(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2021-518116
(P2021-518116A)
(43)公表日　令和3年8月2日(2021.8.2)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/10		4B050
C12N 5/0783	(2010.01)	C12N	5/0783	ZNA	4B065
C07K 14/54	(2006.01)	C07K	14/54		4C087
C07K 14/705	(2006.01)	C07K	14/705		4H045
C12N 15/62	(2006.01)	C12N	15/62	Z	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 29 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2020-549608 (P2020-549608)
(86)(22)出願日　平成31年3月15日 (2019.3.15)
(85)翻訳文提出日　令和2年9月15日 (2020.9.15)
(86)国際出願番号　PCT/EP2019/056634
(87)国際公開番号　WO2019/175428
(87)国際公開日　令和1年9月19日 (2019.9.19)
(31)優先権主張番号　1804291.1
(32)優先日　平成30年3月16日 (2018.3.16)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国 (GB)

(71)出願人　518259431
エヴォックス・セラピューティクス・リミテッド
イギリス・ＯＸ４　４ＨＧ・オックスフォード・ロバート・ロビンソン・アヴェニュー・オックスフォード・サイエンス・パーク・メダワー・センター・イースト・ビルディング・２階
(74)代理人　100108453
弁理士　村山　靖彦
(74)代理人　100110364
弁理士　実広　信哉
(74)代理人　100133400
弁理士　阿部　達彦

最終頁に続く

(54)【発明の名称】細胞媒介性エキソソーム送達

(57)【要約】
本発明は、治療用カーゴ、特にタンパク質治療薬およびＲＮＡ治療薬のエキソソーム媒介送達を可能にする操作された細胞に関する。本発明はまた、独創的なポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび医薬組成物に関する。

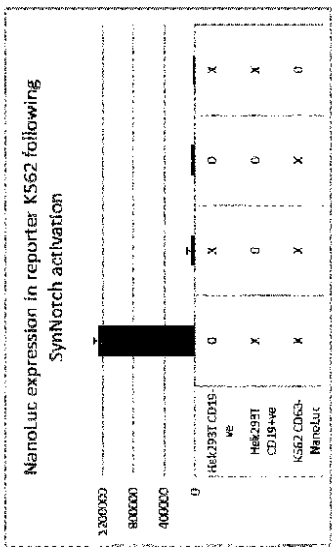


Figure 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
（ｉ）細胞外認識ドメイン、（ｉｉ）少なくとも１つのプロテアーゼ切断部位、および（ｉｉｉ）細胞内転写因子を含み、前記細胞外認識ドメインのその標的への結合が、前記少なくとも１つのプロテアーゼ切断部位のタンパク質分解性切断および少なくとも１つのエキソソームポリペプチドを含む遺伝子産物をコードする少なくとも１つのポリヌクレオチドの前記細胞内転写因子による内因性転写を誘導する、キメラポリペプチドレセプターを産生するように遺伝的に改変された細胞。
【請求項２】
前記遺伝子産物が、目的のタンパク質をさらに含む、請求項１に記載の細胞。
【請求項３】
前記目的のタンパク質が、抗体、単一鎖状抗体または任意の他の抗体誘導体、二重特異性Ｔ細胞エンゲージャー（ＢｉＴＥ）、レセプター、インターロイキンなどのサイトカイン、カスパーゼ、グランザイム、Ｃａｓ、Ｃａｓ９などの酵素、チェックポイント阻害剤、共刺激阻害剤、ＲＮＡ結合タンパク質、ＮＰＣ－１などの膜輸送体、スプライシング因子、細胞小器官に関連するタンパク質、リソソーム酵素、転写因子、ミトコンドリアタンパク質、細胞内タンパク質、抗ウイルスタンパク質、抗細菌タンパク質である、請求項２に記載の細胞。
【請求項４】
前記目的のタンパク質が、ＲＮＡ結合タンパク質である場合、前記細胞が、ｍＲＮＡ、ｓｇＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ＩｎｃＲＮＡ、ｎｃＲＮＡ、ｐｉＲＮＡ、ｐｉｗｉＲＮＡ、ｃｉｒｃＲＮＡ、ｔＲＮＡ、ｒＲＮＡ、ｃｒＲＮＡ、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるＲＮＡカーゴ分子を含むようにさらに遺伝的に改変される、請求項２～３のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項５】
前記遺伝的改変が、ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｅｘ　ｖｉｖｏ遺伝的改変である、請求項１～４のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項６】
前記細胞がエフェクター免疫細胞である、請求項１～５のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項７】
前記細胞が、Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ８＋Ｔ細胞、ＣＤ４＋Ｔ細胞、調節性Ｔ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、Ｂ細胞、形質細胞、樹状細胞（ＤＣ）、マクロファージ、単球、好中球、上皮細胞、内皮細胞、ミクログリア、アストロサイト、ニューロン、幹細胞、骨髄由来間葉系間質細胞、Ｗｈａｒｔｏｎゼリー由来ＭＳＣ、または任意の他の細胞タイプである、請求項５および／または６記載の細胞。
【請求項８】
前記キメラポリペプチドレセプターの前記細胞外認識ドメインが、抗体、抗体誘導体、単一鎖状フラグメント、単一鎖状抗体、ナノボディ、ペプチド、レセプターのリガンド、接着性分子、レセプター、インターロイキンレセプター、細胞外マトリックスコンポーネント、またはそれらの任意の組み合わせである、請求項１～７のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項９】
前記少なくとも１つのプロテアーゼ切断部位が、Ｓ１、Ｓ２および／またはＳ３切断部位の少なくとも１つである、請求項１～８のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項１０】
融合ポリペプチドが、Ｎ末端からＣ末端までおよび共有結合で、
（ｉ）ノッチレセプターポリペプチド中で天然に存在しない細胞外認識ドメイン、
（ｉｉ）Ｌｉｎ１２－ノッチリピート、Ｓ２タンパク質分解切断部位、およびＳ３タンパク質分解切断部位を含む膜貫通ドメインを含むノッチ調節領域、
（ｉｉｉ）前記ノッチ調節領域に異種である細胞内転写因子、

を含むキメラノッチポリペプチドであって、
前記細胞外認識ドメインがその標的に結合すると、前記Ｓ２およびＳ３プロテアーゼ切断部位での切断が誘導され、これにより、前記ポリヌクレオチドの転写を活性化する前記細胞内転写因子が放出される、請求項１～９のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項１１】
前記ノッチ調節領域が、前記Ｓ２タンパク質分解切断部位を含むヘテロ二量体化ドメインをさらに含む、請求項１０に記載の細胞。
【請求項１２】
Ｓ１タンパク質分解切断部位が、アミノ酸配列Ａｒｇ－Ｘ－（Ａｒｇ／Ｌｙｓ）－Ａｒｇを含むフリン様プロテアーゼ切断部位であり、ここで、Ｘは任意のアミノ酸である、請求項９～１１のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項１３】
前記融合ポリペプチドが少なくとも１つのリンカーを含む、請求項１～１２のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項１４】
前記ポリヌクレオチドが、コード配列に作動可能に連結された、前記転写因子に応答する転写制御エレメントをさらに含む、請求項１～１３のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項１５】
少なくとも２つのタイプの融合ポリペプチドを産生するように前記細胞が遺伝的に改変され、（ｉ）前記細胞外認識ドメイン、（ｉｉ）前記プロテアーゼ切断部位、および（ｉｉｉ）前記細胞内転写因子のうちの少なくとも１つが前記融合ポリペプチド間で異なる、請求項１～１４のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項１６】
前記融合ポリペプチドの前記細胞外認識ドメインが互いに異なる、請求項１５に記載の細胞。
【請求項１７】
請求項１～１６のいずれか一項に記載の細胞によって産生される細胞外小胞（ＥＶ）。
【請求項１８】
前記ＥＶがエキソソームである、請求項１６に記載のＥＶ。
【請求項１９】
前記ＥＶが前記遺伝子産物を含む、請求項１７～１８のいずれか１項に記載のＥＶ。
【請求項２０】
請求項１～１９のいずれか一項に記載の、前記遺伝子産物をコードする、前記ポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクター。
【請求項２１】
前記組換え発現ベクターが、コード配列に作動可能に連結された、前記転写因子に応答する転写制御エレメントをさらに含む、請求項２０に記載の組換え発現ベクター。
【請求項２２】
前記転写制御エレメントが、請求項１～１６のいずれか１項に記載の細胞に対して内因性または異種である、請求項２０～２１のいずれか１項に記載の組換え発現ベクター。
【請求項２３】
前記ポリヌクレオチドの前記コード配列が、請求項１～１６のいずれか１項に記載の細胞に対して内因性または異種である、請求項２０～２２のいずれか１項に記載の組換え発現ベクター。
【請求項２４】
請求項２０～２３のいずれか１項に記載のポリヌクレオチドによってコードされる遺伝子産物。
【請求項２５】
請求項１～２４のいずれか１項に記載のキメラポリペプチドレセプターをコードする組換え発現ベクター。

【請求項２６】
請求項２４に記載の組換え発現ベクターによってコードされる融合ポリペプチド。
【請求項２７】
治療効果を発揮する方法であって、
（ｉ）請求項２０～２３のいずれか１項に記載の組換え発現ベクターおよび請求項２５に記載の組換え発現ベクターをｅｘ　ｖｉｖｏまたはｉｎ　ｖｉｔｒｏで細胞に導入することと、
（ｉｉ）前記遺伝的に改変された細胞を個体に投与することと、を含む、方法。
【請求項２８】
請求項１～１６のいずれか１項に記載の細胞を含む医薬組成物。
【請求項２９】
医薬品に使用するための、請求項１～１６のいずれか１項に記載の細胞または請求項２８に記載の医薬組成物。
【請求項３０】
癌、炎症性疾患、自己免疫疾患、遺伝病、感染症、代謝疾患、ＣＮＳ疾患、リソソーム蓄積障害、および神経変性疾患の治療に使用する、請求項１～１６のいずれか一項に記載の細胞または請求項２８に記載の医薬組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、治療用カーゴ、特にタンパク質治療薬およびＲＮＡ治療薬の内因性エキソソーム媒介送達を可能にする操作された細胞に関する。
【背景技術】
【０００２】
全てではないにしても、ほとんどの細胞は、ＥＶを放出し、これは、隣接する細胞またはある距離にある細胞に影響を及ぼす。ＥＶの３つの主要なクラスは、エキソソーム、微小胞（ＭＶ）およびアポトーシス小体であり、共通の性質は、それらが、それらの起源に依存して直径が３０～２０００ｎｍの範囲である、脂質二重層によって囲まれた細胞由来小胞であることである。プラズマ膜から直接的に出芽するＭＶ（直径約２００～１０００ｎｍ）とは対照的に、エキソソーム（直径５０～２００ｎｍ）はエンドリソソーム経路に由来する。ＥＶはほとんどの体液から分離されており、幹細胞維持、組織修復および免疫監視などの正常な生理学的プロセスの調節だけでなく、一連の疾患の基礎にある病理学においても重要な役割を果たすことが次第に明らかになってきている。ＥＶは多面的にその生物学的作用を発揮する；タンパク質および生理活性脂質リガンドを介してレシピエント細胞上の細胞表面レセプターを直接的に活性化するか、タンパク質およびＲＮＡ（例えば、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）およびｍＲＮＡ）を含むエフェクターを送達する。このような広範な生物学的機能は、ＥＶが、例えば、再生医療および悪性疾患の分野において、先天的な治療可能性を有し得ることを示唆する。ＥＶの先天的な治療能力に加えて、ＲＮＡおよびタンパク質を細胞内に自然に運搬し、それらを潜在的に理想的な非ウイルス薬物送達ビヒクルにする能力に、ますます注目が集まっている。実際、今日、多くの研究が、ｍｉＲＮＡおよび他の外因性の高分子薬物の送達のためのＥＶの可能性を示唆している。例えば、エキソソームのＲＮＡ輸送能力は、それを治療用ｓｉＲＮＡの送達に利用した（例えば、ＷＯ２０１０／１１９２５６）。Ｈｅｕｓｅｒｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．，ＪＣＢ，２０１６は、ＥＶが、ウイルスと同様の様式で、速い動態で、単一小胞として、そして凝集体としてではなく、レシピエント細胞によって取り込まれることを強調した。従って、ＥＶの取り込みは、インビトロおよびインビボの両方で、レシピエント細胞への高分子カーゴの送達のための独特の特性をＥＶに与える迅速なプロセスである。
【０００３】
ＣＡＲ　Ｔ細胞は、キメラ抗原レセプターを付与されたＴ細胞であり、Ｂ細胞レセプターに似た抗原を認識するが、Ｔ細胞の応答を伴う。ＣＡＲ　Ｔ細胞治療の可能性は、ＣＡ

ＲＴ細胞を標的とするＣＤ１９で示されており、これは大きな腫瘍を根絶し、脳転移さえも治療に適していることが報告されている。しかしながら、固形腫瘍に対しては、これらの治療はそれほど成功していない。ＣＡＲ Ｔ治療が固形癌に有効であることを妨げる主な障害は２つある。第１のものは、かなりの投資および厳密な研究にもかかわらず、腫瘍細胞上で排他的に発現される抗原を同定することが困難であったことである。ＣＡＲＴ療法はしばしば非常に有効であるため、抗原が非腫瘍細胞上に存在する場合、副作用は一般的に生命を脅かす。ＣＤ１９はすべてのＢ細胞に存在するが、利用可能な免疫グロブリン補充療法があるため、患者は治療後にＢ細胞なしで生存するが、この有害事象軽減戦略は、ＣＡＲ Ｔが固形腫瘍を標的とするようにデザインされている場合には適用できない。第２の問題は、固形腫瘍の微小環境に存在する免疫調節機構であり、ＣＡＲ Ｔ細胞が完全に活性化するのを妨げる。ＣＡＲ Ｔ細胞が、抗原に遭遇した後にのみＴ細胞応答を生成するという欠点を克服するために、ＳｙｎＮｏｔｃｈレセプターが開発されており、これは、操作された細胞およびそれらの応答を、既存のＣＡＲ Ｔ細胞を超えて取り込む（例えば、特許出願ＷＯ２０１７１９３０５９およびＵＳ２０１７０２３３４７４に記載されるように）。ノッチ（ｎｏｔｃｈ）レセプターは進化の過程にある旧レセプターであり、レセプターが隣接する細胞上のリガンドに結合すると転写を制御する。レセプターは、リガンドが別の細胞上に存在する場合にのみ活性化される。リガンドが同じ細胞上に存在する場合、レセプターは阻害され、可溶性リガンドによっても活性化されない。ノッチレセプターがリガンドに結合すると、レセプターの確認が変化し、これがタンパク質背主鎖を切断するプロテアーゼのいくつかの切断部位を露出する。これにより細胞質側に転写因子（ＴＦ）が放出され、核に転写され、レセプターリガンド相互作用に反応して標的遺伝子の転写が始まる。ＳｙｎＮｏｔｃｈシステムの場合、細胞外認識ドメインは、例えば、ｓｃＦｖ、ナノボディ、またはペプチドに交換されているので、理論上、レセプターは、任意の細胞表面標的を認識することができる。さらに、レセプターのＴＦ部分は、正常ドメインの代わりに人工的に誘導されたＴＦを含むように操作された。細胞は、抗原認識時に放出された人造ＴＦに応答するセンシング（感知）要素をさらに備えていた。これまでＳｙｎＮｏｔｃｈシステムは、サイトカインや抗体などの細胞外環境での活性化時に治療薬を送達するために使用されてきた。しかし、未解決の問題の１つは、細胞を、近くの細胞に侵入し、レシピエント細胞の細胞質または核中のタンパク質および／またはＲＮＡに影響を与え、それによって、ＳｙｎＮｏｔｃｈ技術および類似のプラットホームのための薬剤標的を非常に増加させることができる治療活性分子を、細胞にどのように分泌させるかである。

【発明の概要】

【０００４】

従って、本発明の目的は、治療用ＥＶ、好ましくはエキソソームの産生を介してその環境に応答する細胞を生成することである。さらに、本発明は、例えば、細胞外環境内の成分に応答するモジュラー検出システムを確実にすること、治療剤をロードしたＥＶの発現を誘導すること、刺激剤の存在下でのみ応答する細胞オン／オフ治療システムを提供すること、ＲＮＡおよびタンパク質のような生物学的因子を送達する手段、標的細胞に錯体の細胞産生生体分子を送達する方法、および最後に、特定の組織に内因性の細胞を有する治療剤を送達する手段を提供することなど、当該分野における既存の必要性を満たすことを目的とする。

【０００５】

本発明は、キメラポリペプチドレセプターを発現するように細胞を遺伝子操作することによって、これらおよび他の目的を達成し、キメラポリペプチドレセプターは、その標的に結合すると、ＥＶにロードされるべき遺伝子産物の発現を誘導する。そこで、我々は、操作されたＥＶをキメラ抗原レセプター技術と独創的に組み合わせ、定義された抗原による刺激に際してデザイナーＥＶを分泌する細胞を作製した。これは、ＣＡＲ－Ｔ（および他のＣＡＲベースのアプローチ）およびキメラ抗原レセプター（例えば、ＳｙｎＮｏｔｃｈ）技術の範囲を拡張し、直接特異的な微小環境におけるレシピエント細胞の細胞質へ、

および／または標的臓器、臓器系もしくは組織における特定の環境へ、高分子薬物を直接的に送達し得る。その結果、これは、既存の細胞療法を上回る幾つかの利点につながる：（１）治療ＥＶ（典型的にはエキソソーム）の活性化およびその後の分泌物は、所定の抗原の存在下でのみ起こるので、治療は非常に特異的であろう。さらに、特異性は、疾患細胞のみに存在する標的に対して高度に特異的であるように設計され得るｍｉＲＮＡのような、ＥＶにロードされる治療用カーゴからさらに達成される。（２）この特異性は、通常のＣＡＲ　Ｔ細胞療法のような以前の細胞ベースの治療で見られる非特異的な副作用を消失させるであろう。（３）ＣＡＲ　Ｔ細胞治療に利用できない抗原は、重篤な副作用のために、点１および２のために、今や利用できる。（４）このシステムは、新薬の開発につながらなかった標的を新薬の開発につながるようにする。理論的には、任意の遺伝子および／または非コードＲＮＡが、キメラ抗原レセプター技術および操作されたエキソソームの独創的な組み合わせを使用して標的化され得る。（５）異なる細胞タイプ、例えば、Ｔ細胞、マクロファージ、ＮＫ細胞、ＤＣ細胞、間葉系間質細胞、羊膜由来細胞、ＨＥＫ細胞などを操作し、活性治療細胞として使用することができる。（６）レセプターによって認識される治療用カーゴ分子および／または抗原は容易に相互交換されるので、このシステムは非常に適合可能である。従って、このシステムは、癌性疾患および非悪性疾患の両方の治療に利用されるように、簡単に調節され得る。

【０００６】

第１の態様において、本発明は、（ｉ）細胞外認識ドメイン、（ｉｉ）少なくとも１つのプロテアーゼ切断部位、および（ｉｉｉ）細胞内転写因子を含むキメラポリペプチドレセプターを産生するように遺伝子改変された細胞に関する。細胞外認識ドメインのその標的への結合は、少なくとも１つのプロテアーゼ切断部位のタンパク質分解性切断を誘導し、続いて、少なくとも１つのエキソソームポリペプチドを含む遺伝子産物をコードする少なくとも１つのポリヌクレオチドの細胞内転写因子による内因性転写を誘導する。好ましい実施形態において、遺伝子産物は、目的のタンパク質（ＰＯＩ）をさらに含む。エキソソームポリペプチド（これは、共有結合的に（例えば、融合タンパク質として）または非共有結合的にＰＯＩに連結され得る）の存在の結果として、ＰＯＩは、ＥＶ（例えば、エキソソーム）に輸送され、そして標的細胞に送達される。

【０００７】

別の態様において、本発明は、遺伝的に改変された細胞によって産生される細胞外小胞（ＥＶ）に関する。これらのＥＶ、すなわちＥＶの集団は、遺伝子産物を含み、これは、上記のように、典型的には、ＰＯＩに融合された、および／または他の方法でＰＯＩに連結された少なくとも１つのエキソソームポリペプチドを含む。好ましい実施形態において、ＥＶはエキソソームである。

【０００８】

さらに別の態様では、本発明は、遺伝子産物をコードするポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクターに関する。さらに、本発明は、ポリヌクレオチドによってコードされる遺伝子産物に関する。

【０００９】

なおさらなる態様において、本発明は、キメラポリペプチドレセプター（すなわち、少なくとも部分的に細胞表面上に提示され、そして少なくとも以下のドメイン：（ｉ）細胞外認識ドメイン、（ｉｉ）少なくとも１つのプロテアーゼ切断部位、および（ｉｉｉ）遺伝子産物の産生を駆動するための細胞内転写因子を含むポリペプチド）をコードする組換え発現ベクターに関する。

【００１０】

さらなる態様では、本発明は、ｉｎ　ｖｉｖｏ、ｅｘ　ｖｉｖｏ、および／またはｉｎ　ｖｉｔｒｏのいずれかの状況に応じて治療効果を発揮する方法に関し、以下を含む：（ｉ）遺伝子産物をコードするポリヌクレオチドおよびキメラポリペプチドレセプターをコードする組換え発現ベクターを含む組換え発現ベクターを、ｅｘ　ｖｉｖｏまたはｉｎ　ｖｉｔｒｏで細胞に導入すること、

（ｉｉ）遺伝的に改変された細胞を個体に投与すること。

【００１１】

さらに別の態様において、本発明は、本明細書中の遺伝子改変細胞を含む医薬組成物に関し、さらに本発明はまた、このような遺伝子改変細胞、ならびに／または、例えば癌、炎症性疾患、自己免疫疾患、遺伝病、感染症、代謝疾患、ＣＮＳ疾患、リソソーム貯蔵障害、および神経変性疾患の予防および／もしくは治療で使用するためにこのような細胞を含む医薬組成物に関する。

【図面の簡単な説明】

【００１２】

【図１】ＣＤ１９を標的とするキメラポリペプチドレセプターを含み、さらにエキソソームタンパク質ＣＤ６３およびレポーターＰＯＩ　Ｎａｎｏｌｕｃをコードするポリヌクレオチドを含む、活性化Ｋ６５２細胞から産生されたＥＶに基づくルシフェラーゼアッセイ。ＣＤ１９によるそれらの活性化に続いて、Ｋ５６２細胞は、ＣＤ６３－ＮａｎｏＬｕｃを産生し、これは、続いて、前記細胞によって産生されたＥＶにロードされる。

【図２】自己切断可能なインテインを介してＣｒｅタンパク質に融合されたエキソソームタンパク質ＣＤ６３に基づくＣｒｅ－ＥＶロードストラテジーを用いた、ＣｒｅリコンビナーゼをロードされたＥＶの取り込み後のレポーター細胞の赤色から緑色への蛍光変換。実施例１で使用したＣＤ１９抗原によるそれらの活性化に続いて、Ｋ５６２細胞は、Ｃｒｅリコンビナーゼロードされ ＥＶを産生する。レポーターＣＤ１９＋ｖｅ　ＭＤＡ－ＭＤ－２３１細胞株によるその後の取り込みは、緑色から赤色蛍光への変換を示す。

【図３】ｐ５３ｍＲＮＡの取り込み後のｐ５３センシング腫瘍細胞における細胞死。実施例１におけるＣＤ１９抗原によるそれらの活性化に続いて、Ｋ５６２細胞は、ＰＵＦタンパク質に対する結合部位を含むｐ５３　ｍＲＮＡのＥＶローディングのためのＲＮＡ結合タンパク質ＰＵＦのＲＮＡ結合ドメインを含む遺伝子産物をポリヌクレオチドから発現することと一緒に、ｐ５３　ｍＲＮＡを産生する。その後のｐ５３センシング腫瘍細胞株による取り込みは、エキソソームによって送達されたｐ５３ｍＲＮＡの翻訳の結果、細胞死をもたらす。

【図４】ｓｕｐＴ１細胞が産生するグランザイムＢロードエキソソームへの曝露後の卵巣癌細胞の細胞死。ｓｕｐＴ１細胞によって発現されるキメラポリペプチドレセプターのｓｃＦｖと、卵巣癌細胞上で発現されるＣＡ－１２５腫瘍抗原との間の相互作用。細胞死は用量依存的に生じた。目的のタンパク質としてのグランザイムＢは、ＰＯＩをコードするポリヌクレオチドおよびエキソソームタンパク質Ｌａｍｐ２Ｂによってコードされ、これは、グランザイムＢの、ｓｕｐＴ１細胞によって産生されるＥＶへの輸送を可能にする。図４の黒いバーは、ＣＡ１２５を標的とするために操作されたｓｕｐＴ１細胞を表し、目標のエンゲージメント時に、ＣＡ－１２５ポジティブ（陽性）細胞と混合されたグランザイムＢを含むＥＶを産生し、一方、白いバーは、ＣＡ－１２５ネガティブ（陰性）細胞と混合されたｓｕｐＴ１抗ＣＡ－１２５グランザイムＢ　ＥＶ産生細胞を示し、グレーのバーは、ＣＡ－１２５ポジティブ細胞と混合された遺伝子産物をコードするポリヌクレオチドを含まないｓｕｐＴ１抗ＣＡ－１２５細胞を示す。Ｙ軸は卵巣癌細胞の細胞死率を示す。

【図５】（ｉ）ＭＵＣ１に対するｓｃＦｖ、（ｉｉ）ＳｙｎＮｏｔｃｈレセプターコアタンパク質、および（ｉｉｉ）プロテアーゼ切断部位（Ｓ１）を介してＳｙｎＮｏｔｃｈコアタンパク質に連結された人工転写因子Ｇａｌ４ＶＰ６４を含むＳｙｎＮｏｔｃｈキメラポリペプチドレセプターを使用して、乳癌細胞株Ｔ４７ＤのＭＵＣ１を標的とするように遺伝子操作された不死化ＣＥＭ（急性リンパ芽球性リンパ腫）細胞。標的Ｔ４７Ｄ細胞上のｓｃＦｖとＭＵＣ１とが相互作用すると、Ｇａｌ４ＶＰ６４が放出され、ＥＶタンパク質ＣＤ６３の発現を活性化し、これは自己切断型インテインに融合され、次にＦＣＵ１に融合され、それによってＦＣＵ１をＥＶに誘導し、そこでインテインが切断され、遊離ＦＣＵ１を放出する。続いて、ＦＣＵ１ロードＥＶはＴ４７Ｄ細胞に取り込まれ、５－フルオロウラシルの投与時に、細胞はアポトーシスを受ける。図５の黒いバーは、ＣＤ６３－

インテイン－ＦＣＵ１ポリヌクレオチド構築物を含むＣＥＭ細胞を提示する完全なｓｃＦｖ－ＳｙｎＮｏｔｃｈ－Ｇａｌ４ＶＰ６４と混合されたＭＵＣ１ポジティブＴ４７Ｄ細胞を表し；白いバーは、完全なＳｙｎＮｏｔｃｈ　ＣＥＭ細胞と混合されたＭＵＣ１ネガティブＴ４７Ｄ細胞を表し；そして灰色のバーは、キメラポリペプチドレセプターのＳｙｎＮｏｔｃｈ－Ｇａｌ４ＶＰ６４部分のみを含むが、機能的ＣＤ６３－インテイン－ＦＣＵ１をコードするポリヌクレオチド（プラスミドＤＮＡの形態で）を含むＣＥＭ細胞と混合されたＭＵＣ１ポジティブＴ４７Ｄ細胞を表す。グラフに見られるように、Ｔ４７Ｄ細胞は、エキソソームタンパク質（ＣＤ６３）およびＰＯＩ（ＦＣＵ１）をコードするポリヌクレオチドを含む完全に機能的なＳｙｎＮｏｔｃｈ　ＣＥＭ細胞と混合された場合、ＭＵＣ１ポジティブ群において５－フルオロウラシル後にのみアポトーシスに入る。Ｙ軸はＴ４７Ｄ細胞の細胞死の割合を示す。

【図６】プライマリーヒトＴ細胞を、以下の成分を含むキメラポリペプチドレセプターで形質導入した：（ｉ）ＰＳＭＡに対するラクダ科ナノボディ、（ｉｉ）抗ＰＳＭＡラクダ科ナノボディの細胞表面上でのディスプレイを可能にするＴＮＦＲの膜貫通ドメイン、（ｉｉｉ）Ｓ２部位の切断によって放出されるノッチ細胞内ドメイン（ＮＩＤ）（Ｓ２メタロプロテアーゼ切断部位を含む）の転写因子。Ｔ細胞はまた、遺伝子産物ＣＤ８１－ＰＵＦ（ここで、ＰＵＦはｍＲＮＡ結合タンパク質である）をコードするＮＩＤ応答性ポリヌクレオチド、ならびに３’ＵＴＲにＰＵＦ結合部位を有するＰＴＥＮ　ｍＲＮＡを含むように操作された。ＰＵＦとＰＴＥＮ　ｍＲＮＡのＰＵＦ結合部位との相互作用は、キメラポリペプチドレセプター活性化後に発現すると、ｍＲＮＡをＥＶに能動的にロードする。図６は、ＰＣ３　ＰＳＭＡポジティブ細胞と混合された抗ＰＳＭＡ＋、ＣＤ６３－ＰＵＦ＋およびＰＴＥＮ　ｍＲＮＡ＋　Ｔ細胞を示し；白いバーは、ＰＣ３　ＰＳＭＡネガティブ細胞と混合された抗ＰＳＭＡ＋、ＣＤ６３－ＰＵＦ＋およびＰＴＥＮ　ｍＲＮＡ＋　Ｔ細胞を示し、灰色のバーは、ＰＣ３　ＰＳＭＡポジティブ細胞と混合されたＰＴＥＮ　ｍＲＮＡ　Ｔ細胞を含まない抗ＰＳＭＡ＋、ＣＤ６３－ＰＵＦ＋を示し；点線のバーは、ＰＣ３　ＰＳＭＡポジティブ細胞と混合された抗ＰＳＭＡキメラレセプターＴ細胞を含まないＣＤ６３－ＰＵＦ＋およびＰＴＥＮ　ｍＲＮＡ＋細胞のみを示す。グラフに見られるように、抗ＰＳＭＡ＋、ＣＤ６３－ＰＵＦ＋およびＰＴＥＮ　ｍＲＮＡ＋　Ｔ細胞のみが、フローサイトメーターにより分析された細胞アポトーシスの増加を誘導する。

【図７】プライマリーナチュラルキラー（ＮＫ）細胞を、ＥＶタンパク質ＣＤ８１と連結したＣＦＴＲタンパク質をコードするポリヌクレオチドと共にＳｙｎＮｏｔｃｈレセプターに融合した抗ＣＤ１９単鎖状抗体で形質導入した。ＮＫ細胞をＨＥＫ　２９３Ｔ細胞と混合し、３日間の共培養後、ＮＫ細胞を除去し、I^{125}の流動を測定した。図７の三角形の黒線は、抗ＣＤ１９－ＳｙｎＮｏｔｃｈ－ＣＦＴＲ細胞と混合されたＣＤ１９ポジティブのＨＥＫ細胞を示し、黒枠の灰色線は、抗ＣＤ１９－ＳｙｎＮｏｔｃｈ－ＣＦＴＲ細胞と混合されたＣＤ１９ネガティブのＨＥＫ細胞を示し、空欄の黒線は、ＣＦＴＲをコードするポリヌクレオチドを含まない抗ＣＤ１９－ＳｙｎＮｏｔｃｈ細胞と混合されたＣＤ１９ポジティブのＨＥＫ細胞を示している。Ｙ軸はヨウ素^{125}流出速度（Ａ／ｍｉｎ）であり、ｘ軸は時間（分）を表す。

【発明を実施するための形態】

【００１３】

本発明は、細胞外認識ドメイン、プロテアーゼ切断部位および転写因子を含むキメラポリペプチドレセプターを介する特異的細胞外刺激に応答し、その活性化が、例えば、目的のタンパク質を、任意に別のカーゴ分子（例えば、治療用ＲＮＡカーゴ）と組み合わせて、ロードされたＥＶの産生をもたらし、操作された細胞（代表的には、細胞株またはプライマリー細胞）に関する。したがって、本発明は、他の手段では送達できない非常に複雑な生物系のための、高度に修飾可能で、標的化可能で、モジュール式の送達ビヒクルを提供する。

【００１４】

便宜上および明確にするために、本明細書で使用される特定の用語を集め、以下に説明

する。他に規定がない限り、本明細書で用いられるすべての技術的および科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者により一般的に理解されているのと同じ意味を持つ。

【００１５】

用語「細胞外小胞」または「ＥＶ」または「エキソソーム」は、例えば、細胞から得ることができる任意の型の小胞、例えば、微小胞（例えば、細胞の形質膜から放出される任意の小胞）、エキソソーム（例えば、エンドリソソーム経路に由来する任意の小胞）、アポトーシス体（例えば、アポトーシス細胞から得ることができる）、微粒子（例えば、血小板に由来し得る）、エクトソーム（例えば、血清中の好中球および単球に由来し得る）、前立腺腫（例えば、前立腺癌細胞から得ることができる）、または心臓腫（例えば、心臓細胞に由来し得る）などに関連すると理解されるべきである。さらに、前記用語はまた、いくつかの実施形態において、細胞外小胞模倣体、膜押出しまたは他の技術などによって得られる細胞膜小胞に関連すると理解されるべきである。本質的には、本発明は、ユビキチンリガーゼの送達もしくは運搬ビヒクルとして作用することができる任意のタイプの脂質ベースの構成（小胞モルフォロジーを有するか、または任意の他の種類の好適なモルフォロジーを有する）、および任意に抗体に関することができる。ＥＶの医学的および科学的使用および用途を説明する場合、本発明は、通常、複数のＥＶ、すなわち、数千、数百万、数十億、さらには数兆またはそれ以上のＥＶを含むことができるＥＶの集団に関することが、当業者には明らかであろう。同様に、用語「集団」は、そのような集団を一緒に構成する複数の実体を包含すると理解されるべきである。換言すれば、個々のＥＶは、複数存在する場合、ＥＶ母集団を構成する。したがって、当然ながら、本発明は、当業者には明らかなように、個々のＥＶおよびＥＶの集団の両方に関する。同様の理由は、本発明の遺伝的に改変された細胞にも当然適用され、すなわち、本発明は、個々の細胞およびそのような細胞の集団の両方に関連する。

【００１６】

用語「ＥＶタンパク質」および「ＥＶポリペプチド」ならびに「エキソソームポリペプチド」および「エキソソームタンパク質」および同様のものは、本明細書中で交換可能に使用され、そしてポリペプチド構築物（代表的には、エキソソームタンパク質に加えて、典型的には治療に適用するための少なくとも１つの目的のタンパク質および／または少なくとも任意の他の種類の目的の生体分子を含む）を、適切な小胞構造（すなわち、適切なＥＶ、通常はエキソソーム）に輸送するために利用され得る任意のポリペプチドに関連すると理解されるべきである。より具体的には、これらの用語は、融合タンパク質構築物の小胞構造（例えば、ＥＶ）への輸送、トラフィッキングまたは往復を可能にする任意のポリペプチドを含むと理解されるべきである。このようなエキソソームポリペプチドの例は、例えば、ＣＤ９、ＣＤ５３、ＣＤ６３、ＣＤ８１、ＣＤ５４、ＣＤ５０、ＦＬＯＴ１、ＦＬＯＴ２、ＣＤ４９ｄ、ＣＤ７１（トランスフェリンレセプターとしても知られる）およびそのエンドソーム選別ドメイン、すなわち、トランスフェリンレセプターエンドソーム選別ドメイン、ＣＤ１３３、ＣＤ１３８（シンデカン－１）、ＣＤ２３５ａ、ＡＬＩＸ、シンテニン－１、シンテニン－２、Ｌａｍｐ２、Ｌａｍｐ２ｂ、シンデカン－２、シンデカン－３、シンデカン－４、ＴＳＰＡＮ８、ＴＳＰＡＮ１４、ＣＤ３７、ＣＤ８２、ＣＤ１５１、ＣＤ２３１、ＣＤ１０２、ＮＯＴＣＨ１、ＮＯＴＣＨ２、ＮＯＴＣＨ３、ＮＯＴＣＨ４、ＤＬＬ１、ＤＬＬ４、ＪＡＧ１、ＪＡＧ２、ＣＤ４９ｄ／ＩＴＧＡ４、ＩＴＧＢ５、ＩＴＧＢ６、ＩＴＧＢ７、ＣＤ１１ａ、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１１ｃ、ＣＤ１８／ＩＴＧＢ２、ＣＤ４１、ＣＤ４９ｂ、ＣＤ４９ｃ、ＣＤ４９ｅ、ＣＤ５１、ＣＤ６１、ＣＤ１０４、Ｆｃレセプター、インターロイキンレセプター、イムノグロブリン、ＭＨＣ－ＩまたはＭＨＣ－ＩＩ成分、ＣＤ２、ＣＤ３イプシロン、ＣＤ３ゼータ、ＣＤ１３、ＣＤ１８、ＣＤ１９、ＣＤ３０、ＴＳＧ１０１、ＣＤ３４、ＣＤ３６、ＣＤ４０、ＣＤ４０Ｌ、ＣＤ４４、ＣＤ４５、ＣＤ４５ＲＡ、ＣＤ４７、ＣＤ８６、ＣＤ１１０、ＣＤ１１１、ＣＤ１１５、ＣＤ１１７、ＣＤ１２５、ＣＤ１３５、ＣＤ１８４、ＣＤ２００、ＣＤ２７９、ＣＤ２７３、ＣＤ２７４、ＣＤ３６２、ＣＯＬ６Ａ１、ＡＧＲＮ、ＥＧＦＲ、ＧＡＰＤＨ、ＧＬＵＲ２、ＧＬＵＲ３、ＨＬＡ－ＤＭ、ＨＳＰＧ２、Ｌ１ＣＡＭ、ＬＡＭＢ１、Ｌ

ＡＭＣ１、ＬＦＡ－１、ＬＧＡＬＳ３ＢＰ、Ｍａｃ－１アルファ、Ｍａｃ－１ベータ、ＭＦＧＥ８、ＰＴＧＦＲＮ、ＳＬＩＴ２、ＳＴＸ３、ＴＣＲＡ、ＴＣＲＢ、ＴＣＲＤ、ＴＣＲＧ、ＶＴＩ１Ａ、ＶＴＩ１Ｂ、その他のエキソソームポリペプチド、およびそれらのあらゆる組み合わせであるが、ポリペプチド構築物をＥＶに輸送することができる多数の他のポリペプチドは、本発明の範囲内に含まれる。典型的には、本発明の多くの実施形態では、少なくとも１つのエキソソームポリペプチドを少なくとも１つのＰＯＩに融合させて融合タンパク質を形成し、これをＥＶに輸送し、次いでこれを遺伝子改変細胞によって分泌される。このようなＰＯＩは、固有の治療効果（例えば、抗体、二重特異性または多重特異性抗体誘導体、二重特異性Ｔ細胞エンゲージャー（ＢｉＴＥ）、サイトカイン、酵素などの場合）を有し得るが、これらはまた、他の治療剤（例えば、ｓｈＲＮＡまたはｍＲＮＡのようなＲＮＡ分子）のためのキャリアタンパク質として作用し得る。このような融合タンパク質はまた、リンカー、膜貫通ドメイン、サイトゾルドメイン、多量体化ドメインなどを含む、それらの機能を最適化するための種々の他の成分を含み得る。本明細書中に記載されるタンパク質およびポリペプチドは、ヒト起源であることが好ましいが、他の哺乳動物または非哺乳動物から得られてもよい。

【００１７】

第１の態様において、本発明は、細胞外認識ドメイン、少なくとも１つのプロテアーゼ切断部位および細胞内転写因子（ＴＦ）を含むキメラポリペプチドを含む遺伝子操作された細胞に関する。その標的（典型的には、標的細胞または標的臓器もしくは組織上に存在し得る）と相互作用する細胞外認識ドメインの作用を通して、プロテアーゼ切断ドメインは、細胞内ＴＦを放出するために切断を受ける。一旦放出されると、ＴＦは、細胞中に存在し、そして少なくともエキソソームポリペプチドを含む遺伝子産物をコードするポリヌクレオチドの転写を活性化し、これは、代表的には、ＰＯＩに融合され、これは、続いて、ＥＶに輸送される。ＴＦは、典型的には、ポリヌクレオチドの特定のポリヌクレオチド調節エレメントに結合し、それによって遺伝子産物の転写を誘導する。ＰＯＩは、有利な実施形態において、目的の治療用タンパク質、または操作された細胞によって産生された別の生体分子を、問題の細胞によって産生されたＥＶ（好ましくはエキソソーム）に輸送することができるタンパク質である。

【００１８】

一実施形態では、ＴＦによる内因性転写を介して産生される遺伝子産物は、目的のタンパク質（ＰＯＩ）に融合した、典型的には治療活性を有するエキソソームポリペプチドである。目的のタンパク質は、本質的に任意のタンパク質、例えば、抗体、単一鎖状抗体、または二重特異性もしくは多重特異性抗体もしくは抗体誘導体などの任意の他の抗体誘導体、二重特異性Ｔ細胞エンゲージャー（ＢｉＴＥ）、レセプター、インターロイキンなどのサイトカイン、カスパーゼ、グランザイム、Ｃａｓ、Ｃａｓ９などの酵素、チェックポイント阻害剤、共刺激阻害剤、ＮＰＣ－１もしくはシスチノシンなどの膜輸送体、スプライシング因子、イントラボディ、単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、アフィボディ、ｂｉ－ｏｃｈ多重特異性抗体もしくはバインダー、レセプター、リガンド、酵素、例えば、酵素補充療法または遺伝子編集、腫瘍抑制剤、ウイルスまたは細菌阻害剤、細胞成分タンパク質、ＤＮＡおよび／またはＲＮＡ結合タンパク質、ＤＮＡ修復阻害剤、ヌクレアーゼ、プロテイナーゼ、インテグラーゼ、転写因子、成長因子、アポトーシス阻害剤および誘導剤、毒素（例えば、シュードモナス外毒素）、構造タンパク質、ＮＴ３／４などの神経栄養因子脳由来神経栄養因子（ＢＤＮＦ）と神経成長因子（ＮＧＦ）、および２．５Ｓベータサブユニットなどの個々のサブユニットイオンチャネル、膜輸送体、タンパク質恒常性因子、細胞シグナル伝達に関与するタンパク質、翻訳および転写関連タンパク質、ヌクレオチド結合タンパク質、タンパク質結合タンパク質、脂質結合タンパク質、グリコサミノグリカン（ＧＡＧ）およびＧＡＧ結合タンパク質代謝タンパク質、細胞ストレス調節タンパク質、炎症および免疫系調節タンパク質、ミトコンドリアタンパク質、ならびに熱ショックタンパク質などであってもよい。１つの好ましい実施形態において、ＰＯＩは、標的細胞における遺伝子編集を可能にするために、ＣＲＩＳＰＲ関連（Ｃａｓ）ポリペプチドである

。あるいは、別の好ましい実施形態において、Ｃａｓポリペプチドは、標的化された遺伝子工学を可能にするために、触媒的に不活性であり得る。さらに別の代替手段は、任意の他の型のＣＲＩＳＰＲエフェクター（例えば、単一のＲＮＡ誘導エンドヌクレアーゼＣｐｆ１）であり得る。さらなる好ましい実施形態は、リソソーム蓄積症のための酵素、例えば、イミグルセラーゼ、アルファ－ガラクトシダーゼ、アルファ－Ｌ－イズロニダーゼ、イズロン酸－２－スルファターゼおよびイズルスルファターゼなどのグルコセレブロシダーゼ、アリールスルファターゼ、ガルスルファーゼ、酸アルファグルコシダーゼ、スフィンゴミエリナーゼ、ガラクトセレブロシダーゼ、ガラクトシルセラミダーゼ、セラミダーゼ、アルファ－Ｎ－アセチルガラクトサミニダーゼ、ベーター－ガラクトシダーゼ、リソソーム酸性リパーゼ、酸性スフィンゴミエリナーゼ、ＮＰＣ１、ＮＰＣ２、ヘパランスルファミダーゼ、Ｎ－アセチルグルコサミニダーゼ、ヘパラン－α－グルコサミニド－Ｎ－アセチルトランスフェラーゼ、Ｎ－アセチルグルコサミン６－スルファターゼ、ガラクトース－６－硫酸スルファターゼ、ガラクトース－６－硫酸スルファターゼ、ヒアルロニダーゼ、α－Ｎ－アセチルノイラミニダーゼ、ＧｌｃＮＡｃホスホトランスフェラーゼ、ムコリピン、パルミトイルタンパク質チオエステラーゼ、トリペプチジルペプチダーゼＩ、パルミトイルタンパク質チオエステラーゼ１、トリペプチジルペプチダーゼ１、バテニン、リンクリン、アルファ－Ｄ－マンノシダーゼ、ベーター－マンノシダーゼ、アスパルチルグルコサミニダーゼ、α－Ｌ－フコシダーゼ、シスチノシン、カテプシンＫ、シアリン、ＬＡＭＰ２、ならびにヘキソアミニダーゼを含む群から選択されるＰＯＩを含む。他の好ましい実施形態では、ＰＯＩは、例えば、炎症反応を修飾する細胞内タンパク質、例えば、メチラーゼやブロモドメインのような後成的なタンパク質、または筋肉機能を変更する細胞内タンパク質、例えばＭｙｏＤやＭｙｆ５などの転写因子筋収縮を調節するタンパク質例えばミオシン、アクチン、トロポニンなどのカルシウム／結合タンパク質、または構造タンパク質、例えば、ジストロフィン、ミニジストロフィン、マイクロジストロフィン、ユートロフィン、タイチン、ネブリン、ジストロフィン関連タンパク質、例えば、ジストロブレビン、シントロフィン、シンコリン、デスミン、サルコグリカン、ジストログリカン、サルコスパン、アグリン、および／またはフクチンであってもよい。ＰＯＩのさらなる例としては、ケモカイン、ケモカインレセプター、キメラ抗原レセプター、サイトカイン、サイトカインレセプター、分化因子、成長因子、成長因子レセプター、ホルモン、代謝酵素、病原体由来のタンパク質、増殖誘導因子、レセプター、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ、部位特異的ヌクレアーゼ、小分子の２次メッセンジャー合成酵素、Ｔ細胞レセプター、毒素由来タンパク質、転写活性化因子、転写抑制因子、転写活性化因子、転写抑制因子、翻訳レギュレーター、翻訳アクチベーター、翻訳リプレッサー、活性化免疫レセプター、抗体、阻害剤のアポトーシス、アポトーシス誘導因子、人工Ｔ細胞レセプター、免疫賦活剤、免疫阻害剤、ＲＮＡ誘導ＤＮＡ結合タンパク質である阻害免疫レセプター、および第２結合トリガー転写スイッチが挙げられる。ＰＯＩは、典型的には、それらの名称、任意の他の命名法によって、または当業者に知られているように、別段の指示がない限り、ヒト起源のタンパク質またはペプチドであり、それらは、Ｕｎｉｐｒｏｔ、ＲＣＳＢなどの様々な公的に入手可能なデータベースに見出すことができる。

【００１９】

本発明の一実施形態では、内因性転写後の遺伝子産物は、ＲＮＡ結合タンパク質（ＲＢＰ）である。ＲＮＡ結合タンパク質の非限定的な例としては、ｈｎＲＮＰＡ１、ｈｎＲＮＰＡ２Ｂ１、ＤＤＸ４、ＡＤＡＤ１、ＤＡＺＬ、ＥＬＡＶＬ４、ＩＧＦ２ＢＰ３、ＳＡＭＤ４Ａ、ＴＤＰ４３、ＦＵＳ、ＦＭＲ１、ＦＸＲ１、ＦＸＲ２、ＥＩＦ４Ａ１－３、ＭＳ２コートタンパク質、Ｃａｓ６、Ｃａｓ９、ＰＵＦ、ＰＵＦ５３１、ＰＵＦｘ２、ＰＵＦｅｎｇ、および他のＰＵＦドメイン、ならびにそれらの任意のドメイン、部分または誘導体が挙げられる。より広義には、ＲＮＡ結合タンパク質およびドメインの特定のサブクラス、例えば、ｍＲＮＡ結合タンパク質（ｍＲＢＰ）、ｒＲＮＡ前駆体結合タンパク質、ｔＲＮＡ結合タンパク質、核または核小体低分子ＲＮＡ結合タンパク質、非コードＲＮＡ結合タンパク質、ならびに転写因子（ＴＦ）もまた、遺伝子産物に含まれ、ＲＮＡカーゴを

エキソソームのようなＥＶに輸送するために使用され得る。ＲＮＡ結合ＰＯＩのさらなる非限定的な例には、ＤＥＡＤ、ＫＨ、ＧＴＰ＿ＥＦＴＵ、ｄｓｒｍ、Ｇ－ｐａｔｃｈ、ＩＢＮ＿Ｎ、ＳＡＰ、ＴＵＤＯＲ、ＲｎａｓｅＡ、ＭＭＲ－ＨＳＲ１、ＫＯＷ、ＲｎａｓｅＴ、ＭＩＦ４Ｇ、ｚｆ－ＲａｎＢＰ、ＮＴＦ２、ＰＡＺ、ＲＢＭ１　ＣＴＲ、ＰＡＭ２、Ｘｐｏ１、Ｐｉｗｉ、ＣＳＤ、およびＲｉｂｏｓｏｍａｌ＿Ｌ７Ａｅなどの一本鎖および二本鎖ＲＢＤ（ｓｓＲＢＤおよびｄｓＲＢＤの両方であり得る）のスモールＲＮＡ結合ドメイン（ＲＢＤ）が含まれる。このようなＲＮＡ結合ドメインは、ＰＵＦｘ２の場合のように、単独で、または他のものと組み合わせて、複数存在し得、そしてまた、それらの重要な機能（すなわち、目的のＲＮＡカーゴ（例えば、ｍＲＮＡまたは短いＲＮＡ）を輸送する能力）が維持される限り、より大きなＲＮＡ結合タンパク質構築物の一部を形成し得る。天然に存在するＲＮＡカーゴは、ＲＮＡ結合タンパク質によってこのようなＥＶおよびエキソソームにロードされ得る。必要に応じて、この細胞は、ＲＮＡカーゴをコードし、そしてそれを産生するか、または過剰発現する核酸構築物を含むように、さらに遺伝的に改変され得る。

【００２０】

ＲＢＰによって輸送されるＲＮＡ治療薬カーゴは、例えば、以下の非限定的なクラスのＲＮＡから選択され得る：ｍＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ＩｎｃＲＮＡ、ｎｃＲＮＡ、ｐｉＲＮＡ、ｐｉｗｉＲＮＡ、ｃｉｒｃＲＮＡ、ｔＲＮＡ、ｒＲＮＡ、ｃｒＲＮＡ、ＴＬＲ活性化オリゴヌクレオチド、ならびに任意の他の目的のＲＮＡ分子。さらなる実施形態では、目的のＤＮＡ分子がＥＶに輸送されるように、ＲＮＡの代わりにＤＮＡカーゴを使用してもよい。さらなる実施形態では、目的のＲＮＡカーゴが、ＲＮＡ結合ＰＯＩとの相互作用を可能にするドメインまたはモチーフを含むことが好都合である。前記ドメインおよびモチーフは、ヌクレオチドの５’末端または３’末端の近く、典型的には非翻訳領域（ＵＴＲ）内、あるいはポリヌクレオチド末端からさらに離れたドメインおよびモチーフ、潜在的にはコード領域内に位置し得る。１つの非限定的な例として、その転写がキメラポリペプチドのＴＦによって活性化される適切な遺伝子産物は、ＣＤ６３、ＣＤ８１、Ｌａｍｐ２、シンデカン、Ａｌｉｘ（すなわち、適切なエキソソームタンパク質／ポリペプチド）とＰＵＦ（ＲＮＡ結合タンパク質／ポリペプチド）との間の融合タンパク質であってもよく、これは、適切な細胞内ＲＮＡモチーフに結合し、そして細胞によって産生されるＥＶへのＲＮＡ分子のロードをもたらす。この細胞工学戦略は、ｉｎ　ｓｉｔｕで、例えば、コードＲＮＡ分子（治療的有用性の適当なタンパク質をコードするｍＲＮＡなど）または無コードＲＮＡ分子、例えば、ｍｉＲＮＡまたはｓｈＲＮＡなどのサイレンシングＲＮＡ分子を送達する無常に有効な方法であり、このタイプの細胞媒介ｉｎ　ｓｉｔｕ　ＥＶ送達は、悪性疾患（固形癌または血液癌など）および潜在的に無悪性疾患を治療するための潜在的に形質転換可能なアプローチである。

【００２１】

さらなる実施形態では、細胞外認識ドメインは、抗体、抗体誘導体、単一鎖状フラグメント、単一鎖状抗体、ナノボディ、単一ドメイン抗体、ラマ抗体などのラクダ抗体、非抗体認識足場、ペプチド、レセプターのリガンド、接着性分子、レセプター、Ｔ細胞レセプター、サイトカインレセプター、インターロイキンレセプター、細胞外マトリックスコンポーネント、またはそれらの任意の組み合わせである。ＳｃＦｖならびに任意選択で抗体および抗体様タンパク質に由来する他のタイプの一本鎖ベースの認識タンパク質は、非常に好適な細胞外認識ドメインを表す。細胞外認識ドメインが結合し得る標的抗原の非限定的な例としては、疾患関連抗原、例えば、癌関連抗原、自己免疫疾患関連抗原、病原体関連抗原、炎症関連抗原などが挙げられる。例えば、細胞外認識ドメインは、癌関連抗原、例えば、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ３８、ＣＤ３０、Ｈｅｒ２／ｎｅｕ、ＥＲＢＢ２、ＣＡ１２５、ＭＵＣ－１、前立腺特異的膜抗原（ＰＳＭＡ）、ＣＤ４４表面接着性分子、メソテリン、癌胎児性抗原（ＣＥＡ）、上皮増殖因子レセプター（ＥＧＦＲ）、ＥＧＦＲｖＩＩＩ、血管内皮増殖因子レセプター－２（ＶＥＧＦＲ２）、高分子量メラノーマ関連抗原（ＨＭＷ－ＭＡＡ）、ＭＡＧＥ、ＭＡＧＥ－Ａ１、ＩＬ－１３Ｒ－ａ２、ＧＤ２などに

特異的であり得る。癌関連抗原としては、例えば、４－１ＢＢ、５Ｔ４、腺癌抗原、α－フェトプロテイン、ＢＡＦＦ、Ｂリンパ腫細胞、Ｃ２４２抗原、ＣＡ－１２５、炭酸脱水酵素９（ＣＡ－ＩＸ）、Ｃ－ＭＥＴ、ＣＣＲ４、ＣＤ１５２、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２００、ＣＤ２２、ＣＤ２２１、ＣＤ２３（ＩｇＥレセプター）、ＣＤ２８、ＣＤ３０（ＴＮＦＲＳＦ８）、ＣＤ３３、ＣＤ４、ＣＤ４０、ＣＤ４４　ｖ６、ＣＤ５１、ＣＤ５２、ＣＤ５６、ＣＤ７４、ＣＤ８０、ＣＥＡ、ＣＮＴ０８８８、ＣＴＬＡ－４、ＤＲＳ、ＥＧＦＲ、ＥｐＣＡＭ、ＣＤ３、ＦＡＰ、フィブロネクチンエクストラドメインＢ、葉酸レセプター１、ＧＤ２、ＧＤ３ガングリオシド、糖タンパク質７５、ＧＰＮＭＢ、ＦＩＥＲ２／ｎｅｕ、ＦＩＧＦ、ヒト散乱因子レセプターキナーゼ、ＩＧＦ－１レセプター、ＩＧＦ－Ｉ、ＩｇＧ１、Ｌ１－ＣＡＭ、ＩＬ－１３、ＩＬ－６、インスリン様成長因子Ｉレセプター、インテグリンα５β１、インテグリンαｖβ３、ＭＯＲＡｂ－００９、ＭＳ４Ａ１、ＭＵＣ１、ムチンＣａｎＡｇ、Ｎ－グリコリルノイラミン酸、ＮＰＣ－１Ｃ、ＰＤＧＦ－Ｒα、ＰＤＬ１９２、ホスファチジルセリン、前立腺癌細胞、ＲＡＮＫＬ、ＲＯＮ、ＲＯＲ１、ＳＣＨ　９００１０５、ＳＤＣ１、ＳＬＡＭＦ７、ＴＡＧ－７２、テネイシンＣ、ＴＧＦベータ２、ＴＧＦ－β、ＴＲＡＩＬ－Ｒ１、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２、腫瘍抗原ＣＴＡＡ１６．８８、ＶＥＧＦ－Ａ、ＶＥＧＦＲ－１、ＶＥＧＦＲ２、およびビメンチンも挙げられる。この抗原は、代替の実施形態において、炎症性疾患または自己免疫疾患（例えば、１型糖尿病、多発性硬化症、視神経脊髄炎、関節リウマチ）に関連し得る。炎症性疾患に関連する抗原の非限定的な例としては、例えば、ＡＯＣ３（ＶＡＰ－１）、ＣＡＭ－３００１、ＣＣＬ１（エオタキシン－１）、ＣＤ１２５、ＣＤ１４７（ベイシジン）、ＣＤ１５４（ＣＤ４０Ｌ）、ＣＤ２、ＣＤ２０、ＣＤ２３（ＩｇＥレセプター）、ＣＤ２５（ＩＬ－２レセプターの鎖）、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ５、ＩＦＮ－α、ＩＦＮ－ｇ、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レセプター、インテグリンα４、インテグリンα４β７、ＬＦＡ－１（ＣＤ１１ａ）、ミオスタチン、ＯＸ－４０、スクレロスシン、ＳＯＳＴ、ＴＧＦベータ１、ＴＮＦ－α、およびＶＥＧＦ－Ａが挙げられる。

【００２２】

さらなる実施形態において、細胞の遺伝子操作は、インビトロまたはエクスビボで行われる。細胞は、細胞外認識ドメイン、少なくとも１つのプロテアーゼ切断部位および細胞内転写因子を含むキメラポリペプチドを発現するように遺伝子操作され、さらに、問題の遺伝子産物をコードするポリヌクレオチドを含むように遺伝子操作される。細胞は、処置される個体から供給され得るが、関連するドナー、無関係のドナー、一致するドナー、または一致しないドナーから得られ得る同種異系細胞を利用することもまた可能である。遺伝子工学プロセスは、ウイルス形質導入（例えば、レンチウイルス、アデノウイルス、またはＡＡＶなどを使用する）、非ウイルストランスフェクション方法、エレクトロポレーションなどを含む従来の細胞工学手段を使用して実施することができる。好ましくは、モノクローナル培養物を作製し、単離し、増殖させ、遺伝的および発現特性についてスクリーニングする。多くの場合、不死化細胞株は、細胞のさらなる遺伝子工学のための適切な出発物質である。細胞株は、問題の操作された治療細胞のスケーラブルな製造を可能にする利点を有するが、プライマリー細胞および組織から出発することは、維持された天然の遺伝子型、表現型および他の特性、ならびに細胞の機能性などの他の利点を提供し得る。

【００２３】

さらなる実施形態では、遺伝子改変のために選択される細胞は、エフェクター免疫細胞、例えば、Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ８＋Ｔ細胞、ＣＤ４＋Ｔ細胞、マクロファージ、単球、またはナチュラルキラー（ＮＫ）細胞である。一般に、該細胞は、Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ８＋Ｔ細胞、ＣＤ４＋Ｔ細胞、調節性Ｔ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、ナチュラルキラーＴ（ＮＫＴ）細胞、Ｂ細胞、形質細胞、樹状細胞（ＤＣ）、マクロファージ、単球、好中球、上皮細胞、内皮細胞、幹細胞、ＭＳＣ、胎盤由来細胞、羊膜由来細胞、臍帯コード細胞、臍帯コード血球、ＨＥＫ細胞、ニューロン細胞、アストロサイト、ミク

ログリアなどの適当な細胞タイプの非限定的な例のいずれか１つから選択され得る。これらの臓器の疾患のために特定の組織から作製された細胞、例えばハンティントン、パーキンソンまたはアルツハイマー病の治療のためのミクログリア細胞、またはニーマンピックタイプＣ、ＨＢＶもしくはＨＣＶの治療のためのヘパトサイトなどが有利であり得る。

【００２４】

さらなる有利な実施形態において、本発明の特に適切な細胞は、癌および／または自己免疫および／または免疫障害の治療のための有用性を有する細胞を含む。このような特に有利な細胞には、マクロファージ、単球、Ｂ細胞、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、および他の免疫系細胞が含まれる。例えば、操作されたマクロファージもしくは単球、操作されたＮＫもしくはＮＫＴ細胞、および／または操作されたＴ細胞は、種々の癌セッティングにおいて非常に有利であり得、ここで、このようなＥＶ産生細胞供給源は、エキソソームのような治療用ＥＶのインサイチュ送達を可能にする非常に強力なキメラ抗原レセプター細胞として機能し得、ここで、このようなエキソソームは、目的の少なくとも１つの生体分子を含み得る。上述のように、インサイチュで産生されたＥＶによる送達のための目的の好適な生体分子には、抗体、単一鎖状抗体、または任意の他の抗体誘導体（例えば、ナノボディ、ｓｃＦｖ、単一ドメイン抗体、二重特異性抗体、三重特異性抗体など）、二重特異性Ｔ細胞エンゲージャー（ＢｉＴＥ）、多重特異性Ｔ細胞エンゲージャー、レセプター、サイトカイン、酵素、チェックポイント阻害剤、共刺激阻害剤、ＲＮＡ結合タンパク質、トランスポーター、スプライシング因子、転写因子、腫瘍サプレッサーなどのような目的のタンパク質、ならびに種々の他の型の生体分子カーゴ分子が含まれる。非限定的な例として、このような細胞はまた、ｍＲＮＡ、ｓｇＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ＩｎｃＲＮＡ、ｎｃＲＮＡ、ｐｉＲＮＡ、ｐｉｗｉＲＮＡ、ｃｉｒｃＲＮＡ、ｔＲＮＡ、ｒＲＮＡ、ｃｒＲＮＡ、およびこれらの任意の組み合わせを含む非限定的な例の基から選択される少なくとも１つのＲＮＡカーゴ分子を含むように操作され得る。

【００２５】

さらなる実施形態において、プロテアーゼ切断ドメインは、少なくとも１つのプロテアーゼ切断部位を含む。部位は、Ｓ１、Ｓ２および／またはＳ３切断部位、すなわち、１つ、２つ、もしくは３つ、または潜在的にそれ以上の切断部位のいずれかを含み得る。一実施形態では、プロテアーゼ切断部位は、Ｓ２タンパク質分解切断部位を含むヘテロ二量体化ドメインを含む。さらに別の実施形態では、Ｓ１タンパク質分解切断部位は、アミノ酸配列Ａｒｇ－Ｘ－（Ａｒｇ／Ｌｙｓ）－Ａｒｇを含むフリン様プロテアーゼ切断部位であり、ここで、Ｘは任意のアミノ酸（配列番号１および２）である。Ｓ３切断部位はγ－セクレターゼ複合体によってプロセシングされ、膜アンカーから細胞内転写因子が放出される。Ｓ２切断部位はさらに、ｕＰＡ、プラスミン、ＰＳＡ、ＭＭＰメタロプロテアーゼ、カテプシンＢおよびトロンビンなどの代替プロテアーゼによって切断されるように修飾することができる。これは、プロテアーゼ特異性を変化させるためにアミノ酸配列を変異させるためのＳ２切断部位でのレセプターの変異誘発によって達成され得る。さらに、Ｓ２部位を変異させて臓器特異的または細胞特異的プロテアーゼにより切断し、レセプター活性化の特異性をさらに高めることができる。Ｓ３切断部位は、天然のγ－セクレターゼとは別の異なるプロテアーゼによって切断されるように変異させることもできる。Ｓ３部位は、任意の膜内プロテアーゼまたは選択された細胞によって発現される任意の細胞内プロテアーゼによって切断されるように突然変異させることができる。

【００２６】

別の実施形態において、キメラポリペプチドレセプターおよびＰＯＩ含有遺伝子産物をコードするポリヌクレオチドを用いて遺伝子操作される本明細書中の細胞はまた、増殖誘導レセプターをさらに含み得る。このような増殖誘導レセプターは、細胞によって構成的に発現され得るか、またはキメラポリペプチドレセプターのＴＦの制御下にあるように操作され得、その結果、抗原認識によって誘発される。このようなレセプターは、例えば、特定のサイトカインまたは結合すると細胞内増殖反応を活性化する任意の他の可溶性分子

に結合する単一鎖状抗体を含み得る。非限定的な例として、ＥｐｏＲＤ２ドメインに融合された単一鎖状抗体は、ＧＰ１３０の細胞内ドメインとさらに融合され、問題の抗原による活性化の際に細胞増殖をもたらす。増殖誘導レセプターは、例えば、癌細胞、ＩＬ１０、ＴＧＦベータまたはＶＥＧＦ上に発現されるＰＤ－Ｌ１のような癌に関連するタンパク質によって誘導される。これは、本明細書中の操作された細胞（例えば、Ｔ細胞）の増殖をもたらし、同時に、腫瘍関連タンパク質をダウンレギュレートし、これは、治療効果をさらに増加させる。さらに別の非限定的な例において、増殖誘導レセプターは、抗原係合の際に、細胞分裂および増殖も含むＴ細胞応答を誘導する従来のキメラ抗原レセプター（ＣＡＲ）からなり得る。

【００２７】

さらに別の実施形態では、融合ポリペプチドは、Ｎ末端からＣ末端まで、および共有結合で含むキメラノッチポリペプチドである。ここで、ノッチの細胞外認識ドメインは、ノッチレセプター上に天然に存在しない認識ドメインと置き換えられている。さらに、キメラノッチは、Ｌｉｎ－１２ノッチリピート、Ｓ２タンパク質分解切断部位、およびＳ３タンパク質分解切断部位を含む膜貫通ドメインを含む。最後に、キメラノッチは、ノッチ調節領域に異種性である細胞内転写因子を含み、細胞外認識ドメインがその標的に結合すると、Ｓ２およびＳ３プロテアーゼ切断部位での切断が誘導され、それによって、ポリヌクレオチドの転写を活性化して遺伝子産物を産生する細胞内転写因子が放出される。その産生に続いて、遺伝子産物は、細胞によって分泌されるＥＶと会合する。

【００２８】

さらに別の実施形態において、遺伝子産物をコードするポリヌクレオチドは、コード配列に作動可能に連結された、転写因子に応答する転写制御エレメントをさらに含み得る。キメラポリペプチドレセプターと、転写因子の制御下にある少なくとも１つのポリヌクレオチドによってコードされる少なくとも１つの遺伝子産物のＥＶ媒介送達の活性との間の相互作用関係間の機能的結合が本発明にとって重要である。癌細胞の近くにｉｎ　ｓｉｔｕ送達するための、ＣＡＲ細胞と設計されたＥＶ技術のこのユニークな組み合わせは、これまでのところ例えばＣＡＲ　ＴやＣＡＲ　ＮＫ細胞治療には比較的扱いにくいことが証明されている固形腫瘍の治療法を変えることができる。

【００２９】

さらなる実施形態において、細胞は、（ｉ）細胞外認識ドメイン、（ｉｉ）プロテアーゼ切断部位、および（ｉｉｉ）細胞内転写因子のうちの少なくとも１つが融合ポリペプチド間で異なる、少なくとも２つのタイプの融合ポリペプチドを産生するように遺伝的に改変され得る。１つの選択肢は、融合ポリペプチドの細胞外認識ドメインが互いに異なる２つ（またはそれ以上、例えば３つまたは４つ）の融合ポリペプチドを利用することである。このようにして、ＥＶベースの活性の誘発の特異性をより大きく制御することができ、多数の抗原を標的細胞の標的として使用することができる。例として、同一の操作された細胞上に存在する２つのキメラ抗原レセプターは、様々な形態の血液腫瘍および固形腫瘍を標的とする文脈において、非限定的な例として、（ｉ）ＨＥＲ２およびＩＬ１３Ｒａｌｐｈａ２を同時に標的とするために、（ｉｉ）ＣＤ１９およびＣＤ３、（ｉｉｉ）ＣＴＬＡ４およびＰＤＬ１、ならびに（ｉｖ）ＬＡＧ３およびＰＤＬ１を標的とするために使用され得る。

【００３０】

さらなる実施形態において、遺伝子産物（タンパク質ならびに任意にＲＮＡおよび／または目的の他の生体分子）ならびに任意の他の必要とされるタンパク質／ＲＮＡの内因性産生は、複数の異なるキメラポリペプチドレセプターの動作、異なる細胞内転写因子の放出、および同じまたは異なる遺伝子産物をコードするポリヌクレオチドを制御し得る種々の特異的転写制御部位への結合を通して生じ得る。非限定的な例として、例えば、以下の複数のキメラ、例えば、ノッチベースのポリペプチド活性化では、ＣＤ６３－ＰＵＦ（ＲＮＡ結合タンパク質に融合したエキソソームタンパク質）および１つ以上のＰＵＦ結合配列を有するｍＲＮＡを含む細胞エキソソームの生成、ならびに免疫回避および組織親和性

のためのエキソソームポリペプチドの潜在的な発現に関与する成分を細胞は産生する。さらに、細胞が単一のキメラノッチレセプターの単一のコピー、複数のキメラレセプターの複数のコピー、複数の異なる合成ノッチレセプターの複数のコピー、またはそれらの任意の組み合わせを発現し得ることは明らかである。

【００３１】

さらなる態様において、本発明は、操作された細胞によって産生される細胞外小胞（ＥＶ）に関する。産生されたＥＶに、キメラポリペプチドレセプターの細胞内転写因子によって発現される遺伝子産物をロードする。さらに、細胞が数千のＥＶを生産することが優先的であり、数万のＥＶ、さらには数百万のＥＶを生産することがより好ましい。さらなる好ましい実施形態において、細胞によって産生されるＥＶは、エキソソームである。上述したように、本発明にとって重要なことは、ＥＶ－ＰＯＩ遺伝子産物の転写（すなわち、少なくともエキソソームタンパク質をコードするポリヌクレオチドからの発現）を介して、ＥＶ－ＰＯＩ融合タンパク質および必要に応じてＲＮＡ薬剤カーゴをＥＶにロードすることである。好ましくは、ＥＶは、遺伝子産物の複数のコピー、例えば、ＥＶ当たり約１０、約１００、またはさらには約１０００、またはさらには１００００まで、またはそれ以上のコピーを含む。

【００３２】

さらなる態様において、本発明は、遺伝子産物をコードするポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクターに関する。前記組換え発現ベクターは、コード配列に作動可能に連結された、転写因子に応答する転写制御エレメントをさらに含み得る。さらに、転写制御エレメントは、細胞に対して内因性であっても異種であってもよく、また、ポリヌクレオチドのコード配列は、細胞に対して内因性であっても異種であってもよい。さらに、本発明は、上記のポリヌクレオチドによってコードされる遺伝子産物に関する。典型的には、遺伝子産物は、エキソソームポリペプチドおよびＰＯＩを含み、ＰＯＩは、治療活性または標的化活性自体のいずれかを有するか、あるいは、例えば、目的の他の生体分子（例えば、ＲＮＡもしくはＤＮＡまたはタンパク質もしくはペプチド）と相互作用して、そのような生体分子を細胞によって産生されるＥＶに輸送することができる輸送特性を有する。

【００３３】

さらなる態様において、本発明は、本発明のキメラポリペプチドレセプター、ならびにキメラポリペプチドレセプター自体をコードする組換え発現ベクターに関する。

【００３４】

一般的に、ポリヌクレオチド構築物は種々の種類のベクターおよび発現コンストラクト中に存在し得る。例えば、プラスミド、ミニサークル、ウイルス（統合または非統合化）、直鎖状ＤＮＡなどの直鎖状もしくは円形核酸、または一重もしくは二重ストランドＤＮＡストレッチ、ｍＲＮＡ、変更ｍＲＮＡなどである。これらのベクターおよび／または発現構築物は、誘導性であり得、テトラサイクリンもしくはドキシサイクリンまたは任意の他の型のインデューサーのような外部因子によって制御され得る。さらに、本発明のポリペプチドを含むポリヌクレオチド構築物は、上記のように、本質的に任意の型のＥＶ供給源細胞中に存在し得る。細胞（代表的には、適切なＥＶ産生細胞タイプを含む細胞培養物）への導入は、上記のように、トランスフェクション、ウイルス媒介形質転換、エレクトロポレーションなどの種々の従来の技術を使用して達成され得る。トランスフェクションは、従来のトランスフェクション試薬（例えば、リポソーム、ＣＰＰ、カチオン性脂質またはカチオン性ポリマー、リン酸カルシウム、デンドリマーなど）を使用して実施され得る。ウイルス媒介トランスフェクションもまた、非常に適切な方法論であり、そしてアデノウイルス、ＡＡＶまたはレンチウイルスベクターのような従来のウイルスベクターを使用して実施され得る。ウイルス媒介形質転換は、細胞バンキングのための安定な細胞株を作製する場合、すなわち、ＥＶ産生細胞源のマスター細胞バンク（ＭＣＢ）およびワーキング細胞バンク（ＷＣＢ）を作製する場合に特に関連する。安定な細胞および細胞株の作製はまた、エレクトロポレーション、脂質ベースのトランスフェクション、ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）ベースのトランスフェクション、または安定に操作された細胞および／

もしくは細胞株を作製するための任意の他の適切な方法論を使用して、有利に達成され得る。

【００３５】

さらなる実施形態において、本発明の細胞は、例えば、プライマリー細胞または細胞株であり得る。細胞は、例えば、ｈＴｅｒｔ、ＳＶ４０Ｔ抗原、Ｃ－ＭＹＣ、ｖ－ｍｙｃ、Ｅ６／Ｅ７、または任意の他の不死化ストラテジーの非限定的な実施例を用いて不死化された可能性がある。

【００３６】

さらなる態様では、本発明は、ｉｎ　ｖｉｖｏ、ｅｘ　ｖｉｖｏ、および／またはｉｎ　ｖｉｔｒｏのいずれかで治療効果を発揮する方法に関し、以下を含む：

（ｉ）（ａ）遺伝子産物をコードするポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクター、および（ｂ）キメラポリペプチドレセプターをコードする組換え発現ベクターをｅｘ　ｖｉｖｏまたはｉｎ　ｖｉｔｒｏで細胞に導入すること、

（ｉｉ）遺伝的に改変された細胞を個体に投与すること。

【００３７】

治療効果は、遺伝的に改変された（遺伝子組み換え）細胞によって産生され、放出されるＥＶ（典型的にはエキソソーム）によって発揮されると推測される。操作された細胞から放出されるＥＶは、上述のように、例えば標的細胞の内部および／もしくは標的細胞の外部、ならびに／または体内の任意の他の好適な場所、例えば腫瘍もしくは転移部位、または本質的に任意の臓器もしくは組織に治療効果を及ぼし得る様々なタイプの薬剤カーゴ（タンパク質またはＲＮＡカーゴなど）を含み得る。

【００３８】

さらに別の態様において、本発明は、本明細書中の遺伝子改変細胞を含む医薬組成物に関し、さらに本発明はまた、医薬において、例えば、癌、炎症性疾患、自己免疫疾患、遺伝病、感染症、代謝疾患、ＣＮＳ疾患、リソソーム貯蔵障害、ならびに神経変性疾患の予防および／または処置において使用するための、このような遺伝子改変細胞および／または医薬組成物に関する。

【００３９】

操作された細胞（代表的にはその集団）は、個々に、全身的に、局所的に、局所的に、または必要な部位に直接投与され得る。本発明に係る細胞は、種々の異なる投与経路、例えば、耳介（耳）、口腔、結膜、皮膚、歯科、電気浸透、子宮頸管内、副鼻腔内、気管内、経腸、硬膜外、羊膜外、体外、血液透析、浸潤、間質性、腹腔内、羊膜内、動脈内、関節内、胆管内、気管支内、嚢内、心臓内、軟骨内、尾側、海綿体内、腔内、大脳内、大槽内、角膜内、冠状動脈内（歯科）、冠状動脈内、体内海綿体、皮内、椎間板内、管内、十二指腸内、硬膜内、表皮内、食道内、胃内、歯肉内、回腸内、病変内、管腔内、リンパ内、髄内、髄膜内、筋肉内、眼内、卵巣内、心膜内、腹腔内、胸膜内、前立腺内、肺内、洞内、脊髄内、滑膜内、腱内、精巣内、くも膜下腔内、胸腔内、尿細管内、腫瘍内、胸腺内パニック、子宮内、血管内、静脈内、静脈内ボーラス、点滴、脳室内、膀胱内、硝子体内、イオン導入、灌漑、喉頭、鼻、鼻胃、閉塞性ドレッシング技術、眼科、経口、中咽頭、その他、非経口、経皮、関節周囲、硬膜周囲、神経周囲、歯周、直腸、呼吸器（吸入）、球後、軟部組織、くも膜下、結膜下、皮下、舌下、粘膜下、局所、経皮、経粘膜、経胎盤、経気管、鼓室、尿管、尿道、および／もしくは膣内投与、ならびに／または上記の投与経路の任意の組み合わせを介して、ヒトまたは動物被験体に投与することができ、これらは、典型的には、治療される疾患および／またはそのような細胞およびＥＶ集団の特性に依存する。

【００４０】

さらに別の態様において、本発明は、本発明に従って遺伝子操作された細胞を含む医薬組成物に関する。典型的には、本発明による医薬組成物は、少なくとも１つの薬学的に許容される賦形剤と共に製剤化された１つのタイプの治療用遺伝子操作細胞（例えば、特定のタイプのキメラポリペプチドレセプターと、キメラポリペプチドレセプターの転写因子

に応答する治療用遺伝子産物をコードするポリヌクレオチドとを含む安定な細胞の集団）を含むが、１つより多いタイプの遺伝子操作細胞集団が、例えば、組み合わせ治療が望ましい場合には、医薬組成物に天然に含まれてもよい。しかし、当然ながら、上記のように、単一の細胞または単一の細胞の集団は、コード配列に作動可能に連結された、転写因子に応答する、２つ以上の種々のキメラポリペプチドレセプターおよび転写制御エレメントを含み得る。少なくとも１つの薬学的に受容可能な賦形剤は、任意の薬学的に受容可能な物質、組成物またはビヒクル、例えば、固形または液状充填剤、希釈剤、賦形剤、担体、凍結保護物質、抗凝集物質、血小板溶解物、血清アルブミン、および特に組換え的に産生されたヒト血清アルブミン、溶媒またはカプセル化物質を含む群から選択され得、これらは、例えば、懸濁、細胞集団の活性を維持、または体の１つの臓器もしくは部分から、別の臓器もしくは本体部へ（例えば、血液から任意の組織および／もしくは臓器ならびに／または目的の本体部へ）細胞集団の活性を保持もしくは輸送することに関与し得る。患者に投与される細胞の用量は、例えば、治療されるかまたは軽減される疾患または症状の数、投与経路、遺伝子産物の薬理作用、ＥＶの固有の特性、任意のターゲティングエンティティの存在、ならびに当業者に知られている関連性の種々の他のパラメータに依存するであろう。

【００４１】

したがって、本発明による細胞およびＥＶは、予防および／または治療目的、例えば、様々な疾患および障害の予防および／または治療および／または緩和に使用するために使用することができる。本発明が適用され得る疾患の非限定的な試料は、クローン病、潰瘍性大腸炎、強直性脊椎炎、関節リウマチ、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、サルコイドーシス、特発性肺線維症、乾癬、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）受容体関連周期性症候群（ＴＲＡＰＳ）、インターロイキン－１受容体拮抗薬（ＤＩＲＡ）の欠乏、子宮内膜症、自己免疫性肝炎、強皮症、筋炎、脳卒中、急性脊髄損傷、血管炎、ギランバレー症候群、急性心筋梗塞、ＡＲＤＳ、敗血症、髄膜炎、脳炎、肝不全、非アルコール性脂肪性肝炎（ＮＡＳＨ）、腎不全、心不全または任意の急性もしくは慢性臓器不全および関連する根本的な病因、移植片対宿主病、デュシェンヌ型筋ジストロフィーおよびその他の筋ジストロフィー、ゴーシェ病などのリソソーム蓄積症、ファブリー病、ＭＰＳＩ、ＩＩ（ハンター症候群）、ＩＩＩニーマンピック病、ポンペ病などアルツハイマー病を含む神経変性疾患、パーキンソン病、ハンティントン病および他のトリヌクレオチド反復関連疾患、認知症、ＡＬＳ、癌誘発性悪液質、食欲不振、ＩＩ型糖尿病、ならびに様々な癌を含む。事実上すべてのタイプの癌、例えば、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、急性骨髄性白血病、副腎皮質癌、エイズ関連癌、エイズ関連リンパ腫、肛門癌、虫垂癌、星状細胞腫、小脳または大脳、基底細胞癌、胆管癌、膀胱癌、骨腫瘍、脳幹神経膠腫、脳癌、脳腫瘍（小脳星細胞腫、脳星細胞腫／悪性神経膠腫、上衣腫、髄芽腫、テント上原始神経外胚葉性腫瘍、視覚経路および視床下部神経膠腫）、乳癌、気管支腺腫／カルチノイド、バーキットリンパ腫、カルチノイド腫瘍（小児、胃腸）、原発不明癌、中枢神経系リンパ腫、小脳星細胞腫／悪性神経膠腫、子宮頸癌、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性骨髄増殖性疾患、結腸癌、皮膚Ｔ細胞リンパ腫、線維形成性小円形細胞腫瘍、子宮内膜癌、上衣腫、食道癌、頭蓋外胚細胞腫瘍、性腺外胚細胞腫瘍、肝外胆管癌、眼癌（眼内黒色腫、網膜芽細胞腫）、胆嚢癌、胃（胃）癌、消化管カルチノイド、消化管間質腫瘍（ＧＩＳＴ）、胚細胞腫瘍（頭蓋外、性腺外、または卵巣）、妊娠性絨毛腫瘍、神経膠腫（脳幹の神経膠腫、大脳星細胞腫、視覚経路および視床下部神経膠腫）、胃カルチノイド、有毛細胞白血病、頭頸部癌、心臓癌、肝細胞（肝臓）癌、ホジキンリンパ腫、下咽頭癌、眼内黒色腫、膵島細胞癌（内分泌膵臓）、カポジ肉腫、腎臓癌（腎細胞癌）、喉頭癌、白血病（（急性リンパ芽球性（急性リンパ性白血病とも呼ばれる））、急性骨髄性（急性骨髄性白血病とも呼ばれる）、慢性リンパ性（慢性リンパ性白血病とも呼ばれる）、慢性骨髄性（慢性骨髄性白血病とも呼ばれる）、有毛細胞白血病））、唇および口腔、腔癌、脂肪肉腫、肝癌（原発）、肺癌（非小細胞、小細胞）、リンパ腫、エイズ関連リンパ腫、バーキットリンパ腫、皮膚Ｔ細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキン、髄芽腫、メルケル細胞癌、中

皮腫、原発不明の転移性扁平上皮性頸部癌、口内癌、多発性内分泌腫瘍症、多発性骨髄腫／プラズマ細胞腫瘍、菌状息肉腫、骨髄異形成／骨髄増殖性疾患、骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病（急性、慢性）、骨髄腫、鼻腔および副鼻腔癌、上咽頭癌、神経芽細胞腫、口腔癌、中咽頭癌、骨肉腫／骨の悪性線維性組織球腫、卵巣癌、卵巣上皮癌（表面上皮間質腫瘍）、卵巣胚細胞腫瘍、卵巣低悪性度腫瘍、膵臓癌、膵島細胞癌、副甲状腺癌、陰茎癌、咽頭癌、褐色細胞腫、松果体星細胞腫、松果体胚細胞腫、松果体芽腫およびテント上原始神経外胚葉性腫瘍、下垂体腺腫、胸膜肺芽腫、前立腺癌、直腸癌、腎細胞癌（腎癌）、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、唾液腺癌、肉腫（ユーイング腫瘍の肉腫、カポジ肉腫、軟部肉腫、子宮肉腫）、セザリー症候群、皮膚癌（非黒色腫、黒色腫）、小腸癌、扁平上皮細胞、扁平上皮癌、胃癌、テント上原始神経外胚葉性腫瘍、精巣癌、咽喉癌、胸腺腫および胸腺癌、甲状腺癌、腎盂と尿管の移行上皮癌、尿道癌、子宮癌、子宮肉腫、膣癌、外陰癌、ワルデンストレームマクログロブリン血症、および／またはウィルムの腫瘍などが、本発明に関連する疾患標的である。

【００４２】

一般に、本明細書に記載の遺伝子改変細胞を含む医薬組成物、例えば、Ｔ細胞、マクロファージ、単球、ＮＫ細胞、もしくはＮＫＴ細胞、または本発明による任意の他の遺伝子操作細胞を、10^2～10^{12}細胞／ｋｇ体重、好ましくは10^5～10^8細胞／ｋｇ体重（これらの範囲内の全ての整数値を含む）の用量で投与することができると述べることができる。細胞の数は、組成物が意図される最終用途に依存し、その中に含まれる細胞のタイプに依存する。本明細書中に提供される使用のために、細胞は、一般に、１リットル以下の容量であり、５００ｍｌ以下、さらには２５０ｍｌまたは１００ｍｌ以下であり得る。したがって、所望の細胞の密度は、典型的には10^6細胞／ｍｌより多く、一般に10^7細胞／ｍｌより多く、一般に10^8細胞／ｍｌ以上である。10^5、10^6、10^7、10^8、10^9、10^{10}、10^{11}、10^{12}、10^{13}、または10^{14}細胞に累積的に等しいか、またはそれを超える複数注入に、臨床的に関連する数の免疫細胞を配分することができる。本発明のいくつかの態様では、特に、本質的に全ての投与された細胞が特定の標的抗原にリダイレクトされるので、10^6／体重キログラムのより少ない数の細胞が投与され得る。操作された細胞組成物は、様々な用量レベルで複数回投与することができる。細胞は、治療を受ける患者に対して同種、同系、異種、または自家であり得る。望むならば、治療はマイトゲン（例えば、ＰＨＡ）またはリンカイン、サイトカインおよび／もしくはケモカイン（例えば、ＩＦＮ－ｇ、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＴＮＦ－アルファ、ＩＬ－１８およびＴＮＦ－ベータ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－４、ＩＬ－１３、Ｆｌｔ３－Ｌ、ＲＡＮＴＥＳ、ＭＩＰＩαなど）の投与も含めることができる。

【００４３】

実験および実施例

構築設計とクローニング：ＯＲＦは、通常、合成によって作製され、哺乳動物発現ベクター、例えばｐＳＦ－ＣＡＧ－Ａｍｐにクローニングされた。簡単に述べると、合成したＤＮＡおよびベクタープラスミドを、製造業者の説明書に従って、酵素ＮｏｔｌおよびＳａｌｌで消化した。抑制され、精製されたＤＮＡ断片を、製造業者の指示に従ってＴ４リガーゼを用いて一緒に連結した。成功したライゲーション事象を、アンピシリン補充プレート上での細菌形質転換によって選択した。トランスフェクションのためのプラスミドは、製造業者の説明書に従って「ｍａｘｉ－ｐｒｅｐ」によって生成した。

【００４４】

細胞培養およびトランスフェクション：実験設計およびアッセイにより、非ウイルスまたはウイルストランスフェクションを、本明細書中で遺伝子操作された細胞に対して行った。トランスフェクションおよび伝達は、２Ｄ細胞培養、振盪インキュベーター、様々な形態のバイオリアクター、中空繊維バイオリアクター、Ｗａｖｅバッグなどを含むがこれらに限定されない種々の細胞培養系において実施した。細胞を、例えば、エレクトロポレーション、カチオン性脂質トランスフェクション、リポソームトランスフェクション、ＰＥＩトランスフェクションなどを使用して、安定的にまたは一時的に改変した。簡潔さの

ために、細胞工学に適切な細胞のいくつかの例のみが本明細書中に言及される：ＨＥＫ２９３Ｔ細胞、ｓｕｐＴ１細胞、Ｋ６５２細胞、Ｔ細胞（一般に、例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞、ＣＤ４＋Ｔ細胞、調節Ｔ細胞など）、ＮＫ細胞（一般に、ＮＫＴ細胞、一般に、線維芽細胞、間葉系間質細胞（例えば、骨髄、脂肪組織、Ｗｈａｒｔｏｎゼリー、周産期組織、胎盤、羊膜などから入手可能）、Ｂ細胞、好中球、単球、マクロファージ、樹状細胞（ＤＣ）、好酸球、ニューロン、アストロサイト、ミクログリアなど。供給業者（例えば、ＡＴＣＣ）または製造業者によって推奨されるように、細胞を播種した。

【００４５】

アッセイおよび分析：ウェスタンブロットは、ＥＶ（例えば、エキソソーム）中のＰＯＩの富化を評価するための非常に簡便な分析方法である。簡潔には、ＳＤＳ－ＰＡＧＥを、製造業者の指示（Ｎｏｖｅｘ　ＰＡＧＥ　４～１２％ゲル）に従って実施し、これにより、1×10^{10}および２０ｕｇ細胞溶解物を、ウェルあたりロードした。ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルからのタンパク質は、製造者の指示（Ｉｍｍｏｂｉｌｏｎ（ＲＴＭ）、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）に従ってＰＶＤＦ膜に移転された。膜は、典型的には、Ｏｄｙｓｓｅｙ遮断緩衝液（Ｌｉｃｏｒ）中で遮断し、供給者の指示（一次抗体－Ａｂｅａｍ、二次抗体－Ｌｉｃｏｒ）に従って、ＰＯＩおよび／またはエキソソームタンパク質に対する抗体でプローブした。分子プローブは、６８０および８００ｎｍの波長で可視化された。ＥＶ（例えば、ｓｈＲＮＡまたはｍＲＮＡ）にロードされた種々のＲＮＡ種の検出のために、ｑＰＣＲを、代表的には、製造業者の指示に従って利用した。

【００４６】

実施例１。ＣＤ１９依存性キメラノッチポリペプチド活性化を介したＫ５６２細胞におけるＣＤ６３－ＮａｎｏＬｕｃの発現

Ｋ５６２細胞は、ＣＤ１９センシングキメラノッチポリペプチドを発現するように操作され、これは、活性化を通して、ＣＤ６３－ＮａｎｏＬｕｃの発現を誘導する細胞内転写因子を放出する。さらに、２つのＨＥＫ２９３Ｔ細胞株を作製し、一方はＣＤ１９の安定した発現を有し、他方は発現を有さなかった。種々のＨＥＫ２９３Ｔ細胞の各々を、レポーターキメラノッチポリペプチドＫ５６２細胞と一緒に２４ウェルプレートに播種した。４８時間後、馴化培地からＥＶを回収し、ＮａｎｏＬｕｃ活性について測定した。無視できる量のＮａｎｏｌｕｃ活性を、ＣＤ１９を含まない試料で測定したが、ＣＤ１９の存在下では、レポーターＫ５６２細胞は、ＥＶにおいてＣＤ６３－Ｎａｎｏｌｕｃを発現した。このデータは、ＣＤ１９の存在およびＫ５６２細胞上のキメラノッチポリペプチドとのその相互作用によってのみ、ＣＤ６３－Ｎａｎｏｌｕｃが発現され、そしてＥＶにロードされることを示唆する。同様の実験を行ったが、今回、目的のＮａｎｏＬｕｃレポータータンパク質を、テトラスパニンファミリーのタンパク質に属する膜貫通エキソソームタンパク質ＣＤ８１およびＣＤ９と融合させた。これらの原理試験の証拠は、Ｎａｎｏｌｕｃが、標的細胞、組織、臓器、または位置において治療効果を生じるために、目的の治療タンパク質またはＲＮＡで置換され得ることを示唆する（図１）。Ｙ軸＝ルミネッセンス（ＲＬＵ）

【００４７】

実施例２。安定なＫ５６２キメラノッチポリペプチド細胞からのＣＤ６３－インテイン－Ｃｒｅの取り込み後のＣｒｅリコンビナーゼ応答性ＭＤＡ細胞におけるＧＦＰ発現。

Ｋ５６２細胞を、ＣＤ１９センシングキメラノッチポリペプチドを発現するように操作し、その活性化を通して、ＣＤ６３－インテイン－Ｃｒｅまたは水溶性Ｃｒｅリコンビナーゼの発現を誘導した。ＣＤ６３－インテイン－Ｃｒｅは、ＣｒｅリコンビナーゼのＥＶへのロードを可能にし、最終的に任意のエキソソームタンパク質から放出される、以前に記載されたシステムである。さらに、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１　Ｃｒｅ応答性細胞株を、ＣＤ１９を安定に発現するように操作した。Ｃｒｅリコンビナーゼの活性を通じて、レポーター細胞は、永久的に活性化されたＧＦＰ発現を有する。ＭＤＡ－Ｌｏｘ＋ｖｅまたは－Ｌｏｘ－ｖｅの組み合わせを、２４ウェルプレートにおいてＫ５６２－ＣＤ６３－インテイン－Ｃｒｅまたは－Ｃｒｅと共播種した。４８時間後、ＧＦＰ＋ｖｅ細胞を、残りのＭ

ＤＡ集団に対して計数した（ＭＤＡ細胞は、構成的に赤色蛍光タンパク質を発現し、これは、Ｃｒｅ活性を介して緑色に切り替わる）。ＣＤ１９の存在とその後のＥＶ　ＣＤ６３－インテイン－Ｃｒｅの放出において、赤から緑蛍光への著しいシフトが観察された。しかし、ＣＤ１９またはＥＶロードＣｒｅの非存在下では、蛍光の変化は無視できる（図２）。同様の実験において、水溶性エキソソームタンパク質Ａｌｉｘおよびシンテニンを、インテインを介してＣｒｅリコンビナーゼに融合させ、標的ＭＤＡ－ＭＤ－２３１細胞において同様のレベルの組換えをもたらした。Ｙ軸＝ＧＦＰポジティブ細胞のパーセント。

【００４８】

実施例３。ｐ５３センシング細胞においてＥＶ送達ｐ５３ｍＲＮＡを介してｐ５３発現から誘導される細胞死。

Ｋ５６２細胞を操作してＣＤ１９センシングＳｙｎＮｏｔｃｈポリペプチドを発現させ、その活性化を通して、ＰＵＦタンパク質に対する結合モチーフを有するＥＶロードＲＮＡ結合（ＣＤ６３‐ＰＵＦ）ポリペプチドおよびｐ５３ｍＲＮＡの発現を誘導した。さらに、結合モチーフを有するｐ５３ｍＲＮＡを発現させる別のＫ５６２細胞株を作製したが、これらの細胞はＥＶロード機構（すなわち、ＰＵＦとＣＤ６３の間の融合タンパク質）を欠いていた。腫瘍細胞株を、ＣＤ１９を発現するように安定に操作した。前述したように、４８時間後には、ＳｙｎＮｏｔｃｈ活性化（ＣＤ１９＋ｖｅ）とＥＶロード戦略（ＣＤ－６３ＰＵＦ）の組み合わせのみがｐ５３　ｍＲＮＡをｐ５３センシング腫瘍細胞株に送達し、腫瘍細胞株が約５０％死滅した。やはり、ＣＤ１９またはＣＤ６３ＰＵＦを欠く組み合わせは、有意な細胞死をもたらさなかった（図３）。Ｙ軸＝アネキシン染色およびＦＡＣＳ分析によるアポトーシス細胞のパーセント。

【００４９】

実施例４。ｐ５３センシング細胞においてＥＶ送達ｐ５３　ｍＲＮＡを介してｐ５３発現から誘導される細胞死。

Ｋ５６２細胞を操作して、メソテリンセンシングキメラポリペプチドレセプターを発現させ、その活性化を通して、結合モチーフを有するエキソソームタンパク質‐ＲＮＡ結合（ＣＤ６３‐ＰＵＦ）ポリペプチドおよびｐ５３ｍＲＮＡの発現を誘導した。さらに、結合モチーフを有するｐ５３ｍＲＮＡを発現する別のＫ５６２細胞系を作製したが、ＥＶロード機構を欠いていた。メソテリンを発現するように中皮腫細胞系を安定に操作した。前述したように、４８時間後には、キメラポリペプチドレセプター活性化（ｍｅｓｏｔｈｅｌｉｎ＋ｖｅ）とエキソソームポリペプチド（ＣＤ－６３ＰＵＦ）の組み合わせのみが、ｐ５３ｍＲＮＡのｐ５３センシング腫瘍細胞株への送達をもたらし、腫瘍細胞株の約５０％の死滅をもたらした。やはり、メソテリンまたはＣＤ６３ＰＵＦを欠く組み合わせは、有意な細胞死をもたらさなかった（データは示していない）。

【００５０】

実施例５。ＴＮＦレセプターへのキメラポリペプチドレセプター結合により誘導される抗ＳＴＡＴ３単一鎖状抗体のエキソソーム媒介細胞内送達

Ｋ５６２細胞を、その細胞外認識ドメインとしてＴＮＦレセプターを標的とする抗体を含むキメラポリペプチドレセプターを発現するように操作した。インビトロでの標的免疫細胞上のＴＮＦＲの結合を通して、キメラポリペプチドレセプターのＴＦは転写活性化を誘発し、細胞内標的ＳＴＡＴ３に対する単一鎖状抗体フラグメントに融合したエキソソームポリペプチド（シンテニン）の発現を誘発した。ルシフェラーゼベースのＳＴＡＴ３感受性細胞株アッセイを用いて、シンテニン－抗ＳＴＡＴ３－単一鎖状Ａｂを含むエキソソームの産生および細胞内送達を確認した（データは示さず）。

【００５１】

実施例６。実施例６では、ｓｕｐＴ１細胞によって産生されたグランザイムＢロードエキソソームへのそれらの曝露後の卵巣癌細胞（Ｓｋｏｖ３）の細胞死を試験した。グランザイムＢをロードしたエキソソームの産生は、ｓｕｐＴ１細胞によって発現されるキメラポリペプチドレセプターのｓｃＦｖと卵巣癌細胞上に発現されるＣＡ－１２５腫瘍抗原との間の相互作用によって誘発され、Ｓｋｏｖ３細胞死は、増加する濃度の操作されたｓｕｐ

Ｔ１細胞への曝露に応じて用量依存的に起こった。目的のタンパク質としてのグランザイムＢは、ＰＯＩ（すなわち、グランザイムＢ）およびエキソソームタンパク質Ｌａｍｐ２Ｂをコードするポリヌクレオチドによってコードされ、これは、グランザイムＢの、ｓｕｐＴ１細胞によって産生されるＥＶへの輸送を可能にする。図４の黒いバーは、ＣＡ１２５を標的とするように操作されたｓｕｐＴ１細胞を表し、そして標的係合で、ＣＡ－１２５ポジティブ細胞と混合されたグランザイムＢを含むＥＶを産生し、白いバーは、ＣＡ－１２５ネガティブ細胞と混合されたｓｕｐＴ１抗ＣＡ－１２５グランザイムＢ　ＥＶ産生細胞を示し、そして灰色のバーは、ＣＡ－１２５ポジティブ細胞と混合された遺伝子産物をコードするポリヌクレオチドを含まないｓｕｐＴ１抗ＣＡ－１２５細胞を示す。Ｙ軸はＳｋｏｖ３細胞の細胞死率を示す。

【００５２】

実施例７。不死化ＣＥＭ（急性リンパ芽球性リンパ腫）細胞を、（ｉ）ＭＵＣ１に対するｓｃＦｖ、（ｉｉ）ＳｙｎＮｏｔｃｈレセプターコアタンパク質、および（ｉｉｉ）プロテアーゼ切断部位（Ｓ１）を介してＳｙｎＮｏｔｃｈコアタンパク質に連結された人工転写因子Ｇａｌ４ＶＰ６４を含むＳｙｎＮｏｔｃｈキメラポリペプチドレセプターを使用して、乳癌細胞株Ｔ４７ＤのＭＵＣ１を標的とするように遺伝子操作した。標的Ｔ４７Ｄ細胞上のｓｃＦｖとＭＵＣ１とが相互作用すると、Ｇａｌ４ＶＰ６４が放出され、ＥＶタンパク質ＣＤ６３の発現を活性化し、自己切断型インテインに融合し、次にＦＣＵ１に融合し、それによってＦＣＵ１をＥＶに誘導し、そこでインテインが切断され、遊離ＦＣＵ１を放出する。続いて、ＦＣＵ１ロードＥＶはＴ４７Ｄ細胞に取り込まれ、５－フルオロウラシルの投与時に、細胞はアポトーシスを受ける。図５の黒いバーは、ＣＤ６３－インテイン－ＦＣＵ１ポリヌクレオチド構築物を含むＣＥＭ細胞を提示する完全ｓｃＦｖ－ＳｙｎＮｏｔｃｈ－Ｇａｌ４ＶＰ６４と混合されたＭＵＣ１ポジティブＴ４７Ｄ細胞を表し、白いバーは、完全ＳｙｎＮｏｔｃｈ　ＣＥＭ細胞と混合されたＭＵＣ１ネガティブＴ４７Ｄ細胞を表し、そして灰色のバーは、キメラポリペプチドレセプターのＳｙｎＮｏｔｃｈ－Ｇａｌ４ＶＰ６４部分のみを含むが、機能的ＣＤ６３－インテイン－ＦＣＵ１をコードするポリヌクレオチド（プラスミドＤＮＡの形成で）を含むＣＥＭ細胞と混合されたＭＵＣ１ポジティブＴ４７Ｄ細胞を表す。グラフに見られるように、Ｔ４７Ｄ細胞は、エキソソームタンパク質（ＣＤ６３）およびＰＯＩ（ＦＣＵ１）をコードするポリヌクレオチドを含む完全に機能的なＳｙｎＮｏｔｃｈ　ＣＥＭ細胞と混合された場合、ＭＵＣ１ポジティブ群において５－フルオロウラシル後にのみアポトーシスに入る。Ｙ軸はＴ４７Ｄ細胞の細胞死のパーセンテージを示す。

【００５３】

実施例８。プライマリーヒトＴ細胞を、以下の成分を含むキメラポリペプチドレセプターで形質導入した：（ｉ）ＰＳＭＡに対するラクダ科ナノボディ、（ｉｉ）抗ＰＳＭＡラクダ科ナノボディの細胞表面上でのディスプレイを可能にするＴＮＦＲの膜貫通ドメイン、（ｉｉｉ）Ｓ２部位の切断によって放出されるノッチ細胞内ドメイン（ＮＩＤ）（Ｓ２メタロプロテアーゼ切断部位を含む）の転写因子。Ｔ細胞はまた、遺伝子産物ＣＤ８１－ＰＵＦ（ここで、ＰＵＦはｍＲＮＡ結合タンパク質である）をコードするＮＩＤ応答性ポリヌクレオチド、ならびに３’ＵＴＲにＰＵＦ結合部位を有するＰＴＥＮ　ｍＲＮＡを含むように操作された。ＰＵＦとＰＴＥＮ　ｍＲＮＡのＰＵＦ結合部位との相互作用は、キメラポリペプチドレセプター活性化後に発現すると、ｍＲＮＡをＥＶに能動的にロードする。図６は、ＰＣ３　ＰＳＭＡポジティブ細胞と混合された抗ＰＳＭＡ＋、ＣＤ６３－ＰＵＦ＋およびＰＴＥＮ　ｍＲＮＡ＋Ｔ細胞を示し、白いバーは、ＰＣ３　ＰＳＭＡネガティブ細胞と混合された抗ＰＳＭＡ＋、ＣＤ６３－ＰＵＦ＋およびＰＴＥＮ　ｍＲＮＡ＋　Ｔ細胞を示し、灰色のバーは、ＰＣ３　ＰＳＭＡポジティブ細胞と混合されたＰＴＥＮ　ｍＲＮＡ　Ｔ細胞を含まない抗ＰＳＭＡ＋、ＣＤ６３－ＰＵＦ＋を示し、点線のバーは、ＰＣ３　ＰＳＭＡポジティブ細胞と混合された抗ＰＳＭＡキメラレセプターＴ細胞を含まないＣＤ６３－ＰＵＦ＋およびＰＴＥＮ　ｍＲＮＡのみの細胞を示す。グラフに見られるように、抗ＰＳＭＡ＋、ＣＤ６３－ＰＵＦ＋およびＰＴＥＮ　ｍＲＮＡ＋Ｔ細胞のみが、フ

ローサイトメーターにより分析された細胞アポトーシスの増加を誘導する。

【００５４】

実施例９。プライマリーナチュラルキラー（ＮＫ）細胞を、ＥＶタンパク質ＣＤ８１と連結したＣＦＴＲタンパク質をコードするポリヌクレオチドと共にＳｙｎＮｏｔｃｈレセプターに融合した抗ＣＤ１９単鎖状抗体で形質導入した。ＮＫ細胞をＨＥＫ　２９３Ｔ細胞と混合し、３日間の共培養後、ＮＫ細胞を除去し、I^{125}の流動を測定した。図７の三角形の黒線は、抗ＣＤ１９－ＳｙｎＮｏｔｃｈ－ＣＦＴＲ細胞と混合されたＣＤ１９ポジティブのＨＥＫ細胞を示し、黒四角の灰色線は、抗ＣＤ１９－ＳｙｎＮｏｔｃｈ－ＣＦＴＲ細胞と混合されたＣＤ１９ネガティブのＨＥＫ細胞を示し、白四角の黒線は、ＣＦＴＲをコードするポリヌクレオチドを含まない抗ＣＤ１９－ＳｙｎＮｏｔｃｈ細胞と混合されたＣＤ１９ポジティブのＨＥＫ細胞を示している。Ｙ軸はヨウ素^{125}流出速度（Ａ／ｍｉｎ）であり、ｘ軸は時間（分）を表す。

【図１】

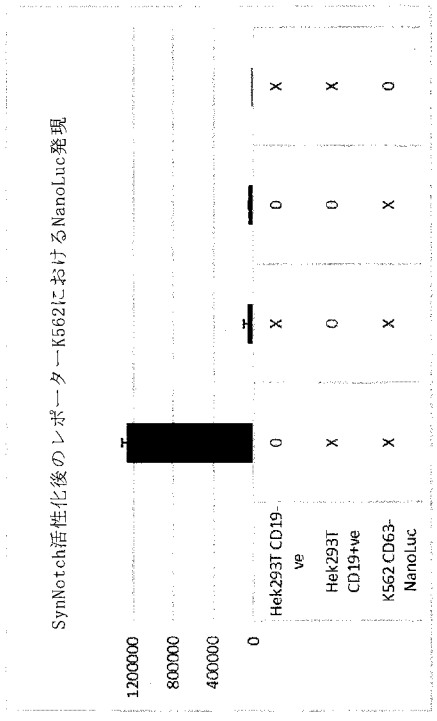


図１

【図２】

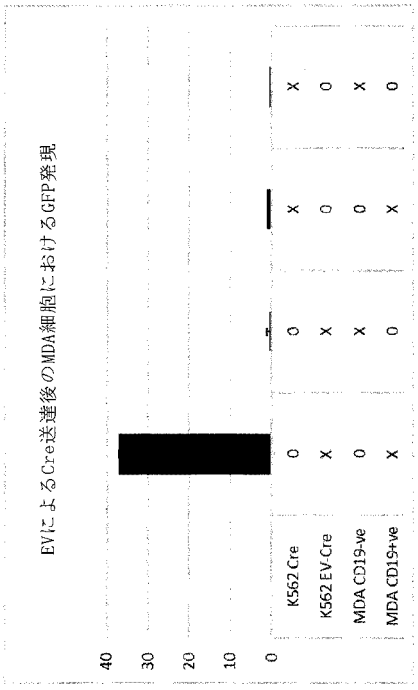


図２

【図３】

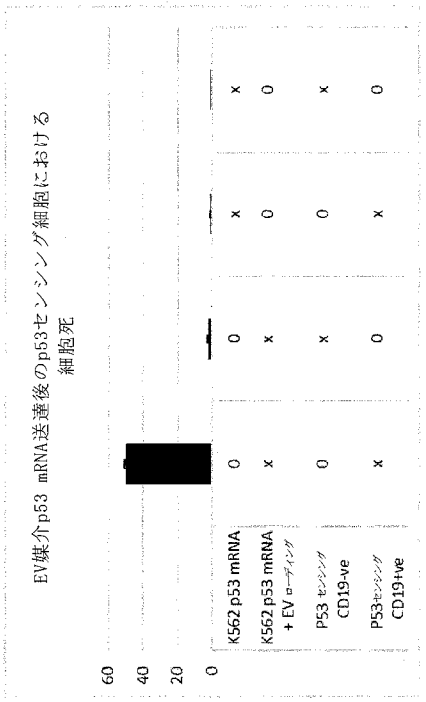


図３

【図４】

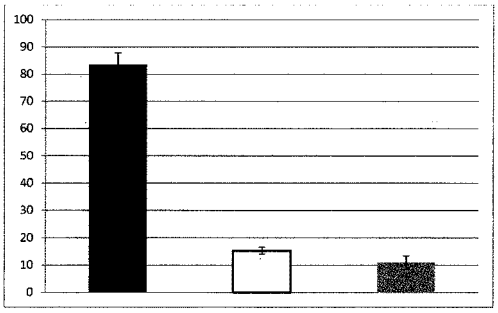


図４

【図５】

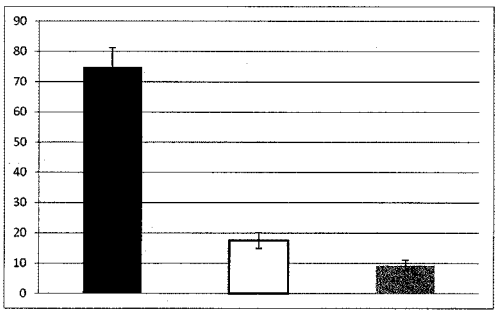


図５

【図６】

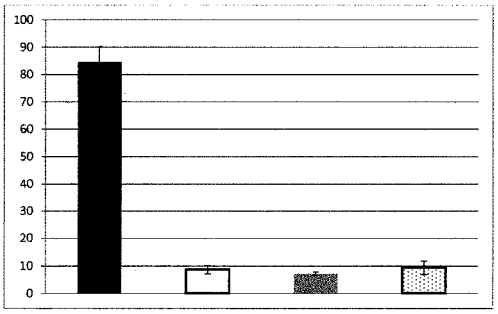


図６

【図７】

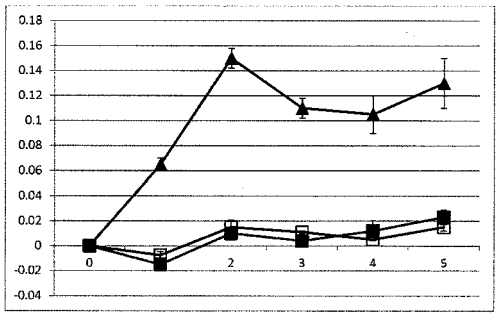


図７

【配列表】
2021518116000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2019/056634

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K19/00 A61K39/395
ADD.

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)
C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, FSTA, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018/039247 A1 (UNIV CALIFORNIA [US]) 1 March 2018 (2018-03-01) paragraphs [0005] - [0031], [0138] - [0147], [0268], [0271], [0317]; figure 1	1-30
X	WO 2018/015535 A1 (EVOX THERAPEUTICS LTD [GB]) 25 January 2018 (2018-01-25) paragraphs [0002] - [0007], [0012] - [0016], [0028] - [0032]; figure 1	17-29

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] 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

"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	Date of mailing of the international search report
16 May 2019	29/05/2019

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Luo, Xinmei

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2019/056634

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Maria Mittelbrunn ET AL: "Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells", Nature Communications, VOL. 2 :282, 19 April 2011 (2011-04-19), pages 1-10, XP055352043, DOI: 10.1038/ncomms1285 Retrieved from the Internet: URL:http://www.nature.com/articles/ncomms1285.pdf [retrieved on 2017-03-07] the whole document -----	17-26

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2019/056634

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2018039247 A1	01-03-2018	AU 2017316649 A1	07-03-2019
		CA 3034093 A1	01-03-2018
		SG 11201901528R A	28-03-2019
		WO 2018039247 A1	01-03-2018
WO 2018015535 A1	25-01-2018	AU 2017299214 A1	07-02-2019
		AU 2017300035 A1	07-02-2019
		CA 3031183 A1	25-01-2018
		CA 3031186 A1	25-01-2018
		CN 109689097 A	26-04-2019
		CN 109689098 A	26-04-2019
		EP 3487528 A1	29-05-2019
		EP 3487529 A1	29-05-2019
		GB 2552473 A	31-01-2018
		KR 20190032479 A	27-03-2019
		KR 20190032480 A	27-03-2019
		SG 11201811151P A	30-01-2019
		SG 11201811152Y A	30-01-2019
		WO 2018015535 A1	25-01-2018
		WO 2018015539 A1	25-01-2018

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
C12N	*15/13*	*(2006.01)*	C12N	15/13		
C12N	*15/24*	*(2006.01)*	C12N	15/24		
C12N	*15/63*	*(2006.01)*	C12N	15/63	Z	
A61K	*35/17*	*(2015.01)*	A61K	35/17	A	
A61K	*35/15*	*(2015.01)*	A61K	35/15	Z	
A61K	*35/36*	*(2015.01)*	A61K	35/36		
A61K	*35/44*	*(2015.01)*	A61K	35/44		
A61K	*35/30*	*(2015.01)*	A61K	35/30		
A61K	*35/28*	*(2015.01)*	A61K	35/28		
A61K	*35/545*	*(2015.01)*	A61K	35/545		
A61P	*3/00*	*(2006.01)*	A61P	3/00		
A61P	*25/00*	*(2006.01)*	A61P	25/00		
A61P	*31/00*	*(2006.01)*	A61P	31/00		
A61P	*43/00*	*(2006.01)*	A61P	43/00	111	
A61P	*29/00*	*(2006.01)*	A61P	29/00		
A61P	*35/00*	*(2006.01)*	A61P	35/00		
A61P	*37/02*	*(2006.01)*	A61P	37/02		
C07K	*16/00*	*(2006.01)*	C07K	16/00		
C12N	*9/16*	*(2006.01)*	C12N	9/16	Z	
C12N	*9/50*	*(2006.01)*	C12N	9/50		
C12N	*15/113*	*(2010.01)*	C12N	15/113	Z	
C07K	*19/00*	*(2006.01)*	C07K	19/00		

(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,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,NE,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,JO,JP,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,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(72)発明者　ジョエル・ノルディン
スウェーデン・１１７６２・ストックホルム・ヒルデベリスヴェーゲン・１２

Ｆターム(参考) 4B050 CC03 LL01
4B065 AA01X AA01Y AA57X AA57Y AA72X AA72Y AA83X AA83Y AA90X AA90Y
AB01 AC14 BA02 CA44
4C087 BB37 BB44 BB45 BB48 BB65 NA06 NA14 ZA01 ZA02 ZB07
ZB11 ZB26 ZB32 ZC21 ZC41
4H045 AA10 AA20 AA30 BA41 CA40 DA02 DA50 DA76