(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2022-546457
(P2022-546457A)
(43)公表日　令和4年11月4日(2022.11.4)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/62 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/62	Ｚ	４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10	ＺＮＡ	４Ｃ０７６
Ｃ１２Ｎ	*5/0783(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/0783		４Ｃ０８４
Ｃ１２Ｎ	*15/13 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/13		４Ｃ０８６
Ｃ１２Ｎ	*15/12 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/12		４Ｃ０８７

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全92頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-513373(P2022-513373)
(86)(22)出願日　令和2年8月28日(2020.8.28)
(85)翻訳文提出日　令和4年4月25日(2022.4.25)
(86)国際出願番号　PCT/GB2020/052076
(87)国際公開番号　WO2021/038249
(87)国際公開日　令和3年3月4日(2021.3.4)
(31)優先権主張番号　1912515.2
(32)優先日　令和1年8月30日(2019.8.30)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　500532757
キングス カレッジ ロンドン
ＫＩＮＧＳ ＣＯＬＬＥＧＥ ＬＯＮＤＯＮ
イギリス国，ＷＣ２Ｒ ２ＬＳ ロンドン，ストランド（番地なし）
(74)代理人　110000040弁理士法人池内アンドパートナーズ
(72)発明者　マルティネス‐ローデラ、マーク
イギリス、ダブリューシー２アール ２エルエス ロンドン、ストランド、シー／オー キングス カレッジ ロンドン
(72)発明者　サンチェス‐フエヨ、アルベルト
イギリス、ダブリューシー２アール ２エルエス ロンドン、ストランド、シー／オー キングス カレッジ ロンドン
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　改変された制御性Ｔ細胞

(57)【要約】
本発明は、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含む、改変された制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）を提供し、前記ＣＡＲはアシアロ糖タンパク質受容体（ＡＳＧＲ）に特異的に結合する抗原認識ドメインを含む。本発明はまた、対象における肝臓組織の修復および／または再生を促進する方法を提供し、前記方法は、ＣＡＲを含む改変されたＴｒｅｇ、または前記改変されたＴｒｅｇを含む医薬組成物を前記対象に投与する工程を含み、前記ＣＡＲは、肝臓特異的抗原認識ドメインを含む。

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含む、改変された制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）であって、前記ＣＡＲは、アシアロ糖タンパク質受容体（ＡＳＧＲ）に特異的に結合する抗原認識ドメインを含む、改変された制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）。
【請求項２】
前記抗原認識ドメインが、ＡＳＧＲ１および／またはＡＳＧＲ２、好ましくはＡＳＧＲ１に特異的に結合する、請求項１に記載の改変されたＴｒｅｇ。
【請求項３】
前記抗原認識ドメインが、ヒトＡＳＧＲに結合する、請求項１または２に記載の改変されたＴｒｅｇ。
【請求項４】
前記抗原認識ドメインが、ヒトＡＳＧＲ１アイソフォームａ、ヒトＡＳＧＲ１アイソフォームｂ、ヒトＡＳＧＲ２アイソフォームａ、ヒトＡＳＧＲ２アイソフォームｂ、ヒトＡＳＧＲ２アイソフォームｃ、およびヒトＡＳＧＲ２アイソフォームｄから選択される１以上のポリペプチドに結合し、好ましくは、前記抗原認識ドメインが、ヒトＡＳＧＲ１アイソフォームａに結合する、請求項１～３のいずれか一項に記載の改変されたＴｒｅｇ。
【請求項５】
前記抗原認識ドメインが、約１ｐＭ～約１００ｎＭ、約１ｐＭ～約１０ｎＭ、または約１ｐＭ～約１ｎＭの親和性で、ＡＳＧＲに結合する、請求項１～４のいずれか一項に記載の改変されたＴｒｅｇ。
【請求項６】
前記抗原認識ドメインが、抗体であるか、抗体断片であるか、または抗体由来である、請求項１～５のいずれか一項に記載の改変されたＴｒｅｇ。
【請求項７】
前記抗原認識ドメインが、抗原結合断片（Ｆａｂ）、単鎖抗体（ｓｃＦｖ）、または単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）であり、好ましくは単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）である、請求項１～６のいずれか一項に記載の改変されたＴｒｅｇ。
【請求項８】
前記抗原認識ドメインが、配列番号１１～７３、または３個以下のアミノ酸置換を含むそれらの誘導体から選択される１以上のＣＤＲ領域を含む、請求項６または７に記載の改変されたＴｒｅｇ。
【請求項９】
前記抗原認識ドメインが、ＣＤＲ１領域と、ＣＤＲ２領域と、ＣＤＲ３領域とを含み、
前記ＣＤＲ１領域、ＣＤＲ２領域、ＣＤＲ３領域は、
それぞれ、配列番号１１、１２、および１３を含み；
それぞれ、配列番号１４、１５、および１６を含み；
それぞれ、配列番号１７、１８、および１９を含み；
それぞれ、配列番号２０、２１、および２２を含み；
それぞれ、配列番号２３、２４、および２５を含み；
それぞれ、配列番号２６、２７、および２８を含み；および／または、
それぞれ、配列番号２９、３０、および３１を含み、
好ましくは、前記抗原認識ドメインが、配列番号１１、１２、および１３をそれぞれ含むＣＤＲ１領域、ＣＤＲ２領域、およびＣＤＲ３領域を含む、請求項６～８のいずれか一項に記載の改変されたＴｒｅｇ。
【請求項１０】
前記抗原認識ドメインが、ＣＤＲ１領域と、ＣＤＲ２領域と、ＣＤＲ３領域とを含み、前記ＣＤＲ１領域と、ＣＤＲ２領域と、ＣＤＲ３領域は、下記（ｉ）、（ｉｉ）または（ｉｉｉ）を含む、請求項６～９のいずれか一項に記載の改変されたＴｒｅｇ。
（ｉ）それぞれ、配列番号１１、１２、および１３、かつ、それぞれ、配列番号２３、２

４、および２５、または、それぞれ、配列番号２６、２７、および２８、またはそれぞれ、配列番号２９、３０、および３１、好ましくは、前記抗原認識ドメインが、それぞれ、配列番号１１、１２、および１３を含み、かつ、それぞれ、配列番号２３、２４、および２５を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３領域を含み：
（ｉｉ）それぞれ、配列番号１４、１５、および１６、かつ、それぞれ、配列番号２３、２４、および２５、または、それぞれ、配列番号２６、２７、および２８、またはそれぞれ、配列番号２９、３０、および３１、好ましくは、前記抗原認識ドメインが、それぞれ、配列番号１４、１５、および１６を含み、かつ、それぞれ、配列番号２６，２７、および２８を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３領域を含み：
（ｉｉｉ）それぞれ、配列番号１７、１８、および１９、かつ、それぞれ、配列番号２３、２４、および２５、または、それぞれ、配列番号２６、２７、および２８、またはそれぞれ、配列番号２９、３０、および３１、好ましくは、前記抗原認識ドメインが、それぞれ、配列番号１７、１８、および１９を含み、かつ、それぞれ、配列番号２６，２７、および２８を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３領域を含む。

【請求項１１】

前記抗原認識ドメインが、配列番号７４～８０の一つ以上に対する同一性が少なくとも約７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、または１００％であるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなり、好ましくは、前記抗原認識ドメインが、配列番号７４に対する同一性が少なくとも７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、または１００％であるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる、請求項１～１０のいずれか一項に記載の改変されたＴｒｅｇ。

【請求項１２】

前記ＣＡＲが、膜貫通（ＴＭ）ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含み、場合によっては、前記ＣＡＲがヒンジドメインおよび／または１個以上の共刺激ドメインを含む、請求項１～１１のいずれか一項に記載の改変されたＴｒｅｇ。

【請求項１３】

前記ＣＡＲが、ＣＤ２８ヒンジドメイン、ＣＤ８αヒンジドメイン、ＩｇＧヒンジドメイン、およびＩｇＤヒンジドメインからなる群から選択された１個以上のヒンジドメインを含み、好ましくは、前記ＣＡＲがＣＤ８αまたはＣＤ２８ヒンジドメインを含む、請求項１～１２のいずれか一項に記載の改変されたＴｒｅｇ。

【請求項１４】

前記ＣＡＲが、ＣＤ２８膜貫通ドメイン、ＩＣＯＳ膜貫通ドメイン、ＣＤ８α膜貫通ドメイン、ＣＤ４膜貫通ドメイン、ＯＸ４０膜貫通ドメイン、４－１ＢＢ　膜貫通ドメイン、およびＣＤ３ゼータ膜貫通ドメインからなる群から選択された１個以上の膜貫通ドメインを含み、好ましくは、前記ＣＡＲがＣＤ２８膜貫通ドメインを含む、請求項１～１３のいずれか一項に記載の改変されたＴｒｅｇ。

【請求項１５】

前記ＣＡＲが、ＣＤ２８シグナル伝達ドメイン、ＩＣＯＳシグナル伝達ドメイン、ＯＸ４０シグナル伝達ドメイン、４－１ＢＢシグナル伝達ドメイン、ＣＤ２７シグナル伝達、またはＴＮＦＲＳＦ２５シグナル伝達ドメインからなる群から選択された１個以上の共刺激ドメインを含み、好ましくは、前記ＣＡＲがＣＤ２８シグナル伝達ドメインを含む、請求項１～１４のいずれか一項に記載の改変されたＴｒｅｇ。

【請求項１６】

前記ＣＡＲが、ＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメインまたはその相同体のいずれか、ＣＤ３ポリペプチド、ｓｙｋファミリーチロシンキナーゼ、ｓｒｃファミリーチロシンキナーゼ、ＣＤ２、ＣＤ５、およびＣＤ８からなる群から選択された１個以上の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、好ましくは、前記ＣＡＲがＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメインを含む、請求項１～１５のいずれか一項に記載の改変されたＴｒｅｇ。

【請求項１７】

前記ＣＡＲが、ＣＤ８αまたはＣＤ２８ヒンジドメイン、ＣＤ２８膜貫通ドメイン、Ｃ

Ｄ２８シグナル伝達ドメイン、およびＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメインを含む、請求項１～１６のいずれか一項に記載の改変されたＴｒｅｇ。
【請求項１８】
前記ＣＡＲが、自己切断（self-cleaving）ドメインまたは切断（cleavage）ドメインによって連結されたシグナルペプチドおよび／またはレポーターペプチドを含む、請求項１～１７のいずれか一項に記載の改変されたＴｒｅｇ。
【請求項１９】
前記ＣＡＲが、配列番号１４９～１５２または１６７～１６９の一つ以上に対する同一性が少なくとも７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、または１００％であるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる、請求項１～１８のいずれか一項に記載の改変されたＴｒｅｇ。
【請求項２０】
前記ＣＡＲが、ＳＴＡＴ５関連モチーフと、ＪＡＫ１および／またはＪＡＫ２結合モチーフとを含むエンドドメインを含む、請求項１～１９のいずれか一項に記載の改変されたＴｒｅｇ。
【請求項２１】
前記エンドドメインがＪＡＫ３結合モチーフを含む、請求項２０に記載の改変されたＴｒｅｇ。
【請求項２２】
前記エンドドメインがＳＴＡＴ３関連モチーフを含まない、請求項２０または２１に記載の改変されたＴｒｅｇ。
【請求項２３】
前記エンドドメインがアミノ酸配列ＹＸＸＱ（配列番号１３３）を含まない、請求項２０または２１に記載の改変されたＴｒｅｇ。
【請求項２４】
前記ＣＡＲが、ＳＴＡＴ５関連モチーフ、ＪＡＫ１結合モチーフ、および／またはＪＡＫ２結合モチーフを含むエンドドメインを含まず、好ましくは前記エンドドメインがＳＴＡＴ５関連モチーフを含まない請求項１～１９のいずれか一項に記載の改変されたＴｒｅｇ。
【請求項２５】
前記Ｔｒｅｇが、$CD4^+CD25^+CD127^-$Ｔ細胞、および／または$CD4^+CD25^+FOXP3^+$Ｔ細胞である、請求項１～２４のいずれか一項に記載の改変されたＴｒｅｇ。
【請求項２６】
前記Ｔｒｅｇが、ＦＯＸＰ３ポリペプチドをコードする外因性ポリヌクレオチドを含む、請求項１～２５のいずれか一項に記載の改変されたＴｒｅｇ。
【請求項２７】
請求項１～２６のいずれか一項に記載の改変されたＴｒｅｇを含む、医薬組成物。
【請求項２８】
対象における肝臓移植組織に対する寛容の誘発に使用するための、または、対象における肝臓移植拒絶反応、肝臓移植片対宿主病（ＧｖＨＤ）、自己免疫性肝疾患、または炎症性肝障害の治療および／または予防に使用するための、請求項１～２６のいずれか一項に記載の改変されたＴｒｅｇ、または請求項２７に記載の医薬組成物。
【請求項２９】
対象における肝臓移植組織に対する寛容を誘発する、または、対象における肝臓移植拒絶反応、肝臓移植片対宿主病（ＧｖＨＤ）、自己免疫性肝疾患、または炎症性肝障害を治療および／または予防する方法であって、前記方法は、請求項１～２６のいずれか一項に記載の改変されたＴｒｅｇ、または請求項２７に記載の医薬組成物を前記対象に投与する工程を含む方法。
【請求項３０】

請求項２８に記載の自己免疫性肝疾患の治療および／または予防に使用するための改変されたＴｒｅｇまたは医薬組成物、もしくは、請求項２９に記載の自己免疫性肝疾患を治療および／または予防する方法であって、前記自己免疫性肝疾患が原発性胆汁性胆管炎および／または原発性硬化性胆管炎である、改変されたＴｒｅｇまたは医薬組成物、もしくは方法。

【請求項３１】

請求項２８に記載の肝臓炎症性障害の治療および／または予防に使用するための改変されたＴｒｅｇまたは医薬組成物、もしくは、請求項２９に記載の肝臓炎症性障害を治療および／または予防する方法であって、前記肝臓炎症性障害が、肝硬変、急性肝不全、または急性憎悪した慢性肝不全であり、および／または前記肝臓の炎症がアルコール、ウイルス性肝炎、脂肪性肝炎、虚血、または薬物毒性によるものであるか、もしくは前記肝臓の炎症の原因が識別不能である、改変されたＴｒｅｇまたは医薬組成物、もしくは方法。

【請求項３２】

対象の肝臓組織の修復および／または再生に使用するための、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含む改変された制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）、または前記改変されたＴｒｅｇを含む医薬組成物であって、前記ＣＡＲが肝臓特異的抗原認識ドメインを含む、改変されたＴｒｅｇまたは医薬組成物。

【請求項３３】

対象における肝臓組織の修復および／または再生を促進する方法であって、前記方法は、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含む改変された制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）、または前記改変されたＴｒｅｇを含む医薬組成物を、前記対象に投与する工程を含み、前記ＣＡＲは、肝臓特異的抗原認識ドメインを含む、方法。

【請求項３４】

前記肝臓が、虚血、部分的肝切除、または炎症により負傷および／または損傷を受けている、請求項３２に記載の使用のための改変されたＴｒｅｇまたは医薬組成物、もしくは請求項３３に記載の方法。

【請求項３５】

前記肝臓が、炎症により負傷および／または損傷を受けている、請求項３４に記載の使用のための改変されたＴｒｅｇまたは医薬組成物、もしくは請求項３４に記載の方法であって、前記炎症が、肝硬変、急性肝不全、または急性憎悪した慢性肝不全であり、および／または前記炎症がアルコール、ウイルス性肝炎、脂肪性肝炎、虚血、または薬物毒性によるものであるか、もしくは前記炎症の原因が識別不能である、改変されたＴｒｅｇまたは医薬組成物、もしくは方法。

【請求項３６】

前記対象が、肝臓の再生が弱まっており、好ましくは、その原因が急性肝不全、硬変、急性憎悪した慢性肝不全、肝炎、脂肪症、脂肪性肝炎、および加齢のうちの一つ以上である、請求項３２、３４、または３５のいずれか一項に記載の使用のための改変されたＴｒｅｇまたは医薬組成物、もしくは請求項３３～３５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３７】

前記対象が、肝硬変、急性肝不全、または急性憎悪した慢性肝不全を有する、請求項３２または３４～３６のいずれか一項に記載の使用のための改変されたＴｒｅｇまたは医薬組成物、もしくは請求項３３～３６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３８】

前記抗原認識ドメインが、アシアロ糖タンパク質受容体（ＡＳＧＲ）、ナトリウム／タウロコール酸共輸送ポリペプチド（ＮＴＣＰ）、マンノース－６－リン酸受容体、ＶＩ型コラーゲン受容体、ＰＤＧＦ受容体、スカベンジャー受容体クラスＡ、スカベンジャー受容体クラスＢタイプＩ、ヘパラン硫酸、グリチルリチン受容体、ＨＤＬ受容体、ＬＤＬ受容体、トランスフェリン受容体、インシュリン受容体、アルファ２マクログロブリン受容体、フェリチン受容体、ウロプラスミノゲン受容体、およびトロンビン受容体からなる群から選択された１個以上の肝臓特異的抗原に、特異的に結合し、好ましくは前記抗原認識

ドメインが、特異的にＡＳＧＲに結合する、請求項３２または３４～３７のいずれか一項に記載の使用のための改変されたＴｒｅｇまたは医薬組成物、もしくは請求項３３～３７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３９】

請求項３２、３４～３８のいずれか一項に記載の使用のための改変されたＴｒｅｇまたは医薬組成物、もしくは請求項３３～３８のいずれか一項に記載の方法であって、前記改変されたＴｒｅｇが、請求項１～２６のいずれか一項にしたがって定義される、改変されたＴｒｅｇまたは医薬組成物、もしくは方法。

【請求項４０】

対象の肝臓組織におけるアルブミン産生の増加または刺激に使用するための、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含む改変されたＴｒｅｇ、または前記改変されたＴｒｅｇを含む医薬組成物であって、前記ＣＡＲが、肝臓特異的抗原認識ドメインを含む、改変されたＴｒｅｇまたは医薬組成物。

【請求項４１】

対象の肝臓組織におけるアルブミン産生を増加させる、または刺激する方法であって、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含む改変されたＴｒｅｇ、または前記改変されたＴｒｅｇを含む医薬組成物を、前記対象に投与する工程を含み、前記ＣＡＲが、肝臓特異的抗原認識ドメインを含む、方法。

【請求項４２】

前記抗原認識ドメインが、アシアロ糖タンパク質受容体（ＡＳＧＲ）、ナトリウム／タウロコール酸共輸送ポリペプチド（ＮＴＣＰ）、マンノース－６－リン酸受容体、ＶＩ型コラーゲン受容体、ＰＤＧＦ受容体、スカベンジャー受容体クラスＡ、スカベンジャー受容体クラスＢタイプＩ、ヘパラン硫酸、グリチルリチン受容体、ＨＤＬ受容体、ＬＤＬ受容体、トランスフェリン受容体、インシュリン受容体、アルファ２マクログロブリン受容体、フェリチン受容体、ウロプラスミノゲン受容体、およびトロンビン受容体からなる群から選択された１個以上の肝臓特異的抗原に、特異的に結合し、好ましくは前記抗原認識ドメインが、ＡＳＧＲに特異的に結合する、請求項４０に記載の使用のための改変されたＴｒｅｇまたは医薬組成物、もしくは請求項４１に記載の方法。

【請求項４３】

請求項４０または４２に記載の使用のための改変されたＴｒｅｇまたは医薬組成物、もしくは請求項４１または４２に記載の方法であって、前記改変されたＴｒｅｇが、請求項１～２６のいずれか一項にしたがって定義される、改変されたＴｒｅｇまたは医薬組成物、もしくは方法。

【請求項４４】

請求項２９～３１または３３～３９または４１～４３のいずれか一項に記載の方法であって、

（ｉ）対象由来のＴｒｅｇ富化サンプルを単離する、または得る工程と、

（ｉｉ）前記Ｔｒｅｇ細胞に、ポリヌクレオチド、核酸、または前記ＣＡＲをコードするベクターを形質導入または遺伝子導入し、改変されたＴｒｅｇ細胞を得る工程と、

（ｉｉｉ）前記対象に、前記改変されたＴｒｅｇ細胞を投与する工程とを含む、方法。

【請求項４５】

前記対象が、哺乳動物であり、好ましくはヒトである、請求項２８、３０～３２、または３４～４０、または４２～４３のいずれか一項に記載の使用のための改変されたＴｒｅｇまたは医薬組成物、もしくは請求項２９～３１、または３３～３９、または４１～４４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４６】

アシアロ糖タンパク質受容体（ＡＳＧＲ）に特異的に結合する抗原認識ドメインを含み、ＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメインをさらに含む、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）。

【請求項４７】
ＳＴＡＴ５関連モチーフと、ＪＡＫ１および／またはＪＡＫ２結合モチーフとを含むエンドドメインを含む、請求項４６に記載のＣＡＲ。
【請求項４８】
前記エンドドメインが、ＪＡＫ３結合モチーフを含む、請求項４７に記載のＣＡＲ。
【請求項４９】
前記エンドドメインが、ＳＴＡＴ３関連モチーフを含まない、請求項４７または４８に記載のＣＡＲ。
【請求項５０】
前記エンドドメインが、アミノ酸配列ＹＸＸＱ（配列番号１３３）を含まない、請求項４７または４８に記載のＣＡＲ。
【請求項５１】
配列番号１４９～１５２または１６７～１６９の一つ以上に対する同一性が少なくとも７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、または１００％であるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる、請求項４６に記載のＣＡＲ。
【請求項５２】
アシアロ糖タンパク質受容体（ＡＳＧＲ）に特異的に結合する抗原認識ドメインを含むキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）であって、前記抗原認識ドメインが、請求項１０で定義されたＣＤＲ１領域、ＣＤＲ２領域、およびＣＤＲ３領域を含み、好ましくは、前記ＣＡＲが請求項４６～５１のいずれか一項で定義されたＣＡＲである、ＣＡＲ。
【請求項５３】
請求項４６～５２のいずれか一項に記載のＣＡＲをコードする、ポリヌクレオチド、核酸、またはベクター。
【請求項５４】
ＦＯＸＰ３ポリペプチドをさらにコードする、請求項５３に記載のポリヌクレオチド、核酸、またはベクター。
【請求項５５】
請求項１～２６のいずれか一項に記載の改変されたＴｒｅｇを作製する方法であって、
（ｉ）対象から細胞含有サンプルを単離する、または細胞含有サンプルを得る工程、および
（ｉｉ）前記細胞含有サンプルに、ＣＡＲをコードするポリヌクレオチド、核酸、またはベクターを形質導入または遺伝子導入し、改変された細胞の集団を提供する工程を含み、前記細胞含有サンプルがＴｒｅｇを含み、および／または、前記工程（ｉｉ）の前または後に、Ｔｒｅｇが富化される、および／または、前記細胞含有サンプルから生成される、方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、改変された制御性Ｔ細胞に関し、また、肝臓の免疫介在性の損傷において、かかる細胞を治療目的で使用することに関する。特に、当該発明は、肝臓の細胞を認識することができ、移植拒絶反応または免疫介在性の損傷を治療および／または予防することができ、肝臓の細胞の再生を促進することができる、改変された制御性Ｔ細胞に関する。
【背景技術】
【０００２】
肝臓は、体の他の臓器のほぼすべてを支援する、生命の維持に必要な臓器である。その位置が戦略的であり機能が重要であることから、肝臓は、疾患、特に免疫介在性の損傷を受けやすい。世界的には、肝疾患による死亡は、毎年約２００万件あり、そのうち１００万件は硬変の合併症によるものであり、１００万件はウイルス性肝炎と肝細胞癌によるものである。現在、世界的に見て、肝硬変は１１番目に多い死因である。肝硬変は、障害調整生命年（disability-adjusted life years）と早死にすることによって失われた年

数（years of life lost）の原因の上位２０に入り、それぞれ、世界全体での負担の１．６％と２．１％を占めている（Asrani, S.K., et al., 2018. Journal of hepatology, 70, pp. 151-171）。

【０００３】

原発性胆汁性胆管炎および原発性硬化性胆管炎など、よくある自己免疫性肝疾患は、肝臓を損傷し、硬変を起こす。原発性胆汁性胆管炎における疾病の負担は、よく、生活の質の低下、健康状態の悪化、および倦怠、かゆみ、鬱病などの重大な症状として現れる。原発性硬化性胆管炎は、胆管細胞癌、胆嚢癌、大腸癌の危険因子であり、若年死亡率を上げる一因となりうる。原発性硬化性胆管炎を有する患者は、母集団と比較して、死亡のリスクが４倍になり、特に胆管細胞癌を発症するリスクが３９８倍になる（Asrani, S.K., et al., 2018. Journal of hepatology, 70, pp. 151-171）。

【０００４】

硬変もまた、ウイルス性肝炎または脂肪性肝炎などの、炎症性肝障害によって起こる。２０１０年、ウイルス性肝炎による死亡は、一年で３０万件になり、１９９０年から４６％増加した。ウイルス性肝炎は、１０番目に多い死因であったが（１９９０年）、増加して２０１３年には7番目に多い死因となった。２０１５年、ウイルス性肝炎に関連した疾患による死亡が１３４万件になり、この数は、結核による死亡数（１３７万件）と同等であり、ＨＩＶによる死亡数（１０６万件）やマラリアによる死亡数（４４万件）を上回った（Asrani, S.K., et al., 2018. Journal of hepatology, 70, pp. 151-171）。

【０００５】

また、移植寛容および生存は、肝臓移植中の重要な問題である。免疫抑制療法に基づいてタクロリムスを使用している肝臓移植レシピエントの１５～２５％に、急性細胞拒絶反応が起こり、一般的にはステロイドの使用により改善する。急性拒絶反応は通常は治療に対してよく応答するが、慢性拒絶反応は困難な状況を呈し、患者のうちのかなりの部分が、免疫抑制を増加しても応答しない。慢性拒絶反応は、再移植をすることになったり、死亡したりすることがよくある（Choudhary, N.S., et al., 2017. Journal of clinical and experimental hepatology, 7(4), pp.358-366）。５年死亡率は、原発性胆汁性胆管炎に対して肝臓移植が行われた患者で最低である。繰り返しうる疾患としては、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、および原発性硬化性胆管炎などがある（Hirschfield, G.M., et al., 2009. BMJ, 338, p.b1670）。

【０００６】

肝臓移植もまた、移植片対宿主病によって起こる免疫介在性の損傷を起こしうる。移植片対宿主病は、０．１％～２％で発生すると報告されており、死亡率は７５％よりも大きい（Akbulut, S., et al., 2012. World journal of gastroenterology, 18(37), p.5240）。

【０００７】

肝臓は、独特な再生能力を有し、これが免疫介在性の損傷を寛解させる一助となりうる。しかしながら、慢性的な免疫介在性の損傷という状況では、肝臓の細胞は老化し、その再生能力が落ち、このため肝不全の発症に寄与し、患者の罹患および死亡を増大させる（Aravinthan, A.D. and Alexander, G.J., 2016. Journal of hepatology, 65(4), pp.825-834）。さらに、免疫介在性の損傷に応じた肝臓の再生は、悪影響を及ぼしかねず、硬変や肝癌に至る可能性がある（Michalopoulos, G.K., 2017. Hepatology, 65(4), pp.1384-1392）。

【０００８】

したがって、免疫介在性の損傷を治療および／または予防することができ、肝臓の再生を促進することができる療法が、肝疾患の治療に大きな可能性を有するだろう。そのため、免疫介在性の損傷を治療および／または予防することができ、肝臓の再生を促進することができる療法が求められている。

【発明の概要】

【０００９】

第一態様において、本発明は、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含む、改変された制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）を提供し、前記ＣＡＲはアシアロ糖タンパク質受容体（ＡＳＧＲ）に特異的に結合する抗原認識ドメインを含む。

【００１０】

いくつかの実施形態において、前記ＣＡＲは、ＳＴＡＴ５関連モチーフと、ＪＡＫ１および／またはＪＡＫ２結合モチーフとを含むエンドドメインを含む。いくつかの別の実施形態において、前記エンドドメインは、ＪＡＫ３結合モチーフを含み、および／またはＳＴＡＴ３関連モチーフを含まない。

【００１１】

好適には、前記ＣＡＲエンドドメインは、アミノ酸配列ＹＸＸＱ（配列番号１３３）を含まない。好適には、前記ＣＡＲエンドドメインのＩＬ２Ｒβ部分は、アミノ酸配列ＹＸＸＱ（配列番号１３３）を含まない。

【００１２】

ＳＴＡＴ５シグナリングを備えた、本発明の改変されたＴｒｅｇは、対象のＴ細胞母集団（general T cell population）と比較して抗原を認識した後に、前記改変されたＣＡＲ－Ｔｒｅｇに生存有意性を提供することにおいて、特に効果があればよい。特に、免疫抑制剤を使用するとＩＬ－２の獲得を低減する状況、たとえば移植などの状況で、前記ＣＡＲ－ＴｒｅｇのＳＴＡＴ５シグナルリングは、それが無ければ不利な微小環境において、本発明のＴｒｅｇに対するさらなる生存と機能の効果を提供する。

【００１３】

他の態様において、本発明は、本発明に係る改変されたＴｒｅｇを含む医薬組成物を提供する。

【００１４】

他の態様において、本発明は、対象における肝臓移植組織に対する寛容の誘発に使用するための、または、対象における肝臓移植拒絶反応、肝臓移植片対宿主病（ＧｖＨＤ）、自己免疫性肝疾患、または炎症性肝障害の治療および／または予防に使用するための、本発明に係る改変されたＴｒｅｇまたは医薬組成物を提供する。

他の態様において、本発明は、対象における肝臓移植組織に対する寛容を誘発する方法、または、対象における肝臓移植拒絶反応、肝臓移植片対宿主病（ＧｖＨＤ）、自己免疫性肝疾患、または炎症性肝障害を治療および／または予防する方法であって、前記方法は、本発明に係る改変されたＴｒｅｇまたは医薬組成物を前記対象に投与する工程を含む方法を、提供する。

【００１５】

他の態様において、本発明は、対象の肝臓移植組織に対する寛容を誘発するための薬品を製造するために、または対象における肝臓移植拒絶反応、肝臓移植片対宿主病（ＧｖＨＤ）、自己免疫性肝疾患、または炎症性肝障害を治療および／または予防する薬品を製造するために、本発明に係る改変されたＴｒｅｇを使用することに関する。

他の態様において、本発明は、対象の肝臓組織の修復および／または再生に使用するための、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含む改変された制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）、または前記改変されたＴｒｅｇを含む医薬組成物を提供し、前記ＣＡＲは、肝臓特異的抗原認識ドメインを含む。

【００１６】

他の態様において、本発明は、対象における肝臓組織の修復および／または再生を促進する方法であって、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含む改変された制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）、または前記改変されたＴｒｅｇを含む医薬組成物を、対象に投与する工程を含む方法を提供し、前記ＣＡＲは、肝臓特異的抗原認識ドメインを含む。

【００１７】

他の態様において、本発明は、対象の肝臓組織の修復および／または再生を促進するための薬品の製造における、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含む改変されたＴｒｅｇの使用を提供し、前記ＣＡＲは、肝臓特異的抗原認識ドメインを含む。

【００１８】
他の態様において、本発明は、対象における肝硬変、急性肝不全、急性憎悪した慢性肝不全の治療および／または予防に使用するための、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含む改変された制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）、または前記改変されたＴｒｅｇを含む医薬組成物を提供し、前記ＣＡＲは、肝臓特異的抗原認識ドメインを含む。
【００１９】
他の態様において、本発明は、対象における肝硬変、急性肝不全、急性憎悪した慢性肝不全を治療および／または予防する方法を提供し、前記方法は、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含む改変された制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）、または前記改変されたＴｒｅｇを含む医薬組成物を、前記対象に投与する工程を含み、前記ＣＡＲは、肝臓特異的抗原認識ドメインを含む。
【００２０】
他の態様において、本発明は、対象における肝硬変、急性肝不全、急性憎悪した慢性肝不全を治療および／または予防するための薬品の製造における、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含む改変されたＴｒｅｇの使用を提供し、前記ＣＡＲは、肝臓特異的抗原認識ドメインを含む。
【００２１】
本発明はまた、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を提供し、前記ＣＡＲはアシアロ糖タンパク質受容体（ＡＳＧＲ）に特異的に結合する抗原認識ドメインを含み、さらにＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメインをさらに含む。いくつかの実施形態において、前記ＣＡＲは、ＳＴＡＴ５関連モチーフと、ＪＡＫ１および／またはＪＡＫ２結合モチーフとを含むエンドドメインを含む。いくつかの別の実施形態において、前記エンドドメインは、ＪＡＫ３結合モチーフを含み、および／またはＳＴＡＴ３関連モチーフを含まない。このように、一実施形態において、本発明はＣＡＲを提供し、前記ＣＡＲは抗原認識ドメインを含み、前記抗原認識ドメインは、ＡＳＧＲに特異的に結合し、ＳＴＡＴ５関連モチーフと、ＪＡＫ１および／またはＪＡＫ２結合モチーフとを含み、好ましくはＪＡＫ３結合モチーフを含むがＳＴＡＴ３関連モチーフを含まない。
【００２２】
本発明はまた、本発明のＣＡＲをコードする、ポリヌクレオチド、核酸、またはベクターを提供する。
【００２３】
本発明はさらに、本発明に係る改変されたＴｒｅｇを作製する方法を提供し、前記方法は、
（ｉ）対象から細胞含有サンプルを単離し、または細胞含有サンプルを得る工程；および
（ｉｉ）前記細胞含有サンプルに対して、ポリヌクレオチド、核酸、またはＣＡＲをコードするベクターを形質導入または遺伝子導入して、改変された細胞の集団を得る工程を含み、
前記細胞含有サンプルがＴｒｅｇを含み、および／または、前記工程（ｉｉ）の前または後に、Ｔｒｅｇを富化する、および／または、Ｔｒｅｇを前記細胞含有サンプルから生成する。
【図面の簡単な説明】
【００２４】
【図１】図１－抗ＡＳＧＲ１ ＣＡＲコンストラクトの設計例抗ＡＳＧＲ１ ＣＡＲコンストラクトの例の概略図。（Ａ）ＡＳＧＲ１ ＶＨ抗原認識ドメイン、ＣＤ８αヒンジドメイン、ＣＤ２８ＴＭ、ＣＤ２８シグナル伝達ドメイン、ＣＤ３ｚシグナル伝達ドメイン、Ｐ２Ａ切断ドメイン、およびｅＧＦＰを含む、抗ＡＳＧＲ１ ＣＡＲコンストラクト。（Ｂ）ＡＳＧＲ１ ＶＨ抗原認識ドメイン、ＣＤ２８ヒンジドメイン、ＣＤ２８ＴＭ、ＣＤ２８シグナル伝達ドメイン、ＣＤ３ｚシグナル伝達ドメイン、Ｐ２Ａ切断ドメイン、およびｅＧＦＰを含む、抗ＡＳＧＲ１ ＣＡＲコンストラクトの例の概略図。

【図２】図２－抗ＡＳＧＲ１ ＣＡＲ－Ｔｒｅｇの生成ＦＡＣＳ解析による、抗ＡＳＧＲ１ ＣＡＲ－Ｔｒｅｇの生成を示すヒストグラム。（Ａ）形質導入されていないＴｒｅｇ。（Ｂ）形質導入されたＴｒｅｇ。ＣＤ４＋ＣＤ２５ｈｉＣＤ１２７細胞を単離し、抗ＣＤ３／ＣＤ２８ビーズで活性化した。活性化の２日後、ＴｒｅｇにＡＳＧＲ１－ＣＡＲとＧＦＰレポーター遺伝子とを含むレンチウイルスを形質導入した。形質導入されたＴｒｅｇと形質導入されていないＴｒｅｇとを１０日間培養し、ＧＦＰを測定して形質導入の効果を調べた。

【図３】図３－ＨｅｐＧ２細胞株におけるＡＳＧＲ１の発現の確認ＦＡＣＳ解析による、Ｋ５６２細胞およびＨｅｐＧ２細胞でのＡＳＧＲ１レベルを示す、ヒストグラム。（Ａ）Ｋ５６２細胞（Ｂ）ＨｅｐＧ２細胞

【図４Ａ】図４－抗ＡＳＧＲ１ ＣＡＲ－Ｔｒｅｇの抗原特異性の評価（ｉ）培地のみ、（ｉｉ）ＨｅｐＧ２細胞、および（ｉｉｉ）抗ＣＤ３／ＣＤ２８ビーズを使用した培養に応じた、ＣＤ６９の発現を示す、ＦＡＣＳ解析によるヒストグラム。（Ａ）形質導入されたＴｒｅｇ（GFP^+）。（Ｂ）形質導入されたＴｒｅｇ（GFP^-）。（Ｃ）形質導入されていないＴｒｅｇ（GFP^-）。培地のみの存在下では、ＣＤ６９の上方制御は観察されない。ＨｅｐＧ２細胞を使用した培養に続き、GFP^+の形質導入されたＴｒｅｇ（ただし、ＧＰＦ－ネガティブの形質導入された細胞や、形質導入されていない細胞ではない）のみがＣＤ６９を上方制御する。これに対して、非特異的な抗ＣＤ３／ＣＤ２８ビーズの刺激で培養された場合、すべての細胞がＣＤ６９を上方制御した。

【図４Ｂ】（Ｂ）形質導入されたＴｒｅｇ（GFP^-）。

【図４Ｃ】（Ｃ）形質導入されていないＴｒｅｇ（GFP^-）。

【図５】図５－抗ＡＳＧＲ１ ＣＡＲ－Ｔｒｅｇ（１：１ Ｔｒｅｇ：Ｔｅｆｆ）の抗原特異性抑制機能の評価ＦＡＣＳ解析による、活性化エフェクターＣＤ４＋ＣＤ２５－Ｔ細胞の増殖を示す、ヒストグラム。増殖色素で染色し、抗ＣＤ３／ＣＤ２８ビーズで予備活性化させたエフェクターＴ細胞について、その増殖能力に対する抗ＡＳＧＲ１ ＣＡＲ－Ｔｒｅｇの影響を、抑制アッセイにより示す。抗ＡＳＧＲ１ ＣＡＲ Ｔｒｅｇは、ＨｅｐＧ２刺激に応じて、通常Ｔ細胞の増殖を効果的に抑制できた。

【図６】図６－抗ＡＳＧＲ１ ＣＡＲ－Ｔｒｅｇ（１：１、１：２ および １：５ Ｔｒｅｇ：Ｔｅｆｆ）の抗原特異性抑制機能の評価Ｔｒｅｇ：Ｔｅｆｆ比が１：１、１：２および１：５のものについての、抑制アッセイの結果。増殖色素で染色し、抗ＣＤ３／ＣＤ２８ビーズで予備活性化させたエフェクターＴ細胞について、その増殖能力に対する抗ＡＳＧＲ１ ＣＡＲ－Ｔｒｅｇの影響を、抑制アッセイにより示す。抗ＡＳＧＲ１ ＣＡＲ Ｔｒｅｇは、ＨｅｐＧ２刺激に応じて、通常Ｔ細胞の増殖を効果的に、形質導入されていないＴｒｅｇよりも低い比率で、抑制できた。

【図７】図７－抗ＨＬＡ．Ａ２ ＩＬ２Ｒ ＣＡＲコンストラクトの設計例ＩＬ２Ｒエンドドメインの様々な組み合わせを含む抗ＨＬＡ．Ａ２ ＣＡＲコンストラクトの例の概略図。（Ａ）ｄＣＡＲコンストラクト：ＨＬＡ．Ａ２ｓｃＦｖ抗原認識ドメイン；ＣＤ２８ヒンジドメイン；ＣＤ２８ＴＭおよびｅＧＦＰ。（Ｂ）ＣＤ２８ｚコンストラクト：ＨＬＡ．Ａ２ｓｃＦｖ抗原認識ドメイン；ＣＤ２８ヒンジドメイン；ＣＤ２８ＴＭ；ＣＤ２８シグナル伝達ドメイン；ＣＤ３ｚシグナル伝達ドメインおよびｅＧＦＰ。（Ｃ）ＩＬ２Ｒコンストラクト１：ＨＬＡ．Ａ２ｓｃＦｖ抗原認識ドメイン；ＣＤ２８ヒンジドメイン；ＣＤ２８ＴＭ；ＣＤ２８シグナル伝達ドメイン；切断型（truncated）ＩＬ２ＲＢエンドドメイン；ＣＤ３ｚシグナル伝達ドメインおよびｅＧＦＰ。（Ｄ）ＩＬ２Ｒコンストラクト１：ＨＬＡ．Ａ２ｓｃＦｖ抗原認識ドメイン；ＣＤ２８ヒンジドメイン；ＣＤ２８ＴＭ；ＣＤ２８シグナル伝達ドメイン；切断型ＩＬ２ＲＧ；切断型ＩＬ２ＲＢエンドドメイン；ＣＤ３ｚシグナル伝達ドメインおよびｅＧＦＰ。（Ｅ）ＩＬ２Ｒコンストラクト１：ＨＬＡ．Ａ２ｓｃＦｖ抗原認識ドメイン；ＣＤ２８ヒンジドメイン；ＣＤ２８ＴＭ；ＣＤ２８シグナリングドメイン；切断型ＩＬ２ＲＢエンドドメイン；ＣＤ３ｚシグナル伝達ドメイン；ＦＰ２Ａ切断ドメイン（cleavage domain）およびｅＧＦＰ。

【図８】図８－抗ＨＬＡ．Ａ２ ＩＬ２Ｒ ＣＡＲ－Ｔｒｅｇの生成抗ＨＬＡ．Ａ２ＩＬ２

ＲＣＡＲ－Ｔｒｅｇの生成および増殖を示す概略図。（Ａ）単離されたＣＤ４＋ＣＤ２５ｈｉＣＤ１２７ｌｏｗ細胞を、単離し抗ＣＤ３／ＣＤ２８ビーズで活性化した。活性化の３日後、Ｔｒｅｇを、ＨＬＡ．Ａ２－ＣＡＲとＧＦＰレポーター遺伝子とを含むレンチウイルスで形質導入した。新鮮な培地と１０００ ＩＵ／ｍｌ ＩＬ－２を２日毎に加えた。形質導入されたＴｒｅｇと形質導入されていないＴｒｅｇとを１０日間培養し、ＧＦＰを測定して形質導入の効果を調べた。Ｔｒｅｇを、新鮮な抗ＣＤ３／ＣＤ２８ビーズを使用してさらに増殖させた。（Ｂ）形質導入されていないＴｒｅｇまたは様々なＣＡＲコンストラクトで形質導入したＴｒｅｇの、活性化後１０日目での倍率変化（fold change）増殖。

【図９】図９－抗ＨＬＡ．Ａ２ ＩＬ２Ｒコンストラクトの形質導入の効果の経時的定量化ＣＡＲコンストラクトが形質導入されていないＴｒｅｇと、ＣＡＲコンストラクトを形質導入したＴｒｅｇとについて、ＧＦＰ発現を、細胞活性化後の異なる時点で解析した。（Ａ）形質導入後７日のＨＬＡ－Ａ２ ＩＬ２Ｒ ＣＡＲ ＴｒｅｇからのＧＦＰ発現の典型的な等高線プロット（contour plot）。（Ｂ）形質導入後７日の生存ＣＤ４＋細胞中のＧＦＰ$^{+}$ ＣＡＲ Ｔｒｅｇの定量化（Ｃ）ＨＬＡ－Ａ２ ＩＬ２Ｒ ＣＡＲ ＴｒｅｇからのＧＦＰ発現の経時的定量化。

【図１０】図１０－形質導入されたＴｒｅｇ上での抗ＨＬＡ．Ａ２ ＩＬ２Ｒ ＣＡＲコンストラクトの細胞表面発現の定量化形質導入されていないＴｒｅｇでの、および形質導入されたＴｒｅｇでの、ＣＡＲコンストラクトの膜発現を、ＰＥコンジュゲートＨＬＡ－Ａ＊０２０１／ＣＩＮＧＶＣＷＴＶデキストラマー（Ｉｍｍｕｄｅｘ、デンマーク、コペンハーゲン）によって解析した。（Ａ）形質導入後７日のＧＦＰ＋Ｄｅｘｔｒａｍｅｒ＋ＣＡＲ Ｔｒｅｇの典型的な等高線プロット。（Ｂ）形質導入後７日のＧＦＰ＋Ｔｒｅｇ中のＤｅｘｔｒａｍｅｒ＋細胞の定量化。

【図１１】図１１－ポリクローナル細胞増殖後のＣＡＲ Ｔｒｅｇの表現型の特性評価抗ＣＤ３／ＣＤ２８活性化ビーズおよびＩＬ－２の存在下で１５日間、Ｔｒｅｇを培養し増殖させた。Ｔｒｅｇ関連マーカーＦＯＸＰ３、ＨＥＬＩＯＳ、ＣＴＬＡ４、およびＴＩＧＩＴを、形質導入されていないＴｒｅｇ上と、形質導入されたＴｒｅｇ上とでＦＡＣＳにより解析し、培養１５日目の表現型の系統安定性を調査した。

【図１２Ａ】図１２－抗ＨＬＡ．Ａ２ＩＬ２ＲＣＡＲ Ｔｒｅｇの抗原特異性の評価形質導入されていないＴｒｅｇと、形質導入されたＴｒｅｇとを、異なる刺激の存在下で１８時間培養した。ＣＤ６９とＣＤ１３７活性化マーカーを解析し、特異的な細胞活性化と非特異的な細胞活性化とを調べた。（Ａ）ＨＬＡ．Ａ１またはＨＬＡ．Ａ２分子を形質導入したＫ５６２細胞との培養に応じたＣＤ６９の発現を示す典型的な等高線プロット。形質導入されたＴｒｅｇを選択するためにＧＦＰシグナルを使用した。

【図１２Ｂ】（Ｂ）培地のみでの培養（刺激無し）、抗ＣＤ３／ＣＤ２８ビーズを用いた培養（非特異的刺激）、Ｋ５６２－ＨＬＡ．Ａ１細胞およびＫ５６２－ＨＬＡ．Ａ２細胞を用いた培養の１８時間後、ＴｒｅｇでのＣＤ６９とＣＤ１３７の発現の定量化。

【図１２Ｃ】（Ｃ）ＨＬＡ．Ａ１細胞株およびＨＬＡ．Ａ２Ｂ細胞株と１８時間培養した後のＴｒｅｇでのＣＤ６９の発現を示す典型的なヒストグラム。異なる細胞対細胞比を使用した。異なる細胞対細胞比を使用した。

【図１３】図１３－ＩＬ２Ｒ ＣＡＲシグナリングの指標としてのＳＴＡＴ５リン酸化解析形質導入されたＣＡＲ Ｔｒｅｇを、ＩＬ２を含まない培地に一晩置いた。培地のみでの培養、１０００ ＩＵ／ｍｌ ＩＬ－２での培養、ＨＬＡ．Ａ２－Ｉｇ系人工ＡＰＣ（ＤＯＩ：１０．３７９１／２８０１に記載のプロトコルに従い作製）の存在下での培養の１０分後および１２０分後、ＦＡＣＳ解析によりＴｒｅｇのＳＴＡＴ５リン酸化を調べた。（Ａ）培地のみの培養、１：１比率のＨＬＡ．Ａ２ビーズとの培養、１０００ＩＵ／ｍｌ ＩＬ－２での培養の１０分後の形質導入されたＣＡＲ－ＴｒｅｇでのＧＦＰおよびｐｈｏｓｐｈｏＳＴＡＴ５の発現を示す典型的な等高線プロット。１：１比率のＨＬＡ．Ａ２ビーズとともに、または培地のみ（刺激無し）で、１２０分間培養したＴｒｅｇのＳＴＡＴ５のリン酸化を示すヒストグラム。

【図１４】図１４－(i)配列番号１１、１２、および１３をそれぞれ、またはそれらの誘導体ＩＬ－２の非存在下での非特異的活性化およびＨＬＡ．Ａ２特異的活性化後のＴｒｅｇ生存の評価異なるコンストラクトのＣＡＲ形質導入Ｔｒｅｇを、抗ＣＤ３／２８活性化ビーズおよびＫ５６２．Ａ２発現細胞と、ＩＬ－２の非存在下で培養した。ＦＡＣＳ解析により活性化の７日後に細胞の生存を調べた。（Ａ）ＩＬ－２を用いない活性化後７日目の生存率色素染色に基づくＧＦＰ＋細胞の細胞生存率を示すＣＡＲ－Ｔｒｅｇｓの典型的なヒストグラム。（Ｂ）ＩＬ－２の非存在下で抗ＣＤ３／２８ビーズおよびＫ５６２－ＨＬＡ．Ａ２細胞との７日間の培養後にＧＦＰ＋Ｔｒｅｇに生存している細胞の率（＊ｐ＜０．０５、Ｔｕｋｅｙ’ｓ ｐｏｓｔ ｈｏｃ ｃｏｒｒｅｃｔｉｏｎを使用したＡＮＯＶＡ分析）。

【図１５】図１５－Ｔｒｅｇ抑制能試験：Ｂ細胞に対する共刺激分子の調節（ｍｏｄｕｌａｔｉｏｎ）の解析によるＴｒｅｇの免疫調節機能の評価Ｔｒｅｇとの共培養後の、Ｂ細胞のＣＤ８０およびＣＤ８６発現を解析し、抗原提示細胞での共刺激分子の発現を低減するＴｒｅｇの能力を評価した。一定数の生きているＡ２発現Ｂ細胞（２０Ｋ／ｗｅｌｌ）を、滴定による数のＴｒｅｇ製品（Ａ２ネガティブドナー）（２００、１００、５０、２５、１２．５Ｋ）と一晩共培養した。Ｂ細胞でのＣＤ８６およびＣＤ８０共刺激マーカーのＦＡＣＳ解析。

【図１６】図１６－初代培養肝細胞によるインビトロでのアルブミン産生について、予備活性化され形質導入されていないＴｒｅｇの効果の評価初代培養肝細胞を、単独で、または、事前に活性化させた制御性Ｔ細胞の存在下で、７日間培養した。制御性Ｔ細胞を添加した結果、改善されたアルブミンの分泌物が上清の中に検出できた。活性化させた制御性Ｔ細胞を含む培養物から得られた馴化培地の存在下で、かつ制御性Ｔ細胞の非存在下で、肝細胞を培養すると、同様の効果が見られた。予備活性化され形質導入されていないＴｒｅｇを添加することにより、インビトロでの初代培養肝細胞によるアルブミンの産生が増加することを、この図は示している。

【図１７】図１７－初代培養肝細胞によるインビトロでのアルブミン産生について、予備活性化され形質導入されていないＴｒｅｇとエフェクターＴ細胞との効果の評価初代培養肝細胞を、単独で、または、事前に活性化させた制御性Ｔ細胞の存在下で、予備活性化エフェクターＴ細胞の存在下で、または両方の存在下で、３日間培養した。制御性Ｔ細胞を添加した結果、改善されたアルブミンの分泌物が上清の中に検出できた。肝細胞をエフェクターＴ細胞とともに培養すると、これは見られず、アルブミンレベルが低下する傾向があった。制御性Ｔ細胞を予備活性化エフェクターＴ細胞と組み合わせても、アルブミンレベルについての制御性Ｔ細胞の有利な効果が見られた。予備活性化され形質導入されていないＴｒｅｇを添加し、エフェクターＴ細胞を添加しないことにより、インビトロでの初代培養肝細胞によるアルブミンの産生が増加することを、この図は示している。

【図１８】図１８－初代培養肝細胞によるインビトロでのアルブミン産生について、抗ＡＳＧＰＲ ＣＡＲ Ｔｒｅｇの効果の評価初代培養肝細胞を、単独で、または、休眠状態の未処理の制御性Ｔ細胞の存在下で、または抗ＡＳＧＰＲ ＣＡＲを発現するようにレンチウイルス形質導入した休眠中の制御性Ｔ細胞の存在下で培養した。抗ＡＳＧＰＲを持ち、したがって肝細胞が発現したＡＳＧＰＲに応じて抗原特異的活性化を行うことができるＴｒｅｇのみが、前記上清のアルブミンレベルに大きな影響を及ぼした。予備活性化され、抗ＡＳＧＰＲ ＣＡＲを発現しているＴｒｅｇを添加することにより、インビトロでの初代培養肝細胞によるアルブミンの産生が増加し、形質導入していないＴｒｅｇを使用する場合に到達するレベルを超えることを、この図は示している。

【００２５】

詳細な説明

本発明は、ＣＡＲを含む改変されたＴｒｅｇを提供するが、当該ＣＡＲは、それが肝臓特異的抗原（たとえばＡＳＧＲ）に対して結合する時にのみ、アクチベーターシグナルをＴｒｅｇへ提供し、したがって、特に肝臓の微小環境において、前記改変されたＴｒｅｇの貯留、機能、および生存を向上する。本発明の前記改変されたＴｒｅｇは、肝臓特異的

抗原（たとえばＡＳＧＲ）へ結合すると、肝臓の再生および組織修復を増加または改善する。

【００２６】

本発明の様々な好ましい特徴および実施形態を、非制限的な例示により説明する。本明細書および添付の特許請求の範囲で用いられているように、単数形「ａ」、「ａｎ」、および「ｔｈｅ」は、文脈において明確に別段の指示がない限り、複数の指示対象を含むことに留意されたい。本明細書における「ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ」、「ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ」および「ｃｏｍｐｒｉｓｅｄ ｏｆ」という用語は、「ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ」、「ｉｎｃｌｕｄｅｓ」、または「ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ」、「ｃｏｎｔａｉｎｓ」の同義語で、包括的または非限定的であり、記載されていない付加の部材や素子、方法の工程を除外するものではない。「ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ」、「ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ」および「ｃｏｍｐｒｉｓｅｄ ｏｆ」という用語はまた、「ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ ｏｆ」という用語も含む。

【００２７】

本明細書で論じられる出版物は、本願の出願日の前の開示を単に提供する。本明細書のいずれの記載も、かかる出版物が添付の特許請求の範囲に対する先行技術を構成していると認めるものとして解釈されはしない。

【００２８】

この開示は、本明細書に開示する前記例示の方法や材料によって制限されず、本明細書に記載された方法や材料と類似の、または等価の方法や材料を、この開示の実施形態の実施や試験に使用できる。数の範囲は、その範囲を定義する数を含む。特に断らない限り、核酸は左から右へ、５’から３’の方向に、アミノ酸配列は左から右へ、アミノからカルボキシの方向にそれぞれ書く。

【００２９】

改変された制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）

制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）は、細胞変性免疫応答を制御し、免疫寛容の維持に必須である、抑制機能を有する免疫細胞である。

【００３０】

本明細書において、Ｔｒｅｇという用語は、免疫抑制機能を有するＴ細胞のことである。好適には、「免疫抑制機能」とは、病原体や、抗原、たとえば同種抗原、または自己抗原等の刺激に応答する免疫系によって促進される生理的な細胞の現象が多数ある内の一つ以上を低減または阻害するＴｒｅｇの能力をいうものであってもよい。かかる現象の例には、通常Ｔ細胞（Ｔｃｏｎｖ）の増殖、および炎症促進性サイトカインの分泌などがある。かかる現象はいずれも、免疫応答の強さの指標として使用してもよい。Ｔｒｅｇの存在下でＴｃｏｎｖによる免疫応答が相対的に弱いことは、Ｔｒｅｇの免疫応答を抑制する能力を示すといえる。たとえば、サイトカインの分泌が相対的に低下することは、免疫応答の弱まりを示し、したがって、Ｔｒｅｇの免疫応答を抑制する能力を示すといえる。Ｔｒｅｇは、Ｂ細胞、樹状細胞およびマクロファージなど抗原提示細胞（ＡＰＣ）上の共刺激分子の発現を調節することにより、免疫応答を抑制することもできる。ＣＤ８０およびＣＤ８６の発現レベルは、共培養後のインビトロでの活性化されたＴｒｅｇの抑制能を調査するために使用できる。

【００３１】

免疫応答の強度の指標を測定し、それによってＴｒｅｇの抑制能を測定するためのアッセイが、当該技術分野で周知である。特に、抗原特異的なＴｃｏｎｖ細胞は、Ｔｒｅｇと共培養してもよく、対応する抗原のペプチドを前記共培養に加えてＴｃｏｎｖ細胞からの応答を刺激してもよい。Ｔｃｏｎｖ細胞の増殖の度合い、および／または前記ペプチドの追加に応答してＴｃｏｎｖ細胞が分泌したサイトカインＩＬ－２の量を、共培養したＴｒｅｇの抑制能の指標として使用してもよい。

【００３２】

本発明のＴｒｅｇと共培養された抗原特異的なＴｃｏｎｖ細胞の増殖は、本発明のＴｒ

ｅｇの非存在下で培養された同じＴｃｏｎｖ細胞の増殖と比較して、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、９０％、９５％、または９９％少なくてもよい。

【００３３】

本発明のＴｒｅｇと共培養された抗原特異的なＴｃｏｎｖ細胞は、本発明のＴｒｅｇの非存在下で培養された対応するＴｃｏｎｖ細胞と比較して、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、または少なくとも６０％少ないエフェクターサイトカインを発現してもよい。

【００３４】

エフェクターサイトカインは、ＩＬ－２、ＩＬ－１７、ＴＮＦα、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－９、ＩＬ－１０、およびＩＬ－１３から選択されてもよい。

【００３５】

好適には、エフェクターサイトカインは、ＩＬ－２、ＩＬ－１７、ＴＮＦα、ＧＭ－ＣＳＦ、およびＩＦＮ－γから選択されてもよい。

【００３６】

好適には、Ｔｒｅｇは、マーカーＣＤ４、ＣＤ２５、およびＦＯＸＰ３（$CD4^+CD25^+FOXP3^+$）を発現するＴ細胞である。「ＦＯＸＰ３」は、フォークヘッドボックスＰ３タンパク質の略称である。ＦＯＸＰ３は、転写因子のＦＯＸタンパク質ファミリーのメンバーであり、制御性Ｔ細胞の発生（development）と機能において調節経路のマスターレギュレーターとして機能する。

【００３７】

マーカーレベルは、当業者に周知のいずれかの方法によって、たとえばフローサイトメトリーによって、決定されてもよい。Ｔｒｅｇｓはまた、ＣＴＬＡ－４（細胞障害性Ｔリンパ球関連分子４）および／またはＧＩＴＲ（グルココルチコイド誘導ＴＮＦ受容体）を発現する。Ｔｒｅｇ細胞は末梢血、リンパ節、および組織に存在する。

【００３８】

好適には、低レベルで発現した表面タンパク質ＣＤ１２７の非存在下で、またはそれとの組み合せで、細胞表面マーカーＣＤ４およびＣＤ２５とを使用することにより（$CD4^+CD25^+CD127^-$、または$CD4^+CD25^+CD127^{low}$、または$CD4^+CD25^{hi}CD127^-$、または$CD4^+CD25^{hi}CD127^{low}$）、Ｔｒｅｇを同定してもよい。かかるマーカーをＴｒｅｇの同定のために使用することは、当該技術分野において周知であり、たとえばＬｉｕら（JEM; 2006; 203; 7(10); 1701-1711）が記載している。

【００３９】

前記Ｔｒｅｇは、$CD4^+CD25^+FOXP3^+$Ｔ細胞、または$CD4^+CD25^{hi}FOXP3^+$Ｔ細胞であってもよい。

【００４０】

前記Ｔｒｅｇは、$CD4^+CD25^+CD127^-$Ｔ細胞、または$CD4^+CD25^{hi}CD127^-$Ｔ細胞であってもよい。前記Ｔｒｅｇは、$CD4^+CD25^+FOXP3^+CD127^-$Ｔ細胞、または$CD4^+CD25^{hi}FOXP3^+CD127^-$Ｔ細胞であってもよい。

【００４１】

前記ＴｒｅｇはＴｒｅｇ特異的な脱メチル化領域（ＴＳＤＲ）を有してもよい。前記ＴＳＤＲは、ＦＯＸＰ３の発現を調節する、重要なメチル化感受性のある素子である（Polansky, J.K., et al.,2008. European journal of immunology, 38(6), pp.1654-1663）。前記Ｔｒｅｇは、天然Ｔｒｅｇ（natural Treg）または胸腺由来Ｔｒｅｇ（thymus-derived Treg）であってもよいし、適応性Ｔｒｅｇ（adaptive Treg）または末梢誘導Ｔｒｅｇ（peripherally-derived Treg）であってもよいし、またはインビトロ誘導Ｔｒｅｇ（in vitro-induced Treg）であってもよい（Abbas, A.K., et

al., 2013. Nature immunology, 14(4), p.307-308）。好適には、前記Ｔｒｅｇは、ＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{+}$ＦＯＸＰ３$^{+}$Ｈｅｌｉｏｓ$^{+}$ニューロピリン１$^{+}$であってもよい。さらに好適なＴｒｅｇの例としては、Ｔｒ１細胞（Ｆｏｘｐ３を発現せず、ＩＬ－１０を高産生する）；ＣＤ８$^{+}$ＦＯＸＰ３$^{+}$Ｔ細胞；およびγδＦＯＸＰ３$^{+}$Ｔ細胞が挙げられるが、これらに限定されるわけではない。

【００４２】

好適には、前記Ｔｒｅｇは、対象から得られた末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）から単離される。好適には、前記対象は哺乳動物であり、好ましくはヒトである。好適には、前記Ｔｒｅｇは、改変されたＴｒｅｇが投与される対象に適合（たとえば、ＨＬＡ適合）しているか、または、対象自身のものである。好適には、前記改変されたＴｒｅｇが投与される対象は、哺乳動物であり、好ましくはヒトである。前記Ｔｒｅｇは、患者本人の末梢血（第一者）から、またはドナー末梢血（第二者）由来の造血性幹細胞移植の環境において、または無関係のドナー（第三者）由来の末梢血からのいずれかで、エクスビボ（生体外）で生成されてもよい。好適には、前記Ｔｒｅｇは、改変されたＴｒｅｇが投与される対象自身のものである。好ましい実施形態において、Ｔｒｅｇは、対象から得られた末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）から単離されて適合（たとえば、ＨＬＡ適合）しているか、または、改変されたＴｒｅｇが投与される対象自身のものである。好適には、前記Ｔｒｅｇは、Ｔｒｅｇの集団の一部である。好適には、Ｔｒｅｇの集団は、Ｔｒｅｇが少なくとも７０％であり、たとえばＴｒｅｇが少なくとも７５％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、または９９％である。かかる集団を、「富化されたＴｒｅｇ集団」、または「富化されたＴｒｅｇサンプル」と称してもよい。

【００４３】

いくつかの態様で、Ｔｒｅｇは、誘導性前駆細胞または胚性前駆細胞の、Ｔｒｅｇへのエクスビボ分化から由来してもよい。本明細書において、「通常Ｔ細胞」またはＴｃｏｎは、αβＴ細胞受容体（ＴＣＲ）と、分化抗原群４（ＣＤ４）または分化抗原群８（ＣＤ８）であってもよい共受容体とを発現し、免疫抑制機能をもたないＴリンパ球細胞を意味する。通常Ｔ細胞は末梢血、リンパ節、および組織に存在する。好適には、ウイルスベクターを用いた形質導入や、同じまたは異なるベクター上でＤＮＡまたはＲＮＡを用いた遺伝子導入などの多数の手段のうちの一つによって、本明細書に記載のＣＡＲをコードするＤＮＡまたはＲＮＡに加えてＦＯＸＰ３をコードするＤＮＡまたはＲＮＡを導入することにより、改変されたＴｒｅｇが生成されてもよい。または、前記改変されたＴｒｅｇは、ＩＬ－２およびＴＧＦ－βの存在下でＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{-}$ＦＯＸＰ３$^{-}$細胞のインビトロ培養によってＴｃｏｎから生成されてもよい。

【００４４】

前記Ｔｒｅｇは、誘導性前駆細胞または胚性前駆細胞の、Ｔｒｅｇへのエクスビボ分化から由来してもよい。本発明のポリヌクレオチドまたはベクターは、Ｔｒｅｇへの分化前または後に誘導性前駆細胞または胚性前駆細胞へ導入してもよい。

【００４５】

本明細書における「改変されたＴｒｅｇ」とは、Ｔｒｅｇによって自然にコードされたわけではないポリヌクレオチド、特に、上述のＣＡＲを、含むかまたは発現するように修飾された（modified）Ｔｒｅｇを意味する。Ｔｒｅｇを改変する方法は、当該技術分野で周知であり、たとえば、Ｔｒｅｇの遺伝子組み換え（genetic modification）があり、それは、たとえば、レトロウイルス形質導入またはレンチウイルス形質導入などの形質導入、リポフェクション法、ポリエチレングリコール法、リン酸カルシウム法およびエレクトロポレーション法などの遺伝子導入（ＤＮＡまたはＲＮＡの一過性形質転換など）によるものであるが、これらに限定されるわけではない。核酸配列を細胞に導入するために、いずれかの好適な方法が使用されればよい。

【００４６】

キメラ抗原受容体

本明細書における「キメラ抗原受容体」または「ＣＡＲ」または「ＣＡＲｓ」は、抗原

特異性を細胞、この場合Ｔｒｅｇ、に付与する改変された受容体のことである。ＣＡＲはまた、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して知られている。本発明のＣＡＲは、肝臓抗原（たとえばＡＳＧＲ）に特異的な結合ドメインと、場合によってはヒンジドメインと、膜貫通ドメインと、エンドドメイン（細胞内シグナル伝達ドメインと、場合によっては１個以上の共刺激ドメインとを含む）とを含む。典型的には、本発明のＣＡＲは、単一ポリペプチド鎖として発現または存在してもよく、たとえば、肝臓抗原（たとえばＡＳＧＲ）に特異的な結合ドメインと、場合によってはヒンジドメインと、膜貫通ドメインと、エンドドメイン（細胞内シグナル伝達ドメインと、場合によっては１個以上の共刺激ドメインとを含む）とを含む単一ポリペプチド鎖として発現または存在してもよい。特に、典型的には、前記細胞内シグナル伝達ドメインと、場合によっては１個以上の共刺激ドメインとは、単一ポリペプチド鎖とともに存在してもよい。このように本発明のＣＡＲは２つ以上のポリペプチド鎖を含む、例えば、二重のポリペプチドまたはＣＡＲの系を含むことが可能であるが、特定の実施形態においては、本発明のＣＡＲは二重のＣＡＲではない。

【００４７】

ＣＡＲをコードするポリヌクレオチドを、たとえばレトロウイルスベクターを使用して、Ｔｒｅｇへ導入してもよい。このように、多数の抗原特異的Ｔ細胞が、細胞の養子移入により生成されうる。ＣＡＲが標的抗原と結合すると、その結果、ＣＡＲが発現するＴｒｅｇに活性化シグナルが伝達される。このように、ＣＡＲは、改変されたＴｒｅｇの特異性を、標的抗原を発現する細胞へ向ける。

【００４８】

本発明のＴｒｅｇは、本発明のＣＡＲのうち１個以上の異なるものを含んでもよく、他のポリペプチドをコードする外因性ポリヌクレオチドをさらに含んでいてもよい。

【００４９】

抗原認識ドメイン

本発明のＣＡＲは、抗原認識ドメインを含む。本明細書における「抗原認識ドメイン」とは、ＣＡＲの抗原結合能力を画定する、ＣＡＲの細胞外部分のことである。本発明のある態様では、抗原認識ドメインは、肝臓特異的抗原に、好ましくはアシアロ糖タンパク質受容体（ＡＳＧＲ）に結合する能力を、ＣＡＲに提供する。このように、前記抗原認識ドメインは、肝臓特異的抗原を、好ましくはＡＳＧＲを、標的とする。

【００５０】

肝臓特異的抗原は、肝臓組織、たとえば肝細胞、実質細胞、クッパー細胞、星状細胞、および／または肝臓類洞内皮細胞に、優先的に発現するものである。好適には、肝臓特異的抗原は、肝臓組織（たとえば肝細胞、実質細胞、クッパー細胞、星状細胞、および肝臓類洞内皮細胞の少なくとも一つ）において、他の組織と比較して高い発現レベルを有する抗原である。たとえば、肝臓特異的抗原は、他の組織での発現レベルと比較して、少なくとも１０％高い、少なくとも２０％高い、少なくとも３０％高い、少なくとも４０％高い、少なくとも５０％高い、少なくとも１００％高い、少なくとも２００％高い、少なくとも３００％高い、少なくとも４００％高い、少なくとも５００％高い、または少なくとも１０００％高い、発現レベルを有する抗原であってもよい。好ましくは、肝臓特異的抗原は、肝臓組織だけに発現するもの、すなわち、他の組織で検出可能に発現しないものである。

【００５１】

前記肝臓特異的抗原は、Ｔｒｅｇ細胞にアクセス可能であるだろう（ただし、前記肝臓特異的抗原は、当該抗原を発現する肝臓細胞タイプのすべてにアクセス可能である必要はないだろうことを理解されたい）。たとえば、前記肝臓特異的抗原は、細胞表面に発現してもよい。好適な肝臓特異的抗原の例としては、アシアロ糖タンパク質受容体（ＡＳＧＲ）、ナトリウム／タウロコール酸共輸送ポリペプチド（ＮＴＣＰ）、マンノース－６－リン酸受容体、ＶＩ型コラーゲン受容体、ＰＤＧＦ受容体、スカベンジャー受容体クラスＡ、スカベンジャー受容体クラスＢタイプＩ、ヘパラン硫酸、グリチルリチン受容体、ＨＤ

Ｌ受容体、ＬＤＬ受容体、トランスフェリン受容体、インシュリン受容体、アルファ２マクログロブリン受容体、フェリチン受容体、ウロプラスミノゲン受容体、およびトロンビン受容体がある。

【００５２】

好ましくは、前記抗原認識ドメインは、アシアロ糖タンパク質受容体（ＡＳＧＲ）に特異的に結合する。最も好ましくは、前記抗原認識ドメインは、ヒトＡＳＧＲに結合する。いくつかの実施形態において、前記抗原認識ドメインは、ヒトＡＳＧＲと、他の動物由来のＡＳＧＲ、たとえばマウスＡＳＧＲとの両方に結合する。好適には、前記抗原認識ドメインは、ヒトＡＳＧＲに特異的に結合してもよい。

【００５３】

アシアロ糖タンパク質受容体（ＡＳＧＲまたはＡＳＧＰＲ）は、Ｃ型レクチンであり、肝細胞の類洞面上に原発的に発現する。ＡＳＧＲは、大きな４８ｋＤａサブユニット（ＡＳＧＲ１）と、小さな４０ｋＤａサブユニット（ＡＳＧＲ２）から形成される。ＡＳＧＲの主な役割は、結合、内部移行、および、その後に末端ガラクトースまたはＮアセチルガラクトースアミン残基（アシアロ糖タンパク質）を含む糖タンパク質を循環から除去することである（Roggenbuck, D., et al., 2012. Autoimmunity Highlights, 3(3), p.119）。通常の肝細胞では、ＡＳＧＲは、プラズマ肝細胞膜の類洞面および基底面上に極性的に発現する。しかしながら肝臓の炎症の間は、ＡＳＧＲの発現は、胆管側膜に向かって移行する。末期の肝疾患（硬変）では、ＡＳＧＲは過剰発現し、アシアロ糖タンパク質の血清レベルが上昇する（Roggenbuck, D., et al., 2012. Autoimmunity Highlights, 3(3), p.119）.

【００５４】

抗原認識ドメインはＡＳＧＲ１および／またはＡＳＧＲ２、好ましくはＡＳＧＲ１に結合してもよい。抗原認識ドメインはＡＳＧＲ１および／またはＡＳＧＲ２、好ましくはＡＳＧＲ１に特異的に結合してもよい。

【００５５】

ヒトＡＳＧＲ１（ＵｎｉＰｒｏｔ ｅｎｔｒｙ Ｐ０７３０６）は、ＡＳＧＲ１遺伝子によりコードされる。この遺伝子について、多数のアイソフォームをコードするスプライシング翻訳物の変異体が観察されてきた（Harris, R.L., et al., 2012. Molecular biology international, 2012, Article ID 283974, 10 pages）。長い方の転写産物は、８個のエクソンをすべて含み、はるかに大きく、全長分のＡＳＧＲ１（アイソフォームａ、２９１個のアミノ酸）をコードする。短い方の転写産物は、エクソン３のインフレーム欠失を有し、その結果３９個の残基を欠失する（アイソフォームｂ、２５２個のアミノ酸）。アイソフォームｂは、膜貫通ドメインが欠失しており、可溶性タンパク質として分泌される。ヒトＡＳＧＲ１アイソフォームａおよびｂの配列例を以下に示す（それぞれ、配列番号１および２）。

【００５６】

配列番号１－ヒトＡＳＧＲ１アイソフォームａ（ＮＰ＿００１６６２．１）

ＭＴＫＥＹＱＤＬＱＨＬＤＮＥＥＳＤＨＨＱＬＲＫＧＰＰＰＰＱＰＬＬＱＲＬＣＳＧＰＲ
ＬＬＬＬＳＬＧＬＳＬＬＬＬＶＶＶＣＶＩＧＳＱＮＳＱＬＱＥＥＬＲＧＬＲＥＴＦＳＮＦ
ＴＡＳＴＥＡＱＶＫＧＬＳＴＱＧＧＮＶＧＲＫＭＫＳＬＥＳＱＬＥＫＱＱＫＤＬＳＥＤＨ
ＳＳＬＬＬＨＶＫＱＦＶＳＤＬＲＳＬＳＣＱＭＡＡＬＱＧＮＧＳＥＲＴＣＣＰＶＮＷＶＥ
ＨＥＲＳＣＹＷＦＳＲＳＧＫＡＷＡＤＡＤＮＹＣＲＬＥＤＡＨＬＶＶＶＴＳＷＥＥＱＫＦ
ＶＱＨＨＩＧＰＶＮＴＷＭＧＬＨＤＱＮＧＰＷＫＷＶＤＧＴＤＹＥＴＧＦＫＮＷＲＰＥＱ
ＰＤＤＷＹＧＨＧＬＧＧＧＥＤＣＡＨＦＴＤＤＧＲＷＮＤＤＶＣＱＲＰＹＲＷＶＣＥＴＥ
ＬＤＫＡＳＱＥＰＰＬＬ

配列番号２－ヒトＡＳＧＲ１アイソフォームｂ（ＮＰ＿００１１８４１４５．１）

ＭＴＫＥＹＱＤＬＱＨＬＤＮＥＥＳＤＨＨＱＬＲＫＤＳＱＬＱＥＥＬＲＧＬＲＥＴＦＳＮ
ＦＴＡＳＴＥＡＱＶＫＧＬＳＴＱＧＧＮＶＧＲＫＭＫＳＬＥＳＱＬＥＫＱＱＫＤＬＳＥＤ
ＨＳＳＬＬＬＨＶＫＱＦＶＳＤＬＲＳＬＳＣＱＭＡＡＬＱＧＮＧＳＥＲＴＣＣＰＶＮＷＶ

ＥＨＥＲＳＣＹＷＦＳＲＳＧＫＡＷＡＤＡＤＮＹＣＲＬＥＤＡＨＬＶＶＶＴＳＷＥＥＱＫ
ＦＶＱＨＨＩＧＰＶＮＴＷＭＧＬＨＤＱＮＧＰＷＫＷＶＤＧＴＤＹＥＴＧＦＫＮＷＲＰＥ
ＱＰＤＤＷＹＧＨＧＬＧＧＧＥＤＣＡＨＦＴＤＤＧＲＷＮＤＤＶＣＱＲＰＹＲＷＶＣＥＴ
ＥＬＤＫＡＳＱＥＰＰＬＬ

【００５７】

前記抗原認識ドメインは、ヒトＡＳＧＲ１アイソフォームａおよび／またはヒトＡＳＧＲ１アイソフォームｂに、好ましくはヒトＡＳＧＲ１アイソフォームａに、結合してもよく、好適には特異的に結合してもよい。前記抗原認識ドメインは、配列番号１および／または配列番号２に対する同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、または１００％である１個以上のポリペプチドに結合してもよく、好適には特異的に結合してもよい。好ましくは、前記抗原認識ドメインは、配列番号１に対する同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、または１００％であるポリペプチドに結合し、好適には、それに特異的に結合してもよい。ヒトＡＳＧＲ２（ＵｎｉＰｒｏｔ ｅｎｔｒｙ Ｐ０７３０７）は、ＡＳＧＲ２遺伝子によりコードされる。または、この遺伝子について、多数のアイソフォームをコードするスプライシング翻訳物の変異体が観察されてきた（Harris, R.L., et al., 2012. Molecular biology international, 2012, Article ID 283974, 10 pages）。ＡＳＧＲ２は、選択的エクソンスプライシング現象から生じた異なるインフレーム欠失を含む４つのアイソフォーム（ａ～ｄ）をコードする５つの転写産物（ＴＨ２′、Ｔ１、Ｔ２、Ｔ３、およびＴ４）を生じさせる。アイソフォームａ～ｃは、膜貫通ドメインと前記ＣＲＤとの間の結合の近くでタンパク質分解切断シグナルとして働く５個のアミノ酸を含む。アイソフォームｂおよびｄにはこのシグナルが無いので、タンパク質分解切断されず、膜結合のままであり、ＡＳＧＲ１アイソフォームａとオリゴマー形成して細胞表面で未変性のＡＳＧＲを形成する。ＡＳＧＲ２アイソフォームａ～ｄの配列例を以下に示す（それぞれ、配列番号３～６）。

【００５８】

配列番号３－ヒトＡＳＧＲ２アイソフォームａ（ＮＰ＿００１１７２．１およびＮＰ＿５５０４３４．１）

ＭＡＫＤＦＱＤＩＱＱＬＳＳＥＥＮＤＨＰＦＨＱＧＥＧＰＧＴＲＲＬＮＰＲＲＧＮＰＦＬ
ＫＧＰＰＰＡＱＰＬＡＱＲＬＣＳＭＶＣＦＳＬＬＡＬＳＦＮＩＬＬＬＶＶＩＣＶＴＧＳＱ
ＳＥＧＨＲＧＡＱＬＱＡＥＬＲＳＬＫＥＡＦＳＮＦＳＳＳＴＬＴＥＶＱＡＩＳＴＨＧＧＳ
ＶＧＤＫＩＴＳＬＧＡＫＬＥＫＱＱＱＤＬＫＡＤＨＤＡＬＬＦＨＬＫＨＦＰＶＤＬＲＦＶ
ＡＣＱＭＥＬＬＨＳＮＧＳＱＲＴＣＣＰＶＮＷＶＥＨＱＧＳＣＹＷＦＳＨＳＧＫＡＷＡＥ
ＡＥＫＹＣＱＬＥＮＡＨＬＶＶＩＮＳＷＥＥＱＫＦＩＶＱＨＴＮＰＦＮＴＷＩＧＬＴＤＳ
ＤＧＳＷＫＷＶＤＧＴＤＹＲＨＮＹＫＮＷＡＶＴＱＰＤＮＷＨＧＨＥＬＧＧＳＥＤＣＶＥ
ＶＱＰＤＧＲＷＮＤＤＦＣＬＱＶＹＲＷＶＣＥＫＲＲＮＡＴＧＥＶＡ

配列番号４－ヒトＡＳＧＲ２アイソフォームｂ（ＮＰ＿５５０４３５．１）

ＭＡＫＤＦＱＤＩＱＱＬＳＳＥＥＮＤＨＰＦＨＱＧＰＰＰＡＱＰＬＡＱＲＬＣＳＭＶＣＦ
ＳＬＬＡＬＳＦＮＩＬＬＬＶＶＩＣＶＴＧＳＱＳＡＱＬＱＡＥＬＲＳＬＫＥＡＦＳＮＦＳ
ＳＳＴＬＴＥＶＱＡＩＳＴＨＧＧＳＶＧＤＫＩＴＳＬＧＡＫＬＥＫＱＱＱＤＬＫＡＤＨＤ
ＡＬＬＦＨＬＫＨＦＰＶＤＬＲＦＶＡＣＱＭＥＬＬＨＳＮＧＳＱＲＴＣＣＰＶＮＷＶＥＨ
ＱＧＳＣＹＷＦＳＨＳＧＫＡＷＡＥＡＥＫＹＣＱＬＥＮＡＨＬＶＶＩＮＳＷＥＥＱＫＦＩ
ＶＱＨＴＮＰＦＮＴＷＩＧＬＴＤＳＤＧＳＷＫＷＶＤＧＴＤＹＲＨＮＹＫＮＷＡＶＴＱＰ
ＤＮＷＨＧＨＥＬＧＧＳＥＤＣＶＥＶＱＰＤＧＲＷＮＤＤＦＣＬＱＶＹＲＷＶＣＥＫＲＲ
ＮＡＴＧＥＶＡ

配列番号５－ヒトＡＳＧＲ２アイソフォームｃ（ＮＰ＿５５０４３６．１）

ＭＡＫＤＦＱＤＩＱＱＬＳＳＥＥＮＤＨＰＦＨＱＧＰＰＰＡＱＰＬＡＱＲＬＣＳＭＶＣＦ
ＳＬＬＡＬＳＦＮＩＬＬＬＶＶＩＣＶＴＧＳＱＳＥＧＨＲＧＡＱＬＱＡＥＬＲＳＬＫＥＡ
ＦＳＮＦＳＳＳＴＬＴＥＶＱＡＩＳＴＨＧＧＳＶＧＤＫＩＴＳＬＧＡＫＬＥＫＱＱＱＤＬ
ＫＡＤＨＤＡＬＬＦＨＬＫＨＦＰＶＤＬＲＦＶＡＣＱＭＥＬＬＨＳＮＧＳＱＲＴＣＣＰＶ
ＮＷＶＥＨＱＧＳＣＹＷＦＳＨＳＧＫＡＷＡＥＡＥＫＹＣＱＬＥＮＡＨＬＶＶＩＮＳＷＥ

ＥＱＫＦＩＶＱＨＴＮＰＦＮＴＷＩＧＬＴＤＳＤＧＳＷＫＷＶＤＧＴＤＹＲＨＮＹＫＮＷＡＶＴＱＰＤＮＷＨＧＨＥＬＧＧＳＥＤＣＶＥＶＱＰＤＧＲＷＮＤＤＦＣＬＱＶＹＲＷＶＣＥＫＲＲＮＡＴＧＥＶＡ

配列番号６－ヒトＡＳＧＲ２アイソフォームｄ（ＮＰ＿００１１８８２８１．１）

ＭＡＫＤＦＱＤＩＱＱＬＳＳＥＥＮＤＨＰＦＨＱＧＥＧＰＧＴＲＲＬＮＰＲＲＧＮＰＦＬＫＧＰＰＰＡＱＰＬＡＱＲＬＣＳＭＶＣＦＳＬＬＡＬＳＦＮＩＬＬＬＶＶＩＣＶＴＧＳＱＳＡＱＬＱＡＥＬＲＳＬＫＥＡＦＳＮＦＳＳＳＴＬＴＥＶＱＡＩＳＴＨＧＧＳＶＧＤＫＩＴＳＬＧＡＫＬＥＫＱＱＱＤＬＫＡＤＨＤＡＬＬＦＨＬＫＨＦＰＶＤＬＲＦＶＡＣＱＭＥＬＬＨＳＮＧＳＱＲＴＣＣＰＶＮＷＶＥＨＱＧＳＣＹＷＦＳＨＳＧＫＡＷＡＥＡＥＫＹＣＱＬＥＮＡＨＬＶＶＩＮＳＷＥＥＱＫＦＩＶＱＨＴＮＰＦＮＴＷＩＧＬＴＤＳＤＧＳＷＫＷＶＤＧＴＤＹＲＨＮＹＫＮＷＡＶＴＱＰＤＮＷＨＧＨＥＬＧＧＳＥＤＣＶＥＶＱＰＤＧＲＷＮＤＤＦＣＬＱＶＹＲＷＶＣＥＫＲＲＮＡＴＧＥＶＡ

【００５９】

前記抗原認識ドメインは、ヒトＡＳＧＲ２アイソフォームａ、ｂ、ｃおよび／またはｄに、好ましくはヒトＡＳＧＲ２アイソフォームｂおよび／またはｄに、結合してもよく、好適には特異的に結合してもよい。前記抗原認識ドメインは、配列番号３～６の一つ以上に対する同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、または１００％である１個以上のポリペプチドに結合してもよく、好適には特異的に結合してもよい。好ましくは、前記抗原認識ドメインは、配列番号４に対する同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、または１００％、もしくは配列番号６に対する同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、または１００％であるポリペプチドに結合し、好適には、それに特異的に結合する。

【００６０】

前記抗原認識ドメインは、（ａ）ヒトＡＳＧＲ１アイソフォームａおよびヒトＡＳＧＲ２アイソフォームｂを含むヒトＡＳＧＲ、および／または、（ｂ）ヒトＡＳＧＲ１アイソフォームａおよびヒトＡＳＧＲ２アイソフォームｄを含むヒトＡＳＧＲに、結合してもよく、好適には特異的に結合してもよい。抗原認識ドメインは、（ａ）（ｉ）配列番号１に対する同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、または１００％である１個以上のポリペプチド、および（ｉｉ）配列番号４に対する同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、または１００％である１個以上のポリペプチド、および／または（ｂ）（ｉ）配列番号１に対する同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、または１００％である１個以上のポリペプチド、および（ｉｉ）配列番号６に対する同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、または１００％である１個以上のポリペプチドと結合してもよく、好適には特異的に適合してもよい。いくつかの実施形態において、前記抗原認識ドメインは、ヒトＡＳＧＲ１および／またはＡＳＧＲ２と、他の動物由来のＡＳＧＲ１および／またはＡＳＧＲ２、たとえばマウスＡＳＧＲ１および／またはマウスＡＳＧＲ２との、両方に結合する。このように、いくつかの実施形態において、前記抗原認識ドメインは、ヒトＡＳＧＲとマウスＡＳＧＲとの間の交差反応性を示す。たとえば、前記抗原認識ドメインがヒトＡＳＧＲ１アイソフォームａに結合するなら、いくつかの実施形態において、マウスＡＳＧＲ１アイソフォームａにも結合する。マウスＡＳＧＲ１アイソフォームａおよびｂと、マウスＡＳＧＲ２アイソフォームａおよびｂの例を以下に示す（配列番号７～１０）。

【００６１】

配列番号７－マウスＡＳＧＲ１アイソフォームａ（ＮＰ＿０３３８４４．１およびＮＰ＿００１２７８０６０．１）

ＭＴＫＤＹＱＤＦＱＨＬＤＮＤＮＤＨＨＱＬＲＲＧＰＰＰＴＰＲＬＬＱＲＬＣＳＧＳＲＬＬＬＬＳＳＳＬＳＩＬＬＬＶＶＶＣＶＩＴＳＱＮＳＱＬＲＥＤＬＬＡＬＲＱＮＦＳＮＬＴＶＳＴＥＤＱＶＫＡＬＳＴＱＧＳＳＶＧＲＫＭＫＬＶＥＳＫＬＥＫＱＱＫＤＬＴＥＤＨＳＳＬＬＬＨＶＫＱＬＶＳＤＶＲＳＬＳＣＱＭＡＡＦＲＧＮＧＳＥＲＴＣＣＰＩＮＷＶＥＹ

ＥＧＳＣＹＷＦＳＳＳＶＲＰＷＴＥＡＤＫＹＣＱＬＥＮＡＨＬＶＶＶＴＳＲＤＥＱＮＦＬＱＲＨＭＧＰＬＮＴＷＩＧＬＴＤＱＮＧＰＷＫＷＶＤＧＴＤＹＥＴＧＦＱＮＷＲＰＥＱＰＤＮＷＹＧＨＧＬＧＧＧＥＤＣＡＨＦＴＴＤＧＲＷＮＤＤＶＣＲＲＰＹＲＷＶＣＥＴＫＬＤＫＡＮ

配列番号８－マウスＡＳＧＲ１アイソフォームｂ（ＮＰ＿００１２７８０６１．１）

ＭＴＫＤＹＱＤＦＱＨＬＤＮＤＮＤＨＨＱＬＲＲＧＰＰＰＴＰＲＬＬＱＲＬＣＳＧＳＲＬＬＬＬＳＳＳＬＳＩＬＬＬＶＶＶＣＶＩＴＳＱＮＳＱＬＲＥＤＬＬＡＬＲＱＮＦＳＮＬＴＶＳＴＥＤＱＶＫＡＬＳＴＱＧＳＳＶＧＲＫＭＫＬＶＥＳＫＬＥＫＱＱＫＤＬＴＥＧＳＥＲＴＣＣＰＩＮＷＶＥＹＥＧＳＣＹＷＦＳＳＳＶＲＰＷＴＥＡＤＫＹＣＱＬＥＮＡＨＬＶＶＶＴＳＲＤＥＱＮＦＬＱＲＨＭＧＰＬＮＴＷＩＧＬＴＤＱＮＧＰＷＫＷＶＤＧＴＤＹＥＴＧＦＱＮＷＲＰＥＱＰＤＮＷＹＧＨＧＬＧＧＧＥＤＣＡＨＦＴＴＤＧＲＷＮＤＤＶＣＲＲＰＹＲＷＶＣＥＴＫＬＤＫＡＮ

配列番号９－マウスＡＳＧＲ２アイソフォームａ（ＮＰ＿０３１５１９．１、ＮＰ＿００１３００８５４．１、およびＮＰ＿００１３００８５５．１）

ＭＥＫＤＣＱＤＩＱＱＬＤＳＥＥＮＤＨＱＬＳＧＤＤＥＨＧＳＨＶＱＤＰＲＩＥＮＰＨＷＫＧＱＰＬＳＲＰＦＰＱＲＬＣＳＴＦＲＬＳＬＬＡＬＡＦＮＩＬＬＬＶＶＩＣＶＶＳＳＱＳＩＱＬＱＥＥＦＲＴＬＫＥＴＦＳＮＦＳＳＳＴＬＭＥＦＧＡＬＤＴＬＧＧＳＴＮＡＩＬＴＳＷＬＡＱＬＥＥＫＱＱＱＬＫＡＤＨＳＴＬＬＦＨＬＫＨＦＰＭＤＬＲＴＬＴＣＱＬＡＹＦＱＳＮＧＴＥＣＣＰＶＮＷＶＥＦＧＧＳＣＹＷＦＳＲＤＧＬＴＷＡＥＡＤＱＹＣＱＬＥＮＡＨＬＬＶＩＮＳＲＥＥＱＤＦＶＶＫＨＲＳＱＦＨＩＷＩＧＬＴＤＲＤＧＳＷＫＷＶＤＧＴＤＹＲＳＮＹＲＮＷＡＦＴＱＰＤＮＷＱＧＨＥＱＧＧＧＥＤＣＡＥＩＬＳＤＧＨＷＮＤＮＦＣＱＱＶＮＲＷＶＣＥＫＲＲＮＩＴＨ

配列番号１０－マウスＡＳＧＲ２アイソフォームｂ（ＮＰ＿００１３００８５６．１）

ＭＥＦＧＡＬＤＴＬＧＧＳＴＮＡＩＬＴＳＷＬＡＱＬＥＥＫＱＱＱＬＫＡＤＨＳＴＬＬＦＨＬＫＨＦＰＭＤＬＲＴＬＴＣＱＬＡＹＦＱＳＮＧＴＥＣＣＰＶＮＷＶＥＦＧＧＳＣＹＷＦＳＲＤＧＬＴＷＡＥＡＤＱＹＣＱＬＥＮＡＨＬＬＶＩＮＳＲＥＥＱＤＦＶＶＫＨＲＳＱＦＨＩＷＩＧＬＴＤＲＤＧＳＷＫＷＶＤＧＴＤＹＲＳＮＹＲＮＷＡＦＴＱＰＤＮＷＱＧＨＥＱＧＧＧＥＤＣＡＥＩＬＳＤＧＨＷＮＤＮＦＣＱＱＶＮＲＷＶＣＥＫＲＲＮＩＴＨ

【００６２】

前記抗原認識ドメインは、マウスＡＳＧＲ１アイソフォームａ、マウスＡＳＧＲ１アイソフォームｂ、マウスＡＳＧＲ２アイソフォームａ、および／またはマウスＡＳＧＲ２アイソフォームｂに特異的に結合してもよく、好適にはマウスＡＳＧＲ１アイソフォームａに特異的に結合してもよい。前記抗原認識ドメインは、前記同等のヒトタンパク質と結合してもよく、好適には特異的に適合してもよい。前記抗原認識ドメインは、配列番号７～１０の一つ以上に対する同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、または１００％である１個以上のポリペプチドに結合してもよく、好適には特異的に結合してもよい。好ましくは、前記抗原認識ドメインは、配列番号１に対する同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、または１００％、および配列番号７に対する同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、または１００％であるポリペプチドに結合し、好適には、それに特異的に結合する。

【００６３】

前記抗原認識ドメインは、肝臓特異的抗原内の、たとえばＡＳＧＲ内の、１個以上の領域またはエピトープと結合してもよく、好適には、特異的に適合してもよい。エピトープは抗原決定基としても知られ、抗原認識ドメイン（たとえば抗体）によって認識される抗原の一部である。つまり、エピトープは抗原認識ドメインが結合する抗原の特定の部分である。好適には、前記抗原認識ドメインは、肝臓特異的抗原内の、たとえばＡＳＧＲ内の、１個の領域またはエピトープと結合し、好適には特異的に適合する。

【００６４】

本発明で使用される前記抗原認識ドメインは、肝臓特異的抗原、好ましくはＡＳＧＲに

、選択的または特異的に結合してもよく、したがって、肝臓特異的抗原、好ましくはＡＳＧＲに対する結合親和性が、他のタンパク質／分子に対する結合親和性よりも、大きくてもよい。好適には、本明細書において「特異的に結合する」とは、抗原認識ドメインが他のタンパク質に結合しない、または、それが特異的に結合する抗原への結合と比較して、かなり小さい親和性で（たとえば、それが特異的に結合する抗原への親和性の、１０、５０、１００、５００、１０００または１００００分の１の親和性で）結合する、ということを意味する。したがって、本明細書でいう抗原認識ドメインは、その抗原、たとえばＡＳＧＲに、他のタンパク質に対する結合の親和性の１０、５０、１００、５００、１０００または１００００分の１以下の親和性で、結合してもよい。前記抗原認識ドメインの結合親和性は、ビアコアシステムを用いた方法など、当該技術分野において周知方法を使用して決定できる。前記抗原認識ドメインは、肝臓特異的抗原、たとえばＡＳＧＲに対して、高い結合親和性を有してもよく、すなわち、10^{-6}Ｍ以下、10^{-7}Ｍ以下、10^{-8}Ｍ以下、10^{-9}Ｍ以下、10^{-10}Ｍ以下、10^{-11}Ｍ以下、または10^{-12}Ｍ以下の範囲のＫｄを有してもよい。前記抗原認識ドメインは、肝臓特異的抗原、たとえばＡＳＧＲに対する、１００ｎＭ、５０ｎＭ、２０ｎＭ、または１０ｎＭよりも小さいＫｄに対応する結合親和性を有してもよく、より好ましくは１０、９．５、９、８．５、８、７．５、７、６．５、６、５．５、５、４．５、４、３．５、３、２．５、２、１．５、または１ｎＭよりも小さいＫｄに対応する結合親和性を有してもよく、最も好ましくは０．９、０．８、０．７、０．６、０．５、０．４、０．３、０．２、または０．１ｎＭよりも小さいＫｄに対応する結合親和性を有してもよい。前記抗原認識ドメインは、肝臓特異的抗原、たとえばＡＳＧＲに対する、約１ｐＭ～約１００ｎＭ、約１ｐＭ～約１０ｎＭ、または約１ｐｍ～約１ｎＭのＫｄに対応する結合親和性を有していてもよい。

【００６５】

Ｋｄの決定には任意の適切な方法を用いてもよい。ただし、都合に応じて、前記Ｋｄは表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）解析またはシステム（たとえば、ビアコア解析またはシステム）で決定されてもよい。たとえば、前記Ｋｄは、たとえば、ラインウィーバーバークプロット法を使用するなど、インビトロでの抗原の様々な濃度に対して抗原認識ドメインの様々な濃度をテストすることにより飽和曲線を確立して決定してもよく、またはＢＩＡｃｏｒｅ １０００ Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎソフトウェアの１：１結合モデルなど、市販の結合モデルソフトウェアを使用することにより決定してもよい。好適には、ＨＢＳ－Ｐ緩衝系（０．０１Ｍ Ｈｅｐｅｓ、ｐＨ ７．４、０．１５Ｍ ＮａＣｌ、０．０５％界面活性剤Ｐ２０）が使用される。特に、前述の抗原認識ドメインが抗体または抗体断片であるか、抗体由来である場合、前記抗原認識ドメインが、たとえばｓｃＦｖまたはｓｄＡｂフォーマット、または本明細書中の他の箇所に記載された別のフォーマットなどのなんらかのフォーマットであれば、上記Ｋｄが適切であり得る。

【００６６】

前記抗原認識ドメインは、融解温度が５０℃、５５℃、６０℃、６５℃、またはそれ以上であり、好ましくは５５℃以上であり、たとえば５５℃～７５℃である。融解温度は、当業者に周知のいずれかの方法によって決定されてもよい。好適には、融解温度は、示差走査熱量測定によって決定される。好適には、前記抗原認識ドメインを、１ｍｇ／ｍＬのＰＢＳ中で１８０℃／時間で加熱し、検出可能な熱変化を測定する。遷移中点が、見かけの融解温度となる。

【００６７】

前記抗原認識ドメイン（抗原特異的標的ドメインとしても知られる）は、肝臓特異的抗原、好ましくはアシアロ糖タンパク質受容体（ＡＳＧＲ）を特異的に認識しそれと結合する能力を有するタンパク質またはペプチドであってもよい。前記抗原認識ドメインは、肝臓特異的抗原、好ましくはアシアロ糖タンパク質受容体（ＡＳＧＲ）の、天然由来、合成、半合成、または遺伝子組換えにより作製した結合パートナーを含む。抗原認識ドメインの例としては、抗体または抗体断片または誘導体、受容体の細胞外ドメイン、細胞表面分子／受容体用のリガンド、またはその受容体結合ドメイン、および腫瘍結合タンパク質な

どがある。たとえば、ＡＳＧＲに適したリガンドとしては、ベータ－Ｄ－ガラクトースおよびＮ－アセチルガラクトースアミン（ＧａｌＮＡｃ）などがある。

好ましくは、抗原認識ドメインは、抗体（Ａｂ）であるか、または抗体（Ａｂ）由来である。抗体由来の抗原認識ドメインは、抗体の断片、または１個以上の前記抗体の断片の遺伝子改変産物であってもよく、該断片は抗原との結合に関与する。その例としては、ラクダ抗体（ＶＨＨ）、抗原結合断片（Ｆａｂ）、可変領域（Ｆｖ）、単鎖抗体（ｓｃＦｖ）、単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）、重鎖可変領域（ＶＨ）、軽鎖可変領域（ＶＬ）、および相補性決定領域（ＣＤＲ）などがある。好ましい実施形態において、前記抗原認識ドメインは単鎖抗体（ｓｃＦｖ）、または単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）である。最も好ましくは、前記抗原認識ドメインは単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）である。

【００６８】

抗体は、前記断片抗原結合（Ｆａｂ）可変領域を介して抗原を認識する。抗体は免疫グロブリン上科に属する糖タンパク質であり、血液タンパク質のガンマグロブリン画分のほとんどを構成し、典型的には、各々が二つの長い重鎖と二つの小さい軽鎖から成る基本構造単位から成る。ラクダ抗体（ＶＨＨ）は軽鎖が無く、可変ドメインに付着した二つの重鎖から構成されている。

【００６９】

「抗原結合断片」（Ｆａｂ）とは、抗原に結合した抗体上の領域のことであり、重鎖と軽鎖の各々が１個の定常領域と１個の可変領域を有して成る。

【００７０】

「Ｆｖ」とは、完全な抗原結合部位をもつ、抗体の最も小さい断片のことである。Ｆｖ断片は、一つの重鎖の可変領域に結合した一つの軽鎖の可変領域から成る。「単鎖抗体」（ｓｃＦｖ）とは、直接またはペプチドリンカー配列を介して互いに接続された軽鎖可変領域および重鎖可変領域から成る、改変された抗体のことである。前記ペプチドリンカー配列は、通常、約１０～２５アミノ酸長であり、グリシンが多く柔軟性があり、セリンまたはスレオニンが多く溶解性がある。前記ペプチドリンカー配列は、重鎖可変領域のＮ末端を、軽鎖可変領域のＣ末端と繋げる、または、その逆を行うことができる。

【００７１】

ナノボディとしても知られている「単一ドメイン抗体」（ｓｄＡｂ）は、単一モノマー可変抗体ドメインから成る抗体断片のことである。したがって、ｓｄＡｂは重鎖可変領域（ＶＨ）または軽鎖可変領域（ＶＬ）であってもよい。「重鎖可変領域」すなわち「ＶＨ」とは、フレームワーク領域として知られる隣接範囲に挟まれた、３個のＣＤＲを含む、抗体の重鎖の断片のことである。前記隣接範囲は、ＣＤＲよりも高度に保存され、ＣＤＲ維持の足場を形成する。「軽鎖可変領域」すなわち「ＶＬ」とは、フレームワーク領域に挟まれた、３個のＣＤＲを含む、抗体の軽鎖の断片のことである。

【００７２】

抗体またはその抗原結合断片についての「相補性決定領域」すなわち「ＣＤＲ」とは、抗体の重鎖または軽鎖の可変領域中の超可変ループのことである。ＣＤＲは、抗原構造と作用しあうことができ、主として抗原との結合を判定する（ただし、いくつかのフレームワーク領域は、結合に関与していることがわかっている）。重鎖可変領域および軽鎖可変領域はそれぞれ３個のＣＤＲを含んでいる（アミノ末端からカルボキシ末端に向かって付番して、重鎖ＣＤＲ１、２、および３ならびに軽鎖ＣＤＲ１、２、および３）。抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域のＣＤＲは、抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域配列から、当該技術分野で利用可能な予測ソフトウェアを用いて、たとえばＡｂｙｓｉｓアルゴリズムを用いるか、またはＩＭＧＴ／Ｖ－ＱＵＥＳＴソフトウェア、たとえばｗｗｗ．ＩＭＧＴ．ｏｒｇで入手可能なＩＭＧＴアルゴリズム（ＩｍＭｕｎｏＧｅｎｅＴｉｃｓ）を用いて予測することができる（たとえばLefranc et al, 2009 NAR 37:D1006-D1012及びLefranc 2003, Leukemia 17: 260-266を参照）。いずれのアルゴリズムによって同定されたＣＤＲ領域も、本発明での使用に、等しく好適であると考えられる。ＣＤＲは、その予測の元になる抗体に応じて及び重鎖と軽鎖との間で長さが異なり得る。従って、インタクト

な抗体の３つの重鎖ＣＤＲは、異なる長さであってもよく（または同じ長さであってもよく）、インタクトな抗体の３つの軽鎖ＣＤＲは、異なる長さであってもよい（または同じ長さであってもよい）。たとえば、ＣＤＲは、２または３アミノ酸長～５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９または２０アミノ酸長の範囲であってもよい。特に、ＣＤＲは、３～１４アミノ酸長、たとえば少なくとも３アミノ酸、かつ１５アミノ酸未満であってもよい。

【００７３】

本明細書では、ＣＤＲの位置を定義するために必要に応じてＫａｂａｔ命名法に従うことに留意しなければならない（Kabat et al, 1991, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 647-669）。

【００７４】

肝臓特異的抗原、好ましくはアシアロ糖タンパク質受容体（ＡＳＧＲ）と特異的に結合する抗体、その誘導体および断片は、当業者に周知の方法を使用して調製できる。かかる方法には、ファージディスプレイ、ヒト抗体またはヒト化抗体を作成する方法、または、ヒト抗体を作るために改変されたトランスジェニック動物または植物を使用する方法などがある。部分的合成抗体または全長合成抗体のファージディスプレイライブラリが利用可能であり、標的分子に結合できる抗体またはその断片について、前記ライブラリをスクリーニングすることが可能である。ヒト抗体のファージディスプレイライブラリもまた利用可能である。前記抗体（もしくはその誘導体または断片）をコードするアミノ酸配列またはポリヌクレオチド配列を特定したら、それを単離および／または判定することができる。抗体の配列は、その好適な誘導体または断片を設計するために使用できる。肝臓特異的抗原、好ましくはアシアロ糖タンパク質受容体（ＡＳＧＲ）と特異的に結合する、好適な抗体、その誘導体および断片は、周知である。たとえば、抗ＮＴＣＰ抗体が、Stieger, B., et al., 1994. Gastroenterology, 107(6), pp.1781-1787に記載されている。von Figura, K., et al., 1984. The EMBO journal, 3(6), pp.1281-1286に、抗マンノース－６－リン酸受容体抗体が記載されている。Ogawa, S., et al., 2010. Hepatology Research, 40(11), pp.1128-1141に、抗ＰＤＧＦ受容体抗体が記載されている。Tomokiyo, R.I., et al., 2002. Atherosclerosis, 161(1), pp.123-132に、抗スカベンジャー受容体クラスＡ抗体が記載されている。Meuleman, P., et al., 2012. Hepatology, 55(2), pp.364-372に、抗スカベンジャー受容体クラスＢタイプＩ抗体が記載されている。また、Gao, W., et al., 2014. Hepatology, 60(2), pp.576-587に、抗ヘパラン硫酸抗体が記載されている。肝臓特異的抗原に特異的に結合する、抗体、その誘導体および断片は、市販されている。前記周知の抗体の配列は、その好適な誘導体または断片を設計するために使用できる。

【００７５】

本発明に使用できる抗体、その誘導体および断片の例を、さらに以下に記載する。

【００７６】

抗原認識ドメインは、少なくとも１個のＣＤＲ（たとえば、ＣＤＲ３）を含んでもよく、これは肝臓特異的抗原と結合する抗体から推測でき、好ましくはアシアロ糖タンパク質受容体（ＡＳＧＲ）（または、かかる推測されたＣＤＲの変異体（たとえば、１個、２個、または３個のアミノ酸置換を有する変異体））と結合する抗体から推測できる。３個以下のＣＤＲ領域を含む分子（たとえば、１個のＣＤＲ、またはその一部）が、ＣＤＲの由来元である抗体の抗原結合活性を保持できるだろうということは、理解されるであろう。２個のＣＤＲ領域を含む分子は、たとえばミニボディ（minibody）の形態の標的抗原と結合することができる、と当該技術分野では記載されている（Vaughan and Sollazzo, 2001, Combinational Chemistry & High Throughput Screening, 4, 417-430）。１個のＣＤＲを含む分子は、標的に対して強力な結合活性を発揮することができるという記載がある（Nicaise et al, 2004, Protein Science, 13: 1882-91）。これに関して、抗原認識ドメインは、１個以上の可変重鎖ＣＤＲ、たとえば１個、２個または３個の可変重鎖ＣＤＲを含んでいてもよい。または／さらに、抗原認識ドメインは

、１個以上の可変軽鎖ＣＤＲ、たとえば１個、２個または３個の可変軽鎖ＣＤＲを含んでいてもよい。抗原認識ドメインは、３個の重鎖ＣＤＲおよび／または３個の軽鎖ＣＤＲ（特に、３個のＣＤＲを含む重鎖可変領域および／または３個のＣＤＲを含む軽鎖可変領域）を含んでもよく、少なくとも１個のＣＤＲ、好適にはすべてのＣＤＲが肝臓特異的抗原、好ましくはＡＳＧＲと結合する抗体由来であってもよく、下記に示すＣＤＲ配列の一つから選択されてもよい。抗原認識ドメインは、可変重鎖ＣＤＲと可変軽鎖ＣＤＲとの組み合わせを含んでもよく、たとえば、１個の可変重鎖ＣＤＲと１個の可変軽鎖ＣＤＲの組み合わせ、２個の可変重鎖ＣＤＲと１個の可変軽鎖ＣＤＲの組み合わせ、２個の可変重鎖ＣＤＲと２個の可変軽鎖ＣＤＲとの組み合わせ、３個の可変重鎖ＣＤＲと１個または２個の可変軽鎖ＣＤＲとの組み合わせ、１個の可変重鎖ＣＤＲと２個または３個の可変軽鎖ＣＤＲとの組み合わせ、３個の可変重鎖ＣＤＲと３個の可変軽鎖ＣＤＲとの組み合わせを含んでいてもよい。好ましくは、抗原認識ドメインは、３個の可変重鎖ＣＤＲ（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３）、または３個の可変軽鎖ＣＤＲ（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３）との組み合わせを含む、すなわち３個のＣＤＲを含む。または、抗原認識ドメインは、３個の可変重鎖ＣＤＲ（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３）と、および３個の可変軽鎖ＣＤＲ（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３）との組み合わせを含むことができ、またはさもなければ６個のＣＤＲを含むことができる。抗原認識ドメインが上記の結合活性を有すればよく、前記ドメインに存在する１個以上のＣＤＲは、すべてが同じ抗体由来でなくてもよい。したがって、あるＣＤＲが肝臓特異的抗原、たとえばＡＳＧＲと結合する抗体の重鎖または軽鎖から推測されてもよく、一方で同じ肝臓特異的抗原（たとえばＡＳＧＲ）と結合する別の抗体から別のＣＤＲが推測されてもよい。この場合には、ＣＤＲ３が、肝臓特異的抗原と結合する抗体、たとえはＡＳＧＲから推測されるのが好ましいだろう。しかしながら、特に１個より多いＣＤＲが抗原認識ドメインに存在すれば、これらＣＤＲが肝臓特異的抗原、たとえばＡＳＧＲに結合する抗体から推測されるのが好ましい。異なる抗体からの、特に同じ所望の領域またはエピトープと結合する抗体からのＣＤＲの組み合わせが使用されてもよい。ＣＤＲ配列例や好ましいＣＤＲ配列を、本明細書中の他の箇所に記載する。

【００７７】

特に好ましい実施形態において、前記抗原認識ドメインは、肝臓特異的抗原、たとえばＡＳＧＲに結合する抗体の可変重鎖配列から推測される３個のＣＤＲ、および／または肝臓特異的抗原、たとえばＡＳＧＲに結合する抗体（好ましくは同じ抗体）の可変軽鎖配列から推測される３個のＣＤＲを含む。ＣＤＲ配列例や好ましいＣＤＲ配列を、本明細書中の他の箇所に記載する。

【００７８】

いくつかの実施形態において、抗原認識ドメインは抗体であるか、または抗体由来であり（たとえば、Ｆａｂ、ｓｃＦｖ、またはｓｄＡｂであり）、前記抗体は配列番号１１～７３、またはその誘導体から選択される、１個以上のＣＤＲ領域を含む。換言すると、いくつかの実施形態において、抗原認識ドメインは、配列番号１１～７３、またはその誘導体から選択される、１個以上のＣＤＲ領域を含む。好適には、抗原認識ドメインは、配列番号１１～７３、またはその誘導体から選択される、３個のＣＤＲ領域を含む。

【表１】

CDR名	CDR1	CDR2	CDR3
ASGR1 VH1 CDR (配列番号11～13)	EKYAMA (配列番号11)	RISARGVT (配列番号12)	HKRHEHTRFDS (配列番号13)
ASGR1 VH2 CDR (配列番号14～16)	RYTMG (配列番号14)	AIGPPGSNTYYADSVKG (配列番号15)	WVMLRGRFDY (配列番号16)
ASGR1 VH3 CDR (配列番号17～19)	DYGMG (配列番号17)	AIGRNGSQTYYADSVKG (配列番号18)	LRRGRGLNTFTLDY (配列番号19)
ASGR1 VH4 CDR (配列番号20～22)	AAGMG (配列番号20)	AIGRNGSQTYYADSVKG (配列番号21)	LRRGRGLNTFTLDY (配列番号22)
ASGR1 VK1 CDR (配列番号23～25)	RASQAIGRWLL (配列番号23)	PGSRLRS (配列番号24)	QQAYAWPPT (配列番号25)
ASGR1 VK2 CDR (配列番号26～28)	RASQAIGRWLL (配列番号26)	PGSRLQS (配列番号27)	QQAYQLPVT (配列番号28)
ASGR1 VK3 CDR (配列番号29～31)	RASQAIGRWLL (配列番号29)	PGSRLQS (配列番号30)	QQAYSLPPT (配列番号31)
ASGR1 VK4 CDR (配列番号32～34)	RASGDIGHALW (配列番号32)	RGGSALQS (配列番号33)	GQSHVRPFT (配列番号34)
ASGR1 VK5 CDR (配列番号35～37)	QASKNIGERLV (配列番号35)	GFASLLQS (配列番号36)	GQYRWVPAT (配列番号37)
ASGR1 VH5 CDR (配列番号38～40)	STYPMH (配列番号38)	SISPSGDS (配列番号39)	NALRFDY (配列番号40)
ASGR1 VH6 CDR (配列番号41～43)	KPYAMH (配列番号41)	SISSTGLS (配列番号42)	DASRFRQPFDY (配列番号43)
ASGR1 VH7 CDR (配列番号44～46)	PKYGMA (配列番号44)	RIGATGSE (配列番号45)	HRGTAHSSFFDY (配列番号46)
ASGR1 VH8 CDR (配列番号47～49)	SANGMH (配列番号47)	VISATGDQ (配列番号48)	GYDRRHRKFDY (配列番号49)
ASGR1 VH9 CDR (配列番号50～52)	ADYSMY (配列番号50)	DISPSGSM (配列番号51)	GLPGQNMHVGFDY (配列番号52)
ASGR1 VK6 CDR (配列番号53～55)	RASQAIGRWLL (配列番号53)	YAASRLQS (配列番号54)	QQAYSLPPT (配列番号55)
ASGR1 VK7 CDR (配列番号56～58)	RASMSIDESLW (配列番号56)	RGGSGLQS (配列番号57)	GQAARRPYT (配列番号58)
ASGR1 VK8 CDR (配列番号59～61)	RASHYIGNELW (配列番号59)	RRGSGLQS (配列番号60)	GQARHRPYT (配列番号61)
ASGR1 VK9 CDR (配列番号62～64)	RASSNIGRSLV (配列番号62)	AGGSLLQS (配列番号63)	GQYAEEPFT (配列番号64)
ASGR1 VK10 CDR (配列番号65～67)	RASVKIGERLW (配列番号65)	RDASLLQS (配列番号66)	GQSWMRPYT (配列番号67)
ASGR1 VK11 CDR (配列番号68～70)	RASSYIGGELW (配列番号68)	SGTSGLQS (配列番号69)	GQAAKRPFT (配列番号70)
ASGR1 VK12 CDR (配列番号71～73)	RASSWINSDLV (配列番号71)	AGGSLLQS (配列番号72)	GQYLEEPYT (配列番号73)

【００７９】

好適には、抗原結合ドメインは、同じ可変鎖から選択された、ＣＤＲ（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３）、またはその誘導体を含む。たとえば、前記抗原結合ドメインは、配列番号１１～１３、配列番号１４～１６、配列番号１７～１９、配列番号２０～２２、配列番号２３～２５、配列番号２６～２８、配列番号２９～３１、配列番号３２～３４、配列番号３５～３７、配列番号３８～４０、配列番号４１～４３、配列番号４４～４６、配列番号４７～４９、配列番号５０～５２、配列番号５３～５５、配列番号５６～５８、配列番号５９～６１、配列番号６２～６４、配列番号６５～６７、配列番号６８～７０、および／または配列番号７１～７３、またはその誘導体を含んでいてもよい。

【００８０】
好ましくは、前記抗原結合ドメインは、配列番号１１～１３、配列番号１４～１６、配列番号１７～１９、配列番号２０～２２、配列番号２３～２５、配列番号２６～２８、および／または配列番号２９～３１、またはその誘導体を含んでいてもよい。
好ましくは、前記抗原結合ドメインは、配列番号１１～１３、配列番号１４～１６、配列番号１７～１９、配列番号２３～２５、配列番号２６～２８、および／または配列番号２９～３１、またはその誘導体を含んでいてもよい。
【００８１】
好ましくは、前記抗原結合ドメインは、配列番号１１～１３、配列番号１４～１６、または配列番号１７～１９、および／または配列番号２３～２５、配列番号２６～２８、または配列番号２９～３１、またはその誘導体を含んでいてもよい。
【００８２】
好ましい実施形態において、前記抗原認識ドメインは、配列番号１１～３１から選択される、１個以上のＣＤＲ領域を含む。好適には、前記抗原認識ドメインは、配列番号１１～３１、またはその誘導体から選択される、３個のＣＤＲ領域を含む。
【００８３】
好ましい実施形態において、前記抗原認識ドメインは、下記配列を含む:
（ｉ）ＣＤＲ１配列ＥＫＹＡＭＡ（配列番号１１）、ＣＤＲ２配列ＲＩＳＡＲＧＶＴ（配列番号１２）、およびＣＤＲ３配列ＨＫＲＨＥＨＴＲＦＤＳ（配列番号１３）、またはその誘導体；
（ｉｉ）ＣＤＲ１配列ＲＹＴＭＧ（配列番号１４）、ＣＤＲ２配列ＡＩＧＰＰＧＳＮＴＹＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号１５）、およびＣＤＲ３配列ＷＶＭＬＲＧＲＦＤＹ（配列番号１６）、またはその誘導体；
（ｉｉｉ）ＣＤＲ１配列ＤＹＧＭＧ（配列番号１７）、ＣＤＲ２配列ＡＩＧＲＮＧＳＱＴＹＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号１８）、およびＣＤＲ３配列ＬＲＲＧＲＧＬＮＴＦＴＬＤＹ（配列番号１９）、またはその誘導体；
（ｉｖ）ＣＤＲ１配列ＡＡＧＭＧ（配列番号２０）、ＣＤＲ２配列ＡＩＧＲＮＧＳＱＴＹＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号２１）、およびＣＤＲ３配列ＬＲＲＧＲＧＬＮＴＦＴＬＤＹ（配列番号２２）、またはその誘導体；
（ｖ）ＣＤＲ１配列ＲＡＳＱＡＩＧＲＷＬＬ（配列番号２３）、ＣＤＲ２配列ＰＧＳＲＬＲＳ（配列番号２４）、およびＣＤＲ３配列ＱＱＡＹＡＷＰＰＴ（配列番号２５）、またはその誘導体；
（ｖｉ）ＣＤＲ１配列ＲＡＳＱＡＩＧＲＷＬＬ（配列番号２６）、ＣＤＲ２配列ＰＧＳＲＬＱＳ（配列番号２７）、およびＣＤＲ３配列ＱＱＡＹＱＬＰＶＴ（配列番号２８）、またはその誘導体；および／または
（ｖｉｉ）ＣＤＲ１配列ＲＡＳＱＡＩＧＲＷＬＬ（配列番号２９）、ＣＤＲ２配列ＰＧＳＲＬＱＳ（配列番号３０）、およびＣＤＲ３配列ＱＱＡＹＳＬＰＰＴ（配列番号３１）、またはその誘導体。
【００８４】
最も好ましくは、前記抗原認識ドメインは、ＣＤＲ１配列ＥＫＹＡＭＡ（配列番号１１）、ＣＤＲ２配列ＲＩＳＡＲＧＶＴ（配列番号１２）、およびＣＤＲ３配列ＨＫＲＨＥＨＴＲＦＤＳ（配列番号１３）、またはその誘導体を含む。好ましくは、前記抗原認識ドメインは、ＣＤＲ１配列ＥＫＹＡＭＡ（配列番号１１）、ＣＤＲ２配列ＲＩＳＡＲＧＶＴ（配列番号１２）、およびＣＤＲ３配列ＨＫＲＨＥＨＴＲＦＤＳ（配列番号１３）、またはその誘導体を含むｓｄＡｂである。
【００８５】
その他の実施形態において、前記抗原認識ドメインは、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３領域を含み、前記ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３領域は、下記（ｉ）、（ｉｉ）または（ｉｉｉ）を含む：
（ｉ）それぞれ、配列番号１１、１２、および１３、またはそれらの誘導体、かつ、それ

ぞれ、配列番号２３、２４、および２５、またはそれらの誘導体、または、それぞれ、配列番号２６、２７、および２８、またはそれらの誘導体、またはそれぞれ、配列番号２９、３０、および３１、またはそれらの誘導体、好ましくは、前記抗原認識ドメインが、それぞれ、配列番号１１、１２、および１３を含み、かつ、それぞれ、配列番号２３、２４、および２５を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３領域を含む：
（ｉｉ）それぞれ、配列番号１４、１５、および１６、またはそれらの誘導体、かつ、それぞれ、配列番号２３、２４、および２５、またはそれらの誘導体、または、それぞれ、配列番号２６、２７、および２８、またはそれらの誘導体、または、それぞれ、配列番号２９、３０、および３１、またはそれらの誘導体、好ましくは、前記抗原認識ドメインが、それぞれ、配列番号１４、１５、および１６を含み、かつ、それぞれ、配列番号２６，２７、および２８を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３領域を含む：
（ｉｉｉ）それぞれ、配列番号１７、１８、および１９、またはそれらの誘導体、かつ、それぞれ、配列番号２３、２４、および２５、またはそれらの誘導体、または、それぞれ、配列番号２６、２７、および２８、またはそれらの誘導体、またはそれぞれ、配列番号２９、３０、および３１、またはそれらの誘導体、好ましくは、前記抗原認識ドメインが、それぞれ、配列番号１７、１８、および１９を含み、かつ、それぞれ、配列番号２６，２７、および２８を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３領域を含む。

【００８６】

このように、かかる実施形態において、前記抗原認識ドメインは、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３領域を含み、前記ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３領域は、配列番号１１、１２、および１３をそれぞれ、またはそれらの誘導体；および配列番号２３、２４、および２５をそれぞれ、またはそれらの誘導体を含む。

【００８７】

前記抗原認識ドメインは、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３領域を含み、前記ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３領域は、配列番号１１、１２、および１３をそれぞれ、またはそれらの誘導体；および配列番号２６、２７、および２８をそれぞれ、またはそれらの誘導体を含む。

【００８８】

前記抗原認識ドメインは、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３領域を含み、前記ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３領域は、配列番号１１、１２、および１３をそれぞれ、またはそれらの誘導体；および配列番号２９、３０、および３１をそれぞれ、またはそれらの誘導体を含む。

【００８９】

前記抗原認識ドメインは、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３領域を含み、前記ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３領域は、配列番号１４、１５、および１６をそれぞれ、またはそれらの誘導体；および配列番号２３、２４、および２５をそれぞれ、またはそれらの誘導体を含む。

【００９０】

前記抗原認識ドメインは、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３領域を含み、前記ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３領域は、配列番号１４、１５、および１６をそれぞれ、またはそれらの誘導体；および配列番号２６、２７、および２８をそれぞれ、またはそれらの誘導体を含む。

【００９１】

前記抗原認識ドメインは、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３領域を含み、前記ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３領域は、配列番号１４、１５、および１６をそれぞれ、またはそれらの誘導体；および配列番号２９、３０、および３１をそれぞれ、またはそれらの誘導体を含む。

【００９２】

前記抗原認識ドメインは、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３領域を含み、前記ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３領域は、配列番号１７、１８、および１９をそれぞれ、

またはそれらの誘導体；および配列番号２３、２４、および２５をそれぞれ、またはそれらの誘導体を含む。

【００９３】

前記抗原認識ドメインは、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３領域を含み、前記ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３領域は、配列番号１７、１８、および１９をそれぞれ、またはそれらの誘導体；および配列番号２６、２７、および２８をそれぞれ、またはそれらの誘導体を含む。

【００９４】

前記抗原認識ドメインは、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３領域を含み、前記ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３領域は、配列番号１７、１８、および１９をそれぞれ、またはそれらの誘導体；および配列番号２９、３０、および３１をそれぞれ、またはそれらの誘導体を含む。

【００９５】

かかる抗原認識ドメインを含むＣＡＲもまた、本発明のさらなる態様を構成する。

【００９６】

好ましくは、６個のＣＤＲを含む上記の抗原認識ドメインは、ｓｃＦｖである。

【００９７】

本発明は、上述の、および本明細書中の他の箇所に記載された、前記ＣＤＲ領域（ならびにＶＨおよびＶＬ（ＶＫ）領域、および当該領域内のＣＤＲ領域）の「誘導体」を含む。本明細書における「誘導体」という用語は、下記の「変異体、誘導体、および断片」のセクションで定義される。抗原結合能力を保持したままＣＤＲ内で１個以上のアミノ酸置換がなされてもよいことは、理解されるであろう。たとえば、ＣＤＲ誘導体は、３個以下のアミノ酸置換、たとえば、３個のアミノ酸置換、２個のアミノ酸置換、または１個のアミノ酸置換を含んでいてもよい。特に、いくつかの実施形態において、前記ＣＤＲ誘導体は、１個のアミノ酸置換を含み、かつ抗原結合能力を保持している。前記誘導体は変異体、たとえば前記ＣＤＲに対する同一性が少なくとも８０％または９０％である変異体であってもよい。

【００９８】

いくつかの実施形態において、前記抗原認識ドメインは、配列番号７４～９４の一つ以上に対する同一性が少なくとも約７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、または１００％であるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

【表２】

CDR名	配列
ASGR1 VH1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEKYAMAWVRQAPGKGLEWVSRISARGVTTYYADSVK
(配列番号74)	GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHKRHEHTRFDSWGQGTLVTVSS
ASGR1 VH2	ELQLLEFGGGLVQPGGSLRLSCTTSGFTFSRYTMGWVRQAPGKGLEWVSAIGPPGSNTYYADSVK
(配列番号75)	GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWVMLRGRFDYWGQGTLVTVSS
ASGR1 VH3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEDYGMGWVRQAPGKGLEWVSAIGRNGSQTYYADSVK
(配列番号76)	GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLRRGRGLNTFTLDYWGQGTLVTVSS
ASGR1 VH4	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGAAGMGWVRQAPGKGLEWVSAIGRNGSQTYYADSVK
(配列番号77)	GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLRRGRGLNTFTLDYWGQGTLVTVSS
ASGR1 VK1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAIGRWLLWYQQKPGKAPKLLIGPGSRLRSGVPSRFSGS
(配列番号78)	GSGTDFTLTISSLQPEDFVTYYCQQAYAWPPTFGQGTKVEIKR
ASGR1 VK2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAIGRWLLWYQQKPGKAPKHLIGPGSRLQSGVPSRFSGS
(配列番号79)	GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAYQLPVTFGQGTKVEIKR
ASGR1 VK3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAIGRWLLWYQQKPGKAPKLLIGPGSRLQSGVPSRFSGS
(配列番号80)	GSGTDFTLTIGSLQPEDFATYYCQQAYSLPPTFGQGTKVEIKR
ASGR1 VK4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASGDIGHALWWYQQKPGKAPKLLIRGGSALQSGVPSRFSGS
(配列番号81)	GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGQSHVRPFTFGQGTKVEIKR
ASGR1 VK5	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASKNIGERLVWYQQKPGKAPKLLIGFASLLQSGVPSRFSGS
(配列番号82)	GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGQYRWVPATFGQGTKVEIKR
ASGR1 VH5	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYPMHWARQAPGKGLEWVSSISPSGDSTYYADSVK
(配列番号83)	GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNALRFDYWGQGTLVTVSS
ASGR1 VH6	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKPYAMHWVRQAPGKGLEWVSSISSTGLSTYYADSVK
(配列番号84)	GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDASRFRQPFDYWGQGTLVTVSS
ASGR1 VH7	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFPKYGMAWVRQAPGKGLEWVSRIGATGSETYYADSVK
(配列番号85)	GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHRGTAHSSFFDYWGQGTLVTVSS
ASGR1 VH8	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSANGMHWVRQAPGKGLEWVSVISATGDQTYYADSVK
(配列番号86)	GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGYDRRHRKFDYWGQGTLVTVSS
ASGR1 VH9	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFADYSMYWVRQAPGKGLEWVSDISPSGSMTYYADSVK
(配列番号87)	GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGLPGQNMHVGFDYWGQGTLVTVSS
ASGR1 VK6	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAIGRWLLWYQQKPGKAPKLLIYAASRLQSGVPSRFSGS
(配列番号88)	GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAYSLPPTFGQGTKVEIKR
ASGR1 VK7	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASMSIDESLWWYQQKPGKAPKLLIRGGSGLQSGVPSRFSGS
(配列番号89)	GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGQAARRPYTFGQGTKVEIKR
ASGR1 VK8	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASHYIGNELWWYQQKPGKAPKLLIRRGSGLQSGVPSRFSGS
(配列番号90)	GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGQARHRPYTFGQGTRVEIKR
ASGR1 VK9	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSNIGRSLVWYQQKPGKAPKLLIAGGSLLQSGVPSRFSGS
(配列番号91)	GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGQYAEEPFTFGQGTRVEIKR
ASGR1 VK10	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASVKIGERLWWYQQKPGEAPKLLIRDASLLQSGVPSRFSGS
(配列番号92)	GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGQSWMRPYTFGQGTKVEIKR
ASGR1 VK11	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSYIGGELWWYQQKPGKAPKLLISGTSGLQSGVPSRFSGS
(配列番号93)	GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGQAAKRPFTFGQGTKVEIKR
ASGR1 VK12	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSWINSDLVWYQQKPGEAPKLLIAGGSLLQSGVPSRFSGS
(配列番号94)	GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGQYLEEPYTFGQGTKVEVKR

【００９９】

好ましい実施形態において、前記抗原認識ドメインは、配列番号７４～８０の一つ以上に対する同一性が少なくとも約７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、または１００％であるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

【０１００】

最も好ましくは、前記抗原認識ドメインは、ＡＳＧＲ１　ＶＨ１（配列番号７４）に対する同一性が少なくとも約７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、または１００％であるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態において、前記抗原認識ドメインは、配列番号７４、７５、または７６のアミノ酸配列、

またはその誘導体、および／または配列番号７８、７９、または８０のアミノ酸配列、またはその誘導体を含むか、またはそれからなる。好ましい実施形態において、前記抗原認識ドメインは、配列番号７４および７８のアミノ酸配列、またはその誘導体；配列番号７５および７９、またはその誘導体；または配列番号７６および８０、またはその誘導体を含むか、またはそれからなる。

【０１０１】

このように、かかる実施形態において、前記抗原認識ドメインは、配列番号７４および７８、またはその誘導体を含むか、またはそれからなる。前記抗原認識ドメインは、配列番号７４および７９、またはその誘導体を含むか、またはそれからなる。前記抗原認識ドメインは、配列番号７４および８０、またはその誘導体を含むか、またはそれからなる。

【０１０２】

前記抗原認識ドメインは、配列番号７５および７８、またはその誘導体を含むか、またはそれからなる。前記抗原認識ドメインは、配列番号７５および７９、またはその誘導体を含むか、またはそれからなる。前記抗原認識ドメインは、配列番号７５および８０、またはその誘導体を含むか、またはそれからなる。

【０１０３】

前記抗原認識ドメインは、配列番号７６および７８、またはその誘導体を含むか、またはそれからなる。前記抗原認識ドメインは、配列番号７６および７９、またはその誘導体を含むか、またはそれからなる。前記抗原認識ドメインは、配列番号７６および８０、またはその誘導体を含むか、またはそれからなる。

【０１０４】

好ましくは、ＶＨおよびＶＬ（ＶＫ）ドメインを含む上記の抗原認識ドメインは、ｓｃＦｖである。かかるｓｃＦｖは、ＶＨドメインとＶＬ（ＶＫ）ドメインとのあいだのリンカーを含みうる。

【０１０５】

前記抗原認識ドメインは、さらに、配列番号７４、またはその誘導体と、配列番号８１、８２、または８８～９４、またはその誘導体のいずれか一つとを含んでいてもよい。

【０１０６】

前記抗原認識ドメインは、さらに、配列番号７５、またはその誘導体と、配列番号８１、８２、または８８～９４、またはその誘導体のいずれか一つとを含んでいてもよい。

【０１０７】

前記抗原認識ドメインは、さらに、配列番号７６、またはその誘導体と、配列番号８１、８２、または８８～９４、またはその誘導体のいずれか一つとを含んでいてもよい。

【０１０８】

前記抗原認識ドメインは、さらに、配列番号７７、またはその誘導体と、配列番号７８～８２または８８～９４、もしくはその誘導体のいずれか一つとを含んでいてもよい。

【０１０９】

前記抗原認識ドメインは、さらに、配列番号８３、またはその誘導体と、配列番号７８～８２または８８～９４、もしくはその誘導体のいずれか一つとを含んでいてもよい。

【０１１０】

前記抗原認識ドメインは、さらに、配列番号８４、またはその誘導体と、配列番号７８～８２または８８～９４、もしくはその誘導体のいずれか一つとを含んでいてもよい。

【０１１１】

前記抗原認識ドメインは、さらに、配列番号８５、またはその誘導体と、配列番号７８～８２または８８～９４、もしくはその誘導体のいずれか一つとを含んでいてもよい。

【０１１２】

前記抗原認識ドメインは、さらに、配列番号８６、またはその誘導体と、配列番号７８～８２または８８～９４、もしくはその誘導体のいずれか一つとを含んでいてもよい。

【０１１３】

前記抗原認識ドメインは、さらに、配列番号８７、またはその誘導体と、配列番号７８

～８２または８８～９４、もしくはその誘導体のいずれか一つとを含んでいてもよい。

【０１１４】

いくつかのｓｃＦｖ（ｓｃＦｖ断片）の例の概略を以下に示す。

ＥＶＱＬＬＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＴＦＥＫＹＡＭＡＷＶＲＱＡ
ＰＧＫＧＬＥＷＶＳＲＩＳＡＲＧＶＴＴＹＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＬＹ
ＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＫＨＫＲＨＥＨＴＲＦＤＳＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ
ＬＶＴＶＳＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶ
ＴＩＴＣＲＡＳＱＡＩＧＲＷＬＬＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＧＰＧＳＲＬＲＳＧＶＰ
ＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＶＴＹＹＣＱＱＡＹＡＷＰＰＴＦＧ
ＱＧＴＫＶＥＩＫＲ（配列番号１７３）

ＥＬＱＬＬＥＦＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＴＴＳＧＦＴＦＳＲＹＴＭＧＷＶＲＱＡ
ＰＧＫＧＬＥＷＶＳＡＩＧＰＰＧＳＮＴＹＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＬＹ
ＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＫＷＶＭＬＲＧＲＦＤＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳＬ
ＶＴＶＳＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴ
ＩＴＣＲＡＳＱＡＩＧＲＷＬＬＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＨＬＩＧＰＧＳＲＬＱＳＧＶＰＳ
ＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣＱＱＡＹＱＬＰＶＴＦＧＱ
ＧＴＫＶＥＩＫＲ（配列番号１７４）

ＥＶＱＬＬＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＴＦＥＤＹＧＭＧＷＶＲＱＡ
ＰＧＫＧＬＥＷＶＳＡＩＧＲＮＧＳＱＴＹＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＬＹ
ＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＫＬＲＲＧＲＧＬＮＴＦＴＬＤＹＷＧＱＧＴＬＶＴ
ＶＳＳＬＶＴＶＳＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧ
ＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＡＩＧＲＷＬＬＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＧＰＧＳＲＬＱＳ
ＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＧＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣＱＱＡＹＳＬＰＰ
ＴＦＧＱＧＴＫＶＥＩＫＲ（配列番号１７５）

【０１１５】

かかる抗原認識ドメインを含むＣＡＲもまた、本発明のさらなる態様を構成する。

【０１１６】

本明細書に記載の前記抗原認識ドメインの変異体は、抗原結合能力を保持する。たとえば、前記変異体は、対応する参照アミノ酸配列の結合レベルの、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、または少なくとも９０％のレベルで、ＡＳＧＲと結合できればよい。前記変異体または誘導体は、対応する参照アミノ酸配列のレベルに類似または同一のレベルでＡＳＧＲと結合できてもよく、または、対応する参照アミノ酸配列よりも高いレベル（たとえば、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、または少なくとも５０％高くなったレベル）でＡＳＧＲと結合できればよい。したがって、前記抗原認識ドメインは、前記ＡＳＧＲ１　ＶＨ１～４（配列番号１１～２２）および／またはＡＳＧＲ１　ＶＫ１－３（配列番号２３～３１）（それぞれ、上記の配列番号７４～７７および配列番号７８～８０の下線で示した部分）を含むアミノ酸配列を含むか、またはそれから成ってもよい。前記抗原認識ドメインは、前記ＡＳＧＲ１　ＶＨ１～３（配列番号１１～１９）および／またはＡＳＧＲ１　ＶＫ１－３（配列番号２３～３１）（それぞれ、上記の配列番号７４～７６および配列番号７８～８０の下線で示した部分）を含むアミノ酸配列を含むか、またはそれから成ってもよい。フレームワーク領域で、１個（またはそれ以上）のアミノ酸残基が置換、変異、修飾、代替、消去および／または添加されてもよい。

【０１１７】

このように、いくつかの実施形態において、前記抗原認識ドメインは、下記配列を含むか、またはそれから成ってもよい：

（ｉ）ＡＳＧＲ１　ＶＨ１（配列番号７４）に対する同一性が少なくとも約７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、または１００％であるアミノ酸配列であって、ＣＤＲ１配列ＥＫＹＡＭＡ（配列番号１１）、ＣＤＲ２配列

ＲＩＳＡＲＧＶＴ（配列番号１２）、およびＣＤＲ３配列ＨＫＲＨＥＨＴＲＦＤＳ（配列番号１３）を含む、アミノ酸配列；
（ｉｉ）ＡＳＧＲ１ ＶＨ２（配列番号７５）に対する同一性が少なくとも約７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、または１００％であるアミノ酸配列であって、ＣＤＲ１配列ＲＹＴＭＧ（配列番号１４）、ＣＤＲ２配列ＡＩＧＰＰＧＳＮＴＹＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号１５）、およびＣＤＲ３配列ＷＶＭＬＲＧＲＦＤＹ（配列番号１６）を含む、アミノ酸配列；
（ｉｉｉ）ＡＳＧＲ１ ＶＨ３（配列番号７６）に対する同一性が少なくとも約７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、または１００％であるアミノ酸配列であって、ＣＤＲ１配列ＤＹＧＭＧ（配列番号１７）、ＣＤＲ２配列ＡＩＧＲＮＧＳＱＴＹＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号１８）、およびＣＤＲ３配列ＬＲＲＧＲＧＬＮＴＦＴＬＤＹ（配列番号１９）を含む、アミノ酸配列；
（ｉｖ）ＡＳＧＲ１ ＶＨ４（配列番号７７）に対する同一性が少なくとも約７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、または１００％であるアミノ酸配列であって、ＣＤＲ１配列ＡＡＧＭＧ（配列番号２０）、ＣＤＲ２配列ＡＩＧＲＮＧＳＱＴＹＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号２１）、およびＣＤＲ３配列ＬＲＲＧＲＧＬＮＴＦＴＬＤＹ（配列番号２２）を含む、アミノ酸配列；
（ｖ）ＡＳＧＲ１ ＶＫ１（配列番号７８）に対する同一性が少なくとも約７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、または１００％であるアミノ酸配列であって、ＣＤＲ１配列ＲＡＳＱＡＩＧＲＷＬＬ（配列番号２３）、ＣＤＲ２配列ＰＧＳＲＬＲＳ（配列番号２４）、およびＣＤＲ３配列ＱＱＡＹＡＷＰＰＴ（配列番号２５）を含む、アミノ酸配列；
（ｖｉ）ＡＳＧＲ１ ＶＫ２（配列番号７９）に対する同一性が少なくとも約７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、または１００％であるアミノ酸配列であって、ＣＤＲ１配列ＲＡＳＱＡＩＧＲＷＬＬ（配列番号２６）、ＣＤＲ２配列ＰＧＳＲＬＱＳ（配列番号２７）、およびＣＤＲ３配列ＱＱＡＹＱＬＰＶＴ（配列番号２８）を含む、アミノ酸配列；または
（ｖｉｉ）ＡＳＧＲ１ ＶＫ３（配列番号８０）に対する同一性が少なくとも約７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、または１００％であるアミノ酸配列であって、ＣＤＲ１配列ＲＡＳＱＡＩＧＲＷＬＬ（配列番号２９）、ＣＤＲ２配列ＰＧＳＲＬＱＳ（配列番号３０）、およびＣＤＲ３配列ＱＱＡＹＳＬＰＰＴ（配列番号３１）を含む、アミノ酸配列。

【０１１８】

好ましい実施形態において、前記抗原認識ドメインは、ＡＳＧＲ１ ＶＨ１（配列番号７４）に対する同一性が少なくとも約７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、または１００％であるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなり、前記アミノ酸配列は、ＣＤＲ１配列ＥＫＹＡＭＡ（配列番号１１）、ＣＤＲ２配列ＲＩＳＡＲＧＶＴ（配列番号１２）、およびＣＤＲ３配列ＨＫＲＨＥＨＴＲＦＤＳ（配列番号１３）、またはそれらの誘導体を含む。

【０１１９】

本発明のＣＡＲは、上記に定義したように、１個より多い抗原認識ドメインを含んでもよく、すなわち１個より多い肝臓特異的抗原、または肝臓特異的抗原内の１個より多いエピトープに結合してもよく、たとえば、特定の実施形態において二重または２個のポリペプチドまたはＣＡＲの系の一部として結合してもよいが、本発明のＣＡＲは、１個のみの、または単一の抗原認識ドメインを含んでいてもよい。

【０１２０】

<u>ヒンジドメイン</u>

ＣＡＲはまた、ヒンジドメインを含んでいてもよい。本明細書における、「スペーサドメイン」とも称される前記「ヒンジドメイン」は、抗原結合ドメインを膜貫通ドメインから隔てるＣＡＲの細胞外の一部のことである。前記ヒンジは、標的抗原にアクセスするた

めのフレキシビリティを提供してもよい。たとえば、長いスペーサはＣＡＲに余分なフレキシビリティを提供し、膜に近位のエピトープにアクセスしやすくする。

【０１２１】

好適なヒンジドメインは、当業者に明らかであろう（たとえば、Guedan, S., et al., 2018. Molecular Therapy-Methods & Clinical Development, 12, 145-156）。好適なヒンジドメインとしては、ＣＤ２８ヒンジドメイン、ＣＤ８αヒンジドメイン、ＩｇＧヒンジドメイン、およびＩｇＤヒンジドメインがあるが、これらに限定されるわけではない。好ましくは、前記ヒンジドメインはＣＤ８αまたはＣＤ２８ヒンジドメインである。

【０１２２】

好適には、前記ヒンジドメインは、配列番号９５として示されるアミノ酸配列、または配列番号９５に対する同一性が少なくとも８０％である変異体を含んでいてもよい。

ＣＤ２８ヒンジドメインの例（配列番号９５）：ＩＥＶＭＹＰＰＰＹＬＤＮＥＫＳＮＧＴＩＩＨＶＫＧＫＨＬＣＰＳＰＬＦＰＧＰＳＫＰ

【０１２３】

好適には、前記変異体は、配列番号９５に対する同一性が少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、または９９％であってもよい。

【０１２４】

好適には、前記ヒンジドメインは、配列番号９６として示されるアミノ酸配列、または配列番号９６に対する同一性が少なくとも８０％である変異体を含んでいてもよい。

ＣＤ８アルファヒンジドメインの例（配列番号９６）：
ＴＴＴＰＡＰＲＰＰＴＰＡＰＴＩＡＳＱＰＬＳＬＲＰＥＡＣＲＰＡＡＧＧＡＶＨＴＲＧＬＤＦＡＣＤ

【０１２５】

好適には、前記変異体は、配列番号９６に対する同一性が少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、または９９％であってもよい。

【０１２６】

好適には、ＣＡＲは、ｃ－Ｍｙｃタグ（ＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬ－配列番号９７）などのタグをコードしてもよい。好適には、前記タグは、ＣＡＲの細胞外ドメイン、たとえば、細胞外ドメインのヒンジドメインなどに組み込まれてもよい。ｃ－Ｍｙｃタグが一体化されているＣＤ２８ヒンジドメインの例を以下に示す。

ｃ－Ｍｙｃタグが一体化されているＣＤ２８ヒンジドメインの例（配列番号９８）：
ＩＥＶＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬＬＤＮＥＫＳＮＧＴＩＩＨＶＫＧＫＨＬＣＰＳＰＬＦＰＧＰＳＫＰ

【０１２７】

好適には、前記変異体は配列番号９８に対する同一性が少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、または９９％であってもよい。

【０１２８】

膜貫通ドメイン

前記ＣＡＲは、膜貫通ドメインを含んでいてもよい。本明細書における前記「膜貫通ドメイン」は、Ｔｒｅｇの細胞膜内にＣＡＲを固定する、ＣＡＲの一部のことである。このように、膜貫通ドメインは、Ｔｒｅｇの細胞膜内に及ぶ、または存在することができる。膜貫通ドメインは、細胞外および／または細胞内部分を含むタンパク質から由来してもよく、したがって本明細書における膜貫通ドメインは、前記細胞膜内にあるかまたはそれに及ぶ部分だけでなく、由来元のタンパク質から由来する細胞外および／または細胞内残基にも付着していてもよい。たとえば、膜貫通ドメインは、その由来元のタンパク質から由来するヒンジドメインに付着していてもよく、たとえば、ＣＤ８αから由来する膜貫通ドメインがＣＤ８αから由来するヒンジドメインに付着していてもよい。膜貫通ドメインが細胞膜内に存在することは、蛍光顕微鏡を使用した蛍光標識など、当該技術分野で周知のいずれか好適な方法を使用して調べることができる。

【０１２９】
好適な膜貫通ドメインは、当業者に明らかであろう。前記膜貫通ドメインは、Ｉ型膜貫通タンパク質、ＩＩ型膜貫通タンパク質、またはＩＩＩ型膜貫通タンパク質などの、膜貫通ドメインを有するタンパク質のいずれかからの膜貫通配列を含んでいてもよい。ＣＡＲの膜貫通ドメインはまた、人工疎水性配列を含んでいてもよい。膜貫通ドメインは、二量化しないように選択されればよい。
【０１３０】
ＣＡＲ構築に使用される膜貫通（ＴＭ）ドメインの例を、下記に示す。１）ＣＤ２８ＴＭドメイン（Pule et al, Mol Ther, 2005, Nov;12(5):933-41; Brentjens et al, CCR, 2007, Sep 15;13(18 Pt 1):5426-35; Casucci et al, Blood, 2013, Nov 14;122(20):3461-72.）； ２）ＯＸ４０ ＴＭドメイン（Pule et al, Mol Ther, 2005, Nov;12(5):933-41）； ３）４１ＢＢ ＴＭドメイン（Brentjens et al, CCR, 2007, Sep 15;13(18 Pt 1):5426-35）； ４）ＣＤ３ ｚｅｔａ ＴＭドメイン（Pule et al, Mol Ther, 2005, Nov;12(5):933-41; Savoldo B, Blood, 2009, Jun 18;113(25):6392-402.）； ５）ＣＤ８ ＴＭドメイン（Maher et al, Nat Biotechnol, 2002, Jan;20(1):70-5.; Imai C, Leukemia, 2004, Apr;18(4):676-84; Brentjens et al, CCR, 2007, Sep 15;13(18 Pt 1):5426-35; Milone et al, Mol Ther, 2009, Aug;17(8):1453-64.）； ６）ＩＣＯＳ ＴＭドメイン； ７）ＣＤ４ ＴＭドメイン。
【０１３１】
好適には、ＣＡＲはＣＤ２８膜貫通ドメインを含んでいてもよい。好適には、膜貫通ドメインは配列番号９９として示されるアミノ酸配列、または配列番号９９に対する同一性が少なくとも８０％である変異体を含んでいてもよい。
ＣＤ２８ ＴＭドメイン（ＡＡ １５３～１７９）の例（配列番号９９）：
ＦＷＶＬＶＶＶＧＧＶＬＡＣＹＳＬＬＶＴＶＡＦＩＩＦＷＶ
【０１３２】
好適には、前記変異体は配列番号９９に対する同一性が少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、または９９％であってもよい。
【０１３３】
好適には、ＣＡＲはＣＤ８α膜貫通ドメインを含んでいてもよい。好適には、膜貫通ドメインは配列番号１６５として示されるアミノ酸配列、または配列番号１６５に対する同一性が少なくとも８０％である変異体を含んでいてもよい。
ＣＤ８α ＴＭドメイン（ＡＡ １８３～２０３）の例（配列番号１６５）：
ＩＹＩＷＡＰＬＡＧＴＣＧＶＬＬＬＳＬＶＩＴ
【０１３４】
好適には、前記変異体は配列番号１６５に対する同一性が少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、または９９％であってもよい。
【０１３５】
好適には、ＣＡＲはＣＤ２８ヒンジおよび膜貫通ドメイン（場合によっては、ｃ－Ｍｙｃタグを伴う）を含んでいてもよい。好適には、前記ヒンジおよび膜貫通ドメインは、配列番号１００または配列番号１０１として示されるアミノ酸配列、または配列番号１００または配列番号１０１に対する同一性が少なくとも８０％である変異体を含んでいてもよい。
ＣＤ２８ヒンジドメインおよび膜貫通ドメインの例（配列番号１００）：
ＩＥＶＭＹＰＰＰＹＬＤＮＥＫＳＮＧＴＩＩＨＶＫＧＫＨＬＣＰＳＰＬＦＰＧＰＳＫＰＦＷＶＬＶＶＶＧＧＶＬＡＣＹＳＬＬＶＴＶＡＦＩＩＦＷＶ
ｃ－Ｍｙｃタグを伴うＣＤ２８ヒンジドメインおよび膜貫通ドメインの例（配列番号１０１）：
ＩＥＶＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬＬＤＮＥＫＳＮＧＴＩＩＨＶＫＧＫＨＬＣＰＳＰＬＦＰＧＰＳＫＰＦＷＶＬＶＶＶＧＧＶＬＡＣＹＳＬＬＶＴＶＡＦＩＩＦＷＶ

【０１３６】
好適には、前記変異体は配列番号１００または配列番号１０１に対する同一性が少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、または９９％であってもよい。
【０１３７】
好適には、ＣＡＲはＣＤ８αヒンジドメインとＣＤ２８膜貫通ドメインとを含んでいてもよい。好適には、前記ヒンジおよび膜貫通ドメインは、配列番号１０２として示されるアミノ酸配列、または配列番号１０２に対する同一性が少なくとも８０％である変異体を含んでいてもよい。
ＣＤ８αヒンジドメインとＣＤ２８膜貫通ドメインの例（配列番号１０２）：
ＴＴＴＰＡＰＲＰＰＴＰＡＰＴＩＡＳＱＰＬＳＬＲＰＥＡＣＲＰＡＡＧＧＡＶＨＴＲＧＬＤＦＡＣＤＦＷＶＬＶＶＶＧＧＶＬＡＣＹＳＬＬＶＴＶＡＦＩＩＦＷＶ
【０１３８】
好適には、前記変異体は配列番号１０２に対する同一性が少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、または９９％であってもよい。
【０１３９】
好適には、ＣＡＲはＣＤ２８ヒンジドメインとＣＤ８α膜貫通ドメインとを含んでいてもよい。好適には、前記ヒンジおよび膜貫通ドメインは、配列番号１６６として示されるアミノ酸配列、または配列番号１６６に対する同一性が少なくとも８０％である変異体を含んでいてもよい。
ＣＤ２８ヒンジドメインとＣＤ８α膜貫通ドメインの例（配列番号１６６）：
ＩＥＶＭＹＰＰＰＹＬＤＮＥＫＳＮＧＴＩＩＨＶＫＧＫＨＬＣＰＳＰＬＦＰＧＰＳＫＰＩＹＩＷＡＰＬＡＧＴＣＧＶＬＬＬＳＬＶＩＴ
【０１４０】
好適には、前記変異体は配列番号１６６に対する同一性が少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、または９９％であってもよい。
【０１４１】
<u>エンドドメイン</u>
ＣＡＲは、１個以上の細胞内シグナル伝達ドメインと、場合によっては１個以上の共刺激ドメインとを含むエンドドメインを含んでいてもよい。
【０１４２】
ＣＡＲは、１個以上の細胞内シグナル伝達ドメインを含んでいてもよい。
【０１４３】
本明細書における「細胞内シグナル伝達ドメイン」とは、肝臓特異的抗原（たとえばＡＳＧＲ）に結合する有効なＣＡＲのメッセージをＴｒｅｇ内部に伝達して、たとえば免疫抑制機能などのＴｒｅｇ機能を誘導することにかかわる、ＣＡＲの細胞内の部分のことである。好適な細胞内シグナル伝達ドメインは、当業者に明らかであろう。前記細胞内シグナル伝達ドメインは、エフェクター機能シグナルを伝達し、Ｔｒｅｇがその特殊機能を抗原結合の際に発揮するよう指示するために必要である。細胞内シグナル伝達ドメインの例としては、Ｔ細胞受容体またはその相同体（たとえば、η鎖、ＦｃεＲ１γおよびβ鎖、ＭＢ１（Ｉｇα）鎖、Ｂ２９（Ｉｇβ）鎖など）のζ鎖エンドドメイン、ＣＤ３ポリペプチドドメイン（Δ、δ、およびε）、ｓｙｋファミリーチロシンキナーゼ（Ｓｙｋ、ＺＡＰ７０、など）、ｓｒｃファミリーチロシンキナーゼ（Ｌｃｋ、Ｆｙｎ、Ｌｙｎ、など）、ならびに、ＣＤ２、ＣＤ５およびＣＤ２８などのＴ細胞形質導入に関わるその他の分子があるが、これらに限定されない。前記細胞内シグナル伝達ドメインは、ヒトＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメイン、ＦｃｙＲＩＩＩ、ＦｃｓＲＩ、Ｆｃ受容体の細胞質側末端、免疫受容体チロシン活性化モチーフ（ＩＴＡＭ）を有する細胞質受容体、またはそれらの組み合わせであってもよい。好適には、前記細胞内シグナル伝達ドメインは、ヒトＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメインの細胞内シグナル伝達ドメインを含む。好ましくは、前記ＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメインは、ＡＳＧＲに結合するか、または特異的に結合する、抗原認識ドメインと同じポリペプチド鎖にある。好適には、細胞内シグナル伝達ドメイン

は配列番号１０３として示されるアミノ酸配列、または配列番号１０３に対する同一性が少なくとも８０％である変異体を含んでいてもよい。
ＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメインの例（配列番号１０３）：
ＲＶＫＦＳＲＳＡＤＡＰＡＹＱＱＧＱＮＱＬＹＮＥＬＮＬＧＲＲＥＥＹＤＶＬＤＫＲＲＧ
ＲＤＰＥＭＧＧＫＰＲＲＫＮＰＱＥＧＬＹＮＥＬＱＫＤＫＭＡＥＡＹＳＥＩＧＭＫＧＥＲ
ＲＲＧＫＧＨＤＧＬＹＱＧＬＳＴＡＴＫＤＴＹＤＡＬＨＭＱＡＬＰＰＲ
【０１４４】
好適には、前記変異体は配列番号１０３に対する同一性が少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、または９９％であってもよい。
【０１４５】
ＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ２８シグナル伝達ドメインを含んでいてもよい。好適には、細胞内シグナル伝達ドメインは配列番号１０４として示されるアミノ酸配列、または配列番号１０４に対する同一性が少なくとも８０％のである変異体を含んでいてもよい。
ＣＤ２８シグナル伝達ドメインの例（配列番号１０４）：
ＲＳＫＲＳＲＬＬＨＳＤＹＭＮＭＴＰＲＲＰＧＰＴＲＫＨＹＱＰＹＡＰＰＲＤＦＡＡＹＲ
Ｓ
【０１４６】
好適には、前記変異体は配列番号１０４に対する同一性が少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、または９９％であってもよい。
【０１４７】
ＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ２７シグナル伝達ドメインを含んでいてもよい。好適には、細胞内シグナル伝達ドメインは配列番号１０５として示されるアミノ酸配列、または配列番号１０５に対する同一性が少なくとも８０％である変異体を含んでいてもよい。ＣＤ２７シグナル伝達ドメインの例（配列番号１０５）：
ＱＲＲＫＹＲＳＮＫＧＥＳＰＶＥＰＡＥＰＣＨＹＳＣＰＲＥＥＥＧＳＴＩＰＩＱＥＤＹＲ
ＫＰＥＰＡＣＳＰ
【０１４８】
一実施形態において、前記細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号１０５に対する同一性が少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、または９９％であるシグナリングモチーフを含む。
【０１４９】
さらに別の細胞内シグナル伝達ドメインは当業者に明らかであろう。これらは本発明の代替の実施形態と関連して用いられてもよい。
【０１５０】
ＣＡＲはまた、１個以上の共刺激ドメインを含んでいてもよい。本明細書における「共刺激ドメイン」とは、Ｔｒｅｇ機能（たとえば免疫抑制機能）、増殖、および／または持続を促進する、ＣＡＲの細胞内の部分のことである。したがって、ＣＡＲは、たとえばＣＤ３ζなどの細胞内シグナル伝達ドメインに対して前記１個以上の共刺激ドメインの融合したものを含む化合物エンドドメインを含んでいてもよい。かかる化合物エンドドメインは、抗原認識後に同時に活性化および共刺激シグナルを伝送できる第２世代ＣＡＲと称されてもよい。最も一般的に使用される共刺激ドメインは、ＣＤ２８の共刺激ドメインである。これは、Ｔｒｅｇ増殖を誘発する最も強力な共刺激シグナル、すなわち免疫学的シグナル２を供給する。好適な共刺激ドメインは、当業者に明らかであろう。
【０１５１】
好適には、前記１個以上の共刺激ドメインは配列番号１０４または１０５として示されるアミノ酸配列、または配列番号１０４または１０５に対する同一性が少なくとも８０％（たとえば８５、９０、９５、９７、９８または９９％）である変異体を含んでいてもよい。好適には、前記１個以上の共刺激ドメインは、ＯＸ４０、４－１ＢＢ、ＩＣＯＳ、またはＴＮＦＲＳＦ２５のシグナル伝達ドメインなど、ＴＮＦ受容体ファミリーのシグナリ

ングドメインを１個以上含んでいてもよい。
【０１５２】
ＯＸ４０、４－１ＢＢ、ＩＣＯＳ、またはＴＮＦＲＳＦ２５のシグナル伝達ドメインの例が、下記に示される。前記１個以上の共刺激ドメインは、配列番号１０６～１０９の一つ以上、または配列番号１０６～１０９の一つ以上に対する同一性が少なくとも８０％である変異体を含んでいてもよい。
ＯＸ４０シグナル伝達ドメインの例（配列番号１０６）：ＡＬＹＬＬＲＲＤＱＲＬＰＰＤＡＨＫＰＰＧＧＧＳＦＲＴＰＩＱＥＥＱＡＤＡＨＳＴＬＡＫＩ
４１ＢＢシグナル伝達ドメインの例（配列番号１０７）
ＫＲＧＲＫＫＬＬＹＩＦＫＱＰＦＭＲＰＶＱＴＴＱＥＥＤＧＣＳＣＲＦＰＥＥＥＥＧＧＣＥＬ
ＩＣＯＳシグナル伝達ドメインの例（配列番号１０８）
ＣＷＬＴＫＫＫＹＳＳＳＶＨＤＰＮＧＥＹＭＦＭＲＡＶＮＴＡＫＫＳＲＬＴＤＶＴＬ
ＴＮＦＲＳＦ２５シグナル伝達ドメインの例（配列番号１０９）：
ＴＹＴＹＲＨＣＷＰＨＫＰＬＶＴＡＤＥＡＧＭＥＡＬＴＰＰＰＡＴＨＬＳＰＬＤＳＡＨＴＬＬＡＰＰＤＳＳＥＫＩＣＴＶＱＬＶＧＮＳＷＴＰＧＹＰＥＴＱＥＡＬＣＰＱＶＴＷＳＷＤＱＬＰＳＲＡＬＧＰＡＡＡＰＴＬＳＰＥＳＰＡＧＳＰＡＭＭＬＱＰＧＰＱＬＹＤＶＭＤＡＶＰＡＲＲＷＫＥＦＶＲＴＬＧＬＲＥＡＥＩＥＡＶＥＶＥＩＧＲＦＲＤＱＱＹＥＭＬＫＲＷＲＱＱＱＰＡＧＬＧＡＶＹＡＡＬＥＲＭＧＬＤＧＣＶＥＤＬＲＳＲＬＱＲＧＰ
【０１５３】
前記１個以上の共刺激ドメインは、配列番号１０６～１０９のいずれか一つに対する同一性が少なくとも８５、９０、９５、９７、９８または９９％であるＯＸ４０、４－１ＢＢ、ＩＣＯＳおよびＴＮＦＲＳＦ２５シグナル伝達ドメインのうちの１個以上の変異体を含んでいてもよい。
【０１５４】
ＣＡＲのエンドドメインは、ＣＤ２８シグナル伝達ドメインと、ＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメインとを含んでいてもよい。好適には、前記エンドドメインは配列番号１１０として示されるアミノ酸配列、または配列番号１１０に対する同一性が少なくとも８０％である変異体を含んでいてもよい。
ＣＤ２８シグナル伝達ドメインおよびＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメインの例（配列番号１１０）：
ＲＳＫＲＳＲＬＬＨＳＤＹＭＮＭＴＰＲＲＰＧＰＴＲＫＨＹＱＰＹＡＰＰＲＤＦＡＡＹＲＳＲＶＫＦＳＲＳＡＤＡＰＡＹＱＱＧＱＮＱＬＹＮＥＬＮＬＧＲＲＥＥＹＤＶＬＤＫＲＲＧＲＤＰＥＭＧＧＫＰＲＲＫＮＰＱＥＧＬＹＮＥＬＱＫＤＫＭＡＥＡＹＳＥＩＧＭＫＧＥＲＲＲＧＫＧＨＤＧＬＹＱＧＬＳＴＡＴＫＤＴＹＤＡＬＨＭＱＡＬＰＰＲ
【０１５５】
好適には、前記変異体は配列番号１１０に対する同一性が少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、または９９％であってもよい。
【０１５６】
いくつかの実施形態において、前記ＣＡＲは、ＳＴＡＴ５関連モチーフと、ＪＡＫ１および／またはＪＡＫ２結合モチーフとを含むエンドドメインを含む。
【０１５７】
「シグナル伝達性転写因子５」（ＳＴＡＴ５）は、ＩＬ－２シグナリング経路に関与する転写因子であり、ＦＯＸＰ３、ＩＬ２ＲＡおよびＢＣＬＸＬなどの遺伝子の発現を促進することによって、Ｔｒｅｇの機能、安定性、および生存において鍵となる役割を果たす。機能し、かつ核移行するためには、ＳＴＡＴ５はリン酸化する必要がある。ＩＬ－２ライゲーションの結果、ＩＬ－２Ｒβ鎖およびＩＬ－２Ｒγ鎖のそれぞれに存在する特異的なシグナル伝達ドメインを介してＪａｋ１およびＪａｋ３キナーゼを活性化することにより、ＳＴＡＴ５がリン酸化する。Ｊａｋ１（またはＪａｋ２）は、Ｊａｋ３を必要とせずにＳＴＡＴ５をリン酸化できるが、Ｊａｋ１とＪａｋ３との両方のトランスリン酸化によ

りＳＴＡＴ５の活性を増加することができ、これにより活性が安定する。本明細書における「ＳＴＡＴ５関連モチーフ」とは、チロシンを含みＳＴＡＴ５ポリペプチドと結合することのできるアミノ酸モチーフのことである。タンパク質－タンパク質相互作用を判定するための当該技術分野において周知の方法を用いて、関連モチーフがＳＴＡＴ５と結合できるかどうか判定してもよい。たとえば、共免疫沈降の後にウエスタンブロットを行ってもよい。

【０１５８】

本発明は従って、肝臓特異的抗原に、好ましくはアシアロ糖タンパク質受容体に結合する能力を有するＣＡＲを含む、改変されたＴｒｅｇを提供し、前記ＣＡＲはまた、抗原に対してＣＡＲが結合する時にのみ、ＳＴＡＴ５介在性の生存促進性シグナルをＴｒｅｇへ提供する。特に、抗原認識後、前記ＣＡＲが密集し、前記ＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメイン（エンドドメイン）を介して、改変されたＴｒｅｇへシグナルが伝達される。前記ＣＡＲが、ＳＴＡＴ５関連モチーフとＪＡＫ１結合モチーフおよび／またはＪＡＫ２結合モチーフとを含むエンドドメインを含む場合、ＣＡＲの密集によってＳＴＡＴ５ならびにＪＡＫ１および／またはＪＡＫ２が集められ活性化され、微小環境におけるＩＬ－２の獲得に依存することなく、抗原特異的に、前記改変されたＴｒｅｇの機能と生存とを向上する信号を提供する。

【０１５９】

ＳＴＡＴ５シグナリングを備えた、本発明の改変されたＴｒｅｇは、対象のＴ細胞母集団（general T cell population）と比較して抗原を認識した後に、前記改変されたＣＡＲ－Ｔｒｅｇに生存有意性を提供することにおいて、特に効果があればよい。特に、免疫抑制剤を使用してＩＬ－２の獲得が減少する状況、たとえば移植などの状況で、前記ＣＡＲ－ＴｒｅｇのＳＴＡＴ５シグナリングは、それが無ければ不利な微小環境において、本発明の細胞に対するさらなる生存と機能の効果を提供する。

【０１６０】

好適には、ＣＡＲエンドドメインは、本明細書において定義された２個以上のＳＴＡＴ５関連モチーフを含んでいてもよい。たとえば、ＣＡＲエンドドメインは、本明細書において定義された２個、３個、４個、５個、またはそれ以上のＳＴＡＴ５関連モチーフを含んでいてもよい。好ましくは、ＣＡＲエンドドメインは、本明細書において定義された２個または３個のＳＴＡＴ５関連モチーフを含んでいてもよい。

【０１６１】

好適には、前記ＳＴＡＴ５関連モチーフは、膜貫通タンパク質の細胞質ドメイン中に内在してもよい。たとえば、前記ＳＴＡＴ５関連モチーフは、インターロイキン受容体（ＩＬ）受容体エンドドメインまたはホルモン受容体由来であってもよい。

【０１６２】

前記ＣＡＲエンドドメインは、ＳＴＡＴ５が下流成分であるインターロイキン受容体の鎖のいずれかから選択されたアミノ酸配列を含んでもよく、たとえば、ＩＬ－２受容体β鎖のアミノ酸番号２６６～５５１（米国立バイオテクノロジー情報センター（ＮＣＢＩ）標準配列（ＲＥＦＳＥＱ）：ＮＰ＿０００８６９．１、配列番号１１１）、ＩＬ－７Ｒα鎖のアミノ酸番号２６５～４５９（ＮＣＢＩ ＲＥＦＳＥＱ：ＮＰ＿００２１７６．２、配列番号１１２）、ＩＬ－７ＲＡ ２Ｙ鎖切断型（配列番号１１３）、ＩＬ－９Ｒ鎖のアミノ酸番号２９２～５２１（ＮＣＢＩ ＲＥＦＳＥＱ：ＮＰ＿００２１７７．２、配列番号１１４）、ＩＬ－４Ｒα鎖のアミノ酸番号２５７～８２５（ＮＣＢＩ ＲＥＦＳＥＱ：ＮＰＪＤ００４０９．１、配列番号１１５）、ＩＬ－３Ｒβ鎖のアミノ酸番号４６１～８９７（ＮＣＢＩ ＲＥＦＳＥＱ：ＮＰ＿０００３８６．１、配列番号１１６）、またはＩＬ－１７Ｒβ鎖のアミノ酸番号３１４～５０２（ＮＣＢＩ ＲＥＦＳＥＱ：ＮＰ＿０６１１９５．２、配列番号１１７）を含む前記細胞質ドメインが使用されてもよい。インターロイキン受容体鎖の細胞質ドメインの領域全体が使用されてもよい。

配列番号１１１－ＩＬ７ＲＢ（ＮＰ＿０００８６９．１のアミノ酸番号（ＡＡ）２６５～５５１）

NCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLS
SPFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLLQQDKVPE
PASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYD
PYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRD
DLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPR
DWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGP
REGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQ
DPTHLV

配列番号１１２－ＩＬ７ＲＡ（ＮＰ＿００２１７６．２のＡＡ ２６５～４５９）

KKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKNLNVSFNPESFL
DCQIHRVDDIQARDEVEGFLQDTFPQQLEESEKQRLGGDV
QSPNCPSEDVVITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSS
SRSLDCRESGKNGPHVYQDLLLSLGTTNSTLPPPFSLQSG
ILTLNPVAQGQPILTSLGSNQEEAYVTMSSFYQNQ

配列番号１１３－ＩＬ７ＲＡ ２Ｙ切断型

KKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKNLNVSFNPESFL
DCQIHRVDDIQARDEVEGFLQDTFPQQPILTSLGSNQEEA
YVTMSSFYQNQ

配列番号１１４－ＩＬ９Ｒ（ＮＰ＿００２１７７．２のＡＡ ２９２～５２１）

KLSPRVKRIFYQNVPSPAMFFQPLYSVHNGNFQTWMGAHG
AGVLLSQDCAGTPQGALEPCVQEATALLTCGPARPWKSVA
LEEEQEGPGTRLPGNLSSEDVLPAGCTEWRVQTLAYLPQE
DWAPTSLTRPAPPDSEGSRSSSSSSSSNNNNYCALGCYGG
WHLSALPGNTQSSGPIPALACGLSCDHQGLETQQGVAWVL
AGHCQRPGLHEDLQGMLLPSVLSKARSWTF

配列番号１１５－ＩＬ４ＲＡ（ＮＰＪＤ００４０９．１のＡＡ ２５７～８２５）

KIKKEWWDQIPNPARSRLVAIIIQDAQGSQWEKRSRGQEP
AKCPHWKNCLTKLLPCFLEHNMKRDEDPHKAAKEMPFQGS
GKSAWCPVEISKTVLWPESISVVRCVELFEAPVECEEEEEE
VEEEKGSFCASPESSRDDFQEGREGIVARLTESLFLDLLG
EENGGFCQQDMGESCLLPPSGSTSAHMPWDEFPSAGPKEA
PPWGKEQPLHLEPSPPASPTQSPDNLTCTETPLVIAGNPA
YRSFSNSLSQSPCPRELGPDPLLARHLEEVEPEMPCVPQL
SEPTTVPQPEPETWEQILRRNVLQHGAAAAPVSAPTSGYQ
EFVHAVEQGGTQASAVVGLGPPGEAGYKAFSSLLASSAVS
PEKCGFGASSGEEGYKPFQDLIPGCPGDPAPVPVPLFTFG
LDREPPRSPQSSHLPSSSPEHLGLEPGEKVEDMPKPPLPQ
EQATDPLVDSLGSGIVYSALTCHLCGHLKQCHGQEDGGQT
PVMASPCCGCCCGDRSSPPTTPLRAPDPSPGGVPLEASLC
PASLAPSGISEKSKSSSSFHPAPGNAQSSSQTPKIVNFVS
VGPTYMRVS

配列番号１１６－ＩＬ３ＲＢ（ＮＰ＿０００３８６．１のＡＡ ４６１～８９７）

RFCGIYGYRLRRKWEEKIPNPSKSHLFQNGSAELWPPGSM
SAFTSGSPPHQGPWGSRFPELEGVFPVGFGDSEVSPLTIE
DPKHVCDPPSGPDTTPAASDLPTEQPPSPQPGPPAASHTP
EKQASSFDFNGPYLGPPHSRSLPDILGQPEPPQEGGSQKS
PPPGSLEYLCLPAGGQVQLVPLAQAMGPGQAVEVERRPSQ
GAAGSPSLESGGGPAPPALGPRVGGQDQKDSPVAIPMSSG
DTEDPGVASGYVSSADLVFTPNSGASSVSLVPSLGLPSDQ
TPSLCPGLASGPPGAPGPVKSGFEGYVELPPIEGRSPRSP

ＲＮＮＰＶＰＰＥＡＫＳＰＶＬＮＰＧＥＲＰＡＤＶＳＰＴＳＰＱＰＥＧＬＬＶＬＱＱＶＧ
ＤＹＣＦＬＰＧＬＧＰＧＰＬＳＬＲＳＫＰＳＳＰＧＰＧＰＥＩＫＮＬＤＱＡＦＱＶＫＫＰ
ＰＧＱＡＶＰＱＶＰＶＩＱＬＦＫＡＬＫＱＱＤＹＬＳＬＰＰＷＥＶＮＫＰＧＥＶＣ
配列番号１１７－ＩＬ１７ＲＢ（ＮＰ＿０６１１９５．２のＡＡ ３１４～５０２）
ＲＨＥＲＩＫＫＴＳＦＳＴＴＴＬＬＰＰＩＫＶＬＶＶＹＰＳＥＩＣＦＨＨＴＩＣＹＦＴＥ
ＦＬＱＮＨＣＲＳＥＶＩＬＥＫＷＱＫＫＫＩＡＥＭＧＰＶＱＷＬＡＴＱＫＫＡＡＤＫＶＶ
ＦＬＬＳＮＤＶＮＳＶＣＤＧＴＣＧＫＳＥＧＳＰＳＥＮＳＱＤＬＦＰＬＡＦＮＬＦＣＳＤ
ＬＲＳＱＩＨＬＨＫＹＶＶＶＹＦＲＥＩＤＴＫＤＤＹＮＡＬＳＶＣＰＫＹＨＬＭＫＤＡＴ
ＡＦＣＡＥＬＬＨＶＫＱＱＶＳＡＧＫＲＳＱＡＣＨＤＧＣＣＳＬ

【０１６３】

前記ＣＡＲエンドドメインは、配列番号１１１～１１７の一つとして示されるアミノ酸配列を、または配列番号１１１～１１７の一つに対する同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％である変異体を含む、ＳＴＡＴ５関連モチーフを含んでいてもよい。たとえば、前記変異体は、配列番号１１１～１１７の一つとして示されるアミノ酸配列の結合レベルの、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、または少なくとも９０％のレベルで、ＳＴＡＴ５と結合できればよい。前記変異体または誘導体は、配列番号１１１～１１７の一つのレベルに類似または同一のレベルでＳＴＡＴ５と結合できてもよく、または、配列番号１１１～１１７の一つとして示されるアミノ酸配列よりも高いレベル（たとえば、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、または少なくとも５０％高くなったレベル）でＳＴＡＴ５と結合できてもよい。

【０１６４】

たとえば、前記ＳＴＡＴ５関連モチーフは、ＩＬ２Ｒβ、ＩＬ７Ｒα、ＩＬ－３Ｒβ（ＣＳＦ２ＲＢ）、ＩＬ－９Ｒ、ＩＬ－４Ｒα、ＩＬ－１７Ｒβ、エリスロポエチン受容体、トロンボポエチン受容体、成長ホルモン受容体、およびプロラクチン受容体由来であってもよい。

【０１６５】

前記ＳＴＡＴ５関連モチーフは、アミノ酸モチーフＹＸＸＦ／Ｌ（配列番号１１８）（Ｘは任意のアミノ酸）を含んでいてもよい。

【０１６６】

好適には、前記ＳＴＡＴ５関連モチーフは、アミノ酸モチーフＹＣＴＦ（配列番号１１９）、ＹＦＦＦ（配列番号１２０）、ＹＬＳＬ（配列番号１２１）、またはＹＬＳＬＱ（配列番号１２２）を含んでいてもよい。

【０１６７】

好適には、前記ＳＴＡＴ５関連モチーフは、アミノ酸モチーフＹＬＳＬＱ（配列番号１２２）を含んでいてもよい。

【０１６８】

前記ＣＡＲエンドドメインは、アミノ酸モチーフＹＣＴＦ（配列番号１１９）、ＹＦＦＦ（配列番号１２０）、ＹＬＳＬ（配列番号１２１）、および／またはＹＬＳＬＱ（配列番号１２２）を含む前記ＳＴＡＴ５関連モチーフを１個以上を含んでいてもよい。

【０１６９】

前記ＣＡＲエンドドメインは、アミノ酸モチーフＹＬＳＬＱ（配列番号１２２）を含む第１のＳＴＡＴ５関連モチーフと、アミノ酸モチーフＹＣＴＦ（配列番号１１９）またはＹＦＦＦ（配列番号１２０）を含む第２のＳＴＡＴ５関連モチーフとを含んでいてもよい。

【０１７０】

前記ＣＡＲエンドドメインは、ＳＴＡＴ５関連モチーフである、ＹＬＳＬＱ（配列番号１２２）、ＹＣＴＦ（配列番号１１９）、およびＹＦＦＦ（配列番号１２０）を含んでいてもよい。

【０１７１】
本明細書における「ＪＡＫ１および／またはＪＡＫ２結合モチーフ」とは、チロシンキナーゼＪＡＫ１および／またはＪＡＫ２関連付けをもたらすＢＯＸモチーフのことである。好適なＪＡＫ１およびＪＡＫ２結合モチーフは、たとえば、Ｆｅｒｒａｏ＆Ｌｕｐａｒｄｕｓ（Frontiers in Endocrinology; 2017; 8(71)；この参照により本明細書に援用される）により記載されている。
【０１７２】
タンパク質－タンパク質相互作用を判定するための当該技術分野において周知の方法を用いて、モチーフがＪＡＫ１および／またはＪＡＫ２と結合できるかどうか判定してもよい。たとえば、共免疫沈降の後にウエスタンブロットを行ってもよい。
【０１７３】
ＪＡＫ１および／またはＪＡＫ２結合モチーフは、膜貫通タンパク質の細胞質ドメイン内に内在的に発生してもよい。たとえば、ＪＡＫ１および／またはＪＡＫ２結合モチーフは、ＩＦＮＬＲ１、ＩＦＮＡＲ、ＩＦＮＧＲ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ２０ＲＡ、ＩＬ２２ＲＡ、ＩＦＮＧＲ２、またはＩＬ１０ＲＢ由来であってもよい。
【０１７４】
ＪＡＫ１結合モチーフは、ＪＡＫ１と結合できる、配列番号１２３～１２９として示されたアミノ酸モチーフまたはその変異体を含んでもよい。たとえば、前記変異体は、配列番号１２３～１２９の一つとして示されるアミノ酸配列の結合レベルの、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、または少なくとも９０％のレベルで、ＪＡＫ１と結合できればよい。前記変異体または誘導体は、配列番号１２３～１２９の一つのレベルに類似または同一のレベルでＪＡＫ１と結合できてもよく、または、配列番号１２３～１２９の一つとして示されるアミノ酸配列よりも高いレベル（たとえば、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、または少なくとも５０％高くなったレベル）でＪＡＫ１結合できてもよい。
【表３】

JAK1 結合モチーフ 1 (配列番号 123)	KVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDK
JAK1 結合モチーフ 2 (配列番号 124)	NPWFQRAKMPRALDFSGHTHPVATFQPSRPESVNDLFLCPQKELT
JAK1 結合モチーフ 3 (配列番号 125)	GYICLRNSLPKVLNFHNFLAWPFPNLPPLEAMDMVEVIYINR
JAK1 結合モチーフ 4 (配列番号 126)	PLKEKSIILPKSLISVVRSATLETKPESKYVSLITSYQPFSL
JAK1 結合モチーフ 5 (配列番号 127)	RRRKKLPSVLLFKKPSPFIFISQRPSPETQDTIHPLDEEAFLK
JAK1 結合モチーフ 6 (配列番号 128)	YIHVGKEKHPANLILIYGNEFDKRFFVPAEKIVINFITLNISDDS
JAK1 結合モチーフ 7 (配列番号 129)	RYVTKPPAPPNSLNVQRVLTFQPLRFIQEHVLIPVFDLSGP

【０１７５】
変異体は、配列番号１２３～１２９のいずれかと比較して１個、２個、または３個のアミノ酸の差異を含んでいてもよく、ＪＡＫ１と結合する能力を保持しうる。
前記変異体は、配列番号１２３～１２９のいずれか一つに対する同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％であってもよい。

好ましい実施形態において、ＪＡＫ１結合ドメインは、ＪＡＫ１と結合できる、配列番号１２３またはその変異体を含んでいてもよい。

【０１７６】

ＪＡＫ２結合モチーフは、ＪＡＫ２と結合できる、配列番号１３０～１３２として示されたアミノ酸モチーフまたはその変異体を含んでもよい。たとえば、前記変異体は、配列番号１３０～１３２の一つとして示されるアミノ酸配列の結合レベルの、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、または少なくとも９０％のレベルで、ＪＡＫ２と結合できればよい。前記変異体または誘導体は、配列番号１３０～１３２の一つのレベルに類似または同一のレベルでＪＡＫ２と結合できてもよく、または、配列番号１３０～１３２の一つとして示されるアミノ酸配列よりも高いレベル（たとえば、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、または少なくとも５０％高くなったレベル）でＪＡＫ２結合できてもよい。

【表４】

JAK2 結合モチーフ 1 (配列番号 130)	NYVFFPSLKPSSSIDEYFSEQPLKNLLLSTSEEQIEKCFIIEN
JAK2 結合モチーフ 2 (配列番号 131)	YWFHTPPSIPLQIEEYLKDPTQPILEALDKDSSPKDDVWDSVSIISFPE
JAK2 結合モチーフ 3 (配列番号 132)	YAFSPRNSLPQHLKEFLGHPHHNTLLFFSFPLSDENDVFDKLSVIAEDSES

【０１７７】

変異体は、配列番号１３０～１３２のいずれかと比較して１個、２個、または３個のアミノ酸の差異を含んでいてもよく、ＪＡＫ２と結合する能力を保持しうる。

【０１７８】

前記変異体は、配列番号１３０～１３２のいずれか一つに対する同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％であってもよい。

【０１７９】

タンパク質－タンパク質相互作用を判定するための当該技術分野において周知の方法を用いて、ＪＡＫ１結合モチーフまたはＪＡＫ２結合モチーフがＪＡＫ１またはＪＡＫ２と結合できるかどうか判定してもよい。たとえば、共免疫沈降の後にウエスタンブロットを行ってもよい。

【０１８０】

好適には、本明細書に記載のＣＡＲのエンドドメインは、「シグナル伝達性転写因子３」（ＳＴＡＴ３）関連モチーフを含まなくてもよい。ＳＴＡＴ３は、Ｔｒｅｇの安定と機能のためには有害なシグナルとして記載されてきた。たとえば、ＳＴＡＴ３シグナリングは、ＩＬ１７、ＩＬ２１、およびＩＬ２２などの炎症促進性の遺伝子の発現を促進する。このように、ＳＴＡＴ３関連モチーフを含まないＣＡＲを使用することは、本発明の改変されたＴｒｅｇにおいて特別な利点をもたらす。

【０１８１】

ＳＴＡＴ３関連モチーフは、ＳＴＡＴ３と結合できるアミノ酸配列ＹＸＸＱ（配列番号１３３）（Ｘは任意のアミノ酸）を含んでいてもよい。タンパク質－タンパク質相互作用を判定するための当該技術分野において周知の方法を用いて、ＳＴＡＴ３関連モチーフがＳＴＡＴ３と結合できるかどうか判定してもよい。たとえば、共免疫沈降の後にウエスタンブロットを行ってもよい。好適には、前記ＣＡＲエンドドメインは、アミノ酸配列ＹＸＸＱ（配列番号１３３）（Ｘは任意のアミノ酸）を含まない。

【０１８２】

「ＳＴＡＴ３関連モチーフ」とは、チロシンを含み、Ｔｒｅｇの中に存在する時にＳＴＡＴ３ポリペプチドと機能的に結合することのできる（すなわち、ＳＴＡＴ３ポリペプチドの活性化をもたらす）をアミノ酸モチーフのことをいうものであってもよい。
好適には、ＣＡＲエンドドメインは、チロシンを含みＳＴＡＴ３ポリペプチドと結合することのできるアミノ酸モチーフを含まない。たとえば、好適には、ＣＡＲエンドドメインは、チロシンを含み、Ｔｒｅｇの中に存在する時にＳＴＡＴ３ポリペプチドと機能的に結合することのできる（すなわち、ＳＴＡＴ３ポリペプチドの活性化をもたらす）アミノ酸モチーフを含まない。

【０１８３】

好適には、当該ＣＡＲのエンドドメインは、Ｔｒｅｇ中に発現した時に産生ＳＴＡＴ３および／またはＳＴＡＴ１シグナリングを誘発することができない。換言すれば、Ｔｒｅｇ中に発現した時に、当該ＣＡＲは、ＳＴＡＴ３および／またはＳＴＡＴ１に機能的に結合できず、および／またはＳＴＡＴ３および／またはＳＴＡＴ１のリン酸化と活性化を誘発することができなくてもよい。好適には、前記ＣＡＲは、Ｔｒｅｇ中に発現した時にＳＴＡＴ３および／またはＳＴＡＴ１に依存した転写活性化を誘発することができない。
好適には、前記ＣＡＲのＩＬ２Ｒβエンドドメイン部分は、本明細書において定義されたＳＴＡＴ３関連モチーフを含んでいなくてもよい。

【０１８４】

好適には、前記ＣＡＲエンドドメインは、ＩＬ２Ｒβエンドドメインを含んでいてもよい。好適には、前記ＣＡＲエンドドメインは配列番号１３４として示されるアミノ酸配列、または配列番号１３４に対する配列同一性が少なくとも８０％である変異体を含んでいてもよい。

ＩＬ２Ｒβエンドドメインの例（配列番号１３４）
ＮＣＲＮＴＧＰＷＬＫＫＶＬＫＣＮＴＰＤＰＳＫＦＦＳＱＬＳＳＥＨＧＧＤＶＱＫＷＬＳ
ＳＰＦＰＳＳＳＦＳＰＧＧＬＡＰＥＩＳＰＬＥＶＬＥＲＤＫＶＴＱＬＬＬＱＱＤＫＶＰＥ
ＰＡＳＬＳＳＮＨＳＬＴＳＣＦＴＮＱＧＹＦＦＦＨＬＰＤＡＬＥＩＥＡＣＱＶＹＦＴＹＤ
ＰＹＳＥＥＤＰＤＥＧＶＡＧＡＰＴＧＳＳＰＱＰＬＱＰＬＳＧＥＤＤＡＹＣＴＦＰＳＲＤ
ＤＬＬＬＦＳＰＳＬＬＧＧＰＳＰＰＳＴＡＰＧＧＳＧＡＧＥＥＲＭＰＰＳＬＱＥＲＶＰＲ
ＤＷＤＰＱＰＬＧＰＰＴＰＧＶＰＤＬＶＤＦＱＰＰＰＥＬＶＬＲＥＡＧＥＥＶＰＤＡＧＰ
ＲＥＧＶＳＦＰＷＳＲＰＰＧＱＧＥＦＲＡＬＮＡＲＬＰＬＮＴＤＡＹＬＳＬＱＥＬＱＧＱ
ＤＰＴＨＬＶ

【０１８５】

前記変異体は、配列番号１３４に対する同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％であってもよい。

【０１８６】

好適には、前記ＣＡＲエンドドメインは、切断型ＩＬ２Ｒβエンドドメインを含んでいてもよい。好適には、前記ＣＡＲエンドドメインは配列番号１３５または配列番号１３６として示されるアミノ酸配列、またはそれに対する配列同一性が少なくとも８０％である、配列番号１３５または配列番号１３６の変異体を含んでいてもよい。

ＩＬ２ＲＢ切断型ーＹ５１０の例（配列番号１３５）
ＮＣＲＮＴＧＰＷＬＫＫＶＬＫＣＮＴＰＤＰＳＫＦＦＳＱＬＳＳＥＨＧＧＤＶＱＫＷＬＳ
ＳＰＦＰＳＳＳＦＳＰＧＧＬＡＰＥＩＳＰＬＥＶＬＥＲＤＫＶＴＱＬＬＰＬＮＴＤＡＹＬ
ＳＬＱＥＬＱＧＱＤＰＴＨＬＶ

ＩＬ２ＲＢ切断型ーＹ５１０＆Ｙ３９２の例（配列番号１３６）
ＮＣＲＮＴＧＰＷＬＫＫＶＬＫＣＮＴＰＤＰＳＫＦＦＳＱＬＳＳＥＨＧＧＤＶＱＫＷＬＳ
ＳＰＦＰＳＳＳＦＳＰＧＧＬＡＰＥＩＳＰＬＥＶＬＥＲＤＫＶＴＱＬＬＤＡＹＣＴＦＰＳ
ＲＤＤＬＬＬＦＳＰＳＬＬＧＧＰＳＰＰＳＴＡＰＧＧＳＧＡＧＥＥＲＭＰＰＳＬＱＥＲＶ
ＰＲＤＷＤＰＱＰＬＧＰＰＴＰＧＶＰＤＬＶＤＦＱＰＰＰＥＬＶＬＲＥＡＧＥＥＶＰＤＡ
ＧＰＲＥＧＶＳＦＰＷＳＲＰＰＧＱＧＥＦＲＡＬＮＡＲＬＰＬＮＴＤＡＹＬＳＬＱＥＬＱ
ＧＱＤＰＴＨＬＶ

【０１８７】
前記変異体は、配列番号１３５または配列番号１３６に対する同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％であってもよい。
【０１８８】
Ｊａｋ１／２とＪａｋ３との両方のトランスリン酸化によりＳＴＡＴ５の活性を増加することができ、これにより活性が安定する。好適には、本明細書に記載の前記ＣＡＲエンドドメインは、さらに、ＪＡＫ３結合モチーフを含んでいてもよい。．本明細書における「ＪＡＫ３結合モチーフ」とは、チロシンキナーゼＪＡＫ３をもたらすＢＯＸモチーフのことである。好適なＪＡＫ３結合モチーフは、たとえば、Ｆｅｒｒａｏ＆Ｌｕｐａｒｄｕｓ（Frontiers in Endocrinology; 2017; 8(71)；この参照により本明細書に援用される）により記載されている。
【０１８９】
タンパク質－タンパク質相互作用を判定するための当該技術分野において周知の方法を用いて、モチーフがＪＡＫ３と結合できるかどうか判定してもよい。たとえば、共免疫沈降の後にウエスタンブロットを行ってもよい。
【０１９０】
ＪＡＫ３結合モチーフは、膜貫通タンパク質の細胞質ドメイン内に内在的に発生してもよい。たとえば、前記ＪＡＫ３結合モチーフは、ＩＬ－２Ｒγポリペプチド由来であってもよい。
【０１９１】
ＪＡＫ３結合モチーフは、ＪＡＫ３と結合できる、配列番号１３７または１３８として示されたアミノ酸モチーフまたはその変異体を含んでもよい。
ＪＡＫ３結合モチーフ１（配列番号１３７）
ＥＲＴＭＰＲＩＰＴＬＫＮＬＥＤＬＶＴＥＹＨＧＮＦＳＡＷＳＧＶＳＫＧＬＡＥＳＬＱＰＤＹＳＥＲＬＣＬＶＳＥＩ
ＪＡＫ３結合モチーフ２（配列番号１３８）
ＥＲＴＭＰＲＩＰＴＬＫＮＬＥＤＬＶＴＥＹＨＧＮＦＳＡＷＳＧＶＳＫＧＬＡＥＳＬＱＰＤＹＳＥＲＬＣＬＶＳＥＩＰＰＫＧＧＡＬＧＥＧＰＧＡＳＰＣＮＱＨＳＰＹＷＡＰＰＣＹＴＬＫＰＥＴ
【０１９２】
前記変異体は、配列番号１３７または１３８に対する同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％であってもよい。
いくつかの実施形態において、前記ＣＡＲは、ＳＴＡＴ５関連モチーフ、ＪＡＫ１および／またはＪＡＫ２結合モチーフ、およびＪＡＫ３結合モチーフを含むエンドドメインを含む。
【０１９３】
好ましい実施形態において、前記ＣＡＲエンドドメインは、１個以上のＪＡＫ１結合ドメインと、少なくとも１個のＪＡＫ３結合ドメインとを含む。好適には、前記ＣＡＲエンドドメインは、配列番号１３９、または、配列番号１３９に対する同一性が少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、または９９％である変異体を含んでいてもよい。
配列番号１３９（ＣＤ２８、ＩＬ２ＲＧ－Ｔ５２、ＩＬ２ＲＢ－Ｙ５１０、ＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメインを含むエンドドメイン配列の例）
ＲＳＫＲＳＲＬＬＨＳＤＹＭＮＭＴＰＲＲＰＧＰＴＲＫＨＹＱＰＹＡＰＰＲＤＦＡＡＹＲＳＥＲＴＭＰＲＩＰＴＬＫＮＬＥＤＬＶＴＥＹＨＧＮＦＳＡＷＳＧＶＳＫＧＬＡＥＳＬＱＰＤＹＳＥＲＬＣＬＶＳＥＩＮＣＲＮＴＧＰＷＬＫＫＶＬＫＣＮＴＰＤＰＳＫＦＦＳＱＬＳＳＥＨＧＧＤＶＱＫＷＬＳＳＰＦＰＳＳＳＦＳＰＧＧＬＡＰＥＩＳＰＬＥＶＬＥＲＤＫＶＴＱＬＬＰＬＮＴＤＡＹＬＳＬＱＥＬＱＧＱＤＰＴＨＬＶＲＶＫＦＳＲＳＡＤＡＰＡＹＱＱＧＱＮＱＬＹＮＥＬＮＬＧＲＲＥＥＹＤＶＬＤＫＲＲＧＲＤＰＥＭＧＧＫＰＲＲＫＮＰＱＥＧＬＹＮＥＬＱＫＤＫＭＡＥＡＹＳＥＩＧＭＫＧＥＲＲＲＧＫＧＨＤＧＬＹＱＧＬ

ＳＴＡＴＫＤＴＹＤＡＬＨＭＱＡＬＰＰＲ

【０１９４】

好適には、前記ＣＡＲエンドドメインは、配列番号１４０、または、配列番号１４０に対する同一性が少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、または９９％である変異体を含んでいてもよい。

配列番号１４０（ＣＤ２８、ＩＬ２ＲＧ－Ｔ５２、ＩＬ７ＲＡ－２Ｙ、およびＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメインを含むエンドドメイン配列の例）

ＲＳＫＲＳＲＬＬＨＳＤＹＭＮＭＴＰＲＲＰＧＰＴＲＫＨＹＱＰＹＡＰＰＲＤＦＡＡＹＲ
ＳＥＲＴＭＰＲＩＰＴＬＫＮＬＥＤＬＶＴＥＹＨＧＮＦＳＡＷＳＧＶＳＫＧＬＡＥＳＬＱ
ＰＤＹＳＥＲＬＣＬＶＳＥＩＫＫＲＩＫＰＩＶＷＰＳＬＰＤＨＫＫＴＬＥＨＬＣＫＫＰＲ
ＫＮＬＮＶＳＦＮＰＥＳＦＬＤＣＱＩＨＲＶＤＤＩＱＡＲＤＥＶＥＧＦＬＱＤＴＦＰＱＱ
ＰＩＬＴＳＬＧＳＮＱＥＥＡＹＶＴＭＳＳＦＹＱＮＱＲＶＫＦＳＲＳＡＤＡＰＡＹＱＱＧ
ＱＮＱＬＹＮＥＬＮＬＧＲＲＥＥＹＤＶＬＤＫＲＲＧＲＤＰＥＭＧＧＫＰＲＲＫＮＰＱＥ
ＧＬＹＮＥＬＱＫＤＫＭＡＥＡＹＳＥＩＧＭＫＧＥＲＲＲＧＫＧＨＤＧＬＹＱＧＬＳＴＡ
ＴＫＤＴＹＤＡＬＨＭＱＡＬＰＰＲＧＳＧＡＴＮＦＳＬＬＫＱＡＧＤＶＥＥＮＰＧ

【０１９５】

その他のドメイン

いくつかの実施形態において、前記ＣＡＲは、１個以上のシグナルペプチドを含む。ＣＡＲは、細胞表面での発現のための小胞体経路に対してＣＡＲを向かわせるリーダー配列を含んでいてもよい。リーダー配列の例としては、ＣＤ８リーダー（配列番号１４１）がある。

ＣＤ８リーダー（配列番号１４１）

ＭＡＬＰＶＴＡＬＬＬＰＬＡＬＬＬＨＡＡＲＰ

【０１９６】

いくつかの実施形態において、前記ＣＡＲは１個以上のレポータードメインを含み、場合によっては自己切断（self-cleaving）ドメインまたは切断（cleavage）ドメインと組み合わせて含む。

【０１９７】

好適なレポータードメインは、当該技術分野において周知であり、ＧＦＰなどの蛍光蛋白質を含むが、これらに限定されるわけではない。レポータードメインを使用することにより、本発明のポリヌクレオチドまたはベクターが（コードされているＣＡＲが発現するように）導入されているＴｒｅｇを、たとえばフローサイトメトリーなどの一般的な方法を使用して開始細胞集団から選択し単離できるので、選択可能マーカーの使用が有利である。

【０１９８】

好適には、前記レポータードメインは、たとえばＧＦＰ、ＹＦＰ、ＲＦＰ、ｔｄＴｏｍａｔｏ、ｄｓＲｅｄ、またはこれらの変異体などの蛍光蛋白質であってもよい。いくつかの実施形態において、前記蛍光蛋白質はＧＦＰ、またはＧＦＰ変異体である。好適には、前記ＧＦＰ変異体は配列番号１４２として示されるアミノ酸配列、または配列番号１４２に対する同一性が少なくとも８０％である変異体を含んでいてもよい。

ｅＧＦＰの例（配列番号１４２）

ＭＶＳＫＧＥＥＬＦＴＧＶＶＰＩＬＶＥＬＤＧＤＶＮＧＨＫＦＳＶＳＧＥＧＥＧＤＡＴＹ
ＧＫＬＴＬＫＦＩＣＴＴＧＫＬＰＶＰＷＰＴＬＶＴＴＬＴＹＧＶＱＣＦＳＲＹＰＤＨＭＫ
ＱＨＤＦＦＫＳＡＭＰＥＧＹＶＱＥＲＴＩＦＦＫＤＤＧＮＹＫＴＲＡＥＶＫＦＥＧＤＴＬ
ＶＮＲＩＥＬＫＧＩＤＦＫＥＤＧＮＩＬＧＨＫＬＥＹＮＹＮＳＨＮＶＹＩＭＡＤＫＱＫＮ
ＧＩＫＶＮＦＫＩＲＨＮＩＥＤＧＳＶＱＬＡＤＨＹＱＱＮＴＰＩＧＤＧＰＶＬＬＰＤＮＨ
ＹＬＳＴＱＳＫＬＳＫＤＰＮＥＫＲＤＨＭＶＬＬＥＦＶＴＡＡＧＩＴＬＧＭＤＥＬＹＫ

【０１９９】

好適には、前記変異体は配列番号１４２に対する同一性が少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、または９９％であってもよい。

【０２００】
好適には、前記レポータードメインは、ルシフェラーゼ系レポーター、ＰＥＴレポーター（たとえば、ヨウ化ナトリウム共輸送体（ＮＩＳ）、または膜タンパク質（たとえば、ＣＤ３４、低親和性神経成長因子受容体（ＬＮＧＦＲ））であってもよい。
【０２０１】
前記ＣＡＲをコードする核酸配列とレポータードメインとは、共発現部位によって分離されてもよく、それにより各ポリペプチドが個々の実体として発現することが可能になる。好適な共発現部位は当該技術分野で周知であり、たとえば、配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）や自己切断ペプチドがある。
【０２０２】
したがって、前記ＣＡＲは、さらに自己切断ドメインまたは切断ドメインを含んでいてもよい。かかる配列は、タンパク質作成中に自己切断するか、または細胞中に存在する一般的な酵素により切断されてもよい。したがって、ポリペプチド配列中にかかる自己切断ドメインまたは切断ドメインを含むことにより、第一および第二のポリペプチドが単一のポリペプチドとして発現されるようにでき、前記単一のポリペプチドがその後切断されて、個々の機能的なポリペプチドになる。好適な自己切断ドメインまたは切断ドメインには、Ｐ２Ａペプチド、Ｔ２Ａペプチド、Ｅ２Ａペプチド、Ｆ２Ａペプチド、およびフューリン部位（配列番号１４３～１４８）があるが、それらに限定されるわけではない。
Ｐ２Ａペプチド－切断ドメイン：ＧＳＧＡＴＮＦＳＬＬＫＱＡＧＤＶＥＥＮＰＧＰ（配列番号１４３）
Ｔ２Ａペプチド－切断ドメイン：ＧＳＧＥＧＲＧＳＬＬＴＣＧＤＶＥＥＮＰＧＰ（配列番号１４４）
Ｅ２Ａペプチド－切断ドメイン：ＧＳＧＱＣＴＮＹＡＬＬＫＬＡＧＤＶＥＳＮＰＧＰ（配列番号１４５）
Ｆ２Ａペプチド－切断ドメイン：ＧＳＧＶＫＱＴＬＮＦＤＬＬＫＬＡＧＤＶＥＳＮＰＧＰ（配列番号１４６）
フューリン部位－切断ドメインＲＸＸＲ（配列番号１４７）（優先的には、ＲＲＫＲ（配列番号１４８））
【０２０３】
ＣＡＲの例
本発明に使用するためのＣＡＲの例を以下に示す。ＣＡＲは、配列番号１４９～１５２または１６７～１６９の一つ以上に対する同一性が少なくとも７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、９９％、または１００％である配列を有していてもよい。好ましくは、かかる変異体のいずれも、配列番号１４９～１５２または１６７～１６９と比較して、少なくとも部分的な機能を有する。たとえば、前記変異体は、配列番号１４９～１５２または１６７～１６９の一つとして示されるアミノ酸配列の機能の、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、または少なくとも９０％を有していてもよい。前記変異体または誘導体は、配列番号１４９～１５２または１６７～１６９の一つのレベルに類似または同一のレベルの機能を有していてもよく、または、配列番号１４９～１５２または１６７～１６９の一つとして示されるアミノ酸配列よりも高いレベル（たとえば、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、または少なくとも５０％高くなったレベル）の機能を有していてもよい。
配列番号１４９－ＣＡＲ１の例　ＣＤ８リーダー、ＡＳＧＲ１　ＶＨ、ＣＤ８αヒンジ、ＣＤ２８膜貫通、ＣＤ２８細胞質、およびＣＤ３ｚ細胞質を含むＣＡＲ
ＭＡＬＰＶＴＡＬＬＬＰＬＡＬＬＬＨＡＡＲＰＥＶＱＬＬＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＴＦＥＫＹＡＭＡＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶＳＲＩＳＡＲＧＶＴＴＹＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＬＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＫＨＫＲＨＥＨＴＲＦＤＳＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳＴＴＴＰＡＰＲＰＰＴＰＡＰＴＩＡＳＱＰＬＳＬＲＰＥＡＣＲＰＡＡＧＧＡＶＨＴＲＧＬＤＦＡＣＤＦＷＶＬＶＶＶＧＧＶＬＡＣＹ

SLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHY
QPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL
GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK
MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM
QALPPR

配列番号１５０－ＣＡＲ２の例　ＣＤ８リーダー、ＡＳＧＲ１　ＶＨ、ｃ－Ｍｙｃタグ付きのＣＤ２８ヒンジ、ＣＤ２８膜貫通、ＣＤ２８細胞質、およびＣＤ３ｚ細胞質を含むＣＡＲ

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLLESGGGLVQPGGSLR
LSCAASGFTFEKYAMAWVRQAPGKGLEWVSRISARGVTTY
YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKH
KRHEHTRFDSWGQGTLVTVSSAAAIEVEQKLISEEDLLDN
EKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLAC
YSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKH
YQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN
LGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKD
KMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALH
MQALPPR

配列番号１５１－ＣＡＲ３の例　ＣＤ８リーダー、ＡＳＧＲ１　ＶＨ、ＣＤ８αヒンジ、ＣＤ２８膜貫通、ＣＤ２８細胞質、ＣＤ３ｚ細胞質、ＦＰ２Ａドメイン、およびＧＦＰを含むＣＡＲ

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLLESGGGLVQPGGSLR
LSCAASGFTFEKYAMAWVRQAPGKGLEWVSRISARGVTTY
YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKH
KRHEHTRFDSWGQGTLVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQP
LSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDFWVLVVVGGVLACY
SLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHY
QPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL
GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK
MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM
QALPPRRRKRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPTRGGGATM
VSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYG
KLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVQCFSRYPDHMKQ
HDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLV
NRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNG
IKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHY
LSTQSKLSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYK

配列番号１５２－ＣＡＲ４の例　ＣＤ８リーダー、ＡＳＧＲ１　ＶＨ、ＣＤ８αヒンジ、ＣＤ２８膜貫通、ＣＤ２８細胞質、ＣＤ３ｚ細胞質、ＦＰ２Ａドメイン、およびＧＦＰを含むＣＡＲ

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLLESGGGLVQPGGSLR
LSCAASGFTFEKYAMAWVRQAPGKGLEWVSRISARGVTTY
YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKH
KRHEHTRFDSWGQGTLVTVSSAAAIEVEQKLISEEDLLDN
EKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLAC
YSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKH
YQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN
LGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKD
KMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALH
MQALPPRRRKRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPTRGGGAT

MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY
GKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVQCFSRYPDHMK
QHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTL
VNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKN
GIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNH
YLSTQSKLSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYK

配列番号１６７－ＣＡＲ５の例　ＣＤ８リーダー、ＡＳＧＲ１　ＶＨ（ＶＨ１、配列番号７４）、リンカー、ＡＳＧＲ１　ＶＬ（ＶＫ１、配列番号７８）、ｃ－Ｍｙｃタグ付きのＣＤ２８ヒンジ、ＣＤ２８膜貫通、ＣＤ２８細胞質、およびＣＤ３ｚ細胞質を含むＣＡＲ

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLLESGGGLVQPGGSLR
LSCAASGFTFEKYAMAWVRQAPGKGLEWVSRISARGVTTY
YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKH
KRHEHTRFDSWGQGTLVTVSS<u>LVTVSSGGGGSGGGGSGGGG
SG</u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAIGRWLLWYQQ
KPGKAPKLLIGPGSRLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL
QPEDFVTYYCQQAYAWPPTFGQGTKVEIKRAAAIEVEQKL
ISEEDLLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVL
VVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTP
RRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQG
QNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE
GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTA
TKDTYDALHMQALPPR

配列番号１６８－ＣＡＲ６の例　ＣＤ８リーダー、ＡＳＧＲ１　ＶＨ（ＶＨ２、配列番号７５）、リンカー、ＡＳＧＲ１　ＶＬ（ＶＫ２、配列番号７９）、ｃ－Ｍｙｃタグ付きのＣＤ２８ヒンジ、ＣＤ２８膜貫通、ＣＤ２８細胞質、およびＣＤ３ｚ細胞質を含むＣＡＲ

MALPVTALLLPLALLLHAARPELQLLEFGGGLVQPGGSLR
LSCTTSGFTFSRYTMGWVRQAPGKGLEWVSAIGPPGSNTY
YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKW
VMLRGRFDYWGQGTLVTVSS<u>LVTVSSGGGGSGGGGSGGGG
S</u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAIGRWLLWYQQK
PGKAPKHLIGPGSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYYCQQAYQLPVTFGQGTKVEIKRAAAIEVEQKLI
SEEDLLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLV
VVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPR
RPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQ
NQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTAT
KDTYDALHMQALPPR

配列番号１６９－ＣＡＲ７の例　ＣＤ８リーダー、ＡＳＧＲ１　ＶＨ（ＶＨ３、配列番号７６）、リンカー、ＡＳＧＲ１　ＶＬ（ＶＫ３、配列番号８０）、ｃ－Ｍｙｃタグ付きのＣＤ２８ヒンジ、ＣＤ２８膜貫通、ＣＤ２８細胞質、およびＣＤ３ｚ細胞質を含むＣＡＲ

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLLESGGGLVQPGGSLR
LSCAASGFTFEDYGMGWVRQAPGKGLEWVSAIGRNGSQTY
YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKL
RRGRGLNTFTLDYWGQGTLVTVSS<u>LVTVSSGGGGSGGGGS
GGGGS</u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAIGRWLLW
YQQKPGKAPKLLIGPGSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
GSLQPEDFATYYCQQAYSLPPTFGQGTKVEIKRAAAIEVE
QKLISEEDLLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPF
WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMN

ＭＴＰＲＲＰＧＰＴＲＫＨＹＱＰＹＡＰＰＲＤＦＡＡＹＲＳＲＶＫＦＳＲＳＡＤＡＰＡＹＱＱＧＱＮＱＬＹＮＥＬＮＬＧＲＲＥＥＹＤＶＬＤＫＲＲＧＲＤＰＥＭＧＧＫＰＲＲＫＮＰＱＥＧＬＹＮＥＬＱＫＤＫＭＡＥＡＹＳＥＩＧＭＫＧＥＲＲＲＧＫＧＨＤＧＬＹＱＧＬＳＴＡＴＫＤＴＹＤＡＬＨＭＱＡＬＰＰＲ

【０２０４】

変異体、誘導体、および断片

本明細書で言及されている特異的なタンパク質、ペプチド、およびヌクレオチドに加えて、その誘導体、変異体、および断片の使用も本発明に包含される。本発明のタンパク質またはポリペプチドに関連した、本明細書における「誘導体」という用語は、前記配列からの、または前記配列への、１個（またはそれ以上）のアミノ酸残基の置換、変異、修飾、代替、欠失、および／または付加によって、得られたタンパク質またはポリペプチドは所望の機能を保持するのであれば、かかるアミノ酸残基の１個（またはそれ以上）の置換、変異、修飾、代替、欠失、および／または付加を含む（前記所望の機能は、たとえば、前記誘導体または変異体が抗原結合ドメインの場合、抗原結合ドメインの標的抗原と結合する能力であってもよく、または前記誘導体または変異体がシグナル伝達ドメインの場合、前記所望の機能は前記ドメインが信号を発する（たとえば、下流の分子を活性化または不活性化する）能力であってもよい）。前記変異体または誘導体は、対応する参照配列と比較して、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、または少なくとも９０％の機能；対応する参照配列と比較して、近いレベル、または同じレベルの機能；または対応する参照配列よりも高いレベルの機能、たとえば、未改変の配列と比較して、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、または少なくとも５０％高くなった機能を有していてもよい。

【０２０５】

典型的には、アミノ酸置換は、それにより改変された配列が求められる活性または能力を保持するなら、たとえば１個、２個または３個から１０個または２０個の置換からなっていてもよい。たとえば、対応する参照配列と比較して、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、または少なくとも９０％の活性を保持するなら、または対応する参照配列と比較して、近いレベル、または同じレベルの活性を保持するなら、または対応する参照配列よりも高いレベルの活性、たとえば、未改変の配列と比較して、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、または少なくとも５０％高くなった活性を保持するなら、上記置換からなっていてもよい。アミノ酸置換では、天然由来ではない類似体の使用を含んでいてもよい。

【０２０６】

本発明で使用されるタンパク質またはペプチドもまた、アミノ酸残基の欠失、挿入、または置換を有してもよく、それによりサイレントな変化を生じ、機能的に同等のタンパク質となってもよい。内在的な機能が保持される限り、前記残基の極性、電荷、溶解性、疎水性、親水性、および／または、両親媒性における類似に基づいて、意図的なアミノ酸置換を行ってもよい。たとえば、負帯電アミノ酸としては、アスパラギン酸およびグルタミン酸などがあり、正帯電アミノ酸としては、リジンおよびアルギニンがあり、類似の親水性値をもつ非荷電の極性先端基を有するアミノ酸としては、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、およびチロシンがある。

【０２０７】

たとえば下記表にしたがい、保存的置換を行ってもよい。第二欄の同じブロックにあるアミノ酸、好ましくは第三欄の同じ列にあるアミノ酸は、互いに置換できうる。

【表５】

脂肪族	無極性	Ｇ Ａ Ｐ
		Ｉ Ｌ Ｖ
	極性－非荷電	Ｃ Ｓ Ｔ Ｍ
		Ｎ Ｑ
	極性－荷電	Ｄ Ｅ
		Ｋ Ｒ Ｈ
芳香族		Ｆ Ｗ Ｙ

【０２０８】
前記誘導体は、相同体または変異体でもよい。本明細書における「相同体」または「変異体」という用語は、野生型アミノ酸配列および野生型ヌクレオチド配列と、特定の相同性を有した実体を意味する。「相同性」という用語は、「同一性」と同等視することができる。
【０２０９】
相同配列または変異型配列は、前記対象配列に対する同一性が少なくとも５０％、５５％、６５％、７５％、８５％、または９０％、好適には少なくとも９５％、９７％、または９９％であってもよいアミノ酸配列またはヌクレオチド配列を含んでもよい。典型的には、前記相同体は、たとえば、対象のアミノ酸配列、または対象のヌクレオチド配列によってコードされているアミノ酸配列と同じ結合部位などを含むなど、類似の化学的特性／機能を有するだろう。相同性は、類似（すなわち、類似の化学的特性／機能を有するアミノ酸残基）の観点から考えることもできるが、本発明の文脈においては、配列同一性の観点から相同性を表すことが好ましい。
【０２１０】
相同性の比較は、目視で、またはより一般には、容易に入手可能な配列比較プログラムを用いて実施することができる。これら市販のコンピュータプログラムは、二つ以上の配列間の百分率相同性または同一性の比率を算出できる。百分率相同性は、連続配列に対して算出してもよい。すなわち、一方の配列を他方の配列と整列させ、一方の配列中の各アミノ酸を他方の配列中の対応するアミノ酸と一残基ずつ直接比較する。これは、「非ギャップ（ungapped）」アライメントと呼ばれる。通常、そのような非ギャップアライメントは、比較的短い数の残基にわたってのみ行われる。
【０２１１】
これは非常に単純で一貫した方法であるが、たとえば、１個の挿入または欠失を除いては同一の配列対において、該ヌクレオチド配列中のその挿入または欠失が、その後に続くコドンがアライメントから外されうる、すなわちグローバルアライメントが行われた場合に％相同性の大幅な減少を潜在的に生じるということが考慮されていない。その結果、ほとんどの配列比較方法は、全体的な相同性スコアを過度に不利にすることなく、考えられる挿入および欠失を考慮に入れた最適アライメントを作成するように設計される。これは、配列アライメントに「ギャップ」を挿入して局所相同性を最大にすることによって達成される。
【０２１２】
しかしながら、これらのより複雑な方法は、アライメント中に生じる各ギャップに「ギャップペナルティ」を割り当て、同じ数の同一アミノ酸について、できるだけ少ないギャップの配列アライメント（２つの比較した配列間の類似性が高いことを反映する）が、多くのギャップを持つスコアよりも高いスコアを達成するようにする。ギャップの存在に対して比較的高いコストを課し、ギャップ内のそれぞれ後続の残基に対してより小さいペナルティを課す「アフィンギャップコスト」が通常使用される。これは、最も一般的に使用されるギャップスコアリングシステムである。高いギャップペナルティは、当然ながら、

ギャップのより少ない最適化アライメントを作成する。ほとんどのアライメントプログラムは、ギャップペナルティを改変することを可能にする。しかしながら、そのようなソフトウェアを配列比較に使用する際は、デフォルト値を使用することが好ましい。たとえば、ＧＣＧ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｂｅｓｔｆｉｔパッケージを使用する際、アミノ酸配列のデフォルトのギャップペナルティは、ギャップについては－１２、それぞれの延長については－４である。

【０２１３】

最大百分率相同性の算出は、したがって、ギャップペナルティを考慮に入れ、最適アライメントの作成を最初に必要とする。そのようなアライメントを実行するのに好適なコンピュータプログラムは、ＧＣＧ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｂｅｓｔｆｉｔパッケージ（University of Wisconsin, U.S.A.; Devereux et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12: 387）である。配列比較を行うことができる他のソフトウェアの例には、ＢＬＡＳＴパッケージ（Ausubel et al. (1999) ibid - Ch. 18を参照）、ＦＡＳＴＡ（Atschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 403-410）およびＧＥＮＥＷＯＲＫＳ比較ツール一式が挙げられるが、これらに限定されるわけではない。ＢＬＡＳＴおよびＦＡＳＴＡの両方が、オフラインおよびオンライン検索に利用可能である（Ausubel et al. (1999) ibid, pages 7-58 to 7-60を参照）。しかしながら、いくつかのアプリケーションについては、ＧＣＧ Ｂｅｓｔｆｉｔプログラムを使用することが好ましい。ＢＬＡＳＴ２ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓと呼ばれる別のツールも、タンパク質およびヌクレオチド配列を比較するために利用可能である（FEMS Microbiol. Lett. (1999)174:247-50; FEMS Microbiol. Lett. (1999)177:187-8参照）。

【０２１４】

最終的な百分率相同性は同一性の観点から測定することができるが、アライメントプロセス自体は、典型的には、オールオアナッシング対比較に基づくものではない。その代わりに、化学的類似性または進化距離に基づいて対ごとの比較にスコアを割り当てるスケール化類似性スコアマトリクスが一般的に使用される。一般に使用されるそのようなマトリクスの一例は、ＢＬＯＳＵＭ６２マトリクス（一連のＢＬＡＳＴプログラムのデフォルトマトリクス）である。ＧＣＧ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎプログラムでは、一般的には、パブリックデフォルト値または供給されるのであればカスタムシンボル比較表のいずれかが使用される（さらに詳しくはユーザーマニュアルを参照されたい）。しかしながら、いくつかのアプリケーションについては、ＧＣＧパッケージではデフォルト値を使用することが好ましく、他のソフトウェアの場合は、ＢＬＯＳＵＭ６２のようなデフォルトマトリクスを使用することが好ましい。好適には、百分率同一性は、参照配列および／または問い合わせ配列の全体にわたって判断される。

【０２１５】

ソフトウェアが最適アライメントを作成すると、百分率相同性、好ましくは百分率配列同一性を算出することが可能である。ソフトウェアは、典型的にはこれを配列比較の一部として行い、数値結果を与える。

【０２１６】

「断片」は、典型的には、機能の点で、着目のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの選択された領域のことである。したがって、「断片」は、全長ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの一部であるアミノ酸または核酸の配列のことである。

【０２１７】

そのような誘導体、変異体、および断片は部位特異的変異誘発などの標準的な組換えＤＮＡ技術を使用して調製されてもよい。挿入が作製される場合には、挿入位置のどちらか一方の側で天然由来の配列に対応する５’および３’隣接領域とともに挿入部分をコードする合成ＤＮＡが作製されてもよい。前記隣接領域は、前記配列が適切な酵素（または複数の酵素）で切断され合成ＤＮＡが切断場所に連結（ligated）され得るように、天然由来の配列における部位に対応する適当な制限酵素部位を含む。前記ＤＮＡは次に、コードされるタンパク質を作製するために本発明に従って発現される。これらの方法はＤＮＡ配

列操作のための当該技術分野において周知の多数の標準的手法の実例となるだけであり、他の公知の手法もまた使用されてもよい。

【０２１８】

医薬組成物

本発明の改変されたＴｒｅｇまたはＣＡＲを含む医薬組成物もまた提供される。医薬組成物は、治療上有効量の医薬的に活性な薬剤、すなわち前記Ｔｒｅｇを含む、またはそれから成る、組成物である。好ましくは、医薬組成物は薬学的に許容可能な担体、希釈剤、または賦形剤（それらの組み合わせを含む）を含む。「薬学的に許容可能」とは、製剤が滅菌済であり、発熱物質を含まないという意味を含む。担体、希釈剤および／または賦形剤は、Ｔｒｅｇと親和性があり、レシピエントに対して有害ではないという意味において、「許容可能」でなければならない。典型的には、担体、希釈剤および／または賦形剤は、滅菌済であり、発熱物質を含まない生理的媒体または輸液媒体であるが、他の許容可能な担体、希釈剤、賦形剤を用いてもよい。

【０２１９】

治療目的の使用のために許容可能な担体、希釈剤、および賦形剤は、薬学的技術分野で周知である。薬学的担体、賦形剤、または希釈剤の選択は、意図する投与経路と標準的な薬務とを考慮して選択できる。前記医薬組成物は、担体、賦形剤、または希釈剤として、またはそれらに加えて、適した結合剤、滑剤、懸濁化剤、コーティング剤、または可溶化剤を含んでいてもよい。

【０２２０】

薬学的に許容可能な担体の例としては、たとえば、水、塩類溶液、アルコール、シリコーン、蝋、ワセリン、植物油、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、リポソーム、糖、ゼラチン、ラクトース、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、界面活性剤、珪酸、粘性パラフィン、香油、脂肪酸モノグリセリド、脂肪酸ジグリセリド、ペトロエスラル脂肪酸エステル、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどがある。

【０２２１】

本発明に係るＴｒｅｇまたは医薬組成物は、本明細書に記載の疾患を治療および／または予防するのに適した様式で投与されてもよい。投与量および投与頻度は、対象の状態ならびに対象の疾患の種類および重症度などの要因によって決定されるが、適切な投与量は、臨床治験によって決定されてもよい。前記医薬組成物は、適切に処方されればよい。本明細書に記載のＴｒｅｇまたは医薬組成物は、非経口投与、たとえば静脈内投与でき、または輸液技術により投与してもよい。前記Ｔｒｅｇまたは医薬組成物は、血液と等張にするために、たとえば十分な塩類やグルコースなど、他の物質を含んだ滅菌済水溶液の形態で投与してもよい。前記水溶液は、好適に緩衝してもよい（好ましくはｐＨ３～９）。前記医薬組成物は、適切に処方されればよい。滅菌条件のもとでの好適な非経口製剤の調製は、当業者に周知の標準的な薬学的技術によって容易に成しえる。

【０２２２】

前記医薬組成物は、輸液媒体、たとえば滅菌済等張溶液中に本発明のＴｒｅｇを含んでいてもよい。前記医薬組成物は、ガラスまたはプラスチック製の、アンプル、使い捨て注射器、または複数回投与バイアルに封入してもよい。

【０２２３】

前記Ｔｒｅｇまたは医薬組成物は、単回または複数回で投与されてもよい。特に、前記Ｔｒｅｇまたは医薬組成物は、単回の使い切りで投与されてもよい。前記医薬組成物は、適切に処方されればよい。

【０２２４】

治療する疾患や対象、投与経路によって、前記Ｔｒｅｇまたは医薬組成物が様々な投与量（たとえば、細胞数／ｋｇ、または細胞数／対象、などで測定）で投与されてもよい。いずれにしても、医師が個体対象にとって最も適した実際の投与量を判定するものであり、それはその対象の年齢、体重、および反応に応じて変わるであろう。しかしながら典型

的には、本発明のＴｒｅｇについては、投与量として一人の対象につき５ｘ１０^{7}～３ｘ１０^{9}個の細胞、または１０^{8}～２ｘ１０^{9}個の細胞が投与されてもよい。前記Ｔｒｅｇは、医薬組成物に使用するために適切に変更されてもよい。たとえば、Ｔｒｅｇは、対象に注入される前に、凍結保存されて適切な時間に解凍されてもよい。

【０２２５】

前記医薬組成物はさらに、リンパ球枯渇剤（たとえば、サイモグロブリン、キャンパス－１Ｈ、抗ＣＤ２抗体、抗ＣＤ３抗体、抗ＣＤ２０抗体、シクロホスファミド、フルダラビン）、ｍＴＯＲ阻害剤（たとえば、シロリムス、エベロリムス）、共刺激経路を阻害する薬剤（たとえば、抗ＣＤ４０／ＣＤ４０Ｌ、ＣＴＡＬ４Ｉｇ）、および／または特異的なサイトカイン（ＩＬ－６、ＩＬ－１７、ＴＮＦａｌｐｈａ、ＩＬ１８）などの、一つ以上の他の治療薬を含んでいてもよい。

【０２２６】

本発明のＴｒｅｇおよび／または医薬組成物を含むキットの使用も、さらに本発明に含まれる。好ましくは、当該キットは、本明細書に記載の前記方法および使用、たとえば、本明細書に記載の治療方法に用いられるためのものである。好ましくは、当該キットは、キットの構成部分の使用についての指示書を含む。

【０２２７】

疾患の治療および／または予防方法

既存の疾患または病状を持つ対象に、前記疾患に関連する少なくとも一つの症状を少なくしたり、軽くしたり、または改善するために、および／または前記疾患の進行を遅めたり、軽減したり、または止めたりするために、前記改変されたＴｒｅｇを投与してもよい。

【０２２８】

たとえば、黄疸、暗色尿、かゆみ、腹部膨満、圧痛、倦怠、吐き気または嘔吐、および／または食欲不振などの、疾患の症状の少なくとも一つを少なくしたり、軽くしたり、または改善するために、肝疾患（たとえば、肝臓移植拒絶反応、肝臓ＧｖＨＤ、自己免疫性肝疾患、肝臓の炎症、肝不全など）のある対象に改変されたＴｒｅｇを投与してもよい。少なくとも一つの症状を少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、または少なくとも５０％少なくしたり、軽くしたり、または改善してもよく、または、少なくとも一つの症状を完全に癒してもよい。

【０２２９】

肝疾患（たとえば、肝臓移植拒絶反応、肝臓ＧｖＨＤ、自己免疫性肝疾患、肝臓の炎症、肝不全など）のある対象に、前記疾患の進行を遅めたり、軽減したり、または止めたりするために、改変されたＴｒｅｇを投与してもよい。改変されたＴｒｅｇが投与されない対象と比較して、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、または少なくとも５０％疾患の進行を遅めたり、軽減したり、または止めたりしてもよく、または、前記疾患の進行を完全に止めてもよい。

または、まだ罹患していない、および／または疾患の症状を示していない対象に対して、前記疾患を予防したり、前記疾患に関連する少なくとも一つの症状を軽くしたり、または予防したりするために、前記改変されたＴｒｅｇを投与してもよい。対象は、前記疾患にかかりやすい体質であったり、または、前記疾患を発症する危険性を教示されているかもしれない。

【０２３０】

たとえば、黄疸、暗色尿、かゆみ、腹部膨満、圧痛、倦怠、吐き気または嘔吐、および／または食欲不振などの、肝疾患の症状の少なくとも一つを軽くしたり、または予防するために、肝疾患（たとえば、肝臓移植拒絶反応、肝臓ＧｖＨＤ、自己免疫性肝疾患、肝臓の炎症、肝不全など）にまだかかっていない、またはその症状を示していない対象に、改変されたＴｒｅｇを投与してもよい。改変されたＴｒｅｇを投与していない対象と比較して、前記少なくとも一つの症状を少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、または少なくとも５０％軽くしてもよく、または、少なくとも一

つの症状を完全に予防してもよい。

【０２３１】

肝疾患（たとえば、肝臓移植拒絶反応、肝臓ＧｖＨＤ、自己免疫性肝疾患、肝臓の炎症、肝不全など）を予防するために、前記肝疾患にまだかかっていない、および／またはその症状を示していない対象に、改変されたＴｒｅｇを投与してもよい。改変されたＴｒｅｇを投与していない対象と比較して、肝疾患を少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、または少なくとも５０％減じてもよく、または、肝疾患を完全に予防してもよい。

【０２３２】

肝疾患は、肝臓移植拒絶反応、肝臓ＧｖＨＤ、自己免疫性肝疾患、肝臓の炎症、肝不全などの病状を含み、特に、肝臓の損傷や破壊をもたらしうる、対象の中での免疫応答の望ましくない増加に関連した、肝疾患を含む。特定の実施形態において、肝疾患は、たとえば肝癌を含まなくてもよく、さらに特に、肝細胞癌（ＨＣＣ）を含まなくてもよい。このように好ましくは、肝疾患は、特に肝臓内部または近くにおいての免疫応答の減少により（たとえば、少なくとも１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、または９０％の減少により）治療または予防されてもよい病状を含む。好適には、本発明の治療方法は、本発明に係る、または本発明に係る方法により獲得可能な（たとえば、獲得された）、改変されたＴｒｅｇ、または本明細書において定義された（たとえば、本明細書に記載の医薬組成物中の）ポリヌクレオチドまたはベクターを、対象に投与する工程を含んでいてもよい。

【０２３３】

好適には、疾患の治療および／または予防のための当該方法は、本発明に係る改変されたＴｒｅｇ（たとえば、本明細書に記載の医薬組成物中の）を、対象に投与する工程を含んでいてもよい。

【０２３４】

上記方法は、下記の工程を包含していてもよい。

（ｉ）細胞含有サンプルを単離する、または細胞含有サンプルを提供する工程；

（ｉｉ）本明細書において定義されたポリヌクレオチドまたはベクターを前記細胞に導入する工程；および

（ｉｉｉ）対象に、（ｉｉ）からの前記細胞を投与する工程。

【０２３５】

好適には、前記細胞は、本明細書において定義されたＴｒｅｇである。

【０２３６】

好適には、前記方法の工程（ｉｉ）の前に、および／またはその後に、前記細胞含有サンプルから、富化されたＴｒｅｇ集団を単離し、および／または生成してもよい。たとえば、単離および／または生成は、工程（ｉｉ）の前に、および／またはその後に行い、富化されたＴｒｅｇサンプルを単離し、および／または生成してもよい。本発明のＣＡＲ、ポリヌクレオチド、および／またはベクターを含む細胞および／またはＴｒｅｇについて富化を行うために、工程（ｉｉ）の後に富化を行ってもよい。

【０２３７】

好適には、前記ポリヌクレオチドまたはベクターは、形質導入および／または遺伝子導入によって導入してもよい。

【０２３８】

好適には、前記細胞は、自家および／または同種細胞である。

【０２３９】

好適には、改変されたＴｒｅｇは、一つ以上の他の治療薬と組み合わせて投与してもよく、他の治療薬としては、リンパ球枯渇剤（たとえば、サイモグロブリン、ｃａｍｐａｔｈ－１Ｈ、抗ＣＤ２抗体、抗ＣＤ３抗体、抗ＣＤ２０抗体、シクロホスファミド、フルダラビン）、ｍＴＯＲ阻害剤（たとえば、シロリムス、エベロリムス）、共刺激経路を阻害する薬剤（たとえば、抗ＣＤ４０／ＣＤ４０Ｌ、ＣＴＡＬ４Ｉｇ）、および／または特異

的なサイトカイン（ＩＬ－６、ＩＬ－１７、ＴＮＦａｌｐｈａ、ＩＬ１８）などがある。改変されたＴｒｅｇは、前記一つ以上の他の治療薬と同時にもしくは逐次的に（つまり、その前、または後に）投与してもよい。

【０２４０】

肝臓移植

肝臓移植は、末期の肝疾患の患者にとって、現在利用可能な唯一の治療処置の選択肢である。近年の免疫抑制剤の進歩にもかかわらず、急性同種移植拒絶反応は依然として肝臓移植の一般的な合併症であり、その発生率は肝臓移植の２０％～４０％である。ほとんどの場合、肝臓移植後一ケ月以内に拒絶が発生する。初期の拒絶エピソードが、長期的な移植成功や患者アウトカムを大きく悪化させることはない。これに対して、遅発性の同種移植拒絶反応（肝臓移植後３～６ケ月を超える）は、低い移植生存率と関連している（Dogan, N., et al., 2018. Journal of International Medical Research, 46(9), pp.3979-3990）。

【０２４１】

本発明は、本発明の改変されたＴｒｅｇまたは医薬組成物を対象に投与する工程を含む、肝臓移植組織に対する寛容を誘発する方法を提供する。好適には、前記対象は哺乳動物であり、好ましくはヒトである。

【０２４２】

本明細書において、「肝臓移植組織に対する寛容を誘導する」とは、レシピエントに移植された肝臓への寛容を誘導することをいう。換言すれば、肝臓移植組織に対する寛容を誘導するとは、ドナー移植臓器に対するレシピエントの免疫応答のレベルを下げることを意味する。移植された肝臓に対する寛容を誘導することで、拒絶反応の発生率を低下させ、移植を受けた患者が必要とする免疫抑制剤の量を減らし、または、免疫抑制剤の中断を可能にしてもよい。

【０２４３】

本発明はまた、肝臓移植拒絶反応を治療および／または予防する方法を提供し、前記方法は、本発明の改変されたＴｒｅｇまたは医薬組成物を、対象に投与する工程を含む。好適には、前記対象は哺乳動物であり、好ましくはヒトである。好適には、肝臓移植拒絶反応を治療および／または予防するというのは、肝臓移植レシピエントが必要とする免疫抑制剤の量を減らすか、または、免疫抑制剤の中断を可能にすることをいうものであってもよい。

【０２４４】

一実施形態において、対象は免疫抑制治療を受けている肝臓移植レシピエントである。一実施形態において、好ましくは肝臓移植組織に対する寛容を誘導する、または肝臓移植拒絶反応を治療および／または予防することに加えて、本発明は肝臓組織の修復および／または肝臓の再生を促進する。

【０２４５】

移植片対宿主病

本発明は、肝臓移植片対宿主病を治療および／または予防する方法を提供し、前記方法は、本発明の改変されたＴｒｅｇまたは医薬組成物を、対象に投与する工程を含む。対象は肝臓移植レシピエントであればよい。好適には、前記対象は哺乳動物であり、好ましくはヒトである。

【０２４６】

ＧｖＨＤは、遺伝的に異なる人物から組織の移植を受けた後に一般的に起こる合併症である。ＧｖＨＤは、一般的に、骨髄移植に伴って起こるものなど、幹細胞の移植に関連する。ＧｖＨＤはまた、肝臓移植組織など、移植された組織の他の形態に対しても適用される。ドナーから提供された組織（移植組織）の中に残る、ドナーの免疫システムの白血球細胞が、レシピエント（宿主）を異物（非自己）として認識する。そして、移植された組織の中にある白血球細胞が、レシピエントの体の細胞を攻撃し、ＧｖＨＤを起こす。典型的な意味で、急性移植片対宿主病の特徴は、肝臓、皮膚、粘膜、および消化管に対する選

択的な損傷である。したがって、前記対象は肝臓の損傷、すなわち肝臓ＧｖＨＤを有していてもよい。

【０２４７】

いくつかの実施形態において、前記対象は移植レシピエントであり、前記移植は、肝臓、腎臓、心臓、肺臓、膵臓、小腸、胃、骨髄、血管柄付複合組織移植、および皮膚の移植組織から選択される。好ましくは、前記対象は肝臓移植レシピエントである。

【０２４８】

一実施形態において、対象は免疫抑制治療を受けている肝臓移植レシピエントである。一実施形態において、肝臓ＧｖＨＤを治療および／または予防することに加えて、本発明は肝臓組織の修復および／または肝臓の再生を促進する。

【０２４９】

自己免疫性肝疾患本発明は、本発明の改変されたＴｒｅｇまたは医薬組成物を対象に投与する工程を含む、自己免疫性肝疾患を治療および／または予防する方法を提供する。好適には、前記対象は哺乳動物であり、好ましくはヒトである。

【０２５０】

好適には、前記自己免疫性肝疾患は慢性自己免疫性肝疾患である。

【０２５１】

前記自己免疫性肝疾患は、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性胆管炎、および／または（原発性）硬化性胆管炎の一つ以上から選択されてもよい。自己免疫性肝疾患は、重複した特徴を持ちうる慢性的で進行の遅い炎症性肝疾患である（Decock, S., McGee, P. and Hirschfield, G.M., 2009. Bmj, 339, p.b3305）。

【０２５２】

自己免疫性肝炎は、通常、再発性の免疫介在性肝炎である。患者は、臨床的には、症状として関節痛と倦怠を訴え、患者の３分の１には硬変がある。検査でわかる初期の異常の特徴は、肝臓酵素（トランスアミナーゼ）の上昇である（Decock, S., McGee, P. and Hirschfield, G.M., 2009. Bmj, 339, p.b3305）。自己免疫性肝炎はまた、急性の疾患として現れ、これは治療せずにいると肝不全および死に至る。

【０２５３】

原発性胆汁性胆管炎は、進行の遅い慢性の、胆汁うっ滞性の疾患であり、小管肉芽腫性胆管炎（small duct granulomatous cholangitis）および生化学的胆汁うっ滞（アルカリホスファターゼの上昇）という特徴がある。現在、原発性胆汁性胆管炎と診断された患者の６０％が、症状が無く、ほとんどが肝硬変ではない疾患を有している。症状がある場合、倦怠、かゆみ、右上腹部の違和感が一般的であるが、疾患の深刻さは示さない。しかし、症状が無い場合でも、原発性胆汁性胆管炎の患者は、母集団と比較して、長期生存率が有意に低下する（Decock, S., McGee, P. and Hirschfield, G.M., 2009. Bmj, 339, p.b3305）。

【０２５４】

原発性硬化性胆管炎は、肝臓内および／または肝臓外の胆管の線維化炎症性破壊を特徴とする、慢性的な胆汁うっ滞性の肝疾患である。原発性硬化性胆管炎には、今のところ治療法が無い。いったん症状が現れれば、約５０％の確率で移植が必要となり、１０年間にわたって１０％の胆管細胞癌のリスクがある（Decock, S., McGee, P. and Hirschfield, G.M., 2009. Bmj, 339, p.b3305）。

【０２５５】

一実施形態において、本発明は、自己免疫性肝疾患の治療および／または予防に加えて、肝臓組織の修復および／または肝臓の再生を促進する。

【０２５６】

肝臓の炎症

本発明は、本発明の改変されたＴｒｅｇまたは医薬組成物を対象に投与する工程を含む、炎症性肝障害を治療および／または予防する方法を提供する。好適には、前記対象は哺乳動物であり、好ましくはヒトである。

【０２５７】
肝臓組織の炎症はまた、肝炎としても知られている。肝炎は、急性でも慢性でもありうる。急性肝炎は、自然と治ることもありうるが、慢性肝炎となることもあれば、まれに急性肝不全になることもある。時が経つにつれ、慢性の状態が肝臓の瘢痕（硬変）、慢性肝不全、および／または肝癌になりうる。肝硬変の徴候や症状には、黄疸、腹水貯留（腹腔内の体液の蓄積）、倦怠、肝性脳症（肝不全によって起こる脳の機能不全）などがある。
【０２５８】
肝炎の原因は、大きくは、感染、代謝、アルコール、虚血、自己免疫、および遺伝というカテゴリーに分けることができる：。このように、いくつかの実施形態において、肝炎は、感染性肝炎、代謝性肝炎、アルコール性肝炎、虚血性肝炎、自己免疫性肝炎、および遺伝性肝炎から選択される。感染性肝炎には、ウイルス性肝炎、寄生虫性肝炎、および細菌性肝炎がある。ウイルス性肝炎は、ウイルス性感染によって起こる肝臓の炎症である。それは、比較的急な発症を伴う新たな感染としての急性の状態を呈しうるか、または慢性の状態を呈しうる。ウイルス性肝炎のもっともよくある原因は、５つの、互いに関連性の無い、肝臓指向性ウイルス肝炎Ａ、Ｂ、Ｃ、Ｄ、およびＥ型である。サイトメガロウイルス、エプスタイン・バーウイルス、および黄熱病など、他のウイルスも肝臓の炎症を起こしうる。また、単純ヘルペスウイルスがウイルス性肝炎を起こした症例も数十例報告されている。
【０２５９】
寄生虫性肝炎は、寄生虫性感染によって起こる肝臓の炎症である。原生動物のうち、クルーズトリパノソーマ、リーシュマニア属、およびマラリア原虫属はすべて肝臓の炎症の原因となりうる。蠕虫のうち、瓜実条虫は肝臓に感染して、特徴的な肝エキノコックス症を生じさせる。Ｆａｓｃｉｏｌａ ｈｅｐａｔｉｃａやＣｌｏｎｏｒｃｈｉｓ ｓｉｎｅｎｓｉｓなど肝吸虫は、胆管に寄生し、進行した肝炎や肝線維症を起こす。
細菌性肝炎は、細菌性感染によって起こる肝臓の炎症である。急性肝炎は、髄膜炎菌、淋菌、ヘンセラ菌、ライム病ボレリア、サルモネラ属細菌、ブルセラ属細菌、およびカンピロバクター属細菌によって生じる。慢性または肉芽腫性の肝炎は、ミコバクテリア属細菌、トロフェリマ・ホウィップリ、梅毒トレポネーマ、コクシエラ菌、リケッチア属細菌の感染で見られる。
アルコール性肝炎は、アルコールの過剰摂取による肝臓の炎症である。アルコール性肝炎は、肝硬変、肝不全および／または癌に至る可能性のある慢性的な課程を有しうるか、または、急性の症状を示しうる。急性アルコール性肝炎の深刻なケースでは、３カ月死亡率が５０％である。薬品、産業毒、ならびに、薬草および栄養補助食品など、多くの化学的薬剤もまた、中毒性肝炎の原因となりうる。
【０２６０】
ノンアルコール脂肪性肝炎は、代謝性肝炎の最もよくある形態であるが、これは非アルコール性脂肪性肝疾患（ＮＡＦＬＤ）のスペクトル内にある。非アルコール性脂肪性肝疾患は、アルコールをほとんど使用しないかアルコール使用歴が無いが、かわりにメタボリック症候群、肥満、インシュリン抵抗性および糖尿病、ならびに高トリグリセリド血症との関連が大きい人々に生じる。非アルコール性脂肪性肝疾患の結果、非アルコール脂肪性肝炎になりうる。脂肪性肝炎は、脂肪性肝疾患の一種であり、肝臓の脂肪蓄積を伴う肝臓の炎症が特徴であり、硬変、肝不全、および／または肝癌に至る可能性がある。虚血性肝障害またはショック肝としても知られる虚血性肝炎は、肝臓への不十分な血流（とその結果起こる不十分な酸素輸送）によって生じる急性肝損傷として定義される病状である。
肝炎の遺伝的な原因としては、アルファ１アンチトリプシン欠損、ヘモクロマトーシス、およびウィルソン病がある。
【０２６１】
いくつかの実施形態において、肝臓の炎症には、識別可能な原因が無い。
【０２６２】
一実施形態において、本発明は、炎症性肝障害の治療および／または予防に加えて、肝

臓組織の修復および／または肝臓の再生を促進する。

【０２６３】

肝臓の修復または再生

本発明は、本発明の改変されたＴｒｅｇまたは医薬組成物を対象に投与する工程を含む、肝臓組織の修復および／または肝臓の再生を促進する方法を提供する。好適には、前記対象は哺乳動物であり、好ましくはヒトである。前記対象は、肝硬変、急性肝不全、または急性憎悪した慢性肝不全を有していてもよい。

【０２６４】

本明細書において、「肝臓の再生」とは、損傷後に、肝臓の構造および機能を傷を残さずに再現することをいうものであってもよい（Cordero-Espinoza, L. and Huch, M., 2018. The Journal of clinical investigation, 128(1), pp.85-96）。たとえば、肝臓の再生は、元の肝臓の質量の、少なくとも２５％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、または少なくとも１００％を回復する結果となればよい。本発明の方法は、最大限の肝臓の質量が達成されるまでにかかる時間を減少させてもよく、たとえば、改変されたＴｒｅｇまたは医薬組成物が投与されない対象と比較して、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、または少なくとも５０％減少させてもよい。

【０２６５】

本明細書において、「肝臓組織の修復」とは、損傷（たとえば慢性的損傷）後に、傷（すなわち線維症）とともに、肝臓の構造および機能を再現することをいうものであってもよい（Cordero-Espinoza, L. and Huch, M., 2018. The Journal of clinical investigation, 128(1), pp.85-96）。これは、機能的柔組織を網状の細胞外基質（ＥＣＭ）と置き換えることを特徴としてもよい。前記肝臓の構造は変えられてもよく、最適な機能が妨げられてもよい。たとえば、肝臓修復は、元の肝臓の機能の、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、または少なくとも５０％を回復する結果となってもよい。本発明の方法は、最大限の肝臓の機能に至るまでにかかる時間を減少させてもよく、たとえば、改変されたＴｒｅｇまたは医薬組成物が投与されない対象と比較して、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、または少なくとも５０％減少させてもよい。

【０２６６】

本発明の改変されたＴｒｅｇは、肝臓の再生および組織修復にかかわる遺伝子を発現させて、しっかりした肝臓の修復および／または再生を促進してもよい。

【０２６７】

主な成人の肝細胞は寿命が長く、正常なら細胞分裂しないが、炎症性の損傷に応じて増殖する、または部分肝切除後に増殖する、能力を維持している。この能力は、齧歯動物での３分の２部分肝切除モデルによって最も明瞭に示されている。このモデルでは、肝臓の３分の２が外科的に除去され、その残りの肝臓が、元の肝臓の質量が回復されるまで大きくなり－手術後おおよそ１週間－、その後再生プロセスが停止する。ヒトでは、虚血または肝炎による肝臓の損傷の後に最もよく肝臓の再生が起こる（Taub, R., 2004. Nature reviews Molecular cell biology, 5(10), p.836-847）。肝臓の腫瘍の治療として部分肝切除を受けているヒトの中で、または、生体肝移植中に、よく似た現象が起こる。さらに、ヒトにおいて、虚血、中毒、および急性または慢性肝炎による肝細胞への損傷後に、肝臓の再生が起こる。

【０２６８】

好適には、肝臓が傷害、および／または肝炎による損傷されていてもよい。いくつかの実施形態において、肝臓組織の修復および／または肝臓の再生を促進することに加えて、本発明の改変されたＴｒｅｇはさらに、肝炎を治療する。肝炎は、感染性肝炎、代謝性肝炎、アルコール性肝炎、虚血性肝炎、自己免疫性肝炎、および遺伝性肝炎から選択されてもよい。一実施形態において、肝炎は劇症性でなくてもよいし、慢性肝炎でなくてもよい。

【０２６９】
肝臓の再生のおかげで、移植のために生体ドナーからの肝臓部分を使用することが可能になり、それによって、移植に利用可能な臓器の数を増加させている。肝臓移植の数の増加は、生体血縁ドナーの組織や小型サイズの移植臓器を使用することで行っているが、このためには、少なくともいくらか肝臓を再生したり修復したりすることが移植の成功に必要である（Taub, R., 2004. Nature reviews Molecular cell biology, 5(10), p.836-847）。
【０２７０】
このように、前記対象は、肝臓移植レシピエント、または部分肝切除を受けている患者（たとえば、肝臓移植のための生体ドナーとして、または外科的切除を必要とする肝臓腫瘍があるため）であってもよい。前記肝臓は、移植された肝臓であってもよい。
硬変（肝臓の線維症）、脂肪症（脂肪肝）や、加齢による症状さえも含まれる、なんらかの肝臓の症状を有するヒトは、肝臓の再生が弱まっており、その結果、肝臓の傷害または損傷に応じて疾病率や死亡率が高まる（Taub, R., 2004. Nature reviews Molecular cell biology, 5(10), p.836-847）。
【０２７１】
このように、前記対象は、肝臓の再生が弱まっていてもよく、好ましくはその原因が、急性肝不全、硬変、急性憎悪した慢性肝不全、肝炎、脂肪症、脂肪性肝炎、および加齢のうちの一つ以上である。
【０２７２】
一実施形態において、本発明は、肝臓組織の修復および／または肝臓の再生を促進することに加えて、免疫介在性の損傷を治療および／または予防する。たとえば、本発明は、対象における肝臓移植組織に対する寛容を誘発してもよく、または、対象において肝臓移植拒絶反応、肝臓移植片対宿主病（ＧｖＨＤ）、自己免疫性肝疾患、または炎症性肝障害を治療および／または予防してもよい。
【０２７３】
修復および／または再生のためのこれらの実施形態（および、本明細書に記載の、修復および／または再生が関わる他の実施形態）で使用するための、好ましいＣＡＲは、アルブミン産生を増加または刺激することができ、たとえば、肝臓中で、たとえば肝臓の細胞または肝臓組織、たとえば肝細胞中で、アルブミン濃度やレベルを増加する、および／またはアルブミン産生を刺激することができる。
【０２７４】
このように、本発明のさらなる他の態様は、対象の肝臓の組織または細胞における、アルブミン産生の増加または刺激に使用するための、またはアルブミン濃度やレベルの増加および／またはアルブミン産生の刺激に使用するための、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含む改変された制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）、または前記改変されたＴｒｅｇを含む医薬組成物を提供し、前記ＣＡＲは、肝臓特異的抗原認識ドメインを含む。
【０２７５】
別の観点から、本発明のこの態様は、対象の肝臓の組織または細胞において、アルブミン産生を増加または刺激する方法、またはアルブミンレベルを増加させる方法を提供し、前記方法は、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含む改変された制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）、または前記改変されたＴｒｅｇを含む医薬組成物を前記対象に投与する工程を含み、前記ＣＡＲは、肝臓特異的抗原認識ドメインを含む。
【０２７６】
別の観点から、本発明のこの態様は、対象の肝臓の組織または細胞における、アルブミン産生の増加または刺激に使用するための、またはアルブミン濃度やレベルの増加および／またはアルブミン産生の刺激に使用するための、薬品または組成物の製造における、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含む改変された制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）、または前記改変されたＴｒｅｇを含む医薬組成物の使用を提供し、前記ＣＡＲは、肝臓特異的抗原認識ドメインを含む。アルブミンレベルが増加されるような態様における使用のための、

適切であり好ましい肝臓特異的抗原認識ドメイン、たとえば、ＡＳＧＲに特異的に結合する抗原認識ドメインなどが、本明細書中の他の箇所に記載されている。この態様のための他の好ましい実施形態もまた、本明細書中の他の箇所に記載されている。

【０２７７】

肝細胞は、典型的には、肝臓質量の大半を構成し、肝細胞中の、肝細胞または肝臓組織サンプルをインビトロまたは患者の血液中で培養する場合の上清中の、アルブミンレベルまたはアルブミン濃度は、肝細胞など肝臓の細胞、分化、機能、および生存率のマーカーである。このように、かかる細胞中のアルブミンレベルに対する、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含むＴｒｅｇの効果を判定することにより、抗原の刺激に応じた肝臓の細胞または肝臓組織に対する栄養効果（たとえば、肝細胞機能および／または生存率を促進する栄養シグナル）および／または細胞保護効果を媒介するＣＡＲ Ｔｒｅｇの能力の測定または指標を提供する。

【０２７８】

アルブミン産生を増加または刺激できる、またはアルブミンレベルまたは濃度を増加できる、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含むＴｒｅｇは、好適なアッセイを使用して特定できる。好適なアッセイは、当該技術分野においてよく知られている。たとえば、常用手技によって、適切な肝臓の細胞を使用して、これらの細胞中の、またはこれら細胞からの上清中の、アルブミンレベルを（たとえば、分泌されたアルブミンのレベルを調査するために）測定するインビトロアッセイが、容易に使用できるであろう。レベルは、都合に応じて、適切なＣＡＲ Ｔｒｅｇの存在下および非存在下で測定し比較できるであろう。肝細胞、特にヒト肝細胞、たとえば初代ヒト肝細胞が、特に適切である。実施例１４にアッセイの例を示す。上述したように、抗原刺激に応じて、かかるＣＡＲが今度は肝臓の細胞に対する栄養および／または細胞保護効果を媒介する能力を有し、それによって、それらを、肝臓の修復および／または再生に関わる本発明の態様における使用にとって特に適切になるようにさせる。本明細書に記載の改変されたＴｒｅｇを使用した治療を受けた後の患者におけるアルブミンレベルまたは濃度は、上述のように、常用手技を使用して血液サンプルを介して測定できる。

【０２７９】

本明細書でいう、肝臓の細胞または肝臓の組織におけるアルブミン産生またはアルブミンレベルまたは濃度の増加または刺激（またはその等価語）への言及は、適切なコントロールと比較した場合の何らかの測定可能な増加または増大または改善を含む。好ましくは、かかる増加等は有意な増加であり、好ましくは、たとえば適切なコントロールのレベルまたは値と比較した時に確率値が＜０．０５の、臨床的に有意かつ統計的に有意な増加である。

【０２８０】

適切なコントロールは、当業者により簡単に見つけられるであろう。たとえば、本発明のＣＡＲ Ｔｒｅｇ（たとえば、本発明の形質導入されたＣＡＲ Ｔｒｅｇ）の存在下で観察されたアルブミンの産生、レベル、または濃度であって、当該ＣＡＲ Ｔｒｅｇの非存在との比較（たとえば、未処理のサンプルとの比較、たとえば適切なコントロール培地のみとの比較）におけるものや、たとえば、本発明のＣＡＲ Ｔｒｅｇ（たとえば、本発明の形質導入されたＣＡＲ Ｔｒｅｇ）の存在下で観察されたアルブミンの産生、レベル、または濃度であって、形質導入されていないＴｒｅｇ（たとえば、活性化された、または非活性化／休眠状態の、形質導入されていないＴｒｅｇ）の存在との比較におけるものを含むであろう。

【０２８１】

本発明のＣＡＲ Ｔｒｅｇ（たとえば、本発明の形質導入されたＣＡＲ Ｔｒｅｇ）の場合に、肝臓の細胞におけるアルブミンの産生、レベル、または濃度の増加が観察される実施形態において、少なくとも（または最大）１．５倍、２倍、３倍、４倍、５倍、７倍、１０倍、１５倍、２０倍、２５倍、３０倍、３５倍、４０倍、４５倍、または５０倍のアルブミンレベルまたは濃度の改善または増加が観察されることが好ましい。たとえば、本

発明のＣＡＲ Ｔｒｅｇの非存在下で観察されるレベルまたは濃度との比較において、たとえば、未処理のサンプルまたは適切なコントロール培地のみの場合と比較して、少なくとも（または最大）５倍、７倍、１０倍、１５倍、２０倍、２５倍、３０倍、３５倍、４０倍、４５倍、５０倍のアルブミンレベルまたは濃度の改善または増加が、本発明の好ましいＣＡＲ Ｔｒｅｇの場合に観察されてもよい。たとえば、形質導入されていない、または遺伝子導入されていないＴｒｅｇの場合に観察されるレベルの比較において、たとえば形質導入されていない活性化された、または非活性化／休眠状態のＴｒｅｇと比較した時に、少なくとも（または最大）１．５倍、２倍、３倍、４倍、５倍、７倍、１０倍のアルブミンレベルまたは濃度の改善または増加が、本発明の好ましいＣＡＲ Ｔｒｅｇの場合に観察されてもよい。

【０２８２】

肝線維症、硬変、急性肝不全、および急性憎悪した慢性肝不全

本発明は、肝線維症、肝硬変、急性肝不全、または急性憎悪した慢性肝不全を治療および／または予防する方法を提供する。

【０２８３】

肝線維症、肝硬変、急性肝不全、または急性憎悪した慢性肝不全を改善するには、典型的には、肝臓の免疫介在性の損傷を治療および／または予防すること、および肝臓の再生を促進することが必要である。

【０２８４】

肝線維症は、臓器の構造を変えて正常に機能させなくするため、主要な死因の一つである。肝線維症は、ウイルス性肝炎、アルコール性肝疾患、非アルコール性脂肪性肝疾患や、その他の肝障害などの慢性的な肝臓の疾患に起因する創傷治癒過程の結果、組織に起こったものである。原繊維コラーゲンが豊富な細胞外基質（ＥＣＭ）の過剰な蓄積が、典型的な肝線維症の所見である。ＥＣＭの過剰な蓄積は、肝臓の正常な構造を変化させ、その結果、病態生理学的な損傷を臓器にもたらす（Suk, K.T. and Kim, D.J., 2015. World journal of hepatology, 7(3), p.607）。

【０２８５】

肝硬変は、肝臓の脈管構造および肝臓の構造の崩壊を伴う、肝線維症の進行した段階と定義される。組織学的には、慢性的な傷害に対して繊維状組織の再生小結節が形成され、肝硬変を起こす。その結果、肝線維症および／または硬変のために肝臓の構造が崩れ、血行動態が不安定になり、門脈圧亢進症を起こす（Suk, K.T. and Kim, D.J., 2015. World journal of hepatology, 7(3), p.607）。

【０２８６】

急性肝不全は、本明細書では、以前からわかっている肝疾患が無い患者における肝細胞機能障害、特に凝血異常および脳障害の急な発生（development）として定義される。たとえば、「急性肝不全」は、肝臓の症状の発症より２６週以内の脳障害の発生として定義されてもよい。これは、８週以内の脳障害の発症が条件である「劇症肝不全」と、８週後２６週以前の脳障害の発症を規定する「亜劇症」とにさらに分類されてもよい。別の方法では、７日以内の発症の「超急性」、７日から２８日の間の発症の「急性」、および２８日から２４週の間の発症の「亜急性」を定義する。

【０２８７】

急性憎悪した慢性肝不全は、臓器の障害と高い短期死亡率に関連づけられる、慢性肝疾患の急性代償不全によって特徴づけられる。アルコールおよび慢性ウイルス性肝炎は、最も多い潜在的な肝疾患である（Hernaez, R., et al., 2017. Gut, 66(3), pp.541-553）。

【０２８８】

ポリヌクレオチド

本発明はさらに、本発明のＣＡＲをコードするポリヌクレオチド提供する。

【０２８９】

本発明のポリヌクレオチドは、ＤＮＡまたはＲＮＡを含んでいてもよい。それらは、一

本鎖または二本鎖であってもよい。多数の様々なポリヌクレオチドが、遺伝子コードの退化の結果、同じポリペプチドをコードできるポリヌクレオチドが数多く様々あることを、当業者は理解しているであろう。さらに、当業者が常用手技を使用して、本発明のポリヌクレオチドによりコードされたポリペプチド配列に影響を与えないヌクレオチド置換基を作り、本発明のポリペプチドが発現される特定の宿主個体のコドン使用を反映させてもよいことが、理解されるであろう。

【０２９０】

前記ポリヌクレオチドは、当該技術分野で利用可能な任意の方法で改変してもよい。本発明のポリヌクレオチドのインビボ活性を向上し、または寿命を伸ばすために、かかる改変を行ってもよい。

【０２９１】

ＤＮＡポリヌクレオチドのようなポリヌクレオチドは、遺伝子組換え、合成、または当業者が利用可能な任意の手段によって作成してもよい。標準的な技術でポリヌクレオチドのクローンを作ってもよい。

【０２９２】

より長いポリヌクレオチドは、一般的に、遺伝子組換え手段を使用して、たとえばポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）クローニング技術を使用して作成されるだろう。これは、クローンを作りたい標的配列の横に並べた一対のプライマー（たとえば、ヌクレオチドが約１５～３０個のもの）を作り、前記プライマーを動物またはヒトの細胞から得られたｍＲＮＡまたはｃＤＮＡと接触させ、所望の領域の増幅をもたらすような条件でポリメラーゼ連鎖反応を行い、増幅された断片を単離し（たとえば、アガロースゲルで反応混合物を精製することにより）、増幅されたＤＮＡを回収することを含むだろう。前記プライマーは、増幅されたＤＮＡが好適なベクターにクローニングされるように、好適な制限酵素認識部位を含むように設計されてもよい。

【０２９３】

本発明で使用されるポリヌクレオチドは、コドン最適化されてもよい。コドン最適化は、以前より、ＷＯ１９９９／４１３９７およびＷＯ２００１／７９５１８に記載されている。細胞が異なっていれば、特定のコドンの使用も異なる。このコドンバイアスは、細胞タイプにおける特定のｔＲＮＡの相対的存在量の偏りに対応している。配列中のコドンを変えて、対応するｔＲＮＡの相対的存在量に合うようにコドンを適合させることにより、発現を増加させることが可能である。同様に、対応するｔＲＮＡが特定の細胞タイプにおいて少ないとわかっているコドンを故意に選択することによって、発現を減少させることが可能である。このように、翻訳調節の度合いをさらに増やすこともできる。

【０２９４】

本発明のＣＡＲの例（配列番号１４９～１５２または１６７～１６９）をコードするヌクレオチド配列の例を以下に示す。本発明のＣＡＲをコードするポリヌクレオチドは、配列番号１５３～１５６または１７０～１７２の一つ以上に対する同一性が少なくとも７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、９９％、または１００％である配列を有していてもよい。

配列番号１５３－ＣＡＲ１の例をコードするヌクレオチド配列の例　ＣＤ８リーダー、ＡＳＧＲ１　ＶＨ、ＣＤ８αヒンジ、ＣＤ２８膜貫通、ＣＤ２８細胞質、およびＣＤ３ｚ細胞質を含むＣＡＲ

ＡＴＧＧＣＣＴＴＡＣＣＡＧＴＧＡＣＣＧＣＣＴＴＧＣＴＣＣＴＧＣＣＧＣＴＧＧＣＣＴ
ＴＧＣＴＧＣＴＣＣＡＣＧＣＣＧＣＣＡＧＧＣＣＧＧＡＧＧＴＧＣＡＧＣＴＧＴＴＧＧＡ
ＧＴＣＴＧＧＧＧＧＡＧＧＣＴＴＧＧＴＡＣＡＧＣＣＴＧＧＧＧＧＧＴＣＣＣＴＧＣＧＴ
ＣＴＣＴＣＣＴＧＴＧＣＡＧＣＣＴＣＣＧＧＡＴＴＣＡＣＣＴＴＴＧＡＧＡＡＧＴＡＴＧ
ＣＧＡＴＧＧＣＧＴＧＧＧＴＣＣＧＣＣＡＧＧＣＣＣＣＡＧＧＧＡＡＧＧＧＴＣＴＧＧＡ
ＧＴＧＧＧＴＣＴＣＡＣＧＧＡＴＴＴＣＧＧＣＧＡＧＧＧＧＴＧＴＧＡＣＧＡＣＡＴＡＣ
ＴＡＣＧＣＡＧＡＣＴＣＣＧＴＧＡＡＧＧＧＣＣＧＧＴＴＣＡＣＣＡＴＣＴＣＣＣＧＣＧ
ＡＣＡＡＴＴＣＣＡＡＧＡＡＣＡＣＧＣＴＧＴＡＴＣＴＧＣＡＡＡＴＧＡＡＣＡＧＣＣＴ

GCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAACAT
AAGCGGCACGAGCATACTCGTTTTGACTCCTGGGGTCAGG
GAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCACCACGACGCCAGCGCC
GCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCC
CTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGG
GCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATTT
CTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGGCGGCGTGCTGGCCTGCTAC
AGCCTGCTGGTGACCGTGGCCTTCATCATCTTCTGGGTGC
GGAGCAAGCGGAGCCGGCTGCTGCACAGCGACTACATGAA
CATGACCCCCCGGCGGCCTGGGCCCACCCGCAAGCATTAC
CAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCT
CCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTA
CCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTA
GGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTG
GCCGGGACCCTGAGATGGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAA
CCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAG
ATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGC
GCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCT
CAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATG
CAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA

配列番号１５４－ＣＡＲ２の例をコードするヌクレオチド配列の例　ＣＤ８リーダー、ＡＳＧＲ１　ＶＨ、ｃ－Ｍｙｃタグ付きのＣＤ２８ヒンジ、ＣＤ２８膜貫通、ＣＤ２８細胞質、およびＣＤ３ｚ細胞質を含むＣＡＲ

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCT
TGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGGAGGTGCAGCTGTTGGA
GTCTGGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGGTCCCTGCGT
CTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGAGAAGTATG
CGATGGCGTGGGTCCGCCAGGCCCCCAGGGAAGGGGTCTGGA
GTGGGTCTCACGGATTTCGGCGAGGGGGTGTGACGACATAC
TACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCG
ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCT
GCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAACAT
AAGCGGCACGAGCATACTCGTTTTGACTCCTGGGGTCAGG
GAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCGGCCGCCATCGAGGT
GGAGCAGAAGCTGATCAGCGAGGAGGACCTGCTGGACAAC
GAGAAGAGCAACGGCACCATCATCCACGTGAAGGGCAAGC
ACCTGTGCCCCAGCCCCCTGTTCCCCGGCCCCAGCAAGCC
CTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTGGGCGGCGTGCTGGCCTGC
TACAGCCTGCTGGTGACCGTGGCCTTCATCATCTTCTGGG
TGCGGAGCAAGCGGAGCCGGCTGCTGCACAGCGACTACAT
GAACATGACCCCCCGGCGGCCTGGGCCCACCCGCAAGCAT
TACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATC
GCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGC
GTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAAT
CTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGAC
GTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAA
GAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGAT
AAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCG
AGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGG
TCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCAC

ＡＴＧＣＡＧＧＣＣＣＴＧＣＣＣＣＣＴＣＧＣＴＡＡ

配列番号１５５－ＣＡＲ３の例をコードするヌクレオチド配列の例　ＣＤ８リーダー、ＡＳＧＲ１　ＶＨ、ＣＤ８αヒンジ、ＣＤ２８膜貫通、ＣＤ２８細胞質、ＣＤ３ｚ細胞質、ＦＰ２Ａドメイン、およびＧＦＰを含むＣＡＲ

ＡＴＧＧＣＣＴＴＡＣＣＡＧＴＧＡＣＣＧＣＣＴＴＧＣＴＣＣＴＧＣＣＧＣＴＧＧＣＣＴ
ＴＧＣＴＧＣＴＣＣＡＣＧＣＣＧＣＣＡＧＧＣＣＧＧＡＧＧＴＧＣＡＧＣＴＧＴＴＧＧＡ
ＧＴＣＴＧＧＧＧＧＡＧＧＣＴＴＧＧＴＡＣＡＧＣＣＴＧＧＧＧＧＧＴＣＣＣＴＧＣＧＴ
ＣＴＣＴＣＣＴＧＴＧＣＡＧＣＣＴＣＣＧＧＡＴＴＣＡＣＣＴＴＴＧＡＧＡＡＧＴＡＴＧ
ＣＧＡＴＧＧＣＧＴＧＧＧＴＣＣＧＣＣＡＧＧＣＣＣＣＡＧＧＧＡＡＧＧＧＴＣＴＧＧＡ
ＧＴＧＧＧＴＣＴＣＡＣＧＧＡＴＴＴＣＧＧＣＧＡＧＧＧＧＴＧＴＧＡＣＧＡＣＡＴＡＣ
ＴＡＣＧＣＡＧＡＣＴＣＣＧＴＧＡＡＧＧＧＣＣＧＧＴＴＣＡＣＣＡＴＣＴＣＣＣＧＣＧ
ＡＣＡＡＴＴＣＣＡＡＧＡＡＣＡＣＧＣＴＧＴＡＴＣＴＧＣＡＡＡＴＧＡＡＣＡＧＣＣＴ
ＧＣＧＴＧＣＴＧＡＧＧＡＣＡＣＣＧＣＧＧＴＡＴＡＴＴＡＣＴＧＴＧＣＧＡＡＡＣＡＴ
ＡＡＧＣＧＧＣＡＣＧＡＧＣＡＴＡＣＴＣＧＴＴＴＴＧＡＣＴＣＣＴＧＧＧＧＴＣＡＧＧ
ＧＡＡＣＣＣＴＧＧＴＣＡＣＣＧＴＣＴＣＧＡＧＣＡＣＣＡＣＧＡＣＧＣＣＡＧＣＧＣＣ
ＧＣＧＡＣＣＡＣＣＡＡＣＡＣＣＧＧＣＧＣＣＣＡＣＣＡＴＣＧＣＧＴＣＧＣＡＧＣＣＣ
ＣＴＧＴＣＣＣＴＧＣＧＣＣＣＡＧＡＧＧＣＧＴＧＣＣＧＧＣＣＡＧＣＧＧＣＧＧＧＧＧ
ＧＣＧＣＡＧＴＧＣＡＣＡＣＧＡＧＧＧＧＧＣＴＧＧＡＣＴＴＣＧＣＣＴＧＴＧＡＴＴＴ
ＣＴＧＧＧＴＧＣＴＧＧＴＧＧＴＧＧＴＧＧＧＣＧＧＣＧＴＧＣＴＧＧＣＣＴＧＣＴＡＣ
ＡＧＣＣＴＧＣＴＧＧＴＧＡＣＣＧＴＧＧＣＣＴＴＴＣＡＴＣＡＴＣＴＴＣＴＧＧＧＴＧＣ
ＧＧＡＧＣＡＡＧＣＧＧＡＧＣＣＧＧＣＴＧＣＴＧＣＡＣＡＧＣＧＡＣＴＡＣＡＴＧＡＡ
ＣＡＴＧＡＣＣＣＣＣＣＧＧＣＧＧＣＣＴＧＧＧＣＣＣＡＣＣＣＧＣＡＡＧＣＡＴＴＡＣ
ＣＡＧＣＣＣＴＡＴＧＣＣＣＣＡＣＣＡＣＧＣＧＡＣＴＴＣＧＣＡＧＣＣＴＡＴＣＧＣＴ
ＣＣＡＧＡＧＴＧＡＡＧＴＴＣＡＧＣＡＧＧＡＧＣＧＣＡＧＡＣＧＣＣＣＣＣＣＧＣＧＴＡ
ＣＣＡＧＣＡＧＧＧＣＣＡＧＡＡＣＣＡＧＣＴＣＴＡＴＡＡＣＧＡＧＣＴＣＡＡＴＣＴＡ
ＧＧＡＣＧＡＡＧＡＧＡＧＧＡＧＴＡＣＧＡＴＧＴＴＴＴＧＧＡＣＡＡＧＡＧＡＣＧＴＧ
ＧＣＣＧＧＧＡＣＣＣＴＧＡＧＡＴＧＧＧＧＧＧＡＡＡＧＣＣＧＡＧＡＡＧＧＡＡＧＡＡ
ＣＣＣＴＣＡＧＧＡＡＧＧＣＣＴＧＴＡＣＡＡＴＧＡＡＣＴＧＣＡＧＡＡＡＧＡＴＡＡＧ
ＡＴＧＧＣＧＧＡＧＧＣＣＴＡＣＡＧＴＧＡＧＡＴＴＧＧＧＡＴＧＡＡＡＧＧＣＧＡＧＣ
ＧＣＣＧＧＡＧＧＧＧＣＡＡＧＧＧＧＣＡＣＧＡＴＧＧＣＣＴＴＴＡＣＣＡＧＧＧＴＣＴ
ＣＡＧＴＡＣＡＧＣＣＡＣＣＡＡＧＧＡＣＡＣＣＴＡＣＧＡＣＧＣＣＣＴＴＣＡＣＡＴＧ
ＣＡＧＧＣＣＣＴＧＣＣＣＣＣＴＣＧＣＡＧＧＡＧＡＡＡＡＡＧＡＧＧＡＡＧＣＧＧＡＧ
ＣＴＡＣＴＡＡＣＴＴＣＡＧＣＣＴＧＣＴＧＡＡＧＣＡＧＧＣＴＧＧＡＧＡＣＧＴＧＧＡ
ＧＧＡＧＡＡＣＣＣＴＧＧＡＣＣＴＡＣＧＣＧＴＧＧＡＧＧＴＧＧＣＧＣＣＡＣＣＡＴＧ
ＧＴＧＡＧＣＡＡＧＧＧＣＧＡＧＧＡＧＣＴＧＴＴＣＡＣＣＧＧＧＧＴＧＧＴＧＣＣＣＡ
ＴＣＣＴＧＧＴＣＧＡＧＣＴＧＧＡＣＧＧＣＧＡＣＧＴＡＡＡＣＧＧＣＣＡＣＡＡＧＴＴ
ＣＡＧＣＧＴＧＴＣＣＧＧＣＧＡＧＧＧＣＧＡＧＧＧＣＧＡＴＧＣＣＡＣＣＴＡＣＧＧＣ
ＡＡＧＣＴＧＡＣＣＣＴＧＡＡＧＴＴＣＡＴＣＴＧＣＡＣＣＡＣＣＧＧＣＡＡＧＣＴＧＣ
ＣＣＧＴＧＣＣＣＴＧＧＣＣＣＡＣＣＣＴＣＧＴＧＡＣＣＡＣＣＣＴＧＡＣＣＴＡＣＧＧ
ＣＧＴＧＣＡＧＴＧＣＴＴＣＡＧＣＣＧＣＴＡＣＣＣＣＧＡＣＣＡＣＡＴＧＡＡＧＣＡＧ
ＣＡＣＧＡＣＴＴＣＴＴＣＡＡＧＴＣＣＧＣＣＡＴＧＣＣＣＧＡＡＧＧＣＴＡＣＧＴＣＣ
ＡＧＧＡＧＣＧＣＡＣＣＡＴＣＴＴＣＴＴＣＡＡＧＧＡＣＧＡＣＧＧＣＡＡＣＴＡＣＡＡ
ＧＡＣＣＣＧＣＧＣＣＣＧＡＧＧＴＧＡＡＧＴＴＣＧＡＧＧＧＣＧＡＣＡＣＣＣＴＧＧＴＧ
ＡＡＣＣＧＣＡＴＣＧＡＧＣＴＧＡＡＧＧＧＣＡＴＣＧＡＣＴＴＴＣＡＡＧＧＡＧＧＡＣＧ
ＧＣＡＡＣＡＴＣＣＴＧＧＧＧＣＡＣＡＡＧＣＴＧＧＡＧＴＡＣＡＡＣＴＡＣＡＡＣＡＧ
ＣＣＡＣＡＡＣＧＴＣＴＡＴＡＴＣＡＴＧＧＣＣＧＡＣＡＡＧＣＡＧＡＡＧＡＡＣＧＧＣ
ＡＴＣＡＡＧＧＴＧＡＡＣＴＴＣＡＡＧＡＴＣＣＧＣＣＡＣＡＡＣＡＴＣＧＡＧＧＡＣＧ
ＧＣＡＧＣＧＴＧＣＡＧＣＴＣＧＣＣＧＡＣＣＡＣＴＡＣＣＡＧＣＡＧＡＡＣＡＣＣＣＣ
ＣＡＴＣＧＧＣＧＡＣＧＧＣＣＣＣＧＴＧＣＴＧＣＴＧＣＣＣＧＡＣＡＡＣＣＡＣＴＡＣ
ＣＴＧＡＧＣＡＣＣＣＡＧＴＣＣＡＡＧＣＴＧＡＧＣＡＡＡＧＡＣＣＣＣＡＡＣＧＡＧＡ

AGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGC
CGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

配列番号１５６－ＣＡＲ４の例をコードするヌクレオチド配列の例　ＣＤ８リーダー、ＡＳＧＲ１　ＶＨ、ＣＤ８αヒンジ、ＣＤ２８膜貫通、ＣＤ２８細胞質、ＣＤ３ｚ細胞質、ＦＰ２Ａドメイン、およびＧＦＰを含むＣＡＲ

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCT
TGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGGAGGTGCAGCTGTTGGA
GTCTGGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGGTCCCTGCGT
CTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGAGAAGTATG
CGATGGCGTGGGTCCGCCAGGCCCCAGGGAAGGGTCTGGA
GTGGGTCTCACGGATTTCGGCGAGGGGTGTGACGACATAC
TACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCG
ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCT
GCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAACAT
AAGCGGCACGAGCATACTCGTTTTGACTCCTGGGGGTCAGG
GAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCGGCCGCCATCGAGGT
GGAGCAGAAGCTGATCAGCGAGGAGGACCTGCTGGACAAC
GAGAAGAGCAACGGCACCATCATCCACGTGAAGGGCAAGC
ACCTGTGCCCCAGCCCCCTGTTCCCCGGCCCCAGCAAGCC
CTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTGGGCGGCGTGCTGGCCTGC
TACAGCCTGCTGGTGACCGTGGCCTTCATCATCTTCTGGG
TGCGGAGCAAGCGGAGCCGGCTGCTGCACAGCGACTACAT
GAACATGACCCCCCGGCGGCCTGGGCCCACCCGCAAGCAT
TACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATC
GCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGC
GTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAAT
CTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGAC
GTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAA
GAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGAT
AAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCG
AGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGG
TCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCAC
ATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCAGGAGAAAAAGAGGAAGCG
GAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGT
GGAGGAGAACCCTGGACCTACGCGTGGAGGTGGCGCCACC
ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGC
CCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAA
GTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTAC
GGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGC
TGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTA
CGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAG
CAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACG
TCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTA
CAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTG
GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGG
ACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAA
CAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAC
GGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGG
ACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACAC
CCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCAC

ＴＡＣＣＴＧＡＧＣＡＣＣＣＡＧＴＣＣＡＡＧＣＴＧＡＧＣＡＡＡＧＡＣＣＣＣＡＡＣＧ
ＡＧＡＡＧＣＧＣＧＡＴＣＡＣＡＴＧＧＴＣＣＴＧＣＴＧＧＡＧＴＴＣＧＴＧＡＣＣＧＣ
ＣＧＣＣＧＧＧＡＴＣＡＣＴＣＴＣＧＧＣＡＴＧＧＡＣＧＡＧＣＴＧＴＡＣＡＡＧＴＡＡ
配列番号１７０－ＣＡＲ５の例をコードするヌクレオチド配列の例　ＣＤ８リーダー、ＡＳＧＲ１　ＶＨ（ＶＨ１、配列番号７４）、リンカー、ＡＳＧＲ１　ＶＬ（ＶＫ１、配列番号７８）、ｃ－Ｍｙｃタグ付きのＣＤ２８ヒンジ、ＣＤ２８膜貫通、ＣＤ２８細胞質、およびＣＤ３ｚ細胞質を含むＣＡＲ
ＡＴＧＧＣＣＴＴＡＣＣＡＧＴＧＡＣＣＧＣＣＴＴＧＣＴＣＣＴＧＣＣＧＣＴＧＧＣＣＴ
ＴＧＣＴＧＣＴＣＣＡＣＧＣＣＧＣＣＡＧＧＣＣＧＧＡＧＧＴＧＣＡＧＣＴＧＴＴＧＧＡ
ＧＴＣＴＧＧＧＧＧＡＧＧＣＴＴＧＧＴＡＣＡＧＣＣＴＧＧＧＧＧＧＧＴＣＣＣＴＧＣＧＴ
ＣＴＣＴＣＣＴＧＴＧＣＡＧＣＣＴＣＣＧＧＡＴＴＣＡＣＣＴＴＴＧＡＧＡＡＧＴＡＴＧ
ＣＧＡＴＧＧＣＧＴＧＧＧＴＣＣＧＣＣＡＧＧＣＣＣＣＡＧＧＧＡＡＧＧＧＴＣＴＧＧＡ
ＧＴＧＧＧＴＣＴＣＡＣＧＧＡＴＴＴＣＧＧＣＧＡＧＧＧＧＴＧＴＧＡＣＧＡＣＡＴＡＣ
ＴＡＣＧＣＡＧＡＣＴＣＣＧＴＧＡＡＧＧＧＣＣＧＧＴＴＣＡＣＣＡＴＣＴＣＣＣＧＣＧ
ＡＣＡＡＴＴＣＣＡＡＧＡＡＣＡＣＧＣＴＧＴＡＴＣＴＧＣＡＡＡＴＧＡＡＣＡＧＣＣＴ
ＧＣＧＴＧＣＴＧＡＧＧＡＣＡＣＣＧＣＧＧＴＡＴＡＴＴＡＣＴＧＴＧＣＧＡＡＡＣＡＴ
ＡＡＧＣＧＧＣＡＣＧＡＧＣＡＴＡＣＴＣＧＴＴＴＴＧＡＣＴＣＣＴＧＧＧＧＴＣＡＧＧ
ＧＡＡＣＣＣＴＧＧＴＣＡＣＣＧＴＣＴＣＧＡＧＣＣＴＧＧＴＧＡＣＣＧＴＧＡＧＣＡＧ
ＣＧＧＣＧＧＣＧＧＡＧＧＣＡＧＣＧＧＴＧＧＣＧＧＡＧＧＣＡＧＣＧＧＣＧＧＡＧＧＣ
ＧＧＴＡＧＣＧＡＣＡＴＣＣＡＧＡＴＧＡＣＣＣＡＧＴＣＴＣＣＡＴＣＣＴＣＣＣＴＧＴ
ＣＴＧＣＡＴＣＴＧＴＡＧＧＡＧＡＣＣＧＴＧＴＣＡＣＣＡＴＴＡＣＴＴＧＣＣＧＧＧＣ
ＡＡＧＴＣＡＧＧＣＧＡＴＴＧＧＧＣＧＧＴＧＧＴＴＡＴＴＧＴＧＧＴＡＴＣＡＧＣＡＧ
ＡＡＡＣＣＡＧＧＧＡＡＡＧＣＣＣＣＴＡＡＧＣＴＣＣＴＧＡＴＣＧＧＴＣＣＧＧＧＴＴ
ＣＣＣＧＧＴＴＧＣＧＡＡＧＴＧＧＧＧＴＣＣＣＡＴＣＡＣＧＴＴＴＣＡＧＴＧＧＣＡＧ
ＴＧＧＡＴＣＴＧＧＧＡＣＡＧＡＴＴＴＣＡＣＴＣＴＣＡＣＣＡＴＣＡＧＣＡＧＴＣＴＡ
ＣＡＡＣＣＴＧＡＡＧＡＴＴＴＴＧＴＴＡＣＧＴＡＣＴＡＣＴＧＴＣＡＡＣＡＧＧＣＧＴ
ＡＴＧＣＣＴＧＧＣＣＴＣＣＧＡＣＧＴＴＣＧＧＣＣＡＡＧＧＧＡＣＣＡＡＧＧＴＧＧＡ
ＡＡＴＣＡＡＡＣＧＧＧＣＧＧＧＣＣＧＣＣＡＴＣＧＡＧＧＴＧＧＡＧＣＡＧＡＡＧＣＴＧ
ＡＴＣＡＧＣＧＡＧＧＡＧＧＡＣＣＴＧＣＴＧＧＡＣＡＡＣＧＡＧＡＡＧＡＧＣＡＡＣＧ
ＧＣＡＣＣＡＴＣＡＴＣＣＡＣＧＴＧＡＡＧＧＧＣＡＡＧＣＡＣＣＴＧＴＧＣＣＣＣＡＧ
ＣＣＣＣＣＴＧＴＴＣＣＣＣＧＧＣＣＣＣＡＧＣＡＡＧＣＣＣＴＴＣＴＧＧＧＴＧＣＴＧ
ＧＴＧＧＴＧＧＴＧＧＧＣＧＧＣＧＴＧＣＴＧＧＣＣＴＧＣＴＡＣＡＧＣＣＴＧＣＴＧＧ
ＴＧＡＣＣＧＴＧＧＣＣＴＴＣＡＴＣＡＴＣＴＴＣＴＧＧＧＴＧＣＧＧＡＧＣＡＡＧＣＧ
ＧＡＧＣＣＧＧＣＴＧＣＴＧＣＡＣＡＧＣＧＡＣＴＡＣＡＴＧＡＡＣＡＴＧＡＣＣＣＣＣ
ＣＧＧＣＧＧＣＣＴＧＧＧＣＣＣＡＣＣＣＧＣＡＡＧＣＡＴＴＡＣＣＡＧＣＣＣＴＡＴＧ
ＣＣＣＣＡＣＣＡＣＧＣＧＡＣＴＴＣＧＣＡＧＣＣＴＡＴＣＧＣＴＣＣＡＧＡＧＴＧＡＡ
ＧＴＴＣＡＧＣＡＧＧＡＧＣＧＣＡＧＡＣＧＣＣＣＣＣＧＣＧＴＡＣＣＡＧＣＡＧＧＧＣ
ＣＡＧＡＡＣＣＡＧＣＴＣＴＡＴＡＡＣＧＡＧＣＴＣＡＡＴＣＴＡＧＧＡＣＧＡＡＧＡＧ
ＡＧＧＡＧＴＡＣＧＡＴＧＴＴＴＴＧＧＡＣＡＡＧＡＧＡＣＧＴＧＧＣＣＧＧＧＡＣＣＣ
ＴＧＡＧＡＴＧＧＧＧＧＧＧＡＡＡＧＣＣＧＡＧＡＡＧＧＡＡＧＡＡＣＣＣＴＣＡＧＧＡＡ
ＧＧＣＣＴＧＴＡＣＡＡＴＧＡＡＣＴＧＣＡＧＡＡＡＧＡＴＡＡＧＡＴＧＧＣＧＧＡＧＧ
ＣＣＴＡＣＡＧＴＧＡＧＡＴＴＧＧＧＡＴＧＡＡＡＧＧＣＧＡＧＣＧＣＣＧＧＡＧＧＧＧ
ＣＡＡＧＧＧＧＣＡＣＧＡＴＧＧＣＣＴＴＴＡＣＣＡＧＧＧＴＣＴＣＡＧＴＡＣＡＧＣＣ
ＡＣＣＡＡＧＧＡＣＡＣＣＴＡＣＧＡＣＧＣＣＣＴＴＣＡＣＡＴＧＣＡＧＧＣＣＣＴＧＣ
ＣＣＣＣＴＣＧＣ

配列番号１７１－ＣＡＲ６の例をコードするヌクレオチド配列の例　ＣＤ８リーダー、ＡＳＧＲ１　ＶＨ（ＶＨ２、配列番号７５）、リンカー、ＡＳＧＲ１　ＶＬ（ＶＫ２、配列番号７９）、ｃ－Ｍｙｃタグ付きのＣＤ２８ヒンジ、ＣＤ２８膜貫通、ＣＤ２８細胞質、およびＣＤ３ｚ細胞質を含むＣＡＲ
ＡＴＧＧＣＣＴＴＡＣＣＡＧＴＧＡＣＣＧＣＣＴＴＧＣＴＣＣＴＧＣＣＧＣＴＧＧＣＣＴ

TGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGGAGTTGCAGCTGTTGGA
GTTTGGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGGTCCCTGCGT
CTCTCCTGTACAACCTCCGGATTCACCTTTTCGAGGTATA
CTATGGGTTGGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGTCTAGA
GTGGGTCTTCAGCCATTGGCCCGCCCCGGGTCGAACACATAC
TACGCAGACTCCGTGAAGGGTCGGTTCACCATCTCCCGCG
ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCT
GCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAATGG
GTGATGTTGCGGGGGCGCTTTGACTACTGGGGTCAGGGAA
CCCTGGTCACCGTCTCGAGCCTGGTGACCGTGAGCAGCGG
CGGCGGAGGCAGCGGTGGCGGAGGCAGCGGCGGAGGCGGT
AGCGACATCCAGATGACCCAGTCCCCCATCCTCCCTGTCTG
CATCTGTAGGAGACCGTGTCACCATTACTTGCCGGGCAAG
TCAGGCGATTGGGCGGTGGTTATTGTGGTATCAGCAGAAA
CCAGGGAAAGCCCCTAAGCACCTGATCGGTCCGGGGTTCCC
GGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAA
CCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGGCGTATC
AGCTGCCTGTCACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAAT
CAAACGGGCGGCCGCCATCGAGGTGGAGCAGAAGCTGATC
AGCGAGGAGGACCTGCTGGACAACGAGAAGAGCAACGGCA
CCATCATCCACGTGAAGGGCAAGCACCTGTGCCCCAGCCC
CCTGTTCCCCGGCCCCAGCAAGCCCTTCTGGGTGCTGGTG
GTGGTGGGCGGCGTGCTGGCCTGCTACAGCCTGCTGGTGA
CCGTGGCCTTCATCATCTTCTGGGTGCGGAGCAAGCGGAG
CCGGCTGCTGCACAGCGACTACATGAACATGACCCCCCGG
CGGCCTGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCC
CACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTT
CAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAG
AACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGG
AGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGA
GATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGC
CTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCT
ACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAA
GGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACC
AAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCC
CTCGC

配列番号１７２－ＣＡＲ７の例をコードするヌクレオチド配列の例　ＣＤ８リーダー、ＡＳＧＲ１　ＶＨ（ＶＨ３、配列番号７６）、リンカー、ＡＳＧＲ１　ＶＬ（ＶＫ３、配列番号８０）、ｃ－Ｍｙｃタグ付きのＣＤ２８ヒンジ、ＣＤ２８膜貫通、ＣＤ２８細胞質、およびＣＤ３ｚ細胞質を含むＣＡＲ

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCT
TGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGGAGGTGCAGCTGTTGGA
GTCTGGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGGTCCCTGCGT
CTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGAGGATTATG
GTATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTCTAGA
GTGGGTCTCAGCGATTGGCCGCAACGGGTCGCAGACATAC
TACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCG
ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCT
GCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAAACTT

CGGAGGGGGCGGGGTCTGAATACGTTTACGTTAGACTACT
GGGGGTCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTTCAAGCCTGGTGAC
CGTGAGCAGCGGCGGCGGAGGCAGCGGTGGCGGAGGCAGC
GGCGGAGGCGGTAGCGACATCCAGATGACCCAGTCCCCCAT
CCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCATTAC
TTGCCGGGCAAGTCAGGCGATTGGGCGGTGGTTATTGTGG
TATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCG
GTCCGGGTTCCCGGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTT
CAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC
GGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGTC
AACAGGCGTATAGTCTGCCTCCGACGTTCGGCCAAGGGAC
CAAGGTGGAAATCAAACGGGCGGCCGCCATCGAGGTGGAG
CAGAAGCTGATCAGCGAGGAGGACCTGCTGGACAACGAGA
AGAGCAACGGCACCATCATCCACGTGAAGGGCAAGCACCT
GTGCCCCAGCCCCCTGTTCCCCGGCCCCAGCAAGCCCTTC
TGGGTGCTGGTGGTGGTGGGCGGCGTGCTGGCCTGCTACA
GCCTGCTGGTGACCGTGGCCTTCATCATCTTCTGGGTGCG
GAGCAAGCGGAGCCGGCTGCTGCACAGCGACTACATGAAC
ATGACCCCCCGGCGGCCTGGGCCCACCCGCAAGCATTACC
AGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTC
CAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTAC
CAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAG
GACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGG
CCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAAC
CCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGA
TGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCG
CCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTC
AGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGC
AGGCCCTGCCCCCTCGC

【０２９５】

上記に論じたように、本発明のポリヌクレオチドは、本明細書において定義されたＣＡＲに加えてポリペプチドもコードしてもよく、たとえばレポーターまたはマーカーポリペプチドまたはタンパク質をコードしてもよい。特に、本発明のポリヌクレオチドは、さらにＦＯＸＰ３ポリペプチドをコードしてもよい。

【０２９６】

一実施形態において、本発明のＴｒｅｇは、本発明のＣＡＲとＦＯＸＰ３ポリペプチド（外因性ＦＯＸＰ３ポリペプチド）をコードする１個以上のポリヌクレオチドを含んでもよく、したがって本発明のＴｒｅｇは、本発明のＣＡＲとＦＯＸＰ３ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを細胞に導入することにより作製してもよい。本発明のＣＡＲとＦＯＸＰ３ポリペプチドは、単一のポリヌクレオチド配列でコードされてもよく、または異なるポリヌクレオチドでコードされてもよい。

【０２９７】

「ＦＯＸＰ３」は、フォークヘッドボックスＰ３タンパク質の略称である。ＦＯＸＰ３は、転写因子のＦＯＸタンパク質ファミリーのメンバーであり、制御性Ｔ細胞の発生（development）と機能において調節経路のマスターレギュレーターとして機能する。本明細書における「ＦＯＸＰ３」は、ＦＯＸＰ３の変異体、アイソフォーム、および機能的断片を含む。

【０２９８】

「ＦＯＸＰ３ポリペプチド」は、ＦＯＸＰ３活性を有するポリペプチド、すなわちＦＯＸＰ３標的ＤＮＡに結合できて、Ｔｒｅｇの発生（development）と機能を調節する転

写因子として機能するポリペプチドである。特に、ＦＯＸＰ３ポリペプチドは、野生型ＦＯＸＰ３（配列番号１５７）と同じ、または類似の活性を有していてもよく、たとえば、野生型ＦＯＸＰ３ポリペプチドの活性の少なくとも４０、５０、６０、７０、８０、９０、９５、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、または１５０％を有していてもよい。このように、本明細書に記載のヌクレオチド配列によってコードされたＦＯＸＰ３ポリペプチドは、野生型ＦＯＸＰ３と比較して、増加または減少した活性を有していてもよい。転写因子活性を測定する技術が、当該技術分野においてよく知られている。たとえば、転写因子ＤＮＡ結合活性は、ＣｈＩＰによって測定されてもよい。転写因子の前記転写調節活性は、それが調節する遺伝子の発現レベルを定量化することにより測定してもよい。遺伝子発現は、ノーザンブロット法、ＳＡＧＥ、ｑＰＣＲ、ＨＰＬＣ、ＬＣ／ＭＳ、ウエスタンブロット法、またはＥＬＩＳＡなどの技術を使用して、ｍＲＮＡおよび／または前記遺伝子からつ作られるタンパク質のレベルを測定することにより定量化されてもよい。ＦＯＸＰ３により調節される遺伝子には、ＩＬ－２、ＩＬ－４、およびＩＦＮ－γなどのサイトカインなどがある（Siegler et al. Annu. Rev. Immunol. 2006, 24: 209-26, この参照により本明細書に援用される）。下記および上記に詳細に述べられたように、ＦＯＸＰ３またはＦＯＸＰ３ポリペプチドは、機能的断片、変異体、およびそれらのアイソフォーム、たとえば、配列番号１５７を含む。

【０２９９】

「ＦＯＸＰ３の機能的断片」とは、全長ＦＯＸＰ３ポリペプチドまたはポリヌクレオチドと同じかまたは類似の活性を有するＦＯＸＰ３ポリペプチドをコードするＦＯＸＰ３ポリペプチドの部分または領域、またはポリヌクレオチド（すなわち、ヌクレオチド配列）をいう。前記機能的断片は、全長ＦＯＸＰ３ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの活性の、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または少なくとも１００％を有していてもよい。当業者は、ＦＯＸＰ３の周知の構造および機能の特徴に基づいて、機能的断片を生成することができるであろう。たとえば、Song, X., et al.,2012.細胞reports, 1(6),pp.665-675; Lopes, J.E., et al.,2006に、それらが記載されている。The Journal of Immunology, 177(5), pp.3133-3142; and Lozano, T., et al, 2013. Frontiers in oncology, 3, p.294。また、ＮおよびＣ末端切断ＦＯＸＰ３断片が、ＷＯ２０１９／２４１５４９に記載され（この参照により本明細書に援用される）、たとえば下記のように配列番号１５７を有する。

【０３００】

「ＦＯＸＰ３変異体」は、ＦＯＸＰ３ポリペプチド、またはＦＯＸＰ３ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、たとえば配列番号１５７に対する同一性が、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、好ましくは少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％であってもよいアミノ酸配列またはヌクレオチド配列を、含んでいてもよい。ＦＯＸＰ３変異体は、野生型ＦＯＸＰ３と同じ、または類似の活性を有していてもよく、たとえば、野生型ＦＯＸＰ３ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの活性の少なくとも４０、５０、６０、７０、８０、９０、９５、１００、１１０、１２０、１３０、１４０または１５０％を有していてもよい。当業者は、ＦＯＸＰ３の周知の構造および機能の特徴に基づいて、および／または保存的置換を使用して、ＦＯＸＰ３変異体を生成することができるであろう。野生型ＦＯＸＰ３と比較して、ＦＯＸＰ３変異体は、Ｔｒｅｇ細胞中で類似または同じの代謝時間（または分解速度）を有していてもよく、たとえば、Ｔｒｅｇ細胞中での野生型ＦＯＸＰ３の代謝時間の少なくとも４０、５０、６０、７０、８０、９０、９５、９９、または１００％を有していてもよい。いくつかのＦＯＸＰ３変異体は、野生型ＦＯＸＰ３と比較して代謝時間（または分解速度）が少なくてもよく、ＷＯ２０１９／２４１５４９　（この参照により本明細書に援用される）に記載のように、たとえば、配列番号１５７のアミノ酸４１８および／または４２２で、たとえばＳ４１８Ｅおよび／またはＳ４２２Ａというアミノ酸置換を有するＦＯＸ

Ｐ３変異体があり、配列番号１５８～１６０に示されており、配列番号１５８～１６０は、ａａ４１８変異種（ｍｕｔａｎｔ）と、ａａ４２２変異種と、ａａ４１８およびａａ４２２変異種とをそれぞれ表す。

【０３０１】

好適には、本明細書に記載の核酸分子、コンストラクトまたはベクトルによってコードされる前記ＦＯＸＰ３ポリペプチドは、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢアクセッション番号Ｑ９ＢＺＳ１（配列番号：１５７）やその機能的断片または変異体などの、ヒトＦＯＸＰ３のポリペプチド配列を含むかそれから成ってもよい。

【０３０２】

本発明のいくつかの実施形態において、前記ＦＯＸＰ３ポリペプチドは、配列番号１５７に対する同一性が少なくとも７０％であるアミノ酸配列またはその機能的断片を含むか、またはそれから成る。好適には、前記ＦＯＸＰ３ポリペプチドは、配列番号１５７に対する同一性が少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％であるアミノ酸配列またはその機能的断片を含むか、またはそれから成る。いくつかの実施形態において、前記ＦＯＸＰ３ポリペプチドは、配列番号１５７またはその機能的断片を含むか、またはそれから成る。

【０３０３】

いくつかの実施形態において、上述したように、前記ＦＯＸＰ３ポリペプチドは、配列番号１５７の残基４１８および／または４２２に変異を含んでいてもよく、配列番号１５８、配列番号１５９、または配列番号１６０に示されている通りである。

【０３０４】

本発明のいくつかの実施形態において、ＦＯＸＰ３ポリペプチドは、Ｎおよび／またはＣ末端で切断され、その結果、機能的断片が作製されてもよい。特に、ＦＯＸＰ３のＮおよびＣ末端切断機能的断片は、配列番号１６１、またはそれに対する同一性が少なくとも８０、８５、９０、９５または９９％である機能的変異体のアミノ酸配列を含むか、またはそれから成ってもよい。

【０３０５】

好適には、前記ＦＯＸＰ３ポリペプチドは配列番号１５７の変異体、たとえば自然変異体であってもよい。好適には、前記ＦＯＸＰ３ポリペプチドは配列番号１５７のアイソフォームであってもよい。たとえば、前記ＦＯＸＰ３ポリペプチドは、配列番号１５７と比較して７２～１０６位のアミノ酸が欠失していてもよい。または、前記ＦＯＸＰ３ポリペプチドは、配列番号１５７と比較して２４６～２７２位のアミノ酸が欠失していてもよい。

【０３０６】

好適には、前記ＦＯＸＰ３ポリペプチドは、配列番号１６２またはその機能的断片を含む。配列番号１６２は、ＦＯＸＰ３ポリペプチドの例を表す。

【０３０７】

好適には、前記ＦＯＸＰ３ポリペプチドは、配列番号１６２に対する同一性が少なくとも７０％であるアミノ酸配列またはその機能的断片を含むか、またはそれから成る。好適には、前記ＦＯＸＰ３ポリペプチドは、配列番号１６２に対する同一性が少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％であるアミノ酸配列またはその機能的断片を含む。いくつかの実施形態において、前記ＦＯＸＰ３ポリペプチドは、配列番号１６２またはその機能的断片を含むか、またはそれから成る。

【０３０８】

好適には、前記ＦＯＸＰ３ポリペプチドは配列番号１６２の変異体、たとえば自然変異体であってもよい。好適には、前記ＦＯＸＰ３ポリペプチドは、配列番号１６２またはその機能的断片のアイソフォームである。たとえば、前記ＦＯＸＰ３ポリペプチドは、配列番号１６２と比較して７２～１０６位のアミノ酸が欠失していてもよい。または、前記ＦＯＸＰ３ポリペプチドは、配列番号１６２と比較して２４６～２７２位のアミノ酸が欠失

していてもよい。

【０３０９】

好適には、ＦＯＸＰ３ポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドは、配列番号１６３に示すヌクレオチド配列を含むか、またはそれから成ってもよく、前記ヌクレオチド配列はＦＯＸＰ３ヌクレオチド配列の例を表す。

【０３１０】

本発明のいくつかの実施形態において、前記ＦＯＸＰ３ポリペプチドまたは変異体をコードするポリヌクレオチドは、配列番号１６３に対する同一性が少なくとも７０％であるヌクレオチド配列、または機能的ＦＯＸＰ３ポリペプチドをコードするその機能的断片を含む。好適には、前記ＦＯＸＰ３ポリペプチドまたは変異体をコードするポリヌクレオチドは、配列番号１６３に対する同一性が少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％であるポリヌクレオチド配列、または、機能的ＦＯＸＰ３ポリペプチドをコードするその機能的断片を含む。本発明のいくつかの実施形態において、前記ＦＯＸＰ３ポリペプチドまたは変異体をコードするポリヌクレオチドは、配列番号１６３、または機能的ＦＯＸＰ３ポリペプチドをコードするその機能的断片を含むか、またはそれから成る。

【０３１１】

好適には、ＦＯＸＰ３ポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドは、配列番号１６４に示すポリヌクレオチド配列を含むか、またはそれから成ってもよく、前記ポリヌクレオチド配列はＦＯＸＰ３ヌクレオチド配列の別の例を表す。

【０３１２】

本発明のいくつかの実施形態において、前記ＦＯＸＰ３ポリペプチドまたは変異体をコードするポリヌクレオチドは、配列番号１６４に対する同一性が少なくとも７０％であるヌクレオチド配列、または機能的ＦＯＸＰ３ポリペプチドをコードするその断片を含む。好適には、前記ＦＯＸＰ３ポリペプチドまたは変異体をコードするポリヌクレオチドは、配列番号１６４に対する同一性が少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％であるポリヌクレオチド配列、または、機能的ＦＯＸＰ３ポリペプチドをコードするその機能的断片を含む。本発明のいくつかの実施形態において、前記ＦＯＸＰ３ポリペプチドまたは変異体をコードするポリヌクレオチドは、配列番号１６４、または機能的ＦＯＸＰ３ポリペプチドをコードするその機能的断片を含むか、またはそれから成る。

【０３１３】

好適には、前記ＦＯＸＰ３ポリペプチドまたは機能的断片またはその変異体をコードするポリヌクレオチドは、コドン最適化されていてもよい。好適には、前記ＦＯＸＰ３ポリペプチドまたは機能的断片またはその変異体をコードするポリヌクレオチドは、ヒトの細胞における発現のためにコドン最適化されていてもよい。

配列番号１５７　ＦＯＸＰ３、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢアクセッション番号Ｑ９ＢＺＳ１：

ＭＰＮＰＲＰＧＫＰＳＡＰＳＬＡＬＧＰＳＰＧＡＳＰＳＷＲＡＡＰＫＡＳＤＬＬＧＡＲＧ
ＰＧＧＴＦＱＧＲＤＬＲＧＧＡＨＡＳＳＳＳＬＮＰＭＰＰＳＱＬＱＬＰＴＬＰＬＶＭＶＡ
ＰＳＧＡＲＬＧＰＬＰＨＬＱＡＬＬＱＤＲＰＨＦＭＨＱＬＳＴＶＤＡＨＡＲＴＰＶＬＱＶ
ＨＰＬＥＳＰＡＭＩＳＬＴＰＰＴＴＡＴＧＶＦＳＬＫＡＲＰＧＬＰＰＧＩＮＶＡＳＬＥＷ
ＶＳＲＥＰＡＬＬＣＴＦＦＰＮＰＳＡＰＲＫＤＳＴＬＳＡＶＰＱＳＳＹＰＬＬＡＮＧＶＣＫ
ＷＰＧＣＥＫＶＦＥＥＰＥＤＦＬＫＨＣＱＡＤＨＬＬＤＥＫＧＲＡＱＣＬＬＱＲＥＭＶＱ
ＳＬＥＱＱＬＶＬＥＫＥＫＬＳＡＭＱＡＨＬＡＧＫＭＡＬＴＫＡＳＳＶＡＳＳＤＫＧＳＣ
ＣＩＶＡＡＧＳＱＧＰＶＶＰＡＷＳＧＰＲＥＡＰＤＳＬＦＡＶＲＲＨＬＷＧＳＨＧＮＳＴ
ＦＰＥＦＬＨＮＭＤＹＦＫＦＨＮＭＲＰＰＦＴＹＡＴＬＩＲＷＡＩＬＥＡＰＥＫＱＲＴＬ
ＮＥＩＹＨＷＦＴＲＭＦＡＦＦＲＮＨＰＡＴＷＫＮＡＩＲＨＮＬＳＬＨＫＣＦＶＲＶＥＳ
ＥＫＧＡＶＷＴＶＤＥＬＥＦＲＫＫＲＳＱＲＰＳＲＣＳＮＰＴＰＧＰ

配列番号１５８　ＦＯＸＰ３、ａａ４１８変種：

ＭＰＮＰＲＰＧＫＰＳＡＰＳＬＡＬＧＰＳＰＧＡＳＰＳＷＲＡＡＰＫＡＳＤＬＬＧＡＲＧ

PGGTFQGRDLRGGAHASSSSLNPMPPSQLQLPTLPLVMVA
PSGARLGPLPHLQALLQDRPHFMHQLSTVDAHARTPVLQV
HPLESPAMISLTPPTTATGVFSLKARPGLPPGINVASLEW
VSREPALLCTFPNPSAPRKDSTLSAVPQSSYPLLANGVCK
WPGCEKVFEEPEDFLKHCQADHLLDEKGRAQCLLQREMVQ
SLEQQLVLEKEKLSAMQAHLAGKMALTKASSVASSDKGSC
CIVAAGSQGPVVPAWSGPREAPDSLFAVRRHLWGSHGNST
FPEFLHNMDYFKFHNMRPPFTYATLIRWAILEAPEKQRTL
NEIYHWFTRMFAFFRNHPATWKNAIRHNLSLHKCFVRVES
EKGAVWTVDELEFRKKREQRPSRCSNPTPGP

配列番号１５９ ＦＯＸＰ３、ａａ４２２変種：

MPNPRPGKPSAPSLALGPSPGASPSWRAAPKASDLLGARG
PGGTFQGRDLRGGAHASSSSLNPMPPSQLQLPTLPLVMVA
PSGARLGPLPHLQALLQDRPHFMHQLSTVDAHARTPVLQV
HPLESPAMISLTPPTTATGVFSLKARPGLPPGINVASLEW
VSREPALLCTFPNPSAPRKDSTLSAVPQSSYPLLANGVCK
WPGCEKVFEEPEDFLKHCQADHLLDEKGRAQCLLQREMVQ
SLEQQLVLEKEKLSAMQAHLAGKMALTKASSVASSDKGSC
CIVAAGSQGPVVPAWSGPREAPDSLFAVRRHLWGSHGNST
FPEFLHNMDYFKFHNMRPPFTYATLIRWAILEAPEKQRTL
NEIYHWFTRMFAFFRNHPATWKNAIRHNLSLHKCFVRVES
EKGAVWTVDELEFRKKRSQRPARCSNPTPGP

配列番号１６０ ＦＯＸＰ３、ａａ４１８および４２２変種：

MPNPRPGKPSAPSLALGPSPGASPSWRAAPKASDLLGARG
PGGTFQGRDLRGGAHASSSSLNPMPPSQLQLPTLPLVMVA
PSGARLGPLPHLQALLQDRPHFMHQLSTVDAHARTPVLQV
HPLESPAMISLTPPTTATGVFSLKARPGLPPGINVASLEW
VSREPALLCTFPNPSAPRKDSTLSAVPQSSYPLLANGVCK
WPGCEKVFEEPEDFLKHCQADHLLDEKGRAQCLLQREMVQ
SLEQQLVLEKEKLSAMQAHLAGKMALTKASSVASSDKGSC
CIVAAGSQGPVVPAWSGPREAPDSLFAVRRHLWGSHGNST
FPEFLHNMDYFKFHNMRPPFTYATLIRWAILEAPEKQRTL
NEIYHWFTRMFAFFRNHPATWKNAIRHNLSLHKCFVRVES
EKGAVWTVDELEFRKKRESQRPARCSNPTPGP

配列番号１６１ ＦＯＸＰ３、切断型変異体：

GGAHASSSSL NPMPPSQLQL PTLPLVMVAP SGARLGPL
PH LQALLQDRPH FMHQLSTVDA HARTPVLQVH PLESPA
MISL TPPTTATGVF SLKARPGLPP GINVASLEWV SREP
ALLCTF PNPSAPRKDS TLSAVPQSSY PLLANGVCKW PG
CEKVFEEP EDFLKHCQAD HLLDEKGRAQ CLLQREMVQS
LEQQLVLEKE KLSAMQAHLA GKMALTKASS VASSDKGS
CC IVAAGSQGPV VPAWSGPREA PDSLFAVRRH LWGSHG
NSTF PEFLHNMDYF KFHNMRPPFT YATLIRWAIL EAPE
KQRTLN EIYHWFTRMF AFFRNHPATW KNAIRHNLSL HK
CFVRVESE KGAVWTVDEL EF

配列番号１６２ ＦＯＸＰ３、変異体の例：

MPNPRPGKPSAPSLALGPSPGASPSWRAAPKASDLLGARG
PGGTFQGRDLRGGAHASSSSLNPMPPSQLQLPTLPLVMVA
PSGARLGPLPHLQALLQDRPHFMHQLSTVDAHARTPVLQV
HPLESPAMISLTPPTTATGVFSLKARPGLPPGINVASLEW

V S R E P A L L C T F P N P S A P R K D S T L S A V P Q S S Y P L L A N G V C K
W P G C E K V F E E P E D F L K H C Q A D H L L D E K G R A Q C L L Q R E M V Q
S L E Q V E E L S A M Q A H L A G K M A L T K A S S V A S S D K G S C C I V A A
G S Q G P V V P A W S G P R E A P D S L F A V R R H L W G S H G N S T F P E F L
H N M D Y F K F H N M R P P F T Y A T L I R W A I L E A P E K Q R T L N E I Y H
W F T R M F A F F R N H P A T W K N A I R H N L S L H K C F V R V E S E K G A V
W T V D E L E F R K K R S Q R P S R C S N P T P G P E G R G S L L T C G D V E E
N

配列番号１６３ ＦＯＸＰ３、ＦＯＸＰ３ポリヌクレオチドの例

A T G C C C A A C C C C A G G C C T G G C A A G C C C T C G G C C C C T T C C T
T G G C C C T T G G C C C A T C C C C A G G A G C C T C G C C C A G C T G G A G
G G C T G C A C C C A A A G C C T C A G A C C T G C T G G G G G C C C C G G G G C
C C A G G G G G A A C C T T C C A G G G C C G A G A T C T T C G A G G C G G G G
C C C A T G C C T C C T C T T C T T C C T T G A A C C C C A T G C C A C C A T C
G C A G C T G C A G C T G C C C A C A C T G C C C C T A G T C A T G G T G G C A
C C C T C C G G G G C A C G G C T G G G C C C C T T G C C C C A C T T A C A G G
C A C T C C T C C A G G A C A G G C C A C A T T T C A T G C A C C A G C T C T C
A A C G G T G G A T G C C C A C G C C C G G A C C C C T G T G C T G C A G G T G
C A C C C C C T G G A G A G C C C A G C C A T G A T C A G C C T C A C A C C A C
C C A C C A C C G C C A C T G G G G T C T T C T C C C T C A A G G C C C G G C C
T G G C C T C C C A C C T G G G A T C A A C G T G G C C A G C C T G G A A T G G
G T G T C C A G G G A G C C G G C A C T G C T C T G C A C C T T C C C A A A T C
C C A G T G C A C C C A G G A A G G A C A G C A C C C T T T C G G C T G T G C C
C C A G A G C T C C T A C C C A C T G C T G G C A A A T G G T G T C T G C A A G
T G G C C C G G A T G T G A G A A G G T C T T C G A A G A G C C A G A G G A C T
T C C T C A A G C A C T G C C A G G C G G A C C A T C T T C T G G A T G A G A A
G G G C A G G G C A C A A T G T C T C C T C C A G A G A G A G A T G G T A C A G
T C T C T G G A G C A G C A G C T G G T G C T G G A G A A G G A G A A G C T G A
G T G C C A T G C A G G C C C A C C T G G C T G G G A A A A T G G C A C T G A C
C A A G G C T T C A T C T G T G G C A T C A T C C G A C A A G G G C T C C T G C
T G C A T C G T A G C T G C T G G C A G C C A A G G C C C T G T C G T C C C A G
C C T G G T C T G G C C C C C G G G A G G C C C C T G A C A G C C T G T T T G C
T G T C C G G A G G C A C C T G T G G G G T A G C C A T G G A A A C A G C A C A
T T C C C A G A G T T C C T C C A C A A C A T G G A C T A C T T C A A G T T C C
A C A A C A T G C G A C C C C C T T T C A C C T A C G C C A C G C T C A T C C G
C T G G G C C A T C C T G G A G G C T C C A G A G A A G C A G C G G A C A C T C
A A T G A G A T C T A C C A C T G G T T C A C A C G C A T G T T T G C C T T C T
T C A G A A A C C A T C C T G C C A C C T G G A A G A A C G C C A T C C G C C A
C A A C C T G A G T C T G C A C A A G T G C T T T G T G C G G G T G G A G A G C
G A G A A G G G G G C T G T G T G G A C C G T G G A T G A G C T G G A G T T C C
G C A A G A A A C G G A G C C A G A G G C C C A G C A G G T G T T C C A A C C C
T A C A C C T G G C C C C T G A

配列番号１６４ ＦＯＸＰ３、ＦＯＸＰ３ポリヌクレオチドの例：

G A A T T C G T C G A C A T G C C C A A C C C C A G A C C C G G C A A G C C T T
C T G C C C C T T C T C T G G C C C T G G G A C C A T C T C C T G G C G C C T C
C C C A T C T T G G A G A G C C G C C C C T A A A G C C A G C G A T C T G C T G
G G A G C T A G A G G C C C T G G C G G C A C A T T C C A G G G C A G A G A T C
T G A G A G G C G G A G C C C A C G C C T C T A G C A G C A G C C T G A A T C C
C A T G C C C C C T A G C C A G C T G C A G C T G C C T A C A C T G C C T C T C
G T G A T G G T G G C C C C T A G C G G A G C T A G A C T G G G C C C T C T G C

CTCATCTGCAGGCTCTGCTGCAGGACCGGCCCCACTTTAT
GCACCAGCTGAGCACCGTGGACGCCCACGCCAGAACACCT
GTGCTGCAGGTGCACCCCCCTGGAAAGCCCTGCCATGATCA
GCCTGACCCCCTCCAACCACAGCCACCGGCGTGTTCAGCCT
GAAGGCCAGACCTGGACTGCCCCCTGGCATCAATGTGGCC
AGCCTGGAATGGGTGTCCCGCGAACCTGCCCTGCTGTGCA
CCTTCCCCCAATCCTAGCGCCCCCAGAAAGGACAGCACACT
GTCTGCCGTGCCCCAGAGCAGCTATCCCCTGCTGGCTAAC
GGCGTGTGCAAGTGGCCTGGCTGCGAGAAGGTGTTCGAGG
AACCCGAGGACTTCCTGAAGCACTGCCAGGCCGACCATCT
GCTGGACGAGAAAGGCAGAGCCCAGTGCCTGCTGCAGCGC
GAGATGGTGCAGTCCCTGGAACAGCAGCTGGTGCTGGAAA
AAGAAAAGCTGAGCGCCATGCAGGCCCACCTGGCCGGAAA
GATGGCCCTGACAAAAGCCAGCAGCGTGGCCAGCTCCGAC
AAGGGCAGCTGTTGTATCGTGGCCGCTGGCAGCCAGGGAC
CTGTGGTGCCTGCTTGGAGCGGACCTAGAGAGGCCCCCGA
TAGCCTGTTTGCCGTGCGGAGACACCTGTGGGGCAGCCAC
GGCAACTCTACCTTCCCCGAGTTCCTGCACAACATGGACT
ACTTCAAGTTCCACAACATGAGGCCCCCCTTCACCTACGC
CACCCTGATCAGATGGGCCATTCTGGAAGCCCCCGAGAAG
CAGCGGACCCTGAACGAGATCTACCACTGGTTTACCCGGA
TGTTCGCCTTCTTCCGGAACCACCCCGCCACCTGGAAGAA
CGCCATCCGGCACAATCTGAGCCTGCACAAGTGCTTCGTG
CGGGTGGAAAGCGAGAAGGGCGCCGTGTGGACAGTGGACG
AGCTGGAATTTCGGAAGAAGCGGTCCCAGAGGCCCAGCCG
GTGTAGCAATCCTACACCTGGCCCTGAGGGCAGAGGAAGT
CTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGGAGAATCC

【０３１４】

ベクター

本発明はさらに、本発明のＣＡＲをコードするベクターを提供する。前記ベクターは、たとえば、本発明のＣＡＲをコードし、場合によってはさらに別のポリペプチド、たとえばＦＯＸＰ３ポリペプチドをコードする、本発明のポリヌクレオチドを含んでいてもよい。

【０３１５】

ベクターは、一つの環境から別の環境へのある実体の移動を可能にする、または容易にするツールである。本発明によれば、例として、組換え核酸技術に使用されるいくつかのベクターは、核酸のセグメント（たとえば、異種ｃＤＮＡセグメントなどの異種ＤＮＡセグメント）などの実体を、標的細胞に移動させることができる。ベクターは、非ウイルス性であってもよいし、ウイルス性であってもよい。組換え核酸技術に使用されるベクトルの例としては、プラスミド、ｍＲＮＡ分子（たとえば、インビトロ転写ｍＲＮＡ）、染色体、人工染色体およびウイルスが挙げられるが、これらに限定されるわけではない。ベクターはまた、たとえば、ネイキッド核酸（たとえば、ＤＮＡ）であってもよい。もっとも単純な形態では、ベクターそれ自体が、目的のヌクレオチドであってもよい。

【０３１６】

本発明で使用されるベクターは、たとえば、プラスミド、ｍＲＮＡ、またはウイルスベクターであってもよく、ポリヌクレオチドの発現のためのプロモーター、場合によってはそのプロモーターのレギュレーターを含んでいてもよい。

【０３１７】

本発明のポリヌクレオチドを含むベクターを、形質転換や形質導入など、当該技術分野で周知の様々な技術を使用して細胞に導入してもよい。いくつかの技術が、当該技術分野

で周知である。たとえば、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、バキュロウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクターなどの組換えウイルスベクターを使用した感染、核酸の直接注入や、遺伝子銃形質転換である。非ウイルス送達システムには、ＤＮＡ導入法などがあるが、これらに限定されるわけではない。なお、遺伝子導入は、遺伝子を標的細胞へ送達するための非ウイルスベクターを使用したプロセスを含む。非ウイルス送達システムは、リポソームまたは両親媒性細胞浸透性ペプチド、好ましくは、本発明のポリヌクレオチドと複合されたものを含むことができる。

【０３１８】

典型的な遺伝子導入法としては、エレクトロポレーション、ＤＮＡ遺伝子銃、脂質媒介トランスフェクション、圧縮ＤＮＡ媒介トランスフェクション、リポソーム法、イムノリポソーム法、リポフェクション法、カチオン性薬剤媒介トランスフェクション、カチオン性表面両親媒性物質法（ＣＦＡｓ）（Nat. Biotechnol. (1996) 14: 556）、および、これらの組み合わせがある。

【０３１９】

たとえば本発明の異なる複数のＣＡＲをコードするベクター、または、本発明のＣＡＲと、さらに別のポリペプチドとをコードするベクターなど、複数のベクターが、形質導入／遺伝子導入に使用できるであろう。

【０３２０】

細胞作成方法

ウイルスベクターを用いた形質導入や、ＤＮＡまたはＲＮＡを用いた遺伝子導入などの多数の手段のうちの一つによって、本明細書で定義されたＣＡＲをコードするＤＮＡまたはＲＮＡを導入することにより、本発明の改変されたＴｒｅｇが生成されてもよい。本発明の改変されたＴｒｅｇは、本明細書において定義されたポリヌクレオチドまたはベクターをＴｒｅｇに（たとえば、形質導入または遺伝子導入によって）導入することにより、作成される。または、以下にさらに記載するように、本発明の改変されたＴｒｅｇは、本明細書において定義されたポリヌクレオチドまたはベクターを、Ｔｒｅｇではない細胞に導入して変換し（たとえば、前記細胞を分化させ、または再プログラムして）Ｔｒｅｇ表現型を有するようにしてもよい。前記ポリヌクレオチドまたはベクターは、変換前または後に導入してもよい。

【０３２１】

好適には、前記Ｔｒｅｇは、対象から単離されたサンプル由来であってもよい。前記Ｔｒｅｇは、いずれかの好適な方法、たとえば磁性分離によって、前記サンプルからさらに分離されてもよい。

【０３２２】

本発明の改変されたＴｒｅｇは、下記工程を含む方法によって生成されてもよい。

（ｉ）対象から細胞含有サンプルを単離する、または細胞含有サンプルを得る工程；および

（ｉｉ）前記細胞含有サンプルに、ポリヌクレオチド、核酸、または本発明のＣＡＲをコードするベクターを形質導入または遺伝子導入し、改変された細胞の集団を得る工程。

【０３２３】

好適には、前記方法の工程（ｉｉ）の前、および／またはその後に、Ｔｒｅｇ富化サンプルを、細胞含有サンプルから単離し、富化し、および／または細胞含有サンプルから生成してもよい。たとえば、Ｔｒｅｇの単離、富化、および／または生成は、工程（ｉｉ）の前に、および／またはその後に行って、Ｔｒｅｇ富化サンプルを単離し、富化し、および／または生成してもよい。本発明のＣＡＲ、ポリヌクレオチド、および／またはベクターを含む細胞および／またはＴｒｅｇについて富化を行うために、工程（ｉｉ）の後に単離および／または富化を行ってもよい。

【０３２４】

Ｔｒｅｇ富化サンプルは、当業者に周知のいずれかの方法によって、たとえばＦＡＣＳおよび／または磁性ビーズ分離によって、単離または富化されてもよい。Ｔｒｅｇ富化サンプルは、当業者に周知のいずれかの方法によって、細胞含有サンプルから生成されてもよく、たとえば、ＦＯＸＰ３をコードするＤＮＡまたはＲＮＡを導入することによりＴｃｏｎ細胞から、および／または誘導性前駆細胞または胚性前駆細胞のエクスビボ分化から、生成されてもよい。

【０３２５】

好適には、前記細胞は、本明細書において定義されたＴｒｅｇである。

【０３２６】

好適には、本発明の改変されたＴｒｅｇは、下記工程を含む方法によって生成されてもよい。

（ｉ）対象からＴｒｅｇ富化サンプルを単離する、またはＴｒｅｇ富化サンプルを得る工程；および

（ｉｉ）前記Ｔｒｅｇ富化サンプルに、ポリヌクレオチド、核酸、または本発明のＣＡＲをコードするベクターを形質導入または遺伝子導入し、本発明に係る改変されたＴｒｅｇ細胞の集団を提供する工程。

【０３２７】

本明細書に記載のＣＡＲをコードするポリヌクレオチドを導入する前に、または後に、たとえば、抗ＣＤ３モノクローナル抗体での処理により、または抗ＣＤ３および抗ＣＤ２８モノクローナル抗体での処理により、前記細胞および／またはＴｒｅｇを活性化および／または増殖させてもよい。

【０３２８】

また、抗ＣＤ３および抗ＣＤ２８モノクローナル抗体がＩＬ－２との組み合わせで存在するところで、前記細胞および／またはＴｒｅｇを増殖してもよい。好適には、ＩＬ－２はＩＬ－１５と置き換えられてもよい。Ｔｒｅｇ増殖プロトコルで使用されてもよい別の成分としては、ラパマイシン、全トランス型レチノイン酸（ＡＴＲＡ）およびＴＧＦβがあるが、これらに限定されるわけではない。

【０３２９】

本明細書において、「活性化される」とは、細胞または細胞の集団が刺激されて、細胞の増殖が起こることを意味する。本明細書において、「増殖される」とは、細胞または細胞の集団の増殖が誘導されることを意味する。細胞の集団の増殖は、たとえば、集団に存在する細胞の数をカウントすることにより測定してもよい。細胞の表現型は、フローサイトメトリーなど当該技術分野で周知の方法によって判定してもよい。

【０３３０】

前記細胞および／またはＴｒｅｇは、前記方法の各工程の後に、特に増殖の後に、洗浄してもよい。

【０３３１】

前記改変された細胞またはＴｒｅｇの集団は、当業者に周知のいずれかの方法によって、たとえばＦＡＣＳおよび／または磁性ビーズ分離によって、さらに富化されてもよい。作製方法の工程は、閉鎖された無菌の細胞培養系で行われてもよい。

【実施例】

【０３３２】

本発明を実施例によりさらに説明するが、これは本発明を実施する際に当業者を支援するためのものであり、本発明の範囲を制限することを意図していない。

【０３３３】

実施例１－抗ＡＳＧＲ１　ＣＡＲコンストラクトの設計

キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）は、ＡＳＧＲに特異的に結合することがわかっている単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）由来の抗原認識ドメインと、ＣＤ２８（ａａ１５３～１７９）由来の膜貫通ドメイン（ＴＭ）と、ＣＤ３ζおよびＣＤ２８のシグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインと、を含むように設計された。コンストラクトの例を以下

および図１に示す。
ＣＤ８リーダー、ＡＳＧＲ１ ＶＨ抗原認識ドメイン、ＣＤ８αヒンジドメイン、ＣＤ２８膜貫通、ＣＤ２８細胞質シグナル伝達ドメイン、ＣＤ３ｚ細胞質シグナル伝達ドメイン、ＦＰ２Ａドメイン、ＧＦＰを含む、抗ＡＳＧＲ１ ＣＡＲコンストラクト１（配列番号１５１）
ＭＡＬＰＶＴＡＬＬＬＰＬＡＬＬＬＨＡＡＲＰＥＶＱＬＬＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲ
ＬＳＣＡＡＳＧＦＴＦＥＫＹＡＭＡＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶＳＲＩＳＡＲＧＶＴＴＹ
ＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＬＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＫＨ
ＫＲＨＥＨＴＲＦＤＳＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳＴＴＴＰＡＰＲＰＰＴＰＡＰＴＩＡＳＱＰ
ＬＳＬＲＰＥＡＣＲＰＡＡＧＧＡＶＨＴＲＧＬＤＦＡＣＤＦＷＶＬＶＶＶＧＧＶＬＡＣＹ
ＳＬＬＶＴＶＡＦＩＩＦＷＶＲＳＫＲＳＲＬＬＨＳＤＹＭＮＭＴＰＲＲＰＧＰＴＲＫＨＹ
ＱＰＹＡＰＰＲＤＦＡＡＹＲＳＲＶＫＦＳＲＳＡＤＡＰＡＹＱＱＧＱＮＱＬＹＮＥＬＮＬ
ＧＲＲＥＥＹＤＶＬＤＫＲＲＧＲＤＰＥＭＧＧＫＰＲＲＫＮＰＱＥＧＬＹＮＥＬＱＫＤＫ
ＭＡＥＡＹＳＥＩＧＭＫＧＥＲＲＲＧＫＧＨＤＧＬＹＱＧＬＳＴＡＴＫＤＴＹＤＡＬＨＭ
ＱＡＬＰＰＲＲＲＫＲＧＳＧＡＴＮＦＳＬＬＫＱＡＧＤＶＥＥＮＰＧＰＴＲＧＧＧＡＴＭ
ＶＳＫＧＥＥＬＦＴＧＶＶＰＩＬＶＥＬＤＧＤＶＮＧＨＫＦＳＶＳＧＥＧＥＧＤＡＴＹＧ
ＫＬＴＬＫＦＩＣＴＴＧＫＬＰＶＰＷＰＴＬＶＴＴＬＴＹＧＶＱＣＦＳＲＹＰＤＨＭＫＱ
ＨＤＦＦＫＳＡＭＰＥＧＹＶＱＥＲＴＩＦＦＫＤＤＧＮＹＫＴＲＡＥＶＫＦＥＧＤＴＬＶ
ＮＲＩＥＬＫＧＩＤＦＫＥＤＧＮＩＬＧＨＫＬＥＹＮＹＮＳＨＮＶＹＩＭＡＤＫＱＫＮＧ
ＩＫＶＮＦＫＩＲＨＮＩＥＤＧＳＶＱＬＡＤＨＹＱＱＮＴＰＩＧＤＧＰＶＬＬＰＤＮＨＹ
ＬＳＴＱＳＫＬＳＫＤＰＮＥＫＲＤＨＭＶＬＬＥＦＶＴＡＡＧＩＴＬＧＭＤＥＬＹＫ
ＣＤ８リーダー、ＡＳＧＲ１ ＶＨ抗原認識ドメイン、ｃ－Ｍｙｃタグ付きのＣＤ２８ヒンジドメイン、ＣＤ２８膜貫通、ＣＤ２８細胞質シグナル伝達ドメイン、ＣＤ３ｚ細胞質シグナル伝達ドメイン、ＦＰ２Ａドメイン、ＧＦＰを含む、抗ＡＳＧＲ１ ＣＡＲコンストラクト２（配列番号１５２）
ＭＡＬＰＶＴＡＬＬＬＰＬＡＬＬＬＨＡＡＲＰＥＶＱＬＬＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲ
ＬＳＣＡＡＳＧＦＴＦＥＫＹＡＭＡＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶＳＲＩＳＡＲＧＶＴＴＹ
ＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＬＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＫＨ
ＫＲＨＥＨＴＲＦＤＳＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳＡＡＡＩＥＶＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬＬＤＮ
ＥＫＳＮＧＴＩＩＨＶＫＧＫＨＬＣＰＳＰＬＦＰＧＰＳＫＰＦＷＶＬＶＶＶＧＧＶＬＡＣ
ＹＳＬＬＶＴＶＡＦＩＩＦＷＶＲＳＫＲＳＲＬＬＨＳＤＹＭＮＭＴＰＲＲＰＧＰＴＲＫＨ
ＹＱＰＹＡＰＰＲＤＦＡＡＹＲＳＲＶＫＦＳＲＳＡＤＡＰＡＹＱＱＧＱＮＱＬＹＮＥＬＮ
ＬＧＲＲＥＥＹＤＶＬＤＫＲＲＧＲＤＰＥＭＧＧＫＰＲＲＫＮＰＱＥＧＬＹＮＥＬＱＫＤ
ＫＭＡＥＡＹＳＥＩＧＭＫＧＥＲＲＲＧＫＧＨＤＧＬＹＱＧＬＳＴＡＴＫＤＴＹＤＡＬＨ
ＭＱＡＬＰＰＲＲＲＫＲＧＳＧＡＴＮＦＳＬＬＫＱＡＧＤＶＥＥＮＰＧＰＴＲＧＧＧＡＴ
ＭＶＳＫＧＥＥＬＦＴＧＶＶＰＩＬＶＥＬＤＧＤＶＮＧＨＫＦＳＶＳＧＥＧＥＧＤＡＴＹ
ＧＫＬＴＬＫＦＩＣＴＴＧＫＬＰＶＰＷＰＴＬＶＴＴＬＴＹＧＶＱＣＦＳＲＹＰＤＨＭＫ
ＱＨＤＦＦＫＳＡＭＰＥＧＹＶＱＥＲＴＩＦＦＫＤＤＧＮＹＫＴＲＡＥＶＫＦＥＧＤＴＬ
ＶＮＲＩＥＬＫＧＩＤＦＫＥＤＧＮＩＬＧＨＫＬＥＹＮＹＮＳＨＮＶＹＩＭＡＤＫＱＫＮ
ＧＩＫＶＮＦＫＩＲＨＮＩＥＤＧＳＶＱＬＡＤＨＹＱＱＮＴＰＩＧＤＧＰＶＬＬＰＤＮＨ
ＹＬＳＴＱＳＫＬＳＫＤＰＮＥＫＲＤＨＭＶＬＬＥＦＶＴＡＡＧＩＴＬＧＭＤＥＬＹＫ

【０３３４】

実施例２－抗ＡＳＧＲ１ ＣＡＲ－Ｔｒｅｇの生成

抗ＡＳＧＲ１ ＣＡＲ－Ｔｒｅｇを生成した。ＣＤ４＋ＣＤ２５ｈｉＣＤ１２７－を単離し、抗ＣＤ３／ＣＤ２８ビーズで活性化した。活性化の２日後、Ｔｒｅｇに抗ＡＳＧＲ１ ＣＡＲとＧＦＰレポーター遺伝子とを含むレンチウイルスを形質導入した。形質導入されたＴｒｅｇと形質導入されていないＴｒｅｇとを１０日間培養し、ＧＦＰを測定して形質導入の効果を調べた。図２は、形質導入されたＴｒｅｇの６７．３％が、ＧＦＰを発現した（すなわち、前記抗ＡＳＧＲ１ ＣＡＲコンストラクトを含んでいた）ことを示している。

【０３３５】
実施例３－ＨｅｐＧ２細胞株におけるＡＳＧＲ１発現の確認
ＨｅｐＧ２細胞は、分極化したヒト肝細胞の研究のための、好適なインビトロモデル系である。ＨｅｐＧ２におけるＡＳＧＲ１の発現は、ＦＡＣＳにより確認され、Ｋ５６２細胞、すなわち不死化ヒト骨髄性白血病細胞株と比較された。図３は、ＨｅｐＧ２細胞においてＡＳＧＲ１が高発現したことを示す。ＨｅｐＧ２細胞は、下記実験においてＣＡＲ－Ｔｒｅｇ標的細胞として使用される。
【０３３６】
実施例４－抗ＡＳＧＲ１ ＣＡＲ－Ｔｒｅｇの抗原特異性の評価
ＡＳＧＲ１を発現する細胞株ＨｅｐＧ２の培養後に、Ｔｒｅｇの活性化および増殖を調べ、抗ＡＳＧＲ１ ＣＡＲを発現したＴｒｅｇのみがＡＳＧＲ１の刺激に応答してＣＤ６９を上方制御することを確認した。
図４は、培地のみの存在下ではＣＤ６９の上方制御が観察されないことを示す。ＨｅｐＧ２細胞を使用した培養に続き、ＧＦＰ＋の形質導入されたＴｒｅｇ（ただし、ＧＰＦ－ネガティブの形質導入された細胞や、形質導入されていない細胞ではない）のみがＣＤ６９を上方制御する。これに対して、非特異的な抗ＣＤ３／ＣＤ２８ビーズの刺激で培養された場合、すべての細胞がＣＤ６９を上方制御した。
【０３３７】
実施例５－抗ＡＳＧＲ１ ＣＡＲ－Ｔｒｅｇの抗原特異性抑制機能の評価
活性化エフェクターＣＤ４＋ＣＤ２５－Ｔ細胞の増殖を抗原特異的に抑制する、抗ＡＳＧＲ１ ＣＡＲ Ｔｒｅｇの能力を調べるため、予備活性化されたＣＤ４＋ＣＤ２５－エフェクターＴ細胞を、抗ＡＳＧＲ１ ＣＡＲ Ｔｒｅｇと共に、または形質導入されていないＴｒｅｇと共に、ＨｅｐＧ２細胞の存在下で共培養した。
Ｔｅｆｆ予備活性化は、下記条件下で行った。ＣＤ４＋ＣＤ２５－Ｔ細胞を活性化させた；ＣＤ３／ＣＤ２８ビーズ １：１０；１４時間。抑制アッセイの条件は以下の通りであった：３日間の培養；１００，０００ Ｔｅｆｆ；３０，０００ ＨｅｐＧ２；形質導入されていないＴｒｅｇと抗ＡＳＧＲ１ ＣＡＲ－Ｔｒｅｇとの比較
増殖色素で染色し、抗ＣＤ３／ＣＤ２８ビーズで予備活性化させたエフェクターＴ細胞について、その増殖能力に対する抗ＡＳＧＲ１ ＣＡＲ－Ｔｒｅｇの影響を、抑制アッセイ（図５、図６）により示す。形質導入されていないＴｒｅｇと比較して、抗ＡＳＧＲ１ ＣＡＲ Ｔｒｅｇは、ＨｅｐＧ２刺激に応じて、低いＴｒｅｇ対Ｔエフェクター比率で、通常Ｔ細胞の増殖を効果的に抑制できた。
【０３３８】
実施例６－抗ＨＬＡ．Ａ２ ＩＬ２ＲＣＡＲ－Ｔｒｅｇの生成
ＳＴＡＴ５関連モチーフと、ＪＡＫ１および／またはＪＡＫ２結合モチーフとを含む（場合によっては、ＪＡＫ３結合モチーフを含む、および／またはＳＴＡＴ３関連モチーフを含まない）エンドドメインの効果を、ＨＬＡ．Ａ２－ＣＡＲコンストラクトを使用した実施例６～１３に示す。例に挙げた抗原結合ドメインはＨＬＡ．Ａ２を標的にしているが、前記エンドドメインは幅広く適用可能であると考えられ、肝臓特異的抗原、たとえば、ＡＳＧＲなどを標的にする抗原結合ドメインを含むＣＡＲコンストラクトに適用可能であると考えられる。
【０３３９】
ＣＤ４＋ＣＤ２５ｈｉＣＤ１２７ｌｏｗ細胞を単離し、抗ＣＤ３／ＣＤ２８ビーズで活性化した。活性化の３日後、ＴｒｅｇにＨＬＡ．Ａ２－ＣＡＲコンストラクトとＧＦＰレポーター遺伝子とを含むレンチウイルスを形質導入した（図７）。ポリクローナル活性化の後の全Ｔｒｅｇの細胞増殖は、形質導入されたＴｒｅｇと形質導入されていないＴｒｅｇとでは、有意の差異が示されなかった（図８）。
【０３４０】
実施例７－抗ＨＬＡ．Ａ２ ＩＬ２Ｒコンストラクトの形質導入の効果の経時的定量化
ＣＡＲコンストラクトが形質導入されていないＴｒｅｇと、ＣＡＲコンストラクトを形

質導入したＴｒｅｇとについて、ＧＦＰ発現を、細胞活性化後の異なる時点で解析した。
ＧＦＰ＋細胞の頻度を解析し、Ｔｒｅｇ増殖期間にわたって様々なコンストラクトの形質導入の効果と発現の持続性を評価した。ｄＣＡＲ、ＣＤ２８ｚ、コンストラクト１、２、および３を含むＴｒｅｇは、形質導入後、同様の発現頻度を示した。すべてのＴｒｅｇにおけるＧＦＰ＋細胞の割合は、ポリクローナル細胞増殖のあいだ、維持された（図９）。

【０３４１】

実施例８－形質導入されたＴｒｅｇの抗ＨＬＡ．Ａ２ ＩＬ２Ｒ ＣＡＲコンストラクトの細胞表面発現の定量化

形質導入されていないＴｒｅｇでの、および形質導入されたＴｒｅｇでの、ＣＡＲコンストラクトの膜発現を、ＰＥコンジュゲートＨＬＡ－Ａ＊０２０１／ＣＩＮＧＶＣＷＴＶデキストラマー（Ｉｍｍｕｄｅｘ、デンマーク、コペンハーゲン）によって解析した。細胞表面にあるＣＡＲタンパク質（ＨＬＡ－Ａ２デキストラマー$^{+}$）を発現するＴｒｅｇの頻度は、コンストラクトすべてにおいて同様であった（図１０）。

【０３４２】

実施例９－ポリクローナル細胞増殖後のＣＡＲ Ｔｒｅｇの表現型の特性評価

抗ＣＤ３／ＣＤ２８活性化ビーズおよびＩＬ－２の存在下で１５日間、Ｔｒｅｇを培養し増殖させた。Ｔｒｅｇ関連マーカーＦＯＸＰ３、ＨＥＬＩＯＳ、ＣＴＬＡ４、およびＴＩＧＩＴを、形質導入されていないＴｒｅｇ上と、形質導入されたＴｒｅｇ上とでＦＡＣＳにより解析し、培養１５日目の表現型の系統安定性を調査した。

形質導入されていないものと、ＣＡＲ形質導入されたものとは、Ｔｒｅｇ系統に関連したタンパク質の発現レベルとポリクローナル増殖後の機能のレベルが同程度であった（図１１）。

【０３４３】

実施例１０－抗ＨＬＡ．Ａ２ ＩＬ２ＲＣＡＲ Ｔｒｅｇの抗原特異性の評価

形質導入されていないＴｒｅｇと、形質導入されたＴｒｅｇとを、異なる刺激の存在下で１８時間培養した。ＣＤ６９とＣＤ１３７活性化マーカーを解析し、特異的な細胞活性化と非特異的な細胞活性化とを調べた。ＣＤ２８ｚ、コンストラクト１ＣＡＲ、コンストラクト２ＣＡＲ、およびコンストラクト３ＣＡＲを形質導入したＴｒｅｇは、Ｔ細胞活性化マーカーの発現に基づくと、ＨＬＡ－Ａ２分子に対して同様の特異性を示した。ＣＤ６９およびＣＤ１３７の発現は、不活性化細胞上で、またはＨＬＡ－Ａ１発現細胞との培養後、増加しなかった。ｄＣＡＲコンストラクトは、シグナリングエンドドメインが無いため、活性化を示さなかった（図１２）。

【０３４４】

実施例１１－ＩＬ２Ｒ ＣＡＲシグナリングの指標としてのＳＴＡＴ５リン酸化解析

形質導入されたＣＡＲ Ｔｒｅｇを、ＩＬ２を含まない培地に一晩置いた。培地のみでの培養、１０００ ＩＵ／ｍｌ ＩＬ－２での培養、ＨＬＡ．Ａ２－Ｉｇ系人工ＡＰＣ（ＤＯＩ：１０．３７９１／２８０１に記載のプロトコルに従い作製）の存在下での培養の１０分後および１２０分後、ＦＡＣＳ解析によりＴｒｅｇのＳＴＡＴ５リン酸化を調べた。ＩＬ２Ｒエンドドメインの ＣＡＲコンストラクトへの導入は、ＨＬＡ－Ａ２分子によるＣＡＲ活性化後に効率的なＳＴＡＴ５のリン酸化を示した。ＨＬＡ－Ａ２ビーズを使用した培養後、ＩＬ２Ｒエンドドメインの無いＣＡＲ Ｔｒｅｇ上では、ｐＳＴＡＴ５の有意の増加は検出されなかった（図１３）。

【０３４５】

実施例１２－ＩＬ－２の非存在下での非特異的活性化およびＨＬＡ．Ａ２特異的活性化後のＴｒｅｇ生存の評価

異なるコンストラクトのＣＡＲ形質導入Ｔｒｅｇを、抗ＣＤ３／２８活性化ビーズおよびＫ５６２．Ａ２発現細胞と、ＩＬ－２の非存在下で培養した。ＦＡＣＳ解析により活性化の７日後に細胞の生存を調べた。ＨＬＡ－Ａ２発現細胞との細胞培養の後、ＩＬ２Ｒエンドドメインを含むＣＡＲコンストラクトを発現したＴｒｅｇｓは、基準のＣＤ２８ｚと

比較して、細胞の生存率の増大を示した。Ｔｒｅｇのポリクローナル活性化後は、この差異が見られず、これは前記効果がＣＡＲシグナリングに依存していることを示している（図１４）。

【０３４６】

実施例１３－Ｔｒｅｇ抑制能試験：Ｂ細胞に対する共刺激分子の調節（ｍｏｄｕｌａｔｉｏｎ）の解析によるＴｒｅｇの免疫調節機能の評価

Ｔｒｅｇとの共培養後の、Ｂ細胞のＣＤ８０およびＣＤ８６発現を解析し、抗原提示細胞での共刺激分子の発現を低減するＴｒｅｇの能力を評価した。

ＣＤ２８ｚ、コンストラクト１ＣＡＲ、およびコンストラクト２ＣＡＲを発現するＴｒｅｇは、形質導入されていないＴｒｅｇやｄＣＡＲ発現Ｔｒｅｇと比較して、抑制機能が大きいことを示した。Ｂ細胞でのＣＤ８０およびＣＤ８６の発現は、ＣＡＲ分子を介してシグナリングするＴｒｅｇと培養した後にのみ、下方制御している（図１５）。

【０３４７】

実施例１４－肝臓細胞におけるアルブミン産生に対するＣＡＲ Ｔｒｅｇの効果の評価

方法：

５０ＩＵ／ｍＬのヒト組換インターロイキン－２（Ａｌｄｅｓｌｅｕｋｉｎ、Ｎｏｖａｒｔｉｓ）と共に／無しで、１０％ＦＢＳ、２ｍＭ Ｌ－グルタミン、１％ ＩＴＳ、１０ｎＭ Ｈｅｐｅｓ、１００Ｕ／Ｌ ペニシリン／ストレプトマイシンを追加したウィリアムズＥ培地（Ｇｉｂｃｏ）中の、Ｉ型コラーゲン（ラット尾由来）をコーティングしたプレート上に、２２５Ｋ／ｃｍ^{2}の細胞密度（ハーフエリア ９６ウェルプレートまたはトランスウェルプレートに３６Ｋ／ｗｅｌｌ）で、凍結保存された成人ヒト初代培養肝細胞（Ｌｏｎｚａ）を播種した。肝細胞が２４時間後に付着すれば、ＣＤ４＋ＣＤ２５－エフェクターＴ細胞の存在下または非存在下で、ＣＤ４＋ＣＤ２５＋Ｆｏｘｐ３＋制御性Ｔ細胞を培地に追加した。上清を４８時間ごとに交換し、解析用に凍結保存した。ＨＴＳトランスウェル膜（孔径０．４μｍ；ＣＯＲＮＩＮＧ Ｉｎｃ．）を使用して、間接共培養を行った。いくつかの実験用に、抗ＣＤ３および抗ＣＤ２８ビーズの存在下で、制御性Ｔ細胞およびエフェクターＴ細胞を予備活性化した。別の実験用に、予備活性化していない制御性Ｔ細胞を、培養プレートに加える前に、抗ＡＳＧＰＲ１ ＣＡＲ（実施例１に記載のコンストラクト１）と共にレンチウイルス形質導入した。いくつかの実験では、増殖した制御性Ｔ細胞を含む培地から取得した培養上清と共に、肝細胞を培養した。ヒトアルブミンの酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ－Ｂｅｔｈｙｌ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を使用して、前記培地中で、アルブミン濃度、つまり肝細胞機能および生存率のマーカーを、測定した。統計的な解析のために、クラスカルワリス・ノンパラメトリック検定をダン群間事後検定（Dunn's inter-group post-tests）とともに行った。アステリスクはｐ＜０．０５を示す。肝細胞のみのペア単位の比較およびｐ＜０．０５を示す。示されたプロットは、３つの独立した実験を表している。

【０３４８】

結果：抗原刺激に応答して、肝臓の細胞に対する栄養および細胞保護効果を媒介する、抗ＡＳＧＰＲ ＣＡＲ Ｔｒｅｇの能力を判定するために、共培養実験を設定し、そこでＴｒｅｇおよび／またはエフェクターＴ細胞の様々な組み合わせと共に、初代ヒト肝細胞を７日まで培養した。肝細胞表現型の安定性および機能に対する効果を調査するために、肝細胞合成機能、生存率、および系統安定性と相互関連するアルブミンの上清への産生を定量化した。抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８ビーズの存在下で事前に活性化したＴｒｅｇを、培養した初代培養肝細胞に添加した結果、アルブミンレベルが増加した。この効果は、共培養の３日後は有意であったが、７日目には有意でなくなっており、これは、肝細胞に対して栄養効果を及ぼすためにＴｒｅｇが繰り返し抗原刺激を受ける必要性を反映している（図１６）Ｔｒｅｇの有益な効果は、活性化されたＴｒｅｇから得られた馴化培地で肝細胞を培養することにより複製されることを考えれば、細胞どうしの接触を必要としない（図１７）。注目すべきは、前記馴化培地は、４８時間ごとに繰り返し培養プレートに添加され、通常は毎週再活性化が必要な予備活性化されたＴｒｅｇよりも、もっと持続性のある有益

な効果を引き起こすことである。Ｔｒｅｇとは対照的に、エフェクターＴ細胞は、アルブミンレベルを増加させる能力がなかった（図１７）。

休眠状態の（予備活性化していない）Ｔｒｅｇを使用すると、効果はより弱く、有意ではなかった（図１８）。有意の効果が得られたのは、休眠状態のＴｒｅｇが、培養された肝細胞でＡＳＧＰＲを認識してＴｒｅｇの活性化を起こすことができる抗ＡＳＧＰＲ ＣＡＲを発現した時のみであった（図１８）。

【０３４９】

これらの結果は、制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）が、肝臓の細胞に対して栄養および細胞保護効果をもたらすことができることを示す。これはＴｒｅｇの活性化を必要とし、細胞どうしの接触の非存在下で起こりうる。Ｔｒｅｇの活性化は、抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８ビーズなどの通常Ｔ細胞刺激物でＴｒｅｇを刺激することによって、またはＡＳＧＰＲなどの肝細胞特異的抗原を認識した後にＴ細胞活性化を誘発できるＣＡＲをＴｒｅｇに形質導入することにより、達成できる。

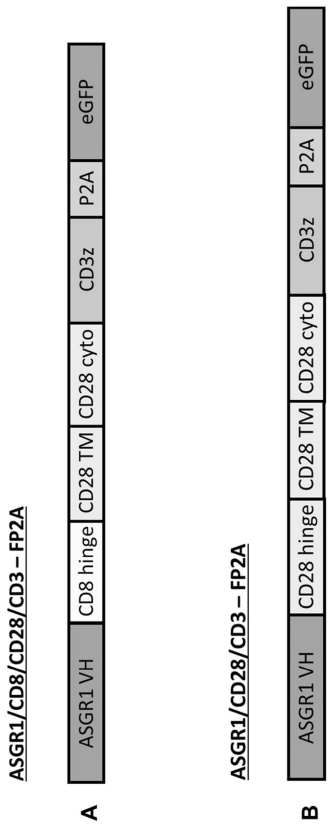
【０３５０】

本明細書で言及された刊行物はすべて、この参照により本明細書に援用される。本発明の範囲と趣旨を逸脱しない、本明細書に開示された本発明の方法、細胞、組成物、および使用の様々な変更および変形が、当業者に明らかであろう。本発明は特定の好適な実施形態に関連して開示されているが、請求項に記載されている発明が、かかる特定の実施形態に過度に限定されるべきではないことを理解されたい。開示された本発明を実施するための形態の、当業者に自明である様々な変更は、下記の請求項の範囲内のものとする。

【図面】

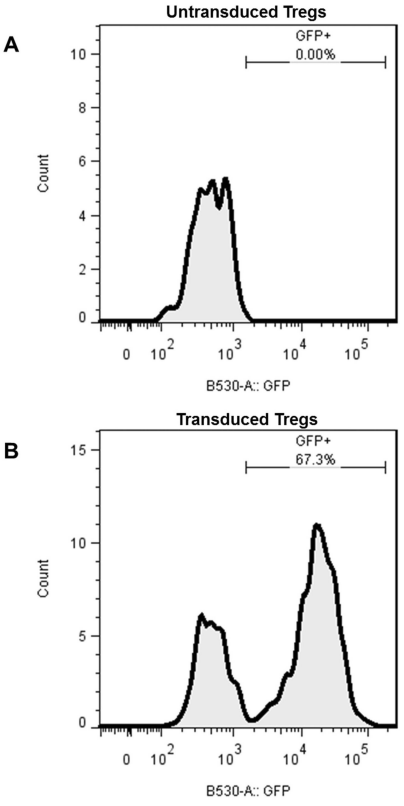
【図１】

FIGURE 1



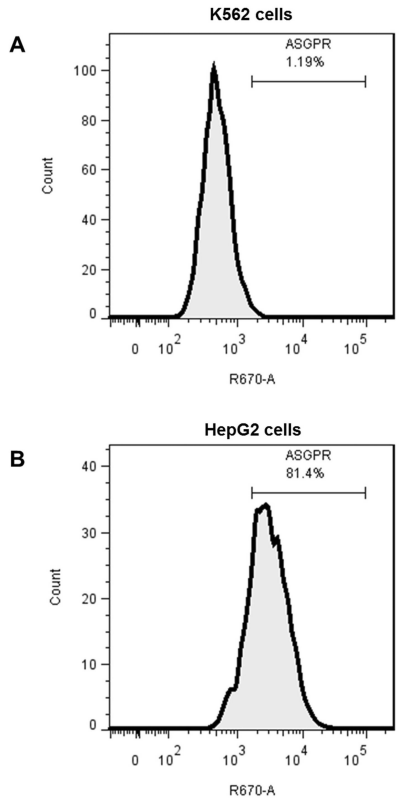
【図２】

FIGURE 2



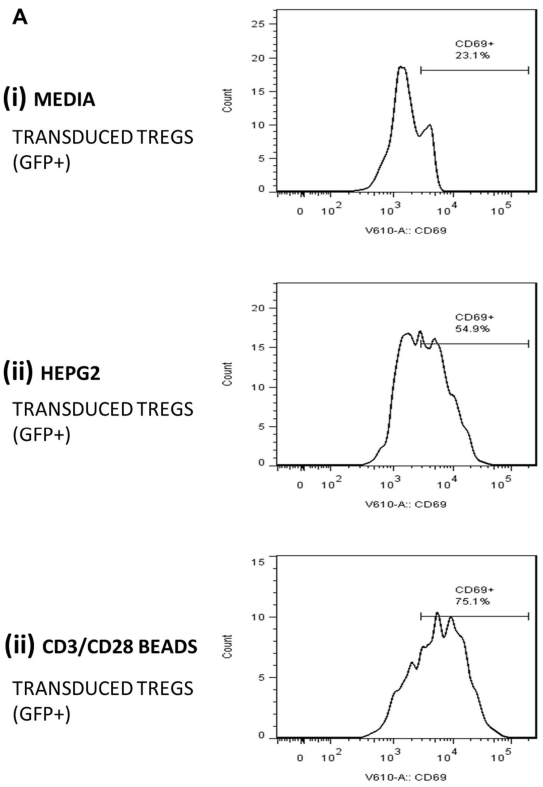
【図３】

FIGURE 3



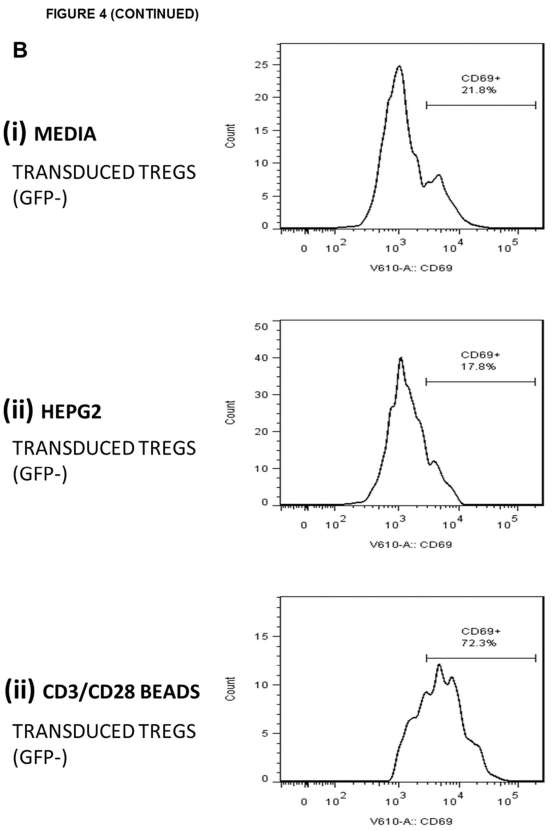
【図４Ａ】

FIGURE 4



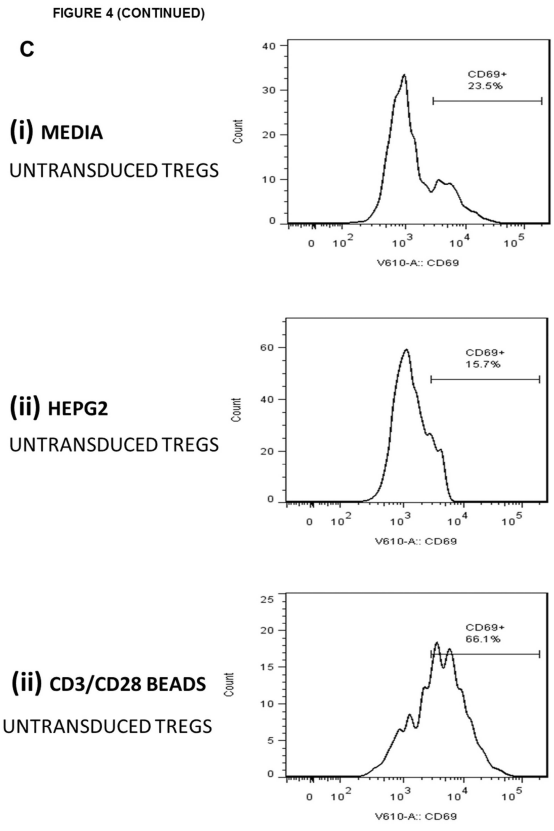
【図４Ｂ】

FIGURE 4 (CONTINUED)



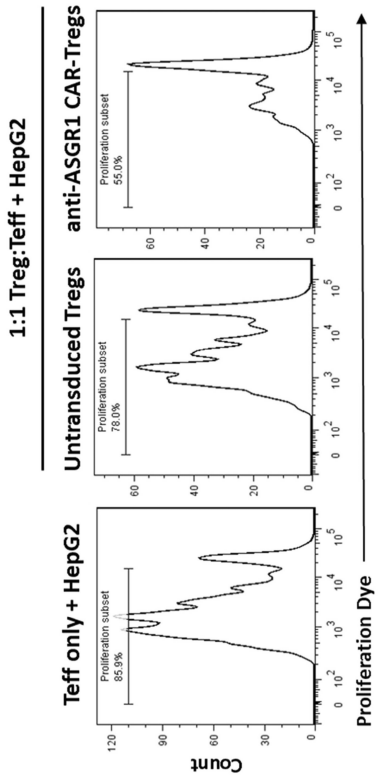
【図４Ｃ】

FIGURE 4 (CONTINUED)



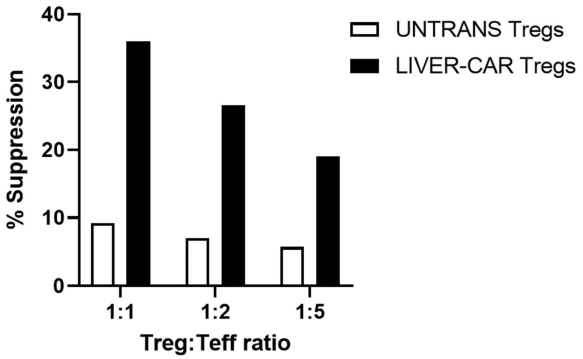
【図５】

FIGURE 5



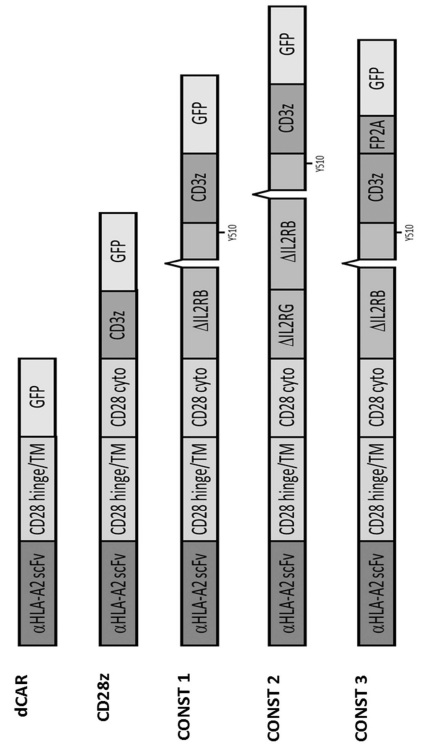
【図６】

FIGURE 6



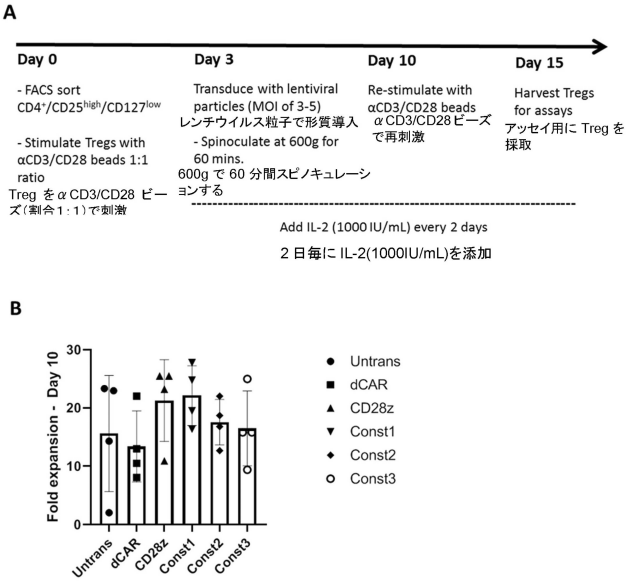
【図７】

FIGURE 7



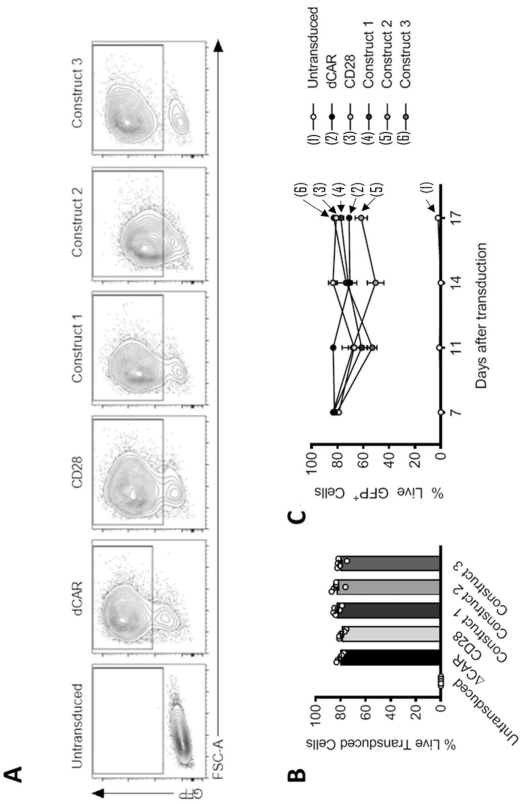
【図８】

FIGURE 8



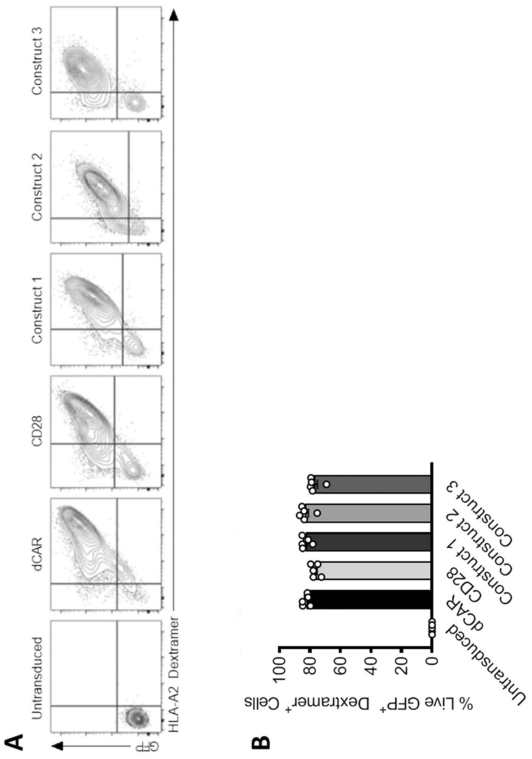
【図９】

FIGURE 9



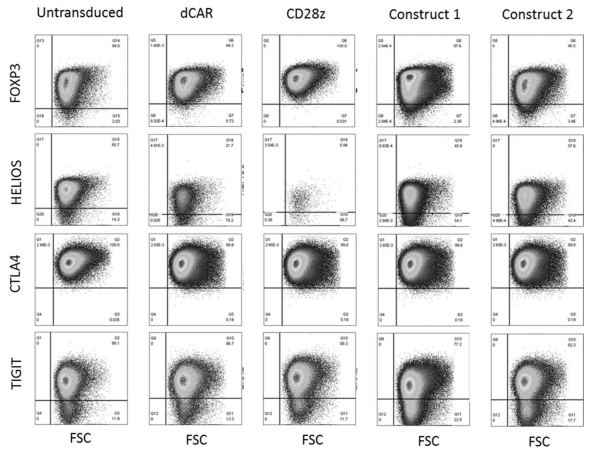
【図１０】

FIGURE 10



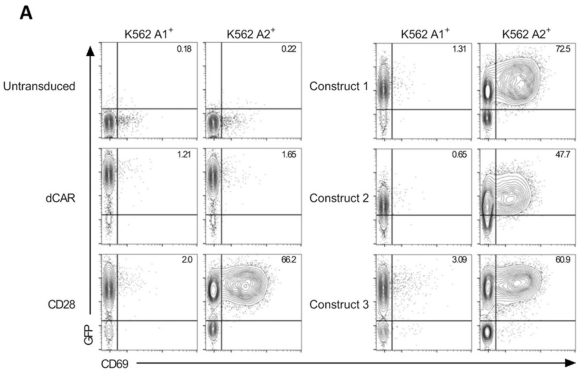
【図１１】

FIGURE 11



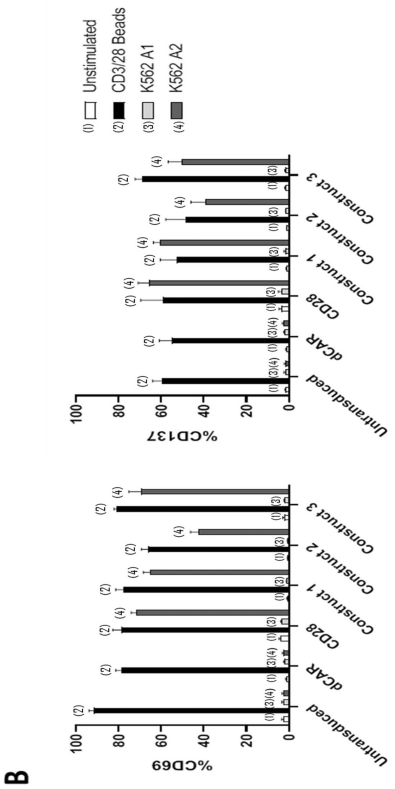
【図１２Ａ】

FIGURE 12



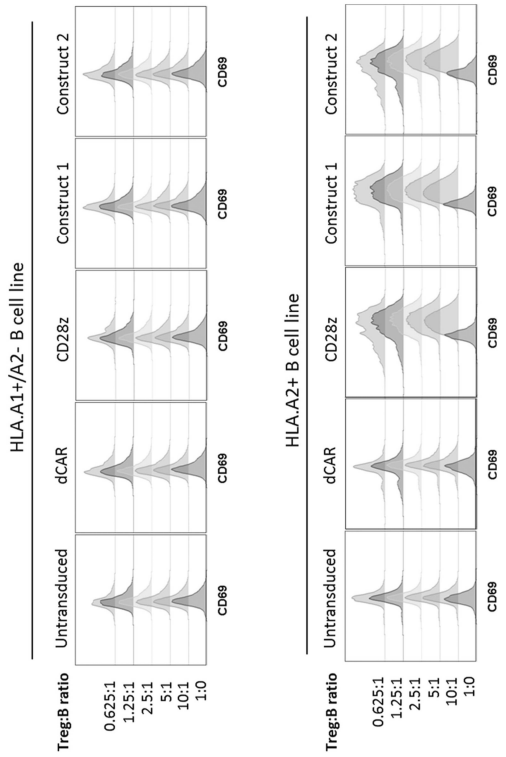
【図１２Ｂ】

FIGURE 12 (CONTINUED)



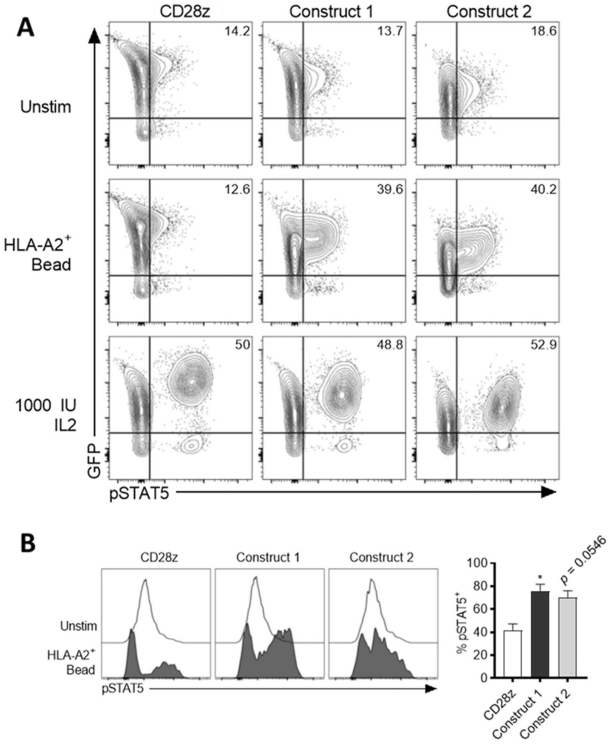
【図１２Ｃ】

FIGURE 12 (CONTINUED)



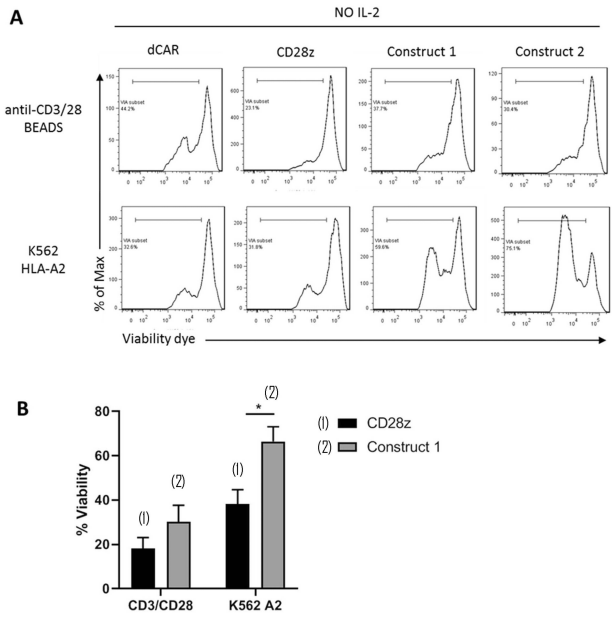
【図１３】

FIGURE 13



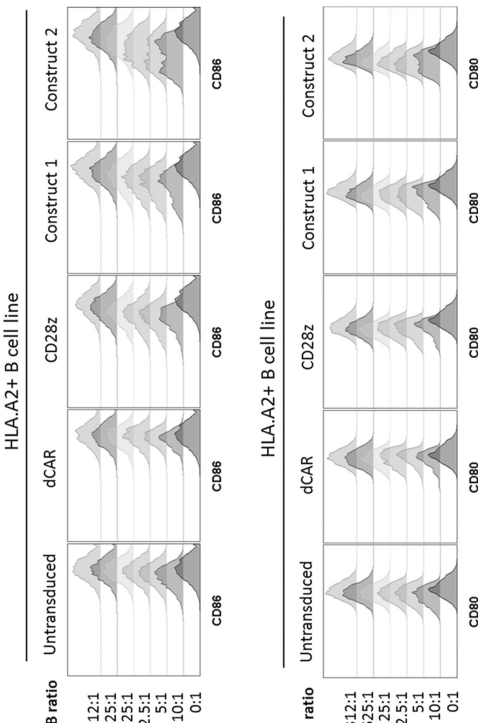
【図１４】

FIGURE 14



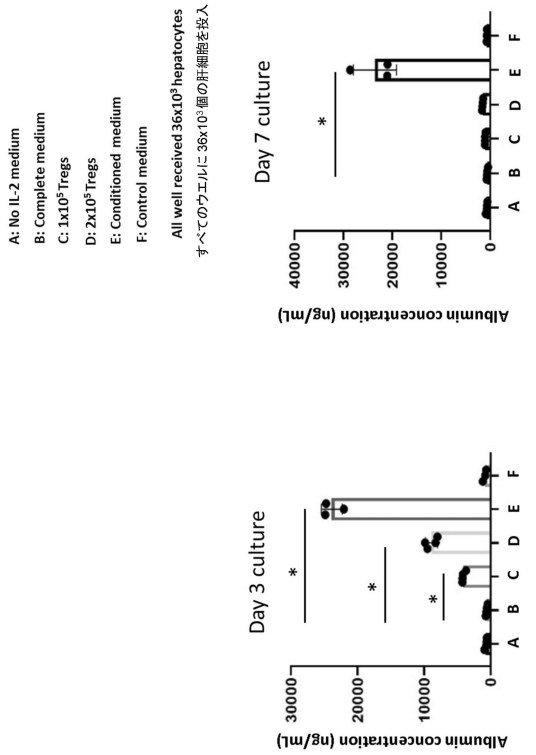
【図１５】

FIGURE 15



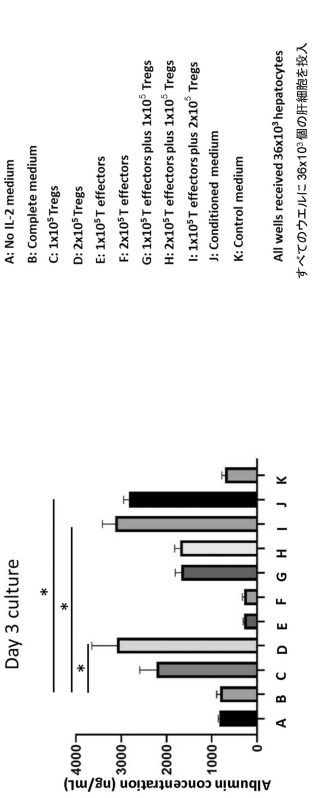
【図１６】

FIGURE 16



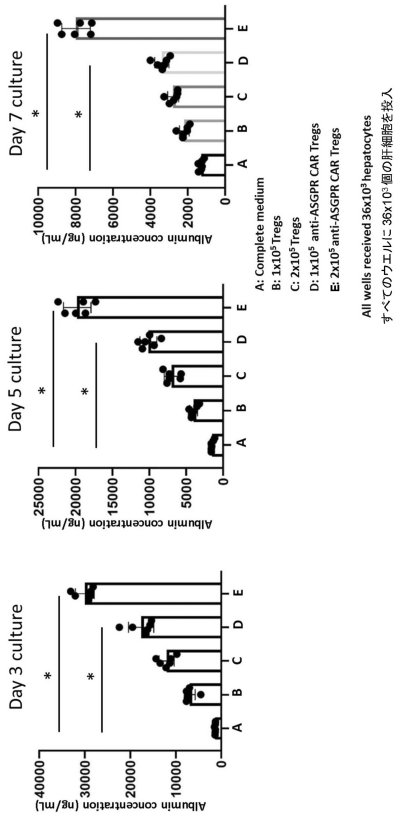
【図１７】

FIGURE 17



【図１８】

FIGURE 18



【配列表】
2022546457000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2020/052076

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/2851 A61K39/00 A61P1/16
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61P

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2011/086143 A2 (GLAXO GROUP LTD [GB]; DUNLEVY GRAINNE [GB] ET AL.) 21 July 2011 (2011-07-21) claim 1; sequences 874,876,978,880,868,870,872	1-55
X	EP 3 228 702 A1 (CARSGEN THERAPEUTICS LTD [CN]) 11 October 2017 (2017-10-11)	46,52,53
Y	paragraph [0047]; claims 1,2; sequence 20	1-55
	-/--	

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

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
23 November 2020	03/12/2020

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2020/052076

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEN CHENG ET AL: "Development of T cells carrying two complementary chimeric antigen receptors against glypican-3 and asialoglycoprotein receptor 1 for the treatment of hepatocellular carcinoma", CANCER IMMUNOLOGY, IMMUNOTHERAPY, SPRINGER, BERLIN/HEIDELBERG, vol. 66, no. 4, 29 December 2016 (2016-12-29), pages 475-489, XP036192310, ISSN: 0340-7004, DOI: 10.1007/S00262-016-1949-8 [retrieved on 2016-12-29]	46,52,53
Y	Materials & Methods; figure 2	1-55

Y	QUNFANG ZHANG ET AL: "Chimeric Antigen Receptor (CAR) Treg: A Promising Approach to Inducing Immunological Tolerance", FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, vol. 9, 1 January 2018 (2018-01-01), page 2359, XP055591405, DOI: 10.3389/fimmu.2018.02359 page 2 - page 5; figure 1	1-15

Y	ANGELA C. BOROUGHS ET AL: "Chimeric antigen receptor costimulation domains modulate human regulatory T cell function", JCI INSIGHT, vol. 4, no. 8, 18 April 2019 (2019-04-18), XP055752734, ISSN: 2379-3708, DOI: 10.1172/jci.insight.126194 abstract; figure 1	1-55

Y	SATORU TODO ET AL: "A pilot study of operational tolerance with a regulatory T-cell-based cell therapy in living donor liver transplantation", HEPATOLOGY, vol. 64, no. 2, 1 August 2016 (2016-08-01) , pages 632-643, XP055752732, ISSN: 0270-9139, DOI: 10.1002/hep.28459 abstract	1-55

Y	MOA FRANSSON ET AL: "CAR/FoxP3-engineered T regulatory cells target the CNS and suppress EAE upon intranasal delivery", JOURNAL OF NEUROINFLAMMATION, vol. 9, no. 1, 1 January 2012 (2012-01-01) , page 112, XP055108972, ISSN: 1742-2094, DOI: 10.1186/1742-2094-9-112 figure 1	1-55

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/GB2020/052076

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011086143 A2	21-07-2011	CA 2786660 A1	21-07-2011
		CN 102791293 A	21-11-2012
		EP 2523686 A2	21-11-2012
		JP 2013516967 A	16-05-2013
		US 2013078216 A1	28-03-2013
		WO 2011086143 A2	21-07-2011
EP 3228702 A1	11-10-2017	CN 105713881 A	29-06-2016
		EP 3228702 A1	11-10-2017
		US 2018201902 A1	19-07-2018
		WO 2016086813 A1	09-06-2016

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

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N 15/63 (2006.01)		C12N	15/63	Z	4H045
A61K 35/17 (2015.01)		A61K	35/17	A	
A61P 1/16 (2006.01)		A61P	1/16		
A61K 47/68 (2017.01)		A61K	47/68		
A61P 43/00 (2006.01)		A61P	43/00	107	
A61K 31/7088(2006.01)		A61K	31/7088		
A61K 48/00 (2006.01)		A61K	48/00		
C07K 19/00 (2006.01)		C07K	19/00		
C07K 16/28 (2006.01)		C07K	16/28		
C07K 14/725 (2006.01)		C07K	14/725		
C07K 14/715 (2006.01)		C07K	14/715		

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

Fターム（参考）
4B065 AA94X AA94Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44
4C076 AA95 CC16 CC41 EE41 EE59 FF32 FF34
4C084 AA13 NA05 NA13 NA14 ZA75 ZB22
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA05 NA13 NA14 ZA75 ZB22
4C087 AA01 AA02 BB37 NA05 NA13 NA14 ZA75 ZB22
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA42 DA50 DA76 EA20 FA74