(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6765968号
(P6765968)
(45)発行日　令和2年10月7日(2020.10.7)　(24)登録日　令和2年9月18日(2020.9.18)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/62	(2006.01)	C12N	15/62	Z
C12N 15/12	(2006.01)	C12N	15/12	ZNA
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/10	
C07K 14/725	(2006.01)	C07K	14/725	
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00	

請求項の数 17　(全 127 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2016-561659 (P2016-561659)
(86)(22)出願日　平成27年4月8日(2015.4.8)
(65)公表番号　特表2017-513470 (P2017-513470A)
(43)公表日　平成29年6月1日(2017.6.1)
(86)国際出願番号　PCT/US2015/024947
(87)国際公開番号　WO2015/157432
(87)国際公開日　平成27年10月15日(2015.10.15)
審査請求日　平成30年4月4日(2018.4.4)
(31)優先権主張番号　62/089,730
(32)優先日　平成26年12月9日(2014.12.9)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/088,363
(32)優先日　平成26年12月5日(2014.12.5)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者　515045617
シアトル　チルドレンズ　ホスピタル,
ディービーエー　シアトル　チルドレンズ　リサーチ　インスティテュート
アメリカ合衆国　９８１０５　ワシントン州　シアトル　サンド　ポイント　ウェイ　ノースイースト　４８００
(74)代理人　100077012
弁理士　岩谷　龍
(72)発明者　ジェンセン, マイケル, シー.
アメリカ合衆国　ワシントン州　９８１０１　シアトル, ナインス　アベニュー　１９００
審査官　松田　芳子
最終頁に続く

(54)【発明の名称】薬物制御による導入遺伝子の発現

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
キメラ抗原受容体の発現誘導システムであって、
ａ）配列番号４１のヌクレオチド配列を含む第１の誘導可能なプロモーターを含む第１の核酸、および
ｂ）前記第１の誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された構成的な第２のプロモーターを含む第２の核酸を含み、
前記第１の誘導可能なプロモーターが、キメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されていること、
前記キメラ抗原受容体が、リガンドに特異的なリガンド結合ドメイン、ポリペプチドスペーサー、膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含むこと、
前記リガンドが、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子、または標的細胞集団に発現されている分子であること
を特徴とするシステム。
【請求項２】
抗ＣＤ３および／または抗ＣＤ２８を含む活性化刺激剤をさらに含む、請求項１に記載のシステム。
【請求項３】
タモキシフェン、その代謝物、またはその類似体をさらに含む、請求項１または２に記載のシステム。

【請求項４】
前記第１の核酸が第１のベクターをさらに含み、前記第２の核酸が第２のベクターをさらに含む、請求項１～３のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項５】
前記第１のベクターと前記第２のベクターとが、単一のウイルスベクターにパッケージされている、請求項４に記載のシステム。
【請求項６】
前記第１の核酸または前記第２の核酸が、選択マーカーをコードする核酸配列をさらに含む、請求項１～５のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項７】
前記第１の誘導可能なプロモーターが、前記第２のプロモーターとは逆向きである、請求項１～６のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項８】
前記腫瘍に特異的な分子が、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、ＣＥ７、ＥＧＦＲ、ｈＢ７Ｈ３、メソテリン（mesothelin）、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ Ａ３ ＴＣＲ、およびこれらの組み合わせか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システム。
【請求項９】
前記第１のベクターおよび前記第２のベクターを含む宿主細胞をさらに含む、請求項１～８のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項１０】
前記宿主細胞が、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細胞およびバルクＣＤ８$^+$Ｔ細胞からなる群から選択される細胞傷害性ＣＤ８$^+$Ｔリンパ球、またはナイーブ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細胞およびバルクＣＤ４$^+$Ｔ細胞からなる群から選択されるＣＤ４$^+$Ｔヘルパーリンパ球である、請求項９に記載のシステム。
【請求項１１】
前記宿主細胞が、Ｔ細胞前駆細胞または造血幹細胞である、請求項９に記載のシステム。
【請求項１２】
前記スペーサーの長さが、前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されるように最適化されている、請求項１～１１のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項１３】
移入用細胞集団をインビトロにおいて製造する方法であって、
ａ）請求項１～８のいずれか一項に記載のシステムを提供すること、
ｂ）単離された個別のＴリンパ球集団に前記システムを導入すること、
ｃ）前記Ｔリンパ球集団をインビトロで増殖させること
ならびに
ｄ）前記Ｔリンパ球を、（ｉ）タモキシフェン、その代謝物、またはその類似体、（ｉｉ）抗ＣＤ３および／または抗ＣＤ２８を含む活性化刺激剤、および（ｉｉｉ）１つの恒常性サイトカインの存在下で、移入細胞として使用するのに十分な数に達するまで培養することを含む方法。
【請求項１４】
がんまたはウイルス性感染症の治療において使用するための、請求項９～１１のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項１５】
前記がんが、乳がん、脳がん、肺がん、大腸がん、腎臓がん、膵臓がん、前立腺がん、卵巣がんから選択される固形腫瘍、または血液悪性腫瘍である、請求項１４に記載のシステム。

【請求項１６】
キメラ抗原受容体の発現誘導システムであって、
ａ）第１の誘導可能なプロモーターを含む第１の核酸、および
ｂ）前記第１の誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された構成的な第２のプロモーターを含む第２の核酸を含み、
前記第１の誘導可能なプロモーターが、キメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されていること、
前記キメラ抗原受容体が、リガンドに特異的なリガンド結合ドメイン、ポリペプチドスペーサー、膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含むこと、
前記リガンドが、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子、または標的細胞集団に発現されている分子であること、
前記転写活性化因子が、配列番号４０のアミノ酸配列を含むこと
を特徴とするシステム。
【請求項１７】
前記第１の誘導可能なプロモーターが配列番号４１のヌクレオチド配列を含む、請求項１６に記載のシステム。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本願は、2014年10月2日に出願された米国仮特許出願62/058,973号、2014年4月10日に出願された米国仮特許出願61/977,751号、2014年4月30日に出願された米国仮特許出願61/986,479号、2014年12月9日に出願された米国仮特許出願62/089,730号、2014年12月11日に出願された米国仮特許出願62/090845号、および2014年12月5日に出願された米国仮特許出願62/088,363号に係る優先権を主張するものである。前記出願の開示は、参照によりその全体が明示的に本明細書に組み込まれる。
【０００２】
配列、配列表またはコンピュータープログラムにより作成した配列に関する情報
本願は電子形式の配列表とともに出願されたものである。この配列表は、SCRI-53WO_SEQUENCE_LISTING.TXTのファイル名で2015年4月7日に作成された65kbのファイルとして提供されたものである。この電子形式の配列表に記載された情報は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。
【背景技術】
【０００３】
腫瘍細胞上に発現した表面分子に特異的なキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を発現するように遺伝子移入により改変されたヒトＴリンパ球を養子移入することによって、効果的にがんを治療できる可能性がある。キメラ受容体は、細胞外リガンド結合ドメインを含む合成受容体であり、該細胞外リガンド結合ドメインは、最も一般的には、細胞内シグナル伝達成分に連結されたモノクローナル抗体一本鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）であり、該細胞内シグナル伝達成分は、最も一般的には、ＣＤ３ζ単独、または１つ以上の共刺激ドメインと組み合わせられたＣＤ３ζである。キメラ受容体の設計に関する研究の多くは、生体にとって不可欠な正常組織に対して重大な毒性を引き起こすことなく、悪性細胞を標的とすることが可能なｓｃＦｖおよびその他のリガンド結合因子を見出すこと、およびＴ細胞のエフェクター機能を活性化することが可能な、細胞内シグナル伝達モジュールの最適な構成を見出すことに焦点を当てている。
【０００４】
Ｔ細胞（ＣＡＲ－Ｔ）養子療法（キメラ抗原受容体を発現するＴ細胞）の臨床試験において強力な抗腫瘍活性を示されているものの、顕著な毒性も認められている。たとえば、移植細胞により誘導されたサイトカインストーム、腫瘍崩壊症候群、および慢性的なＢ細胞の減少が起こることがあり、これらはいずれも構成的に発現されたＣＡＲが非制御下に

その機能を発揮していることに起因する。そのような毒性によって、ＣＡＲ－Ｔ細胞を用いた養子療法の適用範囲が制限されることがある。導入遺伝子により改変した養子Ｔ細胞免疫療法を用いた臨床試験では、導入遺伝子を構成的に発現させたＴ細胞のみしか検討されておらず、このような導入遺伝子は常に「オン」状態であり、導入遺伝子に関連する副作用の大部分に寄与している。自殺遺伝子を使用してＣＡＲ－Ｔ細胞を排除することによって、そのような毒性を低減することができるが、このアプローチは、抗腫瘍活性が十分に発揮される前にこれを低減させてしまう恐れがあり、治療有効性にもかなりの影響を与えてしまう。

【０００５】

現在使用されている、小分子により導入遺伝子の発現を制御する技術は、マクロライド系抗生物質、エクジソン、ラパマイシン類似体などの種々の薬物による効果に依存するものである。このようなシステムは限定的にしか臨床適用できず、その理由として、毒性のオフターゲット効果、望ましくない生体内分布および薬物動態プロファイル、狭い作動域、ならびに／またはＦＤＡ認可の市販医薬品であることによる入手制限が挙げられる。さらに、このようなシステムの多くは、異種生物由来の成分から構築されたキメラ転写制御因子使用するため、このシステムをヒトの治療に使用すると、免疫性の合併症が引き起こされる。

【０００６】

インビボにおける生存および有効性を向上させるとともに、有害な副作用を最小限に抑えることの可能な遺伝的改変および養子移入を実施することを目的として、治療活性および細胞集団において重要な役割を果たす成分を特定してキメラ受容体を設計する方法が必要とされている。さらに、治療活性の向上、インビボでの生存および／もしくは有効性の向上、ならびに／または有害な副作用の最小化を目的として、細胞療法において使用する細胞を調節するための発現システムおよび方法も必要とされており、この発現システムおよび方法は、たとえば、前記細胞において発現されるＣＡＲなどの組換え抗原受容体および／またはその他の分子の発現を調節するための発現システムおよび方法であってもよい。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００７】

本発明の開示の一態様は、細胞において薬物により制御発現される導入遺伝子を送達するための遺伝子システムを包含する。一実施形態においては、制御された導入遺伝子の発現は細胞を標的とし、たとえば、養子免疫療法における使用を目的として設計されたリンパ球を標的とする。このシステムは、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をリダイレクトした養子療法を使用するため、安全性が厳密に保たれており、さらに、臨床医がインビボでのＣＡＲの発現をリアルタイムで制御することを可能にするという治療目的を損なうことがない。薬物応答性に基づいてＣＡＲの発現の転写制御が可能となるようにベクターを遺伝子改変し、臨床医により処方された薬物で刺激することによって、インビボでＣＡＲの活性およびその他の細胞メディエーターの活性を「オン」または「オフ」に切り替えることができ、その結果、臨床的に許容可能な薬物動態、組織分布、および細胞外間隙とリンパ球の細胞質との間の分配を達成することができる。本発明の遺伝子システムは薬物で制御される導入遺伝子の発現を提供し、薬物の非存在下で導入遺伝子を機能的に「オフ」の状態とし、かつ薬物の存在下で導入遺伝子を機能的に「オン」の状態とすることができる。

【０００８】

前述の薬物の一例として、タモキシフェンが挙げられる。タモキシフェンは、エストロゲンのアンタゴニスト／部分アゴニストであり、ＦＤＡ認可薬物として市販されている。タモキシフェンは経口投与され、長期間にわたって連日投与することができる。タモキシフェンは、安全性が証明されており、薬物動態プロファイルが好適であり、組織分布が良好であり、細胞外間隙と細胞質との間の分配係数が低い。また、安全性が証明されていること、薬物動態プロファイルが好適であること、組織分布が良好であること、細胞外間隙

と細胞質との間の分配係数が低いこと、および／または毒性が低いことを目安に他の薬物を選択することもできる。

【０００９】

いくつかの実施形態において、前記システムは、タモキシフェンの存在下で導入遺伝子の上流の合成プロモーターに結合する合成転写制御因子を使用して発現を誘導する。タモキシフェンで制御されるこの転写因子（「TamR-tf」あるいは「HEA3」とも称される）は、ヒト由来サブユニットを含むキメラ転写因子であり、肝細胞核因子１－α（ＨＮＦ－１α）のＮ末端に存在するＤＮＡ結合ドメインが、エストロゲン受容体のリガンド結合ドメイン（ＥＲ－ＬＢＤ）のタモキシフェン特異的変異リガンド結合ドメインにインフレームで融合されており、このタモキシフェン特異的変異リガンド結合ドメインがさらにＮＦ－κＢのｐ６５活性化ドメイン（ｐ６５）に融合されている。典型的なアミノ酸配列は表１０に記載されており、配列番号４０で示されている。エストロゲン受容体のリガンド結合ドメイン（ＥＲ－ＬＢＤ）の前記タモキシフェン特異的変異リガンド結合ドメインは、TamR-tfの２８２～５９５番目のアミノ酸からなる配列であり、５２１番目のアミノ酸に変異を有する。ＮＦ－κＢのｐ６５活性化ドメイン（ｐ６５）は、配列番号４０の５９６～８６２番目のアミノ酸からなる配列である。転写因子の特性を向上させるために、前記転写活性化因子にさらに変更を加えてもよく、たとえば、前記エストロゲン受容体のリガンド結合ドメイン内の１つ以上のアミノ酸に変更を加えることによって、前記転写因子のエストロゲン類似体に対する親和性を増加させてもよく、かつ前記ｐ６５転写活性化ドメイン内の１つ以上のアミノ酸に変更を加えてもよいが、前記転写活性化因子への変更はこれらに限定されない。

【００１０】

タモキシフェンの非存在下では、細胞質内の熱ショックタンパク質９０（ＨＳＰ９０）がタモキシフェン結合活性部位に結合することによって、TamR-tfが核内から排除されるため、導入遺伝子の発現は「オフ」の状態となる。細胞質内にナノモル濃度のタモキシフェンが存在すると、ＥＲ－ＬＢＤへの結合に対してＨＳＰ９０と活発に競合することによってこれを阻害し、TamR-tfの核内への転座が生じる。核内への転座が起こると、TamR-tfは、自体の特異的結合部位である合成プロモーター（たとえば7xHBD/EF1αp）と結合することが容易となる。タモキシフェンの存在下では、TamR-tfが7xHBD/EF1αpプロモーターに結合することによって導入遺伝子の発現が「オン」の状態へと誘導される。いくつかの実施形態においては、この転写制御因子は、導入遺伝子の発現の制御を様々なレベルで行えるように改変されていてもよい。TamR-tfのリガンド結合ドメイン内のアミノ酸を置換することによって、タモキシフェンおよびその代謝産物に対する選択的応答が可能となる。４－ヒドロキシタモキシフェン（4-OHT）は、TamR-tf活性に関して薬理学的活性が最も高い代謝物であり、内在性エストロゲンと相互作用を起こさない。

【００１１】

一態様において、本発明の開示は、腫瘍に特異的な遺伝子改変ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞サブセットまたはＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞サブセットを単独または組み合わせて使用した養子移入などによる細胞免疫療法によって媒介される免疫応答を付与かつ／または増強する方法および組成物に関する。また、本発明の開示は、キメラ受容体の核酸配列、ならびに該核酸を含むベクターおよび宿主細胞を提供する。前記キメラ受容体をコードする前記核酸配列は、様々なモジュール部分と連結されており、該モジュール部分を切断して他のモジュール部分と置換することによって前記キメラ受容体のカスタマイズを行うことができ、それによって、効率的なＴ細胞の活性化および特異的な標的分子もしくは該分子上のエピトープの認識のためのキメラ受容体を得ることができ、ひいては本明細書に記載の制御された転写を達成することができる。

【００１２】

いくつかの実施形態においては、キメラ抗原受容体の発現誘導システムは、第１の核酸および第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつリガンド

結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されており、該リガンド結合ドメインがリガンドに特異的であり、該リガンドが、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子、または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能であり、前記第１の核酸が、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含むこと；ならびに

前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とする。

いくつかの実施形態においては、前記薬物は、タモキシフェンおよび／またはその代謝産物である。いくつかの実施形態においては、前記スペーサーは、前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されるように最適化されている。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、構成的プロモーターまたは誘導可能なプロモーターである。

【００１３】

いくつかの実施形態においては、キメラ抗原受容体の発現誘導システムは、第１の核酸および第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつサイトカイン、ケモカイン、アポトーシスを制御するポリペプチドおよび／またはチェックポイントシグナル伝達を調節するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されていること、ならびに

前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とする。

いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、構成的プロモーターまたは誘導可能なプロモーターである。典型的な一実施形態において、前記第２の核酸は、構成的プロモーターの制御下でキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドをさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記薬物は、タモキシフェンおよび／またはその代謝産物である。

【００１４】

別の態様では、本発明の開示は、腫瘍特異的かつサブセット特異的な遺伝子改変ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の養子移入などによる細胞免疫療法によって媒介される免疫応答を付与かつ／または増強する組成物であって、前記ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞が、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞に能力を付与し、かつ／またはＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の能力を増強することによって、抗腫瘍反応を維持し、腫瘍特異的な増殖を増加させかつ／または最大限にすることを特徴とする組成物を提供する。いくつかの実施形態においては、本明細書に記載されているように、前記ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞は、制御されたプロモーターの制御下でキメラ受容体の核酸配列および／またはキメラ受容体ポリペプチドを発現するように遺伝子改変されている。

【００１５】

別の一態様では、本発明の開示は、腫瘍特異的かつサブセット特異的な遺伝子改変Ｔ細胞の養子移入などによる細胞免疫療法によって媒介される免疫応答を付与かつ／または増強する組成物を提供する。いくつかの実施形態においては、前記細胞はＴ細胞前駆細胞である。いくつかの実施形態においては、前記細胞は造血幹細胞である。いくつかの実施形態においては、前記細胞はＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞である。いくつかの実施形態においては、本明細書に記載されているように、前記ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞は、制御されたプロモーターの制御下でキメラ受容体の核酸配列および／またはキメラ受容体ポリペプチドを発現する。

【００１６】

いくつかの実施形態は、疾患または障害を有する対象において細胞免疫療法を行う方法あって、細胞性免疫応答を提供する遺伝子改変Ｔリンパ球製剤を該対象に投与すること、および該遺伝子改変Ｔリンパ球内の導入遺伝子を誘導する薬物を投与することを含む方法に関する。いくつかの実施形態においては、前記遺伝子改変Ｔリンパ球製剤はＴ細胞前駆

細胞を含む。いくつかの実施形態においては、前記遺伝子改変Ｔリンパ球製剤は造血幹細胞を含む。いくつかの実施形態においては、前記遺伝子改変ＣＤ８＋細胞集団および前記遺伝子改変ＣＤ４＋細胞集団を共投与する。いくつかの実施形態においては、前記薬物は、タモキシフェンおよび／またはその代謝産物である。いくつかの実施形態においては、前記Ｔ細胞は自己由来Ｔ細胞または同種異系Ｔ細胞である。上記の方法の様々な変法も可能である。たとえば、前記ＣＤ４＋Ｔ細胞および前記ＣＤ８＋Ｔ細胞によって発現されるキメラ受容体は、同じものであっても異なるものであってもよい。

【００１７】

いくつかの実施形態においては、キメラ抗原受容体の発現誘導システムであって、第１の核酸および第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつリガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されており、該リガンド結合ドメインがリガンドに特異的であり、該リガンドが、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子、または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能であり、前記第１の核酸が、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含むこと；ならびに

前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とするシステムが提供される。

いくつかの実施形態においては、前記薬物は、タモキシフェンおよび／またはその代謝産物である。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、誘導可能なプロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、構成的プロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは配列番号４１の核酸配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは構成的プロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、前記ＥＦ１αｐである。いくつかの実施形態においては、前記転写活性化因子は、配列番号４０の配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は第１のベクターをさらに含み、前記第２の核酸は第２のベクターをさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第１のベクターおよび第２のベクターは、単一のウイルスベクターにパッケージされている。いくつかの実施形態においては、前記ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸および第２の核酸はベクターを含む。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は、選択マーカーをコードする核酸配列をさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、選択マーカーをコードする核酸をさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記スペーサーは、前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されるように最適化されている。

【００１８】

いくつかの実施形態においては、キメラ抗原受容体の発現誘導システムであって、

ａ）第１の核酸および

ｂ）第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつリガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されており、該リガンド結合ドメインがリガンドに特異的であり、該リガンドが、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子、または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能であり、前記第１の核酸が、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含むこと；ならびに

前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とするシステムが提供される。

いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、構成的プロモーターまたは誘導可能なプロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記薬物は、タモキシフェンおよび／またはその代謝産物である。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、リガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記リガンド結合ドメインはリガンドに特異的であり、該リガンドは腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能である。いくつかの実施形態においては、前記薬物は、タモキシフェンおよび／またはその代謝産物である。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記第２のプロモーターとは逆向きである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは抗体フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは一本鎖可変フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記腫瘍に特異的な分子は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、ＣＥ７、ＥＧＦＲ、ｈＢ７Ｈ３、メソテリン（mesothelin）、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ　Ａ３　ＴＣＲ、またはこれらの組み合わせである。いくつかの実施形態においては、前記スペーサーは、前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されるように最適化されている。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、誘導可能なプロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、構成的プロモーターである。

【００１９】

いくつかの実施形態においては、システムによってコードされるキメラ受容体ポリペプチドが提供される。

いくつかの実施形態においては、該システムは、

ａ）第１の核酸および

ｂ）第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつリガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されており、該リガンド結合ドメインがリガンドに特異的であり、該リガンドが、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子、または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能であり、前記第１の核酸が、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含むこと；ならびに

前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とする。

いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、構成的プロモーターまたは誘導可能なプロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記薬物は、タモキシフェンおよび／またはその代謝産物である。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは配列番号４１の核酸配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは構成的プロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、前記ＥＦ１αｐである。いくつかの実施形態においては、前記転写活性化因子は、配列番号４０の配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は第１のベクターをさらに含み、前記第２の核酸は第２のベクターをさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第１のベクターおよび第２のベクターは、単一のウイルスベクターにパッケージされている。いくつかの実施形態においては、前記ウイルス

ベクターは、レンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸および第２の核酸はベクターを含む。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は、選択マーカーをコードする核酸配列をさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、選択マーカーをコードする核酸をさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、誘導可能なプロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記スペーサーは、前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されるように最適化されている。

【００２０】

いくつかの実施形態においては、キメラ抗原受容体の発現誘導システムであって、

ａ）第１の核酸および

ｂ）第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつサイトカイン、ケモカイン受容体、アポトーシスを制御するポリペプチドまたはチェックポイントシグナル伝達を調節するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されていること、ならびに

前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とするシステムが提供される。

いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、構成的プロモーターまたは誘導可能なプロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、リガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記リガンド結合ドメインはリガンドに特異的であり、該リガンドは腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能である。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記第２のプロモーターとは逆向きである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは抗体フラグメントであり、好ましくはその結合ドメインである。いくつかの実施形態においては、前記腫瘍に特異的な分子は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、ＣＥ７、ＥＧＦＲ、ｈＢ７Ｈ３、メソテリン（mesothelin）、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ Ａ３ ＴＣＲ、またはこれらの組み合わせである。いくつかの実施形態においては、前記システムは、第１の核酸および第２の核酸を含み、前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつサイトカイン、ケモカイン受容体、アポトーシスを制御するポリペプチドまたはチェックポイントシグナル伝達を調節するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されていること、ならびに前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とする。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、構成的プロモーターまたは誘導可能なプロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記薬物は、タモキシフェンおよび／またはその代謝産物である。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、リガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記リガンドは、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能である。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記第２のプロモーターとは逆向きである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは抗体フラグメントであり、好ましくはその結

合フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは一本鎖可変フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記腫瘍に特異的な分子は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、ＣＥ７、ＥＧＦＲ、ｈＢ７Ｈ３、メソテリン（mesothelin）、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ Ａ３ ＴＣＲ、またはこれらの組み合わせである。いくつかの実施形態においては、前記スペーサーは、前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されるように最適化されている。

【００２１】

いくつかの実施形態においては、システムを含む宿主細胞が提供される。いくつかの実施形態においては、該システムは、

ａ）第１の核酸および

ｂ）第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつリガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されており、該リガンドが、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子、または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能であり、前記第１の核酸が、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含むこと；ならびに

前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とする。

いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、構成的プロモーターまたは誘導可能なプロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記薬物は、タモキシフェンおよび／またはその代謝産物である。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは配列番号４１の核酸配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは構成的プロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、前記ＥＦ１αｐである。いくつかの実施形態においては、前記転写活性化因子は、配列番号４０の配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は第１のベクターをさらに含み、前記第２の核酸は第２のベクターをさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第１のベクターおよび第２のベクターは、単一のウイルスベクターにパッケージされている。いくつかの実施形態においては、前記ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸および第２の核酸はベクターを含む。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は、選択マーカーをコードする核酸配列をさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、選択マーカーをコードする核酸をさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、リガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記リガンド結合ドメインはリガンドに特異的であり、該リガンドは腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能である。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記第２のプロモーターとは逆向きである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは抗体フラグメントであり、好ましくはその結合フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記腫瘍に特異的な分子は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、ＣＥ７、ＥＧＦＲ、ｈＢ７Ｈ３、メソテリン（mesothelin）、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ Ａ３ ＴＣＲ、またはこれらの組み合わせである。いくつかの実施形態においては、前記システムは、ａ）第１の核

酸およびｂ）第２の核酸を含み、前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつサイトカイン、ケモカイン受容体、アポトーシスを制御するポリペプチドまたはチェックポイントシグナル伝達を調節するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されていること、ならびに前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とする。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、構成的プロモーターまたは誘導可能なプロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、リガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記リガンドは、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能である。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記第２のプロモーターとは逆向きである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは抗体フラグメントであり、好ましくはその結合フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは一本鎖可変フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記腫瘍に特異的な分子は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、ＣＥ７、ＥＧＦＲ、ｈＢ７Ｈ３、メソテリン（mesothelin）、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ Ａ３ ＴＣＲ、またはこれらの組み合わせである。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は、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細胞およびバルクＣＤ８$^+$Ｔ細胞からなる群から選択される細胞傷害性ＣＤ８$^+$Ｔリンパ球である。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は、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細胞およびバルクＣＤ４$^+$Ｔ細胞からなる群から選択されるＣＤ４$^+$Ｔヘルパーリンパ球である。いくつかの実施形態においては、前記スペーサーは、前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されるように最適化されている。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞はＴ細胞前駆細胞である。いくつかの実施形態においては、前記Ｔ細胞前駆細胞は造血幹細胞である。

【００２２】

いくつかの実施形態においては、薬学的に許容される添加剤中に宿主細胞を含む組成物が提供される。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞はシステムを含む。

いくつかの実施形態においては、該システムは、

ａ）第１の核酸および

ｂ）第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつリガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されており、該リガンドが、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子、または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能であり、前記第１の核酸が、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含むこと；ならびに

前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とする。

いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、構成的プロモーターまたは誘導可能なプロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記薬物は、タモキシフェンおよび／またはその代謝産物である。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは配列番号４１の核酸配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記

第２のプロモーターは構成的プロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、前記ＥＦ１αｐである。いくつかの実施形態においては、前記転写活性化因子は、配列番号４０の配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は第１のベクターをさらに含み、前記第２の核酸は第２のベクターをさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第１のベクターおよび第２のベクターは、単一のウイルスベクターにパッケージされている。いくつかの実施形態においては、前記ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸および第２の核酸はベクターを含む。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は、選択マーカーをコードする核酸配列をさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、選択マーカーをコードする核酸をさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、リガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記リガンドは、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能である。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記第２のプロモーターとは逆向きである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは抗体フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記腫瘍に特異的な分子は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、ＣＥ７、ＥＧＦＲ、ｈＢ７Ｈ３、メソテリン（mesothelin）、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ Ａ３ ＴＣＲ、またはこれらの組み合わせである。いくつかの実施形態においては、該システムは、ａ）第１の核酸およびｂ）第２の核酸を含み、前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつサイトカイン、ケモカイン受容体、アポトーシスを制御するポリペプチドまたはチェックポイントシグナル伝達を調節するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されていること、ならびに前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とする。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、構成的プロモーターまたは誘導可能なプロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、リガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記リガンド結合ドメインはリガンドに特異的であり、該リガンドは腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能である。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記第２のプロモーターとは逆向きである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは抗体フラグメントであり、好ましくはその結合フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは一本鎖可変フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記腫瘍に特異的な分子は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、ＣＥ７、ＥＧＦＲ、ｈＢ７Ｈ３、メソテリン（mesothelin）、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ Ａ３ ＴＣＲ、またはこれらの組み合わせである。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞はＴ細胞前駆細胞である。いくつかの実施形態においては、前記Ｔ細胞前駆細胞は造血幹細胞である。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は、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細胞およびバルクＣＤ８$^+$Ｔ細胞からなる群から選択される細胞傷害性ＣＤ８$^+$Ｔリンパ球である。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は、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細胞およびバルクＣＤ４$^+$Ｔ細胞からなる群から選択されるＣＤ４$^+$Ｔヘルパーリンパ球である

。いくつかの実施形態においては、前記組成物は、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細胞およびバルクＣＤ８＋Ｔ細胞からなる群から選択される細胞傷害性ＣＤ８＋Ｔリンパ球である宿主細胞を含み、該組成物は、さらに、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細胞およびバルクＣＤ４＋Ｔ細胞からなる群から選択されるＣＤ４＋Ｔヘルパーリンパ球である別の宿主細胞を含む。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞はＴ細胞前駆細胞である。いくつかの実施形態においては、前記Ｔ細胞前駆細胞は造血幹細胞である。いくつかの実施形態においては、前記スペーサーは、前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されるように最適化されている。いくつかの実施形態においては、前記組成物は、第１の宿主細胞と第２の宿主細胞とを含み、該第１の宿主細胞は、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細胞およびバルク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、またはナイーブ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細胞およびバルクＣＤ４＋Ｔ細胞からなる群から選択されるＣＤ４＋Ｔヘルパーリンパ球であり、前記第２の宿主細胞は、Ｔ細胞前駆細胞または造血幹細胞である。

【００２３】

いくつかの実施形態においては、インビトロにおいて宿主細胞を製造する方法であって、

ａ）システムを提供すること、

ｂ）単離された個別のＴリンパ球集団に前記システムを導入し、各Ｔリンパ球集団をインビトロで増殖させることを含む方法が提供される。

いくつかの実施形態においては、前記システムは、

ａ）第１の核酸および

ｂ）第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつリガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されており、該リガンド結合ドメインがリガンドに特異的であり、該リガンドが、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子、または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能であり、前記第１の核酸が、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含むこと；ならびに

前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とする。

いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、構成的プロモーターまたは誘導可能なプロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記薬物は、タモキシフェンおよび／またはその代謝産物である。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、構成的プロモーターまたは誘導可能なプロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは配列番号４１の核酸配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは構成的プロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、前記ＥＦ１αｐである。いくつかの実施形態においては、前記転写活性化因子は、配列番号４０の配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は第１のベクターをさらに含み、前記第２の核酸は第２のベクターをさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第１のベクターおよび第２のベクターは、単一のウイルスベクターにパッケージされている。いくつかの実施形態においては、前記ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸および第２の核酸はベクターを含む。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は、選択マーカーをコードする核酸配列をさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、選択マーカーをコードする核酸

をさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、リガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記リガンド結合ドメインはリガンドに特異的であり、該リガンドは腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能である。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記第２のプロモーターとは逆向きである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは抗体フラグメントであり、好ましくはその結合フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記腫瘍に特異的な分子は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、ＣＥ７、ＥＧＦＲ、ｈＢ７Ｈ３、メソテリン（mesothelin）、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ Ａ３ ＴＣＲ、またはこれらの組み合わせである。いくつかの実施形態においては、該システムは、ａ）第１の核酸およびｂ）第２の核酸を含み、前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつサイトカイン、ケモカイン受容体、アポトーシスを制御するポリペプチドまたはチェックポイントシグナル伝達を調節するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されていること、ならびに前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とする。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、構成的プロモーターまたは誘導可能なプロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、リガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記リガンドは、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能である。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記第２のプロモーターとは逆向きである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは抗体フラグメントであり、好ましくはその結合フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは一本鎖可変フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記腫瘍に特異的な分子は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、ＣＥ７、ＥＧＦＲ、ｈＢ７Ｈ３、メソテリン（mesothelin）、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ Ａ３ ＴＣＲ、またはこれらの組み合わせである。いくつかの実施形態においては、前記Ｔリンパ球が増殖しており、前記方法は、抗ＣＤ３および／または抗ＣＤ２８と少なくとも１つの恒常性サイトカインとの存在下において、前記Ｔリンパ球を、細胞移入における使用に十分な数に達するまで培養することをさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記リンパ球はＣＤ８$^{+}$またはＣＤ４$^{+}$である。いくつかの実施形態においては、前記スペーサーは、前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されるように最適化されている。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞はＴ細胞前駆細胞である。いくつかの実施形態においては、前記Ｔ細胞前駆細胞は造血幹細胞である。

【００２４】

いくつかの実施形態においては、がんまたはウイルス感染症の治療のための、宿主細胞または組成物と該宿主細胞中または該組成物中の導入遺伝子の発現を誘導する薬物との組み合わせの使用が提供される。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞はシステムを含む。

いくつかの実施形態においては、該システムは、

ａ）第１の核酸および

ｂ）第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつリガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されており、該リガンド結合ドメインがリガンドに特異的であり、該リガンドが、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子、または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能であり、前記第１の核酸が、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含むこと；ならびに

前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とする。

いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、構成的プロモーターまたは誘導可能なプロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記薬物は、タモキシフェンおよび／またはその代謝産物である。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは配列番号４１の核酸配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは構成的プロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、前記ＥＦ１αｐである。いくつかの実施形態においては、前記転写活性化因子は、配列番号４０の配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は第１のベクターをさらに含み、前記第２の核酸は第２のベクターをさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第１のベクターおよび第２のベクターは、単一のウイルスベクターにパッケージされている。いくつかの実施形態においては、前記ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸および第２の核酸はベクターを含む。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は、選択マーカーをコードする核酸配列をさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、選択マーカーをコードする核酸をさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、リガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記リガンド結合ドメインはリガンドに特異的であり、該リガンドは腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能である。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記第２のプロモーターとは逆向きである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは抗体フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記腫瘍に特異的な分子は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、ＣＥ７、ＥＧＦＲ、ｈＢ７Ｈ３、メソテリン（mesothelin）、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ Ａ３ ＴＣＲ、またはこれらの組み合わせである。いくつかの実施形態においては、前記システムは、ａ）第１の核酸およびｂ）第２の核酸を含み、前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつサイトカイン、ケモカイン受容体、アポトーシスを制御するポリペプチドまたはチェックポイントシグナル伝達を調節するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されていること、ならびに前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とする。

いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、構成的プロモーターまたは誘導可能なプロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、リガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記リガンドは、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能

である。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記第２のプロモーターとは逆向きである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは抗体フラグメントであり、好ましくはその結合フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは一本鎖可変フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記腫瘍に特異的な分子は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、ＣＥ７、ＥＧＦＲ、ｈＢ７Ｈ３、メソテリン（mesothelin）、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ Ａ３ ＴＣＲ、またはこれらの組み合わせである。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は、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細胞およびバルクＣＤ８$^+$Ｔ細胞からなる群から選択される細胞傷害性ＣＤ８$^+$Ｔリンパ球である。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は、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細胞およびバルクＣＤ４$^+$Ｔ細胞からなる群から選択されるＣＤ４$^+$Ｔヘルパーリンパ球である。いくつかの実施形態においては、前記細胞はＴ細胞前駆細胞である。いくつかの実施形態においては、前記細胞は造血幹細胞である。いくつかの実施形態においては、前記組成物は、薬学的に許容される添加剤中に宿主細胞を含む。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞はシステムを含む。

いくつかの実施形態においては、該システムは、

ａ）第１の核酸および

ｂ）第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつリガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されており、該リガンド結合ドメインがリガンドに特異的であり、該リガンドが、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子、または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能であり、前記第１の核酸が、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチドをさらに含むこと；ならびに

前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とする。

いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、構成的プロモーターまたは誘導可能なプロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記薬物は、タモキシフェンおよび／またはその代謝産物である。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは配列番号４１の核酸配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは構成的プロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、前記ＥＦ１αｐである。いくつかの実施形態においては、前記転写活性化因子は、配列番号４０の配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は第１のベクターをさらに含み、前記第２の核酸は第２のベクターをさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第１のベクターおよび第２のベクターは、単一のウイルスベクターにパッケージされている。いくつかの実施形態においては、前記ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸および第２の核酸はベクターを含む。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は、選択マーカーをコードする核酸配列をさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、選択マーカーをコードする核酸をさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、リガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記リガンド結合ドメインはリガンドに特異的であり、該リガンドは腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能である。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記第２のプロモ

ーターとは逆向きである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは抗体フラグメントであり、好ましくはその結合フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記腫瘍に特異的な分子は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、ＣＥ７、ＥＧＦＲ、ｈＢ７Ｈ３、メソテリン（mesothelin）、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ Ａ３ ＴＣＲ、またはこれらの組み合わせである。いくつかの実施形態においては、該システムは、ａ）第１の核酸およびｂ）第２の核酸を含み、前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつサイトカイン、ケモカイン受容体、アポトーシスを制御するポリペプチドまたはチェックポイントシグナル伝達を調節するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されていること、ならびに前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とする。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、構成的プロモーターまたは誘導可能なプロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、リガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記リガンドは、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能である。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記第２のプロモーターとは逆向きである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは抗体フラグメントであり、好ましくはその結合フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは一本鎖可変フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記腫瘍に特異的な分子は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、ＣＥ７、ＥＧＦＲ、ｈＢ７Ｈ３、メソテリン（mesothelin）、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ Ａ３ ＴＣＲ、またはこれらの組み合わせである。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は、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細胞およびバルクＣＤ８$^+$Ｔ細胞からなる群から選択される細胞傷害性ＣＤ８$^+$Ｔリンパ球である。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は、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細胞およびバルクＣＤ４$^+$Ｔ細胞からなる群から選択されるＣＤ４$^+$Ｔヘルパーリンパ球である。いくつかの実施形態においては、前記組成物は、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細胞およびバルクＣＤ８$^+$Ｔ細胞からなる群から選択される細胞傷害性ＣＤ８$^+$Ｔリンパ球である宿主細胞を含み、該組成物は、さらに、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細胞およびバルクＣＤ４$^+$Ｔ細胞からなる群から選択されるＣＤ４$^+$Ｔヘルパーリンパ球である別の宿主細胞を含む。いくつかの実施形態においては、前記がんは、固形腫瘍または血液悪性腫瘍である。いくつかの実施形態においては、前記固形腫瘍は、乳がん、脳がん、肺がん、大腸がん、腎臓がん、膵臓がん、前立腺がんおよび卵巣がんからなる群から選択される。いくつかの実施形態においては、前記スペーサーは、前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されるように最適化されている。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞はＴ細胞前駆細胞である。いくつかの実施形態においては、前記Ｔ細胞前駆細胞は造血幹細胞である。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞はＴ細胞前駆細胞である。いくつかの実施形態においては、前記Ｔ細胞前駆細胞は造血幹細胞である。いくつかの実施形態においては、前記スペーサーは、前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されるように最適化されている。いくつかの実施形態においては、前記組成物は、第１の宿主細胞と第２の宿主細胞とを含み、該第１の宿主細胞は、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細胞およびバル

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、またはナイーブ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細胞およびバルクＣＤ４＋Ｔ細胞からなる群から選択されるＣＤ４＋Ｔヘルパーリンパ球であり、前記第２の宿主細胞は、Ｔ細胞前駆細胞または造血幹細胞である。

【００２５】

いくつかの実施形態においては、がんまたはウイルス感染症を有する対象において細胞免疫療法を行う方法であって、組成物または宿主細胞を前記対象に投与すること、および該組成物中または該宿主細胞中の導入遺伝子の発現を誘導する薬物を投与することを含む方法が提供される。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞はシステムを含む。

いくつかの実施形態においては、該システムは、

ａ）第１の核酸および

ｂ）第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつリガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されており、該リガンド結合ドメインがリガンドに特異的であり、該リガンドが、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子、または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能であり、前記第１の核酸が、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含むこと；ならびに

第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とする。

いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、構成的プロモーターまたは誘導可能なプロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記薬物は、タモキシフェンおよび／またはその代謝産物である。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは配列番号４１の核酸配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは構成的プロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、前記ＥＦ１αｐである。いくつかの実施形態においては、前記転写活性化因子は、配列番号４０の配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は第１のベクターをさらに含み、前記第２の核酸は第２のベクターをさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第１のベクターおよび第２のベクターは、単一のウイルスベクターにパッケージされている。いくつかの実施形態においては、前記ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸および第２の核酸はベクターを含む。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は、選択マーカーをコードする核酸配列をさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、選択マーカーをコードする核酸をさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、リガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記リガンド結合ドメインはリガンドに特異的であり、該リガンドは腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能である。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記第２のプロモーターとは逆向きである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは抗体フラグメントであり、好ましくはその結合フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記腫瘍に特異的な分子は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、ＣＥ７、ＥＧＦＲ、ｈＢ７Ｈ３、メソテリン（mesothelin）、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ Ａ３ ＴＣＲ、またはこれらの組み合わせである。いくつかの実施形態においては、該システムは、ａ）第１の核酸およびｂ）第２の核酸を含み、前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモ

ーターを含み、かつサイトカイン、ケモカイン受容体、アポトーシスを制御するポリペプチドまたはチェックポイントシグナル伝達を調節するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されていること、ならびに前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とする。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、構成的プロモーターまたは誘導可能なプロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、リガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記リガンドは、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能である。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記第２のプロモーターとは逆向きである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは抗体フラグメントであり、好ましくはその結合フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは一本鎖可変フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記腫瘍に特異的な分子は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、ＣＥ７、ＥＧＦＲ、ｈＢ７Ｈ３、メソテリン（mesothelin）、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ Ａ３ ＴＣＲ、またはこれらの組み合わせである。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は、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細胞およびバルクＣＤ８$^+$Ｔ細胞からなる群から選択される細胞傷害性ＣＤ８$^+$Ｔリンパ球である。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は、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細胞およびバルクＣＤ４$^+$Ｔ細胞からなる群から選択されるＣＤ４$^+$Ｔヘルパーリンパ球である。いくつかの実施形態においては、前記組成物は、薬学的に許容される添加剤中に宿主細胞を含む。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞はシステムを含む。

いくつかの実施形態においては、該システムは、

ａ）第１の核酸および

ｂ）第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつリガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されており、該リガンド結合ドメインがリガンドに特異的であり、該リガンドが、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子、または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能であり、前記第１の核酸が、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチドをさらに含むこと；ならびに

前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とする。

いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、構成的プロモーターまたは誘導可能なプロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記薬物は、タモキシフェンおよび／またはその代謝産物である。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは配列番号４１の核酸配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは構成的プロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、前記ＥＦ１αｐである。いくつかの実施形態においては、前記転写活性化因子は、配列番号４０の配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は第１のベクターをさらに含み、前記第２の核酸は第２のベクターをさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第１のベクターおよび第２のベクターは、単一のウイルスベクターにパッケージされている。いくつかの実施形態においては、前記ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態においては、前記第１

の核酸および第２の核酸はベクターを含む。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は、選択マーカーをコードする核酸配列をさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、選択マーカーをコードする核酸をさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、リガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記リガンド結合ドメインはリガンドに特異的であり、該リガンドは腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能である。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記第２のプロモーターとは逆向きである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは抗体フラグメントであり、好ましくはその結合フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記腫瘍に特異的な分子は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、ＣＥ７、ＥＧＦＲ、ｈＢ７Ｈ３、メソテリン（mesothelin）、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ Ａ３ ＴＣＲ、またはこれらの組み合わせである。いくつかの実施形態においては、該システムは、ａ）第１の核酸およびｂ）第２の核酸を含み、前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつサイトカイン、ケモカイン受容体、アポトーシスを制御するポリペプチドまたはチェックポイントシグナル伝達を調節するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されていること、ならびに前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とする。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、構成的プロモーターまたは誘導可能なプロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、リガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記リガンドは、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能である。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記第２のプロモーターとは逆向きである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは抗体フラグメントであり、好ましくはその結合フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは一本鎖可変フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記腫瘍に特異的な分子は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、ＣＥ７、ＥＧＦＲ、ｈＢ７Ｈ３、メソテリン（mesothelin）、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ Ａ３ ＴＣＲ、またはこれらの組み合わせである。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は、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細胞およびバルクＣＤ８$^+$Ｔ細胞からなる群から選択される細胞傷害性ＣＤ８$^+$Ｔリンパ球である。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は、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細胞およびバルクＣＤ４$^+$Ｔ細胞からなる群から選択されるＣＤ４$^+$Ｔヘルパーリンパ球である。いくつかの実施形態においては、前記組成物は、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細胞およびバルクＣＤ８$^+$Ｔ細胞からなる群から選択される細胞傷害性ＣＤ８$^+$Ｔリンパ球である宿主細胞を含み、該組成物は、さらに、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細胞およびバルクＣＤ４$^+$Ｔ細胞からなる群から選択されるＣＤ４$^+$Ｔヘルパーリンパ球である別の宿主細胞を含む。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞はＴ細胞前駆細胞である。いくつかの実施形態においては、前記Ｔ細胞前駆細胞は造血幹細胞である。いくつかの実施形態においては、前記スペーサーは、前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生

が対照のキメラ受容体よりも増強されるように最適化されている。いくつかの実施形態においては、前記組成物は、第１の宿主細胞と第２の宿主細胞とを含み、該第１の宿主細胞は、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細胞およびバルク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、またはナイーブ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細胞およびバルクＣＤ４＋Ｔ細胞からなる群から選択されるＣＤ４＋Ｔヘルパーリンパ球であり、前記第２の宿主細胞は、Ｔ細胞前駆細胞または造血幹細胞である。いくつかの実施形態においては、前記がんは、固形腫瘍および血液悪性腫瘍から選択される。いくつかの実施形態においては、前記固形腫瘍は、乳がん、脳がん、肺がん、大腸がん、腎臓がん、膵臓がん、前立腺がんおよび卵巣がんからなる群から選択される。いくつかの実施形態においては、前記スペーサーは、前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されるように最適化されている。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞はＴ細胞前駆細胞である。いくつかの実施形態においては、前記Ｔ細胞前駆細胞は造血幹細胞である。いくつかの実施形態においては、前記単離されたＴリンパ球集団はＴ細胞前駆細胞を含む。いくつかの実施形態においては、前記Ｔ細胞前駆細胞は造血幹細胞である。いくつかの実施形態においては、前記薬物の投与は、前記組成物または前記宿主細胞の投与後に行い、前記組成物または前記宿主細胞の投与から１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、２週間、４週間もしくは２ヶ月が経過した後、またはこれらの時間点のいずれか２つの間にある任意の時間が経過した後に前記薬物の投与を行う。

【図面の簡単な説明】

【００２６】

【図１】図１Ａは、構築物Ａおよび構築物Ｂを含むデュアルプラスミドレンチウイルス構築物で形質導入したJurkat細胞におけるZsGreenおよびEGFRtの発現量を、４－ヒドロキシタモキシフェン（4OHT）の存在下または非存在下においてフローサイトメトリーで測定した結果を示す。この結果から、4-OHTの存在下または非存在下でEGFRtが発現されることが示され、これによって前記細胞が構築物Ａを有することが示された。前記結果から、さらに、4-OHTの存在下でZsGreenの発現が誘導されたことが示され、これによって前記細胞が構築物Ｂを有することが示された。図１Ｂは、EGFRtに連結されたTamR-tf（HEA3）に連結された構成的プロモーターEF1αpを含む構築物Ａ、およびZsGreenをコードするポリヌクレオチドに連結された合成プロモーター7xHBD/mE1bを含む構築物Ｂを示す。

【００２７】

【図２】図２は、５０～１０００ｎＭの様々な用量の4-OHTと接触させた形質導入Jurkat細胞におけるZsGreenの発現を示すである。

【００２８】

【図３】図３は、4-OHTで４８時間の単回処理を実施した後に洗浄した形質導入Jurkat細胞（○）、および4-OHTで２４時間処理した後に洗浄し、その後１５日目に4-OHTで再刺激した形質導入されたJurkat細胞（■）におけるZsGreenの発現のオン／オフ率の動態を示す。

【００２９】

【図４】図４Ａ～図４Ｄは、デュアルパッケージレンチウイルス構築物ＡおよびＢで形質導入したＣＤ４セントラルメモリー細胞におけるZsGreenの発現を示す。細胞を３つの処理群、すなわち、4OHT単独処理群（図４Ａ）、4OHTとCD3/CD28ビーズとを組み合わせた共処理群（図４Ｂ）、または4OHT単独で４８時間処理した後にCD3/CD28ビーズを添加することによって処理した群（図４Ｃ）に分けた。ZsGreenの発現は、９６時間にわたって監視した。図４Ｄは、EGFRtに連結されたTamR-tf（HEA3）に連結された構成的プロモーターEF1αpを含む構築物A、およびZsGreenをコードするポリヌクレオチドに連結された合成プロモーター7xHBD/mE1bを含む構築物Bを示す。

【００３０】

【図５】図５Ａ～図５Ｃは、図４に示したデュアルパッケージレンチウイルス構築物Ａお

よびＢで形質導入したＣＤ８セントラルメモリー細胞におけるZsGreenの発現を示す。細胞を３つの処理群、すなわち、4OHT単独処理群（図5A）、4OHTとCD3/CD28ビーズとを組み合わせた共処理群（図5B）、または4OHT単独で４８時間処理した後にCD3/CD28ビーズを添加することによって処理した群（図5C）に分けた。ZsGreenの発現は、７２時間にわたって監視した。

【００３１】

【図６】図６Ａは、図６Ｃに示した構築物Ａおよび構築物Ｂで形質導入したヒトJurkat T細胞におけるEGFRtおよびHer2tの発現を示す。EGFRtおよびHer2tの発現は、4OHTの存在下または非存在下で監視した。サンプルを、EGFRt-APC抗体およびハーセプチン－ビオチンで染色し、続いてSA-PEで染色した。図６Ｂは、CD19 CAR上の細胞内ＣＤ３ζ鎖（約４８ｋＤａ）を認識するマウス抗CD247で染色したJurkat親細胞および形質導入CD19 CAR細胞のウエスタンブロットを示す。内在性CD3ζ鎖は２３ｋＤａの位置に認められる。内在性CD3ζ鎖はすべての細胞において検出された。CD19 CAR CD3ζ鎖は、4-OHTに暴露させた形質導入Jurkat細胞においてのみ検出された。図６Ｃは、EGFRtに連結されたTamR-tf（HEA3）に連結された構成的プロモーターEF1αpを含む構築物Ａ、およびHer2tをコードするポリヌクレオチドに連結されたCD19CARをコードするポリヌクレオチドに連結された合成プロモーター7xHBD/mE1bを含む構築物Ｂを示す。

【００３２】

【図７】図７Ａは、4OHTの存在下または非存在下において、さらなる選択マーカーであるDHFRdmを含むTamR CD19CAR LVで形質導入したヒトJurkat T細胞におけるEGFRtおよびHer2tの発現を示す。EGFRtおよびHer2tの発現は、4OHTの存在下または非存在下で監視した。サンプルを、EGFRt-APC抗体およびハーセプチン－ビオチンで染色し、続いてSA-PEで染色した。図７Ｂは、CD19 CAR上の細胞内CD3ζ鎖（約48kDa）を認識するマウス抗CD247で染色したJurkat親細胞および形質導入CD19 CAR細胞のウエスタンブロットを示す。内在性CD3ζ鎖は23kDaの位置に認められる。内在性CD3ζ鎖はすべての細胞において検出された。CD19 CAR CD3ζ鎖は、4-OHTに暴露させた形質導入Jurkat細胞においてのみ検出された。図７Ｃは、EGFRtに連結されたTamR-tf（HEA3）に連結された構成的プロモーターEF1αpを含む構築物Ａ、およびDHFRdmをコードするポリヌクレオチドに連結されたHer2tをコードするポリヌクレオチドに連結されたCD19CARをコードするポリヌクレオチドに連結された合成プロモーター7xHBD/mE1bを含む構築物Ｂを示す図である。

【００３３】

【図８】図８Ａは、4OHTおよび抗CD3/CD28ビーズの存在下または非存在下において、さらなる選択マーカーであるDHFRdmを含むTamR CD19CAR LVで形質導入したヒトCD4セントラルメモリーＴ細胞におけるEGFRtおよびHer2tの発現を示す。EGFRtおよびHer2tの発現は、4OHTの存在下または非存在下および抗CD3/CD28ビーズの存在下または非存在下で監視した。サンプルを、EGFRt-APC抗体およびハーセプチン－ビオチンで染色し、続いてSA-PEで染色した。図８Ｂは、EGFRtに連結されたTamR-tf（HEA3）に連結された構成的プロモーターEF1αpを含む構築物Ａ、およびDHFRdmをコードするポリヌクレオチドに連結されたHer2tをコードするポリヌクレオチドに連結されたCD19CARをコードするポリヌクレオチドに連結された合成プロモーター7xHBD/mE1bを含む構築物Ｂを示す。

【発明を実施するための形態】

【００３４】

用語の定義

特に記載がない限り、本明細書で使用されている技術用語および科学用語はいずれも、本発明が属する技術分野における当業者によって一般的に理解される意味を有すると見なされる。

【００３５】

本明細書において「約」は、測定値について述べる場合、所定値から±２０％または±１０％の変動を意味し、より好ましくは±５％の変動、さらにより好ましくは±１％の変動、さらにより好ましくは±０．１％の変動を意味する。

【００３６】
本明細書に記載の「抗原」または「Ａｇ」は、免疫応答を引き起こす分子を指す。この免疫応答は、抗体産生もしくは特異的な免疫担当細胞の活性化、またはこれらの両方を包含することができる。抗原が組換え技術により作製、合成および産生可能であること、または生体サンプルから得ることができることは容易に理解される。そのような生体サンプルとしては、組織サンプル、腫瘍サンプル、細胞または体液（たとえば血液、血漿または腹水）が挙げられるが、これらに限定されない。
【００３７】
本明細書に記載の「抗腫瘍効果」は、腫瘍体積の減少、腫瘍細胞数の減少、転移巣の減少、余命の延長、またはがん症状と関連した種々の生理学的症候の減少によって示される生物学的効果を指す。また、「抗腫瘍効果」は再発の減少または再発までの時間の延長によって示すことができる。
【００３８】
本明細書に記載の「キメラ受容体」は、抗体配列または他のタンパク質配列に由来するリガンド結合ドメインを含む合成設計された受容体を指し、該リガンド結合ドメインは、上記疾患または障害に関連する分子と結合し、Ｔ細胞受容体またはその他の受容体の細胞内シグナル伝達ドメイン（たとえば共刺激ドメイン）の１つ以上とスペーサードメインを介して連結されている。キメラ受容体は、人工Ｔ細胞受容体、キメラＴ細胞受容体、キメラ免疫受容体、およびキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）とも呼ぶことができる。ＣＡＲは、任意の特異性を免疫受容体細胞に付与することが可能な遺伝子改変受容体である。研究者によっては、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）は、抗体または抗体フラグメント、スペーサー、シグナル伝達ドメインおよび膜貫通領域を含むものであるとも考えられている。しかしながら、本明細書によれば、ＣＡＲの様々な構成成分すなわちドメイン（たとえばエピトープ結合領域（たとえば、抗体フラグメント、ｓｃＦｖまたはそれらの一部）、スペーサー、膜貫通ドメインおよび／またはシグナル伝達ドメインなど）は改変されており、この改変によって驚くべき効果が得られたことから、それぞれ独立した特徴に注目すると、本明細書全体ではＣＡＲの成分は様々に異なっていることが多い。ＣＡＲが様々な特徴を有することから、たとえば、特定のエピトープや抗原に対しての結合親和性がさらに強くなることがある。本明細書に記載の「共刺激ドメイン」は、たとえばＴＣＲ／ＣＤ３複合体のＣＤ３ζ鎖によって提供される一次シグナルに加えて、活性化、増殖、分化、サイトカイン分泌などの（ただしこれらに限定されない）Ｔ細胞応答を媒介するシグナルをＴ細胞に提供するシグナル伝達部分を指す。共刺激ドメインは、ＣＤ２７、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、ＯＸ４０、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＩＣＯＳ、リンパ球機能関連抗原－１（ＬＦＡ－１）、ＣＤ２、ＣＤ７、ＬＩＧＨＴ、ＮＫＧ２Ｃ、Ｂ７－Ｈ３などの分子全体、またはＣＤ８３と特異的に結合するリガンド全体、またはこれらの分子やリガンドの一部を含んでいてもよいが、これらに限定されない。いくつかの実施形態においては、共刺激ドメインは、他の細胞内メディエーターと相互作用することによって、活性化、増殖、分化、サイトカイン分泌などの細胞応答を媒介する細胞内シグナル伝達ドメインである。本明細書において「コードする」は、遺伝子、ｃＤＮＡ、ｍＲＮＡなどのポリヌクレオチド中の特定のヌクレオチド配列が、特定のアミノ酸配列などの別の巨大分子を合成する際にテンプレートとして機能する特性を指す。したがって、ある遺伝子に対応するｍＲＮＡの転写および翻訳がなされた結果、細胞または他の生物系においてタンパク質が産生された場合、その遺伝子はタンパク質をコードすると言える。「ポリペプチドをコードする核酸配列」は、同じアミノ酸配列をコードするあらゆる縮重ヌクレオチド配列を包含する。
【００３９】
本明細書に記載の「条件的」または「誘導可能な」は、誘導因子の存在下で遺伝子を発現させるが、誘導因子の非存在下では実質的に遺伝子を発現させないプロモーターを含む核酸構築物を指す。
【００４０】
本明細書に記載の「構成的」は、継続的に産生されるポリペプチドを構成的に発現させ

るプロモーターを含む核酸構築物を指す。

【００４１】

「特異的」または「特異性」は、結合パートナーに対するリガンドの特性、あるいはリガンドに対する結合パートナーの特性を指すことができ、結合に特異的な相補的形状、電荷性および疎水性が挙げられる。結合に関与する特異性としては、立体特異性、領域選択性、および化学選択性が挙げられる。いくつかの実施形態において、キメラ抗原受容体をコードする核酸を得ることが可能な、キメラ抗原受容体をコードする核酸の製造方法が提供される。

【００４２】

本明細書に記載の「制御」または「調節」は、生物学的プロセスを制御すること、または生物学的プロセス、生物学的経路、細胞プロセスもしくは細胞経路を改変もしくは制御することを指す。

いくつかの実施形態においては、キメラ抗原受容体の発現誘導システムであって、

ａ）第１の核酸および

ｂ）第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつリガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されており、該リガンド結合ドメインがリガンドに特異的であり、該リガンドが、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子、または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能であり、前記第１の核酸が、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含むこと；ならびに

前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とするシステムが提供される。

いくつかの実施形態においては、「調節」は、細胞の分化およびアポトーシスを調節することを含む。いくつかの実施形態においては、「調節」は、タンパク質の活性の制御によって細胞の増殖を調節することを含む。いくつかの実施形態においては、前記タンパク質は細胞周期調節因子および転写因子である。いくつかの実施形態においては、前記細胞周期制御因子は、サイクリンＤ１、ｐ２１、ｐ２７および／またはｃｄｃ２５Ａである。いくつかの実施形態においては、前記転写因子はｃ－Ｍｙｃである。

【００４３】

本明細書に記載の「細胞傷害性Ｔリンパ球」（ＣＴＬ）は、表面上にＣＤ８を発現するＴリンパ球（たとえば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）を指す。いくつかの実施形態において、そのような細胞は、抗原を経験したことのある「メモリー」Ｔ細胞（T_M細胞）であることが好ましい。本明細書に記載の「セントラルメモリー」Ｔ細胞（または「T_{CM}」）は、抗原を経験したＣＴＬであり、ナイーブ細胞と比較して、その表面上にＣＤ６２Ｌ、ＣＣＲ－７、および／またはＣＤ４５ＲＯを発現するが、ＣＤ４５ＲＡを発現していないか、ＣＤ４５ＲＡの発現が低下しているＣＴＬを指す。いくつかの実施形態において、セントラルメモリー細胞は、ナイーブ細胞と比較して、ＣＤ６２Ｌ、ＣＣＲ７、ＣＤ２８、ＣＤ１２７、ＣＤ４５ＲＯ、および／またはＣＤ９５の発現が陽性であるが、ＣＤ５４ＲＡの発現が低下していることがある。本明細書に記載の「エフェクターメモリー」Ｔ細胞（または「T_{EM}」）は、抗原を経験したＴ細胞であり、セントラルメモリー細胞と比較して、その表面上にＣＤ６２Ｌを発現していないか、ＣＤ６２Ｌの発現が低下しており、ナイーブ細胞と比較して、ＣＤ４５ＲＡを発現していないか、ＣＤ４５ＲＡの発現が低下しているＴ細胞を指す。いくつかの実施形態において、エフェクターメモリー細胞は、ナイーブ細胞またはセントラルメモリー細胞と比較して、ＣＤ６２Ｌおよび／またはＣＣＲ７の発現が陰性であり、ＣＤ２８および／またはＣＤ４５ＲＡの発現が陽性あるいは陰性である。

【００４４】

本明細書に記載の「ナイーブ」Ｔ細胞は、抗原を経験していないＴリンパ球であり、セントラルメモリー細胞またはエフェクターメモリー細胞と比較して、ＣＤ６２Ｌおよび／またはＣＤ４５ＲＡを発現しており、ＣＤ４５ＲＯを発現していないＴリンパ球を指す。いくつかの実施形態において、ナイーブＣＤ８＋Ｔリンパ球は、ナイーブＴ細胞の表現型マーカーの発現によって特徴付けられ、ナイーブＴ細胞の表現型マーカーとしては、ＣＤ６２Ｌ、ＣＣＲ７、ＣＤ２８、ＣＤ１２７、および／またはＣＤ４５ＲＡが挙げられる。

【００４５】

本明細書に記載の「エフェクター」Ｔ細胞または「$Ｔ_{Ｅ}$」Ｔ細胞は、抗原を経験した細胞傷害性Ｔリンパ球であり、セントラルメモリー細胞またはナイーブＴ細胞と比較して、ＣＤ６２Ｌ、ＣＣＲ７、および／もしくはＣＤ２８を発現していないか、またはＣＤ６２Ｌ、ＣＣＲ７、および／もしくはＣＤ２８の発現が低下しており、かつグランザイムＢ陽性および／またはパーフォリンに陽性であるＴリンパ球を指す。本明細書において、混合物中の特定の細胞種の量について述べる際に使用される「濃縮された」および「除去された」という用語は、細胞の混合物中において「濃縮された」細胞種の数を増加させる方法もしくは工程で細胞混合物を処理すること、または細胞の混合物中の「除去された」細胞の数を低減させる方法もしくは工程で細胞混合物を処理することを指す。したがって、濃縮工程に付された細胞の由来に応じて、混合物または組成物において、「濃縮された」細胞は（細胞数で）全体の６０％、７０％、８０％、９０％、９５％もしくは９９％以上を占めていてもよく、かつ／または「除去された」細胞は（細胞数で）全体の４０％、３０％、２０％、１０％、５％もしくは１％以下を占めていてもよい。

【００４６】

本明細書に記載の「エピトープ」は、抗体、Ｔ細胞および／またはＢ細胞を含む免疫系によって認識される抗原または分子の一部を指す。エピトープは、通常、少なくとも７つのアミノ酸を有し、線状であっても高次構造を有していてもよい。本明細書において開示される種々のポリペプチドについて述べる際に使用される「単離された」という用語は、ポリペプチドまたは核酸が本来存在する環境にある他の成分から同定、分離かつ／または回収されたポリペプチドまたは核酸を意味する。単離されたポリペプチドまたは核酸は、これらが本来関連する他の成分を全く含まないことが好ましい。単離されたポリペプチドまたは核酸が本来存在する環境にある不純物としては、典型的には、該ポリペプチドまたは核酸の診断用途または治療用途を妨害するような物質であり、たとえば、酵素、ホルモンおよび他のタンパク性の溶質または非タンパク性の溶質が挙げられる。

【００４７】

本明細書に記載の「細胞内シグナル伝達ドメイン」は、リンパ球を活性化する分子（ここでは、キメラ受容体分子）の１つ以上のドメイン全体またはその一部を指す。そのような分子の細胞内ドメインは、細胞メディエーターと相互作用することによってシグナルを媒介し、増殖、分化、活性化、およびその他のエフェクター機能をもたらす。いくつかの実施形態において、そのような分子として、ＣＤ２８、ＣＤ３、もしくは４－１ＢＢの全体もしくはその一部、またはそれらの組み合わせが挙げられる。

【００４８】

本明細書に記載の「リガンド」は、別の物質と特異的に結合して複合体を形成する物質を指す。リガンドとしては、抗原上のエピトープ、受容体に結合する分子、基質、阻害物質、ホルモン、および／または活性化物質が挙げられる。本明細書に記載の「リガンド結合ドメイン」は、リガンドに結合する物質またはその一部を指す。リガンド結合ドメインとしては、抗体の抗原結合部分、受容体の細胞外ドメイン、および／または酵素の活性部位が挙げられる。本明細書に記載の「作動可能に連結される」は、制御配列と異種核酸配列との間の機能的な連結を指し、これは該異種核酸配列の発現をもたらす。たとえば、第１の核酸配列が第２の核酸配列と機能的に関係して配置されている場合、該第１の核酸配列は該第２の核酸配列と作動可能に連結されていると言える。たとえば、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響を及ぼす場合、該プロモーターは該コード配列に作動可能に連結されていると言える。通常、作動可能に連結されるＤＮＡ配列は連続しており

、２つのタンパク質コード領域の連結が必要とされる場合、これらは同じリーディングフレーム内に存在する。

【００４９】

本明細書に記載のキメラ受容体ポリペプチド配列における「アミノ酸配列同一性（％）」は、リガンド結合ドメイン、スペーサー、膜貫通ドメイン、および／またはリンパ球活性化ドメインそれぞれの参照配列中のアミノ酸残基と一致している候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。このアミノ酸配列同一性は、配列同一性（％）の最大値を算出するため、必要に応じて配列をアラインしてギャップを挿入した後に算出され、保存的置換を配列同一性としては考慮しない。アミノ酸配列同一性（％）を決定するためのアラインメントは、当技術分野の範囲にある種々の方法で行うことができ、たとえば、一般公開されているコンピュータソフトウェア、たとえばBLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2、またはMegalign（DNASTAR）ソフトウェアを用いて実施することができる。当業者であれば、アラインメントを測定するのに適切なパラメータを決定することができ、このようなパラメータとしては、比較される複数の配列の全長にわたってアラインメントを最大とするのに必要な任意のアルゴリズムが挙げられる。たとえば、WU-BLAST-2コンピュータープログラム［Altschul et al., Methods in Enzymology, 266:460-480 (1996)］を用いてアミノ酸配列同一性（％）を算出するには、いくつかの検索パラメータを用いるが、それらのほとんどはデフォルト値に設定されている。デフォルト値に設定されないパラメータ（すなわち調整可能なパラメータ）は、overlap span=1, overlap fraction=0.125, word threshold (T) =11およびscoring matrix=BLOSUM62と設定される。アミノ酸配列同一性（％）は、（ａ）ＷＵ－ＢＬＡＳＴ－２によって決定された、表２に示した参照キメラ受容体配列のポリペプチドアミノ酸配列すべてまたは各配列と、目的の比較アミノ酸配列との間で一致したアミノ酸残基の数を、（ｂ）目的のポリペプチドのアミノ酸残基の総数で割ることによって決定される。いくつかの実施形態において、アミノ酸の配列同一性（％）または核酸の配列同一性（％）は、コンピュータソフトウェアによって決定される。

【００５０】

本明細書に記載の「キメラ受容体のバリアントのポリヌクレオチド」または「キメラ受容体のバリアントの核酸配列」は、以下に定義されるように、表１に示したポリヌクレオチド酸配列またはそれに由来する特定のフラグメントと少なくとも８０％、８５％、９０％、または９５％の核酸配列同一性（またはこれらのパーセンテージのいずれか２つによって定義される範囲にある核酸配列同一性（％））を有する、ポリペプチドをコードする核酸分子を指す。表１に示したポリヌクレオチド配列またはその特定のフラグメントとしては、たとえば、抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチド、スペーサードメインをコードするポリヌクレオチド、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチド、および／またはリンパ球刺激ドメインをコードするポリヌクレオチドが挙げられる。

通常、ポリヌクレオチドのキメラ受容体バリアントまたはそのフラグメントは、表に示した核酸配列またはそれに由来するフラグメントと少なくとも８０％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも８１％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも８２％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも８３％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも８４％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも８５％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも８６％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも８７％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも８８％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも８９％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも９０％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも９１％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも９２％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも９３％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも９４％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも９５％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも９６％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも９７％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも９８％の核酸配列同一性、さらにより好ましくは少なくとも９９％の核酸配列同一性を有する。バリアントは、自体が由来するヌクレオ

チド配列を包含しない。これは、遺伝コードの縮重によるものであり、当業者であれば、表１のヌクレオチド配列と少なくとも８０％の核酸配列同一性を有する様々なキメラ受容体バリアントのポリヌクレオチドによって、表２のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を有するポリペプチドがコードされることを容易に認識するであろう。

【００５１】

「実質的に精製された」は、目的の分子以外の他の分子や他の細胞が全体の１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、または１％以下しか占めていないことを指す。また、「実質的に精製された細胞」は、天然の状態において通常関連する他の細胞種から分離された細胞を指す。場合によっては、実質的に精製された細胞の集団は、均質な細胞集団を指すこともある。

【００５２】

正常細胞上の腫瘍抗原または他の分子の存在に関して述べる際に使用される「実質的に存在しない」という用語は、腫瘍抗原または他の分子を有する正常細胞のパーセンテージおよび／または正常細胞上の腫瘍抗原の密度を指す。いくつかの実施形態において、「実質的に存在しない」は、腫瘍細胞または他の疾患細胞に存在する細胞の数または抗原の量と比較して、腫瘍抗原または他の分子が正常細胞の５０％未満に存在し、かつ／または正常細胞上の腫瘍抗原の密度が５０％未満であることを意味する。

【００５３】

本明細書に記載の「Ｔ細胞」または「Ｔリンパ球」は、どのような哺乳動物から得られたものであってもよく、霊長類から得られたものであることが好ましく、該哺乳動物としては、サル、イヌおよびヒトが挙げられる。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞はレシピエント対象と同種異系（同種であるが異なるドナーに由来するもの）である。いくつかの実施形態においては、Ｔ細胞は自己由来である（ドナーとレシピエントは同じである）。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞は同質遺伝子型である（ドナーとレシピエントは異なるが、一卵性双生児である）。

【００５４】

「ベクター」または「構築物」は、様々な制御要素を有する細胞中に異種核酸を導入するために使用される核酸であり、この導入によって該異種核酸が発現される。ベクターとしては、プラスミド、ミニサークル（minicircle）、酵母、およびウイルスゲノムが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態においては、ベクターは、プラスミド、ミニサークル、酵母、またはウイルスゲノムである。

【００５５】

本明細書に記載の「アポトーシス」は、多細胞生物において起こりうるプログラム細胞死（ＰＣＤ）のプロセスを指す。生化学的事象によって、特徴的な細胞変化（形態変化）および特徴的な細胞死が引き起こされる。このような変化としては、ブレブ形成、細胞収縮、核断片化、クロマチン凝集、および染色体のＤＮＡ断片化が挙げられる。アポトーシスにおいては、細胞はストレスに反応して細胞内アポトーシスシグナル伝達を開始し、これによって細胞の自殺が引き起こされる。グルココルチコイドの核受容体への結合、熱、放射線、栄養不足、ウイルス感染、低酸素状態、および、たとえば細胞膜の損傷などによる細胞内カルシウム濃度の増加はいずれも細胞に損傷を与え、細胞内アポトーシスシグナルの放出を誘起しうる。ポリ（ＡＤＰリボース）ポリメラーゼなどの細胞内成分のいくつかもアポトーシスの制御を補助しうる。

【００５６】

酵素によって細胞死が実際に起こるには、アポトーシスシグナルの誘導によって制御タンパク質がアポトーシス経路を開始する必要がある。アポトーシスシグナルは、このようなプロセスにより細胞死を引き起こすが、細胞死が必要でなくなった場合は、このプロセスは停止する。アポトーシスにはいくつかのタンパク質が関与しているが、主に２種の制御方法が同定されており、ミトコンドリアの機能を標的とする方法、またはアダプタータンパク質を介してアポトーシス機構にアポトーシスシグナルを直接的に伝達する方法によってアポトーシスを制御することができる。いくつかの毒素研究において、アポトーシス

を開始させるための別の外因性経路が同定されており、薬物の活性により細胞内カルシウム濃度を増大させることによって、カルシウム結合プロテアーゼであるカルパインを介してアポトーシスが起こる。

【００５７】

アポトーシスは、多くの因子によって制御されうる。これらの因子として、ＩＬ－２を発現可能な遺伝子、ＩＬ－１５を発現可能な遺伝子、ケモカイン受容体を発現可能な遺伝子、Ｂｃｌ２を発現可能な遺伝子、ＣＡ－Ａｋｔを発現可能な遺伝子、ｄｎ－ＴＧＦβＲIIIを発現可能な遺伝子、ｄｎ－ＳＨＰ１／２を発現可能な遺伝子、および／またはＰＤ－１　ＣＤ２８キメラを発現可能な遺伝子が挙げられるが、これらに限定されない。ＩＬ－１５は、Ｔ細胞およびナチュラルキラー細胞の活性化および増殖を制御する。齧歯類のリンパ球においては、ＩＬ－１５は、アポトーシスの阻害因子であるＢＣＬ２Ｌ１／ＢＣＬ－Ｘ（Ｌ）を誘導することによって、アポトーシスを抑制することが示された。同様に、セリアック病患者において、ＩＬ－１５はＢｃｌ－２および／またはＢＣＬ－ｘＬを誘導することによって、Ｔリンパ球のアポトーシスを抑制する。ヒトＢＣＬ２遺伝子によってコードされるＢｃｌ－２（Ｂ細胞リンパ腫２）は、制御タンパク質であるＢｃｌ－２ファミリーのメンバーとして最初に見出されたタンパク質であり、Ｂｃｌ－２ファミリーは、細胞死（アポトーシス）の誘導（プロアポトーシス）または抑制（抗アポトーシス）によって、細胞死（アポトーシス）を制御する。特に、Ｂｃｌ－２は重要な抗アポトーシスタンパク質として考えられており、がん遺伝子として分類されている。Ａｋｔとしても知られているプロテインキナーゼＢ（ＰＫＢ）は、グルコース代謝、アポトーシス、細胞増殖、転写、細胞遊走などの様々な細胞プロセスにおいて重要な役割を果たしているセリン／トレオニン特異的プロテインキナーゼである。

いくつかの実施形態においては、キメラ抗原受容体の発現誘導システムであって、ａ）第１の核酸およびｂ）第２の核酸を含み、前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつサイトカイン、ケモカイン受容体、アポトーシスを制御するポリペプチドまたはチェックポイントシグナル伝達を調節するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されていること、ならびに前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された構成的または誘導可能な第２のプロモーターを含むことを特徴とするシステムが提供される。いくつかの実施形態においては、アポトーシスの制御またはチェックポイントシグナル伝達の調節を担う前記ポリペプチドは、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、ケモカイン受容体、Ｂｃｌ２、ＣＡ－Ａｋｔ、ｄｎ－ＴＧＦβ　RIII、ｄｎ－ＳＨＰ１／２またはＰＤ－１-ＣＤ２８キメラを含む。

【００５８】

本明細書に記載の「チェックポイントシグナル伝達」は、特定の移行点で細胞周期を遮断して、細胞周期イベントが正確な順序で起こることを各周期で監視している。チェックポイントシグナル伝達は、活性化することもできる。たとえば、チェックポイントシグナル伝達はＤＮＡの損傷によって誘導され、その損傷が修復されるまで細胞周期は進行しない（ただし、チェックポイントシグナル伝達の機能はこれに限定されない）。「細胞周期チェックポイント」は、真核細胞において細胞を適切に分裂させる制御機構である。それぞれの細胞周期では細胞の状態が評価され、各チェックポイントにおいて細胞周期は停止されうるが、細胞の状態が良好である場合は細胞周期が次々に進行する。現在、３つのチェックポイントが知られており、制限チェックポイントまたは開始チェックポイントとしても知られているＧ１チェックポイント；Ｇ２／Ｍチェックポイント；およびスピンドルチェックポイントとしても知られている中期チェックポイントがある。ストレスを受けた後に細胞周期の移行を制限し、かつ／または細胞死を誘導する生化学的経路は、細胞周期チェックポイントとして知られている。これらのチェックポイントは、ＤＮＡの複製、修復、および分裂が正確性を維持する。チェックポイントシグナル伝達を制御することができるポリペプチドとしては、ｐ５３、ｐ１０７、ｐ１３０、および転写抑制因子Ｒｂが挙げられるが、これらに限定されない。

【００５９】
本明細書に記載の「負のチェックポイント制御因子」は、Ｔ細胞応答が効果的に腫瘍を攻撃する能力を制限することができる因子を指し、「負のチェックポイントシグナル伝達」とも呼ばれる。いくつかの実施形態においては、キメラ抗原受容体の発現誘導システムであって、ａ）第１の核酸およびｂ）第２の核酸を含み、前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつサイトカイン、ケモカイン受容体、アポトーシスを抑制または制御するポリペプチドまたはチェックポイントシグナル伝達を調節するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されていること、ならびに前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された構成的または誘導可能な第２のプロモーターを含むことを特徴とするシステムが提供される。いくつかの実施形態においては、チェックポイントシグナル伝達を調節する前記ポリペプチドは、負のチェックポイント制御因子を抑制する。いくつかの実施形態においては、前記負のチェックポイント制御因子は、ＶＩＳＴＡ、ＬＡＧ－３および／またはＴＩＭ３を含む。

【００６０】
別の例においては、シグナル伝達経路の上流において増殖抑制刺激を媒介する細胞周期阻害因子であるCip/Kipファミリーに属するサイクリン－ＣＤＫ阻害因子p21Cip1、p27Kip1およびp57Kip2が、細胞周期の制御以外の機能も備えた多機能タンパク質として見出された。Cip/Kipタンパク質は、細胞周期の制御に加えて、アポトーシス、転写調節、細胞の運命決定、細胞遊走、および細胞骨格動態において重要な役割を果たすことができる。複雑なリン酸化ネットワークがCip/Kipタンパク質の細胞内局在、タンパク質－タンパク相互作用および安定性を様々に変化させることによって、Cip/Kipタンパク質の機能が調節されている。このような機能は、胚発生から腫瘍抑制にまで及ぶプロセスにおいて、正常細胞の維持および組織のホメオスタシスの維持に不可欠である。
いくつかの実施形態においては、キメラ抗原受容体の発現誘導システムであって、
ａ）第１の核酸および
ｂ）第２の核酸を含み、
前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつサイトカイン、ケモカイン受容体、アポトーシスを制御するポリペプチドまたはチェックポイントシグナル伝達を調節するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されていること、ならびに
前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された構成的または誘導可能な第２のプロモーターを含むこと
を特徴とするシステムが提供される。
いくつかの実施形態においては、前記ポリペプチドはチェックポイントシグナル伝達を調節する。いくつかの実施形態においては、チェックポイントシグナル伝達を調節する前記ポリペプチドは、負のチェックポイント制御因子を抑制する。いくつかの実施形態においては、前記負のチェックポイント制御因子は、ＶＩＳＴＡ、ＬＡＧ－３および／またはＴＩＭ３を含む。

【００６１】
本明細書に記載の「Ｔ細胞前駆細胞」は、胸腺へと遊走して、Ｔ細胞前駆細胞となり得るリンパ球前駆細胞を指し、Ｔ細胞前駆細胞はＴ細胞受容体を発現しない。すべてのＴ細胞は、骨髄中の造血幹細胞に由来する。造血幹細胞由来の造血前駆細胞（リンパ球系前駆細胞）は胸腺に移行し、細胞分裂により増殖し、未熟な胸腺細胞の大集団を作り出す。最も初期の胸腺細胞はＣＤ４もＣＤ８も発現せず、したがって、ダブルネガティブ（ＣＤ４$^{-}$ＣＤ８$^{-}$）細胞に分類される。これらは成長により発達し、ダブルポジティブ胸腺細胞（ＣＤ４$^{+}$ＣＤ８$^{+}$）となり、最終的にシングルポジティブ（ＣＤ４$^{+}$ＣＤ８$^{-}$またはＣＤ４$^{-}$ＣＤ８$^{+}$）胸腺細胞に成熟して、その後、胸腺から末梢組織に放出される。

【００６２】
胸腺細胞の約９８％は、胸腺での発達過程においてポジティブ選択およびネガティブ選

択により選抜されずに死滅し、残りの２％が生存して胸腺を去り、成熟した免疫担当Ｔ細胞になる。

【００６３】

Ｔ細胞前駆細胞は、ダブルネガティブ（ＤＮ）段階においては主に機能的β鎖を産生し、ダブルポジティブ（ＤＰ）段階では主に機能的α鎖を産生し、その結果、最終的に機能性αβ Ｔ細胞受容体を産生する。４つのＤＮ段階（ＤＮ１、ＤＮ２、ＤＮ３およびＤＮ４）を経て胸腺細胞が発達するに従って、Ｔ細胞はインバリアントα鎖を発現するが、β鎖の遺伝子は再編成される。再編成されたβ鎖がインバリアントα鎖と対を為すことに成功した場合、β鎖の再編成を止めるシグナルが産生され（さらに、もう一方のアレルが抑制され）、細胞の増殖が起こる。これらのシグナルが産生されるには、この前駆ＴＣＲが細胞表面上に発現されていなければならないが、これらのシグナル自体は前駆ＴＣＲに結合するリガンドに依存する。このように発達した胸腺細胞はその後、ＣＤ４およびＣＤ８の両方を発現し、α鎖が選択されるダブルポジティブ（ＤＰ）段階を経る。再編成β鎖がシグナル伝達を全くもたらさない場合（たとえば、インバリアントα鎖との対合ができなかった結果）、この細胞は無視され（シグナル伝達を受けることなく）、死滅すると考えられている。

【００６４】

本明細書に記載の「造血幹細胞」または「ＨＳＣ」は、骨髄系細胞に分化しうる前駆細胞であり、該骨髄系細胞としては、たとえば、マクロファージ、単球、マクロファージ、好中球、好塩基球、好酸球、赤血球、巨核球／血小板、樹状細胞およびリンパ系細胞（たとえば、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫ細胞など）が挙げられる。ＨＳＣは３種の幹細胞が存在する異種細胞集団であり、これらの幹細胞は血液中のリンパ系子孫細胞と骨髄系子孫細胞との比（Ｌ／Ｍ）により識別される。

【００６５】

本開示は、導入遺伝子の発現のための誘導可能な因子、および導入遺伝子の発現のための構成的因子を有するシステムを提供する。このシステムは、形質導入された細胞に機能的特性を付与するための１つ以上の導入遺伝子の発現が制御されるように調整することができる。

【００６６】

いくつかの実施形態においては、誘導可能なプロモーターの制御下の導入遺伝子は、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）である。前記誘導可能なプロモーターは、細胞においてＣＡＲの発現を停止させること、および時間が経過してから（たとえば再発した場合などに）該細胞を再活性化することを可能とする能力を提供する。また、ＣＡＲ Ｔ細胞において発現のオンとオフとを周期的に切り替えることによって、Ｔ細胞受容体の持続的な刺激による疲弊および／またはアナジーを最小限に抑えることができる。

【００６７】

さらに、ベクターを設計することによって、形質導入細胞の１以上の機能持性を増強することができるさらなる導入遺伝子を導入することができ、これによって、形質導入細胞の抗腫瘍作用、生存および増殖などを増強することができる。いくつかの実施形態においては、この導入遺伝子は誘導可能なプロモーターによって制御される。このような導入遺伝子としては、生存および増殖を促進する遺伝子、アポトーシスを阻害する遺伝子、ならびにチェックポイントシグナル伝達を制御する遺伝子が挙げられるが、これらに限定されない。このような遺伝子は、ＩＬ－２をコードする遺伝子、ＩＬ－１５をコードする遺伝子、ケモカイン受容体をコードする遺伝子、Ｂｃｌ２をコードする遺伝子、ＣＡ－Ａｋｔをコードする遺伝子、ｄｎ－ＴＧＦβ ＲＩＩＩをコードする遺伝子、ｄｎ－ＳＨＰ１／２をコードする遺伝子、および／またはＰＤ－１-ＣＤ２８キメラをコードする遺伝子を含む。いくつかの実施形態においては、前記導入遺伝子は、ＩＬ－２をコードする遺伝子、ＩＬ－１５をコードする遺伝子、ケモカイン受容体をコードする遺伝子、Ｂｃｌ２をコードする遺伝子、ＣＡ－Ａｋｔをコードする遺伝子、ｄｎ－ＴＧＦβ ＲＩＩＩをコードする遺伝子、ｄｎ－ＳＨＰ１／２をコードする遺伝子、および／またはＰＤ－１-ＣＤ２８キメラ

をコードする遺伝子である。いくつかの実施形態においては、チェックポイントシグナル伝達を調節する前記遺伝子は、負のチェックポイント制御因子を抑制するポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態においては、前記負のチェックポイント制御因子は、ＶＩＳＴＡ、ＬＡＧ－３および／またはＴＩＭ３を含む。

【００６８】

本開示は、第１の核酸および第２の核酸を含むシステム、ならびにこれらの核酸を含むベクターおよび宿主細胞を提供する。第１の核酸および第２の核酸はそれぞれいくつかのモジュール部分を含み、これらのモジュール部分は切断して別のモジュール部分と置換することができ、このようにして特定の標的細胞に対して前記システムをカスタマイズすることができる。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は、必要に応じて遺伝子（たとえばキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド）の発現のオンとオフとを切り替えることによって制御するための誘導可能なプロモーターを含む。別の実施形態において、前記第２の核酸は、転写活性化因子を発現する構成的プロモーターを含む。いくつかの実施形態においては、前記遺伝子はキメラ抗原受容体をコードする。

【００６９】

誘導システム

本発明の開示は、細胞における導入遺伝子の発現制御に有用なシステムを提供する。このような導入遺伝子としては、Ｔ細胞受容体、親和性成熟を経たＴ細胞受容体、キメラ抗原受容体、ケモカイン受容体、サイトカイン、アポトーシスを抑制する遺伝子、および／またはチェックポイントシグナル伝達を調節する遺伝子が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態においては、チェックポイントシグナル伝達を調節する前記ポリペプチドは、負のチェックポイント制御因子を抑制する。いくつかの実施形態においては、前記負のチェックポイント制御因子は、ＶＩＳＴＡ、ＬＡＧ－３および／またはＴＩＭ３を含む。いくつかの実施形態において、前記システムは、前記核酸の構成要素を容易に置換できる様々なモジュール部分を含む。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記システムは、細胞における導入遺伝子の制御発現を提供する。いくつかの実施形態において、前記導入遺伝子は、Ｔ細胞受容体、親和性成熟を経たＴ細胞受容体、キメラ抗原受容体、ケモカイン受容体、サイトカイン、アポトーシスを制御する遺伝子、および／またはチェックポイントシグナル伝達を調節する遺伝子をコードする。いくつかの実施形態においては、チェックポイントシグナル伝達を調節する前記遺伝子は、負のチェックポイント制御因子を抑制するポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態においては、前記負のチェックポイント制御因子は、ＶＩＳＴＡ、ＬＡＧ－３および／またはＴＩＭ３を含む。

【００７０】

いくつかの実施形態においては、キメラ抗原受容体の発現誘導システムは、第１の核酸および第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつリガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されており、該リガンド結合ドメインがリガンドに特異的であり、該リガンドが、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子、または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能であり、前記第１の核酸が、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含むこと；ならびに

前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写調節因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とする。

いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、構成的プロモーターまたは誘導可能なプロモーターである。

【００７１】

いくつかの実施形態においては、キメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドは、

腫瘍持異抗原を標的分子とするリガンド結合ドメインをコードするポリヌクレオチド、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチド、および細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態においては、本明細書に記載されているように、発現ベクターは第１の核酸および／または第２の核酸を含む。前記キメラ受容体のこれらの核酸全体によってコードされるポリペプチド、およびこれらの核酸の一部によってコードされるポリペプチドも本発明に包含される。

【００７２】

別の実施形態においては、第１の核酸は薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、該第１核酸は、細胞の生存および増殖を促進する遺伝子、アポトーシスを制御する遺伝子、ならびに／またはチェックポイントシグナル伝達を調節する遺伝子をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されている。このような遺伝子は、ＩＬ－２をコードする遺伝子、ＩＬ－１５をコードする遺伝子、ケモカイン受容体をコードする遺伝子、Ｂｃｌ２をコードする遺伝子、ＣＡ－Ａｋｔをコードする遺伝子、ｄｎ－ＴＧＦβ RIIIをコードする遺伝子、ｄｎ－ＳＨＰ１／２をコードする遺伝子、および／またはＰＤ－１-ＣＤ２８キメラをコードする遺伝子を含む。いくつかの実施形態においては、チェックポイントシグナル伝達を調節する前記遺伝子は、負のチェックポイント制御因子を抑制するポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態においては、前記負のチェックポイント制御因子は、ＶＩＳＴＡ、ＬＡＧ－３および／またはＴＩＭ３を含む。

【００７３】

誘導可能なプロモーター

本発明のシステムは、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含む第１の核酸を含む。誘導可能なプロモーターを利用することによって、導入遺伝子の発現のオンとオフとを切り替えることができ、その結果、毒性による副作用を回避することができ、かつ／または寛解期には細胞を休止させることができる。誘導可能なプロモーターシステムはいくつか知られているが、このようなシステムは限定的にしか臨床適用できず、その理由として、毒性のオフターゲット効果、望ましくない生体内分布および薬物動態プロファイル、狭い作動域、ならびに／またはＦＤＡ認可の市販医薬品であることによる入手制限が挙げられる。さらに、このようなシステムの多くは、異種生物由来の成分から構築されたキメラ転写制御因子使用するため、このシステムをヒトの治療に使用すると、免疫性の合併症が引き起こされる。

【００７４】

いくつかの実施形態においては、第１のプロモーターを薬物によって誘導することができる。この薬物は、安全性が証明されていること、薬物動態プロファイルが好適であること、組織分布が良好であること、細胞外間隙と細胞質との間の分配係数が低いこと、免疫原性が低いこと、毒性が低いこと、および／またはリンパ球における発現性が高いことを目安に選択される。特定の一実施形態においては、ＦＤＡに認可されており、リンパ球において導入遺伝子を発現することができ、望ましくない他の遺伝子の発現を活性化させず、かつ、異種成分を含有しないプロモーターを誘導することができる薬物が選択される。いくつかの実施形態においては、前記誘導可能なプロモーターは、薬物と相互作用する転写活性化因子によって活性化される。薬物の存在下において、転写活性化因子が活性化されるか、あるいは転写活性化因子が誘導可能なプロモーターに結合しこれを活性化することができる。

【００７５】

別の特定の薬物としては、転写活性化因子である、エストロゲン受容体のリガンド結合ドメインに結合する薬物が挙げられる。いくつかの実施形態においては、前記薬物としては、タモキシフェン、ならびにその代謝産物、類似体、および薬学的に許容される塩および／または水和物または溶媒和物が挙げられる。

【００７６】

タモキシフェン（CAS RN:10540-29-1）は、２－（４－（（１Ｚ）－１，２－ジフェニ

ル－１－ブテニル）フェノキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－エタンアミン、または（Ｚ）－２－（パラ－（１，２－ジフェニル－１－ブテニル）フェノキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミン（ＩＵＰＡＣ）としても知られており、分子式は$C_{26}H_{29}NO$で示され、分子量（M.W.）は３７１．５２である。タモキシフェンは、組織特異的活性を有する選択的エストロゲン受容体モジュレーターである。タモキシフェンは、乳房組織において抗エストロゲン剤（阻害剤）として作用するが、子宮内膜においては、コレステロールの代謝、骨密度、および細胞増殖をうながすエストロゲン（刺激剤）として作用する。タモキシフェンは、薬学的に許容される塩として経口投与されることが多い。たとえば、タモキシフェンクエン酸塩（RN 54965-24-1, M.W.563.643）は、転移性乳がんの治療への適応が記載されており、乳房切除、腋窩切除および乳房への放射線照射を行った女性乳がんの治療においてアジュバントとして使用される。また、タモキシフェンクエン酸塩は、乳がんを発症する危険性の高い女性における乳がん罹患率の低減への適応も記載されている。

【００７７】

ラット、マウス、およびヒトの乳がん患者におけるタモキシフェンの代謝産物は、Robinson et al., Metabolites, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of tamoxifen in rats and mice compared to the breast cancer patient. Drug Metab Dispos January 1991 19:36-43（その全体が参照によって本明細書に組み込まれる）に開示されており、主なものとして、Ｎ－デスメチルタモキシフェン（RN 31750-48-8, M.W.357.494）および４－ヒドロキシタモキシフェン（4-OHT）（RN 68392-35-8, M.W.387.52、アフィモキシフェン）が挙げられる。チトクロムＰ－４５０による別の代謝産物は、Crewe et al., 2002に開示されており、シス－４－ヒドロキシタモキシフェン（RN 174592, M.W.387.52；アフィモキシフェン、Ｅ異性体）、および４’－ヒドロキシタモキシフェン（（Ｚ）－４－（１－（４－（２－（ジメチルアミノ）エトキシ）フェニル）－１－フェニルブタ－１－エン－２－イル）フェノール）が挙げられる。Crewe et al., 2002, Metabolism of Tamoxifen by recombinant human cytochrome P-450 enzymes: Formation of the 4-hydroxy, 4’-hydroxy and N-desmethyl metabolites and isomerization of trans-4-hydroxytamoxifen, Drug Metab Dispos, 30(8): 869-874のFIG. 1（参照によって本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【００７８】

タモキシフェンとの類似の構造を有する化合物としては、シス－タモキシフェン（RN 13002-65-8, M.W. 371.521）、４－メチルタモキシフェン（RN 73717-95-5, M.W. 385.548）、Ｎ－デスメチルタモキシフェン（RN 31750-48-8, M.W. 357.494）、（Ｚ）－デスエチルメチルタモキシフェン（RN 15917-50-7, M.W. 357.494）、（Ｅ）－デスエチルメチルタモキシフェン（RN 31750-45-5, M.W. 357.494）、トランス－４－ヒドロキシタモキシフェン（RN 68047-06-3, M.W. 387.52）、アフィモキシフェン（RN 68392-35-8, M.W. 387.52、４－ヒドロキシタモキシフェン）、アフィモキシフェン、Ｅ異性体（RN 174592-47-3, M.W. 387.52）、４－クロロタモキシフェン（RN 77588-46-6, M.W. 405.966）、４－フルオロタモキシフェン（RN 73617-96-6, M.W. 389.511）、トレミフェン（RN 89778-26-7, M.W. 405.966）、デスエチルタモキシフェン（RN 19957-51-8, M.W. 343.47）、（Ｅ）－デスエチルタモキシフェン（RN 97151-10-5, M.W. 343.47）、（Ｚ）－デスエチルタモキシフェン（RN 97151-11-6, M.W. 343.47）、ミプロキシフェン（RN 129612-87-9, M.W. 429.6）、２－（ｐ－（β－エチル－α－フェニルスチリル）フェノキシ）トリエチルアミン（RN 749-86-0, M.W. 399.575）、ドロロキシフェン（RN 82413-20-5, M.W. 387.52）、４－ヨード－タモキシフェン（RN 116057-68-2, M.W. 497.413）、ジヒドロタモキシフェン（RN 109640-20-2, M.W. 373.537）、（Ｅ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－２－（４－（１－（２－メチルフェニル）－２－フェニル－１－ブテニル）フェノキシ）エタンアミン（RN 97150-96-4, M.W. 385.548）、および４－ヒドロキシトレミフェン（RN 110503-62-3, M.W. 421.965）；ならびに／またはそれらの薬学的に許容される塩および／もしくは水和物もしくは溶媒和物が挙げられるが、これらに限定されない。

【００７９】

たとえば、タモキシフェンのクエン酸塩、またはタモキシフェンと類似の構造を有する化合物のクエン酸塩としては、タモキシフェンクエン酸塩（RN 54965-24-1，M.W．563.64）、２－（ｐ－（１，２－ジフェニル－１－ブテニル）フェノキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルエチルアミンクエン酸塩（RN 7244-97-5，563.64）、（Ｅ）－タモキシフェンクエン酸塩（RN 76487-65-5，M.W．563.64）、トレミフェンクエン酸塩（RN 89778-27-8，M.W．598.088）、ドロロキシフェンクエン酸塩（RN 97752-20-0，M.W．579.64）、２－（ｐ－（１，２－ビス（ｐ－メトキシフェニル）－１－ブテニル）フェノキシ）トリエチルアミンクエン酸塩（RN 42920-39-8，M.W．651.748）、２－（４－（１，２－ジフェニルエテニル）フェノキシ）－Ｎ，Ｎ－ジエチル－エタンアミン２－ヒドロキシ－１，２，３－プロパントリカルボン酸塩（RN 40297-42-5，M.W．563.643）、２－（ｐ－（α－フェニルスチリル）フェノキシ）トリエチルアミンクエン酸塩（RN 102433-95-4，M.W．563.64）、２－（ｐ－（２－（ｐ－メトキシフェニル）－１－フェニル－１－ブテニル）フェノキシ）トリエチルアミンクエン酸塩（１：１）（RN 42824-34-0，M.W．637.72）、２－（ｐ－（１－（ｐ－メトキシフェニル）－２－フェニルプロペニル）フェノキシ）トリエチルアミンクエン酸塩（RN 13554-24-0，M.W．607.696）、２－（ｐ－（α－（ｐ－メトキシフェニル）スチリル）フェノキシ）トリエチルアミンクエン酸一水和物（RN 13542-71-7，M.W．593.669）、２－（ｐ－（ｐ－メトキシ－α－フェニルフェネチル）フェノキシ）トリエチルアミンクエン酸塩（RN 16421-72-0，M.W．595.685）、α－（ｐ－（２－（ジエチルアミノ）エトキシ）フェニル）－β－エチル－ｐ－メトキシ－α－フェニルフェネチルアルコールクエン酸塩（１：１）（RN 35263-93-5，M.W．639.737）、１－（ｐ－（２－（ジエチルアミノ）エトキシ）フェニル）－２－（ｐ－メトキシフェニル）－１－フェニルエタノールクエン酸塩（M.W．611.68）、α－ｐ－（２－（ジエチルアミノ）エトキシ）フェニル）－β－エチル－α－（ｐ－ヒドロキシフェニル）－ｐ－メトキシフェネチルアルコールクエン酸塩（RN 35263-96-8，M.W．655.737）、および／または２－（ｐ－（ｐ－メトキシ－α－メチルフェネチル）フェノキシ）－トリエチルアミンクエン酸塩（RN 15624-34-7，M.W．533.614）が挙げられるが、これらに限定されない。

【００８０】

いくつかの実施形態において、発現を誘導するのに有効な前記薬物の量は、発現が誘導されていない導入遺伝子の発現量および／または基底レベルの導入遺伝子の発現量を上回る量の導入遺伝子の発現を達成可能な量である。いくつかの実施形態において、発現を誘導するのに有効な薬物の量は、前記薬物の公知の投与量および薬物動態プロファイルを用いることによって容易に決定することができる。

【００８１】

いくつかの実施形態において、前記誘導可能なプロモーターは、基底レベルでの活性が低い。レンチウイルスベクターを用いる場合、非誘導細胞における基底レベルでの活性は、細胞において前記遺伝子の発現が誘導された場合の活性レベルの２０％、１５％、１０％、５％、４％、３％、２％、１％またはこれ以下である。基底レベルでの活性は、フローサイトメトリーを用いて、誘導因子（たとえば薬物）の非存在下において前記導入遺伝子（たとえばマーカー遺伝子）の発現量を測定することによって決定することができる。

【００８２】

いくつかの実施形態においては、前記誘導可能なプロモーターは、発現が誘導されていない場合の活性または基底レベルでの活性よりも高レベルの誘導活性を達成することができる。いくつかの実施形態においては、発現が誘導された場合の活性レベルは、発現が誘導されていない場合の活性レベルの２倍、４倍、６倍、８倍、１０倍またはそれ以上である。いくつかの実施形態においては、前記誘導可能なプロモーターの制御下で発現された導入遺伝子は、転写活性化因子の非存在下において、１０日未満、８日未満、６日未満、４日未満、２日未満または１日未満にオフの状態となるが、０日未満ではオフの状態とはならない。

【００８３】

いくつかの実施形態においては、基底レベルでの活性が低くなり、高レベルの発現が誘

導でき、かつ／または短期間でオンとオフとを切り替えることができるように、誘導可能なプロモーターを設計かつ／または改変してもよい。いくつかの実施形態においては、前記誘導可能なプロモーターは、7xHBD/mE1bプロモーターである。典型的なプロモーターの配列を表１２（配列番号４１）に示す。たとえば、7xHBD/mE1bプロモーターにおいて、転写活性化因子の結合を増強する変異を作製してもよい。

【００８４】

いくつかの実施形態においては、前記システムは合成転写活性化因子を使用し、該合成転写活性化因子は、前記薬物（たとえばタモキシフェン）の存在下において、導入遺伝子の上流の合成プロモーターに結合し、発現を誘導する。いくつかの実施形態においては、前記転写活性化因子はＴａｍＲ－ｔｆ（ＨＥＡ３）である。タモキシフェンで制御されるこの転写因子（「TamR-tf」あるいは「HEA3」とも称される）は、ヒト由来サブユニットを含むキメラ転写因子であり、肝細胞核因子１－α（ＨＮＦ－１α）のＮ末端に存在するＤＮＡ結合ドメイン（たとえば配列番号４０の１～２８１番目のアミノ酸）が、エストロゲン受容体のリガンド結合ドメイン（ＥＲ－ＬＢＤ）のタモキシフェン特異的変異リガンド結合ドメインにインフレームで融合されており、このタモキシフェン特異的変異リガンド結合ドメインがさらにＮＦ－κＢのｐ６５活性化ドメイン（ｐ６５）に融合されている。典型的なアミノ酸配列は表１０に記載されており、配列番号４０で示されている。エストロゲン受容体のリガンド結合ドメイン（ＥＲ－ＬＢＤ）の前記タモキシフェン特異的変異リガンド結合ドメインは、TamR-tfの２８２～５９５番目のアミノ酸配列であり、５２１番目のアミノ酸に変異を有する。ＮＦ－κＢのｐ６５活性化ドメイン（ｐ６５またはＴＡＤ）は、５９６～８６２番目のアミノ酸からなる配列である。

【００８５】

いくつかの実施形態においては、キメラ抗原受容体の発現誘導システムであって、

ａ）第１の核酸および

ｂ）第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつリガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されており、該リガンド結合ドメインがリガンドに特異的であり、該リガンドが、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子、または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能であり、前記第１の核酸が、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含むこと；ならびに

前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とするシステムが提供される。

いくつかの実施形態においては、前記薬物は、タモキシフェンおよび／またはその代謝産物である。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、構成的プロモーターまたは誘導可能なプロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは配列番号４１の核酸配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは構成的プロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、前記ＥＦ１αｐである。いくつかの実施形態においては、前記転写活性化因子は、配列番号４０の配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は第１のベクターをさらに含み、前記第２の核酸は第２のベクターをさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第１のベクターおよび第２のベクターは、単一のウイルスベクターにパッケージされている。いくつかの実施形態においては、前記ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸および第２の核酸はベクターを含む。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は、選択マーカーをコードする核酸配列をさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、選択マーカーをコードする核酸をさらに含む。

いくつかの実施形態においては、キメラ抗原受容体の発現誘導システムであって、
ａ）第１の核酸および
ｂ）第２の核酸を含み、
前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、該第１のプロモーターが、サイトカイン、ケモカイン受容体、アポトーシスを制御するポリペプチドまたはチェックポイントシグナル伝達を調節するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されていること、ならびに
前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とするシステムが提供される。
いくつかの実施形態においては、チェックポイントシグナル伝達を調節する前記ポリペプチドは、負のチェックポイント制御因子を抑制する。いくつかの実施形態においては、前記負のチェックポイント制御因子は、ＶＩＳＴＡ、ＬＡＧ－３および／またはＴＩＭ３を含む。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、構成的プロモーターまたは誘導可能なプロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、リガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記リガンド結合ドメインはリガンドに特異的であり、該リガンドは腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能である。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記第２のプロモーターとは逆向きである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは抗体フラグメントであり、好ましくはその結合フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは一本鎖可変フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記腫瘍に特異的な分子は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、ＣＥ７、ＥＧＦＲ、ｈＢ７Ｈ３、メソテリン（mesothelin）、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ Ａ３ ＴＣＲ、またはこれらの組み合わせである。いくつかの実施形態においては、前記システムは合成転写活性化因子を使用し、該合成転写活性化因子は、薬物の存在下において、導入遺伝子の上流の合成プロモーターに結合し、発現を誘導する。いくつかの実施形態においては、前記転写活性化因子はＴａｍＲ－ｔｆ（ＨＥＡ３）である。いくつかの実施形態においては、前記薬物はタモキシフェンである。

【００８６】

転写因子の特性を向上させるために、前記転写活性化因子にさらに変更を加えてもよく、たとえば、前記エストロゲン受容体のリガンド結合ドメイン内の１つ以上のアミノ酸に変更を加えてもよく、かつ／または前記ｐ６５転写活性化ドメイン内の１つ以上のアミノ酸に変更を加えてもよいが、前記転写活性化因子への変更はこれらに限定されない。前記エストロゲン受容体の結合ドメインのアミノ酸に変更を加えることによって、前記薬物の転写活性化因子への結合の特異性をさらに高めることができる。前記エストロゲン受容体の結合ドメイン（ＥＲ－ＬＢＤ）のアミノ酸配列に変更を加えた転写活性化因子の一例を表１１に示す（配列番号４３）。変異は、配列番号４０の４００番目のアミノ酸、５４３番目のアミノ酸および５４４番目のアミノ酸に導入される。前記配列に変更を加えた転写活性化因子は、タモキシフェンまたは４－ＯＨＴに対する親和性が増大している。前記ｐ６５転写活性化ドメイン内のアミノ酸に変更を加えると、形質導入された細胞の活性化の非存在下において、導入遺伝子の発現を増大させることができる。

【００８７】

タモキシフェンの非存在下では、細胞質内の熱ショックタンパク質９０（ＨＳＰ９０）がタモキシフェン結合活性部位に結合することによって、TamR-tfが核内から排除されるため、導入遺伝子の発現は「オフ」の状態となる。細胞質内にナノモル濃度のタモキシフェンが存在すると、ＥＲ－ＬＢＤへの結合に対してＨＳＰ９０と活発に競合することによ

ってこれを阻害し、TamR-tfの核内への転座が生じる。核内への転座が起こると、TamR-tfは、自体の特異的結合部位である合成プロモーターと結合することが容易となる。タモキシフェンの存在下では、TamR-tfが7xHBD/EF1αpプロモーターに結合することによって導入遺伝子の発現が「オン」の状態へと誘導される。いくつかの実施形態においては、この転写制御因子は、導入遺伝子の発現の制御を様々なレベルで行えるように改変されていてもよい。TamR-tf（HEA-3）のリガンド結合ドメイン内のアミノ酸を置換することによって、タモキシフェンおよびその代謝産物に対する選択的応答が可能となる。４－ヒドロキシタモキシフェン（4-OHT）は、TamR-tf（HEA-3）活性に関して薬理学的活性が最も高い代謝物であり、内在性エストロゲンと相互作用を起こさない。

【００８８】

いくつかの実施形態においては、前記誘導可能なプロモーターは、レンチウイルス構築物および／またはリンパ球において機能する。

【００８９】

キメラ抗原受容体

キメラ抗原受容体の発現誘導システムは、第１の核酸を含み、前記第１の核酸は、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつリガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されており、該リガンド結合ドメインはリガンドに特異的であり、該リガンドは、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子、または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能であり、前記第１の核酸は、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含む。別の実施形態においては、キメラ抗原受容体をコードする別のポリヌクレオチドは、構成的プロモーターの制御下にある。いくつかの実施形態においては、前記薬物はタモキシフェンである。

【００９０】

リガンド結合ドメイン

いくつかの実施形態において、前記キメラ受容体の核酸配列は、リガンド結合ドメインをコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、前記リガンド結合ドメインは、腫瘍抗原または特定のウイルス抗原に特異的に結合し、前記リガンド結合ドメインはヒト化されていてもよい。いくつかの実施形態において、前記リガンド結合ドメインとしては、受容体またはその一部、小さいペプチド、ペプチドミメティック、基質、およびサイトカイン等が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、前記リガンド結合ドメインは、抗体またはそのフラグメントであり、その結合フラグメントであることが好ましく、これらはいずれもヒト化されていてもよい。抗体または抗体フラグメントをコードする核酸配列は容易に決定することができる。特定の実施形態においては、前記ポリヌクレオチドは、ＣＤ１９と特異的に結合する一本鎖Ｆｖをコードする。別の特定の実施形態において、前記ポリヌクレオチドは、ＨＥＲ２、ＣＥ７、ｈＢ７Ｈ３、またはＥＧＦＲと特異的に結合する一本鎖Ｆｖをコードし、前記ポリヌクレオチドはそのヒト化された該一本鎖Ｆｖをコードしてもよい。これらの抗体およびその結合ドメインの配列は、当業者に知られており、当業者によって容易に決定される。

【００９１】

腫瘍抗原は、免疫応答を誘発する腫瘍細胞によって産生されるタンパク質である。本発明のリガンド結合ドメインは、治療されるがんの種類に応じて選択され、腫瘍抗原またはその他の腫瘍細胞表面分子を標的とすることができる。対象由来の腫瘍サンプルは、特定のバイオマーカーまたは細胞表面マーカーの存在について特性を評価することができる。たとえば、対象由来の乳がん細胞は、Ｈｅｒ２Ｎｅｕ、エストロゲン受容体、および／またはプロゲステロン受容体のそれぞれについて陽性であっても陰性であってもよい。個々の対象の腫瘍細胞上に存在する腫瘍抗原または細胞表面分子が選択される。腫瘍抗原および細胞表面分子は、当技術分野において周知であり、たとえば、癌胎児性抗原（ＣＥＡ）

、前立腺特異抗原、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２／ｎｅｕ、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、エフリンＢ２、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＣＥ７、ｈＢ７Ｈ３、ＲＯＲ１、メソテリン、ｃ－Ｍｅｔ、ＧＤ－２、および／またはＭＡＧＥ Ａ３ ＴＣＲが挙げられる。いくつかの実施形態において、標的分子は、腫瘍細胞上に存在する細胞表面分子であり、正常組織上に実質的に存在しないか、またはその発現が重要視されない正常組織に制限されている。

【００９２】

一実施形態において、腫瘍上の標的分子は、悪性腫瘍と関連する１つ以上のエピトープを含む。悪性腫瘍は、Ｔ細胞受容体またはキメラ受容体により媒介される認識のための標的抗原として機能しうるタンパク質を多数発現している。その他の標的分子としては、細胞の形質転換に関連する分子の一群に属するものが挙げられ、たとえばがん遺伝子HER-2/Neu/ErbB2が挙げられる。いくつかの実施形態において、腫瘍抗原は、同じ組織型の対照細胞と比較して、腫瘍細胞上に選択的に発現されるか、あるいは過剰発現される。別の実施形態において、腫瘍抗原は細胞表面ポリペプチドである。

【００９３】

キメラ受容体の標的となりうる腫瘍細胞表面分子を同定した後、この標的分子のエピトープを選択し、その特性を評価する。腫瘍細胞表面分子と特異的に結合する抗体は、モノクローナル抗体を得る方法、ファージディスプレイ法、ヒト抗体もしくはヒト化抗体を製造する方法、またはヒト抗体を得るために遺伝子改変されたトランスジェニック動物もしくはトランスジェニック植物を用いる方法を用いて製造することができる。部分的に合成した抗体または全合成抗体のファージディスプレイライブラリが入手可能であり、このライブラリから、標的分子に結合することができる抗体またはそのフラグメントをスクリーニングすることができる。ヒト抗体のファージディスプレイライブラリも入手可能である。いくつかの実施形態において、抗体は、腫瘍細胞表面分子に特異的に結合し、ウシ血清アルブミンやその他の無関係な抗原などの非特異的成分とは交差反応しない。前記抗体をコードするアミノ酸配列またはポリヌクレオチド配列を同定した後、これらの配列を単離し、かつ／または配列決定することができる。

【００９４】

抗体または抗原結合フラグメントとしては抗体の全体またはその一部が挙げられ、該抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、合成抗体、キメラ抗体、二重特異性抗体、ミニボディ、および線状抗体が挙げられる。「抗体フラグメント」は、完全な抗体の一部を含み、好ましくは完全な抗体の抗原結合領域または可変領域であり、これらは容易に調製することができる。抗体フラグメントとしては、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、およびＦｖフラグメント；二機能性抗体；線状抗体；単鎖抗体分子；および抗体フラグメントから形成された多重特異性抗体が挙げられる。いくつかの実施形態において、抗体フラグメントは、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、もしくはＦｖフラグメント；二機能性抗体；線状抗体；単鎖抗体分子；または抗体フラグメントから形成された多重特異性抗体である。これらの抗体または抗体フラグメントはいずれもヒト化することができ、本明細書に記載の組成物および方法とともに用いることができる。

【００９５】

いくつかの実施形態においては、特定の単一の腫瘍細胞表面分子に結合する様々な抗体を多数単離されることがあり、これらの特性を評価することができる。いくつかの実施形態においては、前記抗体は、標的分子のエピトープに対する特異性に基づいて特徴が表される。また、場合によっては、エピトープに対する抗体の親和性に基づいて、同じエピトープに結合する抗体が選択されうる。いくつかの実施形態において、前記抗体は少なくとも１ｍＭの親和性を有し、５０ｎＭ未満の親和性を有することが好ましい。いくつかの実施形態において、前記抗体が有する親和性は、５０ｎＭ、１００ｎＭ、２００ｎＭ、３００ｎＭ、４００ｎＭ、５００ｎＭ、１μＭ、１００μＭ、２００μＭ、３００μＭ、４００μＭ、５００μＭ、６００μＭ、７００μＭ、８００μＭ、９００μＭ、もしくは１ｍ

Ｍであるか、またはこれらの値のいずれか２つによって定義される範囲にある親和性を有する。いくつかの実施形態においては、別の抗体よりもエピトープに対する親和性が高い抗体が選択される。たとえば、同じエピトープに結合する対照の抗体と比較して、親和性が少なくとも２倍、少なくとも５倍、少なくとも１０倍、少なくとも２０倍、少なくとも３０倍、少なくとも４０倍、もしくは少なくとも５０倍である抗体、または対照の抗体と比較して、親和性がこれらの値のいずれか２つによって定義される範囲にある抗体が選択される。

【００９６】

いくつかの実施形態においては、標的分子は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＥ７、ｈＢ７Ｈ３、ＥＧＦＲ、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、メソテリン（mesothelin）、Ｈｅｒ２、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ Ａ３ ＴＣＲ、またはこれらの組み合わせである。いくつかの実施形態においては、これらの標的分子に特異的な前記抗体またはその結合フラグメントは、ヒト化されている。

【００９７】

特定の実施形態において、前記標的抗原はＣＤ１９である。ＣＤ１９に特異的な抗体は当業者に多数知られており、その配列、エピトープに対する結合性および親和性について容易に特性を評価することができる。特定の一実施形態において、前記キメラ受容体構築物は、ＦＭＣ６３抗体由来のｓｃＦＶ配列を含む。別の実施形態において、前記ｓｃＦＶはヒトｓｃＦｖまたはヒト化ｓｃＦｖであり、これらのｓｃＦｖは、RASQDISKYLNで表されるＣＤＲＬ１配列（配列番号８８）、SRLHSGVで表されるＣＤＲＬ２配列（配列番号８９）、およびGNTLPYTFGで表されるＣＤＲＬ３配列（配列番号９０）を含む軽鎖可変領域を含む。別の実施形態において、前記ｓｃＦＶはヒトｓｃＦｖまたはヒト化ｓｃＦｖであり、これらのｓｃＦｖは、DYGVSで表されるＣＤＲＨ１配列（配列番号９１）、VIWGSETTYYNSALKSで表されるＣＤＲＨ２配列（配列番号９２）、およびYAMDYWGで表されるＣＤＲＨ３配列（配列番号９３）を含む重鎖可変領域を含む。本開示はまた、ＦＭＣ６３由来のｓｃＦｖの可変領域と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％のアミノ酸配列同一性を有し、かつＣＤ１９に対する親和性がＦＭＣ６３由来のｓｃＦｖの可変領域と少なくとも同等である可変領域も包含する。

【００９８】

いくつかの実施形態において、ＣＤＲ領域は、Kabatのナンバリングに基づいて抗体領域内に見出され、軽鎖は、２４～３４番目のアミノ酸からなるＣＤＲＬ１；５０～５６番目のアミノ酸からなるＣＤＲＬ２；および８９～９７番目のアミノ酸からなるＣＤＲＬ３を含み、重鎖は、３１～３５番目のアミノ酸からなるＣＤＲＨ１；５０～６５番目のアミノ酸からなるＣＤＲＨ２；９５～１０２番目のアミノ酸からなるＣＤＲＨ３を含む。抗体中のＣＤＲ領域は容易に決定することができる。

【００９９】

特定の実施形態において、前記標的抗原はＨｅｒ２である。Ｈｅｒ２に特異的な抗体は当業者に多数知られており、その配列、エピトープに対する結合性および親和性について容易に特性を評価することができる。特定の一実施形態において、前記キメラ受容体構築物は、抗体であるハーセプチン由来のｓｃＦＶ配列を含む。別の実施形態において、前記ｓｃＦＶは、抗体であるハーセプチンのＣＤＲＬ１配列、ＣＤＲＬ２配列、およびＣＤＲＬ３配列を含む軽鎖可変領域を含むヒトｓｃＦｖまたはヒト化ｓｃＦｖである。別の実施形態において、前記ｓｃＦＶは、ハーセプチンのＣＤＲＨ１配列、ＣＤＲＨ２配列、およびＣＤＲＨ３配列を含む重鎖可変領域を含むヒトｓｃＦｖまたはヒト化ｓｃＦｖである。これらのＣＤＲ配列は、ハーセプチンのアミノ酸配列から容易に決定することができる。本開示はまた、ハーセプチン由来のｓｃＦｖの可変領域と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％のアミノ酸配列同一性を有し、かつＨｅｒ２に対する親和性がハーセプチン由来のｓｃＦｖの可変領域と少なくとも同等である可変領域も包含する。

【０１００】
本明細書に記載の「ヒト化抗体」は、非ヒト種由来の抗体であって、ヒトにおいて天然に産生されるその抗体のバリアントとの類似性が高まるようにタンパク質配列が改変された抗体を指す。ヒトに投与する目的で開発されたモノクローナル抗体（たとえば、抗がん薬として開発された抗体）を「ヒト化」してもよい。非ヒト免疫系（たとえばマウスの免疫系）を利用して特定の抗体を開発する方法では、抗体のヒト化を行うことが望ましい場合がある。このような方法で製造された抗体のタンパク質配列は、ヒトにおいて天然に産生される同種抗体のタンパク質配列とは部分的に異なるため、ヒト患者に投与した場合に免疫原性を発揮しうる。ヒト化抗体は、ヒト抗体に対するタンパク質配列の類似性がキメラ抗体よりも高められており、かつキメラ抗体が含むことのできる非ヒトタンパク質よりも長い非ヒトタンパク質を含むことができるという点でキメラ抗体とは異なる。ヒト化抗体の誘導体は、ヒト化抗体に由来する抗体または配列のセグメントであってもよい。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは、ヒト化抗体またはその一部を含む。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは、ｓｃＦｖを含む。いくつかの実施形態においては、前記ｓｃＦｖは、ヒト化ｓｃＦｖである。
【０１０１】
いくつかの実施形態において、異種生物由来のモノクローナル抗体、たとえば齧歯類に由来するモノクローナル抗体の免疫原性を低減するために、抗体をヒト化することが望ましい場合がある。いくつかの実施形態においては、抗体またはそのフラグメントとヒト免疫系との相互作用を増強するために、抗体をヒト化することが望ましい場合がある。ハイブリドーマ技術の発達に伴って開発された異種抗体の多くはヒトに対して免疫原性が高いため、臨床適用が制限される場合があり、これは特に、繰り返し投与を行う必要がある場合に顕著である。さらに、このような異種抗体は体内循環から速やかに排除される可能性があり、全身性の炎症作用を引き起こす恐れもある。したがって、いくつかの実施形態においては、これらの状況を回避するためにヒト化を行うことが望ましい。抗体をヒト化する技術は当業者に知られている。
【０１０２】
いくつかの実施形態においては、リガンド結合ドメインをコードするポリヌクレオチドは、スペーサー領域をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態においては、リガンド結合ドメインをコードする前記ポリヌクレオチドは、該コード配列の５’末端および／または３’末端に１つ以上の制限酵素部位をさらに有していてもよく、これによって、リガンド結合ドメインをコードする前記ポリヌクレオチドを切断することが容易となり、該ポリヌクレオチドとは別の抗原をコードするか、あるいは別の結合特性を有するリガンド結合ドメインをコードする別のポリヌクレオチドと置換することが容易となる。たとえば、制限部位NheIを前記リーダー配列の上流にコードし、かつヒンジ領域内の３’末端にRsrIIを配置することよって、キメラ受容体ベクターに所望のｓｃＦｖをサブクローニングすることが可能となる。いくつかの実施形態において、前記ポリヌクレオチドは、哺乳類細胞における発現を目的としてコドン最適化されている。
【０１０３】
いくつかの実施形態において、リガンド結合ドメインをコードする前記ポリヌクレオチドは、シグナルペプチドに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態において、該シグナルペプチドは、顆粒球コロニー刺激因子のシグナルペプチドである。ＣＤ８αなどの他のシグナルペプチドをコードするポリヌクレオチドを利用することもできる。いくつかの実施形態において、前記ポリヌクレオチドはＣＤ８αをコードする。
【０１０４】
いくつかの実施形態において、リガンド結合ドメインをコードする前記ポリヌクレオチドは、プロモーターに作動可能に連結されている。哺乳類細胞において前記キメラ抗原受容体の発現を可能とするプロモーターが選択される。特定の一実施形態においては、前記プロモーターは、誘導可能なプロモーターである。

【０１０５】
リガンド結合ドメインをコードするポリヌクレオチドの特定の態様を表１に示すが、これは、ＣＤ１９（たとえばＦＭＣ６３）に特異的に結合する抗体由来のｓｃＦｖである。アミノ酸配列GSTSGSGKPGSGEGSTKG（配列番号９４）を含むフレキシブルリンカーをコードするポリヌクレオチドを介して、ｓｃＦｖ中のＶＨ鎖とＶＬ鎖とが隔てられている。前記リンカーを含む前記ｓｃＦｖのアミノ酸配列を表２（配列番号１１）に示す。ＳＪ２５Ｃ１およびＨＤ３７などの他のＣＤ１９標的抗体も知られている（SJ25C1: Bejcek et al. Cancer Res 2005, PMID 7538901; HD37: Pezutto et al. JI 1987, PMID 2437199）。

【０１０６】
スペーサー

いくつかの実施形態において、前記キメラ受容体の核酸配列は、スペーサー領域をコードするポリヌクレオチドを含む。スペーサー領域は、典型的には、キメラ受容体のリガンド結合ドメインと膜貫通ドメインとの間に位置する。いくつかの実施形態において、スペーサー領域は、前記リガンド結合ドメインに柔軟性を持たせ、かつリンパ球において高レベル発現を可能とする。２２９アミノ酸長のスペーサードメインを有するＣＤ１９特異的キメラ受容体の抗腫瘍活性は、改変ＩｇＧ４ヒンジのみからなる短いスペーサー領域を有するＣＤ１９特異的キメラ受容体の抗腫瘍活性よりも低かった。いくつかの実施形態においては、前記スペーサーは、前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されるように最適化されている。

【０１０７】
いくつかの実施形態において、スペーサー領域は、少なくとも１０～２２９アミノ酸長、１０～２００アミノ酸長、１０～１７５アミノ酸長、１０～１５０アミノ酸長、１０～１２５アミノ酸長、１０～１００アミノ酸長、１０～７５アミノ酸長、１０～５０アミノ酸長、１０～４０アミノ酸長、１０～３０アミノ酸長、１０～２０アミノ酸長、もしくは１０～１５アミノ酸長であるか、またはこれらの長さのいずれか２つによって定義される範囲にある長さを有する。いくつかの実施形態において、スペーサー領域は、１２アミノ酸長以下、１１９アミノ酸長以下、または２２９アミノ酸長以下であり、かつ１アミノ酸長または２アミノ酸長よりも長い。いくつかの実施形態においては、前記スペーサーは、前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されるように最適化されている。

【０１０８】
いくつかの実施形態において、前記スペーサー領域は、免疫グロブリン様分子のヒンジ領域に由来する。いくつかの実施形態において、スペーサー領域は、ヒトＩｇＧ１、ヒトＩｇＧ２、ヒトＩｇＧ３、またはヒトＩｇＧ４に由来するヒンジ領域の全体またはその一部を含み、１つ以上のアミノ酸置換を含んでいてもよい。前記ヒンジ領域の典型的な配列を表８に示す。いくつかの実施形態においては、前記ヒンジ領域の一部は、重鎖可変領域とコアとの間に存在するアッパーヒンジ領域のアミノ酸配列、およびポリプロリン領域を含むコアヒンジ領域のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記スペーサーは、前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されるように最適化されている。

【０１０９】
いくつかの実施形態において、二量体化などの望ましくない構造間の相互作用を回避するため、ヒンジ領域の配列は１つ以上のアミノ酸が改変されていてもよい。特定の一実施形態において、前記スペーサー領域は、表２または表８（配列番号２１）に示すような、ＩｇＧ４に由来する改変されたヒトヒンジ領域の一部を含む。改変されたＩｇＧ４ヒンジ領域の一部をコードするポリヌクレオチドの典型的な配列を表１に示す（配列番号４）。いくつかの実施形態において、ヒンジ領域は、表２または表８に示すヒンジ領域のアミノ酸配列と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、もしくは９９％の配列同一性、またはこれらの配列同一性（％）のいずれか２つの間にある任意の配列同一性（％）を有していてもよい。特定の一実施形態において、

ＩｇＧ４に由来するヒトヒンジ領域の一部は、コアヒンジ領域のアミノ酸配列においてCPSPがCPPCに置換されている。

【０１１０】

いくつかの実施形態において、前記ヒンジ領域の全体またはその一部は、免疫グロブリンの定常領域の１つ以上と組み合わされる。たとえば、ヒンジ領域の一部は、ＣＨ２ドメイン、ＣＨ３ドメインまたはそれらバリアントの全体またはその一部と組み合わせてもよい。いくつかの実施形態において、前記スペーサー領域は、ＣＤ８αに由来する４７～４８アミノ酸長のヒンジ領域配列およびＣＤ２８分子の細胞外部分からなるスペーサー領域を含んでいない。

【０１１１】

いくつかの実施形態において、短いスペーサー領域は、１２個以下のアミノ酸を有し、かつＩｇＧ４のヒンジ領域配列またはそのバリアントの全体もしくはその一部を含む。中程度の長さのスペーサー領域は、１１９個以下のアミノ酸を有し、かつＩｇＧ４のヒンジ領域配列またはそのバリアントの全体またはその一部と、ＣＨ３領域またはそのバリアントの全体またはその一部とを含む。長いスペーサーは、２２９個以下のアミノ酸を有し、かつＩｇＧ４のヒンジ領域配列またはそのバリアントの全体またはその一部と、ＣＨ２領域またはそのバリアントの全体またはその一部と、ＣＨ３領域またはそのバリアントの全体またはその一部とを含む。いくつかの実施形態において、短いスペーサー領域は、１アミノ酸長、２アミノ酸長、３アミノ酸長、４アミノ酸長、５アミノ酸長、６アミノ酸長、７アミノ酸長、８アミノ酸長、９アミノ酸長、１０アミノ酸長、１１アミノ酸長、もしくは１２アミノ酸長、またはこれらのアミノ酸長のいずれか２つによって定義される範囲にあるサイズを有する。いくつかの実施形態において、中程度の長さのスペーサー領域は、１３アミノ酸長、２０アミノ酸長、３０アミノ酸長、４０アミノ酸長、５０アミノ酸長、６０アミノ酸長、７０アミノ酸長、８０アミノ酸長、９０アミノ酸長、１００アミノ酸長、１１０アミノ酸長、もしくは１１９アミノ酸長、またはこれらのアミノ酸長のいずれか２つによって定義される範囲にあるサイズを有する。いくつかの実施形態において、スペーサー領域は、１２０アミノ酸長、１３０アミノ酸長、１４０アミノ酸長、１５０アミノ酸長、１６０アミノ酸長、１７０アミノ酸長、１８０アミノ酸長、１９０アミノ酸長、２００アミノ酸長、２１０アミノ酸長、もしくは２１９アミノ酸長、またはこれらのアミノ酸長のいずれか２つによって定義される範囲にあるサイズを有する。

【０１１２】

スペーサー領域をコードするポリヌクレオチドは、アミノ酸配列に基づいて合成法または組換え法により容易に作製することができる。いくつかの実施形態においては、スペーサー領域をコードするポリヌクレオチドは、膜貫通領域をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態において、スペーサー領域をコードする前記ポリヌクレオチドは、該コード配列の５’末端および／または３’末端に１つ以上の制限酵素部位をさらに有していてもよく、これによって、該ポリヌクレオチドを切断して、別のスペーサー領域をコードする別のポリヌクレオチドと置換することが容易となる。いくつかの実施形態において、前記スペーサー領域をコードする前記ポリヌクレオチドは、哺乳類細胞における発現を目的としてコドン最適化されている。

【０１１３】

一実施形態において、前記スペーサー領域は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３またはＩｇＧ４に由来するヒンジ領域配列またはその一部、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３またはＩｇＧ４に由来するヒンジ領域配列とＣＨ２領域またはそのバリアントの全体またはその一部との組み合わせ、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３またはＩｇＧ４に由来するヒンジ領域配列とＣＨ３領域またはそのバリアントの全体またはその一部との組み合わせ、ならびにＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３またはＩｇＧ４に由来するヒンジ領域配列とＣＨ２領域もしくはそのバリアントおよび／またはＣＨ３領域もしくはそのバリアントの全体またはその一部との組み合わせである。いくつかの実施形態において、短いスペーサー領域は、１２アミノ酸長以下であり、かつ１アミノ酸長もしくは２アミノ酸長を超える長さを有す

る改変ＩｇＧ４ヒンジ配列（配列番号４）であり、中程度の長さの配列は、１１９アミノ酸長以下であり、かつ１アミノ酸長もしくは２アミノ酸長を超える長さを有する、ＣＨ３配列を備えたＩｇＧ４ヒンジ配列（配列番号６２）であるか、または２２９アミノ酸長以下であり、かつ１アミノ酸長もしくは２アミノ酸長を超える長さを有する、ＣＨ２領域およびＣＨ３領域を備えたＩｇＧ４ヒンジ配列（配列番号５０）である。

【０１１４】

膜貫通ドメイン

いくつかの実施形態において、前記キメラ受容体の核酸配列は、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチドを含む。該膜貫通ドメインは、前記キメラ受容体を膜につなぎ止める役割を果たす。

【０１１５】

一実施形態において、他からの作用を必要とせずに、前記キメラ受容体中のドメインのうちの１つと関連し合う膜貫通ドメインが用いられる。場合によっては、前記キメラ受容体中のこのようなドメインが、同じまたは異なる表面膜タンパク質に由来する様々な膜貫通ドメインに結合することを回避できるようなアミノ酸置換に基づいて前記膜貫通ドメインを選択してもよく、あるいはこのようなアミノ酸置換によって前記膜貫通ドメインを改変してもよく、これによって、前記受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小限にすることができる。

【０１１６】

該膜貫通ドメインは、天然由来であってもよく、合成由来であってもよい。天然由来である場合、前記膜貫通ドメインは、膜結合型タンパク質であっても膜貫通型タンパク質であってもよく、これらのタンパク質はどのようなものであってもよい。

【０１１７】

膜貫通領域は、Ｔ細胞受容体のα鎖、β鎖もしくはζ鎖、ＣＤ２８、ＣＤ３、ＣＤ４５、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ９、ＣＤ１６、ＣＤ２２、ＣＤ３３、ＣＤ３７、ＣＤ６４、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ１３４、ＣＤ１３７および／またはＣＤ１５４の膜貫通領域を少なくとも含む。特定の一実施形態において、前記膜貫通ドメインは、表２に示すＣＤ２８膜貫通ドメインのアミノ酸配列を含む。ＣＤ２８膜貫通ドメインをコードする典型的なポリヌクレオチド配列を表１（配列番号５）に示す。

【０１１８】

膜貫通ドメインは、合成されたものであってもよく、天然の膜貫通ドメインのバリアントであってもよい。いくつかの実施形態において、合成膜貫通ドメインまたは膜貫通ドメインのバリアントは、主に疎水性残基、たとえば、ロイシンおよびバリンを含む。いくつかの実施形態において、膜貫通ドメインは、表２または表６に示す膜貫通ドメインと、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、もしくは１００％のアミノ酸配列同一性、またはこれらの値のいずれか２つにより定義される範囲にあるアミノ酸配列同一性を有してもいてもよい。膜貫通ドメインのバリアントは、Kyte Doolittle法により算出された疎水性スコアが少なくとも５０であることが好ましい。

【０１１９】

膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチドは、合成法または組換え法により容易に作製することができる。いくつかの実施形態において、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチドは、細胞内シグナル伝達領域をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態において、膜貫通ドメインをコードする前記ポリヌクレオチドは、該コード配列の５’末端および／または３’末端に１つ以上の制限酵素部位をさらに有していてもよく、これによって、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチドを切断して、別の膜貫通ドメインをコードする別のポリヌクレオチドと置換することが容易となる。いくつかの実施形態において、膜貫通ドメインをコードする前記ポリヌクレオチドは、哺乳類細胞における発現を目的としてコドン最適化されている。いくつかの実施形態においては、前記哺乳類細胞はヒト細胞である。

【０１２０】

細胞内シグナル伝達ドメイン

いくつかの実施形態において、前記キメラ受容体の核酸配列は、細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドを含む。該細胞内シグナル伝達ドメインが存在することによって、前記キメラ受容体を発現する形質導入細胞が腫瘍細胞上に発現されたリガンドに結合すると、該形質導入細胞の１つの機能が活性化される。いくつかの実施形態において、前記細胞内シグナル伝達ドメインは、１つ以上の細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態において、前記細胞内シグナル伝達ドメインは、前記形質導入細胞の少なくとも１つの機能を活性化する細胞内シグナル伝達ドメインの一部および／またはそのバリアントである。

【０１２１】

本開示のキメラ受容体に用いられる細胞内シグナル伝達ドメインとしては、ＣＤ３ζ鎖の細胞内配列、および／またはキメラ受容体が結合するとこれと協同してシグナル伝達を開始する補助受容体の細胞内配列、これらの配列の任意の誘導体またはバリアント、ならびに同じ機能を有する任意の合成配列が挙げられる。Ｔ細胞の活性化は、２種類の細胞内シグナル伝達配列によって媒介されると考えられており、これらの２種類の細胞内シグナル伝達配列は、抗原依存性一次活性化を開始し、かつＴ細胞受容体様シグナルを提供する細胞内シグナル伝達配列（一次細胞内シグナル伝達配列）と、抗原非依存性に、二次シグナルまたは共刺激シグナルを提供する細胞内シグナル伝達配列（二次細胞内シグナル伝達配列）とである。刺激性に作用する一次細胞内シグナル伝達配列は、受容体チロシン活性化モチーフすなわちＩＴＡＭとして知られるシグナル伝達モチーフを含んでいてもよい。一次細胞内シグナル伝達配列を含有するＩＴＡＭとしては、ＣＤ３ζ、ＦｃＲγ、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、ＣＤ３ε、ＣＤ５、ＣＤ２２、ＣＤ７９ａ、ＣＤ７９ｂ、および／またはＣＤ６６ｄに由来するものが挙げられる。いくつかの実施形態において、前記一次シグナル伝達細胞内ドメインは、表２に示す配列を有するＣＤ３ζと少なくとも８０％、８５％、９０％もしくは９５％の配列同一性、またはこれらの配列同一性（％）のいずれか２つによって定義される範囲にある配列同一性（％）を少なくとも有していてもよい。いくつかの実施形態において、ＣＤ３ζのバリアントは、表７に示すＩＴＡＭ領域を少なくとも１つ、２つもしくは３つ、またはこれらのＩＴＡＭ領域をすべて有する。

【０１２２】

好ましい実施形態において、前記キメラ受容体の前記細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ３ζシグナル伝達ドメインを単独で、あるいは他の任意の所望される単一または複数の細胞内ドメインと組み合わせて含むように設計することができる。たとえば、前記キメラ受容体の前記細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ３ζ鎖および共刺激シグナル伝達領域を含んでいてもよい。

【０１２３】

前記共刺激シグナル伝達領域は、共刺激分子の前記細胞内ドメインを含む、キメラ受容体の一部分を指す。共刺激分子は、抗原に対するリンパ球の応答に必要とされる抗原受容体やそのリガンド以外の細胞表面分子である。そのような分子としては、ＣＤ２７、ＣＤ２８、４－１ＢＢ（ＣＤ １３７）、ＯＸ４０、ＣＤ３０、ＣＤ４０、リンパ球機能関連抗原－１（ＬＦＡ－１）、ＣＤ２、ＣＤ７、ＬＩＧＨＴ、ＮＫＧ２Ｃ、Ｂ７－Ｈ３、およびζ鎖関連プロテインキナーゼ（ＺＡＰ７０）、ならびに／またはＣＤ８３と特異的に結合するリガンドが挙げられる。いくつかの実施形態においては、前記共刺激シグナル伝達ドメインは、表５に示すＣＤ２８の細胞内ドメインまたは表２に示す配列を有する４－１ＢＢと少なくとも８０％、８５％、９０％もしくは９５％のアミノ酸配列同一性、またはこれらの配列同一性（％）のいずれか２つによって定義される範囲にある配列同一性（％）を少なくとも有していてもよい。一実施形態においては、前記ＣＤ２８細胞内ドメインのバリアントは、１８６～１８７番目のアミノ酸がLLからGGに置換されている。

【０１２４】

キメラ受容体に複数存在する細胞内シグナル伝達配列は、ランダムな順序または指定された順序で互いに連結されていてもよい。いくつかの実施形態においては、これらの細胞

内シグナル伝達配列は、短いオリゴペプチドリンカーまたは短いポリペプチドリンカーによって連結されていてもよく、これらのリンカーは２～１０アミノ酸長であることが好ましい。一実施形態において、前記細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ３ζのシグナル伝達ドメインまたはそのバリアントの全体または一部と、ＣＤ２８のシグナル伝達ドメインまたはそのバリアントの全体またはその一部とを含む。別の実施形態においては、前記細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ３ζのシグナル伝達ドメインまたはそのバリアントの全体またはその一部と、４－１ＢＢのシグナル伝達ドメインまたはそのバリアントの全体またはその一部とを含む。さらに別の実施形態においては、前記細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ３ζのシグナル伝達ドメインまたはそのバリアントの全体またはその一部と、ＣＤ２８のシグナル伝達ドメインまたはそのバリアントの全体または一部と、４－１ＢＢのシグナル伝達ドメインまたはそのバリアントの全体またはその一部とを含む。特定の一実施形態における、ＣＤ３ζのバリアントと４－１ＢＢの細胞内シグナル伝達ドメインの一部とを含む前記細胞内シグナル伝達ドメインのアミノ酸配列を表２に示す。典型的な核酸配列を表１に示す（配列番号６；配列番号７）。いくつかの実施形態においては、前記核酸配列は、配列番号６で示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸配列は、配列番号７で示される配列を含む。

【０１２５】

一実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドは、ＣＤ３ζドメインの一部に連結された４－１ＢＢの細胞内ドメインを含む。別の実施形態においては、４－１ＢＢ細胞内ドメインおよびＣＤ２８細胞内ドメインは、ＣＤ３ζドメインの一部に連結されている。

【０１２６】

細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドは、アミノ酸配列に基づいて合成法または組換え法により容易に作製することができる。いくつかの実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインをコードする前記ポリヌクレオチドは、該コード配列の５’末端および／または３’末端に１つ以上の制限酵素部位をさらに有していてもよく、これによって、細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドを切断して、別の細胞内シグナル伝達ドメインをコードする別のポリヌクレオチドと置換することが容易となる。いくつかの実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインをコードする前記ポリヌクレオチドは、哺乳類細胞における発現を目的としてコドン最適化されている。いくつかの実施形態においては、前記哺乳類細胞はヒト細胞である。

【０１２７】

マーカー配列

いくつかの実施形態においては、前記システムは、誘導可能なプロモーターの制御下において１つ以上のマーカー配列をさらに含む。マーカー配列によって、形質導入細胞の選択および／または形質導入細胞の同定が可能となる。いくつかの実施形態においては、前記マーカー配列を使用して、形質導入細胞の選択および／または形質導入細胞の同定を行う。いくつかの実施形態においては、前記マーカー配列は、リンカー配列をコードするポリヌクレオチド配列に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態においては、前記リンカー配列は切断可能なリンカー配列である。いくつかの実施形態において、前記リンカーは切断可能なＴ２Ａリンカーである。

【０１２８】

様々なマーカー配列を使用することができる。通常、マーカー配列は、形質導入細胞の選択および／または検出を可能にする機能特性を有する。いくつかの実施形態において、前記マーカー配列は、ヒトリンパ球の形質導入に適合している。いくつかの実施形態において、前記マーカー配列は、形質導入細胞の選択および／または検出を可能にする。

【０１２９】

このポジティブ選択可能なマーカーは、導入された宿主細胞において、該遺伝子を持つ細胞のポジティブ選択を可能にする表現型を優位に発現する遺伝子であってもよい。このような遺伝子は当技術分野で知られており、たとえば、ハイグロマイシンＢに対する耐性

を与えるハイグロマイシンＢホスホトランスフェラーゼ遺伝子（ｈｐｈ）、抗生物質であるＧ４１８に対する耐性をコードするＴｎ５由来のアミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ遺伝子（ｎｅｏまたはａｐｈ）、メトトレキサートに対する耐性を与えるジヒドロ葉酸還元酵素（ＤＨＦＲ）遺伝子、ＤＨＦＲ ｄｍ（典型的なポリヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、表１４の配列番号４６および配列番号４７に示す）、ピューロマイシンに対する耐性を与えるｐａｃ遺伝子、ゼオシンを不活化するＳｈ ｂｌｅ遺伝子、アデノシンデアミナーゼ遺伝子（ＡＤＡ）、および／または多剤耐性（ＭＤＲ）遺伝子などが挙げられる。これらの薬剤の存在下で培養されて生き残った形質導入細胞が選択されることになる。

【０１３０】

一実施形態において、第１の核酸は、マーカー配列をコードするポリヌクレオチドをさらに含む。一実施形態において、前記マーカー配列は、表２に示す末端切断型上皮成長因子受容体である。末端切断型上皮成長因子受容体の典型的なポリヌクレオチド配列を表１に示す（配列番号９）。いくつかの実施形態においては、前記マーカー配列は末端切断型のＨｅｒ２配列である。末端切断型Ｈｅｒ２の典型的なポリヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を表１３に示し、これらはそれぞれ配列番号４４および配列番号４５で示される。

【０１３１】

いくつかの実施形態においては、前記マーカー配列をコードする前記ポリヌクレオチドは、リンカー配列をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されている。特定の一実施形態において、表２に示すように、前記リンカー配列は、切断可能なリンカー配列であるＴ２Ａである。Ｔ２Ａリンカーをコードする典型的なポリヌクレオチド配列を表１に示す（配列番号８）。

【０１３２】

マーカー配列をコードするポリヌクレオチドは、アミノ酸配列に基づいて合成法または組換え法により容易に作製することができる。いくつかの実施形態において、マーカー配列をコードするポリヌクレオチドは、細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態において、マーカー配列をコードする前記ポリヌクレオチドは、該コード配列の５’末端および／または３’末端に１つ以上の制限酵素部位をさらに有していてもよく、これによって、マーカー配列をコードするポリヌクレオチドを切断して、別のマーカー配列をコードする別のポリヌクレオチドと置換することが容易となる。いくつかの実施形態において、マーカー配列をコードする前記ポリヌクレオチドは、哺乳動物細胞における発現、好ましくはヒト細胞における発現を目的としてコドン最適化されている。

【０１３３】

いくつかの実施形態において、２つ以上のマーカー配列を用いることができる。いくつかの実施形態においては、第１のマーカー配列は、構成的プロモーターの制御下にあり、形質導入された細胞が導入遺伝子を発現していることの指標となる。別の実施形態においては、第２のマーカー配列は、誘導可能なプロモーターの制御下にあり、導入遺伝子の発現が誘導されたことの指標となる。いくつかの実施形態においては、誘導可能なプロモーターの制御下にある前記マーカーを使用して、誘導可能なプロモーターの制御下におけるマーカー配列の発現が他の細胞よりも低い細胞を選択することによって、誘導されていない状態での発現量または基底レベルでの発現量が他の細胞よりも大幅に低い細胞の選択を行い、選択した細胞を増殖させて、さらなる用途に使用することができる。

【０１３４】

誘導可能なプロモーターの制御下にあるその他の遺伝子成分

前記システムの実施形態のいくつかにおいて、第１核酸は、生存および増殖を促進する遺伝子、アポトーシスを阻害する遺伝子、および／または誘導可能なプロモーターの制御下で負のチェックポイントシグナル伝達を抑制する遺伝子をコードするポリヌクレオチド配列を含む。このような遺伝子は、ＩＬ－２をコードする遺伝子、ＩＬ－１５をコードす

る遺伝子、ケモカイン受容体をコードする遺伝子、Ｂｃｌ２をコードする遺伝子、ＣＡ－Ａｋｔをコードする遺伝子、ｄｎ－ＴＧＦβ RIIIをコードする遺伝子、ｄｎ－ＳＨＰ１／２をコードする遺伝子、および／またはＰＤ－１-ＣＤ２８キメラをコードする遺伝子を含む。これらの遺伝子も、本明細書に記載の誘導可能なプロモーターの制御下に置かれる。いくつかの実施形態において、前記遺伝子は、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、ケモカイン受容体、Ｂｃｌ２、ＣＡ－Ａｋｔ、ｄｎ－ＴＧＦβ RIII、ｄｎ－ＳＨＰ１／２および／またはＰＤ－１-ＣＤ２８キメラをコードする。いくつかの実施形態においては、チェックポイントシグナル伝達を調節する前記遺伝子は、負のチェックポイント制御因子を抑制するポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態においては、前記負のチェックポイント制御因子は、ＶＩＳＴＡ、ＬＡＧ－３および／またはＴＩＭ３を含む。

【０１３５】

いくつかの実施形態において、第１の核酸は、サイトカインまたはケモカイン受容体をコードするポリヌクレオチドに連結された第１の誘導可能なプロモーターを含む。走化性サイトカインとも呼ばれるケモカインは、リンパ球の交通を制御する構造的に関連したタンパク質の一群である。いくつかの実施形態では、前記ケモカインは恒常性ケモカインまたは炎症性ケモカインである。ケモカイン受容体としては、ＣＣＲ２、ＣＣＲ７またはＣＣＲ１５が挙げられる。サイトカインとしては、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－７および／またはＩＬ－１５などのインターロイキン、インターフェロン－δなどのインターフェロン、腫瘍壊死因子、およびＴＬＲ４アゴニストが挙げられる。いくつかの実施形態では、前記ケモカイン受容体は、ＣＣＲ２、ＣＣＲ７、および／またはＣＣＲ１５を含む。いくつかの実施形態では、ケモカイン受容体は、ＣＣＲ２、ＣＣＲ７またはＣＣＲ１５を含む。いくつかの実施形態では、前記サイトカインはインターロイキンを含み、該インターロイキンは、ＩＬ－２、ＩＬ－１２およびＩＬ－７および／もしくはＩＬ－１５、またはインターフェロンであり、該インターフェロンは、インターフェロン－δ、腫瘍壊死因子またはＴＬＲ４アゴニストを含む。

【０１３６】

いくつかの実施形態において、第１の核酸は、アポトーシスを制御するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに連結された第１の誘導可能なプロモーターを含む。いくつかの実施形態では、アポトーシスを抑制する遺伝子として、たとえば、Ｂｃｌ２および／またはＣＡ－Ａｋｔが挙げられる。いくつかの実施形態では、前記ポリペプチドはＢｃｌ２またはＣＡ－Ａｋｔである。

【０１３７】

いくつかの実施形態において、第１の核酸は、チェックポイントシグナル伝達を調節するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに連結された第１の誘導可能なプロモーターを含む。このような遺伝子としては、ｄｎ－ＴＧＦβ RIII、ｄｎ－ＳＨＰ１／２および／またはＰＤ－１-ＣＤ２８キメラが挙げられる。いくつかの実施形態においては、前記ポリペプチドは、ｄｎ－ＴＧＦβ RIII、ｄｎ－ＳＨＰ１／２および／またはＰＤ－１-ＣＤ２８キメラである。いくつかの実施形態においては、チェックポイントシグナル伝達を調節する前記ポリペプチドは、負のチェックポイント制御因子を抑制する。いくつかの実施形態においては、前記負のチェックポイント制御因子は、ＶＩＳＴＡ、ＬＡＧ－３および／またはＴＩＭ３を含む。

【０１３８】

これらの遺伝子をコードする典型的なポリヌクレオチド配列を以下に示す。

【表１】

Gene	A.A.	A.A.	N.A.	N.A.
	Accession	gI	Accession	gI
CCR2	P41597	1168965	NM_001123041	183979979
CCR7	P32248	1352335	NM_001838	299473754
IL-2	AAH70338	47682793	BC070338	47682792
IL-12	AAD16432	4323579	AF101062	4323578
IL-7	AAC63047	386824	NM_000880	315467865
IL-15	CAG46804	49456967	CR542007	49456966
IFN-g	EAW97180	119617586	EAW97180	119617586
TNF	NP_000585	25952111	NM_000594	395132451
Bcl2	AAH27258	20072668	BC027258	20072667
CA-Akt	NP_001014432	62241015	NM_001014432	62241014
TGFbeta Receptor III	Q03167	311033535	NM_003243	307574689
SHP1	NP_002822	18104989	NM_002831	166064064
SHP2	Q06124	84028248	NM_002834	33356176
PD-1	NP_001129245	209413749	NM_001135773	209413748
CD28	AAA51945	180092	NM_006139	340545506

【０１３９】

誘導可能なプロモーターの制御下に置かれる核酸の種類は特に限定されず、このような核酸として、キメラ抗原受容体をコードする核酸、マーカー配列をコードする核酸、サイトカインをコードする核酸、ケモカインをコードする核酸、アポトーシスの阻害因子をコードする核酸、および／または負のチェックポイントシグナル伝達の阻害因子をコードする核酸が挙げられる。いくつかの実施形態においては、十分な発現量で各核酸を発現させるために、１つ以上の誘導可能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においては、誘導可能なプロモーターの制御下にある遺伝子（たとえばサイトカイン）と、構成的プロモーターの制御下にあるキメラ抗原受容体を含む構築物とを使用して別の構築物を作製してもよい。このようにして作製された構築物は、たとえばキメラ抗原受容体を発現するリンパ球などの形質導入された細胞の生存と増殖の向上に有用である。

【０１４０】

構成的プロモーターシステム

別の実施形態においては、本発明のシステムは、転写活性化因子に連結された構成的プロモーターすなわち第２の誘導可能なプロモーターを含む第２の核酸を含む。別の実施形態においては、本発明のシステムは、転写活性化因子に連結されたプロモーターを含む第２の核酸を含む。いくつかの実施形態においては、前記プロモーターは、構成的プロモーターまたは誘導可能なプロモーターである。いくつかの実施形態において、構成的プロモーターとしては、ＥＦ１αプロモーター、アクチンプロモーター、ミオシンプロモーター、ヘモグロビンプロモーター、およびクレアチンキナーゼプロモーターが挙げられる。いくつかの実施形態においては、ＣＭＶプロモーターなどのウイルスプロモーターは使用されない。いくつかの実施形態においては、前記構成的プロモーターは、マーカーまたは本明細書に記載のキメラ抗原受容体をコードする１つ以上ポリヌクレオチドに連結されていてもよい。

【０１４１】

構成的プロモーター

構成的プロモーターは、自体の制御下で遺伝子の連続的な遺伝子発現を可能とする。いくつかの実施形態において、構成的プロモーターは、レンチウイルス構築物および／また

はリンパ球において遺伝子の発現を可能とするプロモーターである。いくつかの実施形態においては、構成的プロモーターは、異種生物には由来せず、たとえば、植物やウイルスに由来するものではない。

【０１４２】

特定の一実施形態において、構成的プロモーターとしては、ＥＦ１αプロモーター、アクチンプロモーター、ミオシンプロモーター、ヘモグロビンプロモーター、および／またはクレアチンキナーゼプロモーターが挙げられる。いくつかの実施形態においては、ＣＭＶプロモーターなどのウイルスプロモーターは使用しない。

【０１４３】

転写活性化因子

いくつかの実施形態において、前記構成的プロモーターは、転写活性化因子に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態においては、前記転写活性化因子は、誘導因子（たとえば薬物）の存在下で、誘導可能なプロモーターを活性化する。

【０１４４】

いくつかの実施形態において、誘導可能なプロモーターは、転写活性化因子の存在下で誘導される。いくつかの実施形態においては、前記転写活性化因子は薬物の存在下で誘導可能なプロモーターに選択的に結合する。いくつかの実施形態においては、前記転写活性化因子は、TamR-tf（HEA3）である。転写活性化因子の改変は、該転写活性化因子のアミノ酸配列のうち、薬物、プロモーター、またはこれらの両方に対する転写活性化因子の結合能力に影響を与えうるアミノ酸配列において行ってもよい。たとえば、ＥＲリガンド結合ドメインにおける結合性は、薬物の転写活性化因子への結合に影響を及ぼすと考えられる。

【０１４５】

いくつかの実施形態においては、前記システムは合成転写活性化因子を使用し、該合成転写活性化因子は、前記薬物（たとえばタモキシフェン）の存在下において、導入遺伝子の上流の合成プロモーターに結合し、発現を誘導する。いくつかの実施形態においては、前記転写活性化因子はTamR-tf（HEA3）である。タモキシフェンで制御されるこの転写因子（「TamR-tf」あるいは「HEA3」とも称される）は、ヒト由来サブユニットを含むキメラ転写因子であり、肝細胞核因子１－α（ＨＮＦ－１α）のＮ末端に存在するＤＮＡ結合ドメイン（たとえば配列番号４０の１～２８１番目のアミノ酸）が、エストロゲン受容体のリガンド結合ドメイン（ＥＲ－ＬＢＤ）のタモキシフェン特異的変異リガンド結合ドメインにインフレームで融合されており、このタモキシフェン特異的変異リガンド結合ドメインがさらにＮＦ－κＢのｐ６５活性化ドメイン（ｐ６５）に融合されている。典型的なアミノ酸配列は表１０に記載されており、配列番号４０で示されている。エストロゲン受容体のリガンド結合ドメイン（ＥＲ－ＬＢＤ）の前記タモキシフェン特異的変異リガンド結合ドメインは、TamR-tfの２８２～５９５番目のアミノ酸からなる配列であり、５２１番目のアミノ酸に変異を有する。ＮＦ－κＢのｐ６５活性化ドメイン（ｐ６５またはＴＡＤ）は、５９６～８６２番目のアミノ酸からなる配列である。

【０１４６】

転写因子の特性を向上させるために、前記転写活性化因子にさらに変更を加えてもよく、たとえば、前記エストロゲン受容体のリガンド結合ドメイン内の１つ以上のアミノ酸に変更を加えてもよく、かつ／または前記ｐ６５転写活性化ドメイン内の１つ以上のアミノ酸に変更を加えてもよいが、前記転写活性化因子への変更はこれらに限定されない。前記エストロゲン受容体の結合ドメインのアミノ酸に変更を加えることによって、前記薬物の転写活性化因子への結合の特異性をさらに高めることができる。前記エストロゲン受容体の結合ドメイン（ＥＲ－ＬＢＤ）の配列に変更を加えた転写活性化因子の一例を表１１に示す（配列番号４３）。変異は、配列番号４０の４００番目のアミノ酸、５４３番目のアミノ酸および５４４番目のアミノ酸に導入される。前記配列に変更を加えた転写活性化因子は、タモキシフェンまたは４－ＯＨＴに対する親和性が増大している。前記ｐ６５転写活性化ドメイン内のアミノ酸に変更を加えると、形質導入された細胞の活性化の非存在下

において、導入遺伝子の発現を増大させることができる。

【０１４７】

マーカー

いくつかの実施形態においては、前記構成的プロモーターは、マーカーポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されている。このようなマーカーポリペプチドは本明細書に記載されており、ＥＧＦＲｔ、Ｈｅｒ２ｔおよび／またはＤＨＦＲｄｍが挙げられる。

【０１４８】

キメラ抗原受容体

いくつかの実施形態においては、前記構成的プロモーターは、キメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態において、前記キメラ抗原受容体は、リガンド結合ドメイン、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドを含み、前記リガンド結合ドメインはリガンドに特異的であり、該リガンドは腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能である。いくつかの実施形態においては、前記スペーサーは、前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されるように最適化されている。キメラ抗原受容体の具体例は本明細書に記載されている。

【０１４９】

ベクター

形質導入および導入遺伝子の発現を効率的に実施することが可能な様々なベクターの組み合わせを構築することができる。いくつかの実施形態において、前記ベクターはデュアルパッケージウイルスベクターまたは単一の（オールインワン）ウイルスベクターである。別の実施形態においては、前記ベクターとして、ウイルスベクターとプラスミドベクターの組み合わせが挙げられる。別のウイルスベクターとしては、フォーミーウイルスベクター、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、およびレンチウイルスベクターが挙げられる。いくつかの実施形態において、前記ベクターは、レンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、前記ベクターは、フォーミーウイルスベクター、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、またはレンチウイルスベクターである。

【０１５０】

いくつかの実施形態においては、プラスミドベクターまたはウイルスベクターは、キメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドに連結された誘導可能なプロモーターを含む第１の核酸を含む。いくつかの実施形態においては、プラスミドベクターまたはウイルスベクターは、細胞の生存または増殖を増強する遺伝子、アポトーシスを制御する遺伝子、および／またはチェックポイントシグナル伝達を調節する遺伝子をコードするポリヌクレオチドを含む第１の核酸配列を含む。いくつかの実施形態においては、チェックポイントシグナル伝達を調節することによって、負のチェックポイント制御因子を抑制する。いくつかの実施形態においては、前記負のチェックポイント制御因子は、ＶＩＳＴＡ、ＬＡＧ－３および／またはＴＩＭ３を含む。このようなポリヌクレオチドは、サイトカインまたはケモカイン受容体をコードする。いくつかの実施形態においては、プラスミドベクターまたはウイルスベクターは、マーカー配列をコードするポリヌクレオチドに連結された誘導可能なプロモーターを含む第１の核酸を含む。マーカー配列は本明細書に記載されている。いくつかの実施形態において、前記マーカー配列は、ヒトリンパ球の形質導入に適合している。いくつかの実施形態においては、前記マーカー配列は、形質導入細胞の選択および／または検出を可能にする。いくつかの実施形態においては、前記マーカーは遺伝子であり、該遺伝子としては、具体的には、ハイグロマイシンＢに対する耐性を与えるハイグロマイシンＢホスホトランスフェラーゼ遺伝子（ｈｐｈ）、抗生物質であるＧ４１８に

対する耐性をコードするＴｎ５由来のアミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ遺伝子（ｎｅｏまたはａｐｈ）、メトトレキサートに対する耐性を与えるジヒドロ葉酸還元酵素（ＤＨＦＲ）遺伝子、ＤＨＦＲ ｄｍ（典型的なポリヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、表１４の配列番号４６および配列番号４７に示す）、ピューロマイシンに対する耐性を与えるｐａｃ遺伝子、ゼオシンを不活化するＳｈ ｂｌｅ遺伝子、アデノシンデアミナーゼ遺伝子（ＡＤＡ）、および／または多剤耐性（ＭＤＲ）遺伝子などが挙げられる。第１の核酸は、誘導可能なプロモーターの制御下において、様々なポリヌクレオチド配列を多数含むことができる。たとえば、キメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドは、マーカーポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよび／またはサイトカインもしくはケモカイン受容体をコードするポリヌクレオチドに連結することができる。

【０１５１】

いくつかの実施形態において、レンチウイルスベクターは、薬物に結合して誘導可能なプロモーターの発現を活性化する転写活性化因子をコードする核酸配列に連結された構成的プロモーターを含む第２の核酸を含む。いくつかの実施形態においては、構成的プロモーターを有するレンチウイルスベクターは、マーカー遺伝子、PiggyBacトランスポゼース、および／またはキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドを含む核酸配列をさらに含んでいてもよい。この核酸の各構成要素は、T2A自己切断配列などの配列を介して互いに隔てられていてもよい。いくつかの実施形態においては、前記核酸の各構成要素は、自己切断配列を介して互いに隔てられている。いくつかの実施形態においては、前記自己切断配列はT2Aである。

【０１５２】

別の実施形態において、外来性（前記ベクター、たとえばレンチウイルスベクターにとって外来性）の核酸配列は、ベクター中にパッケージされうる他の遺伝子成分の量によって制限される。いくつかの実施形態においては、構築物は、前記ウイルスベクターにとって外来性の遺伝子を少なくとも２つ含有する。いくつかの実施形態においては、前記構築物に含まれる、前記ウイルスベクターにとって外来性の遺伝子は４つ以下である。前記ウイルスベクター中にパッケージすることが可能な、該ベクターにとって外来性の遺伝子の数は、１つ以上の導入遺伝子の発現を検出すること、および細胞の少なくとも１０％に形質導入することが可能であり、かつ／または細胞の少なくとも１０％において該導入遺伝子の発現が検出可能なベクター構築物を選択することによって決定することができる。

【０１５３】

いくつかの実施形態において、レンチウイルスはデュアルパッケージされたウイルスである。デュアルパッケージされたウイルスは、キメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結された誘導可能なプロモーターを含む少なくとも１つの条件的構築物を含む。前記条件的構築物は、マーカー遺伝子、サイトカインをコードする核酸、ケモカイン受容体をコードする核酸を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、デュアルパッケージされたレンチウイルスは、構成的プロモーターを含む構成的構築物を含む。一実施形態においては、前記構成的構築物は、誘導可能なプロモーターの転写活性化因子に連結された構成的プロモーターを含む。いくつかの実施形態においては、前記構成的構築物は、マーカー遺伝子、および／またはサイトカインもしくはケモカインをコードするポリヌクレオチドをさらに含む。２つの構築物を含むシステムのいくつかの実施形態においては、それぞれの構築物は、別々のウイルスベクターにパッケージされおり、該ウイルスベクターを混合して使用することによって細胞集団に形質導入することができる。

【０１５４】

構成的構築物および条件的構築物がいずれもマーカー遺伝子を含んでいる場合、各構築物中のマーカー遺伝子は同じものであるか、または互いに異なるものである。いくつかの実施形態においては、構成的構築物および条件的構築物がいずれもキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドを含んでいる場合、該キメラ抗原受容体は、同じ抗原を標的とするが異なるリガンド結合ドメインを含んでいてもよく、同じ抗原を標的とするがエピトープは異なっていてもよく、あるいは異なる抗原を標的としてもよい。

【０１５５】
いくつかの実施形態において、前記ベクターはミニサークル（minicircle）である。ミニサークルは、細菌プラスミドのＤＮＡ骨格を含んでいない環状の発現カセットとして作製されたエピソーマルＤＮＡベクターである。ミニサークルの分子サイズは小さいためより効率的な形質移入が可能になり、また、数日間しか機能しない標準的なプラスミドベクターに比べて、数週間にわたる持続発現が可能となる。いくつかの実施形態において、ミニサークルは、キメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドに連結された、薬物による誘導の可能なプロモーターを含んでいる。いくつかの実施形態においては、前記誘導可能なプロモーターはケモカイン受容体、マーカー遺伝子および／またはサイトカインに連結することができる。１つ以上のミニサークルを使用することができる。いくつかの実施形態においては、ミニサークルは第１のキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドに連結された誘導可能なプロモーターを含み、別のミニサークルは、第１のキメラ抗原受容体とは異なる第２のキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドに連結された誘導可能なプロモーターを含み、かつ／または、さらに別のミニサークルは、ケモカイン受容体、キメラ抗原受容体およびマーカー遺伝子をコードするポリヌクレオチドに連結された誘導可能なプロモーターを含む。前記構築物それぞれの各構成要素は、自己切断Ｔ２Ａ配列をコードする核酸などの核酸を介して隔てられている。いくつかの実施形態において、前記構築物それぞれの各構成要素は、自己切断Ｔ２Ａ配列をコードする核酸などの核酸を介して隔てられている。いくつかの実施形態においては、それぞれのミニサークルに含まれるキメラ抗原受容体が互いに異なっており、たとえば、スペーサーの長さおよびスペーサーの配列、細胞内シグナル伝達ドメイン、ならびに／またはマーカー配列が異なっている（ただし、これらに限定されない）。前記ミニサークルベクターは、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする構成的レンチウイルスベクターとともに使用することができる。いくつかの実施形態においては、前記ミニサークルベクターは、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする構成的レンチウイルスベクターとともに使用する。

【０１５６】
いくつかの実施形態において、前記ベクターは、PiggyBacトランスポゾンである。PiggyBac（PB）トランスポゾンは、「カット＆ペースト」機構を介してベクターと染色体との間を効率的に移動する転移性遺伝因子である。転移に際して、PBトランスポゼースは、トランスポゾンベクターの両末端に存在するトランスポゾン特異性逆方向末端反復配列（ＩＴＲ）を認識し、ＩＴＲに挟まれた配列を元の部位から効率的に移動させて、これをＴＴＡＡ染色体部位に効率的に組み込む。PiggyBacトランスポゾンシステムの強力な活性によって、PBベクターの２つのＩＴＲに挟まれた目的の遺伝子を標的ゲノムへと容易に移動することができる。

【０１５７】
いくつかの実施形態において、PBは、キメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドに連結された、薬物による誘導の可能なプロモーターを含んでいる。いくつかの実施形態においては、前記誘導可能なプロモーターはケモカイン受容体、マーカー遺伝子および／またはサイトカインに連結することができる。１つ以上のPBトランスポゾンを使用することができる。いくつかの実施形態においては、PBは第１のキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドに連結された誘導可能なプロモーターを含み、別のPBは、第１のキメラ抗原受容体とは異なる第２のキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドに連結された誘導可能なプロモーターを含み、かつ／または、さらに別のPBは、ケモカイン受容体、キメラ抗原受容体およびマーカー遺伝子をコードするポリヌクレオチドに連結された誘導可能なプロモーターを含む。前記構築物それぞれの各構成要素は、自己切断Ｔ２Ａ配列をコードする核酸などの核酸を介して隔てられている。いくつかの実施形態においては、それぞれのPBに含まれるキメラ抗原受容体が互いに異なっており、たとえば、スペーサーの長さおよびスペーサーの配列、細胞内シグナル伝達ドメイン、ならびに／またはマーカー配列が異なっている（ただし、これらに限定されない）。前記PBは、前記誘導可能なプロ

モーターの転写活性化因子をコードする構成的レンチウイルスベクターおよび構成的プロモーターに連結されたPiggyBacトランスポゼースを含む構成的ベクターとともに使用することができる。

【０１５８】

いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつリガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されており、該リガンド結合ドメインはリガンドに特異的であり、該リガンドは、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子、または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能であり、前記第１の核酸は、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含み；ならびに前記第２の核酸は、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された構成的または誘導可能な第２のプロモーターを含む。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸と前記第２の核酸は、単一のレンチウイルスベクターに含まれている。いくつかの実施形態においては、前記スペーサーは、前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されるように最適化されている。

【０１５９】

いくつかの実施形態では、前記第１の核酸はマーカー遺伝子をさらに含む。いくつかの実施形態において、前記第２の核酸は、第１のキメラ抗原受容体とは異なる第２のキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドをさらに含む。第１のキメラ抗原受容体と第２のキメラ抗原受容体は互いに異なっていてもよく、その差異は、リガンド結合ドメイン、標的抗原、標的抗原のエピトープ、スペーサードメインの長さおよびスペーサードメインの配列（短い配列、中程度の配列または長い配列）、ならびに細胞内シグナル伝達ドメインにあってもよい。

【０１６０】

いくつかの実施形態において、単一のレンチウイルス構築物では、第１の核酸と第２の核酸は、ゲノムのインスレーターの核酸配列を介して隔てられていてもよく、該インスレーターは、たとえば、ウニのインスレーターのクロマチンドメインであってもよい。別の実施形態においては、前記第１核酸の前記誘導可能なプロモーターは、前記第２の核酸の前記構成的プロモーターとは逆向きである。

【０１６１】

これらのベクターのうち１つ以上を組み合わせて使用することによって、標的細胞に形質導入し、キメラ抗原受容体の発現を誘導することができる。

【０１６２】

宿主細胞および組成物：Ｔリンパ球集団

本明細書に記載の組成物は、本明細書に記載のベクターおよび／または構築物を含む遺伝子改変宿主細胞を提供する。いくつかの実施形態では、前記宿主細胞はＣＤ４$^{+}$Ｔリンパ球および／またはＣＤ８$^{+}$Ｔリンパ球である。

【０１６３】

Ｔリンパ球は、公知の技術によって回収することができ、フローサイトメトリーおよび／または免疫磁気選択のような、抗体との親和性結合などの公知の技術によって濃縮または除去することができる。濃縮工程および／または除去工程を行った後、当業者であれば容易に理解できる公知の技術またはその変法によって所望のＴリンパ球をインビトロで増殖させることができる。いくつかの実施形態では、前記Ｔ細胞は患者から得られた自己由来Ｔ細胞である。

【０１６４】

たとえば、所望のＴ細胞集団またはＴ細胞亜集団の増殖は、増殖前のＴリンパ球集団をインビトロにおいて培地に添加すること、非分裂末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）などのフィーダー細胞を該培地に添加すること（たとえば、添加後の細胞集団が、増殖培養される最

初の集団中の各Ｔリンパ球１個あたり、少なくとも５個、１０個、２０個、または４０個またはそれ以上のＰＢＭＣフィーダー細胞を含むような比率で加える）、および該培地を（たとえばＴ細胞数の増加に十分な時間にわたって）インキュベートすることによって行うことができる。前記非分裂フィーダー細胞は、γ線が照射されたＰＢＭＣフィーダー細胞を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、細胞分裂を防ぐため、3000～3600radのγ線を前記ＰＢＭＣに照射する。いくつかの実施形態においては、前記ＰＢＭＣの細胞分裂を防ぐため、3000rad、3100rad、3200rad、3300rad、3400rad、3500rad、もしくは3600radのγ線、またはこれらの値のいずれか２つで示されるエンドポイントの間にある任意の放射線値のγ線を前記ＰＢＭＣに照射する。培地にＴ細胞またはフィーダー細胞を添加する順序は必要に応じて入れ替えてもよい。典型的には、Ｔリンパ球の増殖に適した温度などの条件下で培養物をインキュベートすることができる。ヒトＴリンパ球を増殖させるための温度としては、たとえば、通常、少なくとも２５℃、好ましくは少なくとも３０℃、より好ましくは３７℃である。いくつかの実施形態において、ヒトＴリンパ球を増殖させるための温度は、２２℃、２４℃、２６℃、２８℃、３０℃、３２℃、３４℃、３６℃、もしくは３７℃、またはこれらの値のいずれか２つで示されるエンドポイントの間にある他の任意の温度である。

【０１６５】

増殖させたＴリンパ球としては、ヒト腫瘍または病原体上に存在する抗原に特異的であってもよいＣＤ８$^{+}$細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）およびＣＤ４$^{+}$ヘルパーＴリンパ球が挙げられる。いくつかの実施形態において、前記細胞としてはＴ細胞前駆細胞が挙げられる。いくつかの実施形態においては、前記細胞は造血幹細胞である。

【０１６６】

いくつかの実施形態において、前記増殖方法は、ＥＢＶで形質転換された非分裂リンパ芽球様細胞（ＬＣＬ）をフィーダー細胞として加えることをさらに含んでもよい。6000～10,000radのγ線をＬＣＬに照射してもよい。いくつかの実施形態においては、6000rad、6500rad、7000rad、7500rad、8000rad、8500rad、9000rad、9500rad、もしくは10,000radのγ線、またはこれらの値のいずれか２つで示されるエンドポイントの間にある任意の放射線量のγ線を前記ＬＣＬに照射する。前記ＬＣＬフィーダー細胞は任意の適切な量で提供することができ、たとえば、ＬＣＬフィーダー細胞と増殖開始時のＴリンパ球との比は少なくとも１０：１であってもよい。

【０１６７】

いくつかの実施形態において、前記増殖方法は、（たとえば、少なくとも０．５ｎｇ／ｍｌの濃度で）抗ＣＤ３抗体および／または抗ＣＤ２８抗体を培地に加えることをさらに含んでもよい。いくつかの実施形態においては、前記増殖方法は、ＩＬ－２および／またはＩＬ－１５を培地に加えることをさらに含んでもよい（ＩＬ－２の濃度は、たとえば、少なくとも１０ユニット／ｍｌである）。

【０１６８】

Ｔリンパ球を単離し、増殖を行う前または増殖を行った後に、細胞傷害性Ｔリンパ球およびヘルパーＴリンパ球をそれぞれ、ナイーブＴ細胞亜集団、メモリーＴ細胞亜集団、およびエフェクターＴ細胞亜集団にソートすることができる。

【０１６９】

ＣＤ８$^{+}$細胞は、標準的な方法を用いることによって得ることができる。いくつかの実施形態において、ＣＤ８$^{+}$細胞は、ナイーブＣＤ８$^{+}$細胞、セントラルメモリーＣＤ８$^{+}$細胞、およびエフェクターメモリーＣＤ８$^{+}$細胞それぞれと関連する細胞表面抗原を同定することによって、ナイーブ細胞、セントラルメモリー細胞、およびエフェクターメモリー細胞にさらにソートされる。いくつかの実施形態において、メモリーＴ細胞は、ＣＤ８$^{+}$末梢血リンパ球由来のＣＤ６２Ｌ$^{+}$サブセットおよびＣＤ６２Ｌ$^{-}$サブセットの両方に存在する。ＰＢＭＣは、抗ＣＤ８抗体および抗ＣＤ６２Ｌ抗体で染色した後に、ＣＤ６２Ｌ$^{-}$ＣＤ８$^{+}$画分およびＣＤ６２Ｌ$^{+}$ＣＤ８$^{+}$画分にソートされる。いくつかの実施形態において、セントラルメモリーT_{CM}の表現型マーカーの発現は、ＣＤ４５ＲＯ、ＣＤ６

２Ｌ、ＣＣＲ７、ＣＤ２８、ＣＤ３、および／またはＣＤ１２７を含み、グランザイムＢは陰性であるか、低発現を示す。いくつかの実施形態において、セントラルメモリーＴ細胞は、ＣＤ４５ＲＯ$^{+}$、ＣＤ６２Ｌ$^{+}$、および／またはＣＤ８$^{+}$のＴ細胞である。いくつかの実施形態において、エフェクターＴ$_{E}$は、ＣＤ６２Ｌ、ＣＣＲ７、ＣＤ２８、および／またはＣＤ１２７が陰性であり、グランザイムＢおよび／またはパーフォリンは陽性である。いくつかの実施形態において、ナイーブＣＤ８$^{+}$Ｔリンパ球は、ナイーブＴ細胞の表現型マーカーの発現によって特徴付けられ、ナイーブＴ細胞の表現型マーカーとしては、ＣＤ６２Ｌ、ＣＣＲ７、ＣＤ２８、ＣＤ３、ＣＤ１２７、および／またはＣＤ４５ＲＡが挙げられる。

【０１７０】

ＣＤ４$^{+}$ヘルパーＴ細胞は、細胞表面抗原を有する細胞集団を同定することによって、ナイーブ細胞、セントラルメモリー細胞、およびエフェクター細胞にソートされる。ＣＤ４$^{+}$リンパ球は、標準的な方法によって得ることができる。いくつかの実施形態において、ナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔリンパ球は、ＣＤ４５ＲＯ$^{-}$、ＣＤ４５ＲＡ$^{+}$、ＣＤ６２Ｌ$^{+}$、および／またはＣＤ４$^{+}$のＴ細胞である。いくつかの実施形態において、セントラルメモリーＣＤ４$^{+}$細胞は、ＣＤ６２Ｌ$^{+}$および／またはＣＤ４５ＲＯ$^{+}$である。いくつかの実施形態において、エフェクターＣＤ４$^{+}$細胞は、ＣＤ６２Ｌ$^{-}$および／またはＣＤ４５ＲＯ$^{-}$である。

【０１７１】

細胞または細胞集団が特定の細胞表面マーカーについて陽性であるかどうかは、該表面マーカーに特異的な抗体およびアイソタイプを一致させたコントロール抗体による染色を使用したフローサイトメトリーによって判定することができる。細胞集団において特定のマーカーが陰性であることは、アイソタイプコントロールと比べて特異的抗体で強く染まる細胞集団が見られないことを指し、陽性は、アイソタイプコントロールと比べて特異的抗体で均一染まる細胞集団が見られることを指す。いくつかの実施形態において、１つ以上のマーカーの発現の減少は、対照の細胞集団と比較して、平均蛍光強度の低下が1 $\log_{10}$であること、および／またはマーカーを発現する細胞のパーセンテージが細胞全体の少なくとも２０％に低下すること、細胞全体の少なくとも２５％に低下すること、細胞全体の少なくとも３０％に低下すること、細胞全体の少なくとも３５％に低下すること、細胞全体の少なくとも４０％に低下すること、細胞全体の少なくとも４５％に低下すること、細胞全体の少なくとも５０％に低下すること、細胞全体の少なくとも５５％に低下すること、細胞全体の少なくとも６０％に低下すること、細胞全体の少なくとも６５％に低下すること、細胞全体の少なくとも７０％に低下すること、細胞全体の少なくとも７５％に低下すること、細胞全体の少なくとも８０％に低下すること、細胞全体の少なくとも８５％に低下すること、細胞全体の少なくとも９０％に低下すること、細胞全体の少なくとも９５％に低下すること、もしくは細胞全体の少なくとも１００％に低下すること、もしくは２０～１００％の範囲の任意のパーセンテージに低下することを指す。いくつかの実施形態において、細胞集団が１つ以上のマーカーについて陽性であることは、対照の細胞集団と比較して、マーカーを発現する細胞のパーセンテージが細胞全体の少なくとも５０％であること、細胞全体の少なくとも５５％であること、細胞全体の少なくとも６０％であること、細胞全体の少なくとも６５％であること、細胞全体の少なくとも７０％であること、細胞全体の少なくとも７５％であること、細胞全体の少なくとも８０％であること、細胞全体の少なくとも８５％であること、細胞全体の少なくとも９０％であること、細胞全体の少なくとも９５％であること、もしくは細胞全体の少なくとも１００％であること、または５０～１００％の範囲の任意のパーセンテージであることを指す。

【０１７２】

細胞または細胞集団が特定の細胞表面マーカーについて陽性であるかどうかは、該表面マーカーに特異的な抗体およびアイソタイプを一致させたコントロール抗体による染色を使用したフローサイトメトリーによって判定することができる。細胞集団において特定のマーカーが陰性であることは、アイソタイプコントロールと比べて特異的抗体で強く染ま

る細胞集団が見られないことを指し、陽性は、アイソタイプコントロールと比べて特異的抗体で均一染まる細胞集団が見られることを指す。いくつかの実施形態において、１つ以上のマーカーの発現の減少は、対照の細胞集団と比較して、平均蛍光強度の低下が1 $\log_{10}$であること、および／またはマーカーを発現する細胞のパーセンテージが細胞全体の少なくとも２０％に低下すること、細胞全体の少なくとも２５％に低下すること、細胞全体の少なくとも３０％に低下すること、細胞全体の少なくとも３５％に低下すること、細胞全体の少なくとも４０％に低下すること、細胞全体の少なくとも４５％に低下すること、細胞全体の少なくとも５０％に低下すること、細胞全体の少なくとも５５％に低下すること、細胞全体の少なくとも６０％に低下すること、細胞全体の少なくとも６５％に低下すること、細胞全体の少なくとも７０％に低下すること、細胞全体の少なくとも７５％に低下すること、細胞全体の少なくとも８０％に低下すること、細胞全体の少なくとも８５％に低下すること、細胞全体の少なくとも９０％に低下すること、細胞全体の少なくとも９５％に低下すること、もしくは細胞全体の少なくとも１００％に低下すること、もしくは２０～１００％の範囲の任意のパーセンテージに低下することを指す。いくつかの実施形態において、１つ以上のマーカーの発現の増加は、平均蛍光強度が増加すること、および／または細胞集団において１つのマーカーまたは任意のマーカーが陽性である細胞の数が増加することを指し、たとえば、対照の細胞集団などと比較して、特定の細胞集団におけるマーカーを発現する細胞のパーセンテージが細胞全体の少なくとも５０％であること、細胞全体の少なくとも５５％であること、細胞全体の少なくとも６０％であること、細胞全体の少なくとも６５％であること、細胞全体の少なくとも７０％であること、細胞全体の少なくとも７５％であること、細胞全体の少なくとも８０％であること、細胞全体の少なくとも８５％であること、細胞全体の少なくとも９０％であること、細胞全体の少なくとも９５％であること、もしくは細胞全体の少なくとも１００％であること、または５０～１００％の範囲の任意のパーセンテージであることを指す。

【０１７３】

いくつかの実施形態において、抗原特異的なＣＤ４$^+$集団およびＣＤ８$^+$集団は、ナイーブＴリンパ球または抗原特異的Ｔリンパ球を抗原で刺激することによって得ることができる。たとえば、サイトメガロウイルス抗原に対して特異的なＴ細胞株またはＴ細胞クローンは、サイトメガロウイルス抗原に感染した対象からＴ細胞を単離し、インビトロにおいてサイトメガロウイルス抗原で該細胞を刺激することによって作製することができる。ナイーブＴ細胞を使用することもできる。Ｔ細胞応答を誘導するための標的として使用する、腫瘍細胞に由来する抗原の数は特に限定されない。いくつかの実施形態において、本発明の養子細胞免疫療法組成物は、固形腫瘍、血液悪性腫瘍、乳がん、または黒色腫を含む疾患または障害の治療に有用である。

【０１７４】

Ｔリンパ球集団の改変

いくつかの実施形態においては、本発明の開示による免疫療法に使用する前記Ｔ細胞に機能性遺伝子を導入することが望ましい場合がある。たとえば、単一の遺伝子または複数の遺伝子をＴ細胞に導入することによって、体内に移入された該Ｔ細胞の生存能および／または機能を向上することができ、それによって治療法の有効性を改善することができる。あるいは、上記単一または複数の遺伝子を導入することによって、遺伝子マーカーを提供することができ、この遺伝子マーカーを利用することによって、インビボにおける生存Ｔ細胞および／または移行Ｔ細胞の選択および／または評価が可能となる。あるいは、上記単一または複数の遺伝子をＴ細胞に導入することによって、たとえば、該導入遺伝子の発現制御により該Ｔ細胞を調節することができ、それによって免疫療法の安全性を改善することができる。これらは、本発明の開示を踏まえ、当業者であれば容易に理解できる公知の技術に従って行うことができる。

【０１７５】

いくつかの実施形態においては、Ｔ細胞は、本明細書に記載の、薬物による誘導の可能なキメラ受容体をコードするベクターで改変される。いくつかの実施形態においては、細

胞は、誘導可能なプロモーターの制御下でキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドを含むベクターで改変される。別の実施形態においては、細胞は、誘導可能なプロモーターの制御下で、サイトカイン、ケモカイン受容体、アポトーシスを制御する遺伝子、またはチェックポイントシグナル伝達を調節する遺伝子をコードするポリヌクレオチドを含むベクターで改変される。いくつかの実施形態において、前記Ｔ細胞は、処置を受ける対象から得られ、別の実施形態においては、前記リンパ球は同種異系のヒトドナー、好ましくは健常ヒトドナーから得られる。いくつかの実施形態においては、チェックポイントシグナル伝達を調節することによって、負のチェックポイント制御因子を抑制する。いくつかの実施形態においては、前記負のチェックポイント制御因子は、ＶＩＳＴＡ、ＬＡＧ－３および／またはＴＩＭ３を含む。

【０１７６】

キメラ受容体は、たとえば抗体分子などに由来する抗原結合フラグメントまたは抗体可変ドメインを利用することによって、任意の細胞表面マーカーに対する特異性を備えるように構築することができる。前記抗原結合分子は、１つ以上の細胞シグナル伝達モジュールに連結することができる。いくつかの実施形態において、前記細胞シグナル伝達モジュールとしては、ＣＤ３膜貫通ドメイン、ＣＤ３細胞内シグナル伝達ドメイン、および／またはＣＤ２８膜貫通ドメインが挙げられる。いくつかの実施形態において、前記細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ３ζ細胞内ドメインに連結されたＣＤ２８膜貫通シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態において、キメラ受容体は、ｔＥＧＦＲなどの形質導入マーカーをさらに含んでいてもよい。

【０１７７】

いくつかの実施形態において、ＣＤ４$^{+}$Ｔリンパ球集団および／またはＣＤ８$^{+}$Ｔリンパ球集団のそれぞれに導入されるキメラ受容体は同じでも異なっていてもよい。いくつかの実施形態においては、これらの細胞集団のそれぞれに導入されるキメラ受容体のリガンド結合ドメインは、腫瘍細胞上または感染細胞上の同じリガンドに特異的に結合するか、または異なる抗原もしくは異なるエピトープに特異的に結合する。前記細胞シグナル伝達モジュールもそれぞれ異なっていてもよい。いくつかの実施形態においては、前記ＣＤ８$^{+}$細胞傷害性Ｔ細胞の前記細胞内シグナル伝達ドメインは、前記ＣＤ４$^{+}$ヘルパーＴ細胞の前記細胞内シグナル伝達ドメインと同一のものである。別の実施形態では、前記ＣＤ８$^{+}$細胞傷害性Ｔ細胞の前記細胞内シグナル伝達ドメインは、前記ＣＤ４$^{+}$ヘルパーＴ細胞の前記細胞内シグナル伝達ドメインと異なるものである。

【０１７８】

いくつかの実施形態において、ＣＤ４Ｔリンパ球またはＣＤ８Ｔリンパ球はそれぞれ、本明細書に記載されるように、形質導入前に、ナイーブ細胞、セントラルメモリー細胞、エフェクターメモリー細胞、またはエフェクター細胞にソートすることができる。いくつかの実施形態において、ＣＤ４Ｔリンパ球またはＣＤ８Ｔリンパ球はそれぞれ、形質導入後に、ナイーブ細胞、セントラルメモリー細胞、エフェクターメモリー細胞、またはエフェクター細胞にソートすることができる。

【０１７９】

本明細書に記載のように、いくつかの実施形態において、ナイーブＣＤ４$^{+}$細胞は、ＣＤ４５ＲＯ$^{-}$、ＣＤ４５ＲＡ$^{+}$、ＣＤ６２Ｌ$^{+}$、および／またはＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞である。いくつかの実施形態において、セントラルメモリーＣＤ４$^{+}$細胞は、ＣＤ６２Ｌ$^{+}$および／またはＣＤ４５ＲＯ$^{+}$である。いくつかの実施形態において、エフェクターＣＤ４$^{+}$細胞は、ＣＤ６２Ｌ$^{-}$および／またはＣＤ４５ＲＯ$^{+}$である。これらの集団はそれぞれ別個にキメラ受容体で改変することができる。

【０１８０】

本明細書に記載されているように、いくつかの実施形態において、メモリーＴ細胞は、ＣＤ８$^{+}$末梢血リンパ球由来のＣＤ６２Ｌ$^{+}$サブセットおよびＣＤ６２Ｌ$^{-}$サブセットの両方に存在する。ＰＢＭＣは、抗ＣＤ８抗体および抗ＣＤ６２Ｌ抗体で染色した後に、ＣＤ６２Ｌ$^{-}$ＣＤ８$^{+}$画分およびＣＤ６２Ｌ$^{+}$ＣＤ８$^{+}$画分にソートされる。いくつかの実

施形態において、セントラルメモリーＴ細胞（$Ｔ_{ＣＭ}$）の表現型マーカーの発現は、ＣＤ６２Ｌ、ＣＣＲ７、ＣＤ２８、ＣＤ３、および／またはＣＤ１２７を含み、グランザイムＢは陰性であるか、低発現を示す。いくつかの実施形態において、セントラルメモリーＴ細胞は、$ＣＤ４５ＲＯ^{+}$、$ＣＤ６２Ｌ^{+}$、および／または$ＣＤ８^{+}$のＴ細胞である。いくつかの実施形態において、エフェクターＴ細胞（$Ｔ_{Ｅ}$）は、ＣＤ６２Ｌ、ＣＣＲ７、ＣＤ２８、および／またはＣＤ１２７が陰性であり、グランザイムＢおよび／またはパーフォリンは陽性である。いくつかの実施形態において、ナイーブ$ＣＤ８^{+}$Ｔリンパ球は、$ＣＤ８^{+}$、$ＣＤ６２Ｌ^{+}$、$ＣＤ４５ＲＯ^{+}$、$ＣＣＲ７^{+}$、$ＣＤ２８^{+}$、$ＣＤ１２７^{+}$、および／または$ＣＤ４５ＲＯ^{+}$によって特徴付けられる。これらの集団はそれぞれ別個にキメラ受容体で改変することができる。

【０１８１】

遺伝子送達のための組換え感染性ウイルス粒子を利用した様々な形質導入技術が開発されてきた。このような形質導入技術は、本発明のＴリンパ球を形質導入するためのアプローチとして現時点では好ましい。この形質導入技術に通常使用されるウイルスベクターとしては、シミアンウイルス４０、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、レンチウイルスベクター、および／またはレトロウイルスに由来するウイルスベクターが挙げられる。このように、遺伝子導入方法および発現方法としては様々なものが存在するが、このような方法は、哺乳類細胞に遺伝物質を導入して発現させることを本質的な機能とする。前記形質導入技術のいくつかは、造血細胞またはリンパ球に形質導入することを目的として使用され、このような形質導入技術としては、リン酸カルシウムトランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、組換えアデノウイルスによる感染、アデノ随伴ウイルスによる感染、およびレトロウイルスベクターによる感染が挙げられる。初代Ｔリンパ球の形質導入は、エレクトロポレーションおよびレトロウイルスまたはレンチウイルスの感染によって成功を収めている。

【０１８２】

レトロウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターを使用することによって、真核細胞への遺伝子導入を非常に効率的に行うことができる。さらに、レトロウイルスまたはレンチウイルスの組み込みは制御下で行うことができ、細胞１個あたり１コピーまたは数コピーの新しい遺伝情報を安定して組み込むことができる。

【０１８３】

刺激因子（たとえばリンホカインまたはサイトカイン）の過剰発現は、治療を受ける個体に対して毒性がある場合がある。したがって、本発明は、インビボにおけるネガティブ選択に対する感受性を本発明のＴ細胞に付与する遺伝子セグメントをさらに包含する。「ネガティブ選択」は、個体のインビボ状態を変化させることによって該個体に注入した細胞を排除できることを意味する。ネガティブ選択が可能な表現型は、投与される薬剤（たとえば化合物）に対する感受性を付与する遺伝子を挿入することによって発現される。ネガティブ選択可能な遺伝子は当技術分野において知られており、たとえば、ガンシクロビルに対する感受性を付与する単純ヘルペスウイルスＩ型チミジンキナーゼ（HSV-I TK）遺伝子、細胞由来ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HPRT）遺伝子、細胞由来アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（APRT）遺伝子、および細菌シトシンデアミナーゼなどが挙げられる。

【０１８４】

いくつかの実施形態においては、ネガティブ選択可能な表現型を有する細胞のインビトロでの選択を可能にするポジティブマーカーをＴ細胞に導入すると有用である場合がある。このポジティブ選択可能なマーカーは、導入された宿主細胞において、該遺伝子を持つ細胞のポジティブ選択を可能にする表現型を優位に発現する遺伝子であってもよい。このような遺伝子は当技術分野において公知であり、具体的には、ハイグロマイシンＢに対する耐性を与えるハイグロマイシンＢホスホトランスフェラーゼ遺伝子（hph）、抗生物質であるＧ４１８に対する耐性をコードするＴｎ５由来のアミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ遺伝子（neoまたはaph）、ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）遺伝子、アデノシン

デアミナーゼ遺伝子（ADA）、および／または多剤耐性（MDR）遺伝子などが挙げられる。

【０１８５】

Ｔリンパ球に形質を導入するため、当技術分野において公知の様々な方法を使用することができる。いくつかの実施形態においては、レンチウイルスベクターを用いて形質導入を行う。

【０１８６】

いくつかの実施形態においては、キメラ受容体をコードする発現ベクターを使用して、ＣＤ４$^+$細胞およびＣＤ８$^+$細胞をそれぞれ別々に改変し、所定の集団を形成することができる。いくつかの実施形態においては、これらの細胞は、構成的プロモーターの制御下でポリヌクレオチドを含むベクター、および誘導可能なプロモーターの制御下でサイトカインまたはケモカイン受容体をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを使用して別々に改変することができる。

【０１８７】

いくつかの実施形態においては、これらの細胞は、次いで、前述したナイーブ細胞の亜集団、セントラルメモリー細胞の亜集団、およびエフェクター細胞の亜集団のそれぞれに固有の細胞表面抗原でソートすることによって、これらの亜集団にソートされる。また、ＣＤ４$^+$細胞集団およびＣＤ８$^+$細胞集団は、それらのサイトカインプロファイルまたは増殖活動によって選択することができる。たとえば、抗原で刺激した後の、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－１０、ＴＮＦα、および／またはＩＦＮγなどのサイトカインの産生が、偽形質導入細胞や形質導入ＣＤ８$^+$細胞よりも増強されたＣＤ４$^+$Ｔリンパ球を選択することができる。別の実施形態において、ＩＬ－２および／またはＴＮＦαの産生が増強されたナイーブＣＤ４$^+$Ｔ細胞またはセントラルメモリーＣＤ４$^+$Ｔ細胞が選択される。同様に、偽形質導入ＣＤ８$^+$細胞よりもＩＦＮγの産生が増強されたＣＤ８$^+$細胞が選択される。

【０１８８】

いくつかの実施形態においては、抗原を有する細胞に対して細胞傷害性を示すＣＤ４$^+$細胞およびＣＤ８$^+$細胞が選択される。いくつかの実施形態においては、ＣＤ４$^+$細胞は、ＣＤ８$^+$細胞よりも低い細胞傷害性を示すと予想される。好ましい一実施形態においては、特定の種類のがんについて確立されたインビボ動物モデルにおいて、このがんの腫瘍細胞を殺傷する能力を発揮する形質導入リンパ球（たとえばＣＤ８$^+$セントラルメモリー細胞）が選択される。

【０１８９】

さらに別の実施形態においては、特定の種類のがんについて確立されたインビボ動物モデルにおいて持続可能な、形質導入キメラ受容体発現Ｔ細胞が選択される。いくつかの実施形態においては、短いスペーサー領域を備えた形質導入キメラ受容体ＣＤ８$^+$セントラルメモリー細胞は、インビボ動物モデルに導入後、３日間以上、１０日間以上、２０日間以上、３０日間以上、４０日間以上、または５０日間以上にわたってインビボで持続可能であったことが示された。

【０１９０】

本開示は、本発明の組成物においてＣＤ４$^+$Ｔ細胞とＣＤ８$^+$Ｔ細胞の組み合わせを使用することを包含する。一実施形態において、キメラ受容体により形質導入されたＣＤ４$^+$細胞の組み合わせは、同じリガンドに特異的である形質導入キメラ受容体発現ＣＤ８$^+$細胞と組み合わせてもよく、あるいは異なる腫瘍リガンドに特異的であるＣＤ８$^+$Ｔ細胞と組み合わせてもよい。別の実施形態においては、形質導入キメラ受容体発現ＣＤ８$^+$細胞は、腫瘍上に発現された別のリガンドに特異的な形質導入キメラ受容体発現ＣＤ４$^+$細胞と組み合わせる。さらに別の実施形態においては、キメラ受容体で改変されたＣＤ４$^+$細胞とＣＤ８$^+$細胞とを組み合わせる。いくつかの実施形態においては、ＣＤ８$^+$細胞とＣＤ４$^+$細胞は、様々な比率で組み合わせることができ、たとえば、ＣＤ８$^+$とＣＤ４$^+$とを１：１の比率で組み合わせることができ、ＣＤ８$^+$とＣＤ４$^+$とを１０：１の比率で組み合わせることができ、ＣＤ８$^+$とＣＤ４$^+$とを１００：１の比率で組み合わせること

ができ、またはこれらの比率のいずれかの間にある任意の他の比率でＣＤ８$^{+}$とＣＤ４$^{+}$とを組み合わせることができる。いくつかの実施形態においては、組み合わされた細胞集団は、インビトロおよび／またはインビボにおいて細胞増殖を試験し、細胞の増殖が見られる細胞比率を選択する。

【０１９１】

形質導入を行った後および／またはキメラ受容体を有する細胞を選択した後、得られた各細胞集団は、ヒト対象中への少なくとも１回の注入に十分な数に達するまでインビトロにおいて増殖させることが好ましく、少なくとも１回の注入に十分な細胞数としては、典型的には、約10^{4}細胞／ｋｇ～10^{9}細胞／ｋｇが挙げられる。いくつかの実施形態においては、前記形質導入細胞は、抗原を有する細胞、抗ＣＤ３、抗ＣＤ２８、およびＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、もしくはＩＬ－２１、またはそれらの組み合わせの存在下で培養される。

【０１９２】

いくつかの実施形態においては、インビトロまたはインビボにおいてサイトカイン刺激、抗原または腫瘍標的に応答して増殖するＣＤ４$^{+}$細胞およびＣＤ８$^{+}$細胞が選択される。たとえば、抗ＣＤ３および／または抗ＣＤ２８で刺激した際に、活発に増殖する形質導入ＣＤ４$^{+}$細胞または形質導入ＣＤ８$^{+}$細胞が選択される。いくつかの実施形態においては、誘導可能なプロモーターの制御下および導入遺伝子の誘導因子（たとえば薬物）の存在下において形質導入細胞を刺激すると、導入遺伝子の発現が増強される。

【０１９３】

ＣＤ４$^{+}$細胞の亜集団とＣＤ８$^{+}$細胞の亜集団とを組み合わせてもよい。特定の一実施形態においては、改変されたナイーブＣＤ４$^{+}$細胞またはセントラルメモリーＣＤ４$^{+}$細胞と、改変されたセントラルメモリーＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞とを組み合わせることによって、抗原を有する細胞（たとえば腫瘍細胞）に対して相乗的な細胞傷害性効果を提供する。

【０１９４】

組成物

本発明の開示は、本明細書に記載の遺伝子改変Ｔリンパ球製剤を含む養子細胞免疫療法組成物を提供する。いくつかの実施形態においては、前記Ｔリンパ球製剤は、キメラ受容体を有するＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞を含み、該キメラ受容体は、本明細書に記載されているように、薬物による誘導の可能なプロモーターの制御下において前記疾患または障害に関連するリガンドに特異的な細胞外抗体可変ドメイン、スペーサー領域、膜貫通ドメイン、およびＴ細胞受容体またはその他の受容体の細胞内シグナル伝達ドメインを含む。別の実施形態においては、養子細胞免疫療法組成物は、キメラ受容体により改変された腫瘍特異的ＣＤ８$^{+}$細胞傷害性Ｔリンパ球製剤をさらに含み、該細胞傷害性Ｔリンパ球製剤が、細胞性免疫応答を提供し、キメラ受容体を有するＣＤ８＋Ｔ細胞を含み、該キメラ受容体が、本明細書に記載されているように、薬物による誘導の可能なプロモーターの制御下において、前記疾患または障害に関連するリガンドに特異的な細胞外一本鎖抗体、スペーサー領域、膜貫通ドメイン、およびＴ細胞受容体の細胞内シグナル伝達ドメインを含むことを特徴とする。いくつかの実施形態においては、本発明において開示された、前記キメラ受容体により改変されたＴ細胞集団は、インビボにおいて少なくとも３日またはそれ以上にわたって持続することができる。別の一実施形態においては、前記の各細胞集団は互いに組み合わせることも、別の細胞種と組み合わせることもでき、これによって組成物が提供される。

【０１９５】

いくつかの実施形態においては、前記ＣＤ４$^{+}$Ｔヘルパーリンパ球は、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細胞またはバルクＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞である。いくつかの実施形態においては、前記ＣＤ４$^{+}$ヘルパーリンパ球は、ナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞であり、該ナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞は、ＣＤ４５ＲＯ$^{-}$Ｔ細胞、ＣＤ４５ＲＡ$^{+}$Ｔ細胞、および／またはＣＤ６２Ｌ$^{+}$ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞を含む。

【０１９６】
いくつかの実施形態においては、前記ＣＤ８＋Ｔ細胞傷害性リンパ球は、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細胞および／またはバルクＣＤ８＋Ｔ細胞である。いくつかの実施形態においては、前記ＣＤ８＋細胞傷害性Ｔリンパ球は、セントラルメモリーＴ細胞であり、該セントラルメモリーＴ細胞は、ＣＤ４５ＲＯ＋Ｔ細胞、ＣＤ６２Ｌ＋Ｔ細胞および／またはＣＤ８＋Ｔ細胞を含む。さらに別の実施形態では、前記ＣＤ８＋細胞傷害性Ｔリンパ球はセントラルメモリーＴ細胞であり、前記ＣＤ４＋ヘルパーＴリンパ球はナイーブＣＤ４＋Ｔ細胞またはセントラルメモリーＣＤ４＋Ｔ細胞である。

【０１９７】
いくつかの実施形態においては、前記組成物はＴ細胞前駆細胞を含む。いくつかの実施形態においては、前記組成物は造血幹細胞を含む。いくつかの実施形態においては、組成物は、第１の宿主細胞と第２の宿主細胞とを含み、該第１の宿主細胞は、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細胞およびバルク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、またはナイーブ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細胞およびバルクＣＤ４＋Ｔ細胞からなる群から選択されるＣＤ４＋Ｔヘルパーリンパ球であり、前記第２の宿主細胞はＴ細胞前駆細胞である。いくつかの実施形態においては、前記Ｔ細胞前駆細胞は造血幹細胞である。

【０１９８】
方法
本発明の開示は、養子免疫療法組成物の製造方法、および、疾患または障害を有する対象において細胞免疫療法を行うための、該組成物の使用、または疾患または障害を有する対象において組成物を使用して細胞免疫療法を行う方法を提供する。
いくつかの実施形態においては、前記組成物の製造方法は、改変されたナイーブＣＤ４＋Ｔヘルパー細胞またはセントラルメモリーＣＤ４＋Ｔヘルパー細胞を得ることを含み、前記改変されたヘルパーＴリンパ球製剤が、キメラ受容体を有するＣＤ４＋Ｔ細胞を含み、該キメラ受容体が、本明細書に記載されているように、誘導可能なプロモーターの制御下で、腫瘍細胞の表面分子に特異的なリガンド結合ドメイン、スペーサードメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含むことを特徴とする。別の実施形態では、ＣＤ４＋細胞は、誘導可能なプロモーターの制御下にあるサイトカイン受容体またはケモカイン受容体を有する。

【０１９９】
別の一実施形態では、前記方法は、改変されたＣＤ８＋セントラルメモリーＴ細胞を得ることをさらに含み、該改変されたセントラルメモリーＣＤ８　Ｔリンパ球製剤は、キメラ受容体を有するＣＤ８＋細胞を含み、該キメラ受容体は、本明細書に記載されているように、誘導可能なプロモーターの制御下で、リガンド結合ドメイン、スペーサードメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含み、該リガンド結合ドメインがリガンドに特異的であること、前記リガンドが、腫瘍に特異的な、分子、ウイルス分子または標的細胞集団に発現されているその他の分子であること、ならびに前記リガンドが、リンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することができることを特徴とする。別の実施形態では、ＣＤ４＋細胞は、誘導可能なプロモーターの制御下にあるサイトカイン受容体またはケモカイン受容体を有する。

【０２００】
前記改変されたＣＤ４＋Ｔ細胞および前記改変されたＣＤ８＋細胞傷害性Ｔ細胞における薬物による誘導の可能なプロモーターは、同じものであっても異なるものであってもよい。いくつかの実施形態においては、一細胞集団において、キメラ抗原受容体に連結されたプロモーターは構成的プロモーターであり、別の集団において、キメラ抗原受容体に連結されたプロモーターは誘導可能なプロモーターである。たとえば、キメラ受容体を有する改変されたＣＤ４＋Ｔ細胞は、構成的プロモーターの制御下において、腫瘍細胞の表面

分子に特異的なリガンド結合ドメイン、スペーサードメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含み、これに対して、ＣＤ８＋細胞傷害性Ｔ細胞集団中に含まれる、キメラ受容体を有するＣＤ８＋細胞は、誘導可能なプロモーターの制御下において、腫瘍細胞の表面分子に特異的なリガンド結合ドメイン、スペーサードメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【０２０１】

いくつかの実施形態では、ＣＤ４＋細胞集団およびＣＤ８＋細胞集団において前記ポリヌクレオチドによってコードされるキメラ抗原受容体は、異なるものであってもよい。これらの２種の構築物の差異としては、抗原またはエピトープに対するリガンド結合ドメインの特異性または親和性、スペーサー領域の長さおよび配列、ならびに細胞内シグナル伝達成分が挙げられる。

【０２０２】

キメラ受容体で改変されたＣＤ４＋細胞およびＣＤ８＋細胞の調製は、本明細書を通して説明されている。抗原特異的Ｔリンパ球は、疾患または障害を有する患者から得ることができ、また、抗原の存在下、インビトロにおいてＴリンパ球を刺激することによっても調製することができる。抗原特異性によって選択されなかったＣＤ４＋Ｔリンパ球亜集団および／またはＣＤ８＋Ｔリンパ球亜集団も本明細書に記載の方法で単離することができ、前記製造方法に組み込むことができる。

【０２０３】

いくつかの実施形態においては、このような細胞集団の組み合わせは、細胞表面マーカーの均一性、すなわち少なくとも２世代にわたり増殖する能力を評価して、均一な細胞分化状態を有するかどうかを確認することができる。品質管理は、前記標的リガンドを発現する細胞株を、キメラ受容体により改変されたＴ細胞およびキメラ抗原受容体の発現を誘導する薬物とともに共培養し、該誘導因子の存在下において、当技術分野で公知の細胞傷害アッセイ、増殖アッセイ、またはサイトカイン産生アッセイを使用して、該キメラ受容体により改変されたＴ細胞が該細胞株を認識するかどうかを確認することによって実施することができる。前記キメラ受容体により改変されたＴ細胞の細胞分化状態および細胞表面マーカーは、フローサイトメトリーによって測定することができる。いくつかの実施形態において、前記ＣＤ８＋細胞の前記マーカーおよび細胞分化状態は、ＣＤ３、ＣＤ８、ＣＤ６２Ｌ、ＣＤ２８、ＣＤ２７、ＣＤ６９、ＣＤ２５、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＣＤ４５ＲＯおよび／またはＣＤ４５ＲＡを含む。いくつかの実施形態において、前記ＣＤ４＋細胞の前記マーカーおよび細胞分化状態は、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ６２Ｌ、ＣＤ２８、ＣＤ２７、ＣＤ６９、ＣＤ２５、ＰＤ－１およびＣＴＬＡ－４ ＣＤ４５ＲＯおよび／またはＣＤ４５ＲＡを含む。

【０２０４】

いくつかの実施形態においては、本明細書に記載のキメラ受容体により改変された前記Ｔ細胞は、インビボにおいて少なくとも３日間または少なくとも１０日間にわたって持続することができる。いくつかの実施形態においては、本明細書に記載のキメラ受容体により改変された前記Ｔ細胞は、ＣＦＳＥ色素希釈による測定によれば、インビボにおいて少なくとも２世代または少なくとも３世代にわたって増殖することができる。前記キメラ受容体により改変されたＴ細胞の増殖および持続性は、前記疾患または障害の動物モデルを使用し、前記細胞を投与し、移入された細胞の持続能力および／または増殖能力を算出することによって、測定することができる。別の実施形態において、増殖および活性化は、抗原を有する細胞を使用して複数回にわたって活性化することによって、インビトロで試験することができる。

【０２０５】

また、本発明の開示は、疾患または障害を有する対象において細胞免疫療法を行う方法であって、薬物による誘導の可能なプロモーターの制御下において本明細書に記載のキメラ受容体を発現するリンパ球を含む組成物を投与すること、および前記薬物を投与することを含む方法を提供する。

【０２０６】
いくつかの実施形態において、前記薬物は、本明細書に記載されているように、タモキシフェン、ならびにそのバリアント、誘導体、薬学的に許容される塩、溶媒和物、および水和物である。いくつかの実施形態においては、前記薬物は、前記組成物の投与前、前記組成物の投与と同時、または前記組成物が投与された後の任意の時間点において送達される。
【０２０７】
いくつかの実施形態において、前記薬物は前記組成物とともに投与され、前記組成物による毒性作用が見られた場合、前記薬物の投与は毒性作用が低減するまで中止される。毒性による症状が低減した後、前記薬物の投与を再開する。いくつかの実施形態においては、毒性による症状が低減した後に前記薬物の投与を再開してもよい。
【０２０８】
いくつかの実施形態においては、前記薬物は前記組成物とともに投与されるが、対象において腫瘍体積の減少またはがん細胞数の減少が見られた場合は、前記改変細胞を休ませるのに適切な期間にわたって前記薬物の投与を中止し、前記改変細胞の活性が見られない場合は、がんは寛解しており、改変細胞は必要とされない。
【０２０９】
別の実施形態においては、本発明の方法は、
遺伝子改変細胞傷害性Ｔリンパ球製剤および／または遺伝子改変ヘルパーＴリンパ球製剤を対象に投与すること、ならびに
誘導可能なプロモーターを誘導する薬物を投与することを含み、
該細胞傷害性Ｔリンパ球製剤が、細胞性免疫応答を提供し、かつキメラ受容体を有するＣＤ８$^{+}$細胞を含み、
該キメラ受容体が、本明細書に記載されているように、薬物による誘導の可能なプロモーター制御の下において、リガンド結合ドメイン、スペーサードメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含み、
前記リガンド結合ドメインがリガンドに特異的であり、
前記リガンドが、腫瘍に特異的な、分子、ウイルス分子または標的細胞集団に発現されている別の分子であり、かつリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導可能であること、ならびに
前記ヘルパーＴリンパ球製剤が、腫瘍の直接認識を誘導するとともに、前記遺伝子改変細胞傷害性Ｔリンパ球製剤が細胞性免疫応答を媒介する能力を増強し、かつキメラ受容体を有するＣＤ４$^{+}$ Ｔ細胞を含み、
該キメラ受容体が、本明細書に記載されているように、構成的プロモーターまたは薬物による誘導の可能なプロモーターの制御下において、リガンド結合ドメイン、スペーサードメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含み、
該リガンド結合ドメインがリガンドに特異的であり、
前記リガンドが、腫瘍に特異的な、分子、ウイルス分子または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、かつリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導可能であることを特徴とする。
いくつかの実施形態においては、前記薬物の投与は、前記組成物または前記宿主細胞の投与後に行い、前記組成物または前記宿主細胞の投与から１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、２週間、４週間もしくは２ヶ月が経過した後、またはこれらの時間点のいずれか２つの間にある任意の時間が経過した後に前記薬物の投与を行う。
【０２１０】
別の実施形態では、前記方法は、
遺伝子改変細胞傷害性Ｔリンパ球製剤および／または遺伝子改変ヘルパーＴリンパ球製剤を前記対象に投与すること、ならびに
誘導可能なプロモーターを誘導する薬物を投与することを含み、
前記細胞傷害性Ｔリンパ球製剤が、細胞性免疫応答を提供し、かつキメラ受容体を有す

るＣＤ８＋Ｔ細胞を含み、該キメラ受容体が、本明細書に記載されているように、構成的プロモーターの制御下において、腫瘍細胞の表面分子に特異的なリガンド結合ドメイン、スペーサードメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含むこと、ならびに

前記ヘルパーＴリンパ球製剤が、直接的な腫瘍認識を誘導するとともに、前記細胞傷害性Ｔリンパ球の細胞性免疫応答を媒介する能力を増強し、かつキメラ受容体を有するＣＤ４＋Ｔ細胞を含み、該キメラ受容体が、本明細書に記載されているように、構成的プロモーターまたは前記薬物による誘導の可能なプロモーターの制御下において、腫瘍細胞の表面分子に特異的なリガンド結合ドメイン、スペーサードメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含むことを特徴とする。

いくつかの実施形態においては、腫瘍に特異的な前記分子は腫瘍の表面分子である。

【０２１１】

別の実施形態においては、本発明の方法は、

遺伝子改変細胞傷害性Ｔリンパ球製剤および／または遺伝子改変ヘルパーＴリンパ球製剤を対象に投与すること、ならびに

誘導可能なプロモーターを誘導する薬物を投与することを含み、

前記細胞傷害性Ｔリンパ球製剤が、細胞性免疫応答を提供し、かつＣＤ８＋Ｔ細胞を含み、該ＣＤ８＋Ｔ細胞が、本明細書に記載されているように、誘導可能なプロモーターの制御下において、サイトカイン、ケモカイン受容体、アポトーシスを制御するポリペプチド、および／またはチェックポイントシグナル伝達を調節するポリペプチドを発現すること、ならびに

前記ヘルパーＴリンパ球製剤が、腫瘍の直接認識を誘導するとともに、前記遺伝子改変細胞傷害性Ｔリンパ球製剤が細胞性免疫応答を媒介する能力を増強し、かつＣＤ４＋Ｔ細胞を含み、該ＣＤ４＋Ｔ細胞が、本明細書に記載されているように、構成的プロモーターまたは薬物による誘導の可能なプロモーター制御下において、サイトカイン、ケモカイン受容体、アポトーシスを制御するポリペプチド、および／またはチェックポイントシグナル伝達を調節するポリペプチドを発現することを特徴とする。

いくつかの実施形態においては、１つ以上の前記細胞集団は、構成的プロモーターの制御下でキメラ抗原受容体を発現する。いくつかの実施形態においては、チェックポイントシグナル伝達を調節することによって、負のチェックポイント制御因子を抑制する。いくつかの実施形態においては、前記負のチェックポイント制御因子は、ＶＩＳＴＡ、ＬＡＧ－３および／またはＴＩＭ３を含む。

【０２１２】

発現の誘導に有効な薬物の量は、形質導入細胞の少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも１００％においてキメラ抗原受容体を誘導することができる薬物量、またはこれらのパーセント値のいずれかの間にある任意の数値の形質導入細胞においてキメラ抗原受容体を誘導することができる薬物量である。

【０２１３】

別の一実施形態は、疾患または障害を有する対象において細胞免疫療法を行う方法であって、

前記対象の生体試料を分析して、前記疾患または障害に関連する標的分子の存在を検出すること、

本明細書に記載の養子免疫療法組成物を投与すること、および

前記誘導可能なプロモーターを誘導する薬物を投与することを含み、

前記キメラ受容体が、前記標的分子に特異的に結合することを特徴とする方法に関する。

【０２１４】

本発明によって治療することができる対象は、通常、ヒトまたは他の霊長類の対象であり、たとえば、獣医学の対象となるサルおよび類人猿である。対象は雄性でも雌性でもよ

く、任意の適切な年齢であってもよく、たとえば、幼児、幼年者、若年者、成人、および高齢者の対象が挙げられる。

【０２１５】

本発明の方法は、たとえば、血液悪性腫瘍、黒色腫、乳がん、脳がん、その他の上皮悪性腫瘍または固形腫瘍の治療または抑制に有用である。いくつかの実施形態において、これらの疾患または障害と関連する分子は、オーファンチロシンキナーゼ受容体ＲＯＲ１、Ｈｅｒ２、ＥＧＦＲ、ＣＥ７、ｈＢ７Ｈ３、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、メソテリン（mesothelin）、ＣＥＡ、またはＢ型肝炎表面抗原である。

【０２１６】

本明細書に記載の方法を用いて処置することができる対象としては、がんを有すると同定または選択された対象が挙げられ、該がんとしては、大腸がん、肺がん、肝臓がん、乳がん、腎臓がん、前立腺がん、卵巣がん、皮膚がん（黒色腫を含む）、骨がん、および脳がんなどが挙げられるが、これらに限定されない。がん患者の同定および／または選択は、臨床的評価または診断的評価によって行うことができる。いくつかの実施形態においては、腫瘍関連抗原または腫瘍関連分子が知られており、該腫瘍としては、黒色腫、乳がん、脳がん、扁平上皮腫、大腸がん、白血病、骨髄腫、および／または前立腺がんなどが挙げられる。別の実施形態においては、前記腫瘍関連分子は、遺伝子改変キメラ受容体を発現する遺伝子改変Ｔ細胞で標的化することができる。前記がんとしては、Ｂ細胞リンパ腫、乳がん、脳がん、前立腺がん、および／または白血病が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２１７】

前述のように製造された細胞は、本発明の開示を踏まえ、当業者であれば容易に理解できる公知の技術またはその変法に従って、養子免疫療法のための方法および組成物において使用することができる。

【０２１８】

いくつかの実施形態において、前記細胞の製剤化は、まず該細胞を培地から回収し、次いで該細胞を洗浄し、投与に適した培地および容器システム（「薬学的に許容され得る」担体）中において該細胞を治療有効量まで濃縮することによって行われる。適切な注入用培地は、任意の等張性培地製剤であってもよく、典型的には、生理食塩水、Normosol R（アボット）もしくはPlasma-Lyte A（バクスター）、５％デキストロース水溶液、または乳酸リンゲル液を使用することができる。前記注入用培地には、ヒト血清アルブミン、ウシ胎児血清、またはその他のヒト血清成分を添加してもよい。

【０２１９】

いくつかの実施形態においては、組成物中の細胞の治療有効量または抑制有効量は、形質導入されたＣＤ４細胞もしくはＣＤ８細胞の量、または少なくとも２つの細胞サブセット（たとえば、$CD8^+$セントラルメモリーＴ細胞の１つのサブセットと$CD4^+$ヘルパーＴ細胞の１つのサブセット）の量を指す。より典型的には、10^2個を超えかつ10^6個以下の細胞であり、または10^8個以下または10^9個以下の細胞であり、たとえば10^8個または10^9個であってもよく、10^{10}個を超える数の細胞であってもよい。細胞の数は、前記組成物の最終的な用途や、該組成物に含まれる細胞種などによって決定される。たとえば、特定の抗原に特異的な細胞が所望される場合、前記集団を占める該細胞の割合は７０％を超え、一般的には、８０％を超え、８５％を超え、あるいは前記集団全体の９０～９５％を占める。本明細書に記載の用途において、前記細胞の量は通常１Ｌ以下であり、５００ｍｌ以下であってもよく、さらには２５０ｍｌ以下もしくは１００ｍｌ以下であってもよく、これらの量のいずれか２つの間にある量であってもよい。したがって、前記所望の細胞の密度は、典型的には、10^4細胞／ｍｌよりも大きく、通常10^7細胞／ｍｌよりも大きく、通常10^8細胞／ｍｌ以上である。臨床用途に適したこのような数の免疫細胞は、複数の注入に分割して投与してもよく、その累積投与量は10^6個、10^7個、10^8個、10^8個、10^9個、10^{10}個、もしくは10^{11}個の細胞、もしくはこれらの細胞数以上の細胞、またはこれらの値のいずれか２つで示されるエンドポ

イントで定義される任意の細胞数に相当する。

【０２２０】

いくつかの実施形態において、本発明のリンパ球は、個体に免疫を付与するために使用することができる。「免疫」は、病原体の感染に対する応答またはリンパ球反応の標的となる腫瘍に対する応答に伴う１つ以上の身体症状を軽減することを意味する。前記細胞の投与量は、通常、病原体に対する免疫を備える正常個体の体内に存在する量の範囲内である。したがって、細胞は、通常、注入によって投与され、１回の注入あたり２個以上から少なくとも$１０^{６}$個～３×１０^{１０}個までの範囲の数の細胞が投与され、少なくとも$１０^{７}$個～$１０^{９}$個の細胞を注入することが好ましい。前記Ｔ細胞は、単回の注入によって、または特定の期間における複数回の注入によって投与することができる。しかしながら、個体によって反応性が異なると考えられるため、注入する細胞の種類および細胞の量、ならびに注入の回数および複数回の注入を実施する期間は主治医によって決定され、日常的な検査によっても決定することができる。十分な量のＴリンパ球（細胞傷害性Ｔリンパ球および／またはヘルパーＴリンパ球を含む）の作製は、本明細書に例示したような、本発明による迅速な増殖方法を用いて容易に行うことができる。

【０２２１】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の組成物は、同定または選択された対象（たとえば、黒色腫、乳がん、脳がん、扁平上皮腫、大腸がん、白血病、骨髄腫、および／もしくは前立腺がんを有することが同定または選択された対象）に静脈内投与、腹腔内投与、腫瘍内投与、骨髄内投与、リンパ節内投与、かつ／または脳脊髄液内投与される。いくつかの実施形態において、キメラ受容体により遺伝子改変された前記組成物は、腫瘍部位に送達される。あるいは、本明細書に記載の組成物は、本発明の細胞を腫瘍または免疫コンパートメントに標的化させるとともに、肺などの部位を避けることが可能な化合物と組み合わせることができる。

【０２２２】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の組成物は、化学療法剤および／または免疫抑制剤とともに投与される。別の一実施形態においては、まず、本発明の免疫細胞以外の免疫細胞を抑制または殺傷する化学療法剤を患者に投与してから、本明細書に記載の組成物を投与する。場合によっては、化学療法を完全に省いてもよい。

【０２２３】

いくつかの実施形態においては、本発明の方法は、全身腫瘍組織量が減少するまで、本明細書に記載の改変Ｔ細胞と前記誘導因子（たとえば誘導を行うことの可能な薬物）とを組み合わせて投与することを含む。全身腫瘍組織量が減少すれば、誘導薬物の投与を中止して、キメラ抗原受容体の発現をオフに切り換え、キメラ抗原受容体を発現するＴ細胞の数を減少させてもよい。別の実施形態においては、腫瘍増殖の再発または増強が生じた場合に、別の時間点において前記誘導薬物を投与して、キメラ抗原受容体の発現をオンに切り換えてもよい。

【０２２４】

別の実施形態においては、前記細胞の持続的な刺激によるアナジーまたは応答不能状態を回避するため、前記誘導薬物を数日間、数週間または数ケ月間にわたって投与してから、数日間、数週間、または数ケ月間にわたって投与を中止し、その後、数日間、数週間、または数ケ月間にわたって再投与することによって、前記キメラ抗原受容体の発現を周期的に切り替えてもよい。

【０２２５】

デュアルパッケージされたレンチウイルスベクター構築および調製

7xHBD/mE1b-CD19t-her2t-T2A-epHIV7をコードする誘導可能なレンチウイルスベクターを構築した。CD19tに特異的なキメラ受容体は以下のもの用いて構築した。

（１）$(G_4S)_3$リンカー（配列番号１２）ペプチドを介して連結された、CD19特異的mAb FMC63（配列番号３）のＶＬ鎖セグメントおよびＶＨ鎖セグメント（VL-リンカー-VH）。

（２）IgG4-Fcヒンジのみに由来するスペーサードメイン（（配列番号４）によってコー

ドされる１２個のアミノ酸からなる配列）。スペーサーはヒンジドメイン内にＳ→Ｐ置換を有し、この置換位置は天然型IgG4-Fcタンパク質の１０８番目のアミノ酸に相当する。ヒトCD28の膜貫通ドメイン（２７アミノ酸長）（Uniprot Database: P10747（配列番号１４））。
（４）（ｉ）天然型のCD28タンパク質の１８６～１８７番目にＬＬ→ＧＧ置換を有する、ヒトCD28の細胞内ドメイン（４１アミノ酸長）（配列番号１４）；および／または
（ii）ヒト4-1BBの細胞内ドメイン（４２アミノ酸長）（Uniprot Database: Q07011（配列番号１５））のいずれかを含み；
（iii）ヒトCD3ζのアイソフォーム３の細胞内ドメイン（１１２アミノ酸長）（Uniprot Database: P20963（配列番号１６））に連結されている、シグナル伝達モジュール。

【０２２６】
CD19tをコードする核酸配列は、Her2tをコードする配列（配列番号４４）および自己切断T2A配列（配列番号８）をコードする配列と連結させた。

【０２２７】
7xHBD/mEF1ap-ZsGreen-epHIV7をコードする条件的レンチウイルスベクターを構築した。合成プロモーター7xHBD/mEF1apは、ヒトアルブミンプロモーターからクローニングした肝細胞核ファミリー－１（ＨＮＦ－１）の７つの最小結合部位と、huEF1αプロモーターのTATAボックスとを組み合わせることによって構築した。7xHBD/mEF1apの配列を配列番号４１に示す。このようなベクターを使用することによって、タモキシフェンの存在下においてのみ、HEA-3が7xHBD/EF1mpプロモーターに結合することによって、導入遺伝子の発現の「オン」の状態が誘導される。

【０２２８】
7xHBD/mEF1ap-CD19t-T2A-DHFRdm_epHIV7をコードする条件的レンチウイルスベクターを構築した。CD19tに特異的なキメラ受容体は以下のもの用いて構築した。
（１）$(G_4S)_3$リンカー（配列番号１２）ペプチドを介して連結された、CD19特異的mAb FMC63（配列番号３）のＶＬ鎖セグメントおよびＶＨ鎖セグメント（VL-リンカー-VH）。
（２）IgG4-Fcヒンジのみに由来するスペーサードメイン（（配列番号４）によってコードされる１２個のアミノ酸からなる配列）。スペーサーはヒンジドメイン内にＳ→Ｐ置換を有し、この置換位置は天然型IgG4-Fcタンパク質の１０８番目のアミノ酸に相当する。ヒトCD28の膜貫通ドメイン（２７アミノ酸長）（Uniprot Database: P10747（配列番号１４））。
（４）（ｉ）天然型のCD28タンパク質の１８６～１８７番目にＬＬ→ＧＧ置換を有する、ヒトCD28の細胞内ドメイン（４１アミノ酸長）（配列番号１４）；および／または
（ii）ヒト4-1BBの細胞内ドメイン（４２アミノ酸長）（Uniprot Database: Q07011（配列番号１５））のいずれかを含み；
（iii）ヒトCD3ζのアイソフォーム３の細胞内ドメイン（１１２アミノ酸長）（Uniprot Database: P20963（配列番号１６））に連結されている、シグナル伝達モジュール。

【０２２９】
CD19tをコードする核酸配列は、自己切断T2A配列をコードする配列（配列番号８）およびDHFRdmをコードする配列（配列番号４６）と連結させた。

【０２３０】
転写制御因子HEA-3は、ヒト由来サブユニットを含むキメラ転写因子であり、肝細胞核因子1-α（HNF-1α）のN末端に存在するDNA結合ドメインが、エストロゲン受容体のリガンド結合ドメイン（ER-LBD）のタモキシフェン特異的変異リガンド結合ドメインにインフレームで融合されており、このタモキシフェン特異的変異リガンド結合ドメインがさらにNF-κβのp65活性化ドメイン（p65）に融合されている。タモキシフェンの非存在下では、細胞質内の熱ショックタンパク質90（HSP90）がタモキシフェン結合活性部位に結合することによって、HEA-3が核内から排除されるため、導入遺伝子の発現は「オフ」の状態となる。細胞質内にナノモル濃度のタモキシフェンが存在すると、ER-LBDへの結合に対してHSP90と活発に競合することによってこれを阻害し、HEA-3の核内への転座が生じる。核

内への転座が起こると、HEA-3は、自体の特異的結合部位である合成プロモーターと結合することが容易となる。導入遺伝子をHEA-3応答性合成プロモーター（7xHBD/EF1mp）の下流に配置した場合に、タモキシフェンの存在下においてHEA-3に応答した転写反応が起こる。

【０２３１】

転写活性化因子HEA3コードするポリヌクレオチド（配列番号３９）およびマーカー配列EGFRtコードするポリヌクレオチド（配列番号９）に構成的プロモーターEF-1αを連結させることによって、構成的構築物を構築した。

【０２３２】

各導入遺伝子をコードするヒトコドン最適化ヌクレオチド配列を合成し（LifeTechnologies、カールズバッド、ＣＡ）、ＮｈｅＩおよびＮｏｔ１制限部位を用いて、epHIV7レンチウイルスベクターにクローニングした。このepHIV7レンチウイルスベクターは、pHIV7のサイトメガロウイルスプロモーターをEF-1プロモーターと置き換えることによってpHIV7ベクターから作製した。

【０２３３】

誘導可能なCD19キメラ受容体をコードする構成的レンチウイルスは、Calphosトランスフェクション試薬（Clontech）を用いて、レンチウイルスベクターならびにパッケージングベクターpCHGP-2、pCMV-Rev2、およびpCMV-Gを共トランスフェクションした２９３Ｔ細胞において産生させた。トランスフェクションの１６時間後に培地を交換し、トランスフェクションの２４時間後、４８時間後および７２時間後にレンチウイルスを回収した。

【０２３４】

タモキシフェンによる誘導によってCD19キメラ受容体およびZsGreenを発現するJurkat T細胞株の作製

Jurkat細胞を３２℃、2,100rpmで４５分間遠心分離して活性化してから３日目に、1μg/mLポリブレン（Millipore）を添加したレンチウイルスの培養上清（ＭＯＩ＝３）を用いて形質導入した。１０％ヒト血清、２ｍＭ Ｌ－グルタミン、および１％ペニシリン－ストレプトマイシンを含むRPMI（ＣＴＬ培地）中で前記Ｔ細胞を増殖させ、最終濃度が５０Ｕ／ｍＬとなるように組換えヒト（ｒｈ）ＩＬ－２を４８時間毎に添加した。

【０２３５】

さらなる実施形態

いくつかの実施形態においては、キメラ抗原受容体の発現誘導システムであって、

ａ）第１の核酸および

ｂ）第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつリガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されており、該リガンド結合ドメインがリガンドに特異的であり、該リガンドが、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子、または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能であり、前記第１の核酸が、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含むこと；ならびに

前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とするシステムが提供される。

いくつかの実施形態においては、前記スペーサーは、前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されるように最適化されている。いくつかの実施形態においては、前記薬物は、タモキシフェンおよび／またはその代謝産物である。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは配列番号４１の核酸配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは構成的プロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモータ

ーは、前記ＥＦ１αｐである。いくつかの実施形態においては、前記転写活性化因子は、配列番号４０の配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は第１のベクターをさらに含み、前記第２の核酸は第２のベクターをさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第１のベクターおよび第２のベクターは、単一のウイルスベクターにパッケージされている。いくつかの実施形態においては、前記ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸および第２の核酸はベクターを含む。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は、選択マーカーをコードする核酸配列をさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、選択マーカーをコードする核酸をさらに含む。

【０２３６】

いくつかの実施形態においては、キメラ抗原受容体の発現誘導システムは、第１の核酸および第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつサイトカイン、ケモカイン、アポトーシスを制御するポリペプチドおよび／またはチェックポイントシグナル伝達を調節するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されていること、ならびに

前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とする。

いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、構成的プロモーターまたは誘導可能なプロモーターである。典型的な一実施形態において、前記第２の核酸は、構成的プロモーターの制御下でキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドをさらに含む。

【０２３７】

別の態様では、本発明の開示は、腫瘍特異的かつサブセット特異的な遺伝子改変ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の養子移入などによる細胞免疫療法によって媒介される免疫応答を付与かつ／または増強する組成物であって、前記ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞が、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞に能力を付与し、かつ／またはＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の能力を増強することによって、抗腫瘍反応を維持し、腫瘍特異的な増殖を増加させかつ／または最大限にすることを特徴とする組成物を提供する。いくつかの実施形態においては、本明細書に記載されているように、前記ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞は、制御されたプロモーターの制御下でキメラ受容体の核酸配列および／またはキメラ受容体ポリペプチドを発現するように遺伝子改変されている。

【０２３８】

別の一態様では、本発明の開示は、腫瘍特異的かつサブセット特異的な遺伝子改変ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の養子移入などによる細胞免疫療法によって媒介される免疫応答を付与かつ／または増強する組成物を提供する。いくつかの実施形態においては、本明細書に記載されているように、前記ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞は、制御されたプロモーターの制御下でキメラ受容体の核酸配列および／またはキメラ受容体ポリペプチドを発現する。

【０２３９】

別の一実施形態では、本発明は、疾患または障害を有する対象において細胞免疫療法を行う方法あって、細胞性免疫応答を提供する遺伝子改変Ｔリンパ球製剤を該対象に投与すること、および該遺伝子改変Ｔリンパ球内の導入遺伝子を誘導する薬物を投与することを含む方法を提供する。

【０２４０】

いくつかの実施形態においては、前記遺伝子改変ＣＤ８$^{+}$細胞集団および前記遺伝子改変ＣＤ４$^{+}$細胞集団を共投与する。いくつかの実施形態においては、前記Ｔ細胞は自己由来Ｔ細胞または同種異系Ｔ細胞である。上記の方法の様々な変法も可能である。たとえば、前記ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞および前記ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞によって発現されるキメラ受容体は、同じものであっても異なるものであってもよい。

【０２４１】

いくつかの実施形態においては、キメラ抗原受容体の発現誘導システムであって、

ａ）第１の核酸および
ｂ）第２の核酸を含み、
前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつリガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されており、該リガンド結合ドメインがリガンドに特異的であり、該リガンドが、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子、または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能であり、前記第１の核酸が、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含むこと；ならびに
前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とするシステムが提供される。

いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、構成的プロモーターまたは誘導可能なプロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記薬物は、タモキシフェンおよび／またはその代謝産物である。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは配列番号４１の核酸配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは構成的プロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、前記ＥＦ１αｐである。いくつかの実施形態においては、前記転写活性化因子は、配列番号４０の配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は第１のベクターをさらに含み、前記第２の核酸は第２のベクターをさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第１のベクターおよび第２のベクターは、単一のウイルスベクターにパッケージされている。いくつかの実施形態においては、前記ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸および第２の核酸はベクターを含む。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は、選択マーカーをコードする核酸配列をさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、選択マーカーをコードする核酸をさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記スペーサーは、前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されるように最適化されている。

【０２４２】

いくつかの実施形態においては、キメラ抗原受容体の発現誘導システムであって、
ａ）第１の核酸および
ｂ）第２の核酸を含み、
前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつサイトカイン、ケモカイン受容体、アポトーシスを制御するポリペプチドまたはチェックポイントシグナル伝達を調節するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されていること、ならびに
前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とするシステムが提供される。

いくつかの実施形態においては、チェックポイントシグナル伝達を調節する前記ポリペプチドは、負のチェックポイント制御因子を抑制する。いくつかの実施形態においては、前記負のチェックポイント制御因子は、ＶＩＳＴＡ、ＬＡＧ－３および／またはＴＩＭ３を含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、リガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記リガンドは、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能である。いくつかの実施形態においては、前記スペーサーは、前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されるように最適化されており、

前記第２の核酸は、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記第２のプロモーターとは逆向きである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは抗体フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは一本鎖可変フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記腫瘍に特異的な分子は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、ＣＥ７、ＥＧＦＲ、ｈＢ７Ｈ３、メソテリン（mesothelin）、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ Ａ３ ＴＣＲ、またはこれらの組み合わせである。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、誘導可能なプロモーターまたは構成的プロモーターである。

【０２４３】

いくつかの実施形態においては、システムによってコードされるキメラ受容体ポリペプチドが提供される。

いくつかの実施形態においては、該システムは、

ａ）第１の核酸および

ｂ）第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつリガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されており、該リガンド結合ドメインがリガンドに特異的であり、該リガンドが、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子、または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能であり、前記第１の核酸が、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含むこと；ならびに

前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とする。

いくつかの実施形態においては、前記薬物は、タモキシフェンおよび／またはその代謝産物である。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは配列番号４１の核酸配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは構成的プロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、前記ＥＦ１αｐである。いくつかの実施形態においては、前記転写活性化因子は、配列番号４０の配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は第１のベクターをさらに含み、前記第２の核酸は第２のベクターをさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第１のベクターおよび第２のベクターは、単一のウイルスベクターにパッケージされている。いくつかの実施形態においては、前記ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸および第２の核酸はベクターを含む。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は、選択マーカーをコードする核酸配列をさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、選択マーカーをコードする核酸をさらに含む。

いくつかの実施形態においては、該システムは、

ａ）第１の核酸および

ｂ）第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつサイトカイン、ケモカイン受容体、アポトーシスを制御するポリペプチドまたはチェックポイントシグナル伝達を調節するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されていること、ならびに

前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とする。

いくつかの実施形態においては、チェックポイントシグナル伝達を調節する前記ポリペプチドは、負のチェックポイント制御因子を抑制する。いくつかの実施形態においては、

前記負のチェックポイント制御因子は、ＶＩＳＴＡ、ＬＡＧ－３および／またはＴＩＭ３を含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、リガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記リガンドは、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能である。いくつかの実施形態においては、前記スペーサーは、前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されるように最適化されている。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記第２のプロモーターとは逆向きである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは抗体フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記腫瘍に特異的な分子は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、ＣＥ７、ＥＧＦＲ、ｈＢ７Ｈ３、メソテリン（mesothelin）、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ Ａ３ ＴＣＲ、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される。

いくつかの実施形態においては、該システムは、

ａ）第１の核酸および

ｂ）第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつサイトカイン、ケモカイン受容体、アポトーシスを制御するポリペプチドまたはチェックポイントシグナル伝達を調節するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されていること、ならびに

前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された構成的または誘導可能な第２のプロモーターを含むことを特徴とする。

いくつかの実施形態においては、チェックポイントシグナル伝達を調節する前記ポリペプチドは、負のチェックポイント制御因子を抑制する。いくつかの実施形態においては、前記負のチェックポイント制御因子は、ＶＩＳＴＡ、ＬＡＧ－３および／またはＴＩＭ３を含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、リガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記リガンドは、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能である。いくつかの実施形態においては、前記スペーサーは、前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されるように最適化されており、前記第２の核酸は、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記第２のプロモーターとは逆向きである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは抗体フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは一本鎖可変フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記腫瘍に特異的な分子は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、ＣＥ７、ＥＧＦＲ、ｈＢ７Ｈ３、メソテリン（mesothelin）、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ Ａ３ ＴＣＲ、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態においては、前記スペーサーは、前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されるように最適化されている。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、誘導可能なプロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは構成的プロモーターである。

【０２４４】
いくつかの実施形態においては、システムを含む宿主細胞が提供される。
いくつかの実施形態においては、該システムは、
ａ）第１の核酸および
ｂ）第２の核酸を含み、
前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつリガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されており、該リガンド結合ドメインがリガンドに特異的であり、該リガンドが、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子、または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能であり、前記第１の核酸が、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含むこと；ならびに
前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とする。
いくつかの実施形態においては、前記薬物は、タモキシフェンおよび／またはその代謝産物である。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは配列番号４１の核酸配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは構成的プロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、前記ＥＦ１αｐである。いくつかの実施形態においては、前記転写活性化因子は、配列番号４０の配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は第１のベクターをさらに含み、前記第２の核酸は第２のベクターをさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第１のベクターおよび第２のベクターは、単一のウイルスベクターにパッケージされている。いくつかの実施形態においては、前記ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸および第２の核酸はベクターを含む。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は、選択マーカーをコードする核酸配列をさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、選択マーカーをコードする核酸をさらに含む。
いくつかの実施形態においては、該システムは、
ａ）第１の核酸および
ｂ）第２の核酸を含み、
前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつサイトカイン、ケモカイン受容体、アポトーシスを制御するポリペプチドまたはチェックポイントシグナル伝達を調節するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されていること、ならびに
前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とする。
いくつかの実施形態においては、チェックポイントシグナル伝達を調節する前記ポリペプチドは、負のチェックポイント制御因子を抑制する。いくつかの実施形態においては、前記負のチェックポイント制御因子は、ＶＩＳＴＡ、ＬＡＧ－３および／またはＴＩＭ３を含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、リガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記リガンドは、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能である。いくつかの実施形態においては、前記スペーサーは、前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されるように最適化されている。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記第２のプロモーターとは逆向きである。いくつかの実施形態に

おいては、前記リガンド結合ドメインは抗体フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記腫瘍に特異的な分子は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、ＣＥ７、ＥＧＦＲ、ｈＢ７Ｈ３、メソテリン（mesothelin）、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ Ａ３ ＴＣＲ、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される。

いくつかの実施形態においては、該システムは、

ａ）第１の核酸および

ｂ）第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつサイトカイン、ケモカイン受容体、アポトーシスを制御するポリペプチドまたはチェックポイントシグナル伝達を調節するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されていること、ならびに

前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された構成的または誘導可能な第２のプロモーターを含むことを特徴とする。

いくつかの実施形態においては、チェックポイントシグナル伝達を調節する前記ポリペプチドは、負のチェックポイント制御因子を抑制する。いくつかの実施形態においては、前記負のチェックポイント制御因子は、ＶＩＳＴＡ、ＬＡＧ－３および／またはＴＩＭ３を含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、リガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記リガンドは、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能である。いくつかの実施形態においては、前記スペーサーは、前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されるように最適化されており、前記第２の核酸は、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記第２のプロモーターとは逆向きである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは抗体フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは一本鎖可変フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記腫瘍に特異的な分子は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、ＣＥ７、ＥＧＦＲ、ｈＢ７Ｈ３、メソテリン（mesothelin）、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ Ａ３ ＴＣＲ、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態においては、前記スペーサーは、前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されるように最適化されている。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、誘導可能なプロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは構成的プロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記腫瘍に特異的な分子は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、ＣＥ７、ＥＧＦＲ、ｈＢ７Ｈ３、メソテリン（mesothelin）、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ Ａ３ ＴＣＲ、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は、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細胞およびバルクＣＤ８$^+$Ｔ細胞からなる群から選択される細胞傷害性ＣＤ８$^+$Ｔリンパ球である。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は、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細胞およびバルクＣＤ４$^+$Ｔ細胞からなる群から選択されるＣＤ４$^+$Ｔヘルパーリンパ球である。いくつかの実施形態においては、前記スペーサーは、前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されるように最適化されている。いくつかの実施形態においては

、前記宿主細胞はＴ細胞前駆細胞である。いくつかの実施形態においては、前記Ｔ細胞前駆細胞は造血幹細胞である。

【０２４５】

いくつかの実施形態においては、薬学的に許容される添加剤中に宿主細胞を含む組成物が提供される。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞はシステムを含む。

いくつかの実施形態においては、該システムは、

ａ）第１の核酸および

ｂ）第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつリガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されており、該リガンド結合ドメインがリガンドに特異的であり、該リガンドが、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子、または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能であり、前記第１の核酸が、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含むこと；ならびに

前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とする。

いくつかの実施形態においては、前記薬物は、タモキシフェンおよび／またはその代謝産物である。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは配列番号４１の核酸配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは構成的プロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、前記ＥＦ１αｐである。いくつかの実施形態においては、前記転写活性化因子は、配列番号４０の配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は第１のベクターをさらに含み、前記第２の核酸は第２のベクターをさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第１のベクターおよび第２のベクターは、単一のウイルスベクターにパッケージされている。いくつかの実施形態においては、前記ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸および第２の核酸はベクターを含む。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は、選択マーカーをコードする核酸配列をさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、選択マーカーをコードする核酸をさらに含む。

いくつかの実施形態においては、該システムは、

ａ）第１の核酸および

ｂ）第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつサイトカイン、ケモカイン受容体、アポトーシスを制御するポリペプチドまたはチェックポイントシグナル伝達を調節するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されていること、ならびに

前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とする。

いくつかの実施形態においては、チェックポイントシグナル伝達を調節する前記ポリペプチドは、負のチェックポイント制御因子を抑制する。いくつかの実施形態においては、前記負のチェックポイント制御因子は、ＶＩＳＴＡ、ＬＡＧ－３および／またはＴＩＭ３を含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、リガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記リガンドは、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能である。いくつかの実施形態においては、前記スペーサーは、前

記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されるように最適化されている。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記第２のプロモーターとは逆向きである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは抗体フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記腫瘍に特異的な分子は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、ＣＥ７、ＥＧＦＲ、ｈＢ７Ｈ３、メソテリン（mesothelin）、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ Ａ３ ＴＣＲ、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される。

いくつかの実施形態においては、該システムは、

ａ）第１の核酸および

ｂ）第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつサイトカイン、ケモカイン受容体、アポトーシスを制御するポリペプチドまたはチェックポイントシグナル伝達を調節するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されていること、ならびに

前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された構成的または誘導可能な第２のプロモーターを含むことを特徴とする。

いくつかの実施形態においては、チェックポイントシグナル伝達を調節する前記ポリペプチドは、負のチェックポイント制御因子を抑制する。いくつかの実施形態においては、前記負のチェックポイント制御因子は、ＶＩＳＴＡ、ＬＡＧ－３および／またはＴＩＭ３を含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、リガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記リガンドは、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能である。いくつかの実施形態においては、前記スペーサーは、前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されるように最適化されており、前記第２の核酸は、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記第２のプロモーターとは逆向きである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは抗体フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは一本鎖可変フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記腫瘍に特異的な分子は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、ＣＥ７、ＥＧＦＲ、ｈＢ７Ｈ３、メソテリン（mesothelin）、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ Ａ３ ＴＣＲ、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態においては、前記スペーサーは、前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されるように最適化されている。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、誘導可能なプロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは構成的プロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は、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細胞およびバルクＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞からなる群から選択される細胞傷害性ＣＤ８$^{+}$Ｔリンパ球である。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は、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細胞およびバルクＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞からなる群から選択されるＣＤ４$^{+}$Ｔヘルパーリンパ球である。いくつかの実施形態においては、前記組成物は、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細胞およびバルクＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞からなる群から選択される細胞傷害性ＣＤ８$^{+}$Ｔリンパ球である宿主細胞を含み、該組成物は、さらに、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細胞およびバルクＣＤ４＋Ｔ細胞からなる群から選択されるＣＤ４＋Ｔヘルパーリンパ球である別の宿主細胞を含む。いくつかの実施形態においては、組成物は、第１の宿主細胞と第２の宿主細胞とを含み、該第１の宿主細胞は、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細胞およびバルク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、またはナイーブ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細胞およびバルクＣＤ４＋Ｔ細胞からなる群から選択されるＣＤ４＋Ｔヘルパーリンパ球であり、前記第２の宿主細胞はＴ細胞前駆細胞である。いくつかの実施形態においては、前記Ｔ細胞前駆細胞は造血幹細胞である。

【０２４６】

いくつかの実施形態においては、インビトロにおいて宿主細胞を製造する方法であって、

ａ）システムを提供すること、

ｂ）単離された個別のＴリンパ球集団に前記システムを導入し、各Ｔリンパ球集団をインビトロで増殖させることを含む方法が提供される。

いくつかの実施形態においては、該システムは、

ａ）第１の核酸および

ｂ）第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつリガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されており、該リガンド結合ドメインがリガンドに特異的であり、該リガンドが、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子、または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能であり、前記第１の核酸が、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含むこと；ならびに

前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とする。いくつかの実施形態においては、前記薬物は、タモキシフェンおよび／またはその代謝産物である。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは配列番号４１の核酸配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは構成的プロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、前記ＥＦ１αｐである。いくつかの実施形態においては、前記転写活性化因子は、配列番号４０の配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は第１のベクターをさらに含み、前記第２の核酸は第２のベクターをさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第１のベクターおよび第２のベクターは、単一のウイルスベクターにパッケージされている。いくつかの実施形態においては、前記ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸および第２の核酸はベクターを含む。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は、選択マーカーをコードする核酸配列をさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、選択マーカーをコードする核酸をさらに含む。

いくつかの実施形態においては、該システムは、

ａ）第１の核酸および

ｂ）第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつサイトカイン、ケモカイン受容体、アポトーシスを制御するポリペプチドまたはチェックポイントシグナル伝達を調節するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されていること、ならびに

前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に

作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とする。
いくつかの実施形態においては、チェックポイントシグナル伝達を調節する前記ポリペプチドは、負のチェックポイント制御因子を抑制する。いくつかの実施形態においては、前記負のチェックポイント制御因子は、ＶＩＳＴＡ、ＬＡＧ－３および／またはＴＩＭ３を含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、リガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記リガンドは、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能である。いくつかの実施形態においては、前記スペーサーは、前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されるように最適化されている。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記第２のプロモーターとは逆向きである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは抗体フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記腫瘍に特異的な分子は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、ＣＥ７、ＥＧＦＲ、ｈＢ７Ｈ３、メソテリン（mesothelin）、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ Ａ３ ＴＣＲ、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される。
いくつかの実施形態においては、該システムは、
ａ）第１の核酸および
ｂ）第２の核酸を含み、
前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつサイトカイン、ケモカイン受容体、アポトーシスを制御するポリペプチドまたはチェックポイントシグナル伝達を調節するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されていること、ならびに
前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された構成的または誘導可能な第２のプロモーターを含むことを特徴とする。
いくつかの実施形態においては、チェックポイントシグナル伝達を調節する前記ポリペプチドは、負のチェックポイント制御因子を抑制する。いくつかの実施形態においては、前記負のチェックポイント制御因子は、ＶＩＳＴＡ、ＬＡＧ－３および／またはＴＩＭ３を含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、リガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記リガンドは、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能である。いくつかの実施形態においては、前記スペーサーは、前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されるように最適化されている。前記第２の核酸は、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記第２のプロモーターとは逆向きである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは抗体フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは一本鎖可変フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記腫瘍に特異的な分子は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、ＣＥ７、ＥＧＦＲ、ｈＢ７Ｈ３、メソテリン（mesothelin）、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ Ａ３ ＴＣＲ、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態においては、前記スペーサーは、前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されるように最適化され

ている。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、誘導可能なプロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは構成的プロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記Ｔリンパ球が増殖しており、前記方法は、抗ＣＤ３および／または抗ＣＤ２８と少なくとも１つの恒常性サイトカインとの存在下において、前記Ｔリンパ球を、細胞移入における使用に十分な数に達するまで培養することをさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記リンパ球はＣＤ８$^+$またはＣＤ４$^+$である。いくつかの実施形態においては、前記細胞はＴ細胞前駆細胞である。いくつかの実施形態においては、前記細胞は造血幹細胞である。いくつかの実施形態においては、組成物は、第１の宿主細胞と第２の宿主細胞とを含み、該第１の宿主細胞は、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細胞およびバルク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、またはナイーブ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細胞およびバルクＣＤ４$^+$Ｔ細胞からなる群から選択されるＣＤ４$^+$Ｔヘルパーリンパ球であり、前記第２の宿主細胞はＴ細胞前駆細胞である。いくつかの実施形態においては、前記Ｔ細胞前駆細胞は造血幹細胞である。

【０２４７】

いくつかの実施形態においては、がんまたはウイルス感染症の治療のための、宿主細胞または組成物と該宿主細胞中または該組成物中の導入遺伝子の発現を誘導する薬物との組み合わせの使用が提供される。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞はシステムを含む。

いくつかの実施形態においては、該システムは、

ａ）第１の核酸および

ｂ）第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつリガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されており、該リガンド結合ドメインがリガンドに特異的であり、該リガンドが、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子、または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能であり、前記第１の核酸が、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含むこと；ならびに

前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とする。

いくつかの実施形態においては、前記薬物は、タモキシフェンおよび／またはその代謝産物である。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは配列番号４１の核酸配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは構成的プロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、前記ＥＦ１αｐである。いくつかの実施形態においては、前記転写活性化因子は、配列番号４０の配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は第１のベクターをさらに含み、前記第２の核酸は第２のベクターをさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第１のベクターおよび第２のベクターは、単一のウイルスベクターにパッケージされている。いくつかの実施形態においては、前記ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸および第２の核酸はベクターを含む。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は、選択マーカーをコードする核酸配列をさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、選択マーカーをコードする核酸をさらに含む。

いくつかの実施形態においては、該システムは、

ａ）第１の核酸および

ｂ）第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつサイトカ

イン、ケモカイン受容体、アポトーシスを制御するポリペプチドまたはチェックポイントシグナル伝達を調節するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されていること、ならびに

前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とする。

いくつかの実施形態においては、チェックポイントシグナル伝達を調節する前記ポリペプチドは、負のチェックポイント制御因子を抑制する。いくつかの実施形態においては、前記負のチェックポイント制御因子は、ＶＩＳＴＡ、ＬＡＧ－３および／またはＴＩＭ３を含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、リガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記リガンドは、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能である。いくつかの実施形態においては、前記スペーサーは、前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されるように最適化されている。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記第２のプロモーターとは逆向きである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは抗体フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記腫瘍に特異的な分子は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、ＣＥ７、ＥＧＦＲ、ｈＢ７Ｈ３、メソテリン（mesothelin）、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ Ａ３ ＴＣＲ、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される。

いくつかの実施形態においては、該システムは、

ａ）第１の核酸および

ｂ）第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつサイトカイン、ケモカイン受容体、アポトーシスを制御するポリペプチドまたはチェックポイントシグナル伝達を調節するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されていること、ならびに

前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された構成的または誘導可能な第２のプロモーターを含むことを特徴とする。

いくつかの実施形態においては、チェックポイントシグナル伝達を調節する前記ポリペプチドは、負のチェックポイント制御因子を抑制する。いくつかの実施形態においては、前記負のチェックポイント制御因子は、ＶＩＳＴＡ、ＬＡＧ－３および／またはＴＩＭ３を含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、リガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記リガンドは、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能である。いくつかの実施形態においては、前記スペーサーは、前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されるように最適化されており、前記第２の核酸は、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記第２のプロモーターとは逆向きである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは抗体フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは一本鎖可変フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記腫瘍に特異的な分子は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、ＣＥ７、ＥＧＦＲ

、ｈＢ７Ｈ３、メソテリン（mesothelin）、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ Ａ３ ＴＣＲ、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態においては、前記スペーサーは、前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されるように最適化されている。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、誘導可能なプロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは構成的プロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は、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細胞およびバルクＣＤ８$^+$Ｔ細胞からなる群から選択される細胞傷害性ＣＤ８$^+$Ｔリンパ球である。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は、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細胞およびバルクＣＤ４$^+$Ｔ細胞からなる群から選択されるＣＤ４$^+$Ｔヘルパーリンパ球である。いくつかの実施形態においては、前記組成物は、薬学的に許容される添加剤中に宿主細胞を含む。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞はシステムを含む。

いくつかの実施形態においては、該システムは、

ａ）第１の核酸および

ｂ）第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつリガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されており、該リガンド結合ドメインがリガンドに特異的であり、該リガンドが、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子、または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能であり、前記第１の核酸が、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含むこと；ならびに

前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とする。

いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、構成的プロモーターまたは誘導可能なプロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記薬物は、タモキシフェンおよび／またはその代謝産物である。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは配列番号４１の核酸配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは構成的プロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、前記ＥＦ１αｐである。いくつかの実施形態においては、前記転写活性化因子は、配列番号４０の配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は第１のベクターをさらに含み、前記第２の核酸は第２のベクターをさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第１のベクターおよび第２のベクターは、単一のウイルスベクターにパッケージされている。いくつかの実施形態においては、前記ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸および第２の核酸はベクターを含む。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は、選択マーカーをコードする核酸配列をさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、選択マーカーをコードする核酸をさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、リガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記リガンド結合ドメインはリガンドに特異的であり、該リガンドは腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能である。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記第２のプロモーターとは逆向きである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは抗体フラグメントである。いくつかの実

施形態においては、前記腫瘍に特異的な分子は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、ＣＥ７、ＥＧＦＲ、ｈＢ７Ｈ３、メソテリン（mesothelin）、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ Ａ３ ＴＣＲ、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される。

いくつかの実施形態においては、該システムは、

ａ）第１の核酸および

ｂ）第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつサイトカイン、ケモカイン受容体、アポトーシスを制御するポリペプチドまたはチェックポイントシグナル伝達を調節するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されていること、ならびに

前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とする。

いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、構成的プロモーターまたは誘導可能なプロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、リガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記リガンド結合ドメインはリガンドに特異的であり、該リガンドは腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能である。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記第２のプロモーターとは逆向きである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは抗体フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは一本鎖可変フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記腫瘍に特異的な分子は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、ＣＥ７、ＥＧＦＲ、ｈＢ７Ｈ３、メソテリン（mesothelin）、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ Ａ３ ＴＣＲ、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞はＴ細胞前駆細胞である。いくつかの実施形態においては、前記Ｔ細胞前駆細胞は造血幹細胞である。いくつかの実施形態においては、前記単離されたＴリンパ球集団はＴ細胞前駆細胞を含む。いくつかの実施形態においては、前記Ｔ細胞前駆細胞は造血幹細胞である。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は、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細胞およびバルクＣＤ８$^+$Ｔ細胞からなる群から選択される細胞傷害性ＣＤ８$^+$Ｔリンパ球である。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は、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細胞およびバルクＣＤ４$^+$Ｔ細胞からなる群から選択されるＣＤ４$^+$Ｔヘルパーリンパ球である。いくつかの実施形態においては、前記組成物は、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細胞およびバルクＣＤ８$^+$Ｔ細胞からなる群から選択される細胞傷害性ＣＤ８$^+$Ｔリンパ球である宿主細胞を含み、該組成物は、さらに、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細胞およびバルクＣＤ４$^+$Ｔ細胞からなる群から選択されるＣＤ４$^+$Ｔヘルパーリンパ球である別の宿主細胞を含む。いくつかの実施形態においては、前記がんは、固形腫瘍または血液悪性腫瘍である。いくつかの実施形態においては、前記固形腫瘍は、乳がん、脳がん、肺がん、大腸がん、腎臓がん、膵臓がん、前立腺がんおよび卵巣がんからなる群から選択される。いくつかの実施形態においては、組成物は、第１の宿主細胞と第２の宿主細胞とを含み、該第１の宿主細胞は、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細胞およびバルク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、またはナイーブ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細胞およびバルクＣＤ４＋Ｔ細胞からなる群から選択されるＣＤ４＋Ｔヘルパーリンパ球であり、前記第２の宿主細胞はＴ細胞前駆細胞である。いくつかの実施形態においては、前記Ｔ細胞前駆細胞は造血幹細胞である。

【０２４８】

いくつかの実施形態においては、がんまたはウイルス感染症を有する対象において細胞免疫療法を行う方法であって、組成物または宿主細胞を前記対象に投与すること、および該組成物中または該宿主細胞中の導入遺伝子の発現を誘導する薬物を投与することを含む方法が提供される。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞はシステムを含む。

いくつかの実施形態においては、該システムは、

ａ）第１の核酸および

ｂ）第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつリガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されており、該リガンド結合ドメインがリガンドに特異的であり、該リガンドが、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子、または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能であり、前記第１の核酸が、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含むこと；ならびに

前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とする。

いくつかの実施形態においては、前記薬物は、タモキシフェンおよび／またはその代謝産物である。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは配列番号４１の核酸配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは構成的プロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、前記ＥＦ１αｐである。いくつかの実施形態においては、前記転写活性化因子は、配列番号４０の配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は第１のベクターをさらに含み、前記第２の核酸は第２のベクターをさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第１のベクターおよび第２のベクターは、単一のウイルスベクターにパッケージされている。いくつかの実施形態においては、前記ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸および第２の核酸はベクターを含む。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は、選択マーカーをコードする核酸配列をさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、選択マーカーをコードする核酸をさらに含む。

いくつかの実施形態においては、該システムは、

ａ）第１の核酸および

ｂ）第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつサイトカイン、ケモカイン受容体、アポトーシスを制御するポリペプチドまたはチェックポイントシグナル伝達を調節するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されていること、ならびに

前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とする。

いくつかの実施形態においては、チェックポイントシグナル伝達を調節する前記ポリペプチドは、負のチェックポイント制御因子を抑制する。いくつかの実施形態においては、前記負のチェックポイント制御因子は、ＶＩＳＴＡ、ＬＡＧ－３および／またはＴＩＭ３を含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、リガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記リ

ガンドは、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能である。いくつかの実施形態においては、前記スペーサーは、前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されるように最適化されている。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記第２のプロモーターとは逆向きである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは抗体フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記腫瘍に特異的な分子は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、ＣＥ７、ＥＧＦＲ、ｈＢ７Ｈ３、メソテリン（mesothelin）、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ Ａ３ ＴＣＲ、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される。

いくつかの実施形態においては、該システムは、

ａ）第１の核酸および

ｂ）第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつサイトカイン、ケモカイン受容体、アポトーシスを制御するポリペプチドまたはチェックポイントシグナル伝達を調節するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されていること、ならびに

前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された構成的または誘導可能な第２のプロモーターを含むことを特徴とする。

いくつかの実施形態においては、チェックポイントシグナル伝達を調節する前記ポリペプチドは、負のチェックポイント制御因子を抑制する。いくつかの実施形態においては、前記負のチェックポイント制御因子は、ＶＩＳＴＡ、ＬＡＧ－３および／またはＴＩＭ３を含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、リガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記リガンドは、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能である。いくつかの実施形態においては、前記スペーサーは、前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されるように最適化されており、前記第２の核酸は、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記第２のプロモーターとは逆向きである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは抗体フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは一本鎖可変フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記腫瘍に特異的な分子は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、ＣＥ７、ＥＧＦＲ、ｈＢ７Ｈ３、メソテリン（mesothelin）、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ Ａ３ ＴＣＲ、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態においては、前記スペーサーは、前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されるように最適化されている。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、誘導可能なプロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは構成的プロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞はＴ細胞前駆細胞である。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は造血幹細胞である。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は、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細胞およびバルクＣＤ８$^+$Ｔ細胞からなる群から選択される細胞傷害性ＣＤ８$^+$Ｔリンパ球である。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は、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細胞およびバルクＣＤ４＋Ｔ細胞からなる群から選択されるＣＤ４＋Ｔヘルパーリンパ球である。いくつかの実施形態においては、前記組成物は、薬学的に許容される添加剤中に宿主細胞を含む。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞はシステムを含む。

いくつかの実施形態においては、該システムは、

ａ）第１の核酸および

ｂ）第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつリガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されており、該リガンド結合ドメインがリガンドに特異的であり、該リガンドが、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子、または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能であり、前記第１の核酸が、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含むこと；ならびに

前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とする。

いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、構成的プロモーターまたは誘導可能なプロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記薬物は、タモキシフェンおよび／またはその代謝産物である。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは配列番号４１の核酸配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは構成的プロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、前記ＥＦ１αｐである。いくつかの実施形態においては、前記転写活性化因子は、配列番号４０の配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は第１のベクターをさらに含み、前記第２の核酸は第２のベクターをさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第１のベクターおよび第２のベクターは、単一のウイルスベクターにパッケージされている。いくつかの実施形態においては、前記ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸および第２の核酸はベクターを含む。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は、選択マーカーをコードする核酸配列をさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、選択マーカーをコードする核酸をさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、リガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記リガンド結合ドメインはリガンドに特異的であり、該リガンドは腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能である。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記第２のプロモーターとは逆向きである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは抗体フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記腫瘍に特異的な分子は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、ＣＥ７、ＥＧＦＲ、ｈＢ７Ｈ３、メソテリン（mesothelin）、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ Ａ３ ＴＣＲ、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される。

いくつかの実施形態においては、該システムは、

ａ）第１の核酸および

ｂ）第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、かつサイトカイン、ケモカイン受容体、アポトーシスを制御するポリペプチドまたはチェックポイントシグナル伝達を調節するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結さ

れていること、ならびに
前記第２の核酸が、前記誘導可能なプロモーターの転写活性化因子をコードする核酸に作動可能に連結された第２のプロモーターを含むことを特徴とする。
いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、構成的プロモーターまたは誘導可能なプロモーターである。いくつかの実施形態においては、チェックポイントシグナル伝達を調節する前記ポリペプチドは、負のチェックポイント制御因子を抑制する。いくつかの実施形態においては、前記負のチェックポイント制御因子は、ＶＩＳＴＡ、ＬＡＧ－３および／またはＴＩＭ３を含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、リガンド結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、最適化されたポリペプチドスペーサーをコードするポリヌクレオチド、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチド、およびｄ）細胞内シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記リガンドは、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子または標的細胞集団に発現されているその他の分子であり、該リガンドによってリンパ球による認識、調節、抑制および／または排除を誘導することが可能である。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記第２のプロモーターとは逆向きである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは抗体フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは一本鎖可変フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記腫瘍に特異的な分子は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、ＣＥ７、ＥＧＦＲ、ｈＢ７Ｈ３、メソテリン（mesothelin）、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ Ａ３ ＴＣＲ、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞はＴ細胞前駆細胞である。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は造血幹細胞である。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は、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細胞およびバルクＣＤ８$^+$Ｔ細胞からなる群から選択される細胞傷害性ＣＤ８$^+$Ｔリンパ球である。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は、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細胞およびバルクＣＤ４$^+$Ｔ細胞からなる群から選択されるＣＤ４$^+$Ｔヘルパーリンパ球である。いくつかの実施形態においては、前記組成物は、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細胞およびバルクＣＤ８$^+$Ｔ細胞からなる群から選択される細胞傷害性ＣＤ８$^+$Ｔリンパ球である宿主細胞を含み、該組成物は、さらに、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細胞およびバルクＣＤ４$^+$Ｔ細胞からなる群から選択されるＣＤ４$^+$Ｔヘルパーリンパ球である別の宿主細胞を含む。いくつかの実施形態においては、前記がんは、固形腫瘍および血液悪性腫瘍から選択される。いくつかの実施形態においては、前記固形腫瘍は、乳がん、脳がん、肺がん、大腸がん、腎臓がん、膵臓がん、前立腺がんおよび卵巣がんからなる群から選択される。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞はＴ細胞前駆細胞である。いくつかの実施形態においては、前記Ｔ細胞前駆細胞は造血幹細胞である。いくつかの実施形態においては、前記単離されたＴリンパ球集団はＴ細胞前駆細胞を含む。いくつかの実施形態においては、前記Ｔ細胞前駆細胞は造血幹細胞である。いくつかの実施形態においては、組成物は、第１の宿主細胞と第２の宿主細胞とを含み、該第１の宿主細胞は、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細胞およびバルク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、またはナイーブ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細胞およびバルクＣＤ４$^+$Ｔ細胞からなる群から選択されるＣＤ４$^+$Ｔヘルパーリンパ球であり、前記第２の宿主細胞はＴ細胞前駆細胞である。いくつかの実施形態においては、前記Ｔ細胞前駆細胞は造血幹細胞である。

【０２４９】
さらなる実施形態

いくつかの実施形態においては、キメラ抗原受容体の発現誘導システムであって、
ａ）第１の核酸および
ｂ）第２の核酸を含み、
前記第１の核酸が第１のプロモーターを含み、該第１のプロモーターが、キメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結された誘導可能なプロモーターであること、ならびに
前記第２の核酸が、転写活性化因子をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結された第２のプロモーターを含み、該転写活性化因子が、薬物またはその代謝産物の存在下で前記第１のプロモーターからの転写を活性化することができることを特徴とするシステムが提供される。

いくつかの実施形態においては、発現誘導システムであって、
ａ）誘導可能なプロモーター、
ｂ）キメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、および
ｃ）転写活性化因子をコードするポリヌクレオチドを含み、
該転写活性化因子が、薬物またはその代謝産物の存在下で前記誘導可能なプロモーターからの転写を活性化することができることを特徴とするシステムが提供される。

いくつかの実施形態においては、前記キメラ受容体をコードするポリヌクレオチドは、前記誘導可能なプロモーターに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態においては、前記システムは、組換えタンパク質をコードするポリヌクレオチドをさらに含み、該ポリヌクレオチドは前記誘導可能なプロモーターに作動可能に連結されている。

いくつかの実施形態においては、前記薬物またはその代謝産物は、
（ｉ）ヒト対象に毎日または毎週投与した場合に忍容される薬物もしくはその代謝産物；
（ii）ヒト受容体（エストロゲン受容体であってもよい）と特異的に結合する分子もしくはその代謝産物；ならびに／または
（iii）タモキシフェンおよび／もしくはタモキシフェンの代謝産物もしくはタモキシフェンの類似体を含む。

いくつかの実施形態において、前記転写活性化因子は、
（ａ）ＤＮＡ結合ドメイン、
（ｂ）前記薬物またはその代謝産物に特異的に結合するリガンド結合ドメイン、および
（ｃ）トランス活性化ドメインを含み、
これらはこの順序で連結および／または融合されていてもよい。

前記システムの実施形態のいくつかにおいて、
（ａ）前記ＤＮＡ結合ドメインは、天然のリンパ球または天然のＴ細胞において発現されるタンパク質には存在しないＤＮＡ結合部位を含み；かつ／または
（ｂ）前記薬物またはその代謝産物は、前記ヒト受容体（エストロゲン受容体であってもよい）と特異的に結合する前記分子またはその代謝産物であり、前記薬物またはその代謝産物と前記リガンド結合ドメインとの結合が、前記ヒト受容体よりも前記リガンド結合領域に選択的であることから、前記リガンド結合ドメインと前記薬物またはその代謝産物との結合は、前記ヒト受容体との結合よりも強く、たとえば、少なくとも１．５倍、２倍、３倍または４倍強力であってもよく；かつ／または
（ｃ）前記トランス活性化ドメインは、ｐ６５トランス活性化ドメインまたはその機能性バリアントを含み；かつ／または
（ｄ）前記第１のプロモーターは、前記ＤＮＡ結合ドメインに対する結合部位を１つ以上含む。

いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記転写活性化因子に存在する単一または複数のＤＮＡ結合ドメイン以外のヒトＤＮＡ結合ドメインに結合する結合部位を含んでおらず；かつ／または前記第１のプロモーターは合成キメラプロモーターであり、かつ／または前記転写活性化因子は合成キメラ転写活性化因子であり；かつ／または前記ＤＮＡ結合ドメインは肝細胞核因子に存在するＤＮＡ結合ドメインを含み、この肝細胞核因子はＨＮＦ－１αまたはＨＮＦ－１βであってもよい。前記システムの実施形

態のいくつかにおいては、前記第１のプロモーターは配列番号４１の核酸配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは構成的プロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、ＥＦ１αプロモーターまたはその機能性部分であるか、これらのいずれかを含む。いくつかの実施形態においては、前記転写活性化因子は、配列番号４０の配列を有するポリペプチドを含む。いくつかの実施形態においては、前記第１核酸は第１のベクターに含まれており、さらに該第１のベクターは前記システムに含まれており、かつ前記第２核酸は第２のベクターに含まれおり、さらに該第２のベクターは前記システムに含まれている。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸および前記第２の核酸、すなわち、前記第１のプロモーター、前記キメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、前記第２のプロモーターおよび前記トランス活性化因子をコードするポリヌクレオチドは、ベクターに含まれており、さらに該ベクターは前記システムに含まれている。前記システムの実施形態のいくつかにおいては、該システムは単一のウイルスパッケージングベクターに含まれている。いくつかの実施形態においては、前記ウイルスベクターはレンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は、選択マーカーをコードする核酸配列をさらに含むか、あるいは前記システムは、前記第１のプロモーターに作動可能に連結された選択マーカーをさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、選択マーカーをコードする核酸配列をさらに含むか、あるいは前記システムは、前記第２のプロモーターに作動可能に連結された選択マーカーをさらに含む。

【０２５０】

いくつかの実施形態においては、発現誘導システムであって、

ａ）第１の核酸および

ｂ）第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が、誘導可能な第１のプロモーターを含み、かつサイトカイン、ケモカイン受容体、アポトーシスを抑制するポリペプチドまたは負のチェックポイントシグナル伝達を抑制するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されていること、および

前記第２の核酸が第２のプロモーターを含み、該第２のプロモーターが、薬物またはその代謝産物もしくは類似体の存在下で前記第１のプロモーターからの転写を誘導することができる転写活性化因子をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結された構成的プロモーターまたは誘導可能なプロモーターであることを特徴とするシステムが提供される。

いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、組換え抗原受容体をコードするポリヌクレオチドをさらに含み、該組換え抗原受容体はキメラ抗原受容体であってもよい。

いくつかの実施形態においては、前記キメラ抗原受容体は、

ａ）リンパ球による認識および排除を媒介するのに適切な標的細胞集団に発現されている腫瘍特異的な分子、ウイルス分子またはその他の分子であってもよいリガンドに結合するリガンド結合ドメイン、

ｂ）前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されうるポリペプチドスペーサー、

ｃ）膜貫通ドメインおよび

ｄ）細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記第２のプロモーターとは逆向きである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは抗体フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは一本鎖可変フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記腫瘍に特異的な分子は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、ＣＥ７、ＥＧＦＲ、ｈＢ７Ｈ３、メソテリン（mesothelin）、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ　Ａ３　ＴＣＲ、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される。

【０２５１】
いくつかの実施形態においては、システムによってコードされたキメラ受容体ポリペプチドが提供される。
いくつかの実施形態においては、該システムは、
ａ）第１の核酸および
ｂ）第２の核酸を含み、
前記第１の核酸が第１のプロモーターを含み、該第１のプロモーターが、キメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結された誘導可能なプロモーターであること、ならびに
前記第２の核酸が、転写活性化因子をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結された第２のプロモーターを含み、該転写活性化因子が、薬物またはその代謝産物の存在下で前記第１のプロモーターからの転写を活性化することができることを特徴とする。
いくつかの実施形態においては、発現誘導システムであって、
ａ）誘導可能なプロモーター、
ｂ）キメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、および
ｃ）転写活性化因子をコードするポリヌクレオチドを含み、
該転写活性化因子が、薬物またはその代謝産物の存在下で前記誘導可能なプロモーターからの転写を活性化することができることを特徴とするシステムが提供される。
いくつかの実施形態においては、前記キメラ受容体をコードするポリヌクレオチドは、前記誘導可能なプロモーターに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態においては、前記システムは、組換えタンパク質をコードするポリヌクレオチドをさらに含み、該ポリヌクレオチドは前記誘導可能なプロモーターに作動可能に連結されている。
いくつかの実施形態においては、前記薬物またはその代謝産物は、
（ｉ）ヒト対象に毎日または毎週投与した場合に忍容される薬物もしくはその代謝産物；
（ii）ヒト受容体（エストロゲン受容体であってもよい）と特異的に結合する分子もしくはその代謝産物；ならびに／または
（iii）タモキシフェンおよび／もしくはタモキシフェンの代謝産物もしくはタモキシフェンの類似体を含む。
いくつかの実施形態において、前記転写活性化因子は、
（ａ）ＤＮＡ結合ドメイン、
（ｂ）前記薬物またはその代謝産物に特異的に結合するリガンド結合ドメイン、および
（ｃ）トランス活性化ドメインを含み、これらはこの順序で連結および／または融合されていてもよい。
前記システムの実施形態のいくつかにおいて、
（ａ）前記ＤＮＡ結合ドメインは、天然のリンパ球または天然のＴ細胞において発現されるタンパク質には存在しないＤＮＡ結合部位を含み；かつ／または
（ｂ）前記薬物またはその代謝産物は、前記ヒト受容体（エストロゲン受容体であってもよい）と特異的に結合する前記分子またはその代謝産物であり、前記薬物またはその代謝産物と前記リガンド結合ドメインとの結合が、前記ヒト受容体よりも前記リガンド結合領域に選択的であることから、前記リガンド結合ドメインと前記薬物またはその代謝産物との結合は、前記ヒト受容体との結合よりも強く、たとえば、少なくとも１．５倍、２倍、３倍または４倍強力であってもよく；かつ／または
（ｃ）前記トランス活性化ドメインは、ｐ６５トランス活性化ドメインまたはその機能性バリアントを含み；かつ／または
（ｄ）前記第１のプロモーターは、前記ＤＮＡ結合ドメインに対する結合部位を１つ以上含む。
いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記転写活性化因子に存在する単一または複数のＤＮＡ結合ドメイン以外のヒトＤＮＡ結合ドメインに結合する結合部位を含んでおらず；かつ／または前記第１のプロモーターは合成キメラプロモーターであり、かつ／または前記転写活性化因子は合成キメラ転写活性化因子であり；かつ／ま

たは前記ＤＮＡ結合ドメインは肝細胞核因子に存在するＤＮＡ結合ドメインを含み、この肝細胞核因子はＨＮＦ－１αまたはＨＮＦ－１βであってもよい。請求項１～８のいずれか一項に記載されているように、前記第１のプロモーターは、配列番号４１の核酸配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは構成的プロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、ＥＦ１αプロモーターまたはその機能性部分であるか、これらのいずれかを含む。いくつかの実施形態においては、前記転写活性化因子は、配列番号４０の配列を有するポリペプチドを含む。いくつかの実施形態においては、前記第１核酸は第１のベクターに含まれており、さらに該第１のベクターは前記システムに含まれており、かつ前記第２核酸は第２のベクターに含まれおり、さらに該第２のベクターは前記システムに含まれている。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸および前記第２の核酸、すなわち、前記第１のプロモーター、前記キメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、前記第２のプロモーターおよび前記トランス活性化因子をコードするポリヌクレオチドは、ベクターに含まれており、さらに該ベクターは前記システムに含まれている。前記システムの実施形態のいくつかにおいては、該システムは単一のウイルスパッケージングベクターに含まれている。いくつかの実施形態においては、前記ウイルスベクターはレンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は、選択マーカーをコードする核酸配列をさらに含むか、あるいは前記システムは、前記第１のプロモーターに作動可能に連結された選択マーカーをさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、選択マーカーをコードする核酸配列をさらに含むか、あるいは前記システムは、前記第２のプロモーターに作動可能に連結された選択マーカーをさらに含む。

いくつかの実施形態においては、前記発現誘導システムは、

ａ）第１の核酸および

ｂ）第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が、誘導可能な第１のプロモーターを含み、かつサイトカイン、ケモカイン受容体、アポトーシスを抑制するポリペプチドまたは負のチェックポイントシグナル伝達を抑制するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されていること、および

前記第２の核酸が第２のプロモーターを含み、該第２のプロモーターが、薬物またはその代謝産物もしくは類似体の存在下で前記第１のプロモーターからの転写を誘導することができる転写活性化因子をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結された構成的プロモーターまたは誘導可能なプロモーターであることを特徴とする。

いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、組換え抗原受容体をコードするポリヌクレオチドをさらに含み、該組換え抗原受容体はキメラ抗原受容体であってもよい。

いくつかの実施形態においては、前記キメラ抗原受容体は、

ａ）リンパ球による認識および排除を媒介するのに適切な標的細胞集団に発現されている腫瘍特異的な分子、ウイルス分子またはその他の分子であってもよいリガンドに結合するリガンド結合ドメイン、

ｂ）前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されうるポリペプチドスペーサー、

ｃ）膜貫通ドメインおよび

ｄ）細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記第２のプロモーターとは逆向きである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは抗体フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは一本鎖可変フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記腫瘍に特異的な分子は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、ＣＥ７、ＥＧＦＲ、ｈＢ７Ｈ３、メソテリン（mesothelin）、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ Ａ３ ＴＣＲ、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される。

【０２５２】
いくつかの実施形態においては、システムまたはウイルスパッケージングベクターを含む宿主細胞が提供される。
いくつかの実施形態においては、該システムは、
ａ）第１の核酸および
ｂ）第２の核酸を含み、
前記第１の核酸が第１のプロモーターを含み、該第１のプロモーターが、キメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結された誘導可能なプロモーターであること、ならびに
前記第２の核酸が、転写活性化因子をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結された第２のプロモーターを含み、該転写活性化因子が、薬物またはその代謝産物の存在下で前記第１のプロモーターからの転写を活性化することができることを特徴とする。
いくつかの実施形態においては、発現誘導システムであって、
ａ）誘導可能なプロモーター、
ｂ）キメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、および
ｃ）転写活性化因子をコードするポリヌクレオチドを含み、
該転写活性化因子が、薬物またはその代謝産物の存在下で前記誘導可能なプロモーターからの転写を活性化することができることを特徴とするシステムが提供される。
いくつかの実施形態においては、前記キメラ受容体をコードするポリヌクレオチドは、前記誘導可能なプロモーターに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態においては、前記システムは、組換えタンパク質をコードするポリヌクレオチドをさらに含み、該ポリヌクレオチドは前記誘導可能なプロモーターに作動可能に連結されている。
いくつかの実施形態においては、前記薬物またはその代謝産物は、
（ｉ）ヒト対象に毎日または毎週投与した場合に忍容される薬物もしくはその代謝産物；
（ii）ヒト受容体（エストロゲン受容体であってもよい）と特異的に結合する分子もしくはその代謝産物；ならびに／または
（iii）タモキシフェンおよび／もしくはタモキシフェンの代謝産物もしくはタモキシフェンの類似体を含む。
いくつかの実施形態において、前記転写活性化因子は、
（ａ）ＤＮＡ結合ドメイン、
（ｂ）前記薬物またはその代謝産物に特異的に結合するリガンド結合ドメイン、および
（ｃ）トランス活性化ドメインを含み、これらはこの順序で連結および／または融合されていてもよい。
前記システムの実施形態のいくつかにおいて、
（ａ）前記ＤＮＡ結合ドメインは、天然のリンパ球または天然のＴ細胞において発現されるタンパク質には存在しないＤＮＡ結合部位を含み；かつ／または
（ｂ）前記薬物またはその代謝産物は、前記ヒト受容体（エストロゲン受容体であってもよい）と特異的に結合する前記分子またはその代謝産物であり、前記薬物またはその代謝産物と前記リガンド結合ドメインとの結合が、前記ヒト受容体よりも前記リガンド結合領域に選択的であることから、前記リガンド結合ドメインと前記薬物またはその代謝産物との結合は、前記ヒト受容体との結合よりも強く、たとえば、少なくとも１．５倍、２倍、３倍または４倍強力であってもよく；かつ／または
（ｃ）前記トランス活性化ドメインは、ｐ６５トランス活性化ドメインまたはその機能性バリアントを含み；かつ／または
（ｄ）前記第１のプロモーターは、前記ＤＮＡ結合ドメインに対する結合部位を１つ以上含む。
いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記転写活性化因子に存在する単一または複数のＤＮＡ結合ドメイン以外のヒトＤＮＡ結合ドメインに結合する結合部位を含んでおらず；かつ／または前記第１のプロモーターは合成キメラプロモーターであり、かつ／または前記転写活性化因子は合成キメラ転写活性化因子であり；かつ／ま

たは前記ＤＮＡ結合ドメインは肝細胞核因子に存在するＤＮＡ結合ドメインを含み、この肝細胞核因子はＨＮＦ－１αまたはＨＮＦ－１βであってもよい。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは配列番号４１の核酸配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは構成的プロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、ＥＦ１αプロモーターまたはその機能性部分であるか、これらのいずれかを含む。いくつかの実施形態においては、前記転写活性化因子は、配列番号４０の配列を有するポリペプチドを含む。いくつかの実施形態においては、前記第１核酸は第１のベクターに含まれており、さらに該第１のベクターは前記システムに含まれており、かつ前記第２核酸は第２のベクターに含まれおり、さらに該第２のベクターは前記システムに含まれている。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸および前記第２の核酸、すなわち、前記第１のプロモーター、前記キメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、前記第２のプロモーターおよび前記トランス活性化因子をコードするポリヌクレオチドは、ベクターに含まれており、さらに該ベクターは前記システムに含まれている。いくつかの実施形態においては、前記システムは、単一のウイルスパッケージングベクターに含まれている。このような実施形態いくつかにおいては、前記ウイルスベクターはレンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は、選択マーカーをコードする核酸配列をさらに含むか、あるいは前記システムは、前記第１のプロモーターに作動可能に連結された選択マーカーをさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、選択マーカーをコードする核酸配列をさらに含むか、あるいは前記システムは、前記第２のプロモーターに作動可能に連結された選択マーカーをさらに含む。

いくつかの実施形態においては、前記発現誘導システムは、

ａ）第１の核酸および

ｂ）第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が、誘導可能な第１のプロモーターを含み、かつサイトカイン、ケモカイン受容体、アポトーシスを抑制するポリペプチドまたは負のチェックポイントシグナル伝達を抑制するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されていること、および

前記第２の核酸が第２のプロモーターを含み、該第２のプロモーターが、薬物またはその代謝産物もしくは類似体の存在下で前記第１のプロモーターからの転写を誘導することができる転写活性化因子をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結された構成的プロモーターまたは誘導可能なプロモーターであることを特徴とする。

いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、組換え抗原受容体をコードするポリヌクレオチドをさらに含み、該組換え抗原受容体はキメラ抗原受容体であってもよい。

いくつかの実施形態においては、前記キメラ抗原受容体は、

ａ）リンパ球による認識および排除を媒介するのに適切な標的細胞集団に発現されている腫瘍特異的な分子、ウイルス分子またはその他の分子であってもよいリガンドに結合するリガンド結合ドメイン、

ｂ）前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されうるポリペプチドスペーサー、

ｃ）膜貫通ドメインおよび

ｄ）細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記第２のプロモーターとは逆向きである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは抗体フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは一本鎖可変フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記腫瘍に特異的な分子は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、ＣＥ７、ＥＧＦＲ、ｈＢ７Ｈ３、メソテリン（mesothelin）、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ Ａ３ ＴＣＲ、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される。

【０２５３】
いくつかの実施形態においては、宿主細胞であって、初代ヒトリンパ球であり、かつ核酸とポリヌクレオチドとを含み、
ａ）前記核酸が第１のプロモーターを含み、該第１のプロモーターが、天然の初代ヒトリンパ球には存在しないＤＮＡ結合ドメインに対する結合部位を含む誘導可能な合成プロモーターであること、ならびに
ｂ）前記ポリヌクレオチドが、転写活性化因子をコードし、該転写活性化因子が、
ｉ）天然の初代ヒトリンパ球に存在するＤＮＡ配列には特異的に結合しないＤＮＡ結合ドメイン；
ii）薬物またはその代謝産物に特異的に結合するが、天然の初代ヒトリンパ球に存在する分子とは結合しないか、該分子に対する親和性が低いドメイン；および
iii）トランス活性化ドメインを含み、前記転写活性化因子が、薬物もしくはその代謝産物の存在下または前記（ii）に記載のドメインに薬物またはその代謝産物が結合した後に、前記第１のプロモーターからの転写を誘導することができることを特徴とする宿主細胞が提供される。
いくつかの実施形態においては、前記細胞は、キメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドをさらに含み、該ポリヌクレオチドは前記第１のプロモーターに作動可能に連結されていてもよい。いくつかの実施形態においては、前記細胞は第２のプロモーターをさらに含み、該第２のプロモーターは、前記転写活性化因子をコードする前記ポリヌクレオチドに作動可能に連結されており、該第２のプロモーターは構成的プロモーターであってもよい。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は、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細胞およびバルクＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞からなる群から選択される細胞傷害性ＣＤ８$^{+}$Ｔリンパ球である。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は、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細胞およびバルクＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞からなる群から選択されるＣＤ４$^{+}$Ｔヘルパーリンパ球である。
【０２５４】
いくつかの実施形態においては、薬学的に許容される添加剤中に宿主細胞を含む組成物が提供される。
いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は初代ヒトリンパ球であり、核酸とポリヌクレオチドとを含み、
ａ）前記核酸が第１のプロモーターを含み、該第１のプロモーターが、天然の初代ヒトリンパ球には存在しないＤＮＡ結合ドメインに対する結合部位を含む誘導可能な合成プロモーターであること、ならびに
ｂ）前記ポリヌクレオチドが、転写活性化因子をコードし、該転写活性化因子が、
ｉ）天然の初代ヒトリンパ球に存在するＤＮＡ配列には特異的に結合しないＤＮＡ結合ドメイン；
ii）薬物またはその代謝産物に特異的に結合するが、天然の初代ヒトリンパ球に存在する分子とは結合しないか、該分子に対する親和性が低いドメイン；および
iii）トランス活性化ドメインを含み、前記転写活性化因子が、薬物もしくはその代謝産物の存在下または前記（ii）に記載のドメインに薬物またはその代謝産物が結合した後に、前記第１のプロモーターからの転写を誘導することができることを特徴とする。
いくつかの実施形態においては、前記細胞は、キメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドをさらに含み、該ポリヌクレオチドは前記第１のプロモーターに作動可能に連結されていてもよい。いくつかの実施形態においては、前記細胞は第２のプロモーターをさらに含み、該第２のプロモーターは、前記転写活性化因子をコードする前記ポリヌクレオチドに作動可能に連結されており、該第２のプロモーターは構成的プロモーターであってもよい。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は、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細胞およびバルクＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞からなる群から選択される細胞傷害性ＣＤ８$^{+}$Ｔリンパ球である。いくつか

の実施形態においては、前記宿主細胞は、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細胞およびバルクＣＤ４＋Ｔ細胞からなる群から選択されるＣＤ４＋Ｔヘルパーリンパ球である。いくつかの実施形態においては、前記組成物は、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細胞およびバルクＣＤ８＋Ｔ細胞からなる群から選択される細胞傷害性ＣＤ８＋Ｔリンパ球を含み、該組成物は、さらに、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細胞およびバルクＣＤ４＋Ｔ細胞からなる群から選択されるＣＤ４＋Ｔヘルパーリンパ球を含む。

【０２５５】

いくつかの実施形態においては、インビトロにおいて宿主細胞を製造する方法であって、単離された個別のＴリンパ球集団にシステムを導入すること、および各Ｔリンパ球集団をインビトロで増殖させることを含む方法が提供される。

いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は初代ヒトリンパ球であり、核酸とポリヌクレオチドとを含み、

ａ）前記核酸が第１のプロモーターを含み、該第１のプロモーターが、天然の初代ヒトリンパ球には存在しないＤＮＡ結合ドメインに対する結合部位を含む誘導可能な合成プロモーターであること、ならびに

ｂ）前記ポリヌクレオチドが、転写活性化因子をコードし、該転写活性化因子が、

ｉ）天然の初代ヒトリンパ球に存在するＤＮＡ配列には特異的に結合しないＤＮＡ結合ドメイン；

ii）薬物またはその代謝産物に特異的に結合するが、天然の初代ヒトリンパ球に存在する分子とは結合しないか、該分子に対する親和性が低いドメイン；および

iii）トランス活性化ドメインを含み、前記転写活性化因子が、薬物もしくはその代謝産物の存在下または前記（ii）に記載のドメインに薬物またはその代謝産物が結合した後に、前記第１のプロモーターからの転写を誘導することができることを特徴とする。

いくつかの実施形態においては、前記細胞は、キメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドをさらに含み、該ポリヌクレオチドは前記第１のプロモーターに作動可能に連結されていてもよい。いくつかの実施形態においては、前記細胞は第２のプロモーターをさらに含み、該第２のプロモーターは、前記転写活性化因子をコードする前記ポリヌクレオチドに作動可能に連結されており、該第２のプロモーターは構成的プロモーターであってもよい。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は、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細胞およびバルクＣＤ８＋Ｔ細胞からなる群から選択される細胞傷害性ＣＤ８＋Ｔリンパ球である。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は、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細胞およびバルクＣＤ４＋Ｔ細胞からなる群から選択されるＣＤ４＋Ｔヘルパーリンパ球である。

いくつかの実施形態においては、該システムは、

ａ）第１の核酸および

ｂ）第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が第１のプロモーターを含み、該第１のプロモーターが、キメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結された誘導可能なプロモーターであること、ならびに

前記第２の核酸が、転写活性化因子をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結された第２のプロモーターを含み、該転写活性化因子が、薬物またはその代謝産物の存在下で前記第１のプロモーターからの転写を活性化することができることを特徴とする。

いくつかの実施形態においては、発現誘導システムであって、

ａ）誘導可能なプロモーター、

ｂ）キメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、および

ｃ）転写活性化因子をコードするポリヌクレオチドを含み、該転写活性化因子が、薬物またはその代謝産物の存在下で前記誘導可能なプロモーターからの転写を活性化することが

できることを特徴とするシステムが提供される。
いくつかの実施形態においては、前記キメラ受容体をコードするポリヌクレオチドは、前記誘導可能なプロモーターに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態においては、前記システムは、組換えタンパク質をコードするポリヌクレオチドをさらに含み、該ポリヌクレオチドは前記誘導可能なプロモーターに作動可能に連結されている。
いくつかの実施形態においては、前記薬物またはその代謝産物は、
（ｉ）ヒト対象に毎日または毎週投与した場合に忍容される薬物もしくはその代謝産物；
（ii）ヒト受容体（エストロゲン受容体であってもよい）と特異的に結合する分子もしくはその代謝産物；ならびに／または
（iii）タモキシフェンおよび／もしくはタモキシフェンの代謝産物もしくはタモキシフェンの類似体を含む。
いくつかの実施形態において、前記転写活性化因子は、
（ａ）ＤＮＡ結合ドメイン、
（ｂ）前記薬物またはその代謝産物に特異的に結合するリガンド結合ドメイン、および
（ｃ）トランス活性化ドメインを含み、これらはこの順序で連結および／または融合されていてもよい。
前記システムの実施形態のいくつかにおいて、
（ａ）前記ＤＮＡ結合ドメインは、天然のリンパ球または天然のＴ細胞において発現されるタンパク質には存在しないＤＮＡ結合部位を含み；かつ／または
（ｂ）前記薬物またはその代謝産物は、前記ヒト受容体（エストロゲン受容体であってもよい）と特異的に結合する前記分子またはその代謝産物であり、前記薬物またはその代謝産物と前記リガンド結合ドメインとの結合が、前記ヒト受容体よりも前記リガンド結合領域に選択的であることから、前記リガンド結合ドメインと前記薬物またはその代謝産物との結合は、前記ヒト受容体との結合よりも強く、たとえば、少なくとも１．５倍、２倍、３倍または４倍強力であってもよく；かつ／または
（ｃ）前記トランス活性化ドメインは、ｐ６５トランス活性化ドメインまたはその機能性バリアントを含み；かつ／または
（ｄ）前記第１のプロモーターは、前記ＤＮＡ結合ドメインに対する結合部位を１つ以上含む。
いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記転写活性化因子に存在する単一または複数のＤＮＡ結合ドメイン以外のヒトＤＮＡ結合ドメインに結合する結合部位を含んでおらず；かつ／または前記第１のプロモーターは合成キメラプロモーターであり、かつ／または前記転写活性化因子は合成キメラ転写活性化因子であり；かつ／または前記ＤＮＡ結合ドメインは肝細胞核因子に存在するＤＮＡ結合ドメインを含み、この肝細胞核因子はＨＮＦ－１αまたはＨＮＦ－１βであってもよい。いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは配列番号４１の核酸配列を含む。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは構成的プロモーターである。いくつかの実施形態においては、前記第２のプロモーターは、ＥＦ１αプロモーターまたはその機能性部分であるか、これらのいずれかを含む。いくつかの実施形態においては、前記転写活性化因子は、配列番号４０の配列を有するポリペプチドを含む。いくつかの実施形態においては、前記第１核酸は第１のベクターに含まれており、さらに該第１のベクターは前記システムに含まれており、かつ前記第２核酸は第２のベクターに含まれおり、さらに該第２のベクターは前記システムに含まれている。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸および前記第２の核酸、すなわち、前記第１のプロモーター、前記キメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、前記第２のプロモーターおよび前記トランス活性化因子をコードするポリヌクレオチドは、ベクターに含まれており、さらに該ベクターは前記システムに含まれている。いくつかの実施形態においては、前記システムは、単一のウイルスパッケージングベクターに含まれている。いくつかの実施形態においては、前記ウイルスベクターはレンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態においては、前記第１の核酸は、選択マーカーをコードする核酸配列をさらに含むか、あるいは前記システムは、前

記第１のプロモーターに作動可能に連結された選択マーカーをさらに含む。いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、選択マーカーをコードする核酸配列をさらに含むか、あるいは前記システムは、前記第２のプロモーターに作動可能に連結された選択マーカーをさらに含む。

いくつかの実施形態においては、前記発現誘導システムは、

ａ）第１の核酸および

ｂ）第２の核酸を含み、

前記第１の核酸が、誘導可能な第１のプロモーターを含み、かつサイトカイン、ケモカイン受容体、アポトーシスを抑制するポリペプチドまたは負のチェックポイントシグナル伝達を抑制するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されていること、および

前記第２の核酸が第２のプロモーターを含み、該第２のプロモーターが、薬物またはその代謝産物もしくは類似体の存在下で前記第１のプロモーターからの転写を誘導することができる転写活性化因子をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結された構成的プロモーターまたは誘導可能なプロモーターであることを特徴とする。

いくつかの実施形態においては、前記第２の核酸は、組換え抗原受容体をコードするポリヌクレオチドをさらに含み、該組換え抗原受容体はキメラ抗原受容体であってもよい。

いくつかの実施形態においては、前記キメラ抗原受容体は、

ａ）リンパ球による認識および排除を媒介するのに適切な標的細胞集団に発現されている腫瘍特異的な分子、ウイルス分子またはその他の分子であってもよいリガンドに結合するリガンド結合ドメイン、

ｂ）前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されうるポリペプチドスペーサー、

ｃ）膜貫通ドメインおよび

ｄ）細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

いくつかの実施形態においては、前記第１のプロモーターは、前記第２のプロモーターとは逆向きである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは抗体フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記リガンド結合ドメインは一本鎖可変フラグメントである。いくつかの実施形態においては、前記腫瘍に特異的な分子は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ＲＯＲ１、ＣＥ７、ＥＧＦＲ、ｈＢ７Ｈ３、メソテリン（mesothelin）、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２、ＧＤ－２、ＭＡＧＥ Ａ３ ＴＣＲ、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態においては、前記集団の前記Ｔリンパ球が増殖しており、前記方法は、抗ＣＤ３および／または抗ＣＤ２８と少なくとも１つの恒常性サイトカインとの存在下において、前記Ｔリンパ球を、細胞移入における使用に十分な数に達するまで培養することをさらに含む。いくつかの実施形態においては、抗ＣＤ３および／または抗ＣＤ２８と少なくとも１つの恒常性サイトカインとの存在下での培養は、前記システムを導入する前またはその後に行うことができる。

【０２５６】

いくつかの実施形態においては、がんまたはウイルス感染症の治療のための、前記宿主細胞または組成物と薬物またはその代謝産物との組み合わせの使用が提供される。

いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は初代ヒトリンパ球であり、核酸とポリヌクレオチドとを含み、

ａ）前記核酸が第１のプロモーターを含み、該第１のプロモーターが、天然の初代ヒトリンパ球には存在しないＤＮＡ結合ドメインに対する結合部位を含む誘導可能な合成プロモーターであること、ならびに

ｂ）前記ポリヌクレオチドが、転写活性化因子をコードし、該転写活性化因子が、

ｉ）天然の初代ヒトリンパ球に存在するＤＮＡ配列には特異的に結合しないＤＮＡ結合ドメイン；

ii）薬物またはその代謝産物に特異的に結合するが、天然の初代ヒトリンパ球に存在す

る分子とは結合しないか、該分子に対する親和性が低いドメイン；および
iii）トランス活性化ドメインを含み、前記転写活性化因子が、薬物もしくはその代謝産物の存在下または前記（ii）に記載のドメインに薬物またはその代謝産物が結合した後に、前記第１のプロモーターからの転写を誘導することができることを特徴とする。
いくつかの実施形態においては、前記細胞は、キメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドをさらに含み、該ポリヌクレオチドは前記第１のプロモーターに作動可能に連結されていてもよい。いくつかの実施形態においては、前記細胞は第２のプロモーターをさらに含み、該第２のプロモーターは、前記転写活性化因子をコードする前記ポリヌクレオチドに作動可能に連結されており、該第２のプロモーターは構成的プロモーターであってもよい。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は、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細胞およびバルクＣＤ８＋Ｔ細胞からなる群から選択される細胞傷害性ＣＤ８＋Ｔリンパ球である。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は、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細胞およびバルクＣＤ４＋Ｔ細胞からなる群から選択されるＣＤ４＋Ｔヘルパーリンパ球である。いくつかの実施形態においては、前記組成物は、薬学的に許容される添加剤中に宿主細胞を含む。
いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は初代ヒトリンパ球であり、核酸とポリヌクレオチドとを含み、
ａ）前記核酸が第１のプロモーターを含み、該第１のプロモーターが、天然の初代ヒトリンパ球には存在しないＤＮＡ結合ドメインに対する結合部位を含む誘導可能な合成プロモーターであること、ならびに
ｂ）前記ポリヌクレオチドが、転写活性化因子をコードし、該転写活性化因子が、
ｉ）天然の初代ヒトリンパ球に存在するＤＮＡ配列には特異的に結合しないＤＮＡ結合ドメイン；
ii）薬物またはその代謝産物に特異的に結合するが、天然の初代ヒトリンパ球に存在する分子とは結合しないか、該分子に対する親和性が低いドメイン；および
iii）トランス活性化ドメインを含み、前記転写活性化因子が、薬物もしくはその代謝産物の存在下または前記（ii）に記載のドメインに薬物またはその代謝産物が結合した後に、前記第１のプロモーターからの転写を誘導することができることを特徴とする。
いくつかの実施形態においては、前記細胞は、キメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドをさらに含み、該ポリヌクレオチドは前記第１のプロモーターに作動可能に連結されていてもよい。いくつかの実施形態においては、前記細胞は第２のプロモーターをさらに含み、該第２のプロモーターは、前記転写活性化因子をコードする前記ポリヌクレオチドに作動可能に連結されており、該第２のプロモーターは構成的プロモーターであってもよい。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は、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細胞およびバルクＣＤ８＋Ｔ細胞からなる群から選択される細胞傷害性ＣＤ８＋Ｔリンパ球である。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は、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細胞およびバルクＣＤ４＋Ｔ細胞からなる群から選択されるＣＤ４＋Ｔヘルパーリンパ球である。いくつかの実施形態においては、前記組成物は、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細胞およびバルクＣＤ８＋Ｔ細胞からなる群から選択される細胞傷害性ＣＤ８＋Ｔリンパ球を含み、該組成物は、さらに、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細胞およびバルクＣＤ４＋Ｔ細胞からなる群から選択されるＣＤ４＋Ｔヘルパーリンパ球を含む。
【０２５７】
いくつかの実施形態においては、がんまたはウイルス感染症の治療または抑制における使用のための細胞および薬物であって、該細胞が、
（ａ）前記がんまたはウイルス感染症と関連する抗原に特異的に結合するキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、

（ｂ）誘導可能な合成プロモーター、および
（ｃ）前記合成プロモーターに特異的に結合するＤＮＡ結合ドメインと薬物またはその代謝産物に特異的に結合するドメインとを含み、
該薬物またはその代謝産物の存在下において前記合成プロモーターからの転写を誘導することができる転写活性化因子を含む細胞および薬物が提供される。
いくつかの実施形態においては、前記がんは、固形腫瘍または血液悪性腫瘍である。いくつかの実施形態においては、前記固形腫瘍は、乳がん、肺がん、大腸がん、腎臓がん、膵臓がん、前立腺がんおよび卵巣がんからなる群から選択される。
【０２５８】
いくつかの実施形態においては、がんまたはウイルス感染症を有する対象において細胞免疫療法を行う方法であって、組成物または宿主細胞を前記対象に投与し、薬物またはその代謝産物を投与することによって、前記プロモーターからの発現を誘導することを含む方法が提供される。
いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は初代ヒトリンパ球であり、核酸とポリヌクレオチドとを含み、
ａ）前記核酸が第１のプロモーターを含み、該第１のプロモーターが、天然の初代ヒトリンパ球には存在しないＤＮＡ結合ドメインに対する結合部位を含む誘導可能な合成プロモーターであること、ならびに
ｂ）前記ポリヌクレオチドが、転写活性化因子をコードし、該転写活性化因子が、
ｉ）天然の初代ヒトリンパ球に存在するＤＮＡ配列には特異的に結合しないＤＮＡ結合ドメイン；
ii）薬物またはその代謝産物に特異的に結合するが、天然の初代ヒトリンパ球に存在する分子とは結合しないか、該分子に対する親和性が低いドメイン；および
iii）トランス活性化ドメインを含み、前記転写活性化因子が、薬物もしくはその代謝産物の存在下または前記（ii）に記載のドメインに薬物またはその代謝産物が結合した後に、前記第１のプロモーターからの転写を誘導することができることを特徴とする。
いくつかの実施形態においては、前記細胞は、キメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドをさらに含み、該ポリヌクレオチドは前記第１のプロモーターに作動可能に連結されていてもよい。いくつかの実施形態においては、前記細胞は第２のプロモーターをさらに含み、該第２のプロモーターは、前記転写活性化因子をコードする前記ポリヌクレオチドに作動可能に連結されており、該第２のプロモーターは構成的プロモーターであってもよい。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は、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細胞およびバルクＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞からなる群から選択される細胞傷害性ＣＤ８$^{+}$Ｔリンパ球である。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は、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細胞およびバルクＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞からなる群から選択されるＣＤ４$^{+}$Ｔヘルパーリンパ球である。いくつかの実施形態においては、前記組成物は、薬学的に許容される添加剤中に宿主細胞を含む。
いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は初代ヒトリンパ球であり、核酸とポリヌクレオチドとを含み、
ａ）前記核酸が第１のプロモーターを含み、該第１のプロモーターが、天然の初代ヒトリンパ球には存在しないＤＮＡ結合ドメインに対する結合部位を含む誘導可能な合成プロモーターであること、ならびに
ｂ）前記ポリヌクレオチドが、転写活性化因子をコードし、該転写活性化因子が、
ｉ）天然の初代ヒトリンパ球に存在するＤＮＡ配列には特異的に結合しないＤＮＡ結合ドメイン；
ii）薬物またはその代謝産物に特異的に結合するが、天然の初代ヒトリンパ球に存在する分子とは結合しないか、該分子に対する親和性が低いドメイン；および
iii）トランス活性化ドメインを含み、前記転写活性化因子が、薬物もしくはその代謝産物の存在下または前記（ii）に記載のドメインに薬物またはその代謝産物が結合した後

に、前記第１のプロモーターからの転写を誘導することができることを特徴とする。
いくつかの実施形態においては、前記細胞は、キメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドをさらに含み、該ポリヌクレオチドは前記第１のプロモーターに作動可能に連結されていてもよい。いくつかの実施形態においては、前記細胞は第２のプロモーターをさらに含み、該第２のプロモーターは、前記転写活性化因子をコードする前記ポリヌクレオチドに作動可能に連結されており、該第２のプロモーターは構成的プロモーターであってもよい。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は、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細胞およびバルクＣＤ８＋Ｔ細胞からなる群から選択される細胞傷害性ＣＤ８＋Ｔリンパ球である。いくつかの実施形態においては、前記宿主細胞は、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細胞およびバルクＣＤ４＋Ｔ細胞からなる群から選択されるＣＤ４＋Ｔヘルパーリンパ球である。いくつかの実施形態においては、前記組成物は、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細胞およびバルクＣＤ８＋Ｔ細胞からなる群から選択される細胞傷害性ＣＤ８＋Ｔリンパ球を含み、該組成物は、さらに、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細胞およびバルクＣＤ４＋Ｔ細胞からなる群から選択されるＣＤ４＋Ｔヘルパーリンパ球を含む。いくつかの実施形態においては、前記がんは、固形腫瘍および血液悪性腫瘍から選択される。いくつかの実施形態においては、前記固形腫瘍は、乳がん、肺がん、大腸がん、腎臓がん、膵臓がん、前立腺がんおよび卵巣がんからなる群から選択される。

【０２５９】

本発明の開示の別の態様は、細胞において薬物により制御発現される導入遺伝子を送達するための遺伝子システムを包含し、この発現は、たとえば、薬物による組換えタンパク質の制御発現であり、該組換えタンパク質は、たとえば、組換え抗原受容体および／または組換え抗原受容体を発現する細胞によって発現される分子である。一実施形態においては、制御発現される導入遺伝子は、たとえば養子細胞療法（たとえば養子免疫療法）などにおいて使用するため、細胞（たとえばリンパ球）に形質導入され、かつ／または細胞内に含まれている。このようなシステムは、概して治療目的を損なうことなく、細胞療法（たとえばキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を使用した養子療法）に厳格な安全性を付与するものである。このような特徴を有することから、いくつかの態様においては、インビボでの組換えタンパク質の発現（たとえばＣＡＲの発現）を臨床医によってリアルタイムで制御することが可能となる。薬物応答性に基づいて組換え遺伝子（たとえばＣＡＲ）の発現の転写制御が可能となるようにベクターを遺伝子改変し、たとえば臨床医により処方された薬物で刺激することなどによって、インビボで該組換え遺伝子（たとえばＣＡＲ）の活性および／またはその他の細胞メディエーターの活性を「オン」または「オフ」に切り替えることができ、その結果、臨床的に許容可能な薬物動態、組織分布、および細胞外間隙とリンパ球の細胞質との間の分配を達成することができる。本発明の遺伝子システムは薬物で制御される導入遺伝子の発現を提供し、薬物の非存在下で導入遺伝子を機能的に「オフ」の状態とし、かつ薬物の存在下で導入遺伝子を機能的に「オン」の状態とすることができる。

【０２６０】

前述の薬物の一例として、タモキシフェンが挙げられる。タモキシフェンは、エストロゲンのアンタゴニスト／部分アゴニストであり、ＦＤＡ認可薬物として市販されている。タモキシフェンは経口投与され、長期間にわたって連日投与することができる。タモキシフェンは、安全性が証明されており、薬物動態プロファイルが好適であり、組織分布が良好であり、細胞外間隙と細胞質との間の分配係数が低い。タモキシフェンの機能的類似体を使用してもよい。また、たとえば、安全性が証明されていること、薬物動態プロファイルが好適であること、組織分布が良好であること、細胞外間隙と細胞質との間の分配係数が低いこと、および／または毒性が低いことを目安に他の薬物を選択することもできる。

【０２６１】

いくつかの実施形態においては、前記システムは、合成転写制御因子（たとえば合成転写活性化因子）を使用し、タモキシフェンの存在下でこの合成転写制御因子を誘導することによって、導入遺伝子の（たとえば上流に）作動可能に連結された合成プロモーターに結合し、（たとえば該導入遺伝子の）前記プロモーターからの発現を誘導することができる。本明細書に記載の実施形態のいくつかにおいて、前記転写活性化因子は薬物またはその代謝産物によって制御され、たとえば、タモキシフェンにより制御される転写活性化因子または転写因子であり、これは、タモキシフェンまたはその類似体もしくは代謝産物によって制御されてもよく、たとえば誘導されてもよい。典型的なタモキシフェン制御性転写因子は、キメラ転写因子であり、たとえば、前記システムの合成プロモーターに特異的なＤＮＡ結合ドメイン、（たとえばエストロゲンなどの天然分子に存在するドメインが有する親和性よりも強い親和性で）タモキシフェンおよび／またはその単一もしくは複数の代謝産物と特異的に結合するドメイン、および転写活性化ドメイン（たとえば強力な転写活性化ドメイン）を含むキメラ転写因子である。タモキシフェンで制御される転写因子（「TamR-tf」あるいは「HEA3」とも称される）の一例は、ヒト由来サブユニットを含むキメラ転写因子であり、肝細胞核因子１－α（ＨＮＦ－１α）のＮ末端に存在するＤＮＡ結合ドメインが、エストロゲン受容体のリガンド結合ドメイン（ＥＲ－ＬＢＤ）のタモキシフェン特異的変異体（Ｇ５２１Ｒ）（エストロゲンよりも高い親和性でタモキシフェン代謝産物に結合する）にインフレームで融合されており、このタモキシフェン特異的変異リガンド結合ドメインがさらにＮＦ－κＢのｐ６５活性化ドメイン（ｐ６５）に融合されている。TamR-tfの典型的なアミノ酸配列は表１０に記載されており、配列番号４０で示されている。この配列において、エストロゲン受容体のリガンド結合ドメイン（ＥＲ－ＬＢＤ）の前記タモキシフェン特異的変異体は、TamR-tfの２８２～５９５番目のアミノ酸からなる配列であり、野生型のエストロゲン受容体のリガンド結合ドメインと比較すると５２１番目のアミノ酸に変異を有する。ＮＦ－κＢのｐ６５活性化ドメイン（ｐ６５）は、配列番号４０の５９６～８６２番目のアミノ酸からなる配列である。たとえば転写因子の特性を向上させるために、前記転写活性化因子に変更を加えてもよく、たとえば、前記エストロゲン受容体のリガンド結合ドメイン内の１つ以上のアミノ酸に変更を加えることによって、前記転写因子のエストロゲン類似体に対する親和性を増加させてもよく、かつ前記ｐ６５転写活性化ドメイン内の１つ以上のアミノ酸に変更を加えてもよいが、前記転写活性化因子への変更はこれらに限定されない。いくつかの実施形態においては、転写活性化因子に変更を加えることによって、tamR-tfの１つ以上の機能を保持または実質的に保持された改変転写因子が得られ、tamR-tfの１つ以上の機能としては、たとえば、タモキシフェンに特異的な結合性；任意の天然分子と同等、実質的に同等もしくは少なくとも同等の、タモキシフェンもしくはその代謝産物に対する特異性；任意の天然分子と少なくとも同等もしくはほぼ同等の、特異的なＤＮＡ結合機能；および／または同等もしくは少なくとも同等の転写活性化活性が挙げられる。

【０２６２】

タモキシフェンの非存在下では、通常、細胞質内の熱ショックタンパク質９０（ＨＳＰ９０）がタモキシフェン結合活性部位に結合することによって、前記転写活性化因子（たとえばTamR-tf）が核内から排除されるため、tamR-tfにより誘導可能なプロモーターに作動可能に連結された導入遺伝子の発現は「オフ」の状態となる。細胞質内にナノモル濃度のタモキシフェンが存在すると、ＥＲ－ＬＢＤへの結合に対してＨＳＰ９０と活発に競合することによってこれを阻害し、TamR-tfの核内への転座が生じる。核内への転座が起こると、TamR-tfは、特異的結合部位である合成プロモーター（たとえば７ｘＨＢＤ／ＥＦ１αｐ）と結合することが容易となる。タモキシフェンの存在下では、TamR-tfが前記合成プロモーター（たとえば7xHBD/EF1αpプロモーター）に結合することによって、該合成プロモーターに作動可能に連結された導入遺伝子の発現が「オン」の状態へと誘導される。いくつかの実施形態においては、この転写制御因子は、導入遺伝子の発現の制御を様々なレベルで行えるように改変されていてもよい。TamR-tfのリガンド結合ドメイン内のアミノ酸を置換することによって、タモキシフェンおよびその代謝産物に対する選択的応答

が可能となる。４－ヒドロキシタモキシフェン（4-OHT）は、TamR-tf活性に関して薬理学的活性が最も高い代謝物であり、内在性エストロゲンと相互作用を起こさない。

いくつかの実施形態においては、キメラ抗原受容体の発現誘導システムであって、

ａ）第１の核酸および

ｂ）第２の核酸を含み、

第１の核酸が、薬物による誘導の可能な第１のプロモーターを含み、該第１のプロモーターが、たとえばキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドなどのポリヌクレオチドに作動可能に連結されており、該キメラ抗原受容体がリガンド結合ドメインを含んでいてもよく、該リガンド結合ドメインがリガンドに結合し、該リガンドが、腫瘍に特異的な分子、ウイルス分子、またはリンパ球による認識および排除の媒介に適切な標的細胞集団上に発現されるその他の分子であり、第１の核酸が、前記リガンドに応答したＴ細胞の増殖および／またはサイトカインの産生が対照のキメラ受容体よりも増強されうるポリペプチドスペーサー、膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインをさらに含むことを特徴とするシステムが提供される。

いくつかの実施形態においては、前記システムは、前記誘導可能なプロモーターの転写調節物質をコードする第２の核酸をさらに含み、該転写調節物質は、たとえば薬物またはその代謝産物の存在下などにおいて、前記第１のプロモーターからの転写を調節する（たとえば活性化させる）ことができ、典型的には、前記システムは、前記転写調節物質をコードする核酸に作動可能に連結された第２の構成的プロモーターまたは誘導可能なプロモーターを含む。

【０２６３】

前記誘導システムの実施形態のいくつかにおいて、前記第１のプロモーターは、細胞の生存および増殖を促進する遺伝子、アポトーシスを阻害する遺伝子および／または負のチェックポイントシグナル伝達を抑制する遺伝子をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されている。このような遺伝子は、ＩＬ－２をコードする遺伝子、ＩＬ－１５をコードする遺伝子、ケモカイン受容体をコードする遺伝子、Ｂｃｌ２をコードする遺伝子、ＣＡ－Ａｋｔをコードする遺伝子、ｄｎ－ＴＧＦβ RIIIをコードする遺伝子、ｄｎ－ＳＨＰ１／２をコードする遺伝子、および／またはＰＤ－１-ＣＤ２８キメラをコードする遺伝子を含む。

【０２６４】

いくつかの実施形態においては、前記システムは合成転写活性化因子を使用し、該合成転写活性化因子は、前記薬物（たとえばタモキシフェン）またはその代謝産物の存在下（たとえば該薬物の投与後）において、導入遺伝子の上流の合成プロモーターへの結合が誘導され、発現を誘導する。いくつかの実施形態においては、前記転写活性化因子はTamR-tf（HEA3）、または類似したドメインを有する、タモキシフェンによる誘導の可能なその他の転写活性化因子である。タモキシフェンで制御されるこの転写因子（「TamR-tf」あるいは「HEA3」とも称される）は、ヒト由来サブユニットを含むキメラ転写因子であり、肝細胞核因子１－α（ＨＮＦ－１α）のＮ末端に存在するＤＮＡ結合ドメイン（たとえば配列番号４０の１～２８１番目のアミノ酸）が、エストロゲン受容体のリガンド結合ドメイン（ＥＲ－ＬＢＤ）のタモキシフェン特異的変異リガンド結合ドメインにインフレームで融合されており、このタモキシフェン特異的変異リガンド結合ドメインがさらにＮＦ－κＢのｐ６５活性化ドメイン（ｐ６５）に融合されている。

【０２６５】

本明細書に記載の組成物の実施形態のいくつかにおいて、前記ＣＤ４$^+$Ｔヘルパーリンパ球は、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細胞またはバルクＣＤ４$^+$Ｔ細胞である。いくつかの実施形態においては、前記ＣＤ４$^+$ヘルパーリンパ球は、ナイーブＣＤ４$^+$Ｔ細胞であり、該ナイーブＣＤ４$^+$Ｔ細胞は、ＣＤ４５ＲＯ－Ｔ細胞、ＣＤ４５ＲＡ$^+$Ｔ細胞、および／またはＣＤ６２Ｌ$^+$ＣＤ４$^+$Ｔ細胞を含む。いくつかの実施形態においては、前記組成物中の細胞の少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９

９％または１００％はＣＤ４＋であり；いくつかの実施形態においては、組成物中の細胞の少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％もしくは１００％または前記組成物中のＣＤ４＋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細胞またはバルクＣＤ４＋Ｔ細胞である。

【０２６６】

本明細書に記載の組成物の実施形態のいくつかにおいては、前記ＣＤ８＋Ｔ細胞傷害性リンパ球は、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細胞および／またはバルクＣＤ８＋Ｔ細胞である。いくつかの実施形態においては、前記ＣＤ８＋細胞傷害性Ｔリンパ球は、セントラルメモリーＴ細胞であり、該セントラルメモリーＴ細胞は、ＣＤ４５ＲＯ＋Ｔ細胞、ＣＤ６２Ｌ＋Ｔ細胞および／またはＣＤ８＋Ｔ細胞を含む。さらに別の実施形態では、前記ＣＤ８＋細胞傷害性Ｔリンパ球はセントラルメモリーＴ細胞であり、前記ＣＤ４＋ヘルパーＴリンパ球はナイーブＣＤ４＋Ｔ細胞またはセントラルメモリーＣＤ４＋Ｔ細胞である。いくつかの実施形態においては、前記組成物中の細胞の少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％または１００％はＣＤ８＋であり；いくつかの実施形態においては、組成物中の細胞の少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％もしくは１００％または前記組成物中のＣＤ８＋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細胞またはバルクＣＤ８＋Ｔ細胞である。実施形態のいくつかにおいては、前記組成物中の細胞の少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％もしくは１００％または前記組成物中のＣＤ４＋および／もしくはＣＤ８＋細胞は、前記導入遺伝子または組換え分子（ＣＡＲなど）を発現し、かつ／または前記発現システムを含んでいる。

【０２６７】

さらに、本発明のシステムを含む養子免疫療法組成物などの養子免疫療法組成物を包含する組成物の製造方法、および、たとえば疾患または障害を有する対象において細胞免疫療法を行うための、前記組成物の使用または使用方法を提供する。

【０２６８】

いくつかの実施形態においては、前記組成物の製造方法は、改変されたナイーブＣＤ４＋Ｔヘルパー細胞、改変されたナイーブ由来ＣＤ４＋Ｔヘルパー細胞、改変されたセントラルメモリーＣＤ４＋Ｔヘルパー細胞、もしくは改変されたセントラルメモリー由来ＣＤ４＋Ｔヘルパー細胞、またはこれらのいずれかを含む集団　を作製することを含み、前記改変されたヘルパーＴリンパ球製剤が、キメラ受容体を有するＣＤ４＋Ｔ細胞を含み、該キメラ受容体が、たとえば、本明細書に記載されているように、誘導可能なプロモーターの制御下で、腫瘍細胞の表面分子に特異的なリガンド結合ドメイン、スペーサードメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含むキメラ受容体であることを特徴とする。別の実施形態のいくつかでは、ＣＤ４＋細胞は、誘導可能なプロモーターの制御下にあるサイトカイン受容体またはケモカイン受容体を有する。

【０２６９】

本明細書に記載の方法の実施形態のいくつかにおいては、ＣＡＲを発現せず、かつ／またはＴａｍによる誘導の可能なタンパク質を産生する別のＴ細胞とともに、本発明のＴ細胞を投与する。いくつかの実施形態においては、ＣＡＲの転写活性化因子は、ＤＮＡ結合ドメイン、タモキシフェン／その代謝産物に結合するドメイン、または転写活性化ドメインを含む。いくつかの実施形態においては、前記合成転写活性化因子のドメインの１つ以上、通常そのドメインすべてが、ヒトタンパク質、たとえばヒト由来ドメインまたは実質的にヒトに由来するドメインに由来する。このような特徴から、たとえば細胞治療法などにおいて、ヒト対象に投与された際の本発明の構築物の免疫原性は低減することができる。

【実施例】

【０２７０】
Jurkat細胞における発現
TamR ZsGreenを発現するJurkat T細胞の「オン」および「オフ」の状態を研究した。
【０２７１】
構築物
いくつかの実施形態において、本発明のシステムは、
１）T2Aスキップリンカードメインを介して、単一または複数の導入遺伝子に連結されたHEA-3の構成的発現、および
２）タモキシフェンに応答して導入遺伝子の誘導が起こる、HEA-3特異的合成プロモーター7xHBD/mEF1apの制御下での導入遺伝子の条件的発現
からなる２つの要素を含む。
TamR LVによる遺伝子制御の所望の用途に応じて、送達系とベクター組成物との組み合わせを用いることができる。構築物の作製は上述されている。
【０２７２】
別のTamR-LVシステムを構築することによって、ZsGreenまたはキメラ抗原受容体の構成的HEA3発現および誘導発現が可能となり、タモキシフェンの存在または非存在において発現の「オン」と「オフ」を制御された場合の動態分析および生物学的効果を評価することが可能となる。この目的のため、以下の２つの構築物を用いた。
１）HEA-3はヒトEF1aプロモーターによって作動する。構築された末端切断型ＥＧＦＲ（EGFRt）膜貫通マーカータンパク質にT2Aスキップリンカー配列を介してHEA-3を連結し、第三世代のepHIV7自己不活化レンチウイルスパッケージングプラスミドにクローニングした（構築物Ａ）。（表１０の配列番号３９および表１の配列番号８および配列番号９を参照されたい。）
２）商業的に利用されるCMVプロモーターを欠失するように遺伝子改変されたpcDNA3.1(-)にクローニングしたZsGreenのタモキシフェン依存的発現は、7xHBD/mEF1apによって制御される（構築物Ｂ）（表１２の配列番号４１参照）。ZsGreen1は、市販品のうち最も明るい緑色蛍光タンパク質をコードするヒトコドン最適化ZsGreenバリアントである（Clontechから入手可能）。
【０２７３】
方法
前記で作製したレンチウイルスパッケージング構築物をＭＯＩ＝５で使用することによって、Jurkat細胞に形質導入した。このレンチウイルスパッケージング構築物は、レンチウイルスを産生している２９３Ｔ細胞に各プラスミドを共トランスフェクションするデュアルパッケージングアプローチにより作製したものである。この構築物は、構築物Ａと構築物Ｂとを１：２のモル比で含んでいた。構築物Ａは、リボソーム切断配列T2Aを介して追跡選択マーカーEGFRtに連結されたキメラ転写因子HEA3をコードする。構築物Ｂは、導入遺伝子ZsGreen-DR1の発現を制御する合成HEA3応答性プロモーター7xHBD/mE1bをコードし、ZsGreen-DR1は、半減期の短い緑色蛍光リポーター遺伝子である。
【０２７４】
形質導入後、細胞を培養して増殖させ、Miltenyi磁気ビーズ選択を利用して、EGFRtを発現している細胞を濃縮して純度＞９９％とした。さらに培養して増殖させた後、細胞を回収し、５００ｎＭ　４－ヒドロキシタモキシフェン（4OHT）またはネガティブコントロールとしてのエタノール（ビヒクル）で２４時間処理した。細胞を回収し、アービタックス－ビオチンで染色し、続いてSA-APCで染色して、フローサイトメトリーを用いてAPCの発現およびZsGreenの発現を分析した。結果を図１に示す。
【０２７５】
用量反応性
細胞を回収し、０ｎＭ～１０００ｎＭの所定濃度の4OHTで処理した。サンプルを回収し、洗浄し、EGFRt－ビオチンで染色し、続いてストレプトアビジン－APCで染色し、ZsGreenの発現をフローサイトメトリーで分析した。結果を図２に示す。

【０２７６】
オン／オフ率の動態
細胞集団を500nM 4OHTによる刺激に４８時間暴露させ、FACSを利用してZsGreen^{+}細胞をソートし、ソーティング直後の分析でZsGreen^{+}細胞が集団全体の＞９９％を占めることを確認した。その後、細胞を培養して３週間増殖させてから、動態評価用に調製した。細胞は３つの処理群、すなわち、（１）4OHT非添加群、（２）200nM 4OHT添加群（４８時間毎に添加）、（３）200nM 4OHTで２４時間処理して１×PBSで洗浄し、4OHT非含有培地で１４日間培養し、200nM 4OHTで２４時間再刺激して１×PBSで洗浄した群に分けた。各時点にてサンプルを回収し、フローサイトメトリーを用いてZsGreenの発現を分析した。結果を図３に示し、図中、%ZsGreen^{+}で示す。
【０２７７】
結果
図１中の結果は、４－ヒドロキシタモキシフェン（4OHT）の存在下で、約５０％の細胞がZsGreenを発現することを示しており、これらの細胞は構築物Ａおよび構築物Ｂの両方を有すること、および4-OHTが構築物Ｂの発現を誘導したことが示された。用量反応曲線の結果からは、200nM以上の濃度の4-OHTによって、形質導入細胞の導入遺伝子の発現が効果的に誘導されたことが示された（図２）。図３の結果からは、細胞を洗浄して培養物から4-OHTを除去すると、ZsGreenの発現が、５日以内に最大活性の１０％未満にまで低下することが示された。4-OHTを再び添加すると、ZsGreen活性は２日以内に約１００％の最大活性に戻る。
【０２７８】
考察
これらの実験から、構成的成分および誘導可能な成分を有するデュアルパッケージレンチウイルスを使用してヒトT Jurkat細胞に形質導入することが可能であることが示された。ZsGreen遺伝子の発現は、4-OHTの存在下で用量依存的に誘導される。また、細胞を洗浄して培養物から4-OHTを除去すると、ZsGreenの発現量が低下し、該細胞に4-OHTを再び添加すると、ZsGreenの発現を再刺激することができた。
【０２７９】
初代ＣＤ４セントラルメモリー細胞および初代ＣＤ８セントラルメモリー細胞における発現
TamR ZsGreenを発現するＣＤ４セントラルメモリーＴ細胞およびＣＤ８セントラルメモリーＴ細胞の「オン」および「オフ」の状態を研究した。
【０２８０】
構築物
いくつかの実施形態において、本発明のシステムは、
１）T2Aスキップリンカードメインを介して、単一または複数の導入遺伝子に連結されたHEA-3の構成的発現（構築物Ａ）（表１０の配列番号３９ならびに表１の配列番号８および配列番号９を参照されたい）、および
２）タモキシフェンに応答して導入遺伝子の誘導が起こる、HEA-3特異的合成プロモーター7xHBD/mEF1apの制御下での導入遺伝子の条件的発現（構築物Ｂ）（表１２の配列番号４１を参照されたい）
からなる２つの要素を含む。
TamR LVによる遺伝子制御の所望の用途に応じて、送達系とベクター組成物との組み合わせを用いることができる。これらの構築物は前記と同様にして調製した。
【０２８１】
方法
ＣＤ４およびＣＤ６２Ｌをマーカーとして、かつＣＤ４５ＲＯを陰性マーカーとしてフローサイトメトリーにて細胞を選択することによって、ＣＤ４セントラルメモリー細胞を末梢血から得た。この細胞を、抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８ビーズとともに３日間培養した。
【０２８２】

ＣＤ８およびＣＤ６２Ｌをマーカーとして、かつＣＤ４５ＲＯを陰性マーカーとしてフローサイトメトリーにて細胞を選択することによって、ＣＤ８セントラルメモリー細胞を末梢血から得た。この細胞を、抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８ビーズとともに３日間培養した。

【０２８３】

３日後、前記で作製したレンチウイルスパッケージング構築物をＭＯＩ＝５で使用することによって、ＣＤ４セントラルメモリー細胞またはＣＤ８セントラルメモリー細胞に形質導入した。このレンチウイルスパッケージング構築物は、レンチウイルスを産生している２９３Ｔ細胞に各プラスミドを共トランスフェクションするデュアルパッケージングアプローチにより作製したものである。この構築物は、構築物Ａと構築物Ｂとを１：２のモル比で含んでいた。構築物Ａは、リボソーム切断配列T2Aを介して追跡選択マーカーEGFRtに連結されたキメラ転写因子HEA3をコードする。構築物Ｂは、導入遺伝子ZsGreen-DR1の発現を制御する合成HEA3応答性プロモーター7xHBD/mE1bをコードし、ZsGreen-DR1は、半減期の短い緑色蛍光リポーター遺伝子である。

【０２８４】

形質導入後２１日目に、EGFRtを発現している細胞を濃縮し、フィーダー細胞、ＩＬ－２、およびＩＬ－１５ともに増殖させた。増殖後、細胞を３つの処理群、すなわち、（Ａ）4OHT単独処理群、（Ｂ）4OHTとCD3/CD28ビーズとを組み合わせた共処理群、または（Ｃ）4OHT単独で４８時間処理した後にCD3/CD28ビーズを添加することによって処理した群に分けた。それぞれの群に対応する4OHT非添加サンプルも比較のために調製した。サンプルはいずれも4OHTによる処理を行った後、所定の時点にて回収し、EGFRt－ビオチン抗体で染色し、続いてSA-APCで染色して、フローサイトメトリーで分析した。結果を、図４（ＣＤ４セントラルメモリー）および図５（ＣＤ８セントラルメモリー）に示す。

【０２８５】

結果

分析結果から、デュアルプラスミドベクターで形質導入したＣＤ４細胞は、タモキシフェンの存在下であっても、ZsGreenを発現するために活性刺激の存在を必要としたことが示された。図４Ｂを参照されたい。初代形質導入ＣＤ４細胞の約７０％は、タモキシフェンおよび抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８ビーズの存在下でZsGreenを発現した。タモキシフェンで４８時間にわたって処理を行うことによって活性化させた場合に、遺伝子発現が見られた。図４Ｃを参照されたい。

【０２８６】

また、分析結果から、デュアルプラスミドベクターで形質導入したＣＤ８細胞も、タモキシフェンの存在下であっても、ZsGreenを発現するために活性刺激の存在を必要としたことを示された。図５Ｂを参照されたい。初代形質導入ＣＤ８細胞の約３７％は、タモキシフェンおよび抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８ビーズの存在下でZsGreenを発現した。タモキシフェンで４８時間にわたって処理を行うことによって活性化させた場合に、遺伝子発現が見られた。図５Ｃを参照されたい。

【０２８７】

これらの結果から、誘導可能な構築物で形質導入した初代セントラルメモリーＴ細胞は、抗ＣＤ３細胞／抗ＣＤ２８細胞による活性化を行った後に誘導因子の存在下で導入遺伝子を発現できることが示された。また、導入遺伝子を発現するが、活性化されなかった細胞は、免疫磁気選択またはフローサイトメトリーソーティングを用いて容易に単離することができる。

【０２８８】

TamR-CD19CAR-LVの構築

このベクターの構築は、プラスミド構築物Ａとプラスミド構築物Ｂのモル比を１：１として、それぞれの構築物を含む移入プラスミドを前記と同様にデュアルパッケージングすることによって行った（図６Ｃおよび図７Ｃを参照されたい）。構成的EF-1αプロモーターの制御下の構築物Ａは、リボソーム切断配列T2Aを介して追跡選択マーカーEGFRtに連結されたTamR-tf（HEA3）をコードする（表１０の配列番号３９ならびに表１の配列番号８

および配列番号９を参照されたい）。構築物Ｂは、7xHBD/mE1bプロモーターを含有し、その下流に導入遺伝子ｃＤＮＡを有しており、該導入遺伝子ｃＤＮＡは、2a切断配列を介して追跡選択マーカーHer2tに連結されたCD19 CARを含む（表１２の配列番号４１、表２の配列番号１０、表１３の配列番号４４を参照されたい参照）。これらとは別に、さらなる選択マーカーDHFRdmを付加した構築物を調製した（表１４の配列番号４６を参照されたい）。

【０２８９】

ＭＯＩ＝２でヒトJurkat細胞に形質導入し、培養することにより増殖させ、磁気ビーズによる選択によりEGFRt$^+$細胞を選択した。さらに増殖させた後、細胞をビヒクルのみ（EtOH）または500nM 4OHTのいずれかで処理して、フローサイトメトリー分析用に回収した。サンプルを、EGFRt-APC抗体およびハーセプチン－ビオチンで染色し、続いてSA PEで染色した。これとは別に、サンプルをウエスタンブロット分析用に調製した。ウエスタンブロット分析の一次抗体として、CD19CAR上の細胞内CD3ζ鎖（約４８ｋＤａ）を認識する抗CD247マウスmAbを使用した。内在性CD3ζは約２３ｋＤａの位置に認められる。結果を図６に示す。

【０２９０】

選択マーカーを含有するTamR CD19CAR LVで形質導入したJurkat T細胞

TamR CD19CAR LVの構築は、構築物Ａおよび構築物Ｂをデュアルパッケージングすることによって行なった。構築物Ａは、リボソーム切断配列T2Aを介して追跡選択マーカーEGFRtに連結されたHEA3を含有する。構築物Ｂは、7xHBD/mE1bプロモーターを含有し、その下流に導入遺伝子を有しており、該導入遺伝子は、2a切断配列を介して追跡選択マーカーHer2tに連結されたCD19CARを含み、この追跡選択マーカーHer2tは別の2a切断配列（P2A）を介してメトトレキサート選択遺伝子DHFRdmに連結されている。

【０２９１】

ＭＯＩ＝１においてTamR CD19CAR LVで細胞に形質導入し、培養することにより増殖させ、磁気ビーズによる選択によりEGFRt$^+$細胞を選択した。さらに増殖させた後、細胞をビヒクルのみ（EtOH）または500nM 4OHTで処理して、フローサイトメトリー用に回収した（上段のパネル）（図７）。サンプルを、EGFRt-APC抗体およびハーセプチン-ビオチンで染色し、続いてSA-PEで染色した。比較のために親細胞（形質導入していないJurkat細胞）を示す。これとは別に、サンプルをウエスタンブロット分析用に調製した。ウエスタンブロット分析の一次抗体として、CD19CAR上の細胞内CD3ζ鎖（約４８ｋＤａ）を認識する抗CD247マウスmAbを使用した。内在性CD3ζは約２３ｋＤａの位置に認められる。

【０２９２】

結果

分析結果から、さらなる選択マーカーであるDHFRdmを含まない構築物で形質導入した細胞の９４．６％においてEGFRtが検出されたことが示された。図６Ｂを参照されたい。図６Ｃは、DHFRdmを含まない構築物で形質導入した細胞の約４２．６％が、タモキシフェンの存在下で、EGFRtおよびHer2tの両方を発現したことを示す。ウエスタンブロットで検出されたように、両方のマーカーを発現する細胞は、CAR構築物の一部としてCD3ζ鎖（４８ｋＤａ）を発現した。図６Ｂを参照されたい。

【０２９３】

図７は、DHFRdmが別の2a切断配列（P2A）を介して連結された構築物で形質導入したJurkat細胞の８５．９％は、タモキシフェンの非存在下でEGFRtを発現することを示す。タモキシフェンの存在下では、約７．５％の細胞がEGFRtおよびHer2tの両方を発現した。ウエスタンブロットで検出されたように、両方のマーカーを発現する細胞は、CAR構築物の一部としてCD3ζ鎖（４８ｋＤａ）を発現した。図７Ｂを参照されたい。

【０２９４】

形質導入したJurkat細胞においてはCD19 CARの誘導可能な発現が見られる。誘導の測定は、ウエスタンブロットを用いて、マーカーであるHer2tの発現およびCD19CARの発現を検出することによって行うことができる。誘導可能な構築物にさらなる選択可能マーカーと

してDHFRdmを付加しても、誘導可能な遺伝子の発現は向上しなかった。

【０２９５】

TamR CD19CAR LVにより形質導入されたヒトCD4 T_{CM} T細胞

ＣＤ４およびＣＤ６２Ｌをマーカーとして、かつＣＤ４５ＲＯを陰性マーカーとしてフローサイトメトリーにて細胞を選択することによって、ＣＤ４セントラルメモリー細胞を末梢血から得た。この細胞を、抗CD3/抗CD28ビーズとともに３日間培養した。３日後、構築物Ａおよび構築物Ｂをパッケージしたレンチウイルスを ＭＯＩ＝５で使用して、ＣＤ４セントラルメモリー細胞に形質導入した（図８Ｂ）。構築物Ａは、リボソーム切断配列T2Aを介して追跡選択マーカーEGFRtに連結されたキメラ転写因子HEA3をコードする。（表１０の配列番号３９および表１の配列番号８および配列番号９を参照されたい。）構築物Ｂは、導入遺伝子CD19CARの発現を制御する合成HEA3反応プロモーター7xHBD/mE1bをコードし、この導入遺伝子は、T2Aを介して追跡選択マーカーであるHer2tに連結されており、Her2tは第２の2a配列（P2A）を介してメトトレキサート選択遺伝子DHFRdmに連結されている。（表１２の配列番号４１、表２の配列番号１０、表１３の配列番号４４および表１４の配列番号４６を参照されたい）。

【０２９６】

形質導入後２１日目に、磁気ビーズ選択を使用して、EGFRtを発現している細胞を濃縮した後、放射線照射フィーダー細胞、ＩＬ－２、およびＩＬ－１５とともに増殖させた。増殖の２週後、細胞を凍結保存した。前述した実験において、Mock形質導入した$CD4^+$CEM細胞、または$CD4^+$TamR CD19CAR LVを解凍し、ＣＤ３／ＣＤ２８ビーズ、ＩＬ－２、ＩＬ－１５とともに培養した。$CD4^+$TamRCD19CAR LVを500nM 4OHTで２４時間処理した群と、4OHTで処理しなかった群とを作製した。全サンプルを回収して洗浄し、EGFRt-APC抗体およびＨｅｒ２ｔ－ビオチンで染色し、続いてSA-PEで染色して、フローサイトメトリーで分析した。結果を図８に示す。

【０２９７】

結果

図８の結果から、形質導入した初代ＣＤ４セントラルメモリー細胞の７５．６％は、タモキシフェンの非存在下でEGFRtを発現することが示され、このことから構築物Ａの構成的発現が示された。タモキシフェンおよび活性刺激（たとえば抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８ビーズ）の存在下では、初代細胞の約１４．７％がEGFRtおよびHer2tの両方を発現する。

【０２９８】

マーカー遺伝子であるHer2tの発現が検出されたことから、誘導可能なベクターで形質導入した初代ＣＤ４細胞は、誘導因子および活性刺激の存在下で、誘導可能なプロモーターの制御下で導入遺伝子を発現することが示された。

また、導入遺伝子を発現するが、活性化されなかった細胞は、免疫磁気選択またはフローサイトメトリーソーティングを用いて容易に単離することができる。

これらの細胞は、CD19CARの発現を検出することによって、さらに特性を評価することができる。

【０２９９】

前述の実施例は本発明を例示するものであり、本発明をなんら限定するものではない。本発明は、以下の請求項によって定義され、請求項の等価物も本発明に含まれる。本明細書において引用した参考文献および論文はいずれも参照により本明細書に組み込まれる。

表 1

短いスペーサーを有する抗 CD19 キメラ受容体の配列

GMCSFRss-CD19scFv-IgG4hinge-CD28tm-41BB-Zeta-T2A-EGFRt

*Atg*ctgctgctggtgaccagcctgctgctgtgcgagctgccccaccccgcctttctgctgatcccc (GMCSFRss) (配列番号 2)

Gacatccagatgacccagaccacctccagcctgagcgccagcctgggcgaccgggtgaccatcagctgccgggccagccaggac
atcagcaagtacctgaactggtatcagcagaagcccgacggcaccgtcaagctgctgatctaccacaccagccggctgcacagcgg
cgtgcccagccggtttagcggcagcggctccggcaccgactacagcctgaccatctccaacctggaacaggaagatatcgccacct
actttgccagcagggcaacacactgccctacacctttggcggcggaacaaagctggaaatcaccggcagcacctccggcagcggc
aagcctggcagcggcgagggcagcaccaagggcgaggtgaagctgcaggaaagcggccctggcctggtggcccccagccaga
gcctgagcgtgacctgcaccgtgagcggcgtgagcctgcccgactacggcgtgagctggatccggcagccccccaggaagggcc
tggaatggctgggcgtgatctggggcagcgagaccacctactacaacagcgccctgaagagccggctgaccatcatcaaggacaa
cagcaagagccaggtgttcctgaagatgaacagcctgcagaccgacgacaccgccatctactactgcgccaagcactactactacgg
cggcagctacgccatggactactggggccagggcaccagcgtgaccgtgagcagc (CD19scFv) (配列番号 3)

Gaatctaagtacggaccgccctgccccccttgccct (IgG4hinge) (配列番号 4)

Atgttctgggtgctggtggtggtcggaggcgtgctggcctgctacagcctgctggtcaccgtggccttcatcatcttttgggtg
(CD28tm-)(配列番号 5)

Aaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagct
gccgatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaactg (41BB) (配列番号 6)

Cgggtgaagttcagcagaagcgccgacgcccctgcctaccagcagggccagaatcagctgtacaacgagctgaacctgggcaga
agggaagagtacgacgtcctggataagcggagaggccgggaccctgagatgggcggcaagcctcggcggaagaaccccccagga
aggcctgtataacgaactgcagaaagacaagatggccgaggcctacagcgagatcggcatgaagggcgagcggaggcggggca
agggccacgacggcctgtatcagggcctgtccaccgccaccaaggatacctacgacgccctgcacatgcaggccctgcccccaag
g (CD3Zeta)- (配列番号 7)

Ctcgagggcggcggagagggcagaggaagtcttctaacatgcggtgacgtggaggagaatcccggccctagg (T2A) (配列番号 8)

Atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacacccagcattcctcctgatcccacgcaaagtgtgtaacggaataggt
attggtgaatttaaagactcactctccataaatgctacgaatattaaacacttcaaaaactgcacctccatcagtggcgatctccacatcct
gccggtggcatttaggggtgactccttcacacatactcctcctctggatccacaggaactggatattctgaaaaccgtaaaggaaatcac
agggtttttgctgattcaggcttggcctgaaaacaggacggacctccatgcctttgagaacctagaaatcatacgcggcaggaccaag
caacatggtcagttttctcttgcagtcgtcagcctgaacataacatccttgggattacgctccctcaaggagataagtgatggagatgtga
taatttcaggaaacaaaaatttgtgctatgcaaatacaataaactggaaaaaactgtttgggacctccggtcagaaaaccaaaattataag
caacagaggtgaaaacagctgcaaggccacaggccaggtctgccatgccttgtgctcccccgagggctgctggggcccggagccc

agggactgcgtctcttgccggaatgtcagccgaggcagggaatgcgtggacaagtgcaaccttctggagggtgagccaagggagtt
tgtggagaactctgagtgcatacagtgccacccagagtgcctgcctcaggccatgaacatcacctgcacaggacggggaccagaca
actgtatccagtgtgcccactacattgacggcccccactgcgtcaagacctgcccggcaggagtcatgggagaaaacaacaccctgg
tctggaagtacgcagacgccggccatgtgtgccacctgtgccatccaaactgcacctacggatgcactgggccaggtcttgaaggct
gtccaacgaatgggcctaagatcccgtccatcgccactgggatggtgggggccctcctcttgctgctggtggtggccctggggatcg
gcctcttcatg*tga* (EGFRt) (配列番号 9)

表 2

GMCSFRss

DNA: *ATG*CTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCCACCCCGCC
AA: M L L L V T S L L L C E L P H P A

CD19scFv

DNA: TTTCTGCTGATCCCC:GACATCCAGATGACCCAGACCACCTCCAGCCTGAGC
AA: F L L I P D I Q M T Q T T S S L S

DNA: GCCAGCCTGGGCGACCGGGTGACCATCAGCTGCCGGGCCAGCCAGGACATC
AA: A S L G D R V T I S C R A S Q D I

DNA: AGCAAGTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGACGGCACCGTCAAGCTG
AA: S K Y L N W Y Q Q K P D G T V K L

DNA: CTGATCTACCACACCAGCCGGCTGCACAGCGGCGTGCCCAGCCGGTTTAGC
AA: L I Y H T S R L H S G V P S R F S

DNA: GGCAGCGGCTCCGGCACCGACTACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAACAG
AA: G S G S G T D Y S L T I S N L E Q

DNA: GAAGATATCGCCACCTACTTTTGCCAGCAGGGCAACACACTGCCCTACACC
AA: E D I A T Y F C Q Q G N T L P Y T

DNA: TTTGGCGGCGGAACAAAGCTGGAAATCACCGGCAGCACCTCCGGCAGCGGC
AA: F G G G T K L E I T G S T S G S G

DNA: AAGCCTGGCAGCGGCGAGGGCAGCACCAAGGGCGAGGTGAAGCTGCAGGAA
AA: K P G S G E G S T K G E V K L Q E

DNA: AGCGGCCCTGGCCTGGTGGCCCCCAGCCAGAGCCTGAGCGTGACCTGCACC
AA: S G P G L V A P S Q S L S V T C T

DNA: GTGAGCGGCGTGAGCCTGCCCGACTACGGCGTGAGCTGGATCCGGCAGCCC
AA: V S G V S L P D Y G V S W I R Q P

DNA: CCCAGGAAGGGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGCGAGACCACC
AA: P R K G L E W L G V I W G S E T T

DNA: TACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACAGC
AA: Y Y N S A L K S R L T I I K D N S

DNA: AAGAGCCAGGTGTTCCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCC
AA: K S Q V F L K M N S L Q T D D T A

DNA: ATCTACTACTGCGCCAAGCACTACTACTACGGCGGCAGCTACGCCATGGAC
AA: I Y Y C A K H Y Y Y G G S Y A M D

IgG4hinge

DNA: TACTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACCGTGAGCAGC:GAGAGCAAGTACGGA
AA: Y W G Q G T S V T V S S E S K Y G

CD28tm

DNA: CCGCCCTGCCCCCCTTGCCCT:ATGTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTCGGAGGC
AA: P P C P P C P M F W V L V V V G G

DNA: GTGCTGGCCTGCTACAGCCTGCTGGTCACCGTGGCCTTCATCATCTTTTGG
AA: V L A C Y S L L V T V A F I I F W

41BB

DNA: GTG:AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATG
AA: V K R G R K K L L Y I F K Q P F M

DNA: AGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCA
AA: R P V Q T T Q E E D G C S C R F P

CD3**Zeta**

DNA: GAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGCGGGTGAAG:TTCAGCAGAAGCGCC
AA: E E E E G G C E L R V K F S R S A

DNA: GACGCCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAATCAGCTGTACAACGAGCTGAAC
AA: D A P A Y Q Q G Q N Q L Y N E L N

DNA: CTGGGCAGAAGGGAAGAGTACGACGTCCTGGATAAGCGGAGAGGCCGGGAC
AA: L G R R E E Y D V L D K R R G R D

DNA: CCTGAGATGGGCGGCAAGCCTCGGCGGAAGAACCCCCAGGAAGGCCTGTAT
AA: P E M G G K P R R K N P Q E G L Y

DNA: AACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATG
AA: N E L Q K D K M A E A Y S E I G M

DNA: AAGGGCGAGCGGAGGCGGGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTATCAGGGCCTG
AA: K G E R R R G K G H D G L Y Q G L

DNA: TCCACCGCCACCAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCC
AA: S T A T K D T Y D A L H M Q A L P

T2A

DNA: CCAAGG:CTCGAGGGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGT
AA: P R L E G G G E G R G S L L T C G

EGFRt

DNA: GACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGG:**ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTT**
AA: D V E E N P G P R M L L L V T S L

DNA: **CTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCCTCCTGATCCCACGCAAAGTG**
AA: L L C E L P H P A F L L I P R K V

DNA: **TGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACTCACTCTCCATAAATGCT**
AA: C N G I G I G E F K D S L S I N A

DNA: **ACGAATATTAAACACTTCAAAAACTGCACCTCCATCAGTGGCGATCTCCAC**
AA: T N I K H F K N C T S I S G D L H

DNA: **ATCCTGCCGGTGGCATTTAGGGGTGACTCCTTCACACATACTCCTCCTCTG**
AA: I L P V A F R G D S F T H T P P L

DNA: **GATCCACAGGAACTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTTT**
AA: D P Q E L D I L K T V K E I T G F

DNA: **TTGCTGATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCTTTGAG**
AA: L L I Q A W P E N R T D L H A F E

DNA: **AACCTAGAAATCATACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTT**
AA: N L E I I R G R T K Q H G Q F S L

DNA: **GCAGTCGTCAGCCTGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAG**
AA: A V V S L N I T S L G L R S L K E

DNA: **ATAAGTGATGGAGATGTGATAATTTCAGGAAACAAAAATTTGTGCTATGCA**
AA: I S D G D V I I S G N K N L C Y A

DNA: **AATACAATAAACTGGAAAAAACTGTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACCAAA**
AA: N T I N W K K L F G T S G Q K T K

DNA: **ATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGCTGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGC**
AA: I I S N R G E N S C K A T G Q V C

DNA: **CATGCCTTGTGCTCCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCGGAGCCCAGGGACTGC**
AA: H A L C S P E G C W G P E P R D C

DNA: **GTCTCTTGCCGGAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATGCGTGGACAAGTGCAAC**
AA: V S C R N V S R G R E C V D K C N

DNA: **CTTCTGGAGGGTGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGCATACAG**
AA: L L E G E P R E F V E N S E C I Q

DNA: **TGCCACCCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACGG**
AA: C H P E C L P Q A M N I T C T G R

DNA: **GGACCAGACAACTGTATCCAGTGTGCCCACTACATTGACGGCCCCCACTGC**
AA: G P D N C I Q C A H Y I D G P H C

DNA: **GTCAAGACCTGCCCGGCAGGAGTCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCTGG**
AA: V K T C P A G V M G E N N T L V W

DNA: **AAGTACGCAGACGCCGGCCATGTGTGCCACCTGTGCCATCCAAACTGCACC**
AA: K Y A D A G H V C H L C H P N C T

DNA: **TACGGATGCACTGGGCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCAACGAATGGGCCTAAG**
AA: Y G C T G P G L E G C P T N G P K

DNA: **ATCCCGTCCATCGCCACTGGGATGGTGGGGGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTG**
AA: I P S I A T G M V G A L L L L L V

DNA: **GTGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCATG*TGA*** (配列番号 10)
AA: V A L G I G L F M * (配列番号 11)

表 3
ZXR-014ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列（各セクションのマップ）

GMCSFRss: nt2084-2149 (配列番号 50)

CD19scFv: nt2150-2884(配列番号 51)

Igg4Hinge: nt2885-2920 (配列番号 52)

CD28tm: nt2921-3004 (配列番号 53)

41BB: nt3005-3130 (配列番号 54)

Zeta: nt3131-3466 (配列番号 55)

T2A: nt3467-3538 (配列番号 56)

EGFRt: nt3539-4612 (配列番号 57)

シークエンシングプライマー:

オリゴ名	配列	領域
oJ02649	ATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGT	pre-U5(配列番号 22)
oJ02648	CCGTACCTTTAAGACCAATGACTTAC	delU3(配列番号 23)
oJ02650	TTGAGAGTTTTCGCCCCG	mid-Ampr(配列番号 24)
oJ02651	AATAGACAGATCGCTGAGATAGGT	post-Ampr(配列番号 25)
oJ02652	CAGGTATCCGGTAAGCGG	CoE1 ori(配列番号 26)
oJ02653	CGACCAGCAACCATAGTCC	SV40(配列番号 27)
oJ02654	TAGCGGTTTGACTCACGG	CMV(配列番号 28)
oJ02655	GCAGGGAGCTAGAACGATTC	psi(配列番号 29)
oJ02656	ATTGTCTGGTATAGTGCAGCAG	RRE(配列番号 30)
oJ02657	TCGCAACGGGTTTGCC	EF1p(配列番号 31)
oJ02658	AGGAAGATATCGCCACCTACT	CD19Rop(配列番号 32)
oJ02601	CGGGTGAAGTTCAGCAGAAG	Zeta(配列番号 33)
oJ02735	ACTGTGTTTGCTGACGCAAC	WPRE(配列番号 34)
oJ02715	ATGCTTCTCCTGGTGACAAG	EGFRt(配列番号 35)

表 4　Uniprot P0861 IgG4-Fc(配列番号13)

```
    10         20         30         40         50         60
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS

        70         80         90        100        110        120
GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPSCP APEFLGGPSV

       130        140        150        160        170        180
FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY

       190        200        210        220        230        240
RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK

       250        260        270        280        290        300
NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG

       310        320
NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK
```

1-98 CH1 (配列番号 59)

99-110 ヒンジ (配列番号 60)

111-220 CH2 (配列番号 61)

221-327 CH3 (配列番号 62)

108 番目 S→P (配列番号 63)

表 5 Uniprot P10747 CD28(配列番号14)

```
10         20         30         40         50         60
MLRLLLALNL FPSIQVTGNK ILVKQSPMLV AYDNAVNLSC KYSYNLFSRE FRASLHKGLD

        70         80         90        100        110        120
SAVEVCVVYG NYSQQLQVYS KTGFNCDGKL GNESVTFYLQ NLYVNQTDIY FCKIEVMYPP

       130        140        150        160        170        180
PYLDNEKSNG TIIHVKGKHL CPSPLFPGPS KPFWVLVVVG GVLACYSLLV TVAFIIFWVR

       190        200        210        220
SKRSRLLHSD YMNMTPRRPG PTRKHYQPYA PPRDFAAYRS
```

1-18 シグナルペプチド (配列番号 64)

19-152 細胞外ドメイン (配列番号 65)

153-179 膜貫通ドメイン (配列番号 66)

180-220 細胞内ドメイン (配列番号 67)

186-187 番目 LL→GG (配列番号 68)

表 6 Uniprot Q07011 4-1BB(配列番号15)

```
    10         20         30         40         50         60
MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR

        70         80         90        100        110        120
TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC

       130        140        150        160        170        180
CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE

       190        200        210        220        230        240
PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG

       250
CSCRFPEEEE GGCEL
```

1-23 シグナルペプチド (配列番号 69)

24-186 細胞外ドメイン (配列番号 70)

187-213 膜貫通ドメイン (配列番号 71)

214-255 細胞内ドメイン (配列番号 72)

表 7 Uniprot P20963 ヒト CD3ζ アイソフォーム 3 (配列番号16)

```
1          2          3          4          5          6
MKWKALFTAA ILQAQLPITE AQSFGLLDPK LCYLLDGILF IYGVILTALF LRVKFSRSAD

          7          8          9          10         11         12
APAYQQGQNQ LYNELNLGRR EEYDVLDKRR GRDPEMGGKP QRRKNPQEGL YNELQKDKMA

         13         14         15         16
EAYSEIGMKG ERRRGKGHDG LYQGLSTATK DTYDALHMQA LPPR
```

1-21 シグナルペプチド (配列番号 73)

22-30 細胞外ドメイン (配列番号 74)

31-51 膜貫通ドメイン (配列番号 75)

52-164 細胞内ドメイン (配列番号 76)

61-89 ITAM1 (配列番号 77)

100-128 ITAM2 (配列番号 78)

131-159 ITAM3 (配列番号 79)

表 8 典型的なヒンジ領域配列

ヒト IgG1 EPKSCDKTHTCPPCP (配列番号 17)

ヒト IgG2 ERKCCVECPPCP (配列番号 18)

ヒト IgG3 ELKTPLGDTHTCPRCP $(EPKSCDTPPPCPRCP)_3$ (配列番号 19)

ヒト IgG4 ESKYGPPCPSCP (配列番号 20)

改変ヒト IgG4 ESKYGPPCPPCP (配列番号 21)

改変ヒト IgG4 YGPPCPPCP (配列番号 36)

改変ヒト IgG4 KYGPPCPPCP (配列番号 37)

改変ヒト IgG4 EVVKYGPPCPPCP (配列番号 38)

表 9 Her 2 構築物-短いスペーサー (配列番号1)

GMCSFss-Her2scFv-IgG4hinge-CD28tm-41BB-Zeta-T2A-EGFRt

Leader

Atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacacccagcattcctcctgatccca (配列番号 80)

Her2scFV

Gatatccagatgacccagtccccgagctccctgtccgcctctgtgggcgatagggtcaccatcacctgccgtgccagtcaggatgt
gaatactgctgtagcctggtatcaacagaaaccaggaaaagctccgaaactactgatttactcggcatccttcctctactctggagtcc
cttctcgcttctctggttccagatctgggacggatttcactctgaccatcagcagtctgcagccggaagacttcgcaacttattactgtca
gcaacattatactactcctcccacgttcggacagggtaccaaggtggagatcaaaggcagtactagcggcggtggctccgggggc
ggatccggtgggggcggcagcagcgaggttcagctggtggagtctggcggtggcctggtgcagccaggggctcactccgtttgt
cctgtgcagcttctggcttcaacattaaagacacctatatacactgggtgcgtcaggccccgggtaagggcctggaatgggttgcaa
ggatttatcctacgaatggttatactagatatgccgatagcgtcaagggccgtttcactataagcgcagacacatccaaaaacacagc
ctacctgcagatgaacagcctgcgtgctgaggacactgccgtctattattgttctagatggggaggggacggcttctatgctatggact
actggggtcaaggaaccctggtcaccgtctcgagt (配列番号 81)

Hinge spacer

Gagagcaagtacggaccgccctgccccccttgccct (配列番号 82)

CD28tm

Atgttctgggtgctggtggtggtcggaggcgtgctggcctgctacagcctgctggtcaccgtggccttcatcatcttttgggtg (配列番号 83)

4-1BB

Aaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagc
tgccgatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaactg (配列番号 84)

CD3 zeta

Cgggtgaagttcagcagaagcgccgacgcccctgcctaccagcagggccagaatcagctgtacaacgagctgaacctgggcag
aagggaagagtacgacgtcctggataagcggagaggccgggaccctgagatgggcggcaagcctcggcggaagaaccccccag
gaaggcctgtataacgaactgcagaaagacaagatggccgaggcctacagcgagatcggcatgaagggcgagcggaggcgggg
gcaagggccacgacggcctgtatcagggcctgtccaccgccaccaaggatacctacgacgccctgcacatgcaggccctgcccc
caagg (配列番号 85)

T2A

Ctcgagggcggcggagagggcagaggaagtcttctaacatgcggtgacgtggaggagaatcccggccctagg (配列番号 86)

tEGFR

atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacacccagcattcctcctgatcccacgcaaagtgtgtaacggaataggt
attggtgaatttaaagactcactctccataaatgctacgaatattaaacacttcaaaaactgcacctccatcagtggcgatctccacatcc
tgccggtggcatttaggggtgactccttcacacatactcctcctctggatccacaggaactggatattctgaaaaccgtaaaggaaatc
acagggtttttgctgattcaggcttggcctgaaaacaggacggacctccatgcctttgagaacctagaaatcatacgcggcaggacc
aagcaacatggtcagttttctcttgcagtcgtcagcctgaacataacatccttgggattacgctccctcaaggagataagtgatggaga
tgtgataatttcaggaaacaaaaatttgtgctatgcaaatacaataaactggaaaaaactgtttgggacctccggtcagaaaaccaaaa
ttataagcaacagaggtgaaaacagctgcaaggccacaggccaggtctgccatgccttgtgctcccccgagggctgctggggccc
ggagcccagggactgcgtctcttgccggaatgtcagccgaggcagggaatgcgtggacaagtgcaaccttctggagggtgagcc
aagggagtttgtggagaactctgagtgcatacagtgccacccagagtgcctgcctcaggccatgaacatcacctgcacaggacgg
ggaccagacaactgtatccagtgtgcccactacattgacggcccccactgcgtcaagacctgcccggcaggagtcatgggagaaa
acaacaccctggtctggaagtacgcagacgccggccatgtgtgccacctgtgccatccaaactgcacctacggatgcactgggcca

ggtcttgaaggctgtccaacgaatgggcctaagatcccgtccatcgccactgggatggtgggggccctcctcttgctgctggtggtg
gccctggggatcggcctcttcatgtga (配列番号 87)

表 10 TamR-tf (HEA3) 核酸 (配列番号 39)

HEA3ヌクレオチド配列(配列番号:39)およびアミノ酸配列(配列番号:40)

```
                M  V  S  K  L  S  Q  L  Q  T  E  L  L  A  A  L  L  E  S  G  L  S  K  E  A  L  I  Q  A ·
               ATGGTG TCCAAGCTGT CCCAGCTGCA GACAGAACTG CTGGCAGCAC TGCTGGAAAG CGGCCTGAGC AAAGAGGCCC TGATTCAGGC
               TACCAC AGGTTCGACA GGGTCGACGT CTGTCTTGAC GACCGTCGTG ACGACCTTTC GCCGGACTCG TTTCTCCGGG ACTAAGTCCG

·  L  G  E  P  G  P  Y  L  L  A  G  E  G  P  L  D  K  G  E  S  C  G  G  G  R  G  E  L  A  E  L  P  N
ACTCGGCGAA CCTGGACCTT ATCTGCTCGC TGGCGAAGGC CCTCTGGATA AGGGCGAGAG CTGTGGCGGA GGAAGAGGAG AGCTGGCCGA GCTGCCTAAC
TGAGCCGCTT GGACCTGGAA TAGACGAGCG ACCGCTTCCG GGAGACCTAT TCCCGCTCTC GACACCGCCT CCTTCTCCTC TCGACCGGCT CGACGGATTG

 G  L  G  E  T  R  G  S  E  D  E  T  D  D  D  G  E  D  F  T  P  P  I  L  K  E  L  E  N  L  S  P  E  E
GGCCTGGGCG AGACAAGAGG CAGCGAGGAC GAGACAGACG ACGACGGCGA GGACTTCACC CCCCCATCC TGAAAGAGCT GGAAAACCTG AGCCCCGAGG
CCGGACCCGC TCTGTTCTCC GTCGCTCCTG CTCTGTCTGC TGCTGCCGCT CCTGAAGTGG GGGGGGTAGG ACTTTCTCGA CCTTTTGGAC TCGGGGCTCC

·  A  A  H  Q  K  A  V  V  E  T  L  L  Q  E  D  P  W  R  V  A  K  M  V  K  S  Y  L  Q  Q  H  N  I  P ·
AAGCCGCCCA CCAGAAAGCC GTGGTGGAGA CACTGCTGCA GGAAGATCCC TGGCGGGTCG CCAAGATGGT CAAGAGCTAC CTGCAGCAGC ACAACATCCC
TTCGGCGGGT GGTCTTTCGG CACCACCTCT GTGACGACGT CCTTCTAGGG ACCGCCCAGC GGTTCTACCA GTTCTCGATG GACGTCGTCG TGTTGTAGGG

·  Q  R  E  V  V  D  T  T  G  L  N  Q  S  H  L  S  Q  H  L  N  K  G  T  P  M  K  T  Q  K  R  A  A  L
CCAGCGGGAG GTGGTGGACA CCACCGGCCT GAACCAGAGC CACCTGAGCC AGCACCTGAA CAAGGGCACC CCCATGAAAA CCCAGAAGAG AGCCGCCCTG
GGTCGCCCTC CACCACCTGT GGTGGCCGGA CTTGGTCTCG GTGGACTCGG TCGTGGACTT GTTCCCGTGG GGGTACTTTT GGGTCTTCTC TCGGCGGGAC

 Y  T  W  Y  V  R  K  Q  R  E  V  A  Q  Q  F  T  H  A  G  Q  G  G  L  I  E  E  P  T  G  D  E  L  P  T
TACACTTGGT ACGTGCGGAA GCAGAGAGAG GTGGCCCAGC AGTTTACACA CGCCGGCCAG GGCGGCCTGA TCGAGGAACC TACCGGCGAC GAGCTGCCCA
ATGTGAACCA TGCACGCCTT CGTCTCTCTC CACCGGGTCG TCAAATGTGT GCGGCCGGTC CCGCCGGACT AGCTCCTTGG ATGGCCGCTG CTCGACGGGT

·  K  K  G  R  R  N  R  F  K  W  G  P  A  S  Q  Q  I  L  F  Q  A  Y  E  R  Q  K  N  P  S  K  E  E  R ·
CCAAGAAGGG CAGACGGAAC CGGTTTAAGT GGGGCCCTGC ATCTCAGCAG ATCCTGTTCC AGGCCTACGA GCGGCAGAAG AACCCCAGCA AAGAGGAACG
GGTTCTTCCC GTCTGCCTTG GCCAAATTCA CCCCGGGACG TAGAGTCGTC TAGGACAAGG TCCGGATGCT CGCCGTCTTC TTGGGGTCGT TTCTCCTTGC

·  E  T  L  V  E  E  C  N  R  A  E  C  I  Q  R  G  V  S  P  S  Q  A  Q  G  L  G  S  N  L  V  T  E  V
GGAGACACTG GTGGAAGAGT GCAACCGGGC CGAGTGCATC CAGAGAGGCG TGAGCCCTTC TCAGGCTCAG GGCCTCGGCA GCAATCTGGT CACCGAAGTG
CCTCTGTGAC CACCTTCTCA CGTTGGCCCG GCTCACGTAG GTCTCTCCGC ACTCGGGAAG AGTCCGAGTC CCGGAGCCGT CGTTAGACCA GTGGCTTCAC

 R  V  Y  N  W  F  A  N  R  R  K  E  E  A  F  R  H  K  L  S  A  G  D  M  R  A  A  N  L  W  P  S  P  L
CGGGTGTACA ATTGGTTCGC CAACCGGCGG AAAGAGGAAG CCTTCCGGCA CAAGCTGTCT GCTGGCGATA TGAGAGCCGC CAACCTGTGG CCCAGCCCCC
GCCCACATGT TAACCAAGCG GTTGGCCGCC TTTCTCCTTC GGAAGGCCGT GTTCGACAGA CGACCGCTAT ACTCTCGGCG GTTGGACACC GGGTCGGGGG

·  M  I  K  R  S  K  K  N  S  L  A  L  S  L  T  A  D  Q  M  V  S  A  L  L  D  A  E  P  P  I  L  Y  S ·
TGATGATCAA GCGGAGCAAG AAGAACAGCC TGGCCCTGAG CCTGACCGCC GATCAGATGG TGTCCGCTGT GCTGGACGCC GAGCCCCCTA TCCTGTACAG
ACTACTAGTT CGCCTCGTTC TTCTTGTCGG ACCGGGACTC GGACTGGCGG CTAGTCTACC ACAGGCGAGA CGACCTGCGG CTCGGGGGAT AGGACATGTC
```

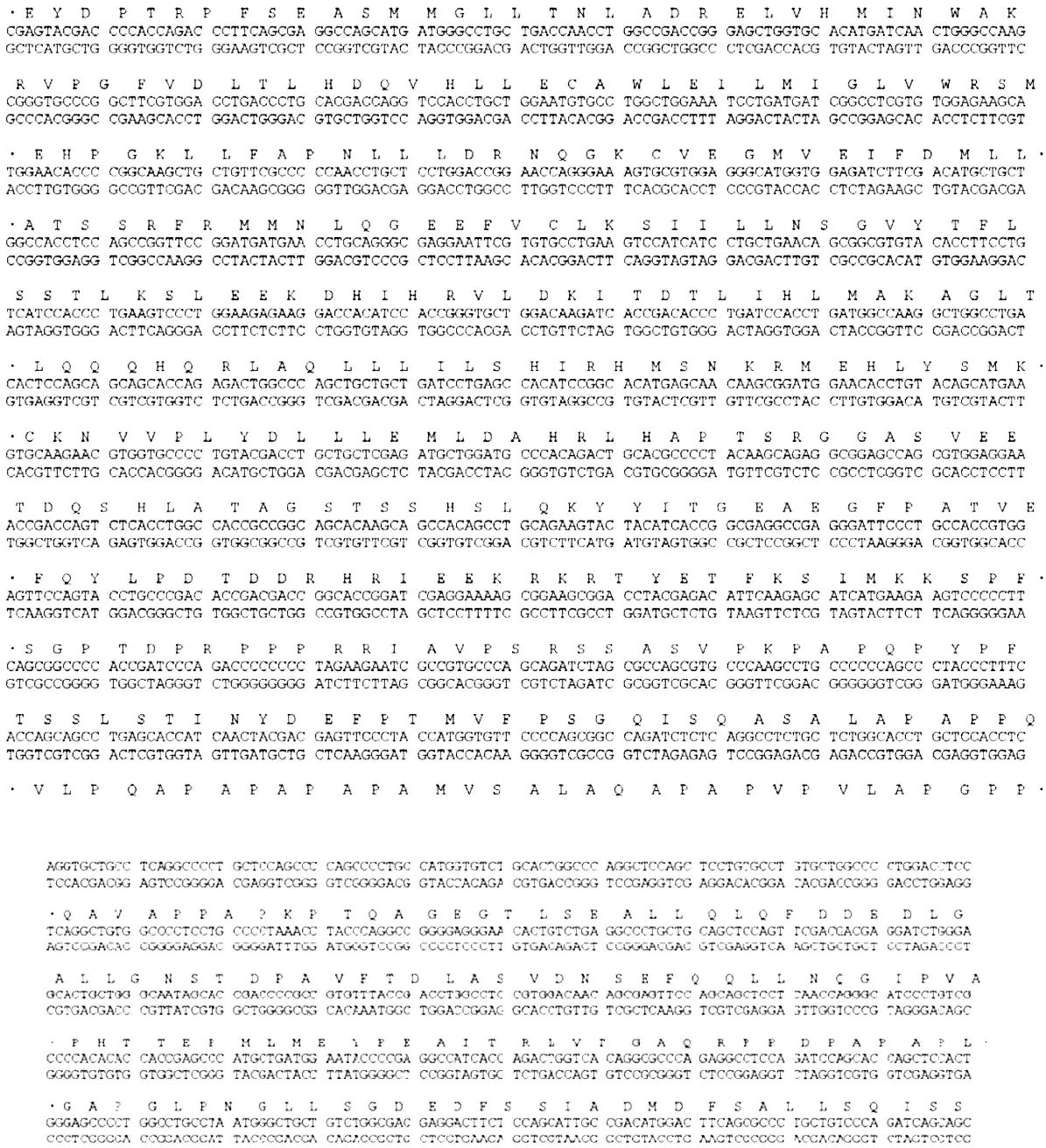


表 11 TamR-tf（HEA4）核酸配列（配列番号 42）アミノ酸配列（配列番号 43）

HEA4 ヌクレオチド配列(配列番号 およびアミノ酸配列

```
                M  V  S  K  L  S  Q  L  Q  T  E  L  L  A  A  L  L  E  S  G  L  S  K  E  A  L  I  Q  A ·
               ATGGTG TCCAAGCTGT CCCAGCTGCA GACAGAACTG CTGGCAGCAC TGCTGGAAAG CGGCCTGAGC AAAGAGGCCC TGATTCAGGC
               TACCAC AGGTTCGACA GGGTCGACGT CTGTCTTGAC GACCGTCGTG ACGACCTTTC GCCGGACTCG TTTCTCCGGG ACTAAGTCCG

 ·L  G  E  P  G  P  Y  L  L  A  G  E  G  P  L  D  K  G  E  S  C  G  G  G  R  G  E  L  A  E  L  P  N
ACTCGGCGAA CCTGGACCTT ATCTGCTCGC TGGCGAAGGC CCTCTGGATA AGGGCGAGAG CTGTGGCGGA GGAAGAGGAG AGCTGGCCGA GCTGCCTAAC
TGAGCCGCTT GGACCTGGAA TAGACGAGCG ACCGCTTCCG GGAGACCTAT TCCCGCTCTC GACACCGCCT CCTTCTCCTC TCGACCGGCT CGACGGATTG

 G  L  G  E  T  R  G  S  E  D  E  T  D  D  D  G  E  D  F  T  P  P  I  L  K  E  L  E  N  L  S  P  E  E
GGCCTGGGCG AGACAAGAGG CAGCGAGGAC GAGACAGACG ACGACGGCGA GGACTTCACC CCCCCATCC TGAAAGAGCT GGAAAACCTG AGCCCCGAGG
CCGGACCGC TCTGTTCTCC GTCGCTCCTG CTCTGTCTGC TGCTGCCGCT CCTGAAGTGG GGGGGGTAGG ACTTTCTCGA CCTTTTGGAC TCGGGGCTCC

 ·  A  A  H  Q  K  A  V  V  E  T  L  L  Q  E  D  P  W  R  V  A  K  M  V  K  S  Y  L  Q  Q  H  N  I  P ·
AAGCCGCCCA CCAGAAAGCC GTGGTGGAGA CACTGCTGCA GGAAGATCCC TGGCGGGTCG CCAAGATGGT CAAGAGCTAC CTGCAGCAGC ACAACATCCC
TTCGGCGGGT GGTCTTTCGG CACCACCTCT GTGACGACGT CCTTCTAGGG ACCGCCCAGC GGTTCTACCA GTTCTCGATG GACGTCGTCG TGTTGTAGGG

 ·Q  R  E  V  V  D  T  T  G  L  N  Q  S  H  L  S  Q  H  L  N  K  G  T  P  M  K  T  Q  K  R  A  A  L
CCAGCGGGAG GTGGTGGACA CCACCGGCCT GAACCAGAGC CACCTGAGCC AGCACCTGAA CAAGGGCACC CCCATGAAAA CCCAGAAGAG AGCCGCCCTG
GGTCGCCCTC CACCACCTGT GGTGGCCGGA CTTGGTCTCG GTGGACTCGG TCGTGGACTT GTTCCCGTGG GGGTACTTTT GGGTCTTCTC TCGGCGGGAC

 Y  T  W  Y  V  R  K  Q  R  E  V  A  Q  Q  F  T  H  A  G  Q  G  G  L  I  E  E  P  T  G  D  E  L  P  T
TACACTTGGT ACGTGCGGAA GCAGAGAGAG GTGGCCCAGC AGTTTACACA CGCCGGCCAG GGCGGCCTGA TCGAGGAACC TACCGGCGAC GAGCTGCCCA
ATGTGAACCA TGCACGCCTT CGTCTCTCTC CACCGGGTCG TCAAATGTGT GCGGCCGGTC CGCCGGACT AGCTCCTTGG ATGGCCGCTG CTCGACGGGT

 ·  K  K  G  R  R  N  R  F  K  W  G  P  A  S  Q  Q  I  L  F  Q  A  Y  E  R  Q  K  N  P  S  K  E  E  R ·
CCAAGAAGGG CAGACGGAAC CGGTTTAAGT GGGGCCCTGC ATCTCAGCAG ATCCTGTTCC AGGCCTACGA GCGGCAGAAG AACCCCAGCA AAGAGGAACG
GGTTCTTCCC GTCTGCCTTG GCCAAATTCA CCCCGGGACG TAGAGTCGTC TAGGACAAGG TCCGGATGCT CGCCGTCTTC TTGGGGTCGT TTCTCCTTGC

 ·E  T  L  V  E  E  C  N  R  A  E  C  I  Q  R  G  V  S  P  S  Q  A  Q  G  L  G  S  N  L  V  T  E  V
GGAGACACTG GTGGAAGAGT GCAACCGGGC CGAGTGCATC CAGAGAGGCG TGAGCCCTTC TCAGGCTCAG GGCCTCGGCA GCAATCTGGT CACCGAAGTG
CCTCTGTGAC CACCTTCTCA CGTTGGCCCG GCTCACGTAG GTCTCTCCGC ACTCGGGAAG AGTCCGAGTC CCGGAGCCGT CGTTAGACCA GTGGCTTCAC

 R  V  Y  N  W  F  A  N  R  R  K  E  E  A  F  R  H  K  L  S  A  G  D  M  R  A  A  N  L  W  P  S  P  L
CGGGTGTACA ATTGGTTCGC CAACCGGCGG AAAGAGGAAG CCTTCCGGCA CAAGCTGTCT GCTGGCGATA TGAGAGCCGC CAACCTGTGG CCCAGCCCCC
GCCCACATGT TAACCAAGCG GTTGGCCGCC TTTCTCCTTC GGAAGGCCGT GTTCGACAGA CGACCGCTAT ACTCTCGGCG GTTGGACACC GGGTCGGGGG

 ·  M  I  K  R  S  K  K  N  S  L  A  L  S  L  T  A  D  Q  M  V  S  A  L  L  D  A  E  P  P  I  L  Y  S ·
TGATGATCAA GCGGAGCAAG AAGAACAGCC TGGCCCTGAG CCTGACCGCC GATCAGATGG TGTCCGCTCT GCTGGACGCC GAGCCCCCTA TCCTGTACAG
ACTACTAGTT CGCCTCGTTC TTCTTGTCGG ACCGGGACTC GGACTGGCGG CTAGTCTACC ACAGGCGAGA CGACCTGCGG CTCGGGGGAT AGGACATGTC

 ·E  Y  D  P  T  R  P  F  S  E  A  S  M  M  G  L  L  T  N  L  A  D  R  E  L  V  H  M  I  N  W  A  K
CGAGTACGAC CCCACCAGAC CCTTCAGCGA GGCCAGCATG ATGGGCCTGC TGACCAACCT GGCCGACCGG GAGCTGGTGC ACATGATCAA CTGGGCCAAG
GCTCATGCTG GGGTGGTCTG GGAAGTCGCT CCGGTCGTAC TACCCGGACG ACTGGTTGGA CCGGCTGGCC CTCGACCACG TGTACTAGTT GACCCGGTTC

 R  V  P  G  F  V  D  L  T  L  H  D  Q  V  H  L  L  E  C  A  W  L  E  I  L  M  I  G  L  V  W  R  S  M
CGGGTGCCCG GCTTCGTGGA CCTGACCCTG CACGACCAGG TCCACCTGCT GGAATGTGCC TGGCTGGAAA TCCTGATGAT CGGCCTCGTG TGGAGAAGCA
GCCCACGGGC CGAAGCACCT GGACTGGGAC GTGCTGGTCC AGGTGGACGA CCTTACACGG ACCGACCTTT AGGACTACTA GCCGGAGCAC ACCTCTTCGT

 ·  E  H  P  V  K  L  L  F  A  P  N  L  L  L  D  R  N  Q  G  K  C  V  E  G  M  V  E  I  F  D  M  L  L ·
TGGAACACCC CGTGAAGCTG CTGTTCGCCC CCAACCTGCT CCTGGACCGG AACCAGGGAA AGTGCGTGGA GGGCATGGTG GAGATCTTCG ACATGCTGCT
ACCTTGTGGG GCACTTCGAC GACAAGCGGG GGTTGGACGA GGACCTGGCC TTGGTCCCTT TCACGCACCT CCCGTACCAC CTCTAGAAGC TGTACGACGA

 ·A  T  S  S  R  F  R  M  M  N  L  Q  G  E  E  F  V  C  L  K  S  I  I  L  L  N  S  G  V  Y  T  F  L
GGCCACCTCC AGCCGGTTCC GGATGATGAA CCTGCAGGGC GAGGAATTCG TGTGCCTGAA GTCCATCATC CTGCTGAACA GCGGCGTGTA CACCTTCCTG
CCGGTGGAGG TCGGCCAAGG CCTACTACTT GGACGTCCCG CTCCTTAAGC ACACGGACTT CAGGTAGTAG GACGACTTGT CGCCGCACAT GTGGAAGGAC

 S  S  T  L  K  S  L  E  E  K  D  H  I  H  R  V  L  D  K  I  T  D  T  L  I  H  L  M  A  K  A  G  L  T
TCATCCACCC TGAAGTCCCT GGAAGAGAAG GACCACATCC ACCGGGTGCT GGACAAGATC ACCGACACCC TGATCCACCT GATGGCCAAG GCTGGCCTGA
AGTAGGTGGG ACTTCAGGGA CCTTCTCTTC CTGGTGTAGG TGGCCCACGA CCTGTTCTAG TGGCTGTGGG ACTAGGTGGA CTACCGGTTC CGACCGGACT

 ·  L  Q  Q  Q  H  Q  R  L  A  Q  L  L  L  I  L  S  H  I  R  H  M  S  N  K  G  M  E  H  L  Y  S  M  K ·
CACTCCAGCA GCAGCACCAG AGACTGGCCC AGCTGCTGCT GATCCTGAGC CACATCCGGC ACATGAGCAA CAAGGGAATG GAACACCTGT ACAGCATGAA
GTGAGGTCGT CGTCGTGGTC TCTGACCGGG TCGACGACGA CTAGGACTCG GTGTAGGCCG TGTACTCGTT GTTCCCTTAC CTTGTGGACA TGTCGTACTT

 ·C  K  N  V  V  P  L  Y  D  L  L  L  E  A  A  D  A  H  R  L  H  A  P  T  S  R  G  G  A  S  V  E  E
GTGCAAGAAC GTGGTGCCCC TGTACGACCT GCTGCTCGAG GCTGCCGATG CCCACAGACT GCACGCCCCT ACAAGCAGAG GCGGAGCCAG CGTGGAGGAA
CACGTTCTTG CACCACGGGG ACATGCTGGA CGACGAGCTC CGACGGCTAC GGGTGTCTGA CGTGCGGGGA TGTTCGTCTC CGCCTCGGTC GCACCTCCTT

 T  D  Q  S  H  L  A  T  A  G  S  T  S  S  H  S  L  Q  K  Y  Y  I  T  G  E  A  E  G  F  P  A  T  V  E
ACCGACCAGT CTCACCTGGC CACCGCCGGC AGCACAAGCA GCCACAGCCT GCAGAAGTAC TACATCACCG GCGAGGCCGA GGGATTCCCT GCCACCGTGG
TGGCTGGTCA GAGTGGACCG GTGGCGGCCG TCGTGTTCGT CGGTGTCGGA CGTCTTCATG ATGTAGTGGC CGCTCCGGCT CCCTAAGGGA CGGTGGCACC

 ·  F  Q  Y  L  P  D  T  D  D  R  H  R  I  E  E  K  R  K  R  T  Y  E  T  F  K  S  I  M  K  K  S  P  F ·
AGTTCCAGTA CCTGCCCGAC ACCGACGACC GGCACCGGAT CGAGGAAAAG CGGAAGCGGA CCTACGAGAC ATTCAAGAGC ATCATGAAGA AGTCCCCTT
TCAAGGTCAT GGACGGGCTG TGGCTGCTGG CCGTGGCCTA GCTCCTTTTC GCCTTCGCCT GGATGCTCTG TAAGTTCTCG TAGTACTTCT TCAGGGGGAA

 ·S  G  P  T  D  P  R  P  P  P  R  R  I  A  V  P  S  R  S  S  A  S  V  P  K  P  A  P  Q  P  Y  P  F
CAGCGGCCCC ACCGATCCCA GACCCCCCCC TAGAAGAATC GCCGTGCCCA GCAGATCTAG CGCCAGCGTG CCCAAGCCTG CCCCCCAGCC CTACCCTTTC
GTCGCCGGGG TGGCTAGGGT CTGGGGGGGG ATCTTCTTAG CGGCACGGGT CGTCTAGATC GCGGTCGCAC GGGTTCGGAC GGGGGGTCGG GATGGGAAAG

 T  S  S  L  S  T  I  N  Y  D  E  F  P  T  M  V  F  P  S  G  Q  I  S  Q  A  S  A  L  A  P  A  P  P  Q
ACCAGCAGCC TGAGCACCAT CAACTACGAC GAGTTCCCTA CCATGGTGTT CCCCAGCGGC CAGATCTCTC AGGCCTCTGC TCTGGCACCT GCTCCACCTC
TGGTCGTCGG ACTCGTGGTA GTTGATGCTG CTCAAGGGAT GGTACCACAA GGGGTCGCCG GTCTAGAGAG TCCGGAGACG AGACCGTGGA CGAGGTGGAG
```

```
· V L P  Q A P  A P A P  A P A  M V S  A L A Q  A P A  P V P  V L A P  G P P ·
AGGTGCTGCC TCAGGCCCCT GCTCCAGCCC CAGCCCCTGC CATGGTGTCT GCACTGGCCC AGGCTCCAGC TCCTGTGCCT GTGCTGGCCC CTGGACCTCC
TCCACGACGG AGTCCGGGGA CGAGGTCGGG GTCGGGGACG GTACCACAGA CGTGACCGGG TCCGAGGTCG AGGACACGGA CACGACCGGG GACCTGGAGG

·Q A V  A P P A  P K P  T Q A  G E G T  L S E  A L L  Q L Q F  D D E  D L G
TCAGGCTGTG GCCCCTCCTG CCCCTAAACC TACCCAGGCC GGGGAGGGAA CACTGTCTGA GGCCCTGCTG CAGCTCCAGT TCGACGACGA GGATCTGGGA
AGTCCGACAC CGGGGAGGAC GGGGATTTGG ATGGGTCCGG CCCCTCCCTT GTGACAGACT CCGGGACGAC GTCGAGGTCA AGCTGCTGCT CCTAGACCCT

 A L L G  N S T  D P A  V F T D  L A S  V D N  S E F Q  Q L L  N Q G  I P V A
GCACTGCTGG GCAATAGCAC CGACCCCGCC GTGTTTACCG ACCTGGCCTC CGTGGACAAC AGCGAGTTCC AGCAGCTCCT CAACCAGGGC ATCCCTGTCG
CGTGACGACC CGTTATCGTG GCTGGGGCGG CACAAATGGC TGGACCGGAG GCACCTGTTG TCGCTCAAGG TCGTCGAGGA GTTGGTCCCG TAGGGACAGC

· P H T  T E P  M L M E  Y P E  A I T  R L V T  G A Q  R P P  D P A P  A P L ·
CCCCACACAC CACCGAGCCC ATGCTGATGG AATACCCCGA GGCCATCACC AGACTGGTCA CAGGCGCCCA GAGGCCTCCA GATCCAGCAC CAGCTCCACT
GGGGTGTGTG GTGGCTCGGG TACGACTACC TTATGGGGCT CCGGTAGTGG TCTGACCAGT GTCCGCGGGT CTCCGGAGGT CTAGGTCGTG GTCGAGGTGA

·G A P  G L P N  G L L  S G D  E D F S  S I A  D M D  F S A L  L S Q  I S S
GGGAGCCCCT GGCCTGCCTA ATGGGCTGCT GTCTGGCGAC GAGGACTTCT CCAGCATTGC CGACATGGAC TTCAGCGCCC TGCTGTCCCA GATCAGCAGC
CCCTCGGGGA CCGGACGGAT TACCCGACGA CAGACCGCTG CTCCTGAAGA GGTCGTAACG GCTGTACCTG AAGTCGCGGG ACGACAGGGT CTAGTCGTCG
```

表 12 7xHBD/mEF1α 核酸配列（配列番号 41）

Tagttaataatctacaatagttaataatctacaatagttaataatctacaatagttaataatctacaatagttaataatctacaatagttaataatctacaata
gttaataatctacaa

表 13 Her2t 核酸配列（配列番号 44）およびアミノ酸配列（配列番号 45）

HER2t (CHP) ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列

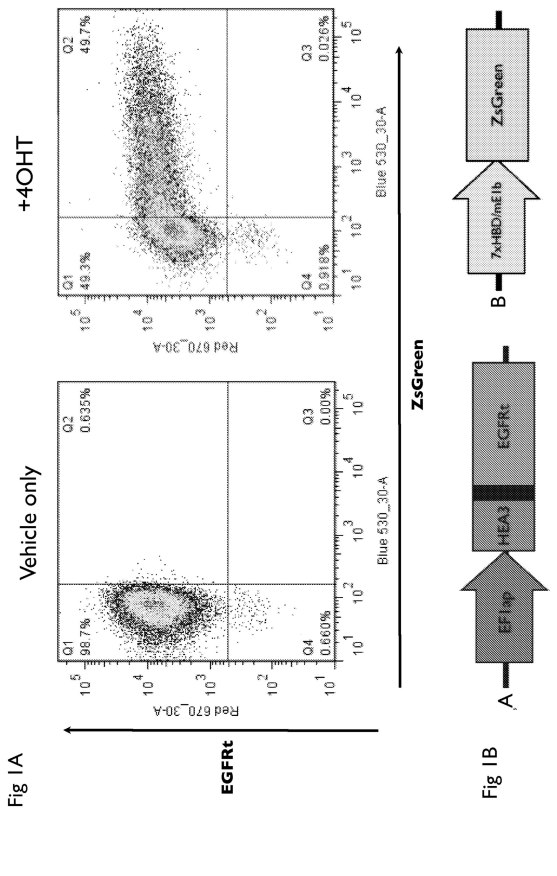
```
                                                    M L  L L V  T S L L  L C E  L P H
                                                    ATGCT TCTCCTGGTG ACAAGCCTTC TGCTCTGTGA GTTACCACAC
                                                    TACGA AGAGGACCAC TGTTCGGAAG ACGAGACACT CAATGGTGTG

 P A F L  L I P  C H P  E C Q P  Q N G  S V T  C F G P  E A D  Q C V  A C A H
CCAGCATTCC TCCTGATCCC ATGCCACCCT GAGTGTCAGC CCCAGAATGG CTCAGTGACC TGTTTTGGAC CGGAGGCTGA CCAGTGTGTG GCCTGTGCCC
GGTCGTAAGG AGGACTAGGG TACGGTGGGA CTCACAGTCG GGGTCTTACC GAGTCACTGG ACAAAACCTG GCCTCCGACT GGTCACACAC CGGACACGGG

· Y K D  P P F  C V A R  C P S  G V K  P D L S  Y M P  I W K  F P D E  E G A ·
ACTATAAGGA CCCTCCCTTC TGCGTGGCCC GCTGCCCCAG CGGTGTGAAA CCTGACCTCT CCTACATGCC CATCTGGAAG TTTCCAGATG AGGAGGGCGC
TGATATTCCT GGGAGGGAAG ACGCACCGGG CGACGGGGTC GCCACACTTT GGACTGGAGA GGATGTACGG GTAGACCTTC AAAGGTCTAC TCCTCCCGCG

·C Q P  C P I N  C T H  S C V  D L D D  K G C  P A E  Q R A S  P L T  S I I
ATGCCAGCCT TGCCCCATCA ACTGCACCCA CTCCTGTGTG GACCTGGATG ACAAGGGCTG CCCCGCCGAG CAGAGAGCCA GCCCTCTGAC GTCCATCATC
TACGGTCGGA ACGGGGTAGT TGACGTGGGT GAGGACACAC CTGGACCTAC TGTTCCCGAC GGGGCGGCTC GTCTCTCGGT CGGGAGACTG CAGGTAGTAG

 S A V V  G I L  L V V  V L G V  V F G  I L I  *
TCTGCGGTGG TTGGCATTCT GCTGGTCGTG GTCTTGGGGG TGGTCTTTGG GATCCTCATC TGA
AGACGCCACC AACCGTAAGA CGACCAGCAC CAGAACCCCC ACCAGAAACC CTAGGAGTAG ACT
```

表 14 DHFRdm 核酸配列（配列番号 46）およびアミノ酸配列（配列番号 47）

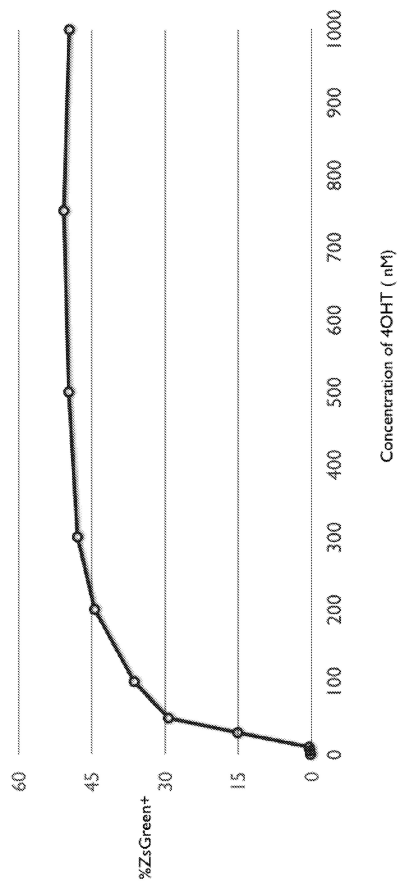
DHFRdm ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列

```
M  V  G  S  L  N ·
ATGGTTG GTTCGCTAAA
TACCAAC CAAGCGATTT

·C  I  V  A  V  S  Q  N  M  G  I  G  K  N  G  D  F  P  W  P  P  L  R  N  E  S  R  Y  F  Q  R  M  T
CTGCATCGTC GCTGTGTCCC AGAACATGGG CATCGGCAAG AACGGGGACT TCCCCTGGCC ACCGCTCAGG AATGAATCCA GATATTTCCA GAGAATGACC
GACGTAGCAG CGACACAGGG TCTTGTACCC GTAGCCGTTC TTGCCCCTGA AGGGGACCGG TGGCGAGTCC TTACTTAGGT CTATAAAGGT CTCTTACTGG

 T  T  S  S  V  E  G  K  Q  N  L  V  I  M  G  K  K  T  W  F  S  I  P  E  K  N  R  P  L  K  G  R  I  N
ACAACCTCTT CAGTAGAAGG TAAACAGAAT CTGGTGATTA TGGGTAAGAA GACCTGGTTC TCCATTCCTG AGAAGAATCG ACCTTTAAAG GGTAGAATTA
TGTTGGAGAA GTCATCTTCC ATTTGTCTTA GACCACTAAT ACCCATTCTT CTGGACCAAG AGGTAAGGAC TCTTCTTAGC TGGAAATTTC CCATCTTAAT

· L  V  L  S  R  E  L  K  E  P  P  Q  G  A  H  F  L  S  R  S  L  D  D  A  L  K  L  T  E  Q  P  E  L ·
ATTTAGTTCT CAGCAGAGAA CTCAAGGAAC CTCCACAAGG AGCTCATTTT CTTTCCAGAA GTCTAGATGA TGCCTTAAAA CTTACTGAAC AACCAGAATT
TAAATCAAGA GTCGTCTCTT GAGTTCCTTG GAGGTGTTCC TCGAGTAAAA GAAAGGTCTT CAGATCTACT ACGGAATTTT GAATGACTTG TTGGTCTTAA

·A  N  K  V  D  M  V  W  I  V  G  G  S  S  V  Y  K  E  A  M  N  H  P  G  H  L  K  L  F  V  T  R  I
AGCAAATAAA GTAGACATGG TCTGGATAGT TGGTGGCAGT TCTGTTTATA AGGAAGCCAT GAATCACCCA GGCCATCTTA AACTATTTGT GACAAGGATC
TCGTTTATTT CATCTGTACC AGACCTATCA ACCACCGTCA AGACAAATAT TCCTTCGGTA CTTAGTGGGT CCGGTAGAAT TTGATAAACA CTGTTCCTAG

 M  Q  D  F  E  S  D  T  F  F  P  E  I  D  L  E  K  Y  K  L  L  P  E  Y  P  G  V  L  S  D  V  Q  E  E
ATGCAAGACT TTGAAAGTGA CACGTTTTTT CCAGAAATTG ATTTGGAGAA ATATAAACTT CTGCCAGAAT ACCCAGGTGT TCTCTCTGAT GTCCAGGAGG
TACGTTCTGA AACTTTCACT GTGCAAAAAA GGTCTTTAAC TAAACCTCTT TATATTTGAA GACGGTCTTA TGGGTCCACA AGAGAGACTA CAGGTCCTCC

· K  G  I  K  Y  K  F  E  V  Y  E  K  N  D
AGAAAGGCAT TAAGTACAAA TTTGAAGTAT ATGAGAAGAA TGAT
TCTTTCCGTA ATTCATGTTT AAACTTCATA TACTCTTCTT ACTA
```

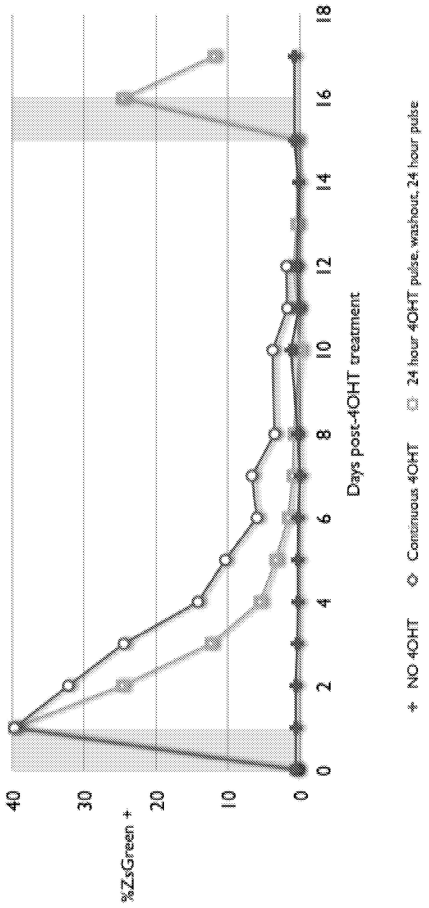
【図１】



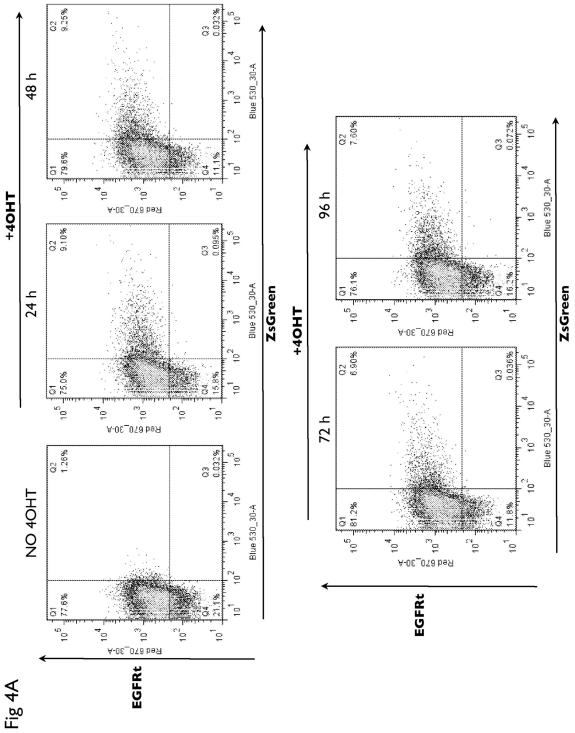
【図２】



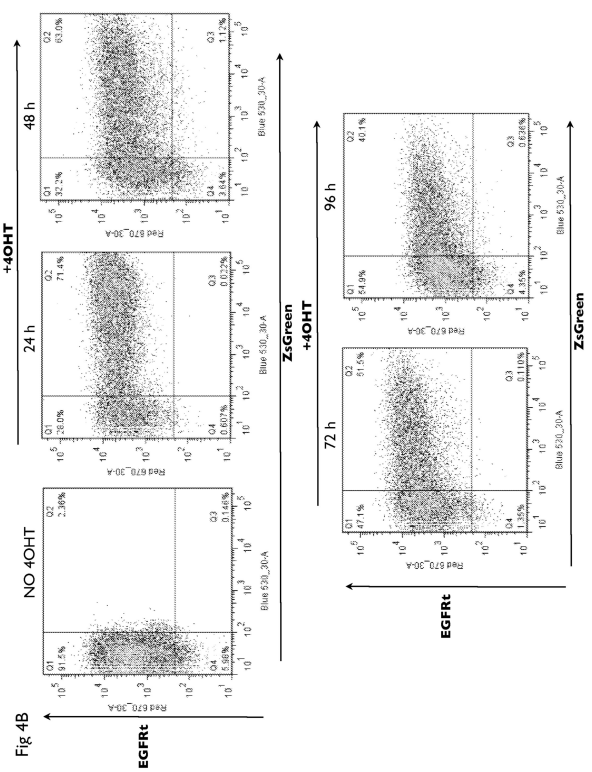
【図３】



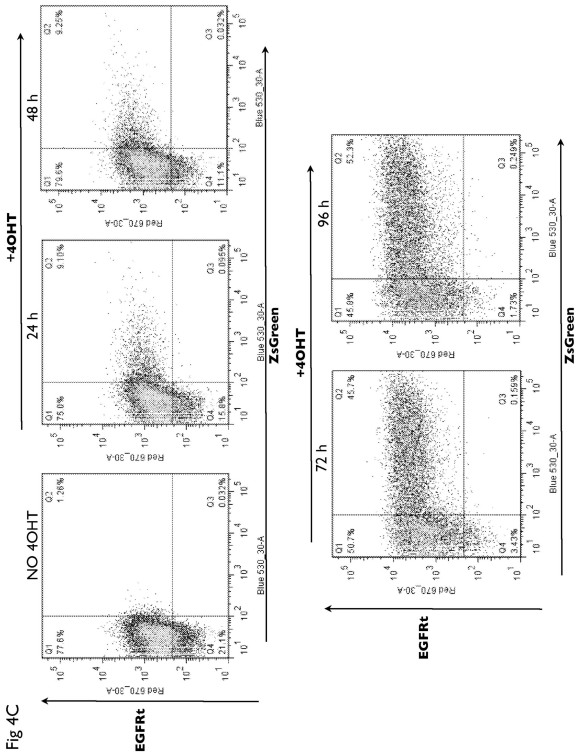
【図４－１】



【図４－２】



【図４－３】



【図４－４】

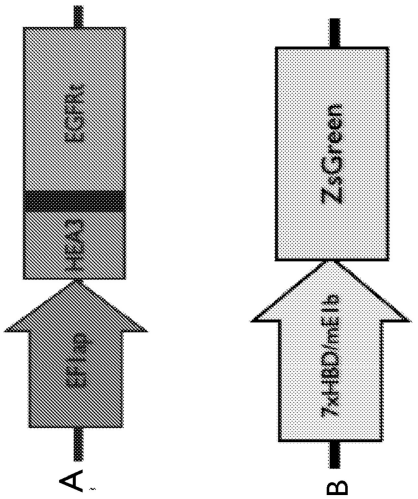


Fig 4D

【図５－１】

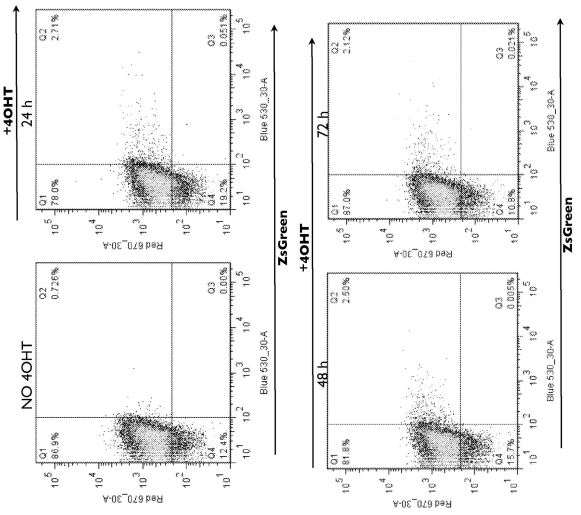


Fig 5A

【図５－２】

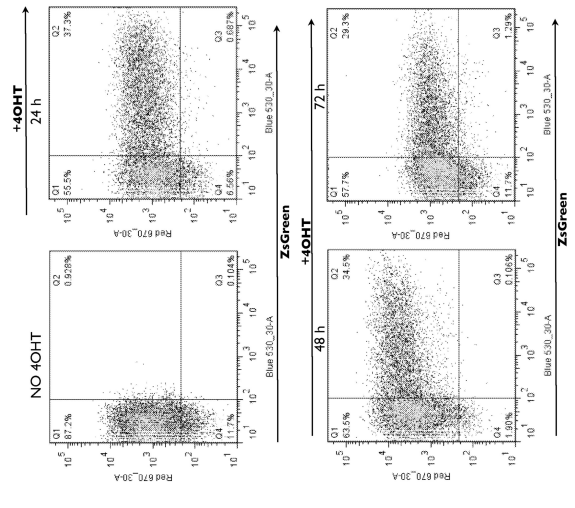


Fig 5B

【図５－３】

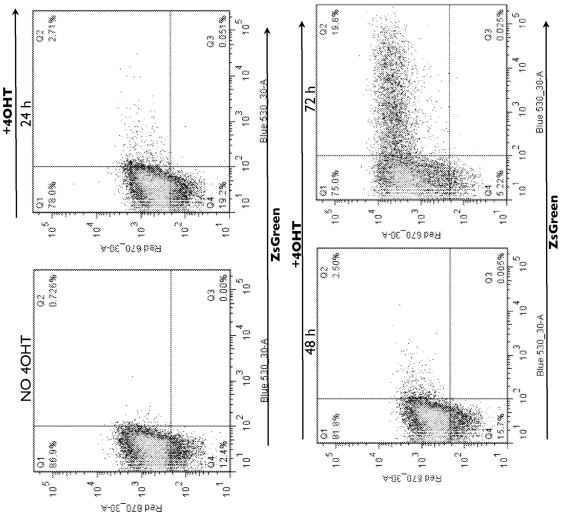


Fig 5C

【図６－１】

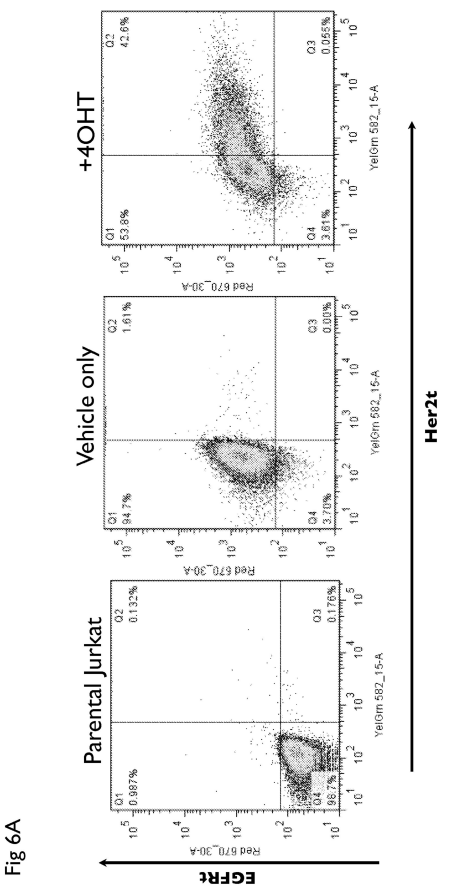


Fig 6A

【図６－２】

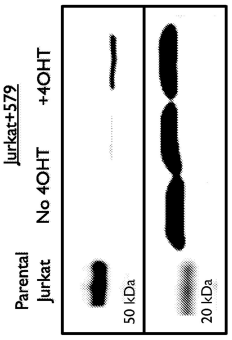


Fig 6B

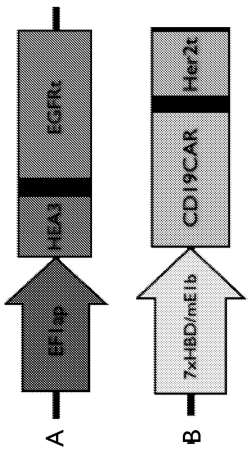


Fig 6C

【図７－１】

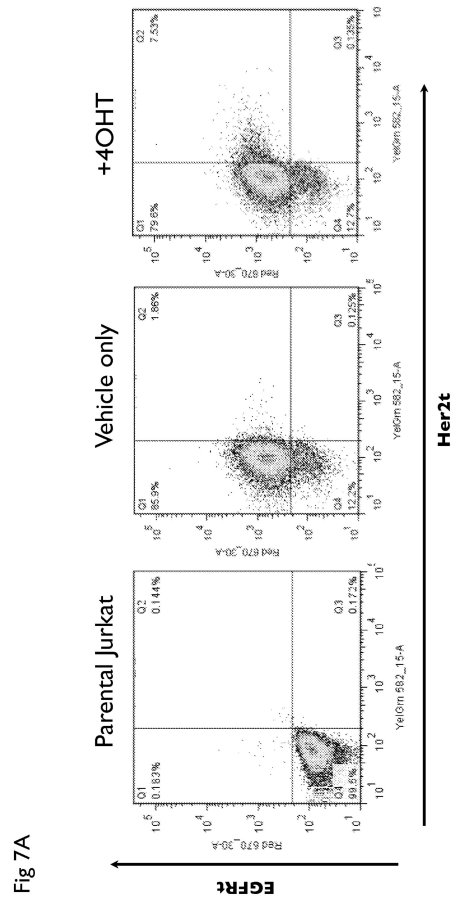


Fig 7A

【図７－２】

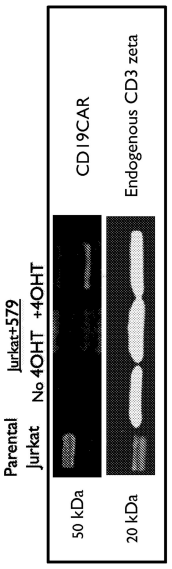


Fig 7B

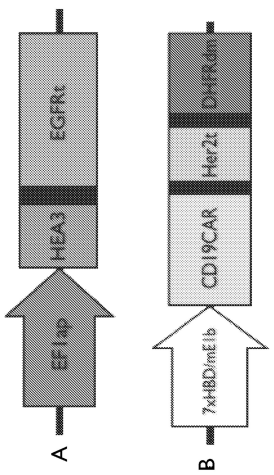


Fig 7C

【図８－１】

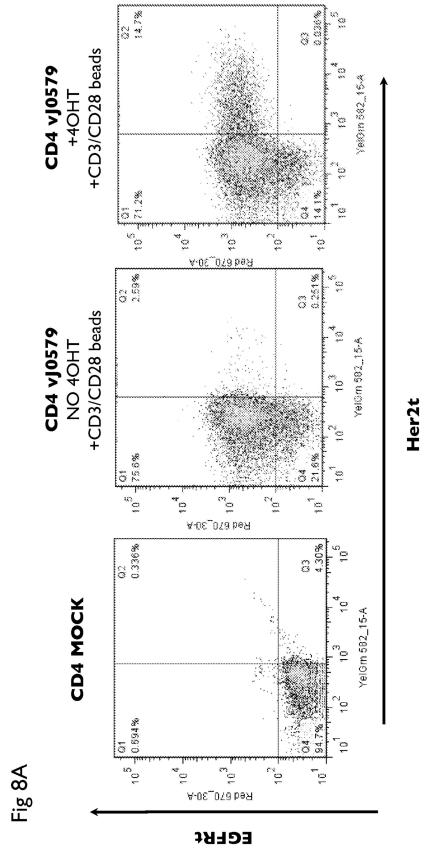


Fig 8A

【図８－２】

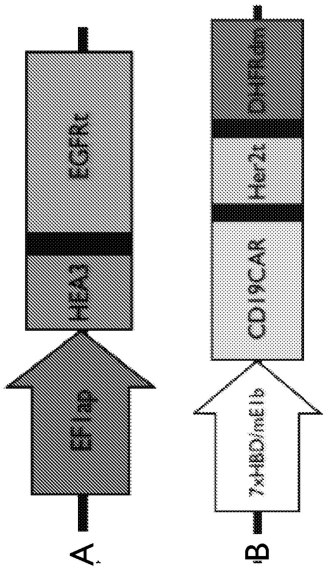


Fig 8B

【配列表】

0006765968000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		
A61P 31/12	***(2006.01)***	A61P	31/12	
A61P 43/00	***(2006.01)***	A61P	43/00	121
A61K 45/00	***(2006.01)***	A61K	45/00	
A61K 35/12	***(2015.01)***	A61K	35/12	
A61P 35/02	***(2006.01)***	A61P	35/02	

(31)優先権主張番号 62/090,845
(32)優先日 平成26年12月11日(2014.12.11)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 61/986,479
(32)優先日 平成26年4月30日(2014.4.30)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 61/977,751
(32)優先日 平成26年4月10日(2014.4.10)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 62/058,973
(32)優先日 平成26年10月2日(2014.10.2)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(56)参考文献 特表２００４－５００８８４（ＪＰ，Ａ）
特表２００７－５３５９０６（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１４／０３１６８７（WO，Ａ１）
国際公開第２０１３／１２６７３３（WO，Ａ１）
国際公開第２０１３／１５４７６０（WO，Ａ１）
Immunol. Rev., ２０１４年 １月, vol.257, no.1, p.127-144
Mol. Ther., ２００２年, vol.6, no.5, p.653-663
Chemisry & Biology, ２００５年, vol.12, p.883-893

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／１２
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＷＰＩＤＳ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）