

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7288401号

(P7288401)

(45)発行日 令和5年6月7日(2023.6.7)

(24)登録日 令和5年5月30日(2023.5.30)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/63 (2006.01)

C 1 2 N 15/63

1 0 0 Z

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

C 1 2 N 15/62

Z Z N A

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/12

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

C 1 2 N 15/19 (2006.01)

C 1 2 N 15/19

請求項の数 18 (全172頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-537292(P2019-537292)

(86)(22)出願日 平成30年1月10日(2018.1.10)

(65)公表番号 特表2020-513777(P2020-513777
A)

(43)公表日 令和2年5月21日(2020.5.21)

(86)国際出願番号 PCT/US2018/013196

(87)国際公開番号 WO2018/132494

(87)国際公開日 平成30年7月19日(2018.7.19)

審査請求日 令和3年1月6日(2021.1.6)

(31)優先権主張番号 62/444,775

(32)優先日 平成29年1月10日(2017.1.10)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/464,958

(32)優先日 平成29年2月28日(2017.2.28)

最終頁に続く

(73)特許権者 508087044

プレシゲン、インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 メリーランド州 208
76, ジャーマンタウン, セネカ メド
ウズ パークウェイ 20358

(74)代理人 100092783

弁理士 小林 浩

(74)代理人 100120134

弁理士 大森 規雄

(74)代理人 100141195

弁理士 西澤 恵美子

(72)発明者 シャー, ルトゥル アール.

アメリカ合衆国 バージニア州 2406
0, ブラックスバーグ, クラフト ドラ
イブ 1750

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規の遺伝子スイッチ発現系を介したポリペプチドの発現のモジュレーション

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) (i) レチノイド受容体Xへと融合させたVP16トランス活性化ドメインを含む、第1の遺伝子スイッチポリペプチド;および (ii) エクジソン受容体へと融合させたGal4DNA結合性ドメインを含む、第2の遺伝子スイッチポリペプチド;をコードするベクターであって、

前記第1および第2の遺伝子スイッチポリペプチドが、切断型リンカー配列を含むポリペプチドリンカーにより連結される、ベクター;

(b) ベレジメクスにより誘導可能なプロモーターの制御下にある異種遺伝子を含むベクター;および

(c) 抗原結合性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド;
を含む、組成物。

【請求項2】

前記切断型リンカーが、2Aリンカー、p2Aリンカー、T2Aリンカー、F2Aリンカー、E2Aリンカー、またはGS2Aリンカーを含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

前記切断型リンカーが、配列番号153~160のうちのいずれか1つに少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項4】

前記抗原結合性ポリペプチドが、キメラ抗原受容体(CAR)およびT細胞受容体のう

ちの少なくとも1つを含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項5】

前記CARが、CD19、CD33、BCMA、CD44、 α -葉酸受容体、CAIX、CD30、ROR1、CEA、EGP-2、EGP-40、HER2、HER3、葉酸結合性タンパク質、GD2、GD3、IL-13R α 2、KDR、EDB-F、メソテリン、CD22、EGFR、MUC-1、MUC-16、MAGE-A1、h5T4、PSMA、TAG-72、EGFRvIII、CD123、およびVEGF-R2のうちの少なくとも1つに結合することが可能である、請求項4に記載の組成物。

【請求項6】

細胞タグをコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請求項4又は5に記載の組成物。

10

【請求項7】

前記細胞タグが、配列番号189～202のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含む、請求項6に記載の組成物。

【請求項8】

前記第1および第2の遺伝子スイッチポリペプチドが、組織特異的プロモーター、EF1Aプロモーター、または組織特異的プロモーターもしくはEF1Aプロモーターに対する少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列によりモジュレートされる、請求項1に記載の組成物。

【請求項9】

前記(b)のベクターが、第2の異種遺伝子をさらに含む、請求項1に記載の組成物。

20

【請求項10】

前記異種遺伝子が、サイトカイン、細胞タグ、またはキメラ抗原受容体(CAR)をコードする、請求項1に記載の組成物。

【請求項11】

前記サイトカインが、IL-1、IL-2、IL-15、IL-12、またはIL-21である、請求項10に記載の組成物。

【請求項12】

前記異種遺伝子が、

(a) IL-15またはそれに対する少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド；および

30

(a) IL-15R α またはそれに対する少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド；

を含む融合体ポリペプチドをコードする、請求項10に記載の組成物。

【請求項13】

前記プロモーターが、前記VP16トランス活性化ドメインにより活性化される、請求項1に記載の組成物。

【請求項14】

前記(a)のベクターが、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、または非ウイルスベクターである、請求項1に記載の組成物。

【請求項15】

前記非ウイルスベクターが、Sleeping Beautyトランスポゾンである、請求項14に記載の組成物。

40

【請求項16】

前記第1および第2の遺伝子スイッチポリペプチドが、1または複数のNFAT応答エレメントによりモジュレートされる、請求項1に記載の組成物。

【請求項17】

操作細胞の増殖および／または生存を刺激する方法であって、

対象から得られた細胞に、

(a) 請求項1に記載の組成物であって、ベクターがトランスポゾンである、組成物；および(b) サイトカイン、細胞タグおよび前記トランスポゾンを前記細胞のゲノムへと

50

組み込むのに有効なトランスポザーゼをコードする1または複数のポリヌクレオチドをトランスフェクトするステップを含む、方法。

【請求項18】

操作細胞を含む医薬組成物であって、

(a) 対象から得られた細胞に、請求項1に記載の組成物であって、ベクターがトランスポゾンである、組成物をトランスフェクトすることにより得られた操作細胞；及び

(b) サイトカイン、細胞タグおよび前記トランスポゾンを前記細胞のゲノムへと組み込むのに有効なトランスポザーゼをコードする1または複数のポリヌクレオチド；

を含む、医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

【0002】

本出願は、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、2017年1月10日に提出された米国特許仮出願第62/444,775号明細書、および2017年2月28日に提出された米国特許仮出願第62/464,958号明細書の利益を主張する。

【0003】

配列表への参照

本出願は、ASCIIフォーマットにおいて、電子的に提出され、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる配列表を含有する。2018年1月9日に作成された前記ASCIIコピーは、50471__706__601__SL.txtと名付けられ、421,163バイトのサイズである。

【0004】

参照による組み込み

本明細書で言及される、全ての刊行物、特許、および特許出願は、各個別の刊行物、特許、または特許出願が、参照により具体的かつ個別に組み込まれることが指し示された場合と同じ程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0005】

キメラ抗原受容体(CAR)およびT細胞受容体(TCR)を使用する養子T細胞免疫療法は、腫瘍細胞の直接的な殺滅に成功することが示されている。この革新的な技術は、有望であるが、改変T細胞の、腫瘍保有個体への投与は、安全性問題、例えば、腫瘍溶解/サイトカイン放出症候群を伴わずにはなされていない。加えて、CARまたはTCR単独の発現は、有効性について、十分ではない場合があり、IL-2、IL-12、IL-15、またはIL-21など、サイトカインのさらなる発現も、このような処置の有効性を増大させるのに必要とされうる。しかし、これは、さらなる安全性問題をもたらしうる。したがって、患者への投与後において、目的の治療用遺伝子の発現に対する、完全な制御を得ることに関心がもたれる。

【発明の概要】

【0006】

本明細書の、ある特定の実施形態では、遺伝子スイッチポリペプチドを含む、系、方法、または組成物、およびこれをコードするポリヌクレオチドが開示される。

【0007】

本明細書では、異種遺伝子発現のリガンド誘導性制御のための、遺伝子スイッチポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む組成物であって、前記遺伝子スイッチポリペプチドが、(a)第1の核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたDNA結合性ドメインを含む、第1の遺伝子スイッチポリペプチド；および(b)第2の核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたトランス活性化ドメインを含む、第2の遺伝子スイ

10

20

30

40

50

ッチポリペプチドを含み、前記第1の遺伝子スイッチポリペプチドと、前記第2の遺伝子スイッチポリペプチドとが、リンカーにより連結されている、組成物が提示される。

【0008】

本明細書では、異種遺伝子発現のリガンド誘導性制御のための遺伝子スイッチ系をコードする、1または複数のポリヌクレオチドを含む組成物であって、前記遺伝子スイッチ系が、(a)トランス活性化ドメインを含む、第1の遺伝子スイッチポリペプチド；(b)リガンド結合性ドメインへと融合させたDNA結合性ドメインを含む、第2の遺伝子スイッチポリペプチド；および(c)少なくとも1つの異種遺伝子ポリペプチドを含み、前記第1の遺伝子スイッチポリペプチド、前記第2の遺伝子スイッチポリペプチド、および前記異種遺伝子ポリペプチドのうちの1つが、ポリペプチドリンカーにより、前記第1の遺伝子スイッチポリペプチド、前記第2の遺伝子スイッチポリペプチド、および前記異種遺伝子ポリペプチドのうちの別の1つへと連結されており、前記ポリペプチドリンカーが、切断型リンカーまたはリボソームスキッピングリンカー配列を含む、組成物が提示される。

【0009】

一部の実施形態では、本明細書で提示される組成物のうちのいずれかのDNA結合性ドメインは、GAL4 (GAL4 DBD)、LexADB D、転写因子DBD、ステロイド／甲状腺ホルモン核内受容体スーパーファミリーメンバーDBD、細菌LacZ DBD、および酵母DBDのうちの少なくとも1つを含む。一部の実施形態では、本明細書で提示される組成物のうちのいずれかのDNA結合性ドメインは、配列番号184に示される配列を有する。一部の実施形態では、本明細書で提示される組成物のうちのいずれかのトランス活性化ドメインは、VP16トランス活性化ドメインおよびB42酸性活性化因子トランス活性化ドメインのうちの少なくとも1つを含む。一部の実施形態では、本明細書で提示される組成物のうちのいずれかのトランス活性化ドメインは、配列番号181に示される配列を有する。

【0010】

場合によって、本明細書で提示される組成物のうちのいずれかの、第1の核内受容体リガンド結合性ドメイン、第2の核内受容体リガンド結合性ドメイン、およびリガンド結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、エクジソン受容体 (EcR)、ユビキタス受容体、オーファン受容体1、NER-1、ステロイドホルモン核内受容体1、レチノイドX受容体相互作用性タンパク質15、肝臓X受容体β、ステロイドホルモン受容体様タンパク質、肝臓X受容体、肝臓X受容体α、ファルネソイドX受容体、受容体相互作用性タンパク質14、およびファルネソール受容体のうちの少なくとも1つを含む。他の場合には、本明細書で提示される組成物のうちのいずれかの、第1の核内受容体リガンド結合性ドメイン、第2の核内受容体リガンド結合性ドメイン、およびリガンド結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、配列番号185～186のうちのいずれか1つに示される配列を有する。別の場合には、第1の遺伝子スイッチポリペプチドは、EcR核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたGAL4 DBDを含み、前記第2の遺伝子スイッチポリペプチドは、レチノイド受容体X (RXR) 核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたVP16トランス活性化ドメインを含む。さらに別の場合には、EcR核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたGal4 DBDは、配列番号185～186または187～188のうちのいずれか1つに示される配列を有し、レチノイド受容体X (RXR) 核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたVP16トランス活性化ドメインは、配列番号183に示される配列を有する。

【0011】

場合によって、本明細書で提示される組成物のうちのいずれかのリンカーは、切断型リンカー、リボソームスキッピングリンカー配列、またはIRESリンカーである。場合によって、リンカーは、IRESリンカーであり、配列番号18～19のうちのいずれか1つに示される配列を有する。他の場合には、リンカーは、切断型リンカーまたはリボソームスキッピングリンカー配列である。一部の実施形態では、切断型リンカーまたはリボソームスキッピングリンカー配列は、2Aリンカー、p2Aリンカー、T2Aリンカー、F

2 A リンカー、E 2 A リンカー、G S G - 2 A リンカー、G S G リンカー、S G S G リンカー、フーリンリンクリンカー (furinlink linker)、ならびにこれらの変異体および誘導体のうちの1または複数を含む。他の実施形態では、切断型リンカーまたは前記リボソームスキッピングリンカー配列は、配列番号146～162のうちのいずれか1つに示される配列を有する。

【0012】

ある実施形態では、本明細書で提示される組成物のうちのいずれかの、ポリヌクレオチドまたは1または複数のポリヌクレオチドは、抗原結合性ポリペプチドをさらにコードする。別の実施形態では、本明細書で提示される組成物のうちのいずれかの、抗原結合性ポリペプチドは、キメラ抗原受容体 (CAR) およびT細胞受容体のうちの少なくとも1つを含む。他の実施形態では、抗原結合性ポリペプチドは、CARを含み、前記CARは、CD19、CD33、BCMA、CD44、 α -葉酸受容体、CAIX、CD30、ROR1、CEA、EGP-2、EGP-40、HER2、HER3、葉酸結合性タンパク質、GD2、GD3、IL-13R-a2、KDR、EDB-F、メソテリン、CD22、EGFR、MUC-1、MUC-16、MAGE-A1、h5T4、PSMA、TAG-72、EGFRvIII、CD123、およびVEGF-R2のうちの少なくとも1つに結合することが可能である。別の実施形態では、抗原結合性ポリペプチドは、CARを含み、CARは、配列番号210～244のうちのいずれか1つに示される配列を有する。

【0013】

他の実施形態では、本明細書で提示される組成物のうちのいずれかの、ポリヌクレオチドまたは1または複数のポリヌクレオチドは、細胞タグをさらにコードする。場合によって、細胞タグは、HER1切断型変異体またはCD20切断型変異体のうちの少なくとも1つを含む。他の場合には、細胞タグは、配列番号189～202のうちのいずれか1つに示される配列を有する。

【0014】

一部の実施形態では、本明細書で提示される組成物のうちのいずれかの、第1の遺伝子スイッチポリペプチド、第2の遺伝子スイッチポリペプチド、抗原結合性ポリペプチド、および細胞タグのうちの少なくとも1つの発現は、プロモーターによりモジュレートされ、プロモーターは、組織特異的プロモーターもしくはEF1Aプロモーター、またはこれらの機能的な変異体である。場合によって、プロモーターは、配列番号58～60のうちのいずれか1つに示される配列を有するEF1Aプロモーター、またはこの機能的な変異体である。他の場合には、プロモーターは、T細胞特異的応答エレメントを含む、組織特異的プロモーターである。別の場合には、組織特異的プロモーターは、1または複数のNFAT応答エレメントを含む。さらに別の場合には、NFAT応答エレメントは、配列番号51～57のうちのいずれか1つに示される配列を有する。

【0015】

一部の例では、本明細書で提示される組成物のうちのいずれかは、異種遺伝子ポリペプチドをコードする、第2のポリヌクレオチドをさらに含む。場合によって、異種遺伝子ポリペプチドは、サイトカイン、細胞タグ、およびキメラ抗原受容体 (CAR) のうちの少なくとも1つを含む。場合によって、サイトカインは、1つのサイトカインを含み、前記サイトカインは、IL-1、IL-2、IL-15、IL-12、IL-21、IL-15、IL-15R α 、またはIL-15変異体の融合体のうちの少なくとも1つを含む。他の場合には、サイトカインは、分泌形態にある。別の場合には、サイトカインは、膜結合形態にある。さらに別の場合には、サイトカインは、配列番号203～209のうちのいずれか1つに示される配列を有する。

【0016】

ある実施形態では、本明細書で提示される組成物のうちのいずれかの、少なくとも1つの異種遺伝子ポリペプチドの発現は、誘導性プロモーターによりモジュレートされる。一部の実施形態では、誘導性プロモーターは、配列番号40～64のうちのいずれかにおいて示される配列を有する。他の実施形態では、誘導性プロモーターは、第1の遺伝子スイ

10

20

30

40

50

ッチポリペプチド、および第2の遺伝子スイッチポリペプチドのうちの少なくとも1つによりモジュレートされる。

【0017】

本明細書ではまた、本明細書で提示される組成物のうちのいずれかのポリヌクレオチドを含むベクターも提示される。ある実施形態では、ベクターは、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、または非ウイルスベクターである。別の実施形態では、非ウイルスベクターは、Sleeping Beautyトランスポゾンである。

【0018】

本明細書では、エフェクター細胞内の異種遺伝子の発現を調節する方法であって、(a) 前記エフェクター細胞へと、(i) リガンド結合性ドメインへと融合させたDNA結合性ドメインを含む、第1の遺伝子スイッチポリペプチド、(ii) トランス活性化ドメインを含む、第2の遺伝子スイッチポリペプチド、(iii) 前記異種遺伝子によりコードされる異種遺伝子ポリペプチド、ならびに(iv) 切断型リンカー配列またはリボソームスキッピングリンカー配列を含むポリペプチドリンカーをコードする、1または複数のポリヌクレオチドを導入するステップであって、前記ポリペプチドリンカーが、前記第1の遺伝子スイッチポリペプチド、前記第2の遺伝子スイッチポリペプチド、および前記異種遺伝子ポリペプチドのうちの1つを、前記第1の遺伝子スイッチポリペプチド、前記第2の遺伝子スイッチポリペプチド、および前記異種遺伝子ポリペプチドのうちの別の1つへと連結する、ステップと；(b) 前記エフェクター細胞を、前記異種遺伝子の発現を誘導するのに十分な量のリガンドと接触させるステップとを含む方法が提示される。

【0019】

ある例では、本明細書で提示されるエフェクター細胞内の、異種遺伝子の発現を調節する方法の、1または複数のポリヌクレオチドのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ポリペプチドをさらにコードする。場合によって、抗原結合性ポリペプチドは、標的細胞の所定の細胞表面タンパク質に選択的に結合する。場合によって、標的細胞は、哺乳動物細胞である。他の場合には、標的細胞は、腫瘍細胞である。

【0020】

一部の実施形態では、本明細書で提示されるエフェクター細胞内の、異種遺伝子の発現を調節する方法の、所定の細胞表面タンパク質は、腫瘍抗原である。場合によって、エフェクター細胞を、リガンドと接触させるステップの前に、抗原結合性ポリペプチドは、標的細胞の、所定の細胞表面タンパク質に選択的に結合する。場合によって、エフェクター細胞を、リガンドと接触させるステップの前に、少なくとも7日間にわたり、エフェクター細胞を、標的細胞の、所定の細胞表面タンパク質へと曝露する。他の場合には、抗原結合性ポリペプチドによる、所定の細胞表面タンパク質への結合は、エフェクター細胞を活性化させる。一部の実施形態では、方法は、前記エフェクター細胞を、前記所定の細胞表面タンパク質を発現する人工抗原提示細胞(aAPC)と共培養するステップをさらに含み、前記aAPCの、前記所定の細胞表面タンパク質への、前記抗原結合性ポリペプチドの結合は、前記エフェクター細胞を活性化させる。一部の実施形態では、共培養するステップは、少なくとも7日間、14日間、21日間、または28日間にわたる。場合によって、aAPCは、トランスジェニックK562細胞である。

【0021】

他の実施形態では、本明細書で提示されるエフェクター細胞内の、異種遺伝子の発現を調節する方法における抗原結合性ポリペプチドは、キメラ抗原受容体(CAR)およびT細胞受容体のうちの少なくとも1つを含む。別の実施形態では、抗原結合性ポリペプチドは、CARを含み、前記CARは、CD19、CD33、BCMA、CD44、 α -葉酸受容体、CAIX、CD30、ROR1、CEA、EGP-2、EGP-40、HER2、HER3、葉酸結合性タンパク質、GD2、GD3、IL-13R-a2、KDR、EDB-F、メソテリン、CD22、EGFR、MUC-1、MAGE-A1、MUC-16、h5T4、PSMA、TAG-72、EGFRvIII、CD123、およびVEGF-R2のうちの少なくとも1つに結合することが可能である。さらに別の実施形態では

、抗原結合性ポリペプチドは、配列番号 210～244 のうちのいずれか 1 つに示される配列を有する C A R を含む。一部の実施形態では、異種遺伝子ポリペプチドは、抗原結合性ポリペプチドを含む。

【0022】

場合によって、本明細書で提示されるエフェクター細胞内の、異種遺伝子の発現を調節する方法における、1 または複数のポリヌクレオチドのうちの少なくとも 1 つは、細胞タグをさらにコードする。場合によって、細胞タグは、H E R 1 切断型変異体および C D 2 0 切断型変異体のうちの少なくとも 1 つを含む。他の場合には、細胞タグは、配列番号 189～202 のうちのいずれか 1 つに示される配列を有する。場合によって、異種遺伝子ポリペプチドは、細胞タグを含む。

10

【0023】

他の場合には、本明細書で提示されるエフェクター細胞内の、異種遺伝子の発現を調節する方法における、1 または複数のポリヌクレオチドのうちの少なくとも 1 つは、サイトカインをさらにコードする。場合によって、サイトカインは、I L - 1、I L - 2、I L - 15、I L - 12、I L - 21、I L - 15、I L - 15 R α 、または I L - 15 変異体の融合体のうちの少なくとも 1 つを含む。ある実施形態では、サイトカインは、分泌形態にある。別の実施形態では、サイトカインは、膜結合形態にある。さらに別の実施形態では、サイトカインは、配列番号 203～209 のうちのいずれか 1 つに示される配列を有する。他の実施形態では、異種遺伝子ポリペプチドは、前記サイトカインを含む。

【0024】

20

ある実施形態では、本明細書で提示されるエフェクター細胞内の、異種遺伝子の発現を調節する方法における、異種遺伝子ポリペプチドの発現は、誘導性プロモーターによりモジュレートされる。ある特定の実施形態では、誘導性プロモーターは、配列番号 40～64 のうちのいずれか 1 つに示される配列を有する。

【0025】

別の実施形態では、本明細書で提示されるエフェクター細胞内の、異種遺伝子の発現を調節する方法における D N A 結合性ドメインは、G A L 4 (G A L 4 D B D)、L e x A D B D、転写因子 D B D、ステロイド／甲状腺ホルモン核内受容体スーパーファミリメンバー D B D、細菌 L a c Z D B D、および酵母 D B D のうちの少なくとも 1 つを含む。さらに別の実施形態では、D N A 結合性ドメインは、配列番号 184 に示される配列を有する。

30

【0026】

さらに別の実施形態では、本明細書で提示されるエフェクター細胞内の、異種遺伝子の発現を調節する方法におけるトランス活性化ドメインは、V P 16 トランス活性化ドメイン、および B 4 2 酸性活性化因子トランス活性化ドメインのうちの少なくとも 1 つを含む。場合によって、トランス活性化ドメインは、配列番号 181 に示される配列を有する。他の実施形態では、前記第 1 の遺伝子スイッチポリペプチドおよび第 2 の遺伝子スイッチポリペプチドのうちの少なくとも 1 つは、前記 D N A 結合性ドメインに結合することが可能な応答エレメントをさらに含む。

【0027】

40

一部の実施形態では、本明細書で提示されるエフェクター細胞内の、異種遺伝子の発現を調節する方法におけるリガンド結合性ドメインは、エクジソン受容体 (E c R)、ユビキタス受容体、オーファン受容体 1、N E R - 1、ステロイドホルモン核内受容体 1、レチノイド X 受容体相互作用性タンパク質 15、肝臓 X 受容体 β 、ステロイドホルモン受容体様タンパク質、肝臓 X 受容体、肝臓 X 受容体 α 、ファルネソイド X 受容体、受容体相互作用性タンパク質 14、およびファルネソール受容体のうちの少なくとも 1 つを含む。ある特定の実施形態では、リガンド結合性ドメインは、配列番号 185～186 のうちのいずれか 1 つに示される配列を有する。ある特定の実施形態では、第 1 の遺伝子スイッチポリペプチドは、E c R 核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させた G A L 4 D B D を含み、第 2 の遺伝子スイッチポリペプチドは、レチノイド受容体 X (R X R) 核内受

50

容体リガンド結合性ドメインへと融合させたVP16トランス活性化ドメインを含む。一部の実施形態では、EcRへと融合させたGal4 DBDは、配列番号185～186のうちのいずれか1つに示される配列を有し、レチノイド受容体X (RXR) 核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させた前記VP16トランス活性化ドメインは、配列番号183に示される配列を有する。

【0028】

ある特定の実施形態では、本明細書で提示されるエフェクター細胞内の、異種遺伝子の発現を調節する方法におけるリガンドは、(2S, 3R, 5R, 9R, 10R, 13R, 14S, 17R) - 17 - [(2S, 3R) - 3, 6 - ジヒドロキシ - 6 - メチルヘプタン - 2 - イル] - 2, 3, 14 - トリヒドロキシ - 10, 13 - ジメチル - 2, 3, 4, 5, 9, 11, 12, 15, 16, 17 - デカヒドロ - 1H - シクロペンタ [a] フェナントレン - 6 - オン; N' - (3, 5 - ジメチルベンゾイル) - N' - [(3R) - 2, 2 - ジメチル - 3 - ヘキサニル] - 2 - エチル - 3 - メトキシベンゾヒドラジド; 5 - メチル - 2, 3 - ジヒドロ - ベンゾ [1, 4] ジオキシ - 6 - カルボン酸 N' - (3, 5 - ジメチル - ベンゾイル) - N' - (1 - エチル - 2, 2 - ジメチル - プロピル) - ヒドラジド; 5 - メチル - 2, 3 - ジヒドロ - ベンゾ [1, 4] ジオキシ - 6 - カルボン酸 N' - (3, 5 - ジメトキシ - 4 - メチル - ベンゾイル) - N' - (1 - エチル - 2, 2 - ジメチル - プロピル) - ヒドラジド; 5 - メチル - 2, 3 - ジヒドロ - ベンゾ [1, 4] ジオキシ - 6 - カルボン酸 N' - (1 - tert - ブチル - ブチル) - N' - (3, 5 - ジメチル - ベンゾイル) - ヒドラジド; 5 - メチル - 2, 3 - ジヒドロ - ベンゾ [1, 4] ジオキシ - 6 - カルボン酸 N' - (1 - tert - ブチル - ブチル) - N' - (3, 5 - ジメトキシ - 4 - メチル - ベンゾイル) - ヒドラジド; 5 - エチル - 2, 3 - ジヒドロ - ベンゾ [1, 4] ジオキシ - 6 - カルボン酸 N' - (3, 5 - ジメチル - ベンゾイル) - N' - (1 - エチル - 2, 2 - ジメチル - プロピル) - ヒドラジド; 5 - エチル - 2, 3 - ジヒドロ - ベンゾ [1, 4] ジオキシ - 6 - カルボン酸 N' - (3, 5 - ジメトキシ - 4 - メチル - ベンゾイル) - N' - (1 - エチル - 2, 2 - ジメチル - プロピル) - ヒドラジド; 5 - エチル - 2, 3 - ジヒドロ - ベンゾ [1, 4] ジオキシ - 6 - カルボン酸 N' - (1 - tert - ブチル - ブチル) - N' - (3, 5 - ジメチル - ベンゾイル) - ヒドラジド; 5 - エチル - 2, 3 - ジヒドロ - ベンゾ [1, 4] ジオキシ - 6 - カルボン酸 N' - (1 - tert - ブチル - ブチル) - N' - (3, 5 - ジメトキシ - 4 - メチル - ベンゾイル) - ヒドラジド; 3, 5 - ジメチル - 安息香酸 N - (1 - エチル - 2, 2 - ジメチル - プロピル) - N' - (3 - メトキシ - 2 - メチル - ベンゾイル) - ヒドラジド; 3, 5 - ジメトキシ - 4 - メチル - 安息香酸 N - (1 - エチル - 2, 2 - ジメチル - プロピル) - N' - (3 - メトキシ - 2 - メチル - ベンゾイル) - ヒドラジド; 3, 5 - ジメチル - 安息香酸 N - (1 - tert - ブチル - ブチル) - N' - (3 - メトキシ - 2 - メチル - ベンゾイル) - ヒドラジド; 3, 5 - ジメトキシ - 4 - メチル - 安息香酸 N - (1 - tert - ブチル - ブチル) - N' - (3 - メトキシ - 2 - メチル - ベンゾイル) - ヒドラジド; 3, 5 - ジメチル - 安息香酸 N - (1 - エチル - 2, 2 - ジメチル - プロピル) - N' - (2 - エチル - 3 - メトキシ - ベンゾイル) - ヒドラジド; 3, 5 - ジメトキシ - 4 - メチル - 安息香酸 N - (1 - エチル - 2, 2 - ジメチル - プロピル) - N' - (2 - エチル - 3 - メトキシ - ベンゾイル) - ヒドラジド; 3, 5 - ジメチル - 安息香酸 N - (1 - tert - ブチル - ブチル) - N' - (2 - エチル - 3 - メトキシ - ベンゾイル) - ヒドラジド; 2 - メトキシ - ニコチン酸 N - (1 - tert - ブチル - ペンチル) - N' - (4 - エチル - ベンゾイル) - ヒドラジド; 3, 5 - ジメチル - 安息香酸 N - (2, 2 - ジメチル - 1 - フェニル - プロピル) - N' - (4 - エチル - ベンゾイル) - ヒドラジド; 3, 5 - ジメチル - 安息香酸 N - (1 - tert - ブチル - ペンチル) - N' - (3 - メトキシ - 2 - メチル - ベンゾイル) - ヒドラジド; および 3, 5 - ジメトキシ - 4 - メチル - 安息香酸 N - (1 - tert - ブチル - ペンチル) - N' - (3 - メトキシ - 2 - メチル - ベンゾイル) - ヒドラジドのうちの少なくとも1

10

20

30

40

50

つを含む。

【0029】

場合によって、本明細書で提示されるエフェクター細胞内の、異種遺伝子の発現を調節する方法における、異種遺伝子の発現は、リガンドの非存在下において、リガンドの存在下における発現と比較して低減されるか、または消失する。ある特定の場合には、前記異種遺伝子の発現は、さらなる量のリガンドを施すことにより回復する。

【0030】

他の場合には、第1の遺伝子スイッチポリペプチドおよび第2の遺伝子スイッチポリペプチドのうちの少なくとも1つの発現は、本明細書で提示されるエフェクター細胞内の、異種遺伝子の発現を調節する方法におけるプロモーターによりモジュレートされ、前記プロモーターは、組織特異的プロモーターもしくはEF1Aプロモーター、またはこれらの機能的な変異体である。ある特定の場合には、プロモーターは、配列番号58～60のうちのいずれか1つに示される配列を有するEF1Aプロモーター、またはこの機能的な変異体である。他の場合には、プロモーターは、組織特異的プロモーターであり、組織特異的プロモーターは、T細胞特異的応答エレメントを含む。別の場合には、組織特異的プロモーターは、1または複数のNFAT応答エレメントを含む。さらに別の場合には、NFAT応答エレメントは、配列番号50～57のうちのいずれか1つに示される配列を有する。

【0031】

ある特定の場合には、本明細書で提示されるエフェクター細胞内の、異種遺伝子の発現を調節する方法の、1または複数のポリヌクレオチドは、ベクター内に含まれる。場合によって、ベクターは、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、または非ウイルスベクターである。ある特定の場合には、非ウイルスベクターは、Sleeping Beautyトランスポゾンである。

【0032】

本明細書では、1または複数の発現カセットを含む、異種遺伝子発現のリガンド誘導性制御のための遺伝子スイッチ系であって、前記1または複数の発現カセットが、(a)第1の核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたDNA結合性ドメインを含む、第1の遺伝子スイッチポリペプチドをコードする配列；および(b)第2の核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたトランス活性化ドメインを含む、第2の遺伝子スイッチポリペプチドをコードする配列を含み、前記第1の遺伝子スイッチポリペプチドと、前記第2の遺伝子スイッチポリペプチドとが、ポリペプチドリンカーにより連結されている、遺伝子スイッチ系が提示される。

【0033】

本明細書では、1または複数の発現カセットを含む、異種遺伝子発現のリガンド誘導性制御のための遺伝子スイッチ系であって、前記1または複数の発現カセットが、(a)トランス活性化ドメインを含む、第1の遺伝子スイッチポリペプチドをコードする配列；(b)リガンド結合性ドメインへと融合させたDNA結合性ドメインを含む、第2の遺伝子スイッチポリペプチドをコードする配列；および(c)異種遺伝子ポリペプチドをコードする配列を含み、前記リガンド結合性ドメインへと融合させた前記トランス活性化ドメイン、DNA結合性ドメイン、および前記異種遺伝子ポリペプチドのうちの1つが、ポリペプチドリンカーにより、前記リガンド結合性ドメインへと融合させた前記トランス活性化ドメイン、DNA結合性ドメイン、および前記異種遺伝子ポリペプチドのうちの別の1つへと連結されており、前記ポリペプチドリンカーが、切断型リンカー配列またはリボソームスキッピングリンカー配列を含む、遺伝子スイッチ系が提示される。

【0034】

一部の実施形態では、本明細書で提示される遺伝子スイッチ系の、1または複数の発現カセットは、異種遺伝子ポリペプチドをコードする配列をさらに含む。一部の実施形態では、1または複数の発現カセットは、以下：(a)1または複数のリコンビナーゼ接合部位；および(b)セリンリコンビナーゼをコードする配列の1または複数のさらに含む。

10

20

30

40

50

他の実施形態では、1または複数の発現カセットは、以下：（a）非誘導性プロモーター；および（b）誘導性プロモーターのうちの1または複数をさらに含む。

【0035】

ある特定の実施形態では、本明細書で提示される遺伝子スイッチ系のDNA結合性ドメインは、配列番号184に示される配列を有する。他の実施形態では、本明細書で提示される遺伝子スイッチ系のトランス活性化ドメインは、配列番号181に示される配列を有する。別の実施形態では、第1の核内受容体リガンド結合ドメイン、および第2の核内受容体リガンド結合ドメイン、ならびにリガンド結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、配列番号185～186のうちのいずれか1つに示される配列を有する。ある特定の実施形態では、非誘導性プロモーターは、配列番号40～64のうちのいずれか1つに示される配列を有する。ある特定の実施形態では、誘導性プロモーターは、配列番号40～64のうちのいずれか1つに示される配列を有する。ある特定の実施形態では、ポリペプチドリンカーは、配列番号146～162のうちのいずれか1つに示される配列を有する。一部の実施形態では、ポリペプチドリンカーは、配列番号18～19および146～162のうちのいずれか1つに示される配列を伴う切断型リンカー、リボソームスキッピングリンカー、またはIRESリンカーである。

10

【0036】

一部の例では、本明細書で提示される遺伝子スイッチ系の、1または複数の発現カセットは、キメラ抗原受容体（CAR）をコードする配列を含む発現カセットを含み、キメラ抗原受容体の発現は、非誘導性プロモーターによりモジュレートされる。ある特定の例では、CARは、CD19、CD33、BCMA、CD44、 α -葉酸受容体、CAIX、CD30、ROR1、CEA、EGP-2、EGP-40、HER2、HER3、葉酸結合性タンパク質、GD2、GD3、IL-13R-a2、KDR、EDB-F、メソテリン、CD22、EGFR、MUC-1、MAGE-A1、MUC-16、h5T4、PSMA、TAG-72、EGFRvIII、CD123、およびVEGF-R2のうちの少なくとも1つに結合することが可能である。

20

【0037】

他の例では、本明細書で提示される遺伝子スイッチ系の非誘導性プロモーターは、EF1Aまたはこれらの変異体を含む。ある特定の場合には、発現カセットは、配列番号131に示される配列を有する。他の場合には、発現カセットは、細胞タグをコードする配列をさらに含み、細胞タグは、リンカーにより、CARへと連結されている。場合によって、細胞タグは、HER1切断型変異体およびCD20切断型変異体のうちの少なくとも1つを含む。

30

【0038】

別の例では、本明細書で提示される遺伝子スイッチ系の発現カセットは、配列番号132に示される配列を有する。一部の実施形態では、発現カセットは、第1の遺伝子スイッチポリペプチドをコードする配列および第2の遺伝子スイッチポリペプチドをコードする配列をさらに含み、第1の遺伝子スイッチポリペプチドおよび第2の遺伝子スイッチポリペプチドのうちの1つは、リンカーにより、CARへと連結されている。

【0039】

一部の実施形態では、本明細書で提示される遺伝子スイッチ系の第1の遺伝子スイッチポリペプチドと、第2の遺伝子スイッチポリペプチドとは、前記ポリペプチドリンカーにより連結されており、ポリペプチドリンカーは、切断型リンカーである。一部の実施形態では、発現カセットは、配列番号133に示される配列を有する。一部の実施形態では、第1の遺伝子スイッチポリペプチドと、第2の遺伝子スイッチポリペプチドとは、ポリペプチドリンカーにより連結されており、ポリペプチドリンカーは、IRESリンカーである。

40

【0040】

ある特定の実施形態では、本明細書で提示される遺伝子スイッチ系の発現カセットは、配列番号134に示される配列を有する。他の実施形態では、1または複数の発現カセッ

50

トは、異種遺伝子ポリペプチドをコードする配列を含む発現カセットを含み、前記異種遺伝子ポリペプチドの発現は、誘導性プロモーターによりモジュレートされる。他の実施形態では、異種遺伝子ポリペプチドは、サイトカインを含む。場合によって、サイトカインは、IL-1、IL-2、IL-15、IL-12、IL-21、IL-15、IL-15R α 、またはIL-15変異体の融合体のうちの少なくとも1つを含む。

【0041】

別の実施形態では、本明細書で提示される遺伝子スイッチ系の発現カセットは、配列番号135に示される配列を有する。一部の実施形態では、発現カセットは、第2の異種遺伝子ポリペプチドをコードする配列を含み、第2の異種遺伝子ポリペプチドは、細胞タグを含む。ある特定の場合には、細胞タグは、HER1切断型変異体およびCD20切断型変異体のうちの少なくとも1つを含む。他の場合には、細胞タグは、リンカーにより、サイトカインへと連結されている。別の場合には、発現カセットは、配列番号136に示される配列を有する。

【0042】

場合によって、本明細書で提示される遺伝子スイッチ系は、異種遺伝子を、宿主細胞内に組み込むための遺伝子スイッチ系であり、宿主細胞を、セリンリコンビナーゼ、および1または複数のリコンビナーゼ接合部位の存在下で、1または複数の発現カセットと接触させると、異種遺伝子は、宿主細胞内に組み込まれる。ある特定の場合には、遺伝子スイッチ系は、リガンドをさらに含み、宿主細胞を、リガンドと接触させると、異種遺伝子は、宿主細胞内で発現する。ある特定の場合には、宿主細胞は、T細胞またはNK細胞である。ある特定の場合には、1または複数のリコンビナーゼ接合部位は、ファージゲノム組換え接合部位 (attP) または細菌ゲノム組換え接合部位 (attB) を含む。場合によって、セリンリコンビナーゼは、SF370でありうる。

【0043】

ある特定の場合には、本明細書で提示される遺伝子スイッチ系の誘導性プロモーターは、トランス活性化ドメインにより活性化する。ある特定の場合には、系は、1または複数のベクター内に含有される。ある特定の場合には、系は、1つのベクター内に含有される。

【0044】

本明細書で提示される遺伝子スイッチ系の構成要素のうちの1または複数をコードするポリヌクレオチドが開示される。本明細書ではまた、本明細書で提示される遺伝子スイッチ系の構成要素のうちの1または複数をコードするポリヌクレオチド含むベクターも開示される。ある特定の場合には、ベクターは、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、または非ウイルスベクターのうちのいずれか1つである。ある特定の場合には、ベクターは、非ウイルスベクターであり、前記非ウイルスベクターは、Sleeping Beautyトランスポゾンである。

【0045】

本明細書では、第1の遺伝子スイッチポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、第2の遺伝子スイッチポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、および目的の遺伝子 (GOI) をコードするポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド構築物であって、GOIをコードするポリヌクレオチドが、第1の遺伝子スイッチポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと、第2の遺伝子スイッチポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとの間に位置する、連続オープンリーディングフレーム (ORF) を含み、ポリヌクレオチド構築物が、リンカーをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記GOIが、前記リンカーにより、前記第1の遺伝子スイッチポリペプチドおよび第2の遺伝子スイッチポリペプチドの各々へと連結されている、ポリヌクレオチド構築物が提示される。

【0046】

本明細書では、(i) 第1の核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたDNA結合性ドメインを含む、第1の遺伝子スイッチポリペプチドをコードする、第1の配列；および(ii) 第2の核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたトランス活性化ドメインを含む、第2の遺伝子スイッチポリペプチドをコードする、第2の配列のうちの

10

20

30

40

50

少なくとも1つを含み；前記第1の配列および前記第2の配列のうちの少なくとも1つの発現が、1または複数のN F A T応答エレメントによりモジュレートされる、ポリヌクレオチドが提示される。

【0047】

本明細書では、操作細胞の増殖および／または生存を刺激する方法であって、(a)細胞試料を、対象から得るステップと、(b)前記細胞試料の細胞に、1または複数のトランスポゾンを含む、1または複数のポリヌクレオチドをトランスフェクトするステップであって、前記1または複数のトランスポゾンが、キメラ抗原受容体(CAR)またはTCR、サイトカイン、1または複数の細胞タグ、前記サイトカインのリガンド誘導性制御のための遺伝子スイッチポリペプチド、および前記1または複数のポリヌクレオチドを、前記細胞のゲノムへと組み込んで、操作細胞の集団をもたらしのに有効なトランスポザーゼをコードする、ステップとを含み、前記遺伝子スイッチポリペプチドが、i)第1の核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたDNA結合性ドメインを含む、第1の遺伝子スイッチポリペプチド、およびii)第2の核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたトランス活性化ドメインを含む、第2の遺伝子スイッチポリペプチドを含み、前記第1の遺伝子スイッチポリペプチドと、前記第2の遺伝子スイッチポリペプチドとが、リンカーにより連結されている、方法が提示される。

10

【0048】

本明細書では、それを必要とする対象の、*in vivo*における操作細胞の存続を増強する方法であって、(a)細胞試料を、対象から得るステップと、(b)前記細胞試料の細胞に、1または複数のトランスポゾンを含む、1または複数のポリヌクレオチドをトランスフェクトするステップであって、前記1または複数のトランスポゾンが、キメラ抗原受容体(CAR)またはTCR、サイトカイン、1または複数の細胞タグ、前記サイトカインのリガンド誘導性制御のための遺伝子スイッチポリペプチド、およびDNAを、前記細胞のゲノムへと組み込んで、操作細胞の集団をもたらしのに有効なトランスポザーゼをコードする、ステップとを含み、前記遺伝子スイッチポリペプチドが、i)第1の核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたDNA結合性ドメインを含む、第1の遺伝子スイッチポリペプチド、およびii)第2の核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたトランス活性化ドメインを含む、第2の遺伝子スイッチポリペプチドを含み、前記第1の遺伝子スイッチポリペプチドと、前記第2の遺伝子スイッチポリペプチドとが、リンカーにより連結されている、方法が提示される。

20

30

【0049】

一部の実施形態では、本明細書で提示される方法における、細胞にトランスフェクトするステップは、細胞に電気穿孔することを含む。ある特定の実施形態では、1または複数のポリヌクレオチドのうちの、少なくとも1つのポリヌクレオチドは、遺伝子スイッチポリペプチドをコードし、少なくとも1つのポリヌクレオチドは、プロモーターによりモジュレートされ、プロモーターは、組織特異的プロモーターもしくはEF1Aプロモーター、またはこれらの機能的な変異体である。ある特定の場合には、プロモーターは、配列番号58～60のうちのいずれか1つに示される配列を有するEF1Aプロモーター、またはこの機能的な変異体である。ある特定の場合には、プロモーターは、組織特異的プロモーターであり、組織特異的プロモーターは、T細胞特異的応答エレメントを含む。ある特定の場合には、プロモーターは、組織特異的プロモーターであり、組織特異的プロモーターは、1または複数のN F A T応答エレメントを含む。ある特定の場合には、N F A T応答エレメントは、配列番号50～57のうちのいずれか1つに示される配列を有する。ある特定の場合には、サイトカインは、IL-1、IL-2、IL-15、IL-12、IL-21、IL-15、IL-15R α 、またはIL-15変異体の融合体のうちの少なくとも1つを含む。他の場合には、サイトカインは、分泌形態にある。別の場合には、サイトカインは、膜結合形態にある。さらに別の場合には、サイトカインは、配列番号203～209のうちのいずれか1つに示される配列を有する。さらに別の場合には、細胞は、NK細胞、NK T細胞、T細胞、またはT細胞前駆細胞である。

40

50

【0050】

他の場合には、本明細書で提示される方法は、有効量の操作細胞を、それを必要とする対象へと投与するステップをさらに含む。ある特定の場合には、投与するステップは、対象に、操作細胞を、速やかに輸注することを含む。ある特定の場合には、方法は、有効量のリガンドを投与して、サイトカインの発現を誘導するステップをさらに含む。ある特定の場合には、リガンドは、ベレジメクス (veledimex) である。場合によって、CARは、CD19、CD33、BCMA、CD44、 α -葉酸受容体、CAIX、CD30、ROR1、CEA、EGP-2、EGP-40、HER2、HER3、葉酸結合性タンパク質、GD2、GD3、IL-13R-a2、KDR、EDB-F、メソテリン、CD22、EGFR、MUC-1、MAGE-A1、MUC-16、h5T4、PSMA、TAG-72、EGFRvIII、CD123、およびVEGF-R2のうちの少なくとも1つに結合することが可能である。ある特定の場合には、CARは、CD19に結合することが可能である。ある特定の場合には、CARは、CD33に結合することが可能である。ある特定の場合には、トランスポザーゼは、サケ科型Tc1様トランスポザーゼである。ある特定の場合には、トランスポザーゼは、SB11またはSB100xトランスポザーゼである。ある特定の場合には、1または複数の細胞タグは、HER1切断型変異体およびCD20切断型変異体のうちの少なくとも1つを含む。ある特定の場合には、1または複数の細胞タグは、配列番号189～202のうちのいずれか1つに示される配列を有する。

10

【0051】

本明細書では、充実性腫瘍を伴う対象を処置する方法であって、(a) 細胞試料を、対象から得るステップと、(b) 前記細胞試料の細胞に、1または複数のトランスポゾンを含む、1または複数のポリヌクレオチドをトランスフェクトするステップであって、前記1または複数のトランスポゾンが、キメラ抗原受容体 (CAR) またはTCR、サイトカイン、1または複数の細胞タグ、前記サイトカインのリガンド誘導性制御のための遺伝子スイッチポリペプチド、およびDNAを、前記細胞のゲノムへと組み込んで、操作細胞の集団をもたらすのに有効なトランスポザーゼをコードし、前記遺伝子スイッチポリペプチドが、i) 第1の核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたDNA結合性ドメインを含む、第1の遺伝子スイッチポリペプチド、およびii) 第2の核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたトランス活性化ドメインを含む、第2の遺伝子スイッチポリペプチドを含み、前記第1の遺伝子スイッチポリペプチドと、前記第2の遺伝子スイッチポリペプチドとが、リンカーにより連結されている、ステップと、(c) 操作細胞の前記集団を、前記対象へと投与するステップとを含む方法が提示される。

20

30

【0052】

一部の実施形態では、処置する方法におけるサイトカインは、IL-1、IL-2、IL-15、IL-12、IL-21、IL-15、IL-15R α 、またはIL-15変異体の融合体のうちの少なくとも1つを含む。一部の実施形態では、サイトカインは、IL-12を含む。一部の実施形態では、1または複数のポリヌクレオチドのうちの、少なくとも1つのポリヌクレオチドは、遺伝子スイッチポリペプチドをコードし、少なくとも1つのポリヌクレオチドは、プロモーターによりモジュレートされ、プロモーターは、組織特異的プロモーターもしくはEF1Aプロモーター、またはこれらの機能的な変異体である。一部の実施形態では、プロモーターは、配列番号58～60のうちのいずれか1つに示される配列を有するEF1Aプロモーター、またはこの機能的な変異体である。ある特定の実施形態では、プロモーターは、組織特異的プロモーターであり、組織特異的プロモーターは、T細胞特異的応答エレメントを含む。一部の実施形態では、プロモーターは、組織特異的プロモーターであり、組織特異的プロモーターは、1または複数のNFAT応答エレメントを含む。一部の実施形態では、NFAT応答エレメントは、配列番号50～57のうちのいずれか1つに示される配列を有する。

40

【0053】

また、操作エフェクター細胞も開示され、この場合、前記操作エフェクター細胞は、(

50

a) 標的細胞が発現する、所定の細胞表面タンパク質に選択的に結合する、操作受容体構築物をコードする、第1のポリヌクレオチド；(b) 1または複数の操作遺伝子スイッチポリペプチドをコードする、1または複数のポリヌクレオチドであって、前記操作遺伝子スイッチポリペプチドが、トランス活性化ドメイン、DNA結合性ドメイン、およびリガンド結合性ドメインのうちの1または複数を含む、1または複数のポリヌクレオチド；ならびに(c) 前記操作遺伝子スイッチポリペプチドによりモジュレートされる、リガンド誘導性プロモーターの制御下にある異種遺伝子であって、サイトカインをコードする異種遺伝子を含む。

【0054】

一部の実施形態では、標的細胞は、哺乳動物細胞である。一部の実施形態では、標的細胞は、腫瘍細胞である。一部の実施形態では、細胞表面タンパク質は、前記腫瘍細胞の表面上で発現する。一部の実施形態では、細胞表面タンパク質は、人工抗原提示細胞(aAPC)内で発現する。一部の実施形態では、操作受容体構築物は、キメラ抗原受容体である。一部の実施形態では、キメラ抗原受容体は、CD19、CD33、BCMA、CD44、 α -葉酸受容体、CAIX、CD30、ROR1、CEA、EGP-2、EGP-40、HER2、HER3、葉酸結合性タンパク質、GD2、GD3、IL-13R- α 2、KDR、EDB-F、メソテリン、CD22、EGFR、MUC-1、MAGE-A1、h5T4、PSMA、TAG-72、EGFRvIII、CD123、またはVEGFR2に結合する。一部の実施形態では、キメラ抗原受容体は、EGFRvIIIに結合する。

【0055】

一部の実施形態では、操作受容体構築物は、操作T細胞受容体である。一部の実施形態では、サイトカインは、IL-2、IL-15、IL-12、IL-21、またはIL-15とIL-15R α との融合体である。一部の実施形態では、サイトカインは、IL-12である。一部の実施形態では、エフェクター細胞は、細胞タグを含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドをさらに含む。一部の実施形態では、細胞タグは、切断型HER1変異体またはCD20切断型変異体である。一部の実施形態では、エフェクター細胞は、免疫エフェクター細胞である。一部の実施形態では、エフェクター細胞は、T細胞、NK細胞、または腫瘍浸潤リンパ球である。一部の実施形態では、1または複数の操作遺伝子スイッチポリペプチドは、トランス活性化ドメイン、DNA結合性ドメイン、およびリガンド結合性ドメインを含む。一部の実施形態では、1または複数の操作遺伝子スイッチポリペプチドは、核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させた前記DNA結合性ドメインを含む、第1の遺伝子スイッチポリペプチド、および核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させた前記トランス活性化ドメインを含む、第2の遺伝子スイッチポリペプチドを含む。

【0056】

一部の実施形態では、第1の遺伝子スイッチポリペプチドと、前記第2の遺伝子スイッチポリペプチドとは、ポリペプチドリンカーにより連結されている。一部の実施形態では、ポリペプチドリンカーは、切断型リンカー配列またはリボソームスキッピングリンカー配列である。一部の実施形態では、ポリペプチドリンカーは、2A、F/T2A、GSG-2A、GSGリンカー、SGSGリンカー、フーリンリンク、ならびにこれらの変異体および誘導体のうちの1つを含む。一部の実施形態では、トランス活性化ドメインは、VP16トランス活性化ドメインを含む。一部の実施形態では、1または複数の操作遺伝子スイッチポリペプチドは、エクジソン受容体(EcR)、ユビキタス受容体、オーファン受容体1、NER-1、ステロイドホルモン核内受容体1、レチノイドX受容体相互作用性タンパク質15、肝臓X受容体 β 、ステロイドホルモン受容体様タンパク質、肝臓X受容体、肝臓X受容体 α 、ファルネソイドX受容体、受容体相互作用性タンパク質14、およびファルネソール受容体のうちの少なくとも1つを含む。一部の実施形態では、DNA結合性ドメイン(DBD)は、GAL4(GAL4 DBD)、LexADBBD、転写因子DBD、ステロイド/甲状腺ホルモン核内受容体スーパーファミリーメンバーDBD

、細菌 LacZ DBD、および酵母 DBD のうちの少なくとも 1 つを含む。

【0057】

本明細書では、異種遺伝子の発現をモジュレートする方法であって、標的細胞を、本明細書で開示されるエフェクター細胞と接触させるステップを含む方法がさらに開示される。場合によって、モジュレートすることは、前記異種遺伝子の発現を増大または減少させることを含む。場合によって、発現は、前記リガンドの非存在下において、前記リガンドの存在下における発現と比較して低減されるか、または消失する。場合によって、発現は、さらなる量の前記リガンドを施すことにより蘇生する。

【0058】

さらに、エフェクター細胞内の異種遺伝子の発現を調節する方法であって、前記エフェクター細胞へと、1 または複数の操作遺伝子スイッチポリペプチド、操作受容体構築物、および前記異種遺伝子をコードするポリヌクレオチドを導入するステップであって、前記異種遺伝子が、誘導性プロモーターの制御下にある、ステップと；前記操作受容体構築物を介して、前記エフェクター細胞を活性化させるステップと；前記エフェクター細胞を活性化させる前記ステップの後で、前記 1 または複数の操作遺伝子スイッチポリペプチドを介して、前記異種遺伝子の発現を誘導するために、リガンドを、前記エフェクター細胞へと提示するステップとを含む方法も開示される。

【0059】

場合によって、活性化させるステップは、エフェクター細胞を、抗原と接触させることを含む。場合によって、抗原は、腫瘍抗原である。場合によって、リガンドを、エフェクター細胞へと提示する前に、少なくとも 7 日間にわたり、エフェクター細胞を、腫瘍抗原へと曝露する。場合によって、エフェクター細胞を活性化させるステップは、エフェクター細胞を、人工抗原提示細胞 (aAPC) と共培養することを含む。場合によって、共培養することは、少なくとも 7 日間、14 日間、21 日間、または 28 日間にわたる。場合によって、aAPC は、トランスジェニック K562 細胞である。場合によって、操作受容体構築物は、キメラ抗原受容体 (CAR) を含む。場合によって、CAR は、CD19、CD33、BCMA、CD44、 α -葉酸受容体、CAIX、CD30、ROR1、CEA、EGP-2、EGP-40、HER2、HER3、葉酸結合性タンパク質、GD2、GD3、IL-13R- α 2、KDR、EDB-F、メソテリン、CD22、EGFR、MUC-1、MAGE-A1、h5T4、PSMA、TAG-72、EGFRvIII、CD123、または VEGF-R2 に結合する。場合によって、操作受容体構築物は、操作 T 細胞受容体 (TCR) を含む。場合によって、エフェクター細胞は、エフェクター細胞を、TCR 結合性ポリペプチドと接触させることを含む。場合によって、TCR 結合性ポリペプチドは、TCR 結合性抗体またはこの断片を含む。場合によって、リガンドを、エフェクター細胞へと提示する前に、少なくとも 7 日間にわたり、エフェクター細胞を、TCR 結合性ポリペプチドへと曝露する。場合によって、TCR 結合性ポリペプチドは、aAPC を介して発現する。場合によって、異種遺伝子は、サイトカインをコードする。場合によって、サイトカインは、IL-2、IL-15、IL-12、IL-21、または IL-15 と IL-15R α との融合体である。場合によって、サイトカインは、IL-12 である。

【0060】

場合によって、異種遺伝子は、少なくとも 1 つの細胞タグをコードする。場合によって、細胞タグは、HER1 切断型変異体または CD20 切断型変異体である。場合によって、1 または複数の遺伝子発現カセットは、細胞タグをコードするヌクレオチド配列をさらに含む。場合によって、エフェクター細胞は、免疫エフェクター細胞である。場合によって、免疫エフェクター細胞は、T 細胞、NK 細胞、または腫瘍浸潤リンパ球である。場合によって、1 または複数の操作遺伝子スイッチポリペプチドは、トランス活性化ドメイン、DNA 結合性ドメイン、およびリガンド結合性ドメインを含む。場合によって、リガンド結合性ドメインは、エクジソン受容体 (EcR)、ユビキタス受容体、オーファン受容体 1、NER-1、ステロイドホルモン核内受容体 1、レチノイド X 受容体相互作用性タ

10

20

30

40

50

ンパク質 15、肝臓 X 受容体 β 、ステロイドホルモン受容体様タンパク質、肝臓 X 受容体、肝臓 X 受容体 α 、ファルネソイド X 受容体、受容体相互作用性タンパク質 14、およびファルネソール受容体のうちの少なくとも 1 つを含む。場合によって、DNA 結合性ドメインは、GAL4 (GAL4 DBD)、LexA DBD、転写因子 DBD、ステロイド／甲状腺ホルモン核内受容体スーパーファミリーメンバー DBD、細菌 LacZ DBD、および酵母 DBD のうちの少なくとも 1 つを含む。場合によって、トランス活性化ドメインは、VP16 トランス活性化ドメインを含む。

【0061】

場合によって、1 または複数の操作遺伝子スイッチポリペプチドは、前記 DNA 結合性ドメインに結合することが可能な応答エレメントをさらに含む。場合によって、1 または複数の操作遺伝子スイッチポリペプチドは、ウルTRASピラクルタンパク質 (USP)、レチノイド受容体 X (RXR)、またはこれらの機能的な断片および変異体のうちの少なくとも 1 つをさらに含み、前記これらの機能的な断片および変異体は、EcR に結合することが可能である。場合によって、1 または複数の操作遺伝子スイッチポリペプチドは、1 または複数のポリペプチドリンカーをさらに含む。場合によって、1 または複数のポリペプチドリンカーは、2A、GSG-2A、GSG リンカー、SGSG リンカー、フーリンリンク、ならびにこれらの変異体および誘導体のうちの少なくとも 1 つをさらに含む。場合によって、リガンドは、(2S, 3R, 5R, 9R, 10R, 13R, 14S, 17R)-17-[(2S, 3R)-3, 6-ジヒドロキシ-6-メチルヘプタン-2-イル]-2, 3, 14-トリヒドロキシ-10, 13-ジメチル-2, 3, 4, 5, 9, 11, 12, 15, 16, 17-デカヒドロ-1H-シクロペンタ[a]フェナントレン-6-オン; N'-[(3, 5-ジメチルベンゾイル)-N'-[(3R)-2, 2-ジメチル-3-ヘキサニル]-2-エチル-3-メトキシベンゾヒドラジド; 5-メチル-2, 3-ジヒドロ-ベンゾ[1, 4]ジオキシン-6-カルボン酸 N'-[(3, 5-ジメチル-ベンゾイル)-N'-[(1-エチル-2, 2-ジメチル-プロピル)-ヒドラジド; 5-メチル-2, 3-ジヒドロ-ベンゾ[1, 4]ジオキシン-6-カルボン酸 N'-[(3, 5-ジメトキシ-4-メチル-ベンゾイル)-N'-[(1-エチル-2, 2-ジメチル-プロピル)-ヒドラジド; 5-メチル-2, 3-ジヒドロ-ベンゾ[1, 4]ジオキシン-6-カルボン酸 N'-[(1-tert-ブチル-ブチル)-N'-[(3, 5-ジメチル-ベンゾイル)-ヒドラジド; 5-メチル-2, 3-ジヒドロ-ベンゾ[1, 4]ジオキシン-6-カルボン酸 N'-[(1-tert-ブチル-ブチル)-N'-[(3, 5-ジメトキシ-4-メチル-ベンゾイル)-ヒドラジド; 5-エチル-2, 3-ジヒドロ-ベンゾ[1, 4]ジオキシン-6-カルボン酸 N'-[(3, 5-ジメチル-ベンゾイル)-N'-[(1-エチル-2, 2-ジメチル-プロピル)-ヒドラジド; 5-エチル-2, 3-ジヒドロ-ベンゾ[1, 4]ジオキシン-6-カルボン酸 N'-[(3, 5-ジメトキシ-4-メチル-ベンゾイル)-N'-[(1-エチル-2, 2-ジメチル-プロピル)-ヒドラジド; 5-エチル-2, 3-ジヒドロ-ベンゾ[1, 4]ジオキシン-6-カルボン酸 N'-[(1-tert-ブチル-ブチル)-N'-[(3, 5-ジメチル-ベンゾイル)-ヒドラジド; 5-エチル-2, 3-ジヒドロ-ベンゾ[1, 4]ジオキシン-6-カルボン酸 N'-[(1-tert-ブチル-ブチル)-N'-[(3, 5-ジメトキシ-4-メチル-ベンゾイル)-ヒドラジド; 3, 5-ジメチル-安息香酸 N-[(1-エチル-2, 2-ジメチル-プロピル)-N'-[(3-メトキシ-2-メチル-ベンゾイル)-ヒドラジド; 3, 5-ジメトキシ-4-メチル-安息香酸 N-[(1-エチル-2, 2-ジメチル-プロピル)-N'-[(3-メトキシ-2-メチル-ベンゾイル)-ヒドラジド; 3, 5-ジメチル-安息香酸 N-[(1-tert-ブチル-ブチル)-N'-[(3-メトキシ-2-メチル-ベンゾイル)-ヒドラジド; 3, 5-ジメトキシ-4-メチル-安息香酸 N-[(1-tert-ブチル-ブチル)-N'-[(3-メトキシ-2-メチル-ベンゾイル)-ヒドラジド; 3, 5-ジメチル-安息香酸 N-[(1-エチル-2, 2-ジメチル-プロピル)-N'-[(2-エチル-3-メトキシ-ベンゾイル)-ヒドラジド; 3, 5-ジメトキシ-4-メチル-安息香酸 N-[(1-エチル-2, 2-ジメチル-プロピル)-N'-[(2-エチル-3-メトキシ-ベンゾイ

10

20

30

40

50

ル) -ヒドラジド; 3, 5-ジメチル-安息香酸N-(1-tert-ブチル-ブチル)-N'-(2-エチル-3-メトキシ-ベンゾイル)-ヒドラジド; 3, 5-ジメトキシ-4-メチル-安息香酸N-(1-tert-ブチル-ブチル)-N'-(2-エチル-3-メトキシ-ベンゾイル)-ヒドラジド; 2-メトキシ-ニコチン酸N-(1-tert-ブチル-ペンチル)-N'-(4-エチル-ベンゾイル)-ヒドラジド; 3, 5-ジメチル-安息香酸N-(2, 2-ジメチル-1-フェニル-プロピル)-N'-(4-エチル-ベンゾイル)-ヒドラジド; 3, 5-ジメチル-安息香酸N-(1-tert-ブチル-ペンチル)-N'-(3-メトキシ-2-メチル-ベンゾイル)-ヒドラジド; および 3, 5-ジメトキシ-4-メチル-安息香酸N-(1-tert-ブチル-ペンチル)-N'-(3-メトキシ-2-メチル-ベンゾイル)-ヒドラジドのうちの少なくとも1つを含む。

10

【0062】

本明細書では、操作細胞内の異種遺伝子発現の、リガンド誘導性制御のためのポリヌクレオチドであって、(a) 標的細胞が発現する、所定の細胞表面タンパク質に結合することが可能な、操作受容体構築物をコードする、第1の配列; および (b) 前記リガンドの存在に応答して、前記異種遺伝子へと連結されたプロモーターをモジュレートすることによる、前記異種遺伝子発現のリガンド誘導性制御のための、1または複数の操作遺伝子スイッチポリペプチドをコードする、第2の配列を含み、前記操作受容体構築物と、前記1または複数の操作遺伝子スイッチポリペプチドとが、ポリペプチドリンカーにより連結されている、ポリヌクレオチドがさらに開示される。

【0063】

20

一部の実施形態では、ポリペプチドリンカーは、切断型リンカー配列を含む。一部の実施形態では、切断型リンカー配列は、F2Aリンカーである。一部の実施形態では、1または複数の操作遺伝子スイッチポリペプチドは、核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたDNA結合性ドメインを含む、第1の遺伝子スイッチポリペプチド、および核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたトランス活性化ドメインを含む、第2の遺伝子スイッチポリペプチドを含む。一部の実施形態では、第1の遺伝子スイッチポリペプチドと、第2の遺伝子スイッチポリペプチドとは、リンカーにより連結されている。一部の実施形態では、リンカーは、切断型リンカー配列またはリボソームスキッピングリンカー配列である。一部の実施形態では、リンカーは、2Aリンカー、GS G-2Aリンカー、GS Gリンカー、S G S Gリンカー、フューリンリンク、ならびにこれらの変異体および誘導体である。一部の実施形態では、2Aリンカーは、F2Aリンカーである。一部の実施形態では、異種遺伝子は、サイトカインをコードする。一部の実施形態では、サイトカインは、IL-2、IL-15、IL-12、IL-21、またはIL-15とIL-15 R α との融合体である。一部の実施形態では、サイトカインは、IL-12である。一部の実施形態では、異種遺伝子は、少なくとも1つの細胞タグをコードする。一部の実施形態では、細胞タグは、HER1切断型変異体またはCD20切断型変異体である。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドを、操作細胞へと組み込む。

30

【0064】

本明細書では、標的細胞の近傍の宿主細胞内で、サイトカインを発現させるための系であって、リガンドの存在下で、操作受容体構築物が、細胞表面タンパク質に結合すると、標的細胞の近傍の宿主細胞が、サイトカインを発現するように、(a) (i) 標的細胞内で発現する、所定の細胞表面タンパク質に選択的に結合する、操作受容体構築物; (i i) トランス活性化ドメイン、DNA結合性ドメイン、およびリガンド結合性ドメインのうちの1または複数を含む操作遺伝子スイッチポリペプチド; ならびに (i i i) 操作遺伝子スイッチポリペプチドによりモジュレートされるプロモーターへと連結された、異種遺伝子から発現するサイトカインをコードする宿主細胞と; (b) リガンドとを含む系がさらに開示される。

40

【0065】

場合によって、操作受容体構築物は、キメラ抗原受容体を含む。場合によって、キメラ抗原受容体は、CD19、CD33、BCMA、CD44、 α -葉酸受容体、CAIX、

50

CD30、ROR1、CEA、EGP-2、EGP-40、HER2、HER3、葉酸結合性タンパク質、GD2、GD3、IL-13R-a2、KDR、EDB-F、メソテリン、CD22、EGFR、MUC-1、MAGE-A1、h5T4、PSMA、TAG-72、EGFRvIII、CD123、またはVEGF-R2に結合する。場合によって、キメラ抗原受容体は、EGFRvIIIに結合する。場合によって、操作受容体構築物は、操作T細胞受容体を含む。場合によって、サイトカインは、IL-2、IL-15、IL-12、IL-21、またはIL-15とIL-15Rαとの融合体である。場合によって、サイトカインは、IL-12である。場合によって、宿主細胞は、少なくとも1つの細胞タグをさらにコードする。場合によって、細胞タグは、HER1切断型変異体またはCD20切断型変異体である。

10

【0066】

本明細書ではさらに、標的細胞の近傍の宿主細胞から、サイトカインを発現させる方法であって、リガンドの存在下で、本明細書で開示される系を、前記標的細胞と接触させるステップを含む方法も提示される。本明細書ではさらに、標的細胞の近傍の宿主細胞からの、サイトカインの発現をモジュレートする方法であって、リガンドの存在下で、本明細書で開示される系を、標的細胞と接触させるステップと、リガンドの量を調節するステップとを含む方法も提示される。場合によって、発現は、前記リガンドの非存在下で、前記リガンドの存在下における発現と比較して低減されるか、または消失する。場合によって、発現は、さらなる量の前記リガンドを施すことにより蘇生する。場合によって、宿主細胞は、動物細胞または哺乳動物細胞である。場合によって、哺乳動物細胞は、ヒト細胞である。場合によって、哺乳動物細胞は、T細胞、NK細胞、または腫瘍浸潤リンパ球である。場合によって、標的細胞は、腫瘍細胞である。場合によって、系は、1または複数のベクター内に含有される。場合によって、各ベクターは、プラスミドを含む。場合によって、各ベクターは、発現プラスミドを含む。場合によって、各ベクターは、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、または非ウイルスベクターである。場合によって、非ウイルスベクターは、Sleeping BeautyトランスポザーゼおよびSBトランスポゾンを含む。

20

【0067】

本明細書では、EGFRvIIIへの結合のためのポリペプチドであって、配列番号233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、または244に示される配列に対する、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、または99.5%の同一性を有するポリペプチド配列を含むポリペプチドがさらに開示される。

30

【0068】

場合によって、ポリペプチドは、操作エフェクター細胞内で発現する。場合によって、エフェクター細胞は、免疫エフェクター細胞である。場合によって、免疫エフェクター細胞は、T細胞、NK細胞、または腫瘍浸潤リンパ球である。場合によって、ポリペプチドは、抗体またはこの断片を含む。場合によって、ポリペプチドは、キメラ抗原受容体(CAR)を含む。場合によって、EGFRvIIIは、前記抗体もしくはこの断片または前記CARのscFv抗原結合性ドメインに結合する。場合によって、ポリペプチドは、野生型EGFRと交差反応しない。

40

【0069】

本明細書では、a) EGFRvIIIに結合することが可能な、操作受容体構築物；b) トランス活性化ドメインおよび核内受容体リガンド結合性ドメインを含む第1のポリペプチド；ならびにc) DNA結合性ドメインおよび核内受容体リガンド結合性ドメインを含む第2のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、F/T2Aリンカーが、操作受容体構築物、第1のポリペプチド、および第2のポリペプチドのうちの、少なくとも2つを連結する、ポリヌクレオチドがさらに開示される。

【0070】

場合によって、F/T2Aリンカーは、前記操作受容体構築物を、前記第1のポリペプ

50

チドおよび前記第2のポリペプチドのうちの少なくとも1つへと連結する。場合によって、F/T2Aリンカーは、第1のポリペプチドを、前記第2のポリペプチドへと連結する。場合によって、ポリヌクレオチドは、IRESリンカーをさらにコードする。場合によって、IRESリンカーは、第1のポリペプチドを、第2のポリペプチドへと連結する。

【0071】

本明細書では、本明細書で開示されるポリヌクレオチドを含むエフェクター細胞がさらに開示される。場合によって、エフェクター細胞は、前記第1のポリペプチドまたは前記第2のポリペプチドによりモジュレートされることが可能な、誘導性プロモーターへと連結された異種遺伝子をコードする。

【0072】

本明細書では、EGFRvIIIに結合することが可能なキメラ抗原受容体(CAR)であって、(a)EGFRvIII結合性領域；(b)膜貫通領域；および(c)膜貫通領域を、EGFRvIII結合性領域と連結するスペーサー領域を含み、スペーサー領域が、少なくとも1つの二量体化部位を含むストーク領域、およびストーク領域に対する、少なくとも75%の配列同一性を伴う配列を含むストーク伸長領域を含む、CARがさらに開示される。

【0073】

本明細書では、(a)EGFRvIII分子またはこの変異体に結合するのに有効な、操作エフェクター細胞の表面における、EGFRvIII結合性部分；(b)トランス活性化ドメイン、DNA結合性ドメイン、およびリガンド結合性ドメインのうちの1または複数を含み、操作遺伝子スイッチポリペプチド；ならびに(c)サイトカインをコードする異種遺伝子であって、操作遺伝子スイッチポリペプチドによりモジュレートされる、プロモーターにより制御される異種遺伝子を含む、操作エフェクター細胞がさらに開示される。

【0074】

本開示の特徴は、特に、付属の特許請求の範囲において明示されている。本開示の特徴および利点についてのよりよい理解は、本開示の原理が用いられる、例示的な実施形態を明示する、以下の詳細な記載および付属の図面を参照することにより得られるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0075】

【図1】遺伝子改変T細胞へと適応させたSleeping Beauty(SB)系についての概略的描示を示す図である。SBトランスポゾン系、すなわち、SB11、膜結合型IL-15(mbIL-15)、およびキメラ抗原受容体(CAR)を発現させるDNAプラスミドを、末梢血単核細胞(PBMC)へとトランスフェクトして、T細胞の特異性をリダイレクトする。デザイナーAaPC(activating and propagating cell)に接すると、組み込み配列を安定的に発現するT細胞を、繁殖および拡大増殖させる。

【図2A】多様なリガンド誘導性遺伝子スイッチベクター系の、多様な構造的構成要素を概略的に例示する図である。描示される、例示的なCARは、CD19 CARを含みうる。EF1Aプロモーターは、例示的な構造的プロモーターである。

【図2B】図2Aの説明が参照される。

【図2C】図2Aの説明が参照される。

【図2D】図2Aの説明が参照される。

【図3】リガンド誘導性遺伝子スイッチポリペプチドのための、複数のベクター系についての概略的例示を示す図である。

【図4】ベレジメクスリガンド(溶媒：DMSO)の存在下／非存在下におけるヌクレオフェクション後1日目において、本明細書で記載されるリガンド誘導性遺伝子スイッチベクター系をトランスフェクトされた細胞についての定量的フローサイトメトリー解析を描示する図である。構築物1、4、5、6、7、および9は、図2A～2Dに概略的に描示された構築物に対応する。

10

20

30

40

50

【図5】ベレジメクスリガンド（溶媒：DMSO）の存在下／非存在下におけるヌクレオフェクション後21日目において、本明細書で記載されるリガンド誘導性遺伝子スイッチベクター系をトランスフェクトされ、CD19特異的CAR陽性集団についてゲートをかけられた細胞についての定量的フローサイトメトリー解析を描述する図である。リガンドを、フローサイトメトリー解析の48時間前に添加した。構築物1、4、5、6、および9は、図2A～2Dに概略的に描述された構築物に対応する。

【図6】ベレジメクスリガンド（溶媒：DMSO）の存在下／非存在下におけるヌクレオフェクション後29日目において、本明細書で記載されるリガンド誘導性遺伝子スイッチベクター系をトランスフェクトされ、CD19特異的CAR陽性集団についてゲートをかけられた細胞についての定量的フローサイトメトリー解析を描述する図である。mbIL-15の発現は、リガンド追加後にオンになる。構築物1、4、5、6、7、および9は、図2A～2Dに概略的に描述された構築物に対応する。

10

【図7】ベレジメクスリガンド（溶媒：DMSO）の存在下／非存在下におけるヌクレオフェクション後35日目において、本明細書で記載されるリガンド誘導性遺伝子スイッチベクター系をトランスフェクトされ、CD19特異的CAR陽性集団についてゲートをかけられた細胞についての定量的フローサイトメトリー解析を示す図である。mbIL-15の発現は、リガンド除去後にオフになる。構築物1、4、5、6、および9は、図2A～2Dに概略的に描述された構築物に対応する。

【図8】ベレジメクスリガンド（溶媒：DMSO）の存在下／非存在下におけるヌクレオフェクション後40日目において、本明細書で記載されるリガンド誘導性遺伝子スイッチベクター系をトランスフェクトされ、CD19特異的CAR陽性集団についてゲートをかけられた細胞についての定量的フローサイトメトリー解析を示す図である。mbIL-15の発現は、リガンドの再導入後において、維持される。構築物1、4、5、6、および9は、図2A～2Dに概略的に描述された構築物に対応する。

20

【図9】ベレジメクスリガンド（溶媒：DMSO）の存在下／非存在下におけるヌクレオフェクション後48日目において、本明細書で記載されるリガンド誘導性遺伝子スイッチベクター系をトランスフェクトされ、CD19特異的CAR陽性集団についてゲートをかけられた細胞についての定量的フローサイトメトリー解析を示す図である。mbIL-15の発現は、リガンドの再導入後において、連続的に維持される。構築物1、4、5、6、および9は、図2A～2Dに概略的に描述された構築物に対応する。

30

【図10】ベレジメクスリガンド（溶媒：DMSO）の存在下／非存在下におけるヌクレオフェクション後50日目において、本明細書で記載されるリガンド誘導性遺伝子スイッチベクター系をトランスフェクトされ、CD19特異的CAR陽性集団についてゲートをかけられた細胞についての定量的フローサイトメトリー解析を示す図である。mbIL-15の発現は、リガンドの再導入後において、連続的に維持される。構築物1、4、5、6、および9は、図2A～2Dに概略的に描述された構築物に対応する。

【図11】本明細書で記載されるリガンドの存在下および非存在下における、ヌクレオフェクション後29、33、35、および40日目における、本明細書で記載されるリガンド誘導性遺伝子スイッチベクター系をトランスフェクトされた細胞内の、mbIL-15発現についての定量的RT-qPCR解析であって、遺伝子スイッチによる、mbIL-15の発現の、リガンド依存性の調節を裏付ける定量的RT-qPCR解析を示す図である。

40

【図12】リガンド調節性mbIL-15発現が、IL-2サイトカインおよびIL-21サイトカインの非存在下において、優先的なCAR-T細胞の生存を促進することを例示する、細胞生存アッセイからの結果を示す図である。

【図13A】本明細書で記載されるリガンド誘導性遺伝子スイッチベクター系をトランスフェクトされた細胞についての定量的フローサイトメトリー解析であって、ベレジメクスリガンドの用量反応を裏付ける解析を示す図である。図13Dは、本明細書で記載されるリガンド誘導性遺伝子スイッチベクター系をトランスフェクトされた細胞についての定量的フローサイトメトリー解析であって、ベレジメクスリガンドの用量反応を裏付ける解析

50

を示す。細胞に、FSC/SSC/LIVE/CD3+についてゲートをかけた。試料は、100 nM、25 nM、6.25 nM、1.56 nM、0.4 nM、および0 nM (DMSO対照)のベレジメクスを伴う、2日間にわたるインキュベーションの後で採取した。

【図13B】図13Aの説明が参照される。

【図13C】図13Aの説明が参照される。

【図13D】図13Aの説明が参照される。

【図14】ベレジメクスリガンドの存在下/非存在下における、本明細書で記載されるリガンド誘導性遺伝子スイッチベクター系をトランスフェクトされた細胞内の、mbIL-15発現についてのウェスタンブロット解析を示す図である。

【図15A】本明細書で記載される、一般の、多様なリガンド誘導性遺伝子スイッチベクター系の、変動する構造的構成要素について概略的に描示する図である。概略図において、「PR」は、プロモーターを表し；「IP」とは、遺伝子転写のための遺伝子スイッチの、リガンド誘導性プロモーターであり；「5'UTR」とは、5'側非翻訳領域(mRNAへの転写のための)であり；「GOI」、「GOI-1」、「GOI-2」とは、mRNAだけ(例えば、siRNA)、またはmRNAおよびポリペプチドとして転写され、発現する、目的の遺伝子または第1のGOI(GOI-1)および第2のGOI(GOI-2)であり；「リンカー」とは、切断型リンカー配列またはリボソームスキッピングリンカー配列であり；「TAD」とは、転写トランス活性化ドメイン(例えば、ヘルペスウイルスに由来するVP16 TADであるがこれらに限定されない)であり；「LBD」とは、核内受容体リガンド結合性ドメイン(例えば、脊椎動物種および非脊椎動物種に由来する、USPドメイン、RXRドメイン、またはキメラ(例えば、USP/RXRキメラ)、および置換突然変異LBDドメインであるがこれらに限定されない)であり；「DBD」とは、DNA結合性ドメイン(例えば、Gal4 DBDであるがこれらに限定されない)であり；「EcR」とは、切断型EcRドメインおよび置換突然変異EcRドメイン(in vitroおよびin vivoにおいて、ステロイド性リガンド(ボナステロンAおよびムリストロンAなど)および非ステロイド性リガンド(ジアシルヒドラジン、テブフェノジド、およびメトキシフェノジドなど)を含むステロイド性および/または非ステロイド性のリガンド(アゴニスト)の存在下で、活性の転写活性化複合体を形成する能力を付与するEcRドメインなど)を含むエクジソン受容体リガンド結合性ドメインであり；「任意選択のGOI」とは、mRNAまたはポリペプチドとして転写され、発現する、任意の、任意選択の、目的の遺伝子であり；「BDポリA」とは、双方向性ポリアデノシンテール配列である。

【図15B】図15Aの説明が参照される。

【図16A】本明細書で記載される、多様なリガンド誘導性遺伝子スイッチベクター系の、変動する構造的構成要素について概略的に描示する図である。

【図16B】図16Aの説明が参照される。

【図17】リコンビナーゼ接合部位を伴う、例示的なリガンド誘導性遺伝子スイッチベクター系についての概略的記載を示す図である。このような系は、リコンビナーゼ(セリンリコンビナーゼなど)を用いて、単一ベクターを、免疫細胞(例えば、T細胞)へと組み込む。

【図18A】図18Aは、1、8、および15日目にわたり、CAR陽性T細胞%について描示する表である。セリンリコンビナーゼ(SF370)媒介性組換えを使用して、CARおよび遺伝子スイッチに制御されるmbIL-15(RTS-mbIL15)を、単一ベクターから発現させるように、このようなT細胞を改変した。図18Bは、15日目の、ベレジメクスの存在下および非存在下における、mbIL-15発現の誘導について描示する。図はまた、22日目の、ベレジメクスの除去時における、mbIL15発現の喪失も裏付ける。図18Cは、RTS-mbIL15構成的CAR構築物についての例示的描示である。

【図18B】図18Aの説明が参照される。

【図18C】図18Aの説明が参照される。

【図 19 A】構成的プロモーターまたは T 細胞特異的プロモーターの制御下にある、多様なリガンド誘導性遺伝子スイッチベクター系の、多様な構造的構成要素を概略的に例示する図である。

【図 19 B】図 19 A の説明が参照される。

【図 20 A】図 20 A は、構成的プロモーターまたは T 細胞特異的プロモーターの制御下にある、多様なリガンド誘導性遺伝子スイッチベクター系の、多様な構造的構成要素を概略的に例示する図である。図 20 B ～ 20 E は、本明細書で記載されるリガンド誘導性遺伝子スイッチベクター系をトランスフェクトされた細胞についての定量的フローサイトメトリー解析を示し、mb IL-15 の発現が、T 細胞活性化 (Con A の添加による) およびベレジメクスの存在に依存することを裏付ける。構築物 1 ～ 6 は、図 20 A に概略的に

10

【図 20 B】図 20 A の説明が参照される。

【図 20 C】図 20 A の説明が参照される。

【図 20 D】図 20 A の説明が参照される。

【図 20 E】図 20 A の説明が参照される。

【図 21 A】IL-12 の多様な構成を描写する図である。

【図 21 B】図 21 A の説明が参照される。

【図 22】構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターの制御下にある、多様なリガンド誘導性遺伝子スイッチベクター系の、多様な構造的構成要素を概略的に例示する図である。

20

【図 23】構成的プロモーター、誘導性プロモーター、または組織特異的プロモーター (PR) の制御下で、異なる形態の IL-12 を発現させる、多様なリガンド誘導性遺伝子スイッチベクター系の、多様な構造的構成要素を概略的に例示する図である。IL-12 は、単鎖 IL-12 として発現させることもでき、膜結合型 IL-12 として発現させることもでき、p35 ドメインおよび p40 ドメインの個別の発現により発現させることもできる。

【図 24 A】構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターの制御下にある、多様なリガンド誘導性遺伝子スイッチベクター系の、多様な構造的構成要素を概略的に例示する図である。

【図 24 B】図 24 A の説明が参照される。

30

【図 24 C】図 24 A の説明が参照される。

【図 24 D】図 24 A の説明が参照される。

【図 25 A】構成的プロモーター、誘導性プロモーター、または T 細胞特異的プロモーターの制御下にある、多様なリガンド誘導性遺伝子スイッチベクター系の、多様な構造的構成要素を概略的に例示する図である。

【図 25 B】図 25 A の説明が参照される。

【図 26】複数のドナーを使用する、AaPC との共培養を介する、逐次的な刺激により、ex vivo において拡大増殖させた EGFRvIII CAR T 細胞内の、CAR の発現について描写する定量的フローサイトメトリー解析を示す図である。

【図 27】ベレジメクスリガンド (溶媒: DMSO) の存在下 / 非存在下で、本明細書で記載されるリガンド誘導性遺伝子スイッチベクター系をトランスフェクトされた細胞による、IL-12 の産生を示す図である。

40

【図 28 A】IL-12 の発現レベルについての解析を示す図である。図 28 A は、細胞活性化の非存在下における、ベレジメクスリガンド (溶媒: DMSO) の存在下 / 非存在下で、本明細書で記載されるリガンド誘導性遺伝子スイッチベクター系をトランスフェクトされた細胞による、IL-12 の発現レベルを示す。図 28 B は、抗原特異的活性化に続く、ベレジメクスリガンド (溶媒: DMSO) の存在下 / 非存在下で、本明細書で記載されるリガンド誘導性遺伝子スイッチベクター系をトランスフェクトされた細胞による、IL-12 の発現レベルを示す。

【図 28 B】図 28 A の説明が参照される。

50

【図29】本明細書で記載されるリガンド誘導性遺伝子スイッチベクター系をトランスフェクトされ、aAPCおよびベレジメクスリガンド（溶媒：DMSO）の存在下／非存在下で共培養された細胞内の、IL-12の発現レベルについての解析を示す図である。

【図30A】IL-12の発現レベルについての経時解析を示す図である。図30Aは、本明細書で記載されるリガンド誘導性遺伝子スイッチベクター系をトランスフェクトされ、ベレジメクスリガンド（溶媒：DMSO）の存在下／非存在下におけるaAPCの非存在下で共培養された細胞による、IL-12の発現レベルを示す。リガンドを、24時間後において添加し、48時間後において除去した。図30Bは、本明細書で記載されるリガンド誘導性遺伝子スイッチベクター系をトランスフェクトされ、ベレジメクスリガンド（溶媒：DMSO）の存在下／非存在下におけるaAPCの存在下で共培養された細胞による、IL-12の発現レベルを示す。リガンドを、24時間後において添加し、48時間後において除去した。IL-12の発現は、リガンドを添加した24、48、および120時間後に定量化した。

【図30B】図30Aの説明が参照される。

【図31A】IL-12の発現レベルについての解析を示す図である。図31Aは、本明細書で記載されるリガンド誘導性遺伝子スイッチベクター系をトランスフェクトされ、ベレジメクスを伴わない培地中の、aAPCとの共培養により、あらかじめ拡大増殖させた（サイクル1）細胞による、ベレジメクスおよびaAPCの存在下／非存在下におけるIL-12の発現レベルを示す。図31Bは、本明細書で記載されるリガンド誘導性遺伝子スイッチベクター系をトランスフェクトされ、培地中の、aAPCとの共培養により、あらかじめ拡大増殖させた（サイクル1）細胞による、ベレジメクスおよびaAPCの存在下／非存在下におけるIL-12の産生を示す。

【図31B】図31Aの説明が参照される。

【図32】図32Aおよび32Bは、IL-12の発現レベルについての解析を示す図である。図32Aは、本明細書で記載されるリガンド誘導性遺伝子スイッチベクター系をトランスフェクトされた細胞による、IL-12の産生を示す。ベレジメクスリガンドを、時点0において添加し、48時間後の時点において除去し、168時間後の時点において、再度添加し、216時間後の時点において除去した。図32Bは、フローサイトメトリ解析により、本明細書で記載されるリガンド誘導性遺伝子スイッチベクター系をトランスフェクトされた細胞内の、CARの発現を示す。細胞に、CD3陽性集団について、ゲートをかけた。

【図33】ベレジメクスの存在下、およびaAPCの存在下（サイクル1）／非存在下（サイクル2）で、本明細書で記載されるリガンド誘導性遺伝子スイッチベクター系をトランスフェクトされた細胞による、IL-12の発現レベルを示す図である。

【図34】本明細書で記載されるリガンド誘導性遺伝子スイッチベクター系をトランスフェクトされた細胞による、ベレジメクス用量依存性のIL-12の発現を示す図である。

【図35】本明細書で記載されるリガンド誘導性遺伝子スイッチベクター系のトランスフェクションを介して作出され、1：1のエフェクター対標的細胞比で、標的細胞と共に共培養されたCAR-T細胞による、IFN γ の産生を示す図である。IFN γ の産生は、CAR-T細胞の、EL4標的細胞、EL4 EGFRvIII標的細胞との共培養、ならびに標的細胞を伴わない（エフェクター単独）対照を使用して測定した。

【図36A】CAR-T細胞の特異的細胞傷害作用を示す図である。図36Aは、本明細書で記載されるリガンド誘導性遺伝子スイッチベクター系のトランスフェクションを介して作出されたCAR-T細胞による、IFN γ の産生を示す。エフェクターCAR-T細胞を、U87MG、U87MG-FLuc-GFP、U87MG-EGFRvIII-FLuc-GFP、U251MG、U251MG-FLuc-GFP、およびU251MG-EGFRvIII-FLuc-GFPの標的細胞と共に、1：1のエフェクター：標的細胞比で、培養物上清中のIFN γ 発現についての解析前24時間にわたり共培養した。図36Bは、本明細書で記載されるリガンド誘導性遺伝子スイッチベクター系のトランスフェクションを介して作出されたCAR-T細胞による、EGFRvIIIを発現する神

10

20

30

40

50

経膠芽腫細胞の溶解%を示す。エフェクターCART細胞を、エフェクター：標的細胞比を変動させて、EL4、EGFRvIIIを発現するEL4、K562、およびEGFRvIIIを発現するK562標的細胞系と共に共インキュベートした。

【図36B】図36Aの説明が参照される。

【発明を実施するための形態】

【0076】

発明の詳細な説明

以下の記載および例は、本開示の実施形態について、詳細に例示する。本開示は、本明細書で記載される特定の実施形態に限定されず、そのようなものとして、変動しうることを理解されたい。当業者は、本開示には、多数の変動および改変がなされ、これらは、その範囲内に包含されることを認識するであろう。

【0077】

全ての用語は、それらが、当業者により理解される通りに理解されることを意図する。そうでないことが規定されない限りにおいて、本明細書で使用される技術用語および科学用語は、本開示が関連する技術分野の当業者により一般に理解される意味と同じ意味を有する。

【0078】

本明細書で使用される節の小見出しは、構成上の目的だけのものであり、記載される主題を限定するものと見なすべきではない。

【0079】

本開示の多様な特色は、単一の実施形態の文脈で記載しうるが、特色はまた、個別に提示される場合もあり、任意の適切な組合せで提示される場合もある。逆に、本明細書では、明確さのために、本開示を、個別の実施形態の文脈で記載しうるが、本開示はまた、単一の実施形態でも、実施することができる。

【0080】

定義

以下の定義は、当技術分野における定義を補完し、本出願へと方向付けられ、いかなる関連または非関連の案件、例えば、共同所有される、いかなる特許または出願にも帰属しない。本明細書で記載される方法および材料と、同様または同等である、任意の方法および材料を、本開示の試験の実施において使用しうるが、本明細書では、好ましい材料および方法について記載する。したがって、本明細書で使用される用語法は、特定の実施形態について記載することだけを目的とするものであり、限定的であることを意図するものではない。

【0081】

本出願では、そうでないことが別段に言明されない限りにおいて、単数形の使用は、複数形を含む。本明細書で使用される通り、そうでないことが文脈により明確に指示されない限りにおいて、単数形の「ある(a)」、「ある(an)」、および「その」は、複数の指示対象を含むことに注意しなければならない。本出願では、そうでないことが言明されない限りにおいて、「または」の使用は、「および／または」を意味する。さらに、「～を含むこと」という用語のほか、「～を含む(include)」、「～を含む(includes)」

、および「含まれた」など、他の形態の使用は、限定的ではない。

【0082】

本明細書における、「一部の実施形態」、「ある実施形態」、「一実施形態」、または「他の実施形態」への言及は、実施形態との関連で記載される、特定の特色、構造、または特徴が、本開示の、少なくとも一部の実施形態には含まれるが、全ての実施形態には、必ずしも含まれないことを意味する。

【0083】

本明細書および特許請求の範囲で使用される「～を含むこと(comprising)」(「～を含む(comprise)」および「～を含む(comprises)」など、「～を含むこと(comp rising)」の任意の形態)、「～を有すること」(「～を有する(have)」および「～を

10

20

30

40

50

有する (has) 」など、「～を有すること」の任意の形態)、「～を含むこと (including) 」(「～を含む (include) 」および「～を含む (includes) 」など、「～を含むこと (including) 」の任意の形態)、または「～を含有すること」(「～を含有する (contain) 」および「～を含有する (contains) 」など、「～を含有すること」の任意の形態) という語は、包含的またはオープンエンドであり、さらなる、列挙されていない要素または方法ステップを除外しない。本明細書で論じられる任意の実施形態は、本開示の任意の方法または組成物に関して実施することが可能であり、この逆も成り立つことが想定される。さらに、本開示の組成物を使用して、本開示の方法を達成することができる。

【0084】

「約」または「およそ」という用語は、当業者により決定される、特定の値についての、許容可能な誤差範囲内であって、部分的に、値がどのようにして測定または決定されるのか、すなわち、測定系の限界に依存する誤差範囲内を意味する。例えば、「約」は、当技術分野における慣行に従い、1標準偏差または1標準偏差を超える範囲内を意味する。代替的に、「約」は、所与の値の、最大で20%、例えば、最大で10%、最大で5%、または最大で1%の範囲も意味する。別の例では、「約10」の量は、10および9~11の任意の量を含む。さらに別の例では、基準数値との関係における「約」という用語はまた、値±この値から10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、または1%の範囲も含む。代替的に、特に、生物学的系または生物学的過程に関して、「約」という用語は、値の桁数内、好ましくは、5倍以内、より好ましくは2倍以内も意味する。特定の値を、本出願および特許請求の範囲において記載する場合、そうでないことが言明されない限りにおいて、特定の値について、許容可能な誤差範囲内を意味する「約」という用語を仮定すべきである。

【0085】

本明細書で使用される「単離」という用語およびその文法的同等物は、その天然環境からの核酸の抽出を意味する。本明細書で使用される「精製」という用語およびその文法的同等物は、分子または組成物が、天然から抽出されたもの(ゲノムDNAおよびmRNAを含む)であれ、合成されたもの(cDNAを含む)であれ、かつ/または検査室条件下で増幅されたものであれ、純度が増大しており、この場合、「純度」とは、相対的用語であり、「絶対純度」ではないことを意味する。一方、核酸およびタンパク質は、希釈剤またはアジュバントと共に製剤化される場合があるが、実際的な目的では、単離されているものとしうることを理解されたい。例えば、核酸は、細胞への導入のために使用する場合、許容可能な担体または希釈剤と混合することが典型的である。本明細書で使用される「実質的に精製された」という用語およびその文法的同等物は、核酸、ポリペプチド、タンパク質、または他の化合物が、天然では会合する、ポリヌクレオチド、タンパク質、ポリペプチド、および他の分子を本質的に含まない、すなわち、約50%を超えて含まない、約70%を超えて含まない、約90%を超えて含まない、核酸配列、ポリペプチド、タンパク質または他の化合物を指す。

【0086】

本明細書で使用される「ポリヌクレオチド」または「オリゴヌクレオチド」とは、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドである、任意の長さのヌクレオチドまたは核酸のポリマー形態を指す。この用語は、分子の一次構造だけを指す。したがって、この用語は、二本鎖DNAおよび一本鎖DNA、三重鎖DNAのほか、二本鎖RNAおよび一本鎖RNAも含む。この用語はまた、例えば、ポリヌクレオチドのメチル化および/またはキャッピングによる修飾形態、ならびにポリヌクレオチドの非修飾形態も含みうる。用語はまた、天然のものではないヌクレオチドまたは合成ヌクレオチドのほか、ヌクレオチド類似体を含む分子を含むことも意図する。

【0087】

本明細書で使用される「ポリペプチド」、「ペプチド」、「タンパク質」、およびそれらの文法的同等物は、アミノ酸残基のポリマーを指す。「成熟タンパク質」とは、全長タンパク質であり、任意選択で、グリコシル化または所与の細胞内環境内のタンパク質に典

10

20

30

40

50

型的な他の修飾を含むタンパク質である。本明細書で開示されるポリペプチドおよびタンパク質（これらの機能的部分および機能的変異体を含む）は、1または複数の、自然発生のアミノ酸の代わりに、合成アミノ酸を含みうる。当技術分野では、このような合成アミノ酸が公知であり、例えば、アミノシクロヘキサンカルボン酸、ノルロイシン、 α -アミノ n -デカン酸、ホモセリン、S-アセチルアミノメチルシステイン、trans-3-ヒドロキシプロリンおよびtrans-4-ヒドロキシプロリン、4-アミノフェニルアラニン、4-ニトロフェニルアラニン、4-クロロフェニルアラニン、4-カルボキシフェニルアラニン、 β -フェニルセリン、 β -ヒドロキシフェニルアラニン、フェニルグリシン、 α -ナフチルアラニン、シクロヘキシルアラニン、シクロヘキシルグリシン、インドリン-2-カルボン酸、1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸、アミノマロン酸、アミノマロン酸モノアミド、N'-ベンジル-N'-メチルリシン、N', N'-ジベンジルリシン、6-ヒドロキシリシン、オルニチン、 α -アミノシクロペンタンカルボン酸、 α -アミノシクロヘキサンカルボン酸、 α -アミノシクロヘプタンカルボン酸、 α -(2-アミノ-2-ノルボルナン)カルボン酸、 α , γ -ジアミノ酪酸、 α , β -ジアミノプロピオン酸、ホモフェニルアラニン、および α -tert-ブチルグリシンを含む。本開示は、操作細胞内の、本明細書で記載されるポリペプチドの発現が、ポリペプチド構築物の、1または複数のアミノ酸の翻訳後修飾と関連しうることをさらに想定する。翻訳後修飾の非限定例は、リン酸化、アセチル化およびホルミル化を含むアシル化、グリコシル化（N連結型およびO連結型を含む）、アミド化、ヒドロキシル化、メチル化およびエチル化を含むアルキル化、ユビキチン化、ピロリドンカルボン酸の付加、ジスルフィド架橋の形成、硫酸化、ミリストイル化、パルミトイル化、イソプレニル化、ファルネシル化、ゲラニル化、グリピオン化、リポイル化、およびヨード化を含む。

【0088】

核酸および／または核酸配列は、天然または人工で、共通の先祖核酸または先祖核酸配列に由来する場合、「相同」である。タンパク質および／またはタンパク質配列は、それらのコードDNAが、天然または人工で、共通の先祖核酸または先祖核酸配列に由来する場合、相同である。相同な分子は、相同体と称する場合がある。例えば、本明細書で記載される、任意の天然タンパク質は、任意の利用可能な突然変異誘発法により修飾することができる。発現させると、この突然変異核酸は、元の核酸によりコードされるタンパク質と相同なポリペプチドをコードする。相同性は一般に、2つまたはこれを超える核酸またはタンパク質（またはこれらの配列）の間の配列同一性から推定される。相同性を確立するのに有用な配列の間の同一性の、正確な百分率は、問題の核酸およびタンパク質と共に変動するが、少なくとも25%の配列同一性を使用して、相同性を確立する。高レベルの配列同一性、例えば、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、もしくは99%、またはこれを超える配列同一性もまた、相同性を確立するのに使用することができる。本明細書では、配列同一性百分率を決定するための方法（例えば、デフォルトパラメータを使用する、BLASTPおよびBLASTN）について記載するが、これらは、一般に利用可能である。

【0089】

ポリペプチドの、2つの核酸配列またはアミノ酸配列の文脈において、本明細書で使用される、「同一」または「配列同一性」という用語およびその文法的同等物は、指定された比較域にわたり、最大の照応関係についてアライメントされた場合に同じである、2つの配列内の残基を指す。本明細書で使用される「比較域」とは、少なくとも約20、通例、約50～約200、より通例では、約100～約150の連続する位置によるセグメントであって、2つの配列を、最適にアライメントした後で、その中の配列を、同じ数の、連続する位置による基準配列と比較しうるセグメントを指す。当技術分野では、比較のための配列アライメント法が周知である。比較のための最適な配列アライメントは、Smith and Waterman, Adv. Appl. Math., 2:482 (1981)の局所相同性アルゴリズム；Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol., 48:443 (1970)のアライメントアルゴリズム；Pearson and Lipman, Proc. Nat. Acad. Sci U.S.A., 85:2444 (1988)の類似性検索法；

これらのアルゴリズムのコンピュータ化された実装 (Intelligentics、Mountain View Calif. によるPC/Geneプログラム内のCLUSTAL、Wisconsin Genetics Software Package、Genetics Computer Group (GCG)、575 Science Dr.、Madison、Wis.、U. S. A. における、GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA、およびTFASTAを含むがこれらに限定されない) により行うことができ、CLUSTALプログラムについては、Higgins and Sharp, Gene, 73:237-244 (1988)およびHiggins and Sharp, CABIOS, 5:151-153 (1989)、Corpet et al., Nucleic Acids Res., 16:10881-10890 (1988)、Huang et al., Computer Applications in the Biosciences, 8:155-165 (1992)、およびPearson et al., Methods in Molecular Biology, 24:307-331 (1994)により十分に記載されている。アライメントはまた、目視および手作業のアライメントにより実施されることも多い。実施形態の1つのクラスでは、本明細書のポリペプチドは、例えば、デフォルトパラメータを使用する、BLASTP (もしくはCLUSTAL、または他の任意の利用可能なアライメントソフトウェア) により測定される通り、基準ポリペプチドまたはこの断片と少なくとも80%、85%、90%、98%の99%、または100%同一である。同様に、核酸はまた、出発核酸に照らして記載することもでき、例えば、それらは、例えば、デフォルトパラメータを使用する、BLASTN (もしくはCLUSTAL、または他の任意の利用可能なアライメントソフトウェア) により測定される通り、基準核酸またはこの断片と50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、98%、99%、または100%同一でありうる。1つの分子が、大型の分子に対して、ある特定の百分率の配列同一性を有するという場合、これは、2つの分子が最適にアライメントされれば、小型の分子内の、前記百分率の残基は、2つの分子が最適にアライメントされた順序に従い、大型の分子内にマッチ残基を見出すことを意味する。

【0090】

核酸配列またはアミノ酸配列に対して適用される「実質的に同一な」という用語およびその文法的同等物は、核酸配列またはアミノ酸配列が、上記で記載したプログラム、例えば、標準的なパラメータを使用するBLASTを使用する基準配列と比較して、少なくとも90%の配列同一性、またはこれを超える配列同一性、少なくとも95%、少なくとも98%、および少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含むことを意味する。例えば、BLASTNプログラム (ヌクレオチド配列のための) は、デフォルトとして、11のワード長 (W)、10の期待値 (E)、 $M=5$ 、 $N=-4$ 、および両方の鎖の比較を使用する。アミノ酸配列のために、BLASTPプログラムは、デフォルトとして、3のワード長 (W)、10の期待値 (E)、およびBLOSUM62スコアリングマトリックスを使用する (Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1992) を参照されたい)。配列同一性百分率は、2つの最適にアライメントされた配列を、比較域にわたり比較することにより決定し、比較域内のポリヌクレオチド配列の部分は、2つの配列の最適なアライメントのために、基準配列 (付加または欠失を含まない) と比較して、付加または欠失 (すなわち、ギャップ) を含みうる。百分率は、同一な核酸塩基またはアミノ酸残基が、両方の配列内で生じる位置の数を決定して、マッチさせた位置の数を求め、マッチさせた位置の数を、比較域内の位置の総数で除し、結果に、100を乗じて、配列同一性百分率を求めることにより計算する。複数の実施形態では、実質的な同一性は、少なくとも約50残基の長さの配列の領域にわたり、少なくとも約100残基の領域にわたり存在し、複数の実施形態では、配列は、少なくとも約150残基にわたり、実質的に同一である。複数の実施形態では、配列は、コード領域の全長にわたり、実質的に同一である。

【0091】

「トランスポゾン」または「転移性エレメント」 (TE) とは、ゲノム内のその位置を変化させ、場合によって、突然変異を創出または保存し、細胞のゲノムサイズを変更する、ベクターDNA配列である。転移は、TEの重複を結果としてもたらすことが多い。ク

ラスⅠのTEは、2段階でコピーされる：まず、クラスⅠのTEは、DNAからRNAへと転写され、次いで、産生されたRNAは、DNAへと逆転写される。次いで、この、コピーされたDNAは、ゲノム内の新たな位置へと挿入される。逆転写ステップは、TE自身によりコードされうる、逆転写酵素により触媒される。レトロトランスポゾンの特徴は、HIVなどのレトロウイルスと同様である。クラスⅡのTEによるカットアンドペースト転移機構は、RNA中間体を伴わない。転移は、いくつかのトランスポザゼ酵素により触媒される。あるトランスポザゼは、DNA内の任意の標的部位に非特異的に結合するのに対し、他のトランスポザゼは、特異的DNA配列標的に結合する。トランスポザゼは、標的部位において、互い違いの(staggered)切断をもたらす結果として、5'側または3'側における、一本鎖のDNA突出(粘着(sticky)末端)をもたらす。このステップは、DNAトランスポゾンを切り出し、次いで、DNAトランスポゾンは、新たな標的部位へとライゲーションされるが、この過程は、ギャップを埋めるDNAポリメラーゼの活性と、糖リン酸骨格をつなぎ合わせるDNAリガーゼの活性とを伴う。これは、標的部位の重複を結果としてもたらす。DNAトランスポゾンの挿入部位は、標的DNA内が互い違いに切断され、DNAポリメラーゼにより埋められることにより創出されうる短い直接的なリピート、ならびにそれらに続く、トランスポザゼによるTEの切出しに重要な一連の逆位リピートにより同定されうる。細胞周期のS期において、ドナー部位は既に複製されているが、標的部位はまだ複製されていない場合に転移が生じるとカットアンドペーストTEは重複される。転移は、クラスⅠ TEおよびクラスⅡ TEのいずれにおいても、「自律型」または「非自律型」として分類することができる。自律型TEが、それ自身で移動しうるのに対し、非自律型TEは、移動するのに、別のTEの存在を必要とする。これは、非自律型TEが、トランスポザゼ(クラスⅡの場合)または逆転写酵素(クラスⅠの場合)を欠くためであることが多い。

【0092】

「トランスポザゼ」とは、トランスポゾンの末端に結合し、カットアンドペースト機構または複製性転移機構による、トランスポゾンの、ゲノムの別の部分への移動を触媒する酵素を指す。一部の実施形態では、トランスポザゼの触媒活性を用いて、遺伝子を、ベクターからゲノムへと移動させることができる。一部の実施形態では、トランスポザゼの触媒活性を用いて、遺伝子を、ベクター(例えば、トランスポゾン)からゲノムへと移動させることができる。ある特定の実施形態では、Sleeping Beautyトランスポザゼは、mRNAとして用意される。一部の態様では、mRNAは、キャップおよびポリAテールを含む。

【0093】

本明細書で開示または想定される核酸配列およびベクターは、細胞へと、「トランスフェクション」、「形質転換」、「ヌクレオフェクション」または「形質導入」により導入することができる。本明細書で使用される「トランスフェクション」、「形質転換」、または「形質導入」とは、物理的方法または化学的方法を使用することによる、1または複数の外因性ポリヌクレオチドの、宿主細胞への導入を指す。当技術分野では、多くのトランスフェクション法が公知であり、例えば、リン酸カルシウムDNA共沈殿法(例えば、Murray E. J. (ed.), *Methods in Molecular Biology*, Vol. 7, *Gene Transfer and Expression Protocols*, Humana Press (1991)を参照されたい);DEAE-デキストラン法;電気穿孔法;カチオン性リポソーム媒介性トランスフェクション法;タングステン粒子促進型遺伝子銃法(Johnston, *Nature*, 346: 776-777 (1990));リン酸ストロンチウム共沈殿法(Brash et al., *Mol. Cell Biol.*, 7: 2031-2034 (1987));およびヌクレオフェクション(Trompeter et al., *J. Immunol. Methods* 274:245-256 (2003))を含む。ファージベクターまたはウイルスベクターは、それらの多くが市販されている、適切なパッケージング細胞内で、感染性粒子を増殖させた後で、宿主細胞へと導入することができる。

【0094】

本明細書で使用される「腫瘍抗原」とは、腫瘍細胞内で産生されるかまたは過剰発現す

る、任意の抗原性物質を指す。腫瘍抗原は、例えば、宿主における免疫応答を誘発しうる。代替的に、本開示の目的では、腫瘍抗原は、健常細胞および腫瘍細胞のいずれもが発現するが、ある特定の腫瘍型を同定するため、適切な治療標的であるタンパク質でありうる。複数の実施形態では、腫瘍抗原は、CD19、CD33、BCMA、CD44、 α -葉酸受容体、CAIX、CD30、ROR1、CEA、EGP-2、EGP-40、HER2、HER3、葉酸結合性タンパク質、GD2、GD3、IL-13R-a2、KDR、EDB-F、メソテリン、CD22、EGFR、MUC-1、MAGE-A1、MUC16、h5T4、PSMA、TAG-72、EGFRvIII、CD123、またはVEGF-R2である。一実施形態では、腫瘍抗原は、骨髄性悪性腫瘍、例えば、神経膠芽腫または多形性膠芽腫（GBM）を処置するためのCAR T細胞療法の標的である、EGFRvIIIである。別の実施形態では、腫瘍抗原は、CD19である。さらに別の実施形態では、腫瘍抗原は、CD33である。

【0095】

本明細書で使用される「エンハンサー」という用語は、例えば、それが作動可能に連結された核酸配列の転写を増大させるDNA配列を指す。エンハンサーは、核酸配列のコード領域から、何キロベースも離れて位置することが可能であり、調節因子の結合、DNAのメチル化パターン、またはDNA構造の変化を媒介しうる。当技術分野では、様々な異なる供給源に由来する、多数のエンハンサーが周知であり、クローニングされたポリヌクレオチドとして、またはクローニングされたポリヌクレオチド内で利用可能である（例えば、ATCCなどの寄託先のほか、他の商業的供給源または個人的供給源から）。プロモーター（一般に使用されるCMVプロモーターなど）を含む、多数のポリヌクレオチドはまた、エンハンサー配列も含む。エンハンサーは、コード配列の上流に位置する場合もあり、この中に位置する場合もあり、この下流に位置する場合もある。「Igエンハンサー」という用語は、免疫グロブリン（Ig）遺伝子座内にマップされるエンハンサー領域に由来するエンハンサーエレメント（このようなエンハンサーは、例えば、重鎖（ミュー）5'側エンハンサー、軽鎖（カッパ）5'側エンハンサー、カッパイントロンエンハンサーおよびミューイントロンエンハンサー、ならびに3'側エンハンサーを含む）を指す（一般に、Paul W. E. (ed), Fundamental Immunology, 3rd Edition, Raven Press, New York (1993), pages 353-363、および米国特許第5,885,827号明細書を参照されたい）。

【0096】

本明細書で使用される「コード配列」とは、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのセグメントを指す。領域または配列には、5'末端の近傍では、開始コドンが結合し、3'末端の近傍では、終止コドンが結合する。コード配列はまた、オープンリーディングフレームと称することもできる。

【0097】

本明細書で使用される「作動可能に連結された」とは、DNAセグメントの、別のDNAセグメントへの、物理的な連結および／または機能的な連結であって、セグメントが、それらの意図される方式で機能することを可能とするような連結を指す。遺伝子産物をコードするDNA配列は、それが、例えば、プロモーター、エンハンサー、および／またはサイレンサーなどの調節配列に、DNA配列の転写のモジュレーションを、直接的または間接的に可能とする方式で連結されている場合に、調節配列に作動可能に連結されている。例えば、DNA配列は、それが、プロモーターの転写開始部位に対して、下流において、転写開始部位に対して、適正なリーディングフレーム内で、プロモーターへとライゲーションされており、DNA配列を通して、転写の伸長が進行することを可能とする場合に、プロモーターに作動可能に連結されている。エンハンサーまたはサイレンサーは、それが、それぞれ、DNA配列の転写を増加または減少させるように、DNA配列へとライゲーションされている場合に、遺伝子産物をコードするDNA配列に作動可能に連結されている。エンハンサーおよびサイレンサーは、DNA配列のコード領域の上流に位置する場合もあり、この下流に位置する場合もあり、この中に埋め込まれている場合もある。シグ

ナル配列が、ポリペプチドの分泌に参与するプレタンパク質として発現する場合、シグナル配列のDNAは、ポリペプチドをコードするDNAに作動可能に連結されている。DNA配列の、調節配列への連結は、典型的に、適切な制限部位におけるライゲーションにより、または当業者に公知の制限エンドヌクレアーゼを使用して、配列内に挿入された、アダプターまたはリンカーを介して達せられる。

【0098】

「転写調節因子」という用語は、ある特定の環境条件下で、プロモーター駆動性DNA配列の転写を防止もしくは阻害するように作用する生化学的エレメント（例えば、リプレッサータンパク質または核阻害性タンパク質）、または、ある特定の環境条件下で、プロモーター駆動性DNA配列の転写を可能とするか、もしくは刺激するように作用する生化学的エレメント（例えば、インデューサーまたはエンハンサー）を指す。

10

【0099】

本明細書で使用される「～を誘導する」、「誘導」という用語、およびその文法的同等物は、転写調節因子によりもたらされる、核酸配列の転写、プロモーターの活性、および／またはプロモーターの発現の、何らかの転写基礎レベルと比べた上昇を指す。

【0100】

「標的」遺伝子または「異種」遺伝子または「目的の遺伝子（GOI）」とは、遺伝子導入により宿主細胞へと導入される遺伝子を指す。例示的なGOIは、本明細書で記載される、抗原結合性ポリペプチド、キメラ受容体、CAR、TCR、サイトカイン、および／または細胞タグを含むうる、抗原結合性ポリペプチドでありうる。

20

【0101】

本明細書で使用される「リコンビナーゼ」とは、規定された部位の間の部位特異的組換えを容易としうる酵素群であって、部位が、単一のDNA分子上で物理的に隔てられているか、または部位が、別個のDNA分子上に存在する、酵素群を指す。規定された組換え部位のDNA配列は、必ずしも同一ではない。組換えの開始は、タンパク質-DNA間相互作用に依存し、酵素群内には、ファージの組込みおよび切出し（例えば、λインテグラーゼ、ΦC31）、環状プラスミドの切断（resolution）（例えば、Tn3、ガンマデルタ、Cre、Flp）、代替的遺伝子の発現のためのDNAの反転（例えば、Hin、Gin、Pin）、発生時における遺伝子（例えば、アナバナ属（Anabaena）による窒素固定遺伝子）のアセンブリ、および転移（例えば、IS607トランスポゾン）を触媒する、多数のタンパク質が存在する。大半の部位特異的リコンビナーゼは、進化的類縁性および機能的類縁性にに基づき、2つのファミリーのうちの1つに収まる。これらは、λインテグラーゼファミリーまたはチロシンリコンビナーゼ（例えば、Cre、Flp、XerD）、およびレゾルバーゼ／インテグラーゼファミリー、またはセリンリコンビナーゼファミリー（例えば、ΦC31、TP901-1、Tn3、ガンマデルタ）である。

30

【0102】

「組換え接合部位」とは、本明細書で記載されるリコンビナーゼ酵素により認識される、特異的ポリヌクレオチド配列である。典型的に、1つの部位が、標的核酸（例えば、真核生物または原核生物の染色体またはエピソーム）内に存在し、別の部位が、標的組換え部位において統合される核酸上に存在する、2つの異なる部位（「相補的部位」と称する）が関与する。本明細書では、それぞれ、細菌標的およびファージドナーに由来する、接合（または組換え）部位を指す、「attB」および「attP」という用語が使用されるが、特定の酵素のための組換え部位は、異なる名称を有しうる。組換え部位は、典型的に、コア領域またはスパーサー領域により隔てられた、左側アームおよび右側アームを含む。したがって、attB組換え部位は、BOB' [配列中、BおよびB'は、それぞれ、左側アームおよび右側アームであり、Oは、コア領域である] からなる。同様に、attPとは、POP' [配列中、PおよびP'は、アームであり、Oは、ここでもまた、コア領域である] である。attB部位と、attP部位との組換え時、および標的における、同時の核酸の組込み時に、組み込まれるDNAを挟む組換え部位を、「attL」および

40

50

「attR」と称する。したがって、上記の用語法を使用する、attL部位およびattR部位は、それぞれ、BOP'およびPOB'からなる。本明細書における一部の表示では、「O」を省き、attBおよびattPを、例えば、それぞれ、BB'およびPP'と呼ぶ。

【0103】

遺伝子の発現のモジュレーション

遺伝子操作の分野では、遺伝子発現の精密な制御は、発生および他の生理学的過程について研究し、これを操作し、制御するための貴重なツールである。遺伝子発現は、多数の特異的なタンパク質間相互作用を伴う、複雑な生物学的過程である。緊密に調節された誘導性遺伝子発現系または「遺伝子スイッチ」は、遺伝子治療、細胞内の、大スケールのタンパク質の作製、細胞ベースのハイスループットのスクリーニングアッセイ、機能的なゲノミクス、ならびにトランスジェニック植物およびトランスジェニック動物における形質の調節など、多様な適用に有用である。しかし、治療のためには、調節され、局在化された発現が、オフターゲット作用を防止するのに重要である。本明細書では、必要とされる場合に、かつ、標的細胞の特異的近傍、または特異的位置において、サイトカインなど、異種遺伝子の発現を調節する手段が提示される。本明細書では、さらに、サイトカインなど、異種遺伝子の発現を調節する方法であって、例えば、サイトカインが、リガンド誘導性プロモーターの制御下にある方法が提示される。場合によって、方法は、リガンドの非存在下で、異種遺伝子発現の基礎レベルの低下または非存在を結果としてもたらす。さらなる実施形態では、リガンド誘導性プロモーターは、遺伝子スイッチのリガンド誘導性プロモーターである。本明細書では、さらに、サイトカインなど、異種遺伝子の、操作細胞からの発現を調節する方法が提示される。本明細書における操作細胞とは、その天然状態または内因性状態から改変された細胞である。操作細胞の例は、改変された（例えば、ポリヌクレオチドの、細胞へのトランスフェクションにより）、本明細書で記載される細胞である。場合によって、操作細胞は、操作免疫エフェクター細胞でありうる。1つの場合には、操作細胞は、T細胞である。別の場合には、操作細胞は、NK細胞である。1つの場合には、リガンドで異種遺伝子の発現を誘導する前に、操作細胞を活性化させる。別の場合には、細胞を抗原へと曝露することにより、操作細胞を活性化させる。抗原は、操作細胞が発現する抗原結合性ポリペプチドにより認識される抗原でありうる。抗原は、腫瘍抗原または感染性疾患抗原でありうる。1つの場合には、操作細胞は、このような抗原に結合する、抗原結合性ポリペプチドを含みうる。

【0104】

さらなる場合には、遺伝子スイッチのリガンド誘導性プロモーターの遺伝子スイッチ構成要素は、組織特異的プロモーターにより、さらに調節することができる。このような場合、遺伝子スイッチ構成要素は、組織特異的プロモーターが、例えば、活性化T細胞内または活性化NK細胞内で活性化する場合に限り発現する。

【0105】

ベクター

【0106】

「発現ベクター」または「ベクター」とは、細胞内のポリヌクレオチドの複製の自律的単位として挙動する（すなわち、それ自身の制御下における複製が可能である）か、または宿主細胞の染色体への挿入により複製が可能となる、任意の遺伝子エレメント、例えば、プラスミド、染色体、ウイルス、トランスポゾンであって、接合させたセグメントの複製および／または発現をもたらすように、それへと、別のポリヌクレオチドセグメントを接合させた遺伝子エレメントである。適切なベクターは、プラスミド、トランスポゾン、バクテリオファージ、およびコスミドを含むがこれらに限定されない。ベクターは、所望の宿主細胞中へのベクターのライゲーションまたは挿入を実施し、接合させたセグメントの発現を実施するのに必要なポリヌクレオチド配列を含有しうる。このような配列は、宿主生物に応じて異なり、転写を実施するプロモーター配列、転写を増加させるエンハンサー配列、リボソーム結合性部位の配列、および転写翻訳終結配列を含む。代替的に、発現

ベクターは、ベクターの、宿主細胞のDNA配列へのライゲーションまたは組込みを伴わずに、その中でコードされる核酸配列の産物を、直接発現させることが可能でありうる。

【0107】

ベクターはまた、「選択用マーカー遺伝子」も含みうる。本明細書で使用される「選択用マーカー遺伝子」という用語は、核酸配列を発現する細胞を、対応する選択用薬剤の存在下で、これと順方向または逆方向に、特異的に選択することを可能とする核酸配列を指す。当技術分野では、適切な選択用マーカー遺伝子が公知であり、例えば、国際特許出願公開第1992/08796号パンフレットおよび同第1994/28143号パンフレット、Wigler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 3567 (1980)、O' Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 1527 (1981)、Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 2072 (1981)、Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol., 150:1 (1981)、Santerre et al., Gene, 30: 147 (1984)、Kent et al., Science, 237: 901-903 (1987)、Wigler et al., Cell, 11: 223 (1977)、Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48: 2026 (1962)、Lowy et al., Cell, 22: 817 (1980)、ならびに米国特許第5, 122, 464号明細書および同第5, 770, 359号明細書において記載されている。

【0108】

一部の実施形態では、ベクターは、宿主細胞内で複製することが可能であり、適切な選択的圧の存在下で、宿主細胞内のDNAの染色体外セグメントとして存続する、「エピソーム発現ベクター」または「エピソーム」である（例えば、Conese et al., Gene Therapy, 11:1735-1742 (2004)を参照されたい）。代表的な、市販のエピソーム発現ベクターは、エプスタインバー核抗原1 (EBNA1) およびエプスタインバーウイルス (EBV) 複製起点 (oriP) を用いるエピソームプラスミドを含むがこれらに限定されない。ベクターである、pREP4、pCEP4、pREP7、ならびにInvitrogen (Carlsbad, Calif.) 製のpCDNA3.1およびStratagene (La Jolla, Calif.) 製のpBK-CMVは、EBNA1およびoriPの代わりに、T抗原およびSV40の複製起点を使用する、エピソームベクターの非限定的な例を表す。

【0109】

本明細書で使用される「遺伝子発現カセット」とは、ベクターの一部であり、EF1aなどの構成的プロモーター、または誘導性プロモーター、5' UTR、3' UTR、およびポリAエレメント、ならびに1または複数の目的の遺伝子 (GOI) を含有しうる。一実施形態では、ポリAエレメントは、SV40eポリA (配列番号65) である。別の実施形態では、ポリAエレメントは、双方向aCAポリA (配列番号66) である。さらに別の実施形態では、ポリAは、PA2ポリA (配列番号67) である。一部の態様では、遺伝子発現カセットは、核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたDNA結合性ドメイン、および／または核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたトランス活性化ドメインなどの、遺伝子スイッチ構成要素をさらに含む。ベクターは、1または複数の遺伝子発現カセットを含む。

【0110】

ベクターの修飾

本明細書に記載される方法および組成物に有用なポリヌクレオチドベクターは、「医薬品および医薬部外品の製造管理および品質管理の基準」(GMP) に適合するベクターでありうる。例えば、GMPベクターは、非GMPベクターより純粋でありうる。場合によって、純度は、バイオバーデンにより測定することができる。例えば、バイオバーデンは、ベクター組成物中の、好気性細菌、嫌気性細菌、芽胞形成菌、真菌、またはこれらの組合せの存在または非存在でありうる。場合によって、純粋なベクターは、低内毒素または内毒素非含有でありうる。純度は、二本鎖プライマーウォーキングシーケンシングによってもまた測定することができる。プラスミドの同一性は、ベクターの純度を決定する源泉でありうる。本開示のGMPベクターは、非GMPベクターより、10%~99%純粋で

ありうる。GMPベクターは、バイオーバーデン、内毒素、シーケンシング、またはこれらの組合せの存在により測定される通り、非GMPベクターより、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%純粋でありうる。

【0111】

場合によって、第1の遺伝子プログラムの終点におけるターミネーター配列を使用する。ターミネーター配列は、第2の遺伝子プログラムを開始する前に転写物が終結することを確認にしうる。例えば、発現ベクターは、転写の終結およびmRNAの安定化に必要な配列を含有しうる。このような配列は、真核生物またはウイルスの、DNAまたはcDNAの5'側非翻訳領域から入手可能であり、時に、3'側非翻訳領域からも入手可能である。これらの領域は、mRNAの非翻訳部分内の、ポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含有しうる。発現ベクターを含む細胞を、*in vivo*または*in vitro*の、所望のポリペプチドの発現をもたらす条件下で増殖させる。

【0112】

場合によって、スペーサー配列は、ベクター内のポリヌクレオチドによりコードされる、第1のポリペプチドの末端において使用することができる。他の場合には、スペーサー配列は、ベクター内の、第2の遺伝子の末端において使用することができる。スペーサー配列はまた、ベクター内で、第1の遺伝子および第2の遺伝子に後続して使用することもできる。

【0113】

これらのベクターを使用して、目的の遺伝子、または目的の遺伝子の部分によりコードされるポリペプチドを発現させることができる。遺伝子または遺伝子の部分は、ウイルス法または非ウイルス法の任意の方法を使用して挿入することができる。例えば、方法は、非ウイルススペースの技法でありうる。

【0114】

IRESエレメント

本明細書ではまた、本明細書で記載されるポリヌクレオチドおよびポリペプチドの発現および機能性を容易とする、IRESエレメントを含む構築物も開示される。本明細書で使用される「内部リボソーム進入部位 (IRES)」という用語は、内部リボソーム進入部位を意味することが意図されうる。IRES配列を含むベクター内では、第1の遺伝子が、その独自の5'-UTRを伴う機構である、キャップ依存性のリボソーム走査により翻訳されうるのに対し、後続の遺伝子の翻訳は、リボソームの、IRESへの直接的な動員により、キャップ非依存的に達せられうる。IRES配列は、真核リボソームが結合し、5'キャップ末端に結合せずに、翻訳を開始することを可能としうる。IRES配列は、1つの転写物からの、複数の遺伝子の発現を可能としうる (Mountford and Smith 1995)。

【0115】

本明細書で使用される「キャップ (CAP)」または「キャップ (cap)」という用語は、一般に、真核生物mRNAの5'末端へと、3'-5'連結された、7-メチルグアノシン (7meGpppG) である修飾ヌクレオチドであって、このmRNAからのタンパク質の発現時に、正常な翻訳開始経路内で必要とされるエレメントとして用いられる修飾ヌクレオチドを指す。

【0116】

ある特定の場合には、IRES領域は、ピコルナウイルス、脳心筋炎ウイルス、C型肝炎ウイルスのIRES配列など、ウイルスに由来しうる。他の場合には、IRES領域は、脳心筋炎ウイルスに由来しうる。本明細書で使用される「EMCV」または「脳心筋炎ウイルス」という用語は、ピコルナウイルス科 (Picornaviridae) の属の、脳心筋炎ウイルス種の、任意のメンバーである単離株または株を指す。例は、EMCV-R (リュッカート) 株ウイルス、コロンビアSKウイルスである。場合によって、真核開始因子4G、

免疫グロブリン重鎖結合性タンパク質、c-mycがん原遺伝子、血管内皮増殖因子、線維芽細胞増殖因子1のIRES、またはこれらの任意の組合せまたは修飾など、細胞性IRESエレメントを使用することができる。場合によって、細胞性IRESは、ウイルスIRESと比較した場合の、遺伝子発現の増大を有する。

【0117】

ウイルスのIRES配列、細胞性IRES配列、またはこれらの組合せを、ベクター内で用いることができる。IRESは、脳心筋炎ウイルス(EMCV)またはポリオウイルス(PV)に由来する。場合によって、IRESエレメントは、ポリオウイルス(PV)、脳心筋炎ウイルス(EMCV)、口蹄疫ウイルス(FMDV)、ブタテッシュウウイルス1(PTV-1)、愛知ウイルス(AiV)、セネカバレーウイルス(SVV)、C型肝炎ウイルス(HCV)、豚コレラウイルス(CSFV)、ヒト免疫不全ウイルス2(HIV-2)、ヒト免疫不全ウイルス1(HIV-1)、モロニー Maus 白血病ウイルス(MoMLV)、ネコ免疫不全ウイルス(FIV)、マウス乳がんウイルス(MMTV)、潜伏期ヒトサイトメガロウイルス(pUL138)、エプスタインバーウイルス(EBNA-1)、ヘルペスウイルスマレック病(MDVRLORF9)、SV40ポリシストロニック19S(SV4019S)、ムギクビレアブラムシ(Rhopalosiphum padi)ウイルス(RhPV)、クリケット麻痺ウイルス(CrPV)、ウスジロエダシャク(Ectropis obliqua)ピコルナ様ウイルス(EoPV)、チャバネアオカメムシ(Plautia stali)腸ウイルス(PSIV)、サシガメ属(Triatoma)ウイルス(TrV)、ミツバチ麻痺病シシストウイルス(IAPV、KBV)、ブラックカラン復帰ウイルス(BRV)、テンジクアオイ属(Pelargonium)斑入りウイルス(PFBV)、ハイビスカス退緑斑ウイルス(HCRSV)、アブラナ科感染トバモウイルス(CrTMV)、ジャガイモ葉巻ウイルス(PLRV)、タバコエッチウイルス(TEV)、ジアルジアウイルス(GLV)、リーシュマニア属(Leishmania)RNAウイルス1(LRV-1)、およびこれらの組合せまたは修飾からなる群から選択される。場合によって、IRESは、Apaf-1、XIAP、HIAP2/c-IAP1、DAP5、Bcl-2、c-myc、CAT-1、INR、分化LEF-1、PDGF2、HIF-1a、VEGF、FGF2、Bip、BAG-1、CIRP、p53、SHMT1、PITSLRep58、CDK1、Rpr、hid、hsp70、grim、skl、Antennapedia、dFoxO、dInR、Adh-Adhr、HSP101、ADH、URE-2、GPR1、NCE102、YMR181a、MSN1、BOI1、FLO8、GIC1、およびこれらの任意の組合せまたは修飾からなる群から選択される。IRESエレメントを、2つのオープンリーディングフレーム(ORF)の間に組み入れる場合、翻訳の開始は、第1のORF内の、カノニカルな5'-m7GpppNキャップ依存性機構、およびIRESエレメントの下流における、第2のORF内の、キャップ非依存性の機構により生じる。

【0118】

場合によって、遺伝子を、内部リボソーム進入部位(IRES)により連結することができる。IRESは、複数の遺伝子の、同時的な発現を可能とする。例えば、IRES配列は、単一のmRNA転写物からの、複数のタンパク質の産生を許容する。リボソームは、IRESに、5'キャップ非依存的に結合し、翻訳を開始することが可能である。

【0119】

場合によって、IRES配列は、500塩基対でありうるか、またはほぼこの長さでありうる。IRES配列は、300塩基対~1000塩基対でありうる。例えば、IRESは、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、または1000塩基対の長さでありうる。

【0120】

場合によって、IRES配列を含む、ベクター内の下流遺伝子の発現を、低減することができる。例えば、IRES配列に後続する遺伝子は、IRES配列に先行する遺伝子に対して、発現が低減される。発現の低減は、先行する遺伝子に対する、1%~99%の低減でありうる。

【0121】

ある特定の実施形態では、IRESは、配列番号18のヌクレオチド配列との、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、99.5%、または100%の同一性を有するヌクレオチド配列を含むEMCV IRESである。

【0122】

リンカー

また、本明細書で記載されるポリヌクレオチドおよびポリペプチドの発現および機能性を促進するリンカーを含む構築物も開示される。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドリンカーは、本明細書で記載されるポリヌクレオチド内で用いることができる。ポリヌクレオチドリンカーは、本明細書で記載されるポリヌクレオチドを含むベクターと適合性である末端構造を創出するように付加されうる、所望の制限部位を含有する、DNAの二本鎖セグメントでありうる。場合によって、ポリヌクレオチドリンカーは、本明細書で記載されるポリヌクレオチドを含むベクターを修飾するために有用でありうる。例えば、ポリヌクレオチドリンカーを含む、ベクターの修飾は、複数のクロニング部位の変化、またはポリヒスチジンテールの付加でありうる。ポリヌクレオチドリンカーはまた、平滑末端インサートDNAの末端を、制限酵素により切断され、粘着末端を伴うベクターへのクロニングに適応させるのに使用することもできる。ポリヌクレオチドリンカーの使用は、ベクターへの平滑末端ライゲーションより効率的な場合があり、後段の適用において、インサートを、ベクターから放出する方法をもたらさう。場合によって、インサートは、治療適用に有用なポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列でありうる。場合によって、リンカーは、切断型リンカーでありうる。

【0123】

ポリヌクレオチドリンカーは、オリゴマーでありうる。ポリヌクレオチドリンカーは、DNA二本鎖、DNA一本鎖、またはこれらの組合せでありうる。場合によって、リンカーは、RNAでありうる。場合によって、ポリヌクレオチドリンカーは、T4リガーゼにより、本明細書で記載されるポリヌクレオチドを含むベクターへとライゲーションすることができる。ライゲーションを容易とするために、過剰量のポリヌクレオチドリンカーを、インサートおよびベクターを含む組成物へと添加することができる。場合によって、リンカーを導入する前に、インサートおよびベクターを前処理する。例えば、メチラーゼによる前処理により、インサートDNAの望ましくない切断を防止することができる。

【0124】

ある特定の実施形態では、本明細書で記載されるポリヌクレオチドによりコードされる、2つまたはこれを超えるポリペプチドは、介在リンカーポリペプチドをコードする介在配列により隔てることができる。本明細書では、ポリヌクレオチドによりコードされる、2つまたはこれを超えるポリペプチドを隔てるアミノ酸配列を指す、「介在リンカーポリペプチド」という用語は、膜貫通ドメインを、細胞表面ポリペプチド（例えば、天然ポリペプチドの切断型変異体を含む）へと連結するように、本明細書で開示されるポリペプチド構築物内に、任意選択で組み入れられる、アミノ酸の配列を指す、「ペプチドリンカー」という用語と区別される。ある特定の場合には、介在リンカーは、易切断性介在リンカーポリペプチドである。一部の実施形態では、リンカーは、切断型グリンカーまたはリボソームスキッピングリンカーである。一部の実施形態では、切断型リンカーまたはリボソームスキッピングリンカー配列は、2A、GS G-2A、GS Gリンカー、SGSGリンカー、フューリンリンク、ならびにこれらの変異体および誘導体からなる群から選択される。一部の実施形態では、2Aリンカーは、p2Aリンカー、T2Aリンカー、F2Aリンカー、またはE2Aリンカーである。一部の実施形態では、目的のポリペプチドは、易切断性介在リンカーポリペプチドにより連結された、融合タンパク質として発現する。ある特定の実施形態では、易切断性介在リンカーポリペプチドは、F/T2A、T2A、p2A、2A、GS G-p2A、GS Gリンカー、およびフューリンリンク変異体のうちの、任意の1または複数でありうる。ある特定の実施形態では、リンカーポリペプチドは、下記の表に開示されたリンカーポリペプチドを含む。

【 0 1 2 5 】

【表 1 - 1】

表 1. リンカーのアミノ酸配列およびポリヌクレオチド配列

リンカー名	配列 番号	ポリヌクレオチド配列(該当する 場合、5'~3')	配列 番号	アミノ酸配列(該当する場 合、5'~3')
ホイットローリ ンカー	1	GGCAGCACCTCCGGCAGCG GCAAGCCTGGCAGCGGCGA GGGCAGCACCAAGGGC	146	GSTSGSGKPGSGEGSTKG
リンカー	2	TCTGGCGGAGGATCTGGAG GAGGCGGATCTGGAGGAGG AGGCAGTGGAGGCGGAGGA TCTGGCGGAGGATCTCTGCA G	147	SGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGS LQ
GSG リンカー	3	GGAAGCGGA	148	GSG
SGSG リンカー	4	AGTGGCAGCGGC	149	SGSG
(G4S)3 リンカー	5	GGTGGCGGTGGCTCGGGCG GTGGTGGGTGGGTGGCGG CGGATCT	150	GGGGSGGGGSGGGGS
フューリン切断 部位/フューリン リンク 1	6	CGTGCAAAGCGT	151	RAKR
Fmdv	7	AGAGCCAAGAGGGCACCGG TGAAACAGACTTTGAATTTT GACCTTCTGAAGTTGGCAGG AGACGTTGAGTCCAACCCTG GGCCC	152	RAKRAPVKQTLNFDLLKLA GDVESNPGP
トセア・アシグ ナ(Thosea asigna) ウイルス 2A 領 域(T2A)	8	GAGGGCAGAGGAAGTCTGC TAACATGCGGTGACGTCGAG GAGAATCCTGGACCT	153	EGRGSLTTCGDVEENPGP
フューリン- GSG-T2A	9	AGAGCTAAGAGGGGAAGCG GAGAGGGCAGAGGAAGTCT GCTAACATGCGGTGACGTCG AGGAGAATCCTGGACCT	154	RAKRSGEGRGSLTTCGDV EENPGP
フューリン- SGSG-T2A	10	AGGGCCAAGAGGAGTGGCA GCGGCGAGGGCAGAGGAAG TCTTCTAACATGCGGTGACG TGGAGGAGAATCCCGGCCCT	155	RAKRSGSGEGRGSLTTCGD VEENPGP
ブタテッシュウ ウイルス 1 2A 領 域(P2A)	11	GCAACGAACCTTCTCTCCT AAAACAGGCTGGTGATGTG GAGGAGAATCCTGGTCCA	156	ATNFSLLKQAGDVEENPGP
GSG-P2A	12	GGAAGCGGAGCTACTAAGT CAGCCTGCTGAAGCAGGCTG GAGACGTGGAGGAGAACCC TGGACCT	157	GSGATNFSLLKQAGDVEEN PGP

【 0 1 2 6 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

リンカー名	配列番号	ポリヌクレオチド配列(該当する場合、5'～3')	配列番号	アミノ酸配列(該当する場合、5'～3')
A 型ウマ鼻炎ウイルス 2A 領域 (E2A)	13	CAGTGTACTAATTATGCTCT CTTGAAATTGGCTGGAGATG TTGAGAGCAACCCTGGACCT	158	QCTNYALLKLAGDVESNPG P
口蹄疫ウイルス 2A 領域(F2A)	14	GTCAAACAGACCCTAAACTT TGATCTGCTAAACTGGCCG GGGATGTGGAAAGTAATCC CGGCCCC	159	VKQTLNFDLLKLAGDVESN PGP
FP2A	15	CGTGCAAAGCGTGCACCGGT GAAACAGGGAAGCGGAGCT ACTAACTTCAGCCTGCTGAA GCAGGCTGGAGACGTGGAG GAGAACCCTGGACCT	160	RAKRAPVKQGSGATNFSLL KQAGDVEENPGP
リンカー-GSG	16	GCACCGGTGAAACAGGGAA GCGGA	161	APVKQGS
リンカー	17	GCACCGGTGAAACAG	162	APVKQ

【0127】

一部の実施形態では、介在リンカーポリペプチドは、ホイトローリンカー（配列番号 146）、GSG リンカー（配列番号 148）、SGSG リンカー（配列番号 149）、（G4S）3 リンカー（配列番号 150）、フーリン切断部位／フーリンリンク 1（Furlink 1）（配列番号 151）、Fmdv リンカー（配列番号 152）、トセア・アシグナ（*Thosea asigna*）ウイルス 2A 領域（T2A）（配列番号 153）、フーリン-GSG-T2A（配列番号 154）、フーリン-SGSG-T2A（配列番号 155）、ブタテッシュウイルス 12A 領域（P2A）（配列番号 156）、GSG-P2A（配列番号 157）、A 型ウマ鼻炎ウイルス 2A 領域（E2A）（配列番号 158）、または口蹄疫ウイルス 2A 領域（F2A）（配列番号 159）のアミノ酸配列との、少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、99.5%、または 100% の同一性を有するアミノ酸配列を含む。場合によって、介在リンカーポリペプチドは、リンカー（配列番号 147、161、または 162）のアミノ酸配列との、少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、99.5%、または 100% の同一性を有するアミノ酸配列を含む。場合によって、ウイルス 2A 配列を使用することができる。2A エLEMENT は、5～100 塩基対を有する IRES より短くなりうる。場合によって、2A 配列は、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、または 100 ヌクレオチドの長さを有しうる。2A を連結された遺伝子は、単一のオープンリーディングフレーム内で発現させることができ、「自己切断」は、2A ポリペプチド C 末端の、最後の 2 つのアミノ酸である G-P 間で、共翻訳的に生じることが可能であり、等量の共発現タンパク質をもたらす。

【0128】

ウイルス 2A 配列は、約 20 アミノ酸でありうる。場合によって、ウイルス 2A 配列は、コンセンサスモチーフである、Asp-Val/Ile-Glu-X-Asn-Pro-Gly-Pro を含有しうる。コンセンサスモチーフ配列は、共翻訳的に作用しうる。例えば、グリシン残基とプロリン残基との、正常なペプチド結合の形成を防止することができ、これは、リボソームスキッピングおよび新生ポリペプチドの切断を結果としてもたらしうる。この効果は、等モルレベルで、複数の遺伝子をもたらす。

【0129】

2A ペプチドは、単一のオープンリーディングフレーム内の、複数のタンパク質の、その後、リボソームスキッピング機構を介して、個別のポリペプチドへと切断されうる、ポ

リペプチドへの翻訳を可能としうる (Funston, Kallioinen et al. 2008)。一部の実施形態では、2 A 配列は、F / T 2 A、T 2 A、p 2 A、2 A、T 2 A、E 2 A、F 2 A、および B m C P V 2 A、B m I F V 2 A、ならびにこれらの任意の組合せを含みうる。

【0130】

場合によって、ベクターは、I R E S 配列および 2 A リンカー配列を含みうる。他の場合には、2 A ペプチドと連結された、複数の遺伝子の発現は、2 A ペプチドに前置されたスペーサー配列 (G S G) により容易とすることができる。場合によって、構築物は、スペーサー、リンカー、アダプター、プロモーター、またはこれらの組合せを組み合わせうる。例えば、リンカーは、異なる 2 A ペプチドと共に、スペーサー (S G S G リンカーまたは G S G リンカーまたはホイットローリンカー) およびフューリンリンカー (R - A - K - R) 切断部位を有しうる。スペーサーは、I - C e u I でありうる。場合によって、リンカーは、操作することができる。例えば、リンカーは、疎水性などの化学的特徴を含むようにデザインすることができる。場合によって、少なくとも 2 つのリンカー配列は、同じタンパク質をもたらしうる。他の場合には、複数のリンカーを、ベクター内で使用することができる。例えば、目的の遺伝子は、図 2 および図 3 に示される通り、少なくとも 2 つのリンカーにより隔てることができる。

【0131】

ある特定の実施形態では、本明細書で記載されるポリヌクレオチドによりコードされる、2 つまたはこれを超えるポリペプチドは、リンカーポリペプチドをコードする介在配列により隔てることができる。ある特定の場合には、リンカーは、易切断性リンカーである。一部の実施形態では、目的のポリペプチドは、易切断性介在リンカーポリペプチドにより連結された、融合タンパク質として発現する。ある特定の実施形態では、易切断性リンカーポリペプチドは、下記で記載されるフューリンリンク、f m d v、p 2 a、G S G - p 2 a、および / または f p 2 a のうちの、任意の 1 つまたは 2 つでありうる。場合によって、リンカーは、A P V K Q G S G (配列番号 1 6 1) である。

【0132】

ある特定の場合には、リンカーポリペプチドは、アミノ酸配列「R A K R」(配列番号 1 5 1) を含みうる。ある特定の場合には、フューリンリンカーポリペプチドは、「C G T G C A A A G C G T」(配列番号 6) または「A G A G C T A A G A G G」(配列番号 9) を含むポリヌクレオチド配列によりコードされうる。

【0133】

一部の実施形態では、リンカーは、本明細書で記載されるポリヌクレオチド内で用いることができる。リンカーは、可撓性リンカー、非可撓性リンカー、i n v i v o 切断型リンカー、またはこれらの任意の組合せでありうる。場合によって、リンカーは、機能的ドメインを、併せて連結する (可撓性リンカーおよび非可撓性リンカーの場合のように) 場合もあり、i n v i v o 切断型リンカーの場合のように、機能的ドメインを、i n v i v o において放出する場合もある。

【0134】

リンカーは、生物学的活性を改善し、発現収率を増大させることから、所望の薬物動態を達成しうる。リンカーはまた、ヒドラゾン、ペプチド、ジスルフィド、またはチオエーテル (thioester) も含みうる。

【0135】

場合によって、本明細書で記載されるリンカー配列は、可撓性リンカーを含みうる。可撓性リンカーは、接合されるドメインが、ある程度の移動または相互作用を必要とする場合に適用することができる。可撓性リンカーは、小型、非極性 (例えば、G l y)、または極性 (例えば、S e r または T h r) のアミノ酸から構成されうる。可撓性リンカーは、G l y 残基および S e r 残基の連なりから主になる配列 (「G S」リンカー) を有しうる。可撓性リンカーの例は、(G l y - G l y - G l y - G l y - S e r) n の配列 (配列番号 1 5 0) を有しうる。コピー数である「n」を調整することにより、この例示的 G S リンカーの長さを最適化して、機能的ドメインの適切な分離を達成することもでき、必

要なドメイン間相互作用を維持することもできる。G S リンカーのほかに、他の可撓性リンカーも、組換え融合タンパク質に用いることができる。場合によって、可撓性リンカーはまた、G l y および S e r など、小型アミノ酸または極性アミノ酸に富む場合もあるが、可撓性を維持するように、T h r および A l a など、さらなるアミノ酸を含有する場合もある。他の場合には、L y s および G l u などの極性アミノ酸を使用して、可溶性を改善することができる。

【0136】

本明細書で記載されるリンカー配列内に組み入れられる可撓性リンカーは、良好な可撓性および可溶性をもたらすように、G l y および S e r など、小型アミノ酸または極性アミノ酸に富む場合がある。可撓性リンカーは、ある特定の移動または相互作用が、融合タンパク質ドメインに所望される場合に適切でありうる。加えて、可撓性リンカーは、非可撓性構造を有さない場合もあるが、機能的ドメイン間の距離を保持する、受動的リンカーとして用いられる場合もある。可撓性リンカーの長さを調整して、適正なフォールディングを可能とすることもでき、融合タンパク質の最適な生物学的活性を可能とすることもできる。

【0137】

本明細書で記載されるリンカーは、場合によって、非可撓性リンカーをさらに含む。非可撓性リンカーを用いて、ポリペプチドのドメイン間で、一定の距離を維持することができる。非可撓性リンカーの例は、少数を挙げれば、アルファヘリックス形成リンカー、P r o に富む配列、(X P) _n、X - P r o 骨格、A (E A A A K) _n A (n = 2 ~ 5) でありうる。非可撓性リンカーは、場合によって、αヘリックス構造を取ることににより、または複数のP r o 残基を含有することにより、比較的剛直な構造を呈しうる。

【0138】

本明細書で記載されるリンカーは、場合によって、切断されうる。他の場合に、リンカーは、切断されない。切断されないリンカーは、i n v i v o 過程またはe x v i v o 過程を通して1つの分子として作用するように、機能的ドメインを、共有結合的に、一体に接合しうる。リンカーはまた、i n v i v o においても切断されうる。切断型リンカーは、i n v i v o において、遊離の機能的ドメインを放出させるように導入することができる。切断型リンカーは、少数を挙げれば、還元試薬、プロテアーゼの存在により切断することができる。例えば、ジスルフィド結合の還元を用いて、切断型リンカーを作製することができる。ジスルフィドリンカーの場合、グルタチオンなど、チオールとのジスルフィド交換を介する切断イベントが、切断をもたらしうるであろう。他の場合には、i n v i v o における、組換え融合タンパク質内のリンカーの切断はまた、i n v i v o の、病理学的状態（例えば、がんまたは炎症）下、特異的な細胞内または組織内で発現する場合もあり、ある特定の細胞区画内に拘束される場合もあるプロテアーゼによっても実行されうる。場合によって、切断型リンカーは、切断のターゲティングを可能としうる。例えば、多くのプロテアーゼの特異性は、拘束区画内のリンカーの緩徐な切断をもたらしうる。切断型リンカーはまた、ヒドラゾン、ペプチド、ジスルフィド、またはチオエーテルも含みうる。例えば、ヒドラゾンは、血清中の安定性を付与しうる。他の場合には、ヒドラゾンは、酸性区画内の切断を可能としうる。酸性区画は、最大で7のp Hを有しうる。リンカーはまた、チオエーテルも含みうる。チオエーテルは、非還元性でありうる。チオエーテルは、細胞内タンパク質分解のためにデザインすることができる。

【0139】

ある特定の実施形態では、f m d v リンカーポリペプチドは、配列番号152と、少なくとも約45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、または100%同一でありうる配列を含む。ある特定の実施形態では、f m d v リンカーポリペプチドは、2つまたはこれを超える融合タンパク質を連結する、単一のベクター内でコードされるリンカーのうちの1または複数である。ある特定の場場合には、f m d v リンカーポリペプチドは、ポリヌクレオチドのオープンリーディングフレーム（O R F）の核酸配列によりコードされうる。場合によっ

10

20

30

40

50

て、f m d vをコードするO R Fは、配列番号7の配列を含むか、またはこれからなる。ある特定の実施形態では、f m d vをコードするポリヌクレオチドは、配列番号7と、少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、または100%同一である。

【0140】

ある特定の場合には、リンカーポリペプチドは、「p 2 a」リンカーでありうる。ある特定の実施形態では、p 2 aポリペプチドは、配列番号156と、少なくとも約45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、または100%同一でありうる配列を含みうる。ある特定の実施形態では、p 2 aリンカーポリペプチドは、2つまたはこれを超える融合タンパク質を連結する、単一のベクター内でコードされるリンカーのうちの1または複数でありうる。場合によって、p 2 aリンカーポリペプチドは、ポリヌクレオチドのオープンリーディングフレーム（O R F）の核酸配列によりコードされうる。ある特定の実施形態では、p 2 aをコードするO R Fは、配列番号11の配列を含むか、またはこれからなる。ある特定の場合には、p 2 aをコードするポリヌクレオチドは、配列番号11と、少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、または100%同一であるか、または少なくともほぼこれらの比率同一でありうる。

【0141】

場合によって、リンカーポリペプチドは、「G S G - p 2 a」リンカーでありうる。ある特定の実施形態では、G S G - p 2 aリンカーポリペプチドは、配列番号157と、少なくとも約45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、または100%同一でありうる配列を含みうる。ある特定の実施形態では、G S G - p 2 aリンカーポリペプチドは、2つまたはこれを超える融合タンパク質を連結する、単一のベクター内でコードされるリンカーのうちの1または複数でありうる。場合によって、G S G - p 2 aリンカーポリペプチドは、ポリヌクレオチドのオープンリーディングフレーム（O R F）の核酸配列によりコードされうる。G S G p 2 aをコードするO R Fは、配列番号12の配列を含みうる。場合によって、G S G - p 2 aをコードするポリヌクレオチドは、配列番号12と、少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、または100%同一であるか、または少なくともほぼこれらの比率同一でありうる。

【0142】

リンカーポリペプチドは、本明細書で提示される「f p 2 a」リンカーでありうる。ある特定の実施形態では、f p 2 aリンカーポリペプチドは、配列番号160と、少なくとも約45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、または100%同一でありうる配列を含みうる。ある特定の場合には、f p 2 aリンカーポリペプチドは、2つまたはこれを超える融合タンパク質を連結する、単一のベクター内でコードされるリンカーのうちの1または複数でありうる。場合によって、f p 2 aリンカーポリペプチドは、ポリヌクレオチドのオープンリーディングフレーム（O R F）の核酸配列によりコードされうる。ある特定の実施形態では、f p 2 aリンカーをコードするポリヌクレオチドは、配列番号15と、少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、または100%同一であるか、または少なくともほぼこれらの比率同一でありうる。

【0143】

場合によって、リンカーは、操作することができる。例えば、リンカーは、疎水性などの化学的特徴を含むようにデザインすることができる。場合によって、少なくとも2つのリンカー配列は、同じタンパク質をもたらさう。配列は、配列番号147、161、または162のポリペプチド配列と、45%、50%、55%、60%、65%、70%、

10

20

30

40

50

75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一でありうるか、またはほぼこれらの比率で同一でありうる。他の場合には、複数のリンカーを、ベクター内で使用することができる。例えば、本明細書で記載される、目的の遺伝子と、1または複数の遺伝子スイッチポリペプチド配列とは、図15および図16に示される通り、少なくとも2つのリンカーにより隔てることができる。場合によって、遺伝子は、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、または最大で10のリンカーにより隔てることができる。

【0144】

リンカーは、操作リンカーでありうる。リンカーをデザインする方法は、コンピュータ計算による方法でありうる。場合によって、コンピュータ計算による方法は、グラフ法を含みうる。コンピュータ計算法を使用して、データベースから導出された三次元ペプチド構造のライブラリーから、適切なペプチドを検索することができる。例えば、Brookhaven Protein Data Bank (PDB) を使用して、リンカーの選択されたアミノ酸の間の間隔の距離を測ることができる。

【0145】

一部の実施形態では、フューリンポリペプチドおよび2Aポリペプチドを含むポリペプチド構築物をコードするポリヌクレオチドが提供されるが、この場合、フューリンポリペプチドおよび2Aポリペプチドが、少なくとも3つの疎水性アミノ酸を含むポリペプチドリンカーにより連結されている。場合によって、少なくとも3つの疎水性アミノ酸は、グリシン (Gly) (G)、アラニン (Ala) (A)、バリン (Val) (V)、ロイシン (Leu) (L)、イソロイシン (Ile) (I)、プロリン (Pro) (P)、フェニルアラニン (Phe) (F)、メチオニン (Met) (M)、トリプトファン (Trp) (W) からなるリストから選択される。場合によって、ポリペプチドリンカーはまた、1または複数のGSリンカー配列、例えば、(GS)_n、(SG)_n、(GSG)_n (配列番号78)、および(SGSG)_n (配列番号79) [配列中、nは、0~15の任意の数でありうる] も含みうる。

【0146】

ポリペプチド構築物の発現の改善を得る方法であって、第1の機能的ポリペプチドおよび第2の機能的ポリペプチドを含む前記ポリペプチド構築物をコードするポリヌクレオチドを用意するステップであって、前記第1の機能的ポリペプチドと、第2の機能的ポリペプチドとが、配列APVKQ (配列番号162) との、少なくとも60%の同一性を伴う配列を含むリンカーポリペプチドにより連結されている、ステップと；宿主細胞内で、前記ポリヌクレオチドを発現させるステップであって、ポリペプチド構築物の発現の、配列APVKQとの、少なくとも60%の同一性を伴う配列を含むリンカーポリペプチドを有さない、対応するポリペプチド構築物と比較した改善を結果としてもたらすステップとを含む方法が提供される。

【0147】

プロモーター

【0148】

「プロモーター」とは、コード配列の転写を誘発する、ポリヌクレオチドの領域を指す。プロモーターは、DNAの、同じ鎖上の、遺伝子の転写開始部位の近傍であり、かつ、上流に（センス鎖の5'側領域に向かって）位置する。あるプロモーターが、細胞内の全ての状況において活性であるので、構成的であるのに対し、他のプロモーター、例えば、誘導性プロモーターは、特異的刺激に応答して調節され、活性となる。さらに他のプロモーターは、T細胞特異的プロモーターを含むがこれらに限定されない、組織特異的プロモーターまたは活性化プロモーターである。

【0149】

本明細書で使用される「プロモーター活性」という用語およびその文法的同等物は、その活性が測定されるプロモーターに作動可能に連結されたヌクレオチド配列の発現の程度を指す。プロモーター活性は、例えば、ノーザンブロット解析により、産生されるRNA

転写物の量を決定することにより、直接的に測定することもでき、プロモーターに連結されたレポーター核酸配列など、連結された核酸配列によりコードされる産物の量を決定することにより、間接的に測定することもできる。

【0150】

本明細書で使用される「誘導性プロモーター」とは、転写調節因子、例えば、生物因子または非生物因子の存在または非存在により、活性へと誘導されるプロモーターを指す。誘導性プロモーターは、それらに作動可能に連結した遺伝子の発現が、生物または特に、組織の発生の、ある特定の段階において、オンまたはオフにされうるため、有用である。誘導性プロモーターの例は、アルコール調節性プロモーター、テトラサイクリン調節性プロモーター、ステロイド調節性プロモーター、金属調節性プロモーター、発症機序調節性プロモーター、温度調節性プロモーター、および光調節性プロモーターである。一実施形態では、誘導性プロモーターは、遺伝子スイッチの一部である。誘導性プロモーターは、遺伝子スイッチのリガンド誘導性プロモーターでありうる。場合によって、誘導性プロモーターは、RHEOSWITCH（登録商標）遺伝子スイッチなど、低分子リガンド誘導性の、2つのポリペプチドによる、エクジソン受容体ベースの遺伝子スイッチでありうる。場合によって、遺伝子スイッチは、それらの各々が、参照によりその全体において組み込まれる、PCT／米国出願第2001／009050号明細書（国際公開第2001／070816号パンフレット）；米国特許第7,091,038号明細書；同第7,776,587号明細書；同第7,807,417号明細書；同第8,202,718号明細書；PCT／米国出願第2001／030608号明細書（国際公開第2002／029075号パンフレット）；米国特許第8,105,825号明細書；同第8,168,426号明細書；PCT／米国出願第2002／005235号明細書（国際公開第2002／066613号パンフレット）；米国特許出願公開第10／468,200号明細書（米国公開第20120167239号明細書）；PCT／米国出願第2002／005706号明細書（国際公開第2002／066614号パンフレット）；米国特許第7,531,326号明細書；同第8,236,556号明細書；同第8,598,409号明細書；PCT／米国出願第2002／005090号明細書（国際公開第2002／066612号パンフレット）；米国特許第8,715,959号明細書（米国公開第20060100416号明細書）；PCT／米国出願第2002／005234号明細書（国際公開第2003／027266号パンフレット）；米国特許第7,601,508号明細書；同第7,829,676号明細書；同第7,919,269号明細書；同第8,030,067号明細書；PCT／米国出願第2002／005708号明細書（国際公開第2002／066615号パンフレット）；米国特許出願公開第10／468,192号明細書（米国公開第20110212528号明細書）；PCT／米国出願第2002／005026号明細書（国際公開第2003／027289号パンフレット）；米国特許第7,563,879号明細書；同第8,021,878号明細書；同第8,497,093号明細書；PCT／米国出願第2005／015089号明細書（国際公開第2005／108617号パンフレット）；米国特許第7,935,510号明細書；同第8,076,454号明細書；PCT／米国出願第2008／011270号明細書（国際公開第2009／045370号パンフレット）；米国特許出願公開第12／241,018号明細書（米国公開第20090136465号明細書）；PCT／米国出願第2008／011563号明細書（国際公開第2009／048560号パンフレット）；米国特許出願公開第12／247,738号明細書（米国公開第20090123441号明細書）；PCT／米国出願第2009／005510号明細書（国際公開第2010／042189号パンフレット）；米国特許出願公開第13／123,129号明細書（米国公開第20110268766号明細書）；PCT／米国出願第2011／029682号明細書（国際公開第2011／119773号パンフレット）；米国特許出願公開第13／636,473号明細書（米国公開第20130195800号明細書）；PCT／米国出願第2012／027515号明細書（国際公開第2012／122025号パンフレット）；および米国特許第9,402,919号明細書において記載される、し

10

20

30

40

50

かしながらこれらに限定されるわけではないが、これらに記載されている系のうちのいずれかの、エクジソンベースの受容体による構成要素から選択しうる。

【0151】

本明細書では、対象へと、少なくとも2つの機能的タンパク質またはこれらの部分；少なくとも1つのプロモーター；および少なくとも1つの操作組換え部位を含む、本明細書で記載されるポリペプチド配列をコードする、ポリヌクレオチドを含む、少なくとも1つの非ウイルスベクターを投与するステップを含み；前記少なくとも1つのプロモーターが、前記少なくとも2つの機能的タンパク質の発現を駆動する、方法が提示される。場合によって、少なくとも1つのプロモーターは、構成的プロモーターでありうる。場合によって、少なくとも1つのプロモーターは、組織特異的プロモーターでありうる。場合によって、少なくとも1つのプロモーターは、誘導性プロモーターでありうる。場合によって、誘導性プロモーターは、低分子リガンド誘導性の、2つのポリペプチドによる、エクジソン受容体ベースの遺伝子スイッチである。他の場合には、少なくとも1つのプロモーターが、誘導的であることが可能であり、少なくとも1つのプロモーターが、活性化特異的でありうる、プロモーターの組合せを用いることができる。

【0152】

誘導性プロモーターは、前記少なくとも2つの遺伝子の発現の、用量調節性制御のために、リガンドを用いる。場合によって、リガンドは、*ecdys*ステロイド、*9-cis*-レチノイン酸、レチノイン酸の合成類似体、*N*，*N'*-ジアシルヒドラジン、オキサゾリン、ジベンゾイルアルキルシアノヒドラジン、*N*-アルキル-*N*，*N'*-ジアロイルヒドラジン、*N*-アシル-*N*-アルキルカルボニルヒドラジン、*N*-アロイル-*N*-アルキル-*N'*-アロイルヒドラジン、アルニドケトン、3，5-ジ-*tert*-ブチル-4-ヒドロキシ-*N*-イソブチル-ベンズアミド、8-*O*-アセチルハルパジド、オキシステロール、22(R)ヒドロキシコレステロール、24(S)ヒドロキシコレステロール、25-エポキシコレステロール、T0901317、5-アルファ-6-アルファ-エポキシコレステロール-3-スルフェート(sulfate)(ECHS)、7-ケトコレステロール-3-スルフェート(sulfate)、フラメゾール、胆汁酸、1，1-ビホスホネート(biphosphate)エステル、若年性ホルモンIII、RG-115819(3，5-ジメチル-安息香酸*N*-(1-エチル-2，2-ジメチル-プロピル)-*N'*-(2-メチル-3-メトキシ-ベンゾイル)-ヒドラジド)、RG-115932((R)-3，5-ジメチル-安息香酸*N*-(1-*tert*-ブチル-ブチル)-*N'*-(2-エチル-3-メトキシ-ベンゾイル)-ヒドラジド)、およびRG-115830(3，5-ジメチル-安息香酸*N*-(1-*tert*-ブチル-ブチル)-*N'*-(2-エチル-3-メトキシ-ベンゾイル)-ヒドラジド)、ならびにこれらの任意の組合せからなる群から選択することができる。

【0153】

一部の実施形態では、プロモーターは、誘導性プロモーターである。一部の実施形態では、プロモーターは、非誘導性プロモーターである。場合によって、プロモーターは、組織特異的プロモーターでありうる。本明細書の「組織特異的」は、組織または細胞型のサブセット内の、遺伝子発現の調節を指す。場合によって、組織特異的プロモーターは、プロモーターが、生物の、ある特定の組織または細胞型における発現だけを駆動するように、空間的に調節することができる。他の場合には、組織特異的プロモーターは、プロモーターが、生物の発生時を含む時間にわたり、細胞型または組織における発現を、示差的に駆動するように、時間的に調節することができる。場合によって、組織特異的プロモーターは、空間的に、かつ、時間的に調節される。ある特定の実施形態では、組織特異的プロモーターは、ある特定の細胞型内で、構成的に、または特定の時点または細胞型の特定の段階において、間欠的に活性化する。例えば、組織特異的プロモーターは、T細胞またはNK細胞など、特異的細胞が活性化する場合に活性化されるプロモーターでありうる。T細胞は、様々な形で、例えば、MHCクラスII分子により、ペプチド抗原と共に提示される場合、または抗原結合性ポリペプチドを含む操作T細胞が、抗原と会合する場合に活性化しうる。1つの場合には、このような操作T細胞または操作NK細胞は、キメラ抗原受

容体 (CAR) または T 細胞受容体 (TCR) を発現する。

【0154】

1つの場合には、少なくとも1つのプロモーターは、操作プロモーターまたはこの変異体である。本明細書で記載される通り、プロモーターは、IL-2に由来する最小プロモーター配列と、以下：配列番号51など、活性化T細胞核内因子 (NFAT) 応答エレメント；NFIL2D応答エレメント、NFkB/TCF応答エレメント、NFAT/NFIL2B応答エレメント、またはNFIL2A/OCT応答エレメントのうちの1または複数とを組み込みうる。応答エレメントの例については、その全体において本明細書に組み込まれる、Mattila et al., EMBO J. 1990 December; 9(13): 4425-4433において記載されている。

【0155】

一部の実施形態では、少なくとも1つのプロモーターは、IL-2コアプロモーター (配列番号40) を含む。一実施形態では、少なくとも1つのプロモーターは、IL-2最小プロモーター (配列番号41) を含む。別の実施形態では、少なくとも1つのプロモーターは、IL-2エンハンサー/プロモーター変異体 (配列番号42~43) を含む。さらに別の実施形態では、少なくとも1つのプロモーターは、NFkB結合部位 (配列番号44~46) を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのプロモーターは、(NFkB)₁-IL2プロモーター変異体 (配列番号47) を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのプロモーターは、(NFkB)₃-IL2プロモーター変異体 (配列番号48) を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのプロモーターは、(NFkB)₆-IL2プロモーター変異体 (配列番号49) を含む。一実施形態では、少なくとも1つのプロモーターは、1×NFAT応答エレメント-IL2プロモーター変異体 (配列番号50) を含む。別の実施形態では、少なくとも1つのプロモーターは、活性化T細胞核内因子 (NFAT) 応答エレメント (配列番号51) を含む。さらに別の実施形態では、少なくとも1つのプロモーターは、6×NFAT応答エレメント-IL2プロモーター変異体 (配列番号52~55) を含む。さらに別の実施形態では、少なくとも1つのプロモーターは、3×NFAT応答エレメント-IL2プロモーター変異体 (配列番号56~57) を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのプロモーターは、ヒトEF1A1プロモーター変異体 (配列番号58~59) を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのプロモーターは、ヒトEF1A1プロモーター/エンハンサー (配列番号60) を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのプロモーターは、ヒトUBCプロモーター (配列番号61) を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのプロモーターは、6部位GAL4誘導性近位因子結合エレメント (PFB) (配列番号62) を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのプロモーターは、合成最小プロモーター1 (誘導性プロモーター) (配列番号63) を含む。ヒトIL-2遺伝子および5'側フランキング領域は、配列番号95のヌクレオチド配列を含む。

【0156】

本明細書で記載される、IL-12発現のリガンド誘導性制御のための、遺伝子スイッチの使用は、例えば、発現の調節および治療指数の改善を可能とすることにより、IL-12の安全性プロファイルを改善しうる。しかし、遺伝子スイッチを使用する、リガンド用量依存性のIL-12の発現のための条件は、活性化リガンド (例えば、ベレジメクス) の存在または非存在である。ある特定の実施形態では、誘導IL-12発現に対する、さらなる条件付け制御も想定される。T細胞活性化特異的プロモーターの制御下にある遺伝子スイッチ構成要素が提供される。これは、遺伝子スイッチの制御下にある、トランス遺伝子の、ベレジメクス制御型発現に必要な遺伝子スイッチ構成要素の条件付け (例えば、T細胞の活性化) 発現を結果としてもたらす。一部の実施形態では、これは、ベレジメクスが、存在し、T細胞が、活性化している場合における、腫瘍特異的T細胞による、IL-12またはIL-15などのサイトカインの優先的な発現を結果としてもたらす。これは、遺伝子スイッチに制御される、トランス遺伝子発現の局在化レベルの上昇をもたらす。

10

20

30

40

50

【0157】

例えば、遺伝子スイッチ構成要素の、T細胞活性化特異的発現は、活性化T細胞核内因子(NFAT)応答エレメントを含むプロモーターにより制御することができる。NFAT転写因子は、エフェクターT細胞状態の、鍵となるモジュレーターである。NFATは、枯渇を漸進的に駆動する、早期転写チェックポイントである。NFATは、TCRの刺激後に、T細胞内で迅速に活性化し、適切な共刺激シグナル伝達により誘導されて、AP-1と共に、タンパク質複合体を形成し、エフェクター遺伝子およびT細胞機能を調節する。NFAT応答エレメントは、他の最小プロモーター配列(例えば、IL2最小プロモーター)と融合させて、T細胞の活性化に応答した、トランス遺伝子の発現を駆動することができる。

10

【0158】

活性化特異的プロモーターの他の例は、インターロイキン2(IL2)プロモーターおよびプログラム細胞死(PD)1(CD279)プロモーターを含むがこれらに限定されない。遺伝子スイッチ構成要素はまた、炎症促進性シグナル伝達経路のNF-κBなど、他の核内因子に対する結合性部位を、最小プロモーター配列(例えば、IL2)へと融合させることにより、免疫細胞の活性化時にも、条件付けで発現させることができる。

【0159】

一部の実施形態では、プロモーターは、NF-κB結合部位(配列番号44~46)、活性化T細胞核内因子(NFAT)応答エレメント(配列番号51)、6部位GAL4誘導性近位因子結合エレメント(PFB)(配列番号62)、またはRPL6に基づく合成5'UTR(配列番号64)を含む。ある特定の実施形態では、プロモーターは、IL-2コアプロモーター、IL-2最小プロモーター、IL-2エンハンサー／プロモーター変異体、(NF-κB)₁-IL2プロモーター変異体、(NF-κB)₃-IL2プロモーター変異体、(NF-κB)₆-IL2プロモーター変異体、1×NFAT応答エレメント-IL2プロモーター変異体、3×NFAT応答エレメント-IL2プロモーター変異体、6×NFAT応答エレメント-IL2プロモーター変異体、ヒトEEF1A1プロモーター変異体、ヒトEEF1A1プロモーター／エンハンサー、ヒトUBCプロモーター、および合成最小プロモーター1のうちの、任意の1または複数でありうる。ある特定の実施形態では、プロモーターヌクレオチドは、下記の表に開示されたリンカーポリペプチドを含む。

20

30

【0160】

40

50

【表 2 - 1】

表 2. プロモーターのポリヌクレオチド配列

配列 番号	プロモーター	ポリヌクレオチド配列(該当する場合、5'~3')
40	IL-2 コアプロモーター	ACATTTTGACACCCCCATAATATTTTCCAGAATTAACA GTATAAATTGCATCTCTTGTTCAGAGTTCCCTATCACT CTCTTTAATCACTACTCACAGTAACCTCAACTCCTG
41	IL-2 最小プロモーター	TCAAGAGTTCCCTATCACTCTCTTTAATCACTACTCACA GTAACCTCAACTCCTG
42	IL-2 エンハンサー/プロモーター変異体	TGATATCTTTTCTGAGTTACTTTTGTATCCCCACCCCCTT AAAGAAAGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTT AATTGCATGAATTAGAGCTATCACCTAAGTGTGGGCTA ATGTAACAAAGAGGGATTTACCTACATCCATTCACTC AGTCTTTGGGGGTTTAAAGAAATTCCAAAGAGTCATCA GAAGAGGAAAAATGAAGGTAATGTTTTTTCAGACTGGT AAAGTCTTTGAAAAATATGTGTAATATGTAAAACATTTTG ACACCCCCATAATATTTTCCAGAATTAACAGTATAAAT TGCATCTCTTGTTCAGAGTTCCCTATCACTCTCTTTAAT CACTACTCACAGTAACCTCAACTCCTGCCACA
43	L-2 エンハンサー/プロモーター変異体	TTTTCTGAGTTACTTTTGTATCCCCACCCCCTTAAAGAA AGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTTAATTGC ATGAATTAGAGCTATCACCTAAGTGTGGGCTAATGTAA CAAAGAGGGATTTACCTACATCCATTCACTCAGTCTTT GGGGGTTTAAAGAAATTCCAAAGAGTCATCAGAAGAGG AAAAATGAAGGTAATGTTTTTTCAGACTGGTAAAGTCTT TGAAAATATGTGTAATATGTAAAACATTTTGACACCCCC ATAATATTTTCCAGAATTAACAGTATAAATTGCATCTC TTGTTCAAGAGTTCCCTATCACTCTCTTTAATCACTACTC ACAGTAACCTCAACTCCTGCCACA
47	(NF-κB) ₁ -IL2 プロモーター変異体	AATTGGTCCCATCGAAGAGGGATTTACCTACATAAATTG GTCCCGGGACATTTTGACACCCCCATAATATTTTCCAG AATTAACAGTATAAATTGCATCTCTTGTTCAGAGTTCC CTATCACTCTCTTTAATCACTACTCACAGTAACCTCAAC TCCTG
48	(NF-κB) ₃ -IL2 プロモーター変異体	AATTGGTCCCATCGAAGAGGGATTTACCTACATAAGA GGGATTTACCTACATAAGAGGGATTTACCTACATAAT TGGTCCCGGGACATTTTGACACCCCCATAATATTTTCC AGAATTAACAGTATAAATTGCATCTCTTGTTCAGAGTT CCCTATCACTCTCTTTAATCACTACTCACAGTAACCTCA ACTCCTG
49	(NF-κB) ₆ -IL2 プロモーター変異体	AATTGGTCCCATCGAAGAGGGATTTACCTACATAAGA GGGATTTACCTACATAAGAGGGATTTACCTACATAAT TGGTAAGAGGGATTTACCTACATAAGAGGGATTTAC CTACATAAGAGGGATTTACCTACATAAATTGGTCCCGG GACATTTTGACACCCCCATAATATTTTCCAGAATTAAC AGTATAAATTGCATCTCTTGTTCAGAGTTCCCTATCAC TCTCTTTAATCACTACTCACAGTAACCTCAACTCCTG

【 0 1 6 1 】

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

配列 番号	プロモーター	ポリヌクレオチド配列(該当する場合、5'~3')
50	1×NFAT 応答エレメント-IL2 プロモーター変異体	AATTGGTCCCATCGAATTAGGAGGAAAACTGTTTCAT ACAGAAGGCGTCAATTGGTCCCGGGACATTTTGACACC CCCATAATATTTTCCAGAATTAACAGTATAAATTGCAT CTCTTGTTCAAGAGTTCCCTATCACTCTCTTTAATCACTA CTCACAGTAACCTCAACTCCTG
56	3×NFAT 応答エレメント-IL2 プロモーター変異体	TGATATCAATTGGTCCCATCGAATTAGGAGGAAAACT GTTTCATACAGAAGGCGTCAATTAGGAGGAAAACTGT TTCATACAGAAGGCGTCAATTAGGAGGAAAACTGTTT CATACAGAAGGCGTCAATTGGTCCCGGGACATTTTGAC ACCCCCATAATATTTTCCAGAATTAACAGTATAAATTG CATCTCTTGTTCAAGAGTTCCCTATCACTCTCTTTAATCA CTACTCACAGTAACCTCAACTCCTG
57	3×NFAT 応答エレメント-IL2 プロモーター変異体	AATTGGTCCCATCGAATTAGGAGGAAAACTGTTTCAT ACAGAAGGCGTCAATTAGGAGGAAAACTGTTTCATAC AGAAGGCGTCAATTAGGAGGAAAACTGTTTCATACAG AAGGCGTCAATTGGTCCCGGGACATTTTGACACCCCCAT AATATTTTCCAGAATTAACAGTATAAATTGCATCTCTT GTTCAAGAGTTCCCTATCACTCTCTTTAATCACTACTCA CAGTAACCTCAACTCCTG
52	6×NFAT 応答エレメント-IL2 プロモーター変異体	GAATTAGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCA ATTAGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAAT TAGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAATTG GTCCCATCGAATTAGGAGGAAAACTGTTTCATACAGA AGGCGTCAATTAGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAG GCGTCAATTAGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGC GTCAATTGGTCCCGGGACATTTTGACACCCCCATAATAT TTTTCCAGAATTAACAGTATAAATTGCATCTCTTGTTCA AGAGTTCCTATCACTCTCCTTAATCACTACTCACAGTA ACCTCAACTCCTG
53	6×NFAT 応答エレメント-IL2 プロモーター変異体	TGATATCGAATTAGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAA GGCGTCAATTAGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGG CGTCAATTAGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCG TCAATTGGTCCCATCGAATTAGGAGGAAAACTGTTTC ATACAGAAGGCGTCAATTAGGAGGAAAACTGTTTCAT ACAGAAGGCGTCAATTAGGAGGAAAACTGTTTCATAC AGAAGGCGTCAATTGGTCCCGGGACATTTTGACACCCC CATAATATTTTCCAGAATTAACAGTATAAATTGCATCT CTTGTTCAAGAGTTCCCTATCACTCTCTTTAATCACTACT CACAGTAACCTCAACTCCTGAATTCCATG

10

20

30

40

【 0 1 6 2 】

50

【表 2 - 3】

配列 番号	プロモーター	ポリヌクレオチド配列(該当する場合、5'~3')
54	6×NFAT 応答エレメント-IL2 プロモーター変異体	GAATTAGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCA ATTAGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAAT TAGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAATTG GTCCCATCGAATTAGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGA AGGCGTCAATTAGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAG GCGTCAATTAGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGC GTCAATTGGTCCCGGGACATTTTGACACCCCCATAATAT TTTCCAGAATTAACAGTATAAATTGCATCTCTTGTTCA AGAGTTCCTATCACTCTCTTAATCACTACTCACAGTA ACCTCAACTCCTG
55	6×NFAT 応答エレメント-IL2 プロモーター変異体	TGATATCGAATTAGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAA GGCGTCAATTAGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGG CGTCAATTAGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCG TCAATTGGTCCCATCGAATTAGGAGGAAAAACTGTTTC ATACAGAAGGCGTCAATTAGGAGGAAAAACTGTTTCAT ACAGAAGGCGTCAATTAGGAGGAAAAACTGTTTCATAC AGAAGGCGTCAATTGGTCCCGGGACATTTTGACACCC CATAATATTTTCCAGAATTAACAGTATAAATTGCATCT CTTGTTCAAGAGTTCCCTATCACTCTCTTAATCACTACT CACAGTAACCTCAACTCCTG
58	ヒト EEF1A1 プロモーター変異体	GAGCGTGCGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGA GCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAG GGGGTCGGCGATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCG CGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCC GCCTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGT GCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTT GCCGCCAGAACACAG
59	ヒト EEF1A1 プロモーター変異体	GCGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCAC ATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCG GCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTA AACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTT CCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGT CGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAG AACACA

【 0 1 6 3 】

10

20

30

40

50

【表 2 - 4】

配列 番号	プロモーター	ポリヌクレオチド配列(該当する場合、5'~3')
60	ヒト EEF1A1 プロモーター/エンハンサー	GAGCTTTGCAAAGATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAGG AATCTTTGCAGCTAATGGACCTTCTAGGTCTTGAAAGGA GTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCG CACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGG TCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGG GTAAACTGGGAAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTT TTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGT AGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGC CAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGC CTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAA TTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCG AGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTTCGAGGCCT TGCGCTTAAGGAGCCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAG GCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTG GTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTC TCTAGCCATTTAAAAATTTTGATGACCTGCTGCGACGCT TTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGA TCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGG CGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGA GGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACG GGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTG GCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCA AGGCTGGCCCGGTTCGGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAG ATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAAT GGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTC ACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCGTCCTCAGCCG TCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCA GGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGAGTACGTCGT CTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTC CCCACACTGAGTGGGTGGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCT TGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTG AGTTTGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGG TTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGAG

【 0 1 6 4】

10

20

30

40

50

【表 2 - 5】

配列 番号	プロモーター	ポリヌクレオチド配列(該当する場合、5'~3')
61	ヒト UBC プロモーター	GGCCTCCGCGCCGGGTTTTGGCGCCTCCCGCGGGCGCCC CCCTCCTCACGGCGAGCGCTGCCACGTCAGACGAAGGG CGCAGCGAGCGTCCTGATCCTTCCGCCCCGGACGCTCAG GACAGCGGCCCGCTGCTCATAAGACTCGGCCTTAGAAC CCCAGTATCAGCAGAAGGACATTTTAGGACGGGACTTG GGTGA CTCTAGGGCACTGGTTTTCTTTCCAGAGAGCGGA ACAGGCGAGGAAAAGTAGTCCCTTCTCGGCGATTCTGC GGAGGGATCTCCGTGGGGCGGTGAACGCCGATGATTAT ATAAGGACGCGCCGGGTGTGGCACAGCTAGTTCCGTCG CAGCCGGGATTTGGGTCGCGGTTCTTGTTTGTGGATCGC TGTGATCGTCACTTGGTGAGTAGCGGGCTGCTGGGCTG GGTACGTGCGCTCGGGGTGGCGAGTGTGTTTTGTGAA GTTTTTTAGGCACCTTTTGAATGTAATCATTTGGGTCA ATATGTAATTTTCAGTGTTAGACTAGTAAATTGTCCGCT AAATTCTGGCCGTTTTTTGGCTTTTTTGTAGACG
63	合成最小プロモーター1	AGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCCTCATT CTGGAGACGGATCCCGAGCCGAGTGTTTTGACCTCCAT AGAA

10

20

【0165】

遺伝子スイッチ

本明細書では、遺伝子スイッチポリペプチド、リガンド誘導性遺伝子スイッチポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ならびにこれらのポリペプチドおよび／またはポリヌクレオチドを組み込む方法および系が提示される。

【0166】

「遺伝子スイッチ (gene switch)」または「遺伝子スイッチ (genetic switch)」という用語は、プロモーターと関連する応答エレメントの組合せを指し、例えば、1または複数のリガンドの存在下で、応答エレメントおよびプロモーターを組み込んだ遺伝子の発現をモジュレートする、E c R ベースの系を指す。緊密に調節された誘導性遺伝子発現系または遺伝子スイッチは、遺伝子治療、細胞内の、大スケールのタンパク質の作製、細胞ベースのハイスループットのスクリーニングアッセイ、機能的なゲノミクス、ならびにトランスジェニック植物およびトランスジェニック動物における形質の調節など、多様な適用に有用である。このような誘導性遺伝子発現系は、リガンド誘導性異種遺伝子発現系を含みうる。

30

【0167】

E c R ベースの遺伝子スイッチの初期形は、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) E c R (DmE c R) ポリペプチドおよびマウス (*Mus musculus*) R X R (MmR X R) ポリペプチドを使用し、これらの受容体が、ステロイドであるポナステロン A の存在下で、哺乳動物細胞系およびトランスジェニックマウスにおいて、レポーター遺伝子をトランス活性化させることを示した (Christopherson et al., 1992 ; No et al., 1996)。その後、Suhr et al., 1998は、非ステロイド系のエクジソンアゴニストであるテブフェノジドが、外因性ヘテロ二量体パートナーの非存在下で、カイコ (*Bombyx mori*) E c R (BmE c R) を介して、哺乳動物細胞内のレポーター遺伝子の、高レベルのトランス活性化を誘導することを示した。

40

【0168】

P C T 国際特許出願／米国出願第 97 / 05330 号明細書 (国際公開第 97 / 38117 号パンフレット) および P C T 国際特許出願／米国出願第 99 / 08381 号明細書 (国際公開第 99 / 58155 号パンフレット) は、外因性遺伝子の発現をモジュレート

50

するための方法であって、外因性遺伝子およびエクジソン応答エレメントを含むDNA構築物が、それに対するリガンドの存在下で、かつ、任意選択で、サイレントパートナーとして作用することが可能な受容体の存在下で、エクジソン応答エレメントに結合して、遺伝子発現を誘導するエクジソン受容体を含む、第2のDNA構築物により活性化する方法について開示している。この例では、エクジソン受容体を、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) から単離した。典型的に、このような系は、最適の活性化をもたらすために、サイレントパートナー、好ましくはレチノイドX受容体 (RXR) の存在を必要とする。哺乳動物細胞内では、昆虫エクジソン受容体 (EcR) は、哺乳動物レチノイドX受容体 (RXR) と、ヘテロ二量体化し、これにより、標的遺伝子または異種遺伝子の発現を、リガンド依存的に調節するのに使用することが可能である。PCT国際特許出願/米国出願第98/14215号明細書 (国際公開第99/02683号パンフレット) は、カイコガであるカイコ (*Bombyx mori*) から単離されたエクジソン受容体が、外因性の二量体パートナーを必要とせずに、哺乳動物系内で機能的であることについて開示している。一部の実施形態では、RXRは、配列番号69と、少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、もしくは100%同一なヌクレオチド、または配列番号182と、少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、もしくは100%同一なポリペプチドを含む。一部の実施形態では、遺伝子スイッチは、VP16-リンカー-RxRを含み、VP16-リンカー-RXRは、配列番号70と、少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、もしくは100%同一なヌクレオチド、または配列番号183と、少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、もしくは100%同一なポリペプチドを含む。

【0169】

米国特許第6,265,173号明細書は、受容体のステロイド/甲状腺スーパーファミリーの多様なメンバーを、遺伝子発現系における使用のための、USPの、少なくとも二量体化ドメインを含むキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) ウルトラスピラクル受容体 (USP) またはこの断片と組み合わせることについて開示している。米国特許第5,880,333号明細書は、植物において使用された、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) のEcRおよびウルトラスピラクル (USP) によるヘテロ二量体系であって、トランス活性化ドメインおよびDNA結合性ドメインが、2つの異なるハイブリッドタンパク質上に位置する、ヘテロ二量体系について開示している。これらの場合の各々では、トランス活性化ドメインおよびDNA結合性ドメイン (PCT国際特許出願/米国出願第98/14215号明細書における通りに、天然のEcRとして、またはPCT国際特許出願/米国出願第97/05330号明細書における通りに、修飾EcRとして) を、単一の分子へと組み込み、USPまたはRXRである、他のヘテロ二量体パートナーを、それらの天然状態において使用した。一部の実施形態では、遺伝子スイッチは、EcRリガンド結合性ドメイン-VY変異体を含み、EcRリガンド結合性ドメイン-VY変異体は、配列番号72もしくは73と、少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、もしくは100%同一なヌクレオチド、または配列番号185もしくは186と、少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、もしくは100%同一なポリペプチドを含む。他の実施形態では、遺伝子スイッチは、GAL4-リンカー-EcRを含み、GAL4-リンカー-EcRは、配列番号74もしくは75と、少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、もしくは100%同一なヌクレオチド、または配列番号187もしくは188と、少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、もしくは100%同一なヌクレオチド、または配列番号189もしくは190と、少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、もしくは100%同一なポリペプチドを含む。

10

20

30

40

50

0%同一なポリペプチドを含む。

【0170】

PCT国際特許出願／米国出願第01／0905号明細書は、トランス活性化ドメインと、DNA結合ドメインとを2つの異なるタンパク質上に置くことにより互いから隔てた、エクジソン受容体ベースの誘導性遺伝子発現系が、リガンドの非存在下で、バックグラウンド活性の大幅な低減を結果としてもたらし、リガンドの存在下で、バックグラウンドを上回る活性の著明な増大を結果としてもたらすことについて開示している。この2ハイブリッド系は、PCT出願／米国出願第97／05330号明細書およびPCT出願／米国出願第98／14215号明細書の出願において開示されている、2つの系と比較して、著明に改善された誘導性遺伝子発現モジュレーション系である。2ハイブリッド系は、DNA結合性ドメインが、遺伝子上のDNA結合性部位に結合すると、トランス活性化ドメインが、プロモーターを、より効果的に活性化させるように、相互作用タンパク質の対が、転写活性化ドメインを、DNA結合性ドメインに対して、より好適な位置に置く能力を利用すると考えられる（例えば、米国特許第5,283,173号明細書を参照されたい）。2ハイブリッド遺伝子発現系は、核内受容体ポリペプチドへと融合させたDNA結合性ドメインをコードする、第1の遺伝子発現カセット、および異なる核内受容体ポリペプチドへと融合させたトランス活性化ドメインをコードする、第2の遺伝子発現カセットである、2つの遺伝子発現カセットを含む。リガンドの存在下では、第1のポリペプチドの、第2のポリペプチドとの相互作用を促進するコンフォメーション変化が誘導され、これにより、DNA結合性ドメインと、トランス活性化ドメインとの二量体化が結果としてもたらされると考えられる。DNA結合性ドメインおよびトランス活性化ドメインは、2つの異なる分子上に存在するので、リガンドの非存在下では、バックグラウンド活性が、大幅に低減される。

【0171】

別の驚くべき発見は、2ハイブリッド系のある特定の修飾がまた、ステロイド性リガンド、例えば、ポナステロンA（「PonA」）またはムリステロンA（「MurA」）と比較した場合に、非ステロイド性リガンド、例えば、ジアシルヒドラジンに対する感受性の改善をもたらすことであった。すなわち、ステロイドと比較した場合、非ステロイド性リガンドは、低リガンド濃度で、より大きな遺伝子転写活性をもたらした。さらに、2ハイブリッド系は、非修飾RXRを切り替えパートナーとして使用する場合に生じうる、RXRの過剰発現に起因する一部の副作用も回避する。好ましい2ハイブリッド系では、EcRまたはRXRの、天然のDNA結合性ドメインおよびトランス活性化ドメインは除去され、結果として、これらのハイブリッド分子は、細胞内に存在する、他のステロイドホルモン受容体との相互作用の可能性を低下させ、これにより、副作用の低減を結果としてもたらす。

【0172】

エクジソン受容体（EcR）とは、核内受容体スーパーファミリーのメンバーであり、サブファミリー1、群H（本明細書では、「群H核内受容体」と称する）へと分類される。各群のメンバーは、E（リガンド結合）ドメイン内で、40～60%のアミノ酸同一性を共有する（Laudet et al., A Unified Nomenclature System for the Nuclear Receptor Subfamily, 1999; Cell 97: 161-163）。エクジソン受容体に加えて、この核内受容体サブファミリー1、群Hの他のメンバーは、ユビキタス受容体（UR）、オーファン受容体1（OR-1）、ステロイドホルモン核内受容体1（NER-1）、RXR相互作用性タンパク質15（RIP-15）、肝臓x受容体β（LXRβ）、ステロイドホルモン受容体様タンパク質（RLD-1）、肝臓x受容体（LXR）、肝臓x受容体α（LXRα）、ファルネソイドx受容体（FXR）、受容体相互作用性タンパク質14（RIP-14）、およびファルネソール受容体（HRR-1）を含む。

【0173】

場合によって、誘導性プロモーターは、Intrexon Corporation製のRHEOSWITCH（登録商標）遺伝子スイッチなど、低分子リガンド誘導性の、2

10

20

30

40

50

つのポリペプチドによる、エクジソン受容体ベースの遺伝子スイッチでありうる。場合によって、遺伝子スイッチは、それらの各々が、参照によりその全体において組み込まれる、PCT/米国出願第2001/009050号明細書（国際公開第2001/070816号パンフレット）；米国特許第7,091,038号明細書；同第7,776,587号明細書；同第7,807,417号明細書；同第8,202,718号明細書；PCT/米国出願第2001/030608号明細書（国際公開第2002/029075号パンフレット）；米国特許第8,105,825号明細書；同第8,168,426号明細書；PCT/米国出願第2002/005235号明細書（国際公開第2002/066613号パンフレット）；米国特許出願公開第10/468,200号明細書（米国公開第20120167239号明細書）；PCT/米国出願第2002/005706号明細書（国際公開第2002/066614号パンフレット）；米国特許第7,531,326号明細書；同第8,236,556号明細書；同第8,598,409号明細書；PCT/米国出願第2002/005090号明細書（国際公開第2002/066612号パンフレット）；米国特許第8,715,959号明細書（米国公開第20060100416号明細書）；PCT/米国出願第2002/005234号明細書（国際公開第2003/027266号パンフレット）；米国特許第7,601,508号明細書；同第7,829,676号明細書；同第7,919,269号明細書；同第8,030,067号明細書；PCT/米国出願第2002/005708号明細書（国際公開第2002/066615号パンフレット）；米国特許出願公開第10/468,192号明細書（米国公開第20110212528号明細書）；PCT/米国出願第2002/005026号明細書（国際公開第2003/027289号パンフレット）；米国特許第7,563,879号明細書；同第8,021,878号明細書；同第8,497,093号明細書；PCT/米国出願第2005/015089号明細書（国際公開第2005/108617号パンフレット）；米国特許第7,935,510号明細書；同第8,076,454号明細書；PCT/米国出願第2008/011270号明細書（国際公開第2009/045370号パンフレット）；米国特許出願公開第12/241,018号明細書（米国公開第20090136465号明細書）；PCT/米国出願第2008/011563号明細書（国際公開第2009/048560号パンフレット）；米国特許出願公開第12/247,738号明細書（米国公開第20090123441号明細書）；PCT/米国出願第2009/005510号明細書（国際公開第2010/042189号パンフレット）；米国特許出願公開第13/123,129号明細書（米国公開第20110268766号明細書）；PCT/米国出願第2011/029682号明細書（国際公開第2011/119773号パンフレット）；米国特許出願公開第13/636,473号明細書（米国公開第20130195800号明細書）；PCT/米国出願第2012/027515号明細書（国際公開第2012/122025号パンフレット）；および米国特許第9,402,919号明細書において記載されている系のうちのいずれかの、エクジソンベースの受容体による構成要素から選択しうるが、これらに限定されない。

【0174】

宿主細胞内の、異種遺伝子およびインターロイキンの発現をモジュレートするための系であって、本明細書で開示される遺伝子スイッチポリペプチドを発現させるポリヌクレオチドを含む系が提供される。構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターの制御下にある、非限定的な例示的リガンド誘導性遺伝子スイッチベクター系の、多様な構造的構成要素を、図22に示す。

【0175】

一部の実施形態では、遺伝子スイッチベクター系の発現カセットは、XON-64であり、配列番号131に示される配列を有する。一部の実施形態では、遺伝子スイッチベクター系の発現カセットは、XON-30であり、配列番号132に示される配列を有する。一部の実施形態では、遺伝子スイッチベクター系の発現カセットは、XON-59であり、配列番号133に示される配列を有する。一部の実施形態では、遺伝子スイッチベク

10

20

30

40

50

ター系の発現カセットは、XON-60であり、配列番号134に示される配列を有する。一部の実施形態では、遺伝子スイッチベクター系の発現カセットは、XON-61であり、配列番号135に示される配列を有する。一部の実施形態では、遺伝子スイッチベクター系の発現カセットは、XON-62であり、配列番号136に示される配列を有する。

【0176】

一部の実施形態では、宿主細胞内の、異種遺伝子およびサイトカインの発現をモジュールするための系であって、第1のポリペプチドをコードする、第1のポリヌクレオチドを含む、第1の遺伝子発現カセット；第2のポリペプチドをコードする、第2のポリヌクレオチドを含む、第2の遺伝子発現カセット；およびリガンドを含み、前記宿主細胞を、前記リガンドの存在下で、前記第1の遺伝子発現カセットおよび前記第2の遺伝子発現カセットと接触させると、前記異種遺伝子および前記サイトカインが、前記宿主細胞内で発現するように、前記第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドが、(i)トランス活性化ドメイン；(ii)DNA結合性ドメイン；および(iii)リガンド結合性ドメイン；(iv)前記異種遺伝子；ならびに(vi)前記サイトカインのうちの1または複数を含む系が提供される。場合によって、異種遺伝子は、本明細書で記載される抗原結合性ポリペプチドを含む。場合によって、抗原結合性ポリペプチドは、本明細書で記載されるCAR、例えば、CD19、CD33、BCMA、CD44、 α -葉酸受容体、CAIX、CD30、ROR1、CEA、EGP-2、EGP-40、HER2、HER3、葉酸結合性タンパク質、GD2、GD3、IL-13R- α 2、KDR、EDB-F、メソテリン、CD22、EGFR、MUC-1、MUC-16、MAGE-A1、MUC16、h5T4、PSMA、TAG-72、EGFRvIII、CD123、およびVEGFR2のうちの少なくとも1つに結合するCARでありうる。

【0177】

サイトカイン

本明細書では、遺伝子スイッチポリペプチドおよびサイトカイン、またはこれらの変異体もしくは誘導体をコードするポリヌクレオチド、ならびにこれらを組み込む方法および系が提示される。サイトカインとは、細胞のシグナル伝達に関与する、約5~20kDaの間の、小型タンパク質の類別である。一部の場合には、サイトカインは、ケモカイン、インターフェロン、インターロイキン、コロニー刺激因子、または腫瘍壊死因子を含む。一部の実施形態では、ケモカインは、細胞の遊走を導く、化学誘引物質としての役割を果たし、4つのサブファミリー：CXC、CC、CX3C、およびXCへと分類される。例示的なケモカインは、CCサブファミリー：CCL1、CCL2(MCP-1)、CCL3、CCL4、CCL5(RANTES)、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9(またはCCL10)、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、およびCCL28；CXCサブファミリー：CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、およびCXCL17；XCサブファミリー：XCL1およびXCL2；ならびにCX3CサブファミリーであるCX3CL1に由来するケモカインを含む。

【0178】

インターフェロン(IFN)は、I型インターフェロン(例えば、IFN- α 、IFN- β 、IFN- ϵ 、IFN- κ 、およびIFN- ω)、II型インターフェロン(例えば、IFN- γ)、およびIII型インターフェロンを含む。一部の実施形態では、IFN- α は、IFNA1、IFNA2、IFNA4、IFNA5、IFNA6、IFNA7、IFNA8、IFNA10、IFNA13、IFNA14、IFNA16、IFNA17、およびIFNA21を含む、約13の亜型へとさらに分類される。

【0179】

インターロイキンは、白血球(leukocyte)または白血球(white blood cell)により

発現され、Tリンパ球およびBリンパ球ならびに造血細胞の発生および分化を促進する。例示的なインターロイキンは、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8 (CXCL8)、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26、IL-27、IL-28、IL-29、IL-30、IL-31、IL-32、IL-33、IL-35、およびIL-36を含む。

【0180】

一部の実施形態では、インターロイキンは、mb IL-15を含む。一部の実施形態では、mb IL-15は、本明細書で記載される改変エフェクター細胞を用いて共発現させることができる、膜結合型キメラIL-15である。一部の実施形態では、mb IL-15は、全長IL-15 R α 、またはこれらの機能的な断片もしくは変異体とインフレイムで融合させた、全長IL-15 (例えば、天然IL-15ポリペプチド)、またはこれらの断片もしくは変異体を含む。場合によって、IL-15を、IL-15 R α へと、リンカーを介して、間接的に連結する。場合によって、mb IL-15は、Hurton et al., “Tethered IL-15 augments antitumor activity and promotes a stem-cell memory subset in tumor-specific T cells,” PNAS 2016において記載されている通りである。

【0181】

腫瘍壊死因子 (TNF) とは、アポトーシスをモジュレートするサイトカインの群である。一部の場合には、TNFファミリー内には、TNF α 、リンホトキシンアルファ (LT α)、リンホトキシンベータ (LT β)、T細胞抗原であるgp39 (CD40L)、CD27L、CD30L、FASL、4-1BBL、OX40L、およびTNF放出型アポトーシス誘導リガンド (TRAIL) を含むがこれらに限定されない、約19のメンバーが存在する。

【0182】

コロニー刺激因子 (CSF) とは、造血幹細胞の表面上の受容体タンパク質と相互作用する、分泌糖タンパク質であって、その後、細胞の増殖および特異的種類の血液細胞への分化をモジュレートする分泌糖タンパク質である。一部の場合には、CSFは、マクロファージコロニー刺激因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、またはプロメガポエチンを含む。

【0183】

一部の実施形態では、サイトカインは、本明細書で記載されるキメラ抗原受容体と共に共発現される膜結合型サイトカインである。

【0184】

一部の実施形態では、1または複数の本明細書で記載される方法は、サイトカインの投与をさらに含む。一部の場合には、サイトカインは、ケモカイン、インターフェロン、インターロイキン、コロニー刺激因子、または腫瘍壊死因子を含む。一部の場合には、1または複数の本明細書で記載される方法は、ケモカイン、インターフェロン、インターロイキン、コロニー刺激因子、または腫瘍壊死因子から選択されるサイトカインの投与をさらに含む。一部の場合には、1または複数の本明細書で記載される方法は、IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21、IFN γ 、またはTNF- α から選択されるサイトカインの投与をさらに含む。

【0185】

場合によって、サイトカインは、少なくとも1つの、ケモカイン、インターフェロン、インターロイキン、リンホカイン、腫瘍壊死因子、またはこれらの変異体もしくは組合せを含む。場合によって、サイトカインは、インターロイキンである。場合によって、インターロイキンは、IL-12、IL-2、IL-15、IL-21、ならびにこれらの機能的な変異体および断片のうちの少なくとも1つである。一部の実施形態では、サイトカインは、IL-1、IL-2、IL-15、IL-12、IL-21、IL-15、IL-15 R α 、またはIL-15変異体の融合体のうちの少なくとも1つである。一実施形

10

20

30

40

50

態では、サイトカインは、IL-15の変異体（配列番号90；配列番号203）である。一実施形態では、サイトカインは、IL-15受容体アルファ（配列番号91；配列番号204）を含む。一部の実施形態では、サイトカインは、膜結合型の場合もあり、分泌型の場合もある。他の実施形態では、サイトカインは、細胞内サイトカインでありうる。インターロイキンは、膜結合型IL-15（mb IL-15）、IL-15とIL-15 R α との融合体（配列番号91；配列番号204）、またはIL-15変異体（配列番号90；配列番号203）を含みうる。一部の実施形態では、mb IL-15は、本明細書で記載される改変エフェクター細胞を用いて共発現させうる、膜結合型キメラIL-15である。一部の実施形態では、mb IL-15は、全長IL-15 R α 、またはこの機能的な断片もしくは変異体とインフレーションで融合させた全長IL-15（例えば、天然IL-15ポリペプチド）またはこの断片もしくは変異体を含む。場合によって、IL-15は、リンカーを介して、IL-15 R α へと間接的に連結される。一部の実施形態では、mb IL-15は、シグナルペプチド（配列番号92；配列番号205）を含む。場合によって、mb IL-15は、Hurton et al., “Tethered IL-15 augments antitumor activity and promotes a stem-cell memory subset in tumor-specific T cells,” PNAS 2016において記載されている通りである。別の態様では、インターロイキンは、IL-12を含みうる。一部の実施形態では、IL-12は、単鎖IL-12（sc IL-12）、プロテアーゼ感受性IL-12、不安定化IL-12、膜結合型IL-12、または挿入IL-12でありうる。一部の実施形態では、IL-12は、マウスIL-12サブユニットベータ（p40）（配列番号206）である。一部の実施形態では、IL-12は、マウスのIL-12サブユニットアルファ（p35）（配列番号207）である。一部の実施形態では、IL-12は、マウス単鎖IL-12（p40-リンカー-p35）（配列番号93；配列番号208）である。一部の実施形態では、IL-12は、ヒト単鎖IL-12（p40-リンカー-p35）（配列番号94；配列番号209）である。ある特定の実施形態では、IL-12は、単鎖IL-12である。場合によって、IL-12変異体は、それらの全てが、参照によりそれらの全体において組み込まれる、国際公開第2015/095249号パンフレット、国際公開第2016/048903号パンフレット、および国際公開第2017/062953号パンフレットにおいて記載されている通りである。

【0186】

本明細書では、遺伝子スイッチポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、前記遺伝子スイッチポリペプチドが、a) 核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたDNA結合性ドメインを含む、第1の遺伝子スイッチポリペプチド、およびb) 核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたトランス活性化ドメインを含む、第2の遺伝子スイッチポリペプチドを含み、第1の遺伝子スイッチポリペプチドと、第2の遺伝子スイッチポリペプチドとが、リンカーにより連結されている、ポリヌクレオチドが提示される。場合によって、リンカーは、本明細書で記載されるリンカー、例えば、GSGリンカー、フーリンリンク、F/T2A、T2A、p2A、GSG-p2Aなどの2Aリンカー、ならびにこれらの変異体および誘導体でありうる。他の場合には、リンカーは、IRESでありうる。一部の実施形態では、IRESは、EMCV IRESまたは2×Rbm3 IRESである。例示的なIRES配列は、配列番号18および19に見出すことができる。ある特定の場場合には、2×Rbm3 IRESをコードするポリヌクレオチドは、配列番号19と、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、または100%同一でありうるか、または少なくともほぼこれらの比率で同一でありうる。ある特定の場場合には、EMCV IRESをコードするポリヌクレオチドは、配列番号18と、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、または100%同一でありうるか、または少なくともほぼこれらの比率で同一でありうる。

【0187】

場合によって、DNA結合性ドメイン（DBD）は、本明細書で記載されるDBD、例えば、GAL4（GAL4 DBD）（配列番号71；配列番号184）、LexADB D、転写因子DBD、ステロイド／甲状腺ホルモン核内受容体スーパーファミリーメンバーDBD、細菌LacZ DBD、および酵母DBDのうちの少なくとも1つを含む。トランス活性化ドメインは、本明細書で記載されるトランス活性化ドメイン、例えば、VP16トランス活性化ドメイン（配列番号68；配列番号181）、p53トランス活性化ドメイン、およびB42酸性活性化因子トランス活性化ドメインのうちの1つを含みうる。核内受容体リガンド結合性ドメインは、エクジソン受容体（EcR）、ユビキタス受容体、オーファン受容体1、NER-1、ステロイドホルモン核内受容体1、レチノイドX受容体相互作用性タンパク質15、肝臓X受容体β、ステロイドホルモン受容体様タンパク質、肝臓X受容体、肝臓X受容体α、ファルネソイドX受容体、受容体相互作用性タンパク質14、およびファルネソール受容体のうちの少なくとも1つを含みうる。

【0188】

場合によって、ポリペプチドリンカーまたはリボソームスキッピング配列により連結された、遺伝子スイッチポリペプチドは、遺伝子発現に対する、用量依存性のリガンド誘導性制御の、リガンド誘導性遺伝子スイッチと比較した改善を呈するが、この場合、遺伝子スイッチポリペプチドは、IRESなど、非コード配列により連結されている。場合によって、2Aリンカーにより連結された遺伝子スイッチポリペプチドは、異種遺伝子発現に対する、用量依存性のリガンド誘導性制御の、遺伝子スイッチと比較した改善を呈するが、この場合、前記遺伝子スイッチポリペプチドは、IRESにより隔てられている。

【0189】

本明細書で記載されるポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、操作細胞内で発現させることができる。本明細書では、操作細胞とは、その天然状態または内因性状態から改変された細胞である。操作細胞の例は、例えば、遺伝子スイッチポリペプチド、目的の遺伝子（GOI）、細胞タグ、異種遺伝子、ならびに本明細書で記載される、他の任意のポリペプチドおよびポリヌクレオチドをコードするように改変された（例えば、ポリヌクレオチドの、細胞へのトランスフェクションにより）、本明細書で記載される細胞である。

【0190】

リガンド

一部の実施形態では、誘導性遺伝子スイッチの調節のために使用されるリガンドは、以下：N-[(1R)-1-(1,1-ジメチルエチル)ブチル]-N'-(2-エチル-3-メトキシベンゾイル)-3,5-ジメチルベンゾヒドラジド（ベレジメクスともまた称する）、(2S,3R,5R,9R,10R,13R,14S,17R)-17-[(2S,3R)-3,6-ジヒドロキシ-6-メチルヘプタン-2-イル]-2,3,14-トリヒドロキシ-10,13-ジメチル-2,3,4,5,9,11,12,15,16,17-デカヒドロ-1H-シクロペンタ[a]フェナントレン-6-オン；N'-(3,5-ジメチルベンゾイル)-N'-(3R)-2,2-ジメチル-3-ヘキサニル]-2-エチル-3-メトキシベンゾヒドラジド；5-メチル-2,3-ジヒドロ-ベンゾ[1,4]ジオキシシ-6-カルボン酸N'-(3,5-ジメチル-ベンゾイル)-N'-(1-エチル-2,2-ジメチル-プロピル)-ヒドラジド；5-メチル-2,3-ジヒドロ-ベンゾ[1,4]ジオキシシ-6-カルボン酸N'-(3,5-ジメトキシ-4-メチル-ベンゾイル)-N'-(1-エチル-2,2-ジメチル-プロピル)-ヒドラジド；5-メチル-2,3-ジヒドロ-ベンゾ[1,4]ジオキシシ-6-カルボン酸N'-(1-tert-ブチル-ブチル)-N'-(3,5-ジメチル-ベンゾイル)-ヒドラジド；5-メチル-2,3-ジヒドロ-ベンゾ[1,4]ジオキシシ-6-カルボン酸N'-(1-tert-ブチル-ブチル)-N'-(3,5-ジメトキシ-4-メチル-ベンゾイル)-ヒドラジド；5-エチル-2,3-ジヒドロ-ベンゾ[1,4]ジオキシシ-6-カルボン酸N'-(3,5-ジメチル-ベンゾイル)-N'-(1-エチル-2,2-ジメチル-プロピル)-ヒドラジド；5-エチル-2,3-ジヒドロ-ベンゾ[1,4]ジオキシシ-6-カルボン酸N'-(3,5-ジメトキシ-4-メチル-ベンゾイル)-N'-(1-エ

10

20

30

40

50

チル-2, 2-ジメチル-プロピル)-ヒドラジド; 5-エチル-2, 3-ジヒドロベンゾ [1, 4] ジオキシ-6-カルボン酸 N'-(1-tert-ブチル-ブチル)-N'-(3, 5-ジメチル-ベンゾイル)-ヒドラジド; 5-エチル-2, 3-ジヒドロベンゾ [1, 4] ジオキシ-6-カルボン酸 N'-(1-tert-ブチル-ブチル)-N'-(3, 5-ジメトキシ-4-メチル-ベンゾイル)-ヒドラジド; 3, 5-ジメチル-安息香酸 N-(1-エチル-2, 2-ジメチル-プロピル)-N'-(3-メトキシ-2-メチル-ベンゾイル)-ヒドラジド; 3, 5-ジメトキシ-4-メチル-安息香酸 N-(1-エチル-2, 2-ジメチル-プロピル)-N'-(3-メトキシ-2-メチル-ベンゾイル)-ヒドラジド; 3, 5-ジメチル-安息香酸 N-(1-tert-ブチル-ブチル)-N'-(3-メトキシ-2-メチル-ベンゾイル)-ヒドラジド; 3, 5-ジメトキシ-4-メチル-安息香酸 N-(1-tert-ブチル-ブチル)-N'-(3-メトキシ-2-メチル-ベンゾイル)-ヒドラジド; 3, 5-ジメチル-安息香酸 N-(1-エチル-2, 2-ジメチル-プロピル)-N'-(2-エチル-3-メトキシ-ベンゾイル)-ヒドラジド; 3, 5-ジメトキシ-4-メチル-安息香酸 N-(1-エチル-2, 2-ジメチル-プロピル)-N'-(2-エチル-3-メトキシ-ベンゾイル)-ヒドラジド; 3, 5-ジメチル-安息香酸 N-(1-tert-ブチル-ブチル)-N'-(2-エチル-3-メトキシ-ベンゾイル)-ヒドラジド; 2-メトキシ-ニコチン酸 N-(1-tert-ブチル-ペンチル)-N'-(4-エチル-ベンゾイル)-ヒドラジド; 3, 5-ジメチル-安息香酸 N-(2, 2-ジメチル-1-フェニル-プロピル)-N'-(4-エチル-ベンゾイル)-ヒドラジド; 3, 5-ジメチル-安息香酸 N-(1-tert-ブチル-ペンチル)-N'-(3-メトキシ-2-メチル-ベンゾイル)-ヒドラジド; および 3, 5-ジメトキシ-4-メチル-安息香酸 N-(1-tert-ブチル-ペンチル)-N'-(3-メトキシ-2-メチル-ベンゾイル)-ヒドラジドのうちのいずれかから選択しうるがこれらに限定されない。

【0191】

場合によって、エクジソン受容体ベースの誘導性遺伝子スイッチの、用量調節性制御のために使用されるリガンドは、エクジソン、20-ヒドロキシエクジソン、ポナステロン A、ムリストロン A などの *ecdys* ステロイド、9-*cis*-レチノイン酸、レチノイン酸の合成類似体、それらの各々が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第 6, 013, 836 号明細書; 同第 5, 117, 057 号明細書; 同第 5, 530, 028 号明細書; および同第 5, 378, 726 号明細書、ならびに米国出願公開第 2005/0209283 号明細書および同第 2006/0020146 号明細書において開示されている N, N'-ジアシルヒドラジンなどの N, N'-ジアシルヒドラジン; 米国出願公開第 2004/0171651 号明細書において記載されているオキサゾリン; 欧州出願第 461, 809 号明細書において開示されているジベンゾイルアルキルシアノヒドラジンなどのジベンゾイルアルキルシアノヒドラジン; 米国特許第 5, 225, 443 号明細書において開示されている N-アルキル-N, N'-ジアロイルヒドラジンなどの N-アルキル-N, N'-ジアロイルヒドラジン; 欧州出願第 234, 994 号明細書において開示されている N-アシル-N-アルキルカルボニルヒドラジンなどの N-アシル-N-アルキルカルボニルヒドラジン; 米国特許第 4, 985, 461 号明細書において記載されている N-アロイル-N-アルキル-N'-アロイルヒドラジンなどの N-アロイル-N-アルキル-N'-アロイルヒドラジン; 米国出願公開第 2004/0049037 号明細書において記載されているアルニドケトンなどのアルニドケトン; 3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシ-N-イソブチル-ベンズアミド、8-O-アセチルハルパジド、オキシステロール、22(R)ヒドロキシコレステロール、24(S)ヒドロキシコレステロール、25-エポキシコレステロール、T0901317、5-アルファ-6-アルファ-エポキシコレステロール-3-スルフェート (sulfate) (ECHS)、7-ケトコレステロール-3-スルフェート (sulfate)、フラメゾール、胆汁酸、1, 1-ビホスホネート (biphosphonate) エステル、若年性ホルモン E E E などを含む、他の類似の材料のうち

10

20

30

40

50

のいずれかから選択しうるがこれらに限定されない。本開示において有用なジアシルヒドラジンリガンドの例は、RG-115819 (3, 5-ジメチル-安息香酸N-(1-エチル-2, 2-ジメチル-プロピル)-N'-(2-メチル-3-メトキシ-ベンゾイル)-ヒドラジド)、RG-115932 ((R)-3, 5-ジメチル-安息香酸N-(1-tert-ブチル-ブチル)-N'-(2-エチル-3-メトキシ-ベンゾイル)-ヒドラジド)、およびRG-115830 (3, 5-ジメチル-安息香酸N-(1-tert-ブチル-ブチル)-N'-(2-エチル-3-メトキシ-ベンゾイル)-ヒドラジド)を含む。例えば、それらのいずれもが参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、米国特許出願第12/155, 111号明細書およびPCT出願/米国出願第2008/006757号明細書を参照されたい。

10

【0192】

抗原結合性ポリペプチド

本明細書で開示されるポリペプチドおよびタンパク質（これらの機能的部分および機能的変異体を含む）は、1または複数の、天然アミノ酸の代わりに、合成アミノ酸を含みうる。当技術分野では、このような合成アミノ酸が公知であり、例えば、アミノシクロヘキサンカルボン酸、ノルロイシン、 α -アミノn-デカン酸、ホモセリン、S-アセチルアミノメチル-システイン、trans-3-ヒドロキシプロリンおよびtrans-4-ヒドロキシプロリン、4-アミノフェニルアラニン、4-ニトロフェニルアラニン、4-クロロフェニルアラニン、4-カルボキシフェニルアラニン、 β -フェニルセリン β -ヒドロキシフェニルアラニン、フェニルグリシン、 α -ナフチルアラニン、シクロヘキシルアラニン、シクロヘキシルグリシン、インドリン-2-カルボン酸、1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸、アミノマロン酸、アミノマロン酸モノアミド、N'-ベンジル-N'-メチル-リシン、N', N'-ジベンジル-リシン、6-ヒドロキシリシン、オルニチン、 α -アミノシクロペンタンカルボン酸、 α -アミノシクロヘキサンカルボン酸、 α -アミノシクロヘプタンカルボン酸、 α -(2-アミノ-2-ノルボルナン)-カルボン酸、 α , γ -ジアミノ酪酸、 α , β -ジアミノプロピオン酸、ホモフェニルアラニン、および α -tert-ブチルグリシンを含む。

20

【0193】

本明細書で使用される「抗体」とは、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を指す。本明細書で使用される「モノクローナル抗体」という用語は、B細胞の単一のクローンにより産生され、同じエпитープに結合する抗体を指す。これに対し、「ポリクローナル抗体」とは、異なるB細胞により産生され、同じ抗原の異なるエпитープに結合する抗体の集団を指す。全抗体は、典型的に、4つのポリペプチド：重（H）鎖ポリペプチドの2つの同一なコピー、および軽（L）鎖ポリペプチドの2つの同一なコピーからなる。重鎖の各々は、1つのN末端の可変（VH）領域と、3つのC末端の定常（CH1、CH2、およびCH3）領域とを含有し、各軽鎖は、1つのN末端の可変（VL）領域と、1つのC末端の定常（CL）領域とを含有する。軽鎖および重鎖の各対の可変領域は、抗体の抗原結合性部位を形成する。VH領域と、VL領域とは、各領域が、それらの配列が比較的保存されている、4つのフレームワーク領域を含む、共通の一般的な構造を有する。フレームワーク領域は、3つの相補性決定領域（CDR）により連結されている。CDR1、CDR2、およびCDR3として公知である、3つのCDRは、抗原への結合の一因となる、抗体の「超可変領域」を形成する。

30

40

【0194】

「抗原認識部分」または「抗体認識ドメイン」とは、抗原に特異的に結合する分子または分子の部分の部分を指す。一実施形態では、抗原認識部分は、抗体、抗体様分子、またはこれらの断片であり、抗原は、腫瘍抗原または感染性疾患抗原である。

【0195】

「抗体様分子」は、例えば、パートナーに選択的に結合することが可能な、Igスーパーファミリーのメンバーであるタンパク質でありうる。MHC分子およびT細胞受容体は、このような分子である。一実施形態では、抗体様分子は、TCRである。一実施形態で

50

は、TCRは、そのMHCへの結合アフィニティーを増大させるように改変されている。

【0196】

本明細書では、「抗体の断片」、「抗体断片」、「抗体の機能的断片」、および「抗原結合性部分」、またはそれらの文法的同等物という用語を、抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体の、1または複数の断片または部分を意味するように、互換的に使用する（一般に、Holliger et al., Nat. Biotech., 23(9):1126-1129 (2005)を参照されたい）。抗体断片は、例えば、1もしくは複数のCDR、可変領域（またはこの部分）、定常領域（またはこの部分）、またはこれらの組合せを含むことが所望される。抗体断片の例は、(i) VLドメイン、VHドメイン、CLドメイン、およびCH1ドメインからなる一価断片である、Fab断片；(ii) ストック領域におけるジスルフィド架橋により連結された2つのFab断片を含む二価断片である、F(ab')₂断片；(iii) 抗体の単一のアームのVLドメインおよびVHドメインからなる、Fv断片；(iv) 2つのドメインを、単一のポリペプチド鎖として合成することを可能とする合成リンカーにより接合された、Fv断片の2つのドメイン（すなわち、VLおよびVH）からなる一価分子である、単鎖Fv(scFv)（例えば、Bird et al., Science, 242: 423-426 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5879-5883 (1988); and Osbourn et al., Nat. Biotechnol., 16: 778 (1998)を参照されたい）；ならびに(v) 各ポリペプチド鎖が、同じポリペプチド鎖上のVHとVLとの間の対合を可能とするには短すぎるペプチドリinkerにより、VLへと連結されたVHを含み、これにより、2つの機能的な抗原結合性部位を有する二量体分子を作出するように、異なるVH-VLポリペプチド鎖上の相補的ドメインの間の対合を駆動する、ポリペプチド鎖の二量体である、ダイアボディーを含むがこれらに限定されない。当技術分野では、抗体断片が公知であり、例えば、米国特許第8,603,950号明細書において、より詳細に記載されている。他の抗体断片は、重鎖抗体の可変断片(VHH)を含むうる。

【0197】

CARに関して使用される場合の「機能的部分」という用語は、本開示のCARの、任意の部分または断片であって、機能的部分がその一部であるCAR（親CAR）の生物学的活性を保持する部分または断片を指す。親CARをコードする核酸配列に関して、CARの機能的部分をコードする核酸配列は、親CARのうちの、例えば、約10%、25%、30%、50%、68%、80%、90%、95%、またはこれを超える親CARを含むタンパク質をコードしうる。

【0198】

本明細書で使用される「機能的変異体」という用語は、基準ポリペプチドに対する、実質的または著明な配列同一性または配列類似性を有するポリペプチドまたはタンパク質を指し、それがその変異体である、基準ポリペプチドの生物学的活性を保持する。一部の実施形態では、機能的変異体は、例えば、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、もしくは20カ所の保存的アミノ酸置換、またはほぼこれらの数の保存的アミノ酸置換を伴う基準タンパク質のアミノ酸配列を含む。機能的変異体は、例えば、本明細書に記載されるCAR（親CAR）の変異体であって、標的細胞を、親CARと同様の程度、これと同程度、またはこれより高い程度に認識する能力を保持する変異体を包含する。親CARをコードする核酸配列に照らして、CARの機能的変異体をコードする核酸配列は、親CARをコードする核酸配列と、例えば、約10%同一、約25%同一、約30%同一、約50%同一、約65%同一、約80%同一、約90%同一、約95%同一、または約99%同一でありうる。

【0199】

「保存的アミノ酸置換」または「保存的突然変異」という用語は、1つのアミノ酸の、共通の特性を伴う、別のアミノ酸による置き換えを指す。個別のアミノ酸の間の共通の特性を規定する、機能的な方式は、相同な生物の、対応するタンパク質の間の、アミノ酸変化の標準化頻度を解析することである（Schulz, G. E. and Schirmer, R. H., Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, New York (1979)）。このような解析に従

い、群内のアミノ酸が、互いと優先的に交換され、したがって、全体的なタンパク質構造に対するそれらの影響において、最も互いと相似する、アミノ酸群を規定することができる (Schulz, G. E. and Schirmer, R. H., 前出)。保存的突然変異の例は、上記の亜群内のアミノ酸のアミノ酸置換、例えば、正の電荷を維持しうるような、リシンによる、アルギニンの置換、およびこの逆の置換；負の電荷を維持しうるような、グルタミン酸による、アスパラギン酸の置換、およびこの逆の置換；遊離-OHを維持しうるような、セリンによる、トレオニンの置換；ならびに遊離-NH₂を維持しうるような、グルタミンによる、アスパラギンの置換を含む。代替的に、または加えて、機能的変異体は、少なくとも1つの非保存的アミノ酸置換を伴う、基準タンパク質のアミノ酸配列を含みうる。

【0200】

「非保存的突然変異」という用語は、異なる群の間のアミノ酸置換、例えば、リシンによるトリプトファンの置換、またはフェニルアラニンによるセリンの置換などを伴う。この場合、非保存的アミノ酸置換は、機能的変異体の生物学的活性に干渉したり、これを阻害したりしないことが好ましい。非保存的アミノ酸置換は、機能的変異体の生物学的活性が、親CARと比較して増大するように、機能的変異体の生物学的活性を増強しうる。

【0201】

一部の実施形態では、本明細書で記載されるCARの抗原結合性部分は、CD19、CD33、BCMA、CD44、 α -葉酸受容体、CAIX、CD30、ROR1、CEA、EGP-2、EGP-40、HER2、HER3、葉酸結合性タンパク質、GD2、GD3、IL-13R-a2、KDR、EDB-F、メソテリン、CD22、EGFR、MUC-1、MUC-16、MAGE-A1、MUC16、h5T4、PSMA、TAG-72、EGFRvIII、CD123、およびVEGF-R2に特異的であるか、またはこれらに結合する。複数の実施形態では、抗原結合性ドメインは、標的抗原特異的なモノクローナル抗体の、可変ドメイン軽鎖 (VL) および可変ドメイン重鎖 (VH) であって、グリシン-セリンリンカーまたはホイットローリンカーなどの可撓性リンカーにより連結されたVLおよびVHを含む単鎖抗体断片 (scFv) を含む。複数の実施形態では、scFvは、ヒト化scFvである。一部の実施形態では、抗原結合性部分は、例えば、N末端からC末端へと、VH-リンカー-VLまたはVL-リンカー-VHと、方向性をもって連結されたVHおよびVLを含みうる。場合によって、抗原結合性ドメインは、標的のエピトープを認識する。本明細書の一部の実施形態では、抗原結合性ドメインが、F(a b')₂、Fab'、Fab、Fv、またはscFvを含む、CARまたはCAR-T細胞が記載される。

【0202】

一実施形態では、本明細書で記載されるCARの抗原結合性部分は、CD19に特異的である。一実施形態では、本明細書で記載されるCARの抗原結合性部分は、CD33に特異的である。別の実施形態では、本明細書で記載されるCARの抗原結合性部分は、BCMAに特異的である。さらに別の実施形態では、本明細書で記載されるCARの抗原結合性部分は、CD44に特異的である。一部の実施形態では、本明細書で記載されるCARの抗原結合性部分は、 α -葉酸受容体に特異的である。一部の実施形態では、本明細書で記載されるCARの抗原結合性部分は、CAIXに特異的である。一実施形態では、本明細書で記載されるCARの抗原結合性部分は、CD30に特異的である。一部の実施形態では、本明細書で記載されるCARの抗原結合性部分は、ROR1に特異的である。一実施形態では、本明細書で記載されるCARの抗原結合性部分は、CEAに特異的である。一部の実施形態では、本明細書で記載されるCARの抗原結合性部分は、EGP-2に特異的である。一実施形態では、本明細書で記載されるCARの抗原結合性部分は、EGP-40に特異的である。別の実施形態では、本明細書で記載されるCARの抗原結合性部分は、HER2に特異的である。さらに別の実施形態では、本明細書で記載されるCARの抗原結合性部分は、HER3に特異的である。さらに別の実施形態では、本明細書で記載されるCARの抗原結合性部分は、葉酸結合性タンパク質に特異的である。一部の実施形態では、本明細書で記載されるCARの抗原結合性部分は、GD2に特異的である。

一部の実施形態では、本明細書で記載されるCARの抗原結合性部分は、GD3に特異的である。一実施形態では、本明細書で記載されるCARの抗原結合性部分は、IL-13R-a2に特異的である。一実施形態では、本明細書で記載されるCARの抗原結合性部分は、KDRに特異的である。一実施形態では、本明細書で記載されるCARの抗原結合性部分は、EDB-Fに特異的である。別の実施形態では、本明細書で記載されるCARの抗原結合性部分は、メソテリンに特異的である。さらに別の実施形態では、本明細書で記載されるCARの抗原結合性部分は、CD22に特異的である。一実施形態では、本明細書で記載されるCARの抗原結合性部分は、EGFRに特異的である。一実施形態では、本明細書で記載されるCARの抗原結合性部分は、MUC-1に特異的である。一実施形態では、本明細書で記載されるCARの抗原結合性部分は、MUC-16に特異的である。一実施形態では、本明細書で記載されるCARの抗原結合性部分は、MAGE-A1に特異的である。一部の実施形態では、本明細書で記載されるCARの抗原結合性部分は、h5T4に特異的である。一部の実施形態では、本明細書で記載されるCARの抗原結合性部分は、PSMAに特異的である。別の実施形態では、本明細書で記載されるCARの抗原結合性部分は、TAG-72に特異的である。さらなる一実施形態では、本明細書で記載されるCARの抗原結合性部分は、EGFRvIIIに特異的である。別の実施形態では、本明細書で記載されるCARの抗原結合性部分は、CD123に特異的である。さらなる実施形態では、本明細書で記載されるCARの抗原結合性部分は、VEGF-R2に特異的である。

10

【0203】

20

キメラ抗原受容体 (CAR)

一部の実施形態では、本明細書では、細胞表面上で発現したキメラ受容体をコードする、ポリヌクレオチドが記載される。一部の場合には、キメラ受容体は、抗原、例えば、腫瘍関連抗原または腫瘍特異的抗原などの腫瘍抗原の認識およびこれへの結合を可能とする抗原結合性領域を含む。一部の場合には、抗原結合性領域は、抗体または結合性断片、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、F(ab')₃、scFv、sc(Fv)₂、dsFv、ダイアボディー、ミニボディー、およびナノボディーまたはこれらの結合性断片を含む。場合によって、抗原結合性領域は、scFvを含む。場合によって、キメラ受容体は、scFv (例えば、キメラ抗原受容体 (CAR)) を含む。一部の場合には、キメラ抗原受容体は、パターン認識受容体を含む。他の場合には、キメラ受容体は、操作T細胞受容体 (TCR) を含む。

30

【0204】

本明細書で使用される、「キメラ抗原受容体 (CAR)」、「人工T細胞受容体」、「キメラT細胞受容体」、または「キメラ免疫受容体」という用語は、外因性の特異性を、免疫エフェクター細胞へとグラフトする、操作受容体を指す。一部の場合には、CARは、抗原結合性ドメイン、ストーク領域、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメイン (エンドドメイン) を含む細胞外ドメイン (エクストドメイン) を含む。一部の場合には、細胞内ドメインは、1または複数の細胞内シグナル伝達ドメインをさらに含む。一部の場合には、本明細書で記載されるCARは、T細胞活性化のための、抗原結合性ドメイン、ストーク領域、膜貫通ドメイン、1または複数の共刺激ドメイン、およびシグナル伝達ドメインを含む。

40

【0205】

複数の実施形態では、本開示のCARは、そうでなければ、抗原結合性部分と称する、標的特異的結合エレメントを含む。複数の実施形態では、腫瘍細胞上の抗原に特異的に結合する、所望の抗原結合性部分を操作することにより、目的の腫瘍抗原をターゲティングするように、本開示のCARを操作する。本開示の文脈では、「腫瘍抗原」または「過剰増殖性障害抗原」または「過剰増殖性障害と関連する抗原」とは、がんなど、特異的な過剰増殖性障害に共通する抗原を指す。

【0206】

抗原結合性ドメインは、モノクローナル抗体の相補性決定領域、モノクローナル抗体の

50

可変領域、および／またはこれらの抗原結合性断片を含みうる。相補性決定領域（CDR）とは、抗原と相補的であり、したがって、受容体に、この特定の抗原に対するその特異性をもたらす、抗原受容体（例えば、免疫グロブリンおよびT細胞受容体）タンパク質の可変ドメイン内に見出される、短いアミノ酸配列である。抗原受容体の各ポリペプチド鎖は、3つのCDR（CDR1、CDR2、およびCDR3）を含有しうる。一部の場合には、抗原結合性ドメインは、F（ab'）₂、Fab'、Fab、Fv、またはscFvを含む。場合によって、抗原結合性ドメインは、scFvである。場合によって、抗原結合性ドメインは、Fabである。場合によって、抗原結合性ドメインは、Fab'である。場合によって、抗原結合性ドメインは、F（ab'）₂である。場合によって、抗原結合性ドメインは、Fvである。

【0207】

一部の実施形態では、本明細書で記載されるCARは、CD19、CD33、BCMA、CD44、α-葉酸受容体、CAIX、CD30、ROR1、CEA、EGP-2、EGP-40、HER2、HER3、葉酸結合性タンパク質、GD2、GD3、IL-13R-α2、KDR、EDB-F、メソテリン、CD22、EGFR、MUC-1、MUC-16、MAGE-A1、MUC16、h5T4、PSMA、TAG-72、EGFRvIII、CD123、およびVEGF-R2におけるエピトープに結合する抗原結合性ドメインを含む。一部の実施形態では、本明細書で記載されるCARは、CD19、CD33、BCMA、CD44、α-葉酸受容体、CAIX、CD30、ROR1、CEA、EGP-2、EGP-40、HER2、HER3、葉酸結合性タンパク質、GD2、GD3、IL-13R-α2、KDR、EDB-F、メソテリン、CD22、EGFR、MUC-1、MUC-16、MAGE-A1、MUC16、h5T4、PSMA、TAG-72、EGFRvIII、CD123、およびVEGF-R2上のエピトープに結合する抗原結合性ドメインを含む。一部の実施形態では、本明細書で記載されるCARは、CD19、CD33、またはEGFRvIII上のエピトープに結合する抗原結合性ドメインを含む。一部の場合には、本明細書で記載されるCARは、CD19上のエピトープに結合する抗原結合性ドメインを含む。場合によって、本明細書で記載されるCARは、CD33上のエピトープに結合する抗原結合性ドメインを含む。さらなる実施形態では、本明細書で記載されるCARまたはキメラ受容体または抗原結合性ポリペプチドは、HLA-A2、ミエリン希突起膠細胞糖タンパク質（MOG）、第VIIII因子（FVIIII）、MAdCAM1、SDF1、またはII型コラーゲン上のエピトープに結合する、自己抗原結合性領域または抗原結合性領域を含む。

【0208】

別の実施形態では、本明細書で記載されるCARは、EGFRvIII特異的CARである。「EGFRvIII」、「EGFR変異体III」、「III型EGFR突然変異体」、「EGFR.D2-7」、または「de2-7EGFR」とは、ヒト対象および非ヒト対象における、細胞外タンパク質リガンドである、表皮増殖因子（EGF）ファミリーのメンバーに対する、膜貫通タンパク質すなわち受容体である、表皮増殖因子受容体（EGFR；Erbb-1；HER1）の突然変異形態である。EGFRvIIIは、全長野生型EGFRタンパク質の細胞外ドメイン内の、267アミノ酸の、インフレームにおける欠失を結果としてもたらす、野生型EGFR遺伝子の第2～7エクソンの欠失により特徴づけられる。EGFRvIIIはまた、融合体の接合部に挿入される、新規のグリシン残基も含有する。切断型受容体であるEGFRvIIIは、公知のEGFRリガンドに結合することが不可能であるが、構成的チロシンキナーゼ活性を示す。この構成的活性化は、その発がん促進効果にとって重要である。キナーゼ欠損EGFRvIIIは、同様の発がん性の利点を付与することが不可能である。EGFRvIIIは、神経膠芽腫（GBM）内で、高度に発現することが可能であり、他の一部の充実性腫瘍型でも検出されうるが、正常組織では検出されえない。

【0209】

一部の実施形態では、本明細書で記載されるCARの抗原結合性部分は、EGFRvI

ⅠⅠに特異的（EGFRvⅠⅠⅠ CAR）である。EGFRvⅠⅠⅠ特異的CARは、細胞表面上で発現すると、T細胞の特異性を、ヒトEGFRvⅠⅠⅠへとリダイレクトする。複数の実施形態では、抗原結合性ドメインは、標的抗原特異的な、抗EGFRvⅠⅠⅠモノクローナル抗体の、可変ドメイン軽鎖（VL）および可変ドメイン重鎖（VH）であって、グリシン-セリンリンカーまたはホイットローリンカーなどの可撓性リンカーにより連結されたVLおよびVHを含む単鎖抗体断片（scFv）を含む。複数の実施形態では、scFvは、マウスMR1 IgGである。一部の実施形態では、scFvは、抗EGFRvⅠⅠⅠ scFvクローンMR1（配列番号115；配列番号229）、抗EGFRvⅠⅠⅠ scFvクローンMR1-1（配列番号116；配列番号230）、抗EGFRvⅠⅠⅠ scFvクローンhumMR1-1（配列番号117；配列番号231）、抗EGFRvⅠⅠⅠ scFvクローンhumMR1-2（配列番号118；配列番号232）である。一部の実施形態では、抗原結合性部分は、例えば、N末端からC末端へと、VH-リンカー-VLまたはVL-リンカー-VHと、方向性をもって連結されたVHおよびVLを含むうる。

【0210】

複数の実施形態では、本明細書で記載されるCARは、配列番号221のアミノ酸配列（抗EGFRvⅠⅠⅠクローンであるMR1のVL）との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有する、VLポリペプチドを含む抗原結合性部分を含む。複数の実施形態では、本明細書で記載されるCARは、配列番号220のアミノ酸配列（抗EGFRvⅠⅠⅠクローンであるMR1のVH）との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有する、VHポリペプチドを含む抗原結合性部分を含む。複数の実施形態では、本明細書で記載されるCARは、配列番号223のアミノ酸配列（抗EGFRvⅠⅠⅠクローンであるMR1-1のVL）との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有する、VLポリペプチドを含む抗原結合性部分を含む。複数の実施形態では、本明細書で記載されるCARは、配列番号222のアミノ酸配列（抗EGFRvⅠⅠⅠクローンであるMR1-1のVH）との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有する、VHポリペプチドを含む抗原結合性部分を含む。

【0211】

複数の実施形態では、本明細書で記載されるCARは、配列番号225のアミノ酸配列（抗EGFRvⅠⅠⅠクローンであるhumMR1-1のVL）との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有する、VLポリペプチドを含む抗原結合性部分を含む。複数の実施形態では、本明細書で記載されるCARは、配列番号224のアミノ酸配列（抗EGFRvⅠⅠⅠクローンであるhumMR1-1のVH）との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有する、VHポリペプチドを含む抗原結合性部分を含む。複数の実施形態では、本明細書で記載されるCARは、配列番号227のアミノ酸配列（抗EGFRvⅠⅠⅠクローンであるhumMR1-2のVL）との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有する、VLポリペプチドを含む抗原結合性部分を含む。複数の実施形態では、本明細書で記載されるCARは、配列番号226のアミノ酸配列（抗EGFRvⅠⅠⅠクローンであるhumMR1-2のVH）との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有する、VHポリペプチドを含む抗原結合性部分を含む。

【0212】

一実施形態では、本明細書で記載されるCARは、CD19特異的CARである。分化抗原群19またはBリンパ球抗原CD19である「CD19」とは、ヒトでは、CD19

10

20

30

40

50

遺伝子によりコードされるタンパク質である。CD19遺伝子は、抗原受容体依存性の刺激に対する閾値を低下させるために、Bリンパ球の抗原受容体によりアセンブルされる、細胞表面分子をコードする。CD19は、濾胞樹状細胞上およびB細胞上で発現する。実際、CD19は、B細胞芽球への発生時には、認識可能な最早期のB系統細胞に由来するB細胞上に存在するが、形質細胞への成熟時に失われる。CD19は主に、CD21およびCD81と共に、B細胞共受容体として作用する。活性化すると、CD19の細胞質テールは、リン酸化し、これは、Srcファミリーキナーゼによる結合およびPI-3キナーゼの動員をもたらす。T細胞上と同様に、いくつかの表面分子は、Bリンパ球上で、抗原受容体を形成し、複合体を形成する。(ほぼ)B細胞特異的である、CD19リン糖タンパク質は、これらの分子のうちの1つである。他の表面分子は、CD21およびCD81である。これらの表面免疫グロブリン(sIg)関連分子は、シグナル伝達を容易とする。B細胞上では、外因性抗原を模倣する、抗免疫グロブリン抗体は、CD19を、sIgに結合させ、sIgと共に内部化させる。逆過程は裏付けられていないことから、この受容体複合体の形成が、抗原誘導性であることが示唆される。この分子的会合は、化学的研究により確認されている。

【0213】

さらに別の実施形態では、本明細書で記載されるCARは、CD33特異的CARである。Siglec-3、シアル酸結合性Ig様レクチン3、SIGLEC3、SIGLEC-3、gp67、またはp67である、「CD33」とは、67kDaの1回膜貫通糖タンパク質であり、シアル酸結合性免疫グロブリン様レクチン(Siglecs)スーパーファミリーのメンバーである。CD33は、シアル酸への結合の一因となる、VセットのIg様ドメインと、その細胞外ドメイン内の、C2セットのIg様ドメインとにより特徴づけられる。CD33 mRNAの代替的スプライシングは、VセットのIg様ドメインのほか、VセットのIg様ドメインと、C2セットのIg様ドメインとを連結するジスルフィド結合も欠く、短鎖アイソフォーム(CD33m)をもたらす。健常対象では、CD33は主に、正常な複能性骨髄性前駆細胞上、単能性コロニー形成細胞上、単球上、および成熟しつつある顆粒球上に見出される、骨髄性分化抗原として発現する。CD33は、80%を超える骨髄性白血病細胞上で発現するが、正常な造血幹細胞上または成熟顆粒球上では発現しない(Andrews, R. et al., The L4F3 antigen is expressed by unipotent and multipotent colony-forming cells but not by their precursors, Blood, 68(5):1030-5 (1986))。CD33は、悪性骨髄細胞上、活性化T細胞上、および活性化NK細胞上で発現することが報告されており、AML患者の大多数における芽球の、少なくともサブセット上に見出される(Pollard, J. et al., Correlation of CD33 expression level with disease characteristics and response to gemtuzumab ozogamicin containing chemotherapy in childhood AML, Blood, 119(16):3705-11 (2012))。AML芽球上の広範な発現に加えて、CD33は、AMLの基底をなす幹細胞上でも発現しうる。

【0214】

複数の実施形態では、本明細書で記載されるCARの抗原結合性部分は、CD33に特異的(CD33 CAR)である。CD33特異的CARは、細胞表面上で発現すると、T細胞の特異性を、ヒトCD33へとリダイレクトする。複数の実施形態では、抗原結合性ドメインは、標的抗原特異的な、抗CD33モノクローナル抗体の、可変ドメイン軽鎖(VL)および可変ドメイン重鎖(VH)であって、グリシン-セリンリンカーまたはホイットローリンカーなどの可撓性リンカーにより連結されたVLおよびVHを含む単鎖抗体断片(scFv)を含む。複数の実施形態では、scFvは、M195、m2H12、DRB2、および/またはMy9-6である。複数の実施形態では、scFvは、ヒト化scFv、例えば、hM195である。一部の実施形態では、抗原結合性部分は、例えば、N末端からC末端へと、VH-リンカー-VLまたはVL-リンカー-VHと、方向性をもって連結されたVHおよびVLを含みうる。

一部の実施形態では、CD33抗原結合性ドメインは、配列番号214のアミノ酸配列

(hM195 VL)との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチドを含む。一部の実施形態では、CD33抗原結合性ドメインは、配列番号215のアミノ酸配列(hM195 VH)との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチドを含む。一部の実施形態では、CD33抗原結合性ドメインは、配列番号216のアミノ酸配列(リンカーを伴う、hM195 scFv)との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチドを含む。

【0215】

一部の実施形態では、本明細書で記載されるポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび方法を、がんなどの過剰増殖性疾患、自己免疫疾患の処置、またはウイルス感染、細菌感染、または寄生虫感染など、感染の処置のために使用することができる。一部の態様では、抗原は、がん細胞内、自己免疫細胞内、またはウイルス、細菌、もしくは寄生虫に感染した細胞内で増大する抗原である。ターゲティングされうる病原体は、限定せずに述べると、マラリア原虫(Plasmodium)属、トリパノソーム、アスペルギルス(Aspergillus)属、カンジダ(Candida)属、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、HSV、HPV、RSV、EBV、CMV、JCウイルス、BKウイルス、またはエボラ病原体を含む。自己免疫疾患は、移植片対宿主病、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、セリアック病、クローン病、シェーグレン症候群、リウマチ性多発筋痛症、多発性硬化症、視神経脊髄炎、強直性脊椎炎、1型糖尿病、円形脱毛症、血管炎、側頭動脈炎、水疱性類天疱瘡、乾癬、尋常性天疱瘡、または自己免疫性ブドウ膜炎を含む。

【0216】

CARにより本質的に認識される病原体は、任意の種類 of 病原体でありうるが、一部の実施形態では、病原体は、真菌、細菌、またはウイルスである。例示的なウイルス性病原体は、アデノウイルス科(Adenoviridae)、エプスタインバーウイルス(EBV)、サイトメガロウイルス(CMV)、RS(Respiratory Syncytial)ウイルス(RSV)、JCウイルス、BKウイルス、HPV、HSV、HHVファミリーのウイルス、肝炎ファミリーのウイルス、ピコルナウイルス科(Picornaviridae)、ヘルペスウイルス科(Herpesviridae)、ヘパドナウイルス科(Hepadnaviridae)、フラビウイルス科(Flaviviridae)、レトロウイルス科(Retroviridae)、オルトミクソウイルス科(Orthomyxoviridae)、パラミクソウイルス科(Paramyxoviridae)、パポバウイルス科(Papovaviridae)、ポリオーマウイルス属(Polyomavirus)、ラブドウイルス科(Rhabdoviridae)、およびトガウイルス科(Togaviridae)の病原体を含む。例示的な病原性ウイルスは、天然痘、インフルエンザ、耳下腺炎、麻疹、水痘、エボラ、および風疹を引き起こす。例示的な病原性真菌は、カンジダ属(Candida)、アスペルギルス属(Aspergillus)、クリプトコッカス属(Cryptococcus)、ヒストプラズマ属(Histoplasma)、ニューモシスチス属(Pneumocystis)、およびスタキボトリス属(Stachybotrys)を含む。例示的な病原性細菌は、ストレプトコッカス属(Streptococcus)、シュードモナス属(Pseudomonas)、赤痢菌属(Shigella)、カンピロバクター属(Campylobacter)、スタフィロコッカス属(Staphylococcus)、ヘリコバクター属(Helicobacter)、大腸菌(E. coli)、リケッチア属(Rickettsia)、バチルス属(Bacillus)、ボルデテラ属(Bordetella)、クラミジア属(Chlamydia)、スピロヘータ門(Spirochetes)、およびサルモネラ属(Salmonella)を含む。一部の実施形態では、病原体受容体であるデクチン1を使用して、アスペルギルス(Aspergillus)属など、真菌の細胞壁上の炭水化物構造を認識するCARを作出することができる。別の実施形態では、ウイルス決定基(例えば、CMVおよびエボラに由来する糖タンパク質)を認識する抗体に基づき、ウイルス感染およびウイルス病態を阻止するCARを作ることができる。

【0217】

一部の実施形態では、「スパーサー」、「スパーサー領域」、もしくは「スパーサードメイン」、または「ヒンジ」、「ヒンジ」領域、もしくは「ヒンジドメイン」という用語を包含する、「ストーク」、「ストーク領域」、または「ストークドメイン」を、抗原結合性ドメインを、膜貫通ドメインと関連させるのに使用する。一部の場合には、「ストークドメイン」または「ストーク領域」は、ポリペプチド鎖内で、膜貫通ドメインを、細胞外ドメインまたは細胞質ドメインへと連結するように機能する、任意のオリゴヌクレオチドまたはポリペプチドを含む。一部の実施形態では、ストークドメインは、抗原結合性ドメインが、抗原認識を容易とするように、異なる方向を向くことを可能とするのに十分な程度に可撓性である。場合によって、ストーク領域は、IgG1に由来するヒンジ領域を含む。代替的な場合に、ストーク領域は、免疫グロブリンのCH2CH3領域と、任意選択で、CD3の一部とを含む。場合によって、ストーク領域は、国際公開第2016/073755号パンフレットにおいて記載されている、CD8αヒンジ領域（配列番号29；配列番号170）、IgG4-Fcの12アミノ酸のヒンジ領域（ESKYGPCCPPCCP）、またはIgG4ヒンジ領域を含む。

【0218】

一部の実施形態では、ストーク領域は、CD8アルファ2X（配列番号30；配列番号171）、CD8アルファ3X（配列番号31；配列番号172）、またはCD8アルファ4X（配列番号32；配列番号173）のアミノ酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチドのうちの少なくとも1つを含む。

【0219】

他の実施形態では、CARの細胞外ドメインと、膜貫通ドメインとの間に、スパーサーが組み込まれる。スパーサーは、ストーク領域およびストーク伸長領域を含みうる。一実施形態では、スパーサーは、単一のストーク領域を含みうる。別の実施形態では、スパーサーは、ストーク領域およびストーク伸長領域を含みうる。例えば、スパーサーは、1つのストーク領域、および0、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20のストーク領域を含みうる。さらなる実施形態では、ストーク領域を、リンカーを介して、ストーク伸長領域へと連結することができる。

【0220】

膜貫通ドメインは、天然供給源に由来する場合もあり、組換え供給源に由来する場合もある。供給源が天然である場合、ドメインは、任意の膜結合性タンパク質または膜貫通タンパク質に由来しうる。適切な膜貫通ドメインは、T細胞受容体の、アルファ鎖、ベータ鎖、またはゼータ鎖の膜貫通領域を含む場合もあり、CD28、CD3イプシロン、CD3ζ、CD45、CD4、CD5、CD8アルファ、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、またはCD154に由来する膜貫通領域を含む場合もある。代替的に、膜貫通ドメインは、合成の場合もあり、ロイシンおよびバリンなどの疎水性残基を含みうる。一部の実施形態では、合成膜貫通ドメインの、一方または両方の末端では、フェニルアラニン、トリプトファン、およびバリンのトリプレットが見出される。任意選択で、一部の実施形態では、2～10アミノ酸の間の長さである、短いオリゴヌクレオチドリンカーまたはポリペプチドリンカーは、CARの膜貫通ドメインと、細胞質シグナル伝達ドメインとの間の連結を形成しうる。一部の実施形態では、リンカーは、グリシン-セリンリンカーである。一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、CD8α膜貫通ドメインまたはCD3ζ膜貫通ドメインを含む。一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、CD8α膜貫通ドメインを含む。他の実施形態では、膜貫通ドメインは、CD3ζ膜貫通ドメインを含む。一部の実施形態では、膜貫通領域は、CD8アルファ膜貫通ドメイン（配列番号174）のアミノ酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチドのうちの少なくとも1つを含む。一部の実施形態では、膜貫通領域は、CD28膜貫通ドメイン（配列番号175）のアミ

ノ酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチドのうちの少なくとも1つを含む。

【0221】

細胞内ドメインは、1または複数の共刺激ドメインを含みうる。例示的な共刺激ドメインは、CD8、CD27、CD28、4-1BB（CD137）、ICOS、DAP10、DAP12、OX40（CD134）、またはこれらの断片もしくは組合せを含むがこれらに限定されない。場合によって、本明細書で記載されるCARは、CD8、CD27、CD28、4-1BB（CD137）、ICOS、DAP10、DAP12、OX40（CD134）、またはこれらの断片もしくは組合せから選択される共刺激ドメインのうちの1もしくは複数、または2つもしくはこれを超えるものを含む。場合によって、本明細書で記載されるCARは、CD27、CD28、4-1BB（CD137）、ICOS、OX40（CD134）、またはこれらの断片もしくは組合せから選択される共刺激ドメインのうちの1もしくは複数、または2つもしくはこれを超えるものを含む。場合によって、本明細書で記載されるCARは、CD8、CD28、4-1BB（CD137）、またはこれらの断片もしくは組合せから選択される共刺激ドメインのうちの1もしくは複数、または2つもしくはこれを超えるものを含む。場合によって、本明細書で記載されるCARは、共刺激ドメインであるCD28および4-1BB（CD137）、またはこれらのそれぞれの断片を含む。場合によって、本明細書で記載されるCARは、共刺激ドメインであるCD28およびOX40（CD134）、またはこれらのそれぞれの断片を含む。場合によって、本明細書で記載されるCARは、共刺激ドメインであるCD8およびCD28、またはこれらのそれぞれの断片を含む。場合によって、本明細書で記載されるCARは、共刺激ドメインであるCD28、またはこの断片を含む。場合によって、本明細書で記載されるCARは、共刺激ドメインである4-1BB（CD137）、またはこの断片を含む。場合によって、本明細書で記載されるCARは、共刺激ドメインであるOX40（CD134）、またはこの断片を含む。場合によって、本明細書で記載されるCARは、共刺激ドメインであるCD8、またはこの断片を含む。

【0222】

本開示のCARの、細胞質ドメインとしてまた公知の細胞内シグナル伝達ドメインは、CARを入れた免疫細胞の正常エフェクター機能のうちの少なくとも1つの活性化の一因となる。「エフェクター機能」という用語は、細胞の特化機能を指す。T細胞のエフェクター機能は、例えば、細胞傷害活性の場合もあり、サイトカインの分泌を含むヘルパー活性の場合もある。したがって、「細胞内シグナル伝達ドメイン」という用語は、エフェクター機能シグナルを伝達し、特化機能を実施するように、細胞を方向付ける、タンパク質の部分を目指す。通常、細胞内シグナル伝達ドメインの全体が用いられうるが、多くの場合、鎖全体を使用することは必要でない。細胞内シグナル伝達ドメインの切断部分を使用し、エフェクター機能シグナルを伝達する限りにおいて、このような切断部分を、無傷鎖の代わりに使用することができる。したがって、細胞内シグナル伝達ドメインという用語とは、エフェクター機能シグナルを伝達するのに十分な、細胞内シグナル伝達ドメインの、任意の切断部分を含むことが意図される。一部の実施形態では、細胞内ドメインは、T細胞活性化のためのシグナル伝達ドメインをさらに含む。場合によって、T細胞活性化のためのシグナル伝達ドメインは、TCRゼータ、FcRガンマ、FcRベータ、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD5、CD22、CD79a、CD79b、またはCD66dに由来するドメインを含む。場合によって、T細胞活性化のためのシグナル伝達ドメインは、CD3ζに由来するドメインを含む。

【0223】

一部の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD28（配列番号176）、

CD3ゼータシグナル伝達ドメイン（配列番号177）、4-1BBシグナル伝達ドメイン（配列番号178）、DNAX活性化タンパク質10（DAP10）シグナル伝達ドメイン（配列番号179）、またはDNAX活性化タンパク質12（DAP12）シグナル伝達ドメイン（配列番号180）のアミノ酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチドのうちの少なくとも1つを含む。

【0224】

CD19特異的CAR

CD19とは、免疫グロブリンスーパーファミリーの細胞表面糖タンパク質である。一部の場合には、CD19は、膵臓がん、肝臓がん、および前立腺がんなど、充実性腫瘍内で検出されている。

【0225】

一部の実施形態では、本明細書で記載されるCARの抗原結合性部分は、CD19に特異的である。CD19特異的CARは、細胞表面上で発現すると、T細胞の特異性を、ヒトCD19へとリダイレクトする。複数の実施形態では、抗原結合性ドメインは、標的抗原特異的な、抗CD19モノクローナル抗体の、可変ドメイン軽鎖（VL）および可変ドメイン重鎖（VH）であって、グリシン-セリンリンカーまたはホイットローリンカーなどの可撓性リンカーにより連結されたVLおよびVHを含む単鎖抗体断片（scFv）を含む。複数の実施形態では、scFvは、SJ25C1および／またはFMC63である。複数の実施形態では、scFvは、ヒト化scFvである。一部の実施形態では、抗原結合性部分は、例えば、N末端からC末端へと、VH-リンカー-VLまたはVL-リンカー-VHと、方向性をもって連結されたVHおよびVLを含みうる。

【0226】

一部の実施形態では、本明細書では、抗原結合性ドメインが、CD19を結合するscFvを含む、CD19特異的CARが記載される。一部の場合には、抗原結合性ドメインは、CD19上のエピトープを認識する。

【0227】

一部の実施形態では、抗原結合性ドメインは、JCAR014、JCAR015、JCAR017、または19-28z CAR（Juno Therapeutics）によってもまた認識される、CD19上のエピトープを認識する。一部の実施形態では、本明細書では、抗原結合性ドメインが、JCAR014、JCAR015、JCAR017、または19-28z CAR（Juno Therapeutics）によってもまた認識される、CD19上のエピトープを認識する、CD19特異的CAR-T細胞が記載される。一部の場合には、CD19特異的CAR-T細胞は、CD8アルファ膜貫通ドメインまたはCD3ζ膜貫通ドメインから選択される膜貫通ドメイン；CD27、CD28、4-1BB（CD137）、ICOS、DAP10、DAP12、OX40（CD134）、またはこれらの断片もしくは組合せから選択される、1または複数の共刺激ドメイン；およびCD3ζに由来するシグナル伝達ドメインをさらに含む。

【0228】

一部の実施形態では、本明細書で記載されるCD19特異的CAR-T細胞は、scFvの抗原結合性ドメインを含み、抗原結合性ドメインは、JCAR014、JCAR015、JCAR017、または19-28z CAR（Juno Therapeutics）によってもまた認識される、CD19上のエピトープを認識する。一部の場合には、CD19特異的CAR-T細胞は、CD8アルファ膜貫通ドメインまたはCD3ζ膜貫通ドメインから選択される膜貫通ドメイン；CD27、CD28、4-1BB（CD137）、ICOS、DAP10、OX40（CD134）、またはこれらの断片もしくは組合せから選択される、1または複数の共刺激ドメイン；およびCD3ζに由来するシグナル伝達ドメインをさらに含む。

【0229】

一部の実施形態では、本明細書で記載されるCD19特異的CAR-T細胞は、米国特

10

20

30

40

50

許出願公開第20160152723号明細書において記載されている抗CD19抗体を含む。

【0230】

一部の実施形態では、抗原結合性ドメインは、KTE-C19 (Kite Pharma, Inc.) によってもまた認識される、CD19上のエピトープを認識する。一部の実施形態では、本明細書では、抗原結合性ドメインが、KTE-C19によってもまた認識される、CD19上のエピトープを認識する、CD19特異的CAR-T細胞が記載される。一部の場合には、CD19特異的CAR-T細胞は、CD8アルファ膜貫通ドメインまたはCD3ζ膜貫通ドメインから選択される膜貫通ドメイン；CD27、CD28、4-1BB (CD137)、ICOS、DAP10、DAP12、OX40 (CD134) 、またはこれらの断片もしくは組合せから選択される、1または複数の共刺激ドメイン；およびCD3ζに由来するシグナル伝達ドメインをさらに含む。

10

【0231】

一部の実施形態では、本明細書で記載されるCD19特異的CAR-T細胞は、scFvの抗原結合性ドメインを含み、抗原結合性ドメインは、KTE-C19によってもまた認識される、CD19上のエピトープを認識する。一部の場合には、CD19特異的CAR-T細胞は、CD8アルファ膜貫通ドメインまたはCD3ζ膜貫通ドメインから選択される膜貫通ドメイン；CD27、CD28、4-1BB (CD137)、ICOS、DAP10、DAP12、OX40 (CD134) 、またはこれらの断片もしくは組合せから選択される、1または複数の共刺激ドメイン；およびCD3ζに由来するシグナル伝達ドメインをさらに含む。

20

【0232】

一部の実施形態では、本明細書で記載されるCD19特異的CAR-T細胞は、国際公開第2015187528号パンフレットにおいて記載されている抗CD19抗体、またはこの断片もしくは誘導体を含む。

【0233】

一部の実施形態では、抗原結合性ドメインは、CTL019 (Novartis) によってもまた認識される、CD19上のエピトープを認識する。一部の実施形態では、本明細書では、抗原結合性ドメインが、CTL019によってもまた認識される、CD19上のエピトープを認識する、CD19特異的CAR-T細胞が記載される。一部の場合には、CD19特異的CAR-T細胞は、CD8アルファ膜貫通ドメインまたはCD3ζ膜貫通ドメインから選択される膜貫通ドメイン；CD27、CD28、4-1BB (CD137)、ICOS、DAP10、DAP12、OX40 (CD134) 、またはこれらの断片もしくは組合せから選択される、1または複数の共刺激ドメイン；およびCD3ζに由来するシグナル伝達ドメインをさらに含む。

30

【0234】

一部の実施形態では、本明細書で記載されるCD19特異的CAR-T細胞は、scFvの抗原結合性ドメインを含み、抗原結合性ドメインは、CTL019によってもまた認識される、CD19上のエピトープを認識する。一部の場合には、CD19特異的CAR-T細胞は、CD8アルファ膜貫通ドメインまたはCD3ζ膜貫通ドメインから選択される膜貫通ドメイン；CD27、CD28、4-1BB (CD137)、ICOS、DAP10、DAP12、OX40 (CD134) 、またはこれらの断片もしくは組合せから選択される、1または複数の共刺激ドメイン；およびCD3ζに由来するシグナル伝達ドメインをさらに含む。

40

【0235】

一部の実施形態では、抗原結合性ドメインは、UCART19 (Collectis) によってもまた認識される、CD19上のエピトープを認識する。一部の実施形態では、本明細書では、抗原結合性ドメインが、UCART19によってもまた認識される、CD19上のエピトープを認識する、CD19特異的CAR-T細胞が記載される。一部の場合には、CD19特異的CAR-T細胞は、CD8アルファ膜貫通ドメインまたはCD3

50

膜貫通ドメインから選択される膜貫通ドメイン；CD27、CD28、4-1BB（CD137）、ICOS、DAP10、DAP12、OX40（CD134）、またはこれらの断片もしくは組合せから選択される、1または複数の共刺激ドメイン；およびCD3ζに由来するシグナル伝達ドメインをさらに含む。

【0236】

一部の実施形態では、本明細書で記載されるCD19特異的CAR-T細胞は、scFvの抗原結合性ドメインを含み、抗原結合性ドメインは、UCART19によってもまた認識される、CD19上のエピトープを認識する。一部の場合には、CD19特異的CAR-T細胞は、CD8アルファ膜貫通ドメインまたはCD3ζ膜貫通ドメインから選択される膜貫通ドメイン；CD27、CD28、4-1BB（CD137）、ICOS、DAP10、OX40（CD134）、またはこれらの断片もしくは組合せから選択される、1または複数の共刺激ドメイン；およびCD3ζに由来するシグナル伝達ドメインをさらに含む。

10

【0237】

一部の実施形態では、抗原結合性ドメインは、BPX-401（Bellium）によってもまた認識される、CD19上のエピトープを認識する。一部の実施形態では、本明細書では、抗原結合性ドメインが、BPX-401によってもまた認識される、CD19上のエピトープを認識する、CD19特異的CAR-T細胞が記載される。一部の場合には、CD19特異的CAR-T細胞は、CD8アルファ膜貫通ドメインまたはCD3ζ膜貫通ドメインから選択される膜貫通ドメイン；CD27、CD28、4-1BB（CD137）、ICOS、DAP10、DAP12、OX40（CD134）、またはこれらの断片もしくは組合せから選択される、1または複数の共刺激ドメイン；およびCD3ζに由来するシグナル伝達ドメインをさらに含む。

20

【0238】

一部の実施形態では、本明細書で記載されるCD19特異的CAR-T細胞は、scFvの抗原結合性ドメインを含み、抗原結合性ドメインは、BPX-401によってもまた認識される、CD19上のエピトープを認識する。一部の場合には、CD19特異的CAR-T細胞は、CD8アルファ膜貫通ドメインまたはCD3ζ膜貫通ドメインから選択される膜貫通ドメイン；CD27、CD28、4-1BB（CD137）、ICOS、DAP10、DAP12、OX40（CD134）、またはこれらの断片もしくは組合せから選択される、1または複数の共刺激ドメイン；およびCD3ζに由来するシグナル伝達ドメインをさらに含む。

30

【0239】

場合によって、抗原結合性ドメインは、ブリナツモマブ（Amgen）、コルツキシマブ・ラプタンシン（ImmunoGen Inc. / Sanofi-aventis）、MOR208（Morphosys AG / Xencor Inc.）、MEDI-551（Medimmune）、デニンツズマブ・マホドチン（Seattle Genetics）、B4（またはDI-B4）（Merck Serono）、タブリツモマブ・パプトックス（National Cancer Institute）、XmAb 5871（Amgen / Xencor, Inc.）、MDX-1342（Medarex）またはAFM11（Affimed）によってもまた認識される、CD19上のエピトープを認識する。一部の場合には、CD19特異的CARは、CD8アルファ膜貫通ドメインまたはCD3ζ膜貫通ドメインから選択される膜貫通ドメイン；CD27、CD28、4-1BB（CD137）、ICOS、DAP10、OX40（CD134）、またはこれらの断片もしくは組合せから選択される、1または複数の共刺激ドメイン；およびCD3ζに由来するシグナル伝達ドメインをさらに含む。

40

【0240】

一部の実施形態では、本明細書では、抗原結合性ドメインが、F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv、またはscFvを含む、CD19特異的CAR-T細胞が記載される。一部の場合には、抗原結合性ドメインは、CD19上のエピトープを認識する。場合によ

50

て、抗原結合性ドメインは、ブリナツモマブ (Amgen)、コルツキシマブ・ラブタンシン (ImmunoGen Inc. / Sanofi-aventis)、MOR208 (Morphosys AG / Xencor Inc.)、MEDI-551 (Medimmune)、デニンツズマブ・マホドチン (Seattle Genetics)、B4 (またはDI-B4) (Merck Serono)、タブリツモマブ・パプトックス (National Cancer Institute)、XmAb 5871 (Amgen / Xencor, Inc.)、MDX-1342 (Medarex) またはAFM11 (Affimed) によってもまた認識される、CD19上のエピトープを認識する。一部の 경우에는、CD19特異的CAR-T細胞は、CD8アルファ膜貫通ドメインまたはCD3ζ膜貫通ドメインから選択される膜貫通ドメイン；CD27、CD28、4-1BB (CD137)、ICOS、DAP10、DAP12、OX40 (CD134)、またはこれらの断片もしくは組合せから選択される、1または複数の共刺激ドメイン；およびCD3ζに由来するシグナル伝達ドメインをさらに含む。

【0241】

場合によって、本明細書で記載されるCD19特異的CAR-T細胞は、scFvの抗原結合性ドメインを含み、抗原結合性ドメインは、ブリナツモマブ (Amgen)、コルツキシマブ・ラブタンシン (ImmunoGen Inc. / Sanofi-aventis)、MOR208 (Morphosys AG / Xencor Inc.)、MEDI-551 (Medimmune)、デニンツズマブ・マホドチン (Seattle Genetics)、B4 (またはDI-B4) (Merck Serono)、タブリツモマブ・パプトックス (National Cancer Institute)、XmAb 5871 (Amgen / Xencor, Inc.)、MDX-1342 (Medarex) またはAFM11 (Affimed) によってもまた認識される、CD19上のエピトープを認識する。一部の 경우에는、CD19特異的CAR-T細胞は、CD8アルファ膜貫通ドメインまたはCD3ζ膜貫通ドメインから選択される膜貫通ドメイン；CD27、CD28、4-1BB (CD137)、ICOS、DAP10、OX40 (CD134)、またはこれらの断片もしくは組合せから選択される、1または複数の共刺激ドメイン；およびCD3ζに由来するシグナル伝達ドメインをさらに含む。

【0242】

複数の実施形態では、本明細書で記載されるCARは、配列番号210のアミノ酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有する、CD19特異的CAR (CD19-CD8α-CD28-CD3ζ) を含む。複数の実施形態では、本明細書で記載されるCARは、配列番号211のアミノ酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有する、CD19特異的CAR (シグナルペプチドを伴う、CD19-CD8α-CD28-CD3ζ) を含む。

【0243】

一部の実施形態では、本明細書で記載されるCARの抗原結合性部分は、CD19に特異的である。CD19特異的CARは、細胞表面上で発現すると、T細胞の特異性を、ヒトCD19へとリダイレクトする。複数の実施形態では、抗原結合性ドメインは、標的抗原特異的な、抗CD19モノクローナル抗体の、可変ドメイン軽鎖 (VL) および可変ドメイン重鎖 (VH) であって、グリシン-セリンリンカーまたはホイトローリンカーなどの可撓性リンカーにより連結されたVLおよびVHを含む単鎖抗体断片 (scFv) を含む。複数の実施形態では、scFvは、ホイトローリンカーを伴う、抗CD19クローンである、FMC63 scFv (配列番号213) である。複数の実施形態では、抗CD19抗体は、抗CD19モノクローナル抗体クローンであるFMC 63の可変重鎖 (配列番号212) を含む。一部の実施形態では、抗原結合性部分は、例えば、N末端からC末端へと、VH-リンカー-VLまたはVL-リンカー-VHと、方向性をもって連結されたVHおよびVLを含むうる。

【0244】

操作T細胞受容体 (TCR)

一部の実施形態では、本明細書で記載されるポリヌクレオチドによりコードされるキメラ受容体は、操作T細胞受容体を含む。T細胞受容体 (TCR) は、T細胞の表面上で対合して、ヘテロ二量体の受容体を形成する、2つの鎖 ($\alpha\beta$ または $\gamma\delta$) から構成される。一部の場合には、 $\alpha\beta$ TCR は、体内の大半のT細胞上で発現し、特異的MHC拘束抗原の認識に関与することが公知である。 α 鎖および β 鎖の各々は、2つのドメイン：タンパク質を、細胞膜へとアンカリングし、CD3シグナル伝達装置の不変サブユニットと関連する定常ドメイン (C) と；相補性決定領域 (CDR) と称する、6回ループを介して、抗原認識を付与する可変ドメイン (V) とから構成される。一部の場合には、各Vドメインは、3つのCDR、例えば、CDR3を超可変領域とする、CDR1、CDR2、およびCDR3を含む。これらのCDRは、主要組織適合性複合体によりコードされるタンパク質に結合した抗原性ペプチドとの間で形成される複合体 (p e p M H C) (例えば、HLA-A複合体、HLA-B複合体、HLA-C複合体、HLA-DPA1複合体、HLA-DPB1複合体、HLA-DQA1複合体、HLA-DQB1複合体、HLA-DRA複合体、またはHLA-DRB1複合体) と相互作用する。一部の場合には、定常ドメインは、定常ドメインを、可変ドメインへと連結する接合領域をさらに含む。場合によって、ベータ鎖は、接合領域の一部を構成する、短い多様性領域をさらに含む。

10

【0245】

場合によって、このようなTCRは、特異的腫瘍抗原、例えば、NY-ESO、Mage A3、Titinと反応性である。他の場合には、このようなTCRは、患者の腫瘍内で発現する、特異的ネオ抗原（すなわち、腫瘍が発現する、患者特異的な、体細胞性の、非同義突然変異）と反応性である。場合によって、操作TCRは、アフィニティー増強されうる。

20

【0246】

一部の実施形態では、TCRは、International Immunogenetics (IMGT) によるTCR命名法を使用して記載され、IMGTによる、TCR配列についての公開データベースへとリンクする。例えば、それらのフレームワーク配列、CDR1配列、CDR2配列、およびCDR3配列により識別される、いくつかの種類のアルファ鎖可変 ($V\alpha$) 領域と、いくつかの種類のベータ鎖可変 ($V\beta$) 領域とが存在しうる。このようにして、 $V\alpha$ の種類は、IMGT命名法では、固有のTRAV数により言及されうる。例えば、「TRAV21」は、固有のフレームワーク配列およびCDR1配列およびCDR2配列、ならびにTCRから、TCRへと保存されるアミノ酸配列により、部分的に規定されるが、また、TCRから、TCRへと変動するアミノ酸配列も含むCDR3配列を有するTCRV α 領域を規定する。同様に、「TRBV5-1」は、固有のフレームワーク配列およびCDR1配列およびCDR2配列を有するが、CDR3配列は、部分的に規定されているに過ぎない、TCRV β 領域を規定する。

30

【0247】

場合によって、ベータ鎖多様性領域は、IMGT命名法では、TRBDという略号で言及される。

40

【0248】

一部の場合には、IMGT命名法により規定される固有の配列は、広く公知であり、TCRの分野に携わる者に関連可能である。例えば、これらは、IMGTによる公開データベースおよび“T cell Receptor Factsbook”, (2001) LeFranc and LeFranc, Academic Press, ISBN 0-12-441352-8において見出すことができる。

【0249】

一部の実施形態では、 $\alpha\beta$ ヘテロ二量体TCRは、例えば、細胞質ドメインおよび膜貫通ドメインの両方を有する全長鎖としてトランスフェクトされる。場合によって、TCRは、例えば、国際公開第2006/000830号パンフレットにおいて記載されている、それぞれの定常ドメインの残基の間に導入されたジスルフィド結合を含有する。

50

【0250】

一部の場合には、本明細書で記載されるTCRは、単鎖フォーマットである（例えば、国際公開第2004/033685号パンフレットを参照されたい）。単鎖フォーマットは、 $V\alpha-L-V\beta$ 型、 $V\beta-L-V\alpha$ 型、 $V\alpha-C\alpha-L-V\beta$ 型、 $V\alpha-L-V\beta-C\beta$ 型、 $V\alpha-C\alpha-L-V\beta-C\beta$ 型の $\alpha\beta$ TCRポリペプチド〔フォーマット中、 $V\alpha$ および $V\beta$ は、それぞれ、TCR α 可変領域およびTCR β 可変領域であり、 $C\alpha$ および $C\beta$ は、それぞれ、TCR α 定常領域およびTCR β 定常領域であり、 L は、リンカー配列である〕を含む。ある特定の実施形態では、本開示の単鎖TCRは、国際公開第2004/033685号パンフレットにおいて記載されている、それぞれの定常ドメインの残基の間に導入されたジスルフィド結合を有する。

10

【0251】

本明細書で記載されるTCRは、検出用標識、治療剤、またはPK修飾部分と会合させることができる。

【0252】

診断を目的とする、例示的な検出用標識は、蛍光標識、放射性標識、酵素、核酸プローブ、および造影試薬を含むがこれらに限定されない。

【0253】

さらなる遺伝子エレメント

細胞療法は、ヒト疾患の処置のために、極めて有望であるが、細胞自体またはそれらのトランス遺伝子産物に由来する著明な毒性は、臨床的探索を妨げている。本明細書で記載される、複数の実施形態では、本明細書で記載されるCARまたはTCRを含む免疫エフェクター細胞であって、哺乳動物対象、例えば、ヒトへと輸注された細胞は、それらの使用から、毒性が生じる場合は、このような免疫エフェクター細胞の効果を調節するために、枯渇させることができる。したがって、ある特定の実施形態では、本明細書で記載される、特異的キメラ抗原受容体に加えて、第2の遺伝子もまた、本明細書で記載される、操作免疫エフェクター細胞へと導入することができる。第2の遺伝子は、実質的に、CARもしくはTCRまたは抗原結合性ポリペプチドを含有する細胞の枯渇を可能とする、「キルスイッチ」または「細胞タグ」である。ある特定の実施形態では、「キルスイッチ」とは、HER1の、少なくとも1つの抗体結合性エピトープまたはその機能的断片と、任意選択で、シグナルポリペプチド配列またはその断片とを含む、切断型HER1ペプチド（本明細書では、HER1tまたはEGFRtと呼ぶ）である。

20

30

【0254】

ある特定の実施形態では、第2の遺伝子は、表皮増殖因子受容体（HER1）またはこの断片もしくは変異体である、HER1タグである。複数の実施形態では、第2の遺伝子は、切断型ヒト表皮増殖因子受容体1（例えば、HER1t）（配列番号76；配列番号189）である、HER1タグである。場合によって、第2の遺伝子は、ヒト表皮増殖因子受容体1の変異体である。場合によって、切断型HER1の変異体は、HER1t1（配列番号77；配列番号190）、HER1t2（配列番号78；配列番号191）、HER1t3（配列番号79；配列番号192）、HER1t4（配列番号80；配列番号193）、HER1t5（配列番号81；配列番号194）、HER1t6（配列番号82；配列番号195）、HER1t7（配列番号83；配列番号196）、HER1t8（配列番号84；配列番号197）、HER1t9（配列番号85；配列番号198）、HER1t10（配列番号86；配列番号199）またはHER1t11（配列番号87；配列番号200）である。複数の実施形態では、HER1、HER1t、HER1t1、HER1t2、HER1t3、HER1t4、HER1t5、HER1t6、HER1t7、HER1t8、HER1t9、HER1t10、およびHER1t11のうちの少なくとも1つは、FDAにより承認されているセツキシマブ、またはHER1、HER1t、HER1t1、HER1t2、HER1t3、HER1t4、HER1t5、HER1t6、HER1t7、HER1t8、HER1t9、HER1t10、および／もしくはHER1t11を認識する任意の抗体の投与を介して、輸注されたCAR-T細胞の枯

40

50

渴を可能とすることにより、安全性機構をもたらす。

【0255】

複数の実施形態では、HER1t遺伝子は、配列番号76の核酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。複数の実施形態では、HER1t1遺伝子は、配列番号77の核酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。複数の実施形態では、HER1t2遺伝子は、配列番号78の核酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。複数の実施形態では、HER1t3遺伝子は、配列番号79の核酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。複数の実施形態では、HER1t4遺伝子は、配列番号80の核酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。複数の実施形態では、HER1t5遺伝子は、配列番号81の核酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。複数の実施形態では、HER1t6遺伝子は、配列番号82の核酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。複数の実施形態では、HER1t7遺伝子は、配列番号83の核酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。複数の実施形態では、HER1t8遺伝子は、配列番号84の核酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。複数の実施形態では、HER1t9遺伝子は、配列番号85の核酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。複数の実施形態では、HER1t10遺伝子は、配列番号86の核酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。複数の実施形態では、HER1t11遺伝子は、配列番号87の核酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【0256】

切断型HER1配列、例えば、HER1t、HER1t1、HER1t2、HER1t3、HER1t4、HER1t5、HER1t6、HER1t7、HER1t8、HER1t9、HER1t10、および／またはHER1t11は、セツキシマブの、受容体への結合を無傷に保ちながら、EGFリガンドへの結合、EGFRのホモ二量体化およびヘテロ二量体化、ならびにEGFR媒介性シグナル伝達の潜在的可能性を消失させる（Ferguson, K., 2008. A structure-based view of Epidermal Growth Factor Receptor regulation. Annu Rev Biophys, Volume 37, pp. 353-373）。

【0257】

さらなる実施形態では、本開示の、治療標的に特異的なキメラ抗原受容体に加えて、導入される第2の遺伝子は、HER1タグである。場合によって、HER1タグは、全長HER1ポリペプチド、または切断型HER1ポリペプチド（HER1t1）、HER1t2、HER1t3、HER1t4、HER1t5、HER1t6、HER1t7、HER1t8、HER1t9、HER1t10、もしくはHER1t11である。場合によって、HER1タグは、切断型HER1変異体である。場合によって、HER1タグ、例えば、HER1、HER1t1、HER1t2、HER1t3、HER1t4、HER1t5

、HER1 ϵ 6、HER1 ϵ 7、HER1 ϵ 8、HER1 ϵ 9、HER1 ϵ 10、またはHER1 ϵ 11はまた、FDAにより承認されているリツキシマブ療法の投与を介して、輸注されたCAR-T細胞の枯渇を可能とすることにより、安全性機構も可能とする。ある特定の実施形態では、HER1タグは、配列番号189の配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する。ある特定の実施形態では、HER1タグは、HER1 ϵ 1タグであり、配列番号190の配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する。ある特定の実施形態では、HER1タグは、HER1 ϵ 2タグであり、配列番号191の配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する。ある特定の実施形態では、HER1タグは、HER1 ϵ 3タグであり、配列番号192の配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する。ある特定の実施形態では、HER1タグは、HER1 ϵ 4タグであり、配列番号193の配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する。ある特定の実施形態では、HER1タグは、HER1 ϵ 5タグであり、配列番号194の配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する。ある特定の実施形態では、HER1タグは、HER1 ϵ 6タグであり、配列番号195の配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する。ある特定の実施形態では、HER1タグは、HER1 ϵ 7タグであり、配列番号196の配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する。ある特定の実施形態では、HER1タグは、HER1 ϵ 8タグであり、配列番号197の配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する。ある特定の実施形態では、HER1タグは、HER1 ϵ 9タグであり、配列番号198の配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する。ある特定の実施形態では、HER1タグは、HER1 ϵ 10タグであり、配列番号199の配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する。ある特定の実施形態では、HER1タグは、HER1 ϵ 11タグであり、配列番号200の配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する。

【0258】

ある特定の実施形態では、第2の遺伝子は、活性化グリコシル化リンタンパク質またはこの断片もしくは変異体である、CD20タグ（配列番号88；配列番号201）である。場合によって、第2の遺伝子は、切断型CD20の変異体である、CD20 ϵ 1（配列番号89；配列番号202）である。複数の実施形態では、CD20タグ、CD20タグ（CD20 ϵ 1）の変異体、またはCD20もしくはCD20 ϵ 1タグの断片は、CD20を認識する抗体の投与を介して、輸注されたCAR-T細胞の枯渇を可能とすることにより、安全性機構をもたらす。複数の実施形態では、CD20タグをコードする遺伝子は、配列番号88の核酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。複数の実施形態では、CD20 ϵ 1タグをコードする遺伝子は、配列番号89の核酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%

10

20

30

40

50

、 97%、98%、99%、または100%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【0259】

さらなる実施形態では、本開示の、治療標的に特異的なキメラ抗原受容体に加えて、導入される第2の遺伝子は、CD20タグである。場合によって、CD20タグは、全長CD20ポリペプチドまたは切断型CD20ポリペプチド（CD20t1）である。

【0260】

複数の実施形態では、本明細書で記載されるCARを含むCARベクターは、配列番号88の核酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有する核酸配列を含む全長CD20タグをさらに含む。複数の実施形態では、本明細書で記載されるCARを含むCARベクターは、配列番号89の核酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有する核酸配列を含む、CD20タグの変異体（CD20t1）をさらに含む。

【0261】

複数の実施形態では、キルタグ、例えば、HER1t、HER1t1、HER1t2、HER1t3、HER1t4、HER1t5、HER1t6、HER1t7、HER1t8、HER1t9、HER1t10、またはHER1t11をコードする遺伝子を、CARまたはTCRまたはサイトカインへと、インフレーションの、例えば、トセア・アシグナ（*Thosea asigna*）ウイルス（T2A）ペプチドであるがこれらに限定されない、自己切断型ペプチドを介して、遺伝子融合させる。複数の実施形態では、T2Aペプチドは、配列番号153のアミノ酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する。他の実施形態では、キルタグ、例えば、HER1t、HER1t1、HER1t2、HER1t3、HER1t4、HER1t5、HER1t6、HER1t7、HER1t8、HER1t9、HER1t10、またはHER1t11をコードする遺伝子を、サイトカインへと、3'末端において、インフレーションの、例えば、トセア・アシグナ（*Thosea asigna*）ウイルス（T2A）ペプチドであるがこれらに限定されない、自己切断型ペプチドを介して、遺伝子融合させる。

【0262】

複数の実施形態では、両方の遺伝子を、プラスミドへとクローニングする。他の実施形態では、細胞タグを、別個のレンチウイルスベクターへとクローニングする。他の実施形態では、細胞タグ遺伝子を、CAR遺伝子とインフレーションで、Sleeping Beautyトランスポゾンベクター骨格へとクローニングする。さらに他の実施形態では、HER1t、HER1t1、HER1t2、HER1t3、HER1t4、HER1t5、HER1t6、HER1t7、HER1t8、HER1t9、HER1t10、またはHER1t11などの細胞タグを、複数のSleeping Beautyトランスポゾンベクターへとクローニングする。

【0263】

ある特定の実施形態では、細胞タグは、シグナルペプチド、例えば、GM-CSFR α シグナルペプチドを有し、この場合、GM-CSFR α シグナルペプチドは、配列番号163のアミノ酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有する。ある特定の実施形態では、シグナルペプチドは、配列番号164のアミノ酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一な配列を有するIgKである。ある特定の実施形態では、シグナルペプチドは、配列番号165のアミノ酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有する、IgE配列である。ある特定の実施形態では、シグナルペプチドは、配列番号166のアミノ酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有する、CD8 α 配列である。

ある特定の実施形態では、シグナルペプチドは、配列番号167のアミノ酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有する、TVB2(T21A)配列である。ある特定の実施形態では、シグナルペプチドは、配列番号168のアミノ酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有する、CD52配列である。ある特定の実施形態では、シグナルペプチドは、配列番号169のアミノ酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有する、低アフィニティー神経増殖因子受容体(LNGFR、TNFRSF16)配列である。場合によって、シグナルペプチドは、GM-CSFR α 、IgK、IgE、CD8 α 、T21A、CD52、低アフィニティー神経増殖因子受容体、ならびにこれらの変異体および断片から選択することができる。

【0264】

一部の実施形態では、細胞タグは、シグナルペプチド、例えば、GM-CSFR α シグナルペプチドを有し、この場合、GM-CSFR α シグナルペプチドは、配列番号20または配列番号21の核酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するヌクレオチド配列からコードされる。一部の実施形態では、細胞タグは、シグナルペプチド、例えば、IgKシグナルペプチドを有し、この場合、IgKシグナルペプチドは、配列番号22の核酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するヌクレオチド配列からコードされる。一部の実施形態では、細胞タグは、シグナルペプチド、例えば、IgEシグナルペプチドを有し、この場合、IgEシグナルペプチドは、配列番号23の核酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するヌクレオチド配列からコードされる。一部の実施形態では、細胞タグは、シグナルペプチド、例えば、CD8 α シグナルペプチドを有し、この場合、CD8 α シグナルペプチドは、配列番号24または配列番号25の核酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するヌクレオチド配列からコードされる。一部の実施形態では、細胞タグは、シグナルペプチド、例えば、TVB2(T21A)シグナルペプチドを有し、この場合、TVB2(T21A)シグナルペプチドは、配列番号26の核酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するヌクレオチド配列からコードされる。一部の実施形態では、細胞タグは、シグナルペプチド、例えば、CD52シグナルペプチドを有し、この場合、CD52シグナルペプチドは、配列番号27の核酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するヌクレオチド配列からコードされる。一部の実施形態では、細胞タグは、シグナルペプチド、例えば、低アフィニティー神経増殖因子受容体(LNGFR、TNFRSF16)シグナルペプチドを有し、この場合、低アフィニティー神経増殖因子受容体(LNGFR、TNFRSF16)シグナルペプチドは、配列番号28の核酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するヌクレオチド配列からコードされる。

【0265】

シグナルペプチドは、新たに合成されるタンパク質またはポリペプチドのN末端に位置することが典型的なアミノ酸配列であって、タンパク質またはポリペプチドを、細胞表面へと方向付けるアミノ酸配列である。一部の実施形態では、シグナルペプチドは、細胞膜へと挿入される(例えば、膜貫通ドメインを介して)ポリペプチドを、細胞表面へと方向付ける。一部の実施形態では、本明細書で記載されるポリペプチド構築物は、シグナルペプチドと共に合成されるが、次いで、成熟ポリペプチド構築物が、シグナルペプチドのア

10

20

30

40

50

ミノ酸配列を欠くように、翻訳後プロセッシングされて、シグナルペプチドを切断する。他の実施形態では、シグナルペプチド配列は、切断されず、成熟ポリペプチド構築物内に残存する。

【0266】

本開示は、ポリペプチド構築物を、細胞表面へと方向付け、かつ／またはトラフィッキングすることが可能な、任意の、公知または未知のシグナルペプチドを含むポリペプチド構築物を提示する。例えば、一部の実施形態では、ポリペプチド構築物は、GMCSFR α 、Igカッパ、免疫グロブリンE、CD8 α 、TVB2 (T21A)、CD52、または低アフィニティー神経増殖因子受容体 (LNGFR、TNFRSF16) のシグナルペプチドに対応するシグナル配列を含む。

10

【0267】

複数の実施形態では、シグナルペプチドは、配列番号20～28からなるリストから選択されるヌクレオチド配列との、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、または100%の同一性を有するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドによりコードされる。複数の実施形態では、シグナルペプチドは、配列番号163～169からなるリストから選択されるアミノ酸配列との、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0268】

改変エフェクター細胞

20

本明細書で開示される遺伝子スイッチポリペプチドにより調節される、1または複数の異種遺伝子または遺伝子を発現するように改変されたエフェクター細胞（免疫エフェクター細胞ともまた称する）が提供される。

【0269】

本明細書で使用される「T細胞」または「Tリンパ球」とは、細胞媒介性免疫において、中心的な役割を果たす、リンパ球の種類である。「T細胞」または「Tリンパ球」は、細胞表面上のT細胞受容体 (TCR) の存在により、B細胞およびナチュラルキラー細胞 (NK細胞) など、他のリンパ球と区別される。

【0270】

一部の実施形態では、改変エフェクター細胞は、T細胞および／またはナチュラルキラー細胞を含む改変免疫細胞である。T細胞またはTリンパ球は、細胞媒介性免疫に関与する白血球の亜型である。例示的なT細胞は、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、T_H17細胞、ステムセルメモリーT細胞 (TSCM)、ナイーブT細胞、メモリーT細胞、エフェクターT細胞、調節性T細胞、またはナチュラルキラーT細胞を含む。

30

【0271】

「ヘルパーT細胞」 (T_H細胞) は、B細胞の、血漿細胞およびメモリーB細胞への成熟、ならびに細胞傷害性T細胞およびマクロファージの活性化を含む免疫過程において、他の白血球を支援する。場合によって、T_H細胞は、細胞表面上のCD4糖タンパク質の発現のために、CD4+ T細胞として公知である。ヘルパーT細胞は、抗原提示細胞 (APC) の表面上で発現する、MHCクラスII分子により、ペプチド抗原を提示されると、活性化する。活性化すると、ヘルパーT細胞は、急速に分裂し、活性の免疫応答を調節するか、またはこれらを支援する、サイトカインと呼ばれる、小型のタンパク質を分泌する。これらの細胞は、T_H1、T_H2、T_H3、T_H17、T_H9、またはT_{FH}を含む、いくつかの亜型であって、異なるサイトカインを分泌して、異なる種類の免疫応答を容易とする、いくつかの亜型のうちの1つへと分化しうる。APCからのシグナル伝達は、T細胞を、特定の亜型へと方向付ける。

40

【0272】

「細胞傷害性T細胞」 (TC細胞またはCTL) は、ウイルス感染細胞および腫瘍細胞を破壊し、また、移植片拒絶にも関与している。これらの細胞はまた、それらの表面上において、CD8糖タンパク質を発現するので、CD8+ T細胞としても公知である。こ

50

これらの細胞は、全ての有核細胞の表面上に存在する、MHCクラスⅠ分子と会合する抗原に結合することにより、それらの標的を認識する。調節性T細胞により分泌される、IL-10、アデノシン、および他の分子を介して、CD8+細胞は、アネルギー状態へと不活化される場合があり、これにより、自己免疫疾患を防止する。

【0273】

「メモリーT細胞」は、感染が消失した後で、長期にわたり存続する、抗原特異的T細胞のサブセットである。メモリーT細胞は、それらのコグネイト抗原へと再曝露されると、多数のエフェクターT細胞へと急速に拡大増殖し、これにより、免疫系に、過去の感染に対する「メモリー」をもたらす。メモリーT細胞は、亜型：ステムセルメモリーT細胞(TSCM)、セントラルメモリーT細胞(TCM細胞)および2種類のエフェクターメモリーT細胞(TEM細胞およびTEMRA細胞)を含む。メモリー細胞は、CD4+細胞の場合もあり、CD8+細胞の場合もある。メモリーT細胞は、細胞表面タンパク質である、CD45RO、CD45RA、および／またはCCR7を発現しうる。

10

【0274】

かつては、サプレッサーT細胞として公知であった、「調節性T細胞」(Treg細胞)は、免疫寛容の維持において役割を果たす。調節性T細胞の主要な役割は、T細胞媒介性免疫を遮断して、免疫反応を終了させ、胸腺内の陰性選択過程を回避した自己反応性T細胞を抑制することである。

【0275】

「ナチュラルキラーT細胞」(NKT細胞)は、養子免疫系を、自然免疫系と橋渡しする。主要組織適合性複合体(MHC)分子により提示されるペプチド抗原を認識する従来のT細胞と異なり、NKT細胞は、CD1dと呼ばれる分子により提示される糖脂質抗原を認識する。活性化すると、これらの細胞は、Th細胞およびTc細胞の両方に帰せられた機能(すなわち、サイトカインの産生および細胞溶解性／細胞殺滅分子の放出)を果たしうる。NKT細胞はまた、一部の腫瘍細胞およびヘルペスウイルスに感染した細胞を認識し、これらを消失させることも可能である。ナチュラルキラー(NK)細胞とは、自然免疫系の、細胞傷害性リンパ球の種類である。場合によって、NK細胞は、ウイルス感染および／または腫瘍形成に対する、最前線の防御をもたらす。NK細胞は、感染細胞上またはがん性細胞上に提示されたMHCを検出することが可能であり、サイトカイン放出を誘発し、その後、溶解およびアポトーシスを誘導する。NK細胞はさらに、抗体および／またはMHCの非存在下で、ストレス細胞を検出することが可能であり、これにより、迅速な免疫応答を可能とする。

20

30

【0276】

改変エフェクター細胞の用量

一部の実施形態では、ある量の改変エフェクター細胞を、それを必要とする対象へと投与するが、量は、サイトカインと関連する傷害作用を誘導する有効性および潜在的可能性に基づき決定する。場合によって、改変エフェクター細胞の量は、1kg当たりの改変エフェクター細胞約 10^5 ～約 10^9 個を含む。場合によって、改変エフェクター細胞の量は、1kg当たりの改変エフェクター細胞約 10^5 ～約 10^8 個を含む。場合によって、改変エフェクター細胞の量は、1kg当たりの改変エフェクター細胞約 10^5 ～約 10^7 個を含む。場合によって、改変エフェクター細胞の量は、1kg当たりの改変エフェクター細胞約 10^5 ～約 10^9 個を含む。場合によって、改変エフェクター細胞の量は、1kg当たりの改変エフェクター細胞約 10^6 ～約 10^8 個を含む。場合によって、改変エフェクター細胞の量は、1kg当たりの改変エフェクター細胞約 10^7 ～約 10^9 個を含む。場合によって、改変エフェクター細胞の量は、1kg当たりの改変エフェクター細胞約 10^5 ～約 10^6 個を含む。場合によって、改変エフェクター細胞の量は、1kg当たりの改変エフェクター細胞約 10^6 ～約 10^7 個を含む。場合によって、改変エフェクター細胞の量は、1kg当たりの改変エフェクター細胞約 10^7 ～約 10^8 個を含む。場合によって、改変エフェクター細胞の量は、1kg当たりの改変エフェクター細胞約 10^8 ～約 10^9 個を含む。場合によって、改変エフェクター細胞の量は、1kg当たりの改変エ

40

50

フェクター細胞約 10^9 個を含む。場合によって、改変エフェクター細胞の量は、1 kg 当たりの改変エフェクター細胞約 10^8 個を含む。場合によって、改変エフェクター細胞の量は、1 kg 当たりの改変エフェクター細胞約 10^7 個を含む。場合によって、改変エフェクター細胞の量は、1 kg 当たりの改変エフェクター細胞約 10^6 個を含む。場合によって、改変エフェクター細胞の量は、1 kg 当たりの改変エフェクター細胞約 10^5 個を含む。

【0277】

一部の実施形態では、改変エフェクター細胞は、改変T細胞である。一部の場合には、改変T細胞は、CAR-T細胞である。場合によって、CAR-T細胞の量は、1 kg 当たりのCAR-T細胞約 10^5 ～約 10^9 個を含む。場合によって、CAR-T細胞の量は、1 kg 当たりのCAR-T細胞約 10^5 ～約 10^8 個を含む。場合によって、CAR-T細胞の量は、1 kg 当たりのCAR-T細胞約 10^5 ～約 10^7 個を含む。場合によって、CAR-T細胞の量は、1 kg 当たりのCAR-T細胞約 10^6 ～約 10^9 個を含む。場合によって、CAR-T細胞の量は、1 kg 当たりのCAR-T細胞約 10^6 ～約 10^8 個を含む。場合によって、CAR-T細胞の量は、1 kg 当たりのCAR-T細胞約 10^7 ～約 10^9 個を含む。場合によって、CAR-T細胞の量は、1 kg 当たりのCAR-T細胞約 10^5 ～約 10^6 個を含む。場合によって、CAR-T細胞の量は、1 kg 当たりのCAR-T細胞約 10^6 ～約 10^7 個を含む。場合によって、CAR-T細胞の量は、1 kg 当たりのCAR-T細胞約 10^7 ～約 10^8 個を含む。場合によって、CAR-T細胞の量は、1 kg 当たりのCAR-T細胞約 10^8 ～約 10^9 個を含む。一部の場合には、CAR-T細胞の量は、1 kg 当たりのCAR-T細胞約 10^9 個を含む。一部の場合には、CAR-T細胞の量は、1 kg 当たりのCAR-T細胞約 10^8 個を含む。一部の場合には、CAR-T細胞の量は、1 kg 当たりのCAR-T細胞約 10^7 個を含む。一部の場合には、CAR-T細胞の量は、1 kg 当たりのCAR-T細胞約 10^6 個を含む。一部の場合には、CAR-T細胞の量は、1 kg 当たりのCAR-T細胞約 10^5 個を含む。

【0278】

一部の実施形態では、CAR-T細胞は、CD19特異的CAR-T細胞である。場合によって、CD19特異的CAR-T細胞の量は、1 kg 当たりのCAR-T細胞約 10^5 ～約 10^9 個を含む。場合によって、CD19特異的CAR-T細胞の量は、1 kg 当たりのCAR-T細胞約 10^5 ～約 10^8 個を含む。場合によって、CD19特異的CAR-T細胞の量は、1 kg 当たりのCAR-T細胞約 10^5 ～約 10^7 個を含む。場合によって、CD19特異的CAR-T細胞の量は、1 kg 当たりのCAR-T細胞約 10^6 ～約 10^9 個を含む。場合によって、CD19特異的CAR-T細胞の量は、1 kg 当たりのCAR-T細胞約 10^6 ～約 10^8 個を含む。場合によって、CD19特異的CAR-T細胞の量は、1 kg 当たりのCAR-T細胞約 10^7 ～約 10^9 個を含む。場合によって、CD19特異的CAR-T細胞の量は、1 kg 当たりのCAR-T細胞約 10^5 ～約 10^6 個を含む。場合によって、CD19特異的CAR-T細胞の量は、1 kg 当たりのCAR-T細胞約 10^6 ～約 10^7 個を含む。場合によって、CD19特異的CAR-T細胞の量は、1 kg 当たりのCAR-T細胞約 10^7 ～約 10^8 個を含む。場合によって、CD19特異的CAR-T細胞の量は、1 kg 当たりのCAR-T細胞約 10^8 ～約 10^9 個を含む。場合によって、CD19特異的CAR-T細胞の量は、1 kg 当たりのCAR-T細胞約 10^9 個を含む。場合によって、CD19特異的CAR-T細胞の量は、1 kg 当たりのCAR-T細胞約 10^8 個を含む。場合によって、CD19特異的CAR-T細胞の量は、1 kg 当たりのCAR-T細胞約 10^7 個を含む。場合によって、CD19特異的CAR-T細胞の量は、1 kg 当たりのCAR-T細胞約 10^6 個を含む。場合によって、CD19特異的CAR-T細胞の量は、1 kg 当たりのCAR-T細胞約 10^5 個を含む。

【0279】

一部の実施形態では、改変T細胞は、操作TCR-T細胞である。場合によって、操

10

20

30

40

50

作 T C R T ー細胞の量は、1 k g 当たりの T C R 細胞約 10^5 ～約 10^9 個を含む。場合によって、操作 T C R 細胞の量は、1 k g 当たりの T C R 細胞約 10^5 ～約 10^8 個を含む。場合によって、操作 T C R 細胞の量は、1 k g 当たりの T C R 細胞約 10^5 ～約 10^7 個を含む。場合によって、操作 T C R 細胞の量は、1 k g 当たりの T C R 細胞約 10^6 ～約 10^9 個を含む。場合によって、操作 T C R 細胞の量は、1 k g 当たりの T C R 細胞約 10^6 ～約 10^8 個を含む。場合によって、操作 T C R 細胞の量は、1 k g 当たりの T C R 細胞約 10^7 ～約 10^9 個を含む。場合によって、操作 T C R 細胞の量は、1 k g 当たりの T C R 細胞約 10^5 ～約 10^6 個を含む。場合によって、操作 T C R 細胞の量は、1 k g 当たりの T C R 細胞約 10^6 ～約 10^7 個を含む。場合によって、操作 T C R 細胞の量は、1 k g 当たりの T C R 細胞約 10^7 ～約 10^8 個を含む。場合によって、操作 T C R 細胞の量は、1 k g 当たりの T C R 細胞約 10^8 ～約 10^9 個を含む。一部の場合には、操作 T C R 細胞の量は、1 k g 当たりの T C R 細胞約 10^9 個を含む。一部の場合には、操作 T C R 細胞の量は、1 k g 当たりの T C R 細胞約 10^8 個を含む。一部の場合には、操作 T C R 細胞の量は、1 k g 当たりの T C R 細胞約 10^7 個を含む。一部の場合には、操作 T C R 細胞の量は、1 k g 当たりの T C R 細胞約 10^6 個を含む。一部の場合には、操作 T C R 細胞の量は、1 k g 当たりの T C R 細胞約 10^5 個を含む。

【0280】

適応

一部の実施形態では、本明細書で記載されるポリヌクレオチドをコードする改変エフェクター細胞を、障害、例えば、がんまたは感染性疾患を有する対象へと投与する方法が開示される。場合によって、がんは、CD19、CD33、BCMA、CD44、 α -葉酸受容体、CAIX、CD30、ROR1、CEA、EGP-2、EGP-40、HER2、HER3、葉酸結合性タンパク質、GD2、GD3、IL-13R-a2、KDR、EDB-F、メソテリン、CD22、EGFR、MUC-1、MAGE-A1、MUC16、h5T4、PSMA、TAG-72、EGFRvIII、CD123、またはVEGF-R2の発現と関連するがんである。

【0281】

一部の実施形態では、本明細書で記載されるポリヌクレオチド、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドをコードする改変エフェクター細胞を、CD19の過剰発現と関連するがんを有する対象へと投与する方法が開示される。一部の実施形態では、改変エフェクター細胞を、CD33の過剰発現と関連するがんを有する対象へと投与する方法が開示される。一部の実施形態では、本明細書では、改変エフェクター細胞を、CD19、CD33、BCMA、CD44、 α -葉酸受容体、CAIX、CD30、ROR1、CEA、EGP-2、EGP-40、HER2、HER3、葉酸結合性タンパク質、GD2、GD3、IL-13R-a2、KDR、EDB-F、メソテリン、CD22、EGFR、MUC-1、MAGE-A1、MUC16、h5T4、PSMA、TAG-72、EGFRvIII、CD123またはVEGF-R2の過剰発現と関連するがんを有する対象へと投与する方法が開示される。場合によって、がんは、転移性がんである。他の場合には、がんは、再発性がんまたは不応性がんである。

【0282】

場合によって、がんは、充実性腫瘍または血液悪性腫瘍である。一部の場合には、がんは、充実性腫瘍である。他の場合には、がんは、血液悪性腫瘍である。場合によって、がんは、転移性がんである。場合によって、がんは、再発性がんまたは不応性がんである。

【0283】

一部の場合には、がんは、充実性腫瘍である。例示的な充実性腫瘍は、肛門がん；虫垂がん；胆管がん（すなわち、胆管癌）；膀胱がん；脳腫瘍；乳がん；子宮頸がん；結腸がん；原発不明がん（CUP）；食道がん；眼がん；卵管がん；消化器がん；腎臓がん；肝臓がん；肺がん；髄芽腫；黒色腫；口腔がん；卵巣がん；膵臓がん；上皮小体疾患；陰茎がん；下垂体腫瘍；前立腺がん；直腸がん；皮膚がん；胃がん；精巣がん；咽頭がん；甲状腺がん；子宮がん；膣がん；外陰がん；または神経膠芽腫を含むがこれらに限定されな

い。

【0284】

「神経膠芽腫」または「多形性膠芽腫」(GBM)とは、侵襲性の神経上皮性脳がんである。GBMは、神経膠型細胞、星状細胞、希突起膠細胞前駆細胞、または神経幹細胞に由来しうる。神経膠芽腫の4つの亜型が同定されている。GBMの大部分である、古典的亜型は、表皮増殖因子受容体(EGFR)遺伝子の追加のコピーを保有し、大半は、表皮増殖因子受容体(EGFR)の、正常より高度な発現をもたらす。症例のサブセットでは、EGFRの増幅は、遺伝子再編成により達せられるが、これらのうちで最も一般的なのは、EGFR変異体II I (EGFRvII I)である。神経膠芽腫内で突然変異することが多い遺伝子である、TP53(p53)は、古典的亜型では、突然変異しない。前神経膠型は、TP53(p53)、および血小板由来増殖因子受容体Aをコードする遺伝子であるPDGFRA、およびイソクエン酸デヒドロゲナーゼ1をコードする遺伝子であるIDH1において、変更の比率が高い。間葉系型は、ニューロフィブロミン1をコードする遺伝子であるNF1内の、他の種類より、高比率の突然変異または他の変更、およびEGFR遺伝子内の少数の変更、およびEGFRの低度の発現により特徴づけられる。神経膠型は、NEFL、GABRA1、SYT1、およびSLC12A5など、ニューロンマーカーの発現により典型化された。神経膠芽腫内の、他の遺伝子変更も記載されており、それらの大部分は、2つの経路である、RBおよびPI3K/AKTにおいてクラスター化されている。神経膠芽腫は、これらの経路のうちの、それぞれ、68~78%および88%において、変更を有する。

【0285】

一部の場合には、がんは、血液悪性腫瘍である。場合によって、血液悪性腫瘍は、リンパ腫、白血病、骨髄腫、またはB細胞性悪性腫瘍を含む。場合によって、血液悪性腫瘍は、リンパ腫、白血病、または骨髄腫を含む。一部の場合には、例示的な血液悪性腫瘍は、慢性リンパ球性白血病(CLL)、小リンパ球性リンパ腫(SLL)、高危険性CLL、非CLL/SLL性リンパ腫、前リンパ球性白血病(PLL)、濾胞性リンパ腫(FL)、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)、マントル細胞リンパ腫(MCL)、ワルデンシュトロームマクログロブリン血症、多発性骨髄腫、節外性辺縁帯B細胞リンパ腫、節性辺縁帯B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、非バーキット高悪性度B細胞リンパ腫、縦隔原発B細胞リンパ腫(PMBL)、免疫芽球性大細胞型リンパ腫、前駆Bリンパ芽球性リンパ腫、B細胞前リンパ球性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫、脾辺縁帯リンパ腫、形質細胞骨髄腫、形質細胞腫、縦隔(胸腺)大細胞型B細胞リンパ腫、血管内大細胞型B細胞リンパ腫、原発性滲出性リンパ腫、またはリンパ腫様肉芽腫症を含む。一部の実施形態では、血液悪性腫瘍は、骨髄性白血病を含む。一部の実施形態では、血液悪性腫瘍は、急性骨髄性白血病(AML)または慢性骨髄性白血病(CML)を含む。

【0286】

一部の場合には、本明細書では、慢性リンパ球性白血病(CLL)、小リンパ球性リンパ腫(SLL)、高危険性CLL、非CLL/SLL性リンパ腫、前リンパ球性白血病(PLL)、濾胞性リンパ腫(FL)、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)、マントル細胞リンパ腫(MCL)、ワルデンシュトロームマクログロブリン血症、多発性骨髄腫、節外性辺縁帯B細胞リンパ腫、節性辺縁帯B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、非バーキット高悪性度B細胞リンパ腫、縦隔原発B細胞リンパ腫(PMBL)、免疫芽球性大細胞型リンパ腫、前駆Bリンパ芽球性リンパ腫、B細胞前リンパ球性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫、脾辺縁帯リンパ腫、形質細胞骨髄腫、形質細胞腫、縦隔(胸腺)大細胞型B細胞リンパ腫、血管内大細胞型B細胞リンパ腫、原発性滲出性リンパ腫、またはリンパ腫様肉芽腫症から選択される血液悪性腫瘍を有する対象へと、本明細書で記載される改変エフェクター細胞を投与する方法が開示される。一部の場合には、本明細書では、AMLまたはCMLから選択される血液悪性腫瘍を有する対象へと、改変エフェクター細胞を投与する方法が開示される。

【0287】

他の場合には、本明細書では、感染性疾患に起因する感染を有する対象へと投与する方法が開示される。感染性疾患は、細菌感染、ウイルス感染、または真菌感染から生じる疾患でありうる。他の場合には、例示的ウイルス性病原体は、アデノウイルス科 (Adenoviridae)、エプスタインバーウイルス (EBV)、サイトメガロウイルス (CMV)、RSV (respiratory syncytial virus)、JCウイルス、BKウイルス、HSV、HHV科のウイルス、ピコルナウイルス科 (Picornaviridae)、ヘルペスウイルス科 (Herpesviridae)、ヘパドナウイルス科 (Hepadnaviridae)、フラビウイルス科 (Flaviviridae)、レトロウイルス科 (Retroviridae)、オルトミクソウイルス科 (Orthomyxoviridae)、パラミクソウイルス科 (Paramyxoviridae)、パポバウイルス科 (Papovaviridae)、ポリオーマウイルス属 (Polyomavirus)、ラブドウイルス科 (Rhabdoviridae)、およびトガウイルス科 (Togaviridae) の病原体を含む。例示的な病原性ウイルスは、天然痘、インフルエンザ、流行性耳下腺炎、麻疹、水痘、エボラ熱、および風疹を引き起こす。例示的な病原性真菌は、カンジダ属 (Candida)、アスペルギルス属 (Aspergillus)、クリプトコッカス属 (Cryptococcus)、ヒストプラズマ属 (Histoplasma)、ニューモシスチス属 (Pneumocystis)、およびスタキボトリス属 (Stachybotrys) を含む。例示的な病原性細菌は、連鎖球菌属 (Streptococcus)、シュードモナス属 (Pseudomonas)、赤痢菌属 (Shigella)、カンピロバクター属 (Campylobacter)、ブドウ球菌属 (Staphylococcus)、ヘリコバクター属 (Helicobacter)、大腸菌 (E. coli)、リケッチア属 (Rickettsia)、バチルス属 (Bacillus)、ボルデテラ属 (Bordetella)、クラミジア属 (Chlamydia)、スピロヘータ綱 (Spirochetes)、およびサルモネラ属 (Salmonella) を含む。

【0288】

ウイルスのベースの送達系

本開示はまた、本明細書で記載される核酸を挿入したウイルスのベースの系などの送達系も提供する。代表的なウイルス発現ベクターは、アデノ随伴ウイルスベクター、アデノウイルスベースのベクター (例えば、CruCell, Inc. (Leiden, Netherlands) から市販されている、アデノウイルスベースのPer.C6系)、レンチウイルスベースのベクター (例えば、Life Technologies (Carlsbad, Calif.) 製の、レンチウイルスベースのpLPI)、レトロウイルスベクター (例えば、pCFB-EGSHを付加したpFB-ERV)、およびヘルペスウイルスベースのベクターを含むがこれらに限定されない。ある実施形態では、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。レンチウイルスなどのレトロウイルスに由来するベクターは、トランス遺伝子の、娘細胞における、長期にわたる、安定的な組み込みおよびその繁殖を可能とするので、長期にわたる遺伝子導入を達成するのに適するツールである。レンチウイルスベクターは、肝細胞などの非増殖性細胞に形質導入するという点で、マウス白血病ウイルスなど、がんレトロウイルスに由来するベクターに優る追加の利点を有する。レンチウイルスベクターはまた、低免疫原性という追加の利点も有する。さらなる実施形態では、ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルスベクターである。さらなる実施形態では、ウイルスベクターは、レトロウイルスベクターである。一般に、かつ、複数の実施形態では、適切なベクターは、少なくとも1つの生物において機能的な複製起点、プロモーター配列、好都合な制限エンドヌクレアーゼ部位、および1または複数の選択用マーカー (例えば、国際公開第01/96584号パンフレット、国際公開第01/29058号パンフレット、および米国特許第6,326,193号明細書) を含有する。

【0289】

さらなる適切なベクターは、宿主細胞のDNAへと、ランダムに組み込まれる場合もあり、発現ベクターと、宿主細胞の染色体との特異的組換えを可能とする組換え部位を含む場合もある、組み込み用発現ベクターを含む。このような組み込み用発現ベクターは、宿主細胞の染色体の内因性発現制御配列を用いて、所望のタンパク質の発現をもたらす。部位特異的に組み込むベクターの例は、例えば、Invitrogen (Carlsbad, Calif.) (例えば、pCDNA (商標) 5/FRT) 製のfLp-in系、また

はStratagene (La Jolla, Calif.) 製のpExchange-6 Core Vectorsにおいて見出されるcre-lox系などのcre-lox系の構成要素を含む。宿主細胞染色体へとランダムに組み込まれるベクターの例は、例えば、Invitrogen (Carlsbad, Calif.) 製のpcDNA3.1 (T抗原の非存在下で導入される場合)、およびPromega (Madison, Wis.) 製のpCIまたはpFN10A (ACT) FLEXI (商標) を含む。さらなるプロモーターエレメント、例えば、エンハンサーは、転写開始の頻度を調節する。典型的に、プロモーターエレメントは、開始部位の30~110bp上流の領域内に位置するが、多数のプロモーターは、開始部位の下流にも、機能的なエレメントを含有することが近年示されている。エレメントが、互いに対して逆位であるか、または移動している場合にも、プロモーター機能が保存されるように、プロモーターエレメントの間のスペーシングは、柔軟であることが多い。チミジンキナーゼ (tk) プロモーターでは、活性が減衰し始める前に、プロモーターエレメントの間のスペーシングが、50bpの距離まで増大する場合がある。個別のエレメントは、転写を活性化させるように、プロモーターに応じて、共作動的に機能する場合もあり、独立に機能する場合もあると考えられる。

【0290】

適切なプロモーターの1つの例は、サイトメガロウイルス (CMV) 即初期プロモーター配列である。このプロモーター配列は、それへと作動的に連結された、任意のポリヌクレオチド配列の、高レベルの発現を駆動することが可能である、強力な構成的プロモーター配列である。

【0291】

適切なプロモーターの別の例は、ヒト伸長成長因子1アルファ1 (hEF1a1) である。複数の実施形態では、本開示のCARおよび／またはTCRを含むベクター構築物は、hEF1a1機能的変異体を含む。

【0292】

しかし、サルウイルス40 (SV40) 初期プロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルス (MMTV)、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) LTR (long terminal repeat) プロモーター、MoMuLVプロモーター、トリ白血病ウイルスプロモーター、エプスタインバーウイルス即初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーターのほか、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などであるがこれらに限定されない、ヒト遺伝子プロモーターを含むがこれらに限定されない、他の構成的プロモーター配列もまた、使用することができる。さらに、本開示は、構成的プロモーターの使用に限定されないものとする。誘導性プロモーターもまた、本開示の一部として想定される。誘導性プロモーターの使用は、このような発現が所望される場合に、それが作動的に連結されたポリヌクレオチド配列の発現をオンにするか、または発現が所望されない場合に、発現をオフにすることが可能な分子スイッチをもたらす。誘導性プロモーターの例は、メタロチオネイン (methallothioneine) プロモーター、グルココルチコイドプロモーター、プロゲステロンプロモーター、およびテトラサイクリンプロモーターを含むがこれらに限定されない。

誘導性プロモーターの他の例は、本明細書で記載される、組織特異的プロモーターを含むがこれらに限定されない。一部の実施形態では、プロモーターは、NF-κB結合部位 (配列番号44~46)、活性化T細胞核内因子 (NFAT) 応答エレメント (配列番号51)、6部位GAL4誘導性近位因子結合エレメント (PFB) (配列番号62)、またはRPL6に基づく合成5' UTR (配列番号64) を含む。ある特定の実施形態では、プロモーターは、IL-2コアプロモーター、IL-2最小プロモーター、IL-2エンハンサー／プロモーター変異体、(NF-κB)₁-IL2プロモーター変異体、(NF-κB)₃-IL2プロモーター変異体、(NF-κB)₆-IL2プロモーター変異体、1×NFAT応答エレメント-IL2プロモーター変異体、3×NFAT応答エレメント-IL2プロモーター変異体、6×NFAT応答エレメント-IL2プロモーター変異体、ヒトEEF1A1プロモーター変異体、ヒトEEF1A1プロモーター／エンハンサー

、ヒトUBCプロモーター、および合成最小プロモーター1のうちの、任意の1または複数でありうる。ある特定の実施形態では、プロモーターヌクレオチドは、表2に開示されているプロモーターヌクレオチドを含む。

【0293】

CARもしくはTCRポリペプチドまたはこの部分の発現を評価するために、細胞へと導入される発現ベクターはまた、ウイルスベクターを介してトランスフェクトまたは感染させることが求められる細胞集団からの、発現細胞の同定および選択を容易とする、選択用マーカー遺伝子もしくはレポーター遺伝子またはこれらの両方も含有しうる。他の態様では、選択用マーカーは、別個のDNA片上に保有され、共トランスフェクション手順で使用する場合もある。選択用マーカーおよびレポーター遺伝子のいずれも、宿主細胞内の発現を可能とするように、適切な調節配列で挟むことができる。有用な選択用マーカーは、例えば、ネオマイシン耐性遺伝子(neo)およびアンピシリン耐性遺伝子などの抗生剤耐性遺伝子を含む。一部の実施形態では、切断型表皮増殖因子受容体(HER1t)タグを、選択用マーカー遺伝子として使用することができる。

【0294】

レポーター遺伝子を、トランスフェクトされた可能性がある細胞を同定し、調節配列の機能性について査定するために使用することができる。一般に、レポーター遺伝子は、レシピエントの生物または組織において存在しないか、またはこれらにより発現せず、その発現が、何らかの、容易に検出可能な特性、例えば、酵素活性により顕在化されるポリペプチドをコードする遺伝子である。DNAを、レシピエント細胞へと導入した後の適切な時点において、レポーター遺伝子の発現についてアッセイする。適切なレポーター遺伝子は、ルシフェラーゼ、ベクターガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、分泌型アルカリホスファターゼをコードする遺伝子、または緑色蛍光タンパク質遺伝子(例えば、Ui-Tei et al., FEBS Letters 479: 79-82 (2000))を含むことができる。適切な発現系が周知であり、公知の技法を使用して調製することもでき、市販品を購入することもできる。一般に、最高レベルのレポーター遺伝子の発現を示す、最小の5'側フランキング領域を伴う構築物は、プロモーターとして同定される。このようなプロモーター領域は、レポーター遺伝子へと連結することができ、薬剤を、プロモーター駆動型転写をモジュレートする能力について査定するのに使用することができる。

【0295】

いくつかの実施形態では、ベクターは、トランス遺伝子の発現を駆動するhEF1a1プロモーター、転写を増強するウシ成長ホルモンポリA配列、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント(WPRE)のほか、pFUGWプラスミドに由来するLTR配列を含む。

【0296】

当技術分野では、遺伝子を細胞へと導入し発現させる方法が公知である。発現ベクターの文脈では、ベクターを、当技術分野における任意の方法により、宿主細胞、例えば、哺乳動物細胞、細菌細胞、酵母細胞、または昆虫細胞へと、たやすく導入することができる。例えば、発現ベクターは、宿主細胞へと、物理的手段により導入することもでき、化学的手段により導入することもでき、生物学的手段により導入することもできる。

【0297】

ポリヌクレオチドを、宿主細胞へと導入するための物理的方法は、リン酸カルシウム沈殿法、リポフェクション法、遺伝子銃法、マイクロインジェクション法、電気穿孔法などを含む。当技術分野では、ベクターおよび／または外因性核酸を含む細胞を作製するための方法が周知である。例えば、Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001))を参照されたい。複数の実施形態では、ポリヌクレオチドを、宿主細胞へと導入するための方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションまたはポリエチレンイミン(PEI)トランスフェクションである。

【0298】

目的のポリヌクレオチドを、宿主細胞へと導入するための生物学的方法は、DNAベクターおよびRNAベクターの使用を含む。ウイルスベクターと、とりわけ、レトロウイルスベクターとは、遺伝子を、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞へと挿入するための、最も広く使用される方法となっている。他のウイルスベクターは、レンチウイルス、ポックスウイルス、単純ヘルペスウイルスⅠ、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルスなどに由来しうる。例えば、米国特許第5,350,674号明細書および同第5,585,362号明細書を参照されたい。

【0299】

ポリヌクレオチドを、宿主細胞へと導入するための化学的手段は、高分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズ、ならびに水中油エマルジョン、ミセル、混合型ミセル、およびリポソームを含む脂質ベースの系などのコロイド分散系を含む。in vitroおよびin vivoにおける、送達媒体としての使用のための、例示的なコロイド状系は、リポソーム（例えば、人工膜小胞）である。

【0300】

ウイルス送達系を用いる場合、例示的な送達媒体は、リポソームである。核酸の、宿主細胞への導入（in vitro、ex vivo、またはin vivoにおける）のために、脂質製剤の使用が想定される。別の態様では、核酸は、脂質と会合させることができる。脂質と会合させた核酸は、リポソームの脂質二重層内に散在する、水性のリポソーム内部に封入することもでき、リポソームおよびオリゴヌクレオチドのいずれとも会合する連結分子を介して、リポソームへと接合させることもでき、リポソーム内に取り込むこともでき、リポソームと複合体化させることもでき、脂質を含有する溶液中に分散させることもでき、脂質と混合することもでき、脂質と組み合わせることもでき、脂質中の懸濁液として含有することもでき、ミセルと共に含有するかもしくは複合体化させることもでき、または他の形で脂質と会合させることもできる。脂質、脂質/DNA、または脂質/発現ベクターに関連する組成物は、溶液中の、任意の特定の構造に限定されない。例えば、組成物は、ミセルとしての二重層構造内に存在する場合もあり、「コラプシング」構造を伴う二重層構造内に存在する場合もある。組成物はまた、単に、溶液中に散在させることもでき、おそらく、サイズまたは形状が均質ではない凝集物を形成しうる。脂質とは、天然脂質の場合もあり、合成脂質の場合もある、脂肪性物質である。例えば、脂質は、天然では、細胞質内で発生する脂肪性液滴のほか、長鎖脂肪族炭化水素、ならびに脂肪酸、アルコール、アミン、アミノアルコール、およびアルデヒドなど、それらの誘導体を含有する化合物のクラスを含む。

【0301】

使用に適する脂質は、市販元から購入することができる。例えば、ジミリスチルホスファチジルコリン（「DMPC」）は、Sigma、St. Louis、Mo. から購入することができ、ジセチルリン酸（「DCP」）は、K & K Laboratories（Plainview、N. Y.）から購入することができ、コレステロール（「Chol」）は、Calbiochem-Behringから購入することができ、ジミリスチルホスファチジルグリセロール（「DMPG」）および他の脂質は、Avanti Polar Lipids, Inc.（Birmingham、Ala.）から購入することができる。クロロホルムまたはクロロホルム/メタノール中の脂質原液は、約-20℃で保存することができる。クロロホルムは、メタノールよりたやすく蒸発するので、唯一の溶媒として使用される。「リポソーム」とは、封入された脂質の二重層または脂凝集物の作出により形成される、様々な単一の脂質媒体および多層性脂質媒体を包含する、一般的な用語である。リポソームは、リン脂質二重層膜および内部の水性媒質を伴う小胞構造を有するものとして特徴づけることができる。多層性リポソームは、水性媒質により分離された複数の脂質層を有する。多層性リポソームは、リン脂質を、過剰量の水溶液中に懸濁させると、自発的に形成される。脂質成分は、閉止構造を形成する前に、自己転移を経、脂質二重層の間に、水および溶解させた溶質を取り込む（Ghosh et al., Glycobiology 5: 505-10 (1991)）。しかし、溶液中に通常の小胞構造と異なる構造を有する組成物もま

10

20

30

40

50

た、包含される。例えば、脂質は、ミセル構造を取る場合もあり、脂質分子による不均質の凝集物として存在する場合もある。また、リポフェクタミン-核酸複合体も想定される。

【0302】

非ウイルスベースの送達系

場合によって、本明細書で記載されるCARおよび／またはTCRを発現させるための遺伝子スイッチポリペプチドをコードするポリヌクレオチドはまた、DNA配列を、脊椎動物の染色体へと導入するための、合成DNAトランスポゾン系を指す、「Sleeping Beauty (SB) トランスポゾン系」など、非ウイルスベースの送達系を使用して、T細胞へと導入することもできる。SBトランスポゾン系の、一部の例示的な実施形態については、例えば、米国特許第6,489,458号明細書、同第8,227,432号明細書、同第9,228,180号明細書、および国際公開第2016/145146号パンフレットにおいて記載されている。Sleeping Beautyトランスポゾン系は、Sleeping Beauty (SB) トランスポザラーゼおよびSBトランスポゾンから構成される。複数の実施形態では、Sleeping Beautyトランスポゾン系は、SB11トランスポゾン系、SB100Xトランスポゾン系、またはSB110トランスポゾン系、およびこれらの他の任意の変異体を含みうる。

【0303】

DNAトランスポゾンは、1つのDNA部位から、別のDNA部位へと、単純なカットアンドペースト方式で転座する。転移は、規定されたDNAセグメントを、1つのDNA分子から切り出し、同じDNA分子内もしくはゲノム内、または異なるDNA分子内もしくはゲノム内の別の部位へと移動させる、正確な過程である。他のTc1/mariner型トランスポザラーゼと同様、SBトランスポザラーゼも、トランスポゾンを、レシピエントDNA配列内の、TAジヌクレオチド塩基対へと挿入する。挿入部位は、同じDNA分子内の別の部位の場合もあり、別のDNA分子（または染色体）内の場合もある。ヒトゲノムを含む哺乳動物ゲノムには、約2億カ所のTA部位が存在する。TA挿入部位は、トランスポゾン組込みの過程において、重複される。このTA配列の重複は、転移の顕著な特徴であり、一部の実験では、機構を確認するのに使用される。トランスポザラーゼは、トランスポゾン内でコードされる場合もあり、トランスポザラーゼは、別の供給源、例えば、DNA供給源またはmRNA供給源により供給される場合もあり、この場合、トランスポゾンは、非自律型エレメントとなる。非自律型トランスポゾンは、挿入の後、独立では切り出しおよび再挿入を行えないため、遺伝子ツールとして最も有用である。SBトランスポゾンは、脊椎動物のゲノムへの遺伝子の導入および遺伝子治療のための非ウイルスベクターとして使用することが想定されている。略述すると、T細胞を遺伝子改変するように、Sleeping Beauty (SB) 系 (Hackett et al., Mol Ther 18:674-83, (2010)) を適合させた (Cooper et al., Blood 105:1622-31, (2005))。これは、2つのステップ：(i) T細胞の特異性をリダイレクトするためのSBトランスポゾン [すなわち、キメラ抗原受容体 (CAR)] およびSBトランスポザラーゼを発現するDNAプラスミドのレクトロトランスファー (Jin et al., Gene Ther 18:849-56, (2011)、Kebriaei et al., Hum Gene Ther 23:444-50, (2012))、ならびに(ii) K562細胞株に由来するデザイナー人工抗原提示細胞 (AaPC) (AaPC (Activating and Propagating Cell) としてもまた公知である) に接する形での、組込み配列を安定的に発現するT細胞の繁殖および拡大増殖を伴った。一実施形態では、SBトランスポゾン系は、tdIL-15、IL-21、および／またはキメラ抗原受容体をコードするコード配列を含む。このような系については、例えば、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、Singh et al., Cancer Res (8):68 (2008), April 15, 2008およびMaiti et al., J Immunother. 36(2): 112-123 (2013)において記載されている。

【0304】

一部の実施形態では、CARまたはTCR、1または複数の遺伝子スイッチポリペプチド、およびmbIL-15をコードするポリヌクレオチドは、1または複数のSleep

10

20

30

40

50

ing Beautyトランスポゾン内でコードされ、SBトランスポザーゼは、別個のベクター内でコードされる。複数の実施形態では、CD19特異的CARは、トランスポゾンDNAプラスミドベクター内でコードされ、mb-IL15は、第2のトランスポゾンDNAプラスミドベクター内でコードされ、SBトランスポザーゼは、第3のDNAプラスミドベクター内でコードされる。一部の実施形態では、mbIL-15は、細胞タグと共にコードされる。細胞タグの例は、切断型表皮増殖因子受容体タグ（HER1t）、HER1t1、HER1t2、HER1t3、HER1t4、HER1t5、HER1t6、HER1t7、HER1t8、HER1t9、HER1t10、HER1t11、CD20およびCD20t1、CD20タグ、あるいは枯渇スイッチもしくはキルスイッチ、またはエンリッチメントマーカーとしての使用のための、他の任意の適切な細胞タグを含みうる。細胞タグを含む、非限定的な例示的遺伝子スイッチベクター系を、図2A～2D、図3、図19A～19B、図20A、図22、図24A～24D、および図25A～25Bに例示する。

10

【0305】

一部の実施形態では、HER1tは、FDAにより承認されているセツキシマブ、またはHER1tを認識する任意の抗体の投与を介して、輸注されたCAR-T細胞の枯渇を可能とすることにより、安全性機構をもたらす。一部の実施形態では、CD20もまた、FDAにより承認されているリツキシマブ療法の投与を介して、輸注されたCAR-T細胞の枯渇を可能とすることにより、安全性機構を可能とする。

【0306】

外因性核酸を、宿主細胞へと導入するか、または細胞を、本開示の阻害剤へと、他の形で曝露するのに使用される方法にかかわらず、宿主細胞内の組換えDNA配列の存在を確認するために、様々なアッセイを実施することができる。このようなアッセイは、例えば、サザンブロット法およびノーザンブロット法、RT-PCRおよびPCRなど、当業者に周知の分子アッセイ；例えば、免疫学的手段（ELISAおよびウェスタンブロット）、または薬剤を同定するための、本明細書に記載されるアッセイであって、本開示の範囲内に収まるアッセイにより、特定のペプチドの有無を検出するアッセイなどの「生化学的」アッセイを含む。

20

【0307】

複数の実施形態では、SB11トランスポゾン系、SB100Xトランスポゾン系、SB110トランスポゾン系、piggyBacトランスポゾン系（例えば、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Wilson et al, “PiggyBac Transposon-mediated Gene Transfer in Human Cells,” Molecular Therapy 15:139-145 (2007)を参照されたい）、および／またはpiggyBatトランスポゾン系（例えば、Mitra et al., “Functional characterization of piggyBat from the bat Myotis lucifugus unveils an active mammalian DNA transposon,” Proc. Natl. Acad. Sci USA 110:234-239 (2013)を参照されたい）を使用して、本明細書で説明される改変エフェクター細胞および他の遺伝子エレメントを、細胞へと送達する。さらなるトランスポザーゼおよびトランスポゾン系については、それらの各々が、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、米国特許第6,489,458号明細書、同第6,613,752号明細書、同第7,148,203号明細書、同第7,985,739号明細書、同第8,227,432号明細書、同第9,228,180号明細書、米国特許公開第2011/0117072号明細書、Mates et al., Nat Genet, 41(6):753-61 (2009). doi: 10.1038/ng.343. Epub 2009 May 3, Gene Ther., 18(9):849-56 (2011). doi: 10.1038/gt.2011.40. Epub 2011 Mar 31 およびIvics et al., Cell. 91(4):501-10, (1997)において提示されている。

30

40

【0308】

さらなる適切な非ウイルス系は、宿主細胞のDNAへと、ランダムに組み込まれる場合もあり、発現ベクターと、宿主細胞の染色体との特異的組換えを可能とする組換え部位を含む場合もある、組込み用発現ベクターを含みうる。トランス遺伝子の、所定の遺伝子座

50

への組込みのターゲティングが、多くの適用に所望される目標である。まず、部位特異的リコンビナーゼの第1の組換え部位を、ゲノム部位に、ランダムに、または所定の位置に挿入する。続いて、細胞に、目的の遺伝子またはDNA、ならびに第2の組換え部位およびリコンビナーゼの供給源（リコンビナーゼを発現させる、発現プラスミド、RNA、タンパク質、またはウイルス）を保有するプラスミドをトランスフェクトする。第1の組換え部位と第2の組換え部位との組換えは、プラスミドDNAの組込みをもたらす。

【0309】

このような組込み用発現ベクターは、宿主細胞の染色体の内因性発現制御配列を用いて、所望のタンパク質の発現をもたらす。一部の実施形態では、ドナーポリヌクレオチド上の配列であって、組込み部位を挟む配列と相同な配列の存在により、組込みのターゲティングを促進する。例えば、本明細書に記載されるドナーポリヌクレオチドを使用する、組込みのターゲティングは、従来のトランスフェクション法、例えば、相同組換えにより、遺伝子のノックアウトまたはノックインを創出するのに使用される技法に従い達成することができる。他の実施形態では、ドナーポリヌクレオチド上の配列であって、組込み部位を挟む配列と相同な配列の存在、および部位特異的リコンビナーゼの存在下で、細胞を、ドナーポリヌクレオチドと接触させることの両方により、組込みのターゲティングを促進する。部位特異的リコンビナーゼ、または、単に、リコンビナーゼとは、その適合性の組換え部位の間の、保存的な部位特異的組換えを触媒するポリペプチドを意味する。本明細書で使用される部位特異的リコンビナーゼは、天然ポリペプチドのほか、活性を保持する誘導体、変異体、および／または断片、ならびに天然ポリヌクレオチド、活性を保持するリコンビナーゼをコードする誘導体、変異体、および／または断片を含む。

【0310】

本明細書ではまた、1または複数の遺伝子発現カセットを含む、宿主細胞内において異種遺伝子を組み込むための系も提示される。場合によって、系は、第1のポリペプチド構築物をコードする、第1のポリヌクレオチドを含む、第1の遺伝子発現カセットを含む。他の場合には、系は、第2のポリペプチド構築物をコードする、第2のポリヌクレオチドを含む、第2の遺伝子発現カセットを含みうる。さらに他の場合には、系は、第3の遺伝子発現カセットを含みうる。一実施形態では、遺伝子発現カセットのうちの1つは、(i) トランス活性化ドメイン；(ii) 核内受容体リガンド結合性ドメイン；(iii) DNA結合性ドメイン；および(iv) エクソソ受容体結合性ドメインのうちの1または複数をコードする、遺伝子スイッチポリヌクレオチドを含みうる。別の実施形態では、系は、前記宿主細胞を、セリンリコンビナーゼの存在下で、少なくとも前記第1の遺伝子発現カセットと接触させると、前記異種遺伝子が、前記宿主細胞へと組み込まれるように、組換え接合部位およびセリンリコンビナーゼをさらに含む。

【0311】

場合によって、系は、前記宿主細胞を、前記リガンドの存在下で接触させると、前記異種遺伝子が、前記宿主細胞内で発現するように、リガンドをさらに含む。1つの場合には、系はまた、組換え接合部位も含む。場合によって、1つの組換え接合部位は、ファージゲノム組換え接合部位(attP)または細菌ゲノム組換え接合部位(attB)である。1つの場合には、宿主細胞は、真核細胞である。別の場合には、宿主細胞は、ヒト細胞である。さらなる場合には、宿主細胞は、T細胞またはNK細胞である。

【0312】

一実施形態では、上記に記載した系内の異種遺伝子は、CARを含む。一部の実施形態では、CARは、CD19、CD33、BCMA、CD44、 α -葉酸受容体、CAIX、CD30、ROR1、CEA、EGP-2、EGP-40、HER2、HER3、葉酸結合性タンパク質、GD2、GD3、IL-13R- α 2、KDR、EDB-F、メソテリン、CD22、EGFR、MUC-1、MAGE-A1、MUC16、h5T4、PSMA、TAG-72、EGFRvIII、CD123、またはVEGF-R2のうちの少なくとも1つに結合する。

【0313】

別の実施形態では、系は、サイトカインを含む異種遺伝子を含む。1つの場合には、サイトカインは、IL-15、IL-12、IL-21、およびIL-15とIL-15R α との融合体のうちの少なくとも1つを含む。一実施形態では、系は、少なくとも1つの細胞タグを含む異種遺伝子を含む。1つの場合には、前記細胞タグは、HER1tおよびCD20のうちの少なくとも1つを含む。一部の実施形態では、mbIL-15は、細胞タグと共にコードされる。細胞タグの例は、切断型表皮増殖因子受容体タグ（HER1t）、CD20タグ、あるいは枯渇スイッチもしくはキルスイッチ、またはエンリッチメントマーカーとしての使用のための、他の任意の適切な細胞タグを含みうる。細胞タグの例示的な配列は、下記の通りである。

【0314】

10

20

30

40

50

【表 3 - 1】

表 3. 細胞タグのアミノ酸配列およびポリヌクレオチド配列

細胞タグ名	配列 番号	ポリヌクレオチド配列(該当する 場合、5'～3')	配列 番号	アミノ酸配列(該当する場合、 5'～3')
切断型 EGFR (huEGFRt) (Her1t)	76	CGCAAAGTGTGTAACGGAA TAGGTATTGGTGAATTTAAA GACTCACTCTCCATAAATGC TACGAATATTAAACACTTCA AAAACCTGCACCTCCATCAGT GGCGATCTCCACATCCTGCC GGTGGCATTAGGGGTGACT CCTTCACACATACTCCTCCT CTGGATCCACAGGAACTGG ATATTCTGAAAACCGTAAAG GAAATCACAGGGTTTTTGCT GATTCAGGCTTGGCCTGAAA ACAGGACGGACCTCCATGCC TTTGAGAACCTAGAAATCAT ACGCGGCAGGACCAAGCAA CATGGTCAGTTTTCTCTTGC AGTCGTCAGCCTGAACATAA CATCCTTGGGATTACGCTCC CTCAAGGAGATAAGTGATG GAGATGTGATAATTTTCAGGA AACAAAAATTTGTGCTATGC AAATACAATAAACTGGAAA AAACTGTTTGGGACCTCCGG TCAGAAAACCAAAATTATA AGCAACAGAGGTGAAAACA GCTGCAAGGCCACAGGCCA GGTCTGCCATGCCTTGTGCT CCCCGAGGGCTGCTGGGGC CCGGAGCCCAGGGACTGCG TCTCTTGCCGGAATGTCAGC CGAGGCAGGGAATGCGTGG ACAAGTGCAACCTTCTGGAG GGTGAGCCAAGGGAGTTTGT GGAGAACTCTGAGTGCATAC AGTGCCACCCAGAGTGCCTG CCTCAGGCCATGAACATCAC CTGCACAGGACGGGGACCA GACAACCTGTATCCAGTGTGC CCACTACATTGACGGCCCCC ACTGCGTCAAGACCTGCCCCG GCAGGAGTCATGGGAGAAA ACAACACCCTGGTCTGGAAG	189	RKVCNGIGIGEFKDSLINA TNIKHFKNCTSIISGDLHILPV AFRGDSFTHTPPLDPQELDI LKTVKEITGFLLIQAWPENR TDLHAFENLEIIRGR TKQHG QFSLAVVSLNITSLGLRSLK EISDGDVIISGNKNLCYANTI NWKKLFGTSGQKTKIISNR GENSCKATGQVCHALCSPE GCWGPEPRDCVSCRNVSRG RECVDKCNLLEGEPREFVE NSECIQCHPECLPQAMNITC TGRGPDNCIQCAHYIDGPH CVKTCAPAGVMGENNTLVW KYADAGHVCHLCHPNCTY GCTGPGLEGCP TNGPKIPSI ATGMVGALLLLLVLVALGIG LFM

10

20

30

40

【 0 3 1 5 】

【表 3 - 2】

細胞タグ名	配列 番号	ポリヌクレオチド配列(該当する 場合、5'~3')	配列 番号	アミノ酸配列(該当する場 合、5'~3')
		TACGCAGACGCCGCCATGT GTGCCACCTGTGCCATCCAA ACTGCACCTACGGATGCACT GGGCCAGGTCTTGAAGGCTG TCCAACGAATGGGCCTAAG ATCCCGTCCATCGCCACTGG GATGGTGGGGGCCCTCCTCT TGCTGCTGGTGGTGGCCCTG GGGATCGGCCTCTTCATG		
EGFR 切断型デ ザイン 1 (Her1 切 断型デザイン 1) (HER1t1)	77	CGCAAAGTGTGTAACGGAA TAGGTATTGGTGAATTTAAA GACTCACTCTCCATAAATGC TACGAATATTAAACACTTCA AAAACCTGCACCTCCATCAGT GGCGATCTCCACATCCTGCC GGTGGCATTAGGGGTGACT CCTTCACACATACTCCTCCT CTGGATCCACAGGAACTGG ATATTCTGAAAACCGTAAAG GAAATCACAGGGTTTTTGCT GATTCAGGCTTGGCCTGAAA ACAGGACGGACCTCCATGCC TTTGAGAACCTAGAAATCAT ACGCGGCAGGACCAAGCAA CATGGTCAGTTTTCTCTTGC AGTCGTCAGCCTGAACATAA CATCCTTGGGATTACGCTCC CTCAAGGAGATAAGTGATG GAGATGTGATAATTTAGGA AACAAAAATTTGTGCTATGC AAATACAATAAACTGGAAA AAACTGTTTGGGACCTCCGG TCAGAAAACCAAAATTATA AGCAACAGAGGTGAAAACA GCTGCAAGGCCACAGGCCA GGTCTGCCATGCCTTGTGCT CCCCGAGGGCTGCTGGGGC CCGGAGCCCAGGGACTGCG TCTCTGGTGGCGGTGGCTCG GGCGGTGGTGGGTGCGGTG GCGGCGGATCTGGTGGCGGT GGCTCGTTTTGGGTGCTGGT GGTGGTTGGTGGAGTCCTGG	190	RKVCNGIGIGEFKDSLINA TNIKHFKNCTSISGDLHILPV AFRGDSFTHTPPLDPQELDI LKTVKEITGFLLIQAWPENR TDLHAFENLEIIRGRKQHG QFSLAVVSLNITSLGLRSLK EISDGDVIISGNKNLCYANTI NWKKLFGTSGQTKIISNR GENSKATGQVCHALCSPE GCWGPEPRDCVSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSFWVL VVVGGVLACYSLLVTVAFII FWVRSKRS

【 0 3 1 6 】

10

20

30

40

【表 3 - 3】

細胞タグ名	配列 番号	ポリヌクレオチド配列(該当する 場合、5'～3')	配列 番号	アミノ酸配列(該当する場 合、5'～3')
		CTTGCTATAGCTTGCTAGTA ACAGTGGCCTTTATTATTT CTGGGTGAGGAGTAAGAGG AGC		
EGFR 切断型デ ザイン 2 (Her1 切 断型デザイン 2) (HER1t2)	78	CGCAAAGTGTGTAACGGAA TAGGTATTGGTGAATTTAAA GACTCACTCTCCATAAATGC TACGAATATTAACACTTCA AAACTGCACCTCCATCAGT GGCGATCTCCACATCCTGCC GGTGGCATTAGGGGTGACT CCTTCACACATACTCCTCT CTGGATCCACAGGAACTGG ATATTCTGAAAACCGTAAAG GAAATCACAGGGTTTTTGCT GATTCAGGCTTGGCCTGAAA ACAGGACGGACCTCCATGCC TTTGAGAACCTAGAAATCAT ACGCGGCAGGACCAAGCAA CATGGTCAGTTTTCTCTTGC AGTCGTGAGCCTGAACATAA CATCCTTGGGATTACGCTCC CTCAAGGAGATAAGTGATG GAGATGTGATAATTCAGGA AACAAAAATTTGTGCTATGC AAATACAATAAACTGGAAA AAACTGTTTGGGACCTCCGG TCAGAAAACCAAAATTATA AGCAACAGAGGTGAAAACA GCTGCAAGGCCACAGGCCA GGTCTGCCATGCCTTGTGCT CCCCGAGGGCTGCTGGGGC CCGAGCCCAGGGACTGCG TCTCTTGCCGGAATGTCAGC CGAGGCAGGGAATGCGTGG ACAAGGGTGGCGGTGGCTC GGGCGGTGGTGGGTCGGGT GGCGGCGGATCTGGTGGCG GTGGCTCGTTTTGGGTGCTG GTGGTGGTTGGTGGAGTCCT GGCTTGCTATAGCTTGCTAG TAACAGTGGCCTTTATTATT TTCTGGGTGAGGAGTAAGA GGAGC	191	RKVCNGIGIGEFKDSLSINA TNIKHFKNCTISISDLHILPV AFRGDSFTHTPPLDPQELDI LKTVEITGFLLIQAWPENR TDLHAFENLEIRGRKQHG QFSLAVVSLNITSLGLRSLK EISDGDVIISGNKNLCYANTI NWKKLFGTSGQKTKIISNR GENSCKATGQVCHALCSPE GCWGPEDRDCVSCRNVSRG RECVDKGGGSGGGGSGG GGSGGGGFWVLVVVGGV LACYSLVTVAFIIFWVRSK RS

10

20

30

40

【 0 3 1 7 】

【表 3 - 4】

細胞タグ名	配列 番号	ポリヌクレオチド配列(該当する 場合、5'～3')	配列 番号	アミノ酸配列(該当する場合、 5'～3')
EGFR 切断型デザイン 3 (Her1 切断型デザイン 3) (HER1t3)	79	CGCAAAGTGTGTAACGGAA TAGGTATTGGTGAATTTAAA GACTCACTCTCCATAAATGC TACGAATATTAACACTTCA AAAACCTGCACCTCCATCAGT GGCGATCTCCACATCCTGCC GGTGGCATTAGGGGTGACT CCTTCACACATACTCCTCCT CTGGATCCACAGGAAGTGG ATATTCTGAAAACCGTAAAG GAAATCACAGGGTTTTTGCT GATTCAGGCTTGGCCTGAAA ACAGGACGGACCTCCATGCC TTTGAGAACCTAGAAATCAT ACGCGGCAGGACCAAGCAA CATGGTCAGTTTTCTCTTGC AGTCGTCAGCCTGAACATAA CATCCTTGGGATTACGCTCC CTCAAGGAGATAAGTGATG GAGATGTGATAATTTAGGA AACAAAAATTTGTGCTATGC AAATACAATAAACTGGAAA AAACTGTTTGGGACCTCCGG TCAGAAAACCAAAATTATA AGCAACAGAGGTGAAAACA GCTGCAAGGCCACAGGCCA GGTCTGCCATGCCTTGTGCT CCCCGAGGGCTGCTGGGGC CCGAGCCCAGGGACTGCG TCTCTTGCCGGAATGTCAGC CGAGGCAGGGAATGCGTGG ACAAGTGCAACCTTCTGGAG GGTGAGCCAAGGGAGTTTGT GGAGAACTCTGAGTGCATAC AGGGTGGCGGTGGCTCGGG CGGTGGTGGGTGCGGTGGC GGCGGATCTGGTGGCGGTG GCTCGTTTTGGGTGCTGGTG GTGGTTGGTGGAGTCTTGGC TTGCTATAGCTTGTAGTAA CAGTGGCCTTTATTATTTTCT GGGTGAGGAGTAAGAGGAG C	192	RKVCNGIGIGEFKDSLINA TNIKHFKNCTISGDLHILPV AFRGDSFTHTPPLDPQELDI LKTVKEITGFLLIQAWPENR TDLHAFENLEIRGRKQHG QFSLAVVSLNITSLGLRSLK EISDGDVVISGNKNLCYANTI NWKKLFGTSGQKTKIISNR GENSKATGQVCHALCSPE GCWGPEPRDCVSCRNVSRG RECVDKCNLLEGEPREFVE NSECIQGGGSGGGGSGGG GSGGGGSFWLVVVGVL ACYSLLVTVAFIIFWVRKR S

【 0 3 1 8 】

10

20

30

40

【表 3 - 5】

細胞タグ名	配列 番号	ポリヌクレオチド配列(該当する 場合、5'～3')	配列 番号	アミノ酸配列(該当する場合、 5'～3')
EGFR 切断型デザイン 4 (Her1 切断型デザイン 4) (HER1t4)	80	CGCAAAGTGTGTAACGGAA TAGGTATTGGTGAATTTAAA GACTCACTCTCCATAAATGC TACGAATATTAAACACTTCA AAAAGTGCACCTCCATCAGT GGCGATCTCCACATCCTGCC GGTGGCATTAGGGGTGACT CCTTCACACATACTCCTCCT CTGGATCCACAGGAAGTGG ATATTCTGAAAACCGTAAAG GAAATCACAGGGTTTTTGCT GATTCAGGCTTGGCCTGAAA ACAGGACGGACCTCCATGCC TTTGAGAACCTAGAAATCAT ACGCGGCAGGACCAAGCAA CATGGTCAGTTTTCTCTTGC AGTCGTCAGCCTGAACATAA CATCCTTGGGATTACGCTCC CTCAAGGAGATAAGTGATG GAGATGTGATAATTTGAGGA AACAAAAATTTGTGCTATGC AAATACAATAAACTGGAAA AAAGTGTGTTGGGACCTCCGG TCAGAAAACCAAAATTATA AGCAACAGAGGTGAAAACA GCTGCAAGGCCACAGGCCA GGTCTGCCATGCCTTGTGCT CCCCCGAGGGCTGCTGGGGC CCGGAGCCCAGGGACTGCG TCTCTTGCCGGAATGTCAGC CGAGGCAGGGAATGCGTGG ACAAGTGCAACCTTCTGGAG GGTGAGCCAAGGGAGTTTGT GGAGAACTCTGAGTGCATAC AGTGCCACCCAGAGTGCCTG CCTCAGGCCATGAACATCAC CTGCACAGGACGGGGACCA GACAAGTGTATCCAGGGCG GAGGCGGAAGCGGAGGCGG AGGCTCCGGCGGAGGCGGA AGCTTTTGGGTGCTGGTGGT GGTTGGTGGAGTCTGGCTT GCTATAGCTTGCTAGTAACA	193	RKVCNGIGIGEFKDSLINA TNIKHFKNCTISGDLHILPV AFRGDSFTHTPPLDPQELDI LKTVKEITGFLLIQAWPENR TDLHAFENLEIRGRTKQHG QFSLAVVSLNITSLGLRSLK EISDGDVVISGNKNCYANTI NWKKLFGTSGQTKIISNR GENSKATGQVCHALCSPE GCWGPEPRDCVSCRNVSRG RECVDKCNLLEGEPREFVE NSECIQCHPECLPQAMNITC TGRGPDNCIQGGGSGGGG SGGGGSFWVLVVVGGLA CYSLLVTVAFIIFWVRKRS

【 0 3 1 9 】

10

20

30

40

【表 3 - 6】

細胞タグ名	配列 番号	ポリヌクレオチド配列(該当する 場合、5'~3')	配列 番号	アミノ酸配列(該当する場合、 5'~3')
		GTGGCCTTTATTATTTTCTGG GTGAGGAGTAAGAGGAGC		
EGFR 切断型デザイン 5 (Her1 切断型デザイン 5) (HER1t5)	81	CGCAAAGTGTGTAACGGAA TAGGTATTGGTGAATTTAAA GACTCACTCTCCATAAATGC TACGAATATTAAACACTTCA AAAAGTGCACCTCCATCAGT GGCGATCTCCACATCCTGCC GGTGGCATTAGGGGTGACT CCTTCACACATACTCCTCCT CTGGATCCACAGGAACTGG ATATTCTGAAAACCGTAAAG GAAATCACAGGGTTTTTGCT GATTCAGGCTTGGCCTGAAA ACAGGACGGACCTCCATGCC TTTGAGAACCTAGAAATCAT ACGCGGCAGGACCAAGCAA CATGGTCAGTTTTCTCTTGC AGTCGTCAGCCTGAACATAA CATCCTTGGGATTACGCTCC CTCAAGGAGATAAGTGATG GAGATGTGATAATTTTCAGGA AACAAAAATTTGTGCTATGC AAATACAATAAACTGGAAA AAACTGTTTGGGACCTCCGG TCAGAAAACCAAAATTATA AGCAACAGAGGTGAAAACA GCTGCAAGGCCACAGGCCA GGTCTGCCATGCCTTGTGCT CCCCGAGGGCTGCTGGGGC CCGGAGCCCAGGGACTGCG TCTCTTGCCGGAATGTCAGC CGAGGCAGGGAATGCGTGG ACAAGTGCAACCTTCTGGAG GGTGAGCCAAGGGAGTTTGT GGAGAACTCTGAGTGCATAC AGTGCCACCCAGAGTGCCTG CCTCAGGCCATGAACATCAC CTGCACAGGACGGGGACCA GACAACTGTATCCAGTGTGC CCACTACATTGACGGCCCCC ACTGCGTCAAGACCGGCGG AGGCGGAAGCGGAGGCGGA	194	RKVCNGIGIGEFKDSLINA TNIKHFKNCTISISDLHILPV AFRGDSFTHTPPLDPQELDI LKTVKEITGFLLIQAWPENR TDLHAFENLEIIRGRTKQHG QFSLAVVSLNITSLGLRSLK EISDGDVIISGNKNLCYANTI NWKKLFGTSGQKTKIISNR GENSKATGQVCHALCSPE GCWGPEPRDCVSCRNVSRG RECVDKCNLLEGEPREFVE NSECIQCHPECLPQAMNITC TGRGPDNCIQCAHYIDGPH CVKTGGGGSGGGSGGGG SFWVLVVVGGVLACYSLL VTVAFIIFWVRSKRS

【 0 3 2 0 】

10

20

30

40

【表 3 - 7】

細胞タグ名	配列 番号	ポリヌクレオチド配列(該当する 場合、5'~3')	配列 番号	アミノ酸配列(該当する場合、 5'~3')
		GGCTCCGGCGGAGGCGGAA GCTTTTGGGTGCTGGTGGTG GTTGGTGGAGTCCTGGCTTG CTATAGCTTGCTAGTAACAG TGGCCTTTATTATTTCTGGG TGAGGAGTAAGAGGAGC		
EGFR 切断型デ ザイン 6 (Her1 切 断型デザイン 6) (HER1t6)	82	CGCAAAGTGTGTAACGGAA TAGGTATTGGTGAATTTAAA GACTCACTCTCCATAAATGC TACGAATATTAAACACTTCA AAAAGTGCACCTCCATCAGT GGCGATCTCCACATCCTGCC GGTGGCATTAGGGGTGACT CCTTCACACATACTCCTCCT CTGGATCCACAGGAAGTGG ATATTCTGAAAACCGTAAAG GAAATCACAGGGTTTTGCT GATTCAGGCTTGGCCTGAAA ACAGGACGGACCTCCATGCC TTTGAGAACCTAGAAATCAT ACGCGGCAGGACCAAGCAA CATGGTCAGTTTTCTCTTGC AGTCGTCAGCCTGAACATAA CATCCTTGGGATTACGCTCC CTCAAGGAGATAAGTGATG GAGATGTGATAATTTTCAAG AACAAAAATTTGTGCTATGC AAATACAATAAACTGGAAA AAACTGTTTGGGACCTCCGG TCAGAAAACCAAAATTATA AGCAACAGAGGTGAAAACA GCTGCAAGGCCACAGGCCA GGTCTGCCATGCCTTGTGCT CCCCGAGGGCTGCTGGGGC CCGGAGCCCAGGGACTGCG TCTCTTGCCGGAATGTCAGC CGAGGCAGGGAATGCGTGG ACAAGTGCAACCTTCTGGAG GGTGAGCCAAGGGAGTTTGT GGAGAACTCTGAGTGCATAC AGTGCCACCCAGAGTGCCTG CCTCAGGCCATGAACATCAC CTGCACAGGACGGGGACCA	195	RKVCNGIGIGEFKDSLSINA TNIKHFKNCTSISGDLHILPV AFRGDSFTHTPPLDPQELDI LKTVEITGFLLIQAWPENR TDLHAFENLEIIRGRTKQHG QFSLAVVSLNITSLGLRSLK EISDGDVIISGNKNLCYANTI NWKKLFGTSGQKTKIISNR GENSKATGQVCHALCSPE GCWGPEPRDCVSCRNVSRG RECVDKCNLLEGEPREFVE NSECIQCHPECLPQAMNITC TGRGPDNCIQCAHYIDGPH CVKTCPAGVMGENNTLVW KYADAGHVCHLGGGGSGG GGSFVVLVVVGGVLACYS LLVTVAFIIFWVRSKRS

10

20

30

40

【 0 3 2 1 】

【表 3 - 8】

細胞タグ名	配列 番号	ポリヌクレオチド配列(該当する 場合、5'~3')	配列 番号	アミノ酸配列(該当する場合、 5'~3')
		GACAACGTGTATCCAGTGTGC CCACTACATTGACGGCCCCC ACTGCGTCAAGACCTGCCCCG GCAGGAGTCATGGGAGAAA ACAACACCCTGGTCTGGAAG TACGCAGACGCCGGCCATGT GTGCCACCTGGGCGGAGGC GGAAGCGGAGGCGGAGGCT CCTTTTGGGTGCTGGTGGTG GTTGGTGGAGTCCTGGCTTG CTATAGCTTGCTAGTAACAG TGGCCTTTATTATTTCTGGG TGAGGAGTAAGAGGAGC		
EGFR 切断型デ ザイン 7 (Her1 切 断型デザイン 7) (HER1t7)	83	CGCAAAGTGTGTAACGGAA TAGGTATTGGTGAATTTAAA GACTCACTCTCCATAAATGC TACGAATATTAAACACTTCA AAACTGCACCTCCATCAGT GGCGATCTCCACATCCTGCC GGTGGCATTAGGGGTGACT CCTTCACACATACTCCTCCT CTGGATCCACAGGAAGTGG ATATTCTGAAAACCGTAAAG GAAATCACAGGGTTTTTGCT GATTCAGGCTTGGCCTGAAA ACAGGACGGACCTCCATGCC TTTGAGAACCTAGAAATCAT ACGCGGCAGGACCAAGCAA CATGGTCAGTTTTCTCTTGC AGTCGTCAGCCTGAACATAA CATCCTTGGGATTACGCTCC CTCAAGGAGATAAGTGATG GAGATGTGATAATTCAGGA AACAAAAATTTGTGCTATGC AAATACAATAAACTGGAAA AAACTGTTTGGGACCTCCGG TCAGAAAACCAAAATTATA AGCAACAGAGGTGAAAACA GCTGCAAGGCCACAGGCCA GGTCTGCCATGCCTTGTGCT CCCCGAGGGCTGCTGGGGC CCGGAGCCCAGGGACTGCG TCTCTTGCCGGAATGTCAGC	196	RKVCNGIGIGEFKDSLINA TNIKHFKNCTISISDLHILPV AFRGDSFTHTPPLDPQELDI LKTVKEITGFLLIQAWPENR TDLHAFENLEIRGR TKQHG QFSLAVVSLNITSLGLRSLK EISDGDVIISGNKNLCYANTI NWKKLFGTSGQKTKIISNR GENSKATGQVCHALCSPE GCWGPPEPRDCVSCRNVSRG RECVDKCNLLEGEPREFVE NSECIQCHPECLPQAMNITC TGRGPDNCIQCAHYIDGPH CVKTCPAGVMGENNTLVW KYADAGHVCHLCHPNCTY GCTGPGLEGCPGGGGGGSF WVLVVVGVLACYSLLVT VAFIIFWVRSKRS*

【 0 3 2 2 】

10

20

30

40

【表 3 - 9】

細胞タグ名	配列 番号	ポリヌクレオチド配列(該当する 場合、5'～3')	配列 番号	アミノ酸配列(該当する場合、 5'～3')
		CGAGGCAGGGAATGCGTGG ACAAGTGCAACCTTCTGGAG GGTGAGCCAAGGGAGTTTGT GGAGAACTCTGAGTGCATAC AGTGCCACCCAGAGTGCCTG CCTCAGGCCATGAACATCAC CTGCACAGGACGGGGACCA GACAACTGTATCCAGTGTGC CCACTACATTGACGGCCCCC ACTGCGTCAAGACCTGCCCCG GCAGGAGTCATGGGAGAAA ACAACACCCTGGTCTGGAAG TACGCAGACGCCGGCCATGT GTGCCACCTGTGCCATCCAA ACTGCACCTACGGATGCACT GGGCCAGGTCTTGAAGGCTG TCCAGGTGGCGGTGGCGGC GGATCTTTTTGGGTGCTGGT GGTGGTTGGTGGAGTCCTGG CTTGCTATAGCTTGCTAGTA ACAGTGGCCTTTATTATTTT CTGGGTGAGGAGTAAGAGG AGCTAA		
EGFR 切断型デ ザイン 8 (Her1 切 断型デザイン 8) (HER1t8)	84	CGCAAAGTGTGTAACGGAA TAGGTATTGGTGAATTTAAA GACTCACTCTCCATAAATGC TACGAATATTAAACACTTCA AAAAGTGCACCTCCATCAGT GGCGATCTCCACATCCTGCC GGTGGCATTAGGGGTGACT CCTTCACACATACTCCTCCT CTGGATCCACAGGAACTGG ATATTCTGAAAACCGTAAAG GAAATCACAGGGTTTTTGCT GATTCAGGCTTGGCCTGAAA ACAGGACGGACCTCCATGCC TTTGAGAACCTAGAAATCAT ACGCGGCAGGACCAAGCAA CATGGTCAGTTTTCTCTTGC AGTCGTCAGCCTGAACATAA CATCCTTGGGATTACGCTCC CTCAAGGAGATAAGTGATG GAGATGTGATAATTCAGGA	197	RKVCNGIGIGEFKDSLINA TNIKHFKNCTSSISGDLHILPV AFRGDSFTHTPPLDPQELDI LKTVKEITGFLLIQAWPENR TDLHAFENLEIIRGRKQHG QFSLAVVSLNITSLGLRSLK EISDGDVIISGNKNLCYANTI NWKKLFGTSGQKTKIISNR GENSCKATGQVCHALCSPE GCWGPPEPRDCVSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSEITLII FGVMAGVIGTILLISYGIRR GGGS

【 0 3 2 3 】

10

20

30

40

50

【表 3 - 1 0】

細胞タグ名	配列 番号	ポリヌクレオチド配列(該当する 場合、5'~3')	配列 番号	アミノ酸配列(該当する場合、 5'~3')
		AACAAAAATTTGTGCTATGC AAATACAATAAACTGGAAA AAAGTGTGGGACCTCCGG TCAGAAAACCAAAATTATA AGCAACAGAGGTGAAAACA GCTGCAAGGCCACAGGCCA GGTCTGCCATGCCTTGTGCT CCCCCGAGGGCTGCTGGGGC CCGGAGCCCAGGGACTGCG TCTCTGGTGGCGGTGGCTCG GGCGGTGGTGGGTGCGGTG GCGGCGGATCTGGTGGCGGT GGCTCGGAGATAACACTCAT TATTTTGGGGTGATGGCTG GTGTTATTGGAACGATCCTC TTAATTTCTTACGGTATTCG CCGAGGAGGTGGAAGC		
EGFR 切断型デザイン 9 (Her1 切断型デザイン 9) (HER1t9)	85	CGCAAAGTGTGTAACGGAA TAGGTATTGGTGAATTTAAA GACTCACTCTCCATAAATGC TACGAATATTAAACACTTCA AAAACTGCACCTCCATCAGT GGCGATCTCCACATCCTGCC GGTGGCATTAGGGGTGACT CCTTCACACATACTCCTCCT CTGGATCCACAGGAAGTGG ATATTCTGAAAACCGTAAAG GAAATCACAGGGTTTTGTCT GATTGAGGCTTGGCCTGAAA ACAGGACGGACCTCCATGCC TTTGAGAACCTAGAAATCAT ACGCGGCAGGACCAAGCAA CATGGTCAGTTTTCTCTTGC AGTCGTCAGCCTGAACATAA CATCCTTGGGATTACGCTCC CTCAAGGAGATAAGTGATG GAGATGTGATAATTTGAGGA AACAAAAATTTGTGCTATGC AAATACAATAAACTGGAAA AAAGTGTGGGACCTCCGG TCAGAAAACCAAAATTATA AGCAACAGAGGTGAAAACA GCTGCAAGGCCACAGGCCA	198	RKVCNGIGIGEFKDSLINA TNIKHFKNCTSSISGDLHILPV AFRGDSFTHTPPLDPQELDI LKTVKEITGFLLIQAWPENR TDLHAFENLEIIRGRKQHG QFSLAVVSLNITSLGLRSLK EISDGDVIISGNKNLCYANTI NWKKLFGTSGQKTKIISNR GENSCKATGQVCHALCSPE GCWGPEDRDCVSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSITLIIF GVMAGVIGTILLISYGIGGG S

10

20

30

40

【 0 3 2 4】

【表 3 - 1 1】

細胞タグ名	配列 番号	ポリヌクレオチド配列(該当する 場合、5'～3')	配列 番号	アミノ酸配列(該当する場合、 5'～3')
		GGTCTGCCATGCCTTGTGCT CCCCGAGGGCTGCTGGGGC CCGGAGCCCAGGGACTGCG TCTCTGGTGGCGGTGGCTCG GGCGGTGGTGGGTCGGGTG GCGGCGGATCTGGTGGCGGT GGCTCGATAACACTCATTAT TTTTGGGGTGATGGCTGGTG TTATTGGAACGATCCTCTTA ATTTCTTACGGTATTGGAGG TGGAAGC		
EGFR 切断型デザイン 10 (Her1 切断型デザイン 10) (HER1t10)	86	CGCAAAGTGTGTAACGGAA TAGGTATTGGTGAATTTAAA GACTCACTCTCCATAAATGC TACGAATATTAAACACTTCA AAAACCTGCACCTCCATCAGT GGCGATCTCCACATCCTGCC GGTGGCATTAGGGGTGACT CCTTCACACATACTCCTCCT CTGGATCCACAGGAAGTGG ATATTCTGAAAACCGTAAAG GAAATCACAGGGTTTTTGCT GATTCAGGCTTGGCCTGAAA ACAGGACGGACCTCCATGCC TTTGAGAACCTAGAAATCAT ACGCGGCAGGACCAAGCAA CATGGTCAGTTTTCTCTTGC AGTCGTCAGCCTGAACATAA CATCCTTGGGATTACGCTCC CTCAAGGAGATAAGTGATG GAGATGTGATAATTTAGGA AACAAAAATTTGTGCTATGC AAATACAATAAACTGGAAA AAACTGTTTGGGACCTCCGG TCAGAAAACCAAAATTATA AGCAACAGAGGTGAAAACA GCTGCAAGGCCACAGGCCA GGTCTGCCATGCCTTGTGCT CCCCGAGGGCTGCTGGGGC CCGGAGCCCAGGGACTGCG TCTCTGGTGGCGGTGGCTCG GGCGGTGGTGGGTCGGGTG GCGGCGGATCTGGTGGCGGT	199	RKVCNGIGIGEFKDSLSINA TNIKHFKNCTSSISGDLHILPV AFRGDSFTHTPPLDPQELDI LKTVKEITGFLLIQAWPENR TDLHAFENLEIIRGR TKQHG QFSLAVVSLNITSLGLRSLK EISDGDVSIISGNKNLCYANTI NWKKLFGTSGQKTKIISNR GENSCKATGQVCHALCSPE GCWGPEPRDCVSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSITLIIF GVMAGVIGTILLALLIWGG GS

【 0 3 2 5】

10

20

30

40

【表 3 - 1 2】

細胞タグ名	配列 番号	ポリヌクレオチド配列(該当する 場合、5'～3')	配列 番号	アミノ酸配列(該当する場合、 5'～3')
		GGCTCGATAACACTCATTAT TTTTGGGGTGATGGCTGGTG TTATTGGAACGATCCTCTTA GCCCTGCTCATCTGGGGAGG TGGAAGC		
EGFR 切断型デザイン 11 (Her1 切断型デザイン 11) (HER1t11)	87	CGCAAAGTGTGTAACGGAA TAGGTATTGGTGAATTTAAA GACTCACTCTCCATAAATGC TACGAATATTAACACTTCA AAAAGTGCACCTCCATCAGT GGCGATCTCCACATCCTGCC GGTGGCATTAGGGGTGACT CCTTCACACATACTCCTCCT CTGGATCCACAGGAACTGG ATATTCTGAAAACCGTAAAG GAAATCACAGGGTTTTTGCT GATTCAGGCTTGGCCTGAAA ACAGGACGGACCTCCATGCC TTTGAGAACCTAGAAATCAT ACGCGGCAGGACCAAGCAA CATGGTCAGTTTTCTCTTGC AGTCGTCAGCCTGAACATAA CATCCTTGGGATTACGCTCC CTCAAGGAGATAAGTGATG GAGATGTGATAATTTAGGA AACAAAAATTTGTGCTATGC AAATACAATAAACTGGAAA AAACTGTTTGGGACCTCCGG TCAGAAAACCAAAATTATA AGCAACAGAGGTGAAAACA GCTGCAAGGCCACAGGCCA GGTCTGCCATGCCTTGTGCT CCCCCGAGGGCTGCTGGGGC CCGGAGCCCAGGGACTGCG TCTCTGGTGGCGGTGGCTCG GGCGGTGGTGGGTCGGGTG GCGGCGGATCTGGTGGCGGT GGCTCGCTCTGCTACCTGCT GGATGGAATCCTCTTCATCT ATGGTGTCATTCTCACTGCC TTGTTCTGAGGAGGTGGAAG C	200	RKVCNGIGIGEFKDSLINA TNIKHFKNCTSSISGDLHILPV AFRGDSFTHTPPLDPQELDI LKTVKEITGFLLIQAWPENR TDLHAFENLEIRGRTKQHG QFSLAVVSLNITSLGLRSLK EISDGDVIISGNKNLCYANTI NWKKLFGTSGQKTKIISNR GENSCKATGQVCHALCSPE GCWGPEPRDCVSGGGGSG GGSGGGGSGGGGSLCYLL DGILFIYGVILTALFLGGGS

【 0 3 2 6 】

10

20

30

40

50

【表 3 - 1 3】

細胞タグ名	配列 番号	ポリヌクレオチド配列(該当する 場合、5'~3')	配列 番号	アミノ酸配列(該当する場合、 5'~3')
FL CD20	88	ATGACAACACCCAGAAATTC AGTAAATGGGACTTTCCCGG CAGAGCCAATGAAAGGCC TATTGCTATGCAATCTGGTC CAAAACCACTCTTCAGGAGG ATGTCTTCACTGGTGGGCCC CACGCAAAGCTTCTTCATGA GGGAATCTAAGACTTTGGGG GCTGTCCAGATTATGAATGG GCTCTTCCACATTGCCCTGG GGGGTCTTCTGATGATCCCA GCAGGGATCTATGCACCCAT CTGTGTGACTGTGTGGTACC CTCTCTGGGGAGGCATTATG TATATTATTTCCGGATCACT CCTGGCAGCAACGGAGAAA AACTCCAGGAAGTGTGGT CAAAGGAAAAATGATAATG AATTCATTGAGCCTCTTTGC TGCCATTTCTGGAATGATTC TTTCAATCATGGACATACTT AATATTAATAATTTCCCATTT TTTAAAAATGGAGAGTCTGA ATTTTATTAGAGCTCACACA CCATATATTAACATATACAA CTGTGAACCAGCTAATCCCT CTGAGAAAAACTCCCCATCT ACCCAATACTGTTACAGCAT ACAATCTCTGTTCTTGGGCA TTTTGTCAGTGATGCTGATC TTTGCCTTCTTCCAGGAACT TGTAATAGCTGGCATCGTTG AGAATGAATGGAAAAGAAC GTGCTCCAGACCCAAATCTA ACATAGTTCTCCTGTCAGCA GAAGAAAAAAAAGAACAGA CTATTGAAATAAAAGAAGA AGTGGTTGGGCTAACTGAAA CATCTTCCCAACCAAAGAAT GAAGAAGACATTGAAATTA TTCCAATCCAAGAAGAGGA AGAAGAAGAAACAGAGACG AACTTCCAGAACCTCCCCA	201	MTTPRNSVNGTFPAEPMKG PIAMQSGPKPLFRRMSSLVG PTQSFFMRESKTLGAVQIM NGLFHIALGLLMIPAGIYA PICVTWYPLWGGIMYIISG SLLAATEKNSRKCLVKGKM IMNSLSLFAAISGMILSIMDI LNIKISHFLKMESLNFIRAHT PYINIYNCEPANPSEKNSPST QYCYSIQSLFLGILSVMLIFA FFQELVIAGIVENEWKRTCS RPKSNIVLLSAEEKKEQTIEI KEEVVGLTETSSQPKNEEDI EIPIQEEEEETETNFPPEPPQ DQESSPIENDSSP
				10
				20
				30
				40

【 0 3 2 7】

【表 3 - 1 4】

細胞タグ名	配列 番号	ポリヌクレオチド配列(該当する 場合、5'～3')	配列 番号	アミノ酸配列(該当する場合、 5'～3')
		AGATCAGGAATCCTCACCAA TAGAAAATGACAGCTCTCCT		
切断型 CD20 デ ザイン 1(CD20t1) [CD20(M1-E263)]	89	ATGACCACACCACGGAATC TGTGAATGGCACCTTCCCAG CAGAGCCAATGAAGGGACC AATCGCAATGCAGAGCGGA CCCAAGCCTCTGTTTCGGAG AATGAGCTCCCTGGTGGGCC CAACCCAGTCCTTCTTTATG AGAGAGTCTAAGACACTGG GCGCCGTGCAGATCATGAAC GGACTGTTCCACATCGCCCT GGGAGGACTGCTGATGATCC CAGCCGGCATCTACGCCCCCT ATCTGCGTGACCGTGTGGTA CCCTCTGTGGGGCGGCATCA TGTATATCATCTCCGGCTCT CTGCTGGCCGCCACAGAGA AGAACAGCAGGAAGTGTCT GGTGAAGGGCAAGATGATC ATGAATAGCCTGTCCCTGTT TGCCGCCATCTCTGGCATGA TCCTGAGCATCATGGACATC CTGAACATCAAGATCAGCCA CTTCCTGAAGATGGAGAGCC TGAACCTTCATCAGAGCCAC ACCCCTTACATCAACATCTA TAATTGCGAGCCTGCCAACC CATCCGAGAAGAATTCTCCA AGCACACAGTACTGTTATTC CATCCAGTCTCTGTTCTGCG GCATCCTGTCTGTGATGCTG ATCTTTGCCTTCTTTCAGGA GCTGGTTCATCGCCGGCATCG TGGAGAACGAGTGGAAGAG GACCTGCAGCCGCCCAAGT CCAATATCGTGCTGCTGTCC GCCGAGGAGAAGAAGGAGC AGACAATCGAGATCAAGGA GGAGGTGGTGGGCCTGACC GAGACATCTAGCCAGCCTAA GAATGAGGAGGATATCGAG	202	MTTPRNSVNGTFPAEPMKG PIAMQSGPKPLFRRMSSLVG PTQSFFMRESKTLGAVQIM NGLFHIALGGLLMIPAGIYA PICVTWYPLWGGIMYIISG SLLAATEKNSRKCLVKGKM IMNSLSLFAAISGMILSIMDI LNIKISHFLKMESLNFIRAHT PYINIYNCEPANPSEKNSPST QYCYSIQSLFLGILSVMLIFA FFQELVIAGIVENEWKRTCS RPKSNIVLLSAEEKKEQTIEI KEEVVGLTETSSQPKNEEDI E

10

20

30

40

【 0 3 2 8】

さらなる実施形態では、前記遺伝子発現カセットのうちの少なくとも1つは、トランス活性化ドメインにより活性化するプロモーターをコードするポリヌクレオチドを含む。さらなる実施形態では、前記系は、1または複数のベクター内に含有される。1つの場合には、系は、1つのベクター内に含有される。1つの場合には、第1の遺伝子発現カセット、第2の遺伝子発現カセット、および組換え接合部位は、1つのベクター内に含有される。1つの場合には、第1の遺伝子発現カセット、第2の遺伝子発現カセット、第3の遺伝子発現カセット、および組換え接合部位は、1つのベクター内に含有される。別の場合には、セリンリコンビナーゼは、SF370である。他の場合には、セリンリコンビナーゼは、別個のベクター内にある。

50

【0329】

リコンビナーゼは、標的細胞へと、ターゲティングベクターの導入の前に導入することもでき、これと共時的に導入することもでき、この後で導入することもできる。リコンビナーゼは、例えば、リポソーム、粒子のコーティング、またはマイクロインジェクションを使用して、細胞へと、タンパク質として直接導入することができる。代替的に、適切な発現ベクターを使用して、リコンビナーゼをコードするDNAまたはメッセンジャーRNAである、ポリヌクレオチドを、細胞へと導入することもできる。上記で記載したターゲティングベクターの構成要素は、目的のリコンビナーゼをコードする配列を含有する発現カセットの構築において有用である。しかし、リコンビナーゼの発現は、他の方式で、例えば、リコンビナーゼの発現を、調節可能なプロモーター（すなわち、その発現を選択的に誘導または抑制するプロモーター）の制御下に置くことにより調節することもできる。

10

【0330】

本開示の実施における使用のためのリコンビナーゼは、組換えにより作製することもでき、既に記載された通りに精製することもできる。所望のリコンビナーゼ活性を有するポリペプチドは、当技術分野で公知の方法であって、タンパク質の硫酸アンモニウム沈殿の方法、サイズ分画、アフィニティークロマトグラフィー、HPLC、イオン交換クロマトグラフィー、ヘパリンアガロースアフィニティークロマトグラフィー（例えば、Thorpe & Smith, Proc. Nat. Acad. Sci. 95:5505-5510, 1998）を含むがこれらに限定されないタンパク質精製の方法により、所望の純度まで精製することができる。

20

【0331】

一実施形態では、リコンビナーゼを、任意の適切な方法による組換えが所望される組換え接合部位を含有する真核細胞へと導入することができる。当技術分野では、例えば、マイクロインジェクションまたは他の方法により、機能的タンパク質を、細胞へと導入する方法が周知である。精製リコンビナーゼタンパク質の導入は、タンパク質の一過性の存在、およびその機能を確保するが、これは、好ましい実施形態であることが多い。代替的に、リコンビナーゼをコードする遺伝子は、細胞を形質転換するのに使用される発現ベクターであって、リコンビナーゼをコードするポリヌクレオチドを、真核細胞内のポリヌクレオチドの発現を媒介するプロモーターに作動可能に連結した、発現ベクター内に含まれる。リコンビナーゼポリペプチドはまた、リコンビナーゼポリペプチドをコードするメッセンジャーRNAによっても、真核細胞へと導入することができる。リコンビナーゼは、核酸断片の、改変されるゲノムへの挿入に必要なような時間の間だけ存在することが一般に好ましい。したがって、大半の発現ベクターと関連する永続性の欠如は、有害ではないと予測される。リコンビナーゼ遺伝子を、目的の外因性ポリヌクレオチドの導入の前に導入することもでき、これと同時に導入することもでき、この後で導入することもできる。一実施形態では、リコンビナーゼ遺伝子は、挿入されるポリヌクレオチドを保有するベクター内に存在し、リコンビナーゼ遺伝子はなお、ポリヌクレオチド内にも、組み入れることができる。他の実施形態では、リコンビナーゼ遺伝子を、トランスジェニックの真核生物へと導入する。リコンビナーゼを、構成的に、あるいは細胞特異的プロモーター、組織特異的プロモーター、発生特異的プロモーター、細胞小器官特異的プロモーター、または低分子誘導性プロモーターもしくは低分子抑制性プロモーター下で発現させる、トランスジェニック細胞またはトランスジェニック動物を作製することができる。リコンビナーゼはまた、他のペプチド、タンパク質、核局在化シグナルペプチド、シグナルペプチド、または細胞小器官特異的シグナルペプチド（例えば、ミトコンドリア内またはクロロプラスト内の組換えを容易とする、ミトコンドリアまたはクロロプラストにおけるトランジットペプチド）との融合タンパク質としても発現させることができる。

30

40

【0332】

例えば、リコンビナーゼは、インテグラーゼファミリーまたはリゾルバーゼファミリーに由来する。リコンビナーゼのインテグラーゼファミリーは、100を超えるメンバーを有し、例えば、FLP、Cre、およびラムダインテグラーゼを含む。インテグラーゼファミリーはまた、チロシンファミリーまたはラムダインテグラーゼファミリーとも称し

50

、DNAのホスホジエステル結合に対する求核攻撃のために、チロシンの触媒性ヒドロキシル基を使用する。典型的に、チロシンファミリーのメンバーはまず、DNAにニックを入れ、これにより、その後、二重鎖切断を形成する。チロシンファミリーインテグラーゼの例は、Creインテグラーゼ、FLPインテグラーゼ、SSV1インテグラーゼ、およびラムダ(λ)インテグラーゼを含む。セリンリコンビナーゼファミリーとしてもまた公知の、リゾルバーゼファミリーでは、保存性セリン残基が、DNA標的部点への共有結合性連結を形成する(Grindley, et al., (2006) Ann Rev Biochem 16:16)。

【0333】

一実施形態では、リコンビナーゼは、SPβc2リコンビナーゼ、SF370.1リコンビナーゼ、Bxb1リコンビナーゼ、A118リコンビナーゼ、およびΦRv1リコンビナーゼからなる群から選択されるリコンビナーゼをコードする核酸配列を含む、単離ポリヌクレオチド配列である。セリンリコンビナーゼの例については、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、米国特許第9,034,652号明細書において詳細に記載されている。

【0334】

一実施形態では、部位特異的組換えのための方法は、第1の組換え部点および第2の組換え部点を用意するステップと、第1の組換え部点および第2の組換え部点を、原核細胞のリコンビナーゼポリペプチドと接触させる結果として、組換え部点の間の組換えをもたらすステップとを含み、リコンビナーゼポリペプチドは、第1の組換え部点と、第2の組換え部点との組換えを媒介することが可能であり、第1の組換え部点は、attPまたはattBであり、第2の組換え部点は、attBまたはattPであり、第1の組換え接合部点、attBである場合、第2の組換え接合部点は、attPであり、第1の組換え接合部点、attPである場合、第2の組換え接合部点は、attBであるという条件で、リコンビナーゼは、リステリア・モノサイトゲネス(*Listeria monocytogenes*)のファージリコンビナーゼ、化膿連鎖球菌(*Streptococcus pyogenes*)のファージリコンビナーゼ、枯草菌(*Bacillus subtilis*)のファージリコンビナーゼ、結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)のファージリコンビナーゼ、およびスメグマ菌(*Mycobacterium smegmatis*)のファージリコンビナーゼからなる群から選択される。さらなる実施形態は、部位特異的リコンビナーゼの、ゲノムが改変される細胞への導入を提供する。一実施形態は、真核細胞内の部位特異的組換えを得るための方法であって、第1の組換え接合部点および第2の組換え接合部点を含む真核細胞を用意するステップと、第1の組換え接合部点および第2の組換え接合部点を、原核細胞のリコンビナーゼポリペプチドと接触させる結果として、組換え接合部点の間の組換えをもたらすステップとを含み、リコンビナーゼポリペプチドが、第1の組換え接合部点と、第2の組換え接合部点との組換えを媒介することが可能であり、第1の組換え接合部点、ファージゲノムの組換え接合部点(attP)、または細菌ゲノムの組換え接合部点(attB)であり、第2の組換え接合部点、attBまたはattPであり、第1の組換え接合部点、attBである場合、第2の組換え接合部点、attPであり、第1の組換え接合部点、attPである場合、第2の組換え接合部点、attBであるという条件で、リコンビナーゼが、リステリア・モノサイトゲネス(*Listeria monocytogenes*)のファージリコンビナーゼ、化膿連鎖球菌(*Streptococcus pyogenes*)のファージリコンビナーゼ、枯草菌(*Bacillus subtilis*)のファージリコンビナーゼ、結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)のファージリコンビナーゼ、およびスメグマ菌(*Mycobacterium smegmatis*)のファージリコンビナーゼからなる群から選択される、方法に関する。ある実施形態では、リコンビナーゼは、A118リコンビナーゼ、SF370.1リコンビナーゼ、SPβc2リコンビナーゼ、ΦRv1リコンビナーゼ、およびBxb1リコンビナーゼからなる群から選択される。一実施形態では、組換えは、組込みを結果としてもたらす。

【0335】

免疫エフェクター細胞の供給源

ある特定の態様では、本明細書に記載される実施形態は、リダイレクトされた、抗原特

異的免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞、NK細胞、またはNK T細胞）を作り出し、かつ／またはこれを拡大増殖させる方法であって、細胞に、CARをコードするDNA（またはRNA）構築物を含有する発現ベクターによりトランスフェクトし、次いで、任意選択で、細胞を、フィーダー細胞、組換え抗原、または受容体に対する抗体で刺激して、細胞を増殖させるステップを含む方法を含む。ある特定の態様では、CARまたはTCRを発現するように操作された細胞（または細胞集団）は、幹細胞、iPS細胞、免疫エフェクター細胞、またはこれらの細胞の前駆細胞である。

【0336】

免疫エフェクター細胞の供給源は、同種供給源および自家供給源の両方を含みうる。場合によって、免疫エフェクター細胞は、幹細胞または人工多能性幹細胞（iPSC）から分化させることもできる。したがって、実施形態に従い操作するための細胞は、臍帯血、末梢血、ヒト胚性幹細胞、またはiPSCから単離することができる。例えば、同種T細胞は、キメラ抗原受容体を含むように（そして、任意選択で、機能的なTCRを欠くように）改変することができる。一部の態様では、免疫エフェクター細胞は、ヒト末梢血単核細胞（PBMC）に由来するT細胞などの初代ヒトT細胞である。PBMCは、末梢血から回収することもでき、G-CSF（顆粒球コロニー刺激因子）による刺激の後で、骨髓または臍帯血から回収することもできる。トランスフェクションまたは形質導入（例えば、CAR発現構築物の）の後、細胞を、速やかに輸注することもでき、凍結保存することもできる。ある特定の態様では、トランスフェクションの後、細胞は、細胞への遺伝子導入後、約1、2、3、4、5日間またはこれを超える日数以内に、ex vivoにおいて、バルク集団として、数日間、数週間、または数カ月間にわたり繁殖させることができる。さらなる態様では、トランスフェクションの後、トランスフェクト細胞を、クローニングし、組み込まれるか、またはエピソーム内に維持された、単一の発現カセットまたはプラスミドの存在、およびキメラ抗原受容体の発現を裏付けるクローンを、ex vivoにおいて拡大増殖させる。拡大増殖のために選択されたクローンは、抗原を発現する標的細胞を特異的に認識し、溶解させる能力を裏付ける。組換えT細胞は、IL-2または共通のガンマ鎖に結合する他のサイトカイン（例えば、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21、および他のサイトカイン）を伴う刺激により拡大増殖させることができる。組換えT細胞は、人工抗原提示細胞を伴う刺激により拡大増殖させることができる。組換えT細胞は、人工抗原提示細胞に接する形で拡大増殖させることもでき、T細胞表面上のCD3を架橋する、OKT3などの抗体により拡大増殖させることもできる。組換えT細胞のサブセットは、磁気ビーズベースの単離法および／または蛍光活性化細胞分取技術の使用により、さらに選択することができ、AaPCと共にさらに培養することができる。さらなる態様では、遺伝子改変細胞は、凍結保存することができる。

【0337】

T細胞はまた、末梢血、骨髓、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位に由来する組織、腹水、胸水、脾臓組織、および腫瘍（腫瘍浸潤リンパ球）を含む、多数の供給源からも得ることができる。本開示の、ある特定の実施形態では、当技術分野において入手可能な、任意の数のT細胞株を使用することができる。本開示の、ある特定の実施形態では、T細胞は、Ficoll（登録商標）分離など、当業者に公知の、任意の数の技法を使用して、対象から回収された血液単位から得ることができる。複数の実施形態では、個体の循環血液に由来する細胞は、アフエレーシスにより得る。アフエレーシス生成物は、典型的に、T細胞、単球、顆粒球、B細胞、他の有核白血球、赤血球、および血小板を含むリンパ球を含有する。一実施形態では、アフエレーシスにより回収された細胞を洗浄して、血漿画分を除去し、細胞を、その語における加工ステップのために、適切な緩衝液中または培地中に入れる。本開示の一実施形態では、細胞を、リン酸緩衝生理食塩液（PBS）で洗浄する。代替的な実施形態では、洗浄液は、カルシウムを欠き、マグネシウムを欠く場合もあり、全てではないが、多くの二価カチオンを欠く場合もある。カルシウムの非存在下における初期活性化ステップは、活性化の強化をもたらす。当業者がたやすく理解する通り、洗浄ステップは、製造元の指示書に従い、半自動式「フロースルー」型遠心分

10

20

30

40

50

離機（例えば、Cobe 2991細胞プロセッサ、Baxter CytoMate、またはHaemonetics Cell Saver 5）を使用することなど、当業者に公知の方法により達することができる。洗浄の後、細胞を、例えば、Ca²⁺非含有PBS、Mg²⁺非含有PBS、Plasmalyte A、または緩衝液を伴うかもしくは伴わない、他の生理食塩液溶液など、様々な生体適合性の緩衝液中に再懸濁させることができる。代替的に、アフェレーシス試料の、所望されない構成要素を除去し、細胞を、培養培地中に、直接再懸濁させることもできる。

【0338】

別の実施形態では、例えば、PERCOLL（登録商標）勾配を介する遠心分離、または対向流遠心溶出により、赤血球を溶解させ、単球を枯渇させることにより、T細胞を、末梢血リンパ球から単離する。CD3⁺、CD28⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺、およびCD45RO⁺T細胞など、T細胞の特異的亜集団も、陽性選択法または陰性選択法により、さらに単離することができる。例えば、一実施形態では、T細胞を、DYNABEADS（登録商標）M-450 CD3/CD28 Tなどの、抗CD3/抗CD28（すなわち、3×28）コンジュゲートビーズを伴う、所望のT細胞陽性選択に十分な時間にわたるインキュベーションにより単離する。一実施形態では、時間は、約30分間である。さらなる実施形態では、時間は、30分間～36時間、またはこれより長い時間、およびこれらの間の任意の整数値の時間の範囲である。さらなる実施形態では、時間は、少なくとも1、2、3、4、5、または6時間である。さらに別の実施形態では、時間は、10～24時間である。一実施形態では、インキュベーション時間は、24時間である。白血病を伴う患者からのT細胞の単離のための、24時間など、長いインキュベーション時間の使用は、細胞収率を増大させうる。腫瘍組織または免疫障害個体から、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を単離する状況など、T細胞が、他の細胞型と比較して少数である、任意の状況においては、より長いインキュベーション時間を使用してT細胞を単離することができる。さらに、長いインキュベーション時間の使用は、CD8⁺ T細胞の捕捉効率も増加させうる。したがって、単に、時間を短くするかまたは長くすることにより、T細胞を、CD3/CD28ビーズに結合させることが可能となり、かつ/またはビーズの、T細胞に対する比（本明細書で、さらに記載される通り）を増加もしくは減少させることにより、T細胞の亜集団を、培養の開始時、もしくは工程中の他の時点において、優先的に、陽性もしくは陰性に選択することができる。加えて、ビーズ上または他の表面上の、抗CD3および/または抗CD28抗体の比を増加または減少させることにより、T細胞の亜集団を、培養の開始時、または他の所望の時点において、優先的に、陽性または陰性に選択することができる。当業者は、本開示の文脈では、複数ラウンドにわたる選択もまた、使用しうることを認識するであろう。ある特定の実施形態では、選択手順を実施し、「選択されなかった」細胞を、活性化工程および拡大増殖工程において使用することも所望でありうる。「選択されなかった」細胞はまた、さらなるラウンドにわたる選択にかけることもできる。

【0339】

陰性選択によるT細胞集団の濃縮は、陰性選択された細胞に固有の表面マーカーを指向する抗体の組合せにより達することができる。1つの方法は、陰性選択された細胞上に存在する細胞表面マーカーを指向する、モノクローナル抗体のカクテルを使用する、細胞分取および/または陰性の磁気免疫接着もしくはフローサイトメトリーを介する選択である。例えば、CD4⁺細胞を、陰性選択により濃縮するために、モノクローナル抗体カクテルは、典型的に、CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR、およびCD8に対する抗体を含む。ある特定の実施形態では、典型的に、CD4⁺、CD25⁺、CD62Lhi、GITR⁺、およびFoxP3⁺を発現する調節性T細胞を、濃縮または陽性選択することが所望でありうる。代替的に、ある特定の実施形態では、調節性T細胞を、抗CD25コンジュゲートビーズまたは他の同様の選択法により枯渇させることができる。

【0340】

陽性選択または陰性選択により、所望の細胞集団を単離するために、細胞の濃度および表面（例えば、ビーズなどの粒子）を変動させることができる。ある特定の実施形態では、ビーズと細胞とを、併せて混合する容量を著明に減少させて（すなわち、細胞の濃度を増加させて）、細胞とビーズとの最大の接触を確保することが所望でありうる。例えば、一実施形態では、1ml当たりの細胞20億個の濃度を使用する。一実施形態では、1ml当たりの細胞10億個の濃度を使用する。さらなる実施形態では、1ml当たりの細胞1億個を超える濃度を使用する。さらなる実施形態では、1ml当たりの細胞1000万、1500万、2000万、2500万、3000万、3500万、4000万、4500万、または5000万個の細胞濃度を使用する。さらに別の実施形態では、1ml当たりの細胞7500万、8000万、8500万、9000万、9500万、または1億個の細胞濃度を使用する。さらなる実施形態では、1ml当たりの細胞1億2500万または1億5000万個の濃度を使用する。高濃度の使用は、細胞の収量、細胞の活性化、および細胞の拡大増殖の増大を結果としてもたらしうる。さらに、高細胞濃度の使用は、CD28陰性T細胞、または多くの腫瘍細胞（すなわち、白血病性血液、腫瘍組織など）が存在する試料に由来する細胞など、目的の標的抗原の発現が低度でありうる細胞の、より効率的な捕捉を可能とする。このような細胞集団は、治療的価値を有する可能性があり、得ることが所望であろう。例えば、高細胞濃度の使用は、CD28の発現が通常低度である、CD8+T細胞の、より効率的な選択を可能とする。

【0341】

関連する実施形態では、低濃度の細胞を使用することが所望でありうる。T細胞と表面（例えば、ビーズなどの粒子）との混合物を、著明に希釈することにより、粒子と細胞との相互作用を最小化する。これは、粒子に結合する、高量の所望の抗原を発現する細胞を選択する。例えば、CD4+T細胞は、高レベルのCD28を発現し、希釈濃度のCD8+T細胞より効率的に捕捉される。一実施形態では、使用される細胞濃度は、1ml当たりの細胞 5×10^6 個である。他の実施形態では、使用される濃度は、1ml当たりの細胞約 1×10^5 個～1ml当たりの細胞 1×10^6 個、およびこれらの間の任意の整数値でありうる。

【0342】

他の実施形態では、細胞は、速度を変動させて、2～10℃または室温で、長さを変動させる時間にわたり、ローター上でインキュベートすることができる。

【0343】

刺激されるT細胞はまた、洗浄ステップの後で、凍結させることもできる。血漿および血小板を除去する洗浄ステップの後で、細胞を、凍結用溶液中に懸濁させることができる。当技術分野では、多くの凍結用溶液および凍結パラメータが公知であり、この文脈でも有用であろうが、1つの方法は、20%のDMSOおよび8%のヒト血清アルブミンを含有するPBS、もしくは10%のデキストラン40および5%のデキストロース、20%のヒト血清アルブミン、ならびに7.5%のDMSOを含有する培養培地、もしくは31.25%のPlasmalyte-A、31.25%のデキストロース5%、0.45%のNaCl、10%のデキストラン40および5%のデキストロース、20%のヒト血清アルブミン、ならびに7.5%のDMSO、または例えば、HespanおよびPlasmalyte-Aを含有する、他の適切な細胞凍結用培地の使用を伴い、次いで、細胞を、1分間当たり1℃の速度で、-80℃へと凍結させ、液体窒素保管タンクの蒸気相中で保存する。制御型凍結の他の方法を使用するほか、-20℃または液体窒素中における速やかな非制御型凍結も使用しうる。

【0344】

ある特定の実施形態では、凍結保存された細胞を、本明細書で記載される通りに、融解させ、洗浄し、本開示の方法を使用する活性化の前に、室温で、1時間にわたり休眠させる。

【0345】

本開示の文脈ではまた、本明細書で記載される、拡張細胞が必要とされうる時点より前

10

20

30

40

50

の時期における、血液試料またはアフエーシス生成物の、対象からの回収も想定される。したがって、拡大増殖させる細胞の供給源は、任意の必要な時点において回収することができ、T細胞など、所望の細胞を、本明細書で記載されるT細胞療法などのT細胞療法から利益を得る、任意の数の疾患または状態のためのT細胞療法におけるその後の使用のために、単離し、凍結させることができる。一実施形態では、血液試料またはアフエーシスを、一般に、健常対象から採取する。ある特定の実施形態では、血液試料またはアフエーシスを、一般に、疾患を発症する危険性があるが、疾患をいまだ発症していない健常対象から採取し、目的の細胞を、その後の使用のために単離し、凍結させる。ある特定の実施形態では、T細胞を、その後の時点において、拡大増殖させ、凍結させ、使用することができる。ある特定の実施形態では、試料を、患者から、本明細書で記載される特定の疾患についての診断の直後であるが、任意の処置の前において回収する。さらなる実施形態では、細胞を、ナタリズマブ、エファリズマブ、抗ウイルス剤、化学療法、放射線、シクロスポリン、アザチオプリン、メトトレキサート、ミコフェノール酸塩、およびFK506などの免疫抑制剤、抗体、またはCAMPATH、抗CD3抗体、シトキサン、フルダラビン、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノール酸、ステロイド、FR901228、および照射など、他の免疫除去剤などの薬剤による処置を含むがこれらに限定されない、任意の数の妥当な処置モダリティーの前に、対象に由来する血液試料またはアフエーシスから単離する。これらの薬物は、カルシウム依存性ホスファターゼである、カルシニューリン（シクロスポリンおよびFK506）を阻害するか、または、増殖因子誘導性シグナル伝達に重要なp70S6キナーゼを阻害する（ラパマイシン）（Liu et al., Cell 66:807-815, (1991)、Henderson et al., Immun 73:316-321, (1991)、Bierer et al., Curr. Opin. Immun 5:763-773, (1993)）。さらなる実施形態では、細胞を、患者のために単離し、骨髄移植または幹細胞移植、フルダラビンなどの化学療法剤、外部ビーム放射線療法（XRT）、シクロホスファミド、またはOKT3もしくはCAMPATHなどの抗体を使用するT細胞除去療法を伴う（例えば、この前に、これと同時に、またはこの後で）その後の使用のために凍結させる。別の実施形態では、細胞を、あらかじめ単離し、CD20と反応する薬剤、例えば、RituxanなどのB細胞除去療法の後における処置のためのその後の使用のために凍結させることができる。

【0346】

本開示の、さらなる実施形態では、T細胞を、処置後における患者から直接得る。この点で、ある特定のがん処置、特に、免疫系を損なう薬物による処置の後であって、患者が通常、処置から回復する期間中の、処置の直後である、処置の後において、得られるT細胞の品質は、最適でありうるか、またはex vivoにおいて拡大増殖するそれらの能力について改善されうることが観察されている。同様に、本明細書で記載される方法を使用する、ex vivoにおける操作の後、これらの細胞は、生着の延長、およびin vivoにおける拡大増殖に好ましい状態でありうる。したがって、本開示の文脈内では、この回復期において、T細胞、樹状細胞、または他の造血系列の細胞を含む血液細胞を回収することが想定される。さらに、ある特定の実施形態では、動員（例えば、GM-CSFによる動員）レジメンおよびコンディショニングレジメンを使用して、対象において、とりわけ、治療後における規定された時間窓において、特定の細胞型の再増殖、再循環、再生、および／またはそうが好適となる条件を創出することができる。例示的な細胞型は、T細胞、B細胞、樹状細胞、および免疫系の他の細胞を含む。

【0347】

T細胞の活性化および拡大増殖

ある特定の実施形態では、本明細書で記載される、インターロイキン、CAR、および／またはTCRを発現させるための遺伝子スイッチポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むT細胞が提供される。所望のCARを発現するようにT細胞を遺伝子改変する前であれ後であれ、T細胞は、一般に、例えば、米国特許第6,352,694号明細書；同第6,534,055号明細書；同第6,905,680号明細書；同第6,692,964号明細書；同第5,858,358号明細書；同第6,887,466号明細

書；同第6，905，681号明細書；同第7，144，575号明細書；同第7，067，318号明細書；同第7，172，869号明細書；同第7，232，566号明細書；同第7，175，843号明細書；同第5，883，223号明細書；同第6，905，874号明細書；同第6，797，514号明細書；同第6，867，041号明細書；および米国特許出願公開第20060121005号明細書において記載されている方法を使用して活性化させ、拡大増殖させることができる。

【0348】

「養子T細胞移入」とは、腫瘍特異的T細胞の単離および*ex vivo*または*in vivo*における拡大増殖であって、ワクチン接種単独または患者の天然の腫瘍応答により得られうる数の細胞より大きな数のT細胞を達成する、単離および拡大増殖を指す。次いで、それらの免疫系に、がんを攻撃し、これらを死滅させうるT細胞を介して、残りの腫瘍を圧倒する能力をもたらしとする試みにおいて、がんを伴う患者へと、腫瘍特異的T細胞を輸注する。がん処置のための、養子T細胞療法の多くの形態であって、腫瘍浸潤リンパ球またはTILを培養する形態と、1つの特定のT細胞またはクローンを単離および拡大増殖させる形態とが使用されており、なお、腫瘍を強力に認識し、これらに攻撃するように操作されたT細胞を使用する形態も使用されている。一部の態様では、養子T細胞療法は、改変され、患者へと速やかに輸注され、これにより、抗原特異的T細胞の、*in vivo*における拡大増殖が、患者の中で生じることを可能とする、操作された抗原特異的T細胞を含むうる。

【0349】

場合によって、本明細書で記載されるT細胞を、T細胞の表面上の共刺激分子を刺激する、CD3/TCR複合体と関連するシグナルおよびリガンドを刺激する薬剤を、それへと接合させた表面と接触させることにより活性化および／または拡大増殖させる。特に、T細胞集団は、本明細書で記載される通り、表面上に固定化させた、抗CD3抗体、もしくはこの抗原結合性断片、または抗CD2抗体との接触、あるいはカルシウムイオノフォアを伴う、タンパク質キナーゼC活性化因子（例えば、ブリオスタチン）との接触などにより刺激することができる。T細胞表面上のアクセサリ分子を共刺激するために、アクセサリ分子に結合するリガンドを使用する。例えば、T細胞の集団は、T細胞の増殖を刺激するために適切な条件下で、抗CD3抗体および抗CD28抗体と接触させることができる。CD4+T細胞またはCD8+T細胞の増殖を刺激するには、抗CD3抗体および抗CD28抗体と接触させることができる。抗CD28抗体の例は、9.3、B-T3、XR-CD28（Diaclone, Besancon, France）を含み、当技術分野で一般に公知の他の方法と同様に使用することができる（Berg et al., Transplant Proc. 30(8):3975-3977, (1998)、Haanen et al., J. Exp. Med. 190(9):1319-1328, (1999)、Garland et al., J. Immunol Meth. 227(1-2):53-63, (1999)）。

【0350】

ある特定の実施形態では、T細胞のための一次刺激シグナルおよび共刺激シグナルは、異なるプロトコールによりもたらされる。例えば、各シグナルをもたらし薬剤は、溶液中とする場合もあり、表面へとカップリングさせる場合もある。表面へとカップリングさせる場合、薬剤は、同じ表面へとカップリングさせることもでき（すなわち、「シス」構成）、別個の表面へとカップリングさせることもできる（すなわち、「トランス」構成）。代替的に、1つの薬剤を、表面へとカップリングさせ、他の薬剤を、溶液中とすることもできる。一実施形態では、共刺激シグナルをもたらし薬剤を、細胞表面に結合させ、一次活性化シグナルをもたらし薬剤を、溶液とするか、または表面へとカップリングさせる。ある特定の実施形態では、いずれの薬剤も、溶液中とする。別の実施形態では、薬剤は、可溶性形態であることが可能であり、次いで、Fc受容体もしくは抗体、または薬剤に結合する他の結合剤を発現する細胞などの表面へと架橋される。この点で、本開示における、T細胞の活性化および拡大増殖における使用のために想定される人工抗原提示細胞（AAPC）については、例えば、米国特許出願公開第20040101519号明細書および同20060034810号明細書を参照されたい。

【0351】

一実施形態では、2つの薬剤を、同じビーズ上に、すなわち、「シス」であるか、または別個のビーズへと、すなわち、「トランス」である、ビーズ上に固定化させる。例を目的として述べると、一次活性化シグナルをもたらす薬剤は、抗CD3抗体またはこの抗原結合性断片であり、共刺激シグナルをもたらす薬剤は、抗CD28抗体またはこの抗原結合性断片であり、両方の薬剤を、等分子量で、同じビーズへと、共固定化させる。一実施形態では、CD4 + T細胞の拡大増殖およびT細胞の増殖のために、ビーズへと結合させた各抗体の、1 : 1の比を使用する。本開示のある特定の態様では、ビーズへと結合させた抗CD3 : CD28抗体の比を、1 : 1の比を使用して観察される拡大増殖と比較した、T細胞の拡大増殖の増大が観察されるように使用する。特定の一実施形態では、1 : 1の比を使用して観察される拡大増殖と比較した、約1 ~ 約3倍の増大が観察される。一実施形態では、ビーズへと結合させたCD3 : CD28抗体の比は、100 : 1 ~ 1 : 100、およびこれらの間の全ての整数値の範囲である。本開示の一態様では、抗CD3抗体より多くの抗CD28抗体を、粒子へと結合させる、すなわち、CD3 : CD28の比は、1未満である。本開示のある特定の実施形態では、抗CD28抗体の、ビーズへと結合させた抗CD3に対する比は、2 : 1を超える。特定の一実施形態では、ビーズへと結合させたCD3 : CD28の、1 : 100の比を使用する。別の実施形態では、ビーズへと結合させたCD3 : CD28の、1 : 75の比を使用する。さらなる実施形態では、ビーズへと結合させたCD3 : CD28の、1 : 50の比を使用する。別の実施形態では、ビーズへと結合させたCD3 : CD28の、1 : 30の比を使用する。複数の実施形態では、ビーズへと結合させたCD3 : CD28の、1 : 10の比を使用する。別の実施形態では、ビーズへと結合させたCD3 : CD28の、1 : 3の比を使用する。さらに別の実施形態では、ビーズへと結合させたCD3 : CD28の、3 : 1の比を使用する。

【0352】

1 : 500 ~ 500 : 1、およびこれらの間の任意の整数値である、粒子の、細胞に対する比を使用して、T細胞または他の標的細胞を刺激することができる。当業者がたやすく理解しうる通り、粒子の、細胞に対する比は、標的細胞と比べた粒子サイズに依存しうる。例えば、小型サイズのビーズが、少数の細胞だけに結合しうるのに対し、大型のビーズは、多くの細胞に結合しうるであろう。ある特定の実施形態では、細胞の、粒子に対する比は、1 : 100 ~ 100 : 1、およびこれらの間の任意の整数値の範囲であり、さらなる実施形態では、比は、1 : 9 ~ 9 : 1、およびこれらの間の任意の整数値を含み、これらもまた、T細胞を刺激するのに使用しうる。抗CD3 / 抗CD28カップリング粒子の、T細胞に対する比であって、T細胞の刺激を結果としてもたらす比は、上記で言及した通り、変動しうるが、ある特定の値は、1 : 100、1 : 50、1 : 40、1 : 30、1 : 20、1 : 10、1 : 9、1 : 8、1 : 7、1 : 6、1 : 5、1 : 4、1 : 3、1 : 2、1 : 1、2 : 1、3 : 1、4 : 1、5 : 1、6 : 1、7 : 1、8 : 1、9 : 1、10 : 1、および15 : 1を含み、1つの比は、T細胞あたり少なくとも1 : 1の粒子である。一実施形態では、1 : 1またはこれ未満の、粒子の、細胞に対する比を使用する。特定の一実施形態では、粒子 : 細胞比は、1 : 5である。さらなる実施形態では、粒子の、細胞に対する比は、刺激日に応じて変動しうる。例えば、一実施形態では、粒子の、細胞に対する比は、1日目には、1 : 1 ~ 10 : 1であり、さらなる粒子を、細胞へと、その後、最長10日間にわたり、毎日または隔日で追加し、最終的な比を1 : 1 ~ 1 : 10とする（追加日における細胞カウントに基づく）。特定の一実施形態では、粒子の、細胞に対する比は、第1の刺激日には、1 : 1であり、第3の刺激日および第5の刺激日には、1 : 5へと調整される。別の実施形態では、粒子を、1日目における、1 : 1の最終比、ならびに第3の刺激日および第5の刺激日における1 : 5へと、毎日または隔日で追加する。別の実施形態では、粒子の、細胞に対する比は、第1の刺激日には、2 : 1であり、第3の刺激日および第5の刺激日には、1 : 10へと調整される。別の実施形態では、粒子を、1日目における、1 : 1の最終比、ならびに第3の刺激日および第5の刺激日における1 : 10へと、毎日または隔日で追加する。当業者は、様々な他の比も、本開示におけ

10

20

30

40

50

る使用に適しうることを理解するであろう。特に、比は、粒子のサイズ、ならびに細胞のサイズおよび種類に応じて変動するであろう。

【0353】

本開示のさらなる実施形態では、T細胞などの細胞を、薬剤コーティングビーズと組み合わせ、その後、ビーズと細胞とを分離し、次いで、細胞を培養する。代替的な実施形態では、培養の前に、薬剤コーティングビーズと、細胞とを分離せず、併せて培養する。さらなる実施形態では、ビーズおよび細胞を、まず、磁力などの力を適用することにより濃縮する結果として、細胞表面マーカーのライゲーシヨンの増加をもたらし、これにより、細胞の刺激を誘導する

【0354】

例を目的として述べると、抗CD3および抗CD28を接合させた常磁性ビーズ（3×28ビーズ）を、T細胞に接触させることにより、細胞表面タンパク質をライゲーシヨンさせることができる。一実施形態では、細胞（例えば、T細胞104～109個）と、ビーズ（例えば、比を1：1とする、DYNABEADS（登録商標）M-450 CD3/CD28 常磁性ビーズ、またはMiltenyi Biotec製のMACS（登録商標）MicroBeads）とを、緩衝液中、例えば、PBS（カルシウムおよびマグネシウムなどの二価カチオンを伴わない）中で組み合わせる。ここでもまた、当業者は、任意の細胞濃度を使用しうることをたやすく理解することができる。例えば、標的細胞は、試料中で極めて稀であり、試料のうちの0.01%だけを含む場合もあり、全試料（すなわち、100%）が、目的の標的細胞を含む場合もある。したがって、任意の細胞数が、本開示の文脈内にある。ある特定の実施形態では、粒子と細胞とを、併せて混合する容量を著明に減少させて（すなわち、細胞の濃度を増大させて）、細胞と粒子との最大の接触を確保することが所望でありうる。例えば、一実施形態では、約1ml当たりの細胞20億個の濃度を使用する。別の実施形態では、1ml当たりの細胞1億個を超える濃度を使用する。さらなる実施形態では、1ml当たりの細胞1000万、1500万、2000万、2500万、3000万、3500万、4000万、4500万、または5000万個の細胞濃度を使用する。さらに別の実施形態では、1ml当たりの細胞7500万、8000万、8500万、9000万、9500万、または1億個の細胞濃度を使用する。さらなる実施形態では、1ml当たりの細胞1億2500万または1億5000万個の濃度を使用しうる。高濃度の使用は、細胞の収量、細胞の活性化、および細胞の拡大増殖の増大を結果としてもたらしうる。さらに、高細胞濃度の使用は、CD28陰性T細胞など、目的の標的抗原の発現が低度でありうる細胞の、より効率的な捕捉を可能とする。ある特定の実施形態では、このような細胞集団は、治療的価値を有する可能性があり、得ることが所望であろう。例えば、高細胞濃度の使用は、CD28の発現が通常低度である、CD8⁺T細胞の、より効率的な選択を可能とする。

【0355】

本開示の一実施形態では、混合物を、数時間（約3時間）～約14日間またはこれらの間の任意の整数値時間にわたり培養することができる。別の実施形態では、混合物を、21日間にわたり培養することができる。本開示の一実施形態では、ビーズおよびT細胞を、併せて、約8日間にわたり培養する。別の実施形態では、ビーズおよびT細胞を、併せて、2～3日間にわたり培養する。T細胞の培養期間が、60日間またはこれを超えるように、数サイクルにわたる刺激もまた、所望でありうる。T細胞の培養に適切な条件は、増殖および生存に必要な因子であって、血清（例えば、ウシ胎仔血清またはヒト血清）、インターロイキン2（IL-2）、インスリン、IFN-ガンマ、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGFβ、およびTNF-アルファ、または当業者に公知である、細胞の増殖のための、他の任意の添加剤を含む因子を含むしうる、適切な培地（例えば、最小必須培地またはRPMI培地1640、またはX-vivo 15（Lonza））を含む。細胞の増殖のための、他の添加剤は、界面活性剤、プラズマネート、およびN-アセチルシステインおよび2-メルカプトエタノールなどの還元剤を含むがこれらに限定されない。培地は、RPMI 1640、AIM-V、

10

20

30

40

50

DMEM、MEM、アルファMEM、F-12、X-Vivo 15およびX-Vivo 20、Optimizer、アミノ酸の添加、ピルビン酸ナトリウム、ならびにビタミン、無血清もしくは適量の血清（または血漿）の補充、または規定されたセットのホルモン、ならびに／あるいはT細胞の増殖および拡大増殖に十分な量のサイトカインを含みうる。抗生剤、例えば、ペニシリンおよびストレプトマイシンは、実験培養物に限り組み入れ、対象へと輸注される細胞培養物には組み入れない。標的細胞は、増殖を支援するのに必要な条件、例えば、適切な温度（例えば、37℃）および雰囲気（例えば、空気+5%のCO₂）下で維持する。

【0356】

変動させる刺激時間へと曝露されたT細胞は、異なる特徴を呈しうる。例えば、典型的な血液生成物またはアファレーシスされた末梢血単核細胞生成物は、細胞傷害性T細胞集団またはサプレッサーT細胞集団（TC、CD8+）より多くのヘルパーT細胞集団（TH、CD4+）を有する。CD3受容体およびCD28受容体を刺激することによる、ex vivoにおけるT細胞の拡大増殖は、約8～9日目の前には、主にTH細胞からなるが、約8～9日目の後では、ますます多くのTC細胞の集団を含むT細胞の集団をもたらす。したがって、処置の目的に応じて、対象に、主にTH細胞を含むT細胞集団を輸注することも、有利でありうる。同様に、TC細胞の抗原特異的サブセットを単離した場合、このサブセットを、より大きな程度で拡大増殖させることが有益でありうる。

【0357】

さらに、CD4マーカーおよびCD8マーカーに加えて、他の表現型マーカーも、著明に変動するが、大部分は、細胞拡大増殖工程の経過中において、再現可能な形で変動する。したがって、このような再現性は、特殊な目的のためのT細胞生成物の活性化を調整する能力を可能とする。

【0358】

場合によって、実施形態の免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞）を、AaPC（activating and propagating cell）と共に共培養して、細胞の拡大増殖を支援する。AaPCはまた、人工抗原提示細胞（AaPC）と称することもできる。例えば、抗原提示細胞（APC）は、実施形態の治療用組成物および細胞療法用生成物の調製において有用である。一態様では、AaPCは、トランスジェニックK562細胞でありうる。抗原提示系の調製および使用に関する、一般的な指針については、例えば、それらの各々が参照により組み込まれる、米国特許第6,225,042号明細書、同第6,355,479号明細書、同第6,362,001号明細書、および同第6,790,662号明細書、米国特許出願公開第2009/0017000号明細書および同第2009/0004142号明細書、ならびに国際公開第2007/103009号パンフレットを参照されたい。実施形態についてのなおさらなる態様では、トランスジェニックCAR細胞の培養は、CARを発現する免疫エフェクター細胞の拡大増殖を刺激する、樹状細胞またはAaPC（activating and propagating cell）の存在下で、トランスジェニックCAR細胞を培養することを含む。なおさらなる態様では、AaPCは、AaPCの表面上で発現したCAR結合性抗体またはこの断片を含む。他の実施形態では、AaPCは、AaPCの表面上で発現する、TCR結合性ポリペプチドもしくはTCR結合性抗体またはこれらの断片を含む。AaPCは、場合によって、T細胞を活性化させるかまたは共刺激する、さらなる分子を含みうる。さらなる分子は、場合によって、膜結合型γサイトカインを含みうる。なおまださらなる態様では、AaPCは、不活化させているかもしくは照射されているか、または感染性物質について調べられ、これを含まないことが確認されている。なおさらなる態様では、AaPCの存在下におけるトランスジェニックCAR細胞の培養は、IL-15、IL-21、および／またはIL-2などの可溶性サイトカインを含む培地中で、トランスジェニックCAR細胞を培養することを含む。細胞を、約10:1～約1:10、約3:1～約1:5、約1:1～約1:3（免疫エフェクター細胞対AaPC）、またはこの中で導出可能な任意の範囲の比で培養することができる。例えば、T細胞およびAaPCの共培養

10

20

30

40

50

は、約 1 : 1、約 1 : 2 または約 1 : 3 の比でありうる。

【0359】

一態様では、A a P C は、C D 1 3 7 L を発現しうる。他の態様では、A a P C は、C D 1 9、C D 6 4、C D 8 6、または m I L 1 5 をさらに発現しうる。ある特定の態様では、A a P C は、例えば、O K T 3 および／または U C H T 1 など、少なくとも 1 つの抗 C D 3 抗体クローンを発現しうる。一態様では、A a P C を処理して（例えば、照射するか、またはマイトマイシン C で処理して）、それらの増殖可能性を消失させることができる。一態様では、A a P C は、感染性物質について調べられ、これを含まないことが確認されている場合がある。当技術分野では、このような A a P C を作製するための方法が公知である。一態様では、A a P C を伴う C A R 改変 T 細胞集団の培養は、細胞を、約 1 0 : 1 ~ 約 1 : 1 0、約 3 : 1 ~ 約 1 : 5、約 1 : 1 ~ 約 1 : 3 (T 細胞対 A a P C)、またはこの中で導出可能な任意の範囲の比で培養することを含みうる。例えば、T 細胞および A a P C の共培養は、約 1 : 1、約 1 : 2 または約 1 : 3 の比でありうる。一態様では、培養するステップは、アミノビスホスホネート（例えば、ゾレドロン酸）と共に培養することをさらに含みうる。

10

【0360】

さらなる態様では、C A R - T 細胞の集団を、7、14、21、28、35、42 日間、49、56、63、または 70 日間を超えない日数にわたり培養および／または刺激する。一部の実施形態では、C A R - T 細胞の集団を、少なくとも 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30 日間、またはこれを超える期間にわたり培養および／または刺激する。一部の実施形態では、C A R - T 細胞の集団を、少なくとも 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60 日間、またはこれを超える期間にわたり培養および／または刺激する。一部の実施形態では、C A R - T 細胞の集団を、少なくとも 7、14、21、28、35、42、49、56、63 日間、またはこれを超える期間にわたり培養および／または刺激する。他の実施形態では、刺激は、C A R - T 細胞の、A a P C との共培養であって、C A R 陽性 T 細胞の増殖を促進する共培養を含む。別の態様では、トランスジェニック C A R 細胞の集団を、刺激 1 回、刺激 2 回、刺激 3 回、刺激 4 回、刺激 5 回、刺激 5 回、刺激 6 回、刺激 7 回、刺激 8 回、刺激 9 回、または刺激 10 回を超えない回数にわたり刺激する。場合によって、トランスジェニック細胞を、A a P C の存在下にある *ex vivo* では培養しない。一部の特殊な場合には、実施形態の方法は、トランスフェクションステップおよび／または培養するステップの後で、細胞集団を、C A R を発現する免疫エフェクター細胞（例えば、T 細胞）について濃縮するステップをさらに含む。濃縮するステップは、蛍光活性化細胞分取 (FACS) と、C A R を発現する細胞について分取することを含みうる。さらなる態様では、C A R を発現する細胞について分取することは、C A R 結合性抗体の使用を含む。濃縮するステップはまた、C D 5 6 + 細胞の枯渇も含みうる。実施形態についての、なおまださらなる態様では、方法は、トランスジェニック C A R 細胞の集団についての凍結保存試料をさらに含む。

20

30

【0361】

場合によって、A a P C を、さらなるプロセッシングを伴わずに、ペプチドの、M H C 分子との直接的な結合を可能とする、最適な長さのペプチドと共にインキュベートする。代替的に、細胞は、目的の抗原（すなわち、M H C 非依存型の抗原認識の場合）を発現しうる。さらに、場合によって、A P C は、特異的な C A R ポリペプチドまたは一般的な C A R ポリペプチド（例えば、u A a P C (universal activating and propagating cell) に結合する抗体を発現しうる。このような方法については、参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第 2014 / 190273 号パンフレットにおいて開示されている。ペプチド-M H C 分子または目的の抗原に加えて、A a P C 系はまた、少なくとも 1 つの外因性支援分子も含みうる。任意の適切な数および組合せの支援分子を利用することができる。支援分子は、共刺激分子および接着分子などの支援分子から選択することができる。例示的な共刺激分子は、C D 7 0 および B 7 . 1

40

50

(B7.1は、かつては、B7として公知であり、また、CD80としても公知であった)を含み、これらは、とりわけ、T細胞の表面上のCD28分子および／またはCTLA-4分子に結合し、これにより、例えば、T細胞の拡大増殖、Th1の分化、短期的なT細胞の生存、およびインターロイキン(IL)2など、サイトカインの分泌に影響を及ぼす。接着分子は、セレクチンなどの炭水化物結合性糖タンパク質、インテグリンなどの膜貫通結合生糖タンパク質、カドヘリンなどのカルシウム依存性タンパク質、および例えば、細胞間または細胞マトリックス間の接触を促進する、細胞間接着分子(ICAM)などの、1回膜貫通免疫グロブリン(Ig)スーパーファミリータンパク質を含みうる。例示的な接着分子は、LFA-3およびICAM-1などのICAM、を含む。共刺激分子および接着分子を含む、例示的な支援分子の選択、クローニング、調製、および発現に有用な技法、方法、および試薬については、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第6,225,042号明細書、同第6,355,479号明細書、および同第6,362,001号明細書において例示されている。

【0362】

AaPCとなるように選択される細胞は、好ましくは、細胞内抗原プロセッシング、細胞内ペプチドトラフィッキング、および／またはMHCクラスI分子もしくはクラスII分子の細胞内ペプチドローディングを欠損させているか、あるいは。変温性(すなわち、哺乳動物細胞株より、温度刺激に対する感受性が小さい)であるか、あるいは欠損および変温特性の両方を有する。好ましくは、AaPCとなるように選択される細胞はまた、細胞へと導入される、外因性のMHCクラスI分子またはクラスII分子、および支援分子の構成要素に対する、少なくとも1つの内因性対応物(例えば、内因性のMHCクラスI分子もしくはクラスII分子、および／または上記で記載した内因性支援分子)を発現する能力も欠く。さらに、AaPCは、AaPCを作出するための、それらの改変の前に、細胞が保有していた欠損および変温特性を保持することが好ましい。例示的なAaPCは、昆虫細胞株など、TAP(transporter associated with antigen processing)欠損細胞株を構成するか、またはこれに由来する。例示的な変温性昆虫細胞株は、Schneider 2細胞株などのショウジョウバエ(Drosophila)属細胞株(例えば、Schneider 1972を参照されたい)である。Schneider 2細胞の調製、増殖、および培養のための例示的な方法は、米国特許第6,225,042号明細書、同第6,355,479号明細書、および同第6,362,001号明細書において提示されている。

【0363】

一実施形態ではまた、AaPCを、凍結融解サイクルにもかける。例示的な凍結融解サイクルでは、凍結が、迅速に生じるように、AaPCを含有する、適切なレセプタクルを、適量の液体窒素、固体二酸化炭素(すなわち、ドライアイス)、または同様の低温材料と接触させることにより、AaPCを凍結させることができる。次いで、凍結させたAPCを、AaPCの、低温材料からの摘出、および周囲の室温条件への曝露により、または微温水浴もしくは手の温熱を利用して、融解時間の短縮を促進する、促進融解工程により融解させる。加えて、融解の前に、AaPCを、凍結させ、長f時間にわたり保存することができる。凍結させたAaPCはまた、融解させ、次いで、さらなる使用の前に、凍結乾燥させることもできる。好ましくは、ジメチルスルホキシド(DMSO)、ポリエチレングリコール(PEG)、および他の保存剤など、凍結融解手順に有害な影響を及ぼしうる保存剤は、凍結融解サイクルを経るAaPCを含有する培地には非含有とするか、またはこのような保存剤を本質的に欠く培地へのAaPCの導入などにより、本質的に除去する。

【0364】

さらなる実施形態では、不活化の後で、細胞の増殖、複製、または核酸の発現が本質的に生じないように、異種核酸およびAaPCに内因性の核酸を、架橋により不活化させることができる。一実施形態では、AaPCを、外因性MHCおよび支援分子の発現、このような分子の、AaPC表面上の提示、ならびに提示されたMHC分子への、選択された

10

20

30

40

50

、1または複数のペプチドのローディングの後の時点において不活化させる。したがって、このような、選択されたペプチドをロードした不活化A a P Cは、増殖または複製が本質的に不可能とされているが、選択されたペプチドの提示機能は保持する。好ましくは、架橋はまた、A a P Cの抗原提示細胞機能を、実質的に低下させずに、細菌およびウイルスなどの汚染微生物を本質的に含まない、A a P Cももたらす。したがって、架橋は、A a P Cを使用して開発される細胞療法製品の安全性に関する懸念を軽減する一助となる一方、重要なA a P C機能を維持する。架橋およびA a P Cに関する方法については、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第20090017000号明細書を参照されたい。

【0365】

ある特定の実施形態では、操作抗原提示細胞（A P C）がさらに提供される。e x v i v oにおいて、免疫エフェクター細胞を繁殖させるのに、このような細胞を、例えば、上記で記載した通りに使用することができる。さらなる態様では、操作A P C自体を、患者へと投与し、これにより、i n v i v oにおける免疫エフェクター細胞の拡大増殖を刺激することができる。実施形態の操作A P C自体を、治療剤として使用することができる。他の実施形態では、操作A P Cを、標的抗原に特異的な内因性免疫エフェクター細胞の活性化を刺激し、かつ／または標的抗原に特異的な、養子導入された免疫エフェクター細胞の活性を増加させるか、もしくは存続を延長しうる治療剤として使用することができる。

【0366】

本明細書で使用される「操作A P C」という用語は、少なくとも第1のトランス遺伝子を含み、第1のトランス遺伝子が、H L Aをコードする細胞を指す。このような操作A P Cは、抗原が、H L Aと複合したA P Cの表面上に提示されるように、抗原の発現のための第2のトランス遺伝子をさらに含む。一部の態様では、操作A P Cは、抗原を提示した細胞型（例えば、樹状細胞）でありうる。さらなる態様では、操作A P Cは、T細胞またはT細胞の前駆細胞など、通常、抗原を提示しない細胞型（「T－A P C」と称する）から作製することができる。したがって、一部の態様では、実施形態の操作A P Cは、H L Aが、標的抗原のエピトープと複合した操作A P Cの表面上で発現するように、標的抗原をコードする第1のトランス遺伝子と、ヒト白血球抗原（H L A）をコードする第2のトランス遺伝子とを含む。ある特定の具体的な態様では、操作A P C内で発現するH L Aは、H L A－A 2である。

【0367】

一部の態様では、実施形態の操作A P Cは、共刺激分子をコードする、少なくとも第3のトランス遺伝子をさらに含む。共刺激分子は、膜結合型C γサイトカインでありうる、共刺激サイトカインでありうる。ある特定の態様では、共刺激サイトカインは、膜結合型I L－15などのI L－15である。一部のさらなる態様では、操作A P Cは、編集（または欠失）遺伝子を含む。例えば、P D－1、L I M－3、C T L A－4、またはT C Rなどの阻害性遺伝子は、遺伝子の発現を低減するかまたは消失させるように編集することができる。実施形態の操作A P Cは、任意の目的の標的抗原をコードするトランス遺伝子をさらに含む。例えば、標的抗原は、感染性疾患抗原または腫瘍関連抗原（T A A）でありうる。

【0368】

発現を調節する方法

一実施形態では、操作細胞内の異種遺伝子の発現を調節する方法が提供される。異種遺伝子発現のリガンド誘導性制御のための遺伝子スイッチポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、抗原結合性ポリペプチド、および異種遺伝子が提供される。場合によって、ポリヌクレオチドは、図1～16のうちのいずれか1つにおいて描示されている、1または複数の遺伝子発現カセット内にある。別の場合には、ポリヌクレオチドは、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターを介して、操作細胞へと組み込まれる。ウイルスベクターは、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、またはアデノウイルスベクター

10

20

30

40

50

ーを含みうる。非ウイルスベクターは、Sleeping Beautyトランスポゾンを含みうる。他の場合には、ポリヌクレオチドは、リコンビナーゼまたは遺伝子編集法を介して、操作細胞へと組み込まれる。リコンビナーゼの例は、本明細書で記載されるセリリコンビナーゼである。遺伝子編集法の例は、CRISPR系またはArgonaute系を含みうる。本明細書における「CRISPR遺伝子編集系」または「CRISPR系」とは、DNA配列の変化を、ゲノムの特異的領域へとターゲティングするための、任意のRNA誘導型のCasタンパク質媒介性過程を指す。本明細書における「Argonaute遺伝子編集系」とは、DNA配列の変化を、ゲノムの特異的領域へとターゲティングするための、任意の一本鎖DNA誘導型のArgonauteエンドヌクレアーゼ媒介性過程を指す。

10

【0369】

場合によって、抗原結合性ポリペプチドは、抗原結合性ポリペプチドの場合もあり、リガンド結合性ポリペプチドの場合もある。例えば、抗原結合性ポリペプチドは、抗体またはこの断片、F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv、scFv、重鎖抗体の可変断片(VHH)、CAR、または操作TCRでありうる。さらなる例として述べると、リガンド結合性ポリペプチドは、受容体でありうる。ある特定の態様では、異種遺伝子は、サイトカインである。サイトカインは、IL-2、IL-15、IL-12、IL-21、またはIL-15とIL-15Rとの融合体(mbIL-15)でありうる。ある特定の場合には、サイトカインは、IL-12である。例えば、IL-12は、単鎖IL-12(scIL-12)、プロテアーゼ感受性IL-12、不安定化IL-12、膜結合型IL-12、挿入IL-12である。場合によって、異種遺伝子は、誘導性プロモーターの制御下にある。例えば、誘導性プロモーターは、遺伝子転写のための、遺伝子スイッチの、リガンド誘導性プロモーターである。

20

【0370】

ある特定の場合には、細胞は、操作細胞である。本明細書における操作細胞とは、その天然状態または内因性状態から改変された細胞である。操作細胞の例は、改変された(例えば、ポリヌクレオチドの、細胞へのトランスフェクションにより)、本明細書で記載される細胞である。場合によって、操作細胞は、操作免疫エフェクター細胞でありうる。

【0371】

本明細書では、異種遺伝子の発現を調節する方法であって、異種遺伝子が、リガンド誘導性プロモーターの制御下にある、方法が提示される。場合によって、方法は、リガンドの非存在下で、異種遺伝子発現の基礎レベルの低下または非存在を結果としてもたらす。1つの場合には、リガンドで異種遺伝子の発現を誘導する前に、操作細胞を活性化させる。別の場合には、細胞を抗原へと曝露することにより、操作細胞を活性化させる。抗原は、操作細胞が発現する、抗原結合性ポリペプチドにより認識される抗原でありうる。抗原は、腫瘍抗原または感染性疾患抗原でありうる。

30

【0372】

操作細胞は、抗原へと、少なくとも0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30日間にわたり曝露することができる。場合によって、操作細胞は、抗原へと、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24時間にわたり曝露することができる。

40

【0373】

別の場合には、遺伝子スイッチポリペプチドおよび目的の誘導性遺伝子を包含するベクター(本明細書の図2A~2D、図3、図19A~19B、図20A、図22、図24A~24D、および図25A~25Bに記載される)により形質導入された免疫エフェクター細胞の集団を、少なくとも1回の刺激、2回の刺激、3回の刺激、または4回の刺激のための実施形態の操作AaPCと共に培養し、かつ/またはこれにより刺激する。場合によって、操作AaPCは、操作細胞上で発現する結合性ポリペプチドにより認識される抗

50

原またはリガンドを含む。最終回の刺激の後、患者への輸注の前に、細胞を休眠させる。次いで、患者に、目的の遺伝子を活性化させ、発現させる、誘導性遺伝子スイッチによる調節のために使用される、適切な用量のリガンドを施す。一態様では、リガンドは、ベレジメクスである。別の態様では、ベレジメクスを、5mg、10mg、15mg、20mg、30mg、40mg、50mg、60mg、70mg、80mg、90mg、または100mgで施す。さらなる態様では、低用量のベレジメクスを、例えば、0.5mg、1mg、5mg、10mg、15mg、または20mgで施す。

【0374】

POC (point-of-care)

本開示の一実施形態では、本明細書で記載される免疫エフェクター細胞を、POC (point-of-care) 施設で改変する。場合によって、POC (point-of-care) 施設は、処置を必要とする対象の近隣の病院または機関（例えば、医療機関）にある。対象は、アフアレシスを受け、得られた末梢血単核細胞（PBMC）は、例えば、湿式分級により濃縮することができる。1つの場合には、ヒト血清アルブミンを含有する緩衝液を使用して、湿式分級工程を実施する。T細胞などの免疫エフェクター細胞は、本明細書で記載される選択法により単離することができる。1つの場合には、T細胞についての選択法は、T細胞上のCD3およびCD8に特異的なビーズを含む。1つの場合には、ビーズは、常磁性ビーズでありうる。採取された免疫エフェクター細胞は、改変の前に、任意の適切な低温保存用溶液中で低温保存することができる。免疫エフェクター細胞は、輸注に先立ち、最大で24時間、36時間、48時間、72時間、または96時間

10

20

【0375】

場合によって、キメラ受容体、1もしくは複数の細胞タグ、および／またはサイトカインを、免疫エフェクター細胞へと操作／導入することにより、免疫エフェクター細胞を改変し、次いで、対象へと、迅速に輸注する。場合によって、免疫エフェクター細胞の供給源は、同種供給源および自家供給源の両方を含みうる。1つの場合には、免疫エフェクター細胞は、T細胞またはNK細胞でありうる。1つの場合には、キメラ受容体は、CARまたはTCRでありうる。別の場合には、サイトカインは、mbIL-15でありうる。1つの場合には、mbIL-15は、配列番号15のmbIL-15、またはこの変異体もしくは断片である。さらに別の場合には、mbIL-15の発現は、本明細書で記載される、リガンド誘導性遺伝子スイッチ発現系によりモジュレートされる。例えば、ベレジメクスなどのリガンドを、対象へと送達して、mbIL-15の発現をモジュレートすることができる。別の態様では、ベレジメクスを、5mg、10mg、15mg、20mg、30mg、40mg、50mg、60mg、70mg、80mg、90mg、または100mgで施す。さらなる態様では、低用量のベレジメクスを、例えば、0.5mg、1mg、5mg、10mg、15mg、または20mgで施す。一実施形態では、ベレジメクスを、改変免疫エフェクター細胞を輸注する0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、または21日前に、対象へと投与する。さらなる実施形態では、ベレジメクスを、改変免疫エフェクター細胞の輸注後、有効期間にわたり、約12時間ごとに1回、約24時間ごとに1回、約36時間ごとに1回、または約48時間ごとに1回、対象へと投与する。一実施形態では、ベレジメクス投与のための有効期間は、約7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30日間である。他の実施形態では、休薬期間後の休眠期間の後、または対象が、再発を被る場合に、ベレジメクスを再投与することができる。

30

40

【0376】

対象に対する副作用が観察されるか、または処置が必要とされない、ある特定の場合に

50

は、例えば、セツキシマブを介して、*in vivo*における、改変免疫エフェクター細胞の、条件付けアブレーションのために、本明細書で記載される切断型表皮増殖因子受容体タグなどの細胞タグを含む細胞タグを活性化させることができる。

【0377】

一部の実施形態では、このような免疫エフェクター細胞を、図2A～2D、図3、図19A～19B、図20A、図22、図24A～24D、および図25A～25Bに記載される構築物により、電気穿孔を介して改変する。1つの場合には、電気穿孔を、Lonza製のNucleofector（商標）電気穿孔器などの電気穿孔器により実施する。他の実施形態では、上述の構築物を含むベクターは、非ウイルスベクターまたはウイルスベクターである。1つの場合には、非ウイルスベクターは、Sleeping Beautyトランスポゾントランスポザーゼ系を含む。1つの場合には、特異的配列を使用して、免疫エフェクター細胞に電気穿孔する。例えば、免疫エフェクター細胞に、1つのトランスポゾンに続く、トランスポザーゼをコードするDNAに続く、第2のトランスポゾンに電気穿孔することができる。別の場合には、免疫エフェクター細胞に、全てのトランスポゾンと、トランスポザーゼとを、同時に電気穿孔することができる。別の場合には、免疫エフェクター細胞に、トランスポザーゼに続き、両方のトランスポゾンまたは1つのトランスポゾンに、同時に電気穿孔することができる。逐次的な電気穿孔を経ながら、免疫エフェクター細胞を、次の電気穿孔ステップの前に、ある時間にわたり、休眠させることができる。

【0378】

場合によって、改変免疫エフェクター細胞は、繁殖ステップおよび活性化ステップを経ない。場合によって、改変免疫エフェクター細胞は、インキュベーションステップまたは培養ステップ（例えば、*ex vivo*における繁殖）を経ない。ある特定の場合には、輸注の前に、改変免疫エフェクター細胞を、IL-2およびIL21を含む緩衝液に入れる。他の場合には、輸注の前に、改変免疫エフェクター細胞を、細胞培養緩衝液、例えば、ウシ胎仔血清（FBS）を補充した細胞培養緩衝液（例えば、RPMI）に入れるか、またはこの中で休眠させる。輸注の前に、改変免疫エフェクター細胞を、採取し、洗浄し、生理食塩緩衝液中で、対象への輸注のための調製物に製剤化することができる。

【0379】

1つの場合には、輸注の前に、対象を、リンパ枯渇させている。他の場合には、リンパ枯渇は、必要とされず、改変免疫エフェクター細胞は、対象へと、迅速に、輸注される。例示的なリンパ枯渇レジメンを、下記の表4および5に一覧する。

【0380】

10

20

30

40

50

【表 4】

表 4. レジメン 1

-6 日目	入院/静脈内水分補給
-5 日目	25mg/m ² のフルダラビン、250mg/m ² のシクロホスファミド
-4 日目	25mg/m ² のフルダラビン、250mg/m ² のシクロホスファミド
-3 日目	25mg/m ² IV のフルダラビン、250mg/m ² のシクロホスファミド
-2 日目	休薬
-1 日目	休薬
0 日目	T 細胞輸注

10

20

【0381】

【表 5】

表 5. レジメン 2

-6 日目	入院/静脈内水分補給
-5 日目	30mg/m ² のフルダラビン、500mg/m ² のシクロホスファミド
-4 日目	30mg/m ² のフルダラビン、500mg/m ² のシクロホスファミド
-3 日目	30mg/m ² IV のフルダラビン、500mg/m ² のシクロホスファミド
-2 日目	休薬
-1 日目	休薬
0 日目	T 細胞輸注

30

40

【0382】

さらなる場合には、対象は、最小リンパ枯渇を受ける。本明細書における最小リンパ枯渇とは、リンパ枯渇レジメン後 1 日、2 日、または 3 日以内に対象に輸注しうるような、低減型リンパ枯渇プロトコルを指す。1つの場合には、低減型リンパ枯渇プロトコルは、低用量のフルダラビンおよび／またはシクロホスファミドを含みうる。別の場合には、低減型リンパ枯渇プロトコルは、短期間、例えば、1 日間または 2 日間にわたるリンパ枯渇を含みうる。

50

【0383】

一実施形態では、キメラ受容体およびサイトカインを、免疫エフェクター細胞へと操作／導入することにより、免疫エフェクター細胞を改変し、次いで、対象へと、迅速に輸注する。他の場合には、キメラ受容体およびサイトカインを、細胞へと操作／導入することにより、免疫エフェクター細胞を改変し、次いで、少なくとも0、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50時間以内に、対象へと輸注する。他の場合には、キメラ受容体およびサイトカインを、免疫エフェクター細胞へと操作／導入することにより、免疫エフェクター細胞を改変し、次いで、0日間、＜1日間、＜2日間、＜3日間、＜4日間、＜5日間、＜6日間、または＜7日間以内に、対象へと輸注する。

10

【0384】

一実施形態では、ある量の改変エフェクター細胞を、それを必要とする対象へと投与し、その量を、有効性およびサイトカイン関連毒性を誘導する潜在的可能性に基づき決定する。別の実施形態では、改変エフェクター細胞は、CAR⁺細胞またはTCR⁺細胞、およびCD3⁺細胞である。場合によって、改変エフェクター細胞の量は、1kg当たりの改変エフェクター細胞約10⁴～約10⁹個を含む。場合によって、改変エフェクター細胞の量は、1kg当たりの改変エフェクター細胞約10⁴～約10⁵個を含む。場合によって、改変エフェクター細胞の量は、1kg当たりの改変エフェクター細胞約10⁵～約10⁶個を含む。場合によって、改変エフェクター細胞の量は、1kg当たりの改変エフェクター細胞約10⁶～約10⁷個を含む。場合によって、改変エフェクター細胞の量は、1kg当たりの改変エフェクター細胞＞10⁴個、かつ、≦約10⁵個を含む。場合によって、改変エフェクター細胞の量は、1kg当たりの改変エフェクター細胞＞10⁵個、かつ、≦約10⁶個を含む。場合によって、改変エフェクター細胞の量は、1kg当たりの改変エフェクター細胞＞10⁶個、かつ、≦約10⁷個を含む。

20

【0385】

他の実施形態では、操作細胞の増殖および／または生存を刺激する方法は、細胞試料を、対象から得るステップと、細胞試料の細胞に、1または複数のトランスポゾンを含む、1または複数のポリヌクレオチドをトランスフェクトするステップとを含む。ある実施形態では、トランスポゾンは、キメラ抗原受容体(CAR)またはTCR、サイトカイン、1または複数の細胞タグ、サイトカインのリガンド誘導性制御のための遺伝子スイッチポリペプチド、および前記1または複数のポリヌクレオチドを、前記細胞のゲノムへと組み込んで、操作細胞の集団をもたらすのに有効なトランスポザーゼをコードする。ある実施形態では、遺伝子スイッチポリペプチドは、i) 第1の核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたDNA結合性ドメインを含む、第1の遺伝子スイッチポリペプチド、およびii) 第2の核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたトランス活性化ドメインを含む、第2の遺伝子スイッチポリペプチドを含む。一実施形態では、第1の遺伝子スイッチポリペプチドと、第2の遺伝子スイッチポリペプチドとは、リンカーにより連結されている。1つの場合には、操作細胞の、対象への投与の前に、リンパ枯渇が必要とされない。

30

【0386】

1つの場合には、操作細胞を、*in vivo*において繁殖させる方法は、細胞試料を、対象から得るステップと、細胞試料の細胞に、1または複数のトランスポゾンを含む、1または複数のポリヌクレオチドをトランスフェクトするステップとを含む。ある実施形態では、トランスポゾンは、キメラ抗原受容体(CAR)またはTCR、サイトカイン、1または複数の細胞タグ、サイトカインのリガンド誘導性制御のための遺伝子スイッチポリペプチド、および前記1または複数のポリヌクレオチドを、前記細胞のゲノムへと組み込んで、操作細胞の集団をもたらすのに有効なトランスポザーゼをコードする。ある実施形態では、遺伝子スイッチポリペプチドは、i) 第1の核内受容体リガンド結合性ドメイ

40

50

ンへと融合させたDNA結合性ドメインを含む、第1の遺伝子スイッチポリペプチド、およびii)第2の核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたトランス活性化ドメインを含む、第2の遺伝子スイッチポリペプチドを含む。一部の実施形態では、第1の遺伝子スイッチポリペプチドと、第2の遺伝子スイッチポリペプチドとは、リンカーにより連結されている。1つの場合には、操作細胞の、対象への投与の前に、リンパ枯渇が必要とされない。

【0387】

別の実施形態では、それを必要とする対象の、*in vivo*における操作細胞の存続を増強する方法は、細胞試料を、対象から得るステップと、細胞試料の細胞に、1または複数のトランスポゾンを含む、1または複数のポリヌクレオチドをトランスフェクトするステップとを含む。場合によって、トランスポゾンは、キメラ抗原受容体(CAR)またはTCR、サイトカイン、1または複数の細胞タグ、サイトカインのリガンド誘導性制御のための遺伝子スイッチポリペプチド、およびDNAを、前記細胞のゲノムへと組み込んで、操作細胞の集団をもたらすのに有効なトランスポザーゼをコードする。場合によって、遺伝子スイッチポリペプチドは、i)第1の核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたDNA結合性ドメインを含む、第1の遺伝子スイッチポリペプチド、およびii)第2の核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたトランス活性化ドメインを含む、第2の遺伝子スイッチポリペプチドを含み、第1の遺伝子スイッチポリペプチドと、第2の遺伝子スイッチポリペプチドとは、リンカーにより連結されている。1つの場合には、操作細胞の、対象への投与の前に、リンパ枯渇が必要とされない。

【0388】

別の実施形態では、充実性腫瘍を伴う対象を処置する方法は、細胞試料を、対象から得るステップと、試料の細胞に、1または複数のトランスポゾンを含む、1または複数のポリヌクレオチドをトランスフェクトするステップと、操作細胞の集団を、対象へと投与するステップとを含む。1つの場合には、操作細胞の、対象への投与の前に、リンパ枯渇が必要とされない。場合によって、1または複数のトランスポゾンは、キメラ抗原受容体(CAR)またはTCR、サイトカイン、1または複数の細胞タグ、サイトカインのリガンド誘導性制御のための遺伝子スイッチポリペプチド、およびDNAを、細胞のゲノムへと組み込むのに有効なトランスポザーゼをコードする。場合によって、遺伝子スイッチポリペプチドは、i)第1の核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたDNA結合性ドメインを含む、第1の遺伝子スイッチポリペプチド、およびii)第2の核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたトランス活性化ドメインを含む、第2の遺伝子スイッチポリペプチドを含み、第1の遺伝子スイッチポリペプチドと、第2の遺伝子スイッチポリペプチドとは、リンカーにより連結されている。場合によって、細胞は、電気穿孔を介してトランスフェクトされる。場合によって、遺伝子スイッチポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、プロモーターによりモジュレートされる。場合によって、プロモーターは、組織特異的プロモーターもしくはEF1Aプロモーター、またはこれらの機能的な変異体である。場合によって、組織特異的プロモーターは、T細胞特異的応答エレメントまたはNFAT応答エレメントを含む。場合によって、サイトカインは、IL-1、IL-2、IL-15、IL-12、IL-21、IL-15、IL-15R α 、またはIL-15変異体の融合体のうちの少なくとも1つを含む。場合によって、サイトカインは、分泌形態にある。場合によって、サイトカインは、膜結合形態にある。場合によって、細胞は、NK細胞、NKT細胞、T細胞、またはT細胞前駆細胞である。場合によって、細胞は、対象へと(例えば、対象に、操作細胞を輸注することにより)投与される。場合によって、方法は、有効量のリガンド(例えば、ベレジメクス)を投与して、サイトカインの発現を誘導するステップをさらに含む。場合によって、CARは、CD19、CD33、BCMA、CD44、 α -葉酸受容体、CAIX、CD30、ROR1、CEA、EGP-2、EGP-40、HER2、HER3、葉酸結合性タンパク質、GD2、GD3、IL-13R α 2、KDR、EDB-F、メソテリン、CD22、EGFR、MUC-1、MAGE-A1、MUC-16、h5T4、PSMA、TAG-72、EGFR

v I I I、C D 1 2 3、およびV E G F－R 2のうちの少なくとも1つに結合することが可能である。場合によって、トランスポザーゼは、サケ科型T c 1様トランスポザーゼである。場合によって、トランスポザーゼは、S B 1 1またはS B 1 0 0 xトランスポザーゼである。場合によって、細胞タグは、H E R 1切断型変異体およびC D 2 0切断型変異体のうちの少なくとも1つを含む。

【0389】

医薬組成物および投与量

一部の実施形態では、対象における投与のための、本明細書で開示されるポリヌクレオチドまたはポリペプチドを含む組成物が開示される。場合によって、本明細書では、本明細書で開示されるポリヌクレオチドまたはポリペプチドをコードし、任意選択で、サイトカインおよび／またはさらなる治療剤を含有する、改変エフェクター細胞組成物が開示される。場合によって、本明細書にはまた、エフェクター細胞の改変のために、キメラ抗原受容体の発現を調節するための、遺伝子スイッチポリペプチドをコードするベクターも含まれる。

【0390】

一部の場合には、改変エフェクター細胞または遺伝子スイッチポリペプチドおよびキメラ抗原受容体をコードするベクターによる医薬組成物を、活性化合物の、薬学的に使用されうる調製物への加工を容易とする、賦形剤および補助剤を含む、1または複数の生理学的に許容される担体を使用する、常套的な形で製剤化する。適正な製剤は、選択される投与経路に依存する。本明細書で記載される医薬組成物の概要については、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Nineteenth Ed (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995); Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 1975; Liberman, H.A. and Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, New York, N. Y., 1980; and Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Seventh Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 1999)において見出される。

【0391】

医薬組成物は、任意選択で、例だけを目的として述べると、常套的な、混合工程、溶解工程、顆粒化工程、糖衣錠作製工程、微粒化工程、乳化工程、カプセル化工程、封入工程、または圧縮工程などによる、常套的な形で製造される。

【0392】

ある特定の実施形態では、組成物はまた、酢酸、ホウ酸、クエン酸、乳酸、リン酸、および塩酸などの酸；水酸化ナトリウム、リン酸ナトリウム、ホウ酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、およびトリス－ヒドロキシメチルアミノメタンなどの塩基を含む、1または複数のpH調整剤または緩衝剤；ならびにクエン酸塩／デキストロース、炭酸水素ナトリウム、および塩化アンモニウムなどの緩衝液も含みうる。このような酸、塩基、および緩衝剤は、組成物のpHを、許容可能な範囲で維持するのに必要とされる量で組み入れられる。

【0393】

他の実施形態では、組成物はまた、組成物のオスモル濃度を、許容可能な範囲に収めるのに必要とされる量の、1または複数の塩も含みうる。このような塩は、ナトリウムカチオン、カリウムカチオン、またはアンモニウムカチオンと、塩化物アニオン、クエン酸アニオン、アスコルビン酸アニオン、ホウ酸アニオン、リン酸アニオン、重炭酸アニオン、硫酸アニオン、チオ硫酸アニオン、または亜硫酸水素アニオンとを有する塩を含み、適切な塩は、塩化ナトリウム塩、塩化カリウム塩、チオ硫酸ナトリウム塩、亜硫酸水素ナトリウム塩、および硫酸アンモニウム塩を含む。

【0394】

本明細書で記載される医薬組成物は、経口投与経路、非経口（例えば、静脈内、皮下、筋内、脳内、脳室内、関節内、腹腔内、または頭蓋内）投与経路、鼻腔内投与経路、口腔内投与経路、舌下投与経路、または直腸内投与経路を含むがこれらに限定されない、任意

10

20

30

40

50

の適切な投与経路により投与される。一部の場合には、医薬組成物を、非経口（例えば、静脈内、皮下、筋内、脳内、脳室内、関節内、腹腔内、または頭蓋内）投与のために製剤化する。

【0395】

本明細書で記載される医薬組成物を、処置される個体による経口の服用のための、水性経口分散液、液体、ゲル、シロップ、エリキシル、スラリー、懸濁液など、固体経口剤形、エアゾール剤、制御放出製剤、即時融解製剤、発泡製剤、凍結乾燥製剤、錠剤、粉剤、丸剤、糖衣錠剤、カプセル剤、遅延放出製剤、持続放出製剤、パルス放出製剤、多粒子製剤、即時放出製剤と制御放出製剤との混合剤を含むがこれらに限定されない、任意の適切な剤形へと製剤化する。一部の実施形態では、医薬組成物を、カプセル剤へと製剤化する。一部の実施形態では、医薬組成物を、溶液（例えば、静脈内投与のための）へと製剤化する。場合によって、医薬組成物を、輸注液として製剤化する。場合によって、医薬組成物を、注射液として製剤化する。

10

【0396】

本明細書で記載される、固体の医薬の剤形は、任意選択で、本明細書で記載される化合物と、適合性の担体、結合剤、充填剤、懸濁剤、香味剤、甘味剤、崩壊剤、分散剤、界面活性剤、滑沢剤、着色剤、希釈剤、可溶化剤、湿潤剤、可塑化剤、安定化剤、浸透増強剤、保湿剤、消泡剤、抗酸化剤、防腐剤、または1もしくは複数のこれらの組合せなど、1または複数の薬学的に許容される添加剤とを含む。

【0397】

さらなる他の態様では、Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th Edition (2000)において記載されている手順など、標準的なコーティング手順を使用して、組成物の周囲に、薄膜コーティングを施す。一部の実施形態では、組成物を、粒子（例えば、カプセルによる投与のための）へと製剤化し、粒子の一部または全部をコーティングする。一部の実施形態では、組成物を、粒子（例えば、カプセルによる投与のための）へと製剤化し、粒子の一部または全部をマイクロカプセル化する。一部の実施形態では、組成物を、粒子（例えば、カプセルによる投与のための）へと製剤化し、粒子の一部または全部をマイクロカプセル化せず、アンコーティングする。

20

【0398】

ある特定の実施形態では、本明細書で提示される組成物はまた、微生物活性を阻害する、1または複数の保存剤も含みうる。適切な保存剤は、メルフェンおよびチオメルサルなどの水銀含有物質；安定化二酸化塩素；ならびに塩化ベンザルコニウム、臭化セチルトリメチルアンモニウム、および塩化セチルピリジニウムなどの四級アンモニウム化合物を含む。

30

【0399】

本明細書で言及される「増殖性疾患」とは、細胞の過剰な増殖および細胞内マトリックスの過剰な代謝回転が、がんを含むいくつかの疾患の発症機序に著明に寄与する、という統一的概念が提示されていることを意味する。

【0400】

本明細書で使用される「患者」または「対象」とは、生理学的状態、例えば、がんまたは自己免疫状態または感染症を伴うか、またはこれを有するかもしれない発症することが疑われると診断された哺乳動物対象を指す。一部の実施形態では、「患者」という用語は、がんを発症する可能性が平均より高い哺乳動物対象を指す。例示的な患者は、ヒト、類人猿、イヌ、ブタ、ウシ、ネコ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、齧歯動物、および本明細書で開示される療法から利益を得うる、他の哺乳動物でありうる。例示的なヒト患者は、男性および／または女性でありうる。

40

【0401】

本明細書では、「それを必要とする患者」または「それを必要とする対象」とは、例えば、がんなどの増殖性障害であるがこれらに限定されない、疾患または障害を伴うと診断されているか、またはこれを有することか疑われる患者とみなされる。場合によって、が

50

んは、充実性腫瘍または血液悪性腫瘍である。場合によって、がんは、充実性腫瘍である。他の場合には、がんは、血液悪性腫瘍である。場合によって、がんは、転移性がんである。場合によって、がんは、再発性がんまたは不応性がんである。場合によって、がんは、充実性腫瘍である。例示的な充実性腫瘍は、肛門がん；虫垂がん；胆管がん（すなわち、胆管癌）；膀胱がん；脳腫瘍；乳がん；子宮頸がん；結腸がん；原発不明がん（CUP）；食道がん；眼がん；卵管がん；消化器がん；腎臓がん；肝臓がん；肺がん；髄芽腫；黒色腫；口腔がん；卵巣がん；脾臓がん；副甲状腺疾患；陰茎がん；下垂体腫瘍；前立腺がん；直腸がん；皮膚がん；胃がん；精巣がん；咽頭がん；甲状腺がん；子宮がん；膣がん；外陰がん；または神経膠芽腫を含むがこれらに限定されない。一部の実施形態では、白血病は、例えば、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、および慢性骨髄性白血病（CML）でありうる。

【0402】

本明細書では、「～を投与すること」とは、本開示の組成物を、患者に施すことを指す。例を目的として、限定せずに述べると、組成物の投与、例えば、注射は、静脈内（i.v.）注射、皮下（s.c.）注射、皮内（i.d.）注射、腹腔内（i.p.）注射、または筋肉内（i.m.）注射により実施することができる。1または複数のこのような経路を利用することができる。非経口投与は、例えば、ボーラス注射による場合もあり、時間経過にわたる、漸次的な灌流による場合もある。代替的に、または共時的に、投与は、経口経路による投与でありうる。加えて、投与はまた、ボーラスまたは細胞ペレットのデポ手術による場合もあり、医療用デバイスの設置による場合もある。ある実施形態では、本開示の組成物は、本明細書で記載される核酸配列を発現する操作細胞もしくは宿主細胞、または本明細書で記載される、少なくとも1つの核酸配列を含むベクターを、増殖性障害を処置または防止するのに有効な量で含む。医薬組成物は、本明細書で記載される標的細胞集団を、1または複数の、薬学的または生理学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤と組み合わせて含む。このような組成物は、中性緩衝生理食塩液、リン酸緩衝生理食塩液などの緩衝液；グルコース、マンノース、スクロースまたはデキストラン、マンニトールなどの炭水化物；タンパク質；ポリペプチドまたはグリシンなどのアミノ酸；抗酸化剤；EDTAまたはグルタチオンなどのキレート剤；アジュバント（例えば、水酸化アルミニウム）；および保存剤を含む。

【0403】

本明細書で使用される「処置」、「～を処置すること」という用語、およびそれらの文法的同等物は、所望の薬理学的効果および／または生理学的効果を得ることを指す。複数の実施形態では、効果は、治療的である、すなわち、効果は、疾患および／または疾患に帰せられうる有害症状を、部分的または完全に治療させる。この目的で、本明細書で記載される方法は、本明細書で記載される核酸配列を発現する宿主細胞、または本明細書で記載される核酸配列を含むベクターを含む、「治療有効量」の組成物を投与するステップを含む。

【0404】

「治療有効量」、「治療的量」、「免疫学的有効量」、「抗腫瘍有効量」、「腫瘍阻害有効量」という用語、またはそれらの文法的同等物は、所望の治療結果を達成するのに必要な投与量において、必要な期間にわたり有効な量を指す。治療有効量は、個体の疾患状態、年齢、性別、および体重、ならびに個体において所望の応答を誘発する、本明細書で記載される組成物の能力などの因子に従い変動する。投与される、本開示の組成物の正確な量は、患者（対象）の年齢、体重、腫瘍サイズ、感染または転移の程度、および状態の個別差を考慮して、医師により決定される。

【0405】

代替的に、本明細書で記載される、1または複数の組成物の、患者または対象への投与の、薬理学的効果および／または生理学的効果は、「予防的」な場合もある、すなわち、効果は、疾患またはその症状を、完全に、または部分的に予防する場合もある。

【0406】

「予防有効量」とは、所望の予防結果（例えば、疾患の発症の防止）を達成するのに必要な投与量において、必要な期間にわたり有効な量を指す。

【0407】

「消泡剤」は、加工時における発泡であって、水性分散液の凝固、薄膜完成品中の気泡を結果としてもたらすか、または、一般に、加工を損なう発泡を低減する。例示的な抗発泡剤は、シリコンエマルジョン（silicon emulsion）またはセスキオレイン酸（sesquileate）ソルビタンを含む。

【0408】

「抗酸化剤」は、例えば、ブチル化ヒドロキシトルエン（BHT）、アスコルビン酸ナトリウム、アスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム、およびトコフェロールを含む。ある特定の実施形態では、抗酸化剤は、必要とされる場合、化学的安定性を増強する。

【0409】

本明細書で記載される製剤は、抗酸化剤、金属キレート化剤、チオールを含有する化合物、および他の一般的な安定化剤から利益を得る場合がある。このような安定化剤の例は、（a）約0.5%～約2%w/vのグリセロール、（b）約0.1%～約1%w/vのメチオニン、（c）約0.1%～約2%w/vのモノチオグリセロール、（d）約1mM～約10mMのEDTA、（e）約0.01%～約2%w/vのアスコルビン酸、（f）0.003%～約0.02%w/vのポリソルベート80、（g）0.001%～約0.05%w/vのポリソルベート20、（h）アルギニン、（i）ヘパリン、（j）硫酸デキストラン、（k）シクロデキストリン、（l）ポリ硫酸ペンタサン、および他のヘパリノイド、（m）マグネシウムおよび亜鉛などの二価カチオン、または（n）これらの組合せを含むがこれらに限定されない。

【0410】

「結合剤」は、凝集性の性質を付与し、例えば、アルギン酸およびその塩；カルボキシメチルセルロース、メチルセルロース（例えば、Methocel（登録商標））、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース（例えば、Klucel（登録商標））、エチルセルロース（例えば、Ethocel（登録商標））、および結晶セルロース（例えば、Avicel（登録商標））などのセルロース誘導体；微晶質デキストロース；アミロース；ケイ酸マグネシウムアルミニウム；多糖酸；ベントナイト；ゼラチン；ポリビニルピロリドン／酢酸ビニルコポリマー；クロスポビドン；ポビドン；デンプン；アルファデンプン；トラガント、デキストリン、スクロース（例えば、Dipac（登録商標））、グルコース、デキストロース、糖蜜、マンニトール、ソルビトール、キシリトール（例えば、Xylitab（登録商標））、およびラクトースなどの糖；アカシア、トラガント、ガッティガム、イサポールハスクの粘液、ポリビニルピロリドン（例えば、Polyvidone（登録商標）CL、Kollidon（登録商標）CL、Polyp lasdone（登録商標）XL-10）、カラマツ由来のアラビノガラクトタン（arabogalactan）、Veegum商標）、ポリエチレングリコール、蠟、アルギン酸ナトリウムなどの天然ガムまたは合成ガムを含む。

【0411】

「担体」または「担体材料」は、医薬中で一般に使用される任意の賦形剤を含み、イブチニブおよび抗がん剤の化合物など、本明細書で開示される化合物との適合性、ならびに所望の剤形の放出プロファイル特性に基づき選択されるものとする。例示的な担体材料は、例えば、結合剤、懸濁剤、崩壊剤、充填剤、界面活性剤、可溶化剤、安定化剤、滑沢剤、保湿剤、希釈剤などを含む。「薬学的に適合性の担体材料」は、アカシア、ゼラチン、コロイド状二酸化ケイ素、グリセロリン酸カルシウム、カルシウム乳酸、マルトデキストリン、グリセリン、ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン（PVP）、コレステロール、コレステロールエステル、カゼイン酸ナトリウム、ダイズレシチン、タウロコール酸、ホスファチジルコリン、塩化ナトリウム、リン酸三カルシウム、リン酸二カリウム、セルロースおよびセルロースコンジュゲート、糖、ステアロイル乳酸ナトリウム、カラギーナン、モノグリセリド、ジグリセリド、アルファデンプンなどを含みうるがこれらに

10

20

30

40

50

限定されない。例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Nineteenth Ed (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995)、Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 1975、Lieberman, H.A. and Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, New York, N.Y., 1980、および Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Seventh Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 1999)を参照されたい。

【0412】

「分散剤」および／または「粘性モジュレーティング剤」は、液体培地または顆粒化法またブレンド法を介して、薬物の拡散および均質性を制御する材料を含む。一部の実施形態では、これらの薬剤はまた、コーティングマトリックスまたはエロージョンマトリックスの有効性も促進する。例示的な拡散促進剤／分散剤は、例えば、親水性ポリマー、電解質、Tween（登録商標）60またはTween（登録商標）80、PEG、ポリビニルピロリドン（PVP；市販品では、Plasdone（登録商標）として公知である）、and 例えば、ヒドロキシプロピルセルロース（例えば、HPC、HPC-SL、およびHPC-L）、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（例えば、HPMC K100、HPMC K4M、HPMC K15M、およびHPMC K100M）、カルボキシメチルセルロースナトリウム（carboxymethylcellulose sodium）、メチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、フタル酸ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ステアリン酸酢酸ヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMCAS）、非晶質セルロースなど、炭水化物ベースの分散剤、ケイ酸マグネシウムアルミニウム、トリエタノールアミン、ポリビニルアルコール（PVA）、ビニルピロリドン／酢酸ビニルコポリマー（S630）、酸化エチレンおよびホルムアルデヒドを伴う、4-（1, 1, 3, 3-テトラメチルブチル）-フェノールポリマー（チロキサポールとしてもまた公知である）、ポロキサマー（例えば、酸化エチレンと、酸化プロピレンとのブロックコポリマーである、Pluronic F68（登録商標）、Pluronic F88（登録商標）、およびPluronic F108（登録商標））；およびポロキサミン（例えば、酸化プロピレンおよび酸化エチレンの、エチレンジアミンへの逐次的付加から導出される四官能性ブロックコポリマーである、Poloxamine 908（登録商標）（BASF Corporation, Parsippany, N. J.）としてもまた公知のTetronic 908（登録商標））、ポリビニルピロリドンK12、ポリビニルピロリドンK17、ポリビニルピロリドンK25、またはポリビニルピロリドンK30、ポリビニルピロリドン／酢酸ビニルコポリマー（S-630）、ポリエチレングリコール（例えば、ポリエチレングリコールは、約300～約6000、または約3350～約4000、または約7000～約5400の分子量を有する）、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ポリソルベート80、アルギン酸ナトリウム、例えば、トラガントガムおよびアカシアガム、グアルガムなどのガム、キサンタンガムを含むキサンタン、糖、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムなどのセルロース誘導体、ポリソルベート80、アルギン酸ナトリウム、モノラウリン酸ポリエトキシ化ソルビタン、ポビドン、カルボマー、ポリビニルアルコール（PVA）、アルギン酸塩、キトサン、およびこれらの組合せを含む。セルロースまたはトリエチルセルロースなどの可塑化剤もまた、分散剤として使用することができる。特に、リポソーム分散液中および自己乳化分散液中で有用な分散剤は、ジミリストイルホスファチジルコリン、鶏卵に由来する天然ホスファチジルコリン、鶏卵に由来する天然ホスファチジルグリセロール、コレステロール、およびイソプロピルミリスチン酸である。

【0413】

1または複数のエロージョン促進剤の、1または複数の拡散促進剤との組合せもまた、本組成物中で使用することができる。

【0414】

10

20

30

40

50

「希釈剤」という用語は、送達の前に、目的の化合物を希釈するのに使用される化合物を指す。希釈剤はまた、より安定的な環境をもたらしうるため、化合物を安定化させるのにも使用することができる。当技術分野では、緩衝液中に溶解させた塩（これはまた、pHの制御または維持をもたらしうる）を、リン酸緩衝生理食塩液溶液を含むがこれらに限定されない希釈剤として用いる。ある特定の実施形態では、希釈剤は、組成物のバルクを増大させて、圧縮を容易とするか、またはカプセルの充填のための均質なブレンドに十分なバルクを創出する。このような化合物は、例えば、ラクトース、デンプン、マンニトール、ソルビトール、デキストロース、Avicel（登録商標）などの結晶セルロース；二塩基性リン酸カルシウム、リン酸二カルシウム二水和物；リン酸三カルシウム、リン酸カルシウム；無水ラクトース、噴霧乾燥ラクトース；アルファデンプン、Dierpac（登録商標）（Amstar）などの圧縮糖；マンニトール、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ステアリン酸酢酸ヒドロキシプロピルメチルセルロース、スクロースベースの希釈剤、粉砂糖；一塩基性硫酸カルシウム一水和物、硫酸カルシウム二水和物；乳酸カルシウム三水和物、デキストレート（dextrate）；加水分解シリアル固形、アミロース；粉末セルロース、炭酸カルシウム；グリシン、カオリン；マンニトール、塩化ナトリウム；イノシトール、ベントナイトなどを含む。

10

【0415】

「充填剤」は、ラクトース、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、二塩基性リン酸カルシウム、硫酸カルシウム、結晶セルロース、セルロース粉末、デキストロース、デキストレート（dextrate）、デキストラン、デンプン、アルファデンプン、スクロース、キシリトール、ラクチトール、マンニトール、ソルビトール、塩化ナトリウム、ポリエチレングリコールなどの化合物を含む。

20

【0416】

「滑沢剤」および「流動促進剤」とは、材料の接着または摩擦を防止、低減、または阻害する化合物である。例示的な滑沢剤は、例えば、ステアリン酸、水酸化カルシウム、滑石、フマル酸ステアリルナトリウム、鉱物油などの炭化水素、または水素化ダイズ油（Sterotex（登録商標））などの水素化植物油、高脂肪酸、ならびにアルミニウム、カルシウム、マグネシウム、亜鉛など、それらのアルカリ金属塩およびアルカリ土類金属塩、ステアリン酸、ステアリン酸ナトリウム、グリセロール、滑石、蠟、Stearowet（登録商標）、ホウ酸、安息香酸ナトリウム、ナトリウム酢酸、塩化ナトリウム、ロイシン、ポリエチレングリコール（例えば、PEG-4000）、またはCarbowax（商標）などのメトキシポリエチレングリコール、ナトリウムオレイン酸、安息香酸ナトリウム、ベヘン酸グリセリル、ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸マグネシウムまたはラウリル硫酸ナトリウム、Syloid（商標）、Cab-O-Sil（登録商標）などのコロイド状シリカ、トウモロコシデンプンなどのデンプン、シリコン油、界面活性剤などを含む。

30

【0417】

「可塑化剤」とは、マイクロカプセル化材料を軟化させるのに使用される化合物、またはマイクロカプセル化材料の脆性を低下させるフィルムコーティングである。適切な可塑化剤は、例えば、PEG 300、PEG 400、PEG 600、PEG 1450、PEG 3350、およびPEG 800などのポリエチレングリコール、ステアリン酸、プロピレングリコール、オレイン酸、トリエチルセルロース、およびトリアセチンを含む。一部の実施形態では、可塑化剤はまた、分散剤または保湿剤としても機能しうる。

40

【0418】

「可溶化剤」は、トリアセチン、クエン酸トリエチル、オレイン酸エチル、カプリル酸エチル、ラウリル硫酸ナトリウム、ナトリウムドクセート（docusate）、ビタミンE TPGS、ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン、N-ヒドロキシエチルピロリドン、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルシクロデキストリン、エタノール、n-ブタノール、イソプロピルアルコール、コレステロール、胆汁塩、ポリエチレングリコール200～600、グリコフロール、トランス

50

クトール、プロピレングリコール、およびジメチルイソソルビドなどの化合物を含む。

【0419】

「安定化剤」は、任意の抗酸化薬剤、緩衝液、酸、保存剤などの化合物を含む。

【0420】

「懸濁剤」は、ポリビニルピロリドン、例えば、ポリビニルピロリドンK12、ポリビニルピロリドンK17、ポリビニルピロリドンK25、またはポリビニルピロリドンK30、ビニルピロリドン／酢酸ビニルコポリマー（S630）、ポリエチレングリコール（例えば、ポリエチレングリコールは、約300～約6000、または約3350～約4000、または約7000～約5400の分子量を有する）、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ステアリン酸酢酸ヒドロキシメチルセルロース、ポリソルベート80、ヒドロキシエチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、例えば、トラガントガムおよびアカシアガム、グアルガムなどのガム、キサンタンガムを含むキサンタン、糖、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロースなどのセルロース誘導体、ポリソルベート80、アルギン酸ナトリウム、モノラウリン酸ポリエトキシ化ソルビタン、ポビドンなどの化合物を含む。

【0421】

「界面活性剤」は、ラウリル硫酸ナトリウム、ナトリウムドクセート（docusate）、Tween 60またはTween 80、トリアセチン、ビタミンE TP GS、モノオレイン酸ソルビタン、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン、ポリソルベート（polysorbate）、ポロキサマー、胆汁塩、モノステアリン酸グリセリン、酸化エチレンと酸化プロピレンとのコポリマー、例えば、Pluronic（登録商標）（BASF）などの化合物を含む。他の一部の界面活性剤は、ポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステルおよび植物油、例えば、ポリオキシエチレン（60）水素化ヒマシ油；ならびにポリオキシエチレンアルキルエーテルおよびアルキルフェニルエーテル、例えば、オクトキシノール10、オクトキシノール40を含む。一部の実施形態では、界面活性剤は、物理的安定性を増強するか、または他の目的で、組み入れることができる。

【0422】

「粘性増強剤」は、例えば、メチルセルロース、キサンタンガム、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ステアリン酸酢酸ヒドロキシプロピルメチルセルロース、フタル酸ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボマー、ポリビニルアルコール、アルギン酸塩、アカシア、キトサン、およびこれらの組合せを含む。

【0423】

「保湿剤」は、オレイン酸、モノステアリン酸グリセリン、ソルビタンモノオレイン酸、モノラウリン酸ソルビタン、オレイン酸トリエタノールアミン、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン、モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン、ナトリウムドクセート（docusate）、オレイン酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、ナトリウムドクセート（doccusate）、トリアセチン、Tween 80、ビタミンE TP GS、アンモニウム塩などの化合物を含む。

【0424】

キット／製品

本明細書の、ある特定の実施形態では、本明細書で記載される、1または複数の方法による使用のためのキットおよび製品が開示される。このようなキットは、バイアル、試験管など、1または複数の容器であって、容器の各々が、本明細書で記載される方法において使用される個別の要素のうち1つを含む容器を受容するように区画化されたキャリングケース、パッケージ、または容器を含む。適切な容器は、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、および試験管を含む。一実施形態では、容器は、ガラスまたはプラスチックなど、様々な材料から形成されている。

10

20

30

40

50

【0425】

本明細書で提示される製品は、パッケージング材料を含有する。医薬パッケージング材料の例は、プリスターパック、ボトル、試験管、バッグ、容器、ボトル、ならびに選択される製剤と、意図される投与方式および処置方式とに適する、任意のパッケージング材料を含むがこれらに限定されない。

【0426】

例えば、容器は、本明細書で記載されるCARの発現を調節するための遺伝子スイッチポリペプチドをコードするCAR-T細胞（例えば、CD19特異的CAR-T細胞）と、任意選択で、加えて、本明細書で開示されるサイトカインおよび／または化学療法剤とを含む。このようなキットは、任意選択で、本明細書で記載される方法におけるその使用に関する記載または表示または指示書の内容確認を含む。

10

【0427】

キットは、典型的に、内容物を列挙する表示、および／または使用のための指示書、ならびに使用のための指示書を伴う添付文書を含む。典型的に、指示書のセットもまた、組み入れられると予想される。

【0428】

一部の実施形態では、表示は、容器上に貼付されているか、または容器に付随する。一実施形態では、表示を形成する文字、数、または他の記号が、容器自体へと接着されているか、鋳造されているか、またはエッチングされている場合、表示は容器上に貼付されており、表示はまた、容器を保持する、レセプタクルまたはキャリングケース内に、例えば、パッケージ添付文書として存在する場合、容器に付随する。一実施形態では、表示は、内容物が、具体的な治療適用に使用されるものであることを指し示すのに使用される。表示はまた、内容物の、本明細書で記載される方法などにおける使用のための指示も指し示す。

20

【実施例】

【0429】

これらの例は、例示的な目的だけで提示されるものであり、本明細書で提示される特許請求の範囲を限定しようとするものではない。

【0430】

[実施例1]

30

PBMCへの、SB遺伝子スイッチ系のヌクレオフェクション

SBトランスポゾン系、すなわち、SB11、膜結合型IL-15 (mbIL-15)、およびキメラ抗原受容体(CAR)を発現させる、多様なDNAプラスミドを、ヌクレオフェクションを介して、末梢血単核細胞(PBMC)へとトランスフェクトして、T細胞の特異性をリダイレクトした(図1)。

【0431】

0日目に、PBMC2000万個を、合計で15μgのトランスポゾンおよび5μgのトランスポザーゼ(SB11)と混合した、Amaxa Human T cell Nucleofector solution (型番: VPA-1002; Lonza, Basel, Switzerland) 100μL中に再懸濁させ、電気穿孔した。

40

【0432】

翌日(1日目)、細胞をカウントし、フローサイトメトリーにより、CARの発現を測定した。CAR-T細胞を、γ照射(100Gy)するか、またはマイトマイシンCで処置した、1:1の比のAaPCで刺激した。使用したAaPC細胞は、CD19抗原を発現するK562-AaPCであった。培養物に、第1のラウンドの刺激には、IL-21 (30ng/ml)だけを補充し、その後、残りの刺激には、組換えヒトIL-2 (50IU/ml)およびIL-21 (30ng/ml) (Peprtech)を補充した。T細胞培養物を、7日間にわたり持続することが典型的な、各刺激サイクルの終了時に表現型解析した。プロテインLまたはCD19特異的CARを認識する抗イディオタイプ抗体を用いる、マルチパラメーターのフローサイトメトリーにより、培養物を、CAR発

50

現について、表現型解析した。培養物はまた、NK細胞（CD3^{neg}CD56⁺集団として規定された）の増生についても、緊密にモニタリングし、百分率が、総細胞集団のうちの10%を超えたら、製造元の指示書に従い、CD56に特異的な磁気ビーズ（Stem Cell Technologiesおよび／またはMiltenyi Biotec）を使用して、CAR T細胞培養物から摘出した。

【0433】

[実施例2]

SB遺伝子オン・オフスイッチ系についてのフローサイトメトリー解析

CARを導入するSB転移を使用して、CD19特異的T細胞を、PBまたはUCBに由来する単核細胞（MNC）から作出するのに続き、AaPCを添加して、CAR依存的に、T細胞数を拡大増殖させた。

【0434】

多様なマーカーおよび目的の遺伝子の発現について評価するフローサイトメトリー解析のために、細胞を静かに再懸濁させ、Countess計測器を伴うトリパンプル除外法を使用して、細胞数および生存率を測定した。細胞直径サイズもまた、記録した。各試料につき、細胞 5×10^5 個ずつを、10℃、330×gで、4分間にわたり、抗体染色のために採取した。採取された細胞は、HBSS中に10%のヒトAB血清と共に、氷上で、少なくとも15分間にわたりインキュベートした。蛍光コンジュゲート抗体を含有する抗体カクテルは、HBSS+0.1%のBSA+2mMのEDTA中に、CD4（クローンRPA-T4）、CD8（クローンSK1）、CD3（クローンUCHT1）、CD56、CD19特異的CAR（抗イディオタイプ抗体）、IL-15、およびIL-15Raに特異的な抗体のうちの1または複数を含んだ。調製された抗体カクテルおよび関連するFMO（fluorescence minus one）／アイソタイプ対照を、添加して、細胞試料を染色し、次いで、試料を、氷上で、30分間にわたりインキュベートした。次いで、試料を、FACS緩衝液（HBSS+0.5%のBSA+2mMのEDTA）で洗浄し、氷上で、Fixable Viability Dye（eBiosciences）により、30分間にわたり染色した。細胞を、FACS緩衝液で洗浄し、次いで、4%のパラホルムアルデヒド溶液（BD Cytofix；BD Biosciences）で固定した。全ての試料は、LSR IIフローサイトメーター、Fortessa X-20フローサイトメーター（BD Biosciences）、またはiQue Screener Plus（Intellicyt）にかけ、データは、FlowJo V10（TreeStar、Ashland、OR）またはiQue Screenerソフトウェアを使用して解析した。

【0435】

リガンド（ベレジメクス）を使用して、発現を誘導するために、AaPCで刺激したCAR-T細胞を、1ml当たりの細胞 1×10^6 個で採取した。ベレジメクスまたはDMSO（両方の培養物中のDMSO濃度を一定に保つための）を、培養物へと添加した。ベレジメクスは、20nM、50nM、100nM、または記載されている濃度で使用した。次いで、細胞を、ベレジメクスまたはDMSOの存在下、37℃で、2～3日間にわたり培養した。培養の2～3日後、各試料につき、細胞 5×10^5 個ずつを、10℃、330×gで、4分間にわたり、抗体染色のために採取した。採取された細胞は、HBSS中に10%のヒトAB血清と共に、氷上で、少なくとも15分間にわたりインキュベートした。蛍光コンジュゲート抗体を含有する抗体カクテルは、HBSS+0.1%のBSA+2mMのEDTA中に、CD4（クローンRPA-T4）、CD8（クローンSK1）、CD3（クローンUCHT1）、CD56、CD19特異的CAR（抗イディオタイプ抗体）、IL-15、およびIL-15Raに特異的な抗体のうちの1または複数を含んだ。調製された抗体カクテルおよび関連するアイソタイプ対照を、添加して、細胞試料を染色し、次いで、試料を、氷上で、30分間にわたりインキュベートした。次いで、試料を、FACS緩衝液（HBSS+0.5%のBSA+2mMのEDTA）で洗浄し、氷上で、Fixable Viability Dye（eBiosciences）により、3

10

20

30

40

50

0 分間にわたり染色した。細胞を、FACS 緩衝液で洗浄し、4 %のパラホルムアルデヒド溶液 (BD Cytotfix; BD Biosciences) で固定した。全ての試料は、LSR II フローサイトメーター、Fortessa X-20 フローサイトメーター (BD Biosciences)、または iQue Screener Plus (Intellicyt) にか、データは、FlowJo V10 (TreeStar、Ashland、OR) または iQue Screener ソフトウェアを使用して解析した。

【0436】

ベレジメクス のオン-オフ-オン実験のために、まず、ベレジメクスを、言及された濃度 (典型的に、20 ~ 100 nM の間の) で、細胞培養物へと、2 ~ 3 日間にわたり添加した。細胞のアリコートを採取し、上記で言及した通り、フローサイトメトリーにより、多様なタンパク質の発現 (オン) について解析した。次いで、残りの細胞培養物を洗浄し、ベレジメクスを伴わない完全培地中に再懸濁させ、最大で5日間にわたり培養した。細胞のアリコートを採取し、上記で言及した通り、フローサイトメトリーにより、言及される時点において、発現 (オフ) について解析した。次いで、残りの細胞培養物を洗浄しベレジメクスを含有する完全培地で再懸濁させて、標的遺伝子の発現をオンにした。培養の2 ~ 3 日後、細胞のアリコートを採取し、フローサイトメトリーにより、発現について解析した。

【0437】

[実施例3]

生存実験

ヌクレオフェクションを介して、RTS 膜結合型 IL-15 (RTS-mb IL-15)、CD19 特異的キメラ抗原受容体 (CD19 CAR) をコードする、複数の Sleeping Beauty トランスポゾン DNA プラスミド (デザイン9、図2) を、Sleeping Beauty トランスポザーゼである SB11 をコードするプラスミド DNA と共に、末梢血単核細胞 (PBMC) へとトランスフェクトした (図1)。0 日目に、PBMC 2000 万個を、合計で 15 μ g のトランスポゾンおよび 5 μ g のトランスポザーゼと混合した、Amaxa Human T cell Nucleofector solution (型番: VPA-1002; Lonza、Basel、Switzerland) 100 μ L 中に再懸濁させ、細胞へとヌクレオフェクトした。翌日 (1 日目)、細胞をカウントし、フローサイトメトリーを使用して、CAR の発現を測定した。細胞を、 γ 照射 (100 Gy) するか、またはマイトマイシン C で処置した、1 : 1 の比の K562 ベースの AaPC であって、それらの表面上で CD19 を発現する AaPC で刺激した。培養物に、第1のラウンドの刺激には、IL-21 (30 ng/ml) だけを補充し、その後、残りの刺激には、組換えヒト IL-2 (50 IU/ml) および IL-21 (30 ng/ml) (Peprotech) を補充した。T 細胞培養物を、7 日間にわたり持続することが典型的な、各刺激サイクルの終了時に表現型解析した。マルチパラメーターのフローサイトメトリーにより、CD19 特異的 CAR-T 細胞を検出する、抗イディオタイプ抗体染色を用いて、培養物を、CAR 発現について、表現型解析した。培養物はまた、NK 細胞 (CD3 neg CD56 + 集団として規定された) の増生についても、緊密にモニタリングし、百分率が、総細胞集団のうちの 10 % を超えたら、製造元の指示書に従い、CD56 に特異的な磁気ビーズ (Stem Cell Technologies および/または Miltenyi Biotec) を使用して、CAR T 細胞培養物から摘出した。

【0438】

培養培地から、サイトカイン (IL-2 および IL-21) を除去したときの、RTS-mb IL-15 を共発現する CD19 特異的 CAR-T 細胞の存続を測定するために、CAR-T 細胞を、採取し、6 ウェルプレート内の、IL-2 および IL-21 を伴うかまたは伴わない完全 RPMI 培地中に、1 ml 当たりの細胞 1×10^6 個の濃度で播種した。ベレジメクス (50 nM の最終濃度) または DMSO 対照を、培養培地へと添加した

。培養培地は、2～3日間ごとに交換し、低量の細胞アリコートをし、フロー解析のために採取した。フローサイトメトリ解析を行って、培地に由来するサイトカインの存在下または非存在下における、培養物中の、mb IL-15の発現を測定するほか、生細胞%も測定した。サイトカインの存在下および非存在下におけるCAR-T細胞の生存率を、図12に示す。培養物中のサイトカインの非存在下では、ベレジメクスを、添加して、mb IL-15発現を誘導した場合に、CAR-T細胞の生存率の改善が見られた。ベレジメクスを添加しない(mb IL-15発現を誘導しない)場合、細胞は、ex vivoの培養物中で存続しなかった。

【0439】

[実施例4]

ウェスタンブロット法

PBMCに、Sleeping Beauty系のプラスミドをヌクレオフェクトして、構成的プロモーター下のCD19特異的CAR(CD19 CAR単独)、またはいずれも構成的プロモーター下のCD19特異的CARおよびmb IL-15(CD19 CAR+構成的mb IL-15)、または構成的プロモーター下のCD19特異的CARおよびRTS-mb IL-15(CD19 CAR+RTS-mb IL-15)を発現させた。ヌクレオフェクトされた細胞を、実施例1で記載した通り、AaPCの存在下で培養した。

【0440】

4ラウンドにわたる刺激の後、細胞を、ベレジメクスの非存在(CD19 CAR単独、CD19 CAR+構成的mb IL-15、およびCD19 CAR+RTS-mb IL-15)下、または存在(CD19 CAR+RTS-mb IL-15)下において、2～3日間にわたり培養した。ウェスタンブロット解析のために、細胞溶解物を調製した。NuPAGE 10% Bis-Trisゲルのレーン1つ当たり、約10μgの溶解物をロードした。iBlot(登録商標)(Life Technologies) semi-dry transfer装置を使用して、タンパク質を、ゲルから、フッ化ポリビニルピロリドン(PVDF)膜へと転写した。PBS+Tween-20(PBST; 1倍濃度のPBS+0.05%のTween-20)溶液中に5%(w/v)の粉乳溶液を使用して、膜をブロッキングし、ヤギ抗ヒトIL-15(R&D systems)一次抗体およびウサギ抗ヤギIgG HRP(KPL Laboratories)二次抗体で染色した。増強化学発光(ECL)検出のための、SuperSignal(商標)West Pico Chemiluminescent Substrate(Thermo Fisher Scientific)を用いた。

【0441】

Digital DarkroomソフトウェアおよびAlphaView(登録商標)ソフトウェア(ProteinSimple)を使用して、ウェスタンブロットの画像を、FluorChem(商標)E Imager(ProteinSimple、San Jose, CA)システム上で捕捉した。図14は、ウェスタンブロットの画像を示す。ベレジメクスが非存在(CD19 CAR+RTS-mb IL-15)の場合、mb IL-15発現は、ウェスタンブロットにより検出されなかったが、ベレジメクスを、培養物へと添加したところ、mb IL-15の強力な発現が観察された。CD19 CARだけの陰性対照では、mb IL-15の発現は、観察されなかった。CD19 CAR+構成的mb IL-15陽性対照では、mb IL-15の発現が検出された。

【0442】

[実施例5]

T細胞の活性化、およびmb IL-15トランス遺伝子発現のリガンド特異的制御

Sleeping Beautyトランスポゾン、CD19特異的CAR、細胞タグ、ならびに遺伝子スイッチにより制御されるmb IL-15を安定的に発現させるようにデザインした。遺伝子スイッチ構成要素(例えば、VP16/RxRandGal4/ECR)の一方または両方の発現は、T細胞活性化特異的プロモーターの制御下で実施した

10

20

30

40

50

。この例では、最小IL-2プロモーター（NFAT6-IL2プロモーター）へと融合させた6×NFAT応答エレメントにより作出された、T細胞活性化依存性プロモーターを用いて、mbIL-15の条件付け発現のための、遺伝子スイッチ構成要素-VP16-R×Rおよび／またはGal4-EcR融合タンパク質の発現を駆動した。遺伝子スイッチの構成要素が、NFAT6-IL2プロモーターの制御下にある場合、mbIL-15の発現は、2つの条件：1）T細胞が活性化していること、および2）活性化リガンドであるベレジメクスが存在することが満たされることを必要とする。図20Aに示される、SBトランスポゾン構築物の組合せを、SB11トランスポザーゼと共に、ドナーT細胞にトランスフェクトした。

【0443】

0日目に、T細胞1000万～2000万個を、合計で15μgのトランスポゾンおよび5μgのトランスポザーゼ（SB11）と混合した、Amaxa Human T cell Nucleofector solution（型番：VPA-1002；Lonza、Basel、Switzerland）100μL中に再懸濁させ、電気穿孔した。

【0444】

翌日（1日目）、細胞をカウントし、フローサイトメトリーにより、CARの発現を測定した。CAR-T細胞を、γ照射（100Gy）するか、またはマイトマイシンCで処置した、1：1の比のAaPCを伴う7～10日間ごとに、最大で4サイクルの、逐次的な刺激ラウンドにより、ex vivoにおいて選択的に拡大増殖させた。使用したAaPC細胞は、CD19抗原を発現するK562-AaPCであった。培養物に、第1のラウンドの刺激には、IL-21（30ng/mL）だけを補充し、その後、残りの刺激には、組換えヒトIL-2（50IU/mL）およびIL-21（30ng/mL）（Pepro Tech）を補充した。

【0445】

多様なマーカーおよび目的の遺伝子の発現について評価するフローサイトメトリー解析のために、細胞を静かに再懸濁させ、Countess計測器を伴うトリパンプル除外法を使用して、細胞数および生存率を測定した。細胞直径サイズもまた、記録した。各試料につき、細胞 5×10^5 個ずつを、10℃、330×gで、4分間にわたり、抗体染色のために採取した。採取された細胞は、HBSS中に10%のヒトAB血清と共に、氷上で、少なくとも15分間にわたりインキュベートした。蛍光コンジュゲート抗体を含有する抗体カクテルは、HBSS+0.1%のBSA+2mMのEDTA中に、CD4、CD8、CD3、CD56、CD19特異的CAR（抗イディオタイプ抗体）、IL-15および／またはIL-15Raに特異的な抗体のうちの1または複数を含んだ。調製された抗体カクテルおよび関連するFMO（fluorescence minus one）／アイソタイプ対照を、添加して、細胞試料を染色し、次いで、試料を、氷上で、30分間にわたりインキュベートした。次いで、試料を、FACS緩衝液（HBSS+0.5%のBSA+2mMのEDTA）で洗浄し、氷上で、Fixable Viability Dye（eBiosciences）により、30分間にわたり染色した。細胞を、FACS緩衝液で洗浄し、次いで、4%のパラホルムアルデヒド溶液（BD Cytotfix；BD Biosciences）で固定した。全ての試料は、LSR IIフローサイトメーター、Fortessa X-20フローサイトメーター（BD Biosciences）、またはiQue Screener Plus（Intellicyt）にかけ、データは、FlowJo V10（TreeStar、Ashland、OR）またはiQue Screenerソフトウェアを使用して解析した。

【0446】

T細胞活性化の、mbIL-15発現に対する影響について評価するため、細胞を、最終回のAaPC刺激後、少なくとも7日間にわたり、培養培地中に保持して、ベースラインの（刺激を伴わない場合の）発現レベルについて調べた。T細胞は、ベレジメクスまたはDMSOによる処置の前に、48時間にわたる、異なる用量のConA（1または5μg/mL）、または24時間にわたる、PMA／イオノマイシン使用して活性化させた。

10

20

30

40

50

【0447】

非活性化CAR-T細胞または活性化CAR-T細胞を、採取し、100nMのベレジメクスまたはDMSO（両方の培養物中のDMSO濃度を一定に保つための）を、培養物へと添加した。次いで、細胞を、ベレジメクスまたはDMSOの存在下、37℃で、トランス遺伝子の発現を測定するフローサイトメトリー解析の前に、少なくとも24時間にわたり培養した。CARおよびmbIL-15の発現は、ベレジメクス（図20C：1μg/mLのConA；5μg/mLのConA；図20D、PMA／イオノマイシン：図20E）の存在下または非存在下における、休眠T細胞内（図20B）、または活性化T細胞内で定量化した。

【0448】

図20Bは、T細胞活性化の非存在下で、構成的プロモーター下における遺伝子スイッチ構成要素（例えば、VP16／RxRおよびGal4／EcR）の発現のための、トランスポゾン保有するCAR-T細胞だけが、ベレジメクスを、培養物へと添加した場合に、mbIL-15を発現することが可能であったことを示す。図20C～20Eにおいて示される通り、NFAT6-IL-2プロモーター（構築物3、4、および6）下における、1または複数の遺伝子スイッチ構成要素の発現のためのトランスポゾン保有するCAR-T細胞が、ベレジメクスを、培養物へと添加した場合に、mbIL-15の発現を呈したことから、CAR-T細胞による、mbIL-15の誘導性発現のためには、2つの条件を満たさなければならないことが示される。さらに、固定濃度のベレジメクスの存在下における、mbIL-15の発現レベルは、T細胞活性化のレベルと共に上昇した（図20Cおよび図20D）。ベレジメクスの非存在下では、全ての被験構築物組合せについて、極度に低レベルのmbIL-15発現が、フローサイトメトリーにより検出された。ベレジメクスの存在下では、CAR⁺ T細胞だけが、mbIL-15を誘導することが可能であったことは、これらのリガンド誘導性スイッチ系のデザインと符合する。

【0449】

[実施例6]

遺伝子スイッチ系を使用する、IL-12の発現

EGFRvIII特異的CAR、細胞タグ、およびRTS-IL-12を安定的に発現させるように、図22に描示される通りに、Sleeping Beautyトランスポゾンをデザインした。トランスポゾンプラスミドを、既に記載されている通り、いくつかのドナーT細胞に電気穿孔した。EGFRvIII-CAR-T細胞を、γ照射するか、またはマイトマイシンCで処置した、IL-2およびIL-21を補充した培地中に1：1の比のAaPCであって、「フィーダー細胞」として用いられるAaPCを伴う7～10日間ごとに、最大で4サイクルの、逐次的な刺激ラウンドにより、ex vivoにおいて選択的に拡大増殖させた。使用したAaPC細胞は、EGFRvIII抗原を発現するK562-AaPCであった。図26は、CAR⁺ T細胞を、ex vivoにおいて選択的に拡大増殖させるときの、複数のドナーに由来するT細胞内の、CAR発現について描示する。

【0450】

ベレジメクスオン-オフサイクリング実験：各オン-オフサイクルのために、まず、ベレジメクスを、既に言及された濃度（典型的に、20～100nMの間の）で、細胞培養物へと、2～3日間にわたり添加した（オン）。細胞のアリコートを採取し、言及された時点において、フローサイトメトリーおよび／またはELISAにより、多様なタンパク質の発現（オン）について解析した。次いで、残りの細胞培養物を洗浄し、ベレジメクスを伴わない（オフ）完全培地中に再懸濁させ、最大で5日間にわたり培養した。細胞のアリコートを採取し、上記で言及した通り、フローサイトメトリーおよび／またはELISAにより、言及される時点において、発現（オフ）について解析した。ベレジメクスのオン-オフサイクルは、工程を繰り返すことにより、残りの細胞培養物に対して、再度繰り返すことができる。

【0451】

EGFRvIII-CAR-T細胞内の、IL-12誘導についてアッセイするため、ヌクレオフェクションの24時間後における汎T細胞を、IL-21を含有する培地のAaPCの存在下において、DMSO（対照）またはベレジメクスで処置した。ヌクレオフェクションの48時間後、ELISAにより、培養物上清を、IL-12レベルについて解析した。

【0452】

図27は、ベレジメクスによる処置が、CARおよびRTS-IL-12の両方を共発現する、SBトランスポゾンでトランスフェクトされたT細胞による、IL-12の発現を誘導したことを示す。しかし、RTS-IL-12を欠くCAR-T細胞は、培養物上清中に、IL-12を産生しなかった。DMSO対照による処置は、低バックグラウンドレベルのIL-12誘導を示した。

【0453】

さらに、RTS-IL-12/CAR-T細胞が、誘導性IL-12を産生する能力を、抗原特異的刺激の存在下または非存在下において評価した。EGFRvIII-CAR/RTS-IL-12 T細胞を、EGFRvIII⁺AaPCを伴う、3回にわたる、逐次的な刺激ラウンドにより、*ex vivo*において拡大増殖させた。ベレジメクス（100 nM）またはDMSO（対照）を、EGFRvIII⁺AaPCの非存在下（図28A）、または存在下（図28B）において、EGFRvIII-CAR/RTS-IL-12 T細胞の培養物へと、培養物上清中のIL-12レベルの解析前の48時間にわたり添加した。図28Aおよび図28Bに示される通り、EGFRvIII-CAR/RTS-IL-12 T細胞が、ベレジメクス誘導性IL-12を発現する能力は、EGFRvIII抗原特異的刺激の存在下では、大幅に増強されたが、ベレジメクスの非存在下におけるIL-12発現のバックグラウンドレベルは、低レベルであった。

【0454】

[実施例7]

RTS遺伝子スイッチ系を使用する、EGFRvIII-CAR発現細胞内の、ベレジメクスオン-オフサイクリング

IL-12誘導性遺伝子を保有するEGFRvIII-CAR-T細胞に対するベレジメクスによる処置およびこの除去の繰り返しの効果を、*in vitro*の、抗原特異的T細胞活性化の存在下および非存在下の両方において、AaPCとの共培養により決定した。リガンド処置の第1のサイクル（オン-オフ）では、EGFRvIII⁺AaPCを伴う、4回にわたる、逐次的な刺激ラウンドにより、*ex vivo*において拡大増殖させたCAR-T細胞（1 mL当たり10⁶個）を、DMSOまたはベレジメクスで処置し、IL-21およびIL-2を含有する培地中、AaPCの存在下または非存在下において培養した。処置の48時間後、細胞を、完全に洗浄し、リガンドを除去し、新規の培養容器内の、IL-21およびIL-2を含有する培地中で、5日間にわたり培養した。次いで、処置後24～120時間の間に採取された培養物上清を、IL-12およびIFN γ の発現について解析した。

【0455】

リガンド処置の第2のサイクル（オン-オフ）では、サイクル1において、AaPCの存在下で、DMSOまたはベレジメクスにより処置された培養物からのCAR-T細胞を、ベレジメクスの除去（サイクル1における）の5日後に回収し、抗原特異的T細胞活性化の存在下および非存在下において、AaPCとの共培養により、DMSOまたはベレジメクスを伴う、リガンド処置の第2のサイクルにかけた。処置の48時間後、細胞を、完全に洗浄し、リガンドを除去し、新規の培養容器内の、IL-21に加えて、IL-2を含有する培地中で、5日間にわたり培養した。次いで、処置後24～120時間の間に採取された培養物上清を、IL-12およびIFN γ の発現について解析した。

【0456】

図29Aは、誘導性IL-12構築物（XON-61またはXON-62；配列番号135または136）もまた保有する、EGFRvIII-CAR-T細胞内の、ベレジメ

10

20

30

40

50

クスによる処置が、処置の48時間後において、IL-12発現の、培養物上清中のDMSOによる処置と比べて増大を結果としてもたらすことを示す。AaPC媒介性抗原特異的刺激の存在下では、IL-12誘導のレベルは、抗原特異的刺激の非存在下と比較して増強された。ベレジメクスの非存在下では、極めて低バックグラウンドレベルのIL-12発現が、抗原特異的刺激の存在下または非存在下において観察された。誘導性IL-12を伴わないEGFRvIII-CAR-T細胞は、抗原特異的刺激の存在下または非存在下で、IL-12を発現しなかった。

【0457】

ベレジメクス除去の、IL-12発現に対する効果を、図30A（AaPCの非存在下で培養された細胞）および図30B（AaPCの存在下で培養された細胞）に示す。AaPC媒介性抗原特異的刺激の存在下および非存在下のいずれにおいても、処置の48時間後におけるベレジメクスの除去は、IL-12発現の低減を結果としてもたらした。IL-12誘導のレベルは、抗原特異的刺激の非存在下（図30A）では、抗原特異的刺激の存在下（図30B）と比較して、有意に低かった。しかし、ベレジメクスを除去したところ、IL-12のレベルは、徐々に低減され、ベースラインへと戻ったことから、誘導的遺伝子発現の緊密な制御が示される。

【0458】

図31Aおよび図31Bは、サイクル1中の薬剤の除去後の、ベレジメクスまたはDMSOによる、第2のサイクル中のリガンド処置の48時間後における、培養物上清中のIL-12誘導のレベルを示す。サイクル1において、EGFRvIII発現AaPCの存在下で培養された、DMSOまたはベレジメクスによる処置細胞を、サイクル2では、EGFRvIII+AaPCの存在下または非存在下において、ベレジメクス（またはDMSO）で処置した。結果は、サイクル2において、ベレジメクスおよびEGFRvIII+AaPCで処置された細胞が、サイクル1において、ベレジメクスおよびEGFRvIII+AaPCで処置された場合、サイクル1中に、DMSOおよびEGFRvIII+AaPCで処置された細胞（図31A）と比べて、IL-12誘導の増大（図31B）を示すことを示す。ここでもまた、ベレジメクスの非存在下では、極めて低バックグラウンドレベルのIL-12発現が観察された。

【0459】

ベレジメクスにより、2サイクルにわたり処置したときの、RTS-IL-12発現の動態を、図32Aに捕捉する。誘導性IL-12構築物（XON-61またはXON-62；配列番号135または136）を保有するEGFRvIII-CAR-T細胞を、上記で記載した、2サイクルにわたるリガンド処置により、ベレジメクスの存在下または非存在下で、IL-12発現を誘導する、それらの能力について査定した。本実施例におけるリガンド誘導性遺伝子スイッチベクターは、両方のトランスポゾンを発現する細胞だけが、遺伝子スイッチにより制御されるIL-12の発現が可能であるようにデザインする。EGFRvIII-CARの発現は、図34Bにおいて示される通り、リガンド処置のサイクル1の開始前における、T細胞内のフローサイトメトリーにより定量化した。細胞に、CD3についてゲートをかけた。

【0460】

図32Aに示される通り、これらのCAR-T細胞によるIL-12発現は、活性化因子リガンドである、ベレジメクスの添加または除去により、長期にわたる培養期間中、繰り返し、オンおよびオフにすることができる。IL-12発現は、ベレジメクスを除去すると、ベースラインレベルへと低下し、ベレジメクスを添加すると、オンに戻った。データは、1例のドナーに由来する代表的データである。

【0461】

図33は、ベレジメクスにより、2サイクルにわたり処置したときの、RTS-IL-12発現の動態の別の例を示す。誘導性IL-12構築物（XON-61またはXON-62；配列番号135または136）を保有するEGFRvIII-CAR-T細胞を、上記で記載した、2サイクルにわたるリガンド処置により、ベレジメクスの存在下または

10

20

30

40

50

非存在下で、IL-12発現を誘導する、それらの能力について査定した。この場合、第1の処置サイクルは、EGFRvIII⁺AaPCの存在下で実行し、第2のサイクルは、EGFRvIII⁺AaPCの非存在下で実行した。長期にわたる培養期間中に、処置および除去を繰り返すと、ベレジメクスが、EGFRvIIICAR-T細胞によるIL-12発現を調節しうるのは、前出の知見と符合する。サイクル2における、AaPC媒介性EGFRvIII特異的刺激的除去は、対応する、IL-12レベルの低減をもたらす。データは、第2のドナーに由来する代表的データである。

【0462】

[実施例8]

ベレジメクスの用量反応

RTS-IL-12を伴うかまたは伴わないEGFRvIII-CAR T細胞を、EGFRvIII⁺AaPCを伴う、3回にわたる、逐次的な刺激ラウンドにより、*ex vivo*において拡大増殖させた。次いで、用量を0 nM (DMSO対照) ~ 100 nMで変動させるベレジメクスにより、T細胞を処置した。ベレジメクス処置の48時間後、培養物上清を採取し、ELISAにより、IL-12レベルについて解析した。全ての群におけるEGFRvIII-CAR発現を、フローサイトメトリーにより確認したところ、構成的プロモーターの制御下におけるCAR発現に関して予測される通り、ベレジメクスの用量を増大させた場合に安定した(データは示さない)。

【0463】

結果を、図34に示す。結果は、EGFRvIII-CAR/RTS-IL-12 T細胞が、IL-12を、ベレジメクス用量依存的に産生したことを示す。CARおよびIL-12に加えて、細胞タグを発現させるトランスポゾンにトランスフェクトされた細胞では、所与のベレジメクス濃度に対して、細胞タグの発現を欠く細胞と比較して、低レベルのIL-12発現が観察された。RTS-IL-12を伴わないEGFRvIII-CAR-T細胞は、IL-12を発現しなかった。

【0464】

[実施例9]

EGFRvIII-CAR-T細胞の、EGFRvIII⁺標的細胞に対する、特異的細胞傷害作用

EGFRvIII-CARを発現するT細胞が、EGFRvIII⁺標的細胞に対して応答する能力について調べた。RTS-IL-12を伴うかまたは伴わないEGFRvIII-CAR T細胞を、EGFRvIII⁺AaPCを伴う、4回にわたる、逐次的な刺激ラウンドにより、*ex vivo*において拡大増殖させた。これらのエフェクターEGFRvIII-CAR-T細胞は、2%のFBSおよびL-グルタミンを含有するRPMI中で、48時間にわたり休眠させてから、EGFRvIII⁺標的細胞およびEGFRvIII^{neg}標的細胞を、ベレジメクスの非存在下における、エフェクター対標的細胞比を1:1とする共培養にかけた。培養物上清を、培養の24時間後に回収し、EGFRvIII-CAR-T細胞の特異性についての、機能的なリードアウトとしての、IFN γ について解析した。

【0465】

図35は、標的細胞との共培養の24時間後における、CAR-T細胞による、EGFRvIII抗原特異的IFN γ の産生を示す。EGFRvIII^{neg}EL4細胞系との共培養、またはエフェクターCAR-T細胞単独は、IFN γ 発現を結果としてもたらさなかった。

【0466】

図36Aは、EGFRvIIIを発現する神経膠芽腫標的細胞との共培養(ベレジメクスを伴わない)の24時間後における培養物上清中のIFN γ を示す。結果は、EGFRvIII⁺(U251MG-EGFRvIII-Fluc-GFPおよびU87MG-EGFRvIII-Fluc-GFP)神経膠芽腫標的細胞が、EGFRvIII-CAR T細胞によるIFN γ 分泌を誘導したのに対し、EGFRvIII^{neg}標的細胞(U25

10

20

30

40

50

1MG、U251MG-EGFRvIII-Fluc-GFP、U87MG、およびU87MG-Fluc-GFP)、またはエフェクター細胞単独は、IFN γ 分泌を誘導しなかったことを示す。

【0467】

EGFRvIII-CAR-T細胞の、EGFRvIII⁺およびEGFRvIII^{neg}標的細胞に対する細胞傷害作用について、2時間にわたるユーロピウム放出アッセイにおいて調べた。DELFIA BATDA試薬(DELFIA EuTDA Cytotoxicityアッセイ; Perkin Elmer)を使用して、標的細胞系を標識化した。EGFRvIII-CAR-Tエフェクター(E)細胞を、標識化標的(T)細胞と共に、RPMI-1640+5%の熱不活化FBS中に、3:1、1:1または0.3:1の(E:T)比で共培養した。2時間後、共培養物からの上清を採取し、DELFIAユーロピウムアッセイを添加して現像し、時間分解蛍光計測器上で読み取って、標的細胞に対する細胞傷害作用を測定した。実施例の実験からの結果を、図36Bに描示する。

10

【0468】

図36Bに示される通り、RTS-IL-12を伴うかまたは伴わないEGFRvIII-CAR-T細胞は、標的細胞に対する、EGFRvIII抗原特異的な、用量依存性の細胞傷害作用を示した。

【0469】

[実施例10]

PBMCへの、セリンリコンビナーゼ系のヌクレオフェクション

20

セリンリコンビナーゼ接合部位と、図17に描示される遺伝子スイッチ系の構成要素とを含有する、多様なDNAプラスミドを、ヌクレオフェクションを介して、末梢血単核細胞(PBMC)へとトランスフェクトして、T細胞の特異性をリダイレクトした。具体的には、3つの単一ベクター:

(i) CAR:HER1t+構成的mbIL15(陽性対照)

(ii) CAR:HER1t+プロモーターを伴わないmbIL15(陰性対照)

(iii) CAR:HER1t+RTS:mbIL15

を、セリンリコンビナーゼである、SF370の存在下および非存在下において調べた。CARおよびmbIL15の発現は、毎週(1日目、8日目、15日目、および22日目)査定した。細胞のアリコート、各フローの24~48時間前に、DMSOまたはベレジメクスで処置して、誘導性mbIL15発現について評価した。AaPCクローン1を、CAR+細胞との、1:1の比で、毎週添加した。

30

【0470】

CAR/mbIL15ベクター構築物+SF370リコンビナーゼを施される細胞だけが、拡大増殖することが観察され、全ての他の培養物は、同様のトランスフェクション効率にもかかわらず、1週間以内に、拡大増殖に失敗した。この結果は、被験構築物の、リコンビナーゼ媒介性の組込みを示す。HER1tの発現は、22および29日目だけにおいて査定されたが、CAR発現(データは示さない)と相関する。

【0471】

トランスフェクションの2週間後、ベレジメクス処置(約48時間)は、mbIL-15発現の誘導と関連した。ベレジメクスの非存在下では、mbIL-15発現は、陰性対照「プロモーターを伴わないmbIL15」試料の場合の範囲にある。ベレジメクスの除去は、mbIL15発現の完全喪失と関連した。

40

【0472】

本明細書では、本開示の好ましい実施形態を示し、それらについて記載してきたが、当業者には、このような実施形態が、例だけを目的として提示されていることが明らかであろう。今や、本開示から逸脱しない限りにおいて、当業者は、多数の変更、変化、および代用に想到するであろう。本明細書で記載される実施形態、またはこれらの実施形態、もしくはその中で記載される態様のうちの1または複数の組合せに対する、多様な代替物を、本開示の実施において利用しうることを理解されたい。以下の特許請求の範囲は、本開

50

示の範囲を規定するものであり、これらの特許請求の範囲の範囲内にある方法および構造、ならびにそれらの均等物は、その対象となることが意図される。

本発明は以下の態様を含み得る。

[1]

異種遺伝子発現のリガンド誘導性制御のための、遺伝子スイッチポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む組成物であって、前記遺伝子スイッチポリペプチドが、

a) 第1の核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたDNA結合性ドメインを含む、第1の遺伝子スイッチポリペプチド、および

b) 第2の核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたトランス活性化ドメインを含む、第2の遺伝子スイッチポリペプチドを含み、前記第1の遺伝子スイッチポリペプチドと、前記第2の遺伝子スイッチポリペプチドとが、リンカーにより連結されている、組成物。

10

[2]

異種遺伝子発現のリガンド誘導性制御のための遺伝子スイッチ系をコードする、1または複数のポリヌクレオチドを含む組成物であって、前記遺伝子スイッチ系が、

a) トランス活性化ドメインを含む、第1の遺伝子スイッチポリペプチド；

b) リガンド結合性ドメインへと融合させたDNA結合性ドメインを含む、第2の遺伝子スイッチポリペプチド；および

c) 少なくとも1つの異種遺伝子ポリペプチド

を含み、前記第1の遺伝子スイッチポリペプチド、前記第2の遺伝子スイッチポリペプチド、および前記異種遺伝子ポリペプチドのうちの1つが、ポリペプチドリンカーにより、前記第1の遺伝子スイッチポリペプチド、前記第2の遺伝子スイッチポリペプチド、および前記異種遺伝子ポリペプチドのうちの別の1つへと連結されており、前記ポリペプチドリンカーが、切断型リンカーまたはリボソームスキッピングリンカー配列を含む、組成物。

20

[3]

前記DNA結合性ドメインが、GAL4 (GAL4 DBD)、LexA DBD、転写因子DBD、ステロイド／甲状腺ホルモン核内受容体スーパーファミリーメンバーDBD、細菌LacZ DBD、および酵母DBDのうちの少なくとも1つを含む、請求項1または2に記載の組成物。

[4]

前記DNA結合性ドメインが、配列番号184に示される配列を有する、請求項1から3のいずれか一項に記載の組成物。

30

[5]

前記トランス活性化ドメインが、VP16トランス活性化ドメインおよびB42酸性活性化因子トランス活性化ドメインのうちの少なくとも1つを含む、請求項1から4のいずれか一項に記載の組成物。

[6]

前記トランス活性化ドメインが、配列番号181に示される配列を有する、請求項1から5のいずれか一項に記載の組成物。

[7]

前記第1の核内受容体リガンド結合性ドメイン、前記第2の核内受容体リガンド結合性ドメイン、および前記リガンド結合性ドメインのうちの少なくとも1つが、エクジソン受容体 (EcR)、ユビキタス受容体、オーファン受容体1、NER-1、ステロイドホルモン核内受容体1、レチノイドX受容体相互作用性タンパク質15、肝臓X受容体β、ステロイドホルモン受容体様タンパク質、肝臓X受容体、肝臓X受容体α、ファルネソイドX受容体、受容体相互作用性タンパク質14、およびファルネソール受容体のうちの少なくとも1つを含む、請求項1から6のいずれか一項に記載の組成物。

40

[8]

前記第1の核内受容体リガンド結合性ドメイン、前記第2の核内受容体リガンド結合性ドメイン、および前記リガンド結合性ドメインのうちの少なくとも1つが、配列番号18

50

5～186のうちのいずれか1つに示される配列を有する、請求項1から7のいずれか一項に記載の組成物。

[9]

前記第1の遺伝子スイッチポリペプチドが、EcR核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたGAL4 DBDを含み、前記第2の遺伝子スイッチポリペプチドが、レチノイド受容体X (RXR) 核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたVP16トランス活性化ドメインを含む、請求項1に記載の組成物。

[10]

前記EcR核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させた前記GAL4 DBDが、配列番号185～186または187～188のうちのいずれか1つに示される配列を有し、前記レチノイド受容体X (RXR) 核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させた前記VP16トランス活性化ドメインが、配列番号183に示される配列を有する、請求項9に記載の組成物。

[11]

前記リンカーが、切断型リンカー、リボソームスキッピングリンカー配列、またはIRESリンカーである、請求項1に記載の組成物。

[12]

前記リンカーが、IRESリンカーであり、前記IRESリンカーが、配列番号18～19のうちのいずれか1つに示される配列を有する、請求項11に記載の組成物。

[13]

前記リンカーが、切断型リンカーまたはリボソームスキッピングリンカー配列である、請求項11に記載の組成物。

[14]

前記切断型リンカーまたは前記リボソームスキッピングリンカー配列が、2Aリンカー、p2Aリンカー、T2Aリンカー、F2Aリンカー、E2Aリンカー、GS-G-2Aリンカー、GS-Gリンカー、SGSGリンカー、フューリンリンクリンカー変異体およびこれらの誘導体のうちの1または複数を含む、請求項2または13に記載の組成物。

[15]

前記切断型リンカーまたは前記リボソームスキッピングリンカー配列が、配列番号146～162のうちのいずれか1つに示される配列を有する、請求項2または13に記載の組成物。

[16]

前記ポリヌクレオチドまたは前記1または複数のポリヌクレオチドが、抗原結合性ポリペプチドをさらにコードする、請求項1から15のいずれか一項に記載の組成物。

[17]

前記抗原結合性ポリペプチドが、キメラ抗原受容体 (CAR) およびT細胞受容体のうちの少なくとも1つを含む、請求項16に記載の組成物。

[18]

前記抗原結合性ポリペプチドが、CARを含み、前記CARが、CD19、CD33、BCMA、CD44、 α -葉酸受容体、CAIX、CD30、ROR1、CEA、EGP-2、EGP-40、HER2、HER3、葉酸結合性タンパク質、GD2、GD3、IL-13R-a2、KDR、EDB-F、メソテリン、CD22、EGFR、MUC-1、MUC-16、MAGE-A1、h5T4、PSMA、TAG-72、EGFRvIII、CD123、およびVEGF-R2のうちの少なくとも1つに結合することが可能である、請求項17に記載の組成物。

[19]

前記抗原結合性ポリペプチドが、CARを含み、前記CARが、配列番号210～244のうちのいずれか1つに示される配列を有する、請求項17に記載の組成物。

[20]

前記ポリヌクレオチドまたは前記1または複数のポリヌクレオチドが、細胞タグをさら

10

20

30

40

50

にコードする、請求項 16 から 19 のいずれか一項に記載の組成物。

[21]

前記細胞タグが、HER1 切断型変異体または CD20 切断型変異体のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 20 に記載の組成物。

[22]

前記細胞タグが、配列番号 189～202 のうちのいずれか 1 つに示される配列を有する、請求項 20 に記載の組成物。

[23]

前記第 1 の遺伝子スイッチポリペプチド、前記第 2 の遺伝子スイッチポリペプチド、前記抗原結合性ポリペプチド、および前記細胞タグのうちの少なくとも 1 つの発現が、プロモーターによりモジュレートされ、前記プロモーターが、組織特異的プロモーターもしくは EF1A プロモーター、またはこれらの機能的な変異体である、請求項 20 に記載の組成物。

[24]

前記プロモーターが、配列番号 58～60 のうちのいずれか 1 つに示される配列を有する EF1A プロモーター、またはこの機能的な変異体である、請求項 23 に記載の組成物。

[25]

前記プロモーターが、組織特異的プロモーターであり、前記組織特異的プロモーターが、T 細胞特異的応答エレメントを含む、請求項 23 に記載の組成物。

[26]

前記組織特異的プロモーターが、1 または複数の NFAT 応答エレメントを含む、請求項 25 に記載の組成物。

[27]

前記 NFAT 応答エレメントが、配列番号 51～57 のうちのいずれか 1 つに示される配列を有する、請求項 26 に記載の組成物。

[28]

前記組成物が、異種遺伝子ポリペプチドをコードする、第 2 のポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 1 に記載の組成物。

[29]

前記異種遺伝子ポリペプチドが、サイトカイン、細胞タグ、およびキメラ抗原受容体 (CAR) のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 2 または 28 に記載の組成物。

[30]

前記サイトカインは、1 つのサイトカインを含み、前記サイトカインが、IL-1、IL-2、IL-15、IL-12、IL-21、IL-15、IL-15R α 、または IL-15 変異体の融合体のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 29 に記載の組成物。

[31]

前記サイトカインが、分泌形態にある、請求項 30 に記載の組成物。

[32]

前記サイトカインが、膜結合形態にある、請求項 30 に記載の組成物。

[33]

前記サイトカインが、配列番号 203～209 のうちのいずれか 1 つに示される配列を有する、請求項 30 から 32 のいずれか一項に記載の組成物。

[34]

前記少なくとも 1 つの異種遺伝子ポリペプチドの発現が、誘導性プロモーターによりモジュレートされる、請求項 2 および 28 から 33 のいずれか一項に記載の組成物。

[35]

前記誘導性プロモーターが、配列番号 40～64 のうちのいずれかにおいて示される配列を有する、請求項 33 に記載の組成物。

[36]

前記誘導性プロモーターが、前記第 1 の遺伝子スイッチポリペプチド、および前記第 2

10

20

30

40

50

の遺伝子スイッチポリペプチドのうちの少なくとも1つによりモジュレートされる、請求項34または35に記載の組成物。

[37]

請求項1に記載のポリヌクレオチド、または請求項2に記載の、1もしくは複数のポリヌクレオチドのうちの少なくとも1つを含むベクター。

[38]

前記ベクターが、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、または非ウイルスベクターである、請求項37に記載のベクター。

[39]

前記非ウイルスベクターが、Sleeping Beautyトランスポゾンである、請求項38に記載のベクター。

[40]

エフェクター細胞内の異種遺伝子の発現を調節する方法であって、

前記エフェクター細胞へと、(i)リガンド結合性ドメインへと融合させたDNA結合性ドメインを含む、第1の遺伝子スイッチポリペプチド、(ii)トランス活性化ドメインを含む、第2の遺伝子スイッチポリペプチド、(iii)前記異種遺伝子によりコードされる異種遺伝子ポリペプチド、ならびに(iv)切断型リンカー配列またはリボソームスキッピングリンカー配列を含むポリペプチドリンカーをコードする、1または複数のポリヌクレオチドを導入するステップであって、前記ポリペプチドリンカーが、前記第1の遺伝子スイッチポリペプチド、前記第2の遺伝子スイッチポリペプチド、および前記異種遺伝子ポリペプチドのうちの1つを、前記第1の遺伝子スイッチポリペプチド、前記第2の遺伝子スイッチポリペプチド、および前記異種遺伝子ポリペプチドのうちの別の1つへと連結する、ステップと；

前記エフェクター細胞を、前記異種遺伝子の発現を誘導するのに十分な量のリガンドと接触させるステップとを含む方法。

[41]

前記1または複数のポリヌクレオチドのうちの少なくとも1つが、抗原結合性ポリペプチドをさらにコードする、請求項40に記載の方法。

[42]

前記抗原結合性ポリペプチドが、標的細胞の、所定の細胞表面タンパク質に選択的に結合する、請求項41に記載の方法。

[43]

前記標的細胞が、哺乳動物細胞である、請求項42に記載の方法。

[44]

前記標的細胞が、腫瘍細胞である、請求項42または43に記載の方法。

[45]

前記所定の細胞表面タンパク質が、腫瘍抗原である、請求項44に記載の方法。

[46]

前記エフェクター細胞を、前記リガンドと接触させる前記ステップの前に、前記抗原結合性ポリペプチドが、前記標的細胞の、前記所定の細胞表面タンパク質に選択的に結合する、請求項42から45のいずれか一項に記載の方法。

[47]

前記エフェクター細胞を、前記リガンドと接触させる前記ステップの前に、少なくとも7日間にわたり、前記エフェクター細胞を、前記標的細胞の、前記所定の細胞表面タンパク質へと曝露する、請求項46に記載の方法。

[48]

前記抗原結合性ポリペプチドによる、前記所定の細胞表面タンパク質への結合が、前記エフェクター細胞を活性化させる、請求項42から47のいずれか一項に記載の方法。

[49]

前記抗原結合性ポリペプチドが、キメラ抗原受容体(CAR)およびT細胞受容体のう

10

20

30

40

50

ちの少なくとも1つを含む、請求項38から48のいずれか一項に記載の方法。

[50]

前記抗原結合性ポリペプチドが、CARを含み、前記CARが、CD19、CD33、BCMA、CD44、 α -葉酸受容体、CAIX、CD30、ROR1、CEA、EGP-2、EGP-40、HER2、HER3、葉酸結合性タンパク質、GD2、GD3、IL-13R-a2、KDR、EDB-F、メソテリン、CD22、EGFR、MUC-1、MAGE-A1、MUC-16、h5T4、PSMA、TAG-72、EGFRvIII、CD123、およびVEGF-R2のうちの少なくとも1つに結合することが可能である、請求項49に記載の方法。

[51]

前記抗原結合性ポリペプチドが、CARを含み、前記CARが、配列番号210~244のうちのいずれか1つに示される配列を有する、請求項49に記載の方法。

[52]

前記異種遺伝子ポリペプチドが、前記抗原結合性ポリペプチドを含む、請求項38から51のいずれか一項に記載の方法。

[53]

前記1または複数のポリヌクレオチドのうちの少なくとも1つが、細胞タグをさらにコードする、請求項37から52のいずれか一項に記載の方法。

[54]

前記細胞タグが、HER1切断型変異体およびCD20切断型変異体のうちの少なくとも1つを含む、請求項53に記載の方法。

[55]

前記細胞タグが、配列番号189~202のうちのいずれか1つに示される配列を有する、請求項53に記載の方法。

[56]

前記異種遺伝子ポリペプチドが、前記細胞タグを含む、請求項53から55のいずれか一項に記載の方法。

[57]

前記1または複数のポリヌクレオチドのうちの少なくとも1つが、サイトカインをさらにコードする、請求項37から56のいずれか一項に記載の方法。

[58]

前記サイトカインが、IL-1、IL-2、IL-15、IL-12、IL-21、IL-15、IL-15R α 、またはIL-15変異体の融合体のうちの少なくとも1つを含む、請求項57に記載の方法。

[59]

前記サイトカインが、分泌形態にある、請求項58に記載の方法。

[60]

前記サイトカインが、膜結合形態にある、請求項58に記載の方法。

[61]

前記サイトカインが、配列番号203~209のうちのいずれか1つに示される配列を有する、請求項57から60のいずれか一項に記載の方法。

[62]

前記異種遺伝子ポリペプチドが、前記サイトカインを含む、請求項57から61のいずれか一項に記載の方法。

[63]

前記異種遺伝子ポリペプチドの発現が、誘導性プロモーターによりモジュレートされる、請求項37から62のいずれか一項に記載の方法。

[64]

前記誘導性プロモーターが、配列番号40~64のうちのいずれか1つに示される配列を有する、請求項63に記載の方法。

10

20

30

40

50

[6 5]

前記DNA結合性ドメインが、GAL4 (GAL4 DBD)、LexA DBD、転写因子DBD、ステロイド／甲状腺ホルモン核内受容体スーパーファミリーメンバーDBD、細菌LacZ DBD、および酵母DBDのうちの少なくとも1つを含む、請求項37から64のいずれか一項に記載の方法。

[6 6]

前記DNA結合性ドメインが、配列番号184に示される配列を有する、請求項64に記載の方法。

[6 7]

前記トランス活性化ドメインが、VP16トランス活性化ドメインおよびB42酸性活性化因子トランス活性化ドメインのうちの少なくとも1つを含む、請求項37から66のいずれか一項に記載の方法。

10

[6 8]

前記トランス活性化ドメインが、配列番号181に示される配列を有する、請求項67に記載の方法。

[6 9]

前記第1の遺伝子スイッチポリペプチドおよび第2の遺伝子スイッチポリペプチドのうちの少なくとも1つが、前記DNA結合性ドメインに結合することが可能な応答エレメントをさらに含む、請求項37から68のいずれか一項に記載の方法。

[7 0]

前記リガンド結合性ドメインが、エクジソン受容体 (EcR)、ユビキタス受容体、オーファン受容体1、NER-1、ステロイドホルモン核内受容体1、レチノイドX受容体相互作用性タンパク質15、肝臓X受容体β、ステロイドホルモン受容体様タンパク質、肝臓X受容体、肝臓X受容体α、ファルネソイドX受容体、受容体相互作用性タンパク質14、およびファルネソール受容体のうちの少なくとも1つを含む、請求項37から69のいずれか一項に記載の方法。

20

[7 1]

前記リガンド結合性ドメインが、配列番号185～186のうちのいずれか1つに示される配列を有する、請求項70に記載の方法。

[7 2]

前記第1の遺伝子スイッチポリペプチドが、EcR核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたGAL4 DBDを含み、前記第2の遺伝子スイッチポリペプチドが、レチノイド受容体X (RXR) 核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたVP16トランス活性化ドメインを含む、請求項37から71のいずれか一項に記載の方法。

30

[7 3]

EcRへと融合させた前記Gal4 DBDが、配列番号185～186のうちのいずれか1つに示される配列を有し、前記レチノイド受容体X (RXR) 核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたVP16トランス活性化ドメインが、配列番号183に示される配列を有する、請求項72に記載の方法。

[7 4]

前記リガンドが、
(2S, 3R, 5R, 9R, 10R, 13R, 14S, 17R) - 17 - [(2S, 3R) - 3, 6 - ジヒドロキシ - 6 - メチルヘプタン - 2 - イル] - 2, 3, 14 - トリヒドロキシ - 10, 13 - ジメチル - 2, 3, 4, 5, 9, 11, 12, 15, 16, 17 - デカヒドロ - 1H - シクロペンタ [a] フェナントレン - 6 - オン; N' - (3, 5 - ジメチルベンゾイル) - N' - [(3R) - 2, 2 - ジメチル - 3 - ヘキサニル] - 2 - エチル - 3 - メトキシベンゾヒドラジド; 5 - メチル - 2, 3 - ジヒドロ - ベンゾ [1, 4] ジオキシシン - 6 - カルボン酸 N' - (3, 5 - ジメチル - ベンゾイル) - N' - (1 - エチル - 2, 2 - ジメチル - プロピル) - ヒドラジド; 5 - メチル - 2, 3 - ジヒドロ - ベンゾ [1, 4] ジオキシシン - 6 - カルボン酸 N' - (3, 5 - ジメトキシ - 4 - メチル - ベンゾ

40

50

イル) - N' - (1-エチル-2, 2-ジメチル-プロピル) - ヒドラジド; 5-メチル-2, 3-ジヒドロ-ベンゾ [1, 4] ジオキシ-6-カルボン酸 N' - (1-tert-ブチル-ブチル) - N' - (3, 5-ジメチル-ベンゾイル) - ヒドラジド; 5-メチル-2, 3-ジヒドロ-ベンゾ [1, 4] ジオキシ-6-カルボン酸 N' - (1-tert-ブチル-ブチル) - N' - (3, 5-ジメトキシ-4-メチル-ベンゾイル) - ヒドラジド; 5-エチル-2, 3-ジヒドロ-ベンゾ [1, 4] ジオキシ-6-カルボン酸 N' - (3, 5-ジメチル-ベンゾイル) - N' - (1-エチル-2, 2-ジメチル-プロピル) - ヒドラジド; 5-エチル-2, 3-ジヒドロ-ベンゾ [1, 4] ジオキシ-6-カルボン酸 N' - (3, 5-ジメトキシ-4-メチル-ベンゾイル) - N' - (1-エチル-2, 2-ジメチル-プロピル) - ヒドラジド; 5-エチル-2, 3-ジヒドロ-ベンゾ [1, 4] ジオキシ-6-カルボン酸 N' - (1-tert-ブチル-ブチル) - N' - (3, 5-ジメチル-ベンゾイル) - ヒドラジド; 5-エチル-2, 3-ジヒドロ-ベンゾ [1, 4] ジオキシ-6-カルボン酸 N' - (1-tert-ブチル-ブチル) - N' - (3, 5-ジメトキシ-4-メチル-ベンゾイル) - ヒドラジド; 3, 5-ジメチル-安息香酸 N - (1-エチル-2, 2-ジメチル-プロピル) - N' - (3-メトキシ-2-メチル-ベンゾイル) - ヒドラジド; 3, 5-ジメトキシ-4-メチル-安息香酸 N - (1-エチル-2, 2-ジメチル-プロピル) - N' - (3-メトキシ-2-メチル-ベンゾイル) - ヒドラジド; 3, 5-ジメチル-安息香酸 N - (1-tert-ブチル-ブチル) - N' - (3-メトキシ-2-メチル-ベンゾイル) - ヒドラジド; 3, 5-ジメトキシ-4-メチル-安息香酸 N - (1-tert-ブチル-ブチル) - N' - (3-メトキシ-2-メチル-ベンゾイル) - ヒドラジド; 3, 5-ジメチル-安息香酸 N - (1-エチル-2, 2-ジメチル-プロピル) - N' - (2-エチル-3-メトキシ-ベンゾイル) - ヒドラジド; 3, 5-ジメトキシ-4-メチル-安息香酸 N - (1-エチル-2, 2-ジメチル-プロピル) - N' - (2-エチル-3-メトキシ-ベンゾイル) - ヒドラジド; 3, 5-ジメチル-安息香酸 N - (1-tert-ブチル-ブチル) - N' - (2-エチル-3-メトキシ-ベンゾイル) - ヒドラジド; 3, 5-ジメトキシ-4-メチル-安息香酸 N - (1-tert-ブチル-ブチル) - N' - (2-エチル-3-メトキシ-ベンゾイル) - ヒドラジド; 2-メトキシ-ニコチン酸 N - (1-tert-ブチル-ペンチル) - N' - (4-エチル-ベンゾイル) - ヒドラジド; 3, 5-ジメチル-安息香酸 N - (2, 2-ジメチル-1-フェニル-プロピル) - N' - (4-エチル-ベンゾイル) - ヒドラジド; 3, 5-ジメチル-安息香酸 N - (1-tert-ブチル-ペンチル) - N' - (3-メトキシ-2-メチル-ベンゾイル) - ヒドラジド; および 3, 5-ジメトキシ-4-メチル-安息香酸 N - (1-tert-ブチル-ペンチル) - N' - (3-メトキシ-2-メチル-ベンゾイル) - ヒドラジドのうちの少なくとも1つを含む、請求項 37 から 73 のいずれか一項に記載の方法。

[7 5]

前記異種遺伝子の前記発現が、前記リガンドの非存在下において、前記リガンドの存在下における発現と比較して低減されるか、または消失する、請求項 37 から 74 のいずれか一項に記載の方法。

[7 6]

前記異種遺伝子の前記発現が、さらなる量の前記リガンドを施すことにより回復する、請求項 75 に記載の方法。

[7 7]

前記第 1 の遺伝子スイッチポリペプチドおよび第 2 の遺伝子スイッチポリペプチドのうちの少なくとも1つの発現が、プロモーターによりモジュレートされ、前記プロモーターが、組織特異的プロモーターもしくは EF1A プロモーター、またはこれらの機能的な変異体である、請求項 37 から 76 のいずれか一項に記載の方法。

[7 8]

前記プロモーターが、配列番号 58 ~ 60 のうちのいずれか 1 つに示される配列を有する EF1A プロモーター、またはこの機能的な変異体である、請求項 77 に記載の方法。

[7 9]

前記プロモーターが、組織特異的プロモーターであり、前記組織特異的プロモーターが、T細胞特異的応答エレメントを含む、請求項77に記載の方法。

[8 0]

前記組織特異的プロモーターが、1または複数のNFAT応答エレメントを含む、請求項79に記載の方法。

[8 1]

前記NFAT応答エレメントが、配列番号50～57のうちのいずれか1つに示される配列を有する、請求項80に記載の方法。

[8 2]

前記1または複数のポリヌクレオチドが、ベクター内に含まれる、請求項40から81のいずれか一項に記載の方法。

[8 3]

前記ベクターが、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、または非ウイルスベクターである、請求項82に記載の方法。

[8 4]

前記非ウイルスベクターが、Sleeping Beautyトランスポゾンである、請求項83に記載の方法。

[8 5]

1または複数の発現カセットを含む、異種遺伝子発現のリガンド誘導性制御のための遺伝子スイッチ系であって、前記1または複数の発現カセットが、

a) 第1の核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたDNA結合性ドメインを含む、第1の遺伝子スイッチポリペプチドをコードする配列；

b) 第2の核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたトランス活性化ドメインを含む、第2の遺伝子スイッチポリペプチドをコードする配列を含み、

前記第1の遺伝子スイッチポリペプチドと、前記第2の遺伝子スイッチポリペプチドとが、ポリペプチドリンカーにより連結されている、遺伝子スイッチ系。

[8 6]

1または複数の発現カセットを含む、異種遺伝子発現のリガンド誘導性制御のための遺伝子スイッチ系であって、前記1または複数の発現カセットが、

a) トランス活性化ドメインを含む、第1の遺伝子スイッチポリペプチドをコードする配列；

b) リガンド結合性ドメインへと融合させたDNA結合性ドメインを含む、第2の遺伝子スイッチポリペプチドをコードする配列；および

c) 異種遺伝子ポリペプチドをコードする配列を含み、

前記リガンド結合性ドメインへと融合させた前記トランス活性化ドメイン、DNA結合性ドメイン、および前記異種遺伝子ポリペプチドのうちの1つが、ポリペプチドリンカーにより、前記リガンド結合性ドメインへと融合させた前記トランス活性化ドメイン、DNA結合性ドメイン、および前記異種遺伝子ポリペプチドのうちの別の1つへと連結されており、前記ポリペプチドリンカーが、切断型リンカー配列またはリボソームスキッピングリンカー配列を含む、遺伝子スイッチ系。

[8 7]

前記1または複数の発現カセットが、異種遺伝子ポリペプチドをコードする配列をさらに含む、請求項85に記載の遺伝子スイッチ系。

[8 8]

前記1または複数の発現カセットが、以下：

a) 1または複数のリコンビナーゼ接合部位；および

b) セリンリコンビナーゼをコードする配列

のうちの1または複数のをさらに含む、請求項85から87のいずれか一項に記載の遺伝子

10

20

30

40

50

スイッチ系。

[8 9]

前記 1 または複数の発現カセットが、以下：

a) 非誘導性プロモーター；および

b) 誘導性プロモーター

のうちの 1 または複数のさらに含む、請求項 8 5 から 8 8 のいずれか一項に記載の遺伝子スイッチ系。

[9 0]

前記 DNA 結合性ドメインが、配列番号 1 8 4 に示される配列を有する、請求項 8 5 から 8 9 のいずれか一項に記載の遺伝子スイッチ系。

[9 1]

前記トランス活性化ドメインが、配列番号 1 8 1 に示される配列を有する、請求項 8 5 から 9 0 のいずれか一項に記載の遺伝子スイッチ系。

[9 2]

前記第 1 の核内受容体リガンド結合ドメイン、および第 2 の核内受容体リガンド結合ドメイン、ならびに前記リガンド結合性ドメインのうちの少なくとも 1 つが、配列番号 1 8 5 ～ 1 8 6 のうちのいずれか 1 つに示される配列を有する、請求項 8 5 から 9 1 のいずれか一項に記載の遺伝子スイッチ系。

[9 3]

前記非誘導性プロモーターが、配列番号 4 0 ～ 6 4 のうちのいずれか 1 つに示される配列を有する、請求項 8 9 に記載の遺伝子スイッチ系。

[9 4]

前記誘導性プロモーターが、配列番号 4 0 ～ 6 4 のうちのいずれか 1 つに示される配列を有する、請求項 8 9 に記載の遺伝子スイッチ系。

[9 5]

前記ポリペプチドリンカーが、配列番号 1 4 6 ～ 1 6 2 のうちのいずれか 1 つに示される配列を有する、請求項 8 5 に記載の遺伝子スイッチ系。

[9 6]

前記ポリペプチドリンカーが、配列番号 1 8 ～ 1 9 および 1 4 6 ～ 1 6 2 のうちのいずれか 1 つに示される配列を伴う切断型リンカー、リボソームスキッピングリンカー、または I R E S リンカーである、請求項 8 6 に記載の遺伝子スイッチ系。

[9 7]

前記 1 または複数の発現カセットが、キメラ抗原受容体 (C A R) をコードする配列を含む発現カセットを含み、前記キメラ抗原受容体の発現が、非誘導性プロモーターによりモジュレートされる、請求項 8 5 に記載の遺伝子スイッチ系。

[9 8]

前記 C A R が、C D 1 9、C D 3 3、B C M A、C D 4 4、 α -葉酸受容体、C A I X、C D 3 0、R O R 1、C E A、E G P - 2、E G P - 4 0、H E R 2、H E R 3、葉酸結合性タンパク質、G D 2、G D 3、I L - 1 3 R - a 2、K D R、E D B - F、メソテリン、C D 2 2、E G F R、M U C - 1、M A G E - A 1、M U C - 1 6、h 5 T 4、P S M A、T A G - 7 2、E G F R v I I I、C D 1 2 3、および V E G F - R 2 のうちの少なくとも 1 つに結合することが可能である、請求項 9 7 に記載の遺伝子スイッチ系。

[9 9]

前記非誘導性プロモーターが、E F 1 A またはこれらの変異体を含む、請求項 9 7 に記載の遺伝子スイッチ系。

[1 0 0]

前記発現カセットが、配列番号 1 3 1 に示される配列を有する、請求項 9 7 に記載の遺伝子スイッチ系。

[1 0 1]

前記発現カセットが、細胞タグをコードする配列をさらに含み、前記細胞タグが、リン

10

20

30

40

50

カーにより、前記CARへと連結されている、請求項97に記載の遺伝子スイッチ系。

[102]

前記細胞タグが、HER1切断型変異体およびCD20切断型変異体のうちの少なくとも1つを含む、請求項101に記載の遺伝子スイッチ系。

[103]

前記発現カセットが、配列番号132に示される配列を有する、請求項102に記載の遺伝子スイッチ系。

[104]

前記発現カセットが、前記第1の遺伝子スイッチポリペプチドをコードする前記配列および前記第2の遺伝子スイッチポリペプチドをコードする前記配列をさらに含み、前記第1の遺伝子スイッチポリペプチドおよび第2の遺伝子スイッチポリペプチドのうちの1つが、リンカーにより、前記CARへと連結されている、請求項97に記載の遺伝子スイッチ系。

[105]

前記第1の遺伝子スイッチポリペプチドと、第2の遺伝子スイッチポリペプチドとが、前記ポリペプチドリンカーにより連結されており、前記ポリペプチドリンカーが、切断型リンカーである、請求項104に記載の遺伝子スイッチ系。

[106]

前記発現カセットが、配列番号133に示される配列を有する、請求項105に記載の遺伝子スイッチ系。

[107]

前記第1の遺伝子スイッチポリペプチドと、第2の遺伝子スイッチポリペプチドとが、前記ポリペプチドリンカーにより連結されており、前記ポリペプチドリンカーが、IRESリンカーである、請求項106に記載の遺伝子スイッチ系。

[108]

前記発現カセットが、配列番号134に示される配列を有する、請求項107に記載の遺伝子スイッチ系。

[109]

前記1または複数の発現カセットが、前記異種遺伝子ポリペプチドをコードする前記配列を含む発現カセットを含み、前記異種遺伝子ポリペプチドの発現が、誘導性プロモーターによりモジュレートされる、請求項86または87に記載の遺伝子スイッチ系。

[110]

前記異種遺伝子ポリペプチドが、サイトカインを含む、請求項109に記載の遺伝子スイッチ系。

[111]

前記サイトカインが、IL-1、IL-2、IL-15、IL-12、IL-21、IL-15、IL-15R α 、またはIL-15変異体の融合体のうちの少なくとも1つを含む、請求項110に記載の遺伝子スイッチ系。

[112]

前記発現カセットが、配列番号135に示される配列を有する、請求項109に記載の遺伝子スイッチ系。

[113]

前記発現カセットが、第2の異種遺伝子ポリペプチドをコードする配列を含み、前記第2の異種遺伝子ポリペプチドが、細胞タグを含む、請求項109に記載の遺伝子スイッチ系。

[114]

前記細胞タグが、HER1切断型変異体およびCD20切断型変異体のうちの少なくとも1つを含む、請求項113に記載の遺伝子スイッチ系。

[115]

前記細胞タグが、リンカーにより、前記サイトカインへと連結されている、請求項11

10

20

30

40

50

4に記載の遺伝子スイッチ系。

[116]

前記発現カセットが、配列番号136に示される配列を有する、請求項115に記載の遺伝子スイッチ系。

[117]

異種遺伝子を、宿主細胞内に組み込むための遺伝子スイッチ系であり、前記宿主細胞を、前記セリンリコンビナーゼ、および前記1または複数のリコンビナーゼ接合部位の存在下で、前記1または複数の発現カセットと接触させると、前記異種遺伝子が、前記宿主細胞内に組み込まれる、請求項88に記載の遺伝子スイッチ系。

[118]

前記系が、リガンドをさらに含み、前記宿主細胞を、前記リガンドと接触させると、前記異種遺伝子が、前記宿主細胞内で発現する、請求項117に記載の遺伝子スイッチ系。

[119]

前記宿主細胞が、T細胞またはNK細胞である、請求項117または118に記載の遺伝子スイッチ系。

[120]

前記誘導性プロモーターが、前記トランス活性化ドメインにより活性化する、請求項89に記載の遺伝子スイッチ系。

[121]

1または複数のベクター内に含有される、請求項85から120のいずれか一項に記載の遺伝子スイッチ系。

[122]

1つのベクター内に含有される、請求項121に記載の遺伝子スイッチ系。

[123]

請求項85から89のいずれか一項に記載の遺伝子スイッチ系の構成要素のうちの1または複数にコードするポリヌクレオチド。

[124]

請求項123に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

[125]

前記ベクターが、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、または非ウイルスベクターのうちのいずれか1つである、請求項124に記載のベクター。

[126]

前記ベクターが、非ウイルスベクターであり、前記非ウイルスベクターが、Sleeping Beautyトランスポゾンである、請求項125に記載のベクター。

[127]

第1の遺伝子スイッチポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、
第2の遺伝子スイッチポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、および
目的の遺伝子(GOI)をコードするポリヌクレオチド
を含むポリヌクレオチド構築物であって、

前記GOIをコードする前記ポリヌクレオチドが、前記第1の遺伝子スイッチポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドと、前記第2の遺伝子スイッチポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドとの間に位置する、連続オープンリーディングフレーム(ORF)を含み、前記ポリヌクレオチド構築物が、リンカーをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記GOIが、前記リンカーにより、前記第1の遺伝子スイッチポリペプチドおよび第2の遺伝子スイッチポリペプチドの各々へと連結されている、ポリヌクレオチド構築物。

[128]

(i) 第1の核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたDNA結合性ドメインを含む、第1の遺伝子スイッチポリペプチドをコードする、第1の配列；および(ii) 第2の核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたトランス活性化ドメインを含む

10

20

30

40

50

、第2の遺伝子スイッチポリペプチドをコードする、第2の配列のうちの少なくとも1つを含み；

前記第1の配列および前記第2の配列のうちの少なくとも1つの発現が、1または複数のNFAT応答エレメントによりモジュレートされる、ポリヌクレオチド。

[129]

操作細胞の増殖および／または生存を刺激する方法であって、

(a) 細胞試料を、対象から得るステップと、

(b) 前記細胞試料の細胞に、1または複数のトランスポゾンを含む、1または複数のポリヌクレオチドをトランスフェクトするステップであって、前記1または複数のトランスポゾンが、

キメラ抗原受容体(CAR)またはTCR、サイトカイン、1または複数の細胞タグ、前記サイトカインのリガンド誘導性制御のための遺伝子スイッチポリペプチド、および前記1または複数のポリヌクレオチドを、前記細胞のゲノムへと組み込んで、操作細胞の集団をもたらすのに有効なトランスポザーゼをコードする、ステップとを含み、

前記遺伝子スイッチポリペプチドが、i) 第1の核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたDNA結合性ドメインを含む、第1の遺伝子スイッチポリペプチド、およびii) 第2の核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたトランス活性化ドメインを含む、第2の遺伝子スイッチポリペプチドを含み、前記第1の遺伝子スイッチポリペプチドと、前記第2の遺伝子スイッチポリペプチドとが、リンカーにより連結されている、方法。

[130]

それを必要とする対象の、*in vivo*における操作細胞の存続を増強する方法であって、

(a) 細胞試料を、対象から得るステップと、

(b) 前記細胞試料の細胞に、1または複数のトランスポゾンを含む、1または複数のポリヌクレオチドをトランスフェクトするステップであって、前記1または複数のトランスポゾンが、

キメラ抗原受容体(CAR)またはTCR、サイトカイン、1または複数の細胞タグ、前記サイトカインのリガンド誘導性制御のための遺伝子スイッチポリペプチド、および前記DNAを、前記細胞のゲノムへと組み込んで、操作細胞の集団をもたらすのに有効なトランスポザーゼをコードする、ステップとを含み、

前記遺伝子スイッチポリペプチドが、i) 第1の核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたDNA結合性ドメインを含む、第1の遺伝子スイッチポリペプチド、およびii) 第2の核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたトランス活性化ドメインを含む、第2の遺伝子スイッチポリペプチドを含み、前記第1の遺伝子スイッチポリペプチドと、前記第2の遺伝子スイッチポリペプチドとが、リンカーにより連結されている、方法。

[131]

前記細胞にトランスフェクトするステップが、前記細胞に電気穿孔することを含む、請求項129または130に記載の方法。

[132]

前記1または複数のポリヌクレオチドのうちの、少なくとも1つのポリヌクレオチドが、前記遺伝子スイッチポリペプチドをコードし、前記少なくとも1つのポリヌクレオチドが、プロモーターによりモジュレートされ、前記プロモーターが、組織特異的プロモーターもしくはEF1Aプロモーター、またはこれらの機能的な変異体である、請求項129から131のいずれか一項に記載の方法。

[133]

前記プロモーターが、配列番号58～60のうちのいずれか1つに示される配列を有す

10

20

30

40

50

る E F 1 A プロモーター、またはこの機能的な変異体である、請求項 1 3 2 に記載の方法。

[1 3 4]

前記プロモーターが、組織特異的プロモーターであり、前記組織特異的プロモーターが、T細胞特異的応答エレメントを含む、請求項 1 3 2 に記載の方法。

[1 3 5]

前記プロモーターが、組織特異的プロモーターであり、前記組織特異的プロモーターが、1または複数の N F A T 応答エレメントを含む、請求項 1 3 2 に記載の方法。

[1 3 6]

前記 N F A T 応答エレメントが、配列番号 5 0 ～ 5 7 のうちのいずれか 1 つに示される配列を有する、請求項 1 3 5 に記載の方法。

[1 3 7]

前記サイトカインが、I L - 1、I L - 2、I L - 1 5、I L - 1 2、I L - 2 1、I L - 1 5、I L - 1 5 R α 、または I L - 1 5 変異体の融合体のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 1 2 9 から 1 3 6 のいずれか一項に記載の方法。

[1 3 8]

前記サイトカインが、分泌形態にある、請求項 1 3 7 に記載の方法。

[1 3 9]

前記サイトカインが、膜結合形態にある、請求項 1 3 7 に記載の方法。

[1 4 0]

前記サイトカインが、配列番号 2 0 3 ～ 2 0 9 のうちのいずれか 1 つに示される配列を有する、請求項 1 3 7 から 1 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

[1 4 1]

前記細胞が、N K 細胞、N K T 細胞、T 細胞、または T 細胞前駆細胞である、請求項 1 2 9 から 1 4 0 のいずれか一項に記載の方法。

[1 4 2]

前記方法が、有効量の前記操作細胞を、それを必要とする対象へと投与するステップをさらに含む、請求項 1 2 9 から 1 4 1 のいずれか一項に記載の方法。

[1 4 3]

投与する前記ステップが、前記対象に、前記操作細胞を、速やかに輸注することを含む、請求項 1 4 2 に記載の方法。

[1 4 4]

前記方法が、有効量の前記リガンドを投与して、前記サイトカインの発現を誘導するステップをさらに含む、請求項 1 4 2 または 1 4 3 に記載の方法。

[1 4 5]

前記リガンドが、ベレジメクスである、請求項 1 4 4 に記載の方法。

[1 4 6]

前記 C A R が、C D 1 9、C D 3 3、B C M A、C D 4 4、 α -葉酸受容体、C A I X、C D 3 0、R O R 1、C E A、E G P - 2、E G P - 4 0、H E R 2、H E R 3、葉酸結合性タンパク質、G D 2、G D 3、I L - 1 3 R - α 2、K D R、E D B - F、メソテリン、C D 2 2、E G F R、M U C - 1、M A G E - A 1、M U C - 1 6、h 5 T 4、P S M A、T A G - 7 2、E G F R v I I I、C D 1 2 3、および V E G F - R 2 のうちの少なくとも 1 つに結合することが可能である、請求項 1 2 9 から 1 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

[1 4 7]

前記 C A R が、前記 C D 1 9 に結合することが可能である、請求項 1 4 6 に記載の方法。

[1 4 8]

前記 C A R が、前記 C D 3 3 に結合することが可能である、請求項 1 4 6 に記載の方法。

[1 4 9]

前記トランスポザーゼが、サケ科型 T c 1 様トランスポザーゼである、請求項 1 2 9 から 1 4 8 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

[1 5 0]

前記トランスポザーゼが、S B 1 1またはS B 1 0 0 xトランスポザーゼである、請求項 1 2 9 から 1 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

[1 5 1]

前記 1 または複数の細胞タグが、H E R 1 切断型変異体および C D 2 0 切断型変異体のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 1 2 9 から 1 5 0 のいずれか一項に記載の方法。

[1 5 2]

前記 1 または複数の細胞タグが、配列番号 1 8 9 ~ 2 0 2 のうちのいずれか 1 つに示される配列を有する、請求項 1 2 9 から 1 5 1 のいずれか一項に記載の方法。

[1 5 3]

充実性腫瘍を伴う対象を処置する方法であって、

(a) 細胞試料を、対象から得るステップと、

(b) 前記細胞試料の細胞に、1 または複数のトランスポゾンを含む、1 または複数のポリヌクレオチドをトランスフェクトするステップであって、前記 1 または複数のトランスポゾンが、

キメラ抗原受容体 (C A R) または T C R 、サイトカイン、1 または複数の細胞タグ、前記サイトカインのリガンド誘導性制御のための遺伝子スイッチポリペプチド、および前記 D N A を、前記細胞のゲノムへと組み込んで、操作細胞の集団をもたらすのに有効なトランスポザーゼをコードし、

前記遺伝子スイッチポリペプチドが、i) 第 1 の核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させた D N A 結合性ドメインを含む、第 1 の遺伝子スイッチポリペプチド、および i i) 第 2 の核内受容体リガンド結合性ドメインへと融合させたトランス活性化ドメインを含む、第 2 の遺伝子スイッチポリペプチドを含み、前記第 1 の遺伝子スイッチポリペプチドと、前記第 2 の遺伝子スイッチポリペプチドとが、リンカーにより連結されている、ステップと、

(c) 操作細胞の前記集団を、前記対象へと投与するステップとを含む方法。

[1 5 4]

前記サイトカインが、I L - 1 、 I L - 2 、 I L - 1 5 、 I L - 1 2 、 I L - 2 1 、 I L - 1 5 、 I L - 1 5 R α 、または I L - 1 5 変異体の融合体のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 1 5 3 に記載の方法。

[1 5 5]

前記サイトカインが、I L - 1 2 を含む、請求項 1 5 4 に記載の方法。

[1 5 6]

前記 1 または複数のポリヌクレオチドのうちの、少なくとも 1 つのポリヌクレオチドが、前記遺伝子スイッチポリペプチドをコードし、前記少なくとも 1 つのポリヌクレオチドが、プロモーターによりモジュレートされ、前記プロモーターが、組織特異的プロモーターもしくは E F 1 A プロモーター、またはこれらの機能的な変異体である、請求項 1 5 3 に記載の方法。

[1 5 7]

前記プロモーターが、配列番号 5 8 ~ 6 0 のうちのいずれか 1 つに示される配列を有する E F 1 A プロモーター、またはこの機能的な変異体である、請求項 1 5 6 に記載の方法。

[1 5 8]

前記プロモーターが、組織特異的プロモーターであり、前記組織特異的プロモーターが、T 細胞特異的応答エレメントを含む、請求項 1 5 6 に記載の方法。

[1 5 9]

前記プロモーターが、組織特異的プロモーターであり、前記組織特異的プロモーターが、1 または複数の N F A T 応答エレメントを含む、請求項 1 5 6 に記載の方法。

[1 6 0]

前記 N F A T 応答エレメントが、配列番号 5 0 ~ 5 7 のうちのいずれか 1 つに示される

10

20

30

40

50

配列を有する、請求項 1 5 9 に記載の方法。

【図面】

【図 1】

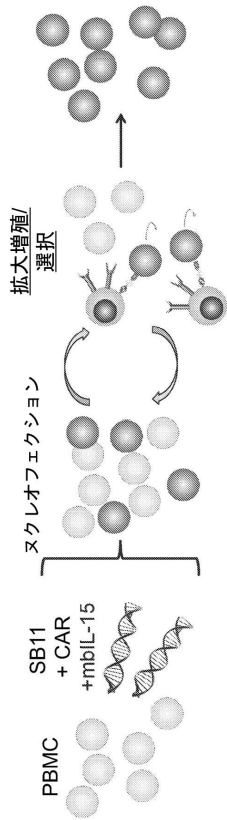


図 1

【図 2 A】

番号	ベクター1	ベクター2
1		該当なし
2		
3		
4		
5		
6		
7		

図 2A

【図 2 B】

番号	ベクター1	ベクター2
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		

図 2B

【図 2 C】

番号	ベクター1	ベクター2
16		
17		
18		
19		
20		
21		
22		
23		

図 2C

10

20

30

40

50

【図 2 D】

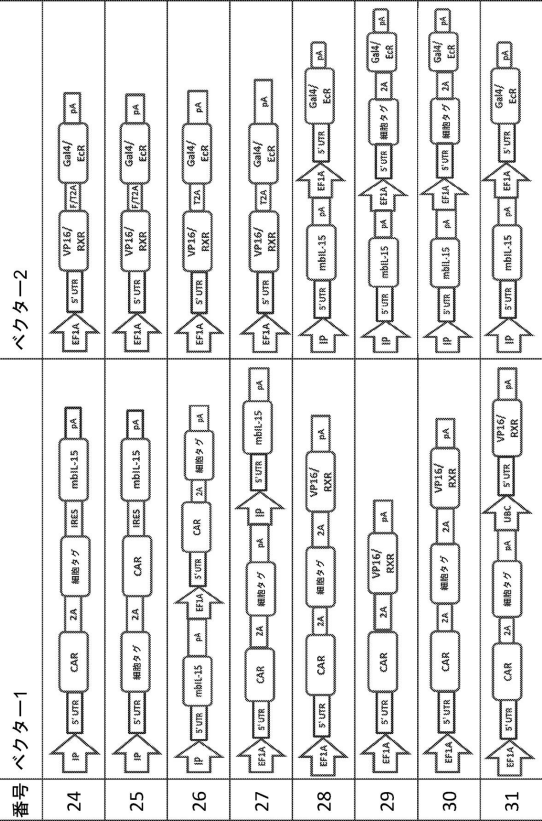


図 2D

【図 3】

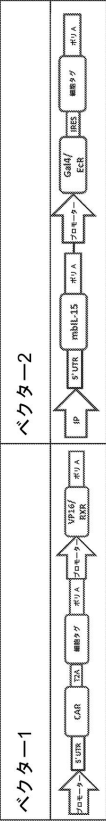


図 3

【図 4】

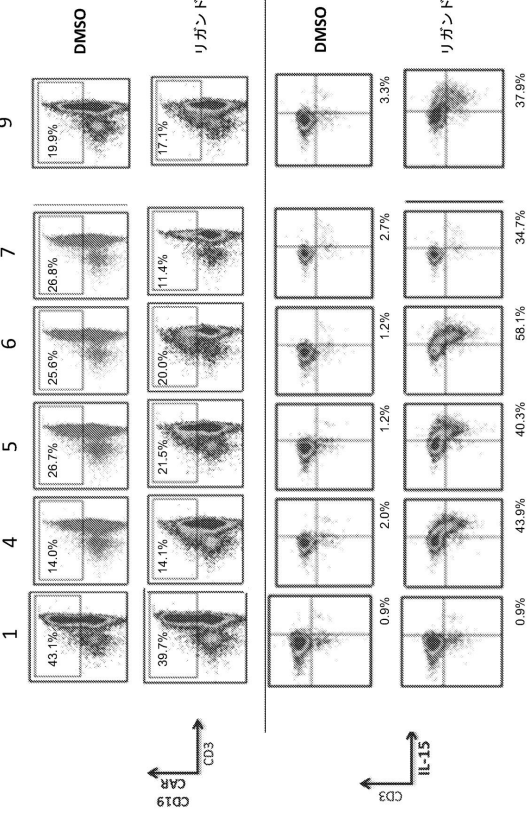


図 4

【図 5】

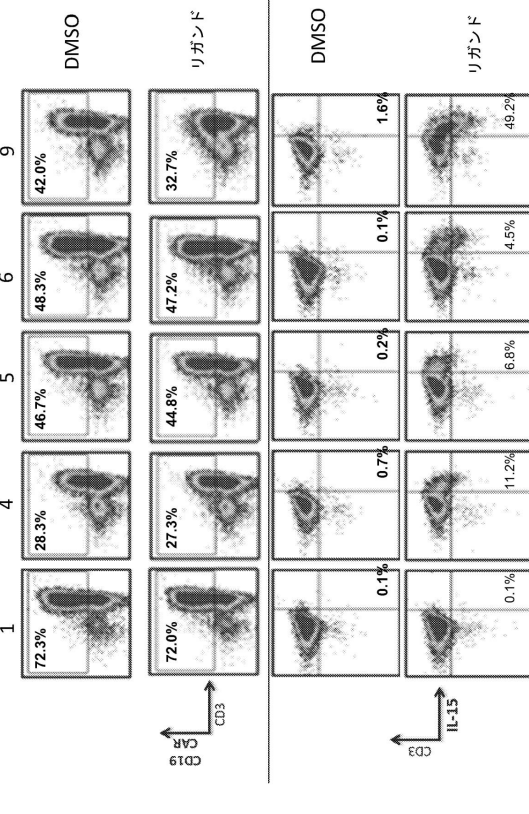
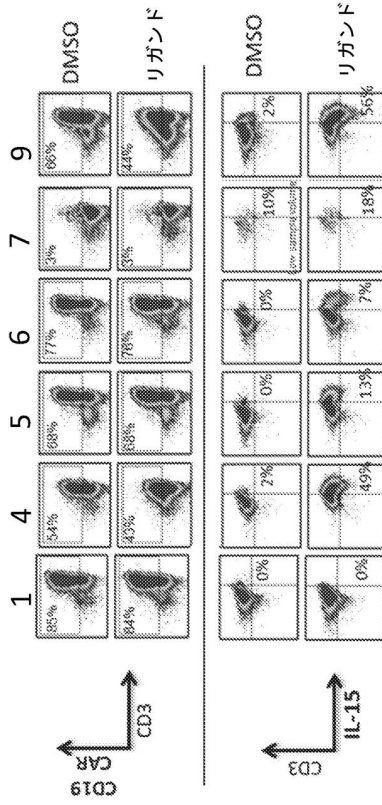


図 5

【図 6】



【図 7】

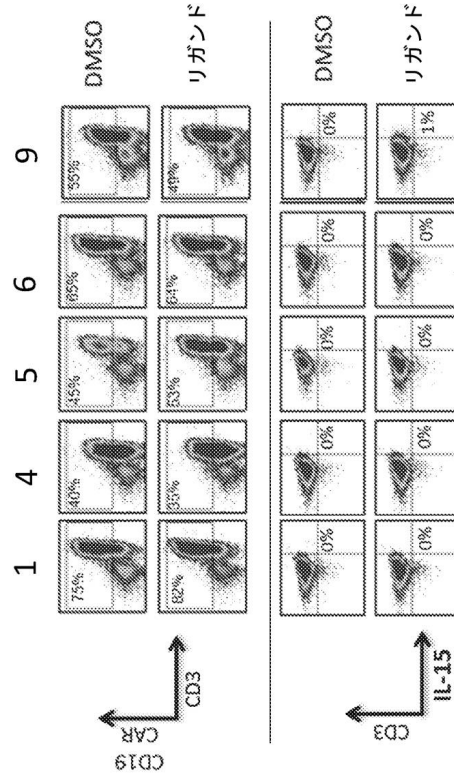
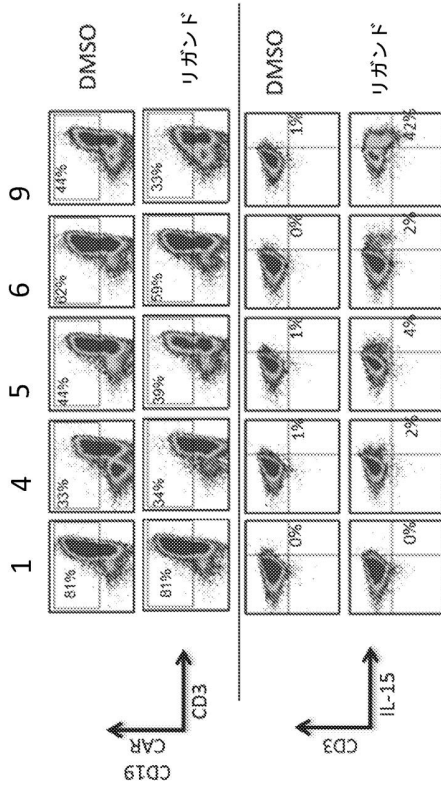


図 6

図 7

【図 8】



【図 9】

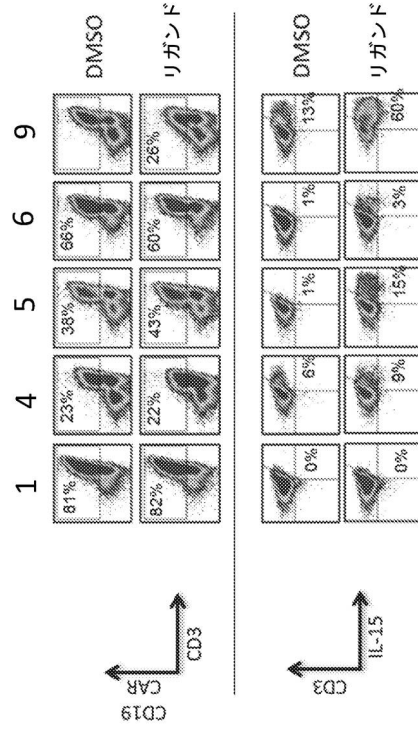


図 8

図 9

10

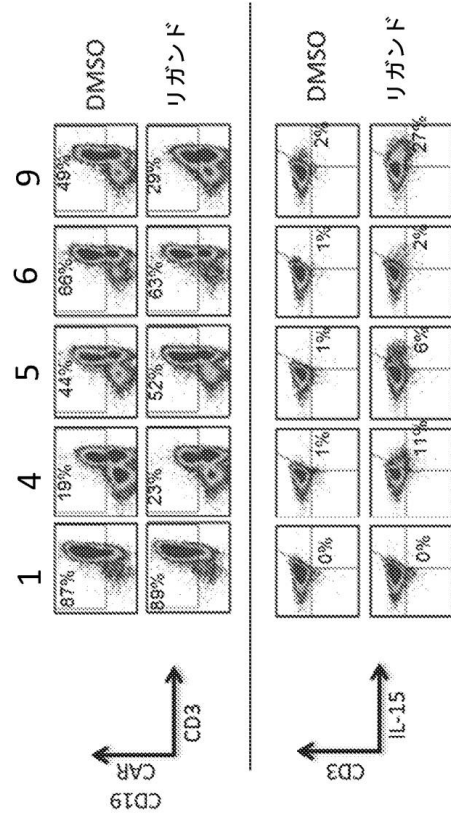
20

30

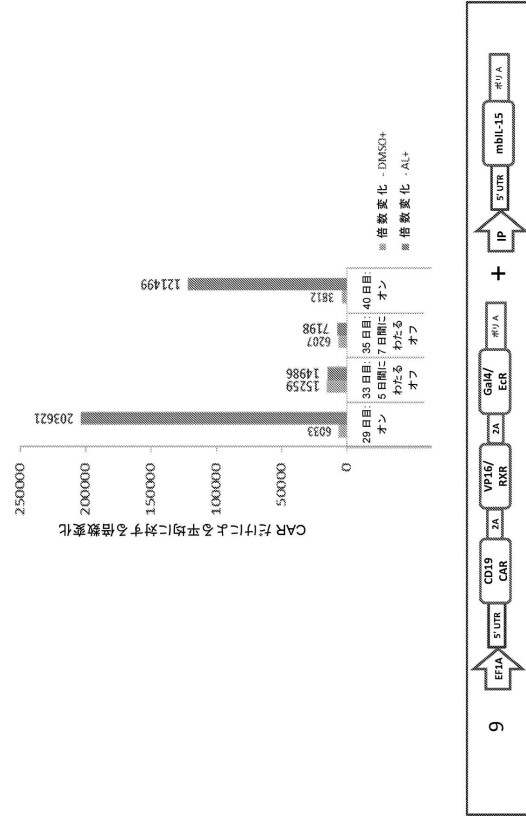
40

50

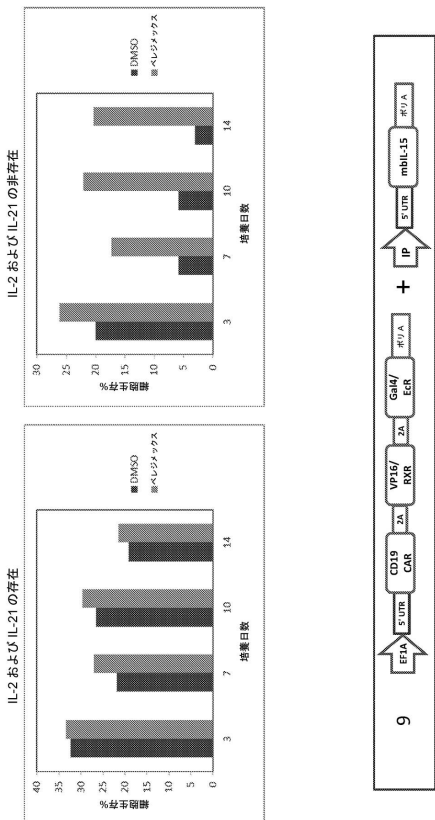
【図 10】



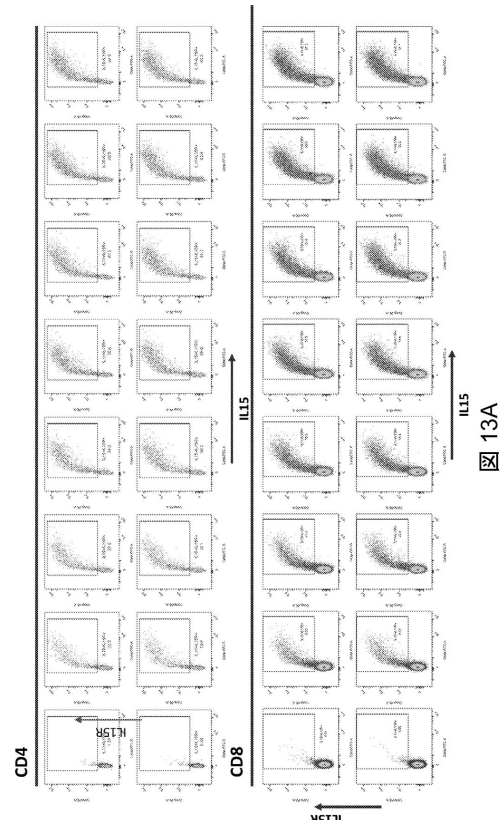
【図 11】



【図 12】



【図 13 A】



【図 13 B】

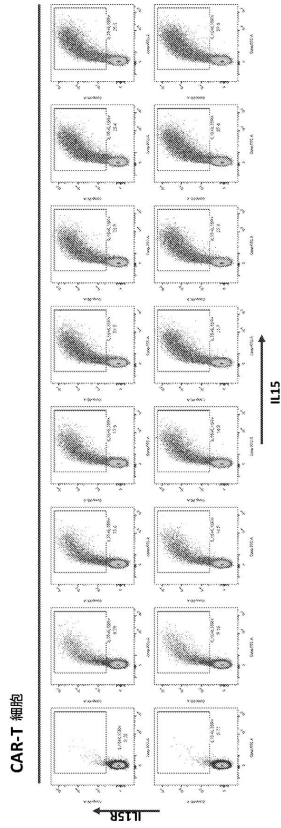


図 13B

【図 13 C】

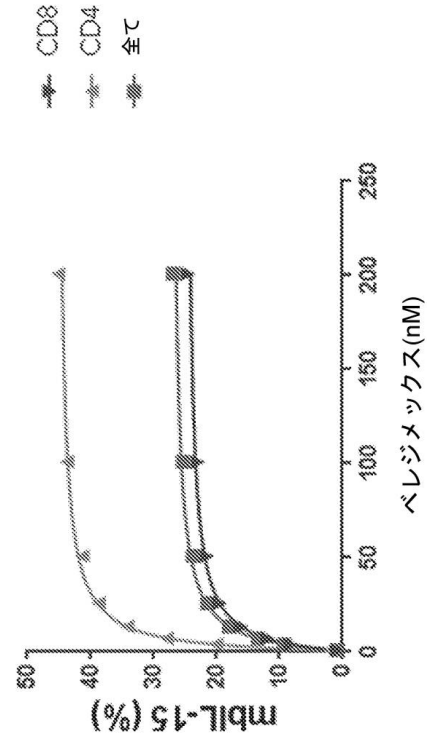


図 13C

【図 13 D】

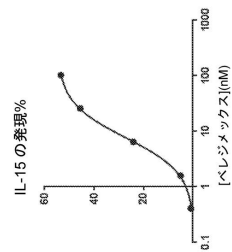
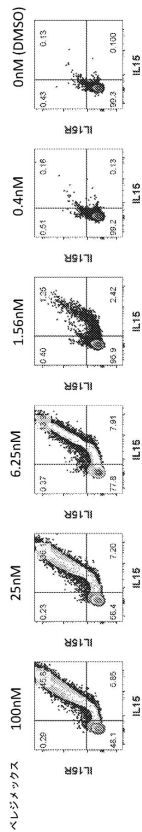


図 13D

【図 14】

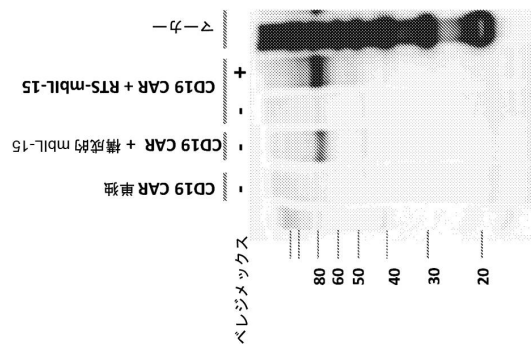


図 14

10

20

30

40

50

【図 15 A】

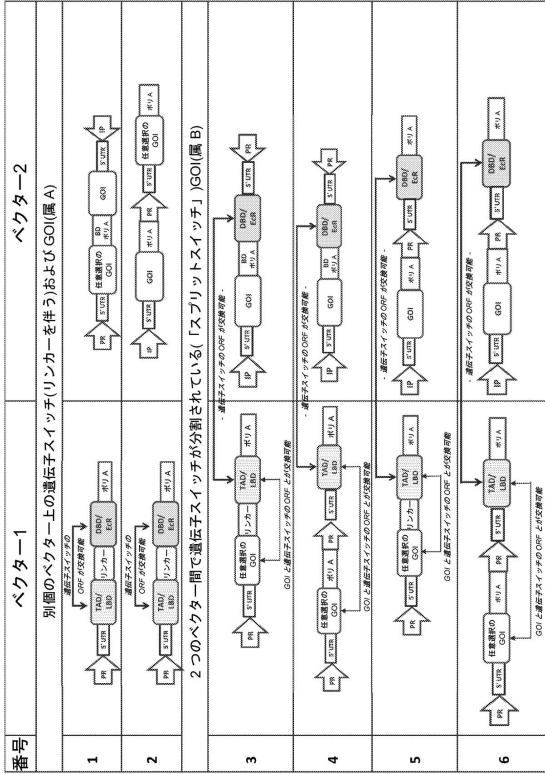


図 15A

【図 15 B】

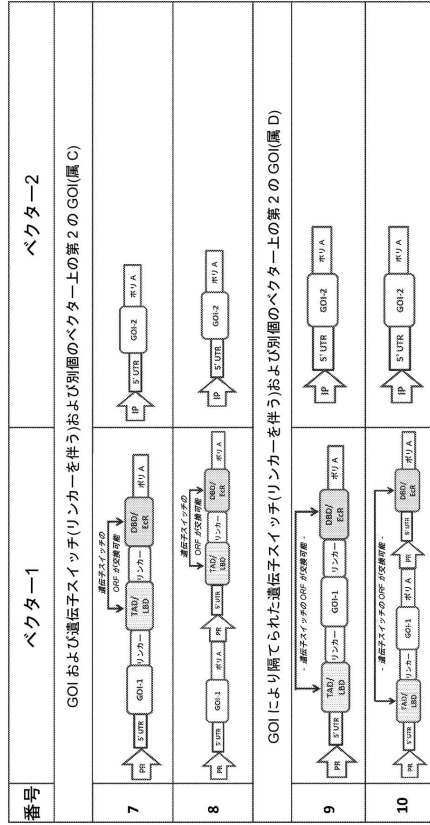


図 15B

【図 16 A】

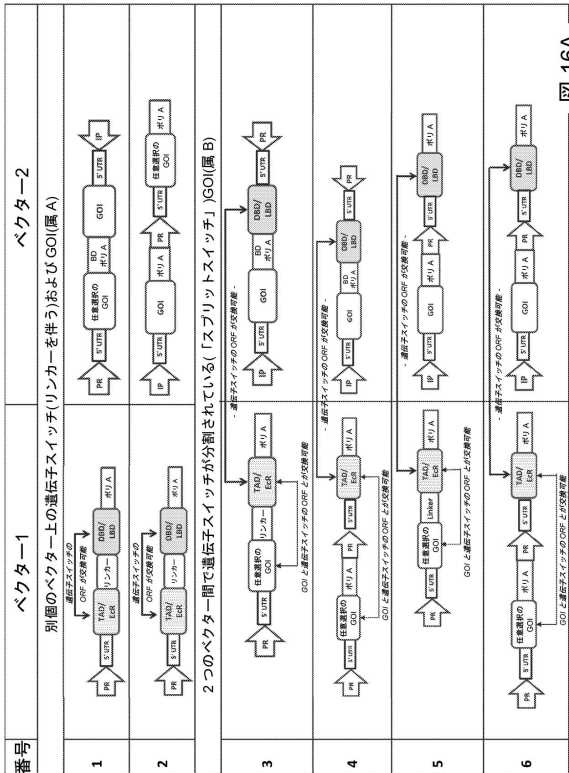


図 16A

【図 16 B】

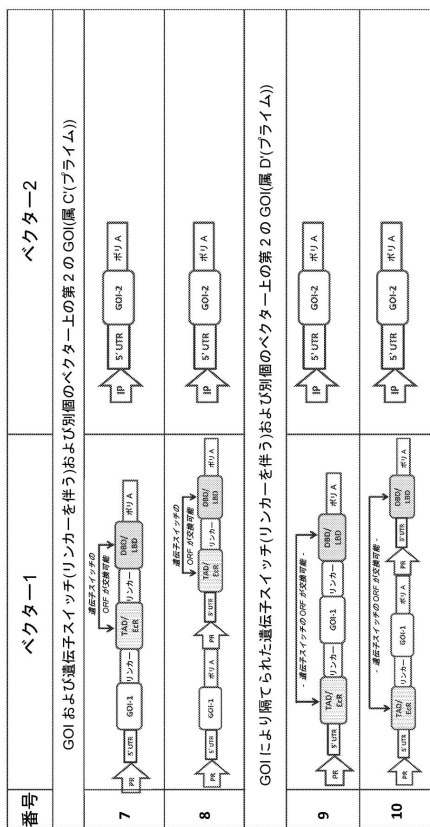


図 16B

【図 17】

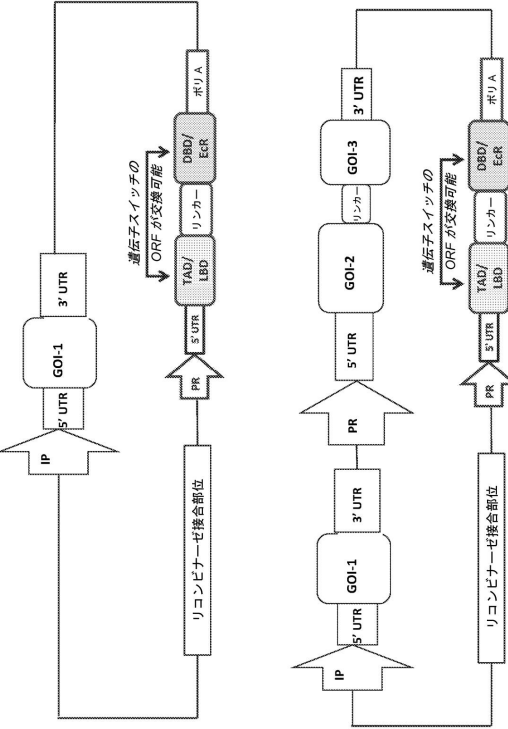


図 17

【図 18 A】

試料についての記載	CAR+%		
	1 日目	8 日目	15 日目
RTS-mbIL15 構築物	4.8	39.8	45.6
プロモーター非含有 mbIL15 陰性対照	7.7	47.6	60.3
RTS-mbIL15 構築物	6.4	0.2	0
プロモーター非含有 mbIL15 陰性対照	12.3	0.2	0.1

図 18A

【図 18 B】

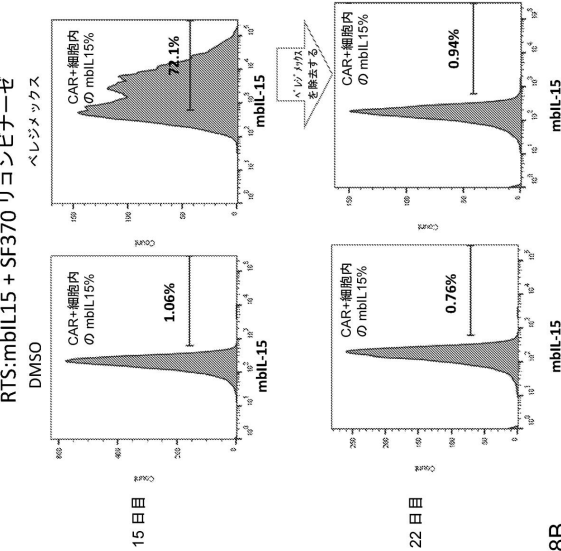


図 18B

【図 18 C】

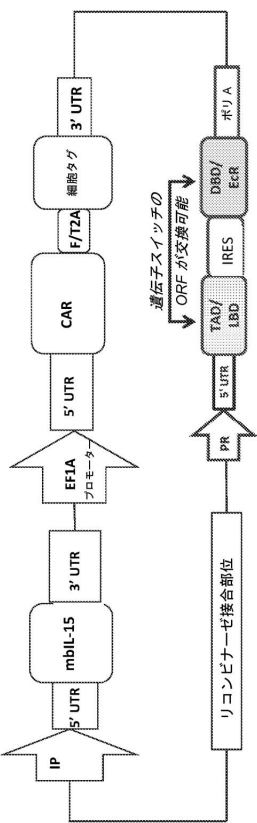


図 18C

【図 19 A】

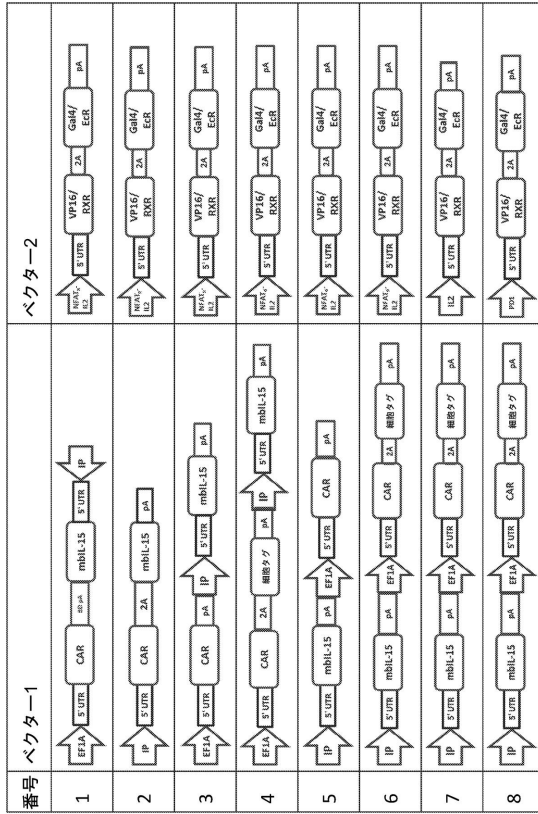


図 19A

【図 19 B】

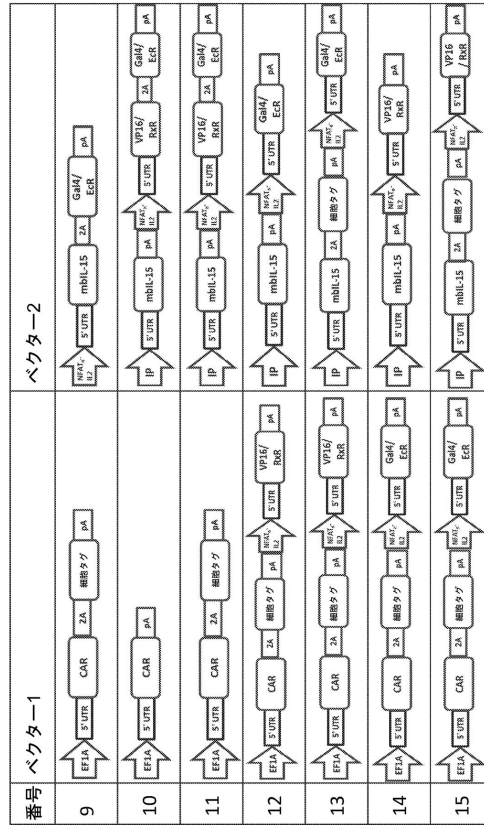


図 19B

【図 20 A】

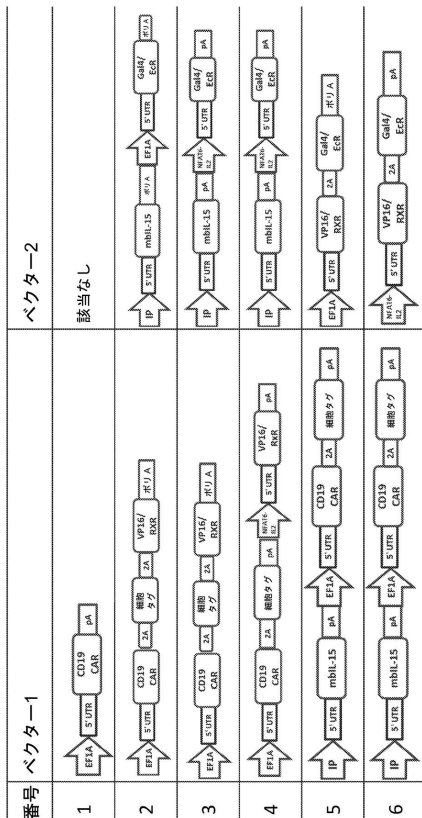


図 20A

【図 20 B】

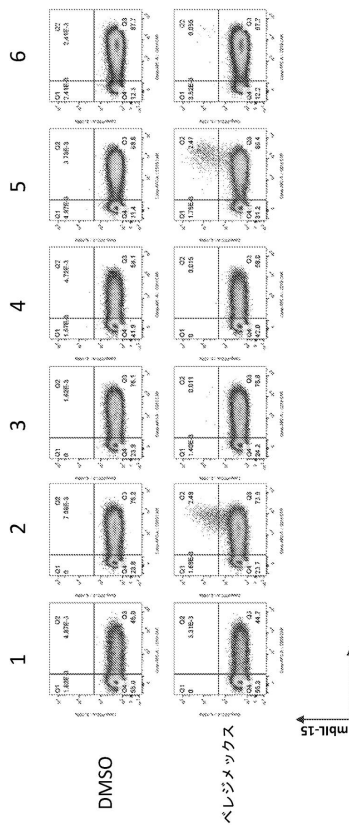


図 20B

【図 20C】

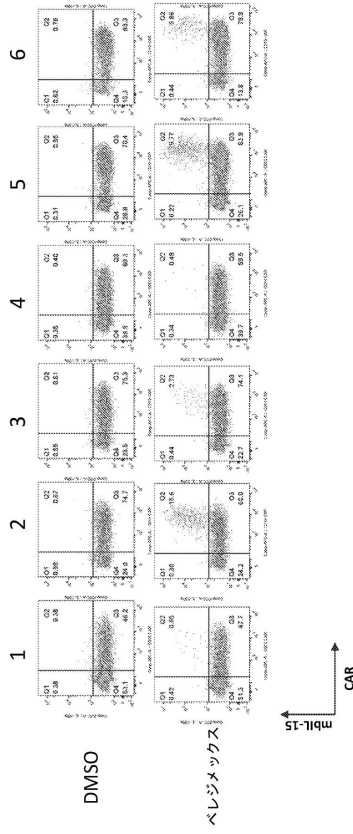


図 20C

【図 20D】

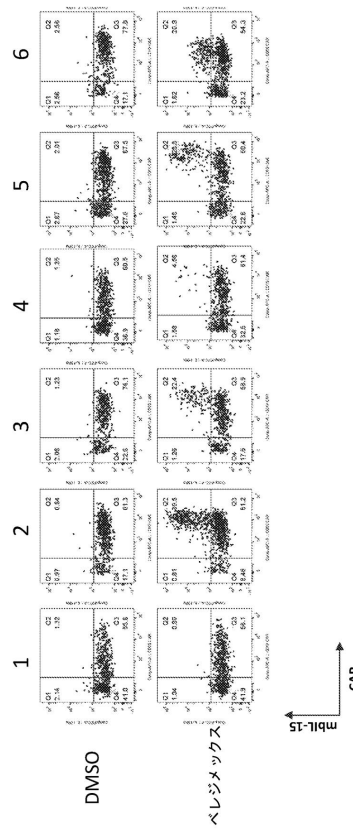


図 20D

【図 20E】

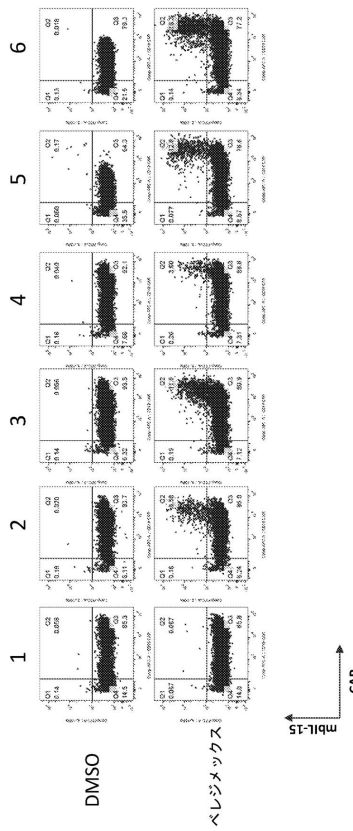


図 20E

【図 21A】

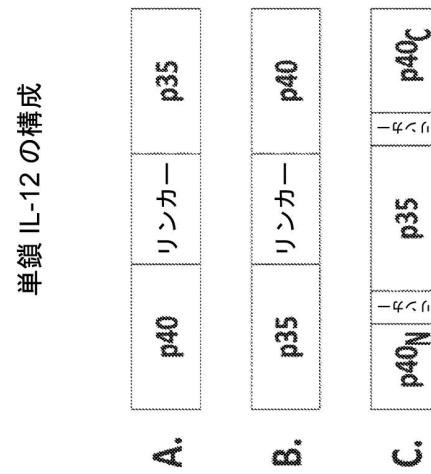


図 21A

10

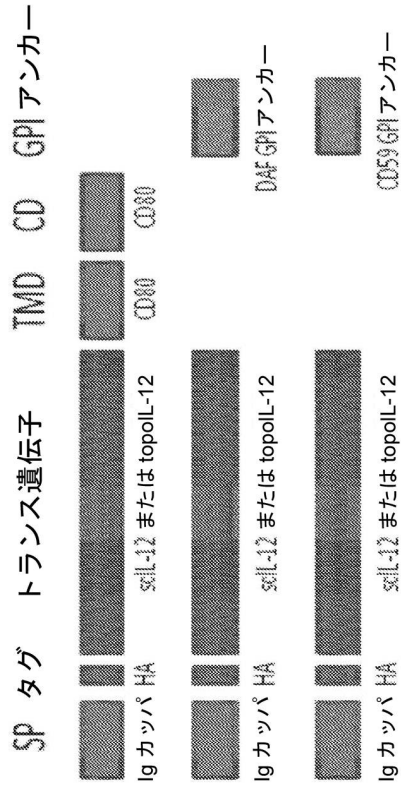
20

30

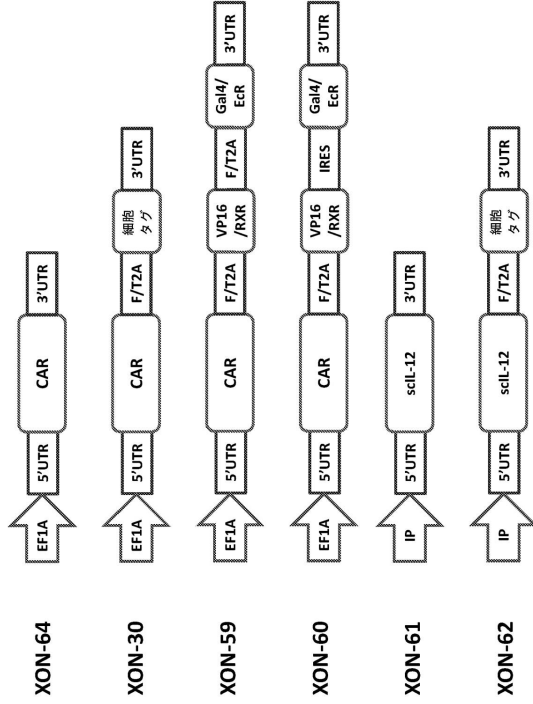
40

50

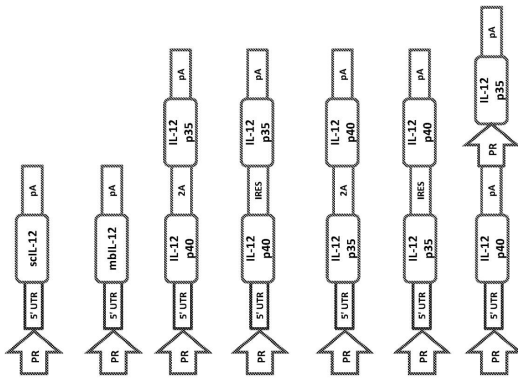
【図 2 1 B】



【図 22】

22

【図 23】



23

【図 2 4 A】

番号	ベクター-1	ベクター-2
1		該当なし
2		
3		
4		
5		
6		
7		

☒ 24A

【図 2 4 B】

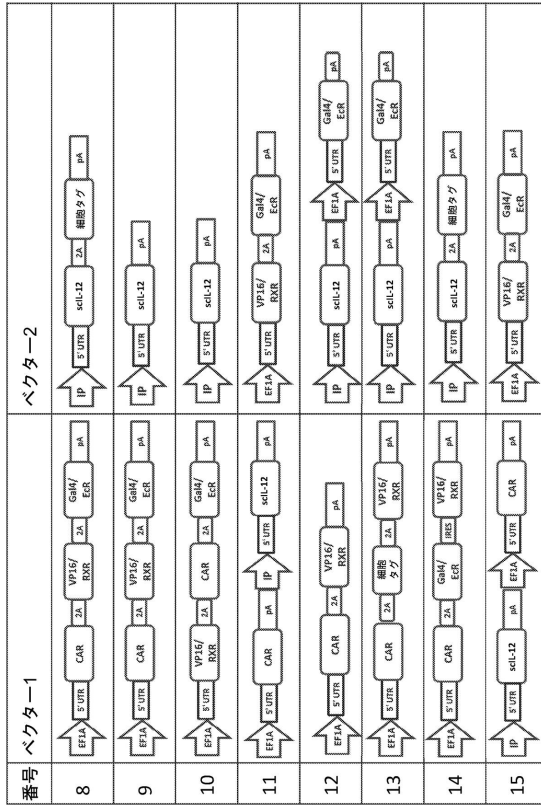


図 24B

【図 2 4 C】

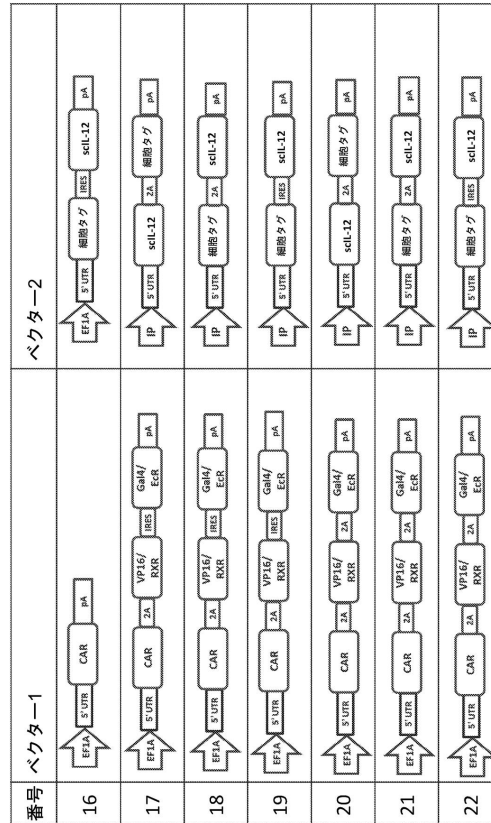


図 24C

【図 2 4 D】

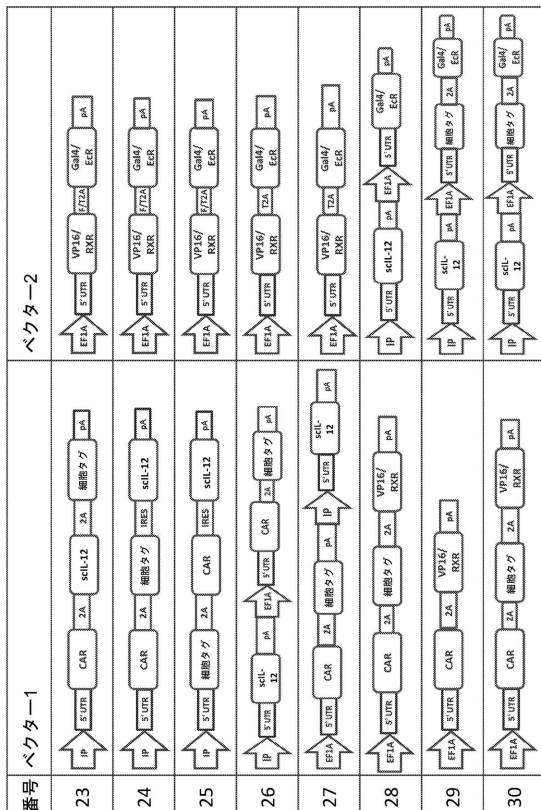


図 24D

【図 2 5 A】

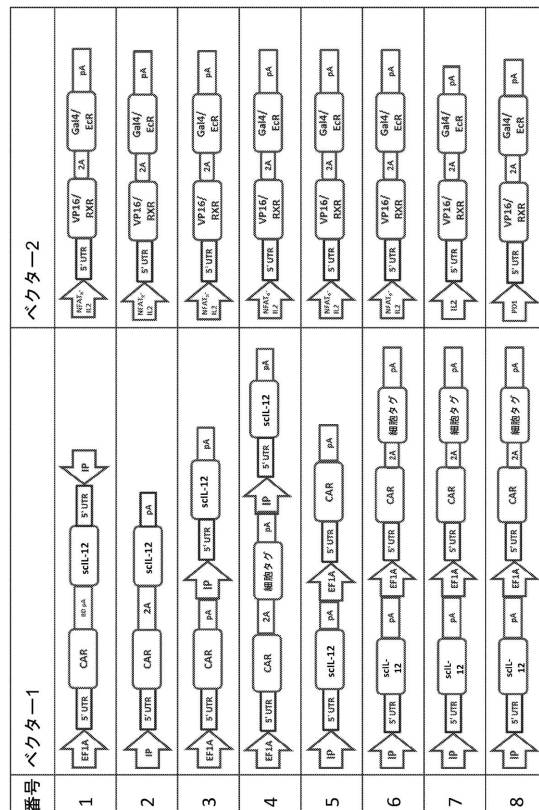


図 25A

10

20

30

40

50

【図 2 5 B】

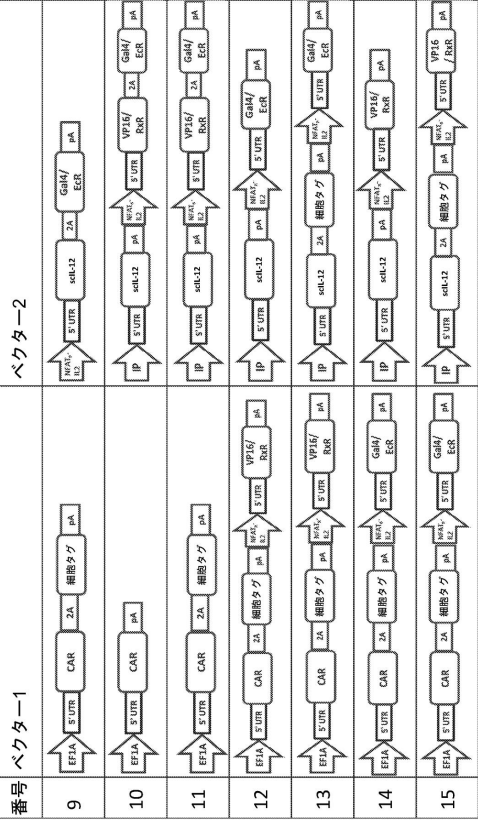


図 25B

【図 2 7】

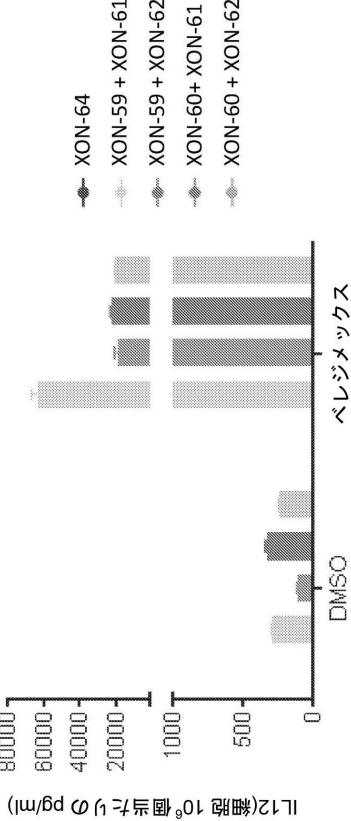


図 27

【図 2 6】

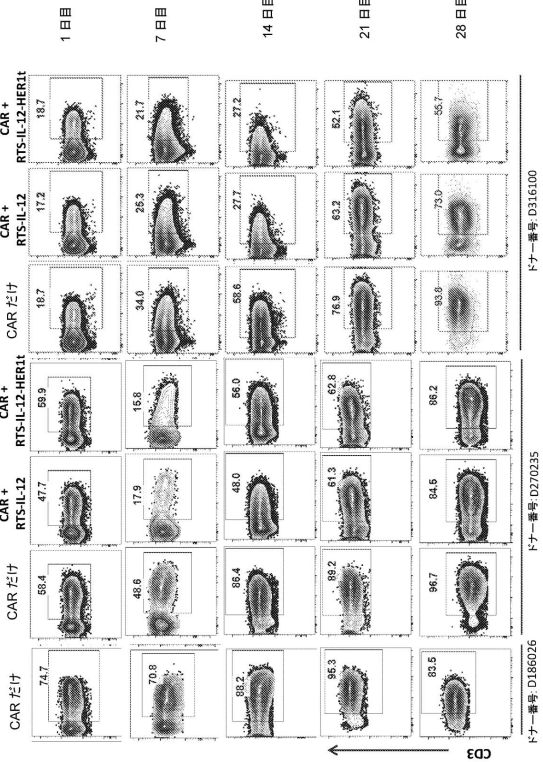


図 26

【図 2 8 A】

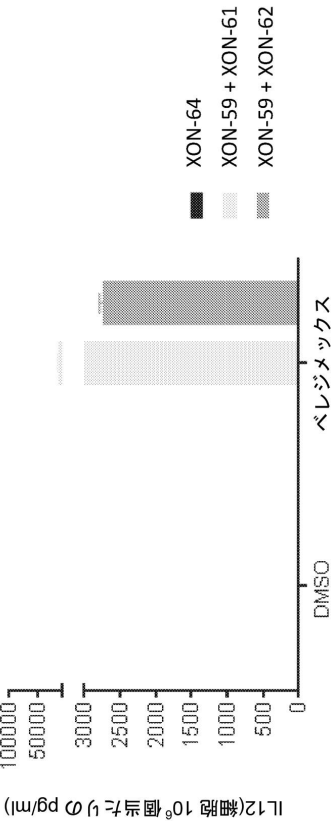


図 28A

【図 28 B】

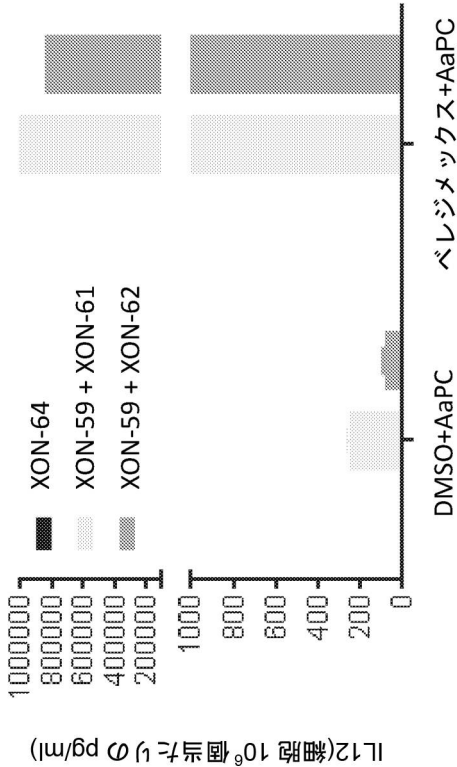


図 28B

【図 29】

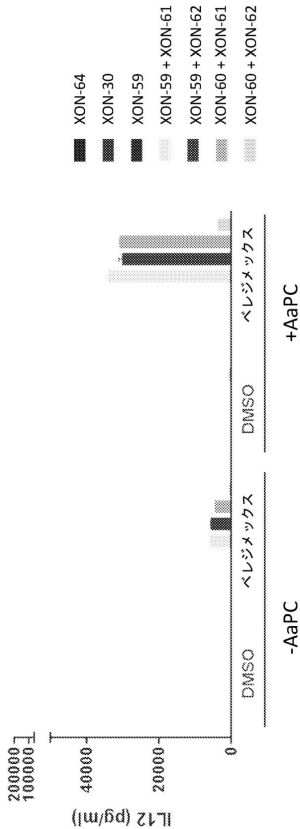


図 29

【図 30 A】

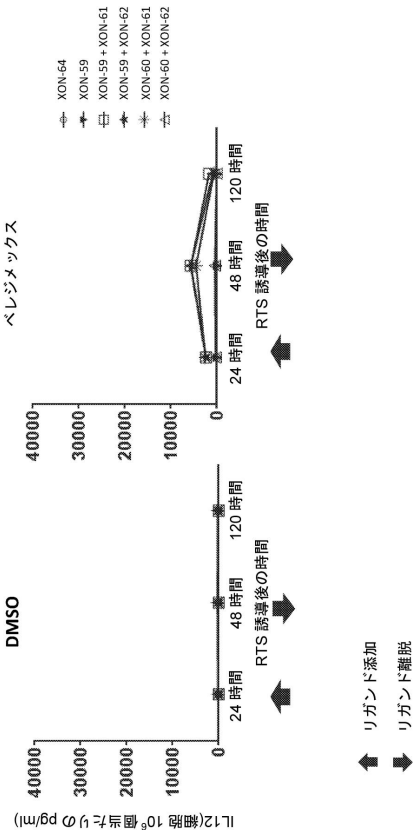


図 30A

【図 30 B】

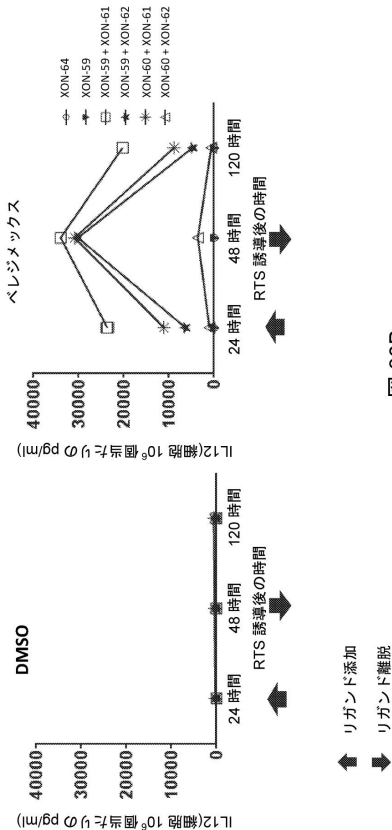


図 30B

【図 3 1 A】

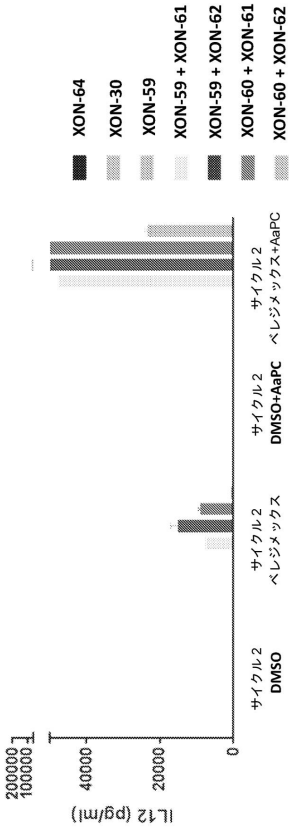


図 31A

【図 3 1 B】

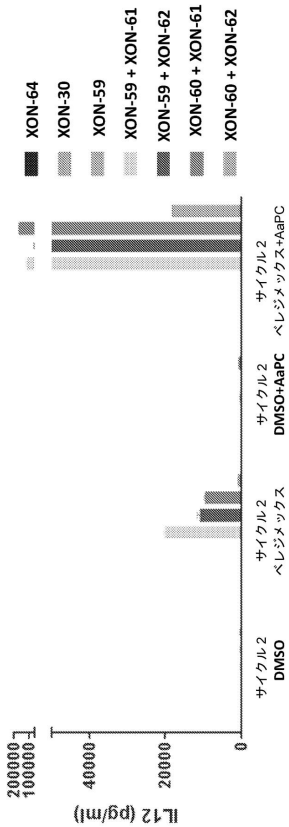


図 31B

【図 3 2】

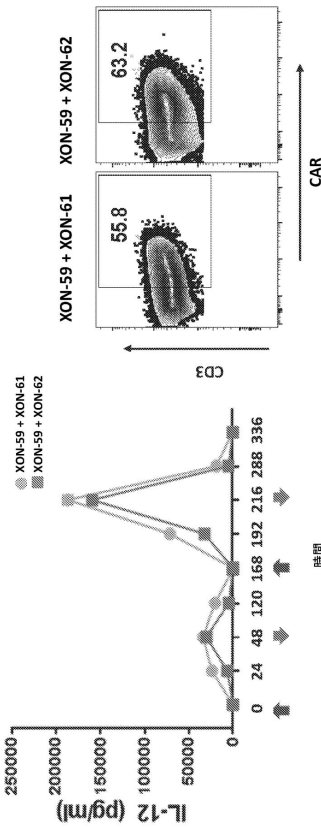


図 32A

図 32B

【図 3 3】

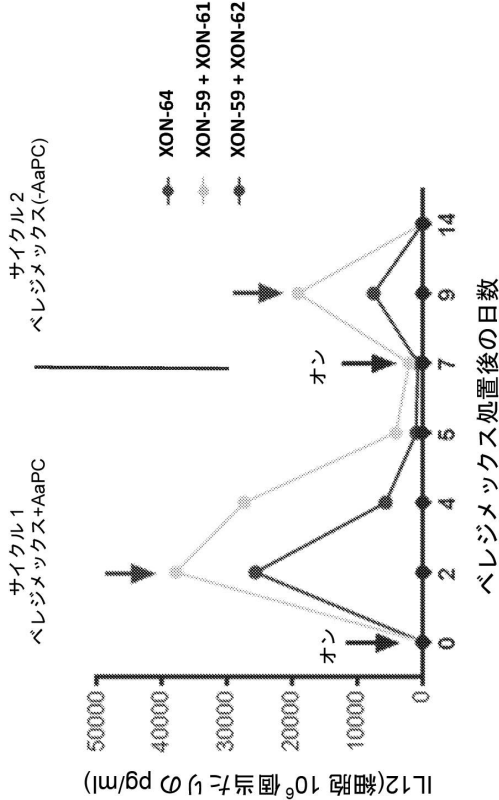


図 33

【図 3 4】

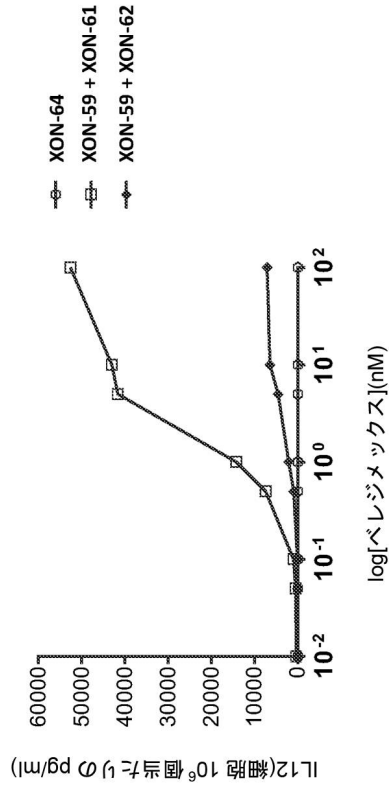


図 34

【図 3 5】

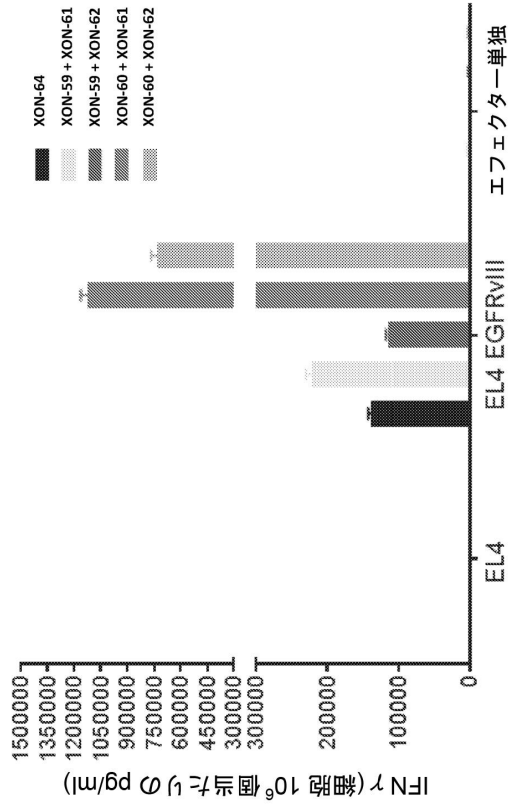


図 35

【図 3 6 A】

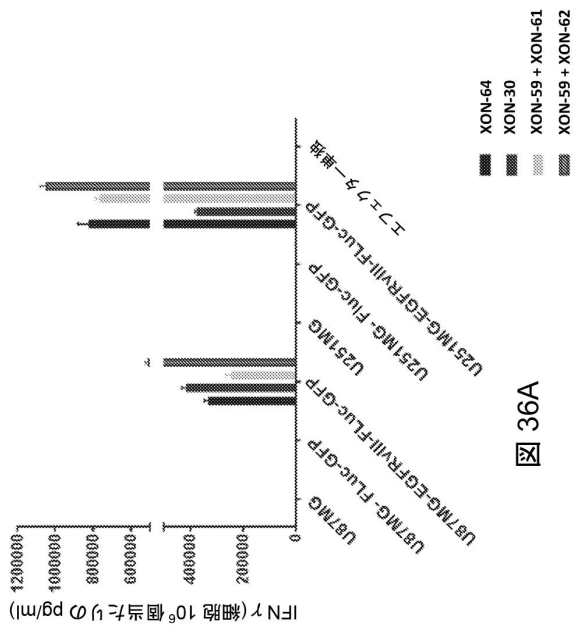


図 36A

【図 3 6 B】

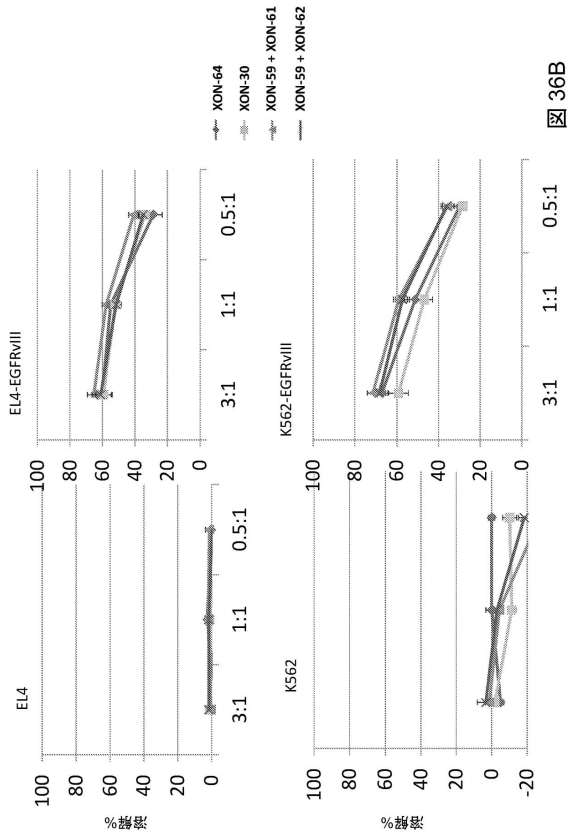


図 36B

【配列表】
0007288401000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	15/24 (2006.01)	C 1 2 N	15/24	
C 1 2 N	15/25 (2006.01)	C 1 2 N	15/25	
C 1 2 N	15/26 (2006.01)	C 1 2 N	15/26	
C 1 2 N	15/85 (2006.01)	C 1 2 N	15/85	Z
C 1 2 N	15/867 (2006.01)	C 1 2 N	15/867	Z
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
A 6 1 K	35/12 (2015.01)	A 6 1 K	35/12	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
C 0 7 K	14/725 (2006.01)	C 0 7 K	14/725	
C 1 2 N	5/0783 (2010.01)	C 1 2 N	5/0783	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28	
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17	

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

前置審査

(72)発明者 リード, トーマス ディー.

アメリカ合衆国 バージニア州 2 4 0 6 0, ブラックスバーク, クラフト ドライブ 1 7 5 0

(72)発明者 ボリンガー, シェリル ジー.

アメリカ合衆国 バージニア州 2 4 0 6 0, ブラックスバーク, クラフト ドライブ 1 7 5 0

審査官 小田 浩代

(56)参考文献 特開 2 0 1 6 - 0 2 5 8 5 8 (J P, A)

特表 2 0 1 0 - 5 4 0 5 3 4 (J P, A)

Kim, J. H. et al., High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice, PLoS One, 2011年, Vol. 6(4):e18556, pp. 1-8

中西 秀之 ほか, トランスポゾンに基づく持続発現型ベクターの開発と治療応用, Y A K U G A K U Z A S S H I, 2009年, Vol. 129(12), pp. 1433-1443

Uchibori, R. et al., Activation signals from CD19-CAR permit NFAT-controlled inducible expression of transgenes in PBMCs, Molecular Therapy, 2015年, Vol. 23, SUPPL. 1, p. S89

Hurton, L. V. et al., Tethered IL-15 augments antitumor activity and promotes a stem-cell memory subset in tumor-specific T cells, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 2016年, Vol. 113(48), pp. E7788-E7797

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

C 1 2 N 5 / 0 0 - 5 / 2 8

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

P u b M e d