

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7012645号

(P7012645)

(45)発行日 令和4年1月28日(2022.1.28)

(24)登録日 令和4年1月20日(2022.1.20)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 0 7 K 19/00

Z N A

C 0 7 K 14/705 (2006.01)

C 0 7 K 14/705

C 1 2 N 9/50 (2006.01)

C 1 2 N 9/50

C 1 2 N 5/0783(2010.01)

C 1 2 N 5/0783

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 1 1 0

請求項の数 16 (全177頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-536108(P2018-536108)

(86)(22)出願日 平成29年1月10日(2017.1.10)

(65)公表番号 特表2019-504835(P2019-504835
A)

(43)公表日 平成31年2月21日(2019.2.21)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/012881

(87)国際公開番号 WO2017/123556

(87)国際公開日 平成29年7月20日(2017.7.20)

審査請求日 令和1年12月26日(2019.12.26)

(31)優先権主張番号 62/277,322

(32)優先日 平成28年1月11日(2016.1.11)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/351,522

(32)優先日 平成28年6月17日(2016.6.17)

最終頁に続く

(73)特許権者 515158308

ザ ボード オブ トラスティーズ オブ
ザ レランド スタンフォード ジュニア
ユニバーシティーアメリカ合衆国, カリフォルニア州 9
4 3 0 5 - 2 0 3 8 , スタンフォード,
メイン クワッド ピー . オー . ボックス
2 0 3 8 6 , オフィス オブ ザ セネラル
カウンセル ビルディング 1 7 0 , サード
フロア

(74)代理人 100102978

弁理士 清水 初志

(74)代理人 100102118

弁理士 春名 雅夫

(74)代理人 100160923

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 キメラタンパク質および免疫治療の方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) (i) 抗原に結合する抗原相互作用ドメインを含む細胞外領域と (ii) 免疫細胞シグナル伝達ドメインを含む細胞内領域とを含む、キメラ膜貫通受容体ポリペプチド、

(b) 該受容体ポリペプチドが抗原に結合して受容体修飾を受けたときに該受容体ポリペプチドに結合する受容体結合モエティを含む、キメラアダプターポリペプチド、

(c) 切断認識部位に連結されたアクチュエータモエティを含む、遺伝子調整ポリペプチド (GMP)、および

(d) 該切断認識部位に近接したときに該切断認識部位を切断してGMPからアクチュエータモエティを放出させる、切断モエティ

を含み、

(i) 該切断モエティは、該受容体ポリペプチドの細胞内領域の一部分を形成し、かつ該GMPは該キメラアダプターポリペプチドの一部分を形成するか、

(ii) 該切断モエティは、抗原に結合して受容体修飾を受けた該受容体ポリペプチドに結合する第2アダプターポリペプチドと複合体形成し、かつ該GMPは該キメラアダプターポリペプチドの一部分を形成するか、

(iii) 該切断モエティは該キメラアダプターポリペプチドの一部分を形成し、かつ該GMPは該受容体ポリペプチドの細胞内領域の一部分を形成する、

免疫細胞の条件付き調節のためのシステム。

【請求項2】

- (a)切断モエティが受容体ポリペプチドの細胞内領域の一部を形成し、かつGMPがキメラアダプターポリペプチドの一部を形成する；
- (b)切断モエティが、抗原に結合して受容体修飾を受けた受容体ポリペプチドに結合する第2アダプターポリペプチドと複合体形成し、かつGMPがキメラアダプターポリペプチドの一部を形成する；
- (c)切断モエティがキメラアダプターポリペプチドの一部を形成し、かつGMPが受容体ポリペプチドの細胞内領域の一部を形成する；
- (d)免疫細胞がリンパ球である、任意で、T細胞またはナチュラルキラー（NK）細胞である；
- (e)抗原相互作用ドメインが抗体に結合する；
任意で、抗原相互作用ドメインが、抗体のFcドメイン、Fvドメイン、重鎖、および軽鎖のうちの少なくとも1つに結合する；
任意で、抗原相互作用ドメインが抗体のFcドメインに結合する；
- (f)抗原相互作用ドメインが、Fab、単鎖Fv（scFv）、細胞外受容体ドメイン、およびFc結合ドメインのうちの少なくとも1つを含む；
任意で、抗原相互作用ドメインが、Fc受容体またはそのフラグメントを含むFc結合ドメインを含む；
任意で、抗原相互作用ドメインが、Fc RI（CD64）、Fc RIa、Fc RIb、Fc RIc、Fc RIIA（CD32）、Fc RIIA（CD32, H131）、Fc RIIA（CD32, R131）、Fc RII B（CD32）、Fc RII B-1、Fc RII B-2、Fc RIIIA（CD16a, V158）、Fc RIIIA（CD 16a, F158）、Fc RII B（CD16b、Fc RII B-NA1）、Fc RII B（CD16b、Fc RII B-NA2）、Fc RI、Fc RII（CD23）、Fc RI（CD89）、Fc μ R、FcRn、それらの任意の誘導体、それらの任意のバリエーション、またはそれらの任意のフラグメントを含むFc結合ドメインを含む；
- (g)抗原相互作用ドメインが抗体を含む抗原に結合し、次にその抗体が、1-40- -アミロイド、4-1BB、5AC、5T4、アクチビン受容体様キナーゼ1、ACVR2B、腺癌抗原、AGS-22M6、アルファ-フェトプロテイン、アンジオポエチン2、アンジオポエチン3、炭疽毒素、AOC3（VAP-1）、B7-H3、炭疽菌炭疽（*Bacillus anthracis anthrax*）、BAFF、ベータ-アミロイド、Bリンパ腫細胞、C242抗原、C5、CA-125、イヌ（*Canis lupus familiaris*）IL31、炭酸脱水酵素9（CA-IX）、心筋ミオシン、CCL11（エオタキシン-1）、CCR4、CCR5、CD11、CD18、CD125、CD140a、CD147（ベイシジン）、CD15、CD152、CD154（CD40L）、CD19、CD2、CD20、CD200、CD22、CD221、CD23（IgE受容体）、CD25（IL-2受容体の鎖）、CD27、CD274、CD28、CD3、CD3イプシロン、CD30、CD33、CD37、CD38、CD4、CD40、CD40リガンド、CD41、CD44v6、CD5、CD51、CD52、CD56、CD6、CD70、CD74、CD79B、CD80、CEA、CEA関連抗原、CFD、ch4D5、CLDN18.2、クロストリジウム・ディフィシレ（*Clostridium difficile*）、クランピング因子A、CSF1R、CSF2、CTLA-4、C-X-Cケモカイン受容体4型、サイトメガロウイルス、サイトメガロウイルス糖タンパク質B、ダビガトラン、DLL4、DPP4、DR5、大腸菌（*E. coli*）志賀毒素1型、大腸菌志賀毒素2型、EGFL7、EGFR、エンドトキシン、EpCAM、エプシアリン、ERBB3、大腸菌（*Escherichia coli*）、呼吸器合胞体ウイルスのFタンパク質、FAP、フィブリンIIベータ鎖、フィブロネクチンエクストラドメイン-B、葉酸ヒドロラーゼ、葉酸受容体1、葉酸受容体アルファ、Frizzled受容体、ガングリオシドGD2、GD2、GD3ガングリオシド、グリピカン3、GMCSF受容体鎖、GPNMB、増殖分化因子8、GUCY2C、ヘマグルチニン、B型肝炎表面抗原、B型肝炎ウイルス、HER1、HER2/neu、HER3、HGF、HHGFR、ヒストン複合体、HIV-1、HLA-DR、HNGF、Hsp90、ヒト散乱因子受容体（scatter factor receptor）キナーゼ、ヒトTNF、ヒトベータ-アミロイド、ICAM-1（CD54）、IFN- α 、IFN- β 、IgE、IgE Fc領域、IGF-1受容体、IGF-1、IGHE、IL17A、IL17F、IL20、IL-12、IL-13、IL-17、IL-1、IL-22、IL-23、IL-31RA、IL-4、IL-5、IL-6、IL-6受容体、IL-9、ILGF2、インフルエンザAヘマグルチニン、インフルエンザAウイルスヘマグルチニン、インスリン様成長因

10

20

30

40

50

子I受容体、インテグリン 4 7、インテグリン 4、インテグリン 5 1、インテグリン 7 7、インテグリン IIb 3、インテグリン v 3、インターフェロン / 受容体、インターフェロンガンマ誘導タンパク質、ITGA2、ITGB2 (CD18)、KIR2D、ルイス Y抗原、LFA-1 (CD11a)、LINGO-1、リポテイコ酸、LOXL2、L-セレクチン (CD62L)、LTA、MCP-1、メソテリン、MIF、MS4A1、MSLN、MUC1、ムチンCanAg、ミエリン関連糖タンパク質、ミオスタチン、NCA-90 (顆粒球抗原)、神経アポトーシス調節プロテイナーゼ (neural apoptosis-regulated proteinase) 1、NGF、N-グリコシルノイラミン酸、NOGO-A、Notch受容体、NRP1、アナウサギ (Oryctolagus cuniculus)、OX-40、oxLDL、PCSK9、PD-1、PDCD1、PDGF-R、リン酸-ナトリウム共輸送体、ホスファチジルセリン、血小板由来成長因子受容体ベータ、前立腺癌細胞、緑膿菌 (Pseudomonas aeruginosa)、狂犬病ウイルス糖タンパク質、RANKL、呼吸器合胞体ウイルス、RHD、リーサス因子、RON、RTN4、スクレロスチン、SDC1、セレクチンP、SLAMF7、SOST、スフィンゴシン-1-リン酸、黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus)、STEAP1、TAG-72、T細胞受容体、TEM1、テネイシンC、TFPI、TGF- 1、TGF- 2、TGF-、TNF-、TRAIL-R1、TRAIL-R2、腫瘍抗原CTAA16.88、MUC1の腫瘍特異的グリコシル化、腫瘍関連カルシウムシグナル伝達物質2、TWEAK受容体、TYRP1 (糖タンパク質75)、VEGFA、VEGFR1、VEGFR2、ビメンチン、およびVWFからなる群より選択される抗原に結合する；

(h)抗原相互作用ドメインが、20-(74)-(74) (ミラツズマブ；ベルツズマブ)、20-2b-2b、3F8、74-(20)-(20) (ミラツズマブ；ベルツズマブ)、8H9、A33、AB-16B5、アバゴボマブ (abagovomab)、アブシキシマブ、アビツズマブ (abituzumab)、ABP494 (セツキシマブバイオシミラー)、アブリルマブ、ABT-700、ABT-806、Actimab-A (アクチニウムAc-225リンツズマブ)、アクトクスマブ、アダリムマブ、ADC-1013、ADCT-301、ADCT-402、アデカツムマブ (adecatumumab)、アデユカヌマブ、アフエリモマブ、AFM13、アフツズマブ、AGEN1884、AGS15E、AGS-16C3F、AGS67E、アラシズマブペゴル (alacizumab pegol)、ALD518、アレムツズマブ、アリロクマブ、アルツモマブペンテテート、アマツキシマブ、AMG228、AMG820、アナツモマブマフェナトクス (anatumomab mafenatox)、アネツマブラブタンシン (anetumab ravtansine)、アニフロルマブ (anifrolumab)、アンルキンズマブ、APN301、APN311、アポリズマブ、APX003/SIM-BD0801 (セバシズマブ (sevacizumab))、APX005M、アルシツモマブ、ARX788、アスクリンバクマブ (ascrinvacumab)、アセリズマブ (aselizumab)、ASG-15ME、アテゾリズマブ、アチヌマブ (atinumab)、ATL101、アトリズマブ (atlizumab) (トシリズマブともいう)、アトロリムマブ (atorolimumab)、アベルマブ、B-701、バピネオズマブ、バシリキシマブ、バビツキシマブ、BAY 1129980、BAY1187982、ベクツモマブ、ベゲロマブ (begelomab)、ベリムマブ、ベンラリズマブ、ベルチリムマブ (bertilimumab)、ベシレソマブ、Betalutin (177Lu-テトラキセタン-テツロマブ (tetulomab))、ベバシズマブ、BEVZ92 (ベバシズマブバイオシミラー)、ベズロトクスマブ、BGB-A317、BHQ880、BI836880、BI-505、ビシロマブ、ピマグルマブ、ピメキズマブ (bimekizumab)、ビバツズマブメルタンシン (bivatuzumab mertansine)、BIW-8962、ブリナツモマブ、プロソズマブ、BMS-936559、BMS-986012、BMS-986016、BMS-986148、BMS-986178、BNC101、ボコシズマブ、ブレンツキシマブベドチン、BrevaRex、ブリアキヌマブ、プロダルマブ、プロルシズマブ、ブロンチクツズマブ (brontictuzumab)、C2-2b-2b、カナキヌマブ、カンツズマブメルタンシン、カンツズマブラブタンシン、カブラシズマブ (caplacizumab)、カプロマブペンデチド、カルルマブ、カツマキソマブ、CBR96-ドキシソルピシムノコンジュゲート、CBT124 (ベバシズマブ)、CC-90002、CDX-014、CDX-1401、セデリズマブ、セルトリズマブペゴル、セツキシマブ、CGEN-15001T、CGEN-15022、CGEN-15029、CGEN-15049、CGEN-15052、CGEN-15092、Ch.14.18、シタツズマブ・ボガトクス (citatzumab bogatox)、シクスツムマブ、クラザキズマブ、クレノリキシマブ、クリバツズマブテトラキセタン、CM-24、コドリツズマブ (codrituz

10

20

30

40

50

umab)、コルトキシマブラブタンシン (coltuximab ravtansine)、コナツムマブ、コンシズマブ (concizumab)、Cotara (ヨウ素I-131デルロツキシマブ (derlotuximab) ビオチン)、cR6261、クレネズマブ、DA-3111 (トラスツズマブバイオシミラー)、ダセツズマブ、ダクリズマブ、ダロツズマブ、ダピロリズマブペゴル (dapirolizumab pegol)、ダラツムマブ、Daratumumab Enhance (ダラツムマブ)、Darleukin、デクトレクマブ (dectrekumab)、デムシズマブ、デニンツズマブマホドチン (denintuzumab mafodotin)、デノスマブ、デパツキシズマブ、デパツキシズマブマホドチン、デルロツキシマブビオチン (derlotuximab biotin)、デツモマブ (detumomab)、DI-B4、ジヌツキシマブ、ジリダブマブ (diridavumab)、DKN-01、DMOT4039A、ドルリモマブアリトクス (dorlimomab aritox)、ドロジツマブ、DS-1123、DS-8895、デュリゴツマブ (duligotumab)、デュピルマブ、デュルバルマブ、デュシギツマブ (dusigitumab)、エクロメキシマブ、エクリズマブ、エドバコマブ、エドレコロマブ、エファリズマブ、エファンクマブ、エルデルマブ、エルゲムツマブ (elgemtumab)、エロツズマブ、エルシリモマブ (elsilimomab)、エマクツズマブ (emactuzumab)、エミベツズマブ (emibetuzumab)、エナバツズマブ、エンフォルツマブベドチン (enfortumab vedotin)、エンリモマブペゴル、エノブリツズマブ (enoblituzumab)、エノキズマブ、エノチクマブ、エンシツキシマブ、エピツモマブシツキセタン (epitumomab cituxetan)、エブラツズマブ、エルリズマブ、エルツマキソマブ、エタラシズマブ、エトロリズマブ、エビナクマブ (evinacumab)、エボロクマブ、エクスピビルマブ (exbivirumab)、ファノレソマブ、ファラリモマブ (faralimomab)、ファーレツズマブ、ファシヌマブ、FBTA05、フェルビズマブ、フェザキヌマブ、FF-21101、FGFR2抗体-薬物コンジュゲート、Fibromun、フィクラツズマブ、フィギツムマブ、フィリブマブ (firivumab)、フランボツマブ、フレチクマブ (fletikumab)、フォントリズマブ、フォラルマブ (foralumab)、フォラビルマブ (foravirumab)、FPA144、フレソリムマブ、FS102、フルラヌマブ、フツキシマブ (futuximab)、ガリキシマブ、ガニツマブ、ガンテネルマブ、ガビリモマブ (gavilimomab)、ゲムツズマブオゾガマイシン、ゲリリムズマブ (Gerilimzumab)、ゲボキズマブ、ギレンツキシマブ、グレンバツムマブベドチン、GNR-006、GNR-011、ゴリムマブ、ゴミリキシマブ、GSK2849330、GSK2857916、GSK3174998、GSK3359609、グセルクマブ、Hu14.18K322A MAb、hu3S193、Hu8F4、HuL2G7、HuMab-5B1、イバリズマブ、イブリツモマブチウキセタン、イクルクマブ、イダルシズマブ、IGN002、IGN523、イゴボマブ (igovomab)、IMAB362、IMAB362 (クラウジキシマブ (claudiximab))、イマルマブ (imalumab)、IMC-CS4、IMC-D11、イムシロマブ (imciromab)、イムガツズマブ、IMGN529、IMMU-102 (イトトリウムY-90エブラツズマブテトラキセタン)、IMMU-114、ImmuTune IMP701アンタゴニスト抗体、INCAGN1876、インクラクマブ、INCSHR1210、インダツキシマブラブタンシン (indatuximab ravtansine)、インデュサツマブベドチン (indusatumab vedotin)、インフリキシマブ、イノリモマブ、イノツズマブオゾガマイシン、インテツムマブ、Ipafricept、IPH4102、イピリムマブ、イラツムマブ、イサツキシマブ、イステラツマブ、イトリズマブ、イキセキズマブ、JNJ-56022473、JNJ-61610588、ケリキシマブ、KTN3379、L19IL2/L19TNF、ラベツズマブ、ラベツズマブゴビテカン、LAG525、ランプロリズマブ、ランパリズマブ、L-DOS47、レブリキズマブ、レマレソマブ (lemalesomab)、レンジルマブ (lenzilumab)、レルデリムマブ (lerdelimumab)、ロイコツキシマブ (Leukotuximab)、レクサツムマブ、リビビルマブ (libivirumab)、リファスツズマブベドチン (lifastuzumab vedotin)、リゲリズマブ (ligelizumab)、リロトマブサテトラキセタン (lilotomab satetraxetan)、リンツズマブ、リリルマブ、LKZ145、ロデルシズマブ (lodelcizumab)、ロキベトマブ (lokivetmab)、ロルボツズマブメルタンシン、ルカツムマブ、ルリズマブペゴル (lulizumab pegol)、ルミリキシマブ、ルムレツズマブ (lumretuzumab)、LY3164530、マバツムマブ、マルジェツキシマブ、マスリモマブ (maslimomab)、マツズマブ、マブリリムマブ、MB311、MCS-110、MEDI0562、MEDI-0639、MEDI0680、MEDI-3617、MEDI-551 (

10

20

30

40

50

イネビリズマブ (inebilizumab))、MEDI-565、MEDI6469、メボリズマブ、メテリ
 ムマブ (metelimumab)、MGB453、MGD006/S80880、MGD007、MGD009、MG
 D011、ミラツズマブ、ミラツズマブ-SN-38、ミンレッツモマブ (minretumomab)、ミ
 ルベツキシマブソラブタンシン、ミツモマブ、MK-4166、MM-111、MM-151、MM-3
 02、モガムリズマブ、MOR202、MOR208、MORAb-066、モロリムマブ (morolimu
 mab)、モタビズマブ、モキセツモマブシュードトクス、ムロモナブ-CD3、ナコロマブタ
 フェナトクス (nacolomab tafenatox)、ナミルマブ (namilumab)、ナプツモマブエ
 スタフェナトクス、ナルナツマブ、ナタリズマブ、ネバクマブ、ネシツムマブ、ネモリズ
 マブ (nemolizumab)、ネレリモマブ、ネスバクマブ、ニモツズマブ、ニボルマブ、ノ
 フェツモマブメルペンタン、NOV-10、オビルトキサキシマブ、オビヌツズマブ、オカラ
 ツズマブ、オクレリズマブ、オデュリモマブ (odulimomab)、オフアツムマブ、オララ
 ツマブ、オロキズマブ (olokizumab)、オマリズマブ、OMP-131R10、OMP-305B83
 、オナルツズマブ、オンツキシズマブ (ontuxizumab)、オピシヌマブ (opicinumab)
 、オポルツズマブモナトクス (oportuzumab monatox)、オレゴボマブ、オルチクマブ
 (orticumab)、オテリキシズマブ、オトレルツズマブ (otlertuzumab)、OX002/ME
 N1309、オキセルマブ、オザネズマブ、オゾラリズマブ、パギバキシマブ、パリビズマブ
 、パニツムマブ、パンコマブ (pankomab)、PankoMab-GEX、パノバクマブ (panoba
 cumab)、パルサツズマブ (parsatuzumab)、パスコリズマブ、パソツキシズマブ (p
 asotuxizumab)、パテクリズマブ、パトリツマブ (patritumab)、PAT-SC1、PAT-S
 M6、ペンブロリズマブ、ペムツモマブ (pemtumomab)、ペラキズマブ (perakizuma
 b)、ペルツズマブ、ペキセリズマブ、PF-05082566 (ウトミルマブ)、PF-0664726
 3、PF-06671008、PF-06801591、ピディリズマブ、ピナツズマブベドチン (pinatuz
 umab vedotin)、ピンツモマブ (pintumomab)、ブラクルマブ、ボラツズマブベドチ
 ン、ポネズマブ、プリリキシマブ、プリトキサキシマブ (pritoxaximab)、プリツムマ
 ブ (pritumumab)、PRO140、Proxinium、PSMA ADC、キリズマブ、ラコツモマブ
 (racotumomab)、ラドレッツマブ (radretumab)、ラフィビルマブ (rafivirumab)
 、ラルパンシズマブ (ralpancizumab)、ラムシルマブ、ラニビズマブ、ラキシバクマブ
 、レファネズマブ (refanezumab)、レガビルマブ、REGN1400、REGN2810/SAR43
 9684、レスリズマブ、RFM-203、RG7356、RG7386、RG7802、RG7813、RG7841
 、RG7876、RG7888、RG7986、リロツムマブ、リヌクマブ (rinucumab)、リツキシ
 マブ、RM-1929、RO7009789、ロバツムマブ、ロレデュマブ (roledumab)、ロモソ
 ズマブ、ロンタリズマブ、ロベリズマブ、ルブリズマブ、サシツズマブゴビテカン、サマ
 リズマブ、SAR408701、SAR566658、サリルマブ、SAT 012、サツモマブペンデチド
 、SCT200、SCT400、SEA-CD40、セクキヌマブ、セリバンツマブ (seribantumab)
 、セトキサキシマブ (setoxaximab)、セヴィルマブ、SGN-CD19A、SGN-CD19B、SG
 N-CD33A、SGN-CD70A、SGN-LIV1A、シブロツズマブ (sibrotuzumab)、シファリ
 ムマブ、シルツキシマブ、シムツズマブ (simtuzumab)、シプリズマブ、シルクマブ、
 ソフィツズマブベドチン (sofituzumab vedotin)、ソラネズマブ、ソリトマブ (solito
 mab)、ソネプシズマブ (sonepcizumab)、ソんツズマブ (sontuzumab)、スタムル
 マブ、スレソマブ、スビズマブ (suvizumab)、SYD985、SYM004 (フツキシマブ (f
 utuximab) およびモドツキシマブ (modotuximab))、Sym015、TAB08、タバルマ
 ブ、タカツズマブテトラキセタン、タドシズマブ、タリズマブ、タネズマブ、タニビルマ
 ブ (Tanibirumab)、タプリツモマブパプトクス (taplitumomab paptox)、タレクス
 ツマブ (tarextumab)、TB-403、テフィバズマブ、Teleukin、テリモマブアリトクス
 (telimomab aritox)、テナツモマブ (tenatumomab)、テネリキシマブ、テプリズ
 マブ、テプロツムマブ、テシドルマブ (tesidolumab)、テツロマブ (tetulomab)、T
 G-1303、TGN1412、トリウム-227-エブラツズマブコンジュゲート、チシリムマブ、チ
 ィガツズマブ、チルドラキズマブ、チソツマブベドチン (Tisotumab vedotin)、TNX-
 650、トシリズマブ、トラリズマブ、トサトクスマブ (tosatoxumab)、トシツモマブ、
 トベツマブ、トラロキヌマブ、トラスツズマブ、トラスツズマブエムタンシン、TRBS07

10

20

30

40

50

、TRC105、トレガリズマブ (tregalizumab)、トレメリムマブ、トレボグルマブ (trevogrumab)、TRPH011、TRX518、TSR-042、TTI-200.7、ツコツズマブセルモロイキン、ツビルマブ、U3-1565、U3-1784、ウブリツキシマブ (ublrituximab)、ウロクプルマブ、ウレルマブ、ウルトキサズマブ、ウステキヌマブ、バダスツキシマブタリリン (Vadastuxim

ab Talirine)、バンドルツズマブベドチン、バンチクツマブ、バヌシズマブ (vanucizumab)、バパリキシマブ (vapaliximab)、バルリルマブ (varlilumab)、パテリズマブ (vatelizumab)、VB6-845、ベドリズマブ、ベルツズマブ、ベパリモマブ (vepalimomab)、ベセンクマブ、ビジリズマブ、ポロシキシマブ、ボルセツズマブマホドチン、ボツムマブ、YYB-101、ザルツムマブ、ザノリムマブ、ザツキシマブ (zatuximab)、ジラリムマブ (ziralimumab)、およびゾリモマブアリトックスからなる群より選択される抗体のFcドメインに結合する；

(i)細胞外領域が、それぞれが同じ抗原または異なる抗原への結合を呈する複数の抗原相互作用ドメインを含む；

(j)抗原相互作用ドメインが、707-AP、ビオチン化分子、a-アクチニン-4、abl-bcr alb-b3 (b2a2)、abl-bcr alb-b4 (b3a2)、アディポフィリン、AFP、AIM-2、アネキシンII、ART-4、BAGE、b-カテニン、bcr-abl、bcr-abl p190 (e1a2)、bcr-abl p210 (b2a2)、bcr-abl p210 (b3a2)、BING-4、CAG-3、CAIX、CAMEL、カスパーゼ-8、CD171、CD19、CD20、CD22、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44v7/8、CDC27、CDK-4、CEA、CLCA2、Cyp-B、DAM-10、DAM-6、DEK-CAN、EGFRvIII、EGP-2、EGP-40、ELF2、Ep-CAM、EphA2、EphA3、erb-B2、erb-B3、erb-B4、ES-ESO-1a、ETV6/AML、FBP、胎児アセチルコリン受容体、FGF-5、FN、G250、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7B、GAGE-8、GD2、GD3、GnT-V、Gp100、gp75、Her-2、HLA-A*0201-R170I、HMW-MAA、HSP70-2 M、HST-2 (FGF6)、HST-2/neu、hTERT、iCE、IL-11R、IL-13R、KDR、KIAA0205、K-RAS、L1細胞接着分子、LAGE-1、LDLR/FUT、ルイスY、MAGE-1、MAGE-10、MAGE-12、MAGE-2、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-6、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A6、MAGE-B1、MAGE-B2、リンゴ酸酵素、マンマグロピン-A、MART-1/Melan-A、MART-2、MC1R、M-CSF、メソテリン、MUC1、MUC16、MUC2、MUM-1、MUM-2、MUM-3、ミオシン、NA88-A、Neo-PAP、NKG2D、NPM/ALK、N-RAS、NY-ESO-1、OA1、OGT、腫瘍胎児性抗原 (h5T4)、OS-9、Pポリペプチド、P15、P53、PRAME、PSA、PSCA、PSMA、PTPRK、RAGE、ROR1、RU1、RU2、SART-1、SART-2、SART-3、SOX10、SSX-2、サバイピン、サバイピン-2B、SYT/SX、TAG-72、TEL/AML1、TGFAII、TGFbRII、TP1、TRAG-3、TRG、TRP-1、TRP-2、TRP-2/INT2、TRP-2-6b、チロシナーゼ、VEGF-R2、WT1、葉酸受容体、および軽鎖からなる群より選択される抗原に結合する；

(k)受容体ポリペプチドの免疫細胞シグナル伝達ドメインが、免疫受容体チロシン活性化モチーフ (ITAM) または免疫受容体チロシン阻害モチーフ (ITIM) を含む一次シグナル伝達ドメインを含む；

(l)免疫細胞シグナル伝達ドメインが、Fc受容体 (FcR)、Fc受容体 (FcR)、Fc受容体 (FcR)、新生児型Fc受容体 (FcRn)、CD3、CD3、CD3、CD3、CD3、CD4、CD5、CD8、CD21、CD22、CD28、CD32、CD40L (CD154)、CD45、CD66d、CD79a、CD79b、CD80、CD86、CD278 (ICOSとしても公知)、CD247、CD247、DAP10、DAP12、FYN、LAT、Lck、MAPK、MHC複合体、NFAT、NF-B、PLC-、iC3b、C3dg、C3d、およびZap70からなる群より選択されるタンパク質の一次シグナル伝達ドメインを含む；

任意で、一次シグナル伝達ドメインがCD3シグナル伝達ドメインを含む；

任意で、一次シグナル伝達ドメインがCD3の免疫受容体チロシン活性化モチーフ (ITAM) を含む；

(m)免疫細胞シグナル伝達ドメインが共刺激ドメインを含む；任意で

10

20

30

40

50

(i)免疫細胞シグナル伝達ドメインが複数の共刺激ドメインを含む；

(ii)共刺激ドメインが、MHCクラスI分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ球活性化分子（SLAMタンパク質）、活性化NK細胞受容体、またはTollリガンド受容体のシグナル伝達ドメインを含む；

(iii)共刺激ドメインが、2B4/CD244/SLAMF4、4-1BB/TNFSF9/CD137、B7-1/CD80、B7-2/CD86、B7-H1/PD-L1、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H6、B7-H7、BAFFR/TNFRSF13C、BAFF/BLyS/TNFSF13B、BLAME/SLAMF8、BTLA/CD272、CD100（SEMA4D）、CD103、CD11a、CD11b、CD11c、CD11d、CD150、CD160（BY55）、CD18、CD19、CD2、CD200、CD229/SLAMF3、CD27リガンド/TNFSF7、CD27/TNFRSF7、CD28、CD29、CD2F-10/SLAMF9、CD30リガンド/TNFSF8、CD30/TNFRSF8、CD300a/LMIR1、CD4、CD40リガンド/TNFSF5、CD40/TNFRSF5、CD48/SLAMF2、CD49a、CD49D、CD49f、CD53、CD58/LFA-3、CD69、CD7、CD8、CD8、CD82/Kai-1、CD84/SLAMF5、CD90/Thy1、CD96、CDS、CEACAM1、CRACC/SLAMF7、CRTAM、CTLA-4、DAP12、デクチン-1/CLEC7A、DNAM1（CD226）、DPPIV/CD26、DR3/TNFRSF25、EphB6、GADS、Gi24/VISTA/B7-H5、GITRリガンド/TNFSF18、GITR/TNFRSF18、HLAクラスI、HLA-DR、HVEM/TNFRSF14、IA4、ICAM-1、ICOS/CD278、イカロス（Ikaros）、IL2R、IL2R、IL7R、インテグリン4/CD49d、インテグリン41、インテグリン47/LPAM-1、IPO-3、ITGA4、ITGA6、ITGAD、ITGAE、ITGAL、ITGAM、ITGAX、ITGB1、ITGB2、ITGB7、KIRDS2、LAG-3、LAT、LIGHT/TNFSF14、LTBR、Ly108、Ly9（CD229）、リンパ球機能関連抗原-1（LFA-1）、リンフォトキシン-1/TNF-1、NKG2C、NKG2D、NKp30、NKp44、NKp46、NKp80（KLRF1）、NTB-A/SLAMF6、OX40リガンド/TNFSF4、OX40/TNFRSF4、PAG/Cbp、PD-1、PDCD6、PD-L2/B7-DC、PSGL1、RELT/TNFRSF19L、SELP1G（CD162）、SLAM（SLAMF1）、SLAM/CD150、SLAMF4（CD244）、SLAMF6（NTB-A）、SLAMF7、SLP-76、TACI/TNFRSF13B、TCL1A、TCL1B、TIM-1/KIM-1/HAOCR、TIM-4、TL1A/TNFSF15、TNFRII/TNFRSF1B、TNF-1、TRANCE/RANKL、TSLP、TSLP R、VLA1、およびVLA-6からなる群より選択される分子のシグナル伝達ドメインを含む；または

(iv)共刺激ドメインが、免疫細胞における増殖シグナルおよび/または生存シグナルを調節するように作動しうる；

(n)受容体が、細胞の特異的領域へ受容体ポリペプチドを輸送させる少なくとも1つの標的指向ペプチドを含む；任意で

(i)標的指向ペプチドが、核、ミトコンドリア、小胞体（ER）、クロロプラスト、ペルオキシソームまたは形質膜へ受容体ポリペプチドを輸送させる；

(ii)標的指向ペプチドが核外移行シグナル（NES）を含む；または

(iii)標的指向ペプチドが、形質膜を標的とするペプチドを含む；

(o)受容体修飾が化学修飾を含む、任意で、化学修飾がリン酸化を含む；

(p)キメラアダプターポリペプチドの受容体結合モエティが、ABL1、ABL2、APBA1、APBA2、APBA3、BCAR3、BLK、BLNK、BMX、BTK、CHN2、CISH、CRK、CRKL、CSK、DAPP1、DOK1、DOK2、DOK3、DOK4、DOK5、DOK6、DOK7、EAT-2、EPS8、EPS8L1、EPS8L2、EPS8L3、FER、FES、FGR、FRK、FRS2、FRS3、FYN、GADS、GRAP、GRAP2、GRB10、GRB14、GRB2、GRB7、HCK、HSH2D、INPP5D、INPPL1、IRS1、IRS2、IRS3、IRS4、ITK、JAK2、LAT、LCK、LCP2、LYN、MATK、NCK1、NCK2、PIK3R1、PIK3R2、PIK3R3、PLCG1、PLCG2、PTK6、PTPN11、PTPN6、RASA1、SAP、SH2B1、SH2B2、SH2B3、SH2D1A、SH2D1B、SH2D2A、SH2D3A、SH2D3C、SH2D4A、SH2D4B、SH2D5、SH2D6、SH3BP2、SHB、SHC1、SHC2、SHC3、SHC4、SHD、SHE、SHP1、SHP2、SLA、SLA2、SOCS1、SOCS2、SOCS3、SOCS4、SOCS5、SOCS6、SOCS7、SRC、SRMS、STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5A、STAT5B、STAT6、SUPT6H、SYK、TEC、TENC1、TLN1、TLN2、T

10

20

30

40

50

NS、TNS1、TNS3、TNS4、TXK、VAV1、VAV2、VAV3、YES1、ZAP70、X11a、それらの任意の誘導体、それらの任意のバリエーション、およびそれらのフラグメントからなる群より選択される分子の結合ドメインを含む；

(q)アクチュエータモエティが、CRISPR関連ポリペプチド(Cas)、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、ジンクフィンガー関連遺伝子調節ポリペプチド、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、転写活性化因子様エフェクター関連遺伝子調節ポリペプチド、メガヌクレアーゼ、天然マスター転写因子、エピジェネティック修飾酵素、リコンビナーゼ、フリッパーゼ、トランスポザーゼ、RNA結合タンパク質(RBP)、アルゴノートタンパク質、それらの任意の誘導体、それらの任意のバリエーション、またはそれらの任意のフラグメントを含む；

10

任意で、アクチュエータモエティがCasタンパク質を含み、前記システムが、Casタンパク質と複合体形成するガイドRNA(gRNA)をさらに含む；任意で

(i)gRNAが、標的ポリヌクレオチドに対して少なくとも80%の配列同一性を呈する標的指向セグメントを含む；または

(ii)Casタンパク質がDNA切断活性を実質的に欠く；

(r)アクチュエータモエティが、細胞の特異的領域にアクチュエータモエティを向かわせる少なくとも1つの標的指向ペプチドを含む；

任意で、標的指向ペプチドが核局在化シグナル(NLS)を含む；

(s)受容体修飾が複数の修飾部位における修飾を含み、各修飾部位が、キメラアダプターポリペプチドおよび/または第2アダプターポリペプチドに結合するのに有効である；または

20

(t)切断認識部位がポリペプチド配列を含み、切断モエティがプロテアーゼ活性を含む、請求項1記載のシステム。

【請求項3】

(a)アクチュエータモエティが、GMPから放出されると、標的ポリヌクレオチドに結合することで、標的ポリヌクレオチドの物理的妨害によって、または標的ポリヌクレオチドからの遺伝子発現を抑圧もしくは強化するのに有効な追加因子の動員によって、標的ポリヌクレオチドからの遺伝子発現を調節する；

(b)アクチュエータモエティが、標的ポリヌクレオチドからの遺伝子発現を増加させるのに有効な転写活性化因子を含む；または

30

(c)アクチュエータモエティが、標的ポリヌクレオチドからの遺伝子発現を減少させるのに有効な転写抑制因子を含む、請求項1記載のシステム。

【請求項4】

(a)標的ポリヌクレオチドがゲノムDNAを含む；

(b)標的ポリヌクレオチドがRNAを含む；

(c)標的ポリヌクレオチドが内在性遺伝子または内在性遺伝子産物を含む；任意で

(i)内在性遺伝子または内在性遺伝子産物がサイトカインをコードする；

任意で、サイトカインが、4-1BBL、アクチピン A、アクチピン B、アクチピン C、アクチピン E、アルテミン(ARTN)、BAFF/BLyS/TNFSF138、BMP10、BMP15、BMP2、BMP3、BMP4、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8a、BMP8b、骨形成タンパク質1(BMP1)、CCL1/TCA3、CCL11、CCL12/MCP-5、CCL13/MCP-4、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17/TARC、CCL18、CCL19、CCL2/MCP-1、CCL20、CCL21、CCL22/MDC、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CCL28、CCL3、CCL3L3、CCL4、CCL4L1/LAG-1、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9、CD153/CD30L/TNFSF8、CD40L/CD154/TNFSF5、CD40LG、CD70、CD70/CD27L/TNFSF7、CLCF1、c-MPL/CD110/TPOR、CNTF、CX3CL1、CXCL1、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCL17、CXCL2/MIP-2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7/Ppbbp、CXCL9、EDA-A1、FAM19A1、FAM19A2、FAM19A3、FAM19A4、FAM19A5、Fasリガンド/FASLG/CD95L/CD178、GDF10、GDF11、GDF15、GDF2、GDF3、GDF4、GDF5、GDF6、GDF7、GDF8、GDF9、グリア

40

50

細胞株由来神経栄養因子 (GDNF)、増殖分化因子1 (GDF1)、IFNA1、IFNA10、IFNA13、IFNA14、IFNA2、IFNA4、IFNA5/IFNaG、IFNA7、IFNA8、IFNB1、IFNE、IFNG、IFNZ、IFN /IFNW1、IL11、IL18、IL18BP、IL1A、IL1B、IL1F10、IL1F3/IL1RA、IL1F5、IL1F6、IL1F7、IL1F8、IL1F9、IL1RL2、IL31、IL33、IL6、IL8/CXCL8、インヒピン-A、インヒピン-B、レプチン、LIF、LTA/TNFB/TNFSF1、LTB/TNFC、ニュールツリン (NRTN)、OSM、OX-40L/TNFSF4/CD252、パーセフィン (PSPN)、RANKL/OPGL/TNFSF11 (CD254)、TL1A/TNFSF15、TNFA、TNF-アルファ/TNFA、TNFSF10/TRAIL/APO-2L (CD253)、TNFSF12、TNFSF13、TNFSF14/LIGHT/CD258、XCL1、およびXCL2からなる群より選択される；または

(ii) 内在性遺伝子または内在性遺伝子産物が免疫調節タンパク質をコードする；

10

任意で、免疫調節タンパク質が、A2AR、B7.1、B7-H3/CD276、B7-H4/B7S1/B7x/Vtcn1、B7-H6、BTLA/CD272、CCR4、CD122、4-1BB/CD137、CD27、CD28、CD40、CD47、CD70、CISH、CTLA-4/CD152、DR3、GITR、ICOS/CD278、IDO、KIR、LAG-3、OX40/CD134、PD-1/CD279、PD2、PD-L1、PD-L2、TIM-3、およびVISTA/Dies1/Gi24/PD-1H (C10orf54) からなる群より選択される；または

(d) 標的ポリヌクレオチドが異種遺伝子または異種遺伝子産物を含む；

任意で、異種遺伝子または異種遺伝子産物が、追加のキメラ膜貫通受容体ポリペプチドをコードする；

任意で、追加のキメラ膜貫通受容体ポリペプチドが、

a) 追加抗原に結合する追加の抗原相互作用ドメインを含む、細胞外領域、および

20

b) 共刺激ドメイン

を含む、請求項3記載のシステム。

【請求項5】

請求項1記載のシステムを発現する、リンパ球。

【請求項6】

(a) 受容体ポリペプチドが抗原に結合したときに切断認識部位における切断によってアクチュエータモエティがGMPから放出されることを特徴とする；または

(b) 放出されたアクチュエータモエティが、リンパ球中の標的ポリヌクレオチドと複合体形成する；任意で

(i) アクチュエータモエティと標的ポリヌクレオチドとの複合体形成が、リンパ球中の遺伝子のアップレギュレートされた発現をもたらす；任意で

30

a. 遺伝子が異種遺伝子である；

任意で、異種遺伝子が追加のキメラ膜貫通受容体ポリペプチドをコードする；

任意で、追加のキメラ膜貫通受容体ポリペプチドが、

(1) 追加抗原に結合する追加の抗原相互作用ドメインを含む、細胞外領域、および

(2) 共刺激ドメイン

を含む；または

b. 遺伝子が内在性遺伝子である；

任意で、内在性遺伝子がサイトカインをコードする；

任意で、サイトカインが、4-1BBL、アクチピン A、アクチピン B、アクチピン C、アクチピン E、アルテミン (ARTN)、BAFF/BLyS/TNFSF138、BMP10、BMP15、BMP2、BMP3、BMP4、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8a、BMP8b、骨形成タンパク質1 (BMP1)、CCL1/TCA3、CCL11、CCL12/MCP-5、CCL13/MCP-4、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17/TARC、CCL18、CCL19、CCL2/MCP-1、CCL20、CCL21、CCL22/MDC、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CCL28、CCL3、CCL3L3、CCL4、CCL4L1/LAG-1、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9、CD153/CD30L/TNFSF8、CD40L/CD154/TNFSF5、CD40LG、CD70、CD70/CD27L/TNFSF7、CLCF1、c-MPL/CD110/TPOR、CNTF、CX3CL1、CXCL1、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCL17、CXCL2/MIP-2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7/Ppbb、CXCL9、EDA-A1、FAM19A1、FAM19A2、FA

40

50

M19A3、FAM19A4、FAM19A5、Fasリガンド/FASLG/CD95L/CD178、GDF10、GDF11、GDF15、GDF2、GDF3、GDF4、GDF5、GDF6、GDF7、GDF8、GDF9、グリア細胞株由来神経栄養因子(GDNF)、増殖分化因子1(GDF1)、IFNA1、IFNA10、IFNA13、IFNA14、IFNA2、IFNA4、IFNA5/IFNaG、IFNA7、IFNA8、IFNB1、IFNE、IFNG、IFNZ、IFN /IFNW1、IL11、IL18、IL18BP、IL1A、IL1B、IL1F10、IL1F3/IL1RA、IL1F5、IL1F6、IL1F7、IL1F8、IL1F9、IL1RL2、IL31、IL33、IL6、IL8/CXCL8、インヒピン-A、インヒピン-B、レプチン、LIF、LTA/TNFB/TNFSF1、LTB/TNFC、ニューロツリン(NRTN)、OSM、OX-40L/TNFSF4/CD252、パーセフィン(PSPN)、RANKL/OPGL/TNFSF11(CD254)、TL1A/TNFSF15、TNFA、TNF-アルファ/TNFA、TNFSF10/TRAIL/APO-2L(CD253)、TNFSF12、TNFSF13、TNFSF14/LIGHT/CD258、XCL1、およびXCL2からなる群より選択される；または

(ii)アクチュエータモエティと標的ポリヌクレオチドとの複合体形成が、リンパ球中の遺伝子の発現をダウンレギュレートする；

任意で、遺伝子が内在性遺伝子である；

任意で、内在性遺伝子が免疫調節タンパク質をコードする；

任意で、免疫調節タンパク質が、A2AR、B7.1、B7-H3/CD276、B7-H4/B7S1/B7x/Vt cn1、B7-H6、BTLA/CD272、CCR4、CD122、4-1BB/CD137、CD27、CD28、CD40、CD47、CD70、CISH、CTLA-4/CD152、DR3、GITR、ICOS/CD278、IDO、KIR、LAG-3、OX40/CD134、PD-1/CD279、PD2、PD-L1、PD-L2、TIM-3、およびVISTA/Dies1/Gi24/PD-1H(C10orf54)からなる群より選択される、請求項5記載のリンパ球。

【請求項7】

受容体ポリペプチドが抗原に結合したときに切断認識部位における切断によってアクチュエータモエティがGMPから放出されることを特徴とする、請求項1記載のシステムを発現するリンパ球の集団。

【請求項8】

請求項1記載のシステムを発現するリンパ球を含む、標的細胞の死を誘導するための薬学的組成物。

【請求項9】

標的細胞をリンパ球に曝露すると、リンパ球によって発現された受容体ポリペプチドが、標的細胞の細胞表面抗原または標的細胞によって分泌される抗原を含む抗原に結合し、抗原への受容体ポリペプチドの結合がリンパ球の細胞傷害性を活性化することによって標的細胞の死を誘導する、請求項8記載の薬学的組成物。

【請求項10】

標的細胞ががん細胞である、請求項8または9記載の薬学的組成物。

【請求項11】

受容体ポリペプチドと抗原の結合が、免疫細胞活動の活性化または失活を引き起こすことによって、リンパ球を条件付きで調節する、請求項9記載の薬学的組成物。

【請求項12】

免疫細胞活動が、リンパ球のクローン増加；リンパ球によるサイトカイン放出；リンパ球の細胞傷害性；リンパ球の増殖；リンパ球の分化、脱分化または分化転換；リンパ球の運動および/または輸送；リンパ球の疲弊および/または再活性化；ならびにリンパ球による他の細胞間分子、代謝産物、化学化合物、またはそれらの組合せの放出からなる群より選択される、請求項11記載の薬学的組成物。

【請求項13】

切断モエティが受容体ポリペプチドの細胞内領域の一部分を形成し、かつGMPがキメラアダプターポリペプチドの一部分を形成する、請求項9記載の薬学的組成物。

【請求項14】

切断モエティが、抗原に結合して受容体修飾を受けた受容体ポリペプチドに結合する第2アダプターポリペプチドと複合体形成し、かつGMPがキメラアダプターポリペプチドの一

10

20

30

40

50

部分を形成する、請求項9記載の薬学的組成物。

【請求項15】

切断モエティがキメラアダプターポリペプチドの一部を形成し、かつGMPが受容体ポリペプチドの細胞内領域の一部を形成する、請求項9記載の薬学的組成物。

【請求項16】

抗原結合にตอบสนองして、受容体が修飾され、キメラアダプターポリペプチドが受容体に動員される、請求項1記載のシステム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

相互参照

本願は、2016年1月11日に出願された米国仮出願第62/277,322号、2016年6月17日に
出願された米国仮出願第62/351,522号、2016年9月26日に
出願された米国仮出願第62/399,902号、2016年9月26日に
出願された米国仮出願第62/399,923号、および2016
年9月26日に
出願された米国仮出願第62/399,939号の恩典を主張し、これら仮出願の
それぞれは、参照によりそのすべてが本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

【0002】

背景

細胞活動の調節は、細胞外リガンド結合ドメインと細胞内（例えば細胞質）シグナル伝達
ドメインとを含む膜結合型受容体へのリガンドの結合を必要とする場合がある。リガンド
とリガンド結合ドメインとの間の複合体の形成は、細胞内で伝達されるシグナルをもたらし
うるコンフォメーション修飾および/または化学修飾を、受容体にもたらしうる。場合によ
っては、受容体の細胞質部分がリン酸化（例えばトランスリン酸化および/または自己リン
酸化）され、それが、その活性の変化にもたらす。これらのイベントは、二次メッセン
ジャーおよび/または補因子タンパク質の動員と共役することができる。場合によっては、
細胞質部分の変化が、他のタンパク質（例えば補因子タンパク質および/または他の受容体
）への結合をもたらしうる。これら他のタンパク質は活性化された後、細胞内でさまざまな機
能を果たしうる。

【0003】

あるタンパク質の細胞外ドメイン（例えばリガンド結合ドメイン）を、シグナル伝達に関
与する別のタンパク質の細胞内ドメイン（例えばシグナル伝達ドメイン）に取り付けると
、前者の抗原認識を後者のシグナル伝達に結びつける分子（例えばキメラ受容体）が創出
される。そのようなキメラ分子（例えばキメラ受容体またはキメラ抗原受容体）は、例え
ば免疫治療における免疫細胞の調節など、さまざまな目的に役立つ。免疫治療は、任
意のリガンド特異性が免疫細胞シグナル伝達ドメイン上に移植されているキメラ受容体
を発現するように、患者自身の免疫細胞を修飾することを必要としうる。免疫細胞シグ
ナル伝達ドメインは、がんなどの疾患にตอบสนองするために免疫細胞を活性化することおよ
び/または失活させることに関与しうる。

【0004】

従来の免疫治療法には、さまざまな不足がある。そのような不足として、共刺激受容体
からのシグナル伝達が治療効果を得るための持続的および/または受当な免疫応答にと
っては不十分であること、がん細胞などの疾患細胞に対する修飾免疫細胞の特異性が十
分でないこと（例えばオンターゲット・オフ腫瘍効果および毒性）、サイトカイン放出
症候群（CRS）などの副作用が挙げられる。免疫細胞におけるシグナル伝達は、共刺
激受容体を含むさまざまな受容体を必要としうる。共刺激受容体からのシグナルが不
十分であると、免疫細胞応答の減少および免疫治療の有効性の低減が起こりうる。
オフターゲット効果およびサイトカイン放出症候群などの副作用は、炎症応答、臓器
不全、そして極端な場合には、死亡を含むさらなる医学的合併症をもたらしうる。

【発明の概要】

10

20

30

40

50

【 0 0 0 5 】

概要

上記に鑑み、免疫治療を行うための代替的組成物および方法が、少なからず必要とされている。本開示の組成物および方法は、この必要に対処するものであり、付加的な利点も提供する。特に、本開示のさまざまな局面は、免疫細胞調節のためのシステムを提供する。

【 0 0 0 6 】

一局面において、本開示は、免疫細胞の条件付き調節のためのシステムを提供する。本システムは、(a) (i) 抗原に結合する抗原相互作用ドメインを含む細胞外領域と (ii) 免疫細胞シグナル伝達ドメインを含む細胞内領域とを含むキメラ膜貫通受容体ポリペプチド、(b) 受容体ポリペプチドが抗原に結合して受容体修飾を受けたときに受容体ポリペプチドに結合する受容体結合モエティを含むキメラアダプターポリペプチド、(c) 切断認識部位に連結されたアクチュエータモエティを含む遺伝子調整ポリペプチド (gene modulating polypeptide: GMP)、および (d) 切断認識部位に近接したときに切断認識部位を切断してGMPからアクチュエータモエティを放出させる切断モエティを含み、(i) 切断モエティは、受容体ポリペプチドの細胞内領域の一部分を形成し、かつGMPはキメラアダプターポリペプチドの一部分を形成するか、(ii) 切断モエティは、抗原に結合して受容体修飾を受けた受容体ポリペプチドに結合する第2アダプターポリペプチドと複合体形成し、かつGMPはキメラアダプターポリペプチドの一部分を形成するか、または (iii) 切断モエティはキメラアダプターポリペプチドの一部分を形成し、かつGMPは受容体ポリペプチドの細胞内領域の一部分を形成する。いくつかの態様において、切断モエティは、受容体ポリペプチドの細胞内領域の一部分を形成し、かつGMPは、キメラアダプターポリペプチドの一部分を形成する。いくつかの態様において、切断モエティは、抗原に結合して受容体修飾を受けた受容体ポリペプチドに結合する第2アダプターポリペプチドと複合体形成し、かつGMPはキメラアダプターポリペプチドの一部分を形成する。いくつかの態様において、切断モエティはキメラアダプターポリペプチドの一部分を形成し、GMPは受容体ポリペプチドの細胞内領域の一部分を形成する。

【 0 0 0 7 】

いくつかの態様において、免疫細胞はリンパ球である。いくつかの態様において、リンパ球はT細胞である。いくつかの態様において、リンパ球はナチュラルキラー (NK) 細胞である。

【 0 0 0 8 】

いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは抗体に結合する。いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、抗体のFcドメイン、Fvドメイン、重鎖、および軽鎖のうちの少なくとも1つに結合する。いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは抗体のFcドメインに結合する。

【 0 0 0 9 】

いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、Fab、単鎖Fv (scFv)、細胞外受容体ドメイン、およびFc結合ドメインのうちの少なくとも1つを含む。いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、Fc受容体またはそのフラグメントを含むFc結合ドメインを含む。いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、Fc RI (CD64)、Fc RIa、Fc RIb、Fc RIc、Fc RIIA (CD32)、Fc RIIA (CD32, H131)、Fc RIIA (CD32, R131)、Fc RIIIB (CD32)、Fc RIIIB-1、Fc RIIIB-2、Fc RIIIA (CD16a, V158)、Fc RIIIA (CD16a, F158)、Fc RIIIB (CD16b、Fc RIIIB-NA1)、Fc RIIIB (CD16b、Fc RIIIB-NA2)、Fc RI、Fc RII (CD23)、Fc RI (CD89)、Fc / μ R、FcRn、それらの任意の誘導体、それらの任意のバリエーション、またはそれらの任意のフラグメントを含むFc結合ドメインを含む。

【 0 0 1 0 】

いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは抗体を含む抗原に結合し、次にその抗体は、1-40- -アミロイド、4-1BB、5AC、5T4、アクチビン受容体様キナーゼ1、ACV R2B、腺癌抗原、AGS-22M6、アルファ-フェトプロテイン、アンジオポエチン2、アンジ

10

20

30

40

50

オボエチン3、炭疽毒素、AOC3 (VAP-1)、B7-H3、炭疽菌炭疽 (*Bacillus anthracis anthrax*)、BAFF、ベータ-アミロイド、Bリンパ腫細胞、C242抗原、C5、CA-125、イヌ (*Canis lupus familiaris*) IL31、炭酸脱水酵素9 (CA-IX)、心筋ミオシン、CCL11 (エオタキシン-1)、CCR4、CCR5、CD11、CD18、CD125、CD140a、CD147 (ペイシジン)、CD15、CD152、CD154 (CD40L)、CD19、CD2、CD20、CD200、CD22、CD221、CD23 (IgE受容体)、CD25 (IL-2受容体の鎖)、CD27、CD274、CD28、CD3、CD3イプシロン、CD30、CD33、CD37、CD38、CD4、CD40、CD40リガンド、CD41、CD44 v6、CD5、CD51、CD52、CD56、CD6、CD70、CD74、CD79B、CD80、CEA、CEA関連抗原、CFD、ch4D5、CLDN18.2、クロストリジウム・ディフィシレ (*Clostridium difficile*)、クランピング因子A、CSF1R、CSF2、CTLA-4、C-X-Cケモカイン受容体4型、サイトメガロウイルス、サイトメガロウイルス糖タンパク質B、ダビガトラン、DLL4、DPP4、DR5、大腸菌 (*E. coli*) 志賀毒素1型、大腸菌志賀毒素2型、EGFL7、EGFR、エンドトキシン、EpCAM、エピシアリン、ERBB3、大腸菌 (*Escherichia coli*)、呼吸器合胞体ウイルスのFタンパク質、FAP、フィブリンIIベータ鎖、フィブロネクチンエクストラドメイン-B、葉酸ヒドロラーゼ、葉酸受容体1、葉酸受容体アルファ、Frizzled受容体、ガングリオシドGD2、GD2、GD3ガングリオシド、グリピカン3、GMCSF受容体鎖、GPNMB、増殖分化因子8、GUCY2C、ヘマグルチニン、B型肝炎表面抗原、B型肝炎ウイルス、HER1、HER2/neu、HER3、HGF、HHGFR、ヒストン複合体、HIV-1、HLA-DR、HNGF、Hsp90、ヒト散乱因子受容体 (scatter factor receptor) キナーゼ、ヒトTNF、ヒトベータ-アミロイド、ICAM-1 (CD54)、IFN- α 、IFN- β 、IgE、IgE Fc領域、IGF-1受容体、IGF-1、IGHE、IL17A、IL17F、IL20、IL-12、IL-13、IL-17、IL-1 α 、IL-22、IL-23、IL-31RA、IL-4、IL-5、IL-6、IL-6受容体、IL-9、ILGF2、インフルエンザAヘマグルチニン、インフルエンザAウイルスヘマグルチニン、インスリン様成長因子I受容体、インテグリン α 4 β 7、インテグリン α 4 β 1、インテグリン α 7 β 1、インテグリン α IIb β 3、インテグリン α v β 3、インターフェロン γ 受容体、インターフェロンガンマ誘導タンパク質、ITGA2、ITGB2 (CD18)、KIR2D、ルイスY抗原、LFA-1 (CD11a)、LINGO-1、リポテイコ酸、LOXL2、L-セレクチン (CD62L)、LTA、MCP-1、メソテリン、MIF、MS4A1、MSLN、MUC1、ムチンCanAg、ミエリン関連糖タンパク質、ミオスタチン、NCA-90 (顆粒球抗原)、神経アポトーシス調節プロテイナーゼ (neural apoptosis-regulated proteinase) 1、NGF、N-グリコリルノイラミン酸、NOGO-A、Notch受容体、NRP1、アナウサギ (*Oryctolagus cuniculus*)、OX-40、oxLDL、PCSK9、PD-1、PDCD1、PDGF-R α 、リン酸-ナトリウム共輸送体、ホスファチジルセリン、血小板由来成長因子受容体ベータ、前立腺癌細胞、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、狂犬病ウイルス糖タンパク質、RANKL、呼吸器合胞体ウイルス、RHD、リーサス因子、RON、RTN4、スクレロスチン、SDC1、セレクチンP、SLAMF7、SOST、スフィンゴシン-1-リン酸、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、STEAP1、TAG-72、T細胞受容体、TEM1、テネイシンC、TFPI、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TNF- α 、TRAIL-R1、TRAIL-R2、腫瘍抗原CTAA16.88、MUC1の腫瘍特異的グリコシル化、腫瘍関連カルシウムシグナル伝達物質2、TWEAK受容体、TYRP1 (糖タンパク質75)、VEGFA、VEGFR1、VEGFR2、ビメンチン、およびVWFからなる群より選択される抗原に結合する。

【0011】

いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、20-(74)-(74) (ミラツズマブ;ベルツズマブ)、20-2b-2b、3F8、74-(20)-(20) (ミラツズマブ;ベルツズマブ)、8H9、A33、AB-16B5、アバゴボマブ (abagovomab)、アブシキシマブ、アビツズマブ (abituzumab)、ABP494 (セツキシマブバイオシミラー)、アブリルマブ、ABT-700、ABT-806、Actimab-A (アクチニウムAc-225リンツズマブ)、アクトクスマブ、アダリムマブ、ADC-1013、ADCT-301、ADCT-402、アデカツムマブ (adecatumumab)、アデュカナマブ、アフエリモマブ、AFM13、アフツズマブ、AGEN1884、AGS15E、AGS-16C3F、AGS67E、アラシズマブペゴル (alacizumab pegol)、ALD518、アレムツズマブ

ブ、アリロクマブ、アルツモマブペンテテート、アマツキシマブ、AMG228、AMG820
 、アナツモマブマフェナトクス (anatumomab mafenatox)、アネツマブラブタンシン
 (anetumab ravtansine)、アニフロルマブ (anifrolumab)、アンルキンズマブ、AP
 N301、APN311、アポリズマブ、APX003/SIM-BD0801 (セバシズマブ (sevacizumab))、
 APX005M、アルシツモマブ、ARX788、アスクリンバクマブ (ascrinvacumab)、アセリズマブ (aselizumab)、ASG-15ME、アテゾリズマブ、アチヌマブ (atinumab)、ATL101、アトリズマブ (atlizumab) (トシリズマブともいう)、アトロリム
 マブ (atorolimumab)、アベルマブ、B-701、パビネオズマブ、バシリキシマブ、バビ
 ツキシマブ、BAY1129980、BAY1187982、ベクツモマブ、ベゲロマブ (begelomab)
)、ベリムマブ、ベンラリズマブ、ベルチリムマブ (bertilimumab)、ベシレソマブ、B
 etalutin (177Lu-テトラキセタン-テツロマブ (tetulomab))、ベバシズマブ、BEVZ9
 2 (ベバシズマブバイオシミラー)、ベズロトクスマブ、BGB-A317、BHQ880、BI836
 880、BI-505、ピシロマブ、ピマグルマブ、ピメキズマブ (bimekizumab)、ピバツズ
 マブメルタンシン (bivatuzumab mertansine)、BIW-8962、ブリナツモマブ、プロ
 ソズマブ、BMS-936559、BMS-986012、BMS-986016、BMS-986148、BMS-9861
 78、BNC101、ボコシズマブ、ブレンツキシマブベドチン、BrevaRex、ブリアキヌマブ
 、プロダルマブ、プロルシズマブ、ブロンチクツズマブ (brontictuzumab)、C2-2b-2
 b、カナキヌマブ、カンツズマブメルタンシン、カンツズマブラブタンシン、カブラシズ
 マブ (caplacizumab)、カプロマブペンデチド、カルルマブ、カツマキソマブ、CBR96
 -ドキシロピシンイムノコンジュゲート、CBT124 (ベバシズマブ)、CC-90002、CDX-
 014、CDX-1401、セデリズマブ、セルトリズマブペゴル、セツキシマブ、CGEN-1500
 1T、CGEN-15022、CGEN-15029、CGEN-15049、CGEN-15052、CGEN-15092、C
 h.14.18、シタツズマブ・ボガトクス (citatumomab bogatox)、シクスツムマブ、ク
 ラザキズマブ、クレノリキシマブ、クリバツズマブテトラキセタン、CM-24、コドリツズ
 マブ (codrituzumab)、コルツキシマブラブタンシン (coltuximab ravtansine)、コ
 ナツムマブ、コンシズマブ (concozumab)、Cotara (ヨウ素I-131デルロツキシマブ (derlotuximab) ビオチン)、cR6261、クレネズマブ、DA-3111 (トラスツズマブバイ
 オシミラー)、ダセツズマブ、ダクリズマブ、ダロツズマブ、ダピロリズマブペゴル (da
 pirolizumab pegol)、ダラツムマブ、Daratumumab Enhance (ダラツムマブ)、Da
 rleukin、デクトレクマブ (dectrekumab)、デムシズマブ、デニンツズマブマホドチン
 (denintuzumab mafodotin)、デノスマブ、デパツキシズマブ、デパツキシズマブマ
 ホドチン、デルロツキシマブビオチン (derlotuximab biotin)、デツモマブ (detumo
 mab)、DI-B4、ジヌツキシマブ、ジリダブマブ (diridavumab)、DKN-01、DMOT4
 039A、ドルリモマブアリトクス (dorlimomab aritox)、ドロジツマブ、DS-1123、D
 S-8895、デュリゴツマブ (duligotumab)、デュピルマブ、デュルバルマブ、デュシギ
 ツマブ (dusigitumab)、エクロメキシマブ、エクリズマブ、エドバコマブ、エドレコロ
 マブ、エファリズマブ、エファングマブ、エルデルマブ、エルゲムツマブ (elgemtumab)
)、エロツズマブ、エルシリモマブ (elsilimomab)、エマクツズマブ (emactuzumab)
)、エミベツズマブ (emibetuzumab)、エナバツズマブ、エンフォルツマブベドチン (enfortumab vedotin)、エンリモマブペゴル、エノブリツズマブ (enoblituzumab)
)、エノキズマブ、エノチクマブ、エンシツキシマブ、エピツモマブシツキセタン (epitum
 omab cituxetan)、エブラツズマブ、エルリズマブ、エルツマキソマブ、エタラシズマ
 ブ、エトロリズマブ、エピナクマブ (evinacumab)、エボロクマブ、エクスピビルマブ
 (exbivirumab)、ファノレソマブ、ファラリモマブ (faralimomab)、ファーレツズ
 マブ、ファシヌマブ、FBTA05、フェルビズマブ、フェザキヌマブ、FF-21101、FGFR2
 抗体-薬物コンジュゲート、Fibromun、フィクラツズマブ、フィギツムマブ、フィリブマ
 ブ (firivumab)、フランボツマブ、フレチクマブ (fletikumab)、フォントリズマブ、
 フォラルマブ (foralumab)、フォラビルマブ (foravirumab)、FPA144、フレソリム
 マブ、FS102、フルラヌマブ、フツキシマブ (futuximab)、ガリキシマブ、ガニツマブ
 、ガンテネルマブ、ガビリモマブ (gavilimomab)、ゲムツズマブオゾガマイシン、ゲリ

10

20

30

40

50

リムズマブ (Gerilimzumab)、ゲボキズマブ、ギレンツキシマブ、グレンバツムマブベドチン、GNR-006、GNR-011、ゴリムマブ、ゴミリキシマブ、GSK2849330、GSK2857916、GSK3174998、GSK3359609、グセルクマブ、Hu14.18K322A MAb、hu3S193、Hu8F4、HuL2G7、HuMab-5B1、イバリズマブ、イブリツモマブチウキセタン、イクルクマブ、イダルシズマブ、IGN002、IGN523、イゴボマブ (igovomab)、IMAB362、IMAB362 (クラウジキシマブ (claudiximab))、イマルマブ (imalumab)、IMC-CS4、IMC-D11、イムシロマブ (imciromab)、イムガツズマブ、IMGN529、IMMU-102 (イットリウムY-90エブラツズマブテトラキセタン)、IMMU-114、ImmuTune IMP701アンタゴニスト抗体、INCAGN1876、インクラクマブ、INCSHR1210、インダツキシマブラブタンシン (indatuximab ravtansine)、インデュサツマブベドチン (indusatumab vedotin)、インフリキシマブ、イノリモマブ、イノツズマブオゾガマイシン、インテツムマブ、Ipafricept、IPH4102、イピリムマブ、イラツムマブ、イサツキシマブ、イスチラツマブ、イトリズマブ、イキセキズマブ、JNJ-56022473、JNJ-61610588、ケリキシマブ、KTN3379、L19IL2/L19TNF、ラベツズマブ、ラベツズマブゴビテカン、LAG525、ランプロリズマブ、ランパリズマブ、L-DOS47、レブリキズマブ、レマレソマブ (lemalesomab)、レンジルマブ (lenzilumab)、レルデリムマブ (lerdelimumab)、ロイコツキシマブ (Leukotuximab)、レクサツムマブ、リビビルマブ (libivirumab)、リファスツズマブベドチン (lifastuzumab vedotin)、リゲリズマブ (ligelizumab)、リロトマブサテトラキセタン (lilotomab satetraxetan)、リンツズマブ、リリルマブ、LKZ145、ロデルシズマブ (lodelcizumab)、ロキベトマブ (lokivetmab)、ロルボツズマブメルタンシン、ルカツムマブ、ルリズマブペゴル (lulizumab pegol)、ルミリキシマブ、ルムレツズマブ (lumretuzumab)、LY3164530、マバツムマブ、マルジェツキシマブ、マスリモマブ (maslimomab)、マツズマブ、マブリリムマブ、MB311、MCS-110、MEDI0562、MEDI-0639、MEDI0680、MEDI-3617、MEDI-551 (イネビリズマブ (inebilizumab))、MEDI-565、MEDI6469、メボリズマブ、メテリムマブ (metelimumab)、MGB453、MGD006/S80880、MGD007、MGD009、MGD011、ミラツズマブ、ミラツズマブ-SN-38、ミンレツモマブ (minretumomab)、ミルベツキシマブラブタンシン、ミツモマブ、MK-4166、MM-111、MM-151、MM-302、モガムリズマブ、MOR202、MOR208、MORAb-066、モロリムマブ (morolimumab)、モタビズマブ、モキセツモマブシュードトクス、ムロモナブ-C D3、ナコロマブタフェナトクス (nacolomab tafenatox)、ナミルマブ (namilumab)、ナブツモマブエスタフェナトクス、ナルナツマブ、ナタリズマブ、ネバクマブ、ネシツムマブ、ネモリズマブ (nemolizumab)、ネレリモマブ、ネスバクマブ、ニモツズマブ、ニボルマブ、ノフェツモマブメルペンタン、NOV-10、オビルトキサキシマブ、オビヌツズマブ、オカラツズマブ、オクレリズマブ、オデュリモマブ (odulimomab)、オフアツムマブ、オララツマブ、オロキズマブ (olokizumab)、オマリズマブ、OMP-131R10、OMP-305B83、オナルツズマブ、オンツキシズマブ (ontuxizumab)、オピシヌマブ (opicinumab)、オボルツズマブモナトクス (oportuzumab monatox)、オレゴボマブ、オルチクマブ (orticumab)、オテリキシズマブ、オトレルツズマブ (otlertuzumab)、OX002/MEN1309、オキセルマブ、オザネズマブ、オゾラリズマブ、パギバキシマブ、パリビズマブ、パニツムマブ、パンコマブ (pankomab)、PankoMab-GEX、パノバクマブ (panobacumab)、パルサツズマブ (parsatuzumab)、パスコリズマブ、パソツキシズマブ (pasotuxizumab)、パテクリズマブ、パトリツマブ (patritumab)、PAT-SC1、PAT-SM6、ペンプロリズマブ、ペムツモマブ (pemtumomab)、ペラキズマブ (perakizumab)、ペルツズマブ、ペキセリズマブ、PF-05082566 (ウトミルマブ)、PF-06647263、PF-06671008、PF-06801591、ピディリズマブ、ピナツズマブベドチン (pinatuzumab vedotin)、ピンツモマブ (pintumomab)、ブラクルマブ、ボラツズマブベドチン、ボネズマブ、ブリリキシマブ、プリトキサキシマブ (pritoxaximab)、プリツムマブ (pritumumab)、PRO140、Proxinium、PSMA ADC、キリズマブ、ラコツモマブ (racotumomab)、ラドレツマブ (radretumab)、ラフィビ

10

20

30

40

50

ルマブ (rafivirumab)、ラルパンシズマブ (ralpancizumab)、ラムシルマブ、ラニビズマブ、ラキシバクマブ、レファネズマブ (refanezumab)、レガビルマブ、REGN1400、REGN2810/SAR439684、レスリズマブ、RFM-203、RG7356、RG7386、RG7802、RG7813、RG7841、RG7876、RG7888、RG7986、リロツムマブ、リヌクマブ (rinucumab)、リツキシマブ、RM-1929、RO7009789、ロバツムマブ、ロレデュマブ (roledumab)、ロモソズマブ、ロンタリズマブ、ロベリズマブ、ルプリズマブ、サシツズマブゴピテカン、サマリズマブ、SAR408701、SAR566658、サリルマブ、SAT 012、サツモマブペンデチド、SCT200、SCT400、SEA-CD40、セクキヌマブ、セリバンツマブ (seribantumab)、セトキサキシマブ (setoxaximab)、セヴィルマブ、SGN-CD19A、SGN-CD19B、SGN-CD33A、SGN-CD70A、SGN-LIV1A、シブロットズマブ (sibr 10
otuzumab)、シファリムマブ、シルツキシマブ、シムツズマブ (simtuzumab)、シプリズマブ、シルクマブ、ソフィツズマブベドチン (sofituzumab vedotin)、ソラネズマブ、ソリトマブ (solitomab)、ソネプシズマブ (sonepcizumab)、ソントズマブ (so 20
ntuzumab)、スタムルマブ、スレソマブ、スピズマブ (suvizumab)、SYD985、SYM004 (フツキシマブ (futuximab) およびモドツキシマブ (modotuximab))、Sym015、TAB08、タバルマブ、タカツズマブテトラキセタン、タドシズマブ、タリズマブ、タネズマブ、タニビルマブ (Tanibirumab)、タブリツモマブパプトクス (taplitumomab 30
paptox)、タレクスツマブ (tarextumab)、TB-403、テフィバズマブ、Teleukin、テリモマブアリトクス (telimomab aritox)、テナツモマブ (tenatumomab)、テネリキシマブ、テプリズマブ、テプロツムマブ、テシドルマブ (tesidolumab)、テツロマブ (tetulomab)、TG-1303、TGN1412、トリウム-227-エプラツズマブコンジュゲート、チシリムマブ、ティガツズマブ、チルドラキズマブ、チソツマブベドチン (Tisotumab 40
vedotin)、TNX-650、トシリズマブ、トラリズマブ、トサトクスマブ (tosatoxumab)、トシツモマブ、トベツマブ、トラロキヌマブ、トラスツズマブ、トラスツズマブエムタンシン、TRBS07、TRC105、トレガリズマブ (tregalizumab)、トレメリムマブ、トレボグルマブ (trevogrumab)、TRPH011、TRX518、TSR-042、TTI-200.7、ツコツズマブセルモロイキン、ツビルマブ、U3-1565、U3-1784、ウブリツキシマブ (ub 50
lituximab)、ウロクプルマブ、ウレルマブ、ウルトキサズマブ、ウステキヌマブ、バダスツキシマブタ

リリン (Vadastuximab Talirine)、バンドルツズマブベドチン、バンチクツマブ、バヌシズマブ (vanucizumab)、バパリキシマブ (vapaliximab)、バルリルマブ (varlilumab)、バテリズマブ (vatelizumab)、VB6-845、ベドリズマブ、ベルツズマブ、ベ 30
パリモマブ (vepalimomab)、ベセンクマブ、ビジリズマブ、ボロシキシマブ、ボルセツズマブマホドチン、ボツムマブ、YYB-101、ザルツムマブ、ザノリムマブ、ザツキシマブ (zatuximab)、ジラリムマブ (ziralimumab)、およびゾリモマブアリトックスからなる群より選択される抗体のFcドメインに結合する。

【0012】

いくつかの態様において、細胞外領域は、それぞれが同じ抗原または異なる抗原への結合を呈する複数の抗原相互作用ドメインを含む。いくつかの態様において、抗原相互作用ド 40
メインは、707-AP、ピオチン化分子、 α -アクチニン-4、abl-bcr alb-b3 (b2a2)、abl-bcr alb-b4 (b3a2)、アディポフィリン、AFP、AIM-2、アネキシン II、ART-4、BAGE、b-カテニン、bcr-abl、bcr-abl p190 (e1a2)、bcr-abl p210 (b2a2)、bcr-abl p210 (b3a2)、BING-4、CAG-3、CAIX、CAMEL、カスパーゼ-8、CD171、CD19、CD20、CD22、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44v7/8、CDC27、CDK-4、CEA、CLCA2、Cyp-B、DAM-10、DAM-6、DEK-CAN、EGFRvIII、EGP-2、EGP-40、ELF2、Ep-CAM、EphA2、EphA3、erb-B2、erb-B3、erb-B4、ES-ESO-1a、ET 50
V6/AML、FBP、胎児アセチルコリン受容体、FGF-5、FN、G250、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7B、GAGE-8、GD2、GD3、GnT-V、Gp100、gp75、Her-2、HLA-A*0201-R170I、HMW-MAA、HSP70-2 M、HST-2 (FGF6)、HST-2/neu、hTERT、iCE、IL-11R、IL-13R 2、KDR、KIAA0205、K

F5、CD90/Thy1、CD96、CDS、CEACAM1、CRACC/SLAMF7、CRTAM、CTLA-4、DAP12、デクチン-1/CLEC7A、DNAM1 (CD226)、DPPIV/CD26、DR3/TNFRSF25、EphB6、GADS、Gi24/VISTA/B7-H5、GITRリガンド/TNFSF18、GITR/TNFRSF18、HLAクラスI、HLA-DR、HVEM/TNFRSF14、IA4、ICAM-1、ICOS/CD278、イカロス (Ikaros)、IL2R、IL2R、IL7R、インテグリン 4/CD49d、インテグリン 4 1、インテグリン 4 7/LPAM-1、IPO-3、ITGA4、ITGA6、ITGAD、ITGAE、ITGAL、ITGAM、ITGAX、ITGB1、ITGB2、ITGB7、KIRDS2、LAG-3、LAT、LIGHT/TNFSF14、LTBR、Ly108、Ly9 (CD229)、リンパ球機能関連抗原-1 (LFA-1)、リンフォトキシン- /TNF-、NKG2C、NKG2D、NKp30、NKp44、NKp46、NKp80 (KLR F1)、NTB-A/SLAMF6、OX40リガンド/TNFSF4、OX40/TNFRSF4、PAG/Cbp、PD-1、PDCD6、PD-L2/B7-DC、PSGL1、RELT/TNFRSF19L、SELPLG (CD162)、SLAM (SLAMF1)、SLAM/CD150、SLAMF4 (CD244)、SLAMF6 (NTB-A)、SLAMF7、SLP-76、TACI/TNFRSF13B、TCL1A、TCL1B、TIM-1/KIM-1/HAVCR、TIM-4、TL1A/TNFSF15、TNF RII/TNFRSF1B、TNF-、TRANCE/RANKL、TSLP、TSLP R、VLA1、およびVLA-6からなる群より選択される分子のシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、共刺激ドメインは、免疫細胞における増殖シグナルおよび/または生存シグナルを調節するように作動しうる。

【0015】

いくつかの態様において、受容体は、細胞の特異的領域へ受容体ポリペプチドを輸送させる少なくとも1つの標的指向ペプチドを含む。いくつかの態様において、標的指向ペプチドは、核、ミトコンドリア、小胞体 (ER)、クロロプラスト、ペルオキシソームまたは形質膜へ受容体ポリペプチドを輸送させる。いくつかの態様において、標的指向ペプチドは、核外移行シグナル (NES) を含む。いくつかの態様において、標的指向ペプチドは、形質膜を標的とするペプチドを含む。

【0016】

いくつかの態様において、受容体修飾は化学修飾を含む。いくつかの態様において、化学修飾はリン酸化を含む。

【0017】

いくつかの態様において、キメラアダプターポリペプチドの受容体結合モエティは、ABL1、ABL2、APBA1、APBA2、APBA3、BCAR3、BLK、BLNK、BMX、BTK、CHN2、CISH、CRK、CRKL、CSK、DAPP1、DOK1、DOK2、DOK3、DOK4、DOK5、DOK6、DOK7、EAT-2、EPS8、EPS8L1、EPS8L2、EPS8L3、FER、FES、FGR、FRK、FRS2、FRS3、FYN、GADS、GRAP、GRAP2、GRB10、GRB14、GRB2、GRB7、HCK、HSH2D、INPP5D、INPPL1、IRS1、IRS2、IRS3、IRS4、ITK、JAK2、LAT、LCK、LCP2、LYN、MATK、NCK1、NCK2、PIK3R1、PIK3R2、PIK3R3、PLCG1、PLCG2、PTK6、PTPN11、PTPN6、RASA1、SAP、SH2B1、SH2B2、SH2B3、SH2D1A、SH2D1B、SH2D2A、SH2D3A、SH2D3C、SH2D4A、SH2D4B、SH2D5、SH2D6、SH3BP2、SHB、SHC1、SHC2、SHC3、SHC4、SHD、SHE、SHP1、SHP2、SLA、SLA2、SOCS1、SOCS2、SOCS3、SOCS4、SOCS5、SOCS6、SOCS7、SRC、SRMS、STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5A、STAT5B、STAT6、SUPT6H、SYK、TEC、TENC1、TLN1、TLN2、TNS、TNS1、TNS3、TNS4、TXK、VAV1、VAV2、VAV3、YES1、ZAP70、X11a、それらの任意の誘導体、それらの任意のバリエーション、およびそれらのフラグメントからなる群より選択される分子の結合ドメインを含む。

【0018】

いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、CRISPR関連ポリペプチド (Cas)、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、ジンクフィンガー関連遺伝子調節ポリペプチド、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、転写活性化因子様エフェクター関連遺伝子調節ポリペプチド、メガヌクレアーゼ、天然マスター転写因子、エピジェネティック修飾酵素、リコンビナーゼ、フリッパーゼ、トランスポザーゼ、RNA結合タンパク質 (RBP)、アルゴノートタンパク質、それらの任意の誘導体、それらの任意のバリエーション、およびそれらのフラグメントからなる群より選択される分子の結合ドメインを含む。

10

20

30

40

50

アント、またはそれらの任意のフラグメントを含む。いくつかの態様において、アクチュエータモエティはCasタンパク質を含み、本システムはさらに、Casタンパク質と複合体形成するガイドRNA (gRNA) を含む。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、Casタンパク質と複合体形成することができるgRNAと複合体形成したRBPを含む。いくつかの態様において、gRNAは、標的ポリヌクレオチドに対して少なくとも80%の配列同一性を呈する標的指向セグメントを含む。いくつかの態様において、Casタンパク質はDNA切断活性を実質的に欠く。

【0019】

いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、細胞の特異的領域にアクチュエータモエティを向かわせる少なくとも1つの標的指向ペプチドを含む。いくつかの態様において、標的指向ペプチドは核局在化シグナル (NLS) を含む。

10

【0020】

いくつかの態様において、受容体修飾は複数の修飾部位における修飾を含み、各修飾部位は、キメラアダプターポリペプチドおよび/または第2アダプターポリペプチドに結合するのに有効である。

【0021】

いくつかの態様において、切断認識部位はポリペプチド配列を含み、切断モエティはプロテアーゼ活性を含む。

【0022】

いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、GMPから放出されたときに、標的ポリヌクレオチドに結合することで、標的ポリヌクレオチドの物理的妨害によって、または標的ポリヌクレオチドからの遺伝子発現を抑圧もしくは強化するのに有効な追加因子の動員によって、標的ポリヌクレオチドからの遺伝子発現を調節する。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、標的ポリヌクレオチドからの遺伝子発現を増加させるのに有効な転写活性化因子を含む。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、標的ポリヌクレオチドからの遺伝子発現を減少させるのに有効な転写抑制因子を含む。

20

【0023】

いくつかの態様において、標的ポリヌクレオチドはゲノムDNAを含む。いくつかの態様において、標的ポリヌクレオチドはRNAを含む。いくつかの態様において、標的ポリヌクレオチドは内在性遺伝子または内在性遺伝子産物を含む。いくつかの態様において、内在性遺伝子または内在性遺伝子産物はサイトカインをコードする。いくつかの態様において、サイトカインは、4-1BBL、アクチビン A、アクチビン B、アクチビン C、アクチビン E、アルテミン (ARTN)、BAFF/BLyS/TNFSF138、BMP10、BMP15、BMP2、BMP3、BMP4、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8a、BMP8b、骨形成タンパク質1 (BMP1)、CCL1/TCA3、CCL11、CCL12/MCP-5、CCL13/MCP-4、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17/TARC、CCL18、CCL19、CCL2/MCP-1、CCL20、CCL21、CCL22/MDC、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CCL28、CCL3、CCL3L3、CCL4、CCL4L1/LAG-1、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9、CD153/CD30L/TNFSF8、CD40L/CD154/TNFSF5、CD40LG、CD70、CD70/CD27L/TNFSF7、CLCF1、c-MPL/CD110/TPOR、CNTF、CX3CL1、CXCL1、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCL17、CXCL2/MIP-2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7/Ppbbp、CXCL9、EDA-A1、FAM19A1、FAM19A2、FAM19A3、FAM19A4、FAM19A5、Fasリガンド/FASLG/CD95L/CD178、GDF10、GDF11、GDF15、GDF2、GDF3、GDF4、GDF5、GDF6、GDF7、GDF8、GDF9、グリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF)、増殖分化因子1 (GDF1)、IFNA1、IFNA10、IFNA13、IFNA14、IFNA2、IFNA4、IFNA5/IFNaG、IFNA7、IFNA8、IFNB1、IFNE、IFNG、IFNZ、IFN /IFNW1、IL11、IL18、IL18BP、IL1A、IL1B、IL1F10、IL1F3/IL1RA、IL1F5、IL1F6、IL1F7、IL1F8、IL1F9、IL1RL2、IL31、IL33、IL6、IL8/CXCL8、インヒピン-A、インヒピン-B、レプチン、LIF、LTA/TNFB/TNFSF1、LTB/TNFC、ニューロツリン (NRTN)、OSM、OX-40L/TNFSF4/CD252、パーセフィン (PSPN)、RA

30

40

50

NKL/OPGL/TNFSF11 (CD254)、TL1A/TNFSF15、TNFA、TNF-アルファ/TNFA、TNFSF10/TRAIL/APO-2L (CD253)、TNFSF12、TNFSF13、TNFSF14/LIGHT/CD258、XCL1、およびXCL2からなる群より選択される。いくつかの態様において、内在性遺伝子または内在性遺伝子産物は免疫調節タンパク質をコードする。いくつかの態様において、免疫調節タンパク質は、A2AR、B7.1、B7-H3/CD276、B7-H4/B7S1/B7x/Vtcn1、B7-H6、BTLA/CD272、CCR4、CD122、4-1BB/CD137、CD27、CD28、CD40、CD47、CD70、CISH、CTLA-4/CD152、DR3、GITR、ICOS/CD278、IDO、KIR、LAG-3、OX40/CD134、PD-1/CD279、PD2、PD-L1、PD-L2、TIM-3、およびVISTA/Dies1/Gi24/PD-1H (C10orf54) からなる群より選択される。いくつかの態様において、標的ポリヌクレオチドは、異種遺伝子または異種遺伝子産物を含む。いくつかの態様において、異種遺伝子または異種遺伝子産物は、追加のキメラ膜貫通受容体ポリペプチドをコードする。いくつかの態様において、追加のキメラ膜貫通受容体ポリペプチドは、(a) 追加抗原に結合する追加の抗原相互作用ドメインを含む細胞外領域、および(b) 共刺激ドメインを含む。いくつかの態様において、追加の抗原相互作用ドメインは、707-APP、ピオチン化分子、 α -アクチニン-4、abl-bcr alb-b3 (b2a2)、abl-bcr alb-b4 (b3a2)、アディポフィリン、AFP、AIM-2、アネキシン II、ART-4、BAGE、b-カテニン、bcr-abl、bcr-abl p190 (e1a2)、bcr-abl p210 (b2a2)、bcr-abl p210 (b3a2)、BING-4、CAG-3、CAIX、CAMEL、カスパーゼ-8、CD171、CD19、CD20、CD22、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44v7/8、CDC27、CDK-4、CEA、CLCA2、Cyp-B、DAM-10、DAM-6、DEK-CAN、EGFRvIII、EGP-2、EGP-40、ELF2、EpCAM、EphA2、EphA3、erb-B2、erb-B3、erb-B4、ES-ESO-1a、ETV6/AML、FBP、胎児アセチルコリン受容体、FGF-5、FN、G250、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7B、GAGE-8、GD2、GD3、GnT-V、Gp100、gp75、Her-2、HLA-A*0201-R170I、HMW-MAA、HSP70-2 M、HST-2 (FGF6)、HST-2/neu、hTERT、iCE、IL-11R、IL-13R、KDR、KIAA0205、K-RAS、L1細胞接着分子、LAGE-1、LDLR/FUT、ルイスY、MAGE-1、MAGE-10、MAGE-12、MAGE-2、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-6、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A6、MAGE-B1、MAGE-B2、リンゴ酸酵素、マンマグロピン-A、MART-1/Melan-A、MART-2、MC1R、M-CSF、メソテリン、MUC1、MUC16、MUC2、MUM-1、MUM-2、MUM-3、ミオシン、NA88-A、Neo-PAP、NKG2D、NPM/ALK、N-RAS、NY-ESO-1、OA1、OGT、腫瘍胎児性抗原 (h5T4)、OS-9、Pポリペプチド、P15、P53、PRAME、PSA、PSCA、PSMA、PTPRK、RAGE、ROR1、RU1、RU2、SART-1、SART-2、SART-3、SOX10、SSX-2、サバイピン、サバイピン-2B、SYT/SSX、TAG-72、TEL/AML1、TGFR2、TGF β R1、TGF β R2、TP1、TRAG-3、TRG、TRP-1、TRP-2、TRP-2/INT2、TRP-2-6b、チロシナーゼ、VEGF-R2、WT1、 α -葉酸受容体、および軽鎖からなる群より選択される抗原に結合する。いくつかの態様において、共刺激ドメインは、2B4/CD244/SLAMF4、4-1BB/TNFSF9/CD137、B7-1/CD80、B7-2/CD86、B7-H1/PD-L1、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H6、B7-H7、BAFF R/TNFRSF13C、BAFF/BLyS/TNFSF13B、BLAME/SLAMF8、BTLA/CD272、CD100 (SEMA4D)、CD103、CD11a、CD11b、CD11c、CD11d、CD150、CD160 (BY55)、CD18、CD19、CD2、CD200、CD229/SLAMF3、CD27リガンド/TNFSF7、CD27/TNFRSF7、CD28、CD29、CD2F-10/SLAMF9、CD30リガンド/TNFSF8、CD30/TNFRSF8、CD300a/LMIR1、CD4、CD40リガンド/TNFSF5、CD40/TNFRSF5、CD48/SLAMF2、CD49a、CD49D、CD49f、CD53、CD58/LFA-3、CD69、CD7、CD8、CD8、CD82/Kai-1、CD84/SLAMF5、CD90/Thy1、CD96、CDS、CEACAM1、CRACC/SLAMF7、CRTAM、CTLA-4、DAP12、デクチン-1/CLEC7A、DNAM1 (CD226)、DPPIV/CD26、DR3/TNFRSF25、EphB6、GADS、Gi24/VISTA/B7-H5、GITRリガンド/TNFSF18、GITR/TNFRSF18、HLAクラスI、HLA-DR、HVEM/TNFRSF14、IA4、ICAM-1、ICOS/CD278、イカロス (Ikaros)、IL2R α 、IL2R β 、IL7R α 、インテグリン α 4/CD49d、インテグリン α 4 β 1、インテグリン α 4 β 7/LPAM-1、IPO-3、ITGA4、ITGA6、ITGAD、ITGAE、ITGAL、ITGA

10

20

30

40

50

M、ITGAX、ITGB1、ITGB2、ITGB7、KIRDS2、LAG-3、LAT、LIGHT/TNFSF14、L TBR、Ly108、Ly9 (CD229)、リンパ球機能関連抗原-1 (LFA-1)、リンフォトキシン - /TNF-、NKG2C、NKG2D、NKp30、NKp44、NKp46、NKp80 (KLRF1)、NTB -A/SLAMF6、OX40リガンド/TNFSF4、OX40/TNFRSF4、PAG/Cbp、PD-1、PDCD6、PD-L2/B7-DC、PSGL1、RELT/TNFRSF19L、SELPLG (CD162)、SLAM (SLAMF 1)、SLAM/CD150、SLAMF4 (CD244)、SLAMF6 (NTB-A)、SLAMF7、SLP-76、TACI/TNFRSF13B、TCL1A、TCL1B、TIM-1/KIM-1/HAVERCR、TIM-4、TL1A/TNFSF15、TNF RII/TNFRSF1B、TNF-、TRANCE/RANKL、TSLP、TSLP R、VLA1、およびVLA-6からなる群より選択される分子のシグナル伝達ドメインを含む。

【0024】

一局面において、本開示は、本明細書に開示するいずれかのシステムを発現するリンパ球を提供する。いくつかの態様において、リンパ球は、受容体ポリペプチドが抗原に結合したときに切断認識部位における切断によってアクチュエータモエティがGMPから放出されることを特徴とする。いくつかの態様において、放出されたアクチュエータモエティは、リンパ球中の標的ポリヌクレオチドと複合体形成する。

【0025】

いくつかの態様において、アクチュエータモエティと標的ポリヌクレオチドとの複合体形成は、リンパ球中の遺伝子のアップレギュレートされた発現をもたらす。いくつかの態様において、遺伝子は異種遺伝子である。いくつかの態様において、異種遺伝子は追加のキメラ膜貫通受容体ポリペプチドをコードする。いくつかの態様において、追加のキメラ膜貫通受容体ポリペプチドは、(a) 追加抗原に結合する追加の抗原相互作用ドメインを含む細胞外領域、および(b) 共刺激ドメインを含む。いくつかの態様において、遺伝子は内在性遺伝子である。いくつかの態様において、内在性遺伝子はサイトカインをコードする。いくつかの態様において、サイトカインは、4-1BBL、アクチピン A、アクチピン B、アクチピン C、アクチピン E、アルテミン (ARTN)、BAFF/BLyS/TNFSF138、BMP10、BMP15、BMP2、BMP3、BMP4、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8a、BMP8b、骨形成タンパク質1 (BMP1)、CCL1/TCA3、CCL11、CCL12/MCP-5、CCL13/MCP-4、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17/TARC、CCL18、CCL19、CCL2/MCP-1、CCL20、CCL21、CCL22/MDC、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CCL28、CCL3、CCL3L3、CCL4、CCL4L1/LAG-1、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9、CD153/CD30L/TNFSF8、CD40L/CD154/TNFSF5、CD40LG、CD70、CD70/CD27L/TNFSF7、CLCF1、c-MPL/CD110/TPOR、CNTF、CX3CL1、CXCL1、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCL17、CXCL2/MIP-2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7/Pppb、CXCL9、EDA-A1、FAM19A1、FAM19A2、FAM19A3、FAM19A4、FAM19A5、Fasリガンド/FASLG/CD95L/CD178、GDF10、GDF11、GDF15、GDF2、GDF3、GDF4、GDF5、GDF6、GDF7、GDF8、GDF9、グリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF)、増殖分化因子1 (GDF1)、IFNA1、IFNA10、IFNA13、IFNA14、IFNA2、IFNA4、IFNA5/IFNaG、IFNA7、IFNA8、IFNB1、IFNE、IFNG、IFNZ、IFN /IFNW1、IL11、IL18、IL18BP、IL1A、IL1B、IL1F10、IL1F3/IL1RA、IL1F5、IL1F6、IL1F7、IL1F8、IL1F9、IL1RL2、IL31、IL33、IL6、IL8/CXCL8、インヒピン-A、インヒピン-B、レプチン、LIF、LTA/TNFB/TNFSF1、LTB/TNFC、ニュールツリン (NRTN)、OSM、OX-40L/TNFSF4/CD252、パーセフィン (PSPN)、RANKL/OPGL/TNFSF11 (CD254)、TL1A/TNFSF15、TNFA、TNF-アルファ/TNFA、TNFSF10/TRAIL/APO-2L (CD253)、TNFSF12、TNFSF13、TNFSF14/LIGHT/CD258、XCL1、およびXCL2からなる群より選択される。

【0026】

いくつかの態様において、アクチュエータモエティと標的ポリヌクレオチドとの複合体形成は、リンパ球中の遺伝子の発現をダウンレギュレートする。いくつかの態様において、遺伝子は内在性遺伝子である。いくつかの態様において、内在性遺伝子は免疫調節タンパク質をコードする。いくつかの態様において、免疫調節タンパク質は、A2AR、B7.1、B7

10

20

30

40

50

-H3/CD276、B7-H4/B7S1/B7x/Vtcn1、B7-H6、BTLA/CD272、CCR4、CD122、4-1BB/CD137、CD27、CD28、CD40、CD47、CD70、CISH、CTLA-4/CD152、DR3、GITR、ICOS/CD278、IDO、KIR、LAG-3、OX40/CD134、PD-1/CD279、PD2、PD-L1、PD-L2、TIM-3、およびVISTA/Dies1/Gi24/PD-1H (C10orf54) からなる群より選択される。

【0027】

一局面において、本開示は、本明細書に開示するいずれかのシステムを発現するリンパ球の集団を提供する。いくつかの態様において、リンパ球の集団は、受容体ポリペプチドが抗原に結合したときに切断認識部位における切断によってアクチュエータモエティがGMPから放出されることを特徴とする。

10

【0028】

一局面において、本開示は、標的細胞の死を誘導する方法を提供する。本方法は、標的細胞を、本明細書に開示するいずれかのシステムを発現するリンパ球に曝露する工程を含む。いくつかの態様において、標的細胞をリンパ球に曝露すると、リンパ球によって発現された受容体ポリペプチドは、標的細胞の細胞表面抗原または標的細胞によって分泌される抗原を含む抗原に結合し、抗原への受容体ポリペプチドの結合がリンパ球の細胞傷害性を活性化することによって、標的細胞の死を誘導する。いくつかの態様において、標的細胞はがん細胞である。いくつかの態様において、アクチュエータモエティがGMPから放出されたときに、抗原への受容体ポリペプチドの結合はリンパ球の細胞傷害性を活性化する。

【0029】

いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、標的ポリヌクレオチドの物理的妨害によって、または標的ポリヌクレオチドからの遺伝子発現を抑圧もしくは強化するのに有効な追加因子の動員によって、標的ポリヌクレオチドからの遺伝子発現を調節する。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、標的ポリヌクレオチドからの遺伝子発現を増加させるのに有効な転写活性化因子を含む。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、標的ポリヌクレオチドからの遺伝子発現を減少させるのに有効な転写抑制因子を含む。いくつかの態様において、標的ポリヌクレオチドはゲノムDNAを含む。いくつかの態様において、標的ポリヌクレオチドはRNAを含む。

20

【0030】

いくつかの態様において、受容体修飾はリン酸化を含む。いくつかの態様において、受容体修飾は複数の修飾部位における修飾を含み、各修飾は、キメラアダプターポリペプチドに結合するのに有効である。

30

【0031】

いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、CRISPR関連ポリペプチド (Cas)、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、ジンクフィンガー関連遺伝子調節ポリペプチド、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、転写活性化因子様エフェクター関連遺伝子調節ポリペプチド、メガヌクレアーゼ、天然マスター転写因子、エピジェネティック修飾酵素、リコンビナーゼ、フリッパーゼ、トランスボザーゼ、RNA結合タンパク質 (RBP)、アルゴノートタンパク質、任意の誘導体、それらの任意のバリエーション、またはそれらの任意のフラグメントを含む。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、ガイドRNA (gRNA) との複合体を形成するCasタンパク質を含む。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、Casタンパク質との複合体を形成することができるガイドRNA (gRNA) と複合体形成したRBPを含む。いくつかの態様において、Casタンパク質はDNA切断活性を実質的に欠く。

40

【0032】

いくつかの態様において、切断認識部位はポリペプチド配列を含み、切断モエティはプロテアーゼ活性を含む。

【0033】

一局面において、本開示はキメラ膜貫通受容体ポリペプチドを提供する。キメラ膜貫通受容体ポリペプチドは、(a) 抗原に結合する抗原相互作用ドメインを含む細胞外領域、およ

50

び (b) 免疫細胞シグナル伝達ドメインと、免疫細胞シグナル伝達ドメインに連結された遺伝子調整ポリペプチド (GMP) とを含む細胞内領域を含み、ここで、GMPは、ペプチド切断ドメインに連結されたアクチュエータモエティを含み、抗原が細胞外領域に結合すると、アクチュエータモエティは、ペプチド切断ドメインにおける切断によって、GMPから放出される。

【0034】

一局面において、本開示はキメラ膜貫通受容体ポリペプチドを提供する。キメラ膜貫通受容体ポリペプチドは、(a) 抗原に結合する抗原相互作用ドメインを含む細胞外領域、および (b) 免疫細胞シグナル伝達ドメインと、ペプチド切断ドメインを介して免疫細胞シグナル伝達ドメインに連結されたアクチュエータモエティとを含む細胞内領域を含み、抗原が細胞外領域に結合すると、アクチュエータモエティは、ペプチド切断ドメインにおける切断によって、受容体から放出される。

10

【0035】

一局面において、本開示は、リンパ球の条件付き調節のための方法を提供する。本方法は、本明細書に開示するいずれかのシステムを発現するリンパ球を、キメラ膜貫通受容体ポリペプチドの抗原相互作用ドメインに結合する抗原と接触させる工程を含み、前記接触は免疫細胞活動の活性化または失活を引き起こし、それによって、リンパ球を条件付きで調節する。いくつかの態様において、免疫細胞活動は、リンパ球のクローン増加;リンパ球によるサイトカイン放出;リンパ球の細胞傷害性;リンパ球の増殖;リンパ球の分化、脱分化または分化転換;リンパ球の運動および/または輸送;リンパ球の疲弊および/または再活性化;ならびにリンパ球による他の細胞間分子、代謝産物、化学化合物、またはそれらの組合せの放出からなる群より選択される。いくつかの態様において、抗原が受容体ポリペプチドの抗原相互作用ドメインに結合すると、アクチュエータモエティがGMPから放出されて、活性化または失活を引き起こす。

20

【0036】

一局面において、本開示はキメラアダプターポリペプチドを提供する。キメラアダプターポリペプチドは、(a) 抗原に結合して修飾を受けた受容体に結合する受容体結合モエティであって、該受容体が免疫細胞シグナル伝達ドメインを含む細胞内領域を含む、受容体結合モエティと、(b) 受容体結合モエティに連結された遺伝子調整ポリペプチド (GMP) であって、切断認識部位に連結されたアクチュエータモエティを含むGMPとを含み、修飾を受けた受容体に受容体結合モエティが結合すると、アクチュエータモエティは切断認識部位における切断によってGMPから放出される。いくつかの態様において、受容体結合モエティは、ABL1、ABL2、APBA1、APBA2、APBA3、BCAR3、BLK、BLNK、BMX、BTK、CHN2、CISH、CRK、CRKL、CSK、DAPP1、DOK1、DOK2、DOK3、DOK4、DOK5、DOK6、DOK7、EAT-2、EPS8、EPS8L1、EPS8L2、EPS8L3、FER、FES、FGR、FRK、FRS2、FRS3、FYN、GADS、GRAP、GRAP2、GRB10、GRB14、GRB2、GRB7、HCK、HSH2D、INPP5D、INPPL1、IRS1、IRS2、IRS3、IRS4、ITK、JAK2、LAT、LCK、LCP2、LYN、MATK、NCK1、NCK2、PIK3R1、PIK3R2、PIK3R3、PLCG1、PLCG2、PTK6、PTPN11、PTPN6、RASA1、SAP、SH2B1、SH2B2、SH2B3、SH2D1A、SH2D1B、SH2D2A、SH2D3A、SH2D3C、SH2D4A、SH2D4B、SH2D5、SH2D6、SH3BP2、SHB、SHC1、SHC2、SHC3、SHC4、SHD、SHE、SHP1、SHP2、SLA、SLA2、SOCS1、SOCS2、SOCS3、SOCS4、SOCS5、SOCS6、SOCS7、SRC、SRMS、STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5A、STAT5B、STAT6、SUPT6H、SYK、TEC、TENC1、TLN1、TLN2、TNS、TNS1、TNS3、TNS4、TXK、VAV1、VAV2、VAV3、YES1、ZAP70、X11a、それらの任意の誘導体、それらの任意のバリエーション、およびそれらの任意のフラグメントからなる群より選択される分子の結合ドメインを含む。

30

40

【0037】

いくつかの態様において、キメラアダプターポリペプチドは、細胞の特異的領域へキメラアダプターポリペプチドを輸送させる少なくとも1つの標的指向ペプチドを含む。いくつかの態様において、標的指向ペプチドは、核、細胞質、ミトコンドリア、小胞体 (ER)、

50

クロロプラスト、アポプラスト、ペルオキシソームまたは形質膜ヘキメラアダプターポリペプチドを輸送させる。

【0038】

いくつかの態様において、標的指向ペプチドは、核外移行シグナル(NES)を含む。いくつかの態様において、NESはキメラアダプターポリペプチドのN末に連結されている。いくつかの態様において、標的指向ペプチドは、形質膜を標的とするペプチドを含む。

【0039】

いくつかの態様において、標的指向ペプチドは、アクチュエータモエティに連結されている。いくつかの態様において、標的指向ペプチドは核局在化シグナル(NLS)を含む。いくつかの態様において、NLSを含む標的指向ペプチドは、アクチュエータモエティのN末またはC末に連結されている。いくつかの態様において、アクチュエータモエティに連結されたNLSを含む標的指向ペプチドは、切断認識部位における切断によるGMPからのアクチュエータモエティの放出に続いて、細胞の核へアクチュエータモエティを輸送させる。

10

【0040】

いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、CRISPR関連ポリペプチド(Cas)、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、ジンクフィンガー関連遺伝子調節ポリペプチド、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、転写活性化因子様エフェクター関連遺伝子調節ポリペプチド、メガヌクレアーゼ、天然マスター転写因子、エピジェネティック修飾酵素、リコンビナーゼ、フリッパーゼ、トランスボザーゼ、RNA結合タンパク質(RBP)、アルゴノートタンパク質、それらの任意の誘導體、それらの任意のバリ

アント、またはそれらの任意のフラグメントを含む。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、ガイドRNA(gRNA)との複合体を形成するCasタンパク質を含む。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、Casタンパク質との複合体を形成することができるガイドRNAと複合体形成していてもよいRBPを含む。いくつかの態様において、Casタンパク質はDNA切断活性を実質的に欠く。

20

【0041】

いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、標的ポリヌクレオチドの物理的妨害によって、または標的ポリヌクレオチドからの遺伝子発現を抑圧もしくは強化するのに有効な追加因子の動員によって、遺伝子の発現を調節する。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、標的ポリヌクレオチドからの遺伝子発現を増加させるのに有効な転写活性化因子を含む。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、標的ポリヌクレオチドからの遺伝子発現を減少させるのに有効な転写抑制因子を含む。

30

【0042】

いくつかの態様において、切断認識部位は受容体結合モエティとアクチュエータモエティとに挟まれている。いくつかの態様において、切断認識部位は、プロテアーゼによって認識される切断認識配列を含む。いくつかの態様において、切断認識部位は複数の切断認識配列を含み、各切断認識配列は同じプロテアーゼまたは異なるプロテアーゼによって認識される。いくつかの態様において、切断認識配列は、アクロモペプチダーゼ、アミノペプチダーゼ、アングロッド、アンジオテンシン変換酵素、プロメライン、カルパイン、カルパインI、カルパインII、カルボキシペプチダーゼA、カルボキシペプチダーゼB、カルボキシペプチダーゼG、カルボキシペプチダーゼP、カルボキシペプチダーゼW、カルボキシペプチダーゼY、カスパーゼ1、カスパーゼ2、カスパーゼ3、カスパーゼ4、カスパーゼ5、カスパーゼ6、カスパーゼ7、カスパーゼ8、カスパーゼ9、カスパーゼ10、カスパーゼ11、カスパーゼ12、カスパーゼ13、カテプシンB、カテプシンC、カテプシンD、カテプシンE、カテプシンG、カテプシンH、カテプシンL、キモパパイン、キマーゼ、キモトリプシン、クロストリパイン、コラゲナーゼ、補体C1r、補体C1s、補体因子D、補体因子I、ククミシン、ジペプチジルペプチダーゼIV、エラスターゼ(白血球)、エラスターゼ(臍)、エンドプロテイナーゼArg-C、エンドプロテイナーゼAsp-N、エンドプロテイナーゼGlu-C、エンドプロテイナーゼLys-C、エンテロキナーゼ、第Xa因子、フィシン、フェーリン、グランザイムA、グランザイムB、HIVプロテアーゼ、IGase、組織カリクレイン、ロ

40

50

イシニアミノペプチダーゼ（全般）、ロイシニアミノペプチダーゼ（サイトゾル）、ロイシニアミノペプチダーゼ（ミクロソーム）、マトリックスメタロプロテアーゼ、メチオニンアミノペプチダーゼ、ニュートラーゼ、パパイン、ペプシン、プラスミン、プロリダーゼ、プロナーゼE、前立腺特異抗原、ストレプトミセス・グリセウス（*Streptomyces griseus*）由来の好アルカリ性プロテアーゼ、アスペルギルス（*Aspergillus*）由来のプロテアーゼ、アスペルギルス・サイトイ（*Aspergillus saitoi*）由来のプロテアーゼ、ショウユコウジカビ（*Aspergillus sojae*）由来のプロテアーゼ、プロテアーゼ（*B.リケニフォルミス*（*B. licheniformis*））（アルカリ性またはアルカラーゼ）、バチルス・ポリミキサ（*Bacillus polymyxa*）由来のプロテアーゼ、バチルス属の種（*Bacillus sp.*）由来のプロテアーゼ、クモノスカビ属の種（*Rhizopus sp.*）由来のプロテアーゼ、プロテアーゼS、プロテアソーム、コウジカビ（*Aspergillus oryzae*）由来のプロテイナーゼ、プロテイナーゼ3、プロテイナーゼA、プロテイナーゼK、プロテインC、ピログルタミン酸アミノペプチダーゼ、レンニン、レンニン、ストレプトキナーゼ、サブチリシン、サーモライシン、トロンピン、組織プラスミノゲン活性化因子、トリプシン、トリプターゼおよびウロキナーゼからなる群より選択されるプロテアーゼによって認識される。

10

【0043】

一局面において、本開示はキメラ膜貫通受容体ポリペプチドを提供する。キメラ膜貫通受容体ポリペプチドは、（a）抗原に結合する抗原相互作用ドメインを含む細胞外領域、および（b）免疫細胞シグナル伝達ドメインと、免疫細胞シグナル伝達ドメインに連結された遺伝子調整ポリペプチド（GMP）とを含む細胞内領域を含み、ここで、GMPは、切断認識部位に連結されたアクチュエータモエティを含み、抗原が細胞外領域に結合すると、アクチュエータモエティは、切断認識部位における切断によって、GMPから放出される。

20

【0044】

いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは膜結合型抗原に結合する。いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、膜結合型でない抗原に結合する。いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは抗体に結合する。いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、抗体のFcドメイン、Fvドメイン、重鎖、および軽鎖のうちの少なくとも1つに結合する。いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは抗体のFcドメインに結合する。

【0045】

いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、Fab、単鎖Fv（scFv）、細胞外受容体ドメイン、およびFc結合ドメインのうちの少なくとも1つを含む。いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、Fc受容体またはその任意のフラグメントを含むFc結合ドメインを含む。いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、Fc RI（CD64）、Fc RIa、Fc RIb、Fc RIc、Fc RIIA（CD32）、Fc RIIA（CD32, H131）、Fc RIIA（CD32, R131）、Fc RIIb（CD32）、Fc RIIb-1、Fc RIIb-2、Fc RIIIA（CD16a, V158）、Fc RIIIA（CD16a, F158）、Fc RIIIB（CD16b、Fc RIIIB-NA1）、Fc RIIIB（CD16b、Fc RIIIB-NA2）、Fc RI、Fc RII（CD23）、Fc RI（CD89）、Fc μ R、FcRn、それらの任意の誘導体、それらの任意のバリエーション、またはそれらの任意のフラグメントを含むFc結合ドメインを含む。いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは抗体を含む抗原に結合し、次にその抗体は、1-40- -アミロイド、4-1BB、5AC、5T4、アクチビン受容体様キナーゼ1、ACVR2B、腺癌抗原、AGS-22M6、アルファ-フェトプロテイン、アンジオポエチン2、アンジオポエチン3、炭疽毒素、AOC3（VAP-1）、B7-H3、炭疽菌炭疽、BAFF、ベータ-アミロイド、Bリンパ腫細胞、C242抗原、C5、CA-125、イヌIL31、炭酸脱水酵素9（CA-IX）、心筋ミオシン、CCL11（エオタキシン-1）、CCR4、CCR5、CD11、CD18、CD125、CD140a、CD147（ペイシジン）、CD15、CD152、CD154（CD40L）、CD19、CD2、CD20、CD200、CD22、CD221、CD23（IgE受容体）、CD25（IL-2受容体の鎖）、CD27、CD274、CD28、CD3、CD3イブシロン、CD30、CD33、CD37、CD38、CD4、CD40、CD40リガンド、CD41、CD44 v6、CD5、CD51、CD52、CD56、CD6、CD70、CD74、CD79B、CD8

30

40

50

0、CEA、CEA関連抗原、CFD、ch4D5、CLDN18.2、クロストリジウム・ディフィシレ、クランピング因子A、CSF1R、CSF2、CTLA-4、C-X-Cケモカイン受容体4型、サイトメガロウイルス、サイトメガロウイルス糖タンパク質B、ダビガトラン、DLL4、DPP4、DR5、大腸菌志賀毒素1型、大腸菌志賀毒素2型、EGFL7、EGFR、エンドトキシン、EpCAM、エピシアリン、ERBB3、大腸菌、呼吸器合胞体ウイルスのFタンパク質、FAP、フィブリンIIベータ鎖、フィブロンネクチンエクストラドメイン-B、葉酸ヒドロラーゼ、葉酸受容体1、葉酸受容体アルファ、Frizzled受容体、ガングリオシドGD2、GD2、GD3ガングリオシド、グリピカン3、GMCSF受容体鎖、GPNMB、増殖分化因子8、GUCY2C、ヘマグルチニン、B型肝炎表面抗原、B型肝炎ウイルス、HER1、HER2/neu、HER3、HGF、HHGFR、ヒストン複合体、HIV-1、HLA-DR、HNGF、Hsp90、ヒト散乱因子受容体キナーゼ、ヒトTNF、ヒトベータ-アミロイド、ICAM-1 (CD54)、IFN- α 、IFN- β 、IgE、IgE Fc領域、IGF-1受容体、IGF-1、IGHE、IL17A、IL17F、IL20、IL-12、IL-13、IL-17、IL-1 α 、IL-22、IL-23、IL-31RA、IL-4、IL-5、IL-6、IL-6受容体、IL-9、ILGF2、インフルエンザAヘマグルチニン、インフルエンザAウイルスヘマグルチニン、インスリン様成長因子I受容体、インテグリン α 4 β 7、インテグリン α 4 β 1、インテグリン α 7 β 1、インテグリン α IIb β 3、インテグリン α v β 3、インターフェロン γ 受容体、インターフェロンガンマ誘導タンパク質、ITGA2、ITGB2 (CD18)、KIR2D、ルイスY抗原、LFA-1 (CD11a)、LINGO-1、リポテイコ酸、LOXL2、L-セレクチン (CD62L)、LTA、MCP-1、メソテリン、MIF、MS4A1、MSLN、MUC1、ムチンCanAg、ミエリン関連糖タンパク質、ミオスタチン、NCA-90 (顆粒球抗原)、神経アポトーシス調節プロテイナーゼ1、NGF、N-グリコシルノイラミン酸、NOGO-A、Notch受容体、NRP1、アナウサギ、OX-40、oxLDL、PCSK9、PD-1、PDCD1、PDGF-R α 、リン酸-ナトリウム共輸送体、ホスファチジルセリン、血小板由来成長因子受容体ベータ、前立腺癌細胞、緑膿菌、狂犬病ウイルス糖タンパク質、RANKL、呼吸器合胞体ウイルス、RHD、リーサス因子、RON、RTN4、スクレロスチン、SDC1、セレクチnP、SLAMF7、SOST、スフィンゴシン-1-リン酸、黄色ブドウ球菌、STEAP1、TAG-72、T細胞受容体、TEM1、テネイシンC、TFPI、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TNF- α 、TRAIL-R1、TRAIL-R2、腫瘍抗原CTAA16.88、MUC1の腫瘍特異的グリコシル化、腫瘍関連カルシウムシグナル伝達物質2、TWEAK受容体、TYRP1 (糖タンパク質75)、VEGFA、VEGFR1、VEGFR2、ビメンチン、およびVWFからなる群より選択される抗原に結合する。

【0046】

いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、20-(74)-(74) (ミラツズマブ;ベルツズマブ)、20-2b-2b、3F8、74-(20)-(20) (ミラツズマブ;ベルツズマブ)、8H9、A33、AB-16B5、アバゴボマブ、アブシキシマブ、アビツズマブ、ABP494 (セツキシマブバイオシミラー)、アブリルマブ、ABT-700、ABT-806、Actimab-A (アクチニウムAc-225リンツズマブ)、アクトクスマブ、アダリムマブ、ADC-1013、ADCT-301、ADCT-402、アデカツムマブ、アデュカヌマブ、アフエリモマブ、AFM13、アフツズマブ、AGEN1884、AGS15E、AGS-16C3F、AGS67E、アラシズマブペゴル、ALD518、アレムツズマブ、アリロクマブ、アルツモマブペンテテート、アマツキシマブ、AMG228、AMG820、アナツモマブマフェナトクス、アネツマブラブタンシン、アニフロルマブ、アンルキンズマブ、APN301、APN311、アボリズマブ、APX003/SIM-BD0801 (セバシズマブ)、APX005M、アルシツモマブ、ARX788、アスクリンバクマブ、アセリズマブ、ASG-15ME、アテゾリズマブ、アチヌマブ、ATL101、アトリズマブ (トシリズマブともいう)、アトロリムマブ、アベルマブ、B-701、バピネオズマブ、バシリキシマブ、バビツキシマブ、BAY1129980、BAY1187982、ベクツモマブ、ベゲロマブ、ベリムマブ、ベンラリズマブ、ベルチリムマブ、ベシレソマブ、Betalutin (177Lu-テトラキセタン-テツロマブ)、ベバシズマブ、BEVZ92 (ベバシズマブバイオシミラー)、ベズロトクスマブ、BGB-A317、BHQ880、BI836880、BI-505、ピシロマブ、ピマグルマブ、ピメキズマブ、ピバツズマブメルタンシン、BIW-8962、ブリナツモマブ、プロソズマブ、BMS-936559、BMS-986012、BMS-986016、BMS-986148、BMS-986178、BNC1

01、ボコシズマブ、ブレンツキシマブベドチン、BrevaRex、ブリアキヌマブ、プロダル
 マブ、プロルシズマブ、ブロンチクツズマブ、C2-2b-2b、カナキヌマブ、カンツズマブ
 メルタンシン、カンツズマブラブタンシン、カブラシズマブ、カプロマブベンデチド、カ
 ルルマブ、カツマキソマブ、CBR96-ドキシソルピシンイムノコンジュゲート、CBT124 (
 ベバシズマブ)、CC-90002、CDX-014、CDX-1401、セデリズマブ、セルトリズマブ
 ペゴル、セツキシマブ、CGEN-15001T、CGEN-15022、CGEN-15029、CGEN-1504
 9、CGEN-15052、CGEN-15092、Ch.14.18、シタツズマブ・ボガトクス、シクスツム
 マブ、クラザキズマブ、クレノリキシマブ、クリバツズマブテトラキセタン、CM-24、コ
 ドリツズマブ、コルツキシマブラブタンシン、コナツムマブ、コンシズマブ、Cotara (ヨ
 ウ素I-131デルロツキシマブピオチン)、cR6261、クレネズマブ、DA-3111 (トラスツ
 ズマブバイオシミラー)、ダセツズマブ、ダクリズマブ、ダロツズマブ、ダピロリズマブ
 ペゴル、ダラツムマブ、Daratumumab Enhanze (ダラツムマブ)、Darleukin、デク
 トレクマブ、デムシズマブ、デニンツズマブマホドチン、デノスマブ、デパツキシズマブ
 、デパツキシズマブマホドチン、デルロツキシマブピオチン、デツモマブ、DI-B4、ジヌ
 ツキシマブ、ジリダブマブ、DKN-01、DMOT4039A、ドルリモマブアリトクス、ドロジ
 ツマブ、DS-1123、DS-8895、デュリゴツマブ、デュビルマブ、デュルバルマブ、デュ
 シギツマブ、エクロメキシマブ、エクリズマブ、エドバコマブ、エドレコロマブ、エファ
 リズマブ、エファンクマブ、エルデルマブ、エルゲムツマブ、エロツズマブ、エルシリモ
 マブ、エマクツズマブ、エミベツズマブ、エナバツズマブ、エンフォルツマブベドチン、
 エンリモマブペゴル、エノブリツズマブ、エノキズマブ、エノチクマブ、エンシツキシマ
 ブ、エピツモマブシツキセタン、エプラツズマブ、エルリズマブ、エルツマキソマブ、エ
 タラシズマブ、エトロリズマブ、エビナクマブ、エボロクマブ、エクスピビルマブ、ファ
 ノレソマブ、ファラリモマブ、ファーレッツズマブ、ファシヌマブ、FBTA05、フェルビズ
 マブ、フェザキヌマブ、FF-21101、FGFR2抗体-薬物コンジュゲート、Fibromun、フィ
 クラツズマブ、フィギツムマブ、フィリブマブ、フランボツマブ、フレチクマブ、フォン
 トリズマブ、フォルアルマブ、フォルアビルマブ、FPA144、フレソリムマブ、FS102、フル
 ラヌマブ、フツキシマブ、ガリキシマブ、ガニツマブ、ガンテネルマブ、ガビリモマブ、
 ゲムツズマブオゾガマイシン、ゲリリムズマブ、ゲボキズマブ、ギレンツキシマブ、グレン
 バツムマブベドチン、GNR-006、GNR-011、ゴリムマブ、ゴミリキシマブ、GSK284
 9330、GSK2857916、GSK3174998、GSK3359609、グセルクマブ、Hu14.18K32
 2A MAb、hu3S193、Hu8F4、HuL2G7、HuMab-5B1、イバリズマブ、イブリツモマ
 ブチウキセタン、イクルクマブ、イダルシズマブ、IGN002、IGN523、イゴボマブ、IM
 AB362、IMAB362 (クラウジキシマブ)、イマルマブ、IMC-CS4、IMC-D11、イムシ
 ロマブ、イムガツズマブ、IMGN529、IMMU-102 (イットリウムY-90エプラツズマブ
 テトラキセタン)、IMMU-114、ImmuTune IMP701アンタゴニスト抗体、INCAGN18
 76、インクラクマブ、INCSHR1210、インダツキシマブラブタンシン、インデュサツマ
 ブベドチン、インフリキシマブ、イノリモマブ、イノツズマブオゾガマイシン、インテツ
 ムマブ、Ipafricept、IPH4102、イピリムマブ、イラツムマブ、イサツキシマブ、イス
 チラツマブ、イトリズマブ、イキセキズマブ、JNJ-56022473、JNJ-61610588、ケリ
 キシマブ、KTN3379、L19IL2/L19TNF、ラベツズマブ、ラベツズマブゴビテカン、LA
 G525、ランブロリズマブ、ランパリズマブ、L-DOS47、レブリキズマブ、レマレソマブ
 、レンジルマブ、レルデルリムマブ、ロイコツキシマブ、レクサツムマブ、リビビルマブ、
 リファスツズマブベドチン、リゲリズマブ、リロトマブサテトラキセタン、リンツズマブ
 、リリルマブ、LKZ145、ロデルシズマブ、ロキベトマブ、ロルボツズマブメルタンシン
 、ルカツムマブ、ルリズマブペゴル、ルミリキシマブ、ルムレッツズマブ、LY3164530、
 マパツムマブ、マルジェツキシマブ、マスリモマブ、マツズマブ、マブリリムマブ、MB3
 11、MCS-110、MEDI0562、MEDI-0639、MEDI0680、MEDI-3617、MEDI-551 (
 イネピリズマブ)、MEDI-565、MEDI6469、メボリズマブ、メテリムマブ、MGB453
 、MGD006/S80880、MGD007、MGD009、MGD011、ミラツズマブ、ミラツズマブ-
 SN-38、ミンレッツモマブ、ミルベツキシマブソラブタンシン、ミツモマブ、MK-4166、

10

20

30

40

50

MM-111、MM-151、MM-302、モガムリズマブ、MOR202、MOR208、MORAb-066、モロリムマブ、モタビズマブ、モキセツモマブシュードトクス、ムロモナブ-CD3、ナコロマブタフェナトクス、ナミルマブ、ナブツモマブエスタフェナトクス、ナルナツマブ、ナタリズマブ、ネバクマブ、ネシツムマブ、ネモリズマブ、ネレリモマブ、ネスバクマブ、ニモツズマブ、ニボルマブ、ノフェツモマブメルペンタン、NOV-10、オビルトキサキシマブ、オビヌツズマブ、オカラツズマブ、オクレリズマブ、オデュリモマブ、オフアツムマブ、オララツマブ、オロキズマブ、オマリズマブ、OMP-131R10、OMP-305B83、オナルツズマブ、オンツキシズマブ、オピシヌマブ、オボルツズマブモナトクス、オレゴボマブ、オルチクマブ、オテリキシズマブ、オトレルツズマブ、OX002/MEN1309、オキセルマブ、オザネズマブ、オゾラリズマブ、バギバキシマブ、パリビズマブ、パニツムマブ、パンコマブ、PankoMab-GEX、パノバクマブ、パルサツズマブ、パスコリズマブ、パソツキシズマブ、パテクリズマブ、パトリツマブ、PAT-SC1、PAT-SM6、ペンブロリズマブ、ペムツモマブ、ペラキズマブ、ベルツズマブ、ベキセリズマブ、PF-05082566 (ウトミルマブ)、PF-06647263、PF-06671008、PF-06801591、ピディリズマブ、ピナツズマブベドチン、ピンツモマブ、ブラクルマブ、ボラツズマブベドチン、ボネズマブ、プリリキシマブ、プリトキサキシマブ、プリツムマブ、PRO140、Proxinium、PSMA ADC、キリズマブ、ラコツモマブ、ラドレツマブ、ラフィビルマブ、ラルパンシズマブ、ラムシルマブ、ラニビズマブ、ラキシバクマブ、レファネズマブ、レガビルマブ、REGN1400、REGN2810/SAR439684、レスリズマブ、RFM-203、RG7356、RG7386、RG7802、RG7813、RG7841、RG7876、RG7888、RG7986、リロツムマブ、リヌクマブ、リツキシマブ、RM-1929、RO7009789、ロバツムマブ、ロレデュマブ、ロモソズマブ、ロンタリズマブ、ロベリズマブ、ルブリズマブ、サシツズマブゴビテカン、サマリズマブ、SAR408701、SAR566658、サリルマブ、SAT 012、サツモマブペンデチド、SCT200、SCT400、SEA-CD40、セクキヌマブ、セリバンツマブ、セトキサキシマブ、セヴィルマブ、SGN-CD19A、SGN-CD19B、SGN-CD33A、SGN-CD70A、SGN-LIV1A、シブロツズマブ、シファリムマブ、シルツキシマブ、シムツズマブ、シブリズマブ、シルクマブ、ソフィツズマブベドチン、ソラネズマブ、ソリトマブ、ソネブシズマブ、ソソツズマブ、スタムルマブ、スレソマブ、スビズマブ、SYD985、SYM004 (フツキシマブおよびモドツキシマブ)、Sym015、TAB08、タバルマブ、タカツズマブテトラキセタン、タドシズマブ、タリズマブ、タネズマブ、タニビルマブ、タブリツモマブパプトクス、タレクスツマブ、TB-403、テフィバズマブ、Teleukin、テリモマブアリトクス、テナツモマブ、テネリキシマブ、テブリズマブ、テプロツムマブ、テシドルマブ、テツロマブ、TG-1303、TGN1412、トリウム-227-エブラツズマブコンジュゲート、チシリムマブ、ティガツズマブ、チルドラキズマブ、チソツマブベドチン、TNX-650、トシリズマブ、トラリズマブ、トサトクスマブ、トシツモマブ、トベツマブ、トラロキヌマブ、トラスツズマブ、トラスツズマブエムタンシン、TRBS07、TRC105、トレガリズマブ、トレメリムマブ、トレボグルマブ、TRPH011、TRX518、TSR-042、TTI-200.7、ツコツズマブセルモロイキン、ツビルマブ、U3-1565、U3-1784、ウブリツキシマブ、ウロクプルマブ、ウレルマブ、ウルトキサズマブ、ウステキヌマブ、バダスツキシマブタリリン、バンドルツズマブベドチン、パンチクツマブ、パヌシズマブ、ババリキシマブ、バルリルマブ、バテリズマブ、VB6-845、ベドリズマブ、ベルツズマブ、ベパリモマブ、ベセンクマブ、ビジリズマブ、ボロシキシマブ、ボルセツズマブマホドチン、ボツムマブ、YYB-101、ザルツムマブ、ザノリムマブ、ザツキシマブ、ジラリムマブ、およびゾリモマブアリトックスからなる群より選択される抗体のFcドメインに結合する。

【0047】

いくつかの態様において、細胞外領域は、それぞれが同じ抗原または異なる抗原への結合を呈する複数の抗原相互作用ドメインを含む。

【0048】

いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、707-AP、ビオチン化分子、 α -アクチニン-4、abl-bcr alb-b3 (b2a2)、abl-bcr alb-b4 (b3a2)、アディポフィリン、A

10

20

30

40

50

FP、AIM-2、アネキシン II、ART-4、BAGE、b-カテニン、bcr-abl、bcr-abl p190 (e 1a2)、bcr-abl p210 (b2a2)、bcr-abl p210 (b3a2)、BING-4、CAG-3、CAIX、CAMEL、カスパーゼ-8、CD171、CD19、CD20、CD22、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44v7/8、CDC27、CDK-4、CEA、CLCA2、Cyp-B、DAM-10、DAM-6、DEK-CAN、EGFRvIII、EGP-2、EGP-40、ELF2、Ep-CAM、EphA2、EphA3、erb-B2、erb-B3、erb-B4、ES-ESO-1a、ETV6/AML、FBP、胎児アセチルコリン受容体、FGF-5、FN、G250、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7B、GAGE-8、GD2、GD3、GnT-V、Gp100、gp75、Her-2、HLA-A * 0201-R170I、HMW-MAA、HSP70-2 M、HST-2 (FGF6)、HST-2/neu、hTERT、iCE、IL-11R、IL-13R 2、KDR、KIAA0205、K-RAS、L1細胞接着分子、LAGE-1、LDLR/FUT、ルイスY、MAGE-1、MAGE-10、MAGE-12、MAGE-2、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-6、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A6、MAGE-B1、MAGE-B2、リンゴ酸酵素、マンマグロビン-A、MART-1/Melan-A、MART-2、MC1R、M-CSF、メソテリン、MUC1、MUC16、MUC2、MUM-1、MUM-2、MUM-3、ミオシン、NA88-A、Neo-PAP、NKG2D、NPM/ALK、N-RAS、NY-ESO-1、OA1、OGT、腫瘍胎児性抗原 (h5T4)、OS-9、Pポリペプチド、P15、P53、PRAME、PSA、PSCA、PSMA、PTPRK、RAGE、ROR1、RU1、RU2、SART-1、SART-2、SART-3、SOX10、SSX-2、サバイピン、サバイピン-2B、SYT/SSX、TAG-72、TEL/AML1、TGFaRII、TGFbRII、TP1、TRAG-3、TRG、TRP-1、TRP-2、TRP-2/INT2、TRP-2-6b、チロシナーゼ、VEGF-R2、WT1、
-葉酸受容体、および 軽鎖からなる群より選択される抗原に結合する。

10

20

【 0 0 4 9 】

いくつかの態様において、免疫細胞シグナル伝達ドメインは、免疫受容体チロシン活性化モチーフ (ITAM) を含む一次シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、免疫細胞シグナル伝達ドメインは、免疫受容体チロシン阻害モチーフ (ITIM) を含む一次シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、免疫細胞シグナル伝達ドメインは、Fc 受容体 (Fc R)、Fc 受容体 (Fc R)、Fc 受容体 (Fc R)、新生児型Fc受容体 (FcRn)、CD3、CD3、CD3、CD3、CD3、CD4、CD5、CD8、CD21、CD22、CD28、CD32、CD40L (CD154)、CD45、CD66d、CD79a、CD79b、CD80、CD86、CD278 (ICOSとしても公知)、CD247、CD247、DAP10、DAP12、FYN、LAT、Lck、MAPK、MHC複合体、NFAT、NF- B、PLC-、iC3b、C3dg、C3d、およびZap70から選択されるタンパク質の一次シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、一次シグナル伝達ドメインはCD3 シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、一次シグナル伝達ドメインはCD3 の免疫受容体チロシン活性化モチーフ (ITAM) を含む。いくつかの態様において、一次シグナル伝達ドメインはFc Rシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、一次シグナル伝達ドメインは、Fc RI (CD64)、Fc RIIA (CD32)、Fc RIIB (CD32)、Fc RIIIA (CD16a)、およびFc RIIIB (CD16b) から選択されるFc Rシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、一次シグナル伝達ドメインはFc Rシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、一次シグナル伝達ドメインは、Fc RIおよびFc RII (CD23) から選択されるFc Rシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、一次シグナル伝達ドメインはFc Rシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、一次シグナル伝達ドメインは、Fc RI (CD89) およびFc / μRから選択されるFc Rシグナル伝達ドメインを含む。

30

40

【 0 0 5 0 】

いくつかの態様において、免疫細胞シグナル伝達ドメインは共刺激ドメインを含む。いくつかの態様において、免疫細胞シグナル伝達ドメインは複数の共刺激ドメインを含む。いくつかの態様において、共刺激ドメインは、MHCクラスI分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ球活性化分子 (SLAMタンパク質)、活性化NK細胞受容体、またはTollリガンド受容体のシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、共刺激ドメインは、2B4/CD24

50

4/SLAMF4、4-1BB/TNFSF9/CD137、B7-1/CD80、B7-2/CD86、B7-H1/PD-L1、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H6、B7-H7、BAFF R/TNFRSF13C、BAFF/BLyS/TNFSF13B、BLAME/SLAMF8、BTLA/CD272、CD100 (SEMA4D)、CD103、CD11a、CD11b、CD11c、CD11d、CD150、CD160 (BY55)、CD18、CD19、CD2、CD200、CD229/SLAMF3、CD27リガンド/TNFSF7、CD27/TNFRSF7、CD28、CD29、CD2F-10/SLAMF9、CD30リガンド/TNFSF8、CD30/TNFRSF8、CD300a/LMIR1、CD4、CD40リガンド/TNFSF5、CD40/TNFRSF5、CD48/SLAMF2、CD49a、CD49D、CD49f、CD53、CD58/LFA-3、CD69、CD7、CD8、CD8、CD82/Kai-1、CD84/SLAMF5、CD90/Thy1、CD96、CDS、CEACAM1、CRACC/SLAMF7、CRTAM、CTLA-4、DAP12、デクチン-1/CLEC7A、DNAM1 (CD226)、DPPIV/CD26、DR3/TNFRSF25、EphB6、GADS、Gi24/VISTA/B7-H5、GITRリガンド/TNFSF18、GITR/TNFRSF18、HLAクラスI、HLA-DR、HVEM/TNFRSF14、IA4、ICAM-1、ICOS/CD278、イカロス、IL2R、IL2R、IL7R、インテグリン 4/CD49d、インテグリン 4 1、インテグリン 4 7/LPAM-1、IPO-3、ITGA4、ITGA6、ITGAD、ITGAE、ITGAL、ITGAM、ITGAX、ITGB1、ITGB2、ITGB7、KIRDS2、LAG-3、LAT、LIGHT/TNFSF14、LTBR、Ly108、Ly9 (CD229)、リンパ球機能関連抗原-1 (LFA-1)、リンフォトキシン- /TNF-、NKG2C、NKG2D、NKp30、NKp44、NKp46、NKp80 (KLRF1)、NTB-A/SLAMF6、OX40リガンド/TNFSF4、OX40/TNFRSF4、PAG/Cbp、PD-1、PDCD6、PD-L2/B7-DC、PSGL1、RELT/TNFRSF19L、SELPLG (CD162)、SLAM (SLAMF1)、SLAM/CD150、SLAMF4 (CD244)、SLAMF6 (NTB-A)、SLAMF7、SLP-76、TACI/TNFRSF13B、TCL1A、TCL1B、TIM-1/KIM-1/HAVCR、TIM-4、TL1A/TNFSF15、TNF RII/TNFRSF1B、TNF-、TRANCE/RANKL、TSLP、TSLP R、VLA1、およびVLA-6からなる群より選択される分子のシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、共刺激ドメインは、免疫細胞の増殖シグナルおよび/または生存シグナルを調節する。

10

20

【0051】

いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、CRISPR関連ポリペプチド (Cas)、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、ジンクフィンガー関連遺伝子調節ポリペプチド、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、転写活性化因子様エフェクター関連遺伝子調節ポリペプチド、メガヌクレアーゼ、天然マスター転写因子、エピジェネティック修飾酵素、リコンビナーゼ、フリッパーゼ、トランスボザーゼ、RNA結合タンパク質 (RBP)、アルゴノートタンパク質、それらの任意の誘導體、それらの任意のバリエーション、またはそれらの任意のフラグメントを含む。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、ガイドRNA (gRNA) との複合体を形成するCasタンパク質を含む。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、Casタンパク質との複合体を形成することができるガイドRNA (gRNA) と複合体形成していてもよいRBPを含む。いくつかの態様において、Casタンパク質はDNA切断活性を実質的に欠く。

30

【0052】

いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、標的ポリヌクレオチドの物理的妨害によって、または標的核酸からの遺伝子発現を抑圧もしくは強化するのに有効な追加因子の動員によって、遺伝子の発現を調節する。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、標的ポリヌクレオチドからの遺伝子発現を増加させるのに有効な転写活性化因子を含む。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、標的ポリヌクレオチドからの遺伝子発現を減少させるのに有効な転写抑制因子を含む。

40

【0053】

いくつかの態様において、切断認識部位は免疫細胞シグナル伝達ドメインとアクチュエータモエティとに挟まれている。いくつかの態様において、切断認識部位は、プロテアーゼによって認識される切断認識配列を含む。いくつかの態様において、切断認識部位は複数の切断認識配列を含み、各切断認識配列は同じプロテアーゼまたは異なるプロテアーゼによって認識される。いくつかの態様において、切断認識配列は、アクロモペプチダーゼ、

50

アミノペプチダーゼ、アングロッド、アンジオテンシン変換酵素、プロメライン、カルパイン、カルpain I、カルpain II、カルボキシペプチダーゼA、カルボキシペプチダーゼB、カルボキシペプチダーゼG、カルボキシペプチダーゼP、カルボキシペプチダーゼW、カルボキシペプチダーゼY、カスパーゼ1、カスパーゼ2、カスパーゼ3、カスパーゼ4、カスパーゼ5、カスパーゼ6、カスパーゼ7、カスパーゼ8、カスパーゼ9、カスパーゼ10、カスパーゼ11、カスパーゼ12、カスパーゼ13、カテプシンB、カテプシンC、カテプシンD、カテプシンE、カテプシンG、カテプシンH、カテプシンL、キモパイン、キマーゼ、キモトリプシン、クロストリパイン、コラゲナーゼ、補体C1r、補体C1s、補体因子D、補体因子I、ククミシン、ジペプチジルペプチダーゼIV、エラスターゼ（白血球）、エラスターゼ（臍）、エンドプロテイナーゼArg-C、エンドプロテイナーゼAsp-N、エンドプロテイナーゼGlu-C、エンドプロテイナーゼLys-C、エンテロキナーゼ、第Xa因子、フィシン、フューリン、グランザイムA、グランザイムB、HIVプロテアーゼ、IGase、組織カリクレイン、ロイシニアミノペプチダーゼ（全般）、ロイシニアミノペプチダーゼ（サイトゾル）、ロイシニアミノペプチダーゼ（ミクロソーム）、マトリックスメタロプロテアーゼ、メチオニンアミノペプチダーゼ、ニュートラーゼ、パpain、ペプシン、プラスミン、プロリダーゼ、プロナーゼE、前立腺特異抗原、ストレプトミセス・グリセウス由来の好アルカリ性プロテアーゼ、アスペルギルス由来のプロテアーゼ、アスペルギルス・サイトイ由来のプロテアーゼ、ショウユコウジカビ由来のプロテアーゼ、プロテアーゼ（B.リケニフォルミス）（アルカリ性またはアルカラーゼ）、パチルス・ポリミキサ由来のプロテアーゼ、パチルス属由来のプロテアーゼ、クモノスカビ属由来のプロテアーゼ、プロテアーゼS、プロテアソーム、コウジカビ由来のプロテイナーゼ、プロテイナーゼ3、プロテイナーゼA、プロテイナーゼK、プロテインC、ピログルタミン酸アミノペプチダーゼ、レンニン、レンニン、ストレプトキナーゼ、サブチリシン、サーモライシン、トロンピン、組織プラスミノゲン活性化因子、トリプシン、トリプターゼおよびウロキナーゼからなる群より選択されるプロテアーゼによって認識される。いくつかの態様において、キメラ膜貫通受容体ポリペプチドは、さらに、細胞の特異的領域へ受容体を輸送させる少なくとも1つの標的指向ペプチドを含む。いくつかの態様において、標的指向ペプチドは、核、ミトコンドリア、小胞体（ER）、クロロプラスト、ペルオキシソームまたは形質膜へ受容体を輸送させる。いくつかの態様において、標的指向ペプチドは、核外移行シグナル（NES）を含む。いくつかの態様において、標的指向ペプチドは、形質膜を標的とするペプチドを含む。

10

20

30

【0054】

いくつかの態様において、標的指向ペプチドは、アクチュエータモエティに連結されている。いくつかの態様において、標的指向ペプチドは核局在化シグナル（NLS）を含む。いくつかの態様において、NLSを含む標的指向ペプチドは、アクチュエータモエティのN末またはC末に連結されている。いくつかの態様において、アクチュエータモエティに連結されたNLSを含む標的指向ペプチドは、切断認識部位における切断によるGMPからのアクチュエータモエティの放出に続いて、細胞の核へアクチュエータモエティを輸送させる。

[本発明1001]

（a）（i）抗原に結合する抗原相互作用ドメインを含む細胞外領域と（ii）免疫細胞シグナル伝達ドメインを含む細胞内領域とを含む、キメラ膜貫通受容体ポリペプチド、

40

（b）該受容体ポリペプチドが抗原に結合して受容体修飾を受けたときに該受容体ポリペプチドに結合する受容体結合モエティを含む、キメラアダプターポリペプチド、

（c）切断認識部位に連結されたアクチュエータモエティを含む、遺伝子調整ポリペプチド（GMP）、および

（d）該切断認識部位に近接したときに該切断認識部位を切断してGMPからアクチュエータモエティを放出させる、切断モエティを含む、

（i）該切断モエティは、該受容体ポリペプチドの細胞内領域の一部分を形成し、かつ該GMPは該キメラアダプターポリペプチドの一部分を形成するか、

50

(ii) 該切断モエティは、抗原に結合して受容体修飾を受けた該受容体ポリペプチドに結合する第2アダプターポリペプチドと複合体形成し、かつ該GMPは該キメラアダプターポリペプチドの一部を形成するか、

(iii) 該切断モエティは該キメラアダプターポリペプチドの一部を形成し、かつ該GMPは該受容体ポリペプチドの細胞内領域の一部を形成する、
免疫細胞の条件付き調節のためのシステム。

[本発明1002]

切断モエティが受容体ポリペプチドの細胞内領域の一部を形成し、かつGMPがキメラアダプターポリペプチドの一部を形成する、本発明1001のシステム。

[本発明1003]

切断モエティが、抗原に結合して受容体修飾を受けた受容体ポリペプチドに結合する第2アダプターポリペプチドと複合体形成し、かつGMPがキメラアダプターポリペプチドの一部を形成する、本発明1001のシステム。

[本発明1004]

切断モエティがキメラアダプターポリペプチドの一部を形成し、かつGMPが受容体ポリペプチドの細胞内領域の一部を形成する、本発明1001のシステム。

[本発明1005]

免疫細胞がリンパ球である、本発明1001のシステム。

[本発明1006]

リンパ球がT細胞である、本発明1005のシステム。

[本発明1007]

リンパ球がナチュラルキラー（NK）細胞である、本発明1005のシステム。

[本発明1008]

抗原相互作用ドメインが抗体に結合する、本発明1001のシステム。

[本発明1009]

抗原相互作用ドメインが、抗体のFcドメイン、Fvドメイン、重鎖、および軽鎖のうちの少なくとも1つに結合する、本発明1008のシステム。

[本発明1010]

抗原相互作用ドメインが抗体のFcドメインに結合する、本発明1009のシステム。

[本発明1011]

抗原相互作用ドメインが、Fab、単鎖Fv（scFv）、細胞外受容体ドメイン、およびFc結合ドメインのうちの少なくとも1つを含む、本発明1001のシステム。

[本発明1012]

抗原相互作用ドメインが、Fc受容体またはそのフラグメントを含むFc結合ドメインを含む、本発明1011のシステム。

[本発明1013]

抗原相互作用ドメインが、Fc RI（CD64）、Fc RIa、Fc RIb、Fc RIc、Fc RIIA（CD32）、Fc RIIA（CD32、H131）、Fc RIIA（CD32、R131）、Fc RIIIB（CD32）、Fc RIIIB-1、Fc RIIIB-2、Fc RIIIA（CD16a、V158）、Fc RIIIA（CD16a、F158）、Fc RIIIB（CD16b、Fc RIIIB-NA1）、Fc RIIIB（CD16b、Fc RIIIB-NA2）、Fc RI、Fc RII（CD23）、Fc RI（CD89）、Fc / μ R、FcRn、それらの任意の誘導体、それらの任意のバリエーション、またはそれらの任意のフラグメントを含むFc結合ドメインを含む、本発明1012のシステム。

[本発明1014]

抗原相互作用ドメインが抗体を含む抗原に結合し、次にその抗体が、1-40- β -アミロイド、4-1BB、5A6、5T4、アクチビン受容体様キナーゼ1、ACVR2B、腺癌抗原、AGS-22 M6、アルファ-フェトプロテイン、アンジオポエチン2、アンジオポエチン3、炭疽毒素、AOC3（VAP-1）、B7-H3、炭疽菌炭疽（*Bacillus anthracis anthrax*）、BAFF、ベータ-アミロイド、Bリンパ腫細胞、C242抗原、C5、CA-125、イヌ（*Canis lupus familiaris*）IL31、炭酸脱水酵素9（CA-IX）、心筋ミオシン、CCL11（エオタキシン-1）、C

10

20

30

40

50

CR4、CCR5、CD11、CD18、CD125、CD140a、CD147 (ベイシジン)、CD15、CD152、CD154 (CD40L)、CD19、CD2、CD20、CD200、CD22、CD221、CD23 (IgE受容体)、CD25 (IL-2受容体の鎖)、CD27、CD274、CD28、CD3、CD3イプシロン、CD30、CD33、CD37、CD38、CD4、CD40、CD40リガンド、CD41、CD44 v6、CD5、CD51、CD52、CD56、CD6、CD70、CD74、CD79B、CD80、CEA、CEA関連抗原、CFD、ch4D5、CLDN18.2、クロストリジウム・ディフィシレ (*Clostridium difficile*)、クランピング因子A、CSF1R、CSF2、CTLA-4、C-X-Cケモカイン受容体4型、サイトメガロウイルス、サイトメガロウイルス糖タンパク質B、ダビガトラン、DLL4、DPP4、DR5、大腸菌 (*E. coli*) 志賀毒素1型、大腸菌志賀毒素2型、EGFL7、EGFR、エンドトキシン、EpCAM、エピシアリン、ERBB3、大腸菌 (*Escherichia coli*)、呼吸器合胞体ウイルスのFタンパク質、FAP、フィブリンIIベータ鎖、フィブロンекチンエクストラドメイン-B、葉酸ヒドロラーゼ、葉酸受容体1、葉酸受容体アルファ、Frizzled受容体、ガングリオシドGD2、GD2、GD3ガングリオシド、グリピカン3、GMCSF受容体鎖、GPNMB、増殖分化因子8、GUCY2C、ヘماغルチニン、B型肝炎表面抗原、B型肝炎ウイルス、HER1、HER2/neu、HER3、HGF、HHGFR、ヒストン複合体、HIV-1、HLA-DR、HNGF、Hsp90、ヒト散乱因子受容体 (scatter factor receptor) キナーゼ、ヒトTNF、ヒトベータ-アミロイド、ICAM-1 (CD54)、IFN- α 、IFN- γ 、IgE、IgE Fc領域、IGF-1受容体、IGF-1、IGHE、IL17A、IL17F、IL20、IL-12、IL-13、IL-17、IL-17、IL-22、IL-23、IL-31RA、IL-4、IL-5、IL-6、IL-6受容体、IL-9、ILGF2、インフルエンザAヘماغルチニン、インフルエンザAウイルスヘماغルチニン、インスリン様成長因子I受容体、インテグリン α 4 β 7、インテグリン α 4 β 1、インテグリン α 7 β 1、インテグリン α IIb β 3、インテグリン α v β 3、インターフェロン γ / 受容体、インターフェロンガンマ誘導タンパク質、ITGA2、ITGB2 (CD18)、KIR2D、ルイスY抗原、LFA-1 (CD11a)、LINGO-1、リボテイコ酸、LOXL2、L-セレクチン (CD62L)、LTA、MCP-1、メソテリン、MIF、MS4A1、MSLN、MUC1、ムチンCanAg、ミエリン関連糖タンパク質、ミオスタチン、NCA-90 (顆粒球抗原)、神経アポトーシス調節プロテイナーゼ (neural apoptosis-regulated proteinase) 1、NGF、N-グリコリルノイラミン酸、NOGO-A、Notch受容体、NRP1、アナウサギ (*Oryctolagus cuniculus*)、OX-40、oxLDL、PCSK9、PD-1、PDCD1、PDGF-R、リン酸-ナトリウム共輸送体、ホスファチジルセリン、血小板由来成長因子受容体ベータ、前立腺癌細胞、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、狂犬病ウイルス糖タンパク質、RANKL、呼吸器合胞体ウイルス、RHD、リーサス因子、RON、RTN4、スクレロスチン、SDC1、セレクチnP、SLAMF7、SOST、スフィンゴシン-1-リン酸、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、STEAP1、TAG-72、T細胞受容体、TEM1、テネイシンC、TFPI、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TNF- α 、TRAIL-R1、TRAIL-R2、腫瘍抗原CTAA16.88、MUC1の腫瘍特異的グリコシル化、腫瘍関連カルシウムシグナル伝達物質2、TWEAK受容体、TYRP1 (糖タンパク質75)、VEGFA、VEGFR1、VEGFR2、ビメンチン、およびVWFからなる群より選択される抗原に結合する、本発明1001のシステム。

[本発明1015]

抗原相互作用ドメインが、20-(74)-(74) (ミラツズマブ;ベルツズマブ)、20-2b-2b、3F8、74-(20)-(20) (ミラツズマブ;ベルツズマブ)、8H9、A33、AB-16B5、アバゴボマブ (abagovomab)、アブシキシマブ、アビツズマブ (abituzumab)、ABP494 (セツキシマブパイオシミラー)、アブリルマブ、ABT-700、ABT-806、Actimab-A (アクチニウムAc-225リンツズマブ)、アクトクスマブ、アダリムマブ、ADC-1013、ADCT-301、ADCT-402、アデカツムマブ (adecatumumab)、アデユカヌマブ、アフエリモマブ、AFM13、アフツズマブ、AGEN1884、AGS15E、AGS-16C3F、AGS67E、アラシズマブペゴル (alacizumab pegol)、ALD518、アレムツズマブ、アリロクマブ、アルツモマブベンテレート、アマツキシマブ、AMG228、AMG820、アナツモマブマフェナトクス (anatumomab mafenatox)、アネツマブラブタンシン (anetumab ravtansin)、アニフロルマブ (anifrolumab)、アンルキンズマブ、APN301、APN311、アポ

10

20

30

40

50

リズマブ、APX003/SIM-BD0801 (セバシズマブ (sevacizumab))、APX005M、アルシツモマブ、ARX788、アスクリンバクマブ (ascrivacumab)、アセリズマブ (aselizumab)、ASG-15ME、アテゾリズマブ、アチヌマブ (atinumab)、ATL101、アトリズマブ (atlizumab) (トシリズマブともいう)、アトロリムマブ (atorolimumab)、アベルマブ、B-701、バピネオズマブ、バシリキシマブ、バビツキシマブ、BAY1129980、BAY1187982、ベクツモマブ、ベゲロマブ (begelomab)、ベリムマブ、ベンラリズマブ、ベルチリムマブ (bertilimumab)、ベシレソマブ、Betalutin (177Lu-テトラキセタン-テツロマブ (tetulomab))、ベバシズマブ、BEVZ92 (ベバシズマブバイオシミラー)、ベズロトクスマブ、BGB-A317、BHQ880、BI836880、BI-505、ビシロマブ、ビマグルマブ、ビメキズマブ (bimekizumab)、ビバツズマブメルタンシン (bivatuzumab mertansine)、BIW-8962、ブリナツモマブ、プロソズマブ、BMS-936559、BMS-986012、BMS-986016、BMS-986148、BMS-986178、BNC101、ボコシズマブ、ブレンツキシマブベドチン、BrevaRex、ブリアキヌマブ、プロダルマブ、プロルシズマブ、ブロンチクツズマブ (brontictuzumab)、C2-2b-2b、カナキヌマブ、カンツズマブメルタンシン、カンツズマブラブタンシン、カブラシズマブ (caplacizumab)、カプロマブペンデチド、カルルマブ、カツマキソマブ、CBR96-ドキシソルビシンイムノコンジュゲート、CBT124 (ベバシズマブ)、CC-90002、CDX-014、CDX-1401、セデリズマブ、セルトリズマブペゴル、セツキシマブ、CGEN-15001T、CGEN-15022、CGEN-15029、CGEN-15049、CGEN-15052、CGEN-15092、Ch.14.18、シタツズマブ・ボガトクス (citatuzumab bogatox)、シクスツムマブ、クラザキズマブ、クレノリキシマブ、クリバツズマブテトラキセタン、CM-24、コドリツズマブ (codrituzumab)、コルトキシマブラブタンシン (coltuximab ravtansine)、コナツムマブ、コンシズマブ (concizumab)、Cotara (ヨウ素I-131デルロツキシマブ (derlotuximab) ビオチン)、cR6261、クレネズマブ、DA-3111 (トラスツズマブバイオシミラー)、ダセツズマブ、ダクリズマブ、ダロツズマブ、ダピロリズマブペゴル (dapirolizumab pegol)、ダラツムマブ、Daratumumab Enhance (ダラツムマブ)、Darleukin、デクトレクマブ (dectrekumab)、デムシズマブ、デニンツズマブマホドチン (denintuzumab mafodotin)、デノスマブ、デパツキシズマブ、デパツキシズマブマホドチン、デルロツキシマブビオチン (derlotuximab biotin)、デツモマブ (detumomab)、DI-B4、ジヌツキシマブ、ジリダブマブ (diridavumab)、DKN-01、DMOT4039A、ドルリモマブアリトクス (dorlimomab aritox)、ドロジツマブ、DS-1123、DS-8895、デュリゴツマブ (duligotumab)、デュピルマブ、デュルバルマブ、デュシギツマブ (dusigitumab)、エクロメキシマブ、エクリズマブ、エドバコマブ、エドレコロマブ、エファリズマブ、エファンクマブ、エルデルマブ、エルゲムツマブ (elgemtumab)、エロツズマブ、エルシリモマブ (elsilimomab)、エマクツズマブ (emactuzumab)、エミベツズマブ (emibetuzumab)、エナバツズマブ、エンフォルツマブベドチン (enfortumab vedotin)、エンリモマブペゴル、エノブリツズマブ (enoblituzumab)、エノキズマブ、エノチクマブ、エンシツキシマブ、エピツモマブシツキセタン (epitumomab cituxetan)、エブラツズマブ、エルリズマブ、エルツマキソマブ、エタラシズマブ、エトロリズマブ、エビナクマブ (evinacumab)、エボロクマブ、エクスピビルマブ (exbivirumab)、ファノレソマブ、ファラリモマブ (faralimomab)、ファーレツズマブ、ファシヌマブ、FBTA05、フェルビズマブ、フェザキヌマブ、FF-21101、FGFR2抗体-薬物コンジュゲート、Fibromun、フィクラツズマブ、フィギツムマブ、フィリブマブ (firivumab)、フランボツマブ、フレチクマブ (fletikumab)、フォントリズマブ、フォラルマブ (foralumab)、フォラビルマブ (foravirumab)、FPA144、フレソリムマブ、FS102、フルラヌマブ、フツキシマブ (futuximab)、ガリキシマブ、ガニツマブ、ガンテネルマブ、ガビリモマブ (gavilimomab)、ゲムツズマブオゾガマイシン、ゲリリムズマブ (Gerilimzumab)、ゲボキズマブ、ギレンツキシマブ、グレンバツムマブベドチン、GNR-006、GNR-011、ゴリムマブ、ゴミリキシマブ、GSK2849330、GSK2857916、GSK3174998、GSK3359609、グセルクマブ、Hu14.18K322A MAb、hu3S193、Hu8F4、Hu

10

20

30

40

50

L2G7、HuMab-5B1、イバリズマブ、イブリツモマブチウキセタン、イクルクマブ、イダ
ルシズマブ、IGN002、IGN523、イゴボマブ (igovomab)、IMAB362、IMAB362 (
クラウジキシマブ (claudiximab)、イマルマブ (imalumab)、IMC-CS4、IMC-D1
1、イムシロマブ (imciromab)、イムガツズマブ、IMGN529、IMMU-102 (イットリ
ウムY-90エブラツズマブテトラキセタン)、IMMU-114、ImmuTune IMP701アンタゴ
ニスト抗体、INCAGN1876、インクラクマブ、INCSHR1210、インダツキシマブラプタ
ンシン (indatuximab ravtansine)、インデュサツマブベドチン (indusatumab vedo
tin)、インフリキシマブ、イノリモマブ、イノツズマブオゾガマイシン、インテツムマブ
、Ipafricept、IPH4102、イピリムマブ、イラツムマブ、イサツキシマブ、イスチラツ
マブ、イトリズマブ、イキセキズマブ、JNJ-56022473、JNJ-61610588、ケリキシマ
ブ、KTN3379、L19IL2/L19TNF、ラベツズマブ、ラベツズマブゴビテカン、LAG525
、ランプロリズマブ、ランパリズマブ、L-DOS47、レブリキズマブ、レマレソマブ (lem
alesomab)、レンジルマブ (lenzilumab)、レルデリムマブ (lerdelimumab)、ロイ
コツキシマブ (Leukotuximab)、レクサツムマブ、リビビルマブ (libivirumab)、リ
ファスツズマブベドチン (lifastuzumab vedotin)、リゲリズマブ (ligelizumab)、
リロトマブサテトラキセタン (lilotomab satetraxetan)、リンツズマブ、リリルマブ
、LKZ145、ロデルシズマブ (lodelcizumab)、ロキベトマブ (lokivetmab)、ロルボ
ツズマブメルタンシン、ルカツムマブ、ルリズマブペゴル (lulizumab pegol)、ルミリ
キシマブ、ルムレツズマブ (lumretuzumab)、LY3164530、マパツムマブ、マルジェ
ツキシマブ、マスリモマブ (maslimomab)、マツズマブ、マブリリムマブ、MB311、
MCS-110、MEDI0562、MEDI-0639、MEDI0680、MEDI-3617、MEDI-551 (イネ
ビリズマブ (inebilizumab)、MEDI-565、MEDI6469、メボリズマブ、メテリムマ
ブ (metelimumab)、MGB453、MGD006/S80880、MGD007、MGD009、MGD01
1、ミラツズマブ、ミラツズマブ-SN-38、ミンレツモマブ (minretumomab)、ミルベ
ツキシマブソラプタンシン、ミツモマブ、MK-4166、MM-111、MM-151、MM-302、
モガムリズマブ、MOR202、MOR208、MORAb-066、モロリムマブ (morolimumab
)、モタビズマブ、モキセツモマブシュードトクス、ムロモナブ-CD3、ナコロマブタフェ
ナトクス (nacolomab tafenatox)、ナミルマブ (namilumab)、ナブツモマブエスタ
フェナトクス、ナルナツマブ、ナタリズマブ、ネバクマブ、ネシツムマブ、ネモリズマブ
(nemolizumab)、ネレリモマブ、ネスバクマブ、ニモツズマブ、ニボルマブ、ノフェ
ツモマブメルペンタン、NOV-10、オビルトキサキシマブ、オビヌツズマブ、オカラツズ
マブ、オクレリズマブ、オデュリモマブ (odulimomab)、オフアツムマブ、オララツマ
ブ、オロキズマブ (olokizumab)、オマリズマブ、OMP-131R10、OMP-305B83、オ
ナルツズマブ、オンツキシズマブ (ontuxizumab)、オピシヌマブ (opicinumab)、オ
ポルツズマブモナトクス (oportuzumab monatox)、オレゴボマブ、オルチクマブ (or
ticumab)、オテリキシズマブ、オトレルツズマブ (otlertuzumab)、OX002/MEN13
09、オキセルマブ、オザネズマブ、オゾラリズマブ、パギバキシマブ、パリビズマブ、パ
ニツムマブ、パンコマブ (pankomab)、PankoMab-GEX、パノバクマブ (panobacum
ab)、パルサツズマブ (parsatuzumab)、パスコリズマブ、パソツキシズマブ (pasot
uxizumab)、パテクリズマブ、パトリツマブ (patritumab)、PAT-SC1、PAT-SM6、
ペンプロリズマブ、ペムツモマブ (pemtumomab)、ペラキズマブ (perakizumab)、
ペルツズマブ、ペキセリズマブ、PF-05082566 (ウトミルマブ)、PF-06647263、PF
-06671008、PF-06801591、ピディリズマブ、ピナツズマブベドチン (pinatuzumab
vedotin)、ピンツモマブ (pintumomab)、プラクルマブ、ポラツズマブベドチン、ポ
ネズマブ、プリリキシマブ、プリトキサキシマブ (pritoxaximab)、プリツムマブ (pri
tumumab)、PRO140、Proxinium、PSMA ADC、キリズマブ、ラコツモマブ (racot
umomab)、ラドレツマブ (radretumab)、ラフィビルマブ (rafivirumab)、ラルパ
ンシズマブ (ralpancizumab)、ラムシルマブ、ラニビズマブ、ラキシバクマブ、レファ
ネズマブ (refanezumab)、レガビルマブ、REGN1400、REGN2810/SAR439684、
レスリズマブ、RFM-203、RG7356、RG7386、RG7802、RG7813、RG7841、RG78

10

20

30

40

50

76、RG7888、RG7986、リロツムマブ、リヌクマブ (rinucumab)、リツキシマブ、R M-1929、RO7009789、ロバツムマブ、ロレデュマブ (roledumab)、ロモソズマブ、ロンタリズムマブ、ロベリズムマブ、ルプリズマブ、サシツズマブゴビテカン、サマリズマブ、SAR408701、SAR566658、サリルマブ、SAT 012、サツモマブペンデチド、SCT200、SCT400、SEA-CD40、セクキヌマブ、セリバンツマブ (seribantumab)、セトキサキシマブ (setoxaximab)、セヴィルマブ、SGN-CD19A、SGN-CD19B、SGN-CD33A、SGN-CD70A、SGN-LIV1A、シブロツズマブ (sibrotuzumab)、シファリムマブ、シルツキシマブ、シムツズマブ (sintuzumab)、シプリズマブ、シルクマブ、ソフィツズマブベドチン (sofituzumab vedotin)、ソラネズマブ、ソリトマブ (solitomab)、ソネブシズマブ (sonepcizumab)、ソントズマブ (sontuzumab)、スタムルマブ、スレソマブ、スビズマブ (suvizumab)、SYD985、SYM004 (フツキシマブ (futuximab) およびモドツキシマブ (modotuximab))、Sym015、TAB08、タバルマブ、タカツズマブテトラキセタン、タドシズマブ、タリズムマブ、タネズマブ、タニビルマブ (Tani birumab)、タプリツモマブパプトクス (taplitumomab paptox)、タレクスツマブ (tarextumab)、TB-403、テフィバズマブ、Teleukin、テリモマブアリトクス (telimomab aritox)、テナツモマブ (tenatumomab)、テネリキシマブ、テプリズマブ、テプロツムマブ、テシドルマブ (tesidolumab)、テツロマブ (tetulomab)、TG-1303、TGN1412、トリウム-227-エブラツズマブコンジュゲート、チシリムマブ、ティガツズマブ、チルドラキズマブ、チソツマブベドチン (Tisotumab vedotin)、TNX-650、トシリズマブ、トラリズムマブ、トサトクスマブ (tosatoxumab)、トシツモマブ、トベツマブ、トラロキヌマブ、トラスツズマブ、トラスツズマブエムタンシン、TRBS07、TRC105、トレガリズムマブ (tregalizumab)、トレメリムマブ、トレボグルマブ (trevogrumab)、TRPH011、TRX518、TSR-042、TTI-200.7、ツコツズマブセルモロイキン、ツビルマブ、U3-1565、U3-1784、ウブリツキシマブ (ublrituximab)、ウロクプルマブ、ウレルマブ、ウルトキサズマブ、ウステキヌマブ、バダスツキシマブタリリン (Vadastuximab Ta lirine)、バンドルツズマブベドチン、バンチクツマブ、バヌシズマブ (vanucizumab)、バパリキシマブ (vapaliximab)、バルリルマブ (varlilumab)、バテリズムマブ (vatelizumab)、VB6-845、ベドリズマブ、ベルツズマブ、ベパリモマブ (vepalimomab)、ベセンクマブ、ビジリズムマブ、ボロシキシマブ、ボルセツズマブマホドチン、ボツムマブ、YYB-101、ザルツムマブ、ザノリムマブ、ザツキシマブ (zatuximab)、ジラリムマブ (ziralimumab)、およびゾリモマブアリトックスからなる群より選択される抗体のFcドメインに結合する、本発明1001のシステム。

[本発明1016]

細胞外領域が、それぞれが同じ抗原または異なる抗原への結合を呈する複数の抗原相互作用ドメインを含む、本発明1001のシステム。

[本発明1017]

抗原相互作用ドメインが、707-AP、ビオチン化分子、a-アクチニン-4、abl-bcr alb-b3 (b2a2)、abl-bcr alb-b4 (b3a2)、アディポフィリン、AFP、AIM-2、アネキシンII、ART-4、BAGE、b-カテニン、bcr-abl、bcr-abl p190 (e1a2)、bcr-abl p210 (b2a2)、bcr-abl p210 (b3a2)、BING-4、CAG-3、CAIX、CAMEL、カスパーゼ-8、CD171、CD19、CD20、CD22、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44v7/8、CDC27、CDK-4、CEA、CLCA2、Cyp-B、DAM-10、DAM-6、DEK-CAN、EGFRvIII、EGP-2、EGP-40、ELF2、Ep-CAM、EphA2、EphA3、erb-B2、erb-B3、erb-B4、ES-ESO-1a、ETV6/AML、FBP、胎児アセチルコリン受容体、FGF-5、FN、G250、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7B、GAGE-8、GD2、GD3、GnT-V、Gp100、gp75、Her-2、HLA-A*0201-R170I、HMW-MAA、HSP70-2 M、HST-2 (FGF6)、HST-2/neu、hTERT、iCE、IL-11R、IL-13R 2、KDR、KIAA0205、K-RAS、L1細胞接着分子、LAGE-1、LDLR/FUT、ルイスY、MAGE-1、MAGE-10、MAGE-12、MAGE-2、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-6、MAGE-A1、MAGE-

10

20

30

40

50

A2、MAGE-A3、MAGE-A6、MAGE-B1、MAGE-B2、リンゴ酸酵素、マンマグロビン-A、MART-1/Melan-A、MART-2、MC1R、M-CSF、メソテリン、MUC1、MUC16、MUC2、MUM-1、MUM-2、MUM-3、ミオシン、NA88-A、Neo-PAP、NKG2D、NPM/ALK、N-RAS、NY-ESO-1、OA1、OGT、腫瘍胎児性抗原(h5T4)、OS-9、Pポリペプチド、P15、P53、PRAME、PSA、PSCA、PSMA、PTPRK、RAGE、ROR1、RU1、RU2、SART-1、SART-2、SART-3、SOX10、SSX-2、サバイビン、サバイビン-2B、SYT/SX、TAG-72、TEL/AML1、TGFAII、TGFbRII、TP1、TRAG-3、TRG、TRP-1、TRP-2、TRP-2/INT2、TRP-2-6b、チロシナーゼ、VEGF-R2、WT1、葉酸受容体、および軽鎖からなる群より選択される抗原に結合する、本発明1001のシステム。

[本発明1018]

受容体ポリペプチドの免疫細胞シグナル伝達ドメインが、免疫受容体チロシン活性化モチーフ(ITAM)を含む一次シグナル伝達ドメインを含む、本発明1001のシステム。

[本発明1019]

受容体ポリペプチドの免疫細胞シグナル伝達ドメインが、免疫受容体チロシン阻害モチーフ(ITIM)を含む一次シグナル伝達ドメインを含む、本発明1001のシステム。

[本発明1020]

免疫細胞シグナル伝達ドメインが、Fc受容体(FcR)、Fc受容体(FcR)、Fc受容体(FcR)、新生児型Fc受容体(FcRn)、CD3、CD3、CD3、CD3、CD3、CD4、CD5、CD8、CD21、CD22、CD28、CD32、CD40L(CD154)、CD45、CD66d、CD79a、CD79b、CD80、CD86、CD278(ICOSとしても公知)、CD247、CD247、DAP10、DAP12、FYN、LAT、Lck、MAPK、MHC複合体、NFAT、NF-B、PLC-、iC3b、C3dg、C3d、およびZap70からなる群より選択されるタンパク質の一次シグナル伝達ドメインを含む、本発明1001のシステム。

[本発明1021]

一次シグナル伝達ドメインがCD3シグナル伝達ドメインを含む、本発明1020のシステム。

[本発明1022]

一次シグナル伝達ドメインがCD3の免疫受容体チロシン活性化モチーフ(ITAM)を含む、本発明1021のシステム。

[本発明1023]

免疫細胞シグナル伝達ドメインが共刺激ドメインを含む、本発明1001のシステム。

[本発明1024]

免疫細胞シグナル伝達ドメインが複数の共刺激ドメインを含む、本発明1023のシステム。

[本発明1025]

共刺激ドメインが、MHCクラスI分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ球活性化分子(SLAMタンパク質)、活性化NK細胞受容体、またはTollリガンド受容体のシグナル伝達ドメインを含む、本発明1023のシステム。

[本発明1026]

共刺激ドメインが、2B4/CD244/SLAMF4、4-1BB/TNFSF9/CD137、B7-1/CD80、B7-2/CD86、B7-H1/PD-L1、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H6、B7-H7、BAFFR/TNFRSF13C、BAFF/BLyS/TNFSF13B、BLAME/SLAMF8、BTLA/CD272、CD100(SEMA4D)、CD103、CD11a、CD11b、CD11c、CD11d、CD150、CD160(BY55)、CD18、CD19、CD2、CD200、CD229/SLAMF3、CD27リガンド/TNFSF7、CD27/TNFRSF7、CD28、CD29、CD2F-10/SLAMF9、CD30リガンド/TNFSF8、CD30/TNFRSF8、CD300a/LMIR1、CD4、CD40リガンド/TNFSF5、CD40/TNFRSF5、CD48/SLAMF2、CD49a、CD49D、CD49f、CD53、CD58/LFA-3、CD69、CD7、CD8、CD8、CD82/Kai-1、CD84/SLAMF5、CD90/Thy1、CD96、CDS、CEACAM1、CRACC/SLAMF7、CRTAM、CTLA-4、DAP12、デクチン-1/CLEC7A、DNAM1(CD226)

10

20

30

40

50

、DPPIV/CD26、DR3/TNFRSF25、EphB6、GADS、Gi24/VISTA/B7-H5、GITRリガ
ンド/TNFSF18、GITR/TNFRSF18、HLAクラスI、HLA-DR、HVEM/TNFRSF14、IA4
、ICAM-1、ICOS/CD278、イカロス(Ikaros)、IL2R、IL2R、IL7R、インテグ
リン4/CD49d、インテグリン41、インテグリン47/LPAM-1、IPO-3、ITGA
4、ITGA6、ITGAD、ITGAE、ITGAL、ITGAM、ITGAX、ITGB1、ITGB2、ITGB7、KI
RDS2、LAG-3、LAT、LIGHT/TNFSF14、LTBR、Ly108、Ly9(CD229)、リンパ球
機能関連抗原-1(LFA-1)、リンフォトキシン- /TNF-、NKG2C、NKG2D、NKp30
、NKp44、NKp46、NKp80(KLRF1)、NTB-A/SLAMF6、OX40リガンド/TNFSF4、
OX40/TNFRSF4、PAG/Cbp、PD-1、PDCD6、PD-L2/B7-DC、PSGL1、RELT/TNFR
SF19L、SELPGL(CD162)、SLAM(SLAMF1)、SLAM/CD150、SLAMF4(CD244
)、SLAMF6(NTB-A)、SLAMF7、SLP-76、TACI/TNFRSF13B、TCL1A、TCL1B、
TIM-1/KIM-1/HAVER、TIM-4、TL1A/TNFSF15、TNFRII/TNFRSF1B、TNF-、T
RANCE/RANKL、TSLP、TSLP R、VLA1、およびVLA-6からなる群より選択される分子
のシグナル伝達ドメインを含む、本発明1023のシステム。

10

[本発明1027]

共刺激ドメインが、免疫細胞における増殖シグナルおよび/または生存シグナルを調節す
るように作動しうる、本発明1023のシステム。

[本発明1028]

受容体が、細胞の特異的領域へ受容体ポリペプチドを輸送させる少なくとも1つの標的指
向ペプチドを含む、本発明1001のシステム。

20

[本発明1029]

標的指向ペプチドが、核、ミトコンドリア、小胞体(ER)、クロロプラスト、ペルオキ
シソームまたは形質膜へ受容体ポリペプチドを輸送させる、本発明1028のシステム。

[本発明1030]

標的指向ペプチドが核外移行シグナル(NES)を含む、本発明1028のシステム。

[本発明1031]

標的指向ペプチドが、形質膜を標的とするペプチドを含む、本発明1028のシステム。

[本発明1032]

受容体修飾が化学修飾を含む、本発明1001のシステム。

[本発明1033]

化学修飾がリン酸化を含む、本発明1032のシステム。

30

[本発明1034]

キメラアダプターポリペプチドの受容体結合モエティが、ABL1、ABL2、APBA1、APB
A2、APBA3、BCAR3、BLK、BLNK、BMX、BTK、CHN2、CISH、CRK、CRKL、CSK
、DAPP1、DOK1、DOK2、DOK3、DOK4、DOK5、DOK6、DOK7、EAT-2、EPS8、E
PS8L1、EPS8L2、EPS8L3、FER、FES、FGR、FRK、FRS2、FRS3、FYN、GADS、G
RAP、GRAP2、GRB10、GRB14、GRB2、GRB7、HCK、HSH2D、INPP5D、INPPL1
、IRS1、IRS2、IRS3、IRS4、ITK、JAK2、LAT、LCK、LCP2、LYN、MATK、NCK1
、NCK2、PIK3R1、PIK3R2、PIK3R3、PLCG1、PLCG2、PTK6、PTPN11、PTPN6
、RASA1、SAP、SH2B1、SH2B2、SH2B3、SH2D1A、SH2D1B、SH2D2A、SH2D3
A、SH2D3C、SH2D4A、SH2D4B、SH2D5、SH2D6、SH3BP2、SHB、SHC1、SHC2
、SHC3、SHC4、SHD、SHE、SHP1、SHP2、SLA、SLA2、SOCS1、SOCS2、SOCS3
、SOCS4、SOCS5、SOCS6、SOCS7、SRC、SRMS、STAT1、STAT2、STAT3、STAT
4、STAT5A、STAT5B、STAT6、SUPT6H、SYK、TEC、TENC1、TLN1、TLN2、TN
S、TNS1、TNS3、TNS4、TXK、VAV1、VAV2、VAV3、YES1、ZAP70、X11a、それ
らの任意の誘導体、それらの任意のバリエーション、およびそれらのフラグメントからなる群
より選択される分子の結合ドメインを含む、本発明1001のシステム。

40

[本発明1035]

アクチュエータモエティが、CRISPR関連ポリペプチド(Cas)、ジンクフィンガーヌク
レアーゼ(ZFN)、ジンクフィンガー関連遺伝子調節ポリペプチド、転写活性化因子様工

50

フェクターヌクレアーゼ (TALEN)、転写活性化因子様エフェクター関連遺伝子調節ポリペプチド、メガヌクレアーゼ、天然マスター転写因子、エピジェネティック修飾酵素、リコンビナーゼ、フリッパーゼ、トランスポザーゼ、RNA結合タンパク質 (RBP)、アルゴノートタンパク質、それらの任意の誘導体、それらの任意のバリエーション、またはそれらの任意のフラグメントを含む、本発明1001のシステム。

[本発明1036]

アクチュエータモエティがCasタンパク質を含み、前記システムが、Casタンパク質と複合体形成するガイドRNA (gRNA) をさらに含む、本発明1035のシステム。

[本発明1037]

gRNAが、標的ポリヌクレオチドに対して少なくとも80%の配列同一性を呈する標的指向セグメントを含む、本発明1036のシステム。

10

[本発明1038]

Casタンパク質がDNA切断活性を実質的に欠く、本発明1036のシステム。

[本発明1039]

アクチュエータモエティが、細胞の特異的領域にアクチュエータモエティを向かわせる少なくとも1つの標的指向ペプチドを含む、本発明1001のシステム。

[本発明1040]

標的指向ペプチドが核局在化シグナル (NLS) を含む、本発明1039のシステム。

[本発明1041]

受容体修飾が複数の修飾部位における修飾を含み、各修飾部位が、キメラアダプターポリペプチドおよび/または第2アダプターポリペプチドに結合するのに有効である、本発明1001のシステム。

20

[本発明1042]

切断認識部位がポリペプチド配列を含み、切断モエティがプロテアーゼ活性を含む、本発明1001のシステム。

[本発明1043]

アクチュエータモエティが、GMPから放出されると、標的ポリヌクレオチドに結合することで、標的ポリヌクレオチドの物理的妨害によって、または標的ポリヌクレオチドからの遺伝子発現を抑制もしくは強化するのに有効な追加因子の動員によって、標的ポリヌクレオチドからの遺伝子発現を調節する、本発明1001のシステム。

30

[本発明1044]

アクチュエータモエティが、標的ポリヌクレオチドからの遺伝子発現を増加させるのに有効な転写活性化因子を含む、本発明1001のシステム。

[本発明1045]

アクチュエータモエティが、標的ポリヌクレオチドからの遺伝子発現を減少させるのに有効な転写抑制因子を含む、本発明1001のシステム。

[本発明1046]

標的ポリヌクレオチドがゲノムDNAを含む、本発明1043~1045のいずれかのシステム。

[本発明1047]

標的ポリヌクレオチドがRNAを含む、本発明1043~1045のいずれかのシステム。

40

[本発明1048]

標的ポリヌクレオチドが内在性遺伝子または内在性遺伝子産物を含む、本発明1043~1045のいずれかのシステム。

[本発明1049]

内在性遺伝子または内在性遺伝子産物がサイトカインをコードする、本発明1048のシステム。

[本発明1050]

サイトカインが、4-1BBL、アクチビン A、アクチビン B、アクチビン C、アクチビン E、アルテミン (ARTN)、BAFF/BLyS/TNFSF138、BMP10、BMP15、BMP2、BMP3、BMP4、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8a、BMP8b、骨形成タンパク質1 (BMP1

50

)、CCL1/TCA3、CCL11、CCL12/MCP-5、CCL13/MCP-4、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17/TARC、CCL18、CCL19、CCL2/MCP-1、CCL20、CCL21、CCL22/MDC、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CCL28、CCL3、CCL3L3、CCL4、CCL4L1/LAG-1、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9、CD153/CD30L/TNFSF8、CD40L/CD154/TNFSF5、CD40LG、CD70、CD70/CD27L/TNFSF7、CLCF1、c-MPL/CD110/TPOR、CNTF、CX3CL1、CXCL1、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCL17、CXCL2/MIP-2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7/Ppbbp、CXCL9、EDA-A1、FAM19A1、FAM19A2、FAM19A3、FAM19A4、FAM19A5、Fasリガンド/FASLG/CD95L/CD178、GDF10、GDF11、GDF15、GDF2、GDF3、GDF4、GDF5、GDF6、GDF7、GDF8、GDF9、グリア細胞株由来神経栄養因子(GDNF)、増殖分化因子1(GDF1)、IFNA1、IFNA10、IFNA13、IFNA14、IFNA2、IFNA4、IFNA5/IFNaG、IFNA7、IFNA8、IFNB1、IFNE、IFNG、IFNZ、IFN /IFNW1、IL11、IL18、IL18BP、IL1A、IL1B、IL1F10、IL1F3/IL1RA、IL1F5、IL1F6、IL1F7、IL1F8、IL1F9、IL1RL2、IL31、IL33、IL6、IL8/CXCL8、インヒピン-A、インヒピン-B、レプチン、LIF、LTA/TNFB/TNFSF1、LTB/TNFC、ニューロツリン(NRTN)、OSM、OX-40L/TNFSF4/CD252、パーセフィン(PSPN)、RANKL/OPGL/TNFSF11(CD254)、TL1A/TNFSF15、TNFA、TNF-アルファ/TNFA、TNFSF10/TRAIL/APO-2L(CD253)、TNFSF12、TNFSF13、TNFSF14/LIGHT/CD258、XCL1、およびXCL2からなる群より選択される、本発明1049のシステム。

10

[本発明1051]

内在性遺伝子または内在性遺伝子産物が免疫調節タンパク質をコードする、本発明1048のシステム。

20

[本発明1052]

免疫調節タンパク質が、A2AR、B7.1、B7-H3/CD276、B7-H4/B7S1/B7x/Vtcn1、B7-H6、BTLA/CD272、CCR4、CD122、4-1BB/CD137、CD27、CD28、CD40、CD47、CD70、CISH、CTLA-4/CD152、DR3、GITR、ICOS/CD278、IDO、KIR、LAG-3、OX40/CD134、PD-1/CD279、PD2、PD-L1、PD-L2、TIM-3、およびVISTA/Dies1/Gi24/PD-1H(C10orf54)からなる群より選択される、本発明1051のシステム。

[本発明1053]

標的ポリヌクレオチドが異種遺伝子または異種遺伝子産物を含む、本発明1043~1045のいずれかのシステム。

30

[本発明1054]

異種遺伝子または異種遺伝子産物が、追加のキメラ膜貫通受容体ポリペプチドをコードする、本発明1053のシステム。

[本発明1055]

追加のキメラ膜貫通受容体ポリペプチドが、
 (a) 追加抗原に結合する追加の抗原相互作用ドメインを含む、細胞外領域、および
 (b) 共刺激ドメイン
 を含む、本発明1054のシステム。

[本発明1056]

本発明1001のシステムを発現する、リンパ球。

40

[本発明1057]

受容体ポリペプチドが抗原に結合したときに切断認識部位における切断によってアクチュエータモエティがGMPから放出されることを特徴とする、本発明1056のリンパ球。

[本発明1058]

放出されたアクチュエータモエティが、リンパ球中の標的ポリヌクレオチドと複合体形成する、本発明1056のリンパ球。

[本発明1059]

アクチュエータモエティと標的ポリヌクレオチドとの複合体形成が、リンパ球中の遺伝子のアップレギュレートされた発現をもたらす、本発明1058のリンパ球。

50

[本発明1060]

遺伝子が異種遺伝子である、本発明1059のリンパ球。

[本発明1061]

異種遺伝子が追加のキメラ膜貫通受容体ポリペプチドをコードする、本発明1060のリンパ球。

[本発明1062]

追加のキメラ膜貫通受容体ポリペプチドが、

(a) 追加抗原に結合する追加の抗原相互作用ドメインを含む、細胞外領域、および

(b) 共刺激ドメイン

を含む、本発明1061のリンパ球。

10

[本発明1063]

遺伝子が内在性遺伝子である、本発明1059のリンパ球。

[本発明1064]

内在性遺伝子がサイトカインをコードする、本発明1063のリンパ球。

[本発明1065]

サイトカインが、4-1BBL、アクチビン A、アクチビン B、アクチビン C、アクチビン E、アルテミン (ARTN)、BAFF/BLyS/TNFSF138、BMP10、BMP15、BMP2、BMP3、BMP4、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8a、BMP8b、骨形成タンパク質1 (BMP1)、CCL1/TCA3、CCL11、CCL12/MCP-5、CCL13/MCP-4、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17/TARC、CCL18、CCL19、CCL2/MCP-1、CCL20、CCL21、CCL22/MD C、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CCL28、CCL3、CCL3L3、CCL4、CCL4L1/LAG-1、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9、CD153/CD30L/TNFSF8、CD40L/CD154/TNFSF5、CD40LG、CD70、CD70/CD27L/TNFSF7、CLCF1、c-MPL/CD110/TPOR、CNTF、CX3CL1、CXCL1、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCL17、CXCL2/MIP-2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7/Ppbb、CXCL9、EDA-A1、FAM19A1、FAM19A2、FAM19A3、FAM19A4、FAM19A5、Fasリガンド/FASLG/CD95L/CD178、GDF10、GDF11、GDF15、GDF2、GDF3、GDF4、GDF5、GDF6、GDF7、GDF8、GDF9、グリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF)、増殖分化因子1 (GDF1)、IFNA1、IFNA10、IFNA13、IFNA14、IFNA2、IFNA4、IFNA5/IFNaG、IFNA7、IFNA8、IFNB1、IFNE、IFNG、IFNZ、IFN /IFNW1、IL11、IL18、IL18BP、IL1A、IL1B、IL1F10、IL1F3/IL1RA、IL1F5、IL1F6、IL1F7、IL1F8、IL1F9、IL1RL2、IL31、IL33、IL6、IL8/CXCL8、インヒピン-A、インヒピン-B、レプチン、LIF、LTA/TNFB/TNFSF1、LTB/TNFC、ニューロツリン (NRTN)、OSM、OX-40L/TNFSF4/CD252、パーセフィン (PSPN)、RANKL/OPGL/TNFSF11 (CD254)、TL1A/TNFSF15、TNFA、TNF-アルファ/TNFA、TNFSF10/TRAIL/APO-2L (CD253)、TNFSF12、TNFSF13、TNFSF14/LIGHT/CD258、XCL1、およびXCL2からなる群より選択される、本発明1064のリンパ球。

20

30

[本発明1066]

アクチュエータモエティと標的ポリヌクレオチドとの複合体形成が、リンパ球中の遺伝子の発現をダウンレギュレートする、本発明1058のリンパ球。

40

[本発明1067]

遺伝子が内在性遺伝子である、本発明1066のリンパ球。

[本発明1068]

内在性遺伝子が免疫調節タンパク質をコードする、本発明1067のリンパ球。

[本発明1069]

免疫調節タンパク質が、A2AR、B7.1、B7-H3/CD276、B7-H4/B7S1/B7x/Vtcn1、B7-H6、BTLA/CD272、CCR4、CD122、4-1BB/CD137、CD27、CD28、CD40、CD47、CD70、CISH、CTLA-4/CD152、DR3、GITR、ICOS/CD278、IDO、KIR、LAG-3、OX40/CD134、PD-1/CD279、PD2、PD-L1、PD-L2、TIM-3、およびVISTA/Dies1/Gi24/PD-1H (C10orf54) からなる群より選択される、本発明1068のリンパ球。

50

[本発明1070]

受容体ポリペプチドが抗原に結合したときに切断認識部位における切断によってアクチュエータモエティがGMPから放出されることを特徴とする、本発明1001のシステムを発現するリンパ球の集団。

[本発明1071]

標的細胞の死を誘導する方法であって、標的細胞を本発明1056のリンパ球に曝露する工程を含み、標的細胞をリンパ球に曝露すると、リンパ球によって発現された受容体ポリペプチドが、標的細胞の細胞表面抗原または標的細胞によって分泌される抗原を含む抗原に結合し、抗原への受容体ポリペプチドの結合がリンパ球の細胞傷害性を活性化することによって標的細胞の死を誘導する、方法。

10

[本発明1072]

標的細胞ががん細胞である、本発明1071の方法。

[本発明1073]

アクチュエータモエティがGMPから放出されたときに、抗原への受容体ポリペプチドの結合がリンパ球の細胞傷害性を活性化する、本発明1071の方法。

[本発明1074]

アクチュエータモエティが、標的ポリヌクレオチドの物理的妨害によって、または標的ポリヌクレオチドからの遺伝子発現を抑圧もしくは強化するのに有効な追加因子の動員によって、標的ポリヌクレオチドからの遺伝子発現を調節する、本発明1073の方法。

[本発明1075]

アクチュエータモエティが、標的ポリヌクレオチドからの遺伝子発現を増加させるのに有効な転写活性化因子を含む、本発明1073の方法。

20

[本発明1076]

アクチュエータモエティが、標的ポリヌクレオチドからの遺伝子発現を減少させるのに有効な転写抑制因子を含む、本発明1073の方法。

[本発明1077]

標的ポリヌクレオチドがゲノムDNAを含む、本発明1074～1076のいずれかの方法。

[本発明1078]

標的ポリヌクレオチドがRNAを含む、本発明1074～1076のいずれかの方法。

[本発明1079]

受容体修飾がリン酸化を含む、本発明1071の方法。

30

[本発明1080]

受容体修飾が複数の修飾部位における修飾を含み、各修飾が、キメラアダプターポリペプチドに結合するのに有効である、本発明1071の方法。

[本発明1081]

アクチュエータモエティが、CRISPR関連ポリペプチド(Cas)、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、ジンクフィンガー関連遺伝子調節ポリペプチド、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、転写活性化因子様エフェクター関連遺伝子調節ポリペプチド、メガヌクレアーゼ、天然マスター転写因子、エピジェネティック修飾酵素、リコンビナーゼ、フリッパーゼ、トランスポザーゼ、RNA結合タンパク質(RBP)、アルゴノートタンパク質、それらの任意の誘導體、それらの任意のパリアント、またはそれらの任意のフラグメントを含む、本発明1071～1080のいずれかの方法。

40

[本発明1082]

アクチュエータモエティが、ガイドRNA(gRNA)との複合体を形成するCasタンパク質を含む、本発明1081の方法。

[本発明1083]

Casタンパク質がDNA切断活性を実質的に欠く、本発明1082の方法。

[本発明1084]

切断認識部位がポリペプチド配列を含み、切断モエティがプロテアーゼ活性を含む、本発明1071～1083のいずれかの方法。

50

[本発明1085]

リンパ球の条件付き調節のための方法であって、本発明1056のリンパ球を、キメラ膜貫通受容体ポリペプチドの抗原相互作用ドメインに結合する抗原と接触させる工程を含み、前記接触させる工程が免疫細胞活動の活性化または失活を引き起こすことによって、リンパ球を条件付きで調節する、方法。

[本発明1086]

免疫細胞活動が、リンパ球のクローン増加;リンパ球によるサイトカイン放出;リンパ球の細胞傷害性;リンパ球の増殖;リンパ球の分化、脱分化または分化転換;リンパ球の運動および/または輸送;リンパ球の疲弊および/または再活性化;ならびにリンパ球による他の細胞間分子、代謝産物、化学化合物、またはそれらの組合せの放出からなる群より選択される、本発明1085の方法。

10

[本発明1087]

抗原が受容体ポリペプチドの抗原相互作用ドメインに結合すると、アクチュエータモエティがGMPから放出されて、活性化または失活を引き起こす、本発明1085の方法。

[本発明1088]

(a) 抗原に結合して修飾を受けた受容体に結合する受容体結合モエティであって、該受容体が免疫細胞シグナル伝達ドメインを含む細胞内領域を含む、受容体結合モエティと、
(b) 該受容体結合モエティに連結された遺伝子調整ポリペプチド(GMP)であって、切断認識部位に連結されたアクチュエータモエティを含む、GMPと
を含み、

20

修飾を受けた該受容体に該受容体結合モエティが結合すると、該アクチュエータモエティが、該切断認識部位における切断によって該GMPから放出される、キメラアダプターポリペプチド。

[本発明1089]

受容体結合モエティが、ABL1、ABL2、APBA1、APBA2、APBA3、BCAR3、BLK、BLNK、BMX、BTK、CHN2、CISH、CRK、CRKL、CSK、DAPP1、DOK1、DOK2、DOK3、DOK4、DOK5、DOK6、DOK7、EAT-2、EPS8、EPS8L1、EPS8L2、EPS8L3、FER、FES、FGR、FRK、FRS2、FRS3、FYN、GADS、GRAP、GRAP2、GRB10、GRB14、GRB2、GRB7、HCK、HSH2D、INPP5D、INPPL1、IRS1、IRS2、IRS3、IRS4、ITK、JAK2、LAT、LCK、LCP2、LYN、MATK、NCK1、NCK2、PIK3R1、PIK3R2、PIK3R3、PLCG1、PLCG2、PTK6、PTPN11、PTPN6、RASA1、SAP、SH2B1、SH2B2、SH2B3、SH2D1A、SH2D1B、SH2D2A、SH2D3A、SH2D3C、SH2D4A、SH2D4B、SH2D5、SH2D6、SH3BP2、SHB、SHC1、SHC2、SHC3、SHC4、SHD、SHE、SHP1、SHP2、SLA、SLA2、SOCS1、SOCS2、SOCS3、SOCS4、SOCS5、SOCS6、SOCS7、SRC、SRMS、STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5A、STAT5B、STAT6、SUPT6H、SYK、TEC、TENC1、TLN1、TLN2、TNS、TNS1、TNS3、TNS4、TXK、VAV1、VAV2、VAV3、YES1、ZAP70、X11a、それらの任意の誘導体、それらの任意のバリエーション、およびそれらの任意のフラグメントからなる群より選択される分子の結合ドメインを含む、本発明1088のキメラアダプターポリペプチド。

30

[本発明1090]

細胞の特異的領域へキメラアダプターポリペプチドを輸送させる少なくとも1つの標的指向ペプチドを含む、本発明1088のキメラアダプターポリペプチド。

40

[本発明1091]

標的指向ペプチドが、核、細胞質、ミトコンドリア、小胞体(ER)、クロロプラスト、アポプラスト、ペルオキシソームまたは形質膜へキメラアダプターポリペプチドを輸送させる、本発明1090のキメラアダプターポリペプチド。

[本発明1092]

標的指向ペプチドが核外移行シグナル(NES)を含む、本発明1090のキメラアダプターポリペプチド。

[本発明1093]

50

NESがキメラアダプターポリペプチドのN末に連結されている、本発明1092のキメラアダプターポリペプチド。

[本発明1094]

標的指向ペプチドが、形質膜を標的とするペプチドを含む、本発明1090のキメラアダプターポリペプチド。

[本発明1095]

標的指向ペプチドがアクチュエータモエティに連結されている、本発明1090のキメラアダプターポリペプチド。

[本発明1096]

標的指向ペプチドが核局在化シグナル(NLS)を含む、本発明1095のキメラアダプターポリペプチド。

10

[本発明1097]

アクチュエータモエティに連結されたNLSを含む標的指向ペプチドが、切断認識部位における切断によるGMPからのアクチュエータモエティの放出に続いて、細胞の核へアクチュエータモエティを輸送させる、本発明1096のキメラアダプターポリペプチド。

[本発明1098]

アクチュエータモエティが、CRISPR関連ポリペプチド(Cas)、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、ジンクフィンガー関連遺伝子調節ポリペプチド、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、転写活性化因子様エフェクター関連遺伝子調節ポリペプチド、メガヌクレアーゼ、天然マスター転写因子、エピジェネティック修飾酵素、リコンビナーゼ、フリッパーゼ、トランスポザーゼ、RNA結合タンパク質(RBP)、アルゴノートタンパク質、それらの任意の誘導體、それらの任意のパリアント、またはそれらの任意のフラグメントを含む、本発明1088のキメラアダプターポリペプチド。

20

[本発明1099]

アクチュエータモエティが、ガイドRNA(gRNA)との複合体を形成するCasタンパク質を含む、本発明1098のキメラアダプターポリペプチド。

[本発明1100]

Casタンパク質がDNA切断活性を実質的に欠く、本発明1099のキメラアダプターポリペプチド。

[本発明1101]

アクチュエータモエティが、標的ポリヌクレオチドの物理的妨害によって、または標的ポリヌクレオチドからの遺伝子発現を抑圧もしくは強化するのに有効な追加因子の動員によって、遺伝子の発現を調節する、本発明1088のキメラアダプターポリペプチド。

30

[本発明1102]

アクチュエータモエティが、標的ポリヌクレオチドからの遺伝子発現を増加させるのに有効な転写活性化因子を含む、本発明1088のキメラアダプターポリペプチド。

[本発明1103]

アクチュエータモエティが、標的ポリヌクレオチドからの遺伝子発現を減少させるのに有効な転写抑制因子を含む、本発明1088のキメラアダプターポリペプチド。

[本発明1104]

切断認識部位が受容体結合モエティとアクチュエータモエティとに挟まれている、本発明1088のキメラアダプターポリペプチド。

40

[本発明1105]

切断認識部位が、プロテアーゼによって認識される切断認識配列を含む、本発明1088のキメラアダプターポリペプチド。

[本発明1106]

切断認識部位が複数の切断認識配列を含み、各切断認識配列は同じプロテアーゼまたは異なるプロテアーゼによって認識される、本発明1105のキメラアダプターポリペプチド。

[本発明1107]

切断認識配列が、アクロモペプチダーゼ、アミノペプチダーゼ、アングロッド、アンジ

50

オテンシン変換酵素、プロメライン、カルパイン、カルパインI、カルパインII、カルボキシペプチダーゼA、カルボキシペプチダーゼB、カルボキシペプチダーゼG、カルボキシペプチダーゼP、カルボキシペプチダーゼW、カルボキシペプチダーゼY、カスパーゼ1、カスパーゼ2、カスパーゼ3、カスパーゼ4、カスパーゼ5、カスパーゼ6、カスパーゼ7、カスパーゼ8、カスパーゼ9、カスパーゼ10、カスパーゼ11、カスパーゼ12、カスパーゼ13、カテプシンB、カテプシンC、カテプシンD、カテプシンE、カテプシンG、カテプシンH、カテプシンL、キモパイン、キマーゼ、キモトリプシン、クロストリパイン、コラゲナーゼ、補体C1r、補体C1s、補体因子D、補体因子I、ククミシン、ジペプチジルペプチダーゼIV、エラスターゼ（白血球）、エラスターゼ（臍）、エンドプロテイナーゼArg-C、エンドプロテイナーゼAsp-N、エンドプロテイナーゼGlu-C、エンドプロテイナーゼLys-C、エンテロキナーゼ、第Xa因子、フィシン、フューリン、グランザイムA、グランザイムB、HIVプロテアーゼ、IGase、組織カリクレイン、ロイシニアミノペプチダーゼ（全般）、ロイシニアミノペプチダーゼ（サイトゾル）、ロイシニアミノペプチダーゼ（ミクロソーム）、マトリックスメタロプロテアーゼ、メチオニンアミノペプチダーゼ、ニュートラーゼ、パパイン、ペプシン、プラスミン、プロリダーゼ、プロナーゼE、前立腺特異抗原、ストレプトミセス・グリセウス（*Streptomyces griseus*）由来の好アルカリ性プロテアーゼ、アスペルギルス（*Aspergillus*）由来のプロテアーゼ、アスペルギルス・サイトイ（*Aspergillus saitoi*）由来のプロテアーゼ、ショウコウジカビ（*Aspergillus sojae*）由来のプロテアーゼ、プロテアーゼ（*B.リケニフォルミス*（*B. licheniformis*））（アルカリ性またはアルカラーゼ）、バチルス・ポリミキサ（*Bacillus polymyxa*）由来のプロテアーゼ、バチルス属の種（*Bacillus sp.*）由来のプロテアーゼ、クモノスカビ属の種（*Rhizopus sp.*）由来のプロテアーゼ、プロテアーゼS、プロテアソーム、コウジカビ（*Aspergillus oryzae*）由来のプロテイナーゼ、プロテイナーゼ3、プロテイナーゼA、プロテイナーゼK、プロテインC、ピログルタミン酸アミノペプチダーゼ、レンニン、レンニン、ストレプトキナーゼ、サブチリシン、サーモライシン、トロンピン、組織プラスミノゲン活性化因子、トリプシン、トリプターゼおよびウロキナーゼからなる群より選択されるプロテアーゼによって認識される、本発明1105のキメラアダプターポリペプチド。

[本発明1108]

（a）抗原に結合する抗原相互作用ドメインを含む、細胞外領域、および
（b）以下：
免疫細胞シグナル伝達ドメインと、
切断認識部位に連結されたアクチュエータモエティを含む、GMP免疫細胞シグナル伝達ドメインに連結された遺伝子調整ポリペプチド（GMP）と
を含む、細胞内領域
を含み、

抗原が該細胞外領域に結合すると、該アクチュエータモエティが、該切断認識部位における切断によって、該GMPから放出される、キメラ膜貫通受容体ポリペプチド。

[本発明1109]

抗原相互作用ドメインが膜結合型抗原に結合する、本発明1108のキメラ膜貫通受容体ポリペプチド。

[本発明1110]

抗原相互作用ドメインが膜結合型でない抗原に結合する、本発明1108のキメラ膜貫通受容体ポリペプチド。

[本発明1111]

抗原相互作用ドメインが抗体に結合する、本発明1108のキメラ膜貫通受容体ポリペプチド。

[本発明1112]

抗原相互作用ドメインが、抗体のFcドメイン、Fvドメイン、重鎖、および軽鎖のうちの少なくとも1つに結合する、本発明1111のキメラ膜貫通受容体ポリペプチド。

10

20

30

40

50

[本発明11113]

抗原相互作用ドメインが抗体のFcドメインに結合する、本発明11112のキメラ膜貫通受容体ポリペプチド。

[本発明11114]

抗原相互作用ドメインが、Fab、単鎖Fv(scFv)、細胞外受容体ドメイン、およびFc結合ドメインのうちの少なくとも1つを含む、本発明1108のキメラ膜貫通受容体ポリペプチド。

[本発明11115]

抗原相互作用ドメインが、Fc受容体またはその任意のフラグメントを含むFc結合ドメインを含む、本発明1114のキメラ膜貫通受容体ポリペプチド。

10

[本発明11116]

抗原相互作用ドメインが、Fc RI(CD64)、Fc RIa、Fc RIb、Fc RIc、Fc RIIA(CD32)、Fc RIIA(CD32, H131)、Fc RIIA(CD32, R131)、Fc RIIIB(CD32)、Fc RIIIB-1、Fc RIIIB-2、Fc RIIIA(CD16a, V158)、Fc RIIIA(CD16a, F158)、Fc RIIIB(CD16b、Fc RIIIB-NA1)、Fc RIIIB(CD16b、Fc RIIIB-NA2)、Fc RI、Fc RII(CD23)、Fc RI(CD89)、Fc /μR、FcRn、それらの任意の誘導体、それらの任意のパリアント、またはそれらの任意のフラグメントを含むFc結合ドメインを含む、本発明1115のキメラ膜貫通受容体ポリペプチド。

[本発明11117]

抗原相互作用ドメインが抗体を含む抗原に結合し、次にその抗体が、1-40- -アミロイド、4-1BB、5AC、5T4、アクチピン受容体様キナーゼ1、ACVR2B、腺癌抗原、AGS-22 M6、アルファ-フェトプロテイン、アンジオポエチン2、アンジオポエチン3、炭疽毒素、AOC3(VAP-1)、B7-H3、炭疽菌炭疽、BAFF、ベータ-アミロイド、Bリンパ腫細胞、C242抗原、C5、CA-125、イヌIL31、炭酸脱水酵素9(CA-IX)、心筋ミオシン、CCL11(エオタキシン-1)、CCR4、CCR5、CD11、CD18、CD125、CD140a、CD147(ベイシジン)、CD15、CD152、CD154(CD40L)、CD19、CD2、CD20、CD200、CD22、CD221、CD23(IgE受容体)、CD25(IL-2受容体の鎖)、CD27、CD274、CD28、CD3、CD3イプシロン、CD30、CD33、CD37、CD38、CD4、CD40、CD40リガンド、CD41、CD44 v6、CD5、CD51、CD52、CD56、CD6、CD70、CD74、CD79B、CD80、CEA、CEA関連抗原、CFD、ch4D5、CLDN18.2、クロストリジウム・ディフィシレ、クランピング因子A、CSF1R、CSF2、CTLA-4、C-X-Cケモカイン受容体4型、サイトメガロウイルス、サイトメガロウイルス糖タンパク質B、ダビガトラン、DLL4、DPP4、DR5、大腸菌志賀毒素1型、大腸菌志賀毒素2型、EGFL7、EGFR、エンドトキシン、EpCAM、エピシアリン、ERBB3、大腸菌、呼吸器合胞体ウイルスのFタンパク質、FAP、フィブリンIIベータ鎖、フィブロンネクチンエクストラドメイン-B、葉酸ヒドロラーゼ、葉酸受容体1、葉酸受容体アルファ、Frizzled受容体、ガングリオシドGD2、GD2、GD3ガングリオシド、グリピカン3、GMCSF受容体鎖、GPNMB、増殖分化因子8、GUCY2C、ヘマグルチニン、B型肝炎表面抗原、B型肝炎ウイルス、HER1、HER2/neu、HER3、HGF、HHGFR、ヒストン複合体、HIV-1、HLA-DR、HNGF、Hsp90、ヒト散乱因子受容体キナーゼ、ヒトTNF、ヒトベータ-アミロイド、ICAM-1(CD54)、IFN-、IFN-、IgE、IgE Fc領域、IGF-1受容体、IGF-1、IGHE、IL17A、IL17F、IL20、IL-12、IL-13、IL-17、IL-1、IL-22、IL-23、IL-31RA、IL-4、IL-5、IL-6、IL-6受容体、IL-9、ILGF2、インフルエンザAヘマグルチニン、インフルエンザAウイルスヘマグルチニン、インスリン様成長因子I受容体、インテグリン 4 7、インテグリン 4、インテグリン 5 1、インテグリン 7 7、インテグリン IIb 3、インテグリン v 3、インターフェロン / 受容体、インターフェロンガンマ誘導タンパク質、ITGA2、ITGB2(CD18)、KIR2D、ルイスY抗原、LFA-1(CD11a)、LINGO-1、リボテイコ酸、LOXL2、L-セレクチン(CD62L)、LTA、MCP-1、メソテリン、MIF、MS4A1、MSLN、MUC1、ムチンCanAg、ミエリン関連糖タンパク質、ミオスタチン、NCA-90(顆粒球抗原)、神経アポトーシス調節プロテイナーゼ1、NGF、N-グリコシルノイラミン酸、NOGO-A、No

20

30

40

50

tch受容体、NRP1、アナウサギ、OX-40、oxLDL、PCSK9、PD-1、PDCD1、PDGF-R、リン酸-ナトリウム共輸送体、ホスファチジルセリン、血小板由来成長因子受容体ベータ、前立腺癌細胞、緑膿菌、狂犬病ウイルス糖タンパク質、RANKL、呼吸器合胞体ウイルス、RHD、リーサス因子、RON、RTN4、スクレロスチン、SDC1、セレクチンP、SLAMF7、SOST、スフィンゴシン-1-リン酸、黄色ブドウ球菌、STEAP1、TAG-72、T細胞受容体、TEM1、テネイシンC、TFPI、TGF-1、TGF-2、TGF-、TNF-、TRAIL-R1、TRAIL-R2、腫瘍抗原CTAA16.88、MUC1の腫瘍特異的グリコシル化、腫瘍関連カルシウムシグナル伝達物質2、TWEAK受容体、TYRP1(糖タンパク質75)、VEGFA、VEGFR1、VEGFR2、ビメンチン、およびVWFからなる群より選択される抗原に結合する、本発明1108のキメラ膜貫通受容体ポリペプチド。

10

[本発明1118]

抗原相互作用ドメインが、20-(74)-(74)(ミラツズマブ;ベルツズマブ)、20-2b-2b、3F8、74-(20)-(20)(ミラツズマブ;ベルツズマブ)、8H9、A33、AB-16B5、アバゴボマブ、アブシキシマブ、アビツズマブ、ABP494(セツキシマブバイオシミラー)、アブリルマブ、ABT-700、ABT-806、Actimab-A(アクチニウムAc-225リンツズマブ)、アクトクスマブ、アダリムマブ、ADC-1013、ADCT-301、ADCT-402、アデカツムマブ、アデュカヌマブ、アフェリモマブ、AFM13、アフツズマブ、AGEN1884、AGS15E、AGS-16C3F、AGS67E、アラシズマブペゴル、ALD518、アレムツズマブ、アリロクマブ、アルツモマブペンテテート、アマツキシマブ、AMG228、AMG820、アナツモマブマフェナトクス、アネツマブラブタンシン、アニフロルマブ、アンルキンズマブ、APN301、APN311、アポリズマブ、APX003/SIM-BD0801(セバシズマブ)、APX005M、アルシツモマブ、ARX788、アスクリンバクマブ、アセリズマブ、ASG-15ME、アテゾリズマブ、アチヌマブ、ATL101、アトリスマブ(トシリズマブともいう)、アトロリムマブ、アベルマブ、B-701、パピネオズマブ、パシリキシマブ、パビツキシマブ、BAY1129980、BAY1187982、ベクツモマブ、ベゲロマブ、ベリムマブ、ベンラリズマブ、ベルチリムマブ、ベシレソマブ、Betalutin(177Lu-テトラキセタン-テツロマブ)、ベバシズマブ、BEVZ92(ベバシズマブバイオシミラー)、ベズロトクスマブ、BGB-A317、BHQ880、BI836880、BI-505、ビシロマブ、ビマグルマブ、ビメキズマブ、ビバツズマブメルタンシン、BIW-8962、ブリナツモマブ、プロソズマブ、BMS-936559、BMS-986012、BMS-986016、BMS-986148、BMS-986178、BNC101、ボコシズマブ、ブレンツキシマブベドチン、BrevaRex、ブリアキヌマブ、プロダルマブ、プロルシズマブ、ブロンチクツズマブ、C2-2b-2b、カナキヌマブ、カンツズマブメルタンシン、カンツズマブラブタンシン、カブラシズマブ、カプロマブペンテチド、カルルマブ、カツマキソマブ、CBR96-ドキシソルピシンイムノコンジュゲート、CBT124(ベバシズマブ)、CC-90002、CDX-014、CDX-1401、セデリズマブ、セルトリズマブペゴル、セツキシマブ、CGEN-15001T、CGEN-15022、CGEN-15029、CGEN-15049、CGEN-15052、CGEN-15092、Ch.14.18、シタツズマブ・ボガトクス、シクスツムマブ、クラザキズマブ、クレノリキシマブ、クリバツズマブテトラキセタン、CM-24、コドリツズマブ、コルツキシマブラブタンシン、コナツムマブ、コンシズマブ、Cotara(ヨウ素I-131デルロツキシマブバイオチン)、cR6261、クレネズマブ、DA-3111(トラスツズマブバイオシミラー)、ダセツズマブ、ダクリズマブ、ダロツズマブ、ダピロリズマブペゴル、ダラツムマブ、Daratumumab Enhance(ダラツムマブ)、Darleukin、デクトレクマブ、デムシズマブ、デニンツズマブマホドチン、デノスマブ、デパツキシズマブ、デパツキシズマブマホドチン、デルロツキシマブバイオチン、デツモマブ、DI-B4、ジヌツキシマブ、ジリダブマブ、DKN-01、DMOT4039A、ドルリモマブアリトクス、ドロジツマブ、DS-1123、DS-8895、デュリゴツマブ、デュピルマブ、デュルバルマブ、デュシギツマブ、エクロメキシマブ、エクリズマブ、エドバコマブ、エドレコロマブ、エファリズマブ、エファンゲマブ、エルデルマブ、エルゲムツマブ、エロツズマブ、エルシリモマブ、エマクツズマブ、エミベツズマブ、エナバツズマブ、エンフォルツマブベドチン、エンリモマブペゴル、エノブリツズマブ、エノキズマブ、エノチクマブ、エンシツキシマブ、エピツモマブシツキセタン

20

30

40

50

エブラツズマブ、エルリズマブ、エルツマキソマブ、エタラシズマブ、エトリリズマブ
、エビナクマブ、エボロクマブ、エクスピビルマブ、ファノレソマブ、ファラリモマブ、
ファーレッズマブ、ファシヌマブ、FBTA05、フェルビズマブ、フェザキヌマブ、FF-211
01、FGFR2抗体-薬物コンジュゲート、Fibromun、フィクラツズマブ、フィギツムマブ
、フィリブマブ、フランボツマブ、フレチクマブ、フォントリズマブ、フォルルマブ、フ
ォラビルマブ、FPA144、フレソリムマブ、FS102、フルラヌマブ、フツキシマブ、ガリ
キシマブ、ガニツマブ、ガントネルマブ、ガビリモマブ、ゲムツズマブオゾガマイシン、
ゲリリムズマブ、ゲボキズマブ、ギレンツキシマブ、グレンバツムマブベドチン、GNR-0
06、GNR-011、ゴリムマブ、ゴミリキシマブ、GSK2849330、GSK2857916、GSK31
74998、GSK3359609、グセルクマブ、Hu14.18K322A MAb、hu3S193、Hu8F4、
HuL2G7、HuMab-5B1、イバリズマブ、イブリツモマブチウキセタン、イクルクマブ、
イダルシズマブ、IGN002、IGN523、イゴボマブ、IMAB362、IMAB362(クラウドキシ
マブ)、イマルマブ、IMC-CS4、IMC-D11、イムシロマブ、イムガツズマブ、IMGN5
29、IMMU-102(イットリウムY-90エブラツズマブテトラキセタン)、IMMU-114、I
mmuTune IMP701アンタゴニスト抗体、INCAGN1876、インクラクマブ、INCSHR12
10、インダツキシマブラブタンシン、インデュサツマブベドチン、インフリキシマブ、イ
ノリモマブ、イノツズマブオゾガマイシン、インテツムマブ、Ipafricept、IPH4102、
イピリムマブ、イラツムマブ、イサツキシマブ、イスチラツマブ、イトリズマブ、イキセ
キズマブ、JNJ-56022473、JNJ-61610588、ケリキシマブ、KTN3379、L19IL2/L1
9TNF、ラベツズマブ、ラベツズマブゴビテカン、LAG525、ランプロリズマブ、ランパ
リズマブ、L-DOS47、レブリキズマブ、レマレソマブ、レンジルマブ、レルデリムマブ、
ロイコツキシマブ、レクサツムマブ、リビビルマブ、リファスツズマブベドチン、リゲリ
ズマブ、リロトマブサテトラキセタン、リンツズマブ、リリルマブ、LKZ145、ロデルシ
ズマブ、ロキベトマブ、ロルボツズマブメルタンシン、ルカツムマブ、ルリズマブペゴル
、ルミリキシマブ、ルムレッズマブ、LY3164530、マパツムマブ、マルジェツキシマブ
、マスリモマブ、マツズマブ、マブリリムマブ、MB311、MCS-110、MEDI0562、ME
DI-0639、MEDI0680、MEDI-3617、MEDI-551(イネビリズマブ)、MEDI-565、M
EDI6469、メボリズマブ、メテリムマブ、MGB453、MGD006/S80880、MGD007、
MGD009、MGD011、ミラツズマブ、ミラツズマブ-SN-38、ミンレッツモマブ、ミルベツ
キシマブソラブタンシン、ミツモマブ、MK-4166、MM-111、MM-151、MM-302、モ
ガムリズマブ、MOR202、MOR208、MORAb-066、モロリムマブ、モタビズマブ、モ
キセツモマブシュードトクス、ムロモナブ-CD3、ナコロマブタフェナトクス、ナミルマブ
、ナプツモマブエスタフェナトクス、ナルナツマブ、ナタリズマブ、ネバクマブ、ネシツ
ムマブ、ネモリズマブ、ネレリモマブ、ネスバクマブ、ニモツズマブ、ニボルマブ、ノフ
ェツモマブメルペンタン、NOV-10、オビルトキサキシマブ、オビヌツズマブ、オカラツ
ズマブ、オクレリズマブ、オデュリモマブ、オフアツムマブ、オララツマブ、オロキズマ
ブ、オマリズマブ、OMP-131R10、OMP-305B83、オナルツズマブ、オンツキシズマブ
、オピシヌマブ、オボルツズマブモナトクス、オレゴボマブ、オルチクマブ、オテリキシ
ズマブ、オトレルツズマブ)、OX002/MEN1309、オキセルマブ、オザネズマブ、オゾ
ラリズマブ、パギバキシマブ、パリビズマブ、パニツムマブ、パンコマブ、PankoMab-G
EX、パノバクマブ、パルサツズマブ、パスコリズマブ、パソツキシズマブ、パテクリズマ
ブ、パトリツマブ、PAT-SC1、PAT-SM6、ペンプロリズマブ、ペムツモマブ、ペラキズ
マブ、ペルツズマブ、ペキセリズマブ、PF-05082566(ウトミルマブ)、PF-0664726
3、PF-06671008、PF-06801591、ピディリズマブ、ピナツズマブベドチン、ピンツ
モマブ、プラクルマブ、ポラツズマブベドチン、ポネズマブ、プリリキシマブ、プリトキ
サキシマブ、ブリツムマブ、PRO140、Proxinium、PSMA ADC、キリズマブ、ラコツ
モマブ、ラドレッツマブ、ラフィビルマブ、ラルパンシズマブ、ラムシルマブ、ラニビズマ
ブ、ラキシバクマブ、レファネズマブ、レガビルマブ、REGN1400、REGN2810/SAR4
39684、レスリズマブ、RFM-203、RG7356、RG7386、RG7802、RG7813、RG784
1、RG7876、RG7888、RG7986、リロツムマブ、リヌクマブ、リツキシマブ、RM-19

10

20

30

40

50

29、RO7009789、ロバツムマブ、ロレデュマブ、ロモソズマブ、ロンタリズムマブ、ロベリズムマブ、ルプリズマブ、サシツズマブゴビテカン、サマリズムマブ、SAR408701、SAR566658、サリルマブ、SAT 012、サツモマブペンデチド、SCT200、SCT400、SEA-CD40、セクキヌマブ、セリバンツマブ、セトキサキシマブ、セヴィルマブ、SGN-CD19A、SGN-CD19B、SGN-CD33A、SGN-CD70A、SGN-LIV1A、シプロツズマブ、シファリムマブ、シルツキシマブ、シムツズマブ、シプリズマブ、シルクマブ、ソフィツズマブベドチン、ソラネズマブ、ソリトマブ、ソネプシズマブ、ソソツズマブ、スタムルマブ、スレソマブ、スピズマブ、SYD985、SYM004（フツキシマブおよびモドツキシマブ）、Sym 015、TAB08、タバルマブ、タカツズマブテトラキセタン、タドシズマブ、タリズムマブ、タネズマブ、タニビルマブ、タブリツモマブバプトクス、タレクスツマブ、TB-403、テフィバズマブ、Teleukin、テリモマブアリトクス、テナツモマブ、テネリキシマブ、テプリズマブ、テプロツムマブ、テシドルマブ、テツロマブ、TG-1303、TGN1412、トリウム-227-エブラツズマブコンジュゲート、チシリムマブ、ティガツズマブ、チルドラキズマブ、チソツマブベドチン、TNX-650、トシリズマブ、トラリズムマブ、トサトクスマブ、トシツモマブ、トベツマブ、トラロキヌマブ、トラスツズマブ、トラスツズマブエムタンシン、TRBS07、TRC105、トレガリズムマブ、トレメリムマブ、トレボグルマブ、TRPH011、TRX518、TSR-042、TTI-200.7、ツコツズマブセルモロイキン、ツビルマブ、U3-1565、U3-1784、ウブリツキシマブ、ウロクブルマブ、ウレルマブ、ウルトキサズマブ、ウステキヌマブ、バダスツキシマブタリリン、バンドルツズマブベドチン、パンチクツマブ、バヌシズマブ、バパリキシマブ、バルリルマブ、バテリズムマブ、VB6-845、ベドリズマブ、ベルツズマブ、ベパリモマブ、ベセンクマブ、ビジリズムマブ、ボロシキシマブ、ボルセツズマブマホドチン、ボツムマブ、YYB-101、ザルツムマブ、ザノリムマブ、ザツキシマブ、ジラリムマブ、およびゾリモマブアリトックスからなる群より選択される抗体のFcドメインに結合する、本発明1115のキメラ膜貫通受容体ポリペプチド。

[本発明1119]

細胞外領域が、それぞれが同じ抗原または異なる抗原への結合を呈する複数の抗原相互作用ドメインを含む、本発明1108のキメラ膜貫通受容体ポリペプチド。

[本発明1120]

抗原相互作用ドメインが、707-AP、ビオチン化分子、 α -アクチニン-4、abl-bcr alb-b3 (b2a2)、abl-bcr alb-b4 (b3a2)、アディポフィリン、AFP、AIM-2、アネキシンII、ART-4、BAGE、b-カテニン、bcr-abl、bcr-abl p190 (e1a2)、bcr-abl p210 (b2a2)、bcr-abl p210 (b3a2)、BING-4、CAG-3、CAIX、CAMEL、カスパーゼ-8、CD171、CD19、CD20、CD22、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44v7/8、CDC27、CDK-4、CEA、CLCA2、Cyp-B、DAM-10、DAM-6、DEK-CAN、EGFRvIII、EGP-2、EGP-40、ELF2、Ep-CAM、EphA2、EphA3、erb-B2、erb-B3、erb-B4、ES-ESO-1a、ETV6/AML、FBP、胎児アセチルコリン受容体、FGF-5、FN、G250、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7B、GAGE-8、GD2、GD3、GnT-V、Gp100、gp75、Her-2、HLA-A*0201-R170I、HMW-MAA、HSP70-2 M、HST-2 (FGF6)、HST-2/neu、hTERT、iCE、IL-11R、IL-13R 2、KDR、KIAA0205、K-RAS、L1細胞接着分子、LAGE-1、LDLR/FUT、ルイスY、MAGE-1、MAGE-10、MAGE-12、MAGE-2、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-6、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A6、MAGE-B1、MAGE-B2、リンゴ酸酵素、マンマグロビン-A、MART-1/Melan-A、MART-2、MC1R、M-CSF、メソテリン、MUC1、MUC16、MUC2、MUM-1、MUM-2、MUM-3、ミオシン、NA88-A、Neo-PAP、NKG2D、NPM/ALK、N-RAS、NY-ESO-1、OA1、OGT、腫瘍胎児性抗原 (h5T4)、OS-9、Pポリペプチド、P15、P53、PRAME、PSA、PSCA、PSMA、PTPRK、RAGE、ROR1、RU1、RU2、SART-1、SART-2、SART-3、SOX10、SSX-2、サバイピン、サバイピン-2B、SYT/SX、TAG-72、TEL/AML1、TGfRII、TGfRII、TP1、TRAG-3、TRG、TRP-1、TRP-2、TRP-2/INT2、TRP-2-6b、チロシナーゼ、VEGF-R2、WT1、-葉酸受容体、および軽鎖からなる群より選択される抗原に結合する、本発明1108のキメラ膜貫通受容体

10

20

30

40

50

ポリペプチド。

[本発明1121]

免疫細胞シグナル伝達ドメインが、免疫受容体チロシン活性化モチーフ (ITAM) を含む一次シグナル伝達ドメインを含む、本発明1108のキメラ膜貫通受容体ポリペプチド。

[本発明1122]

免疫細胞シグナル伝達ドメインが、免疫受容体チロシン阻害モチーフ (ITIM) を含む一次シグナル伝達ドメインを含む、本発明1108のキメラ膜貫通受容体ポリペプチド。

[本発明1123]

免疫細胞シグナル伝達ドメインが、Fc 受容体 (Fc R)、Fc 受容体 (Fc R)、Fc 受容体 (Fc R)、新生児型Fc受容体 (FcRn)、CD3、CD3、CD3、CD3、CD3、CD4、CD5、CD8、CD21、CD22、CD28、CD32、CD40L (CD154)、CD45、CD66d、CD79a、CD79b、CD80、CD86、CD278 (ICOSとしても公知)、CD247、CD247、DAP10、DAP12、FYN、LAT、Lck、MAPK、MHC複合体、NFAT、NF-B、PLC-、iC3b、C3dg、C3d、およびZap70から選択されるタンパク質の一次シグナル伝達ドメインを含む、本発明1108のキメラ膜貫通受容体ポリペプチド。

[本発明1124]

一次シグナル伝達ドメインがCD3 シグナル伝達ドメインを含む、本発明1123のキメラ膜貫通受容体ポリペプチド。

[本発明1125]

一次シグナル伝達ドメインがCD3 の免疫受容体チロシン活性化モチーフ (ITAM) を含む、本発明1124のキメラ膜貫通受容体ポリペプチド。

[本発明1126]

免疫細胞シグナル伝達ドメインが共刺激ドメインを含む、本発明1108のキメラ膜貫通受容体ポリペプチド。

[本発明1127]

免疫細胞シグナル伝達ドメインが複数の共刺激ドメインを含む、本発明1126のキメラ膜貫通受容体ポリペプチド。

[本発明1128]

共刺激ドメインが、MHCクラスI分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ球活性化分子 (SLAMタンパク質)、活性化NK細胞受容体、またはTollリガンド受容体のシグナル伝達ドメインを含む、本発明1126のキメラ膜貫通受容体ポリペプチド。

[本発明1129]

共刺激ドメインが、2B4/CD244/SLAMF4、4-1BB/TNFSF9/CD137、B7-1/CD80、B7-2/CD86、B7-H1/PD-L1、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H6、B7-H7、BAFF R/TNFRSF13C、BAFF/BLyS/TNFSF13B、BLAME/SLAMF8、BTLA/CD272、CD100 (SEMA4D)、CD103、CD11a、CD11b、CD11c、CD11d、CD150、CD160 (BY55)、CD18、CD19、CD2、CD200、CD229/SLAMF3、CD27リガンド/TNFSF7、CD27/TNFRSF7、CD28、CD29、CD2F-10/SLAMF9、CD30リガンド/TNFSF8、CD30/TNFRSF8、CD300a/LMIR1、CD4、CD40リガンド/TNFSF5、CD40/TNFRSF5、CD48/SLAMF2、CD49a、CD49D、CD49f、CD53、CD58/LFA-3、CD69、CD7、CD8、CD8、CD82/Kai-1、CD84/SLAMF5、CD90/Thy1、CD96、CDS、CEACAM1、CRAC/SLAMF7、CRTAM、CTLA-4、DAP12、デクチン-1/CLEC7A、DNAM1 (CD226)、DPPIV/CD26、DR3/TNFRSF25、EphB6、GADS、Gi24/VISTA/B7-H5、GITRリガンド/TNFSF18、GITR/TNFRSF18、HLAクラスI、HLA-DR、HVEM/TNFRSF14、IA4、ICAM-1、ICOS/CD278、イカロス、IL2R、IL2R、IL7R、インテグリン 4/CD49d、インテグリン 4 1、インテグリン 4 7/LPAM-1、IPO-3、ITGA4、ITGA6、ITGAD、ITGAE、ITGAL、ITGAM、ITGAX、ITGB1、ITGB2、ITGB7、KIRDS2、LAG-3、LAT、LIGHT/TNFSF14、LTBR、Ly108、Ly9 (CD229)、リンパ球機能関連抗原-1 (LFA-1)、リンフォトキシン- /TNF-、NKG2C、NKG2D、NKp30、NKp44、

10

20

30

40

50

NKp46、NKp80 (KLRF1)、NTB-A/SLAMF6、OX40リガンド/TNFSF4、OX40/TNFRSF4、PAG/Cbp、PD-1、PDCD6、PD-L2/B7-DC、PSGL1、RELT/TNFRSF19L、SELLPLG (CD162)、SLAM (SLAMF1)、SLAM/CD150、SLAMF4 (CD244)、SLAMF6 (NTB-A)、SLAMF7、SLP-76、TACI/TNFRSF13B、TCL1A、TCL1B、TIM-1/KIM-1/HAVCR、TIM-4、TL1A/TNFSF15、TNF RII/TNFRSF1B、TNF-、TRANCE/RANKL、TSLP、TSLP R、VLA1、およびVLA-6からなる群より選択される分子のシグナル伝達ドメインを含む、本発明1126のキメラ膜貫通受容体ポリペプチド。

[本発明1130]

共刺激ドメインが免疫細胞の増殖シグナルおよび/または生存シグナルを調節する、本発明1126のキメラ膜貫通受容体ポリペプチド。

10

[本発明1131]

アクチュエータモエティが、CRISPR関連ポリペプチド (Cas)、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、ジンクフィンガー関連遺伝子調節ポリペプチド、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、転写活性化因子様エフェクター関連遺伝子調節ポリペプチド、メガヌクレアーゼ、天然マスター転写因子、エピジェネティック修飾酵素、リコンビナーゼ、フリッパーゼ、トランスポザーゼ、RNA結合タンパク質 (RBP)、アルゴノートタンパク質、それらの任意の誘導體、それらの任意のパリアント、またはそれらの任意のフラグメントを含む、本発明1108のキメラ膜貫通受容体ポリペプチド。

[本発明1132]

アクチュエータモエティが、ガイドRNA (gRNA) との複合体を形成するCasタンパク質を含む、本発明1131のキメラ膜貫通受容体ポリペプチド。

20

[本発明1133]

Casタンパク質がDNA切断活性を実質的に欠く、本発明1132のキメラ膜貫通受容体ポリペプチド。

[本発明1134]

アクチュエータモエティが、標的ポリヌクレオチドの物理的妨害によって、または標的核酸からの遺伝子発現を抑圧もしくは強化するのに有効な追加因子の動員によって、遺伝子の発現を調節する、本発明1108のキメラ膜貫通受容体ポリペプチド。

[本発明1135]

アクチュエータモエティが、標的ポリヌクレオチドからの遺伝子発現を増加させるのに有効な転写活性化因子を含む、本発明1108のキメラ膜貫通受容体ポリペプチド。

30

[本発明1136]

アクチュエータモエティが、標的ポリヌクレオチドからの遺伝子発現を減少させるのに有効な転写抑制因子を含む、本発明1108のキメラ膜貫通受容体ポリペプチド。

[本発明1137]

切断認識部位が免疫細胞シグナル伝達ドメインとアクチュエータモエティとに挟まれている、本発明1108のキメラ膜貫通受容体ポリペプチド。

[本発明1138]

切断認識部位が、プロテアーゼによって認識される切断認識配列を含む、本発明1108のキメラ膜貫通受容体ポリペプチド。

40

[本発明1139]

切断認識部位が複数の切断認識配列を含み、各切断認識配列は同じプロテアーゼまたは異なるプロテアーゼによって認識される、本発明1138のキメラ膜貫通受容体ポリペプチド。

[本発明1140]

切断認識配列が、アクロモペプチダーゼ、アミノペプチダーゼ、アングロッド、アンジオテンシン変換酵素、プロメライン、カルパイン、カルパインI、カルパインII、カルボキシペプチダーゼA、カルボキシペプチダーゼB、カルボキシペプチダーゼG、カルボキシペプチダーゼP、カルボキシペプチダーゼW、カルボキシペプチダーゼY、カスパーゼ1、カスパーゼ2、カスパーゼ3、カスパーゼ4、カスパーゼ5、カスパーゼ6、カスパーゼ7、カ

50

スパーゼ8、カスパーゼ9、カスパーゼ10、カスパーゼ11、カスパーゼ12、カスパーゼ13、カテプシンB、カテプシンC、カテプシンD、カテプシンE、カテプシンG、カテプシンH、カテプシンL、キモパイン、キマーゼ、キモトリプシン、クロストリパイン、コラゲナーゼ、補体C1r、補体C1s、補体因子D、補体因子I、ククミシン、ジペプチジルペプチダーゼIV、エラスターゼ（白血球）、エラスターゼ（臍）、エンドプロテイナーゼArg-C、エンドプロテイナーゼAsp-N、エンドプロテイナーゼGlu-C、エンドプロテイナーゼLys-C、エンテロキナーゼ、第Xa因子、フィシン、フェーリン、グランザイムA、グランザイムB、HIVプロテアーゼ、IGase、組織カリクレイン、ロイシニアミノペプチダーゼ（全般）、ロイシニアミノペプチダーゼ（サイトゾル）、ロイシニアミノペプチダーゼ（ミクロソーム）、マトリックスメタロプロテアーゼ、メチオニンアミノペプチダーゼ、ニュートラーゼ、パパン、ペプシン、プラスミン、プロリダーゼ、プロナーゼE、前立腺特異抗原、ストレプトミセス・グリセウス由来の好アルカリ性プロテアーゼ、アスペルギルス由来のプロテアーゼ、アスペルギルス・サイトイ由来のプロテアーゼ、ショウユコウジカビ由来のプロテアーゼ、プロテアーゼ（B.リケニフォルミス）（アルカリ性またはアルカラーゼ）、バチルス・ポリミキサ由来のプロテアーゼ、バチルス属の種由来のプロテアーゼ、クモノスカビ属の種由来のプロテアーゼ、プロテアーゼS、プロテアソーム、コウジカビ由来のプロテイナーゼ、プロテイナーゼ3、プロテイナーゼA、プロテイナーゼK、プロテインC、ピログルタミン酸アミノペプチダーゼ、レンニン、レンニン、ストレプトキナーゼ、サブチリシン、サーモライシン、トロンピン、組織プラスミノゲン活性化因子、トリプシン、トリプターゼおよびウロキナーゼからなる群より選択されるプロテアーゼによって認識される、本発明1138のキメラ膜貫通受容体ポリペプチド。

10

20

[本発明1141]

細胞の特異的領域へ受容体を輸送させる少なくとも1つの標的指向ペプチドをさらに含む、本発明1108のキメラ膜貫通受容体ポリペプチド。

[本発明1142]

標的指向ペプチドが、核、ミトコンドリア、小胞体（ER）、クロロプラスト、ペルオキシソームまたは形質膜へ受容体を輸送させる、本発明1141のキメラ膜貫通受容体ポリペプチド。

[本発明1143]

標的指向ペプチドが核外移行シグナル（NES）を含む、本発明1141のキメラ膜貫通受容体ポリペプチド。

30

[本発明1144]

標的指向ペプチドが、形質膜を標的とするペプチドを含む、本発明1141のキメラ膜貫通受容体ポリペプチド。

[本発明1145]

標的指向ペプチドがアクチュエータモエティに連結されている、本発明1141のキメラ膜貫通受容体ポリペプチド。

[本発明1146]

標的指向ペプチドが核局在化シグナル（NLS）を含む、本発明1145のキメラ膜貫通受容体ポリペプチド。

40

[本発明1147]

アクチュエータモエティに連結されたNLSを含む標的指向ペプチドが、切断認識部位における切断によるGMPからのアクチュエータモエティの放出に続いて、細胞の核へアクチュエータモエティを輸送させる、本発明1146のキメラ膜貫通受容体ポリペプチド。

【0055】

参照による組み入れ

この明細書において言及する刊行物、特許、および特許出願はすべて、個々の刊行物、特許、または特許出願について参照により本明細書に組み入れられることを具体的かつ個別に示した場合と同じ程度に、参照により本明細書に組み入れられる。

【0056】

50

本発明の新規な特徴については、添付の特許請求の範囲に具体的に示す。本発明の特徴および利点は、本発明の原理が利用されている説明のための態様を示す以下の詳細な説明と添付の図面とを参照することによって、より良く理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0057】

【図1】抗原相互作用ドメイン、免疫細胞シグナル伝達ドメイン、および遺伝子調整ポリペプチド(GMP)を含む、例示的キメラ膜貫通受容体ポリペプチドを示す図である。

【図2】少なくとも1つの共刺激ドメインを含む例示的キメラ膜貫通受容体ポリペプチドを示す図である。

【図3】図3Aは、ガイド核酸(例えばsgRNA)と複合体形成していてもよいRNA結合タンパク質を含むアクチュエータモエティを含む、例示的キメラ受容体ポリペプチドを示す図である。図3Bは、抗原相互作用ドメイン、免疫細胞シグナル伝達ドメイン、および遺伝子調整ポリペプチド(GMP)を含むキメラ膜貫通受容体ポリペプチドと、切断モエティを含むキメラアダプターポリペプチドとを含む、例示的システムを示す図である。

10

【図4】図4A~図4Dは、リン酸化を受ける受容体を含むシステムにおけるGMPからのアクチュエータモエティの放出を模式的に図解している。図4E~図4Hは、コンフォメーション変化を起こす受容体を含むシステムにおけるGMPからのアクチュエータモエティの放出を模式的に図解している。

【図5】少なくとも1つの標的指向配列を含む例示的キメラ膜貫通受容体ポリペプチドを示す図である。

20

【図6】図6Aは、受容体結合モエティと遺伝子調整ポリペプチド(GMP)とを含む例示的キメラアダプターポリペプチドを示す図である。図6Bは、ガイド核酸(例えばsgRNA)と複合体形成していてもよいRNA結合タンパク質を含むアクチュエータモエティを含む、例示的キメラアダプターポリペプチドを示す図である。

【図7】受容体結合モエティおよび遺伝子調整ポリペプチド(GMP)を含むキメラアダプターポリペプチドと、切断モエティを含むキメラ膜貫通受容体ポリペプチドとを含む、例示的システムを示す図である。

【図8】図8A~図8Dは、リン酸化を受ける受容体を含むシステムにおけるGMPからのアクチュエータモエティの放出を模式的に図解している。図8E~図8Hは、コンフォメーション変化を起こす受容体を含むシステムにおけるGMPからのアクチュエータモエティの放出を模式的に図解している。

30

【図9】受容体結合モエティおよび遺伝子調整ポリペプチド(GMP)を含むキメラアダプターポリペプチドと、切断モエティを含む第2アダプターポリペプチドと、キメラ膜貫通受容体ポリペプチドとを含む、例示的システムを示す図である。

【図10】図10A~図10Dは、少なくとも2つのアダプターポリペプチドとリン酸化を受ける受容体とを含むシステムにおけるGMPからのアクチュエータモエティの放出を模式的に図解している。図10E~図10Hは、少なくとも2つのアダプターポリペプチドと受容体とを代替的コンフィギュレーションで含むシステムにおけるGMPからのアクチュエータモエティの放出を模式的に図解している。

【図11】少なくとも1つの標的指向配列を含む例示的キメラアダプターポリペプチドを示す図である。

40

【図12】図12A~図12Dは、切断認識部位がインテイン配列を含むシステムを模式的に図解している。図12E~図12Hは、切断認識部位がインテイン配列を含むシステムの代替的配置を図解している。

【図13】図13A~図13Dは、切断認識部位がジスルフィド結合を含むシステムを模式的に図解している。図13E~図13Hは、切断認識部位がジスルフィド結合を含むシステムの代替的配置を図解している。

【図14】リンパ球においてIL-1を抑制するための、本明細書に開示するシステムの使用を図解している。

【図15】リンパ球においてPD-1を抑制するための、本明細書に開示するシステムの使用

50

を図解している。

【図16】免疫細胞において外因性プラスミドから第2キメラ受容体を発現させるための、本明細書に開示するシステムの使用を図解している。

【図17】Makarova, K.S. et al, 「An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems」Nat Rev Microbiol (2015) 13:722-736の図2から採った図であり、これは、CRISPR-Casシステムのサブタイプについて、ゲノム座位のアーキテクチャを示している。

【図18】図18A~Dは、少なくとも2つのアダプターポリペプチドを含むシステムにおけるGMPからのアクチュエータモエティの放出を模式的に図解している。

【図19】GMPが第1キメラ膜貫通受容体ポリペプチドの一部を形成し、切断モエティが第2キメラ膜貫通受容体ポリペプチドの一部を形成しているシステムの図解である。

【図20】dCas9-KRABドメインがプロテアーゼの存在下でキメラ受容体から切断されることを、ウェスタンブロット分析によって示す図である。

【図21】dCas9-KRABドメインがアダプタープロテアーゼの存在下でキメラ受容体から切断されることを、ウェスタンブロット分析によって示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0058】

発明の詳細な説明

本明細書において開示するいくつかの方法の実施では、別段の表示がある場合を除き、当技術分野の技能の範囲内にある、従来の免疫学、生化学、化学、分子生物学、微生物学、細胞生物学、ゲノミクスおよび組換えDNAの技法を使用する。例えばSambrook and Green, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4th Edition (2012)、*Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel, et al. eds.) シリーズ、*Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.) シリーズ、*PCR 2: A Practical Approach* (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995))、*Harlow and Lane, eds. (1988) Antibodies, A Laboratory Manual*、および*Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, 6th Edition (R.L. Freshney, ed. (2010)) を参照されたい。

【0059】

本明細書および特許請求の範囲において使用される場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」は、文脈上そうでないことが明らかである場合を除き、複数の指示対象を包含する。例えば「キメラ膜貫通受容体ポリペプチド」(a chimeric transmembrane receptor polypeptide) という用語は、複数のキメラ膜貫通受容体ポリペプチドを包含する。

【0060】

「約」または「およそ」という用語は、当業者によって決定される特定の値に関して、許容誤差範囲内であることを意味し、これは、その値が測定または決定される方法、すなわち測定システムの制約に一部依存するであろう。例えば「約」は、当技術分野における慣例によれば、1(または1超の)標準偏差内であることを意味することができる。あるいは、「約」は、所与の値の20%まで、10%まで、5%まで、または1%までの範囲を意味することができる。あるいは、特に生物学的なシステムまたは過程に関して、この用語は、ある値の一桁以内、好ましくは5分の1~5倍以内、より好ましくは2分の1~2倍以内を意味することができる。本願および特許請求の範囲において特定の値が記載される場合は、別段の言明がある場合を除き、その特定の値の許容誤差範囲内を意味する用語「約」が想定されるべきである。

【0061】

本明細書において使用される場合、「細胞」とは、一般に、生物学的細胞を指すことができる。細胞は、生きている生物の基本的な構造、機能および/または生物学的単位であることができる。細胞は、1つまたは複数の細胞を有する任意の生物に由来することができる。いくつかの非限定的な例として、原核細胞、真核細胞、細菌細胞、古細菌細胞、単細胞

10

20

30

40

50

真核生物の細胞、原生動物細胞、植物からの細胞（例えば作物、果実、野菜、穀物、ダイズ、コーン（corn）、トウモロコシ（maize）、コムギ、種子、トマト、コメ、キャッサバ、サトウキビ、カボチャ、まぐさ、ジャガイモ、ワタ、麻、タバコ、顕花植物、針葉樹、裸子植物、シダ、ヒカゲノカズラ類、ツノゴケ類、苔類（liverworts）、蘚類（mosses）からの細胞）、藻類細胞（例えばボツリオコッカス・ブラウニー（*Botryococcus braunii*）、コナミドリムシ（*Chlamydomonas reinhardtii*）、ナンノクロロプシス・ガディタナ（*Nannochloropsis gaditana*）、クロレラ・ピレノイドーサ（*Chlorella pyrenoidosa*）、ヤツマタモク（*Sargassum patens* C. Agardh）など）、海藻（例えばケルプ）、真菌細胞（例えば酵母細胞、キノコからの細胞）、動物細胞、無脊椎動物（例えばミバエ、刺胞動物、棘皮動物、線虫など）からの細胞、脊椎動物（例えば魚類、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳動物）からの細胞、哺乳動物（例えばブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、齧歯類、ラット、マウス、非ヒト霊長類、ヒトなど）からの細胞などが挙げられる。場合によっては、細胞は天然の生物に由来しない（例えば細胞は、合成的に作製された、時に人工細胞と呼ばれる、細胞であることができる）。

10

【0062】

本明細書において使用される「抗原」という用語は、選択的結合作用物質によって結合されうる分子またはそのフラグメントを指す。一例として、抗原は、受容体などの選択的結合作用物質によって結合されうるリガンドであることができる。別の例として、抗原は、免疫学的タンパク質（例えば抗体）などの選択的結合作用物質によって結合されうる抗原分子であることができる。抗原は、当該抗原に結合する能力を有する抗体を生産するために動物において使用することができる分子またはそのフラグメントを指すこともできる。

20

【0063】

本明細書において使用される「抗体」という用語は、免疫グロブリン様の機能を持つタンパク質性結合分子を指す。抗体という用語は、抗体（例えばモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体）、ならびにその誘導体、バリエーション、およびフラグメントを包含する。抗体としては、異なるクラス（すなわち、IgA、IgG、IgM、IgDおよびIgE）およびサブクラス（IgG1、IgG2など）の免疫グロブリン（Ig）が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。その誘導体、バリエーションまたはフラグメントとは、対応する抗体の（例えば完全なおよび/または部分的な）結合特性を保持している機能的な誘導体またはフラグメントを指しうる。抗原結合性フラグメントには、Fab、Fab'、F(ab')₂、可変フラグメント（Fv）、単鎖可変フラグメント（scFv）、ミニボディ、ダイアボディ、および単ドメイン抗体（「sdAb」または「ナノボディ」または「キャメルイド（camelid）」）がある。抗体という用語は、最適化された、または工学的に操作された、または化学的にコンジュゲートされた、抗体および抗体の抗原結合性フラグメントを包含する。最適化された抗体の例として、親和性成熟抗体が挙げられる。工学的に操作された抗体の例として、Fc最適化抗体（例えばFc（fragment crystallizable）領域が最適化された抗体）および多重特異性抗体（例えば二重特異性抗体）が挙げられる。

30

【0064】

本明細書において使用される「Fc受容体」または「FcR」という用語は、一般に、抗体のFc領域に結合することができる受容体、またはその任意の誘導体、バリエーションもしくはフラグメントを指す。一定の態様において、FcRは、IgG抗体（ガンマ受容体、FcガンマR）に結合するものであり、これには、FcガンマRI（CD64）、FcガンマRII（CD32）、およびFcガンマRIII（CD16）サブクラスの受容体が、これらの受容体のアレルバリエーションおよび選択的スプライスタイプを含めて、包含される。FcガンマRII受容体には、FcガンマRIIA（「活性化受容体」）およびFcガンマRIIB（「阻害受容体」）があり、これらは、主としてその細胞質ドメインが異なる類似のアミノ酸配列を有する。「FcR」という用語は、胎児への母性IgGの移行を担う新生児型受容体、FcRnも包含する。

40

【0065】

本明細書において使用される「ヌクレオチド」という用語は、一般に、塩基-糖-リン酸の組合せを指す。ヌクレオチドは合成ヌクレオチドを含むことができる。ヌクレオチドは合

50

成ヌクレオチド類似体を含むことができる。ヌクレオチドは、核酸配列（例えばデオキシリボ核酸（DNA）およびリボ核酸（RNA））の単量体単位であることができる。ヌクレオチドという用語は、リボヌクレオシド三リン酸である、アデノシン三リン酸（ATP）、ウリジン三リン酸（UTP）、シトシン三リン酸（CTP）、グアノシン三リン酸（GTP）およびdATP、dCTP、dITP、dUTP、dGTP、dTTPなどのデオキシリボヌクレオシド三リン酸、またはそれらの誘導体を包含しうる。そのような誘導体としては、例えば[S] dATP、7-デアザ-dGTPおよび7-デアザ-dATP、ならびに当該誘導体を含有する核酸分子にヌクレアーゼ耐性を付与するヌクレオチド誘導体を挙げるることができる。本明細書において使用されるヌクレオチドという用語は、ジデオキシリボヌクレオシド三リン酸（ddNTP）およびそれらの誘導体を指しうる。ジデオキシリボヌクレオシド三リン酸の具体例としては、ddATP、ddCTP、ddGTP、ddITP、およびddTTPを挙げるができるが、それらに限定されるわけではない。ヌクレオチドは無標識であることも、周知の技法によって検出可能に標識されていることもできる。標識化は、量子ドットで実行することもできる。検出可能なラベルとしては、例えば放射性同位体、蛍光ラベル、化学発光ラベル、生物発光ラベルおよび酵素ラベルを挙げるができる。ヌクレオチドの蛍光ラベルとしては、フルオレセイン、5-カルボキシフルオレセイン（FAM）、2'7'-ジメトキシ-4'5'-ジクロロ-6-カルボキシフルオレセイン（JOE）、ローダミン、6-カルボキシローダミン（R6G）、N,N,N',N'-テトラメチル-6-カルボキシローダミン（TAMRA）、6-カルボキシ-X-ローダミン（ROX）、4-(4'ジメチルアミノフェニルアゾ)安息香酸（DABCYL）、Cascade Blue、Oregon Green、Texas Red、シアニンおよび5-(2'-アミノエチル)アミノナフタレン-1-スルホン酸（EDANS）を挙げるができるが、それらに限定されるわけではない。蛍光標識ヌクレオチドの具体例としては、Perkin Elmer（カリフォルニア州フォスターシティ）から入手できる[R6G]dUTP、[TAMRA]dUTP、[R110]dCTP、[R6G]dCTP、[TAMRA]dCTP、[JOE]ddATP、[R6G]ddATP、[FAM]ddCTP、[R110]ddCTP、[TAMRA]ddGTP、[ROX]ddTTP、[dR6G]ddATP、[dR110]ddCTP、[dTAMRA]ddGTP、および[dROX]ddTTP; Amersham（イリノイ州アーリントンハイツ）から入手できるFluoroLinkデオキシヌクレオチド、FluoroLink Cy3-dCTP、FluoroLink Cy5-dCTP、FluoroLink Fluor X-dCTP、FluoroLink Cy3-dUTP、およびFluoroLink Cy5-dUTP; Boehringer Mannheim（インディアナ州インディアナポリス）から入手できるフルオレセイン-15-dATP、フルオレセイン-12-dUTP、テトラメチル-ローダミン-6-dUTP、IR770-9-dATP、フルオレセイン-12-ddUTP、フルオレセイン-12-UTP、およびフルオレセイン-15-2'-dATP;ならびにMolecular Probes（オレゴン州ユージーン）から入手できる染色体標識ヌクレオチド（Chromosome Labeled Nucleotide）、BODIPY-FL-14-UTP、BODIPY-FL-4-UTP、BODIPY-TMR-14-UTP、BODIPY-TMR-14-dUTP、BODIPY-TR-14-UTP、BODIPY-TR-14-dUTP、Cascade Blue-7-UTP、Cascade Blue-7-dUTP、フルオレセイン-12-UTP、フルオレセイン-12-dUTP、Oregon Green 488-5-dUTP、Rhodamine Green-5-UTP、Rhodamine Green-5-dUTP、テトラメチルローダミン-6-UTP、テトラメチルローダミン-6-dUTP、Texas Red-5-UTP、Texas Red-5-dUTP、およびTexas Red-12-dUTPを挙げることができる。ヌクレオチドは化学修飾によって標識またはマークすることもできる。化学修飾された単独ヌクレオチドは、ビオチン-dNTPであることができる。ビオチン化dNTPのいくつかの非限定的例としては、ビオチン-dATP（例えばbio-N6-ddATP、ビオチン-14-dATP）、ビオチン-dCTP（例えばビオチン-11-dCTP、ビオチン-14-dCTP）、およびビオチン-dUTP（例えばビオチン-11-dUTP、ビオチン-16-dUTP、ビオチン-20-dUTP）を挙げることができる。

【 0 0 6 6 】

「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「核酸」という用語は、任意の長さのポリマー型のヌクレオチド（デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドのいずれか）またはその類似体（一本鎖型、二本鎖型、または複数本鎖型のいずれか）を指すために、可換的に使用される。ポリヌクレオチドは細胞にとって外因性または内在性であることができる。ポリヌクレオチドは無細胞環境に存在することができる。ポリヌクレオ

10

20

30

40

50

チドは遺伝子またはそのフラグメントであることができる。ポリヌクレオチドはDNAであることができる。ポリヌクレオチドはRNAであることができる。ポリヌクレオチドは任意の三次元構造を有することができる、公知または未知の任意の機能を果たすことができる。ポリヌクレオチドは、1つまたは複数の類似体（例えば改変された主鎖、糖、または核酸塩基）を含むことができる。ヌクレオチド構造への修飾が存在する場合、その修飾は、ポリマーの組み立ての前または後に加えることができる。類似体のいくつかの非限定的な例として、5-プロモウラシル、ペプチド核酸、キセノ核酸、モルホリノ類（morpholinos）、ロックト核酸、グリコール核酸、トレオース核酸、ジデオキシヌクレオチド、コルジセピン、7-デアザ-GTP、発蛍光団（例えば糖に連結されたローダミンまたはフルオレセイン）、チオール含有ヌクレオチド、ビオチン連結ヌクレオチド、蛍光塩基類似体、CpGアイランド、メチル-7-グアノシン、メチル化ヌクレオチド、イノシン、チオウリジン、プソイドウリジン（pseudouridine）、ジヒドロウリジン、キューオシン、およびワイオシンが挙げられる。ポリヌクレオチドの非限定的な例として、遺伝子または遺伝子フラグメントのコーディング領域またはノンコーディング領域、連鎖解析から規定される1つまたは複数の座位、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA（mRNA）、トランスファーRNA（tRNA）、リボソームRNA（rRNA）、短鎖干渉RNA（siRNA）、低分子ヘアピン型RNA（shRNA）、マイクロRNA（miRNA）、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたDNA、任意の配列の単離されたRNA、無細胞DNA（cfDNA）および無細胞RNA（cfRNA）を含む無細胞ポリヌクレオチド、核酸プローブ、ならびにプライマーが挙げられる。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド構成要素によって中断されていてもよい。

【0067】

本明細書において使用される「遺伝子」という用語は、RNA転写産物のコーディングに関与する核酸（例えばゲノムDNAおよびcDNAなどのDNA）および対応するそのヌクレオチド配列を指す。ゲノムDNAに関して本明細書で使用されるこの用語は、介在領域、ノンコーディング領域、ならびに調節領域を包含し、5'端および3'端を含むことができる。いくつかの使用例において、この用語は、5'および3'非翻訳領域（5'-UTRおよび3'-UTR）、エクソンおよびイントロンを含む転写配列を包含する。いくつかの遺伝子において、転写配列は、ポリペプチドをコードする「オープンリーディングフレーム」を含有するであろう。この用語のいくつかの使用例において、「遺伝子」は、ポリペプチドをコードするのに必要なコーディング配列（例えば「オープンリーディングフレーム」または「コーディング領域」）だけを含む。例えばリボソームRNA遺伝子（rRNA）およびトランスファーRNA（tRNA）遺伝子など、遺伝子がポリペプチドをコードしない場合もある。場合により、「遺伝子」という用語は、転写される配列だけでなく、上流および下流の調節領域、エンハンサーおよびプロモーターなどといった、非転写領域も含む。遺伝子は、ある生物のゲノムにおいてそれ本来の場所にある「内在性遺伝子」またはネイティブ遺伝子を指すことができる。遺伝子は「外因性遺伝子」または非ネイティブ遺伝子を指すことができる。非ネイティブ遺伝子とは、宿主細胞中に通常は見いだされないが遺伝子移入によって宿主生物中に導入される遺伝子を指すことができる。非ネイティブ遺伝子は、ある生物のゲノムにおいてそれ本来の場所のない遺伝子を指すこともできる。非ネイティブ遺伝子は、突然変異、挿入および/または欠失（例えば非ネイティブ配列）を含む天然の核酸またはポリペプチド配列を指すこともできる。

【0068】

本明細書において使用される「標的ポリヌクレオチド」および「標的核酸」という用語は、本開示のアクチュエータモエティが標的とする核酸またはポリヌクレオチドを指す。標的ポリヌクレオチドはDNA（例えば内在性または外因性）であることができる。DNAは、mRNA転写産物を生成させるためのテンプレートおよび/またはDNAテンプレートからのmRNAの転写を調節するさまざまな調節領域を指すことができる。標的ポリヌクレオチドは、より大きなポリヌクレオチドの、例えば染色体または染色体の一領域の、一部分であることができる。標的ポリヌクレオチドは、染色体外配列（例えばエピソーム配列、ミニサ

ークル配列、ミトコンドリア配列、クロロプラスト配列など)または染色体外配列の一領域を指すことができる。標的ポリヌクレオチドはRNAであることができる。RNAは、例えば、タンパク質をコードするテンプレートとして役立つmRNAであることができる。RNAを含む標的ポリヌクレオチドは、mRNAテンプレートからのタンパク質の翻訳を調節するさまざまな調節領域を含むことができる。標的ポリヌクレオチドは、遺伝子産物をコードするか(例えばRNA転写産物をコードするDNA、またはタンパク質産物をコードするRNA)、遺伝子産物の発現を調節する調節配列を含むことができる。一般に、「標的配列」という用語は、標的核酸の単一鎖上の核酸配列を指す。標的配列は、遺伝子、調節配列、ゲノムDNA、cfDNAおよび/またはcfRNAを含む無細胞核酸、cDNA、融合遺伝子、ならびにmRNA、miRNA、rRNAを含むRNAなどの一部分であることができる。標的ポリヌクレオチドは、アクチュエータモエティの標的となった場合に、改変された遺伝子発現および/または遺伝子活性をもたらすことができる。標的ポリヌクレオチドは、アクチュエータモエティの標的となった場合に、編集された核酸配列をもたらすことができる。標的核酸は、単一のヌクレオチド置換ゆえに核酸試料中の他のどの配列とも関連しえない核酸配列を含むことができる。標的核酸は、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のヌクレオチド置換ゆえに核酸試料中の他のどの配列とも関連しえない核酸配列を含むことができる。いくつかの態様において、置換は、標的核酸の5'端から5、10、15、20、25、30、または35ヌクレオチド以内には存在しえない。いくつかの態様において、置換は、標的核酸の3'端から5、10、15、20、25、30、35ヌクレオチド以内には存在しえない。

【0069】

「発現」という用語は、ポリヌクレオチドがDNAテンプレートから(例えばmRNAまたは他のRNA転写産物などに)転写される1つまたは複数の過程、および/または転写されたmRNAが、次いでペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質に翻訳される過程を指す。転写産物とコードされているポリペプチドとを「遺伝子産物」と総称することができる。ポリヌクレオチドがゲノムDNAに由来する場合、発現は真核細胞におけるmRNAのスプライシングを含みうる。発現に関して「アップレギュレートされた」とは、一般に、ポリヌクレオチド(例えばmRNAなどのRNA)配列および/またはポリペプチド配列の、野生型状態におけるその発現レベルと比較して増加した、発現レベルを指し、「ダウンレギュレートされた」とは、一般に、ポリヌクレオチド(例えばmRNAなどのRNA)配列および/またはポリペプチド配列の、野生型状態におけるその発現レベルと比較して減少した、発現レベルを指す。

【0070】

本明細書において使用される「相補体」(complement、complements)、「相補的」および「相補性」という用語は、一般に、所与の配列に完全に相補的であり、ハイブリダイズすることができる配列を指す。場合により、所与の配列とハイブリダイズする配列は、その塩基の配列が所与の領域においてその結合パートナーの塩基に、例えばA-T、A-U、G-C、およびG-U塩基対が形成されるように相補的に結合する能力を有するのであれば、当該所与の分子の「相補体」または「逆相補体」と呼ばれる。一般に、第2配列にハイブリダイズすることができる第1配列は、ハイブリダイゼーション反応中に、第2配列または第2配列セットへのハイブリダイゼーションが、非標的配列とのハイブリダイゼーションよりも、好ましくなる(例えば、所与の条件セット下で、例えば当技術分野においてよく使用されるストリンジェントな条件下で、熱力学的により安定になる)ように、第2配列に特異的または選択的にハイブリダイズすることができる。通例、ハイブリダイズ可能な配列同士は、各々の長さの全部または一部分にわたって、ある度合の配列相補性、例えば25%~100%の相補性、例えば少なくとも25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、および100%の配列相補性を共有する。例えば相補性パーセントを評価するなどの目的で、配列同一性を、任意の適切なアラインメントアルゴリズムによって、例えば限定するわけではないが、Needleman-Wunschアルゴリズム(例えばwww.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.htmlにおいて、任意でデ

フォルト設定で、利用することができるEMBOSS Needleアライナーを参照されたい)、BLASTアルゴリズム(例えばblast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgiにおいて、任意でデフォルト設定で、利用することができるBLASTアラインメントツールを参照されたい)、またはSmith-Watermanアルゴリズム(例えばwww.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/nucleotide.htmlにおいて、任意でデフォルト設定で、利用することができるEMBOSS Waterアライナーを参照されたい)によって、測定することができる。最適アラインメントは、選ばれたアルゴリズムの任意の適切なパラメータを使って、例えばデフォルトパラメータを使って、評価することができる。

【0071】

相補性は、完全な相補性であるか、実質的/十分な相補性であることができる。2つの核酸間の完全な相補性は、デュプレックス(duplex)中の各塩基がワトソン-クリックペアリングによって相補的塩基に結合しているデュプレックスを、それら2つの核酸が形成できることを意味する。実質的なまたは十分な相補性は、一方の鎖中の配列が、反対鎖中の配列に完全にはおおよび/または完璧には相補的でないが、一組のハイブリダイゼーション条件(例えば塩濃度および温度)下で、それら2つの鎖上の塩基間には十分な結合が生じて、安定なハイブリッド複合体を形成することを意味する。そのような条件は、配列と標準的な数学的計算とを使ってハイブリダイズした鎖のT_mを予測することによって、または常法を使ってT_mを実験的に決定することによって、予測することができる。

10

【0072】

発現または活性に関して「調節する」という用語は、本明細書において使用される場合、発現または活性のレベルを変化させることを指す。調節は、転写レベルおよび/または翻訳レベルで起こりうる。

20

【0073】

「ペプチド」、「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、本明細書では、ペプチド結合によって接合された少なくとも2アミノ酸残基のポリマーを指すために、可換的に使用される。この用語は、特別な長さのポリマーを意味せず、そのペプチドが組換え技法を使って生産されるか、化学的合成または酵素的合成を使って生産されるか、天然物であるかどうかを、含意もしくはは区別することも意図されていない。この用語は、天然のアミノ酸ポリマーにも、少なくとも1つの修飾アミノ酸を含むアミノ酸ポリマーにも適用される。場合により、ポリマーは非アミノ酸によって中断されていてもよい。この用語は、完全長タンパク質を含む任意の長さのアミノ酸鎖、ならびに二次構造および/または三次構造(例えばドメイン)を持つまたは持たないタンパク質を包含する。この用語は、例えばジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、酸化、および他の任意の操作、例えば標識構成要素とのコンジュゲーションなどによって修飾されたアミノ酸ポリマーも包含する。本明細書において使用される「アミノ酸」(amino acidおよびamino acids)という用語は、一般に、天然アミノ酸および非天然アミノ酸、例えば限定するわけではないが、修飾アミノ酸およびアミノ酸類似体を指す。修飾アミノ酸には、アミノ酸上に天然には存在しない基または化学モエティを含むように化学的に修飾された天然アミノ酸および非天然アミノ酸を含めることができる。アミノ酸類似体は、アミノ酸誘導体を指すことができる。「アミノ酸」という用語はD-アミノ酸とL-アミノ酸をどちらも包含する。

30

40

【0074】

「誘導体」、「バリエント」および「フラグメント」という用語は、ポリペプチドに関して本明細書において使用される場合、例えばアミノ酸配列、構造(例えば二次構造および/または三次構造)、活性(例えば酵素活性)および/または機能のいずれかが野生型ポリペプチドと関連するポリペプチドを指す。ポリペプチドの誘導体、バリエントおよびフラグメントは、野生型ポリペプチドと比較して、1つまたは複数のアミノ酸変異(例えば突然変異、挿入、および欠失)、トラスケーション、修飾、またはそれらの組合せを含むことができる。

【0075】

50

本明細書において使用される「同一性パーセント(%)」という用語は、最大の同一性パーセントが達成されるように配列をアラインメントし、必要であればギャップを導入した後に(すなわち最適アラインメントのために候補配列およびリファレンス配列の一方または両方にギャップを導入することができ、比較という目的には非相同配列を無視することができる)、リファレンス配列のアミノ酸(または核酸)残基と同一である候補配列のアミノ酸(または核酸)残基のパーセンテージを指す。同一性パーセントを決定するためのアラインメントは、当技術分野における技量の範囲内にあるさまざまな方法で、例えばBLAST、ALIGNまたはMegalign(DNASTAR)ソフトウェアなどの公に利用できるコンピュータソフトウェアを使って達成することができる。2つの配列の同一性パーセントは、BLASTを使って試験配列を比較配列とアラインメントし、アラインメントされた試験配列中のアミノ酸またはヌクレオチドのうち、比較配列中の同じ位置にあるアミノ酸またはヌクレオチドと同一であるものの数を決定し、同一アミノ酸またはヌクレオチドの数を比較配列中のアミノ酸またはヌクレオチドの数で割ることによって、計算することができる。

10

【0076】

本明細書において使用される「遺伝子調整ポリペプチド」または「GMP」という用語は、発現または活性を調節する能力および/または核酸配列を編集する能力を有するアクチュエータモエティを、少なくとも含むポリペプチドを指す。GMPは、遺伝子発現の調整には関与しない追加ペプチド配列、例えば切断認識部位、リンカー配列、標的指向配列などを含むことができる。

【0077】

20

本明細書において使用される「アクチュエータモエティ」という用語は、外因性であるか内在性であるかを問わず遺伝子の発現または活性を調節することおよび/または核酸配列を編集することができるモエティを指す。アクチュエータモエティは、遺伝子の発現を転写レベルおよび/または翻訳レベルで調節することができる。アクチュエータモエティは、例えば染色体DNAまたはcDNAなどのDNAからのmRNAの生産を調節することによって、遺伝子発現を転写レベルで調節することができる。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、特異的DNA配列に結合することでDNAからmRNAへの転写の速度を制御する、少なくとも1つの転写因子を動員する。アクチュエータモエティは、それ自身がDNAに結合して、例えばRNAポリメラーゼなどのタンパク質および他の関連タンパク質がDNAテンプレート上で集合することを防ぐ物理的妨害によって、転写を調節することができる。アクチュエータモエティは、例えばmRNAテンプレートからのタンパク質の生産を調節することにより、翻訳レベルで遺伝子の発現を調節することができる。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、mRNA転写産物の安定性に影響を及ぼすことによって、遺伝子発現を調節する。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、核酸配列(例えばゲノムの一領域)を編集することによって遺伝子の発現を調節する。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、mRNAテンプレートを編集することによって、遺伝子の発現を調節する。核酸配列の編集は、場合によっては、根底にある、遺伝子発現のためのテンプレートを変化させることができる。

30

【0078】

本明細書にいうCasタンパク質は、あるタイプのタンパク質またはポリペプチドであることができる。Casタンパク質はヌクレアーゼを指しうる。Casタンパク質はエンドリボヌクレアーゼを指しうる。Casタンパク質は、当該Casタンパク質の任意の修飾(例えば短縮型、突然変異型、延長型)ポリペプチド配列またはホモログを指しうる。Casタンパク質はコドン最適化することができる。Casタンパク質はCasタンパク質のコドン最適化ホモログであることができる。Casタンパク質は、酵素的に不活性、部分的に活性、構成的に活性、完全に活性、誘導性に活性、および/またはより活性(例えば当該タンパク質またはポリペプチドの野生型ホモログより活性)であることができる。Casタンパク質はCas9であることができる。Casタンパク質はCpf1であることができる。Casタンパク質はC2c2であることができる。Casタンパク質(例えばバリエーション、突然変異型、酵素不活性型および/または条件付き酵素不活性型の部位指向性(site-directed)ポリペプチド)は、標的核酸に

40

50

結合することができる。Casタンパク質（例えばバリエーション、突然変異型、酵素不活性型および/または条件付き酵素不活性型のエンドリボヌクレアーゼ）は、標的RNAまたは標的DNAに結合することができる。

【0079】

本明細書において使用される「crRNA」という用語は、一般に、野生型の例示的crRNA（例えば化膿連鎖球菌（*S. pyogenes*）由来のcrRNA）に対して少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%の配列同一性および/または配列類似性を持つ核酸を指すことができる。crRNAは、一般に、野生型の例示的crRNA（例えば化膿連鎖球菌由来のcrRNA）に対して、多くて約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%の配列同一性および/または配列類似性を持つ核酸を指すことができる。crRNAは、欠失、挿入、または置換などのヌクレオチド変化を含みうる修飾型のcrRNA、バリエーション、突然変異体、またはキメラを指すことができる。crRNAは、野生型の例示的crRNA（例えば化膿連鎖球菌由来のcrRNA）配列に対し、少なくとも6連続ヌクレオチドのストレッチにわたって、少なくとも約60%の配列同一性を有する核酸であることができる。例えば、crRNA配列は、野生型の例示的crRNA配列（例えば化膿連鎖球菌由来のcrRNA）に対し、少なくとも6連続ヌクレオチドのストレッチにわたって、少なくとも約60%同一、少なくとも約65%同一、少なくとも約70%同一、少なくとも約75%同一、少なくとも約80%同一、少なくとも約85%同一、少なくとも約90%同一、少なくとも約95%同一、少なくとも約98%同一、少なくとも約99%同一、または100%同一であることができる。

10

20

【0080】

本明細書において使用される「tracrRNA」という用語は、一般に、野生型の例示的tracrRNA配列（例えば化膿連鎖球菌由来のtracrRNA）に対して少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%の配列同一性および/または配列類似性を持つ核酸を指すことができる。tracrRNAは、野生型の例示的tracrRNA配列（例えば化膿連鎖球菌由来のtracrRNA）に対して、多くて約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%の配列同一性および/または配列類似性を持つ核酸を指すことができる。tracrRNAは、欠失、挿入、または置換などのヌクレオチド変化を含みうる修飾型のtracrRNA、バリエーション、突然変異体、またはキメラを指すことができる。tracrRNAは、野生型の例示的tracrRNA（例えば化膿連鎖球菌由来のtracrRNA）配列に対し、少なくとも6連続ヌクレオチドのストレッチにわたって、少なくとも約60%同一であることができる核酸を指すことができる。例えば、tracrRNA配列は、野生型の例示的tracrRNA（例えば化膿連鎖球菌由来のtracrRNA）配列に対し、少なくとも6連続ヌクレオチドのストレッチにわたって、少なくとも約60%同一、少なくとも約65%同一、少なくとも約70%同一、少なくとも約75%同一、少なくとも約80%同一、少なくとも約85%同一、少なくとも約90%同一、少なくとも約95%同一、少なくとも約98%同一、少なくとも約99%同一、または100%同一であることができる。

30

【0081】

本明細書において使用される場合、「ガイド核酸」は、別の核酸にハイブリダイズすることができる核酸を指すことができる。ガイド核酸はRNAであることができる。ガイド核酸はDNAであることができる。ガイド核酸は、核酸の配列に部位特異的に結合するようにプログラムすることができる。標的となる核酸、すなわち標的核酸は、ヌクレオチドを含むことができる。ガイド核酸はヌクレオチドを含むことができる。標的核酸の一部は、ガイド核酸の一部に相補的であることができる。二本鎖標的ポリヌクレオチドのうち、ガイド核酸に相補的であってガイド核酸とハイブリダイズする方の鎖を、相補鎖と呼ぶことができる。二本鎖標的ポリヌクレオチドのうち、相補鎖に相補的であり、それゆえにガイド核酸には相補的でありえない方の鎖を、非相補鎖と呼ぶことができる。ガイド核酸は1つのポリヌクレオチド鎖を含むことができ、「シングルガイド核酸（single guide nucleic acid）」と呼ぶことができる。ガイド核酸は2つのポリヌクレオチド鎖を含むことができ、「ダブルガイド核酸（double guide nucleic acid）」と呼ぶことができる。別段の

40

50

明示がなければ、「ガイド核酸」という用語は包括的であって、シングルガイド核酸とダブルガイド核酸の両方を指しうる。

【0082】

ガイド核酸は、「核酸を標的とするセグメント」または「核酸を標的とする配列」と呼ぶことができるセグメントを含むことができる。核酸を標的とするセグメントは、「タンパク質結合セグメント」または「タンパク質結合配列」または「Casタンパク質結合セグメント」と呼ぶことができるサブセグメントを含みうる。

【0083】

ペプチドに関して、本明細書において使用される「切断認識部位」という用語は、ペプチドの部位であって、ペプチド結合またはジスルフィド結合などの化学結合が切断されうる部位を指す。切断はさまざまな方法によって達成することができる。ペプチド結合の切断は、例えばプロテアーゼなどの酵素によって、またはタンパク質スプライシング（例えばインテイン）によって、促進されうる。ジスルフィド結合の切断は、例えばオキシドレダクターゼなどの酵素によって促進されうる。

10

【0084】

本明細書において使用される「標的指向配列」という用語は、細胞内の場所への、例えば形質膜もしくは所与の細胞小器官の膜、核、サイトゾル、ミトコンドリア、小胞体（ER）、ゴルジ、クロロプラスト、アポプラスト、ペルオキシソームまたは他の細胞小器官への、タンパク質の局在化（または保留）を媒介する標的指向ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列を指す。例えば標的指向配列は、タンパク質（例えば受容体ポリペプチドまたはアダプターポリペプチド）を、核局在化シグナル（NLS）を利用して核に、または核外移行シグナル（NES）を利用して細胞核外、例えば細胞質に、またはミトコンドリアを標的とするシグナルを利用してミトコンドリアに、またはER保留シグナルを利用して小胞体（ER）に、またはペルオキシソームを標的とするシグナルを利用してペルオキシソームに、または膜局在化シグナルを利用して形質膜に、またはそれらを組合せて、向かわせることができる。

20

【0085】

本明細書において使用される場合、「融合物」とは、1つまたは複数の非ネイティブ配列（例えばモエティ）を含むタンパク質および/または核酸を指すことができる。融合物は、1つまたは複数の同じ非ネイティブ配列を含むことができる。融合物は1つまたは複数の異なる非ネイティブ配列を含むことができる。融合物はキメラであることができる。融合物は核酸アフィニティータグを含むことができる。融合物はバーコードを含むことができる。融合物はペプチドアフィニティータグを含むことができる。融合物は、部位指向性ポリペプチドの細胞内局在をもたらしうる（核を標的とするための核局在化シグナル（NLS）、ミトコンドリアを標的とするためのミトコンドリア局在化シグナル、クロロプラストを標的とするためのクロロプラスト局在化シグナル、小胞体（ER）保留シグナルなど）。融合物は、追跡または精製に使用することができる非ネイティブ配列（例えばアフィニティータグ）を提供することができる。融合物は、ビオチンなどの小分子またはAlexa fluor色素、シアニン3色素、シアニン5色素などの色素であることができる。

30

【0086】

融合物は、機能的効果を持つ任意のタンパク質を指すことができる。例えば融合タンパク質は、メチルトランスフェラーゼ活性、デメチラーゼ活性、ジスムターゼ活性、アルキル化活性、脱プリン化活性、酸化活性、ピリミジン二量体形成活性、インテグラーゼ活性、トランスポザーゼ活性、リコンビナーゼ活性、ポリメラーゼ活性、リガーゼ活性、ヘリカーゼ活性、フォトリアーゼ活性またはグリコシラーゼ活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、デアセチラーゼ活性、キナーゼ活性、ホスファターゼ活性、ユビキチンリガーゼ活性、脱ユビキチン化活性、アデニル化活性、脱アデニル化活性、SUMO化活性、脱SUMO化活性、リボシル化活性、脱リボシル化活性、ミリスチル化活性、リモデリング活性、プロテアーゼ活性、オキシドレダクターゼ活性、トランスフェラーゼ活性、ヒドロラーゼ活性、リアーゼ活性、イソメラーゼ活性、シンターゼ活性、シンテターゼ活性、または脱

40

50

ミリストイル化活性を含むことができる。エフェクタータンパク質はゲノム座位を修飾することができる。融合タンパク質はCasタンパク質中の融合物であることができる。融合タンパク質はCasタンパク質中の非ネイティブ配列であることができる。

【0087】

本明細書において使用される場合、「非ネイティブ」とは、ネイティブ核酸またはネイティブタンパク質中に見いだされない核酸またはポリペプチド配列を指す。非ネイティブは、アフィニータグを指すことができる。非ネイティブは融合物を指すことができる。非ネイティブは、突然変異、挿入および/または欠失を含む天然の核酸またはポリペプチド配列を指すこともできる。非ネイティブ配列は、非ネイティブ配列が融合される核酸および/またはポリペプチド配列も呈しうる活性（例えば酵素活性、メチルトランスフェラーゼ活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、キナーゼ活性、ユビキチン化活性など）を呈しかつ/またはコードすることができる。非ネイティブ核酸またはポリペプチド配列を、遺伝子工学により、天然の核酸またはポリペプチド配列（もしくはそのバリエーション）に連結することで、キメラ核酸および/またはポリペプチドをコードするキメラ核酸および/またはポリペプチドを生成させることができる。

10

【0088】

「対象」、「個体」、および「患者」という用語は、脊椎動物、好ましくはヒトなどの哺乳動物を指すために、本明細書では可換的に使用される。哺乳動物としては、マウス、サル、ヒト、農用動物、スポーツ動物、およびペットが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。インビボでまたはインビトロ培養で得られる生物学的実体の組織、細胞およびそれらの子孫も、包含される。

20

【0089】

本明細書において使用される「処置」および「処置する」という用語は、限定するわけではないが治療上の利益および/または予防上の利益を含む有益な結果または望ましい結果を得るためのアプローチを指す。例えば処置は、本明細書に開示するシステムまたは細胞集団を投与する工程を含むことができる。治療上の利益とは、処置を受けている1つまたは複数の疾患、状態、もしくは症状における、またはそれらに対する、治療に関連する改善、または治療に関連する効果を意味する。予防上の利益のためには、特定の疾患、状態、または症状を発症するリスクがある対象に、または疾患の生理学的症状のうちの一つもしくは複数に訴える対象に、たとえそれら疾患、状態、または症状がまだ発現していなくても、組成物を投与することができる。

30

【0090】

「有効量」または「治療有効量」という用語は、組成物、例えば本開示のシステムを含むリンパ球（例えばTリンパ球および/またはNK細胞）などの免疫細胞を含む組成物の、それを必要とする対象に投与したときに所望の活性をもたらすのに十分な量を指す。本開示に関して、「治療的に有効」という用語は、本開示の方法によって処置される障害の症状発現を遅延させ、その進行を停止させ、少なくとも1つのその症状を軽減または緩和するのに十分な組成物の量を指す。

【0091】

一局面において、本開示は、免疫細胞の条件付き調節のためのシステムを提供する。例示的システムは、(a) (i) 抗原に結合する抗原相互作用ドメインを含む細胞外領域と (ii) 免疫細胞シグナル伝達ドメインを含む細胞内領域とを含むキメラ膜貫通受容体ポリペプチド、(b) 受容体ポリペプチドが抗原に結合して修飾を受けたときにキメラ膜貫通受容体ポリペプチドに結合する受容体結合モエティを含むキメラアダプターポリペプチド、(c) 切断認識部位に連結されたアクチュエータモエティを含む遺伝子調整ポリペプチド (GMP)、および (d) 切断認識部位に近接した場合にのみ、切断認識部位を切断してGMPからアクチュエータモエティを放出させる切断モエティを含み、(i) GMPは受容体の細胞内領域の一部を形成し、かつ切断モエティはアダプターポリペプチドの一部を形成するか、(ii) GMPはアダプターポリペプチドの一部を形成し、かつ切断モエティは受容体の細胞内領域の一部を形成するか、または (iii) 切断モエティは、受容体修飾に応答し

40

50

てキメラ膜貫通受容体ポリペプチドに結合する第2アダプターポリペプチドと複合体形成し、かつGMPはキメラアダプターポリペプチドの一部を形成する。

【0092】

本システムのキメラ膜貫通受容体ポリペプチド、キメラアダプターポリペプチド、遺伝子調整ポリペプチド(GMP)、および切断モエティは、さまざまなコンフィギュレーションで配置することができる。例示的コンフィギュレーションにおいて、GMPはキメラ膜貫通受容体ポリペプチドの細胞内領域の一部を形成し、かつ切断モエティはキメラアダプターポリペプチドの一部を形成する。例示的コンフィギュレーションのキメラ膜貫通受容体ポリペプチドは、(a) 抗原に結合する抗原相互作用ドメインを含む細胞外領域と、(b) (i) 免疫細胞シグナル伝達ドメインおよび(ii) 免疫細胞シグナル伝達ドメインに連結された遺伝子調整ポリペプチド(GMP)を含む細胞内領域とを含むことができ、GMPは切断認識部位に連結されたアクチュエータモエティを含み、抗原相互作用ドメインを含むキメラ膜貫通受容体ポリペプチドの細胞外領域に抗原が結合した場合にのみ、切断認識部位の切断によってアクチュエータモエティがGMPから放出される。

10

【0093】

図1に示す具体例において、受容体の細胞外領域は抗原相互作用ドメイン101を含むことができ、細胞内領域は(i) 免疫細胞シグナル伝達ドメイン102と(ii) 切断認識部位104に連結されたアクチュエータモエティ103を含むGMPとを含むことができる。

【0094】

キメラ膜貫通受容体ポリペプチドの抗原相互作用ドメインは、抗原に結合することができる任意のタンパク質または分子を含むことができる。本明細書に開示するキメラ膜貫通受容体ポリペプチドの抗原相互作用ドメインは、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、組換え抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、またはその機能的誘導体、バリエーションもしくはフラグメント、例えば限定するわけではないが、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、単鎖Fv(scFv)、ミニボディ、ダイアボディ、および単ドメイン抗体、例えば重鎖可変ドメイン(VH)、軽鎖可変ドメイン(VL)およびラクダ科由来のナノボディの可変ドメイン(VHH)であることができる。いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、およびscFvのうちの少なくとも1つを含む。いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは抗体ミメティックを含む。抗体ミメティックとは、抗体に匹敵するアフィニティーで標的分子に結合することができる分子を指し、これには、単鎖結合分子、シトクロムb562に基づく結合分子、フィブロネクチンまたはフィブロネクチン様タンパク質スキャフォールド(例えばアドネクチン)、リポカリンスキャフォールド、カリックスアレーンスキャフォールド、Aドメインその他のスキャフォールドが含まれる。いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、膜貫通受容体、またはその任意の誘導体、バリエーション、もしくはフラグメントを含む。例えば抗原相互作用ドメインは、膜貫通受容体の少なくともリガンド結合ドメインを含むことができる。

20

30

【0095】

いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインはヒト化抗体を含む。ヒト化抗体は、さまざまな技法を使って、例えば限定するわけではないが、CDR移植、ベニアリングまたはリサーフェイシング、鎖シャフリングその他の方法を使って、生産することができる。軽鎖および重鎖を含むヒト可変ドメインは、ヒト化抗体の免疫原性が低減するように選択することができる。いくつかの態様において、キメラ膜貫通受容体ポリペプチドの抗原相互作用ドメインは、高いアフィニティーで抗原に結合し、他の好ましい生物学的性質、例えば低減したかつ/またはごくわずかな免疫原性などを有する、ヒト化抗体のフラグメントを含む。ヒト化抗体またはヒト化抗体フラグメントは、対応する非ヒト化抗体と類似する抗原特異性を保つことができる。

40

【0096】

いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、単鎖可変フラグメント(scFv)を含む。scFv分子は、ポリペプチドリinkerなどの可動性リンカーを使って、免疫グロブリンの重鎖(VH)領域と軽鎖(VL)領域とを一つに連結することによって生産することがで

50

きる。scFvはさまざまな方法に従って調製することができる。

【0097】

いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、特異的標的抗原に結合するように工学的に操作される。例えば、抗原相互作用ドメインは、工学的に操作されたscFvであることができる。scFvを含む抗原相互作用ドメインは、さまざまな方法を使って、例えば限定するわけではないが、ファージディスプレイライブラリー、酵母ディスプレイライブラリー、細胞ベースのディスプレイライブラリー（例えば哺乳動物細胞）、タンパク質-核酸融合物、リボソームディスプレイライブラリー、および/または大腸菌ペリプラスムディスプレイライブラリーなどのディスプレイライブラリーを使って、工学的に操作することができる。いくつかの態様において、工学的に操作された抗原相互作用ドメインは、類似の抗体または工学的操作を受けていない抗体よりも高いアフィニティーで抗原に結合しうる。

10

【0098】

いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、複数の抗原、例えば少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の抗原に結合する。抗原相互作用ドメインは、2つの関連する抗原、例えばボツリヌス毒素の2つのサブタイプ（例えばボツリヌス神経毒サブタイプA1とサブタイプA2）に結合することができる。抗原相互作用ドメインは、2つの無関係なタンパク質、例えば受容体チロシンキナーゼerbB-2（Neu、ERBB2、およびHER2ともいう）と血管内皮成長因子（VEGF）に結合することができる。2つの抗原に結合する能力を有する抗原相互作用ドメインは、抗体の別個の、ただしオーバーラップしている部位にある、2つの無関係なタンパク質標的に結合するように工学的に操作された抗体を含むことができる。いくつかの態様において、複数の抗原に結合する抗原相互作用ドメインは、二重特異性抗体分子を含む。二重特異性抗体分子は、第1エピトープに対する結合特異性を有する第1免疫グロブリン可変ドメイン配列と、第2エピトープに対する結合特異性を有する第2免疫グロブリン可変ドメイン配列とを有しうる。いくつかの態様において、第1エピトープと第2エピトープは同じ抗原上、例えば同じタンパク質（または多量体型タンパク質の同じサブユニット）上に存在する。第1エピトープと第2エピトープはオーバーラップすることができる。いくつかの態様において、第1エピトープと第2エピトープはオーバーラップしない。いくつかの態様において、第1エピトープと第2エピトープは異なる抗原上、例えば異なるタンパク質（または多量体型タンパク質の異なるサブユニット）上にある。いくつかの態様において、二重特異性抗体分子は、第1エピトープに対する結合特異性を有する重鎖可変ドメイン配列および軽鎖可変ドメイン配列、ならびに第2エピトープに対する結合特異性を有する重鎖可変ドメイン配列および軽鎖可変ドメイン配列を含む。いくつかの態様において、二重特異性抗体分子は、第1エピトープに対する結合特異性を有するハーフ抗体（half antibody）と、第2エピトープに対する結合特異性を有するハーフ抗体とを含む。いくつかの態様において、二重特異性抗体分子は、第1エピトープに対する結合特異性を有するハーフ抗体またはそのフラグメントと、第2エピトープに対する結合特異性を有するハーフ抗体またはそのフラグメントとを含む。

20

30

【0099】

いくつかの態様において、キメラ膜貫通受容体ポリペプチドの細胞外領域は、複数の抗原相互作用ドメイン、例えば少なくとも2つの抗原相互作用ドメイン（例えば少なくとも3、4、5、6、7、8、9、または10個の抗原相互作用ドメイン）を含む。それら複数の抗原相互作用ドメインは、同じ抗原または異なる抗原への結合を呈することができる。いくつかの態様において、細胞外領域は、少なくとも2つの抗原相互作用ドメイン、例えばタンデムに連結された少なくとも2つのscFvを含む。いくつかの態様において、2つのscFvフラグメントは、ペプチドリンカーによって連結される。

40

【0100】

キメラ膜貫通受容体ポリペプチドの細胞外領域の抗原相互作用ドメインは、膜結合型抗原、例えば細胞（例えば標的細胞）の細胞外表面にある抗原に結合することができる。いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、膜結合型でない（非膜結合型である）抗原、例えば細胞（例えば標的細胞）が分泌した細胞外抗原、または細胞（例えば標的細胞

50

)の細胞質中にある抗原に結合する。抗原(例えば膜結合型および非膜結合型)は、ウイルス感染、細菌感染、および/または寄生虫感染;炎症性および/もしくは自己免疫性疾患;またはがんおよび/もしくは腫瘍などの新生物などといった疾患と関連しうる。本システムのキメラ膜貫通受容体ポリペプチドの抗原相互作用ドメインによって結合されうる抗原の非限定的な例としては、1-40- -アミロイド、4-1BB、5AC、5T4、707-AP、Aキナーゼアンカータンパク質4(AKAP-4)、アクチビン受容体2B型(ACVR2B)、アクチビン受容体様キナーゼ1(ALK1)、腺癌抗原、アディポフィリン、アドレノセプター 3(ADRB3)、AGS-22M6、葉酸受容体、 -フェトプロテイン(AFP)、AIM-2、未分化リンパ腫キナーゼ(ALK)、アンドロゲン受容体、アンジオポエチン2、アンジオポエチン3、アンジオポエチン結合性細胞表面受容体2(Tie2)、炭疽毒素、AOC3(VAP-1)、B細胞成熟抗原(BCMA)、B7-H3(CD276)、炭疽菌炭疽、B細胞活性化因子(BAFF)、Bリンパ腫細胞、骨髄ストローマ細胞抗原2(BST2)、BORIS(Brother of the Regulator of Imprinted Sites)、C242抗原、C5、CA-125、がん抗原125(CA-125またはMUC16)、がん/精巣抗原1(NY-ESO-1)、がん/精巣抗原2(LAGE-1a)、炭酸脱水酵素9(CA-IX)、癌胎児性抗原(CEA)、心筋ミオシン、CCCTC結合因子(CTCF)、CCL11(エオタキシン-1)、CCR4、CCR5、CD11、CD123、CD125、CD140a、CD147(ペイジジン)、CD15、CD152、CD154(CD40L)、CD171、CD179a、CD18、CD19、CD2、CD20、CD200、CD22、CD221、CD23(IgE受容体)、CD24、CD25(IL-2受容体の鎖)、CD27、CD274、CD28、CD3、CD3、CD30、CD300分子様ファミリーメンバーf(CD300LF)、CD319(SLAMF7)、CD33、CD37、CD38、CD4、CD40、CD40リガンド、CD41、CD44 v7、CD44 v8、CD44 v6、CD5、CD51、CD52、CD56、CD6、CD70、CD72、CD74、CD79A、CD79B、CD80、CD97、CEA関連抗原、CFD、ch4D5、染色体Xオープンリーディングフレーム61(CXORF61)、クローディン18.2(CLDN18.2)、クローディン6(CLDN6)、クロストリジウム・ディフィシレ、クランピング因子A、CLCA2、コロニー刺激因子1受容体(CSF1R)、CSF2、CTLA-4、C型レクチンドメインファミリー12メンバーA(CLEC12A)、C型レクチン様分子-1(CLL-1またはCLECL1)、C-X-Cケモカイン受容体4型、サイクリンB1、シトクロムP4501B1(CYP1B1)、cyp-B、サイトメガロウイルス、サイトメガロウイルス糖タンパク質B、ダビガトラン、DLL4、DPP4、DR5、大腸菌志賀毒素1型、大腸菌志賀毒素2型、エクト-ADP-リボシルトランスフェラーゼ4(ART4)、EGF様モジュール含有ムチン様ホルモン受容体様2(EMR2)、EGF様ドメインマルチプル(EGF-like-domain multiple)7(EGFL7)、伸長因子2突然変異型(elongation factor 2 mutated)(ELF2M)、エンドトキシン、エフリンA2、エフリンB2、エフリンA型受容体2、上皮成長因子受容体(EGFR)、上皮成長因子受容体バリエーションIII(EGFRvIII)、エプシアリン(episialin)、上皮細胞接着分子(EpCAM)、上皮糖タンパク質2(EGP-2)、上皮糖タンパク質40(EGP-40)、ERBB2、ERBB3、ERBB4、ERG(膜貫通プロテアーゼ、セリン2(transmembrane protease, serine 2)(TMPRSS2)ETS融合遺伝子)、大腸菌、染色体12p上のETS転座バリエーション遺伝子6(ETS translocation-variant gene 6, located on chromosome 12p(ETV6-AML))、呼吸器合胞体ウイルスのFタンパク質、FAP、IgA受容体のFcフラグメント(FCARまたはCD89)、Fc受容体様5(FCRL5)、胎児アセチルコリン受容体、フィブリンII鎖、線維芽細胞活性化タンパク質(FAP)、フィブロネクチンエクストラドメイン-B、FGF-5、Fms様チロシンキナーゼ3(FLT3)、葉酸結合タンパク質(FBP)、葉酸ヒドロラーゼ、葉酸受容体1、葉酸受容体、葉酸受容体、Fos関連抗原1、Frizzled受容体、フコシルGM1、G250、Gタンパク質共役受容体20(GPR20)、Gタンパク質共役受容体クラスCグループ5メンバーD(GPRC5D)、ガングリオシドG2(GD2)、GD3ガングリオシド、糖タンパク質100(gp100)、グリピカン-3(GPC3)、GM-CSF受容体鎖、GPNMB、GnT-V、増殖分化因子8、GUCY2C、熱ショックタンパク質70-2突然変異型(mut hsp70-2)、ヘマグルチニン、A型肝炎ウイルス細胞受容体1(HAVCR1)、B型肝炎表面抗原、B型肝炎ウイルス、HER1、HER2/neu、HER3、グロボHグリコセラミド(GloboH)の六糖部分、HGF、HHGFR、高分子量メラノーマ関連抗原(H

10

20

30

40

50

MW-MAA)、ヒストン複合体、HIV-1、HLA-DR、HNGF、Hsp90、HST-2 (FGF6)、ヒトパピローマウイルスE6 (HPV E6)、ヒトパピローマウイルスE7 (HPV E7)、ヒト散乱因子受容体キナーゼ、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT)、ヒトTNF、ICAM-1 (CD54)、iCE、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、IgE、IgE Fc領域、IGF-1、IGF-1受容体、IGHE、IL-12、IL-13、IL-17、IL-17A、IL-17F、IL-1 β 、IL-20、IL-22、IL-23、IL-31、IL-31RA、IL-4、IL-5、IL-6、IL-6受容体、IL-9、免疫グロブリンラムダ様ポリペプチド1 (IGLL1)、インフルエンザAヘマグルチニン、インスリン様成長因子1受容体 (IGF-1受容体)、インスリン様成長因子2 (ILGF2)、インテグリン α 4 β 7、インテグリン α 2 β 2、インテグリン α 4 β 7、インテグリン α 5 β 1、インテグリン α 7 β 7、インテグリン α IIb β 3、インテグリン α v β 3、インターフェロン γ 受容体、インターフェロン誘導タンパク質、インターロイキン11受容体 (IL-11R)、インターロイキン-13受容体サブユニット β -2 (IL-13Ra2またはCD213A2)、腸カルボキシルエステラーゼ、キナーゼドメイン領域 (KDR)、KIR2D、KIT (CD117)、L1細胞接着分子 (L1-CAM)、レグマイン、白血球免疫グロブリン様受容体サブファミリーAメンバー2 (LILRA2)、白血球関連免疫グロブリン様受容体1 (LAIR1)、ルイスY抗原、LFA-1 (CD11a)、LINGO-1、リポテイコ酸、LOXL2、L-セレクチン (CD62L)、リンパ球抗原6複合体、ローカスK9 (lymphocyte antigen 6 complex, locus K 9) (LY6K)、リンパ球抗原75 (LY75)、リンパ球特異的タンパク質チロシンキナーゼ (LCK)、リンフォトキシン- α (LT- α)または腫瘍壊死因子- α (TNF- α)、マクロファージ遊走阻止因子 (MIFまたはMMIF)、M-CSF、乳腺分化抗原 (NY-BR-1)、MCP-1、メラノーマがん精巣抗原-1 (MAD-CT-1)、メラノーマがん精巣抗原-2 (MAD-CT-2)、メラノーマアポトーシス阻害因子 (ML-IAP)、メラノーマ関連抗原1 (MAGE-A1)、メソテリン、ムチン1細胞表面型 (mucine 1, cell surface associated) (MUC1)、MUC-2、ムチンCan Ag、ミエリン関連糖タンパク質、ミオスタチン、N-アセチルグルコサミニル-トランスフェラーゼV (NA17)、NCA-90 (顆粒球抗原)、神経成長因子 (NGF)、神経アポトーシス調節プロテイナーゼ1、神経系細胞接着分子 (NCAM)、神経突起伸長阻害因子 (例えばNOGO-A、NOGO-B、NOGO-C)、ニューロピリン-1 (NRP1)、N-グリコシルノイラミン酸、NKG2D、Notch受容体、o-アセチル-GD2ガングリオシド (OAcGD2)、嗅受容器51E2 (OR51E2)、腫瘍胎児性抗原 (h5T4)、切断点クラスター領域 (breakpoint cluster region) (BCR)およびエーベルソンマウス白血病ウイルスがん遺伝子ホモログ1 (Abl)からなるがん遺伝子融合タンパク質 (bcr-abl)、アナウサギ、OX-40、oxLDL、p53突然変異体、ペアードボックスタンパク質Pax-3 (PAX3)、ペアードボックスタンパク質Pax-5 (PAX5)、パンネキシン (pannexin) 3 (PANX3)、リン酸-ナトリウム共輸送体、ホスファチジルセリン、胎盤特異的 (placenta-specific) 1 (PLAC1)、血小板由来成長因子受容体 (PDGF-R)、血小板由来成長因子受容体 (PDGFR- α)、ポリシアル酸、プロアクロシン結合タンパク質sp32 (OY-TESE1)、プログラム細胞死タンパク質1 (PD-1)、プロタンパク質コンバーターゼサブチリシン/ケキシン9型 (PCSK9)、プロスターゼ (prostase)、前立腺癌腫瘍抗原-1 (PCTA-1またはガレクチン8)、T細胞が認識するメラノーマ抗原 (melanoma antigen recognized by T cells) 1 (MelanAまたはMART1)、P15、P53、PRAME、前立腺幹細胞抗原 (PSCA)、前立腺特異的膜抗原 (PSMA)、前立腺酸性ホスファターゼ (PAP)、前立腺癌細胞、プロステイン (prostain)、プロテアーゼセリン21 (テストチン (Testisin)またはPRSS21)、プロテアソーム (プロソーム (Prosome)、マクロパイン (Macropain))サブユニット、タイプ9 (LMP2)、緑膿菌、狂犬病ウイルス糖タンパク質、RAGE、RasホモログファミリーメンバーC (RhoC)、核内因子カッパB受容体活性化因子 (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) (RANKL)、終末糖化産物の受容体 (RAGE-1)、受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体1 (ROR1)、腎遍在性 (renal ubiquitous) 1 (RU1)、腎遍在性2 (RU2)、呼吸器合胞体ウイルス、Rh血液型D抗原、リーサス因子、肉腫転座切断点 (sarcoma translocation breakpoint)、スクレロスチン (SOST)、セレクチンP、シアリルルイス接着分子 (sLe)、精子タンパク質17 (SPA17)、ス

10

20

30

40

50

フィンゴシン-1-リン酸、T細胞が認識する扁平上皮癌抗原 (squamous cell carcinoma antigen recognized by T Cell) 1、2、および3 (SART1、SART2、およびSART3)、ステージ特異的胚抗原-4 (SSEA-4)、黄色ブドウ球菌、STEAP1、サバイビング (surviving)、シンデカン1 (SDC1) + A314、SOX10、サバイピン、サバイビング-2B (surviving-2B)、滑膜肉腫、X切断点2 (SSX2)、T細胞受容体、TARP (TCR Alternate Reading Frame Protein)、テロメラゼ、TEM1、テネイシンC、TGF- (例えば TGF- 1、TGF- 2、TGF- 3)、甲状腺刺激ホルモン受容体 (TSHR)、組織因子経路インヒビター (TFPI)、Tn抗原 (Tn Ag) または (GalNAc -Ser/Thr)、TNF受容体ファミリーメンバーB細胞成熟 (BCMA)、TNF-、TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRG、トランスグルタミナーゼ5 (TGS5)、腫瘍抗原CTAA16.88、腫瘍内皮マーカ-1 (TEM1/CD248)、腫瘍内皮マーカ-7関連 (TEM7R)、腫瘍タンパク質p53 (p53)、MUC1の腫瘍特異的グリコシル化、腫瘍関連カルシウムシグナル伝達物質2、腫瘍関連糖タンパク質72 (TAG72)、腫瘍関連糖タンパク質72 (TAG-72) + A327、TWEAK受容体、チロシナーゼ、チロシナーゼ関連タンパク質1 (TYRP1または糖タンパク質75)、チロシナーゼ関連タンパク質2 (TYRP2)、ウロプラキシン2 (UPK2)、血管内皮成長因子 (例えばVEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PIGF)、血管内皮成長因子受容体1 (VEGFR1)、血管内皮成長因子受容体2 (VEGFR2)、ピメンチン、v-myc鳥類骨髄細胞腫症ウイルスがん遺伝子神経芽細胞腫由来ホモログ (MYCN)、ヴォン・ヴィレブランド因子 (VWF)、ウィルムス腫瘍タンパク質 (WT1)、X抗原ファミリー、メンバー1A (XAGE1)、 α -アミロイド、および 軽鎖が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

10

20

【0101】

いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、707-AP、ビオチン化分子、 α -アクチニン-4、abl-bcr alb-b3 (b2a2)、abl-bcr alb-b4 (b3a2)、アディポフィリン、AFP、AIM-2、アネキシン II、ART-4、BAGE、b-カテニン、bcr-abl、bcr-abl p190 (e1a2)、bcr-abl p210 (b2a2)、bcr-abl p210 (b3a2)、BING-4、CAG-3、CAIX、CAMEL、カスパーゼ-8、CD171、CD19、CD20、CD22、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44v7/8、CDC27、CDK-4、CEA、CLCA2、Cyp-B、DAM-10、DAM-6、DEK-CAN、EGFRvIII、EGP-2、EGP-40、ELF2、Ep-CAM、EphA2、EphA3、erb-B2、erb-B3、erb-B4、ES-ESO-1a、ETV6/AML、FBP、胎児アセチルコリン受容体、FGF-5、FN、G250、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7B、GAGE-8、GD2、GD3、GnT-V、Gp100、gp75、Her-2、HLA-A*0201-R170I、HMW-MAA、HSP70-2 M、HST-2 (FGF6)、HST-2/neu、hTERT、iCE、IL-11R、IL-13R 2、KDR、KIAA0205、K-RAS、L1細胞接着分子、LAGE-1、LDLR/FUT、ルイスY、MAGE-1、MAGE-10、MAGE-12、MAGE-2、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-6、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A6、MAGE-B1、MAGE-B2、リンゴ酸酵素、マンマグロピン-A、MART-1/Melan-A、MART-2、MC1R、M-CSF、メソテリン、MUC1、MUC16、MUC2、MUM-1、MUM-2、MUM-3、ミオシン、NA88-A、Neo-PAP、NKG2D、NPM/ALK、N-RAS、NY-ESO-1、OA1、OGT、腫瘍胎児性抗原 (h5T4)、OS-9、Pポリペプチド、P15、P53、PRAME、PSA、PSCA、PSMA、PTPRK、RAGE、ROR1、RU1、RU2、SART-1、SART-2、SART-3、SOX10、SSX-2、サバイピン、サバイピン-2B、SYT/SSX、TAG-72、TEL/AML1、TGF α RII、TGF β RII、TP1、TRAG-3、TRG、TRP-1、TRP-2、TRP-2/INT2、TRP-2-6b、チロシナーゼ、VEGF-R2、WT1、 α -葉酸受容体、および 軽鎖からなる群より選択される抗原に結合する。いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは腫瘍関連抗原に結合する。

30

40

【0102】

いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、抗体を含む抗原、例えば細胞表面のタンパク質またはポリペプチドに結合する抗体を含む抗原に結合する。抗体によって結合される細胞表面上のタンパク質またはポリペプチドは、ウイルス感染、細菌感染、および/または寄生虫感染;炎症性および/もしくは自己免疫性疾患;またはがんおよび/もしくは腫瘍などの新生物などといった疾患と関連する抗原を含みうる。いくつかの態様において、

50

抗体は腫瘍関連抗原（例えばタンパク質またはポリペプチド）に結合する。いくつかの態様において、本明細書に開示するキメラ膜貫通受容体ポリペプチドの抗原相互作用ドメインは、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、組換え抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、またはその機能的誘導体、バリエーションもしくはフラグメント、例えば限定するわけではないが、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fc、Fv、scFv、ミニボディ、ダイアボディ、および単ドメイン抗体、例えば重鎖可変ドメイン（VH）、軽鎖可変ドメイン（VL）およびラクダ科由来のナノボディの可変ドメイン（VHH）に結合することができる。いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fc、Fv、およびscFvのうちの少なくとも1つに結合することができる。いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは抗体のFcドメインに結合する。

10

【0103】

いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、20-(74)-(74)（ミラツズマブ；ベルツズマブ）、20-2b-2b、3F8、74-(20)-(20)（ミラツズマブ；ベルツズマブ）、8H9、A33、AB-16B5、アパゴボマブ、アブシキシマブ、アビツズマブ、ABP494（セツキシマブバイオシミラー）、アブリルマブ、ABT-700、ABT-806、Actimab-A（アクチニウムAc-225リンツズマブ）、アクトクスマブ、アダリムマブ、ADC-1013、ADCT-301、ADCT-402、アデカツムマブ、アデュカナマブ、アフエリモマブ、AFM13、アフツズマブ、AGEN1884、AGS15E、AGS-16C3F、AGS67E、アラシズマブペゴル、ALD518、アレムツズマブ、アリロクマブ、アルツモマブペンテテート、アマツキシマブ、AMG228、AMG820、アナツモマブマフェナトクス、アネツマブラブタンシン、アニフロルマブ、アンルキンズマブ、APN301、APN311、アポリズマブ、APX003/SIM-BD0801（セバシズマブ）、APX005M、アルシツモマブ、ARX788、アスクリンバクマブ、アセリズマブ、ASG-15ME、アテゾリズマブ、アチヌマブ、ATL101、アトリズマブ（トシリズマブともいう）、アトロリムマブ、アベルマブ、B-701、パピネオズマブ、バシリキシマブ、バビツキシマブ、BAY1129980、BAY1187982、ベクツモマブ、ベゲロマブ、ベリムマブ、ベンラリズマブ、ベルチリムマブ、ベシレソマブ、Betalutin（177Lu-テトラキセタン-テツロマブ）、ベバシズマブ、BEVZ92（ベバシズマブバイオシミラー）、ベズロトクスマブ、BGB-A317、BHQ880、BI836880、BI-505、ピシロマブ、ピマゲルマブ、ピメキズマブ、ピバツズマブメルタンシン、BIW-8962、プリナツモマブ、プロソズマブ、BMS-936559、BMS-986012、BMS-986016、BMS-986148、BMS-986178、BNC101、ボコシズマブ、ブレンツキシマブベドチン、BrevaRex、ブリアキヌマブ、プロダルマブ、プロルシズマブ、ブロンチクツズマブ、C2-2b-2b、カナキヌマブ、カンツズマブメルタンシン、カンツズマブラブタンシン、カブラシズマブ、カプロマブペンデチド、カルルマブ、カツマキソマブ、CBR96-ドキシソルピシンイムノコンジュゲート、CBT124（ベバシズマブ）、CC-90002、CDX-014、CDX-1401、セデリズマブ、セルトリズマブペゴル、セツキシマブ、CGEN-15001T、CGEN-15022、CGEN-15029、CGEN-15049、CGEN-15052、CGEN-15092、Ch.14.18、シタツズマブ・ボガトクス、シクスツムマブ、クラザキズマブ、クレノリキシマブ、クリバツズマブテトラキセタン、CM-24、コドリツズマブ、コルツキシマブラブタンシン、コナツムマブ、コンシズマブ、Cotara（ヨウ素I-131デルロツキシマブピオチン）、cR6261、クレネズマブ、DA-3111（トラスツズマブバイオシミラー）、ダセツズマブ、ダクリズマブ、ダロツズマブ、ダピロリズマブペゴル、ダラツムマブ、Daratumumab Enhance（ダラツムマブ）、Darleukin、デクトレクマブ、デムシズマブ、デニンツズマブマホドチン、デノスマブ、デパツキシズマブ、デパツキシズマブマホドチン、デルロツキシマブピオチン、デツモマブ、DI-B4、ジヌツキシマブ、ジリダブマブ、DKN-01、DMOT4039A、ドルリモマブアリトクス、ドロジツマブ、DS-1123、DS-8895、デュリゴツマブ、デュビルマブ、デュルバルマブ、デュシギツマブ、エクロメキシマブ、エクリズマブ、エドバコマブ、エドレコロマブ、エファリズマブ、エファンクマブ、エルデルマブ、エルゲムツマブ、エロツズマブ、エルシリモマブ、エマクツズマブ、エミベツズマブ、エナバツズマブ、エンフォルツマブベドチン、エンリモマブペゴル、エノブリツズマブ、エノキズマブ、エノチクマブ、エンシツキシマ

20

30

40

50

ブ、エピツモマブシツキセタン、エブラツズマブ、エルリズマブ、エルツマキソマブ、エ
 タラシズマブ、エトリズマブ、エビナクマブ、エボロクマブ、エクスピビルマブ、ファ
 ノレソマブ、ファラリモマブ、ファーレッズマブ、ファシヌマブ、FBTA05、フェルビズ
 マブ、フェザキヌマブ、FF-21101、FGFR2抗体-薬物コンジュゲート、Fibromun、フィ
 クラツズマブ、フィギツムマブ、フィリブマブ、フランボツマブ、フレチクマブ、フォン
 トリズマブ、フォルマブ、フォラビルマブ、FPA144、フレソリムマブ、FS102、フル
 ラヌマブ、フツキシマブ、ガリキシマブ、ガニツマブ、ガンテネルマブ、ガビリモマブ、
 ゲムツズマブオゾガマイシン、ゲリリムズマブ、ゲボキズマブ、ギレンツキシマブ、グレン
 バツムマブベドチン、GNR-006、GNR-011、ゴリムマブ、ゴミリキシマブ、GSK284
 9330、GSK2857916、GSK3174998、GSK3359609、グセルクマブ、Hu14.18K32
 2A MAb、hu3S193、Hu8F4、HuL2G7、HuMab-5B1、イバリズマブ、イブリツモマ
 ブチウキセタン、イクルクマブ、イダルシズマブ、IGN002、IGN523、イゴボマブ、IM
 AB362、IMAB362(クラウジキシマブ)、イマルマブ、IMC-CS4、IMC-D11、イムシ
 ロマブ、イムガツズマブ、IMGN529、IMMU-102(イットリウムY-90エブラツズマブ
 テトラキセタン)、IMMU-114、ImmuTune IMP701アンタゴニスト抗体、INCAGN18
 76、インクラクマブ、INCSHR1210、インダツキシマブラブタンシン、インデュサツマ
 ブベドチン、インフリキシマブ、イノリモマブ、イノツズマブオゾガマイシン、インテツ
 ムマブ、Ipafricept、IPH4102、イピリムマブ、イラツムマブ、イサツキシマブ、イス
 チラツマブ、イトリズマブ、イクセキズマブ、JNJ-56022473、JNJ-61610588、ケリ
 キシマブ、KTN3379、L19IL2/L19TNF、ラベツズマブ、ラベツズマブゴビテカン、LA
 G525、ランプロリズマブ、ランパリズマブ、L-DOS47、レブリキズマブ、レマレソマブ
 、レンジルマブ、レルデリムマブ、ロイコツキシマブ、レクサツムマブ、リビビルマブ、
 リファスツズマブベドチン、リゲリズマブ、リロトマブサテトラキセタン、リンツズマブ
 、リリルマブ、LKZ145、ロデルシズマブ、ロキベトマブ、ロルボツズマブメルタンシン
 、ルカツムマブ、ルリズマブペゴル、ルミリキシマブ、ルムレッズマブ、LY3164530、
 マパツムマブ、マルジェツキシマブ、マスリモマブ、マツズマブ、マブリリムマブ、MB3
 11、MCS-110、MEDI0562、MEDI-0639、MEDI0680、MEDI-3617、MEDI-551(イ
 ネビリズマブ)、MEDI-565、MEDI6469、メボリズマブ、メテリムマブ、MGB453
 、MGD006/S80880、MGD007、MGD009、MGD011、ミラツズマブ、ミラツズマブ-
 SN-38、ミンレッツモマブ、ミルベツキシマブソラブタンシン、ミツモマブ、MK-4166、
 MM-111、MM-151、MM-302、モガムリズマブ、MOR202、MOR208、MORAb-066
 、モロリムマブ、モタビズマブ、モキセツモマブシュードトクス、ムロモナブ-CD3、ナコ
 ロマブタフェナトクス、ナミルマブ、ナプツモマブエスタフェナトクス、ナルナツマブ、
 ナタリズマブ、ネバクマブ、ネシツムマブ、ネモリズマブ、ネレリモマブ、ネスバクマブ
 、ニモツズマブ、ニボルマブ、ノフェツモマブメルペンタン、NOV-10、オビルトキサキ
 シマブ、オビヌツズマブ、オカラツズマブ、オクレリズマブ、オデュリモマブ、オフアツ
 ムマブ、オララツマブ、オロキズマブ、オマリズマブ、OMP-131R10、OMP-305B83、
 オナルツズマブ、オンツキシズマブ、オピシヌマブ、オボルツズマブモナトクス、オレゴ
 ボマブ、オルチクマブ、オテリキシズマブ、オトレルツズマブ、OX002/MEN1309、オ
 キセルマブ、オザネズマブ、オゾラリズマブ、パギバキシマブ、パリビズマブ、パニツム
 マブ、パンコマブ、PankoMab-GEX、パノバクマブ、パルサツズマブ、パスコリズマブ
 、パソツキシズマブ、パテクリズマブ、パトリツマブ、PAT-SC1、PAT-SM6、ペンプロ
 リズマブ、ペムツモマブ、ペラキズマブ、ベルツズマブ、ベキセリズマブ、PF-0508256
 6(ウトミルマブ)、PF-06647263、PF-06671008、PF-06801591、ピディリズマ
 ブ、ピナツズマブベドチン、ピンツモマブ、ブラクルマブ、ボラツズマブベドチン、ボネ
 ズマブ、プリリキシマブ、プリトキサキシマブ、プリツムマブ、PRO140、Proxinium、
 PSMA ADC、キリズマブ、ラコツモマブ、ラドレッツマブ、ラフィビルマブ、ラルパンシズ
 マブ、ラムシルマブ、ラニビズマブ、ラキシバクマブ、レファネズマブ、レガビルマブ、
 REGN1400、REGN2810/SAR439684、レスリズマブ、RFM-203、RG7356、RG738
 6、RG7802、RG7813、RG7841、RG7876、RG7888、RG7986、リロツムマブ、リ

10

20

30

40

50

ヌクマブ、リツキシマブ、RM-1929、RO7009789、ロバツムマブ、ロレデュマブ、ロモソズマブ、ロンタリズマブ、ロベリズマブ、ルプリズマブ、サシツズマブゴビテカン、サマリズマブ、SAR408701、SAR566658、サリルマブ、SAT 012、サツモマブベンデチド、SCT200、SCT400、SEA-CD40、セクキヌマブ、セリバンツマブ、セトキサキシマブ、セヴィルマブ、SGN-CD19A、SGN-CD19B、SGN-CD33A、SGN-CD70A、SGN-LIV1A、シブロッツズマブ、シファリムマブ、シルツキシマブ、シムツズマブ、シプリズマブ、シルクマブ、ソフィツズマブベドチン、ソラネズマブ、ソリトマブ、ソネブシズマブ、ソソツズマブ、スタムルマブ、スレソマブ、スピズマブ、SYD985、SYM004 (フツキシマブおよびモドツキシマブ)、Sym015、TAB08、タバルマブ、タカツズマブテトラキセタン、タドシズマブ、タリズマブ、タネズマブ、タニビルマブ、タブリツモマブパプトクス、タレクスツマブ、TB-403、テフィバズマブ、Teleukin、テリモマブアリトクス、テナツモマブ、テネリキシマブ、テプリズマブ、テプロツムマブ、テシドルマブ、テツロマブ、TG-1303、TGN1412、トリウム-227-エブラツズマブコンジュゲート、チシリムマブ、ティガツズマブ、チルドラキズマブ、チソツマブベドチン、TNX-650、トシリズマブ、トラリズマブ、トサトクスマブ、トシツモマブ、トベツマブ、トラロキヌマブ、トラスツズマブ、トラスツズマブエムタンシン、TRBS07、TRC105、トレガリズマブ、トレメリムマブ、トレボグルマブ、TRPH011、TRX518、TSR-042、TTI-200.7、ツコツズマブセルモロイキン、ツビルマブ、U3-1565、U3-1784、ウブリツキシマブ、ウロクブルマブ、ウレルマブ、ウルトキサズマブ、ウステキヌマブ、バダスツキシマブタリリン、バンドルツズマブベドチン、パンチクツマブ、バヌシズマブ、ババリキシマブ、バルリルマブ、バテリズマブ、VB6-845、ベドリズマブ、ベルツズマブ、ベパリモマブ、ベセンクマブ、ビジリズマブ、ボロシキシマブ、ボルセツズマブマホドチン、ボツムマブ、YYB-101、ザルツムマブ、ザノリムマブ、ザツキシマブ、ジラリムマブ、およびゾリモマブアリトックスからなる群より選択される抗体に結合する。一定の態様において、抗原相互作用ドメインは、前述の抗体のFcドメインに結合する。

【0104】

いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは抗体に結合し、次にその抗体は、1-40 - -アミロイド、4-1BB、5AC、5T4、アクチビン受容体様キナーゼ1、ACVR2B、腺癌抗原、AGS-22M6、アルファ-フェトプロテイン、アンジオポエチン2、アンジオポエチン3、炭疽毒素、AOC3 (VAP-1)、B7-H3、炭疽菌炭疽、BAFF、ベータ-アミロイド、Bリンパ腫細胞、C242抗原、C5、CA-125、イヌIL31、炭酸脱水酵素9 (CA-IX)、心筋ミオシン、CCL11 (エオタキシン-1)、CCR4、CCR5、CD11、CD18、CD125、CD140a、CD147 (ベイシジン)、CD15、CD152、CD154 (CD40L)、CD19、CD2、CD20、CD200、CD22、CD221、CD23 (IgE受容体)、CD25 (IL-2受容体の鎖)、CD27、CD274、CD28、CD3、CD3イプシロン、CD30、CD33、CD37、CD38、CD4、CD40、CD40リガンド、CD41、CD44 v6、CD5、CD51、CD52、CD56、CD6、CD70、CD74、CD79B、CD80、CEA、CEA関連抗原、CFD、ch4D5、CLDN18.2、クロストリジウム・ディフィシレ、クランピング因子A、CSF1R、CSF2、CTLA-4、C-X-Cケモカイン受容体4型、サイトメガロウイルス、サイトメガロウイルス糖タンパク質B、ダビガトラン、DLL4、DPP4、DR5、大腸菌志賀毒素1型、大腸菌志賀毒素2型、EGFL7、EGFR、エンドトキシン、EpCAM、エピシアリン、ERBB3、大腸菌、呼吸器合胞体ウイルスのFタンパク質、FAP、フィブリンIIベータ鎖、フィブロンネクチンエクストラドメイン-B、葉酸ヒドロラーゼ、葉酸受容体1、葉酸受容体アルファ、Frizzled受容体、ガングリオシドGD2、GD2、GD3ガングリオシド、グリピカン3、GMCSF受容体鎖、GPNMB、増殖分化因子8、GUCY2C、ヘマグルチニン、B型肝炎表面抗原、B型肝炎ウイルス、HER1、HER2/neu、HER3、HGF、HHGFR、ヒストン複合体、HIV-1、HLA-DR、HNGF、Hsp90、ヒト散乱因子受容体キナーゼ、ヒトTNF、ヒトベータ-アミロイド、ICAM-1 (CD54)、IFN- α 、IFN- β 、IgE、IgE Fc領域、IGF-1受容体、IGF-1、IGHE、IL17A、IL17F、IL20、IL-12、IL-13、IL-17、IL-1 α 、IL-22、IL-23、IL-31RA、IL-4、IL-5、IL-6、IL-6受容体、IL-9、ILGF2、インフルエンザAヘマグルチニン、インフルエンザAウイルスへ

10

20

30

40

50

マグルチニン、インスリン様成長因子I受容体、インテグリン 4 7、インテグリン 4、インテグリン 5 1、インテグリン 7 7、インテグリン IIb 3、インテグリン v 3、インターフェロン / 受容体、インターフェロンガンマ誘導タンパク質、ITGA2、ITGB2 (CD18)、KIR2D、ルイスY抗原、LFA-1 (CD11a)、LINGO-1、リポテイコ酸、LOXL2、L-セレクチン (CD62L)、LTA、MCP-1、メソテリン、MIF、MS4A1、MSLN、MUC1、ムチンCanAg、ミエリン関連糖タンパク質、ミオスタチン、NCA-90 (顆粒球抗原)、神経アポトーシス調節プロテイナーゼ1、NGF、N-グリコシルノイラミン酸、NOGO-A、Notch受容体、NRP1、アナウサギ、OX-40、oxLDL、PCSK9、PD-1、PDCD1、PDGF-R、リン酸-ナトリウム共輸送体、ホスファチジルセリン、血小板由来成長因子受容体ベータ、前立腺癌細胞、緑膿菌、狂犬病ウイルス糖タンパク質、RANKL、呼吸器合胞体ウイルス、RHD、リーサス因子、RON、RTN4、スクレロスチン、SDC1、セレクチンP、SLAMF7、SOST、スフィンゴシン-1-リン酸、黄色ブドウ球菌、STEAP1、TAG-72、T細胞受容体、TEM1、テネイシンC、TFPI、TGF- 1、TGF- 2、TGF-、TNF-、TRAIL-R1、TRAIL-R2、腫瘍抗原CTAA16.88、MUC1の腫瘍特異的グリコシル化、腫瘍関連カルシウムシグナル伝達物質2、TWEAK受容体、TYRP1 (糖タンパク質75)、VEGFA、VEGFR1、VEGFR2、ビメンチン、およびVWFからなる群より選択される抗原に結合する。

10

【0105】

いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは抗体ミメティックに結合することができる。本明細書の他の項で説明する抗体ミメティックは、抗体に匹敵するアフィニティーで標的分子に結合することができる。いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、本明細書の他の項で説明するヒト化抗体に結合することができる。いくつかの態様において、キメラ膜貫通受容体ポリペプチドの抗原相互作用ドメインは、ヒト化抗体のフラグメントに結合することができる。いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは単鎖可変フラグメント (scFv) に結合することができる。

20

【0106】

いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、適切な哺乳動物 (例えばヒト、マウス、ラット、ヤギ、ヒツジ、またはサル) の免疫グロブリン (例えばIgG、IgA、IgM、またはIgE) のFc部分に結合する。適切なFc結合ドメインは、哺乳類Fc受容体または一定の細菌タンパク質 (例えばプロテインAおよびプロテインG) などといった天然のタンパク質に由来しうる。加えて、Fc結合ドメインは、特に、本明細書に記載するIg分子のいずれかのFc部分に所望のアフィニティーおよび特異性で結合するように工学的に操作された合成ポリペプチドであってもよい。例えば、そのようなFc結合ドメインは、免疫グロブリンのFc部分に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性フラグメントであることができる。例として、単鎖可変フラグメント (scFv)、ドメイン抗体、およびナノボディが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。あるいは、Fc結合ドメインは、Fc部分に特異的に結合する合成ペプチド、例えばKunitzドメイン、スモールモジュラー免疫薬 (small modular immunopharmaceutical) (SMIP)、アドネクチン、アビマー、アフィボディ、DARPin、またはアンチカリンであることもでき、これらは、Fcに対する結合活性に関してペプチドライブラリーをスクリーニングすることによって同定されうる。

30

40

【0107】

いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、哺乳類Fc受容体の細胞外リガンド結合ドメインを含むFc結合ドメインを含む。Fc受容体は、一般に、多くの免疫細胞 (B細胞、樹状細胞、ナチュラルキラー (NK) 細胞、マクロファージ、好中球 (neutrophil)、肥満細胞、および好酸球を含む) の表面に発現する細胞表面受容体であり、抗体のFcドメインに対する結合特異性を呈する。場合により、抗体のFc部分へのFc受容体の結合は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (ADCC) 効果をトリガーすることができる。本明細書に記載のキメラ膜貫通受容体ポリペプチドを構築するために使用されるFc受容体は、天然の多形バリエーション、例えば野生型対応物と比較してFcドメインに対するアフィニティーが変化 (例えば増加または減少) していてもよいバリエーションでありうる。あるいは、Fc受容体は

50

、Ig分子のFc部分に対する結合アフィニティーを変化させる1つまたは複数の突然変異（例えば最大10個のアミノ酸残基置換）を保持する、野生型対応物の機能的バリエーションである。いくつかの態様において、突然変異は、Fc受容体のグリコシル化パターンを、したがってFcドメインに対する結合アフィニティーを変化させうる。

【0108】

表1に、Fc受容体細胞外ドメインにおけるいくつかの例示的多形を列挙する（例えばKim et al., J. Mol. Evol.53:1-9, 2001を参照されたい）。

【0109】

（表1）Fc受容体における例示的多形

アミノ酸 番号	19	48	65	89	105	130	134	141	142	158
FCRI0	R	S	D	I	D	G	F	Y	T	V
P08637	R	S	D	I	D	G	F	Y	I	F
S76824	R	S	D	I	D	G	F	Y	I	V
J04162	R	N	D	V	D	D	F	H	I	V
M31936	S	S	N	I	D	D	F	H	I	V
M24854	S	S	N	I	E	D	S	H	I	V
X07934	R	S	N	I	D	D	F	H	I	V
X14356 (FcγRII)	N	N	N	S	E	S	S	S	I	I
M31932 (FcγRI)	S	T	N	R	E	A	F	T	I	G
X06948 (FcγRI)	R	S	E	S	Q	S	E	S	I	V

10

20

【0110】

Fc受容体は、一般に、それが結合することのできる抗体のアイソタイプに基づいて分類することができる。例えばFc-ガンマ受容体（Fc γ R）は一般にIgG抗体（例えばIgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4）に結合し、Fc-アルファ受容体（Fc α R）は一般にIgA抗体に結合し、Fc-イプシロン受容体（Fc ϵ R）は一般にIgE抗体に結合する。いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、Fc受容体またはその任意の誘導体、バリエーションもしくはフラグメントを含む。いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、FcRI（CD64）、FcRIa、FcRIb、FcRIc、アロタイプH131およびR131を含むFcRIIA（CD32）、FcRIIB-1およびFcRIIB-2を含むFcRIIB（CD32）、アロタイプV158およびF158を含むFcRIIIA（CD16a）、アロタイプFcRIIIb-NA1およびFcRIIIb-NA2を含むFcRIIIB（CD16b）、それらの任意の誘導体、それらの任意のバリエーション、およびそれらの任意のフラグメントから選択されるFcRを含むFc結合ドメインを含む。FcRは、限定するわけではないがヒト、マウス、ラット、ウサギ、およびサルを含む任意の生物に由来しうる。マウスFcRとして、FcRI（CD64）、FcRII（CD32）、FcRIII（CD16）、およびFcRIII-2（CD16-2）が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、Fc受容体またはその任意の誘導体、バリエーションもしくはフラグメントを含む。いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、FcRI、FcRII（CD23）、それらの任意の誘導体、それらの任意のバリエーション、およびそれらの任意のフラグメントから選択されるFcRを含む。いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、Fc受容体またはその任意の誘導体、バリエーションもしくはフラグメントを含む。いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、FcRI（CD89）、Fc μ R、それらの任意の誘導体、それらの任意のバリエーション、およびそれらの任意のフラグメントから選択されるFcRを含む。いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、FcRn、その任意の誘導体、その任意のバリエーション、およびその任意のフラグメントから選択されるFcRを含む。キメラ膜貫通受容体ポリペプチドにおいて使用するためのFc受容体のリガンド結合ドメインの選択は、Fc結合ドメインの結合が望まれる抗体のアイソタイプおよび所望する結合相互作用のアフィニティーなどといった、さま

30

40

50

ざまな因子に依存しうる。

【0111】

いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、Fcドメインに対するアフィニティーを調整することができる天然の多形を組み入れていてもよいCD16の細胞外リガンド結合ドメインを含む。いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、158番目（例えばバリンまたはフェニルアラニン）に多形を組み入れたCD16の細胞外リガンド結合ドメインを含む。いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、そのグリコシル化状態およびFcドメインに対するそのアフィニティーを変化させる条件下で生産される。いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、それを組み入れたキメラ膜貫通受容体ポリペプチドがIgG抗体のサブセットに対して特異的になるようにする修飾を組み入れたCD16の細胞外リガンド結合ドメインを含む。

10

【0112】

例えば、IgGサブタイプ（例えばIgG1）に対するアフィニティーを増加または減少させる突然変異を組み入れることができる。いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、Fcドメインに対するアフィニティーを調整しうる天然の多形を組み入れていてもよいCD32の細胞外リガンド結合ドメインを含む。いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、それを組み入れたキメラ膜貫通受容体ポリペプチドがIgG抗体のサブセットに対して特異的になるようにする修飾を組み入れたCD32の細胞外リガンド結合ドメインを含む。例えば、IgGサブタイプ（例えばIgG1）に対するアフィニティーを増加または減少させる突然変異を組み入れることができる。

20

【0113】

いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、Fcドメインに対するアフィニティーを調整しうる天然の多形を組み入れていてもよいCD64の細胞外リガンド結合ドメインを含む。いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、そのグリコシル化状態およびFcドメインに対するそのアフィニティーを変化させる条件下で生産される。いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、それを組み入れたキメラ膜貫通受容体ポリペプチドがIgG抗体のサブセットに対して特異的になるようにする修飾を組み入れたCD64の細胞外リガンド結合ドメインを含む。例えば、IgGサブタイプ（例えばIgG1）に対するアフィニティーを増加または減少させる突然変異を組み入れることができる。

30

【0114】

別の態様において、抗原相互作用ドメインは、IgG分子のFc部分に結合する能力を有する天然の細菌タンパク質、またはその任意の誘導体、バリエーションもしくはフラグメント（例えばプロテインA、プロテインG）を含む。いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、プロテインA、またはその任意の誘導体、バリエーションもしくはフラグメントを含む。プロテインAは、元々は細菌・黄色ブドウ球菌の細胞壁に見いだされた42kDaの表面タンパク質を指す。これは、それぞれが3ヘリックスバンドルに折りたたまれていて、大半の抗体のFc領域との相互作用およびヒトVH3ファミリー抗体のFab領域との相互作用によって、IgGに結合することができる、5つのドメインで構成されている。いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、プロテインG、またはその任意の誘導体、バリエーションもしくはフラグメントを含む。プロテインGは、哺乳類IgGのFab領域とFc領域の両方に結合する、C群およびG群連鎖球菌に発現する約60kDaタンパク質を指す。ネイティブプロテインGはアルブミンにも結合するが、アルブミン結合を排除する組換えバリエーションが工学的に作製されている。

40

【0115】

抗原相互作用ドメインは、コンビナトリアルバイオロジーまたは指向的進化法を使って、新規に創製することもできる。タンパク質スキュフォールド（例えばIgG由来のscFv、Kunitz型プロテアーゼ阻害因子由来のKunitzドメイン、アンキリンリピート、プロテインAからのZドメイン、リボカリン、フィブロネクチンIII型ドメイン、FynからのSH3ドメインなど）から出発して、バリエーションスキュフォールドの大きなライブラリーを創製するために、表面上の一組の残基についてアミノ酸側鎖をランダムに置換することができる。大

50

きなライブラリーからは、ファージディスプレイ、リボゾームディスプレイまたは細胞ディスプレイで、まず結合について選択し、次に増幅することにより、Fcドメインのような標的に対するアフィニティーを持つバリエーションを単離することが可能である。選択ラウンドと増幅ラウンドの繰り返しを使って、標的に対して最も高いアフィニティーを持つタンパク質を単離することができる。例示的Fc結合性ペプチドは、

ETQRCTWHMGELVWCEREHN

(SEQ ID NO: 19), KEASCSYWLGELVWCVAGVE (SEQ ID NO: 20), または

DCAWHLGELVWCT (SEQ ID NO: 21)

10

のアミノ酸配列を含みうる。

【0116】

本明細書に記載するFc結合物質はいずれも、抗体のFcドメインに対して適切な結合アフィニティーを有しうる。結合アフィニティーとは、見掛けの会合定数、すなわち K_A を指す。 K_A は解離定数 K_D の逆数である。本明細書に記載するキメラ膜貫通受容体ポリペプチドのFc受容体ドメインの細胞外リガンド結合ドメインは、抗体のFc部分に対して少なくとも 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} Mまたはそれ未満の結合アフィニティー K_D を有しうる。いくつかの態様において、ある抗体のFc部分に結合する抗原相互作用ドメインは、抗体、抗体のアイソタイプ、またはそのサブタイプに対して、別の抗体、抗体のアイソタイプ、またはそのサブタイプに対するその抗原相互作用ドメインの結合アフィニティーと比較して、高い結合アフィニティーを有する。

20

【0117】

いくつかの態様において、Fc受容体の細胞外リガンド結合ドメインは、ある抗体、抗体のアイソタイプ、またはそのサブタイプに対し、別の抗体、抗体のアイソタイプ、またはそのサブタイプに対するFc受容体の細胞外リガンド結合ドメインの結合と比較して、特異性を有する。比較的高いアフィニティー結合を持つFc受容体として、CD64A、CD64B、およびCD64Cが挙げられる。比較的低いアフィニティー結合を持つFc受容体として、CD32A、CD32B、CD16A、およびCD16Bが挙げられる。比較的高いアフィニティー結合を持つFc受容体としてはFcRIが挙げられ、比較的低いアフィニティー結合を持つFc受容体としてはFcRII/CD23が挙げられる。

30

【0118】

Fc受容体、またはその任意の誘導体、バリエーション、もしくはフラグメントに対する結合アフィニティーまたは結合特異性、あるいはFc結合ドメインを含むキメラ膜貫通受容体ポリペプチドに対する結合アフィニティーまたは結合特異性は、平衡透析、平衡結合、ゲル濾過、ELISA、表面プラズモン共鳴、および分光法を含むさまざまな方法によって決定することができる。

【0119】

いくつかの態様において、Fc受容体の細胞外リガンド結合ドメインを含む抗原相互作用ドメインは、天然のFc受容体、Fc受容体、Fc受容体、またはFcRnの細胞外リガンド結合ドメインのアミノ酸配列と少なくとも90%（例えば91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上）同一なアミノ酸配列を含む。2つのアミノ酸配列の「同一性パーセント」または「同一性」は、Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77, 1993にあるように変更されたKarlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68, 1990のアルゴリズムを使って決定することができる。そのようなアルゴリズムは、Altschul, et al. J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990のNBLASTプログラムおよびXBLASTプログラム（バージョン2.0）に組み入れられている。本開示のタンパク質分子に相同なアミノ酸配列を得るには、BLASTタンパク質サーチを、XBLASTプログラム、score = 50、wordlength = 3で行うことができる。2つの配列の間にギャップが存在する場合は、Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25 (17): 3389-3402, 1997に記載されているように、Gapped BLASTを利用することができる。B

40

50

LASTプログラムおよびGapped BLASTプログラムを利用する場合は、それぞれのプログラム（例えばXBLASTおよびNBLAST）のデフォルトパラメータを使用することができる。

【0120】

いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、Fc受容体の細胞外リガンド結合ドメインのバリエーションを含むFc結合ドメインを含む。いくつかの態様において、Fc受容体のバリエーション細胞外リガンド結合ドメインは、リファレンス細胞外リガンド結合ドメインのアミノ酸配列と比較して、最大10個（例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個）のアミノ酸残基変異を含みうる。いくつかの態様において、バリエーションは、遺伝子多形による天然のバリエーションであることができる。別の態様において、バリエーションは非天然修飾分子であることができる。例えば、Fc受容体の細胞外リガンド結合ドメインに突然変異を導入することで、そのグリコシル化パターンを、したがって対応するFcドメインに対するその結合アフィニティーを変化させることができる。

10

【0121】

いくつかの例において、抗原相互作用ドメインは、CD16A、CD16B、CD32A、CD32B、CD32C、CD64A、CD64B、CD64C、または本明細書に記載するそのバリエーション、フラグメントもしくは誘導体から選択されるFc受容体のFc結合ドメインを含む。Fc受容体の細胞外リガンド結合ドメインは、本明細書に記載するCD16A、CD16B、CD32A、CD32B、CD32C、CD64A、CD64B、CD64Cの細胞外リガンド結合ドメインのアミノ酸配列と比較して、最大10個（例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個）のアミノ酸残基変異を含みうる。Fc受容体の細胞外リガンド結合ドメインのアミノ酸残基の突然変異は、その突然変異を含まないFc受容体ドメインと比較して、Fc受容体ドメインが抗体、抗体のアイソタイプ、またはそのサブタイプに結合する結合アフィニティーの増加をもたらす。例えば、Fc-ガンマ受容体CD16Aの残基158の突然変異は、抗体のFc部分に対するFc受容体の結合アフィニティーの増加をもたらす。いくつかの態様において、突然変異は、Fc受容体CD16Aの残基158におけるフェニルアラニンからバリンへの置換である。Fc受容体の細胞外リガンド結合ドメインには、抗体などの分子のFc部分に対する結合アフィニティーを強化または低減しうる種々の適切な代替的または付加的突然変異を施すことができる。

20

【0122】

抗原相互作用ドメインを含む細胞外領域は、例えば貫膜セグメントなどによって、細胞内領域に連結されうる。いくつかの態様において、貫膜セグメントはポリペプチドを含む。キメラ膜貫通受容体の細胞外領域と細胞内領域とを連結する貫膜ポリペプチドは、任意の適切なポリペプチド配列を有しうる。場合により、貫膜ポリペプチドは、内在性または野生型貫膜タンパク質の貫膜部分のポリペプチド配列を含む。いくつかの態様において、貫膜ポリペプチドは、内在性または野生型貫膜タンパク質の貫膜部分と比較して少なくとも1個（例えば少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上）のアミノ酸置換、欠失、および挿入を有するポリペプチド配列を含む。いくつかの態様において、貫膜ポリペプチドは、非天然ポリペプチド配列、例えばポリペプチドリンカーの配列を含む。ポリペプチドリンカーは可動性または剛性である。ポリペプチドリンカーは構造化されていても不定形であってもよい。いくつかの態様において、貫膜ポリペプチドは、受容体の細胞外領域から細胞内領域へとシグナル、例えばリガンド結合を示すシグナルを伝達する。

30

40

【0123】

本システムのキメラ膜貫通受容体ポリペプチドの細胞内領域の免疫細胞シグナル伝達ドメインは一次シグナル伝達ドメインを含むことができる。一次シグナル伝達ドメインは、免疫細胞のシグナル伝達に関与する任意のシグナル伝達ドメイン、またはその誘導体、バリエーションもしくはフラグメントであることができる。例えばシグナル伝達ドメインは、TCR複合体の一次活性化を刺激性または阻害性に調節することに関与する。一次シグナル伝達ドメインは、Fc受容体（FcR）、Fc受容体（FcR）、Fc受容体（FcR）、新生児型Fc受容体（FcRn）、CD3、CD3、CD3、CD3、CD3、CD4、CD5、CD8、CD21、CD22、CD28、CD32、CD40L（CD154）、CD45、CD66d、CD79a、CD7

50

9b、CD80、CD86、CD278 (ICOSとしても公知である)、CD247、CD247、DAP10、DAP12、FYN、LAT、Lck、MAPK、MHC複合体、NFAT、NF- κ B、PLC- γ 、iC3b、C3dg、C3d、およびZap70のシグナル伝達ドメインを含むことができる。いくつかの態様において、一次シグナル伝達ドメインは、免疫受容体チロシン活性化モチーフ、すなわちITAMを含む。ITAMを含む一次シグナル伝達ドメインは、6~8個のアミノ酸によって分離されたアミノ酸配列YxxL/I (ここで各xは独立して任意のアミノ酸である)のリピートを2つ含んで、保存されたモチーフYxxL/Ix (6~8) YxxL/Iを与えることができる。ITAMを含む一次シグナル伝達ドメインは、抗原相互作用ドメインが抗原に結合したときに、例えばリン酸化によって修飾されうる。リン酸化ITAMは、他のタンパク質 (例えばさまざまなシグナル伝達経路に参与するタンパク質) に対するドッキング部位として機能することができる。いくつかの態様において、一次シグナル伝達ドメインは、ネイティブITAMドメインと比較して改変された (例えば増加したまたは減少した) 活性を有する修飾ITAMドメイン、例えば突然変異型、トランケート型、および/または最適化ITAMドメインを含む。

【0124】

いくつかの態様において、一次シグナル伝達ドメインは、Fc γ Rシグナル伝達ドメイン (例えばITAM) を含む。Fc γ Rシグナル伝達ドメインは、Fc γ RI (CD64)、Fc γ RIIA (CD32)、Fc γ RIIB (CD32)、Fc γ RIIIA (CD16a)、およびFc γ RIIIB (CD16b) から選択されうる。いくつかの態様において、一次シグナル伝達ドメインは、Fc γ Rシグナル伝達ドメイン (例えばITAM) を含む。Fc γ Rシグナル伝達ドメインはFc γ RIおよびFc γ RII (CD23) から選択されうる。いくつかの態様において、一次シグナル伝達ドメインは、Fc γ Rシグナル伝達ドメイン (例えばITAM) を含む。Fc γ Rシグナル伝達ドメインは、Fc γ RI (CD89) およびFc γ RIIから選択されうる。いくつかの態様において、一次シグナル伝達ドメインはCD3シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、一次シグナル伝達ドメインはCD3のITAMを含む。

【0125】

いくつかの態様において、一次シグナル伝達ドメインは、免疫受容体チロシン阻害モチーフ、すなわちITIMを含む。ITIMを含む一次シグナル伝達ドメインは、免疫系の一部の阻害性受容体の細胞質テールに見いだされる保存されたアミノ酸の配列 (S/I/V/LxYxxI/V/L) を含むことができる。ITIMを含む一次シグナル伝達ドメインは、Srcキナーゼファミリーメンバー (例えばLck) などの酵素によって、修飾 (例えばリン酸化) されうる。リン酸化に続いて、酵素を含む他のタンパク質がITIMに動員される。これら他のタンパク質として、ホスホチロシンホスファターゼSHP-1およびSHP-2、SHIPと呼ばれるイノシトール-ホスファターゼ、1つまたは複数のSH2ドメインを有するタンパク質 (例えばZAP70) などの酵素が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。一次シグナル伝達ドメインは、BTLA、CD5、CD31、CD66a、CD72、CMRF35H、DCIR、EPO-R、Fc γ RIIB (CD32)、Fc受容体様タンパク質2 (FCRL2)、Fc受容体様タンパク質3 (FCRL3)、Fc受容体様タンパク質4 (FCRL4)、Fc受容体様タンパク質5 (FCRL5)、Fc受容体様タンパク質6 (FCRL6)、プロテインG6b (G6B)、インターロイキン4受容体 (IL4R)、免疫グロブリンスーパーファミリー受容体トランスロケーション関連1 (IRTA1)、免疫グロブリンスーパーファミリー受容体トランスロケーション関連2 (IRTA2)、キラー細胞免疫グロブリン様受容体2DL1 (KIR2DL1)、キラー細胞免疫グロブリン様受容体2DL2 (KIR2DL2)、キラー細胞免疫グロブリン様受容体2DL3 (KIR2DL3)、キラー細胞免疫グロブリン様受容体2DL4 (KIR2DL4)、キラー細胞免疫グロブリン様受容体2DL5 (KIR2DL5)、キラー細胞免疫グロブリン様受容体3DL1 (KIR3DL1)、キラー細胞免疫グロブリン様受容体3DL2 (KIR3DL2)、白血球免疫グロブリン様受容体サブファミリーBメンバー1 (LIR1)、白血球免疫グロブリン様受容体サブファミリーBメンバー2 (LIR2)、白血球免疫グロブリン様受容体サブファミリーBメンバー3 (LIR3)、白血球免疫グロブリン様受容体サブファミリーBメンバー5 (LIR5)、白血球免疫グロブリン様受容体サブファミリーBメンバー8 (LIR8)、白血球関連免疫グロブリン様受容体1 (LAIR-1)

、肥満細胞機能関連抗原 (MAFA)、NKG2A、ナチュラル細胞傷害誘発受容体 (natural cytotoxicity triggering receptor) 2 (NKp44)、NTB-A、プログラム細胞死タンパク質1 (PD-1)、PILR、SIGLECL1、シアル酸結合性Ig様レクチン2 (SIGLEC2またはCD22)、シアル酸結合性Ig様レクチン3 (SIGLEC3またはCD33)、シアル酸結合性Ig様レクチン5 (SIGLEC5またはCD170)、シアル酸結合性Ig様レクチン6 (SIGLEC6)、シアル酸結合性Ig様レクチン7 (SIGLEC7)、シアル酸結合性Ig様レクチン10 (SIGLEC10)、シアル酸結合性Ig様レクチン11 (SIGLEC11)、シアル酸結合性Ig様レクチン4 (SIGLEC4)、シアル酸結合性Ig様レクチン8 (SIGLEC8)、シアル酸結合性Ig様レクチン9 (SIGLEC9)、血小板内皮細胞接着分子1 (PECAM-1)、シグナル調節タンパク質 (SIRP2)、およびシグナル伝達調節膜貫通アダプター (signaling threshold regulating transmembrane adaptor) 1 (SIT) のシグナル伝達ドメイン (例えばITIM) を含むことができる。いくつかの態様において、一次シグナル伝達ドメインは、ネイティブITIMドメインと比較して改変された (例えば増加したまたは減少した) 活性を有する修飾ITIMドメイン、例えば突然変異型、トランケート型、および/または最適化ITIMドメインを含む。
【0126】

10

いくつかの態様において、免疫細胞シグナル伝達ドメインは、複数の一次シグナル伝達ドメインを含む。例えば免疫細胞シグナル伝達ドメインは、少なくとも2つの一次シグナル伝達ドメイン、例えば少なくとも2、3、4、5、7、8、9、または10個の一次シグナル伝達ドメインを含むことができる。いくつかの態様において、免疫細胞シグナル伝達ドメインは、少なくとも2つのITAMドメイン (例えば少なくとも3、4、5、6、7、8、9、または10個のITAMドメイン) を含む。いくつかの態様において、免疫細胞シグナル伝達ドメインは、少なくとも2つのITIMドメイン (例えば少なくとも3、4、5、6、7、8、9、または10個のITIMドメイン) (例えば少なくとも2つの一次シグナル伝達ドメイン) を含む。いくつかの態様において、免疫細胞シグナル伝達ドメインは、ITAMドメインとITIMドメインの両方を含む。

20

【0127】

キメラ膜貫通受容体ポリペプチドの細胞内領域の免疫細胞シグナル伝達ドメインは共刺激ドメインを含むことができる。いくつかの態様において、共刺激ドメイン、例えば共刺激分子からの共刺激ドメインは、免疫細胞シグナル伝達のための、例えばITAMドメインおよび/またはITIMドメインからの、例えば免疫細胞の活性化および/または失活のためのシグナル伝達のための、共刺激シグナルを提供することができる。図2に示すキメラ膜貫通受容体の例示的コンフィギュレーションでは、免疫細胞シグナル伝達ドメイン202は、一次シグナル伝達ドメイン202aおよび少なくとも1つの共刺激ドメイン202bを含む。受容体の細胞内領域は、切断認識部位204に連結されたアクチュエータモエティ203を含むGMPも含む。いくつかの態様において、共刺激ドメインは、免疫細胞における増殖シグナルおよび/または生存シグナルを調節するように作動しうる。いくつかの態様において、共刺激シグナル伝達ドメインは、MHCクラスIタンパク質、MHCクラスIIタンパク質、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ球活性化分子 (SLAMタンパク質)、活性化NK細胞受容体、BTLA、またはToIIリガンド受容体のシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、共刺激ドメインは、2B4/CD244/SLAMF4、4-1BB/TNFSF9/CD137、B7-1/CD80、B7-2/CD86、B7-H1/PD-L1、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H6、B7-H7、BAFF R/TNFRSF13C、BAFF/BLyS/TNFSF13B、BLAME/SLAMF8、BTLA/CD272、CD100 (SEMA4D)、CD103、CD11a、CD11b、CD11c、CD11d、CD150、CD160 (BY55)、CD18、CD19、CD2、CD200、CD229/SLAMF3、CD27リガンド/TNFSF7、CD27/TNFRSF7、CD28、CD29、CD2F-10/SLAMF9、CD30リガンド/TNFSF8、CD30/TNFRSF8、CD300a/LMIR1、CD4、CD40リガンド/TNFSF5、CD40/TNFRSF5、CD48/SLAMF2、CD49a、CD49D、CD49f、CD53、CD58/LFA-3、CD69、CD7、CD8、CD8、CD82/Kai-1、CD84/SLAMF5、CD90/Thy1、CD96、CDS、CEACAM1、CRACC/SLAMF7、CRTAM、CTLA-4、DAP12、デクチン-1/CLEC7A、DNAM1 (CD226)、DPP

30

40

50

IV/CD26、DR3/TNFRSF25、EphB6、GADS、Gi24/VISTA/B7-H5、GITRリガンド/TNFRSF18、GITR/TNFRSF18、HLAクラスI、HLA-DR、HVEM/TNFRSF14、IA4、ICAM-1、ICOS/CD278、イカロス、IL2R α 、IL2R β 、IL7R α 、インテグリン α 4/CD49d、インテグリン α 4 β 1、インテグリン α 4 β 7/LPAM-1、IPO-3、ITGA4、ITGA6、ITGAD、ITGAE、ITGAL、ITGAM、ITGAX、ITGB1、ITGB2、ITGB7、KIRDS2、LAG-3、LAT、LIGHT/TNFRSF14、LTBR、Ly108、Ly9 (CD229)、リンパ球機能関連抗原-1 (LFA-1)、リンフォトキシン α /TNF α 、NKG2C、NKG2D、NKp30、NKp44、NKp46、NKp80 (KLRF1)、NTB-A/SLAMF6、OX40リガンド/TNFRSF4、OX40/TNFRSF4、PAG/Cbp、PD-1、PDCD6、PD-L2/B7-DC、PSGL1、RELT/TNFRSF19L、SELPLG (CD162)、SLAM (SLAMF1)、SLAM/CD150、SLAMF4 (CD244)、SLAMF6 (NTB-A)、SLAMF7、SLP-76、TACI/TNFRSF13B、TCL1A、TCL1B、TIM-1/KIM-1/HAVCR、TIM-4、TL1A/TNFRSF15、TNFRIF1/TNFRSF1B、TNF α 、TRANCE/RANKL、TSLP、TSLP R、VLA1、およびVLA-6からなる群より選択される分子のシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、免疫細胞シグナル伝達ドメインは、複数の共刺激ドメイン、例えば少なくとも2個、例えば少なくとも3、4、または5個の共刺激ドメインを含む。

10

【0128】

免疫細胞シグナル伝達ドメインは、遺伝子調整ポリペプチド (GMP) に連結することができる。GMPは、切断認識部位に連結されたアクチュエータモエティを含むことができる。アクチュエータモエティは、ヌクレアーゼ (例えばDNAヌクレアーゼおよび/またはRNAヌクレアーゼ)、ヌクレアーゼ欠損型であるか野生型ヌクレアーゼと比較してヌクレアーゼ活性が低減している修飾ヌクレアーゼ (例えばDNAヌクレアーゼおよび/またはRNAヌクレアーゼ)、その誘導体、そのバリエーション、またはそのフラグメントを含むことができる。アクチュエータモエティは、遺伝子の発現および/または活性を調節するか、核酸 (例えば遺伝子および/または遺伝子産物) の配列を編集することができる。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、DNAヌクレアーゼ、例えば標的DNA配列のゲノム編集を誘導するための工学的に操作された (例えばプログラム可能なまたは標的指向可能な) DNAヌクレアーゼを含む。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、RNAヌクレアーゼ、例えば標的RNA配列の編集を誘導するための工学的に操作された (例えばプログラム可能なまたは標的指向可能な) RNAヌクレアーゼを含む。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは低減したまたはごくわずかなヌクレアーゼ活性を有する。低減したまたはごくわずかなヌクレアーゼ活性を有するアクチュエータモエティは、標的ポリヌクレオチドの物理的妨害によって、または標的ポリヌクレオチドの発現を抑制もしくは強化するのに有効な追加因子の動員によって、遺伝子の発現および/または活性を調節することができる。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、標的DNA配列の転写活性化または転写抑制を誘導することができる、DNAヌクレアーゼ由来のヌクレアーゼヌルDNA結合タンパク質を含む。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、標的RNA配列の転写活性化または転写抑制を誘導することができる、RNAヌクレアーゼ由来のヌクレアーゼヌルRNA結合タンパク質を含む。アクチュエータモエティは、外因性であるか内在性であるかを問わず遺伝子の発現または活性を調節することおよび/または核酸配列を編集することができる。

20

30

40

【0129】

アクチュエータモエティには任意の適切なヌクレアーゼを使用することができる。適切なヌクレアーゼとして、CRISPR関連 (Cas) タンパク質またはCasヌクレアーゼ、例えばI型CRISPR関連 (Cas) ポリペプチド、II型CRISPR関連 (Cas) ポリペプチド、III型CRISPR関連 (Cas) ポリペプチド、IV型CRISPR関連 (Cas) ポリペプチド、V型CRISPR関連 (Cas) ポリペプチド、およびVI型CRISPR関連 (Cas) ポリペプチド;ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN);転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN);メガヌクレアーゼ; RNA結合タンパク質 (RBP); CRISPR関連RNA結合タンパク質;リコンビナーゼ;フリッパーゼ;トランスポザーゼ;アルゴノートタンパク質;それらの任意の誘導体;それ

50

らの任意のバリエーション;およびそれらの任意のフラグメントが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【0130】

遺伝子の調節は、任意の関心対象の遺伝子の調節であることができる。本明細書に記載する遺伝子の遺伝子ホモログも包含されると考えられる。例えば遺伝子は本明細書に記載する遺伝子に対して一定の同一性および/または相同性を呈することができる。それゆえに、(核酸レベルまたはタンパク質レベルで)50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の相同性を呈する遺伝子、または約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%の相同性を呈する遺伝子は、修飾することができると考えられる。また、(核酸レベルまたはタンパク質レベルで)50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の同一性を呈する遺伝子、または約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%の同一性を呈する遺伝子も、修飾することができると考えられる。

10

20

【0131】

いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、非天然CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats: クラスタ化して規則的な配置の短い回文配列リピート) / Cas (CRISPR-associated: CRISPR関連) システムにおいて機能するCRISPR関連 (Cas) タンパク質またはCasヌクレアーゼを含む。細菌において、このシステムは、外来DNAに対する適応免疫を与えることができる (Barrangou, R., et al, 「CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes」 Science (2007) 315: 1709-1712、Makarova, K.S., et al, 「Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems」 Nat Rev Microbiol (2011) 9:467- 477、Garneau, J. E., et al, 「The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA」 Nature (2010) 468:67-71、Sapranauskas, R., et al, 「The Streptococcus thermophilus CRISPR/Cas system provides immunity in Escherichia coli」 Nucleic Acids Res (2011) 39: 9275-9282)。

30

【0132】

多様な哺乳動物、動物、植物、および酵母を含む広範囲にわたる種々の生物において、ゲノム工学ツールとして、CRISPR/Casシステム (例えば修飾型および/または無修飾型) を利用することができる。CRISPR/Casシステムは、遺伝子の発現および/または活性の標的調節または核酸編集のための、Casタンパク質と複合体形成したガイドRNA (gRNA) などのガイド核酸を含むことができる。RNAにガイドされたCasタンパク質 (例えばCas9ヌクレアーゼなどのCasヌクレアーゼ) は、配列依存的に、標的ポリヌクレオチド (例えばDNA) に、特異的に結合することができる。Casタンパク質がヌクレアーゼ活性を有する場合、それは、DNAを切断することができる (Gasiunas, G., et al, 「Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria」 Proc Natl Acad Sci USA (2012) 109:E2579-E286、Jinek, M., et al 「A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity」 Science (2012) 337:816-821、Sternberg, S. H., et al 「DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9」 Nature (2014) 507:62、Deltcheva, E., et al 「CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III」 Nature (2011) 471:602-607)、さまざまな生物およびモデル系においてプログラム可能なゲノム編集に幅広く使用されてきた (Cong, L., et al

40

50

「Multiplex genome engineering using CRISPR Cas systems」 Science (2013) 339:819-823、Jiang, W., et al 「RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems」 Nat.Biotechnol. (2013) 31:233-239、Sander, J. D. & Joung, J. K 「CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes」 Nature Biotechnol. (2014) 32:347-355)。

【0133】

場合により、Casタンパク質は、ヌクレアーゼ欠損タンパク質を与えるか、野生型Casタンパク質と比較して減少したヌクレアーゼ活性を持つタンパク質を与えるように、突然変異および/または修飾に付される。ヌクレアーゼ欠損タンパク質は、DNAに結合する能力を保つことはできるが、核酸切断活性を欠くか、低減した核酸切断活性を有する。Casヌクレアーゼ(例えば野生型ヌクレアーゼ活性を保っているもの、低減したヌクレアーゼ活性を有するもの、および/またはヌクレアーゼ活性を欠くもの)を含むアクチュエータモエティは、CRISPR/Casシステムにおいて、標的遺伝子または標的タンパク質のレベルおよび/または活性を調節する(例えば減少させ、増加させ、または排除する)ように機能することができる。Casタンパク質は標的ポリヌクレオチドに結合し、物理的妨害によって転写を妨げるか、非機能的遺伝子産物を与えるように核酸配列を編集することができる。

10

【0134】

いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、ガイドRNA(gRNA)などのガイド核酸と複合体を形成するCasタンパク質を含む。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、シングルガイドRNA(sgRNA)などのシングルガイド核酸と複合体を形成するCasタンパク質を含む。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、Casタンパク質との複合体を形成することができるガイドRNA(例えばsgRNA)などのガイド核酸と複合体形成していてもよいRNA結合タンパク質(RBP)を含む。

20

【0135】

図3Aは、アクチュエータモエティが、ガイド核酸(例えばsgRNA)と複合体形成していてもよいRNA結合タンパク質300aを含む、キメラ受容体ポリペプチドを含むシステムを模式的に図解している。例えばRNA結合タンパク質(RBP)からのガイド核酸の解離によって、または切断認識部位300cの切断によって、RBPから放出されると、ガイド核酸は、遺伝子の発現および/または活性を調節するように作動するか核酸配列を編集するように作動することができるCasタンパク質との複合体300bを形成することができる。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、標的DNA配列の転写活性化または転写抑制を誘導することができる、DNAヌクレアーゼ由来のヌクレアーゼヌルDNA結合タンパク質を含む。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、標的RNA配列の転写活性化または転写抑制を誘導することができる、RNAヌクレアーゼ由来のヌクレアーゼヌルRNA結合タンパク質を含む。例えばアクチュエータモエティは切断活性を欠くCasタンパク質を含むことができる。

30

【0136】

任意の適切なCRISPR/Casシステムを使用することができる。CRISPR/Casシステムはさまざまな命名システムを使って言及することができる。例示的な命名システムはMakarova, K.S. et al 「An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems」 Nat Rev Microbiol (2015) 13:722-736およびShmakov, S. et al 「Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems」 Mol Cell (2015) 60:1-13に掲載されている。CRISPR/Casシステムは、I型、II型、III型、IV型、V型、VI型システム、または他の任意の適切なCRISPR/Casシステムであることができる。ここで使用されるCRISPR/Casシステムは、クラス1、クラス2、または他の任意の適切に分類されたCRISPR/Casシステムであることができる。クラス1またはクラス2の決定は、エフェクターモジュールをコードする遺伝子に基づくことができる。クラス1システムは一般にマルチサブユニットcrRNA-エフェクター複合体を有し、一方クラス2システムは一般に単一のタンパク質、例えばCas9、Cpf1、C2c1、C2c2、C2c3、またはcrRNA-エフェクター複合体を有する。クラス1CRISPR/Casシステムは、調節を達成するために

40

50

、複数のCasタンパク質の複合体を使用しうる。クラス1CRISPR/Casシステムは、例えばI型（例えばI、IA、IB、IC、ID、IE、IF、IU型）、III型（例えばIII、IIIA、IIIB、IIIC、IIID型）、およびIV型（例えばIV、IVA、IVB型）のCRISPR/Casタイプを含むことができる。クラス2CRISPR/Casシステムは調節を達成するために単一の大きなCasタンパク質を使用することができる。クラス2CRISPR/Casシステムは例えばII型（例えばII、IIA、IIB型）およびV型のCRISPR/Casタイプを含むことができる。CRISPRシステムは互いに相補的であることができ、かつ/またはCRISPR座位を標的とするのを容易にするために機能ユニットをトランスに提供することができる。図17は、Makarova, K.S. et al, 「An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems」 Nat Rev Microbiol (2015) 13:722-736の図2から採った図であり、これは、CRISPR-Casシステムのサブタイプについて、ゲノム座位のアーキテクチャを示している。

10

【0137】

Casタンパク質を含むアクチュエータモエティは、クラス1またはクラス2のCasタンパク質であることができる。Casタンパク質は、I型、II型、III型、IV型、V型、またはVI型Casタンパク質であることができる。Casタンパク質は1つまたは複数のドメインを含むことができる。ドメインの非限定的な例として、ガイド核酸認識および/または結合ドメイン、ヌクレアーゼドメイン（例えばDNaseドメインまたはRNaseドメイン、RuvC、HNH）、DNA結合ドメイン、RNA結合ドメイン、ヘリカーゼドメイン、タンパク質-タンパク質相互作用ドメイン、および二量体化ドメインが挙げられる。ガイド核酸認識および/または結合ドメインはガイド核酸と相互作用することができる。ヌクレアーゼドメインは核酸切断のための触媒活性を含むことができる。ヌクレアーゼドメインは核酸切断を防ぐために触媒活性を欠くことができる。Casタンパク質は、他のタンパク質またはポリペプチドに融合されたキメラCasタンパク質であることができる。Casタンパク質は、例えば異なるCasタンパク質からのドメインを含む、さまざまなCasタンパク質のキメラであることができる。

20

【0138】

Casタンパク質の非限定的な例として、c2c1、C2c2、c2c3、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas5e (CasD)、Cas6、Cas6e、Cas6f、Cas7、Cas8a、Cas8a1、Cas8a2、Cas8b、Cas8c、Cas9 (Csn1またはCsx12)、Cas10、Cas10d、Cas10e、Cas10f、Cas10g、Cas10h、Cas10i、Cas10j、Cas10k、Cas10l、Cas10m、Cas10n、Cas10o、Cas10p、Cas10q、Cas10r、Cas10s、Cas10t、Cas10u、Cas10v、Cas10w、Cas10x、Cas10y、Cas10z、Cas10aa、Cas10ab、Cas10ac、Cas10ad、Cas10ae、Cas10af、Cas10ag、Cas10ah、Cas10ai、Cas10aj、Cas10ak、Cas10al、Cas10am、Cas10an、Cas10ao、Cas10ap、Cas10aq、Cas10ar、Cas10as、Cas10at、Cas10au、Cas10av、Cas10aw、Cas10ax、Cas10ay、Cas10az、Cas10ba、Cas10bb、Cas10bc、Cas10bd、Cas10be、Cas10bf、Cas10bg、Cas10bh、Cas10bi、Cas10bj、Cas10bk、Cas10bl、Cas10bm、Cas10bn、Cas10bo、Cas10bp、Cas10bq、Cas10br、Cas10bs、Cas10bt、Cas10bu、Cas10bv、Cas10bw、Cas10bx、Cas10by、Cas10bz、Cas10ca、Cas10cb、Cas10cc、Cas10cd、Cas10ce、Cas10cf、Cas10cg、Cas10ch、Cas10ci、Cas10cj、Cas10ck、Cas10cl、Cas10cm、Cas10cn、Cas10co、Cas10cp、Cas10cq、Cas10cr、Cas10cs、Cas10ct、Cas10cu、Cas10cv、Cas10cw、Cas10cx、Cas10cy、Cas10cz、Cas10da、Cas10db、Cas10dc、Cas10dd、Cas10de、Cas10df、Cas10dg、Cas10dh、Cas10di、Cas10dj、Cas10dk、Cas10dl、Cas10dm、Cas10dn、Cas10do、Cas10dp、Cas10dq、Cas10dr、Cas10ds、Cas10dt、Cas10du、Cas10dv、Cas10dw、Cas10dx、Cas10dy、Cas10dz、Cas10ea、Cas10eb、Cas10ec、Cas10ed、Cas10ee、Cas10ef、Cas10eg、Cas10eh、Cas10ei、Cas10ej、Cas10ek、Cas10el、Cas10em、Cas10en、Cas10eo、Cas10ep、Cas10eq、Cas10er、Cas10es、Cas10et、Cas10eu、Cas10ev、Cas10ew、Cas10ex、Cas10ey、Cas10ez、Cas10fa、Cas10fb、Cas10fc、Cas10fd、Cas10fe、Cas10ff、Cas10fg、Cas10fh、Cas10fi、Cas10fj、Cas10fk、Cas10fl、Cas10fm、Cas10fn、Cas10fo、Cas10fp、Cas10fq、Cas10fr、Cas10fs、Cas10ft、Cas10fu、Cas10fv、Cas10fw、Cas10fx、Cas10fy、Cas10fz、Cas10ga、Cas10gb、Cas10gc、Cas10gd、Cas10ge、Cas10gf、Cas10gg、Cas10gh、Cas10gi、Cas10gj、Cas10gk、Cas10gl、Cas10gm、Cas10gn、Cas10go、Cas10gp、Cas10gq、Cas10gr、Cas10gs、Cas10gt、Cas10gu、Cas10gv、Cas10gw、Cas10gx、Cas10gy、Cas10gz、Cas10ha、Cas10hb、Cas10hc、Cas10hd、Cas10he、Cas10hf、Cas10hg、Cas10hh、Cas10hi、Cas10hj、Cas10hk、Cas10hl、Cas10hm、Cas10hn、Cas10ho、Cas10hp、Cas10hq、Cas10hr、Cas10hs、Cas10ht、Cas10hu、Cas10hv、Cas10hw、Cas10hx、Cas10hy、Cas10hz、Cas10ia、Cas10ib、Cas10ic、Cas10id、Cas10ie、Cas10if、Cas10ig、Cas10ih、Cas10ii、Cas10ij、Cas10ik、Cas10il、Cas10im、Cas10in、Cas10io、Cas10ip、Cas10iq、Cas10ir、Cas10is、Cas10it、Cas10iu、Cas10iv、Cas10iw、Cas10ix、Cas10iy、Cas10iz、Cas10ja、Cas10jb、Cas10jc、Cas10jd、Cas10je、Cas10jf、Cas10jg、Cas10jh、Cas10ji、Cas10jj、Cas10jk、Cas10jl、Cas10jm、Cas10jn、Cas10jo、Cas10jp、Cas10jq、Cas10jr、Cas10js、Cas10jt、Cas10ju、Cas10jv、Cas10jw、Cas10jx、Cas10jy、Cas10jz、Cas10ka、Cas10kb、Cas10kc、Cas10kd、Cas10ke、Cas10kf、Cas10kg、Cas10kh、Cas10ki、Cas10kj、Cas10kk、Cas10kl、Cas10km、Cas10kn、Cas10ko、Cas10kp、Cas10kq、Cas10kr、Cas10ks、Cas10kt、Cas10ku、Cas10kv、Cas10kw、Cas10kx、Cas10ky、Cas10kz、Cas10la、Cas10lb、Cas10lc、Cas10ld、Cas10le、Cas10lf、Cas10lg、Cas10lh、Cas10li、Cas10lj、Cas10lk、Cas10ll、Cas10lm、Cas10ln、Cas10lo、Cas10lp、Cas10lq、Cas10lr、Cas10ls、Cas10lt、Cas10lu、Cas10lv、Cas10lw、Cas10lx、Cas10ly、Cas10lz、Cas10ma、Cas10mb、Cas10mc、Cas10md、Cas10me、Cas10mf、Cas10mg、Cas10mh、Cas10mi、Cas10mj、Cas10mk、Cas10ml、Cas10mm、Cas10mn、Cas10mo、Cas10mp、Cas10mq、Cas10mr、Cas10ms、Cas10mt、Cas10mu、Cas10mv、Cas10mw、Cas10mx、Cas10my、Cas10mz、Cas10na、Cas10nb、Cas10nc、Cas10nd、Cas10ne、Cas10nf、Cas10ng、Cas10nh、Cas10ni、Cas10nj、Cas10nk、Cas10nl、Cas10nm、Cas10nn、Cas10no、Cas10np、Cas10nq、Cas10nr、Cas10ns、Cas10nt、Cas10nu、Cas10nv、Cas10nw、Cas10nx、Cas10ny、Cas10nz、Cas10oa、Cas10ob、Cas10oc、Cas10od、Cas10oe、Cas10of、Cas10og、Cas10oh、Cas10oi、Cas10oj、Cas10ok、Cas10ol、Cas10om、Cas10on、Cas10oo、Cas10op、Cas10oq、Cas10or、Cas10os、Cas10ot、Cas10ou、Cas10ov、Cas10ow、Cas10ox、Cas10oy、Cas10oz、Cas10pa、Cas10pb、Cas10pc、Cas10pd、Cas10pe、Cas10pf、Cas10pg、Cas10ph、Cas10pi、Cas10pj、Cas10pk、Cas10pl、Cas10pm、Cas10pn、Cas10po、Cas10pp、Cas10pq、Cas10pr、Cas10ps、Cas10pt、Cas10pu、Cas10pv、Cas10pw、Cas10px、Cas10py、Cas10pz、Cas10qa、Cas10qb、Cas10qc、Cas10qd、Cas10qe、Cas10qf、Cas10qg、Cas10qh、Cas10qi、Cas10qj、Cas10qk、Cas10ql、Cas10qm、Cas10qn、Cas10qo、Cas10qp、Cas10qq、Cas10qr、Cas10qs、Cas10qt、Cas10qu、Cas10qv、Cas10qw、Cas10qx、Cas10qy、Cas10qz、Cas10ra、Cas10rb、Cas10rc、Cas10rd、Cas10re、Cas10rf、Cas10rg、Cas10rh、Cas10ri、Cas10rj、Cas10rk、Cas10rl、Cas10rm、Cas10rn、Cas10ro、Cas10rp、Cas10rq、Cas10rr、Cas10rs、Cas10rt、Cas10ru、Cas10rv、Cas10rw、Cas10rx、Cas10ry、Cas10rz、Cas10sa、Cas10sb、Cas10sc、Cas10sd、Cas10se、Cas10sf、Cas10sg、Cas10sh、Cas10si、Cas10sj、Cas10sk、Cas10sl、Cas10sm、Cas10sn、Cas10so、Cas10sp、Cas10sq、Cas10sr、Cas10ss、Cas10st、Cas10su、Cas10sv、Cas10sw、Cas10sx、Cas10sy、Cas10sz、Cas10ta、Cas10tb、Cas10tc、Cas10td、Cas10te、Cas10tf、Cas10tg、Cas10th、Cas10ti、Cas10tj、Cas10tk、Cas10tl、Cas10tm、Cas10tn、Cas10to、Cas10tp、Cas10tq、Cas10tr、Cas10ts、Cas10tt、Cas10tu、Cas10tv、Cas10tw、Cas10tx、Cas10ty、Cas10tz、Cas10ua、Cas10ub、Cas10uc、Cas10ud、Cas10ue、Cas10uf、Cas10ug、Cas10uh、Cas10ui、Cas10uj、Cas10uk、Cas10ul、Cas10um、Cas10un、Cas10uo、Cas10up、Cas10uq、Cas10ur、Cas10us、Cas10ut、Cas10uu、Cas10uv、Cas10uw、Cas10ux、Cas10uy、Cas10uz、Cas10va、Cas10vb、Cas10vc、Cas10vd、Cas10ve、Cas10vf、Cas10vg、Cas10vh、Cas10vi、Cas10vj、Cas10vk、Cas10vl、Cas10vm、Cas10vn、Cas10vo、Cas10vp、Cas10vq、Cas10vr、Cas10vs、Cas10vt、Cas10vu、Cas10vv、Cas10vw、Cas10vx、Cas10vy、Cas10vz、Cas10wa、Cas10wb、Cas10wc、Cas10wd、Cas10we、Cas10wf、Cas10wg、Cas10wh、Cas10wi、Cas10wj、Cas10wk、Cas10wl、Cas10wm、Cas10wn、Cas10wo、Cas10wp、Cas10wq、Cas10wr、Cas10ws、Cas10wt、Cas10wu、Cas10wv、Cas10ww、Cas10wx、Cas10wy、Cas10wz、Cas10xa、Cas10xb、Cas10xc、Cas10xd、Cas10xe、Cas10xf、Cas10xg、Cas10xh、Cas10xi、Cas10xj、Cas10xk、Cas10xl、Cas10xm、Cas10xn、Cas10xo、Cas10xp、Cas10xq、Cas10xr、Cas10xs、Cas10xt、Cas10xu、Cas10xv、Cas10xw、Cas10xx、Cas10xy、Cas10xz、Cas10ya、Cas10yb、Cas10yc、Cas10yd、Cas10ye、Cas10yf、Cas10yg、Cas10yh、Cas10yi、Cas10yj、Cas10yk、Cas10yl、Cas10ym、Cas10yn、Cas10yo、Cas10yp、Cas10yq、Cas10yr、Cas10ys、Cas10yt、Cas10yu、Cas10yv、Cas10yw、Cas10yx、Cas10yy、Cas10yz、Cas10za、Cas10zb、Cas10zc、Cas10zd、Cas10ze、Cas10zf、Cas10zg、Cas10zh、Cas10zi、Cas10zj、Cas10zk、Cas10zl、Cas10zm、Cas10zn、Cas10zo、Cas10zp、Cas10zq、Cas10zr、Cas10zs、Cas10zt、Cas10zu、Cas10zv、Cas10zw、Cas10zx、Cas10zy、Cas10zz

30

【0139】

Casタンパク質は任意の適切な生物に由来しうる。非限定的な例として、化膿連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、ストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*)、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus sp.*)、黄色ブドウ球菌、ノカルジオプシス・ダソンビレイ (*Nocardioopsis dassonvillei*)、ストレプトミセス・プリステチナエ・スピラリス (*Streptomyces pristinae spiralis*)、ストレプトミセス・ピリドクロモゲンス (*Streptomyces viridochromogenes*)、ストレプトミセス・ピリドクロモゲンス (*Streptomyces viridochromogenes*)、ストレプトスポランジウム・ロゼウム (*Streptosporangium roseum*)、ストレプトスポランジウム・ロゼウム、アリシクロバチルス・アシドカルダリウス (*Alicyclobacillus acidocaldarius*)、バチルス・シュードミコイデス (*Bacillus pseudomycooides*)、バチルス・セレニチレデュセンス (*Bacillus selenitireducens*)、エクシグオバクテリウム・シビリカム (*Exiguobacterium sibiricum*)、ラクトバチルス・デルブリュッキ (*Lactobacillus delbrueckii*)、ラクトバチルス・サリパリウス (*Lactobacillus salivarius*)、マイクロシラ・マリナ (*Microscilla marina*)、バークホルデルリア目の細菌 (*Burkholderiales bacterium*)、ポラロモナス・ナフタレニボランス (*Polaromonas naphthalenivorans*)、ポラロモナ

40

50

ス属の種 (*Polaromonas* sp.)、クロコスファエラ・ワトソニイ (*Crocospaera wats onii*)、シアノセイス属の種 (*Cyanothece* sp.)、ミクロシスティス・アエルギノーサ (*Microcystis aeruginosa*)、緑膿菌、シネコッカス属の種 (*Synechococcus* sp.)、アセトハロビウム・アラビティカム (*Acetohalobium arabaticum*)、アンモニフェクス・デゲンシイ (*Ammonifex degensii*)、カルジセルロシルプトル・ベクシイ (*Caldicelulosiruptor becsicii*)、カンジダツス・デサルホルディス (*Candidatus Desulfor udis*)、クロストリジウム・ボツリナム (*Clostridium botulinum*)、クロストリジウム・ディフィシレ、フィネゴルディア・マグナ (*Finegoldia magna*)、ナトラナエロピウス・サーモフィラス (*Natranaerobius thermophilus*)、ペロトマクルム・サーモプロピオニカム (*Pelotomaculum thermopropionicum*)、アシジチオバチルス・カルダス (*Acidithiobacillus caldus*)、アシジチオバチルス・フェロオキシダンス (*Acidithiobacillus ferrooxidans*)、アロクロマチウム・ビノスム (*Allochromatium vinosum*)、マリノバクター属の種 (*Marinobacter* sp.)、ニトロソコッカス・ハロフィラス (*Nitrosococcus halophilus*)、ニトロソコッカス・ワトソニイ (*Nitrosococcus watsoni*)、シュードアルテロモナス・ハロプランクティス (*Pseudoalteromonas haloplanktis*)、クテドノバクター・ラセミファー (*Ktedonobacter racemifer*)、メタノハロビウム・エベスチガタム (*Methanohalobium evestigatum*)、アナベナ・バリアビリス (*Anabaena variabilis*)、ノジュラリア・スプミゲナ (*Nodularia spumigena*)、ノストック属の種 (*Nostoc* sp.)、アルスロスピラ・マキシマ (*Arthrospira maxima*)、アルスロスピラ・プラテンシス (*Arthrospira platensis*)、アルスロスピラ属の種 (*Arthrospira* sp.)、リングピア属の種 (*Lyngbya* sp.)、ミクロコレウス・クソノプラステス (*Microcoleus chthonoplastes*)、オシキラトリア属の種 (*Oscillatoria* sp.)、ペトロトガ・モビリス (*Petrotoga mobilis*)、サーモシフォ・アフリカヌス (*Thermosiphon africanus*)、アカリオクロリス・マリナ (*Acaryochloris marina*)、レプトトリキア・シャヒイ (*Leptotrichia shahii*)、およびフランシセラ・ノビシダ (*Francisella novicida*) が挙げられる。いくつかの局面において、生物は化膿連鎖球菌 (*S. pyogenes*) である。いくつかの局面において、生物は黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) である。いくつかの局面において、生物はストレプトコッカス・サーモフィラス (*S. thermophilus*) である。

【 0 1 4 0 】

Casタンパク質はさまざまな細菌種、例えば限定するわけではないが、ベイロネラ・アティピカル (*Veillonella atypical*)、フソバクテリウム・ヌクレアツム (*Fusobacterium nucleatum*)、フィリファクター・アロシス (*Filifactor alocis*)、ソロバクテリウム・モオレイ (*Solobacterium moorei*)、コプロコッカス・カツス (*Coprococcus catus*)、トレポネマ・デンティコーラ (*Treponema denticola*)、ペプトニフィラス・デュエルデニイ (*Peptoniphilus duerdenii*)、カテニバクテリウム・ミツオカイ (*Catenibacterium mitsuokai*)、ストレプトコッカス・ミュータンス (*Streptococcus mutans*)、リステリア・イノキュア (*Listeria innocua*)、スタフィロコッカス・シュードインテルメジウス (*Staphylococcus pseudintermedius*)、アシドアミノコッカス・インテスチン (*Acidaminococcus intestine*)、オルセネラ・ウリ (*Olsenella uli*)、オエノコッカス・キタハラエ (*Oenococcus kitaharae*)、ビフィドバクテリウム・ビフィドゥム (*Bifidobacterium bifidum*)、ラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasseri*)、フィネゴルディア・マグナ (*Finegoldia magna*)、マイコプラズマ・モービレ (*Mycoplasma mobile*)、マイコプラズマ・ガリセプチカム (*Mycoplasma gallisepticum*)、マイコプラズマ・オビニューモニエ (*Mycoplasma ovipneumoniae*)、マイコプラズマ・カニス (*Mycoplasma canis*)、マイコプラズマ・シノビエ (*Mycoplasma synoviae*)、ユウバクテリウム・レクタレ (*Eubacterium rectale*)、ストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*)、ユウバクテリウム・ドリクム (*Eubacterium dolichum*)、ラクトバチルス・コリニフォルミス亜種トルクエンズ (*Lactobacillus coryniformis*)

subsp. *Torquens*)、イリオバクター・ポリトロパス (*Ilyobacter polytropus*)、ルミノコッカス・アルバス (*Ruminococcus albus*)、アッカーマンシア・ムチニフィラ (*Akkermansia muciniphila*)、アシドサーマス・セルロリチカス (*Acidothermus cellulolyticus*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*)、コリネバクテリウム・ジフテリア (*Corynebacterium diphtheria*)、エルシミクロビウム・ミヌツム (*Elusimicrobium minutum*)、ニトラチフラクター・サルスギニス (*Nitratifactor salsuginis*)、スフェロケタ・クロプス (*Sphaerochaeta globus*)、フィプロバクター・スクシノゲネス亜種スクシノアゲネス (*Fibrobacter succinogenes* subsp. *Succinogenes*)、バクテロイデス・フラジリス (*Bacteroides fragilis*)、カプノシトファーガ・オクラセア (*Capnocytophaga ochracea*)、ロドシュードモナス・パルストリス (*Rhodopseudomonas palustris*)、プレボテラ・ミカンス (*Prevotella micans*)、プレボテラ・ルミニコラ (*Prevotella ruminicola*)、フラボバクテリウム・コルムナレ (*Flavobacterium columnare*)、アミノモナス・パウシボランス (*Aminomonas paucivorans*)、ロドスピリラム・ラブラム (*Rhodospirillum rubrum*)、カンジダトス・プニセイスピリナム・マリナム (*Candidatus Puniceispirillum marinum*)、ベルミネフロバクター・エイセニアエ (*Verminephrobacter eiseniae*)、ラルストニア・シジギイ (*Ralstonia syzygii*)、ジノロセオバクター・シバエ (*Dinoroseobacter shibae*)、アゾスピリラム (*Azospirillum*)、ニトロバクター・ハンブルゲンシス (*Nitrobacter hamburgensis*)、ブラジリゾビウム (*Bradyrhizobium*)、ウォリネラ・スクシノゲネス (*Wolinella succinogenes*)、カンピロバクター・ジェジュニ亜種ジェジュニ (*Campylobacter jejuni* subsp. *Jejuni*)、ヘリコバクター・ムステラエ (*Helicobacter mustelae*)、バチルス・セレウス (*Bacillus cereus*)、アシドボラクス・エブレウス (*Acidovorax ebreus*)、クロストリジウム・パーフリンゲンシス (*Clostridium perfringens*)、パルピバクラム・ラバメンティボランス (*Parvibaculum lavamentivorans*)、ロゼブリア・インテスチナリス (*Roseburia intestinalis*)、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*)、パストレラ・ムルトシダ亜種ムルトシダ (*Pasteurella multocida* subsp. *Multocida*)、ステレラ・ワズワルテンシス (*Sutterella wadsworthensis*)、プロテオバクテリウム (*proteobacterium*)、レジオネラ・ニューモフィラ (*Legionella pneumophila*)、パラステレラ・エクスクレメンチホミニス (*Parasutterella excrementihominis*)、ウォリネラ・スクシノゲネス (*Wolinella succinogenes*)、およびフランシセラ・ノビシダ (*Francisella novicida*) に由来しうる。

【 0 1 4 1 】

本明細書において使用されるCasタンパク質は、野生型または修飾型のCasタンパク質であることができる。Casタンパク質は、野生型または修飾Casタンパク質の活性バリエーション、不活性バリエーション、またはフラグメントであることができる。Casタンパク質は、野生型のCasタンパク質と比較して欠失、挿入、置換、バリエーション、突然変異、融合、キメラ、またはそれらの任意の組合せなどといったアミノ酸変化を含むことができる。Casタンパク質は、野生型の例示的Casタンパク質に対して少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性または配列類似性を持つポリペプチドであることができる。Casタンパク質は、野生型の例示的Casタンパク質に対して多くて約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%の配列同一性および/または配列類似性を持つポリペプチドであることができる。バリエーションまたはフラグメントは、野生型もしくは修飾Casタンパク質またはその一部分に対して少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性または配列類似性を含むことができる。バリエーションまたはフラグメントは、核酸切断活性を欠いた状態で、ガイド核酸との複合体として核酸座位を標的とすることができる。

【 0 1 4 2 】

Casタンパク質は、1つまたは複数のヌクレアーゼドメイン、例えばDNaseドメインを含むことができる。例えばCas9タンパク質は、RuvC様ヌクレアーゼドメインおよび/またはHNH様ヌクレアーゼドメインを含むことができる。RuvCドメインおよびHNHドメインはそれぞれ二本鎖DNAの異なる鎖を切断して、DNAに二本鎖切断を生じさせることができる。Casタンパク質はヌクレアーゼドメインを1つだけ含む場合もある（例えばCpf1はRuvCドメインを含むが、HNHドメインを欠く）。

【0143】

Casタンパク質は、野生型Casタンパク質のヌクレアーゼドメイン（例えばRuvCドメイン、HNHドメイン）に対して少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性または配列類似性を有するアミノ酸配列を含むことができる。

10

【0144】

遺伝子発現の調節を最適化するためにCasタンパク質を修飾することができる。核酸結合アフィニティー、核酸結合特異性、および/または酵素活性を増加または減少させるために、Casタンパク質を修飾することができる。Casタンパク質の他の活性または性質、例えば安定性を変化させるために、Casタンパク質を修飾することもできる。例えば、Casタンパク質の1つまたは複数のヌクレアーゼドメインを修飾し、欠失させ、または不活化することができる、あるいはCasタンパク質をトランケートすることで、タンパク質の機能にとって必須でないドメインを除去するか、遺伝子発現を調節するためにCasタンパク質の活性を最適化（例えば強化または低減）することができる。

20

【0145】

Casタンパク質は融合タンパク質であることができる。例えばCasタンパク質は、切断ドメイン、エピジェネティック修飾ドメイン、転写活性化ドメイン、または転写抑制因子ドメインに融合することができる。Casタンパク質は、増加した安定性または減少した安定性を与える異種ポリペプチドに融合することもできる。融合されるドメインまたは異種ポリペプチドは、Casタンパク質のN末、C末、または内部に位置しうる。

【0146】

Casタンパク質は任意の形態で提供することができる。例えばCasタンパク質は、Casタンパク質のみまたはガイド核酸と複合体形成したCasタンパク質などといったタンパク質の形態で、提供することができる。Casタンパク質は、Casタンパク質をコードする核酸の形態で、例えばRNA（例えばメッセンジャーRNA（mRNA））またはDNAの形態で、提供することができる。

30

【0147】

Casタンパク質をコードする核酸は、特定の細胞または生物におけるタンパク質への効率のよい翻訳のために、コドン最適化することができる。

【0148】

Casタンパク質をコードする核酸は、細胞のゲノムに安定に組み込まれうる。Casタンパク質をコードする核酸は、細胞中で活性化プロモーターに機能的に連結することができる。Casタンパク質をコードする核酸は発現コンストラクト中のプロモーターに機能的に連結することができる。発現コンストラクトとしては、関心対象の遺伝子または他の核酸配列（例えばCas遺伝子）を発現させる能力を有しかつそのような関心対象の核酸配列を標的細胞に移入することができる、任意の核酸コンストラクトを挙げることができる。

40

【0149】

いくつかの態様では、Casタンパク質がデッド（dead）Casタンパク質である。デッドCasタンパク質は、核酸切断活性を欠くタンパク質であることができる。

【0150】

Casタンパク質は、野生型Casタンパク質の修飾型を含むことができる。野生型Casタンパク質の修飾型は、Casタンパク質の核酸切断活性を低減するアミノ酸変化（例えば欠失、挿入、または置換）を含むことができる。例えば修飾型のCasタンパク質は、野生型Casタ

50

ンパク質（例えば化膿連鎖球菌からのCas9）の90%未満、80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、10%未満、5%未満、または1%未満の核酸切断活性を有しうる。修飾型のCasタンパク質は実質的な核酸切断活性を有しない場合がある。Casタンパク質が実質的な核酸切断活性を有しない修飾型である場合は、それを、酵素的に不活性および/または「デッド」（「d」と略記する）ということができる。デッドCasタンパク質（例えばdCas、dCas9）は、標的ポリヌクレオチドに結合することはできるが、標的ポリヌクレオチドを切断することはできない。いくつかの局面において、デッドCasタンパク質はデッドCas9タンパク質である。

【0151】

dCas9ポリペプチドは、標的DNAの転写を活性化または抑制するために、シングルガイドRNA（sgRNA）と会合することができる。sgRNAは、工学的に操作されたキメラ受容体ポリペプチドを発現する細胞に導入することができる。場合により、そのような細胞は、同じ核酸を標的とする1つまたは複数の異なるsgRNAを含有する。別の例では、sgRNAが細胞中の異なる核酸を標的とする。ガイドRNAが標的とする核酸は、免疫細胞などの細胞中で発現する核酸であればなんでもよい。標的となる核酸は、免疫細胞の調節に關与する遺伝子であることができる。いくつかの態様において、核酸はがんと關連する。がんと關連する核酸は、細胞周期遺伝子、細胞応答遺伝子、アポトーシス遺伝子、または貪食遺伝子であることができる。組換えガイドRNAは、CRISPRタンパク質、ヌクレアーゼナルCRISPRタンパク質、そのバリエーション、その誘導体、またはそのフラグメントによって認識されうる。

【0152】

酵素的に不活性とは、ポリヌクレオチド中の核酸配列に配列特異的に結合することはできるが、標的ポリヌクレオチドを切断することはできないポリペプチドを指すことができる。酵素的に不活性な部位指向性ポリペプチドは、酵素的に不活性なドメイン（例えばヌクレアーゼドメイン）を含むことができる。酵素的に不活性とは活性がないことを指しうる。酵素的に不活性とは活性が実質的にないことを指しうる。酵素的に不活性とは活性が本質的にないことを指しうる。酵素的に不活性とは、野生型の例示的活性（例えば核酸切断活性、野生型Cas9活性）と比較して、1%未満、2%未満、3%未満、4%未満、5%未満、6%未満、7%未満、8%未満、9%未満、または10%未満の活性を指しうる。

【0153】

Casタンパク質の1つまたは複数のヌクレアーゼドメイン（例えばRuvC、HNH）は、それらがもはや機能的でなくなるか、低減したヌクレアーゼ活性を含むように、欠失または突然変異させることができる。例えば、少なくとも2つのヌクレアーゼドメインを含むCasタンパク質（例えばCas9）において、ヌクレアーゼドメインの一方を欠失または突然変異させた場合、その結果生じるCasタンパク質は、ニックラーゼと呼ばれ、二本鎖DNA内のCRISPR RNA（crRNA）認識配列に一本鎖切断を生じさせることはできるが、二本鎖切断を生じさせることはできない。そのようなニックラーゼは、相補鎖または非相補鎖を切断することはできるが、両方を切断することはできない。Casタンパク質のヌクレアーゼドメインのすべて（例えばCas9タンパク質中のRuvCヌクレアーゼドメインとHNHヌクレアーゼドメインの両方；Cpf1タンパク質中のRuvCヌクレアーゼドメイン）を欠失または突然変異させた場合、その結果生じるCasタンパク質は、二本鎖DNAの両方の鎖を切断する能力が低減しているか、またはそのような能力を有することができない。Cas9タンパク質をニックラーゼに変換することができる突然変異の一例は、化膿連鎖球菌からのCas9のRuvCドメイン中のD10A（Cas9の10番目におけるアスパラギン酸からアラニンへの）突然変異である。化膿連鎖球菌からのCas9のHNHドメインにおけるH939A（アミノ酸位置839においてヒスチジンからアラニンへ）またはH840A（アミノ酸位置840においてヒスチジンからアラニンへ）は、このCas9をニックラーゼに変換することができる。Cas9タンパク質をデッドCas9に変換することができる突然変異の一例は、化膿連鎖球菌からのCas9のRuvCドメイン中のD10A（Cas9の10番目におけるアスパラギン酸からアラニンへの）突然変異およびHNHドメイン中のH939A（アミノ酸位置839においてヒスチジンからアラニンへ）

10

20

30

40

50

またはH840A（アミノ酸位置840においてヒスチジンからアラニンへ）である。

【0154】

デッドCasタンパク質は、野生型のタンパク質と比較して1つまたは複数の突然変異を含むことができる。突然変異は、野生型Casタンパク質の複数の核酸切断ドメインのうちの1つまたは複数における核酸切断活性の90%未満、80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、10%未満、5%未満、または1%未満の核酸切断活性をもたらすことができる。突然変異は、複数の核酸切断ドメインのうちの1つまたは複数であって、標的核酸の相補鎖を切断する能力は保っているが、標的核酸の非相補鎖を切断する能力は低減しているものをもたらすことができる。突然変異は、複数の核酸切断ドメインのうちの1つまたは複数であって、標的核酸の非相補鎖を切断する能力は保っているが、標的核酸の相補鎖を切断する能力は低減しているものをもたらすことができる。突然変異は、複数の核酸切断ドメインのうちの1つまたは複数であって、標的核酸の相補鎖および非相補鎖を切断する能力を欠くものをもたらすことができる。ヌクレアーゼドメイン中の突然変異させるべき残基は、ヌクレアーゼの1つまたは複数の触媒残基に対応しうる。例えば、複数の核酸切断ドメイン（例えばヌクレアーゼドメイン）のうちの1つまたは複数を生産するために、Asp10、His840、Asn854およびAsn856などといった、野生型の例示的化膿連鎖球菌Cas9ポリペプチド中の残基を、突然変異させることができる。Casタンパク質のヌクレアーゼドメイン中の突然変異させるべき残基は、例えば配列アラインメントおよび/または構造アラインメントによって決定した場合に、野生型化膿連鎖球菌Cas9ポリペプチドの残基Asp10、His840、Asn854およびAsn856に対応しうる。

10

20

【0155】

非限定的な例として、残基D10、G12、G17、E762、H840、N854、N863、H982、H983、A984、D986、および/またはA987（または任意のCasタンパク質の対応する突然変異）を突然変異させることができる。例えばD10A、G12A、G17A、E762A、H840A、N854A、N863A、H982A、H983A、A984A、および/またはD986Aなど。アラニン置換以外の突然変異も適切でありうる。

【0156】

D10A突然変異をH840A、N854A、またはN856A突然変異のうちの1つまたは複数と組み合わせ、DNA切断活性を実質的に欠くCas9タンパク質（例えばデッドCas9タンパク質）を生産することができる。H840A突然変異を、D10A、N854A、またはN856A突然変異のうちの1つまたは複数と組み合わせ、DNA切断活性を実質的に欠く部位指向性ポリペプチドを生産することができる。N854A突然変異を、H840A、D10A、またはN856A突然変異のうちの1つまたは複数と組み合わせ、DNA切断活性を実質的に欠く部位指向性ポリペプチドを生産することができる。N856A突然変異を、H840A、N854A、またはD10A突然変異のうちの1つまたは複数と組み合わせ、DNA切断活性を実質的に欠く部位指向性ポリペプチドを生産することができる。

30

【0157】

いくつかの態様において、Casタンパク質はクラス2のCasタンパク質である。いくつかの態様において、Casタンパク質はII型Casタンパク質である。いくつかの態様において、Casタンパク質はCas9タンパク質であるか、Cas9タンパク質の修飾型であるか、またはCas9タンパク質に由来する。例えば切断活性を欠くCas9タンパク質。いくつかの態様において、Cas9タンパク質は化膿連鎖球菌からのCas9タンパク質（例えばSwissProtアクセッション番号Q99ZW2）である。いくつかの態様において、Cas9タンパク質は黄色ブドウ球菌からのCas9（例えばSwissProtアクセッション番号J7RUA5）である。いくつかの態様において、Cas9タンパク質は、化膿連鎖球菌または黄色ブドウ球菌からのCas9タンパク質の修飾型である。いくつかの態様において、Cas9タンパク質は、化膿連鎖球菌または黄色ブドウ球菌からのCas9タンパク質に由来する。例えば、切断活性を欠く化膿連鎖球菌または黄色ブドウ球菌Cas9タンパク質。

40

【0158】

50

Cas9とは、一般に、野生型の例示的Cas9ポリペプチド（例えば化膿連鎖球菌からのCas9）に対して、少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%の配列同一性および/または配列類似性を持つポリペプチドを指しうる。Cas9とは、野生型の例示的Cas9ポリペプチド（例えば化膿連鎖球菌からのもの）に対して、多くて約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%の配列同一性および/または配列類似性を持つポリペプチドを指しうる。Cas9とは、欠失、挿入、置換、バリエーション、突然変異、融合、キメラ、またはそれらの任意の組合せなどのアミノ酸変化を含むことができる野生型または修飾型のCas9タンパク質を指しうる。

【0159】

いくつかの態様において、アクチュエータモエティは「ジンクフィンガーヌクレアーゼ」、すなわち「ZFN」を含む。ZFNとは、切断ドメイン、例えばFokIの切断ドメインと、DNAおよびRNAなどのポリヌクレオチドに結合することができる少なくとも1つのジンクフィンガーモチーフ（例えば少なくとも2、3、4、または5個のジンクフィンガーモチーフ）との融合物を指す。2つの個別のZFNが一定の配向および間隔でポリヌクレオチド中の一定の位置でヘテロ二量体化すると、そのポリヌクレオチドの切断が起こりうる。例えばDNAに結合するZFNはDNA中の二本鎖切断を誘導することができる。2つの切断ドメインを二量体化し、それらにDNAを切断させるために、2つの個別のZFNは、それぞれのC末で、一定距離を置いて、DNAの反対鎖に結合することができる。場合により、ジンクフィンガードメインと切断ドメインとの間のリンカー配列は、各結合部位の5'エッジが、約5~7塩基対で分離されていることを必要としうる。場合により、切断ドメインは、各ジンクフィンガードメインのC末に融合される。例示的なZFNとして、Urnov et al., *Nature Reviews Genetics*, 2010, 11:636-646、Gaj et al., *Nat Methods*, 2012, 9(8):805-7、米国特許第6,534,261号、同第6,607,882号、同第6,746,838号、同第6,794,136号、同第6,824,978号、同第6,866,997号、同第6,933,113号、同第6,979,539号、同第7,013,219号、同第7,030,215号、同第7,220,719号、同第7,241,573号、同第7,241,574号、同第7,585,849号、同第7,595,376号、同第6,903,185号、同第6,479,626号、ならびに米国出願公開第2003/0232410号および同第2009/0203140号に記載されているものが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【0160】

いくつかの態様において、ZFNを含むアクチュエータモエティは、DNAなどの標的ポリヌクレオチド中に二本鎖切断を生じさせることができる。DNA中の二本鎖切断は、遺伝子修飾の導入（例えば核酸編集）を可能にするDNA切断修復をもたらす。DNA切断修復は、非相同末端結合（NHEJ）または相同組換え修復（homology-directed repair）（HDR）によって起こりうる。HDRでは、標的DNAの部位に隣接するホモロジーアームを含有するドナーDNA修復テンプレートを、用意することができる。いくつかの態様において、ZFNは、部位特異的一本鎖DNA切断、すなわちニックを誘発し、よってHDRをもたらすジンクフィンガーニッカーゼである。ジンクフィンガーニッカーゼの説明は、例えばRamirez et al., *Nucl Acids Res*, 2012, 40(12):5560-8、Kim et al., *Genome Res*, 2012, 22(7):1327-33に見いだされる。いくつかの態様において、ZFNは、ポリヌクレオチド（例えばDNAおよび/またはRNA）に結合するが、ポリヌクレオチドを切断することはできない。

【0161】

いくつかの態様において、ZFNを含むアクチュエータモエティの切断ドメインは、野生型切断ドメインの修飾型を含む。修飾型の切断ドメインは、切断ドメインの核酸切断活性を低減するアミノ酸変化（例えば欠失、挿入、または置換）を含むことができる。例えば修飾型の切断ドメインは、野生型切断ドメインの核酸切断活性の90%未満、80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、10%未満、5%未満、または1%未満の核酸切断活性を有することができる。修飾型の切断ドメインは、実質的な核酸切断活性を有しない場合がある。いくつかの態様において、切断ドメインは酵素的に不活性である。

10

20

30

40

50

【0162】

いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、「TALEN」、すなわち「TAL-エフェクターヌクレアーゼ」を含む。TALENとは、一般にDNA結合性タンデムリピートの中央ドメインと切断ドメインとを含有する工学的に操作された転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼを指す。TALENは、TALエフェクターDNA結合ドメインをDNA切断ドメインに融合することによって生産することができる。場合により、DNA結合性タンデムリピートは、長さにして33~35アミノ酸を含み、少なくとも1つの特異的DNA塩基対を認識することができる2つの超可変アミノ酸残基を12番目と13番目に含有する。転写活性化因子様エフェクター(TALE)タンパク質は、野生型もしくは突然変異型FokIエンドヌクレアーゼまたはFokIの触媒ドメインなどのヌクレアーゼに融合することができる。FokIをTALENに使用するために、例えば切断特異性または切断活性を改良する数個の突然変異が、FokIに加えられている。そのようなTALENは所望する任意のDNA配列に結合するように工学的に操作することができる。TALENは、標的DNA配列中に二本鎖切断を作り出し、次にそれがNHEJまたはHDRを起こすことによって遺伝子修飾(例えば核酸配列編集)を生じさせるために、使用することができる。場合によっては、HDRを促進するために一本鎖ドナーDNA修復テンプレートが用意される。TALENとそれらを使った遺伝子編集に関する詳細な説明は、例えば米国特許第8,440,431号、同第8,440,432号、同第8,450,471号、同第8,586,363号、および同第8,697,853号、Scharenberg et al., *Curr Gene Ther*, 2013, 13(4):291-303、Gaj et al., *Nat Methods*, 2012, 9(8):805-7、Beurdeley et al., *Nat Commun*, 2013, 4:1762、ならびに Joung and Sander, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(1):49-55に見いだされる。

10

20

【0163】

いくつかの態様において、TALENは、ヌクレアーゼ活性が低減するように工学的に操作される。いくつかの態様において、TALENのヌクレアーゼドメインは、野生型ヌクレアーゼドメインの修飾型を含む。修飾型のヌクレアーゼドメインは、ヌクレアーゼドメインの核酸切断活性を低減するアミノ酸変化(例えば欠失、挿入、または置換)を含むことができる。例えば修飾型のヌクレアーゼドメインは、野生型ヌクレアーゼドメインの核酸切断活性の90%未満、80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、10%未満、5%未満、または1%未満の核酸切断活性を有することができる。修飾型のヌクレアーゼドメインは、実質的な核酸切断活性を有しない場合がある。いくつかの態様において、ヌクレアーゼドメインは酵素的に不活性である。

30

【0164】

いくつかの態様において、転写活性化因子様エフェクター(TALE)タンパク質は、転写を調整することができてヌクレアーゼを含まないドメインに融合される。いくつかの態様において、転写活性化因子様エフェクター(TALE)タンパク質は、転写活性化因子として機能するように設計される。いくつかの態様において、転写活性化因子様エフェクター(TALE)タンパク質は、転写抑制因子として機能するように設計される。例えば、転写活性化因子様エフェクター(TALE)タンパク質のDNA結合ドメインを、1つまたは複数の転写活性化ドメインに、または1つもしくは複数の転写抑制ドメインに、融合(または連結)することができる。転写活性化ドメインの非限定的な例として、単純ヘルペスVP16活性化ドメインおよびVP16活性化ドメインの四量体リピート、例えばVP64活性化ドメインが挙げられる。転写抑制ドメインの非限定的な例として、Kruppel関連ボックスドメインが挙げられる。

40

【0165】

いくつかの態様において、アクチュエータモエティはメガヌクレアーゼを含む。メガヌクレアーゼは一般に、高度に特異的であることができるレアカッター(rare-cutting)エンドヌクレアーゼまたはホーミングエンドヌクレアーゼを指す。メガヌクレアーゼは、少なくとも12塩基対長、例えば12~40塩基対、12~50塩基対、または12~60塩基対長の範囲のDNA標的部を認識することができる。メガヌクレアーゼは、モジュール型DNA結合性ヌクレアーゼ、例えば少なくとも1つのエンドヌクレアーゼ触媒ドメインと核酸標的配

50

列を指定する少なくとも1つのDNA結合ドメインまたはタンパク質とを含む任意の融合タンパク質であることができる。DNA結合ドメインは、一本鎖または二本鎖DNAを認識する少なくとも1つのモチーフを含有することができる。メガヌクレアーゼは単量体型または二量体型であることができる。いくつかの態様において、メガヌクレアーゼは天然のもの（自然界に見いだされるもの）または野生型であり、他の例では、メガヌクレアーゼが非天然物、人工物、工学的に操作されたもの、合成物、合理的に設計されたもの、または人造物である。いくつかの態様では、本開示のメガヌクレアーゼとして、I-CreIメガヌクレアーゼ、I-CeuIメガヌクレアーゼ、I-MsoIメガヌクレアーゼ、I-SceIメガヌクレアーゼ、それらのバリエーション、それらの誘導体、およびそれらのフラグメントが挙げられる。有用なメガヌクレアーゼと遺伝子編集におけるそれらの応用について詳細な説明は、例えばSilva et al., *Curr Gene Ther*, 2011, 11 (1):11-27、Zaslavoskiy et al., *BMC Bioinformatics*, 2014, 15:191、Takeuchi et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111 (11):4061-4066、ならびに米国特許第7,842,489号、同第7,897,372号、同第8,021,867号、同第8,163,514号、同第8,133,697号、同第8,021,867号、同第8,119,361号、同第8,119,381号、同第8,124,36号、および同第8,129,134号に見いだされる。

10

【0166】

いくつかの態様において、メガヌクレアーゼのヌクレアーゼドメインは、野生型ヌクレアーゼドメインの修飾型を含む。修飾型のヌクレアーゼドメインは、ヌクレアーゼドメインの核酸切断活性を低減するアミノ酸変化（例えば欠失、挿入、または置換）を含むことができる。例えば修飾型のヌクレアーゼドメインは、野生型ヌクレアーゼドメインの核酸切断活性の90%未満、80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、10%未満、5%未満、または1%未満の核酸切断活性を有することができる。修飾型のヌクレアーゼドメインは、実質的な核酸切断活性を有しない場合がある。いくつかの態様において、ヌクレアーゼドメインは酵素的に不活性である。いくつかの態様において、メガヌクレアーゼはDNAに結合することはできるが、DNAを切断することはできない。

20

【0167】

いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、1つまたは複数の転写抑制因子ドメイン、活性化因子ドメイン、エピジェネティックドメイン、リコンビナーゼドメイン、トランスポザーゼドメイン、フリッパーゼドメイン、ニッカーゼドメイン、またはそれらの任意の組合せに融合される。活性化ドメインは、タンパク質のカルボキシル末端に位置する1つまたは複数のタンデム活性化ドメインを含むことができる。場合により、アクチュエータモエティは、タンパク質のカルボキシル末端に位置する1つまたは複数のタンデム抑制因子ドメインを含む。非限定的な例示的活性化ドメインとしては、GAL4、単純ヘルペス活性化ドメインVP16、VP64（単純ヘルペス活性化ドメインVP16の四量体）、NF- κ B p65サブユニット、エプスタイン・バー・ウイルスRトランス活性化因子（Rta）が挙げられ、それらは、Chavez et al., *Nat Methods*, 2015, 12 (4):326-328および米国特許出願公開第20140068797号に記載されている。非限定的な例示的抑制ドメインとしては、Kox1のKRAB（Kruppel関連ボックス）ドメイン、Mad mSIN3相互作用ドメイン（SID）、ERF抑制因子ドメイン（ERD）が挙げられ、それらは、Chavez et al., *Nat Methods*, 2015, 12 (4):326-328および米国特許出願公開第20140068797号に記載されている。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、タンパク質のアミノ末端に位置する1つまたは複数のタンデム抑制因子ドメインを含む。

30

40

【0168】

アクチュエータモエティは、増加した安定性または減少した安定性を与える異種ポリペプチドに融合することもできる。融合されるドメインまたは異種ポリペプチドは、アクチュエータモエティのN末、C末、または内部に位置しうる。

【0169】

アクチュエータモエティは、容易な追跡または精製のための異種ポリペプチド、例えば蛍光タンパク質、精製タグ、またはエピトープタグを含むことができる。蛍光タンパク質の

50

例として、緑色蛍光タンパク質（例えばGFP、GFP-2、tagGFP、turboGFP、eGFP、Emerald、Azami Green、Monomeric Azami Green、CopGFP、AceGFP、ZsGreen1）、黄色蛍光タンパク質（例えばYFP、eYFP、Citrine、Venus、YPet、PhiYFP、ZsYellow1）、青色蛍光タンパク質（例えばeBFP、eBFP2、Azurite、mKalama1、GFPuv、Sapphire、T-sapphire）、シアン蛍光タンパク質（例えばeCFP、Cerulean、CyPet、AmCyan1、Midoriishi-Cyan）、赤色蛍光タンパク質（mKate、mKate2、mPlum、DsRedモノマー、mCherry、mRFP1、DsRed-Express、DsRed2、DsRed-Monomer、HcRed-Tandem、HcRed1、AsRed2、eqFP611、mRaspberry、mStrawberry、Jred）、オレンジ色蛍光タンパク質（mOrange、mKO、Kusabira-Orange、Monomeric Kusabira-Orange、mTangerine、tdTomato）、および他の任意の適切な蛍光タンパク質が挙げられる。タグの例として、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）、キチン結合タンパク質（CBP）、マルトース結合タンパク質、チオレドキシン（TRX）、ポリ(NANP)、タンデムアフィニティー精製（TAP）タグ、myc、AcV5、AU1、AU5、E、ECS、E2、FLAG、ヘマグルチニン（HA）、nus、Softag1、Softag3、Strep、SBP、Glu-Glu、HSV、KT3、S、SI、T7、V5、VSV-G、ヒスチジン（His）、ビオチンカルボキシル担体タンパク質（BCCP）、およびカルモジュリンが挙げられる。

10

【0170】

アクチュエータモエティは切断認識部位の切断によってGMPから放出されうる。キメラ膜貫通受容体ポリペプチドでは、GMPの切断認識部位が免疫細胞シグナル伝達ドメインとアクチュエータモエティに挟まれている。切断モエティは、例えば切断認識部位に近接したときに、切断認識部位を認識しかつ/または切断することができる。切断モエティはポリペプチド配列を含むことができる。切断モエティはキメラアダプターポリペプチドの一部を形成することができる。切断モエティは、キメラアダプターポリペプチドのN末、C末または内部部分を形成することができる。いくつかの態様において、切断モエティはキメラアダプターポリペプチドと複合体形成する。切断モエティは、キメラアダプターポリペプチドのN末、C末または内部部分と複合体形成することができる。図3Bは、本システムのさまざまな構成要素の例示的配置を示している。GMPの切断認識部位304は、免疫細胞シグナル伝達ドメイン302とアクチュエータモエティ303に挟まれており、切断モエティ306はキメラアダプターポリペプチド305の一部を形成している。

20

【0171】

図4A~Dは、GMPからのアクチュエータモエティの放出を模式的に図解している。図4Aは、膜貫通キメラ受容体ポリペプチドへの抗原の結合を示す。膜貫通キメラ受容体ポリペプチドは、抗原相互作用ドメイン401を有する細胞外領域とGMPを含む細胞内領域とを含む。細胞内領域は免疫細胞シグナル伝達ドメインも含む。GMPは切断認識部位402bに連結されたアクチュエータモエティ402aを含む。抗原結合にตอบสนองして、受容体は、受容体の細胞内領域におけるリン酸化403によって修飾される（図4B）。受容体修飾（例えばリン酸化）に続いて、図4Cに示すように、受容体結合モエティを含むアダプタータンパク質が受容体に動員される。受容体は切断モエティ404を含み、その切断モエティはアダプターとの複合体を形成するか、例えばペプチド結合および/またはペプチドリinkerによって、受容体結合モエティに連結されうる。切断認識部位に近接すると、切断モエティは認識部位を切断して、図4Dに示すように、アクチュエータモエティをGMPから放出させることができる。放出されると、アクチュエータモエティは核に進入して、標的遺伝子の発現および/または活性を調節するか、核酸配列を編集することができる。図4E~Hは、受容体修飾がコンフォメーション変化を含む、類似のシステムを示す。いくつかの態様において、アダプタータンパク質は（例えば膜結合型タンパク質として）膜に係留される。

30

40

【0172】

いくつかの態様において、切断モエティは、切断認識部位に近接した場合にのみ、認識部位を切断する。切断認識部位は、プロテアーゼの認識配列であるポリペプチド配列を含みうる。切断モエティは、ポリペプチド配列を認識するプロテアーゼ活性を含むことができる。プロテアーゼ活性を含む切断モエティは、プロテアーゼ、またはその任意の誘導体、

50

バリエーションもしくはフラグメントであることができる。プロテアーゼとは、ポリペプチドがより小さなポリペプチドまたはアミノ酸へと切断されるタンパク質分解を行う、任意の酵素を指す。切断モエティとしての使用には、さまざまなプロテアーゼが適している。いくつかのプロテアーゼは選択性が低い (highly promiscuous) ので、幅広いタンパク質基質が加水分解されうる。いくつかのプロテアーゼは特異性が高く、一定の配列を持つ基質、例えば切断認識配列またはペプチド切断ドメインを持つ基質だけを切断することができる。いくつかの態様において、切断認識部位は、複数の切断認識配列を含み、各切断認識配列は、プロテアーゼ活性を含む同じ切断モエティまたは異なる切断モエティ (例えばプロテアーゼ) によって認識されうる。切断モエティとして使用することができる配列特異的プロテアーゼとしては、スーパーファミリーCAプロテアーゼ、例えば、パパイン (パパイヤ (*Carica papaya*))、プロメライン (パイナップル (*Ananas comosus*))、カテプシンK (苔類) およびカルpain (ホモ・サピエンス (*Homo sapiens*)) を含む、ファミリーC1、C2、C6、C10、C12、C16、C19、C28、C31、C32、C33、C39、C47、C51、C54、C58、C64、C65、C66、C67、C70、C71、C76、C78、C83、C85、C86、C87、C93、C96、C98、およびC101; スーパーファミリーCDプロテアーゼ、例えばファミリーC11、C13、C14、C25、C50、C80、およびC84; 例えはカパーゼ-1 (ドブネズミ (*Rattus norvegicus*)) およびセパラゼ (サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)); スーパーファミリーCEプロテアーゼ、例えば、アデニン (ヒトアデノウイルス2型) を含むファミリーC5、C48、C55、C57、C63、およびC79; スーパーファミリーCFプロテアーゼ、例えば、ピログルタミルペプチダーゼI (バチルス・アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*)) を含むファミリーC15; スーパーファミリーCLプロテアーゼ、例えば、ソルターゼA (黄色ブドウ球菌) を含むファミリーC60およびC82; スーパーファミリーCMプロテアーゼ、例えば、C型肝炎ウイルスペプチダーゼ2 (C型肝炎ウイルス) を含むファミリーC18; スーパーファミリーCNプロテアーゼ、例えば、シンドビスウイルス型nsP2ペプチダーゼ (シンドビスウイルス) を含むファミリーC9; スーパーファミリーCOプロテアーゼ、例えば、ジペプチジルペプチダーゼVI (リシニバチルス・スフェリカス (*Lysinibacillus sphaericus*)) を含むファミリーC40; スーパーファミリーCPプロテアーゼ、例えば、DeSI-1ペプチダーゼ (ハツカネズミ (*Mus musculus*)) を含むファミリーC97; スーパーファミリーPAプロテアーゼ、例えば、TEVプロテアーゼ (タバコエッチウイルス) を含む、ファミリーC3、C4、C24、C30、C37、C62、C74、およびC99; スーパーファミリーPBプロテアーゼ、例えば、アミドホスホリボシルトランスフェラーゼ前駆体 (ホモ・サピエンス) を含むファミリーC44、C45、C59、C69、C89、およびC95; スーパーファミリーPCプロテアーゼ、例えば、グルタミルヒドロラーゼ (ドブネズミ) を含む、ファミリーC26およびC56; スーパーファミリーPDプロテアーゼ、例えば、ヘッジホッグタンパク質 (キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*)) を含むファミリーC46; スーパーファミリーPEプロテアーゼ、例えば、DmpAアミノペプチダーゼ (オクロバクテリウム・アンソロピ (*Ochrobactrum anthropi*)) を含むファミリーP1; 他のプロテアーゼ、例えばファミリーC7、C8、C21、C23、C27、C36、C42、C53およびC75が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。さらなるプロテアーゼとして、セリンプロテアーゼ、例えばスーパーファミリーSB、例えばファミリーS8およびS53のもの、例えばサブチリシン (バチルス・リケニフォルミス); スーパーファミリーSC、例えばファミリーS9、S10、S15、S28、S33、およびS37のもの、例えばプロリルオリゴペプチダーゼ (イノシシ (*Sus scrofa*)); スーパーファミリーSE、例えばファミリーS11、S12、およびS13のもの、例えばD-Ala-D-AlaペプチダーゼC (大腸菌); スーパーファミリーSF、例えばファミリーS24およびS26のもの、例えばシグナルペプチダーゼI (大腸菌); スーパーファミリーSJ、例えばファミリーS16、S50、およびS69のもの、例えばIon-Aペプチダーゼ (大腸菌); スーパーファミリーSK、例えばファミリーS14、S41、およびS49のもの、例えばCipプロテアーゼ (大腸菌); スーパーファミリーSO、例えばファミリーS74のもの、例えばファージK1FエンドシアリダーゼCIMCD自己切断タンパク質 (腸内細菌ファージK1F); スーパーファミリーSP、例

10

20

30

40

50

例えばファミリー-S59のもの、例えばヌクレオポリン145（ホモ・サピエンス）；スーパーファミリー-SR、例えばファミリー-S60のもの、例えばラクトフェリン（ホモ・サピエンス）；スーパーファミリー-SS、ファミリー-S66のもの、例えばムレインテトラペプチダーゼLD-カルボキシペプチダーゼ（緑膿菌）；スーパーファミリー-ST、例えばファミリー-S54のもの、例えばロンボイド-1（キロシヨウジョウバエ）；スーパーファミリー-PA、例えばファミリー-S1、S3、S6、S7、S29、S30、S31、S32、S39、S46、S55、S64、S65、およびS75のもの、例えばキモトリプシンA（ウシ（*Bos taurus*））；スーパーファミリー-PB、例えばファミリー-S45およびS63のもの、例えばペニシリンGアシラーゼ前駆体（大腸菌）；スーパーファミリー-PC、例えばファミリー-S51のもの、例えばジペプチダーゼE（大腸菌）；スーパーファミリー-PE、例えばファミリー-P1のもの、例えばDmpAアミノペプチダーゼ（オクrobakテリウム・アンソロピ）；割り当てられていないもの、例えばファミリー-S48、S62、S68、S71、S72、S79、およびS81；スレオニンプロテアーゼ、例えばスーパーファミリー-PBクラン、例えばファミリー-T1、T2、T3、およびT6のもの、例えば古細菌プロテアソーム（archaeal proteasome）コンポーネント（テルモプラズマ・アシドフィルム（*Thermoplasma acidophilum*））；およびスーパーファミリー-PEクラン、例えばファミリー-T5のもの、例えばオルニチンアセチルトランスフェラーゼ（サッカロミセス・セレピシエ）；アスパラギン酸プロテアーゼ、例えばBACE1、BACE2；カテプシンD；カテプシンE；キモシン；ナプシン-A；ネペンテシン；ペプシン；プラスメプシン；プレセニン；レニン；ならびにHIV-1プロテアーゼ、およびメタロプロテイナーゼ、例えばエキソペプチダーゼ、メタロエキソペプチダーゼ；エンドペプチダーゼ、およびメタロエンドペプチダーゼが挙げられる。切断認識配列（例えばポリペプチド配列）は本明細書に開示するプロテアーゼのどれで認識されてもよい。

【0173】

いくつかの態様において、切断認識部位は、アクロモペプチダーゼ、アミノペプチダーゼ、アングロッド、アンジオテンシン変換酵素、プロメライン、カルパイン、カルパインI、カルパインII、カルボキシペプチダーゼA、カルボキシペプチダーゼB、カルボキシペプチダーゼG、カルボキシペプチダーゼP、カルボキシペプチダーゼW、カルボキシペプチダーゼY、カスパーゼ1、カスパーゼ2、カスパーゼ3、カスパーゼ4、カスパーゼ5、カスパーゼ6、カスパーゼ7、カスパーゼ8、カスパーゼ9、カスパーゼ10、カスパーゼ11、カスパーゼ12、カスパーゼ13、カテプシンB、カテプシンC、カテプシンD、カテプシンE、カテプシンG、カテプシンH、カテプシンL、キモパイン、キマーゼ、キモトリプシン、クロストリパイン、コラゲナーゼ、補体C1r、補体C1s、補体因子D、補体因子I、ククミシン、ジペプチジルペプチダーゼIV、エラスターゼ（白血球）、エラスターゼ（臍）、エンドプロテイナーゼArg-C、エンドプロテイナーゼAsp-N、エンドプロテイナーゼGlu-C、エンドプロテイナーゼLys-C、エンテロキナーゼ、第Xa因子、フィシン、フューリン、グランザイムA、グランザイムB、HIVプロテアーゼ、IGase、組織カリクレイン、ロイシニアミノペプチダーゼ（全般）、ロイシニアミノペプチダーゼ（サイトゾル）、ロイシニアミノペプチダーゼ（ミクロソーム）、マトリックスメタロプロテアーゼ、メチオニンアミノペプチダーゼ、ニュートラーゼ、パパイン、ペプシン、プラスミン、プロリダーゼ、プロナーゼE、前立腺特異抗原、ストレプトミセス・グリセウス由来の好アルカリ性プロテアーゼ、アスペルギルス由来のプロテアーゼ、アスペルギルス・サイトイ由来のプロテアーゼ、ショウユコウジカビ由来のプロテアーゼ、プロテアーゼ（B.リケニフォルミス）（アルカリ性またはアルカラーゼ）、パチルス・ポリミキサ由来のプロテアーゼ、パチルス属の種由来のプロテアーゼ、クモノスカビ属の種由来のプロテアーゼ、プロテアーゼS、プロテアソーム、コウジカビ由来のプロテイナーゼ、プロテイナーゼ3、プロテイナーゼA、プロテイナーゼK、プロテインC、ピログルタミン酸アミノペプチダーゼ、レンニン、レンニン、ストレプトキナーゼ、サブチリシン、サーモライシン、トロンピン、組織プラスミノゲン活性化因子、トリプシン、トリプターゼおよびウロキナーゼからなる群より選択されるプロテアーゼによって認識される切断認識配列（例えばポリペプチド配列またはペプチド切断ドメイン）を含む。

10

20

30

40

50

【 0 1 7 4 】

表2に、本開示のシステムにおいて使用することができる例示的プロテアーゼおよび関連認識配列を列挙する。

【 0 1 7 5 】

(表2) 例示的プロテアーゼおよび関連認識配列

プロテアーゼ名	同義語	認識配列
Arg-C	アルギニルペプチダーゼ、エンドプロテイナーゼ Arg-C、組織カリクレイン	R-x
Asp-N	エンドプロテイナーゼAsp-N、ペプチジル-Asp メタロエンドペプチダーゼ	x-D
Asp-N (N末Glu)	エンドプロテイナーゼAsp-N、ペプチジル-Asp メタロエンドペプチダーゼ	x-[DE]
BNPSまたは NCS/尿素	3-ブromo-3-メチル-2-(2-ニトロフェニルチオ)-3H-インドール、 BNPS-スカトール、N-クロスクシニミド/尿素	W-x
カスパーゼ-1	ICE、インターロイキン-1 β 変換酵素	[FLWY]-x-[AHT]-D- {DEKPQR}
カスパーゼ-10	Flice2, Mch4	I-E-A-D-x (SEQ ID NO:27)
カスパーゼ-2	Ich-1, Nedd2	D-V-A-D- <u>{DEKPQR}</u> (SEQ ID NO:28) または D-E-H-D- <u>{DEKPQR}</u> (SEQ ID NO:29)
カスパーゼ-3	アポパイン, CPP32, Yama	D-M-Q-D- <u>{DEKPQR}</u> (SEQ ID NO:30) または D-E-V-D- <u>{DEKPQR}</u> (SEQ ID NO:31)
カスパーゼ-4	ICE(rel)II, Ich-2, TX	L-E-V-D- <u>{DEKPQR}</u> (SEQ ID NO:32) または [LW]-E-H-D- <u>{DEKPQR}</u>
カスパーゼ-5	ICE(rel)III, TY	[LW]-E-H-D-x
カスパーゼ-6	Mch2	V-E-[HI]-D- <u>{DEKPQR}</u>
カスパーゼ-7	CMH-1, ICE-LAP3, Mch-3	D-E-V-D- <u>{DEKPQR}</u> (SEQ ID NO:33)
カスパーゼ-8	FLICE, MASH, Mch5	[IL]-E-T-D- <u>{DEKPQR}</u>
カスパーゼ-9	ICE-Lap6, Mch6	L-E-H-D-x (SEQ ID NO:34)
キモトリプシン		[FY]- <u>{P}</u> または W- <u>{MP}</u>
キモトリプシン (低特異性)		[FLY]- <u>{P}</u> または W- <u>{MP}</u> または M- <u>{PY}</u> または H- <u>{DMPW}</u>
クロストリパイン	クロストリジオペプチダーゼB	R-x
CNBr	臭化シアン	M-x
CNBr(メチル- Cys)	臭化シアン	M-x または x-C
CNBr(+酸)	臭化シアン	[MW]-x
エンテロキナーゼ	エンテロペプチダーゼ	[DE]-(4)-K-x
第Xa因子	凝固因子Xa	[AFGILTVM]-[DE]-G-R-x
ギ酸		D-x
Glu-C (AmAc 緩衝液)	エンドプロテイナーゼGlu-C、V8プロテアーゼ、 グルタミルエンドペプチダーゼ	E-x
Glu-C (リン酸 緩衝液)	エンドプロテイナーゼGlu-C、V8プロテアーゼ、 グルタミルエンドペプチダーゼ	[DE]-x
グランザイムB	細胞傷害性Tリンパ球プロテイナーゼ2、グランザイム2、 グランザイムB、リンパ球プロテアーゼ、SECT、T細胞 セリンプロテアーゼ1-3E	I-E-P-D-x (SEQ ID NO:35)
HRV3C プロテアーゼ	ヒトライノウイルス3Cプロテアーゼ、ピコルナイン (Picornain) 3C、プロテアーゼ3C	L-E-V-L-F-Q-G-P (SEQ ID NO:36)
ヒドロキシルアミン	ヒドロキシルアンモニウム	N-G

10

20

30

40

50

ヨードソ安息香酸	2-ヨードソ安息香酸	W-x	
Lys-C	エンドプロテイナーゼLys-C、リジルエンドペプチダーゼ	K-x	
Lys-N	エンドプロテイナーゼLys-N、ペプチジル-Lys メタロエンドペプチダーゼ、ナラタケ (<i>Armillaria mellea</i>) 中性プロテイナーゼ	x-K	
Lys-N (Cys 修飾)	エンドプロテイナーゼLys-N、ペプチジル-Lys メタロエンドペプチダーゼ、 ナラタケ 中性プロテイナーゼ	x-[CK]	
温和な 酸加水分解		D-P	10
NBS (長時間 曝露)	N-ブロモスクシンイミド	[HWY]-x	
NBS (短時間 曝露)	N-ブロモスクシンイミド	[WY]-x	
NTCB	2-ニトロ-5-チオシアナト安息香酸、2-ニトロ-5- チオシアノ安息香酸	x-C	
膵 エラスターゼ	パンクレアトペプチダーゼE、エラスターゼ-1	[AGSV]-x	
ペプシンA	ペプシン	{HKR}-{P}-{R}-[FLWY]- {P} または {HKR}-{P}- [FLWY]-x-{P}	20
ペプシンA (低特異性)	ペプシン	{HKR}-{P}-{R}-[FL]-{P} または {HKR}-{P}-[FL]-x-{P}	
プロリルエンド ペプチダーゼ	プロリルオリゴペプチダーゼ、ポストプロリン 切断酵素	[HKR]-P-{P}	
プロテイナーゼK	エンドペプチダーゼK、ペプチダーゼK	[AEFILTVWY]-x	
TEVプロテアーゼ	タバコエッチウイルスプロテアーゼ、核封入体a エンドペプチダーゼ	E-x-x-Y-x-Q-[GS]	
サーモリシン	好熱性細菌プロテアーゼ	{DE}-[AFILMV]-{P}	
トロンピン	第IIa因子	x-x-G-R-G-x または [AFGILTVW]- [AFGILTVW]-P-R-{DE}- {DE}	
トリプシン	トリプシン1	x-[KR]-{P} または W-K-P または M- R-P ただし以下を除く: [CD]-K-D または C-K-[HY] または C-R-K または R-R-[HR]	30
トリプシン (Arg保護)		K-{P}	
トリプシン (Cys修飾)		[RKC]-{P}	
トリプシン (Lys保護)		R-{P}	

【0176】

切断モエティとして使用するために選択されるプロテアーゼは、所望の特徴、例えばペプチド結合選択性、一定のpHにおける活性、分子質量などに基づいて選択することができる。例示的プロテアーゼの性質を表3に掲載する。

【0177】

(表3) 例示的プロテアーゼおよびプロテアーゼの特徴

10

20

30

40

50

プロテアーゼ	EC no.	クラス	ペプチド結合 選択性	至適pH	分子質量 (kDa)	アクセッション 番号
エンドプロテイナーゼ						
トリプシン (ウシ)	3.4.21.4	セリン	$P_1-P_1^1-$ ($P_1 = \text{Lys, Arg}$)	8.0-9.0	23.5	P00760 ^S
キモトリプシン (ウシ)	3.4.21.1	セリン	$P_1-P_1^1-$ ($P_1 =$ 芳香族, $P_1^1 =$ 非特異的)	7.5-8.5	25	P00766 ^S
エンドプロテイナーゼ Asp-N(シュードモナス ・フラギ(Pseudomonas fragi))	3.4.24.33	メタロ	$P_1\text{-Asp-}$ (および $-P_1\text{-システイン酸}$)	6.0-8.0	27	φ
エンドプロテイナーゼ Arg-C(マウス 顎下腺)	φ	セリン	$-\text{Arg-P}_1-$	8.0-8.5	30	n.a.
エンドプロテイナーゼ Glu-C(V8 プロテアーゼ) (黄色ブドウ球菌)	3.4.21.19	セリン	$-\text{Glu-P}_1^1-$ (および Asp-P_1^1-) (2)	8.0	27	P04188 ^S
エンドプロテイナーゼ Lys-C(リソバクター エンチモゲネス (Lysobacter enzymogenes))	3.4.21.50	セリン	$-\text{Lys-P}_1^1-$	8.0	30 ^{NR} 33 ^R	S77957 ^P
ペプシン (ブタ)	3.4.23.1	アスパラ ギン酸	$P_1-P_1^1-$ ($P_1 =$ 疎水性 選好的)	2.0-4.0	34.5	P00791 ^S
サーモライシン (バチルス・サーモ プロテオリチカス (Bacillus thermo proteolyticus))	3.4.24.27	メタロ	$P_1-P_1^1-$ ($P_1 = \text{Leu, Phe, Ile, Val, Met, Ala}$)	7.0-9.0	37.5	P00800 ^S
エラスターゼ (ブタ)	3.4.21.36	セリン	$P_1-P_1^1-$ ($P_1 =$ 非荷電、 非芳香族)	7.8-8.5	25.9	P00772 ^S
パパイン (パパイヤ)	3.4.22.2	システイン	$P_1-P_1^1-$ ($P_1 = \text{Arg, Lys}$ 選好的)	6.0-7.0	23	P00784 ^S

10

20

30

40

50

プロテイナーゼK (トリチアキウム・アル ブム(Tritirachium album))	3.4.21.64	セリン	$P_1-P_1^1-$ ($P_1 =$ 芳香族、 疎水性 選好的)	7.5-12.0	18.5	P06873 ^S	
サブチリシン(枯草菌 (Bacillus subtilis))	3.4.21.62	セリン	$P_1-P_1^1-$ ($P_1 =$ 中性/酸性 選好的)	7.0-11.0	30 ^S 27.3 ^L	P04189 ^S	
クロストリパイン(エンド プロテイナーゼ-Arg- C)(クロストリジウム・ ヒストリチウム (Clostridium histolyticum))	3.4.22.8	システイン	-Arg- P_1- ($P_1 =$ Pro 選好的)	7.1-7.6	59	P09870 ^S	10
エキソペプチダーゼ							
カルボキシペプチ ダーゼA (ウシ)	3.4.17.1	メタロ	$P_1-P_1^1-$ (P_1 が Arg, Lys, Proで あることはできない)	7.0-8.0	34.5	P00730 ^S	
カルボキシペプチ ダーゼB (ブタ)	3.4.17.2	メタロ	$P_1-P_1^1-$ ($P_1 =$ Lys, Arg)	7.0-9.0	34.6	P00732 ^S	20
カルボキシペプチ ダーゼP(ペニシリウム・ ヤンチネルム (Penicillium janthinellum))	φ	セリン	$P_1-P_1^1-$ (非特異的)	4.0-5.0	51	n.a.	
カルボキシペプチ ダーゼY (酵母)	3.4.16.5	セリン	$P_1-P_1^1-$ (非特異的)	5.5-6.5	61	P00729 ^S	
カテプシンC	3.4.14.1	システイン	X- $P_1-P_1^1-$ (アミノ末端 ジペプチドを 除去する)	5.5	210	n.a.	30
アシルアミノ 酸放出酵素 (ブタ)	3.4.19.1	セリン	Ac- $P_1-P_1^1-$ ($P_1 =$ Ser, Ala, Met 選好的)	7.5	80 ^H 360 ^P	P19205 ^{S+}	
ピログルタミン酸 アミノペプチ ダーゼ (ウシ)	3.4.19.3	システイン	$P_1-P_1^1-$ ($P_1 =$ 5- オキソプロリンまたは ピログルタミン酸)	7.0-9.0	70-80 ^B	n.a.	40

【 0 1 7 8 】

いくつかの態様において、切断認識部位は、インティン配列の第2部分と反応することでアクチュエータモエティを放出するインティン配列の第1部分を含む。キメラ受容体ポリペプチドからのアクチュエータモエティの放出を容易にするために、異種スプリットインティンシステムを使用することができる。アクチュエータモエティはインティン配列の第1部分に共有結合で連結することができる。アクチュエータモエティは、そのN末またはC末を介して、インティン配列の第1部分に連結することができる。インティン配列の第2部分は、キメラアダプターポリペプチドの一部であることができる。インティン配列の第2部分は切断モエティとしての役割を果たすことができる。インティン配列の第1部分また

は第2部分はN末インテイン、C末インテイン、またはアクチュエータモエティの放出を容易にすることができるインテインの他の任意の適切な部分であることができる。インテイン配列は任意の適切な供給源に由来しうる。第1部分および第2部分は、同じ供給源または異なる供給源（例えば生物、タンパク質）に由来しうる。

【0179】

図12Aに示す具体例では、キメラ受容体ポリペプチドが、N末インテインを含むインテイン配列の第1部分1202にペプチド結合を介して（例えばそのN末またはC末で）共有結合されたアクチュエータモエティ1201を含む。アクチュエータモエティ-N末インテイン融合物は、図12Bに示すようにC末インテインを含むインテイン配列の第2部分1203、例えばアダプターポリペプチドに連結されたインテイン配列の第2部分と接触させることができる。インテイン配列の第1部分と第2部分とのこの接触は、図12Cに示すように（例えばアクチュエータモエティとN末インテインとの間にある部位における）部位特異的切断をもたらすことができ、それによって図12Dに示すようにアクチュエータモエティが放出される。図12E~Hに示す代替的コンフィギュレーションでは、アクチュエータモエティが、受容体ポリペプチドではなくアダプターポリペプチドに連結され、かつ/またはアダプターポリペプチドと複合体形成している。別の具体例では、C末インテインを含むインテインの第1部分に、ペプチド結合を介して、アクチュエータモエティを（例えばそのN末またはC末において）共有結合で連結することができる。アクチュエータモエティ-C末インテイン融合物は、N末インテインを含むインテイン配列の第2部分と接触させることができる。インテインの第1部分と第2部分とのこの接触は、（例えばアクチュエータモエティとC末インテインとの間にある適切な部位における）部位特異的切断をもたらすことができ、それによってアクチュエータモエティが放出される。

10

20

【0180】

いくつかの態様において、切断認識部位はジスルフィド結合を含む。ジスルフィド結合はアクチュエータモエティをキメラ受容体ポリペプチドに連結することができる。ジスルフィド結合は、アクチュエータモエティと受容体の1つまたは複数のシステインの間に形成させることができる。システインはアクチュエータモエティまたは受容体中に工学的に作製することができる。システインは、ネイティブ配列または野生型配列の一部であることができる。システインは、アクチュエータモエティまたは受容体に付加されたリンカーペプチド中に存在することができる。ジスルフィド結合の切断は、例えばジスルフィド結合の酸化還元条件を変化させることなどによって、容易にすることができる。酸化還元条件の改変は、ジスルフィド結合のチオールへの還元とアクチュエータモエティの放出につながりうる。ジスルフィド結合の切断は、ジスルフィド結合の還元を触媒することができる酸化還元作用物質を含む切断モエティによって容易にすることができる。酸化還元作用物質は、酵素、またはその任意の誘導體、バリエーションもしくはフラグメントであることができる。酵素はオキシドレダクターゼであることができる。オキシドレダクターゼの例として、タンパク質ジスルフィドレダクターゼ、チオレドキシン、グルタレドキシン、チオールジスルフィドオキシドレダクターゼ（例えばDsbA、BdbA-D、MdbA、およびSdbA）、およびグルタチオンジスルフィドレダクターゼが挙げられる。酸化還元作用物質は、原核生物および真核生物を含む任意の適切な供給源に由来しうる。酵素の最適な活性のために補因子（例えばニコチンアミド補因子、フラビン、ならびにそれらの誘導體および類似体）を供給することができる。図13Aに示す具体例では、キメラ受容体ポリペプチドが、ジスルフィド結合によって連結されたアクチュエータモエティ1301を含む。ジスルフィド結合は、図13Bに示すように、オキシドレダクターゼ（例えばアダプターポリペプチドと複合体形成しかつ/またはアダプターポリペプチドに連結されたオキシドレダクターゼ）などの酵素を含む切断モエティ1302によって切断されうる。ジスルフィド結合の切断により、図13Cに示すように、アクチュエータモエティが放出されうる。アクチュエータモエティは放出されると、図13Dに示すように、細胞核へと移動することができ、そこで遺伝子の発現および/または活性を調節し、または核酸配列を編集するように作動しうる。図13E~Hは、アクチュエータモエティがアダプターポリペプチドと複合体形成しかつ/また

30

40

50

はアダプターポリペプチドに連結されており、切断モエティ（例えばオキシドレダクターゼ）が受容体に連結されている、代替的コンフィギュレーションを図解している。

【0181】

いくつかの態様において、キメラ膜貫通受容体ポリペプチドは、細胞の特異的領域へ受容体を輸送させる少なくとも1つの標的指向配列を含む。標的指向配列は、標的指向配列が連結されているポリペプチドを、細胞の特異的領域へ輸送させるために使用することができる。例えば、標的指向配列は、受容体を、核局在化シグナル（NLS）を利用して細胞核に、または核外移行シグナル（NES）を利用して核外（例えば細胞質）に、またはミトコンドリア、小胞体（ER）、ゴルジ、クロロプラスト、アポプラスト、ペルオキシソーム、形質膜、もしくは細胞のさまざまな細胞小器官の膜に、向かわせることができる。いくつかの態様において、標的指向配列は核外移行シグナル（NES）を含み、ポリペプチドを核外に、例えば細胞の細胞質に向かわせる。標的指向配列は、さまざまな核外移行シグナルを利用してポリペプチドを細胞質に向かわせることができる。核外移行シグナルは一般に、タンパク質を、核輸送を使った核膜孔複合体による細胞核から細胞質への搬出の標的にする、疎水性残基（例えば少なくとも約2、3、4、または5個の疎水性残基）の短いアミノ酸配列である。NES基質のすべてが構成的に核から搬出されうるわけではない。いくつかの態様において、標的指向配列は核局在化シグナル（NLS、例えばSV40 NLS）を含み、ポリペプチドを細胞核へと向かわせる。標的指向配列は、さまざまな核局在化シグナル（NLS）を利用して、ポリペプチドを細胞核へと向かわせることができる。NLSは、単一部分（monopartite）配列または二部分（bipartite）配列であることができる。

10

20

【0182】

NLSの非限定的な例として、アミノ酸配列PKKKRKV（SEQ ID NO:2）を有するSV40ウイルスラージT抗原のNLS;ヌクレオプラスミンからのNLS（例えばKRPAATKKAGQAKKKK（SEQ ID NO:3）

を持つヌクレオプラスミン二部分NLS);アミノ酸配列
PAAKRVKLD（SEQ ID NO:4）またはRQRRNELKRSP（SEQ ID NO:5）

を有するc-myc NLS;配列
NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY（SEQ ID NO:6）

30

を有するhRNPA1 M9 NLS;インポーチン-アルファからのIBBドメインの配列
RMRIZFKNKGKDTAELRRRVEVSVELRKAKKDEQILKRRNV（SEQ ID NO:7）

;筋腫Tタンパク質の配列VSRKRPRP（SEQ ID NO:8）およびPPKKARED（SEQ ID NO:9）;
ヒトp53の配列PQPKKKPL（SEQ ID NO:10）;マウスc-abl IVの配列
SALIKKKKMAP（SEQ ID NO:11）

;インフルエンザウイルスNS1の配列DRLRR（SEQ ID NO:12）およびPKQKKRK（SEQ ID NO:13）;
肝炎ウイルスデルタ抗原の配列
RKLKKKIKKL（SEQ ID NO:14）

40

;マウスMx1タンパク質の配列
REKKKFLKRR（SEQ ID NO:15）

;ヒトポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼの配列
KRKGDEVDGVDEVAKKSKK（SEQ ID NO:16）

;およびステロイドホルモン受容体（ヒト）グルココルチコイドの配列
RKCLQAGMNLEARKTKK（SEQ ID NO:17）

50

に由来するNLS配列が挙げられる。

【0183】

いくつかの態様において、標的指向配列は膜を標的とするペプチドを含み、ポリペプチドを形質膜または細胞小器官の膜に向かわせる。膜を標的とする配列は、細胞表面膜または他の細胞膜へのキメラ膜貫通受容体ポリペプチドの輸送をもたらさう。細胞膜と会合している分子は膜会合を容易にする一定の領域を含有し、そのような領域を膜を標的とする配列に組み入れることができる。例えばいくつかのタンパク質はN末またはC末にアシル化された配列を含有し、これらのアシルモエティは膜会合を容易にする。そのような配列はアシルトランスフェラーゼによって認識されることが可能であり、特定の配列モチーフに従うことが多い。一定のアシル化モチーフは単一のアシルモエティによる修飾を受けることができ（多くの場合、アニオン性脂質ヘッドグループとの会合を改善するために、いくつかの正荷電残基が続いている（例えばヒトc-Src））、他のアシル化モチーフは複数のアシルモエティによる修飾を受けることができる。例えばタンパク質チロシンキナーゼSrcのN末配列は単一のミリストイルモエティを含むことができる。Srcファミリーメンバーのサブセット（例えばYes、Fyn、Lck）およびGタンパク質アルファサブユニットなどといった一定のプロテインキナーゼのN末領域には、二重アシル化領域がある。そのような二重アシル化領域は、多くの場合、そのようなタンパク質の最初の18アミノ酸内に位置して、配列モチーフMet-Gly-Cys-Xaa-Cys（SEQ ID NO:18）に合致し、ここでは、Metが切断され、GlyがNアシル化され、Cys残基がSアシル化される。Glyはミリストイル化されることが多く、Cysはパルミトイル化されう。Gタンパク質ガンマサブユニットおよび他のタンパク質のC末に由来する、C15またはC10イソプレニルモエティで修飾されう配列モチーフCys-Ala-Ala-Xaa（SEQ ID NO:22）（いわゆる「CAAXボックス」）に合致するアシル化領域も利用することができる。これらのアシル化モチーフおよび他のアシル化モチーフには、Gauthier-Campbell et al., *Molecular Biology of the Cell* 15: 2205-2217 (2004)、Glabati et al., *Biochem. J.* 303: 697-700 (1994) およびZlankine et al., *J. Cell Science* 110: 673-679 (1997) において議論されているものが含まれ、膜局在化を誘導するために標的指向配列中に組み入れることができる。

【0184】

一定の態様では、アシル化モチーフを含有するタンパク質からのネイティブ配列が、標的指向配列に組み入れられる。例えばいくつかの態様では、Lck、FynもしくはYesまたはGタンパク質アルファサブユニットのN末部分、例えばそのようなタンパク質からの最初の25個またはそれ以下（例えば突然変異を持っていてもよいネイティブ配列の約5～約20アミノ酸、約10～約19アミノ酸、または約15～約19アミノ酸）のN末アミノ酸をキメラポリペプチドのN末内に組み入れることができる。一定の態様では、CAAXボックスモチーフ配列を含有するGタンパク質ガンマサブユニットからの約25アミノ酸以下（例えば突然変異を持っていてもよいネイティブ配列の約5～約20アミノ酸、約10～約18アミノ酸、または約15～約18アミノ酸）のC末配列を、キメラポリペプチドのC末に連結することができる。

【0185】

任意の、膜を標的とする配列を使用することができる。いくつかの態様では、そのような配列として、受容体からのミリストイル化標的指向配列、パルミトイル化標的指向配列、プレニル化配列（すなわちファルネシル化、ゲラニル-ゲラニル化、CAAXボックス）、タンパク質-タンパク質相互作用モチーフまたは膜貫通配列（シグナルペプチドを利用するもの）が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。例として、例えばten Klooster, J.P. et al, *Biology of the Cell* (2007) 99, 1-12、Vincent, S., et al., *Nature Biotechnology* 21:936-40, 1098 (2003) において議論されているものが挙げられる。

【0186】

さまざまな膜におけるタンパク質保留を増加させることができるさらなるタンパク質ドメインが存在する。例えば約120アミノ酸のプレクストリンホモロジー（PH）ドメインが、典型的には細胞内シグナル伝達に關与する200を超えるヒトタンパク質に見いだされる。

PHドメインは、膜内でさまざまなホスファチジルイノシトール (PI) 脂質 (例えばPI(3, 4,5)-P3、PI(3,4)-P2、PI(4,5)-P2) に結合することができるので、タンパク質を異なる膜または細胞コンパートメントに動員する際に、鍵となる役割を果たすことができる。多くの場合、PI脂質のリン酸化状態は、例えばPI-3キナーゼまたはPTENなどによって調節されるので、膜とPHドメインとの相互作用は、アシル脂質によるものほどは安定ではない。

【0187】

いくつかの態様において、ポリペプチドを細胞膜に向かわせる標的指向配列は、膜アンカーシグナル配列を利用することができる。さまざまな膜アンカー配列を利用することができる。例えばさまざまな膜結合型タンパク質の膜アンカーシグナル配列を使用することができる。配列として、1) IL-2受容体ベータ鎖およびインスリン受容体ベータ鎖などのクラスI内在性膜タンパク質; 2) 中性エンドペプチダーゼなどのクラスII内在性膜タンパク質; 3) ヒトシトクロム P450 NF25などのIII型タンパク質; および4) ヒトP糖タンパク質などのIV型タンパク質からの配列を挙げることができる。

10

【0188】

いくつかの態様では、キメラ受容体ポリペプチドが、タンパク質フォールディングを支援できるポリペプチドフォールディングドメインに連結される。いくつかの態様では、アクチュエータモエティが細胞透過性ドメインに連結される。例えば細胞透過性ドメインは、HIV-1 TATタンパク質、ヒトB型肝炎ウイルスからのTLM細胞透過性モチーフ、MPG、Pep-1、VP22、単純ヘルペスウイルスからの細胞透過性ペプチド、またはポリアルギニンペプチド配列に由来しうる。細胞透過性ドメインは、アクチュエータモエティのN末、C末、またはアクチュエータモエティ内のどこにでも位置しうる。

20

【0189】

標的指向配列は、例えば受容体のN末、C末、または内部領域など、キメラ受容体ポリペプチドの任意の適当な領域に連結することができる。いくつかの態様では、少なくとも2つの標的指向配列が受容体に連結される。図5に示す例示的キメラ受容体ポリペプチドでは、第1の標的指向配列501aを受容体の細胞外領域に連結することができ、第2の標的指向配列501bを受容体の細胞内領域に、例えばGMPに、連結することができる。受容体が複数の標的指向配列 (例えば細胞の異なる場所に向けられた標的指向配列) に連結された場合、受容体の最終的局在は、標的指向配列の相対的強さによって決定されうる。例えば、NESを含む標的指向配列とNLSを含む標的指向配列の両方を有する受容体は、そのNESがNLSより強ければ、細胞質に局在することができる。あるいは、NLSがNESより強ければ、受容体は、たとえ核局在化シグナルと核外移行シグナルの両方が受容体上に存在しても、核に局在することができる。標的指向配列は、細胞局在の度合を微調整するために、例えばNLSおよびNESのそれぞれの複数コピーを含むことができる。

30

【0190】

場合により、標的指向配列はアクチュエータモエティに連結される。切断認識部位の切断によるGMPからのアクチュエータモエティの放出に続いて、標的指向配列は、受容体とは異なる細胞の場所にアクチュエータモエティに向かわせることができる。例えばキメラ膜貫通受容体は受容体を形質膜に向かわせる第1の標的指向配列を含むことができ、アクチュエータモエティは別途、細胞核へ局在化させる第2の標的指向配列を含むことができる。まず、アクチュエータモエティ (受容体の一部分を形成しているもの) は、第1の標的指向配列ゆえに、形質膜に局在化されうる。切断認識部位の切断によるGMPからのアクチュエータモエティの放出に続いて、アクチュエータモエティは、第2の標的指向配列による標的指向によって、細胞核に局在化されうる。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、切断認識部位の切断後に、細胞核に移動する。

40

【0191】

抗原に結合して受容体ポリペプチドが修飾を受けた場合、キメラ膜貫通受容体ポリペプチドへのキメラアダプターポリペプチドの結合は、切断モエティを切断認識部位に近接させることができる。認識部位の切断はアクチュエータモエティをGMPから放出させることが

50

できる。放出に続いて、アクチュエータモエティは、例えば細胞質内または細胞核内で、標的ポリヌクレオチドと複合体を形成するように作動しうる。アクチュエータモエティと標的ポリヌクレオチドとの複合体形成は、少なくとも1つの遺伝子の発現および/または活性を調節するか、核酸配列を編集することができる。

【0192】

別の例示的コンフィギュレーションでは、GMPがキメラアダプターポリペプチドの一部を形成し、切断モエティはキメラ膜貫通受容体ポリペプチドの細胞内領域の一部を形成する。ある例示的コンフィギュレーションのキメラアダプターポリペプチドは、(a) 抗原に結合して修飾を受けた免疫細胞シグナル伝達ドメインを含む細胞内領域を含む受容体に結合する受容体結合モエティ、および(b) 受容体結合モエティに連結された遺伝子調整ポリペプチド(GMP)を含むことができ、GMPは、切断認識部位に連結されたアクチュエータモエティを含み、修飾受容体に受容体結合モエティが結合した場合にのみ、アクチュエータモエティは切断認識部位の切断によってGMPから放出される。図6Aに示すように、例示的キメラアダプターポリペプチドは、GMP 602に連結された受容体結合モエティ601を含むことができる。GMPは、切断認識部位604に連結されたアクチュエータモエティ603を含むことができる。

10

【0193】

キメラアダプターポリペプチドの受容体結合モエティは、受容体に結合することができる任意のタンパク質、その誘導体、そのバリエーション、またはフラグメントであることができる。受容体結合モエティは、例えば抗原結合に応答して受容体修飾を受けたキメラ膜貫通受容体に結合することができる。受容体結合モエティは、受容体修飾を受けた受容体に動員される結合パートナー(例えばタンパク質)の結合ドメインを含むことができる。いくつかの態様において、受容体修飾は、受容体の少なくとも1つの領域におけるコンフォメーション変化を含む。いくつかの態様において、受容体修飾はリン酸化または脱リン酸化などの化学修飾を含む。いくつかの態様において、受容体修飾は複数の修飾部位における修飾を含み、各修飾部位はアダプターポリペプチドに結合するのに有効である。受容体結合モエティは、場合によっては、免疫細胞シグナル伝達ドメインに結合する。受容体結合モエティは、例えば一次シグナル伝達ドメインおよび/または共刺激ドメインに結合することができる。受容体がITAMドメインもしくはITIMドメインを含む場合、受容体結合モエティは、リン酸化されたITAMまたはITIMに動員される結合パートナー(例えばタンパク質)、またはその任意の誘導体、バリエーションもしくはフラグメントを含むことができる。

20

30

【0194】

リン酸化された基質、例えばリン酸化されたITAMおよび/またはITIMに結合する能力を有する結合パートナー(例えばタンパク質)として、Srcホモロジー-2(SH2)ドメイン含有タンパク質およびホスホチロシン結合(PTB)ドメイン含有タンパク質などの分子が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。SH2ドメインを含有するタンパク質の例として、ABL1、ABL2、BCAR3、BLK、BLNK、BMX、BTK、CHN2、CISH、CRK、CRKL、CSK、DAPP1、EAT-2、FER、FES、FGR、FRK、FYN、GADS、GRAP、GRAP2、GRB10、GRB14、GRB2、GRB7、HCK、HSH2D、INPP5D、INPPL1、ITK、JAK2、LCK、LCP2、LYN、MATK、NCK1、NCK2、PIK3R1、PIK3R2、PIK3R3、PLCG1、PLCG2、PTK6、PTPN11、PTPN6、RASA1、SAP、SH2B1、SH2B2、SH2B3、SH2D1A、SH2D1B、SH2D2A、SH2D3A、SH2D3C、SH2D4A、SH2D4B、SH2D5、SH2D6、SH3BP2、SHB、SHC1、SHC2、SHC3、SHC4、SHD、SHE、SHP1、SHP2、SLA、SLA2、SOCS1、SOCS2、SOCS3、SOCS4、SOCS5、SOCS6、SOCS7、SRC、SRMS、STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5A、STAT5B、STAT6、SUPT6H、SYK、TEC、TENC1、TNS、TNS1、TNS3、TNS4、TXK、VAV1、VAV2、VAV3、YES1、およびZAP70が挙げられる。PTBドメインを含有するタンパク質の例として、APBA1、APBA2、APBA3、EPS8、EPS8L1、EPS8L2、EPS8L3、TENC1、TNS、TNS1、TNS3、TNS4、DOK1、DOK2、DOK3、DOK4、DOK5、DOK6、DOK7、FRS2、FRS3、IRS1、IRS2、IRS3、IRS4、SHC1、SHC2、SHC3、SHC4、TLN1、TLN2、およびX11aが挙げ

40

50

られる。いくつかの態様において、受容体結合モエティは、SH2ドメインおよび/またはPTBドメインを含有するタンパク質、またはその任意の誘導体、バリエーションもしくはフラグメントを含む。いくつかの態様において、受容体結合モエティはZAP70の受容体結合ドメインを含む。いくつかの態様において、受容体結合モエティは、修飾された受容体に動員される共刺激分子またはその任意の誘導体、バリエーションもしくはフラグメントを含む。

【0195】

いくつかのコンフィギュレーションにおいて、本システムのキメラアダプターポリペプチドは、遺伝子調整ポリペプチド(GMP)を含むことができる。GMPは、本明細書の他の項で説明するとおり、切断認識部位に連結されたアクチュエータモエティを含むことができる。アクチュエータモエティは、本明細書の他の項で説明するように、ヌクレアーゼ(例えばDNAヌクレアーゼおよび/またはRNAヌクレアーゼ)、ヌクレアーゼ欠損型であるか野生型ヌクレアーゼと比較してヌクレアーゼ活性が低減している修飾ヌクレアーゼ(例えばDNAヌクレアーゼおよび/またはRNAヌクレアーゼ)、それらのバリエーション、それらの誘導体、またはそれらのフラグメントを含むことができる。アクチュエータモエティは、遺伝子の発現および/または活性を調節するか、核酸(例えば遺伝子および/または遺伝子産物)の配列を編集することができる。アクチュエータモエティは、外因性であるか内在性であるかを問わず遺伝子の発現または活性を調節することおよび/または核酸配列を編集することができる。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、DNAヌクレアーゼ、例えば標的DNA配列のゲノム編集を誘導するための工学的に操作された(例えばプログラム可能なまたは標的指向可能な)DNAヌクレアーゼを含む。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、RNAヌクレアーゼ、例えば標的RNA配列の編集を誘導するための工学的に操作された(例えばプログラム可能なまたは標的指向可能な)RNAヌクレアーゼを含む。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは低減したまたはごくわずかなヌクレアーゼ活性を有する。低減したまたはごくわずかなヌクレアーゼ活性を有するアクチュエータモエティは、標的ポリヌクレオチドの物理的妨害によって、または標的ポリヌクレオチドの発現を抑圧もしくは強化するのに有効な追加因子の動員によって、遺伝子の発現および/または活性を調節することができる。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、標的DNA配列の転写活性化または転写抑制を誘導することができる、DNAヌクレアーゼ由来のヌクレアーゼヌルDNA結合タンパク質を含む。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、標的RNA配列の転写活性化または転写抑制を誘導することができる、RNAヌクレアーゼ由来のヌクレアーゼヌルRNA結合タンパク質を含む。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、切断活性を欠くCasタンパク質を含む。

【0196】

アクチュエータモエティには任意の適切なヌクレアーゼを使用することができる。適切なヌクレアーゼとして、CRISPR関連(Cas)タンパク質またはCasヌクレアーゼ、例えばI型CRISPR関連(Cas)ポリペプチド、II型CRISPR関連(Cas)ポリペプチド、III型CRISPR関連(Cas)ポリペプチド、IV型CRISPR関連(Cas)ポリペプチド、V型CRISPR関連(Cas)ポリペプチド、およびVI型CRISPR関連(Cas)ポリペプチド;ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN);転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN);メガヌクレアーゼ;RNA結合タンパク質(RBP);CRISPR関連RNA結合タンパク質;リコンビナーゼ;フリッパーゼ;トランスポザラーゼ;アルゴノートタンパク質;それらの任意の誘導体;それらの任意のバリエーション;およびそれらの任意のフラグメントが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【0197】

いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、ガイドRNAなどのガイド核酸との複合体を形成するCasタンパク質を含む。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、Casタンパク質との複合体を形成することができるガイドRNAなどのガイド核酸と複合体形成していてもよいRNA結合タンパク質(RBP)を含む。図6Bは、アクチュエータモエティが、ガイド核酸と複合体形成していてもよいRNA結合タンパク質600aを含む

10

20

30

40

50

、例示的キメラアダプターポリペプチドを示している。例えばRNA結合タンパク質（RBP）からのガイド核酸の解離によって、または切断認識部位の切断によって、RBPから放出されると、ガイド核酸は、遺伝子の発現および/または活性を調節するように作動するか核酸配列を編集するように作動することができるCasタンパク質との複合体600bを形成することができる。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、標的DNA配列の転写活性化または転写抑制を誘導することができる、DNAヌクレアーゼ由来のヌクレアーゼヌルDNA結合タンパク質を含む。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、標的RNA配列の転写活性化または転写抑制を誘導することができる、RNAヌクレアーゼ由来のヌクレアーゼヌルRNA結合タンパク質を含む。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、切断活性を欠くCasタンパク質を含むことができる。

10

【0198】

いくつかの態様において、切断認識部位は受容体結合モエティとアクチュエータモエティとに挟まれている。アクチュエータモエティは、切断モエティによる切断認識部位の切断によって、GMPから放出されうる。切断モエティは、例えば切断認識部位に近接したときに、切断認識部位を認識しかつ/または切断することができる。切断モエティはポリペプチド配列を含むことができる。切断モエティは、いくつかのコンフィギュレーションでは、キメラ膜貫通受容体ポリペプチドの一部を形成する。切断モエティは、受容体のN末、C末または内部部分を形成することができる。切断モエティは、受容体のN末、C末、または内部部分と複合体形成することができる。図7に示す例示的コンフィギュレーションでは、切断認識部位703が受容体結合モエティ701とアクチュエータモエティ704に挟まれ、切断モエティ706がキメラ膜貫通受容体ポリペプチド705の一部を形成する。

20

【0199】

図8A~Dは、GMPからのアクチュエータモエティの放出を模式的に図解している。図8Aは、膜貫通キメラ受容体ポリペプチドへの抗原の結合を示す。膜貫通キメラ受容体ポリペプチドは、抗原相互作用ドメイン805を有する細胞外領域と、切断モエティ806を含む細胞内領域とを含む。切断モエティは、受容体と複合体形成するか、例えばペプチド結合および/またはペプチドリinkerによって、受容体に連結されうる。GMPはキメラアダプターポリペプチドの一部を形成する。受容体結合モエティ801に連結されたGMPは、切断認識部位802bに連結されたアクチュエータモエティ802aを含む。抗原結合に応答して、受容体は、受容体の細胞内領域におけるリン酸化803によって修飾される（図8B）。受容体修飾（例えばリン酸化）に続いて、図8Cに示すように、キメラアダプターポリペプチドが受容体に動員される。受容体は切断モエティ806を含む。切断認識部位に近接すると、切断モエティは認識部位を切断して、図8Dに示すように、アクチュエータモエティをGMPから放出させることができる。放出されると、アクチュエータモエティは核に進入して、標的遺伝子の発現および/または活性を調節するか、核酸配列を編集することができる。図8E~Hは、受容体修飾がコンフォメーション変化を含む、類似のシステムを示す。いくつかの態様において、キメラアダプタータンパク質は膜に（例えば膜結合型タンパク質として）係留される。

30

【0200】

別のコンフィギュレーションでは、切断モエティが、抗原と結合して受容体ポリペプチドが修飾を受けたときにキメラ膜貫通受容体ポリペプチドに結合する第2アダプターポリペプチドと複合体形成する。図9に示す例示的コンフィギュレーションでは、切断認識部位903が受容体結合モエティ901とアクチュエータモエティ904に挟まれ、切断モエティ906が第2アダプターポリペプチド907の一部を形成する。

40

【0201】

図10A~Dは、GMPからのアクチュエータモエティの放出を模式的に図解している。図10Aは、膜貫通キメラ受容体ポリペプチドへの抗原の結合を示す。膜貫通キメラ受容体ポリペプチドは、抗原相互作用ドメインを有する細胞外領域と細胞内領域とを含む。切断認識部位に連結されたアクチュエータモエティを含むGMPは、キメラアダプターポリペプチドの一部を形成する。切断認識部位1002bは受容体結合モエティ1001とアクチュエータ

50

モエティ1002aとに挟まれている。抗原結合に応答して、受容体は、細胞内領域におけるリン酸化1003によって修飾される(図10B)。受容体修飾(例えばリン酸化)に続いて、図10Bに示すように、キメラアダプターポリペプチドが受容体に動員される。切断モエティ1006を含む第2アダプターポリペプチド1007も、修飾された受容体に動員される(図10C)。切断モエティは、第2アダプターポリペプチドと複合体形成するか、例えばペプチド結合および/またはペプチドリンカーによって、アダプターに連結されうる。切断認識部位に近接すると、切断モエティは認識部位を切断して、図10Dに示すように、アクチュエータモエティをGMPから放出させることができる。放出されると、アクチュエータモエティは核に進入して、標的遺伝子の発現および/または活性を調節するか、核酸配列を編集することができる。図10E~Hは、キメラアダプターポリペプチドが切断モエティを含み、第2アダプターポリペプチドがアクチュエータモエティを含む、代替的コンフィギュレーションを有するシステムを示している。いくつかの態様において、キメラアダプターポリペプチドは膜に(例えば膜結合型タンパク質として)係留される。いくつかの態様において、第2アダプターポリペプチドは膜に(例えば膜結合型タンパク質として)係留される。

【0202】

図18A~Dは、第1膜係留アダプターと第2細胞質アダプターとを含むシステムにおけるアクチュエータモエティの放出を模式的に図解している。図18Aは、膜係留ドメイン1801a(例えばCAAX)、プロテアーゼ認識部位1801b(例えばTEV)、およびアクチュエータモエティ1801cを含む第1膜係留アダプターと、キメラ膜貫通受容体1802との会合を示す。キメラ膜貫通受容体はスキャフォールドとして機能することができ、少なくとも2つのアダプター結合部位(例えばEGFRまたは受容体チロシンキナーゼ(RTK))を含む。一方のアダプター結合部位は図18Bに示すように膜係留アダプターと会合することができる。膜係留アダプターの会合は、場合によっては、受容体への抗原結合に依存する。いくつかのシステムにおいて、膜係留アダプターは受容体に近接して位置し、会合は受容体への抗原結合に依存しないだろう。図18Bおよび図18Cに示すように、抗原と受容体との相互作用は、細胞質受容体結合モエティ1803aとプロテアーゼ1803bとを含む第2アダプタータンパク質を、受容体の他方のアダプター結合部位に、条件付きで動員する。プロテアーゼを含む第2アダプタータンパク質は、膜貫通受容体に動員されると、膜係留分子のプロテアーゼ認識部位1801bを切断し、それによって、図18Dに示すようにアクチュエータモエティ1801cを放出することができる。

【0203】

いくつかの態様において、切断モエティは、切断認識部位に近接した場合にのみ、認識部位において切断する。いくつかの態様において、切断認識部位は、プロテアーゼの認識配列であるポリペプチド配列(例えばペプチド切断ドメイン)を含む。切断モエティは、前記ポリペプチド配列を認識するプロテアーゼ活性を含む。プロテアーゼ活性を含む切断モエティは、限定するわけではないが、本明細書の他の項で説明するプロテアーゼ、またはそれらの任意の誘導体、バリエーションもしくはフラグメントなど、任意のプロテアーゼを含むことができる。いくつかの態様において、切断認識部位は、複数の切断認識配列を含み、各切断認識配列は、プロテアーゼ活性を含む同じ切断モエティまたは異なる切断モエティ(例えばプロテアーゼ)によって認識されうる。

【0204】

いくつかの態様において、切断認識部位は、インテイン配列の第2部分と反応することでアクチュエータモエティを放出するインテイン配列の第1部分を含む。キメラアダプターポリペプチドからのアクチュエータモエティの放出を容易にするために、異種スプリットインテインシステムを使用することができる。アクチュエータモエティはインテイン配列の第1部分に共有結合で連結することができる。アクチュエータモエティは、そのN末またはC末を介して、インテイン配列の第1部分に連結することができる。切断モエティはインテイン配列の第2部分を含むことができる。インテイン配列の第1部分または第2部分はN末インテイン、C末インテイン、またはアクチュエータモエティの放出を容易にすること

10

20

30

40

50

ができるインテインの他の任意の適切な部分であることができる。インテイン配列は任意の適切な供給源に由来しうる。第1部分および第2部分は、同じ供給源または異なる供給源（例えば生物、タンパク質）に由来しうる。ある具体例では、N末インテインを含むインテイン配列の第1部分に、ペプチド結合を介して、アクチュエータモエティを（例えばそのN末またはC末において）共有結合で連結することができる。アクチュエータモエティ-N末インテイン融合物は、C末インテインを含むインテイン配列の第2部分と接触させることができる。インテイン配列の第1部分と第2部分とのこの接触は、（例えばアクチュエータモエティとN末インテインとの間にある部位における）部位特異的切断をもたらすことができ、それによってアクチュエータモエティが放出される。別の具体例では、C末インテインを含むインテインの第1部分に、ペプチド結合を介して、アクチュエータモエティを（例えばそのN末またはC末において）共有結合で連結することができる。アクチュエータモエティ-C末インテイン融合物は、N末インテインを含むインテイン配列の第2部分と接触させることができる。インテインの第1部分と第2部分とのこの接触は、（例えばアクチュエータモエティとC末インテインとの間にある適切な部位における）部位特異的切断をもたらすことができ、それによってアクチュエータモエティが放出される。

【0205】

いくつかの態様において、切断認識部位はジスルフィド結合を含む。ジスルフィド結合はアクチュエータモエティをキメラアダプターポリペプチド中の受容体結合モエティに連結することができる。ジスルフィド結合は、アクチュエータモエティと受容体結合モエティの1つまたは複数のシステインの間形成させることができる。システインはアクチュエータモエティまたは受容体結合モエティ中に工学的に作製することができる。システインは、アクチュエータモエティまたは受容体結合モエティのネイティブ配列または野生型配列の一部であることができる。システインは、アクチュエータモエティまたは受容体結合モエティに付加されたリンカーペプチド中に存在することができる。ジスルフィド結合の切断は、例えばジスルフィド結合の酸化還元条件を変化させることなどによって、容易にすることができる。酸化還元条件の改変は、ジスルフィド結合のチオールへの還元とアクチュエータモエティの放出につながりうる。ジスルフィド結合の切断は、ジスルフィド結合の還元をもたらすことができる酸化還元作用物質を含む切断モエティによって容易にすることができる。酸化還元作用物質は、酵素、またはその任意の誘導体、バリエーションもしくはフラグメントであることができる。酵素はオキシドレダクターゼであることができる。オキシドレダクターゼの例として、タンパク質ジスルフィドレダクターゼ、チオレドキシシン、グルタレドキシシン、チオールジスルフィドオキシドレダクターゼ（例えばDsbA、BdbA-D、MdbA、SdbA）、およびグルタチオンジスルフィドレダクターゼが挙げられる。酸化還元作用物質は、原核生物および真核生物を含む任意の適切な供給源に由来しうる。酵素の最適な活性のために補因子（例えばニコチンアミド補因子、フラビン、ならびにそれらの誘導体および類似体）を供給することができる。

【0206】

いくつかの態様において、キメラアダプターポリペプチドは、細胞の特異的領域へアダプターを輸送させる少なくとも1つの標的指向配列を含む。例えば、標的指向配列は、アダプターを、核局在化シグナル（NLS）を利用して細胞核に、または核外移行シグナル（NES）を利用して細胞核外に（例えば細胞質）に、またはミトコンドリア、小胞体（ER）、ゴルジ、クロロプラスト、アポプラスト、ペルオキシソーム、形質膜、もしくは細胞のさまざまな細胞小器官の膜に、向かわせることができる。いくつかの態様において、標的指向配列は核外移行シグナル（NES）を含み、キメラアダプターポリペプチドを細胞核外に向かわせる。いくつかの態様において、標的指向配列は核局在化シグナル（NLS）を含み、アダプターを細胞核へと向かわせる。標的指向配列は、さまざまな核局在化シグナル（NLS）を利用して、アダプターを細胞核へと向かわせることができる。いくつかの態様において、標的指向配列は膜を標的とするペプチドを含み、アダプターを形質膜または細胞小器官の膜に向かわせる。標的指向配列は、前述の膜アンカーシグナル配列を利用して、アダプターを膜に向かわせることができる。さまざまな膜アンカー配列を利用することが

できる。

【0207】

標的指向配列は、例えばポリペプチドのN末もしくはC末、またはアダプターの内部領域など、キメラアダプターポリペプチドの任意の適当な領域に連結することができる。いくつかの態様では、少なくとも2つの標的指向配列がアダプターに連結される。例えば図11に示すように、第1の標的指向配列1101aをアダプターの受容体結合モエティに連結し、第2の標的指向配列1101bをアダプターのGMPに、例えばアクチュエータモエティに、連結することができる。アダプターが複数の標的指向配列（例えば細胞の異なる場所に向けられた標的指向配列）に連結された場合、アダプターの最終的局在は、標的指向配列の相対的強さによって決定されうる。例えば、NESを含む標的指向配列とNLSを含む標的指向配列の両方を有するアダプターは、そのNESがNLSより強ければ、サイトゾルに局在することができる。あるいは、NLSがNESより強ければ、アダプターは、たとえ核局在化シグナルと核外移行シグナルの両方がアダプター上に存在しても、核に局在することができる。標的指向配列は、細胞局在の度合を微調整するために、例えばNLSおよびNESのそれぞれの複数コピーを含むことができる。

10

【0208】

場合により、標的指向配列はアクチュエータモエティに連結される。切断認識部位の切断によるGMPからのアクチュエータモエティの放出に続いて、標的指向配列は、アダプターとは異なる細胞の場所にアクチュエータモエティを向かわせることができる。例えばキメラアダプターポリペプチドはアダプターを細胞質に向かわせる第1の標的指向配列を含むことができ、アクチュエータモエティは別途、細胞核へ局在化させる第2の標的指向配列を含むことができる。まず、アクチュエータモエティ（アダプターの一部を形成しているもの）は、第1の標的指向配列ゆえに、細胞質に局在化することができる。切断認識部位の切断によるGMPからのアクチュエータモエティの放出に続いて、アクチュエータモエティは、第2の標的指向配列による標的指向によって、細胞核に局在化することができる。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、切断認識配列の切断後に、細胞核に移動する。

20

【0209】

いくつかの態様において、標的指向配列は膜を標的とするペプチドを含み、ポリペプチドを形質膜または細胞小器官の膜に向かわせる。膜を標的とする配列は、細胞表面膜または他の細胞膜へのキメラ膜貫通受容体ポリペプチドの輸送をもたらす。本明細書において前述した任意の適切な膜標的配列を使用しうる。

30

【0210】

いくつかの態様では、キメラアダプターポリペプチドが、タンパク質フォールディングを支援できるポリペプチドフォールディングドメインに連結される。いくつかの態様では、アクチュエータモエティを細胞透過性ドメインに連結することができる。例えば細胞透過性ドメインは、HIV-1 TATタンパク質、ヒトB型肝炎ウイルスからのTLM細胞透過性モチーフ、MPG、Pep-1、VP22、単純ヘルペスウイルスからの細胞透過性ペプチド、またはポリアルギニンペプチド配列に由来しうる。細胞透過性ドメインは、アクチュエータモエティのN末、C末、またはアクチュエータモエティ内のどこにでも位置しうる。

40

【0211】

本システムのアクチュエータモエティは、キメラアダプターポリペプチドまたはキメラ膜貫通受容体ポリペプチドから放出されると、標的ポリヌクレオチドに結合することで、標的ポリヌクレオチドの物理的妨害によって、または標的ポリヌクレオチドの発現を抑制もしくは強化するのに有効な追加因子の動員によって、標的ポリヌクレオチドの発現および/または活性を調節することができる。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、標的ポリヌクレオチドの発現を増加させるのに有効な転写活性化因子を含む。アクチュエータモエティは、標的ポリヌクレオチドの発現を減少させるのに有効な転写抑制因子を含むことができる。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、核酸配列を編集するように作動しうる。

50

【0212】

いくつかの態様において、標的ポリヌクレオチドはゲノムDNAを含む。いくつかの態様において、標的ポリヌクレオチドはプラスミド（例えば外因性遺伝子を保持するプラスミド）の一領域を含む。いくつかの態様において、標的ポリヌクレオチドは、RNA、例えばmRNAを含む。いくつかの態様において、標的ポリヌクレオチドは、内在性遺伝子または内在性遺伝子産物を含む。アクチュエータモエティは、アクチュエータがGMPから切断されたときにアクチュエータが細胞核内に移動することを可能にする核局在化シグナルのコピーを1つまたは複数含むことができる。

【0213】

別の例示的コンフィギュレーションでは、GMPがキメラ膜貫通受容体ポリペプチドの一部を形成し、切断モエティがキメラ膜貫通ポリペプチドの一部を形成する。いくつかの態様において、切断モエティを有するキメラ膜貫通ポリペプチドは抗原相互作用ドメインを含み、同様に膜貫通受容体ポリペプチドと呼ぶことができる。この膜貫通受容体ポリペプチドは、場合により、免疫細胞シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、GMPを含むキメラ膜貫通受容体ポリペプチドの抗原相互作用ドメインと同じ抗原に結合する。いくつかの態様において、抗原相互作用ドメインは、GMPを含むキメラ膜貫通受容体ポリペプチドの抗原相互作用ドメインとは異なる抗原に結合する。いくつかの態様において、キメラ膜貫通ポリペプチドは抗原相互作用ドメインを含まず、膜貫通タンパク質と呼ぶことができる。GMPは、前述のとおり、切断認識配列に連結されたアクチュエータモエティを含むことができる。切断モエティを含むキメラ膜貫通受容体ポリペプチドは、キメラ膜貫通受容体ポリペプチドへの抗原の結合にตอบสนองして、GMPを含むキメラ膜貫通ポリペプチド（例えば受容体または非受容体）とクラスター化しかつ/または相互作用することができる。2つのポリペプチド間のクラスター化および/または相互作用は、GMPを切断モエティに近接させて、切断モエティによる切断認識部位の切断を可能にすることができる。切断モエティを含む膜貫通タンパク質は、キメラ膜貫通受容体ポリペプチドの細胞外領域にリガンドが結合すると、GMPを含むキメラ膜貫通受容体ポリペプチドとクラスター化しかつ/または相互作用することができる。いくつかの態様において、キメラ膜貫通ポリペプチドは、T細胞受容体複合体の分子、またはその任意の誘導体、バリエーションもしくはフラグメントを含む。いくつかの態様において、キメラ膜貫通ポリペプチド（例えば受容体または非受容体）は、別の膜貫通ポリペプチド（例えば受容体または非受容体）とクラスター化および/またはオリゴマー化する能力を有する分子、またはその任意の誘導体、バリエーションもしくはフラグメントを含む。図19は、GMPが第1キメラ膜貫通受容体ポリペプチド1901の一部を形成し、切断モエティが第2キメラ膜貫通受容体ポリペプチド1902の一部を形成しているシステムの図解である。第1および第2受容体ポリペプチドの細胞外抗原結合ドメインに抗原が結合すると、第1および第2キメラ膜貫通受容体ポリペプチドはクラスター化して、切断モエティ1905を切断認識部位1903に近接させることができる。切断モエティはアクチュエータモエティ1904（例えばsgRNAと複合体形成していてもよいCas9、例えばdCas9）を、受容体から切断し、放出させることができる。

【0214】

本開示のシステムおよび組成物はさまざまな応用に有用である。例えば本開示のシステムおよび方法は、遺伝子発現および/または細胞活動を調節する方法において有用である。一局面において、本明細書に開示するシステムおよび組成物は、免疫細胞における遺伝子発現および/または細胞活動を調節する方法において利用される。本システムを使って調節される免疫細胞は、限定するわけではないが、疾患および障害を処置するための免疫治療など、さまざまな応用において役立つ。本開示の修飾免疫細胞を使って処置することができる疾患および障害として、炎症状態、がん、および感染性疾患が挙げられる。いくつかの態様において、免疫治療はがんを処置するために使用される。

【0215】

本システムは、免疫応答に関与する任意の細胞を含むさまざまな免疫細胞に導入すること

10

20

30

40

50

ができる。いくつかの態様において、免疫細胞は、好塩基球、好酸球および好中球などの顆粒球;肥満細胞;マクロファージに発生することができる単球;樹状細胞などの抗原提示細胞;ならびにナチュラルキラー細胞(NK細胞)、B細胞、およびT細胞などのリンパ球を含む。いくつかの態様において、免疫細胞は免疫エフェクター細胞である。免疫エフェクター細胞とは刺激に応答して特異的機能を果たすことができる免疫細胞を指す。いくつかの態様において、免疫細胞は、細胞死を誘導することができる免疫エフェクター細胞である。いくつかの態様において、免疫細胞はリンパ球である。いくつかの態様において、リンパ球はNK細胞である。いくつかの態様において、リンパ球はT細胞である。いくつかの態様において、T細胞は活性化T細胞である。T細胞には、ナイーブ細胞とメモリー細胞(例えばセントラルメモリー、すなわちT_{CM}、エフェクターメモリー、すなわちT_{EM}、およびエフェクターメモリー-RA、すなわちT_{EMRA})の両方、エフェクター細胞(例えば細胞傷害性T細胞、すなわちCTLまたはT_c細胞)、ヘルパー細胞(例えばTh1、Th2、Th3、Th9、Th7、TFH)、制御性細胞(例えばTreg、およびTr1細胞)、ナチュラルキラーT細胞(NKT細胞)、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)、リンパ球活性化キラー細胞(LAK)、T細胞、T細胞、その他T細胞系譜のユニークなクラスが含まれる。T細胞は、どのタンパク質が細胞表面に存在するかに基づいて、CD8+ T細胞およびCD4+ T細胞という2つのカテゴリーに大別することができる。本システムを発現するT細胞は、感染細胞を死滅させることおよび他の免疫細胞を活性化または動員することなど、複数の機能を実行することができる。CD8+ T細胞は細胞傷害性T細胞または細胞傷害性Tリンパ球(CTL)と呼ばれる。本システムを発現するCTLは、ウイルス感染細胞およびがん細胞の認識および除去に参与しうる。CTLは、アポトーシス、例えばプログラム細胞死を引き起こす細胞毒を含有する特殊化したコンパートメント、すなわち顆粒を有する。CD4+ T細胞は、4つのサブセットTh1、Th2、Th17、およびTregに細分することができ、ここで「Th」は「Tヘルパー細胞」を指す。ただし、さらなるサブセットも存在しうる。Th1細胞は、細胞内微生物、とりわけ細菌に対する免疫応答をコーディネートすることができる。T1細胞は、細菌を摂取するマクロファージのような他の免疫細胞にアラートを発してそれらを活性化分子を生産し、分泌することができる。Th2細胞は、B細胞、顆粒球、および肥満細胞にアラートを発することにより、蠕虫(寄生虫)のような細胞外病原体に対する免疫応答のコーディネーションに参与する。Th17細胞は、免疫細胞および非免疫細胞を活性化シグナル伝達分子であるインターロイキン17(IL-17)を生産することができる。Th17細胞は好中球の動員にとって重要である。

【0216】

一局面において、本開示は、本システム(例えば本明細書に記載する受容体ポリペプチド、アダプターポリペプチド、遺伝子調整ポリペプチド(GMP)、および切断モエティのうちの少なくとも1つ)を発現する免疫細胞を提供する。いくつかの態様において、免疫細胞はリンパ球である。本システムは、免疫細胞中で発現させると、免疫細胞の一定の活性を条件付きで調節するのに役立つ。本システムを発現するリンパ球などの免疫細胞は、疾患細胞および/または病原体を排除するための細胞媒介性免疫に参与しうる。

【0217】

いくつかの態様において、本開示のリンパ球は、キメラ膜貫通受容体ポリペプチドが抗原に結合した場合にのみ、切断認識部位における切断によってアクチュエータモエティがGMPから放出されることを特徴とする。アクチュエータモエティがGMPから放出されると、アクチュエータモエティは、リンパ球中の標的ポリヌクレオチドと複合体形成するように作動しうる。アクチュエータモエティとリンパ球中の標的ポリヌクレオチドとの複合体形成は、リンパ球における標的ポリヌクレオチド(例えば遺伝子)の発現のアップレギュレーションまたは増加をもたらしうる。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、内在性遺伝子または内在性遺伝子産物を含む標的ポリヌクレオチドの発現および/または活性を調節する。前記内在性遺伝子または内在性遺伝子産物は、免疫応答に参与しうる。例えば、アクチュエータモエティは、サイトカインなどの内在性遺伝子の発現の増加をもたらしうる。サイトカインの発現の増加は、有効な免疫応答の一因となり、かつ/または

10

20

30

40

50

免疫応答に付随する負の治療効果を低減しうる。

【0218】

いくつかの態様において、アクチュエータモエティはサイトカインの発現および/または活性を調節する。サイトカイン発現を変化させる方法は、免疫細胞の調節および/または免疫応答の調整において、例えばT細胞の活性化の改変、NK細胞活性化および免疫治療におけるさまざまな他の免疫細胞活動のレベルの改変において、役立ちうる。サイトカインの発現の調節は、さまざまな機序で達成することができる。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、標的ポリヌクレオチドからのサイトカインの発現および/または活性を調節するか、核酸配列、例えばサイトカインをコードするゲノムDNAの核酸配列を編集する。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、標的ポリヌクレオチドからのサイトカイン受容体の発現および/または活性を調節するか、核酸配列、例えばサイトカイン受容体をコードするゲノムDNAの核酸配列を編集する。アクチュエータモエティによって調節および/または編集される標的ポリヌクレオチドは、内在性遺伝子または内在性遺伝子産物、例えば内在性サイトカインまたは内在性サイトカイン受容体の遺伝子（例えばDNA）または遺伝子産物（例えばRNA）を含むことができる。アクチュエータモエティは、いくつかの態様において、サイトカインまたはサイトカイン受容体の発現を変化させる（例えばアップレギュレートおよび/またはダウンレギュレートする）。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、サイトカインまたはサイトカイン受容体をコードする核酸配列を編集する。核酸配列を編集することにより、非機能的な遺伝子産物、例えばトランケート型および/またはアウトオブフレームのタンパク質を生じさせることができる。

10

20

【0219】

サイトカインとは、細胞によって放出され、細胞の挙動に影響を及ぼすことができる、タンパク質（例えばケモカイン、インターフェロン、リンホカイン、インターロイキン、および腫瘍壊死因子）を指す。サイトカインは、広範囲にわたるさまざまな細胞によって、例えばマクロファージ、Bリンパ球、Tリンパ球および肥満細胞などの免疫細胞、ならびに内皮細胞、線維芽細胞、およびさまざまなストローマ細胞によって、生産される。所与のサイトカインは、2タイプ以上の細胞によって生産されうる。サイトカインは、全身性または局所性の免疫調整効果の生成に関与しうる。

【0220】

一定のサイトカインは炎症誘発性サイトカインとして機能することができる。炎症誘発性サイトカインとは、炎症反応の誘導または増幅に関与するサイトカインを指す。炎症誘発性サイトカインは、好中球および白血球など、免疫系のさまざまな細胞と共に作動して、免疫応答を生成することができる。一定のサイトカインは抗炎症性サイトカインとして機能することができる。抗炎症性サイトカインとは、炎症反応の低減に関与するサイトカインを指す。抗炎症性サイトカインは、場合により、炎症誘発性サイトカイン応答を調節することができる。いくつかのサイトカインは炎症誘発性サイトカインとしても抗炎症性サイトカインとしても機能することができる。

30

【0221】

いくつかの態様では、炎症誘発機能を有するサイトカインの発現を、免疫細胞においてアップレギュレートすることができる。炎症誘発機能を有するサイトカインの発現をアップレギュレートすることは、例えば免疫治療において標的に対する免疫応答を刺激するために役立ちうる。しかし過剰量の炎症誘発性サイトカインは、場合によっては、身体における慢性の全身性上昇などといった有害な効果を引き起こしうる。いくつかの態様では、炎症誘発機能を有するサイトカインの発現がダウンレギュレートされる。そのようなダウンレギュレーションは有害な効果を減少させかつ/または最小限に抑えることができる。

40

【0222】

いくつかの態様では、抗炎症機能を有するサイトカインの発現を、アップレギュレートすることができる。抗炎症機能を有するサイトカインの発現をアップレギュレートすることは、例えば、炎症応答が有害な効果を引き起こしている場合に、炎症応答を低減しかつ/ま

50

たは最小限に抑えるために役立つ。いくつかの態様では、抗炎症機能を有するサイトカインの発現を、ダウンレギュレートすることができる。そのようなダウンレギュレーションは、炎症応答を、それが望まれる場合には、増加させかつ/または強化することができる。

【0223】

本開示のシステムおよび組成物によって調節することが可能なサイトカインの例として、リンホカイン、モノカイン、および従来のポリペプチドホルモンが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。サイトカインには、ヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、およびウシ成長ホルモンなどの成長ホルモン;副甲状腺ホルモン;チロキシン;インスリン;プロインスリン;リラキシン;プロリラキシン;卵胞刺激ホルモン(FSH)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、および黄体形成ホルモン(LH)などの糖タンパク質ホルモン;肝成長因子;線維芽細胞成長因子;プロラクチン;胎盤性ラクトゲン;腫瘍壊死因子-アルファ;ミューラー管抑圧物質;マウスゴナドトロピン関連ペプチド;インヒピン;アクチビン;血管内皮成長因子;インテグリン;トロンボポエチン(TPO);NGF-アルファなどの神経成長因子;血小板成長因子;TGF-アルファ、TGF-ベータ、TGF-ベータ1、TGF-ベータ2、およびTGF-ベータ3などのトランスフォーミング成長因子(TGF);インスリン様成長因子-Iおよび-II;エリスロポエチン(EPO);Flt-3L;幹細胞因子(SCF);骨誘導性因子;IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ などのインターフェロン(IFN);マクロファージ-CSF(M-CSF)などのコロニー刺激因子(CSF);顆粒球-マクロファージ-CSF(GM-CSF);顆粒球-CSF(G-CSF);マクロファージ刺激因子(MSP);IL-1、IL-1a、IL-1b、IL-1RA、IL-18、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-20などのインターロイキン(IL);CD154、LT-ベータ、TNF-アルファ、TNF-ベータ、4-1BBL、APRIL、CD70、CD153、CD178、GITRL、LIGHT、OX40L、TALL-1、TRAIL、TWEAK、TRANCEなどの腫瘍壊死因子;ならびにLIF、オンコスタチンM(OSM)およびkitリガンド(KL)を含む他のポリペプチド因子がある。サイトカイン受容体とは、サイトカインに結合する受容体タンパク質を指す。サイトカイン受容体は膜結合型であっても可溶性であってもよい。

【0224】

いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、インターロイキン(IL-1)ファミリーメンバー(例えばリガンド)、IL-1受容体ファミリーメンバー、インターロイキン-6(IL-6)ファミリーメンバー(例えばリガンド)、IL-6受容体、インターロイキン-10(IL-10)ファミリーメンバー(例えばリガンド)、IL-10受容体、インターロイキン-12(IL-12)ファミリーメンバー(例えばリガンド)、IL-12受容体、インターロイキン-17(IL-17)ファミリーメンバー(例えばリガンド)、またはIL-17受容体の発現および/または活性を調節する。

【0225】

いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、サイトカイン、例えば限定するわけではないが、インターロイキン-1(IL-1)ファミリーメンバーまたは関連タンパク質;腫瘍壊死因子(TNF)ファミリーメンバーまたは関連タンパク質;インターフェロン(IFN)ファミリーメンバーまたは関連タンパク質;インターロイキン-6(IL-6)ファミリーメンバーまたは関連タンパク質;およびケモカインまたは関連タンパク質の発現および/または活性を調節する。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、IL18、IL18BP、IL1A、IL1B、IL1F10、IL1F3/IL1RA、IL1F5、IL1F6、IL1F7、IL1F8、IL1RL2、IL1F9、IL33、BAFF/BLyS/TNFSF138、4-1BBL、CD153/CD30L/TNFSF8、CD40LG、CD70、Fasリガンド/FASLG/CD95L/CD178、EDA-A1、TNFSF14/LIGHT/CD258、TNFA、LTA/TNFB/TNFSF1、LTB/TNFC、CD70/CD27L/TNFSF7、TNFSF10/TRAIL/APO-2L(CD253)、RANKL/OPGL/TNFSF11(CD254)、TNFSF12、TNF-アルファ/TNFA、TNFSF13、TL1A/TNFSF15、OX-40L/TNFSF4/CD252、CD40L/CD154/TNFSF5、IFNA1、IFNA10、IFNA13、IFNA14、IFNA2、IFNA4、IFNA7、IFNB1、IFNE、IFNG、IFNZ、IFNA8、IFNA5/IFNaG、IFN β /IFNW1、CLCF1、CNTF、I

10

20

30

40

50

L11、IL31、IL6、レプチン、LIF、OSM、CCL1/TCA3、CCL11、CCL12/MCP-5、CCL13/MCP-4、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17/TARC、CCL18、CCL19、CCL2/MCP-1、CCL20、CCL21、CCL22/MDC、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CCL28、CCL3、CCL3L3、CCL4、CCL4L1/LAG-1、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9、CX3CL1、CXCL1、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCL17、CXCL2/MIP-2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7/Ppbp、CXCL9、IL8/CXCL8、XCL1、XCL2、FAM19A1、FAM19A2、FAM19A3、FAM19A4、およびFAM19A5から選択されるサイトカインの発現および/または活性を調節する。

【0226】

いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、サイトカイン受容体、例えば限定するわけではないが、インターロイキン-1 (IL-1) 受容体ファミリーメンバーまたは関連タンパク質;腫瘍壊死因子 (TNF) 受容体ファミリーメンバーまたは関連タンパク質;インターフェロン (IFN) 受容体ファミリーメンバーまたは関連タンパク質;インターロイキン-6 (IL-6) 受容体ファミリーメンバーまたは関連タンパク質;およびケモカイン受容体または関連タンパク質の発現および/または活性を調節する。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、IL18R1、IL18RAP、IL1R1、IL1R2、IL1R3、IL1R8、IL1R9、IL1RL1、SIGIRR、4-1BB、BAFF R、TNFRSF7、CD40、CD95、DcR3、TNFRSF21、EDA2R、EDAR、PGLYRP1、TNFRSF19L、TNFR1、TNFR2、TNFRSF11A、TNFRSF11B、TNFRSF12A、TNFRSF13B、TNFRSF14、TNFRSF17、TNFRSF18、TNFRSF19、TNFRSF25、LTBR、TNFRSF4、TNFRSF8、TRAILR1、TRAILR2、TRAILR3、TRAILR4、IFNAR1、IFNAR2、IFNGR1、IFNGR2、CNTFR、IL11RA、IL6R、LEPR、LIFR、OSMR、IL31RA、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCRL1、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CXCR7、CXCR1、CXCR2、ARMCX、BCA-1/CXCL1、CCL1、CCL12/MCP-、CCL13/MCP-、CCL15/MIP-5/MIP-1 del Δ 、CCL16/HCC-4/NCC、CCL17/TAR、CCL18/PARC/MIP-、CCL19/MIP-3、CCL2/MCP-、CCL20/MIP-3アルファ/MIP3、CCL21/6Ckin、CCL22/MD、CCL23/MIP、CCL24/エオタキシン-2/MPIF-、CCL25、CCL26/エオタキシン-、CCL27、CCL3、CCL4、CCL4L1/LAG、CCL5、CCL6、CCL8/MCP-、CXCL10/Crg、CXCL12/SDF-1、CXCL14、CXCL15、CXCL16/SR-、CXCL2/MIP-、CXCL3/GRO、CXCL4、CXCL6/GCP-、CXCL9、FAM19A4、フラクタルカイン、I-309/CCL1/TCA-、IL-8、MCP-3、NAP-2/PPBP、XCL2、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR11、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CXCR7/RDC-1、IL8Ra/CXCR1、およびIL8Rb/CXCR2から選択されるサイトカイン受容体の発現および/または活性を調節する。

【0227】

いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、アクチビン (例えばアクチビン A、アクチビン B、アクチビン Cおよびアクチビン E);インヒビン (例えばインヒビン-Aおよびインヒビン-B);アクチビン受容体 (例えばアクチビン1型受容体、アクチビン2型受容体);骨形成タンパク質 (例えばBMP1、BMP2、BMP3、BMP4、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8a、BMP8b、BMP10、およびBMP15); BMP受容体;増殖分化因子 (例えばGDF1、GDF2、GDF3、GDF4、GDF5、GDF6、GDF7、GDF8、GDF9、GDF10、GDF11、およびGDF15);グリア細胞由来神経栄養因子ファミリーリガンド (例えばグリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF)、ニューールツリン (NRTN)、アルテミン (ARTN)、およびパーセフィン (PSPN)); GDNFファミリー受容体;およびc-MPL/CD110/TPORの発現および/または活性を調節する。

【0228】

サイトカイン生産はさまざまな方法を使って評価することができる。サイトカイン生産は、修飾免疫細胞を成長させた細胞培養培地 (例えばインピトコ生産) または修飾免疫細胞を有する対象から得た血清 (例えばインピボ生産) を、1つまたは複数のサイトカインの存在についてアッセイすることによって、評価することができる。サイトカインレベルは

10

20

30

40

50

、任意の適切なアッセイを使って、濃度を含む種々の適切な単位で、定量することができる。いくつかの態様では、サイトカインタンパク質が検出される。いくつかの態様では、サイトカインのmRNA転写産物が検出される。サイトカインアッセイの例として、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、イムノプロット、免疫蛍光アッセイ、ラジオイムノアッセイ、試料中のさまざまなサイトカインを並行して検出することを可能にする抗体アレイ、ビーズベースのアレイ、定量PCR、マイクロアレイなどが挙げられる。他の適切な方法としてプロテオミクスのアプローチ(2Dゲル、MS分析など)を挙げることができる。

【0229】

いくつかの態様において、内在性遺伝子または内在性遺伝子産物は免疫調節タンパク質をコードする。免疫調節タンパク質としては、コグネイトリガンドに結合したときに免疫細胞シグナルを、例えば限定するわけではないが、免疫細胞の活性化シグナルおよび阻害シグナルを、強化および/または抑圧することができる、免疫チェックポイント受容体などのタンパク質が挙げられる。アクチュエータは、場合によっては、調節タンパク質の発現を変化させる(例えばアップレギュレートおよび/またはダウンレギュレートする)ことができる。いくつかの態様において、アクチュエータは、調節タンパク質をコードする核酸配列を編集する。いくつかの態様において、内在性遺伝子または内在性遺伝子産物は、A2AR、B7.1、B7-H3/CD276、B7-H4/B7S1/B7x/Vtcn1、B7-H6、BTLA/CD272、CCR4、CD122、4-1BB/CD137、CD27、CD28、CD40、CD47、CD70、CISH、CTLA-4/CD152、DR3、GITR、ICOS/CD278、IDO、KIR、LAG-3、OX40/CD134、PD-1/CD279、PD2、PD-L1、PD-L2、TIM-3、およびVISTA/Dies1/Gi24/PD-1H(C10orf54)などの分子をコードする。

【0230】

いくつかの態様において、標的ポリヌクレオチドは、異種遺伝子または異種遺伝子産物を含む。異種遺伝子または異種遺伝子産物は、追加のキメラ膜貫通受容体ポリペプチドなどのタンパク質をコードすることができる。いくつかの態様において、追加のキメラ膜貫通受容体ポリペプチドは、(a)追加抗原に特異的に結合する追加の抗原相互作用ドメインを含む細胞外領域、および(b)共刺激ドメインを含む。追加の抗原相互作用ドメインは任意の適切な抗原に結合することができる。追加の抗原相互作用ドメインは前述の抗原に結合することができる。追加の抗原相互作用ドメインはキメラ受容体ポリペプチドと同じ抗原または異なる抗原に結合することができる。追加の抗原相互作用ドメインは任意の適切な抗原相互作用ドメインを含むことができる。追加の抗原相互作用ドメインは、本明細書の他の項で説明する任意の抗原相互作用ドメインであることができる。例えば追加の抗原相互作用ドメインは、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、組換え抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、単鎖抗体(例えばscFv)、ミニボディ、ダイアボディ、単ドメイン抗体(「sdAb」または「ナノボディ」または「キャメリド」)、またはFc結合ドメインを含むことができる。いくつかの態様において、追加の抗原相互作用ドメインは抗体ミメティックを含む。

【0231】

追加のキメラ膜貫通受容体ポリペプチドは共刺激ドメインを含むことができる。共刺激ドメインは、前述した任意の共刺激ドメインであることができる。共刺激ドメインは共刺激シグナルを与えることができる。そのような共刺激シグナルは、場合により、本システムを発現する免疫細胞において増殖シグナルおよび/または生存シグナルを与えることができる。いくつかの態様では、キメラ膜貫通受容体ポリペプチドの免疫細胞シグナル伝達ドメインと、追加のキメラ膜貫通受容体ポリペプチドは、どちらも、少なくとも1つの共刺激ドメインを含有する。共刺激ドメインを含む追加のキメラ膜貫通受容体の発現は、持続的および/または妥当な免疫応答を得るのに十分な細胞シグナル伝達を与えることができる。

【0232】

いくつかの態様において、キメラ膜貫通受容体ポリペプチドの免疫細胞シグナル伝達ドメインは共刺激ドメインを含まず、一方、追加のキメラ膜貫通受容体ポリペプチドは、少なくとも1つの共刺激ドメインを含む。キメラ膜貫通受容体ポリペプチドの細胞外領域への

10

20

30

40

50

第1抗原の結合は、切断認識部位の切断をもたらすことで、アクチュエータモエティを放出させることができる。次に、アクチュエータモエティは、標的ポリヌクレオチド、例えば追加のキメラ膜貫通受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと複合体形成し、追加のキメラ膜貫通受容体ポリペプチドの発現を調節することができる。追加のキメラ膜貫通受容体ポリペプチドは、(i) 第1抗原とは異なる抗原に特異的に結合する追加の抗原相互作用ドメインと、(ii) 免疫細胞の効率のよい免疫応答に貢献しうる共刺激ドメインとを含む。共刺激ドメインが追加のキメラ膜貫通受容体ポリペプチド上に位置するので、有効な免疫応答は、両方の受容体が抗原に結合するまでは、生じることができない。こうして、免疫細胞の調節は2つの抗原の存在を条件とし、それによって、免疫細胞調節（例えば活性化および/または失活）の特異性を増加させる。いくつかの態様において、共刺激ドメインの（例えばキメラ膜貫通受容体ポリペプチド、追加のキメラ膜貫通受容体ポリペプチド、および/または両受容体への）配置は、条件付き免疫細胞調節の特異性に影響を及ぼす。例えば免疫細胞は、抗原相互作用ドメインを含む細胞外領域と切断認識部位を介してアクチュエータモエティに連結された免疫細胞シグナル伝達ドメインを含む細胞内領域とを有するキメラ膜貫通受容体ポリペプチドを含むシステムを発現することができる。多くの細胞タイプはオーバーラップする抗原（例えば細胞表面タンパク質など）を発現するので、少なくとも2つの抗原の存在に依存する条件付き活性化は、免疫細胞活性化の閾を高くすることができる。

10

【0233】

一局面において、本開示は、リンパ球の条件付き調節のための方法を提供する。いくつかの態様において、本方法は、本明細書に開示するリンパ球を、受容体の抗原相互作用ドメインに特異的に結合する抗原に、接触させまたは曝露する工程を含む。この接触は、免疫細胞活動の活性化または失活をもたらし、それによってリンパ球を条件付きで調節する。いくつかの態様において、免疫細胞活動は、リンパ球のクローン増加;リンパ球によるサイトカイン放出;リンパ球の細胞傷害性;リンパ球の増殖;リンパ球の分化、脱分化または分化転換;リンパ球の運動および/または輸送;リンパ球の疲弊および/または再活性化;ならびにリンパ球による他の細胞間分子、代謝産物、化学化合物、またはそれらの組合せの放出からなる群より選択される。

20

【0234】

いくつかの例において、本開示のシステムおよび組成物は、免疫細胞中で発現させれば、標的細胞を死滅させるために使用することができる。一局面において、本システムを発現する免疫細胞または免疫細胞集団は、標的細胞の死を誘導することができる。標的細胞の死滅は、例えば限定するわけではないが、細胞集団を排除することまたはその増殖を阻害することが望まれる疾患または障害の処置など、さまざまな応用に役立つ。いくつかの態様において、標的細胞の死を誘導する方法は、標的細胞を、本明細書に開示するシステムを発現する免疫細胞または免疫細胞集団に曝露する工程を含む。いくつかの態様において、免疫細胞はT細胞またはNK細胞などのリンパ球である。標的細胞をリンパ球に曝露すると、リンパ球が発現する受容体は、標的細胞の膜結合型抗原または標的細胞の非膜結合型抗原に結合することができる。この曝露はリンパ球の細胞傷害性の活性化をもたらし、それによって標的細胞の死を誘導する。

30

40

【0235】

本システムを発現する細胞傷害性T細胞などのリンパ球は標的細胞のアポトーシスを誘導することができる。本システムは、T細胞などの免疫細胞中で発現させれば、T細胞のクローン増加、細胞表面における活性化マーカーの発現、エフェクター細胞への分化、細胞傷害性またはサイトカイン分泌の誘導、アポトーシスの誘導、およびそれらの組合せを調節するために使用することができる。細胞傷害性T細胞中で発現した本システムは、(i) パーフォリン、グランザイム、およびグラニュライシンなどの細胞毒の放出、および/または(ii) T細胞と標的細胞の間のFas-Fasリガンド相互作用によるアポトーシスの誘導を変化させ、それによって標的細胞の破壊をトリガーすることができる。本システムは、ナチュラルキラー(NK)細胞中で発現させると、NK細胞による標的細胞の死滅を媒介すること

50

ができる。ナチュラルキラー（NK）細胞は、活性化されると、ウイルス感染細胞および腫瘍原性細胞などの異常細胞を標的とし、それらを死滅させることができる。本システムは、標的細胞の特異的の死滅をもたらすことができるNK細胞の分泌リソソーム内に貯蔵される細胞傷害性分子の生産および/または放出を調節することができる。いくつかの態様において、(i) 本システムを発現する抗原特異的細胞傷害性T細胞（例えばリンパ球）は、その表面に外来抗原のエピトープをディスプレイする細胞において、例えばウイルス感染細胞、細胞内細菌を持つ細胞、および腫瘍抗原をディスプレイするがん細胞において、アポトーシスを誘導することができる；(ii) 本システムを発現するマクロファージおよびナチュラルキラー細胞（NK細胞）は病原体を破壊することができる；かつ/または(iii) 本システムを発現する他の免疫細胞は、さらなる免疫応答を助長するために、さまざまなサイトカインを分泌することができる。

10

【0236】

T細胞およびNK細胞などの免疫細胞の細胞傷害性の活性化とは、生物学的状態の誘導された変化であって、それによって細胞が細胞傷害性になるものを指す。そのような変化としては、改変された活性化マーカー発現、サイトカインの生産、および増殖が挙げられる。これらの変化は一次刺激シグナルによってもたらされうる。共刺激シグナルは、一次シグナルの強さを増幅し、初期刺激に続く細胞死を抑圧することで、より耐久性のある活性化状態をもたらす、よってより高い細胞傷害能をもたらすことができる。細胞傷害性とは抗体依存性細胞性細胞傷害を指すことができる。

【0237】

本明細書に開示するシステムを発現する免疫細胞において、受容体は、抗原結合に応答して受容体修飾を受けることができる。受容体修飾として、コンフォメーション変化および/または化学修飾が挙げられる。化学修飾として、例えば受容体の少なくとも1つのアミノ酸残基におけるリン酸化または脱リン酸化が挙げられる。いくつかの態様において、受容体修飾は複数の修飾部位における修飾を含み、各修飾はアダプタータンパク質に結合するのに有効である。免疫細胞上のキメラ膜貫通受容体ポリペプチドの抗原相互作用ドメインが標的細胞の抗原（膜結合型または非膜結合型のいずれか）に結合すると、アクチュエータモエティがGMPから放出されて、免疫細胞活動、例えばリンパ球の細胞傷害性の活性化または失活をもたらす。

20

【0238】

GMPから放出されたアクチュエータモエティは、DNA（例えばゲノムDNAおよび/またはcDNA）およびRNA（例えばmRNA）などの標的ポリヌクレオチドの発現を調節することによって、リンパ球の細胞傷害性の活性化をもたらすことができる。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、標的ポリヌクレオチドの物理的妨害によって、または標的ポリヌクレオチドからの遺伝子発現を抑圧もしくは強化するのに有効な追加因子の動員によって、標的ポリヌクレオチドの発現を調節する。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、標的ポリヌクレオチドの発現を増加させるのに有効な転写活性化因子を含む。いくつかの態様において、アクチュエータモエティは、標的ポリヌクレオチドの発現を減少させるのに有効な転写抑制因子を含む。

30

【0239】

いくつかの態様において、標的ポリヌクレオチドは、ゲノムDNA、例えばゲノムの一領域を含む。いくつかの態様において、標的ポリヌクレオチドはプラスミド（例えば外因性遺伝子を保持するプラスミド）の一領域を含む。いくつかの態様において、標的ポリヌクレオチドはRNAを含む。アクチュエータモエティは、アクチュエータモエティがGMPから切断されたときにそのドメインを核内に移動させる、核局在化シグナルのコピーを1つまたは複数含むことができる。

40

【0240】

本開示のシステムおよび方法を使ってさまざまな標的細胞を死滅させることができる。この方法を適用することができる標的細胞には、多種多様な細胞タイプが含まれる。標的細胞はインビトロであることができる。標的細胞はインビボであることができる。標的細胞

50

はエクスピボであることができる。標的細胞は単離された細胞であることができる。標的細胞は生物の内部にある細胞であることができる。標的細胞は生物であることができる。標的細胞は細胞培養物中の細胞であることができる。標的細胞は細胞の集合体のうちの1つであることができる。標的細胞は哺乳類細胞であるか、哺乳類細胞に由来することができる。標的細胞は齧歯類細胞であるか、齧歯類細胞に由来することができる。標的細胞はヒト細胞であるか、ヒト細胞に由来することができる。標的細胞は原核細胞であるか、原核細胞に由来することができる。標的細胞は細菌細胞であるか、細菌細胞に由来することができる。標的細胞は古細菌細胞であるか、古細菌細胞に由来することができる。標的細胞は真核細胞であるか、真核細胞に由来することができる。標的細胞は多能性幹細胞であることができる。標的細胞は植物細胞であるか、植物細胞に由来することができる。標的細胞は動物細胞であるか、動物細胞に由来することができる。標的細胞は無脊椎動物細胞であるか、無脊椎動物細胞に由来することができる。標的細胞は脊椎動物細胞であるか、脊椎動物細胞に由来することができる。標的細胞は微生物細胞であるか、微生物細胞に由来することができる。標的細胞は真菌細胞であるか、真菌細胞に由来することができる。標的細胞は特別な器官または組織に由来することができる。

10

【0241】

標的細胞は幹細胞または前駆細胞であることができる。標的細胞として、幹細胞（例えば成体幹細胞、胚性幹細胞、誘導多能性幹（iPS）細胞）および前駆細胞（例えば心筋前駆細胞、神経前駆細胞など）を挙げることができる。標的細胞として、齧歯類幹細胞、齧歯類前駆細胞、ヒト幹細胞、ヒト前駆細胞などを含む哺乳類の幹細胞および前駆細胞を挙げることができる。クローン細胞はある細胞の子孫を含むことができる。標的細胞は標的核酸を含むことができる。標的細胞は生きている生物中に存在することができる。標的細胞は遺伝子修飾細胞であることができる。標的細胞は宿主細胞であることができる。

20

【0242】

標的細胞が全能性幹細胞であることはできるが、本開示のいくつかの態様では、「細胞」という用語を使用しても、それが全能性幹細胞を指すことはない。標的細胞が植物細胞であることはできるが、本開示のいくつかの態様では、「細胞」という用語を使用しても、それが植物細胞を指すことはない。標的細胞は多能性細胞であることができる。例えば標的細胞は、造血細胞系譜の他の細胞に分化することはできるが、他のどの非造血細胞へも分化することはできない、多能性造血細胞であることができる。標的細胞は生物全体へと発生できるものであってよい。標的細胞は生物全体へと発生できるものであってよい、生物全体へは発生できないものであってよい。標的細胞は生物全体であってよい。

30

【0243】

標的細胞は初代細胞であることができる。例えば初代培養の培養物は、0回、1回、2回、4回、5回、10回、15回またはそれ以上、継代することができる。細胞は単細胞生物であることができる。細胞は培養中で成長させることができる。

【0244】

標的細胞は疾患細胞であることができる。疾患細胞は、変化した代謝的特徴、遺伝子発現特徴、および/または形態学的特徴を有することができる。疾患細胞はがん細胞、糖尿病細胞、およびアポトーシス細胞であることができる。疾患細胞は罹患対象からの細胞であることができる。例示的疾患として、血液障害、がん、代謝障害、眼障害、臓器障害、筋骨格障害、心疾患などを挙げることができる。

40

【0245】

標的細胞が初代細胞である場合、それらは任意の方法によって個体から回収することができる。例えば白血球は、アフエレーシス、白血球アフエレーシス、密度勾配分離などによって回収することができる。皮膚、筋、骨髄、脾臓、肝臓、膵臓、肺、腸、胃などの組織からの細胞は、生検によって回収することができる。回収した細胞の分散または懸濁には適当な溶液を使用することができる。そのような溶液は一般に、低濃度の許容される緩衝剤と共にウシ胎児血清または他の天然因子が都合よく添加された平衡塩類溶液（例えば生理食塩水、リン酸緩衝食塩水（PBS）、ハンクス平衡塩類溶液など）であることができる

50

。緩衝剤としては、HEPES、リン酸緩衝液、乳酸緩衝液などを挙げることができる。細胞は直ちに使用してもよいし、(例えば凍結によって)貯蔵してもよい。凍結細胞は融解することができ、再使用可能であることができる。細胞は、DMSO、血清、培地緩衝液(例えば10% DMSO、50%血清、40%緩衝培地)および/または凍結温度で細胞を保存するためによく使用されているいくつかの他の同様の溶液中で凍結することができる。

【0246】

標的細胞になりうる細胞の非限定的な例として、以下の細胞が挙げられるが、それらに限定されるわけではない: B細胞、T細胞(細胞傷害性T細胞、ナチュラルキラーT細胞、制御性T細胞、Tヘルパー細胞)、ナチュラルキラー細胞、サイトカイン誘導キラー(CIK)細胞(例えばUS20080241194参照)などのリンパ系細胞;顆粒球(好塩基性顆粒球、好酸性顆粒球、好中性顆粒球/過分葉好中球)、単球/マクロファージ、赤血球(網状赤血球)、肥満細胞、血小板/巨核球、樹状細胞などの骨髄性細胞;甲状腺(甲状腺上皮細胞、傍濾胞細胞)、副甲状腺(上皮小体主細胞、好酸性細胞)、副腎(クロム親和性細胞)、松果体(松果体細胞)の細胞を含む内分泌系からの細胞;グリア細胞(アストロサイト、ミクログリア)、巨大神経分泌細胞(Magnocellular neurosecretory cell)、星細胞(Stellate cell)、ベッチャー細胞、および下垂体(性腺刺激ホルモン分泌細胞、副腎皮質刺激ホルモン分泌細胞、甲状腺刺激ホルモン分泌細胞、成長ホルモン分泌細胞、プロラクチン分泌細胞)を含む神経系の細胞;肺細胞(I型肺細胞、II型肺細胞)、クララ細胞、杯細胞、塵埃細胞を含む呼吸器系の細胞;心筋細胞、周皮細胞を含む循環系の細胞;胃(胃主細胞、壁細胞)、杯細胞、パネート細胞、G細胞、D細胞、ECL細胞、I細胞、K細胞、S細胞を含む消化器系の細胞;腸クロム親和性細胞を含む腸内分泌細胞、APUD細胞、肝臓(肝細胞、クッパー細胞)、軟骨/骨/筋;骨芽細胞、骨細胞、破骨細胞、歯(セメント芽細胞、エナメル芽細胞)を含む骨細胞;軟骨芽細胞、軟骨細胞を含む軟骨細胞;毛包、ケラチノサイト、メラノサイト(母斑細胞)を含む皮膚細胞;ミオサイトを含む筋細胞;ポドサイト、傍系球体細胞、系球体内メサンギウム細胞/系球体外メサンギウム細胞、腎臓近位尿細管刷子縁細胞、マクラデンサ細胞を含む泌尿器系細胞;精子、セルトリ細胞、ライディッヒ細胞、卵子を含む生殖器系細胞;ならびに次に挙げる細胞を含む他の細胞:脂肪細胞、線維芽細胞、腱細胞、表皮ケラチノサイト(分化表皮細胞)、表皮基底細胞(幹細胞)、指の爪および足指爪のケラチノサイト、爪床基底細胞(幹細胞)、毛髄質細胞(Medullary hair shaft cell)、毛髄皮質細胞(Cortical hair shaft cell)、毛小皮細胞(Cuticular hair shaft cell)、毛根鞘小皮細胞(Cuticular hair root sheath cell)、ハックスリー層の毛根鞘細胞(Hair root sheath cell of Huxley's layer)、ヘンレ層の毛根鞘細胞(Hair root sheath cell of Henle's layer)、外毛根鞘細胞(External hair root sheath cell)、毛母細胞(幹細胞)、湿潤重層障壁上皮細胞(Wet stratified barrier epithelial cell)、角膜、舌、口腔、食道、肛門管、遠位尿道および膣の重層扁平上皮の表層上皮細胞、角膜、舌、口腔、食道、肛門管、遠位尿道および膣の上皮の基底細胞(幹細胞)、泌尿器上皮細胞(膀胱および尿道を裏打ちする)、外分泌分泌上皮細胞、唾液腺粘液細胞(多糖リッチ分泌)、唾液腺漿液細胞(糖タンパク質酵素リッチ分泌)、舌のフォン・エブネル腺細胞(味蕾を濡らす)、乳腺細胞(乳汁分泌)、涙腺細胞(涙液分泌)、耳の耳道腺細胞(耳垢分泌)、エクリン汗腺暗細胞(糖タンパク質分泌)、エクリン汗腺明細胞(小分子分泌)。アポクリン汗腺細胞(発香性分泌、性ホルモン感受性)、眼瞼のモル腺細胞(特殊化した汗腺)、皮脂腺細胞(脂質リッチ皮脂分泌)、鼻のポーマン腺細胞(嗅上皮を濡らす)、十二指腸のブルナー腺細胞(酵素およびアルカリ性粘液)、精嚢細胞(遊泳精子のためのフルクトースを含む精液構成要素を分泌する)、前立腺細胞(精液構成要素を分泌する)、尿道球腺細胞(粘液分泌)、バルトリン腺細胞(膣液分泌)、リトル腺細胞(粘液分泌)、子宮内膜細胞(糖質分泌)、気道および消化管の孤立杯細胞(Isolated goblet cell)(粘液分泌)、胃内壁粘液細胞(粘液分泌)、胃腺酵素分泌細胞(ペプシノーゲン分泌)、胃腺酸分泌細胞(塩酸分泌)、膵腺房細胞(炭酸水素塩および消化酵素分泌)、小腸のパネート細胞(リゾチーム分泌)、肺のII型肺細胞(サーファクタント分泌)、肺のクララ細胞、ホルモン分泌細胞、下垂体前葉細胞、成長ホルモン分泌細胞、

10

20

30

40

50

プロラクチン分泌細胞、甲状腺刺激ホルモン分泌細胞、性腺刺激ホルモン分泌細胞、副腎皮質刺激ホルモン分泌細胞、脳下垂体中葉細胞、巨大神経分泌細胞、腸および気道細胞、甲状腺細胞、甲状腺上皮細胞、傍濾胞細胞、副甲状腺細胞、上皮小体主細胞、好酸性細胞、副腎細胞、クロム親和性細胞、精巢のライディッヒ細胞、卵胞の内卵胞膜細胞、破裂卵胞の黄体細胞、顆粒層ルテイン細胞、卵胞膜黄体細胞、傍糸球体細胞（レニン分泌）、腎臓のマクラデンサ細胞、代謝および貯蔵細胞、障壁機能細胞（肺、腸、外分泌腺および尿生殖路）、腎臓、I型肺細胞（肺の気泡を裏打ちする）、腺管細胞（腺房中心細胞）、（汗腺、唾液腺、乳腺などの）非横紋導管細胞、（精囊、前立腺などの）導管細胞、閉じた体内体腔を裏打ちする上皮細胞、推進機能を持つ繊毛細胞、細胞外マトリックス分泌細胞、収縮細胞、骨格筋細胞、幹細胞、心筋細胞、血液細胞および免疫系細胞、エリスロサイト（赤血球）、巨核球（血小板前駆体）、単球、結合組織マクロファージ（さまざまなタイプ）、表皮ランゲルハンス細胞、破骨細胞（骨中）、樹状細胞（リンパ組織中）、ミクログリア細胞（中枢神経系中）、好中性顆粒球、好酸性顆粒球、好塩基性顆粒球、肥満細胞、ヘルパーT細胞、サブレッサーT細胞、細胞傷害性T細胞、ナチュラルキラーT細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、網状赤血球、血液および免疫系の幹細胞および委任前駆細胞（さまざまなタイプ）、多能性幹細胞、全能性幹細胞、誘導多能性幹細胞、成体幹細胞、感覚トランスデューサー細胞、自律性ニューロン細胞、感覚器および末梢性ニューロン支持細胞、中枢神経系ニューロンおよびグリア細胞、水晶体細胞、顔料細胞、メラノサイト、網膜色素上皮細胞、生殖細胞、卵原細胞/卵母細胞、精細胞、精母細胞、精原細胞（精母細胞の幹細胞）、精子、ナース細胞、卵胞細胞、セルトリ細胞（精巢中）、胸腺上皮細胞、間質細胞、および間質腎臓細胞。

10

20

【0247】

特に興味深いものはがん細胞である。いくつかの態様において、標的細胞はがん細胞である。がん細胞の非限定的な例として、次に挙げるようながんの細胞が挙げられる:棘細胞腫、腺房細胞癌、聴神経腫、末端黒子型メラノーマ、先端汗腺腫、急性好酸球性白血病、急性リンパ芽球性白血病、急性巨核芽球性白血病、急性単球性白血病、急性分化型骨髄性白血病、急性骨髄系樹状細胞白血病、急性骨髄性白血病、急性前骨髄球性白血病、アダマンチノーマ、腺癌、腺様嚢胞癌、腺腫、腺様歯原性腫瘍、副腎皮質癌、成人T細胞白血病、悪性（Aggressive）NK細胞白血病、AIDS関連がん、AIDS関連リンパ腫、胞状軟部肉腫、エナメル上皮線維腫、肛門がん、未分化大細胞リンパ腫、組織非形成性甲状腺がん、血管免疫芽球性T細胞性リンパ腫、血管筋脂肪腫、血管肉腫、虫垂がん、星状細胞腫、非定型奇形ラブドイド腫瘍、基底細胞癌、基底様癌、B細胞白血病、B細胞性リンパ腫、ペリーニ管癌、胆道がん、膀胱がん、芽細胞腫、骨がん、骨腫瘍、脳幹神経膠腫、脳腫瘍、乳がん、ブレンネル腫瘍、気管支腫瘍、細気管支肺胞上皮癌、褐色腫瘍、パーキットリンパ腫、原発部位不明のがん、カルチノイド腫瘍、癌、上皮内癌、陰茎癌、原発部位不明の癌、癌肉腫、キャスルマン病、中枢神経系胚芽腫、小脳星状細胞腫、大脳星状細胞腫、子宮頸がん、胆管癌、軟骨腫、軟骨肉腫、脊索腫、絨毛癌、脈絡叢パピローマ、慢性リンパ球性白血病、慢性単球性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性骨髄増殖性障害、慢性好中球性白血病、明細胞腫瘍、大腸がん、結腸直腸がん、頭蓋咽頭腫、皮膚T細胞性リンパ腫、デゴス病、隆起性皮膚線維肉腫、類皮嚢胞、線維形成性小円形細胞腫瘍、びまん性大B細胞リンパ腫、胚芽異形成性神経上皮腫瘍、胎児性癌、内胚葉洞腫瘍、子宮内膜がん、子宮内膜子宮がん、子宮内膜性腫瘍、腸症関連T細胞性リンパ腫、上衣芽細胞腫、脳室上衣腫、類上皮肉腫、赤白血病、食道がん、感覚神経芽腫、ユーイング腫瘍ファミリー、ユーイングファミリー肉腫、ユーイング肉腫、頭蓋外胚細胞性腫瘍、性腺外胚細胞性腫瘍、肝臓外胆管がん、乳房外パジェット病、ファロピウス管がん、胎児内胎児、線維腫、線維肉腫、濾胞性リンパ腫、濾胞性甲状腺がん、胆嚢がん、胆嚢がん、神経節膠腫、神経節腫、胃がん、胃リンパ腫、胃腸がん、消化管カルチノイド腫瘍、消化管ストローマ腫瘍、消化管ストローマ腫瘍、胚細胞性腫瘍、胚細胞腫、妊娠性絨毛癌、妊娠性絨毛性腫瘍、骨巨細胞腫、多形性神経膠芽腫、神経膠腫、大脳神経膠腫症、グロムス腫瘍、グルカゴノーマ、性腺芽腫、顆粒膜細胞腫、ヘアリー細胞白血病、ヘアリー細胞白血病、頭頸部がん、頭頸部がん

30

40

50

、心臓がん、血管芽腫、血管周囲細胞腫、血管肉腫、血液学的悪性疾患、肝細胞癌、肝脾T細胞性リンパ腫、遺伝性乳がん-卵巣がん症候群、ホジキンリンパ腫、ホジキンのリンパ腫、下咽頭がん、視床下部神経膠腫、炎症性乳がん、眼内メラノーマ、島細胞癌、島細胞腫瘍、若年性骨髄単球性白血病、カポジ肉腫、カポジ肉腫、腎がん、クラツキン腫瘍、クルケンベルグ腫瘍、咽頭がん、喉頭がん、悪性黒子型メラノーマ、白血病、白血病、口唇口腔がん、脂肪肉腫、肺がん、黄体腫、リンパ管腫、リンパ管肉腫、リンパ上皮腫、リンパ性白血病、リンパ腫、マクログロブリン血症、悪性線維性組織球腫、悪性線維性組織球腫、骨の悪性線維性組織球腫、悪性神経膠腫、悪性中皮腫、悪性末梢神経鞘腫瘍、悪性ラブドイド腫瘍、悪性トリトン腫瘍、MALTリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、肥満細胞性白血病、縦隔胚細胞性腫瘍、縦隔腫瘍、甲状腺髄様がん、髄芽腫、髄芽腫、髄上皮腫、メラノーマ、メラノーマ、髄膜腫、メルケル細胞癌、中皮腫、中皮腫、原発不明の転移性頸部扁平上皮がん、転移性尿路上皮癌、混合ミューラー腫瘍、単球性白血病、口腔がん、ムチン性腫瘍、多発性内分泌新生物症候群、多発性骨髄腫、多発性骨髄腫、菌状息肉腫、菌状息肉腫、骨髄異形成疾患、骨髄異形成症候群、骨髄性白血病、骨髄肉腫、骨髄増殖性疾患、粘液腫、鼻腔がん、鼻咽腔癌がん、鼻咽腔癌、新生物、神経鞘腫、神経芽細胞腫、神経芽細胞腫、神経線維腫、神経腫、結節性メラノーマ、非ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、非メラノーマ皮膚がん、非小細胞肺がん、眼腫瘍学 (Ocular oncology)、乏突起星状細胞腫、乏突起神経膠腫、オンコサイトーマ、視神経鞘髄膜腫、口腔がん、口腔がん、中咽頭がん、骨肉腫、骨肉腫、卵巣がん、卵巣がん、卵巣上皮がん、卵巣胚細胞性腫瘍、卵巣低悪性度腫瘍、乳房のパジェット病、パネコースト腫瘍、膵がん、膵がん、乳頭様甲状腺がん、乳頭腫、傍神経節腫、副鼻腔がん、副甲状腺がん、陰茎がん、血管周囲類上皮細胞腫瘍、咽頭癌がん、褐色細胞腫、中分化型松果体実質腫瘍、松果体芽腫、下垂体細胞腫、下垂体腺腫、下垂体腫瘍、形質細胞新生物、胸膜肺芽腫、多胚腫、前駆Tリンパ芽球性リンパ腫、原発性中枢神経系リンパ腫、原発性体液性リンパ腫、原発性肝細胞がん、原発性肝がん、原発性腹膜がん、原始神経外胚葉性腫瘍、前立腺がん、腹膜偽粘液腫、直腸がん、腎細胞癌、第15染色体上のNUT遺伝子に関連する気道癌 (Respiratory Tract Carcinoma involving the NUT gene on Chromosome 15)、網膜芽細胞腫、横紋筋腫、横紋筋肉腫、リヒター形質転換、仙尾部奇形腫、唾液腺がん、肉腫、神経鞘腫症、皮脂腺癌、続発性新生物、精上皮腫、漿液性腫瘍、セルトリ・ライディッヒ細胞腫、性索間質性腫瘍、セザリー症候群、印環細胞癌、皮膚がん、小円形青色細胞腫瘍 (Small blue round cell tumor)、小細胞癌、小細胞肺がん、小細胞リンパ腫、小腸がん、軟組織肉腫、ソマトスタチン産生腫瘍、煤煙性いぼ、脊髄腫瘍 (Spinal Cord Tumor)、脊椎腫瘍 (Spinal tumor)、脾性辺縁帯リンパ腫、扁平上皮癌、胃がん、表在拡大型メラノーマ、テント上原始神経外胚葉性腫瘍、表層上皮性-間質性腫瘍、滑膜肉腫、T細胞急性リンパ芽球性白血病、T細胞大型顆粒リンパ球白血病、T細胞白血病、T細胞性リンパ腫、T細胞前リンパ球性白血病、奇形腫、終末リンパ系がん (Terminal lymphatic cancer)、精巣がん、莖膜腫、咽頭がん、胸腺癌、胸腺腫、甲状腺がん、腎盂および尿管の移行上皮がん、移行上皮癌、尿管がん、尿道がん、泌尿生殖器新生物、子宮肉腫、ぶどう膜メラノーマ、膣がん、ヴェルナー・モリソン症候群、いぼ状がん、視覚路神経膠腫、外陰がん、ワルデンストレーム・マクログロブリン血症、ワルチン腫瘍、ウィルムス腫瘍、およびそれらの組合せを含むがんの細胞。いくつかの態様において、標的となるがん細胞は、がん幹細胞など、がん細胞集団内の部分集団に相当する。いくつかの態様において、がんは、リンパ腫などの造血系譜のがんである。抗原は腫瘍関連抗原であることができる。

【0248】

いくつかの態様において、標的細胞は腫瘍を形成する。本願の方法で処置された腫瘍は、安定化された腫瘍成長をもたらすことができる (例えば1つまたは複数の腫瘍は、サイズが1%、5%、10%、15%、または20%を超えて増加することがなく、かつ/または転移しない)。いくつかの態様において、腫瘍は、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12週、またはそれ以上にわたって安定化される。いくつかの態様において、腫瘍は、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12ヶ月、またはそれ

10

20

30

40

50

以上にわたって安定化される。いくつかの態様において、腫瘍は、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10年、またはそれ以上にわたって安定化される。いくつかの態様では、腫瘍のサイズまたは腫瘍細胞の数が、少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%またはそれ以上、低減する。いくつかの態様では、腫瘍が完全に排除されるか、検出レベル未満に低減する。いくつかの態様では、対象が、処置後、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12週、またはそれ以上にわたって、無腫瘍（例えば寛解状態）を保つ。いくつかの態様では、対象が、処置後、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12ヶ月、またはそれ以上にわたって、無腫瘍を保つ。いくつかの態様では、対象が、処置後、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10年、またはそれ以上にわたって、無腫瘍を保つ。

10

【0249】

標的細胞の死は、例えば限定するわけではないが、処置の前後に細胞をカウントすること、または生細胞もしくは死細胞（例えば標的生細胞または標的死細胞）に関連するマーカーのレベルを測定することなど、任意の適切な方法によって決定することができる。細胞死の度合は任意の適切な方法によって決定することができる。いくつかの態様では、細胞死の度合が、出発条件を基準として決定される。例えば個体は、既知出発量の標的細胞、例えば既知サイズの出発細胞塊、または既知濃度の循環標的細胞を有しうる。そのような場合は、細胞死の度合を、出発細胞集団に対する生き残った細胞の比として表すことができる。いくつかの態様では、細胞死の度合を、適切な細胞死アッセイによって決定することができる。さまざまな細胞死アッセイを入手することができ、それらはさまざまな検出方法を利用することができる。検出方法の例として、細胞染色の使用、顕微鏡法、フローサイトメトリー、セルソーティング、およびそれらの組合せが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

20

【0250】

腫瘍は、治療期間の完了後に外科的切除に付され、壊死性である（すなわち死んでいる）切除組織のパーセンテージを測定することによって、処置の腫瘍サイズ低減効力を決定することができる。いくつかの態様において、切除組織の壊死パーセンテージが約20%超（例えば少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%）であれば、処置は治療的に有効である。いくつかの態様において、切除組織の壊死パーセンテージは100%である。すなわち生きている腫瘍組織は存在しないか、または検出できない。

30

【0251】

本明細書に開示する免疫細胞または免疫細胞集団への標的細胞の曝露は、インビトロでもインビボでも行うことができる。標的細胞を免疫細胞または免疫細胞集団に曝露するとは、一般に、標的細胞の抗原（例えば膜結合型または非膜結合型）が免疫細胞において発現したキメラ膜貫通受容体ポリペプチドの抗原相互作用ドメインに結合することができるように、標的細胞を免疫細胞と接触させることおよび/または十分に近接させることを指す。インビトロでの免疫細胞または免疫細胞集団への標的細胞の曝露は、標的細胞と免疫細胞と共培養することによって達成することができる。標的細胞と免疫細胞は、例えば接着細胞として、あるいは懸濁状態で、共培養することができる。標的細胞と免疫細胞は、例えばサプリメント、成長因子、イオンなどを含む種々の適切なタイプの細胞培養培地中で共培養することができる。インビボでの免疫細胞または免疫細胞集団への標的細胞の曝露は、場合によっては、免疫細胞を対象に、例えばヒト対象に投与し、循環系を介して免疫細胞を標的細胞に局在化させることによって、達成することができる。場合によっては、標的細胞が局在化している隣接区域に、例えば直接注射によって、免疫細胞を送達することができる。

40

【0252】

曝露は任意の適切な長さの時間にわたって、例えば少なくとも1分、少なくとも5分、少なくとも10分、少なくとも30分、少なくとも1時間、少なくとも2時間、少なくとも3時間

50

、少なくとも4時間、少なくとも5時間、少なくとも6時間、少なくとも7時間、少なくとも8時間、少なくとも12時間、少なくとも16時間、少なくとも20時間、少なくとも24時間、少なくとも2日、少なくとも3日、少なくとも4日、少なくとも5日、少なくとも6日、少なくとも1週間、少なくとも2週間、少なくとも3週間、少なくとも1ヶ月、またはそれ以上にわたって、行うことができる。

【0253】

本願の諸局面のさまざまな態様では、複数のアクチュエータモエティが同じ細胞中で同時に使用される。いくつかの態様では、Casタンパク質を含むアクチュエータモエティを、

ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、メガヌクレアーゼ、RNA結合タンパク質 (RBP)、CRISPR関連RNA結合タン

10

パク質、リコンビナーゼ、フリッパーゼ、トランスポザーゼ、またはアルゴノートタンパク質を含む第2アクチュエータモエティと同時に使用することができる。いくつかの態様

では、ZFNを含むアクチュエータモエティを、Casタンパク質、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、メガヌクレアーゼ、RNA結合タンパク質 (RBP)、CRI

SPR関連RNA結合タンパク質、リコンビナーゼ、フリッパーゼ、トランスポザーゼ、またはアルゴノートタンパク質を含む第2アクチュエータモエティと同時に使用することが

20

できる。いくつかの態様では、TALENを含むアクチュエータモエティを、Casタンパク質、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、メガヌクレアーゼ、RNA結合タンパク質 (RBP)、

CRISPR関連RNA結合タンパク質、リコンビナーゼ、フリッパーゼ、トランスポザーゼ、またはアルゴノートタンパク質を含む第2アクチュエータモエティと同時に使用することが

できる。いくつかの態様では、RNA結合タンパク質 (RBP) を含むアクチュエータモエティを、Casタンパク質、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (

30

TALEN)、メガヌクレアーゼ、CRISPR関連RNA結合タンパク質、リコンビナーゼ、フリッパーゼ、トランスポザーゼ、またはアルゴノートタンパク質を含む第2アクチュエータ

モエティと同時に使用することができる。いくつかの態様では、CRISPR関連RNA結合タンパク質を含むアクチュエータモエティを、Casタンパク質、ジンクフィンガーヌクレア

ーゼ (ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、メガヌクレアーゼ、RNA結合タンパク質 (RBP)、リコンビナーゼ、フリッパーゼ、トランスポザーゼ、

またはアルゴノートタンパク質を含む第2アクチュエータモエティと同時に使用することができる。いくつかの態様では、リコンビナーゼを含むアクチュエータモエティを、Cas

タンパク質、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、メガヌクレアーゼ、RNA結合タンパク質 (RBP)、CRISPR関連

40

RNA結合タンパク質、フリッパーゼ、トランスポザーゼ、またはアルゴノートタンパク質を含む第2アクチュエータモエティと同時に使用することができる。いくつかの態様では、

フリッパーゼを含むアクチュエータモエティを、Casタンパク質、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、メガヌクレアーゼ、RNA結合タン

パク質 (RBP)、CRISPR関連RNA結合タンパク質、リコンビナーゼ、フリッパーゼ、またはアルゴノートタンパク質を含む第2アクチュエータモエティと同時に使用することが

50

ーヌクレアーゼ (TALEN)、メガヌクレアーゼ、RNA結合タンパク質 (RBP)、CRISPR関連RNA結合タンパク質、リコンビナーゼ、フリッパーゼ、またはトランスポザーゼを含む第2アクチュエータモエティと同時に使用することができる。

【0254】

いくつかの態様では、同じ標的DNA上または異なる標的DNA上の異なる場所における転写を同時に調整するために、複数のアクチュエータモエティが同じ細胞中で同時に使用される。いくつかの態様において、アクチュエータモエティはCasヌクレアーゼを含む。複数のCRISPR/Cas複合体は、単一供給源または単一タイプのCasタンパク質を、複数のガイド核酸と共に使用することで、異なる核酸を標的とすることができる。あるいは、複数のCRISPR/Cas複合体は、いくつかの核酸を標的とするために、オルソログCasタンパク質 (例えば化膿連鎖球菌、黄色ブドウ球菌、S.サーモフィラス、L.イノキア、および髄膜炎菌 (N. meningitides) などの異なる生物からのデッドCas9タンパク質) を使用することができる。

10

【0255】

いくつかの態様では、少なくとも2つの標的ポリヌクレオチドの発現および/または活性を調節するために、または少なくとも2つの標的ポリヌクレオチドの核酸配列を編集するために、複数のアクチュエータモエティが使用される。前記少なくとも2つの標的ポリヌクレオチドは、同じまたは異なる遺伝子または遺伝子産物を含みうる。いくつかの態様では、少なくとも2つのサイトカインの発現が、アップレギュレートされるか、ダウンレギュレートされるか、またはそれらの組合せである。いくつかの態様において、少なくとも2つの免疫調節タンパク質の発現が、アップレギュレートされるか、ダウンレギュレートされるか、またはそれらの組合せである。いくつかの態様では、サイトカインと免疫調節タンパク質の発現を変化させる。例えばサイトカインの発現と免疫調節タンパク質の発現をどちらも増加させる。サイトカインの発現と免疫調節タンパク質の発現をどちらも減少させることができる。サイトカインの発現を増加させつつ、免疫調節タンパク質の発現を減少させること、またはその逆も可能である。

20

【0256】

いくつかの態様では、内在性遺伝子と外因性遺伝子の発現を変化させる。例えば、追加のキメラ受容体を含む外因性遺伝子の発現を変化させることに加えて、サイトカインまたは免疫調節タンパク質などの内在性遺伝子の発現を変化させることができる。本明細書において議論する標的ポリヌクレオチドの発現の調節は、任意の所望するさまざまな組合せで、マルチプレックス化することができる。

30

【0257】

いくつかの態様では、同じ標的DNA上または異なる標的DNA上の異なる場所における転写を同時に調整するために、複数のガイド核酸を同じ細胞中で同時に使用することができる。いくつかの態様では、2つ以上のガイド核酸が、同じ遺伝子または転写物または座位を標的とする。いくつかの態様では、2つ以上のガイド核酸が、異なる無関係な座位を標的とする。いくつかの態様では、2つ以上のガイド核酸が、異なる座位ではあるが関連する座位を標的とする。

【0258】

2つ以上のガイド核酸は同じ発現ベクター上に同時に存在することができる。2つ以上のガイド核酸は同じ転写制御を受けることができる。いくつかの態様では、2つ以上 (例えば3つ以上、4つ以上、5つ以上、10個以上、15個以上、20個以上、25個以上、30個以上、35個以上、40個以上、45個以上、または50個以上) のガイド核酸を、標的細胞中で同時に (同じベクターまたは異なるベクターから) 発現させる。発現したガイド核酸は、デッドCasタンパク質 (例えば化膿連鎖球菌、黄色ブドウ球菌、S.サーモフィラス、L.イノキア、および髄膜炎菌 (N. meningitides) などの異なる細菌からのdCas9タンパク質) によって、別々に認識されうる。

40

【0259】

複数のガイド核酸を発現させるために、エンドヌクレアーゼが媒介する人工的ガイド核酸

50

プロセッシングシステムを利用することができる（例えばガイドRNAをプロセッシングするためにCsy4エンドリボヌクレアーゼを使用することができる）。例えば複数のガイドRNAを、（例えばU6プロモーターから発現される）前駆体転写産物上の、Csy4特異的RNA配列で分離されたタンデムアレイへと、コンカテマー化することができる。共発現させたCsy4タンパク質は、複数のガイドRNAへと前駆体転写産物を切断することができる。すべてのガイドRNAが1つの前駆体転写産物からプロセッシングされるので、類似するdCas9結合が得られるように、それらの濃度を標準化することができる。

【0260】

本開示の方法および組成物と共に使用することができるプロモーターとして、例えば真核細胞、哺乳類細胞、非ヒト哺乳類細胞またはヒト細胞において活性なプロモーターが挙げられる。プロモーターは誘導性プロモーターまたは構成的に活性なプロモーターであることができる。上記に代えて、または上記に加えて、プロモーターは組織特異的または細胞特異的であることができる。

10

【0261】

適切な真核プロモーター（すなわち真核細胞中で機能するプロモーター）の非限定的な例として、サイトメガロウイルス（CMV）前初期、単純ヘルペスウイルス（HSV）チミジンキナーゼ、初期および後期SV40、レトロウイルスからの長末端反復（LTR）、ヒト伸長因子-1プロモーター（EF1）、ニワトリベータ-アクチンプロモーター（beta-active promoter）に融合されたサイトメガロウイルス（CMV）エンハンサーを含むハイブリッドコンストラクト（CAG）、マウス幹細胞ウイルスプロモーター（MSCV）、ホスホグリセリン酸キナーゼ-1座位プロモーター（PGK）およびマウスメタロチオネイン-1からの真核プロモーターを挙げることができる。プロモーターは真菌プロモーターであることができる。プロモーターは植物プロモーターであることができる。植物プロモーターのデータベースを見いだすことができる（例えばPlantProm）。発現ベクターは翻訳開始のためのリボソーム結合部位および転写ターミネーターも含有しうる。発現ベクターは発現を増幅するための適当な配列も含みうる。

20

【0262】

いくつかの態様において、標的ポリヌクレオチドは、1つまたは複数の疾患関連遺伝子およびポリヌクレオチドならびにシグナル伝達生化学経路関連遺伝子およびポリヌクレオチドを含むことができる。標的ポリヌクレオチドの例として、シグナル伝達生化学経路と関連する配列、例えばシグナル伝達生化学経路関連遺伝子またはポリヌクレオチドが挙げられる。標的ポリヌクレオチドの例として疾患関連遺伝子またはポリヌクレオチドが挙げられる。「疾患関連」遺伝子またはポリヌクレオチドとは、罹患組織に由来する細胞において、非疾患対照の組織または細胞と比較して異常なレベルでまたは異常な形態で転写産物または翻訳産物を与えている、任意の遺伝子またはポリヌクレオチドを指す。いくつかの態様において、これは、異常に高いレベルで発現されるようになる遺伝子である。いくつかの態様において、これは、異常に低いレベルで発現されるようになる遺伝子である。改変された発現は、疾患の発生および/または進行と相関しうる。疾患関連遺伝子は、病因に直接的に係わる、または病因に係わる遺伝子と連鎖不均衡にある、突然変異または遺伝的変異を有する遺伝子も指す。転写産物または翻訳産物は公知であっても未知であってもよく、正常レベルであっても異常レベルであってもよい。

30

40

【0263】

疾患関連遺伝子およびポリヌクレオチドの例は、ワールドワイドウェブで利用可能なジョンズ・ホプキンス大学McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine（メリーランド州ボルチモア）およびアメリカ国立医学図書館国立生物工学情報センター（メリーランド州ベセスダ）から入手することができる。一定の疾患および障害と関連する例示的遺伝子を表4および表5に掲載する。シグナル伝達生化学経路関連遺伝子およびポリヌクレオチドの例を表6に列挙する。

【0264】

これらの遺伝子および経路における突然変異は、機能に影響を及ぼす不適正なタンパク質

50

または不適正な量のタンパク質の生産をもたしうる。

【 0 2 6 5 】

(表 4)

疾患/障害	遺伝子
新生物	PTEN; ATM; ATR; EGFR; ERBB2; ERBB3; ERBB4; Notch1; Notch2; Notch3; Notch4; AKT; AKT2; AKT3; HIF; HIF1a; HIF3a; Met; HRG; Bcl2; PPARアルファ; PPAR ガンマ; WT1 (ウィルムス腫瘍); FGF 受容体ファミリー メンバー (5つのメンバー :1, 2, 3, 4, 5); CDKN2a; APC; RB (網膜芽細胞腫); MEN1; VHL; BRCA1; BRCA2; AR (アンドロゲン受容体); TSG101; IGF; IGF 受容体; Igf1 (4つの バリエント); Igf2 (3つのバリエント); Igf1 受容体; Igf2 受容体; Bax; Bcl2; カスパーゼファミリー (9つのメンバー: 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 12); Kras; Apc
加齢黄斑変性症	Abr; Ccl2; Cc2; cp (セルロプラスミン); Timp3; カテプシンD; Vldlr; Ccr2
統合失調症	ニューレグリン1 (Nrg1); Erb4 (ニューレグリンの受容体); コンプレキシン1 (Cplx1); Tph1トリプトファンヒドロキシラーゼ; Tph2 トリプトファンヒドロキシラーゼ2; ニューレキシン1; GSK3; GSK3a; GSK3b
障害	5-HTT (Slc6a4); COMT; DRD (Drd1a); SLC6A3; DAOA; DTNBP1; Dao (Dao1)
トリヌクレオチドリピート 障害	HTT (ハンチントン病); SBMA/SMAX1/AR (ケネディ病); FXN/X25 (フリードライヒ運動失調症); ATX3 (マシヤド・ ジョセフ病); ATXN1 および ATXN2 (脊髄小脳失調症); DMPK (筋緊張性ジストロフィー); アトロフィン(Atrophin)-1 および Atn1 (DRPLA Dx); CBP (Creb-BP 全体的不安定性); VLDLR (アルツハイマー); Atn7; Atn10
脆弱X症候群	FMR2; FXR1; FXR2; mGLUR5

セクレターゼ関連障害	APH-1 (アルファおよびベータ); プレセニリン(Psen1); ニカストリン (Ncstn); PEN-2
その他	Nos1; Parp1; Nat1; Nat2
プリオン関連障害	Prp
ALS	SOD1; ALS2; STEX; FUS; TARDBP; VEGF (VEGF-a; VEGF-b; VEGF-c)
薬物嗜癖	Prkce (アルコール); Drd2; Drd4; ABAT (アルコール); GRIA2; Grm5; Grin1; Htr1b; Grin2a; Drd3; Pdyn; Grial (アルコール)
自閉症	Mecp2; BZRAP1; MDGA2; Sema5A; ニューレキシン1; 脆弱 X (FMR2 (AFF2); FXR1; FXR2; Mglur5)
アルツハイマー病	E1; CHIP; UCH; UBB; Tau; LRP; PICALM; クラスタリン; PS1; SORL1; CR1; Vldlr; Uba1; Uba3; CHIP28 (Aqp1, アクアポリン1); Uchl1; Uchl3; APP
炎症	IL-10; IL-1 (IL-1a; IL-1b); IL-13; IL-17 (IL-17a (CTLA8); IL- 17b; IL-17c; IL-17d; IL-17f); IL-23; Cx3cr1; ptpn22; TNFa; IBDに関するNOD2/CARD15; IL-6; IL-12 (IL-12a; IL-12b); CTLA4; Cx3cl1
パーキンソン病	x-シヌクレイン; DJ-1; LRRK2; パーキン; PINK1

【 0 2 6 6 】

(表 5)

血液疾患および 血液障害ならびに 凝固疾患および 凝固障害	貧血(CDANI, CDA1, RPS19, DBA, PKLR, PK1, NT5C3, UMPH1, PSN1, RHAG, RH50A, NRAMP2, SPTB, ALAS2, ANH1, ASB, ABCB7, ABC7, ASAT); 裸リンパ球症候群(TAPBP, TPSN, TAP2, ABCB3, PSF2, RING11, MHC2TA, C2TA, RFX5, RFXAP, RFX5), 出血性障害(TBXA2R, P2RX1, P2X1); H因子および H因子様1(HF1, CFH, HUS); 第V因子および第VIII因子(MCFD2); 第VII因子欠損症(F7); 第X因子欠損症(F10); 第XI因子 欠損症(F11); 第XII因子欠損症(F12, HAF); 第XIII因子 欠損症(F13A1, F13A); 第XIII因子欠損症(F13B); ファンコーニ 貧血(FANCA, FACA, FA1, FA, FAA, FAAP95, FAAP90, FLJ34064, FANCB, FANCC, FACC, BRCA2, FANCD1, FANCD2, FANCD, FACD, FAD, FANCE, FACE, FANCF, XRCC9, FANCG, BRIP1, BACH1, FANCI, PHF9, FANCL, FANCM, KIAA1596); 血球貪食性リンパ組織球症障害(PRF1, HPLH2, UNC13D, MUNC13-4, HPLH3, HLH3, FHL3); 血友病A(F8, F8C, HEMA); 血友病B(F9, HEMB), 出血性障害(PI, ATT, F5); 白血球減少症(Leukocyte deficiencies)および白血球障害(ITGB2, CD18, LCAMB, LAD, EIF2B1, EIF2BA, EIF2B2, EIF2B3, EIF2B5, LVWM, CACH, CLE, EIF2B4); 鎌状赤血球貧血(HBB); サラセミア(HBA2, HBB, HBD, LCRB, HBA1).	10
	B細胞非ホジキンリンパ腫(BCL7A, BCL7); 白血病(TAL1 TCL5, SCL, TAL2, FLT3, NBS1, NBS, ZNFN1A1, IK1, LYF1, HOXD4, HOX4B, BCR, CML, PHL, ALL, ARNT, KRAS2, RASK2, GMPS, AF10, ARHGEF12, LARG, KIAA0382, CALM, CLTH, CEBPA, CEBP, CHIC2, BTL, FLT3, KIT, PBT, LPP, NPM1, NUP214, D9S46E, CAN, CAIN, RUNX1, CBFA2, AML1, WHSC1L1, NSD3, FLT3, AF1Q, NPM1, NUMA1, ZNF145, PLZF, PML, MYL, STAT5B,	20

細胞調節不全
ならびに
腫瘍学的疾患
および障害

10

20

30

40

50

	AF10, CALM, CLTH, ARL11, ARLTS1, P2RX7, P2X7, BCR, CML, PHL, ALL, GRAF, NF1, VRNF, WSS, NFNS, PTPN11, PTP2C, SHP2, NS1, BCL2, CCND1, PRAD1, BCL1, TCRA, GATA1, GF1, ERYF1, NFE1, ABL1, NQO1, DIA4, NMOR1, NUP214, D9S46E, CAN, CAIN).	
炎症ならびに免疫関連の疾患および障害	AIDS (KIR3DL1, NKAT3, NKB1, AMB11, KIR3DS1, IFNG, CXCL12, SDF1); 自己免疫性リンパ球増殖症候群 (TNFRSF6, APT1, FAS, CD95, ALPS1A); 複合型免疫不全, (IL2RG, SCIDX1, SCIDX, IMD4); HIV-1 (CCL5, SCYA5, D17S136E, TCP228), HIV感受性または感染 (IL10, CSIF, CMKBR2, CCR2, CMKBR5, CCCR5 (CCR5)); 免疫不全 (CD3E, CD3G, AICDA, AID, HIGM2, TNFRSF5, CD40, UNG, DGU, HIGM4, TNFSF5, CD40LG, HIGM1, IGM, FOXP3, IPEX, AIID, XPID, PIDX, TNFRSF14B, TAC1); 炎症 (IL-10, IL-1 (IL-1a, IL-1b), IL-13, IL-17 (IL-17a (CTLA8), IL-17b, IL-17c, IL-17d, IL-17f), IL-23, Cx3cr1, ptpn22, TNFa, NOD2/CARD15 for IBD, IL-6, IL-12 (IL-12a, IL-12b), CTLA4, Cx3cl1); 重症複合型免疫不全 (SCID)(JAK3, JAKL, DCLRE1C, ARTEMIS, SCIDA, RAG1, RAG2, ADA, PTPRC, CD45, LCA, IL7R, CD3D, T3D, IL2RG, SCIDX1, SCIDX, IMD4).	10
代謝性、肝臓、腎臓およびタンパク質疾患および障害	アミロイドニューロパシー (TTR, PALB); アミロイドーシス (APOA1, APP, AAA, CVAP, AD1, GSN, FGA, LYZ, TTR, PALB); 硬変 (KRT18, KRT8, CIRH1A, NAIC, TEX292, KIAA1988); 嚢胞性線維症 (CFTR, ABCC7, CF, MRP7); 糖原病 (SLC2A2, GLUT2, G6PC, G6PT, G6PT1, GAA, LAMP2, LAMPB, AGL, GDE, GBE1, GYS2, PYGL, PFKM); 肝腺腫, 142330 (TCF1, HNF1A, MODY3), 早発性肝不全および神経障害 (SCOD1, SCO1), 肝リパーゼ欠損症 (LIPC), 肝芽腫、がんおよび癌 (CTNNB1, PDGFRL, PDGRL, PRLTS, AXIN1, AXIN, CTNNB1, TP53, P53, LFS1, IGF2R, MPRI, MET, CASP8, MCH5; 腎髄質嚢胞症腎臓疾患 (UMOD, HNFJ, FJHN, MCKD2, ADMCKD2); フェニルケトン尿症 (PAH, PKU1, QDPR, DHPR, PTS); 多発性嚢胞腎および肝疾患 (FCYT, PKHD1, ARPKD, PKD1, PKD2, PKD4, PKDTS, PRKCSH, G19P1, PCLD, SEC63).	20
筋/骨格疾患および障害	ベッカー型筋ジストロフィー (DMD, BMD, MYF6), デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD, BMD); エメリ・ドレフュス型筋ジストロフィー (LMNA, LMN1, EMD2, FPLD, CMD1A, HGPS, LGMD1B, LMNA, LMN1, EMD2, FPLD, CMD1A); 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー (FSHMD1A, FSHD1A); 筋ジストロフィー (FKRP, MDC1C, LGMD2I, LAMA2, LAMM, LARGE, KIAA0609, MDC1D, FCMD, TTID, MYOT, CAPN3, CANP3, DYSF, LGMD2B, SGCG, LGMD2C, DMDA1, SCG3, SGCA, ADL, DAG2, LGMD2D, DMDA2, SGCB, LGMD2E, SGCD, SGD, LGMD2F, CMD1L, TCAP, LGMD2G, CMD1N, TRIM32, HT2A, LGMD2H, FKRP, MDC1C, LGMD2I, TTN, CMD1G, TMD, LGMD2J, POMT1, CAV3, LGMD1C, SEPN1, SELN, RSMD1, PLEC1, PLTN, EBS1); 大理石骨病 (LRP5, BMND1, LRP7, LR3, OPPG, VBCH2, CLCN7, CLC7, OPTA2, OSTM1, GL, TCIRG1, TIRC7, OC116, OPTB1); 筋萎縮 (VAPB, VAPC, ALS8, SMN1, SMA1, SMA2, SMA3, SMA4, BSCL2, SPG17, GARS, SMAD1, CMT2D, HEXB, IGHMBP2, SMUBP2, CATF1, SMARD1).	30 40

神経およびニューロンの疾患および障害	ALS (SOD1, ALS2, STEX, FUS, TARDBP, VEGF (VEGF-a, VEGF-b, VEGF-c); アルツハイマー病 (APP, AAA, CVAP, AD1, APOE, AD2, PSEN2, AD4, STM2, APBB2, FE65L1, NOS3, PLA2, URK, ACE, DCPI, ACE1, MPO, PACIP1, PAXIP1L, PTIP, A2M, BLMH, BMH, PSEN1, AD3); 自閉症 (Mecp2, BZRAP1, MDGA2, Sema5A, ニューレキシン1, GLO1, MECP2, RTT, PPMX, MRX16, MRX79, NLGN3, NLGN4, KIAA1260, AUTSX2); 脆弱X症候群 (FMR2, FXR1, FXR2, mGLUR5); ハンチントン病およびハンチントン病様の障害 (HD, IT15, PRNP, PRIP, JPH3, JP3, HDL2, TBP, SCA17); パーキンソン病 (NR4A2, NURR1, NOT, TINUR, SNCAIP, TBP, SCA17, SNCA, NACP, PARK1, PARK4, DJ1, PARK7, LRRK2, PARK8, PINK1, PARK6, UCHL1, PARK5, SNCA, NACP, PARK1, PARK4, PRKN, PARK2, PDI, DBH, NDUFV2); レット症候群 (MECP2, RTT, PPMX, MRX16, MRX79, CDKL5, STK9, MECP2, RTT, PPMX, MRX16, MRX79, x-シヌクレイン, DJ-1); 統合失調症 (ニューレグリン1 (Nrg1), Erb4 (ニューレグリンの受容体), コンプレキシン1 (Cplx1), Tph1 トリプトファンヒドロキシラーゼ, Tph2 トリプトファンヒドロキシラーゼ2, ニューレキシン1, GSK3, GSK3a, GSK3b, 5-HTT (Slc6a4), COMT, DRD (Drd1a), SLC6A3, DAOA, DTNBPI, Dao (Dao1)); セクレターゼ関連障害 (APH-1 (アルファおよびベータ), プレセニン (Psen1), ニカストリン, (Ncstn), PEN-2, Nos1, Parp1, Nat1, Nat2); トリヌクレオチドリピート障害 (HTT (ハンチントン病), SBMA/SMAX1/AR (ケネディ病), FXN/X25 (フリードライヒ運動失調症), ATX3 (マシャド・ジョセフ病), ATXN1 および ATXN2 (脊髄小脳失調症), DMPK (筋緊張性ジストロフィー), アトロフィン-1 および Atn1 (DRPLA Dx), CBP (Creb-BP 全体的不安定性), VLDLR (アルツハイマー), Atxn7, Atxn10).	10
	加齢黄斑変性症 (Aber, Ccl2, Cc2, cp (セルロプラスミン), Timp3, カテプシンD, Vldlr, Ccr2); 白内障 (CRYAA, CRYA1, CRYBB2, CRYB2, PITX3, BFSP2, CP49, CP47, CRYAA, CRYA1, PAX6, AN2, MGDA, CRYBA1, CRYB1, CRYGC, CRYG3, CCL, LIM2, MP19, CRYGD, CRYG4, BFSP2, CP49, CP47, HSF4, CTM, HSF4, CTM, MIP, AQP0, CRYAB, CRYA2, CTPP2, CRYBB1, CRYGD, CRYG4, CRYBB2, CRYB2, CRYGC, CRYG3, CCL, CRYAA, CRYA1, GJA8, CX50, CAE1, GJA3, CX46, CZP3, CAE3, CCM1, CAM, KRIT1); 角膜混濁および角膜ジストロフィー (APOA1, TGFBI, CSD2, CDGG1, CSD, BIGH3, CDG2, TACSTD2, TROP2, MIS1, VSX1, RINX, PPCD, PPD, KTCN, COL8A2, FECD, PPCD2, PIP5K3, CFD); 先天性扁平角膜 (KERA, CNA2); 緑内障 (MYOC, TIGR, GLC1A, JOAG, GPOA, OPTN, GLC1E, FIP2, HYPL, NRP, CYP1B1, GLC3A, OPA1, NTG, NPG, CYP1B1, GLC3A); レーバー先天黒内障 (CRB1, RP12, CRX, CORD2, CRD, RPGRI1, LCA6, CORD9, RPE65, RP20, AIPL1, LCA4, GUCY2D, GUC2D, LCA1, CORD6, RDH12, LCA3); 黄斑ジストロフィー (ELOVL4, ADMD, STGD2, STGD3, RDS, RP7, PRPH2, PRPH, AVMD, AOFMD, VMD2).	20
	加齢黄斑変性症 (Aber, Ccl2, Cc2, cp (セルロプラスミン), Timp3, カテプシンD, Vldlr, Ccr2); 白内障 (CRYAA, CRYA1, CRYBB2, CRYB2, PITX3, BFSP2, CP49, CP47, CRYAA, CRYA1, PAX6, AN2, MGDA, CRYBA1, CRYB1, CRYGC, CRYG3, CCL, LIM2, MP19, CRYGD, CRYG4, BFSP2, CP49, CP47, HSF4, CTM, HSF4, CTM, MIP, AQP0, CRYAB, CRYA2, CTPP2, CRYBB1, CRYGD, CRYG4, CRYBB2, CRYB2, CRYGC, CRYG3, CCL, CRYAA, CRYA1, GJA8, CX50, CAE1, GJA3, CX46, CZP3, CAE3, CCM1, CAM, KRIT1); 角膜混濁および角膜ジストロフィー (APOA1, TGFBI, CSD2, CDGG1, CSD, BIGH3, CDG2, TACSTD2, TROP2, MIS1, VSX1, RINX, PPCD, PPD, KTCN, COL8A2, FECD, PPCD2, PIP5K3, CFD); 先天性扁平角膜 (KERA, CNA2); 緑内障 (MYOC, TIGR, GLC1A, JOAG, GPOA, OPTN, GLC1E, FIP2, HYPL, NRP, CYP1B1, GLC3A, OPA1, NTG, NPG, CYP1B1, GLC3A); レーバー先天黒内障 (CRB1, RP12, CRX, CORD2, CRD, RPGRI1, LCA6, CORD9, RPE65, RP20, AIPL1, LCA4, GUCY2D, GUC2D, LCA1, CORD6, RDH12, LCA3); 黄斑ジストロフィー (ELOVL4, ADMD, STGD2, STGD3, RDS, RP7, PRPH2, PRPH, AVMD, AOFMD, VMD2).	30
	角膜混濁および角膜ジストロフィー (APOA1, TGFBI, CSD2, CDGG1, CSD, BIGH3, CDG2, TACSTD2, TROP2, MIS1, VSX1, RINX, PPCD, PPD, KTCN, COL8A2, FECD, PPCD2, PIP5K3, CFD); 先天性扁平角膜 (KERA, CNA2); 緑内障 (MYOC, TIGR, GLC1A, JOAG, GPOA, OPTN, GLC1E, FIP2, HYPL, NRP, CYP1B1, GLC3A, OPA1, NTG, NPG, CYP1B1, GLC3A); レーバー先天黒内障 (CRB1, RP12, CRX, CORD2, CRD, RPGRI1, LCA6, CORD9, RPE65, RP20, AIPL1, LCA4, GUCY2D, GUC2D, LCA1, CORD6, RDH12, LCA3); 黄斑ジストロフィー (ELOVL4, ADMD, STGD2, STGD3, RDS, RP7, PRPH2, PRPH, AVMD, AOFMD, VMD2).	40

【 0 2 6 7 】

(表 6)

細胞機能	遺伝子	
PI3K/AKTシグナル伝達	PRKCE; ITGAM; ITGA5; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2;	10
	PTEN; EIF4E; PRKCZ; GRK6; MAPK1; TSC1; PLK1;	
	AKT2; IKBKB; PIK3CA; CDK8; CDKN1B; NFKB2; BCL2;	
	PIK3CB; PPP2R1A; MAPK8; BCL2L1; MAPK3; TSC2;	
	ITGA1; KRAS; EIF4EBP1; RELA; PRKCD; NOS3;	
	PRKAA1; MAPK9; CDK2; PPP2CA; PIM1; ITGB7;	
	YWHAZ; ILK; TP53; RAF1; IKBKG; RELB; DYRK1A;	
	CDKN1A; ITGB1; MAP2K2; JAK1; AKT1; JAK2; PIK3R1;	
	CHUK; PDPK1; PPP2R5C; CTNNB1; MAP2K1; NFKB1;	
	PAK3; ITGB3; CCND1; GSK3A; FRAP1; SFN; ITGA2;	
	TTK; CSNK1A1; BRAF; GSK3B; AKT3; FOXO1; SGK;	
	HSP90AA1; RPS6KB1	
ERK/MAPKシグナル伝達	PRKCE; ITGAM; ITGA5; HSPB1; IRAK1; PRKAA2;	20
	EIF2AK2; RAC1; RAPIA; TLN1; EIF4E; ELK1; GRK6;	
	MAPK1; RAC2; PLK1; AKT2; PIK3CA; CDK8; CREB1;	
	PRKCI; PTK2; FOS; RPS6KA4; PIK3CB; PPP2R1A;	
	PIK3C3; MAPK8; MAPK3; ITGA1; ETS1; KRAS; MYCN;	
	EIF4EBP1; PPARG; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; SRC;	
	CDK2; PPP2CA; PIM1; PIK3C2A; ITGB7; YWHAZ;	
	PPP1CC; KSR1; PXN; RAF1; FYN; DYRK1A; ITGB1;	
	MAP2K2; PAK4; PIK3R1; STAT3; PPP2R5C; MAP2K1;	
	PAK3; ITGB3; ESRI; ITGA2; MYC; TTK; CSNK1A1;	
	CRKL; BRAF; ATF4; PRKCA; SRF; STAT1; SGK	
	RAC1; TAF4B; EP300; SMAD2; TRAF6; PCAF; ELK1;	
MAPK1; SMAD3; AKT2; IKBKB; NCOR2; UBE2I;		
PIK3CA; CREB1; FOS; HSPA5; NFKB2; BCL2;		
MAP3K14; STAT5B; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; BCL2L1;		
MAPK3; TSC22D3; MAPK10; NRIP1; KRAS; MAPK13;		
RELA; STAT5A; MAPK9; NOS2A; PBX1; NR3C1;		
PIK3C2A; CDKN1C; TRAF2; SERPINE1; NCOA3;		
MAPK14; TNF; RAF1; IKBKG; MAP3K7; CREBBP;		
CDKN1A; MAP2K2; JAK1; IL8; NCOA2; AKT1; JAK2;		
PIK3R1; CHUK; STAT3; MAP2K1; NFKB1; TGFBR1;		
ESRI; SMAD4; CEBPB; JUN; AR; AKT3; CCL2; MMP1;		
STAT1; IL6; HSP90AA1		
軸索ガイダンスシグナル伝達	PRKCE; ITGAM; ROCK1; ITGA5; CXCR4; ADAM12;	40
	IGF1; RAC1; RAPIA; EIF4E; PRKCZ; NRPI; NTRK2;	
	ARHGEF7; SMO; ROCK2; MAPK1; PGF; RAC2;	
	PTPN11; GNAS; AKT2; PIK3CA; ERBB2; PRKCI; PTK2;	
	CFL1; GNAQ; PIK3CB; CXCL12; PIK3C3; WNT11;	
	PRKD1; GNB2L1; ABL1; MAPK3; ITGA1; KRAS; RHOA;	
	PRKCD; PIK3C2A; ITGB7; GLI2; PXN; VASP; RAF1;	
	FYN; ITGB1; MAP2K2; PAK4; ADAM17; AKT1; PIK3R1;	
	GLI1; WNT5A; ADAM10; MAP2K1; PAK3; ITGB3;	
	CDC42; VEGFA; ITGA2; EPHA8; CRKL; RND1; GSK3B;	
AKT3; PRKCA		
エフリン受容体シグナル伝達	PRKCE; ITGAM; ROCK1; ITGA5; CXCR4; IRAK1;	40
	PRKAA2; EIF2AK2; RAC1; RAPIA; GRK6; ROCK2;	

	MAPK1; PGF; RAC2; PTPN11; GNAS; PLK1; AKT2; DOK1; CDK8; CREB1; PTK2; CFL1; GNAQ; MAP3K14; CXCL12; MAPK8; GNB2L1; ABL1; MAPK3; ITGA1; KRAS; RHOA; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; SRC; CDK2; PIM1; ITGB7; PXN; RAF1; FYN; DYRK1A; ITGB1; MAP2K2; PAK4; AKT1; JAK2; STAT3; ADAM10; MAP2K1; PAK3; ITGB3; CDC42; VEGFA; ITGA2; EPHA8; TTK; CSNK1A1; CRKL; BRAF; PTPN13; ATF4; AKT3; SGK	
アクチン細胞骨格シグナル伝達	ACTN4; PRKCE; ITGAM; ROCK1; ITGA5; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; RAC1; INS; ARHGEF7; GRK6; ROCK2; MAPK1; RAC2; PLK1; AKT2; PIK3CA; CDK8; PTK2; CFL1; PIK3CB; MYH9; DIAPH1; PIK3C3; MAPK8; F2R; MAPK3; SLC9A1; ITGA1; KRAS; RHOA; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; CDK2; PIM1; PIK3C2A; ITGB7; PPP1CC; PXN; VIL2; RAF1; GSN; DYRK1A; ITGB1; MAP2K2; PAK4; PIP5K1A; PIK3R1; MAP2K1; PAK3; ITGB3; CDC42; APC; ITGA2; TTK; CSNK1A1; CRKL; BRAF; VAV3; SGK	10
ハンチントン病シグナル伝達	PRKCE; IGF1; EP300; RCOR1; PRKCZ; HDAC4; TGM2; MAPK1; CAPNS1; AKT2; EGFR; NCOR2; SPI; CAPN2; PIK3CA; HDAC5; CREB1; PRKCI; HSPA5; REST; GNAQ; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; IGF1R; PRKD1; GNB2L1; BCL2L1; CAPN1; MAPK3; CASP8; HDAC2; HDAC7A; PRKCD; HDAC11; MAPK9; HDAC9; PIK3C2A; HDAC3; TP53; CASP9; CREBBP; AKT1; PIK3R1; PDPK1; CASP1; APAF1; FRAP1; CASP2; JUN; BAX; ATF4; AKT3; PRKCA; CLTC; SGK; HDAC6; CASP3	20
アポトーシスシグナル伝達	PRKCE; ROCK1; BID; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; BAK1; BIRC4; GRK6; MAPK1; CAPNS1; PLK1; AKT2; IKBKB; CAPN2; CDK8; FAS; NFKB2; BCL2; MAP3K14; MAPK8; BCL2L1; CAPN1; MAPK3; CASP8; KRAS; RELA; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; CDK2; PIM1; TP53; TNF; RAF1; IKBKG; RELB; CASP9; DYRK1A; MAP2K2; CHUK; APAF1; MAP2K1; NFKB1; PAK3; LMNA; CASP2; BIRC2; TTK; CSNK1A1; BRAF; BAX; PRKCA; SGK; CASP3; BIRC3; PARP1	30
B細胞受容体シグナル伝達	RAC1; PTEN; LYN; ELK1; MAPK1; RAC2; PTPN11; AKT2; IKBKB; PIK3CA; CREB1; SYK; NFKB2; CAMK2A; MAP3K14; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; BCL2L1; ABL1; MAPK3; ETS1; KRAS; MAPK13; RELA; PTPN6; MAPK9; EGR1; PIK3C2A; BTK; MAPK14; RAF1; IKBKG; RELB; MAP3K7; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; CHUK; MAP2K1; NFKB1; CDC42; GSK3A; FRAP1; BCL6; BCL10; JUN; GSK3B; ATF4; AKT3; VAV3; RPS6KB1	
白血球血管外遊走シグナル伝達	ACTN4; CD44; PRKCE; ITGAM; ROCK1; CXCR4; CYBA; RAC1; RAPIA; PRKCZ; ROCK2; RAC2; PTPN11; MMP14; PIK3CA; PRKCI; PTK2; PIK3CB; CXCL12;	40

	PIK3C3; MAPK8; PRKD1; ABL1; MAPK10; CYBB; MAPK13; RHOA; PRKCD; MAPK9; SRC; PIK3C2A; BTK; MAPK14; NOX1; PXN; VIL2; VASP; ITGB1; MAP2K2; CTNND1; PIK3R1; CTNNB1; CLDN1; CDC42; F11R; ITK; CRKL; VAV3; CTTN; PRKCA; MMP1; MMP9	
インテグリンシグナル伝達	ACTN4; ITGAM; ROCK1; ITGA5; RAC1; PTEN; RAPIA; TLN1; ARHGEF7; MAPK1; RAC2; CAPNS1; AKT2; CAPN2; PIK3CA; PTK2; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; CAVI; CAPN1; ABL1; MAPK3; ITGA1; KRAS; RHOA; SRC; PIK3C2A; ITGB7; PPP1CC; ILK; PXN; VASP; RAF1; FYN; ITGB1; MAP2K2; PAK4; AKT1; PIK3R1; TNK2; MAP2K1; PAK3; ITGB3; CDC42; RND3; ITGA2; CRKL; BRAF; GSK3B; AKT3	10
急性期応答 シグナル伝達	IRAK1; SOD2; MYD88; TRAF6; ELK1; MAPK1; PTPN11; AKT2; IKBKB; PIK3CA; FOS; NFKB2; MAP3K14; PIK3CB; MAPK8; RIPK1; MAPK3; IL6ST; KRAS; MAPK13; IL6R; RELA; SOCS1; MAPK9; FTL; NR3C1; TRAF2; SERPINE1; MAPK14; TNF; RAF1; PDK1; IKBKG; RELB; MAP3K7; MAP2K2; AKT1; JAK2; PIK3R1; CHUK; STAT3; MAP2K1; NFKB1; FRAP1; CEBPB; JUN; AKT3; IL1R1; IL6	
PTENシグナル伝達	ITGAM; ITGA5; RAC1; PTEN; PRKCZ; BCL2L11; MAPK1; RAC2; AKT2; EGFR; IKBKB; CBL; PIK3CA; CDKN1B; PTK2; NFKB2; BCL2; PIK3CB; BCL2L1; MAPK3; ITGA1; KRAS; ITGB7; ILK; PDGFRB; INSR; RAF1; IKBKG; CASP9; CDKN1A; ITGB1; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; CHUK; PDGFRA; PDPK1; MAP2K1; NFKB1; ITGB3; CDC42; CCND1; GSK3A; ITGA2; GSK3B; AKT3; FOXO1; CASP3; RPS6KB1	20
p53シグナル伝達	PTEN; EP300; BBC3; PCAF; FASN; BRCA1; GADD45A; BIRC5; AKT2; PIK3CA; CHEK1; TP53INP1; BCL2; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; THBS1; ATR; BCL2L1; E2F1; PMAIP1; CHEK2; TNFRSF10B; TP73; RB1; HDAC9; CDK2; PIK3C2A; MAPK14; TP53; LRDD; CDKN1A; HIPK2; AKT1; PIK3R1; RRM2B; APAF1; CTNNB1; SIRT1; CCND1; PRKDC; ATM; SFN; CDKN2A; JUN; SNAI2; GSK3B; BAX; AKT3	30
アリアル炭化水素受容体 シグナル伝達	HSPB1; EP300; FASN; TGM2; RXRA; MAPK1; NQO1; NCOR2; SP1; ARNT; CDKN1B; FOS; CHEK1; SMARCA4; NFKB2; MAPK8; ALDH1A1; ATR; E2F1; MAPK3; NRIP1; CHEK2; RELA; TP73; GSTP1; RB1; SRC; CDK2; AHR; NFE2L2; NCOA3; TP53; TNF; CDKN1A; NCOA2; APAF1; NFKB1; CCND1; ATM; ESR1; CDKN2A; MYC; JUN; ESR2; BAX; IL6; CYP1B1; HSP90AA1	
異物代謝 シグナル伝達	PRKCE; EP300; PRKCZ; RXRA; MAPK1; NQO1; NCOR2; PIK3CA; ARNT; PRKCI; NFKB2; CAMK2A; PIK3CB; PPP2R1A; PIK3C3; MAPK8; PRKD1;	40

	ALDH1A1; MAPK3; NR1P1; KRAS; MAPK13; PRKCD; GSTP1; MAPK9; NOS2A; ABCB1; AHR; PPP2CA; FTL; NFE2L2; PIK3C2A; PPARGC1A; MAPK14; TNF; RAF1; CREBBP; MAP2K2; PIK3R1; PPP2R5C; MAP2K1; NFKB1; KEAP1; PRKCA; EIF2AK3; IL6; CYP1B1; HSP90AA1	
SAPK/JNK シグナル伝達	PRKCE; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; RAC1; ELK1; GRK6; MAPK1; GADD45A; RAC2; PLK1; AKT2; PIK3CA; FADD; CDK8; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; RIPK1; GNB2L1; IRS1; MAPK3; MAPK10; DAXX; KRAS; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; CDK2; PIM1; PIK3C2A; TRAF2; TP53; LCK; MAP3K7; DYRK1A; MAP2K2; PIK3R1; MAP2K1; PAK3; CDC42; JUN; TTK; CSNK1A1; CRKL; BRAF; SGK	10
PPA α /RXR シグナル伝達	PRKAA2; EP300; INS; SMAD2; TRAF6; PPARA; FASN; RXRA; MAPK1; SMAD3; GNAS; IKBKB; NCOR2; ABCA1; GNAQ; NFKB2; MAP3K14; STAT5B; MAPK8; IRS1; MAPK3; KRAS; RELA; PRKAA1; PPARGC1A; NCOA3; MAPK14; INSR; RAF1; IKBKG; RELB; MAP3K7; CREBBP; MAP2K2; JAK2; CHUK; MAP2K1; NFKB1; TGFBRI; SMAD4; JUN; IL1R1; PRKCA; IL6; HSP90AA1; ADIPOQ	
NF-KB シグナル伝達	IRAK1; EIF2AK2; EP300; INS; MYD88; PRKCD; TRAF6; TBK1; AKT2; EGFR; IKBKB; PIK3CA; BTRC; NFKB2; MAP3K14; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; RIPK1; HDAC2; KRAS; RELA; PIK3C2A; TRAF2; TLR4; PDGFRB; TNF; INSR; LCK; IKBKG; RELB; MAP3K7; CREBBP; AKT1; PIK3R1; CHUK; PDGFRA; NFKB1; TLR2; BCL10; GSK3B; AKT3; TNFAIP3; IL1R1	20
ニューレグリンシグナル伝達	ERBB4; PRKCE; ITGAM; ITGA5; PTEN; PRKCD; ELK1; MAPK1; PTPN11; AKT2; EGFR; ERBB2; PRKCI; CDKN1B; STAT5B; PRKDI; MAPK3; ITGA1; KRAS; PRKCD; STAT5A; SRC; ITGB7; RAF1; ITGB1; MAP2K2; ADAM17; AKT1; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; ITGB3; EREG; FRAP1; PSEN1; ITGA2; MYC; NRG1; CRKL; AKT3; PRKCA; HSP90AA1; RPS6KB1	30
Wntおよびベータカテニン シグナル伝達	CD44; EP300; LRP6; DVL3; CSNK1E; GJA1; SMO; AKT2; PIN1; CDH1; BTRC; GNAQ; MARK2; PPP2R1A; WNT11; SRC; DKK1; PPP2CA; SOX6; SFRP2; ILK; LEF1; SOX9; TP53; MAP3K7; CREBBP; TCF7L2; AKT1; PPP2R5C; WNT5A; LRP5; CTNNB1; TGFBRI; CCND1; GSK3A; DVL1; APC; CDKN2A; MYC; CSNK1A1; GSK3B; AKT3; SOX2	
インスリン受容体	PTEN; INS; EIF4E; PTPN1; PRKCD; MAPK1; TSC1; PTPN11; AKT2; CBL; PIK3CA; PRKCI; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; IRS1; MAPK3; TSC2; KRAS; EIF4EBP1; SLC2A4; PIK3C2A; PPP1CC; INSR; RAF1; FYN; MAP2K2; JAK1; AKT1; JAK2; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1;	40

	GSK3A; FRAP1; CRKL; GSK3B; AKT3; FOXO1; SGK; RPS6KB1	
IL-6 シグナル伝達	HSPB1; TRAF6; MAPKAPK2; ELK1; MAPK1; PTPN11; IKBKB; FOS; NFKB2; MAP3K14; MAPK8; MAPK3; MAPK10; IL6ST; KRAS; MAPK13; IL6R; RELA; SOCS1; MAPK9; ABCB1; TRAF2; MAPK14; TNF; RAF1; IKBKG; RELB; MAP3K7; MAP2K2; IL8; JAK2; CHUK; STAT3; MAP2K1; NFKB1; CEBPB; JUN; IL1R1; SRF; IL6	
肝胆汁うっ滞	PRKCE; IRAK1; INS; MYD88; PRKCZ; TRAF6; PPARA; RXRA; IKBKB; PRKCI; NFKB2; MAP3K14; MAPK8; PRKD1; MAPK10; RELA; PRKCD; MAPK9; ABCB1; TRAF2; TLR4; TNF; INSR; IKBKG; RELB; MAP3K7; IL8; CHUK; NR1H2; TJP2; NFKB1; ESR1; SREBF1; FGFR4; JUN; IL1R1; PRKCA; IL6	10
IGF-1 シグナル伝達	IGF1; PRKCZ; ELK1; MAPK1; PTPN11; NEDD4; AKT2; PIK3CA; PRKCI; PTK2; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; IGF1R; IRS1; MAPK3; IGFBP7; KRAS; PIK3C2A; YWHAZ; PXN; RAF1; CASP9; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; IGFBP2; SFN; JUN; CYR61; AKT3; FOXO1; SRF; CTGF; RPS6KB1	
NRF2媒介性酸化 ストレス応答	PRKCE; EP300; SOD2; PRKCZ; MAPK1; SQSTM1; NQO1; PIK3CA; PRKCI; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; PRKD1; MAPK3; KRAS; PRKCD; GSTP1; MAPK9; FTL; NFE2L2; PIK3C2A; MAPK14; RAF1; MAP3K7; CREBBP; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; MAP2K1; PPIB; JUN; KEAP1; GSK3B; ATF4; PRKCA; EIF2AK3; HSP90AA1	20
肝線維症/肝 星細胞活性化	EDN1; IGF1; KDR; FLT1; SMAD2; FGFR1; MET; PGF; SMAD3; EGFR; FAS; CSF1; NFKB2; BCL2; MYH9; IGF1R; IL6R; RELA; TLR4; PDGFRB; TNF; RELB; IL8; PDGFRA; NFKB1; TGFB1; SMAD4; VEGFA; BAX; IL1R1; CCL2; HGF; MMP1; STAT1; IL6; CTGF; MMP9	
PPAR シグナル伝達	EP300; INS; TRAF6; PPARA; RXRA; MAPK1; IKBKB; NCOR2; FOS; NFKB2; MAP3K14; STAT5B; MAPK3; NR1P1; KRAS; PPARG; RELA; STAT5A; TRAF2; PPARGC1A; PDGFRB; TNF; INSR; RAF1; IKBKG; RELB; MAP3K7; CREBBP; MAP2K2; CHUK; PDGFRA; MAP2K1; NFKB1; JUN; IL1R1; HSP90AA1	30
FcイプシロンRIシグナル伝達	PRKCE; RAC1; PRKCZ; LYN; MAPK1; RAC2; PTPN11; AKT2; PIK3CA; SYK; PRKCI; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; PRKD1; MAPK3; MAPK10; KRAS; MAPK13; PRKCD; MAPK9; PIK3C2A; BTK; MAPK14; TNF; RAF1; FYN; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; AKT3; VAV3; PRKCA	
Gタンパク質共役受容体 シグナル伝達	PRKCE; RAPIA; RGS16; MAPK1; GNAS; AKT2; IKBKB; PIK3CA; CREB1; GNAQ; NFKB2; CAMK2A; PIK3CB; PIK3C3; MAPK3; KRAS; RELA; SRC; PIK3C2A; RAF1; IKBKG; RELB; FYN; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; CHUK; PDPK1; STAT3; MAP2K1; NFKB1; BRAF; ATF4; AKT3;	40

	PRKCA	
イノシトールリン酸代謝	PRKCE; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; PTEN; GRK6; MAPK1; PLK1; AKT2; PIK3CA; CDK8; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; CDK2; PIM1; PIK3C2A; DYRK1A; MAP2K2; PIP5K1A; PIK3R1; MAP2K1; PAK3; ATM; TTK; CSNK1A1; BRAF; SGK	
PDGF シグナル伝達	EIF2AK2; ELK1; ABL2; MAPK1; PIK3CA; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; CAV1; ABL1; MAPK3; KRAS; SRC; PIK3C2A; PDGFRB; RAF1; MAP2K2; JAK1; JAK2; PIK3R1; PDGFRA; STAT3; SPHK1; MAP2K1; MYC; JUN; CRKL; PRKCA; SRF; STAT1; SPHK2	10
VEGF シグナル伝達	ACTN4; ROCK1; KDR; FLT1; ROCK2; MAPK1; PGF; AKT2; PIK3CA; ARNT; PTK2; BCL2; PIK3CB; PIK3C3; BCL2L1; MAPK3; KRAS; HIF1A; NOS3; PIK3C2A; PXN; RAF1; MAP2K2; ELAVL1; AKT1; PIK3R1; MAP2K1; SFN; VEGFA; AKT3; FOXO1; PRKCA	
ナチュラルキラー細胞 シグナル伝達	PRKCE; RAC1; PRKCZ; MAPK1; RAC2; PTPN11; KIR2DL3; AKT2; PIK3CA; SYK; PRKC1; PIK3CB; PIK3C3; PRKD1; MAPK3; KRAS; PRKCD; PTPN6; PIK3C2A; LCK; RAF1; FYN; MAP2K2; PAK4; AKT1; PIK3R1; MAP2K1; PAK3; AKT3; VAV3; PRKCA	
細胞周期: G1/Sチェック ポイント調節	HDAC4; SMAD3; SUV39H1; HDAC5; CDKN1B; BTRC; ATR; ABL1; E2F1; HDAC2; HDAC7A; RB1; HDAC11; HDAC9; CDK2; E2F2; HDAC3; TP53; CDKN1A; CCND1; E2F4; ATM; RBL2; SMAD4; CDKN2A; MYC; NRG1; GSK3B; RBL1; HDAC6	20
T細胞受容体シグナル伝達	RAC1; ELK1; MAPK1; IKBKB; CBL; PIK3CA; FOS; NFKB2; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; KRAS; RELA; PIK3C2A; BTK; LCK; RAF1; IKBKG; RELB; FYN; MAP2K2; PIK3R1; CHUK; MAP2K1; NFKB1; ITK; BCL10; JUN; VAV3	
デス受容体シグナル伝達	CRADD; HSPB1; BID; BIRC4; TBK1; IKBKB; FADD; FAS; NFKB2; BCL2; MAP3K14; MAPK8; RIPK1; CASP8; DAXX; TNFRSF10B; RELA; TRAF2; TNF; IKBKG; RELB; CASP9; CHUK; APAF1; NFKB1; CASP2; BIRC2; CASP3; BIRC3	30
FGF シグナル伝達	RAC1; FGFR1; MET; MAPKAPK2; MAPK1; PTPN11; AKT2; PIK3CA; CREB1; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; MAPK13; PTPN6; PIK3C2A; MAPK14; RAF1; AKT1; PIK3R1; STAT3; MAP2K1; FGFR4; CRKL; ATF4; AKT3; PRKCA; HGF	
GM-CSF シグナル伝達	LYN; ELK1; MAPK1; PTPN11; AKT2; PIK3CA; CAMK2A; STAT5B; PIK3CB; PIK3C3; GNB2L1; BCL2L1; MAPK3; ETS1; KRAS; RUNX1; PIM1; PIK3C2A; RAF1; MAP2K2; AKT1; JAK2; PIK3R1; STAT3; MAP2K1; CCND1; AKT3; STAT1	
筋萎縮性側索硬化症 シグナル伝達	BID; IGF1; RAC1; BIRC4; PGF; CAPNS1; CAPN2; PIK3CA; BCL2; PIK3CB; PIK3C3; BCL2L1; CAPN1;	40

10

20

30

40

50

	PIK3C2A; TP53; CASP9; PIK3R1; RAB5A; CASP1; APAF1; VEGFA; BIRC2; BAX; AKT3; CASP3; BIRC3
JAK/Stat シグナル伝達	PTPN1; MAPK1; PTPN11; AKT2; PIK3CA; STAT5B; PIK3CB; PIK3C3; MAPK3; KRAS; SOCS1; STAT5A; PTPN6; PIK3C2A; RAF1; CDKN1A; MAP2K2; JAK1; AKT1; JAK2; PIK3R1; STAT3; MAP2K1; FRAP1; AKT3; STAT1
ニコチン酸および ニコチンアミド代謝	PRKCE; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; GRK6; MAPK1; PLK1; AKT2; CDK8; MAPK8; MAPK3; PRKCD; PRKAA1; PBEF1; MAPK9; CDK2; PIM1; DYRK1A; MAP2K2; MAP2K1; PAK3; NT5E; TTK; CSNK1A1; BRAF; SGK
ケモカインシグナル伝達	CXCR4; ROCK2; MAPK1; PTK2; FOS; CFL1; GNAQ; CAMK2A; CXCL12; MAPK8; MAPK3; KRAS; MAPK13; RHOA; CCR3; SRC; PPP1CC; MAPK14; NOX1; RAF1; MAP2K2; MAP2K1; JUN; CCL2; PRKCA
IL-2 シグナル伝達	ELK1; MAPK1; PTPN11; AKT2; PIK3CA; SYK; FOS; STAT5B; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; KRAS; SOCS1; STAT5A; PIK3C2A; LCK; RAF1; MAP2K2; JAK1; AKT1; PIK3R1; MAP2K1; JUN; AKT3
長期シナプス 抑圧	PRKCE; IGF1; PRKCZ; PRDX6; LYN; MAPK1; GNAS; PRKC1; GNAQ; PPP2R1A; IGF1R; PRKD1; MAPK3; KRAS; GRN; PRKCD; NOS3; NOS2A; PPP2CA; YWHAZ; RAF1; MAP2K2; PPP2R5C; MAP2K1; PRKCA
エストロゲン受容体 シグナル伝達	TAF4B; EP300; CARM1; PCAF; MAPK1; NCOR2; SMARCA4; MAPK3; NRIP1; KRAS; SRC; NR3C1; HDAC3; PPARGC1A; RBM9; NCOA3; RAF1; CREBBP; MAP2K2; NCOA2; MAP2K1; PRKDC; ESR1; ESR2
タンパク質ユビキチン化 経路	TRAF6; SMURF1; BIRC4; BRCA1; UCHL1; NEDD4; CBL; UBE2I; BTRC; HSPA5; USP7; USP10; FBXW7; USP9X; STUB1; USP22; B2M; BIRC2; PARK2; USP8; USP1; VHL; HSP90AA1; BIRC3
IL-10 シグナル伝達	TRAF6; CCR1; ELK1; IKBKB; SP1; FOS; NFKB2; MAP3K14; MAPK8; MAPK13; RELA; MAPK14; TNF; IKBKG; RELB; MAP3K7; JAK1; CHUK; STAT3; NFKB1; JUN; IL1R1; IL6
VDR/RXR 活性化	PRKCE; EP300; PRKCZ; RXRA; GADD45A; HES1; NCOR2; SP1; PRKC1; CDKN1B; PRKD1; PRKCD; RUNX2; KLF4; YY1; NCOA3; CDKN1A; NCOA2; SPP1; LRP5; CEBPB; FOXO1; PRKCA
TGF-ベータシグナル伝達	EP300; SMAD2; SMURF1; MAPK1; SMAD3; SMAD1; FOS; MAPK8; MAPK3; KRAS; MAPK9; RUNX2; SERPINE1; RAF1; MAP3K7; CREBBP; MAP2K2; MAP2K1; TGFBR1; SMAD4; JUN; SMAD5
Toll様受容体シグナル伝達	IRAK1; EIF2AK2; MYD88; TRAF6; PPARA; ELK1; IKBKB; FOS; NFKB2; MAP3K14; MAPK8; MAPK13; RELA; TLR4; MAPK14; IKBKG; RELB; MAP3K7; CHUK; NFKB1; TLR2; JUN
p38 MAPK シグナル伝達	HSPB1; IRAK1; TRAF6; MAPKAPK2; ELK1; FADD; FAS;

10

20

30

40

50

	CREB1; DDIT3; RPS6KA4; DAXX; MAPK13; TRAF2; MAPK14; TNF; MAP3K7; TGFBRI; MYC; ATF4; IL1R1; SRF; STAT1	
ニューロトロフィン/TRK シグナル伝達	NTRK2; MAPK1; PTPN11; PIK3CA; CREB1; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; KRAS; PIK3C2A; RAF1; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; CDC42; JUN; ATF4	
FXR/RXR 活性化	INS; PPARA; FASN; RXRA; AKT2; SDC1; MAPK8; APOB; MAPK10; PPARG; MTPP; MAPK9; PPARGC1A; TNF; CREBBP; AKT1; SREBF1; FGFR4; AKT3; FOXO1	
シナプス長期 増強	PRKCE; RAPIA; EP300; PRKCZ; MAPK1; CREB1; PRKCI; GNAQ; CAMK2A; PRKD1; MAPK3; KRAS; PRKCD; PPP1CC; RAF1; CREBBP; MAP2K2; MAP2K1; ATF4; PRKCA	10
カルシウムシグナル伝達	RAPIA; EP300; HDAC4; MAPK1; HDAC5; CREB1; CAMK2A; MYH9; MAPK3; HDAC2; HDAC7A; HDAC11; HDAC9; HDAC3; CREBBP; CALR; CAMKK2; ATF4; HDAC6	
EGF シグナル伝達	ELK1; MAPK1; EGFR; PIK3CA; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; PIK3C2A; RAF1; JAK1; PIK3R1; STAT3; MAP2K1; JUN; PRKCA; SRF; STAT1	
心血管系における 低酸素シグナル伝達	EDN1; PTEN; EP300; NQO1; UBE2I; CREB1; ARNT; HIF1A; SLC2A4; NOS3; TP53; LDHA; AKT1; ATM; VEGFA; JUN; ATF4; VHL; HSP90AA1	20
RXR機能のLPS/IL-1 媒介性阻害	IRAK1; MYD88; TRAF6; PPARA; RXRA; ABCA1; MAPK8; ALDH1A1; GSTP1; MAPK9; ABCB1; TRAF2; TLR4; TNF; MAP3K7; NRIH2; SREBF1; JUN; IL1R1	
LXR/RXR 活性化	FASN; RXRA; NCOR2; ABCA1; NFKB2; IRF3; RELA; NOS2A; TLR4; TNF; RELB; LDLR; NRIH2; NFKB1; SREBF1; IL1R1; CCL2; IL6; MMP9	
アミロイドプロセッシング	PRKCE; CSNK1E; MAPK1; CAPNS1; AKT2; CAPN2; CAPN1; MAPK3; MAPK13; MAPT; MAPK14; AKT1; PSEN1; CSNK1A1; GSK3B; AKT3; APP	
IL-4 シグナル伝達	AKT2; PIK3CA; PIK3CB; PIK3C3; IRS1; KRAS; SOCS1; PTPN6; NR3C1; PIK3C2A; JAK1; AKT1; JAK2; PIK3R1; FRAP1; AKT3; RPS6KB1	30
細胞周期: G2/M DNA損傷 チェックポイント 調節	EP300; PCAF; BRCA1; GADD45A; PLK1; BTRC; CHEK1; ATR; CHEK2; YWHAZ; TP53; CDKN1A; PRKDC; ATM; SFN; CDKN2A	
心血管系における 一酸化窒素シグナル伝達	KDR; FLT1; PGF; AKT2; PIK3CA; PIK3CB; PIK3C3; CAVI; PRKCD; NOS3; PIK3C2A; AKT1; PIK3R1; VEGFA; AKT3; HSP90AA1	
プリン代謝	NME2; SMARCA4; MYH9; RRM2; ADAR; EIF2AK4; PKM2; ENTPD1; RAD51; RRM2B; TJP2; RAD51C; NT5E; POLD1; NME1	
cAMP 媒介性シグナル伝達	RAPIA; MAPK1; GNAS; CREB1; CAMK2A; MAPK3; SRC; RAF1; MAP2K2; STAT3; MAP2K1; BRAF; ATF4	40
ミトコンドリア機能障害	SOD2; MAPK8; CASP8; MAPK10; MAPK9; CASP9;	40

	PARK7; PSEN1; PARK2; APP; CASP3	
ノッチシグナル伝達	HES1; JAG1; NUMB; NOTCH4; ADAM17; NOTCH2; PSEN1; NOTCH3; NOTCH1; DLL4	
小胞体ストレス 経路	HSPA5; MAPK8; XBP1; TRAF2; ATF6; CASP9; ATF4; EIF2AK3; CASP3	
ピリミジン代謝	NME2; AICDA; RRM2; EIF2AK4; ENTPD1; RRM2B; NT5E; POLD1; NME1	
パーキンソンシグナル伝達	UCHL1; MAPK8; MAPK13; MAPK14; CASP9; PARK7; PARK2; CASP3	
心臓およびベータアドレナリン 作動性シグナル伝達	GNAS; GNAQ; PPP2R1A; GNB2L1; PPP2CA; PPP1CC; PPP2R5C	10
解糖/糖新生	HK2; GCK; GPI; ALDH1A1; PKM2; LDHA; HK1	
インターフェロンシグナル伝達	IRF1; SOCS1; JAK1; JAK2; IFITM1; STAT1; IFIT3	
ソニックヘッジホッグシグナル伝達	ARRB2; SMO; GLI2; DYRK1A; GLI1; GSK3B; DYRK1B	
グリセロリン脂質 代謝	PLD1; GRN; GPAM; YWHAZ; SPHK1; SPHK2	
リン脂質分解	PRDX6; PLD1; GRN; YWHAZ; SPHK1; SPHK2	
トリプトファン代謝	SIAH2; PRMT5; NEDD4; ALDH1A1; CYP1B1; SIAH1	
リジン分解	SUV39H1; EHMT2; NSD1; SETD7; PPP2R5C	
ヌクレオチド除去修復 経路	ERCC5; ERCC4; XPA; XPC; ERCC1	
デンプンおよびスクロース 代謝	UCHL1; HK2; GCK; GPI; HK1	20
アミノ糖代謝	NQO1; HK2; GCK; HK1	
アラキドン酸代謝	PRDX6; GRN; YWHAZ; CYP1B1	
概日リズムシグナル伝達	CSNK1E; CREB1; ATF4; NR1D1	
凝固系	BDKRB1; F2R; SERPINE1; F3	
ドーパミン受容体シグナル伝達	PPP2R1A; PPP2CA; PPP1CC; PPP2R5C	
グルタチオン代謝	IDH2; GSTP1; ANPEP; IDH1	
グリセロ脂質代謝	ALDH1A1; GPAM; SPHK1; SPHK2	
リノール酸代謝	PRDX6; GRN; YWHAZ; CYP1B1	
メチオニン代謝	DNMT1; DNMT3B; AHCY; DNMT3A	
ビルビン酸代謝	GLO1; ALDH1A1; PKM2; LDHA	
アルギニンおよびプロリン 代謝	ALDH1A1; NOS3; NOS2A	
エイコサノイドシグナル伝達	PRDX6; GRN; YWHAZ	30
フルクトースおよびマンノース 代謝	HK2; GCK; HK1	
ガラクトース代謝	HK2; GCK; HK1	
スチルベン、クマリンおよび リグニン生合成	PRDX6; PRDX1; TYR	
抗原提示経路	CALR; B2M	
ステロイドの生合成	NQO1; DHCR7	
ブタン酸代謝	ALDH1A1; NLGN1	
クエン酸回路	IDH2; IDH1	
脂肪酸代謝	ALDH1A1; CYP1B1	
グリセロリン脂質 代謝	PRDX6; CHKA	
ヒスチジン代謝	PRMT5; ALDH1A1	40

10

20

30

40

50

イノシトール代謝	ERO1L; APEX1	
シトクロムp450による 生体異物の代謝	GSTP1; CYP1B1	
メタン代謝	PRDX6; PRDX1	
フェニルアラニン代謝	PRDX6; PRDX1	
プロパン酸代謝	ALDH1A1; LDHA	
セレノアミノ酸代謝	PRMT5; AHCY	
スフィンゴリピド代謝	SPHK1; SPHK2	
アミノリン酸 代謝	PRMT5	10
アンドロゲンおよび エストロゲン代謝	PRMT5	
アスコルビン酸および アルダル酸代謝	ALDH1A1	
胆汁酸生合成	ALDH1A1	
システイン代謝	LDHA	
脂肪酸生合成	FASN	
グルタミン酸受容体シグナル伝達	GNB2L1	
NRF2 媒介性酸化 ストレス応答	PRDX1	
ペントースリン酸経路	GPI	20
ペントースおよびグルクロン酸 相互変換	UCHL1	
レチノール代謝	ALDH1A1	
リボフラビン代謝	TYR	
チロシン代謝	PRMT5; TYR	
ユビキノン生合成	PRMT5	
バリン、ロイシンおよび イソロイシン分解	ALDH1A1	
グリシン、セリンおよび スレオニン代謝	CHKA	
リジン分解	ALDH1A1	30
痛み/味	TRPM5; TRPA1	
痛み	TRPM7; TRPC5; TRPC6; TRPC1; Cnr1; cnr2; Grk2; Trpa1; Pome; Cgrp; Crf; Pka; Era; Nr2b; TRPM5; Prkaca; Prkacb; Prkar1a; Prkar2a	
ミトコンドリア機能	AIF; CytC; SMAC (Diablo); Aifm-1; Aifm-2	
発生神経学	BMP-4; コーディン (Chrd); ノギン (Nog); WNT (Wnt2; Wnt2b; Wnt3a; Wnt4; Wnt5a; Wnt6; Wnt7b; Wnt8b; Wnt9a; Wnt9b; Wnt10a; Wnt10b; Wnt16); ベーター-カテニン; Dkk-1; Frizzled 関連タンパク質; Otx-2; Gbx2; FGF-8; Reelin; Dab1; unc-86 (Pou4fl または Brn3a); Numb; Reln	40

【 0 2 6 8 】

本願の諸局面のさまざまな態様の標的ポリヌクレオチドは、DNAまたはRNA（例えばmRNA）であることができる。標的ポリヌクレオチドは一本鎖または二本鎖であることができる。標的ポリヌクレオチドはゲノムDNAであることができる。標的ポリヌクレオチドは、細胞にとって内在性または外因性の任意のポリヌクレオチドであることができる。例えば標的ポリヌクレオチドは真核細胞の核中に存在しているポリヌクレオチドであることができる。標的ポリヌクレオチドは、遺伝子産物（例えばタンパク質）をコードする配列であるか、ノンコーディング配列（例えば調節ポリヌクレオチド）であることができる。

【 0 2 6 9 】

標的ポリヌクレオチド配列は、20ヌクレオチド長の標的核酸またはプロトスペーサー配列（すなわちガイド核酸のスペーサー領域によって認識される配列）を含むことができる。プロトスペーサーは20ヌクレオチド長未満であることができる。プロトスペーサーは、少なくとも5、10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30ヌクレオチド長またはそれ以上であることができる。プロトスペーサー配列は、多くて5、10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30ヌクレオチド長またはそれ以上であることができる。プロトスペーサー配列は、PAMの第1ヌクレオチドのすぐ5'側の16、17、18、19、20、21、22、または23塩基であることができる。プロトスペーサー配列は、PAM配列の最後のヌクレオチドのすぐ3'側の16、17、18、19、20、21、22、または23塩基であることができる。プロトスペーサー配列はPAM配列の第1ヌクレオチドのすぐ5'側の20塩基であることができる。プロトスペーサー配列はPAMの最後のヌクレオチドのすぐ3'側の20塩基であることができる。標的核酸配列はPAMの5'側または3'側であることができる。

【0270】

プロトスペーサー配列は、ガイド核酸の、核酸を標的とするセグメントが結合することのできる標的ポリヌクレオチド中に存在する核酸配列を含むことができる。例えばプロトスペーサー配列は、ガイド核酸がそれに対する相補性を有するように設計される配列を含むことができる。プロトスペーサー配列は、細胞の核もしくは細胞質内またはミトコンドリアもしくはクロロプラストなどの細胞小器官内に位置することができる任意のポリヌクレオチドを含むことができる。プロトスペーサー配列はCasタンパク質の切断部位を含むことができる。プロトスペーサー配列はCasタンパク質の切断部位に隣接することができる。

【0271】

Casタンパク質は、ガイド核酸の、核酸を標的とする配列が結合することのできる配列の内側または外側の部位で標的ポリヌクレオチドに結合することができる。結合部位は、Casタンパク質が一本鎖切断または二本鎖切断を生じさせることのできる核酸位置を含むことができる。

【0272】

Casタンパク質による標的核酸の部位特異的結合は、ガイド核酸と標的核酸との間の塩基対合相補性によって決まる位置で起こりうる。Casタンパク質による標的核酸の部位特異的結合は、標的核酸中のプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）と呼ばれる短いモチーフによって決定される位置で起こりうる。PAMは、プロトスペーサーに、例えばプロトスペーサー配列の3'端に、隣接しうる。例えばCas9の結合部位は、PAM配列の約1～約25、または約2～約5、または約19～約23塩基対（例えば3塩基対）上流または下流であることができる。Cas（例えばCas9）の結合部位はPAM配列の3塩基対上流であることができる。Cas（例えばCpf1）の結合部位は、（+）鎖上の19塩基および（-）鎖上の23塩基であることができる。

【0273】

異なる生物は異なるPAM配列を含みうる。異なるCasタンパク質は異なるPAM配列を認識することができる。例えば化膿連鎖球菌の場合、PAMは配列5'-XRR-3'を含むことができ、ここで、RはAまたはGのどちらかであることができ、Xは任意のヌクレオチドであって、Xはスペーサー配列が標的とする標的核酸配列のすぐ3'側にある。化膿連鎖球菌Cas9（SpyCas9）のPAM配列は5'-XGG-3'であることができ、ここで、Xは任意のDNAヌクレオチドであって、標的DNAの非相補鎖のプロトスペーサー配列のすぐ3'側にある。Cpf1のPAMは5'-TTX-3'であることができ、ここで、Xは任意のDNAヌクレオチドであって、CRISPR認識配列のすぐ5'側にある。

【0274】

ガイド核酸の標的配列は、PAM配列に隣接する標的配列内の配列を突き止めるバイオインフォマティクスアプローチで同定することができる。ガイド核酸にとって最適な標的配列は、例えば最も高いオン-ターゲット活性および最も低いオフ-ターゲット活性を持つ配列を同定するためにいくつかのガイド核酸配列を試験する実験的アプローチによって同定す

10

20

30

40

50

ることができる。標的配列の位置は望ましい実験アウトカムによって決定することができる。例えば標的プロトスペーサーは、標的遺伝子を活性化または抑制するために、プロモーター中に配置することができる。標的プロトスペーサーは、5'の構成的に発現するエクソンまたは公知ドメインをコードする配列などのコーディング配列内に存在することができる。標的プロトスペーサーは、オフターゲット効果を軽減するために、ゲノム内のユニークな配列であることができる。潜在的標的プロトスペーサーを決定してランク付けするためのアルゴリズムは、公的に利用できるものが当技術分野では数多く公知であり、それらを使用することができる。

【0275】

いくつかの局面において、本明細書に開示するシステムは、遺伝子疾患または医学的状态に関連する少なくとも1つの遺伝子の発現を調節することができる。米国国立衛生研究所のウェブサイトにトピックサブセクションGenetic Disordersという小見出しでさらに詳しく説明されている広範囲にわたる遺伝子疾患（ウェブサイトhealth.nih.gov/topic/GeneticDisorders）。

10

【0276】

本システムは、関心対象の任意のポリヌクレオチド配列を標的にするために使用することができると考えられることは、明らかだろう。ただし例示する遺伝子がすべてではない。

【0277】

本発明の諸局面のさまざまな態様では、宿主細胞（例えば免疫細胞）における標的核酸の転写を選択的に調整（低減または増加）するために、本システムを使用することができる。標的核酸の転写の選択的調整は、標的核酸の転写を低減または増加させることはできるが、非標的核酸またはオフターゲット核酸の転写を実質的に調整することはできず、例えば非標的核酸の転写は、ガイド核酸/酵素的に不活性なまたは酵素活性が低減した（enzymatically reduced）Casタンパク質複合体などのアクチュエータモエティが存在しない場合の非標的核酸の転写のレベルと比較して、1%未満、5%未満、10%未満、20%未満、30%未満、40%未満、または50%未満しか調整されないだろう。例えば、標的核酸の転写の選択的調整（例えば低減または増加）は、標的核酸の転写を、ガイド核酸/酵素的に不活性なまたは酵素活性が低減したCasタンパク質複合体などのアクチュエータモエティが存在しない場合の標的核酸の転写のレベルと比較して、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、または90%超、低減または増加させることができる。

20

30

【0278】

いくつかの態様において、本開示は、標的核酸の転写を増加させるための方法を提供する。標的核酸の転写は、ガイド核酸/酵素的に不活性なまたは酵素活性が低減したCasタンパク質複合体などのアクチュエータモエティが存在しない場合の標的DNAの転写のレベルと比較して、少なくとも約1.1倍、少なくとも約1.2倍、少なくとも約1.3倍、少なくとも約1.4倍、少なくとも約1.5倍、少なくとも約1.6倍、少なくとも約1.7倍、少なくとも約1.8倍、少なくとも約1.9倍、少なくとも約2倍、少なくとも約2.5倍、少なくとも約3倍、少なくとも約3.5倍、少なくとも約4倍、少なくとも約4.5倍、少なくとも約5倍、少なくとも約6倍、少なくとも約7倍、少なくとも約8倍、少なくとも約9倍、少なくとも約10倍、少なくとも約12倍、少なくとも約15倍、少なくとも約20倍、少なくとも約50倍、少なくとも約70倍、または少なくとも約100倍増加することができる。標的核酸の転写の選択的増加は標的核酸の転写を増加させるが、非標的DNAの転写は実質的に増加させることができず、例えば非標的核酸の転写は、ガイド核酸/酵素的に不活性なまたは酵素活性が低減したCasタンパク質複合体などのアクチュエータモエティが存在しない場合の非標的DNAの転写のレベルと比較して、全く増加しないわけではないとしても、その増加は、約5倍未満、約4倍未満、約3倍未満、約2倍未満、約1.8倍未満、約1.6倍未満、約1.4倍未満、約1.2倍未満、または約1.1倍未満である。

40

【0279】

50

いくつかの態様において、本開示は、標的核酸の転写を減少させるための方法を提供する。標的核酸の転写は、ガイド核酸/酵素的に不活性なまたは酵素活性が低減したCasタンパク質複合体などのアクチュエータモエティが存在しない場合の標的DNAの転写のレベルと比較して、少なくとも約1.1分の1、少なくとも約1.2分の1、少なくとも約1.3分の1、少なくとも約1.4分の1、少なくとも約1.5分の1、少なくとも約1.6分の1、少なくとも約1.7分の1、少なくとも約1.8分の1、少なくとも約1.9分の1、少なくとも約2分の1、少なくとも約2.5分の1、少なくとも約3分の1、少なくとも約3.5分の1、少なくとも約4分の1、少なくとも約4.5分の1、少なくとも約5分の1、少なくとも約6分の1、少なくとも約7分の1、少なくとも約8分の1、少なくとも約9分の1、少なくとも約10分の1、少なくとも約12分の1、少なくとも約15分の1、少なくとも約20分の1、少なくとも約50分の1、少なくとも約70分の1、または少なくとも約100分の1に減少することができる。標的核酸の転写の選択的減少は標的核酸の転写を減少させるが、非標的DNAの転写を実質的に減少させることはできず、例えば非標的核酸の転写は、ガイド核酸/酵素的に不活性なまたは酵素活性が低減したCasタンパク質複合体などのアクチュエータモエティが存在しない場合の非標的DNAの転写のレベルと比較して、全く減少しないわけではないとしても、それが、約5分の1以下、約4分の1以下、約3分の1以下、約2分の1以下、約1.8分の1以下、約1.6分の1以下、約1.4分の1以下、約1.2分の1以下、または約1.1分の1以下まで減少することはない。

10

【0280】

転写調整は、酵素的に不活性なCasタンパク質などのアクチュエータモエティを異種配列に融合することによって達成することができる。異種配列は、適切な融合パートナー、例えば標的核酸に直接作用するか、標的核酸と会合したポリペプチド（例えばヒストンまたは他のDNA結合タンパク質）に作用することによって、転写を間接的に増加させ、減少させ、または他の形で調整する活性を与えるポリペプチドであることができる。適切な融合パートナーの非限定的な例として、メチルトランスフェラーゼ活性、デメチラーゼ活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、デアセチラーゼ活性、キナーゼ活性、ホスファターゼ活性、ユビキチンリガーゼ活性、脱ユビキチン化活性、アデニル化活性、脱アデニル化活性、SUMO化活性、脱SUMO化活性、リボシル化活性、脱リボシル化活性、ミリスチル化活性、または脱ミリスチル化活性を与えるポリペプチドが挙げられる。

20

【0281】

適切な融合パートナーとして、標的核酸の転写を直接増加させるポリペプチドを挙げることができる。例えば転写活性化因子もしくはそのフラグメント、転写活性化因子を動員するタンパク質もしくはそのフラグメント、または小分子/薬物応答性転写調節因子。適切な融合パートナーとして、標的核酸の転写を直接減少させるポリペプチドを挙げることができる。例えば転写抑制因子もしくはそのフラグメント、転写抑制因子を動員するタンパク質もしくはそのフラグメント、または小分子/薬物応答性転写調節因子。

30

【0282】

異種配列または融合パートナーは、アクチュエータモエティ、例えばデッドCasタンパク質の、C末、N末、または内部（すなわちN末またはC末以外の部分）に融合することができる。融合パートナーの非限定的な例として、転写活性化因子、転写抑制因子、ヒストンリジンメチルトランスフェラーゼ（KMT）、ヒストンリジンデメチラーゼ（Histone Lysine Demethylase）、ヒストンリジンアセチルトランスフェラーゼ（KAT）、ヒストンリジンデアセチラーゼ、DNAメチラーゼ（アデノシン修飾またはシトシン修飾）、CTCF、末梢動員エレメント（periphery recruitment element）（例えばラミンA、ラミンB）、およびタンパク質ドッキングエレメント（例えばFKBP/FRB）が挙げられる。

40

【0283】

転写活性化因子の非限定的な例として、GAL4、VP16、VP64、およびp65サブドメイン（NFカッパB）が挙げられる。

【0284】

転写抑制因子の非限定的な例として、Kruippel関連ボックス（Kruippel associated bo

50

x) (KRABまたはSKD)、Mad mSIN3相互作用ドメイン (SID)、およびERF抑制因子ドメイン (ERD) が挙げられる。

【0285】

ヒストンリジンメチルトランスフェラーゼ (KMT) の非限定的な例として、KMT1ファミリーのメンバー (例えばSUV39H1、SUV39H2、G9A、ESET/SETDB1、Clr4、Su(var)3-9)、KMT2ファミリーメンバー (例えばhSET1A、hSET1B、MLL1~5、ASH1、およびホモログ (Trx、Trr、Ash1))、KMT3ファミリー (SYMD2、NSD1)、KMT4 (DOT1Lおよびホモログ)、KMT5ファミリー (Pr-SET7/8、SUV4-20H1、およびホモログ)、KMT6 (EZH2)、およびKMT8 (例えばRIZ1) が挙げられる。

【0286】

ヒストンリジンデメチラーゼ (Histone Lysine Demethylase) (KDM) の非限定的な例としては、KDM1ファミリーのメンバー (LSD1/BHC110、Splsd1/Swm1/Saf110、Su(var)3-3)、KDM3ファミリー (JHDM2a/b)、KDM4ファミリー (JMJD2A/JHDM3A、JMJD2B、JMJD2C/GASC1、JMJD2D、およびホモログ (Rph1))、KDM5ファミリー (JARID1A/RBP2、JARID1B/PLU-1、JARIDIC/SMCX、JARID1D/SMCY、およびホモログ (Lid、Jhn2、Jmj2))、およびKDM6ファミリー (例えばUTX、JMJD3) が挙げられる。

【0287】

KATの非限定的な例として、KAT2ファミリーのメンバー (hGCN5、PCAF、およびホモログ (dGCN5/PCAF、Gcn5))、KAT3ファミリー (CBP、p300、およびホモログ (dCBP/NEJ))、KAT4、KAT5、KAT6、KAT7、KAT8、およびKAT13が挙げられる。

【0288】

いくつかの態様において、デッドCasタンパク質またはデッドCas融合タンパク質を含むアクチュエータモエティは、標的核酸中の特異的な場所 (すなわち配列) に、ガイド核酸によって標的指向され、RNAポリメラーゼがプロモーターに結合するのを阻止する (例えばこれにより、転写活性化因子機能を選択的に阻害することができる) および/または局所的クロマチン状態を修飾する (例えば標的核酸を修飾することまたは標的核酸と会合するポリペプチドを修飾することができる融合配列を使用する場合) などの座位特異的調節を発揮する。場合によっては、変化は一過性 (例えば転写抑制または転写活性化) である。場合によっては、変化は遺伝性 (例えば、標的DNAに、または標的DNAと会合するタンパク質、例えばヌクレオソームのヒストンに、エピジェネティック修飾が加えられる場合) である。

【0289】

いくつかの態様において、ガイド核酸は、標的核酸の転写を調整する目的で標的核酸に異種ポリペプチドを動員するためのタンパク質結合セグメントを含むことができる。適切な異種ポリペプチドの非限定的な例として、メチルトランスフェラーゼ活性、デメチラーゼ活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、デアセチラーゼ活性、キナーゼ活性、ホスファターゼ活性、ユビキチンリガーゼ活性、脱ユビキチン化活性、アデニル化活性、脱アデニル化活性、SUMO化活性、脱SUMO化活性、リボシル化活性、脱リボシル化活性、ミリスチル化活性、または脱ミリスチル化活性を与えるポリペプチドが挙げられる。ガイド核酸は、転写活性化因子、転写抑制因子、またはそれらのフラグメントを動員するためのタンパク質結合セグメントを含むことができる。

【0290】

いくつかの態様において、遺伝子発現調整は、標的核酸の調節エレメント、例えば転写応答エレメント (例えばプロモーター、エンハンサー)、上流活性化配列 (UAS)、および/またはDNAの発現を制御することができると思われる機能未知もしくは機能公知の配列を標的とするように設計されたガイド核酸を使用することによって達成される。

【0291】

本願の諸局面のさまざまな態様において、本開示はガイド核酸を提供する。ガイド核酸 (例えばガイドRNA) はCasタンパク質に結合して、そのCasタンパク質を標的ポリヌクレ

10

20

30

40

50

オチド内の特異的な場所に標的指向することができる。ガイド核酸は、核酸を標的とするセグメントおよびCasタンパク質結合セグメントを含むことができる。

【0292】

ガイド核酸とは、別の核酸、例えば細胞のゲノム中の標的ポリヌクレオチドに、ハイブリダイズすることができる核酸を指しうる。ガイド核酸はRNA、例えばガイドRNAであることができる。ガイド核酸はDNAであることができる。ガイド核酸はDNAおよびRNAを含むことができる。ガイド核酸は一本鎖であることができる。ガイド核酸は二本鎖であることができる。ガイド核酸はヌクレオチド類似体を含むことができる。ガイド核酸は修飾ヌクレオチドを含むことができる。ガイド核酸は、核酸の配列に部位特異的に結合するようにプログラムまたは設計することができる。

10

【0293】

ガイド核酸は、新しい特徴または強化された特徴を核酸に与えるために、1つまたは複数の修飾を含むことができる。ガイド核酸は核酸アフィニティータグを含むことができる。ガイド核酸は合成ヌクレオチド、合成ヌクレオチド類似体、ヌクレオチド誘導體、および/または修飾ヌクレオチドを含むことができる。

【0294】

ガイド核酸は、標的ポリヌクレオチド中のプロトスペーサー配列に相補的な、核酸を標的とする領域（例えばスペーサー領域）を、例えば5'端もしくは3'端またはその近傍に含むことができる。ガイド核酸のスペーサーは、プロトスペーサーと、ハイブリダイゼーション（すなわち塩基対合）によって配列特異的に相互作用することができる。プロトスペーサー配列は、標的ポリヌクレオチド中のプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）の5'側または3'側に位置しうる。スペーサー領域のヌクレオチド配列はさまざまであることができ、ガイド核酸が相互作用することのできる標的核酸内の場所を決定する。ガイド核酸のスペーサー領域は、標的核酸内の任意の所望する配列にハイブリダイズするように設計または修飾することができる。

20

【0295】

ガイド核酸は2つの別個の核酸分子を含むことができ、これをダブルガイド核酸と呼ぶことができる。ガイド核酸は単一の核酸分子を含むことができ、これをシングルガイド核酸（例えばsgRNA）と呼ぶことができる。いくつかの態様において、ガイド核酸は融合されたCRISPR RNA（crRNA）とトランス活性化型crRNA（tracrRNA）とを含むシングルガイド核酸である。いくつかの態様において、ガイド核酸はcrRNAを含むシングルガイド核酸である。いくつかの態様において、ガイド核酸は、融合されていないcrRNAとtracrRNAとを含むダブルガイド核酸である。例示的ダブルガイド核酸は、crRNA様分子とtracrRNA様分子とを含むことができる。例示的なシングルガイド核酸はcrRNA様分子を含むことができる。例示的シングルガイド核酸は融合されたcrRNA様分子とtracrRNA様分子とを含むことができる。

30

【0296】

crRNAは、ガイド核酸の、核酸を標的とするセグメント（例えばスペーサー領域）と、ガイド核酸のCasタンパク質結合セグメントの二本鎖デュプレックス（double-stranded duplex）の半分を形成することができるヌクレオチドのストレッチとを含むことができる。

40

【0297】

tracrRNAは、gRNAのCasタンパク質結合セグメントの二本鎖デュプレックスの他方の半分を形成するヌクレオチドのストレッチを含むことができる。crRNAのヌクレオチドのストレッチは、tracrRNAのヌクレオチドのストレッチと相補的であり、それとハイブリダイズして、ガイド核酸のCasタンパク質結合ドメインの二本鎖デュプレックスを形成することができる。

【0298】

crRNAとtracrRNAはハイブリダイズしてガイド核酸を形成することができる。crRNAは、標的核酸認識配列（例えばプロトスペーサー）にハイブリダイズする、一本鎖核酸を標

50

的とするセグメント（例えばスパーサー領域）を提供することもできる。スパーサー領域を含むcrRNAの配列、またはtracrRNA分子の配列は、そのガイド核酸を使用しようとする種に特異的であるように設計することができる。

【0299】

いくつかの態様において、ガイド核酸の、核酸を標的とする領域は、18～72ヌクレオチド長であることができる。ガイド核酸の、核酸を標的とする領域（例えばスパーサー領域）は、約12ヌクレオチド～約100ヌクレオチドの長さを有することができる。例えばガイド核酸の、核酸を標的とする領域（例えばスパーサー領域）は、約12ヌクレオチド（nt）～約80nt、約12nt～約50nt、約12nt～約40nt、約12nt～約30nt、約12nt～約25nt、約12nt～約20nt、約12nt～約19nt、約12nt～約18nt、約12nt～約17nt、約12nt～約16nt、または約12nt～約15ntの長さを有することができる。あるいは、DNAを標的とするセグメントは、約18nt～約20nt、約18nt～約25nt、約18nt～約30nt、約18nt～約35nt、約18nt～約40nt、約18nt～約45nt、約18nt～約50nt、約18nt～約60nt、約18nt～約70nt、約18nt～約80nt、約18nt～約90nt、約18nt～約100nt、約20nt～約25nt、約20nt～約30nt、約20nt～約35nt、約20nt～約40nt、約20nt～約45nt、約20nt～約50nt、約20nt～約60nt、約20nt～約70nt、約20nt～約80nt、約20nt～約90nt、または約20nt～約100ntの長さを有することができる。核酸を標的とする領域の長さは、少なくとも5、10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30ヌクレオチドまたはそれ以上であることができる。核酸を標的とする領域（例えばスパーサー配列）の長さは、多くて5、10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30ヌクレオチドまたはそれ以上であることができる。

10

20

【0300】

いくつかの態様において、ガイド核酸（例えばスパーサー）の、核酸を標的とする領域は20ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、ガイド核酸の、核酸を標的とする領域は19ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、ガイド核酸の、核酸を標的とする領域は18ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、ガイド核酸の、核酸を標的とする領域は17ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、ガイド核酸の、核酸を標的とする領域は16ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、ガイド核酸の、核酸を標的とする領域は21ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、ガイド核酸の、核酸を標的とする領域は22ヌクレオチド長である。

30

【0301】

標的核酸のヌクレオチド配列（標的配列）に相補的なガイド核酸のヌクレオチド配列は、例えば少なくとも約12nt、少なくとも約15nt、少なくとも約18nt、少なくとも約19nt、少なくとも約20nt、少なくとも約25nt、少なくとも約30nt、少なくとも約35nt、または少なくとも約40ntの長さを有することができる。標的核酸のヌクレオチド配列（標的配列）に相補的なガイド核酸のヌクレオチド配列は、約12ヌクレオチド（nt）～約80nt、約12nt～約50nt、約12nt～約45nt、約12nt～約40nt、約12nt～約35nt、約12nt～約30nt、約12nt～約25nt、約12nt～約20nt、約12nt～約19nt、約19nt～約20nt、約19nt～約25nt、約19nt～約30nt、約19nt～約35nt、約19nt～約40nt、約19nt～約45nt、約19nt～約50nt、約19nt～約60nt、約20nt～約25nt、約20nt～約30nt、約20nt～約35nt、約20nt～約40nt、約20nt～約45nt、約20nt～約50nt、または約20nt～約60ntの長さを有することができる。

40

【0302】

プロトスパーサー配列は、関心対象の領域内のPAMを同定し、PAMの上流または下流にある望ましいサイズの領域をプロトスパーサーとして選択することによって、同定することができる。対応するスパーサー配列はプロトスパーサー領域の相補配列を決定することによって設計することができる。

【0303】

スパーサー配列はコンピュータプログラム（例えば機械可読コード）を使って同定することができる。コンピュータプログラムは、予測融解温度、二次構造形成、および予測アニ

50

ーリング温度、配列同一性、ゲノムコンテキスト、クロマチンアクセシビリティ、%GC、ゲノムにおける出現の頻度、メチル化状態、SNPの存在などの変数を使用することができる。

【0304】

核酸を標的とする配列（例えばスペーサー配列）と標的核酸（例えばプロトスペーサー）との間の相補性パーセントは、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%であることができる。核酸を標的とする配列と標的核酸との間の相補性パーセントは、約20個の連続ヌクレオチドにわたって、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%であることができる。

10

【0305】

ガイド核酸のCasタンパク質結合セグメントは、互いに相補的な2つのヌクレオチドストレッチ（例えばcrRNAおよびtracrRNA）を含むことができる。互いに相補的な2つのヌクレオチドストレッチ（例えばcrRNAおよびtracrRNA）は、介在ヌクレオチド（例えばシングルガイド核酸の場合はリンカー）によって共有結合で連結することができる。互いに相補的な2つのヌクレオチドストレッチ（例えばcrRNAおよびtracrRNA）はハイブリダイズすることで、Casタンパク質結合セグメントの二本鎖RNAデュプレックスまたはヘアピンを形成し、よってステム-ループ構造をもたらすことができる。crRNAとtracrRNAは、crRNAの3'端とtracrRNAの5'端とで、共有結合によって連結することができる。あるいは、tracrRNAとcrRNAを、tracrRNAの5'端とcrRNAの3'端とで、共有結合によって連結することもできる。

20

【0306】

ガイド核酸のCasタンパク質結合セグメントは、約10ヌクレオチド～約100ヌクレオチド、例えば約10ヌクレオチド（nt）～約20nt、約20nt～約30nt、約30nt～約40nt、約40nt～約50nt、約50nt～約60nt、約60nt～約70nt、約70nt～約80nt、約80nt～約90nt、または約90nt～約100ntの長さを有することができる。例えばガイド核酸のCasタンパク質結合セグメントは、約15ヌクレオチド（nt）～約80nt、約15nt～約50nt、約15nt～約40nt、約15nt～約30ntまたは約15nt～約25ntの長さを有することができる。

30

【0307】

ガイド核酸のCasタンパク質結合セグメントのdsRNAデュプレックスは、約6塩基対（bp）～約50bpの長さを有することができる。例えばタンパク質結合セグメントのdsRNAデュプレックスは、約6bp～約40bp、約6bp～約30bp、約6bp～約25bp、約6bp～約20bp、約6bp～約15bp、約8bp～約40bp、約8bp～約30bp、約8bp～約25bp、約8bp～約20bpまたは約8bp～約15bpの長さを有することができる。例えばCasタンパク質結合セグメントのdsRNAデュプレックスは、約8bp～約10bp、約10bp～約15bp、約15bp～約18bp、約18bp～約20bp、約20bp～約25bp、約25bp～約30bp、約30bp～約35bp、約35bp～約40bp、または約40bp～約50bpの長さを有することができる。いくつかの態様において、Casタンパク質結合セグメントのdsRNAデュプレックスは36塩基対の長さを有することができる。ハイブリダイズしてタンパク質結合セグメントのdsRNAデュプレックスを形成するヌクレオチド配列間の相補性パーセントは、少なくとも約60%であることができる。例えば、ハイブリダイズしてタンパク質結合セグメントのdsRNAデュプレックスを形成するヌクレオチド配列間の相補性パーセントは、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%であることができる。場合により、タンパク質結合セグメントのdsRNAデュプレックスを形成するヌクレオチド配列間の相補性パーセントは、100%である。

40

【0308】

リンカー（例えばシングルガイド核酸中のcrRNAとtracrRNAとを連結するもの）は、約3

50

ヌクレオチド～約100ヌクレオチドの長さを有することができる。例えばリンカーは、約3ヌクレオチド(nt)～約90nt、約3ヌクレオチド(nt)～約80nt、約3ヌクレオチド(nt)～約70nt、約3ヌクレオチド(nt)～約60nt、約3ヌクレオチド(nt)～約50nt、約3ヌクレオチド(nt)～約40nt、約3ヌクレオチド(nt)～約30nt、約3ヌクレオチド(nt)～約20nt、または約3ヌクレオチド(nt)～約10ntの長さを有することができる。例えばリンカーは、約3nt～約5nt、約5nt～約10nt、約10nt～約15nt、約15nt～約20nt、約20nt～約25nt、約25nt～約30nt、約30nt～約35nt、約35nt～約40nt、約40nt～約50nt、約50nt～約60nt、約60nt～約70nt、約70nt～約80nt、約80nt～約90nt、または約90nt～約100ntの長さを有することができる。いくつかの態様において、DNAを標的とするRNAのリンカーは4ntである。

10

【0309】

ガイド核酸は、追加の望ましい特徴(例えば、修飾されたまたは調節された安定性、細胞内標的指向、蛍光ラベルによる追跡、タンパク質またはタンパク質複合体のための結合部位など)を与える修飾または配列を含むことができる。そのような修飾の例として、例えば、5'キャップ(例えば7-メチルグアニル酸キャップ(m7G))、3'ポリアデニル化テール(すなわち3'ポリ(A)テール)、リボスイッチ配列(例えばタンパク質および/またはタンパク質複合体による調節された安定性および/または調節されたアクセシビリティを可能にするもの)、安定性制御配列、dsRNAデュプレックス(すなわちヘアピン)を形成する配列、細胞内位置(例えば核、ミトコンドリア、クロロプラストなど)にRNAを標的指向する修飾または配列、追跡を可能にする修飾または配列(例えば蛍光分子への直接コンジュゲーション、蛍光検出を容易にするモエティへのコンジュゲーション、蛍光検出を可能にする配列など)、タンパク質(例えば、転写活性化因子、転写抑制因子、DNAメチルトランスフェラーゼ、DNAデメチラーゼ、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ、ヒストンデアセチラーゼ、およびそれらの組合せを含む、DNAに作用するタンパク質)の結合部位を与える修飾または配列が挙げられる。

20

【0310】

ガイド核酸は、核酸に新しい特徴または強化された特徴(例えば改良された安定性)を与えるために、1つまたは複数の修飾(例えば塩基修飾、主鎖修飾)を含むことができる。ガイド核酸は核酸アフィニータグを含むことができる。ヌクレオシドは塩基-糖の組合せであることができる。ヌクレオシドの塩基部分は複素環式塩基であることができる。そのような複素環式塩基のうち最も一般的な2種類の塩基がプリンとピリミジンである。ヌクレオチドは、ヌクレオシドの糖部分に共有結合で連結されたリン酸をさらに含むヌクレオシドであることができる。ペントフラノシル糖を含むヌクレオシドの場合、リン酸基は、糖の2'、3'、または5'ヒドロキシルモエティに連結されうる。ガイド核酸を形成させる際に、リン酸基は、隣接ヌクレオシドを互いに共有結合で連結して、線状ポリマー化合物を形成させることができる。次に、この線状ポリマー化合物のそれぞれの端をさらに接合して、環状の化合物を形成させることができる。ただし、一般的には、線状化合物が適切である。加えて、線状化合物は内部ヌクレオチド塩基相補性を有してもよく、したがって完全にまたは部分的に二本鎖の化合物が生成するように、折りたたまれうる。ガイド核酸内で、リン酸基は、一般に、ガイド核酸のヌクレオシド間主鎖を形成するということができる。ガイド核酸の連結部または主鎖は、3' 5'ホスホジエステル連結部であることができる。

30

40

【0311】

ガイド核酸は、修飾主鎖および/または修飾ヌクレオシド間連結部を含むことができる。修飾主鎖としては、主鎖中にリン原子を保持しているもの、および主鎖中にリン原子を有しないものを挙げることができる。

【0312】

リン原子をそこに含有する適切な修飾ガイド核酸主鎖としては、例えばホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、メチルその他のアルキルホスホネート、例えば3'-アルキレン

50

ホスホネート、5'-アルキレンホスホネート、キラルホスホネート、ホスフィネート、3'-アミノホスホラミデートおよびアミノアルキルホスホラミデートを含むホスホラミデート、ホスホロジアミデート、チオノホスホラミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、セレノホスフェート、および通常の3'-5'連結部を有するボラノホスフェート、2'-5'連結類似体、および1つまたは複数のヌクレオチド間連結部が3' 3'、5' 5'または2' 2'連結部であって極性が反転しているものを挙げることができる。反転した極性を有する適切なガイド核酸は、最も3'端のヌクレオチド間連結部にある単一の3' 3'連結部（すなわち単一の反転ヌクレオシド残基であって、核酸塩基が欠けているか、その代わりにヒドロキシル基を有するもの）を含むことができる。さまざまな塩（例えば塩化カリウムまたは塩化ナトリウム）、混合塩、および遊離酸型も含めることができる。

10

【0313】

ガイド核酸は、1つまたは複数のホスホロチオエートおよび/またはヘテロ原子ヌクレオシド間連結部、特に-CH₂-NH-O-CH₂-、-CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-（すなわちメチレン（メチルイミノ）またはMMI主鎖）、-CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-、-CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂-および-O-N(CH₃)-CH₂-CH₂-を含むことができる（ネイティブホスホジエステルヌクレオチド間連結部は-O-P(=O)(OH)-O-CH₂-と表される）。

【0314】

ガイド核酸はモルホリノ主鎖構造を含むことができる。例えば核酸はリボース環の代わりに6員モルホリノ環を含むことができる。これらの態様のいくつかでは、ホスホジエステル連結部の代わりにホスホロジアミデートまたは他の非ホスホジエステルヌクレオシド間連結部が使用される。

20

【0315】

ガイド核酸は、短鎖アルキルまたはシクロアルキルヌクレオシド間連結部、混合ヘテロ原子およびアルキルまたはシクロアルキルヌクレオシド間連結部、または1つもしくは複数の短鎖ヘテロ原子または複素環式ヌクレオシド間連結部によって形成されるポリヌクレオチド主鎖を含むことができる。これらには、モルホリノ連結部（一部はヌクレオシドの糖部分から形成される）を有するもの；シロキサラン主鎖；スルフィド、スルホキシドおよびスルホン主鎖；ホルムアセチル（formacetyl）およびチオホルムアセチル（thioformacetyl）主鎖；メチレンホルムアセチルおよびチオホルムアセチル主鎖；リボアセチル（riboacetyl）主鎖；アルケン含有主鎖；スルファメート主鎖；メチレンイミノおよびメチレンヒドラジノ主鎖；スルホネートおよびスルホンアミド主鎖；アミド主鎖；その他、混合N、O、SおよびCH₂構成要素部分を有するものを含めることができる。

30

【0316】

ガイド核酸は核酸ミメティックを含むことができる。「ミメティック」という用語は、フラノース環のみ、またはフラノース環とヌクレオチド間連結部の両方が、非フラノース基で置き換えられているポリヌクレオチドを包含するものとすることができ、フラノース環のみの置き換えは、糖代用物と呼ぶこともできる。複素環式塩基モエティまたは修飾複素環式塩基モエティは、適当な標的核酸とのハイブリダイゼーションのために維持しておくことができる。そのような核酸の一つとしてペプチド核酸（PNA）を挙げることができる。PNAでは、ポリヌクレオチドの糖主鎖を、アミド含有主鎖、特にアミノエチルグリシン主鎖で置き換えることができる。ヌクレオチドは保たれ、主鎖のアミド部分のアザ窒素原子に直接的または間接的に結合される。PNA化合物中の主鎖は、PNAにアミド含有主鎖を与える2つ以上の連結されたアミノエチルグリシン単位を含むことができる。複素環式塩基モエティは、主鎖のアミド部分のアザ窒素原子に、直接的または間接的に結合される。

40

【0317】

ガイド核酸は、モルホリノ環に取り付けられた複素環式塩基を有する、連結されたモルホリノ単位（すなわちモルホリノ核酸）を含むことができる。連結基は、モルホリノ核酸中のモルホリノモノマー単位を連結することができる。非イオン性のモルホリノベースのオリゴマー化合物は、細胞のタンパク質との望ましくない相互作用が少なくなりうる。モル

50

ホリノベースのポリヌクレオチドはガイド核酸の非イオン性ミメティックでありうる。モルホリノクラスに含まれるさまざまな化合物を異なる連結基を使って接合することができる。ポリヌクレオチドミメティックのさらなるクラスを、シクロヘキセニル核酸 (CeNA) と呼ぶことができる。核酸分子中に通常存在するフラノース環は、シクロヘキセニル環で置き換えることができる。ホスホラミダイトケミストリーを用いるオリゴマー化合物合成のために、CeNA DMT保護ホスホラミダイトモノマーを調製して、使用することができる。核酸鎖へのCeNAモノマーの組み入れは、DNA/RNAハイブリッドの安定性を増加させることができる。CeNAオリゴアデニル酸は、ネイティブ複合体と類似する安定性で、核酸相補体と複合体形成することができる。さらなる修飾として、2'-ヒドロキシル基が糖環の4'炭素原子に連結されることによって2'-C,4'-C-オキシメチレン連結部を形成し、よって二環式糖モエティを形成している、ロック核酸 (LNA) を挙げることができる。連結部は、2'酸素原子と4'炭素原子を架橋するメチレン (-CH₂-) 基であることができ、ここで、nは1または2である。LNAおよびLNA類似体は、相補的核酸との非常に高いデュプレックス熱安定性 ($T_m = +3 \sim +10$)、3'-エキソヌクレアーゼ分解に対する安定性、および良好な溶解性を呈することができる。

【0318】

ガイド核酸は1つまたは複数の置換糖モエティを含むことができる。適切なポリヌクレオチドは、OH; F; O-, S-, もしくはN-アルキル; O-, S-, もしくはN-アルケニル; O-, S-, もしくはN-アルキニル; またはO-アルキル-O-アルキルから選択される糖置換基を含むことができる (ここで、アルキル、アルケニルおよびアルキニルは置換または無置換C₁~C₁₀アルキルまたはC₂~C₁₀アルケニルおよびアルキニルである)。特に適切なのは、O((CH₂)_nO)_mCH₃、O(CH₂)_nOCH₃、O(CH₂)_nNH₂、O(CH₂)_nCH₃、O(CH₂)_nONH₂、およびO(CH₂)_nON((CH₂)_nCH₃)₂である (ここで、nおよびmは1~約10である)。糖置換基は、C₁~C₁₀低級アルキル、置換低級アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリール、アラールキル、O-アルカリールまたはO-アラールキル、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリール、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、RNA切断基、レポーター基、インターカレーター、ガイド核酸の薬物動態特性を改良するための基、またはガイド核酸の薬学的性質を改良するための基、および同様の性質を有する他の置換基から選択することができる。適切な修飾として、2'-メトキシエトキシ (2'-O-CH₂CH₂OCH₃、2'-O-(2-メトキシエチル)または2'-MOE、すなわちアルコキシアルコキシ基としても公知である) を挙げることができる。さらなる適切な修飾として、2'-ジメチルアミノオキシエトキシ (すなわちO(CH₂)₂ON(CH₃)₂基、2'-DMAOEとしても公知である) および2'-ジメチルアミノエトキシエトキシ (2'-O-ジメチル-アミノ-エトキシエチルまたは2'-DMAEOEとしても公知である)、すなわち2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₃)₂を挙げることができる。

【0319】

他の適切な糖置換基として、メトキシ (-O-CH₃)、アミノプロポキシ (--OCH₂CH₂CH₂NH₂)、アリル (-CH₂-CH=CH₂)、-O-アリル (--O--CH₂-CH=CH₂) およびフルオロ (F) を挙げることができる。2'-糖置換はアラビノ位 (上向き) でもリボ位 (下向き) でもよい。適切な2'-アラビノ修飾は2'-Fである。同様の修飾をオリゴマー化合物の他の位置にも、特に3'末ヌクレオチド上または2'-5'連結ヌクレオチド中の糖の3'位、および5'末ヌクレオチドの5'位にも加えうる。オリゴマー化合物は、ペントフラノシル糖の代わりにシクロブチルモエティなどの糖ミメティックも有しうる。

【0320】

ガイド核酸は、核酸塩基 (単に「塩基」と呼ばれることが多い) の修飾または置換も含みうる。本明細書にいう「無修飾」または「天然」核酸塩基として、プリン塩基 (例えばアデニン (A) およびグアニン (G))、およびピリミジン塩基 (例えばチミン (T)、シトシン (C) およびウラシル (U)) を挙げることができる。修飾核酸塩基としては、他の合成および天然核酸塩基、例えば5-メチルシトシン (5-me-C)、5-ヒドロキシメチルシト

10

20

30

40

50

シン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの6-メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの2-プロピルおよび他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミンおよび2-チオシトシン、5-ハロウラシルおよびシトシン、5-プロピニル(-C=C-CH₃)ウラシルおよびシトシン、ならびにピリミジン塩基の他のアルキニル誘導体、6-アゾウラシル、シトシンおよびチミン、5-ウラシル(シュードウラシル)、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシルおよび他の8-置換アデニンおよびグアニン、5-ハロ、特に5-プロモ、5-トリフルオロメチルおよび他の5-置換ウラシルおよびシトシン、7-メチルグアニンおよび7-メチルアデニン、2-F-アデニン、2-アミノ-アデニン、8-アザグアニンおよび8-アザアデニン、7-デアザグアニンおよび7-デアザアデニンならびに3-デアザグアニンおよび3-デアザアデニンを挙げることができる。修飾核酸塩基として、三環式ピリミジン、例えばフェノキサジンシチジン(1H-ピリミド(5,4-b)(1,4)ベンゾオキサジン-2(3H)-オン)、フェノチアジンシチジン(1H-ピリミド(5,4-b)(1,4)ベンゾチアジン-2(3H)-オン)、G-クランプ(G-clamp)、例えば置換フェノキサジンシチジン(例えば9-(2-アミノエトキシ)-H-ピリミド(5,4-(b)(1,4)ベンゾオキサジン-2(3H)-オン)、カルバゾールシチジン(2H-ピリミド(4,5-b)インドール-2-オン)、ピリドインドールシチジン(H-ピリド(3',2':4,5)ピロロ(2,3-d)ピリミジン-2-オン)を挙げることができる。

【0321】

複素環式塩基モエティとして、プリン塩基またはピリミジン塩基が他の複素環、例えば7-デアザ-アデニン、7-デアザグアニン、2-アミノピリジンおよび2-ピリドンで置き換えられているものを挙げることができる。核酸塩基は、ポリヌクレオチド化合物の結合アフィニティを増加させるのに役立つ。これらは、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジンおよびN-2、N-6およびO-6置換プリン、例えば2-アミノプロピルアデニン、5-プロピニルウラシルおよび5-プロピニルシトシンを含みうる。5-メチルシトシン置換は、核酸デュプレックスの安定性を0.6~1.2 増加させることができ、(例えば2'-O-メトキシエチル糖修飾と組み合わせると)適切な塩基置換になりうる。

【0322】

ガイド核酸の修飾は、ガイド核酸の活性、細胞分布または細胞取り込みを強化することができる1つまたは複数のモエティまたはコンジュゲートをガイド核酸に化学的に連結する工程を含むことができる。これらのモエティまたはコンジュゲートとして、1級または2級ヒドロキシル基などの官能基に共有結合で結合されるコンジュゲート基を挙げることができる。コンジュゲート基としては、インターカレーター、レポーター分子、ポリアミン、ポリアミド、ポリエチレングリコール、ポリエーテル、オリゴマーの薬力学的性質を強化する基、およびオリゴマーの薬物動態特性を強化することができる基を挙げることができるが、それらに限定されるわけではない。コンジュゲート基としては、コレステロール、脂質、リン脂質、ピオチン、フェナジン、葉酸、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、クマリン、および色素を挙げることができるが、それらに限定されるわけではない。薬力学的性質を強化する基としては、取り込みを改良し、分解に対する耐性を強化し、かつ/または標的核酸との配列特異的ハイブリダイゼーションを強くする基が挙げられる。薬物動態特性を強化することができる基としては、核酸の取り込み、分布、代謝または排泄を改良する基が挙げられる。コンジュゲートモエティとしては、コレステロールモエティ、コール酸、チオエーテル(例えばヘキシル-S-トリチルチオール)、チオコレステロール、脂肪族鎖(例えばドデカンジオールまたはウンデシル残基)、リン脂質(例えばジ-ヘキサデシル-rac-グリセロールまたはトリエチルアンモニウム1,2-ジ-O-ヘキサデシル-rac-グリセロ-3-H-ホスホネート)、ポリアミンもしくはポリエチレングリコール鎖、またはアダマンタン酢酸、パルミチルモエティ、またはオクタデシルアミンもしくはヘキシルアミノ-カルボニル-オキシコレステロールモエティなどの脂質モエティを挙げることができるが、それらに限定されるわけではない。

【0323】

修飾は、「タンパク質形質導入ドメイン」(Protein Transduction Domain)、すなわ

ちPTD(つまり細胞透過性ペプチド(CPP))を含みうる。PTDは、脂質二重層、ミセル、細胞膜、細胞小器官膜、または小胞膜を横切ることが容易にする、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、炭水化物、または有機もしくは無機化合物を指すことができる。PTDは、小さな極性分子から大きな高分子および/またはナノ粒子まで多岐にわたりうる別の分子に取り付けることができ、その分子が膜を横切るのを、例えば細胞外間隙から細胞内スペースに、またはサイトゾルから細胞小器官内に移動するのを、容易にすることができる。PTDはポリペプチドのアミノ末端に共有結合で連結することができる。PTDはポリペプチドのカルボキシル末端に共有結合で連結することができる。PTDは核酸に共有結合で連結することができる。例示的なPTDとしては、最小ペプチドタンパク質導入ドメイン(minimal peptide protein transduction domain);細胞への進入を支持するのに十分なくつかのアルギニン(例えば3、4、5、6、7、8、9、10、または10~50個のアルギニン)を含むポリアルギニン配列、VP22ドメイン、ショウジョウバエ(*Drosophila*)アンテナペディアタンパク質導入ドメイン、トランケート型ヒトカルシトニンペプチド、ポリリジン、およびトランスポーター、3アルギニン残基~50アルギニン残基のアルギニンホモポリマー(SEQ ID NO:37)を挙げることができるが、それらに限定されるわけではない。PTDは活性化可能な(activatable)CPP(ACPP)であることができる。ACPPとしては、正味の電荷をほとんどゼロまで低減することができるそれによって細胞への接着と取り込みを阻害する対応ポリアニオン(例えばGlu9、すなわち「E9」(SEQ ID NO:38))に切断可能なリンカーを介して接続された、ポリカチオン性CPP(例えばArg9、すなわち「R9」(SEQ ID NO:39))を挙げることができる。リンカーが切断されると、ポリアニオンが放出され、ポリアルギニンおよびその固有の接着性が局所的に露わになり、よってACPPは膜を横切るように「活性化」される。

10

20

【0324】

ガイド核酸は任意の形態で提供することができる。例えばガイド核酸はRNAの形態で、2分子(例えば個別のcrRNAおよびtracrRNA)として、または1分子(例えばsgRNA)として、提供することができる。ガイド核酸はCasタンパク質との複合体の形態で提供することができる。ガイド核酸はRNAをコードするDNAの形態でも提供することができる。ガイド核酸をコードするDNAは、シングルガイド核酸(例えばsgRNA)または個別のRNA分子(例えば個別のcrRNAおよびtracrRNA)をコードすることができる。後者の場合、ガイド核酸をコードするDNAは、crRNAとtracrRNAをそれぞれコードする個別のDNA分子として提供することができる。

30

【0325】

ガイド核酸をコードするDNAは、細胞のゲノムに安定に組み込まれることができ、任意で、当該細胞において活性化プロモーターに機能的に連結することができる。ガイド核酸をコードするDNAは、発現コンストラクト中のプロモーターに機能的に連結することができる。

【0326】

ガイド核酸は任意の適切な方法によって調製することができる。例えばガイド核酸は、例えばT7 RNAポリメラーゼを使ったインビトロ転写によって、調製することができる。ガイド核酸は、化学合成によって調製される合成的に生産された分子であることもできる。

40

【0327】

ガイド核酸は安定性を増加させるための配列を含むことができる。例えば、ガイド核酸は転写ターミネーターセグメント(すなわち転写終結配列)を含むことができる。転写ターミネーターセグメントは、全部で、約10ヌクレオチド~約100ヌクレオチド、例えば約10ヌクレオチド(nt)~約20nt、約20nt~約30nt、約30nt~約40nt、約40nt~約50nt、約50nt~約60nt、約60nt~約70nt、約70nt~約80nt、約80nt~約90nt、または約90nt~約100ntの長さを有することができる。例えば転写ターミネーターセグメントは、約15ヌクレオチド(nt)~約80nt、約15nt~約50nt、約15nt~約40nt、約15nt~約30ntまたは約15nt~約25ntの長さを有することができる。転写終結配列は真核細胞中または原核細胞中で機能的であることができる。

50

【0328】

本明細書に開示するキメラ受容体ポリペプチドおよびアダプターポリペプチドのさまざまなドメイン（例えば抗原相互作用ドメイン、免疫細胞シグナル伝達ドメイン（例えば一次シグナル伝達ドメインおよび共刺激ドメイン）、受容体結合モエティ、アクチュエータモエティ、切断モエティなど）は、化学結合、例えばアミド結合またはジスルフィド結合；小さな有機分子（例えば炭化水素鎖）；ペプチドリンカーなどのアミノ酸配列（例えば約3～200アミノ酸長のアミノ酸配列）、または小さな有機分子とペプチドリンカーの組合せを使って、連結することができる。ペプチドリンカーは、キメラペプチドの望ましい発現、活性および/またはコンフォメーション的位置決めを可能にするために、望ましい柔軟性を与えることができる。ペプチドリンカーは、少なくとも2つの関心対象のドメインを接続するのに適当な任意の長さを持つことができ、好ましくは、それが接続するドメインの一方または両方の適正なフォールディングおよび/または機能および/または活性が可能になるように、十分に柔軟であるように設計される。ペプチドリンカーは、少なくとも3、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100アミノ酸の長さを有することができる。いくつかの態様において、ペプチドリンカーは、約0～200アミノ酸、約10～190アミノ酸、約20～180アミノ酸、約30～170アミノ酸、約40～160アミノ酸、約50～150アミノ酸、約60～140アミノ酸、約70～130アミノ酸、約80～120アミノ酸、約90～110アミノ酸の長さを有する。いくつかの態様において、リンカー配列は内在性タンパク質配列を含むことができる。いくつかの態様において、リンカー配列は、グリシン、アラニンおよび/またはセリンアミノ酸残基を含む。いくつかの態様において、リンカーはモチーフ、例えばGS、GGG、GGGG（SEQ ID NO:23）、GGSG（SEQ ID NO:24）、またはSGGG（SEQ ID NO:25）の多重または繰り返しモチーフを含有することができる。リンカー配列は、任意の天然アミノ酸、非天然アミノ酸、またはそれらの組合せを含むことができる。

10

20

【0329】

本願の諸局面のさまざまな態様では、本システムを細胞または細胞集団において発現させる。細胞、例えば免疫細胞（例えばT細胞およびNK細胞を含むリンパ球）は、対象から得ることができる。対象の非限定的な例として、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ラット、およびそれらのトランスジェニック種が挙げられる。細胞の由来源となりうる対象からの試料の例としては、皮膚、心臓、肺、腎臓、骨髄、乳房、膵臓、肝臓、筋、平滑筋、膀胱、胆嚢、大腸、腸、脳、前立腺、食道、甲状腺、血清、唾液、尿、胃液および消化液、涙液、糞便、精液、腔液、腫瘍組織由来の間質液、眼液、汗、粘液、耳垢、油、腺分泌物、髄液、毛髪、指の爪、血漿、鼻腔スワブまたは鼻咽頭スワブ、髄液、脳脊髄液、組織、のどスワブ、生検、胎盤液、羊水、臍帯血、リンパ液（emphatic fluid）、腔液（cavity fluid）、喀痰、膿、微生物叢、胎便、乳汁、および/または他の排出物もしくは体組織が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

30

【0330】

本願の諸局面のさまざまな態様において、免疫細胞はリンパ球を含む。いくつかの態様において、リンパ球はナチュラルキラー細胞（NK細胞）である。いくつかの態様において、リンパ球はT細胞である。T細胞は、末梢血単核球、骨髄、リンパ節組織、脾臓組織、臍帯、および腫瘍を含むいくつかの供給源から得ることができる。いくつかの態様では、いくつかもある利用可能なT細胞株を使用することができる。リンパ球などの免疫細胞（例えば細胞傷害性リンパ球）は、好ましくは自家細胞であるが、異種細胞も使用することができる。T細胞は、対象から収集されたある単位の血液から、Ficoll分離など、いくつかもある技法を使って、得ることができる。個体の循環血からの細胞はアフエーシスまたは白血球アフエーシスによって得ることができる。アフエーシス産物は典型的には、T細胞を含むリンパ球、単球、顆粒球、B細胞、他の有核白血球、赤血球、および血小板を含有する。アフエーシスによって収集された細胞は、血漿画分を除去するために、および以後の処理工程に備えて細胞をリン酸緩衝食塩水（PBS）などの適当な緩衝液または培地に入れるために、洗浄することができる。洗浄後は、細胞を、Ca非含有Mg非含有PBSなどの

40

50

さまざまな生体適合性緩衝液中に再懸濁することができる。あるいは、アフェレーシス試料の望ましくない構成要素を除去して、細胞を培養培地に直接再懸濁することもできる。試料は対象から直接的に得るか、1つまたは複数の媒介者、例えば試料収集サービスまたは医療提供者（例えば医師または看護師）を介して、間接的に得ることができる。いくつかの態様において、末梢血白血球からのT細胞の単離には、赤血球を溶解し、例えばPERCOL（商標）勾配を使った遠心分離などによって、単球から末梢血白血球を分離する工程を含みうる。

【0331】

T細胞の特定亜集団、例えばCD4+ T細胞またはCD8+ T細胞は、正の選択技法または負の選択技法によって、さらに単離することができる。T細胞集団の負の選択は、例えば負に選択される細胞にユニークな表面マーカーに対する抗体の組合せを使って達成することができる。適切な技法の一つとして、負に選択される細胞上に存在する細胞表面マーカーに対するモノクローナル抗体のカクテルを利用する負の磁気免疫接着による細胞ソーティングが挙げられる。例えばCD4+細胞を単離するには、モノクローナル抗体カクテルが、CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR、およびCD8に対する抗体を含みうる。負の選択のプロセスは、本質的に均一な所望のT細胞集団を生産するために使用することができる。いくつかの態様において、組成物は、2種類以上（例えば2、3、4、5種類、またはそれ以上）の異なるT細胞の混合物を含む。

10

【0332】

いくつかの態様において、免疫細胞は、濃縮された細胞集団のメンバーである。1つまたは複数の所望の細胞タイプを任意の適切な方法で濃縮することができ、そのような方法の非限定的な例としては、所望の細胞タイプへの拡大および/または分化をトリガーするように細胞集団を処理すること、不要な細胞タイプの成長を停止させるための処理、不要な細胞タイプを死滅させるか溶解するための処理、所望の細胞タイプの精製（例えば1つまたは複数の細胞表面マーカーに基づいて所望のまたは不要な細胞タイプを保持するためのアフニティーカラムでの精製）が挙げられる。いくつかの態様において、濃縮された細胞集団は、細胞傷害性T細胞（細胞傷害性Tリンパ球、CTL、Tキラー細胞、細胞溶解性T細胞、CD8+ T細胞、およびキラーT細胞と、多様な別名を持つ）、ナチュラルキラー（NK）細胞、およびリンホカイン活性化キラー（LAK）細胞から選択される細胞傷害性リンパ球が濃縮された細胞集団である。

20

30

【0333】

正の選択または負の選択によって所望の細胞集団を単離する場合、細胞および表面（例えばビーズなどの粒子）の濃度はさまざまでありうる。一定の態様では、細胞とビーズの接触が確実に最大になるように、ビーズおよび細胞を一つに混合するときの体積を著しく減少させる（すなわち細胞の濃度を増加させる）ことが望ましい場合がある。例えば20億細胞/mLの濃度を使用することができる。いくつかの態様では、10億細胞/mLの濃度が使用される。いくつかの態様では、1億細胞/mL超が使用される。1000万、1500万、2000万、2500万、3000万、3500万、4000万、4500万、または5000万細胞/mLの細胞濃度を使用することができる。さらにもう一つの別の態様では、7500万、8000万、8500万、9000万、9500万、または1億細胞/mLからの細胞濃度を使用することができる。さらなる態様では、1億2500万または1億5000万細胞/mLの濃度を使用することができる。高濃度の使用は、増加した細胞収量、細胞活性化、および細胞拡大をもたらさう。

40

【0334】

細胞、例えば免疫細胞には、本明細書に記載する1つまたは複数のベクターを、一過性に、または非一過性に、トランスフェクトすることができる。細胞には、それが対象中に天然に存在する状態で、トランスフェクションを行うことができる。細胞は、対象から採取したもの、または対象に由来するものであって、それにトランスフェクションを行うことができる。細胞は、対象から採取された細胞に由来するもの、例えば細胞株であることができる。いくつかの態様において、本明細書に記載する1つまたは複数のベクターをトランスフェクトされた細胞は、1つまたは複数のベクターに由来する配列を含む新しい細胞

50

株を樹立するために使用される。いくつかの態様において、本システムのさまざまな構成要素が一過性に（例えば1つまたは複数のベクターの一過性トランスフェクションによって、またはRNAのトランスフェクションによって）トランスフェクトされ、CRISPR複合体の活性によって修飾された細胞は、その修飾を含有するが他の外因性配列はすべて欠いている、細胞を含む新しい細胞株を樹立するために使用される。

【0335】

本開示の組成物および分子（例えばポリペプチドおよび/またはポリペプチドをコードする核酸）を免疫細胞などの宿主細胞に導入するには、任意の適切な送達方法を使用することができる。本システムのさまざまな構成要素は、同時に送達するか、時間的に離して送達することができる。いくつかの態様では、Casタンパク質を含むアクチュエータモエティおよび/またはキメラ受容体および/またはアダプターが、ガイド配列と組み合わせて、また任意でガイド配列と複合体形成させて、細胞、例えば免疫細胞に送達される。方法の選択は、形質転換される細胞のタイプおよび/または形質転換が行われる状況（例えばインピトコ、エクスピボ、またはインピボ）に依存しうる。

10

【0336】

送達の方法は、標的ポリヌクレオチドを接触させること、または本開示の組成物（例えばCasタンパク質またはCasキメラなどのアクチュエータモエティ、キメラ受容体、キメラアダプター、ガイド核酸など）をコードするヌクレオチド配列を含む1つまたは複数の核酸を細胞に導入することを伴いうる。本開示の組成物をコードするヌクレオチド配列を含む適切な核酸として、発現ベクターを挙げることができ、ここでは、1つまたは複数の本開示の組成物（例えばCasタンパク質またはCasキメラなどのアクチュエータモエティ、キメラ受容体、キメラアダプター、ガイド核酸など）をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターが組換え発現ベクターである。

20

【0337】

送達方法または形質転換の非限定的な例として、例えばウイルス感染またはバクテリオファージ感染、トランスフェクション、接合、プロトプラスト融合、リポフェクション、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、ポリエチレンジアミン（PEI）媒介トランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、リポソーム媒介トランスフェクション、粒子銃技術、リン酸カルシウム沈殿、直接マイクロインジェクション、およびナノ粒子媒介核酸送達が挙げられる。

30

【0338】

いくつかの局面において、本開示は、本明細書に記載する1つもしくは複数のポリヌクレオチドまたは1つもしくは複数のベクター、またはそれらの1つもしくは複数の転写産物、および/またはそこから転写された1つまたは複数のタンパク質を、宿主細胞に送達する工程を含む方法を提供する。いくつかの局面において、本開示はさらに、そのような方法によって生産される細胞、およびそのような細胞を含むまたはそのような細胞から生産された生物（例えば動物、植物、または真菌）を提供する。いくつかの態様では、Casタンパク質および/またはキメラ受容体および/またはアダプターが、ガイド配列と組み合わせて、また任意でガイド配列と複合体形成させて、細胞に送達される。

【0339】

哺乳類細胞または哺乳類の標的組織に核酸を導入するには、従来のウイルスベースおよび非ウイルスベースの遺伝子移入方法を使用することができる。そのような方法は、本開示の組成物をコードする核酸を、培養中の細胞または宿主細胞中の細胞に投与するために、使用することができる。非ウイルスベクター送達システムとしては、DNAプラスミド、RNA（例えば本明細書に記載するベクターの転写産物）、裸の核酸、およびリポソームなどの送達媒体と複合体形成した核酸を挙げることができる。ウイルスベクター送達システムとしては、細胞への送達後に、エピソームゲノムを有するか、組み込まれたゲノムを有することができる、DNAウイルスおよびRNAウイルスを挙げることができる。

40

【0340】

核酸の非ウイルス送達の方法としては、リポフェクション、ヌクレオフェクション、マイ

50

クロインジェクション、バイオリスティック法、ピロゾーム、リポソーム、イムノリポソーム、ポリカチオンまたは脂質:核酸コンジュゲート、裸のDNA、人工ピリオン、および作用物質によって強化された (agent-enhanced) DNAの取り込みを挙げることができる。ポリヌクレオチドの高効率受容体認識リポフェクションに適したカチオン性脂質および中性脂質を使用することができる。送達は細胞 (例えばインビトロまたはエクスビボ投与) または標的組織 (例えばインビボ投与) への送達であることができる。免疫脂質 (immunolipid) 複合体などの標的リポソームを含む脂質:核酸複合体の調製を使用することができる。

【0341】

体内の特異的細胞を標的とし、ウイルスペイロードを細胞の核へと輸送するには、RNAウイルスまたはDNAウイルスに基づくシステムを使用することができる。ウイルスベクターを直接投与するか (インビボ)、インビトロで細胞を処理するためにウイルスベクターを使用することができ、修飾された細胞を任意で投与することができる (エクスビボ)。ウイルスに基づくシステムとしては、遺伝子移入のための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、アデノ随伴ウイルスベクターおよび単純ヘルペスウイルスベクターを挙げることができる。宿主ゲノムへの組込みは、レトロウイルス、レンチウイルス、およびアデノ随伴ウイルス遺伝子移入法を使って行うことができ、これは挿入されたトランスジーンの長期発現をもたらす。多種多様な細胞タイプおよび標的組織において高い形質導入効率を観察することができる。

【0342】

レトロウイルスの細胞向性は、外来エンベロープタンパク質を組み入れて、標的細胞の潜在的標的集団を拡張することによって変化させることができる。レンチウイルスベクターは、非分裂細胞に形質導入または感染して、高いウイルス価を生産することができるレトロウイルスベクターである。レトロウイルス遺伝子移入システムの選択は、標的組織に依存する。レトロウイルスベクターは、最大6~10kbの外來配列をパッケージングすることができるシス作用性長末端反復を含むことができる。最小シス作用性LTRは、ベクターの複製およびパッケージングにとって十分であることができ、標的細胞中に治療遺伝子を組み込んで永続的なトランスジーン発現を与えるために、使用することができる。レトロウイルスベクターとしては、マウス白血病ウイルス (MuLV)、テナガザル白血病ウイルス (GaLV)、サル免疫不全ウイルス (SIV)、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、およびそれらの組合せに基づくものを挙げることができる。

【0343】

アデノウイルスに基づくシステムを使用することができる。アデノウイルスに基づくシステムはトランスジーンの一過性発現をもたらす。アデノウイルスに基づくベクターは細胞中で高い形質導入効率を有することができ、細胞分裂を必要としない。アデノウイルスに基づくベクターでは、高い力価および高い発現レベルを得ることができる。例えば核酸およびペプチドのインビトロ生産において、ならびにインビボおよびエクスビボ遺伝子治療法のために、アデノ随伴ウイルス (「AAV」) ベクターを使って、細胞を標的核酸で形質導入することができる。

【0344】

宿主細胞を感染させる能力を有するウイルス粒子を形成させるために、パッケージング細胞を使用することができる。そのような細胞として、293細胞 (例えばアデノウイルスパッケージング用) およびPsi2細胞またはPA317細胞 (例えばレトロウイルスパッケージング用) を挙げることができる。ウイルスベクターは、核酸ベクターをウイルス粒子にパッケージングする細胞株を生産することによって生成させることができる。ベクターはパッケージングとその後の宿主への組込みに必要な最小ウイルス配列を含有することができる。ベクターは、発現させようとするポリヌクレオチドのための発現カセットで置き換えられる他のウイルス配列を含有することができる。欠損しているウイルス機能は、パッケージング細胞株によってトランスに供給することができる。例えばAAVベクターは、パッケージングと宿主ゲノムへの組込みに必要な、AAVゲノムからのITR配列を含むことができ

10

20

30

40

50

る。ウイルスDNAは、ITR配列を欠きつつも、他のAAV遺伝子、すなわちrepおよびcapをコードするヘルパープラスミドを含有することができる細胞株中で、パッケージングされる。細胞株をヘルパーとしてのアデノウイルスで感染させることもできる。ヘルパーウイルスは、AAVベクターの複製およびヘルパープラスミドからのAAV遺伝子の発現を促進することができる。アデノウイルスの混入は、熱処理（アデノウイルスはAAVよりも熱処理に対する感受性が高い）によって低減することができる。例えば参照により本明細書に組み入れられるUS20030087817に記載されているように、核酸を細胞に送達するためのさらなる方法を使用することができる。

【0345】

宿主細胞には、本明細書に記載する1つまたは複数のベクターを、一過性または非一過性にトランスフェクトすることができる。細胞には、それが対象中に天然に存在する状態で、トランスフェクションを行うことができる。細胞は、対象から採取したもの、または対象に由来するものであって、それにトランスフェクションを行うことができる。細胞は、対象から採取された細胞に由来するもの、例えば細胞株であることができる。いくつかの態様において、本明細書に記載する1つまたは複数のベクターをトランスフェクトされた細胞は、1つまたは複数のベクターに由来する配列を含む新しい細胞株を樹立するために使用される。いくつかの態様において、本開示の組成物を一過性に（例えば1つまたは複数のベクターの一過性トランスフェクションによって、またはRNAのトランスフェクションによって）トランスフェクトされ、CRISPR複合体などのアクチュエータモエティの活性によって修飾された細胞は、その修飾を含有するが他の外因性配列はすべて欠いている細胞を含む、新しい細胞株を樹立するために使用される。

【0346】

本開示の方法では宿主細胞と適合する任意の適切なベクターを使用することができる。真核宿主細胞用のベクターの非限定的な例として、pXT1、pSG5（Stratagene（商標））、pSVK3、pBPV、pMSG、およびpSVLSV40（Pharmacia（商標））が挙げられる。

【0347】

いくつかの態様において、ガイド核酸および/またはCasタンパク質もしくはCasキメラをコードするヌクレオチド配列は、制御エレメント（例えばプロモーターなどの転写制御エレメント）に機能的に連結される。転写制御エレメントは、真核細胞、例えば哺乳動物細胞、または原核細胞（細菌細胞または古細菌細胞）のいずれかにおいて、機能的であることができる。いくつかの態様において、ガイド核酸および/またはCasタンパク質もしくはCasキメラをコードするヌクレオチド配列は、原核細胞および/または真核細胞におけるガイド核酸および/またはCasタンパク質もしくはCasキメラをコードするヌクレオチド配列の発現を可能にする複数の制御エレメントに、機能的に連結される。

【0348】

使用する宿主/ベクターシステムに依存して、発現ベクターには、構成的プロモーターおよび誘導性プロモーター、転写エンハンサーエレメント、転写ターミネーターなど、いくつかある適切な転写および翻訳制御エレメントを、どれでも使用することができる（例えばU6プロモーター、H1プロモーターなど；上記参照）（例えばBitter et al.（1987）*Methods in Enzymology*, 153:516-544参照）。

【0349】

いくつかの態様において、本開示の組成物（例えばCasタンパク質またはCasキメラなどのアクチュエータモエティ、キメラ受容体、キメラアダプター、ガイド核酸など）は、RNAとして提供することができる。そのような場合、本開示の組成物（例えばCasタンパク質またはCasキメラなどのアクチュエータモエティ、キメラ受容体、アダプター、ガイド核酸など）は、直接的化学合成によって生産するか、DNAからインビトロで転写することができる。本開示の組成物（例えばCasタンパク質またはCasキメラなどのアクチュエータモエティ、キメラ受容体、アダプター、ガイド核酸など）は、RNAポリメラーゼ酵素（例えばT7ポリメラーゼ、T3ポリメラーゼ、SP6ポリメラーゼなど）を使って、インビトロで合成することができる。ひとたび合成されたら、RNAは標的DNAと直接接触するか、核酸を

10

20

30

40

50

細胞中に導入するための任意の適切な技法（例えばマイクロインジェクション、エレクトロポレーション、トランスフェクションなど）を使って、細胞中に導入することができる。

【0350】

ガイド核酸（DNAまたはRNAのどちらかとして導入されるもの）および/またはCasタンパク質もしくはCasキメラ（DNAまたはRNAとして導入されるもの）をコードするヌクレオチドは、適切なトランスフェクション技法を使って細胞に与えることができる。例えばAngel and Yanik（2010）PLoS ONE 5（7）：e11756、ならびにQiagen製の市販Trans Messenger（登録商標）試薬、Stemgent製のStemfect（商標）RNAトランスフェクションキット、およびMirus Bio LLC製のTransIT（登録商標）-mRNAトランスフェクションキットを参照されたい。また、Beumer et al.（2008）「Efficient gene targeting in Drosophila by direct embryo injection with zinc-finger nucleases」PNAS 105（50）：19821-19826も参照されたい。本開示の組成物（例えばCasタンパク質またはCasキメラなどのアクチュエータモエティ、キメラ受容体、アダプター、ガイド核酸など）をコードする核酸は、DNAベクターに載せて提供することができる。核酸を標的細胞中にトランスフェクトするのに有用な多くのベクター、例えばプラスミド、コスミド、ミニサークル、ファージ、ウイルスなどを利用することができる。核酸を含むベクターはエピソームとして、例えばプラスミド、ミニサークルDNA、サイトメガロウイルス、アデノウイルスなどのウイルスとして、維持されるか、相同組換えまたはランダム組込みによって、標的細胞ゲノムに組みこまれうる（例えばMMLV、HIV-1、およびALVなどのレトロウイルス由来ベクター）。

【0351】

Casタンパク質またはCasキメラなどのアクチュエータモエティ、キメラ受容体、および/またはアダプターは、ポリペプチドとして細胞に与えることができる。そのようなタンパク質は、任意で、産物の溶解度を増加させるポリペプチドドメインに融合されていてもよい。このドメインは、明確なプロテアーゼ切断部位、例えばTEVプロテアーゼによって切断されるTEV配列を介して、ポリペプチドに連結することができる。リンカーは、1つまたは複数の可動性配列、例えば1～10個のグリシン残基も含みうる。いくつかの態様において、融合タンパク質の切断は、産物の溶解度を維持する緩衝液中、例えば0.5～2M尿素の存在下、溶解度を増加させるポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドの存在下などで行われる。興味深いドメインとしては、エンドソーム溶解（endosomolytic）ドメイン、例えばインフルエンザHAドメイン、および生産に役立つ他のポリペプチド、例えばIF2ドメイン、GSTドメイン、GRPEドメインなどが挙げられる。ポリペプチドは安定性が改良されるように製剤化することができる。例えばペプチドをPEG化することができ、この場合、ポリエチレンオキシ基は血流中で強化された寿命をもたらす。

【0352】

本開示の組成物（例えばCasタンパク質またはCasキメラなどのアクチュエータモエティ、キメラ受容体、キメラアダプター、ガイド核酸など）は、細胞による取り込みを促進するために、ポリペプチド浸透性ドメインに融合することができる。本開示の非組込みポリペプチドには、ペプチド、ペプチドミメティック、および非ペプチド担体を含むいくつかの浸透性ドメインを使用することができる。例えば浸透性ペプチドは、アミノ酸配列 RQIKIWFQNRMRMKWKK (SEQ ID NO:26)

を含む、ペネトラチンと呼ばれるキイロシヨウジョウバエ転写因子アンテナペディア（Antennapaedia）の第3アルファヘリックスに由来しうる。別の例として、浸透性ペプチドは、例えば天然tatタンパク質のアミノ酸49～57を含みうるHIV-1 tat塩基性領域アミノ酸配列を含むことができる。他の浸透性ドメインとして、ポリ-アルギニンモチーフ、例えばHIV-1 revタンパク質のアミノ酸34～56の領域、ノナルギニン（SEQ ID NO:38）、オクタアルギニン（SEQ ID NO:40）などが挙げられる。（例えば、トランスロケーションペプチドおよびペプチドの教示に関して本明細書に特に組み入れられる、Futaki et al.（2003）Curr Protein Pept Sci. 2003 April; 4（2）：87-9および446;ならびに

Wender et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 2000 Nov. 21; 97 (24) :13003-8; 米国特許出願公開第20030220334号、同第20030083256号、同第20030032593号、および同第20030022831号を参照されたい)。ノナアルギニン (R9) (SEQ ID NO:38) 配列を使用することができる。(Wender et al. 2000; Uemura et al. 2002)。融合を行う部位は、ポリペプチドの生物学的活性、分泌または結合特徴が最適化されるように選択することができる。

【0353】

本開示の組成物(例えばCasタンパク質またはCasキメラなどのアクチュエータモエティ、キメラ受容体、アダプター、ガイド核酸など)は、インピトロで、または真核細胞によって、もしくは原核細胞によって生産し、アンフォールディング、例えば熱変性、DTT還元などによってさらに処理し、さらに再フォールディングすることができる。

10

【0354】

本開示の組成物(例えばCasタンパク質またはCasキメラなどのアクチュエータモエティ、キメラ受容体、アダプター、ガイド核酸など)は、インピトロ合成によって調製することができる。例えばApplied Biosystems, Inc.、Beckmanなどによる自動シンセサイザーなど、さまざまな市販の合成装置を使用することができる。シンセサイザーを使用することにより、天然アミノ酸の代わりに非天然アミノ酸を使用することができる。調製の具体的な手順および方法は、利便性、経済性、要求される純度などによって決まりうる。

【0355】

本開示の組成物(例えばCasタンパク質またはCasキメラなどのアクチュエータモエティ、キメラ受容体、アダプター、ガイド核酸など)は、従来の組換え合成法に従って単離、精製することもできる。溶解物を発現宿主から調製し、溶解物をHPLC、排除クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、アフィニティークロマトグラフィー、または他の精製技法を使って精製することができる。組成物は、産物の調製方法およびその精製方法に関係する夾雑物に対して、例えば少なくとも20重量%の所望の産物、少なくとも約75重量%、少なくとも約95重量%、また治療用である場合は、例えば少なくとも約99.5重量%の産物を含むことができる。パーセンテージは総タンパク質量に基づくことができる。

20

【0356】

本開示の組成物(例えばCasタンパク質またはCasキメラなどのアクチュエータモエティ、キメラ受容体、アダプター、ガイド核酸など)は、核酸として導入されるかポリペプチドとして導入されるかを問わず、約30分~約24時間、例えば1時間、1.5時間、2時間、2.5時間、3時間、3.5時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、12時間、16時間、18時間、20時間、または約30分から約24時間までの他の任意の期間にわたって、細胞に与えることができ、それをほぼ毎日~約4日ごと、例えば1.5日ごと、2日ごと、3日ごとの頻度、またはほぼ毎日から約4日ごとまでの他の任意の頻度で、繰り返すことができる。組成物は対象細胞に1回または複数回、例えば1回、2回、3回、または4回以上与えることができ、各接触イベントに続いて、細胞をある期間にわたって、例えば16~24時間にわたって、作用物質と共にインキュベートしておき、その後、培地を新鮮培地で置き換えて、細胞をさらに培養することができる。

30

【0357】

2つ以上の異なる標的指向複合体(例えば、同じまたは異なる標的DNA内の異なる配列に相補的な2つの異なるガイド核酸)を細胞に与える場合、それらの複合体は同時に(例えば2つのポリペプチドおよび/または核酸として)与えるか、または同時に送達することができる。あるいは、例えばある標的指向複合体をまず与え、次に第2の複合体を与える、またはその逆など、それらを連続的に与えてもよい。

40

【0358】

有効量の本開示の組成物(例えばCasタンパク質またはCasキメラなどのアクチュエータモエティ、キメラ受容体、アダプター、ガイド核酸など)を、標的DNAまたは標的細胞に与えることができる。有効量とは、陰性対照、例えば空ベクターまたは無関係なポリペプチドと接触させた細胞と比較して、2つの相同配列間に観察される標的調節の量に、例えば

50

少なくとも約2倍の変化（増加または減少）を誘導する量でありうる。有効量または有効用量は、標的遺伝子調節に、例えば約2倍の変化、約3倍の変化、約4倍の変化、約7倍、約8倍の増加、約10倍、約50倍、約100倍、約200倍、約500倍、約700倍、約1000倍、約5000倍、または約10000倍の変化を誘導することができる。標的遺伝子調節の量は、任意の適切な方法によって測定することができる。

【0359】

細胞と組成物との接触は、細胞の生存を増進する任意の培地中および任意の培養条件下で行うことができる。例えば、都合のよい任意の適当な栄養培地、例えばウシ胎児血清または熱非働化ヤギ血清（約5～10%）、L-グルタミン、チオール、特に2-メルカプトエタノール、ならびに抗生物質、例えばペニシリンおよびストレプトマイシンを補足したイスコフ改変ダルベッコDMEMまたはRPMI1640に、細胞を懸濁することができる。培養物は、細胞が反応する成長因子を含有しうる。成長因子とは、本明細書における定義では、膜貫通受容体への特異的効果によって、培養細胞または無傷の組織中の細胞の生存、成長および/または分化を増進する能力を有する分子である。成長因子としてはポリペプチド因子および非ポリペプチド因子を挙げることができる。

10

【0360】

数多くの態様において、選ばれた送達システムは、特異的組織または特異的細胞タイプに対して標的指向される。場合により、送達システムの組織標的指向または細胞標的指向は、送達システムを組織特異的マーカーまたは細胞特異的マーカーに結合させることによって達成される。ウイルス送達システムおよび非ウイルス送達システムは、関心対象の標的組織または標的細胞タイプに合わせてカスタマイズすることができる。

20

【0361】

本明細書に記載する分子（例えばポリペプチドおよび/またはポリペプチドをコードする核酸）または免疫細胞を含有する薬学的組成物は、予防的処置および/または治療的処置のために投与することができる。治療的応用では、ある疾患または状態を患っている対象に、その疾患または状態の症状を治療するか、少なくとも部分的に停止させるのに十分な量で、またはその状態を治療し、治癒させ、改善し、もしくは寛解させるのに十分な量で、組成物を投与することができる。この用途にとって有効な量は、疾患の重症度および経過、治療歴、対象の健康状態、体重、および薬物に対する応答、ならびに治療医の判断に基づいて変動しうる。

30

【0362】

複数の治療剤は、任意の順序で、または同時に、投与することができる。同時である場合、複数の治療剤は、単一の統合された形態で与えるか、複数の形態で、例えば複数の個別の丸剤として投与することができる。分子は、単一のパッケージに、または複数のパッケージに、一緒にまたは別々に充填することができる。治療剤の1つまたは全部を複数回に分けて与えることができる。同時でない場合、複数回にわたる投与の間のタイミングは、さまざまであってよく、約1ヶ月に及びうる。

【0363】

本明細書に記載する分子は、ある疾患または状態の発生前、発生中、または発生後に投与することができる。ある化合物を含有する組成物を投与するタイミングは、さまざまであることができる。例えば薬学的組成物は予防薬として使用することができる。状態または疾患に冒されがちな対象に、その疾患または状態の発生を防止するために、継続して投与することができる。分子および薬学的組成物は、発症中に、または発症後可能な限りすぐに、対象に投与することができる。分子の投与は、発症後最初の48時間以内、発症後最初の24時間以内、発症後最初の6時間以内、発症後3時間以内に、開始することができる。初回の投与は、本明細書に記載する任意の製剤を使って、実用的な任意の経路、例えば本明細書に記載する任意の経路によることができる。分子は、疾患または状態の開始が検出されるか疑われた後、可能な限りすぐに、その疾患の処置に必要な期間にわたって、例えば約1ヶ月～約3ヶ月にわたって、投与することができる。処置の長さは対象ごとに異なりうる。

40

50

【0364】

分子は生物学的コンパートメントにパッケージングすることができる。分子を含む生物学的コンパートメントは対象に投与することができる。生物学的コンパートメントとしては、ウイルス（レンチウイルス、アデノウイルス）、ナノスフェア、リポソーム、量子ドット、ナノ粒子、微粒子、ナノカプセル、小胞、ポリエチレングリコール粒子、ヒドロゲル、およびミセルを挙げることができるが、それらに限定されるわけではない。

【0365】

例えば生物学的コンパートメントはリポソームを含むことができる。リポソームは、それぞれが反対向きの両親媒性脂質分子を含有する2つの単層を含むことができる1つまたは複数の脂質二重層を含む自己集合構造であることができる。両親媒性脂質は、1つまたは2つまたはそれ以上の非極性（疎水性）アシル鎖またはアルキル鎖に共有結合で連結された極性（親水性）ヘッドグループを含むことができる。疎水性アシル鎖と周囲の水性媒質との間のエネルギー的に不利な接触は、両親媒性脂質分子が、極性ヘッドグループを二重層の表面に向かって配向させ、アシル鎖を二重層の内部に向かって配向させることで、アシル鎖を水性環境との接触から効果的に遮蔽するように自身を配置させる誘因となる。

10

【0366】

リポソームに使用される好ましい両親媒性化合物の例としては、ホスホグリセリドおよびスフィンゴリピドを挙げることができ、それらの代表例としては、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸、ホスファチジルグリセロール、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン、リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ジミリストイルホスファチジルコリン（DMPC）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）、ジオレオイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン（DSPC）、ジリノレオイルホスファチジルコリンおよび卵スフィンゴミエリン、またはそれらの任意の組合せが挙げられる。

20

【0367】

生物学的コンパートメントはナノ粒子を含むことができる。ナノ粒子は、約40ナノメートル～約1.5マイクロメートル、約50ナノメートル～約1.2マイクロメートル、約60ナノメートル～約1マイクロメートル、約70ナノメートル～約800ナノメートル、約80ナノメートル～約600ナノメートル、約90ナノメートル～約400ナノメートル、約100ナノメートル～約200ナノメートルの直径を含みうる。

30

【0368】

場合によっては、ナノ粒子のサイズが増加するに連れて放出速度は遅くなるか引き延ばされ、ナノ粒子のサイズが減少するに連れて、放出速度は増加しうる。

【0369】

ナノ粒子中のアルブミンの量は、約5%～約85%アルブミン（v/v）、約10%～約80%、約15%～約80%、約20%～約70%アルブミン（v/v）、約25%～約60%、約30%～約50%、または約35%～約40%の範囲に及びうる。薬学的組成物は、最大で30、40、50、60、70もしくは80%またはそれ以上のナノ粒子を含むことができる。場合によっては本開示の核酸分子をナノ粒子の表面に結合させることができる。

40

【0370】

生物学的コンパートメントはウイルスを含むことができる。ウイルスは、本開示の薬学的組成物のための送達システムになりうる。例示的なウイルスとして、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルスIまたはII、パルボウイルス、細網内皮症ウイルス、およびアデノ随伴ウイルス（AAV）を挙げることができる。本開示の薬学的組成物は、ウイルスを使って細胞に送達することができる。ウイルスは、インビボ、エクスピボ、またはインビトロで細胞に感染し、形質導入することができる。エクスピボ送達およびインビトロ送達では、治療を必要とする対象に形質導入細胞を投与することができる。

【0371】

50

薬学的組成物はウイルス送達システムにパッケージングすることができる。例えば組成物は、HSV-1ヘルパーウイルスフリーパッケージングシステムによってビリオンにパッケージングすることができる。

【0372】

ウイルス送達システム（例えば本開示の薬学的組成物を含むウイルス）は、脳室内に直接注射、定位注射によって、ミニポンプ注入システムによって、対流、カテーテル、静脈内、非経口、腹腔内、および/または皮下注射によって、その必要がある対象の細胞、組織、または器官に投与することができる。場合によっては、細胞を、インビトロまたはエクスピボで、ウイルス送達システムを使って形質導入することができる。形質導入細胞は疾患を有する対象に投与することができる。例えば、薬学的組成物を含むウイルス送達システムで幹細胞に形質導入し、疾患を処置するために、その幹細胞を患者に移植することができる。場合により、対象に与えられる形質導入細胞の用量は、単回投与で、約 1×10^5 細胞/kg、約 5×10^5 細胞/kg、約 1×10^6 細胞/kg、約 2×10^6 細胞/kg、約 3×10^6 細胞/kg、約 4×10^6 細胞/kg、約 5×10^6 細胞/kg、約 6×10^6 細胞/kg、約 7×10^6 細胞/kg、約 8×10^6 細胞/kg、約 9×10^6 細胞/kg、約 1×10^7 細胞/kg、約 5×10^7 細胞/kg、約 1×10^8 細胞/kg、またはそれ以上であることができる。

10

【0373】

細胞への生物学的コンパートメントの導入は、ウイルス感染またはバクテリオファージ感染、トランスフェクション、接合、プロトプラスト融合、リポフェクション、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、ポリエチレンイミン（PEI）媒介トランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、リポソーム媒介トランスフェクション、粒子銃技術、リン酸カルシウム沈殿、直接マイクロインジェクション、およびナノ粒子媒介核酸送達などによって行うことができる。

20

【0374】

いくつかの態様では、本システムを発現する免疫細胞が投与される。本システムを発現する免疫細胞は、疾患または状態の発生前、発生中、または発生後に投与することができる。免疫細胞を投与するタイミングはさまざまであることができる。例えば本システムを発現する免疫細胞は予防薬として使用することができ、状態または疾患に冒されがちな対象に、その疾患または状態の発生を防止するために、継続して投与することができる。免疫細胞は、発症中に、または発症後可能な限りすぐに、対象に投与することができる。投与は、発症後最初の48時間以内、発症後最初の24時間以内、発症後最初の6時間以内、発症後3時間以内に、開始することができる。初回の投与は、本明細書に記載する任意の製剤を使って、任意の適切な経路、例えば本明細書に記載する任意の経路によることができる。免疫細胞は、疾患または状態の開始が検出されるか疑われた後、可能な限りすぐに、その疾患の処置に必要な期間にわたって、例えば約1ヶ月～約3ヶ月にわたって、投与することができる。処置の長さは対象ごとに異なりうる。

30

【0375】

本明細書に記載する分子（例えばポリペプチドおよび/または核酸）は、組成物中に、約1mg～約2000mg;約5mg～約1000mg、約10mg～約25mg～500mg、約50mg～約250mg、約100mg～約200mg、約1mg～約50mg、約50mg～約100mg、約100mg～約150mg、約150mg～約200mg、約200mg～約250mg、約250mg～約300mg、約300mg～約350mg、約350mg～約400mg、約400mg～約450mg、約450mg～約500mg、約500mg～約550mg、約550mg～約600mg、約600mg～約650mg、約650mg～約700mg、約700mg～約750mg、約750mg～約800mg、約800mg～約850mg、約850mg～約900mg、約900mg～約950mg、または約950mg～約1000mgの範囲で存在することができる。

40

【0376】

本明細書に記載する分子（例えばポリペプチドおよび/または核酸）は、組成物中に、約1mg、約2mg、約3mg、約4mg、約5mg、約10mg、約15mg、約20mg、約25mg、約30mg、約35mg、約40mg、約45mg、約50mg、約55mg、約60mg、約65mg、約70mg

50

g、約75mg、約80mg、約85mg、約90mg、約95mg、約100mg、約125mg、約150mg、約175mg、約200mg、約250mg、約300mg、約350mg、約400mg、約450mg、約500mg、約550mg、約600mg、約650mg、約700mg、約750mg、約800mg、約850mg、約900mg、約950mg、約1000mg、約1050mg、約1100mg、約1150mg、約1200mg、約1250mg、約1300mg、約1350mg、約1400mg、約1450mg、約1500mg、約1550mg、約1600mg、約1650mg、約1700mg、約1750mg、約1800mg、約1850mg、約1900mg、約1950mg、または約2000mgの量で存在することができる。

【0377】

本明細書に記載する分子（例えばポリペプチドおよび/または核酸）は、組成物中に、少なくとも0.1、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、10単位またはそれ以上の活性/mg分子を与える量で存在することができる。活性は遺伝子発現の調節であることができる。いくつかの態様において、対象に送達される分子の活性の総単位数は、少なくとも25,000、30,000、35,000、40,000、45,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000、110,000、120,000、130,000、140,000、150,000、160,000、170,000、180,000、190,000、200,000、210,000、220,000、230,000、もしくは250,000単位またはそれ以上である。いくつかの態様において、対象に送達される分子の活性の総単位数は、多くて25,000、30,000、35,000、40,000、45,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000、110,000、120,000、130,000、140,000、150,000、160,000、170,000、180,000、190,000、200,000、210,000、220,000、230,000、もしくは250,000単位またはそれ以上である。

10

20

【0378】

いくつかの態様では、体重50kgあたりに標準化して、少なくとも約10,000単位の活性が対象に送達される。いくつかの態様では、体重50kgあたりに標準化して、少なくとも約10,000、15,000、25,000、30,000、35,000、40,000、45,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000、110,000、120,000、130,000、140,000、150,000、160,000、170,000、180,000、190,000、200,000、210,000、220,000、230,000、もしくは250,000単位またはそれ以上の活性の分子が、対象に送達される。いくつかの態様では、治療有効用量が、少なくとも 5×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、4、 10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 1.1×10^7 、 1.2×10^7 、 1.5×10^7 、 1.6×10^7 、 1.7×10^7 、 1.8×10^7 、 1.9×10^7 、 2×10^7 、 2.1×10^7 、または 3×10^7 単位またはそれ以上の活性の分子を含む。いくつかの態様では、治療有効用量が、多くて 5×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、4、 10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 1.1×10^7 、 1.2×10^7 、 1.5×10^7 、 1.6×10^7 、 1.7×10^7 、 1.8×10^7 、 1.9×10^7 、 2×10^7 、 2.1×10^7 、または 3×10^7 単位またはそれ以上の活性の分子を含む。

30

【0379】

いくつかの態様において、治療有効用量は、少なくとも約10,000、15,000、20,000、22,000、24,000、25,000、30,000、40,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000、100,000、125,000、150,000、200,000、または500,000単位/kg体重である。いくつかの態様において、治療有効用量は、多くて約10,000、15,000、20,000、22,000、24,000、25,000、30,000、40,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000、100,000、125,000、150,000、200,000、または500,000単位/kg体重である。

40

【0380】

いくつかの態様において、対象に送達される分子の活性は、少なくとも10,000、11,000、12,000、13,000、14,000、20,000、21,000、22,000、23,000、24,000、25,000、26,000、27,000、28,000、30,000、32,000、34,000、35,000、36,000、37,000、40,000、45,000、もしくは50,000U/mg分子またはそれ以上である。いくつかの態様において、対象に送達される分子の活性は、多くて10,000、11,000、12,000、13,000、14,000、20,000、21,000、22,000、23,000、24,000、25,000、26,

50

000、27,000、28,000、30,000、32,000、34,000、35,000、36,000、37,000、40,000、45,000、もしくは50,000U/mg分子またはそれ以上である。

【0381】

本願の諸局面のさまざまな態様において、薬物動態データおよび薬力学データを得ることができる。そのようなデータを得るためにさまざまな実験技法を利用することができる。特定の組成物を記述する適当な薬物動態および薬力学プロファイル構成要素は、ヒト対象における薬物代謝の変動ゆえに変動しうる。薬物動態プロファイルおよび薬力学プロファイルは、一群の対象の平均パラメータの決定に基づきうる。対象の群は、代表的平均を決定するのに適した任意の妥当な数の対象、例えば5対象、10対象、15対象、20対象、25対象、30対象、35対象またはそれ以上の対象を含む。平均は、測定される各パラメータについて全対象測定値の平均を計算することによって決定することができる。本明細書に記載するように、所望の血中プロファイルまたは有効な血中プロファイルなどといった所望の薬物動態プロファイルまたは薬力学プロファイルが達成されるように、用量を調整することができる。

10

【0382】

薬物動態パラメータは、分子を記述するのに適した任意のパラメータであることができる。例えばCmaxは、例えば約25ng/mL以上、約50ng/mL以上、約75ng/mL以上、約100ng/mL以上、約200ng/mL以上、約300ng/mL以上、約400ng/mL以上、約500ng/mL以上、約600ng/mL以上、約700ng/mL以上、約800ng/mL以上、約900ng/mL以上、約1000ng/mL以上、約1250ng/mL以上、約1500ng/mL以上、約1750ng/mL以上、約2000ng/mL以上であるか、本明細書に記載する分子の薬物動態プロファイルを記述するのに適した他の任意のCmaxであることができる。

20

【0383】

本明細書に記載するTmaxは、例えば約0.5時間以下、約1時間以下、約1.5時間以下、約2時間以下、約2.5時間以下、約3時間以下、約3.5時間以下、約4時間以下、約4.5時間以下、約5時間以下であるか、本明細書に記載する分子の薬物動態プロファイルを記述するのに適した他の任意のTmaxであることができる。

【0384】

本明細書に記載する分子のAUC(0-inf)は、例えば約50ng・時間/mL以上、約100ng/時間/mL以上、約150ng/時間/mL以上、約200ng・時間/mL以上、約250ng/時間/mL以上、約300ng/時間/mL以上、約350ng/時間/mL以上、約400ng/時間/mL以上、約450ng/時間/mL以上、約500ng/時間/mL以上、約600ng/時間/mL以上、約700ng/時間/mL以上、約800ng/時間/mL以上、約900ng/時間/mL以上、約1000ng・時間/mL以上、約1250ng/時間/mL以上、約1500ng/時間/mL以上、約1750ng/時間/mL以上、約2000ng/時間/mL以上、約2500ng/時間/mL以上、約3000ng/時間/mL以上、約3500ng/時間/mL以上、約4000ng/時間/mL以上、約5000ng/時間/mL以上、約6000ng/時間/mL以上、約7000ng/時間/mL以上、約8000ng/時間/mL以上、約9000ng/時間/mL以上、約10,000ng/時間/mL以上であるか、本明細書に記載する分子の薬物動態プロファイルを記述するのに適した他の任意のAUC(0-inf)であることができる。

30

【0385】

投与の約1時間後の、本明細書に記載する分子の血漿中濃度は、例えば約25ng/mL以上、約50ng/mL以上、約75ng/mL以上、約100ng/mL以上、約150ng/mL以上、約200ng/mL以上、約300ng/mL以上、約400ng/mL以上、約500ng/mL以上、約600ng/mL以上、約700ng/mL以上、約800ng/mL以上、約900ng/mL以上、約1000ng/mL以上、約1200ng/mL以上であるか、本明細書に記載する分子の他の任意の血漿中濃度であることができる。

40

【0386】

薬力学パラメータは、本開示の薬学的組成物を記述するのに適した任意のパラメータであることができる。例えば薬力学プロファイルは、例えば約2時間、約4時間、約8時間、約12時間、または約24時間後に、炎症に関連する因子の減少を呈することができる。

50

【0387】

本願の諸局面のさまざまな態様では、本開示の方法が対象において行われる。対象はヒトであることができる。対象は、哺乳動物（例えばラット、マウス、ウシ、イヌ、ブタ、ヒツジ、ウマ）であることができる。対象は脊椎動物または無脊椎動物であることができる。対象は実験動物であることができる。対象は患者であることができる。対象は疾患を患っているてもよい。対象は疾患の症状を呈してもよい。対象は疾患の症状を呈さないが、それでも疾患を有しうる。対象は介護者の医療を受けていてもよい（例えば対象は入院して、医師の処置を受けている）。対象は植物または作物であることができる。

【実施例】

【0388】

本開示のさまざまな局面を以下の非限定的実施例によってさらに例示する。

【0389】

実施例1:キメラ膜貫通受容体によるサイトカイン発現の改変

図14に図示するように、キメラ膜貫通受容体ポリペプチド1401およびキメラアダプターポリペプチド1402を含むシステムは、免疫細胞におけるサイトカイン発現を変化させるために使用される。本システムの構成要素を、T細胞などのリンパ球で発現させる。キメラ膜貫通受容体ポリペプチドは、HER2に結合する単鎖Fv（scFv、例えば抗原相互作用ドメイン）を含む細胞外領域を含むように生産される。キメラ膜貫通受容体ポリペプチドの細胞内領域は、遺伝子調整ポリペプチド（GMP）に連結された免疫細胞シグナル伝達ドメイン1403を含む。免疫細胞シグナル伝達ドメインは、一次シグナル伝達ドメインとしてのCD3シグナル伝達ドメインと、CD28からの共刺激ドメインとを含む。GMPは、制限認識部位（例えばプロテアーゼ配列）に連結されたアクチュエータモエティ1404（例えばdCas9）を含む。キメラアダプターポリペプチドは切断モエティ1405を含む。受容体結合モエティは修飾されたキメラ膜貫通受容体ポリペプチドに結合するか、修飾されたキメラ膜貫通受容体ポリペプチドとクラスター化することができる。受容体とアダプターの相互作用によって切断モエティが切断認識部位に近接した状態になると、切断認識部位は切断モエティによって切断されることが可能になり、それによって膜に係留されている受容体からアクチュエータモエティを放出させる。アクチュエータモエティは核に移動し、ゲノムDNA（例えば標的ポリヌクレオチド）からのインターロイキン-1（IL-1）の発現を調節する。アクチュエータモエティは、物理的妨害によって転写を調節するか、遺伝子産物が欠損するようにIL-1をコードする核酸配列を編集するか、遺伝子配列を完全に除去することによって、IL-1の発現を調節することができる。リンパ球からのIL-1の発現を減少させると、免疫治療における傷害性関連CRSが減少しうる。dCas9アクチュエータモエティは、GMPからの放出前または放出後にシングルガイドRNA（sgRNA）と複合体形成することができる。代替的コンフィギュレーションでは、キメラ膜貫通受容体が切断モエティを含み、キメラアダプターポリペプチドがGMPを含む。

【0390】

実施例2:抗体共役キメラ膜貫通受容体によるサイトカイン発現の改変

図14に図示するように、キメラ膜貫通受容体ポリペプチド1401およびキメラアダプターポリペプチド1402を含むシステムは、免疫細胞におけるサイトカイン発現を変化させるために使用される。本システムの構成要素を、T細胞などのリンパ球で発現させる。キメラ膜貫通受容体ポリペプチドは、抗HER2抗体（例えば抗原）に結合するFc受容体のFc結合ドメイン（例えば抗原相互作用ドメイン）を含む細胞外領域を含むように生産される。キメラ膜貫通受容体ポリペプチドの細胞内領域は、遺伝子調整ポリペプチド（GMP）に連結された免疫細胞シグナル伝達ドメイン1403を含む。免疫細胞シグナル伝達ドメインは、一次シグナル伝達ドメインとしてのCD3シグナル伝達ドメインと、CD28からの共刺激ドメインとを含む。GMPは、制限認識部位（例えばプロテアーゼ配列）に連結されたアクチュエータモエティ1404（例えばdCas9）を含む。キメラアダプターポリペプチドは切断モエティ1405を含む。受容体結合モエティは修飾されたキメラ膜貫通受容体ポリペプチドに結合するか、修飾されたキメラ膜貫通受容体ポリペプチドとクラスター化するこ

10

20

30

40

50

とができる。受容体とアダプターの相互作用によって切断モエティが切断認識部位に近接した状態になると、切断認識部位は切断モエティによって切断されることが可能になり、それによって膜に係留されている受容体からアクチュエータモエティを放出させる。アクチュエータモエティは核に移動し、ゲノムDNA（例えば標的ポリヌクレオチド）からのインターロイキン-1（IL-1）の発現を調節する。アクチュエータモエティは、物理的妨害によって転写を調節するか、遺伝子産物が欠損するようにIL-1をコードする核酸配列を編集するか、遺伝子配列を完全に除去することによって、IL-1の発現を調節することができる。リンパ球からのIL-1の発現を減少させると、免疫治療における傷害性関連CRSが減少しうる。dCas9アクチュエータモエティは、GMPからの放出前または放出後にシングルガイドRNA（sgRNA）と複合体形成することができる。代替的コンフィギュレーションでは、キメラ膜貫通受容体が切断モエティを含み、キメラアダプターポリペプチドがGMPを含む。

10

【0391】

実施例3:キメラ膜貫通受容体によるPD-1発現の改変

図15に図示するように、キメラ膜貫通受容体ポリペプチド1501およびキメラアダプターポリペプチド1502を含むシステムは、免疫細胞におけるPD-1の発現を変化させるために使用される。本システムの構成要素を、T細胞などのリンパ球で発現させる。キメラ膜貫通受容体ポリペプチドは、HER2に結合する単鎖Fv（scFv、例えば抗原相互作用ドメイン）を含む細胞外領域を含むように生産される。キメラ膜貫通受容体ポリペプチドの細胞内領域は、遺伝子調整ポリペプチド（GMP）に連結された免疫細胞シグナル伝達ドメイン1503を含む。免疫細胞シグナル伝達ドメインは、一次シグナル伝達ドメインとしてのCD3シグナル伝達ドメインと、CD28からの共刺激ドメインとを含む。GMPは、制限認識部位（例えばプロテアーゼ配列）に連結されたアクチュエータモエティ1504（例えばdCas9）を含む。キメラアダプターポリペプチドは切断モエティ1505を含む。受容体結合モエティは修飾されたキメラ膜貫通受容体ポリペプチドに結合するか、修飾されたキメラ膜貫通受容体ポリペプチドとクラスター化することができる。受容体とアダプターの相互作用によって切断モエティが切断認識部位に近接した状態になると、切断認識部位は切断モエティによって切断されることが可能になり、それによって膜に係留されている受容体からアクチュエータモエティを放出させる。アクチュエータモエティは核に移動し、ゲノムDNA（例えば標的ポリヌクレオチド）からのPD-1の発現を調節する。アクチュエータモエティは、物理的妨害によって転写を調節するか、遺伝子産物が欠損するようにPD-1をコードする核酸配列を編集するか、遺伝子配列を完全に除去することによって、PD-1の発現を調節することができる。リンパ球からのPD-1の発現を減少させると免疫治療の有効性が増加しうる。dCas9アクチュエータモエティは、GMPからの放出前または放出後にシングルガイドRNA（sgRNA）との複合体を形成することができる。代替的コンフィギュレーションでは、キメラ膜貫通受容体が切断モエティを含み、キメラアダプターポリペプチドがGMPを含む。

20

30

【0392】

実施例4:抗体共役キメラ膜貫通受容体によるPD-1発現の改変

図15に図示するように、キメラ膜貫通受容体ポリペプチド1501およびキメラアダプターポリペプチド1502を含むシステムは、免疫細胞におけるPD-1の発現を変化させるために使用される。本システムの構成要素を、T細胞などのリンパ球で発現させる。キメラ膜貫通受容体ポリペプチドは、抗HER2抗体（例えば抗原）に結合するFc受容体のFc結合ドメイン（例えば抗原相互作用ドメイン）を含む細胞外領域を含むように生産される。キメラ膜貫通受容体ポリペプチドの細胞内領域は、遺伝子調整ポリペプチド（GMP）に連結された免疫細胞シグナル伝達ドメイン1503を含む。免疫細胞シグナル伝達ドメインは、一次シグナル伝達ドメインとしてのCD3シグナル伝達ドメインと、CD28からの共刺激ドメインとを含む。GMPは、制限認識部位（例えばプロテアーゼ配列）に連結されたアクチュエータモエティ1504（例えばdCas9）を含む。キメラアダプターポリペプチドは切断モエティ1505を含む。受容体結合モエティは修飾されたキメラ膜貫通受容体ポリペプチド

40

50

に結合するか、修飾されたキメラ膜貫通受容体ポリペプチドとクラスター化することができる。受容体とアダプターの相互作用によって切断モエティが切断認識部位に近接した状態になると、切断認識部位は切断モエティによって切断されることが可能になり、それによって膜に係留されている受容体からアクチュエータモエティを放出させる。アクチュエータモエティは核に移動し、ゲノムDNA（例えば標的ポリヌクレオチド）からのPD-1の発現を調節する。アクチュエータモエティは、物理的妨害によって転写を調節するか、遺伝子産物が欠損するようにPD-1をコードする核酸配列を編集するか、遺伝子配列を完全に除去することによって、PD-1の発現を調節することができる。リンパ球からのPD-1の発現を減少させると免疫治療の有効性が増加しうる。dCas9アクチュエータモエティは、GMPからの放出前または放出後にシングルガイドRNA（sgRNA）と複合体形成することができる。代替的コンフィギュレーションでは、キメラ膜貫通受容体が切断モエティを含み、キメラアダプターポリペプチドがGMPを含む。

【0393】

実施例5:キメラ膜貫通受容体ポリペプチドによる追加のキメラ膜貫通受容体ポリペプチドの発現

図16に図示するように、キメラ膜貫通受容体ポリペプチド1601およびキメラアダプターポリペプチド1602を含むシステムは、プラスミドから第2受容体ポリペプチドを発現させるために使用される。本システムの構成要素を、T細胞などのリンパ球で発現させる。キメラ膜貫通受容体ポリペプチドは、HER2に結合する単鎖Fv（scFv、例えば抗原相互作用ドメイン）を含む細胞外領域を含むように生産される。キメラ膜貫通受容体ポリペプチドの細胞内領域は、遺伝子調整ポリペプチド（GMP）に連結された免疫細胞シグナル伝達ドメイン1603を含む。免疫細胞シグナル伝達ドメインは、一次シグナル伝達ドメインとしてのCD3シグナル伝達ドメインと、CD28からの共刺激ドメインとを含む。GMPは、制限認識部位（例えばプロテアーゼ配列）に連結されたアクチュエータモエティ1604（例えばdCas9）を含む。キメラアダプターポリペプチドは切断モエティ1605を含む。受容体結合モエティは修飾されたキメラ膜貫通受容体ポリペプチドに結合するか、修飾されたキメラ膜貫通受容体ポリペプチドとクラスター化することができる。受容体とアダプターの相互作用によって切断モエティが切断認識部位に近接した状態になると、切断認識部位は切断モエティによって切断されることが可能になり、それによって膜に係留されている受容体からアクチュエータモエティを放出させる。アクチュエータモエティは、細胞に送達された外因性プラスミド（例えば標的ポリヌクレオチド）に移動し、第2受容体ポリペプチドの発現を調節する。アクチュエータモエティは、外因性プラスミドからの転写を強化する転写活性化因子を含むことができる。dCas9アクチュエータモエティは、GMPからの放出前または放出後にシングルガイドRNA（sgRNA）と複合体形成することができる。代替的コンフィギュレーションでは、キメラ膜貫通受容体が切断モエティを含み、キメラアダプターポリペプチドがGMPを含む。

【0394】

実施例6:抗体共役キメラ膜貫通受容体ポリペプチドによる追加のキメラ膜貫通受容体ポリペプチドの発現

図16に図示するように、キメラ膜貫通受容体ポリペプチド1601およびキメラアダプターポリペプチド1602を含むシステムは、プラスミドから第2受容体ポリペプチドを発現させるために使用される。本システムの構成要素を、T細胞などのリンパ球で発現させる。キメラ膜貫通受容体ポリペプチドは、抗HER2抗体（例えば抗原）に結合するFc受容体のFc結合ドメイン（例えば抗原相互作用ドメイン）を含む細胞外領域を含むように生産される。キメラ膜貫通受容体ポリペプチドの細胞内領域は、遺伝子調整ポリペプチド（GMP）に連結された免疫細胞シグナル伝達ドメイン1603を含む。免疫細胞シグナル伝達ドメインは、一次シグナル伝達ドメインとしてのCD3シグナル伝達ドメインと、CD28からの共刺激ドメインとを含む。GMPは、制限認識部位（例えばプロテアーゼ配列）に連結されたアクチュエータモエティ1604（例えばdCas9）を含む。キメラアダプターポリペプチドは切断モエティ1605を含む。受容体結合モエティは修飾されたキメラ膜貫通受容体ポリ

10

20

30

40

50

ペプチドに結合するか、修飾されたキメラ膜貫通受容体ポリペプチドとクラスター化することができる。受容体とアダプターの相互作用によって切断モエティが切断認識部位に近接した状態になると、切断認識部位は切断モエティによって切断されることが可能になり、それによって膜に係留されている受容体からアクチュエータモエティを放出させる。アクチュエータモエティは、細胞に送達された外因性プラスミド（例えば標的ポリヌクレオチド）に移動し、第2受容体ポリペプチドの発現を調節する。アクチュエータモエティは、外因性プラスミドからの転写を強化する転写活性化因子を含むことができる。dCas9アクチュエータモエティは、GMPからの放出前または放出後にシングルガイドRNA（sgRNA）と複合体形成することができる。代替的コンフィギュレーションでは、キメラ膜貫通受容体が切断モエティを含み、キメラアダプターポリペプチドがGMPを含む。

10

【0395】

実施例7:dCas9-KRABドメインはTEVプロテアーゼの存在下でキメラ受容体から切断される

哺乳動物細胞中で発現したdCas9-KRABを含むキメラ受容体ポリペプチドは、TEVプロテアーゼの存在下で、TEV切断可能配列（tcs）において切断された。この実施例では、TEVプロテアーゼを、dCas9-KRABに連結されたプレT細胞抗原受容体アルファ（PTCRA）（PTCRA-dCas9-KRAB）、dCas9-KRABに連結されたGPCR受容体CXCR2（CXCR2-dCas9-KRAB）、dCas9-KRABに連結されたインターロイキン6受容体（IL6R）（IL6R-dCas9-KRAB）、またはdCas9-KRABに連結されたCD19標的キメラ抗原受容体（CAR）（CAR-dCas9-KRAB）のうちの1つと共に、HEK293T細胞中で共発現させ、細胞溶解物を切断産物の存在についてウェスタンブロットによって分析した。

20

【0396】

各キメラ受容体のための哺乳動物細胞発現ベクターは、分子クローニングによって生成させた。PTCRA-dCas9-KRABコンストラクトは、TEV切断可能配列（tcs）に連結されたPTCRA、dCas9、KRAB、およびC-Myc-DDK（PTCRA-dCas9-KRAB）を含んだ。CXCR2コンストラクトは、TEV切断可能配列（tcs）に連結されたCXCR2、dCas9、KRAB、およびC-Myc-DDK（CXCR2-dCas9-KRAB）を含んだ。IL6Rコンストラクトは、TEV切断可能配列（tcs）に連結されたIL6R、dCas9、KRAB、およびC-Myc-DDK（IL6R-dCas9-KRAB）を含んだ。CARコンストラクトは、TEV切断可能配列（tcs）に連結されたCAR、dCas9、KRAB、およびC-Myc-DDK（CAR-dCas9-KRAB）を含んだ。ドキシサイクリン（DOX）によるTEV発現の調節を可能にするために、TEVプロテアーゼを、誘導性発現システム（tet-on）で用意した。このシステムは、tet-on-TEVプラスミドおよびrtTA発現プラスミドを含んだ。

30

【0397】

各キメラ受容体について、哺乳動物細胞発現ベクターを、tet-on-TEVプラスミドおよびrtTAプラスミドと共に、HEK293 T細胞に同時トランスフェクトした。「遊離」dCas9-KRABをトランスフェクトした細胞またはDNAなしでトランスフェクションを行った細胞を、対照として使用した。簡単に述べると、HEK293T細胞を、50～70%コンフルエント時に、Mirusトランスフェクション試薬を用いるトランスフェクションに付した。トランスフェクションの24時間後に、TEVプロテアーゼの高発現を開始させるために、ドキシサイクリン（DOX）を細胞培養培地に加えた。この誘導性発現システムを使用すると、ドキシサイクリン（DOX）の添加はTEVプロテアーゼの高発現をもたらす。一方、DOXの非存在はTEVプロテアーゼの低発現をもたらす。トランスフェクションの48時間後に、プロテアーゼ阻害剤を補足したRIPA緩衝液に、細胞試料を収集し、ウェスタンブロットによってアッセイした。

40

【0398】

ウェスタンブロット分析のために、NuPAGE LDSサンプル緩衝液（4×）NuPAGE還元剤（10×）を使って細胞溶解物を調製し、プレキャストプロテインゲルで泳動してから、ニトロセルロースメンブレンに転写した。メンブレンを抗Cas9および抗ACTB（対照）抗体でプローブした。

50

【0399】

ウェスタンブロット分析は、DOXの存在下または非存在下での、tcsにおけるキメラ受容体の切断を示す。図20における切断されたdCas9-KRABに対応する小さい方のタンパク質バンドの存在は、TEVプロテアーゼ（「低」および「高」TEV）の存在下でのキメラ受容体からのdCas9-KRABの切断を示す。

【0400】

実施例8:dCas9-KRABは、アダプター-TEVプロテアーゼの存在下で、CAR-dCas9-KRABから切断される

CAR-dCas9-KRABポリペプチドは、さまざまなアダプター-TEVプロテアーゼ融合物の存在下で、TEV切断可能配列（tcs）において切断された。この実施例では、TEVプロテアーゼを、活性化されたCARに動員されうるさまざまな膜貫通アダプタータンパク質および細胞質アダプタータンパク質に融合した。試験した細胞質アダプタータンパク質には、ZAP70、LCP-2、GADS、およびGRB2が含まれる。試験した膜貫通アダプターには、LCKおよびLATが含まれる。ドキシサイクリン（DOX）によるTEV発現の調節を可能にするために、さまざまなアダプター-TEVプロテアーゼコンストラクトを、誘導性発現システム（tet-on）で用意した。このシステムは、tet-onアダプター-TEVプラスミドおよびrtTA発現プラスミドを含んだ。

【0401】

各アダプタータンパク質について、実施例7で述べたようにCAR-dCas9-KRABの発現ベクターを、tet-onアダプター-TEVプラスミドおよびrtTAプラスミドと共に、HEK293T細胞において同時発現させた。アダプター-TEVの同時トランスフェクションなしで「遊離」dCas9-KRABまたはCAR-dCas9-KRABをトランスフェクトした細胞を、対照として使用した。簡単に述べると、HEK293T細胞を、50～70%コンフルエント時に、Mirusトランスフェクション試薬を用いるトランスフェクションに付した。トランスフェクションの24時間後に、アダプター-TEVの高発現を開始させるために、ドキシサイクリン（DOX）を細胞培養培地に加えた。この誘導性発現システムを使用すると、ドキシサイクリン（DOX）の添加はアダプター-TEVプロテアーゼの高発現をもたらす。一方、DOXの非存在はアダプター-TEVプロテアーゼの低発現をもたらす。トランスフェクションの48時間後に、プロテアーゼ阻害剤を補足したRIPA緩衝液に、細胞試料を収集し、ウェスタンブロットによってアッセイした。

【0402】

ウェスタンブロット分析のために、NuPAGE LDSサンプル緩衝液（4×）NuPAGE還元剤（10×）を使って細胞溶解物を調製し、プレキャストプロテインゲルで泳動してから、ニトロセルロースメンブレンに転写した。メンブレンを抗Cas9および抗ACTB（対照）抗体でプローブした。

【0403】

tcsにおけるキメラ受容体の切断は、膜貫通アダプター-TEV融合物および細胞質アダプター-TEV融合物のどちらについても、低濃度DOXおよび高濃度DOXの存在下で、観察された。図21における切断されたdCas9-KRABに対応する小さい方のタンパク質バンドの存在は、アダプター-TEVプロテアーゼ（低および高TEV）の存在下でのキメラ受容体からのdCas9-KRABの切断を示す。細胞質アダプターの場合、切断には低発現のアダプター-TEVで十分であった。膜貫通アダプターの場合は、高発現のアダプター-TEV（+DOX）の方が高レベルの切断をもたらした。

【0404】

実施例9:リガンド結合誘導キメラ受容体切断

キメラ受容体ポリペプチドのリガンド誘導受容体切断をJurkat細胞および初代ヒトT細胞においてアッセイする。CD19抗原に結合するキメラ受容体ポリペプチドおよびキメラアダプターポリペプチドをJurkat細胞または初代ヒトT細胞において発現させることで、工学的に操作されたJurkat細胞および工学的に操作されたT細胞を生成させる。細胞にCD19抗原を提示すると、工学的に操作されたJurkat細胞および工学的に操作されたT細胞にお

10

20

30

40

50

いて、受容体切断が観察される。

【0405】

CD19結合性CAR-dCas9-KRAB (CD19-CAR-dCas9-KRAB) レンチウイルスおよびアダプター-TEVレンチウイルスを293T細胞中でパッケージングする。レンチウイルス形質導入を使って、CD19-CAR-dCas9-KRABポリペプチドとアダプター-TEVポリペプチド (例えばZAP70-TEV、LCP2-TEV、GADS-TEV、GRB2-TEV、PIK3R-TEV、LCK-TEV、LAT-TEVおよびNCK-TEV) とを共発現する工学的に操作されたJurkat細胞および工学的に操作されたT細胞を生成させる。レンチウイルス形質導入はフローサイトメトリー (CD19-CAR-dCas9-KRAB) およびウェスタンブロット (アダプター-TEV) によって検証される。形質導入およびポリペプチド発現の検証に続いて、工学的に操作されたJurkat細胞および工学的に操作されたT細胞を (個別に) CD19 + 白血病細胞株NALM-6細胞、CD19 + パーキットリンパ腫Daudi細胞、またはCD19 + パーキットリンパ腫Raji細胞と共培養する。対照として、工学的に操作されたJurkat細胞および工学的に操作されたT細胞を (個別に) CD19-細胞 (CD19を発現しないもの) と共培養する。CD19-CAR-dCas9-KRABの細胞外ドメインへのCD19の結合は、CARシグナル伝達を活性化し、アダプター-TEVポリペプチド (例えばZAP70-TEV、LCP2-TEV、GADS-TEV、GRB2-TEV、PIK3R-TEV、LCK-TEV、LAT-TEVおよびNCK-TEV) を、キメラ受容体ポリペプチドの細胞内ドメインに動員して、そこで切断が起こる。共培養後に、実施例7で述べたように、CD19 + 細胞またはCD19-細胞の存在下で遊離dCas9-KRAB (受容体から切断されたもの) の存在を検出するために、工学的に操作されたJurkat細胞および工学的に操作されたT細胞をウェスタンブロット分析用に溶解する。CD19活性化切断レベルを、CD19-細胞と共培養した工学的に操作されたJurkat細胞および工学的に操作されたT細胞における受容体切断の基礎レベルと比較する。

10

20

【0406】

キメラ受容体ポリペプチドの切断は、CD19 + 細胞と共培養した工学的に操作されたJurkat細胞または工学的に操作されたT細胞の方が高いと予想される。

【0407】

実施例10:キメラ受容体切断に起因する転写調節 (ダウンレギュレーション)

キメラ受容体ポリペプチドのリガンド依存的切断とその結果生じる転写調節用のdCas9-KRABの放出に起因する遺伝子発現レベルの変化を、工学的に操作されたJurkat細胞および工学的に操作されたT細胞においてアッセイする。実施例9で述べたように、工学的に操作されたJurkat細胞および工学的に操作されたT細胞は、CD19-CAR-dCas9-KRABとアダプター-TEVとを共発現し、さらに標的指向RNA (sgRNA) も発現する。標的指向RNAはPD-1 (sgPD-1) またはIL-6 (sgIL-6) に特異的である。CD19結合性CAR-dCas9-KRAB (CD19-CAR-dCas9-KRAB) レンチウイルス、アダプター-TEVレンチウイルス、およびPD-1またはIL-6を標的とするsgRNAレンチウイルスを、293T細胞中でパッケージングする。レンチウイルス形質導入を使って、CD19-CAR-dCas9-KRAB、アダプター-TEVポリペプチド (例えばZAP70-TEV、LCP2-TEV、GADS-TEV、GRB2-TEV、PIK3R-TEV、LCK-TEV、LAT-TEVおよびNCK-TEV)、およびsgRNA (例えばsgPD-1、sgIL-6、またはsgNT「非標的指向 (non-targeting)」) を共発現する工学的に操作されたJurkat細胞および工学的に操作されたT細胞を生成させる。レンチウイルス形質導入はフローサイトメトリー (CD19-CAR-dCas9-KRAB) およびウェスタンブロット (アダプター-TEV) によって検証される。形質導入に続いて、工学的に操作されたJurkat細胞および工学的に操作されたT細胞を (個別に) CD19 + 白血病細胞株NALM-6細胞、CD19 + パーキットリンパ腫Daudi細胞、またはCD19 + パーキットリンパ腫Raji細胞と共培養する。対照として、工学的に操作されたJurkat細胞および工学的に操作されたT細胞をCD19-細胞と共培養する。キメラ受容体の細胞外ドメインへのCD19の結合は、CARシグナル伝達を活性化し、アダプター-TEVポリペプチド (例えばZAP70-TEV、LCP2-TEV、GADS-TEV、GRB2-TEV、PIK3R-TEV、LCK-TEV、LAT-TEVおよびNCK-TEV) を、CAR-dCas9-KRAB融合タンパク質の細胞内ドメインに動員して、そこで切断が起こりうる。共培養後に、実施

30

40

50

例7で述べたように、CD19+細胞またはCD19-細胞の存在下で遊離dCas9-KRAB（受容体から切断されたもの）の存在を検出するために、工学的に操作されたJurkat細胞および工学的に操作されたT細胞をウェスタンブロット分析用に溶解する。

【0408】

実施例8で述べたようにリガンド依存的受容体切断をウェスタンブロット分析で検証する。dCas9-KRABの放出とそれに続くsgRNAと複合体形成したdCas9-KRABの標的指向とに起因するPD-1およびIL-6の遺伝子発現レベルの変化を、qPCRによって分析する。PD-1（タンパク質）表面発現をフローサイトメトリーによって分析する。IL-6（タンパク質）分泌をELISAによって分析する。

【0409】

CD19とCD19CAR-dCas9-KRABとの結合に応じて、PD-1発現およびIL-6発現の転写調節の変化が予想される。CD19CAR-dCas9-KRAB、アダプター-TEVおよびsgRNAを発現する工学的に操作されたJurkat細胞および初代ヒトT細胞では、PD-1およびIL-6のダウンレギュレーションが予想される。CD19+白血球細胞およびCD19+リンパ腫細胞と共培養した、非標的指向RNA（例えばsgNT）を発現する工学的に操作されたJurkat細胞およびT細胞が、ベースラインとの比較で示す転写調節の変化は、ごくわずかであると予想される。sgNTは転写調節用のdCas9-KRABを標的指向しないと予想されるからである。

【0410】

実施例11:キメラ受容体切断に起因する転写調節（アップレギュレーション）

キメラ受容体ポリペプチドのリガンド依存的切断とその結果生じる転写調節用のdCas9-KRABの放出に起因する遺伝子発現レベルの変化を、工学的に操作されたJurkat細胞および工学的に操作されたT細胞においてアッセイする。実施例9で述べたように、工学的に操作されたJurkat細胞および工学的に操作されたT細胞は、CD19-CAR-dCas9-VPRとアダプター-TEVとを共発現し、さらに標的指向RNA（sgRNA）も発現する。標的指向RNAはPD-1（sgPD-1）またはIL-6（sgIL-6）に特異的である。CD19結合性CAR-dCas9-VPR（CD19-CAR-dCas9-VPR）レンチウイルス、アダプター-TEVレンチウイルス、およびPD-1またはIL-6を標的とするsgRNAレンチウイルスを、293T細胞中でパッケージングする。レンチウイルス形質導入を使って、CD19-CAR-dCas9-VPR、アダプター-TEVポリペプチド（例えばZAP70-TEV、LCP2-TEV、GADS-TEV、GRB2-TEV、PIK3R-TEV、LCK-TEV、LAT-TEVおよびNCK-TEV）、およびsgRNA（例えばsgPD-1、sgIL-6、またはsgNT「非標的指向（non-targeting）」）を共発現する工学的に操作されたJurkat細胞および工学的に操作されたT細胞を生成させる。レンチウイルス形質導入はフローサイトメトリー（CD19-CAR-dCas9-VPR）およびウェスタンブロット（アダプター-TEV）によって検証される。形質導入に続いて、工学的に操作されたJurkat細胞および工学的に操作されたT細胞を（個別に）CD19+白血球細胞株NALM-6細胞、CD19+パーキットリンパ腫Daudi細胞、またはCD19+パーキットリンパ腫Raji細胞と共培養する。対照として、工学的に操作されたJurkat細胞および工学的に操作されたT細胞をCD19-細胞と共培養する。キメラ受容体の細胞外ドメインへのCD19の結合は、CARシグナル伝達を活性化し、アダプター-TEVポリペプチド（例えばZAP70-TEV、LCP2-TEV、GADS-TEV、GRB2-TEV、PIK3R-TEV、LCK-TEV、LAT-TEVおよびNCK-TEV）を、CAR-dCas9-VPR融合タンパク質の細胞内ドメインに動員して、そこで切断が起こりうる。共培養後に、実施例7で述べたように、CD19+細胞またはCD19-細胞の存在下で遊離dCas9-VPR（受容体から切断されたもの）の存在を検出するために、工学的に操作されたJurkat細胞および工学的に操作されたT細胞をウェスタンブロット分析用に溶解する。

【0411】

実施例8で述べたようにリガンド依存的受容体切断をウェスタンブロット分析で検証する。dCas9-VPRの放出とそれに続くsgRNAと複合体形成したdCas9-VPRの標的指向とに起因するPD-1およびIL-6の遺伝子発現レベルの変化を、qPCRによって分析する。PD-1（タンパク質）表面発現をフローサイトメトリーによって分析する。IL-6（タンパク質）分泌をELISAによって分析する。

10

20

30

40

50

【 0 4 1 2 】

CD19とCD19CAR-dCas9-VPRとの結合に応じて、PD-1発現およびIL-6発現の転写調節の変化が予想される。CD19CAR-dCas9-VPR、アダプター-TEVおよびsgRNAを発現する工学的に操作されたJurkat細胞および初代ヒトT細胞では、PD-1およびIL-6のアップレギュレーションが予想される。CD19+白血病およびCD19+リンパ腫細胞と共培養した、非標的指向RNA（例えばsgNT）を発現する工学的に操作されたJurkat細胞およびT細胞が、ベースラインとの比較で示す転写調節の変化はごくわずかであると予想される。sgNTは転写調節用のdCas9-VPRを標的指向しないと予想されるからである。

【 0 4 1 3 】

本発明の好ましい態様を本明細書に示して説明したが、そのような態様が例示のために提供されるに過ぎないことは、当業者には明白であるだろう。当業者は、今や、本発明から逸脱することなく、数多くの変形、変更および置換を思いつくであろう。本発明の実施には、本明細書に記載する本発明の態様のさまざまな代替態様を試用することができると理解すべきである。以下の請求項が本発明の範囲を画定し、これら請求項の範囲内にある方法および構造ならびにそれらの等価物は、これらの請求項によって包含されるものとする。

10

20

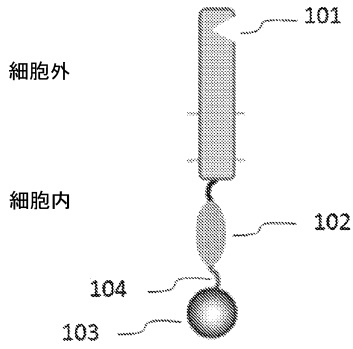
30

40

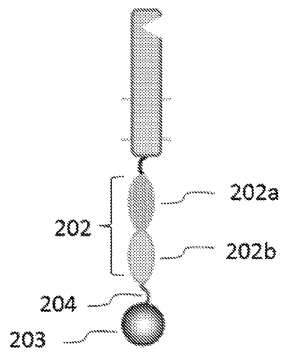
50

【図面】

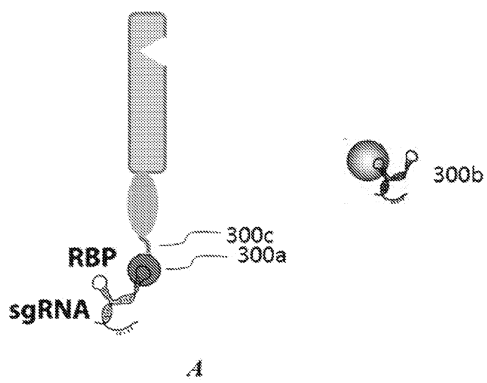
【図 1】



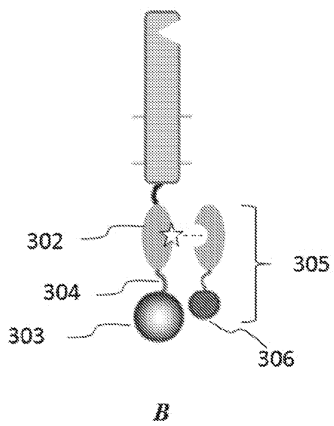
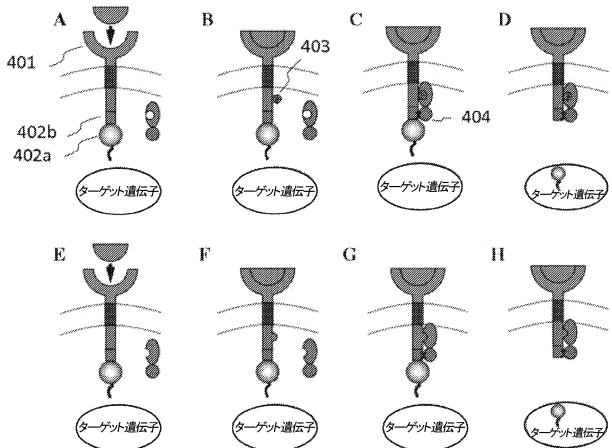
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

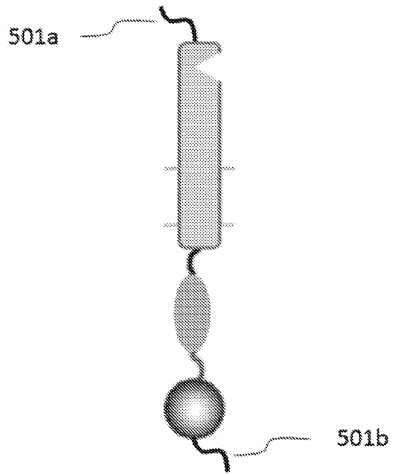
20

30

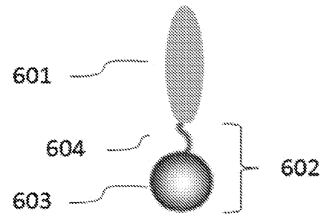
40

50

【図5】

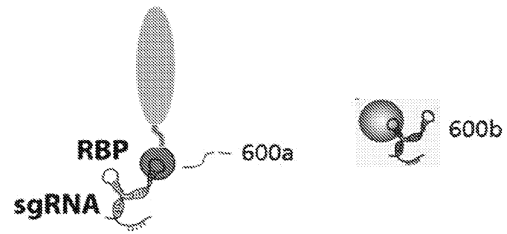


【図6】



A

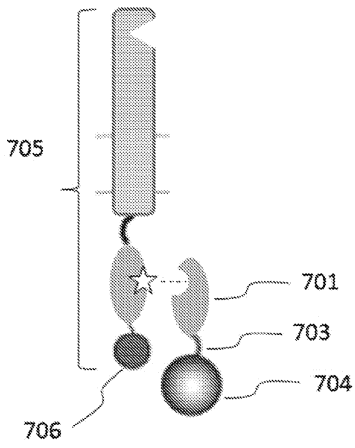
10



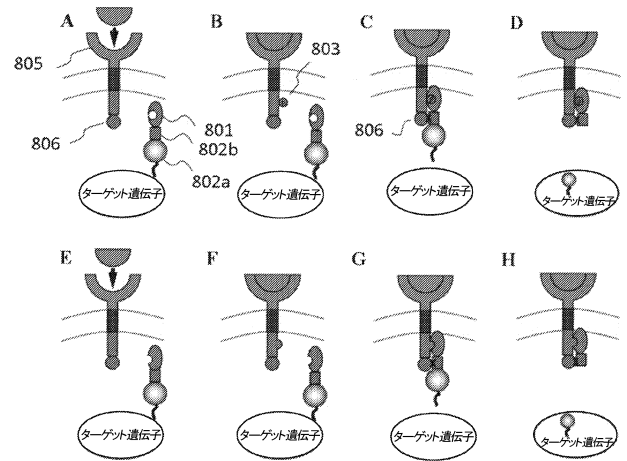
B

20

【図7】



【図8】

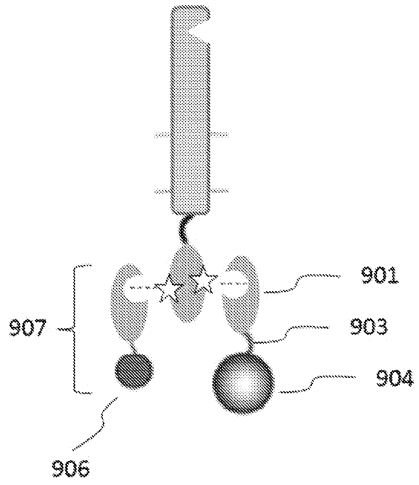


30

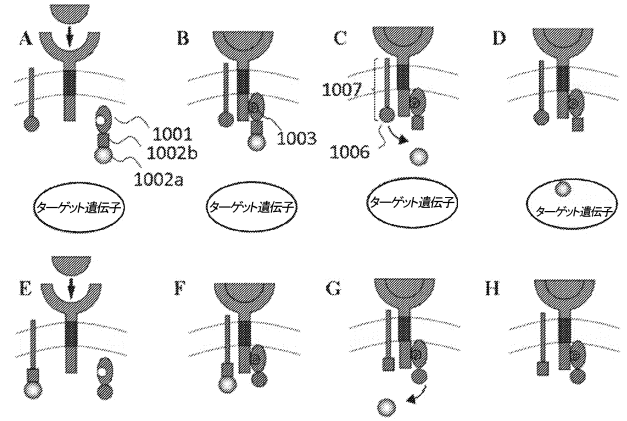
40

50

【図 9】

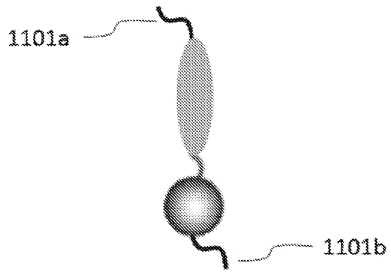


【図 10】

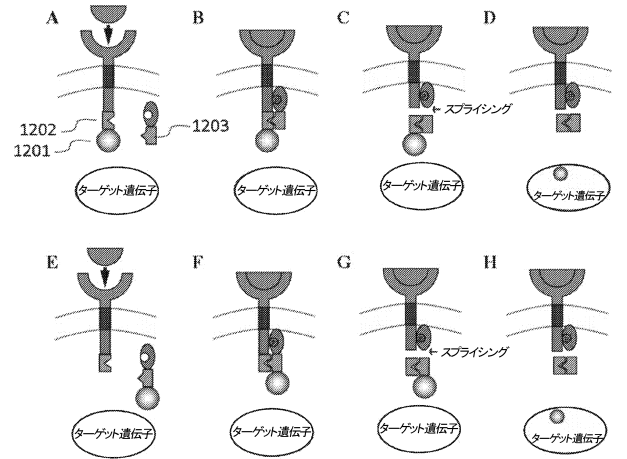


10

【図 11】



【図 12】



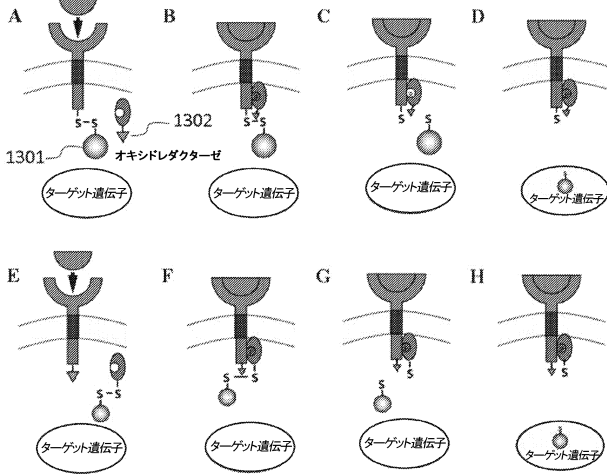
20

30

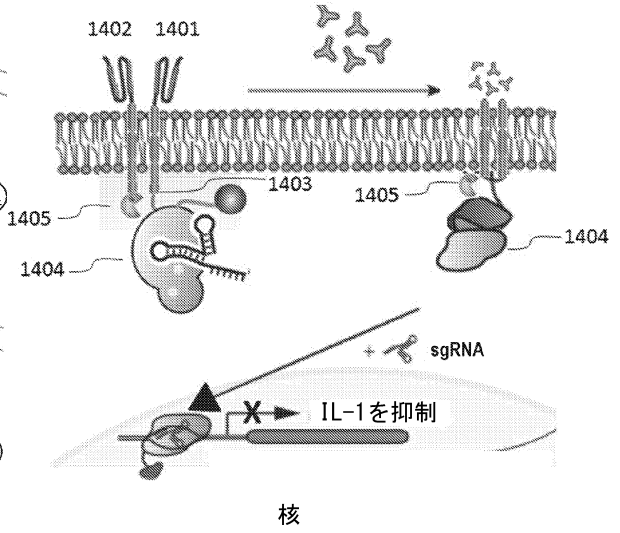
40

50

【図 13】

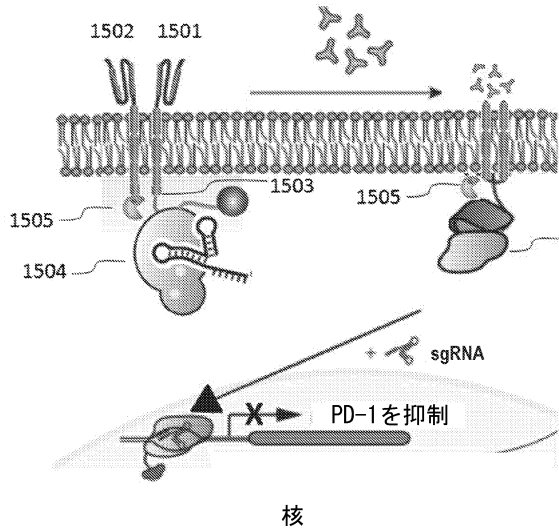


【図 14】



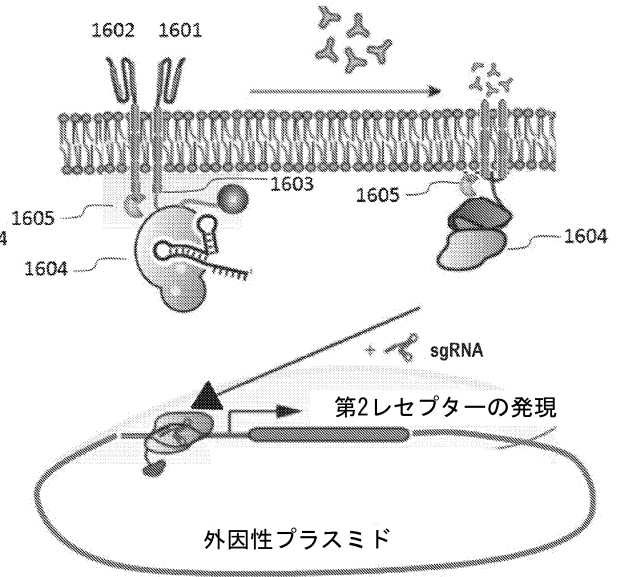
10

【図 15】



核

【図 16】



外因性プラスミド

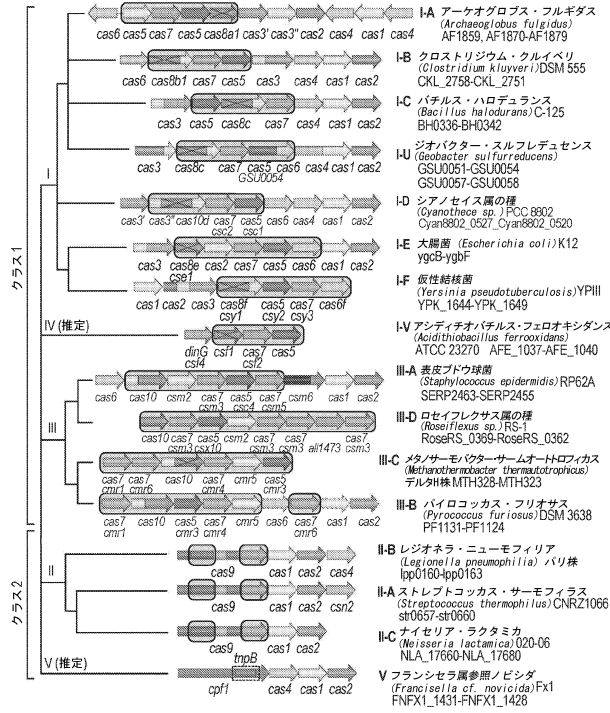
20

30

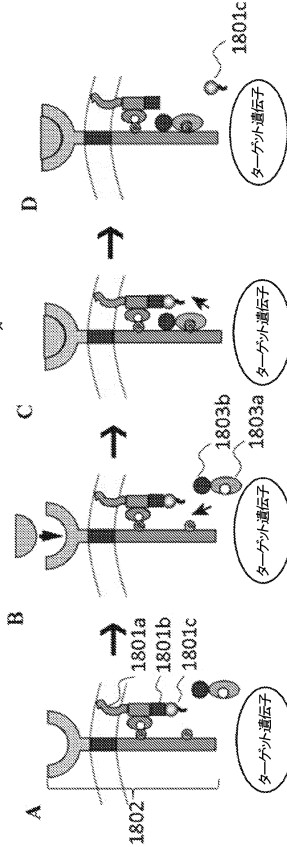
40

50

【 図 17 】



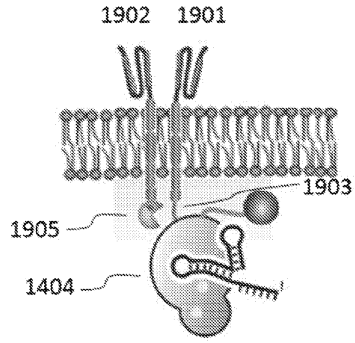
【 図 18 】



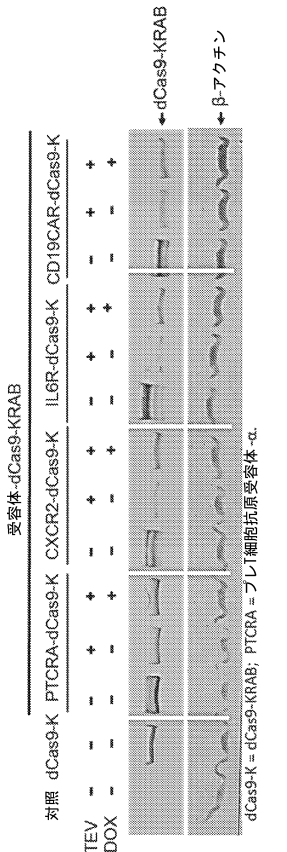
10

20

【 図 19 】



【 図 20 】

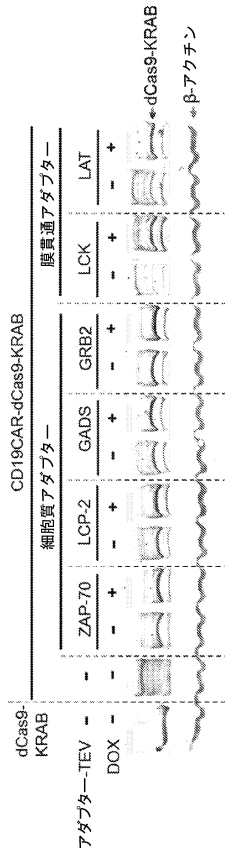


30

40

50

【 2 1】



【配列表】

0007012645000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

	F I		
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17		Z
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00		
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00		
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5	

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/399,902

(32)優先日 平成28年9月26日(2016.9.26)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/399,923

(32)優先日 平成28年9月26日(2016.9.26)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/399,939

(32)優先日 平成28年9月26日(2016.9.26)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

弁理士 山口 裕孝

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 チー レイ エス .

アメリカ合衆国 9 4 3 0 5 - 2 0 3 8 カリフォルニア州 スタンフォード メイン クワッド ピー . オー . ボックス 2 0 3 8 6 オフィス オブ ザ ゼネラル カウンセル ビルディング 1 7 0 サード フロア ザ ボード オブ トラスティー オブ ザ レランド スタンフォード ジュニア ユニバーシティー内

(72)発明者 ワン ビン シー .

アメリカ合衆国 9 4 0 2 5 カリフォルニア州 メンロ パーク アダムス ドライブ 1 5 0 5 スイート ディー

審査官 宮岡 真衣

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 5 / 0 9 2 0 2 4 (W O , A 2)

特表 2 0 1 5 - 5 2 3 8 5 6 (J P , A)

国際公開第 2 0 1 6 / 1 9 3 6 9 6 (W O , A 1)

特表 2 0 1 9 - 5 0 0 8 8 7 (J P , A)

(58)調査した分野 TANAKA Y. et al. , Microbiol. Immunol. , 54 (2010) , p.206-220
(Int.Cl. , D B 名)

C 0 7 K 1 4 / 0 0 - 1 4 / 8 2 5

C 0 7 K 1 9 / 0 0

C 1 2 N 5 / 0 7 8 3

C 1 2 N 1 5 / 0 9 - 1 5 / 9 0

A 6 1 K 3 5 / 1 7

A 6 1 K 4 8 / 0 0

A 6 1 P 3 5 / 0 0

A 6 1 P 4 3 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

P u b M e d