

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7621979号
(P7621979)

(45)発行日 令和7年1月27日(2025.1.27)

(24)登録日 令和7年1月17日(2025.1.17)

(51)国際特許分類		F I		
C 1 2 N	15/86 (2006.01)	C 1 2 N	15/86	Z Z N A
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	5/02 (2006.01)	C 1 2 N	5/02	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02	
請求項の数 23 (全69頁) 最終頁に続く				
(21)出願番号	特願2021-570189(P2021-570189)	(73)特許権者	520184664	
(86)(22)出願日	令和2年5月27日(2020.5.27)		イマティクス ユーエス, アイエヌシー.	
(65)公表番号	特表2022-534716(P2022-534716 A)		アメリカ, テキサス州 77030, ヒューストン, スーツ 205, 2201	
(43)公表日	令和4年8月3日(2022.8.3)		ダブリュ. ホルコム ビーエルブイディー.	
(86)国際出願番号	PCT/US2020/034639	(74)代理人	100088904	
(87)国際公開番号	WO2020/243134		弁理士 庄司 隆	
(87)国際公開日	令和2年12月3日(2020.12.3)	(74)代理人	100124453	
審査請求日	令和5年5月25日(2023.5.25)		弁理士 資延 由利子	
(31)優先権主張番号	62/853,123	(74)代理人	100135208	
(32)優先日	令和1年5月27日(2019.5.27)		弁理士 大杉 卓也	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100183656	
			弁理士 庄司 晃	
		(74)代理人	100224786	
				最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ウイルスベクターおよびその養子細胞療法における使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

C D 8 αポリペプチドをコード化するヌクレオチド配列 S 1、C D 8 βポリペプチドをコード化するヌクレオチド配列 S 2、T細胞受容体 (T C R) αポリペプチドをコード化するヌクレオチド配列 S 3、および T C R βポリペプチドをコード化するヌクレオチド配列 S 4を含んでなるベクターであって、前記ヌクレオチド配列が、 S 2－S 1－S 4－S 3 の 5 ' から 3 ' の方向でタンデムに配置された、ベクター。

【請求項2】

前記 C D 8 αポリペプチドが、配列番号 1 1 と少なくとも 9 0 % 同一であり、および前記 C D 8 βポリペプチドが、配列番号 1 2 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでなる、請求項 1 に記載のベクター。

【請求項3】

2 A ペプチドをコード化する第 5 のヌクレオチド配列 S 5 と、リンカーペプチドをコード化する第 6 のヌクレオチド配列 S 6 をさらに含んでなる、請求項 1 または 2 に記載のベクターであって、S 5 および S 6 が、S 1 と S 2、S 1 と S 4、および／または S 3 と S 4 の間に配置される、ベクター。

【請求項4】

前記 2 A ペプチドが、P 2 A (配列番号 3)、T 2 A (配列番号 4)、E 2 A (配列番号 5)、または F 2 A (配列番号 6) から選択される、請求項 3 に記載のベクター。

【請求項5】

前記リンカーペプチドが、G S GまたはS G S G（配列番号8）である、請求項3または4に記載のベクター。

【請求項6】

フューリンペプチド（配列番号2）をコード化する第7のヌクレオチド配列S7をさらに含んでなる、請求項1～5のいずれか一項に記載のベクターであって、S7が、S1とS2、S1とS4、および／またはS3とS4の間に配置される、ベクター。

【請求項7】

ウッドチャックPRE（WPRE）またはB型肝炎ウイルス（HBV）PRE（HPRE）から選択される、転写後調節エレメント（PRE）配列をさらに含んでなる、請求項1～6のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項8】

前記S2～S7の転写を制御するプロモーター配列をさらに含んでなる、請求項1～7のいずれか一項に記載のベクターであって、前記プロモーター配列が、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ（PGK）プロモーター、ミエリン塩基性タンパク質（MBP）プロモーター、グリア線維性酸性タンパク質（GFAP）プロモーター、骨髄増殖性肉腫ウイルスエンハンサー（MNDU3）を含有する修飾MoMuLV LTR、ユビキチンCプロモーター、EF-1αプロモーター、またはマウス幹細胞ウイルス（MSCV）プロモーターから選択される、ベクター。

【請求項9】

アデノウイルス、ポックスウイルス、アルファウイルス、アレナウイルス、フラビウイルス、ラブドウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、ヘルペスウイルス、パラミクソウイルス、またはピコルナウイルスから選択されるウイルスベクターである、請求項1～8のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項10】

前記ベクターが、天然ネコ内在性ウイルス（RD114）、RD114のキメラバージョン（RD114TR）、テナガザル白血病ウイルス（GALV）、GALVのキメラバージョン（GALV-TR）、両栄養性マウス白血病ウイルス（MLV4070A）、バキュロウイルス（GP64）、水疱性口内炎ウイルス（VSV-G）、家禽ペストウイルス（FPV）、エボラウイルス（EbV）、またはヒヒレトロウイルスエンベロープ糖タンパク質（BaEV）、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（LCMV）から選択されるウイルスのエンベロープタンパク質で偽型化されている、請求項9に記載のベクター。

【請求項11】

インビトロで行われる方法であって、

T細胞を活性化するステップと、

活性化されたT細胞を請求項1～10のいずれか一項に記載のベクターで形質導入するステップと、および

形質導入されたT細胞を増殖させるステップと、

を含んでなる、免疫療法のためのT細胞を調製するインビトロ方法。

【請求項12】

前記T細胞をヒト対象から得られた血液サンプルから単離することをさらに含む、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記T細胞が、白血球アフェレーシスヒトサンプルから単離される、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記活性化が、

a) アミノビスホスホネート、および場合によりヒト組換えインターロイキン2（IL-2）およびヒト組換えインターロイキン15（IL-15）；

b) スタチン；または

c) 抗CD3抗体および抗CD28抗体；

10

20

30

40

50

の存在下で行われる、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記アミノビスホスホネートが、パミドロン酸、アレンドロン酸、ゾレドロン酸、リセドロン酸、イバンドロン酸、インカドロン酸、前述のいずれかの塩および／またはその水和物から選択される、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記スタチンが、アトルバスタチン、セリバスタチン、ダルバスタチン、フルインドスタチン、フルバスタチン、メバスタチン、プラバスタチン、シムバスタチン、ペロスタチン、およびロスバスタチンから選択される、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記増殖させるステップが、 $IL-2$ および $IL-15$ の存在下で行われる、請求項 1 1 ～ 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 8】

$CD8\alpha$ 、 $CD8\beta$ 、 $TCR\alpha$ 、および $TCR\beta$ が、前記増殖した T 細胞の表面上で同時発現される、請求項 1 1 ～ 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 9】

請求項 1 1 ～ 1 8 のいずれか一項に記載の方法によって調製された、増殖した T 細胞の集団。

【請求項 2 0】

請求項 1 9 に記載の増殖した T 細胞集団を含んでなる組成物を含む、がんを治療するための医薬であって、

前記 T 細胞が、表面上に MHC 分子との複合体でペプチドを提示するがん細胞を殺滅し、

前記がんが、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、黒色腫、肝臓がん、乳がん、子宮がん、メルケル細胞がん、膵臓がん、胆嚢がん、胆管がん、結腸直腸がん、尿膀胱がん、腎臓がん、白血病、卵巣がん、食道がん、脳がん、胃がん、および前立腺がんからなる群から選択される、医薬。

【請求項 2 1】

前記組成物がアジュバントをさらに含んでなる、請求項 2 0 に記載の医薬。

【請求項 2 2】

前記アジュバントが、抗 $CD40$ 抗体、イミキモド、レシキモド、 $GM-CSF$ 、シクロホスファミド、スニチニブ、ベバシズマブ、アテゾリズマブ、インターフェロン- α 、インターフェロン- β 、 CpG オリゴヌクレオチドおよび誘導体、ポリ- $(I:C)$ および誘導体、RNA、シルデナフィル、ポリ(ラクチドコグリコリド) (PLG) との粒子状製剤、ピロソーム、インターロイキン (IL)- 1 、 $IL-2$ 、 $IL-4$ 、 $IL-7$ 、 $IL-12$ 、 $IL-13$ 、 $IL-15$ 、 $IL-21$ 、および $IL-23$ から選択される、請求項 2 1 に記載の医薬。

【請求項 2 3】

前記 T 細胞が、 $\alpha\beta$ T 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞、および／またはナチュラルキラー T 細胞を含んでなる、請求項 2 2 に記載の医薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

これは、その内容全体が参照により本明細書に援用される、2019年5月27日に出願された米国仮特許出願第62／853，123号明細書の優先権を主張する、特許協力条約に基づく国際出願である。

【0002】

提出された配列表への言及

配列表の正式なコピーは、2020年5月26日に作成され、313，426バイトのサイズを有する「3000011-013977_SEQLIST_ST25.txt」

10

20

30

40

50

というファイル名のASCII形式の配列表として、EFS-Webを介して電子的に提出され、本明細書と同時に提出されている。このASCII形式のドキュメントに含まれている配列表は明細書の一部であり、その全体が参照により本明細書に援用される。

【背景技術】

【0003】

1. 分野

本開示は、T細胞の製造に関する。一態様では、本開示は、単一ベクターで複数のタンパク質を発現させるための、マルチシストロン性カセットを使用するT細胞製造に関する。より具体的には、本開示は、TCR $\alpha\beta$ およびCD8 $\alpha\beta$ を共発現するT細胞のT細胞製造、および養子細胞療法におけるそれらの使用に関する。

10

【0004】

2. 背景

遺伝性、後天性、または感染性疾患の潜在的な治療法としてのヒトリンパ球の遺伝子操作には、導入遺伝子の効率的な伝達と発現が必要である。がんの養子免疫療法の場合、天然および／または組換え抗腫瘍T細胞受容体(TCR)を使用して、正常なT細胞または腫瘍浸潤リンパ球に抗腫瘍反応性を付与する。

【0005】

非特許文献1は、バイシストロン性RNAによって発現される抗gp100 TCRを開示し、その中ではTCR β 鎖をコード化する第1の遺伝子の発現が、長い末端反復(LTR)によって制御され、TCR α 鎖をコード化する第2の遺伝子が、内部リボソーム侵入部位によって支配される(IRES)。この抗gp100 TCR遺伝子によって操作されたCD4 T細胞は、抗原反応性であった。

20

【0006】

非特許文献2は、p53エピトープに結合するTCR α 鎖およびTCR β 鎖の双方の同時発現のためのバイシストロン性レトロウイルスベクターを開示する。TCR α 鎖をコード化する第1の遺伝子の発現はLTRによって制御され、TCR β 鎖をコード化する第2の遺伝子はIRESによって制御される。p53 TCRで形質導入されたリンパ球は、ペプチドをパルス投与されたAPC、ならびに野生型または変異型p53タンパク質で形質移入されたHLA-A2.1+細胞を高い結合力で特異的に認識できた。

【0007】

非特許文献3は、抗MART-1 TCRの同時発現のための様々なバイシストロン性レトロウイルスベクターを開示する。TCR α 鎖をコード化する第1の遺伝子の発現はLTRによって制御され、TCR β 鎖をコード化する第2の遺伝子はIRESによって制御され、逆もまた同様である。さらに、TCR α 鎖をコード化する第1の遺伝子の発現はLTRによって制御され、TCR β 鎖をコード化する第2の遺伝子はPGKプロモーターによって制御され、逆もまた同様である。これらのベクターで形質導入されたT細胞は、高活性T細胞エフェクター機能を示した。

30

【0008】

非特許文献4は、NY-ESO-1 TCRの同時発現のためのバイシストロン性レトロウイルスベクターを開示する。TCR α 鎖をコード化する第1の遺伝子の発現はLTRによって制御され、TCR β 鎖をコード化する第2の遺伝子はIRESによって制御され、またはTCR α 鎖をコード化する第1の遺伝子の発現はLTRによって制御され、TCR β 鎖をコード化する第2の遺伝子はPGKプロモーターによって制御される。形質導入されたリンパ球は、HLA-A2およびNY-ESO-1陽性黒色腫細胞株を効率的に認識して殺滅し得る。

40

【0009】

非特許文献5は、フューリン切断部位とアミノ酸スペーサー(GSGまたはSGSG(配列番号8))とを組み合わせた後に、2Aリボソームスキップペプチドを導入して、抗gp100 TCRまたは抗ペクタブイシストロニック・レンチウイルス・ベクターを開示する。スペーサー配列が合成V5ペプチドタグ配列の付加によって増強された場合、タン

50

パク質プロセッシングが増強され、形質導入されたリンパ球における高レベルのTCR発現を媒介できるレンチウイルスベクターをもたらした。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0010】

【文献】Morgan et al. J Immunol. 2003 September 15; 171 (6): 3287-32 percent

【文献】Cohen et al. J Immunol. 2005 November 1; 175 (9): 5799-5808

【文献】Hughes et al. Hum Gene Ther. 2005 April; 16 (4): 457-472

【文献】Zhao et al. J Immunol. 2005 April 1; 174 (7): 4415-4423

【文献】Morgan et al. Gene Therapy 2008 15, 1411-1423

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

養子細胞療法における安全で効率的な導入遺伝子発現のための、遺伝子送達システムの必要性が依然として存在する。

【課題を解決するための手段】

【0012】

一態様では、本開示は、タンパク質Z1をコード化する第1のヌクレオチド配列S1、タンパク質Z2をコード化する第2のヌクレオチド配列S2、タンパク質Y1をコード化する第3のヌクレオチド配列S3、およびタンパク質Y2をコード化する第4のヌクレオチド配列S4を含んでなるベクターを含む、遺伝子送達システムを提供し、その中ではZ1とZ2が第1の二量体を形成し、Y1とY2が第2の二量体を形成し、その中では第1の二量体Z1Z2は、第2の二量体Y1Y2とは異なり、ここで遺伝子送達システムは、適応細胞療法に使用される。

【0013】

別の態様では、S1-S2-S3-S4、S1-S2-S4-S3、S1-S3-S2-S4、S1-S3-S4-S2、S1-S4-S3-S2、S1-S4-S2-S3、S2-S1-S3-S4、S2-S1-S4-S3、S2-S3-S1-S4、S2-S3-S4-S1、S2-S4-S3-S1、S2-S4-S1-S3、S3-S1-S2-S4、S3-S1-S4-S2、S3-S2-S1-S4、S3-S2-S4-S1、S3-S4-S1-S2、S3-S4-S2-S1、S4-S1-S2-S3、S4-S1-S3-S2、S4-S2-S1-S3、S4-S2-S3-S1、S4-S3-S1-S2、またはS4-S3-S2-S1から選択される、5'から3'方向でタンデムに配列されたS1、S2、S3、およびS4であってもよい。

【0014】

別の態様では、ベクターは、2Aペプチドをコード化する第5のヌクレオチド配列S5と、リンカーペプチドをコード化する第6のヌクレオチド配列S6とをさらに含んでもよく、S5およびS6が、S1とS2、S1とS3、S1とS4、S2とS3、S2とS4、および／またはS3とS4の間に配置される、ベクター。

【0015】

別の態様では、2Aペプチドは、P2A（配列番号3）、T2A（配列番号4）、E2A（配列番号5）、またはF2A（配列番号6）から選択されてもよい。

【0016】

別の態様では、リンカーペプチドは、GSGまたはSGSG（配列番号8）であってもよい。

10

20

30

40

50

【0017】

別の態様では、ベクターは、第7のヌクレオチド配列S7をコード化する、フューリンペプチド（配列番号2）を含んでもよく、ここでS7は、S1とS2、S1とS3、S1とS4、S2とS3、S2とS4、および／またはS3とS4の間に配置される。

【0018】

別の態様では、ベクターは、ウッドチャックPRE（WPRE）またはaB型肝炎ウイルス（HBV）PRE（HPRE）から選択される、転写後調節エレメント（PRE）配列をさらに含んでもよい。

【0019】

別の態様では、ベクターは、S1、S2、S3、S4、S5、S6および／またはS7の転写を制御するプロモーター配列をさらに含んでもよく、プロモーター配列は、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ（PGK）プロモーター、ミエリン塩基性タンパク質（MBP）プロモーター、グリア線維性酸性タンパク質（GFAP）プロモーター、骨髄増殖性肉腫ウイルスエンハンサー（MNDU3）を含有する修飾MoMuLV LTR、ユビキチンCプロモーター、EF-1 α プロモーター、またはマウス幹細胞ウイルス（MSCV）プロモーターから選択される。

【0020】

別の態様では、第1の二量体Z1Z2は、配列番号13と14、15と16、17と18、19と20、21と22、23と24、25と26、27と28、29と30、31と32、33と34、35と36、37と38、39と40、41と42、43と44、45と46、47と48、49と50、51と52、53と54、55と56、57と58、59と60、61と62、63と64、65と66、67と68、69と70、71と72、73と74、75と76、77と78、79と80、81と82、83と84、85と86、87と88、または89と90から選択されてもよい。

【0021】

別の態様では、第2の二量体Y1およびY2は、配列番号11および12で記載される。

【0022】

別の態様では、配向はS2-S1-S4-S3である。

【0023】

別の態様では、ベクターは、PTE WPRE（配列番号91）、TPE WPRE（配列番号92）、またはPTE fn WPRE（配列番号93）から選択される配列を有する。

【0024】

別の態様では、配向はS4-S3-S2-S1である。

【0025】

別の態様では、ベクターは、配列PTE CD8 TCR WPRE（配列番号94）を有する。

【0026】

別の態様では、ウイルスベクターは、アデノウイルス、ポックスウイルス、アルファウイルス、アレナウイルス、フラビウイルス、ラブドウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、ヘルペスウイルス、パラミクソウイルス、またはピコルナウイルスから選択される。

【0027】

別の態様では、ベクターは、天然ネコ内在性ウイルス（RD114）、RD114のキメラバージョン（RD114TR）、テナガザル白血病ウイルス（GALV）、GALVのキメラバージョン（GALV-TR）、両栄養性マウス白血病ウイルス（MLV4070A）、バキュロウイルス（GP64）、水疱性口内炎ウイルス（VSV-G）、家禽ペストウイルス（FPV）、エボラウイルス（EbV）、ヒヒレトロウイルスエンベロープ糖タンパク質（BaEV）、またはリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（LCMV）から選択されるウイルスのエンベロープタンパク質で偽型化されている。

【0028】

別の態様では、ベクターは、水疱性口内炎ウイルス（VSV-G）のエンベロープタンパク質で偽型化されている。

【0029】

一態様では、本開示は、T細胞をヒト対象の血液サンプルから単離するステップと、アミノビスホスホネートの存在下で単離T細胞を活性化するステップと、活性化されたT細胞を本明細書に記載のベクターで形質導入するステップと、形質導入されたT細胞を増殖させるステップとを含む、免疫療法のためのT細胞を調製する方法に関する。

【0030】

別の態様では、T細胞は白血球アフェレーシスヒトサンプルから単離されてもよい。

10

【0031】

別の態様では、アミノビスホスホネートは、パミドロン酸、アレンドロン酸、ゾレドロン酸、リセドロン酸、イバンドロン酸、インカドロン酸、その塩および／またはその水和物から選択されてもよい。

【0032】

別の態様では、活性化するステップは、ヒト組換えインターロイキン2（IL-2）およびヒト組換えインターロイキン15（IL-15）の存在下でさらに行われてもよい。

【0033】

別の態様では、増殖させるステップは、IL-2とIL-15の存在下で行われてもよい。

20

【0034】

別の態様では、T細胞は $\gamma\delta$ T細胞であってもよい。

【0035】

別の態様では、第1の二量体Z1Z2および第2の二量体Y1Y2は、増殖したT細胞の表面上で同時発現される。

【0036】

別の態様では、本開示は、上記の態様の方法によって調製された増殖したT細胞集団に関連している。

【0037】

一態様では、本開示は、本明細書に記載の増殖したT細胞の集団を含んでなる組成物を患者に投与するステップを含んでなる、がんを有する患者を治療する方法に関し、その中でT細胞は、表面上にMHC分子との複合体でペプチドを提示するがん細胞を殺滅し、ここでペプチドが、配列番号98～255のいずれかから選択され、その中ではがんは、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、黒色腫、肝臓がん、乳がん、子宮がん、メルケル細胞がん、膵臓がん、胆嚢がん、胆管がん、結腸直腸がん、尿膀胱がん、腎臓がん、白血病、卵巣がん、食道がん、脳がん、胃がん、および前立腺がんからなる群から選択される。

30

【0038】

別の態様では、組成物は、アジュバントをさらに含む。

【0039】

別の態様では、アジュバントは、抗CD40抗体、イミキモド、レシキモド、GM-CSF、シクロホスファミド、スニチニブ、ベバシズマブ、アテゾリズマブ、インターフェロン α 、インターフェロン β 、CpGオリゴヌクレオチドおよび誘導体、ポリ（I:C）および誘導体、RNA、シルデナフィル、ポリ（ラクチドコグリコリド）（PLG）との粒子状製剤、ピロソーム、インターロイキン（IL）-1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-12、IL-13、IL-15、IL-21、およびIL-23の1つまたは複数から選択される。

40

【0040】

一態様では、本開示は、本明細書に記載の増殖したT細胞の集団を含んでなる組成物を患者に投与するステップを含んでなる、がんを有する患者における免疫応答を引き起こす方法に関し、その中でT細胞は、表面上にMHC分子との複合体でペプチドを提示するが

50

ん細胞を殺滅し、ここでペプチドが、配列番号 98～255 のいずれかから選択され、その中ではがんは、非小細胞肺がん、小細胞肺がん、黒色腫、肝臓がん、乳がん、子宮がん、メルケル細胞がん、膵臓がん、胆嚢がん、胆管がん、結腸直腸がん、尿膀胱がん、腎臓がん、白血病、卵巣がん、食道がん、脳がん、胃がん、および前立腺がんからなる群から選択される。

【0041】

別の態様では、免疫応答は、細胞傷害性 T 細胞応答を含んでなる。

【0042】

一態様では、本開示は、本明細書に記載の方法でスタチンを使用することによって、T 細胞を調製する方法を提供する。別の態様では、本開示は、T 細胞をスタチンの存在下で活性化することによって、T 細胞を調製する方法を提供する。

10

【0043】

なおも別の態様では、本開示は、T 細胞をスタチンの存在下で活性化するステップと、活性化された T 細胞を、水疱性口内炎ウイルス (VSV-G) エンベロープタンパク質で偽型化されていてもよい、本開示のベクターで形質導入するステップと、形質導入された T 細胞を増殖させるステップとを含む、免疫療法のための T 細胞を調製する方法に関する。

【0044】

別の態様では、T 細胞としては、 $\alpha\beta$ T 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞、および／またはナチュラルキラー T 細胞が挙げられてもよい。

【0045】

別の態様では、スタチンアトルバスタチン、セリバスタチン、ダルバスタチン、フルインドスタチン、フルバスタチン、メバスタチン、プラバスタチン、シムバスタチン、ペロスタチン、およびロスバスタチンから選択されてもよい。

20

【0046】

一態様では、本開示は、T 細胞を活性化するステップと、活性化された T 細胞を本開示のベクターで形質導入するステップと、形質導入された T 細胞を増殖させるステップとを含む、免疫療法のための T 細胞を調製する方法に関する。

【0047】

別の態様では、活性化するステップは、抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体の存在下でさらに行われてもよい。

30

【0048】

別の態様では、増殖させるステップは、IL-7 および IL-15 の存在下で行われてもよい。

【図面の簡単な説明】

【0049】

【図1】本開示の一実施形態による、 $\gamma\delta$ T 細胞の製造工程を示す。 $\gamma\delta$ T 細胞製造は、例えば、白血球アフェレーシス産物などの白血球または PBMC を採取または入手するステップと、PBMC または白血球アフェレーシス産物から $\alpha\beta$ T 細胞を枯渇させるステップと、それに続く $\gamma\delta$ T 細胞の活性化、形質導入、および増殖を含んでもよい。

【図2】本開示のいくつかの実施形態による、オープンリーディングフレーム (ORF) シャフリングを伴う形質導入ストラテジーを示す。

40

【図3】本開示のいくつかの実施形態による、レンチウイルスコンストラクトを示す。

【図4】ゾレドロネート、IL-2、および IL-15 による活性化後 3 日目または 6 日目に、 $\gamma\delta$ T 細胞を形質導入するために使用される RD114 TR で偽型化されたレンチウイルスを示す。TCR ($V\beta 8$) および CD8 ($CD8\alpha$) に特異的な抗体を使用して、フローサイトメトリーを介して導入効率が評価された。

【図5】A 本開示の実施形態によるコンストラクトを示す。 B 本開示の実施形態による別のコンストラクトを示す。 C 本開示の実施形態による別のコンストラクトを示す。 D 本開示の実施形態による別のコンストラクトを示す。

【図6】A 本開示の実施形態による別のコンストラクトを示す。

B 本開示の

50

実施形態による別のコンストラクトを示す。

【図7】本開示のいくつかの実施形態によるコンストラクトの概略図を示す。

【図8】A 本開示の実施形態によるコンストラクトを示す。 B 本開示の実施形態による別のコンストラクトを示す。 C 本開示の実施形態による別のコンストラクトを示す。 D 本開示の実施形態による別のコンストラクトを示す。

【図9】A 本開示のいくつかの実施形態によるコンストラクトの概略図を示す。

B 本開示のいくつかの実施形態によるコンストラクトの概略図を示す。

【図10】PTE、CD8、TCR、WP RE、PTE、WP RE、PTE、Fn、WP RE、またはTPE、WP REを含有するウイルスベクターで形質導入された、%CD8 + TCR + γ δ T細胞を示す。非形質導入（NT）細胞が、対照として機能する。

【図11】PTE、CD8、TCR、WP RE、PTE、WP RE、PTE、Fn、WP RE、またはTPE、WP REを含有するウイルスベクターで形質導入された γ δ T細胞における、CD8およびTCRの中央値蛍光強度（MFI）を示す。非形質導入（NT）細胞が、対照として機能する。

【図12】Incucyte細胞傷害性アッセイによって判定された、例えば、UACC 257（上側パネル）などの高抗原発現腫瘍細胞株、または例えば、U2OS（下側パネル）などの低抗原発現腫瘍細胞株において、PTE、CD8、TCR、WP RE、PTE、WP RE、PTE、Fn、WP RE、またはTPE、WP REを含有するウイルスベクターで形質導入された、ドナー3から得られた γ δ T細胞の腫瘍殺滅活性を示している。標的のみおよび非形質導入細胞は、対照として機能する。

【図13】A-C 例えば、UACC 257（図13A）などの高抗原発現腫瘍細胞株、または例えば、U2OS（図13B）などの低抗原発現腫瘍細胞株、または例えば、MCF-7（図13C）などの抗原陰性腫瘍細胞株において、PTE、CD8、TCR、WP RE、PTE、WP RE、PTE、Fn、WP RE、またはTPE、WP REを含有するウイルスベクターで形質導入されたドナー3から得られた γ δ T細胞によるインターフェロン（IFN）- γ 分泌の量を示す。非形質導入細胞が、対照として機能する。

【図14】Incucyte細胞傷害性アッセイによって判定された、例えば、UACC 257（上側パネル）などの高抗原発現腫瘍細胞株、または例えば、U2OS（下側パネル）などの低抗原発現腫瘍細胞株において、PTE、CD8、TCR、WP RE、PTE、WP RE、PTE、Fn、WP RE、またはTPE、WP REを含有するウイルスベクターで形質導入された、ドナー4から得られた γ δ T細胞の腫瘍殺滅活性を示している。標的のみおよび非形質導入細胞は、対照として機能する。

【図15】A-C 例えば、UACC 257（図15A）などの高抗原発現腫瘍細胞株、または例えば、U2OS（図15B）などの低抗原発現腫瘍細胞株、または例えば、MCF-7（図15C）などの抗原陰性腫瘍細胞株において、PTE、CD8、TCR、WP RE、PTE、WP RE、PTE、Fn、WP RE、またはTPE、WP REを含有するウイルスベクターで形質導入されたドナー4から得られた γ δ T細胞によるIFN- γ 分泌の量を示す。非形質導入細胞が、対照として機能する。

【図16】PTE、CD8、TCR、WP RE、PTE、WP RE、PTE、Fn、WP RE、またはTPE、WP REを含有するウイルスベクターで形質導入された、 γ δ T細胞におけるウイルスベクターのコピー数を示す。非形質導入細胞が、対照として機能する。

【図17】A-B PTE、CD8、TCR、WP RE、PTE、WP RE、PTE、Fn、WP RE、またはTPE、WP REを含有するウイルスベクターで形質導入された、ドナー3（図17A）またはドナー4（図17B）から得られた γ δ T細胞の倍数増殖を示す。非形質導入（NT）細胞が、対照として機能する。

【図18】A 本開示のいくつかの実施形態に従ってフローサイトメトリーによって判定された、 γ δ T細胞の記憶表現型を示す。 B PTE、CD8、TCR、WP RE、PTE、WP RE、PTE、Fn、WP RE、またはTPE、WP REを含有するウイルスベクターで形質導入された、 γ δ T細胞の記憶表現型を示す。非形質導入（NT）細胞が、対照として機能する。

【図19】例えば、120 μ lの各R11KE.WPREとCD8.WPRE（パネルD）、240 μ lの各R11KE.WPREとCD8.WPRE（パネルE）など、ウィルスベクターの量を増加させながら、PTE.CD8.TCR.WPREを含有する単一のレンチウイルスベクター（LV）で導入された（パネルB（120 μ l）およびパネルC（240 μ l）） $\gamma\delta$ T細胞、またはR11KE.WPREを含有するものとCD8.WPREを含有するものの2つの別々のレンチウイルスベクターで形質導入された（パネルDおよびE） $\gamma\delta$ T細胞間の形質導入効率の比較を示す。非形質導入（NT）細胞が、対照として機能する。

【図20】PTE.CD8.TCR.WPREを含有するウィルスベクターの量の増加、例えば、30 μ l、120 μ l、および240 μ lで形質導入された、 $\gamma\delta$ T細胞における増強された形質導入効率を示す。非形質導入細胞が、対照として機能する。

10

【図21】例えば、LV-PTE.CD8.TCR.WPREなどの本開示の4-in-1コンストラクトを発現するレンチウイルスベクター（LV）の様々な希釈を使用して、ドナー5およびドナー6から得られたCD4+T細胞における強制CD8発現を示す。

【図22】例えば、LV-PTE.CD8.TCR.WPREなどの本開示の4-in-1コンストラクトを発現するLVの様々な希釈液を使用した、CD4+T細胞におけるTCR発現の検出を示す。

【図23】例えば、LV-PTE.CD8.TCR.WPREなどの本開示の4-in-1コンストラクトで形質導入されたドナー5（上側パネル）およびドナー6（下側パネル）から得られた、CD4+および／またはCD8+T細胞における%標的ペプチド/MHC複合体デキストラマー203（Dex203）を示す。

20

【図24】例えば、LV-PTE.CD8.TCR.WPREなどの本開示の4-in-1コンストラクトで形質導入されたドナー5（上側パネル）およびドナー6（下側パネル）から得られた、CD8+および／またはCD8+T細胞におけるDex203 MFIを示す。

【図25】本開示の一実施形態による4-in-1コンストラクトまたはTCRのみのコンストラクトで形質導入された、T細胞の機能性を試験するための実験デザインを示す。

【図26】R11KE.WPRE（LV-TCR）（TCR）を含有するレンチウイルスベクター、またはPTE.CD8.TCR.WPRE（LV-CD8.TCR）（TCR+CD8）を含有するレンチウイルスベクターで形質導入され、高標的発現UACC257細胞との共培養がそれに続いた、グループ化ドナーから得られた、CD4-CD8 α T細胞におけるIFN- γ 陽性細胞の増加（上側パネル）およびIFN- γ MFIの増加（下側パネル）を非標的発現MCF7との共培養との比較で示す。非形質導入（NT）細胞が、対照として機能する（エフェクター対標的細胞比=2:1；グループ化ドナーN=4）。

30

【図27】LV-TCR（TCR）またはLV-CD8.TCR（TCR+CD8）で形質導入され、高標的発現UACC257細胞との共培養がそれに続いた、グループ化ドナーから得られたCD4-CD8 α +T細胞における、グランザイムB陽性細胞の増加%（上側パネル）およびグランザイムB MFIの増加（下側パネル）を非標的化発現MCF7との共培養と比較して示す。非形質導入（NT）細胞が、対照として機能する（エフェクター対標的細胞比=2:1；グループ化ドナーN=3）。

40

【図28】LV-CD8.TCR（TCR+CD8）または非含有形質導入（NT）で形質導入され、高標的化発現UACC257細胞との共培養がそれに続いた、グループ化ドナーから得られた、CD4+CD8 α +T細胞におけるIFN- γ 陽性細胞の増加%（上側パネル）およびIFN- γ MFIの増加（下側パネル）を非標的化発現MCF7との共培養と比較して示す（エフェクター対標的細胞比=2:1；グループ化ドナーN=4）。

【図29】LV-CD8.TCR（TCR+CD8）または非含有形質導入（NT）で形質導入され、高標的化発現UACC257細胞との共培養がそれに続いた、グループ化ドナーから得られた、CD4+CD8 α +T細胞におけるグランザイムB陽性細胞の増加%（上側パネル）およびグランザイムB MFIの増加（下側パネル）を非標的化発現MC

50

F 7 との共培養と比較して示す（エフェクター対標的細胞比＝2：1；グループ化ドナー N＝4）。

【図 30】LV-TCR（TCR）または LV-CD8・TCR（TCR+CD8）で形質導入され、高標的発現 UACC257 細胞との共培養がそれに続いた、グループ化ドナーから得られた CD3+T 細胞における、IFN- γ 陽性細胞の増加%（上側パネル）および IFN- γ MFI の増加（下側パネル）を非標的化発現 MCF7 との共培養と比較して示す。非形質導入（NT）細胞が、対照として機能する（エフェクター対標的細胞比＝2：1；グループ化ドナー N＝4）。

【図 31】LV-TCR（TCR）または LV-CD8・TCR（TCR+CD8）で形質導入され、高標的発現 UACC257 細胞との共培養がそれに続いた、グループ化ドナーから得られた CD3+T 細胞における、グランザイム B 陽性細胞の増加%（上側パネル）およびグランザイム B MFI の増加（下側パネル）を非標的化発現 MCF7 との共培養と比較して示す。非形質導入（NT）細胞が、対照として機能する（エフェクター対標的細胞比＝2：1；グループ化ドナー N＝3）。

【図 32】LV-TCR（TCR）または LV-CD8・TCR（TCR+CD8）で形質導入され、高標的発現 UACC257 細胞との共培養がそれに続いた、グループ化ドナーから得られた CD3+T 細胞における、IFN- γ 分泌の増加を非標的化発現 MCF7 との共培養と比較して示す。非形質導入（NT）細胞、UACC257 細胞、および MCF7 細胞が対照として機能する（エフェクター対標的細胞比＝2：1；グループ化ドナー N＝4）。

【図 33】LV-TCR（TCR）または LV-CD8・TCR（TCR+CD8）で形質導入され、高標的発現 UACC257 細胞との共培養がそれに続いた、個々のドナー 5、6、7、および 8 から得られた CD3+T 細胞における、IFN- γ 分泌の増加を非標的化発現 MCF7 との共培養と比較して示す。非形質導入（NT）細胞、UACC257 細胞単独、および MCF7 細胞単独が対照として機能する（エフェクター対標的細胞比＝2：1）。

【図 34】アトルバスタチン、プラバスタチン、またはロスバスタチンで処理された CD3+CD4+T 細胞における、CD25+細胞（上側パネル）、%CD69+細胞（中央パネル）、および%ヒト低密度リポタンパク質受容体（hLDLR）+細胞（下側パネル）を示す。予備活性化細胞、スタチンまたは DMSO なしで活性化された細胞（対照）、および DMSO が対照として機能する。

【図 35】アトルバスタチン、プラバスタチン、またはロスバスタチンで処理された CD3+CD8+T 細胞における、%CD25+細胞（上側パネル）、%CD69+細胞（中央パネル）、および%hLDLR+細胞（下側パネル）を示す。予備活性化細胞、スタチンまたは DMSO なしで活性化された細胞（対照）、および DMSO が対照として機能する。

【図 36】本開示の一実施形態によるレンチウイルスベクターの力価を示す。

【図 37】本開示の一実施形態による T 細胞の製造工程を示す。

【発明を実施するための形態】

【0050】

本明細書の用法では、「自己切断 2A ペプチド」という用語は、グリシンと最後のプロリンの間の正常なペプチド結合の形成を妨げて、次のコドンへのリボソームスキッピング、および Gly と Pro の間の新生ペプチド切断をもたらすことによって、共翻訳的に作用する比較的短いペプチド（起源のウイルス次第で 20 アミノ酸長程度）を指す。切断後、短い 2A ペプチドは「上流」タンパク質の C 末端に融合したままである一方で、プロリンは「下流」タンパク質の N 末端に付加される。自己切断 2A ペプチドは、ブタテッシュウウイルス-1（P2A）、ウマ鼻炎 A ウイルス（E2A）、トセア・アシグナ（Thos sea asigna）ウイルス（T2A）、口蹄疫ウイルス（F2A）、またはそれらの任意の組み合わせから選択されてもよい（例えば、Kim et al., PLOS One 6:e18556, 2011 を参照されたい；2A 核酸およびアミノ酸配列を含む

その内容は、それらの全体が参照により本明細書に援用される)。自己切断 2 A 配列の前にリンカー配列 (G S G または S G S G (配列番号 8)) を付加することによって、これは、例えば、T C R などの生物学的に活性なタンパク質の効率的な合成を可能にしてもよい。

【0051】

本明細書の用法では、「プロモーター」という用語は、遺伝子の転写を可能にする、遺伝子の一般に上流 (センス鎖の 5' 領域に向かって) に位置する DNA の調節領域を指す。プロモーターには、転写因子として知られるタンパク質によって認識される特定の DNA 配列と応答要素が含まれる。これらの因子はプロモーター配列に結合し、遺伝子のコード領域から RNA を合成する酵素である RNA ポリメラーゼを動員する。例えば、本明細書で使用されるプロモーター配列は、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK) プロモーター、ミエリン塩基性タンパク質 (MBP) プロモーター、グリア線維性酸性タンパク質 (GFAP) プロモーター、骨髄増殖性肉腫ウイルスエンハンサー (MNDU3) を含有する修飾 MoMuLV LTR、ユビキチン C プロモーター、EF-1 α プロモーター、またはマウス幹細胞ウイルス (MSCV) プロモーターから選択されてもよい。

【0052】

本明細書の用法では「構成的プロモーター」という用語には、ほとんどの細胞または組織でほとんどの場合に遺伝子の転写を誘導する調節配列が含まれてもよい。いくつかの非限定的実施形態では、構成的プロモーターは、MSCV プロモーター、ユビキチン C (Ubc) プロモーター、CMV プロモーター、EF-1 α プロモーター、PGK プロモーター、 β -アクチンプロモーター、および ROSA26 プロモーターからなる群から選択されてもよい。

【0053】

いくつかの実施形態では、プロモーターは、誘導性プロモーターであってもよい。誘導性プロモーターの活性は、シグナルに応答して増加または減少してもよい。例えば、誘導性プロモーターは、T 細胞活性化またはイソプロピル β -D-1-チオガラクトピラノシド (IPTG) などのシグナルの存在に応答して転写を促進してもよい。誘導性プロモーターは、リン酸などのシグナルの不在に応答して、転写を促進してもよい。これらのシナリオのいずれにおいても、転写の量は、シグナルの量またはその不足に比例しても比例しなくてもよい。原核生物宿主細胞に適した誘導性プロモーターの例としては、限定されることなく、NFAT、CD69、lac、tac、trc、trp、pho、recA、tetA、nar、ファージ PL、cspA、T7、および PBAD プロモーターが挙げられてもよい (その内容全体が参照により援用される、Terpe K. 2006 Appl. Microbiol. Biotechnol. 72:211 を参照されたい)。

【0054】

いくつかの実施形態では、誘導性プロモーターは、活性化された T 細胞の核因子 (NFAT) / AP1 転写応答エレメント (TRE) を含んでもよい。同族ペプチド / MHC1 複合体が認識されると、NFAT は核への Ca²⁺ 依存性転座を受けてもよく、そこで NFAT TRE を保有する遺伝子の転写を促進する。適切な NFAT TRE は当該技術分野で周知であり、ヒト IL2 プロモーター NFAT TRE などが挙げられる (Macian et al (2001) Oncogene, 2001 Apr. 30; 20 (19): 2476-89)。Zhang et al. ("Tumor-Infiltrating Lymphocytes Genetically Engineered with an Inducible Gene Encoding Interleukin-12 for the Immunotherapy of Metastatic Melanoma," Clin. Cancer Res. 21:2278-2288, 2015) は、臨床試験において、その発現が誘導性 NFAT プロモーターによって駆動される、一本鎖 IL12 を分泌するように遺伝子操作されたヒト腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) の使用について記載する。これらの引用文献の内容は、それらの全体が参照により援用される。

【0055】

いくつかの実施形態では、誘導性プロモーターは、例えば、その内容全体が参照により援用される、米国特許第5,759,805号で開示されるような、CD69プロモーターを含んでもよい。CD69は、活性化されたT細胞に誘導されるこれらの新たに合成された細胞表面活性化分子の中で、最初期のものの1つであってもよい。CD69発現は、T細胞刺激から60分間以内に観察され得るが、休止細胞では存在しなくてもよい。CD69発現はまた、胸腺細胞、B細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、および好中球上で誘導されてもよい。マウスCD69プロモーターの50kb上流内に位置するCNS1-4と称される4つの非コード領域は、T細胞およびB細胞における、CD69活性化の発生的および時間的制御に寄与してもよい。CNS2領域は、強力なエンハンサーとして機能してもよい。その内容全体が参照により援用される、Kulemzin et al. ("Design and analysis of stably integrated reporters for inducible transgene expression in human T cells and chimeric antigen receptor (CAR) NK cell lines," BMC Medical Genomics 2019, 12 (Suppl 2): 44, 88-95) は、初代T細胞の文脈で、活性化誘導性CD69プロモーター変異型が、最高の誘導倍率を提供することを記載する。したがって、このプロモーターを使用して、活性化されたヒトT細胞またはCAR T細胞でタンパク質を発現させ得るが、休眠状態のヒトT細胞またはCAR T細胞では発現させ得ない。

【0056】

いくつかの実施形態では、誘導性プロモーターは、IPTG-誘導性プロモーターであってもよい。IPTG誘導性プロモーターは、IPTGに応答する様式で、またはlacオペロンからの転写を促進することができる任意のその他の乳糖誘導体（例えば、アロラクトース）に応答する様式で、転写を促進する任意のポリヌクレオチド配列を指してもよい。限定されることなく、tac（例えば、tacI、tacIIなど）プロモーター、lacプロモーター、およびそれらの誘導体（例えば、lacUV5、tac lacなど）をはじめとする、IPTG誘導性プロモーターの多くの例が、当該技術分野で公知である。

【0057】

一態様では、CD8α鎖、CD8β鎖、TCRα鎖、およびTCRβ鎖をコード化する配列を含有する、例えば、レンチウイルスベクターなどの4-in-1ウイルスベクターの発現は、構成的または誘導性プロモーターによって駆動されてもよい。例えば、図5Aは、例えば、TCR R11KEα鎖（配列番号13）およびR11KEβ鎖（配列番号14）などのTCRをコード化する配列から上流に位置する、CD8α（配列番号12）およびCD8β（配列番号13）をコード化するコドン最適化配列を有し、構成的MSCVプロモーター（配列番号1）によって駆動される、PTE CD8 TCR WPRE（配列番号94）を含有する、4-in-1ウイルスベクターを示す。上記と同じコード配列はまた、例えば、NFAT、CD69、またはIPTGプロモーターなどの誘導性プロモーターによっても駆動され得る。

【0058】

別の態様では、融合タンパク質、TCRα鎖、およびTCRβ鎖をコード化する配列を含有する3-in-1ウイルスベクターの発現は、構成的または誘導性プロモーターによって駆動されてもよい。例えば、図5Bは、融合タンパク質をコード化するコドン最適化配列を有する、CD8aCD4Fusion.TCR WPRE（配列番号256）を含有するウイルスベクターを示し、その中ではCD8α細胞外ドメインは、CD4膜貫通ドメインおよびCD4細胞内ドメインと融合し、TCR R11KEα鎖（配列番号13）およびR11KEβ鎖（配列番号14）をコード化する配列は、MSCVプロモーター（配列番号1）によって駆動される。図5Cは、融合タンパク質をコード化するコドン最適化配列を有する、CD8bCD4Fusion.TCR WPRE（配列番号257）を

含有するウイルスベクターを示し、その中ではCD8β細胞外ドメインは、CD4膜貫通ドメインおよびCD4細胞内ドメインと融合し、TCR R11KEα鎖（配列番号13）およびR11KEβ鎖（配列番号14）をコード化する配列は、MSCVプロモーター（配列番号1）によって駆動される。図5Dは、融合タンパク質をコード化する配列を有するCD8bCD8aFusion.TCR.WPRE（配列番号258）を含有するウイルスベクターを示し、その中ではCD8β細胞外ドメインは、CD8α膜貫通ドメインおよびCD8α細胞内ドメインと融合し、TCR R11KEα鎖（配列番号13）およびR11KEβ鎖（配列番号14）をコード化する配列は、MSCVプロモーター（配列番号1）によって駆動される。上記と同じコード配列はまた、例えば、NFAT、CD69、またはIPTGプロモーターなどの誘導性プロモーターによっても駆動され得る。

10

【0059】

一態様では、本開示の4-in-1ウイルスベクターの発現は、双方向性の構成的および／または誘導性プロモーターによって駆動されてもよい。例えば、図6Aは、TCR R11KEα鎖およびR11KEβ鎖をコード化する配列から上流に位置する、CD8α鎖およびCD8β鎖をコード化するコドン最適化された配列を有する、PGK.CD8.EF1a.TCR（配列番号259）を含有する4-in-1ウイルスベクターを示し、その中ではCD8α鎖およびCD8β鎖をコード化する配列、およびTCR R11KEα鎖およびR11KEβ鎖をコード化する配列は、例えば、PGKプロモーターおよびEF-1αプロモーターなどの双方向性プロモーターによって隔てられてもよい。PGKプロモーターは、CD8α鎖およびCD8β鎖をコード化するコドン最適化された配列の3'末端に配置して、CD8α鎖およびCD8β鎖の発現を駆動してもよい。EF-1αプロモーターは、TCR R11KEα鎖およびR11KEβ鎖をコード化する配列の5'末端に配置されて、TC R11KEα鎖およびR11KEβ鎖の発現を駆動してもよい。

20

【0060】

図6Bは、CD8α鎖およびCD8β鎖をコード化するコドン最適化された配列から上流に位置するTCR R11KEα鎖およびR11KEβ鎖をコード化する配列を有する、PGK.TCR.EF1a.CD8（配列番号260）を含有する別の4-in-1ウイルスベクターを示し、その中ではTCR R11KEα鎖およびR11KEβ鎖をコード化する配列、およびCD8α鎖およびCD8β鎖をコード化する配列は、例えば、PGKプロモーターおよびEF-1αプロモーターなどの双方向性プロモーターによって隔てられてもよい。PGKプロモーターは、TCR R11KEα鎖およびR11KEβ鎖をコード化する配列の3'末端に配置されて、TC R11KEα鎖およびR11KEβ鎖の発現を駆動してもよい。EF-1αプロモーターは、CD8α鎖およびCD8β鎖をコード化するコドン最適化された配列の5'末端に配置して、CD8α鎖およびCD8β鎖の発現を駆動してもよい。

30

【0061】

本開示のいくつかの実施形態は、TCRα鎖およびTCRβ鎖をコード化する配列、およびサイトカイン（、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、およびIL-21をはじめとするが、これらに限定されるものではない）、IL-15／IL-15受容体（IL-15R）融合タンパク質、ドミナントネガティブTGFβ受容体（DN TGFbRII）、および／または形質転換成長因子β受容体の細胞外ドメインなどのその他のタンパク質をコード化する配列を含有する、ウイルスベクターを含んでもよい。いくつかの実施形態では、これらのコード配列は、プロモーターまたは双方向性プロモーターによって駆動されてもよい。

40

【0062】

図7は、サイトカインをコード化する配列から上流に位置するTCRα鎖およびTCRβ鎖をコード化する配列を含有するウイルスベクターを示し、その中ではTCRα鎖およびTCRβ鎖をコード化する配列、およびサイトカインをコード化する配列は、双方向性プロモーターによって隔てられてもよい。双方向性プロモーターは、5'から3'方向に、構成的－構成的、構成的－誘導性、誘導性－構成的、または誘導性－誘導性の方向に配

50

置されてもよい。例えば、例えば、M S C V、P G K、またはE F 1 αプロモーターなどの構成的プロモーターは、T C R α鎖およびT C R β鎖をコード化する配列の3'末端に配置されて、T C R α鎖およびT C R β鎖の発現を駆動してもよい。例えば、N F A T、C D 6 9、またはI P T Gプロモーターなどの誘導性プロモーターは、サイトカインをコード化する配列の5'末端に配置されて、サイトカインの発現を駆動してもよい。図8 Aは、図7に示されるウイルスベクターにおいて、例えば、I L-1 2 α (p 3 5) / I L-1 2 β (p 4 0) 融合タンパク質 (配列番号2 6 1) などのI L-1 2をコード化する配列の5'末端に配置されて、1 2 α (p 3 5) / I L-1 2 β (p 4 0) 融合タンパク質の発現を駆動する、最小I L-2プロモーターを有する誘導性N F A Tプロモーターを示す。図8 Bは、図7に示されるウイルスベクターにおいて、例えば、I L-1 2 α (p 3 5) / I L-1 2 β (p 4 0) 融合タンパク質 (配列番号2 6 2) などのI L-1 2をコード化する配列の5'末端に配置されて、1 2 α (p 3 5) / I L-1 2 β (p 4 0) 融合タンパク質の発現を駆動する、C N S 1およびC N S 2エンハンサーエレメントを有する誘導性C D 6 9プロモーターを示す。図8 Cは、図7に示されるウイルスベクターにおいて、例えば、I L-1 8変異型1 (配列番号2 6 3) などのI L-1 8をコード化する配列の5'末端に配置されて、I L-1 8変異型1の発現を駆動する、最小I L-2プロモーターを有する誘導性N F A Tプロモーターを示す。図8 Cは、図7に示されるウイルスベクターにおいて、例えば、I L-1 8変異型1 (配列番号2 6 4) などのI L-1 8をコード化する配列の5'末端に配置されて、I L-1 8変異型1の発現を駆動する、C N S 1およびC N S 2エンハンサーエレメントを有する誘導性C D 6 9プロモーターを示す。

【0063】

一態様では、本開示は、C D 8 β-C D 8 α-T C R β-T C R αの5'末端から3'末端方向の配向を有する4-i n-1コンストラクトを提供する。別の態様では、本開示は、C D 8 β-C D 8 α-T C R α-T C R βの5'末端から3'末端方向の配向を有する4-i n-1コンストラクトを提供する。別の態様では、本開示は、C D 8 α-C D 8 β-T C R β-T C R αの5'末端から3'末端方向の配向を有する4-i n-1コンストラクトを提供する。別の態様では、本開示は、C D 8 α-C D 8 β-T C R α-T C R βの5'末端から3'末端方向の配向を有する4-i n-1コンストラクトを提供する。

【0064】

一態様では、本開示は、T C R β-T C R α-C D 8 α-C D 8 βを含まない5'末端から3'末端の配向を有する、4-i n-1コンストラクトを提供する。別の態様では、本開示は、T C R β-T C R α-C D 8 β-C D 8 αを含まない5'末端から3'末端の配向を有する、4-i n-1コンストラクトを提供する。別の態様では、本開示は、T C R α-T C R β-C D 8 α-C D 8 βを含まない5'末端から3'末端の配向を有する、4-i n-1コンストラクトを提供する。別の態様では、本開示は、T C R α-T C R β-C D 8 β-C D 8 αを含まない5'末端から3'末端の配向を有する、4-i n-1コンストラクトを提供する。

【0065】

一態様では、本開示は、C D 8 β-C D 8 α-T C R β-T C R αの5'末端から3'末端方向の配向を有する4-i n-1コンストラクトを提供する。非限定的な一態様では、本開示は、T C R β-T C R α-C D 8 α-C D 8 βを含まない5'末端から3'末端の配向を有する、4-i n-1コンストラクトを提供する。

【0066】

いくつかの実施形態では、本開示のウイルスベクターは、T C R α鎖およびT C R β鎖をコード化する配列と、例えば、ドミナントネガティブT G F β受容体 (D N T G F b R I I) などのT G F β阻害剤と、および／または形質転換成長因子β受容体の細胞外ドメインをコード化する配列とを含有してもよい。図9 Aは、D N T G F b R I I、をコード化する配列から上流に位置するT C R α鎖およびT C R β鎖をコード化する配列を含有するウイルスベクターを示し、その中ではT C R α鎖およびT C R β鎖をコード化する配列、およびD N T G F b R I Iをコード化する配列は、双方向性プロモーター

によって隔てられてもよい。例えば、図9Aは、TCR α 鎖およびTCR β 鎖をコード化する配列の3'末端に配置されて、TCR α 鎖およびTCR β 鎖の発現を駆動してもよい、例えば、MSCV、Ubc、CMV、EF-1 α 、およびPGKプロモーターなどの構成的プロモーターを示し；別の構成的プロモーターは、DN TGF β RIIをコード化する配列の5'末端に配置されて、DN TGF β RIIの発現を駆動してもよい。

【0067】

代案としては、図9Bは、TCR α 鎖およびTCR β 鎖をコード化する配列から上流に位置して、DN TGF β RII、TCR α 鎖、およびTCR β 鎖の発現を駆動する、DN TGF β RIIをコード化する配列の5'末端に配置された、例えば、MSCV、Ubc、CMV、EF-1 α 、およびPGKプロモーターなどの構成的プロモーターを含有するウ

10

【0068】

本明細書の用法では、「シストロン」という用語は、1つのポリペプチド鎖の形成を指定する、すなわち1つのポリペプチド鎖をコード化するDNA分子の一部分を指す。例えば、「バイシストロン」は、2つのポリペプチド鎖の形成を特定する、すなわち2つのポリペプチド鎖をコード化するDNA分子の2つのセクションを指す；「トリシストロン」は、3つのポリペプチド鎖の形成を特定する、すなわち3つのポリペプチド鎖をコード化するDNA分子の3つのセクションを指す。

【0069】

本明細書の用法では、「マルチシストロン性RNA」または「マルチシストロン性RNA」という用語は、いくつかのタンパク質に翻訳するための遺伝情報を含むRNAを指す。対照的に、単シストロン性RNAは、単一タンパク質のみを変換するための遺伝情報を含む。本開示の文脈で、実施例2~4においてレンチウイルスから転写されたマルチシストロン性RNAは、4つのタンパク質（4-in-1）：TCR α 鎖、TCR β 鎖、CD8 α 鎖、およびCD8 β 鎖に翻訳されてもよく；または2つのタンパク質（2-in-1）：TCR α 鎖とTCR β 鎖またはCD8 α 鎖とCD8 β 鎖に翻訳されてもよい。

20

【0070】

本明細書の用法では、「タンデムに配置される」という用語は、核酸配列上の1つのファイル中で遺伝子が隣接し、一方が他方に続き、または後ろに配置されていることを指す。遺伝子は、核酸配列上で隣接してライゲートされ、各遺伝子のコード鎖（センス鎖）は、核酸配列上で一緒にライゲートされている。

30

【0071】

本明細書の用法では、「センス鎖」という用語は、タンパク質に翻訳されるまたは翻訳可能な遺伝子のDNA鎖を指す。遺伝子が核酸配列のプロモーターに対して「センス方向」に配向している場合、「センス鎖」はプロモーターの5'末端に位置し、ここで、タンパク質をコード化する核酸の最初のコドンはプロモーターの近位にあり、最後のコドンはプロモーターから遠位にある。

【0072】

本明細書の用法では、「ウイルスベクター」という用語は、ウイルス起源の少なくとも1つの要素を含み、ウイルスベクター粒子にパッケージ化される能力を有し、少なくとも外因性核酸をコード化する、核酸ベクターコンストラクトを指す。ベクターおよび／または粒子は、生体外または生体内のどちらかで、任意の核酸を細胞に移し入れる目的で利用され得る。多数の形態のウイルスベクターが、当該技術分野で公知である。「ビリオン」という用語は、単一の感染性ウイルス粒子を指すために使用される。「ウイルスベクター」、「ウイルスベクター粒子」、および「ウイルス粒子」はまた、細胞の外側に存在するように、そのDNAまたはRNAコアおよびタンパク質コートを有する完全なウイルス粒子を指す。例えば、ウイルスベクターは、アデノウイルス、ポックスウイルス、アルファウイルス、アレナウイルス、ラブドウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、ヘルペスウイルス、パラミクソウイルス、またはピコルナウイルスから選択されてもよい。

40

50

【0073】

「T細胞」または「Tリンパ球」という用語は技術分野で認識されており、胸腺細胞、ナイーブTリンパ球、未成熟Tリンパ球、成熟Tリンパ球、休止Tリンパ球、または活性化Tリンパ球を含むことが意図される。特定の実施形態で使用するのに適した例示的なT細胞集団としては、ヘルパーT細胞（HTL；CD4＋T細胞）、細胞傷害性T細胞（CTL；CD8＋T細胞）、CD4＋CD8＋T細胞、CD4－CD8－T細胞、ナチュラルキラーT細胞、 $\alpha\beta$ TCRを発現するT細胞（ $\alpha\beta$ T細胞）、 $\gamma\delta$ TCを発現するT細胞R（ $\gamma\delta$ T細胞）、または任意のその他のT細胞サブセットが挙げられるが、これらに限定されるものではない。特定の実施形態で使用するのに適したその他の例示的なT細胞集団としては、マーカー：CD3、CD4、CD8、CD27、CD28、CD45RA、CD45RO、CD62L、CD127、CD197、およびHLA-DRの1つまたは複数を発現するT細胞が挙げられるが、これらに限定されず、所望ならば、正または負の選択技術によってさらに単離され得る。

10

【0074】

「スタチン」、「バスタチン」、または本明細書で同義的に使用される「3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル補酵素A（HMG-CoA）レダクターゼ阻害剤」という用語は、酵素3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル補酵素A（HMG-CoA）レダクターゼを阻害する医薬品を指す。この酵素は、HMG-CoAのメバロン酸への変換に関与しており、これはコレステロール生合成のステップの1つである。このような阻害は、当業者に周知の標準的なアッセイに従って容易に判定される。

20

【0075】

本開示に従って使用されてもよい好ましいスタチンとしては、米国特許第4,681,893号明細書で開示されたアトルバスタチン；米国特許第5,273,995号明細書で開示されたアトルバスタチンカルシウム；；米国特許第5,502,199号明細書で開示されたセリバスタチン；米国特許第5,316,765号明細書で開示されたダルバスタチン；米国特許第4,915,954号明細書で開示されたフルインドスタチン；米国特許第4,739,073号明細書で開示されたフルバスタチン；米国特許第4,231,938号明細書で開示されたロバスタチン；米国特許第3,983,140号明細書で開示されたメバスタチン；米国特許第4,346,227号明細書で開示されたプラバスタチン；米国特許第4,444,784号明細書で開示されたシムバスタチン；米国特許第4,448,784号明細書および米国特許第4,450,171号明細書で開示されたベロスタチン；および米国特許第6,858,618号明細書および米国特許第7,511,140号明細書で開示されたロスバスタチンが挙げられる。これらの各参考文献の内容は、それらの全体が参照により本明細書に援用される。代表的な3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル補酵素Aレダクターゼ阻害剤としては、アトルバスタチン、Lipitor（登録商標）としても知られているアトルバスタチンカルシウム、Mevacor（登録商標）としても知られているロバスタチン、Pravachol（登録商標）としても知られているプラバスタチン、Zocor（登録商標）としても知られているシムバスタチン、およびロスバスタチンが挙げられてもよい。

30

【0076】

一態様では、本開示は、導入遺伝子発現に使用されてもよい、例えば、腫瘍浸潤リンパ球、CD8＋T細胞、CD4＋T細胞、および $\gamma\delta$ T細胞などのT細胞の活性化、形質導入、および／または増殖に関する。別の態様では、本開示は、 α -および／または β -TCR陽性細胞を枯渇させる一方で、 $\gamma\delta$ T細胞活性化、形質導入、および増殖させることに関する。

40

【0077】

一態様では、 $\gamma\delta$ T細胞は、生体外で培養された複合サンプルから単離されてもよい。別の態様では、PBMC集団全体は、単球、 $\alpha\beta$ T細胞、B細胞、およびNK細胞などの特定の細胞集団の事前の枯渇なしに、活性化および増殖され得る。別の態様では、富化された $\gamma\delta$ T細胞集団は、それらの特定の活性化および増殖に先立って生成され得る。別の

50

態様では、 $\gamma\delta$ T細胞の活性化および増殖は、ナイーブまたは操作されたAPCの存在なしに実施されてもよい。その他の態様では、腫瘍標本からの $\gamma\delta$ T細胞の単離および増殖は、 $\gamma\delta$ TCRに特異的な抗体をはじめとする固定化 $\gamma\delta$ T細胞マイトジェン、およびレクチンをはじめとするその他の $\gamma\delta$ TCR活性化剤を使用して実施され得る。別の態様では、腫瘍標本からの $\gamma\delta$ T細胞の単離および増殖は、 $\gamma\delta$ TCRに特異的な抗体をはじめとする固定化 $\gamma\delta$ T細胞マイトジェン、およびレクチンをはじめとするその他の $\gamma\delta$ TCR活性化剤の非存在下で実施され得る。

【0078】

一態様では、 $\gamma\delta$ T細胞は、例えば、ヒト対象などの対象の白血球アフェレーシスから単離される。別の態様では、 $\gamma\delta$ T細胞は、末梢血単核細胞(PBMC)から単離されない。

10

【0079】

一態様では、単離された $\gamma\delta$ T細胞は、1つまたは複数の抗原との接触に応答して急速に増殖し得る。 $V\gamma 9V\delta 2$ +T細胞などのいくつかの $\gamma\delta$ T細胞は、組織培養中に、プレニルピロリン酸塩、アルキルアミン、および代謝産物または微生物抽出物のようないくつかの抗原との接触に応答して生体外で急速に増殖し得る。刺激された $\gamma\delta$ T細胞は、複合サンプルからの $\gamma\delta$ T細胞の単離を容易にし得る、多数の抗原提示、刺共激、および接着分子を示し得る。複合サンプル内の $\gamma\delta$ T細胞は、1日間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、または別の適当な期間にわたり、少なくとも1つの抗原によって生体外で刺激され得る。適切な抗原による $\gamma\delta$ T細胞の刺激は、生体外で $\gamma\delta$ T細胞集団を増殖させ得る。

20

【0080】

生体外における複合体試料からの $\gamma\delta$ T細胞の増殖を刺激するために使用されてもよい抗原の非限定的な例としては、イソペンテニルピロリン酸(IPP)などのプレニルピロリン酸塩、アルキルアミン、ヒト微生物病原体の代謝産物、常在細菌の代謝産物、メチル-3-ブテニル-1-ピロリン酸(2M3B1PP)、(E)-4-ヒドロキシ-3-メチル-ブト-2-エニルピロリン酸(HMB-PP)、エチルピロリン酸(EPF)、ピロリン酸ファルネシル(FPP)、ジメチルアリルリン酸塩(DMAP)、ピロリン酸ジメチルアリル(DMAPP)、エチル-アデノシン三リン酸(EPPPA)、ピロリン酸ゲラニル(GPP)、ゲラニルゲラニルピロリン酸(GGPP)、イソペンテニル-アデノシン三リン酸(IPPFA)、モノエチルリン酸(MEP)、モノエチルピロリン酸(MEPP)、3-ホルミル-1-ブチル-ピロリン酸(TUBAg1)、X-ピロリン酸(TUBAg2)、3-ホルミル-1-ブチル-ウリジン三リン酸(TUBAg3)、3-ホルミル-1-ブチル-デオキシチミジン三リン酸(TUBAg4)、モノエチルアルキルアミン、アリルピロリン酸、クロトイルピロリン酸、ジメチルアリル- γ -ウリジン三リン酸、クロトイル- γ -ウリジン三リン酸、アリル- γ -ウリジン三リン酸、エチルアミン、イソブチルアミン、sec-ブチルアミン、イソ-アミルアミン、および窒素含有ビスホスホネートが挙げられてもよい。

30

【0081】

$\gamma\delta$ T細胞の活性化および増殖は、本明細書に記載の活性化剤および共刺激剤を使用して実施され、特定の $\gamma\delta$ T細胞増殖および持続集団を始動し得る。一態様では、異なる培養からの $\gamma\delta$ T細胞の活性化および増殖は、異なるクローナル集団サブセットまたは混合ポリクローナル集団サブセットを達成し得る。別の態様では、異なる作動薬を使用して、特定の $\gamma\delta$ 活性化シグナルを提供する作用物質が同定され得る。別の態様では、特定の $\gamma\delta$ 活性化シグナルを提供する作用物質は、 $\gamma\delta$ TCRに対する異なるモノクローナル抗体(MAb)であり得る。別の態様では、細胞エネルギーおよびアポトーシスの誘導なしに、特定の $\gamma\delta$ T細胞増殖を始動させるのを助ける、コンパニオン共刺激剤が使用され得る。これらの共刺激剤としては、NKG2D、CD161、CD70、JAML、DNAX副分子-1(DNAM-1)、ICOS、CD27、CD137、CD30、HVEM、SLAM、CD122、DAP、およびCD28などの $\gamma\delta$ 細胞上で発現される受容体に

40

50

結合するリガンドが挙げら得る。別の態様では、共刺激剤は、CD 2 および CD 3 分子上の独特のエピトープに特異的な抗体であり得る。CD 2 および CD 3 は、 $\alpha\beta$ または $\gamma\delta$ T 細胞上で発現されたときに、異なる立体構造を有し得る。別の態様では、CD 3 および CD 2 に対する特異的な抗体は、 $\gamma\delta$ T 細胞の明瞭な活性化をもたらし得る。

【0082】

$\gamma\delta$ T 細胞の操作に先立って、 $\gamma\delta$ T 細胞の集団が生体外で増殖されてもよい。生体外における $\gamma\delta$ T 細胞集団の増殖を促進するのに使用され得る試薬の非限定的例としては、抗 CD 3 または抗 CD 2、抗 CD 27、抗 CD 30、抗 CD 70、抗 OX 40 抗体；IL-2、IL-15、IL-12、IL-9、IL-33、IL-18、または IL-21、CD 70 (CD 27 リガンド)、フィトヘマグルチニン (PHA)、コンカバリン A (Con A)、ヨウシュヤマゴボウ (PWM)、タンパク質落花生凝集素 (PNA)、大豆凝集素 (SBA)、レンズマメ (*Lens culinaris*) 凝集素 (LCA)、エンドウマメ (*Pisum sativum*) 凝集素 (PSA)、リンゴマイマイ (*Helix pomatia*) 凝集素 (HPA)、ビシア・グラミネア (*Vicia graminea*) レクチン (VGA)、または T 細胞増殖を刺激できる別の適切なマイトジェンが挙げられてもよい。

【0083】

広域スペクトルの抗原を認識する $\gamma\delta$ T 細胞の能力は、 $\gamma\delta$ T 細胞の遺伝子操作によって増強され得る。一態様では、 $\gamma\delta$ T 細胞は操作され、生体内で選択された抗原を認識する普遍的な同種異系療法が提供され得る。 $\gamma\delta$ T 細胞の遺伝子操作は、抗原結合および T 細胞活性化機能の双方を単一受容体に組み合わせる、 $\alpha\beta$ TCR、 $\gamma\delta$ TCR、キメラ抗原受容体 (CAR) などの腫瘍認識部分を発現するコンストラクト、その抗原結合断片、またはリンパ球活性化ドメインを、単離 $\gamma\delta$ T 細胞、サイトカイン (例えば、IL-15、IL-12、IL-2、IL-7、IL-21、IL-18、IL-19、IL-33、IL-4、IL-9、IL-23、または IL-1 β) のゲノムに安定的に組み込んで、T 細胞の増殖、生存期間、および機能を生体外および生体内で増強することを含んでもよい。単離された $\gamma\delta$ T 細胞の遺伝子操作はまた、例えば、MHC 遺伝子座などの単離された $\gamma\delta$ T 細胞のゲノム中の 1 つまたは複数の内因性遺伝子からの遺伝子発現を欠失させ、または破壊することを含んでもよい。

【0084】

操作された $\gamma\delta$ T 細胞は、様々な方法によって作製されてもよい。例えば、腫瘍認識部分、または別のタイプの認識部分を含んでなる、発現カセットをコード化するポリヌクレオチドは、トランスポゾン／トランスポザーゼシステム；またはレンチウイルスまたはレトロウイルスシステムなどのウイルスベースの遺伝子移入システム；または形質移入、電気穿孔、形質導入、リポフェクション、リン酸カルシウム (CaPO₄)、オルモシルなどのナノ工学物質などの別の適切な方法；アデノウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノ随伴ウイルスをはじめとするウイルス送達方法、または別の適切な方法によって、 $\gamma\delta$ T 細胞に安定に導入され得る。ヒト遺伝子治療には、その内容全体が本明細書に援用される、国際公開第 1993020221 号パンフレットに記載される方法などのいくつかのウイルス法が用いられている。 $\gamma\delta$ T 細胞を操作するために用られ得るウイルス法の非限定的例としては、 γ レトロウイルス法、アデノウイルス法、レンチウイルス法、単純ヘルペスウイルス法、ワクシニアウイルス法、ポックスウイルス法、またはアデノウイルス関連ウイルス法が挙げられてもよい。

【0085】

一態様では、本明細書に記載のコンストラクトおよびベクターは、その内容全体が参照により援用される、2018 年 11 月 26 日に出願された米国特許第 16/200,308 号明細書に記載の方法論で使用される。

【0086】

一態様では、ウイルスとは、天然に存在するウイルスならびに人工ウイルスを指す。本開示のいくつかの実施形態によるウイルスは、エンベロープウイルスまたは非エンベロー

10

20

30

40

50

プウイルスのどちらであってもよい。パルボウイルス（AAVなど）は、非エンベロープウイルスの例である。好ましい実施形態では、ウイルスは、エンベロープウイルスであってもよい。好ましい実施形態では、ウイルスは、レトロウイルス、特にレンチウイルスであってもよい。真核細胞のウイルス感染を促進し得るウイルス外被タンパク質は、水疱性口内炎ウイルス（VSV-G）、改変ネコ内在性レトロウイルス（RD114TR）（配列番号97）、および修飾テナガザル白血病ウイルス（GALVTR）からのエンベロープ糖タンパク質（GP）で偽型化されたHIV-1由来レンチウイルスベクター（LV）を含んでもよい。これらのエンベロープタンパク質は、アデノ随伴ウイルス（AAV）をはじめとするパルボウイルスなどのその他のウイルスの侵入を効率的に促進し得て、それによってそれらの広範な効率を実証する。例えば、モロニー Maus 白血病ウイルス（MLV）4070 env（その内容が参照により本明細書に援用される、Merten et al., J. Virol. 79: 834-840, 2005に記載されているような）、RD114 env、キメラエンベロープタンパク質RD114proまたはRDpro（RD114のRペプチド切断配列をHIV-1マトリックス／カプシド（MA／CA）切断配列で置換することによって構築されたRD114-HIVキメラ、その内容が参照により本明細書に援用される、Bell et al. Experimental Biology and Medicine 2010; 235: 1269-1276に記載されているような）バキュロウイルスGP64 env（その内容が参照により本明細書に援用される、Wang et al. J. Virol. 81: 10869-10878, 2007に記載されているような）、またはGALV env（その内容が参照により本明細書に援用される、Merten et al., J. Virol. 79: 834-840, 2005に記載されているような）またはそれらの誘導体をはじめとする、その他のウイルスエンベロープタンパク質が使用されてもよい。

【0087】

本開示の実施形態は、単一レンチウイルスカセットを使用して単一レンチウイルスベクターを作製し、単一マルチストロン性mRNAから2つの異なる二量体の少なくとも4つの個別のモノマータンパク質を発現させ、細胞表面上に二量体を同時発現させ得るという発見に基づいている。例えば、レンチウイルスベクターの単一コピーの組み込みは、 $\gamma\delta$ T細胞を形質転換してTCR $\alpha\beta$ とCD8 $\alpha\beta$ を同時発現させるのに十分であった。

【0088】

一態様では、本開示は、1を超える、2つを超える、3つを超える、4つを超える遺伝子、5つを超える遺伝子、または6つを超える遺伝子を発現することができる、単一のベクター内にマルチストロン性カセットを含有するベクターに関し、その中ではこれらの遺伝子によってコード化されたポリペプチドが、相互に作用するか、または二量体を形成してもよい。二量体は、ホモ二量体、すなわち、二量体を形成する2つの同一のタンパク質であっても、またはヘテロ二量体、すなわち、二量体を形成する2つの構造的に異なるタンパク質であってもよい。

【0089】

一態様では、レンチウイルスベクターは、タンパク質Z1をコード化する第1のヌクレオチド配列S1、タンパク質Z2をコード化する第2のヌクレオチド配列S2、タンパク質Y1をコード化する第3のヌクレオチド配列S3、およびタンパク質Y2をコード化する第4のヌクレオチド配列S4を含有してもよく、その中ではZ1とZ2が第1の二量体を形成し、Y1とY2が第2の二量体を形成し、その中では第1の二量体Z1Z2が、第2の二量体Y1Y2とは異なる。

【0090】

一態様では、第1のレンチウイルスベクターは、二量体Z1Z2をコード化するバイシストロン性カセット（2-in-1）を含有してもよく、第2のレンチウイルスベクターは、二量体Y1Y2をコード化するバイシストロン性カセット（2-in-1）を含有してもよい。2-in-1ベクター中では、S1とS2は、S1-S2またはS2-S1の5'から3'の方向にタンデムに配置されてもよい。同様に、2-in-1ベクター中では

、S 3とS 4は、S 3－S 4またはS 4－S 3の5'から3'の方向にタンデムに配置されてもよい。Z 1とZ 2またはY 1とY 2は、1つまたは複数の自己切断2 Aペプチドによって隔てられてもよい。

【0091】

別の態様では、単一レンチウイルスベクター（4－in－1）は、別個の二量体Z 1 Z 2およびY 1 Y 2の双方をコード化してもよく、その中ではZ 1、Z 2、Y 1、およびY 2は、1つまたは複数の自己切断2 Aペプチドによって隔てられてもよい。例えば、S 1－S 2－S 3－S 4、S 1－S 2－S 4－S 3、S 1－S 3－S 2－S 4、S 1－S 3－S 4－S 2、S 1－S 4－S 3－S 2、S 1－S 4－S 2－S 3、S 2－S 1－S 3－S 4、S 2－S 1－S 4－S 3、S 2－S 3－S 1－S 4、S 2－S 3－S 4－S 1、S 2－S 4－S 3－S 1、S 2－S 4－S 1－S 3、S 3－S 1－S 2－S 4、S 3－S 1－S 4－S 2、S 3－S 2－S 1－S 4、S 3－S 2－S 4－S 1、S 3－S 4－S 1－S 2、S 3－S 4－S 2－S 1、S 4－S 1－S 2－S 3、S 4－S 1－S 3－S 2、S 4－S 2－S 1－S 3、S 4－S 2－S 3－S 1、S 4－S 3－S 1－S 2、またはS 4－S 3－S 2－S 1から選択される、5'から3'方向でタンデムに配列されたS 1、S 2、S 3、およびS 4であってもよい。

【0092】

一態様では、二量体Z 1 Z 2は、TCR α 鎖およびTCR β 鎖を有するTCRであってもよい。

【0093】

一態様では、本明細書に記載されるコンストラクト、方法、および実施形態と共に使用できるTCRおよび抗原結合タンパク質としては、例えば、表2に記載されるもの（配列番号13～90）、および米国特許出願公開第20170267738号明細書、米国特許出願公開第20170312350号明細書、米国特許出願公開第20180051080号明細書、米国特許出願公開第20180164315号明細書、米国特許出願公開第20180161396号明細書、米国特許出願公開第20180162922号明細書、米国特許出願公開第20180273602号明細書、米国特許出願公開第20190016801号明細書、米国特許出願公開第20190002556号明細書、米国特許出願公開第20190135914号明細書、米国特許第10,538,573号明細書、米国特許第10,626,160号明細書、米国特許出願公開第20190321478号明細書、米国特許出願公開第20190256572号明細書、米国特許第10,550,182号明細書、米国特許第10,526,407号明細書、米国特許出願公開第20190284276号明細書、米国特許出願公開第20190016802号明細書、および米国特許第10,583,573号明細書に記載されるTCRおよび抗原結合タンパク質が挙げられ、これらの各出版物の内容およびその中に記載されている配列リストは、それらの全体が参照により本明細書に援用される。

【0094】

別の態様では、二量体Z 1 Z 2は、R 11K E A（配列番号13および14）、R 20P 1H 7（配列番号15および16）、R 7P 1D 5（配列番号17および18）、R 10P 2G 12（配列番号19および20）、R 10P 1A 7（配列番号21および22）、R 4P 1D 10（配列番号23および24）、R 4P 3F 9（配列番号25および26）、R 4P 3H 3（配列番号27および28）、R 36P 3F 9（配列番号29および30）、R 52P 2G 11（配列番号31および32）、R 53P 2A 9（配列番号33および34）、R 26P 1A 9（配列番号35および36）、R 26P 2A 6（配列番号37および38）、R 26P 3H 1（配列番号39および40）、R 35P 3A 4（配列番号41および42）、R 37P 1C 9（配列番号43および44）、R 37P 1H 1（配列番号45および46）、R 42P 3A 9（配列番号47および48）、R 43P 3F 2（配列番号49および50）、R 43P 3G 5（配列番号51および52）、R 59P 2E 7（配列番号53および54）、R 11P 3D 3（配列番号55および56）、R 16P 1C 10（配列番号57および58）、R 16P 1E 8（配列番号59および60）、

R 1 7 P 1 A 9（配列番号 6 1 および 6 2）、R 1 7 P 1 D 7（配列番号 6 3 および 6 4）、R 1 7 P 1 G 3（配列番号 6 5 および 6 6）、R 1 7 P 2 B 6（配列番号 6 7 および 6 8）、R 1 1 P 3 D 3 K E（配列番号 6 9 および 7 0）、R 3 9 P 1 C 1 2（配列番号 7 1 および 7 2）、R 3 9 P 1 F 5（配列番号 7 3 および 7 4）、R 4 0 P 1 C 2（配列番号 7 5 および 7 6）、R 4 1 P 3 E 6（配列番号 7 7 および 7 8）、R 4 3 P 3 G 4（配列番号 7 9 および 8 0）、R 4 4 P 3 B 3（配列番号 8 1 および 8 2）、R 4 4 P 3 E 7（配列番号 8 3 および 8 4）、R 4 9 P 2 B 7（配列番号 8 5 および 8 6）、R 5 5 P 1 G 7（配列番号 8 7 および 8 8）、または R 5 9 P 2 A 7（配列番号 8 9 および 9 0）から選択される T C R α 鎖および T C R β 鎖であってもよい。一態様では、配列は、配列番号 1 3 ~ 9 0 のいずれかと、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、または少なくとも約 9 8 %を示す。

【0095】

表 1 は、ペプチドが M H C 分子と複合体を形成しているときに、T C R が結合するペプチドの例を示す。

【表 1】

TCR名称	ペプチド（名称/配列/配列番号）
R20P1H7, R7P1D5, R10P2G12	MAG-003 (KVLHVVRV) (配列番号215)
R10P1A7	IGF2BP3-001 (KIQEILTQV) (配列番号123)
R4P1D10, R4P3F9, R4P3H3	COL6A3-002 (FLIDCSMVV) (配列番号238)
R30P3F9, R52P2G11, R53P2A9	DOAF4L2-001 (ILQDG9FLV) (配列番号193)
R20P1A9, R20P2A6, R20P3H1, R35P3A4, R37P1C9, R37P1H1, R42P3A8, R43P3F2, R43P3C5, R50P2E7	MAGEA1-003 (KVLGYVIVK) (配列番号202)
R11KEA, R11P3D3, R10P1C10, R10P1E8, R17P1A9, R17P1D7, R17P1G3, R17P2B6, R11P3D3KE	PRAME-004 (SLIQLHLGL) (配列番号147)
R30P1C12, R30P1F5, R40P1C2, R41P3E8, R43P3G4, R44P3B3, R44P3E7, R40P2B7, R55P1G7, R50P2A7	SPINK2-001 (ALSVLRLL) (配列番号248)

【0096】

一態様では、腫瘍関連抗原、本明細書に記載される方法および実施形態で利用できる、T A A ペプチドとしては、例えば、表 3 に列挙されるもの、および例えば、米国特許出願公開第 2 0 1 6 0 1 8 7 3 5 1 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 7 0 1 6 5 3 3 5 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 7 0 0 3 5 8 0 7 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 6 0 2 8 0 7 5 9 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 6 0 2 8 7 6 8 7 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 6 0 3 4 6 3 7 1 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 6 0 3 6 8 9 6 5 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 7 0 0 2 2 2 5 1 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 7 0 0 0 2 0 5 5 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 7 0 0 2 9 4 8 6 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 7 0 0 3 7 0 8 9 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 7 0 1 3 6 1 0 8 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 7 0 1 0 1 4 7 3 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 7 0 0 9 6 4 6 1 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 7 0 1 6 5 3 3 7 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 7 0 1 8 9 5 0 5 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 7 0 1 7 3 1 3 2 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 7 0 2 9 6 6 4 0 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 7 0 2 5 3 6 3 3 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 7 0 2 6 0 2 4 9 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 8 0 0 5 1 0 8 0 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 8 0 1 6 4 3 1 5 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 8 0 2 9 1 0 8 2 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 8 0 2 9 1 0 8 3 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 9 0 2 5 5 1 1 0 号明細書、米国特許第 9, 7 1 7, 7 7 4 号明細書、米国特許第 9, 8 9 5, 4 1 5 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 9 0 2 4 7 4 3 3 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 9 0 2 9 2 5 2 0 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 2 0 0 0 8 5 9 3 0 号明細書、米国特許第 1 0, 3 3 6, 8 0 9 号明細書、米国特許第 1 0, 1 3 1, 7 0 3 号明細書、米国特許第 1 0, 0 8 1, 6 6 4 号明細書、米国特許第 1 0, 0 8 1, 6 6 4 号明細書、米国特許第 1 0, 0 9 3, 7 1 5 号明細書、米国特許第 1 0, 5 8 3, 5 7 3 号明細書、および米国特許第 2 0 2 0 0 0 8 5 9 3 0 号明細書に記載される腫瘍関連抗原（T A A）ペプチドが挙げられ、これらの各出版物の内容、配列、およびその中に記載されている配列リストは、それらの全体が参照により本明細書に援用される。

【0097】

別の態様では、二量体 Z1Z2 は、CD3 δ ／ ϵ 、CD3 γ ／ ϵ 、および CD247 ζ ／ ζ または ζ ／ η などの T 細胞二量体シグナル伝達モジュール；TCR α 可変領域（V α ）と TCR β 可変領域（V β ）の二量体；免疫グロブリン重鎖可変領域（VH）と免疫グロブリン軽鎖可変領域（VL）の二量体；V α と VH の二量体；V α と VL の二量体；V β と VH の二量体；または V β と VL の二量体であってもよい。

【0098】

別の態様では、Y1Y2 は、CD8 α 鎖および CD8 β 鎖、または他の任意の適切な二量体膜受容体であってもよく、好ましくは、CD8 + T 細胞および／または CD4 + T 細胞で発現するものである。

【0099】

フューリンは、遍在性のサブチリシン様プロタンパク質転換酵素であり、その天然基としては、特定の血清タンパク質、およびインスリン様成長因子受容体などの成長因子受容体が挙げられる。フューリン切断のコンセンサス配列は RXXR（配列番号 7）であるが、実際の切断の可能性は、基質の三次構造と認識部位のすぐ周囲のアミノ酸に依存する。フューリン切断部位とリンカー配列（GSG または SGSG（配列番号 8））の付加は、高効率の遺伝子発現を可能にしてもよい。

【0100】

一態様では、タンデムに配置されたフューリンリンカーと 2A ペプチドのヌクレオチド配列は、Z1 と Z2 の間、Z1 と Y1 の間、Z1 と Y2 の間、Z2 と Y1 の間、Z2 と Y2 の間、および／または Y1 と Y2 の間に配置されてもよい。フューリンは、例えば、RAKR（配列番号 2）などの RXXR（配列番号 7）のコンセンサス配列を有してもよい。リンカー配列は、GSG または SGSG（配列番号 8）であってもよい。2A ペプチドは、P2A（配列番号 3）、T2A（配列番号 4）、E2A（配列番号 5）、F2A（配列番号 6）、またはそれらの任意の組み合わせから選択されてもよい。

【0101】

別の態様では、タンデムに配置されたリンカーと 2A ペプチドのヌクレオチド配列は、Z1 と Z2 の間、Z1 と Y1 の間、Z1 と Y2 の間、Z2 と Y1 の間、Z2 と Y2 の間、および／または Y1 と Y2 の間に配置されてもよい。リンカー配列は、GSG または SGSG（配列番号 8）であってもよい。2A ペプチドは、P2A（配列番号 3）、T2A（配列番号 4）、E2A（配列番号 5）、F2A（配列番号 6）、またはそれらの任意の組み合わせから選択されてもよい。

【0102】

一態様では、操作された（または形質導入された） $\gamma\delta$ T 細胞は、抗原提示細胞またはアミノビスホスホネートによる刺激なしに、生体外で増殖され得る。本開示の抗原反応性の操作された T 細胞は、生体外および生体内で増殖されてもよい。別の態様では、本開示の操作された $\gamma\delta$ T 細胞の活性集団は、抗原提示細胞、抗原性ペプチド、非ペプチド分子、または小分子化合物などのアミノビスホスホネートによる抗原刺激なしで、特定の抗体、サイトカイン、マイトジェン、または IL-17Fc 融合タンパク質、MICAfc 融合タンパク質、および CD70Fc 融合タンパク質などの融合タンパク質を使用して、生体外で増殖されてもよい。 $\gamma\delta$ T 細胞集団の増殖に使用され得る抗体の例としては、抗 CD3、抗 CD27、抗 CD30、抗 CD70、抗 OX40、抗 NKG2D、または抗 CD2 抗体が挙げられ、サイトカインの例としては、IL-2、IL-15、IL-12、IL-21、IL-18、IL-9、IL-7、および／または IL-33 が挙げられてもよく、マイトジェンの例としては、ヒト CD27 に対するリガンドである CD70、フィトヘマグルチニン（PHA）、コンカバリン A（ConA）、アメリカヤマゴボウマイトジェン（PWM）、タンパク質落花生凝集素（PNA）、大豆凝集素（SBA）、レンズマメ（*Lens culinaris*）凝集素（LCA）、エンドウマメ（*Pisum sativum*）凝集素（PSA）、リンゴマイマイ（*Helix pomatia*）凝集素（HPA）、ビシア・グラミネア（*Vicia graminea*）レクチン（VGA

10

20

30

40

50

）またはT細胞増殖を刺激できる別の適切なマイトジェンが挙げられてもよい。別の態様では、操作された $\gamma\delta$ T細胞の集団は、60日間未満、48日間未満、36日間未満、24日間未満、12日間未満、または6日間未満増殖され得る。別の態様では、操作された $\gamma\delta$ T細胞の集団は、約7日間～約49日間、約7日間～約42日間、約7日間～約35日間、約7日間～約28日間、約7日間～約21日間、または約7日間～約14日間増殖され得る。

【0103】

別の態様では、本開示は、養子免疫伝達療法のために、操作された $\gamma\delta$ T細胞集団を生体外で増殖させる方法を提供する。本開示の操作された $\gamma\delta$ T細胞は、生体外で増殖されてもよい。本開示の操作された $\gamma\delta$ T細胞は、APCによる活性化なしで、またはAPCおよびアミノリン酸塩との共培養なしで、生体外で増殖され得る。

【0104】

治療法

本明細書に記載の操作された $\gamma\delta$ T細胞を含有する組成物は、予防的および／または治療的治療のために投与されてもよい。治療用途では、医薬組成物は、疾患または病状の症状を治癒しまたは少なくとも部分的に阻止するのに十分な量で、疾患または病状に既に苦しんでいる対象に投与され得る。操作された $\gamma\delta$ T細胞は、発症、罹患、または病状の悪化の可能性を軽減するためにも投与され得る。治療的使用のための操作された $\gamma\delta$ T細胞の集団の有効量は、疾患または病状の重症度および経過、以前の治療、対象の健康状態、体重、および／または薬物に対する応答、および／または治療医の判断に基づいて変動し得る。

【0105】

本開示の組成物はまた、1つ以上のアジュバントもまた含んでもよい。アジュバントは、免疫応答（例えば、CD8陽性T細胞およびヘルパーT（TH）細胞によって媒介される抗原に対する免疫応答を非特異的に促進または増強する物質であり、したがって本発明の薬剤中で有用であると見なされる。適切なアジュバントとしては、1018 ISS、アルミニウム塩、AMPLIVAX（登録商標）、AS15、BCG、CP-870, 893、CpG7909、CyaA、dSLIM、フラジェリンまたはフラジェリン由来のTLR5リガンド、FLT3リガンド、GM-CSF、IC30、IC31、イミキモド（ALDARA（登録商標））、レシキモド、ImuFact IMP321；IL-2、IL-13、IL-21、インターフェロン- α または- β などのインターロイキン、またはそれらのPEG化誘導体；ISパッチ、ISS、ISCOMATRIX、ISCOMs、JuviImmune（登録商標）、LipoVac、MALP2、MF59、モノホスホリルリピドA、モンタニドIMS 1312、モンタニドISA 206、モンタニドISA 50V、モンタニドISA-51、油中水型および水中油型エマルション、OK-432、OM-174、OM-197-MP-EC、ONTAK、OspA、PepTel（登録商標）ベクターシステム、ポリ（ラクチドコグリコリド）[PLG]ベースおよびデキストラン微粒子、タラクトフェリンSRL172、ピロソームおよびその他のウイルス様粒子、YF-17D、VEGFトラップ、R848、 β -グルカン、Pam3Cys、サポニン由来のAquila's QS21ステイミュロン、マイコバクテリア抽出物および合成細菌細胞壁模倣体；およびRibibi's Detox、Quil、またはSuperfosなどのその他の独自仕様のアジュバントが挙げられるが、これに限定されるものではない。フロイントまたはGM-CSFなどのアジュバントが好ましい。樹状細胞およびそれらの調製物に対して特異的な、いくつかの免疫学的アジュバント（例えば、MF59）が、以前記載されている（Allison and Krummel, 1995）。サイトカインもまた使用されてもよい。数種のサイトカインは、樹状細胞のリンパ組織（例えば、TNF- α ）への遊走に影響を与えること、Tリンパ球（例えば、GM-CSF、IL-1、およびIL-4）のための効率的な抗原提示細胞への樹状細胞の成熟を加速すること（その内容全体が参照により本明細書に具体的に援用される、米国特許第5,849,589号明細書）、および免疫増強剤（例えば、IL-12、IL-15、I

L-23、IL-7、IFN- α 、IFN- β)として作用することと、直接関連付けられている (Gabrilovich et al., 1996)。

【0106】

CpG免疫賦活性オリゴヌクレオチドもまた、ワクチン環境において、アジュバント効果を増強することが報告されている。理論により拘束されることなく、CpGオリゴヌクレオチドは、Toll様受容体 (TLR)、主にTLR9を通じた、内在的 (非適応性) 免疫系の活性化によって作用する。CpG誘導性TLR9活性化は、ペプチドまたはタンパク質抗原、生きたまたは死滅ウイルス、樹状細胞ワクチン、自己細胞ワクチン、そして予防的および治療的ワクチンの双方における多糖コンジュゲートをはじめとする多種多様な抗原に対する、抗原特異的体液性および細胞性応答を増強する。より重要なことには、それは樹状細胞の成熟と分化を増強し、CD4 T細胞援助の不在下であってさえも、TH1細胞の活性化の促進、および強力な細胞傷害性Tリンパ球 (CTL) 生成をもたらす。TLR9刺激によって誘導されるTH1バイアスは、通常はTH2バイアスを促進するミョウバンまたは不完全フロイントアジュバント (IFA) などのワクチンアジュバント存在下であってさえも、維持される。CpGオリゴヌクレオチドは、その他のアジュバントと調合されまたは同時投与された際に、または微粒子、ナノ粒子、脂質エマルションなどの配合物または類似配合物中で、なおもより高いアジュバント活性を示し、それは、抗原が比較的弱い場合、強力な応答を誘導するのに特に必要である。それらは免疫応答もまた加速し、いくつかの実験では、CpGなしのワクチン総量と同等の抗体応答で、抗原用量のほぼ2桁分の低減を可能にする (Krieg, 2006)。米国特許第6,406,705 B1号明細書は、抗原特異的免疫応答を誘導するためのCpGオリゴヌクレオチド、非核酸アジュバント、および抗原の併用を記載する。CpG TLR9拮抗薬は、本発明の医薬組成物の好ましい構成要素である、Mologen (独国ベルリン) 製のdSLIM (二重ステムループ免疫調節剤) である。RNA結合TLR7、TLR8および/またはTLR9などのその他のTLR結合分子もまた、使用されてもよい。

【0107】

有用なアジュバントのその他の例としては、化学修飾されたCpGs (例えば、CpR、Idera)、ポリ (I:C) などのdsRNA類似体およびそれらの誘導體 (例えば、AmpliGen (登録商標)、Hiltonol (登録商標)、ポリ (ICLC)、ポリ (IC-R)、ポリ (I:C12U)、非CpG細菌性DNAまたはRNA; 並びにシクロホスファミド、スニチニブなどの免疫活性小分子および抗体; イピリムマブ、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、およびセミプリマブ、ペバシズマブ (登録商標)、セレブレックス、NCX-4016、シルデナフィル、タダラフィル、バルデナフィル、ソラフェニブ、テモゾロマイド、テムシロリムス、XL-999、CP-547632、パゾパニブ、VEGFトラップ、ZD2171、AZD2171、抗CTLA4をはじめとする免疫チェックポイント阻害剤; 免疫系の主要構造を標的化するその他の抗体 (例えば、抗CD40、抗TGF β 、抗TNF α 受容体); およびSC58175が挙げられるが、これに限定されるものではなく、これらは治療的および/またはアジュバントとして作用してもよい。本発明の文脈で有用なアジュバントおよび添加剤の量と濃度は、過度の実験を実施することなく、当業者によって容易に判定され得る。

【0108】

好ましいアジュバントは、抗CD40、イミキモド、レシキモド、GM-CSF、シクロホスファミド、スニチニブ、ペバシズマブ、アテゾリズマブ、インターフェロナー α 、インターフェロナー β 、CpGオリゴヌクレオチドおよび誘導體、ポリ (I:C) および誘導體、RNA、シルデナフィル、およびポリ (ラクチドコグリコリド) (PLG) との粒子状製剤、ピロソーム、および/またはインターロイキン (IL) -1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-12、IL-13、IL-15、IL-21、およびIL-23である。

【0109】

10

20

30

40

50

本発明による薬剤組成物の好ましい実施形態では、アジュバントは、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF、サルグラモスチム）、シクロホスファミド、イミキモド、レシキモド、およびインターフェロン α などのコロニー刺激因子からなる群から選択される。

【0110】

本発明による医薬組成物の好ましい実施形態では、アジュバントは、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF、サルグラモスチム）、シクロホスファミド、イミキモド、およびレシキモドなどのコロニー刺激因子からなる群から選択される。本発明による薬剤組成物の好ましい実施形態では、アジュバントは、シクロホスファミド、イミキモドまたはレシキモドである。なおもより好ましいアジュバントは、Montanide IMS 1312、Montanide ISA 20、Montanide ISA 50V、Montanide ISA-51、poly-ICLC（Hiltonol（登録商標））、および抗CD40mAbまたはそれらの組み合わせである。

【0111】

本明細書の操作された $\gamma\delta$ T細胞を使用して、例えば、本明細書に記載のがんなどの病状に対する治療を必要とする対象が、治療され得る。

【0112】

対象における病状（例えば、病気）を $\gamma\delta$ T細胞で治療する方法は、治療的に有効な量の操作された $\gamma\delta$ T細胞を対象に投与することを含んでもよい。本開示の $\gamma\delta$ T細胞は、様々なレジメン（例えば、タイミング、濃度、投与量、治療間隔、および／または製剤）で投与されてもよい。対象はまた、本開示の操作された $\gamma\delta$ T細胞と与えられる前に、例えば、化学療法、放射線、または双方の組み合わせで、事前調節され得る。また、操作された $\gamma\delta$ T細胞の集団は、対象に投与する前に冷凍または凍結保存されてもよい。操作された $\gamma\delta$ T細胞の集団は、同じ腫瘍認識部分、異なる腫瘍認識部分、または同じ腫瘍認識部分と異なる腫瘍認識部分との組み合わせを発現する、2種以上の細胞を含み得る。例えば、操作された $\gamma\delta$ T細胞の集団は、異なる抗原を認識し、または同じ抗原の異なるエピトープを認識するように設計された、いくつかの異なる操作された $\gamma\delta$ T細胞を含み得る。

【0113】

本開示の $\gamma\delta$ T細胞を使用して、様々な病状が治療されてもよい。一態様では、本開示の操作された $\gamma\delta$ T細胞を使用して、固形腫瘍および血液学的悪性疾患をはじめとする、がんが治療されてもよい。がんの非限定的例としては、急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄性白血病、副腎皮質がん、AIDS関連がん、AIDS関連リンパ腫、肛門がん、虫垂がん、星状細胞腫、神経芽腫、基底細胞がん腫、胆管がん、膀胱がん、骨がん、小脳星細胞腫などの脳腫瘍、脳星状細胞腫／悪性神経膠腫、上衣腫、髄芽腫、テント上原始神経外胚葉性腫瘍、視覚路および視床下部神経膠腫、乳がん、気管支腺腫、バーキットリンパ腫、原発不明がん、中枢神経系リンパ腫、小脳星細胞腫、子宮頸がん、小児期がん、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性骨髄増殖性障害、結腸がん、皮膚T細胞リンパ腫、線維形成性小円形細胞腫瘍、子宮内膜がん、上衣腫、食道がん、ユーイング肉腫、胚芽細胞腫瘍、胆嚢がん、胃がん、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍、神経膠腫、有毛細胞白血病、頭頸部がん、心臓がん、肝細胞（肝臓）がん、ホジキンリンパ腫、下咽頭がん、眼球内黒色腫、脾臓がん腫、カポジ肉腫、腎臓がん、喉頭がん、口唇および口腔がん、脂肪肉腫、肝臓がん、非小細胞および小細胞肺がんなどの肺がん、リンパ腫、白血病、マクログロブリン血症、骨の悪性線維性組織球腫／骨肉腫、髄芽腫、黒色腫、中皮腫、原発不明転移性扁平上皮頭部がん、口腔がん、多発性内分泌腺腫症候群、骨髄異形成症候群、骨髄性白血病、鼻腔および副鼻腔がん、鼻咽頭のがん腫、神経芽腫、非ホジキンリンパ腫、非小細胞肺がん、口腔がん、中咽頭がん、骨肉腫／骨の悪性線維性組織球腫、卵巣がん、卵巣上皮がん、卵巣胚細胞腫瘍、脾臓がん、脾臓がん脾臓細胞、副鼻腔および鼻腔がん、副甲状腺がん、陰茎がん、咽頭がん、褐色細胞腫、松果体星状細胞腫、松果体胚細胞腫、下垂体腺腫、胸膜肺芽腫、形質細胞新生物、一次中枢神経系リンパ腫、前立腺がん、直腸がん、腎細胞がん腫、腎盂および尿管移行細胞がん、網膜芽細胞腫、横紋筋

肉腫、唾液腺がん、肉腫、皮膚がん、皮膚がんメルケル細胞、小腸がん、軟部組織肉腫、扁平上皮がん、胃がん、T細胞リンパ腫、咽喉がん、胸腺腫、胸腺がん、甲状腺がん、絨毛性腫瘍（妊娠性）、原発不明がん、尿道がん、子宮の肉腫、膣がん、外陰がん、ワルデンストレームマクログロブリン血症、およびウィルムス腫瘍が挙げられる。

【0114】

一態様では、本開示の操作された $\gamma\delta$ T細胞を使用して、感染性疾患が治療されてもよい。別の態様では、本開示の操作された $\gamma\delta$ T細胞を使用して、感染性疾患が治療されてもよく、感染性疾患はウイルスによって引き起こされてもよい。なおも別の態様では、本開示の操作された $\gamma\delta$ T細胞を使用して、自己免疫疾患などの免疫疾患が治療されてもよい。

10

【0115】

本開示の $\gamma\delta$ T細胞による治療は、病状の臨床的発症前、発症中、および発症後に、対象に提供されてもよい。治療は、臨床的発症の1日後、1週間後、6ヶ月後、12ヶ月後、または2年後に、対象に提供されてもよい。治療は、疾患の臨床的発症後、1日間、1週間、1ヶ月間、6ヶ月間、12ヶ月間、2年間、3年間、4年間、5年間、6年間、7年間、8年間、9年間、10年間以上を超えて、対象に提供されてもよい。治療は、疾患の臨床的発症後、1日間、1週間、1ヶ月間、6ヶ月間、12ヶ月間、または2年間未満にわたり対象に提供されてもよい。治療は、臨床試験においてヒトを治療することもまた含んでもよい。治療は、本開示の操作された $\gamma\delta$ T細胞を含んでなる医薬組成物を対象に投与することを含み得る。

20

【0116】

別の態様では、本開示の操作された $\gamma\delta$ T細胞の対象への投与は、対象の体内の内因性リンパ球の活性を調節してもよい。別の態様では、操作された $\gamma\delta$ T細胞の対象への投与は、内因性T細胞に抗原を提供してもよく、免疫応答を高めてもよい。別の態様では、記憶T細胞は、CD4+T細胞であってもよい。別の態様では、記憶T細胞は、CD8+T細胞であってもよい。別の態様では、本開示の操作された $\gamma\delta$ T細胞の対象への投与は、別の免疫細胞の細胞毒性を活性化してもよい。別の態様では、別の免疫細胞は、CD8+T細胞であってもよい。別の態様では、別の免疫細胞は、ナチュラルキラーT細胞であってもよい。別の態様では、本開示の操作された $\gamma\delta$ T細胞の対象への投与は、調節T細胞を抑制してもよい。別の態様では、調節性T細胞は、FOX3+Treg細胞であってもよい。別の態様では、調節性T細胞は、FOX3-Treg細胞であってもよい。本開示の操作された $\gamma\delta$ T細胞によってその活性が調節され得る細胞の非限定的例としては、造血幹細胞；B細胞；CD4；CD8；赤血球；白色血液細胞；樹状抗原提示細胞をはじめとする樹状細胞；白血球；マクロファージ；記憶B細胞；記憶T細胞；単球；ナチュラルキラー細胞；好中球顆粒球；Tヘルパー細胞；およびTキラー細胞が挙げられてもよい。

30

【0117】

ほとんどの骨髄移植中に、シクロホスファミドと全身照射の組み合わせが慣習的に用いられて、対象の免疫系による移植中の造血幹細胞(HSC)の拒絶が予防されてもよい。一態様では、ドナー骨髄とインターロイキン-2(IL-2)との生体外インキュベーションが実施されて、ドナー骨髄中のキラーリンパ球の生成が増強されてもよい。インターロイキン-2(IL-2)は、野生型リンパ球の成長、増殖、分化に必要であってもよいサイトカインである。 $\gamma\delta$ T細胞のヒトへの養子免疫伝達に関する現在の研究では、 $\gamma\delta$ T細胞とインターロイキン-2との同時投与が必要であってもよい。しかし、低用量および高用量のIL-2は、どちらも高度に毒性の副作用を有し得る。IL-2毒性は、複数の臓器/システム、最も顕著には心臓、肺、腎臓、および中枢神経系で顕在化し得る。別の態様では、本開示は、ナイーブサイトカイン、またはIL-2、IL-15、IL-12、IL-21などのその修飾バージョンの同時投与なしに、操作された $\gamma\delta$ T細胞を対象に投与する方法を提供する。別の態様では、操作された $\gamma\delta$ T細胞は、IL-2との同時投与なしに、対象に投与され得る。別の態様では、操作された $\gamma\delta$ T細胞は、IL-2との同時投与なしに、骨髄移植などの処置中に対象に投与されてもよい。

40

50

【0118】

投与方法

1つまたは複数の操作された $\gamma\delta$ T細胞集団は、任意の順序でまたは同時に、対象に投与されてもよい。同時である場合、複数の操作された $\gamma\delta$ T細胞は、静脈内注射などの単一の一体化形態で、または、例えば、複数の静脈内輸液、皮下注射、注射または丸薬として、複数の形態で提供され得る。操作された $\gamma\delta$ T細胞は、単一のパッケージで、または複数のパッケージで、一緒にまたは別々に包装され得る。操作された $\gamma\delta$ T細胞の1つまたは全ては、複数回用量で投与され得る。同時ではない場合、複数回用量のタイミングは、約1週間、1ヶ月間、2ヶ月間、3ヶ月間、4ヶ月間、5ヶ月間、6ヶ月間、または約1年間程度変動してもよい。別の態様では、操作された $\gamma\delta$ T細胞は、対象への投与後に、対象の体内で、生体内増殖され得る。操作された $\gamma\delta$ T細胞は凍結されて、同一の細胞調製物での複数の治療のための細胞が提供され得る。本開示の操作された $\gamma\delta$ T細胞、および該細胞を含んでなる医薬組成物は、キットとして包装され得る。キットは、操作された $\gamma\delta$ T細胞、および該細胞を含んでなる医薬組成物の使用に関する指示（例えば、書面による指示）を含んでもよい。

10

【0119】

別の態様では、がんを治療する方法は、治療的に有効な量の操作された $\gamma\delta$ T細胞を被験者に投与することを含んでなり、投与はがんを治療する。別の実施形態では、治療的に有効な量の操作された $\gamma\delta$ T細胞は、少なくとも約10秒間、30秒間、1分間、10分間、30分間、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、12時間、24時間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、1週間、2週間、3週間、1ヶ月間、2ヶ月間、3ヶ月間、4ヶ月間、5ヶ月間、6ヶ月間、または1年間にわたり投与されてもよい。別の態様では、治療的に有効な量の操作された $\gamma\delta$ T細胞は、少なくとも1週間にわたり投与されてもよい。別の態様では、治療的に有効な量の操作された $\gamma\delta$ T細胞は、少なくとも2週間にわたり投与されてもよい。

20

【0120】

本明細書に記載の操作された $\gamma\delta$ T細胞は、疾患または病状の発生前、発生中、または発生後に投与され得て、操作された $\gamma\delta$ T細胞を含有する医薬組成物を投与するタイミングは変動し得る。例えば、操作された $\gamma\delta$ T細胞は予防的に使用され得て、疾患または病状の発生の可能性を軽減するために、病状または疾患の傾向を有する対象に連続的に投与され得る。操作された $\gamma\delta$ T細胞は、症状の発生中にまたは発生後にできる限り速やかに、対象に投与され得る。操作された $\gamma\delta$ T細胞の投与は、症状の発生後即座に、症状の発生から最初の3時間以内に、症状の発生から最初の6時間以内に、症状の発生から最初の24時間以内に、症状の発生から48時間以内に、または症状の発生から任意の期間内に開始され得る。最初の投与は、本明細書に記載の任意の製剤を使用して、本明細書に記載の任意の経路などの実用的な任意の経路を介し得る。別の態様では、本開示の操作された $\gamma\delta$ T細胞の投与は、静脈内投与であってもよい。操作された $\gamma\delta$ T細胞の1回または複数回の投与は、がん、感染性疾患、免疫疾患、敗血症の発症後実行可能な限り早く、または骨髓移植と共に、例えば、約24時間～約48時間、約48時間～約1週間、約1週間～約2週間、約2週間～約1ヶ月間、約1ヶ月間～約3ヶ月間などの免疫疾患を治療するのに必要な期間にわたり、投与され得る。がんの治療のために、操作された $\gamma\delta$ T細胞の1つまたは複数用量は、がんの発症から数年後に、その他の治療の前または後に、投与され得る。別の態様では、操作された $\gamma\delta$ T細胞は、少なくとも約10分間、30分間、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、12時間、24時間、少なくとも48時間、少なくとも72時間、少なくとも96時間、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4週間、少なくとも1ヶ月間、少なくとも2ヶ月間、少なくとも3ヶ月間、少なくとも4ヶ月間、少なくとも5ヶ月間、少なくとも6ヶ月間、少なくとも7ヶ月間、少なくとも8ヶ月間、少なくとも9ヶ月間、少なくとも10ヶ月間、少なくとも11ヶ月間、少なくとも12ヶ月間、少なくとも1年間、少なくとも2年間、少なくとも3年間、少なくとも4年間、または少なくとも5年間にわたり投与され得る。

30

40

50

治療期間は、対象によって変動し得る。

【0121】

保存

一態様では、 $\gamma\delta$ T細胞は凍結媒体中で調合され、少なくとも約1ヶ月間、2ヶ月間、3ヶ月間、4ヶ月間、5ヶ月間、6ヶ月間、1年間、2年間、3年間、または少なくとも5年間にわたる長期保存のために、液体窒素冷凍庫（ -196°C ）または極低温冷凍庫（ -65°C 、 -80°C 、 -120°C 、または -150°C ）などの極低温保存ユニットに入れられてもよい。凍結媒体は、pHを約6.0～約6.5、約6.5～約7.0、約7.0～約7.5、約7.5～約8.0、または約6.5～約7.5の間に維持するための生理学的pH緩衝剤を有する、ジメチルスルホキシド（DMSO）、および／または塩化ナトリウム（NaCl）、および／またはデキストロース、および／または硫酸デキストランおよび／またはヒドロキシエチルデンプン（HES）を含有し得る。凍結保存 $\gamma\delta$ T細胞は解凍され、本明細書に記載されるような、抗体、タンパク質、ペプチド、および／またはサイトカインでの刺激によって、さらに処理され得る。凍結保存された $\gamma\delta$ T細胞は解凍され、本明細書に記載されるような、ウイルスベクター（レトロウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAAV）、およびレンチウイルスベクターをはじめとする）または非ウイルス手段（RNA、例えば、トランスポゾンなどのDNA、およびタンパク質をはじめとする）で、遺伝子改変され得る。修飾 $\gamma\delta$ T細胞はさらに凍結保存され、凍結媒体1mLあたり少なくとも 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、または少なくとも約 10^{10} 個の細胞で、少なくとも約1、5、10、100、150、200、500本のバイアルの量で、細胞バンクが作製され得る。凍結保存細胞バンクは、それらの機能を保持していてもよく、解凍されさらに刺激されて増殖され得る。別の態様では、解凍された細胞は、細胞培養バッグおよび／またはバイオリアクターなどの適切な閉鎖容器内で刺激および増殖され、同種異系細胞産物として一定量の細胞が生成され得る。凍結保存 $\gamma\delta$ T細胞は、極低温保存条件下で、少なくとも約6ヶ月間、7ヶ月間、8ヶ月間、9ヶ月間、10ヶ月間、11ヶ月間、12ヶ月間、13ヶ月間、15ヶ月間、18ヶ月間、20ヶ月間、24ヶ月間、30ヶ月間、36ヶ月間、40ヶ月間、50ヶ月間、または少なくとも約60ヶ月間にわたり、それらの生物学的機能を保持し得る。別の態様では、製剤中に保存料を使用することはできない。凍結保存 $\gamma\delta$ T細胞は解凍され、同種異系の既製細胞製品として複数の患者に輸液され得る。

【0122】

一態様では、本明細書に記載の操作された $\gamma\delta$ T細胞は、少なくとも 1×10^3 個の細胞/mL、少なくとも 2×10^3 個の細胞/mL、少なくとも 3×10^3 個の細胞/mL、少なくとも 4×10^3 個の細胞/mL、少なくとも 5×10^3 個の細胞/mL、少なくとも 6×10^3 個の細胞/mL、少なくとも 7×10^3 個の細胞/mL、少なくとも 8×10^3 個の細胞/mL、少なくとも 9×10^3 個の細胞/mL、少なくとも 1×10^4 個の細胞/mL、少なくとも 2×10^4 個の細胞/mL、少なくとも 3×10^4 個の細胞/mL、少なくとも 4×10^4 個の細胞/mL、少なくとも 5×10^4 個の細胞/mL、少なくとも 6×10^4 個の細胞/mL、少なくとも 7×10^4 個の細胞/mL、少なくとも 8×10^4 個の細胞/mL、少なくとも 9×10^4 個の細胞/mL、少なくとも 1×10^5 個の細胞/mL、少なくとも 2×10^5 個の細胞/mL、少なくとも 3×10^5 個の細胞/mL、少なくとも 4×10^5 個の細胞/mL、少なくとも 5×10^5 個の細胞/mL、少なくとも 6×10^5 個の細胞/mL、少なくとも 7×10^5 個の細胞/mL、少なくとも 8×10^5 個の細胞/mL、少なくとも 9×10^5 個の細胞/mL、少なくとも 1×10^6 個の細胞/mL、少なくとも 2×10^6 個の細胞/mL、少なくとも 3×10^6 個の細胞/mL、少なくとも 4×10^6 個の細胞/mL、少なくとも 5×10^6 個の細胞/mL、少なくとも 6×10^6 個の細胞/mL、少なくとも 7×10^6 個の細胞/mL、少なくとも 8×10^6 個の細胞/mL、少なくとも 9×10^6 個の細胞/mL、少なくとも 1×10^7 個の細胞/mL、少なくとも 2×10^7 個の細胞/mL、少なくとも 3×10^7 個の細胞/mL、少なくとも 4×10^7 個の細胞/mL、少なくとも 5×10^7 個の細胞/mL、

少なくとも 6×10^7 個の細胞/ml、少なくとも 7×10^7 個の細胞/ml、少なくとも 8×10^7 個の細胞/ml、少なくとも 9×10^7 個の細胞/ml、少なくとも 1×10^8 個の細胞/ml、少なくとも 2×10^8 個の細胞/ml、少なくとも 3×10^8 個の細胞/ml、少なくとも 4×10^8 個の細胞/ml、少なくとも 5×10^8 個の細胞/ml、少なくとも 6×10^8 個の細胞/ml、少なくとも 7×10^8 個の細胞/ml、少なくとも 8×10^8 個の細胞/ml、少なくとも 9×10^8 個の細胞/ml、少なくとも 1×10^9 個の細胞/ml以上、約 1×10^3 個の細胞/ml～少なくとも約 1×10^8 個の細胞/ml、約 1×10^5 個の細胞/ml～少なくとも約 1×10^8 個の細胞/ml、または約 1×10^6 個の細胞/ml～少なくとも約 1×10^8 個の細胞/mlの量で組成物中に存在してもよい。

10

【0123】

一態様では、本明細書に記載の方法を使用して、本開示の態様による自己由来または同種異系産物が生成されてもよい。

【0124】

一態様では、本明細書に記載のベクター、コンストラクト、または配列は、配列番号1～7および265～266のいずれかと、約80%、約85%、約90%、約85%、約96%、約97%、約98%、または約99%を含んでなってもよい。「参照配列と少なくとも85%の同一性を有する」配列とは、その全長において、参照配列の全長と85%以上、特に90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する配列である。

20

【0125】

本出願の文脈では、「同一性の百分率」は、グローバルなペアワイズアラインメントを用いて計算される（すなわち、2つの配列が、それらの全長にわたって比較される）。2つ以上の配列の同一性を比較するための方法は、当該技術分野で周知である。例えば、Needleman-Wunsch大域アラインメントアルゴリズム（Needleman and Wunsch, 1970 J. Mol. Biol. 48:443-453）を用いて、それらの全長を考慮した場合の2つの配列の最適なアラインメント（ギャップを含む）を見つける「needle」プログラムが、用いられてもよい。Needleプログラムは、例えば、ebi.ac.uk World Wide Webサイトで利用でき、以下の出版物でさらに説明されている（EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite (2000) Rice, P. Longden, I. and Bleasby, A. Trends in Genetics 16, (6) pp. 276-277）。本発明による2つのポリペプチド間の同一性の百分率は、10.0に等しい「Gap Open」パラメーター、0.5に等しい「Gap Extend」パラメーター、およびBlosom62マトリックスで、EMBOSS: needle（大域）プログラムを用いて計算される。

30

【0126】

参照配列と「少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一」のアミノ酸配列からなるタンパク質は、参照配列と比較して、欠失、挿入および／または置換などの変異を含んでなってもよい。置換の場合、参照配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一のアミノ酸配列からなるタンパク質は、参照配列とは別の種に由来する相同配列に対応してもよい。

40

【0127】

「アミノ酸置換」は、保存的または非保存的であってもよい。好ましくは、置換は保存的置換であり、その中ではあるアミノ酸が類似の構造的および／または化学的特性を有する別のアミノ酸によって置換される。

【0128】

一実施形態では、保存的置換としては、その内容全体が参照により援用される、Dayhoffによって"The Atlas of Protein Sequence and

50

Structure. Vol. 5", Natl. Biomedical Research に記載されるものが挙げられてもよい。例えば、一態様では、以下のグループの1つに属するアミノ酸は、互いに交換され得て、したがって、保守的な交換を構成する：グループ1：アラニン（A）、プロリン（P）、グリシン（G）、アスパラギン（N）、セリン（S）、スレオニン（T）；グループ2：システイン（C）、セリン（S）、チロシン（Y）、スレオニン（T）；グループ3：バリン（V）、イソロイシン（I）、ロイシン（L）、メチオニン（M）、アラニン（A）、フェニルアラニン（F）；グループ4：リジン（K）、アルギニン（R）、ヒスチジン（H）；グループ5：フェニルアラニン（F）、チロシン（Y）、トリプトファン（W）、ヒスチジン（H）；およびグループ6：アスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）。一態様では、保存的アミノ酸置換は、T→A、G→A、A→I、T→V、A→M、T→I、A→V、T→G、および／またはT→Sから選択されてもよい。

10

【0129】

さらなる実施形態では、保存的アミノ酸置換としては、例えば、（1）非極性：Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Met、Phe、Trp；（2）非荷電極性：Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、Asn、Gln；（3）酸性：Asp、Glu；および（4）塩基性：Lys、Arg、Hisなど、同一クラスの別のアミノ酸によるアミノ酸の置換が挙げられてもよい。その他の保存的アミノ酸置換はまた、以下のように行われ得る：（1）芳香族：Phe、Tyr、His；（2）プロトン供与体：Asn、Gln、Lys、Arg、His、Trp；および（3）プロトン受容体：Glu、Asp、Thr、Ser、Tyr、Asn、Gln（例えば、その内容全体が参照により援用される、米国特許第10,106,805号明細書を参照されたい）。

20

【0130】

別の実施形態では、表1に従って保存的置換が行なわれてもよい。タンパク質修飾に対する耐性を予測する方法は、例えば、その内容全体が参照により援用される、Guo et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 101(25):9205-9210 (2004)にある。

【0131】

表A：保存的アミノ酸置換

30

40

50

【表 2】

保存的アミノ酸置換	
アミノ酸	置換（その他は技術分野で知られている）
Ala	Ser, Gly, Cys
Arg	Lys, Gln, His
Asn	Gln, His, Glu, Asp
Asp	Glu, Asn, Gln
Cys	Ser, Met, Thr
Gln	Asn, Lys, Glu, Asp, Arg
Glu	Asp, Asn, Gln
Gly	Pro, Ala, Ser
His	Asn, Gln, Lys
Ile	Leu, Val, Met, Ala
Leu	Ile, Val, Met, Ala
Lys	Arg, Gln, His
Met	Leu, Ile, Val, Ala, Phe
Phe	Met, Leu, Tyr, Trp, His
Ser	Thr, Cys, Ala
Thr	Ser, Val, Ala
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, His
Val	Ile, Leu, Met, Ala, Thr

10

20

【0132】

一態様では、本明細書に記載の配列は、1、2、3、4、5、10、15、20、25、または30個のアミノ酸またはヌクレオチドの変異、置換、欠失を含んでもよい。一態様では、配列番号1～97および265～266のいずれか1つは、1、2、3、4、5、10、15、20、25、または30の変異、置換、または欠失を含んでもよい。なおも別の態様では、変異または置換は、保存的アミノ酸置換である。

【0133】

30

別の実施形態では、保存的置換は、「保存的置換」の見出しの下で表Bに示されるものであってもよい。このような置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、表Bで「例示的な置換」と命名される、より実質的な変化が導入され、必要に応じて生成物がスクリーニングされてもよい。

【0134】

表B：アミノ酸置換

40

50

【表 3】

アミノ酸置換		
元の残基 (天然アミノ酸)	保存的置換	例示的な置換
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucine
Leu (L)	Ile	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucine

10

【実施例】

【0135】

実施例 1

20

DNAおよびタンパク質配列

【表 4－1】

配列番号	説明	配列
1	WSVプロモーター	Tgaagaacccacccctgtaggtttggcaagctagcttaagtaacgcaattttgcgaagg catggaaaatacataactgagaatagagaagttcagatcaaggttaggaacagagag acagcagaatatggccaaaacaggatatctgtgtaagcagttcctgcccgcctca ggcccaagaacagatggtcccaagatgcggtccgcctcagcagtttctagagaaac catcagatgtttccagggtgcccgaagacccgaaatgacccctgtgacctatttga actaaacacacagttgcctctcgtctgtgttgcgcgcttctgctcccgagctca ataaaagagcccaacccctcaact
2	フェーリン	RAKR
3	P2A	ATNPSLLKGAGDVEENPGP
4	T2A	EGRGSLITGQDVEENPGP
5	E2A	QCINVALLLKLAGDVESNPGP
6	F2A	VKQILNFDLLKLAGDVESNPGP
7	フェーリンコンセンサス	RKXR
8	リンカー	SGSG

30

【表 4－2】

9	WPRE	caagtctgactgacgctgaatcaacctctgattacaaaatttgtgaagattgactg gtattcttaactatgttgcctcttttacgtatggtgatacgtctttaatgcctt tgtatcatgtattgcttccgctatgcttcttcttctctctctgtatataatcct ggttgctgtctctttatgagagattgtgcccgttgcaggaacgtggcgtgtgt gcactgtgtttgtgaagcaaccccaactgattgggcaattgccaccaactgtcagc tctttccgggaacttgccttcccccctcctattggcagcgaggaactcctgcgcg cctgccttgccgcgtgtggaacgggctcggtgtgtggcaactgacaattccgtg tgtgtcggggaactgacgtcttctcattgctgctgcctgtgttgcacacctgaa ttctcgcggggaactcctctctgctacgtcctctcgccctcaatcaacgggaactc cttcccgcggtgtgctgcgcgtctgcgcgctcttccgctcttgccttgcgcctc agacagctcgagctcctcttgggcccgcctccgcgc
10	タンパク質プロモーター	Ggggaagctgacgtccttcc
11	CDS α鎖	MAIPVITALLPLALLHAAPFSQFRVSPIDRTWNLGETVELKQVLLSNPTSGCSWL FQPRGAASPTFLLYLSQWPKAAEGLDTORFSCKRLCDTFVLTLSDFRDNQGYVF CSALNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAFRPTTAPTIASQPLSLRFEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAFLAGTQGVLLLSLVITLYCHNRNRRCQCPRPVVSQDGP SLSARYV
12	CDS β鎖	MRPRLWLLAAQITVLHGNSVLQOTPAYIKWQTNKMWLSCBAKISLSNMRIYWLQ RQAPSSDSHHEFLALWDAKGTIHGEVEGEKIAVFRDASRFILNLTSPEDSGIY FCMIVGSPELTFQGTQLSVVDFLPTTAQTRKSLTKRWCRLPRETQKGLPSP ITLGLVAGVLVLLVSLGVAIHLCCRRRRRLRPMKQPGEGISGTFVQCLHGYYNS ITTSQKLLNPWILKT

40

50

【表 4 - 3】

13	R11KEA α鎖	MEKNPLAEPILLILWFHLDCVSSILNVEGSGPSLHVQEGDSTNFTCSFPSSNFYALHW YRKETAKSPALFVMTLNGDEKKERISATILNTEGYSVLYIGCSQPDSDATYLCAL VNNNDMRFQAGTRLTVEPNIGNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSGSKD SDVYITDKTVLDMRSMDFKSNASAVASNSKDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCD VKLVKESFETDNLNFGNLSVIGFRILLLVAGFNLLMLRLWSS
14	R11KE β鎖	MDSWTFQGVSLGILVAHHDAGYIGSPRHEVTMGGEVTLRCPISGHNSLFVRYET MMRGLLELLIYFNNNVPIDDSGMPEDRPSAEMPNASFTSLKIQSPSPDSAVYFCASS PGSDTQYFGPGTRTLTVLEDLNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFPYD HVELSWMNGKEVHSGVSDTPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWMNPNHFRQ QVQVGLSENDEWTDRAKPYTQIVSAEAWGRADCGFTSESVOGGVLSATILYEILL GKATLYAVLVSAVLVLMAMVERKDSRG
15	R20P1H7 α鎖	MEHMLDCAFIVLVLQGLWLSGEDQVTSPEALRLQEGESSLNCSTYVSGLRGLFWY RQDPGKGFELFILYSAGEEKEKERLKAITLKESFLHITAPKPEDSATYLCAVQGE NSGYSLTLPFGKGTLLVSPDIGNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSGSK DSVYITDKTVLDMRSMDFKSNASAVASNSKDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCD DKLVKESFETDNLNFGNLSVIGFRILLLVAGFNLLMLRLWSS
16	R20P1H7 β鎖	MGPQLLGYVVLCLGAGPLEADVTGNPRYLITVTGKELTVTCGQNMNHEVMSWYRQD FGCLGRQIYYSMNVEYTDGQDVEGYSVREKERNFPLILESFPNQTSLYFCASSL GPGLAAYNBQGFQPGTRTLTVLEDLNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATG YPDHVELSWMNGKEVHSGVSDTPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWMNPNH FRQVQVGLSENDEWTDRAKPYTQIVSAEAWGRADCGFTSESVOGGVLSATILYEILL GKATLYAVLVSAVLVLMAMVERKDSRG
17	R7P1D5 α鎖	MKTFAGFSFLFLVLQGLDQMSRGEDVEQSLFLSVREGDSSVINCITYDSSSYLVYWK GEPGAGLQLLTYIFSNMNMKQDGRRLTVLLNKKDKHLSLRADTQDGSATYFCAEYS SASKIIFGSGTRLSIPNIGNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSGSKDS DVYITDKTVLDMRSMDFKSNASAVASNSKDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCDY RLVERSFETDNLNFGNLSVIGFRILLLVAGFNLLMLRLWSS
18	R7P1D5 β鎖	MGSWTFQGVSLGILVAHHDAGYIGSPRHEVTMGGEVTLRCPISGHNYLFWYRGT MMRGLLELLIYFNNNVPIDDSGMPEDRPSAEMPNASFTSLKIQSPSPDSAVYFCASR ANTGELFQGGTRTLTVLEDLNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFPYD HVELSWMNGKEVHSGVSDTPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWMNPNHFRQ QVQVGLSENDEWTDRAKPYTQIVSAEAWGRADCGFTSESVOGGVLSATILYEILLG KATLYAVLVSAVLVLMAMVERKDSRG
19	R10P2G12 α鎖	MLTASLLRAVIASTGVSSMAGKVTQAGTEISVVEKEDVILDCVETRTTYVYVY RQPPSGELVELIRRNFSDEQNEISGRVSNWFGKSTSSFNFTIITASGVDSAVYFCAL SEGNQNTPLVFGKGTLLSVIANIGNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNV SGKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNASAVASNSKDFACANAFNNSIIPEDTFFPSP SSCDYKLVKESFETDNLNFGNLSVIGFRILLLVAGFNLLMLRLWSS
20	R10P2G12 β鎖	MGIRLLDQVAFCLAGLVLDVWVYQSSRYLVKRTGKVFLECGQMDHNMFWYRQD FGCLGRQIYYSYDWMKRGDIPGYSVREKERNFPLILESANTQTSMLYFCASSL SSGSHQETQYFGPGTRTLTVLEDLNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATG YPDHVELSWMNGKEVHSGVSDTPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWMNPNH FRQVQVGLSENDEWTDRAKPYTQIVSAEAWGRADCGFTSESVOGGVLSATILYEILL GKATLYAVLVSAVLVLMAMVERKDSRG

10

20

【表 4 - 4】

21	R10P1A7 α鎖	MKTFAGFSFLFLVLQGLDQMSRGEDVEQSLFLSVREGDSSVINCITYDSSSYLVYWK GEPGAGLQLLTYIFSNMNMKQDGRRLTVLLNKKDKHLSLRADTQDGSATYFCAEYS ETRLMFGDGTGLVVKPNIGNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSGSKSD VYITDKTVLDMRSMDFKSNASAVASNSKDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCDYK LVKESFETDNLNFGNLSVIGFRILLLVAGFNLLMLRLWSS
22	R10P1A7 β鎖	MLILLILLGPGISLLPGSLAGSLGAWSHQFSVWIKSGTSSVKIEBESLDQATTM FWYRQFPKQSLMLMATSNEGSXATYEGGVKEDFLINHASLTSLTVTSAPHDSS FYICARAGSHQGFQPGTRTLTVLEDLNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLAT GFPYDPHVELSWMNGKEVHSGVSDTPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWMN PNHFRQVQVGLSENDEWTDRAKPYTQIVSAEAWGRADCGFTSESVOGGVLSATIL YEILLGKATLYAVLVSAVLVLMAMVERKDSRG
23	R4P1D10 α鎖	MKSLRVLLVILVLQGLSWMVSGKEVEGNSGPLSVPEGATASLNCITYSDRGSQSFYV RQVSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAGLNKASQVYSLLRDSQPSDSATYLCANWF HDKITIRCKGTLLILNIGNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSGSKSD VYITDKTVLDMRSMDFKSNASAVASNSKDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCDYK LVKESFETDNLNFGNLSVIGFRILLLVAGFNLLMLRLWSS
24	R4P1D10 β鎖	MGRFLDQVAFCLAGCPVDSGVGTQIPKHLITATGGRVTLRCSPRSGDLSVWVYQGS LDQGLQELIHYNGEERAKGNILERFSAQGFPLHSELNLSLELGDALYFCASSV ASAVGYTFQSGTRLTIVEDLNKVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFPYD HVELSWMNGKEVHSGVSDTPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWMNPNHFRQ QVQVGLSENDEWTDRAKPYTQIVSAEAWGRADCGFTSESVOGGVLSATILYEILLG KATLYAVLVSAVLVLMAMVERKDSRG
25	R4P3F9 α鎖	MKSLRVLLVILVLQGLSWMVSGKEVEGNSGPLSVPEGATASLNCITYSDRGSQSFYV RQVSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAGLNKASQVYSLLRDSQPSDSATYLCANWF GAGSYQLTFGKGTLLSVIPNIGNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSGSK SDVYITDKTVLDMRSMDFKSNASAVASNSKDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCD DKLVKESFETDNLNFGNLSVIGFRILLLVAGFNLLMLRLWSS
26	R4P3F9 β鎖	MGRFLDQVAFCLAGCPVDSGVGTQIPKHLITATGGRVTLRCSPRSGDLSVWVYQGS LDQGLQELIHYNGEERAKGNILERFSAQGFPLHSELNLSLELGDALYFCASSV ESSVGYTFQSGTRLTIVEDLNKVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFPYD HVELSWMNGKEVHSGVSDTPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWMNPNHFRQ QVQVGLSENDEWTDRAKPYTQIVSAEAWGRADCGFTSESVOGGVLSATILYEILLG KATLYAVLVSAVLVLMAMVERKDSRG
27	R4P3H3 α鎖	MKSLRVLLVILVLQGLSWMVSGKEVEGNSGPLSVPEGATASLNCITYSDRGSQSFYV RQVSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAGLNKASQVYSLLRDSQPSDSATYLCANWF GAGSYQLTFGKGTLLSVIPNIGNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSGSK SDVYITDKTVLDMRSMDFKSNASAVASNSKDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCD DKLVKESFETDNLNFGNLSVIGFRILLLVAGFNLLMLRLWSS
28	R4P3H3 β鎖	MGRFLDQVAFCLAGCPVDSGVGTQIPKHLITATGGRVTLRCSPRSGDLSVWVYQGS LDQGLQELIHYNGEERAKGNILERFSAQGFPLHSELNLSLELGDALYFCASSV YPDHVELSWMNGKEVHSGVSDTPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWMNPNH FRQVQVGLSENDEWTDRAKPYTQIVSAEAWGRADCGFTSESVOGGVLSATILYEILL GKATLYAVLVSAVLVLMAMVERKDSRG

30

40

【表 4 - 5】

29	R36P3F9 α 鎖	ME TLGVSLVILWLGLARVNSGGGEEDPQALS IOEGENATMNCVS YETS INNLOWYRQ NSGRGLVHLILRSNEREHWSCRLEVTLDTSKSSSLLITASRAADASYFCATVSN YGLIWCAGTKLITKPDIGNPDPAYVQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSGSKDSV YITDKTVLDMRSMDFKSNASAVWSNKSDFACANAFNNSIIPEDIFFPSPSSCDVKL VEKSFETDNLNFQNLVSIGFRILLLEKAGFNLLMLTLRWSS
30	R36P3F9 β 鎖	MGPQLLGYYVLCLLGAGPLEAGVTGNPRYLITVTGKLLTVTCSQNNHHEYMSWYRGD PGLGLRQIYYSNNVEYTDKGDVPEGVKYSRKEKRNFLILESPSPNGTSLYFCASS TSGLSGEQVFGPGTRLTVLEDLNVFPPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGCF YPDHVELSWMNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWMNPNHFR CQVQVYGLSENDEWTDQRAKPVITQIVSAEAWGRADCGFTSES YQGGVLSATILYE ILLGKATLYAVLYSALVLMAMVERKDSG
31	R52P2G11 α 鎖	MKRHLTFLVILWLVFYRNGQNGVGGPGLIILEGKNCLOGNVYSPFSNLRVY KQDTGRGPVSLTMTFSENTSNRGYVATLDADTKGSLHITASGLSDSASYICVVS AYGKLPFGAGTGVVYTPDIGNEDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSGSKDS DVYITDKTVLDMRSMDFKSNASAVWSNKSDFACANAFNNSIIPEDIFFPSPSSCDV KLVEKSFETDNLNFQNLVSIGFRILLLEKAGFNLLMLTLRWSS
32	R52P2G11 β 鎖	MDSVTFQCVSLCILVAKHTDAGVIGSPRHEVTMGQEVTLROKPISGHNSLFWYRGT MMRGLLELLIYFNNNVPIDUSGMPEDRPSAKMPNASFSLTQPSPEPDSAVYFCASS LGSPPGNGPQHPGQDTRLILLEDLNVFPPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGCF FPDHVELSWMNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWMNPNHFR CQVQVYGLSENDEWTDQRAKPVITQIVSAEAWGRADCGFTSES YQGGVLSATILYE ILLGKATLYAVLYSALVLMAMVERKDSG
33	R53P2A9 α 鎖	MACPGFLWALVISTCLEFSMAGTIVTQSGPEMSVQEAETVLSOTYDTSSESVYLLFWY TGPSPSRMILYIRQEAYEGGNATENRFSVNFQKAAKFSKLISDSDLGDAMAYFCAY NSYAGGTSYGLTFGGTILTYHPNIGNPDPAYVQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTN VSGSKDSVYITDKTVLDMRSMDFKSNASAVWSNKSDFACANAFNNSIIPEDIFFP SPSSCDVKLVEKSFETDNLNFQNLVSIGFRILLLEKAGFNLLMLTLRWSS
34	R53P2A9 β 鎖	MGPQLLQWVLLCCLGAGPVDAGVTGSPHILITRGGQVTLRCSPISGHNSLFWYRGT LQGGQPIFOYVEKEERGNGNEPDRFSARGFPNYSLENNWALLLQDSALYLCASSL DGTSEQVFGPGTRLTVTEDLNVFPPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGCFY PDHVELSWMNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWMNPNHFR CQVQVYGLSENDEWTDQRAKPVITQIVSAEAWGRADCGFTSES YQGGVLSATILYE ILLGKATLYAVLYSALVLMAMVERKDSG
35	R28P1A9 α 鎖	ME TLGVSLVILWLGLARVNSGGGEEDPQALS IOEGENATMNCVS YETS INNLOWYRQ NSGRGLVHLILRSNEREHWSCRLEVTLDTSKSSSLLITASRAADASYFCATVSN YGLIWCAGTKLITKPDIGNPDPAYVQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSGSKDS DVYITDKTVLDMRSMDFKSNASAVWSNKSDFACANAFNNSIIPEDIFFPSPSSCDV KLVEKSFETDNLNFQNLVSIGFRILLLEKAGFNLLMLTLRWSS
36	R28P1A9 β 鎖	MGSVTLQCVSLCILVAKHTDAGVIGSPRHEVTMGQEVTLROKPISGHNSLFWYRGT MMRGLLELLIYFNNNVPIDUSGMPEDRPSAKMPNASFSLTQPSPEPDSAVYFCASS YFGWNEKLPFGSGTGLS VLEDLNVFPPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGCF PDHVELSWMNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWMNPNHFR CQVQVYGLSENDEWTDQRAKPVITQIVSAEAWGRADCGFTSES YQGGVLSATILYE ILLGKATLYAVLYSALVLMAMVERKDSG

10

20

【表 4 - 6】

37	R28P2A8 α 鎖	MMKSLRVLVILWLQLSVWWSGGKEVEQDPCPLSVPEGATVSLNCTYSNSAFQYFMW YRQVSRKGPPELWMYVSSGNKEDGRFTAQVDRSSKYSISLFTIDSDGPSDATVLCAMS DVSGGYNKLPFGAGTRLAVHPYIGNPDPAYVQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSG SKDSVDYITDKTVLDMRSMDFKSNASAVWSNKSDFACANAFNNSIIPEDIFFPSP SSCDVKLVEKSFETDNLNFQNLVSIGFRILLLEKAGFNLLMLTLRWSS
38	R28P2A8 β 鎖	MGPQLLGYYVLCCLGAGPLEAGVTGNPRYLITVTGKLLTVTCSQNNHHEYMSWYRGD PGLGLRQIYYSNNVEYTDKGDVPEGVKYSRKEKRNFLILESPSPNGTSLYFCASS PDGIDEGQFGPGTRLTVLEDLNVFPPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGCFY PDHVELSWMNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWMNPNHFR CQVQVYGLSENDEWTDQRAKPVITQIVSAEAWGRADCGFTSES YQGGVLSATILYE ILLGKATLYAVLYSALVLMAMVERKDSG
39	R28P3H1 α 鎖	MASAPISMLWALVISTCLEFSMAGTIVTQSGPEMSVQEAETVLSOTYDTSSESVYLLFWY YPNRGLQFLKVIYITGNLVKGSYGFRAEFNKESQTSFHLKEPSALVSDSALYFCAYR WNRDDKLIIFCGGTRLVILPNIGNPDPAYVQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSGSK DSVDYITDKTVLDMRSMDFKSNASAVWSNKSDFACANAFNNSIIPEDIFFPSPSSCD VKLVEKSFETDNLNFQNLVSIGFRILLLEKAGFNLLMLTLRWSS
40	R28P3H1 β 鎖	MSNOVLQCVVLCCLGAGPLEAGVTGNPRYLITVTGKLLTVTCSQNNHHEYMSWYRGD PGGGLRQIYYSNNVEYTDKGDVPEGVKYSRKEKRNFLILESPSPNGTSLYFCASS AEGGEQVFGPGTRLTVTEDLNVFPPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGCFY PDHVELSWMNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWMNPNHFR CQVQVYGLSENDEWTDQRAKPVITQIVSAEAWGRADCGFTSES YQGGVLSATILYE ILLGKATLYAVLYSALVLMAMVERKDSG
41	R35P3A4 α 鎖	MTSIRAVFIELWLQDLVNGBNVEGHPSTLSVQEGDSAVIKCTYSDSASNYPYVYKQ ELGKRPQLIIDIRSNVGEKKDQRIATVTLNKTAKHFSLHITETQPEDSAYVYFCASS TGGYNKLPFGAGTRLAVHPYIGNPDPAYVQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSGSK DSVDYITDKTVLDMRSMDFKSNASAVWSNKSDFACANAFNNSIIPEDIFFPSPSSCD VKLVEKSFETDNLNFQNLVSIGFRILLLEKAGFNLLMLTLRWSS
42	R35P3A4 β 鎖	MSIGLLDCAALSLVAGPWNAGVTOTPKFQVLTGQSMTLOCAQNNHHEYMSWYRGD PGMGLRLIYYSVAGITDQGEVYNGYVNSRSTIEDFPLRLLSAAPSQTSYVYFCASS GGASQEQVFGPGTRLTVTEDLNVFPPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGCFY PDHVELSWMNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWMNPNHFR CQVQVYGLSENDEWTDQRAKPVITQIVSAEAWGRADCGFTSES YQGGVLSATILYE ILLGKATLYAVLYSALVLMAMVERKDSG
43	R37P1C9 α 鎖	MKLVTSITVLLSLGTWGDARTQPNWSNESNEEPVHLPOHNSITSGTDYIHWYRQLP SQGPEYVTHGLTSNNVNRWASLAIAEDRESSLILHRA TLRDAAVYQILNPNKFY FGSGTKLVKXPIGNPDPAYVQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSGSKDSVDYITD KTVDLRSMDFKSNASAVWSNKSDFACANAFNNSIIPEDIFFPSPSSCDVKLVEK SFETDNLNFQNLVSIGFRILLLEKAGFNLLMLTLRWSS
44	R37P1C9 β 鎖	MGPQLLHWWALLCTGWCDAWVIGNPRYQVTPGKPVTLTCSQTLNHNWVWYQGR SSQAPKLLFHYDQDFMNEADIPNFGSRBNP TSFCFLDIRSPGLGDAMVLCATSS GETWEKLPFGSGTGLS VLEDLNVFPPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGCFY PDHVELSWMNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWMNPNHFR CQVQVYGLSENDEWTDQRAKPVITQIVSAEAWGRADCGFTSES YQGGVLSATILYE ILLGKATLYAVLYSALVLMAMVERKDSG

30

40

50

【表 4－7】

45	R37P1H1 α 鎖	MTKVSLLVAVVSTGLESQAGTVTSQFEMSVOEAEVTLSCTVDTSESNYLFWY KQPPSRQWLLVIRQEAQKQANATENRFSWNPQKAKSFSLKISDSGLGDTAMYPQAF GYSGGGADGLTGGKGTLLIGPYIGNPDPVYVQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS GSKDSVYITDKTVLDMRSMDFKSNSSAVWSNKSDFAACANAFNNSIIPEDTFPSPES SSODVKLVEKSFETDNLNFGNLSVIGFRILLLEVAGFNLLMTLRWSS
46	R37P1H1 β 鎖	MGPQLLWALLCELLGAGLVDAQVIGSPHLLKTRGGQVTLRCSFSGHDTVSWYQGA LGQGPQFIQVYEEERQGNFPDRFSHQGFNYSSELNACLIGDSALYLCASSN EGQWNEAEAFPGGTRLTVVEDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFF PDHVELS#WVNGKEVHSGVSTDPQPLEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPBNHF RQVGFYGLSENDEWTDRAKPVTOIVSAEAWGRADCGFTSVSYGGGVL SATILYEIL LLGKATLYAVLV SALVLMAMVERKDF
47	R42P3A9 α 鎖	MKRILGALLGLLSAQVQCVRGTVQVQSPFDLILQEGANSTLBNFSDSVNWLQWFG NPWQGLINLFIIPSGTKQNGRLSATI VATERYSLLYISSSQITDSGVYFCVHNFNK FVPGSGTKLVNFPNIGNPDPVYVQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSVYI IDKTVLDMRSMDFKSNSSAVWSNKSDFAACANAFNNSIIPEDTFPSPESODVKLVE KSFETDNLNFGNLSVIGFRILLLEVAGFNLLMTLRWSS
48	R42P3A9 β 鎖	MLSPDLPSAWNTRLLCHWMLLGLGAVSVAAGVIGSPRHLIKEKRETA LKCYPIPR HDTVYVYGGQPGQDPQFLISFYKMQSDKGSIPDRFSAQGSQVHSELNWSLELGD SALYFCASSSLLGGYNEQFFGPGTRLTVLEDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHTQKAT LVCLATGFFPDHVELS#WVNGKEVHSGVSTDPQPLEQPALNDSRYCLSSRLRVSAT FWQNPBNHFRQVGFYGLSENDEWTDRAKPVTOIVSAEAWGRADCGFTSVSYGGGV LSATILYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVERKDSRG
49	R43P3F2 α 鎖	MLTASLLRAVIAISICVYSSMAGKVTQAGTISVYKEDVILDCWYETRDITTYLFWY KQPPSGELVFLIRRNSTDEQNEISGRYSWNPQKSTSSNFTITASGVDSAVYFCAL SNNAQNM LTFGGTRLWVKPHIGNPDPVYVQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQ SKDSVYITDKTVLDMRSMDFKSNSSAVWSNKSDFAACANAFNNSIIPEDTFPSPES SODVKLVEKSFETDNLNFGNLSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRWSS
50	R43P3F2 β 鎖	MLSPDLPSAWNTRLLCHWMLLGLGAVSVAAGVIGSPRHLIKEKRETA LKCYPIPR HDTVYVYGGQPGQDPQFLISFYKMQSDKGSIPDRFSAQGSQVHSELNWSLELGD SALYFCASSSPTGTSYNEQFFGPGTRLTVLEDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHTQKAT LVCLATGFFPDHVELS#WVNGKEVHSGVSTDPQPLEQPALNDSRYCLSSRLRVSAT FWQNPBNHFRQVGFYGLSENDEWTDRAKPVTOIVSAEAWGRADCGFTSVSYGGG VL SATILYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVERKDSRG
51	R43P3G5 α 鎖	MEKNPLAAPLLILWFLDCVSSILNVEGSGSLHVGQSDSTNFTGSPSSNFVALHW YRWETAKSPEALFVMTLWQDEKKKGRISATLNTKSGVYLYIKGSQPEDSATYLCAL NRDOKIIFGGTRLHILPNIGNPDPVYVQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKD SDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSSAVWSNKSDFAACANAFNNSIIPEDTFPSPESOD VKLVEKSFETDNLNFGNLSVIGFRILLLEVAGFNLLMTLRWSS
52	R43P3G5 β 鎖	MGRTRLCRVAFPGAVGLVDVYVIGSRYLVKRTGKVFLEQVQMDHNNFWYQD PGGLRLIYFSDYVNMKENGITPBGYSVREKKEFSLILESASNGTSMYLCASRL PSRTYEQVPGGTRLTVTEDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPD HVELS#WVNGKEVHSGVSTDPQPLEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPBNHFRQ VGFYGLSENDEWTDRAKPVTOIVSAEAWGRADCGFTSVSYGGGVL SATILYEILL GKATLYAVLV SALVLMAMVERKDSRG

10

20

【表 4－8】

53	R56P2E7 α 鎖	METLLGLLILWLQWVSSKQEVTOIPAALSYPEGENTVLNCSFTDSATYNLQWFRQ DPKGLTSLLLIGSSQREGTSGRLNASLDESSGRSLYIAASQPGSATYLCANNSD YKLSFGAGTIVYRANI QNPDPVYVQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSV YITDKTVLDMRSMDFKSNSSAVWSNKSDFAACANAFNNSIIPEDTFPSPESODVKL VEKSFETDNLNFGNLSVIGFRILLLEVAGFNLLMTLRWSS
54	R56P2E7 β 鎖	MLSPDLPSAWNTRLLCHWMLLGLGAVSVAAGVIGSPRHLIKEKRETA LKCYPIPR HDTVYVYGGQPGQDPQFLISFYKMQSDKGSIPDRFSAQGSQVHSELNWSLELGD SALYFCASSSLLGLTGQVYTFGSGTRLTVVEDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHTQKAT LVCLATGFFPDHVELS#WVNGKEVHSGVSTDPQPLEQPALNDSRYCLSSRLRVSAT FWQNPBNHFRQVGFYGLSENDEWTDRAKPVTOIVSAEAWGRADCGFTSVSYGGG VL SATILYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVERKDF
55	R11P3D3 α 鎖	MEKNPLAAPLLILWFLDCVSSILNVEGSGSLHVGQSDSTNFTGSPSSNFVALHW YRWETAKSPEALFVMTLWQDEKKKGRISATLNTKSGVYLYIKGSQPEDSATYLCAL YNNDWAFGACTRLTVKPNIGNPDPVYVQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKD SDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSSAVWSNKSDFAACANAFNNSIIPEDTFPSPESOD VKLVEKSFETDNLNFGNLSVIGFRILLLEVAGFNLLMTLRWSS
56	R11P3D3 β 鎖	MDSVTFQVSLCIVAKHTDAQVIGSPHTEVTEMGQVTLRCKPISGHNSLFWYRGT MMRGLLELLIYFNNNVPIIDSGMPEDRFSANPNASFSLLKIQSPREPRISAVYFCASS PGSTIQVPGGTRLTVLEDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPD HVELS#WVNGKEVHSGVSTDPQPLEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPBNHFRQ VGFYGLSENDEWTDRAKPVTOIVSAEAWGRADCGFTSVSYGGGVL SATILYEILL GKATLYAVLV SALVLMAMVERKDSRG
57	R16P1C10 α 鎖	MKSLRVLLVILWLGLSWVVSQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCITYSDRGSQFFWY RQYSGKSPELIMFI VSNQDKEDGFTAGLNKASQVYSLIIRDSQPSDATYLCANNS SNPQNEELTPGTGTRLTIPNIGNPDPVYVQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSK KDSVYITDKTVLDMRSMDFKSNSSAVWSNKSDFAACANAFNNSIIPEDTFPSPES ODVKLVEKSFETDNLNFGNLSVIGFRILLLEVAGFNLLMTLRWSS
58	R16P1C10 β 鎖	MGRLLQWVLLGLLGGAPVWAGVTOIPRYLIRTRGGQVTLSCSPISGHRSVSWYQQT PGGLQFLFEYFSETOBNKGNFPGRFSGQGSNSRSENNYSLELGD SALYLCASSP WDSPNEGYFGPGTRLTVTEDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPD HVELS#WVNGKEVHSGVSTDPQPLEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPBNHFRQ VGFYGLSENDEWTDRAKPVTOIVSAEAWGRADCGFTSVSYGGGVL SATILYEILL GKATLYAVLV SALVLMAMVERKDSRG
59	R16P1E8 α 鎖	MMKSLRVLLVILWLGLS#WVVSQKEVEQDQGPLSVPEGAIVSLNCTYSNSAPQVFM# YRQYSRKGPELIMYTVSNGKEDGFTAGVDESSRYSLFIRDSQPSDATYLCANNS EAGNKLTFGGTRVLEPNIGNPDPVYVQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSK KDSVYITDKTVLDMRSMDFKSNSSAVWSNKSDFAACANAFNNSIIPEDTFPSPES ODVKLVEKSFETDNLNFGNLSVIGFRILLLEVAGFNLLMTLRWSS
60	R16P1E8 β 鎖	MGRTRLCRVAFPGAVGLVDVYVIGSRYLVKRTGKVFLEQVQMDHNNFWYQD PGGLRLIYFSDYVNMKENGITPBGYSVREKKEFSLILESASNGTSMYLCASRL PSRTYEQVPGGTRLTVTEDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPD HVELS#WVNGKEVHSGVSTDPQPLEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPBNHFRQ VGFYGLSENDEWTDRAKPVTOIVSAEAWGRADCGFTSVSYGGGVL SATILYEILL GKATLYAVLV SALVLMAMVERKDF

30

40

50

【表 4 - 9】

61	R17P1A8 α鎖	MKSLRVLLVILWLQSLVWVSGQKEVEGNSGFLSVPEGAIASLNCVTSYDRSGSFFWY RQYSGKSPELIWSIYSGDKEDGRFTAGLNKASQYVSLIIRDQSPSDSATYLCVAVLN QAGTALIFGKGTLLSVSSNIQNPDPFAYVGLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSGSKD SDVYITDKTVLDMRSMDFKSNASAVASNKSDFAANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCD VKLVKESFETDNLNFGNLSVIGFRILLKVGAFNLLMLRLWSS
62	R17P1A8 β鎖	MGFRLLDGVAFCLLGAGCPYDSGVTOIPKHLITAGQORVILRQSPRSGDLSVWVGGOS LHQGLQFLIQYNGEERAKGNILERFSAGQFPDLHSELNLSLELGDALYFCASSA ETGFWLQNBQFFGGTRLTVLEDLNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGF YPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFNONPRNH FRQVQVGLSENDEWTDRAKPYVTQIVSAEAWGRADCGFTSESVOGGVLSATILYEI LLGKATLYAVLVSAVLVMAWVKKDSRG
63	R17P1D7 α鎖	MACPGLWALVISTGLEFSMAGVTYQSQPEMSVQEAETVLSCTYDTSESDDYLFWY KOPPSRGMILVIRGEAYRQGNATENRFSVNFQKAKSFSILKISDQGLGDAAMYFCAY RWAGQSEKLVFGEGTKLTVNPHYIQKPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS GSKDSVYITDKTVLDMRSMDFKSNASAVASNKSDFAANAFNNSIIPEDTFFPSPSE SSCDVKLVKESFETDNLNFGNLSVIGFRILLKVGAFNLLMLRLWSS
64	R17P1D7 β鎖	MTIRLLCYMGFYFLGAGLWEADIYQTPRYLVIGTGKKITLQSGQTMGHWMVWYGGD PGWELHLIHYSYGVNSTERGDLSSSESIVSRIRTEHFPLILESARPSHTSQVLCATEL WSSQGTGLEFFGGGSRLLTVLEDLNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGF YPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFNONPRNH FRQVQVGLSENDEWTDRAKPYVTQIVSAEAWGRADCGFTSESVOGGVLSATILYEI LLGKATLYAVLVSAVLVMAWVKKDSRG
65	R17P1G3 α鎖	WSTYSNGDKREDGRFTAGLNKASQYVSLIIRDQSPSDSATYLCVAVGPGTVEYIPGT GTRLEVLANIQNPDPFAYVGLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSGSKDSVYITDKTV LDMRSMDFKSNASAVASNKSDFAANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCDVKLVKESFET DNLNFGNLSVIGFRILLKVGAFNLLMLRLWSS
66	R17P1G3 β鎖	MGPOLGVVVLCLLGAGPLEAQVTQNPVYLITVTGKKLTVTQSGNNHEVMSWYRQD PGLGLRQIYYSMMNVEVTDKGDWPEGYKVSKEKRNFPILLESFPGTSLYFCASSP GGSGNEGFPGGTRLTVLEDLNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFY HVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFNONPRNH FRQVQVGLSENDEWTDRAKPYVTQIVSAEAWGRADCGFTSESVOGGVLSATILYEI LLGKATLYAVLVSAVLVMAWVKKDSRG
67	R17P2B6 α鎖	MKSLRVLLVILWLQSLVWVSGQKEVEGNSGFLSVPEGAIASLNCVTSYDRSGSFFWY RQYSGKSPELIWSIYSGDKEDGRFTAGLNKASQYVSLIIRDQSPSDSATYLCVAVLN QAGTALIFGKGTLLSVSSNIQNPDPFAYVGLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSGSKD SDVYITDKTVLDMRSMDFKSNASAVASNKSDFAANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCD DVLVKSFEETDNLNFGNLSVIGFRILLKVGAFNLLMLRLWSS
68	R17P2B6 β鎖	WLSPLPDSANNTRLLGHMLCLLGAVSAAGVIGSPRHLEKREKREKATLRCYPIPR HDVYVWVGGPGQDPQFLISFYEDWQSDKGSIPDRFSAQGFSDYHSELNMSLELGD SALYFCASSLGRGGGPGHFGGTRLSILEDLNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATL VCLATGFFPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATF NONPRNHFRQVQVGLSENDEWTDRAKPYVTQIVSAEAWGRADCGFTSESVOGGVLS SATILYEILLGKATLYAVLVSAVLVMAWVKKDSRG
69	R11P3D3KE α鎖	WEKNPLAAPLLILWFHLCVSSILNVGSGPQSLHVQEGDSNMTFCSPSSNFYALHW YRKETAKSPEALFVMTLNGDEKKKGRISATLNTKEGYSVLYIRGSGPQSDSATYLCAL VNNNDWRFAGATRLTVKPNIQNPDPFAYVGLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSGSKD SDVYITDKTVLDMRSMDFKSNASAVASNKSDFAANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCD VKLVKESFETDNLNFGNLSVIGFRILLKVGAFNLLMLRLWSS

10

20

30

40

50

【表 4－10】

70	R1P3D3KE β 鎖	NNNVPIDDSQMPEDRFSARMFNASFS TLRIQPSEPRDS AVYFCASSPGSDTGTQYFGP GTRLTVLEDLENVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPHVELSWWVNGK EVHSGVSTDPOPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWONPNHFRQGVQGVLSSEN EWTODRAKPVTOIVSAEAWGRADCGFTSESVOGGVLSATILYEILLKATLYAVLV ALVLMAMVKKRDSRG
71	R39P1C12 α 鎖	TVLVVVRGEPGAGLQGLTYIFSNMDWQGDQRLTVLINKEKDRHLSLRADTGTGDSAI YFOAEIDNQQGKLIFFGGTIELSVFPNIQNPDPAYVOLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQI NVSQSKSDVYITDKTVLDWMSMDFKSNSAYAWNSKDFACANAFNNSIIPEDTFFP SPSSCDVKLVEKSFETDNLNFGNLSVIGFRILLLRVAGFNLLMTLRLWSS
72	R39P1C12 β 鎖	MGPGLCOWALLCGLGAGLVDAGVTCGSPHLITRGGQVILRQSPESGHDTVS#VQGA LGCGPGPIFGVYEEERGRGNFDRFSGHGFNYSSELNWNALLLGDSALYLCASSQ LNTEAFPGGQGLTVVVEDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPH VELSWWVNGKEVHSGVSTDPOPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWONPNHFRQ GVQGVLSSENDEWTODRAKPVTOIVSAEAWGRADCGFTSESVOGGVLSATILYEILL KATLYAVLVSAALVLMAMVKKRDSRG
73	R39P1F5 α 鎖	MKSLRVLLVILWLQLS#VWSQKEVEGNSGPLSVPEGAIASLNCVTSDRSGSFFWY RQVSGKSPELIMFIVSNCGKEDGRTAGLNKASQVYSLLRDSGQPSDSATYLCANW ARLWFGDGTGLVYKPNIQNPDPAYVOLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSGSKSD VYITDKTVLDWMSMDFKSNSAYAWNSKDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCDVKL VEKSFETDNLNFGNLSVIGFRILLKRVAGFNLLMTLRLWSS
74	R39P1F5 β 鎖	MDTWLCWVAIFSLKAGLTEPEVTOGPSHGVTOMGGQEVILRCVPISNHLVFWYRQI LGQKVEFLVSFYNNIEISEKSEIFDDQFSVERPDGNSFTLKRSTKLEDSAMVFCASS GGANEGYFGPGTRLTVTEDLNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDP HVELSWWVNGKEVHSGVSTDPOPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWONPNHFRQ GVQGVLSSENDEWTODRAKPVTOIVSAEAWGRADCGFTSESVOGGVLSATILYEILL KATLYAVLVSAALVLMAMVKKRDSRG
75	R40P1C2 α 鎖	MACPGELWALVISTGLEPMAQIVTQSQPEMSVQEAETVILSCTDYTSES DYYLFWY KQPPSRQMLVIRQEAARKONATENRFSVNFQKAARFSLLKISDSGLGDAAMVFCAY LNVOLIRGAGTKLIIRKPDIONPDPAVOLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSGSKSD DYYITDKTVLDWMSMDFKSNSAYAWNSKDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCDVKL VEKSFETDNLNFGNLSVIGFRILLKRVAGFNLLMTLRLWSS
76	R40P1C2 β 鎖	MDTWLCWVAIFSLKAGLTEPEVTOGPSHGVTOMGGQEVILRCVPISNHLVFWYRQI LGQKVEFLVSFYNNIEISEKSEIFDDQFSVERPDGNSFTLKRSTKLEDSAMVFCASS EMTAYGVFGPGTRLTVTEDLNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDP HVELSWWVNGKEVHSGVSTDPOPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWONPNHFRQ GVQGVLSSENDEWTODRAKPVTOIVSAEAWGRADCGFTSESVOGGVLSATILYEILL KATLYAVLVSAALVLMAMVKKRDSRG
77	R41P3E6 α 鎖	MKSLRVLLVILWLQLS#VWSQKEVEGNSGPLSVPEGAIASLNCVTSDRSGSFFWY RQVSGKSPELIMFIVSNCGKEDGRTAGLNKASQVYSLLRDSGQPSDSATYLCANW ARLWFGDGTGLVYKPNIQNPDPAYVOLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSGSKSD VYITDKTVLDWMSMDFKSNSAYAWNSKDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCDVKL VEKSFETDNLNFGNLSVIGFRILLKRVAGFNLLMTLRLWSS
78	R41P3E6 β 鎖	MDTWLCWVAIFSLKAGLTEPEVTOGPSHGVTOMGGQEVILRCVPISNHLVFWYRQI LGQKVEFLVSFYNNIEISEKSEIFDDQFSVERPDGNSFTLKRSTKLEDSAMVFCASS QVTCGLFFGEGSRLTVLEDLNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDP HVELSWWVNGKEVHSGVSTDPOPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWONPNHFRQ GVQGVLSSENDEWTODRAKPVTOIVSAEAWGRADCGFTSESVOGGVLSATILYEILL KATLYAVLVSAALVLMAMVKKRDSRG

10

20

【表 4－11】

79	R43P3G4 α 鎖	MKSLRVLLVILWLQLS#VWSQKEVEGNSGPLSVPEGAIASLNCVTSDRSGSFFWY RQVSGKSPELIMFIVSNCGKEDGRTAGLNKASQVYSLLRDSGQPSDSATYLCANW ARLWFGDGTGLVYKPNIQNPDPAYVOLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSGSKSD VYITDKTVLDWMSMDFKSNSAYAWNSKDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCDVKL VEKSFETDNLNFGNLSVIGFRILLKRVAGFNLLMTLRLWSS
80	R43P3G4 β 鎖	MDTWLCWVAIFSLKAGLTEPEVTOGPSHGVTOMGGQEVILRCVPISNHLVFWYRQI LGQKVEFLVSFYNNIEISEKSEIFDDQFSVERPDGNSFTLKRSTKLEDSAMVFCASS GGALBQYFGPGTRLTVTEDLNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDP HVELSWWVNGKEVHSGVSTDPOPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWONPNHFRQ GVQGVLSSENDEWTODRAKPVTOIVSAEAWGRADCGFTSESVOGGVLSATILYEILL KATLYAVLVSAALVLMAMVKKRDSRG
81	R44P3B3 α 鎖	MAMLLGASVILWLQPDVWNSQGDNDQGVKONSPSLSVQEGRIISLNCQVYNSMFD YFLWYKXYPAGEPTFLISSSTKDNEDGRTVFLNKSAGHLSHIVPSPGDSAVY FOASGLYNQGGKLIFFGGTIELSVFPNIQNPDPAYVOLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQ TNVSGSKSDVYITDKTVLDWMSMDFKSNSAYAWNSKDFACANAFNNSIIPEDTFF PSPSSCDVKLVEKSFETDNLNFGNLSVIGFRILLKRVAGFNLLMTLRLWSS
82	R44P3B3 β 鎖	MGCRLGCVVFPGLGAGPLDAYSQTPRYLVTOGNDKSICQCNLGHDTWYVYRQD SKKFLKIMFSYNNKELINETVPNRFSPKSPDKAHLNHLNLSLEGDSAVYFCASSL GDRGYEQYFGPGTRLTVTEDLNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDP HVELSWWVNGKEVHSGVSTDPOPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWONPNHFRQ GVQGVLSSENDEWTODRAKPVTOIVSAEAWGRADCGFTSESVOGGVLSATILYEILL KATLYAVLVSAALVLMAMVKKRDSRG
83	R44P3E7 α 鎖	MKTFAGFSFLFLWLQDQMSRGEDYVQGLFLSVREQDSVINGTYDSSSTYLWYK QEPGAGLQGLTYIFSNMDWQGDQRLTVLLNKKDEHLSLRADTGTGDSAIYFOAEIN NNARLWFGDGTGLVYKPNIQNPDPAYVOLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSGSKSD DYYITDKTVLDWMSMDFKSNSAYAWNSKDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCDVKL VEKSFETDNLNFGNLSVIGFRILLKRVAGFNLLMTLRLWSS
84	R44P3E7 β 鎖	MLSPLDPSAWNTRLLCHVNLCLGAVSVAGVTOGSPRHLIKERETATLQYPIPR HDTVYVYQGGPGQDPQFLISFYENQSDKQSIIPDRFSAQGFSDYHSELNWSLELGD SALYFCASSPFDGNTQYFGPGTRLTVLEDLNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLV CLATGFYDPHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPOPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFW ONPNHFRQGVQGVLSSENDEWTODRAKPVTOIVSAEAWGRADCGFTSESVOGGVLS ATILYEILLKATLYAVLVSAALVLMAMVKKRDSRG
85	R49P2B7 α 鎖	MLLILVPVLEIFTLGGTRAGVYDGLSHVSVSEGLVILRCVYSSSVPYVLYVQ YHQGLGLLLYTTGATLVKINGGFAEFKKSSETSFLHTPSAHMSDAEYFCAYRI FQNEKLTFTGTRTLIIPNIQNPDPAYVOLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSGSKSD SDVYITDKTVLDWMSMDFKSNSAYAWNSKDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCDVKL VEKSFETDNLNFGNLSVIGFRILLKRVAGFNLLMTLRLWSS
86	R49P2B7 β 鎖	MGTRLLCRVAPCFLAVGLVDVYVYGSRYLVKRTGKRVPLECYQDMHDENWFWYRQD PGLGLRLIVFSYDVNMKEKDIPGCVSVREKKEPFLILEASITNGTSMVLCASSL MGELTGELFFGEGSRLTVLEDLNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDP HVELSWWVNGKEVHSGVSTDPOPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWONPNHFRQ GVQGVLSSENDEWTODRAKPVTOIVSAEAWGRADCGFTSESVOGGVLSATILYEILL KATLYAVLVSAALVLMAMVKKRDSRG

30

40

50

【表 4－12】

87	R55P1G7 α鎖	MMKSLRVLLVILWLQLSWVWSGQKEVEQDPGLSVPEGAIVSLNCTYSNSAFQYFWW YRQYSRKGPELLWYTYSSQNKEDGRFTAQYDKSSKYISLFIKDSQPSDSATYLCAMM GDTGTASKLTFGTGRQLQVTLDIQNPDPAYVGLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVVSQ SKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFAKANAFNNSIIPEDTFPPSPES SCDVKLVEKSFETDINLNFQNLVIGFRILLIKVAGENLLMTLRLWSS
88	R55P1G7 β鎖	MGIRLLCRVAFCLAVGLVDVKVYTGSRVYLVKRTGKVFLECVQDMDHENMFVYRQD PGLGLRLIYFSYDVXMKERGDIPBGVSYSREKKERFSLILESASTMQTSMYLCASSF GGVEQYFGPGTRLTVTEDLKNVFPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHV ELSWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSAFTWQNPРНHFRQGV QFYGLSENDEWTDRAKPYTQIVSAEAWGRADCGFTSESYYGGVLSATILYEILLGK ATLYAVLVYALVLMAMVKRKDSRG
89	R58P2A7 α鎖	VKPNIQNPDPAYVGLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVVSQSKDSDVYITDKTVLDMRS MDFKSNSAVAWSNKSDFAKANAFNNSIIPEDTFPPSPESSCDVKLVEKSFETDINLNF QNLVIGFRILLIKVAGENLLMTLRLWSS
90	R58P2A7 β鎖	MLCSLLALLGTFFGVRSQTIHQWPA TLVQPVGSPLECTVEGTSMPNLVYWRQAA GRGLQLLFYSYVIGQISSEVPQWLSASRPQDRQFILLSKKLLLSDSGFYLCAWSGLY AEQFFGPGTRLTVLEDLKNVFPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVEL SWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSAFTWQNPРНHFRQGVQF YGLSENDEWTDRAKPYTQIVSAEAWGRADCGFTSESYYGGVLSATILYEILLGKAT LYAVLVYALVLMAMVKRKDSRG

10

20

30

40

50

[illegible]

50

[illegible]

50

[illegible]

20

30

40

50

96 CD3 WPR: tggaaagcaacccactgtgagtttgacacacatagcttaagtaacgcctttttgc
aaggcatzgaanaatacattacatgaagatagaagaattgaagacaaggttga
acatgaagagacacgaanaattzgcacaaacggagattatgtgtgaagacgt
ttgcocccagctgaagcccaagacaagaattgtcccaazagacactccgcctca
gcagttctctagaagaacactcagatttttccgcgtgcocacagaacgtgaana
tgaocctctgtccttatttgaactaaccaatcagtttgcctttcgtctctat
gcgcctctctgcctcccaagacactcaatgaagacgcacaaacccctcaactga
ggccgcgcgcgggtgaacgtacacccacacgcgcgcacacatctgactctctgc
gcacacacactgaactctctgcacggcaaacacactgactgaacacacacggc
ctcaatcaagtgacgaacacacgaagttctgaattgtctctgcaggacacaga
tttccctctcacaacactcggatctatttggttcggacagacacggcctctcc
toggactccacacactgaattttcttgccctctgggaattccgcacgaaggaact
tccacagcaaaaagtzgaacacagagaagaagtcctgattttccctgactccctcc
gcttatactgaattctgaacctcgttgaagccocaaagatagcggatctactctt
tgtactgtttggctccacccgaactgaactctgggaagggacactcagctgag
cgttgatggactcttcccccatacgcgcacacacacacatagaagatcaacccctga
agagcggatttgaagactccacccgcgcgcgaagacgcaggaactgcgcctgatt
tcccccactcaactgggactctctgttgctgagagtcaggctcctctgtgctc
cttggtgcctgcactccaactcctgctgcgcgaagagagggccacgaactgagtc
tcctgaagcagctccacgaagaagggatgagtcacacttctgttcacacactg
ctccatgtctatacttccaaacacacacccctgcacaaactgctgaacccctgc
gactctgaaaaacccaggacacaaagattctgaagcgcgcgcgcacacacttgac
cttgaaacacgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc
gtacacgaactcctgactccctctgcactcttggacgcgcgcgcgcgcgcgcgc
ccaattccgggttctccctctgtgatgcacactggaacctggggaaaacgttga
agctcaagtgtcaactcctctctctgaagacacgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc
ttccgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc
gaacacacgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc
ggctgaagacacttttgtctgaactctgcactccctgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc
ggctcactctgtctctgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc
ctctgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc
cactccgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc
tgtctgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc
acaactcactgttgggcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc
ccctctgtgacacccctctactcgaacacacgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc
ctgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc
ctgtgtgaacccgctgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc
aatttttgaagagatttgctgatttttaactgattgtgttcctcttttagcact
gtgagtagcgcgtgccttaatacctttttagtattgtattgttccctgtatgct
ttcattttctctctgttgaatacctgatttgccttcttcttcttcttgaagatt
gtgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc
cccccactggttgggcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc
gcctttcccccctcaatttgcacgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc
ctgctgagacgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc
ggaagctgacgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc
gcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc
cttcccccgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc
cttcccccgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc
cttcccccgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc
cttcccccgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc

20

87	ED114TR	NKLPTGMYILCSLIIVRAGFDPDKRAIALVGHQHKPCBCSGGVSEAPNNSIOYV CCTKATAYLWNGKWRKVPVKISPSGEGQNCQPTFQDMHSCQVTEYRGCRBNK TPYATLTLIRSGSLNEVQILWPNQLLGPSCGSGINQVPSGATAPIHISDGGRINL TDFRWVYVQRLEQIHKAMTPELGYHPLALVDNDELSDARTEDILNTRFRLGMS NFSGLADQVLCILKLTGFTPLAPIPTSLYSLANASQCIPLPLVQPVQFQSNSS GLSSCFINDTEGIDLVAFVIMCTVSNANVSSPLCALNCSVFLGNNMAYVLPQWIL VQWQASLLDIDINPQDEVPFIPADHWIHRPRKAWQFIPLLAGLTAAFTGGAT GLCVSWVGYTKLSHGLISDQVWLSGTTQDQDQGVSLAPVWLNQRGLDLTAEQGG IDALBEGKCFYANKSGIYBNKILTRIGELGKARESLKSNAPLTLGLGFLPYLPLLL GLPLLTLLILTIIGPQFNRVLWQFVDRIISVQALVLTQVHGLKPL
285	WPREmut.1	cagtcctgcacgcagcgaatcaaacctctggatgatacaaaatttctgaagaatgaactg gtattctctaaactgctgctctctctcattgcatgtggaacagctctcttaactcctt tgatatctgatctatctctcccgatgctgctctcatttctcctctctgtatgaataact caatctcctctctcttataagaagaattgacccctctctctgaacacatctcctctat gaactgctgtttctgcgcgaaccccccctgattggagcgaattgcacaccccctctcac ctctcttcctggcaactcttcctctcccccctctcctatggcagcagcgaaactccatgcg ccctcctctgcacccctctacaacccacccctctctggcgaacccacatccctctg tgctctcgggaagaactccatgctctctctctggcctctgcctgctgattgagcgaactga tctctgcggaagaactccctctcctacgctcactcctctccactccactccgaacgagcct ctctccgcgcgcctctccgcgcctctgcgcgcctctgcgcctctgcgcctctgcgcctc agaacgctcagatctctcctctctggcgcgcctctccgcgc
268	WPREmut.2	gaacactctaacgcgaactttatcacgtttgctctgtttcttttttgatttgaggtata ctttaaagtattgaataaaacaaagtgtggagcactcaactcttaacttttttgagata gtatcaactgtctcgaagtatttatacgcgaacaaacacttttataagaactctccgat tattttagctctgtctctgtttgaatcaacccctctggatatacaaaattgtgaagaagtg actgatatcttaaactgtttgtctcctttttacgcctgctgtaggattgtcctctttatg ctctctgatatctctctatgtctcccgatgaagctgttctctctctcctctgtataaa ccctctctctctctctcttttgagagatttgctggccctgtatctccaaactgagctg gtgctctctgtgtttcttcaacgcgaaccccacactgtctggagctgtctccacacactg caacactctctctggacatttcctctctcccccctccactgcgcgaacgcgaacactct acccctcctcctctcccccctctctcgaacagcccgtaggtctgtagcactataattctc tgctgtgtgtg

40

TAAペプチド 配列

【表 5】

配列番号	アミノ酸配列	配列番号	アミノ酸配列	配列番号	アミノ酸配列
98	VLVDSETKNA	151	LLWGHPRVALA	204	SLNGPKAV
99	HLWDGFLSV	152	VLDDGVAVV	205	EWSELGTVV
100	GLLKKINSV	153	GLLKKVTSV	206	ALLBGTGMSL
101	FLVDGSSAL	154	KWISAITPL	207	VIIKGLLEITV
102	FLVDGSANLV	155	GLLETTGLLAT	208	KQFGQTEI
103	FLYKIIDEL	156	TLNTLDNL	209	KLOEIPYV
104	FILDSAEITIL	157	VIIKGLLEI	210	GLAEFGENV
105	SYDVSPPKV	158	VLDDGVAVV	211	NVAEIVIH
106	VADKHSV	159	KIWEELSVLEV	212	ALAGIVTNV
107	IVDDLTNL	160	LLIPFTIFM	213	NLLIDBGTIKL
108	GLLEELVTV	161	ISLDEVAVSL	214	VLMDGSLYL
109	TLDDGAANGV	162	KISDFGLATV	215	EVLHVVVV
110	SVLEKEIVSI	163	KLIGNIHONEV	216	LLNGLPEI
111	LLDPKTIPL	164	ILSLVHLGL	217	SLWENGSL
112	YTFSDGVGL	165	LDGSAITL	218	KLLAVTHEL
113	VLWDGFSLL	166	VLGNSDYGSNL	219	ALGDFLTV
114	KVWSDVPL	167	HLGEGAFAGV	220	FLMNSDLYGA
115	LLWGHPRVALA	168	SLVENIHL	221	KLIDHGLYL
116	KIWEELSVLEV	169	YTFSDGVGL	222	GPQIFPPPPQF
117	LLIPFTIFM	170	SLSEKSEV	223	ALNESLVEG
118	FLIDNLAA	171	AMFPDIPRV	224	GLAALAVHL
119	LLWGHPRVALA	172	FLIDNLAA	225	LLLEAVVHL
120	FLIEREGL	173	FIAEFLKV	226	SITVLPPL
121	SLAETIFIV	174	ALYGVQGV	227	TLHDVHLL
122	TLLEGISRA	175	LFGRVAGV	228	SLMWITQC
123	KIQEILTV	176	FLAEPIVIRV	229	FLIDFQDLSI
124	VIFGEPWVL	177	FLIEREGL	230	VLLWPLWYL
125	SLFESLEV	178	LLPLELSLA	231	GLLDQIFL
126	SLNGPKAV	179	SLAETIFIV	232	VLEVNPSI
127	GLAEFGENV	180	ATLVVDENGV	233	TLNPFRTIV
128	KLLAVTHEL	181	RLFEELGV	234	AVPPPPSSV
129	TLHDVHLL	182	VLDEVAVSL	235	KLOELNKV
130	TLNPFRTIV	183	KLIDDEPLFL	236	KLMDGSLPPL
131	KIQEILTV	184	KLFESLGL	237	ALVSLPYL
132	SVLEKEIVSI	185	SLLEVWASSV	238	FLDGSANV
133	RVVDGLVGV	186	GVYDGRHIV	239	ALDPSGGLI
134	VLFGELPAL	187	GLYPVILGV	240	ILIEHLVGV
135	GLVDIMVHL	188	ALLSSVAEA	241	VLLDTILGL
136	FLNAIETAL	189	TLLEGISRA	242	HLIAETHTA
137	ALIGALMEL	190	SLIEESSEL	243	SNNGGVFAV
138	ALSSQAEV	191	ALYVQAPTV	244	NLAELGLA
139	SLITGDILSV	192	KLVKDLVSV	245	VWLDIFHEV
140	QLTEENWLL	193	TLDDGVFLV	246	ALWLFDSATV
141	LLDPKTIPL	194	SLLPYEVSI	247	GLASRILDA
142	RLHDENILL	195	LLDGSFLL	248	ALSLRLAL
143	YTFSDGVGL	196	VIFGEPWVL	249	SYVVEVHL
144	GLPSATITV	197	ALSVILPVL	250	VYLPKIPSW
145	GLPSAESIKL	198	FLVDPELV	251	NVEDHPLLL
146	KTASINGNV	199	SEWGSFAAVP	252	VYIAELKI
147	SLIGHLIGL	200	ALSELERYL	253	VHFDTGKTLF
148	VLWDGFSLL	201	SLFESLEV	254	VLSFFILTL
149	LMYPYIVHV	202	KVLEVYIKV	255	HLLEGSAGV
150	KVWSDVPL	203	VLINEILGV		

【0137】

実施例 2

γ δ T細胞製造

γ δ T細胞を単離するために、一態様では、γ δ T細胞は、対象から、または対象の複合サンプルから単離されてもよい。一態様では、複合サンプルは、末梢血サンプル、臍帯血サンプル、腫瘍、幹細胞前駆体、腫瘍生検、組織、リンパであっても、または外部環境と直接接触する対象の上皮部位からのもの、または幹前駆体細胞に由来するものであってもよい。γ δ T細胞は、例えば、1つまたは複数の細胞表面マーカーを発現するγ δ T細胞をフローサイトメトリー技術を用いて選別することによって、対象の複合サンプルから直接単離されてもよい。野生型γ δ T細胞は、γ δ T細胞に関連し得る、多数の抗原認識、抗原提示、共刺激、および接着分子を示してもよい。特定のγ δ TCR、抗原認識、抗原提示、リガンド、接着分子、または共刺激分子などの1つまたは複数の細胞表面マーカーを使用して、複合サンプルから野生型γ δ T細胞が単離されてもよい。γ δ T細胞に関連する、またはγ δ T細胞によって発現される様々な分子を使用して、例えば、Vδ1、Vδ2、Vδ3細胞またはそれらの任意の組み合わせの混合集団の単離など、複合サンプルからγ δ T細胞が単離されてもよい。

【0138】

例えば、末梢血単核細胞は、例えば、Ficol-Paque（商標）PLUS（GE Healthcare）システムをはじめとする、アフエレーシス療法装置、または別の適切な装置／システムを用いて、対象から採取され得る。γ δ T細胞またはγ δ T細胞の所望の亜集団は、採取されたサンプルから、例えば、フローサイトメトリー技術を用いて

精製され得る。臍帯血細胞は、対象の出産時に臍帯血からも入手され得る。

【0139】

採取された $\gamma\delta$ T細胞上で発現される細胞表面マーカーの陽性および／または陰性選択を使用して、末梢血サンプル、臍帯血サンプル、腫瘍、腫瘍生検、組織、リンパから、または対象の上皮サンプルから、類似した細胞表面マーカーを発現する $\gamma\delta$ T細胞または $\gamma\delta$ T細胞集団が直接単離され得る。例えば、 $\gamma\delta$ T細胞は、CD2、CD3、CD4、CD8、CD24、CD25、CD44、Kit、TCR α 、TCR β 、TCR α 、TCR δ 、NKG2D、CD70、CD27、CD30、CD16、CD337（NKp30）、CD336（NKp46）、OX40、CD46、CCR7、およびその他の適切な細胞表面マーカーの陽性または陰性発現に基づいて、複合サンプルから単離され得る。

10

【0140】

図1は、本開示の一実施形態による、 $\gamma\delta$ T細胞製造を示す。このプロセスは、白血球またはPBMCを白血球アフェレーシス産物から採取または入手することを含んでもよい。白血球アフェレーシスは、ドナーから全血を採取し、アフェレーシス療法装置を使用して成分を分離することを含んでもよい。フェレーシス療法装置は、所望の血液成分を分離し、残りはドナーの循環に戻される。例えば、白色血液細胞、血漿、および血小板が、アフェレーシス療法装置を使用して採取され得て、赤血球と好中球はドナーの循環に戻される。このプロセスでは、市販の白血球アフェレーシス産物が使用されてもよい。白血球を入手するための別の方法は、それらをバフィーコートから入手することである。バフィーコートを単離するために、抗凝固全血がドナーから得られ遠心分離される。遠心分離後に、血液は、血漿、赤血球、およびバフィーコートに分離される。バフィーコートは、血漿層と赤血球層の間に位置する層である。白血球アフェレーシスの採取は、バフィーコートの採取によって達成されるものよりも、より高い純度と、単核細胞含有量の大幅な増加をもたらしてもよい。白血球アフェレーシスによって可能な単核細胞含有量は、典型的には、バフィーコートから得られるものの20倍であってもよい。単核細胞を富化するために、さらなる分離のためのFicoll勾配の使用が必要なこともある。

20

【0141】

PBMCから $\alpha\beta$ T細胞を枯渇させるために、例えば、抗 $\alpha\beta$ TCR抗体で被覆されたCliniMACS（登録商標）磁気ビーズを使用した磁気分離によって、 $\alpha\beta$ TCR発現細胞をPBMCから分離してもよく、 $\alpha\beta$ TCR-T細胞枯渇PBMCの凍結保存がそれに続く。「既製の」T細胞製品を製造するために、例えば、2～7日間など1～10日間にわたり、例えば、ゾレドネートなどのアミノビスホスホネート；および／またはイソペンテニルピロリン酸（IPP）；および／または例えば、インターロイキン2（IL-2）、インターロイキン15（IL-15）、および／またはインターロイキン18（IL-18）などのサイトカイン；および／または例えば、Toll様受容体2（TLR2）リガンドなどのその他の活性化剤の存在下で、例えば、24から4～6ウェルプレートまたはT75／T175フラスコなどの小規模／中規模で、または例えば、50ml～100リットルのバッグなどの大規模で、凍結保存された $\alpha\beta$ TCR-T細胞が枯渇したPBMCを解凍し、活性化してもよい。

30

【0142】

図1は、特定のがん抗原およびCD8に対する $\alpha\beta$ TCRなどの関心のある外因性遺伝子を発現する、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクターで、単離された $\gamma\delta$ T細胞を形質導入することによって、活性化T細胞を操作してもよいことを示す。形質導入は、例えば、1日間などの1／2～5日間にわたり、例えば、24から4～6ウェルプレートなどの小規模で、または中／大規模で、1回または複数回実行して、安定した導入遺伝子発現を達成してもよい。

40

【0143】

図1は、例えば、7～28日間などの7～35日間にわたり、例えば、フラスコ／G-Rexなどの小／中規模で、または例えば、50ml～100リットルバッグなどの大規模で、例えば、IL-2、IL-15、IL-18などのサイトカインの存在下で、形質

50

導入または操作された $\gamma\delta$ T細胞の増殖を実行してもよいことをさらに示す。増殖した形質導入されたT細胞産物は、次に、患者への輸液用の「既製」T細胞製品として凍結保存してもよい。

【0144】

実施例3

レンチウイルスベクター

本明細書で使用されるレンチウイルスベクターは、自己複製および核内搬入を改善するための中央ポリプリントラクト (cPPT) ; いくつかの細胞型においてベクターサイレンシングを軽減することが示されている、マウス幹細胞ウイルス (MSCV) (配列番号1) からのプロモーター ; 転写終止を改善するためのウッドチャック肝炎ウイルス転写後応答要素 (WPRE) (配列番号9) をはじめとする、ベクター機能を増強することが以前に示されたいくつかの要素を含み、主鎖は、安全性、持続的な遺伝子発現、および抗サイレンシング特性の改善を有してもよい、欠失3'-LTR自己不活性化 (SIN) ベクターデザインであった (その内容全体が参照により援用される、Yang et al. Gene Therapy (2008) 15, 1411-1423)。

【0145】

一態様では、本明細書に記載のベクター、コンストラクト、または配列は、変異形態のWPREを含んでなる。別の態様では、本明細書に記載の配列またはベクターは、例えば、WPREmut1 (配列番号265) などのWPREバージョン1、または例えば、WPREmut2 (配列番号266) などのWPREバージョン2、における変異を含んでなる。一態様では、WPRE変異体は、最大で1つの変異、最大で2つの変異、最大で3つの変異、少なくとも4つの変異、または最大で5つの変異を含んでなる。一態様では、本明細書に記載のベクター、コンストラクト、または配列は、WPREを含まない。別の態様では、本開示は、配列番号91~96の1つにおける1、2、3、4、5、10、または20の置換を提供する。

【0146】

別の態様では、本明細書に記載のベクター、コンストラクト、または配列は、Xタンパク質プロモーターを含まない。

【0147】

形質導入された $\gamma\delta$ T細胞におけるTCR $\alpha\beta$ とCD8 $\alpha\beta$ の最適な同時発現レベルを得るために、様々なデザインのレンチウイルスベクターを生成した。図2は、TCR $\alpha\beta$ またはCD8 $\alpha\beta$ を発現する2つの別個のレンチウイルスベクター (2-in-1)、およびTCR $\alpha\beta$ とCD8 $\alpha\beta$ を同時発現する単一レンチウイルスベクター (4-in-1) で、T細胞を形質導入してもよいことを示す。4-in-1ベクターでは、TCR α 鎖、TCR β 鎖、CD8 α 鎖、およびCD8 β 鎖をコード化するヌクレオチドを様々な順序でシャッフルしてもよい。このように作製された様々な4-in-1ベクターを使用して $\gamma\delta$ T細胞を形質導入し、それに続いて、例えば、フローサイトメトリーなどの当該技術分野で公知の技術を用いて、形質導入された細胞のTCR/CD8同時発現レベルを測定してもよい。

【0148】

TCR $\alpha\beta$ とCD8 $\alpha\beta$ を同時発現するレンチウイルスベクターを作製するために、フリリンカー (GSGまたはSGSG (配列番号8)) -2Aペプチドをコード化するヌクレオチドを、TCR α 鎖とTCR β 鎖の間、CD8 α 鎖とCD8 β 鎖の間、TCR鎖とCD8鎖の間に配置させて、高効率な遺伝子発現を可能にしてもよい。2Aペプチドは、P2A (配列番号3)、T2A (配列番号4)、E2A (配列番号5)、またはF2A (配列番号6) から選択されてもよい。

【0149】

レンチウイルスベクターはまた、ウッドチャックPRE (WPRE) (配列番号9) などの転写後調節エレメント (PRE) を含有し、核および細胞質双方のmRNAレベルを増加させることによって、導入遺伝子の発現を増強させてもよい。マウスRNA輸送エレ

メント (RTE)、サルレトロウイルス1型 (SRV-1) の構成的輸送エレメント (CTE)、およびヒト熱ショックタンパク質70の5'未翻訳領域 (Hsp705'UTR) をはじめとする、1つまたは複数の調節要素もまた使用して、および／またはWP REと組み合わせて、導入遺伝子発現を増加させてもよい。

【0150】

レンチウイルスベクターは、マウス白血病ウイルスの細胞質尾部 (TR) に融合したネコ内在性ウイルス (RD114) の細胞外および膜貫通ドメインを含有する、キメラ糖タンパク質であるRD114TR (配列番号97) で偽型化させてもよい。VSV-G env、MLV4070A env、RD114 env、キメラエンベロープタンパク質RD114pro、バキュロウイルスGP64 env、またはGALV envなどのその他のウイルスエンベロープタンパク質、またはその誘導体もまた使用してもよい。

【0151】

図3は、TCR $\alpha\beta$ (R11KEA) とCD8 $\alpha\beta$ を同時発現する4つの異なる4-in-1ベクター、すなわち、PTE WP RE (配列番号91)、TPE WP RE (配列番号92)、PTE fn WP RE (配列番号93)、およびPTE CD8 TCR WP RE (配列番号94)、ならびに2つの2-in-1ベクター、すなわち、TCR $\alpha\beta$ (R11KEA) を発現するR11KE WP RE (配列番号95)、およびCD8 $\alpha\beta$ を発現するCD8 WP RE (配列番号96)を示す。TCR $\alpha\beta$ (R11KEA) は、MHC分子との複合体中でPRAME-004 (SLLQHLIGL) (配列番号147) に結合する。

【0152】

実施例4

TCRおよびCD8の同時発現

ドナー1とドナー2から得られた $\gamma\delta$ T細胞を図1に示す工程で製造した。ゾレドロネート、IL2、およびIL15での活性化後3日目または6日目に、例えば、PTE WP RE (配列番号91)、TPE WP RE (配列番号92)、PTE fn WP RE (配列番号93)、およびPTE CD8 TCR WP RE (配列番号94)などのRD114TRで偽型化したレンチウイルスで、 $\gamma\delta$ T細胞を形質導入し、それに続いてR11KEAとCD8の同時発現レベルをフローサイトメトリーを用いて測定した。TCR (V β 8) およびCD8 (CD8 α) に特異的な抗体 (CD8) を使用して、フローサイトメトリーを介して導入効率を評価した。

【0153】

図4は、ドナー1からの $\gamma\delta$ T細胞において、PTE CD8 TCR WP REでの形質導入によって得られたR11KEAおよびCD8の同時発現レベル、すなわち、40.5% (3日目) および18.5% (6日目) が、PTE WP RE (29.6% (3日目)、16.2% (6日目))、TPE WP RE (30.8% (3日目)、11.0% (6日目))、およびPTE fn WP RE (33.0% (3日目)、15.0% (6日目))での形質導入よりも高いことを示す。ドナー2からの $\gamma\delta$ T細胞では、PTE WP REによる形質導入によって得られた、活性化後6日目のR11KEAとCD8の同時発現レベル、すなわち、18.8%は、TPE WP RE (14.2%)、PTE fn WP RE (14.7%)、およびPTE CD8 TCR WP RE (17.2%)での形質導入よりも高い。対照として、2-in-1ベクター、すなわちTCR $\alpha\beta$ (R11KEA) またはCD8 WP REで別々に形質導入された $\gamma\delta$ T細胞中で、R11KEAおよびCD8のバックグラウンドレベルを検出した。

【0154】

実施例5

CD8 $\alpha\beta$ 鎖をコード化する配列とTCR $\alpha\beta$ 鎖をコード化する配列がベクター内の異なる位置に配置された、例えば、レンチウイルスベクターなどの4-in-1ウイルスベクターの導入遺伝子発現および機能性に対する影響。

【0155】

国際公開第2019／204662号パンフレットは、外因性CD8 $\alpha\beta$ 共受容体と、例えば、TCRなどの1つまたは複数の外因性に操作された抗原受容体とを発現する、CD4+細胞を記載する。表4は、国際公開第2019／204662号パンフレットに記載される4-in-1コンストラクトと、本開示の態様によるものとの比較を示す。

【0156】

【表6】

導入遺伝子の方向（5'末端から3'末端方向）	WO 2019/204662 TCR β -TCR α -CD8 α -CD8 β	本明細書に記載の態様 CD8 β -CD8 α -TCR β -TCR α
CD8 $\alpha\beta$ 配列の起源	GenBank	最適化されたコドン（発現を増強するため）
2Aリンカー	2A	2A+フェーリンリンカー（目的の遺伝子の残留2A配列の効率的な切断を促進するため）
細胞型	CD4+細胞およびCD8+細胞	$\gamma\delta$ T細胞（低い（0~20%）CD8発現およびCD4発現なし）
ウイルスおよび偽型	レトロウイルスおよびRD114	レンチウイルスおよびRD114TRおよびVSV-G

【0157】

本開示の核酸分子のオープンリーディングフレーム（ORF）は、少なくとも部分的にコドン最適化されてもよい。コドン最適化は、翻訳効率が細胞内の移転RNA（tRNA）の発生における異なる頻度によって決定されてもよいという発見に基づく。したがって、本開示の核酸分子のオープンリーディングフレームは、細胞内では比較的稀であるtRNAをコード化する野生型配列の少なくとも1つのコドンが、細胞内で比較的頻度が高く比較的稀なtRNAと同じアミノ酸を保有してもよいtRNAをコードするコドンで、交換されてもよいように、対応する野生型コード領域と比較して修飾されてもよい。この修飾によって、本開示の核酸分子のオープンリーディングフレームは、頻度の高いtRNAが利用できるコドンが、稀なtRNAに対応するコドンを置き換えてもよいように、修飾されてもよい。換言すれば、本開示によれば、このような修飾によって、稀なtRNAをコードする野生型オープンリーディングフレームの全てのコドンが、細胞内で比較的頻度が高く比較的稀なtRNAと同じアミノ酸を保有してもよいtRNAをコードするコドンで、交換されてもよい。どのtRNAが細胞内で比較的頻度が高く、対照的にどのtRNAが比較的稀であるかを当業者は把握している；例えば、その内容が参照により援用される、Akashi, Curr. Opin. Genet. Dev. 2001, 11(6): 660-666。いくつかの実施形態では、本開示の核酸分子のオープンリーディングフレームは、好ましくは、その中で本開示の核酸分子が発現されるシステムに関して、好ましくは、その中で本開示の核酸分子が翻訳されるシステムに関して、コドン最適化されてもよい。好ましくは、本開示の核酸分子のオープンリーディングフレームのコドン使用頻度用は、哺乳類のコドン使用頻度に従って、より好ましくは、ヒトコドン使用頻度に従って、コドン最適化されてもよい。好ましくは、オープンリーディングフレームは、コドン最適化され、G/C含有量が修正されてもよい。

【0158】

どの導入遺伝子の配向が、より良い導入遺伝子の発現と機能を提供するかを判定するために、例えば、PTE.WPRE（配列番号91）、TPE.WPRE（配列番号92）、およびPTE.fn.WPRE（配列番号93）などの、CD8 $\alpha\beta$ 鎖をコード化する配列の上流に位置するTCR $\alpha\beta$ 鎖をコード化する配列をそれぞれ含有する3つの4-in-1ウイルスベクターと、例えば、PTE.CD8.TCR.WPRE（配列番号94）などの、TCR $\alpha\beta$ 鎖をコード化する配列の上流に位置するCD8 $\alpha\beta$ 鎖をコード化する配列を含有する4-in-1ウイルスベクターとを $\gamma\delta$ T細胞に形質導入し、蛍光タグ付き抗CD8抗体および蛍光タグ付き抗TCRV β 8（Vb8）抗体を用いた、蛍光活性化細胞選別（FACS）解析がそれに続き、細胞表面上のCD8およびTCRの発現をそれぞれ検出した。

【0159】

図10および11は、CD8+Vb8+二重陽性細胞の%（図10）およびCD8の

10

20

30

40

50

MFIまたはVb8のMFI（図11）に基づいて、PTE・CD8・TCR・WPREを含有する4-i n-1ウイルスベクターで形質導入されたドナー3およびドナー4から得られた $\gamma\delta$ T細胞が、PTE・WPRE、TPE・WPRE、またはPTE・fn・WPREを含有する4-i n-1ウイルスベクターで形質導入されたものと比較して、製造の14日目に細胞表面上でCD8とTCRの双方の最高の発現をもたらすことを示す。

【0160】

PTE・CD8・TCR・WPREを含有する4-i n-1ウイルスベクターで形質導入された $\gamma\delta$ T細胞の細胞表面上のCD8およびTCRの双方の高発現は、それらの生体外殺滅活性と良好に相関する。例えば、図12は、PTE・WPRE、TPE・WPRE、またはPTE・fn・WPREを含有する4-i n-1ウイルスベクターで形質導入されたものと比較して、PTE・CD8・TCR・WPREを含有する4-i n-1ウイルスベクターで形質導入されたドナー3から得られた $\gamma\delta$ T細胞が、高標的ペプチド提示細胞株UACC257（上側パネル）と低標的ペプチド提示細胞株U2OS（下側パネル）の双方に対する最良の殺滅活性を提示することを示し、図13A～13Cは、例えば、UACC257（図13A）、U2OS（図13B）、および標的陰性細胞株MCF-7（図13C）などの標的細胞の存在下で、PTE・CD8・TCR・WPRE、PTE・WPRE、TPE・WPRE、またはPTE・fn・WPREを含有する4-i n-1ウイルスベクターで形質導入された対応する $\gamma\delta$ T細胞による、IFN- γ 分泌の量を示す。

【0161】

図14は、PTE・WPRE、TPE・WPRE、またはPTE・fn・WPREを含有する4-i n-1ウイルスベクターで形質導入されたものと比較して、ウイルスベクターPTE・CD8・TCR・WPREを含有する4-i n-1で形質導入されたドナー4から得られた $\gamma\delta$ T細胞もまた、UACC257（上側パネル）およびU2OS（下側パネル）の双方に対して、最良の殺滅活性を提示することを示し、図15A～15Cは、例えば、UACC257（図15A）、U2OS（図15B）、およびMCF-7（図15C）などの標的細胞の存在下で、PTE・CD8・TCR・WPRE、PTE・WPRE、TPE・WPRE、またはPTE・fn・WPREを含有する4-i n-1ウイルスベクターで形質導入された対応する $\gamma\delta$ T細胞による、IFN- γ 分泌の量を示す。

【0162】

図16は、PTE・CD8・TCR・WPREを含有する4-i n-1ウイルスベクターで形質導入されたドナー3およびドナー4から得られた $\gamma\delta$ T細胞が、PTE・WPRE、TPE・WPRE、およびPTE・fn・WPREで形質導入されたものと同様に、細胞あたり、0.6コピー未満の組み込みベクターをもたらすことを示す。細胞あたりの組み込みベクターのこの低いコピー数は、安全要件の範囲内、すなわち、細胞あたりの組み込みベクター数が5コピー未満内にある。

【0163】

図17Aおよび17Bは、PTE・CD8・TCR・WPREを含有する4-i n-1ウイルスベクターでそれぞれ形質導入された、ドナー3およびドナー4から得られた $\gamma\delta$ T細胞が、製造の14日目に、PTE・WPRE、TPE・WPRE、またはPTE・fn・WPREを含有する4-i n-1ウイルスベクターで形質導入されたものと同等のレベルの細胞増殖を達成することを示す。

【0164】

形質導入された $\gamma\delta$ T細胞の記憶細胞表現型を判定するために、細胞をアロフィコシアニン（APC）-Cy7タグ付き抗CD45RA抗体およびBV421タグ付き抗CCR7抗体で染色し、FACS分析がそれに続き、形質導入された $\gamma\delta$ T細胞中に存在するTcm、ナイーブT細胞、TemRA、およびTeffの割合を判定した。図18Aは、このような分析の一例を示す。

【0165】

図18Bは、PTE・CD8・TCR・WPREを含有する4-i n-1ウイルスベクターで形質導入された、ドナー3およびドナー1から得られた $\gamma\delta$ T細胞が、製造の14

10

20

30

40

50

日目に、PTE.WPRE、TPE.WPRE、またはPTE.fn.WPREを含有する4-in-1ウイルスベクターで形質導入されたものと同等のレベルの記憶T細胞の表現型を達成することを示す。

【0166】

実施例6

1つの4-in-1ウイルスベクターで形質導入された細胞と2つの2-in-1ウイルスベクターで形質導入された細胞における、導入遺伝子発現への影響

【0167】

図19は、CD8.WPRE (120 μ l) を含有する2-in-1レンチウイルスベクターと、R11KE.WPRE (120 μ l) を含有する2-in-1レンチウイルスベクターとの混合物での形質導入によるもの (パネルD、15.5%) よりも多い、PTE.CD8.TCR.WPRE (120 μ l) を含有する4-in-1レンチウイルスベクターでの形質導入から得られたCD8+TCR+ $\gamma\delta$ T細胞 (パネルB、20.9%) を示す。他方、PTE.CD8.TCR.WPREを含有する4-in-1レンチウイルスベクターで形質導入されたもの (パネルB、21.2%) よりも、CD8.WPRE (120 μ l) を含有する2-in-1レンチウイルスベクターと、R11KE.WPRE (120 μ l) を含有する2-in-1レンチウイルスベクターとの混合物での形質導入からより多くのCD8+TCR- $\gamma\delta$ T細胞 (パネルD、28.3%) が得られた。同様に、CD8.WPRE (240 μ l) を含有する2-in-1レンチウイルスベクターと、R11KE.WPRE (240 μ l) を含有する2-in-1レンチウイルスベクターとの混合物で形質導入されたもの (パネルE、21.1%) よりも、PTE.CD8.TCR.WPRE (240 μ l) を含有する4-in-1レンチウイルスベクターでの形質導入からより多くのCD8+TCR+ $\gamma\delta$ T細胞 (パネルC、27.7%) が得られた。他方、PTE.CD8.TCR.WPREを含有する4-in-1レンチウイルスベクターで形質導入されたもの (パネルC、24.4%) よりも、CD8.WPRE (240 μ l) を含有する2-in-1レンチウイルスベクターと、R11KE.WPRE (240 μ l) を含有する2-in-1レンチウイルスベクターとの混合物での形質導入からより多くのCD8+TCR- $\gamma\delta$ T細胞 (パネルE、40.2%) が得られた。非形質導入 (NT) $\gamma\delta$ T細胞が、対照として機能した (パネルA)。2色染色は、APCタグ付き抗CD8 β 抗体およびフィコエリトリン (PE) タグ付き標的ペプチド/MHC複合体テトラマーを使用して実施した。これらの結果は、例えば、CD8.WPREなどのCD8 $\alpha\beta$ をコード化する配列を含有する2-in-1レンチウイルスベクターと、例えば、R11KE.WPREなどのTCR $\alpha\beta$ をコード化する配列を含有する2-in-1レンチウイルスベクターとの混合物とで形質導入されたものよりも、PTE.CD8.TCR.WPREなどのCD8 $\alpha\beta$ およびTCR $\alpha\beta$ をコード化する配列を含有する4-in-1レンチウイルスベクターでの形質導入が、より多数のCD8+TCR+T細胞をもたらしてもよいことを示唆する。他方、例えば、PTE.CD8.TCR.WPRE.などのCD8 $\alpha\beta$ およびTCR $\alpha\beta$ をコード化する配列を含有する4-in-1レンチウイルスベクターで形質導入されたものよりも、例えば、CD8.WPREなどのCD8 $\alpha\beta$ をコード化する配列を含有する2-in-1レンチウイルスベクターと、例えば、R11KE.WPREなどのTCR $\alpha\beta$ をコード化する配列を含有する2-in-1レンチウイルスベクターとの混合物での形質導入は、より多数のCD8+TCR-T細胞をもたらしてもよい。

【0168】

図20は、形質導入のためのPTE.CD8.TCR.WPREを含有する4-in-1ウイルスベクターの量を例えば、30 μ l、120 μ l、240 μ lと増加させると、形質導入効率が向上することを示し、例えば、CD8+TCR+ $\gamma\delta$ T細胞の%は、例えば、30 μ lで9.6%、120 μ lで20.9%、240 μ lで27.7%と増加する。非形質導入 $\gamma\delta$ T細胞が、対照として機能する。2色染色は、APCタグ付き抗CD8 β 抗体およびPEタグ付き標的ペプチド/MHC複合体テトラマーを使用して実施した。

【0169】

実施例7

 $\alpha\beta$ T細胞における4-in-1コンストラクトの発現

例えば、CD8 $\alpha\beta$ および／またはTCR $\alpha\beta$ などの組換えタンパク質を発現する、操作された $\alpha\beta$ T細胞をはじめとする操作されたリンパ球は、その内容全体が参照により援用される、米国特許第2019/0247433号明細書で開示される方法に従って製造し得る。例えば、図37は、以下を含んでもよい、T細胞製造工程370を示す：PBMCの単離(371)(その中ではPBMCは、新鮮に使用されてもよく、または使用の準備ができるまで冷凍保存されてもよく、または、例えば、Leukopakなどの白血球アフエレーション製品であってもよく、またはT細胞の製造およびリンパ球集団(例えば、 $\alpha\beta$ TCR+T細胞、CD8+、CD4+、または双方)の選択のための出発原料として使用されてもよい)；リンパ球の例えば、約16時間または約4から6時間などの一晩の解凍および休止(372)(これは、アポトーシス細胞を死滅させ、T細胞の機能を回復させてもよい(新鮮な材料を使用する場合、このステップは必要ないこともある))；リンパ球の活性化(373)(これは、抗CD3抗体および抗CD28抗体を使用してもよい(例えば、磁性または生分解性ビーズ、培養容器に固定化された抗体などの可溶性または表面結合型))；例えば、CD8 $\alpha\beta$ および／またはTCR $\alpha\beta$ などのポリペプチド組換えタンパク質をコード化する配列を含有するウイルスベクターでの形質導入(374)(その中ではウイルスベクターはレンチウイルスベクターまたはレトロウイルスベクターであってもよく、または形質移入は非ウイルス法によって実施されてもよい)；リンパ球の増殖、採取、および凍結保存(375)(これは、例えば、IL-7およびIL-15などのサイトカイン、血清(ABSまたはFBS)、および／または凍結保存媒体の存在下で実行されてもよい)。

【0170】

外因性CD8発現

CD8およびTCRをコード化する配列を有する4-in-1コンストラクトを含有するウイルスベクターで形質導入された $\alpha\beta$ T細胞における外因性CD8発現を判定するために、ドナー5およびドナー6から得られたT細胞をLV-PTE、CD8、TCR、WPREの量を増加させながら形質導入し、リンパ球<重項<生細胞<CD3+集団上のFACSゲートがそれに続いて、CD4+細胞中の%CD8 α +細胞を検出した。図21は、ドナー5からの%CD8 α +CD4+細胞が、2.87%(非形質導入)から、14.7%(2.5 μ l/1 $\times$ 10⁶個の細胞)、19.5%(5 μ l/1 $\times$ 10⁶個の細胞)、21.7%(7.5 μ l/1 $\times$ 10⁶個の細胞)、および24.1%(10 μ l/1 $\times$ 10⁶個の細胞)に増加し；ドナー6からの%CD8 α +CD4+細胞が、1.93%(非形質導入)から、12.5%(2.5 μ l/1 $\times$ 10⁶個の細胞)、17.2%(5 μ l/1 $\times$ 10⁶個の細胞)、19.6%(7.5 μ l/1 $\times$ 10⁶個の細胞)、および20.8%(10 μ l/1 $\times$ 10⁶個の細胞)に増加したことを示す。

【0171】

外因性TCR発現

CD8およびTCRをコード化する配列を有する4-in-1コンストラクトを含有するウイルスベクターで形質導入された $\alpha\beta$ T細胞における外因性TCR発現を判定するために、ドナー5およびドナー6から得られたT細胞をLV-PTE、CD8、TCR、WPREの量を増加させながら形質導入し、リンパ球<重項<生細胞<CD3+<CD4+CD8+集団上のFACSゲートがそれに続いて、CD4+CD8+細胞集団中の%標的ペプチド/MHC複合体デキストラマー203+(すなわち、TCR+)細胞を検出した。図22は、ドナー5からの%デキストラマー203+細胞が、0.32%(非形質導入)から、41.9%(2.5 μ l/1 $\times$ 10⁶個の細胞)、48.3%(5 μ l/1 $\times$ 10⁶個の細胞)、54.5%(7.5 μ l/1 $\times$ 10⁶個の細胞)、および49.5%(10 μ l/1 $\times$ 10⁶個の細胞)に増加し；ドナー6からの%デキストラマー203+細胞が、0.19%(非形質導入)から、35.5%(2.5 μ l/1 $\times$ 10⁶個の細胞)

)、41.2% ($5 \mu\text{L} / 1 \times 10^6$ 個の細胞)、44.6% ($7.5 \mu\text{L} / 1 \times 10^6$ 個の細胞)、および44.0% ($10 \mu\text{L} / 1 \times 10^6$ 個の細胞)に増加したことを示す。

【0172】

様々な $\alpha\beta$ T細胞集団におけるTCR発現を検出するために、LV-PTE.CD8.TCR.WPREで形質導入された $\alpha\beta$ T細胞を、リンパ球<重項<生細胞<CD3+<CD4+/-CD8+/-上でゲートするFACSによって分析した。図23は、ドナー5（上側パネル）およびドナー6（下側パネル）から得られた%デキストラマー203（Dex203）+（すなわち、TCR+）細胞が、CD4-CD8 α +細胞集団よりもCD4+CD8 α +細胞集団で一般により高いことを示す。対照的に、%Dex203（すなわち、TCR）細胞は、CD4CD8 α -細胞集団で最小である。同様に、図24は、ドナー5（上側パネル）およびドナー6（下側パネル）から得られた%デキストラマー203（Dex203）MFI細胞が、CD4-CD8 α +細胞集団よりもCD4+CD8 α +細胞集団で一般により高いことを示す。対照的に、%Dex203MFIは、CD4CD8 α -細胞集団で最小である。これらの結果は、LV-PTE.CD8.TCR.WPREによってコード化される外因性TCRとCD8が、CD4T細胞とCD4-T細胞の双方で同時発現され得ることを示唆する。

【0173】

実施例8

4-in-1コンストラクトまたはTCRのみのコンストラクトを発現する $\alpha\beta$ T細胞の機能解析

図25は、例えば、PTE.CD8.TCR.WPREなどの4-in-1コンストラクト（LV-CD8.TCR）、またはR11KE.WPREなどのTCRのみのコンストラクト（LV-TCR）を含有する、レンチウイルスベクター（LV）で形質導入された $\alpha\beta$ T細胞の機能性を試験するための実験デザインを示す。簡潔に述べると、-1日目に、高抗原発現UACC257+RFP細胞株（陽性対照）および抗原-陰性MCF7+GFP細胞株（陰性対照）などの標的細胞を96ウェルプレートに播種した。LV-CD8.TCR（ $5 \mu\text{L} / 1 \times 10^6$ 個の細胞）またはLV-TCR（ $2.5 \mu\text{L} / 1 \times 10^6$ 個の細胞）で形質導入された、例えば、PBMC（ドナー5、6、7、8から入手）などのドナー細胞製品を解凍し、24ウェルのG-Rex（登録商標）ガス透過性急速増殖デバイス内で一晩休ませた。0日目に、例えば、200,000個のエフェクター細胞：100,000個の標的細胞の比率など、2：1のエフェクター細胞対標的細胞（E/T）比で、ドナー細胞製品（エフェクター細胞）と、例えば、UACC257+RFPおよびMCF7+GFPなどの標的細胞とを共培養した。37℃で5時間のインキュベート後、例えば、GolgiStop（商標）（BD Biosciences）などのタンパク質輸送阻害剤を各ウェルに0.5 $\mu\text{L} /$ ウェルずつ添加し、37℃で4時間のインキュベートがそれに続いた。次に、細胞を遠心分離し、ELISAのための上清を収集してIFN- γ 発現を検出し、例えば、CD3、CD4、CD8、IFN- γ 、グランザイムB、および生存/死滅などの、細胞内サイトカイン染色（ICS）パネルを使用して染色するための細胞を収集した。

【0174】

CD4-CD8+T細胞集団

図26は、LV-TCR（TCR）またはLV-CD8.TCR（TCR+CD8）で形質導入されたグループ化ドナーから得られたCD4-CD8 α +T細胞と、高標的発現UACC257細胞との共培養は、形質導入のないもの（NT）よりも、より高い%IFN- γ 陽性細胞（上側パネル）およびより高いIFN- γ MFI（下側パネル）をもたらしたことを示す。対照的に、LV-TCR（TCR）またはLV-CD8.TCR（TCR+CD8）で形質導入されたCD4-CD8 α +T細胞と、抗原陰性のMCF7とを共培養した場合、形質導入細胞と非形質導入細胞の間で、%IFN- γ 陽性細胞およびIFN- γ MFIに有意差は観察されなかった。FACSは、CD4-CD8 α +IFN- γ +T細胞上でゲートした。非形質導入（NT）細胞が、対照として機能する。（エフ

エフェクター対標的細胞比＝2：1；グループ化ドナーN＝4）。これらの結果から、LV-TCRまたはLV-CD8・TCRで形質導入されたCD4-CD8 α +T細胞は、例えば、UACC257細胞などの高抗原発現標的細胞と接触した際にIFN- γ を発現するなど、機能的に活性化し、例えば、MCF7細胞などの抗原陰性細胞に対しては、形質導入された細胞はほとんど影響を及ぼさないことが示唆された。

【0175】

図27は、LV-TCR（TCR）またはLV-CD8・TCR（TCR+CD8）で形質導入されたグループ化ドナーから得られたCD4-CD8 α +T細胞と、高標的発現UACC257細胞との共培養は、形質導入のないもの（NT）よりも、より高い%グランザイムB陽性細胞（上側パネル）およびより高いグランザイムB MFI（下側パネル）をもたらしたことを示す。対照的に、LV-TCR（TCR）またはLV-CD8・TCR（TCR+CD8）で形質導入されたCD4-CD8 α +T細胞と、抗原陰性のMCF7とを共培養した場合、形質導入細胞と非形質導入細胞の間で、%グランザイムB陽性細胞およびグランザイムB MFIに有意差は観察されなかった。FACSは、CD4-CD8 α +グランザイムB+T細胞上でゲートした。非形質導入（NT）細胞が、対照として機能する。（エフェクター対標的細胞比＝2：1；グループ化ドナーN＝3）。これらの結果から、LV-TCRまたはLV-CD8・TCRで形質導入されたCD4-CD8 α +T細胞は、例えば、UACC257細胞などの高抗原発現標的細胞と接触した際にグランザイムBを発現するなど、機能的に活性化し、例えば、MCF7細胞などの抗原陰性細胞に対しては、形質導入された細胞はほとんど影響を及ぼさなくてもよいことが示唆された。

【0176】

CD4-CD8+T細胞集団

図28は、LV-CD8・TCR（TCR+CD8）で形質導入されたグループ化ドナーから得られたCD4+CD8 α +T細胞と、高標的発現UACC257細胞との共培養は、形質導入のないもの（NT）よりも、より高い%IFN- γ 陽性細胞（上側パネル）およびより高いIFN- γ MFI（下側パネル）をもたらしたことを示す。対照的に、thLV-CD8・TCR（TCR+CD8）で形質導入されたCD4-CD8 α +T細胞と、抗原陰性のMCF7とを共培養した場合、形質導入細胞と非形質導入細胞の間で、%IFN- γ 陽性細胞およびIFN- γ MFIに有意差は観察されなかった。FACSは、NT細胞ではCD4+CD8 α -IFN- γ +, LV-CD8・TCR-形質導入細胞ではCD4+CD8 α +IFN- γ +上でゲートした。非形質導入（NT）細胞が、対照として機能する。（エフェクター対標的細胞比＝2：1；グループ化ドナーN＝4）。これらの結果から、LV-CD8・TCRで形質導入されたCD4+CD8 α +T細胞は、例えば、UACC257細胞などの高抗原発現標的細胞と接触した際にIFN- γ を発現するなど、機能的に活性化し、例えば、MCF7細胞などの抗原陰性細胞に対しては、形質導入された細胞はほとんど影響を及ぼさなくてもよいことが示唆された。

【0177】

図29は、LV-CD8・TCR（TCR+CD8）で形質導入されたグループ化ドナーから得られたCD4+CD8 α +T細胞と、高標的発現UACC257細胞との共培養は、形質導入のないもの（NT）よりも、より高い%グランザイムB陽性細胞（上側パネル）およびより高いグランザイムB MFI（下側パネル）をもたらしたことを示す。対照的に、LV-CD8・TCR（TCR+CD8）で形質導入されたCD4+CD8 α +T細胞と、抗原陰性のMCF7とを共培養した場合、形質導入細胞と非形質導入細胞の間で、%グランザイムB陽性細胞およびグランザイムB MFIに有意差は観察されなかった。FACSは、NT細胞ではCD4+CD8 α -グランザイムB+, LV-CD8・TCR形質導入T細胞ではCD4+CD8 α +グランザイムB+上でゲートした。非形質導入（NT）細胞が、対照として機能する。（エフェクター対標的細胞比＝2：1；グループ化ドナーN＝3）。これらの結果から、LV-CD8・TCRで形質導入されたCD4+CD8 α +T細胞は、例えば、UACC257細胞などの高抗原発現標的細胞と接触し

た際にグランザイムBを発現するなど、機能的に活性化し、例えば、MCF7細胞などの抗原陰性細胞に対しては、形質導入された細胞はほとんど影響を及ぼさなくてもよいことが示唆された。

【0178】

CD3+T細胞

図30は、LV-TCR (TCR) またはLV-CD8. TCR (TCR+CD8) で形質導入されたグループ化ドナーから得られたCD3+T細胞と、高標的発現UACC257細胞との共培養は、形質導入のないもの (NT) よりも、より高い%IFN- γ 陽性細胞 (上側パネル) およびより高いIFN- γ MFI (下側パネル) をもたらしたことを示す。対照的に、LV-TCR (TCR) またはLV-CD8. TCR (TCR+CD8) で形質導入されたCD4-CD8 α +T細胞と、抗原陰性のMCF7とを共培養した場合、形質導入細胞と非形質導入細胞の間で、%IFN- γ 陽性細胞およびIFN- γ MFIに有意差は観察されなかった。FACSは、CD3+T細胞上でゲートした。非形質導入 (NT) 細胞が、対照として機能する。(エフェクター対標的細胞比=2:1; グループ化ドナーN=4)。これらの結果から、LV-TCRまたはLV-CD8. TCRで形質導入されたCD3+T細胞は、例えば、UACC257細胞などの高抗原発現標的細胞と接触した際にIFN- γ を発現することなどによって、機能的に活性化し、例えば、MCF7細胞などの抗原陰性細胞に対しては、形質導入された細胞はほとんど影響を及ぼさないことが示唆された。

【0179】

図31は、TCR (TCR) またはLV-CD8. TCR (TCR+CD8) で形質導入されたグループ化ドナーから得られたCD3+T細胞と、高標的発現UACC257細胞との共培養は、形質導入のないもの (NT) よりも、より高い%グランザイムB陽性細胞 (上側パネル) およびより高いグランザイムB MFI (下側パネル) をもたらしたことを示す。対照的に、LV-TCR (TCR) またはLV-CD8. TCR (TCR+CD8) で形質導入されたCD3+T細胞と、抗原陰性のMCF7とを共培養した場合、形質導入細胞と非形質導入細胞の間で、%グランザイムB陽性細胞およびグランザイムB MFIに有意差は観察されなかった。FACSは、CD3+T細胞上でゲートした。非形質導入 (NT) 細胞が、対照として機能する。(エフェクター対標的細胞比=2:1; グループ化ドナーN=3)。これらの結果から、LV-TCRまたはLV-CD8. TCRで形質導入されたCD3+T細胞は、例えば、UACC257細胞などの高抗原発現標的細胞と接触した際にグランザイムBを発現することなどによって、機能的に活性化し、例えば、MCF7細胞などの抗原陰性細胞に対しては、形質導入された細胞はほとんど影響を及ぼさなくてもよいことが示唆された。

【0180】

図32は、LV-TCR (TCR) またはLV-CD8. TCR (TCR+CD8) で形質導入されたグループドナーから得られたCD3+T細胞と、高標的発現UACC257細胞との共培養は、非合形質導入 (NT)、MCF7細胞単独、UACC257細胞単独のものよりも、IFN- γ の分泌量がより多くなることを示す。対照的に、LV-TCR (TCR) またはLV-CD8. TCR (TCR+CD8) で形質導入されたCD4-CD8 α +T細胞と、抗原陰性のMCF7とを共培養した場合、形質導入細胞と非形質導入細胞の間で、IFN- γ 分泌のレベルに有意差は観察されなかった。(エフェクター対標的細胞比=2:1; グループ化ドナーN=4)。これらの結果から、LV-TCRまたはLV-CD8. TCRで形質導入されたCD3+T細胞は、例えば、UACC257細胞などの高抗原発現標的細胞と接触した際にIFN- γ を分泌することなどによって、機能的に活性化し、例えば、MCF7細胞などの抗原陰性細胞に対しては、形質導入された細胞はほとんど影響を及ぼさないことが示唆された。

【0181】

図33は、LV-TCR (TCR) またはLV-CD8. TCR (TCR+CD8) で形質導入された個々のドナー5、6、7、および8から得られたCD3+T細胞と、高標

的発現UACC257細胞との共培養は、非合形質導入（NT）、MCF7細胞単独、UACC257細胞単独のものよりも、IFN- γ の分泌量がより多くなることを示す。対照的に、LV-TCR（TCR）またはLV-CD8・TCR（TCR+CD8）で形質導入されたCD4-CD8 α +T細胞と、抗原陰性のMCF7とを共培養した場合、形質導入細胞と非形質導入細胞の間で、IFN- γ 分泌のレベルに有意差は観察されなかった。（エフェクター対標的細胞比＝2：1）。これらの結果から、LV-TCRまたはLV-CD8・TCRで形質導入された個々のドナーから得られたCD3+T細胞は、例えば、UACC257細胞などの高抗原発現標的細胞と接触した際にIFN- γ を分泌することなどによって、機能的に活性化し、例えば、MCF7細胞などの抗原陰性細胞に対しては、形質導入された細胞はほとんど影響を及ぼさないことが示唆された。

10

【0182】

実施例9

T細胞活性化マーカーの発現に対するスタチンの効果

T細胞活性化マーカーの発現に対するスタチンの効果を判定するために、例えば、アトルバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチンなどのスタチンでT細胞を処理し、FACS分析がそれに続いて、例えば、CD25、CD69、およびhLDLRなどのT細胞活性化マーカーの発現を測定した。

【0183】

CD4+T細胞集団

図34は、アトルバスタチン、プラバスタチン、またはロスバスタチンで処理されたCD3+CD4+T細胞における、CD25+細胞（上側パネル）、%CD69+細胞（中央パネル）、および%hLDLR+細胞（下側パネル）を示す。予備活性化細胞、スタチンまたはDMSOなしで活性化された細胞（対照）、およびDMSOが対照として機能する。これらの結果は、アトルバスタチン、プラバスタチン、およびロスバスタチンが%CD4+CD25+細胞および%CD4+CD69+細胞にほとんど影響しない一方で、例えば、アトルバスタチンなどのスタチンが%CD4+hLDLR+細胞を増加させてもよいことを示す。FACSは、リンパ球>一重項>生存/死滅>CD3+>CD4+上でゲートした。

20

【0184】

CD8+T細胞集団

図35は、アトルバスタチン、プラバスタチン、またはロスバスタチンで処理されたCD3+CD8+T細胞における、%CD25+細胞（上側パネル）、%CD69+細胞（中央パネル）、および%hLDLR+細胞（下側パネル）を示す。予備活性化細胞、スタチンまたはDMSOなしで活性化された細胞（対照）、およびDMSOが対照として機能する。これらの結果は、アトルバスタチン、プラバスタチン、およびロスバスタチンが%CD8+CD25+細胞および%CD8+CD69+細胞にほとんど影響しない一方で、例えば、アトルバスタチンなどのスタチンが%CD8+hLDLR+細胞を増加させてもよいことを示す。FACSは、リンパ球>一重項>生存/死滅>CD3+>CD8+上でゲートした。

30

【0185】

実施例10

レンチウイルス力価に対するWPReの影響

レンチウイルス力価に対するWPReの影響を判定するために、野性型（wt）WPRe（配列番号9）（LV-A）、WPReなし（LV-B）、WPRemut1（配列番号265）（LV-C）、またはWPRemut2（配列番号266）（LV-D）を含むレンチウイルスベクター（LV）を作製した。HEK293T細胞をLV-A、LV-B、LV-C、またはLV-Dで形質移入し、当該技術分野で公知の方法を使用して力価判定がそれに続いた。図36は、これらのレンチウイルスベクターの力価が、LV-C>LV-D $\geq$ LV-A>LV-Bの順であることを示す。これらの結果は、WPRemut1およびWPRemut2が、レンチウイルスベクターの生成を改善するのに有用で

40

50

あってもよいことを示唆する。

【0186】

本開示の利点としては、単一のベクターにおいて、例えば、4つのポリペプチドなどの複数の導入遺伝子を同時発現するウイルスベクターの作製、および養子細胞療法のための安全で標的特異的な「既製の」T細胞製品として、TCR $\alpha\beta$ およびCD8 $\alpha\beta$ を同時発現する $\gamma\delta$ T細胞の作製が挙げられてもよい。

【0187】

本明細書で言及される全ての参考文献は、各参考文献が参照により援用されることが具体的かつ個別に示されているかのように、参照により本明細書に援用される。あらゆる参考文献の引用は、出願日より前のその開示に対するものであり、本開示が、先行発明の性質上、そのような参照を先取りする権利を有していないことを認めるものとして、解釈されるべきではない。

10

20

30

40

50

【図 5】

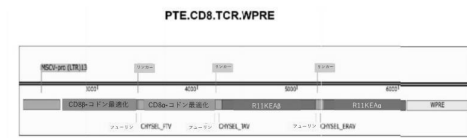


図 5A

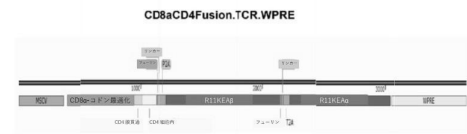


図 5B

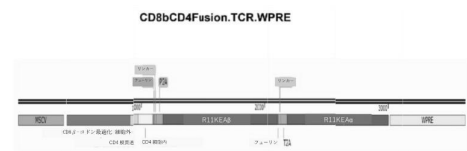


図 5C

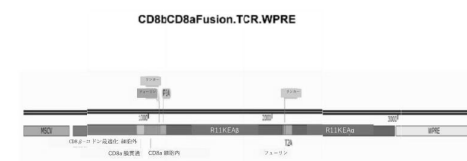


図 5D

【図 7】



【図 6】

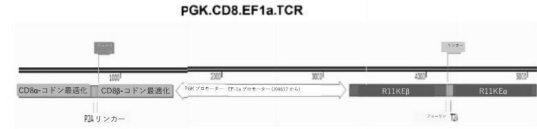


図 6A

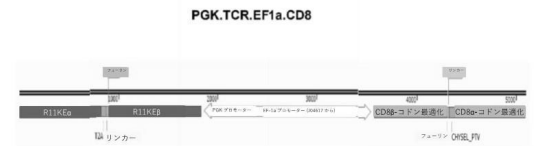


図 6B

【図 8】



図 8A

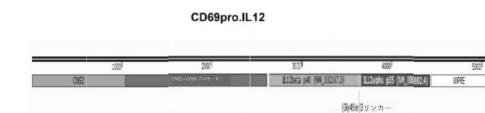


図 8B

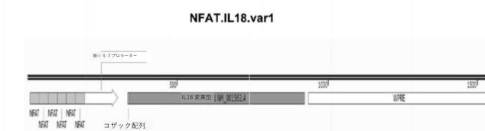


図 8C



図 8D

10

20

30

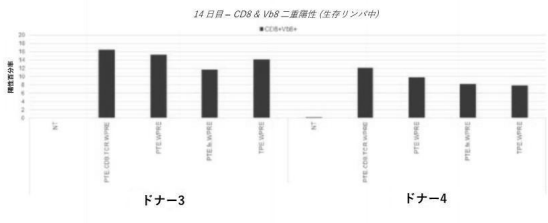
40

50

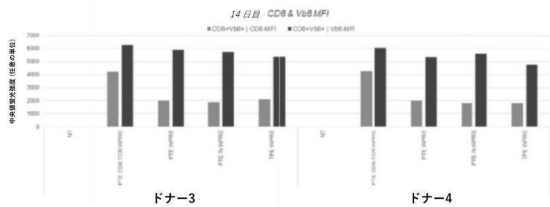
【図 9】



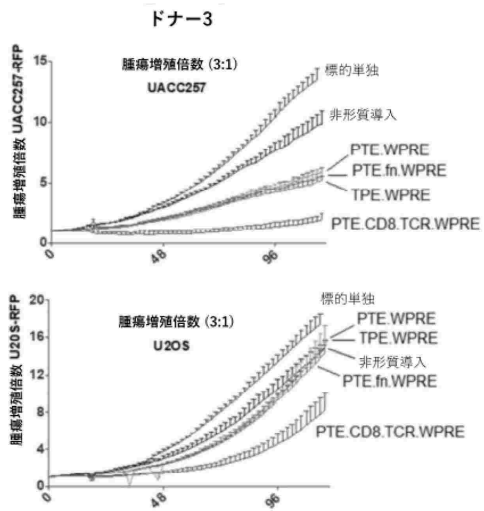
【図 10】



【図 11】



【図 12】



10

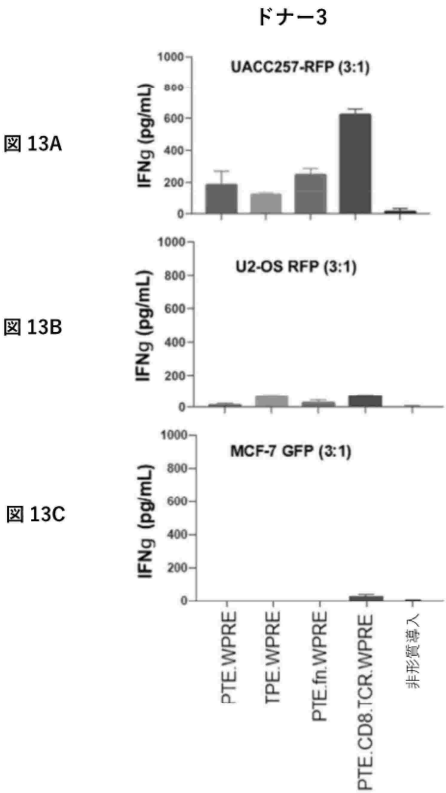
20

30

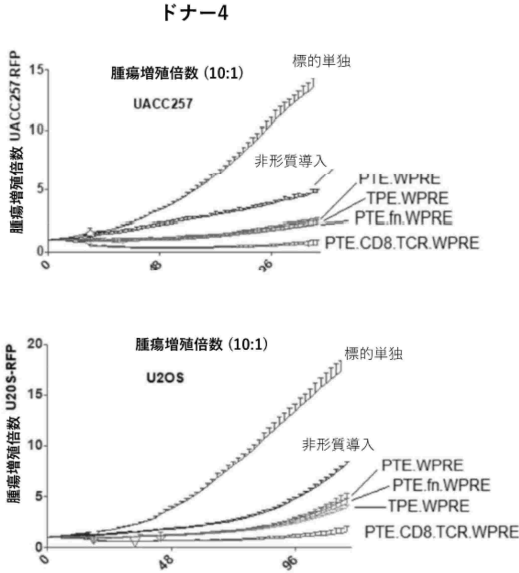
40

50

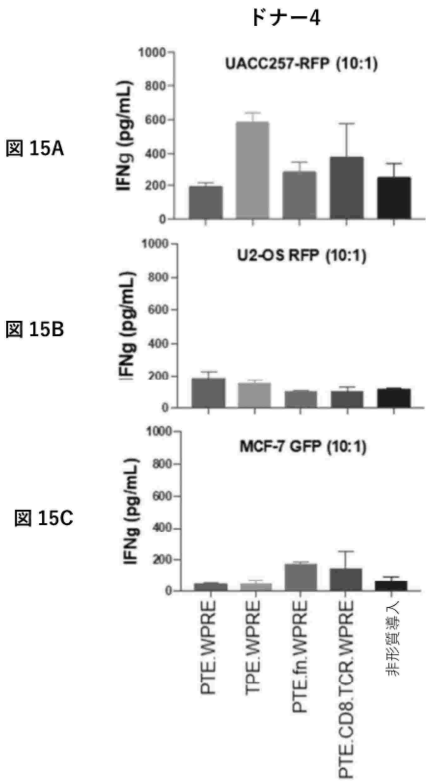
【図 1 3】



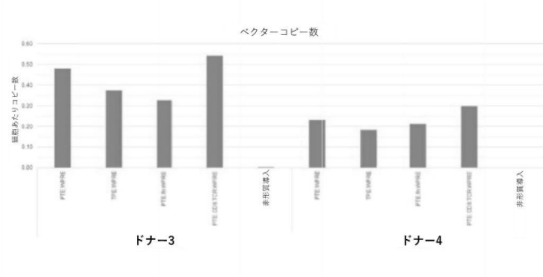
【図 1 4】



【図 1 5】



【図 1 6】



10

20

30

40

50

【図 17】

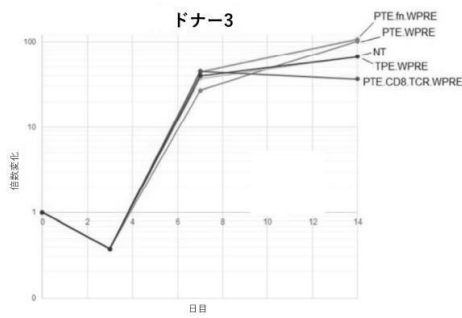


図 17A

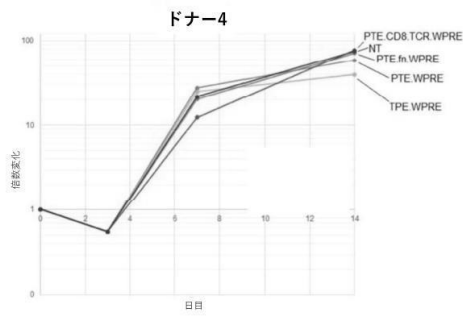


図 17B

【図 18】

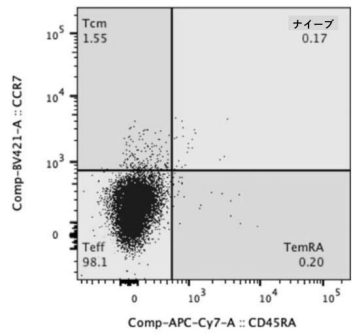


図 18A

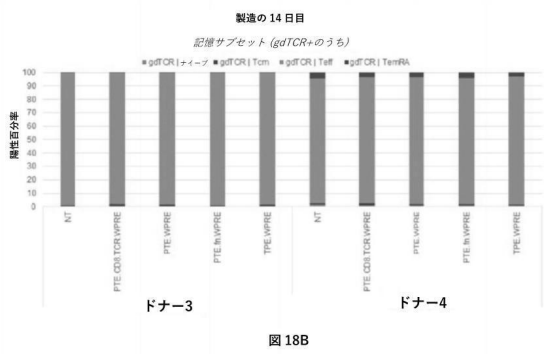
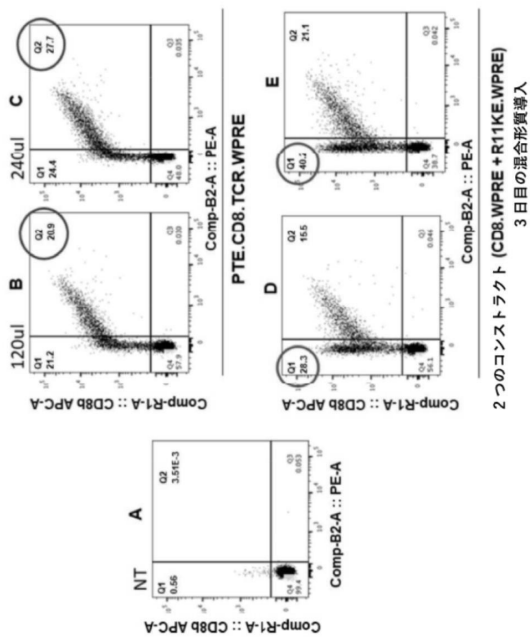


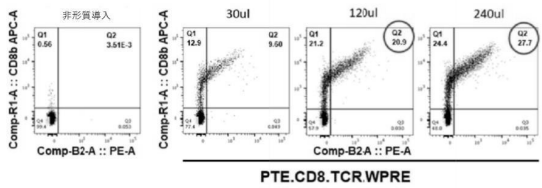
図 18B

【図 19】



2つのコンストラクト (CD8b.WPRE + R11KE.WPRE)
3 日目の混合形質導入

【図 20】



10

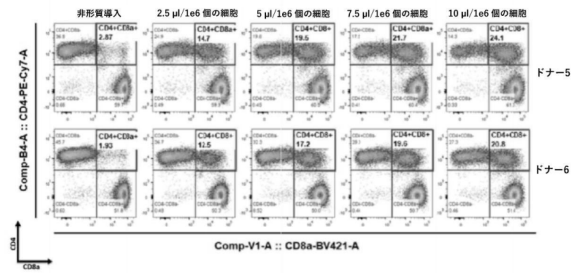
20

30

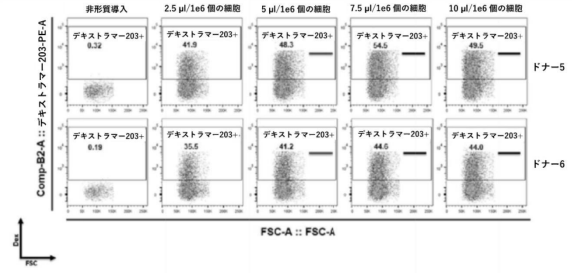
40

50

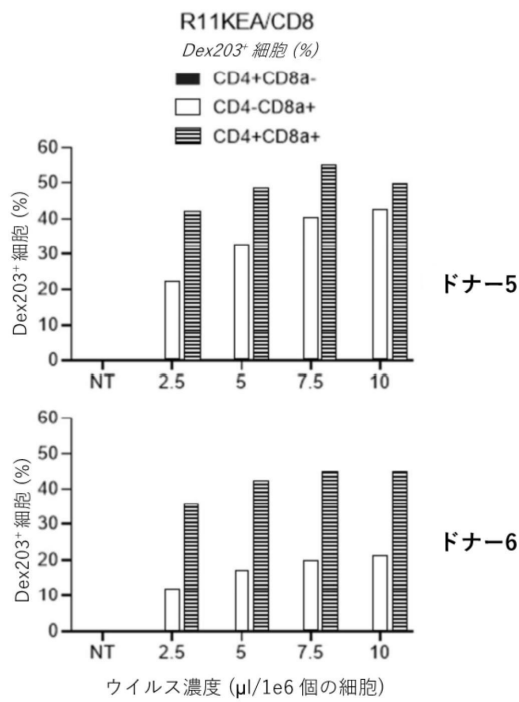
【図 2 1】



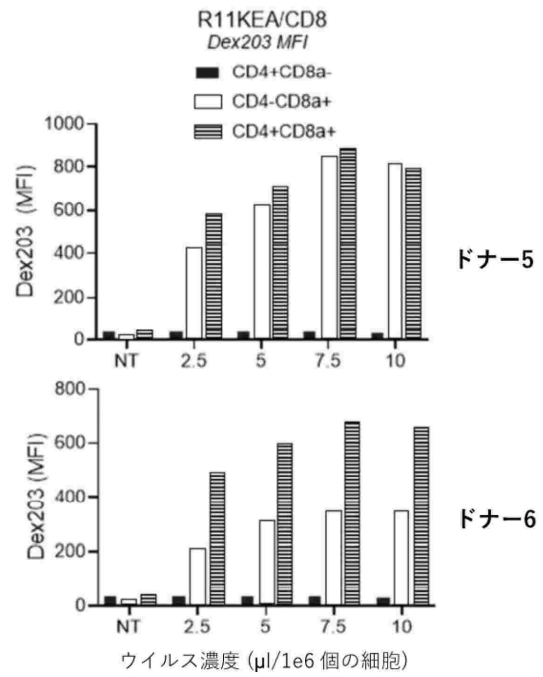
【図 2 2】



【図 2 3】



【図 2 4】



10

20

30

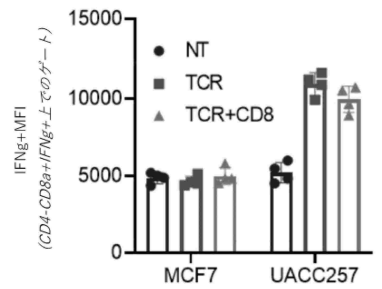
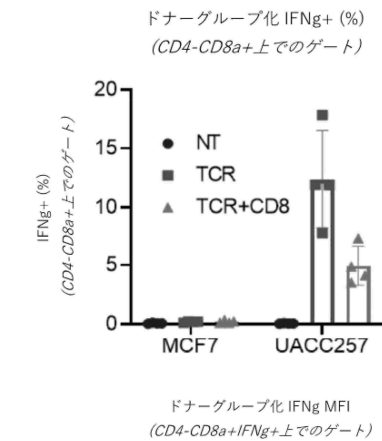
40

50

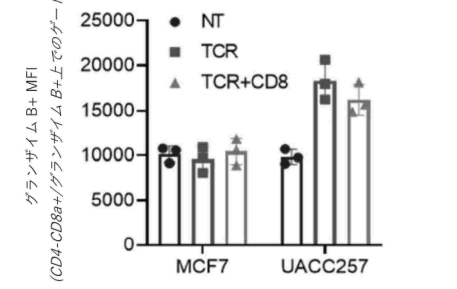
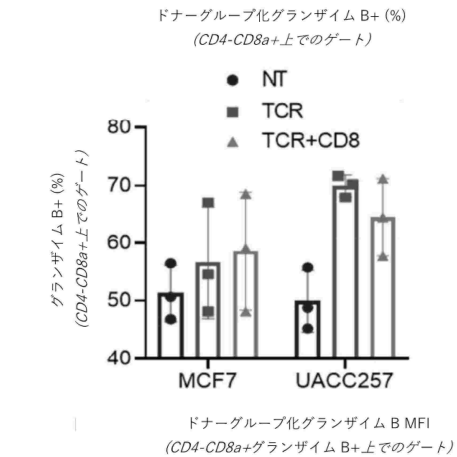
【図 2 5】



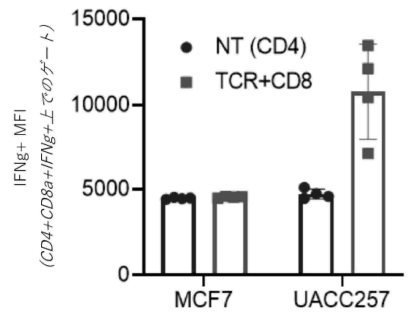
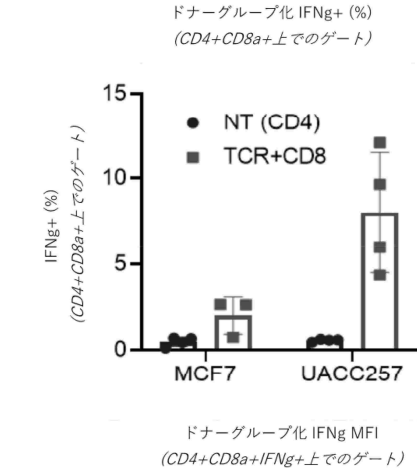
【図 2 6】



【図 2 7】



【図 2 8】



10

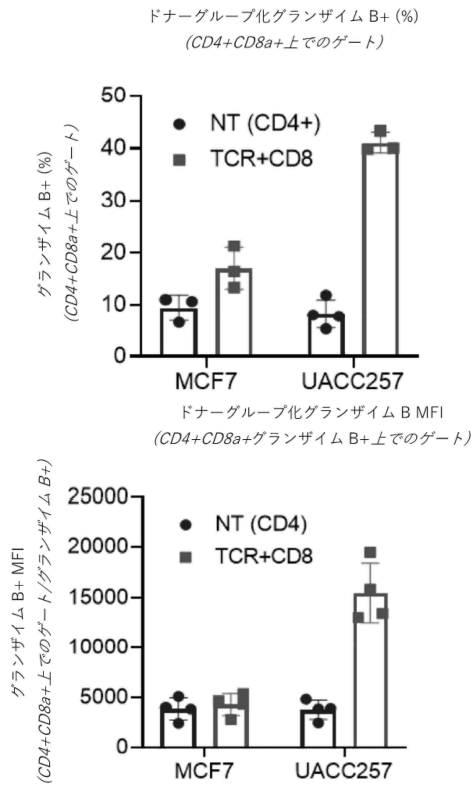
20

30

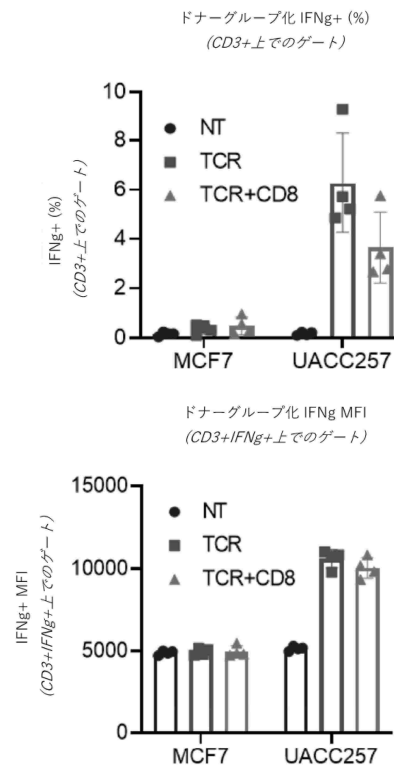
40

50

【図 29】



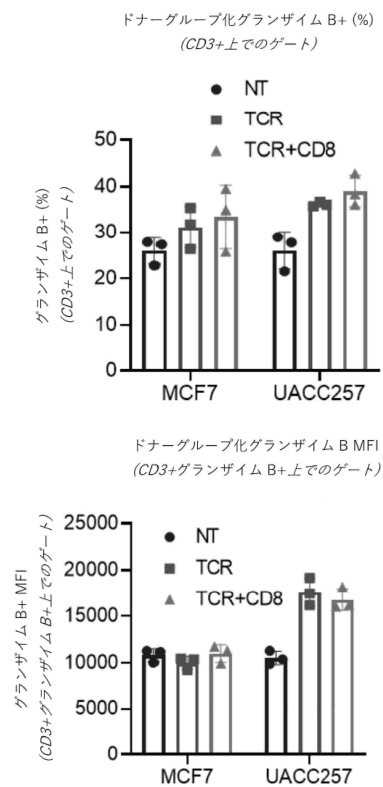
【図 30】



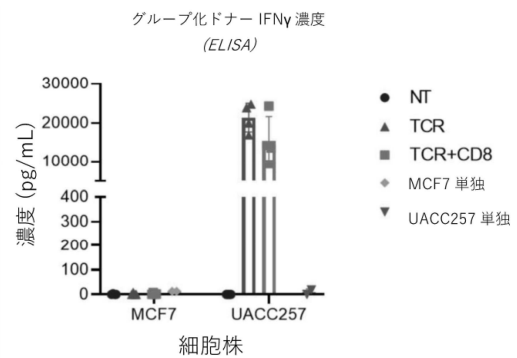
10

20

【図 31】



【図 32】

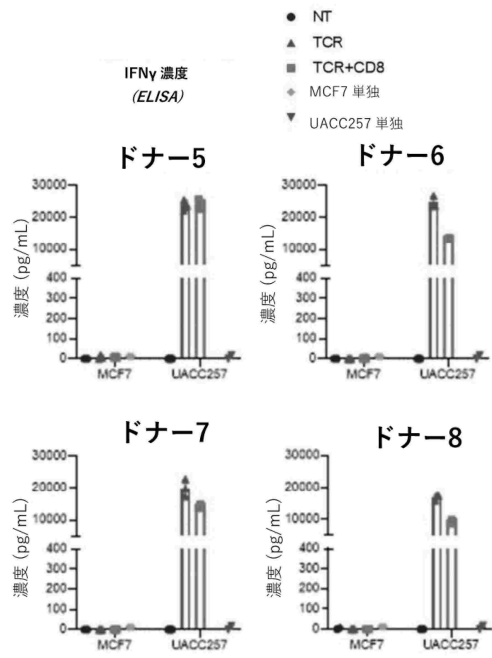


30

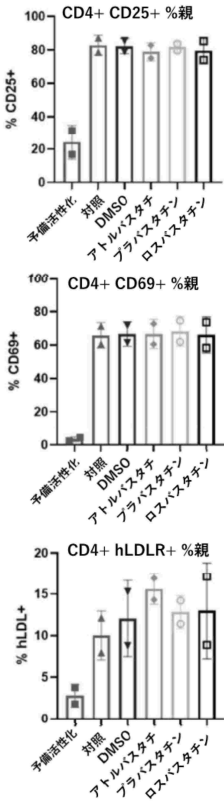
40

50

【図 3 3】



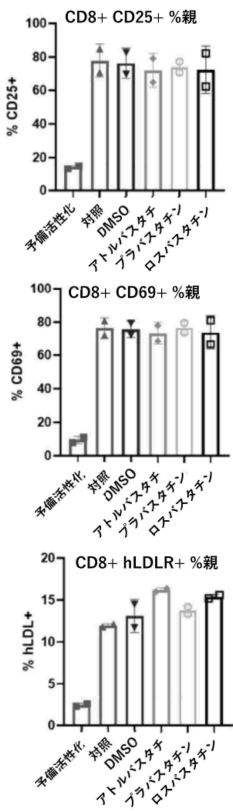
【図 3 4】



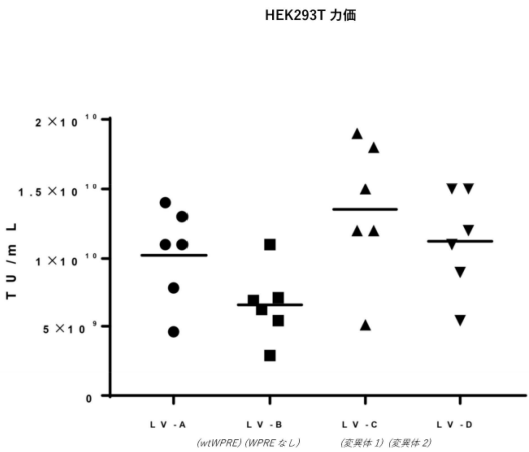
10

20

【図 3 5】



【図 3 6】

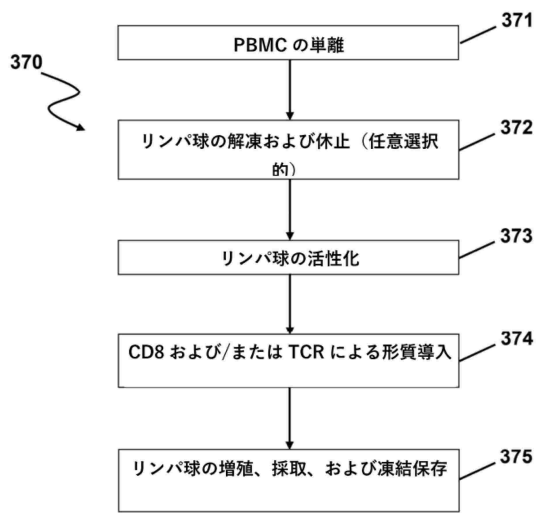


30

40

50

【図 3 7】



10

【配列表】

0007621979000001.app

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 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	
A 6 1 K	35/17 (2025.01)	A 6 1 K	35/17	
A 6 1 K	35/761 (2015.01)	A 6 1 K	35/761	
A 6 1 K	35/763 (2015.01)	A 6 1 K	35/763	
A 6 1 K	35/766 (2015.01)	A 6 1 K	35/766	
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 K	47/68	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
A 6 1 K	39/39 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	E
		A 6 1 K	39/39	

弁理士 大島 卓之

(74)代理人 100225015

弁理士 中島 彩夏

(72)発明者 マタ, メリンダ

アメリカ, テキサス 77030, ヒューストン, スーツ 205, 2201 ダブリュ. ホルコム
ビーエルバイディー.

(72)発明者 ビュイアール, ヤニック

アメリカ, テキサス 77030, ヒューストン, スーツ 205, 2201 ダブリュ. ホルコム
ビーエルバイディー.

(72)発明者 カルラ, マムタ

アメリカ, テキサス 77030, ヒューストン, スーツ 205, 2201 ダブリュ. ホルコム
ビーエルバイディー.

審査官 松原 寛子

(56)参考文献 国際公開第2018/058002 (WO, A1)

Gene Ther., 2008年, doi:10.1038/gt.2008.90.

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

C 1 2 N 15/00-15/90

C 1 2 N 5/00

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 43/00

A 6 1 P 37/04

A 6 1 K 47/68

A 6 1 K 39/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq