Uniprot P46531 : AA1736-1757	Uniprot Q04721 : AA1701-1706
pRL_21_96	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-trunc41BB-YFMTPRRP-CD3z-Gal4VP64	Uniprot P01732: AA1-21、FLAG TAG?、FMC63 scFv配列 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566763/)	Uniprot P01732 : AA138-164	Uniprot P46531 : AA1736-1757	Uniprot Q04721 : AA1701-1706
pRL_21_97	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-trunc41BB-AAIRS-CD3z-Gal4VP64	Uniprot P01732: AA1-21、FLAG TAG?、FMC63 scFv配列 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566763/)	Uniprot P01732 : AA138-164	Uniprot P46531 : AA1736-1757	Uniprot Q04721 : AA1701-1706
pRL_22_33	抗BCMAscFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-trunc41BB-PYAP-CD3z-Gal4VP64	Uniprot P01732: AA1-21、FLAG TAG?、BCMA-50 scFv配列 (米国特許出願公開第2017/01834.18 (A1) 号明細書)	Uniprot P01732 : AA138-164	Uniprot P46531 : AA1736-1757	Uniprot Q04721 : AA1701-1706
pRL_22_35	抗ALPPL2scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-trunc41BB-PYAP-CD3z-Gal4VP64	Uniprot P01732: AA1-21、FLAG TAG?、M25 FYIA scFv配列 (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32868383/)	Uniprot P01732 : AA138-164	Uniprot P46531 : AA1736-1757	Uniprot Q04721 : AA1701-1706

10

20

30

40

50

【表 9】

表 6 続き

プラスミドID	細胞内ドメイン1	細胞内ドメイン2	細胞内ドメイン3
pRL_2194	Uniprot Q07011: AA231-255、Uniprot P10747 : AA208-211	Uniprot P20963-3 : AA52-164 (WE USE U PENN CD 3ゼータ)	Uniprot P04386: AA1-147、Uniprot P06492: AA437-447と、全部で4回反復するGSリンカー
pRL_2195	Uniprot Q07011: AA231-255、AA193をNからFに変異させたUniprot P10747 : AA191-194	Uniprot P20963-3 : AA52-164 (WE USE U PENN CD 3ゼータ)	Uniprot P04386: AA1-147、Uniprot P06492: AA437-447と、全部で4回反復するGSリンカー
pRL_2196	Uniprot Q07011: AA231-255、AA193をNからFに変異させたUniprot P10747 : AA191-199	Uniprot P20963-3 : AA52-164	Uniprot P04386: AA1-147、Uniprot P06492: AA437-447と、全部で4回反復するGSリンカー
pRL_2197	Uniprot Q07011: AA231-255、Uniprot P10747 : AA216-220	Uniprot P20963-3 : AA52-164	Uniprot P04386: AA1-147、Uniprot P06492: AA437-447と、全部で4回反復するGSリンカー
pRL_2233	Uniprot Q07011: AA231-255、Uniprot P10747 : AA208-211	Uniprot P20963-3 : AA52-164	Uniprot P04386: AA1-147、Uniprot P06492: AA437-447と、全部で4回反復するGSリンカー
pRL_2235	Uniprot Q07011: AA231-255、Uniprot P10747 : AA208-211	Uniprot P20963-3 : AA52-164	Uniprot P04386: AA1-147、Uniprot P06492: AA437-447と、全部で4回反復するGSリンカー

10

20

30

40

【0203】

実施例 2 : 方法

この実施例では、本開示で使用されるさらなる方法を説明する。

【0204】

初代ヒトT細胞の単離と培養

初代CD4+及びCD8+T細胞を、アフレーシス後の匿名ドナーの血液からネガティブセレクションによって単離した(ステムセルテクノロジーズ(STEM CELL Technologies) #15062及び15063)。血液は、Blood Centers of the Pacific(カリフォルニア州サンフランシスコ)から、

50

大学治験審査委員会による承認を得て入手した。20%ヒトAB血清 (Valley Biomedical Inc.、#HP1022) 及び10%DMSOを含むRPMI-1640 (UCSF cell culture core) でT細胞を凍結保存した。解凍後、30単位/mLのIL-2 (NCI BRB Preclinical Repository) を補充した、X-VIVO15 (ロンザ (Lonza) #04-418Q)、5%ヒトAB血清及び10mM中和N-アセチルL-システイン (シグマアルドリッチ #A9165) からなるヒトT細胞培地でT細胞を培養した。同様の方法で単離したバルクCD3+細胞を用いて生体内実験を完了した。

【0205】

ヒトT細胞のレンチウイルス形質導入

Mirus TransIT-Lenti (ミラス (Mirus) #MIR6606) を用いて、pHR'SIN:CSW 導入遺伝子発現ベクター並びにウイルスパッケージングプラスミドpCMVdR8.91及びpMD2.Gを、Lenti-X 293T細胞 (クロンテック #11131D) にトランスフェクションすることによってパントロピックVSV-G偽型レンチウイルスを作製した。初代T細胞を同じ日に解凍し、培養24時間後、ヒトT-Activator CD3/CD28ダイナビーズ (ライフテクノロジーズ #11131D) を用いて細胞:ビーズ=1:3の比で刺激した。48時間後にウイルス上清を集め、初代T細胞をウイルスに24時間暴露した。T細胞刺激後5日目に、ダイナビーズを除去し、T細胞を選別し、細胞が休止状態になり、インビトロ又は生体内に使用可能になった10~14日目までT細胞を増殖させた。ベクトン・ディッキンソン (BD) FACS ARIA IIを用いて、T細胞をアッセイ用を選別した。

【0206】

がん細胞株

使用したがん細胞株は、K562骨髄性白血病細胞 (ATCC #CCL-243)、A549肺上皮がん細胞 (ATCC #CCL-18) 及びM28ヒト上皮型中皮腫細胞である。K562、A549及びM28はヒトCD19を安定的に発現するようにレンチウイルスで形質導入した。CD19 APC (バイオレジェンド (Biolegend) #302212) 又はBV421 (バイオレジェンド #302234) で細胞を染色することによって、CD19レベルを決定した。A549をさらに、核染色体mate 2を発現するように形質導入した。すべての細胞株を導入遺伝子の発現に関して選別した。

【0207】

回路誘導アッセイ

回路誘導を評価するために、初代ヒトT細胞をハイブリッドSynNotch CAR及びUAS促進性 (promoted) BFP遺伝子を含む応答エレメントで同時形質導入し、次いで、K562 (CD19の有無は問わない) と24~72時間1:1の比で共培養した。次いで、共培養細胞を遠心分離し、フローバッファー (flow buffer) (PBS+2%FBS) で2回洗浄し、希釈したDRAQ7を含むフローバッファーに再懸濁して生存性を評価した。洗浄した細胞を直ちにフローサイトメーターで分析してBFPの発現を評価した。

【0208】

インビトロ活性化アッセイ

表面活性化マーカーの発現を、CAR又はハイブリッドSynNotch CARシグナル伝達のいずれかによる短期活性化の尺度として使用した。活性化を判定するために、形質導入細胞を、K562 (CD19発現の有無は問わない) と1:1の比で24~72時間共培養した。次いで、共培養細胞を遠心分離し、フローバッファー (PBS+2%FBS) で2回洗浄し、表面活性化マーカーCD69、PD-1、CD25及びCD39を標的とする抗体のマスターミックスの50uLで染色した。染色した後に細胞をフローバッファーで2回洗浄し、DRAQ7を希釈したフローバッファーに再懸濁して生存性を評価した。染色された細胞を直ちにフローサイトメーターで分析し、活性化マーカーの発現

10

20

30

40

50

を評価した。

【0209】

インビトロサイトカイン分泌アッセイ

サイトカイン分泌を評価するために、形質導入された初代ヒトT細胞を、K562 (CD19発現の有無はとわない)と1:1の比で、18~24時間(一晚)、48時間(短期)又は96時間(長期)共培養した。一晚の共培養では、サイトカインの分泌を止めるためにブレフェルジンA (eBioscience #00-4506-51)及びモネンシン (VWR #420701-BL)を含めた。短期及び長期共培養の両方では、ブレフェルジンA及びモネンシン並びにK562の2回目のポラス投与を共培養に加え、染色を開始する前にさらに6時間培養した。共培養細胞をPBSで2回洗浄し、暗所で室温にて、50uLのFixable NEAR IR (インビトロジェン #L34975)で20分間染色した。次いで、蛍光標識タグ付き抗CD4抗体又は抗CD8抗体を含有するマスターミックスの50uLを細胞に加え、暗所で室温にて20分間インキュベートした。次いで、染色した細胞をフローバッファ (PBS+2%FBS)で2回洗浄した。次いで、染色した細胞を100uLのIC Fix Buffer (eBioscience #00-8222-49)に再懸濁し、暗所で4℃にて45分間インキュベートした。次いで、固定した細胞を1x透過バッファ (Permeabilization Buffer) (eBioscience #00-8333-56)で2回洗浄した。細胞内サイトカイン染色マスターミックスを、1x透過バッファに希釈した細胞内サイトカインTNFα、IL-2、IFNγ及びグランザイムBを標的とする蛍光標識タグ付き抗体で作った。洗浄した細胞を50uLのこのマスターミックスで、暗所で4℃にて30分間染色した。染色した細胞を1x透過バッファで2回洗浄し、100uLのフローバッファに再懸濁した。染色した細胞を直ちにフローサイトメーターで分析した。

【0210】

インビトロIncucyte標的殺傷アッセイ

mkate2を発現するCD19+A549細胞を平底96ウェルプレートに播種し、一晚培養して付着させた。形質導入した初代ヒトT細胞を遠心分離し、RPMIはX-IVIVO-15ベースの培地よりも蛍光が少ないので、Jurkat培地+30U/mL IL-2に再懸濁した (Jurkat培地 (RPMI-1640培地+10%FBS+1%ペニシリン-ストレプトマイシン (PenStrep)+1xGlutamax)。付着A549細胞から培地を除去し、形質導入したヒトT細胞を1:1の比で培養物に加えた。実験の過程で、Incucyteソフトウェアを用いて2時間ごとに画像を撮影した (条件間で異なるイメージング総アッセイ時間 (imaging total assay times) については関連図を参照)。

【0211】

インビトロ増殖アッセイ

形質導入したヒトT細胞を培養物から取り出し、CellTrace Far Red (CTFR) (インビトロジェン #C34564)を希釈したPBSで洗浄した。細胞を暗所で37℃にて20分間染色し、次いで、培養培地の染色量の5倍量のタンパク質を加え、さらに細胞を暗所で37℃にて5分間培養した。染色した細胞を遠心分離し、ヒトT細胞培地で洗浄した。K562細胞 (CD19発現の有無は問わない)をヒトT細胞培地で洗浄し、CTFRで染色したT細胞に1:1の比で加えた。共培養物を5日間インキュベートし、インキュベーションの途中で培地の変化が起こった。次いで、共培養物を遠心分離し、フローバッファ (PBS+2%FBS)で2回洗浄し、蛍光標識タグ付き抗CD8抗体を含有するマスターミックスの50μLで染色した。染色した後に、細胞をフローバッファ (PBS+2%FBS)で2回洗浄し、DRAQ7を希釈したフローバッファに再懸濁して生存性を評価した。染色した細胞を直ちにフローサイトメーターで分析し、CTFR色素の希釈度を評価した。

【0212】

生体内NaIm6研究

10

20

30

40

50

NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ(NSG)(UCSF LARC Breeding Core)マウスに、 0.5×10^6 個のルシフェラーゼ発現Na1m6細胞を尾静脈注射で投与した。腫瘍注射の4日後に、ハイブリッドSynNotch CAR又はCARを形質導入したT細胞を、腫瘍を有する動物に、眼窩後方注射で投与した(実験ごとに投与されたT細胞の数については図の詳細を参照)。IVIS Spectrum生体内イメージング(In Vivo Imaging)システムを用いて、一定の時点で生物発光イメージングを行って、腫瘍量を評価した。IP注射によって $200 \mu\text{L}$ の 15 mg/mL ルシフェリンを動物に投与し、12~20分間歩行させた後に、伏臥位及び仰臥位の画像を撮影した。生物発光強度に基づいて画像撮影時間を調整し、平均放射輝度 $[p/s/cm^2/sr]$ を腫瘍量の尺度として使用した。実験を通して、細菌感染を防ぐために、動物の飲料水にクラバモックス(ゾエティス(Zoetis)#55-101)補った。

10

【0213】

生体内M28研究

NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ(NSG)マウスに、CD19リガンドを発現するM28細胞 4×10^6 個の皮下注射で投与した。腫瘍注射の7日後に、 $3 \sim 6 \times 10^6$ 個のHybrid SynNotch CAR又はCAR導入T細胞を、眼窩後部注射で腫瘍をもつ動物に投与した。腫瘍をノギスで週2回測定し、次式を用いて腫瘍体積を算出した： $(\text{長さ} \times \text{幅}^2) / 2$ 。実験を通して、細菌感染を防ぐために、動物の飲料水にクラバモックスを補った。

20

【0214】

実施例3：ハイブリッドSYNNOTCH CARの発現及び回路誘導

この実施例は、本明細書で提供される例示的なハイブリッドSynNotch CARが、転写回路の発現を誘導し、ヒトT細胞を活性化できることを示す。

【0215】

簡単に説明すると、初代ヒトT細胞を抗CD3/抗CD28ダイナビーズ(ギブコ)で活性化し、受容体又は転写レポーターコンストラクトを発現する2つのレンチウイルスコンストラクトで形質導入した。4-1BB共刺激ドメイン(図2A)又はCD28共刺激ドメイン(図2C)をもつハイブリッドSynNotch CARを、最初のT細胞刺激の5日後に選別し、受容体とレポーターの二重陽性集団を精製した。回路誘導を評価するため、最初のT細胞刺激の14日後に、4-1BB共刺激ドメイン(図2B)又はCD28共刺激ドメイン(図2D)をもつ抗CD19受容体及びBFプレポーターを発現するT細胞を、K562細胞(上段(top))、又はCD19+K562細胞(下段(bottom))と48時間共培養した。その後、Fortessa X-50(BD)を使用して誘導性BFプレポーター遺伝子の転写活性化を測定した。

30

【0216】

図に示されているように、4-1BB又はCD28共刺激ドメインをもつハイブリッドSynNotch CARのいくつかの細胞内立体構造は、誘導性転写BFプレポーターエレメントの抗原非依存的誘導を示す(例えば、4-1BBの場合、立体構造1及び4、CD28の場合、立体構造1、2、4、5、及び6)。しかし、ハイブリッドSynNotch CARの他の細胞内立体構造は、BFプレポーターエレメントの抗原特異的誘導を示し、リガンド存在下でのみBFPを発現する(例えば、4-1BBの場合、立体構造2、3、5、及び6、CD28の場合、立体構造3)。このデータセットにより、4-1BB又はCD28共刺激ドメインのいずれかを組み込んだハイブリッドSynNotch CAR回路の特定立体構造が、抗原特異的に転写を誘導する能力が示されている。さらに、このデータセットから、細胞内ドメインの空間的立体構造が、リガンドの存在下でも非存在下でも受容体の挙動に影響を与えることが示されている。

40

【0217】

実施例4：ハイブリッドSYNNOTCH CAR活性化マーカーの発現

この実施例は、例示的なハイブリッドSynNotch CARで形質導入されたT細胞

50

胞の活性化マーカーの発現を示す。

【0218】

4-1BB共刺激ドメイン(図3A)又はCD28共刺激ドメイン(図3B)をもつ抗CD19受容体及びBFPレポーターを発現するT細胞を、上記のように作製した。形質導入した細胞を、K562細胞(灰色)又はCD19+K562細胞(薄い灰色)と48時間共培養した。その後、Fortessa X-50(BD)を使用して、活性化マーカーCD25、CD39、CD69及びPD-1の発現を測定した。図に示されているように、ハイブリッドSynNotch CAR T細胞は、同じ共刺激ドメインを使ったCAR対照と比較して、同様の平均蛍光強度及び全体的な割合(overall percentage)で活性化マーカーを発現する。さらに、ハイブリッドSynNotch CAR T細胞は、リガンド存在下でのみ活性化マーカーを発現する。合わせてまとめると、このデータセットから、ハイブリッドSynNotch CARは抗原と結合すると、その細胞内シグナル伝達ドメイン(4-1BB又はCD28、及びCD3ゼータ)を通じたシグナル伝達を機能的に誘導し、活性化マーカーの発現につながることを示されている。

10

【0219】

実施例5：ハイブリッドSYNNOTCH CARの増殖

この実施例は、例示的なハイブリッドSynNotch CARで形質導入されたT細胞の増殖を示す。

【0220】

4-1BB共刺激ドメイン又はCD28共刺激ドメインをもつ抗CD19受容体及びBFPレポーターを発現するT細胞を、上記のように作製した。形質導入した細胞をCell Trace Far Red(CTFR)で染色し、次いでK562細胞(灰色)又はCD19+K562細胞(青若しくは赤)と5日間共培養した。その後、Fortessa X-50(BD)を使用してCTFR色素の希釈度を測定した。

20

【0221】

図4に示されるように、ハイブリッドSynNotch CARは、リガンドと結合すると、CAR単独と同様の速度でT細胞増殖を誘導する。さらに、抗原が存在するとき、ハイブリッドSynNotch CAR T細胞は広範に(extensively)、特異的に増殖し、ハイブリッドSynNotch CAR T細胞の増殖応答は抗原特異的であることが示されている。まとめると、このデータセットから、ハイブリッドSynNotch CARは、抗原と結合すると、その細胞内シグナル伝達ドメイン(4-1BB又はCD28、及びCD3ゼータ)を通じた短期のシグナル伝達を機能的に誘導し、T細胞の増殖につながることを示されている。

30

【0222】

実施例6：ハイブリッドSYNNOTCH CARサイトカイン分泌

この実施例は、例示的なハイブリッドSynNotch CARで形質導入したT細胞によるサイトカイン分泌を示す。

【0223】

4-1BB共刺激ドメイン(図5A)又はCD28共刺激ドメイン(図5B)をもつ抗CD19受容体及びBFPレポーターを発現するT細胞を、上記のように作製した。形質転換細胞を、K562細胞(灰色)又はCD19+K562細胞(青若しくは赤)と共培養した。48時間後、プレフェルジンA、モネンシン及びK562細胞(CD19+発現の有無は問わない)の2回目のボラスを共培養に加えた。共培養物をさらに6時間インキュベートし、次いで形質導入細胞をFortessa X50(BD)を使用して、サイトカインである、グランザイムB、IFN γ 、IL-2、TNFの細胞内発現を評価した。図に示されているように、ハイブリッドSynNotch CARは、CAR単独と比較して、より低いサイトカイン(グランザイムBを除く)の発現を誘導する。このデータセットから、ハイブリッドSynNotch CARの共刺激ドメイン及びCD3ゼータドメインによって誘導されるシグナル伝達は、CARに対して(to the CA

40

50

R s)、種類又は機序、強さ、強度、又は時間の長さによって異なることが示唆される。

【0224】

実施例7：ハイブリッドSYNNOTCH CARによる標的の殺傷

この実施例は、例示的なハイブリッドSynNotch CARの細胞殺傷活性を示す。

【0225】

4-1BB共刺激ドメイン(図6A)又はCD28共刺激ドメイン(図6B)をもつ抗CD19受容体及びBFPレポーターを発現するT細胞を、上記のように作製した。CD19リガンド及び核染色mKate2を発現するA549細胞を、96ウェル平底プレートに24時間附着させ、次いで形質導入T細胞を1:1の比で加えた。プレートをIncucyteでインキュベートし、プレートの画像及び蛍光を2時間ごとに5日間撮った。イメージングソフトウェアを使用して、各時点における培養物中のA549 CD19+mKate2+細胞の数を算出した。各実験群について、A549細胞カウントをヒンジNotch実験群のものに対して正規化した。図に示されているように、ハイブリッドSynNotch CAR T細胞は、はCAR T細胞と同様の速度で標的細胞を殺傷する。このことは、インピトロの設定において、ハイブリッドSynNotch CARが、数日間にわたって標的細胞を殺傷するのに十分なT細胞の活性化及び細胞傷害性プログラムを誘導することを示している。

10

【0226】

実施例8：ハイブリッドSYNNOTCH CARの生体内有効性

この実施例は、本明細書で提供される例示的なハイブリッドSynNotch CARの生体内有効性を示す。

20

【0227】

図7Aに実験のタイムラインの説明を示す。NOD.Cg-PrkdcscidIl2rgtm1Wjl/SzJ(NSG)マウスに、 0.5×10^6 個のNa1m6-Luc-GFP腫瘍細胞を静脈内投与した。バルクCD3+T細胞に、上記のようにCD3-Gal4VP64-CD28細胞内ドメイン及びBFPレポーターをもつ抗CD19ハイブリッドSynNotch CARを同時形質導入した。簡単に説明すると、腫瘍注射の4日後に 0.5×10^6 個の形質転換CD3+T細胞を眼窩後注射で動物に投与した。IVIS Spectrumを用いたルシフェラーゼ分泌腫瘍細胞の生物発光イメージングを介して測定された腫瘍量を図7Bに示し、実験マウスの生存曲線を図7Cに示す。このデータは、生体内でハイブリッドSynNotch CAR T細胞が、CD28共刺激ドメインをもつCAR T細胞と同様に、Na1m6腫瘍を除去するのに有効であることを示している。生物発光を通して示されているように、Na1m6腫瘍量は、ハイブリッドSynNotch CAR投与群とCAR T細胞投与群の両方で初期には増加するが、その腫瘍量は減少し、最終的には腫瘍注入の約10日後に両投与群で消失した。生存曲線で示されているように、ハイブリッドSynNotch CAR群及びCAR群の動物は研究終了まで生存し、一方では非形質導入T細胞を投与された動物は腫瘍注入後18~28日目の間にその疾患により死亡する。これらのデータは、ハイブリッドSynNotch CAR T細胞が生体内で、腫瘍量を制御し、消失させるのに有効であることを示している。

30

40

【0228】

同様に、図10Aに実験のタイムラインの説明を示す。NOD.Cg-PrkdcscidIl2rgtm1Wjl/SzJ(NSG)マウスに、 4×10^6 個のCD19リガンド発現M28腫瘍細胞を皮下投与した。バルクCD3+T細胞に、10Bに示したICDをもつ抗CD19ハイブリッドSynNotch CAR及び上記のBFPレポーターを同時形質導入した。簡単に説明すると、腫瘍注射の7日後に 6×10^6 個の形質導入CD3+T細胞を眼窩後注射で動物に投与した。ノギスによる測定によって毎週評価した腫瘍体積を図10Bに示す。これらのデータは、CD19を標的とするハイブリッドSynNotch CAR T細胞、特にtrunc41BBドメインをもつT細胞が、PBS陰性対照と比較して腫瘍の除去(depletion)を誘導できることを示している。

50

【0229】

さらに、図14Aに実験のタイムラインの説明を示す。NOD.Cg-PrkdcscidIl2rgtm1Wjl/SzJ(NSG)マウスに、 4×10^6 個のCD19発現M28腫瘍細胞を皮下投与した。バルクCD3+T細胞に、14Bに示したICDをもつ抗CD19ハイブリッドSynNotch CAR及び上記のBFプレポーターを同時形質導入した。簡単に言えば、腫瘍注射の7日後に 3×10^6 個の形質導入CD3+T細胞を眼窩後注射で動物に投与した。ノギスによる測定によって毎週評価した腫瘍体積を図14Bに示す。これらのデータは、第3世代のCD19標的ハイブリッドSynNotch CAR T細胞が、第2世代のCD19標的CARと同様の腫瘍の除去を誘導できることを示している。

10

【0230】

そして、ALPPL2標的ハイブリッドSynNotch CARの生体内有効性を図16に示す。NOD.Cg-PrkdcscidIl2rgtm1Wjl/SzJ(NSG)マウスに、図14に記載のように、 4×10^6 個のM28腫瘍細胞を皮下投与した。バルクCD3+T細胞を、図に示したICDをもつ抗ALPPL2 CAR又は抗ALPPL2 ハイブリッドSynNotch CAR及び図2に記載のBFプレポーターと同時形質導入した。腫瘍注射の7日後に 3×10^6 個の形質導入CD3+T細胞を眼窩後注射で動物に投与した。ノギスによる測定によって腫瘍体積を毎週評価した。これらのデータは、第3世代のALPPL2標的ハイブリッドSynNotch CAR T細胞が、第2世代のALPPL2標的CARと同様の腫瘍の除去を誘導できることを示している。

20

【0231】

実施例9：最小化4-1BB又はCD28バリエーションは VARIANTS IMPROVE NF-KBシグナル伝達を向上させ、ノイズを減らす

この実施例は、4-1BBバリエーション及びCD28バリエーションによってもたらされたNF-kBシグナル伝達の向上及びノイズの減少を示す。

【0232】

図8Aは、野生型4-1BB及び4-1BBバリエーションのアラインメントを示し、「no STS」及び「trunc」4-1BB共刺激ドメインを作るために削除したアミノ酸を示している。図9Aは、野生型4-1BB及び4-1BBバリエーションのアラインメントを示し、「trunc41BB」、「min41BB」、及び「trunc41BB trunc41BB」共刺激ドメインを作るために削除したアミノ酸を示している。図11A及び12Aは、野生型CD28及びCD28バリエーションのアラインメントを示し、「no STS」、「trunc」、「CD28 TPRRP」、「truncCD28 TPRRP」、及び「完全 (fully) truncCD28」CD28共刺激ドメインを作るために削除したアミノ酸を示している。

30

【0233】

T細胞は、抗CD19ハイブリッドSynNotch CARと、4-1BBバリエーション又はCD28バリエーション及びBFプレポーターを発現するように上記のように同時形質導入した。上記のように回路誘導を評価した。図8B、9B、11B、及び12Bは、4-1BBバリエーション又はCD28バリエーションをもつハイブリッドSynNotch CARが、野生型4-1BBをもつハイブリッドSynNotch CARと同様の速度で、誘導後にT細胞の表面に発現することを示す。図8C、9C、11C、及び12Cは、「no STS」4-1BB、「trunc」4-1BB、「min41BB」、「trunc41bb trunc41bb」、「no STS」CD28、「trunc」CD28、及び「CD28 TPRRP」、「truncCD28 TPRRP」、及び「完全 truncCD28」をもつハイブリッドSynNotch CARが、誘導性転写回路の抗原依存的な誘導を維持する一方で、転写回路の抗原非依存的誘導はより少ないことを示している。このデータセットは、これらの受容体の抗原非依存的誘導は、受容体の抗原依存的な活性を低下させることなく、4-1BB又はCD28共刺激ドメインの改変を通して軽減できることを示している。

40

50

【 0 2 3 4 】

NF - Bの共通プロモーター下でmCherryレポーターを発現するようにJurkat細胞株を形質導入した。そのNF - Bレポーター細胞株を、抗CD19ハイブリッドSynNotch CARで形質導入し、CD19を発現するK562細胞と共培養した。NF - B活性の代用としてmCherryの発現を、共培養の24時間、48時間、及び72時間後に、フローサイトメトリーによって評価した。図8D及び9Dは、STSを除去する(「no STS」)、ドメインの最初の17個のアミノ酸を除去する(「trunc」)、又はドメインの最初の17個のアミノ酸及びドメインの最後の13個のアミノ酸を除去する(「min41BB」)ように4-1BBドメインを改変したとき、4-1BB共刺激ドメインによって誘導されるNF - Bシグナル伝達の強さは影響を受けないことを示している。これらのデータは、回路誘導のデータと合わせて、4-1BB共刺激ドメインへの改変が、抗原非依存活性をもつハイブリッドSynNotch CARを最適化でき、抗原依存的な転写回路誘導及びT細胞シグナル伝達の両方が可能な、より良い設計をもたらすことを示している。

10

【 0 2 3 5 】

上記のハイブリッドSynNotch CARの発現及びT細胞活性化活性のまとめを下の表8に示す。

20

30

40

50

【表 10 - 1】

表 8 試験結果の説明

プラスミドID	受容体	回路発現	T細胞活性化
pRL_2080	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-CD28-Gal4VP64-CD3ゼータ	なし (N/A)	なし
pRL_2081	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-CD3ゼータ-CD28-Gal4VP64	なし	なし
pRL_2082	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-CD3ゼータ-Gal4VP64-CD28	なし	なし
pRL_2083	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-CD28-CD3ゼータ-Gal4VP64	なし	なし
pRL_2084	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-Gal4VP64-CD28-CD3ゼータ	なし	なし
pRL_2085	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-Gal4VP64-CD3ゼータ-CD28	なし	なし
pRL_2103	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-CD28-Gal4VP64-CD3ゼータ	回路誘導はベースラインでノイズがある。受容体は抗原の存在下で非常に高い(>90%)回路発現を誘導する。	ベースラインでノイズが低く (Quiet)、CAR抗原の存在下と同様にT細胞活性化マーカーの発現を誘導する。
pRL_2104	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-CD3ゼータ-CD28-Gal4VP64	回路誘導はベースラインでノイズがある。受容体は抗原の存在下で高い(>90%)回路発現を誘導する。	ベースラインでノイズが低く、CAR抗原の存在下と同様にT細胞活性化マーカーの発現を誘導する。

10

20

30

40

50

【表 10 - 2】

pRL_2105	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-CD3ゼータ-Gal4VP64-CD28	回路誘導はベースラインでノイズが低い。受容体は抗原の存在下で低～中程度の(~40%)回路発現を誘導する。	ベースラインでノイズが低く、CAR抗原の存在下と同様にT細胞活性化マーカーの発現を誘導する。	
pRL_2106	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-CD28-CD3ゼータ-Gal4VP64	回路誘導はベースラインでノイズがある。受容体は抗原の存在下で高い(>90%)回路発現を誘導する。	ベースラインでノイズが低く、CAR抗原の存在下と同様にT細胞活性化マーカーの発現を誘導する。	10
pRL_2107	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-Gal4VP64-CD28-CD3ゼータ	回路誘導はベースラインでノイズがある。受容体は抗原の存在下で高い(>90%)回路発現を誘導する。	ベースラインでノイズが低く、CAR抗原の存在下と同様にT細胞活性化マーカーの発現を誘導する。	20
pRL_2108	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-Gal4VP64-CD3ゼータ-CD28	回路誘導はベースラインでノイズがある。受容体は抗原の存在下で高い(>90%)回路発現を誘導する。	ベースラインでノイズが低く、CAR抗原の存在下と同様にT細胞活性化マーカーの発現を誘導する。	30
pRL_2144	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-noSTSCD28-CD3z-Gal4VP64	回路誘導はベースラインでノイズがある。受容体は抗原の存在下で高い(>90%)回路発現を誘導する。	ベースラインでノイズが低く、CAR抗原の存在下と同様にT細胞活性化マーカーの発現を誘導する。	40

【表 1 0 - 3】

pRL_2146	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-truncCD28-CD3z-Gal4VP64	回路誘導はベースラインでノイズがある。受容体は抗原の存在下で高い(>90%)回路発現を誘導する。	ベースラインでノイズが低く、CAR抗原の存在下と同様にT細胞活性化マーカーの発現を誘導する。
pRL_2205	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-CD28delTPRRP-CD3z-Gal4VP64	回路誘導はベースラインでノイズがある。受容体は抗原の存在下で高い(>90%)回路発現を誘導する。	ベースラインでノイズが低く、CAR抗原の存在下と同様にT細胞活性化マーカーの発現を誘導する。
pRL_2206	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-truncCD28delTPRRP-CD3z-Gal4VP64	回路誘導はベースラインでノイズがより低い(quiete r)。受容体は抗原の存在下で高い(>90%)回路発現を誘導する。	ベースラインでノイズが低く、CAR抗原の存在下と同様にT細胞活性化マーカーの発現を誘導する。
pRL_2207	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-完全truncCD28-CD3z-Gal4VP64	回路誘導はベースラインでノイズがより低い。受容体は抗原の存在下で高い(>90%)回路発現を誘導する。	ベースラインでノイズが低く、CAR抗原の存在下と同様にT細胞活性化マーカーの発現を誘導する。
pRL_2073	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-41BB-Gal4VP64-CD3ゼータ	回路誘導はベースラインでノイズがある。受容体は抗原の存在下で高い(>70%)回路発現を誘導する。	ベースラインでノイズが低く、CAR抗原の存在下と同様にT細胞活性化マーカーの発現を誘導する。

10

20

30

40

50

【表 10 - 4】

pRL_2074	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-CD3ゼータ-41BB-Gal4VP64	回路はベースラインでノイズが低い。受容体 induces medium to high (>60%) 回路発現 抗原の存在下で	ベースラインでノイズが低く、CAR抗原の存在下と同様にT細胞活性化マーカーの発現を誘導する。	
pRL_2075	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-CD3ゼータ-Gal4VP64-41BB	回路はベースラインでノイズが低い。受容体は抗原の存在下で低い(~35%)回路発現を誘導する。	ベースラインでノイズが低く、CAR抗原の存在下と同様にT細胞活性化マーカーの発現を誘導する。	10
pRL_2076	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-41BB-CD3ゼータ-Gal4VP64	回路はベースラインで非常に高いノイズがある (very noisy)。受容体は抗原の存在下で高い(>90%)回路発現を誘導する。	ベースラインでノイズが低く、CAR抗原の存在下と同様にT細胞活性化マーカーの発現を誘導する。	20
pRL_2077	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-Gal4VP64-41BB-CD3ゼータ	回路誘導はベースラインでノイズが低い。受容体は抗原の存在下で中程度~高い(>60%)回路発現を誘導する。	ベースラインでノイズが低く、CAR抗原の存在下と同様にT細胞活性化マーカーの発現を誘導する。	30
pRL_2078	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-Gal4VP64-CD3ゼータ-41BB	回路誘導はベースラインでノイズが低い。受容体は抗原の存在下で高い(>90%)回路発現を誘導する。	ベースラインでノイズが低く、CAR抗原の存在下と同様にT細胞活性化マーカーの発現を誘導する。	40

【表 10 - 5】

pRL_2097	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-41BB-Gal4VP64-CD3ゼータ	回路誘導はベースラインでノイズがある。受容体は抗原の存在下で非常に高い(>90%)回路発現を誘導する。	ベースラインでノイズが低く、CAR抗原の存在下と同様にT細胞活性化マーカーの発現を誘導する。	
pRL_2098	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-CD3ゼータ-41BB-Gal4VP64	回路はベースラインでノイズが低い。受容体は抗原の存在下で中程度～高い(>70%)回路発現を誘導する。	ベースラインでノイズが低く、CAR抗原の存在下と同様にT細胞活性化マーカーの発現を誘導する。	10
pRL_2099	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-CD3ゼータ-Gal4VP64-41BB	回路はベースラインでノイズが低い。受容体は抗原の存在下で低い(~35%)回路発現を誘導する。	ベースラインでノイズが低く、CAR抗原の存在下と同様にT細胞活性化マーカーの発現を誘導する。	20
pRL_2100	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-41BB-CD3ゼータ-Gal4VP64	回路はベースラインで非常に高いノイズがある。受容体は抗原の存在下で非常に高い(>90%)回路発現を誘導する。	ベースラインでノイズが低く、CAR抗原の存在下と同様にT細胞活性化マーカーの発現を誘導する。	30
pRL_2101	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-Gal4VP64-41BB-CD3ゼータ	回路誘導はベースラインでノイズが低い。受容体は抗原の存在下で高い(>90%)回路発現を誘導する。	ベースラインでノイズが低く、CAR抗原の存在下と同様にT細胞活性化マーカーの発現を誘導する。	40

【表 10 - 6】

pRL_2102	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-GaI4VP64-CD3ゼータ-41BB	回路誘導はベースラインでノイズが低い。受容体は抗原の存在下で非常に高い(>90%)回路発現を誘導する。	ベースラインでノイズが低く、CAR抗原の存在下と同様にT細胞活性化マーカーの発現を誘導する。	10
pRL_2140	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-noSTS41BB-CD3ゼータ-GaI4VP64	回路はベースラインでノイズがあるが、pRL_2100よりも少ない。受容体は抗原の存在下で高い(>85%)回路発現を誘導する。ベースラインでノイズが高いpRL_2100の若干改良されたバージョン (Some what improved version)。	ベースラインでノイズが低く、CAR抗原の存在下と同様にT細胞活性化マーカーの発現を誘導する。	20
pRL_2142	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-trunc41BB-CD3ゼータ-GaI4VP64	回路誘導はベースラインでノイズが低い。受容体は抗原の存在下で非常に高い(>90%)回路発現を誘導する。 ベースラインでノイズが高いpRL_2100のかなり改良されたバージョン (Much improved version)。	ベースラインでノイズが低く、CAR抗原の存在下と同様にT細胞活性化マーカーの発現を誘導する。	30

40

50

【表 10 - 7】

pRL_2184	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-trunc41BBtrunc41BB-CD3z-Gal4VP64	回路誘導はベースラインでノイズが低い。受容体は抗原の存在下で非常に高い(>90%)回路発現を誘導する。	ベースラインでノイズが低く、CAR抗原の存在下と同様にT細胞活性化マーカーの発現を誘導する。	10
pRL_2185	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-trunc41BBtrunc41BBtrunc41BB-CD3z-Gal4VP64			
pRL_2186	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-min41BB-CD3z-Gal4VP64	回路はベースラインでよりノイズがある。受容体は抗原の存在下で非常に高い(>90%)回路発現を誘導する。	ベースラインでノイズが低く、CAR抗原の存在下と同様にT細胞活性化マーカーの発現を誘導する。	20

【0236】

実施例10:「第3世代」バリエーション

この実施例は、trunc41BB共刺激ドメインのC末端に付加したCD28シグナル伝達モチーフの1つを含むバリエーションによってもたらされるノイズの減少を示す。

【0237】

図13Aは、野生型4-1BB及びCD28並びにバリエーションのアラインメントを示し、「trunc41BB PYAP」、「trunc41BB_YMFM」、「trunc41BB_YMFMTPRRP」、及び「trunc41BB AAYRS」共刺激ドメインを作るために削除及び/又は付加したアミノ酸を示している。

【0238】

「第3世代」バリエーションをもつ抗CD19ハイブリッドSynNotch CAR及びBFPレポーターを発現するように、T細胞を上記のように同時形質導入した。回路誘導を上記のように評価した。図13Bは、trunc41BB共刺激ドメインのC末端にCD28シグナル伝達モチーフの1つを付加したハイブリッドSynNotch CARが、野生型4-1BBをもつハイブリッドSynNotch CARと同様のレベルで、誘導後にT細胞の表面発現することを示している。図13Cは、「trunc41BB PYAP」、「trunc41BB_YMFM」、「trunc41BB_YMFMTPRRP」、及び「trunc41BB AAYRS」をもつハイブリッドSynNotch CARが、誘導性転写回路の抗原依存的誘導を維持し、転写回路の抗原非依存的誘導が低いことを示している。これらのデータは、これらの受容体の抗原非依存的転写調節及び抗原依存的転写調節が、CD28共刺激ドメインからのシグナル伝達モチーフの付加によって影響を受けないことを示している。

【0239】

10

20

30

40

50

上記のハイブリッドSynNotch CARの発現及び胞活性化活性のまとめを下の表9に示す。

【表11】

表9 試験結果の説明

プラスミドID	受容体	回路発現	T細胞活性化
pRL_2194	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-trunc41BB-PYAP-CD3z-Gal4VP64	回路誘導はベースラインでノイズが低い。受容体は抗原の存在下で高い回路発現を誘導する。	ベースラインでノイズが低く、CAR抗原の存在下と同様にT細胞活性化マーカーの発現を誘導する。
pRL_2195	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-trunc41BB-YMFM-CD3z-Gal4VP64	回路誘導はベースラインでノイズが低い。受容体は抗原の存在下で高い回路発現を誘導する。	ベースラインでノイズが低く、CAR抗原の存在下と同様にT細胞活性化マーカーの発現を誘導する。
pRL_2196	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-trunc41BB-YMFMPRRP-CD3z-Gal4VP64	回路誘導はベースラインでノイズが低い。受容体は抗原の存在下で高い回路発現を誘導する。	ベースラインでノイズが低く、CAR抗原の存在下と同様にT細胞活性化マーカーの発現を誘導する。
pRL_2197	抗CD19scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-trunc41BB-AAYRS-CD3z-Gal4VP64	回路誘導はベースラインでノイズが低い。受容体は抗原の存在下で高い回路発現を誘導する。	ベースラインでノイズが低く、CAR抗原の存在下と同様にT細胞活性化マーカーの発現を誘導する。

10

20

30

40

【0240】

実施例10：BCMA及びALPPL2標的バリエーション

41BB共刺激ドメインバリエーションをもつ抗BCMA又は抗ALPPL2ハイブリッドSynNotch CAR及びBFプレポーターを発現するように、T細胞を上記のように同時形質導入した。回路誘導を上記のように評価した。図15Aは、抗BCMA及び抗ALPPL2ハイブリッドSynNotch CARが、誘導後にT細胞の表面に発現することを示している。図15Bは、「trunc41BB」「trunc41BB PY

50

AP」をもつ抗BCMA及び抗ALPPLSハイブリッドSynNotch CARは、誘導性転写回路の抗原依存的誘導を維持する一方で、転写回路の抗原非依存的誘導はより少ないことを示している。このデータセットは、ハイブリッドSynNotch CAR スキャフォールドがscFvsを標的とする他の抗原と融合し、回路の抗原依存的転写調節及びT細胞活性化を維持できることを示している。

【0241】

上記のハイブリッドSynNotch CARの発現及び胞活性化活性のまとめを下の表10に示す。

【表12】

表10 試験結果の説明

プラスミドID	受容体	回路発現	T細胞活性化
pRL_2232	抗BCMAscFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-trunc41BB-CD3z-Gal4VP64	回路誘導はベースラインでノイズが低い。受容体は抗原の存在下で非常に高い(>70%)回路発現を誘導する。	ベースラインでノイズが低く、CAR抗原の存在下と同様にT細胞活性化マーカーの発現を誘導する。
pRL_2234	抗ALPPL2scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-trunc41BB-CD3z-Gal4VP64	回路誘導はベースラインでノイズが低い。受容体は抗原の存在下で非常に高い(>55%)回路発現を誘導する。	ベースラインでノイズが低く、CAR抗原の存在下と同様にT細胞活性化マーカーの発現を誘導する。
pRL_2233	抗BCMAscFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-trunc41BB-PYAP-CD3z-Gal4VP64	回路誘導はベースラインでノイズが低い。	ベースラインでノイズが低く、CAR抗原の存在下と同様にT細胞活性化マーカーの発現を誘導する。
pRL_2235	抗ALPPL2scFv-CD8ヒンジ2-Notch1TMD-Notch2STS-trunc41BB-PYAP-CD3z-Gal4VP64	回路誘導はベースラインでノイズが低い。受容体は抗原の存在下で高い回路発現を誘導する。	ベースラインでノイズが低く、CAR抗原の存在下と同様にT細胞活性化マーカーの発現を誘導する。

10

20

30

40

【表 13 - 1】

説明	配列	配列番号
ECD	MALPVTALLLPLALLLHAARPEQKLISEEDLDIQMTQTSSLSASLGDR VTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGS GTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGG SGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIROPPRK GLEWLGVWGETTYNSALKSRLTIKDNSKQVFLKMNSLQTDDTAI YYCAKHHYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS	1
ECD	MALPVTALLLPLALLLHAARPDYKDDDDKDIQMTQTSSLSASLGDRVT ISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGT DYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGSG GGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIROPPRKGL EWLGVWGETTYNSALKSRLTIKDNSKQVFLKMNSLQTDDTAIYY CAKHHYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS	2
連結 ポリペプチド	TTTPAPRPPTAPTIASQPLSLRPEAC	3
TMD	FMYVAAAFFVLLFFVGGCVLL	4
STS	SKRKRKH	5
GSリンカー	GSGSGSGS	6
ICD	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL	7
ICD	RVKFSRSADAPAYKQGQNLNLYNELNLRREEYDVLKRRGRDPEMGGKP RRKNQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATK DTYDALHMQUALPPR	8
ICD	MKLLSSEIQACDICRLKCLKSKEPKCAKCLKNNWECRYSPKTKRSPL TRAHLTEVESRLERLEQLFLIFPREDLDMILKMDSLQDIKALLTGLFV QDNVNKDAVTDRLASVETDMP LTLRQHRISATSSSEESSNKGQRQLTVS AAAGGSGSGGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDM GSDALDDFDLDM LGS	9
ICD	LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL	10
ICD	PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL	11
ICD	PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCE L	12
ICD	PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCE LPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL	13
ICD	PVQTTQEEDGCS	14
ICD	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	33

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 2】

全配列	MALPVTALLLPLALLLHAARPEQKLISEEDLDIQMTQTTSSLSASLGDR VTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGS GTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGG SGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRK GLEWLGVWGETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAI YYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACFMYVAAAFAVLLFFVGGVLLSKRKRKHGSGSGSGSKRGRKLL LYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELGSGSGSGSMKLLSS IEQACDICRLKCLKSKEKPKCAKCLKNNWECRYSPKTKRSPLTRAHLT EVESRLERLEQLFLLIFPREDLDMILKMDSLQDIKALLTGLFVQDNVNK DAVTDRLASVETDMPLTLRQHRISATSSSEESSNKGRQLTVSAAAGGS GGSGGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLMLGSDALD DFDLMLGSGSGSGSGSRVKFSRSADAPAYKQGQNLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	15	10
全配列	MALPVTALLLPLALLLHAARPEQKLISEEDLDIQMTQTTSSLSASLGDR VTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGS GTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGG SGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRK GLEWLGVWGETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAI YYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACFMYVAAAFAVLLFFVGGVLLSKRKRKHGSGSGSGSRVKFSRS ADAPAYKQGQNLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALH MQALPPRGSGSGSGSKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE EEEEGGCELGSGSGSGSMKLLSSIEQACDICRLKCLKSKEKPKCAKCL NNWECRYSPKTKRSPLTRAHLTEVESRLERLEQLFLLIFPREDLDMILK MDSLQDIKALLTGLFVQDNVNKDAVTDRLASVETDMPLTLRQHRISATS SSEESSNKGRQLTVSAAAGSGGGSDALDDFDLMLGSDALDDFDL DMLGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLMLGS	16	30

40

【表 1 3 - 4】

全配列	MALPVTALLLPLALLLHAARPEQKLI SEEDLDIQMTQTTSSLSASLGDR VTISCRASQDISKYL N WYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGS GTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGG SGGGGSEVKLQESG PGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRK GLEWLGVWGETTYNSALKSRLTI IKDNSKSQVFLKMNSLQDDTAI YYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPT IASQPLS LRPEACFMYVAAA FVLLFFVCGVLLSKRKRKHGSGSGSGSMKLLSSI EQACDICRLK LKCSKEKPKCAKCLKNNWECRYS PKTKRSPLTRAHLTE VESRLERLEQLFLLIFPREDLDMILKMDSLQDIKALLTGLFVQDNV NKD AVTDRLASVETDMPLTLRQHRISATSSSEESSNKGQRQLTVSAAAGGSG GSGGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLMLGSDALDD FDLMLGSGSGSGSGSKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF P EEEEGGCELGSGSGSGSRVKFSRSADAPAYKQQQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGDGLYQGLSTATKDYDALHMQALPPR	19	10
全配列	MALPVTALLLPLALLLHAARPEQKLI SEEDLDIQMTQTTSSLSASLGDR VTISCRASQDISKYL N WYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGS GTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGG SGGGGSEVKLQESG PGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRK GLEWLGVWGETTYNSALKSRLTI IKDNSKSQVFLKMNSLQDDTAI YYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPT IASQPLS LRPEACFMYVAAA FVLLFFVCGVLLSKRKRKHGSGSGSGSMKLLSSI EQACDICRLK LKCSKEKPKCAKCLKNNWECRYS PKTKRSPLTRAHLTE VESRLERLEQLFLLIFPREDLDMILKMDSLQDIKALLTGLFVQDNV NKD AVTDRLASVETDMPLTLRQHRISATSSSEESSNKGQRQLTVSAAAGGSG GSGGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLMLGSDALDD FDLMLGSGSGSGSGSRVKFSRSADAPAYKQQQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR GKGDGLYQGLSTATKDYDALHMQALPPRSGSGSGSGSKRGRKLLYIF KQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCEL	20	30

40

【表 1 3 - 9】

全配列	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPDYKDDDDKDIQMTQTSSLSASLGDRVT ISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGT DYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSG GGGSEVKLQESGGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGL EWLGVWGETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQDDTAIYY CAKHYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR PEACFMYVAAAFAVLLFFVGGVLLSKRKRKHGSGSGSGSPVQTTQEED GCSCRFPEEEEGGCELPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELGSGSGSGS RVKFSRSADAPAYKQGQNLYNELNLGRREYDVLDRRRGRDPEMGGKP RRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATK DTYDALHMQUALPPRGSGSGSGSMKLLSSIEQACDICRLKCLKSKEKPK CAKCLKNWECRYSPKTKRSPLTRAHLTEVESRLERLEQLFLLIFPRED LDMILKMSLQDIKALLTGLFVQDNVNKDAVTDRLASVETDMPLTLRQH RISATSSSESSNKQRQLTVSAAAGGSGSGSGSDALDDFDLMLGSDA LDDFDLMLGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLMLGS</p>	29	10
全配列	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPDYKDDDDKDIQMTQTSSLSASLGDRVT ISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGT DYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSG GGGSEVKLQESGGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGL EWLGVWGETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQDDTAIYY CAKHYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR PEACFMYVAAAFAVLLFFVGGVLLSKRKRKHGSGSGSGSPVQTTQEED GCSCRFPEEEEGGCELPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELPVQTTQEE DGCSCRFPEEEEGGCELGSGSGSGSRVKFSRSADAPAYKQGQNLYNEL NLGRREYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPRGSGSGSGSMK LLSSIEQACDICRLKCLKSKEKPKCAKCLKNWECRYSPKTKRSPLTR AHLTEVESRLERLEQLFLLIFPREDLDMILKMSLQDIKALLTGLFVQD NVNKA VTDRLASVETDMPLTLRQHRISATSSSESSNKQRQLTVSAA AGGSGSGSGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLMLGS DALDDFDLMLGS</p>	30	30

40

【表 1 3 - 1 0】

全配列	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPDYKDDDDKDIQMTQTTSSLASLGDRVT ISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGT DYSLTI SNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGSG GGGSEVKLQESGPGLVAPSQLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKL EWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQDDTAIYY CAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR PEACFMVAAAFAVLLFFVGGVLLSKRKRKHGSGSGSGSPVQTTQEED GCSGSGSGSGSRVKFSRSADAPAYKQQGNQLYNELNLGRREEYDVLDR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGD GLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPRSGSGSGSMKLLSIEQACDICRL KKLKCSKEPKCAKCLKNNWECRYSPKTKRSPLTRAHLTEVESRLERLE QLFLLIFPREDLDMILKMSLQDIKALLTGLFVQDNVKNDAVTDRLASV ETDMPLTLRQHRISATSSSEESSNKGQRQLTVSAAAGGSGSGSDALD DFDLMLGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLMLGS</p>	31
全配列	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPEQKLISEEDLIQMTQTTSSLASLGDR VTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGS GTDYSLTI SNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGG SGGGSEVKLQESGPGLVAPSQLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRK GLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQDDTAI YYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACFMVAAAFAVLLFFVGGVLLSKRKRKHGSGSGSGSRSKRSRL LHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSGSGSGSGSMKLLSSI EQACDICRLKKLKCSKEPKCAKCLKNNWECRYSPKTKRSPLTRAHLTE VESRLERLEQLFLLIFPREDLDMILKMSLQDIKALLTGLFVQDNVKNDA AVTDRLASVETDMPLTLRQHRISATSSSEESSNKGQRQLTVSAAAGGSG GSGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLMLGSDALDD FDLMLGSGSGSGSGSRVKFSRSADAPAYKQQGNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR</p>	32

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 1 3】

全配列	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPEQKLI SEEDLDIQMTQTSSLSASLGDR VTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGS GTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGG SGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRK GLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTI IKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAI YYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGSTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACFMYAAAAFVLLFFVCGVLLSKRKRKHGSGSGSGSMKLLSSI EQACDICRLKCLKSKEKPKCAKCLKNNWECRYSPKTKRSPLTRAHLTE VESRLERLEQLFLLIFPREDLDMILKMDSLQDIKALLTGLFVQDNVNKD AVTDRLASVETDMPLTLRQHRISATSSSESSNKQQRQLTVSAAAGGSG GSGGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLMLGSDALDD FDLMLGSGSGSGSGSRVKFSRSADAPAYKQQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDYDALHMQALPPRGSGSGSGSRKRSRLLHSD YMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS</p>	38	10
全配列	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPDYKDDDDKDIQMTQTSSLSASLGDRVT ISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGT DYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSG GGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGL EWLGVIWGSETTYNSALKSRLTI IKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYY CAKHYYYGGSYAMDYWGQGSTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR PEACFMYAAAAFVLLFFVCGVLLSKRKRKHGSGSGSGSRKRSRLLH SDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSGSGSGSGSMKLLSSIEQ ACDICRLKCLKSKEKPKCAKCLKNNWECRYSPKTKRSPLTRAHLTEVE SRLERLEQLFLLIFPREDLDMILKMDSLQDIKALLTGLFVQDNVNKDAV TDRLASVETDMPLTLRQHRISATSSSESSNKQQRQLTVSAAAGGSGGS GGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLMLGSDALDDFD LDMLGSGSGSGSGSRVKFSRSADAPAYKQQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDYDALHMQALPPR</p>	39	30

40

【表 1 3 - 1 6】

全配列	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPDYKDDDDKDIQMTQTTSSLSASLGDRVT ISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGT DYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGSG GGGSEVKLQESGPGLVAPSQLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKL EWLGVWGETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQDDTAIYY CAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR PEACFMYAAAAFVLLFFVCGVLLSKRKRKHGSGSGSGSMKLLSSIEQ ACDICRLKKLKSKEKPKCAKCLKNWECRYSPKTKRSPLTRAHLTEVE SRLERLEQLFLLIFPREDLDMILKMDSLQDIKALLTGLFVQDNVNKDAV TDRLASVETDMPLTLRQHRISATSSSEESSNKGQRQLTVSAAAGGSGGS GGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLMLGSDALDDFD LDMLGSGSGSGSGSRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRSGSGSGSRSKRSRLLHSDYM NMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS</p>	44
ECD	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPDYKDDDDKQVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYSFPDYINWVRQAPGGLEWGWVIFASGNSEYNQKFTGRVT MTRDTSINTAYMELSSLTSEDVAVYFCASLYDYDWYFDVWGGGTMVTVS SGGGGSGGGGSGGGSDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHSN GNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGIYYCSQSSIYPWTFGGGKLEIK</p>	45
ECD	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPDYKDDDDKQVQLQQSGGGLVKPGGSLRL SCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFT ISRDNKNTLYLQMDSLRAEDTAVYYCAKEGDSSRWSYDLWGRGTLVTV SSGGGSGGGGSGGGGQSALTPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGY NYVSWYQQHPGKAPKVMIIYDVTNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQ AEDEADYYCSSYTIASLTVVFGGKLTVL</p>	46

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 1 7】

全配列	MALPVTALLPLALLLHAARPDYKDDDDKQVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYSPFDYYINWVRQAPGGLEWMGWYIFASGNSEYNQKFTGRVT MTRDTSINTAYMELSSLTSEDVAVYFCASLYDYDWYFDVWGQGMVTVS SGGGGSGGGGSGGGSDIVMTQTPLSLSVTPGGPASI SCKSSQSLVHSN GNTYLHWYLGKPGQSPQLLIYKVSNRFSVGPDRFSGSGSGDFTLKISR VEAEDVGIYCSQSSIYPWTFGGGKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQP LSLRPEACFMVYAAAAFVLLFFVGGVLLSKRKRKHGSGSGSPVQTT QEEDGCSRFPEEEEGGCELGSGSGSGSRVKFSRSADAPAYKQGNQLY NELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGSGG SMKLLSSEIQACDICRLKKLKSKEKPKCAKCLKNWECRYSPKTKRSP LTRAHLTEVESRLERLEQLFLIFPREDLDMILKMDSLQDIKALLTGLF VQDNVNKDAVTDRLASVETDMPLTLRQHRISATSSSESSNKQRQLTV SAAAGSGSGGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLDM LGSDALDDFDLMLGS	47
全配列	MALPVTALLPLALLLHAARPDYKDDDDKQVQLQSGGGLVKPGGSLRL SCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFT ISRDNKNTLYLQMDSLRAEDTAVYYCAKEGDSRWSYDLWGRGTLVTV SSGGGSGGGGSGGGGQSAL TQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGY NYVSWYQQHPGKAPKVMYDVTNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQ AEDEADYYCASYTIASTLVVFGGGTKLTVLTTTPAPRPPTPAPTIASQP LSLRPEACFMVYAAAAFVLLFFVGGVLLSKRKRKHGSGSGSPVQTT QEEDGCSRFPEEEEGGCELGSGSGSGSRVKFSRSADAPAYKQGNQLY NELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGSGG SMKLLSSEIQACDICRLKKLKSKEKPKCAKCLKNWECRYSPKTKRSP LTRAHLTEVESRLERLEQLFLIFPREDLDMILKMDSLQDIKALLTGLF VQDNVNKDAVTDRLASVETDMPLTLRQHRISATSSSESSNKQRQLTV SAAAGSGSGGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLDM LGSDALDDFDLMLGS	48
ICD	LLHSDYMNMPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	49
ICD	SDYMNMPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	50
ICD	RSKRSRLLHSDYMNMPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	51
ICD	SDYMNMPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	52
ICD	GPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	53

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 2 0】

全配列	MALPVTALLLPLALLLHAARPDYKDDDDKDIQMTQTTSSLSASLGDRVT ISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGT DYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSG GGGSEVKLQESGPGLVAPSQLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKG EVLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSVFLKMNSLQDDTAIYY CAKHYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTAPTIASQPLSLR PEACFMYAAAAFVLLFFVGGGVLLSKRKRKHGSGSGSGSPTRKHYQP YAPPRDFAAYRSGSGSGSRVKFSRSADAPAYKQQNQLYNELNLGRR EEDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGDGLYQGLSTATKDYDALHMQUALPPRSGSGSGSMKLLSSI EQACDICRLKCLKSKEKPKCAKCLKNNWECRYSPKTRSPTRAHLTE VESRLERLEQLFLLIFPREDLDMILKMSLQDIKALLTGLFVQDNVND AVTDRLASVETDMLTLRQHRISATSSSEESSNKQRQLTVSAAAGGSG GSGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLMLGSDALDD FDLMLGS	58
ICD	PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELPYAP	59
ICD	PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELYMFM	60
ICD	PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELYMFMTPRRP	61
ICD	PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELAAYRS	62
全配列	MALPVTALLLPLALLLHAARPDYKDDDDKDIQMTQTTSSLSASLGDRVT ISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGT DYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSG GGGSEVKLQESGPGLVAPSQLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKG EVLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSVFLKMNSLQDDTAIYY CAKHYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTAPTIASQPLSLR PEACFMYAAAAFVLLFFVGGGVLLSKRKRKHGSGSGSGSPVQTTQEED GCSCRFPEEEEEGGCELPYAPGSGSGSGSRVKFSRSADAPAYKQQNQLY NELNLGRREEDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDYDALHMQUALPPRSGSGSG SMKLLSIEQACDICRLKCLKSKEKPKCAKCLKNNWECRYSPKTRSP LTRAHLTEVESRLERLEQLFLLIFPREDLDMILKMSLQDIKALLTGLF VQDNVNDAVTDRLASVETDMLTLRQHRISATSSSEESSNKQRQLTV SAAAGGSGGGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLDM LGSDALDDFDLMLGS	63

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 2 3】

全配列	MALPVTALLLPLALLLHAARPDYKDDDDKQVQLQQSGGGLVKPGGSLRL SCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFT ISRDNKNTLYLQMDSLRAEDTAVYYCAKEGDSSRWSYDLWGRGTLTV SSGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGY NYVSWYQQHPGKAPKVMIDVTNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQ AEDEADYYCSSYTIASLTVFVGGGKLTVLTTTPAPRPPTPAPTIASQP LSLRPEACFMYVAAAFFVLLFFVGCGLVLLSKRKRKHGSGSGSPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEEGGCELPYAPGSGSGSGSRVKFSRSADAPAYKQQQ NQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSG SGSGSMKLLSSIEQACDICRLKCLKSKEKPKCAKCLKNNWECRYSPKT KRSPLTRAHLTEVESRLERLEQLFLLIFPREDLDMILKMDSLQDIKALL TGLFVQDNVNKDAVTDRLASVETDMPLTLRQHRISATSSSEESSNKGQR QLTVSAAAGGSGGGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLMLGSDALDDF DLMLGSDALDDFDLMLGS	68	10
CD8 α シグナルペ プチド	MALPVTALLLPLALLLHAARP	69	
flagタグ	DYKDDDDK	70	
Gal4DNA結合ドメ イン標的配列	GGAGCACTGTCCTCCGAACG	71	20
			30
			40
			50

【 図 面 】

【 図 1 A 】

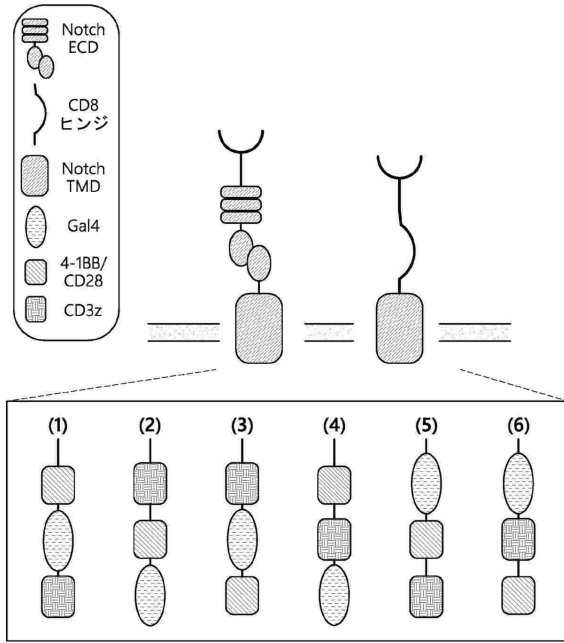


FIG. 1A

【 図 1 B 】

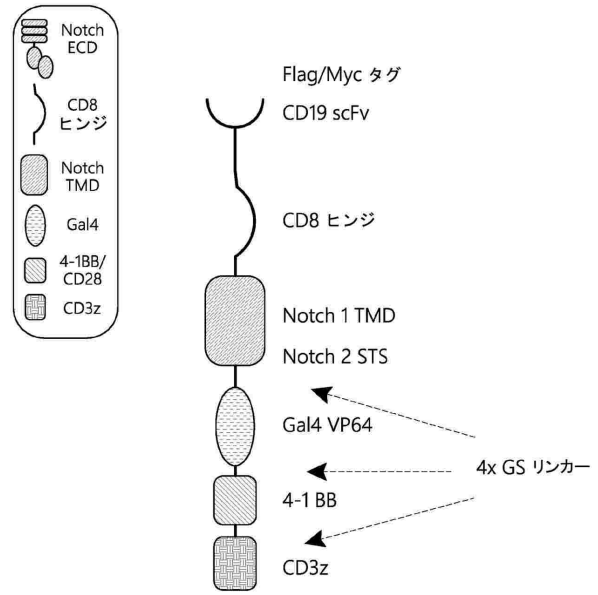


FIG. 1B

10

20

【 図 1 C 】

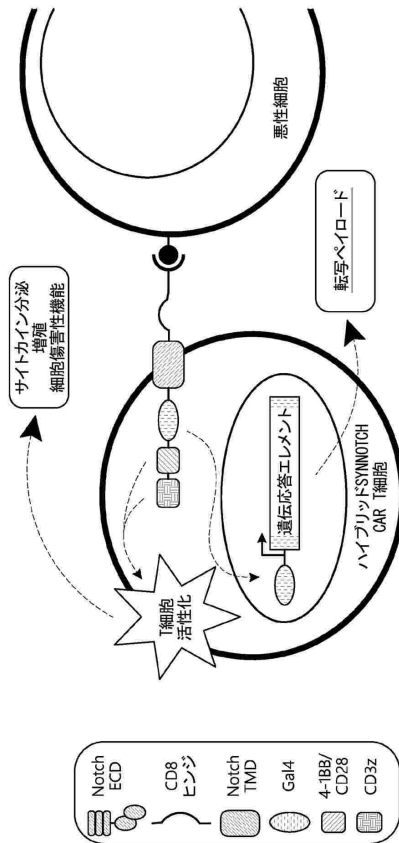


FIG. 1C

【 図 2 A 】

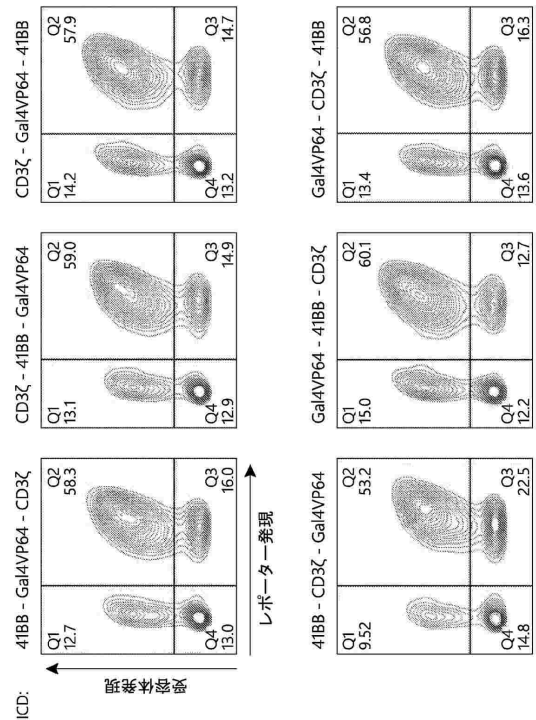


FIG. 2A

30

40

50

【 図 2 B 】

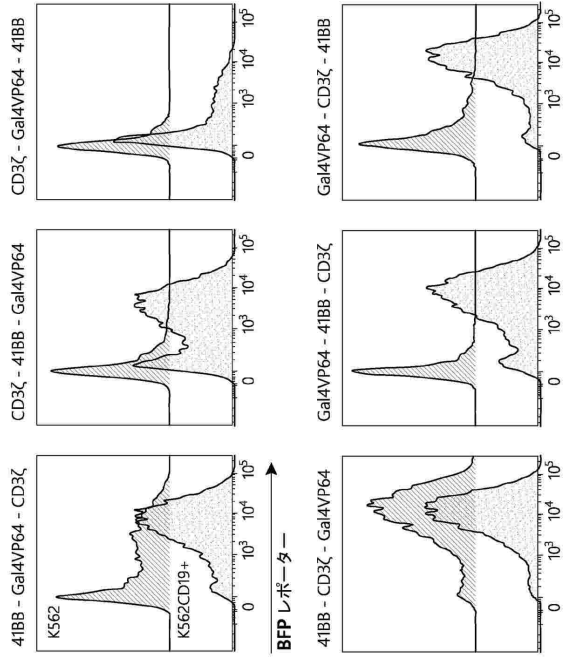


FIG. 2B

【 図 2 C 】

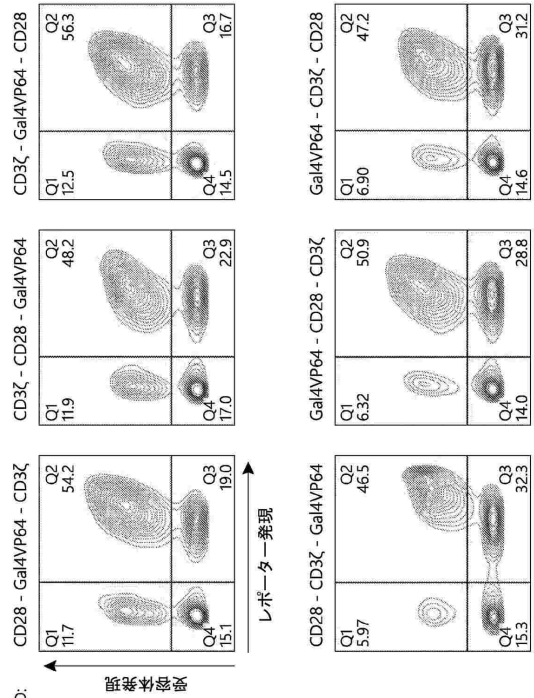


FIG. 2C

10

20

【 図 2 D 】

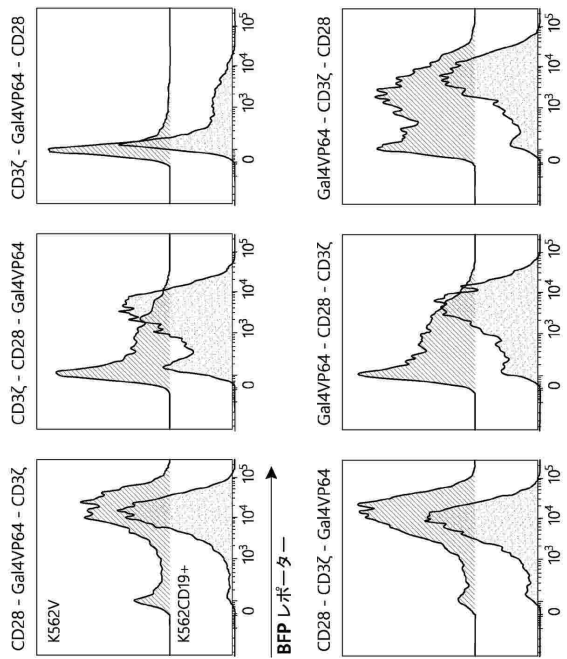


FIG. 2D

【 図 3 A - 1 】

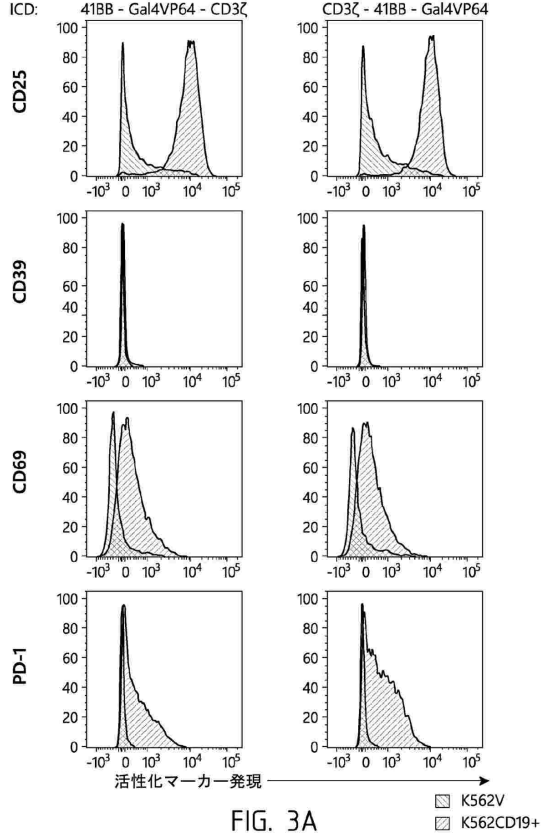


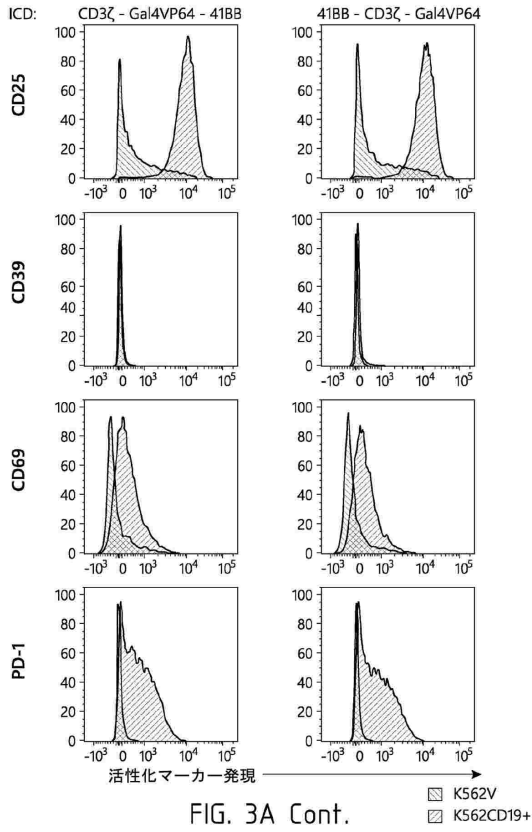
FIG. 3A

30

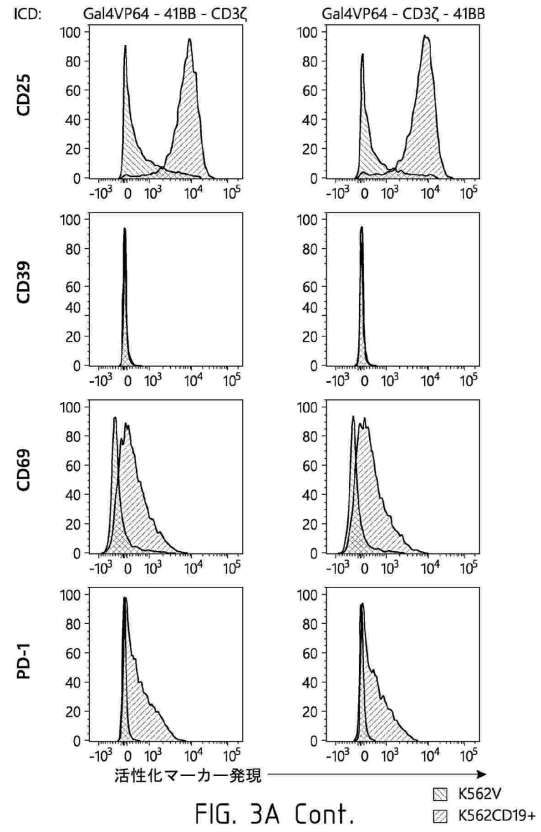
40

50

【 図 3 A - 2 】



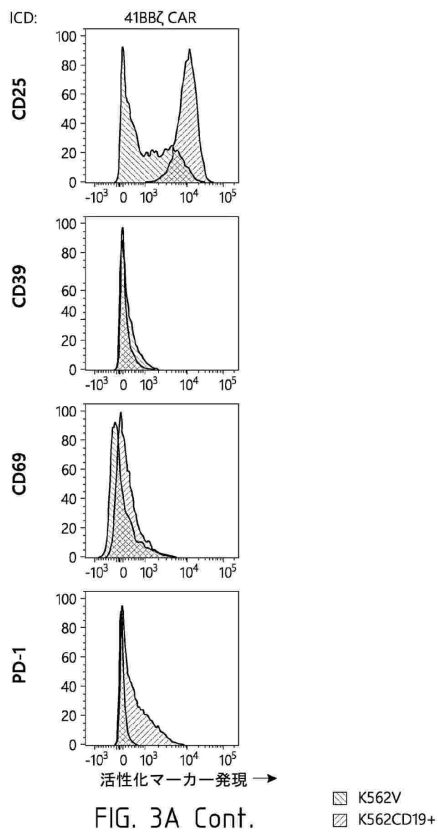
【 図 3 A - 3 】



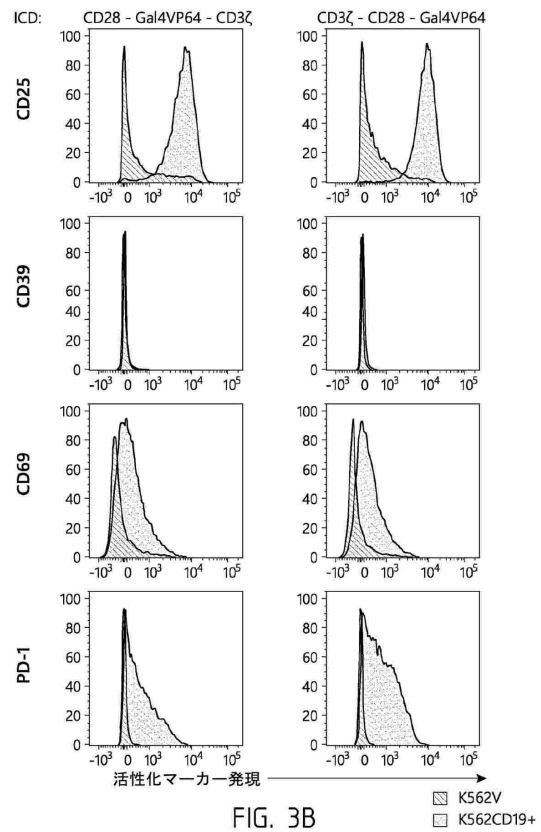
10

20

【 図 3 A - 4 】



【 図 3 B - 1 】

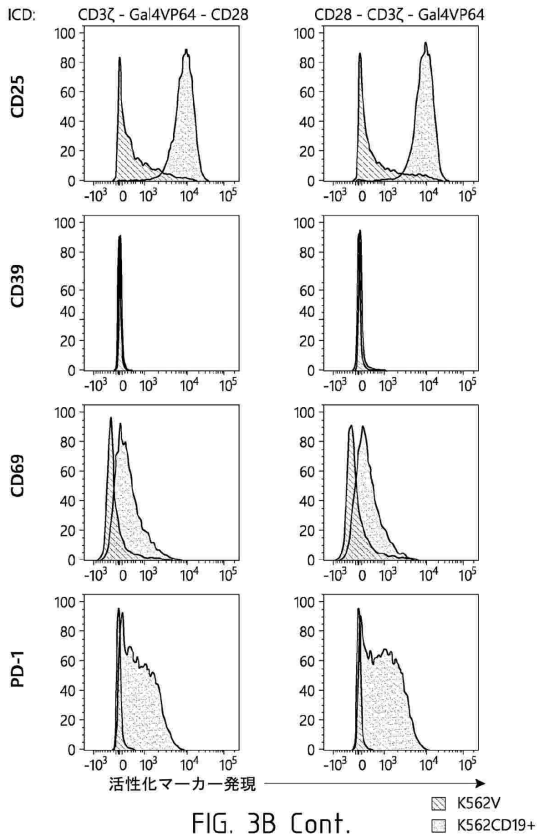


30

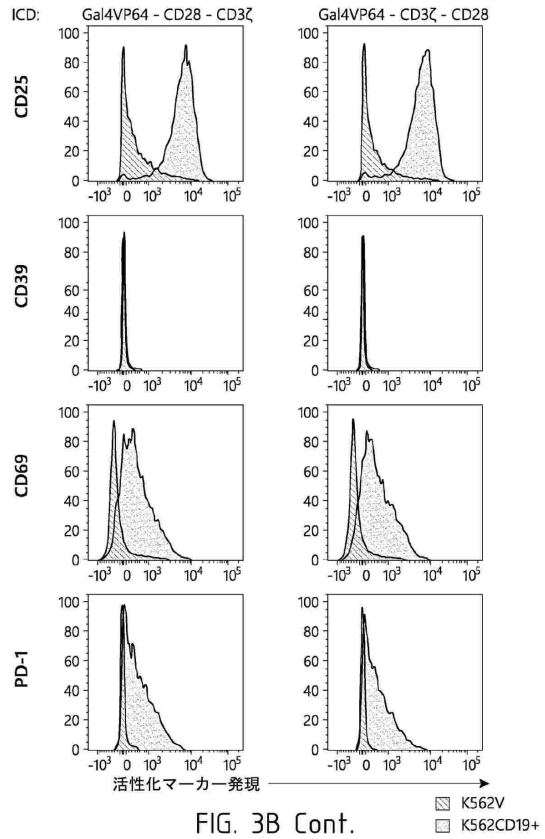
40

50

【 図 3 B - 2 】



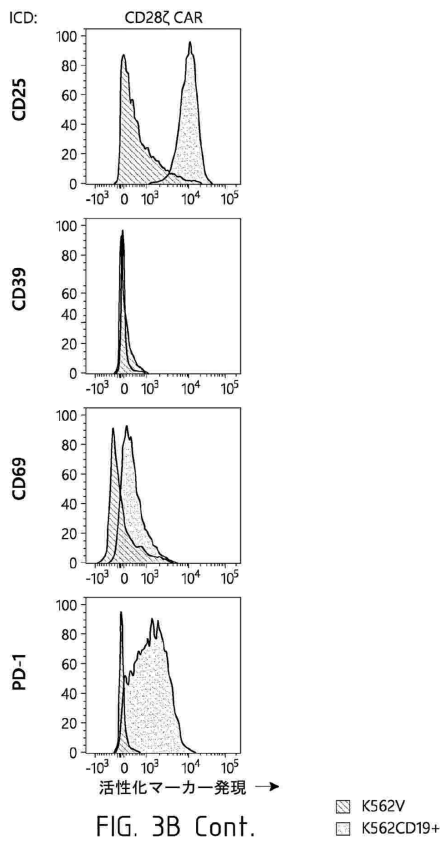
【 図 3 B - 3 】



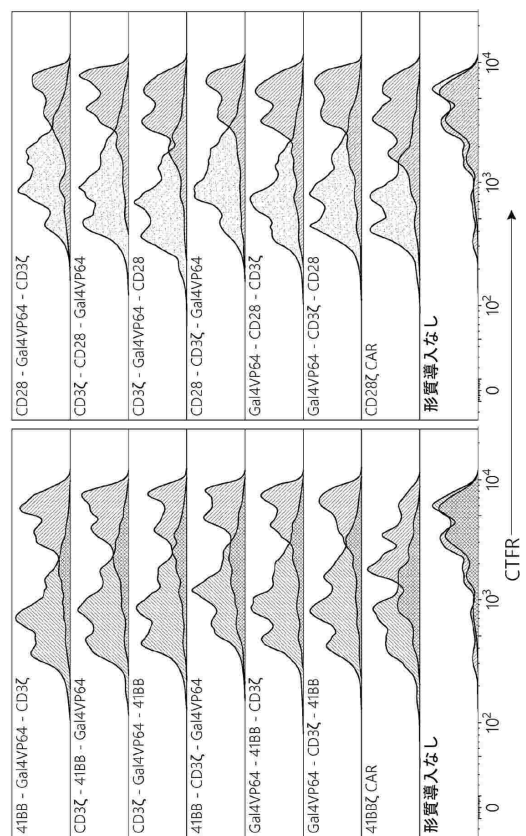
10

20

【 図 3 B - 4 】



【 図 4 】



30

40

50

【 図 5 A - 1 】

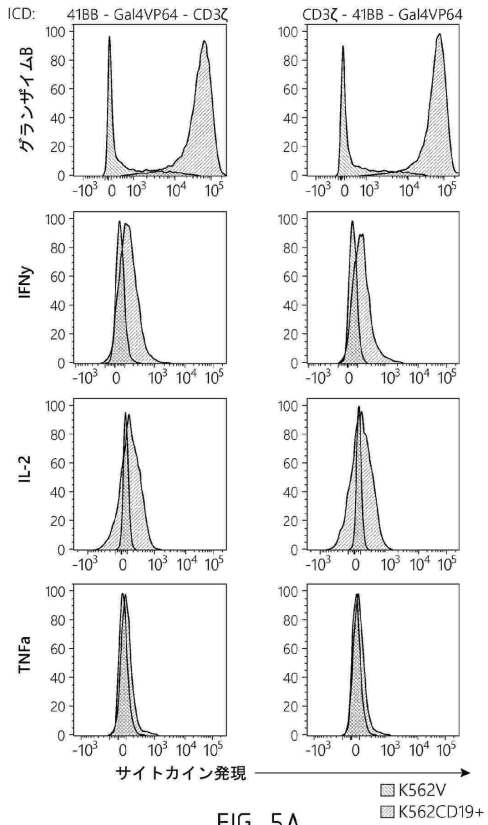


FIG. 5A

【 図 5 A - 2 】

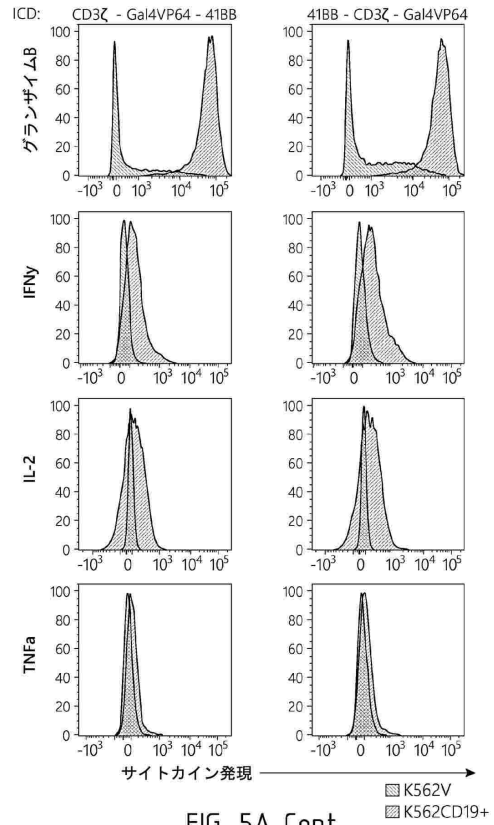


FIG. 5A Cont.

10

20

【 図 5 A - 3 】

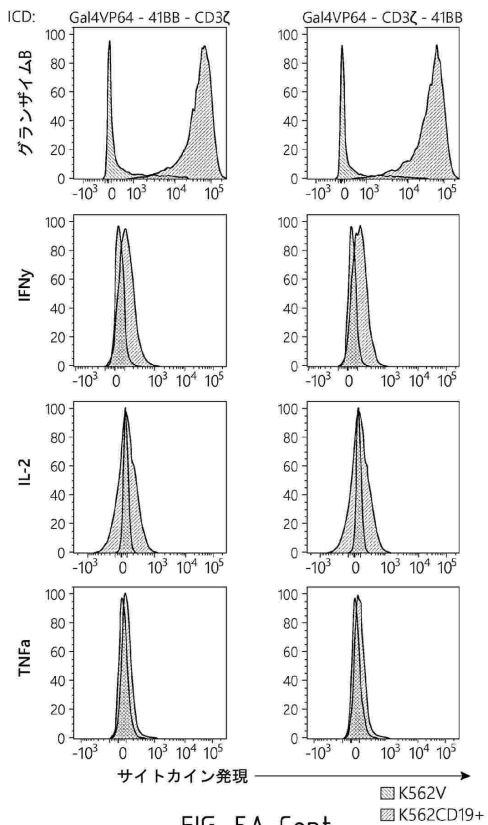


FIG. 5A Cont.

【 図 5 A - 4 】

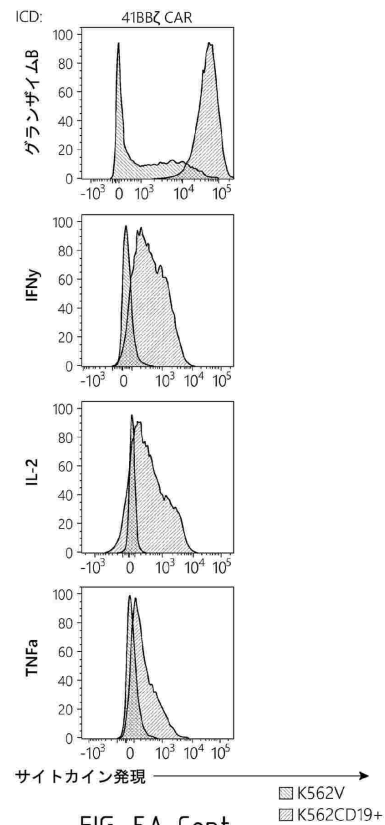


FIG. 5A Cont.

30

40

50

【 図 5 B - 1 】

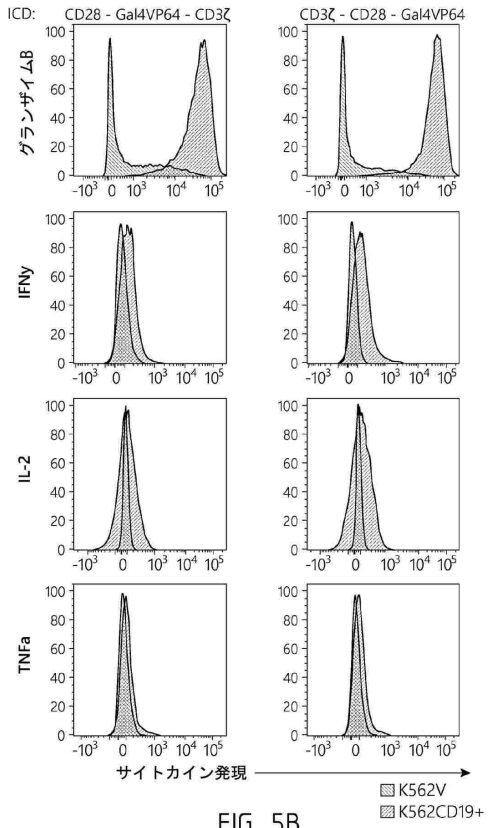


FIG. 5B

【 図 5 B - 2 】

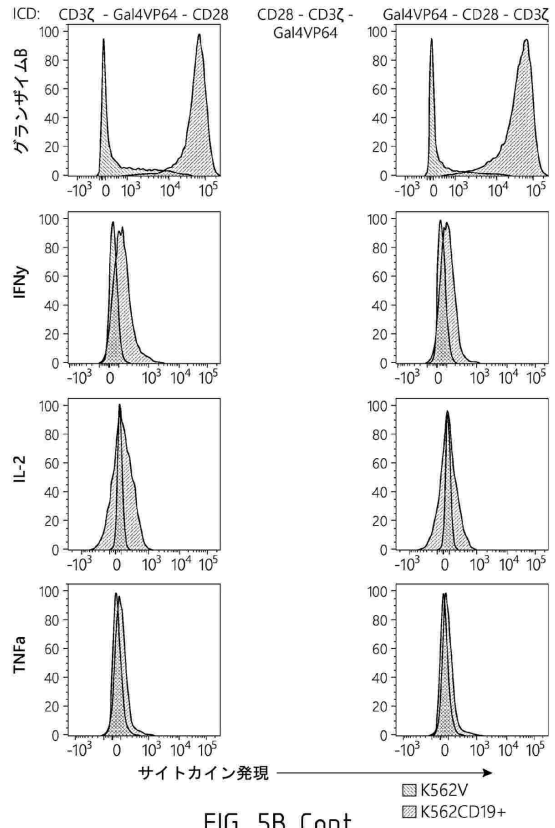


FIG. 5B Cont.

10

20

【 図 5 B - 3 】

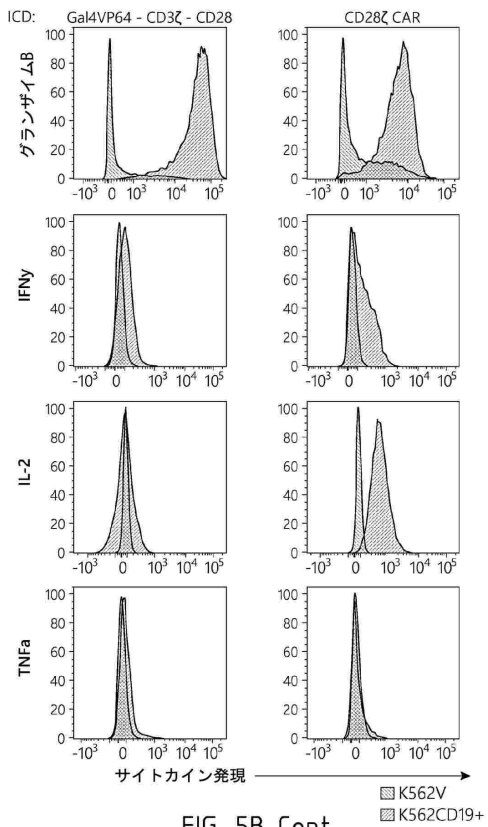


FIG. 5B Cont.

【 図 6 A 】

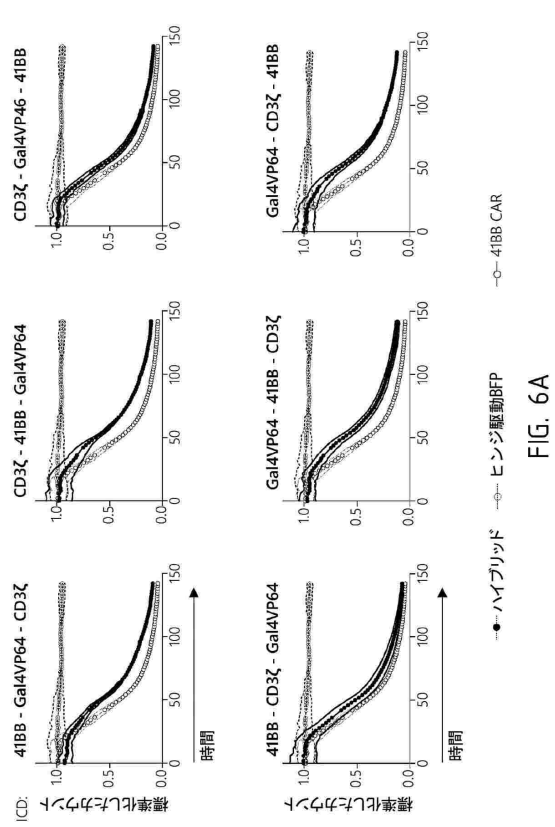


FIG. 6A

30

40

50

【 図 6 B 】

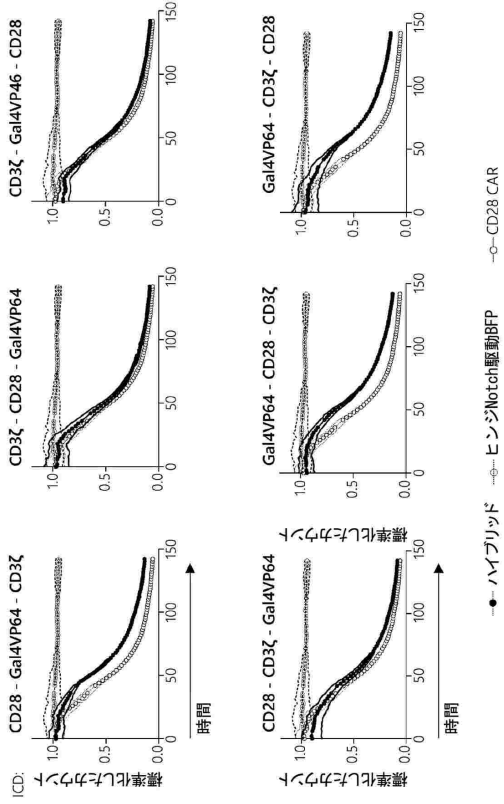


FIG. 6B

【 図 7 】

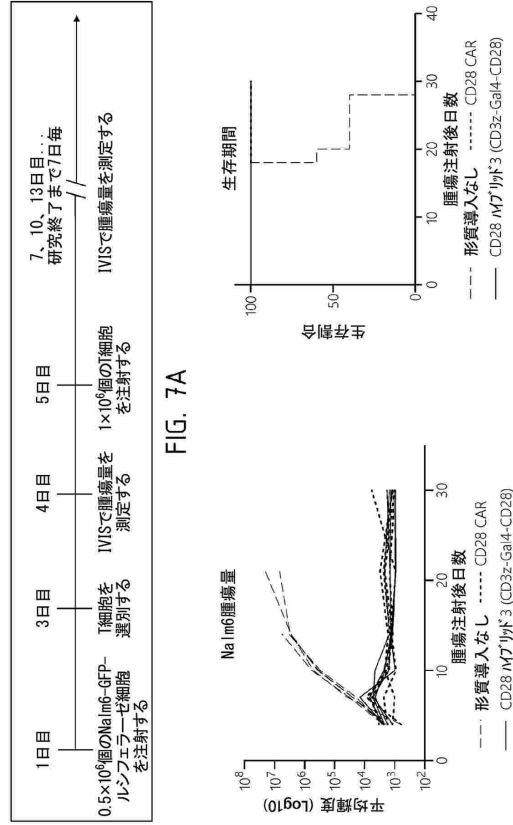


FIG. 7A

FIG. 7C

FIG. 7B

【 図 8 A 】

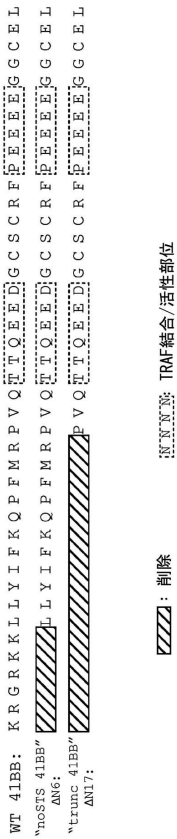


FIG. 8A

【 図 8 B 】

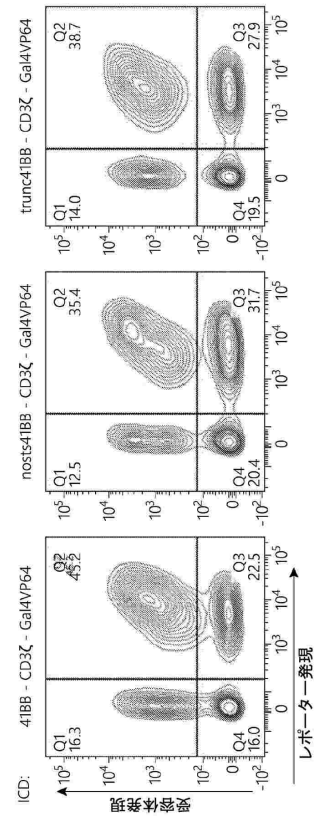


FIG. 8B

【 図 8 C 】

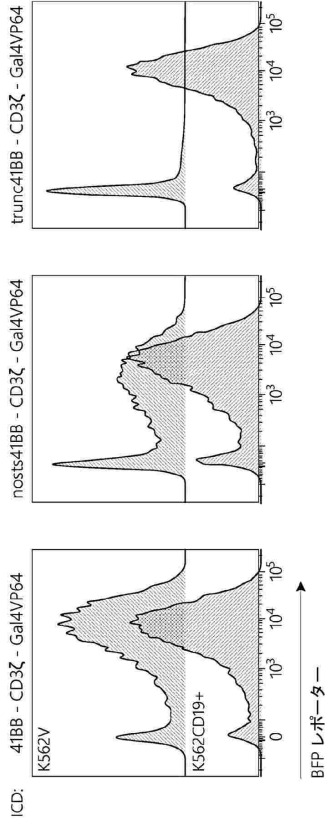


FIG. 8C

【 図 8 D 】

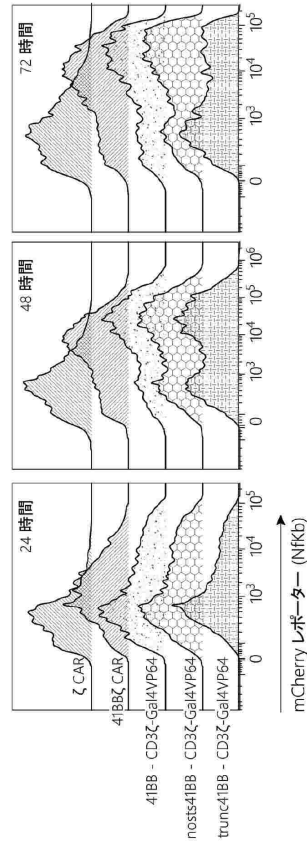


FIG. 8D

10

20

【 図 9 A 】

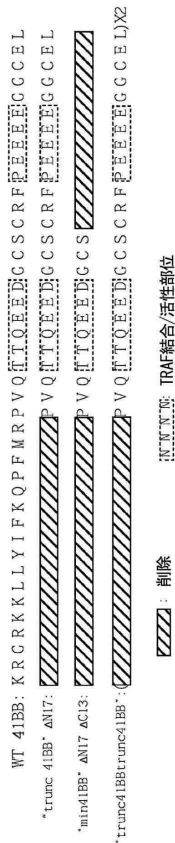


FIG. 9A

【 図 9 B 】

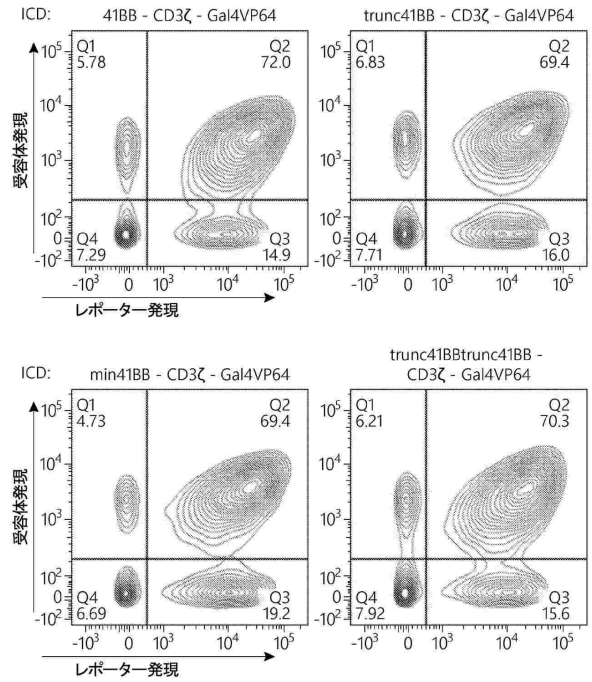


FIG. 9B

30

40

50

【 図 9 C 】

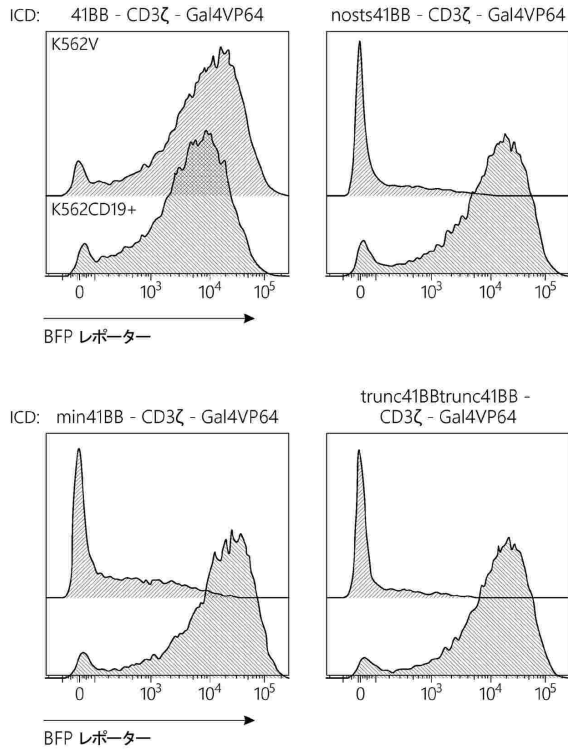


FIG. 9C

【 図 9 D 】

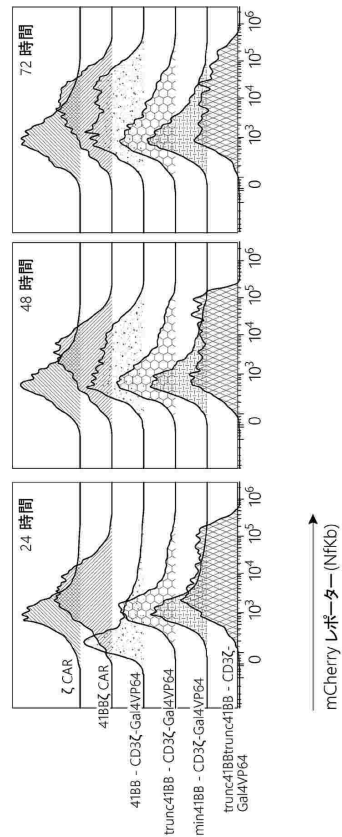


FIG. 9D

10

20

【 図 10 A 】

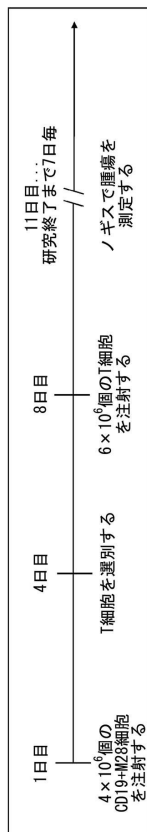


FIG. 10A

【 図 10 B 】

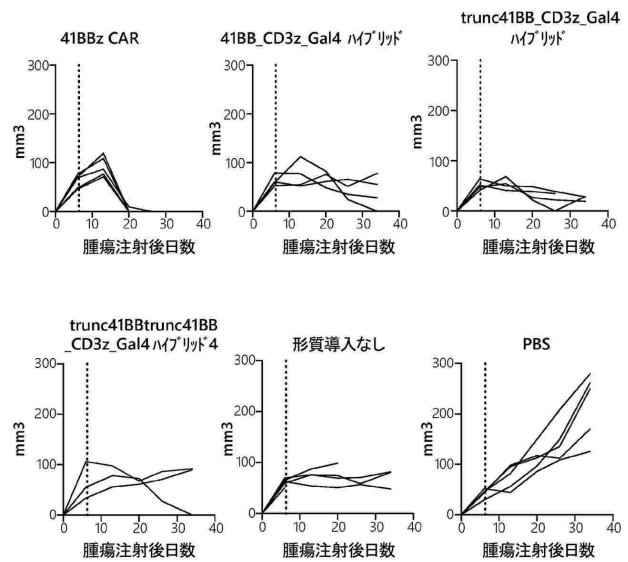


FIG. 10B

30

40

50

【 図 1 1 A 】

WT CD28: RSKRSRLLSHSDYNNMTRRRTGGPTRKHYQFYATPIPRDFAAYRS
 noSTSCD28 ΔN6: LHSDEYNNMTRRRTGGPTRKHYQFYATPIPRDFAAYRS
 truncCD28 ΔN9: SDEYNNMTRRRTGGPTRKHYQFYATPIPRDFAAYRS

██████: 削除
 ██████: リン酸化/ドッキング部位

FIG. 11A

【 図 1 1 B 】

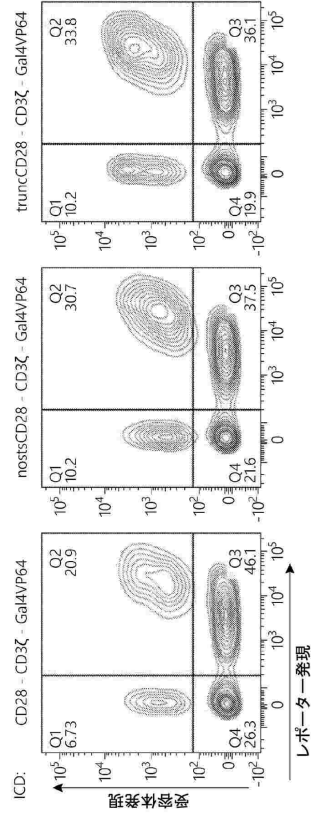


FIG. 11B

10

20

【 図 1 1 C 】

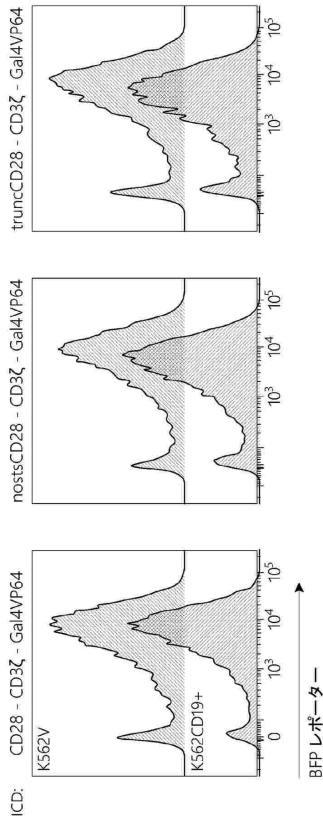


FIG. 11C

【 図 1 2 A 】

WT CD28: RSKRSRLLSHSDYNNMTRRRTGGPTRKHYQFYATPIPRDFAAYRS
 CD28ΔTPRRP: RSKRSRLLSHSDYNNMTRRRTGGPTRKHYQFYATPIPRDFAAYRS
 truncCD28ΔTPRRP: SDEYNNMTRRRTGGPTRKHYQFYATPIPRDFAAYRS
 完全trunc CD28: SDEYNNMTRRRTGGPTRKHYQFYATPIPRDFAAYRS

██████: 削除
 ██████: リン酸化/ドッキング部位

FIG. 12A

30

40

50

【 図 15 B 】

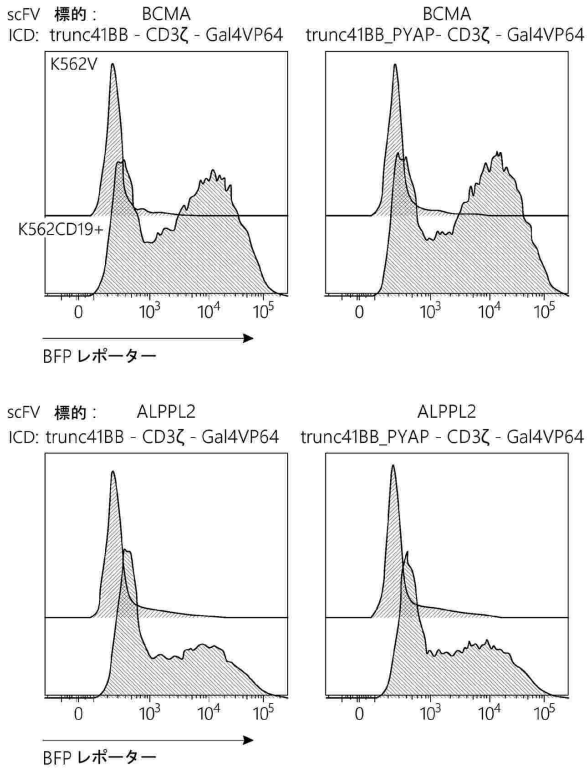


FIG. 15B

【 配列表 】

2024511423000001.app

【 図 16 】

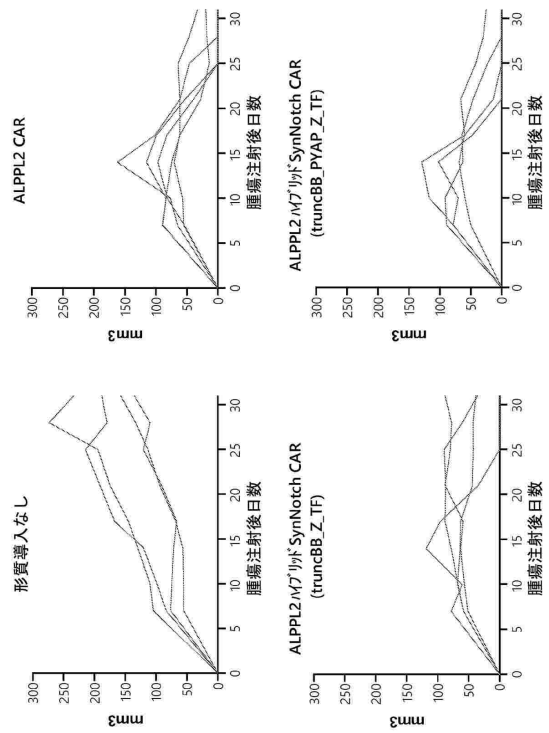


FIG. 16

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/21605

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - A61K 38/17; C07K 14/705; C07K 16/28; C07K 19/00 (2022.01) CPC - C07K 14/705; C07K 16/28; A61K 38/00; A61K 39/0005 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2020/0331985 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 22 October 2020 (22.10.2022) claim 1; para [0006]; [0043]; [0129]-[0133]; [0143]-[0159]; [0199]-[0217]; [0272]-[0275]	1-7
A	US 2020/0071729 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 05 March 2020 (05.03.2020) full document	1-7
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 June 2022		Date of mailing of the international search report JUL 19 2022
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Kari Rodriguez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

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

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/21605

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

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

a. forming part of the international application as filed:

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

on paper or in the form of an image file.

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

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

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

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

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

3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/21605

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

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

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3. Claims Nos.: 8-83
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

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

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

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

20

30

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - No protest accompanied the payment of additional search fees.

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 0 7 K	14/725 (2006.01)	C 0 7 K	14/725		
C 1 2 N	15/867 (2006.01)	C 1 2 N	15/867		Z
C 1 2 N	15/861 (2006.01)	C 1 2 N	15/861		Z
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00		
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17		
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76		
A 6 1 P	35/04 (2006.01)	A 6 1 P	35/04		
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00		
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02		
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		

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

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(74)代理人 100138210

弁理士 池田 達則

(72)発明者 コール ティー . ロイバル

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 1 4 3 , サンフランシスコ , パルナサス アベニュー 5 1 3
 , ボックス 0 5 1 9 , シー / オー ユニバーシティ オブ カリフォルニア サンフランシスコ

(72)発明者 ジュリー ガルシア

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 1 4 3 , サンフランシスコ , パルナサス アベニュー 5 1 3
 , シー / オー ユニバーシティ オブ カリフォルニア サンフランシスコ

(72)発明者 アイオウイス チュー

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 1 4 3 , サンフランシスコ , パルナサス アベニュー 5 1 3
 , エイチエスイー - 3 0 1 , シー / オー ユニバーシティ オブ カリフォルニア サンフランシスコ

(72)発明者 レイモンド リウ

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 1 4 3 , サンフランシスコ , パルナサス アベニュー 5 1 3
 , エイチエスイー - 3 0 1 , シー / オー ユニバーシティ オブ カリフォルニア サンフランシスコ

(72)発明者 アクセル ハイレニウス ウィットステン

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 1 4 3 , サンフランシスコ , パルナサス アベニュー 5 1 3
 , エイチエスイー - 3 0 1 , シー / オー ユニバーシティ オブ カリフォルニア サンフランシスコ

F ターム (参考)

4B065 AA94X AB01 AC14 AC20 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46
 4C084 AA13 AA19 MA55 MA66 NA05 NA14 ZB072 ZB261 ZB262 ZC032
 ZC751
 4C087 AA01 AA02 AA03 BB65 BC83 CA04 CA12 MA55 MA66 NA14
 ZB26 ZB27
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA76 EA28
 FA74