

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和6年3月6日(2024.3.6)

【国際公開番号】WO2021/174124

【公表番号】特表2023-516595(P2023-516595A)

【公表日】令和5年4月20日(2023.4.20)

【年通号数】公開公報(特許)2023-074

【出願番号】特願2022-550927(P2022-550927)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/62(2006.01)

C 1 2 N 15/12(2006.01)

C 1 2 N 15/13(2006.01)

C 1 2 N 5/10(2006.01)

C 0 7 K 14/725(2006.01)

C 0 7 K 14/705(2006.01)

C 0 7 K 19/00(2006.01)

C 0 7 K 16/30(2006.01)

C 1 2 N 5/0786(2010.01)

C 1 2 N 5/0784(2010.01)

C 1 2 N 5/0787(2010.01)

C 1 2 N 5/0781(2010.01)

C 1 2 N 5/0783(2010.01)

A 6 1 K 35/17(2015.01)

A 6 1 P 35/00(2006.01)

A 6 1 P 35/02(2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/62 Z Z N A

C 1 2 N 15/12

C 1 2 N 15/13

C 1 2 N 5/10

C 0 7 K 14/725

C 0 7 K 14/705

C 0 7 K 19/00

C 0 7 K 16/30

C 1 2 N 5/0786

C 1 2 N 5/0784

C 1 2 N 5/0787

C 1 2 N 5/0781

C 1 2 N 5/0783

A 6 1 K 35/17

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 35/02

【手続補正書】

【提出日】令和6年2月26日(2024.2.26)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

10

20

30

40

50

## 【補正の内容】

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

CD20を結合する二量体抗原受容体(DAR)を発現する遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団であって、前記DARが、

a. アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：(i)抗体重鎖可変領域、(ii)抗体重鎖定常領域、(iii)膜貫通領域および(iv)細胞内領域を含む第一のポリペプチド；ならびに

b. アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：(i)抗体軽鎖可変領域および(ii)抗体軽鎖定常領域を含む第二のポリペプチド；

を含み、

前記抗体重鎖定常領域および前記抗体軽鎖定常領域が、前記DARを形成するための二量体化ドメインを形成し、

前記抗体重鎖可変領域および前記抗体軽鎖可変領域が、CD20を結合する抗原結合ドメインを形成する、CD20を結合する二量体抗原受容体(DAR)を発現する遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

10

## 【請求項 2】

CD20を結合する二量体抗原受容体(DAR)を発現する遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団であって、前記DARが、

a. アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：(i)抗体軽鎖可変領域、(ii)抗体軽鎖定常領域、(iii)膜貫通領域および(iv)細胞内領域を含む第一のポリペプチド鎖；ならびに

b. アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：(i)抗体重鎖可変領域および(ii)抗体重鎖定常領域を含む第二のポリペプチド鎖；

を含み、

前記抗体重鎖定常領域および前記抗体軽鎖定常領域が、前記二量体抗原受容体(DAR)を形成するための二量体化ドメインを形成し、

前記抗体重鎖可変領域および前記抗体軽鎖可変領域が、CD20を結合する抗原結合ドメインを形成する、CD20を結合する二量体抗原受容体(DAR)を発現する遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

20

30

## 【請求項 3】

前記抗体重鎖定常領域および前記抗体軽鎖定常領域が1つまたは2つのジスルフィド結合を介して二量体化する、請求項1または2に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

## 【請求項 4】

前記抗体重鎖定常領域および前記抗体軽鎖定常領域が1つまたは2つのジスルフィド結合を介して二量体化する、請求項1または2に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

## 【請求項 5】

部分a)中にヒンジ領域をさらに含み、前記ヒンジ領域が前記抗体定常領域と前記膜貫通領域との間にある、請求項1または2に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

40

## 【請求項 6】

前記ヒンジ領域が、IgG、IgA、IgM、IgEおよびIgDからなる群より選択される抗体由来のヒンジ配列を含む、請求項5に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

## 【請求項 7】

前記ヒンジがCD28ヒンジ領域を含む、請求項5に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

## 【請求項 8】

50

前記ヒンジ領域が、C P P C (配列番号 6 1)またはS P P C (配列番号 6 2)アミノ酸配列を含む、請求項 5 に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

【請求項 9】

前記膜貫通領域が C D 2 8 からの膜貫通配列を含む、請求項 1 または 2 に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

【請求項 10】

前記細胞内領域が、4 - 1 B B 細胞内領域 (配列番号 7)、I T A M 1、2 および 3 を有する C D 3、I T A M 1 を有する C D 3、I T A M 3 を有する C D 3 (配列番号 8)、または C D 2 8、C D 2 7、O X 4 0、C D 3 0、C D 4 0、P D - 1、I C O S、リンパ球機能関連抗原 - 1 (L F A - 1)、C D 2、C D 7、L I G H T、N K G 2 C、B 7 - H 3、G I T R (T N F R S F 1 8)、D R 3 (T N F R S F 2 5)、T N F R 2 および / または C D 2 2 6 のいずれかの細胞内領域からなる群より選択される 1 もしくはそれを超える細胞内アミノ酸配列、またはこれらのいずれかと少なくとも 9 5 % の同一性を有する細胞内アミノ酸配列を含む、請求項 1 または 2 に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

10

【請求項 11】

前記抗体重鎖可変領域が、配列番号 3 と少なくとも 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

20

【請求項 12】

前記抗体重鎖定常領域が、配列番号 4 と少なくとも 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 11 に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

【請求項 13】

前記抗体軽鎖可変領域が、配列番号 11 と少なくとも 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 11 に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

【請求項 14】

前記抗体軽鎖定常領域が、配列番号 12 と少なくとも 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 11 に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

30

【請求項 15】

前記ヒンジ領域が、配列番号 5 と少なくとも 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

【請求項 16】

前記膜貫通領域が、配列番号 6 と少なくとも 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

40

【請求項 17】

前記細胞内領域が、

- i) 4 - 1 B B 細胞内共刺激配列 (配列番号 7) ;
- ii) I T A M 1、2 および 3 を含む C D 3 アミノ酸配列 ;
- iii) I T A M 1 を含む C D 3 アミノ酸配列 ;
- iv) I T A M 2 を含む C D 3 アミノ酸配列 ; ならびに / または
- v) I T A M 3 を含む C D 3 アミノ酸配列 (配列番号 8) ;

のうちの 2 つまたはそれより多くの任意の組み合わせを含む、請求項 1 または 2 に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

【請求項 18】

50

前記細胞内領域が、

i) CD 28からの細胞内配列、ならびにITAM 1、2および3を有するCD 3からの細胞内配列；

ii) 4-1BBからの細胞内配列、ならびにITAM 1、2および3を有するCD 3からの細胞内配列；

iii) CD 28からの細胞内配列、4-1BBからの細胞内配列、ならびにITAM 1、2および3を有するCD 3からの細胞内配列；

iv) 4-1BBからの細胞内配列（配列番号7）、およびITAM 3を有するCD 3からの細胞内配列（配列番号8）；

v) CD 28からの細胞内配列、およびITAM 3を有するCD 3からの細胞内配列；または

vi) CD 28からの細胞内配列、4-1BBからの細胞内配列、およびITAM 3を有するCD 3からの細胞内配列；

を含む、請求項1または2に記載の二量体抗原受容体。

【請求項19】

前記第一のポリペプチド鎖が、配列番号14のアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

【請求項20】

前記第二のポリペプチド鎖が、配列番号15のアミノ酸配列を含む、請求項19に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

【請求項21】

a) 前記第一のポリペプチド鎖が、アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：(i) 配列番号3と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD 20抗体重鎖可変領域；(ii) 配列番号4と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD 20抗体重鎖定常領域；(iii) CD 8およびCD 28ヒンジ領域を含むヒンジ領域；(iv) 配列番号6と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD 28膜貫通領域；ならびに(v) CD 28およびCD 3 ITAM 1、2および3を含む細胞内領域を含み、

b) 前記第二のポリペプチド鎖が、アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：(i) 配列番号11と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD 20抗体軽鎖可変領域；および(ii) 配列番号12と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD 20抗体軽鎖定常領域を含み、

前記抗体重鎖定常領域および前記抗体軽鎖定常領域が二量体化ドメインを形成し、

前記抗体重鎖可変領域および前記抗体軽鎖可変領域が、CD 20タンパク質を結合する抗原結合ドメインを形成する、請求項1に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

【請求項22】

a) 前記第一のポリペプチド鎖が、アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：(i) 配列番号3と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD 20抗体重鎖可変領域；(ii) 配列番号4と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD 20抗体重鎖定常領域；(iii) 配列番号5と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD 28ヒンジ領域を含むヒンジ領域；(iv) 配列番号6と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD 28膜貫通領域；ならびに(v) 4-1BBおよびCD 3 ITAM 1、2および3細胞内配列を含む細胞内領域を含み、

b) 前記第二のポリペプチド鎖が、アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：(i) 配列番号11と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD 20抗体軽鎖可変領域；および(ii) 配列番号12と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD 20抗体軽鎖定常領域を含み、

前記抗体重鎖定常領域および前記抗体軽鎖定常領域が二量体化ドメインを形成し、

10

20

30

40

50

前記抗体重鎖可変領域および前記抗体軽鎖可変領域が、CD20タンパク質を結合する抗原結合ドメインを形成する、請求項1に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

【請求項23】

a) 前記第一のポリペプチド鎖が、アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：(i) 配列番号3と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD20抗体重鎖可変領域；(ii) 配列番号4と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD20抗体重鎖定常領域；(iii) 配列番号5と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD28ヒンジ領域を含むヒンジ領域；(iv) 配列番号6と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD28膜貫通領域；ならびに(v) CD28およびCD3 ITAM1、2および3を含む細胞内領域を含み、

10

b) 前記第二のポリペプチド鎖が、アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：(i) 配列番号11と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD20抗体軽鎖可変領域；および(ii) 配列番号12と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD20抗体軽鎖定常領域を含み、

前記抗体重鎖定常領域および前記抗体軽鎖定常領域が二量体化ドメインを形成し、

前記抗体重鎖可変領域および前記抗体軽鎖可変領域が、CD20タンパク質を結合する抗原結合ドメインを形成し、

前記二量体抗原受容体(DAR)構築物が、DAR V2b構築物である、請求項1に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

20

【請求項24】

a) 前記第一のポリペプチド鎖が、アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：(i) 配列番号3と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD20抗体重鎖可変領域；(ii) 配列番号4と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD20抗体重鎖定常領域；(iii) 配列番号5と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD28ヒンジ領域を含むヒンジ領域；(iv) 配列番号6と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD28膜貫通領域；ならびに(v) 4-1BBおよびCD28およびCD3 ITAM1、2および3細胞内配列を含む細胞内領域を含み、

30

b) 前記第二のポリペプチド鎖が、アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：(i) 配列番号11と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD20抗体軽鎖可変領域；および(ii) 配列番号12と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD20抗体軽鎖定常領域を含み、

前記抗体重鎖定常領域および前記抗体軽鎖定常領域が二量体化ドメインを形成し、

前記抗体重鎖可変領域および前記抗体軽鎖可変領域が、CD20タンパク質を結合する抗原結合ドメインを形成する、請求項1に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

【請求項25】

a) 前記第一のポリペプチド鎖が、アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：(i) 配列番号3と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD20抗体重鎖可変領域；(ii) 配列番号4と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD20抗体重鎖定常領域；(iii) 配列番号5と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD28ヒンジ領域を含むヒンジ領域；(iv) 配列番号6と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD28膜貫通領域；ならびに(v) それぞれ、配列番号7および8のアミノ酸配列を含む細胞内配列である、4-1BBおよびCD3 ITAM3を含む細胞内領域を含み、

40

b) 前記第二のポリペプチド鎖が、アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：(i) 配列番号11と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD20抗体軽鎖可変領域；および(ii) 配列番号12と少なくとも95%の同一

50

性を有するアミノ酸配列を含むCD20抗体軽鎖定常領域を含み、

前記抗体重鎖定常領域および前記抗体軽鎖定常領域が二量体化ドメインを形成し、

前記抗体重鎖可変領域および前記抗体軽鎖可変領域が、CD20タンパク質を結合する抗原結合ドメインを形成する、請求項1に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

【請求項26】

a) 前記第一のポリペプチド鎖が、アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：(i) 配列番号3と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD20抗体重鎖可変領域；(ii) 配列番号4と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD20抗体重鎖定常領域；(iii) 配列番号6と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD28膜貫通領域；ならびに(iv) それぞれ、配列番号7および8のアミノ酸配列を含む細胞内配列である、4-1BBおよびCD3ITAM3を含む細胞内領域を含み、

10

b) 前記第二のポリペプチド鎖が、アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：(i) 配列番号11と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD20抗体軽鎖可変領域；および(ii) 配列番号12と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD20抗体軽鎖定常領域を含み、

前記抗体重鎖定常領域および前記抗体軽鎖定常領域が二量体化ドメインを形成し、

前記抗体重鎖可変領域および前記抗体軽鎖可変領域が、CD20タンパク質を結合する抗原結合ドメインを形成する、請求項1に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

20

【請求項27】

(a) 前記第一のポリペプチド鎖が、(i) 配列番号3のアミノ酸配列を含むCD20抗体重鎖可変領域を含み、b) 前記第二のポリペプチド鎖が、(i) 配列番号11のアミノ酸配列を含むCD20抗体軽鎖可変領域を含む、請求項21～26のいずれかに記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

【請求項28】

前記遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団が、前記DARの前記第一のポリペプチドをコードする核酸配列および前記第二のポリペプチドをコードする核酸配列を含む、請求項1または2に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

30

【請求項29】

前記集団が、配列番号14のポリペプチドおよび配列番号15のポリペプチドをコードする配列を含む、請求項28に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

【請求項30】

前記第一のポリペプチドをコードする核酸配列および前記第二のポリペプチドをコードする核酸配列が単一の連続したオープンリーディングフレームの一部であり、前記オープンリーディングフレームが、前記オープンリーディングフレームからの前記第一および第二のポリペプチドの産生を可能にするペプチドをコードする配列を含む、請求項28に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

40

【請求項31】

前記ペプチドが、T2A、P2A、またはE2A、またはF2A配列である、請求項30に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

【請求項32】

Tリンパ球、NK(ナチュラルキラー)細胞、マクロファージ、樹状細胞、肥満細胞、好酸球、Bリンパ球または単球を含む、請求項1または請求項2に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

【請求項33】

前記細胞が初代細胞である、請求項32に記載の宿主細胞の集団。

50

## 【請求項 34】

前記細胞がヒト細胞である、請求項 32 に記載の宿主細胞の集団。

## 【請求項 35】

前記集団が T 細胞を含む、請求項 32 に記載の宿主細胞の集団。

## 【請求項 36】

前記集団の 1% 未満が前記 T 細胞受容体を発現し、前記集団の 20% 超が前記 D A R を発現する、請求項 35 に記載の宿主細胞の集団。

## 【請求項 37】

前記 T 細胞が初代ヒト T 細胞である、請求項 36 に記載の細胞の集団。

## 【請求項 38】

薬学的に許容され得る賦形剤と、請求項 37 に記載の宿主細胞の集団とを含む薬学的組成物。

10

## 【請求項 39】

薬学的に許容され得る賦形剤と、請求項 21 ~ 26 のいずれかに記載の宿主細胞の集団とを含む薬学的組成物。

## 【請求項 40】

薬学的に許容され得る賦形剤と、請求項 29 に記載の宿主細胞の集団とを含む薬学的組成物。

## 【請求項 41】

a) アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：(i) 抗体重鎖可変領域、(ii) 抗体重鎖定常領域、(iii) 膜貫通領域および(iv) 細胞内領域を含む第一のポリペプチド；ならびに

20

b) アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：(i) 抗体軽鎖可変領域および(ii) 抗体軽鎖定常領域を含む第二のポリペプチド；

をコードする少なくとも 1 つの核酸分子であって、

前記抗体重鎖定常領域および前記抗体軽鎖定常領域が、前記 D A R を形成するための二量体化ドメインを形成し、

前記抗体重鎖可変領域および前記抗体軽鎖可変領域が、C D 20 を結合する抗原結合ドメインを形成する、少なくとも 1 つの核酸分子。

## 【請求項 42】

a) アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：(i) 抗体軽鎖可変領域、(ii) 抗体軽鎖定常領域、(iii) 膜貫通領域および(iv) 細胞内領域を含む第一のポリペプチド鎖；ならびに

30

b) アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：(i) 抗体重鎖可変領域および(ii) 抗体重鎖定常領域を含む第二のポリペプチド鎖；

をコードする少なくとも 1 つの核酸分子であって、

前記抗体重鎖定常領域および前記抗体軽鎖定常領域が、前記二量体抗原受容体(D A R)を形成するための二量体化ドメインを形成し、

前記抗体重鎖可変領域および前記抗体軽鎖可変領域が、C D 20 を結合する抗原結合ドメインを形成する、少なくとも 1 つの核酸分子。

40

## 【請求項 43】

核酸分子であって、アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：(1) 重鎖リーダー配列、(2) 抗体重鎖可変領域、(3) 抗体重鎖定常領域、(4) 必要に応じて含まれるヒンジ領域、(5) 膜貫通領域、(6) 細胞内領域、(7) 自己切断配列、(8) 軽鎖リーダー配列、(9) 抗体軽鎖可変領域および(10) 抗体軽鎖定常領域を含む前駆体ポリペプチドをコードし、前記自己切断配列が、前記前駆体ポリペプチドを第一および第二のポリペプチド鎖に切断することを可能にする、核酸分子。

## 【請求項 44】

核酸分子であって、アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：(1) 軽鎖リーダー配列、(2) 抗体軽鎖可変領域、(3) 抗体軽鎖定常領域、(4) 必

50

要に応じて含まれるヒンジ領域、(5)膜貫通領域、(6)細胞内領域、(7)自己切断配列、(8)重鎖リーダー配列、(9)抗体重鎖可変領域および(10)抗体重鎖定常領域を含む前駆体ポリペプチドをコードし、前記自己切断配列が、前記前駆体ポリペプチドを第一および第二のポリペプチド鎖に切断することを可能にする、核酸分子。

【請求項45】

前記抗体重鎖可変領域が、配列番号3のアミノ酸配列を含む、請求項43または44に記載の核酸分子。

【請求項46】

前記抗体重鎖定常領域が、配列番号4のアミノ酸配列を含む、請求項43または44に記載の核酸分子。

10

【請求項47】

前記抗体軽鎖可変領域が、配列番号11のアミノ酸配列を含む、請求項43または44に記載の核酸分子。

【請求項48】

前記抗体軽鎖定常領域が、配列番号12のアミノ酸配列を含む、請求項43または44に記載の核酸分子。

【請求項49】

前記ヒンジ領域が、IgG、IgA、IgM、IgEおよびIgDからなる群より選択される抗体からのヒンジ配列を含む、請求項43または44に記載の核酸分子。

【請求項50】

前記ヒンジがCD28ヒンジ領域を含む、請求項43または44に記載の核酸分子。

20

【請求項51】

前記ヒンジ領域がCPPC(配列番号61)またはSPPC(配列番号62)アミノ酸配列を含む、請求項43または44に記載の核酸分子。

【請求項52】

前記ヒンジ領域が、配列番号5のアミノ酸配列を含む、請求項43または44に記載の核酸分子。

【請求項53】

前記膜貫通領域がCD28からの膜貫通配列を含む、請求項43または44に記載の核酸分子。

30

【請求項54】

前記膜貫通領域が、配列番号6のアミノ酸配列を含む、請求項43または44に記載の核酸分子。

【請求項55】

前記細胞内領域が、1つの細胞内配列を含むか、または4-1BB(配列番号7)、ITAM1、2および3を有するCD3、ITAM1を有するCD3、ITAM3を有するCD3(配列番号8)、CD28、CD27、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、GITR(TNFRSF18)、DR3(TNFRSF25)、TNFR2および/もしくはCD226からなる群より選択される細胞内配列の任意の順序および任意の組み合わせでの2~5個の細胞内配列を含む、請求項43または44に記載の核酸分子。

40

【請求項56】

前記細胞内領域が、

i) 4-1BB細胞内共刺激配列(配列番号7)；

ii) ITAM1、2および3を有するCD3；

iii) CD3 ITAM1；

iv) CD3 ITAM2；ならびに/または

v) ITAM3を有するCD3(配列番号8)

の2つまたはそれより多くの任意の組み合わせを含む、請求項43または44に記載の

50

核酸分子。

【請求項 57】

前記細胞内領域が、

i) CD28 からの細胞内配列、ならびに ITAM1、2 および 3 を有する CD3 からの細胞内配列；

ii) 4-1BB からの細胞内配列、ならびに ITAM1、2 および 3 を有する CD3 からの細胞内配列；

iii) CD28 からの細胞内配列、4-1BB からの細胞内配列、ならびに ITAM1、2 および 3 を有する CD3 からの細胞内配列；

iv) 4-1BB からの細胞内配列、および ITAM3 を有する CD3 からの細胞内配列；

v) CD28 からの細胞内配列（配列番号 42）、および CD3 からの細胞内配列；  
または

vi) CD28 からの細胞内配列、4-1BB からの細胞内配列、および ITAM3 を有する CD3 からの細胞内配列；

を含む、請求項 43 または 44 に記載の核酸分子。

【請求項 58】

配列番号 13 のアミノ酸配列を含む、請求項 43 または 44 に記載の核酸分子。

【請求項 59】

図 4A および B に示される配向およびアミノ酸配列を含む、請求項 43 または 44 に記載の核酸分子。

【請求項 60】

被験体における腫瘍抗原の有害な発現と関連する疾患、障害または状態を有する前記被験体を処置するための組成物であって、請求項 55 または 56 に記載の宿主細胞の集団を含む、組成物。

【請求項 61】

前記疾患が、非ホジキンリンパ腫（NHL）、バーキットリンパ腫（BL）、B 慢性リンパ球性白血病（B-CLL）、B および T 急性リンパ球性白血病（ALL）、T 細胞リンパ腫（TCL）、急性骨髄性白血病（AML）、有毛細胞白血病（HCL）、ホジキンリンパ腫（HL）、慢性骨髄性白血病（CML）および多発性骨髄腫（MM）からなる群より選択される血液のがんである、請求項 60 に記載の組成物。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0083

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0083】

「ヒンジ」という用語は、一般的にはタンパク質の 2 つのドメイン間に見出され、構築物全体の柔軟性および互いに対してドメインの一方または両方の運動を可能にし得るアミノ酸セグメントを表す。構造的には、ヒンジ領域は、約 10 ~ 約 100 アミノ酸、例えば、約 15 ~ 約 75 アミノ酸、約 20 ~ 約 50 アミノ酸または約 30 ~ 約 60 アミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、DAR ポリペプチドなどのポリペプチド中のヒンジ領域は、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 または 100 アミノ酸の長である。ヒンジ領域は、CD8 ヒンジ領域もしくはその断片、CD8 ヒンジ領域もしくはその断片、抗体（例えば、IgG、IgA、IgM、IgE または IgD 抗体）のヒンジ領域または抗体の定常ドメイン CH1 と CH2 を連結するヒンジ領域などの、天然に存在するタンパク質のヒンジ領域に由来することができる。ヒンジ領域は抗体に由来することができ、抗体の 1 またはそれを超える定常領域を含んでもよくもしくは含まなくてもよく、また

はヒンジ領域は抗体のヒンジ領域と抗体の C H 3 定常領域とを含み、またはヒンジ領域は抗体のヒンジ領域と抗体の C H 2 および C H 3 定常領域とを含み、またはヒンジ領域は天然に存在しないペプチドであり、またはヒンジ領域は s c F v の C 末端と膜貫通ドメインの N 末端との間に配置される。いくつかの実施形態において、ヒンジ領域は、I g G 1、I g G 2、I g G 3 または I g G 4 免疫グロブリン分子からの上方、コアまたは下方ヒンジ配列を含む 2 つまたはそれを超える領域の任意の 1 つまたは任意の組み合わせを含む。D A R のいくつかの実施形態において、ヒンジ領域は I g G 1 上方ヒンジ配列 E P K S C D K T H T (配列番号 59) を含む。いくつかの D A R 実施形態において、ヒンジ領域は I g G 1 コアヒンジ配列 C P X C を含み、X は P、R または S である (配列番号 60)。いくつかの実施形態において、ヒンジ領域は、下方ヒンジ / C H 2 配列 P A P E L L G G P (配列番号 56) を含む。いくつかの実施形態において、ヒンジは、アミノ酸配列 S V F L F P P K P K D T (配列番号 57) を有する F c 領域 (C H 2) に連結されている。いくつかの実施形態において、ヒンジ領域は、上方、コアおよび下方ヒンジのアミノ酸配列を含み、E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P (配列番号 58) を含む。いくつかの実施形態において、ヒンジ領域は、少なくとも 1、2、3 またはそれを超える鎖間ジスルフィド結合を形成することができる 1、2、3 またはそれを超えるシステインを含む。

10

## 【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0136

20

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0136】

一実施形態において、図 1 A および B ならびに 2 A および B に示されている二量体抗原受容体については、ヒンジ領域は約 10 ~ 約 100 アミノ酸の長さである。一実施形態において、ヒンジ領域は、抗体 (例えば、I g G、I g A、I g M、I g E または I g D) からのヒンジ領域またはその断片を含む。一実施形態において、ヒンジ領域は、C D 8 (例えば、C D 8) および / もしくは C D 28 ヒンジ領域またはこれらの断片を含む。一実施形態において、ヒンジ領域は、C P P C (配列番号 61) または S P P C (配列番号 62) アミノ酸配列を含む。一実施形態において、ヒンジ領域は、C D 8 および C D 28 ヒンジ配列の両方 (例えば、長いヒンジ領域)、C D 8 配列のみ (短いヒンジ) または C D 28 ヒンジ配列のみ (例えば、短いヒンジ領域) を含む。一実施形態において、図 1 A もしくは B または図 2 A もしくは B に示される二量体抗原受容体のいずれもが、ヒンジ領域を欠く。

30

## 【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0158

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0158】

配列

以下の例示的な配列が開示される。

40

## 【化1】

## 配列番号 1

*Homo sapiens***CD20 抗原 (UniProtKB P11836 – 遺伝子 MS4A1)**

MTTPRNSVNGTFPAEPMKGP IAMQSGPKPLFRMSSSLVGPTQSFFMRESKTLGAVQIMNG  
 LFHIALGGLLMI PAGIYAPICVTVWYPLWGGIMYIISGSLLAATEKNSRKCLVKGKMIMN  
 SLSLFAAISGMILS IMDILNIKISHFLKMESLNFIRAHTPYINIYNCEPANPSEKNSPST  
 QYCYSIQSLFLGILSVMLIFAFFQELVIAGIVENEWKRTC SRPKSNIVLLSAEEKKEQTI  
 EIKEEVVGLTETSSQPKNEDIEIIPIQEEEEETETNFPEPPQDQESSPIENDSSP

10

## 配列番号 2

*Mus musculus***重鎖リーダーペプチド**

MEWSWVFLFFLSVTTGVHS

## 配列番号 3

**抗CD20重鎖可変領域 :**

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKF  
 KGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSA

20

## 配列番号 4

**抗CD20重鎖定常領域 (CH1)**

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS  
 LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHT

## 配列番号 5

**CD28 ヒンジ**

PRKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKP

## 配列番号 6

**CD28 膜貫通ドメイン**

FWLVVVGGVLAACYSLLVTVAFIIFWV

30

## 配列番号 7

**4-1BB 細胞内共刺激配列**

KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

## 配列番号 8

**CD3 と細胞内シグナル伝達領域、ITAM3のみ**

RVKFSRSADKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQLPPR

40

50

【化 2】

配列番号9

*Thosea asigna* ウイルス

T2A 自己切断配列

GSGEGRGSLTTCGDVEENPGP

配列番号10

軽鎖リーダーペプチド

MSVPTQVLGLLLLLWLT DARC

10

配列番号11

抗CD20軽鎖可変領域

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFOQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGS

GSGETSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIK

配列番号12

抗CD20

軽鎖定常領域( $\kappa$ )

RTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS

TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

20

配列番号13

抗CD20 DAR前駆体ポリペプチド:

MEWSWVFLFFLSVT TGVSQVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGL  
EWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFN  
VWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT  
FPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTPRKIEVMY  
PPPYL DNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLEFPGPSKPFWVLLVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWVKRG  
**RKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL**RVKFSRSADKGERRRGKGGHDGLYQG  
LSTATKDTYDALHMQALPPRGSGEGRGSLTTCGDVEENPGMSVPTQVLGLLLLLWLT DARCQIV  
LSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFOQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGS  
TSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASV  
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV  
THQGLSSPVTKSFNRGEC

30

配列番号14

タンパク質

人工

抗CD20 DAR第一のポリペプチド鎖

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKF  
KGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNWGAGTTVTVSAASTKGPS

40

50

【化3】

VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV  
 PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTPRKIEVMYPPPYLDNEKSNGTI IHVKG  
 KHLCPSPFLFPGPSKPFWVLLVVGGLVACYSLLVTVAFI I FWVKRGRKLLY I FKQPFMRPVQTT  
 QEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP  
 R

配列番号 15

タンパク質  
 人工

10

抗CD20 DAR第二のポリペプチド鎖

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGS  
 GSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT  
 ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLTKADYEKHKVYA  
 CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号 16

DNA  
 人工

抗CD20 DARをコードする配列

ATGGAGTGGAGCTGGGTGTTTCTGTTCTTCTCCTCTCCGTCACAACCGGCGTGCATAGCCAAGTGC  
 AATTGCAGCAGCCCGGTGCCGAACCTCGTGAAACCAGGAGCAAGCGTAAAGATGTCCTGTAAGGC  
 ATCAGGTTATACCTTTACCAGCTACAACATGCACTGGGTGAAACAAACGCCGGGGCGGGCCCTC  
 GAATGGATAGGCGCGATATATCCCGGAAATGGCGATACCAGTTACAATCAGAAGTTCAAAGGCA  
 AAGCGACACTGACAGCTGATAAGTCTTCAAGCACCGCCTATATGCAACTTTCTAGCCTGACCAG  
 CGAAGACTCCGCCGTTTATTACTGTGCTCGGTCCACATACTACGGAGGCGATTGGTACTTTAAT  
 GTGTGGGGTGCGGGCACCACTGTCACTGTATCAGCGCTTCCACCAAGGGCCCTCCGTGTTCC  
 CTCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACATCCGGAGGCACCGCCGCCCTCGGATGTCTGGTGAAGGA  
 CTACTTCCCCGAGCCTGTCAACCGTGTCTGGAATAGCGGCGCCCTCACCTCCGGCGTGCACACC  
 TTCCCCGCTGTCTGAGTCCCTCCGACTGTACAGCCTGTCTCCGTCTGACCGTGCCTAGCT  
 CCTCCCTCGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTTCCAACACAAAGGTGGA  
 CAAACGGGTGGAGCCCAAGTCCCTGCGACAAAACCCACACCCCCAGAAAGATAGAGGTGATGTAC  
 CCTCCCCCTACTTGGACAACGAAAAGTCTAATGGCACTATCATTCACGTAAAGGGCAAACACC  
 TTTGTCCAAGTCTTTGTTCAGGCCCATCTAAGCCGTTCTGGGTACTCGTGGTGTGGGGGG  
 CGTGTCTCGCTTGTTACTCACTGCTGGTGACGGTGGCCTTTATTTATTTCTGGGTAAACGGGGC  
 AGAAAGAACTCCTGTATATATTTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGG  
 AAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAGGAGGAAGGAGGATGTGAACTGAGGGTAAATT  
 TAGCAGGCTGTCAGATAAAGGGGAGAGGAGACGCGGGAAGGGCCATGATGGACTGTATCAGGGA  
 CTTTCCACAGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTCCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGGAA  
 GCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTGAGGAGAATCCTGGACCTATGTC  
 CGTCCCTACCCAGGTGCTGGGCCTGCTGCTGCTGTGGCTGACCGATGCTAGATGCCAGATAGTC  
 CTGAGCCAATCACCGGCCATCTTGTCTGCCTCTCCTGGCGAAAAGGTGACGATGACTTGCAGAG  
 CCAGTAGCTCTGTAAGCTATATACACTGGTTCAGCAAAAACCGGGCTCTTCTCCGAAGCCGTG

20

30

40

50

【化 4】

GATATACGCAACTTCAAACCTGGCGTCTGGGGTTCCTGTAAGGTTTAGCGGCAGCGGTTTCAGGC  
 ACGAGCTACAGCCTTACTATCTCCCGGGTTGAGGCTGAAGATGCAGCCACATACTACTGTCAGC  
 AGTGGACTTCAAATCCACCTACATTCGGGGGAGGCACGAAGCTGGAGATTAAACGAACCGTTGC  
 GGCGCCTAGTGTGTTTCATATTCCC GCCGTCTGATGAACAACTCAAGTCTGGAACGGCAAGTGTG  
 GTGTGCTCCTGAATAATTTTTATCCTAGGGAAGCAAAGGTGCAGTGGAAAGTCGATAACGCAT  
 TGCAAAGCGGTAACAGTCAAGAATCTGTAAGTGAACAAGATTCTAAAGATTCTACCTACAGTCT  
 CTCCTCCACATTGACCCTGTCAAAAAGCAGATTATGAGAAGCACAAGGTGTACGCATGTGAGGTA  
 ACACATCAAGGACTCAGCAGCCCAGTTACAAAAAGTTTCAATCGCGGGGAATGT

配列番号 17

10

DNA

人工

抗CD20 CARをコードする配列

ATGGAGTGGAGCTGGGTCTTTCTGTTCTTTTTAAGCGTGACCACCGGAGTGCACCTCCCAGATAG  
 TCCTGAGCCAATCACCGGCCATCTTGTCTGCCTCTCCTGGCGAAAAGGTGACGATGACTTGCAG  
 AGCCAGTAGCTCTGTAAGCTATATACACTGGTTCAGCAAAAACCGGGCTCTTCTCCGAAGCCG  
 TGGATATACGCAACTTCAAACCTGGCGTCTGGGGTTCCTGTAAGGTTTAGCGGCAGCGGTTTCAG  
 GCACGAGCTACAGCCTTACTATCTCCCGGGTTGAGGCTGAAGATGCAGCCACATACTACTGTCA  
 GCAGTGGACTTCAAATCCACCTACATTCGGGGGAGGCACGAAGCTGGAGATTAAAGGCGGCGGC  
 GGCAGCGGTGGCGGTGGCTCAGGTGGTGGTGGTTCTCAAGTGCATTGCAGCAGCCCGGTGCCG  
 AACTCGTGAAACCAGGAGCAAGCGTAAAGATGTCCTGTAAGGCATCAGGTTATACCTTTACCAG  
 CTACAACATGCACCTGGGTGAAACAAACGCCGGGGCGGGGCCCTCGAATGGATAGGCGCGATATAT  
 CCCGGAAATGGCGATACCAGTTACAATCAGAAGTTCAAAGGCAAAGCGACACTGACAGCTGATA  
 AGTCTTCAAGCACCGCCTATATGCAACTTTCTAGCCTGACCAGCGAAGACTCCGCCGTTTATTA  
 CTGTGCTCGGTCCACATACTACGGAGGCGATTGGTACTTTAATGTGTGGGGTGCGGGCACCCT  
 GTCCTGTATCAGCGCCCAGAAAGATAGAGGTGATGTACCCTCCCCCTACTTGGACAACGAAA  
 AGTCTAATGGCACTATCATTACGTAAAGGGCAAACACCTTTGTCCAAGTCCTTTGTTCCCAGG  
 CCCATCTAAGCCGTTCTGGGTACTCGTGGTTGTGGGGGGCGTGCTCGCTTGTTACTCAGTGTG  
 GTGACGGTGGCCTTTATATTTTTCTGGGTTAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTTCA  
 AACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCC  
 AGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAAGTGAAGGTTAAATTTAGCAGGTCTGCAGATAAAGGGGAG  
 AGGAGACGCGGAAGGGCCATGATGGACTGTATCAGGGACTTCCACAGCCACCAAGGACACCT  
 ATGACGCTCTCCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

20

30

配列番号 18

タンパク質

人工

抗CD20 CAR前駆体ポリペプチド

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSQIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKP  
 WIYATSNLASGVPVRFSGSGSGLTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKGGG  
 GSGGGGSGGGGSQVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGATY  
 PNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT

40

【化5】

VTVSAPRKIEVMYPPPYLDNEKSNGTI IHVKGKHLCPSP LFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYLL  
VTVAFII FWVKRGRKLLY I FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADKGE  
RRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

配列番号 19

人工

CAR GSリンカー

GGGSGGGSGGGGS

10

配列番号 20

DNA

人工

Jetプロモーター

GAATTCGGGCGGAGTTAGGGCGGAGCCAATCAGCGTGCGCCGTTCCGAAAGTTGCCTTTTATGG  
CTGGGCGGAGAATGGGCGGTGAACGCCGATGATTATATAAGGACGCGCCGGGTGTGGCACAGCT  
AGTTCGGTCGCAGCCGGGATTTGGGTCGCGGTTCTTGTGTTGTGGATCCCTGTGATCGTCACTTG  
ACA

20

配列番号 21 DNA

DNA

Homo sapiens

TRAC遺伝子のエクソン1からの5' 相同性アーム、Cas9標的部、660nt

GGCACCATATTCATTTTGCAGGTGAAATTCCTGAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAG  
GCCTTATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGACGCAGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAA  
ACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGATAGATTTCCCAACTTAATGCCAACAT  
ACCATAAACCTCCCATTCTGCTAATGCCAGCCTAAGTTGGGGAGACCACTCCAGATTCCAAGA  
TGTACAGTTTGCTTTGCTGGGCCTTTTCCCATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTTATATTGC  
TGGGGTTTTGAAGAAGATCCTATTAAATAAAAAGAATAAGCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCATT  
TCAGGTTTCCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTG  
GCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTTCTAAG  
ATGCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTGTC  
CATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCTAAC  
CCTGATCCTCTTGTCCACA

30

40

50

【化6】

配列番号22

DNA

Homo sapiens

TRAC遺伝子のエクソン1からの3' 相同性アーム、Cas9標的部位、650nt

GATATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTG  
TCTGCCTATTCACCGATTTTGGATTCTCAAACAAATGTGTACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTA  
TATCACAGACAAAACCTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCC  
TGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAGGACA  
CCTTCTTCCCCAGCCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGG  
AATGGCCAGGTTCTGCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAAACCTCTCTGATTGGTGGTCTC  
GGCCTTATCCATTGCCACCAAAAACCCTCTTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTTCTGGCAGT  
CCAGAGAATGACACGGGAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCCAG  
CCTCAGTCTCTCCAACCTGAGTTCCCTGCCTGCCTTGTCTCAGACTGTTTGCCCTTACTGC  
TCTTCTAGGCCTCATTCTAAGCCCCTTCTCCAAGTTGCCTCTCCTTATTTCTCCCTGTCTGCCA  
AAAAATCTTT

10

配列番号23

DNA

Homo sapiens

Cas9標的部位、TRAC遺伝子座

CAGGGTTCTGGATATCTGT

20

配列番号24

DNA

Homo sapiens

171bpの5' 相同性領域、Cas9標的部位

ATCACGAGCAGCTGGTTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCCAG  
CCCCACAGAGCCCCGCCCTTGTCCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGA  
GGGAAATGAGATCATGTCCTAACCTGATCCTCTTGTCCCACA

30

配列番号25

DNA

Homo sapiens

161bpの3' 相同性領域、Cas9標的部位

GATATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTG  
TCTGCCTATTCACCGATTTTGGATTCTCAAACAAATGTGTACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTA  
TATCACAGACAAAACCTGTGCTAGACATGAGGTC

40

## 【化 7】

## 配列番号 26

DNA

人工

フォワードプライマー

A\*TmC\*mA\*mCGAGCAGCTGGTTTCT

(\* はホスホロチオアート結合を示す; mAは、2'-O-メチルアデノシンを示す;  
mCは、2'-O-メチルシチジンを示す)

10

## 配列番号 27

DNA

人工

リバースプライマー

GACCTCATGTCTAGCACAGTTTTG

## 配列番号 28

DNA

Homo sapiens

5' エクソン1 TRAC遺伝子相同性隣接配列、Cas12a標的部位、645bp

20

TGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAG  
ACGCAGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGGTAATGT  
GATAGATTTCCCAACTTAATGCCAACATACCATAAACCTCCCATTTCTGCTAATGCCAGCCTAA  
GTTGGGGAGACCACTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGGGCCTTTTTCCCATGCC  
TGCCTTACTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGGGTTTTGAAGAAGATCCTATTAATAAAAAGAAT  
AAGCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTTCCAGTTTCCCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGT  
GAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCCTGTCCCTGAGTCCC  
AGTCCATCACGAGCAGCTGGTTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTT  
GCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTGTCCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGC  
AAAGAGGGAAATGAGATCATGTCCTAACCCCTGATCCTCTTGTCCCACAGATATCCAGAACCCTG  
ACCCT

30

## 配列番号 29

DNA

Homo sapiens

3' エクソン1 TRAC遺伝子相同性隣接配列、Cas12a標的部位、600bp

GTACCAGCTGAGAGACTCACTATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCT  
CAAACAAATGTGTACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAACCTGTGCTAGACA  
TGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATG

40

50

## 【化 8】

TGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAGGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGGTAAGGGC  
 AGCTTTGGTGCCTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTCTGCCAGAGCTCT  
 GGTC AATGATGTC TAAA ACTCCTCTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCACCAAACCC  
 TCTTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTTCTGGCAGTCCAGAGAATGACACGGGAAAAAAGCA  
 GATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCAGCCTCAGTCTCTCCAAC TGAGTTCCTG  
 CCTGCCTGCCTTTGCTCAGACTGTTTGCCCTTACTGCTCTTCTAGGCCTCATTCTAAGCCCCT  
 TCTCCAAGTTGCCTCTCCTTATTT

## 配列番号 30

10

DNA  
 Homo sapiens  
 TRAC遺伝子のエクソン1中のCas12a標的部

GAGTCTCTCAGCTGGTACACG

## 配列番号 31

DNA  
 Homo sapiens  
 PCR合成された5' 相同性アーム、Cas12a標的部、192nt

20

ATCACGAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCCAG  
 CCCCACAGAGCCCCGCCCTTGTCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGA  
 GGGAAATGAGATCATGTCCTAACCTGATCCTCTTGTCACAGATATCCAGAACCCTGACCCT

## 配列番号 32

DNA  
 Homo sapiens  
 PCR合成された3' 相同性アーム、Cas12a標的部、159nt

GTACCAGCTGAGAGACTCACTATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCT  
 CAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAAC TGCTAGACA  
 TGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGC

30

## 配列番号 33

DNA  
 人工  
 Cas12a部位中に挿入するためのドナーを作製するためのフォワードプライマー

5' -p-ATCACGAGCAGCTGGTTTCT-3'

(pは5'リン酸を示す)

40

50

## 【化 9】

## 配列番号 34

## DNA

Cas12a部位中に挿入するためのドナーを作製するための人工のリバースプライマー

5' -mG\*mC\*mA\*CTGTTGCTCTTGAAGTCC-3'

(\*はホスホロチオアート結合を示す;mAは、2'-O-メチルアデノシンを示す;  
mCは、2'-O-メチルシチジンを示す;mGは、2'-O-メチルグアノシンを示す)

10

## 配列番号 35

## タンパク質

Homo sapiens

CD8 ヒンジ

AKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAPR

20

## 配列番号 36

## タンパク質

人工

CD8ヒンジ+CD28ヒンジ(長いヒンジ)

AKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAPRKIEVMYPPPYLDNEKS  
NGTIIHVKGKHLCPSPLEFGPSKP

## 配列番号 37

## タンパク質

Homo sapiens

CD8膜貫通ドメイン

IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY

30

## 配列番号 38

## タンパク質

Homo sapiens

4-1BB 膜貫通ドメイン

IISFFLALTSALLFLLFFLTLRFSSV

40

50

【化 1 0】

配列番号39  
タンパク質  
Homo sapiens  
CD3と膜貫通

LCYLLDGLILFIYGVILTALFL

配列番号 40  
タンパク質  
人工  
CD28共刺激配列

10

RSKRSRLHLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS

配列番号 41  
タンパク質  
Homo sapiens  
OX40 共刺激配列

20

ALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI

配列番号 42  
タンパク質  
人工  
ITAM1、2および3を含むCD3と

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK  
DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

30

配列番号 43  
タンパク質  
人工  
CD3と ITAM1

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR

40

50

【化 1 1】

配列番号 44  
タンパク質  
人工  
CD3ζ ITAM2

RVKFSRSADGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM

配列番号 45  
タンパク質  
人工  
CD3ζ ITAM3

10

RVKFSRSADKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

配列番号 46  
タンパク質  
人工

**DAR V1 細胞内ドメイン**

20

RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQOGQNQLYNE  
LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGD  
GLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

配列番号 47  
タンパク質  
人工  
DAR V2a細胞内ドメイン

**KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL**RVKFSRSADAPAYQOGQNQLYN  
ELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGD  
DGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

30

配列番号 48  
タンパク質  
人工  
DAR V2bおよびCAR(28Z)細胞内ドメイン

RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQOGQNQLYNE  
LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGD  
GLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

40

50

【化 1 2】

配列番号 49

タンパク質

人工

DAR V2c細胞内ドメイン

KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGP  
TRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDP  
EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM  
QALPPR

10

配列番号 50

タンパク質

人工

DAR V3およびV4細胞内ドメイン

KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADKGERRRGKGGHDGL  
YQGLSTATKDTYDALHMALPPR

20

配列番号 51

タンパク質

人工

DAR V3細胞内ドメイン

KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGP  
TRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDAL

配列番号 52

タンパク質

Homo sapiens

CD8a リーダー配列

MALEVTALLLFLALLLHAARP

30

配列番号 53

タンパク質

P2A自己切断配列

GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP

40

50

## 【化 1 3】

## 配列番号 54

タンパク質

E2A自己切断配列

GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP

## 配列番号 55

タンパク質

F2A自己切断配列

GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

10

## 配列番号 59

タンパク質

ヒンジ配列

EPKSCDKTHT

20

## 配列番号 56

タンパク質

ヒンジ配列

PAPELLGGP

## 配列番号 57

タンパク質

CH2領域

SVFLFPPKPKDT

30

## 配列番号 58

タンパク質

ヒンジ配列

EPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGP

40

## 【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0196

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0196】

ヒトCD45を認識する抗体を使用して、導入されたT細胞の存在について、およびフローサイトメトリーによってCD20 CARまたはDAR陽性細胞について、TCRノックアウトT細胞、CD20 CAR-T細胞およびCD20 DAR-T細胞で処置されたマウスから採取された末梢血を分析した。結果は、図25に示されている。CD20

50

CAR-T細胞およびCD20 DAR-T細胞の両方で処置されたマウスにおいて、細胞の最初の注入後の9週間を通じてヒトT細胞が見出された(第1のパネル)。図25の第2のパネルは、CARまたはDAR構築物を発現する細胞がまた、これらの構築物を発現する細胞による処置の9週間後にマウスの末梢血中で検出されたことを示す。

特定の実施形態では、例えば、以下が提供される：

(項目1)

CD20を結合する二量体抗原受容体(DAR)を発現する遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団であって、前記DARが、

a. アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：(i)抗体重鎖可変領域、(ii)抗体重鎖定常領域、(iii)膜貫通領域および(iv)細胞内領域を含む第一のポリペプチド；ならびに

b. アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：(i)抗体軽鎖可変領域および(ii)抗体軽鎖定常領域を含む第二のポリペプチド；を含み、

前記抗体重鎖定常領域および前記抗体軽鎖定常領域が、前記DARを形成するための二量体化ドメインを形成し、

前記抗体重鎖可変領域および前記抗体軽鎖可変領域が、CD20を結合する抗原結合ドメインを形成する、CD20を結合する二量体抗原受容体(DAR)を発現する遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

(項目2)

CD20を結合する二量体抗原受容体(DAR)を発現する遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団であって、前記DARが、

a. アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：(i)抗体軽鎖可変領域、(ii)抗体軽鎖定常領域、(iii)膜貫通領域および(iv)細胞内領域を含む第一のポリペプチド鎖；ならびに

b. アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：(i)抗体重鎖可変領域および(ii)抗体重鎖定常領域を含む第二のポリペプチド鎖；を含み、

前記抗体重鎖定常領域および前記抗体軽鎖定常領域が、前記二量体抗原受容体(DAR)を形成するための二量体化ドメインを形成し、

前記抗体重鎖可変領域および前記抗体軽鎖可変領域が、CD20を結合する抗原結合ドメインを形成する、CD20を結合する二量体抗原受容体(DAR)を発現する遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

(項目3)

前記抗体重鎖定常領域および前記抗体軽鎖定常領域が1つまたは2つのジスルフィド結合を介して二量体化する、項目1または2に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

(項目4)

前記抗体重鎖定常領域および前記抗体軽鎖定常領域が1つまたは2つのジスルフィド結合を介して二量体化する、項目1または2に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

(項目5)

部分a)中にヒンジ領域をさらに含み、前記ヒンジ領域が前記抗体定常領域と前記膜貫通領域との間にある、項目1または2に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

(項目6)

前記ヒンジ領域が、IgG、IgA、IgM、IgEおよびIgDからなる群より選択される抗体由来のヒンジ配列を含む、項目5に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

(項目7)

10

20

30

40

50

前記ヒンジが C D 2 8 ヒンジ領域を含む、項目 5 に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

(項目 8)

前記ヒンジ領域が、C P P C (配列番号 6 1) または S P P C (配列番号 6 2) アミノ酸配列を含む、項目 5 に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

(項目 9)

前記膜貫通領域が C D 2 8 からの膜貫通配列を含む、項目 1 または 2 に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

(項目 1 0)

前記細胞内領域が、4 - 1 B B 細胞内領域 (配列番号 7)、I T A M 1、2 および 3 を有する C D 3、I T A M 1 を有する C D 3、I T A M 3 を有する C D 3 (配列番号 8)、または C D 2 8、C D 2 7、O X 4 0、C D 3 0、C D 4 0、P D - 1、I C O S、リンパ球機能関連抗原 - 1 (L F A - 1)、C D 2、C D 7、L I G H T、N K G 2 C、B 7 - H 3、G I T R (T N F R S F 1 8)、D R 3 (T N F R S F 2 5)、T N F R 2 および / または C D 2 2 6 のいずれかの細胞内領域からなる群より選択される 1 もしくはそれを超える細胞内アミノ酸配列、またはこれらのいずれかと少なくとも 9 5 % の同一性を有する細胞内アミノ酸配列を含む、項目 1 または 2 に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

(項目 1 1)

前記抗体重鎖可変領域が、配列番号 3 と少なくとも 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、項目 1 に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

(項目 1 2)

前記抗体重鎖定常領域が、配列番号 4 と少なくとも 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、項目 1 1 に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

(項目 1 3)

前記抗体軽鎖可変領域が、配列番号 1 1 と少なくとも 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、項目 1 1 に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

(項目 1 4)

前記抗体軽鎖定常領域が、配列番号 1 2 と少なくとも 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、項目 1 に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

(項目 1 5)

前記ヒンジ領域が、配列番号 5 と少なくとも 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、項目 1 に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

(項目 1 6)

前記膜貫通領域が、配列番号 6 と少なくとも 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、項目 1 に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

(項目 1 7)

前記細胞内領域が、

- i) 4 - 1 B B 細胞内共刺激配列 (配列番号 7) ;
- i i) I T A M 1、2 および 3 を含む C D 3 アミノ酸配列 ;
- i i i) I T A M 1 を含む C D 3 アミノ酸配列 ;
- i v) I T A M 2 を含む C D 3 アミノ酸配列 ; ならびに / または
- v) I T A M 3 を含む C D 3 アミノ酸配列 (配列番号 8) ;

10

20

30

40

50

のうちの2つまたはそれより多くの任意の組み合わせを含む、項目1または2に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

(項目18)

前記細胞内領域が、

i) CD28からの細胞内配列、ならびにITAM1、2および3を有するCD3からの細胞内配列；

ii) 4-1BBからの細胞内配列、ならびにITAM1、2および3を有するCD3からの細胞内配列；

iii) CD28からの細胞内配列、4-1BBからの細胞内配列、ならびにITAM1、2および3を有するCD3からの細胞内配列；

iv) 4-1BBからの細胞内配列(配列番号7)、およびITAM3を有するCD3からの細胞内配列(配列番号8)；

v) CD28からの細胞内配列、およびITAM3を有するCD3からの細胞内配列；または

vi) CD28からの細胞内配列、4-1BBからの細胞内配列、およびITAM3を有するCD3からの細胞内配列；

を含む、項目1または2に記載の二量体抗原受容体。

(項目19)

前記第一のポリペプチド鎖が、配列番号14のアミノ酸配列を含む、項目1に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

(項目20)

前記第二のポリペプチド鎖が、配列番号15のアミノ酸配列を含む、項目19に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

(項目21)

a) 前記第一のポリペプチド鎖が、アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：(i) 配列番号3と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD20抗体重鎖可変領域；(ii) 配列番号4と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD20抗体重鎖定常領域；(iii) CD8およびCD28ヒンジ領域を含むヒンジ領域；(iv) 配列番号6と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD28膜貫通領域；ならびに(v) CD28およびCD3 ITAM1、2および3を含む細胞内領域を含み、

b) 前記第二のポリペプチド鎖が、アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：(i) 配列番号11と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD20抗体軽鎖可変領域；および(ii) 配列番号12と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD20抗体軽鎖定常領域を含み、

前記抗体重鎖定常領域および前記抗体軽鎖定常領域が二量体化ドメインを形成し、

前記抗体重鎖可変領域および前記抗体軽鎖可変領域が、CD20タンパク質を結合する抗原結合ドメインを形成する、項目1に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

(項目22)

a) 前記第一のポリペプチド鎖が、アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：(i) 配列番号3と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD20抗体重鎖可変領域；(ii) 配列番号4と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD20抗体重鎖定常領域；(iii) 配列番号5と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD28ヒンジ領域を含むヒンジ領域；(iv) 配列番号6と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD28膜貫通領域；ならびに(v) 4-1BBおよびCD3 ITAM1、2および3細胞内配列を含む細胞内領域を含み、

b) 前記第二のポリペプチド鎖が、アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：(i) 配列番号11と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を

10

20

30

40

50

含むCD20抗体軽鎖可変領域；および(ii)配列番号12と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD20抗体軽鎖定常領域を含み、

前記抗体重鎖定常領域および前記抗体軽鎖定常領域が二量体化ドメインを形成し、前記抗体重鎖可変領域および前記抗体軽鎖可変領域が、CD20タンパク質を結合する抗原結合ドメインを形成する、項目1に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

(項目23)

a)前記第一のポリペプチド鎖が、アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：(i)配列番号3と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD20抗体重鎖可変領域；(ii)配列番号4と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD20抗体重鎖定常領域；(iii)配列番号5と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD28ヒンジ領域を含むヒンジ領域；(iv)配列番号6と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD28膜貫通領域；ならびに(v)CD28およびCD3 ITAM1、2および3を含む細胞内領域を含み、

10

b)前記第二のポリペプチド鎖が、アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：(i)配列番号11と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD20抗体軽鎖可変領域；および(ii)配列番号12と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD20抗体軽鎖定常領域を含み、

前記抗体重鎖定常領域および前記抗体軽鎖定常領域が二量体化ドメインを形成し、前記抗体重鎖可変領域および前記抗体軽鎖可変領域が、CD20タンパク質を結合する抗原結合ドメインを形成し、

20

前記二量体抗原受容体(DAR)構築物が、DAR V2b構築物である、項目1に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

(項目24)

a)前記第一のポリペプチド鎖が、アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：(i)配列番号3と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD20抗体重鎖可変領域；(ii)配列番号4と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD20抗体重鎖定常領域；(iii)配列番号5と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD28ヒンジ領域を含むヒンジ領域；(iv)配列番号6と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD28膜貫通領域；ならびに(v)4-1BBおよびCD28およびCD3 ITAM1、2および3細胞内配列を含む細胞内領域を含み、

30

b)前記第二のポリペプチド鎖が、アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：(i)配列番号11と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD20抗体軽鎖可変領域；および(ii)配列番号12と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD20抗体軽鎖定常領域を含み、

前記抗体重鎖定常領域および前記抗体軽鎖定常領域が二量体化ドメインを形成し、前記抗体重鎖可変領域および前記抗体軽鎖可変領域が、CD20タンパク質を結合する抗原結合ドメインを形成する、項目1に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

40

(項目25)

a)前記第一のポリペプチド鎖が、アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：(i)配列番号3と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD20抗体重鎖可変領域；(ii)配列番号4と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD20抗体重鎖定常領域；(iii)配列番号5と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD28ヒンジ領域を含むヒンジ領域；(iv)配列番号6と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD28膜貫通領域；ならびに(v)それぞれ、配列番号7および8のアミノ酸配列を含む細胞内配列である、4-1BBおよびCD3 ITAM3を含む細胞内領域を含み、

50

b) 前記第二のポリペプチド鎖が、アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：(i) 配列番号 11 と少なくとも 95% の同一性を有するアミノ酸配列を含む CD20 抗体軽鎖可変領域；および(ii) 配列番号 12 と少なくとも 95% の同一性を有するアミノ酸配列を含む CD20 抗体軽鎖定常領域を含み、

前記抗体重鎖定常領域および前記抗体軽鎖定常領域が二量体化ドメインを形成し、

前記抗体重鎖可変領域および前記抗体軽鎖可変領域が、CD20 タンパク質を結合する抗原結合ドメインを形成する、項目 1 に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

(項目 26)

a) 前記第一のポリペプチド鎖が、アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：(i) 配列番号 3 と少なくとも 95% の同一性を有するアミノ酸配列を含む CD20 抗体重鎖可変領域；(ii) 配列番号 4 と少なくとも 95% の同一性を有するアミノ酸配列を含む CD20 抗体重鎖定常領域；(iii) 配列番号 6 と少なくとも 95% の同一性を有するアミノ酸配列を含む CD28 膜貫通領域；ならびに(iv) それぞれ、配列番号 7 および 8 のアミノ酸配列を含む細胞内配列である、4-1BB および CD3ITAM3 を含む細胞内領域を含み、

b) 前記第二のポリペプチド鎖が、アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：(i) 配列番号 11 と少なくとも 95% の同一性を有するアミノ酸配列を含む CD20 抗体軽鎖可変領域；および(ii) 配列番号 12 と少なくとも 95% の同一性を有するアミノ酸配列を含む CD20 抗体軽鎖定常領域を含み、

前記抗体重鎖定常領域および前記抗体軽鎖定常領域が二量体化ドメインを形成し、

前記抗体重鎖可変領域および前記抗体軽鎖可変領域が、CD20 タンパク質を結合する抗原結合ドメインを形成する、項目 1 に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

(項目 27)

(a) 前記第一のポリペプチド鎖が、(i) 配列番号 3 のアミノ酸配列を含む CD20 抗体重鎖可変領域を含み、b) 前記第二のポリペプチド鎖が、(i) 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む CD20 抗体軽鎖可変領域を含む、項目 21 ~ 26 のいずれかに記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

(項目 28)

前記遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団が、前記 DAR の前記第一のポリペプチドをコードする核酸配列および前記第二のポリペプチドをコードする核酸配列を含む、項目 1 または 2 に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

(項目 29)

前記集団が、配列番号 14 のポリペプチドおよび配列番号 15 のポリペプチドをコードする配列を含む、項目 28 に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

(項目 30)

前記第一のポリペプチドをコードする核酸配列および前記第二のポリペプチドをコードする核酸配列が単一の連続したオープンリーディングフレームの一部であり、前記オープンリーディングフレームが、前記オープンリーディングフレームからの前記第一および第二のポリペプチドの産生を可能にするペプチドをコードする配列を含む、項目 28 に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

(項目 31)

前記ペプチドが、T2A、P2A、または E2A、または F2A 配列である、項目 30 に記載の遺伝的に改変された宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

(項目 32)

Tリンパ球、NK (ナチュラルキラー) 細胞、マクロファージ、樹状細胞、肥満細胞、好酸球、Bリンパ球または単球を含む、項目 1 または項目 2 に記載の遺伝的に改変された

10

20

30

40

50

宿主細胞または遺伝的に改変された宿主細胞の集団。

(項目 3 3)

前記細胞が初代細胞である、項目 3 2 に記載の宿主細胞の集団。

(項目 3 4)

前記細胞がヒト細胞である、項目 3 2 に記載の宿主細胞の集団。

(項目 3 5)

前記集団が T 細胞を含む、項目 3 2 に記載の宿主細胞の集団。

(項目 3 6)

前記集団の 1 % 未満が前記 T 細胞受容体を発現し、前記集団の 2 0 % 超が前記 D A R を発現する、項目 3 5 に記載の宿主細胞の集団。

(項目 3 7)

前記 T 細胞が初代ヒト T 細胞である、項目 3 6 に記載の細胞の集団。

(項目 3 8)

薬学的に許容され得る賦形剤と、項目 3 7 に記載の宿主細胞の集団とを含む薬学的組成物。

(項目 3 9)

薬学的に許容され得る賦形剤と、項目 2 1 ~ 2 6 のいずれかに記載の宿主細胞の集団とを含む薬学的組成物。

(項目 4 0)

薬学的に許容され得る賦形剤と、項目 2 9 に記載の宿主細胞の集団とを含む薬学的組成物。

(項目 4 1)

a) アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：( i ) 抗体重鎖可変領域、( i i ) 抗体重鎖定常領域、( i i i ) 膜貫通領域および( i v ) 細胞内領域を含む第一のポリペプチド；ならびに

b) アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：( i ) 抗体軽鎖可変領域および( i i ) 抗体軽鎖定常領域を含む第二のポリペプチド；

をコードする少なくとも 1 つの核酸分子であって、

前記抗体重鎖定常領域および前記抗体軽鎖定常領域が、前記 D A R を形成するための二量体化ドメインを形成し、

前記抗体重鎖可変領域および前記抗体軽鎖可変領域が、C D 2 0 を結合する抗原結合ドメインを形成する、少なくとも 1 つの核酸分子。

(項目 4 2)

a) アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：( i ) 抗体軽鎖可変領域、( i i ) 抗体軽鎖定常領域、( i i i ) 膜貫通領域および( i v ) 細胞内領域を含む第一のポリペプチド鎖；ならびに

b) アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：( i ) 抗体重鎖可変領域および( i i ) 抗体重鎖定常領域を含む第二のポリペプチド鎖；

をコードする少なくとも 1 つの核酸分子であって、

前記抗体重鎖定常領域および前記抗体軽鎖定常領域が、前記二量体抗原受容体 ( D A R ) を形成するための二量体化ドメインを形成し、

前記抗体重鎖可変領域および前記抗体軽鎖可変領域が、C D 2 0 を結合する抗原結合ドメインを形成する、少なくとも 1 つの核酸分子。

(項目 4 3)

核酸分子であって、アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：( 1 ) 重鎖リーダー配列、( 2 ) 抗体重鎖可変領域、( 3 ) 抗体重鎖定常領域、( 4 ) 必要に応じて含まれるヒンジ領域、( 5 ) 膜貫通領域、( 6 ) 細胞内領域、( 7 ) 自己切断配列、( 8 ) 軽鎖リーダー配列、( 9 ) 抗体軽鎖可変領域および( 1 0 ) 抗体軽鎖定常領域を含む前駆体ポリペプチドをコードし、前記自己切断配列が、前記前駆体ポリペプチドを第一および第二のポリペプチド鎖に切断することを可能にする、核酸分子。

10

20

30

40

50

(項目 4 4)

核酸分子であって、アミノ末端からカルボキシル末端へ順に複数のポリペプチド領域：  
 (1) 軽鎖リーダー配列、(2) 抗体軽鎖可変領域、(3) 抗体軽鎖定常領域、(4) 必要に応じて含まれるヒンジ領域、(5) 膜貫通領域、(6) 細胞内領域、(7) 自己切断配列、(8) 重鎖リーダー配列、(9) 抗体重鎖可変領域および(10) 抗体重鎖定常領域を含む前駆体ポリペプチドをコードし、前記自己切断配列が、前記前駆体ポリペプチドを第一および第二のポリペプチド鎖に切断することを可能にする、核酸分子。

(項目 4 5)

前記抗体重鎖可変領域が、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む、項目 4 3 または 4 4 に記載の核酸分子。

(項目 4 6)

前記抗体重鎖定常領域が、配列番号 4 のアミノ酸配列を含む、項目 4 3 または 4 4 に記載の核酸分子。

(項目 4 7)

前記抗体軽鎖可変領域が、配列番号 1 1 のアミノ酸配列を含む、項目 4 3 または 4 4 に記載の核酸分子。

(項目 4 8)

前記抗体軽鎖定常領域が、配列番号 1 2 のアミノ酸配列を含む、項目 4 3 または 4 4 に記載の核酸分子。

(項目 4 9)

前記ヒンジ領域が、I g G、I g A、I g M、I g E および I g D からなる群より選択される抗体からのヒンジ配列を含む、項目 4 3 または 4 4 に記載の核酸分子。

(項目 5 0)

前記ヒンジが C D 2 8 ヒンジ領域を含む、項目 4 3 または 4 4 に記載の核酸分子。

(項目 5 1)

前記ヒンジ領域が C P P C (配列番号 6 1) または S P P C (配列番号 6 2) アミノ酸配列を含む、項目 4 3 または 4 4 に記載の核酸分子。

(項目 5 2)

前記ヒンジ領域が、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む、項目 4 3 または 4 4 に記載の核酸分子。

(項目 5 3)

前記膜貫通領域が C D 2 8 からの膜貫通配列を含む、項目 4 3 または 4 4 に記載の核酸分子。

(項目 5 4)

前記膜貫通領域が、配列番号 6 のアミノ酸配列を含む、項目 4 3 または 4 4 に記載の核酸分子。

(項目 5 5)

前記細胞内領域が、1つの細胞内配列を含むか、または 4 - 1 B B (配列番号 7)、I T A M 1、2 および 3 を有する C D 3、I T A M 1 を有する C D 3、I T A M 3 を有する C D 3 (配列番号 8)、C D 2 8、C D 2 7、O X 4 0、C D 3 0、C D 4 0、P D - 1、I C O S、リンパ球機能関連抗原 - 1 (L F A - 1)、C D 2、C D 7、L I G H T、N K G 2 C、B 7 - H 3、G I T R (T N F R S F 1 8)、D R 3 (T N F R S F 2 5)、T N F R 2 および / もしくは C D 2 2 6 からなる群より選択される細胞内配列の任意の順序および任意の組み合わせでの 2 ~ 5 個の細胞内配列を含む、項目 4 3 または 4 4 に記載の核酸分子。

(項目 5 6)

前記細胞内領域が、

i) 4 - 1 B B 細胞内共刺激配列 (配列番号 7) ;

i i) I T A M 1、2 および 3 を有する C D 3 ;

i i i) C D 3 I T A M 1 ;

10

20

30

40

50

i v ) C D 3 I T A M 2 ; ならびに / または  
v ) I T A M 3 を有する C D 3 ( 配列番号 8 )  
の 2 つまたはそれより多くの任意の組み合わせを含む、項目 4 3 または 4 4 に記載の核  
酸分子。

( 項目 5 7 )

前記細胞内領域が、

i ) C D 2 8 からの細胞内配列、ならびに I T A M 1、2 および 3 を有する C D 3 か  
らの細胞内配列；

i i ) 4 - 1 B B からの細胞内配列、ならびに I T A M 1、2 および 3 を有する C D 3  
からの細胞内配列；

i i i ) C D 2 8 からの細胞内配列、4 - 1 B B からの細胞内配列、ならびに I T A M  
1、2 および 3 を有する C D 3 からの細胞内配列；

i v ) 4 - 1 B B からの細胞内配列、および I T A M 3 を有する C D 3 からの細胞内  
配列；

v ) C D 2 8 からの細胞内配列 ( 配列番号 4 2 )、および C D 3 からの細胞内配列；  
または

v i ) C D 2 8 からの細胞内配列、4 - 1 B B からの細胞内配列、および I T A M 3 を  
有する C D 3 からの細胞内配列；

を含む、項目 4 3 または 4 4 に記載の核酸分子。

( 項目 5 8 )

配列番号 1 3 のアミノ酸配列を含む、項目 4 3 または 4 4 に記載の核酸分子。

( 項目 5 9 )

図 4 A および B に示される配向およびアミノ酸配列を含む、項目 4 3 または 4 4 に記載  
の核酸分子。

( 項目 6 0 )

被験体における腫瘍抗原の有害な発現と関連する疾患、障害または状態を有する前記被験  
体を処置する方法であって、項目 5 5 または 5 6 に記載の宿主細胞の集団を前記被験体に  
投与することを含む、方法。

( 項目 6 1 )

前記疾患が、非ホジキンリンパ腫 ( N H L )、バーキットリンパ腫 ( B L )、B 慢性リン  
パ球性白血病 ( B - C L L )、B および T 急性リンパ球性白血病 ( A L L )、T 細胞リン  
パ腫 ( T C L )、急性骨髄性白血病 ( A M L )、有毛細胞白血病 ( H C L )、ホジキンリ  
ンパ腫 ( H L )、慢性骨髄性白血病 ( C M L ) および多発性骨髄腫 ( M M ) からなる群よ  
り選択される血液のがんである、項目 6 0 に記載の方法。

【 手続補正 6 】

【 補正対象書類名 】 図面

【 補正対象項目名 】 図 1 9

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

10

20

30

40

50

【 図 19 】

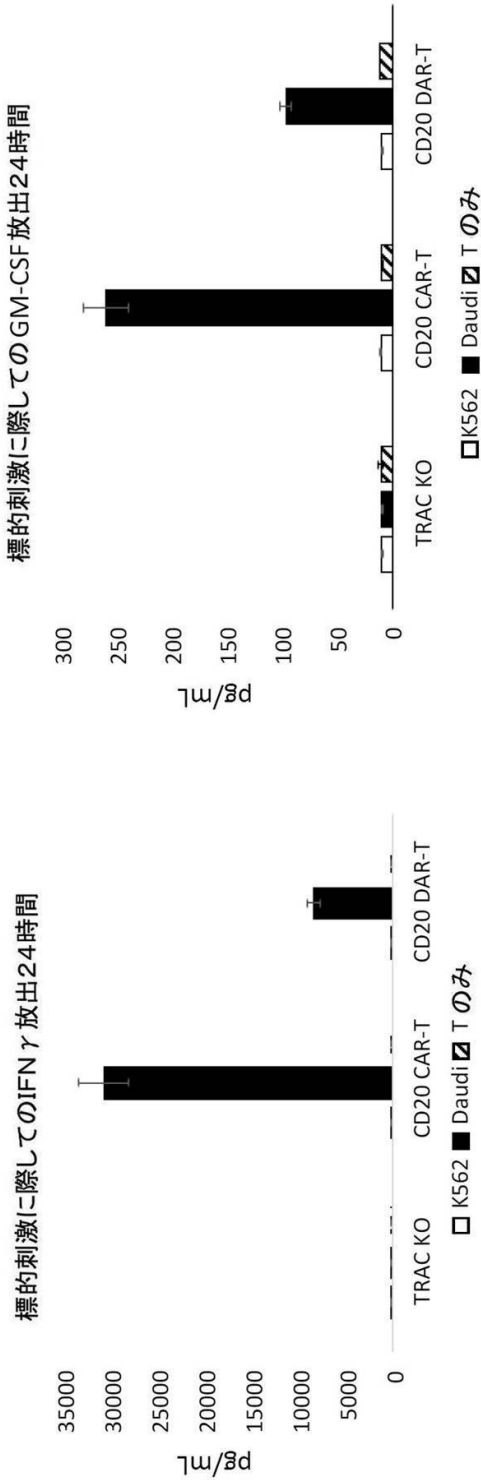


FIG. 19

【 手続補正 7 】  
 【 補正対象書類名 】 図面  
 【 補正対象項目名 】 図 2 5 - 1  
 【 補正方法 】 変更  
 【 補正の内容 】

10

20

30

40

50

【 図 2 5 - 1 】

マウス血液試料中のCD45+陽性細胞

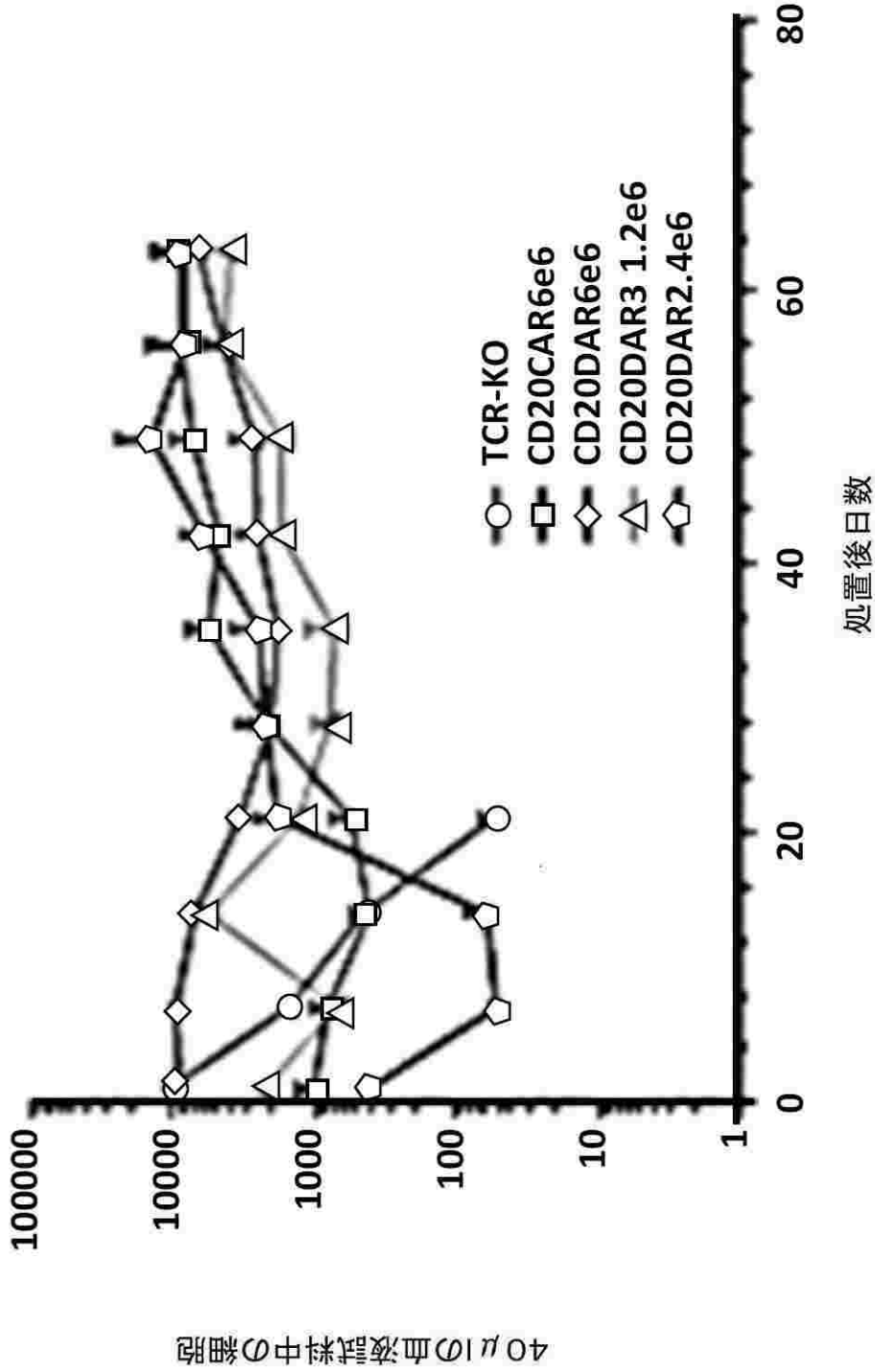


FIG. 25

【 手続補正 8 】  
 【 補正対象書類名 】 図面  
 【 補正対象項目名 】 図 2 5 - 2  
 【 補正方法 】 変更  
 【 補正の内容 】

10

20

30

40

50

【 図 2 5 - 2 】

マウス血液試料中のCAR/DAR陽性細胞

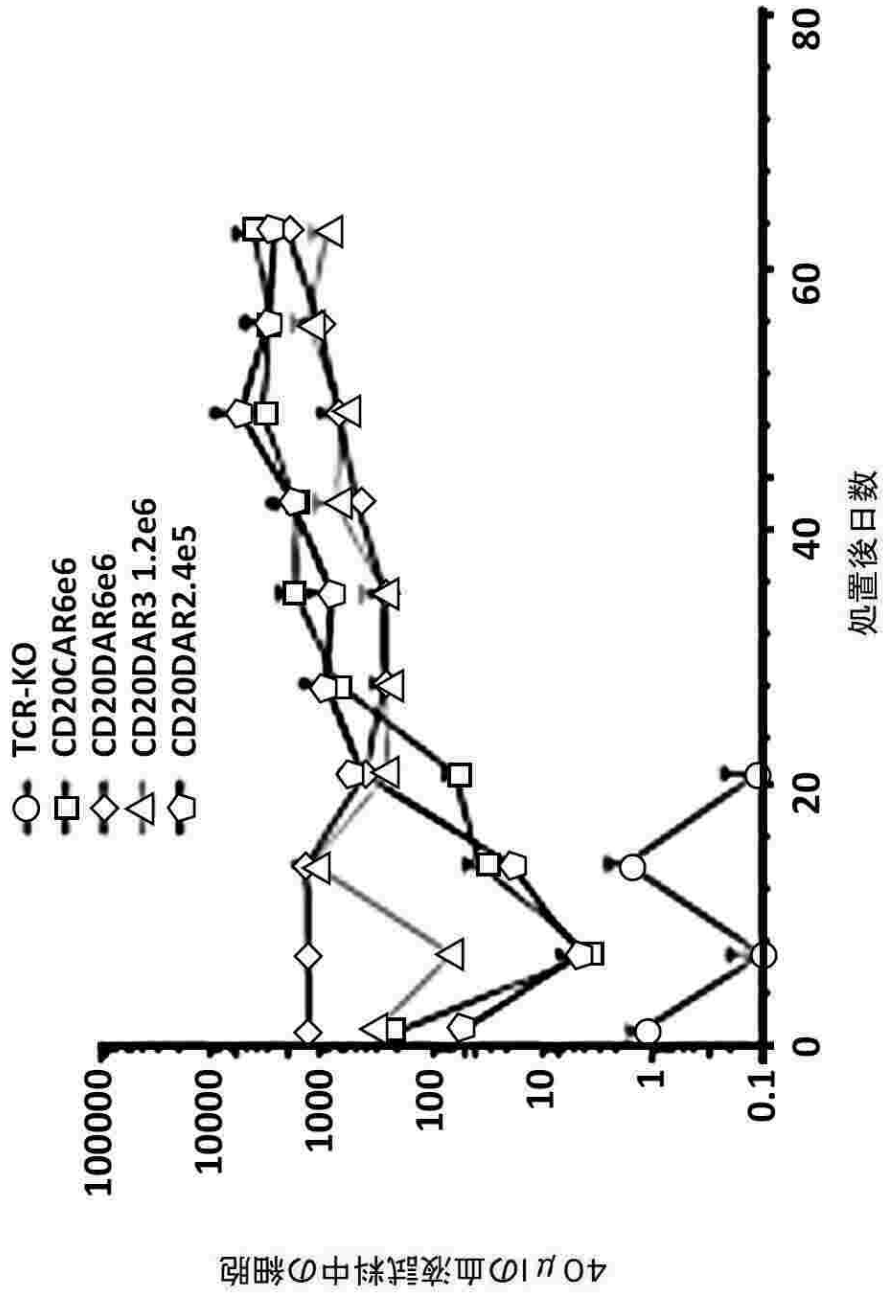


FIG. 25 ( 続き )

10

20

30

40

50