

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-532742

(P2021-532742A)

(43) 公表日 令和3年12月2日 (2021.12.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10 Z N A	4 B 0 6 5
C 0 7 K 14/155 (2006.01)	C 0 7 K 14/155	4 C 0 7 6
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17 A	4 C 0 8 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 7
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/16	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 290 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2021-504286 (P2021-504286)	(71) 出願人	518261261
(86) (22) 出願日	令和1年7月26日 (2019.7.26)		ナンジン レジェンド バイオテック カ
(85) 翻訳文提出日	令和3年3月24日 (2021.3.24)		ンパニー, リミテッド
(86) 国際出願番号	PCT/CN2019/097969		NANJING LEGEND BIOT
(87) 国際公開番号	W02020/020359		ECH CO., LTD.
(87) 国際公開日	令和2年1月30日 (2020.1.30)		中華人民共和国, ジャンスー, ナンジン
(31) 優先権主張番号	PCT/CN2018/097235		シティ, ジャンニン ディストリクト, ロ
(32) 優先日	平成30年7月26日 (2018.7.26)		ンミャン アベニュー ナンバー568,
(33) 優先権主張国・地域又は機関	中国 (CN)		ビルディング オブ ナンジン ライフ
			サイエンス タウン ナンバー6
			No. 6 Building of Na
			njing Life Science
			Town, No. 568 Longmia
			n Avenue, Jiangning
			District, Nanjing ci
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 N E Fを含むT細胞及びその生成方法

(57) 【要約】

N e f タンパク質をコードする第1の核酸を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞を生成する方法であって、N e f タンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性T細胞受容体 (T C R) が下方調節され、修飾T細胞が、工学操作されたT C R (例えば、キメラT C R)、T細胞抗原結合体 (T A C)、T A C様キメラ受容体、またはキメラ抗原受容体 (C A R) などの機能的な外因性受容体をさらに発現する方法、本方法によって得られる修飾T細胞、及び修飾T細胞を含む医薬組成物が提供される。また、1つ以上の変異を含む天然に存在しないN e f タンパク質も提供される。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

N e f タンパク質をコードする第 1 の核酸を、前駆体 T 細胞に導入することを含む、修飾 T 細胞を生成する方法であって、前記 N e f タンパク質が発現すると、前記修飾 T 細胞の内在性 T 細胞受容体 (T C R) が下方調節される前記方法。

【請求項 2】

前記下方調節が、前記内在性 T C R の細胞表面発現を少なくとも約 5 0 % 下方制御することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 N e f を発現する前記修飾 T 細胞が、修飾された内在性 T C R 座位を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

10

【請求項 4】

前記 N e f タンパク質が、S I V N e f、H I V 1 N e f、H I V 2 N e f、及び N e f 相同タンパク質からなる群から選択される、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記 N e f タンパク質が、野生型 N e f である、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記 N e f タンパク質が、変異体 N e f である、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記変異体 N e f が、

(i) 配列番号 1 8 ～ 2 2 のいずれか 1 つのアミノ酸配列、

(i i) a a 2 ～ 4、a a 8 ～ 1 0、a a 1 1 ～ 1 3、a a 3 8 ～ 4 0、a a 4 4 ～ 4 6、a a 4 7 ～ 4 9、a a 5 0 ～ 5 2、a a 5 3 ～ 5 5、a a 5 6 ～ 5 8、a a 5 9 ～ 6 1、a a 6 2 ～ 6 4、a a 6 5 ～ 6 7、a a 9 8 ～ 1 0 0、a a 1 0 7 ～ 1 0 9、a a 1 1 0 ～ 1 1 2、a a 1 3 7 ～ 1 3 9、a a 1 5 2 ～ 1 5 4、a a 1 6 4 ～ 1 6 6、a a 1 6 7 ～ 1 6 9、a a 1 7 0 ～ 1 7 2、a a 1 7 3 ～ 1 7 5、a a 1 7 6 ～ 1 7 8、a a 1 7 8 ～ 1 7 9、1 7 9 ～ 1 8 1 a a、a a 1 8 2 ～ 1 8 4、a a 1 8 5 ～ 1 8 7、a a 1 8 8 ～ 1 9 0、a a 1 9 1 ～ 1 9 3、a a 1 9 4 ～ 1 9 6、a a 2 0 3 ～ 2 0 5、a a 2 0 6 ～ 2 0 8、a a 2 1 2 ～ 2 1 4、a a 2 1 5 ～ 2 1 7、a a 2 1 8 ～ 2 2 0、a a 2 2 1 ～ 2 2 3、a a 8 ～ 1 3、a a 4 4 ～ 6 7、a a 1 0 7 ～ 1 1 2、a a 1 6 4 ～ 1 9 6、a a 2 0 3 ～ 2 0 8、もしくは a a 2 1 2 ～ 2 2 3 のいずれかのアミノ酸残基（ここで、前記アミノ酸残基の位置は、野生型 S I V N e f のものに対応する）における 1 つ以上の変異、

30

(i i i) a a 2 ～ 4、a a 4 4 ～ 4 6、a a 5 6 ～ 5 8、a a 5 9 ～ 6 1、a a 6 2 ～ 6 4、a a 6 5 ～ 6 7、a a 9 8 ～ 1 0 0、a a 1 0 7 ～ 1 0 9、a a 1 3 7 ～ 1 3 9、a a 1 5 2 ～ 1 5 4、a a 1 6 4 ～ 1 6 6、a a 1 6 7 ～ 1 6 9、a a 1 7 6 ～ 1 7 8、a a 1 7 8 ～ 1 7 9、a a 1 7 9 ～ 1 8 1、a a 1 8 5 ～ 1 8 7、a a 1 8 8 ～ 1 9 0、a a 1 9 4 ～ 1 9 6、a a 2 0 3 ～ 2 0 5、a a 4 4 ～ 6 7、a a 1 6 4 ～ 1 6 9、a a 1 7 6 ～ 1 8 1、a a 1 8 5 ～ 1 9 0 のいずれかのアミノ酸残基（ここで、前記アミノ酸残基の位置は、野生型 S I V N e f のものに対応する）における 1 つ以上の変異、

40

(i v) a a 2 ～ 4、a a 5 6 ～ 5 8、a a 5 9 ～ 6 1、a a 6 2 ～ 6 4、a a 6 5 ～ 6 7、a a 1 0 7 ～ 1 0 9、a a 1 3 7 ～ 1 3 9、a a 1 5 2 ～ 1 5 4、a a 1 6 4 ～ 1 6 6、a a 1 6 7 ～ 1 6 9、a a 1 7 0 ～ 1 7 2、a a 1 7 3 ～ 1 7 5、a a 1 7 6 ～ 1 7 8、1 7 8 ～ 1 7 9 a a、a a 1 7 9 ～ 1 8 1、a a 1 8 2 ～ 1 8 4、a a 1 8 5 ～ 1 8 7、a a 1 8 8 ～ 1 9 0、a a 1 9 4 ～ 1 9 6、a a 2 0 3 ～ 2 0 5、a a 5 6 ～ 6 7、もしくは a a 1 6 4 ～ 1 9 0 のいずれかのアミノ酸残基（ここで、前記アミノ酸残基の位置は、野生型 S I V N e f のものに対応する）における 1 つ以上の変異、または

50

(v) aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、aa164～169、aa176～181、もしくはaa185～190のいずれかのアミノ酸残基（ここで、前記アミノ酸残基の位置は、野生型SIV Nefのものに対応する）における1つ以上の変異を含む、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

前記前駆体T細胞が、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体をコードする第2の核酸を含む、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項9】

細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体をコードする第2の核酸を、前記前駆体T細胞に導入することをさらに含む、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】

前記第1の核酸と前記第2の核酸とが、別々のベクター上にある、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

前記第1の核酸と前記第2の核酸とが、同じベクター上にある、請求項9に記載の方法。

20

【請求項12】

前記第1の核酸と前記第2の核酸とが、同じプロモーターに作動可能に連結している、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記第1の核酸が、前記第2の核酸の上流にある、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記第1の核酸と前記第2の核酸とが、連結配列を介して結合している、請求項8～13のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項15】

前記連結配列が、P2A、T2A、E2A、F2A、BmCPV 2A、BmIFV 2A、(GS)_n、(GSGGS)_n、(GGGS)_n、(GGGGS)_nをコードする核酸配列、またはIRES、SV40、CMV、UBC、EF1α、PGK、CAGGの核酸配列、またはそれらの任意の組み合わせ（式中、nは、少なくとも1の整数である）を含む、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記ベクターが、ウイルスベクターである、請求項10～15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項17】

前記ウイルスベクターが、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、エピソームベクター発現ベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、及びそれらの誘導体からなる群から選択される、請求項16に記載の方法。

40

【請求項18】

前記ベクターが、非ウイルスベクターである、請求項10～15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項19】

前記非ウイルスベクターが、PiggybackベクターまたはSleeping Beautyベクターである、請求項18に記載の方法。

50

【請求項 20】

前記 N e f を発現する前記修飾 T 細胞が、組織不適合性の個体において、移植片対宿主病 (G v H D) 応答を誘発しないか、または前記前駆体 T 細胞のドナーから単離された初代 T 細胞によって誘発される G v H D 応答と比較して低減した G v H D 応答を誘発する、請求項 1 ～ 19 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】

前記第 1 の核酸及び／または前記第 2 の核酸を含む T 細胞を単離または濃縮することをさらに含む、請求項 1 ～ 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 22】

前記 N e f を発現する前記修飾 T 細胞から、 T C R 陰性 T 細胞を単離または濃縮することをさらに含む、請求項 1 ～ 21 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 23】

前記 N e f を発現する前記修飾 T 細胞を、少なくとも 1 つの薬学的に許容される担体と配合することをさらに含む、請求項 1 ～ 22 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 24】

前記機能的外因性受容体が、

(a) 腫瘍抗原の 1 つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片を含む細胞外リガンド結合ドメイン、

(b) 任意選択のリンカー、

(c) 第 1 の T C R サブユニットの任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、

20

(d) 第 2 の T C R サブユニットの膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び

(e) 第 3 の T C R サブユニットの細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメイン

を含む、キメラ T C R (c T C R) であり、

前記第 1、前記第 2、及び前記第 3 の T C R サブユニットが全て、 T C R α、 T C R β、 T C R γ、 T C R δ、 C D 3 ε、 C D 3 γ、及び C D 3 δ からなる群から選択される、請求項 8 ～ 23 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 25】

前記第 1、前記第 2、及び前記第 3 の T C R サブユニットが全て C D 3 ε である、請求項 24 に記載の方法。

30

【請求項 26】

前記機能的外因性受容体が、

(a) 腫瘍抗原の 1 つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片を含む細胞外リガンド結合ドメイン、

(b) 任意選択の第 1 のリンカー、

(c) T C R サブユニットの細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外 T C R 結合ドメイン、

(d) 任意選択の第 2 のリンカー、

(e) 第 1 の T C R 共受容体の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、

40

(f) 第 2 の T C R 共受容体の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び

(g) 第 3 の T C R 共受容体の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメイン

を含む、 T 細胞抗原結合体 (T A C) であり、

前記 T C R サブユニットが、 T C R α、 T C R β、 T C R γ、 T C R δ、 C D 3 ε、 C D 3 γ、及び C D 3 δ からなる群から選択され、

前記第 1、前記第 2、及び前記第 3 の T C R 共受容体が全て、 C D 4、 C D 8、及び C D 28 からなる群から選択される、請求項 8 ～ 23 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 27】

前記第 1、前記第 2、及び前記第 3 の T C R 共受容体が同じである、請求項 26 に記載の方法。

50

【請求項 28】

前記機能的外因性受容体が、

(a) 腫瘍抗原の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片を含む細胞外リガンド結合ドメイン、

(b) 任意選択の第1のリンカー、

(c) 第1のTCRサブユニットの細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、

(d) 任意選択の第2のリンカー、

(e) 第2のTCRサブユニットの任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、

(f) 第3のTCRサブユニットの膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び

(g) 第4のTCRサブユニットの細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメイン

を含む、T細胞抗原結合体(TAC)様キメラ受容体であり、

前記第1、前記第2、前記第3、及び前記第4のTCRサブユニットが全て、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される、請求項8～23のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項 29】

前記第2、前記第3、及び前記第4のTCRサブユニットが同じである、請求項28に記載の方法。

【請求項 30】

20

前記機能的外因性受容体が、

(a) 腫瘍抗原の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片を含む細胞外リガンド結合ドメイン、

(b) 膜貫通ドメイン、及び

(c) 細胞内シグナル伝達ドメイン

を含む、キメラ抗原受容体(CAR)である、請求項8～23のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 31】

前記抗原結合性断片が、ラクダIg、Ig NAR、Fab断片、一本鎖Fv抗体、及び単ドメイン抗体(sdAb、ナノボディ)からなる群から選択される、請求項24～30のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項 32】

前記抗原結合性断片が、sdAbまたはscFvである、請求項31に記載の方法。

【請求項 33】

前記細胞外リガンド結合ドメインが、一価である、請求項24～32のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 34】

前記細胞外リガンド結合ドメインが、多価である、請求項24～32のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 35】

40

前記細胞外リガンド結合ドメインが、多重特異性である、請求項34に記載の方法。

【請求項 36】

前記腫瘍抗原が、メソテリン、TSHR、CD19、CD123、CD22、CD30、CD171、CS-1、CLL-1、CD33、EGFRvIII、GD2、GD3、BCMA、Tn Ag、前立腺特異的膜抗原(PSMA)、ROR1、FLT3、FAP、TAG72、CD38、CD44v6、CEA、EPCAM、B7H3、KIT、IL-13Ra2、インターロイキン-11受容体a(IL-11Ra)、PSCA、PRSS21、VEGFR2、Lewis Y、CD24、血小板由来増殖因子受容体ベータ(PDGFRベータ)、SSEA-4、CD20、葉酸受容体アルファ、ERBB2(HER2/neu)、MUC1、上皮増殖因子受容体(EGFR)、NCAM、プロスターゼ、

50

PAP、ELF2M、エフリンB2、IGF-I受容体、CAIX、LMP2、gp100、bcr-abl、チロシナーゼ、EphA2、フコシルGM1、sLe、GM3、TGS5、HMWMAA、o-アセチル-GD2、葉酸受容体ベータ、TEM1/CD248、TEM7R、CLDN6、CLDN18.2、GPRC5D、CXORF61、CD97、CD179a、ALK、ポリシアル酸、PLAC1、GloboH、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、GPR20、LY6K、OR51E2、TARP、WT1、NY-ESO-1、LAGE-1a、MAGE-A1、レグマイン、HPV E6、E7、MAGE A1、ETV6-AML、精子タンパク質17、XAGE1、Tie2、MAD-CT-1、MAD-CT-2、Fos関連抗原1、p53、p53変異体、プロステイン、サバイビン及びテロメラーゼ、PCTA-1/ガレクチン8、メランA/MART1、Ras変異体、hTERT、肉腫転座切断点、ML-IAP、ERG (TMPRSS2 ETS融合遺伝子)、NA17、PAX3、アンドロゲン受容体、サイクリンB1、MYCN、Rhoc、TRP-2、CYP1B1、BORIS、SART3、PAX5、OY-TES1、LCK、AKAP-4、SSX2、RAGE-1、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、RU1、RU2、腸内カルボキシエステラーゼ、mut hsp70-2、CD79a、CD79b、CD72、LAIR1、FCAR、LILRA2、CD300LF、CLEC12A、BST2、EMR2、LY75、GPC3、FCRL5、及びIGLL1からなる群から選択される、請求項24~35のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項37】

20

前記腫瘍抗原が、BCMA、CD19、またはCD20である、請求項36に記載の方法。

【請求項38】

前記膜貫通ドメインが、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD4、CD5、CD8 α 、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137 (4-1BB)、CD152、CD154、及びPD-1からなる群から選択される分子に由来する、請求項30~37のいずれか1項に記載の方法。

【請求項39】

30

前記膜貫通ドメインが、CD8 α に由来する、請求項38に記載の方法。

【請求項40】

前記細胞内シグナル伝達ドメインが、CD3 ζ 、CD3 γ 、CD3 ϵ 、CD3 δ 、FcR γ (FCER1G)、FcR β (FcイブシロンRIb)、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD66d、FcガンマリIIa、DAP10、及びDAP12に由来する一次細胞内シグナル伝達ドメインを含む、請求項30~39のいずれか1項に記載の方法。

【請求項41】

前記一次細胞内シグナル伝達ドメインが、CD3 ζ 、DAP12、またはCD3 γ に由来する、請求項40に記載の方法。

【請求項42】

40

前記細胞内シグナル伝達ドメインが、CARD11、CD2 (LFA-2)、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54 (ICAM-1)、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD162 (SELP LG)、CD258 (LIGHT)、CD270 (HVEM、LIGHTR)、CD276 (B7-H3)、CD278 (ICOS)、CD279 (PD-1)、CD319 (SLAMF7)、LFA-1 (リンパ球機能関連抗原1)、NKG2C、CDS、GITR、BAFFR、NKp80 (KLRF1)、CD160、CD19、CD4、IPO-3、BLAME (SLAMF8)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D、CD83、CD150 (SLAMF1)、CD152 (CTLA-4)、CD223 (LAG3)、CD273 (PD-L2)、CD274 (

50

P D-L 1)、D A P 1 0、T R I M、Z A P 7 0、C D 8 3 に特異的に結合するリガンド、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される共刺激分子に由来する共刺激シグナル伝達ドメインを含む、請求項 3 0～4 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記共刺激シグナル伝達ドメインが、C D 1 3 7 (4-1 B B) の細胞質ドメインを含む、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記細胞外リガンド結合ドメインの C 末端と前記膜貫通ドメインの N 末端との間に位置するヒンジドメインをさらに含む、請求項 2 4～4 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記ヒンジドメインが、C D 8 α に由来する、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

ポリペプチドの N 末端に位置するシグナルペプチドをさらに含む、請求項 2 4～4 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記シグナルペプチドが、C D 8 α に由来する、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

請求項 1～4 7 のいずれか 1 項に記載の方法によって得られる修飾 T 細胞。

【請求項 4 9】

請求項 4 8 に記載の修飾 T 細胞と、薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物。

【請求項 5 0】

有効量の請求項 4 9 に記載の医薬組成物を個体に投与することを含む、前記個体の疾患を処置する方法。

【請求項 5 1】

前記疾患が、がんである、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

ミリストイル化部位、N 末端 α ヘリックス、チロシンベースの A P 動員、C D 4 結合部位、酸性クラスター、プロリンベースのリピート、P A K 結合ドメイン、C O P I 動員ドメイン、ジロイシンベースの A P 動員ドメイン、V-A T P a s e 及び R a f-1 結合ドメイン、もしくはそれらの任意の組み合わせにおける 1 つ以上の変異、または表 1 1 に示されるアミノ酸残基のいずれかにおける 1 つ以上の変異を含む、天然に存在しない N e f タンパク質。

【請求項 5 3】

変異体 S I V N e f タンパク質である、請求項 5 2 に記載の天然に存在しない N e f タンパク質。

【請求項 5 4】

(i) 配列番号 1 8～2 2 のいずれか 1 つのアミノ酸配列、

(i i) a a 2～4、a a 8～1 0、a a 1 1～1 3、a a 3 8～4 0、a a 4 4～4 6、a a 4 7～4 9、a a 5 0～5 2、a a 5 3～5 5、a a 5 6～5 8、a a 5 9～6 1、a a 6 2～6 4、a a 6 5～6 7、a a 9 8～1 0 0、a a 1 0 7～1 0 9、a a 1 1 0～1 1 2、a a 1 3 7～1 3 9、a a 1 5 2～1 5 4、a a 1 6 4～1 6 6、a a 1 6 7～1 6 9、a a 1 7 0～1 7 2、a a 1 7 3～1 7 5、a a 1 7 6～1 7 8、a a 1 7 8～1 7 9、1 7 9～1 8 1 a a、a a 1 8 2～1 8 4、a a 1 8 5～1 8 7、a a 1 8 8～1 9 0、a a 1 9 1～1 9 3、a a 1 9 4～1 9 6、a a 2 0 3～2 0 5、a a 2 0 6～2 0 8、a a 2 1 2～2 1 4、a a 2 1 5～2 1 7、a a 2 1 8～2 2 0、a a 2 2 1～2 2 3、a a 8～1 3、a a 4 4～6 7、a a 1 0 7～1 1 2、a a 1 6 4～1 9 6、a a 2 0 3～2 0 8、もしくは a a 2 1 2～2 2 3 のいずれかのアミノ酸残基(ここで、前記アミノ酸残基の位置は、野生型 S I V N e f のものに対応する)における 1 つ以上の変異、

(i i i) a a 2～4、a a 4 4～4 6、a a 5 6～5 8、a a 5 9～6 1、a a 6 2

10

20

30

40

50

～64、aa65～67、aa98～100、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa44～67、aa164～169、aa176～181、aa185～190のいずれかのアミノ酸残基（ここで、前記アミノ酸残基の位置は、野生型SIV Nefのものに対応する）における1つ以上の変異、

(iv) aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、178～179aa、aa179～181、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、もしくはaa164～190のいずれかのアミノ酸残基（ここで、前記アミノ酸残基の位置は、野生型SIV Nefのものに対応する）における1つ以上の変異、または

(v) aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、aa164～169、aa176～181、もしくはaa185～190のいずれかのアミノ酸残基（ここで、前記アミノ酸残基の位置は、野生型SIV Nefのものに対応する）における1つ以上の変異を含む、請求項52または53に記載の天然に存在しないNefタンパク質。

【請求項55】

内在性TCRの細胞表面発現を下方制御する、請求項52～54のいずれか1項に記載の天然に存在しないNefタンパク質。

【請求項56】

内在性TCRの細胞表面発現を、前記野生型SIV Nefによる下方制御と比べて約3%以下の差で下方制御する、請求項52～55のいずれか1項に記載の天然に存在しないNefタンパク質。

【請求項57】

CD4の細胞表面発現を下方制御しない、請求項52～56のいずれか1項に記載の天然に存在しないNefタンパク質。

【請求項58】

CD4の細胞表面発現を下方制御する、請求項52～56のいずれか1項に記載の天然に存在しないNefタンパク質。

【請求項59】

CD4の細胞表面発現を、前記野生型SIV Nefによる下方制御と比べて約3%以下の差で下方制御する、請求項58に記載の天然に存在しないNefタンパク質。

【請求項60】

CD4の細胞表面発現を、前記野生型SIV Nefによる下方制御と比べて少なくとも約3%小さく下方制御する、請求項58に記載の天然に存在しないNefタンパク質。

【請求項61】

CD28の細胞表面発現を下方制御しない、請求項52～60のいずれか1項に記載の天然に存在しないNefタンパク質。

【請求項62】

CD28の細胞表面発現を下方制御する、請求項52～60のいずれか1項に記載の天然に存在しないNefタンパク質。

【請求項63】

CD28の細胞表面発現を、前記野生型SIV Nefによる下方制御と比べて約3%以下の差で下方制御する、請求項62に記載の天然に存在しないNefタンパク質。

【請求項64】

10

20

30

40

50

C D 2 8 の細胞表面発現を、前記野生型 S I V N e f による下方制御と比べて少なくとも約 3 % 小さく下方制御する、請求項 6 2 に記載の天然に存在しない N e f タンパク質。

【請求項 6 5】

請求項 5 2 ～ 6 4 のいずれか 1 項に記載の天然に存在しない N e f タンパク質をコードする核酸を含む修飾 T 細胞。

【請求項 6 6】

機能的な外因性受容体をさらに含む、請求項 6 5 に記載の修飾 T 細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2018年7月26日に出願された国際特許出願第 P C T / C N 2 0 1 8 / 0 9 7 2 3 5 号に基づく優先権の利益を主張するものであり、その内容は、その全体が参照により本明細書に援用される。

【0002】

A S C I I テキストファイルによる配列表の提出

A S C I I テキストファイルによる次の提出物の内容は、その全体が参照により本明細書に援用される：コンピュータ可読形態 (C R F) の配列表 (ファイル名：7 6 1 4 2 2 0 0 1 7 4 1 S E Q L I S T . T X T、記録日：2019年7月25日、サイズ：1 2 6 K B)。

20

【0003】

本願の技術分野

本願は、下方調節された内在性 T 細胞受容体 (T C R) を有する修飾 T 細胞を生成する方法に関する。本願はまた、下方調節された内在性 T C R を有し、工学操作された T C R またはキメラ抗原受容体 (C A R) などの外因性受容体をさらに発現する、修飾 T 細胞を生成する方法にも関する。さらに、本明細書に記載される方法によって生成される修飾 T 細胞、その医薬組成物、キット、及び処置方法が提供される。

【背景技術】

【0004】

30

キメラ抗原受容体 (C A R) - T 細胞療法は、標的腫瘍抗原を特異的に認識して T 細胞を腫瘍部位に誘導する工学操作された受容体を有する、遺伝子修飾された T 細胞を利用する。これは、血液癌及び多発性骨髄腫 (M M) の処置において有望な結果を示している。とはいえ、個体差があるため、自家 C A R - T 療法または自家 T C R - T 療法 (患者自身の T 細胞を使用するもの) は、製造及び標準化における大きな課題を提示し、製造及び処置のコストは極めて高い。さらに、がん患者は通常、低い免疫機能を有し、リンパ球の数が少なく、免疫活性が低く、i n v i t r o で増大させるのが難しい。

【0005】

汎用性のある同種 C A R - T 療法または T C R - T 療法は、健康なドナーに由来する T 細胞を用いる理想的なモデルであると考えられている。しかしながら、重要な課題は、組織不適合性に起因する処置中の移植片対宿主病 (G v H D) をいかに効果的になくすかである。T C R は、抗原提示に応じる T 細胞活性化に関与する細胞表面受容体である。ヒトの T 細胞の 9 5 % は、アルファ (α) 鎖及びベータ (β) 鎖からなる T C R を有する。T C R α 鎖及び T C R β 鎖が組み合わさってヘテロ二量体を形成し、C D 3 サブユニットと会合して、細胞表面上に存在する T C R 複合体を形成する。G v H D は、ドナーの T 細胞が非自己の主要組織適合抗原 (M H C) 分子を T C R によって認識し、宿主 (移植レシピエント) の組織を抗原的に異質と判断して攻撃すると生じる。内在性 T C R をドナー T 細胞からなくし、それにより G v H D を防止するために、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (Z F N)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (T A L E N)、及びクリスパー (C R I S P R) - C R I S P R 関連 (C a s) (C R I S P R / C a s) などの遺伝子

40

50

編集技術を使用して、内在性TCR α またはTCR β 遺伝子ノックアウト（KO）を行い、次いでTCR陰性T細胞を濃縮することにより、同種のCAR-TまたはTCR-Tの産生が行われてきた。しかしながら、TCRの欠失はCD3下流シグナル伝達経路の障害をもたらし、T細胞の増大に影響を及ぼす場合がある。

【0006】

本明細書において参照される全ての公開物、特許、特許出願、及び公開された特許出願の開示内容は、その全体が参照により本明細書に援用される。

【発明の概要】

【0007】

本願は、内在性TCRを下方調節するNefタンパク質（例えば、野生型（wt）Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）を発現する修飾T細胞を生成する方法を提供する。本願はまた、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）、及び外因性受容体、例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、T細胞抗原結合体（TAC）、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR）を発現する、修飾T細胞を生成する方法も提供する。本明細書に記載される方法によって生成される修飾T細胞、その医薬組成物、キット、及び処置方法も提供される。

【0008】

いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）をコードする第1の核酸を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞を生成する方法であって、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性T細胞受容体（TCR）が下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、下方調節は、内在性TCRの細胞表面発現を少なくとも約50%下方制御することを含む。いくつかの実施形態では、Nefを発現する修飾T細胞は、修飾された内在性TCR座位を含む。

【0009】

本明細書に記載されるNefタンパク質は、いくつかの実施形態では、SIV Nef、HIV1 Nef、HIV2 Nef、及びNef相同タンパク質からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質は、野生型Nefである。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質は、配列番号18～22のいずれか1つのアミノ酸配列を含む変異体Nefのような、変異体Nefである。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質は、表11に示されるアミノ酸残基のいずれかにおける1つ以上の変異を含む、変異体SIV Nefである。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質は、（i）aa2～4、aa8～10、aa11～13、aa38～40、aa44～46、aa47～49、aa50～52、aa53～55、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～100、aa107～109、aa110～112、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、aa178～179、179～181aa、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa191～193、aa194～196、aa203～205、aa206～208、aa212～214、aa215～217、aa218～220、aa221～223、aa8～13、aa44～67、aa107～112、aa164～196、aa203～208、もしくはaa212～223、（ii）aa2～4、aa44～46、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～100、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa44～67、aa164～169、aa176～181、aa185～190、（iii）aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67

、 a a 1 0 7 ~ 1 0 9、 a a 1 3 7 ~ 1 3 9、 a a 1 5 2 ~ 1 5 4、 a a 1 6 4 ~ 1 6 6
 、 a a 1 6 7 ~ 1 6 9、 a a 1 7 0 ~ 1 7 2、 a a 1 7 3 ~ 1 7 5、 a a 1 7 6 ~ 1 7 8
 、 1 7 8 ~ 1 7 9 a a、 a a 1 7 9 ~ 1 8 1、 a a 1 8 2 ~ 1 8 4、 a a 1 8 5 ~ 1 8 7
 、 a a 1 8 8 ~ 1 9 0、 a a 1 9 4 ~ 1 9 6、 a a 2 0 3 ~ 2 0 5、 a a 5 6 ~ 6 7、 も
 しくは a a 1 6 4 ~ 1 9 0、 または (i v) a a 2 ~ 4、 a a 5 6 ~ 5 8、 a a 5 9 ~ 6
 1、 a a 6 2 ~ 6 4、 a a 6 5 ~ 6 7、 a a 1 0 7 ~ 1 0 9、 a a 1 3 7 ~ 1 3 9、 a a
 1 5 2 ~ 1 5 4、 a a 1 6 4 ~ 1 6 6、 a a 1 6 7 ~ 1 6 9、 a a 1 7 6 ~ 1 7 8、 a a
 1 7 8 ~ 1 7 9、 a a 1 7 9 ~ 1 8 1、 a a 1 8 5 ~ 1 8 7、 a a 1 8 8 ~ 1 9 0、 a a
 1 9 4 ~ 1 9 6、 a a 2 0 3 ~ 2 0 5、 a a 5 6 ~ 6 7、 a a 1 6 4 ~ 1 6 9、 a a 1 7
 6 ~ 1 8 1、 もしくは a a 1 8 5 ~ 1 9 0 のいずれかのアミノ酸残基（ここで、アミノ酸
 残基の位置は、野生型 S I V N e f のものに対応する）における 1 つ以上の変異を含む
 、変異体 S I V N e f である。いくつかの実施形態では、変異体 N e f（例えば、変異
 体 S I V N e f）は、内在性 T C R（例えば、T C R α 及び／または T C R β）の細胞
 表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、変異体 N e f タンパク質（例えば、
 変異体 S I V N e f）は、内在性 T C R（例えば、T C R α 及び／または T C R β）の
 細胞表面発現を、野生型 N e f による下方制御と比べて約 3 % 以下（例えば約 2 % 以下ま
 たは約 1 % 以下）の差で下方制御する。いくつかの実施形態では、変異体 N e f タンパク
 質（例えば、変異体 S I V N e f）は、内在性 T C R（例えば、T C R α 及び／または
 T C R β）の細胞表面発現を、野生型 N e f による下方制御と比べて少なくとも約 3 %（
 3 % を含む、例えば少なくとも約 3 %、約 4 %、約 5 %、約 6 %、約 7 %、約 8 %、約 9
 %、約 1 0 %、約 2 0 %、約 3 0 %、約 4 0 %、約 5 0 %、約 6 0 %、約 7 0 %、約 8 0
 %、約 9 0 %、または約 9 5 %）大きく下方制御する。いくつかの実施形態では、変異体
 N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f）は、C D 4 の細胞表面発現を下方制
 御しない。いくつかの実施形態では、変異体 N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V
 N e f）は、C D 4 の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、変異体 N
 e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f）は、C D 4 の細胞表面発現を、野生型
 N e f による下方制御と比べて少なくとも約 3 %（例えば少なくとも約 4 %、約 5 %、約
 6 %、約 7 %、約 8 %、約 9 %、約 1 0 %、約 2 0 %、約 3 0 %、約 4 0 %、約 5 0 %、
 約 6 0 %、約 7 0 %、約 8 0 %、約 9 0 %、または約 9 5 %）小さく下方制御する。いく
 つかの実施形態では、変異体 N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f）は、C
 D 2 8 の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、変異体 N e f タンパ
 ク質（例えば、変異体 S I V N e f）は、C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御する。いく
 つかの実施形態では、変異体 N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f）は、
 C D 2 8 の細胞表面発現を、野生型 N e f による下方制御と比べて少なくとも約 3 %（例
 えば少なくとも約 4 %、約 5 %、約 6 %、約 7 %、約 8 %、約 9 %、約 1 0 %、約 2 0 %
 、約 3 0 %、約 4 0 %、約 5 0 %、約 6 0 %、約 7 0 %、約 8 0 %、約 9 0 %、または約
 9 5 %）小さく下方制御する。いくつかの実施形態では、変異体 N e f タンパク質（例え
 ば、変異体 S I V N e f）は、内在性 T C R（例えば、T C R α 及び／または T C R β
 ）の細胞表面発現を、野生型 N e f による下方制御と比べて約 3 % 以下（例えば約 2 % 以
 下または約 1 % 以下）の差で下方制御し（または、内在性 T C R（例えば、T C R α 及び
 ／または T C R β）の細胞表面発現を、野生型 N e f による下方制御と比べて少なくとも
 約 3 %（3 % を含む、例えば少なくとも約 3 %、約 4 %、約 5 %、約 6 %、約 7 %、約 8
 %、約 9 %、約 1 0 %、約 2 0 %、約 3 0 %、約 4 0 %、約 5 0 %、約 6 0 %、約 7 0 %
 、約 8 0 %、約 9 0 %、または約 9 5 %）大きく下方制御し）、C D 4 及び／または C D
 2 8 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、変異体 N e f
 タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f）は、内在性 T C R（例えば、T C R α 及び
 ／または T C R β）の細胞表面発現を、野生型 N e f による下方制御と比べて約 3 % 以下
 （例えば約 2 % 以下または約 1 % 以下）の差で下方制御し（または、内在性 T C R（例え
 ば、T C R α 及び／または T C R β）の細胞表面発現を、野生型 N e f による下方制御と
 比べて少なくとも約 3 %（3 % を含む、例えば少なくとも約 3 %、約 4 %、約 5 %、約 6

%、約 7 %、約 8 %、約 9 %、約 10 %、約 20 %、約 30 %、約 40 %、約 50 %、約 60 %、約 70 %、約 80 %、約 90 %、または約 95 %) 大きく下方制御し)、CD 4 及び/または CD 28 の細胞表面発現を、野生型 Nef による下方制御と比べて少なくとも約 3 % (例えば少なくとも約 4 %、約 5 %、約 6 %、約 7 %、約 8 %、約 9 %、約 10 %、約 20 %、約 30 %、約 40 %、約 50 %、約 60 %、約 70 %、約 80 %、約 90 %、または約 95 %) 小さく下方制御する。

【0010】

いくつかの実施形態では、前駆体 T 細胞は、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体をコードする第 2 の核酸を含む。例えば、前駆体 T 細胞は、Nef タンパク質 (例えば、wt Nef、または変異体 S I V Nef などの変異体 Nef) を発現させることによってさらに修飾される、工学操作された TCR-T 細胞 (例えば、c TCR-T 細胞)、TAC-T 細胞、TAC 様 T 細胞、または CAR-T 細胞であってもよい。

10

【0011】

いくつかの実施形態では、例えば、前駆体 T 細胞が工学操作されていない場合、本方法は、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体をコードする第 2 の核酸を、前駆体 T 細胞に導入するステップをさらに含んでもよい。いくつかの実施形態では、第 1 の核酸と第 2 の核酸とは、別々のベクター上にある。いくつかの実施形態では、第 1 の核酸と第 2 の核酸とは、同じベクター上にある、例えば、同じプロモーターに作動可能に連結している。いくつかの実施形態では、第 1 の核酸は、第 2 の核酸の上流にある。いくつかの実施形態では、第 1 の核酸と第 2 の核酸とは、連結配列を介して結合しており、この連結配列は例えば、P2A、T2A、E2A、F2A、BmCPV 2A、BmIFV 2A、(GS)_n、(GSGGS)_n、(GGGS)_n、(GGGGGS)_n をコードする核酸配列、または IRES、SV40、CMV、UBC、EF1 α 、PGK、CAGG の核酸配列、またはそれらの任意の組み合わせ (式中、n は、少なくとも 1 の整数である) のいずれかを含む。

20

【0012】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される第 1 の核酸及び/または第 2 の核酸を有するベクターは、ウイルスベクター、例えば、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、エピソードベクター発現ベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、及びそれらの誘導体からなる群から選択されるウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される第 1 の核酸及び/または第 2 の核酸を有するベクターは、Piggyback ベクターまたは Sleeping Beauty ベクターなどの非ウイルスベクターである。

30

【0013】

本明細書に記載される方法のいずれかに従ういくつかの実施形態では、Nef を発現する修飾 T 細胞は、組織不適合性の個体において、移植片対宿主病 (GvHD) 応答を誘発しないか、または前駆体 T 細胞のドナーから単離された初代 T 細胞によって誘発される GvHD 応答と比較して低減した GvHD 応答を誘発する。

【0014】

本明細書に記載される方法のいずれかに従ういくつかの実施形態では、本方法は、第 1 の核酸及び/または第 2 の核酸を含む T 細胞を単離または濃縮することをさらに含む。いくつかの実施形態では、本方法は、Nef を発現する修飾 T 細胞から、TCR 陰性 T 細胞を単離または濃縮することをさらに含む。いくつかの実施形態では、本方法は、Nef を発現する修飾 T 細胞を、少なくとも 1 つの薬学的に許容される担体と配合することをさらに含む。

40

【0015】

機能的な外因性受容体を含む前駆体 T 細胞を使用する、または機能的な外因性受容体を前駆体 T 細胞に導入するステップを含む、本明細書に記載される方法のいずれか 1 つに従ういくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体は、(a) 腫瘍抗原 (例えば、BCMA、C

50

D 1 9、C D 2 0) の 1 つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片 (例えば、s d A b、s c F v) を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 任意選択のリンカー、(c) 第 1 の T C R サブユニット (例えば、C D 3 ε) の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、(d) 第 2 の T C R サブユニット (例えば、C D 3 ε) の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び (e) 第 3 の T C R サブユニット (例えば、C D 3 ε) の細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む、キメラ T C R (c T C R) であり、第 1、第 2、及び第 3 の T C R サブユニットは全て、T C R α、T C R β、T C R γ、T C R δ、C D 3 ε、C D 3 γ、及び C D 3 δ からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、第 1、第 2、及び第 3 の T C R サブユニットは同じ (例えば、全て C D 3 ε) である。いくつかの実施形態では、第 1、第 2、及び第 3 の T C R サブユニットは異なっている。いくつかの実施形態では、c T C R は、細胞外リガンド結合ドメインの C 末端と膜貫通ドメインの N 末端との間に位置するヒンジドメインをさらに含む。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、C D 8 α に由来する。いくつかの実施形態では、c T C R は、c T C R の N 末端に位置するシグナルペプチド、例えば C D 8 α に由来するシグナルペプチドをさらに含む。

10

【0016】

機能的な外因性受容体を含む前駆体 T 細胞を使用する、または機能的な外因性受容体を前駆体 T 細胞に導入するステップを含む、本明細書に記載される方法のいずれか 1 つに従ういくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体は、(a) 腫瘍抗原 (例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0) の 1 つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片 (例えば、s d A b、s c F v) を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 任意選択の第 1 のリンカー、(c) T C R サブユニット (例えば、C D 3 ε) の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外 T C R 結合ドメイン、(d) 任意選択の第 2 のリンカー、(e) 第 1 の T C R 共受容体 (例えば、C D 4) の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、(f) 第 2 の T C R 共受容体 (例えば、C D 4) の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び (g) 第 3 の T C R 共受容体 (例えば、C D 4) の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含む、T 細胞抗原結合体 (T A C) であり、T C R サブユニットは、T C R α、T C R β、T C R γ、T C R δ、C D 3 ε、C D 3 γ、及び C D 3 δ からなる群から選択され、第 1、第 2、及び第 3 の T C R 共受容体は全て、C D 4、C D 8、及び C D 2 8 からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、第 1、第 2、及び第 3 の T C R 共受容体は同じである。いくつかの実施形態では、第 1、第 2、及び第 3 の T C R 共受容体は異なっている。いくつかの実施形態では、T A C は、細胞外リガンド結合ドメインの C 末端と膜貫通ドメインの N 末端との間に位置するヒンジドメインをさらに含む。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、C D 8 α に由来する。いくつかの実施形態では、T A C は、T A C の N 末端に位置するシグナルペプチド、例えば C D 8 α に由来するシグナルペプチドをさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、細胞外 T C R 結合ドメインの N 末端にある。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、細胞外 T C R 結合ドメインの C 末端にある。

20

30

【0017】

機能的な外因性受容体を含む前駆体 T 細胞を使用する、または機能的な外因性受容体を前駆体 T 細胞に導入するステップを含む、本明細書に記載される方法のいずれか 1 つに従ういくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体は、(a) 腫瘍抗原 (例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0) の 1 つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片 (例えば、s d A b、s c F v) を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 任意選択の第 1 のリンカー、(c) 第 1 の T C R サブユニット (例えば、T C R α) の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外 T C R 結合ドメイン、(d) 任意選択の第 2 のリンカー、(e) 第 2 の T C R サブユニット (例えば、C D 3 ε) の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、(f) 第 3 の T C R サブユニット (例えば、C D 3 ε) の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び (g) 第 4 の T C R サブユニット (例えば、C D 3 ε) の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含む、T A C 様キメラ受

40

50

容体であり、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは全て、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じである。いくつかの実施形態では、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じである。いくつかの実施形態では、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは異なっている。いくつかの実施形態では、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じであるが、第1のTCRサブユニットとは異なっている。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、細胞外TCR結合ドメインのN末端にある。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、細胞外TCR結合ドメインのC末端にある。いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受容体は、細胞外リガンド結合ドメインのC末端と膜貫通ドメインのN末端との間に位置するヒンジドメインをさらに含む。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、CD8 α に由来する。いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受容体は、TAC様キメラ受容体のN末端に位置するシグナルペプチド、例えばCD8 α に由来するシグナルペプチドをさらに含む。

10

【0018】

機能的な外因性受容体を含む前駆体T細胞を使用する、または機能的な外因性受容体を前駆体T細胞に導入するステップを含む、本明細書に記載される方法のいずれか1つに従ういくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体は、キメラ抗原受容体(CAR)、例えば、(a)腫瘍抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片(例えば、sdAb、scFv)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)膜貫通ドメイン、及び(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含むポリペプチドを含む、CARである。いくつかの実施形態では、抗原結合性断片は、ラクダIg、IgNAR、Fab断片、一本鎖Fv抗体、及び単一ドメイン抗体(sdAb、ナノボディ)の群から選択される。いくつかの実施形態では、抗原結合性断片は、sdAbまたはscFvである。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、一価である。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、多重特異性またはマルチエピトープなど、多価である。いくつかの実施形態では、腫瘍抗原は、メソテリン、TSHR、CD19、CD123、CD22、CD30、CD171、CS-1、CLL-1、CD33、EGFRvIII、GD2、GD3、BCMA、TnAg、前立腺特異的膜抗原(PSMA)、ROR1、FLT3、FAP、TAG72、CD38、CD44v6、CEA、EPCAM、B7H3、KIT、IL-13Ra2、インターロイキン-11受容体a(IL-11Ra)、PSCA、PRSS21、VEGFR2、LewisY、CD24、血小板由来増殖因子受容体ベータ(PDGFRベータ)、SSEA-4、CD20、葉酸受容体アルファ、ERBB2(HER2/neu)、MUC1、上皮増殖因子受容体(EGFR)、NCAM、プロステリン、PAP、ELF2M、エフリンB2、IGF-1受容体、CAIX、LMP2、gp100、bcr-abl、チロシナーゼ、EphA2、フコシルGM1、sLe、GM3、TGS5、HMWMAA、o-アセチル-GD2、葉酸受容体ベータ、TEM1/CD248、TEM7R、CLDN6、CLDN18.2、GPRC5D、CXORF61、CD97、CD179a、ALK、ポリシアル酸、PLAC1、GloboH、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、GPR20、LY6K、OR51E2、TARP、WT1、NY-ESO-1、LAGE-1a、MAGE-A1、レグマイン、HPV E6、E7、MAGE-A1、ETV6-AML、精子タンパク質17、XAGE1、Tie2、MAD-CT-1、MAD-CT-2、Fos関連抗原1、p53、p53変異体、プロステリン、サバイビン及びテロメラーゼ、PCTA-1/ガレクチン8、メラノA/MART1、Ras変異体、hTERT、肉腫転座切断点、ML-1AP、ERG(TMPPRSS2-ETS融合遺伝子)、NA17、PAX3、アンドロゲン受容体、サイクリンB1、MYCN、Rhoc、TRP-2、CYP1B1、BORIS、SART3、PAX5、OY-TES1、LCK、AKAP-4、SSX2、RAGE-1、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、RU1、RU2、腸内カルボキシルエステラーゼ、mut hsp70-2、

20

30

40

50

CD79a、CD79b、CD72、LAIR1、FCAR、LILRA2、CD300LF、CLEC12A、BST2、EMR2、LY75、GPC3、FCRL5、及びIGLL1からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、腫瘍抗原は、BCMA、CD19、またはCD20である。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、T細胞受容体の α 、 β 、または ζ 鎖、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD4、CD5、CD8 α 、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137（4-1BB）、CD152、CD154、及びPD-1からなる群から選択される分子に由来する。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、CD8 α に由来する。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3 ζ 、CD3 γ 、CD3 ϵ 、CD3 δ 、FcR γ （FCER1G）、FcR β （FcイプシロンRIb）、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD66d、FcガンマRIIa、DAP10、及びDAP12に由来する一次細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、一次細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3 ζ 、CD3 γ 、またはDAP12に由来する。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、CARD11、CD2（LFA-2）、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54（ICAM-1）、CD134（OX40）、CD137（4-1BB）、CD162（SELPg）、CD258（LIGHT）、CD270（HVEM、LIGHTR）、CD276（B7-H3）、CD278（ICOS）、CD279（PD-1）、CD319（SLAMF7）、LFA-1（リンパ球機能関連抗原1）、NKG2C、CDS、GITR、BAFFR、NKp80（KLRF1）、CD160、CD19、CD4、IPO-3、BLAME（SLAMF8）、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D、CD83、CD150（SLAMF1）、CD152（CTLA-4）、CD223（LAG3）、CD273（PD-L2）、CD274（PD-L1）、DAP10、TRIM、ZAP70、CD83に特異的に結合するリガンド、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される共刺激分子に由来する共刺激シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、共刺激シグナル伝達ドメインは、CD137（4-1BB）の細胞質ドメインを含む。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体は、細胞外リガンド結合ドメインのC末端と膜貫通ドメインのN末端との間に位置するヒンジドメインをさらに含む。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、CD8 α に由来する。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体は、ポリペプチドのN末端に位置するシグナルペプチド、例えばCD8 α に由来するシグナルペプチドをさらに含む。

【0019】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法によって得られる修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、修飾T細胞と、薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物が提供される。いくつかの実施形態では、有効量の医薬組成物を個体に投与することを含む、個体（例えばヒト）の疾患（例えばがん）を処置する方法が提供される。

【0020】

別の態様では、ミリスチル化部位、N末端 α ヘリックス、チロシンベースのAP動員、CD4結合部位、酸性クラスター、プロリンベースのリピート、PAK結合ドメイン、COP I動員ドメイン、ジロイシンベースのAP動員ドメイン、V-ATPase及びRaf-1結合ドメイン、もしくはそれらの任意の組み合わせにおける1つ以上の変異、または表11に示されるアミノ酸残基のいずれかにおける1つ以上の変異を含み得る、天然に存在しないNefタンパク質（変異体Nefタンパク質または天然に存在しない変異体Nefタンパク質ともいう）が提供される。別の態様では、天然に存在しないNefタンパク質は、変異体SIV Nefタンパク質である。いくつかの実施形態では、天然に存在しないNefタンパク質は、配列番号18～22のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、天然に存在しないNefタンパク質は、（i）aa2～4、aa8～10、aa11～13、aa38～40、aa44～46、aa47～49、aa50～52、aa53～55、aa56～58、aa59～61、aa62～64、

a a 6 5 ~ 6 7、a a 9 8 ~ 1 0 0、a a 1 0 7 ~ 1 0 9、a a 1 1 0 ~ 1 1 2、a a 1
 3 7 ~ 1 3 9、a a 1 5 2 ~ 1 5 4、a a 1 6 4 ~ 1 6 6、a a 1 6 7 ~ 1 6 9、a a 1
 7 0 ~ 1 7 2、a a 1 7 3 ~ 1 7 5、a a 1 7 6 ~ 1 7 8、a a 1 7 8 ~ 1 7 9、1 7 9
 ~ 1 8 1 a a、a a 1 8 2 ~ 1 8 4、a a 1 8 5 ~ 1 8 7、a a 1 8 8 ~ 1 9 0、a a 1
 9 1 ~ 1 9 3、a a 1 9 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a a 2 0 6 ~ 2 0 8、a a 2
 1 2 ~ 2 1 4、a a 2 1 5 ~ 2 1 7、a a 2 1 8 ~ 2 2 0、a a 2 2 1 ~ 2 2 3、a a 8
 ~ 1 3、a a 4 4 ~ 6 7、a a 1 0 7 ~ 1 1 2、a a 1 6 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0
 8、もしくは a a 2 1 2 ~ 2 2 3、(i i) a a 2 ~ 4、a a 4 4 ~ 4 6、a a 5 6 ~ 5
 8、a a 5 9 ~ 6 1、a a 6 2 ~ 6 4、a a 6 5 ~ 6 7、a a 9 8 ~ 1 0 0、a a 1 0 7
 ~ 1 0 9、a a 1 3 7 ~ 1 3 9、a a 1 5 2 ~ 1 5 4、a a 1 6 4 ~ 1 6 6、a a 1 6 7
 ~ 1 6 9、a a 1 7 6 ~ 1 7 8、a a 1 7 8 ~ 1 7 9、a a 1 7 9 ~ 1 8 1、a a 1 8 5
 ~ 1 8 7、a a 1 8 8 ~ 1 9 0、a a 1 9 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a a 4 4 ~
 6 7、a a 1 6 4 ~ 1 6 9、a a 1 7 6 ~ 1 8 1、a a 1 8 5 ~ 1 9 0、(i i i) a a
 2 ~ 4、a a 5 6 ~ 5 8、a a 5 9 ~ 6 1、a a 6 2 ~ 6 4、a a 6 5 ~ 6 7、a a 1 0
 7 ~ 1 0 9、a a 1 3 7 ~ 1 3 9、a a 1 5 2 ~ 1 5 4、a a 1 6 4 ~ 1 6 6、a a 1 6
 7 ~ 1 6 9、a a 1 7 0 ~ 1 7 2、a a 1 7 3 ~ 1 7 5、a a 1 7 6 ~ 1 7 8、1 7 8 ~
 1 7 9 a a、a a 1 7 9 ~ 1 8 1、a a 1 8 2 ~ 1 8 4、a a 1 8 5 ~ 1 8 7、a a 1 8
 8 ~ 1 9 0、a a 1 9 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a a 5 6 ~ 6 7、もしくは a a
 1 6 4 ~ 1 9 0、または (i v) a a 2 ~ 4、a a 5 6 ~ 5 8、a a 5 9 ~ 6 1、a a 6
 2 ~ 6 4、a a 6 5 ~ 6 7、a a 1 0 7 ~ 1 0 9、a a 1 3 7 ~ 1 3 9、a a 1 5 2 ~ 1
 5 4、a a 1 6 4 ~ 1 6 6、a a 1 6 7 ~ 1 6 9、a a 1 7 6 ~ 1 7 8、a a 1 7 8 ~ 1
 7 9、a a 1 7 9 ~ 1 8 1、a a 1 8 5 ~ 1 8 7、a a 1 8 8 ~ 1 9 0、a a 1 9 4 ~ 1
 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a a 5 6 ~ 6 7、a a 1 6 4 ~ 1 6 9、a a 1 7 6 ~ 1 8 1
 、もしくは a a 1 8 5 ~ 1 9 0 のいずれかのアミノ酸残基（ここで、アミノ酸残基の位置
 は、野生型 S I V N e f のものに対応する）における 1 つ以上の変異を含む、変異体 S
 I V N e f である。いくつかの実施形態では、天然に存在しない N e f（例えば、変異
 体 S I V N e f）は、内在性 T C R（例えば、T C R α 及び／または T C R β）の細胞
 表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、天然に存在しない N e f タンパク質
 （例えば、変異体 S I V N e f）は、内在性 T C R（例えば、T C R α 及び／または T
 C R β）の細胞表面発現を、野生型 N e f による下方制御と比べて約 3 % 以下（例えば約
 2 % 以下または約 1 % 以下）の差で下方制御する。いくつかの実施形態では、天然に存在
 しない N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f）は、内在性 T C R（例えば、
 T C R α 及び／または T C R β）の細胞表面発現を、野生型 N e f による下方制御と比べ
 て少なくとも約 3 %（3 % を含む、例えば少なくとも約 3 %、約 4 %、約 5 %、約 6 %、
 約 7 %、約 8 %、約 9 %、約 1 0 %、約 2 0 %、約 3 0 %、約 4 0 %、約 5 0 %、約 6 0
 %、約 7 0 %、約 8 0 %、約 9 0 %、または約 9 5 %）大きく下方制御する。いくつかの
 実施形態では、天然に存在しない N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f）は、
 C D 4 の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、天然に存在しない
 N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f）は、C D 4 の細胞表面発現を下方制
 御する。いくつかの実施形態では、天然に存在しない N e f タンパク質（例えば、変異体
 S I V N e f）は、C D 4 の細胞表面発現を、野生型 N e f による下方制御と比べて少
 なくとも約 3 %（例えば少なくとも約 4 %、約 5 %、約 6 %、約 7 %、約 8 %、約 9 %、
 約 1 0 %、約 2 0 %、約 3 0 %、約 4 0 %、約 5 0 %、約 6 0 %、約 7 0 %、約 8 0 %、
 約 9 0 %、または約 9 5 %）小さく下方制御する。いくつかの実施形態では、天然に存在
 しない N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f）は、C D 2 8 の細胞表面発現
 を下方制御しない。いくつかの実施形態では、天然に存在しない N e f タンパク質（例え
 ば、変異体 S I V N e f）は、C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実
 施形態では、天然に存在しない N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f）は、
 C D 2 8 の細胞表面発現を、野生型 N e f による下方制御と比べて少なくとも約 3 %（例
 えば少なくとも約 4 %、約 5 %、約 6 %、約 7 %、約 8 %、約 9 %、約 1 0 %、約 2 0 %

、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%)小さく下方制御する。いくつかの実施形態では、天然に存在しないNefタンパク質(例えば、変異体SIV Nef)は、内在性TCR(例えば、TCR α 及び/またはTCR β)の細胞表面発現を、野生型Nefによる下方制御と比べて約3%以下(例えば約2%以下または約1%以下)の差で下方制御し(または、内在性TCR(例えば、TCR α 及び/またはTCR β)の細胞表面発現を、野生型Nefによる下方制御と比べて少なくとも約3%(3%を含む、例えば少なくとも約3%、約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%)大きく下方制御し)、CD4及び/またはCD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、天然に存在しないNefタンパク質(例えば、変異体SIV Nef)は、内在性TCR(例えば、TCR α 及び/またはTCR β)の細胞表面発現を、野生型Nefによる下方制御と比べて約3%以下(例えば約2%以下または約1%以下)の差で下方制御し(または、内在性TCR(例えば、TCR α 及び/またはTCR β)の細胞表面発現を、野生型Nefによる下方制御と比べて少なくとも約3%(3%を含む、例えば少なくとも約3%、約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%)大きく下方制御し)、CD4及び/またはCD28の細胞表面発現を、野生型Nefによる下方制御と比べて少なくとも約3%(例えば少なくとも約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%)小さく下方制御する。

【0021】

本明細書に記載される天然に存在しないNefタンパク質(例えば、変異体SIV Nef)は、本明細書に記載される方法のうちの任意のものにおいて使用され得る。

【0022】

本発明は、本明細書に記載される方法で有用なキット及び製品をさらに提供する。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】A及びBは、SIV Nef発現がT細胞活性化を著しく阻害し得ることを示す。Aは、SIV Nef-LNGFR(M071)をコードするレンチウイルスをJurkat細胞株に形質導入した後、LNGFR+細胞率が66.1%であったことと、磁気活性化細胞選別(MACS)により、LNGFR+細胞が94.3%にさらに濃縮されたことを示す。Bは、T細胞活性化マーカーCD69が、PHAで刺激したLNGFR+Jurkat細胞では著しく低減したが、PMA/IONで刺激したLNGFR+Jurkat細胞では影響を受けなかったことを示す。「UnT」は、形質導入していないJurkat細胞を示す。「TCR α KO」は、CRISPR/Cas法によるTCR α ノックアウトJurkat細胞株を示す。「ベクター」は、空ベクターを形質導入したJurkat細胞を示す。「M071」は、SIV Nef-P2A-LNGFRを発現し、MACSによって濃縮されたLNGFR+Jurkat細胞集団を表す。

【図2】SIV Nefの発現が、TCR/CD3複合体の細胞表面発現を阻害することにより、TCR介在性シグナル伝達経路に影響を及ぼすことを示す。「UnT」は、形質導入していないJurkat細胞を示す。「TCR α KO」は、CRISPR/Cas法によるTCR α ノックアウトJurkat細胞株を示す。「ベクター」は、空ベクターを形質導入したJurkat細胞を示す。「M071」は、SIV Nef-P2A-LNGFRを発現し、MACSによって濃縮されたLNGFR+Jurkat細胞集団を表す。

【図3】HIV1 Nef及びHIV2 Nefの発現が、TCR/CD3複合体の細胞表面発現を阻害することにより、TCR介在性シグナル伝達経路に影響を及ぼすことを示す。「UnT」は、形質導入していないJurkat細胞を示す。「TCR α KO」は、CRISPR/Cas法によるTCR α ノックアウトJurkat細胞株を示す。「ベ

クター」は、空ベクターを形質導入した Jurkat 細胞を示す。「M071」は、SIV Nef-P2A-LNGFRを発現し、MACSによって濃縮されたLNGFR+Jurkat細胞集団を表す。「HIV1 Nef」は、HIV1 Nef-T2A-Puroを発現するJurkat細胞を表す。「HIV2 Nef」は、HIV2 Nef-T2A-Puroを発現するJurkat細胞を表す。

【図4A】SIV Nefを発現するTCR陰性T細胞の細胞選別戦略、及び標的細胞の細胞溶解作用を示す。SIV Nef-P2A-LNGFR及びBCMA CARレンチウイルスをコトランスフェクトした3日後のHEK293T細胞におけるBCMA CAR及びLNGFRの発現のFACS結果を示す。

【図4B】SIV Nefを発現するTCR陰性T細胞の細胞選別戦略、及び標的細胞の細胞溶解作用を示す。SIV Nef-P2A-LNGFR及びBCMA CAR-P2A-LNGFRレンチウイルスをコトランスフェクトし、MACSelect LNGFR MicroBeadsで選別したLNGFR+T細胞における、TCR $\alpha\beta$ の陽性率及び陰性率を示す。

【図4C】SIV Nefを発現するTCR陰性T細胞の細胞選別戦略、及び標的細胞の細胞溶解作用を示す。SIV Nef-P2A-LNGFR及びBCMA CARレンチウイルスをコトランスフェクトした、MACS濃縮後のCD3 ϵ 陰性T細胞における、TCR $\alpha\beta$ 、CD3 ϵ 、及びLNGFRの発現率を示す。

【図4D】SIV Nefを発現するTCR陰性T細胞の細胞選別戦略、及び標的細胞の細胞溶解作用を示す。RPMI-8226 (BCMA+) 及びK562 (BCMA-) の各細胞株に対する、CAR+/CD3 ϵ -T細胞の特異的及び非特異的な細胞溶解作用を示す。「UnT」は、形質導入していない初代T細胞を示す。「NC」は、初代T細胞と共にインキュベートしていない陰性対照としてのLuc標識細胞を表す。「PC」は、全てのLuc標識細胞を溶解するための陽性対照としてのTriton X-100を表す。「MACS CD3 ϵ neg」は、MACS濃縮後のCD3 ϵ 陰性T細胞集団を表す。「TCR $\alpha\beta$ -」は、CD3 ϵ 選別後のTCR $\alpha\beta$ 陰性T細胞を表す。「TCR $\alpha\beta$ +」は、CD3 ϵ 選別後のTCR $\alpha\beta$ 陽性T細胞を表す。

【図5A】SIV Nef+CARオールインワンレンチウイルスベクター、例えばBCMA CAR-P2A-LNGFR-SIV Nef (M072)、BCMA CAR-P2A-SIV Nef (M086)、BCMA CAR-P2A-(GGGS)₃-SIV Nef (M090)、及びSIV Nef-P2A-BCMA CAR (M091)、SIV Nef-IRES-BCMA CAR (M126)、BCMA CAR-IRES-SIV Nef (M159)、BCMA CAR-PGK-SIV Nef (M160)、及びSIV Nef-PGK-BCMA CAR (M161)をトランスフェクトしたT細胞における、BCMA CAR (CAR pos)、TCR $\alpha\beta$ (TCR $\alpha\beta$ neg) 及びCD3 ϵ (CD3 ϵ neg) の発現率を示す。SIV Nef-P2A-LNGFR (M071) は非CARコード対照として使用した。「UnT」は、形質導入していないJurkat細胞を表す。「CAR pos」は、CAR陽性T細胞を表す。「TCR $\alpha\beta$ neg」は、TCR $\alpha\beta$ 陰性T細胞を表す。「CD3 ϵ neg」は、CD3 ϵ 陰性T細胞を表す。

【図5B】SIV Nef+CARオールインワンレンチウイルスベクター、例えばBCMA CAR-P2A-LNGFR-SIV Nef (M072)、BCMA CAR-P2A-SIV Nef (M086)、BCMA CAR-P2A-(GGGS)₃-SIV Nef (M090)、及びSIV Nef-P2A-BCMA CAR (M091)、SIV Nef-IRES-BCMA CAR (M126)、BCMA CAR-IRES-SIV Nef (M159)、BCMA CAR-PGK-SIV Nef (M160)、及びSIV Nef-PGK-BCMA CAR (M161)をトランスフェクトしたT細胞における、BCMA CAR (CAR pos)、TCR $\alpha\beta$ (TCR $\alpha\beta$ neg) 及びCD3 ϵ (CD3 ϵ neg) の発現率を示す。SIV Nef-P2A-LNGFR (M071) は非CARコード対照として使用した。「UnT」は、形質

10

20

30

40

50

導入していない Jurkat 細胞を表す。「CAR pos」は、CAR 陽性 T 細胞を表す。「TCRαβ neg」は、TCRαβ 陰性 T 細胞を表す。「CD3ε neg」は、CD3ε 陰性 T 細胞を表す。

【図 5 C】SIV Nef+CAR オールインワンレンチウイルスベクター、例えば BCMA CAR-P2A-LNGFR-SIV Nef (M072)、BCMA CAR-P2A-SIV Nef (M086)、BCMA CAR-P2A-(GGGS)₃-SIV Nef (M090)、及び SIV Nef-P2A-BCMA CAR (M091)、SIV Nef-IRES-BCMA CAR (M126)、BCMA CAR-IRES-SIV Nef (M159)、BCMA CAR-PGK-SIV Nef (M160)、及び SIV Nef-PGK-BCMA CAR (M161) をトランスフェクトした T 細胞における、BCMA CAR (CAR pos)、TCRαβ (TCRαβ neg) 及び CD3ε (CD3ε neg) の発現率を示す。SIV Nef-P2A-LNGFR (M071) は非 CAR コード対照として使用した。「UnT」は、形質導入していない Jurkat 細胞を表す。「CAR pos」は、CAR 陽性 T 細胞を表す。「TCRαβ neg」は、TCRαβ 陰性 T 細胞を表す。「CD3ε neg」は、CD3ε 陰性 T 細胞を表す。

【図 6 A】Nef サブタイプ及び変異体が、T 細胞における TCRαβ、CDε、CD28、及び CD4 の発現に及ぼす作用を示す。

【図 6 B】Nef サブタイプ及び変異体が、T 細胞における TCRαβ、CDε、CD28、及び CD4 の発現に及ぼす作用を示す。

【図 6 C】Nef サブタイプ及び変異体が、T 細胞における TCRαβ、CDε、CD28、及び CD4 の発現に及ぼす作用を示す。

【図 6 D】Nef サブタイプ及び変異体が、T 細胞における TCRαβ、CDε、CD28、及び CD4 の発現に及ぼす作用を示す。

【図 7】SIV Nef-IRES-CD20 scFv (リツキシマブ) CAR (M167) T 細胞 (89.7%)、SIV Nef-IRES-CD20 scFv (Leu-16) CAR (M168) T 細胞 (93.3%)、SIV Nef-IRES-CD19×CD20 scFv CAR (M169) T 細胞 (92.1%)、SIV Nef-IRES-CD19 scFv CAR (M170) T 細胞 (93.6%)、SIV Nef-IRES-BCMA BiVHH CAR1 (M171) T 細胞 (93.5%)、SIV Nef-IRES-BCMA mono-VHH CAR2 (M172) T 細胞 (87.9%)、及び SIV Nef-IRES-BCMA mono-VHH CAR (M173) T 細胞 (94.0%) についての、MACS 濃縮後の TCRαβ 陰性 T 細胞率を示す。形質導入していない T 細胞 (UnT) を対照とした。

【図 8 A】様々な SIV Nef+CAR オールインワン構築物を形質導入した MACS 選別後の TCRαβ 陽性 T 細胞、及び形質導入していない T 細胞 (UnT) を対照とした、様々な SIV Nef+CAR オールインワン構築物を形質導入した MACS 選別後の TCRαβ 陰性 T 細胞の CAR による特異的腫瘍細胞傷害を示す。M167: SIV Nef-IRES-CD20 scFv (リツキシマブ) CAR T 細胞。M168: SIV Nef-IRES-CD20 scFv (Leu-16) CAR T 細胞。M169: SIV Nef-IRES-CD19×CD20 scFv CAR T 細胞。M170: SIV Nef-IRES-CD19 scFv CAR T 細胞。M171: SIV Nef-IRES-BCMA BiVHH CAR1 T 細胞。M172: SIV Nef-IRES-BCMA BiVHH CAR2 T 細胞。M173: SIV Nef-IRES-BCMA mono-VHH CAR T 細胞。

【図 8 B】様々な SIV Nef+CAR オールインワン構築物を形質導入した MACS 選別後の TCRαβ 陽性 T 細胞、及び形質導入していない T 細胞 (UnT) を対照とした、様々な SIV Nef+CAR オールインワン構築物を形質導入した MACS 選別後の TCRαβ 陰性 T 細胞の CAR による特異的腫瘍細胞傷害を示す。M167: SIV Nef-IRES-CD20 scFv (リツキシマブ) CAR T 細胞。M168: S

I V N e f - I R E S - C D 2 0 s c F v (L e u - 1 6) C A R T 細胞。M 1 6 9 : S I V N e f - I R E S - C D 1 9 × C D 2 0 s c F v C A R T 細胞。M 1 7 0 : S I V N e f - I R E S - C D 1 9 s c F v C A R T 細胞。M 1 7 1 : S I V N e f - I R E S - B C M A B i V H H C A R 1 T 細胞。M 1 7 2 : S I V N e f - I R E S - B C M A B i V H H C A R 2 T 細胞。M 1 7 3 : S I V N e f - I R E S - B C M A m o n o - V H H C A R T 細胞。

【図 9 A】様々な S I V N e f + C A R オールインワン構築物を形質導入した M A C S 選別後の T C R α β 陽性 T 細胞及び T C R α β 陰性 T 細胞の T C R による非特異的細胞傷害を示す。M A C S 選別後の T C R α β 陰性 T 細胞には、T C R による非特異的腫瘍細胞殺傷性がほとんどまたは全くなかった。M 1 6 7 : S I V N e f - I R E S - C D 2 0 s c F v (リツキシマブ) C A R T 細胞。M 1 6 8 : S I V N e f - I R E S - C D 2 0 s c F v (L e u - 1 6) C A R T 細胞。M 1 6 9 : S I V N e f - I R E S - C D 1 9 × C D 2 0 s c F v C A R T 細胞。M 1 7 0 : S I V N e f - I R E S - C D 1 9 s c F v C A R T 細胞。M 1 7 1 : S I V N e f - I R E S - B C M A B i V H H C A R 1 T 細胞。M 1 7 2 : S I V N e f - I R E S - B C M A B i V H H C A R 2 T 細胞。M 1 7 3 : S I V N e f - I R E S - B C M A m o n o - V H H C A R T 細胞。

【図 9 B】様々な S I V N e f + C A R オールインワン構築物を形質導入した M A C S 選別後の T C R α β 陽性 T 細胞及び T C R α β 陰性 T 細胞の T C R による非特異的細胞傷害を示す。M A C S 選別後の T C R α β 陰性 T 細胞には、T C R による非特異的腫瘍細胞殺傷性がほとんどまたは全くなかった。M 1 6 7 : S I V N e f - I R E S - C D 2 0 s c F v (リツキシマブ) C A R T 細胞。M 1 6 8 : S I V N e f - I R E S - C D 2 0 s c F v (L e u - 1 6) C A R T 細胞。M 1 6 9 : S I V N e f - I R E S - C D 1 9 × C D 2 0 s c F v C A R T 細胞。M 1 7 0 : S I V N e f - I R E S - C D 1 9 s c F v C A R T 細胞。M 1 7 1 : S I V N e f - I R E S - B C M A B i V H H C A R 1 T 細胞。M 1 7 2 : S I V N e f - I R E S - B C M A B i V H H C A R 2 T 細胞。M 1 7 3 : S I V N e f - I R E S - B C M A m o n o - V H H C A R T 細胞。

【図 1 0】A は、B C M A B i V H H C A R 1 - I R E S - S I V N e f M 1 1 6 トランスファープラスミド (P L L V - M 1 3 3 プラスミド) を形質導入した T 細胞についての、M A C S 濃縮後の T C R α β 陰性 T 細胞率を示す。B は、P L L V - M 1 3 3 プラスミドを形質導入した M A C S 選別後の T C R α β 陽性 T 細胞及び T C R α β 陰性 T 細胞の、C A R による特異的腫瘍細胞傷害 (左パネル) 及び T C R による非特異的細胞傷害 (右パネル) を示す。形質導入していない T 細胞 (U n T) を対照とした。

【図 1 1】A は、M 5 7 2 という、S I V N e f M 1 1 6 - I R E S - C D 2 0 キメラ T C R (抗 C D 2 0 s c F v (L e u - 1 6) - (G G G G S) ₃ - C D 3 ε) を形質導入した T 細胞についての、M A C S 濃縮後の T C R α β 陰性 T 細胞率を示す。B は、P L L V - M 5 7 2 プラスミドを形質導入した M A C S 選別後の T C R α β 陽性 T 細胞及び T C R α β 陰性 T 細胞の、C D 2 0 キメラ T C R による特異的腫瘍細胞傷害 (左パネル) 及び内在性 T C R による非特異的細胞傷害 (右パネル) を示す。形質導入していない T 細胞 (U n T) を対照とした。

【図 1 2】A は、P L L V - M 5 7 4 という、S I V N e f M 1 1 6 - I R E S - C D 2 0 T A C (抗 C D 2 0 s c F v (L e u - 1 6) - (G G G G S) ₃ - h u U C H T 1 . Y 1 7 7 T - G G G G S - C D 4 配列) を形質導入した T 細胞についての、M A C S 濃縮後の T C R α β 陰性 T 細胞率を示す。B は、M 5 7 4 プラスミドを形質導入した M A C S 選別後の T C R α β 陽性 T 細胞及び T C R α β 陰性 T 細胞の、抗 C D 2 0 T A C による特異的腫瘍細胞傷害 (左パネル) 及び内在性 T C R による非特異的細胞傷害 (右パネル) を示す。形質導入していない T 細胞 (U n T) を対照とした。

【図 1 3 A】様々な S I V N e f アミノ酸残基変異が T C R α β の発現に及ぼす制御作用を、野生型 S I V N e f (M 0 7 1) と比較して示す。形質導入していない J u r k

10

20

30

40

50

a t細胞 (U n T) を陰性対照とした。M 1 1 6 (S I V N e f M 1 1 6、実施例 6 参照) を形質導入したJ u r k a t細胞を陽性対照とした。

【図 1 3 B】様々なS I V N e fアミノ酸残基変異がC D 4の発現に及ぼす制御作用を、野生型S I V N e f (M 0 7 1) と比較して示す。形質導入していないJ u r k a t細胞 (U n T) を陰性対照とした。M 1 1 6 (S I V N e f M 1 1 6、実施例 6 参照) を形質導入したJ u r k a t細胞を陽性対照とした。

【図 1 3 C】様々なS I V N e fアミノ酸残基変異がC D 2 8に及ぼす制御作用を、野生型S I V N e f (M 0 7 1) と比較して示す。形質導入していないJ u r k a t細胞 (U n T) を陰性対照とした。M 1 1 6 (S I V N e f M 1 1 6、実施例 6 参照) を形質導入したJ u r k a t細胞を陽性対照とした。

【発明を実施するための形態】

【0 0 2 4】

本願は、がん免疫療法などの処置中の組織不適合性の個体において低減したG v H D 応答を誘発し得る修飾T細胞 (例えばT C R-T細胞 (例えば、c T C R-T細胞)、T A C-T細胞、T A C様T細胞、またはC A R-T細胞) を生成する方法を提供する。簡単に説明すると、前駆体T細胞 (すなわち、修飾しようとする最初のT細胞) を修飾して、N e f (N e g a t i v e R e g u l a t o r y F a c t o r) タンパク質を発現させ、内在性T C Rを下方制御すること、例えば内在性T C R α またはT C R β の細胞表面発現を下方制御することにより、内在性T C Rによるシグナル伝達を阻害することができるようにする (以下、「T C R欠損T細胞」または「G v H D最小化T細胞」という)。次いで、これらのN e f含有T C R欠損T細胞をさらに工学操作して、外因性受容体、例えば、工学操作されたT C R (例えば、従来 of 工学操作されたT C R、キメラT C R (c T C R))、T A C、T A C様キメラ受容体、またはC A R (例えば、抗体ベースのC A R、リガンド/受容体ベースのC A R、またはA C T R) を発現するようにしてもよい。本願はまた、N e fをコードするベクターと、外因性受容体 (例えば、工学操作されたT C R (例えば、従来 of 工学操作されたT C R、キメラT C R (c T C R))、T A C、T A C様キメラ受容体、またはC A R (例えば、抗体ベースのC A R、リガンド/受容体ベースのC A R、またはA C T R)) をコードするベクターとを前駆体T細胞に同時形質導入すること、あるいは、N e fと外因性受容体 (例えば、工学操作されたT C R (例えば、従来 of 工学操作されたT C R、キメラT C R (c T C R))、T A C、T A C様キメラ受容体、またはC A R (例えば、抗体ベースのC A R、リガンド/受容体ベースのC A R、またはA C T R)) との両方をコードする「オールインワン」ベクターを前駆体T細胞に形質導入することにより、G v H D最小化修飾T細胞 (例えばT C R-T細胞 (例えば、c T C R-T細胞)、T A C-T細胞、T A C様T細胞、またはC A R-T細胞) を生成する1ステップの方法も提供する。本明細書に記載される方法から得られる修飾T細胞は、T C Rの細胞表面発現を効果的に下方制御すると共に、外因性受容体 (例えば、工学操作されたT C R (例えば、従来 of 工学操作されたT C R、キメラT C R (c T C R))、T A C、T A C様キメラ受容体、またはC A R (例えば、抗体ベースのC A R、リガンド/受容体ベースのC A R、またはA C T R)) の発現及び機能を維持することができる。本発明は、同種移植におけるG v H Dの発生を効果的に最小限に抑えるか、またはなくし、汎用性のある同種C A R-T、T C R-T (例えば、c T C R-T)、T A C-T、またはT A C様T療法のための簡便、効果的、かつ低コストの戦略を提供する。

【0 0 2 5】

したがって、本願の一態様は、N e fタンパク質 (例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f) をコードする第1の核酸を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞を生成する方法、及びかかる方法によって得られる修飾T細胞を提供する。別の態様では、N e fタンパク質 (例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f) をコードする第1の核酸と、任意選択で、機能的な外因性受容体 (例えば、工学操作されたT C R (例えば、従来 of 工学操作されたT C R、キメラT C R (c T C R))、T A C、T A C様キメラ受容体、またはC A R (例えば、抗

体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR)をコードする第2の核酸とを含む、修飾T細胞が提供される。別の態様では、本明細書に記載される修飾T細胞を作製するのに有用な、天然に存在しないNefタンパク質(例えば、変異体SIV Nef)が提供される。また、Nefタンパク質(例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef)をコードする核酸と、任意選択で、機能的な外因性受容体(例えば、工学操作されたTCR(例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR(cTCR))、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR(例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR)をコードする核酸とを含む、ベクター(例えばウイルスベクター)が提供される。

【0026】

10

I. 定義

「抗体」という用語には、モノクローナル抗体(免疫グロブリンFc領域を有する、完全長4本鎖抗体または完全長重鎖のみ抗体を含む)、ポリエピトープ特異性を有する抗体組成物、多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体、ダイアボディ、及び一本鎖分子)、ならびに抗体断片(例えば、Fab、F(ab')₂、及びFv)が含まれる。「免疫グロブリン」(Ig)という用語は、本明細書では「抗体」と同義に使用される。本明細書において企図される抗体には、重鎖のみ抗体などの単ドメイン抗体が含まれる。

【0027】

「重鎖のみ抗体」または「HCAb」という用語は、重鎖を含むが、4本鎖抗体に通常見出される軽鎖を欠いている機能的抗体を意味する。ラクダ科動物(例えば、ラクダ、ラマ、またはアルパカ)はHCAbを産生することが知られている。

20

【0028】

「単ドメイン抗体」または「sdAb」という用語は、3つの相補性決定領域(CDR)を有する単一の抗原結合ポリペプチドを意味する。sdAbは単独で、対応するCDR含有ポリペプチドとペアリングすることなく抗原に結合することができる。場合により、単ドメイン抗体は、ラクダ科HCAbから工学操作され、それらの重鎖可変ドメインは、本明細書では「V_HH」といわれる。いくつかのV_HHは、ナノボディとして知られる場合もある。ラクダ科sdAbは、最小の公知の抗原結合抗体断片のうちの1つである(例えば、Hamers-Casterman et al., Nature 363: 446-8 (1993)、Greenberg et al., Nature 374: 168-73 (1995)、Hassanzadeh-Ghassabeh et al., Nanomedicine (Lond), 8: 1013-26 (2013)を参照されたい)。基本的なV_HHは、N末端からC末端に向かって、FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4の構造を有し、ここで、FR1~FR4は、それぞれフレームワーク領域1~4を意味し、CDR1~CDR3は、相補性決定領域1~3を意味する。

30

【0029】

抗体の「可変領域」または「可変ドメイン」とは、抗体の重鎖または軽鎖のアミノ末端ドメインを意味する。重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、それぞれ「V_H」及び「V_L」といわれる場合がある。これらのドメインは、一般的に、抗体の可変性が(同じクラスの他の抗体と比較して)最も高いドメインであり、抗原結合部位を含む。ラクダ科種由来の重鎖のみ抗体は、単一の重鎖可変領域を有し、これは、「V_HH」といわれる。

40

【0030】

「可変」という用語は、可変ドメインの特定のセグメントの配列が、抗体によって大きく異なるという事実に関するものである。Vドメインは抗原結合を媒介し、特定の抗原に対する特定の抗体の特異性を決める。しかしながら、可変性は、可変ドメインの全範囲にわたって均一に分布しているわけではない。そうではなく、可変性は、軽鎖と重鎖の両方の可変ドメインにある超可変領域(HVR)と呼ばれる3つのセグメントに集中している。可変ドメインの中でより高度に保存されている部分は、フレームワーク領域(FR)と呼ばれる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは各々、4つのFR領域を含み、これらは

50

大部分が β シート立体構造をとり、3つのHVRによって結合しており、この3つのHVRはループを形成し、このループが β シート構造を結合し、場合によってはその一部を形成する。各鎖内のHVRは、FR領域によって互いに近接して結び付いており、他方の鎖のHVRと共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する（Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)を参照されたい）。定常ドメインは、抗原に対する抗体の結合に直接関与しないが、抗体依存性細胞傷害における抗体の関与などの様々なエフェクター機能を呈する。

【0031】

「完全長抗体」、「インタクト抗体」、または「全抗体」という用語は、同義に使用され、抗体断片とは対照的に、その実質的にインタクトな形態にある抗体を意味する。具体的には、完全長4本鎖抗体には、Fc領域を含む重鎖及び軽鎖を有する抗体が含まれる。完全長重鎖のみ抗体は、重鎖（例えば $V_H H$ ）及びFc領域を含む。定常ドメインは、天然配列の定常ドメイン（例えば、ヒト天然配列定常ドメイン）であっても、そのアミノ酸配列バリエーションであってもよい。場合により、インタクト抗体は、1つ以上のエフェクター機能を有し得る。

【0032】

「抗体断片」または「抗原結合性断片」は、インタクト抗体の一部分、好ましくはインタクト抗体の抗原結合領域及び／または可変領域を含む。抗体断片（または抗原結合性断片）の例としては、Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 及びFv断片；ダイアボディ；線状抗体（米国特許第5,641,870号、実施例2；Zapata et al., Protein Eng. 8(10):1057-1062 [1995]を参照されたい）；一本鎖抗体分子；単一ドメイン抗体（例えば $V_H H$ ）、ならびに抗体断片から形成された多重特異性抗体が挙げられる。抗体のパパイン消化により、「Fab」断片と呼ばれる2つの同一な抗原結合性断片と、残りの「Fc」断片とが得られた。「Fc」断片とは、容易に結晶化する能力を反映する呼称である。Fab断片は、L鎖全体と併せて、H鎖の可変領域ドメイン（ V_H ）、及び1つの重鎖の第1の定常ドメイン（ $C_H 1$ ）からなる。各Fab断片は、抗原結合に関して一価であり、すなわち、単一の抗原結合部位を有する。抗体のペプシン処理により、単一の大きい $F(ab')_2$ 断片が得られ、これは、異なる抗原結合活性を有する2つのFab断片がジスルフィド結合したものにほぼ相当し、依然として抗原を架橋することができる。Fab'断片は、 $C_H 1$ ドメインのカルボキシ末端に抗体ヒンジ領域のシステインを1つ以上含む数個の追加の残基を有することが、Fab断片とは異なる。Fab'-SHは、定常ドメインのシステイン残基（複数可）が遊離チオール基を有するFab'の本明細書における呼称である。 $F(ab')_2$ 抗体断片は、元々、間にヒンジシステインを有するFab'断片のペアとして生成された。抗体断片の他の化学的結合も知られている。

【0033】

Fc断片は、ジスルフィドによって互いに結び付けられたH鎖両方のカルボキシ末端を含む。抗体のエフェクター機能は、Fc領域内の配列によって決定され、この領域はまた、特定の細胞型に見出されるFc受容体（FcR）によって認識される。

【0034】

「Fv」は、完全な抗原認識結合部位を含む最小の抗体断片である。この断片は、1つの重鎖可変領域ドメインと1つの軽鎖可変領域ドメインとが非共有結合で密接に会合した二量体からなる。これら2つのドメインの折り畳みから、抗原結合のためのアミノ酸残基を寄与し、抗体に抗原結合特異性を与える、6つの超可変ループ（H鎖及びL鎖から各3ループ）が生じる。しかしながら、単一の可変ドメイン（または抗原に特異的な3つのHVRのみを含むFvの半分）ですら、結合部位全体よりも低い親和性であるにせよ、抗原を認識して結合する能力を有する。

【0035】

「s F v」または「s c F v」とも略される「一本鎖 F v」は、結合して単一のポリペプチド鎖となった V_H 抗体ドメイン及び V_L 抗体ドメインを含む抗体断片である。好ましくは、s F v ポリペプチドは、V_H ドメインと V_L ドメインとの間にポリペプチドリンカーをさらに含み、これにより s F v は、抗原結合に望ましい構造を形成することができる。

【0036】

本明細書に記載される抗体の「機能的断片」は、インタクト抗体の一部を含み、これは概して、インタクト抗体の抗原結合領域もしくは可変領域、または F c R 結合能力を保持するもしくは修飾された F c R 結合能力を有する抗体の F c 領域を含む。抗体断片の例としては、線状抗体、一本鎖抗体分子、及び抗体断片から形成された多重特異性抗体が挙げられる。

10

【0037】

本明細書で使用する場合、「特異的に結合する」、「特異的に認識する」、または「に特異的な」という用語は、生体分子を含む不均一な分子集団の存在下における標的の存在を決定付ける、標的と抗原結合タンパク質（例えば抗原結合ドメイン、リガンド、工学操作された T C R、C A R、またはキメラ受容体）との間の結合のような、測定可能かつ再現可能な相互作用に関するものである。例えば、ある標的（エピトープであり得る）に特異的に結合する抗原結合タンパク質は、この標的に、他の標的に結合する場合と比べて高い親和性、高いアビディティ、高い容易さ、及び／または長い期間で結合する抗原結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、無関係な標的への抗原結合タンパク質の結合の程度は、例えばラジオイムノアッセイ（R I A）により測定される抗原結合タンパク質の標的への結合の約 10 % 未満である。いくつかの実施形態では、標的に特異的に結合する抗原結合タンパク質は、 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 、または $\leq 0.1 \text{ nM}$ の解離定数（K d）を有する。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、異なる種のタンパク質間で保存されているタンパク質上のエピトープに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、特異的結合は排他的結合を含み得るが、しかし必須ではない。

20

【0038】

「特異性」という用語は、抗原結合タンパク質（例えば C A R（例えば、抗体ベースの C A R、リガンド／受容体ベースの C A R、または A C T R）、工学操作された T C R（例えば、従来の工学操作された T C R、キメラ T C R（c T C R））、T A C、T A C 様キメラ受容体、または s d A b、s c F v）が抗原の特定のエピトープを選択的に認識することを意味する。例えば、自然抗体は、単一特異性である。本明細書で使用する「多重特異性」という用語は、抗原結合タンパク質（例えば本明細書に記載される外因性受容体または s d A b のいずれか）が 2 つ以上の抗原結合部位を有し、これらの少なくとも 2 つが異なる抗原に結合することを示す。本明細書で使用する「二重特異性」とは、抗原結合タンパク質（例えば本明細書に記載される外因性受容体のいずれか）が 2 つの異なる抗原結合特異性を有することを示す。本明細書で使用する「単一特異性」C A R という用語は、1 つ以上の結合部位を有し、その各々が同じ抗原に結合する、抗原結合タンパク質（例えば本明細書に記載される外因性受容体または s d A b、s c F v のいずれか）を示す。

30

40

【0039】

本明細書で使用する「価」という用語は、抗原結合タンパク質（例えば本明細書に記載される外因性受容体または s d A b、s c F v のいずれか）に特定の数の結合部位が存在することを示す。例えば自然抗体、または完全長抗体は、2 つの結合部位を有し、二価である。したがって、「三価」、「四価」、「五価」、及び「六価」という用語は、それぞれ、2 つの結合部位、3 つの結合部位、4 つの結合部位、5 つの結合部位、及び 6 つの結合部位が抗原結合タンパク質（例えば本明細書に記載される外因性受容体または s d A b、s c F v のいずれか）に存在することを示す。

【0040】

本明細書における「F c 領域」という用語は、天然配列 F c 領域及びバリエント F c 領

50

域を含む免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。免疫グロブリン重鎖のFc領域の境界は様々であり得るが、ヒトIgG重鎖Fc領域は通常、Cys226位のアミノ酸残基から、またはPro230から、そのカルボキシル末端に及ぶと定義される。Fc領域のC末端リジン（EU付番システムによると残基447）は、例えば、抗体の産生もしくは精製の際に、または抗体の重鎖をコードする核酸を組み換え工学操作することによって除去され得る。したがって、インタクト抗体の組成物は、全てのK447残基が除去された抗体集団、K447残基が除去されていない抗体集団、及びK447残基を有する抗体と有しない抗体との混合物を有する抗体集団を含み得る。本明細書に記載される抗体における使用に好適な天然配列のFc領域としては、ヒトIgG1、IgG2（IgG2A、IgG2B）、IgG3、及びIgG4が挙げられる。

10

【0041】

「結合親和性」とは、一般的に、分子（例えば、抗体、CARなどの本明細書に記載される外因性受容体のいずれか）の単一結合部位とその結合パートナー（例えば、抗原）との間の非共有結合的相互作用の合計の強度を意味する。特記なき限り、本明細書で使用する場合、「結合親和性」は、結合ペアのメンバー（例えば、抗体と抗原、または本明細書に記載される外因性受容体のいずれかと抗原、例えばCARと抗原）間の1:1の相互作用を反映する、固有の結合親和性を意味する。分子Xの、そのパートナーYに対する親和性は、一般的に解離定数（Kd）で表すことができる。親和性は、本明細書に記載される方法を含む当技術分野において公知である一般的な方法によって測定することができる。低親和性抗体は、概して、抗原に結合するのが遅く、容易に解離する傾向があるが、高親和性抗体は、概して、抗原に結合するのがより速く、より長く結合した状態を保つ傾向がある。結合親和性を測定する様々な方法が当技術分野で公知であり、そのいずれも本願の目的に使用することができる。結合親和性を測定するための特定の具体的かつ例示的な実施形態を以下に記載する。

20

【0042】

「遮断」抗体または「アンタゴニスト」抗体とは、それが結合する抗原の生物活性を阻害または低減するものである。いくつかの実施形態では、遮断抗体またはアンタゴニスト抗体は、抗原の生物活性を実質的または完全に阻害する。

【0043】

ペプチド、ポリペプチドまたは抗体配列に関する「アミノ酸配列同一性パーセント（％）」及び「相同性」は、配列をアラインし、必要に応じてギャップを導入して最大の配列同一性パーセントを達成した後、いかなる保存的置換も配列同一性の一部として考慮しない場合に、候補配列において特定のペプチドまたはポリペプチド配列におけるアミノ酸残基と同一である、アミノ酸残基の百分率と定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定するためのアラインメントは、当技術分野の技術範囲内にある様々な方法で、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGNまたはMEGALIGN（商標）（DNASTAR）ソフトウェアなどの公的に利用可能なコンピュータソフトウェアを使用して、達成することができる。当業者であれば、比較される配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するのに必要な任意のアルゴリズムを含め、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。

30

40

【0044】

本明細書で使用する「キメラ抗原受容体」または「CAR」とは、T細胞などの免疫エフェクター細胞に1つ以上の抗原特異性をグラフトするために使用され得る、遺伝子工学操作された受容体を意味する。いくつかのCARは、「人工T細胞受容体」、「キメラT細胞受容体」、または「キメラ免疫受容体」としても知られている。いくつかの実施形態では、CARは、1つ以上の抗原（例えば腫瘍抗原）に特異的な細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、ならびにT細胞及び／または他の受容体の細胞内シグナル伝達ドメインを含む。「CAR-T」は、CAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、ACTR）を発現するT細胞を意味する。「BCMA CAR」は、BCMAに特異的な細胞外結合ドメインを有するCARを意味する。「バイエピトープ

50

CAR」は、2つの異なるエピトープに特異的な細胞外結合ドメインを有するCARを意味する。

【0045】

本明細書に記載される「単離された」核酸分子（例えば、Nefタンパク質、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR）をコードするもの）は、それが産生された環境において通常付随する少なくとも1つの混入核酸分子から同定及び分離された核酸分子である。好ましくは、単離された核酸は、産生環境に付随するあらゆる成分との関連がない。本明細書のポリペプチド及び抗体をコードする単離された核酸分子は、それが天然に見出される形態または設定以外の形態である。したがって、単離された核酸分子は、細胞内に自然に存在する本明細書のポリペプチド及び抗体をコードする核酸とは区別される。

10

【0046】

「制御配列」という用語は、特定の宿主生物において作動可能に連結したコード配列の発現に必要なDNA配列を意味する。例えば、原核生物に好適な制御配列には、プロモーター、任意選択でオペレーター配列、及びリボソーム結合部位が含まれる。真核細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、及びエンハンサーを利用することが知られている。

【0047】

核酸は、別の核酸配列と機能的な関係に置かれているとき、「作動可能に連結」している。例えば、プレ配列または分泌リーダーのDNAは、ポリペプチドの分泌に関与するブレタンパク質として発現される場合に、そのポリペプチドのDNAに作動可能に連結しており、プロモーターもしくはエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼす場合に、コード配列に作動可能に連結しており、またはリボソーム結合部位は、翻訳を容易にするように位置付けられている場合に、コード配列に作動可能に連結している。一般的に、「作動可能に連結した」とは、連結されるDNA配列が近接していること、及び分泌リーダーの場合には、近接しており、かつ読み取り相（reading phase）にあることを意味する。しかしながら、エンハンサーは近接している必要はない。連結は、簡便な制限部位でのライゲーションによって達成される。そのような部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーが、従来の慣例に従って使用される。

20

30

【0048】

特記なき限り、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」には、互いの縮重バージョンであり、同じアミノ酸配列をコードする全てのヌクレオチド配列が含まれる。タンパク質またはRNAをコードするヌクレオチド配列という表現は、イントロンを含む場合もあるが、そのタンパク質をコードするヌクレオチド配列が、いくつかのバージョンでイントロン（複数可）を含み得る場合に限る。

【0049】

本明細書で使用する「ベクター」という用語は、それが結合した別の核酸を増殖させることができる核酸分子を意味する。この用語には、自己複製核酸構造としてのベクター、ならびにそれが導入された宿主細胞のゲノムに組み込まれたベクターが含まれる。特定のベクターは、それらが動作可能に連結した核酸の発現を指向することができる。そのようなベクターは、本明細書では「発現ベクター」といわれる。

40

【0050】

本明細書で使用する「トランスフェクトされた」または「形質転換された」または「形質導入された」という用語は、外因性核酸が宿主細胞に移入または導入されるプロセスに関するものである。「トランスフェクト」細胞または「形質転換」細胞または「形質導入」細胞とは、外因性核酸がトランスフェクトされた、それで形質転換された、またはそれが形質導入された細胞である。この細胞は、初代対象細胞及びその子孫を含む。

【0051】

本明細書で使用する場合、「処置」または「処置すること」とは、臨床結果を含む有益

50

なまたは所望の結果を得るためのアプローチである。本発明の目的において、有益なまたは所望の臨床結果は、疾患に起因する1つ以上の症状の緩和、疾患の程度の低減、疾患の安定化（例えば、疾患の悪化の防止もしくは遅延）、疾患の広がり（例えば、転移）の防止もしくは遅延、疾患の再発の防止もしくは遅延、疾患の進行の遅延もしくは緩徐化、病状の改善、疾患の寛解（部分寛解もしくは完全寛解）の提供、疾患の処置に必要な1つ以上の他の薬剤の用量の減少、疾患の進行の遅延、生活の質の向上、及び／または生存期間の延長のうちの1つ以上を含むが、これらに限定されない。また、がんの病理学的帰結の低減も「処置」に包含される。本願の方法は、これらの処置態様のいずれか1つ以上を企図する。

【0052】

本明細書で使用する場合、「個体」または「対象」とは、ヒト、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、齧歯類、または霊長類を含むがこれらに限定されない哺乳動物を意味する。いくつかの実施形態では、個体はヒトである。

【0053】

本明細書で使用する「有効量」という用語は、特定の障害、状態、または疾患を治療するために、例えばその症状（例えば、がん、感染性疾患、G v H D、移植片拒絶、自己免疫障害、または放射線宿酔）のうちの1つ以上を改善、緩和、軽減、及び／または遅延するために十分な、本明細書に記載される修飾T細胞などの薬剤またはその医薬組成物の量を意味する。がんの場合、有効量は、腫瘍を縮小させる及び／または腫瘍の成長速度を低下させる（例えば、腫瘍成長を抑制する）、または他の望まれない細胞増殖を防止もしくは遅延するのに十分な量を含む。いくつかの実施形態では、有効量は、発症を遅延するのに十分な量である。いくつかの実施形態では、有効量は、再発を防止または遅延するのに十分な量である。有効量は、1回以上の投与で投与することができる。薬剤（例えば修飾T細胞）または組成物の有効量は、（i）がん細胞の数を低減させること、（i i）腫瘍サイズを低減させること、（i i i）末梢器官へのがん細胞の浸潤を、ある程度阻止する、遅らせる、緩徐化する、好ましくは停止すること、（i v）腫瘍転移を阻止する（すなわち、ある程度緩徐化する、好ましくは停止すること）、（v）腫瘍成長を阻止すること、（v i）腫瘍の発生及び／または再発を防止もしくは遅延すること、及び／または（v i i）がんに関連する症状のうちの1つ以上をある程度軽減することができる。ウイルス感染などの感染性疾患の場合、本明細書に記載される修飾T細胞またはその組成物の治療有効量は、病原体に感染した細胞の数を低減させること、病原体由来抗原の生成もしくは放出を低減させること、未感染細胞への病原体の拡散を阻止する（すなわち、ある程度緩徐化する、好ましくは停止すること）、及び／または感染に関連する1つ以上の症状をある程度軽減することができる。いくつかの実施形態では、治療有効量とは、患者の生存期間を延長する量である。

【0054】

本明細書で使用する場合、疾患の発症を「遅延させること」とは、疾患（例えば、がん、感染性疾患、G v H D、移植片拒絶、自己免疫障害、または放射線宿酔）の発症を先送りにする、妨げる、緩徐化する、遅らせる、安定化する、及び／または延期することを意味する。この遅延は、病歴及び／または処置される個体に応じて、様々な長さの時間のものであり得る。当業者には明白であるように、十分なまたは著しい遅延は、個体が疾患を発症しないという点で、実質的に防止を包含し得る。がんの発症を「遅延させる」方法は、その方法を使用しない場合と比較して、所与の時間枠内で疾患発症の可能性を低減させる、及び／または所与の時間枠内で疾患の程度を低減させる方法である。そのような比較は、典型的には、統計的に有意な数の個体を使用した臨床研究に基づく。がんの発症は、コンピュータ断層撮影（C A T スキャン）、磁気共鳴画像法（M R I）、腹部超音波検査、凝固検査、動脈造影法、または生検などを含むがこれらに限定されない、標準的な方法を使用して検出できる場合がある。発症（D e v e l o p m e n t）はまた、初期には検出できない場合があるがんの進行も意味し、発生、再発、及び発症（o n s e t）を含む。

10

20

30

40

50

【0055】

本明細書で使用する場合、「自家」という用語は、個体に由来する材料で、後に同じ個体に再導入される任意の材料に関することが意図される。

【0056】

「同種」とは、同じ種の異なる個体に由来するグラフトに関するものである。「同種T細胞」とは、レシピエントにマッチする組織ヒト白血球抗原（HLA）型を有するドナー由来のT細胞を意味する。典型的に、マッチングは、HLA遺伝子の3つ以上の座位における可変性に基づいて行われ、これらの座位が完全にマッチすることが好ましい。いくつかの事例において、同種移植ドナーは、血縁（通常はHLAが良好にマッチする兄弟姉妹）、同系（患者が一卵性「双生児」の一方である場合、もう一方）、または無関係（血縁関係はないがHLAマッチング度が非常に良好であることが見出されるドナー）であり得る。HLA遺伝子は、2つのカテゴリー（I型及びII型）に分類される。一般に、I型遺伝子（すなわち、HLA-A、HLA-B、またはHLA-C）のミスマッチは、グラフト拒絶のリスクを高める。HLA II型遺伝子（すなわち、HLA-DR、またはHLA-DQB1）のミスマッチは、移植片対宿主病（GVHD）のリスクを高める。

【0057】

本明細書で使用する「患者」は、疾患（例えば、がん、ウイルス感染、GVHD）に罹患したあらゆるヒトを含む。「対象」、「個体」、及び「患者」という用語は、本明細書では同義に使用される。「ドナー対象」または「ドナー」という用語は、本明細書では、さらなる *in vitro* 工学操作のための細胞が得られる対象を意味する。ドナー対象は、本明細書に記載される方法によって生成される細胞集団で処置される患者（すなわち、自家ドナー）である場合もあれば、または、本明細書に記載される方法によって生成される細胞集団の生成後に、異なる個体もしくは患者を処置するために使用されることになる血液サンプル（例えば、リンパ球サンプル）を提供する個体（すなわち、同種ドナー）である場合もある。本発明の方法によって調製された細胞を受ける対象は、「レシピエント」または「レシピエント対象」といわれることがある。

【0058】

「T細胞受容体」または「TCR」という用語は、T細胞の表面上でペアリングする α β 鎖または $\gamma\delta$ 鎖からなるヘテロ二量体受容体を意味する。 α 、 β 、 γ 、及び δ の各鎖は、2つのIg様ドメイン、すなわち相補性決定領域（CDR）を介して抗原認識をもたらす可変ドメイン（V）と、これに続く、ペプチド及び膜貫通（TM）領域を結合させることによって細胞膜に固定されている定常ドメイン（C）とからなる。TM領域は、CD3シグナル伝達装置の不変サブユニットと会合する。各Vドメインは、3つのCDRを有する。これらのCDRは、主要組織適合抗原によってコードされるタンパク質と抗原ペプチドが結合した複合体（pMHC）と相互作用する（Davis and Bjorkman (1988) Nature, 334, 395-402、Davis et al. (1998) Annu Rev Immunol, 16, 523-544、Murphy (2012), xix, 868 p.)。

【0059】

「TCR関連シグナル伝達分子」という用語は、TCR-CD3複合体の一部である細胞質免疫受容体活性化チロシンモチーフ（ITAM）を有する分子を意味する。TCR関連シグナル伝達分子には、CD3 $\gamma\epsilon$ 、CD3 $\delta\epsilon$ 、及び $\zeta\zeta$ （別名CD3 ζ またはCD3 $\zeta\zeta$ ）が含まれる。

【0060】

「刺激」という用語は、本明細書で使用する場合、細胞表面部分のライゲーシオンによって誘導される一次応答を意味する。例えば、受容体の文脈において、このような刺激には、受容体のライゲーシオンと、後続のシグナル伝達事象とが含まれる。T細胞の刺激に関しては、このような刺激は、T細胞表面部分のライゲーシオンを意味し、これは一実施形態では、TCR/CD3複合体の結合のように、後にシグナル伝達事象を誘導する。さらに、刺激事象は、細胞を活性化し、TGF- β の下方制御のように、分子の発現または

分泌を上方制御または下方制御し得る。したがって、細胞表面部分のライゲーシオンは、直接的なシグナル伝達事象がない場合であっても、細胞骨格構造の再構築、または細胞表面部分の合体をもたらすことがあり、これらは各々、後の細胞応答を向上、修飾、または変化させる機能を果たし得る。

【0061】

「活性化」という用語は、本明細書で使用する場合、はっきりとした生化学的または形態学的な変化を誘導するのに十分な細胞表面部分のライゲーシオン後の細胞の状態を意味する。T細胞の文脈において、このような活性化は、細胞増殖を誘導するように十分に刺激されているT細胞の状態を意味する。T細胞の活性化は、サイトカイン産生、及び制御性または細胞溶解性のエフェクター機能の実行を誘導する場合もある。他の細胞の文脈において、この用語は、特定の物理化学的プロセスの上方制御または下方制御のいずれかを示す。「活性化T細胞」という用語は、細胞分裂、サイトカイン産生、制御性もしくは細胞溶解性のエフェクター機能の実行が進行中である、及び／または「活性化」のプロセスを経たばかりのT細胞を示す。

10

【0062】

T細胞における分子（例えば、内在性TCRまたはCD4）の「下方調節」という用語は、分子の細胞表面発現を下方制御すること、及び／またはそのシグナル伝達（例えば、TCR、CD3、CD28によるシグナル伝達）、T細胞活性化、及びT細胞増殖に干渉することを意味する。標的受容体の下方調節、すなわち、内部移行、ストリッピング、キャッピング、または細胞表面上の他の形態の受容体転位の変化を介するものも包含され得る。

20

【0063】

本明細書で使用する「機能的な外因性受容体」という用語は、T細胞または本明細書に記載されるNe f発現T細胞に導入された後に生物活性を保持する外因性受容体（例えばCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、ACTR）、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、T細胞抗原結合体（TAC）、またはTAC様キメラ受容体など）を意味する。生物活性は、分子（例えば、がん抗原、またはACTRに対する抗体）に特異的に結合すること、下流シグナルを適切に伝達すること、例えば、細胞増殖、サイトカイン産生及び／または制御性もしくは細胞溶解性のエフェクター機能の実行を誘導することにおける、外因性受容体の能力を含むが、これらに限定されない。

30

【0064】

本明細書に記載される本願の実施形態は、実施形態「からなる」及び／または実施形態「から本質的になる」を含むことが理解される。

【0065】

本明細書における「約」のついた値またはパラメータへの言及は、その値またはパラメータ自体を対象とする変形を含む（及び記述する）。例えば、「約X」について言及する記述は、「X」の記述を含む。

【0066】

本明細書で使用する場合、ある値またはパラメータ「ではない（not）」という言及は、概して、ある値またはパラメータ「以外」を意味し、記述する。例えば、本方法はタイプXのがんを処置するために使用されない、とは、その方法がX以外のタイプのがんを処置するために使用されることを意味する。

40

【0067】

本明細書で使用する「約X～Y」という用語は、「約X～約Y」と同じ意味を有する。

【0068】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用する場合、単数形「a」、「or」、及び「the」は、文脈上特に明記されていない限り、複数の指示対象を含む。

【0069】

II. Ne fタンパク質を発現する修飾T細胞

50

本発明は、N e fを含む修飾T細胞、及びかかる修飾T細胞を生成する方法を提供する。いくつかの実施形態では、T細胞は、機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（c TCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））をさらに発現する。したがって本願は、N e fタンパク質（例えば、変異体S I V N e fなどの天然に存在しないN e fタンパク質）のいずれか1つと、任意選択で、本明細書に記載される機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（c TCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））のいずれか1つとを同時発現する、修飾T細胞を提供する。本明細書に記載されるN e fタンパク質は、いくつかの実施形態では、本明細書に記載される変異体N e fタンパク質のいずれか、例えば変異体S I V N e fのような変異体N e fである。

10

【0070】

いくつかの実施形態では、N e fタンパク質（例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f）をコードする第1の核酸を含む修飾T細胞（例えば、同種T細胞）であって、N e fタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCR（例えば、TCR α 及び／またはTCR β ）が下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、下方調節は、内在性TCRの細胞表面発現を下方制御することを含む。いくつかの実施形態では、内在性TCRの細胞表面発現は、少なくとも約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%下方制御される。いくつかの実施形態では、内在性MHC、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及び／またはCD3 δ の細胞表面発現は、N e fタンパク質により、少なくとも約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%下方制御される。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質は、CD3 ζ を下方調節する（例えば、発現を下方制御する）ことはないか、または、CD3 ζ を最大で約50%、約40%、約30%、約20%、約10%、もしくは約5%下方調節する。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質（例えば、変異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質（例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質（例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、TCR、CD4、及びCD28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質（例えば、変異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、TCRの細胞表面発現を下方制御するが、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質（例えば、変異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、TCR及びCD4の細胞表面発現を下方制御するが、CD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質（例えば、変異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、TCR及びCD28の細胞表面発現を下方制御するが、CD4の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質（例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、内在性TCRの細胞表面発現を下方制御するが、外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（c TCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））を下方調節する（例えば、細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（c TCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））は、N e fタンパク質（例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f）により、最大で約50%、約40%、

20

30

40

50

約 30%、約 20%、約 10%、または約 5% 下方調節される（例えば、細胞表面発現が下方制御される）。

【0071】

いくつかの実施形態では、Nef を発現する修飾 T 細胞は、未修飾の内在性 TCR 座位を含む。いくつかの実施形態では、Nef を発現する修飾 T 細胞は、TCR α または TCR β などの修飾された内在性 TCR 座位を含む。いくつかの実施形態では、内在性 TCR 座位は、CRISPR-Cas、TALEN、shRNA、及び ZFN から選択される遺伝子編集システムによって修飾される。いくつかの実施形態では、内在性 TCR 座位は、配列番号 23 の核酸配列を含む gRNA を含む CRISPR-Cas システムによって修飾される。

10

【0072】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集システムをコードする核酸（複数可）と、Nef タンパク質（例えば、wt Nef、または変異体 SIV Nef などの変異体 Nef）をコードする第 1 の核酸とは、同じベクター上にある。いくつかの実施形態では、遺伝子編集システムをコードする核酸（複数可）と、Nef タンパク質をコードする第 1 の核酸とは、異なるベクター上にある。

【0073】

いくつかの実施形態では、Nef タンパク質は、SIV Nef、HIV1 Nef、HIV2 Nef、及びそれらの相同体からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、Nef タンパク質は、野生型 Nef である。いくつかの実施形態では、Nef タンパク質は、配列番号 12～17 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Nef タンパク質は、変異体 Nef である。いくつかの実施形態では、変異体 Nef は、ミリスチル化部位、N 末端 α ヘリックス、チロシンベースの AP 動員、CD4 結合部位、酸性クラスター、プロリンベースのリピート、PAK 結合ドメイン、COP I 動員ドメイン、ジロイシンベースの AP 動員ドメイン、V-ATPase 及び Raf-1 結合ドメイン、もしくはそれらの任意の組み合わせにおける 1 つ以上の変異、または表 11 に示されるアミノ酸残基のいずれかにおける 1 つ以上の変異を含む。いくつかの実施形態では、変異は、挿入、欠失、点変異（複数可）、及び／または転位を含む。いくつかの実施形態では、変異体 Nef は、配列番号 18～22 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、変異体 Nef は、(i) aa2～4、aa8～10、aa11～13、aa38～40、aa44～46、aa47～49、aa50～52、aa53～55、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～100、aa107～109、aa110～112、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、aa178～179、179～181aa、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa191～193、aa194～196、aa203～205、aa206～208、aa212～214、aa215～217、aa218～220、aa221～223、aa8～13、aa44～67、aa107～112、aa164～196、aa203～208、もしくは aa212～223、(ii) aa2～4、aa44～46、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～100、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa44～67、aa164～169、aa176～181、aa185～190、(iii) aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、178～179aa、aa179～181、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、もしくは aa164～190、ま

20

30

40

50

たは (i v) a a 2 ~ 4、a a 5 6 ~ 5 8、a a 5 9 ~ 6 1、a a 6 2 ~ 6 4、a a 6 5 ~ 6 7、a a 1 0 7 ~ 1 0 9、a a 1 3 7 ~ 1 3 9、a a 1 5 2 ~ 1 5 4、a a 1 6 4 ~ 1 6 6、a a 1 6 7 ~ 1 6 9、a a 1 7 6 ~ 1 7 8、a a 1 7 8 ~ 1 7 9、a a 1 7 9 ~ 1 8 1、a a 1 8 5 ~ 1 8 7、a a 1 8 8 ~ 1 9 0、a a 1 9 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a a 5 6 ~ 6 7、a a 1 6 4 ~ 1 6 9、a a 1 7 6 ~ 1 8 1、もしくは a a 1 8 5 ~ 1 9 0 のいずれかのアミノ酸残基（ここで、アミノ酸残基の位置は、野生型 S I V N e f のものに対応する）における 1 つ以上の変異を含む、変異体 S I V N e f である。

いくつかの実施形態では、変異体 N e f は、修飾 T 細胞における内在性 C D 4 及び／または C D 2 8 に対する下方調節作用（例えば、細胞表面発現の下方制御）を、野生型 N e f タンパク質と比較して低減させる。いくつかの実施形態では、内在性 C D 4 及び／または C D 2 8 の細胞表面発現の下方制御は、少なくとも約 5 0 %、約 6 0 %、約 7 0 %、約 8 0 %、約 9 0 %、または約 9 5 % 低減する。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）をコードする第 1 の核酸を含む修飾 T 細胞は、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体をコードする第 2 の核酸をさらに含む。

いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）の発現は、機能的な外因性受容体（例えば、工学操作された T C R（例えば、従来の工学操作された T C R、キメラ T C R（c T C R））、T A C、T A C 様キメラ受容体、または C A R（例えば、抗体ベースの C A R、リガンド／受容体ベースの C A R、または A C T R）など）を下方調節する（例えば、細胞表面発現を下方制御する）ことはない。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体（例えば、工学操作された T C R（例えば、従来の工学操作された T C R、キメラ T C R（c T C R））、T A C、T A C 様キメラ受容体、または C A R（例えば、抗体ベースの C A R、リガンド／受容体ベースの C A R、または A C T R）など）は、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）により、最大で約 5 0 %、約 4 0 %、約 3 0 %、約 2 0 %、約 1 0 %、または約 5 % 下方調節される（例えば、細胞表面発現が下方制御される）。いくつかの実施形態では、変異体 N e f（例えば、変異体 S I V N e f）は、内在性 T C R（例えば、T C R α 及び／または T C R β ）の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、変異体 N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f）は、内在性 T C R（例えば、T C R α 及び／または T C R β ）の細胞表面発現を、野生型 N e f による下方制御と比べて約 3 % 以下（例えば約 2 % 以下または約 1 % 以下）の差で下方制御する。いくつかの実施形態では、変異体 N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f）は、内在性 T C R（例えば、T C R α 及び／または T C R β ）の細胞表面発現を、野生型 N e f による下方制御と比べて少なくとも約 3 %（3 % を含む、例えば少なくとも約 3 %、約 4 %、約 5 %、約 6 %、約 7 %、約 8 %、約 9 %、約 1 0 %、約 2 0 %、約 3 0 %、約 4 0 %、約 5 0 %、約 6 0 %、約 7 0 %、約 8 0 %、約 9 0 %、または約 9 5 %）大きく下方制御する。いくつかの実施形態では、変異体 N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f）は、C D 4 の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、変異体 N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f）は、C D 4 の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、変異体 N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f）は、C D 4 の細胞表面発現を、野生型 N e f による下方制御と比べて少なくとも約 3 %（例えば少なくとも約 4 %、約 5 %、約 6 %、約 7 %、約 8 %、約 9 %、約 1 0 %、約 2 0 %、約 3 0 %、約 4 0 %、約 5 0 %、約 6 0 %、約 7 0 %、約 8 0 %、約 9 0 %、または約 9 5 %）小さく下方制御する。いくつかの実施形態では、変異体 N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f）は、C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、変異体 N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f）は、C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、変異体 N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f）は、C D 2 8 の細胞表面発現を、野生型 N e f による下方制御と比べて少なくとも約 3 %（例えば少なくとも約 4 %、約 5 %、約 6 %、約 7 %、約 8 %、約 9 %、約 1 0 %、約 2 0 %

、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%)小さく下方制御する。いくつかの実施形態では、変異体Nefタンパク質(例えば、変異体SIV Nef)は、内在性TCR(例えば、TCR α 及び/またはTCR β)の細胞表面発現を、野生型Nefによる下方制御と比べて約3%以下(例えば約2%以下または約1%以下)の差で下方制御し(または、内在性TCR(例えば、TCR α 及び/またはTCR β)の細胞表面発現を、野生型Nefによる下方制御と比べて少なくとも約3%(3%を含む、例えば少なくとも約3%、約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%)大きく下方制御し)、CD4及び/またはCD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、変異体Nefタンパク質(例えば、変異体SIV Nef)は、内在性TCR(例えば、TCR α 及び/またはTCR β)の細胞表面発現を、野生型Nefによる下方制御と比べて約3%以下(例えば約2%以下または約1%以下)の差で下方制御し(または、内在性TCR(例えば、TCR α 及び/またはTCR β)の細胞表面発現を、野生型Nefによる下方制御と比べて少なくとも約3%(3%を含む、例えば少なくとも約3%、約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%)大きく下方制御し)、CD4及び/またはCD28の細胞表面発現を、野生型Nefによる下方制御と比べて少なくとも約3%(例えば少なくとも約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%)小さく下方制御する。いくつかの実施形態では、変異体Nefタンパク質(例えば、変異体SIV Nef)は、内在性TCR(例えば、TCR α 及び/またはTCR β)の細胞表面発現を下方制御するが、機能的な外因性受容体(例えば、工学操作されたTCR(例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR(cTCR))、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR(例えば、抗体ベースのCAR、リガンド/受容体ベースのCAR、またはACTR))を下方調節する(例えば、細胞表面発現を下方制御する)ことではない。いくつかの実施形態では、変異体Nefタンパク質(例えば、変異体SIV Nef)は、野生型Nefによる下方制御と比べて最大で約3%(例えば最大で約2%または約1%)の差で、内在性TCR(例えば、TCR α 及び/またはTCR β)の細胞表面発現を下方制御し、機能的な外因性受容体(例えば、工学操作されたTCR(例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR(cTCR))、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR(例えば、抗体ベースのCAR、リガンド/受容体ベースのCAR、またはACTR))の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、変異体Nefタンパク質(例えば、変異体SIV Nef)は、野生型Nefによる下方制御と比べて少なくとも約3%(例えば少なくとも約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%)少なく、内在性TCR(例えば、TCR α 及び/またはTCR β)の細胞表面発現を下方制御し、機能的な外因性受容体(例えば、工学操作されたTCR(例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR(cTCR))、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR(例えば、抗体ベースのCAR、リガンド/受容体ベースのCAR、またはACTR))の細胞表面発現を下方制御する。

【0074】

いくつかの実施形態では、Nefタンパク質(例えば、野生型Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef)をコードする第1の核酸と、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体をコードする第2の核酸とを含む、修飾T細胞(例えば、同種T細胞)であって、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体は、工学操作されたTCR(例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR(cTCR))である。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体は、T細胞抗原結合体(TAC)またはTAC様キメラ受容体である

。いくつかの実施形態では、機能的・外因性受容体は、CAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR）である。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCR、CD4、及びCD28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCRの細胞表面発現を下方制御するが、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCR及びCD4の細胞表面発現を下方制御するが、CD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCR及びCD28の細胞表面発現を下方制御するが、CD4の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、内在性TCRの細胞表面発現を下方制御するが、外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））を下方調節する（例えば、細胞表面発現を下方制御する）ことはない。いくつかの実施形態では、機能的・外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））は、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）により、最大で約50%、約40%、約30%、約20%、約10%、または約5%下方調節される（例えば、細胞表面発現が下方制御される）。

【0075】

いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）をコードする第1の核酸と、機能的キメラTCR（cTCR）をコードする第2の核酸とを含む、修飾T細胞（例えば、同種T細胞）であって、機能的キメラTCRが、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する1つ以上（例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数）の結合部分（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択のリンカー、（c）第1のTCRサブユニット（例えば、CD3ε）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、（d）第2のTCRサブユニット（例えば、CD3ε）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び（e）第3のTCRサブユニット（例えば、CD3ε）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットが全て、TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ、及びCD3δからなる群から選択され、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、1つ以上の結合部分は、抗体またはその抗原結合性断片である。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットは同じ（例えば、全てCD3ε）である。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットは異なっている。いくつかの実施形態では、cTCRは、そのTCRサブユニットの細胞外ドメイン（またはその一部分）を（またはいかなるTCRサブユニットの細胞外ドメインも）含まない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）をコードする第1の核酸と、機能的キメラTCR（cTCR）をコードする第2の核

酸とを含む、修飾T細胞（例えば、同種T細胞）であって、機能的キメラTCRが、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する1つ以上（例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数）の結合部分（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択のリンカー、及び（c）完全長CD3ε（シグナルペプチドを除く）を含み、Neftタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、cTCRは、配列番号64のアミノ酸配列を含む抗CD20 cTCRである。いくつかの実施形態では、cTCRは、細胞外リガンド結合ドメインのC末端と膜貫通ドメインのN末端との間に位置するヒンジドメインをさらに含む。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、CD8αに由来する。いくつかの実施形態では、cTCRは、cTCRのN末端に位置するシグナルペプチド、例えばCD8αに由来するシグナルペプチドをさらに含む。いくつかの実施形態では、Neftタンパク質（例えば、変異体SIV Neftなどの変異体Neft）は、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、Neftタンパク質（例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft）は、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、Neftタンパク質（例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft）は、TCR、CD4、及びCD28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、Neftタンパク質（例えば、変異体SIV Neftなどの変異体Neft）は、TCRの細胞表面発現を下方制御するが、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Neftタンパク質（例えば、変異体SIV Neftなどの変異体Neft）は、TCR及びCD4の細胞表面発現を下方制御するが、CD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Neftタンパク質（例えば、変異体SIV Neftなどの変異体Neft）は、TCR及びCD28の細胞表面発現を下方制御するが、CD4の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Neftタンパク質（例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft）は、内在性TCRの細胞表面発現を下方制御するが、cTCRを下方調節する（例えば、細胞表面発現を下方制御する）ことではない。いくつかの実施形態では、機能的cTCRは、Neftタンパク質（例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft）により、最大で約50%、約40%、約30%、約20%、約10%、または約5%下方調節される（例えば、細胞表面発現が下方制御される）。

【0076】

いくつかの実施形態では、Neftタンパク質（例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft）をコードする第1の核酸と、機能的T細胞抗原結合体（TAC）をコードする第2の核酸とを含む、修飾T細胞（例えば、同種T細胞）であって、機能的T細胞抗原結合体が、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）TCRサブユニット（例えば、CD3ε）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、（e）第1のTCR共受容体（例えば、CD4）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、（f）第2のTCR共受容体（例えば、CD4）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び（g）第3のTCR共受容体（例えば、CD4）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、TCRサブユニットが、TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ、及びCD3δからなる群から選択され、第1、第2、及び第3のTCR共受容体が全て、CD4、CD8、及びCD28からなる群から選択され、Neftタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCR共受容体は同じである。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCR共受容体は異なって

いる。いくつかの実施形態では、TACは、そのTCR共受容体の細胞外ドメイン（またはその一部分）を（またはいかなるTCR共受容体の細胞外ドメインも）含まない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）をコードする第1の核酸と、機能的T細胞抗原結合体（TAC）をコードする第2の核酸とを含む、修飾T細胞（例えば、同種T細胞）であって、機能的T細胞抗原結合体が、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）TCRサブユニット（例えば、CD3ε）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、（e）CD4の細胞外ドメインまたはその一部分、（f）CD4の膜貫通ドメイン、及び（g）CD4の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、TCRサブユニットが、TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ、及びCD3δからなる群から選択され、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、TACは、配列番号66のアミノ酸配列を含む抗CD20 TACである。いくつかの実施形態では、TACは、細胞外リガンド結合ドメインのC末端と膜貫通ドメインのN末端との間に位置するヒンジドメインをさらに含む。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、CD8αに由来する。いくつかの実施形態では、TACは、TACのN末端に位置するシグナルペプチド、例えばCD8αに由来するシグナルペプチドをさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、細胞外TCR結合ドメインのN末端にある。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、細胞外TCR結合ドメインのC末端にある。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCR、CD4、及びCD28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCRの細胞表面発現を下方制御するが、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCR及びCD4の細胞表面発現を下方制御するが、CD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCR及びCD28の細胞表面発現を下方制御するが、CD4の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、内在性TCRの細胞表面発現を下方制御するが、TACを下方調節する（例えば、細胞表面発現を下方制御する）ことではない。いくつかの実施形態では、機能的TACは、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）により、最大で約50%、約40%、約30%、約20%、約10%、または約5%下方調節される（例えば、細胞表面発現が下方制御される）。

【0077】

いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）をコードする第1の核酸と、機能的TAC様キメラ受容体をコードする第2の核酸とを含む、修飾T細胞（例えば、同種T細胞）であって、機能的TAC様キメラ受容体が、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）第1のTCRサブユニット（例えば、TCRα）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、（e）第2のTCRサブユニ

ット（例えば、CD3ε）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、（f）第3のTCRサブユニット（例えば、CD3ε）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び（g）第4のTCRサブユニット（例えば、CD3ε）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットが全て、TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ、及びCD3δからなる群から選択され、Neftタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じである。いくつかの実施形態では、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じである。いくつかの実施形態では、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは異なっている。いくつかの実施形態では、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じであるが、第1のTCRサブユニットとは異なっている。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、細胞外TCR結合ドメインのN末端にある。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、細胞外TCR結合ドメインのC末端にある。いくつかの実施形態では、Neftタンパク質（例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft）をコードする第1の核酸と、機能的TAC様キメラ受容体をコードする第2の核酸とを含む、修飾T細胞（例えば、同種T細胞）であって、機能的TAC様キメラ受容体が、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）TCRサブユニット（例えば、TCRα）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、及び（e）完全長CD3ε（シグナルペプチドを除く）を含み、TCRサブユニットが、TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ、及びCD3δからなる群から選択され、Neftタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受容体は、そのTCRサブユニットの細胞外ドメイン（またはその一部分）を（またはいかなるTCRサブユニットの細胞外ドメインも）含まない。いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受容体は、細胞外リガンド結合ドメインのC末端と膜貫通ドメインのN末端との間に位置するヒンジドメインをさらに含む。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、CD8αに由来する。いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受容体は、TAC様キメラ受容体のN末端に位置するシグナルペプチド、例えばCD8αに由来するシグナルペプチドをさらに含む。いくつかの実施形態では、Neftタンパク質（例えば、変異体SIV Neftなどの変異体Neft）は、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、Neftタンパク質（例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft）は、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、Neftタンパク質（例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft）は、TCR、CD4、及びCD28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、Neftタンパク質（例えば、変異体SIV Neftなどの変異体Neft）は、TCRの細胞表面発現を下方制御するが、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Neftタンパク質（例えば、変異体SIV Neftなどの変異体Neft）は、TCR及びCD4の細胞表面発現を下方制御するが、CD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Neftタンパク質（例えば、変異体SIV Neftなどの変異体Neft）は、TCR及びCD28の細胞表面発現を下方制御するが、CD4の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Neftタンパク質（例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft）は、内在性TCRの細胞表面発現を下方制御するが、TAC様キメラ受容体を下方調節する（例えば、細胞表面発現を下方制御する）ことではない。いくつかの実施形態では、機能的TAC様キメラ受容体は、Neftタンパク質（例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft）により、最大で約50%、約40%、

約 30%、約 20%、約 10%、または約 5% 下方調節される（例えば、細胞表面発現が下方制御される）。

【0078】

いくつかの実施形態では、Nef タンパク質（例えば、wt Nef、または変異体 S I V Nef などの変異体 Nef）をコードする第 1 の核酸と、機能的 CAR をコードする第 2 の核酸とを含む、修飾 T 細胞（例えば、同種 T 細胞）であって、機能的 CAR が、

（a）抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）を特異的に認識する 1 つ以上（例えば 1、2、3、4、5、6 またはそれ以上のいずれかの数）の結合部分（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）膜貫通ドメイン、及び（c）細胞内シグナル伝達ドメインを含み、Nef タンパク質が発現すると、修飾 T 細胞の内在性 TCR が下方調節される、修飾 T 細胞が提供される。いくつかの実施形態では、Nef タンパク質（例えば、変異体 S I V Nef などの変異体 Nef）は、CD4 及び／または CD28 の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、Nef タンパク質（例えば、wt Nef、または変異体 S I V Nef などの変異体 Nef）は、CD4 及び／または CD28 の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、Nef タンパク質（例えば、wt Nef、または変異体 S I V Nef などの変異体 Nef）は、TCR、CD4、及び CD28 の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、Nef タンパク質（例えば、変異体 S I V Nef などの変異体 Nef）は、TCR の細胞表面発現を下方制御するが、CD4 及び／または CD28 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nef タンパク質（例えば、変異体 S I V Nef などの変異体 Nef）は、TCR 及び CD4 の細胞表面発現を下方制御するが、CD28 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nef タンパク質（例えば、変異体 S I V Nef などの変異体 Nef）は、TCR 及び CD28 の細胞表面発現を下方制御するが、CD4 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nef タンパク質（例えば、wt Nef、または変異体 S I V Nef などの変異体 Nef）は、内在性 TCR の細胞表面発現を下方制御するが、CAR を下方調節する（例えば、細胞表面発現を下方制御する）ことではない。いくつかの実施形態では、CAR は、Nef タンパク質（例えば、wt Nef、または変異体 S I V Nef などの変異体 Nef）により、最大で約 50%、約 40%、約 30%、約 20%、約 10%、または約 5% 下方調節される（例えば、細胞表面発現が下方制御される）。いくつかの実施形態では、1 つ以上の結合部分は、抗体またはその抗原結合性断片である。いくつかの実施形態では、1 つ以上の結合部分は、ラクダ Ig、Ig NAR、Fab 断片、Fab' 断片、F(ab)'₂ 断片、F(ab)'₃ 断片、Fv、一本鎖 Fv 抗体（scFv）、bis-scFv、(scFv)₂、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ジスルフィド安定化 Fv タンパク質（dsFv）、及び単ドメイン抗体（sdAb、ナノボディ）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、1 つ以上の結合部分は、sdAb（例えば、抗 BCMA sdAb）である。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、2 つ以上の sdAb がひとつに結合したものを含む。いくつかの実施形態では、1 つ以上の結合部分は、scFv（例えば、抗 CD19 scFv、抗 CD20 scFv、または CD19×CD20 scFv）である。いくつかの実施形態では、1 つ以上の結合部分は、リガンドに由来する少なくとも 1 つのドメインまたは受容体の細胞外ドメインを含み、このリガンドまたは受容体は、細胞表面抗原である。いくつかの実施形態では、リガンドまたは受容体は、NKG2A、NKG2C、NKG2F、NKG2D、BCMA、APRIL、BAFF、IL-3、IL-13、LLT1、AICL、DNAM-1、及び NKp80 からなる群から選択される分子に由来する。いくつかの実施形態では、リガンドは、APRIL または BAFF に由来する。いくつかの実施形態では、受容体は、Fc 受容体の細胞外ドメインなどの Fc 結合ドメインに由来する。いくつかの実施形態では、Fc 受容体は、Fcγ 受容体（FcγR）である。いくつかの実施形態では、FcγR は、CD16A（FcγRIIa）、CD16B（FcγRIIb）、CD64A、CD64B、CD64C、CD32

10

20

30

40

50

A、及びCD32Bからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、抗原は、メン
 テリン、TSHR、CD19、CD123、CD22、CD30、CD171、CS-1
 、CLL-1、CD33、EGFRvIII、GD2、GD3、BCMA、Tn Ag、
 前立腺特異的膜抗原（PSMA）、ROR1、FLT3、FAP、TAG72、CD38
 、CD44v6、CEA、EPCAM、B7H3、KIT、IL-13Ra2、インター
 ロイキン-11受容体a（IL-11Ra）、PSCA、PRSS21、VEGFR2、
 Lewis Y、CD24、血小板由来増殖因子受容体ベータ（PDGFRベータ）、SS
 EA-4、CD20、葉酸受容体アルファ、ERBB2（Her2/neu）、MUC1
 、上皮増殖因子受容体（EGFR）、NCAM、プロステアゼ、PAP、ELF2M、エ
 フリンB2、IGF-I受容体、CAIX、LMP2、gp100、bcr-abl、チ
 ロシナーゼ、EphA2、フコシルGM1、sLe、GM3、TGS5、HMWMAA、
 オアセチル-GD2、葉酸受容体ベータ、TEM1/CD248、TEM7R、CLDN
 N6、CLDN18.2、GPRC5D、CXORF61、CD97、CD179a、A
 LK、ポリシアル酸、PLAC1、GloboH、NY-BR-1、UPK2、HAVC
 R1、ADRB3、PANX3、GPR20、LY6K、OR51E2、TARP、WT
 1、NY-ESO-1、LAGE-1a、MAGE-A1、レグマイン、HPV E6、
 E7、MAGE A1、ETV6-AML、精子タンパク質17、XAGE1、Tie
 2、MAD-CT-1、MAD-CT-2、Fos関連抗原1、p53、p53変異体、
 プロステイン、サバイビン及びテロメラゼ、PCTA-1/ガレクチン8、メラニン/
 MART1、Ras変異体、hTERT、肉腫転座切断点、ML-IAP、ERG（TM
 PRSS2 ETS融合遺伝子）、NA17、PAX3、アンドロゲン受容体、サイクリ
 ンB1、MYCN、Rhoc、TRP-2、CYP1B1、BORIS、SART3、P
 AX5、OY-TES1、LCK、AKAP-4、SSX2、RAGE-1、ヒトテロメ
 ラゼ逆転写酵素、RU1、RU2、腸内カルボキシルエステラーゼ、mut hsp7
 0-2、CD79a、CD79b、CD72、LAIR1、FCAR、LILRA2、C
 D300LF、CLEC12A、BST2、EMR2、LY75、GPC3、FCRL5
 、及びIGLL1、ならびにそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。いく
 つかの実施形態では、抗原は、BCMA、CD19、またはCD20である。

【0079】

いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体S
 IV Nefなどの変異体Nef）をコードする第1の核酸と、機能的CARをコードす
 る第2の核酸とを含む、修飾T細胞（例えば、同種T細胞）であって、機能的CARが、
 （a）1つ以上（例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数）の抗B
 CMA sdAbを含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）膜貫通ドメイン、及び（c）
 細胞内シグナル伝達ドメインを含み、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内
 在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、下方
 調節は、内在性TCRの細胞表面発現を下方制御することを含む。いくつかの実施形態で
 は、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、CD4
 及び/またはCD28の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、Nef
 タンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef
 ）は、CD4及び/またはCD28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態
 では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）
 は、TCR、CD4、及びCD28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態
 では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCRの細胞表面発現を下方制御するが、CD4及び/またはCD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCR及びCD4の細胞表面発現を下方制御するが、CD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCR及びCD28の細胞表面発現を下方制御するが、CD4の細胞表面発現を下方制御する

ことはない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、内在性 T C R の細胞表面発現を下方制御するが、C A R を下方調節する（例えば、細胞表面発現を下方制御する）ことはない。いくつかの実施形態では、C A R は、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）により、最大で約 50 %、約 40 %、約 30 %、約 20 %、約 10 %、または約 5 % 下方調節される（例えば、細胞表面発現が下方制御される）。

【0080】

いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）をコードする第 1 の核酸と、機能的 C A R をコードする第 2 の核酸とを含む、修飾 T 細胞（例えば、同種 T 細胞）であって、機能的 C A R が、（a）1 つ以上（例えば 1、2、3、4、5、6 またはそれ以上のいずれかの数）の抗 C D 19 s c F v を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）膜貫通ドメイン、及び（c）細胞内シグナル伝達ドメインを含み、N e f タンパク質が発現すると、修飾 T 細胞の内在性 T C R が下方調節される、修飾 T 細胞が提供される。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）をコードする第 1 の核酸と、機能的 C A R をコードする第 2 の核酸とを含む、修飾 T 細胞（例えば、同種 T 細胞）であって、機能的 C A R が、（a）1 つ以上（例えば 1、2、3、4、5、6 またはそれ以上のいずれかの数）の抗 C D 20 s c F v を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）膜貫通ドメイン、及び（c）細胞内シグナル伝達ドメインを含み、N e f タンパク質が発現すると、修飾 T 細胞の内在性 T C R が下方調節される、修飾 T 細胞が提供される。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）をコードする第 1 の核酸と、機能的 C A R をコードする第 2 の核酸とを含む、修飾 T 細胞（例えば、同種 T 細胞）であって、機能的 C A R が、（a）抗 C D 20 s c F v に直接的または間接的に（例えば、リンカーを介して）融合した抗 C D 19 s c F v を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）膜貫通ドメイン、及び（c）細胞内シグナル伝達ドメインを含み、N e f タンパク質が発現すると、修飾 T 細胞の内在性 T C R が下方調節される、修飾 T 細胞が提供される。いくつかの実施形態では、下方調節は、内在性 T C R の細胞表面発現を下方制御することを含む。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、C D 4 及び／または C D 28 の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、C D 4 及び／または C D 28 の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、T C R、C D 4、及び C D 28 の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、T C R の細胞表面発現を下方制御するが、C D 4 及び／または C D 28 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、T C R 及び C D 4 の細胞表面発現を下方制御するが、C D 28 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、内在性 T C R の細胞表面発現を下方制御するが、C A R を下方調節する（例えば、細胞表面発現を下方制御する）ことはない。いくつかの実施形態では、C A R は、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）により、最大で約 50 %、約 40 %、約 30 %、約 20 %、約 10 %、または約 5 % 下方調節される（例えば、細胞表面発現が下方制御される）。

【0081】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、内在性TCRの細胞表面発現は、少なくとも約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%下方制御される。いくつかの実施形態では、内在性MHC、CD3ε、CD3γ、及び／またはCD3δの細胞表面発現は、Neftタンパク質（例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft）により、少なくとも約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%下方制御される。いくつかの実施形態では、Neftタンパク質（例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft）は、CD3ζを下方調節する（例えば、発現を下方制御する）ことはないか、または、CD3ζを最大で約50%、約40%、約30%、約20%、約10%、もしくは約5%下方調節する。いくつかの実施形態では、Neftタンパク質（例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft）の発現は、機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR）など）を下方調節する（例えば、細胞表面発現を下方制御する）ことはない。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR）など）は、Neftタンパク質により、最大で約50%、約40%、約30%、約20%、約10%、または約5%下方調節される（例えば、細胞表面発現が下方制御される）。

10

20

【0082】

いくつかの実施形態では、Neft（例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft）を発現する修飾T細胞は、未修飾の内在性TCR座位を含む。いくつかの実施形態では、Neftを発現する修飾T細胞は、TCRαまたはTCRβなどの修飾された内在性TCR座位を含む。いくつかの実施形態では、内在性TCR座位は、CRISPR-Cas、TALEN、及びZFNから選択される遺伝子編集システムによって修飾される。いくつかの実施形態では、内在性TCR座位は、配列番号23の核酸配列を含むgRNAを含むCRISPR-Casシステムによって修飾される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集システムをコードする核酸（複数可）と、Neftタンパク質（例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft）をコードする第1の核酸とは、同じベクター上にある。いくつかの実施形態では、遺伝子編集システムをコードする核酸（複数可）と、Neftタンパク質をコードする第1の核酸とは、異なるベクター上にある。

30

【0083】

いくつかの実施形態では、Neftタンパク質は、SIV Neft、HIV1 Neft、HIV2 Neft、及びそれらの相同体からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、Neftタンパク質は、野生型Neftである。いくつかの実施形態では、Neftタンパク質は、配列番号12～17のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Neftタンパク質は、変異体Neftである。いくつかの実施形態では、変異体Neftは、ミリスチル化部位、N末端αヘリックス、チロシンベースのAP動員、CD4結合部位、酸性クラスター、プロリンベースのリピート、PAK結合ドメイン、COP I動員ドメイン、ジロイシンベースのAP動員ドメイン、V-ATPase及びRaf-1結合ドメイン、もしくはそれらの任意の組み合わせにおける1つ以上の変異、または表11に示されるアミノ酸残基のいずれかにおける1つ以上の変異を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の変異は、挿入、欠失、点変異（複数可）、及び／または転位を含む。いくつかの実施形態では、変異体Neftタンパク質は、変異体SIV Neftタンパク質である。いくつかの実施形態では、変異体Neftは、配列番号18～22のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、変異体Neftは、(i) aa2～4、aa8～10、aa11～13、aa38～40、aa44～46、aa47～49、aa50～52、aa53～55、aa56～58、aa59～61、aa62～64、

40

50

a a 6 5 ~ 6 7、a a 9 8 ~ 1 0 0、a a 1 0 7 ~ 1 0 9、a a 1 1 0 ~ 1 1 2、a a 1
 3 7 ~ 1 3 9、a a 1 5 2 ~ 1 5 4、a a 1 6 4 ~ 1 6 6、a a 1 6 7 ~ 1 6 9、a a 1
 7 0 ~ 1 7 2、a a 1 7 3 ~ 1 7 5、a a 1 7 6 ~ 1 7 8、a a 1 7 8 ~ 1 7 9、1 7 9
 ~ 1 8 1 a a、a a 1 8 2 ~ 1 8 4、a a 1 8 5 ~ 1 8 7、a a 1 8 8 ~ 1 9 0、a a 1
 9 1 ~ 1 9 3、a a 1 9 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a a 2 0 6 ~ 2 0 8、a a 2
 1 2 ~ 2 1 4、a a 2 1 5 ~ 2 1 7、a a 2 1 8 ~ 2 2 0、a a 2 2 1 ~ 2 2 3、a a 8
 ~ 1 3、a a 4 4 ~ 6 7、a a 1 0 7 ~ 1 1 2、a a 1 6 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0
 8、もしくは a a 2 1 2 ~ 2 2 3、(i i) a a 2 ~ 4、a a 4 4 ~ 4 6、a a 5 6 ~ 5
 8、a a 5 9 ~ 6 1、a a 6 2 ~ 6 4、a a 6 5 ~ 6 7、a a 9 8 ~ 1 0 0、a a 1 0 7
 ~ 1 0 9、a a 1 3 7 ~ 1 3 9、a a 1 5 2 ~ 1 5 4、a a 1 6 4 ~ 1 6 6、a a 1 6 7
 ~ 1 6 9、a a 1 7 6 ~ 1 7 8、a a 1 7 8 ~ 1 7 9、a a 1 7 9 ~ 1 8 1、a a 1 8 5
 ~ 1 8 7、a a 1 8 8 ~ 1 9 0、a a 1 9 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a a 4 4 ~
 6 7、a a 1 6 4 ~ 1 6 9、a a 1 7 6 ~ 1 8 1、a a 1 8 5 ~ 1 9 0、(i i i) a a
 2 ~ 4、a a 5 6 ~ 5 8、a a 5 9 ~ 6 1、a a 6 2 ~ 6 4、a a 6 5 ~ 6 7、a a 1 0
 7 ~ 1 0 9、a a 1 3 7 ~ 1 3 9、a a 1 5 2 ~ 1 5 4、a a 1 6 4 ~ 1 6 6、a a 1 6
 7 ~ 1 6 9、a a 1 7 0 ~ 1 7 2、a a 1 7 3 ~ 1 7 5、a a 1 7 6 ~ 1 7 8、1 7 8 ~
 1 7 9 a a、a a 1 7 9 ~ 1 8 1、a a 1 8 2 ~ 1 8 4、a a 1 8 5 ~ 1 8 7、a a 1 8
 8 ~ 1 9 0、a a 1 9 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a a 5 6 ~ 6 7、もしくは a a
 1 6 4 ~ 1 9 0、または (i v) a a 2 ~ 4、a a 5 6 ~ 5 8、a a 5 9 ~ 6 1、a a 6
 2 ~ 6 4、a a 6 5 ~ 6 7、a a 1 0 7 ~ 1 0 9、a a 1 3 7 ~ 1 3 9、a a 1 5 2 ~ 1
 5 4、a a 1 6 4 ~ 1 6 6、a a 1 6 7 ~ 1 6 9、a a 1 7 6 ~ 1 7 8、a a 1 7 8 ~ 1
 7 9、a a 1 7 9 ~ 1 8 1、a a 1 8 5 ~ 1 8 7、a a 1 8 8 ~ 1 9 0、a a 1 9 4 ~ 1
 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a a 5 6 ~ 6 7、a a 1 6 4 ~ 1 6 9、a a 1 7 6 ~ 1 8 1
 、もしくは a a 1 8 5 ~ 1 9 0 のいずれかのアミノ酸残基（ここで、アミノ酸残基の位置
 は、野生型 S I V N e f のものに対応する）における 1 つ以上の変異を含む、変異体 S
 I V N e f である。いくつかの実施形態では、変異体 N e f は、修飾 T 細胞における内
 在性 C D 4 及び／または C D 2 8 に対する下方調節作用（例えば、細胞表面発現の下方制
 御）を、野生型 N e f タンパク質と比較して低減させる。いくつかの実施形態では、内在
 性 C D 4 及び／または C D 2 8 の細胞表面発現の下方制御は、少なくとも約 5 0 %、約 6
 0 %、約 7 0 %、約 8 0 %、約 9 0 %、または約 9 5 % 低減する。いくつかの実施形態で
 は、変異体 N e f（例えば、変異体 S I V N e f）は、内在性 T C R（例えば、T C R
 α 及び／または T C R β）の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、変
 異体 N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f）は、内在性 T C R（例えば、T
 C R α 及び／または T C R β）の細胞表面発現を、野生型 N e f による下方制御と比べて
 約 3 % 以下（例えば約 2 % 以下または約 1 % 以下）の差で下方制御する。いくつかの実施
 形態では、変異体 N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f）は、内在性 T C R
 （例えば、T C R α 及び／または T C R β）の細胞表面発現を、野生型 N e f による下方
 制御と比べて少なくとも約 3 %（3 % を含む、例えば少なくとも約 3 %、約 4 %、約 5 %
 、約 6 %、約 7 %、約 8 %、約 9 %、約 1 0 %、約 2 0 %、約 3 0 %、約 4 0 %、約 5 0
 %、約 6 0 %、約 7 0 %、約 8 0 %、約 9 0 %、または約 9 5 %）大きく下方制御する。
 いくつかの実施形態では、変異体 N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f）は
 、C D 4 の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、変異体 N e f タン
 パク質（例えば、変異体 S I V N e f）は、C D 4 の細胞表面発現を下方制御する。い
 くつかの実施形態では、変異体 N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f）は、
 C D 4 の細胞表面発現を、野生型 N e f による下方制御と比べて少なくとも約 3 %（例え
 ば少なくとも約 4 %、約 5 %、約 6 %、約 7 %、約 8 %、約 9 %、約 1 0 %、約 2 0 %、
 約 3 0 %、約 4 0 %、約 5 0 %、約 6 0 %、約 7 0 %、約 8 0 %、約 9 0 %、または約 9
 5 %）小さく下方制御する。いくつかの実施形態では、変異体 N e f タンパク質（例えば
 、変異体 S I V N e f）は、C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実
 施形態では、変異体 N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f）は、C D 2 8 の

細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、変異体N e fタンパク質（例えば、変異体S I V N e f）は、C D 2 8の細胞表面発現を、野生型N e fによる下方制御と比べて少なくとも約3%（例えば少なくとも約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%）小さく下方制御する。いくつかの実施形態では、変異体N e fタンパク質（例えば、変異体S I V N e f）は、内在性T C R（例えば、T C R α及び／またはT C R β）の細胞表面発現を、野生型N e fによる下方制御と比べて約3%以下（例えば約2%以下または約1%以下）の差で下方制御し（または、内在性T C R（例えば、T C R α及び／またはT C R β）の細胞表面発現を、野生型N e fによる下方制御と比べて少なくとも約3%（3%を含む、例えば少なくとも約3%、約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%）大きく下方制御し）、C D 4及び／またはC D 2 8の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、変異体N e fタンパク質（例えば、変異体S I V N e f）は、内在性T C R（例えば、T C R α及び／またはT C R β）の細胞表面発現を、野生型N e fによる下方制御と比べて約3%以下（例えば約2%以下または約1%以下）の差で下方制御し（または、内在性T C R（例えば、T C R α及び／またはT C R β）の細胞表面発現を、野生型N e fによる下方制御と比べて少なくとも約3%（3%を含む、例えば少なくとも約3%、約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%）大きく下方制御し）、C D 4及び／またはC D 2 8の細胞表面発現を、野生型N e fによる下方制御と比べて少なくとも約3%（例えば少なくとも約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%）小さく下方制御する。いくつかの実施形態では、変異体N e fタンパク質（例えば、変異体S I V N e f）は、内在性T C R（例えば、T C R α及び／またはT C R β）の細胞表面発現を下方制御するが、機能的・外因性受容体（例えば、工学操作されたT C R（例えば、従来の工学操作されたT C R、キメラT C R（c T C R））、T A C、T A C様キメラ受容体、またはC A R（例えば、抗体ベースのC A R、リガンド／受容体ベースのC A R、またはA C T R））を下方調節する（例えば、細胞表面発現を下方制御する）ことではない。いくつかの実施形態では、変異体N e fタンパク質（例えば、変異体S I V N e f）は、野生型N e fによる下方制御と比べて最大で約3%（例えば最大で約2%または約1%）の差で、内在性T C R（例えば、T C R α及び／またはT C R β）の細胞表面発現を下方制御し、機能的・外因性受容体（例えば、工学操作されたT C R（例えば、従来の工学操作されたT C R、キメラT C R（c T C R））、T A C、T A C様キメラ受容体、またはC A R（例えば、抗体ベースのC A R、リガンド／受容体ベースのC A R、またはA C T R））の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、変異体N e fタンパク質（例えば、変異体S I V N e f）は、野生型N e fによる下方制御と比べて少なくとも約3%（例えば少なくとも約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%）少なく、内在性T C R（例えば、T C R α及び／またはT C R β）の細胞表面発現を下方制御し、機能的・外因性受容体（例えば、工学操作されたT C R（例えば、従来の工学操作されたT C R、キメラT C R（c T C R））、T A C、T A C様キメラ受容体、またはC A R（例えば、抗体ベースのC A R、リガンド／受容体ベースのC A R、またはA C T R））の細胞表面発現を下方制御する。

【0084】

いくつかの実施形態では、N e fタンパク質は、アミノ酸変異（例えば、アミノ酸置換、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び10のいずれかの数のアミノ酸残基のA l aへの変異のような、1つ以上のA l aへの変異）を、表11に記載されるアミノ酸変異部位のいずれかに含む、変異体S I V N e fである。いくつかの実施形態では

、変異体 S I V N e f は、変異（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び 10 のいずれかの数のアミノ酸残基の A l a への変異のような、1つ以上の A l a への変異）を、表 11 に記載される同じ群に属する、最大 2、3、4、5、6、7、8、9、及び 10 のいずれかの数のアミノ酸変異部位に含む。いくつかの実施形態では、変異（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び 10 のいずれかの数のアミノ酸残基の A l a への変異のような、1つ以上の A l a への変異）は、表 11 に記載されるアミノ酸変異部位の 1 つのみにある。いくつかの実施形態では、変異（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び 10 のいずれかの数のアミノ酸残基の A l a への変異のような、1つ以上の A l a への変異）は、表 11 に記載される同じ群に属する、2 つ以上のアミノ酸変異部位にある。いくつかの実施形態では、変異は、連続した 2 つ以上のアミノ酸変異部位にあり、ここで、2 つ以上のアミノ酸変異部位は、表 11 に記載される同じ群に属する（例えば、群 3 の a a 1 8 5 ~ 1 8 7 及び a a 1 8 8 ~ 1 9 0 における変異）。いくつかの実施形態では、変異は、1 つ以上のアミノ酸変異部位における全てのアミノ酸残基の変異（例えば、全ての A l a への変異）であり、ここで、アミノ酸変異部位は、表 11 に記載される同じ群に属する（例えば、群 3 の a a 1 8 5 ~ 1 8 7 及び a a 1 8 8 ~ 1 9 0 における全ての残基の A l a への変異）。いくつかの実施形態では、変異は、第 1 のアミノ酸変異部位における 1 つのアミノ酸残基の変異（例えば、A l a への変異）、及び第 2 のアミノ酸変異部位における別のアミノ酸残基の変異（例えば、A l a への変異）であり、ここで、2 つのアミノ酸変異部位は、表 11 に記載される同じ群に属する。いくつかの実施形態では、変異は近接している。すなわち、少なくとも 2 つの変異部位が互いの近くにある（例えば、変異した残基が a a 8 ~ 1 0 及び a a 1 1 ~ 1 3 にある）。いくつかの実施形態では、変異は近接していない。すなわち、変異部位は互いの近くにない（例えば、変異した残基が a a 8 ~ 1 0 及び a a 4 4 ~ 4 6 にある）。

【0085】

いくつかの実施形態では、N e f タンパク質は、内在性 T C R（例えば、T C R α 及び／または T C R β）の細胞表面発現を下方制御する変異体 S I V N e f である。いくつかの実施形態では、変異体 N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f）は、内在性 T C R（例えば、T C R α 及び／または T C R β）の細胞表面発現を、野生型 N e f による下方制御と比べて約 3 % 以下（例えば約 2 % 以下または約 1 % 以下）の差で下方制御する。いくつかの実施形態では、変異体 N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f）は、内在性 T C R（例えば、T C R α 及び／または T C R β）の細胞表面発現を、野生型 N e f による下方制御と比べて少なくとも約 3 %（3 % を含む、例えば少なくとも約 3 %、約 4 %、約 5 %、約 6 %、約 7 %、約 8 %、約 9 %、約 10 %、約 20 %、約 30 %、約 40 %、約 50 %、約 60 %、約 70 %、約 80 %、約 90 %、または約 95 %）大きく下方制御する。例えば、いくつかの実施形態では、N e f タンパク質は、1 つ以上（例えば 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 のいずれかの数、または最大 2、3、4、5、6、7、8、9、10 もしくはそれ以上のいずれかの数）のアミノ酸変異（例えば、A l a への変異のようなアミノ酸置換）を、a a 2 ~ 4、a a 8 ~ 10、a a 1 1 ~ 1 3（例えば、a a 8 ~ 1 3）、a a 3 8 ~ 40、a a 4 4 ~ 46、a a 4 7 ~ 49、a a 5 0 ~ 52、a a 5 3 ~ 55、a a 5 6 ~ 58、a a 5 9 ~ 61、a a 6 2 ~ 64、a a 6 5 ~ 67（例えば、a a 4 4 ~ 67）、a a 9 8 ~ 100、a a 1 0 7 ~ 109、a a 1 1 0 ~ 112（例えば、a a 1 0 7 ~ 112）、a a 1 3 7 ~ 139、a a 1 5 2 ~ 154、a a 1 6 4 ~ 166、a a 1 6 7 ~ 169、a a 1 7 0 ~ 172、a a 1 7 3 ~ 175、a a 1 7 6 ~ 178、a a 1 7 8 ~ 179、179 ~ 181 a a、a a 1 8 2 ~ 184、a a 1 8 5 ~ 187、a a 1 8 8 ~ 190、a a 1 9 1 ~ 193、a a 1 9 4 ~ 196（例えば、a a 1 6 4 ~ 196）、a a 2 0 3 ~ 205、a a 2 0 6 ~ 208（例えば、a a 2 0 3 ~ 208）、a a 2 1 2 ~ 214、a a 2 1 5 ~ 217、a a 2 1 8 ~ 220、a a 2 2 1 ~ 223（例えば、a a 2 1 2 ~ 223）のいずれかのアミノ酸残基（ここで、アミノ酸残基の位置は、野生型 S I V N e f のものに対応する）に含む、変異体 S I V N e f である。いくつかの実施形態では、変異（例えば、1、2、3、4

、5、6、7、8、9、及び10のいずれかの数のアミノ酸残基のAlaへの変異のような、1つ以上のAlaへの変異)は、最大2、3、4、5、6、7、8、9、及び10のいずれかの数のアミノ酸変異部位にある(例えば、変異した残基がaa8~10及びaa44~46にある)。いくつかの実施形態では、変異(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び10のいずれかの数のアミノ酸残基のAlaへの変異のような、1つ以上のAlaへの変異)は、1つのアミノ酸変異部位のみ(例えば、aa8~10のみ)にある。いくつかの実施形態では、変異(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び10のいずれかの数のアミノ酸残基のAlaへの変異のような、1つ以上のAlaへの変異)は、2つ以上のアミノ酸変異部位にある。いくつかの実施形態では、変異は近接している。すなわち、少なくとも2つのアミノ酸変異部位が互いの隣りにある(例えば、変異した残基がaa8~10及びaa11~13にある)。いくつかの実施形態では、変異は近接していない。すなわち、アミノ酸変異部位は互いの近くにない(例えば、変異した残基がaa8~10及びaa44~46にある)。いくつかの実施形態では、変異は、1つ以上のアミノ酸変異部位における全てのアミノ酸残基の変異(例えば、全てのAlaへの変異)である。いくつかの実施形態では、変異は、第1のアミノ酸変異部位における1つのアミノ酸残基の変異(例えば、Alaへの変異)、及び第2のアミノ酸変異部位における別のアミノ酸残基の変異(例えば、Alaへの変異)である。

【0086】

いくつかの実施形態では、Nefタンパク質は、内在性TCR(例えば、TCRα及び/またはTCRβ)及びCD4の細胞表面発現を下方制御する変異体SIV Nefであり、ここで、内在性TCR(例えば、TCRα及び/またはTCRβ)細胞表面発現の変異体SIV Nefによる下方制御は、野生型SIV Nefによる下方制御と比べて約3%以下(例えば約2%以下または約1%以下)異なり(小さく、または大きく)、CD4細胞表面発現の変異体SIV Nefによる下方制御は、野生型SIV Nefによる下方制御と比べて少なくとも約3%(例えば少なくとも約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%)小さい。いくつかの実施形態では、変異体Nefタンパク質(例えば、変異体SIV Nef)は、内在性TCR(例えば、TCRα及び/またはTCRβ)の細胞表面発現を、野生型Nefによる下方制御と比べて少なくとも約3%(3%を含む、例えば少なくとも約3%、約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%)大きく下方制御し、CD4の細胞表面発現を、野生型Nefによる下方制御と比べて少なくとも約3%(例えば少なくとも約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%)小さく下方制御する。いくつかの実施形態では、変異体SIV Nefは、TCRαβ細胞表面発現を下方制御するが、CD4細胞表面発現を下方制御することはない。例えば、いくつかの実施形態では、Nefタンパク質は、1つ以上(例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10のいずれかの数、または最大2、3、4、5、6、7、8、9、10もしくはそれ以上のいずれかの数)のアミノ酸変異(例えば、Alaへの変異のようなアミノ酸置換)を、aa2~4、aa44~46、aa56~58、aa59~61、aa62~64、aa65~67(例えば、aa44~67)、aa98~100、aa107~109、aa137~139、aa152~154、aa164~166、aa167~169(例えば、aa164~169)、aa176~178、aa178~179、aa179~181(例えば、aa176~181)、aa185~187、aa188~190(例えば、aa185~190)、aa194~196、aa203~205のいずれかのアミノ酸残基(ここで、アミノ酸残基の位置は、野生型SIV Nefのものに対応する)を含む、変異体SIV Nefである。いくつかの実施形態では、変異(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び10のいずれかの数のアミノ酸残基のAlaへの変異のような、1つ以上のAlaへの変異)は、最大2、3、4、5、6、7、8、

10

20

30

40

50

9、及び10のいずれかの数のアミノ酸変異部位にある（例えば、変異した残基が a a 2 ~ 4 及び a a 4 4 ~ 4 6 にある）。いくつかの実施形態では、変異（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び10のいずれかの数のアミノ酸残基の A l a への変異のような、1つ以上の A l a への変異）は、1つのアミノ酸変異部位のみ（例えば、a a 2 ~ 4 のみ）にある。いくつかの実施形態では、変異（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び10のいずれかの数のアミノ酸残基の A l a への変異のような、1つ以上の A l a への変異）は、2つ以上のアミノ酸変異部位にある。いくつかの実施形態では、変異は近接している。すなわち、少なくとも2つのアミノ酸変異部位が互いの隣りにある（例えば、変異した残基が a a 6 2 ~ 6 4 及び a a 6 5 ~ 6 7 にある）。いくつかの実施形態では、変異は近接していない。すなわち、アミノ酸変異部位は互いの近くでない（例えば、変異した残基が a a 2 ~ 4 及び a a 4 4 ~ 4 6 にある）。いくつかの実施形態では、変異は、1つ以上のアミノ酸変異部位における全てのアミノ酸残基の変異（例えば、全ての A l a への変異）である。いくつかの実施形態では、変異は、第1のアミノ酸変異部位における1つのアミノ酸残基の変異（例えば、A l a への変異）、及び第2のアミノ酸変異部位における別のアミノ酸残基の変異（例えば、A l a への変異）である。

【0087】

いくつかの実施形態では、N e f タンパク質は、内在性 T C R（例えば、T C R α 及び／または T C R β）及び C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御する変異体 S I V N e f であり、ここで、内在性 T C R（例えば、T C R α 及び／または T C R β）細胞表面発現の変異体 S I V N e f による下方制御は、野生型 S I V N e f による下方制御と比べて約3%以下（例えば約2%以下または約1%以下）異なり（小さく、または大きく）、C D 2 8 細胞表面発現の変異体 S I V N e f による下方制御は、野生型 S I V N e f による下方制御と比べて少なくとも約3%（例えば少なくとも約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%）小さい。いくつかの実施形態では、変異体 N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f）は、内在性 T C R（例えば、T C R α 及び／または T C R β）の細胞表面発現を、野生型 N e f による下方制御と比べて少なくとも約3%（3%を含む、例えば少なくとも約3%、約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%）大きく下方制御し、C D 2 8 の細胞表面発現を、野生型 N e f による下方制御と比べて少なくとも約3%（例えば少なくとも約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%）小さく下方制御する。いくつかの実施形態では、変異体 S I V N e f は、T C R α β 細胞表面発現を下方制御するが、C D 2 8 細胞表面発現を下方制御することはない。例えば、いくつかの実施形態では、N e f タンパク質は、1つ以上（例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10のいずれかの数、または最大2、3、4、5、6、7、8、9、10もしくはそれ以上のいずれかの数）のアミノ酸変異（例えば、A l a への変異のようなアミノ酸置換）を、a a 2 ~ 4、a a 5 6 ~ 5 8、a a 5 9 ~ 6 1、a a 6 2 ~ 6 4、a a 6 5 ~ 6 7（例えば、a a 5 6 ~ 6 7）、a a 1 0 7 ~ 1 0 9、a a 1 3 7 ~ 1 3 9、a a 1 5 2 ~ 1 5 4、a a 1 6 4 ~ 1 6 6、a a 1 6 7 ~ 1 6 9、a a 1 7 0 ~ 1 7 2、a a 1 7 3 ~ 1 7 5、a a 1 7 6 ~ 1 7 8、1 7 8 ~ 1 7 9 a a、a a 1 7 9 ~ 1 8 1、a a 1 8 2 ~ 1 8 4、a a 1 8 5 ~ 1 8 7、a a 1 8 8 ~ 1 9 0（例えば、a a 1 6 4 ~ 1 9 0）、a a 1 9 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5 のいずれかのアミノ酸残基（ここで、アミノ酸残基の位置は、野生型 S I V N e f のものに対応する）に含む、変異体 S I V N e f である。いくつかの実施形態では、変異（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び10のいずれかの数のアミノ酸残基の A l a への変異のような、1つ以上の A l a への変異）は、最大2、3、4、5、6、7、8、9、及び10のいずれかの数のアミノ酸変異部位にある（例えば、変異した残基が a a 2 ~ 4 及び a a 5 6 ~ 5 8 にある）。いくつかの実施形態では、変異（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、

10

20

30

40

50

及び10のいずれかの数のアミノ酸残基のAlaへの変異のような、1つ以上のAlaへの変異)は、1つのアミノ酸変異部位のみ(例えば、aa2~4のみ)にある。いくつかの実施形態では、変異(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び10のいずれかの数のアミノ酸残基のAlaへの変異のような、1つ以上のAlaへの変異)は、2つ以上のアミノ酸変異部位にある。いくつかの実施形態では、変異は近接している。すなわち、少なくとも2つのアミノ酸変異部位が互いの隣りにある(例えば、変異した残基がaa62~64及びaa65~67にある)。いくつかの実施形態では、変異は近接していない。すなわち、アミノ酸変異部位は互いの近くでない(例えば、変異した残基がaa2~4及びaa62~64にある)。いくつかの実施形態では、変異は、1つ以上のアミノ酸変異部位における全てのアミノ酸残基の変異(例えば、全てのAlaへの変異)である。いくつかの実施形態では、変異は、第1のアミノ酸変異部位における1つのアミノ酸残基の変異(例えば、Alaへの変異)、及び第2のアミノ酸変異部位における別のアミノ酸残基の変異(例えば、Alaへの変異)である。

10

【0088】

いくつかの実施形態では、Nefタンパク質は、内在性TCR(例えば、TCRα及び/またはTCRβ)、CD4、及びCD28の細胞表面発現を下方制御する変異体SIV Nefである。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質は、内在性TCR(例えば、TCRα及び/またはTCRβ)、CD4、及びCD28の細胞表面発現を下方制御する変異体SIV Nefであり、ここで、内在性TCR(例えば、TCRα及び/またはTCRβ)細胞表面発現の変異体SIV Nefによる下方制御は、野生型SIV Nefによる下方制御と比べて約3%以下(例えば約2%以下または約1%以下)異なり(小さく、または大きく)、CD4及びCD28細胞表面発現の変異体SIV Nefによる下方制御は、野生型SIV Nefによる下方制御と比べて少なくとも約3%(例えば少なくとも約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%)小さい。いくつかの実施形態では、変異体Nefタンパク質(例えば、変異体SIV Nef)は、内在性TCR(例えば、TCRα及び/またはTCRβ)の細胞表面発現を、野生型Nefによる下方制御と比べて少なくとも約3%(3%を含む、例えば少なくとも約3%、約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%)大きく下方制御し、CD4及びCD28の細胞表面発現を、野生型Nefによる下方制御と比べて少なくとも約3%(例えば少なくとも約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%)小さく下方制御する。例えば、いくつかの実施形態では、Nefタンパク質は、1つ以上(例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10のいずれかの数、または最大2、3、4、5、6、7、8、9、10もしくはそれ以上のいずれかの数)のアミノ酸変異(例えば、Alaへの変異のようなアミノ酸置換)を、aa2~4、aa56~58、aa59~61、aa62~64、aa65~67(例えば、aa56~67)、aa107~109、aa137~139、aa152~154、aa164~166、aa167~169(例えば、aa164~169)、aa176~178、aa178~179、aa179~181(例えば、aa176~181)、aa185~187、aa188~190(例えば、aa185~190)、aa194~196、aa203~205のいずれかのアミノ酸残基(ここで、アミノ酸残基の位置は、野生型SIV Nefのものに対応する)に含む、変異体SIV Nefである。いくつかの実施形態では、変異(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び10のいずれかの数のアミノ酸残基のAlaへの変異のような、1つ以上のAlaへの変異)は、最大2、3、4、5、6、7、8、9、及び10のいずれかの数のアミノ酸変異部位にある(例えば、変異した残基がaa2~4及びaa56~58にある)。いくつかの実施形態では、変異(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び10のいずれかの数のアミノ酸残基のAlaへの変異のような、1つ以上のAlaへの変異)は

20

30

40

50

、1つのアミノ酸変異部位のみ（例えば、a a 2～4のみ）にある。いくつかの実施形態では、変異（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び10のいずれかの数のアミノ酸残基のA l aへの変異のような、1つ以上のA l aへの変異）は、2つ以上のアミノ酸変異部位にある。いくつかの実施形態では、変異は近接している。すなわち、少なくとも2つのアミノ酸変異部位が互いの隣りにある（例えば、変異した残基がa a 6 2～6 4及びa a 6 5～6 7にある）。いくつかの実施形態では、変異は近接していない。すなわち、アミノ酸変異部位は互いの近くにない（例えば、変異した残基がa a 2～4及びa a 6 5～6 7にある）。いくつかの実施形態では、変異は、1つ以上のアミノ酸変異部位における全てのアミノ酸残基の変異（例えば、全てのA l aへの変異）である。いくつかの実施形態では、変異は、第1のアミノ酸変異部位における1つのアミノ酸残基の変異（例えば、A l aへの変異）、及び第2のアミノ酸変異部位における別のアミノ酸残基の変異（例えば、A l aへの変異）である。

10

【0089】

いくつかの実施形態では、N e fタンパク質は、T C R α β 細胞表面発現を、野生型S I V N e fと比べて大きく（例えば少なくとも約3%、約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%大きく）下方制御するが、C D 4及びC D 2 8細胞表面発現の下方制御は野生型S I V N e fと比較して小さい（例えば少なくとも約3%、約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%小さい）、変異体S I V N e fである。例えば、いくつかの実施形態では、N e fタンパク質は、1つ2つのアミノ酸変異（例えば、一方または両方のアミノ酸のA l aへの変異のようなアミノ酸置換）を、アミノ酸残基1 7 8～1 7 9 a a（ここで、アミノ酸残基の位置は、野生型S I V N e fのものに対応する）に含む、変異体S I V N e fである。いくつかの実施形態では、変異体S I V N e fは、配列番号18のアミノ酸配列を含む。

20

【0090】

いくつかの実施形態では、第1の核酸と第2の核酸とは、別々のベクター上にある。いくつかの実施形態では、第1の核酸と第2の核酸とは、同じベクター上にある。いくつかの実施形態では、第1の核酸と第2の核酸とは、同じプロモーターに作動可能に連結している。いくつかの実施形態では、第1の核酸と第2の核酸とは、異なるプロモーターに作動可能に連結している。いくつかの実施形態では、プロモーターは、ラウス肉腫ウイルス（R S V）プロモーター、サルウイルス40（S V 40）プロモーター、サイトメガロウイルス最初期遺伝子プロモーター（C M V I E）、伸長因子1アルファプロモーター（E F 1- α ）、ホスホグリセリン酸キナーゼ1（P G K）プロモーター、ユビキチンC（U B Q-C）プロモーター、サイトメガロウイルスエンハンサー／ニワトリベータアクチン（C A G）プロモーター、ポリオーマエンハンサー／単純ヘルペスチミジンキナーゼ（M C 1）プロモーター、ベータアクチン（ β -A C T）プロモーター、「骨髓増殖性肉腫ウイルスエンハンサー、陰性対照領域欠失、d 1 5 8 7 r e vプライマー結合部位置換（M N D）」プロモーター、N F A Tプロモーター、T E T O N（登録商標）プロモーター、及びN F κ Bプロモーターからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、プロモーターは、E F 1- α またはP G Kである。いくつかの実施形態では、第1の核酸は、第2の核酸の上流にある。いくつかの実施形態では、第1の核酸は、第2の核酸の下流にある。いくつかの実施形態では、第1の核酸と第2の核酸とは、連結配列を介して結合している。いくつかの実施形態では、連結配列は、P 2 A、T 2 A、E 2 A、F 2 A、B m C P V 2 A、B m I F V 2 A、(G S)_n、(G S G G S)_n、(G G G S)_n、(G G G G S)_nをコードする核酸配列、またはI R E S、S V 40、C M V、U B C、E F 1 α 、P G K、C A G Gの核酸配列、またはそれらの任意の組み合わせ（式中、nは、少なくとも1の整数である）のいずれかを含む。

30

40

【0091】

50

いくつかの実施形態では、ベクターは、ウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、及びそれらの誘導体からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ベクターは、エピソーム発現ベクター、改良エピソームベクター（Enhanced Episomal Vector）（EEV）、PiggyBackトランスポサナーゼベクター、またはSleeping Beauty（SB）トランスポゾンシステムなどの非ウイルスベクターである。

【0092】

いくつかの実施形態では、Ne fを発現する修飾T細胞は、組織不適合性の個体において、GvHD応答を誘発しないか、または修飾T細胞の起源となる前駆体T細胞のドナーから単離された初代T細胞によって誘発されるGvHD応答と比較して低減したGvHD応答を誘発する。

【0093】

いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質（例えば、wt Ne f、または変異体SIV Ne fなどの変異体Ne f）をコードする第1の核酸と、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体をコードする第2の核酸とを含む、修飾T細胞（例えば、同種T細胞）であって、第1の核酸と第2の核酸とが、同じベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）上にあり、Ne fタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体は、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））である。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体は、TACまたはTAC様キメラ受容体である。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体は、CAR（例えば、抗抗原CAR、リガンド／受容体ベースのCAR、ACTR）である。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体は、一価かつ単一特異性である。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体は、多価かつ単一特異性である。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体は、多価かつ多重特異性である。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質（例えば、wt Ne f、または変異体SIV Ne fなどの変異体Ne f）をコードする第1の核酸と、機能的CARをコードする第2の核酸とを含む、修飾T細胞（例えば、同種T細胞）であって、機能的CARが、（a）抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）を特異的に認識する1つ以上（例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数）の結合部分（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）膜貫通ドメイン、及び（c）細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1の核酸と第2の核酸とが、同じベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）上にあり、Ne fタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質（例えば、wt Ne f、または変異体SIV Ne fなどの変異体Ne f）をコードする第1の核酸と、機能的CARをコードする第2の核酸とを含む、修飾T細胞（例えば、同種T細胞）であって、機能的CARが、（a）1つ以上（例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数）の抗BCMA sdAbを含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）膜貫通ドメイン、及び（c）細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1の核酸と第2の核酸とが、同じベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）上にあり、Ne fタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質（例えば、wt Ne f、または変異体SIV Ne fなどの変異体Ne f）をコードする第1の核酸と、機能的キメラTCR（cTCR）をコードする第2の核酸とを含む、修飾T細胞（例えば、同種T細胞）であって、機能的キメラTCRが、腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択のリンカー、（c

10

20

30

40

50

) 第 1 の T C R サブユニット (例えば、C D 3 ε) の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、(d) 第 2 の T C R サブユニット (例えば、C D 3 ε) の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び (e) 第 3 の T C R サブユニット (例えば、C D 3 ε) の細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第 1、第 2、及び第 3 の T C R サブユニットが全て、T C R α、T C R β、T C R γ、T C R δ、C D 3 ε、C D 3 γ、及び C D 3 δ からなる群から選択され、第 1 の核酸と第 2 の核酸とが、同じベクター (例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター) 上にあり、N e f タンパク質が発現すると、修飾 T 細胞の内在性 T C R が下方調節される、修飾 T 細胞が提供される。いくつかの実施形態では、第 1、第 2、及び第 3 の T C R サブユニットは同じ (例えば、全て C D 3 ε) である。いくつかの実施形態では、第 1、第 2、及び第 3 の T C R サブユニットは異なっている。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質 (例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) をコードする第 1 の核酸と、機能的キメラ T C R (c T C R) をコードする第 2 の核酸とを含む、修飾 T 細胞 (例えば、同種 T 細胞) であって、機能的キメラ T C R が、腫瘍抗原 (例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0) の 1 つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片 (例えば、s d A b、s c F v) を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 任意選択のリンカー、及び (c) 完全長 C D 3 ε (シグナルペプチドを除く) を含み、第 1、第 2、及び第 3 の T C R サブユニットが全て、T C R α、T C R β、T C R γ、T C R δ、C D 3 ε、C D 3 γ、及び C D 3 δ からなる群から選択され、第 1 の核酸と第 2 の核酸とが、同じベクター (例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター) 上にあり、N e f タンパク質が発現すると、修飾 T 細胞の内在性 T C R が下方調節される、修飾 T 細胞が提供される。いくつかの実施形態では、c T C R は、配列番号 6 4 のアミノ酸配列を含む抗 C D 2 0 c T C R である。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質 (例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) をコードする第 1 の核酸と、機能的 T 細胞抗原結合体 (T A C) をコードする第 2 の核酸とを含む、修飾 T 細胞 (例えば、同種 T 細胞) であって、機能的 T 細胞抗原結合体が、(a) 腫瘍抗原 (例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0) の 1 つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片 (例えば、s d A b、s c F v) を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 任意選択の第 1 のリンカー、(c) T C R サブユニット (例えば、C D 3 ε) の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外 T C R 結合ドメイン、(d) 任意選択の第 2 のリンカー、(e) 第 1 の T C R 共受容体 (例えば、C D 4) の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、(f) 第 2 の T C R 共受容体 (例えば、C D 4) の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び (g) 第 3 の T C R 共受容体 (例えば、C D 4) の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、T C R サブユニットが、T C R α、T C R β、T C R γ、T C R δ、C D 3 ε、C D 3 γ、及び C D 3 δ からなる群から選択され、第 1、第 2、及び第 3 の T C R 共受容体が全て、C D 4、C D 8、及び C D 2 8 からなる群から選択され、第 1 の核酸と第 2 の核酸とが、同じベクター (例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター) 上にあり、N e f タンパク質が発現すると、修飾 T 細胞の内在性 T C R が下方調節される、修飾 T 細胞が提供される。いくつかの実施形態では、第 1、第 2、及び第 3 の T C R 共受容体は同じである。いくつかの実施形態では、第 1、第 2、及び第 3 の T C R 共受容体は異なっている。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質 (例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) をコードする第 1 の核酸と、機能的 T 細胞抗原結合体 (T A C) をコードする第 2 の核酸とを含む、修飾 T 細胞 (例えば、同種 T 細胞) であって、機能的 T 細胞抗原結合体が、(a) 腫瘍抗原 (例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0) の 1 つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片 (例えば、s d A b、s c F v) を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 任意選択の第 1 のリンカー、(c) T C R サブユニット (例えば、C D 3 ε) の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外 T C R 結合ドメイン、(d) 任意選択の第 2 のリンカー、(e) C D 4 の細胞外ドメインまたはその一部分、(f) C D 4 の膜貫通ドメイン、及び (g) C D 4 の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、T C R サブ

ニットが、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択され、第1の核酸と第2の核酸とが、同じベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）上にあり、Ne fタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、TACは、配列番号66のアミノ酸配列を含む抗CD20 TACである。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質（例えば、wt Ne f、または変異体SIV Ne fなどの変異体Ne f）をコードする第1の核酸と、機能的TAC様キメラ受容体をコードする第2の核酸とを含む、修飾T細胞（例えば、同種T細胞）であって、機能的TAC様キメラ受容体が、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）第1のTCRサブユニット（例えば、TCR α ）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、（e）第2のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、（f）第3のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び（g）第4のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットが全て、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択され、第1の核酸と第2の核酸とが、同じベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）上にあり、Ne fタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質（例えば、wt Ne f、または変異体SIV Ne fなどの変異体Ne f）をコードする第1の核酸と、機能的TAC様キメラ受容体をコードする第2の核酸とを含む、修飾T細胞（例えば、同種T細胞）であって、機能的TAC様キメラ受容体が、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）TCRサブユニット（例えば、TCR α ）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、及び（e）完全長CD3 ϵ （シグナルペプチドを除く）を含み、TCRサブユニットが、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択され、第1の核酸と第2の核酸とが、同じベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）上にあり、Ne fタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、Ne fを発現する修飾T細胞は、未修飾の内在性TCR座位を含む。いくつかの実施形態では、Ne fを発現する修飾T細胞は、TCR α またはTCR β などの修飾された内在性TCR座位を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子編集システムをコードする核酸（複数可）と、Ne fタンパク質をコードする第1の核酸とは、同じベクター上にある。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質は、SIV Ne f、HIV1 Ne f、HIV2 Ne f、及びそれらの相同体からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質は、野生型Ne fである。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質は、配列番号12～17のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質は、変異体Ne fで

ある。いくつかの実施形態では、変異体Ne fは、配列番号18～22のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、変異体Ne fは、表11に示されるアミノ酸残基のいずれかにおける1つ以上の変異を含む、変異体SIV Ne fである。いくつかの実施形態では、変異体Ne fは、（i）aa2～4、aa8～10、aa11～13、aa38～40、aa44～46、aa47～49、aa50～52、aa53～55、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～1

00、aa107~109、aa110~112、aa137~139、aa152~154、aa164~166、aa167~169、aa170~172、aa173~175、aa176~178、aa178~179、179~181aa、aa182~184、aa185~187、aa188~190、aa191~193、aa194~196、aa203~205、aa206~208、aa212~214、aa215~217、aa218~220、aa221~223、aa8~13、aa44~67、aa107~112、aa164~196、aa203~208、もしくはaa212~223、(ii)aa2~4、aa44~46、aa56~58、aa59~61、aa62~64、aa65~67、aa98~100、aa107~109、aa137~139、aa152~154、aa164~166、aa167~169、aa176~178、aa178~179、aa179~181、aa185~187、aa188~190、aa194~196、aa203~205、aa44~67、aa164~169、aa176~181、aa185~190、(iii)aa2~4、aa56~58、aa59~61、aa62~64、aa65~67、aa107~109、aa137~139、aa152~154、aa164~166、aa167~169、aa170~172、aa173~175、aa176~178、178~179aa、aa179~181、aa182~184、aa185~187、aa188~190、aa194~196、aa203~205、aa56~67、もしくはaa164~190、または(iv)aa2~4、aa56~58、aa59~61、aa62~64、aa65~67、aa107~109、aa137~139、aa152~154、aa164~166、aa167~169、aa176~178、aa178~179、aa179~181、aa185~187、aa188~190、aa194~196、aa203~205、aa56~67、aa164~169、aa176~181、もしくはaa185~190のいずれかのアミノ酸残基（ここで、アミノ酸残基の位置は、野生型SIV Nefのものに対応する）における1つ以上の変異を含む、変異体SIV Nefである。いくつかの実施形態では、第1の核酸と第2の核酸とは、同じプロモーターに作動可能に連結している。いくつかの実施形態では、第1の核酸は、第2の核酸の上流にある。いくつかの実施形態では、第1の核酸は、第2の核酸の下流にある。いくつかの実施形態では、ベクターは、ウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、野生型Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、野生型Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCR、CD4、及びCD28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCRの細胞表面発現を下方制御するが、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCR及びCD4の細胞表面発現を下方制御するが、CD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、野生型Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、内在性TCRの細胞表面発現を下方制御するが、機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））を下方調節する（例えば、細胞表面発現を下方制御する）ことではない。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベース

のCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR))は、Neftタンパク質(例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft)により、最大で約50%、約40%、約30%、約20%、約10%、または約5%下方調節される(例えば、細胞表面発現が下方制御される)。

【0094】

いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)を含む修飾T細胞(例えば、同種T細胞)であって、ベクターが、上流から下流に向かって、第1のプロモーター(例えば、EF1- α)と、Neftタンパク質(例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft)をコードする第1の核酸と、第2のプロモーター(例えば、PGK)と、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体(例えば、工学操作されたTCR(例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR(cTCR))、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR(例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR))をコードする第2の核酸とを含み、Neftタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)を含む修飾T細胞(例えば、同種T細胞)であって、ベクターが、上流から下流に向かって、第1のプロモーター(例えば、EF1- α)と、Neftタンパク質(例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft)をコードする第1の核酸と、第2のプロモーター(例えば、PGK)と、機能的CARをコードする第2の核酸であり、機能的CARが、(a)抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)を特異的に認識する1つ以上(例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数)の結合部分(例えば、sdAb、scFv)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)膜貫通ドメイン、及び(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸とを含み、Neftタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)を含む修飾T細胞(例えば、同種T細胞)であって、ベクターが、上流から下流に向かって、第1のプロモーター(例えば、EF1- α)と、Neftタンパク質(例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft)をコードする第1の核酸と、第2のプロモーター(例えば、PGK)と、機能的CARをコードする第2の核酸であり、機能的CARが、(a)1つ以上(例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数)の抗BCMA sdAbを含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)膜貫通ドメイン、及び(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸とを含み、Neftタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)を含む修飾T細胞(例えば、同種T細胞)であって、ベクターが、上流から下流に向かって、第1のプロモーター(例えば、EF1- α)と、Neftタンパク質(例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft)をコードする第1の核酸と、第2のプロモーター(例えば、PGK)と、機能的キメラTCR(cTCR)をコードする第2の核酸であり、機能的キメラTCRが、(a)腫瘍抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片(例えば、sdAb、scFv)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)任意選択のリンカー、(c)第1のTCRサブユニット(例えば、CD3 ϵ)の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、(d)第2のTCRサブユニット(例えば、CD3 ϵ)の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び(e)第3のTCRサブユニット(例えば、CD3 ϵ)の細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットが全て、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される、第2の核酸とを含み、Neftタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、

10

20

30

40

50

第1、第2、及び第3のTCRサブユニットは同じ（例えば、全てCD3ε）である。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットは異なっている。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を含む修飾T細胞（例えば、同種T細胞）であって、ベクターが、上流から下流に向かって、第1のプロモーター（例えば、EF1-α）と、Neftタンパク質（例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft）をコードする第1の核酸と、第2のプロモーター（例えば、PGK）と、機能的キメラTCR（cTCR）をコードする第2の核酸であり、機能的キメラTCRが、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択のリンカー、及び（c）完全長CD3ε（シグナルペプチドを除く）を含む、第2の核酸とを含み、Neftタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、cTCRは、配列番号64のアミノ酸配列を含む抗CD20 cTCRである。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を含む修飾T細胞（例えば、同種T細胞）であって、ベクターが、上流から下流に向かって、第1のプロモーター（例えば、EF1-α）と、Neftタンパク質（例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft）をコードする第1の核酸と、第2のプロモーター（例えば、PGK）と、機能的T細胞抗原結合体（TAC）をコードする第2の核酸であり、機能的T細胞抗原結合体が、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）TCRサブユニット（例えば、CD3ε）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、（e）第1のTCR共受容体（例えば、CD4）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、（f）第2のTCR共受容体（例えば、CD4）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び（g）第3のTCR共受容体（例えば、CD4）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、TCRサブユニットが、TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ、及びCD3δからなる群から選択され、第1、第2、及び第3のTCR共受容体が全て、CD4、CD8、及びCD28からなる群から選択される、第2の核酸とを含み、Neftタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCR共受容体は同じである。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCR共受容体は異なっている。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を含む修飾T細胞（例えば、同種T細胞）であって、ベクターが、上流から下流に向かって、第1のプロモーター（例えば、EF1-α）と、Neftタンパク質（例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft）をコードする第1の核酸と、第2のプロモーター（例えば、PGK）と、機能的T細胞抗原結合体（TAC）をコードする第2の核酸であり、機能的T細胞抗原結合体が、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）TCRサブユニット（例えば、CD3ε）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、（e）CD4の細胞外ドメインまたはその一部分、（f）CD4の膜貫通ドメイン、及び（g）CD4の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、TCRサブユニットが、TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ、及びCD3δからなる群から選択される、第2の核酸とを含み、Neftタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、TACは、配列番号66のアミノ酸配列を含む抗CD20 TACである。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を含む修飾

T細胞（例えば、同種T細胞）であって、ベクターが、上流から下流に向かって、第1のプロモーター（例えば、EF1- α ）と、Neftタンパク質（例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft）をコードする第1の核酸と、第2のプロモーター（例えば、PGK）と、機能的TAC様キメラ受容体をコードする第2の核酸であり、機能的TAC様キメラ受容体が、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）第1のTCRサブユニット（例えば、TCR α ）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、（e）第2のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、（f）第3のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び（g）第4のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットが全て、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される、第2の核酸とを含み、Neftタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じである。いくつかの実施形態では、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じである。いくつかの実施形態では、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは異なっている。いくつかの実施形態では、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じであるが、第1のTCRサブユニットとは異なっている。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を含む修飾T細胞（例えば、同種T細胞）であって、ベクターが、上流から下流に向かって、第1のプロモーター（例えば、EF1- α ）と、Neftタンパク質（例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft）をコードする第1の核酸と、第2のプロモーター（例えば、PGK）と、機能的TAC様キメラ受容体をコードする第2の核酸であり、機能的TAC様キメラ受容体が、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）TCRサブユニット（例えば、TCR α ）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、及び（e）完全長CD3 ϵ （シグナルペプチドを除く）を含み、TCRサブユニットが、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される、第2の核酸とを含む

み、Neftタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、Neftタンパク質は、SIV Neft、HIV1 Neft、HIV2 Neft、及びそれらの相同体からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、Neftタンパク質は、野生型Neftである。いくつかの実施形態では、Neftタンパク質は、配列番号12～17のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Neftタンパク質は、変異体Neftである。いくつかの実施形態では、変異体Neftは、配列番号18～22のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、変異体Neftは、表11に示されるアミノ酸残基のいずれかにおける1つ以上の変異を含む、変異体SIV Neftである。いくつかの実施形態では、変異体Neftは、（i）aa2～4、aa8～10、aa11～13、aa38～40、aa44～46、aa47～49、aa50～52、aa53～55、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～100、aa107～109、aa110～112、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、aa178～179、179～181aa、aa182～184、aa185～1

87、aa188～190、aa191～193、aa194～196、aa203～205、aa206～208、aa212～214、aa215～217、aa218～220、aa221～223、aa8～13、aa44～67、aa107～112、aa164～196、aa203～208、もしくはaa212～223、(ii)aa2～4、aa44～46、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～100、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa44～67、aa164～169、aa176～181、aa185～190、(iii)aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、178～179aa、aa179～181、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、もしくはaa164～190、または(iv)aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、aa164～169、aa176～181、もしくはaa185～190のいずれかのアミノ酸残基（ここで、アミノ酸残基の位置は、野生型SIV Nefのものに対応する）における1つ以上の変異を含む、変異体SIV Nefである。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、野生型Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、野生型Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCR、CD4、及びCD28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCRの細胞表面発現を下方制御するが、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCR及びCD4の細胞表面発現を下方制御するが、CD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCR及びCD28の細胞表面発現を下方制御するが、CD4の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、内在性TCRの細胞表面発現を下方制御するが、外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））を下方調節する（例えば、細胞表面発現を下方制御する）ことではない。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））は、Nefタンパク質（例えば、野生型Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）により、最大で約50%、約40%、約30%、約20%、約10%、または約5%下方調節される（例えば、細胞表面発現が下方制御される）。

【0095】

したがって、いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を含む修飾T細胞（例えば、同種T細胞）であって、ベクターが

、上流から下流に向かって、第2のプロモーター（例えば、EF1- α ）と、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））をコードする第2の核酸と、第1のプロモーター（例えば、PGK）と、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）をコードする第1の核酸とを含み、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を含む修飾T細胞（例えば、同種T細胞）であって、ベクターが、上流から下流に向かって、第2のプロモーター（例えば、EF1- α ）と、機能的CARをコードする第2の核酸であり、機能的CARが、（a）抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）を特異的に認識する1つ以上（例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数）の結合部分（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）膜貫通ドメイン、及び（c）細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸と、第1のプロモーター（例えば、PGK）と、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）をコードする第1の核酸とを含み、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を含む修飾T細胞（例えば、同種T細胞）であって、ベクターが、上流から下流に向かって、第2のプロモーター（例えば、EF1- α ）と、機能的CARをコードする第2の核酸であり、機能的CARが、（a）1つ以上（例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数）の抗BCMA sdAbを含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）膜貫通ドメイン、及び（c）細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸と、第1のプロモーター（例えば、PGK）と、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）をコードする第1の核酸とを含み、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を含む修飾T細胞（例えば、同種T細胞）であって、ベクターが、上流から下流に向かって、第2のプロモーター（例えば、EF1- α ）と、機能的キメラTCR（cTCR）をコードする第2の核酸であり、機能的キメラTCRが、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択のリンカー、（c）第1のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、（d）第2のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び（e）第3のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットが全て、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される、第2の核酸と、第1のプロモーター（例えば、PGK）と、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）をコードする第1の核酸とを含み、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットは同じ（例えば、全てCD3 ϵ ）である。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットは異なっている。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を含む修飾T細胞（例えば、同種T細胞）であって、ベクターが、上流から下流に向かって、第2のプロモーター（例えば、EF1- α ）と、機能的キメラTCR（cTCR）をコードする第2の核酸であり、機能的キメラTCRが、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識す

る抗原結合性断片（例えば、s d A b、s c F v）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択のリンカー、及び（c）完全長C D 3 ε（シグナルペプチドを除く）を含む、第2の核酸と、第1のプロモーター（例えば、P G K）と、N e fタンパク質（例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f）をコードする第1の核酸とを含み、N e fタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性T C Rが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、c T C Rは、配列番号64のアミノ酸配列を含む抗C D 2 0 c T C Rである。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を含む修飾T細胞（例えば、同種T細胞）であって、ベクターが、上流から下流に向かって、第2のプロモーター（例えば、E F 1 - α）と、機能的細胞抗原結合体（T A C）をコードする第2の核酸であり、機能的細胞抗原結合体が、（a）腫瘍抗原（例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、s d A b、s c F v）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）T C Rサブユニット（例えば、C D 3 ε）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外T C R結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、（e）第1のT C R共受容体（例えば、C D 4）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、（f）第2のT C R共受容体（例えば、C D 4）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び（g）第3のT C R共受容体（例えば、C D 4）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、T C Rサブユニットが、T C R α、T C R β、T C R γ、T C R δ、C D 3 ε、C D 3 γ、及びC D 3 δからなる群から選択され、第1、第2、及び第3のT C R共受容体が全て、C D 4、C D 8、及びC D 2 8からなる群から選択される、第2の核酸と、第1のプロモーター（例えば、P G K）と、N e fタンパク質（例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f）をコードする第1の核酸とを含み、N e fタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性T C Rが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のT C R共受容体は同じである。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のT C R共受容体は異なっている。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を含む修飾T細胞（例えば、同種T細胞）であって、ベクターが、上流から下流に向かって、第2のプロモーター（例えば、E F 1 - α）と、機能的細胞抗原結合体（T A C）をコードする第2の核酸であり、機能的細胞抗原結合体が、（a）腫瘍抗原（例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、s d A b、s c F v）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）T C Rサブユニット（例えば、C D 3 ε）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外T C R結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、（e）C D 4の細胞外ドメインまたはその一部分、（f）C D 4の膜貫通ドメイン、及び（g）C D 4の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、T C Rサブユニットが、T C R α、T C R β、T C R γ、T C R δ、C D 3 ε、C D 3 γ、及びC D 3 δからなる群から選択される、第2の核酸と、第1のプロモーター（例えば、P G K）と、N e fタンパク質（例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f）をコードする第1の核酸とを含み、N e fタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性T C Rが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、T A Cは、配列番号66のアミノ酸配列を含む抗C D 2 0 T A Cである。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を含む修飾T細胞（例えば、同種T細胞）であって、ベクターが、上流から下流に向かって、第2のプロモーター（例えば、E F 1 - α）と、機能的T A C様キメラ受容体をコードする第2の核酸であり、機能的T A C様キメラ受容体が、（a）腫瘍抗原（例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、s d A b、s c F v）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）第1のT C Rサブユニット（例えば、T C R α）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外T C R結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、（e）

第2のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、（f）第3のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び（g）第4のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットが全て、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される、第2の核酸と、第1のプロモーター（例えば、PGK）と、Ne fタンパク質（例えば、wt Ne f、または変異体SIV Ne fなどの変異体Ne f）をコードする第1の核酸とを含み、Ne fタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じである。いくつかの実施形態では、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは異なっている。いくつかの実施形態では、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じであるが、第1のTCRサブユニットとは異なっている。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を含む修飾T細胞（例えば、同種T細胞）であって、ベクターが、上流から下流に向かって、第2のプロモーター（例えば、EF1- α ）と、機能的TAC様キメラ受容体をコードする第2の核酸であり、機能的TAC様キメラ受容体が、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）TCRサブユニット（例えば、TCR α ）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、及び（e）完全長CD3 ϵ （シグナルペプチドを除く）を含み、TCRサブユニットが、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される、第2の核酸と、第1のプロモーター（例えば、PGK）と、Ne fタンパク質（例えば、wt Ne f、または変異体SIV Ne fなどの変異体Ne f）をコードする第1の核酸と

を含み、Ne fタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、第1のプロモーターと第2のプロモーターとは同じである。いくつかの実施形態では、第1のプロモーターと第2のプロモーターとは異なっている。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質は、SIV Ne f、HIV1 Ne f、HIV2 Ne f、及びそれらの相同体からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質は、野生型Ne fである。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質は、配列番号12～17のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質は、変異体Ne fである。いくつかの実施形態では、変異体Ne fは、配列番号18～22のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、変異体Ne fは、表11に示されるアミノ酸残基のいずれかにおける1つ以上の変異を含む、変異体SIV Ne fである。いくつかの実施形態では、変異体Ne fは、（i）aa2～4、aa8～10、aa11～13、aa38～40、aa44～46、aa47～49、aa50～52、aa53～55、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～100、aa107～109、aa110～112、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、aa178～179、179～181aa、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa191～193、aa194～196、aa203～205、aa206～208、aa212～214、aa215～217、aa218～220、aa221～223、aa8～13、aa44～67、aa107～112、aa164～196、aa203～208、もしくはaa212～223、（ii）aa2～4、aa44～46、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～

67、aa98～100、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa44～67、aa164～169、aa176～181、aa185～190、(iii)aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、178～179aa、aa179～181、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、もしくはaa164～190、または(iv)aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、aa164～169、aa176～181、もしくはaa185～190のいずれかのアミノ酸残基（ここで、アミノ酸残基の位置は、野生型SIV Nefのものに対応する）における1つ以上の変異を含む、変異体SIV Nefである。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCR、CD4、及びCD28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCRの細胞表面発現を下方制御するが、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCR及びCD4の細胞表面発現を下方制御するが、CD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCR及びCD28の細胞表面発現を下方制御するが、CD4の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、内在性TCRの細胞表面発現を下方制御するが、外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））を下方調節する（例えば、細胞表面発現を下方制御する）ことではない。いくつかの実施形態では、機能的外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））は、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）により、最大で約50%、約40%、約30%、約20%、約10%、または約5%下方調節される（例えば、細胞表面発現が下方制御される）。

【0096】

いくつかの実施形態では、第1の核酸と第2の核酸とは、同じプロモーター下で転写される。したがって、いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を含む修飾T細胞（例えば、同種T細胞）であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター（例えば、EF1- α ）と、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）をコードする第1の核酸と、第1の連結配列（例えば、IRESや、P2AまたはT2Aなどの自己切断性2Aペプチドをコードする配列）と、任意選択の第2の連結配列（例えば、（

(GGGS)₃ リンカーなどの可動性リンカーをコードする配列)と、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体(例えば、工学操作されたTCR(例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR(cTCR))、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR(例えば、抗体ベースのCAR、リガンド/受容体ベースのCAR、またはACTR))をコードする第2の核酸とを含み、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)を含む修飾T細胞(例えば、同種T細胞)であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター(例えば、EF1-α)と、Nefタンパク質(例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef)をコードする第1の核酸と、第1の連結配列IRESと、任意選択の第2の連結配列(例えば、(GGGS)₃ リンカーなどの可動性リンカーをコードする配列)と、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体(例えば、工学操作されたTCR(例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR(cTCR))、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR(例えば、抗体ベースのCAR、リガンド/受容体ベースのCAR、またはACTR))をコードする第2の核酸とを含み、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)を含む修飾T細胞(例えば、同種T細胞)であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター(例えば、EF1-α)と、Nefタンパク質(例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef)をコードする第1の核酸と、P2Aをコードする第1の連結配列と、任意選択の第2の連結配列(例えば、(GGGS)₃ リンカーなどの可動性リンカーをコードする配列)と、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体(例えば、工学操作されたTCR(例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR(cTCR))、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR(例えば、抗体ベースのCAR、リガンド/受容体ベースのCAR、またはACTR))をコードする第2の核酸とを含み、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)を含む修飾T細胞(例えば、同種T細胞)であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター(例えば、EF1-α)と、Nefタンパク質(例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef)をコードする第1の核酸と、第1の連結配列(例えば、IRES、またはP2AもしくはT2Aなどの自己切断性2Aペプチドをコードする核酸配列)と、任意選択の第2の連結配列(例えば、(GGGS)₃ リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列)と、機能的CARをコードする第2の核酸であり、機能的CARが、(a)抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)を特異的に認識する1つ以上(例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数)の結合部分(例えば、sdAb、scFv)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)膜貫通ドメイン、及び(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸とを含み、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)を含む修飾T細胞(例えば、同種T細胞)であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター(例えば、EF1-α)と、Nefタンパク質(例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef)をコードする第1の核酸と、第1の連結配列IRESと、任意選択の第2の連結配列(例えば、(GGGS)₃ リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列)と、機能的CARをコードする第2の核酸であり、機能的CARが、(a)抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)を特異的に認識する1つ以上(例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数)の結合部分(例えば、sdAb、scFv)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)膜貫通ドメイン、

及び(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸とを含み、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)を含む修飾T細胞(例えば、同種T細胞)であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター(例えば、EF1- α)と、Nefタンパク質(例えば、wt

Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef)をコードする第1の核酸と、P2Aをコードする第1の連結配列と、任意選択の第2の連結配列(例えば、(GGGS)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列)と、機能的CARをコードする第2の核酸であり、機能的CARが、(a)抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)を特異的に認識する1つ以上(例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上の

いずれかの数)の結合部分(例えば、sdAb、scFv)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)膜貫通ドメイン、及び(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸とを含み、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)を含む修飾T細胞(例えば、同種T細胞)であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター(例えば、EF1- α)と、Nefタンパク質(例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef)をコードする第1の核酸と、第1の連結配列(例えば、IRESや、P2AまたはT2Aなどの自己切断性2Aペプチドをコードする核酸配列)と、任意選択の第2の連結配列(例えば、(GGGS)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列)と

、機能的CARをコードする第2の核酸であり、機能的CARが、(a)1つ以上(例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数)の抗BCMA sdAbを含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)膜貫通ドメイン、及び(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸とを含み、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)を含む修飾T細胞(例えば、同種T細胞)であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター(例えば、EF1- α)と、Nefタンパク質(例えば、wt Nef、または変異体SIV

Nefなどの変異体Nef)をコードする第1の核酸と、第1の連結配列IRESと、任意選択の第2の連結配列(例えば、(GGGS)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列)と、機能的CARをコードする第2の核酸であり、機能的CARが、

(a)1つ以上(例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数)の抗BCMA sdAbを含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)膜貫通ドメイン、及び(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸とを含み、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)を含む修飾T細胞(例えば、同種T細胞)であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター(例えば、EF1- α)と、Nefタンパク質(例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef)をコードする第1の核酸と、P2Aをコードする第1の連結配列と、任意選択の第2の連結配列(例えば、(GGGS)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列)と、機能的CARをコードする第2の核酸であり、機能的CARが、(a)1つ以上(例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数)の抗BCMA sdAbを含む細胞外リガンド結合ドメイン、

(b)膜貫通ドメイン、及び(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸とを含み、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)を含む修飾T細胞(例えば、同種T細胞)であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター(例えば、EF1- α)と、Nefタンパク質(例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef)をコードする第1の核酸と、第1の連結配列(例えば、IRESや、P2AまたはT2Aな

10

20

30

40

50

どの自己切断性2Aペプチドをコードする核酸配列)と、任意選択の第2の連結配列(例えば、(GGGS)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列)と、機能的キメラTCR(cTCR)をコードする第2の核酸であり、機能的キメラTCRが、(a)腫瘍抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片(例えば、sdAb、scFv)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)任意選択のリンカー、(c)第1のTCRサブユニット(例えば、CD3ε)の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、(d)第2のTCRサブユニット(例えば、CD3ε)の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び(e)第3のTCRサブユニット(例えば、CD3ε)の細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットが全て、TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ、及びCD3δからなる群から選択される、第2の核酸とを含み、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットは同じ(例えば、全てCD3ε)である。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットは異なっている。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)を含む修飾T細胞(例えば、同種T細胞)であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター(例えば、EF1-α)と、Nefタンパク質(例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef)をコードする第1の核酸と、第1の連結配列(例えば、IRESや、P2AまたはT2Aなどの自己切断

10

20

性2Aペプチドをコードする核酸配列)と、任意選択の第2の連結配列(例えば、(GGGS)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列)と、機能的キメラTCR(cTCR)をコードする第2の核酸であり、機能的キメラTCRが、(a)腫瘍抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片(例えば、sdAb、scFv)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)任意選択のリンカー、及び(c)完全長CD3ε(シグナルペプチドを除く)を含む、第2の核酸とを含み、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、cTCRは、配列番号64のアミノ酸配列を含む抗CD20 cTCRである。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)を含む修飾T細胞(例えば、同種T細胞)であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター(例えば、EF1-α)と、Nefタンパク質(例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef)をコードする第1の核酸と、第1の連結配列(例えば、IRESや、P2AまたはT2Aなどの自己切断性2Aペプチドをコードする核酸配列)と、任意選択の第2の連結配列(例えば、(GGGS)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列)と、機能的T細胞抗原結合体(TAC)をコードする第2の核酸であり、機能的T細胞抗原結合体が、(a)腫瘍抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片(例えば、sdAb、scFv)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)任意選択の第1のリンカー、(c)TCRサブユニット(例えば、CD3ε)の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、(d)任意選択の第2のリンカー、(e)第1のTCR共受容体(例えば、CD4)の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、(f)第2のTCR共受容体(例えば、CD4)の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び(g)第3のTCR共受容体(例えば、CD4)の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、TCRサブユニットが、TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ、及びCD3δからなる群から選択され、第1、第2、及び第3のTCR共受容体が全て、CD4、CD8、及びCD28からなる群から選択される、第2の核酸とを含み、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び

30

40

50

第3のTCR共受容体は同じである。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCR共受容体は異なっている。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を含む修飾T細胞（例えば、同種T細胞）であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター（例えば、EF1- α ）と、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）をコードする第1の核酸と、第1の連結配列（例えば、IRESや、P2AまたはT2Aなどの自己切断性2Aペプチドをコードする核酸配列）と、任意選択の第2の連結配列（例えば、(GGGS)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列）と、機能的T細胞抗原結合体（TAC）をコードする第2の核酸であり、機能的T細胞抗原結合体が、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）TCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、（e）CD4の細胞外ドメインまたはその一部分、（f）CD4の膜貫通ドメイン、及び（g）CD4の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、TCRサブユニットが、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される、第2の核酸とを含み、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、TACは、配列番号66のアミノ酸配列を含む抗CD20 TACである。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を含む修飾T細胞（例えば、同種T細胞）であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター（例えば、EF1- α ）と、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）をコードする第1の核酸と、第1の連結配列（例えば、IRESや、P2AまたはT2Aなどの自己切断性2Aペプチドをコードする核酸配列）と、任意選択の第2の連結配列（例えば、(GGGS)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列）と、機能的TAC様キメラ受容体をコードする第2の核酸であり、機能的TAC様キメラ受容体が、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）第1のTCRサブユニット（例えば、TCR α ）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、（e）第2のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、（f）第3のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び（g）第4のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットが全て、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される、第2の核酸とを含み、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じである。いくつかの実施形態では、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じである。いくつかの実施形態では、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは異なっている。いくつかの実施形態では、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じであるが、第1のTCRサブユニットとは異なっている。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を含む修飾T細胞（例えば、同種T細胞）であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター（例えば、EF1- α ）と、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）をコードする第1の核酸と、第1の連結配列（例えば、IRESや、P2AまたはT2Aなどの自己切断性2Aペプチドをコードする核酸配列）と、任意選択の第2の連結配列（例えば、(GGGS)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列）と、機能的TAC様キメラ受容体

をコードする第2の核酸であり、機能的TAC様キメラ受容体が、(a)腫瘍抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片(例えば、sdAb、scFv)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)任意選択の第1のリンカー、(c)TCRサブユニット(例えば、TCR α)の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、(d)任意選択の第2のリンカー、及び(e)完全長CD3 ϵ (シグナルペプチドを除く)を含み、TCRサブユニットが、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される、第2の核酸とを含み、Ne fタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質は、SIV Ne f、HIV1 Ne f、HIV2 Ne f、及びそれらの相同体からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質は、野生型Ne fである。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質は、配列番号12~17のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質は、変異体Ne fである。いくつかの実施形態では、変異体Ne fは、配列番号18~22のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、変異体Ne fは、表11に示されるアミノ酸残基のいずれかにおける1つ以上の変異を含む、変異体Ne fである。いくつかの実施形態では、変異体Ne fは、(i) aa2~4、aa8~10、aa11~13、aa38~40、aa44~46、aa47~49、aa50~52、aa53~55、aa56~58、aa59~61、aa62~64、aa65~67、aa98~100、aa107~109、aa110~112、aa137~139、aa152~154、aa164~166、aa167~169、aa170~172、aa173~175、aa176~178、aa178~179、179~181aa、aa182~184、aa185~187、aa188~190、aa191~193、aa194~196、aa203~205、aa206~208、aa212~214、aa215~217、aa218~220、aa221~223、aa8~13、aa44~67、aa107~112、aa164~196、aa203~208、もしくはaa212~223、(ii) aa2~4、aa44~46、aa56~58、aa59~61、aa62~64、aa65~67、aa98~100、aa107~109、aa137~139、aa152~154、aa164~166、aa167~169、aa176~178、aa178~179、aa179~181、aa185~187、aa188~190、aa194~196、aa203~205、aa44~67、aa164~169、aa176~181、aa185~190、(iii) aa2~4、aa56~58、aa59~61、aa62~64、aa65~67、aa107~109、aa137~139、aa152~154、aa164~166、aa167~169、aa170~172、aa173~175、aa176~178、178~179aa、aa179~181、aa182~184、aa185~187、aa188~190、aa194~196、aa203~205、aa56~67、もしくはaa164~190、または(iv) aa2~4、aa56~58、aa59~61、aa62~64、aa65~67、aa107~109、aa137~139、aa152~154、aa164~166、aa167~169、aa176~178、aa178~179、aa179~181、aa185~187、aa188~190、aa194~196、aa203~205、aa56~67、aa164~169、aa176~181、もしくはaa185~190のいずれかのアミノ酸残基(ここで、アミノ酸残基の位置は、野生型SIV Ne fのものに対応する)における1つ以上の変異を含む、変異体SIV Ne fである。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質(例えば、変異体SIV Ne fなどの変異体Ne f)は、CD4及び/またはCD28の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質(例えば、wt Ne f、または変異体SIV Ne fなどの変異体Ne f)は、CD4及び/またはCD28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、N

10

20

30

40

50

Ne f タンパク質（例えば、wt Ne f、または変異体 S I V Ne f などの変異体 Ne f）は、T C R、C D 4、及び C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、Ne f タンパク質（例えば、変異体 S I V Ne f などの変異体 Ne f）は、T C R の細胞表面発現を下方制御するが、C D 4 及び／または C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Ne f タンパク質（例えば、変異体 S I V Ne f などの変異体 Ne f）は、T C R 及び C D 4 の細胞表面発現を下方制御するが、C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Ne f タンパク質（例えば、変異体 S I V Ne f などの変異体 Ne f）は、T C R 及び C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御するが、C D 4 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Ne f タンパク質（例えば、wt Ne f、または変異体 S I V Ne f などの変異体 Ne f）は、内在性 T C R の細胞表面発現を下方制御するが、外因性受容体（例えば、工学操作された T C R（例えば、従来の工学操作された T C R、キメラ T C R（c T C R））、T A C、T A C 様キメラ受容体、または C A R（例えば、抗体ベースの C A R、リガンド／受容体ベースの C A R、または A C T R））を下方調節する（例えば、細胞表面発現を下方制御する）ことではない。いくつかの実施形態では、機能的外因性受容体（例えば、工学操作された T C R（例えば、従来の工学操作された T C R、キメラ T C R（c T C R））、T A C、T A C 様キメラ受容体、または C A R（例えば、抗体ベースの C A R、リガンド／受容体ベースの C A R、または A C T R））は、Ne f タンパク質（例えば、wt Ne f、または変異体 S I V Ne f などの変異体 Ne f）により、最大で約 5 0 %、約 4 0 %、約 3 0 %、約 2 0 %、約 1 0 %、または約 5 % 下方調節される（例えば、細胞表面発現が下方制御される）。

【0097】

いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を含む修飾 T 細胞（例えば、同種 T 細胞）であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター（例えば、E F 1 - α ）と、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的外因性受容体（例えば、工学操作された T C R（例えば、従来の工学操作された T C R、キメラ T C R（c T C R））、T A C、T A C 様キメラ受容体、または C A R（例えば、抗体ベースの C A R、リガンド／受容体ベースの C A R、または A C T R））をコードする第 2 の核酸と、第 1 の連結配列（例えば、I R E S や、P 2 A または T 2 A などの自己切断性 2 A ペプチドをコードする核酸配列）と、任意選択の第 2 の連結配列（例えば、(G G G S)₃ リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列）と、Ne f タンパク質（例えば、wt Ne f、または変異体 S I V Ne f などの変異体 Ne f）をコードする第 1 の核酸とを含み、Ne f タンパク質が発現すると、修飾 T 細胞の内在性 T C R が下方調節される、修飾 T 細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を含む修飾 T 細胞（例えば、同種 T 細胞）であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター（例えば、E F 1 - α ）と、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的外因性受容体（例えば、工学操作された T C R（例えば、従来の工学操作された T C R、キメラ T C R（c T C R））、T A C、T A C 様キメラ受容体、または C A R（例えば、抗体ベースの C A R、リガンド／受容体ベースの C A R、または A C T R））をコードする第 2 の核酸と、第 1 の連結配列 I R E S と、任意選択の第 2 の連結配列（例えば、(G G G S)₃ リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列）と、Ne f タンパク質（例えば、wt Ne f、または変異体 S I V Ne f などの変異体 Ne f）をコードする第 1 の核酸とを含み、Ne f タンパク質が発現すると、修飾 T 細胞の内在性 T C R が下方調節される、修飾 T 細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を含む修飾 T 細胞（例えば、同種 T 細胞）であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター（例えば、E F 1 - α ）と、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的外因性受容体（例えば、工学操作された T C R（例えば、従来の工学操作された T C R、キメラ T C R（c

TCR))、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR (例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR))をコードする第2の核酸と、P2Aをコードする第1の連結配列と、任意選択の第2の連結配列 (例えば、(GGGS)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列)と、Nefタンパク質 (例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef)をコードする第1の核酸とを含み、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター (例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)を含む修飾T細胞 (例えば、同種T細胞)であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター (例えば、EF1-α)と、機能的CARをコードする第2の核酸であり、機能的CARが、(a)抗原 (例えば、BCMA、CD19、CD20)を特異的に認識する1つ以上 (例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数)の結合部分 (例えば、sdAb、scFv)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)膜貫通ドメイン、及び(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸と、第1の連結配列 (例えば、IRESや、P2AまたはT2Aなどの自己切断性2Aペプチドをコードする核酸配列)と、任意選択の第2の連結配列 (例えば、(GGGS)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列)と、Nefタンパク質 (例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef)をコードする第1の核酸とを含み、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター (例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)を含む修飾T細胞 (例えば、同種T細胞)であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター (例えば、EF1-α)と、機能的CARをコードする第2の核酸であり、機能的CARが、(a)抗原 (例えば、BCMA、CD19、CD20)を特異的に認識する1つ以上 (例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数)の結合部分 (例えば、sdAb、scFv)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)膜貫通ドメイン、及び(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸と、第1の連結配列 IRESと、任意選択の第2の連結配列 (例えば、(GGGS)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列)と、Nefタンパク質 (例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef)をコードする第1の核酸とを含み、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター (例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)を含む修飾T細胞 (例えば、同種T細胞)であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター (例えば、EF1-α)と、機能的CARをコードする第2の核酸であり、機能的CARが、(a)1つ以上 (例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数)の抗BCMA sdAbを含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)膜貫通ドメイン、及び(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸と、第1の連結配列 (例えば、IRESや、P2AまたはT2Aなどの自己切断性2Aペプチドをコードする核酸配列)と、任意選択の第2の連結配列 (例えば、(GGGS)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列)と、Nefタ

ンパク質（例えば、wt Ne f、または変異体S I V Ne fなどの変異体Ne f）をコードする第1の核酸とを含み、Ne fタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を含む修飾T細胞（例えば、同種T細胞）であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター（例えば、EF1- α ）と、機能的CARをコードする第2の核酸であり、機能的CARが、（a）1つ以上（例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数）の抗BCMA s d A bを含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）膜貫通ドメイン、及び（c）細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸と、第1の連結配列IRESと、任意選択の第2の連結配列（例えば、（GGGS）₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列）と、Ne fタンパク質（例えば、wt Ne f、または変異体S I V Ne fなどの変異体Ne f）をコードする第1の核酸とを含み、Ne fタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を含む修飾T細胞（例えば、同種T細胞）であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター（例えば、EF1- α ）と、機能的CARをコードする第2の核酸であり、機能的CARが、（a）1つ以上（例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数）の抗BCMA s d A bを含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）膜貫通ドメイン、及び（c）細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸と、P2Aをコードする第1の連結配列と、任意選択の第2の連結配列（例えば、（GGGS）₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列）と、Ne fタンパク質（例えば、wt Ne f、または変異体S I V Ne fなどの変異体Ne f）をコードする第1の核酸とを含み、Ne fタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を含む修飾T細胞（例えば、同種T細胞）であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター（例えば、EF1- α ）と、機能的キメラTCR（cTCR）をコードする第2の核酸であり、機能的キメラTCRが、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、s d A b、s c F v）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択のリンカー、（c）第1のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、（d）第2のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び（e）第3のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットが全て、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される、第2の核酸と、第1の連結配列（例えば、IRESや、P2AまたはT2Aなどの自己切断性2Aペプチドをコードする核酸配列）と、任意選択の第2の連結配列（例えば、（GGGS）₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列）と、Ne fタンパク質（例えば、wt Ne f、または変異体S I V Ne fなどの変異体Ne f）をコードする第1の核酸とを含み、Ne fタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットは同じ（例えば、全てCD3 ϵ ）である。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットは異なっている。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を含む修飾T細胞（例えば、同種T細胞）であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター（例えば、EF1- α ）と、機能的キメラTCR（cTCR）をコードする第2の核酸であり、機能的キメラTCRが、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、s d A b、s c F v）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選

10

20

30

40

50

損のリンカー、及び(c)完全長CD3ε(シグナルペプチドを除く)を含む、第2の核
 酸と、第1の連結配列(例えば、IRESや、P2AまたはT2Aなどの自己切断性2A
 ペプチドをコードする核酸配列)と、任意選択の第2の連結配列(例えば、(GGGS)
 3リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列)と、Nefタンパク質(例えば
 、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef)をコードする第1の
 核酸とを含み、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節さ
 れる、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、cTCRは、配列番号64の
 アミノ酸配列を含む抗CD20 cTCRである。いくつかの実施形態では、ベクター(10
 例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)を含む修飾T細胞(例えば、
 同種T細胞)であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター(例えば、
 EF1-α)と、機能的T細胞抗原結合体(TAC)をコードする第2の核酸であり、機
 能的T細胞抗原結合体が、(a)腫瘍抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)の
 1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片(例えば、sdAb、scFv)
)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)任意選択の第1のリンカー、(c)TCR
 サブユニット(例えば、CD3ε)の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結
 合ドメイン、(d)任意選択の第2のリンカー、(e)第1のTCR共受容体(例えば、
 CD4)の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、(f)第2のTCR共受容体(20
 例えば、CD4)の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び(g)第3のTCR共受
 容体(例えば、CD4)の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル
 伝達ドメインを含み、TCRサブユニットが、TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ
 、CD3ε、CD3γ、及びCD3δからなる群から選択され、第1、第2、及び第3の
 TCR共受容体が全て、CD4、CD8、及びCD28からなる群から選択される、第2
 の核酸と、第1の連結配列(例えば、IRESや、P2AまたはT2Aなどの自己切断性
 2Aペプチドをコードする核酸配列)と、任意選択の第2の連結配列(例えば、(GGGS)
 3リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列)と、Nefタンパク質(例
 えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef)をコードする第
 1の核酸とを含み、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調
 節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3の
 TCR共受容体は同じである。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCR
 共受容体は異なっている。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルス 30
 ベクターなどのウイルスベクター)を含む修飾T細胞(例えば、同種T細胞)であって、
 ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター(例えば、EF1-α)と、機能的
 T細胞抗原結合体(TAC)をコードする第2の核酸であり、機能的T細胞抗原結合体が
 、(a)腫瘍抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)の1つ以上のエピトープを
 特異的に認識する抗原結合性断片(例えば、sdAb、scFv)を含む細胞外リガンド
 結合ドメイン、(b)任意選択の第1のリンカー、(c)TCRサブユニット(例えば、
 CD3ε)の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、(d)任意
 選択の第2のリンカー、(e)CD4の細胞外ドメインまたはその一部分、(f)CD4
 の膜貫通ドメイン、及び(g)CD4の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、TCRサブ
 ユニットが、TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ、及びCD 40
 3δからなる群から選択される、第2の核酸と、第1の連結配列(例えば、IRESや、
 P2AまたはT2Aなどの自己切断性2Aペプチドをコードする核酸配列)と、任意選
 択の第2の連結配列(例えば、(GGGS)3リンカーなどの可動性リンカーをコード
 する核酸配列)と、Nefタンパク質(例えば、wt Nef、または変異体SIV Nef
 などの変異体Nef)をコードする第1の核酸とを含み、Nefタンパク質が発現すると
 、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実
 施形態では、TACは、配列番号66のアミノ酸配列を含む抗CD20 TACである。
 いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイル
 スベクター)を含む修飾T細胞(例えば、同種T細胞)であって、ベクターが、上流から下流
 に向かって、プロモーター(例えば、EF1-α)と、機能的TAC様キメラ受容体をコ

ードする第2の核酸であり、機能的TAC様キメラ受容体が、(a)腫瘍抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片(例えば、sdAb、scFv)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)任意選択の第1のリンカー、(c)第1のTCRサブユニット(例えば、TCR α)の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、(d)任意選択の第2のリンカー、(e)第2のTCRサブユニット(例えば、CD3 ϵ)の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、(f)第3のTCRサブユニット(例えば、CD3 ϵ)の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び(g)第4のTCRサブユニット(例えば、CD3 ϵ)の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットが全て、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される、第2の核酸と、第1の連結配列(例えば、IRESや、P2AまたはT2Aなどの自己切断性2Aペプチドをコードする核酸配列)と、任意選択の第2の連結配列(例えば、(GGGS)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列)と、Neftタンパク質(例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft)をコードする第1の核酸とを含み、Neftタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じである。いくつかの実施形態では、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じである。いくつかの実施形態では、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは異なっている。いくつかの実施形態では、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じであるが、第1のTCRサブユニットとは異なっている。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)を含む修飾T細胞(例えば、同種T細胞)であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター(例えば、EF1- α)と、機能的TAC様キメラ受容体をコードする第2の核酸であり、機能的TAC様キメラ受容体が、(a)腫瘍抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片(例えば、sdAb、scFv)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)任意選択の第1のリンカー、(c)TCRサブユニット(例えば、TCR α)の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、(d)任意選択の第2のリンカー、及び(e)完全長CD3 ϵ (シグナルペプチドを除く)を含み、TCRサブユニットが、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される、第2の核酸と、第1の連結配列(例えば、IRESや、P2AまたはT2Aなどの自己切断性2Aペプチドをコードする核酸配列)と、任意選択の第2の連結配列(例えば、(GGGS)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列)と、Neftタンパク質(例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft)をコードする第1の核酸とを含み、Neftタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、修飾T細胞が提供される。いくつかの実施形態では、Neftタンパク質は、SIV Neft、HIV1 Neft、HIV2 Neft、及びそれらの相同体からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、Neftタンパク質は、野生型Neftである。いくつかの実施形態では、Neftタンパク質は、配列番号12~17のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Neftタンパク質は、変異体Neftである。いくつかの実施形態では、変異体Neftは、配列番号18~22のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、変異体Neftは、表11に示されるアミノ酸残基のいずれかにおける1つ以上の変異を含む、変異体SIV Neftである。いくつかの実施形態では、変異体Neftは、(i) aa2~4、aa8~10、aa11~13、aa38~40、aa44~46、aa47~49、aa50~52、aa53~55、aa56~58、aa59~61、aa62~64、aa65~67、aa98~100、aa107~109、aa110~112、aa137~139、aa152~154、aa164~166、aa167~169、aa170~172、aa173~175、aa176~178、aa178~179、179~181aa、aa1

82～184、aa185～187、aa188～190、aa191～193、aa194～196、aa203～205、aa206～208、aa212～214、aa215～217、aa218～220、aa221～223、aa8～13、aa44～67、aa107～112、aa164～196、aa203～208、もしくはaa212～223、(ii)aa2～4、aa44～46、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～100、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa44～67、aa164～169、aa176～181、aa185～190、(iii)aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、178～179aa、aa179～181、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、もしくはaa164～190、または(iv)aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、aa164～169、aa176～181、もしくはaa185～190のいずれかのアミノ酸残基（ここで、アミノ酸残基の位置は、野生型SIV Nefのものに対応する）における1つ以上の変異を含む、変異体SIV Nefである。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体N

ef）は、TCR、CD4、及びCD28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCRの細胞表面発現を下方制御するが、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCR及びCD4の細胞表面発現を下方制御するが、CD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCR及びCD28の細胞表面発現を下方制御するが、CD4の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、内在性TCRの細胞表面発現を下方制御するが、外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））を下方調節する（例えば、細胞表面発現を下方制御する）ことではない。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））は、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）により、最大で約50%、約40%、約30%、約20%、約10%、または約5%下方調節される（例えば、細胞表面発現が下方制御される）。

【0098】

いくつかの実施形態では、プロモーターは、ラウス肉腫ウイルス (RSV) プロモーター、サルウイルス 40 (SV40) プロモーター、サイトメガロウイルス最初期遺伝子プロモーター (CMV IE)、伸長因子 1 アルファプロモーター (EF1- α)、ホスホグリセリン酸キナーゼ 1 (PGK) プロモーター、ユビキチン C (UBQ-C) プロモーター、サイトメガロウイルスエンハンサー/ニワトリベータアクチン (CAG) プロモーター、ポリオーマエンハンサー/単純ヘルペスチミジンキナーゼ (MC1) プロモーター、ベータアクチン (β -ACT) プロモーター、「骨髄増殖性肉腫ウイルスエンハンサー、陰性対照領域欠失、d1587 rev プライマー結合部位置換 (MND)」プロモーター、NFAT プロモーター、TETON (登録商標) プロモーター、及び NF κ B プロモーターからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、プロモーターは、EF1- α または PGK である。

10

【0099】

いくつかの実施形態では、連結配列は、P2A、T2A、E2A、F2A、BmCPV2A、BmIFV2A、(GS)_n、(GSGGS)_n、(GGGS)_n、(GGGGGS)_n をコードする核酸配列、または IRES、SV40、CMV、UBC、EF1 α 、PGK、CAGG の核酸配列、またはそれらの任意の組み合わせ (式中、n は、少なくとも 1 の整数である) のいずれかを含む。いくつかの実施形態では、連結配列は、IRES である。いくつかの実施形態では、連結配列は、P2A をコードする核酸配列である。

【0100】

いくつかの実施形態では、ベクターは、ウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、及びそれらの誘導体からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、ベクターは、エピソーム発現ベクター、改良エピソームベクター (EEV)、PiggyBac トランスポサゼーゼベクター、または Sleeping Beauty (SB) トランスポゾンシステムなどの非ウイルスベクターである。さらに、本明細書に記載されるベクター (例えば、ウイルスベクター) のいずれかを導入することによって得られる T 細胞が提供される。さらに、本明細書に記載される方法のいずれかによって得られる T 細胞が提供される。

20

【0101】

ベクター

本願は、本明細書に記載される Ne f タンパク質 (例えば、wt Ne f、または変異体 SIV Ne f などの変異体 Ne f) または機能的な外因性受容体 (例えば、工学操作された TCR (例えば、従来の工学操作された TCR、キメラ TCR (cTCR))、TAC、TAC 様キメラ受容体、または CAR (例えば、抗体ベースの CAR、リガンド/受容体ベースの CAR、または ACTR)) のいずれか 1 つのクローニング及び発現のためのベクターを提供する。いくつかの実施形態では、ベクターは、哺乳動物細胞などの真核細胞における複製及び組み込みに好適である。いくつかの実施形態では、ベクターは、ウイルスベクターである。ウイルスベクターの例としては、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、及びそれらの誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。ウイルスベクター技術は当技術分野で周知であり、例えば、Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)、ならびに他のウイルス学及び分子生物学のマニュアルに記載されている。

30

40

【0102】

いくつかのウイルスベースのシステムが、哺乳動物細胞への遺伝子移入のために開発されている。例えば、レトロウイルスは、遺伝子送達システムのための簡便なプラットフォームを提供する。異種核酸は、当技術分野で公知の技術を使用し、ベクターに挿入し、レトロウイルス粒子にパッケージングすることができる。次いでこの組換えウイルスを単離

50

し、工学操作された哺乳動物細胞に *in vitro* または *ex vivo* で送達することができる。いくつかのレトロウイルスシステムが当技術分野で公知である。いくつかの実施形態では、アデノウイルスベクターが使用される。いくつかのアデノウイルスベクターが当技術分野で公知である。いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクターが使用される。いくつかの実施形態では、自己不活性化レンチウイルスベクターが使用される。例えば、Ne f タンパク質（例えば、wt Ne f、または変異体 S I V Ne f などの変異体 Ne f）をコードする配列を有する自己不活性化レンチウイルスベクター、及び／または外因性受容体（例えば、工学操作された T C R（例えば、従来の工学操作された T C R、キメラ T C R（c T C R））、T A C、T A C 様キメラ受容体、または C A R（例えば、抗体ベースの C A R、リガンド／受容体ベースの C A R、または A C T R）など）を有する自己不活性化レンチウイルスベクターを、当技術分野で公知のプロトコールによってパッケージングしてもよい。結果として得られるレンチウイルスベクターは、当技術分野で公知の方法を使用して哺乳動物細胞（例えば初代ヒト T 細胞）に形質導入するために使用され得る。レンチウイルスなどのレトロウイルスに由来するベクターは、導入遺伝子の長期間の安定な組み込み、及び子孫細胞におけるその増殖を可能にするため、長期間の遺伝子移入を達成するのに好適なツールである。レンチウイルスベクターは、低い免疫原性も有し、非増殖細胞に形質導入することができる。

【0103】

いくつかの実施形態では、ベクターは、非ウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、ベクターは、トランスポゾン、例えば、Sleeping Beauty (S B) トランスポゾンシステム、または Piggy Bac トランスポゾンシステムである。いくつかの実施形態では、ベクターは、例えば、ポリ（乳酸－コグリコール酸）（P L G A）及びポリ乳酸（P L A）、ポリ（エチレンイミン）（P E I）、及びデンドリマーを含む、ポリマーに基づく非ウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、ベクターは、カチオン性脂質に基づく非ウイルスベクター、例えば、カチオン性リポソーム、脂質ナノエマルジョン、及び固体脂質ナノ粒子（S L N）である。いくつかの実施形態では、ベクターは、ペプチドに基づく遺伝子非ウイルスベクター、例えば、ポリ－L－リジンである。ゲノム編集に好適な公知の非ウイルスベクターのいずれも、Ne f をコードする核酸及び／または外因性受容体（例えば、工学操作された T C R（例えば、従来の工学操作された T C R、キメラ T C R（c T C R））、T A C、T A C 様キメラ受容体、または C A R（例えば、抗体ベースの C A R、リガンド／受容体ベースの C A R、または A C T R））をコードする核酸を、工学操作された免疫エフェクター細胞（例えば、T 細胞）に導入するために使用され得る。例えば、Yin H. et al. Nature Rev. Genetics (2014) 15: 521-555、Aronovich EL et al. “The Sleeping Beauty transposon system: a non-viral vector for gene therapy.” Hum. Mol. Genet. (2011) R1: R14-20、及び Zhao S. et al. “PiggyBac transposon vectors: the tools of the human gene editing.” Transl. Lung Cancer Res. (2016) 5 (1): 120-125 を参照されたい。これらは、参照により本明細書に援用される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される Ne f 及び／または外因性受容体（例えば、工学操作された T C R（例えば、従来の工学操作された T C R、キメラ T C R（c T C R））、T A C、T A C 様キメラ受容体、または C A R（例えば、抗体ベースの C A R、リガンド／受容体ベースの C A R、または A C T R）など）をコードする核酸のいずれか 1 つ以上が、工学操作された免疫エフェクター細胞（例えば、T 細胞）に、電気穿孔、ソノポレーション、フォトポレーション、マグネトフェクション、ハイドロポレーションを含むがこれらに限定されない物理的方法によって導入される。

【0104】

いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルス

ベクター)は、本明細書に記載されるNefタンパク質(例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef)及び/または外因性受容体(例えば、工学操作されたTCR(例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR(cTCR))、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR(例えば、抗体ベースのCAR、リガンド/受容体ベースのCAR、またはACTR)など)をコードする核酸のいずれか1つを含む。核酸は、当技術分野で公知の任意の分子クローニング法の使用、例えば、制限エンドヌクレアーゼ部位及び1つ以上の選択可能マーカーの使用により、ベクターにクローニングされ得る。いくつかの実施形態では、核酸は、プロモーターに作動可能に連結している。様々なプロモーターが哺乳動物細胞での遺伝子発現について調査されており、当技術分野で公知のプロモーターのうちのいずれを本発明に使用してもよい。プロモーターは、構成的プロモーター、または誘導性プロモーターなどの制御プロモーターに大まかに分類され得る。

10

【0105】

プロモーター

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるNefタンパク質(例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef)及び/または外因性受容体(例えば、工学操作されたTCR(例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR(cTCR))、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR(例えば、抗体ベースのCAR、リガンド/受容体ベースのCAR、またはACTR)など)をコードする核酸は、構成的プロモーターに作動可能に連結している。構成的プロモーターは、異種遺伝子(導入遺伝子ともいう)を宿主細胞で構成的に発現させる。本明細書で企図される例示的なプロモーターとしては、サイトメガロウイルス最初期プロモーター(CMV)、ヒト伸長因子1アルファ(hEF1 α)、ユビキチンCプロモーター(Ub i C)、ホスホグリセロキナーゼプロモーター(PGK)、サルウイルス40初期プロモーター(SV40)、CMV初期エンハンサーに結合したニワトリ β アクチンプロモーター(CAGG)、ラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーター、ポリオーマエンハンサー/単純ヘルペスチミジンキナーゼ(MC1)プロモーター、ベータアクチン(β -ACT)プロモーター、「骨髓増殖性肉腫ウイルスエンハンサー、陰性対照領域欠失、d1587revプライマー結合部位置換(MND)」プロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。かかる構成的プロモーターが導入遺伝子発現を推進する効率については、多数の研究において広く比較されている。例えば、Michael C. Miloneらは、初代ヒトT細胞におけるCAR発現を推進するCMV、hEF1 α 、Ub i C、及びPGKの効率を比較し、hEF1 α プロモーターが、最も高いレベルの導入遺伝子発現を誘導しただけでなく、CD4及びCD8ヒトT細胞で最適に維持されたと結論した(Molecular Therapy, 17(8):1453-1464(2009))。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるNefタンパク質(例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef)及び/または外因性受容体(例えば、工学操作されたTCR(例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR(cTCR))、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR(例えば、抗体ベースのCAR、リガンド/受容体ベースのCAR、またはACTR)など)をコードする核酸は、hEF1 α プロモーターまたはPGKプロモーターに作動可能に連結している。

20

30

40

【0106】

いくつかの実施形態では、プロモーターは、EF-1プロモーター、CMV IE遺伝子プロモーター、EF-1 α プロモーター、ユビキチンC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、ラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーター、サルウイルス40(SV40)プロモーター、サイトメガロウイルス最初期遺伝子プロモーター(CMV)、伸長因子1アルファプロモーター(EF1- α)、ホスホグリセリン酸キナーゼ1プロモーター(PGK)、ユビキチンCプロモーター(UBQ-C)、サイトメガロウイルスエンハンサー/ニワトリベータアクチンプロモーター(CAG)、ポリオーマエンハンサー/単純ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター(MC1)、ベータアク

50

チンプロモーター (β -ACT)、サルウイルス40プロモーター (SV40)、及び骨髓増殖性肉腫ウイルスエンハンサー、陰性対照領域欠失、d1587revプライマー結合部位置換 (MND) プロモーター、NFATプロモーター、TETON (登録商標) プロモーター、及びNF κ Bプロモーターからなる群から選択される。

【0107】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるNefタンパク質 (例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef) 及び／または外因性受容体 (例えば、工学操作されたTCR (例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR (cTCR))、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR (例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR) など) をコードする核酸は、誘導性プロモーターに作動可能に連結している。誘導性プロモーターは、制御プロモーターのカテゴリーに属する。誘導性プロモーターは、物理的条件、工学操作された免疫エフェクター細胞 (例えば、T細胞) の微小環境、もしくは工学操作された免疫エフェクター細胞の生理学的状態、誘導因子 (すなわち、誘導剤)、またはそれらの組み合わせなどの1つ以上の条件によって誘導され得る。いくつかの実施形態では、誘導条件は、工学操作された哺乳動物細胞及び／または医薬組成物を受ける対象における内在性遺伝子の発現を誘導しない。いくつかの実施形態では、誘導条件は、工学操作された哺乳動物細胞の誘導因子、照射 (電離放射線、光など)、温度 (熱など)、レドックス状態、腫瘍環境、及び活性化状態からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、誘導性プロモーターは、NFATプロモーター、TETON (登録商標) プロモーター、またはNF κ Bプロモーターであり得る。

【0108】

いくつかの実施形態では、ベクターはまた、本明細書に記載されるNefタンパク質 (例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef) 及び／または外因性受容体 (例えば、工学操作されたTCR (例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR (cTCR))、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR (例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR) など) を発現する細胞を、ベクター (例えば、レンチウイルスベクター) によりトランスフェクトされた宿主細胞集団から選択するために、選択可能マーカー遺伝子またはレポーター遺伝子を含む。選択可能マーカー及びレポーター遺伝子のいずれにも、宿主細胞における発現が可能になるように、適切な制御配列がフランキングしてよい。例えば、ベクターは、転写ターミネーター及び翻訳ターミネーター、開始配列、ならびに核酸配列の発現の制御に有用なプロモーターを含み得る。

【0109】

連結配列

いくつかの実施形態では、ベクターは、本明細書に記載されるNefタンパク質 (例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef) 及び／または外因性受容体 (例えば、工学操作されたTCR (例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR (cTCR))、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR (例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR) など) をコードする核酸を2つ以上含む。いくつかの実施形態では、ベクター (例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター) は、Nefタンパク質 (例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef) をコードする第1の核酸と、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体 (例えば、工学操作されたTCR (例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR (cTCR))、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR (例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR) など) をコードする第2の核酸とを含み、第1の核酸は、連結配列を介して第2の核酸に作動可能に連結している。いくつかの実施形態では、連結配列は、内部リボソーム侵入部位 (IRES) である。IRESは、キャップ非依存性様式での翻訳開始を可能にするRNAエレメントである。いくつ

かの実施形態では、連結配列は、P 2 A、T 2 A、E 2 A、F 2 A、BmC P V 2 A、Bm I F V 2 Aなどの自己切断性2 Aペプチドをコードする核酸配列を含む（例えば、この核酸配列である）。いくつかの実施形態では、連結配列は、配列番号34の核酸配列を含むI R E Sである。いくつかの実施形態では、連結配列は、配列番号35の核酸配列を含むP G Kである。いくつかの実施形態では、連結配列は、配列番号36のアミノ酸配列を含むP 2 Aペプチドをコードする核酸配列である。いくつかの実施形態では、連結配列は、配列番号37のアミノ酸配列を含むT 2 Aペプチドをコードする核酸配列である。いくつかの実施形態では、連結配列は、下記「V. 機能的な外因性受容体」における「ペプチドリinker」のセクションに記載する、可動性リンカーのようなペプチドリinkerをコードする核酸配列である。いくつかの実施形態では、可動性連結配列は、(G S)_n、(G S G G S)_n (G G G S)_n、及び(G G G G S)_n（式中、nは、少なくとも1の整数である）をコードする核酸配列からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、連結配列は、L N G F Rなどの選択可能マーカーをコードする。いくつかの実施形態では、連結配列は、本明細書に記載される1つ以上のタイプの連結配列、例えば、自己切断性2 Aペプチド（例えば、P 2 A）に続くG l y - S e r可動性リンカー（例えば、(G G G S)₃）、または自己切断性2 Aペプチド（例えば、P 2 A）に続く選択可能マーカー（例えば、L N G F R）をコードする核酸配列を含む。

【0110】

したがって、いくつかの実施形態では、N e fタンパク質（例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f）をコードする第1の核酸を含むベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）が提供される。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質（例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、内在性T C Rを下方調節する（例えば、細胞表面発現を下方制御する）。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質（例えば、変異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、C D 4及び／またはC D 2 8の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質（例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、C D 4及び／またはC D 2 8の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質（例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、T C R、C D 4、及びC D 2 8の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質（例えば、変異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、T C Rの細胞表面発現を下方制御するが、C D 4及び／またはC D 2 8の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質（例えば、変異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、T C R及びC D 4の細胞表面発現を下方制御するが、C D 2 8の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質（例えば、変異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、T C R及びC D 2 8の細胞表面発現を下方制御するが、C D 4の細胞表面発現を下方制御することはない。

【0111】

いくつかの実施形態では、N e fタンパク質は、T細胞において発現した場合、C D 3 ζ、C D 4、C D 2 8、及び／または機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたT C R（例えば、従来の工学操作されたT C R、キメラT C R（c T C R））、T A C、T A C様キメラ受容体、またはC A R（例えば、抗体ベースのC A R、リガンド／受容体ベースのC A R、またはA C T R）など）を下方調節する（例えば、発現を下方制御する）ことではないか、あるいは、C D 3 ζ、C D 4、C D 2 8、及び／または機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたT C R（例えば、従来の工学操作されたT C R、キメラT C R（c T C R））、T A C、T A C様キメラ受容体、またはC A R（例えば、抗体ベースのC A R、リガンド／受容体ベースのC A R、またはA C T R）など）を最大で約50%、約40%、約30%、約20%、約10%、または約5%下方調節する。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質は、S I V N e f、H I V 1 N e f、H I V 2 N e f、及びそれらの相同体からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、N e fタン

パク質は、野生型 N e f である。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質は、配列番号 1 2 ～ 1 7 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質は、変異体 N e f である。いくつかの実施形態では、変異体 N e f は、配列番号 1 8 ～ 2 2 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、変異体 N e f は、表 1 1 に示されるアミノ酸残基のいずれかにおける 1 つ以上の変異を含む、変異体 S I V N e f である。いくつかの実施形態では、変異体 N e f は、(i) a a 2 ～ 4、a a 8 ～ 1 0、a a 1 1 ～ 1 3、a a 3 8 ～ 4 0、a a 4 4 ～ 4 6、a a 4 7 ～ 4 9、a a 5 0 ～ 5 2、a a 5 3 ～ 5 5、a a 5 6 ～ 5 8、a a 5 9 ～ 6 1、a a 6 2 ～ 6 4、a a 6 5 ～ 6 7、a a 9 8 ～ 1 0 0、a a 1 0 7 ～ 1 0 9、a a 1 1 0 ～ 1 1 2、a a 1 3 7 ～ 1 3 9、a a 1 5 2 ～ 1 5 4、a a 1 6 4 ～ 1 6 6、a a 1 6 7 ～ 1 6 9、a a 1 7 0 ～ 1 7 2、a a 1 7 3 ～ 1 7 5、a a 1 7 6 ～ 1 7 8、a a 1 7 8 ～ 1 7 9、1 7 9 ～ 1 8 1 a a、a a 1 8 2 ～ 1 8 4、a a 1 8 5 ～ 1 8 7、a a 1 8 8 ～ 1 9 0、a a 1 9 1 ～ 1 9 3、a a 1 9 4 ～ 1 9 6、a a 2 0 3 ～ 2 0 5、a a 2 0 6 ～ 2 0 8、a a 2 1 2 ～ 2 1 4、a a 2 1 5 ～ 2 1 7、a a 2 1 8 ～ 2 2 0、a a 2 2 1 ～ 2 2 3、a a 8 ～ 1 3、a a 4 4 ～ 6 7、a a 1 0 7 ～ 1 1 2、a a 1 6 4 ～ 1 9 6、a a 2 0 3 ～ 2 0 8、もしくは a a 2 1 2 ～ 2 2 3、(i i) a a 2 ～ 4、a a 4 4 ～ 4 6、a a 5 6 ～ 5 8、a a 5 9 ～ 6 1、a a 6 2 ～ 6 4、a a 6 5 ～ 6 7、a a 9 8 ～ 1 0 0、a a 1 0 7 ～ 1 0 9、a a 1 3 7 ～ 1 3 9、a a 1 5 2 ～ 1 5 4、a a 1 6 4 ～ 1 6 6、a a 1 6 7 ～ 1 6 9、a a 1 7 6 ～ 1 7 8、a a 1 7 8 ～ 1 7 9、a a 1 7 9 ～ 1 8 1、a a 1 8 5 ～ 1 8 7、a a 1 8 8 ～ 1 9 0、a a 1 9 4 ～ 1 9 6、a a 2 0 3 ～ 2 0 5、a a 4 4 ～ 6 7、a a 1 6 4 ～ 1 6 9、a a 1 7 6 ～ 1 8 1、a a 1 8 5 ～ 1 9 0、(i i i) a a 2 ～ 4、a a 5 6 ～ 5 8、a a 5 9 ～ 6 1、a a 6 2 ～ 6 4、a a 6 5 ～ 6 7、a a 1 0 7 ～ 1 0 9、a a 1 3 7 ～ 1 3 9、a a 1 5 2 ～ 1 5 4、a a 1 6 4 ～ 1 6 6、a a 1 6 7 ～ 1 6 9、a a 1 7 0 ～ 1 7 2、a a 1 7 3 ～ 1 7 5、a a 1 7 6 ～ 1 7 8、1 7 8 ～ 1 7 9 a a、a a 1 7 9 ～ 1 8 1、a a 1 8 2 ～ 1 8 4、a a 1 8 5 ～ 1 8 7、a a 1 8 8 ～ 1 9 0、a a 1 9 4 ～ 1 9 6、a a 2 0 3 ～ 2 0 5、a a 5 6 ～ 6 7、もしくは a a 1 6 4 ～ 1 9 0、または (i v) a a 2 ～ 4、a a 5 6 ～ 5 8、a a 5 9 ～ 6 1、a a 6 2 ～ 6 4、a a 6 5 ～ 6 7、a a 1 0 7 ～ 1 0 9、a a 1 3 7 ～ 1 3 9、a a 1 5 2 ～ 1 5 4、a a 1 6 4 ～ 1 6 6、a a 1 6 7 ～ 1 6 9、a a 1 7 6 ～ 1 7 8、a a 1 7 8 ～ 1 7 9、a a 1 7 9 ～ 1 8 1、a a 1 8 5 ～ 1 8 7、a a 1 8 8 ～ 1 9 0、a a 1 9 4 ～ 1 9 6、a a 2 0 3 ～ 2 0 5、a a 5 6 ～ 6 7、a a 1 6 4 ～ 1 6 9、a a 1 7 6 ～ 1 8 1、もしくは a a 1 8 5 ～ 1 9 0 のいずれかのアミノ酸残基（ここで、アミノ酸残基の位置は、野生型 S I V N e f のものに対応する）における 1 つ以上の変異を含む、変異体 S I V N e f である。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、C D 4 及び／または C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、C D 4 及び／または C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、T C R、C D 4、及び C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、T C R の細胞表面発現を下方制御するが、C D 4 及び／または C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、T C R 及び C D 4 の細胞表面発現を下方制御するが、C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、内在性 T C R の細胞表面発現を下方制御するが、外因性受容体（例えば、工学操作された T C R（例えば、従来 of 工学操作された T C R、キメラ T C R（c T C R））、T A

C、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR）を下方調節する（例えば、細胞表面発現を下方制御する）ことはない。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR）は、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）により、最大で約50%、約40%、約30%、約20%、約10%、または約5%下方調節される（例えば、細胞表面発現が下方制御される）。

【0112】

10

いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）は、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR）など）をコードする第2の核酸をさらに含む。いくつかの実施形態では、第1の核酸と第2の核酸とは、同じプロモーターに作動可能に連結している。いくつかの実施形態では、第1の核酸と第2の核酸とは、異なるプロモーターに作動可能に連結している。

【0113】

20

いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）をコードする第1の核酸と、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR）など）をコードする第2の核酸とを含む、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）であって、第1の核酸と第2の核酸とが、異なるプロモーター（例えば、EF1- α 及びPGK）に作動可能に連結している、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、第1の核酸は、第2の核酸の上流にある。いくつかの実施形態では、第1の核酸は、第2の核酸の下流にある。

30

【0114】

いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）であって、上流から下流に向かって、第1のプロモーター（例えば、EF1- α ）と、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）をコードする第1の核酸と、第2のプロモーター（例えば、PGK）と、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で例えば細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））をコードする第2の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）であって、上流から下流に向かって、第1のプロモーター（例えば、EF1- α ）と、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）をコードする第1の核酸と、第2のプロモーター（例えば、PGK）と、機能的CARをコードする第2の核酸であり、機能的CARが、（a）抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）を特異的に認識する1つ以上（例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数）の結合部分（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）膜貫通ドメイン、及び（c）細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）であって、上流から下流に向かって、第1のプロモータ

40

50

ー（例えば、EF1- α ）と、Ne fタンパク質（例えば、wt Ne f、または変異体SIV Ne fなどの変異体Ne f）をコードする第1の核酸と、第2のプロモーター（例えば、PGK）と、機能的CARをコードする第2の核酸であり、機能的CARが、（a）1つ以上（例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数）の抗BCMA sdAbを含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）膜貫通ドメイン、及び（c）細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）であって、上流から下流に向かって、第1のプロモーター（例えば、EF1- α ）と、Ne fタンパク質（例えば、wt Ne f、または変異体SIV Ne fなどの変異体Ne f）をコードする第1の核酸と、第2のプロモーター（例えば、PGK）と、機能的キメラTCR（cTCR）をコードする第2の核酸であり、機能的キメラTCRが、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択のリンカー、（c）第1のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、（d）第2のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び（e）第3のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットが全て、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される、第2の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットは同じ（例えば、全てCD3 ϵ ）である。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットは異なっている。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）であって、上流から下流に向かって、第1のプロモーター（例えば、EF1- α ）と、Ne fタンパク質（例えば、wt Ne f、または変異体SIV Ne fなどの変異体Ne f）をコードする第1の核酸と、第2のプロモーター（例えば、PGK）と、機能的キメラTCR（cTCR）をコードする第2の核酸であり、機能的キメラTCRが、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択のリンカー、及び（c）完全長CD3 ϵ （シグナルペプチドを除く）を含む、第2の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、cTCRは、配列番号64のアミノ酸配列を含む抗CD20 cTCRである。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）であって、上流から下流に向かって、第1のプロモーター（例えば、EF1- α ）と、Ne fタンパク質（例えば、wt Ne f、または変異体SIV Ne fなどの変異体Ne f）をコードする第1の核酸と、第2のプロモーター（例えば、PGK）と、機能的T細胞抗原結合体（TAC）をコードする第2の核酸であり、機能的T細胞抗原結合体が、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）TCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、（e）第1のTCR共受容体（例えば、CD4）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、（f）第2のTCR共受容体（例えば、CD4）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び（g）第3のTCR共受容体（例えば、CD4）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、TCRサブユニットが、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択され、第1、第2、及び第3のTCR共受容体が全て、CD4、CD8、及びCD28からなる群から選択される、第2の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCR共受容体は同じである。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCR共受容体は異なっている。いくつか

の実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）であって、上流から下流に向かって、第1のプロモーター（例えば、EF1- α ）と、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）をコードする第1の核酸と、第2のプロモーター（例えば、PGK）と、機能的T細胞抗原結合体（TAC）をコードする第2の核酸であり、機能的T細胞抗原結合体が、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）TCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、（e）CD4の細胞外ドメインまたはその一部分、（f）CD4の膜貫通ドメイン、及び（g）CD4の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、TCRサブユニットが、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される、第2の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、TACは、配列番号66のアミノ酸配列を含む抗CD20 TACである。

いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）であって、上流から下流に向かって、第1のプロモーター（例えば、EF1- α ）と、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）をコードする第1の核酸と、第2のプロモーター（例えば、PGK）と、機能的TAC様キメラ受容体をコードする第2の核酸であり、機能的TAC様キメラ受容体が、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）第1のTCRサブユニット（例えば、TCR α ）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、（e）第2のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、（f）第3のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び（g）第4のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットが全て、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される、第2の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じである。いくつかの実施形態では、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じである。いくつかの実施形態では、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは異なっている。いくつかの実施形態では、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じであるが、第1のTCRサブユニットとは異なっている。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）であって、上流から下流に向かって、第1のプロモーター（例えば、EF1- α ）と、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）をコードする第1の核酸と、第2のプロモーター（例えば、PGK）と、機能的TAC様キメラ受容体をコードする第2の核酸であり、機能的TAC様キメラ受容体が、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）TCRサブユニット（例えば、TCR α ）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、及び（e）完全長CD3 ϵ （シグナルペプチドを除く）を含み、TCRサブユニットが、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される、第2の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、CD4及び／またはCD

28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCR、CD4、及びCD28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCRの細胞表面発現を下方制御するが、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCR及びCD4の細胞表面発現を下方制御するが、CD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCR及びCD28の細胞表面発現を

10

下方制御するが、CD4の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、内在性TCRの細胞表面発現を下方制御するが、外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））を下方調節する（例えば、細胞表面発現を下方制御する）ことではない。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））は、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）により、最大で約50%、約40%、約30%、約20%、約10%、または約5%下方調節される（例えば、細胞表面発現が下方制御される）。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質は、

20

(i) aa2~4、aa8~10、aa11~13、aa38~40、aa44~46、aa47~49、aa50~52、aa53~55、aa56~58、aa59~61、aa62~64、aa65~67、aa98~100、aa107~109、aa110~112、aa137~139、aa152~154、aa164~166、aa167~169、aa170~172、aa173~175、aa176~178、aa178~179、179~181aa、aa182~184、aa185~187、aa188~190、aa191~193、aa194~196、aa203~205、aa206~208、aa212~214、aa215~217、aa218~220、aa221~223、aa8~13、aa44~67、aa107~112、aa164~196、aa203~208、もしくはaa212~223、(ii) aa2~4、aa44~46、aa56~58、aa59~61、aa62~64、aa98~100、aa107~109、aa137~139、aa152~154、aa164~166、aa167~169、aa176~178、aa178~179、aa179~181、aa185~187、aa188~190、aa194~196、aa203~205、aa44~67、aa164~169、aa176~181、aa185~190、(iii) aa2~4、aa56~58、aa59~61、aa62~64、aa65~67、aa107~109、aa137~139、aa152~154、aa164~166、aa167~169、aa170~172、aa173~175、aa176~178、178~179aa、aa179~181、aa182~184、aa185~187、aa188~190、aa194~196、aa203~205、aa56~67、もしくはaa164~190、または(iv) aa2~4、aa56~58、aa59~61、aa62~64、aa65~67、aa107~109、aa137~139、aa152~154、aa164~166、aa167~169、aa176~178、aa178~179、aa179~181、aa185~187、aa188~190、aa194~196、aa203~205、aa56~67、aa164~169、aa176~181、もしくはaa185~190のいずれかのアミノ酸残基（ここで、ア

30

40

50

ミノ酸残基の位置は、野生型 S I V N e f のものに対応する)における1つ以上の変異を含む、変異体 S I V N e f である。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質は、配列番号12～22のいずれかのアミノ酸配列を含む。

【0115】

いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)であって、上流から下流に向かって、第2のプロモーター(例えば、E F 1- α)と、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体(例えば、工学操作された T C R (例えば、従来の工学操作された T C R、キメラ T C R (c T C R))、T A C、T A C 様キメラ受容体、または C A R (例えば、抗体ベースの C A R、リガンド/受容体ベースの C A R、または A C T R))をコードする第2の核酸と、第1のプロモーター(例えば、P G K)と、N e f タンパク質(例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f)をコードする第1の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)であって、上流から下流に向かって、第2のプロモーター(例えば、E F 1- α)と、機能的 C A R をコードする第2の核酸であり、機能的 C A R が、(a) 抗原(例えば、B C M A、C D 19、C D 20)を特異的に認識する1つ以上(例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数)の結合部分(例えば、s d A b、s c F v)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 膜貫通ドメイン、及び(c) 細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸と、第1のプロモーター(例えば、P G K)と、N e f タンパク質(例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f)をコードする第1の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)であって、上流から下流に向かって、第2のプロモーター(例えば、E F 1- α)と、機能的 C A R をコードする第2の核酸であり、機能的 C A R が、(a) 1つ以上(例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数)の抗 B C M A s d A b を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 膜貫通ドメイン、及び(c) 細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸と、第1のプロモーター(例えば、P G K)と、N e f タンパク質(例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f)をコードする第1の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)であって、上流から下流に向かって、第2のプロモーター(例えば、E F 1- α)と、機能的キメラ T C R (c T C R)をコードする第2の核酸であり、機能的キメラ T C R が、(a) 腫瘍抗原(例えば、B C M A、C D 19、C D 20)の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片(例えば、s d A b、s c F v)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 任意選択のリンカー、(c) 第1の T C R サブユニット(例えば、C D 3 ϵ)の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、(d) 第2の T C R サブユニット(例えば、C D 3 ϵ)の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び(e) 第3の T C R サブユニット(例えば、C D 3 ϵ)の細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1、第2、及び第3の T C R サブユニットが全て、T C R α 、T C R β 、T C R γ 、T C R δ 、C D 3 ϵ 、C D 3 γ 、及び C D 3 δ からなる群から選択される、第2の核酸と、第1のプロモーター(例えば、P G K)と、N e f タンパク質(例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f)をコードする第1の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3の T C R サブユニットは同じ(例えば、全て C D 3 ϵ)である。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3の T C R サブユニットは異なっている。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)であって、上流から下流に向かって、第2のプロモーター(例えば、E F 1- α)と、機能的キメラ T C R (c T C R)をコードする第2の核酸であり、機能的キメラ T C R が、(a) 腫瘍抗原(例えば、B C M A、C D 19、C D 20)の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片(例えば、s d A b、s c F v)を含む細胞外リガンド結合ドメイン

10

20

30

40

50

、(b) 任意選択のリンカー、及び(c) 完全長CD3 ϵ (シグナルペプチドを除く) を含む、第2の核酸と、第1のプロモーター (例えば、PGK) と、Nefタンパク質 (例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef) をコードする第1の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、cTCRは、配列番号64のアミノ酸配列を含む抗CD20 cTCRである。いくつかの実施形態では、ベクター (例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター) であって、上流から下流に向かって、第2のプロモーター (例えば、EF1- α) と、機能的T細胞抗原結合体 (TAC) をコードする第2の核酸であり、機能的T細胞抗原結合体が、(a) 腫瘍抗原 (例えば、BCMA、CD19、CD20) の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片 (例えば、sdAb、scFv) を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 任意選択の第1のリンカー、(c) TCRサブユニット (例えば、CD3 ϵ) の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、(d) 任意選択の第2のリンカー、(e) 第1のTCR共受容体 (例えば、CD4) の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、(f) 第2のTCR共受容体 (例えば、CD4) の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び(g) 第3のTCR共受容体 (例えば、CD4) の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、TCRサブユニットが、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択され、第1、第2、及び第3のTCR共受容体が全て、CD4、CD8、及びCD28からなる群から選択される、第2の核酸と、第1のプロモーター (例えば、PGK) と、Nefタンパク質 (例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef) をコードする第1の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCR共受容体は同じである。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCR共受容体は異なっている。いくつかの実施形態では、ベクター (例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター) であって、上流から下流に向かって、第2のプロモーター (例えば、EF1- α) と、機能的T細胞抗原結合体 (TAC) をコードする第2の核酸であり、機能的T細胞抗原結合体が、(a) 腫瘍抗原 (例えば、BCMA、CD19、CD20) の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片 (例えば、sdAb、scFv) を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 任意選択の第1のリンカー、(c) TCRサブユニット (例えば、CD3 ϵ) の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、(d) 任意選択の第2のリンカー、(e) CD4の細胞外ドメインまたはその一部分、(f) CD4の膜貫通ドメイン、及び(g) CD4の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、TCRサブユニットが、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される、第2の核酸と、第1のプロモーター (例えば、PGK) と、Nefタンパク質 (例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef) をコードする第1の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、TACは、配列番号66のアミノ酸配列を含む抗CD20 TACである。いくつかの実施形態では、ベクター (例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター) であって、上流から下流に向かって、第2のプロモーター (例えば、EF1- α) と、機能的TAC様キメラ受容体をコードする第2の核酸であり、機能的TAC様キメラ受容体が、(a) 腫瘍抗原 (例えば、BCMA、CD19、CD20) の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片 (例えば、sdAb、scFv) を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 任意選択の第1のリンカー、(c) 第1のTCRサブユニット (例えば、TCR α) の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、(d) 任意選択の第2のリンカー、(e) 第2のTCRサブユニット (例えば、CD3 ϵ) の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、(f) 第3のTCRサブユニット (例えば、CD3 ϵ) の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び(g) 第4のTCRサブユニット (例えば、CD3 ϵ) の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットが全て、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる

群から選択される、第2の核酸と、第1のプロモーター（例えば、PGK）と、Ne f タンパク質（例えば、wt Ne f、または変異体S I V Ne fなどの変異体Ne f）をコードする第1の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じである。いくつかの実施形態では、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じである。いくつかの実施形態では、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは異なっている。いくつかの実施形態では、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じであるが、第1のTCRサブユニットとは異なっている。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）であって、上流から下流に向かって、第2のプロモーター（例えば、EF1- α ）と、機能的TAC様キメラ受容体をコードする第2の核酸であり、機能的TAC様キメラ受容体が、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）TCRサブユニット（例えば、TCR α ）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、及び（e）完全長CD3 ϵ （シグナルペプチドを除く）を含み、TCRサブユニットが、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される、第2の核酸と、第1のプロモーター（例えば、PGK）と、Ne f タンパク質（例えば、wt Ne f、または変異体S I V Ne fなどの変異体Ne f）をコードする第1の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、Ne f タンパク質は、配列番号12～22のいずれかのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Ne f タンパク質は、（i）aa2～4、aa8～10、aa11～13、aa38～40、aa44～46、aa47～49、aa50～52、aa53～55、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～100、aa107～109、aa110～112、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、aa178～179、179～181aa、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa191～193、aa194～196、aa203～205、aa206～208、aa212～214、aa215～217、aa218～220、aa221～223、aa8～13、aa44～67、aa107～112、aa164～196、aa203～208、もしくはaa212～223、（ii）aa2～4、aa44～46、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～100、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、もしくはaa164～190、または（iv）aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、aa164～169、aa176～181、もしくはaa185～190のいずれかのアミノ酸残基（ここで、アミノ酸残基の位置は、野生型S I V Ne fのものに対応する）における1つ以上の変

異を含む、変異体 S I V N e f である。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、C D 4 及び／または C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、C D 4 及び／または C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、T C R、C D 4、及び C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、T C R の細胞表面発現を下方制御するが、C D 4 及び／または C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、T C R 及び C D 4 の細胞表面発現を下方制御するが、C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、T C R 及び C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御するが、C D 4 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、内在性 T C R の細胞表面発現を下方制御するが、外因性受容体（例えば、工学操作された T C R（例えば、従来の工学操作された T C R、キメラ T C R（c T C R））、T A C、T A C 様キメラ受容体、または C A R（例えば、抗体ベースの C A R、リガンド／受容体ベースの C A R、または A C T R））を下方調節する（例えば、細胞表面発現を下方制御する）ことではない。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体（例えば、工学操作された T C R（例えば、従来の工学操作された T C R、キメラ T C R（c T C R））、T A C、T A C 様キメラ受容体、または C A R（例えば、抗体ベースの C A R、リガンド／受容体ベースの C A R、または A C T R））は、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）により、最大で約 50%、約 40%、約 30%、約 20%、約 10%、または約 5% 下方調節される（例えば、細胞表面発現が下方制御される）。

【0116】

いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）をコードする第 1 の核酸と、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体（例えば、工学操作された T C R（例えば、従来の工学操作された T C R、キメラ T C R（c T C R））、T A C、T A C 様キメラ受容体、または C A R（例えば、抗体ベースの C A R、リガンド／受容体ベースの C A R、または A C T R）など）をコードする第 2 の核酸とを含む、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）であって、第 1 の核酸と第 2 の核酸とが、同じプロモーター（例えば、E F 1- α ）に作動可能に連結している、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、第 1 の核酸は、第 2 の核酸の上流にある。いくつかの実施形態では、第 1 の核酸は、第 2 の核酸の下流にある。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）であって、上流から下流に向かって、プロモーター（例えば、E F 1- α ）と、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）をコードする第 1 の核酸と、第 1 の連結配列（例えば、I R E S や、P 2 A または T 2 A などの自己切断性 2 A ペプチドをコードする核酸配列）と、任意選択の第 2 の連結配列（例えば、(G G G S)₃ リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列）と、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体（例えば、工学操作された T C R（例えば、従来の工学操作された T C R、キメラ T C R（c T C R））、T A C、T A C 様キメラ受容体、または C A R（例えば、抗体ベースの C A R、リガンド／受容体ベースの C A R、または A C T R）など）をコードする第 2 の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）であって、上流から下流に向かって、プロモーター（例えば、E F 1- α ）と、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、変異体 S I

V Ne f などの変異体 Ne f) をコードする第 1 の核酸と、第 1 の連結配列 I R E S と、任意選択の第 2 の連結配列 (例えば、(G G G S)₃ リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列) と、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体 (例えば、工学操作された T C R (例えば、従来の工学操作された T C R、キメラ T C R (c T C R))、T A C、T A C 様キメラ受容体、または C A R (例えば、抗体ベースの C A R、リガンド/受容体ベースの C A R、または A C T R)) をコードする第 2 の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、ベクター (例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター) であって、上流から下流に向かって、プロモーター (例えば、E F 1- α) と、Ne f タンパク質 (例えば、wt Ne f、変異体 S I V Ne f などの変異体 Ne f) をコードする第 1 の核酸と、P 2 A をコードする第 1 の連結配列と、任意選択の第 2 の連結配列 (例えば、(G G G S)₃ リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列) と、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体 (例えば、工学操作された T C R (例えば、従来の工学操作された T C R、キメラ T C R (c T C R))、T A C、T A C 様キメラ受容体、または C A R (例えば、抗体ベースの C A R、リガンド/受容体ベースの C A R、または A C T R)) をコードする第 2 の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、ベクター (例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター) であって、上流から下流に向かって、プロモーター (例えば、E F 1- α) と、Ne f タンパク質 (例えば、wt Ne f、または変異体 S I V Ne f などの変異体 Ne f) をコードする第 1 の核酸と、第 1 の連結配列 (例えば、I R E S や、P 2 A または T 2 A などの自己切断性 2 A ペプチドをコードする核酸配列) と、任意選択の第 2 の連結配列 (例えば、(G G G S)₃ リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列) と、機能的 C A R をコードする第 2 の核酸であり、機能的 C A R が、(a) 抗原 (例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0) を特異的に認識する 1 つ以上 (例えば 1、2、3、4、5、6 またはそれ以上のいずれかの数) の結合部分 (例えば、s d A b、s c F v) を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 膜貫通ドメイン、及び (c) 細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第 2 の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、ベクター (例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター) であって、上流から下流に向かって、プロモーター (例えば、E F 1- α) と、Ne f タンパク質 (例えば、wt Ne f、または変異体 S I V Ne f などの変異体 Ne f) をコードする第 1 の核酸と、第 1 の連結配列 I R E S と、任意選択の第 2 の連結配列 (例えば、(G G G S)₃ リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列) と、機能的 C A R をコードする第 2 の核酸であり、機能的 C A R が、(a) 抗原 (例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0) を特異的に認識する 1 つ以上 (例えば 1、2、3、4、5、6 またはそれ以上のいずれかの数) の結合部分 (例えば、s d A b、s c F v) を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 膜貫通ドメイン、及び (c) 細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第 2 の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、ベクター (例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター) であって、上流から下流に向かって、プロモーター (例えば、E F 1- α) と、Ne f タンパク質 (例えば、wt Ne f、または変異体 S I V Ne f などの変異体 Ne f) をコードする第 1 の核酸と、P 2 A をコードする第 1 の連結配列と、任意選択の第 2 の連結配列 (例えば、(G G G S)₃ リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列) と、機能的 C A R をコードする第 2 の核酸であり、機能的 C A R が、(a) 抗原 (例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0) を特異的に認識する 1 つ以上 (例えば 1、2、3、4、5、6 またはそれ以上のいずれかの数) の結合部分 (例えば、s d A b、s c F v) を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 膜貫通ドメイン、及び (c) 細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第 2 の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、ベクター (例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター) であって、上流から下流に向かって、プロモーター (例えば、E F 1- α) と、Ne f タンパク質 (例えば、wt Ne f、または変異体 S I V Ne f などの変異体 Ne f) をコードする第 1 の核酸

と、第1の連結配列（例えば、I R E Sや、P 2 AまたはT 2 Aなどの自己切断性2 A ペプチドをコードする核酸配列）と、任意選択の第2の連結配列（例えば、(G G G S)₃ リンカーなどのリンカーをコードする可動性核酸配列）と、機能的C A Rをコードする第2の核酸であり、機能的C A Rが、(a) 1つ以上（例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数）の抗B C M A s d A bを含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 膜貫通ドメイン、及び(c) 細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）であって、上流から下流に向かって、プロモーター（例えば、E F 1-α）と、N e fタンパク質（例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f）をコードする第1の核酸と、第1の連結配列I R E Sと、任意選択の第2の連結配列（例えば、(G G G S)₃ リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列）と、機能的C A Rをコードする第2の核酸であり、機能的C A Rが、(a) 1つ以上（例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数）の抗B C M A s d A bを含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 膜貫通ドメイン、及び(c) 細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）であって、上流から下流に向かって、プロモーター（例えば、E F 1-α）と、N e fタンパク質（例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f）をコードする第1の核酸と、P 2 Aをコードする第1の連結配列と、任意選択の第2の連結配列（例えば、(G G G S)₃ リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列）と、機能的C A Rをコードする第2の核酸であり、機能的C A Rが、(a) 1つ以上（例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数）の抗B C M A s d A bを含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 膜貫通ドメイン、及び(c) 細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）であって、上流から下流に向かって、プロモーター（例えば、E F 1-α）と、N e fタンパク質（例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f）をコードする第1の核酸と、第1の連結配列（例えば、I R E Sや、P 2 AまたはT 2 Aなどの自己切断性2 A ペプチドをコードする核酸配列）と、任意選択の第2の連結配列（例えば、(G G G S)₃ リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列）と、機能的キメラT C R (c T C R)をコードする第2の核酸であり、機能的キメラT C Rが、(a) 腫瘍抗原（例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、s d A b、s c F v）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 任意選択のリンカー、(c) 第1のT C Rサブユニット（例えば、C D 3 ε）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、(d) 第2のT C Rサブユニット（例えば、C D 3 ε）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び(e) 第3のT C Rサブユニット（例えば、C D 3 ε）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1、第2、及び第3のT C Rサブユニットが全て、T C R α、T C R β、T C R γ、T C R δ、C D 3 ε、C D 3 γ、及びC D 3 δからなる群から選択される、第2の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のT C Rサブユニットは同じ（例えば、全てC D 3 ε）である。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のT C Rサブユニットは異なっている。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）であって、上流から下流に向かって、プロモーター（例えば、E F 1-α）と、N e fタンパク質（例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f）をコードする第1の核酸と、第1の連結配列（例えば、I R E Sや、P 2 AまたはT 2 Aなどの自己切断性2 A ペプチドをコードする核酸配列）と、任意選択の第2の連結配列（例えば、(G G G S)₃ リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列）と、機能的キメラT C R (c T C R)をコードする第2の核酸であり、機能的キメラT C Rが、(a) 腫瘍抗原（例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0）の1つ以上のエピトープを特異的に認

識する抗原結合性断片（例えば、s d A b、s c F v）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択のリンカー、及び（c）完全長C D 3 ε（シグナルペプチドを除く）を含む、第2の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、c T C Rは、配列番号64のアミノ酸配列を含む抗

C D 2 0 c T C Rである。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）であって、上流から下流に向かって、プロモーター（例えば、E F 1-α）と、N e fタンパク質（例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f）をコードする第1の核酸と、第1の連結配列（例えば、I R E Sや、P 2 AまたはT 2 Aなどの自己切断性2 Aペプチドをコードする核酸配列）と、任意選択の第2の連結配列（例えば、（G G G S）₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列）と、機能的T細胞抗原結合体（T A C）をコードする第2の核酸であり、機能的T細胞抗原結合体が、（a）腫瘍抗原（例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、s d A b、s c F v）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）T C Rサブユニット（例えば、C D 3 ε）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外T C R結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、（e）第1のT C R共受容体（例えば、C D 4）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、（f）第2のT C R共受容体（例えば、C D 4）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び（g）第3のT C R共受容体（例えば、C D 4）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、T C Rサブユニットが、T C R α、T C R β、T C R γ、T C R δ、C D 3 ε、C D 3 γ、及びC D 3 δからなる群から選択され、第1、第2、及び第3のT C R共受容体が全て、C D 4、C D 8、及びC D 2 8からなる群から選択される、第2の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のT C R共受容体は同じである。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のT C R共受容体は異なっている。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）であって、上流から下流に向かって、プロモーター（例えば、E F 1-α）と、N e fタンパク質（例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f）をコードする第1の核酸と、第1の連結配列（例えば、I R E Sや、P 2 AまたはT 2 Aなどの自己切断性2 Aペプチドをコードする核酸配列）と、任意選択の第2の連結配列（例えば、（G G G S）₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列）と、機能的T細胞抗原結合体（T A C）をコードする第2の核酸であり、機能的T細胞抗原結合体が、（a）腫瘍抗原（例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、s d A b、s c F v）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）T C Rサブユニット（例えば、C D 3 ε）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外T C R結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、（e）C D 4の細胞外ドメインまたはその一部分、（f）C D 4の膜貫通ドメイン、及び（g）C D 4の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、T C Rサブユニットが、T C R α、T C R β、T C R γ、T C R δ、C D 3 ε、C D 3 γ、及びC D 3 δからなる群から選択される、第2の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、T A Cは、配列番号66のアミノ酸配列を含む抗C D 2 0 T A Cである。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）であって、上流から下流に向かって、プロモーター（例えば、E F 1-α）と、N e fタンパク質（例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f）をコードする第1の核酸と、第1の連結配列（例えば、I R E Sや、P 2 AまたはT 2 Aなどの自己切断性2 Aペプチドをコードする核酸配列）と、任意選択の第2の連結配列（例えば、（G G G S）₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列）と、機能的T A C様キメラ受容体をコードする第2の核酸であり、機能的T A C様キメラ受容体が、（a）腫瘍抗原（例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結

合性断片（例えば、s d A b、s c F v）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）第1のTCRサブユニット（例えば、TCR α ）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、（e）第2のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、（f）第3のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び（g）第4のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットが全て、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される、第2の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じである。いくつかの実施形態では、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは異なっている。いくつかの実施形態では、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じであるが、第1のTCRサブユニットとは異なっている。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）であって、上流から下流に向かって、プロモーター（例えば、EF1- α ）と、Ne fタンパク質（例えば、wt Ne f、または変異体S I V Ne fなどの変異体Ne f）をコードする第1の核酸と、第1の連結配列（例えば、I R E Sや、P 2 AまたはT 2 Aなどの自己切断性2 Aペプチドをコードする核酸配列）と、任意選択の第2の連結配列（例えば、（G G G S）₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列）と、機能的T A C様キメラ受容体をコードする第2の核酸であり、機能的T A C様キメラ受容体が、（a）腫瘍抗原（例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、s d A b、s c F v）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）TCRサブユニット（例えば、TCR α ）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、及び（e）完全長CD3 ϵ （シグナルペプチドを除く）を含み、TCRサブユニットが、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される、第2の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質は、配列番号12～22のいずれかのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質は、（i）a a 2～4、a a 8～10、a a 11～13、a a 38～40、a a 44～46、a a 47～49、a a 50～52、a a 53～55、a a 56～58、a a 59～61、a a 62～64、a a 65～67、a a 98～100、a a 107～109、a a 110～112、a a 137～139、a a 152～154、a a 164～166、a a 167～169、a a 170～172、a a 173～175、a a 176～178、a a 178～179、179～181 a a、a a 182～184、a a 185～187、a a 188～190、a a 191～193、a a 194～196、a a 203～205、a a 206～208、a a 212～214、a a 215～217、a a 218～220、a a 221～223、a a 8～13、a a 44～67、a a 107～112、a a 164～196、a a 203～208、もしくはa a 212～223、（i i）a a 2～4、a a 44～46、a a 56～58、a a 59～61、a a 62～64、a a 65～67、a a 98～100、a a 107～109、a a 137～139、a a 152～154、a a 164～166、a a 167～169、a a 176～178、a a 178～179、a a 179～181、a a 185～187、a a 188～190、a a 194～196、a a 203～205、a a 44～67、a a 164～169、a a 176～181、a a 185～190、（i i i）a a 2～4、a a 56～58、a a 59～61、a a 62～64、a a 65～67、a a 107～109、a a 137～139、a a 152～154、a a 164～166、a a 167～169、a a 170～172、a a 173～175、a a 176～178、178～179 a a、a a 179～181、a a 182～184、a a 185～187、a a 188～190、a a 194～196、a a 203～205、a a 56～67、もしくは

は a a 1 6 4 ~ 1 9 0、または (i v) a a 2 ~ 4、a a 5 6 ~ 5 8、a a 5 9 ~ 6 1、
 a a 6 2 ~ 6 4、a a 6 5 ~ 6 7、a a 1 0 7 ~ 1 0 9、a a 1 3 7 ~ 1 3 9、a a 1 5
 2 ~ 1 5 4、a a 1 6 4 ~ 1 6 6、a a 1 6 7 ~ 1 6 9、a a 1 7 6 ~ 1 7 8、a a 1 7
 8 ~ 1 7 9、a a 1 7 9 ~ 1 8 1、a a 1 8 5 ~ 1 8 7、a a 1 8 8 ~ 1 9 0、a a 1 9
 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a a 5 6 ~ 6 7、a a 1 6 4 ~ 1 6 9、a a 1 7 6 ~
 1 8 1、もしくは a a 1 8 5 ~ 1 9 0 のいずれかのアミノ酸残基（ここで、アミノ酸残基
 の位置は、野生型 S I V N e f のものに対応する）における 1 つ以上の変異を含む、変
 異体 S I V N e f である。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、変異
 体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、C D 4 及び／または C D 2 8 の細胞表面発現
 を下方制御しない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、w t N e f
 、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、C D 4 及び／または C D 2 8 の
 細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、w t
 N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、T C R、C D 4、及
 び C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質
 （例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、T C R の細胞表面発現を下方
 制御するが、C D 4 及び／または C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御することはない。い
 くつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f などの変異体
 N e f）は、T C R 及び C D 4 の細胞表面発現を下方制御するが、C D 2 8 の細胞表面発
 現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、変
 異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、T C R 及び C D 2 8 の細胞表面発現を下方
 制御するが、C D 4 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、
 N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体
 N e f）は、内在性 T C R の細胞表面発現を下方制御するが、外因性受容体（例えば、工
 学操作された T C R（例えば、従来の工学操作された T C R、キメラ T C R（c T C R）
 ）、T A C、T A C 様キメラ受容体、または C A R（例えば、抗体ベースの C A R、リガ
 ンド／受容体ベースの C A R、または A C T R））を下方調節する（例えば、細胞表面発
 現を下方制御する）ことではない。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体（例
 えば、工学操作された T C R（例えば、従来の工学操作された T C R、キメラ T C R（c T C R）
 ）、T A C、T A C 様キメラ受容体、または C A R（例えば、抗体ベースの C A R、
 リガンド／受容体ベースの C A R、または A C T R））は、N e f タンパク質（例えば、
 w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）により、最大で約 5 0
 %、約 4 0 %、約 3 0 %、約 2 0 %、約 1 0 %、または約 5 % 下方調節される（例えば、
 細胞表面発現が下方制御される）。

【0117】

いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルス
 ベクター）であって、上流から下流に向かって、プロモーター（例えば、E F 1 - α ）と
 、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的
 外因性受容体（例えば、工学操作された T C R（例えば、従来の工学操作された T C R、
 キメラ T C R（c T C R））、T A C、T A C 様キメラ受容体、または C A R（例えば、
 抗体ベースの C A R、リガンド／受容体ベースの C A R、または A C T R））をコードす
 る第 2 の核酸と、第 1 の連結配列（例えば、I R E S や、P 2 A または T 2 A などの自己
 切断性 2 A ペプチドをコードする核酸配列）と、任意選択の第 2 の連結配列（例えば、
 (G G G S)₃ リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列）と、N e f タンパク
 質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）をコード
 する第 1 の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、ベクター（
 例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）であって、上流から下流に向
 かって、プロモーター（例えば、E F 1 - α ）と、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意
 選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体（例えば、工学操作された
 T C R（例えば、従来の工学操作された T C R、キメラ T C R（c T C R））、T A C、
 T A C 様キメラ受容体、または C A R（例えば、抗体ベースの C A R、リガンド／受容体

ベースのCAR、またはACTR))をコードする第2の核酸と、第1の連結配列IRESと、任意選択の第2の連結配列(例えば、(GGGS)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列)と、Neftタンパク質(例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft)をコードする第1の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)であって、上流から下流に向かって、プロモーター(例えば、EF1-α)と、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体(例えば、工学操作されたTCR(例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR(cTCR))、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR(例えば、抗体ベースのCAR、リガンド/受容体ベースのCAR、またはACTR))をコードする第2の核酸と、P2Aをコードする第1の連結配列と、任意選択の第2の連結配列(例えば、(GGGS)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列)と、Neftタンパク質(例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft)をコードする第1の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)であって、上流から下流に向かって、プロモーター(例えば、EF1-α)と、機能的CARをコードする第2の核酸であり、機能的CARが、(a)抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)を特異的に認識する1つ以上(例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数)の結合部分(例えば、sdAb、scFv)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)膜貫通ドメイン、及び(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸と、第1の連結配列(例えば、IRESや、P2AまたはT2Aなどの自己切断性2Aペプチドをコードする核酸配列)と、任意選択の第2の連結配列(例えば、(GGGS)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列)と、Neftタンパク質(例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft)をコードする第1の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)であって、上流から下流に向かって、プロモーター(例えば、EF1-α)と、機能的CARをコードする第2の核酸であり、機能的CARが、(a)抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)を特異的に認識する1つ以上(例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数)の結合部分(例えば、sdAb、scFv)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)膜貫通ドメイン、及び(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸と、第1の連結配列IRESと、任意選択の第2の連結配列(例えば、(GGGS)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列)と、Neftタンパク質(例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft)をコードする第1の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)であって、上流から下流に向かって、プロモーター(例えば、EF1-α)と、機能的CARをコードする第2の核酸であり、機能的CARが、(a)1つ以上(例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数)の抗BCMA sdAbを含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)膜貫通ドメイン、及び(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸と、第1の連結配列(例えば、IRESや、P2AまたはT2

Aなどの自己切断性2Aペプチドをコードする核酸配列)と、任意選択の第2の連結配列(例えば、(GGGS)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列)と、Nefタンパク質(例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef)をコードする第1の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)であって、上流から下流に向かって、プロモーター(例えば、EF1-α)と、機能的CARをコードする第2の核酸であり、機能的CARが、(a)1つ以上(例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数)の抗BCMA sdAbを含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)膜貫通ドメイン、及び(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸と、第1の連結配列IRESと、任意選択の第2の連結配列(例えば、(GGGS)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列)と、Nefタンパク質(例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef)をコードする第1の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)であって、上流から下流に向かって、プロモーター(例えば、EF1-α)と、機能的CARをコードする第2の核酸であり、機能的CARが、(a)1つ以上(例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数)の抗BCMA sdAbを含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)膜貫通ドメイン、及び(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸と、P2Aをコードする第1の連結配列と、任意選択の第2の連結配列(例えば、(GGGS)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列)と、Nefタンパク質(例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef)をコードする第1の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)であって、上流から下流に向かって、プロモーター(例えば、EF1-α)と、機能的キメラTCR(cTCR)をコードする第2の核酸であり、機能的キメラTCRが、(a)腫瘍抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片(例えば、sdAb、scFv)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)任意選択のリンカー、(c)第1のTCRサブユニット(例えば、CD3ε)の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、(d)第2のTCRサブユニット(例えば、CD3ε)の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び(e)第3のTCRサブユニット(例えば、CD3ε)の細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットが全て、TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ、及びCD3δからなる群から選択される、第2の核酸と、第1の連結配列(例えば、IRESや、P2AまたはT2Aなどの自己切断性2Aペプチドをコードする核酸配列)と、任意選択の第2の連結配列(例えば、(GGGS)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列)と、Nefタンパク質(例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef)をコードする第1の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットは同じ(例えば、全てCD3ε)である。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットは異なっている。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)であって、上流から下流に向かって、プロモーター(例えば、EF1-α)と、機能的キメラTCR(cTCR)をコードする第2の核酸であり、機能的キメラTCRが、(a)腫瘍抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片(例えば、sdAb、scFv)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)任意選択のリンカー、及び(c)完全長CD3ε(シグナルペプチドを除く)を含む、第2の核酸と、第1の連結配列(例えば、IRESや、P2AまたはT2Aなどの自己切断性2Aペプチドをコードする核酸配列)と、任意選択の第2の連結配列(例えば、(GGGS)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列)と、Nefタンパク質(例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef)をコードする第1の核酸とを含む、ベクターが提供される。い

くつかの実施形態では、 c T C Rは、配列番号64のアミノ酸配列を含む抗C D 2 0 c T C Rである。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）であって、上流から下流に向かって、プロモーター（例えば、E F 1- α ）と、機能的T細胞抗原結合体（T A C）をコードする第2の核酸であり、機能的T細胞抗原結合体が、（a）腫瘍抗原（例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、s d A b、s c F v）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）T C Rサブユニット（例えば、C D 3 ϵ ）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外T C R結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、（e）第1のT C R共受容体（例えば、C D 4）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、（f）第2のT C R共受容体（例えば、C D 4）の膜貫通ドメインを含む膜貫

10

通ドメイン、及び（g）第3のT C R共受容体（例えば、C D 4）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、T C Rサブユニットが、T C R α 、T C R β 、T C R γ 、T C R δ 、C D 3 ϵ 、C D 3 γ 、及びC D 3 δ からなる群から選択され、第1、第2、及び第3のT C R共受容体が全て、C D 4、C D 8、及びC D 2 8からなる群から選択される、第2の核酸と、第1の連結配列（例えば、I R E Sや、P 2 AまたはT 2 Aなどの自己切断性2 Aペプチドをコードする核酸配列）と、任意選択の第2の連結配列（例えば、（G G G S）₃ リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列）と、N e fタンパク質（例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f）をコードする第1の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のT C R共受容体は同じである。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のT C R共受容体は異なっている。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）であって、上流から下流に向かって、プロモーター（例えば、E F 1- α ）と、機能的T細胞抗原結合体（T A C）をコードする第2の核酸であり、機能的T細胞抗原結合体が、（a）腫瘍抗原（例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、s d A b、s c F v）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）T C Rサブユニット（例えば、C D 3 ϵ ）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外T C R結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、（e）C D 4の細胞外ドメインまたはその一部分、（f）C D 4の膜貫通ドメイン、及び（g）C D 4の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、T C Rサブユニットが、T C R α 、T C R β 、T C R γ 、T C R δ 、C D 3 ϵ 、C D 3 γ 、及びC D 3 δ からなる群から選択される、第2の核酸と、第1の連結配列（例えば、I R E Sや、P 2 AまたはT 2 Aなどの自己切断性2 Aペプチドをコードする核酸配列）と、任意選択の第2の連結配列（例えば、（G G G S）₃ リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列）と、N e fタンパク質（例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f）をコードする第1の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、T A Cは、配列番号66のアミノ酸配列を含む抗C D 2 0 T A Cである。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）であって、上流から下流に向かって、プロモーター（例えば、E F 1- α ）と、機能的T A C様キメラ受容体をコードする第2の核酸であり、機能的T A C様キメラ受容体が、（a）腫瘍抗原（例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、s d A b、s c F v）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）第1のT C Rサブユニット（例えば、T C R α ）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外T C R結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、（e）第2のT C Rサブユニット（例えば、C D 3 ϵ ）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、（f）第3のT C Rサブユニット（例えば、C D 3 ϵ ）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び（g）第4のT C Rサブユニット（例えば、C D 3 ϵ ）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シ

20

30

40

50

グナル伝達ドメインを含み、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットが全て、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される、第2の核酸と、第1の連結配列（例えば、IRESや、P2AまたはT2Aなどの自己切断性2Aペプチドをコードする核酸配列）と、任意選択の第2の連結配列（例えば、(GGGS)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列）と、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）をコードする第1の核酸とを含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じである。いくつかの実施形態では、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じである。いくつかの実施形態では、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは異なっている。いくつかの実施形態では、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じであるが、第1のTCRサブユニットとは異なっている。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）であって、上流から下流に向かって、プロモーター（例えば、EF1- α ）と、機能的TAC様キメラ受容体をコードする第2の核酸であり、機能的TAC様キメラ受容体が、(a)腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)任意選択の第1のリンカー、(c)TCRサブユニット（例えば、TCR α ）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、(d)任意選択の第2のリンカー、及び(e)完全長CD3 ϵ （シグナルペプチドを除く）を含み、TCRサブユニットが、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される、第2の核酸と、第1の連結配列（例えば、IRESや、P2AまたはT2Aなどの自己切断性2Aペプチドをコードする核酸配列）と、任意選択の第2の連結配列（例えば、(GGGS)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列）と、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）をコードする第1の核酸を含む、ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質は、配列番号12～22のいずれかのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質は、(i) aa2～4、aa8～10、aa11～13、aa38～40、aa44～46、aa47～49、aa50～52、aa53～55、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～100、aa107～109、aa110～112、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、aa178～179、179～181aa、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa191～193、aa194～196、aa203～205、aa206～208、aa212～214、aa215～217、aa218～220、aa221～223、aa8～13、aa44～67、aa107～112、aa164～196、aa203～208、もしくはaa212～223、(ii) aa2～4、aa44～46、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～100、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa44～67、aa164～169、aa176～181、aa185～190、(iii) aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、178～179aa、aa179～181、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、もしくはaa164～190、または(iv) aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、a

a 1 7 6 ~ 1 7 8、a a 1 7 8 ~ 1 7 9、a a 1 7 9 ~ 1 8 1、a a 1 8 5 ~ 1 8 7、a a 1 8 8 ~ 1 9 0、a a 1 9 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a a 5 6 ~ 6 7、a a 1 6 4 ~ 1 6 9、a a 1 7 6 ~ 1 8 1、もしくは a a 1 8 5 ~ 1 9 0 のいずれかのアミノ酸残基（ここで、アミノ酸残基の位置は、野生型 S I V N e f のものに対応する）における 1 つ以上の変異を含む、変異体 S I V N e f である。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、C D 4 及び／または C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、C D 4 及び／または C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、T C R、C D 4、及び C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、T C R の細胞表面発現を下方制御するが、C D 4 及び／または C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、T C R 及び C D 4 の細胞表面発現を下方制御するが、C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、T C R 及び C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御するが、C D 4 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、内在性 T C R の細胞表面発現を下方制御するが、外因性受容体（例えば、工学操作された T C R（例えば、従来の工学操作された T C R、キメラ T C R（c T C R））、T A C、T A C 様キメラ受容体、または C A R（例えば、抗体ベースの C A R、リガンド／受容体ベースの C A R、または A C T R））を下方調節する（例えば、細胞表面発現を下方制御する）ことではない。いくつかの実施形態では、機能的外因性受容体（例えば、工学操作された T C R（例えば、従来の工学操作された T C R、キメラ T C R（c T C R））、T A C、T A C 様キメラ受容体、または C A R（例えば、抗体ベースの C A R、リガンド／受容体ベースの C A R、または A C T R））は、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）により、最大で約 5 0 %、約 4 0 %、約 3 0 %、約 2 0 %、約 1 0 %、または約 5 % 下方調節される（例えば、細胞表面発現が下方制御される）。

【0118】

I I I . 修飾 T 細胞を生成する方法

本発明の一態様は、上述の修飾 T 細胞のいずれか 1 つを生成する方法を提供する。本方法は、概して、N e f（例えば変異体 N e f）をコードする第 2 の核酸、及び任意選択で機能的外因性受容体（例えば、工学操作された T C R（例えば、従来の工学操作された T C R、キメラ T C R（c T C R））、T A C、T A C 様キメラ受容体、または C A R（例えば、抗体ベースの C A R、リガンド／受容体ベースの C A R、または A C T R））をコードする第 2 の核酸を、天然の、または工学操作された T 細胞（本明細書では「前駆体 T 細胞」という）に導入することを含む。

【0119】

いくつかの実施形態では、前駆体 T 細胞は、血液、骨髄、リンパ、またはリンパ器官に由来し、免疫系の細胞、例えば自然免疫または適応免疫の細胞である。いくつかの態様において、細胞は、ヒト細胞である。

【0120】

いくつかの実施形態では、前駆体 T 細胞は、細胞株、例えば T 細胞株に由来する。いくつかの実施形態における細胞は、異種源から、例えばマウス、ラット、非ヒト霊長類、及びブタから得られる。

【0121】

いくつかの実施形態では、前駆体 T 細胞は、C D 4 + / C D 8 -、C D 4 - / C D 8 +、C D 4 + / C D 8 +、C D 4 - / C D 8 -、またはそれらの組み合わせである。いくつ

かの実施形態では、T細胞は、ナチュラルキラーT（NK T）細胞である。いくつかの実施形態では、前駆体T細胞は、工学操作されたT細胞、例えば、本明細書に記載される機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））のいずれかである。いくつかの実施形態では、前駆体T細胞は、本明細書に記載される機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR）など）を発現し、BCMA＋腫瘍細胞などの標的細胞に結合すると、IL-2、TFN、及び／またはTNFを産生する。いくつかの実施形態では、CD8＋T細胞は、本明細書に記載される機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））を発現し、標的細胞に結合すると、抗原特異的標的細胞を溶解する。

10

【0122】

いくつかの実施形態では、T細胞は、造血幹細胞、多能性幹細胞、iPS、または胚幹細胞などの幹細胞から分化される。

【0123】

いくつかの実施形態では、Nef及び／または機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））は、本明細書に記載される核酸のいずれか1つまたはベクター（例えば、非ウイルスベクター、及びレンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）のいずれか1つをトランスフェクトすることにより、T細胞に導入される。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））は、CELL SQUEEZE（登録商標）（例えば、米国特許出願公開第20140287509号を参照されたい）などのマイクロ流体システムに細胞を通しながら、細胞膜にタンパク質を挿入することにより、T細胞に導入される。

20

30

【0124】

ベクター（例えば、ウイルスベクター）または単離された核酸を哺乳動物細胞に導入する方法は、当技術分野で公知である。本明細書に記載されるベクターは、物理的、化学的、または生物学的な方法により、T細胞に移入され得る。

【0125】

ベクター（例えば、ウイルスベクター）をT細胞に導入するための物理的方法としては、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、粒子衝突、微量注入、電気穿孔などが挙げられる。ベクター及び／または外因性核酸を含む細胞を生成する方法は、当技術分野で周知である。例えば、Sambrook et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New Yorkを参照されたい。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、ウイルスベクター）は、電気穿孔によって細胞に導入される。

40

【0126】

ベクターをT細胞に導入するための生物学的方法は、DNA及びRNAベクターの使用を含む。ウイルスベクターは、遺伝子を哺乳動物細胞、例えばヒト細胞に挿入するために最も広く使用されている方法となっている。

【0127】

ベクター（例えば、ウイルスベクター）をT細胞に導入するための化学的手段には、コ

50

ロイド分散システム、例えば、高分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビーズ、ならびに水中油エマルション、ミセル、混合ミセル、及びリポソームを含む脂質に基づくシステムが含まれる。送達ビヒクルとして *in vitro* で使用される例示的なコロイドシステムは、リポソーム（例えば、人工膜小胞）である。

【0128】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される *Nef* タンパク質（例えば、*wt Nef*、または変異体 *SI V Nef* などの変異体 *Nef*）及び／または機能的な外因性受容体（例えば、工学操作された *TCR*（例えば、従来の工学操作された *TCR*、キメラ *TCR (cTCR)*）、*TAC*、*TAC* 様キメラ受容体、または *CAR*（例えば、抗体ベースの *CAR*、リガンド／受容体ベースの *CAR*、または *ACTR*））のいずれかをコードする *RNA* 分子を、従来の方法（例えば、*in vitro* 転写）によって調製し、次いで *mRNA* 電気穿孔などの公知の方法によって *T* 細胞に導入してもよい。例えば、*Rabinovich et al., Human Gene Therapy 17:1027-1035* を参照されたい。

【0129】

いくつかの実施形態では、形質導入またはトランスフェクトされた *T* 細胞を、ベクターまたは単離された核酸の導入後に *ex vivo* で増殖させる。いくつかの実施形態では、形質導入またはトランスフェクトされた *T* 細胞を培養して、少なくとも約 1 日間、約 2 日間、約 3 日間、約 4 日間、約 5 日間、約 6 日間、約 7 日間、約 10 日間、約 12 日間、または約 14 日間のうちのいずれかにわたって増殖させる。いくつかの実施形態では、形質導入またはトランスフェクトされた *T* 細胞を、さらに評価またはスクリーニングして、工学操作された哺乳動物細胞を選択する。

【0130】

レポーター遺伝子は、トランスフェクトされた可能性のある細胞を同定し、制御配列の機能性を評価するために使用され得る。一般に、レポーター遺伝子は、レシピエント生物もしくは組織に存在せず、またはそれによって発現されず、発現が何らかの容易に検出可能な特性、例えば、酵素活性により明らかになるポリペプチドをコードする遺伝子である。レポーター遺伝子の発現は、*DNA* がレシピエント細胞に導入された後の好適な時点でアッセイされる。好適なレポーター遺伝子には、ルシフェラーゼ、ベクターガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、分泌アルカリホスファターゼ、または緑色蛍光タンパク質遺伝子をコードする遺伝子が含まれ得る（例えば、*Uiet al. F E B S Letters 479:79-82 (2000)*）。好適な発現システムは周知であり、公知の技術を使用して調製されるか、または商業的に入手され得る。

【0131】

工学操作された *T* 細胞における、本明細書に記載される *Nef* タンパク質（例えば、*wt Nef*、または変異体 *SI V Nef* などの変異体 *Nef*）及び／または機能的な外因性受容体（例えば、工学操作された *TCR*（例えば、従来の工学操作された *TCR*、キメラ *TCR (cTCR)*）、*TAC*、*TAC* 様キメラ受容体、または *CAR*（例えば、抗体ベースの *CAR*、リガンド／受容体ベースの *CAR*、または *ACTR*）など）のいずれかをコードする核酸の存在を確認するための他の方法としては、例えば、サザンブロッティング及びノーザンブロッティング、*RT-PCR* 及び *PCR* などの当業者に周知の分子生物学的アッセイや、特定のペプチドの存在または非存在の、例えば免疫学的方法（*ELISA* 及びウエスタンブロットなど）、蛍光活性化細胞選別（*FACS*）、または磁気活性化細胞選別（*MACS*）による検出といった生化学的アッセイが挙げられる（実施例のセクションも参照されたい）。

【0132】

したがって、いくつかの実施形態では、*Nef* タンパク質（例えば、*wt Nef*、または変異体 *SI V Nef* などの変異体 *Nef*）をコードする第 1 の核酸を、前駆体 *T* 細胞に導入することを含む、修飾 *T* 細胞（例えば、同種 *T* 細胞、内在性 *TCR* 欠損 *T* 細胞、

G v H D 最小化 T 細胞) を生成する方法であって、N e f タンパク質が発現すると、修飾 T 細胞の内在性 T C R が下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、前駆体 T 細胞は、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体 (例えば、工学操作された T C R (例えば、従来の工学操作された T C R、キメラ T C R (c T C R))、T A C、T A C 様キメラ受容体、または C A R (例えば、抗体ベースの C A R、リガンド/受容体ベースの C A R、または A C T R) など) をコードする第 2 の核酸を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体をコードする第 2 の核酸を、前駆体 T 細胞に導入することをさらに含む。いくつかの実施形態では、第 1 の核酸と第 2 の核酸とは、T 細胞に連続的に導入される。したがって、いくつかの実施形態では、修飾 T 細胞 (例えば、同種 T 細胞、内在性 T C R 欠損 T 細胞、G v H D 最小化 T 細胞) を生成する方法であって、N e f タンパク質 (例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) をコードする第 1 の核酸を、前駆体 T 細胞に導入することであり、N e f タンパク質が発現すると、修飾 T 細胞の内在性 T C R が下方調節される、導入することと、次いで、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体 (例えば、工学操作された T C R (例えば、従来の工学操作された T C R、キメラ T C R (c T C R))、T A C、T A C 様キメラ受容体、または C A R (例えば、抗体ベースの C A R、リガンド/受容体ベースの C A R、または A C T R)) をコードする第 2 の核酸を、前駆体 T 細胞に導入することとを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態では、N e f 陽性及び/または内在性 T C R / C D 3 ε 陰性の修飾 T 細胞を単離または濃縮し、次いで、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体 (例えば、工学操作された T C R (例えば、従来の工学操作された T C R、キメラ T C R (c T C R))、T A C、T A C 様キメラ受容体、または C A R (例えば、抗体ベースの C A R、リガンド/受容体ベースの C A R、または A C T R)) をコードする第 2 の核酸を、濃縮された修飾 T 細胞に導入する。いくつかの実施形態では、第 1 の核酸と第 2 の核酸とは、T 細胞に同時に導入される。いくつかの実施形態では、第 1 の核酸と第 2 の核酸とは、別々のベクター上にある。したがって、いくつかの実施形態では、修飾 T 細胞 (例えば、同種 T 細胞、内在性 T C R 欠損 T 細胞、G v H D 最小化 T 細胞) を生成する方法であって、1 つのベクター上にある、N e f タンパク質 (例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) をコードする第 1 の核酸と、別のベクター上にある、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体 (例えば、工学操作された T C R (例えば、従来の工学操作された T C R、キメラ T C R (c T C R))、T A C、T A C 様キメラ受容体、または C A R (例えば、抗体ベースの C A R、リガンド/受容体ベースの C A R、または A C T R)) をコードする第 2 の核酸とを、前駆体 T 細胞に同時に導入することを含み、N e f タンパク質が発現すると、修飾 T 細胞の内在性 T C R が下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質は、配列番号 1 2 ~ 2 2 のいずれかのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質は、(i) a a 2 ~ 4、a a 8 ~ 1 0、a a 1 1 ~ 1 3、a a 3 8 ~ 4 0、a a 4 4 ~ 4 6、a a 4 7 ~ 4 9、a a 5 0 ~ 5 2、a a 5 3 ~ 5 5、a a 5 6 ~ 5 8、a a 5 9 ~ 6 1、a a 6 2 ~ 6 4、a a 6 5 ~ 6 7、a a 9 8 ~ 1 0 0、a a 1 0 7 ~ 1 0 9、a a 1 1 0 ~ 1 1 2、a a 1 3 7 ~ 1 3 9、a a 1 5 2 ~ 1 5 4、a a 1 6 4 ~ 1 6 6、a a 1 6 7 ~ 1 6 9、a a 1 7 0 ~ 1 7 2、a a 1 7 3 ~ 1 7 5、a a 1 7 6 ~ 1 7 8、a a 1 7 8 ~ 1 7 9、1 7 9 ~ 1 8 1 a a、a a 1 8 2 ~ 1 8 4、a a 1 8 5 ~ 1 8 7、a a 1 8 8 ~ 1 9 0、a a 1 9 1 ~ 1 9 3、a a 1 9 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a a 2 0 6 ~ 2 0 8、a a 2 1 2 ~ 2 1 4、a a 2 1 5 ~ 2 1 7、a a 2 1 8 ~ 2 2 0、a a 2 2 1 ~ 2 2 3、a a 8 ~ 1 3、a a 4 4 ~ 6 7、a a 1 0 7 ~ 1 1 2、a a 1 6 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 8、もしくは a a 2 1 2 ~ 2 2 3、(i i) a a 2 ~ 4、a a 4 4 ~ 4 6、a a 5 6 ~ 5 8、a a 5 9 ~ 6 1、a a 6 2 ~ 6 4、a a 6 5 ~ 6 7、a a 9 8 ~ 1 0 0、a a 1 0 7 ~ 1 0 9、a a 1 3 7

10

20

30

40

50

～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176
 ～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188
 ～190、aa194～196、aa203～205、aa44～67、aa164～1
 69、aa176～181、aa185～190、(iii)aa2～4、aa56～5
 8、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa13
 7～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa17
 0～172、aa173～175、aa176～178、178～179aa、aa17
 9～181、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa19
 4～196、aa203～205、aa56～67、もしくはaa164～190、また
 は(iv)aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～
 67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～1
 66、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～1
 81、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～2
 05、aa56～67、aa164～169、aa176～181、もしくはaa185
 ～190のいずれかのアミノ酸残基（ここで、アミノ酸残基の位置は、野生型SIV Ne fのものに対応する）における1つ以上の変異を含む、変異体SIV Ne fである。
 いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質（例えば、変異体SIV Ne fなどの変異
 体Ne f）は、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御しない。いくつか
 の実施形態では、Ne fタンパク質（例えば、wt Ne f、または変異体SIV Ne
 fなどの変異体Ne f）は、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御する
 。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質（例えば、wt Ne f、または変異体S
 IV Ne fなどの変異体Ne f）は、TCR、CD4、及びCD28の細胞表面発現を
 下方制御する。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質（例えば、変異体SIV Ne
 fなどの変異体Ne f）は、TCRの細胞表面発現を下方制御するが、CD4及び／ま
 たはCD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Ne
 fタンパク質（例えば、変異体SIV Ne fなどの変異体Ne f）は、TCR及びCD
 4の細胞表面発現を下方制御するが、CD28の細胞表面発現を下方制御することはない
 。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質（例えば、変異体SIV Ne fなどの変
 異体Ne f）は、TCR及びCD28の細胞表面発現を下方制御するが、CD4の細胞表
 面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質（例え
 ば、wt Ne f、または変異体SIV Ne fなどの変異体Ne f）は、内在性TCRの
 細胞表面発現を下方制御するが、外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例
 えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ
 受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR
 、またはACTR））を下方調節する（例えば、細胞表面発現を下方制御する）ことはな
 い。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例
 えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キ
 メラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのC
 AR、またはACTR））は、Ne fタンパク質（例えば、wt Ne f、または変異体
 SIV Ne fなどの変異体Ne f）により、最大で約50%、約40%、約30%、約
 20%、約10%、または約5%下方調節される（例えば、細胞表面発現が下方制御され
 る）。

【0133】

いくつかの実施形態では、第1の核酸と第2の核酸とは、同じベクター上にある。いく
 つかの実施形態では、第1の核酸と第2の核酸とは、異なるプロモーターに作動可能に連
 結している。したがって、いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルス
 ベクターなどのウイルスベクター）を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞
 （例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞）を生成する方
 法であって、ベクターが、Ne fタンパク質（例えば、wt Ne f、または変異体S
 IV Ne fなどの変異体Ne f）をコードする第1の核酸と、細胞外リガンド結合ドメイ

ン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR）など）をコードする第2の核酸とを含み、第1の核酸と第2の核酸とが、異なるプロモーター（例えば、EF1- α 及びPGK）に作動可能に連結しており、Neftタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、第1の核酸は、第2の核酸の上流にある。いくつかの実施形態では、第1の核酸は、第2の核酸の下流にある。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞（例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞）を生成する方法であって、ベクターが、上流から下流に向かって、第1のプロモーター（例えば、EF1- α ）と、Neftタンパク質（例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft）をコードする第1の核酸と、第2のプロモーター（例えば、PGK）と、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR）など）をコードする第2の核酸とを含み、Neftタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞（例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞）を生成する方法であって、ベクターが、上流から下流に向かって、第2のプロモーター（例えば、EF1- α ）と、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR）など）をコードする第2の核酸と、第1のプロモーター（例えば、PGK）と、Neftタンパク質（例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft）をコードする第1の核酸とを含み、Neftタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。

【0134】

いくつかの実施形態では、第1の核酸と第2の核酸とは、同じプロモーターに作動可能に連結している。したがって、いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞（例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞）を生成する方法であって、ベクターが、Neftタンパク質（例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft）をコードする第1の核酸と、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR）など）をコードする第2の核酸とを含み、第1の核酸と第2の核酸とが、同じプロモーター（例えば、EF1- α ）に作動可能に連結しており、Neftタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、第1の核酸は、第2の核酸の上流にある。いくつかの実施形態では、第1の核酸は、第2の核酸の下流にある。いくつかの実施形態では、第1の核酸と第2の核酸とは、連結配列（例えば、IRESや、P2AまたはT2Aなどの自己切断性2Aペプチドをコードする核酸配列）を介して結合している。

【0135】

したがって、いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターな

どのウイルスベクター)を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞(例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞)を生成する方法であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター(例えば、EF1- α)と、Nefタンパク質(例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef)をコードする第1の核酸と、第1の連結配列(例えば、IRESや、P2AまたはT2Aなどの自己切断性2Aペプチドをコードする核酸配列)と、任意選択の第2の連結配列(例えば、(GGGS)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列)と、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体(例えば、工学操作されたTCR(例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR(cTCR))、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR(例えば、抗体ベースのCAR、リガンド/受容体ベースのCAR、またはACTR)など)をコードする第2の核酸とを含む、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞(例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞)を生成する方法であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター(例えば、EF1- α)と、Nefタンパク質(例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef)をコードする第1の核酸と、第1の連結配列 IRESと、任意選択の第2の連結配列(例えば、(GGGS)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列)と、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体(例えば、工学操作されたTCR(例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR(cTCR))、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR(例えば、抗体ベースのCAR、リガンド/受容体ベースのCAR、またはACTR))をコードする第2の核酸とを含む、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞(例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞)を生成する方法であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター(例えば、EF1- α)と、Nefタンパク質(例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef)をコードする第1の核酸と、P2Aをコードする第1の連結配列と、任意選択の第2の連結配列(例えば、(GGGS)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列)と、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体(例えば、工学操作されたTCR(例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR(cTCR))、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR(例えば、抗体ベースのCAR、リガンド/受容体ベースのCAR、またはACTR))をコードする第2の核酸とを含む、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞(例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞)を生成する方法であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター(例えば、EF1- α)と、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体(例えば、工学操作されたTCR(例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR(cTCR))、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR(例えば、抗体ベースのCAR、リガンド/受容体ベースのCAR、またはACTR))をコードする第2の核酸と、第1の連結配列(例えば、IRESや、P2AまたはT2Aなどの自己切断性2Aペプチドをコードする核酸配列)と、任意選択の第2の連結配列(例えば、(GGGS)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列)と、Nefタンパク質(例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef)をコードする第1の核酸とを含む、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。いくつか

の実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞（例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞）を生成する方法であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター（例えば、EF1- α ）と、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））をコードする第2の核酸と、第1の連結配列IRESと、任意選択の第2の連結配列（例えば、（GGGS）₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列）と、Neftタンパク質（例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft）をコードする第1の核酸とを含み、Neftタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。

いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞（例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞）を生成する方法であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター（例えば、EF1- α ）と、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））をコードする第2の核酸と、P2Aをコードする第1の連結配列と、任意選択の第2の連結配列（例えば、（GGGS）₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列）と、Neftタンパク質（例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft）をコードする第1の核酸とを含み、Neftタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。

いくつかの実施形態では、Neftタンパク質は、配列番号12～22のいずれかのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Neftタンパク質は、

(i) aa2～4、aa8～10、aa11～13、aa38～40、aa44～46、aa47～49、aa50～52、aa53～55、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～100、aa107～109、aa110～112、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、aa178～179、179～181aa、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa191～193、aa194～196、aa203～205、aa206～208、aa212～214、aa215～217、aa218～220、aa221～223、aa8～13、aa44～67、aa107～112、aa164～196、aa203～208、もしくはaa212～223、(ii) aa2～4、aa44～46、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～100、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa44～67、aa164～169、aa176～181、aa185～190、(iii) aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、178～179aa、aa179～181、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、もしくはaa164～190、または(iv) aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188～190

10

20

30

40

50

、a a 1 9 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a a 5 6 ~ 6 7、a a 1 6 4 ~ 1 6 9、a a 1 7 6 ~ 1 8 1、もしくはa a 1 8 5 ~ 1 9 0のいずれかのアミノ酸残基（ここで、アミノ酸残基の位置は、野生型S I V N e fのものに対応する）における1つ以上の変異を含む、変異体S I V N e fである。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質（例えば、変異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、C D 4及び／またはC D 2 8の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質（例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、C D 4及び／またはC D 2 8の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質（例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、T C R、C D 4、及びC D 2 8の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質（例えば、変異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、T C Rの細胞表面発現を下方制御するが、C D 4及び／またはC D 2 8の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質（例えば、変異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、T C R及びC D 4の細胞表面発現を下方制御するが、C D 2 8の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質（例えば、変異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、T C R及びC D 2 8の細胞表面発現を下方制御するが、C D 4の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質（例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、内在性T C Rの細胞表面発現を下方制御するが、外因性受容体（例えば、工学操作されたT C R（例えば、従来の工学操作されたT C R、キメラT C R（c T C R））、T A C、T A C様キメラ受容体、またはC A R（例えば、抗体ベースのC A R、リガンド／受容体ベースのC A R、またはA C T R））を下方調節する（例えば、細胞表面発現を下方制御する）ことではない。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたT C R（例えば、従来の工学操作されたT C R、キメラT C R（c T C R））、T A C、T A C様キメラ受容体、またはC A R（例えば、抗体ベースのC A R、リガンド／受容体ベースのC A R、またはA C T R））は、N e fタンパク質（例えば、w t

N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f）により、最大で約50%、約40%、約30%、約20%、約10%、または約5%下方調節される（例えば、細胞表面発現が下方制御される）。

【0136】

いくつかの実施形態では、N e fタンパク質（例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、発現すると、修飾T細胞における内在性T C R、M H C、C D 3 ε、C D 3 γ、及び／またはC D 3 δを下方調節する。例えば、内在性T C R、M H C、C D 3 ε、C D 3 γ、及び／またはC D 3 δの細胞表面発現を、少なくとも約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%下方制御する。いくつかの実施形態では、N e fを発現する修飾T細胞は、未修飾の内在性T C R座位を含む。いくつかの実施形態では、N e fを発現する修飾T細胞は、T C R αまたはT C R βなどの修飾された内在性T C R座位を含む。いくつかの実施形態では、内在性T C R座位は、C R I S P R-C a s、T A L E N、及びZ F Nから選択される遺伝子編集システムによって修飾される。

【0137】

いくつかの実施形態では、内在性T C R座位は、配列番号23の核酸配列を含むg R N Aを含むC R I S P R-C a sシステムによって修飾される。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質は、S I V N e f、H I V 1 N e f、H I V 2 N e f、及びそれらの相同体（例えば、H I V F 2 N e f、H I V C 2 N e f、及びH I V H 2 N 2 N e f）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質は、野生型N e fである。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質は、配列番号12~17のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質

は、変異体N e fである。いくつかの実施形態では、変異体N e fは、ミリスチル化部位、N末端αヘリックス、チロシンベースのA P動員、C D 4結合部位、酸性クラスター、プロリンベースのリピート、P A K結合ドメイン、C O P I 動員ドメイン、ジロイシンベースのA P動員ドメイン、V - A T P a s e 及びR a f - 1 結合ドメイン、もしくはそれらの任意の組み合わせにおける1つ以上の変異を含むか、または表11に示されるアミノ酸残基のいずれかにおける1つ以上の変異を含む。いくつかの実施形態では、変異は、挿入、欠失、点変異（複数可）、及び／または転位を含む。いくつかの実施形態では、変異体N e fは、配列番号18～22のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、変異体N e fは、（i）a a 2～4、a a 8～10、a a 11～13、a a 38～40、a a 44～46、a a 47～49、a a 50～52、a a 53～55、a a 56～58、a a 59～61、a a 62～64、a a 65～67、a a 98～100、a a 107～109、a a 110～112、a a 137～139、a a 152～154、a a 164～166、a a 167～169、a a 170～172、a a 173～175、a a 176～178、a a 178～179、179～181 a a、a a 182～184、a a 185～187、a a 188～190、a a 191～193、a a 194～196、a a 203～205、a a 206～208、a a 212～214、a a 215～217、a a 218～220、a a 221～223、a a 8～13、a a 44～67、a a 107～112、a a 164～196、a a 203～208、もしくはa a 212～223、（i i）a a 2～4、a a 44～46、a a 56～58、a a 59～61、a a 62～64、a a 65～67、a a 98～100、a a 107～109、a a 137～139、a a 152～154、a a 164～166、a a 167～169、a a 176～178、a a 178～179、a a 179～181、a a 185～187、a a 188～190、a a 194～196、a a 203～205、a a 44～67、a a 164～169、a a 176～181、a a 185～190、（i i i）a a 2～4、a a 56～58、a a 59～61、a a 62～64、a a 65～67、a a 107～109、a a 137～139、a a 152～154、a a 164～166、a a 167～169、a a 170～172、a a 173～175、a a 176～178、178～179 a a、a a 179～181、a a 182～184、a a 185～187、a a 188～190、a a 194～196、a a 203～205、a a 56～67、もしくはa a 164～190、または（i v）a a 2～4、a a 56～58、a a 59～61、a a 62～64、a a 65～67、a a 107～109、a a 137～139、a a 152～154、a a 164～166、a a 167～169、a a 176～178、a a 178～179、a a 179～181、a a 185～187、a a 188～190、a a 194～196、a a 203～205、a a 56～67、a a 164～169、a a 176～181、もしくはa a 185～190のいずれかのアミノ酸残基（ここで、アミノ酸残基の位置は、野生型S I V N e fのものに対応する）における1つ以上の変異を含む、変異体S I V N e fである。いくつかの実施形態では、変異体N e f（例えば、変異体S I V N e f）は、修飾T細胞において発現した場合、内在性C D 4及び／またはC D 28に対する下方調節作用（例えば、細胞表面発現の下方制御）を、野生型N e fタンパク質と比較して低減させる。例えば、下方調節作用を、少なくとも約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%低減させる。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質（例えば、変異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、C D 4及び／またはC D 28の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質（例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、C D 4及び／またはC D 28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質（例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、T C R、C D 4、及びC D 28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質（例えば、変異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、T C Rの細胞表面発現を下方制御するが、C D 4及び／またはC D 28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質（例えば、変異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、

T C R及びC D 4の細胞表面発現を下方制御するが、C D 2 8の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質（例えば、変異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、T C R及びC D 2 8の細胞表面発現を下方制御するが、C D 4の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質（例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、内在性T C Rの細胞表面発現を下方制御するが、外因性受容体（例えば、工学操作されたT C R（例えば、従来の工学操作されたT C R、キメラT C R（c T C R））、T A C、T A C様キメラ受容体、またはC A R（例えば、抗体ベースのC A R、リガンド／受容体ベースのC A R、またはA C T R））を下方調節する（例えば、細胞表面発現を下方制御する）ことではない。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたT C R（例えば、従来の工学操作されたT C R、キメラT C R（c T C R））、T A C、T A C様キメラ受容体、またはC A R（例えば、抗体ベースのC A R、リガンド／受容体ベースのC A R、またはA C T R））は、N e fタンパク質（例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f）により、最大で約5 0 %、約4 0 %、約3 0 %、約2 0 %、約1 0 %、または約5 %下方調節される（例えば、細胞表面発現が下方制御される）。

10

【0138】

いくつかの実施形態では、N e fタンパク質（例えば、変異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、発現すると、C D 3 ζ、C D 4、C D 2 8、及び／または、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたT C R（例えば、従来の工学操作されたT C R、キメラT C R（c T C R））、T A C、T A C様キメラ受容体、またはC A R（例えば、抗体ベースのC A R、リガンド／受容体ベースのC A R、またはA C T R）など）を下方調節する（例えば、発現を下方制御する）ことはいないか、あるいは、C D 3 ζ、C D 4、C D 2 8、及び／または、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体を最大で約5 0 %、約4 0 %、約3 0 %、約2 0 %、約1 0 %、または約5 %下方調節する（例えば、発現を下方制御する）。

20

【0139】

いくつかの実施形態では、プロモーターは、ラウス肉腫ウイルス（R S V）プロモーター、サルウイルス4 0（S V 4 0）プロモーター、サイトメガロウイルス最初期遺伝子プロモーター（C M V I E）、伸長因子1アルファプロモーター（E F 1 - α）、ホスホグリセリン酸キナーゼ1（P G K）プロモーター、ユビキチンC（U B Q - C）プロモーター、サイトメガロウイルスエンハンサー／ニワトリベータアクチン（C A G）プロモーター、ポリオーマエンハンサー／単純ヘルペスチミジンキナーゼ（M C 1）プロモーター、ベータアクチン（β - A C T）プロモーター、「骨髄増殖性肉腫ウイルスエンハンサー、陰性対照領域欠失、d 1 5 8 7 r e vプライマー結合部位置換（M N D）」プロモーター、N F A Tプロモーター、T E T O N（登録商標）プロモーター、及びN F κ Bプロモーターからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、プロモーターは、E F 1 - αまたはP G Kである。

30

【0140】

いくつかの実施形態では、連結配列は、P 2 A、T 2 A、E 2 A、F 2 A、B m C P V 2 A、B m I F V 2 A、(G S)_n、(G S G G S)_n、(G G G S)_n、(G G G G S)_nをコードする核酸配列、またはI R E S、S V 4 0、C M V、U B C、E F 1 α、P G K、C A G Gの核酸配列、またはそれらの任意の組み合わせ（式中、nは、少なくとも1の整数である）のいずれかを含む。いくつかの実施形態では、連結配列は、I R E Sである。いくつかの実施形態では、連結配列は、P 2 Aをコードする核酸配列である。

40

【0141】

いくつかの実施形態では、ベクターは、ウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ワクシニアベクター、レンチウイルスベクター、単純ヘルペスウ

50

イルスベクター、及びそれらの誘導体からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ベクターは、エピソード発現ベクター、改良エピソードベクター（E E V）、P i g g y B a c トランスポサゼベクター、またはS l e e p i n g B e a u t y (S B) トランスポゾンシステムなどの非ウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体は、工学操作されたT C R（例えば、従来の工学操作されたT C R、キメラT C R）である。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体は、T A C、T A C 様キメラ受容体である。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体は、C A R（例えば、抗体ベースのC A R、リガンド／受容体ベースのC A R、A C T R）などの非T C R 受容体である。

【0142】

いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体は、（a）抗原（例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0）を特異的に認識する1つ以上（例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数）の結合部分（例えば、s d A b、s c F v）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）膜貫通ドメイン、及び（c）細胞内シグナル伝達ドメインを含む、C A Rである。いくつかの実施形態では、1つ以上の結合部分は、抗体またはその抗原結合性断片である。いくつかの実施形態では、1つ以上の結合部分は、ラクダI g、I g N A R、F a b 断片、F a b ' 断片、F (a b) ' 2断片、F (a b) ' 3断片、F v、一本鎖F v抗体（s c F v）、b i s - s c F v、(s c F v)₂、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ジスルフィド安定化F vタンパク質（d s F v）、及び単一ドメイン抗体（s d A b、ナノボディ）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、1つ以上の結合部分は、s d A b（例えば、抗B C M A s d A b）またはs c F vである。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、2つ以上のs d A bがひとつに結合したものを含む。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、2つ以上のs c F vがひとつに結合したものを含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の結合部分は、リガンドに由来する少なくとも1つのドメインまたは受容体の細胞外ドメインを含み、このリガンドまたは受容体は、細胞表面抗原である。いくつかの実施形態では、リガンドまたは受容体は、N K G 2 A、N K G 2 C、N K G 2 F、N K G 2 D、B C M A、A P R I L、B A F F、I L - 3、I L - 1 3、L L T 1、A I C L、D N A M - 1、及びN K p 8 0からなる群から選択される分子に由来する。いくつかの実施形態では、リガンドは、A P R I LまたはB A F Fに由来する。いくつかの実施形態では、受容体は、F c 受容体の細胞外ドメインなどのF c 結合ドメインに由来する。いくつかの実施形態では、F c 受容体は、F c γ 受容体（F c γ R）である。いくつかの実施形態では、F c γ Rは、C D 1 6 A（F c γ R I I I a）、C D 1 6 B（F c γ R I I I b）、C D 6 4 A、C D 6 4 B、C D 6 4 C、C D 3 2 A、及びC D 3 2 Bからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、C A Rは、一価かつ単一特異性である。いくつかの実施形態では、C A Rは、多価（例えば、二重特異性）かつ単一特異性である。いくつかの実施形態では、C A Rは、多価（例えば、二価）かつ多重特異性（例えば、二重特異性）である。いくつかの実施形態では、抗原は、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 2、C D 3 0、C D 3 3、C D 3 8、B C M A、C S 1、C D 1 3 8、C D 1 2 3 / I L 3 R α、c - M e t、g p 1 0 0、M U C 1、I G F - I 受容体、E p C A M、E G F R / E G F R v I I I、H E R 2、I G F 1 R、メソテリン、P S M A、W T 1、R O R 1、C E A、G D - 2、N Y - E S O - 1、M A G E A 3、G P C 3、糖脂質F 7 7、P D - L 1、P D - L 2、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、抗原は、B C M A、C D 1 9、C D 2 0である。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、T細胞受容体のα、β、またはζ鎖、C D 3 ζ、C D 3 ε、C D 4、C D 5、C D 8 α、C D 9、C D 1 6、C D 2 2、C D 2 7、C D 2 8、C D 3 3、C D 3 7、C D 4 5、C D 6 4、C D 8 0、C D 8 6、C D 1 3 4、C D 1 3 7（4 - 1 B B）、C D 1 5 2、C D 1 5 4、及びP D - 1からなる群から選択される分子に由来する。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、C D 8 αに由来する。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫エフェクター細胞の一次細胞内シグ

10

20

30

40

50

ナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、一次細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3 ζ 、CD3 γ 、CD3 ϵ 、CD3 δ 、FcR γ (FCER1G)、FcR β (FcイプシロンRIb)、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD66d、FcガンマリIIa、DAP10、及びDAP12に由来する。いくつかの実施形態では、一次細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3 ζ 、DAP12、またはCD3 γ に由来する。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、共刺激シグナル伝達ドメインは、CARD11、CD2 (LFA-2)、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54 (ICAM-1)、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD162 (SELP LG)、CD258 (LIGHT)、CD270 (HVEM、LIGHTR)、CD276 (B7-H3)、CD278 (ICOS)、CD279 (PD-1)、CD319 (SLAMF7)、LFA-1 (リンパ球機能関連抗原1)、NKG2C、CDS、GITR、BAFFR、NKp80 (KLRF1)、CD160、CD19、CD4、IPO-3、BLAME (SLAMF8)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D、CD83、CD150 (SLAMF1)、CD152 (CTLA-4)、CD223 (LAG3)、CD273 (PD-L2)、CD274 (PD-L1)、DAP10、TRIM、ZAP70、CD83に特異的に結合するリガンド、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される共刺激分子に由来する。いくつかの実施形態では、共刺激シグナル伝達ドメインは、CD137の細胞質ドメインを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるCARは、細胞外リガンド結合ドメインのC末端と膜貫通ドメインのN末端との間に位置するヒンジドメインをさらに含む。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、CD8 α に由来する。いくつかの実施形態では、CARは、ポリペプチドのN末端に位置するシグナルペプチドをさらに含む。いくつかの実施形態では、シグナルペプチドは、CD8 α に由来する。いくつかの実施形態では、CARは、N末端からC末端に向かって、CD8 α シグナルペプチド、細胞外リガンド結合ドメイン (例えば、BCMA、APRIL/BAFFリガンド、またはFc受容体の1つ以上のエピトープを特異的に認識する1つ以上のsdAb)、CD8 α ヒンジドメイン、CD8 α 膜貫通ドメイン、CD137に由来する共刺激シグナル伝達ドメイン、及びCD3 ζ に由来する一次細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【0143】

いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体は、(a) 腫瘍抗原 (例えば、BCMA、CD19、CD20) の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片 (例えば、sdAb、scFv) を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 任意選択のリンカー、(c) 第1のTCRサブユニット (例えば、CD3 ϵ) の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、(d) 第2のTCRサブユニット (例えば、CD3 ϵ) の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び(e) 第3のTCRサブユニット (例えば、CD3 ϵ) の細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む、キメラTCR (cTCR) であり、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットは全て、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットは同じ (例えば、全てCD3 ϵ) である。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットは異なっている。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体は、(a) 腫瘍抗原 (例えば、BCMA、CD19、CD20) の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片 (例えば、sdAb、scFv) を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 任意選択の第1のリンカー、(c) TCRサブユニット (例えば、CD3 ϵ) の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、(d) 任意選択の第2のリンカー、(e) 第1のTCR共受容体 (例えば、CD4) の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、(f) 第2のTCR共受容体 (例えば、CD4) の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び(g) 第3のTCR共受容体 (例えば、CD4) の細胞

内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含む、T細胞抗原結合体（TAC）であり、TCRサブユニットは、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択され、第1、第2、及び第3のTCR共受容体は全て、CD4、CD8、及びCD28からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCR共受容体は同じである。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCR共受容体は異なっている。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体は、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）第1のTCRサブユニット（例えば、TCR α ）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、（e）第2のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、（f）第3のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び（g）第4のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含む、TAC様キメラ受容体であり、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは全て、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じである。いくつかの実施形態では、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じである。いくつかの実施形態では、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは異なっている。いくつかの実施形態では、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じであるが、第1のTCRサブユニットとは異なっている。

【0144】

いくつかの実施形態では、Nef（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）を発現する修飾T細胞は、組織不適合性の個体において、GvHD応答を誘発しないか、または修飾T細胞の起源となる前駆体T細胞のドナーから単離された初代T細胞によって誘発されるGvHD応答と比較して低減したGvHD応答を誘発する。いくつかの実施形態では、本方法は、第1の核酸及び／または第2の核酸を含むT細胞を単離または濃縮することをさらに含む。いくつかの実施形態では、本方法は、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）を発現する修飾T細胞から、CD3 ϵ 陰性T細胞を単離または濃縮することをさらに含む。いくつかの実施形態では、本方法は、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）を発現する修飾T細胞から、内在性TCR α 陰性T細胞を単離または濃縮することをさらに含む。いくつかの実施形態では、本方法は、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）を発現する修飾T細胞を、少なくとも1つの薬学的に許容される担体と配合することをさらに含む。いくつかの実施形態では、本方法は、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）を発現する有効量の修飾T細胞、または、Nefタンパク質を発現する修飾T細胞と、少なくとも1つの薬学的に許容される担体とを含む、有効量の医薬製剤を、個体に投与することをさらに含む。いくつかの実施形態では、個体は、がんを有する。いくつかの実施形態では、個体はヒトである。

【0145】

いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体は、（a）抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）を特異的に認識する1つ以上（例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数）の結合部分（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）膜貫通ドメイン、及び（c）細胞内シグナル伝達ドメインを含む、CARである。したがって、いくつかの実施形態では、修飾T細胞（例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞）を生成する方法であって、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef

)をコードする第1の核酸を、前駆体T細胞に導入することであり、Ne fタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、導入することと、次いで、CARをコードする第2の核酸を、前駆体T細胞に導入することであり、CARが、(a)抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)を特異的に認識する1つ以上(例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数)の結合部分(例えば、sdAb、scFv)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)膜貫通ドメイン、及び(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含む、導入することを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態では、Ne f陽性及び／または内在性TCR／CD3ε陰性の修飾T細胞を単離または濃縮し、次いで、CARをコードする第2の核酸を、濃縮された修飾T細胞に導入する。いくつかの実施形態では、第1の核酸と第2の核酸とは、T細胞に同時に導入される。いくつかの実施形態では、第1の核酸と第2の核酸とは、別々のベクター上にある。したがって、いくつかの実施形態では、修飾T細胞(例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞)を生成する方法であって、1つのベクター上にある、Ne fタンパク質(例えば、wt Ne f、または変異体SIV Ne fなどの変異体Ne f)をコードする第1の核酸と、別のベクター上にある、CARをコードする第2の核酸とを、前駆体T細胞に同時に導入することを含み、CARが、(a)抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)を特異的に認識する1つ以上(例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数)の結合部分(例えば、sdAb、scFv)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)膜貫通ドメイン、及び(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含む、Ne fタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質は、配列番号12～22のいずれかのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質は、(i) aa2～4、aa8～10、aa11～13、aa38～40、aa44～46、aa47～49、aa50～52、aa53～55、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～100、aa107～109、aa110～112、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、aa178～179、179～181aa、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa191～193、aa194～196、aa203～205、aa206～208、aa212～214、aa215～217、aa218～220、aa221～223、aa8～13、aa44～67、aa107～112、aa164～196、aa203～208、もしくはaa212～223、(ii) aa2～4、aa44～46、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～100、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa44～67、aa164～169、aa176～181、aa185～190、(iii) aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、178～179aa、aa179～181、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、もしくはaa164～190、または(iv) aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、aa164～169、aa176～181、もしくはaa185～190のいずれかのアミノ酸残基(ここで、アミノ酸残基の位置は、野生型SIV Ne fのものに対応する)における1つ以上の変異を含む、変異体SIV Ne fである。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質(

例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) は、C D 4 及び／または C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質 (例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) は、C D 4 及び／または C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質 (例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) は、T C R、C D 4、及び C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質 (例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) は、T C R の細胞表面発現を下方制御するが、C D 4 及び／または C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質 (例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) は、T C R 及び C D 4 の細胞表面発現を下方制御するが、C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質 (例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) は、T C R 及び C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御するが、C D 4 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質 (例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) は、内在性 T C R の細胞表面発現を下方制御するが、C A R を下方調節する (例えば、細胞表面発現を下方制御する) ことではない。いくつかの実施形態では、機能的 C A R は、N e f タンパク質 (例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) により、最大で約 5 0 %、約 4 0 %、約 3 0 %、約 2 0 %、約 1 0 %、または約 5 % 下方調節される (例えば、細胞表面発現が下方制御される)。

【0146】

いくつかの実施形態では、修飾 T 細胞 (例えば、同種 T 細胞、内在性 T C R 欠損 T 細胞、G v H D 最小化 T 細胞) を生成する方法であって、N e f タンパク質 (例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) をコードする第 1 の核酸を、前駆体 T 細胞に導入することであり、N e f タンパク質が発現すると、修飾 T 細胞の内在性 T C R が下方調節される、導入することと、次いで、キメラ T C R (c T C R) をコードする第 2 の核酸を、前駆体 T 細胞に導入することであり、キメラ T C R が、(a) 腫瘍抗原 (例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0) の 1 つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片 (例えば、s d A b、s c F v) を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 任意選択のリンカー、(c) 第 1 の T C R サブユニット (例えば、C D 3 ε) の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、(d) 第 2 の T C R サブユニット (例えば、C D 3 ε) の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び (e) 第 3 の T C R サブユニット (例えば、C D 3 ε) の細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第 1、第 2、及び第 3 の T C R サブユニットが全て、T C R α、T C R β、T C R γ、T C R δ、C D 3 ε、C D 3 γ、及び C D 3 δ からなる群から選択される、導入することとを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態では、N e f 陽性及び／または内在性 T C R / C D 3 ε 陰性の修飾 T 細胞を単離または濃縮し、次いで、c T C R をコードする第 2 の核酸を、濃縮された修飾 T 細胞に導入する。いくつかの実施形態では、第 1 の核酸と第 2 の核酸とは、T 細胞に同時に導入される。いくつかの実施形態では、第 1 の核酸と第 2 の核酸とは、別々のベクター上にある。したがって、いくつかの実施形態では、修飾 T 細胞 (例えば、同種 T 細胞、内在性 T C R 欠損 T 細胞、G v H D 最小化 T 細胞) を生成する方法であって、1 つのベクター上にある、N e f タンパク質 (例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) をコードする第 1 の核酸と、別のベクター上にある、キメラ T C R (c T C R) をコードする第 2 の核酸とを、前駆体 T 細胞に同時に導入することを含み、キメラ T C R が、(a) 腫瘍抗原 (例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0) の 1 つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片 (例えば、s d A b、s c F v) を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 任意選択のリンカー、(c) 第 1 の T C R サブユニット (例えば、C D 3 ε) の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、(d) 第 2 の T C R サブユニット (例えば、C D 3 ε) の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び (e) 第 3 の T C R サブユニット (例えば、C D 3 ε) の細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第 1

、第2、及び第3のTCRサブユニットが全て、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択され、Ne fタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットは同じ（例えば、全てCD3 ϵ ）である。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットは異なっている。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質は、配列番号12～22のいずれかのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質は、（i）aa2～4、aa8～10、aa11～13、aa38～40、aa44～46、aa47～49、aa50～52、aa53～55、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～100、aa107～109、aa110～112、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、aa178～179、179～181aa、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa191～193、aa194～196、aa203～205、aa206～208、aa212～214、aa215～217、aa218～220、aa221～223、aa8～13、aa44～67、aa107～112、aa164～196、aa203～208、もしくはaa212～223、（ii）aa2～4、aa44～46、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～100、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa44～67、aa164～169、aa176～181、aa185～190、（iii）aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、178～179aa、aa179～181、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、もしくはaa164～190、または（iv）aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、aa164～169、aa176～181、もしくはaa185～190のいずれかのアミノ酸残基（ここで、アミノ酸残基の位置は、野生型SIV Ne fのものに対応する）における1つ以上の変異を含む、変異体SIV Ne fである。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質（例えば、変異体SIV Ne fなどの変異体Ne f）は、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質（例えば、wt Ne f、または変異体SIV Ne fなどの変異体Ne f）は、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質（例えば、wt Ne f、または変異体SIV Ne fなどの変異体Ne f）は、TCR、CD4、及びCD28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質（例えば、変異体SIV Ne fなどの変異体Ne f）は、TCRの細胞表面発現を下方制御するが、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質（例えば、変異体SIV Ne fなどの変異体Ne f）は、TCR及びCD4の細胞表面発現を下方制御するが、CD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質（例えば、変異体SIV Ne fなどの変異体Ne f）は、TCR及びCD28の細胞表面発現を下方制御するが、CD4の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質（例えば、wt Ne f、または変異体SIV Ne fなどの変異体Ne f）は、内在性TCRの細胞表面発現を下方制御するが、cTCRを下方調節する（例

えば、細胞表面発現を下方制御する）ことはない。いくつかの実施形態では、機能的 c T C R は、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）により、最大で約 50 %、約 40 %、約 30 %、約 20 %、約 10 %、または約 5 % 下方調節される（例えば、細胞表面発現が下方制御される）。

【0147】

いくつかの実施形態では、修飾 T 細胞（例えば、同種 T 細胞、内在性 T C R 欠損 T 細胞、G v H D 最小化 T 細胞）を生成する方法であって、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）をコードする第 1 の核酸を、前駆体 T 細胞に導入することであり、N e f タンパク質が発現すると、修飾 T 細胞の内在性 T C R が下方調節される、導入することと、次いで、T 細胞抗原結合体（T A C）をコードする第 2 の核酸を、前駆体 T 細胞に導入することであり、T 細胞抗原結合体が、（a）腫瘍抗原（例えば、B C M A、C D 19、C D 20）の 1 つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、s d A b、s c F v）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第 1 のリンカー、（c）T C R サブユニット（例えば、C D 3 ε）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外 T C R 結合ドメイン、（d）任意選択の第 2 のリンカー、（e）第 1 の T C R 共受容体（例えば、C D 4）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、（f）第 2 の T C R 共受容体（例えば、C D 4）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び（g）第 3 の T C R 共受容体（例えば、C D 4）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、T C R サブユニットが、T C R α、T C R β、T C R γ、T C R δ、C D 3 ε、C D 3 γ、及び C D 3 δ からなる群から選択され、第 1、第 2、及び第 3 の T C R 共受容体が全て、C D 4、C D 8、及び C D 28 からなる群から選択される、導入することを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態では、N e f 陽性及び／または内在性 T C R / C D 3 ε 陰性の修飾 T 細胞を単離または濃縮し、次いで、T A C をコードする第 2 の核酸を、濃縮された修飾 T 細胞に導入する。いくつかの実施形態では、第 1 の核酸と第 2 の核酸とは、T 細胞に同時に導入される。いくつかの実施形態では、第 1 の核酸と第 2 の核酸とは、別々のベクター上にある。したがって、いくつかの実施形態では、修飾 T 細胞（例えば、同種 T 細胞、内在性 T C R 欠損 T 細胞、G v H D 最小化 T 細胞）を生成する方法であって、1 つのベクター上にある、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）をコードする第 1 の核酸と、別のベクター上にある、T 細胞抗原結合体（T A C）をコードする第 2 の核酸とを、前駆体 T 細胞に同時に導入することを含み、T 細胞抗原結合体が、（a）腫瘍抗原（例えば、B C M A、C D 19、C D 20）の 1 つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、s d A b、s c F v）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第 1 のリンカー、（c）T C R サブユニット（例えば、C D 3 ε）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外 T C R 結合ドメイン、（d）任意選択の第 2 のリンカー、（e）第 1 の T C R 共受容体（例えば、C D 4）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、（f）第 2 の T C R 共受容体（例えば、C D 4）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び（g）第 3 の T C R 共受容体（例えば、C D 4）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、T C R サブユニットが、T C R α、T C R β、T C R γ、T C R δ、C D 3 ε、C D 3 γ、及び C D 3 δ からなる群から選択され、第 1、第 2、及び第 3 の T C R 共受容体が全て、C D 4、C D 8、及び C D 28 からなる群から選択され、N e f タンパク質が発現すると、修飾 T 細胞の内在性 T C R が下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、第 1、第 2、及び第 3 の T C R 共受容体は同じ（例えば、全て C D 4）である。いくつかの実施形態では、第 1、第 2、及び第 3 の T C R 共受容体は異なっている。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質は、配列番号 12 ~ 22 のいずれかのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質は、（i）a a 2 ~ 4、a a 8 ~ 10、a a 11 ~ 13、a a 38 ~ 40、a a 44 ~ 46、a a 47 ~ 49、a a 50 ~ 52、a a 53 ~ 55、a a 56 ~ 58、a a 59 ~ 61、a a 62 ~ 64、a a 65 ~ 67、a a 98 ~ 100、a a 107 ~ 109、a a 110 ~ 1

12、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、aa178～179、179～181aa、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa191～193、aa194～196、aa203～205、aa206～208、aa212～214、aa215～217、aa218～220、aa221～223、aa8～13、aa44～67、aa107～112、aa164～196、aa203～208、もしくはaa212～223、(ii)aa2～4、aa44～46、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～100、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa44～67、aa164～169、aa176～181、aa185～190、(iii)aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、178～179aa、aa179～181、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、もしくはaa164～190、または(iv)aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、aa164～169、aa176～181、もしくはaa185～190のいずれかのアミノ酸残基（ここで、アミノ酸残基の位置は、野生型SIV Nefのものに対応する）における1つ以上の変異を含む、変異体SIV Nefである。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCR、CD4、及びCD28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCRの細胞表面発現を下方制御するが、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCR及びCD4の細胞表面発現を下方制御するが、CD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCR及びCD28の細胞表面発現を下方制御するが、CD4の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、内在性TCRの細胞表面発現を下方制御するが、TACを下方調節する（例えば、細胞表面発現を下方制御する）ことではない。いくつかの実施形態では、機能的TACは、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）により、最大で約50%、約40%、約30%、約20%、約10%、または約5%下方調節される（例えば、細胞表面発現が下方制御される）。

【0148】

いくつかの実施形態では、修飾T細胞（例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞）を生成する方法であって、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）をコードする第1の核酸を、前駆体T細胞に導入することであり、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される、導入することと、次いで、TAC様キメラ受容体をコードす

る第2の核酸を、前駆体T細胞に導入することであり、TAC様キメラ受容体が、(a) 腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 任意選択の第1のリンカー、(c) 第1のTCRサブユニット（例えば、TCR α ）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、(d) 任意選択の第2のリンカー、(e) 第2のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、(f) 第3のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び(g) 第4のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットが全て、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される、方法が提供される。いくつかの実施形態では、Ne f陽性及び／または内在性TCR／CD3 ϵ 陰性の修飾T細胞を単離または濃縮し、次いで、TAC様キメラ受容体をコードする第2の核酸を、濃縮された修飾T細胞に導入する。いくつかの実施形態では、第1の核酸と第2の核酸とは、T細胞に同時に導入される。いくつかの実施形態では、第1の核酸と第2の核酸とは、別々のベクター上にある。したがって、いくつかの実施形態では、修飾T細胞（例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞）を生成する方法であって、1つのベクター上にある、Ne fタンパク質（例えば、wt Ne f、または変異体SIV Ne fなどの変異体Ne f）をコードする第1の核酸と、別のベクター上にある、TAC様キメラ受容体をコードする第2の核酸とを、前駆体T細胞に同時に導入することを含み、TAC様キメラ受容体が、(a) 腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 任意選択の第1のリンカー、(c) 第1のTCRサブユニット（例えば、TCR α ）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、(d) 任意選択の第2のリンカー、(e) 第2のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、(f) 第3のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び(g) 第4のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットが全て、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択され、Ne fタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じである。いくつかの実施形態では、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じである。いくつかの実施形態では、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは異なっている。いくつかの実施形態では、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じであるが、第1のTCRサブユニットとは異なっている。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質は、配列番号12～22のいずれかのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質は、(i) aa2～4、aa8～10、aa11～13、aa38～40、aa44～46、aa47～49、aa50～52、aa53～55、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～100、aa107～109、aa110～112、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、aa178～179、179～181aa、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa191～193、aa194～196、aa203～205、aa206～208、aa212～214、aa215～217、aa218～220、aa221～223、aa8～13、aa44～67、aa107～112、aa164～196、aa203～208、もしくはaa212～223、(ii) aa2～4、aa44～46、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～100、aa107～109、aa137～139、aa152～

154、aa164~166、aa167~169、aa176~178、aa178~179、aa179~181、aa185~187、aa188~190、aa194~196、aa203~205、aa44~67、aa164~169、aa176~181、aa185~190、(iii)aa2~4、aa56~58、aa59~61、aa62~64、aa65~67、aa107~109、aa137~139、aa152~154、aa164~166、aa167~169、aa170~172、aa173~175、aa176~178、178~179aa、aa179~181、aa182~184、aa185~187、aa188~190、aa194~196、aa203~205、aa56~67、もしくはaa164~190、または(iv)aa2~4、aa56~58、aa59~61、aa62~64、aa65~67、aa107~109、aa137~139、aa152~154、aa164~166、aa167~169、aa176~178、aa178~179、aa179~181、aa185~187、aa188~190、aa194~196、aa203~205、aa56~67、aa164~169、aa176~181、もしくはaa185~190のいずれかのアミノ酸残基（ここで、アミノ酸残基の位置は、野生型SIV Nefのものに対応する）における1つ以上の変異を含む、変異体SIV Nefである。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCR、CD4、及びCD28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCRの細胞表面発現を下方制御するが、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCR及びCD4の細胞表面発現を下方制御するが、CD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCR及びCD28の細胞表面発現を下方制御するが、CD4の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、内在性TCRの細胞表面発現を下方制御するが、TAC様キメラ受容体を下方調節する（例えば、細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、機能的TAC様キメラ受容体は、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）により、最大で約50%、約40%、約30%、約20%、約10%、または約5%下方調節される（例えば、細胞表面発現が下方制御される）。

【0149】

いくつかの実施形態では、第1の核酸と第2の核酸とは、同じベクター上にある。いくつかの実施形態では、第1の核酸と第2の核酸とは、異なるプロモーターに作動可能に連結している。したがって、いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞（例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞）を生成する方法であって、ベクターが、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）をコードする第1の核酸と、CARをコードする第2の核酸とを含み、CARが、(a)抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）を特異的に認識する1つ以上（例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数）の結合部分（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)膜貫通ドメイン、及び(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1の核酸と第2の核酸とが、異なるプロモーター（例えば、EF1- α 及びPGK）に作動可能に連結しており、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が

提供される。いくつかの実施形態では、第1の核酸は、第2の核酸の上流にある。いくつかの実施形態では、第1の核酸は、第2の核酸の下流にある。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞（例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞）を生成する方法であって、ベクターが、上流から下流に向かって、第1のプロモーター（例えば、EF1- α ）と、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）をコードする第1の核酸と、第2のプロモーター（例えば、PGK）と、CARをコードする第2の核酸であり、CARが、（a）抗原（例えば、BCMA、CD20、CD19）を特異的に認識する1つ以上（例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数）の結合部分（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）膜貫通ドメイン、及び（c）細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸とを含み、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞（例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞）を生成する方法であって、ベクターが、上流から下流に向かって、第2のプロモーター（例えば、EF1- α ）と、CARをコードする第2の核酸であり、CARが、（a）抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）を特異的に認識する1つ以上（例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数）の結合部分（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）膜貫通ドメイン、及び（c）細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸と、第1のプロモーター（例えば、PGK）と、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）をコードする第1の核酸とを含み、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、第1の核酸と第2の核酸とは、同じプロモーターに作動可能に連結している。したがって、いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞（例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞）を生成する方法であって、ベクターが、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）をコードする第1の核酸と、CARをコードする第2の核酸とを含み、CARが、（a）抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）を特異的に認識する1つ以上（例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数）の結合部分（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）膜貫通ドメイン、及び（c）細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第1の核酸と第2の核酸とが、同じプロモーター（例えば、EF1- α ）に作動可能に連結しており、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、第1の核酸は、第2の核酸の上流にある。いくつかの実施形態では、第1の核酸は、第2の核酸の下流にある。いくつかの実施形態では、第1の核酸と第2の核酸とは、連結配列、例えば、IRESや、P2AまたはT2Aなどの自己切断性2Aペプチドをコードする核酸配列を介して結合している。したがって、いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞（例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞）を生成する方法であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター（例えば、EF1- α ）と、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）をコードする第1の核酸と、第1の連結配列（例えば、IRESや、P2AまたはT2Aなどの自己切断性2Aペプチドをコードする核酸配列）と、任意選択の第2の連結配列（例えば、（GGGS）₃ リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列）と、CARをコードする第2の核酸であり、CARが、（a）抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）を特異的に認識する1つ以上（例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数）の結合部分

(例えば、s d A b、s c F v)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)膜貫通ドメイン、及び(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸とを含み、N e fタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性T C Rが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞(例えば、同種T細胞、内在性T C R欠損T細胞、G v H D最小化T細胞)を生成する方法であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター(例えば、E F 1-α)と、N e fタンパク質(例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f)をコードする第1の核酸と、第1の連結配列I R E Sと、任意選択の第2の連結配列(例えば、(G G G S)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列)と、C A Rをコードする第2の核酸であり、C A Rが、(a)抗原(例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0)を特異的に認識する1つ以上(例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数)の結合部分(例えば、s d A b、s c F v)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)膜貫通ドメイン、及び(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸とを含み、N e fタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性T C Rが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞(例えば、同種T細胞、内在性T C R欠損T細胞、G v H D最小化T細胞)を生成する方法であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター(例えば、E F 1-α)と、N e fタンパク質(例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f)をコードする第1の核酸と、P 2 Aをコードする第1の連結配列と、任意選択の第2の連結配列(例えば、(G G G S)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列)と、C A Rをコードする第2の核酸であり、C A Rが、(a)抗原(例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0)を特異的に認識する1つ以上(例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数)の結合部分(例えば、s d A b、s c F v)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)膜貫通ドメイン、及び(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸と、第1の連結配列(例えば、I R E Sや、P 2 AまたはT 2 Aなどの自己切断性2 Aペプチドをコードする核酸配列)と、任意選択の第2の連結配列(例えば、(G G G S)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列)と、N e fタンパク質(例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f)をコードする第1の核酸とを含み、N e fタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性T C Rが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞(例えば、同種T細胞、内在性T C R欠損T細胞、G v H D最小化T細胞)を生成する方法であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター(例えば、E F 1-α)と、C A Rをコードする第2の核酸であり、C A Rが、(a)抗原(例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0)を特異的に認識する1つ以上(例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数)の結合部分(例えば、s d A b、s c F v)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)膜貫通ドメイン、及び(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸と、第1の連結配列I R E Sと、任意選択の第2の連結配列(例えば、(G G G S)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核

酸配列)と、N e fタンパク質(例えば、w t N e f、変異体S I V N e fなどの変異体N e f)をコードする第1の核酸とを含み、N e fタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性T C Rが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞(例えば、同種T細胞、内在性T C R欠損T細胞、G v H D最小化T細胞)を生成する方法であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター(例えば、E F 1- α)と、C A Rをコードする第2の核酸であり、C A Rが、(a)抗原(例えば、B C M A、C D 19、C D 20)を特異的に認識する1つ以上(例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数)の結合部分(例えば、s d A b、s c F v)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)膜貫通ドメイン、及び(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸と、P 2 Aをコードする第1の連結配列と、任意選択の第2の連結配列(例えば、(G G G S)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列)と、N e fタンパク質(例えば、w t N e f、変異体S I V N e fなどの変異体N e f)をコードする第1の核酸とを含み、N e fタンパク質が発現すると、修飾T

10

細胞の内在性T C Rが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質は、配列番号12~22のいずれかのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質は、(i) a a 2~4、a a 8~10、a a 11~13、a a 38~40、a a 44~46、a a 47~49、a a 50~52、a a 53~55、a a 56~58、a a 59~61、a a 62~64、a a 65~67、a a 98~100、a a 107~109、a a 110~112、a a 137~139、a a 152~154、a a 164~166、a a 167~169、a a 170~172、a a 173~175、a a 176~178、a a 178~179、179~181 a a、a a 182~184、a a 185~187、a a 188~190、a a 191~193、a a 194~196、a a 203~205、a a 206~208、a a 212~214、a a 215~217、a a 218~220、a a 221~223、a a 8~13、a a 44~67、a a 107~112、a a 164~196、a a 203~208、もしくはa a 212~223、(i i) a a 2~4、a a 44~46、a a 56~58、a a 59~61、a a 62~64、a a 65~67、a a 98~100、a a 107~109、a a 137~139、a a 152~154、a a 164~166、a a 167~169、a a 176~178、a a 178~179、a a 179~181、a a 185~187、a a 188~190、a a 194~196、a a 203~205、a a 44~67、a a 164~169、a a 176~181、a a 185~190、(i i i) a a 2~4、a a 56~58、a a 59~61、a a 62~64、a a 65~67、a a 107~109、a a 137~139、a a 152~154、a a 164~166、a a 167~169、a a 170~172、a a 173~175、a a 176~178、178~179 a a、a a 179~181、a a 182~184、a a 185~187、a a 188~190、a a 194~196、a a 203~205、a a 56~67、もしくはa a 164~190、または(i v) a a 2~4、a a 56~58、a a 59~61、a a 62~64、a a 65~67、a a 107~109、a a 137~139、a a 152~154、a a 164~166、a a 167~169、a a 176~178、a a 178~179、a a 179~181、a a 185~187、a a 188~190、a a 194~196、a a 203~205、a a 56~67、a a 164~169、a a 176~181、もしくはa a 185~190のいずれかのアミノ酸残基(ここで、アミノ酸残基の位置は、野生型S I V N e fのものに対応する)における1つ以上の変異を含む、変異体S I V N e fである。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質(例えば、変異体S I V N e fなどの変異体N e f)は、C D 4及び/またはC D 28の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質(例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f)は、C D 4及び/またはC D 28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実

20

30

40

50

施形態では、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、T C R、C D 4、及び C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、T C R の細胞表面発現を下方制御するが、C D 4 及び／または C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、T C R 及び C D 4 の細胞表面発現を下方制御するが、C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、T C R 及び C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御するが、C D 4 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、内在性 T C R の細胞表面発現を下方制御するが、C A R を下方調節する（例えば、細胞表面発現を下方制御する）ことではない。いくつかの実施形態では、機能的 C A R は、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）により、最大で約 5 0 %、約 4 0 %、約 3 0 %、約 2 0 %、約 1 0 %、または約 5 % 下方調節される（例えば、細胞表面発現が下方制御される）。

【0150】

いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体は、（a）1つ以上（例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数）の抗 B C M A s d A b を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）膜貫通ドメイン、及び（c）細胞内シグナル伝達ドメインを含む、C A R である。したがって、いくつかの実施形態では、修飾 T 細胞（例えば、同種 T 細胞、内在性 T C R 欠損 T 細胞、G v H D 最小化 T 細胞）を生成する方法であって、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）をコードする第 1 の核酸を、前駆体 T 細胞に導入することであり、N e f タンパク質が発現すると、修飾 T 細胞の内在性 T C R が下方調節される、導入することと、次いで、C A R をコードする第 2 の核酸を、前駆体 T 細胞に導入することであり、C A R が、（a）1つ以上（例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数）の抗 B C M A s d A b を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）膜貫通ドメイン、及び（c）細胞内シグナル伝達ドメインを含む、導入することを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態では、N e f 陽性及び／または内在性 T C R / C D 3 ε 陰性の修飾 T 細胞を単離または濃縮し、次いで、C A R をコードする第 2 の核酸を、濃縮された修飾 T 細胞に導入する。いくつかの実施形態では、第 1 の核酸と第 2 の核酸とは、T 細胞に同時に導入される。いくつかの実施形態では、第 1 の核酸と第 2 の核酸とは、別々のベクター上にある。したがって、いくつかの実施形態では、修飾 T 細胞（例えば、同種 T 細胞、内在性 T C R 欠損 T 細胞、G v H D 最小化 T 細胞）を生成する方法であって、1つのベクター上にある、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）をコードする第 1 の核酸と、別のベクター上にある、C A R をコードする第 2 の核酸とを、前駆体 T 細胞に同時に導入することを含み、C A R が、（a）1つ以上（例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数）の抗 B C M A s d A b を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）膜貫通ドメイン、及び（c）細胞内シグナル伝達ドメインを含み、N e f タンパク質が発現すると、修飾 T 細胞の内在性 T C R が下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質は、配列番号 1 2 ~ 2 2 のいずれかのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質は、（i）a a 2 ~ 4、a a 8 ~ 1 0、a a 1 1 ~ 1 3、a a 3 8 ~ 4 0、a a 4 4 ~ 4 6、a a 4 7 ~ 4 9、a a 5 0 ~ 5 2、a a 5 3 ~ 5 5、a a 5 6 ~ 5 8、a a 5 9 ~ 6 1、a a 6 2 ~ 6 4、a a 6 5 ~ 6 7、a a 9 8 ~ 1 0 0、a a 1 0 7 ~ 1 0 9、a a 1 1 0 ~ 1 1 2、a a 1 3 7 ~ 1 3 9、a a 1 5 2 ~ 1 5 4、a a 1 6 4 ~ 1 6 6、a a 1 6 7 ~ 1 6 9、a a 1 7 0 ~ 1 7 2、a a 1 7 3 ~ 1 7 5、a a 1 7 6 ~ 1 7 8、a a 1 7 8 ~ 1 7 9、1 7 9 ~ 1 8 1 a a、a a 1 8 2 ~ 1 8 4、a a 1 8 5 ~ 1 8 7、a a 1 8 8 ~ 1 9 0、a a 1 9 1 ~ 1 9 3、a a 1 9 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a a 2 0

10

20

30

40

50

6～208、aa212～214、aa215～217、aa218～220、aa221～223、aa8～13、aa44～67、aa107～112、aa164～196、aa203～208、もしくはaa212～223、(ii)aa2～4、aa44～46、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～100、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa44～67、aa164～169、aa176～181、aa185～190、(iii)aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、178～179aa、aa179～181、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、もしくはaa164～190、または(iv)aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、aa164～169、aa176～181、もしくはaa185～190のいずれかのアミノ酸残基（ここで、アミノ酸残基の位置は、野生型SIV Nefのものに対応する）における1つ以上の変異を含む、変異体SIV Nefである。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCR、CD4、及びCD28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCRの細胞表面発現を下方制御するが、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCR及びCD4の細胞表面発現を下方制御するが、CD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCR及びCD28の細胞表面発現を下方制御するが、CD4の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、内在性TCRの細胞表面発現を下方制御するが、CARを下方調節する（例えば、細胞表面発現を下方制御する）ことではない。いくつかの実施形態では、機能的CARは、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）により、最大で約50%、約40%、約30%、約20%、約10%、または約5%下方調節される（例えば、細胞表面発現が下方制御される）。

【0151】

いくつかの実施形態では、第1の核酸と第2の核酸とは、同じベクター上にある。いくつかの実施形態では、第1の核酸と第2の核酸とは、異なるプロモーターに作動可能に連結している。したがって、いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞（例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞）を生成する方法であって、ベクターが、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）をコードする第1の核酸と、CARをコードする第2の核酸とを含み、CARが、(a)1つ以上（例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数）の抗BCMA sdAbを含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)

膜貫通ドメイン、及び(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1の核酸と第2の核酸とが、異なるプロモーター(例えば、EF1- α 及びPGK)に作動可能に連結しており、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、第1の核酸は、第2の核酸の上流にある。いくつかの実施形態では、第1の核酸は、第2の核酸の下流にある。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞(例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞)を生成する方法であって、ベクターが、上流から下流に向かって、第1のプロモーター(例えば、EF1- α)と、Nefタンパク質(例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef)をコードする第1の核酸と、第2

のプロモーター(例えば、PGK)と、CARをコードする第2の核酸であり、CARが、(a)1つ以上(例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数)の抗BCMA sdAbを含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)膜貫通ドメイン、及び(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸とを含み、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞(例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞)を生成する方法であって、ベクターが、上流から下流に向

かって、第2のプロモーター(例えば、EF1- α)と、CARをコードする第2の核酸であり、CARが、(a)1つ以上(例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数)の抗BCMA sdAbを含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)膜貫通ドメイン、及び(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸と、第1のプロモーター(例えば、PGK)と、Nefタンパク質(例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef)をコードする第1の核酸とを含み、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、第1の核酸と第2の核酸とは、同じプロモーターに作動可能に連結している。したがって、いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞(例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞)を生成する方法であって、ベクターが、Nefタンパク質(例えば、wt Nef、または変異体SIV

Nefなどの変異体Nef)をコードする第1の核酸と、CARをコードする第2の核酸とを含み、CARが、(a)1つ以上(例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数)の抗BCMA sdAbを含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)膜貫通ドメイン、及び(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1の核酸と第2の核酸とが、同じプロモーター(例えば、EF1- α)に作動可能に連結しており、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、第1の核酸は、第2の核酸の上流にある。いくつかの実施形態では、第1の核酸は、第2の核酸の下流にある。いくつかの実施形態では、第1の核酸と第2の核酸とは、連結配列(例えば、IRESや、P2AまたはT2Aなどの自己切断性2Aペプチドをコードする核酸配列)を介して結合している。したがって、いくつかの実施

形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞(例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞)を生成する方法であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター(例えば、EF1- α)と、Nefタンパク質(例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef)をコードする第1の核酸と、第1の連結配列(例えば、IRESや、P2AまたはT2Aなどの自己切断性2Aペプチドをコードする核酸配列)と、任意選択の第2の連結配列(例えば、(GGGS)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列)と、CARをコードする第2の核酸であり、CARが、(a)1つ以上(例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数)の抗BCMA sdAbを含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)膜貫通ド

メイン、及び(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸とを含み、Ne fタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞(例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞)を生成する方法であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター(例えば、EF1-α)と、Ne fタンパク質(例えば、wt Ne f、変異体SIV Ne fなどの変異体Ne f)をコードする第1の核酸と、第1の連結配列IRESと、任意選択の第2の連結配列(例えば、(GGGS)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列)と、CARをコードする第2の核酸であり、CARが、(a)1つ以上(例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数)の抗BCMA sdAbを含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)膜貫通ドメイン、及び(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸とを含み、Ne fタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞(例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞)を生成する方法であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター(例えば、EF1-α)と、Ne fタンパク質(例えば、wt Ne f、変異体SIV Ne fなどの変異体Ne f)をコードする第1の核酸と、P2Aをコードする第1の連結配列と、任意選択の第2の連結配列(例えば、(GGGS)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列)と、CARをコードする第2の核酸であり、CARが、(a)1つ以上(例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数)の抗BCMA sdAbを含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)膜貫通ドメイン、及び(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸とを含み、Ne fタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞(例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞)を生成する方法であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター(例えば、EF1-α)と、CARをコードする第2の核酸であり、CARが、(a)1つ以上(例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数)の抗BCMA sdAbを含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)膜貫通ドメイン、及び(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸と、第1の連結配列(例えば、IRESや、P2AまたはT2Aなどの自己切断性2Aペプチドをコードする核酸配列)と、任意選択の第2の連結配列(例えば、(GGGS)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列)と、Ne fタンパク質(例えば、wt Ne f、または変異体SIV Ne fなどの変異体Ne f)をコードする第1の核酸とを含み、Ne fタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞(例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞)を生成する方法であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター(例えば、EF1-α)と、CARをコードする第2の核酸であり、CARが、(a)1つ以上(例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数)の抗BCMA sdAbを含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)膜貫通ドメイン、及び(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸と、第1の連結配列IRESと、任意選択の第2の連結配列(例えば、(GGGS)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列)と、Ne fタンパク質(例えば、wt Ne f、変異体SIV Ne fなどの変異体Ne f)をコードする第1の核酸とを含み、Ne fタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞(例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T

細胞)を生成する方法であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター(例えば、EF1- α)と、CARをコードする第2の核酸であり、CARが、(a)1つ以上(例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数)の抗BCMA sdAbを含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)膜貫通ドメイン、及び(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含む、第2の核酸と、P2Aをコードする第1の連結配列と、任意選択の第2の連結配列(例えば、(GGGS)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列)と、Nefタンパク質(例えば、wt Nef、変異体SIV Nefなどの変異体Nef)をコードする第1の核酸とを含み、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、2つ以上の抗BCMA sdAbがひとつに結合したものを含む。いくつかの実施形態では、CARは、一価かつ単一特異性である。いくつかの実施形態では、CARは、多価(例えば、二重特異性)かつ単一特異性である。いくつかの実施形態では、CARは、多価(例えば、二価)かつ多重特異性(例えば、二重特異性)である。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質は、配列番号12~22のいずれかのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質は、(i) aa 2~4、aa 8~10、aa 11~13、aa 38~40、aa 44~46、aa 47~49、aa 50~52、aa 53~55、aa 56~58、aa 59~61、aa 62~64、aa 65~67、aa 98~100、aa 107~109、aa 110~112、aa 137~139

9、aa 152~154、aa 164~166、aa 167~169、aa 170~172、aa 173~175、aa 176~178、aa 178~179、179~181 aa、aa 182~184、aa 185~187、aa 188~190、aa 191~193、aa 194~196、aa 203~205、aa 206~208、aa 212~214、aa 215~217、aa 218~220、aa 221~223、aa 8~13、aa 44~67、aa 107~112、aa 164~196、aa 203~208、もしくはaa 212~223、(ii) aa 2~4、aa 44~46、aa 56~58、aa 59~61、aa 62~64、aa 65~67、aa 98~100、aa 107~109、aa 137~139、aa 152~154、aa 164~166、aa 167~169、aa 176~178、aa 178~179、aa 179~181、aa 185~187、aa 188~190、aa 194~196、aa 203~205、aa 44~67、aa 164~169、aa 176~181、aa 185~190、(iii) aa 2~4、aa 56~58、aa 59~61、aa 62~64、aa 65~67、aa 107~109、aa 137~139、aa 152~154、aa 164~166、aa 167~169、aa 170~172、aa 173~175、aa 176~178、178~179 aa、aa 179~181、aa 182~184、aa 185~187、aa 188~190、aa 194~196、aa 203~205、aa 56~67、もしくはaa 164~190、または(iv) aa 2~4、aa 56~58、aa 59~61、aa 62~64、aa 65~67、aa 107~109、aa 137~139、aa 152~154、aa 164~166、aa 167~169、aa 176~178、aa 178~179、aa 179~181、aa 185~187、aa 188~190、aa 194~196、aa 203~205、aa 56~67、aa 164~169、aa 176~181、もしくはaa 185~190のいずれかのアミノ酸残基(ここで、アミノ酸残基の位置は、野生型SIV Nefのものに対応する)における1つ以上の変異を含む、変異体SIV Nefである。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質(例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef)は、CD4及び/またはCD28の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質(例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef)は、CD4及び/またはCD28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質(例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef)は、TCR、CD4、及びCD28の細胞

表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCRの細胞表面発現を下方制御するが、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCR及びCD4の細胞表面発現を下方制御するが、CD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCR及びCD28の細胞表面発現を下方制御するが、CD4の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、内在性TCRの細胞表面発現を下方制御するが、CARを下方調節する（例えば、細胞表面発現を下方制御する）ことではない。いくつかの実施形態では、機能的CARは、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）により、最大で約50%、約40%、約30%、約20%、約10%、または約5%下方調節される（例えば、細胞表面発現が下方制御される）。

【0152】

いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞（例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞）を生成する方法であって、ベクターが、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）をコードする第1の核酸と、キメラTCR（cTCR）をコードする第2の核酸とを含み、キメラTCRが、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択のリンカー、（c）第1のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、（d）第2のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び（e）第3のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットが全て、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択され、第1の核酸と第2の核酸とが、異なるプロモーター（例えば、EF1- α 及びPGK）に作動可能に連結しており、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、第1の核酸は、第2の核酸の上流にある。いくつかの実施形態では、第1の核酸は、第2の核酸の下流にある。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞（例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞）を生成する方法であって、ベクターが、上流から下流に向かって、第1のプロモーター（例えば、EF1- α ）と、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）をコードする第1の核酸と、第2のプロモーター（例えば、PGK）と、キメラTCR（cTCR）をコードする第2の核酸であり、キメラTCRが、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択のリンカー、（c）第1のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、（d）第2のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び（e）第3のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットが全て、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される、第2の核酸とを含み、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞（

10

20

30

40

50

例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞）を生成する方法であって、ベクターが、上流から下流に向かって、第2のプロモーター（例えば、EF1- α ）と、キメラTCR（cTCR）をコードする第2の核酸であり、キメラTCRが、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択のリンカー、（c）第1のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、（d）第2のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び（e）第3のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットが全て、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される、第2の核酸と、第1のプロモーター（例えば、PGK）と、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）をコードする第1の核酸とを含み、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、第1の核酸と第2の核酸とは、同じプロモーターに作動可能に連結している。したがって、いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞（例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞）を生成する方法であって、ベクターが、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）をコードする第1の核酸と、キメラTCR（cTCR）をコードする第2の核酸とを含み、キメラTCRが、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択のリンカー、（c）第1のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、（d）第2のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び（e）第3のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットが全て、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択され、第1の核酸と第2の核酸とが、同じプロモーター（例えば、EF1- α ）に作動可能に連結しており、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、第1の核酸は、第2の核酸の上流にある。いくつかの実施形態では、第1の核酸は、第2の核酸の下流にある。いくつかの実施形態では、第1の核酸と第2の核酸とは、連結配列、例えば、IRESや、P2AまたはT2Aなどの自己切断性2Aペプチドをコードする核酸配列を介して結合している。したがって、いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞（例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞）を生成する方法であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター（例えば、EF1- α ）と、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）をコードする第1の核酸と、第1の連結配列（例えば、IRESや、P2AまたはT2Aなどの自己切断性2Aペプチドをコードする核酸配列）と、任意選択の第2の連結配列（例えば、（GGGS）₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列）と、キメラTCR（cTCR）をコードする第2の核酸であり、キメラTCRが、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択のリンカー、（c）第1のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、（d）第2のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び（e）第3のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1、第2、

及び第3のTCRサブユニットが全て、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される、第2の核酸とを含み、Neftタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。

いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞（例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞）を生成する方法であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター（例えば、EF1 α ）と、キメラTCR（cTCR）をコードする第2の核酸であり、キメラTCRが、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択のリンカー、（c）第1のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、（d）第2のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び（e）第3のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットが全て、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される、第2の核酸と、第1の連結配列（例えば、IRESや、P2AまたはT2Aなどの自己切断性2Aペプチドをコードする核酸配列）と、任意選択の第2の連結配列（例えば、（GGGS）₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列）と、Neftタンパク質（例えば、wt Neft、変異体SIV Neftなどの変異体Neft）をコードする第1の核酸とを含み、Neftタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。

いくつかの実施形態では、Neftタンパク質は、配列番号12～22のいずれかのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Neftタンパク質は、（i）aa2～4、aa8～10、aa11～13、aa38～40、aa44～46、aa47～49、aa50～52、aa53～55、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～100、aa107～109、aa110～112、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、aa178～179、179～181aa、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa191～193、aa194～196、aa203～205、aa206～208、aa212～214、aa215～217、aa218～220、aa221～223、aa8～13、aa44～67、aa107～112、aa164～196、aa203～208、もしくはaa212～223、（ii）aa2～4、aa44～46、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～100、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa44～67、aa164～169、aa176～181、aa185～190、（iii）aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、178～179aa、aa179～181、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、aa164～169、aa176～181、もしくはaa185～190のいずれかのアミノ酸残基（ここで

～67、もしくはaa164～190、または（iv）aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、aa164～169、aa176～181、もしくはaa185～190のいずれかのアミノ酸残基（ここで

、アミノ酸残基の位置は、野生型 S I V N e f のものに対応する)における1つ以上の変異を含む、変異体 S I V N e f である。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質 (例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) は、C D 4 及び/または C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質 (例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) は、C D 4 及び/または C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質 (例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) は、T C R、C D 4、及び C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質 (例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) は、T C R の細胞表面発現を下方制御するが、C D 4 及び/または C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質 (例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) は、T C R 及び C D 4 の細胞表面発現を下方制御するが、C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質 (例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) は、T C R 及び C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御するが、C D 4 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質 (例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) は、内在性 T C R の細胞表面発現を下方制御するが、c T C R を下方調節する (例えば、細胞表面発現を下方制御する) ことではない。いくつかの実施形態では、機能的 c T C R は、N e f タンパク質 (例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) により、最大で約 5 0 %、約 4 0 %、約 3 0 %、約 2 0 %、約 1 0 %、または約 5 % 下方調節される (例えば、細胞表面発現が下方制御される)。

【0153】

いくつかの実施形態では、ベクター (例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター) を、前駆体 T 細胞に導入することを含む、修飾 T 細胞 (例えば、同種 T 細胞、内在性 T C R 欠損 T 細胞、G v H D 最小化 T 細胞) を生成する方法であって、ベクターが、N e f タンパク質 (例えば、w t N e f、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) をコードする第 1 の核酸と、T 細胞抗原結合体 (T A C) をコードする第 2 の核酸とを含み、T 細胞抗原結合体が、(a) 腫瘍抗原 (例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0) の 1 つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片 (例えば、s d A b、s c F v) を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 任意選択の第 1 のリンカー、(c) T C R サブユニット (例えば、C D 3 ε) の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外 T C R 結合ドメイン、(d) 任意選択の第 2 のリンカー、(e) 第 1 の T C R 共受容体 (例えば、C D 4) の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、(f) 第 2 の T C R 共受容体 (例えば、C D 4) の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び (g) 第 3 の T C R 共受容体 (例えば、C D 4) の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、T C R サブユニットが、T C R α、T C R β、T C R γ、T C R δ、C D 3 ε、C D 3 γ、及び C D 3 δ からなる群から選択され、第 1、第 2、及び第 3 の T C R 共受容体が全て、C D 4、C D 8、及び C D 2 8 からなる群から選択され、第 1 の核酸と第 2 の核酸とが、異なるプロモーター (例えば、E F 1 - α 及び P G K) に作動可能に連結しており、N e f タンパク質が発現すると、修飾 T 細胞の内在性 T C R が下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、第 1 の核酸は、第 2 の核酸の上流にある。いくつかの実施形態では、第 1 の核酸は、第 2 の核酸の下流にある。いくつかの実施形態では、ベクター (例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター) を、前駆体 T 細胞に導入することを含む、修飾 T 細胞 (例えば、同種 T 細胞、内在性 T C R 欠損 T 細胞、G v H D 最小化 T 細胞) を生成する方法であって、ベクターが、上流から下流に向かって、第 1 のプロモーター (例えば、E F 1 - α) と、N e f タンパク質 (例えば、w t N e f、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) をコードする第 1 の核酸と、第 2 のプロモーター (例えば、P G K) と、T 細胞抗原結合体 (T A C) をコードする第 2 の核酸であり、T 細胞抗原結合体が、(a) 腫瘍抗原 (例えば、B C M A、C D

19、CD20)の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片(例えば、*s d A b*、*s c F v*)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)任意選択の第1のリンカー、(c)TCRサブユニット(例えば、CD3 ϵ)の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、(d)任意選択の第2のリンカー、(e)第1のTCR共受容体(例えば、CD4)の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、(f)第2のTCR共受容体(例えば、CD4)の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び(g)第3のTCR共受容体(例えば、CD4)の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、TCRサブユニットが、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択され、第1、第2、及び第3のTCR共受容体が全て、CD4、CD8、及びCD28からなる群から選択される、第2の核酸とを含み、*N e f*タンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞(例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞)を生成する方法であって、ベクターが、上流から下流に向かって、第2のプロモーター(例えば、EF1- α)と、T細胞抗原結合体(TAC)をコードする第2の核酸とがあり、T細胞抗原結合体が、(a)腫瘍抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片(例えば、*s d A b*、*s c F v*)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)任意選択の第1のリンカー、(c)TCRサブユニット(例えば、CD3 ϵ)の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、(d)任意選択の第2のリンカー、(e)第1のTCR共受容体(例えば、CD4)の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、(f)第2のTCR共受容体(例えば、CD4)の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び(g)第3のTCR共受容体(例えば、CD4)の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、TCRサブユニットが、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択され、第1、第2、及び第3のTCR共受容体が全て、CD4、CD8、及びCD28からなる群から選択される、第2の核酸と、第1のプロモーター(例えば、PGK)と、*N e f*タンパク質(例えば、*w t N e f*、変異体SIV *N e f*などの変異体*N e f*)をコードする第1の核酸とを含み、*N e f*タンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、第1の核酸と第2の核酸とは、同じプロモーターに作動可能に連結している。したがって、いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞(例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞)を生成する方法であって、ベクターが、*N e f*タンパク質(例えば、*w t N e f*、変異体SIV *N e f*などの変異体*N e f*)をコードする第1の核酸と、T細胞抗原結合体(TAC)をコードする第2の核酸とを含み、T細胞抗原結合体が、(a)腫瘍抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片(例えば、*s d A b*、*s c F v*)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)任意選択の第1のリンカー、(c)TCRサブユニット(例えば、CD3 ϵ)の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、(d)任意選択の第2のリンカー、(e)第1のTCR共受容体(例えば、CD4)の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、(f)第2のTCR共受容体(例えば、CD4)の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び(g)第3のTCR共受容体(例えば、CD4)の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、TCRサブユニットが、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択され、第1、第2、及び第3のTCR共受容体が全て、CD4、CD8、及びCD28からなる群から選択され、第1の核酸と第2の核酸とが、同じプロモーター(例えば、EF1- α)に作動可能に連結しており、*N e f*タンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、第1

の核酸は、第2の核酸の上流にある。いくつかの実施形態では、第1の核酸は、第2の核酸の下流にある。いくつかの実施形態では、第1の核酸と第2の核酸とは、連結配列、例えば、IRESや、P2AまたはT2Aなどの自己切断性2Aペプチドをコードする核酸配列を介して結合している。したがって、いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞（例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞）を生成する方法であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター（例えば、EF1- α ）と、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）をコードする第1の核酸と、第1の連結配列（例えば、IRESや、P2AまたはT2Aなどの自己切断性2Aペプチドをコードする核酸配列）と、任意選択の第2の連結配列（例えば、(GGGS)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列）と、T細胞抗原結合体（TAC）をコードする第2の核酸であり、T細胞抗原結合体が、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）TCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、（e）第1のTCR共受容体（例えば、CD4）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、（f）第2のTCR共受容体（例えば、CD4）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び（g）第3のTCR共受容体（例えば、CD4）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、TCRサブユニットが、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択され、第1、第2、及び第3のTCR共受容体が全て、CD4、CD8、及びCD28からなる群から選択される、第2の核酸とを含む、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞（例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞）を生成する方法であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター（例えば、EF1- α ）と、T細胞抗原結合体（TAC）をコードする第2の核酸であり、T細胞抗原結合体が、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）TCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、（e）第1のTCR共受容体（例えば、CD4）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、（f）第2のTCR共受容体（例えば、CD4）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び（g）第3のTCR共受容体（例えば、CD4）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、TCRサブユニットが、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択され、第1、第2、及び第3のTCR共受容体が全て、CD4、CD8、及びCD28からなる群から選択される、第2の核酸と、第1の連結配列（例えば、IRESや、P2AまたはT2Aなどの自己切断性2Aペプチドをコードする核酸配列）と、任意選択の第2の連結配列（例えば、(GGGS)₃リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列）と、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）をコードする第1の核酸とを含む、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質は、配列番号12～22のいずれかのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質は、（i）aa2～4、aa8～10、aa11～13、aa38～40、aa44～46、aa47～49、aa50～52、aa53～55、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～100、aa107～109、aa110～112、aa137～139、aa1

52～154、aa164～166、aa167～169、aa1

70～172、aa173～175、aa176～178、aa178～179、179
 ～181aa、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa1
 91～193、aa194～196、aa203～205、aa206～208、aa2
 12～214、aa215～217、aa218～220、aa221～223、aa8
 ～13、aa44～67、aa107～112、aa164～196、aa203～20
 8、もしくはaa212～223、(ii)aa2～4、aa44～46、aa56～5
 8、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～100、aa107
 ～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167 10
 ～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185
 ～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa44～
 67、aa164～169、aa176～181、aa185～190、(iii)aa
 2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa10
 7～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa16
 7～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、178～
 179aa、aa179～181、aa182～184、aa185～187、aa18
 8～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、もしくはaa
 164～190、または(iv)aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa6
 2～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～1 20
 54、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～1
 79、aa179～181、aa185～187、aa188～190、aa194～1
 96、aa203～205、aa56～67、aa164～169、aa176～181
 、もしくはaa185～190のいずれかのアミノ酸残基（ここで、アミノ酸残基の位置
 は、野生型SIV Nefのものに対応する）における1つ以上の変異を含む、変異体S
 IV Nefである。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体S
 IV Nefなどの変異体Nef）は、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方
 制御しない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、また
 は変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、CD4及び／またはCD28の細胞表
 面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt 30
 nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCR、CD4、及びCD
 28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例え
 ば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCRの細胞表面発現を下方制御す
 るが、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつか
 の実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef
 ）は、TCR及びCD4の細胞表面発現を下方制御するが、CD28の細胞表面発現を下
 方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体S
 IV Nefなどの変異体Nef）は、TCR及びCD28の細胞表面発現を下方制御す
 るが、CD4の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Ne
 fタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef 40
 ）は、内在性TCRの細胞表面発現を下方制御するが、TACを下方調節する（例えば、
 細胞表面発現を下方制御する）ことではない。いくつかの実施形態では、機能的TACは、
 Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体N
 ef）により、最大で約50%、約40%、約30%、約20%、約10%、または約5
 %下方調節される（例えば、細胞表面発現が下方制御される）。

【0154】

いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルス
 ベクター）を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞（例えば、同種T細胞、
 内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞）を生成する方法であって、ベクターが
 、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、変異体SIV Nefなどの変異体Nef 50

)をコードする第1の核酸と、TAC様キメラ受容体をコードする第2の核酸とを含み、TAC様キメラ受容体が、(a)腫瘍抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片(例えば、sdAb、scFv)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)任意選択の第1のリンカー、(c)第1のTCRサブユニット(例えば、TCR α)の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、(d)任意選択の第2のリンカー、(e)第2のTCRサブユニット(例えば、CD3 ϵ)の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、(f)第3のTCRサブユニット(例えば、CD3 ϵ)の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び(g)第4のTCRサブユニット(例えば、CD3 ϵ)の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットが全て、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択され、第1の核酸と第2の核酸とが、異なるプロモーター(例えば、EF1- α 及びPGK)に作動可能に連結しており、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、第1の核酸は、第2の核酸の上流にある。いくつかの実施形態では、第1の核酸は、第2の核酸の下流にある。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞(例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞)を生成する方法であって、ベクターが、上流から下流に向かって、第1のプロモーター(例えば、EF1- α)と、Nefタンパク質(例えば、wt Nef、変異体SIV Nefなどの変異体Nef)をコードする第1の核酸と、第2のプロモーター(例えば、PGK)と、TAC様キメラ受容体をコードする第2の核酸であり、TAC様キメラ受容体が、(a)腫瘍抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片(例えば、sdAb、scFv)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)任意選択の第1のリンカー、(c)第1のTCRサブユニット(例えば、TCR α)の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、(d)任意選択の第2のリンカー、(e)第2のTCRサブユニット(例えば、CD3 ϵ)の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、(f)第3のTCRサブユニット(例えば、CD3 ϵ)の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び(g)第4のTCRサブユニット(例えば、CD3 ϵ)の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットが全て、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される、第2の核酸とを含み、Nefタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター(例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター)を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞(例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞)を生成する方法であって、ベクターが、上流から下流に向かって、第2のプロモーター(例えば、EF1- α)と、TAC様キメラ受容体をコードする第2の核酸であり、TAC様キメラ受容体が、(a)腫瘍抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片(例えば、sdAb、scFv)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)任意選択の第1のリンカー、(c)第1のTCRサブユニット(例えば、TCR α)の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、(d)任意選択の第2のリンカー、(e)第2のTCRサブユニット(例えば、CD3 ϵ)の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、(f)第3のTCRサブユニット(例えば、CD3 ϵ)の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び(g)第4のTCRサブユニット(例えば、CD3 ϵ)の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットが全て、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される、第2の核酸と、第1のプロモーター(例えば、PGK)と、Nefタンパク質(例えば、wt Nef、変異体SIV Nefなどの変異体N

e f) をコードする第 1 の核酸とを含み、N e f タンパク質が発現すると、修飾 T 細胞の内在性 T C R が下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、第 1 の核酸と第 2 の核酸とは、同じプロモーターに作動可能に連結している。したがって、いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を、前駆体 T 細胞に導入することを含む、修飾 T 細胞（例えば、同種 T 細胞、内在性 T C R 欠損 T 細胞、G v H D 最小化 T 細胞）を生成する方法であって、ベクターが、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）をコードする第 1 の核酸と、T A C 様キメラ受容体をコードする第 2 の核酸とを含み、T A C 様キメラ受容体が、（a）腫瘍抗原（例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0）の 1 つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、s d A b、s c F v）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第 1 のリンカー、（c）第 1 の T C R サブユニット（例えば、T C R α）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外 T C R 結合ドメイン、（d）任意選択の第 2 のリンカー、（e）第 2 の T C R サブユニット（例えば、C D 3 ε）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、（f）第 3 の T C R サブユニット（例えば、C D 3 ε）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び（g）第 4 の T C R サブユニット（例えば、C D 3 ε）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第 1、第 2、第 3、及び第 4 の T C R サブユニットが全て、T C R α、T C R β、T C R γ、T C R δ、C D 3 ε、C D 3 γ、及び C D 3 δ からなる群から選択され、第 1 の核酸と第 2 の核酸とが、同じプロモーター（例えば、E F 1 - α）に作動可能に連結しており、N e f タンパク質が発現すると、修飾 T 細胞の内在性 T C R が下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、第 1 の核酸は、第 2 の核酸の上流にある。いくつかの実施形態では、第 1 の核酸は、第 2 の核酸の下流にある。いくつかの実施形態では、第 1 の核酸と第 2 の核酸とは、連結配列、例えば、I R E S や、P 2 A または T 2 A などの自己切断性 2 A ペプチドをコードする核酸配列を介して結合している。したがって、いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を、前駆体 T 細胞に導入することを含む、修飾 T 細胞（例えば、同種 T 細胞、内在性 T C R 欠損 T 細胞、G v H D 最小化 T 細胞）を生成する方法であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター（例えば、E F 1 - α）と、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）をコードする第 1 の核酸と、第 1 の連結配列（例えば、I R E S や、P 2 A または T 2 A などの自己切断性 2 A ペプチドをコードする核酸配列）と、任意選択の第 2 の連結配列（例えば、（G G G S）₃ リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列）と、T A C 様キメラ受容体をコードする第 2 の核酸であり、T A C 様キメラ受容体が、（a）腫瘍抗原（例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0）の 1 つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、s d A b、s c F v）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第 1 のリンカー、（c）第 1 の T C R サブユニット（例えば、T C R α）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外 T C R 結合ドメイン、（d）任意選択の第 2 のリンカー、（e）第 2 の T C R サブユニット（例えば、C D 3 ε）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、（f）第 3 の T C R サブユニット（例えば、C D 3 ε）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び（g）第 4 の T C R サブユニット（例えば、C D 3 ε）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第 1、第 2、第 3、及び第 4 の T C R サブユニットが全て、T C R α、T C R β、T C R γ、T C R δ、C D 3 ε、C D 3 γ、及び C D 3 δ からなる群から選択される、第 2 の核酸とを含み、N e f タンパク質が発現すると、修飾 T 細胞の内在性 T C R が下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）を、前駆体 T 細胞に導入することを含む、修飾 T 細胞（例えば、同種 T 細胞、内在性 T C R 欠損 T 細胞、G v H D 最小化 T 細胞）を生成する方法であって、ベクターが、上流から下流に向かって、プロモーター（例えば、E F 1 - α）と、T A C 様キメラ受容体をコードする第 2 の核酸であり、T A C 様キメラ受容体が、（a）腫瘍抗原（例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0）の 1 つ以

上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、s d A b、s c F v）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）第1のTCRサブユニット（例えば、TCR α ）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、（e）第2のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、（f）第3のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び（g）第4のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットが全て、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される、第2の核酸と、第1の連結配列（例えば、I R E Sや、P 2 AまたはT 2 Aなどの自己切断性2 Aペプチドをコードする核酸配列）と、任意選択の第2の連結配列（例えば、（G G G S）₃ リンカーなどの可動性リンカーをコードする核酸配列）と、N e fタンパク質（例えば、w t N e f、変異体S I V N e fなどの変異体N e f）をコードする第1の核酸とを含み、N e fタンパク質が発現すると、修飾T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質は、配列番号12～22のいずれかのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質は、（i）a a 2～4、a a 8～10、a a 11～13、a a 38～40、a a 44～46、a a 47～49、a a 50～52、a a 53～55、a a 56～58、a a 59～61、a a 62～64、a a 65～67、a a 98～100、a a 107～109、a a 110～112、a a 137～139、a a 152～154、a a 164～166、a a 167～169、a a 170～172、a a 173～175、a a 176～178、a a 178～179、179～181 a a、a a 182～184、a a 185～187、a a 188～190、a a 191～193、a a 194～196、a a 203～205、a a 206～208、a a 212～214

10

20

、a a 215～217、a a 218～220、a a 221～223、a a 8～13、a a 44～67、a a 107～112、a a 164～196、a a 203～208、もしくはa a 212～223、（i i）a a 2～4、a a 44～46、a a 56～58、a a 59～61、a a 62～64、a a 65～67、a a 98～100、a a 107～109、a a 137～139、a a 152～154、a a 164～166、a a 167～169、a a 176～178、a a 178～179、a a 179～181、a a 185～187、a a 188～190、a a 194～196、a a 203～205、a a 44～67、a a 164～169、a a 176～181、a a 185～190、（i i i）a a 2～4、a a 56～58、a a 59～61、a a 62～64、a a 65～67、a a 107～109、a a 137～139、a a 152～154、a a 164～166、a a 167～169、a a 170～172、a a 173～175、a a 176～178、178～179 a a、a a 179～181、a a 182～184、a a 185～187、a a 188～190、a a 194～196、a a 203～205、a a 56～67、もしくはa a 164～190、または（i v）a a 2～4、a a 56～58、a a 59～61、a a 62～64、a a 65～67、a a 107～109、a a 137～139、a a 152～154、a a 164～166、a a 167～169、a a 176～178、a a 178～179、a a 179～181、a a 185～187、a a 188～190、a a 194～196、a a 203～205、a a 56～67、a a 164～169、a a 176～181、もしくはa a 185～190のいずれかのアミノ酸残基（ここで、アミノ酸残基の位置は、野生型S I V N e fのものに対応する）における1つ以上の変異を含む、変異体S I V N e fである。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質（例えば、変異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質（例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質（例えば、w t N e f、または

30

40

50

変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) は、T C R、C D 4、及び C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質 (例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) は、T C R の細胞表面発現を下方制御するが、C D 4 及び/または C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質 (例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) は、T C R 及び C D 4 の細胞表面発現を下方制御するが、C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質 (例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) は、T C R 及び C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御するが、C D 4 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質 (例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) は、内在性 T C R の細胞表面発現を下方制御するが、T A C 様キメラ受容体を下方調節する (例えば、細胞表面発現を下方制御する) ことではない。いくつかの実施形態では、機能的 T A C 様キメラ受容体は、N e f タンパク質 (例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) により、最大で約 5 0 %、約 4 0 %、約 3 0 %、約 2 0 %、約 1 0 %、または約 5 % 下方調節される (例えば、細胞表面発現が下方制御される)。

10

【0155】

いくつかの実施形態では、本方法は、N e f タンパク質 (例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) を発現する修飾 T 細胞を、少なくとも 1 つの薬学的に許容される担体と配合することをさらに含む。いくつかの実施形態では、本方法は、N e f タンパク質 (例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) を発現する有効量の修飾 T 細胞、または、N e f タンパク質を発現する修飾 T 細胞と、少なくとも 1 つの薬学的に許容される担体とを含む、有効量の医薬製剤を、個体に投与することをさらに含む。いくつかの実施形態では、個体は、がんを有する。いくつかの実施形態では、個体はヒトである。

20

【0156】

T 細胞源、細胞の調製及び培養

T 細胞 (例えば、前駆体 T 細胞) の増大及び遺伝子修飾の前に、T 細胞源が個体から得られる。T 細胞は、末梢血単核細胞、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位からの組織、腹水、胸水、脾臓組織、及び腫瘍を含むいくつかの源から得ることができる。いくつかの実施形態では、当技術分野で入手可能な任意の数の T 細胞株が使用され得る。いくつかの実施形態では、T 細胞は、当業者に公知の任意の数の技術、例えば F I C O L L (商標) 分離を使用して対象から収集される血液単位から得ることができる。いくつかの実施形態では、個体の循環血液由来の細胞が、アフエレーシスによって得られる。アフエレーシス産物は、典型的には、T 細胞、単球、顆粒球、B 細胞を含むリンパ球、他の有核白血球細胞、赤血球細胞、及び血小板を含む。いくつかの実施形態では、アフエレーシスによって収集された細胞を洗浄して、血漿画分を除去し、細胞をその後の処理ステップのために適切なバッファーまたは培地中に置いてよい。いくつかの実施形態では、細胞は、リン酸緩衝食塩水 (P B S) で洗浄される。いくつかの実施形態では、洗浄液は、カルシウムを欠き、マグネシウムを欠いてもよく、または全てではなくとも多くの二価カチオンを欠いてもよい。この場合もやはり、驚くべきことに、カルシウムの非存在下での初期活性化ステップが、活性化の拡大をもたらす。当業者であれば容易に理解するであろうが、洗浄ステップは、当業者に公知の方法により、例えば、半自動「フロースルー」遠心分離機 (例えば、C o b e 2 9 9 1 細胞処理装置、B a x t e r C y t o M a t e、または H a e m o n e t i c s C e l l S a v e r 5) をメーカーの説明に従って使用することにより、達成され得る。洗浄後、細胞を、様々な生体適合性バッファー、例えば、C a ²⁺ 不含、M g ²⁺ 不含 P B S、P l a s m a L y t e A、または他の食塩水溶液 (バッファーの有無にかかわらず) などに再懸濁してもよい。あるいは、アフエレーシスサンプルの望ましくない成分を除去し、細胞を培養培地に直接再懸濁してもよい。

30

40

【0157】

50

いくつかの実施形態では、T細胞は、臍帯血バンク、末梢血バンクから提供されるか、または人工多能性幹細胞（iPSC）、多分化性幹細胞及び多能性幹細胞、もしくはヒト胚性幹細胞に由来する。いくつかの実施形態では、T細胞は、細胞株に由来する。いくつかの実施形態におけるT細胞は、異種源から、例えばマウス、ラット、非ヒト霊長類、及びブタから得られる。いくつかの実施形態では、T細胞は、ヒト細胞である。いくつかの態様において、T細胞は、初代細胞、例えば、対象から直接単離されたもの及び／または対象から単離され凍結されたものである。いくつかの実施形態では、細胞は、T細胞の1つ以上のサブセット、例えば全T細胞集団、CD4+細胞、CD8+細胞、及びそれらの亜集団、例えば機能、活性化状態、成熟度、分化能、増大、再循環、局在化、及び／または持続の能力、抗原特異性、抗原受容体のタイプ、特定の器官もしくは区画における存在、マーカーもしくはサイトカイン分泌プロファイル、及び／または分化度によって定義されるものを含む。処置される対象に関して、細胞は、同種及び／または自家であり得る。場合により、T細胞は、1体以上の意図されるレシピエントに関して同種である。場合により、T細胞は移植に好適であり、例えば、レシピエントにおいてGVHDを誘導することがない。

10

【0158】

T細胞及び／またはCD4+及び／またはCD8+T細胞のサブタイプ及び亜集団には、ナイーブT（ T_N ）細胞、エフェクターT細胞（ T_{EFF} ）、メモリーT細胞及びそれらのサブタイプ、例えば幹細胞メモリーT（ T_{SCM} ）、セントラルメモリーT（ T_{CM} ）、エフェクターメモリーT（ T_{EM} ）、または高分化型エフェクターメモリーT細胞、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）、未成熟T細胞、成熟T細胞、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、粘膜関連インバリアントT（MAIT）細胞、天然に存在する及び適応型の制御性T（Treg）細胞、ヘルパーT細胞、例えばTH1細胞、TH2細胞、TH3細胞、TH17細胞、TH9細胞、TH22細胞、濾胞性ヘルパーT細胞、アルファ／ベータT細胞、及びデルタ／ガンマT細胞がある。

20

【0159】

いくつかの実施形態では、T細胞は、赤血球細胞を溶解し、例えば、PERCOLL（商標）勾配による遠心分離または向流遠心溶出によって単球を枯渇させることによって、末梢血リンパ球から単離される。CD3+、CD28+、CD4+、CD8+、CD45RA+、及びCD45RO+T細胞など、T細胞の特定の亜集団は、正の選択または負の選択の技術によってさらに単離され得る。例えば、いくつかの実施形態では、T細胞は、所望のT細胞の正の選択に十分な時間にわたる、抗CD3／抗CD28（すなわち、3×28）コンジュゲートビーズ、例えば、DYNABEADS（登録商標）M-450 CD3／CD28 Tとのインキュベーションによって単離される。いくつかの実施形態では、この時間は、約30分間である。さらなる一実施形態では、この時間は、30分間～36時間以上の範囲及びこの間の全ての整数値である。さらなる一実施形態では、この時間は、少なくとも1、2、3、4、5、または6時間である。いくつかの実施形態では、この時間は、10～24時間である。いくつかの実施形態では、インキュベーション時間は、24時間である。白血病患者からT細胞を単離する場合、24時間などのより長いインキュベーション時間により、細胞収率が高まり得る。より長いインキュベーション時間は、他の細胞型と比較してわずかなT細胞しか存在しない任意の状況下で、例えば、腫瘍組織または免疫低下個体から腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を単離する際に、T細胞を単離するために使用され得る。さらに、より長いインキュベーション時間の使用により、CD8+T細胞の捕捉効率が高まり得る。したがって、T細胞をCD3／CD28ビーズに結合させる時間を単に短縮もしくは延長すること、及び／またはビーズのT細胞に対する比を（本明細書にさらに記載されるように）増加もしくは減少させることにより、培養開始時またはプロセス中の他の時点で、T細胞の亜集団についての、またはこれに対しての、優先的な選択を行うことができる。さらに、ビーズまたは他の表面上の抗CD3及び／または抗CD28抗体の比率を増加または減少させることにより、培養開始時または他の所望の時点で、T細胞の亜集団についての、またはこれに対しての、優先的な選択を行うこ

30

40

50

とができる。当業者であれば、複数ラウンドの選択を使用してもよいことを認識するであろう。いくつかの実施形態では、選択手順を行い、「選択されていない」細胞を活性化及び増大プロセスで使用する事が望ましい場合がある。「選択されていない」細胞は、さらなるラウンドの選択に供してもよい。

【0160】

負の選択によるT細胞集団の濃縮は、負の選択を受ける細胞に特有の表面マーカーに対する抗体の組み合わせを用いて達成され得る。1つの方法は、負の選択を受ける細胞に存在する細胞表面マーカーに対するモノクローナル抗体のカクテルを使用する負磁気免疫接着 (negative magnetic immunoadherence) またはフローサイトメトリーによる細胞選別及び／または選択である。例えば、負の選択によりCD4+細胞を濃縮するためには、モノクローナル抗体カクテルは、典型的には、CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR、及びCD8に対する抗体を含む。特定の実施形態では、典型的にはCD4+、CD25+、CD62Lhi、GITR+、及びFoxP3+を発現する制御性T細胞を濃縮するか、または正の選択をすることが望ましい場合がある。あるいは、特定の実施形態では、制御性T細胞は、抗CD25コンジュゲートビーズまたは他の同様の選択方法によって枯渇される。

【0161】

正の選択または負の選択によって所望の細胞集団を単離するには、細胞及び表面（例えば、ビーズなどの粒子）の濃度を変化させてもよい。特定の実施形態では、細胞とビーズの接触が最大になることを確実にするために、ビーズ及び細胞と一緒に混合する体積を著しく減少させる（すなわち、細胞の濃度を増加させる）ことが望ましい場合がある。例えば、一実施形態では、細胞20億個/mLの濃度が使用される。一実施形態では、細胞10億個/mLの濃度が使用される。さらなる一実施形態では、細胞1億個超/mLが使用される。さらなる一実施形態では、細胞1000万、1500万、2000万、2500万、3000万、3500万、4000万、4500万、または5000万個/mLの細胞濃度が使用される。さらに別の実施形態では、細胞7500万、8000万、8500万、9000万、9500万、または1億個/mLの細胞濃度が使用される。さらなる実施形態では、細胞1億2500万または1億5000万個/mLの濃度が使用される。高濃度の使用により、細胞収率の増加、細胞活性化、及び細胞増大がもたらされ得る。さらに、高い細胞濃度の使用により、CD28陰性T細胞などの目的の標的抗原を弱く発現し得る細胞の、または多くの腫瘍細胞が存在するサンプル（すなわち、白血病血液、腫瘍組織など）からの捕捉が、より効率的になる。かかる細胞集団は、治療的価値を有する可能性があり、取得することが望ましいであろう。例えば、高濃度の細胞の使用により、通常はCD28発現が弱いCD8+T細胞の選択がより効率的になる。

【0162】

いくつかの実施形態では、より低い濃度の細胞を使用することが望ましい場合がある。T細胞と表面（例えば、ビーズなどの粒子）との混合物を著しく希釈することにより、粒子と細胞との間の相互作用が最小限に抑えられる。これにより、粒子に結合する所望の抗原を多量に発現する細胞が選択される。例えば、CD4+T細胞は、希釈濃度で、CD8+T細胞よりも高いレベルのCD28を発現し、より効率的に捕捉される。いくつかの実施形態では、使用される細胞濃度は 5×10^6 / mLである。いくつかの実施形態では、使用される濃度は、約 1×10^5 / mL ~ 1×10^6 / mL、及びこの間の任意の整数値であり得る。

【0163】

いくつかの実施形態では、細胞は、回転子上で、2~10℃または室温のいずれかで、様々な速度で様々な長さの時間にわたってインキュベートされ得る。

【0164】

刺激用のT細胞は、洗浄ステップ後に凍結することもできる。理論に束縛されることを望むものではないが、凍結ステップ及びその後の解凍ステップは、細胞集団における顆粒球、及びある程度の単球を除去することによって、より均一な生成物をもたらす。血漿及

び血小板を除去する洗浄ステップ後、細胞を凍結溶液中に懸濁してもよい。多くの凍結溶液及びパラメータが当技術分野で公知であり、この状況において有用であるが、1つの方法は、20% DMSO及び8%ヒト血清アルブミンを含むPBS、または10%デキストラン40及び5%デキストロース、20%ヒト血清アルブミン及び7.5% DMSO、もしくは31.25% PlasmaLyte-A、31.25%デキストロース5%、0.45% NaCl、10%デキストラン40及び5%デキストロース、20%ヒト血清アルブミン、及び7.5% DMSOを含む培養培地、または例えば、Hespan及びPlasmaLyte-Aを含む他の好適な細胞凍結培地の使用を伴い、その後、細胞は、1℃/分の速度で-80℃になるまで凍結され、液体窒素貯蔵タンクの気相中に貯蔵される。他の制御凍結方法、ならびに-20℃でまたは液体窒素中での即時の非制御凍結が使用され得る。

10

【0165】

いくつかの実施形態では、凍結保存細胞を本明細書に記載されるように解凍及び洗浄し、室温で1時間静置した後、活性化させる。

【0166】

本願では、本明細書に記載される細胞の増大が必要とされ得る前の時点での対象からの血液サンプルまたはアフレーシス産物の収集も企図される。したがって、増大させる細胞の源が必要な任意の時点で収集され、T細胞などの所望の細胞が単離され、本明細書に記載される疾患または状態のようなT細胞療法が有効となる任意の数の疾患または状態のためのT細胞療法において後に使用するために凍結され得る。一実施形態では、血液サンプルまたはアフレーシスは、概して健康な対象から採取される。特定の実施形態では、血液サンプルまたはアフレーシスは、疾患を発症するリスクがあるが疾患をまだ発症していない概して健康な対象から採取され、目的の細胞が単離され、後に使用するために凍結される。特定の実施形態では、T細胞を増大させ、凍結し、後に使用してもよい。特定の実施形態では、サンプルは、本明細書に記載される特定の疾患の診断直後、しかし任意の処置の前に、患者から収集される。さらなる一実施形態では、細胞は、任意の数の関連する処置様式の前に、対象由来の血液サンプルまたはアフレーシスから単離され、この処置様式は、薬剤、例えば、ナタリズマブ、エファリズマブ、抗ウイルス剤、化学療法、放射線、免疫抑制剤、例えば、シクロスポリン、アザチオプリン、メトトレキサート、ミコフェノレート、及びFK506、抗体、または他の免疫除去剤（immunoablative agent）、例えば、CAMPATH、抗CD3抗体、シトキサン、フルダラビン、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノール酸、ステロイド、FR901228、及び照射法での処置を含むが、これらに限定されない。これらの薬物は、カルシウム依存性ホスファターゼのカルシニューリンを阻害するか（シクロスポリン及びFK506）、または成長因子によって誘導されるシグナル伝達に重要なp70S6キナーゼを阻害する（ラパマイシン）（Liu et al., Cell 66:807-815, 1991、Henderson et al., Immun 73:316-321, 1991、Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993）。さらなる一実施形態では、細胞は、患者のために単離され、骨髄または幹細胞移植や、フルダラビン、外部ビーム照射療法（XRT）、シクロホスファミドなどの化学療法剤、またはOKT3もしくはCAMPATHなどの抗体のいずれかを使用したT細胞除去療法と併せて（例えば、その前に、それと同時に、またはその後）、後に使用するために凍結される。別の実施形態では、細胞は、先に単離され、B細胞除去療法、例えばCD20と反応する薬剤、例えばRituxanなどに続いて、後に処置で使用するために凍結され得る。

20

30

40

【0167】

いくつかの実施形態では、T細胞は、処置後に患者から直接得られる。この点について、特定のがん治療、特に免疫系を損傷する薬物での治療の後には、治療直後、患者が通常治療から回復する期間中、得られたT細胞の質が最適であるか、またはex vivoで増大するそれらの能力が向上している場合があることが観察されている。同様に、本明細

50

書に記載される方法を使用した *ex vivo* 操作後、これらの細胞は、向上した生着及び *in vivo* での増大に好ましい状態にあり得る。したがって、本発明においては、T細胞、樹状細胞、または他の造血系細胞を含む血液細胞を、この回復期中に収集することが企図される。さらに、特定の実施形態では、動員（例えば、GM-CSFでの動員）及びコンディショニングレジメンを使用して、特に治療後の規定された期間中に、対象において特定の細胞型の再増殖、再循環、再生、及び／または増大が優先される状態を作り出すことができる。具体的な細胞型としては、T細胞、B細胞、樹状細胞、及び他の免疫系細胞が挙げられる。

【0168】

T細胞の活性化及び増大

いくつかの実施形態では、細胞は、遺伝子工学操作の前に、またはそれに関連して、インキュベート及び／または培養される。インキュベーションステップは、培養（*culture*）、培養（*cultivation*）、刺激、活性化、及び／または増殖を含み得る。いくつかの実施形態では、組成物または細胞は、刺激条件または刺激剤の存在下でインキュベートされる。そのような条件としては、集団内の細胞の増殖、増大、活性化、及び／または生存を誘導する、抗原曝露を模倣する、及び／または遺伝子工学操作された抗原受容体の導入のような遺伝子工学操作のために細胞をプライミングするように設計されたものが挙げられる。この条件は、特定の培地、温度、酸素含量、二酸化炭素含量、時間、薬剤、例えば、栄養素、アミノ酸、抗生物質、イオン、及び／または刺激因子、例えばサイトカイン、ケモカイン、抗原、結合パートナー、融合タンパク質、組換え可溶性受容体、及び細胞を活性化するように設計された任意の他の薬剤のうちの1つ以上を含み得る。

【0169】

本明細書に記載される *Nef*（例えば、*wt Nef*、または変異体 *SIV Nef* などの変異体 *Nef*）または外因性受容体（例えば、工学操作された *TCR*（例えば、従来の工学操作された *TCR*、キメラ *TCR*（*cTCR*））、*TAC*、*TAC* 様キメラ受容体、または *CAR*（例えば、抗体ベースの *CAR*、リガンド／受容体ベースの *CAR*、または *ACTR*）など）によるT細胞の遺伝子修飾の前か後かを問わず、T細胞は、概して、例えば、米国特許第6,352,694号、同第6,534,055号、同第6,905,680号、同第6,692,964号、同第5,858,358号、同第6,887,466号、同第6,905,681号、同第7,144,575号、同第7,067,318号、同第7,172,869号、同第7,232,566号、同第7,175,843号、同第5,883,223号、同第6,905,874号、同第6,797,514号、同第6,867,041号、及び米国特許出願公開第20060121005号に記載されている方法を使用して、活性化及び増大させることができる。

【0170】

一般に、T細胞は、*CD3*／*TCR*複合体関連シグナルを刺激する薬剤及びT細胞の表面上の共刺激分子を刺激するリガンドが結合した表面との接触によって増大され得る。特に、T細胞集団は、本明細書に記載されるように、例えば、抗*CD3*抗体もしくはその抗原結合性断片、または表面上に固定化された抗*CD2*抗体との接触によって、またはカルシウムイオノフォアと併せたタンパク質キナーゼC活性化因子（例えば、ブリオスタチン）との接触によって刺激され得る。T細胞の表面上のアクセサリー分子の共刺激のために、アクセサリー分子に結合するリガンドが使用される。例えば、T細胞集団は、T細胞の増殖を刺激するのに適切な条件下で抗*CD3*抗体及び抗*CD28*抗体と接触させてよい。*CD4*＋T細胞または*CD8*＋T細胞のいずれかの増殖を刺激するために、抗*CD3*抗体及び抗*CD28*抗体。抗*CD28*抗体の例としては、9.3、B-T3、XR-*CD28*（*Diaclone*, *Besancon*, *France*）が挙げられ、当技術分野で一般に知られる他の方法として使用され得る（*Berg et al.*, *Transplant Proc.* 30（8）：3975-3977, 1998、*Haanen et al.*, *J. Exp. Med.* 190（9）：1319-1328, 1999、*Garlan*

10

20

30

40

50

d et al., J. Immunol Meth. 227 (1-2) : 53-63, 1999)。

【0171】

いくつかの実施形態では、T細胞は、培養開始組成物に、非分裂性末梢血単核細胞（PBMC）などのフィーダー細胞を（例えば、結果として生じる細胞集団が、増大させようとする初期集団内の各Tリンパ球に対して少なくとも約5、10、20、または40以上のPBMCフィーダー細胞を含むように）添加し、培養物を（例えば、T細胞の数を増大させるのに十分な時間にわたって）インキュベートすることにより、増大される。いくつかの態様において、非分裂性フィーダー細胞は、ガンマ線を照射したPBMCフィーダー細胞を含み得る。いくつかの実施形態では、PBMCは、細胞分裂を防止するために、約3000～3600ラドの範囲のガンマ線を照射される。いくつかの態様において、フィーダー細胞は、T細胞集団の添加前に培養培地に添加される。

10

【0172】

いくつかの実施形態では、T細胞の一次刺激シグナル及び共刺激シグナルは、異なるプロトコールによって提供され得る。例えば、各シグナルを提供する薬剤は、溶液中に存在するか、または表面に結合していてもよい。表面に結合している場合、薬剤は、同じ表面に結合しているか（すなわち、「シス」構成）、または別々の表面に結合していてもよい（すなわち、「トランス」構成）。あるいは、一方の薬剤が表面に結合し、他方の薬剤が溶液中に存在してもよい。一実施形態では、共刺激シグナルを提供する薬剤は、細胞表面に結合し、一次活性化シグナルを提供する薬剤は、溶液中に存在するか、または表面に結合している。特定の実施形態では、両方の薬剤が溶液中に存在し得る。別の実施形態では、薬剤は、可溶性形態であり得、表面、例えば、Fc受容体もしくは抗体を発現する細胞、または薬剤に結合する他の結合剤に架橋してもよい。この点について、例えば、本発明におけるT細胞の活性化及び増大での使用に企図される人工抗原提示細胞（aAPC）に関する米国特許出願公開第20040101519号及び同第20060034810号を参照されたい。

20

【0173】

いくつかの実施形態では、T細胞は、薬剤でコーティングされたビーズと合わせられ、その後、ビーズと細胞が分離され、次いで、細胞が培養される。代替的な一実施形態では、培養前に、薬剤でコーティングされたビーズと細胞は分離されず、一緒に培養される。さらなる一実施形態では、ビーズ及び細胞は、まず、磁力などの力を加えることによって濃縮され、これが細胞表面マーカーのライゲーシオンの増加をもたらし、それにより細胞刺激を誘導する。

30

【0174】

一例として、細胞表面タンパク質は、抗CD3及び抗CD28が結合した常磁性ビーズ（3×28ビーズ）をT細胞と接触させることによってライゲーシオンされ得る。一実施形態では、細胞（例えば、 $10^4 \sim 10^9$ 個のT細胞）及びビーズ（例えば、DYNA BEADS（登録商標）M-450 CD3/CD28 T常磁性ビーズ1：1の比率）が、バッファー、好ましくはPBS（カルシウム及びマグネシウムなどの二価カチオンなし）中で合わせられる。この場合もやはり、当業者であれば、任意の細胞濃度が使用され得ることを容易に理解することができる。例えば、標的細胞がサンプル中で非常に稀であり、サンプルの0.01%のみを構成する場合もあれば、またはサンプル全体（すなわち、100%）が目的の標的細胞を含む場合もある。したがって、任意の細胞数は、本発明の文脈内である。特定の実施形態では、細胞と粒子の接触が最大になることを確実にするために、粒子及び細胞と一緒に混合する体積を著しく減少させる（すなわち、細胞の濃度を増加させる）ことが望ましい場合がある。例えば、一実施形態では、細胞約20億個/mLの濃度が使用される。別の実施形態では、細胞1億個超/mLが使用される。さらなる一実施形態では、細胞1000万、1500万、2000万、2500万、3000万、3500万、4000万、4500万、または5000万個/mLの細胞濃度が使用される。さらに別の実施形態では、細胞7500万、8000万、8500万、9000万、

40

50

9500万、または1億個/mLの細胞濃度が使用される。さらなる実施形態では、細胞1億2500万または1億5000万個/mLの濃度が使用される。高濃度の使用により、細胞収率の増加、細胞活性化、及び細胞増大がもたらされ得る。さらに、高い細胞濃度の使用により、CD28陰性T細胞などの目的の標的抗原を弱く発現し得る細胞の捕捉が、より効率的になる。特定の実施形態では、かかる細胞集団は、治療的価値を有する可能性があり、取得することが望ましいであろう。例えば、高濃度の細胞の使用により、通常はCD28発現が弱いCD8+T細胞の選択がより効率的になる。

【0175】

いくつかの実施形態では、混合物は、数時間（約3時間）～約14日間またはこの間の任意の整数値の時間にわたって培養され得る。別の実施形態では、混合物は、21日間にわたって培養され得る。本発明の一実施形態では、ビーズ及びT細胞は、約8日間にわたって一緒に培養される。別の実施形態では、ビーズ及びT細胞は、2～3日間にわたって一緒に培養される。T細胞の培養時間が60日間以上になり得るように、いくつかの刺激サイクルが所望される場合もある。T細胞培養に適切な条件は、血清（例えば、ウシまたはヒトの胎児血清）、インターロイキン-2（IL-2）、インスリン、IFN- γ 、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF β 、及びTNF- α 、または当業者に公知の細胞成長のための任意の他の添加物を含む、増殖及び生存に必要な因子を含み得る適切な培地（例えば、最小必須培地またはRPMI培地1640またはX-vivo 15（Lonza））を含む。細胞成長のための他の添加物としては、界面活性剤、プラスマネート、ならびにN-アセチル-L-システイン及び2-メルカプトエタノールなどの還元剤が挙げられるが、これらに限定されない。培地には、アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム、及びビタミンが添加され、無血清であるか、あるいは適切な量の血清（もしくは血漿）または規定された一組のホルモン、及び/またはT細胞の成長及び増大に十分な量のサイトカイン（複数可）が補われた、RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-Vivo 15、及びX-Vivo 20、Optimizerが含まれ得る。抗生物質、例えば、ペニシリン及びストレプトマイシンは、実験培養物にのみ含まれ、対象に注入される細胞の培養物には含まれない。標的細胞は、成長を支えるのに必要な条件、例えば、適切な温度（例えば、37℃）及び雰囲気（例えば、空気+5%CO₂）の下で維持される。異なる刺激時間に曝露されたT細胞は、異なる特徴を呈し得る。例えば、典型的な血液またはアフエーシス末梢血単核細胞産物は、細胞傷害性またはサプレッサーT細胞集団（TC、CD8）を超えるヘルパーT細胞集団（TH、CD4+）を有する。CD3及びCD28受容体の刺激によるT細胞のEx vivo増大を行うと、約8～9日目には、主にTH細胞からなるT細胞集団が産生されるが、約8～9日目以降、T細胞集団は、次第により多くのTC細胞集団を含む。したがって、処置の目的に応じて、主にTH細胞を含むT細胞集団を対象に注入することが有利であり得る。同様に、抗原特異的なTC細胞サブセットが単離された場合、このサブセットをより大きな程度に増大させることが有益であり得る。

【0176】

さらに、CD4及びCD8マーカーに加えて、他の表現型マーカーが、細胞増大プロセスの過程に著しく変化するが、主に、再現可能に変化する。したがって、かかる再現性により、特定の目的のために活性化T細胞産物を調整する能力が有効になる。

【0177】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、修飾された細胞、または工学操作される細胞の表面における、1つ以上のマーカーの発現を評価することを含む。一実施形態では、本発明の方法は、TCRまたはCD3 ϵ の表面発現を、例えば、フローサイトメトリーなどの親和性に基づく検出方法により、評価することを含む。いくつかの態様において、本方法が抗原または他のマーカーの表面発現を明らかにする場合、抗原または他のマーカーをコードする遺伝子は、例えば、本明細書に記載される方法を使用して、破壊されるか、または発現が別様に抑圧される。

【0178】

内在性座位の遺伝子編集

いくつかの実施形態では、T細胞の内在性座位、例えば内在性TCR座位（例えば、TCR α 、TCR β ）は、本明細書に記載されるNeftタンパク質（例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft）及び／または機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））を発現するようにT細胞を修飾する前に、またはそれと同時に、遺伝子編集方法によって修飾される。いくつかの実施形態では、内在性座位の修飾は、遺伝子の破壊、例えば、ノックアウト、挿入、ミスセンス、もしくは両アレルフレームシフト変異などのフレームシフト変異、遺伝子の全部もしくは一部、例えば、1つ以上のエクソンもしくはその一部分の欠失、及び／またはノックインをもたらすことによって行われる。いくつかの実施形態では、かかる座位修飾は、DNA結合タンパク質もしくはDNA結合核酸などのDNA標的化分子、またはそれを含む複合体、化合物、もしくは組成物で、遺伝子に特異的に結合またはハイブリダイズするものを使用して行われる。いくつかの実施形態では、DNA標的化分子は、DNA結合ドメイン、例えば、ジンクフィンガータンパク質（ZFP）DNA結合ドメイン、転写活性化因子様タンパク質（TAL）もしくはTALエフェクター（TALE）DNA結合ドメイン、クリスパー（CRISPR）DNA結合ドメイン、またはメガヌクレアーゼのDNA結合ドメインを含む。

10

【0179】

20

いくつかの実施形態では、内在性座位（例えば、TCR）の修飾は、RNAガイドエンドヌクレアーゼ（RGEN）による破壊、または別のRNAガイドエフェクター分子による他の形態の抑圧など、1つ以上のDNA結合核酸を使用して行われる。例えば、いくつかの実施形態では、抑圧は、クリスパー（CRISPR）及びCRISPR関連（Cas）タンパク質を使用して行われる。Sander and Joung, Nature Biotechnology, 32 (4): 347-355を参照されたい。

【0180】

一般に、「CRISPRシステム」とは、CRISPR関連（「Cas」）遺伝子の発現またはその活性の指向に関与する転写物及び他のエレメントを集散的に意味し、Cas遺伝子をコードする配列、tracr（トランス活性化CRISPR）配列（例えばtracrRNAもしくは活性のある部分的なtracrRNA）、tracrメイト配列（内在性CRISPRシステムとの関連における「ダイレクトリピート」及びtracrRNAによりプロセッシングされた部分的なダイレクトリピートを包含する）、ガイド配列（内在性CRISPRシステムとの関連において「スパーサー」ともいわれる）、及び／またはCRISPR座位の他の配列及び転写物を含む。

30

【0181】

いくつかの実施形態では、CRISPR/CasヌクレアーゼまたはCRISPR/Casヌクレアーゼシステムは、DNAに配列特異的に結合する非コードRNA分子（ガイド）RNA、及びヌクレアーゼ機能性（例えば、2つのヌクレアーゼドメイン）を有するCasタンパク質（例えば、Cas9）を含む。

40

【0182】

いくつかの実施形態では、CRISPRシステムの1つ以上のエレメントは、I型、II型、またはIII型のCRISPRシステムに由来する。いくつかの実施形態では、CRISPRシステムの1つ以上のエレメントは、内在性CRISPRシステムを含む特定の生物、例えばStreptococcus pyogenesに由来する。

【0183】

いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼ及びgRNA（標的配列に特異的なcrRNAと固定されたtracrRNAとの融合物を含む）が、細胞に導入される。一般に、gRNAの5'末端の標的部位は、相補的塩基ペアリングを使用して、Casヌクレアーゼの標的を、標的部位、例えば遺伝子とする。いくつかの実施形態では、標的部位は、

50

典型的にはNGGまたはNAGなどのプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）配列のすぐ5'側のその位置に基づいて選択される。この点について、gRNAは、ガイドRNAの最初の20ヌクレオチドを標的DNA配列に対応するように修飾することにより、所望の配列を標的とする。いくつかの実施形態では、gRNAは、配列番号23の核酸配列を含む。

【0184】

いくつかの実施形態では、CRISPRシステムは、標的部位のDSBを誘導する。他の実施形態では、「ニッカーゼ」とみなされるCas9バリエーションが、一本鎖を標的部位でニックングするために使用される。いくつかの態様において、ニックが同時に導入されると5'オーバーハングが導入されるように、配列を標的とする異なるgRNAのペアによって各々が指向される、ペアリングしたニッカーゼが、例えば、特異性を向上させるために使用される。他の実施形態では、触媒的に不活性なCas9を、転写リプレッサーまたは活性化因子などの異種エフェクタードメインに融合させ、遺伝子発現をもたらす。

【0185】

いくつかの実施形態では、T細胞の内在性座位（例えば、内在性TCR）は、本明細書に記載されるNeftタンパク質（例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft）及び／または機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））を発現するようにT細胞を修飾する前に、CRISPR/Casシステムによって修飾される。いくつかの実施形態では、T細胞の内在性座位（例えば、内在性TCR）は、Neftタンパク質（例えば、wt Neft、または変異体SIV Neft

Neftなどの変異体Neft）及び／または機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））を発現するようにT細胞を修飾すると同時に、CRISPR/Casシステムによって修飾される。いくつかの実施形態では、CRISPR/Casシステムをコードする核酸（複数可）と、Neftタンパク質（例えば、wt Neft

Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft）及び／または機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））をコードする核酸（複数可）とは、同じベクター上にある。いくつかの実施形態では、CRISPR/Casシステムをコードする核酸（複数可）と、Neftタンパク質（例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft）及び／または機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））をコードする核酸（複数可）とは、異なるベクター上にある。

【0186】

修飾T細胞の単離及び濃縮

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、第1の核酸及び／または第2の核酸を含むT細胞を単離または濃縮することをさらに含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、Neftタンパク質（例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft）を発現する修飾T細胞から、CD3ε／γ／δ陰性T細胞を単離または濃縮することをさらに含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、Neftタンパク質（例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft）を発現する修飾T細胞から、内在性TCRα／β陰性T細胞を単離または濃縮することをさらに含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、Neftタンパク質（例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変

異体 N e f) を発現する修飾 T 細胞から、C D 4 + 及び／または C D 2 8 + T 細胞を単離または濃縮することをさらに含む。いくつかの実施形態では、T 細胞の単離または濃縮は、本明細書に記載される方法の任意の組み合わせを含む。

【0187】

いくつかの実施形態では、単離方法は、細胞における、表面マーカー、例えば表面タンパク質、細胞内マーカー、または核酸などの 1 つ以上の特異的分子の非存在または存在に基づく、異なる細胞型の分離を含む。いくつかの実施形態では、選択マーカーは、N e f (例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f)、外因性受容体 (例えば、工学操作された T C R (例えば、従来の工学操作された T C R、キメラ T C R (c T C R))、T A C、T A C 様キメラ受容体、または C A R (例えば、抗体ベースの C A R、リガンド／受容体ベースの C A R、または A C T R) など)、C D 4、C D 2 8、C D 3 ε、C D 3 γ、C D 3 δ、C D 3 ζ、C D 6 9、T C R α、T C R β、または M H C である。いくつかの実施形態では、かかるマーカーに基づく任意の公知の分離方法が使用され得る。いくつかの実施形態では、分離は、親和性または免疫親和性に基づく分離である。例えば、いくつかの態様における分離には、1 つ以上のマーカー、典型的には細胞表面マーカーの、細胞による発現または発現レベルに基づく、細胞及び細胞集団の分離が含まれ、これは例えば、かかるマーカーに特異的に結合する抗体または結合パートナーとのインキュベーションと、一般的にその後洗浄ステップを行い、抗体または結合パートナーに結合した細胞を、抗体または結合パートナーに結合していない細胞から分離することによるものである。

【0188】

かかる分離ステップは、試薬に結合した細胞がさらなる使用のために保持される正の選択、及び／または抗体もしくは結合パートナーに結合していない細胞が保持される負の選択に基づいてもよい。いくつかの例においては、両画分が、さらなる使用のために保持される。いくつかの態様において、負の選択は、所望の集団以外の細胞によって発現されるマーカーに基づいて分離が最も良好に行われるように、不均一集団において細胞型を特異的に同定する抗体が利用できない場合に特に有用であり得る。

【0189】

分離は、特定の細胞集団または特定のマーカーを発現する細胞の 1 0 0 % の濃縮または除去をもたらす必要はない。例えば、特定のタイプの細胞、例えばマーカーを発現する細胞の、正の選択または濃縮は、かかる細胞の数または百分率の増加を意味するが、マーカーを発現しない細胞の完全な非存在をもたらす必要はない。同様に、特定のタイプの細胞、例えばマーカーを発現する細胞の、負の選択、除去、または枯渇は、かかる細胞の数または百分率の減少を意味するが、かかる細胞全ての完全な除去をもたらす必要はない。

【0190】

いくつかの例においては、1 つのステップで正の選択または負の選択を受けた画分が、別の分離ステップ、例えば後続の正の選択または負の選択に供されるような、複数ラウンドの分離ステップが行われる。いくつかの例においては、単一の分離ステップにより、例えば、各々が負の選択の標的になるマーカーに特異的な複数の抗体または結合パートナーと共に細胞をインキュベートすることにより、同時に複数のマーカーを発現する細胞を枯渇させることができる。同様に、様々な細胞型で発現される複数の抗体または結合パートナーと共に細胞をインキュベートすることにより、複数の細胞型に同時に正の選択を行うことができる。

【0191】

例えば、いくつかの態様において、T 細胞の特定の亜集団、例えば、1 つ以上の表面マーカーが陽性であるか、またはそれらを高レベルで発現する細胞、例えば、C D 2 8 +、C D 6 2 L +、C C R 7 +、C D 2 7 +、C D 1 2 7 +、C D 4 +、C D 8 +、C D 4 5 R A +、及び／または C D 4 5 R O + T 細胞が、正の選択または負の選択の技術によって単離される。

【0192】

例えば、CD 3⁺、CD 28⁺ T細胞には、CD 3 / CD 28 コンジュゲート磁気ビーズ（例えば、DYNABEADS（登録商標）M-450 CD 3 / CD 28 T Cell Expander）を使用して正の選択を行うことができる。

【0193】

いくつかの実施形態では、単離は、正の選択による特定の細胞集団の濃縮、または負の選択による特定の細胞集団の枯渇によって行われる。いくつかの実施形態では、正の選択または負の選択は、それぞれ、正の選択または負の選択を受ける細胞において発現される1つ以上の表面マーカー（マーカー⁺）または比較的高いレベルで発現される表面マーカー（マーカー^{high}）に特異的に結合する、1つ以上の抗体または他の結合剤と、細胞をインキュベートすることによって達成される。

10

【0194】

いくつかの態様において、分離しようとする細胞のサンプルまたは組成物は、小さく帯磁性または磁気応答性のある材料、例えば磁気応答性粒子または微粒子、例えば常磁性ビーズ（例えば、DynabeadsまたはMACSビーズなど）と共にインキュベートされる。磁気応答性材料、例えば粒子は、一般に、分離することが所望される、例えば、負の選択または正の選択を行うことが所望される細胞、複数の細胞、または細胞集団に存在する分子、例えば表面マーカーに特異的に結合する結合パートナー、例えば抗体に、直接的または間接的に結合する。

【0195】

いくつかの実施形態では、磁性粒子またはビーズは、抗体または他の結合パートナーなどの特定の結合メンバーに結合した磁気応答性材料を含む。磁気分離法で使用される磁気応答性材料は、多くのものが周知である。好適な磁性粒子としては、参照により本明細書に援用される、Moldayの米国特許第4,452,773号、及び欧州特許明細書EP 452342 Bに記載されているものが挙げられる。Owenの米国特許第4,795,698号、及びLibertiらの米国特許第5,200,084号に記載されているようなコロイドサイズの粒子は、他の例である。

20

【0196】

インキュベーションは一般に、磁性粒子またはビーズに結合した、抗体もしくは結合パートナー、またはかかる抗体もしくは結合パートナーに特異的に結合する分子、例えば二次抗体または他の試薬が、サンプル中の細胞に存在する場合、細胞表面分子に特異的に結合する条件下で行われる。

30

【0197】

いくつかの実施形態では、サンプルが磁場に置かれ、磁気応答性または帯磁性のある粒子が結合した細胞が磁石に引きつけられ、未標識の細胞から分離される。正の選択の場合、磁石に引き付けられた細胞が保持され、負の選択の場合、引きつけられない細胞（未標識の細胞）が保持される。いくつかの態様において、正の選択と負の選択との組み合わせが同じ選択ステップ中に行われ、このステップでは、陽性及び陰性の画分が保持され、さらに処理されるか、またはさらなる分離ステップに供される。

【0198】

特定の実施形態では、磁気応答性粒子は、一次抗体もしくは他の結合パートナー、二次抗体、レクチン、酵素、またはストレプトアビジンでコーティングされる。特定の実施形態では、磁性粒子は、1つ以上のマーカーに特異的な一次抗体のコーティングを介して、細胞に結合する。特定の実施形態では、ビーズではなく細胞が一次抗体または結合パートナーで標識され、次いで、細胞型特異的な二次抗体または他の結合パートナー（例えば、ストレプトアビジン）でコーティングされた磁性粒子が添加される。特定の実施形態では、ストレプトアビジンでコーティングされた磁性粒子は、ビオチン化された一次抗体または二次抗体と併せて使用される。

40

【0199】

いくつかの実施形態では、磁気応答性粒子は、後にインキュベート、培養及び／または工学操作される細胞に結合したままにされる。いくつかの態様において、粒子は、患者に

50

投与される細胞に結合したままにされる。いくつかの実施形態では、帯磁性または磁気応答性のある粒子は、細胞から除去される。帯磁性粒子を細胞から除去する方法は公知であり、例えば、競合する非標識抗体、帯磁性粒子、または切断可能リンカーにコンジュゲートした抗体などの使用を含む。いくつかの実施形態では、帯磁性粒子には生分解性がある。

【0200】

いくつかの実施形態では、親和性に基づく選択は、磁気活性化細胞選別（MACS）（Miltenyi Biotec, Auburn, Calif.）による。磁気活性化細胞選別（MACS）システムでは、磁化粒子が結合した細胞の高純度選択が可能である。特定の実施形態では、MACSは、外部磁場の印加後に非標的と標的種とが連続的に溶出されるモードで動作する。すなわち、磁化粒子に結合した細胞は固定されるが、未結合種は溶出される。次いで、この第1の溶出ステップが完了した後、磁場に捕捉されて溶出が阻止された種を、何らかの様式で遊離させて、それらを溶出させ回収できるようにする。特定の実施形態では、非標的細胞は、標識され、不均一な細胞集団から枯渇される。

【0201】

特定の実施形態では、単離または分離は、本発明の方法の単離、細胞調製、分離、処理、インキュベーション、培養、及び／または配合の各ステップのうちの1つ以上を行うシステム、デバイス、または装置を使用して行われる。いくつかの態様において、本システムは、例えば、エラー、使用者による取り扱い、及び／または汚染を最小限に抑えるために、閉鎖環境または無菌環境においてこれらのステップの各々を行うために使用される。一例において、本システムは、国際特許出願公開第WO2009/072003号、またはUS20110003380A1に記載されるようなシステムである。

【0202】

いくつかの実施形態では、本システムまたは装置は、単離、処理、工学操作、及び配合の各ステップのうちの1つ以上、例えば全てを、統合型もしくは自己完結型のシステム、及び／または自動もしくはプログラム可能な様式で行う。いくつかの態様において、本システムまたは装置は、本システムまたは装置と通信するコンピュータ及び／またはコンピュータプログラムを含み、これにより、使用者は、処理、単離、工学操作、及び配合の各ステップをプログラムし、制御し、その結果を評価し、及び／またはその様々な態様を調節することができる。

【0203】

いくつかの態様において、分離及び／または他のステップは、例えば、閉鎖型かつ無菌のシステムにおける臨床規模レベルでの細胞の自動分離のために、CliniMACSシステム（Miltenyi Biotec）を使用して行われる。構成要素には、統合型マイクロコンピュータ、磁気分離ユニット、蠕動ポンプ、及び様々なピンチ弁が含まれる。統合型コンピュータは、いくつかの態様において、機器の全ての構成要素を制御し、反復する手順を標準化された順序で行うようシステムに指示する。磁気分離ユニットは、いくつかの態様において、可動永久磁石及び選択カラムのホルダーを含む。蠕動ポンプは、チューブセット全体にわたる流速を制御し、ピンチ弁と共に、システムを通るバッファの流量の制御、及び細胞の継続的な懸濁を確実にする。

【0204】

CliniMACSシステムは、いくつかの態様において、無菌で非発熱性の溶液において供給される、抗体に結合した帯磁性粒子を使用する。いくつかの実施形態では、細胞を磁性粒子で標識した後、細胞を洗浄して、余剰の粒子を除去する。次いで、細胞調製バッグをチューブセットに接続し、これを次に、バッファを含むバッグ、及び細胞収集バッグに接続する。チューブセットは、プレカラム及び分離カラムを含む予め組み立てられた無菌チューブからなり、これらは使い捨て専用である。分離プログラムの開始後、本システムは、細胞サンプルを分離カラム上に自動的に加える。標識された細胞はカラム内に保持されるが、未標識の細胞は一連の洗浄ステップによって除去される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法で使用する細胞集団は、標識されず、カラム内に保

持されない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法で使用する細胞集団は、標識され、カラム内に保持される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法で使用する細胞集団は、磁場の除去後にカラムから溶出し、細胞収集バッグ内に収集される。

【0205】

特定の実施形態では、分離及び／または他のステップは、CliniMACS Prodigyシステム(Miltenyi Biotec)を使用して行われる。CliniMACS Prodigyシステムは、いくつかの態様において、細胞の自動洗浄及び遠心分離による分画を可能にする細胞処理ユニットを備える。CliniMACS Prodigyシステムはまた、ソース細胞産物の肉眼的な層を識別することによって最適な細胞分画エンドポイントを決定する、内蔵カメラ及び画像認識ソフトウェアを含んでもよい。例えば、末梢血は、赤血球、白血球細胞、及び血漿層に自動的に分離される。CliniMACS Prodigyシステムはまた、例えば、細胞の分化及び増大、抗原負荷、ならびに長期細胞培養などの細胞培養プロトコルを遂行する、統合された細胞培養チャンバを含んでもよい。注入ポートにより、培地の滅菌除去及び補充を行うことができ、一体型顕微鏡を使用することで、細胞をモニタリングすることができる。

10

【0206】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される細胞集団は、フローサイトメトリーによって収集及び濃縮(または枯渇)される。フローサイトメトリーでは、複数の細胞表面マーカーについて染色された細胞が、流体の流れの中を運ばれる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される細胞集団は、分取スケール(FACS)選別によって収集及び濃縮(または枯渇)される。特定の実施形態では、本明細書に記載される細胞集団は、微小電気機械システム(MEMS)チップをFACSベースの検出システムと組み合わせて使用することにより(例えば、WO2010/033140、Cho et al. (2010) Lab Chip 10, 1567-1573、及びGodin et al. (2008) J Biophoton. 1(5):355-376を参照されたい)、収集及び濃縮(または枯渇)される。いずれの場合にも、細胞を複数のマーカーで標識して、明確に定義されたT細胞サブセットを高純度で単離できるようにしてもよい。

20

【0207】

いくつかの実施形態では、抗体または結合パートナーは、正の選択及び／または負の選択のための分離を容易にするために、1つ以上の検出可能なマーカーで標識される。例えば、分離は、蛍光標識抗体への結合に基づき得る。いくつかの例においては、1つ以上の細胞表面マーカーに特異的な抗体または他の結合パートナーの結合に基づく細胞の分離は、例えば、分取スケール(FACS)を含む蛍光活性化細胞選別(FACS)、及び／または例えばフローサイトメトリー検出システムと組み合わせた微小電気機械システム(MEMS)チップにより、流体の流れの中で行われる。かかる方法により、複数のマーカーに基づく正の選択及び負の選択を同時に行うことができる。

30

【0208】

単離及び濃縮の方法については、「実施例」セクションも参照されたい。

【0209】

IV. Nefタンパク質

本明細書に記載される方法は、Nefタンパク質の発現を伴う。また、本明細書に記載される修飾T細胞を作製するために特に有用な、天然に存在しない変異体Nefタンパク質(例えば、変異体SIV Nef)も提供される。

40

【0210】

野生型Nef(negative regulatory factor)は、ヒト免疫不全ウイルス(HIV-1及びHIV-2)ならびにサル免疫不全ウイルス(SIV)を含む霊長類レンチウイルスによってコードされる、小さな27~35kDaのミリスチル化タンパク質である。Nefは、主に細胞質に局在化するが、形質膜(PM)にも部分的に動員される。Nefは、宿主の細胞機構を操作し、したがって病原体の感染、生存

50

、または複製を可能にし得る病原性因子として機能する。

【0211】

Nefは、全ての霊長類レンチウイルスにおいて高度に保存されている。HIV-2及びSIV Nefタンパク質は、HIV-1 Nefよりも10～60アミノ酸長い。N末端からC末端に向かって、Nefタンパク質は、次のドメインを含む：ミリスチル化部位（CD4下方制御、MHC I下方制御、及びシグナル伝達分子との会合に関与し、Nefの内部形質膜標的化及びビリオンの組み込み、ひいては感染力に必要とされる）、N末端αヘリックス（MHC I下方制御及びタンパク質キナーゼ動員に関与する）、チロシンベースのAP動員（HIV-2/SIV Nef）、CD4結合部位（WL残基、CD4下方制御に関与する、HIV-1 Nefに特徴的）、酸性クラスター（MHC I下方制御、宿主PACS1及びPACS2との相互作用に関与する）、プロリンベースのリピート（MHC I下方制御及びSH3結合に関与する）、PAK（p21活性化キナーゼ）結合ドメイン（シグナル伝達分子との会合及びCD4下方制御に関与する）、COP I動員ドメイン（CD4下方制御に関与する）、ジロイシンベースのAP動員ドメイン（CD4下方制御に関与する、HIV-1 Nef）、ならびにV-ATPase及びRaf-1結合ドメイン（CD4下方制御及びシグナル伝達分子との会合に関与する）。

10

【0212】

CD4は、55kDaでI型の内在性細胞表面糖タンパク質である。これは、MHCクラスII制限細胞、例えばヘルパー/インデューサーTリンパ球及びマクロファージ/単球系列の細胞におけるT細胞受容体の成分である。これは、HIV及びSIVの主要な細胞受容体として機能する。

20

【0213】

いくつかの実施形態では、Nefタンパク質は、SIV Nef、HIV1 Nef、及びHIV2 Nefからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質は、野生型Nefである。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質は、配列番号12～17のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。

【0214】

いくつかの実施形態では、Nefタンパク質は、主要なHIV-1サブタイプCインド分離株から得られるか、またはそれに由来する。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質は、完全長タンパク質をコードするインド分離株のF2アレルから発現される（HIV F2-Nef）。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質は、CD4結合部位、酸性クラスター、プロリンベースのリピート、及びPAK結合ドメインのインフレーム欠失を有するインド分離株のC2アレルから発現される（HIV C2-Nef）。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質は、CD4結合部位のインフレーム欠失を有するインド分離株のD2アレルから発現される（HIV D2-Nef）。

30

【0215】

いくつかの実施形態では、Nefタンパク質は、挿入、欠失、点変異（複数可）、及び/または転位のうちの1つ以上を含むNefタンパク質などの変異体Nefである。いくつかの実施形態では、本願は、天然に存在しない変異体Nefタンパク質、例えば、T細胞で発現した場合、外因性受容体（例えばCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド/受容体ベースのCAR、ACTR）、または工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR、TAC様キメラ受容体））を下方制御しない、天然に存在しない変異体Nefタンパク質を提供する。したがって、いくつかの実施形態では、野生型Nefと比較して1つ以上の変異を含む天然に存在しない変異体Nefタンパク質が提供され、この天然に存在しない変異体Nefは、T細胞で発現した場合、外因性受容体の下方制御をもたらさないか、または野生型Nefと比較して小さい下方制御をもたらす。Nefタンパク質は、ミリスチル化部位、N末端αヘリックス、チロシンベースのAP動員、CD4結合部位、酸性クラスター、プロリンベースのリピート、PAK結合ドメイン、COP I動員ドメイン、ジロイシンベースのAP動員ドメイン、V-AT

40

50

P a s e 及び R a f - 1 結合ドメイン、ならびにそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される1つ以上のドメインまたはモチーフに、1つ以上の変異（例えば、天然に存在しない変異）を含み得る。

【0216】

例えば、いくつかの実施形態では、変異体（例えば、天然に存在しない変異体）N e f は、ジロイシンベースのA P 動員ドメインに、1つ以上の変異を含む。いくつかの実施形態では、変異体（例えば、天然に存在しない変異体）N e f は、ジロイシンベースのA P 動員ドメイン及びP A K 結合ドメインに変異を含む。いくつかの実施形態では、変異体（例えば、天然に存在しない変異体）N e f は、ジロイシンベースのA P 動員ドメイン、P A K 結合ドメイン、C O P I 動員ドメイン、ならびにV - A T P a s e 及びR a f - 1 結合ドメインに変異を含む。いくつかの実施形態では、変異体（例えば、天然に存在しない変異体）N e f は、ジロイシンベースのA P 動員ドメイン、C O P I 動員ドメイン、ならびにV - A T P a s e 及びR a f - 1 結合ドメインに、1つ以上の変異を含む。いくつかの実施形態では、変異体（例えば、天然に存在しない変異体）N e f は、ジロイシンベースのA P 動員ドメインならびにV - A T P a s e 及びR a f - 1 結合ドメインに、1つ以上の変異を含む。いくつかの実施形態では、変異体（例えば、天然に存在しない変異体）N e f は、ドメインの一部または全体を欠失させるトランケーションを含む。

【0217】

いくつかの実施形態では、変異体（例えば、天然に存在しない変異体）N e f タンパク質は、配列番号18～22のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質は、1つ以上の変異（例えば、天然に存在しない変異）を、前述のドメイン／モチーフのいずれにも含まない。いくつかの実施形態では、変異体（例えば、天然に存在しない変異体）N e f は、1つ以上の変異（例えば、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10のいずれかの数のアミノ酸残基の変異、例えばA l a への変異）を、表11に記載されるアミノ酸残基のいずれかに含む、変異体S I V N e f である。いくつかの実施形態では、変異体（例えば、天然に存在しない変異体）N e f は、1つ以上の変異（例えば、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10のいずれかの数のアミノ酸残基の変異、例えばA l a への変異）を、(i) a a 2 ~ 4、a a 8 ~ 10、a a 11 ~ 13、a a 38 ~ 40、a a 44 ~ 46、a a 47 ~ 49、a a 50 ~ 52、a a 53 ~ 55、a a 56 ~ 58、a a 59 ~ 61、a a 62 ~ 64、a a 65 ~ 67、a a 98 ~ 100、a a 107 ~ 109、a a 110 ~ 112、a a 137 ~ 139、a a 152 ~ 154、a a 164 ~ 166、a a 167 ~ 169、a a 170 ~ 172、a a 173 ~ 175、a a 176 ~ 178、a a 178 ~ 179、179 ~ 181 a a、a a 182 ~ 184、a a 185 ~ 187、a a 188 ~ 190、a a 191 ~ 193、a a 194 ~ 196、a a 203 ~ 205、a a 206 ~ 208、a a 212 ~ 214、a a 215 ~ 217、a a 218 ~ 220、a a 221 ~ 223、a a 8 ~ 13、a a 44 ~ 67、a a 107 ~ 112、a a 164 ~ 196、a a 203 ~ 208、もしくはa a 212 ~ 223、(i i) a a 2 ~ 4、a a 44 ~ 46、a a 56 ~ 58、a a 59 ~ 61、a a 62 ~ 64、a a 65 ~ 67、a a 98 ~ 100、a a 107 ~ 109、a a 137 ~ 139、a a 152 ~ 154、a a 164 ~ 166、a a 167 ~ 169、a a 176 ~ 178、a a 178 ~ 179、a a 179 ~ 181、a a 185 ~ 187、a a 188 ~ 190、a a 194 ~ 196、a a 203 ~ 205、a a 44 ~ 67、a a 164 ~ 169、a a 176 ~ 181、a a 185 ~ 190、(i i i) a a 2 ~ 4、a a 56 ~ 58、a a 59 ~ 61、a a 62 ~ 64、a a 65 ~ 67、a a 107 ~ 109、a a 137 ~ 139、a a 152 ~ 154、a a 164 ~ 166、a a 167 ~ 169、a a 170 ~ 172、a a 173 ~ 175、a a 176 ~ 178、178 ~ 179 a a、a a 179 ~ 181、a a 182 ~ 184、a a 185 ~ 187、a a 188 ~ 190、a a 194 ~ 196、a a 203 ~ 205、a a 56 ~ 67、もしくはa a 164 ~ 190、または(i v) a a 2 ~ 4、a a 56 ~ 58、a a 59 ~ 61、a a 62 ~ 64、a a 65 ~ 67、a a 107 ~ 109、a a 137 ~ 139、a a 152

～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、aa164～169、aa176～181、もしくはaa185～190のいずれかのアミノ酸残基（ここで、アミノ酸残基の位置は、野生型SIV Nefのものに対応する）に含む、変異体SIV Nefである。

【0218】

いくつかの実施形態では、T細胞（例えば、同種T細胞）における、本明細書に記載されるNefタンパク質（野生型、または変異体、例えば、天然に存在しない変異体）の発現は、内在性TCRを下方調節する。いくつかの実施形態では、内在性TCRの下方調節は、内在性TCR、CD3ε、CD3δ、及び／またはCD3γの細胞表面発現を下方制御すること、及び／またはT細胞活性化もしくはT細胞増殖などのTCRによるシグナル伝達に干渉すること（例えば、Lck及びLATなどの重要なTCR近位の機構の形質膜への輸送を統御する小胞輸送経路を調節することによる、及び／またはTCR近位のシグナル伝達機構の時空間協調に不可欠なTCR誘導性アクチンリモデリング事象を妨げることによる）を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるNefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）を発現するT細胞における内在性TCR、CD3ε、CD3δ、及び／またはCD3γの細胞表面発現は、同じドナー源由来のT細胞のものと比較して、少なくとも約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%下方制御される。いくつかの実施形態では、内在性TCRを下方調節する（例えば、発現を下方制御する）変異体（例えば、天然に存在しない変異体）Nefは、(i) aa2～4、aa8～10、aa11～13、aa38～40、aa44～46、aa47～49、aa50～52、aa53～55、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～100、aa107～109、aa110～112、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、aa178～179、179～181aa、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa191～193、aa194～196、aa203～205、aa206～208、aa212～214、aa215～217、aa218～220、aa221～223、aa8～13、aa44～67、aa107～112、aa164～196、aa203～208、もしくはaa212～223、(ii) aa2～4、aa44～46、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～100、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、もしくはaa164～190、または(iv) aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、178～179aa、aa179～181、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、もしくはaa164～190、または(v) aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、aa164～169、aa176～181、もしくはaa185～190のいずれかのアミノ酸残基（ここで、アミノ酸残基の位置は、野生型SIV Nefのものに対応する）における1つ以上の変異を含む、変異体SIV Nefである。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質は、配列番号12～14及び18～22のいずれかから選択され

るアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、変異体N e f（例えば、変異体S I V N e f）は、内在性T C R（例えば、T C R α及び／またはT C R β）の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、変異体N e fタンパク質（例えば、変異体S I V N e f）は、内在性T C R（例えば、T C R α及び／またはT C R β）の細胞表面発現を、野生型N e fによる下方制御と比べて約3%以下（例えば約2%以下または約1%以下）の差で下方制御する。いくつかの実施形態では、変異体N e fタンパク質（例えば、変異体S I V N e f）は、内在性T C R（例えば、T C R α及び／またはT C R β）の細胞表面発現を、野生型N e fによる下方制御と比べて少なくとも約3%（3%を含む、例えば少なくとも約3%、約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%）大きく下方制御する。いくつかの実施形態では、変異体N e fタンパク質（例えば、変異体S I V N e f）は、C D 4の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、変異体N e fタンパク質（例えば、変異体S I V N e f）は、C D 4の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、変異体N e fタンパク質（例えば、変異体S I V N e f）は、C D 4の細胞表面発現を、野生型N e fによる下方制御と比べて少なくとも約3%（例えば少なくとも約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%）小さく下方制御する。いくつかの実施形態では、変異体N e fタンパク質（例えば、変異体S I V N e f）は、C D 28の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、変異体N e fタンパク質（例えば、変異体S I V N e f）は、C D 28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、変異体N e fタンパク質（例えば、変異体S I V N e f）は、C D 28の細胞表面発現を、野生型N e fによる下方制御と比べて少なくとも約3%（例えば少なくとも約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%）小さく下方制御する。いくつかの実施形態では、変異体N e fタンパク質（例えば、変異体S I V N e f）は、内在性T C R（例えば、T C R α及び／またはT C R β）の細胞表面発現を、野生型N e fによる下方制御と比べて約3%以下（例えば約2%以下または約1%以下）の差で下方制御し（または、内在性T C R（例えば、T C R α及び／またはT C R β）の細胞表面発現を、野生型N e fによる下方制御と比べて少なくとも約3%（3%を含む、例えば少なくとも約3%、約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%）大きく下方制御し）、C D 4及び／またはC D 28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、変異体N e fタンパク質（例えば、変異体S I V N e f）は、内在性T C R（例えば、T C R α及び／またはT C R β）の細胞表面発現を、野生型N e fによる下方制御と比べて約3%以下（例えば約2%以下または約1%以下）の差で下方制御し（または、内在性T C R（例えば、T C R α及び／またはT C R β）の細胞表面発現を、野生型N e fによる下方制御と比べて少なくとも約3%（3%を含む、例えば少なくとも約3%、約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%）大きく下方制御し）、C D 4及び／またはC D 28の細胞表面発現を、野生型N e fによる下方制御と比べて少なくとも約3%（例えば少なくとも約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%）小さく下方制御する。いくつかの実施形態では、変異体N e fタンパク質（例えば、変異体S I V N e f）は、内在性T C R（例えば、T C R α及び／またはT C R β）の細胞表面発現を下方制御するが、機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたT C R（例えば、従来の工学操作されたT C R、キメラT C R（c T C R））、T A C、T A C様キメラ受容体、またはC A R（例えば、抗体ベースのC A R、リガンド／受容体ベースのC A R、またはA C T R））を下方調節する（例えば、細胞表面発現を下方制御

する) ことはない。いくつかの実施形態では、変異体 N e f タンパク質 (例えば、変異体 S I V N e f) は、野生型 N e f による下方制御と比べて最大で約 3 % (例えば最大で約 2 % または約 1 %) の差で、内在性 T C R (例えば、T C R α 及び / または T C R β) の細胞表面発現を下方制御し、機能的な外因性受容体 (例えば、工学操作された T C R (例えば、従来の工学操作された T C R、キメラ T C R (c T C R))、T A C、T A C 様キメラ受容体、または C A R (例えば、抗体ベースの C A R、リガンド / 受容体ベースの C A R、または A C T R)) の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、変異体 N e f タンパク質 (例えば、変異体 S I V N e f) は、野生型 N e f による下方制御と比べて少なくとも約 3 % (例えば少なくとも約 4 %、約 5 %、約 6 %、約 7 %、約 8 %、約 9 %、約 10 %、約 20 %、約 30 %、約 40 %、約 50 %、約 60 %、約 70 %、約 80 %、約 90 %、または約 95 %) 少なく、内在性 T C R (例えば、T C R α 及び / または T C R β) の細胞表面発現を下方制御し、機能的な外因性受容体 (例えば、工学操作された T C R (例えば、従来の工学操作された T C R、キメラ T C R (c T C R))、T A C、T A C 様キメラ受容体、または C A R (例えば、抗体ベースの C A R、リガンド / 受容体ベースの C A R、または A C T R)) の細胞表面発現を下方制御する。

【0219】

いくつかの実施形態では、T 細胞 (例えば、同種 T 細胞) における、本明細書に記載される N e f タンパク質 (野生型、または変異体、例えば、天然に存在しない変異体) の発現は、内在性 C D 3 ζ 発現もしくは C D 3 ζ によるシグナル伝達を変化させることはないか、あるいは、同じドナー源由来の T 細胞のものと比較して、最大で約 50 %、約 40 %、約 30 %、約 20 %、約 10 %、約 5 % もしくはそれ未満、内在性 C D 3 ζ 発現を下方制御し、及び / または C D 3 ζ によるシグナル伝達を下方調節する。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質は、配列番号 12 ~ 14 及び 18 ~ 22 のいずれかから選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質は、(i) a a 2 ~ 4、a a 8 ~ 10、a a 11 ~ 13、a a 38 ~ 40、a a 44 ~ 46、a a 47 ~ 49、a a 50 ~ 52、a a 53 ~ 55、a a 56 ~ 58、a a 59 ~ 61、a a 62 ~ 64、a a 65 ~ 67、a a 98 ~ 100、a a 107 ~ 109、a a 110 ~ 112、a a 137 ~ 139、a a 152 ~ 154、a a 164 ~ 166、a a 167 ~ 169、a a 170 ~ 172、a a 173 ~ 175、a a 176 ~ 178、a a 178 ~ 179、179 ~ 181 a a、a a 182 ~ 184、a a 185 ~ 187、a a 188 ~ 190、a a 191 ~ 193、a a 194 ~ 196、a a 203 ~ 205、a a 206 ~ 208、a a 212 ~ 214、a a 215 ~ 217、a a 218 ~ 220、a a 221 ~ 223、a a 8 ~ 13、a a 44 ~ 67、a a 107 ~ 112、a a 164 ~ 196、a a 203 ~ 208、もしくは a a 212 ~ 223、(i i) a a 2 ~ 4、a a 44 ~ 46、a a 56 ~ 58、a a 59 ~ 61、a a 62 ~ 64、a a 65 ~ 67、a a 98 ~ 100、a a 107 ~ 109、a a 137 ~ 139、a a 152 ~ 154、a a 164 ~ 166、a a 167 ~ 169、a a 176 ~ 178、a a 178 ~ 179、a a 179 ~ 181、a a 185 ~ 187、a a 188 ~ 190、a a 194 ~ 196、a a 203 ~ 205、a a 44 ~ 67、a a 164 ~ 169、a a 176 ~ 181、a a 185 ~ 190、(i i i) a a 2 ~ 4、a a 56 ~ 58、a a 59 ~ 61、a a 62 ~ 64、a a 65 ~ 67、a a 107 ~ 109、a a 137 ~ 139、a a 152 ~ 154、a a 164 ~ 166、a a 167 ~ 169、a a 170 ~ 172、a a 173 ~ 175、a a 176 ~ 178、178 ~ 179 a a、a a 179 ~ 181、a a 182 ~ 184、a a 185 ~ 187、a a 188 ~ 190、a a 194 ~ 196、a a 203 ~ 205、a a 56 ~ 67、もしくは a a 164 ~ 190、または (i v) a a 2 ~ 4、a a 56 ~ 58、a a 59 ~ 61、a a 62 ~ 64、a a 65 ~ 67、a a 107 ~ 109、a a 137 ~ 139、a a 152 ~ 154、a a 164 ~ 166、a a 167 ~ 169、a a 176 ~ 178、a a 178 ~ 179、a a 179 ~ 181、a a 185 ~ 187、a a 188 ~ 190、a a 194 ~ 196、a a 203 ~ 205、a a 56 ~ 67、a a 164 ~ 169、a a 176 ~ 181、もしくは a a 185 ~ 190 のいずれかのアミノ酸残基 (ここで、アミノ酸残基の位

10

20

30

40

50

置は、野生型 S I V N e f のものに対応する)における1つ以上の変異を含む、変異体 S I V N e f である。N e f が C D 3 ζ によるシグナル伝達に影響しない、または影響を最小限に抑えられることは、本発明において重要である。なぜなら、N e f 発現は、内在性 T C R を下方調節するが、同じ細胞に導入された外因性受容体(例えば C A R (例えば、抗体ベースの C A R 、リガンド／受容体ベースの C A R 、 A C T R)、工学操作された T C R (例えば、従来の工学操作された T C R 、キメラ T C R 、 T A C 様キメラ受容体)、または例えばリガンド結合ドメインを含むキメラ受容体)のシグナル伝達に対する作用はほとんどまたは全く誘発しないように意図されるからである。N e f 発現はまた、同じ細胞に導入された外因性受容体(例えば C A R (例えば、抗体ベースの C A R 、リガンド／受容体ベースの C A R 、 A C T R)、工学操作された T C R (例えば、従来の工学操作された T C R 、キメラ T C R 、 T A C 様キメラ受容体)、またはリガンド結合ドメインを含むキメラ受容体)の発現に対する作用をほとんどまたは全く誘発しないことが所望される。

10

【0220】

いくつかの実施形態では、T細胞(例えば、同種T細胞)における、本明細書に記載される N e f タンパク質(野生型、または変異体、例えば、天然に存在しない変異体)の発現は、同じT細胞における外因性受容体(例えば C A R (例えば、抗体ベースの C A R 、リガンド／受容体ベースの C A R 、 A C T R)、工学操作された T C R (例えば、従来の工学操作された T C R 、キメラ T C R 、 T A C 様キメラ受容体)、またはリガンド結合ドメインを含むキメラ受容体)を下方調節する(例えば、細胞表面発現を下方制御する)ことではない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される N e f タンパク質を発現する修飾T細胞における外因性受容体(例えば C A R (例えば、抗体ベースの C A R 、リガンド／受容体ベースの C A R 、 A C T R)、工学操作された T C R (例えば、従来の工学操作された T C R 、キメラ T C R 、 T A C 様キメラ受容体)、またはリガンド結合ドメインを含むキメラ受容体)は、同じドナー源由来で N e f を発現しないT細胞において外因性受容体が発現する場合と比較して、最大で約50%、約40%、約30%、約20%、約10%、または約5%下方調節される(例えば、細胞表面発現が下方制御される)。いくつかの実施形態では、外因性受容体(例えば C A R (例えば、抗体ベースの C A R 、リガンド／受容体ベースの C A R 、 A C T R)、工学操作された T C R (例えば、従来の工学操作された T C R 、キメラ T C R 、 T A C 様キメラ受容体)、またはリガンド結合ドメインを含むキメラ受容体)の細胞表面発現及び／またはシグナル伝達は、修飾T細胞が本明細書に記載される N e f タンパク質を発現するとき、影響を受けないか、または最大で約50%、約40%、約30%、約20%、約10%、もしくは約5%下方制御される。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質は、配列番号12~14及び18~22のいずれかから選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質は、(i) a a 2 ~ 4 、 a a 8 ~ 10 、 a a 11 ~ 13 、 a a 38 ~ 40 、 a a 44 ~ 46 、 a a 47 ~ 49 、 a a 50 ~ 52 、 a a 53 ~ 55 、 a a 56 ~ 58 、 a a 59 ~ 61 、 a a 62 ~ 64 、 a a 65 ~ 67 、 a a 98 ~ 100 、 a a 107 ~ 109 、 a a 110 ~ 112 、 a a 137 ~ 139 、 a a 152 ~ 154 、 a a 164 ~ 166 、 a a 167 ~ 169 、 a a 170 ~ 172 、 a a 173 ~ 175 、 a a 176 ~ 178 、 a a 178 ~ 179 、 179 ~ 181 a a 、 a a 182 ~ 184 、 a a 185 ~ 187 、 a a 188 ~ 190 、 a a 191 ~ 193 、 a a 194 ~ 196 、 a a 203 ~ 205 、 a a 206 ~ 208 、 a a 212 ~ 214 、 a a 215 ~ 217 、 a a 218 ~ 220 、 a a 221 ~ 223 、 a a 8 ~ 13 、 a a 44 ~ 67 、 a a 107 ~ 112 、 a a 164 ~ 196 、 a a 203 ~ 208 、 もしくは a a 212 ~ 223 、 (i i) a a 2 ~ 4 、 a a 44 ~ 46 、 a a 56 ~ 58 、 a a 59 ~ 61 、 a a 62 ~ 64 、 a a 65 ~ 67 、 a a 98 ~ 100 、 a a 107 ~ 109 、 a a 137 ~ 139 、 a a 152 ~ 154 、 a a 164 ~ 166 、 a a 167 ~ 169 、 a a 176 ~ 178 、 a a 178 ~ 179 、 a a 179 ~ 181 、 a a 185 ~ 187 、 a a 188 ~ 190 、 a a 194 ~ 196 、 a a 203 ~ 205 、 a a 44 ~ 67 、 a a 164 ~ 169 、 a a 176 ~ 181 、 a a 185 ~ 19

20

30

40

50

0、(i i i) a a 2 ~ 4、a a 5 6 ~ 5 8、a a 5 9 ~ 6 1、a a 6 2 ~ 6 4、a a 6 5 ~ 6 7、a a 1 0 7 ~ 1 0 9、a a 1 3 7 ~ 1 3 9、a a 1 5 2 ~ 1 5 4、a a 1 6 4 ~ 1 6 6、a a 1 6 7 ~ 1 6 9、a a 1 7 0 ~ 1 7 2、a a 1 7 3 ~ 1 7 5、a a 1 7 6 ~ 1 7 8、1 7 8 ~ 1 7 9 a a、a a 1 7 9 ~ 1 8 1、a a 1 8 2 ~ 1 8 4、a a 1 8 5 ~ 1 8 7、a a 1 8 8 ~ 1 9 0、a a 1 9 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a a 5 6 ~ 6 7、もしくは a a 1 6 4 ~ 1 9 0、または (i v) a a 2 ~ 4、a a 5 6 ~ 5 8、a a 5 9 ~ 6 1、a a 6 2 ~ 6 4、a a 6 5 ~ 6 7、a a 1 0 7 ~ 1 0 9、a a 1 3 7 ~ 1 3 9、a a 1 5 2 ~ 1 5 4、a a 1 6 4 ~ 1 6 6、a a 1 6 7 ~ 1 6 9、a a 1 7 6 ~ 1 7 8、a a 1 7 8 ~ 1 7 9、a a 1 7 9 ~ 1 8 1、a a 1 8 5 ~ 1 8 7、a a 1 8 8 ~ 1 9 0、a a 1 9 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a a 5 6 ~ 6 7、a a 1 6 4 ~ 1 6 9、a a 1 7 6 ~ 1 8 1、もしくは a a 1 8 5 ~ 1 9 0 のいずれかのアミノ酸残基（ここで、アミノ酸残基の位置は、野生型 S I V N e f のものに対応する）における 1 つ以上の変異を含む、変異体 S I V N e f である。

【0221】

いくつかの実施形態では、T 細胞（例えば、同種 T 細胞）における、本明細書に記載される N e f タンパク質（野生型、または変異体、例えば、天然に存在しない変異体）の発現は、内在性 M H C I、C D 4、及び／または C D 2 8 を下方調節する。例えば、内在性 M H C I、C D 4、及び／または C D 2 8 の細胞表面発現を（例えば、エンドサイトーシス及び分解により）下方制御する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される N e f タンパク質を発現する T 細胞における内在性 M H C I、C D 4、及び／または C D 2 8 の細胞表面発現は、同じドナー源由来の T 細胞のものと比較して、少なくとも約 5 0 %、約 6 0 %、約 7 0 %、約 8 0 %、約 9 0 %、または約 9 5 % 下方制御される。

【0222】

いくつかの実施形態では、T 細胞（例えば、同種 T 細胞）における、本明細書に記載される（例えば、C D 4 または C D 2 8 の下方制御に関与する変異したドメイン／モチーフを有する）変異体（例えば、天然に存在しない変異体）N e f タンパク質の発現は、内在性 T C R（及び／または M H C I）を下方調節すると共に、同じドナー源由来の T 細胞において野生型 N e f タンパク質が発現する場合と比較して、内在性 C D 4 または C D 2 8 に対する下方調節作用が低減している（少なくとも約 3 %（例えば少なくとも約 4 %、約 5 %、約 6 %、約 7 %、約 8 %、約 9 %、約 1 0 %、約 2 0 %、約 3 0 %、約 4 0 %、約 5 0 %、約 6 0 %、約 7 0 %、約 8 0 %、約 9 0 %、または約 9 5 %）小さい下方調節）。いくつかの実施形態では、内在性 C D 4 / C D 2 8 に対する下方調節作用は、C D 4 / C D 2 8 の細胞表面発現の下方制御を含む。いくつかの実施形態では、変異体 N e f は、内在性 C D 4 を下方調節する（例えば、細胞表面発現を下方制御する）ことはない。いくつかの実施形態では、変異体 N e f は、内在性 C D 2 8 を下方調節する（例えば、細胞表面発現を下方制御する）ことはない。いくつかの実施形態では、内在性 C D 4（及び／または C D 2 8）の細胞表面発現の下方制御は、変異体 N e f が T 細胞で発現した場合、同じドナー源由来の T 細胞において野生型 N e f タンパク質が発現する場合と比較して、少なくとも約 3 %、約 4 %、約 5 %、約 6 %、約 7 %、約 8 %、約 9 %、約 1 0 %、約 2 0 %、約 3 0 %、約 4 0 %、約 5 0 %、約 6 0 %、約 7 0 %、約 8 0 %、約 9 0 %、または約 9 5 % 低減する。いくつかの実施形態では、T 細胞における変異体 N e f の発現は、内在性 T C R（及び／または M H C I）の細胞表面発現を、同じドナー源由来の T 細胞のものと比較して、少なくとも約 5 0 %、約 6 0 %、約 7 0 %、約 8 0 %、約 9 0 %、約 9 5 % 下方制御するが、内在性 C D 4（及び／または C D 2 8）の細胞表面発現の下方制御は、同じドナー源由来の T 細胞において野生型 N e f タンパク質が発現する場合と比較して、少なくとも約 5 0 %、約 6 0 %、約 7 0 %、約 8 0 %、約 9 0 %、または約 9 5 % 低減する。いくつかの実施形態では、変異体 N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f）は、内在性 T C R（例えば、T C R α 及び／または T C R β）の細胞表面発現を、野生型 N e f による下方制御と比べて約 3 % 以下（例えば約 2 % 以下または約 1 % 以下）の差で下方制御し（または、内在性 T C R（例えば、T C R α 及び／または T C R β）

の細胞表面発現を、野生型Nefによる下方制御と比べて少なくとも約3%（3%を含む、例えば少なくとも約3%、約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%）大きく下方制御し）、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を、野生型Nefによる下方制御と比べて少なくとも約3%（例えば少なくとも約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%）小さく下方制御する。いくつかの実施形態では、変異体Nefタンパク質は、配列番号18～22のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、小さいCD4及び／またはCD28下方制御作用を有する変異体Nefは、(ii) aa2～4、aa44～46、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～100、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa44～67、aa164～169、aa176～181、aa185～190、(iii) aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、178～179aa、aa179～181、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、もしくはaa164～190、または(iv) aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、aa164～169、aa176～181、もしくはaa185～190のいずれかのアミノ酸残基（ここで、アミノ酸残基の位置は、野生型SIV Nefのものに対応する）における1つ以上の変異を含む、変異体SIV Nefである。

【0223】

いくつかの実施形態では、ミリスチル化部位、N末端αヘリックス、チロシンベースのAP動員、CD4結合部位、酸性クラスター、プロリンベースのリピート、PAK結合ドメイン、COP I動員ドメイン、ジロイシンベースのAP動員ドメイン、V-ATPase及びRaf-1結合ドメイン、もしくはそれらの任意の組み合わせにおける1つ以上の変異を含む、または前述のドメイン／モチーフのいずれにも1つ以上の変異を含まない、天然に存在しないNefタンパク質が提供される。いくつかの実施形態では、(i) aa2～4、aa8～10、aa11～13、aa38～40、aa44～46、aa47～49、aa50～52、aa53～55、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～100、aa107～109、aa110～112、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、aa178～179、179～181aa、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa191～193、aa194～196、aa203～205、aa206～208、aa212～214、aa215～217、aa218～220、aa221～223、aa8～13、aa44～67、aa107～112、aa164～196、aa203～208、もしくはaa212～223、(ii) aa2～4、aa44～46、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～100、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa44～67、aa164～169、aa176～181、aa185～190、(i

i i) a a 2 ~ 4、a a 5 6 ~ 5 8、a a 5 9 ~ 6 1、a a 6 2 ~ 6 4、a a 6 5 ~ 6 7、a a 1 0 7 ~ 1 0 9、a a 1 3 7 ~ 1 3 9、a a 1 5 2 ~ 1 5 4、a a 1 6 4 ~ 1 6 6、a a 1 6 7 ~ 1 6 9、a a 1 7 0 ~ 1 7 2、a a 1 7 3 ~ 1 7 5、a a 1 7 6 ~ 1 7 8、1 7 8 ~ 1 7 9 a a、a a 1 7 9 ~ 1 8 1、a a 1 8 2 ~ 1 8 4、a a 1 8 5 ~ 1 8 7、a a 1 8 8 ~ 1 9 0、a a 1 9 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a a 5 6 ~ 6 7、もしくは a a 1 6 4 ~ 1 9 0、または (i v) a a 2 ~ 4、a a 5 6 ~ 5 8、a a 5 9 ~ 6 1、a a 6 2 ~ 6 4、a a 6 5 ~ 6 7、a a 1 0 7 ~ 1 0 9、a a 1 3 7 ~ 1 3 9、a a 1 5 2 ~ 1 5 4、a a 1 6 4 ~ 1 6 6、a a 1 6 7 ~ 1 6 9、a a 1 7 6 ~ 1 7 8、a a 1 7 8 ~ 1 7 9、a a 1 7 9 ~ 1 8 1、a a 1 8 5 ~ 1 8 7、a a 1 8 8 ~ 1 9 0、a a 1 9 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a a 5 6 ~ 6 7、a a 1 6 4 ~ 1 6 9、a a 1 7 6 ~ 1 8 1、もしくは a a 1 8 5 ~ 1 9 0 のいずれか (ここで、アミノ酸残基の位置は、野生型 S I V N e f のものに対応する) における 1 つ以上の変異を含む、天然に存在しない N e f タンパク質が提供される。いくつかの実施形態では、配列番号 1 8 ~ 2 2 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む、天然に存在しない N e f タンパク質が提供される。

10

【0224】

また、本明細書に記載される N e f タンパク質 (例えば、w t N e f、または天然に存在しない N e f タンパク質、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) のいずれかをコードする核酸 (例えば、単離された核酸) も提供される。さらに、本明細書に記載される N e f タンパク質 (例えば、w t N e f、または天然に存在しない N e f タンパク質、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) のいずれかをコードする核酸を含む、ベクター (例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター、細菌発現ベクター) が提供される。これらのベクターは、本明細書に記載されるベクターのいずれに配置してもよい。

20

【0225】

V. 機能的な外因性受容体

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される N e f タンパク質 (例えば、w t N e f、または天然に存在しない N e f タンパク質、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) を発現する修飾 T 細胞は、機能的な外因性受容体 (例えば、工学操作された T C R (例えば、従来の工学操作された T C R、キメラ T C R (c T C R))、T A C、T A C 様キメラ受容体、または C A R (例えば、抗体ベースの C A R、リガンド / 受容体ベースの C A R、または A C T R)) をさらに発現する。機能的な外因性受容体をコードする核酸は、前駆体 T 細胞に予め存在する場合があるか、または、N e f タンパク質をコードする核酸と併せて (例えば、それと同時に) 前駆体 T 細胞に導入される。機能的な外因性受容体は、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含み得る。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体は、工学操作された T C R、例えば、共に抗原 (例えば、腫瘍抗原、例えば、B C M A) を特異的に認識する、野生型 T C R に由来する V α 及び V β を含む、細胞外リガンド結合ドメインを含む、従来の工学操作された T C R (例えば、「抗 B C M A T C R」という、B C M A または B C M A / M H C 複合体を特異的に認識する工学操作された T C R) であり、V α、V β、またはその両方が、野生型 T C R と比べて、1 つ以上の C D R に 1 つ以上の変異を含む。従来の工学操作された T C R を発現する T 細胞を、本明細書では「従来の T C R - T」という。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体は、(a) 腫瘍抗原 (例えば、B C M A、C D 2 0、C D 1 9) の 1 つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片 (例えば、s c F v、s d A b) を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 任意選択のリンカー、(c) 第 1 の T C R サブユニットの任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、(d) 第 2 の T C R サブユニットの膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び (e) 第 3 の T C R サブユニットの細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む、キメラ T C R (c T C R) であり、第 1、第 2、及び第 3 の T C R サブユニットは全て、T C R α、T C R β、T C R γ、T C R δ、C D 3 ε、C D 3 γ、及び C D 3 δ からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、第 1、第 2、及び第 3 の T C R サブユニットは同

30

40

50

じ（例えば、CD3 ϵ ）である。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットは異なっている。キメラTCRを発現するT細胞を、本明細書では「cTCR-T」という。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体は、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD20、CD19）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、scFv、sdAb）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）TCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、（e）第1のTCR共受容体（例えば、CD4、CD28、またはCD8、例えば、CD8 α ）に由来する任意選択の細胞外ドメイン、（f）第2のTCR共受容体（例えば、CD4、CD28、またはCD8、例えば、CD8 α ）の膜貫通部を含む膜貫通部、及び（g）第3のTCR共受容体（例えば、CD4、CD28、またはCD8、例えば、CD8 α ）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含む、T細胞抗原結合体（TAC）である。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCR共受容体は同じ（例えば、全てCD4）である。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCR共受容体は異なっている。例えば、いくつかの実施形態では、TACは、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD20、CD19）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、scFv、sdAb）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）TCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、及び（e）完全長TCR共受容体（例えば、CD4、CD8（例えば、CD8 α ）、またはCD28）を含む。TACを発現するT細胞を、本明細書では「TAC-T」という。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体は、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD20、CD19）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、scFv、sdAb）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）第1のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、（e）第2のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、（f）第3のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び（g）第4のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含む、T細胞抗原結合体（TAC）様キメラ受容体であり、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは全て、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じ（例えば、CD3 ϵ ）である。いくつかの実施形態では、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じ（例えば、CD3 ϵ ）である。いくつかの実施形態では、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは異なっている（例えば、CD3 ϵ ）。いくつかの実施形態では、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じ（例えば、CD3 ϵ ）であるが、第1のTCRサブユニット（例えば、TCR α ）とは異なっている。いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受容体は、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD20、CD19）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、scFv、sdAb）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）第1のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、及び（e）完全長の第2のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）を含み、第1及び第2のTCRサブユニットはいずれも、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、第1及び第2のTCRサブユニットは同じ（例えば、いずれもCD3 ϵ ）である。いくつかの実施形態では、第1（例えば、TCR α ）及び第2（例えば、CD3 ϵ ）のTCRサブユニットは異なっている。TAC様キメラ受容体を発現するT細胞を、本明細書では「TAC様T」という。いくつかの実施形態で

は、機能的な外因性受容体は、非TCR受容体である。いくつかの実施形態では、非TCR受容体は、(a) 抗原（例えば、本明細書に記載される抗原のいずれか、例えばBCMA、CD20、CD19）を特異的に認識する1つ以上（例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数）の結合部分（例えば、受容体ドメインまたは抗体ベースの結合ドメイン、例えばsdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 膜貫通ドメイン、及び(c) 細胞内シグナル伝達ドメインを含む、キメラ抗原受容体(CAR)である。いくつかの実施形態では、CARの細胞外リガンド結合ドメインは、抗原結合性断片（以下、「抗抗原CAR」、または「抗体ベースのCAR」、例えば、「抗BCMA CAR」という）、例えばsdAb（例えば、抗BCMA sdAb）またはscFv（例えば、抗CD20 scFv、抗CD19 scFv）を含む、1つ以上（例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数）の結合部分を含む。いくつかの実施形態では、CARの細胞外リガンド結合ドメインは、リガンドに由来する少なくとも1つのドメインまたは受容体の細胞外ドメインを含む1つ以上の結合部分を含み（以下、「リガンド／受容体ベースのCAR」ともいう）、このリガンドまたは受容体は、細胞表面抗原である。いくつかの実施形態では、リガンドは、APRILまたはBAFF（BCMAのリガンド）に由来する。CARを発現するT細胞を、本明細書では「CAR-T」という。APRILまたはBAFFを含む1つ以上の結合部分を含む細胞外リガンド結合ドメインを含むCARは、以下、「BCMA-リガンドCAR」という。いくつかの実施形態では、受容体は、Fc受容体（例えば、FcγR）の細胞外ドメインなどのFc結合ドメインに由来する。Fc結合ドメイン（例えば、FcγR）を含む1つ以上の結合部分を含む細胞外リガンド結合ドメインを含むCARは、以下、「抗体結合T細胞受容体(ACTR)」ともいう。ACTRを発現するT細胞を、本明細書では「ACTR-T」という。いくつかの実施形態では、Fc含有タンパク質をACTR-T細胞に投与するか、またはACTR-T細胞において同時発現させると、Fc含有タンパク質は、本明細書に記載される抗原に対するACTR発現T細胞の結合特異性をもたらす。いくつかの実施形態では、Fc含有タンパク質は、Fc含有抗体（例えば、抗BCMA完全長抗体などの完全長抗体）、またはFc融合タンパク質、例えば抗原結合性断片-Fc融合タンパク質（例えば、抗BCMA sdAb-Fc融合タンパク質、または抗BCMA HCAb）、Fc受容体／リガンド融合タンパク質（例えば、APRIL-Fc融合タンパク質）、免疫グロブリンG(IgG)のFc領域に融合したTCRの可変領域を含むFc融合タンパク質（「TCR-Fc融合タンパク質」、例えば抗BCMA TCR-Fc融合タンパク質）である。ACTR／Fc含有タンパク質システムは、以下、「抗抗原ACTR」、例えば「抗BCMA ACTR」という。

【0226】

また、本明細書に記載される機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR(cTCR)）、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR）など）のいずれかをコードする核酸（例えば、単離された核酸）が提供される。さらに、本明細書に記載される機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR(cTCR)）、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））のいずれかをコードする核酸を含む、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター）が提供される。

【0227】

抗原

本明細書に記載される機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR(cTCR)）、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））の細胞外リガンド結合ドメインは、標的細胞上の任意の抗原を特異的に認識し得る。いくつかの実施形態では、抗原は、細胞表面分子である。いくつかの実施

形態では、抗原は、特殊な病状に関連する標的細胞上の細胞表面マーカーとして機能する。いくつかの実施形態では、抗原は、腫瘍抗原である。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、単一の腫瘍抗原を特異的に認識する。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、単一の腫瘍抗原の1つ以上のエピトープを特異的に認識する。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、2つ以上の腫瘍抗原を特異的に認識する。いくつかの実施形態では、腫瘍抗原は、B細胞リンパ腫または多発性骨髄腫（MM）などのB細胞悪性腫瘍に関連する。腫瘍は、免疫応答、特にT細胞性免疫応答の標的抗原として機能し得るいくつかのタンパク質を発現する。細胞外リガンド結合ドメインによって特異的に認識される抗原は、単一の疾患細胞上の抗原、または各々が疾患の一因となる異なる細胞で発現する抗原であってもよい。細胞外リガンド結合ドメインによって特異的に認識される抗原は、疾患に直接的または間接的に関与していてもよい。

【0228】

腫瘍抗原は、免疫応答、特にT細胞性免疫応答を誘発できる腫瘍細胞によって産生されるタンパク質である。本発明の標的の抗原の選択は、処置されるがんの特定のタイプに依存する。例示的な腫瘍抗原としては、例えば、神経膠腫関連抗原、BCMA（B細胞成熟抗原）、癌胎児抗原（CEA）、 β -ヒト絨毛性ゴナドトロピン、アルファフェトプロテイン（AFP）、レクチン反応性AFP、サイログロブリン、RAGE-1、MN-CAX、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、RU1、RU2（AS）、腸内カルボキシエステラーゼ、mut hsp70-2、M-CSF、プロスターゼ、前立腺特異抗原（PSA）、PAP、NY-ESO-1、LAGE-1a、p53、プロステイン、PSMA、HER2/neu、サバイビン及びテロメラーゼ、前立腺癌腫瘍抗原-1（PCTA-1）、MAGE、ELF2M、好中球エラスターゼ、エフリンB2、CD22、インスリン成長因子（IGF）-I、IGF-II、IGF-I受容体、ならびにメソテリンが挙げられる。

【0229】

いくつかの実施形態では、腫瘍抗原は、悪性腫瘍に関連する1つ以上の抗原性がんエピトープを含む。悪性腫瘍は、免疫攻撃の標的抗原として機能し得るいくつかのタンパク質を発現する。これらの分子は、黒色腫におけるMART-1、チロシナーゼ、及びgp100、ならびに前立腺癌における前立腺酸性ホスファターゼ（PAP）及び前立腺特異抗原（PSA）などの組織特異的抗原を含むが、これらに限定されない。他の標的分子は、がん遺伝子HER2/neu/erbB-2などの形質転換関連分子の群に属する。さらに別の群の標的抗原は、癌胎児抗原（CEA）などの癌胎児性抗原である。B細胞リンパ腫では、腫瘍特異的イディオタイプ免疫グロブリンは、個々の腫瘍に特有の真に腫瘍特異的な免疫グロブリン抗原を構成する。CD19、CD20、及びCD37などのB細胞分化抗原は、B細胞リンパ腫における標的抗原の他の候補である。

【0230】

いくつかの実施形態では、腫瘍抗原は、腫瘍特異的抗原（TSA）または腫瘍関連抗原（TAA）である。TSAは、腫瘍細胞に特有であり、体内の他の細胞に生じない。TAA関連抗原は、腫瘍細胞に特有ではなく、むしろ、抗原に対する免疫寛容の状態を誘導することができない条件下で正常細胞でも発現する。腫瘍上での抗原の発現は、免疫系が抗原に応答することを可能にする条件下で生じ得る。TAAは、免疫系が未熟で応答できない胎児の発達中に正常細胞で発現する抗原である場合もあれば、通常はきわめて低いレベルで正常細胞に存在するが、腫瘍細胞では大幅に高いレベルで発現する抗原である場合もある。

【0231】

TSAまたはTAA抗原の非限定的な例としては、分化抗原、例えばMART-1/メラニンA（MART-I）、gp100（Pmel17）、チロシナーゼ、TRP-1、TRP-2及び腫瘍特異的多系列抗原、例えばMAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15；CEAなどの過剰発現する胚抗原；p53、R

as、HER2/neuなどの過剰発現するがん遺伝子及び変異した腫瘍抑制遺伝子；染色体転座に起因する特有の腫瘍抗原、例えばBCR-ABL、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR；ならびに、エプスタイン・バーウイルス抗原EBVAならびにヒトパピローマウイルス（HPV）抗原E6及びE7などのウイルス抗原が挙げられる。他の大きなタンパク質ベースの抗原としては、TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、RAGE、NY-ESO、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23HI、PSA、TAG-72、CA19-9、CA72-4、CAM17.1、NuMa、K-ras、ベータカテニン、CDK4、Mum-1、p15、p16、43-9F、5T4、791Tgp72、アルファフェトプロテイン、ベータHCG、BCA225、BTAA、CA125、CA15-3\C

10

【0232】

いくつかの実施形態では、腫瘍抗原は、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD38、BCMA、CS1、CD138、CD123/IL3R α 、c-Met、gp100、MUC1、IGF-I受容体、EpCAM、EGFR/EGFRvII、HER2、IGF1R、メソテリン、PSMA、WT1、ROR1、CEA、GD-2、NY-ESO-1、MAGE A3、GPC3、糖脂質F77、PD-L1、PD-L2、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、抗原は、B細胞上で発現する。いくつかの実施形態では、抗原は、BCMA、CD19、またはCD20である。

20

【0233】

いくつかの実施形態では、抗原は、真菌抗原、ウイルス抗原、または細菌抗原などの病原体抗原である。いくつかの実施形態では、真菌抗原は、AspergillusまたはCandidaに由来する。いくつかの実施形態では、ウイルス抗原は、単純ヘルペスウイルス（HSV）、呼吸器多核体ウイルス（RSV）、メタニューモウイルス（hMPV）、ライノウイルス、パラインフルエンザ（PIV）、エプスタイン・バーウイルス（EBV）、サイトメガロウイルス（CMV）、JCウイルス（John Cunninghamウイルス）、BKウイルス、HIV、ジカウイルス、ヒトコロナウイルス、ノロウイルス、脳炎ウイルス、またはエボラに由来する。

30

【0234】

いくつかの実施形態では、細胞表面抗原は、リガンドまたは受容体である。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、リガンドに由来する少なくとも1つのドメインまたは受容体の細胞外ドメインを含む1つ以上の結合部分を含み、このリガンドまたは受容体は、本明細書に記載される細胞表面抗原である。いくつかの実施形態では、リガンドまたは受容体は、NKG2A、NKG2C、NKG2F、NKG2D、BCMA、APRIL、BAFF、IL-3、IL-13、LLT1、AICL、DNAM-1、及びNKp80からなる群から選択される分子に由来する。いくつかの実施形態では、リガンドは、BCMAに結合することができる、APRILまたはBAFFに由来する。いくつかの実施形態では、受容体は、Fc受容体の細胞外ドメインなどのFc結合ドメインに由来する。いくつかの実施形態では、Fc受容体は、Fc γ 受容体（Fc γ R）である。いくつかの実施形態では、Fc γ Rは、CD16A（Fc γ RIIIa）、CD16B（Fc γ RIIIb）、CD64A、CD64B、CD64C、CD32A、及びCD32Bからなる群から選択される。

40

【0235】

キメラ抗原受容体（CAR）

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるNefタンパク質（例えば、wt N

50

e f、または天然に存在しないN e fタンパク質、変異体S I V N e fなどの変異体N e f)を発現する修飾T細胞は、(a)抗原(例えば、本明細書に記載される抗原のいずれか、例えば、BCMA、CD19、CD20)を特異的に認識する1つ以上(例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数)の結合部分を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)膜貫通ドメイン、及び(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含む、CARをさらに発現する。いくつかの実施形態では、1つ以上の結合部分は、抗体またはその抗原結合性断片である。いくつかの実施形態では、1つ以上の結合部分は、4本鎖抗体に由来する。いくつかの実施形態では、1つ以上の結合部分は、ラクダ科抗体に由来する。いくつかの実施形態では、1つ以上の結合部分は、ヒト抗体に由来する。いくつかの実施形態では、1つ以上の結合部分は、ラクダIg、Ig NAR、Fab断片、Fab'断片、F(ab)'₂断片、F(ab)'₃断片、Fv、一本鎖Fv抗体(scFv)、bis-scFv、(scFv)₂、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ジスルフィド安定化Fvタンパク質(dsFv)、及び単一ドメイン抗体(sdAb、ナノボディ)からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、1つ以上の結合部分は、sdAb(例えば、抗BCMA sdAb)である。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、2つ以上のsdAbがひとつに結合したものを含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の結合部分は、scFv(例えば、抗CD19 scFv、抗CD20 scFv、またはCD19×CD20二重特異性scFv)である。いくつかの実施形態では、1つ以上の結合部分は、非抗体結合タンパク質、例えば、抗原に結合するポリペプチドリガンドまたは工学操作されたタンパク質である。いくつかの実施形態では、1つ以上の結合部分は、リガンドに由来する少なくとも1つのドメインまたは受容体の細胞外ドメインを含み、このリガンドまたは受容体は、細胞表面抗原である。いくつかの実施形態では、リガンドまたは受容体は、NKG2A、NKG2C、NKG2F、NKG2D、BCMA、APRIL、BAFF、IL-3、IL-13、LLT1、AICL、DNAM-1、及びNKp80からなる群から選択される分子に由来する。いくつかの実施形態では、リガンドは、BCMAに結合することができる、APRILまたはBAFFに由来する。いくつかの実施形態では、受容体は、Fc受容体の細胞外ドメインなどのFc結合ドメインに由来する。いくつかの実施形態では、Fc受容体は、Fcγ受容体(FcγR)である。いくつかの実施形態では、FcγRは、CD16A(FcγRIIa)、CD16B(FcγRIIb)、CD64A、CD64B、CD64C、CD32A、及びCD32Bからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、CARは、一価かつ単一特異性である。いくつかの実施形態では、CARは、多価(例えば、二重特異性)かつ単一特異性である。いくつかの実施形態では、CARは、多価(例えば、二価)かつ多重特異性(例えば、二重特異性)である。いくつかの実施形態では、抗原は、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD38、BCMA、CS1、CD138、CD123/IL3Rα、c-Met、gp100、MUC1、IGF-1受容体、EpCAM、EGFR/EGFRvIII、HER2、IGF1R、メソテリン、PSMA、WT1、ROR1、CEA、GD-2、NY-ESO-1、MAGEA3、GPC3、糖脂質F77、PD-L1、PD-L2、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、抗原は、BCMA、CD19、またはCD20である。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、T細胞受容体のα、β、またはζ鎖、CD3ζ、CD3ε、CD4、CD5、CD8α、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137(4-1BB)、CD152、CD154、及びPD-1からなる群から選択される分子に由来する。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、CD8αに由来する。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫エフェクター細胞の一次細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、一次細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3ζ、CD3γ、CD3ε、CD3δ、FcRγ(FcER1G)、FcRβ(FcイプシロンRIb)、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD66d、FcガンマRIIa、DAP10、及びDAP1

2に由来する。いくつかの実施形態では、一次細胞内シグナル伝達ドメインは、DAP12、CD3 ζ 、またはCD3 γ に由来する。いくつかの実施形態では、一次細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3 ζ に由来する。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、共刺激シグナル伝達ドメインは、CARD11、CD2(LFA-2)、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54(ICAM-1)、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、CD162(SELPLG)、CD258(LIGHT)、CD270(HVEM、LIGHTR)、CD276(B7-H3)、CD278(ICOS)、CD279(PD-1)、CD319(SLAMF7)、LFA-1(リンパ球機能関連抗原1)、NKG2C、CDS、GITR、BAFFR、NKp80(KLRF1)、CD160、CD19、CD4、IPO-3、BLAME(SLAMF8)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D、CD83、CD150(SLAMF1)、CD152(CTLA-4)、CD223(LAG3)、CD273(PD-L2)、CD274(PD-L1)、DAP10、TRIM、ZAP70、CD83に特異的に結合するリガンド、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される共刺激分子に由来する。いくつかの実施形態では、共刺激シグナル伝達ドメインは、CD137の細胞質ドメインを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるCARは、細胞外リガンド結合ドメインのC末端と膜貫通ドメインのN末端との間に位置するヒンジドメインをさらに含む。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、CD8 α に由来する。いくつかの実施形態では、CARは、ポリペプチドのN末端に位置するシグナルペプチドをさらに含む。いくつかの実施形態では、シグナルペプチドは、CD8 α に由来する。いくつかの実施形態では、CARは、N末端からC末端に向かって、CD8 α シグナルペプチド、細胞外リガンド結合ドメイン(例えば、BCMA、APRIL/BAFFリガンド、またはFc受容体の1つ以上のエピトープを特異的に認識する1つ以上のsdAb)、CD8 α ヒンジドメイン、CD8 α 膜貫通ドメイン、CD137に由来する共刺激シグナル伝達ドメイン、及びCD3 ζ に由来する一次細胞内シグナル伝達ドメインを含むポリペプチドを含む。

【0236】

いくつかの実施形態では、本願のCARは、「抗BCMA CAR」である。いくつかの実施形態では、CARは、N末端からC末端に向かって、CD8 α シグナルペプチド、抗BCMA sdAbを含む細胞外リガンド結合ドメイン、CD8 α ヒンジドメイン、CD8 α 膜貫通ドメイン、CD137に由来する共刺激シグナル伝達ドメイン、及びCD3 ζ に由来する一次細胞内シグナル伝達ドメインを含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、CARは、N末端からC末端に向かって、CD8 α シグナルペプチド、第1の抗BCMA sdAb及び第2の抗BCMA sdAbを含む細胞外リガンド結合ドメイン、CD8 α ヒンジドメイン、CD8 α 膜貫通ドメイン、CD137に由来する共刺激シグナル伝達ドメイン、ならびにCD3 ζ に由来する一次細胞内シグナル伝達ドメインを含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、第1の抗BCMA sdAbと第2の抗BCMA sdAbとは同じである。いくつかの実施形態では、第1の抗BCMA sdAbと第2の抗BCMA sdAbとは異なっている。いくつかの実施形態では、第1の抗BCMA sdAbと第2の抗BCMA sdAbとは、同じBCMAエピトープに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、第1の抗BCMA sdAbと第2の抗BCMA sdAbとは、異なるBCMAエピトープに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、抗BCMA CARは、配列番号59~61から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0237】

いくつかの実施形態では、本願のCARは、抗CD19 CARである。いくつかの実施形態では、抗CD19 CARの細胞外リガンド結合ドメインは、抗CD19 scFvを含む。いくつかの実施形態では、抗CD19 CARは、配列番号58のアミノ酸配列を含む。

10

20

30

40

50

【0238】

いくつかの実施形態では、本願のCARは、抗CD20 CARである。いくつかの実施形態では、抗CD20 CARの細胞外リガンド結合ドメインは、抗CD20 scFvを含む。いくつかの実施形態では、抗CD20 scFvは、抗CD20抗体、例えばリツキシマブ（例えば、Rituxan（登録商標）、MabThera（登録商標））、またはLeu-16に由来する。いくつかの実施形態では、抗CD20 CARは、配列番号55または56のアミノ酸配列を含む。

【0239】

いくつかの実施形態では、本願のCARは、抗CD19／抗CD20二重特異性CARである（本明細書ではCD19×CD20 CARともいう）。いくつかの実施形態では、CD19×CD20 CARの細胞外リガンド結合ドメインは、抗CD20 scFv及び／または抗CD19 scFvを含む。いくつかの実施形態では、CD19×CD20 CARは、配列番号57のアミノ酸配列を含む。

【0240】

いくつかの実施形態では、本願のCARは、「BCMAーリガンドCAR」である。いくつかの実施形態では、CARは、N末端からC末端に向かって、CD8αシグナルペプチド、APRILまたはBAFFに由来する少なくとも1つのドメインを含む1つ以上の結合部分を含む細胞外リガンド結合ドメイン、CD8αヒンジドメイン、CD8α膜貫通ドメイン、CD137に由来する共刺激シグナル伝達ドメイン、及びCD3ζに由来する一次細胞内シグナル伝達ドメインを含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、APRILドメインを含む。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、BAFFドメインを含む。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、APRILドメイン及びBAFFドメインを含む。

【0241】

いくつかの実施形態では、本願のCARは、抗体結合TCR（ACTR）である。ACTRを有する工学操作されたT細胞は、Fc含有タンパク質（例えば、モノクローナル抗体、例えば、抗BCMA抗体）に結合することができ、これは次いで、腫瘍細胞への架橋として機能する。いくつかの実施形態では、CARは、N末端からC末端に向かって、CD8αシグナルペプチド、Fc結合ドメイン（例えば、Fc受容体、例えば、FcγR）を含む1つ以上の結合部分を含む細胞外リガンド結合ドメイン、CD8αヒンジドメイン、CD8α膜貫通ドメイン、CD137に由来する共刺激シグナル伝達ドメイン、及びCD3ζに由来する一次細胞内シグナル伝達ドメインを含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、FcγRは、CD16A（FcγRIIIa）、CD16B（FcγRIIIb）、CD64A、CD64B、CD64C、CD32A、及びCD32Bからなる群から選択される。

【0242】

PCT／CN2017／096938及びPCT／CN2016／094408（これらの内容は、その全体が参照により本明細書に援用される）に記載されているCARを含め、当技術分野で公知であるか、または本発明者らによって開発された任意のCARを使用して、本明細書に記載されるCARを構築することができる。CARの例示的な構造は、PCT／CN2017／096938の図15A～15Dに示されている。

【0243】

多価及び／または多重特異性CAR

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるCARは、（a）抗原（例えば、本明細書に記載される抗原のいずれか）を特異的に認識する2つ以上（例えば2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数）の結合部分を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）膜貫通ドメイン、及び（c）細胞内シグナル伝達ドメインを含む、多価CARである。いくつかの実施形態では、結合部分のうちの1つ以上は、抗原結合性断片である。いくつかの実施形態では、結合部分のうちの1つ以上は、単一ドメイン抗体（例えば、抗BCMA sdAb、BCMA VHH）を含む。いくつかの実施形態では、結合部分のうちの

の1つ以上は、ラクダ科抗体に由来する。いくつかの実施形態では、結合部分のうちの1つ以上は、4本鎖抗体に由来する。いくつかの実施形態では、結合部分のうちの1つ以上は、s c F v（例えば、抗C D 2 0 s c F v、抗C D 1 9 s c F v）である。いくつかの実施形態では、結合部分のうちの1つ以上は、ヒト抗体に由来する。いくつかの実施形態では、結合部分のうちの1つ以上は、抗原に特異的に結合するポリペプチドリガンドまたは他の非抗体ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、多価C A Rは、単一特異性である。すなわち、多価C A Rは、単一の抗原を標的とし、単一の抗原に対する2つ以上の結合部位を含む。いくつかの実施形態では、多価C A Rは、多重特異性である。すなわち、多価C A Rは、2つ以上の抗原を標的とし、多価C A Rは、少なくとも1つの抗原に対する2つ以上の結合部位を含む。同じ抗原に特異的な結合部分は、抗原の同じエピトープに結合する場合もある（すなわち、「モノエピトープC A R」）、または抗原の異なるエピトープに結合する場合もある（すなわち、バイエピトープC A RまたはトリエピトープC A Rなどの「マルチエピトープC A R」）。同じ抗原に特異的な結合部位は、同じまたは異なるs d A bを含み得る。いくつかの実施形態では、抗原は、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 2、C D 3 0、C D 3 3、C D 3 8、B C M A、C S 1、C D 1 3 8、C D 1 2 3 / I L 3 R α、c - M e t、g p 1 0 0、M U C 1、I G F - I 受容体、E p C A M、E G F R / E G F R v I I I、H E R 2、I G F 1 R、メソテリン、P S M A、W T 1、R O R 1、C E A、G D - 2、N Y - E S O - 1、M A G E A 3、G P C 3、糖脂質F 7 7、P D - L 1、P D - L 2、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、抗原は、B C M A、C D 1 9、またはC D 2 0である。

【0 2 4 4】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるC A Rは、（a）抗原（例えば、腫瘍抗原、例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0）に特異的に結合する複数（例えば、少なくとも約2、3、4、5、6、またはそれ以上のいずれかの数）の結合部分（例えば、s d A b、s c F v）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）膜貫通ドメイン、及び（c）細胞内シグナル伝達ドメインを含む、多価（例えば二価、三価、またはより高い価数）のC A Rである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるC A Rは、（a）抗原（例えば、腫瘍抗原、例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0）に特異的に結合する複数（例えば、少なくとも約2、3、4、5、6、またはそれ以上のいずれかの数）のs d A bを含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）膜貫通ドメイン、及び（c）細胞内シグナル伝達ドメインを含む、多価（例えば二価、三価、またはより高い価数）のC A Rである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるC A Rは、（a）抗原（例えば、腫瘍抗原、例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0）の第1のエピトープに特異的に結合する第1の結合部分（例えば、s d A b、s c F v）、及び抗原（例えば、腫瘍抗原、例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0）の第2のエピトープに特異的に結合する第2の結合部分（例えば、s d A b、s c F v）を含む、細胞外リガンド結合ドメイン、（b）膜貫通ドメイン、ならびに（c）細胞内シグナル伝達ドメインを含む、多価（例えば二価、三価、またはより高い価数）のC A Rである。いくつかの実施形態では、第1のエピトープと第2のエピトープとは異なっている。いくつかの実施形態では、第1のエピトープと第2のエピトープとは同じである。いくつかの実施形態では、第1の結合部分は、s d A bであり、第2の結合部分は、ヒト抗体（例えば、s c F v）に由来する。いくつかの実施形態では、第1及び第2の結合部分はいずれも、s d A bまたはs c F vである。いくつかの実施形態では、第1の結合部分は、s d A bであり、第2の結合部分は、ポリペプチドリガンドまたは受容体（例えば、A P R I L、B A F F、F c 受容体）である。いくつかの実施形態では、多価C A Rは、抗原上の2つの異なるエピトープに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、多価C A Rは、抗原上の3つ以上の異なるエピトープに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるC A Rは、（a）抗原（例えば、腫瘍抗原、例えば、B C M A）の第1のエピトープに特異的に結合する第1のs d A b、及び抗原（例えば、腫瘍抗原、例えば、B C M A）の第2のエピトープに特異的

に結合する第2のs d A bを含む、細胞外リガンド結合ドメイン、(b)膜貫通ドメイン、ならびに(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含む、二価CARである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるCARは、(a)抗原(例えば、腫瘍抗原、例えば、BCMA、CD19、CD20)の第1のエピトープに特異的に結合する第1のs c F v、及び抗原(例えば、腫瘍抗原、例えば、BCMA、CD19、CD20)の第2のエピトープに特異的に結合する第2のs c F vを含む、細胞外リガンド結合ドメイン、(b)膜貫通ドメイン、ならびに(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含む、二価CARである(本明細書では、CD19×CD20 CARともいう)。いくつかの実施形態では、第1のエピトープと第2のエピトープとは異なっている。いくつかの実施形態では、第1のエピトープと第2のエピトープとは同じである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるCARは、(a)CD19に特異的に結合する第1のs c F v、及びCD20に特異的に結合する第2のs c F vを含む、細胞外リガンド結合ドメイン、(b)膜貫通ドメイン、ならびに(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含む、二価かつ二重特異性のCARである。例えばいくつかの実施形態では、抗原は、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD38、BCMA、CS1、CD138、CD123/IL3R α 、c-Met、gp100、MUC1、IGF-I受容体、EpCAM、EGFR/EGFRvIII、HER2、IGF1R、メソテリン、PSMA、WT1、ROR1、CEA、GD-2、NY-ESO-1、MAGE A3、GPC3、糖脂質F77、PD-L1、PD-L2、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、抗原は、BCMA、CD19、またはCD20である。

10

20

【0245】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるCARは、(a)BCMAの第1のエピトープに特異的に結合する第1のs d A b(「抗BCMA s d A b1」または「抗BCMA VHH1」)、及びBCMAの第2のエピトープに特異的に結合する第2のs d A b(「抗BCMA s d A b2」または「抗BCMA VHH2」)を含む、細胞外リガンド結合ドメイン、(b)膜貫通ドメイン、ならびに(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含む、二価CARである。いくつかの実施形態では、抗BCMA s d A b1と抗BCMA s d A b2とは同じである。いくつかの実施形態では、抗BCMA s d A b1と抗BCMA s d A b2とは異なっている。

【0246】

細胞外リガンド結合ドメイン

本明細書に記載される機能的な外因性受容体(例えば、キメラTCR、TAC、TAC様キメラ受容体、CAR(例えば、抗体ベースのCAR、リガンド/受容体ベースのCAR、またはACTR))の細胞外リガンド結合ドメインは、1つ以上(例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数)の結合部分、例えばs d A bを含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の結合部分は、抗体またはその抗原結合性断片である。いくつかの実施形態では、1つ以上の結合部分は、4本鎖抗体に由来する。いくつかの実施形態では、1つ以上の結合部分は、ラクダ科抗体に由来する。いくつかの実施形態では、1つ以上の結合部分は、ヒト抗体に由来する。いくつかの実施形態では、1つ以上の結合部分は、ラクダIg、Ig NAR、Fab断片、Fab'断片、F(ab)'₂断片、F(ab)'₃断片、Fv、一本鎖Fv抗体(s c F v)、bis-s c F v、(s c F v)₂、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ジスルフィド安定化Fvタンパク質(ds F v)、及び単一ドメイン抗体(s d A b、ナノボディ)からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、1つ以上の結合部分は、s d A b(例えば、抗BCMA s d A b)である。いくつかの実施形態では、1つ以上の結合部分は、s c F v(例えば、抗CD19 s c F v、抗CD20 s c F v、またはCD19×CD20 s c F v)である。いくつかの実施形態では、1つ以上の結合部分は、非抗体結合タンパク質、例えば、抗原に結合するポリペプチドリガンドまたは工学操作されたタンパク質である。いくつかの実施形態では、1つ以上の結合部分は、リガンドに由来する少なくとも1つのドメインまたは受容体の細胞外ドメインを含み、このリガンドまたは受容体は

30

40

50

、細胞表面抗原である。いくつかの実施形態では、リガンドまたは受容体は、NK G 2 A、NK G 2 C、NK G 2 F、NK G 2 D、BCMA、APRIL、BAFF、IL-3、IL-13、LIT1、AICL、DNAM-1、及びNKp80からなる群から選択される分子に由来する。いくつかの実施形態では、リガンドは、BCMAに結合することができる、APRILまたはBAFFに由来する。いくつかの実施形態では、受容体は、Fc受容体の細胞外ドメインなどのFc結合ドメインに由来する。いくつかの実施形態では、Fc受容体は、Fcγ受容体(FcγR)である。いくつかの実施形態では、FcγRは、CD16A(FcγRIIa)、CD16B(FcγRIIb)、CD64A、CD64B、CD64C、CD32A、及びCD32Bからなる群から選択される。結合部分は、ペプチド結合またはペプチドリinkerを介して互いに直接融合していてもよい。

10

【0247】

単一ドメイン抗体(s d A b)

いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体(例えば、キメラTCR、TAC、TAC様キメラ受容体、CAR(例えば、抗体ベースのCAR、リガンド/受容体ベースのCAR、またはACTR))は、1つ以上のs d A bを含む細胞外リガンド結合ドメインを含む。s d A bは、同じまたは異なる起源のものであり得、同じまたは異なるサイズのものであり得る。例示的なs d A bとしては、重鎖のみ抗体の重鎖可変ドメイン(例えば、V_HHまたはV_{NAR})、軽鎖を天然に欠いている結合分子、従来の4本鎖抗体に由来する単一ドメイン(例えば、V_HまたはV_L)、ヒト化重鎖のみ抗体、ヒト重鎖セグメントを発現するトランスジェニックマウスまたはラットによって産生されるヒトs d A b、ならびに抗体に由来するもの以外の工学操作されたドメイン及び単一ドメインスキャホールドが挙げられるが、これらに限定されない。PCT/CN2017/096938及びPCT/CN2016/094408(これらの内容は、その全体が参照により本明細書に援用される)に記載されているs d A bを含め、当技術分野で公知であるか、または本発明者らによって開発された任意のs d A bを使用して、本明細書に記載される機能的な外因性受容体(例えば、キメラTCR、TAC、TAC様キメラ受容体、CAR(例えば、抗体ベースのCAR、リガンド/受容体ベースのCAR、またはACTR))を構築することができる。CARの例示的な構造は、PCT/CN2017/096938の図15A~15Dに示されている。s d A bは、マウス、ラット、ヒト、ラクダ、ラマ、ヤツメウナギ、魚類、サメ、ヤギ、ウサギ、及びウシを含むがこれらに限定されない任意の種に由来するものであってもよい。本明細書で企図される単一ドメイン抗体は、ラクダ科及びサメ以外の種に由来する天然に存在するs d A b分子も含む。

20

30

【0248】

いくつかの実施形態では、s d A bは、軽鎖を欠いている重鎖抗体として知られる(本明細書では「重鎖のみ抗体」ともいう)天然に存在する単一ドメイン抗原結合分子に由来する。かかる単一ドメイン分子は、例えば、WO94/04678及びHamers-Casterman, C. et al. (1993) Nature 363:446-448に開示されている。明確にするために、軽鎖を天然に欠いている重鎖分子に由来する可変ドメインは、4本鎖免疫グロブリンの従来のV_Hと区別するために、本明細書ではV_HHとして知られる。かかるV_HH分子は、ラクダ科種、例えば、ラクダ、ラマ、ビクーナ、ヒトコブラクダ、アルパカ、及びグアナコで産生される抗体に由来し得る。ラクダ科以外の他の種が、軽鎖を天然に欠いている重鎖分子を産生する場合もあり、そのようなV_HHは本願の範囲内である。

40

【0249】

ラクダ科由来のV_HH分子は、IgG分子よりも約10倍小さい。それらは単一ポリペプチドであり、非常に安定しており、極端なpH及び温度条件に耐えることができる。さらに、それらは、プロテアーゼ作用に耐性を示すことができ、これは従来の4本鎖抗体にはないものである。さらに、V_HHのin vitro発現は、高収率の適切に折り畳まれた機能的V_HHをもたらす。さらに、ラクダ科動物で生成された抗体は、抗体ライブラリの使用またはラクダ科以外の哺乳動物の免疫化により、in vitroで生成された

50

抗体によって認識されるエピトープ以外のエピトープを認識することができる（例えば、WO 97 49 805を参照されたい）。したがって、1つ以上のV_HHドメインを含む多重特異性または多価のCARは、従来の4本鎖抗体に由来する抗原結合性断片を含む多重特異性または多価のCARよりも効率的に標的と相互作用することができる。V_HHは空洞または溝などの「異常な」エピトープに結合することが知られているため、かかるV_HHを含むCARの親和性は、従来の多重特異性ポリペプチドよりも治療的処置に好適であり得る。

【0250】

いくつかの実施形態では、sdAbは、軟骨魚に見出される免疫グロブリンの可変領域に由来する。例えば、sdAbは、サメの血清に見出される新規抗原受容体（NAR）として公知の免疫グロブリンアイソタイプに由来し得る。NARの可変領域に由来する単一ドメイン分子（「IgNAR」）を生成する方法は、WO 03/014161及びStreltsov（2005）Protein Sci. 14:2901-2909に記載されている。

【0251】

いくつかの実施形態では、sdAbは、組換え、CDRグラフト、ヒト化、ラクダ化、脱免疫化、及び／またはin vitro生成された（例えば、ファージディスプレイによって選択された）ものである。いくつかの実施形態では、フレームワーク領域のアミノ酸配列は、フレームワーク領域内の特定のアミノ酸残基の「ラクダ化」によって変更してもよい。ラクダ化とは、従来の4本鎖抗体の（天然に存在する）V_Hドメインのアミノ酸配列における1つ以上のアミノ酸残基を、重鎖抗体のV_HHドメイン内の対応する位置（複数可）に存在するアミノ酸残基のうちの1つ以上に置き換える、すなわち置換することを意味する。これは、本質的に公知の様式で行うことができ、その様式は、例えば本明細書のさらなる記述に基づいて、当業者には明らかとなろう。かかる「ラクダ化」置換は、好ましくは、V_H-V_L界面を形成し、及び／またはその界面に存在するアミノ酸位置に、及び／または本明細書に定義されるいわゆるラクダ科特徴残基に挿入される（例えば、WO 94/04678、Davies and Riechmann FEBS Letters 339:285-290, 1994、Davies and Riechmann Protein Engineering 9(6):531-537, 1996、Riechmann J. Mol. Biol. 259:957-969, 1996、及びRiechmann and Muyldermans J. Immunol. Meth. 231:25-38, 1999を参照されたい）。

【0252】

いくつかの実施形態では、sdAbは、ヒト重鎖セグメントを発現するトランスジェニックマウスまたはラットによって産生されるヒトsdAbである。例えば、US 2009 0307787 A1、米国特許第8,754,287号、US 20150289489 A1、US 20100122358 A1、及びWO 2004049794を参照されたい。いくつかの実施形態では、sdAbは、親和性成熟したものである。

【0253】

いくつかの実施形態では、特定の抗原または標的に対する天然に存在するV_HHドメインは、ラクダ科V_HH配列の（ナীবまたは免疫）ライブラリから得ることができる。そのような方法は、前記抗原もしくは標的、またはそれらの少なくとも1つの部分、断片、抗原決定基もしくはエピトープを使用し、本質的に公知である1つ以上のスクリーニング技術を使用して、かかるライブラリをスクリーニングすることを含んでも含まなくてもよい。そのようなライブラリ及び技術は、例えば、WO 99/37681、WO 01/90190、WO 03/025020、及びWO 03/035694に記載されている。あるいは、例えばWO 00/43507に記載されているように、（ナীবまたは免疫）V_HHライブラリからランダム変異誘発及び／またはCDRシャッフリングなどの技術によって得られたV_HHライブラリのような、（ナীবまたは免疫）V_HHライブラリに由来する改善された合成または半合成のライブラリを使用してもよい。

【0254】

いくつかの実施形態では、s d A bは、従来の4本鎖抗体から生成される。例えば、E P 0 3 6 8 6 8 4、W a r d e t a l. (N a t u r e 1 9 8 9 O c t. 1 2 ; 3 4 1 (6 2 4 2) : 5 4 4 - 6)、H o l t e t a l., T r e n d s B i o t e c h n o l., 2 0 0 3, 2 1 (1 1) : 4 8 4 - 4 9 0、W O 0 6 / 0 3 0 2 2 0、及びW O 0 6 / 0 0 3 3 8 8を参照されたい。

【0255】

ペプチドリンカー

本明細書に記載される多重特異性または多価の機能的な外因性受容体（例えば、キメラTCR、TAC、TAC様キメラ受容体、CAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））における様々な結合部分（例えばs d A b、リガンド／受容体ドメイン）は、ペプチドリンカーを介して互いに融合していてもよい。いくつかの実施形態では、結合部分（例えば、s d A b、リガンド／受容体ドメイン）は、いかなるペプチドリンカーも用いずに互いに直接融合している。異なる結合部分（例えば、s d A b、リガンド／受容体ドメイン）を連結するペプチドリンカーは、同じであっても異なってもよい。機能的な外因性受容体（例えば、キメラTCR、TAC、TAC様キメラ受容体、CAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））の異なるドメインが、ペプチドリンカーを介して互いに融合していてもよい。

【0256】

機能的な外因性受容体（例えば、キメラTCR、TAC、TAC様キメラ受容体、CAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））における各ペプチドリンカーは、s d A b及び／または様々なドメイン（例えば、リガンド／受容体ドメイン）の構造的及び／または機能的な長さに応じて、同じまたは異なる長さ及び／または配列を有してもよい。各ペプチドリンカーは、独立して選択及び最適化され得る。機能的な外因性受容体（例えば、キメラTCR、TAC、TAC様キメラ受容体、CAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））に使用されるペプチドリンカー（複数可）の長さ、可動性の程度、及び／または他の特性は、1つ以上の特定の抗原またはエピトープに対する親和性、特異性またはアビディティを含むがこれらに限定されない特性に、何らかの影響を及ぼし得る。例えば、2つの隣接するドメインが互いに立体的に干渉しないように、より長いペプチドリンカーを選択してもよい。例えば、多量体抗原に対して指向されたs d A bを含む、本明細書に記載される多価または多重特異性の機能的な外因性受容体（例えば、キメラTCR、TAC、TAC様キメラ受容体、CAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））において、ペプチドリンカーの長さ及び可動性は、多価機能的な外因性受容体（例えば、キメラTCR、TAC、TAC様キメラ受容体、CAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））の各s d A bが、多量体のサブユニットの各々の抗原決定基に結合することを可能にするようなものであることが好ましい。いくつかの実施形態では、短いペプチドリンカーが、機能的な外因性受容体（例えば、キメラTCR、TAC、TAC様キメラ受容体、CAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））の膜貫通ドメインと細胞内シグナル伝達ドメインとの間に配されていてもよい。ある実施形態では、ペプチドリンカーは、隣接するドメインが互いに対して自由に移動することができるように、可動性残基（例えば、グリシン及びセリン）を含む。例えば、グリシン-セリンのダブルレットは、好適なペプチドリンカーであり得る。

【0257】

ペプチドリンカーは、任意の好適な長さのものであり得る。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、50、75、100、またはそれ以上のうちのいずれかのアミノ酸長である。いくつかの実

施形態では、ペプチドリンカーは、約100、75、50、40、35、30、25、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5以下、またはそれ未満のうちのいずれかのアミノ酸長である。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーの長さは、約1アミノ酸～約10アミノ酸、約1アミノ酸～約20アミノ酸、約1アミノ酸～約30アミノ酸、約5アミノ酸～約15アミノ酸、約10アミノ酸～約25アミノ酸、約5アミノ酸～約30アミノ酸、約10アミノ酸～約30アミノ酸長、約30アミノ酸～約50アミノ酸、約50アミノ酸～約100アミノ酸、または約1アミノ酸～約100アミノ酸のうちのいずれかである。

【0258】

ペプチドリンカーは、天然に存在する配列、または天然に存在しない配列を有し得る。例えば、重鎖のみ抗体のヒンジ領域に由来する配列をリンカーとして使用してもよい。例えば、WO1996/34103を参照されたい。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、可動性リンカーである。例示的な可動性リンカーとしては、グリシンポリマー $(G)_n$ 、グリシン-セリンポリマー（例えば、 $(GS)_n$ 、 $(GSGGS)_n$ 、 $(GGGS)_n$ 、及び $(GGGGS)_n$ （式中、 n は、少なくとも1の整数である）を含む）、グリシン-アラニンポリマー、アラニン-セリンポリマー、及び当技術分野で公知の他の可動性リンカーが挙げられる。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、アミノ酸配列 $GGGGS$ （配列番号40）、 $(GGGGS)_2$ （配列番号41）、 $(GGGS)_3$ （配列番号42）、 $(GGGS)_4$ （配列番号43）、 $GGGGSGGGGS$ （配列番号44）、 $GGGGSGGGGS$ （配列番号45）、 $(GGGGS)_3$ （配列番号46）、または $(GGGGS)_4$ （配列番号47）を含む。

【0259】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される様々なペプチドリンカー及びそれらの特性は、機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド/受容体ベースのCAR、またはACTR）など）と、本明細書に記載されるNefタンパク質（例えば、wt Nef、または天然に存在しない変異体Nef、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）との間に用いられる連結配列によってコードされるペプチドにも適用される。例えば、機能的な外因性受容体（例えば、キメラTCR、TAC、TAC様キメラ受容体、CAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド/受容体ベースのCAR、またはACTR））をコードする核酸と、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、変異体Nef）をコードする核酸とが同じベクター上にあれば、それらの間に、可動性残基（例えば、グリシン及びセリン）を含むペプチドリンカーを付加して、機能的な外因性受容体とNefタンパク質の両方の適切な折り畳みに十分な空間を設けること、及び/またはそれらの間の連結配列（例えば、P2A、T2A）の切断を容易にすることができる。例えば、 $(GGGS)_3$ リンカーは、本明細書に記載されるBCMA CAR-P2A- $(GGGS)_3$ -SIV Nef構築物に使用される。

【0260】

膜貫通ドメイン

本願の機能的な外因性受容体（例えば、キメラTCR、TAC、TAC様キメラ受容体、CAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド/受容体ベースのCAR、またはACTR））は、細胞外リガンド結合ドメインに直接的または間接的に融合してよい膜貫通ドメインを含む。膜貫通ドメインは、天然源または合成源のいずれかに由来し得る。本明細書で使用する場合、「膜貫通ドメイン」とは、細胞膜、好ましくは真核細胞膜内で熱力学的に安定している任意のタンパク質構造を意味する。本明細書に記載されるCARでの使用に適合する膜貫通ドメインは、天然に存在するタンパク質から得ることができる。あるいは、それは、合成の天然に存在しないタンパク質セグメント、例えば、細胞膜内で熱力学的に安定している疎水性タンパク質セグメントであってもよい。

【0261】

膜貫通ドメインは、膜貫通ドメインの三次元構造に基づいて分類される。例えば、膜貫通ドメインは、アルファヘリックス、2つ以上のアルファヘリックスの複合体、ベータバレル、または細胞のリン脂質二重層を貫通することができる任意の他の安定した構造を形成し得る。さらに、膜貫通ドメインは、加えて、または代替的に、膜貫通ドメインが膜を通過する回数及びタンパク質の配向を含む膜貫通ドメイントポロジーに基づいて分類され得る。例えば、シングルパス膜タンパク質は、細胞膜を1回横断し、マルチパス膜タンパク質は、細胞膜を少なくとも2回（例えば、2回、3回、4回、5回、6回、7回、またはそれ以上の回数）横断する。膜タンパク質は、細胞の内外に対するそれらの末端及び膜通過セグメント（複数可）のトポロジーに応じて、I型、II型、またはIII型と定義され得る。I型膜タンパク質は、単一の膜貫通領域を有し、タンパク質のN末端が細胞の脂質二重層の細胞外側に存在し、タンパク質のC末端が細胞質側に存在するように配向される。II型膜タンパク質も単一の膜貫通領域を有するが、タンパク質のC末端が細胞の脂質二重層の細胞外側に存在し、タンパク質のN末端が細胞質側に存在するように配向される。III型膜タンパク質は、複数の膜貫通セグメントを有し、膜貫通セグメントの数ならびにN末端及びC末端の位置に基づいてさらに下位分類され得る。

10

【0262】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるCARの膜貫通ドメインは、I型シングルパス膜タンパク質に由来する。いくつかの実施形態では、マルチパス膜タンパク質由来の膜貫通ドメインも、本明細書に記載されるCARでの使用に適合し得る。マルチパス膜タンパク質は、複合（少なくとも2、3、4、5、6、7、またはそれ以上の）アルファヘリックスまたはベータシート構造を含み得る。好ましくは、マルチパス膜タンパク質のN末端及びC末端は、脂質二重層の反対側に存在し、例えば、タンパク質のN末端は、脂質二重層の細胞質側に存在し、タンパク質のC末端は、細胞外側に存在する。

20

【0263】

いくつかの実施形態では、CARの膜貫通ドメインは、T細胞受容体のアルファ鎖、ベータ鎖、もしくはゼータ鎖の膜貫通ドメイン、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、KIRDS2、OX40、CD2、CD27、LFA-1（CD11a、CD18）、ICOS（CD278）、4-1BB（CD137）、GITR、CD40、BAFFR、HVEM（LIGHTR）、SLAMF7、NKP80（KLRF1）、CD160、CD19、IL-2Rベータ、IL-2Rガンマ、IL-7Ra、ITGA1、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、DNAM1（CD226）、SLAMF4（CD244、2B4）、CD84、CD96（Tactile）、CEACAM1、CRTAM、Ly9（CD229）、CD160（BY55）、PSGL1、CD100（SEMA4D）、SLAMF6（NTB-A、Ly108）、SLAM（SLAMF1、CD150、IPO-3）、BLAME（SLAMF8）、SELP（CD162）、LTBR、PAG/Cbp、NKP44、NKP30、NKP46、NKG2D、及び／またはNKG2Cから選択される膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、T細胞受容体の α 、 β 、または ζ 鎖、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD4、CD5、CD8 α 、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137（4-1BB）、CD152、CD154、及びPD-1からなる群から選択される分子に由来する。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、CD28に由来する。

30

40

【0264】

50

本明細書に記載される機能的・外因性受容体（例えば、キメラTCR、TAC、TAC様キメラ受容体、CAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））で使用する膜貫通ドメインは、合成の天然に存在しないタンパク質セグメントの少なくとも一部分を含んでもよい。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、合成の天然に存在しないアルファヘリックスまたはベータシートである。いくつかの実施形態では、タンパク質セグメントは、少なくともおよそ20アミノ酸、例えば、少なくとも18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、またはそれ以上のアミノ酸である。合成膜貫通ドメインの例は、当技術分野で、例えば米国特許第7,052,906号B1及びPCT公開第WO2000/032776号A2において公知であり、これらの関連する開示内容は、参照により本明細書に援用される。

10

【0265】

膜貫通ドメインは、膜貫通領域、及び膜貫通ドメインのC末端側に位置する細胞質領域を含み得る。膜貫通ドメインの細胞質領域は、3つ以上のアミノ酸を含む場合があり、いくつかの実施形態では、脂質二重層内で膜貫通ドメインを配向させる助けとなる。いくつかの実施形態では、1つ以上のシステイン残基が、膜貫通ドメインの膜貫通領域に存在する。いくつかの実施形態では、1つ以上のシステイン残基が、膜貫通ドメインの細胞質領域に存在する。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインの細胞質領域は、正電荷を帯びたアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインの細胞質領域は、アミノ酸、アルギニン、セリン、及びリジンを含む。

20

【0266】

いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインの膜貫通領域は、疎水性アミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態では、機能的・外因性受容体（例えば、キメラTCR、TAC、TAC様キメラ受容体、CAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））の膜貫通ドメインは、人工疎水性配列を含む。例えば、フェニルアラニン、トリプトファン、及びバリンのトリプレットが、膜貫通ドメインのC末端に存在し得る。いくつかの実施形態では、膜貫通領域は、主に疎水性のアミノ酸残基、例えば、アラニン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、またはバリンを含む。いくつかの実施形態では、膜貫通領域は、疎水性である。いくつかの実施形態では、膜貫通領域は、ポリロイシン-アラニン配列を含む。タンパク質またはタンパク質セグメントのハイドロパシー、または疎水性もしくは親水性の特徴は、当技術分野で公知の任意の方法、例えばKyte及びDoolittleのハイドロパシー分析によって評価され得る。

30

【0267】

細胞内シグナル伝達ドメイン

本願の機能的・外因性受容体（例えば、キメラTCR、TAC、TAC様キメラ受容体、CAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））は、細胞内シグナル伝達ドメインを含む。細胞内シグナル伝達ドメインは、CARを発現する免疫エフェクター細胞の正常なエフェクター機能のうちの少なくとも1つの活性化の原因である。「エフェクター機能」という用語は、細胞の特殊化機能を意味する。例えば、T細胞のエフェクター機能は、細胞溶解活性またはサイトカインの分泌を含むヘルパー活性であり得る。したがって、「細胞質シグナル伝達ドメイン」という用語は、エフェクター機能シグナルを伝達し、細胞に特殊化機能を行うように指示するタンパク質の一部を意味する。通常、細胞質シグナル伝達ドメイン全体を用いてもよいが、多くの場合、鎖全体を使用する必要はない。細胞質シグナル伝達ドメインのトランケート部分を使用される場合、かかるトランケート部分は、それがエフェクター機能シグナルを伝達する限り、インタクトな鎖の代わりに使用され得る。したがって、細胞質シグナル伝達ドメインという用語は、エフェクター機能シグナルを伝達するのに十分な、細胞質シグナル伝達ドメインの任意のトランケート部分を含むよう意図される。

40

【0268】

50

いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫エフェクター細胞の一次細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、CARは、免疫エフェクター細胞の一次細胞内シグナル伝達ドメインから本質的になる細胞内シグナル伝達ドメインを含む。「一次細胞内シグナル伝達ドメイン」とは、刺激性の様式で作用して免疫エフェクター機能を誘導する細胞質シグナル伝達配列を意味する。いくつかの実施形態では、一次細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫受容活性化チロシンモチーフ、またはITAMとして知られるシグナル伝達モチーフを含む。本明細書で使用する「ITAM」とは、多くの免疫細胞で発現するシグナル伝達分子の尾部分に通常存在する保存されたタンパク質モチーフである。このモチーフは、6〜8個のアミノ酸によって分離されたアミノ酸配列YxxL/I（式中、各xは独立して、任意のアミノ酸である）の2つの繰り返しを含み、保存されたモチーフYxxL/Ix（6〜8）YxxL/Iを作ってもよい。シグナル伝達分子内のITAMは、細胞内でのシグナル伝達に重要であり、これは、シグナル伝達分子の活性化後のITAMにおけるチロシン残基のリン酸化によって少なくとも部分的に媒介される。ITAMは、シグナル伝達経路に関与する他のタンパク質のドッキング部位としての機能も果たし得る。ITAMを含む一次細胞質シグナル伝達配列の例としては、CD3ζ、CD3γ、CD3ε、CD3δ、FcRγ（FCER1G）、FcRβ（FcイプシロンRIb）、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD66d、FcガンマリIIa、DAP10、及びDAP12に由来するものが挙げられる。いくつかの実施形態では、ITAMを含む一次細胞質シグナル伝達配列は、CD3γ、DAP12、またはCD3ζに由来する。

10

20

【0269】

いくつかの実施形態では、一次細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3ζに由来する。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3ζの細胞質シグナル伝達ドメインからなる。いくつかの実施形態では、一次細胞内シグナル伝達ドメインは、野生型CD3ζの細胞質シグナル伝達ドメインである。

【0270】

共刺激シグナル伝達ドメイン

多くの免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞）は、細胞の増殖、分化、及び生存を促進すると共に、細胞のエフェクター機能を活性化するために、抗原特異的シグナルの刺激に加えて共刺激を必要とする。いくつかの実施形態では、CARは、少なくとも1つの共刺激シグナル伝達ドメインを含む。本明細書で使用する「共刺激シグナル伝達ドメイン」という用語は、細胞内のシグナル伝達を媒介してエフェクター機能などの免疫応答を誘導するタンパク質の少なくとも一部分を意味する。本明細書に記載されるキメラ受容体の共刺激シグナル伝達ドメインは、シグナルを伝達し、T細胞、NK細胞、マクロファージ、好中球、または好酸球などの免疫細胞により媒介される応答を調節する、共刺激タンパク質の細胞質シグナル伝達ドメインであり得る。「共刺激シグナル伝達ドメイン」は、共刺激分子の細胞質部分であり得る。「共刺激分子」という用語は、共刺激リガンドに特異的に結合し、それにより、限定されるものではないが増殖及び生存といった、免疫細胞による共刺激応答を媒介する、免疫細胞（例えばT細胞）上の同族結合パートナーを意味する。

30

40

【0271】

いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、単一の共刺激シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、2つ以上（例えば約2、3、4、またはそれ以上のいずれかの数）の共刺激シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、同じ共刺激シグナル伝達ドメインを2つ以上、例えば、CD28またはCD137（4-1BB）の共刺激シグナル伝達ドメインを2コピー含む。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、本明細書に記載されるいずれか2つ以上の共刺激タンパク質などの異なる共刺激タンパク質に由来する共刺激シグナル伝達ドメインを2つ以上含む。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、一次細胞内シグナル伝達ドメイン（例えば、CD3

50

の細胞質シグナル伝達ドメイン)及び1つ以上の共刺激シグナル伝達ドメイン(例えば、4-1BB)を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインと、一次細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、CD3の細胞質シグナル伝達ドメイン)とは、任意選択のペプチドリンカーを介して互いに融合している。一次細胞内シグナル伝達ドメインと、1つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインとは、任意の好適な順番で配置されていてよい。いくつかの実施形態では、1つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインは、膜貫通ドメインと一次細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、CD3の細胞質シグナル伝達ドメイン)との間に位置する。複数の共刺激シグナル伝達ドメインは、相加的または相乗的な刺激作用をもたらし得る。

【0272】

宿主細胞(例えば、免疫細胞)における共刺激シグナル伝達ドメインの活性化は、細胞を誘導して、サイトカインの産生及び分泌、食作用特性、増殖、分化、生存、及び/または細胞傷害を増加または減少させ得る。いずれの共刺激分子の共刺激シグナル伝達ドメインも、本明細書に記載されるCARでの使用に適合し得る。共刺激シグナル伝達ドメインのタイプ(複数可)は、エフェクター分子を発現させる免疫エフェクター細胞のタイプ(例えば、T細胞、NK細胞、マクロファージ、好中球、または好酸球)、及び所望の免疫エフェクター機能(例えば、ADCC作用)などの因子に基づいて選択される。CARで使用する共刺激シグナル伝達ドメインの例は、限定されるものではないが、B7/CD28ファミリーのメンバー(例えば、B7-1/CD80、B7-2/CD86、B7-H1/PD-L1、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H6、B7-H7、BT
LA/CD272、CD28、CTLA-4、Gi24/VISTA/B7-H5、ICOS/CD278、PD-1、PD-L2/B7-DC、及びPDCD6)；TNFスーパーファミリーのメンバー(例えば、4-1BB/TNFSF9/CD137、4-1B
Bリガンド/TNFSF9、BAFF/BLyS/TNFSF13B、BAFFR/TN
FRSF13C、CD27/TNFRSF7、CD27リガンド/TNFSF7、CD3
0/TNFRSF8、CD30リガンド/TNFSF8、CD40/TNFRSF5、C
D40/TNFSF5、CD40リガンド/TNFSF5、DR3/TNFRSF25、
GITR/TNFRSF18、GITRリガンド/TNFSF18、HVEM/TNFR
SF14、LIGHT/TNFSF14、リンホトキシナルファ/TNFベータ、OX
40/TNFRSF4、OX40リガンド/TNFSF4、RELT/TNFRSF19
L、TACI/TNFRSF13B、TL1A/TNFSF15、TNFアルファ、及び
TNFRII/TNFRSF1B)；SLAMファミリーのメンバー(例えば、2B4/
CD244/SLAMF4、BLAME/SLAMF8、CD2、CD2F-10/SL
AMF9、CD48/SLAMF2、CD58/LFA-3、CD84/SLAMF5、
CD229/SLAMF3、CRACC/SLAMF7、NTB-A/SLAMF6、及
びSLAM/CD150)；ならびに任意の他の共刺激分子、例えばCD2、CD7、C
D53、CD82/Kai-1、CD90/Thy1、CD96、CD160、CD20
0、CD300a/LMIR1、HLAクラスI、HLA-DR、Ikaros、インテ
グリンアルファ4/CD49d、インテグリンアルファ4ベータ1、インテグリンアルフ
ァ4ベータ7/LPAM-1、LAG-3、TCL1A、TCL1B、CRTAM、DA
P12、デクチン-1/CLEC7A、DPPIV/CD26、EphB6、TIM-1
/KIM-1/HAVCR、TIM-4、TSLP、TSLPR、リンパ球機能関連抗原
-1(LFA-1)、及びNKG2Cを含む、共刺激タンパク質の細胞質シグナル伝達ド
メインであり得る。

【0273】

いくつかの実施形態では、1つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインは、CARD11、
CD2(LFA-2)、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54(I
CAM-1)、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、CD162(S
ELPLG)、CD258(LIGHT)、CD270(HVEM、LIGHTR)、C
D276(B7-H3)、CD278(ICOS)、CD279(PD-1)、CD31

10

20

30

40

50

9 (SLAMF7)、LFA-1 (リンパ球機能関連抗原1)、NKG2C、CDS、GITR、BAFFR、NKp80 (KLRF1)、CD160、CD19、CD4、IPO-3、BLAME (SLAMF8)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D、CD83、CD150 (SLAMF1)、CD152 (CTLA-4)、CD223 (LAG3)、CD273 (PD-L2)、CD274 (PD-L1)、DAP10、TRIM、ZAP70、CD83に特異的に結合するリガンド、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される共刺激分子に由来する。いくつかの実施形態では、1つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインは、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、CD3、LFA-1、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、及びCD83に特異的に結合するリガンドからなる群から選択される共刺激分子に由来する。 10

【0274】

いくつかの実施形態では、本願のCARにおける細胞内シグナル伝達ドメインは、4-1BB (CD137) に由来する共刺激シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3ζの細胞質シグナル伝達ドメイン及び4-1BBの共刺激シグナル伝達ドメインを含む。

【0275】

いくつかの実施形態では、本願のCARにおける細胞内シグナル伝達ドメインは、CD28に由来する共刺激シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3ζの細胞質シグナル伝達ドメイン及びCD28の共刺激シグナル伝達ドメインを含む。 20

【0276】

いくつかの実施形態では、本願のCARにおける細胞内シグナル伝達ドメインは、CD28の共刺激シグナル伝達ドメイン及びCD137の共刺激シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3ζの細胞質シグナル伝達ドメイン、CD28の共刺激シグナル伝達ドメイン、及びCD137の共刺激シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、N末端からC末端に向かって、CD28の共刺激シグナル伝達ドメイン、CD137の共刺激シグナル伝達ドメイン、及びCD3ζの細胞質シグナル伝達ドメインを含むポリペプチドを含む。 30

【0277】

また、本開示の範囲には、共刺激シグナル伝達ドメインが免疫細胞の免疫応答を調節することができるような、本明細書に記載される共刺激シグナル伝達ドメインのいずれかのバリエーションも含まれる。いくつかの実施形態では、共刺激シグナル伝達ドメインは、野生型の対応物と比較して、アミノ酸残基変化を最大10個（例えば、1、2、3、4、5、または8個）含む。1つ以上のアミノ酸変化を含む、かかる共刺激シグナル伝達ドメインは、バリエーションといわれる場合がある。共刺激シグナル伝達ドメインのアミノ酸残基の変異は、変異を含まない共刺激シグナル伝達ドメインと比べて、シグナル伝達を増加させ、免疫応答の刺激を増強させる場合がある。共刺激シグナル伝達ドメインのアミノ酸残基の変異は、変異を含まない共刺激シグナル伝達ドメインと比べて、シグナル伝達を減少させ、免疫応答の刺激を低減させる場合がある。 40

【0278】

ヒンジ

本願の機能的な外因性受容体（例えば、キメラTCR、TAC、TAC様キメラ受容体、CAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド/受容体ベースのCAR、またはACTR））は、細胞外リガンド結合ドメインのC末端と膜貫通ドメインのN末端との間に位置するヒンジドメインを含み得る。ヒンジドメインは、タンパク質の2つのドメイン同士の間に見出されるアミノ酸セグメントであり、タンパク質に柔軟性を与え、これらのドメインの一方または両方が互いに対して移動できるようにすることができる。このような柔軟性を与え、エフェクター分子の膜貫通ドメインに対して細胞外抗原結合ドメインが移 50

動できるようにする、任意のアミノ酸配列が使用され得る。

【0279】

ヒンジドメインは、約10～100アミノ酸、例えば、約15～75アミノ酸、約20～50アミノ酸、または約30～60アミノ酸のうちのいずれか1つを含み得る。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、少なくとも約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、または75のうちのいずれか1つのアミノ酸長であり得る。

【0280】

いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、天然に存在するタンパク質のヒンジドメインである。ヒンジドメインを含むことが当技術分野で公知である任意のタンパク質のヒンジドメインが、本明細書に記載される機能的な外因性受容体（例えば、キメラTCR、TAC、TAC様キメラ受容体、CAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））での使用に適合する。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、天然に存在するタンパク質のヒンジドメインの少なくとも一部分であり、キメラ受容体に柔軟性を与える。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、CD8αに由来する。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、CD8αのヒンジドメインの一部分、例えば、CD8αのヒンジドメインの少なくとも15個（例えば、20、25、30、35、または40個）の連続したアミノ酸を含む断片である。

【0281】

IgG、IgA、IgM、IgE、またはIgD抗体などの抗体のヒンジドメインは、本明細書に記載されるpH依存性キメラ受容体システムでの使用にも適合する。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、抗体の定常ドメインCH1及びCH2を連結するヒンジドメインである。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、抗体のものであり、抗体のヒンジドメイン及び抗体の1つ以上の定常領域を含む。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、抗体のヒンジドメイン及び抗体のCH3定常領域を含む。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、抗体のヒンジドメインならびに抗体のCH2及びCH3定常領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、IgG、IgA、IgM、IgE、またはIgD抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は、IgG抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4抗体である。いくつかの実施形態では、ヒンジ領域は、IgG1抗体のヒンジ領域ならびにCH2及びCH3定常領域を含む。いくつかの実施形態では、ヒンジ領域は、IgG1抗体のヒンジ領域及びCH3定常領域を含む。

【0282】

天然に存在しないペプチドを、本明細書に記載されるキメラ受容体のヒンジドメインとして使用してもよい。いくつかの実施形態では、Fc受容体の細胞外リガンド結合ドメインのC末端と膜貫通ドメインのN末端との間のヒンジドメインは、(G_xS)_nリンカー（式中、x及びnは独立して、3～12、例えば3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、またはそれ以上の整数であり得る）などのペプチドリinkerである。

【0283】

シグナルペプチド

本願の機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））は、ポリペプチドのN末端にシグナルペプチド（別名シグナル配列）を含み得る。一般に、シグナルペプチドは、ポリペプチドの標的を細胞内の所望の部位に定めるペプチド配列である。いくつかの実施形態では、シグナルペプチドは、エフェクター分子の標的を細胞の分泌経路に定め、エフェクター分子を脂質二重層に組み込み、固定することを可能にする。本明細書に記載される機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キ

メラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR）での使用に適合する、天然に存在するタンパク質のシグナル配列または合成の天然に存在しないシグナル配列を含むシグナルペプチドは、当業者には明らかであろう。いくつかの実施形態では、シグナルペプチドは、CD8α、GM-CSF受容体α、及びIgG1重鎖からなる群から選択される分子に由来する。いくつかの実施形態では、シグナルペプチドは、CD8αに由来する。

【0284】

ACTRは、Fc受容体（CD16）をシグナル伝達ドメイン（4-1BB／CD3ζ）と組み合わせたキメラタンパク質である。ACTRを有する工学操作されたT細胞は、モノクローナル抗体に結合することができ、これは次いで、腫瘍細胞への架橋として機能する。

10

【0285】

いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体は、（a）リガンドに由来する少なくとも1つのドメインまたは受容体の細胞外ドメインを含む細胞外リガンド結合ドメイン（このリガンドまたは受容体は、細胞表面抗原（例えば、NKG2D、BCMA、IL-3、IL-13）である）、（b）膜貫通ドメイン、及び（c）細胞内シグナル伝達ドメインを含む、キメラ受容体である。

【0286】

いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、BCMAのリガンド、例えば、APRILまたはBAFFに由来する少なくとも1つのドメインを含む。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、BCMAの1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb）を含む。

20

【0287】

T細胞抗原結合体（TAC）

いくつかの実施形態では、本願の機能的な外因性受容体は、T細胞抗原結合体（TAC）である。いくつかの実施形態では、TACは、a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、scFv、sdAb）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、b）任意選択の第1のリンカー、c）TCRサブユニット（例えば、CD3ε）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン（例えば、scFv、sdAb）、d）任意選択の第2のリンカー、e）第1のTCR共受容体（例えば、CD4、CD28、またはCD8、例えば、CD8α）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及びf）第2のTCR共受容体（例えば、CD4、CD28、またはCD8、例えば、CD8α）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、第1及び第2のTCR共受容体はいずれも、CD4、CD28、及びCD8（例えばCD8α）から選択される。いくつかの実施形態では、第1及び第2のTCR共受容体は同じである。いくつかの実施形態では、第1及び第2のTCR共受容体は異なっている。例えば、第1のTCR共受容体がCD4であり、第2のTCR共受容体がCD8（例えば、CD8）であるか、または第2のTCR共受容体がCD4であり、第1のTCR共受容体がCD8（例えば、CD8α）である。いくつかの実施形態では、TACは、a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、scFv、sdAb）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、b）任意選択の第1のリンカー、c）TCRサブユニット（例えば、CD3ε）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、d）任意選択の第2のリンカー、及びe）TCR共受容体（例えば、CD4、CD28、またはCD8、例えば、CD8α）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、TACは、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD20、CD19）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、scFv、sdAb）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）TCRサブユニット（例えば、CD3ε）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリン

30

40

50

カー、(e)第1のTCR共受容体(例えば、CD4、CD28、またはCD8、例えば、CD8α)に由来する任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、(f)第2のTCR共受容体(例えば、CD4、CD28、またはCD8、例えば、CD8α)の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び(g)第3のTCR共受容体(例えば、CD4、CD28、またはCD8、例えば、CD8α)の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCR共受容体は全て、CD4、CD28、及びCD8(例えばCD8α)から選択される。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCR共受容体は同じである(例えば、全てCD4である)。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCR共受容体は異なっている。いくつかの実施形態では、TACの細胞内シグナル伝達ドメインは、CD4、CD28、またはCD8(例えば、CD8α)などのTCR共受容体の細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、TACの膜貫通ドメインは、CD4、CD28、またはCD8(例えば、CD8α)などのTCR共受容体の膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、TACは、TCR共受容体(例えば、CD4、CD28、またはCD8(例えば、CD8α))の細胞外ドメイン(またはその一部分)を含まない。いくつかの実施形態では、TACは、いかなるTCR共受容体の細胞外ドメインまたはその一部分も含まない。いくつかの実施形態では、TACは、細胞外TCR結合ドメイン(例えば、scFvまたはsdAb)のC末端と膜貫通ドメインのN末端との間に位置するヒンジドメインを(例えば、TCR共受容体の細胞外ドメインがなく、細胞外TCR結合ドメインが細胞外リガンド結合ドメインのC末端にある場合に)さらに含む。いくつかの実施形態では、TACは、細胞外リガンド結合ドメインのC末端と膜貫通ドメインのN末端との間に位置するヒンジドメインを(例えば、TCR共受容体の細胞外ドメインがなく、細胞外TCR結合ドメインが細胞外リガンド結合ドメインのN末端にある場合に)さらに含む。上記「ヒンジ」及び「ペプチドリinker」のサブセクションに記載されるヒンジドメイン及びリinkerのいずれも、本明細書におけるTACに使用することができる。いくつかの実施形態では、TACは、細胞内共刺激ドメインを含まない。いくつかの実施形態では、細胞外標的結合ドメインは、細胞外TCR結合ドメインのN末端側にある。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、細胞外TCR結合ドメインのC末端側にある。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、細胞外TCR結合ドメインのN末端側にある。いくつかの実施形態では、TCRサブユニットは、TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ、及びCD3δからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、一価かつ単一特異性である。すなわち、腫瘍抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)のエピトープを特異的に認識する単一の抗原結合性断片(例えば、scFv、sdAb)を含む。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、単量体である。すなわち、腫瘍抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)のエピトープを特異的に認識する単一の抗原結合性断片(例えば、scFv、sdAb)を含む。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、多価かつ単一特異性である。すなわち、腫瘍抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)の同じエピトープを特異的に認識する2つ以上の抗原結合性断片(例えば、scFv、sdAb)を含む。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、多価かつ多重特異性である。すなわち、同じ腫瘍抗原または異なる腫瘍抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)の2つ以上のエピトープを特異的に認識する2つ以上の抗原結合性断片(例えば、scFv、sdAb)を含む。いくつかの実施形態では、TACは、細胞外TCR結合ドメイン(例えば、CD3ε)によって認識されるTCRサブユニット(例えば、TCRα)の異なる細胞外ドメインを特異的に認識する第2の細胞外TCR結合ドメイン(例えば、scFv、sdAb)をさらに含み、第2の細胞外TCR結合ドメインは、細胞外TCR結合ドメインと細胞外リガンド結合ドメインとの間に位置付けられる。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、内容全体が参照により本明細書に援用されるPCT/CN2016/094408及びPCT/CN2017/096938に開示されている抗BCMA sd

A b のいずれかのような、B C M A に特異的に結合する s d A b （すなわち、抗 B C M A s d A b ）である抗原結合性断片を含む。

【0288】

したがって、いくつかの実施形態では、T A C は、（a）腫瘍抗原（例えば、B C M A、C D 2 0、C D 1 9）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、s c F v、s d A b）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）T C R サブユニット（例えば、C D 3 ε）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外 T C R 結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、（e）C D 4 に由来する任意選択の細胞外ドメイン（完全または部分的なドメイン）、（f）C D 4 に由来する膜貫通部、及び（g）C D 4 に由来する任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、T A C は、配列番号 6 6 のアミノ酸配列を含む抗 C D 2 0 T A C である。いくつかの実施形態では、T A C は、（a）腫瘍抗原（例えば、B C M A、C D 2 0、C D 1 9）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、s c F v、s d A b）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）T C R サブユニット（例えば、C D 3 ε）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外 T C R 結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、（e）C D 8 （例えば、C D 8 α）に由来する任意選択の細胞外ドメイン（完全または部分的なドメイン）、（f）C D 8 （例えば、C D 8 α）に由来する膜貫通部、及び（g）C D 8 （例えば、C D 8 α）に由来する任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、T A C は、（a）腫瘍抗原（例えば、B C M A、C D 2 0、C D 1 9）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、s c F v、s d A b）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）T C R サブユニット（例えば、C D 3 ε）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外 T C R 結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、及び（e）完全長 C D 4 （シグナルペプチドを除く）を含む。いくつかの実施形態では、T A C は、（a）腫瘍抗原（例えば、B C M A、C D 2 0、C D 1 9）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、s c F v、s d A b）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）T C R サブユニット（例えば、C D 3 ε）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外 T C R 結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、及び（e）完全長 C D 8 （例えば、C D 8 α；シグナルペプチドを除く）を含む。いくつかの実施形態では、T A C は、（a）腫瘍抗原（例えば、B C M A、C D 2 0、C D 1 9）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、s c F v、s d A b）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）T C R サブユニット（例えば、C D 3 ε）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外 T C R 結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、及び（e）完全長 C D 2 8 （シグナルペプチドを除く）を含む。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、一価かつ単一特異性である。すなわち、腫瘍抗原（例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0）のエピトープを特異的に認識する単一の抗原結合性断片（例えば、s c F v、s d A b）を含む。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、多価かつ単一特異性である。すなわち、腫瘍抗原（例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0）の同じエピトープを特異的に認識する2つ

10

20

30

40

50

以上の抗原結合性断片（例えば、s c F v、s d A b）を含む。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、多価かつ多重特異性である。すなわち、同じ腫瘍抗原または異なる腫瘍抗原（例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0）の2つ以上のエピトープを特異的に認識する2つ以上の抗原結合性断片（例えば、s c F v、s d A b）を含む。いくつかの実施形態では、T A Cは、細胞外T C R結合ドメイン（例えば、C D 3 ε）によって認識されるT C Rサブユニット（例えば、T C R α）の異なる細胞外ドメインを特異的に認識する第2の細胞外T C R結合ドメイン（例えば、s c F v、s d A b）をさらに含み、第2の細胞外T C R結合ドメインは、細胞外T C R結合ドメインと細胞外リガンド結合ドメインとの間に位置付けられる。

【0289】

いくつかの実施形態では、T A Cは、次の構造（N末端からC末端に向かって）：抗C D 2 0 s c F v－（G G G G S）₃－抗C D 3 s c F v－（ G G G G S）－C D 4配列を含む。いくつかの実施形態では、抗C D 2 0 s c F vは、L e u－1 6抗体に由来する。いくつかの実施形態では、抗C D 3 s c F vは、U C H T 1（例えば、h u U C H T 1）、F 6 A、L 2 K、またはO K T 3に由来する。いくつかの実施形態では、C D 4配列は、C D 4の部分的な細胞外ドメイン、完全な膜貫通ドメイン、及び完全な細胞内ドメイン、例えば完全長C D 4のa a 3 7 5～4 5 8を含む（a a 1は、C D 4のシグナルペプチドを始点としての番号である）。いくつかの実施形態では、T A Cは、配列番号66のアミノ酸配列を含む。

【0290】

T細胞抗原結合体（T A C）様キメラ受容体

いくつかの実施形態では、本願の機能的な外因性受容体は、T細胞抗原結合体（T A C）様キメラ受容体である。いくつかの実施形態では、T A C様キメラ受容体は、a）腫瘍抗原（例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、s c F v、s d A b）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、b）任意選択の第1のリンカー、c）第1のT C Rサブユニット（例えば、C D 3 ε）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外T C R結合ドメイン（例えば、s c F v、s d A b）、d）任意選択の第2のリンカー、e）第2のT C Rサブユニット（例えば、C D 3 ε）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及びf）第3のT C Rサブユニット（例えば、C D 3 ε）の細胞内ドメインを含む細胞内ドメインを含み、第1、第2、及び第3のT C Rサブユニットは全て、C D 3 ε、C D 3 γ、C D 3 δ、T C R α、T C R β、T C R γ、及びT C R δからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、第2及び第3のT C Rサブユニットは同じであり、例えば、いずれもC D 3 εである。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のT C Rサブユニットは同じであり、例えば、全てC D 3 εである。いくつかの実施形態では、第1のT C Rサブユニットと、第2及び第3のT C Rサブユニットとは異なっており、例えば、第1のT C RサブユニットはT C R αであり、第2及び第3のT C RサブユニットはC D 3 εである。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のT C Rサブユニットは全て異なっている。いくつかの実施形態では、T A C様キメラ受容体は、a）腫瘍抗原（例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、s c F v、s d A b）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、b）任意選択の第1のリンカー、c）第1のT C Rサブユニット（例えば、C D 3 ε）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外T C R結合ドメイン（例えば、s c F v、s d A b）、d）任意選択の第2のリンカー、及びe）第2のT C Rサブユニット（例えば、C D 3 ε）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメインを含み、第1及び第2のT C Rサブユニットはいずれも、C D 3 ε、C D 3 γ、C D 3 δ、T C R α、T C R β、T C R γ、及びT C R δからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、第1及び第2のT C Rサブユニットは同じであり、例えば、いずれもC D 3 εである。いくつかの実施形態では、第1及び第2のT C Rサブユニットは異なっており、例えば、第1のT C RサブユニットはT C R αであり、第2のT C RサブユニットはC D 3 εである。いくつかの実施形態では、T A C様キメラ受容体は、（a）腫瘍抗

10

20

30

40

50

原（例えば、BCMA、CD20、CD19）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、scFv、sdAb）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）第1のTCRサブユニット（例えば、CD3ε）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、（e）第2のTCRサブユニット（例えば、CD3ε）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、（f）第3のTCRサブユニット（例えば、CD3ε）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び（g）第4のTCRサブユニット（例えば、CD3ε）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは全て、TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ、及びCD3δからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じ（例えば、全てCD3ε）である。いくつかの実施形態では、第1のTCRサブユニットと、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットとは異なっており、例えば、第1のTCRサブユニットはTCRαであり、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットはCD3εである。いくつかの実施形態では、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは全て異なっている。いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、あるTCRサブユニットの細胞内シグナル伝達ドメインを含み、このTCRサブユニットは、CD3ε、CD3γ、CD3δ、TCRα、TCRβ、TCRγ、及びTCRδからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受容体の膜貫通ドメインは、あるTCRサブユニットの膜貫通ドメインを含み、このTCRサブユニットは、CD3ε、CD3γ、CD3δ、TCRα、TCRβ、TCRγ、及びTCRδからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受容体は、そのTCRサブユニットの細胞外ドメインまたはその一部分を含まない。いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受容体は、いかなるTCRサブユニットの細胞外ドメインも含まない。いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受容体は、細胞外TCR結合ドメインのC末端と膜貫通ドメインのN末端との間に位置するヒンジドメインを（例えば、TCRサブユニットの細胞外ドメインまたはその一部分がなく、細胞外TCR結合ドメインが細胞外リガンド結合ドメインのC末端にある場合に）さらに含む。いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受容体は、細胞外リガンド結合ドメインのC末端と膜貫通ドメインのN末端との間に位置するヒンジドメインを（例えば、TCRサブユニットの細胞外ドメインまたはその一部分がなく、細胞外TCR結合ドメインが細胞外リガンド結合ドメインのN末端にある場合に）さらに含む。上記「ヒンジ」及び「ペプチドリinker」のサブセクションに記載されるヒンジドメイン及びリンカーのいずれも、本明細書におけるTAC様キメラ受容体を使用することができる。いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受容体は、細胞内シグナル伝達ドメインを含まない。いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受容体は、細胞内共刺激ドメインを含まない。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、細胞外TCR結合ドメインのN末端側にある。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、細胞外TCR結合ドメインのC末端側にある。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、一価かつ単一特異性である。すなわち、腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）のエピトープを特異的に認識する単一の抗原結合性断片（例えば、scFv、sdAb）を含む。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、単量体である。すなわち、腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）のエピトープを特異的に認識する単一の抗原結合性断片（例えば、scFv、sdAb）を含む。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、多価かつ単一特異性である。すなわち、腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の同じエピトープを特異的に認識する2つ以上の抗原結合性断片（例えば、scFv、sdAb）を含む。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、多価かつ多重特異性である。すなわち、同じ腫瘍抗原または異なる腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の2つ以上のエピトープを特異的に認識する2つ以上の抗原結合性断片（例えば、scFv、sdAb）を含む。いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受

10

20

30

40

50

容体は、細胞外TCR結合ドメイン（例えば、CD3 ϵ ）によって認識されるTCRサブユニット（例えば、TCR α ）の異なる細胞外ドメインを特異的に認識する第2の細胞外TCR結合ドメイン（例えば、scFv、sdAb）をさらに含み、第2の細胞外TCR結合ドメインは、細胞外TCR結合ドメインと細胞外リガンド結合ドメインとの間に位置付けられる。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、内容全体が参照により本明細書に援用されるPCT/CN2016/094408及びPCT/CN2017/096938に開示されている抗BCMA sdAbのいずれかのような、BCMAに特異的に結合するsdAb（すなわち、抗BCMA sdAb）である抗原結合性断片を含む。

【0291】

したがって、いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受容体は、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD20、CD19）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、scFv、sdAb）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）TCRサブユニット（例えば、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ のいずれか）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、（e）CD3 ϵ に由来する任意選択の細胞外ドメイン、（f）CD3 ϵ に由来する膜貫通部、及び（g）CD3 ϵ に由来する任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受容体は、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD20、CD19）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、scFv、sdAb）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）TCRサブユニット（例えば、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ のいずれか）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、（e）CD3 γ に由来する任意選択の細胞外ドメイン、（f）CD3 γ に由来する膜貫通部、及び（g）CD3 γ に由来する任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受容体は、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD20、CD19）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、scFv、sdAb）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）TCRサブユニット（例えば、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ のいずれか）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、（e）TCR α に由来する任意選択の細胞外ドメイン、（f）TCR α に由来する膜貫通部、及び（g）TCR α に由来する任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受容体は、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD20、CD19）の1つ以上のエ

10

20

30

40

50

ピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、s c F v、s d A b）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）TCRサブユニット（例えば、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD 3 ϵ 、CD 3 γ 、CD 3 δ のいずれか）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、（e）TCR γ に由来する任意選択の細胞外ドメイン、（f）TCR γ に由来する膜貫通部、及び（g）TCR γ に由来する任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受容体は、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD 20、CD 19）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、s c F v、s d A b）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）TCRサブユニット（例えば、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD 3 ϵ 、CD 3 γ 、CD 3 δ のいずれか）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、（e）TCR δ に由来する任意選択の細胞外ドメイン、（f）TCR δ に由来する膜貫通部、及び（g）TCR δ に由来する任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受容体は、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD 20、CD 19）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、s c F v、s d A b）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）TCRサブユニット（例えば、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD 3 ϵ 、CD 3 γ 、CD 3 δ のいずれか）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、及び（e）完全長CD 3 ϵ （シグナルペプチドを除く）を含む。いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受容体は、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD 20、CD 19）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、s c F v、s d A b）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）TCRサブユニット（例えば、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD 3 ϵ 、CD 3 γ 、CD 3 δ のいずれか）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、及び（e）完全長CD 3 γ を含む。いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受容体は、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD 20、CD 19）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、s c F v、s d A b）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）TCRサブユニット（例えば、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD 3 ϵ 、CD 3 γ 、CD 3 δ のいずれか）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、及び（e）完全長CD 3 δ を含む。いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受容体は、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD 20、CD 19）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、s c F v、s d A b）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）TCRサブユニット（例えば、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD 3 ϵ 、CD 3 γ 、CD 3 δ のいずれか）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、及び（e）完全長TCR α を含む。いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受容体は、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD 20、CD 19）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、s c F v、s d A b）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）TCRサブユニット（例えば、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD 3 ϵ 、CD 3 γ 、CD 3 δ のいずれか）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、及び（e）完全長TCR β を含む。いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受容体は、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD 20、CD 19）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、s c F v、s d A b）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）TCRサブユニット（例えば、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD 3 ϵ 、CD 3 γ 、CD 3 δ のいずれか）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR

結合ドメイン、(d)任意選択の第2のリンカー、及び(e)完全長TCR γ を含む。いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受容体は、(a)腫瘍抗原(例えば、BCMA、CD20、CD19)の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片(例えば、scFv、sdAb)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)任意選択の第1のリンカー、(c)TCRサブユニット(例えば、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ のいずれか)の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、(d)任意選択の第2のリンカー、及び(e)完全長TCR δ を含む。いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受容体は、(a)腫瘍抗原(例えば、BCMA、CD20、CD19)の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片(例えば、scFv、sdAb)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)任意選択の第1のリンカー、(c)第1のTCRサブユニット(例えば、CD3 ϵ)の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、(d)任意選択の第2のリンカー、(e)任意選択のヒンジ、(f)第2のTCRサブユニット(例えば、CD3 ϵ)に由来する膜貫通部、及び(g)第2のTCRサブユニット(例えば、CD3 ϵ)に由来する細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1及び第2のTCRサブユニットはいずれも、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、一価かつ単一特異性である。すなわち、腫瘍抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)のエピトープを特異的に認識する単一の抗原結合性断片(例えば、scFv、sdAb)を含む。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、単量体である。すなわち、腫瘍抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)のエピトープを特異的に認識する単一の抗原結合性断片(例えば、scFv、sdAb)を含む。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、多価かつ単一特異性である。すなわち、腫瘍抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)の同じエピトープを特異的に認識する2つ以上の抗原結合性断片(例えば、scFv、sdAb)を含む。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、多価かつ多重特異性である。すなわち、同じ腫瘍抗原または異なる腫瘍抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)の2つ以上のエピトープを特異的に認識する2つ以上の抗原結合性断片(例えば、scFv、sdAb)を含む。いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受容体は、細胞外TCR結合ドメイン(例えば、CD3 ϵ)によって認識されるTCRサブユニット(例えば、TCR α)の異なる細胞外ドメインを特異的に認識する第2の細胞外TCR結合ドメイン(例えば、scFv、sdAb)をさらに含み、第2の細胞外TCR結合ドメインは、細胞外TCR結合ドメインと細胞外リガンド結合ドメインとの間に位置付けられる。

【0292】

いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受容体は、a)腫瘍抗原(例えば、BCMA、CD20、CD19)の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片(例えば、scFv、sdAb)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、b)任意選択の第1のリンカー、c)TCRサブユニット(例えば、CD3 ϵ)の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、d)任意選択の第2のリンカー、e)第1のTCRサブユニットの膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及びf)第2のTCRサブユニットの細胞内ドメインを含む細胞内ドメインを含み、第1のTCRサブユニット及び第2のTCRサブユニットはいずれも、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、及びTCR δ からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、第1のTCRサブユニットはCD3 ϵ であり、及び/または、第2のTCRサブユニットはCD3 ϵ である。いくつかの実施形態では、第1のTCRサブユニットはCD3 γ であり、及び/または、第2のTCRサブユニットはCD3 γ である。いくつかの実施形態では、第1のTCRサブユニットはCD3 δ であり、及び/または、第2のTCRサブユニットはCD3 δ である。いくつかの実施形態では、第1のTCRサブユニットはTCR α であり、及び/または、第2のTCRサブユニットはTCR α である。いくつかの実施形態では、第1のTCRサブユニットはTCR β であり、及び/または、第2のTCRサブユニットは

TCR β である。いくつかの実施形態では、第1のTCRサブユニットはTCR γ であり、及び／または、第2のTCRサブユニットはTCR γ である。いくつかの実施形態では、第1のTCRサブユニットはTCR δ であり、及び／または、第2のTCRサブユニットはTCR δ である。いくつかの実施形態では、第1のTCRサブユニットと第2のTCRサブユニットとは同じである。いくつかの実施形態では、第1のTCRサブユニットと第2のTCRサブユニットとは異なっている。いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受容体は、第1及び／または第2のTCRサブユニットの細胞外ドメインを含まない。いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受容体は、いかなるTCRサブユニットの細胞外ドメインも含まない。いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受容体ポリペプチドは、細胞内共刺激ドメインを含まない。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、細胞外TCR結合ドメインのN末端側にある。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、細胞外TCR結合ドメインのC末端側にある。いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受容体は、(a)腫瘍抗原(例えば、BCMA、CD20、CD19)の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片(例えば、scFv、sdAb)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)任意選択の第1のリンカー、(c)TCRサブユニット(例えば、CD3 ϵ)の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、(d)任意選択の第2のリンカー、及び(e)完全長CD3 ϵ (シグナルペプチドを除く)を含み、TCRサブユニットは、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、一価かつ単一特異性である。すなわち、腫瘍抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)のエピトープを特異的に認識する単一の抗原結合性断片(例えば、scFv、sdAb)を含む。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、単量体である。すなわち、腫瘍抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)のエピトープを特異的に認識する単一の抗原結合性断片(例えば、scFv、sdAb)を含む。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、多価かつ単一特異性である。すなわち、腫瘍抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)の同じエピトープを特異的に認識する2つ以上の抗原結合性断片(例えば、scFv、sdAb)を含む。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、多価かつ多重特異性である。すなわち、同じ腫瘍抗原または異なる腫瘍抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)の2つ以上のエピトープを特異的に認識する2つ以上の抗原結合性断片(例えば、scFv、sdAb)を含む。いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受容体は、細胞外TCR結合ドメイン(例えば、CD3 ϵ)によって認識されるTCRサブユニット(例えば、TCR α)の異なる細胞外ドメインを特異的に認識する第2の細胞外TCR結合ドメイン(例えば、scFv、sdAb)をさらに含み、第2の細胞外TCR結合ドメインは、細胞外TCR結合ドメインと細胞外リガンド結合ドメインとの間に位置付けられる。

【0293】

工学操作されたTCR

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるNeftanパク質(例えば、wt Neft、または変異体Neft、例えば、天然に存在しないNeftanパク質、例えば変異体SIV Neft)を発現する修飾T細胞は、共に抗原(例えば、本明細書に記載される抗原のいずれか、例えば、腫瘍抗原、BCMA)を特異的に認識する、野生型TCRに由来するV α 及びV β を含む、細胞外リガンド結合ドメインを含む、工学操作されたTCR(例えば、BCMAまたはBCMA/MHC複合体を特異的に認識する工学操作されたTCR)であって、V α 、V β 、またはその両方が、野生型TCRと比べて、1つ以上のCDRに1つ以上の変異を含む、工学操作されたTCR(以下、「従来の工学操作されたTCR」ともいう)をさらに発現する。いくつかの実施形態では、変異は、保存的アミノ酸置換などのアミノ酸置換をもたらす。いくつかの実施形態では、工学操作されたTCRは、野生型TCRが結合するものと同じ同族ペプチド-MHCに結合する。いくつかの実施形態では、工学操作されたTCRは、野生型TCRが結合するものと比較して高い親和性で

、同じ同族ペプチド-MHCに結合する。いくつかの実施形態では、工学操作されたTCRは、野生型TCRが結合するものと比較して低い親和性で、同じ同族ペプチド-MHCに結合する。いくつかの実施形態では、工学操作されたTCRは、野生型TCRが結合しない非同族ペプチド-MHCに結合する。いくつかの実施形態では、工学操作されたTCRは、一本鎖TCR (scTCR) である。いくつかの実施形態では、工学操作されたTCRは、二量体TCR (dTCCR) である。いくつかの実施形態では、野生型TCRは、HLA-A2に結合する。いくつかの実施形態では、工学操作されたTCRは、CD3ζに由来する一次細胞内シグナル伝達ドメインなどの細胞内シグナル伝達ドメインをさらに含む。

【0294】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるNefタンパク質 (例えば、wt Nef、または変異体Nef、例えば、天然に存在しないNefタンパク質、変異体SIV Nef) を発現する修飾T細胞は、共にBCMAまたはBCMA-MHC複合体を特異的に認識する、野生型TCRに由来するVα及びVβを含む、細胞外リガンド結合ドメインを含む、工学操作されたTCRであって、Vα、Vβ、またはその両方が、野生型TCRと比べて、1つ以上のCDRに1つ以上の変異を含む、工学操作されたTCRをさらに発現する。いくつかの実施形態では、工学操作された抗BCMA TCRは、BCMAへの結合親和性が、野生型抗BCMA TCRよりも高い。いくつかの実施形態では、工学操作されたTCRは、CD3ζに由来する一次細胞内シグナル伝達ドメインなどの細胞内シグナル伝達ドメインをさらに含む。

【0295】

いくつかの実施形態では、本願の工学操作されたTCRは、キメラTCR (cTCR) である。いくつかの実施形態では、cTCRは、TCRサブユニットの完全長または一部分に (直接的または間接的に) 融合した、腫瘍抗原 (例えば、BCMA、CD19、CD20) の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片 (例えば、抗体ベースの抗原結合ドメイン、例えば、scFvまたはsdAb) を含む細胞外リガンド結合ドメインを含み、TCRサブユニットは、TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3γ、CD3ε、及びCD3δからなる群から選択される。融合ポリペプチドは、他の内在性TCRサブユニットと共に機能的TCR複合体に組み込まれ、抗原特異性をTCR複合体に与えることができる。いくつかの実施形態では、cTCR細胞外リガンド結合ドメインは、CD3εサブユニットの完全長または一部分に融合している。cTCRの細胞内シグナル伝達ドメインは、TCRサブユニットの細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、CD3εの細胞内シグナル伝達ドメインに由来し得る。cTCRの膜貫通ドメインは、TCRサブユニットに由来し得る。いくつかの実施形態では、cTCR細胞内シグナル伝達ドメイン及びcTCR膜貫通ドメインは、同じTCRサブユニットに由来し、例えば、いずれもCD3ε由来である。いくつかの実施形態では、cTCR細胞外リガンド結合ドメイン及びTCRサブユニット (全体またはその一部分) は、リンカー (例えばGSリンカー) を介して融合していてもよい。いくつかの実施形態では、cTCRは、cTCR細胞内シグナル伝達ドメイン及び/またはcTCR膜貫通ドメインの起源となるTCRサブユニットと同じであっても異なってもよいTCRサブユニットの細胞外ドメインまたはその一部分をさらに含む。したがって、いくつかの実施形態では、cTCRは、(a) 腫瘍抗原 (例えば、BCMA、CD20、CD19) の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片 (例えば、scFv、sdAb) を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 任意選択のリンカー、(c) 第1のTCRサブユニットの任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、(d) 第2のTCRサブユニットの膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び(e) 第3のTCRサブユニットの細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットは全て、TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ、及びCD3δからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットは同じ (例えば、CD3ε) である。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3

10

20

30

40

50

のTCRサブユニットは異なっている。いくつかの実施形態では、cTCRは、細胞外リガンド結合ドメインのC末端と膜貫通ドメインのN末端との間に位置するヒンジドメインを（例えば、TCRサブユニットの細胞外ドメインまたはその一部分がない場合に）さらに含む。上記「ヒンジ」及び「ペプチドリンカー」のサブセクションに記載されるヒンジドメイン及びリンカーのいずれも、ここでのcTCRに使用することができる。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、一価かつ単一特異性である。すなわち、腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）のエピトープを特異的に認識する単一の抗原結合性断片（例えば、scFv、sdAb）を含む。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、単量体である。すなわち、腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）のエピトープを特異的に認識する単一の抗原結合性断片（例えば、scFv、sdAb）を含む。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、多価かつ単一特異性である。すなわち、腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の同じエピトープを特異的に認識する2つ以上の抗原結合性断片（例えば、scFv、sdAb）を含む。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、多価かつ多重特異性である。すなわち、同じ腫瘍抗原または異なる腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の2つ以上のエピトープを特異的に認識する2つ以上の抗原結合性断片（例えば、scFv、sdAb）を含む。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、内容全体が参照により本明細書に援用されるPCT/CN2016/094408及びPCT/CN2017/096938に開示されている抗BCMA sdAbのいずれかのような、BCMAに特異的に結合するsdAb（すなわち、抗BCMA sdAb）である抗原結合性断片を含む。

【0296】

したがって、例えば、いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるNeftanパク質（例えば、wt Neft、または変異体Neft、例えば、天然に存在しないNeftanパク質、変異体SIV Neft）を発現する修飾T細胞は、抗CD20キメラTCRをさらに発現し、抗CD20キメラTCRは、a) CD20を特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、scFv、sdAb）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、b) 任意選択のリンカー（例えばGSライナー、例えば、(GGGGS)₃）、c) 第1のTCRサブユニットの任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分（例えば、CD3ε）、d) 第2のTCRサブユニット（例えば、CD3ε）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及びe) 第3のTCRサブユニット（例えば、CD3ε）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットは全て、TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ、及びCD3δからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットは同じである。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットは異なっている。いくつかの実施形態では、抗CD20 cTCRは、a) 抗CD20 scFv、b) リンカー（例えば、GSライナー、例えば、(GGGGS)₃）、及びc) 完全長CD3ε（シグナルペプチドを除く）を含む。いくつかの実施形態では、cTCRは、配列番号64のアミノ酸配列を含む抗CD20 cTCRである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるNeftanパク質（例えば、wt Neft、または変異体Neft、例えば、天然に存在しないNeftanパク質、変異体SIV Neft）を発現する修飾T細胞は、抗BCMAキメラTCRをさらに発現し、抗BCMAキメラTCRは、a) BCMAを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、scFv、sdAb）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、b) 任意選択のリンカー（例えばGSライナー、例えば、(GGGGS)₃）、c) 第1のTCRサブユニットの任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分（例えば、CD3ε）、d) 第2のTCRサブユニット（例えば、CD3ε）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及びe) 第3のTCRサブユニット（例えば、CD3ε）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットは全て、TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ、及びCD3δからなる群から選択される。いくつかの

実施形態では、第 1、第 2、及び第 3 の T C R サブユニットは同じである。いくつかの実施形態では、第 1、第 2、及び第 3 の T C R サブユニットは異なっている。いくつかの実施形態では、抗 B C M A c T C R は、a) 抗 B C M A s d A b、b) リンカー（例えば、G S ライナー、例えば、(G G G G S)₃）、及び c) 完全長 C D 3 ε（シグナルペプチドを除く）を含む。いくつかの実施形態では、T C R サブユニットの c T C R 膜貫通ドメイン、c T C R 細胞内シグナル伝達ドメイン、及び任意選択の細胞外ドメイン、またはそれらの一部分は、同じ T C R サブユニットに由来する。いくつかの実施形態では、T C R サブユニットの c T C R 膜貫通ドメイン、c T C R 細胞内シグナル伝達ドメイン、及び任意選択の細胞外ドメイン、またはそれらの一部分は、C D 3 ε に由来する。いくつかの実施形態では、c T C R は、完全長 C D 3 ε（シグナルペプチドを除く）の N 末端に融合した細胞外リガンド結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗 C D 2 0 c T C R は、抗 C D 2 0 s c F v - (G G G G S)₃ - C D 3 ε の構造、例えば配列番号 6 4 を有する。いくつかの実施形態では、抗 B C M A c T C R は、抗 B C M A s d A b - (G G G G S)₃ - C D 3 ε の構造を有する。

【0297】

V I . 医薬組成物

さらに、本願により、本明細書に記載される N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）及び／または機能的な外因性受容体（例えば、工学操作された T C R（例えば、従来の工学操作された T C R、キメラ T C R（c T C R））、T A C、T A C 様キメラ受容体、または C A R（例えば、抗体ベースの C A R、リガンド／受容体ベースの C A R、または A C T R））を発現する修飾 T 細胞（例えば、同種 T 細胞、内在性 T C R 欠損 T 細胞、G v H D 最小化 T 細胞）のいずれか 1 つと、薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物が提供される。医薬組成物は、所望の純度を有するキメラ抗体免疫エフェクター細胞エンゲージャーを、任意選択の薬学的に許容される担体、賦形剤、または安定剤（R e m i n g t o n ' s P h a r m a c e u t i c a l S c i e n c e s 1 6 t h e d i t i o n, O s o l, A. E d. (1980)）と混合することにより、凍結乾燥製剤または水溶液の形態で調製することができる。

【0298】

許容される担体、賦形剤、または安定剤は、用いられる投与量及び濃度でレシピエントに対して無毒であり、バッファー、抗酸化剤、例えばアスコルビン酸、メチオニン、ビタミン E、メタ重亜硫酸ナトリウム；防腐剤、等張化剤、安定剤、金属錯体（例えば Z n - タンパク質複合体）；E D T A などのキレート剤、及び／または非イオン性界面活性剤を含む。

【0299】

バッファーは、特に安定性が p H 依存性である場合、治療有効性を最適化する範囲内で p H を制御するために使用される。バッファーは、好ましくは、約 5 0 m M ~ 約 2 5 0 m M の範囲の濃度で存在する。本発明で使用するのに好適な緩衝剤には、有機酸及び無機酸の両方ならびにそれらの塩が含まれる。例えば、クエン酸塩、リン酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、シュウ酸塩、乳酸塩、酢酸塩である。さらに、バッファーは、ヒスチジン及びトリスなどのトリメチルアミン塩を含み得る。

【0300】

防腐剤は、微生物の増殖を遅らせるために添加され、典型的には、0 . 2 % ~ 1 . 0 % (w / v) の範囲で存在する。本発明で使用するのに好適な防腐剤としては、塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；ベンザルコニウムハロゲン化物（例えば、塩化物、臭化物、ヨウ化物）、塩化ベンゼトニウム；チメロサル、フェノール、ブチルアルコールまたはベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えばメチルパラベンまたはプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール、3 - ペンタノール、及び m - クレゾールが挙げられる。

【0301】

等張剤は、「安定剤」として知られることもあり、組成物中の液体の浸透圧を調整または維持するために存在する。タンパク質及び抗体などの大きい荷電した生体分子と共に使用される場合、これらは「安定剤」と呼ばれることが多い。なぜなら、これらは、アミノ酸側鎖の荷電基と相互作用し、それにより、分子間及び分子内の相互作用の可能性を低くし得るからである。等張剤は、他の成分の相対量を考慮して、0.1重量%～25重量%、好ましくは1～5%の任意の量で存在してよい。好ましい等張剤としては、多価糖アルコール、好ましくはグリセリン、エリスリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール、及びマンニトールなどの三価以上の糖アルコールが挙げられる。

【0302】

さらなる賦形剤としては、(1)増量剤、(2)溶解度向上剤、(3)安定剤、及び(4)変性または容器の壁への付着を防止する薬剤のうちの1つ以上として機能し得る薬剤が挙げられる。そのような賦形剤としては、多価糖アルコール(上記に列挙)；アラニン、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、リジン、オルニチン、ロイシン、2-フェニルアラニン、グルタミン酸、スレオニンなどのアミノ酸；スクロース、ラクトース、ラクチトール、トレハロース、スタキオース、マンノース、ソルボース、キシロース、リボース、リビトール、ミオイニシトース(myoinisitolose)、ミオイニシトール(myoinisitol)、ガラクトース、ガラクトール、グリセロール、シクリトール(例えば、イノシトール)、ポリエチレングリコールなどの有機糖または糖アルコール；尿素、グルタチオン、チオクト酸、チオグリコール酸ナトリウム、チオグリセロール、 α -モノチオグリセロール、及びチオ硫酸ナトリウムなどの硫黄含有還元剤；ヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミン、ゼラチン、または他の免疫グロブリンなどの低分子量タンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；単糖類(例えば、キシロース、マンノース、フルクトース、グルコース；二糖類(例えば、ラクトース、マルトース、スクロース)；ラフィノースなどの三糖類；ならびにデキストリンまたはデキストランなどの多糖類が挙げられる。

【0303】

非イオン性界面活性剤または界面活性物質(別名「湿潤剤」)は、治療剤の可溶化を助けるために、かつ攪拌によって誘導される凝集から治療用タンパク質を保護するために存在し、それにより、活性のある治療用タンパク質または抗体の変性を引き起こすことなく製剤をせん断表面応力に曝露することも可能になる。非イオン性界面活性剤は、約0.05mg/mL～約1.0mg/mL、好ましくは約0.07mg/mL～約0.2mg/mLの範囲で存在する。

【0304】

好適な非イオン性界面活性剤としては、ポリソルベート(20、40、60、65、80など)、ポリオキサマー(184、188など)、PLURONIC(登録商標)ポリオール、TRITON(登録商標)、ポリオキシエチレンソルビタンモノエーテル(TWEEN(登録商標)-20、TWEEN(登録商標)-80など)、ラウロマクロゴール400、ステアリン酸ポリオキシル40、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油10、50、及び60、モノステアリン酸グリセロール、スクロース脂肪酸エステル、メチルセルロース、ならびにカルボキシメチルセルロースが挙げられる。使用され得るアニオン性界面活性物質としては、ラウリル硫酸ナトリウム、ジオクチルスルホコハク酸ナトリウム、及びジオクチルスルホン酸ナトリウムが挙げられる。カチオン性界面活性物質としては、塩化ベンザルコニウムまたは塩化ベンゼトニウムが挙げられる。

【0305】

医薬組成物をin vivo投与に使用するためには、それらは無菌でなければならない。医薬組成物は、滅菌濾過膜を通した濾過によって無菌にすることができる。本明細書の医薬組成物は、概して、無菌アクセスポート、例えば、皮下注射針によって穿刺可能なストッパーを有する静注液バッグまたはバイアルに入れられる。

【0306】

投与経路は、好適な様式での、例えば、皮下、静脈内、腹腔内、筋肉内、動脈内、病巣

10

20

30

40

50

内、もしくは関節内の経路による注射もしくは注入、局所投与、吸入、または徐放もしくは持続放出手段による、長期間にわたる単回もしくは複数回ボーラスまたは注入などの公知の認められている方法に従う。

【0307】

徐放性調製物を調製してもよい。徐放性調製物の好適な例としては、アンタゴニストを含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが挙げられ、このマトリックスは、成形品、例えばフィルム、またはマイクロカプセルの形態である。徐放性マトリックスの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチルメタクリレート）、またはポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸とL-グルタミン酸エチルのコポリマー、非分解性エチレン酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、例えば、LUPRON DEPOT（商標）（乳酸-グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドからなる注射用マイクロスフェア）、及びポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。

【0308】

本明細書に記載される医薬組成物は、処置される特定の適応症に必要な2つ以上の活性化合物または薬剤、好ましくは、互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を有するものを含んでもよい。あるいは、またはさらに、組成物は、細胞傷害剤、化学療法剤、サイトカイン、免疫抑制剤、または成長阻害剤を含んでもよい。かかる分子は、好適には、意図される目的に有効な量で組み合わせられて存在する。

【0309】

活性成分はまた、コロイド薬物送達システム（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、及びナノカプセル）、またはマイクロエマルジョンにおいて、例えば、コアセルベーション技術により、または界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンマイクロカプセル及びポリ（メチルメタクリレート）マイクロカプセルに封入してもよい。そのような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 18th editionに開示されている。

【0310】

VII. 処置方法

本願は、本明細書に記載される、医薬組成物、あるいはNeftanパク質（例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft）及び／または機能的受容体（例えばCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、ACTR）、または工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR、TAC様キメラ受容体））を発現する修飾T細胞（例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞）のいずれか1つを有効量で個体に投与することを含む、個体の疾患（例えば、がん、感染性疾患、GvHD、移植片拒絶、自己免疫障害、または放射線宿酔）を処置する方法をさらに提供する。

【0311】

本明細書に記載される方法は、固形がんと液性がんの両方を含む様々ながんを処置するのに好適である。これらの方法は、早期がん、進行期がん、及び転移がんを含む全ての病期のがんに適用される。本明細書に記載される方法は、アジュバント設定またはネオアジュバント設定において、第1の療法、第2の療法、第3の療法、または当技術分野で公知の他のタイプのがん療法、例えば化学療法、手術、放射線、遺伝子療法、免疫療法、骨髄移植、幹細胞移植、標的化療法、凍結療法、超音波療法、光線力学療法、高周波アブレーションなどとの併用療法として使用され得る。

【0312】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、結腸癌、直腸癌、腎細胞癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、小腸癌、食道癌、黒色腫、骨癌、膵臓癌、皮膚癌、頭頸部癌、皮膚または眼球内の悪性黒色腫、子宮癌、卵巣癌、直腸癌、肛門部癌、胃癌、精巣癌、子宮癌、卵管癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、腔癌、外陰部癌、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫

10

20

30

40

50

、内分泌系癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、軟部組織肉腫、尿道癌、陰茎癌、小児期の固形腫瘍、膀胱癌、腎臓または尿管の癌、腎盂癌、中枢神経系（CNS）の新生物、原発性CNSリンパ腫、腫瘍血管新生、脊髄軸の腫瘍、脳幹神経膠腫、下垂体腺腫、カポジ肉腫、類表皮癌、扁平上皮癌、T細胞リンパ腫、環境誘発癌、前記がんの組み合わせ、及び前記がんの転移巣からなる群から選択される固形がんを処置するのに好適である。

【0313】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、慢性リンパ性白血病（CLL）、急性白血病、急性リンパ様白血病（ALL）、B細胞急性リンパ様白血病（B-ALL）、T細胞急性リンパ様白血病（T-ALL）、慢性骨髄性白血病（CML）、B細胞性前リンパ性白血病、芽細胞性形質細胞様樹状細胞新生物、バーキットリンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、ヘアリーセル白血病、小細胞型もしくは大細胞型の濾胞性リンパ腫、悪性リンパ増殖性状態、MALTリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、多発性骨髄腫、脊髄形成異常症及び骨髄異形成症候群、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、形質芽球性リンパ腫、形質細胞様樹状細胞新生物、ワルデンストレーム高ガンマグロブリン血症、または前白血病のうちの1つ以上から選択される血液癌を処置するのに好適である。

【0314】

いくつかの実施形態では、がんは、多発性骨髄腫である。いくつかの実施形態では、がんは、Durie-Salmon病期分類システムに基づいた、ステージI、ステージII、もしくはステージIII、及び／またはステージAもしくはステージBの多発性骨髄腫である。いくつかの実施形態では、がんは、International Myeloma Working Group（IMWG）の発表する国際病期分類システムに基づいた、ステージI、ステージII、またはステージIIIの多発性骨髄腫である。いくつかの実施形態では、がんは、意義不明の単クローン性ガンマグロブリン血症（MGUS）である。いくつかの実施形態では、がんは、無症候性（くすぶり型／遅発性）骨髄腫である。いくつかの実施形態では、がんは、症候性または活動性の骨髄腫である。いくつかの実施形態では、がんは、難治性多発性骨髄腫である。いくつかの実施形態では、がんは、転移性多発性骨髄腫である。いくつかの実施形態では、個体は、多発性骨髄腫に対する既往の処置に応答しなかった。いくつかの実施形態では、個体は、多発性骨髄腫の既往の処置後に進行性疾患を有する。いくつかの実施形態では、個体は、多発性骨髄腫に対して少なくとも約2、3、4、またはそれ以上のいずれかの回数の処置をそれまでに受けたことがある。いくつかの実施形態では、がんは、再発性多発性骨髄腫である。

【0315】

いくつかの実施形態では、個体は、活動性多発性骨髄腫を有する。いくつかの実施形態では、個体は、少なくとも10%のクローン骨髄形質細胞を有する。いくつかの実施形態では、個体は、生検により確定診断された骨性または髄外性の形質細胞腫を有する。いくつかの実施形態では、個体は、基礎にある形質細胞増殖疾患に起因し得る末端器官障害の証拠を有する。いくつかの実施形態では、個体は、高カルシウム血症を有する。例えば、血清カルシウムが正常上限より $>0.25\text{ mmol/L}$ （ $>1\text{ mg/dL}$ ）高い、または $>2.75\text{ mmol/L}$ （ $>11\text{ mg/dL}$ ）である。いくつかの実施形態では、個体は、腎不全を有する。例えば、クレアチニンクリアランス $<40\text{ mL/分}$ または血清クレアチニン $>177\text{ mol/L}$ （ $>2\text{ mg/dL}$ ）である。いくつかの実施形態では、個体は、貧血である。例えば、ヘモグロビン値が正常下限を $>20\text{ g/L}$ 下回る、またはヘモグロビン値 $<100\text{ g/L}$ である。いくつかの実施形態では、個体は、1つ以上の骨病変を有する。例えば、1つ以上の溶骨性病変が骨格のX線検査、CT、またはPET/CTにみられる。いくつかの実施形態では、個体は、次の悪性腫瘍のバイオマーカー（MDE）のうちの1つ以上を有する：（1）骨髄検査でクローン形質細胞が60%以上であること、（2）血清中の病変部／非病変部の遊離軽鎖比が100以上であること（但し、病変部軽鎖の絶対レベルが少なくとも 100 mg/L であるものとする）、及び（3）少なくとも5mm以上のサイズの限局性病変が2つ以上MRIで認められること。

【0316】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、自己免疫疾患を処置するのに好適である。自己免疫疾患、または自己免疫とは、生物が自身の構成要素を（分子下レベルまで）「自己」として認識することができず、その結果、自身の細胞及び組織に対する免疫応答を生じることである。そのような異常な免疫応答に起因するあらゆる疾患が、自己免疫疾患と呼ばれる。顕著な例としては、セリアック病、真性糖尿病1型（IDDM）、全身性エリテマトーデス（SLE）、シェーグレン症候群、多発性硬化症（MS）、橋本甲状腺炎、グレーブス病、特発性血小板減少性紫斑病、及び関節リウマチ（RA）が挙げられる。

【0317】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、B細胞障害に関連する疾患のクラスでもある自己免疫疾患を含む炎症性疾患を処置するのに好適である。自己免疫疾患の例としては、急性特発性血小板減少性紫斑病、慢性特発性血小板減少性紫斑病、皮膚筋炎、シデナム舞踏病、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、リウマチ熱、多腺性症候群、水疱性類天疱瘡、真性糖尿病、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、連鎖球菌感染後腎炎（post-streptococcal nephritis）、結節性紅斑、高安動脈炎、アジソン病、関節リウマチ、多発性硬化症、サルコイドーシス、潰瘍性大腸炎、多形性紅斑、IgA腎症、結節性多発動脈炎、強直性脊椎炎、グッドパスチャー症候群、閉塞性血栓性血管炎、シェーグレン症候群、原発性胆汁性肝硬変、橋本甲状腺炎、甲状腺中毒症、強皮症、慢性活動性肝炎、多発性筋炎／皮膚筋炎、多発性軟骨炎、尋常性天疱瘡、ウェゲナー肉芽腫症、膜性腎症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄癆、巨細胞性動脈炎／多発性筋痛、悪性貧血、急速進行性糸球体腎炎、乾癬、及び線維性肺肺炎が挙げられるが、これらに限定されない。最も一般的な処置はコルチコステロイド及び細胞傷害性薬であるが、これらは毒性が非常に高い場合がある。これらの薬物はまた、免疫系全体を抑制するものであり、重篤な感染をもたらし、骨髄、肝臓、及び腎臓に悪影響を及ぼす場合がある。これまで、クラスIII自己免疫疾患を処置するために使用されてきた他の治療薬は、T細胞及びマクロファージに対して指向されたものである。自己免疫疾患、特にクラスIII自己免疫疾患を処置する、より有効な方法が必要とされている。

【0318】

医薬組成物の投与は、注射、摂取、輸注、植え込み、または移植を含む、任意の簡便な様式で行ってよい。組成物は、患者の経動脈、皮下、皮内、腫瘍内、結節内、髄内、筋肉内、静脈内、または腹腔内に投与され得る。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、全身投与される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、静脈内注入などの注入によって個体に投与される。免疫療法のための注入技術は、当技術分野で公知である（例えば、Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676 (1988)を参照されたい）。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、皮内または皮下注射によって個体に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、静脈内注射によって投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、腫瘍またはリンパ節に直接注射される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、腫瘍部位に、例えば腫瘍細胞に直接、または腫瘍細胞を有する組織に、局所投与される。

【0319】

本発明の医薬組成物の投与量及び所望の薬物濃度は、想定される特定の用途に応じて異なり得る。適切な投与量または投与経路の決定は、十分に当業者の技術の範囲内である。動物実験により、ヒトの治療に有効な用量を決定するための信頼できる指針が得られる。有効量の種間スケールリングは、Mordenti, J. and Chappell, W. "The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics," In Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobi et al., Eds, Pergamon Press, New York 1989, pp. 42-46によって策定された原則に従って行うことができる。異なる製剤が異なる処置及び異なる障害に有効であること

、ならびに特定の器官または組織の処置を目的とする投与が、別の器官または組織への投与とは異なる様式での送達を必要とし得ることは、本願の範囲内である。

【0320】

いくつかの実施形態では、医薬組成物が、本明細書に記載される N e f（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）及び／または外因性受容体（例えば、工学操作された T C R（例えば、従来の工学操作された T C R、キメラ T C R（c T C R））、T A C、T A C 様キメラ受容体、または C A R（例えば、抗体ベースの C A R、リガンド／受容体ベースの C A R、または A C T R））を発現する修飾 T 細胞のいずれか 1 つを含む場合、医薬組成物は、少なくとも約 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、または 10^9 細胞／k g（個体の体重）のいずれかの投与量で投与される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約 $10^4 \sim 10^5$ 、約 $10^5 \sim 10^6$ 、約 $10^6 \sim 10^7$ 、約 $10^7 \sim 10^8$ 、約 $10^8 \sim 10^9$ 、約 $10^4 \sim 10^9$ 、約 $10^4 \sim 10^6$ 、約 $10^6 \sim 10^8$ 、または約 $10^5 \sim 10^7$ 細胞／k g（個体の体重）のいずれかの投与量で投与される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、少なくとも約 1×10^5 、 2×10^5 、 3×10^5 、 4×10^5 、 5×10^5 、 6×10^5 、 7×10^5 、 8×10^5 、 9×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 細胞／k g またはそれ以上のいずれかの用量で投与される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約 $3 \times 10^5 \sim 7 \times 10^6$ 細胞／k g、または約 3×10^6 細胞／k g の用量で投与される。

【0321】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、単回投与される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、複数回（例えば 2、3、4、5、6、またはそれ以上のいずれかの回数）投与される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、1 週間に 1 回、2 週間に 1 回、3 週間に 1 回、4 週間に 1 回、1 か月に 1 回、2 か月に 1 回、3 か月に 1 回、4 か月に 1 回、5 か月に 1 回、6 か月に 1 回、7 か月に 1 回、8 か月に 1 回、9 か月に 1 回、または 1 年に 1 回投与される。いくつかの実施形態では、投与間の間隔は、約 1 週間～2 週間、2 週間～1 か月、2 週間～2 か月、1 か月～2 か月、1 か月～3 か月、3 か月～6 か月、または 6 か月～1 年のうちのいずれか 1 つである。特定の患者に最適な投与量及び処置体制は、疾患の徴候について患者をモニタリングし、それに応じて処置を調整することにより、医学分野の当業者が容易に決定することができる。

【0322】

さらに、投与量は、1 回以上の別々の投与によって、または持続注入によって投与され得る。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、分割用量、例えば約 2、3、4、5、またはそれ以上のいずれかの回数の用量で投与される。いくつかの実施形態では、分割用量は、約 1 週間にわたって投与される。いくつかの実施形態では、用量は、等しく分割される。いくつかの実施形態では、分割用量は、総用量の約 20%、約 30%、約 40%、または約 50% である。いくつかの実施形態では、連続した分割用量間の間隔は、約 1 日、2 日、3 日、またはそれ以上である。状態に応じて数日間以上にわたる反復投与の場合、処置は、疾患症状の所望される抑制が生じるまで継続される。しかしながら、他の投与レジメンも有用であり得る。この療法の進捗は、従来の技術及びアッセイによって容易にモニタリングされる。

【0323】

いくつかの実施形態では、有効量の医薬組成物を個体に投与することを含む、疾患（例えば、がん、感染性疾患、G v H D、移植片拒絶、自己免疫障害、または放射線宿酔）を有する個体を処置する方法であって、医薬組成物が、（1）N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）及び C A R を含む、修飾 T 細胞（例えば、同種 T 細胞、内在性 T C R 欠損 T 細胞、G v H D 最小化 T 細胞）であり、C A R が、（a）抗原（例えば、B C M A、C D 19、C D 20）を特異的に認識する 1 つ以上（例えば 1、2、3、4、5、6 またはそれ以上のいずれかの数）の結合部分

(例えば、s d A b、s c F v)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)膜貫通ドメイン、及び(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含むポリペプチドを含む、修飾T細胞と、(2)薬学的に許容される担体とを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態では、C A Rは、(a)1つ以上(例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数)の抗B C M A s d A bを含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)膜貫通ドメイン、及び(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、C A Rは、単一特異性である。いくつかの実施形態では、C A Rは、多価である。いくつかの実施形態では、C A Rは、多重特異性である。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質は、配列番号12~22のいずれかのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質は、(i) a a 2~4、a a 8~10、a a 11~13、a a 38~40、a a 44~46、a a 47~49、a a 50~52、a a 53~55、a a 56~58、a a 59~61、a a 62~64、a a 65~67、a a 98~100、a a 107~109、a a 110~112、a a 137~139、a a 152~154、a a 164~166、a a 167~169、a a 170~172、a a 173~175、a a 176~178、a a 178~179、179~181 a a、a a 182~184、a a 185~187、a a 188~190、a a 191~193、a a 194~196、a a 203~205、a a 206~208、a a 212~214、a a 215~217、a a 218~220、a a 221~223、a a 8~13、a a 44~67、a a 107~112、a a 164~196、a a 203~208、もしくはa a 212~223、(i i) a a 2~4、a a 44~46、a a 56~58、a a 59~61、a a 62~64、a a 65~67、a a 98~100、a a 107~109、a a 137~139、a a 152~154、a a 164~166、a a 167~169、a a 176~178、a a 178~179、a a 179~181、a a 185~187、a a 188~190、a a 194~196、a a 203~205、a a 44~67、a a 164~169、a a 176~181、a a 185~190、(i i i) a a 2~4、a a 56~58、a a 59~61、a a 62~64、a a 65~67、a a 107~109、a a 137~139、a a 152~154、a a 164~166、a a 167~169、a a 170~172、a a 173~175、a a 176~178、178~179 a a、a a 179~181、a a 182~184、a a 185~187、a a 188~190、a a 194~196、a a 203~205、a a 56~67、もしくはa a 164~190、または(i v) a a 2~4、a a 56~58、a a 59~61、a a 62~64、a a 65~67、a a 107~109、a a 137~139、a a 152~154、a a 164~166、a a 167~169、a a 176~178、a a 178~179、a a 179~181、a a 185~187、a a 188~190、a a 194~196、a a 203~205、a a 56~67、a a 164~169、a a 176~181、もしくはa a 185~190のいずれかのアミノ酸残基(ここで、アミノ酸残基の位置は、野生型S I V N e fのものに対応する)における1つ以上の変異を含む、変異体S I V N e fである。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質(例えば、変異体S I V N e fなどの変異体N e f)は、C D 4及び/またはC D 28の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質(例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f)は、C D 4及び/またはC D 28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質(例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f)は、T C R、C D 4、及びC D 28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質(例えば、変異体S I V N e fなどの変異体N e f)は、T C Rの細胞表面発現を下方制御するが、C D 4及び/またはC D 28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質(例えば、変異体S I V N e fなどの変異体N e f)は、T C R及びC D 4の細胞表面発現を下方制御するが、C D 28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質(例えば、変異体S I V N e fなどの変異体N e f)は、T C R及びC D 28の細胞表面発現を下方制御するが、C D 4の細胞表面発現を下

方制御することはない。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質（例えば、wt Ne f、または変異体S I V Ne fなどの変異体Ne f）は、内在性TC Rの細胞表面発現を下方制御するが、CARを下方調節する（例えば、細胞表面発現を下方制御する）ことではない。いくつかの実施形態では、機能的CARは、Ne fタンパク質（例えば、wt Ne f、または変異体S I V Ne fなどの変異体Ne f）により、最大で約50%、約40%、約30%、約20%、約10%、または約5%下方調節される（例えば、細胞表面発現が下方制御される）。

【0324】

いくつかの実施形態では、有効量の医薬組成物を個体に投与することを含む、疾患（例えば、がん、感染性疾患、G v H D、移植片拒絶、自己免疫障害、または放射線宿酔）を有する個体を処置する方法であって、医薬組成物が、（1）Ne fタンパク質（例えば、wt Ne f、または変異体S I V Ne fなどの変異体Ne f）及びキメラTC R（c TC R）を含む、修飾T細胞（例えば、同種T細胞、内在性TC R欠損T細胞、G v H D最小化T細胞）であり、キメラTC Rが、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sd Ab、sc Fv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択のリンカー、（c）第1のTC Rサブユニット（例えば、CD3ε）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、（d）第2のTC Rサブユニット（例えば、CD3ε）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び（e）第3のTC Rサブユニット（例えば、CD3ε）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1、第2、及び第3のTC Rサブユニットが全て、TC Rα、TC Rβ、TC Rγ、TC Rδ、CD3ε、CD3γ、及びCD3δからなる群から選択される、修飾T細胞と、（2）薬学的に許容される担体とを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTC Rサブユニットは同じ（例えば、全てCD3ε）である。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTC Rサブユニットは異なっている。いくつかの実施形態では、有効量の医薬組成物を個体に投与することを含む、疾患（例えば、がん、感染性疾患、G v H D、移植片拒絶、自己免疫障害、または放射線宿酔）を有する個体を処置する方法であって、医薬組成物が、（1）Ne fタンパク質（例えば、wt Ne f、または変異体S I V Ne fなどの変異体Ne f）及びキメラTC R（c TC R）を含む、修飾T細胞（例えば、同種T細胞、内在性TC R欠損T細胞、G v H D最小化T細胞）であり、キメラTC Rが、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sd Ab、sc Fv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択のリンカー、及び（c）完全長CD3ε（シグナルペプチドを除く）を含む、修飾T細胞と、（2）薬学的に許容される担体とを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態では、c TC Rは、単一特異性である。いくつかの実施形態では、c TC Rは、多価である。いくつかの実施形態では、c TC Rは、多重特異性である。いくつかの実施形態では、c TC Rは、配列番号64のアミノ酸配列を含む抗CD20 c TC Rである。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質は、配列番号12～22のいずれかのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質は、（i）aa2～4、aa8～10、aa11～13、aa38～40、aa44～46、aa47～49、aa50～52、aa53～55、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～100、aa107～109、aa110～112、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、aa178～179、179～181aa、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa191～193、aa194～196、aa203～205、aa206～208、aa212～214、aa215～217、aa218～220、aa221～223、aa8～13、aa44～67、aa107～112、aa164～196、aa203～208、もしくはaa212～223、（ii）aa2～4、aa44～46、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、a

a 9 8 ~ 1 0 0、a a 1 0 7 ~ 1 0 9、a a 1 3 7 ~ 1 3 9、a a 1 5 2 ~ 1 5 4、a a 1 6 4 ~ 1 6 6、a a 1 6 7 ~ 1 6 9、a a 1 7 6 ~ 1 7 8、a a 1 7 8 ~ 1 7 9、a a 1 7 9 ~ 1 8 1、a a 1 8 5 ~ 1 8 7、a a 1 8 8 ~ 1 9 0、a a 1 9 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a a 4 4 ~ 6 7、a a 1 6 4 ~ 1 6 9、a a 1 7 6 ~ 1 8 1、a a 1 8 5 ~ 1 9 0、(i i i) a a 2 ~ 4、a a 5 6 ~ 5 8、a a 5 9 ~ 6 1、a a 6 2 ~ 6 4、a a 6 5 ~ 6 7、a a 1 0 7 ~ 1 0 9、a a 1 3 7 ~ 1 3 9、a a 1 5 2 ~ 1 5 4、a a 1 6 4 ~ 1 6 6、a a 1 6 7 ~ 1 6 9、a a 1 7 0 ~ 1 7 2、a a 1 7 3 ~ 1 7 5、a a 1 7 6 ~ 1 7 8、1 7 8 ~ 1 7 9 a a、a a 1 7 9 ~ 1 8 1、a a 1 8 2 ~ 1 8 4、a a 1 8 5 ~ 1 8 7、a a 1 8 8 ~ 1 9 0、a a 1 9 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a a 5 6 ~ 6 7、もしくは a a 1 6 4 ~ 1 9 0、または (i v) a a 2 ~ 4、a a 5 6 ~ 5 8、a a 5 9 ~ 6 1、a a 6 2 ~ 6 4、a a 6 5 ~ 6 7、a a 1 0 7 ~ 1 0 9、a a 1 3 7 ~ 1 3 9、a a 1 5 2 ~ 1 5 4、a a 1 6 4 ~ 1 6 6、a a 1 6 7 ~ 1 6 9、a a 1 7 6 ~ 1 7 8、a a 1 7 8 ~ 1 7 9、a a 1 7 9 ~ 1 8 1、a a 1 8 5 ~ 1 8 7、a a 1 8 8 ~ 1 9 0、a a 1 9 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a a 5 6 ~ 6 7、a a 1 6 4 ~ 1 6 9、a a 1 7 6 ~ 1 8 1、もしくは a a 1 8 5 ~ 1 9 0 のいずれかのアミノ酸残基 (ここで、アミノ酸残基の位置は、野生型 S I V N e f のものに対応する) における 1 つ以上の変異を含む、変異体 S I V N e f である。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質 (例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) は、C D 4 及び / または C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質 (例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) は、C D 4 及び / または C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質 (例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) は、T C R、C D 4、及び C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質 (例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) は、T C R の細胞表面発現を下方制御するが、C D 4 及び / または C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質 (例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) は、T C R 及び C D 4 の細胞表面発現を下方制御するが、C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質 (例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) は、T C R 及び C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御するが、C D 4 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質 (例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) は、内在性 T C R の細胞表面発現を下方制御するが、c T C R を下方調節する (例えば、細胞表面発現を下方制御する) ことではない。いくつかの実施形態では、機能的 c T C R は、N e f タンパク質 (例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) により、最大で約 5 0 %、約 4 0 %、約 3 0 %、約 2 0 %、約 1 0 %、または約 5 % 下方調節される (例えば、細胞表面発現が下方制御される)。

【 0 3 2 5 】

いくつかの実施形態では、有効量の医薬組成物を個体に投与することを含む、疾患 (例えば、がん、感染性疾患、G v H D、移植片拒絶、自己免疫障害、または放射線宿酔) を有する個体を処置する方法であって、医薬組成物が、(1) N e f タンパク質 (例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) 及び T 細胞抗原結合体 (T A C) を含む、修飾 T 細胞 (例えば、同種 T 細胞、内在性 T C R 欠損 T 細胞、G v H D 最小化 T 細胞) であり、T 細胞抗原結合体が、(a) 腫瘍抗原 (例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0) の 1 つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片 (例えば、s d A b、s c F v) を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 任意選択の第 1 のリンカー、(c) T C R サブユニット (例えば、C D 3 ε) の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外 T C R 結合ドメイン、(d) 任意選択の第 2 のリンカー、(e) 第 1 の T C R 共受容体 (例えば、C D 4) の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、(f) 第 2 の T C R 共受容体 (例えば、C D 4) の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び (

g) 第3のTCR共受容体(例えば、CD4)の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、TCRサブユニットが、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択され、第1、第2、及び第3のTCR共受容体が全て、CD4、CD8、及びCD28からなる群から選択される、修飾T細胞と、(2)薬学的に許容される担体とを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCR共受容体は同じである。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCR共受容体は異なっている。いくつかの実施形態では、有効量の医薬組成物を個体に投与することを含む、疾患(例えば、がん、感染性疾患、GvHD、移植片拒絶、自己免疫障害、または放射線宿酔)を有する個体を処置する方法であって、医薬組成物が、(1)Neftanパク質(例えば、wt Neftan、または変異体SIV Neftanなどの変異体Neftan)及びT細胞抗原結合体(TAC)を含む、修飾T細胞(例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GvHD最小化T細胞)であり、T細胞抗原結合体が、(a)腫瘍抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片(例えば、sdAb、scFv)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)任意選択の第1のリンカー、(c)TCRサブユニット(例えば、CD3 ϵ)の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、(d)任意選択の第2のリンカー、(e)CD4の細胞外ドメインまたはその一部分、(f)CD4の膜貫通ドメイン、及び(g)CD4の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、TCRサブユニットが、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される、修飾T細胞と、(2)薬学的に許容される担体とを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態では、TACは、配列番号66のアミノ酸配列を含む抗CD20 TACである。いくつかの実施形態では、TACは、単一特異性である。いくつかの実施形態では、TACは、多価である。いくつかの実施形態では、TACは、多重特異性である。いくつかの実施形態では、Neftanパク質は、配列番号12~22のいずれかのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Neftanパク質は、(i)aa2~4、aa8~10、aa11~13、aa38~40、aa44~46、aa47~49、aa50~52、aa53~55、aa56~58、aa59~61、aa62~64、aa65~67、aa98~100、aa107~109、aa110~112、aa137~139、aa152~154、aa164~166、aa167~169、aa170~172、aa173~175、aa176~178、aa178~179、179~181aa、aa182~184、aa185~187、aa188~190、aa191~193、aa194~196、aa203~205、aa206~208、aa212~214、aa215~217、aa218~220、aa221~223、aa8~13、aa44~67、aa107~112、aa164~196、aa203~208、もしくはaa212~223、(ii)aa2~4、aa44~46、aa56~58、aa59~61、aa62~64、aa65~67、aa98~100、aa107~109、aa137~139、aa152~154、aa164~166、aa167~169、aa176~178、aa178~179、aa179~181、aa185~187、aa188~190、aa194~196、aa203~205、aa44~67、aa164~169、aa176~181、aa185~190、(iii)aa2~4、aa56~58、aa59~61、aa62~64、aa65~67、aa107~109、aa137~139、aa152~154、aa164~166、aa167~169、aa170~172、aa173~175、aa176~178、178~179aa、aa179~181、aa182~184、aa185~187、aa188~190、aa194~196、aa203~205、aa56~67、もしくはaa164~190、または(iv)aa2~4、aa56~58、aa59~61、aa62~64、aa65~67、aa107~109、aa137~139、aa152~154、aa164~166、aa167~169、aa176~178、aa178~179、aa179~181、aa185~187、aa188~190、aa194~196、aa203~205、a

a 5 6 ~ 6 7、a a 1 6 4 ~ 1 6 9、a a 1 7 6 ~ 1 8 1、もしくは a a 1 8 5 ~ 1 9 0 のいずれかのアミノ酸残基（ここで、アミノ酸残基の位置は、野生型 S I V N e f のものに対応する）における 1 つ以上の変異を含む、変異体 S I V N e f である。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、C D 4 及び／または C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、C D 4 及び／または C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、T C R、C D 4、及び C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、T C R の細胞表面発現を下方制御するが、C D 4 及び／または C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、T C R 及び C D 4 の細胞表面発現を下方制御するが、C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、T C R 及び C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御するが、C D 4 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、内在性 T C R の細胞表面発現を下方制御するが、T A C を下方調節する（例えば、細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、機能的 T A C は、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）により、最大で約 5 0 %、約 4 0 %、約 3 0 %、約 2 0 %、約 1 0 %、または約 5 % 下方調節される（例えば、細胞表面発現が下方制御される）。

【0326】

いくつかの実施形態では、有効量の医薬組成物を個体に投与することを含む、疾患（例えば、がん、感染性疾患、G v H D、移植片拒絶、自己免疫障害、または放射線宿酔）を有する個体を処置する方法であって、医薬組成物が、（1）N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）及び T A C 様キメラ受容体を含む、修飾 T 細胞（例えば、同種 T 細胞、内在性 T C R 欠損 T 細胞、G v H D 最小化 T 細胞）であり、T A C 様キメラ受容体が、（a）腫瘍抗原（例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0）の 1 つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、s d A b、s c F v）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第 1 のリンカー、（c）第 1 の T C R サブユニット（例えば、T C R α）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外 T C R 結合ドメイン、（d）任意選択の第 2 のリンカー、（e）第 2 の T C R サブユニット（例えば、C D 3 ε）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、（f）第 3 の T C R サブユニット（例えば、C D 3 ε）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び（g）第 4 の T C R サブユニット（例えば、C D 3 ε）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第 1、第 2、第 3、及び第 4 の T C R サブユニットが全て、T C R α、T C R β、T C R γ、T C R δ、C D 3 ε、C D 3 γ、及び C D 3 δ からなる群から選択される、修飾 T 細胞と、（2）薬学的に許容される担体とを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態では、第 2、第 3、及び第 4 の T C R サブユニットは同じである。いくつかの実施形態では、第 1、第 2、第 3、及び第 4 の T C R サブユニットは同じである。いくつかの実施形態では、第 1、第 2、第 3、及び第 4 の T C R サブユニットは異なっている。いくつかの実施形態では、第 2、第 3、及び第 4 の T C R サブユニットは同じであるが、第 1 の T C R サブユニットとは異なっている。いくつかの実施形態では、有効量の医薬組成物を個体に投与することを含む、疾患（例えば、がん、感染性疾患、G v H D、移植片拒絶、自己免疫障害、または放射線宿酔）を有する個体を処置する方法であって、医薬組成物が、（1）N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）及び T A C 様キメラ受容体を含む、修飾 T 細胞（例えば、同種 T 細胞、内在性 T C R 欠損 T 細胞、

G v H D 最小化 T 細胞) であり、T A C 様キメラ受容体が、(a) 腫瘍抗原 (例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0) の 1 つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片 (例えば、s d A b、s c F v) を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 任意選択の第 1 のリンカー、(c) T C R サブユニット (例えば、T C R α) の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外 T C R 結合ドメイン、(d) 任意選択の第 2 のリンカー、及び (e) 完全長 C D 3 ε (シグナルペプチドを除く) を含み、T C R サブユニットが、T C R α 、T C R β 、T C R γ 、T C R δ 、C D 3 ε 、C D 3 γ 、及び C D 3 δ からなる群から選択される、修飾 T 細胞と、(2) 薬学的に許容される担体とを含む、方法が提供される。

いくつかの実施形態では、T A C は、単一特異性である。いくつかの実施形態では、T A C は、多価である。いくつかの実施形態では、T A C は、多重特異性である。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質は、配列番号 1 2 ~ 2 2 のいずれかのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質は、(i) a a 2 ~ 4、a a 8 ~ 1 0、a a 1 1 ~ 1 3、a a 3 8 ~ 4 0、a a 4 4 ~ 4 6、a a 4 7 ~ 4 9、a a 5 0 ~ 5 2、a a 5 3 ~ 5 5、a a 5 6 ~ 5 8、a a 5 9 ~ 6 1、a a 6 2 ~ 6 4、a a 6 5 ~ 6 7、a a 9 8 ~ 1 0 0、a a 1 0 7 ~ 1 0 9、a a 1 1 0 ~ 1 1 2、a a 1 3 7 ~ 1 3 9、a a 1 5 2 ~ 1 5 4、a a 1 6 4 ~ 1 6 6、a a 1 6 7 ~ 1 6 9、a a 1 7 0 ~ 1 7 2、a a 1 7 3 ~ 1 7 5、a a 1 7 6 ~ 1 7 8、a a 1 7 8 ~ 1 7 9、1 7 9 ~ 1 8 1 a a、a a 1 8 2 ~ 1 8 4、a a 1 8 5 ~ 1 8 7、a a 1 8 8 ~ 1 9 0、a a 1 9 1 ~ 1 9 3、a a 1 9 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a a 2 0 6 ~ 2 0 8、a a 2 1 2 ~ 2 1 4、a a 2 1 5 ~ 2 1 7、a a 2 1 8 ~ 2 2 0、a a 2 2 1 ~ 2 2 3、a a 8 ~ 1 3、a a 4 4 ~ 6 7、a a 1 0 7 ~ 1 1 2、a a 1 6 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 8、もしくは a a 2 1 2 ~ 2 2 3、(i i) a a 2 ~ 4、a a 4 4 ~ 4 6、a a 5 6 ~ 5 8、a a 5 9 ~ 6 1、a a 6 2 ~ 6 4、a a 6 5 ~ 6 7、a a 9 8 ~ 1 0 0、a a 1 0 7 ~ 1 0 9、a a 1 3 7 ~ 1 3 9、a a 1 5 2 ~ 1 5 4、a a 1 6 4 ~ 1 6 6、a a 1 6 7 ~ 1 6 9、a a 1 7 6 ~ 1 7 8、a a 1 7 8 ~ 1 7 9、a a 1 7 9 ~ 1 8 1、a a 1 8 5 ~ 1 8 7、a a 1 8 8 ~ 1 9 0、a a 1 9 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a a 4 4 ~ 6 7、a a 1 6 4 ~ 1 6 9、a a 1 7 6 ~ 1 8 1、a a 1 8 5 ~ 1 9 0、(i i i) a a 2 ~ 4、a a 5 6 ~ 5 8、a a 5 9 ~ 6 1、a a 6 2 ~ 6 4、a a 6 5 ~ 6 7、a a 1 0 7 ~ 1 0 9、a a 1 3 7 ~ 1 3 9、a a 1 5 2 ~ 1 5 4、a a 1 6 4 ~ 1 6 6、a a 1 6 7 ~ 1 6 9、a a 1 7 0 ~ 1 7 2、a a 1 7 3 ~ 1 7 5、a a 1 7 6 ~ 1 7 8、1 7 8 ~ 1 7 9 a a、a a 1 7 9 ~ 1 8 1、a a 1 8 2 ~ 1 8 4、a a 1 8 5 ~ 1 8 7、a a 1 8 8 ~ 1 9 0、a a 1 9 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a a 5 6 ~ 6 7、もしくは a a 1 6 4 ~ 1 9 0、または (i v) a a 2 ~ 4、a a 5 6 ~ 5 8、a a 5 9 ~ 6 1、a a 6 2 ~ 6 4、a a 6 5 ~ 6 7、a a 1 0 7 ~ 1 0 9、a a 1 3 7 ~ 1 3 9、a a 1 5 2 ~ 1 5 4、a a 1 6 4 ~ 1 6 6、a a 1 6 7 ~ 1 6 9、a a 1 7 6 ~ 1 7 8、a a 1 7 8 ~ 1 7 9、a a 1 7 9 ~ 1 8 1、a a 1 8 5 ~ 1 8 7、a a 1 8 8 ~ 1 9 0、a a 1 9 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a a 5 6 ~ 6 7、a a 1 6 4 ~ 1 6 9、a a 1 7 6 ~ 1 8 1、もしくは a a 1 8 5 ~ 1 9 0 のいずれかのアミノ酸残基 (ここで、アミノ酸残基の位置は、野生型 S I V N e f のものに対応する) における 1 つ以上の変異を含む、変異体 S I V N e f である。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質 (例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) は、C D 4 及び/または C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質 (例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) は、C D 4 及び/または C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質 (例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) は、T C R、C D 4、及び C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質 (例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) は、T C R の細胞表面発現を下方制御するが、C D 4 及び/または C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質 (例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f) は、T C R 及び C D 4 の細胞表面発現を下方制御するが、C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御すること

はない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、T C R 及び C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御するが、C D 4 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、内在性 T C R の細胞表面発現を下方制御するが、T A C 様キメラ受容体を下方調節する（例えば、細胞表面発現を下方制御する）ことはない。いくつかの実施形態では、機能的 T A C 様キメラ受容体は、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）により、最大で約 5 0 %、約 4 0 %、約 3 0 %、約 2 0 %、約 1 0 %、または約 5 % 下方調節される（例えば、細胞表面発現が下方制御される）。

【0327】

いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、修飾 T 細胞における内在性 T C R、M H C、C D 3 ε、C D 3 γ、及び／または C D 3 δ を下方調節する。例えば、内在性 T C R、M H C、C D 3 ε、C D 3 γ、及び／または C D 3 δ の細胞表面発現を、少なくとも約 5 0 %、約 6 0 %、約 7 0 %、約 8 0 %、約 9 0 %、または約 9 5 % 下方制御する。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、C D 3 ζ、C D 4、C D 2 8、及び／または外因性受容体（例えば、工学操作された T C R（例えば、従来の工学操作された T C R、キメラ T C R（c T C R））、T A C、T A C 様キメラ受容体、または C A R（例えば、抗体ベースの C A R、リガンド／受容体ベースの C A R、または A C T R））を下方調節する（例えば、発現を下方制御する）こと

【0328】

いくつかの実施形態では、N e f タンパク質は、S I V N e f、H I V 1 N e f、H I V 2 N e f、及びそれらの相同体からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質は、野生型 N e f である。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質は、変異体 N e f である。いくつかの実施形態では、変異体 N e f は、ミリスチル化部位、N 末端 α ヘリックス、チロシンベースの A P 動員、C D 4 結合部位、酸性クラスター、プロリンベースのリピート、P A K 結合ドメイン、C O P I 動員ドメイン、ジロイシンベースの A P 動員ドメイン、V - A T P a s e 及び R a f - 1 結合ドメイン、またはそれらの任意の組み合わせにおける 1 つ以上の変異を含む。いくつかの実施形態では、変異は、挿入、欠失、点変異（複数可）、及び／または転位を含む。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質は、配列番号 1 2 ~ 2 2 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質は、1 つ以上の変異（例えば、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上のアミノ酸残基の変異、例えば A 1 a への変異）を、表 1 1 に記載されるアミノ酸残基のいずれかに含む、変異体 S I V N e f である。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質は、（i）a a 2 ~ 4、a a 8 ~ 10、a a 1 1 ~ 1 3、a a 3 8 ~ 40、a a 4 4 ~ 4 6、a a 4 7 ~ 4 9、a a 5 0 ~ 5 2、a a 5 3 ~ 5 5、a a 5 6 ~ 5 8、a a 5 9 ~ 6 1、a a 6 2 ~ 6 4、a a 6 5 ~ 6 7、a a 9 8 ~ 100、a a 1 0 7 ~ 109、a a 1 1 0 ~ 1 1 2、a a 1 3 7 ~ 1 3 9、a a 1 5 2 ~ 1 5 4、a a 1 6 4 ~ 1 6 6、a a 1 6 7 ~ 1 6 9、a a 1 7 0 ~ 1 7 2、a a 1 7 3 ~ 1 7 5、a a 1 7 6 ~ 1 7 8、a a 1 7 8 ~ 1 7 9、1 7 9 ~ 1 8 1 a a、a a 1 8 2 ~ 1 8 4、a a 1 8 5 ~ 1 8 7、a a 1 8 8 ~ 1 9 0、a a 1 9 1 ~ 1 9 3、a a 1 9 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a a 2 0 6 ~ 2 0 8、a a 2 1 2 ~ 2 1 4、a a 2 1 5 ~ 2 1 7、a a 2 1 8 ~ 2 2 0、a a 2 2 1 ~ 2 2 3、a a 8 ~ 1 3、a a 4 4 ~ 6 7、a a 1 0 7 ~ 1 1 2、a a 1 6 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 8、もしくは a a 2 1 2 ~ 2 2 3、（ii）a a 2 ~ 4、a a 4 4 ~ 4 6、a a 5 6 ~ 5

8、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～100、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa44～67、aa164～169、aa176～181、aa185～190、(iii)aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、178～179aa、aa179～181、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、もしくはaa164～190、または(iv)aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、aa164～169、aa176～181、もしくはaa185～190のいずれかのアミノ酸残基（ここで、アミノ酸残基の位置は、野生型SIV Nefのものに対応する）における1つ以上の変異を含む、変異体SIV Nefである。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCR、CD4、及びCD28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCRの細胞表面発現を下方制御するが、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCR及びCD4の細胞表面発現を下方制御するが、CD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCR及びCD28の細胞表面発現を下方制御するが、CD4の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、内在性TCRの細胞表面発現を下方制御するが、外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））を下方調節する（例えば、細胞表面発現を下方制御する）ことではない。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））は、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）により、最大で約50%、約40%、約30%、約20%、約10%、または約5%下方調節される（例えば、細胞表面発現が下方制御される）。

【0329】

いくつかの実施形態では、疾患は、がんである。いくつかの実施形態では、がんは、再発性または難治性の多発性骨髄腫などの多発性骨髄腫である。いくつかの実施形態では、処置効果は、個体において客観的臨床応答を引き起こすことを含む。いくつかの実施形態では、厳格な臨床応答（sCR）が個体において得られる。いくつかの実施形態では、処置効果は、個体において疾患の寛解（部分または完全）を引き起こすことを含む。場合により、臨床的寛解は、個体が医薬組成物を受けてから約6か月、5か月、4か月、3か月

、2か月、1か月以下、またはそれ未満のいずれかの期間の後に得られる。いくつかの実施形態では、処置効果は、個体においてがんの再発または疾患進行を防止することを含む。いくつかの実施形態では、再発または疾患進行は、少なくとも約6か月間、1年間、2年間、3年間、4年間、5年間、またはそれ以上にわたって防止される。いくつかの実施形態では、処置効果は、個体の生存期間（例えば無病生存期間）を延長することを含む。いくつかの実施形態では、処置効果は、個体の生活の質を向上させることを含む。いくつかの実施形態では、処置効果は、固形腫瘍もしくはリンパ系腫瘍の成長を阻害すること、またはそのサイズを低減させることを含む。

【0330】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍またはリンパ系腫瘍のサイズは、少なくとも約10%（例えば、少なくとも約20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%、または100%のうちのいずれかを含む）低減する。いくつかの実施形態では、個体における固形腫瘍もしくはリンパ系腫瘍の成長を阻害するか、またはそのサイズを低減させる方法が提供される。いくつかの実施形態では、処置効果は、個体において腫瘍転移を阻害することを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも約10%の（例えば、少なくとも約20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%、または100%のうちのいずれかを含む）転移が阻害される。いくつかの実施形態では、リンパ節への転移を阻害する方法が提供される。いくつかの実施形態では、肺への転移を阻害する方法が提供される。いくつかの実施形態では、肝臓への転移を阻害する方法が提供される。転移は、当技術分野で公知の任意の方法、例えば血液検査、骨スキャン、X線スキャン、CTスキャン、PETスキャン、及び生検によって評価され得る。

【0331】

本発明は、本明細書に記載されるNef（またはNef＋機能的な外因性受容体）を発現する修飾T細胞（例えば、同種T細胞）、その単離集団、またはそれを含む医薬組成物を使用して、疾患及び障害を低減もしくは改善する、または防止もしくは処置する方法にも関する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるNef（またはNef＋機能的な外因性受容体）を発現する修飾T細胞（例えば、同種T細胞）、その単離集団、またはそれを含む医薬組成物は、がん、感染、1つ以上の自己免疫障害、放射線宿酔を低減もしくは改善する、または防止もしくは処置するために、あるいは移植手術を受けた対象の移植片対宿主病（GvHD）もしくは移植片拒絶を防止または処置するために使用される。

【0332】

Nef（またはNef＋機能的な外因性受容体）を発現する修飾T細胞（例えば、同種T細胞）、その単離集団、またはそれを含む医薬組成物は、自己免疫拒絶または移植片拒絶を変化させるのに有用である。なぜなら、これらのT細胞は、発生中にTGF- β で成長させることができ、分化して誘導性制御性T細胞になるからである。一実施形態では、機能的な外因性受容体（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（cTCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR）など）を使用して、これらの誘導性制御性T細胞が疾患の組織部位でその阻害機能を行うために必要な機能的特異性を、誘導性制御性T細胞に与える。したがって、患者に使用するための、多数の抗原特異的制御性T細胞が成長する。制御性T細胞の分化に必須であるFoxP3の発現は、フローサイトメトリーによって分析することができ、これらの制御性T細胞によるT細胞増殖の機能的阻害は、共培養時の抗CD3刺激後のT細胞増殖における減少を検査することによって分析することができる。

【0333】

本発明の別の実施形態は、Nef（またはNef＋機能的な外因性受容体）を発現する修飾T細胞（例えば、同種T細胞）、その単離集団、またはそれを含む医薬組成物の、放射線宿酔の防止または処置のための使用に関する。放射線治療もしくは放射線曝露（例えば、汚染爆弾曝露、放射性物質漏れ）、または骨髓細胞を除去する他の条件（特定の薬物療法）後の1つの課題は、造血系を再構成することである。骨髓移植を受けた患者では、移

植後15日目のリンパ球絶対数が、良好な結果に相関する。リンパ球数が多い患者では再構成が良好であるため、良好なリンパ球の再構成があることが重要である。この作用の理由は不明だが、感染からのリンパ球の保護及び／または造血再構成に有利に働く成長因子の産生に起因する可能性がある。

【0334】

いくつかの実施形態では、本発明は、個体におけるドナーT細胞の持続性及び／または生着を高める方法であって、1) 同種T細胞を用意すること、及び2) Ne f タンパク質(例えば、wt Ne f、または変異体S I V Ne fなどの変異体Ne f)をコードする第1の核酸を、同種T細胞に導入することを含み、Ne f タンパク質が発現すると、同種T細胞の内在性TCRが下方調節される方法も提供する。いくつかの実施形態では、同種T細胞は、同種CAR-T細胞、工学操作されたTCR-T細胞(例えば、c TCR-T細胞)、TAC-T細胞、TAC様T細胞である。いくつかの実施形態では、本方法は、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、工学操作されたTCR(例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR(c TCR))、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR(例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR))を含む機能的な外因性受容体をコードする第2の核酸を、同種T細胞に導入することをさらに含む。いくつかの実施形態では、第2の核酸は、CARをコードする。いくつかの実施形態では、CARは、(a) 抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)を特異的に認識する1つ以上(例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数)の結合部分(例えば、sdAb、scFv)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 膜貫通ドメイン、及び(c) 細胞内シグナル伝達ドメインを含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、CARは、(a) 1つ以上(例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数)の抗BCMA sdAbを含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 膜貫通ドメイン、及び(c) 細胞内シグナル伝達ドメインを含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、CARは、(a) 1つ以上(例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数)の抗CD19 scFvを含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 膜貫通ドメイン、及び(c) 細胞内シグナル伝達ドメインを含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、CARは、(a) 1つ以上(例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数)の抗CD20 scFvを含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 膜貫通ドメイン、及び(c) 細胞内シグナル伝達ドメインを含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、CARは、(a) 1つの抗CD20 scFvと1つの抗CD19 scFvとが直接的または間接的に(例えばリンカーを介して)ひとつに融合したものを含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 膜貫通ドメイン、及び(c) 細胞内シグナル伝達ドメインを含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、第2の核酸は、従来の工学操作されたTCRをコードする。いくつかの実施形態では、第2の核酸は、ACTRをコードする。いくつかの実施形態では、第2の核酸は、c TCRをコードする。いくつかの実施形態では、c TCRは、(a) 腫瘍抗原(例えば、BCMA、CD20、CD19)の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片(例えば、scFv、sdAb)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 任意選択のリンカー、(c) 第1のTCRサブユニットの任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、(d) 第2のTCRサブユニットの膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び(e) 第3のTCRサブユニットの細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットは全て、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、c TCRは、(a) 腫瘍抗原(例えば、BCMA、CD20、CD19)の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片(例えば、scFv、sdAb)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 任意選択のリンカー、及び(e) 完全長CD3 ϵ (シグナルペプチドを除く)を含む。いくつかの実施形態では、c TCRは、配列番号64のアミノ酸配列を含む抗CD20 c TCRである。いくつかの実施形態では、第2の核酸は、TAC

10

20

30

40

50

をコードする。いくつかの実施形態では、TACは、(a) 腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD20、CD19）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、scFv、sdAb）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 任意選択の第1のリンカー、(c) TCRサブユニット（例えば、CD3ε）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、(d) 任意選択の第2のリンカー、(e) 第1のTCR共受容体（例えば、CD4、CD28、またはCD8、例えば、CD8α）に由来する任意選択の細胞外ドメイン、(f) 第2のTCR共受容体（例えば、CD4、CD28、またはCD8、例えば、CD8α）の膜貫通部を含む膜貫通部、及び(g) 第3のTCR共受容体（例えば、CD4、CD28、またはCD8、例えば、CD8α）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、TACは、(a) 腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD20、CD19）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、scFv、sdAb）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 任意選択の第1のリンカー、(c) TCRサブユニット（例えば、CD3ε）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、(d) 任意選択の第2のリンカー、(e) CD4の細胞外ドメインまたはその一部分、(f) CD4の膜貫通ドメイン、及び(g) CD4の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、TCRサブユニットは、TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ、及びCD3δからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、TACは、配列番号66のアミノ酸配列を含む抗CD20 TACである。いくつかの実施形態では、第2の核酸は、TAC様キメラ受容体をコードする。いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受容体は、(a) 腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD20、CD19）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、scFv、sdAb）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 任意選択の第1のリンカー、(c) 第1のTCRサブユニット（例えば、CD3ε）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、(d) 任意選択の第2のリンカー、(e) 第2のTCRサブユニット（例えば、CD3ε）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、(f) 第3のTCRサブユニット（例えば、CD3ε）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び(g) 第4のTCRサブユニット（例えば、CD3ε）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは全て、TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ、及びCD3δからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受容体は、(a) 腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD20、CD19）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、scFv、sdAb）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 任意選択の第1のリンカー、(c) TCRサブユニット（例えば、CD3ε）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、(d) 任意選択の第2のリンカー、及び(e) 完全長CD3ε（シグナルペプチドを除く）を含み、TCRサブユニットは、TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ、及びCD3δからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体（例えばCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、ACTR）、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、cTCR）、TAC、TAC様キメラ受容体）は、一価かつ単一特異性である。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体（例えばCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、ACTR）、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、cTCR）、TAC、TAC様キメラ受容体）は、多価かつ単一特異性である。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体（例えばCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、ACTR）、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、cTCR）、TAC、TAC様キメラ受容体）は、多重特異性（かつ多価）である。いくつかの実施形態では、第1の核酸と第2の核酸とは、別々のベクター上にある。いくつかの実施形態では、第1の核酸と第2の核酸とは、同じベクター上にある。したがって、いくつかの実施形態では、本発明は、個体におけるドナーT

10

20

30

40

50

細胞の持続性及び／または生着を高める方法であって、1) 同種T細胞を用意すること、及び2) N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f）をコードする第1の核酸と、本明細書に記載される例えば機能的受容体（例えばC A R（例えば、抗体ベースのC A R、リガンド／受容体ベースのC A R、A C T R）、工学操作されたT C R（例えば、従来の工学操作されたT C R、c T C R）、T A C、T A C様キメラ受容体）をコードする第2の核酸とを含むベクター（例えば、ウイルスベクター、レンチウイルスベクター）を、同種T細胞に導入することを含み、N e f タンパク質が発現すると、同種T細胞の内在性T C Rが下方調節される方法を提供する。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質は、配列番号12～22のいずれかのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質は、（i）a a 2～4、
 a a 8～10、a a 11～13、a a 38～40、a a 44～46、a a 47～49、a a 50～52、a a 53～55、a a 56～58、a a 59～61、a a 62～64、a a 65～67、a a 98～100、a a 107～109、a a 110～112、a a 137～139、a a 152～154、a a 164～166、a a 167～169、a a 170～172、a a 173～175、a a 176～178、a a 178～179、179～181 a a、a a 182～184、a a 185～187、a a 188～190、a a 191～193、a a 194～196、a a 203～205、a a 206～208、a a 212～214、a a 215～217、a a 218～220、a a 221～223、a a 8～13、a a 44～67、a a 107～112、a a 164～196、a a 203～208、
 もしくはa a 212～223、（i i）a a 2～4、a a 44～46、a a 56～58
 a a 59～61、a a 62～64、a a 65～67、a a 98～100、a a 107～109、a a 137～139、a a 152～154、a a 164～166、a a 167～169、a a 176～178、a a 178～179、a a 179～181、a a 185～187、a a 188～190、a a 194～196、a a 203～205、a a 44～67、a a 164～169、a a 176～181、a a 185～190、（i i i）a a 2～4、a a 56～58、a a 59～61、a a 62～64、a a 65～67、a a 107～109、a a 137～139、a a 152～154、a a 164～166、a a 167～169、a a 170～172、a a 173～175、a a 176～178、178～179 a a、a a 179～181、a a 182～184、a a 185～187、a a 188～190、a a 194～196、a a 203～205、a a 56～67、もしくはa a 164～190、または（i v）a a 2～4、a a 56～58、a a 59～61、a a 62～64、a a 65～67、a a 107～109、a a 137～139、a a 152～154、a a 164～166、a a 167～169、a a 176～178、a a 178～179

、a a 179～181、a a 185～187、a a 188～190、a a 194～196、a a 203～205、a a 56～67、a a 164～169、a a 176～181、もしくはa a 185～190のいずれかのアミノ酸残基（ここで、アミノ酸残基の位置は、野生型S I V N e fのものに対応する）における1つ以上の変異を含む、変異体S I V N e fである。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、変異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、C D 4及び／またはC D 28の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、C D 4及び／またはC D 28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、T C R、C D 4、及びC D 28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、変異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、T C Rの細胞表面発現を下方制御するが、C D 4及び／またはC D 28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、変異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、T C R及びC D 4の細胞表面発現を下方制御するが、C D 28の細胞表面発現を下方制

御することはない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、T C R 及び C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御するが、C D 4 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、内在性 T C R の細胞表面発現を下方制御するが、外因性受容体（例えば、工学操作された T C R（例えば、従来の工学操作された T C R、キメラ T C R（c T C R））、T A C、T A C 様キメラ受容体、または C A R（例えば、抗体ベースの C A R、リガンド／受容体ベースの C A R、または A C T R））を下方調節する（例えば、細胞表面発現を下方制御する）ことではない。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体（例えば、工学操作された T C R（例えば、従来の工学操作された T C R、キメラ T C R（c T C R））、T A C、T A C 様キメラ受容体、または C A R（例えば、抗体ベースの C A R、リガンド／受容体ベースの C A R、または A C T R））は、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）により、最大で約 5 0 %、約 4 0 %、約 3 0 %、約 2 0 %、約 1 0 %、または約 5 % 下方調節される（例えば、細胞表面発現が下方制御される）。

10

【0335】

いくつかの実施形態では、第 1 の核酸と第 2 の核酸とは、同じプロモーターに作動可能に連結している。いくつかの実施形態では、第 1 の核酸と第 2 の核酸とは、異なるプロモーターに作動可能に連結している。いくつかの実施形態では、プロモーターは、ラウス肉腫ウイルス（R S V）プロモーター、サルウイルス 4 0（S V 4 0）プロモーター、サイトメガロウイルス最初期遺伝子プロモーター（C M V I E）、伸長因子 1 アルファプロモーター（E F 1 - α ）、ホスホグリセリン酸キナーゼ 1（P G K）プロモーター、ユビキチン C（U B Q - C）プロモーター、サイトメガロウイルスエンハンサー／ニワトリベータアクチン（C A G）プロモーター、ポリオーマエンハンサー／単純ヘルペスチミジンキナーゼ（M C 1）プロモーター、ベータアクチン（ β - A C T）プロモーター、「骨髄増殖性肉腫ウイルスエンハンサー、陰性対照領域欠失、d 1 5 8 7 r e v プライマー結合部位置換（M N D）」プロモーター、N F A T プロモーター、T E T O N（登録商標）プロモーター、及び N F κ B プロモーターからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、プロモーターは、E F 1 - α または P G K である。いくつかの実施形態では、第 1 の核酸は、第 2 の核酸の上流にある。いくつかの実施形態では、第 1 の核酸は、第 2 の核酸の下流にある。いくつかの実施形態では、第 1 の核酸と第 2 の核酸とは、連結配列を介して結合している。いくつかの実施形態では、連結配列は、P 2 A、T 2 A、E 2 A、F 2 A、B m C P V 2 A、B m I F V 2 A、(G S)_n、(G S G G S)_n、(G G G S)_n、(G G G G S)_n をコードする核酸配列、または I R E S、S V 4 0、C M V、U B C、E F 1 α 、P G K、C A G G の核酸配列、またはそれらの任意の組み合わせ（式中、n は、少なくとも 1 の整数である）のいずれかである。いくつかの実施形態では、連結配列は、I R E S または P 2 A をコードする核酸である。いくつかの実施形態では、ベクターは、ウイルスベクターである。

20

30

【0336】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ワクシニアベクター、レンチウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、及びそれらの誘導体からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ベクターは、エピソーム発現ベクター、改良エピソームベクター（E E V）、P i g g y B a c トランスポサージベクター、または S l e e p i n g B e a u t y（S B）トランスポゾンシステムなどの非ウイルスベクターである。

40

【0337】

いくつかの実施形態では、本発明は、同種 T 細胞移植を受ける個体において、G v H D または移植片拒絶を誘導することなく疾患（例えば、がん、感染性疾患、自己免疫障害、または放射線宿酔）を処置する方法であって、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）をコードする第 1 の核酸を、同種 T

50

細胞に導入することを含み、N e f タンパク質が発現すると、同種T細胞の内在性TCRが下方調節される方法も提供する。いくつかの実施形態では、同種T細胞は、同種CAR-T細胞、TCR-T細胞（例えば、c TCR-T細胞）、TAC-T細胞、またはTAC様T細胞である。いくつかの実施形態では、本方法は、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメイン（例えば、工学操作されたTCR（例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR（c TCR））、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR（例えば、抗体ベースのCAR、リガンド／受容体ベースのCAR、またはACTR））を含む機能的な外因性受容体をコードする第2の核酸を、同種T細胞に導入することをさらに含む。いくつかの実施形態では、第2の核酸は、CARをコードする。

いくつかの実施形態では、CARは、（a）抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）を特異的に認識する1つ以上（例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数）の結合部分（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）膜貫通ドメイン、及び（c）細胞内シグナル伝達ドメインを含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、CARは、（a）1つ以上（例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数）の抗BCMA sdAbを含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）膜貫通ドメイン、及び（c）細胞内シグナル伝達ドメインを含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、第2の核酸は、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択のリンカー、（c）第1のTCRサブユニット（例えば、CD3ε）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、（d）第2のTCRサブユニット（例えば、CD3ε）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び（e）第3のTCRサブユニット（例えば、CD3ε）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む、c TCRをコードし、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットは全て、TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ、及びCD3δからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットは同じ（例えば、全てCD3ε）である。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットは異なっている。いくつかの実施形態では、第2の核酸は、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）TCRサブユニット（例えば、CD3ε）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、（e）第1のTCR共受容体（例えば、CD4）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、（f）第2のTCR共受容体（例えば、CD4）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び（g）第3のTCR共受容体（例えば、CD4）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含む、T細胞抗原結合体（TAC）をコードし、TCRサブユニットは、TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ、及びCD3δからなる群から選択され、第1、第2、及び第3のTCR共受容体は全て、CD4、CD8、及びCD28からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCR共受容体は同じである。いくつかの実施形態では、第1、第2、及び第3のTCR共受容体は異なっている。いくつかの実施形態では、第2の核酸は、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）TCRサブユニット（例えば、CD3ε）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、（e）CD4の細胞外ドメインまたはその一部分、（f）CD4の膜貫通ドメイン、及び（g）CD4の細胞内シグナル伝達ドメインを含む、T細胞抗原結合体（TAC）をコードし、TCRサブユニットは、TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ、及びCD3δからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、TACは、配列番号66のアミノ酸配列を含む抗CD

20 TACである。いくつかの実施形態では、第2の核酸は、(a)腫瘍抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片(例えば、sdAb、scFv)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)任意選択の第1のリンカー、(c)第1のTCRサブユニット(例えば、TCR α)の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、(d)任意選択の第2のリンカー、(e)第2のTCRサブユニット(例えば、CD3 ϵ)の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、(f)第3のTCRサブユニット(例えば、CD3 ϵ)の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び(g)第4のTCRサブユニット(例えば、CD3 ϵ)の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含む、TAC様キメラ受容体をコードし、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは全

10

20 TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じである。いくつかの実施形態では、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じである。いくつかの実施形態では、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは異なっている。いくつかの実施形態では、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じであるが、第1のTCRサブユニットとは異なっている。いくつかの実施形態では、第2の核酸は、(a)腫瘍抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片(例えば、sdAb、scFv)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)任意選択の第1のリンカー、(c)TCRサブユニット(例えば、TCR α)の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、(d)任意選択の第2のリンカー、及び(e)完全長CD3 ϵ (シグナルペプチドを除く)を含む、TAC様キメラ受容体をコードし、TCRサブユニットは、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体(例えば、工学操作されたTCR(例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR(cTCR))、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR(例えば、抗体ベースのCAR、リガンド/受容体ベースのCAR、またはACTR))は、単一特異性である。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体(例えば、工学操作されたTCR(例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR(cTCR))、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR(例えば、抗体ベースのCAR、リガンド/受容体ベースのCAR、またはACTR))は、多価である。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体(例えば、工学操作されたTCR(例えば、従来の工学操作されたTCR、キメラTCR(cTCR))、TAC、TAC様キメラ受容体、またはCAR(例えば、抗体ベースのCAR、リガンド/受容体ベースのCAR、またはACTR))は、多重特異性である。いくつかの実施形態では、第1の核酸と第2の核酸とは、別々のベクター上にある。いくつかの実施形態では、第1の核酸と第2の核酸とは、同じベクター上にある。したがって、いくつかの実施形態では、本発明は、同種T細胞移植を受ける個体において、GvHDまたは移植片拒絶を誘導することなく疾患(例えば、がん、感染性疾患、自己免疫障害、または放射線宿酔)を処置する方法であって、Nefタンパク質(例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef)をコードする第1の核酸と、CARをコードする第2の核酸とを含むベクターを、同種T細胞に導入することを含み、CARが、(a)抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)を特異的に認識する1つ以上(例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数)の結合部分(例えば、sdAb、scFv)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)膜貫通ドメイン、及び(c)細胞内シグナル伝達ドメインを含み、Nefタンパク質が発現すると、同種T細胞の内在性TCRが下方調節される方法も提供する。いくつかの実施形態では、同種T細胞移植を受ける個体において、GvHDまたは移植片拒絶を誘導することなく疾患(例えば、がん、感染性疾患、自己免疫障害、または放射線宿酔)を処置する方法であって、Nefタンパク質(例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef)をコードする第1の核酸と、キメラTCR(cTCR)をコードする第2の核酸とを含むベクターを、同種T

30

40

50

細胞に導入することを含み、キメラTCRが、(a)腫瘍抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片(例えば、sdAb、scFv)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)任意選択のリンカー、(c)第1のTCRサブユニット(例えば、CD3ε)の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、(d)第2のTCRサブユニット(例えば、CD3ε)の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び(e)第3のTCRサブユニット(例えば、CD3ε)の細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1、第2、及び第3のTCRサブユニットが全て、TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ、及びCD3δからなる群から選択され、Neftanパク質が発現すると、同種T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、同種T細胞移植を受ける個体において、GvHDまたは移植片拒絶を誘導することなく疾患(例えば、がん、感染性疾患、自己免疫障害、または放射線宿酔)を処置する方法であって、Neftanパク質(例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft)をコードする第1の核酸と、T細胞抗原結合体(TAC)をコードする第2の核酸とを含むベクターを、同種T細胞に導入することを含み、T細胞抗原結合体が、(a)腫瘍抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片(例えば、sdAb、scFv)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)任意選択の第1のリンカー、(c)TCRサブユニット(例えば、CD3ε)の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、(d)任意選択の第2のリンカー、(e)第1のTCR共受容体(例えば、CD4)の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、(f)第2のTCR共受容体(例えば、CD4)の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び(g)第3のTCR共受容体(例えば、CD4)の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、TCRサブユニットが、TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ、及びC

D3δからなる群から選択され、第1、第2、及び第3のTCR共受容体が全て、CD4、CD8、及びCD28からなる群から選択され、Neftanパク質が発現すると、同種T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、同種T細胞移植を受ける個体において、GvHDまたは移植片拒絶を誘導することなく疾患(例えば、がん、感染性疾患、自己免疫障害、または放射線宿酔)を処置する方法であって、Neftanパク質(例えば、wt Neft、または変異体SIV Neftなどの変異体Neft)をコードする第1の核酸と、TAC様キメラ受容体をコードする第2の核酸とを含むベクターを、同種T細胞に導入することを含み、TAC様キメラ受容体が、(a)腫瘍抗原(例えば、BCMA、CD19、CD20)の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片(例えば、sdAb、scFv)を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)任意選択の第1のリンカー、(c)第1のTCRサブユニット(例えば、TCRα)の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、(d)任意選択の第2のリンカー、(e)第2のTCRサブユニット(例えば、CD3ε)の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、(f)第3のTCRサブユニット(例えば、CD3ε)の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び(g)第4のTCRサブユニット(例えば、CD3ε)の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットが全て、TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ、及びCD3δからなる群から選択され、Neftanパク質が発現すると、同種T細胞の内在性TCRが下方調節される方法が提供される。いくつかの実施形態では、Neftanパク質は、配列番号12~22のいずれかのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Neftanパク質は、(i)aa2~4、aa8~10、aa11~13、aa38~40、aa44~46、aa47~49、aa50~52、aa53~55、aa56~58、aa59~61、aa62~64、aa65~67、aa98~100、aa107~109、aa110~112、

a a 1 3 7 ~ 1 3 9、a a 1 5 2 ~ 1 5 4、a a 1 6 4 ~ 1 6 6、a a 1 6 7 ~ 1 6 9、
 a a 1 7 0 ~ 1 7 2、a a 1 7 3 ~ 1 7 5、a a 1 7 6 ~ 1 7 8、a a 1 7 8 ~ 1 7 9、
 1 7 9 ~ 1 8 1 a a、a a 1 8 2 ~ 1 8 4、a a 1 8 5 ~ 1 8 7、a a 1 8 8 ~ 1 9 0、
 a a 1 9 1 ~ 1 9 3、a a 1 9 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a a 2 0 6 ~ 2 0 8、
 a a 2 1 2 ~ 2 1 4、a a 2 1 5 ~ 2 1 7、a a 2 1 8 ~ 2 2 0、a a 2 2 1 ~ 2 2 3、
 a a 8 ~ 1 3、a a 4 4 ~ 6 7、a a 1 0 7 ~ 1 1 2、a a 1 6 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3
 ~ 2 0 8、もしくは a a 2 1 2 ~ 2 2 3、(i i) a a 2 ~ 4、a a 4 4 ~ 4 6、a a 5
 6 ~ 5 8、a a 5 9 ~ 6 1、a a 6 2 ~ 6 4、a a 6 5 ~ 6 7、a a 9 8 ~ 1 0 0、a a
 1 0 7 ~ 1 0 9、a a 1 3 7 ~ 1 3 9、a a 1 5 2 ~ 1 5 4、a a 1 6 4 ~ 1 6 6、a a
 1 6 7 ~ 1 6 9、a a 1 7 6 ~ 1 7 8、a a 1 7 8 ~ 1 7 9、a a 1 7 9 ~ 1 8 1、a a 10
 1 8 5 ~ 1 8 7、a a 1 8 8 ~ 1 9 0、a a 1 9 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a a
 4 4 ~ 6 7、a a 1 6 4 ~ 1 6 9、a a 1 7 6 ~ 1 8 1、a a 1 8 5 ~ 1 9 0、(i i i
) a a 2 ~ 4、a a 5 6 ~ 5 8、a a 5 9 ~ 6 1、a a 6 2 ~ 6 4、a a 6 5 ~ 6 7、a
 a 1 0 7 ~ 1 0 9、a a 1 3 7 ~ 1 3 9、a a 1 5 2 ~ 1 5 4、a a 1 6 4 ~ 1 6 6、a
 a 1 6 7 ~ 1 6 9、a a 1 7 0 ~ 1 7 2、a a 1 7 3 ~ 1 7 5、a a 1 7 6 ~ 1 7 8、1
 7 8 ~ 1 7 9 a a、a a 1 7 9 ~ 1 8 1、a a 1 8 2 ~ 1 8 4、a a 1 8 5 ~ 1 8 7、a
 a 1 8 8 ~ 1 9 0、a a 1 9 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a a 5 6 ~ 6 7、もし
 くは a a 1 6 4 ~ 1 9 0、または (i v) a a 2 ~ 4、a a 5 6 ~ 5 8、a a 5 9 ~ 6 1、
 a a 6 2 ~ 6 4、a a 6 5 ~ 6 7、a a 1 0 7 ~ 1 0 9、a a 1 3 7 ~ 1 3 9、a a 1 5
 2 ~ 1 5 4、a a 1 6 4 ~ 1 6 6、a a 1 6 7 ~ 1 6 9、a a 1 7 6 ~ 1 7 8、a a 1 7
 8 ~ 1 7 9、a a 1 7 9 ~ 1 8 1、a a 1 8 5 ~ 1 8 7、a a 1 8 8 ~ 1 9 0、a a 1 9
 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a a 5 6 ~ 6 7、a a 1 6 4 ~ 1 6 9、a a 1 7 6 ~
 1 8 1、もしくは a a 1 8 5 ~ 1 9 0 のいずれかのアミノ酸残基（ここで、アミノ酸残基
 の位置は、野生型 S I V N e f のものに対応する）における 1 つ以上の変異を含む、変
 異体 S I V N e f である。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、変異
 体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、C D 4 及び／または C D 2 8 の細胞表面発現
 を下方制御しない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、w t N e f
 、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、C D 4 及び／または C D 2 8 の
 細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、w
 t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、T C R、C D 4、及
 び C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質
 （例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、T C R の細胞表面発現を下方
 制御するが、C D 4 及び／または C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御することはない。い
 くつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f などの変異体
 N e f）は、T C R 及び C D 4 の細胞表面発現を下方制御するが、C D 2 8 の細胞表面発
 現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、変
 異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、T C R 及び C D 2 8 の細胞表面発現を下方
 制御するが、C D 4 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では
 、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体
 N e f）は、内在性 T C R の細胞表面発現を下方制御するが、外因性受容体（例えば、工
 学操作された T C R（例えば、従来 of 工学操作された T C R、キメラ T C R（c T C R）
 ）、T A C、T A C 様キメラ受容体、または C A R（例えば、抗体ベースの C A R、リガ
 ンド／受容体ベースの C A R、または A C T R））を下方調節する（例えば、細胞表面発
 現を下方制御する）ことではない。いくつかの実施形態では、機能的な外因性受容体（例
 えば、工学操作された T C R（例えば、従来 of 工学操作された T C R、キメラ T C R（c T C
 R））、T A C、T A C 様キメラ受容体、または C A R（例えば、抗体ベースの C A R、
 リガンド／受容体ベースの C A R、または A C T R））は、N e f タンパク質（例えば、
 w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）により、最大で約 5 0
 %、約 4 0 %、約 3 0 %、約 2 0 %、約 1 0 %、または約 5 % 下方調節される（例えば、
 細胞表面発現が下方制御される）。

10

20

30

40

50

【0338】

いくつかの実施形態では、本発明は、同種CAR-T細胞のGvHDまたは移植片拒絶を低減させる方法であって、Ne fタンパク質（例えば、wt Ne f、または変異体S I V Ne fなどの変異体Ne f）をコードする核酸を、同種CAR-T細胞に導入することを含み、Ne fタンパク質が発現すると、同種CAR-T細胞の内在性TCRが下方調節される方法も提供する。いくつかの実施形態では、CARは、（a）抗原（例えば、BCMA、CD20、CD19）を特異的に認識する1つ以上（例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数）の結合部分（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）膜貫通ドメイン、及び（c）細胞内シグナル伝達ドメインを含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、CARは、（a）1つ以上（例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上のいずれかの数）の抗BCMA sdAbを含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）膜貫通ドメイン、及び（c）細胞内シグナル伝達ドメインを含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、CARは、単一特異性である。いくつかの実施形態では、CARは、多価である。いくつかの実施形態では、CARは、多重特異性である。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質は、配列番号12～22のいずれかのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質は、（i）aa2～4、aa8～10、aa11～13、aa38～40、aa44～46、aa47～49、aa50～52、aa53～55、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～100、aa107～109、aa110～112、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、aa178～179、179～181aa、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa191～193、aa194～196、aa203～205、aa206～208、aa212～214、aa215～217、aa218～220、aa221～223、aa8～13、aa44～67、aa107～112、aa164～196、aa203～208、もしくはaa212～223、（ii）aa2～4、aa44～46、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～100、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa44～67、aa164～169、aa176～181、aa185～190、（iii）aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、178～179aa、aa179～181、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、もしくはaa164～190、または（iv）aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、aa164～169、aa176～181、もしくはaa185～190のいずれかのアミノ酸残基（ここで、アミノ酸残基の位置は、野生型S I V Ne fのものに対応する）における1つ以上の変異を含む、変異体S I V Ne fである。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質（例えば、変異体S I V Ne fなどの変異体Ne f）は、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質（例えば、wt Ne f、または変異体S I V Ne fなどの変異体Ne f）は、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、Ne fタンパク質（例えば、wt Ne f、または変異体S I V Ne fなどの変異体Ne f）は、TCR、CD4、及びCD28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態で

は、N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、T C R の細胞表面発現を下方制御するが、C D 4 及び／または C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、T C R 及び C D 4 の細胞表面発現を下方制御するが、C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、T C R 及び C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御するが、C D 4 の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、内在性 T C R の細胞表面発現を下方制御するが、C A R を下方調節する（例えば、細胞表面発現を下方制御する）ことではない。いくつかの実施形態では、機能的 C A R は、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）により、最大で約 5 0 %、約 4 0 %、約 3 0 %、約 2 0 %、約 1 0 %、または約 5 % 下方調節される（例えば、細胞表面発現が下方制御される）。

【0339】

いくつかの実施形態では、本発明は、同種 c T C R-T 細胞の G v H D または移植片拒絶を低減させる方法であって、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）をコードする核酸を、同種 c T C R-T 細胞に導入することを含み、N e f タンパク質が発現すると、同種 c T C R-T 細胞の内在性 T C R が下方調節される方法も提供する。いくつかの実施形態では、c T C R は、（a）腫瘍抗原（例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0）の 1 つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、s d A b、s c F v）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択のリンカー、（c）第 1 の T C R サブユニット（例えば、C D 3 ε）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、（d）第 2 の T C R サブユニット（例えば、C D 3 ε）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び（e）第 3 の T C R サブユニット（例えば、C D 3 ε）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第 1、第 2、及び第 3 の T C R サブユニットは全て、T C R α、T C R β、T C R γ、T C R δ、C D 3 ε、C D 3 γ、及び C D 3 δ からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、第 1、第 2、及び第 3 の T C R サブユニットは同じ（例えば、全て C D 3 ε）である。いくつかの実施形態では、第 1、第 2、及び第 3 の T C R サブユニットは異なっている。いくつかの実施形態では、c T C R は、（a）腫瘍抗原（例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0）の 1 つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、s d A b、s c F v）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択のリンカー、及び（c）完全長 C D 3 ε（シグナルペプチドを除く）を含む。いくつかの実施形態では、c T C R は、単一特異性である。いくつかの実施形態では、c T C R は、多価である。いくつかの実施形態では、c T C R は、多重特異性である。いくつかの実施形態では、c T C R は、配列番号 6 4 のアミノ酸配列を含む抗 C D 2 0 c T C R である。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質は、配列番号 1 2 ~ 2 2 のいずれかのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質は、（i）a a 2 ~ 4、a a 8 ~ 1 0、a a 1 1 ~ 1 3、a a 3 8 ~ 4 0、a a 4 4 ~ 4 6、a a 4 7 ~ 4 9、a a 5 0 ~ 5 2、a a 5 3 ~ 5 5、a a 5 6 ~ 5 8、a a 5 9 ~ 6 1、a a 6 2 ~ 6 4、a a 6 5 ~ 6 7、a a 9 8 ~ 1 0 0、a a 1 0 7 ~ 1 0 9、a a 1 1 0 ~ 1 1 2、a a 1 3 7 ~ 1 3 9、a a 1 5 2 ~ 1 5 4、a a 1 6 4 ~ 1 6 6、a a 1 6 7 ~ 1 6 9、a a 1 7 0 ~ 1 7 2、a a 1 7 3 ~ 1 7 5、a a 1 7 6 ~ 1 7 8、a a 1 7 8 ~ 1 7 9、1 7 9 ~ 1 8 1 a a、a a 1 8 2 ~ 1 8 4、a a 1 8 5 ~ 1 8 7、a a 1 8 8 ~ 1 9 0、a a 1 9 1 ~ 1 9 3、a a 1 9 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a a 2 0 6 ~ 2 0 8、a a 2 1 2 ~ 2 1 4、a a 2 1 5 ~ 2 1 7、a a 2 1 8 ~ 2 2 0、a a 2 2 1 ~ 2 2 3、a a 8 ~ 1 3、a a 4 4 ~ 6 7、a a 1 0 7 ~ 1 1 2、a a 1 6 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 8、もしくは a a 2 1 2 ~ 2 2 3、（i i）a a 2 ~ 4、a a 4 4 ~ 4 6、a a 5 6 ~ 5 8、a a 5 9 ~ 6 1、a a 6 2 ~ 6 4、a a 6 5 ~ 6 7、a a 9 8 ~ 1 0 0、a a 1 0 7 ~ 1

09、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa44～67、aa164～169、aa176～181、aa185～190、(iii)aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、178～179aa、aa179～181、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、もしくはaa164～190、または(iv)aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、aa164～169、aa176～181、もしくはaa185～190のいずれかのアミノ酸残基（ここで、アミノ酸残基の位置は、野生型SIV Nefのものに対応する）における1つ以上の変異を含む、変異体SIV

Nefである。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCR、CD4、及びCD28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCRの細胞表面発現を下方制御するが、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCR及びCD4の細胞表面発現を下方制御するが、CD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、内在性TCRの細胞表面発現を下方制御するが、cTCRを下方調節する（例えば、細胞表面発現を下方制御する）ことではない。いくつかの実施形態では、機能的cTCRは、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）により、最大で約50%、約40%、約30%、約20%、約10%、または約5%下方調節される（例えば、細胞表面発現が下方制御される）。

【0340】

いくつかの実施形態では、本発明は、同種TAC-T細胞のGvHDまたは移植片拒絶を低減させる方法であって、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）をコードする核酸を、同種TAC-T細胞に導入することを含み、Nefタンパク質が発現すると、同種TAC-T細胞の内在性TCRが下方調節される方法も提供する。いくつかの実施形態では、TACは、(a)腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)任意選択の第1のリンカー、(c)TCRサブユニット（例えば、CD3ε）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、(d)任意選択の第2のリンカー、(e)第1のTCR共受容体（例えば、CD4）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、(f)第2のTCR共受容体（例えば、CD4）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び(g)第3のTCR共受容体（例えば、CD4）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、TCRサブユニットは、T

C R α 、T C R β 、T C R γ 、T C R δ 、C D 3 ϵ 、C D 3 γ 、及び C D 3 δ からなる群から選択され、第 1、第 2、及び第 3 の T C R 共受容体は全て、C D 4、C D 8、及び C D 2 8 からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、第 1、第 2、及び第 3 の T C R 共受容体は同じである。いくつかの実施形態では、第 1、第 2、及び第 3 の T C R 共受容体は異なっている。いくつかの実施形態では、T A C は、(a) 腫瘍抗原（例えば、B C M A、C D 1 9、C D 2 0）の 1 つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、s d A b、s c F v）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) 任意選択の第 1 のリンカー、(c) T C R サブユニット（例えば、C D 3 ϵ ）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外 T C R 結合ドメイン、(d) 任意選択の第 2 のリンカー、(e) C D 4 の細胞外ドメインまたはその一部分、(f) C D 4 の膜貫通ドメイン、及び (g) C D 4 の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、T C R サブユニットは、T C R α 、T C R β 、T C R γ 、T C R δ 、C D 3 ϵ 、C D 3 γ 、及び C D 3 δ からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、T A C は、配列番号 6 6 のアミノ酸配列を含む抗 C D 2 0 T A C である。いくつかの実施形態では、T A C は、単一特異性である。いくつかの実施形態では、T A C は、多価である。いくつかの実施形態では、T A C は、多重特異性である。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質は、配列番号 1 2 ~ 2 2 のいずれかのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質は、(i) a a 2 ~ 4、a a 8 ~ 1 0、a a 1 1 ~ 1 3、a a 3 8 ~ 4 0、a a 4 4 ~ 4 6、a a 4 7 ~ 4 9、a a 5 0 ~ 5 2、a a 5 3 ~ 5 5、a a 5 6 ~ 5 8、a a 5 9 ~ 6 1、a a 6 2 ~ 6 4、a a 6 5 ~ 6 7、a a 9 8 ~ 1 0 0、a a 1 0 7 ~ 1 0 9、a a 1 1 0 ~ 1 1 2、a a 1 3 7 ~ 1 3 9、a a 1 5 2 ~ 1 5 4、a a 1 6 4 ~ 1 6 6、a a 1 6 7 ~ 1 6 9、a a 1 7 0 ~ 1 7 2、a a 1 7 3 ~ 1 7 5、a a 1 7 6 ~ 1 7 8、a a 1 7 8 ~ 1 7 9、1 7 9 ~ 1 8 1 a a、a a 1 8 2 ~ 1 8 4、a a 1 8 5 ~ 1 8 7、a a 1 8 8 ~ 1 9 0、a a 1 9 1 ~ 1 9 3、a a 1 9 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a a 2 0 6 ~ 2 0 8、a a 2 1 2 ~ 2 1 4、a a 2 1 5 ~ 2 1 7、a a 2 1 8 ~ 2 2 0、a a 2 2 1 ~ 2 2 3、a a 8 ~ 1 3、a a 4 4 ~ 6 7、a a 1 0 7 ~ 1 1 2、a a 1 6 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 8、もしくは a a 2 1 2 ~ 2 2 3、(i i) a a 2 ~ 4、a a 4 4 ~ 4 6、a a 5 6 ~ 5 8、a a 5 9 ~ 6 1、a a 6 2 ~ 6 4、a a 6 5 ~ 6 7、a a 9 8 ~ 1 0 0、a a 1 0 7 ~ 1 0 9、a a 1 3 7 ~ 1 3 9、a a 1 5 2 ~ 1 5 4、a a 1 6 4 ~ 1 6 6、a a 1 6 7 ~ 1 6 9、a a 1 7 6 ~ 1 7 8、a a 1 7 8 ~ 1 7 9、a a 1 7 9 ~ 1 8 1、a a 1 8 5 ~ 1 8 7、a a 1 8 8 ~ 1 9 0、a a 1 9 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a a 4 4 ~ 6 7、a a 1 6 4 ~ 1 6 9、a a 1 7 6 ~ 1 8 1、a a 1 8 5 ~ 1 9 0、(i i i) a a 2 ~ 4、a a 5 6 ~ 5 8、a a 5 9 ~ 6 1、a a 6 2 ~ 6 4、a a 6 5 ~ 6 7、a a 1 0 7 ~ 1 0 9、a a 1 3 7 ~ 1 3 9、a a 1 5 2 ~ 1 5 4、a a 1 6 4 ~ 1 6 6、a a 1 6 7 ~ 1 6 9、a a 1 7 0 ~ 1 7 2、a a 1 7 3 ~ 1 7 5、a a 1 7 6 ~ 1 7 8、1 7 8 ~ 1 7 9 a a、a a 1 7 9 ~ 1 8 1、a a 1 8 2 ~ 1 8 4、a a 1 8 5 ~ 1 8 7、a a 1 8 8 ~ 1 9 0、a a 1 9 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a a 5 6 ~ 6 7、もしくは a a 1 6 4 ~ 1 9 0、または (i v) a a 2 ~ 4、a a 5 6 ~ 5 8、a a 5 9 ~ 6 1、a a 6 2 ~ 6 4、a a 6 5 ~ 6 7、a a 1 0 7 ~ 1 0 9、a a 1 3 7 ~ 1 3 9、a a 1 5 2 ~ 1 5 4、a a 1 6 4 ~ 1 6 6、a a 1 6 7 ~ 1 6 9、a a 1 7 6 ~ 1 7 8、a a 1 7 8 ~ 1 7 9、a a 1 7 9 ~ 1 8 1、a a 1 8 5 ~ 1 8 7、a a 1 8 8 ~ 1 9 0、a a 1 9 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a a 5 6 ~ 6 7、a a 1 6 4 ~ 1 6 9、a a 1 7 6 ~ 1 8 1、もしくは a a 1 8 5 ~ 1 9 0 のいずれかのアミノ酸残基（ここで、アミノ酸残基の位置は、野生型 S I V N e f のものに対応する）における 1 つ以上の変異を含む、変異体 S I V N e f である。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、C D 4 及び／または C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、C D 4 及び／または C D 2 8 の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、N e f タンパク質（例えば、w t N e f、または変異体 S I V N e f などの変異体 N e f）は、T C R、C D 4、及び C D

28の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCRの細胞表面発現を下方制御するが、CD4及び／またはCD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCR及びCD4の細胞表面発現を下方制御するが、CD28の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、TCR及びCD28の細胞表面発現を下方制御するが、CD4の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）は、内在性TCRの細胞表面発現を下方制御するが、TACを下方調節する（例えば、細胞表面発現を下方制御する）ことではない。いくつかの実施形態では、機能的TACは、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）により、最大で約50%、約40%、約30%、約20%、約10%、または約5%下方調節される（例えば、細胞表面発現が下方制御される）。

【0341】

いくつかの実施形態では、本発明は、同種TAC様T細胞のGvHDまたは移植片拒絶を低減させる方法であって、Nefタンパク質（例えば、wt Nef、または変異体SIV Nefなどの変異体Nef）をコードする核酸を、同種TAC様T細胞に導入することを含み、Nefタンパク質が発現すると、同種TAC様T細胞の内在性TCRが下方調節される方法も提供する。いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受容体は、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）第1のTCRサブユニット（例えば、TCR α ）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、（e）第2のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、（f）第3のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び（g）第4のTCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは全て、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じである。いくつかの実施形態では、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じである。いくつかの実施形態では、第1、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは異なっている。いくつかの実施形態では、第2、第3、及び第4のTCRサブユニットは同じであるが、第1のTCRサブユニットとは異なっている。いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受容体は、（a）腫瘍抗原（例えば、BCMA、CD19、CD20）の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片（例えば、sdAb、scFv）を含む細胞外リガンド結合ドメイン、（b）任意選択の第1のリンカー、（c）TCRサブユニット（例えば、TCR α ）の細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、（d）任意選択の第2のリンカー、及び（e）完全長CD3 ϵ （シグナルペプチドを除く）を含み、TCRサブユニットは、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受容体は、単一特異性である。いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受容体は、多価である。いくつかの実施形態では、TAC様キメラ受容体は、多重特異性である。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質は、配列番号12～22のいずれかのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Nefタンパク質は、（i）aa2～4、aa8～10、aa11～13、aa38～40、aa44～46、aa47～49、aa50～52、aa53～55、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～100、aa107～109、aa110～112、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169

10

20

30

40

50

、a a 1 7 0 ~ 1 7 2、a a 1 7 3 ~ 1 7 5、a a 1 7 6 ~ 1 7 8、a a 1 7 8 ~ 1 7 9
 、1 7 9 ~ 1 8 1 a a、a a 1 8 2 ~ 1 8 4、a a 1 8 5 ~ 1 8 7、a a 1 8 8 ~ 1 9 0
 、a a 1 9 1 ~ 1 9 3、a a 1 9 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a a 2 0 6 ~ 2 0 8
 、a a 2 1 2 ~ 2 1 4、a a 2 1 5 ~ 2 1 7、a a 2 1 8 ~ 2 2 0、a a 2 2 1 ~ 2 2 3
 、a a 8 ~ 1 3、a a 4 4 ~ 6 7、a a 1 0 7 ~ 1 1 2、a a 1 6 4 ~ 1 9 6、a a 2 0
 3 ~ 2 0 8、もしくはa a 2 1 2 ~ 2 2 3、(i i) a a 2 ~ 4、a a 4 4 ~ 4 6、a a
 5 6 ~ 5 8、a a 5 9 ~ 6 1、a a 6 2 ~ 6 4、a a 6 5 ~ 6 7、a a 9 8 ~ 1 0 0、a
 a 1 0 7 ~ 1 0 9、a a 1 3 7 ~ 1 3 9、a a 1 5 2 ~ 1 5 4、a a 1 6 4 ~ 1 6 6、a
 a 1 6 7 ~ 1 6 9、a a 1 7 6 ~ 1 7 8、a a 1 7 8 ~ 1 7 9、a a 1 7 9 ~ 1 8 1、a
 a 1 8 5 ~ 1 8 7、a a 1 8 8 ~ 1 9 0、a a 1 9 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a
 a 4 4 ~ 6 7、a a 1 6 4 ~ 1 6 9、a a 1 7 6 ~ 1 8 1、a a 1 8 5 ~ 1 9 0、(i i
 i) a a 2 ~ 4、a a 5 6 ~ 5 8、a a 5 9 ~ 6 1、a a 6 2 ~ 6 4、a a 6 5 ~ 6 7、
 a a 1 0 7 ~ 1 0 9、a a 1 3 7 ~ 1 3 9、a a 1 5 2 ~ 1 5 4、a a 1 6 4 ~ 1 6 6、
 a a 1 6 7 ~ 1 6 9、a a 1 7 0 ~ 1 7 2、a a 1 7 3 ~ 1 7 5、a a 1 7 6 ~ 1 7 8、
 1 7 8 ~ 1 7 9 a a、a a 1 7 9 ~ 1 8 1、a a 1 8 2 ~ 1 8 4、a a 1 8 5 ~ 1 8 7、
 a a 1 8 8 ~ 1 9 0、a a 1 9 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a a 5 6 ~ 6 7、もし
 くはa a 1 6 4 ~ 1 9 0、または(i v) a a 2 ~ 4、a a 5 6 ~ 5 8、a a 5 9 ~ 6 1
 、a a 6 2 ~ 6 4、a a 6 5 ~ 6 7、a a 1 0 7 ~ 1 0 9、a a 1 3 7 ~ 1 3 9、a a 1
 5 2 ~ 1 5 4、a a 1 6 4 ~ 1 6 6、a a 1 6 7 ~ 1 6 9、a a 1 7 6 ~ 1 7 8、a a 1
 7 8 ~ 1 7 9、a a 1 7 9 ~ 1 8 1、a a 1 8 5 ~ 1 8 7、a a 1 8 8 ~ 1 9 0、a a 1
 9 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a a 5 6 ~ 6 7、a a 1 6 4 ~ 1 6 9、a a 1 7 6
 ~ 1 8 1、もしくはa a 1 8 5 ~ 1 9 0のいずれかのアミノ酸残基（ここで、アミノ酸残
 基の位置は、野生型S I V N e fのものに対応する）における1つ以上の変異を含む、
 変異体S I V N e fである。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質（例えば、変
 異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、C D 4及び／またはC D 2 8の細胞表面発
 現を下方制御しない。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質（例えば、w t N e
 f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、C D 4及び／またはC D 2 8
 の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質（例えば、
 w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、T C R、C D 4、
 及びC D 2 8の細胞表面発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、N e fタンパク
 質（例えば、変異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、T C Rの細胞表面発現を下
 方制御するが、C D 4及び／またはC D 2 8の細胞表面発現を下方制御することはない。
 いくつかの実施形態では、N e fタンパク質（例えば、変異体S I V N e fなどの変異
 体N e f）は、T C R及びC D 4の細胞表面発現を下方制御するが、C D 2 8の細胞表面
 発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態では、N e fタンパク質（例えば、
 変異体S I V N e fなどの変異体N e f）は、T C R及びC D 2 8の細胞表面発現を下
 方制御するが、C D 4の細胞表面発現を下方制御することはない。いくつかの実施形態で
 は、N e fタンパク質（例えば、w t N e f、または変異体S I V N e fなどの変異
 体N e f）は、内在性T C Rの細胞表面発現を下方制御するが、T A C様キメラ受容体を
 下方調節する（例えば、細胞表面発現を下方制御する）ことではない。いくつかの実施形態
 では、機能的T A C様キメラ受容体は、N e fタンパク質（例えば、w t N e f、また
 は変異体S I V N e fなどの変異体N e f）により、最大で約5 0 %、約4 0 %、約3
 0 %、約2 0 %、約1 0 %、または約5 %下方調節される（例えば、細胞表面発現が下方
 制御される）。

10

20

30

40

50

【0 3 4 2】

V I I I . キット及び製品

さらに、本明細書に記載されるN e fタンパク質（例えば、w t N e f、または変異
 体S I V N e fなどの変異体N e f）及び／または機能的な外因性受容体（例えば、工学
 操作されたT C R（例えば、従来の工学操作されたT C R、キメラT C R（c T C R））
 、T A C、T A C様キメラ受容体、またはC A R（例えば、抗体ベースのC A R、リガン

ド／受容体ベースのCAR、またはACTR))を発現する修飾T細胞(例えば、同種T細胞、内在性TCR欠損T細胞、GVHD最小化T細胞)のいずれか1つを含む、キット、単位剤形、及び製品が提供される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される医薬組成物のいずれか1つを含み、好ましくはその使用に関する説明を提供する、キットが提供される。

【0343】

本願のキットは、好適なパッケージングに入っている。好適なパッケージングとしては、バイアル、ボトル、瓶、可撓性パッケージング(例えば、密封マイラーまたはプラスチック袋)などが挙げられるが、これらに限定されない。キットは、任意選択で、バッファー及び解説情報などの追加の構成要素を提供してもよい。したがって、本願は、バイアル(密封バイアルなど)、ボトル、瓶、可撓性パッケージングなどを含む製品も提供する。

10

【0344】

製品は、容器、及び容器に貼付または関連したラベルまたは添付文書を含み得る。好適な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、シリンジなどが挙げられる。容器は、ガラスまたはプラスチックなど、様々な材料から形成されていてもよい。概して、容器は、本明細書に記載される疾患もしくは障害(例えば、がん、自己免疫疾患、または感染性疾患)の処置、または疾患もしくは障害の処置におけるGVHDもしくは移植片拒絶の低減／防止に有効な組成物を保持し、かつ、無菌アクセスポートを有し得る(例えば、容器は、皮下注射針によって穿刺可能なストッパーを有する静注液バッグまたはバイアルであってもよい)。ラベルまたは添付文書は、組成物が個体の特定の状態を処置するために使用されることを示す。ラベルまたは添付文書は、組成物の個体への投与に関する説明をさらに含む。ラベルは、再構成及び／または使用に関する指示を示し得る。医薬組成物を保持する容器は、再構成した製剤の反復投与(例えば、2～6回の投与)を可能にする複数回使用バイアルであってもよい。添付文書とは、治療薬の商業用パッケージに通常含まれる説明書を意味し、かかる治療薬の適応症、使用法、投与量、投与、禁忌に関する情報及び／またはその使用に関する警告を含む。さらに、製品は、注射用静菌水(BWFI)、リン酸緩衝食塩水、リンゲル液、及びデキストロース溶液などの薬学的に許容されるバッファーを含む第2の容器をさらに含んでもよい。さらに、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、及びシリンジなど、商業的観点及び使用者の観点から望ましい他の材料を含んでもよい。キットまたは製品は、薬局、例えば病院薬局及び調剤薬局での保管及び使用に十分な量でパッケージングされた、医薬組成物の複数の単位用量、及び使用説明書を含んでもよい。

20

30

例示的な実施形態

実施形態1。

Nefタンパク質をコードする第1の核酸を、前駆体T細胞に導入することを含む、修飾T細胞を生成する方法であって、前記Nefタンパク質が発現すると、前記修飾T細胞の内在性T細胞受容体(TCR)が下方調節される前記方法。

実施形態2。

前記下方調節が、前記内在性TCRの細胞表面発現を下方制御することを含む、実施形態1に記載の方法。

40

実施形態3。

前記内在性TCRの細胞表面発現が、少なくとも約50%下方制御される、実施形態2に記載の方法。

実施形態4。

前記内在性TCRの細胞表面発現が、少なくとも約60%下方制御される、実施形態2または3に記載の方法。

実施形態5。

前記内在性TCRの細胞表面発現が、少なくとも約70%下方制御される、実施形態2～4のいずれか1つに記載の方法。

実施形態6。

50

前記内在性TCRの細胞表面発現が、少なくとも約80%下方制御される、実施形態2～5のいずれか1つに記載の方法。

実施形態7。

前記内在性TCRの細胞表面発現が、少なくとも約90%下方制御される、実施形態2～6のいずれか1つに記載の方法。

実施形態8。

前記内在性TCRの細胞表面発現が、少なくとも約95%下方制御される、実施形態2～7のいずれか1つに記載の方法。

実施形態9。

前記修飾T細胞が、未修飾の内在性TCR座位を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の方法。 10

実施形態10。

前記修飾T細胞が、修飾された内在性TCR座位を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の方法。

実施形態11。

前記修飾T細胞が、修飾された内在性TCR α 座位を含む、実施形態10に記載の方法。

実施形態12。

前記内在性TCR座位が、CRISPR-Cas（クリスパー（CRISPR）-CRISPR関連（Cas））システムによって修飾される、実施形態10または11に記載の方法。 20

実施形態13。

前記CRISPR-Casシステムが、配列番号23の核酸配列を含むガイドRNA（gRNA）を含む、実施形態12に記載の方法。

実施形態14。

前記Nefタンパク質が、SIV Nef、HIV1 Nef、及びHIV2 Nefからなる群から選択される、実施形態1～13のいずれか1つに記載の方法。

実施形態15。

前記Nefタンパク質が、野生型Nefである、実施形態1～14のいずれか1つに記載の方法。 30

実施形態16。

前記野生型Nefが、配列番号12～17のいずれか1つのアミノ酸配列を含む、実施形態15に記載の方法。

実施形態17。

前記Nefタンパク質が、変異体Nefである、実施形態1～14のいずれか1つに記載の方法。

実施形態18。

前記変異体Nefが、ミリスチル化部位、N末端 α ヘリックス、チロシンベースのAP動員、CD4結合部位、酸性クラスター、プロリンベースのリピート、PAK結合ドメイン、COP I動員ドメイン、ジロイシンベースのAP動員ドメイン、V-ATPase及びRaf-1結合ドメイン、もしくはそれらの任意の組み合わせにおける1つ以上の変異、または表11に示されるアミノ酸残基のいずれかにおける1つ以上の変異を含む、実施形態17に記載の方法。 40

実施形態19。

前記変異が、挿入、欠失、点変異（複数可）、及び／または転位を含む、実施形態17または18に記載の方法。

実施形態20。

前記変異体Nefが、

(i) 配列番号18～22のいずれか1つのアミノ酸配列、

(ii) aa2～4、aa8～10、aa11～13、aa38～40、aa44～4 50

6、aa47～49、aa50～52、aa53～55、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～100、aa107～109、aa110～112、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、aa178～179、179～181aa、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa191～193、aa194～196、aa203～205、aa206～208、aa212～214、aa215～217、aa218～220、aa221～223、aa8～13、aa44～67、aa107～112、aa164～196、aa203～208、もしくはaa212～223のいずれかのアミノ酸残基（ここで、前記アミノ酸残基の位置は、野生型SIV Nefのものに対応する）における1つ以上の変異、

10

(iii) aa2～4、aa44～46、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～100、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa44～67、aa164～169、aa176～181、aa185～190のいずれかのアミノ酸残基（ここで、前記アミノ酸残基の位置は、野生型SIV Nefのものに対応する）における1つ以上の変異、

(iv) aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、178～179aa、aa179～181、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、もしくはaa164～190のいずれかのアミノ酸残基（ここで、前記アミノ酸残基の位置は、野生型SIV Nefのものに対応する）における1つ以上の変異、または

20

(v) aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、aa164～169、aa176～181、もしくはaa185～190のいずれかのアミノ酸残基（ここで、前記アミノ酸残基の位置は、野生型SIV Nefのものに対応する）における1つ以上の変異を含む、実施形態17～19のいずれか1つに記載の方法。

30

実施形態21。

前記前駆体T細胞が、細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体をコードする第2の核酸を含む、実施形態1～20のいずれか1つに記載の方法。

実施形態22。

細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的な外因性受容体をコードする第2の核酸を、前記前駆体T細胞に導入することをさらに含む、実施形態1～20のいずれか1つに記載の方法。

40

実施形態23。

前記第1の核酸と前記第2の核酸とが、前記T細胞に連続的に導入される、実施形態22に記載の方法。

実施形態24。

前記第1の核酸と前記第2の核酸とが、前記T細胞に同時に導入される、実施形態22に記載の方法。

実施形態25。

前記第1の核酸と前記第2の核酸とが、別々のベクター上にある、実施形態24に記載の方法。

50

実施形態 26。

前記第1の核酸と前記第2の核酸とが、同じベクター上にある、実施形態24に記載の方法。

実施形態 27。

前記第1の核酸と前記第2の核酸とが、同じプロモーターに作動可能に連結している、実施形態26に記載の方法。

実施形態 28。

前記第1の核酸が、前記第2の核酸の上流にある、実施形態27に記載の方法。

実施形態 29。

前記第1の核酸が、前記第2の核酸の下流にある、実施形態27に記載の方法。

10

実施形態 30。

前記第1の核酸と前記第2の核酸とが、連結配列を介して結合している、実施形態26～29のいずれか1つに記載の方法。

実施形態 31。

前記連結配列が、P2A、T2A、E2A、F2A、BmCPV 2A、BmIFV 2A、(GS)_n、(GSGGS)_n、(GGGS)_n、(GGGGGS)_nをコードする核酸配列、またはIRES、SV40、CMV、UBC、EF1α、PGK、CAGGの核酸配列、またはそれらの任意の組み合わせ(式中、nは、少なくとも1の整数である)のいずれかである、実施形態30に記載の方法。

実施形態 32。

20

前記ベクターが、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターである、実施形態25～31のいずれか1つに記載の方法。

実施形態 33。

前記修飾T細胞が、組織不適合性の個体において、移植片対宿主病(GvHD)応答を誘発しないか、または前記前駆体T細胞のドナーから単離された初代T細胞によって誘発されるGvHD応答と比較して低減したGvHD応答を誘発する、実施形態1～32のいずれか1つに記載の方法。

実施形態 34。

前記第1の核酸及び／または前記第2の核酸を含むT細胞を単離または濃縮することをさらに含む、実施形態1～33のいずれか1つに記載の方法。

30

実施形態 35。

前記Nefタンパク質を発現する前記修飾T細胞から、CD3ε陰性T細胞を単離または濃縮することをさらに含む、実施形態1～34のいずれか1つに記載の方法。

実施形態 36。

前記Nefタンパク質を発現する前記修飾T細胞から、内在性TCRα陰性T細胞を単離または濃縮することをさらに含む、実施形態1～35のいずれか1つに記載の方法。

実施形態 37。

前記Nefタンパク質を発現する前記修飾T細胞を、少なくとも1つの薬学的に許容される担体と配合することをさらに含む、実施形態1～36のいずれか1つに記載の方法。

実施形態 38。

40

前記Nefタンパク質を発現する有効量の前記修飾T細胞を個体に投与することをさらに含む、実施形態1～37のいずれか1つに記載の方法。

実施形態 39。

前記個体が、がんを有する、実施形態38に記載の方法。

実施形態 40。

前記個体が、ヒトである、実施形態38または39に記載の方法。

実施形態 41。

前記機能的な外因性受容体が、工学操作されたTCRである、実施形態21～40のいずれか1つに記載の方法。

実施形態 42。

50

前記工学操作された T C R が、

(a) 腫瘍抗原の 1 つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片を含む細胞外リガンド結合ドメイン、

(b) 任意選択のリンカー、

(c) 第 1 の T C R サブユニットの任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、

(d) 第 2 の T C R サブユニットの膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び

(e) 第 3 の T C R サブユニットの細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメイン

を含む、キメラ T C R (c T C R) であり、

前記第 1、前記第 2、及び前記第 3 の T C R サブユニットが全て、T C R α 、T C R β 、T C R γ 、T C R δ 、C D 3 ϵ 、C D 3 γ 、及び C D 3 δ からなる群から選択される、実施形態 4 1 に記載の方法。 10

実施形態 4 3。

前記第 1、前記第 2、及び前記第 3 の T C R サブユニットが同じである、実施形態 4 2 に記載の方法。

実施形態 4 4。

前記第 1、前記第 2、及び前記第 3 の T C R サブユニットが異なっている、実施形態 4 2 に記載の方法。

実施形態 4 5。

前記機能的外因性受容体が、 20

(a) 腫瘍抗原の 1 つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片を含む細胞外リガンド結合ドメイン、

(b) 任意選択の第 1 のリンカー、

(c) T C R サブユニットの細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外 T C R 結合ドメイン、

(d) 任意選択の第 2 のリンカー、

(e) 第 1 の T C R 共受容体の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、

(f) 第 2 の T C R 共受容体の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び

(g) 第 3 の T C R 共受容体の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメイン 30

を含む、T 細胞抗原結合体 (T A C) であり、

前記 T C R サブユニットが、T C R α 、T C R β 、T C R γ 、T C R δ 、C D 3 ϵ 、C D 3 γ 、及び C D 3 δ からなる群から選択され、

前記第 1、前記第 2、及び前記第 3 の T C R 共受容体が、C D 4、C D 8、及び C D 2 8 からなる群から選択される、実施形態 2 1 ~ 4 0 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 4 6。

前記第 1、前記第 2、及び前記第 3 の T C R 共受容体が同じである、実施形態 4 5 に記載の方法。

実施形態 4 7。

前記第 1、前記第 2、及び前記第 3 の T C R 共受容体が異なっている、実施形態 4 5 に記載の方法。 40

実施形態 4 8。

前記機能的外因性受容体が、

(a) 腫瘍抗原の 1 つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片を含む細胞外リガンド結合ドメイン、

(b) 任意選択の第 1 のリンカー、

(c) 第 1 の T C R サブユニットの細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外 T C R 結合ドメイン、

(d) 任意選択の第 2 のリンカー、

(e) 第 2 の T C R サブユニットの任意選択の細胞外ドメイン、またはその一部分、 50

(f) 第3のTCRサブユニットの膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び

(g) 第4のTCRサブユニットの細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメイン

を含む、T細胞抗原結合体(TAC)様キメラ受容体であり、

前記第1、前記第2、前記第3、及び前記第4のTCRサブユニットが全て、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される、実施形態21～40のいずれか1つに記載の方法。

実施形態49。

少なくとも前記第2、前記第3、及び前記第4のTCRサブユニットが同じである、実施形態48に記載の方法。

10

実施形態50。

前記第1、前記第2、前記第3、及び前記第4のTCRサブユニットが異なっている、実施形態48に記載の方法。

実施形態51。

前記機能的な外因性受容体が、非TCR受容体である、実施形態21～40のいずれか1つに記載の方法。

実施形態52。

前記非TCR受容体が、キメラ抗原受容体(CAR)である、実施形態51に記載の方法。

実施形態53。

20

前記CARが、

(a) 腫瘍抗原の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片を含む細胞外リガンド結合ドメイン、

(b) 膜貫通ドメイン、及び

(c) 細胞内シグナル伝達ドメイン

を含むポリペプチドを含む、実施形態52に記載の方法。

実施形態54。

前記CARが、

(a) Fc受容体である抗原結合性断片を含む細胞外リガンド結合ドメイン、

(b) 膜貫通ドメイン、及び

(c) 細胞内シグナル伝達ドメイン

を含む、抗体結合TCR(ACTR)である、実施形態52に記載の方法。

30

実施形態55。

前記抗原結合性断片が、ラクダIg、IgNAR、Fab断片、Fab'断片、F(ab)'₂断片、F(ab)'₃断片、Fv、一本鎖Fv抗体(scFv)、bis-scFv、(scFv)₂、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ジスルフィド安定化Fvタンパク質(dsFv)、及び単一ドメイン抗体(sdAb、ナノボディ)からなる群から選択される、実施形態42～53のいずれか1つに記載の方法。

実施形態56。

前記抗原結合性断片が、sdAbまたはscFvである、実施形態55に記載の方法。

40

実施形態57。

前記細胞外リガンド結合ドメインが、一価である、実施形態42～56のいずれか1つに記載の方法。

実施形態58。

前記細胞外リガンド結合ドメインが、多価である、実施形態42～57のいずれか1つに記載の方法。

実施形態59。

前記細胞外リガンド結合ドメインが、多重特異性である、実施形態58に記載の方法。

実施形態60。

前記細胞外リガンド結合ドメインが、第1のsdAb及び第2のsdAbを含む、実施

50

形態 4 2 ～ 5 3、5 5、5 6、5 8、及び 5 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 6 1。

前記細胞外リガンド結合ドメインが、第 1 の s c F v 及び第 2 の s c F v を含む、実施形態 4 2 ～ 5 3、5 5、5 6、5 8、及び 5 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 6 2。

前記腫瘍抗原が、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 2、C D 3 0、C D 3 3、C D 3 8、B C M A、C S 1、C D 1 3 8、C D 1 2 3 / I L 3 R α、c - M e t、g p 1 0 0、M U C 1、I G F - I 受容体、E p C A M、E G F R / E G F R v I I I、H E R 2、I G F 1 R、メソテリン、P S M A、W T 1、R O R 1、C E A、G D - 2、N Y - E S O - 1、M A G E A 3、G P C 3、糖脂質 F 7 7、P D - L 1、P D - L 2、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、実施形態 4 2 ～ 5 3 及び 5 5 ～ 6 1 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

実施形態 6 3。

前記腫瘍抗原が、B C M A、C D 1 9、または C D 2 0 である、実施形態 6 2 に記載の方法。

実施形態 6 4。

前記細胞外リガンド結合ドメインが、B C M A、C D 1 9、または C D 2 0 の 1 つ以上のエピトープを特異的に認識する 1 つ以上の s d A b または s c F v を含む、実施形態 6 3 に記載の方法。

実施形態 6 5。

前記膜貫通ドメインが、T 細胞受容体の α、β、または ζ 鎖、C D 3 ζ、C D 3 ε、C D 4、C D 5、C D 8 α、C D 9、C D 1 6、C D 2 2、C D 2 7、C D 2 8、C D 3 3、C D 3 7、C D 4 5、C D 6 4、C D 8 0、C D 8 6、C D 1 3 4、C D 1 3 7 (4 - 1 B B)、C D 1 5 2、C D 1 5 4、及び P D - 1 からなる群から選択される分子に由来する、実施形態 5 3 ～ 6 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

20

実施形態 6 6。

前記膜貫通ドメインが、C D 8 α に由来する、実施形態 6 5 に記載の方法。

実施形態 6 7。

前記細胞内シグナル伝達ドメインが、免疫エフェクター細胞の一次細胞内シグナル伝達ドメインを含む、実施形態 4 2 ～ 6 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

30

実施形態 6 8。

前記一次細胞内シグナル伝達ドメインが、C D 3 ζ、C D 3 γ、C D 3 ε、C D 3 δ、F c R γ (F C E R 1 G)、F c R β (F c イブシロン R I b)、C D 5、C D 2 2、C D 7 9 a、C D 7 9 b、C D 6 6 d、F c ガンマ R I I a、D A P 1 0、及び D A P 1 2 に由来する、実施形態 6 7 に記載の方法。

実施形態 6 9。

前記一次細胞内シグナル伝達ドメインが、C D 3 ζ、C D 3 γ、または D A P 1 2 に由来する、実施形態 6 8 に記載の方法。

実施形態 7 0。

前記細胞内シグナル伝達ドメインが、共刺激シグナル伝達ドメインを含む、実施形態 5 3 ～ 6 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

40

実施形態 7 1。

前記共刺激シグナル伝達ドメインが、C A R D 1 1、C D 2 (L F A - 2)、C D 7、C D 2 7、C D 2 8、C D 3 0、C D 4 0、C D 5 4 (I C A M - 1)、C D 1 3 4 (O X 4 0)、C D 1 3 7 (4 - 1 B B)、C D 1 6 2 (S E L P L G)、C D 2 5 8 (L I G H T)、C D 2 7 0 (H V E M、L I G H T R)、C D 2 7 6 (B 7 - H 3)、C D 2 7 8 (I C O S)、C D 2 7 9 (P D - 1)、C D 3 1 9 (S L A M F 7)、L F A - 1 (リンパ球機能関連抗原 1)、N K G 2 C、C D S、G I T R、B A F F R、N K p 8 0 (K L R F 1)、C D 1 6 0、C D 1 9、C D 4、I P O - 3、B L A M E (S L A M F 8)、L T B R、L A T、G A D S、S L P - 7 6、P A G / C b p、N K p 4 4、N K

50

p 3 0、NK p 4 6、NKG 2 D、CD 8 3、CD 1 5 0 (S L A M F 1)、CD 1 5 2 (C T L A - 4)、CD 2 2 3 (L A G 3)、CD 2 7 3 (P D - L 2)、CD 2 7 4 (P D - L 1)、D A P 1 0、T R I M、Z A P 7 0、CD 8 3 に特異的に結合するリガンド、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される共刺激分子に由来する、実施形態 7 0 に記載の方法。

実施形態 7 2。

前記共刺激シグナル伝達ドメインが、CD 1 3 7 (4 - 1 B B) の細胞質ドメインを含む、実施形態 7 1 に記載の方法。

実施形態 7 3。

前記細胞外リガンド結合ドメインの C 末端と前記膜貫通ドメインの N 末端との間に位置するヒンジドメインをさらに含む、実施形態 4 2 ~ 7 2 のいずれか 1 つに記載の方法。 10

実施形態 7 4。

前記ヒンジドメインが、CD 8 α に由来する、実施形態 7 3 に記載の方法。

実施形態 7 5。

前記機能的な外因性受容体の N 末端に位置するシグナルペプチドをさらに含む、実施形態 4 2 ~ 7 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 7 6。

前記シグナルペプチドが、CD 8 α に由来する、実施形態 7 5 に記載の方法。

実施形態 7 7。

前記 C A R が、N 末端から C 末端に向かって、CD 8 α に由来するシグナルペプチド、B C M A の 1 つ以上のエピトープを特異的に認識する 1 つ以上の s d A b、CD 8 α に由来するヒンジドメイン、CD 8 α に由来する膜貫通ドメイン、CD 1 3 7 (4 - 1 B B) に由来する共刺激シグナル伝達ドメイン、及び CD 3 ζ に由来する一次細胞内シグナル伝達ドメインを含むポリペプチドを含む、実施形態 5 3 及び 5 5 ~ 7 6 のいずれか 1 つに記載の方法。 20

実施形態 7 8。

実施形態 1 ~ 7 7 のいずれか 1 つに記載の方法によって得られる修飾 T 細胞。

実施形態 7 9。

N e f タンパク質をコードする第 1 の核酸を含む修飾 T 細胞であって、前記 N e f タンパク質が発現すると、前記修飾 T 細胞の内在性 T C R が下方調節される、前記修飾 T 細胞。 30

実施形態 8 0。

前記下方調節が、前記内在性 T C R の細胞表面発現を下方制御することを含む、実施形態 7 9 に記載の修飾 T 細胞。

実施形態 8 1。

前記内在性 T C R の細胞表面発現が、少なくとも約 5 0 % 下方制御される、実施形態 8 0 に記載の修飾 T 細胞。

実施形態 8 2。

前記内在性 T C R の細胞表面発現が、少なくとも約 6 0 % 下方制御される、実施形態 8 0 または 8 1 に記載の修飾 T 細胞。 40

実施形態 8 3。

前記内在性 T C R の細胞表面発現が、少なくとも約 7 0 % 下方制御される、実施形態 8 0 ~ 8 2 のいずれか 1 つに記載の修飾 T 細胞。

実施形態 8 4。

前記内在性 T C R の細胞表面発現が、少なくとも約 8 0 % 下方制御される、実施形態 8 0 ~ 8 3 のいずれか 1 つに記載の修飾 T 細胞。

実施形態 8 5。

前記内在性 T C R の細胞表面発現が、少なくとも約 9 0 % 下方制御される、実施形態 8 0 ~ 8 4 のいずれか 1 つに記載の修飾 T 細胞。

実施形態 8 6。

前記内在性TCRの細胞表面発現が、少なくとも約95%下方制御される、実施形態80～85のいずれか1つに記載の修飾T細胞。

実施形態87。

前記修飾T細胞が、未修飾の内在性TCR座位を含む、実施形態79～86のいずれか1つに記載の修飾T細胞。

実施形態88。

前記修飾T細胞が、修飾された内在性TCR座位を含む、実施形態79～86のいずれか1つに記載の修飾T細胞。

実施形態89。

前記修飾T細胞が、修飾された内在性TCR α 座位を含む、実施形態88に記載の修飾T細胞。

10

実施形態90。

前記内在性TCR座位が、CRISPR-Casシステムによって修飾される、実施形態88または89に記載の修飾T細胞。

実施形態91。

前記CRISPR-Casシステムが、配列番号23の核酸配列を含むgRNAを含む、実施形態90に記載の修飾T細胞。

実施形態92。

前記Nefタンパク質が、SIV Nef、HIV1 Nef、及びHIV2 Nefからなる群から選択される、実施形態79～91のいずれか1つに記載の修飾T細胞。

20

実施形態93。

前記Nefタンパク質が、野生型Nefである、実施形態79～92のいずれか1つに記載の修飾T細胞。

実施形態94。

前記野生型Nefが、配列番号12～17のいずれか1つのアミノ酸配列を含む、実施形態93に記載の修飾T細胞。

実施形態95。

前記Nefタンパク質が、変異体Nefである、実施形態79～92のいずれか1つに記載の修飾T細胞。

実施形態96。

30

前記変異体Nefが、ミリストイル化部位、N末端 α ヘリックス、チロシンベースのAP動員、CD4結合部位、酸性クラスター、プロリンベースのリピート、PAK結合ドメイン、COP I動員ドメイン、ジロイシンベースのAP動員ドメイン、V-ATPase及びRaf-1結合ドメイン、もしくはそれらの任意の組み合わせにおける1つ以上の変異、または表11に示されるアミノ酸残基のいずれかにおける1つ以上の変異を含む、実施形態95に記載の修飾T細胞。

実施形態97。

前記変異が、挿入、欠失、点変異（複数可）、及び／または転位を含む、実施形態95または96に記載の修飾T細胞。

実施形態98。

40

前記変異体Nefが、

(i) 配列番号18～22のいずれか1つのアミノ酸配列、

(ii) aa2～4、aa8～10、aa11～13、aa38～40、aa44～46、aa47～49、aa50～52、aa53～55、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～100、aa107～109、aa110～112、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、aa178～179、179～181aa、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa191～193、aa194～196、aa203～205、aa206～208、aa212～214、aa215～217、aa218～220、aa2

50

21～223、aa8～13、aa44～67、aa107～112、aa164～196、aa203～208、もしくはaa212～223のいずれかのアミノ酸残基（ここで、前記アミノ酸残基の位置は、野生型SIV Nefのものに対応する）における1つ以上の変異、

(iii) aa2～4、aa44～46、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～100、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa44～67、aa164～169、aa176～181、aa185～190のいずれかのアミノ酸残基（ここで、前記アミノ酸残基の位置は、野生型SIV Nefのものに対応する）における1つ以上の変異、

(iv) aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、178～179aa、aa179～181、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、もしくはaa164～190のいずれかのアミノ酸残基（ここで、前記アミノ酸残基の位置は、野生型SIV Nefのものに対応する）における1つ以上の変異、または

(v) aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、aa164～169、aa176～181、もしくはaa185～190のいずれかのアミノ酸残基（ここで、前記アミノ酸残基の位置は、野生型SIV Nefのものに対応する）における1つ以上の変異

を含む、実施形態95～97のいずれか1つに記載の修飾T細胞。

実施形態99。

細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的
外因性受容体をコードする第2の核酸をさらに含む、実施形態79～98のいずれか1つ
に記載の修飾T細胞。

実施形態100。

前記第1の核酸と前記第2の核酸とが、別々のベクター上にある、実施形態99に記載
の修飾T細胞。

実施形態101。

前記第1の核酸と前記第2の核酸とが、同じベクター上にある、実施形態99に記載の
修飾T細胞。

実施形態102。

前記第1の核酸と前記第2の核酸とが、同じプロモーターに作動可能に連結している、
実施形態101に記載の修飾T細胞。

実施形態103。

前記第1の核酸が、前記第2の核酸の上流にある、実施形態102に記載の修飾T細胞
。

実施形態104。

前記第1の核酸が、前記第2の核酸の下流にある、実施形態102に記載の修飾T細胞
。

実施形態105。

前記第1の核酸と前記第2の核酸とが、連結配列を介して結合している、実施形態10
1～104のいずれか1つに記載の修飾T細胞。

実施形態106。

前記連結配列が、P2A、T2A、E2A、F2A、BmCPV 2A、BmIFV

10

20

30

40

50

2 A、 $(GS)_n$ 、 $(GSGGS)_n$ 、 $(GGGS)_n$ 、 $(GGGGS)_n$ をコードする核酸配列、またはIRES、SV40、CMV、UBC、EF1 α 、PGK、CAGGの核酸配列、またはそれらの任意の組み合わせ（式中、 n は、少なくとも1の整数である）のいずれかである、実施形態105に記載の修飾T細胞。

実施形態107。

前記ベクターが、ウイルスベクターである、実施形態100～106のいずれか1つに記載の修飾T細胞。

実施形態108。

前記ウイルスベクターが、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、及びレンチウイルスベクターからなる群から選択される、実施形態107に記載の修飾T細胞。

10

実施形態109。

前記ウイルスベクターが、レンチウイルスベクターである、実施形態108に記載の修飾T細胞。

実施形態110。

前記修飾T細胞が、組織不適合性の個体において、GvHD応答を誘発しないか、または前記修飾T細胞の起源となる前記前駆体T細胞のドナーから単離された初代T細胞によって誘発されるGvHD応答と比較して低減したGvHD応答を誘発する、実施形態79～109のいずれか1つに記載の修飾T細胞。

実施形態111。

20

前記機能的な外因性受容体が、工学操作されたTCRである、実施形態99～110のいずれか1つに記載の修飾T細胞。

実施形態112。

前記工学操作されたTCRが、

(a) 腫瘍抗原の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片を含む細胞外リガンド結合ドメイン、

(b) 任意選択のリンカー、

(c) 第1のTCRサブユニットの任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、

(d) 第2のTCRサブユニットの膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び

(e) 第3のTCRサブユニットの細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメイン

30

を含む、キメラTCR(cTCR)であり、

前記第1、前記第2、及び前記第3のTCRサブユニットが全て、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される、実施形態111に記載の方法。

実施形態113。

前記第1、前記第2、及び前記第3のTCRサブユニットが同じである、実施形態112に記載の方法。

実施形態114。

前記第1、前記第2、及び前記第3のTCRサブユニットが異なっている、実施形態112に記載の方法。

40

実施形態115。

前記機能的な外因性受容体が、

(a) 腫瘍抗原の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片を含む細胞外リガンド結合ドメイン、

(b) 任意選択の第1のリンカー、

(c) TCRサブユニットの細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、

(d) 任意選択の第2のリンカー、

(e) 第1のTCR共受容体の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、

50

(f) 第2のTCR共受容体の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び

(g) 第3のTCR共受容体の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメイン

を含む、T細胞抗原結合体(TAC)であり、

前記TCRサブユニットが、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択され、

前記第1、前記第2、及び前記第3のTCR共受容体が、CD4、CD8、及びCD28からなる群から選択される、実施形態99~110のいずれか1つに記載の方法。

実施形態116。

前記第1、前記第2、及び前記第3のTCR共受容体が同じである、実施形態115に記載の方法。 10

実施形態117。

前記第1、前記第2、及び前記第3のTCR共受容体が異なっている、実施形態115に記載の方法。

実施形態118。

前記機能的な外因性受容体が、

(a) 腫瘍抗原の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片を含む細胞外リガンド結合ドメイン、

(b) 任意選択の第1のリンカー、

(c) 第1のTCRサブユニットの細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外TCR結合ドメイン、 20

(d) 任意選択の第2のリンカー、

(e) 第2のTCRサブユニットの任意選択の細胞外ドメイン、またはその一部分、

(f) 第3のTCRサブユニットの膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び

(g) 第4のTCRサブユニットの細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメイン

を含む、T細胞抗原結合体(TAC)様キメラ受容体であり、

前記第1、前記第2、前記第3、及び前記第4のTCRサブユニットが全て、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及びCD3 δ からなる群から選択される、実施形態99~110のいずれか1つに記載の方法。 30

実施形態119。

少なくとも前記第2、前記第3、及び前記第4のTCRサブユニットが同じである、実施形態118に記載の方法。

実施形態120。

前記第1、前記第2、前記第3、及び前記第4のTCRサブユニットが異なっている、実施形態118に記載の方法。

実施形態121。

前記機能的な外因性受容体が、非TCR受容体である、実施形態99~110のいずれか1つに記載の修飾T細胞。

実施形態122。 40

前記非TCR受容体が、CARである、実施形態121に記載の修飾T細胞。

実施形態123。

前記CARが、

(a) 腫瘍抗原の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片を含む細胞外リガンド結合ドメイン、

(b) 膜貫通ドメイン、及び

(c) 細胞内シグナル伝達ドメイン

を含むポリペプチドを含む、実施形態122に記載の修飾T細胞。

実施形態124。

前記CARが、 50

- (a) Fc受容体である抗原結合性断片を含む細胞外リガンド結合ドメイン、
- (b) 膜貫通ドメイン、及び
- (c) 細胞内シグナル伝達ドメイン

を含む、抗体結合TCR (ACTR) である、実施形態122に記載の方法。

実施形態125。

前記抗原結合性断片が、ラクダIg、Ig NAR、Fab断片、Fab'断片、F(ab)'₂断片、F(ab)'₃断片、Fv、一本鎖Fv抗体(scFv)、bis-scFv、(scFv)₂、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ジスルフィド安定化Fvタンパク質(dsFv)、及び単一ドメイン抗体(sdAb、ナノボディ) からなる群から選択される、実施形態112~124のいずれか1つに記載の修飾T細胞。

10

実施形態126。

前記抗原結合性断片が、sdAbまたはscFvである、実施形態125に記載の修飾T細胞。

実施形態127。

前記細胞外リガンド結合ドメインが、一価である、実施形態112~126のいずれか1つに記載の修飾T細胞。

実施形態128。

前記細胞外リガンド結合ドメインが、多価である、実施形態112~126のいずれか1つに記載の修飾T細胞。

20

実施形態129。

前記細胞外リガンド結合ドメインが、多重特異性である、実施形態128に記載の修飾T細胞。

実施形態130。

前記細胞外リガンド結合ドメインが、第1のsdAb及び第2のsdAbを含む、実施形態128または129に記載の修飾T細胞。

実施形態131。

前記細胞外リガンド結合ドメインが、第1のscFv及び第2のscFvを含む、実施形態128または129に記載の修飾T細胞。

実施形態132。

30

前記腫瘍抗原が、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD38、BCMA、CS1、CD138、CD123/IL3R α 、c-Met、gp100、MUC1、IGF-I受容体、EpCAM、EGFR/EGFRvIII、HER2、IGF1R、メソテリン、PSMA、WT1、ROR1、CEA、GD-2、NY-ESO-1、MAGE A3、GPC3、糖脂質F77、PD-L1、PD-L2、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、実施形態112~123及び125~131のいずれか1つに記載の修飾T細胞。

実施形態133。

前記腫瘍抗原が、BCMA、CD19、またはCD20である、実施形態132に記載の修飾T細胞。

40

実施形態134。

前記細胞外リガンド結合ドメインが、BCMAの1つ以上のエピトープを特異的に認識する1つ以上のsdAbを含む、実施形態133に記載の修飾T細胞。

実施形態135。

前記膜貫通ドメインが、T細胞受容体の α 、 β 、または ζ 鎖、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD4、CD5、CD8 α 、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137(4-1BB)、CD152、CD154、及びPD-1からなる群から選択される分子に由来する、実施形態123~134のいずれか1つに記載の修飾T細胞。

実施形態136。

50

前記膜貫通ドメインが、CD8 α に由来する、実施形態135に記載の修飾T細胞。
実施形態137。

前記細胞内シグナル伝達ドメインが、免疫エフェクター細胞の一次細胞内シグナル伝達ドメインを含む、実施形態112～136のいずれか1つに記載の修飾T細胞。

実施形態138。

前記一次細胞内シグナル伝達ドメインが、CD3 ζ 、CD3 γ 、CD3 ϵ 、CD3 δ 、FcR γ (FCER1G)、FcR β (FcイプシロンRIIb)、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD66d、FcガンマリIIa、DAP10、及びDAP12に由来する、実施形態137に記載の修飾T細胞。

実施形態139。

10

前記一次細胞内シグナル伝達ドメインが、CD3 ζ 、CD3 γ 、またはDAP12に由来する、実施形態138に記載の修飾T細胞。

実施形態140。

前記細胞内シグナル伝達ドメインが、共刺激シグナル伝達ドメインを含む、実施形態123～139のいずれか1つに記載の修飾T細胞。

実施形態141。

前記共刺激シグナル伝達ドメインが、CARD11、CD2 (LFA-2)、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54 (ICAM-1)、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD162 (SELP LG)、CD258 (LIGHT)、CD270 (HVEM、LIGHTR)、CD276 (B7-H3)、CD278 (ICOS)、CD279 (PD-1)、CD319 (SLAMF7)、LFA-1 (リンパ球機能関連抗原1)、NKG2C、CDS、GITR、BAFFR、NKp80 (KLRF1)、CD160、CD19、CD4、IPO-3、CD353 (BLAME、SLAMF8)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D、CD83、CD150 (SLAMF1)、CD152 (CTLA-4)、CD223 (LAG3)、CD273 (PD-L2)、CD274 (PD-L1)、DAP10、TRIM、ZAP70、CD83に特異的に結合するリガンド、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される共刺激分子に由来する、実施形態140に記載の修飾T細胞。

20

実施形態142。

30

前記共刺激シグナル伝達ドメインが、CD137 (4-1BB)の細胞質ドメインを含む、実施形態141に記載の修飾T細胞。

実施形態143。

前記細胞外リガンド結合ドメインのC末端と前記膜貫通ドメインのN末端との間に位置するヒンジドメインをさらに含む、実施形態112～142のいずれか1つに記載の修飾T細胞。

実施形態144。

前記ヒンジドメインが、CD8 α に由来する、実施形態143に記載の修飾T細胞。

実施形態144。

前記機能的な外因性受容体のN末端に位置するシグナルペプチドをさらに含む、実施形態112～144のいずれか1つに記載の修飾T細胞。

40

実施形態145。

前記シグナルペプチドが、CD8 α に由来する、実施形態144に記載の修飾T細胞。

実施形態146。

前記CARが、N末端からC末端に向かって、CD8 α に由来するシグナルペプチド、BCMAの1つ以上のエピトープを特異的に認識する1つ以上のsdAb、CD8 α に由来するヒンジドメイン、CD8 α に由来する膜貫通ドメイン、CD137 (4-1BB)に由来する共刺激シグナル伝達ドメイン、及びCD3 ζ に由来する一次細胞内シグナル伝達ドメインを含むポリペプチドを含む、実施形態123及び125～145のいずれか1つに記載の修飾T細胞。

50

実施形態 147。

実施形態 78～147 のいずれか 1 つに記載の修飾 T 細胞と、薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物。

実施形態 148。

有効量の実施形態 147 に記載の医薬組成物を個体に投与することを含む、前記個体の疾患を処置する方法。

実施形態 149。

前記疾患が、がんである、実施形態 148 に記載の方法。

実施形態 150。

前記個体が、前記修飾 T 細胞の起源となる前記前駆体 T 細胞のドナーと組織不適合性である、実施形態 148 または 149 に記載の方法。 10

実施形態 151。

前記個体が、ヒトである、実施形態 148～150 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 152。

ミリストイル化部位、N 末端 α ヘリックス、チロシンベースの AP 動員、CD4 結合部位、酸性クラスター、プロリンベースのリピート、PAK 結合ドメイン、COP I 動員ドメイン、ジロイシンベースの AP 動員ドメイン、V-ATPase 及び Raf-1 結合ドメイン、もしくはそれらの任意の組み合わせにおける 1 つ以上の変異、または表 11 に示されるアミノ酸残基のいずれかにおける 1 つ以上の変異を含む、天然に存在しない Neftanpak 質。 20

実施形態 153。

前記変異が、挿入、欠失、点変異（複数可）、及び／または転位から選択される、実施形態 152 に記載の天然に存在しない Neftanpak 質。

実施形態 154。

前記天然に存在しない Neftanpak 質が、T 細胞において発現した場合、前記 T 細胞における内在性 CD4 及び／または CD28 に対し、野生型 Neftanpak 質と比較して低減した下方調節作用を有する、実施形態 152 または 153 に記載の天然に存在しない Neftanpak 質。

実施形態 155。

前記下方調節が、前記内在性 CD4 及び／または CD28 の細胞表面発現を下方制御することを含む、実施形態 154 に記載の天然に存在しない Neftanpak 質。 30

実施形態 156。

前記内在性 CD4 及び／または CD28 の細胞表面発現の下方制御が、少なくとも約 50% 低減する、実施形態 155 に記載の天然に存在しない Neftanpak 質。

実施形態 157。

前記内在性 CD4 及び／または CD28 の細胞表面発現の下方制御が、少なくとも約 60% 低減する、実施形態 155 または 156 に記載の天然に存在しない Neftanpak 質。

実施形態 158。

前記内在性 CD4 及び／または CD28 の細胞表面発現の下方制御が、少なくとも約 70% 低減する、実施形態 155～157 のいずれか 1 つに記載の天然に存在しない Neftanpak 質。 40

実施形態 159。

前記内在性 CD4 及び／または CD28 の細胞表面発現の下方制御が、少なくとも約 80% 低減する、実施形態 155～158 のいずれか 1 つに記載の天然に存在しない Neftanpak 質。

実施形態 160。

前記内在性 CD4 及び／または CD28 の細胞表面発現の下方制御が、少なくとも約 90% 低減する、実施形態 155～159 のいずれか 1 つに記載の天然に存在しない Neftanpak 質。 50

実施形態 1 6 1。

前記内在性 C D 4 及び／または C D 2 8 の細胞表面発現の下方制御が、少なくとも約 9 5 % 低減する、実施形態 1 5 5 ～ 1 6 0 のいずれか 1 つに記載の天然に存在しない N e f タンパク質。

実施形態 1 6 2。

単離された前記 N e f タンパク質が T 細胞において発現すると、前記 T 細胞の前記内在性 T C R が下方調節される、実施形態 1 5 2 ～ 1 6 1 のいずれか 1 つに記載の天然に存在しない N e f タンパク質。

実施形態 1 6 3。

前記下方調節が、前記内在性 T C R の細胞表面発現を下方制御することを含む、実施形態 1 6 2 に記載の天然に存在しない N e f タンパク質。

10

実施形態 1 6 4。

前記内在性 T C R の細胞表面発現が、少なくとも約 5 0 % 下方制御される、実施形態 1 6 3 に記載の天然に存在しない N e f タンパク質。

実施形態 1 6 5。

前記内在性 T C R の細胞表面発現が、少なくとも約 6 0 % 下方制御される、実施形態 1 6 3 または 1 6 4 に記載の天然に存在しない N e f タンパク質。

実施形態 1 6 6。

前記内在性 T C R の細胞表面発現が、少なくとも約 7 0 % 下方制御される、実施形態 1 6 3 ～ 1 6 5 のいずれか 1 つに記載の天然に存在しない N e f タンパク質。

20

実施形態 1 6 7。

前記内在性 T C R の細胞表面発現が、少なくとも約 8 0 % 下方制御される、実施形態 1 6 3 ～ 1 6 6 のいずれか 1 つに記載の天然に存在しない N e f タンパク質。

実施形態 1 6 8。

前記内在性 T C R の細胞表面発現が、少なくとも約 9 0 % 下方制御される、実施形態 1 6 3 ～ 1 6 7 のいずれか 1 つに記載の天然に存在しない N e f タンパク質。

実施形態 1 6 9。

前記内在性 T C R の細胞表面発現が、少なくとも約 9 5 % 下方制御される、実施形態 1 6 3 ～ 1 6 8 のいずれか 1 つに記載の天然に存在しない N e f タンパク質。

30

実施形態 1 7 0。

前記 N e f タンパク質が、S I V N e f、H I V 1 N e f、及び H I V 2 N e f からなる群から選択される、実施形態 1 5 2 ～ 1 6 9 のいずれか 1 つに記載の天然に存在しない N e f タンパク質。

実施形態 1 7 1。

(i) 配列番号 1 8 ～ 2 2 のいずれか 1 つのアミノ酸配列、

(i i) a a 2 ～ 4、a a 8 ～ 1 0、a a 1 1 ～ 1 3、a a 3 8 ～ 4 0、a a 4 4 ～ 4 6、a a 4 7 ～ 4 9、a a 5 0 ～ 5 2、a a 5 3 ～ 5 5、a a 5 6 ～ 5 8、a a 5 9 ～ 6 1、a a 6 2 ～ 6 4、a a 6 5 ～ 6 7、a a 9 8 ～ 1 0 0、a a 1 0 7 ～ 1 0 9、a a 1 1 0 ～ 1 1 2、a a 1 3 7 ～ 1 3 9、a a 1 5 2 ～ 1 5 4、a a 1 6 4 ～ 1 6 6、a a 1 6 7 ～ 1 6 9、a a 1 7 0 ～ 1 7 2、a a 1 7 3 ～ 1 7 5、a a 1 7 6 ～ 1 7 8、a a 1 7 8 ～ 1 7 9、1 7 9 ～ 1 8 1 a a、a a 1 8 2 ～ 1 8 4、a a 1 8 5 ～ 1 8 7、a a 1 8 8 ～ 1 9 0、a a 1 9 1 ～ 1 9 3、a a 1 9 4 ～ 1 9 6、a a 2 0 3 ～ 2 0 5、a a 2 0 6 ～ 2 0 8、a a 2 1 2 ～ 2 1 4、a a 2 1 5 ～ 2 1 7、a a 2 1 8 ～ 2 2 0、a a 2 2 1 ～ 2 2 3、a a 8 ～ 1 3、a a 4 4 ～ 6 7、a a 1 0 7 ～ 1 1 2、a a 1 6 4 ～ 1 9 6、a a 2 0 3 ～ 2 0 8、もしくは a a 2 1 2 ～ 2 2 3 のいずれかのアミノ酸残基（ここで、前記アミノ酸残基の位置は、野生型 S I V N e f のものに対応する）における 1 つ以上の変異、

40

(i i i) a a 2 ～ 4、a a 4 4 ～ 4 6、a a 5 6 ～ 5 8、a a 5 9 ～ 6 1、a a 6 2 ～ 6 4、a a 6 5 ～ 6 7、a a 9 8 ～ 1 0 0、a a 1 0 7 ～ 1 0 9、a a 1 3 7 ～ 1 3 9、a a 1 5 2 ～ 1 5 4、a a 1 6 4 ～ 1 6 6、a a 1 6 7 ～ 1 6 9、a a 1 7 6 ～ 1 7 8

50

、a a 1 7 8 ~ 1 7 9、a a 1 7 9 ~ 1 8 1、a a 1 8 5 ~ 1 8 7、a a 1 8 8 ~ 1 9 0、a a 1 9 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a a 4 4 ~ 6 7、a a 1 6 4 ~ 1 6 9、a a 1 7 6 ~ 1 8 1、a a 1 8 5 ~ 1 9 0のいずれかのアミノ酸残基（ここで、前記アミノ酸残基の位置は、野生型S I V N e fのものに対応する）における1つ以上の変異、

(i v) a a 2 ~ 4、a a 5 6 ~ 5 8、a a 5 9 ~ 6 1、a a 6 2 ~ 6 4、a a 6 5 ~ 6 7、a a 1 0 7 ~ 1 0 9、a a 1 3 7 ~ 1 3 9、a a 1 5 2 ~ 1 5 4、a a 1 6 4 ~ 1 6 6、a a 1 6 7 ~ 1 6 9、a a 1 7 0 ~ 1 7 2、a a 1 7 3 ~ 1 7 5、a a 1 7 6 ~ 1 7 8、1 7 8 ~ 1 7 9 a a、a a 1 7 9 ~ 1 8 1、a a 1 8 2 ~ 1 8 4、a a 1 8 5 ~ 1 8 7、a a 1 8 8 ~ 1 9 0、a a 1 9 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a a 5 6 ~ 6 7、もしくはa a 1 6 4 ~ 1 9 0のいずれかのアミノ酸残基（ここで、前記アミノ酸残基の位置は、野生型S I V N e fのものに対応する）における1つ以上の変異、または

(v) a a 2 ~ 4、a a 5 6 ~ 5 8、a a 5 9 ~ 6 1、a a 6 2 ~ 6 4、a a 6 5 ~ 6 7、a a 1 0 7 ~ 1 0 9、a a 1 3 7 ~ 1 3 9、a a 1 5 2 ~ 1 5 4、a a 1 6 4 ~ 1 6 6、a a 1 6 7 ~ 1 6 9、a a 1 7 6 ~ 1 7 8、a a 1 7 8 ~ 1 7 9、a a 1 7 9 ~ 1 8 1、a a 1 8 5 ~ 1 8 7、a a 1 8 8 ~ 1 9 0、a a 1 9 4 ~ 1 9 6、a a 2 0 3 ~ 2 0 5、a a 5 6 ~ 6 7、a a 1 6 4 ~ 1 6 9、a a 1 7 6 ~ 1 8 1、もしくはa a 1 8 5 ~ 1 9 0のいずれかのアミノ酸残基（ここで、前記アミノ酸残基の位置は、野生型S I V N e fのものに対応する）における1つ以上の変異

を含む、実施形態1 5 2 ~ 1 7 0のいずれか1つに記載の天然に存在しないN e fタンパク質。

実施形態1 7 2。

N e fタンパク質をコードする第1の核酸を含むウイルスベクター。

実施形態1 7 3。

前記N e fタンパク質が、S I V N e f、H I V 1 N e f、及びH I V 2 N e fからなる群から選択される、実施形態1 7 2に記載のウイルスベクター。

実施形態1 7 4。

前記N e fタンパク質が、野生型N e fである、実施形態1 7 2または1 7 3に記載のウイルスベクター。

実施形態1 7 5。

前記野生型N e fが、配列番号1 2 ~ 1 7のいずれか1つのアミノ酸配列を含む、実施形態1 7 4に記載のウイルスベクター。

実施形態1 7 6。

前記N e fタンパク質が、変異体N e fである、実施形態1 7 2または1 7 3に記載のウイルスベクター。

実施形態1 7 7。

前記変異体N e fが、ミリストイル化部位、N末端αヘリックス、チロシンベースのA P動員、C D 4結合部位、酸性クラスター、プロリンベースのリピート、P A K結合ドメイン、C O P I動員ドメイン、ジロイシンベースのA P動員ドメイン、V - A T P a s e及びR a f - 1結合ドメイン、もしくはそれらの任意の組み合わせにおける1つ以上の変異、または表1 1に示されるアミノ酸残基のいずれかにおける1つ以上の変異を含む、実施形態1 7 6に記載のウイルスベクター。

実施形態1 7 8。

前記変異が、挿入、欠失、点変異（複数可）、及び／または転位を含む、実施形態1 7 6または1 7 7に記載のウイルスベクター。

実施形態1 7 9。

前記変異体N e fが、

(i) 配列番号1 8 ~ 2 2のいずれか1つのアミノ酸配列、

(i i) a a 2 ~ 4、a a 8 ~ 1 0、a a 1 1 ~ 1 3、a a 3 8 ~ 4 0、a a 4 4 ~ 4 6、a a 4 7 ~ 4 9、a a 5 0 ~ 5 2、a a 5 3 ~ 5 5、a a 5 6 ~ 5 8、a a 5 9 ~ 6 1、a a 6 2 ~ 6 4、a a 6 5 ~ 6 7、a a 9 8 ~ 1 0 0、a a 1 0 7 ~ 1 0 9、a a 1

10

20

30

40

50

10～112、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、aa178～179、179～181aa、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa191～193、aa194～196、aa203～205、aa206～208、aa212～214、aa215～217、aa218～220、aa221～223、aa8～13、aa44～67、aa107～112、aa164～196、aa203～208、もしくはaa212～223のいずれかのアミノ酸残基（ここで、前記アミノ酸残基の位置は、野生型SIV Nefのものに対応する）における1つ以上の変異、

(iii) aa2～4、aa44～46、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa98～100、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa44～67、aa164～169、aa176～181、aa185～190のいずれかのアミノ酸残基（ここで、前記アミノ酸残基の位置は、野生型SIV Nefのものに対応する）における1つ以上の変異、

(iv) aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa170～172、aa173～175、aa176～178、178～179aa、aa179～181、aa182～184、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、もしくはaa164～190のいずれかのアミノ酸残基（ここで、前記アミノ酸残基の位置は、野生型SIV Nefのものに対応する）における1つ以上の変異、または

(v) aa2～4、aa56～58、aa59～61、aa62～64、aa65～67、aa107～109、aa137～139、aa152～154、aa164～166、aa167～169、aa176～178、aa178～179、aa179～181、aa185～187、aa188～190、aa194～196、aa203～205、aa56～67、aa164～169、aa176～181、もしくはaa185～190のいずれかのアミノ酸残基（ここで、前記アミノ酸残基の位置は、野生型SIV Nefのものに対応する）における1つ以上の変異

を含む、実施形態176～178のいずれか1つに記載のウイルスベクター。

実施形態180。

細胞外リガンド結合ドメイン及び任意選択で細胞内シグナル伝達ドメインを含む機能的
外因性受容体をコードする第2の核酸をさらに含む、実施形態172～179のいずれか
1つに記載のウイルスベクター。

実施形態181。

前記第1の核酸と前記第2の核酸とが、同じプロモーターに作動可能に連結している、
実施形態180に記載のウイルスベクター。

実施形態182。

前記プロモーターが、EF-1プロモーター、CMV IE遺伝子プロモーター、EF-
1aプロモーター、ユビキチンCプロモーター、及びホスホグリセリン酸キナーゼ（P
GK）プロモーターからなる群から選択される、実施形態181に記載のウイルスベク
ター。

実施形態183。

前記第1の核酸が、前記第2の核酸の上流にある、実施形態181または182に記載
のウイルスベクター。

実施形態184。

前記第1の核酸が、前記第2の核酸の下流にある、実施形態181または182に記載
のウイルスベクター。

実施形態185。

10

20

30

40

50

前記第 1 の核酸と前記第 2 の核酸とが、連結配列を介して結合している、実施形態 180～184 のいずれか 1 つに記載のウイルスベクター。

実施形態 186。

前記連結配列が、P2A、T2A、E2A、F2A、BmCPV 2A、BmIFV 2A、(GS)_n、(GSGGS)_n、(GGGS)_n、(GGGGS)_n をコードする核酸配列、または IRES、SV40、CMV、UBC、EF1 α 、PGK、CAGG の核酸配列、またはそれらの任意の組み合わせ（式中、n は、少なくとも 1 の整数である）のいずれかである、実施形態 185 に記載のウイルスベクター。

実施形態 187。

前記ウイルスベクターが、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、及びレンチウイルスベクターからなる群から選択される、実施形態 172～186 のいずれか 1 つに記載のウイルスベクター。

10

実施形態 188。

前記ウイルスベクターが、レンチウイルスベクターである、実施形態 187 に記載のウイルスベクター。

実施形態 189。

前記機能的な外因性受容体が、工学操作された TCR である、実施形態 180～188 のいずれか 1 つに記載のウイルスベクター。

実施形態 190。

前記工学操作された TCR が、

20

(a) 腫瘍抗原の 1 つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片を含む細胞外リガンド結合ドメイン、

(b) 任意選択のリンカー、

(c) 第 1 の TCR サブユニットの任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、

(d) 第 2 の TCR サブユニットの膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び

(e) 第 3 の TCR サブユニットの細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメイン

を含む、キメラ TCR (cTCR) であり、

前記第 1、前記第 2、及び前記第 3 の TCR サブユニットが全て、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、及び CD3 δ からなる群から選択される、

30

実施形態 191。

前記第 1、前記第 2、及び前記第 3 の TCR サブユニットが同じである、実施形態 190 に記載の方法。

実施形態 192。

前記第 1、前記第 2、及び前記第 3 の TCR サブユニットが異なっている、実施形態 190 に記載の方法。

実施形態 193。

前記機能的な外因性受容体が、

(a) 腫瘍抗原の 1 つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片を含む細胞外リガンド結合ドメイン、

40

(b) 任意選択の第 1 のリンカー、

(c) TCR サブユニットの細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外 TCR 結合ドメイン、

(d) 任意選択の第 2 のリンカー、

(e) 第 1 の TCR 共受容体の任意選択の細胞外ドメインまたはその一部分、

(f) 第 2 の TCR 共受容体の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び

(g) 第 3 の TCR 共受容体の細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメイン

を含む、T 細胞抗原結合体 (TAC) であり、

50

前記 T C R サブユニットが、T C R α 、T C R β 、T C R γ 、T C R δ 、C D 3 ϵ 、C D 3 γ 、及び C D 3 δ からなる群から選択され、

前記第 1、前記第 2、及び前記第 3 の T C R 共受容体が、C D 4、C D 8、及び C D 2 8 からなる群から選択される、実施形態 1 8 0 ~ 1 8 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 1 9 4。

前記第 1、前記第 2、及び前記第 3 の T C R 共受容体が同じである、実施形態 1 9 3 に記載の方法。

実施形態 1 9 5。

前記第 1、前記第 2、及び前記第 3 の T C R 共受容体が異なっている、実施形態 1 9 3 に記載の方法。

10

実施形態 1 9 6。

前記機能的な外因性受容体が、

(a) 腫瘍抗原の 1 つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片を含む細胞外リガンド結合ドメイン、

(b) 任意選択の第 1 のリンカー、

(c) 第 1 の T C R サブユニットの細胞外ドメインを特異的に認識する細胞外 T C R 結合ドメイン、

(d) 任意選択の第 2 のリンカー、

(e) 第 2 の T C R サブユニットの任意選択の細胞外ドメイン、またはその一部分、

(f) 第 3 の T C R サブユニットの膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び

20

(g) 第 4 の T C R サブユニットの細胞内シグナル伝達ドメインを含む任意選択の細胞内シグナル伝達ドメイン

を含む、T 細胞抗原結合体 (T A C) 様キメラ受容体であり、

前記第 1、前記第 2、前記第 3、及び前記第 4 の T C R サブユニットが全て、T C R α 、T C R β 、T C R γ 、T C R δ 、C D 3 ϵ 、C D 3 γ 、及び C D 3 δ からなる群から選択される、実施形態 1 8 0 ~ 1 8 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 1 9 7。

少なくとも前記第 2、前記第 3、及び前記第 4 の T C R サブユニットが同じである、実施形態 1 9 6 に記載の方法。

実施形態 1 9 8。

30

前記第 1、前記第 2、前記第 3、及び前記第 4 の T C R サブユニットが異なっている、実施形態 1 9 6 に記載の方法。

実施形態 1 9 9。

前記機能的な外因性受容体が、非 T C R 受容体である、実施形態 1 8 0 ~ 1 8 8 のいずれか 1 つに記載のウイルスベクター。

実施形態 2 0 0。

前記非 T C R 受容体が、C A R である、実施形態 1 9 9 に記載のウイルスベクター。

実施形態 2 0 1。

前記 C A R が、

(a) 腫瘍抗原の 1 つ以上のエピトープを特異的に認識する抗原結合性断片を含む細胞外リガンド結合ドメイン、

40

(b) 膜貫通ドメイン、及び

(c) 細胞内シグナル伝達ドメイン

を含むポリペプチドを含む、実施形態 2 0 0 に記載のウイルスベクター。

実施形態 2 0 2。

前記 C A R が、

(a) F c 受容体である抗原結合性断片を含む細胞外リガンド結合ドメイン、

(b) 膜貫通ドメイン、及び

(c) 細胞内シグナル伝達ドメイン

を含む、抗体結合 T C R (A C T R) である、実施形態 2 0 0 に記載の方法。

50

実施形態 203。

前記抗原結合性断片が、ラクダ Ig、Ig NAR、Fab 断片、Fab' 断片、F(ab)'₂ 断片、F(ab)'₃ 断片、Fv、一本鎖 Fv 抗体 (scFv)、bis-scFv、(scFv)₂、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ジスルフィド安定化 Fv タンパク質 (dsFv)、及び単一ドメイン抗体 (sdAb、ナノボディ) からなる群から選択される、実施形態 190~201 のいずれか 1 つに記載のウイルスベクター。

実施形態 204。

前記抗原結合性断片が、sdAb または scFv である、実施形態 203 に記載のウイルスベクター。

10

実施形態 205。

前記細胞外リガンド結合ドメインが、一価である、実施形態 190~204 のいずれか 1 つに記載のウイルスベクター。

実施形態 206。

前記細胞外リガンド結合ドメインが、多価である、実施形態 190~204 のいずれか 1 つに記載のウイルスベクター。

実施形態 207。

前記細胞外リガンド結合ドメインが、多重特異性である、実施形態 206 に記載のウイルスベクター。

実施形態 208。

20

前記細胞外リガンド結合ドメインが、第 1 の sdAb 及び第 2 の sdAb を含む、実施形態 206 または 207 に記載のウイルスベクター。

実施形態 209。

前記細胞外リガンド結合ドメインが、第 1 の scFv 及び第 2 の scFv を含む、実施形態 206 または 207 に記載のウイルスベクター。

実施形態 210。

前記腫瘍抗原が、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD38、BCMA、CS1、CD138、CD123/IL3Ra、c-Met、gp100、MUC1、IGF-I 受容体、EpCAM、EGFR/EGFRvIII、HER2、IGF1R、メソテリン、PSMA、WT1、ROR1、CEA、GD-2、NY-ESO-1、MAGE-A3、GPC3、糖脂質 F77、PD-L1、PD-L2、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、実施形態 190~201 及び 203~209 のいずれか 1 つに記載のウイルスベクター。

30

実施形態 211。

前記腫瘍抗原が、BCMA、CD19、または CD20 である、実施形態 210 に記載のウイルスベクター。

実施形態 212。

前記細胞外リガンド結合ドメインが、BCMA の 1 つ以上のエピトープを特異的に認識する 1 つ以上の sdAb を含む、実施形態 211 に記載のウイルスベクター。

実施形態 213。

40

前記細胞外リガンド結合ドメインが、CD19 または CD20 の 1 つ以上のエピトープを特異的に認識する 1 つ以上の scFv を含む、実施形態 211 に記載のウイルスベクター。

実施形態 214。

前記膜貫通ドメインが、T 細胞受容体の α、β、または ζ 鎖、CD3ζ、CD3ε、CD4、CD5、CD8α、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137 (4-1BB)、CD152、CD154、及び PD-1 からなる群から選択される分子に由来する、実施形態 201~213 のいずれか 1 つに記載のウイルスベクター。

194。

50

前記膜貫通ドメインが、CD8αに由来する、実施形態193に記載のウイルスベクター。

実施形態215。

前記細胞内シグナル伝達ドメインが、免疫エフェクター細胞の一次細胞内シグナル伝達ドメインを含む、実施形態190～214のいずれか1つに記載のウイルスベクター。

実施形態216。

前記一次細胞内シグナル伝達ドメインが、CD3ζ、CD3γ、CD3ε、CD3δ、FcRγ (FCER1G)、FcRβ (FcイプシロンRIb)、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD66d、FcガンマRIIa、DAP10、及びDAP12に由来する、実施形態215に記載のウイルスベクター。

10

実施形態217。

前記一次細胞内シグナル伝達ドメインが、CD3ζ、CD3γ、またはDAP12に由来する、実施形態216に記載のウイルスベクター。

実施形態218。

前記細胞内シグナル伝達ドメインが、共刺激シグナル伝達ドメインを含む、実施形態201～217のいずれか1つに記載のウイルスベクター。

実施形態219。

前記共刺激シグナル伝達ドメインが、CARD11、CD2 (LFA-2)、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54 (ICAM-1)、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD162 (SELP LG)、CD258 (LIGHT)、CD270 (HVEM、LIGHTR)、CD276 (B7-H3)、CD278 (ICOS)、CD279 (PD-1)、CD319 (SLAMF7)、LFA-1 (リンパ球機能関連抗原1)、NKG2C、CDS、GITR、BAFFR、NKp80 (KLRF1)、CD160、CD19、CD4、IPO-3、CD353 (BLAME、SLAMF8)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D、CD83、CD150 (SLAMF1)、CD152 (CTLA-4)、CD223 (LAG3)、CD273 (PD-L2)、CD274 (PD-L1)、DAP10、TRIM、ZAP70、CD83に特異的に結合するリガンド、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される共刺激分子に由来する、実施形態218に記載のウイルスベクター。

20

30

実施形態220。

前記共刺激シグナル伝達ドメインが、CD137 (4-1BB)の細胞質ドメインを含む、実施形態219に記載のウイルスベクター。

実施形態221。

前記細胞外リガンド結合ドメインのC末端と前記膜貫通ドメインのN末端との間に位置するヒンジドメインをさらに含む、実施形態190～220のいずれか1つに記載のウイルスベクター。

実施形態222。

前記ヒンジドメインが、CD8αに由来する、実施形態221に記載のウイルスベクター。

40

実施形態223。

前記機能的外因性受容体のN末端に位置するシグナルペプチドをさらに含む、実施形態190～222のいずれか1つに記載のウイルスベクター。

実施形態224。

前記シグナルペプチドが、CD8αに由来する、実施形態23に記載のウイルスベクター。

実施形態225。

前記CARが、N末端からC末端に向かって、CD8αに由来するシグナルペプチド、BCMAの1つ以上のエピトープを特異的に認識する1つ以上のsdAb、CD8αに由来するヒンジドメイン、CD8αに由来する膜貫通ドメイン、CD137 (4-1BB)

50

に由来する共刺激シグナル伝達ドメイン、及びC D 3 ζに由来する一次細胞内シグナル伝達ドメインを含むポリペプチドを含む、実施形態201及び203～224のいずれか1つに記載のウイルスベクター。

実施形態226。

上流から下流に向かって、前記N e fタンパク質をコードする前記第1の核酸と、P 2 A、I R E S、またはP G Kをコードする第3の核酸と、(G G G S)₃リンカーをコードする任意選択の第4の核酸と、B C M Aの1つ以上のエピトープを特異的に認識する1つ以上のs d A bを含む細胞外リガンド結合ドメインを含む前記C A Rをコードする前記第2の核酸とを含む、実施形態201及び203～225のいずれか1つに記載のウイルスベクター。

10

実施形態227。

上流から下流に向かって、B C M Aの1つ以上のエピトープを特異的に認識する1つ以上のs d A bを含む細胞外リガンド結合ドメインを含む前記C A Rをコードする前記第2の核酸と、P 2 A、I R E S、またはP G Kをコードする第3の核酸と、(G G G S)₃リンカーをコードする任意選択の第4の核酸と、前記N e fタンパク質をコードする前記第1の核酸とを含む、実施形態201及び203～225のいずれか1つに記載のウイルスベクター。

実施形態228。

実施形態172～227のいずれか1つに記載のウイルスベクターを前駆体T細胞に導入することによって得られる修飾T細胞。

20

実施形態229。

前記修飾T細胞が、組織不適合性の個体において、G v H D応答を誘発しないか、または前記修飾T細胞の起源となる前記前駆体T細胞のドナーから単離された初代T細胞によって誘発されるG v H D応答と比較して低減したG v H D応答を誘発する、実施形態228に記載の修飾T細胞。

実施形態230。

実施形態228または229に記載の修飾T細胞と、薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物。

実施形態231。

有効量の実施形態230に記載の医薬組成物を個体に投与することを含む、前記個体の疾患を処置する方法。

30

実施形態232。

前記疾患が、がんである、実施形態231に記載の方法。

実施形態233。

前記個体が、前記修飾T細胞の起源となる前記前駆体T細胞のドナーと組織不適合性である、実施形態231または232に記載の方法。

実施形態234。

前記個体が、ヒトである、実施形態231～233のいずれか1つに記載の方法。

【実施例】

【0345】

40

以下の実施例及び例示的な実施形態は、単に本発明の例示となるよう意図されており、したがって、いかなる点でも本発明を限定するものとみなされるべきではない。以下の実施例及び詳細な説明は、例示として提供するものであり、制限するものではない。

【0346】

実施例1。S I V N e fは、T C Rによるシグナル伝達を阻害する

本実施例では、S I V N e fを発現する例示的なT細胞の設計及び調製、ならびにS I V N e fがT C Rによるシグナル伝達に及ぼす作用を説明する。

【0347】

1。S I V N e f - P 2 A - L N G F Rトランスフェープラスミド、及びS I V N e f - P 2 A - L N G F Rを発現するJ u r k a t細胞株の構築

50

pLVX-Puroは、HIV-1に基づくレンチウイルス発現ベクターである。pLVX-hEF1 α ベクターを構築するために、ClaI及びEcoRIを使用してpLVX-Puro (Clontech)ベクターを酵素的に消化して、多重クローニング部位(MCS)のすぐ上流に位置する構成的活性型ヒトサイトメガロウイルス最初期プロモーター(P_{CMV} I_E)を除去し、次いで、消化されたベクターにヒトEF1 α プロモーター(GenBank: J04617.1)をクローニングした。次に、SIV Nef、P2A、及びLNGFR(低親和性神経成長因子受容体)をコードする融合遺伝子を連続的に構築した。次いで、SIV Nef-P2A-LNGFR融合遺伝子(配列番号24)をpLVX-hEF1 α プラスミドにクローニングし、その結果、組換えSIV Nef-P2A-LNGFRトランスファープラスミド(以下、「PLLV-M071」といい、「M071」と略す)を得た。M071組換えトランスファープラスミドを精製し、パッケージングプラスミドpsPAX2及びエンベローププラスミドpMD2.Gと同じ比率で混合し、次いで、HEK293T細胞に同時形質導入した。形質導入の60時間後、ウイルス上清を収集し、4℃、3000rpmで5分間遠心分離した。この上清を0.45 μ mフィルターの使用により濾過し、次いで、500KDの中空繊維膜による接流濾過を使用してさらに濃縮し、濃縮されたレンチウイルスを得て、これを-80℃で保管した。

10

【0348】

Jurkat細胞(クローンE6-1、ATCC(登録商標)TIB-152(商標))を、90% RPMI 1640培地(Life Technologies、#22400-089)、10%ウシ胎児血清(FBS、Life Technologies、#10099-141)、及び1%ペニシリン-ストレプトマイシン(Life Technologies、#15140-122)で培養した。SIV nef-P2A-LNGFR融合遺伝子を有するレンチウイルスを、Jurkat細胞培養物の上清に添加して形質導入した。LNGFRを、SIV Nef+細胞の選択マーカーとして使用した。形質導入の60時間後、 5×10^5 個のJurkat細胞を、下記のようにLife Attune NxT FACS(FACS)を使用したフローサイトメトリー分析に供し、LNGFR+細胞の百分率は66.1%であった。他の 1×10^7 細胞をDPBSで再懸濁し、次いで20 μ LのMACSelect LNGFR MicroBeads(Miltenyi Biotec、#130-091-330)を補い、磁気標識のために氷上で15分間インキュベートした。インキュベーション後、PBEバッファー(リン酸ナトリウム/EDTA)を添加して、体積を500 μ Lに調整した。次いで、細胞懸濁液を、MACSキットプロトコール(Miltenyi Biotecキット、#130-091-330)に従う磁気分離及び濃縮に供し、その結果、SIV Nef-P2A-LNGFRを発現する94.3%のLNGFR+Jurkat細胞株を得た(図1A)。

20

30

【0349】

FACS(蛍光活性化細胞選別機)

簡単に説明すると、細胞懸濁液を室温1000rpm/分で遠心分離し、上清を廃棄した。細胞をDPBSで再懸濁し、次いで抗体を添加し、4℃で30分間インキュベートした。本実施例において、使用した抗体は、1 μ LのPerCP/Cy5.5抗ヒトCD271 LNGFR抗体(BioLegend(登録商標)、#345111)であった。インキュベーション後、細胞懸濁液を室温1000rpm/分で遠心分離し、上清を廃棄し、次いで細胞を1mLのDPBSで再懸濁した。遠心分離及びDPBSでの再懸濁のステップを1回繰り返した。次いで、細胞を0.4mLのDPBSで再懸濁し、FACSを行った。

40

【0350】

MACS(磁気活性化細胞選別)

簡単に説明すると、細胞懸濁液を室温1000rpm/分で遠心分離し、上清を廃棄した。細胞をDPBSで再懸濁し、次いで20 μ LのMACSelect LNGFR M

50

microBeads (Miltenyi Biotec、#130-091-330)を補い、磁気標識のために氷上で15分間インキュベートした。インキュベーション後、PBバッファー(リン酸ナトリウム/EDTA)を添加して、体積を500 μ Lに調整した。次いで、細胞懸濁液を、MACSキットプロトコルに従う磁気分離及び濃縮に供した。

【0351】

2。TCR α ノックアウト(KO)構築物及びTCR α 欠損Jurkat細胞株の構築
ヒトTRAC(T Cell Receptor Alpha Constant、GenBank:NC_018925.2)を標的とするgRNA配列を、CRISPR/Cas9技術のために設計し(配列番号23)、lentiviralベクター
(Addgeneプラスミド、#52961、プーロマイシン選択可能マーカーを含む)にサブクローニングして、TCR α KO組換えプラスミドを構築した。TCR α KO組換えプラスミドを精製し、パッケージングプラスミドpsPAX2及びエンベローププラスミドpMD2.Gと同じ比率で混合し、次いで、HEK293T細胞に同時形質導入した。形質導入の60時間後、ウイルス上清を収集し、4℃、3000 rpmで5分間遠心分離した。この上清を0.45 μ mフィルターの使用により濾過し、次いで、500 KDの中空繊維膜による接線流濾過を使用してさらに濃縮し、濃縮されたレンチウイルスを得て、これを-80℃で保管した。

【0352】

Jurkat細胞(クローンE6-1、ATCC(登録商標)TIB-152(商標))を上記のように培養した。TCR α KO配列を有するレンチウイルスを、Jurkat細胞培養物の上清に添加して形質導入した。形質導入の72時間後、最終濃度1 μ g/mLのプーロマイシンを添加した。培養培地を3日毎に変え、同濃度のプーロマイシンを補って、単細胞クローンについてさらにスクリーニングした。

【0353】

3。SIV Nefは、TCR/CD3によるシグナル伝達を阻害する
SIV Nef過剰発現がTCR/CD3によるシグナル伝達に影響を及ぼすかどうかを試験するために、LNGFR+Jurkat細胞、形質導入していないJurkat細胞(UnT)、TCR α KO Jurkat細胞、及び空ベクターを形質導入したJurkat細胞を、上述のようにMACSで単離し、次いで、フィトヘマグルチニン(PHA、2 μ g/mL)でT細胞活性化を誘導した。PHAは、TCRを含むグリコシル化表面タンパク質上の糖に結合し、それによってそれらを架橋する。これにより、カルシウム依存性シグナル伝達経路が作動し、NFAT(活性化T細胞核内因子)の活性化が起こる。PHA刺激の3日後、各Jurkat細胞型の5 $\times$ 10⁵細胞を、CD69+率について、FACSを使用して試験した。FACSは上記のように行い、1 μ LのPE抗ヒトCD69抗体(BioLegend(登録商標)、#310906)を使用した。

【0354】

図1B(パネル中左の2つの縦列)に示すように、PHA刺激後、CD69陽性率は、形質導入していないJurkat細胞で41.1%、TCR α KO Jurkat細胞で1.09%、空ベクターを発現するJurkat細胞で60.1%、M071(SIV Nef-P2A-LNGFR) LNGFR+濃縮Jurkat細胞で7.05%であった。これらの結果は、TCRによるT細胞活性化が、SIV Nefの過剰発現時に有意に阻害される(P<0.05)ことを示した。

【0355】

4。SIV Nefは、TCR/CD3複合体下流のシグナル伝達を阻害しない
SIV Nef過剰発現がTCR/CD3下流のシグナル伝達に影響を及ぼすかどうかを試験するために、Jurkat細胞株を、PMA(ホルボール12-ミリステート13-アセテート、10 ng/mL)とION(イオノマイシン、250 ng/mL)との混合物で誘導し、次いで、T細胞活性化マーカーCD69の発現を、FACSで試験した(上記方法を参照されたい)。PMAは、タンパク質キナーゼC(PKC)の、ひいてはN

F- κ Bの特異的活性化因子である。IONは、細胞内外へのCa²⁺の移動を容易にする膜透過性カルシウムイオノフォアであり、細胞内カルシウムレベルを上昇させるために使用され得る。PMAとIONとの組み合わせにより、シグナル伝達装置が迂回され、転写因子のNF- κ B及びNFATが活性化し、T細胞活性化が起こる。図1B（パネル中右の2つの縦列を参照のこと）に示すように、PMA/ION刺激後、形質導入していないJurkat細胞(UnT)、TCR α KO Jurkat細胞、空ベクターを発現するJurkat細胞、及びM071 L NGFR+濃縮Jurkat細胞のCD69+率は、それぞれ96.7%、97.1%、98.5%、及び87.4%であった。これらの結果は、下流核内シグナル伝達が、SIV Nefの過剰発現時に著しく影響されないことを示した。

10

【0356】

まとめると、上記の結果は、Nefが、TCRによる上流T細胞活性化を著しく阻害するが、TCR下流の核内シグナル伝達には影響しないことを示した。

【0357】

実施例2。SIV Nefは、T細胞表面上のTCR/CD3複合体の発現を下方制御する

実施例1に記載したような、 5×10^5 個の形質導入していないJurkat細胞(UnT)、TCR α KO Jurkat細胞、空ベクターを発現するJurkat細胞、及びM071 L NGFR+濃縮Jurkat細胞を得て、CD3 ϵ 及びTCR $\alpha\beta$ の陽性率検査のためにFACSに供した。FACSを実施例1のように行った。1 μ LのPE/Cy7抗ヒトCD3抗体(BioLegend(登録商標)、#300316)または1 μ LのPE/Cy5抗ヒトTCR α/β 抗体(BioLegend(登録商標)、#306710)をFACSに使用した。

20

【0358】

別個の実験として、実施例1に記載したような、 1×10^6 個の形質導入していないJurkat細胞(UnT)、TCR α KO Jurkat細胞、空ベクターを発現するJurkat細胞、及びM071 L NGFR+濃縮Jurkat細胞を収集し、室温1000rpm/分で遠心分離し、上清を廃棄した。細胞をDPBSで再懸濁し、100 μ LのImmunol Staining Fix Solution(Beyotime、#P0098)を固定のために20分、室温で添加した。次いで、細胞懸濁液を室温1500rpm/分で遠心分離し、上清を廃棄した。細胞を、室温で20分間、200 μ LのDPBS+Triton X-100(0.1%)で再懸濁した。次いで、1 μ LのFITCコンジュゲートCD3 ζ /CD247抗体(Life Technologies、#A15754)を添加し、細胞懸濁液を15分間室温でインキュベートした。インキュベーション後、細胞懸濁液を室温1500rpm/分で遠心分離し、上清を廃棄し、次いで細胞を1mLのDPBSで再懸濁した。遠心分離及びDPBSでの再懸濁のステップを1回繰り返した。次いで、細胞を0.4mLのDPBSで再懸濁し、CD3 ζ 陽性率検査のためにFACSを行った。

30

【0359】

図2に示すように、CD3 ϵ 発現の高いJurkat細胞、及びTCR $\alpha\beta$ を発現する細胞は、SIV Nef発現時に著しく低減した。M071 L NGFR+濃縮Jurkat細胞に関するCD3 ϵ +率15.6%及びTCR $\alpha\beta$ +率15.3%を、形質導入していない(UnT) Jurkat細胞のもの(それぞれ85.9%及び90.0%)と比較されたい。CD3 ζ +率は、M071 L NGFR+濃縮Jurkat細胞については93.2%であり、形質導入していないJurkat細胞のもの(95.6%)との有意差はなかった。対照として、空ベクターの発現は、形質導入していない(UnT) Jurkat細胞の場合と比較して、CD3 ϵ 、TCR $\alpha\beta$ 、及びCD3 ζ のJurkat細胞発現に影響を及ぼさない。

40

【0360】

これらの結果は、SIV Nefの過剰発現がTCR/CD3複合体のT細胞表面発現

50

を著しく下方制御し（一方、CD3ζ発現は影響を受けない）、それにより、TCRによるT細胞活性化が影響を受けることを示した。

【0361】

実施例3。SIV Nef相同体のHIV1 Nef及びHIV2 Nefは、TCR/CD3によるシグナル伝達を阻害する

1。HIV1 Nef/HIV2 Nef-T2A-Puroトランスファープラスミド及び細胞株の構築

UniProtデータベースの分析に基づき、HIV1 Nef及びHIV2 NefをSIV Nef相同体として回収した。融合遺伝子HIV1 nef-T2A-Puro（配列番号25）及びHIV2 nef-T2A-Puro（配列番号26）を構築し、pLVX-hEF1α発現ベクター（実施例1において構築）にクローニングして、組換えトランスファープラスミドのHIV1 Nef-T2A-Puro（以下、「HIV1」トランスファープラスミドという）及びHIV2 Nef-T2A-Puro（以下、「HIV2」トランスファープラスミドという）をそれぞれ形成した。HIV1トランスファープラスミドを精製し、パッケージングプラスミドpsPAX2及びエンベローププラスミドpMD2.Gと同じ比率で混合し、次いで、HEK293T細胞に同時形質導入した。HIV2トランスファープラスミドを精製し、同様にpsPAX2及びpMD2.Gプラスミドと共にHEK293T細胞に形質導入した。形質導入の60時間後、ウイルス上清を収集し、4℃、3000rpmで5分間遠心分離した。この上清を0.45μmフィルターの使用により濾過し、次いで、500KDの中空繊維膜による接線流濾過を使用してさらに濃縮し、濃縮されたレンチウイルスを得て、これを-80℃で保管した。

【0362】

Jurkat細胞（クローンE6-1、ATCC（登録商標）TIB-152（商標））を実施例1のように培養した。HIV1 Nef-T2A-PuroまたはHIV2 Nef-T2A-Puro融合配列を有するレンチウイルスを、Jurkat細胞培養物の上清に添加して形質導入した。ピューロマイシンをHIV1/HIV2 Nef+細胞の選択可能マーカーとして使用した。形質導入の72時間後、最終濃度1μg/mLのピューロマイシンを添加した。培養培地を3日毎に変え、同濃度のピューロマイシンを補って、単細胞クローンについてさらにスクリーニングした。

【0363】

2。HIV1 Nef/HIV2 Nefは、T細胞表面上のTCR/CD3複合体の発現を下方制御する

実施例1に記載したような、 5×10^5 個のHIV1 Nef+Jurkat細胞、HIV2 Nef+Jurkat細胞、形質導入していないJurkat細胞（Unt）、TCRαKO Jurkat細胞、空ベクターを発現するJurkat細胞、M071 LNGFR+濃縮Jurkat細胞を、CD3ε及びTCRαβの陽性率検査のためにFACSに供した。FACSを実施例1のように行い、1μLのPE/Cy7抗ヒトCD3抗体（BioLegend（登録商標）、#300316）または1μLのPE/Cy5抗ヒトTCRα/β抗体（BioLegend（登録商標）、#306710）をFACSに使用した。別個の実験として、実施例1に記載したような、 1×10^6 個のHIV1

Nef+Jurkat細胞、HIV2 Nef+Jurkat細胞、形質導入していない（Unt）Jurkat細胞、TCRαKO Jurkat細胞、空ベクターを発現するJurkat細胞、及びM071 LNGFR+濃縮Jurkat細胞を、実施例2のように収集し、固定し、CD3ζ陽性率検査のためにFACSに供した。1μLのFITCコンジュゲートCD3ζ/CD247抗体（Life Technologies、#A15754）をFACSに使用した。

【0364】

図3に示すように、TCRαβ+率は、M071 LNGFR+濃縮Jurkat細胞、HIV1 Nef+Jurkat細胞、及びHIV2 Nef+Jurkat細胞でそれぞれ16.1%、15.1%、及び26.2%であり、空ベクターを発現するJurk

a t細胞のもの（96.5%、 $P < 0.05$ ）より有意に低かった。CD3 ϵ +率は、M071 L N G F R+濃縮J u r k a t細胞、H I V 1 N e f+J u r k a t細胞、及びH I V 2 N e f+J u r k a t細胞でそれぞれ19.4%、18.1%、及び30.6%であり、空ベクターを発現するJ u r k a t細胞のもの（98.2%、 $P < 0.05$ ）より有意に低かった。T C R α K O J u r k a t細胞は陽性対照であり、著しく低減したT C R α +率及びC D 3 ϵ +率を示した。一方、C D 3 ζ +率は、M071 L N G F R+濃縮J u r k a t細胞、H I V 1 N e f+J u r k a t細胞、及びH I V 2 N e f+J u r k a t細胞でそれぞれ99.0%、94.3%、及び95.0%であり、形質導入していない（U n T）J u r k a t細胞または空ベクターを発現するJ u r k a t細胞のもの（それぞれ98.0%及び99.7%、 $P > 0.05$ ）との有意差はなかった。

10

【0365】

これらの結果は、S I V N e f相同体H I V 1 N e f及びH I V 2 N e fの過剰発現が、T C R / C D 3の細胞表面発現を効果的に下方制御することができ（一方、C D 3 ζ 発現は影響を受けない）、それにより、T C R / C D 3によるT細胞活性化が阻害されることを示す。H I V 1 N e f及びH I V 2 N e fの阻害効率は、S I V N e fのものに匹敵する。

【0366】

実施例4。S I V N e fは、標的細胞のT C Rによる細胞溶解を阻害する

1。抗B C M A C A R及び抗B C M A C A R - L N G F Rトランスフェープラスミドの構築

20

抗B C M A C A R（以下、「B C M A C A R」という）を、W O 2 0 1 7 0 2 5 0 3 8及びW O 2 0 1 8 0 2 8 6 4 7の実施例に記載されているように構築した。W O 2 0 1 8 0 2 8 6 4 7の内容全体は、記載されている全てのB C M A C A R構築物の配列を含め、参照により本明細書に具体的に援用される。

【0367】

簡単に説明すると、N末端からC末端に向かって、C D 8 α ヒンジドメイン（「C D 8 α ヒンジ」）、C D 8膜貫通ドメイン（「C D 8 T M」）、C D 2 8細胞質ドメイン（「C D 2 8 c y t o」）、及び／または4-1 B B（C D 1 3 7）細胞質ドメイン（「4-1 B B c y t o」）、及びC D 3 ζ 細胞質ドメイン（「C D 3 ζ 」）を含むC A R 骨格ポリペプチドをコードする核酸配列を化学合成し、これを、構成的h E F 1 α プロモーター（実施例1のように構築したp L V X - h E F 1 α ）の下流でそれに作動可能に連結した事前修飾レンチウイルスベクターにクローニングした。

30

【0368】

融合配列B C M A C A R - P 2 A - L N G F Rを有するB C M A C A R - P 2 A - L N G F Rトランスフェープラスミドを構築するために、B C M A C A R - P 2 A - L N G F R遺伝子をG e n s c r i p tによって直接構築した。

【0369】

B C M A C A R - P 2 A - L N G F Rトランスフェープラスミドを精製し、パッケージングプラスミドp s P A X 2及びエンベローププラスミドp M D 2 . Gと同じ比率で混合し、次いで、H E K 2 9 3 T細胞に同時形質導入した。形質導入の60時間後、ウイルス上清を収集し、4℃、3000 r p mで5分間遠心分離した。この上清を0.45 μ m フィルターの使用により濾過し、次いで、500 K Dの中空繊維膜による接線流濾過を使用してさらに濃縮し、濃縮されたレンチウイルスを得て、これを-80℃で保管した。

40

【0370】

2。S I V N e f及び抗B C M A C A Rの同時発現試験

B C M A C A R及びS I V N e f - P 2 A - L N G F Rプラスミドを、通常のポリエチレンイミン（P E I）形質導入プロトコルの使用によりH E K 2 9 3 T細胞にコトランスフェクトした。トランスフェクションの3日後、 5×10^5 細胞をB C M A C A R+及びL N G F R+発現についてF A C Sにより検査した。F A C Sは、実施例1に記

50

載したように行った。1 μ LのFITC標識ヒトBCMA／TNFRSF17タンパク質、Fcタグ（ACROBiosystems、#BCA-HF254）、及び1 μ LのPerCP／Cy5.5抗ヒトCD271 NGFR抗体（BioLegend（登録商標）、#345111）を混合し、FACSに使用した。

【0371】

図4Aに示すように、HEK293T細胞にコトランスフェクトしたBCMA CAR及びSIV Nef-P2A-LNGFRプラスミドにより、17.3%のBCMA CAR+／LNGFR+二重陽性細胞が生成された。このことは、BCMA CARが、SIV Nefの過剰発現時にも細胞表面上で効果的に発現し得ることを示した。

【0372】

3。SIV Nefは、初代Tリンパ球においてTCR細胞表面発現を著しく阻害する50 mLの末梢血をボランティアから採血した。末梢血単核細胞（PBMC）を、密度勾配遠心分離によって単離した。汎T細胞単離キット（Miltenyi Biotec、#130-096-535）を使用して、PBMCを磁気標識し、Tリンパ球を単離及び精製した。ヒトT細胞活性化／増大キット（Miltenyi Biotec、#130-091-441）を使用して、精製後のTリンパ球の活性化及び増大を行った。活性化Tリンパ球を収集し、RPMI 1640培地（Thermo Fisher Scientific、#22400-089）に再懸濁した。活性化の3日後、 5×10^6 個の活性化Tリンパ球に、SIV Nef-P2A-LNGFRをコードするレンチウイルスと、BCMA CAR-P2A-LNGFRをコードするレンチウイルスとを同時形質導入した。T細胞懸濁液を6ウェルプレートに加え、37℃、5%CO₂のインキュベータで一晩インキュベートした。形質導入の5日後、 1×10^7 個のT細胞を採取し、MACS（実施例1に記載の通り、MACSelect LNGFR MicroBeads（Miltenyi Biotec、#130-091-330）を使用）を使用して分離して、LNGFR+T細胞を得た。選別後のLNGFR+T細胞を2日間にわたって増大及び濃縮させ、次いで、 5×10^5 個のLNGFR+T細胞を、FACSにより、TCR $\alpha\beta$ 陽性率について試験した。FACSは実施例1のように行い、1 μ LのPE／Cy5抗ヒトTCR α/β 抗体（BioLegend（登録商標）、#306710）を使用した。

【0373】

図4Bに示すように、T細胞に、BCMA CAR-P2A-LNGFRをコードするレンチウイルスと、SIV Nef-P2A-LNGFRをコードするレンチウイルスとを同時形質導入したところ、LNGFR+T細胞集団中、35.8%のTCR $\alpha\beta$ -細胞がもたらされた。このことは、BCMA CAR-P2A-LNGFR及びSIV Nef-P2A-LNGFRの同時形質導入により、TCR $\alpha\beta$ 陰性CAR-T細胞が効果的に生成されることを示した。

【0374】

4。TCR／CD3枯渇Tリンパ球の選別及び濃縮

BCMA CAR-P2A-LNGFRをコードするレンチウイルス、及びSIV Nef-P2A-LNGFRをコードするレンチウイルスを、 5×10^7 個の初代Tリンパ球への同時形質導入に使用した。形質導入の5日後、汎T細胞単離キット（Miltenyi Biotec、#130-096-535）を使用して、キットプロトコールに従い、細胞を磁気標識し、CD3 ϵ 陰性Tリンパ球を分離及び精製した。選別後のCD3 ϵ 陰性T細胞を2日間にわたって増大及び濃縮させ、次いで、 5×10^5 個の細胞を（各FACS実験につき）収集し、FACSにより、CD3 ϵ 陰性T細胞集団中のTCR $\alpha\beta$ 、CD3 ϵ 、及びLNGFRの陽性率を検査した。FACSは実施例1のように行い、1 μ LのPE／Cy5抗ヒトTCR α/β 抗体（BioLegend（登録商標）、#306710）をTCR $\alpha\beta$ +試験に使用し、1 μ LのPE／Cy7抗ヒトCD3抗体（BioLegend（登録商標）、#300316）をCD3 ϵ +試験に使用し、1 μ LのPerCP／Cy5.5抗ヒトCD271 NGFR抗体（BioLegend（登録商標）

10

20

30

40

50

、#345111)をLNGFR+試験に使用した。

【0375】

図4Cに示すように、BCMA CAR-P2A-LNGFRをコードするレンチウイルスと、SIV Nef-P2A-LNGFRをコードするレンチウイルスとを同時形質導入した、MACS選別後のCD3ε陰性T細胞集団のうち、TCRαβ+率は5.35%であり、CD3ε+率は2.27%であり、LNGFR+率は88.5%であった(「MACS CD3 neg パネル」を参照されたい)。一方、MACS選別後の形質導入していない(UnT)T細胞では、TCRαβ+率は80.9%であり、CD3ε+率は91.9%であり、LNGFR+率は1.25%しかなかった。このことは、MACSによるCD3ε陰性細胞選別によって、TCR陰性初代Tリンパ球がさらに単離及び濃縮され得ることを示した。

10

【0376】

5。標的細胞に対するTCRによる細胞溶解活性は、TCR/CD3枯渇Tリンパ球において著しく低減した

上記ステップから得られた、BCMA CAR-P2A-LNGFRをコードするレンチウイルスと、SIV Nef-P2A-LNGFRをコードするレンチウイルスとを同時形質導入した、選別後のCD3ε陰性T細胞の異なる群を、20:1または10:1のエフェクター対標的(E:T)細胞比で、多発性骨髄腫(MM)細胞株RPMI-8226(BCMA+、ルシフェラーゼ(Luc)マーカーあり)または慢性骨髄性白血病(CML)細胞株K562(BCMA-、Lucマーカーあり)と混合し、Corning(登録商標)384ウェルソリッドプレート白で12時間インキュベートした。ONE-Glo(商標)ルシフェラーゼアッセイシステム(Promega、#E6120)を使用して、ルシフェラーゼ産生を測定した。25μLのONE-Glo(商標)試薬を384ウェルプレートの各ウェルに加え、インキュベートしてから、標的細胞に対する異なるTリンパ球の細胞溶解作用を計算するために、Spark(商標)10Mマルチモードマイクロプレートリーダー(TECAN)上に置き、ルシフェラーゼ測定を行った。

20

【0377】

RPMI-8226及びK562細胞株に対するCAR+/CD3ε-T細胞の特異的及び非特異的な細胞溶解作用を、さらに試験した。図4Dに示すように、BCMA CAR-P2A-LNGFR及びSIV Nef-P2A-LNGFRを発現する濃縮CD3ε陰性T細胞は、TCR発現レベル(CD3ε+/TCRαβ+、「TCR pos」、またはCD3ε-/TCRαβ-、「TCR neg」)にかかわらず、RPMI-8226細胞(BCMA+)に対する抗BCMA CAR特異的腫瘍細胞殺傷を効果的に媒介し、溶解率は90%超であり、これは、形質導入していないT細胞(「UnT」、P<0.05)の場合と比べて有意に高かった。一方、TCRαβを発現する細胞(CD3ε+/TCRαβ+)が、TCRαβを発現しない細胞(CD3ε-/TCRαβ-)と比べて高い細胞溶解性を有し、そのような細胞溶解作用が、形質導入していないT細胞(UnT、P>0.05)の場合に匹敵したことから、BCMA CAR-P2A-LNGFR及びSIV Nef-P2A-LNGFRを発現する濃縮CD3ε陰性T細胞は、K562細胞株(BCMA-)において、TCRによる非特異的腫瘍細胞殺傷を誘導した。初代T細胞と共にインキュベートしていないLuc標識細胞を陰性対照(NC)とした。0.25% Triton X-100化学溶解群を陽性対照(PC)とした。RPMI-8226とK562の両細胞株において、E:T率が高いほど細胞殺傷性が高かった。これは、レンチウイルスによる腫瘍細胞殺傷に起因すると考えられる。これらの結果は、SIV Nefの発現が、TCRαβによるT細胞活性化を効果的に阻害し、その結果、標的細胞に対するTCRによる細胞溶解作用が低減することを示した。

30

40

【0378】

実施例5。TCR/CD3枯渇CAR-T細胞の1ステップでの取得

1。SIV Nef+CARオールインワンベクター及びJurkat細胞株の構築
融合遺伝子配列BCMA CAR-P2A-LNGFR-SIV Nef、BCMA

50

CAR-P2A-SIV Nef、BCMA CAR-P2A-(GGGS)₃-SIV Nef、SIV Nef-P2A-BCMA CAR、SIV Nef-IRES-CAR、CAR-IRES-SIV Nef、CAR-PGK-SIV Nef、及びSIV Nef-PGK-CARを化学合成し、pLVX-hEF1 α ベクター（実施例1参照）にクローニングし、組換えトランスファープラスミドBCMA CAR-P2A-LNGFR-SIV Nef（「PLLV-M072」または「M072」）、BCMA CAR-P2A-SIV Nef（「PLLV-M086」または「M086」）、BCMA CAR-P2A-(GGGS)₃-SIV Nef（「PLLV-M090」または「M090」）、SIV Nef-P2A-BCMA CAR（「PLLV-M091」または「M091」）、SIV Nef-IRES-BCMA CAR（「PLLV-M126」または「M126」）、BCMA CAR-IRES-SIV Nef（「PLLV-M159」または「M159」）、BCMA CAR-PGK-SIV Nef（「PLLV-M160」または「M160」）、及びSIV Nef-PGK-BCMA CAR（「PLLV-M161」または「M161」）を構築した。トランスファープラスミドを精製し、パッケージングプラスミドpSPAX2及びエンベローププラスミドpMD2.Gと同じ比率で混合し、次いで、HEK293T細胞に同時形質導入した。形質導入の60時間後、ウイルス上清を収集し、4℃、3000rpmで5分間遠心分離した。この上清を0.45 μ mフィルターの使用により濾過し、次いで、500KDの中空繊維膜による接線流濾過を使用してさらに濃縮し、濃縮されたレンチウイルスを得て、これを-80℃で保管した。

10

20

【0379】

2. TCR/CD3 枯渴CAR-T細胞の1ステップでの取得

BCMA CAR-P2A-LNGFR-SIV Nef、BCMA CAR-P2A-SIV Nef、BCMA CAR-P2A-(GGGS)₃-SIV Nef、SIV Nef-P2A-BCMA CAR、SIV Nef-IRES-BCMA CAR、BCMA CAR-IRES-SIV Nef、BCMA CAR-PGK-SIV Nef、及びSIV Nef-PGK-BCMA CARの各配列を有するレンチウイルスを、培養後のJurkat細胞懸濁液に添加して形質導入した。レンチウイルスSIV Nef-P2A-LNGFR(M071)を非CARコード対照として使用した。形質導入していないJurkat細胞（「UnT」）を陰性対照として使用した。形質導入の72時間後、 5×10^5 細胞を含む懸濁液を収集及び調製し、実施例1に記載したようにFACSを行って、CD3 ϵ 、TCR $\alpha\beta$ 、及びBCMA CARの陽性率を検査した。1 μ LのPE/Cy7抗ヒトCD3抗体（BioLegend（登録商標）、#300316）、1 μ LのPE/Cy5抗ヒトTCR α/β 抗体（BioLegend（登録商標）、#306710）、または1 μ LのFITC標識ヒトBCMA/TNFRSF17タンパク質、Fcタグ（ACROBiosystems、#BCA-HF254）をFACSに使用した。

30

【0380】

図5A~5Cから分かるように、SIV Nef-P2A-CAR(M091)、SIV Nef-IRES-CAR(M126)、CAR-IRES-SIV Nef(M159)、CAR-PGK-SIV Nef(M160)、SIV Nef-PGK-CAR(M161)のTCR $\alpha\beta$ -率はそれぞれ、59.1%、82.7%、50.4%、43.5%、95.0%であり、TCR $\alpha\beta$ は、UnT群(12.6%)と比較して著しく下方制御された。一方、CAR-P2A-LNGFR-SIV Nef(M072)、CAR-P2A-SIV Nef(M086)、CAR-P2A-(GGGS)₃-SIV Nef(M090)のTCR $\alpha\beta$ -率はそれぞれ、7.94%、16.3%、15.4%であり、形質導入していない(UnT)群(12.6%)と比較して有意差はなかった。これらの上記結果は、SIV NefのC'末端に構築されたCARが、自己切断性ペプチドP2A(M091)を介して、TCR/CD3の細胞表面発現を下方制御すると共に、十分なCAR発現を維持し得ることを示した。しかしその一方で、SIV Nefタ

40

50

ンパク質のN末端の空間的構造がTCR／CD3複合体の細胞表面発現を下方制御するうえで重要であり、Nefタンパク質のN'末端に残留するM072、M086、及びM090ペクターの切断されたP2Aアミノ酸が、その機能に著しく影響したという可能性がある。下記の表5に、SIV Nef CARオールインワンプラスミドがCD3ε、TCRαβ、及びBCMA CARの発現に及ぼす作用をまとめる。

【表5】

表5。オールインワンプラスミド、ならびにTCR／CD3複合体及びCARの発現に対する影響

群	構造	CAR 発現%	TCR/CD3 複合体の発現		
			下方制御	TCRαβ neg %	CD3ε neg %
UnT	陽性対照	0.124	該当せず	12.6	9.68
M071	SIV Nef-P2A-LNGFR	0.959	あり	94.7	89.0
M072	CAR-P2A-LNGFR -SIV Nef	97.3	なし	7.94	4.17
M086	CAR-P2A-SIV Nef	97.5	なし	16.3	8.26
M090	CAR-P2A-(GGGS) ₃ -SIV Nef	97.6	なし	15.4	7.36
M091	SIV Nef-P2A-CAR	85.5	あり	59.1	42.5
M126	SIV Nef-IRES-CAR	21.4	あり	82.7	71.5
M159	CAR-IRES-SIV Nef	79.6	あり	50.4	34.6
M160	CAR-PGK-SIV Nef	94.3	あり	43.5	35.6
M161	SIV Nef-PGK-CAR	5.44	あり	95.0	89.6

【0381】

実施例6。T細胞CD4及びCD28発現に対する負の効果が低減しているNef変異体及びサブタイプ

Nefタンパク質の特定のアミノ酸は、CD4及びCD28に結合することで、T細胞におけるCD4、CD28発現を下方制御し得る（表6参照）。NefがCD4及びCD28の発現及び機能に及ぼす負の効果を低減させるために、本発明者らは、サブタイプNef（HIV F2-Nef、HIV C2-Nef、HIV HV2NZ-Nef）及び変異体Nef（「mut Nef」という）をさらに設計し、構築した。

【表 6】

表 6. Nef アミノ酸の機能

(出典: V. Piguet and D. Trono, "A Structure-function Analysis of the Nef Protein of Primate Lentiviruses", 1999, [Rev Med Viro 1] 448-459)

アミノ酸	ドメイン	機能
G	ミリスチル化部位	CD 4 下方制御 + MHC I 下方調節 + シグナル伝達分子との会合
R G K P	N 末端 α ヘリックス (MHC I 下方制御 + タンパク質キナーゼ動員)	MHC I 下方調節 + シグナル伝達分子との会合
D D E E E	酸性クラスター (MHC - I 下方制御)	MHC I 下方調節
P V Q P R V P L R Q M T Y	プロリンベースのリピート (MHC - I 下方制御 + SH3 結合)	MHC I 下方調節 + シグナル伝達分子との会合
R R	PAK 結合	CD 4 下方制御 + シグナル伝達分子との会合
A R	COP I 動員	CD 4 下方制御
L M	ジロイシンベースの AP 動員 (HIV-1 Nef)	CD 4 下方制御
E D	V-ATPase 及び Raf-1 結合	CD 4 下方制御 + シグナル伝達分子との会合

10

20

30

【0382】

1. サブタイプまたは変異体 Nef プラスミド及び様々な Nef 発現細胞株の構築

本発明者らは、CD 4 及び CD 28 結合に重要な変異型アミノ酸を有する SIV Nef 配列を設計した。また、他の SIV Nef 変異体及び HIV Nef 相同体もいくつか設計した。サブタイプ Nef-P2A-LNGFR または mutant Nef-P2A-LNGFR 融合配列を化学合成し、次いで、実施例 1 に記載したような pLVX-hEF1 α プラスミドにクローニングし、その結果、サブタイプ Nef-P2A-LNGFR 及び mutant Nef-P2A-LNGFR トランスファープラスミドを得た (サブタイプまたは変異型 Nef の構造については表 7 を、変異体の配列については「配列表」のセクションを参照されたい)。M016 (スクランブル配列) を陰性対照とした。実施例 1 で構築したような M071 (野生型 SIV Nef-P2A-LNGFR) を陽性対照として使用した。

40

【表 7】

表 7。N e f 変異体及びサブタイプの構造

ベ ク タ ー	タンパク質	種類	Nef 情報
M016	陰性対照	-	陰性対照、スクランブル配列
M071	SIV Nef	-	陽性対照、野生型 SIV Nef タンパク質
M116	SIV Nef 変異体 1 または SIV Nef M116	変異	SIV Nef 「ジロイシンベースの AP 動員 ドメイン」を変異させる
M117	SIV Nef 変異体 2	変異	SIV Nef 「ジロイシンベースの AP 動員 ドメイン」を変異させる
		変異	SIV Nef 「PAK 結合ドメイン」を変異さ せる
M118	SIV Nef 変異体 3	変異	SIV Nef 「PAK 結合ドメイン」を変異さ せる
			SIV Nef 「COP I 動員ドメイン」を変異 させる
			SIV Nef 「ジロイシンベースの AP 動員 ドメイン」を変異させる
			SIV Nef 「V-ATPase 及び Raf-1 結合ド メイン」を変異させる
M119	HIV F2-Nef	サブタイプ	HIV F2-Nef タンパク質
M120	HIV C2-Nef	サブタイプ	HIV C2-Nef タンパク質
M121	HIV HV2NZ-Nef	サブタイプ	HIV HV2NZ-Nef タンパク質
M142	SIV Nef 変異体 4	変異	SIV Nef 「COP I 動員ドメイン」を変異 させる
			SIV Nef 「ジロイシンベースの AP 動員 ドメイン」を変異させる
			SIV Nef 「V-ATPase 及び Raf-1 結合ド メイン」を変異させる
M143	SIV Nef 変異体 5	変異	SIV Nef 「ジロイシンベースの AP 動員 ドメイン」を変異させる
			SIV Nef 「V-ATPase 及び Raf-1 結合ド メイン」を変異させる

*M119、M120、及びM121 mut Nef 配列は、S. R. Das and S. Jameel, 2005 (Biology of the HIV Nef protein, Indian J Med Res., 121 (4): 315-332) を元にした。他の変異体は、自己設計したものであった。

【0383】

表 7 のトランスファープラスミドを精製し、パッケージングプラスミド pSPAX2 及びエンベローププラスミド pMD2. G と同じ比率で混合し、次いで、HEK293T 細胞に同時形質導入した。形質導入の 60 時間後、ウイルス上清を収集し、4℃、3000 rpm で 5 分間遠心分離した。この上清を 0.45 μm フィルターの使用により濾過し、次いで、500 KD の中空繊維膜による接線流濾過を使用してさらに濃縮し、濃縮されたレンチウイルスを得てから、これを -80℃ で保管した。

【0384】

Jurkat 細胞 (クローン E6-1、ATCC (登録商標) TIB-152 (商標)) を実施例 1 のように培養した。表 6 に記載の融合配列を有するレンチウイルスを、Jurkat 細胞培養物の上清に添加して形質導入した。ピューロマイシンを Nef+細胞の

選択可能マーカーとして使用した。形質導入の72時間後、最終濃度1 μg/mLのピューロマイシンを添加した。培養培地を3日毎に変え、同濃度のピューロマイシンを補って、単細胞クローンについてさらにスクリーニングした。

【0385】

2. サブタイプまたは変異体NefがT細胞におけるCD4及びCD28の発現に及ぼす作用の試験

形質導入の72時間後、 5×10^5 個のJurkat細胞を含む懸濁液を収集及び調製し、実施例1に記載したようにFACSを行って、CD3ε、TCRαβ、CD4、及びCD28の陽性率を検査した。1 μLのPE/Cy7抗ヒトCD3抗体(BioLegend(登録商標)、#300316)、1 μLのPE/Cy5抗ヒトTCRα/β抗体(BioLegend(登録商標)、#306710)、1 μLのPE-CD4またはAPC抗ヒトCD28抗体をFACSに使用した。

【0386】

図6A~6Dから分かるように、M116(SIV Nef変異体1またはSIV Nef M116)を形質導入したJurkat細胞は、88.5%のTCRαβ陰性率、86.6%のCD3ε陰性率を呈し、73.3%のTCRαβ陰性率、87.3%のCD3ε陰性率を呈したM071形質導入細胞(wt SIV Nef、 $P > 0.05$)との有意差はなかった。一方、M116(SIV Nef変異体1またはSIV Nef M116)を形質導入したJurkat細胞は、7.44%のCD4陰性率及び1.67%のCD28陰性率しか呈さず、これは、M071形質導入Jurkat細胞(wt SIV Nef、 $P < 0.05$)における53.3%のCD4陰性率及び72.9%のCD28陰性率と比べて有意に低かった。この結果は、野生型SIV Nefタンパク質と比較して、M116プラスミド中のSIV Nef変異体1が、T細胞表面上のTCR/CD3複合体の発現を効果的に下方制御し得るが、CD4及びCD28の発現には下方制御作用をほとんど及ぼさないことを示した。M117(SIV Nef変異体2)、M118(SIV Nef変異体3)、M142(SIV Nef変異体4)、及びM143(SIV Nef変異体5)は、T細胞表面において、TCR/CD3複合体の発現を効果的に下方制御すると共に、CD4及びCD28の発現を維持する(すなわち、CD4下方制御作用及び/またはCD28下方制御作用が大幅に低い)という同様の作用を有した。HIVサブタイプNefタンパク質(M119、M120、及びM121)もまた、CD4発現に対する下方制御作用をほとんど有しなかったが、T細胞表面上のTCR/CD3複合体に対する下方制御作用は、SIV Nef変異体(M116、M117、M118、M142、及びM143)ほど良好ではなかった。表8に、異なるNefサブタイプ及び変異体が、T細胞におけるTCRαβ、CD3ε、CD4、及びCD28の発現に及ぼす作用をまとめる。

【表8】

表8。Nefサブタイプまたは変異体が、T細胞におけるTCRαβ、CD3ε、CD4、及びCD28の発現に及ぼす作用

マーカー	UnT	M016	M071	M116	M117	M118	M119	M120	M121	M142	M143
TCRαβ neg	10.5 %	19.0 %	73.3 %	88.5 %	35.0 %	26.5 %	5.82 %	5.34 %	6.85 %	82.9 %	81.8 %
CD3ε neg	12.4 %	8.54 %	87.3 %	86.6 %	8.83 %	6.28 %	2.55 %	3.57 %	6.85 %	89.3 %	90.0 %
CD4 neg	17.0 %	12.8 %	53.3 %	7.44 %	3.85 %	4.79 %	3.97 %	11.8 %	9.62 %	19.3 %	21.5 %
CD28 neg	2.13 %	2.08 %	72.9 %	1.67 %	0.54 %	1.36 %	1.06 %	3.73 %	2.21 %	8.81 %	5.52 %

【0387】

実施例 7。CAR-T 細胞免疫療法における SIV Nef の使用

1。SIV Nef + CAR オールインワンベクターの構築

融合遺伝子配列 SIV Nef-IRES-CD20 scFv (リツキシマブ) CAR (配列番号 48)、SIV Nef-IRES-CD20 scFv (Leu-16) CAR (配列番号 49)、SIV Nef-IRES-CD19×CD20 scFv CAR (配列番号 50)、SIV Nef-IRES-CD19 scFv CAR (配列番号 51)、SIV Nef-IRES-BCMA BiVHH CAR1 (配列番号 52)、SIV Nef-IRES-BCMA BiVHH CAR2 (配列番号 53)、SIV Nef-IRES-BCMA mono-VHH CAR (配列番号 54) を化学合成し、次いで、pLVX-hEF1α 発現ベクター (実施例 1 参照) にクローニングし、組換えトランスファープラスミド PLLV-M167、PLLV-M168、PLLV-M169、PLLV-M170、PLLV-M171、PLLV-M172、及び PLLV-M173 を、それぞれ構築した (表 9 参照)。

10

【0388】

トランスファープラスミドを精製し、同様に pSPAX2 及び pMD2. G プラスミドと共に HEK293T 細胞に形質導入した。形質導入の 60 時間後、ウイルス上清を収集し、4℃、3000 rpm で 5 分間遠心分離した。この上清を 0.45 μm フィルターの使用により濾過し、500 KD の中空繊維膜による接線流濾過を使用してさらに濃縮し、濃縮されたレンチウイルスを得てから、これを -80℃ で保管した。

【表 9】

20

表 9。例示的な SIV Nef + CAR オールインワンベクター

ベクター名	融合遺伝子	融合遺伝子構造	核酸配列	CAR アミノ酸配列
PLLV-M167	M167	SIV Nef-IRES-CD20 scFv (リツキシマブ) CAR	配列番号 48	配列番号 55
PLLV-M168	M168	SIV Nef-IRES-CD20 scFv (Leu-16) CAR	配列番号 49	配列番号 56
PLLV-M169	M169	SIV Nef-IRES-CD19×CD20 scFv CAR	配列番号 50	配列番号 57
PLLV-M170	M170	SIV Nef-IRES-CD19 scFv CAR	配列番号 51	配列番号 58
PLLV-M171	M171	SIV Nef-IRES-BCMA BiVHH CAR1	配列番号 52	配列番号 59
PLLV-M172	M172	SIV Nef-IRES-BCMA BiVHH CAR2	配列番号 53	配列番号 60
PLLV-M173	M173	SIV Nef-IRES-BCMA mono-VHH CAR	配列番号 54	配列番号 61

30

【0389】

2。TCR 陰性 CAR-T 細胞の 1 ステップでの取得

40

解凍された PBMC から、汎 T 細胞単離キット (Miltenyi Biotec、#130-096-535) を使用し、T 細胞を得た。単離された T 細胞を 10 cm の細胞培養皿に播種し、次いで MicroBeads (Miltenyi Biotec、#130-111-160) をメーカーの説明に従って補い、37℃、5% CO₂ のインキュベータで 72 時間インキュベートした。

【0390】

SIV Nef-IRES-CD19 scFv CAR、SIV Nef-IRES-CD20 scFv CAR、SIV Nef-IRES-CD19×CD20 scFv CAR、SIV Nef-IRES-BCMA BiVHH CAR1、SIV Nef-IRES-BCMA BiVHH CAR2、または SIV Nef-IRES

50

—BCMA mono-VHH CARの各配列を有するレンチウイルスを、それぞれ、培養後の初代T細胞懸濁液に添加して形質導入した。形質導入後、TCR $\alpha\beta$ 細胞単離キット (Miltenyi Biotec、#130-092-614) を使用したMACSにより、TCR陰性CAR-T細胞を単離し、濃縮した。

【0391】

MACSの1日後、濃縮された 5×10^5 個のTCR $\alpha\beta$ 陰性細胞を含む懸濁液を収集及び調製し、FACSを行ってTCR $\alpha\beta$ の発現を検査した。

【0392】

図7から分かるように、MACS濃縮後のTCR $\alpha\beta$ 陰性T細胞率は、SIV Nef + CARオールインワン構築物を形質導入したT細胞の場合はかなり高かったが、形質導入していないT細胞 (UnT) は、MACS後、1.14%のTCR $\alpha\beta$ 陰性率しかもたらしなかった。SIV Nef-IRES-CD20 scFv (リツキシマブ) CAR (M167) T細胞 (89.7%)、SIV Nef-IRES-CD20 scFv (Leu-16) CAR (M168) T細胞 (93.3%)、SIV Nef-IRES-CD19 $\times$ CD20 scFv CAR (M169) T細胞 (92.1%)、SIV Nef-IRES-CD19 scFv CAR (M170) T細胞 (93.6%)、SIV Nef-IRES-BCMA BiVHH CAR1 (M171) T細胞 (93.5%)、SIV Nef-IRES-BCMA BiVHH CAR2 (M172) T細胞 (87.9%)、及びSIV Nef-IRES-BCMA mono-VHH CAR (M173) T細胞 (94.0%) について、MACS後のTCR $\alpha\beta$ 陰性率を参照されたい。

【0393】

上記ステップで得た、MACS選別後のTCR $\alpha\beta$ 陰性T細胞、MACS選別後のTCR $\alpha\beta$ 陽性T細胞、及び形質導入していないT細胞 (UnT) を、異なるエフェクター対標的 (E:T) 細胞比で、標的細胞または腫瘍細胞とそれぞれ混合し、Corning (登録商標) 384ウェルソリッドプレート白で12時間インキュベートした。K562-CD20は、CD20を形質導入した骨髓性白血病細胞株である。Rajiは、B細胞リンパ腫細胞株 (CD19+、CD20+、BCMA-) である。K562-CD19は、CD19を形質導入した骨髓性白血病細胞株である。RPMI-8226は、BCMAを発現する多発性骨髓腫細胞株である。One-Glo (商標) ルシフェラーゼアッセイシステム (TAKARA、#B6120) を使用して、ルシフェラーゼ活性を測定した。25 μ LのOne-Glo (商標) 試薬を384ウェルプレートの各ウェルに加えた。インキュベーション後、標的細胞に対する異なるTリンパ球の細胞傷害率を計算するために、Spark (商標) 10Mマルチモードマイクロプレートリーダー (TECAN) を使用して蛍光を測定した。シナリオは、MACS選別後のTCR $\alpha\beta$ 陽性T細胞では、TCRがSIV Nefによって枯渇されないため、TCRによる非特異的殺傷活性が示されるであろうが、MACS選別後のTCR $\alpha\beta$ 陰性T細胞ではTCRがほぼ枯渇しているため、主にCARによる特異的殺傷活性が示されるであろう、というものであった。

【0394】

図8A~8Bは、様々なSIV Nef + CARオールインワン構築物を形質導入したMACS選別後のTCR $\alpha\beta$ 陽性T細胞、及び形質導入していないT細胞 (UnT) を対照とした、様々なSIV Nef + CARオールインワン構築物を形質導入したMACS選別後のTCR $\alpha\beta$ 陰性T細胞のCARによる特異的腫瘍細胞傷害を示す。図8A~8Bから分かるように、MACS選別後のTCR $\alpha\beta$ 陰性T細胞は、MACS選別後のTCR $\alpha\beta$ 陽性T細胞及び形質導入していないT細胞と比較して著しく高い腫瘍細胞殺傷活性を示し、腫瘍細胞殺傷活性は、E:T比との正の相関を示す (E:Tが高いほど、CARによる殺傷力が高い)。

【0395】

図9A~9Bは、様々なSIV Nef + CARオールインワン構築物を形質導入したMACS選別後のTCR $\alpha\beta$ 陽性T細胞及びTCR $\alpha\beta$ 陰性T細胞のTCRによる非特異

的殺傷効率を示す。H 9 2 9 は、ヒト多発性骨髄腫細胞株 (C D 1 9 −、C D 2 0 −) である。K G 1 は、ヒト急性骨髄性白血病細胞株 (C D 1 9 −) である。R a j i は、パーキットリンパ腫細胞株 (C D 1 9 +、C D 2 0 +、B C M A −) である。K 5 6 2 は、骨髄性白血病細胞株 (C D 2 0 −、C D 1 9 −、B C M A −) である。図 9 A ~ 9 B から分かるように、M A C S 選別後の T C R α β 陰性 T 細胞 (C A R を発現し、T C R をほとんどまたは全く発現しないもの) は、対応する C A R 抗原 (例えば、C D 1 9、C D 2 0、B C M A) が対応する試験標的細胞で発現しないことから、予想された通り、標的細胞に対して殺傷活性がほとんどまたは全くなかった。一方、M A C S 選別後の T C R α β 陽性 T 細胞 (T C R のみを発現するもの) は、T C R による非特異的腫瘍細胞殺傷を大幅に強く引き起こした。

10

【0396】

これらの結果は、S I V N e f + C A R オールインワンベクターが、T C R α β 陰性 C A R − T 細胞を生成するのに効果的かつ容易であり、その結果、C A R による特異的腫瘍細胞殺傷を効果的に引き起こすことができ ($P < 0.05$)、T C R による非特異的細胞傷害を伴わないことを示す。したがって、本明細書に例示する S I V N e f + C A R オールインワンベクターは、初代 T 細胞における T C R α β の発現及び機能を効果的に低減させると共に、C A R 発現、及び標的細胞に対する C A R による特異的細胞傷害を維持することができる。

【0397】

実施例 8。C A R − T 細胞免疫療法における S I V N e f 変異体の使用

20

この実験では、S I V N e f M 1 1 6 配列 (実施例 6 の S I V N e f 変異体 1 を参照されたい) を使用して、S I V N e f + C A R オールインワンベクターを構築した。融合遺伝子配列 B C M A B i V H H C A R 1 − I R E S − S I V N e f M 1 1 6 (配列番号 6 2) を化学合成し、P L V X − h E F 1 α 発現プラスミド (実施例 1 参照) にクローニングし、その結果、組換え B C M A B i V H H C A R 1 − I R E S − S I V N e f M 1 1 6 トランスファープラスミド (以下、「P L L V − M 1 3 3」という) を得た。P L L V − M 1 3 3 組換えトランスファープラスミドを精製し、パッケージングプラスミド p s P A X 2 及びエンベローププラスミド p M D 2 . G と同じ比率で混合し、次いで、H E K 2 9 3 T 細胞に同時形質導入した。形質導入の 6 0 時間後、ウイルス上清を収集し、4 °C、3 0 0 0 r p m で 5 分間遠心分離した。この上清を 0 . 4 5 μ m フ

30

【0398】

初代 T 細胞を、実施例 7 に記載したように得てから、P L L V − M 1 3 3 を有するレンチウイルスを形質導入した。形質導入後、T C R α β 細胞単離キット (M i l t e n y i B i o t e c、# 1 3 0 − 0 9 2 − 6 1 4) を使用した M A C S により、T C R 陰性 C A R − T 細胞を単離し、濃縮した。M A C S の 1 日後、濃縮された 5×10^5 個の T C R α β 陰性細胞を含む懸濁液を収集及び調製し、F A C S を行って T C R α β の発現を検査した。

【0399】

40

図 1 0 A に示すように、M A C S 濃縮後の T C R α β 陰性 M 1 3 3 C A R − T 細胞の割合は 9 9 . 7 % であった。形質導入していない T 細胞は対照であり、1 . 3 8 % の T C R α β 陰性率しか示さなかった。

【0400】

細胞傷害アッセイを、実施例 7 に記載したように実施した。K 5 6 2 は、骨髄性白血病細胞株 (B C M A −) である。R P M I − 8 2 2 6 は、B C M A を発現する多発性骨髄腫細胞株である。図 1 0 B 左パネルから分かるように、M A C S 選別後の T C R α β 陰性 M 1 3 3 C A R − T 細胞は、R P M I − 8 2 2 6 細胞 (B C M A +) に対して、M A C S 選別後の T C R α β 陽性 M 1 3 3 T 細胞及び形質導入していない T 細胞と比較して有意に高い細胞傷害 ($34.99 \pm 6.20\%$) をもたらした。これは、C A R − T による特

50

異的腫瘍細胞殺傷を反映するものである。MACS選別後のTCR $\alpha\beta$ 陰性M133 T細胞は、K562細胞（BCMA-）に対して、TCRによる非特異的細胞殺傷性がほとんどなく（ $0.90 \pm 3.45\%$ ）、MACS選別後のTCR $\alpha\beta$ 陽性T細胞は、TCRによる非特異的細胞殺傷を大幅に強く引き起こした（図10B右パネル）。

【0401】

これらの結果は、変異体SIV Nef配列を有するSIV Nef+CARオールインワンベクターもまた、TCR $\alpha\beta$ 陰性CAR-T細胞を生成するのに効果的かつ容易であり、SIV Nef-IRES-CAR及びCAR-IRES-SIV Nefの構成がいずれも効果的に機能することを示す（実施例7及び8を比較されたい）。両方の配列構成が、初代T細胞におけるTCR $\alpha\beta$ の発現及び機能を効果的に低減させると共に、CAR発現、及び標的細胞に対するCARによる特異的細胞傷害を維持することができる。

【0402】

実施例9。キメラTCR-T（cTCR-T）細胞免疫療法におけるSIV Nef変異体の使用

この実験では、SIV Nef M116配列（実施例6のM116、SIV NEF変異体1を参照されたい）及び抗CD20キメラTCR（cTCR）配列を使用して、SIV-Nef+キメラTCRオールインワンベクターを構築した。抗CD20 cTCRは、抗CD20 scFv（Leu-16）-（GGGGS）₃-CD3 ϵ （シグナルペプチドを除く完全長）の構造と、配列番号64のアミノ酸配列を有する。抗CD20 cTCR融合ポリペプチドを天然TCR複合体に組み込むことにより、修飾されたTCR複合体は、HLAの必要なしに、CD20を発現する腫瘍細胞を認識し、完全なTCR機構を利用して、強力で調節され、かつ持続的な腫瘍殺傷に必要とされる、完全なT細胞機能を推進することができる。融合遺伝子配列SIV Nef M116-IRES-CD20 cTCR（配列番号63）を化学合成し、PLVX-hEF1 α 発現プラスミド（実施例1参照）にクローニングし、その結果、組換えSIV Nef M116-IRES-CD20 cTCRトランスファープラスミド（以下、「PLLV-M572」という）を得た。PLLV-M572組換えトランスファープラスミドを精製し、パッケージングプラスミドpsPAX2及びエンベローププラスミドpMD2.Gと同じ比率で混合し、次いで、HEK293T細胞に同時形質導入した。形質導入の60時間後、ウイルス上清を収集し、4℃、3000rpmで5分間遠心分離した。この上清を0.45 μ mフィルターの使用により濾過し、次いで、500KDの中空繊維膜による接線流濾過を使用してさらに濃縮し、濃縮されたレンチウイルスを得てから、これを-80℃で保管した。実施例7に記載したように、初代T細胞にPLLV-M572を有するレンチウイルスを形質導入し、次いでMACS濃縮を行うことにより、TCR $\alpha\beta$ 陰性CD20-cTCR陽性T細胞を調製した。TCR $\alpha\beta$ の発現は、上述のものと同様の方法に従って検査した。図11Aに示すように、MACS濃縮後のTCR $\alpha\beta$ 陰性T細胞率は、PLLV-M572を形質導入したT細胞では94.9%であったが、形質導入していないT細胞は、0.599%のTCR $\alpha\beta$ 陰性率しか有しなかった。

【0403】

細胞傷害アッセイを、実施例7に記載したように実施した。K562は、骨髄性白血病細胞株（CD20-、CD19-、BCMA-）である。Rajiは、バーキットリンパ腫細胞株（CD19+、CD20+、BCMA-）である。図11B左パネルから分かるように、MACS選別後のTCR $\alpha\beta$ 陰性CD20 cTCR-T細胞は、Raji細胞（CD20+）に対して、MACS選別後のTCR $\alpha\beta$ 陽性M572 T細胞及び形質導入していないT細胞と比較して有意に高い細胞傷害（ $49.21 \pm 22.96\%$ ）をもたらした。これは、CD20 cTCRによる特異的腫瘍細胞殺傷を反映するものである。さらに、MACS選別後のTCR $\alpha\beta$ 陰性CD20 cTCR-T細胞の殺傷力は、E:T比が高いほど高かった。MACS選別後のTCR $\alpha\beta$ 陰性CD20 cTCR-T細胞は、K562細胞（CD20-）に対して、内在性TCRによる非特異的細胞殺傷性がほとんどなく（ $3.76 \pm 4.31\%$ ）、一方、MACS選別後のTCR $\alpha\beta$ 陽性M572

T細胞は、内在性TCRによる非特異的細胞殺傷を大幅に強く引き起こした（図11B右パネル）。

【0404】

これらの驚くべき結果は、SIV Nef + cTCRオールインワンベクターが、外因性cTCRと統合されたTCR複合体の機能に影響を及ぼすことなく、初代T細胞における内在性TCR $\alpha\beta$ の発現及び機能を効果的に下方制御し得ることを示す。さらに、TCR $\alpha\beta$ 陰性cTCR-T細胞は、腫瘍細胞に対するcTCR特異的細胞傷害を効果的に媒介し（ $P < 0.05$ ）、内在性TCRによる非特異的細胞傷害はほとんどまたは全くなかった。

【0405】

実施例10。TAC-T細胞免疫療法におけるSIV Nef変異体の使用

この実験では、SIV Nef M116（実施例6のM116、SIV NEF変異体1を参照されたい）を使用して、SIV Nef + CD20 TACオールインワンベクターを構築した。抗CD20 TACは、抗CD20 scFv（Leu-16）-（GGGGG₃-huUCHT1.Y177T-GGGGS-CD4（部分的細胞外ドメイン+膜貫通ドメイン+細胞内ドメイン）の構造と、配列番号66のアミノ酸配列を含む。huUCHT1は、CD3 ϵ を標的にする。融合遺伝子配列SIV Nef M116-IRES-CD20 TAC（配列番号65）を化学合成し、PLVX-hEF1 α 発現プラスミド（実施例1参照）にクローニングし、その結果、組換えSIV Nef-IRES-CD20 TACトランスファープラスミド（以下、「PLLV-M574」という）を得た。PLLV-M574組換えトランスファープラスミドを精製し、パッケージングプラスミドpsPAX2及びエンベローププラスミドpMD2.Gと同じ比率で混合し、次いで、HEK293T細胞に同時形質導入した。形質導入の60時間後、ウイルス上清を収集し、4℃、3000rpmで5分間遠心分離した。この上清を0.45 μ mフィルターの使用により濾過し、次いで、500KDの中空繊維膜による接線流濾過を使用してさらに濃縮し、濃縮されたレンチウイルスを得てから、これを-80℃で保管した。実施例7に記載したように、初代T細胞にPLLV-M574を有するレンチウイルスを形質導入し、次いでMACS濃縮を行うことにより、TCR $\alpha\beta$ 陰性TAC-T細胞を調製した。TCR $\alpha\beta$ の発現は、上述のものと同様の方法に従って検査した。図12Aに示すように、PLLV-M574を形質導入したT細胞のMACS濃縮後のTCR $\alpha\beta$ 陰性率は95.5%であったが、形質導入していないT細胞（UnT）は、0.971%のTCR $\alpha\beta$ 陰性率しか有しなかった。

【0406】

細胞傷害アッセイを、実施例7に記載したように実施した。Rajiは、バーキットリンパ腫細胞株（CD20+）である。H929は、ヒト多発性骨髄腫細胞株（CD20-）である。図12B左パネルから分かるように、MACS選別後のTCR $\alpha\beta$ 陰性CD20 TAC-T細胞は、Raji細胞（CD20+）に対して、MACS選別後のTCR $\alpha\beta$ 陽性M574 T細胞及び形質導入していないT細胞と比較して有意に高い細胞傷害（ $54.58 \pm 20.03\%$ ）を引き起こした。これは、抗CD20 TACによる特異的腫瘍細胞殺傷を反映するものである。さらに、MACS選別後のTCR $\alpha\beta$ 陰性CD20 TAC-T細胞の殺傷力は、E:T比が高いほど高かった。MACS選別後のTCR $\alpha\beta$ 陰性CD20 TAC-T細胞は、H929細胞（CD20-）に対して、内在性TCRによる非特異的細胞殺傷性がほとんどなく（ $3.33 \pm 2.80\%$ ）、一方、MACS選別後のTCR $\alpha\beta$ 陽性M574 T細胞は、内在性TCRによる非特異的細胞殺傷を大幅に強く引き起こした（図12B右パネル）。

【0407】

これらの驚くべき結果は、SIV Nef + TACオールインワンベクターが、TACの発現及び機能に影響を及ぼすことなく、初代T細胞における内在性TCR $\alpha\beta$ の発現及び機能を効果的に下方制御し得ることを示す。さらに、TCR $\alpha\beta$ 陰性TAC-T細胞は、腫瘍細胞に対するTAC特異的細胞傷害を効果的に媒介し（ $P < 0.05$ ）、内在性T

10

20

30

40

50

C Rによる非特異的細胞傷害はほとんどまたは全くない。

【0408】

実施例11。TCR $\alpha\beta$ 、CD4、及びCD28の制御に関するSIV Nefドメインエレメントの試験

完全長SIV Nefは、223個のアミノ酸を有する。Nefタンパク質の特定のアミノ酸は、CD4及びCD28に結合することで、T細胞におけるCD4、CD28を下方制御し得る（実施例6、表6参照）。様々なNefドメインエレメントがTCR $\alpha\beta$ 、CD4、及びCD28の発現及び機能に及ぼす作用を試験するために、最初のメチオニンを除いて完全長配列にわたり、3つずつ連続したアミノ酸をアラニン-アラニン-アラニン（AAA）に変異させることにより、74個の変異体を設計した。これらの変異体核酸配列を化学合成し、PLVX-hEF1 α 発現プラスミド（実施例1参照）にクローニングし、その結果、74個の組換えSIV Nef変異体トランスファープラスミドを得た。各組換えトランスファープラスミドを有するレンチウイルスを、上述のように調製した。例えば、実施例7を参照されたい。Jurkat細胞に74個のレンチウイルスをそれぞれ感染させ、2週間にわたり、1 μ g/mLのピューロマイシンを使用し、陽性細胞クローンを選択した。Jurkat細胞におけるTCR $\alpha\beta$ 、CD4、及びCD28の発現を、上述のようにFACSによって検査した。例えば、実施例1を参照されたい。形質導入していないJurkat細胞を陰性対照とした。M071（野生型SIV Nef）またはM116（SIV Nef M116、実施例6参照）を形質導入したJurkat細胞を陽性対照とした。少なくとも3%の制御を、TCR $\alpha\beta$ 、CD4、及びCD28発現の制御に対するSIV Nef変異体の影響をさらに評価するためのカットオフとみなした。例えば、変異体SIV NefによるTCR $\alpha\beta$ の下方制御レベルと、野生型SIV Nefによる下方制御との差が0%（0%を含む）～3%未満であった場合、または変異体SIV NefによるTCR $\alpha\beta$ の下方制御が、野生型SIV Nefによる下方制御と比較して3%超である（またはそれに等しい）場合、その変異体SIV Nefは、「野生型SIV Nefと比較して同様の（またはより大きい）TCR $\alpha\beta$ 下方制御」をもたらすとみなした。変異体SIV NefによるCD4（及び／またはCD28）の下方制御が、野生型SIV Nefによる下方制御と比較して3%未満である場合、かかる変異体SIV Nefは、「野生型SIV Nefと比較して小さいCD4下方制御」（及び／または「野生型SIV Nefと比較して小さいCD28下方制御」）をもたらすとみなした。

【0409】

図13A～13Cに示すように、74個のSIV Nef変異体がTCR $\alpha\beta$ 、CD4、及びCD28の発現を制御する能力について、野生型SIV Nef（M071）との比較における並列スクリーニングを行った。変異の位置及びそれらの対応する機能を表10に記載する。このスクリーニング実験の結果、異なる制御機能を有する様々なSIV Nef変異体セットが得られた。34個のSIV Nef変異体は、野生型SIV Nef（M071）と比較して、TCR $\alpha\beta$ 発現に対する下方制御作用を維持した。そのうち18個の変異体は、野生型SIV Nefと比較して小さいCD4の下方制御をさらに示し、19個の変異体は、野生型SIV Nefと比較して小さいCD28の下方制御をさらに示し、16個の変異体は、野生型SIV Nef（M071）のTCR $\alpha\beta$ 下方制御作用を維持するだけでなく、CD4及びCD28の下方制御作用が野生型SIV Nef（M071）と比較して小さいことも見出された。詳細な概要については表11を参照されたい。

表10。野生型SIV Nef（M071）と比較したSIV Nef変異体の制御作用

【表 10 - 1】

構築物/ アミノ酸変 異部位	野生型 SIV Nef と比較 して同様の(またはよ り大きい)TCR $\alpha\beta$ 下 方制御	野生型 SIV Nef と比較 して小さい CD4 下方制 御	野生型 SIV Nef と比 較して小さい CD28 下方制御
M116 (aa 178~179)	+	+	+
aa 2~4	+	+	+
aa 5~7	-	+	+
aa 8~10	+	-	-
aa 11~13	+	-	-
aa 14~16	-	-	-
aa 17~19	-	-	-
aa 20~22	-	-	-
aa 23~25	-	-	-
aa 26~28	-	-	+
aa 29~31	-	+	+
aa 32~34	-	+	+
aa 35~37	-	-	-
aa 38~40	+	-	-
aa 41~43	-	-	-
aa 44~46	+	+	-
aa 47~49	+	-	-
aa 50~52	+	-	-
aa 53~55	+	-	-
aa 56~58	+	+	+
aa 59~61	+	+	+
aa 62~64	+	+	+
aa 65~67	+	+	+
aa 68~70	-	+	+
aa 71~73	-	+	+
aa 74~76	-	+	+
aa 77~79	-	+	+
aa 80~82	-	-	-
aa 83~85	-	+	+
aa 86~88	-	+	+
aa 89~91	-	+	+
aa 92~94	-	+	+
aa 95~97	-	+	+
aa 98~100	+	+	-
aa 101~103	-	+	+
aa 104~106	-	+	+
aa 107~109	+	+	+

10

20

30

40

50

【表 10 - 2】

構築物/ アミノ酸変異部位	野生型 SIV Nef と比較 して同様の(またはより 大きい)TCR $\alpha\beta$ 下 方制御	野生型 SIV Nef と比較 して小さい CD4 下方制 御	野生型 SIV Nef と比 較して小さい CD28 下方制御
aa 110~112	+	-	-
aa 113~115	-	+	+
aa 116~118	-	+	+
aa 119~121	-	+	+
aa 122~124	-	+	+
aa 125~127	-	+	+
aa 128~130	-	+	+
aa 131~133	-	+	+
aa 134~136	-	+	+
aa 137~139	+	+	+
aa 140~142	-	+	+
aa 143~145	-	+	+
aa 146~148	-	+	+
aa 149~151	-	+	+
aa 152~154	+	+	+
aa 155~157	-	+	+
aa 158~160	-	+	+
aa 161~163	-	+	+
aa 164~166	+	+	+
aa 167~169	+	+	+
aa 170~172	+	-	+
aa 173~175	+	-	+
aa 176~178	+	+	+
aa 179~181	+	+	+
aa 182~184	+	-	+
aa 185~187	+	+	+
aa 188~190	+	+	+
aa 191~193	+	-	-
aa 194~196	+	+	+
aa 197~199	-	+	+
aa 200~202	-	+	+
aa 203~205	+	+	+
aa 206~208	+	-	-
aa 209~211	-	-	-
aa 212~214	+	-	-
aa 215~217	+	-	-
aa 218~220	+	-	-
aa 221~223	+	-	-

10

20

30

40

50

【表 1 1】

表 1 1。S I V N e f アミノ酸変異部位が T C R $\alpha \beta$ 、C D 4、及び C D 8 の発現に及ぼす作用の概要

群	作用(野生型 SIV Nef との比較)	アミノ酸(aa)変異部位
1	同様の(またはより大きい)TCR $\alpha \beta$ 下方制御	aa2~4、aa8~10、aa11~13(例えば、aa8~13)、aa38~40、aa44~46、aa47~49、aa50~52、aa53~55、aa56~58、aa59~61、aa62~64、aa65~67(例えば、aa44~67)、aa98~100、aa107~109、aa110~112(例えば、aa107~112)、aa137~139、aa152~154、aa164~166、aa167~169、aa170~172、aa173~175、aa176~178、aa178~179、179~181aa、aa182~184、aa185~187、aa188~190、aa191~193、aa194~196(例えば、aa164~196)、aa203~205、aa206~208(例えば、aa203~208)、aa212~214、aa215~217、aa218~220、aa221~223(例えば、aa212~223)
2	同様の(またはより大きい)TCR $\alpha \beta$ 下方制御、より小さい CD4 下方制御	aa2~4、aa44~46、aa56~58、aa59~61、aa62~64、aa65~67(例えば、aa44~67)、aa98~100、aa107~109、aa137~139、aa152~154、aa164~166、aa167~169(例えば、aa164~169)、aa176~178、aa178~179、aa179~181(例えば、aa176~181)、aa185~187、aa188~190(例えば、aa185~190)、aa194~196、aa203~205
3	同様の(またはより大きい)TCR $\alpha \beta$ 下方制御、より小さい CD28 下方制御	aa2~4、aa56~58、aa59~61、aa62~64、aa65~67(例えば、aa56~67)、aa107~109、aa137~139、aa152~154、aa164~166、aa167~169、aa170~172、aa173~175、aa176~178、178~179aa、aa179~181、aa182~184、aa185~187、aa188~190(例えば、aa164~190)、aa194~196、aa203~205
4	同様の(またはより大きい)TCR $\alpha \beta$ 下方制御、より小さい CD4 下方制御、より小さい CD28 下方制御	aa2~4、aa56~58、aa59~61、aa62~64、aa65~67(例えば、aa56~67)、aa107~109、aa137~139、aa152~154、aa164~166、aa167~169(例えば、aa164~169)、aa176~178、aa178~179、aa179~181(例えば、aa176~181)、aa185~187、aa188~190(例えば、aa185~190)、aa194~196、aa203~205

10

20

30

配列表

配列番号 1 (野生型 S I V N e f 核酸配列)

【化 1】

ATGGGCTCCAGCAACTCCAAGAGGCAGCAACAGGGCTTGCTCAAGCTCTGGCGAGGGCTGC
 GAGGGAAGCCTGGGGCAGACTGGGTGCTATTGTCCGATCCGCTTATCGGGCAGTCATCAACA
 GTCCAAGAAGAGTGC GGCAAGGCCTTGAAAAAGTCCTGGGGTAAAGGTAAATGACTCCAG
 ACGGCCGCCCTGCAAGAAGGAGACACCTTTGATGAGTGGGATGATGATGAAGAAGAAGTA
 GGCTTCCCTGTGCAACCTCGAGTCCCCTTAAGACAGATGACCTATAAATTAGCAGTGGACTTT
 TCCCACTTTTAAATCAAAGGGGGGACTGGATGGGATATATTACTCTGAAAGAAGAGAAAAG
 ATCCTGAATTTGTATGCCTTGAACGAGTGGGGAATAATAGATGATTGGCAAGCTTACTCACCAG
 GCGCGGGGATAAGGTACCCGAGAGTCTTTGGCTTCTGCTTTAAGCTAGTCCCAGTGGACCTGC
 ATGAGGAGGCACGCAACTGTGAGAGACACTGTCTGATGCATCCAGCACAGATGGGGGAAGAT
 CCTGATGGAATAGATCATGGAGAAGTCTTGGTCTGGAAGTTTGACCCGAAGTTGGCGGTGGA
 GTACCGCCCGGACATGTTTAAGGACATGCACGAACATGCAAAGCGC

40

配列番号 2 (H I V 1 N e f 核酸配列)

【化 2】

ATGGGTGGCAAGTGGTCAAAAAGTAGTGTGATTGGATGGCCTACTGTAAGGGAAAGAATGAG
ACGAGCTGAGCCAGCAGCAGATAGGGTGGGAGCAGCATCTCGAGACCTGGAAAAACATGGA
GCAATCACAAGTAGCAATACAGCAGCTACCAATGCTGCTTGTGCCTGGCTAGAAGCACAAGA
GGAGGAGGAGGTGGGTTTTCCAGTCACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGG
CAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCCTCC
CAAAGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCTACTTCCCTGATTgG
CAGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTCAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGCTACAAGCT
AGTACCAGTTGAGCCAGATAAGATAGAAGAGGCCAATAAAGGAGAGAACACCAGCTTGTTAC
ACCCTGTGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAGAGAAAGTGTTAGAGTGAGGTTTTGAC
AGCCGCCTAGCATTTTCATCACGTGGCCCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAACTGC

10

配列番号 3 (H I V 2 N e f 核酸配列)

【化 3】

ATGGGTGCGAGTGGATCCAAGAAGCTTTCCAAGCATTGCGGAGGACTACGAGAGAGACTCTT
GCGGGCGCGTGGGGATGGTTATGGGAAGCAGCGCGACGCATCGGGAGGGGAATACTCGCAGT
TCCAAGAAGAATCAGGCAGGGAGCAGAACTCGCCCTCCTGTGAGGGACAGCAGTATCAGCA
GGGAGAGTACATGAACAGCCCATGGAGAAACCCAGCAACAGAAAGACAGAAAGATTTGTAT
AGGCAGCAAAATATGGATGATGTAGATTCTGATGATGATGACCTAATAGGAGTTTCTGTACAC
CAAGAGTACCACGGAGAGAAATGACCTATAAATTGGCAATAGATATGTCACATTTTATAAAAG
AAAAAGGGGGACTGCAAGGGATGTTTTACAGTAGGAGGAGACATAGAATCCTAGACATATAC
CTAGAAAAAGAGGAAGGGATAATACCAGATTGGCAGAATTATACTCATGGGCCAGGAGTAAG
GTACCCAATGTACTTTCGGGTGGCTGTGGAAGCTAGTATCAGTAGAACTCTCACAAGAGGCAG
AGGAAGATGAGGCCAACTGCTTAGTACCCAGCACAAACAAGCAGACATGATGATGAGCAT
GGGGAGACATTAGTGTGGCAGTTTGACTCCATGCTGGCCTATAACTACAAGGCCTTCACTCTG
TACCCAGAAGAGTTTGGGCACAAGTCAGGATTGCCAGAGAAAGAATGGAAGGCCAAACTGA
AAGCAAGAGGGATACCATATAGTGAA

20

配列番号 4 (H I V F 2 - N e f 核酸配列)

【化 4】

ATGGGTGGCAAGTGGTCAAAATGCAGCATAGTTGGATGGCCTGATATAAGAGAGAGAATGAG
ACGAACTGAGCCAGCAGCAGAGCCAGCAGCAGAGAAGGAGTAGGAGCAGCGTCTCAAGACTTA

【化 5】

GATAAACATGGAGCACTTACAAGTAGCAACACAAACACCACTAATGCTGATTGTGCTTGGCCG
GAAGCGCAAGAGGATGAAGGAGAAGTAGGCTTTGCAGTCAGACCTCAGAGTCCTTTAAGAC
CAATGACTTATAAGGGAGCATTTGATCTCGGCTTCTTTTTAAAAGAAGGGGGACTGGAAGGGT
TAATTTACTCTAAGAAAAGGCAAGAGATCCTTGATTTGTGGGTCTATCATAACAAGGCTACTT
CCCTGATTGGCAAACTACACACCGGGACCAGGGGTCAGATACCACTGACTTTTGGGTGGT
GCTTCAAGCTGGTACCAGTTGACCCAAAGGCAGTAGAAGAGGCCAACGAAGGAGAAGACAA
CTGTCTGCTACACCCAGTGTGCCAGCATGGAATGGAGGATGAACACAGAGAAGTATTAATGTG
GAAGTTTGACAGTCAACTAGCACGCAGACACATGGCCCGAGAGCTACATCCGGAGTTCTACA
AAGACTGC

30

配列番号 5 (H I V C 2 - N e f 核酸配列)

【化 6】

ATGGGTGGCAAGTGGTCAAAATGCAGCATAGGTGGATGGCCTCAGATAAGAGAGAGAATGAG
ACGAACTGAGCCAGCAGTAGAGCCAGCAGCAGAGCCAGCAGCAGAGAAGGAGTAGGAGCAGC
GTGGCTACTTCCTGATTGGCAAACTACACACCGGGACCAGGAGTCAGATACCACTGACTTT
TGGGTGGTGCTTCAAGCTGGTACCAGTAGACCCAGGGGCAGTAGAAGAGGCCAACGAAGGA
GAAAACAAGTGTGTGCTACACCCGGTGTGCCAGCATGGAATGGAGGATGAGCAAAGAGAAGT
ATTAGTGTGCAAGTTTGACAGTCTACTAGCACGCAGACACATGGCCCGAGAGCTACATCCGGA
GTTCTACAAAGACTGC

40

配列番号 6 (H I V H V 2 N Z - N e f 核酸配列)

【化 7】

ATGGGTGCGAGTGGATCCAAGAAGCGTTCCAAGCCCTTGCAAGGACTACAAGAGAGACTCTT
GCAGGCGCGGGGAGAGACTTGTGGAGGGCGCTGCAACGAATCGGGAGGGGGATACTTGCA
TCCCACGAAGGATCAGGCAGGGAGCAGAACTCGCCCTCCTGTGAGGGACAGCGATATCAGCA
GGGAGATTTTGTAAATACCCCATGGAGAACCCAGCAGCAGAAAGGGAGAAAGAATTGTACA
AACAGCAAAATATGGATGATGTAGATCTAGATGATGATGACCAAGTAGGATTCCCTGTCACAC
CAAGAGTACCATTAAGACCAATGACATTCAAATTGGCAGTAGATATGTCTCATTTTATAAAAGA
AAAAGGGGGACTGGAAGGGCTGTTTTATAGTCAGAGAAGACATAGAATCTTAGACTTATACTT
AGACAAGGCTTTTACTCTGTACCCAGAGGAATTTGGGCATAATTCAGGACTGCCAGAGAAAG
AGTGGAAGGCGAGACTGAAAGCAAGGGGAATACCATTAGT

配列番号 7 (S I V N e f 変異体 1 / S I V N e f M 1 1 6 核酸配列)

10

【化 8】

ATGGGCTCCAGCAACTCCAAGAGGCAGCAACAGGGCTTGCTCAAGCTCTGGCGAGGGCTGC
GAGGGAAGCCTGGGGCAGACTGGGTGCTATTGTCCGATCCGCTTATCGGGCAGTCATCAACA
GTCCAAGAAGAGTGCGGCAAGGCCTTGAAAAAGTCCTGGGGTAAAGGTAAAATGACTCCAG
ACGGCCGCCGCTGCAAGAAGGAGACACCTTTGATGAGTGGGATGATGATGAAGAAGAAGTA
GGCTTCCCTGTGCAACCTCGAGTCCCCTTAAGACAGATGACCTATAAATTAGCAGTGGACTTT
TCCCACTTTTTAAATCAAAGGGGGGACTGGATGGGATATATTACTCTGAAAGAAGAGAAAAG
ATCCTGAATTTGTATGCCTTGAACGAGTGGGGAATAATAGATGATTGGCAAGCTTACTCACCAG
GCCCCGGGATAAGGTACCCGAGAGTCTTTGGCTTCTGCTTTAAGCTAGTCCCAGTGGACCTGC
ATGAGGAGGCACGCAACTGTGAGAGACACTGT_{gctgca}CATCCAGCACAGATGGGGGAAGATCC
TGATGGAATAGATCATGGAGAAGTCTTGGTCTGGAAGTTTGACCCGAAGTTGGCGGTGGAGT
ACCGCCCGGACATGTTTAAGGACATGCACGAACATGCAAAGCGC

20

配列番号 8 (S I V N e f 変異体 2 核酸配列)

【化 9】

ATGGGCTCCAGCAACTCCAAGAGGCAGCAACAGGGCTTGCTCAAGCTCTGGCGAGGGCTGC
GAGGGAAGCCTGGGGCAGACTGGGTGCTATTGTCCGATCCGCTTATCGGGCAGTCATCAACA
GTCCAAGAAGAGTGCGGCAAGGCCTTGAAAAAGTCCTGGGGTAAAGGTAAAATGACTCCAG
ACGGCCGCCGCTGCAAGAAGGAGACACCTTTGATGAGTGGGATGATGATGAAGAAGAAGTA
GGCTTCCCTGTGCAACCTCGAGTCCCCTTAAGACAGATGACCTATAAATTAGCAGTGGACTTT
TCCCACTTTTTAAATCAAAGGGGGGACTGGATGGGATATATTACTCTGA_{Agctgca}GAAAAGAT
CCTGAATTTGTATGCCTTGAACGAGTGGGGAATAATAGATGATTGGCAAGCTTACTCACCAGG

【化 10】

30

CCCGGGGATAAGGTACCCGAGAGTCTTTGGCTTCTGCTTTAAGCTAGTCCCAGTGGACCTGCA
TGAGGAGGCACGCAACTGTGAGAGACACTGT_{gctgca}CATCCAGCACAGATGGGGGAAGATCCT
GATGGAATAGATCATGGAGAAGTCTTGGTCTGGAAGTTTGACCCGAAGTTGGCGGTGGAGTA
CCGCCCCGACATGTTTAAGGACATGCACGAACATGCAAAGCGC

配列番号 9 (S I V N e f 変異体 3 核酸配列)

【化 11】

ATGGGCTCCAGCAACTCCAAGAGGCAGCAACAGGGCTTGCTCAAGCTCTGGCGAGGGCTGC
GAGGGAAGCCTGGGGCAGACTGGGTGCTATTGTCCGATCCGCTTATCGGGCAGTCATCAACA
GTCCAAGAAGAGTGCGGCAAGGCCTTGAAAAAGTCCTGGGGTAAAGGTAAAATGACTCCAG
ACGGCCGCCGCTGCAAGAAGGAGACACCTTTGATGAGTGGGATGATGATGAAGAAGAAGTA
GGCTTCCCTGTGCAACCTCGAGTCCCCTTAAGACAGATGACCTATAAATTAGCAGTGGACTTT
TCCCACTTTTTAAATCAAAGGGGGGACTGGATGGGATATATTACTCTGA_{Agctgca}GAAAAGAT
CCTGAATTTGTATGCCTTGAACGAGTGGGGAATAATAGATGATTGGCAAGCTTACTCACCAGG
CCCGGGGATAAGGTACCCGAGAGTCTTTGGCTTCTGCTTTAAGCTAGTCCCAGTGGACCTGCA
TGAGGA_{Gcatcac}AACTGTGAGAGACACTGT_{gctgca}CATCCAGCACAGATGGGG_{Gcgga}CCTGATG
GAATAGATCATGGAGAAGTCTTGGTCTGGAAGTTTGACCCGAAGTTGGCGGTGGAGTACCGC
CCGACATGTTTAAGGACATGCACGAACATGCAAAGCGC

40

配列番号 10 (S I V N e f 変異体 4 核酸配列)

【化 1 2】

ATGGGCTCCAGCAACTCCAAGAGGCAGCAACAGGGCTTGCTCAAGCTCTGGCGAGGGCTGC
 GAGGGAAGCCTGGGGCAGACTGGGTGCTATTGTCCGATCCGCTTATCGGGCAGTCATCAACA
 GTCCAAGAAGAGTGCGGCAAGGCCTTGAAAAAGTCTGGGGTAAAGGTAAAATGACTCCAG
 ACGGCCGCCGCTGCAAGAAGGAGACACCTTTGATGAGTGGGATGATGATGAAGAAGAAGTA
 GGCTTCCCTGTGCAACCTCGAGTCCCCTTAAGACAGATGACCTATAAATTAGCAGTGGACTTT
 TCCCACTTTTTAAATCAAAGGGGGGACTGGATGGGATATATTACTCTGAAAGAAGAGAAAAG
 ATCCTGAATTTGTATGCCTTGAACGAGTGGGGAATAATAGATGATTGGCAAGCTTACTCACCAG
 GCCCGGGGATAAGGTACCCGAGAGTCTTTGGCTTCTGCTTTAAGCTAGTCCCAGTGGACCTGC
 ATGAGGAGcatcacAACTGTGAGAGACACTGTgctgcaCATCCAGCACAGATGGGGgcggaCCTGAT
 GGAATAGATCATGGAGAAGTCTTGGTCTGGAAGTTTGACCCGAAGTTGGCGGTGGAGTACCG
 CCCGGACATGTTTAAGGACATGCACGAACATGCAAAGCGC

10

配列番号 1 1 (S I V N e f 変異体 5 核酸配列)

【化 1 3】

ATGGGCTCCAGCAACTCCAAGAGGCAGCAACAGGGCTTGCTCAAGCTCTGGCGAGGGCTGC
 GAGGGAAGCCTGGGGCAGACTGGGTGCTATTGTCCGATCCGCTTATCGGGCAGTCATCAACA
 GTCCAAGAAGAGTGCGGCAAGGCCTTGAAAAAGTCTGGGGTAAAGGTAAAATGACTCCAG
 ACGGCCGCCGCTGCAAGAAGGAGACACCTTTGATGAGTGGGATGATGATGAAGAAGAAGTA
 GGCTTCCCTGTGCAACCTCGAGTCCCCTTAAGACAGATGACCTATAAATTAGCAGTGGACTTT
 TCCCACTTTTTAAATCAAAGGGGGGACTGGATGGGATATATTACTCTGAAAGAAGAGAAAAG
 ATCCTGAATTTGTATGCCTTGAACGAGTGGGGAATAATAGATGATTGGCAAGCTTACTCACCAG
 GCCCGGGGATAAGGTACCCGAGAGTCTTTGGCTTCTGCTTTAAGCTAGTCCCAGTGGACCTGC
 ATGAGGAGGCACGCAACTGTGAGAGACACTGTgctgcaCATCCAGCACAGATGGGGgcggaCCTG
 ATGGAATAGATCATGGAGAAGTCTTGGTCTGGAAGTTTGACCCGAAGTTGGCGGTGGAGTAC
 CGCCCGGACATGTTTAAGGACATGCACGAACATGCAAAGCGC

20

配列番号 1 2 (野生型 S I V N e f アミノ酸配列)

【化 1 4】

MGSSNSKRQQQLKLWRGLRGKPGADWVLLSDPLIGQSSTVQEECGKALKKSWGKGKMTDP
 GRRLQEGDTFDEWDDDEEEVGFPVQPRVPLRQMTYKLAVDFSHFLKSKGGLDGIYYSERREKIL
 NLYALNEWGIHDDWQAYSPGPGIRYPRVFGFCFLVPVDLHEEARNRERHCLMHPAQMGEDPDGI
 DHGEVLVWKFDPKLAVEYRPDMFKDMHEHAKR

配列番号 1 3 (H I V 1 N e f アミノ酸配列)

【化 1 5】

MGGKWSKSSVIGWPTVRERMRRAPAAEDRVGAASRDLEKHGAITSSNTAATNAACAWLEAQE
 EEEVGFPVTPQVPLRPMYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQRRQDILDWYHTQGYFPDWQN
 YTPGPGVRYPLTFGWCYKLVPVEPKIEEANKGENTSLLHPVSLHGMDDPEREVLEWRFDRLA
 FHHVARELHPEYFKNC

30

配列番号 1 4 (H I V 2 N e f アミノ酸配列)

【化 1 6】

MGASGSKLSKHSRGLRERLLRARGDGYGKQRDASGGEYSQFQEEGREGNSPCEGQQYQQG
 EYMNSPWRNPATERQKDLRQQNMDDVSDDDDLIGVPVTPRVPRREMTYKLAIMSHFIKEK
 GGLQGMFYSSRRHRILDIYLEKEEGIIPDWQNYTHGPGVRYPMYFGWLWKLVSVELSQEAEDE
 ANCLVHPAQTSRHDDHGETLVWQFDSMLAYNYKAFTLYPEEFGHKSGLPEKEWKAKLKARGI
 PYSE

40

配列番号 1 5 (H I V F 2 - N e f アミノ酸配列)

【化 1 7】

MGGKWSKCSIVGWPDIRERMRRTEPAAEPAAEGVGAASQDLDKHGALTSSNTNTTNADCAWPE
 AQEDEGEVGFVPRPQSPRLRPMYKGAFFDLGFFLKEGGLEGLIYSKKRQEILDWVYHTQGYFPD
 WQNYTPGPGVRYPLTFGWCFKLVPVDPKAVEEANEDEDNCLLHPVCQHGMEDHREVLWKF
 DSQARRHMARELHPEFYKDC

配列番号 1 6 (H I V C 2 - N e f アミノ酸配列)

【化 1 8】

MGGKWSKCSIGGWPQIRERMRRTEPAVEPAAEPAAGVGAAWLLPDWQNYTPGPGVRYPLTFG
WCFKLVPVDPGAVEEANEKENNCLLHPVCQHGMEDEQREVLVCKFDSLLARRHMARELHPEFY
KDC

配列番号 1 7 (H I V H V 2 N Z - N e f アミノ酸配列)

【化 1 9】

MGASGSKRSKPLQGLQERLLQARGETCGGRCNESGGGYLQSHEGSGREQNSPSCGQRYQQG
DFVNTPWRTPAAREKELYKQNMDDVDLDDDDQVGFPVTPRVPLRPMFTKLAVDMSHFIKEK
GGLEGLFYSQRRHRILDYLDKAFTLYPEEFGHNSGLPEKEWKARLKARGIPFS

配列番号 1 8 (S I V N e f 変異体 1 / S I V N e f M 1 1 6 アミノ酸配列)

10

【化 2 0】

MGSSNSKRQQQGLLKLWRGLRGKPGADWVLLSDPLIGQSSTVQEECGKALKKSWGKGKMTDP
GRRLQEGDTFDEWDDDEEEVGFPVQPRVPLRQMTYKLAVDFSHFLKSKGGLDGIYYSERREKIL
NLYALNEWGIHDDWQAYSPGPGIRYPRVFGFCFKLVPVDLHEEARNCERHCAAAHPAQMGEDPDGI
DHGEVLVWKFDPKLAVEYRPDMFKDMHEHAKR

配列番号 1 9 (S I V N e f 変異体 2 アミノ酸配列)

【化 2 1】

MGSSNSKRQQQGLLKLWRGLRGKPGADWVLLSDPLIGQSSTVQEECGKALKKSWGKGKMTDP
GRRLQEGDTFDEWDDDEEEVGFPVQPRVPLRQMTYKLAVDFSHFLKSKGGLDGIYYSEAAEKIL
NLYALNEWGIHDDWQAYSPGPGIRYPRVFGFCFKLVPVDLHEEARNCERHCAAAHPAQMGEDPDGI
DHGEVLVWKFDPKLAVEYRPDMFKDMHEHAKR

20

配列番号 2 0 (S I V N e f 変異体 3 アミノ酸配列)

【化 2 2】

MGSSNSKRQQQGLLKLWRGLRGKPGADWVLLSDPLIGQSSTVQEECGKALKKSWGKGKMTDP
GRRLQEGDTFDEWDDDEEEVGFPVQPRVPLRQMTYKLAVDFSHFLKSKGGLDGIYYSEAAEKIL
NLYALNEWGIHDDWQAYSPGPGIRYPRVFGFCFKLVPVDLHEEHHNCERHCAAAHPAQMGAAPDGI
DHGEVLVWKFDPKLAVEYRPDMFKDMHEHAKR

配列番号 2 1 (S I V N e f 変異体 4 アミノ酸配列)

【化 2 3】

MGSSNSKRQQQGLLKLWRGLRGKPGADWVLLSDPLIGQSSTVQEECGKALKKSWGKGKMTDP
GRRLQEGDTFDEWDDDEEEVGFPVQPRVPLRQMTYKLAVDFSHFLKSKGGLDGIYYSERREKIL
NLYALNEWGIHDDWQAYSPGPGIRYPRVFGFCFKLVPVDLHEEHHNCERHCAAAHPAQMGAAPDGI
DHGEVLVWKFDPKLAVEYRPDMFKDMHEHAKR

30

配列番号 2 2 (S I V N e f 変異体 5 アミノ酸配列)

【化 2 4】

MGSSNSKRQQQGLLKLWRGLRGKPGADWVLLSDPLIGQSSTVQEECGKALKKSWGKGKMTDP
GRRLQEGDTFDEWDDDEEEVGFPVQPRVPLRQMTYKLAVDFSHFLKSKGGLDGIYYSERREKIL
NLYALNEWGIHDDWQAYSPGPGIRYPRVFGFCFKLVPVDLHEEARNCERHCAAAHPAQMGAAPDGI
DHGEVLVWKFDPKLAVEYRPDMFKDMHEHAKR

40

配列番号 2 3 (g R N A 核酸配列)

【化 2 5】

GAGAATCAAAATCGGTGAAT

配列番号 2 4 (S I V N e f - P 2 A - L N G F R 核酸配列; S I V N e f 配列は太字であり、P 2 A 配列には下線が引かれており、L N G F R 配列はイタリック体であり、制限部位は小文字である)

【化 2 6】

gaattcATGGGCTCCAGCAACTCCAAGAGGCAGCAACAGGGCTTGCTCAAGCTCTGGCGAG
 GGCTGCGAGGGAAGCCTGGGGCAGACTGGGTGCTATTGTCCGATCCGCTTATCGGGCA
 GTCATCAACAGTCCAAGAAGAGTGCAGCAAGGCCTTGAAAAAGTCCTGGGGTAAAGGT
 AAAATGACTCCAGACGGCCGCCGCTGCAAGAAGGAGACACCTTTGATGAGTGGGATG
 ATGATGAAGAAGAAGTAGGCTTCCCTGTGCAACCTCGAGTCCCCTTAAGACAGATGACC
 TATAAATTAGCAGTGGACTTTTCCCACTTTTAAAAATCAAAGGGGGGACTGGATGGGATA
 TATTACTCTGAAAGAAGAGAAAAAGATCCTGAATTTGTATGCCTTGAACGAGTGGGGAAT
 AATAGATGATTGGCAAGCTTACTCACCAGGCCCGGGGATAAGGTACCCGAGAGTCTTTG
 GCTTCTGCTTTAAGCTAGTCCCAGTGGACCTGCATGAGGAGGCACGCAACTGTGAGAG
 AACTGTCTGATGCATCCAGCACAGATGGGGGAAGATCCTGATGGAATAGATCATGGAG
 AAGTCTTGGTCTGGAAGTTTGACCCGAAGTTGGCGGTGGAGTACCGCCCGGACATGTT
 TAAGGACATGCACGAACATGCAAAGCGC^{cacgct}GGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCT
 GAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCT^{ggatcc}ATGGGGGCAGGTGCCACCGG
 CCGCGCCATGGACGGGGCCGCGCTGCTGCTGTTGCTGCTTCTGGGGGTGTCCCTTGGAGGTGCC
 AAGGAGGCATGCCCCACAGGCCGTGTACACACACAGCGGTGAGTGTGCAAAAGCCTGCAACCTGGG
 CGAGGGTGTGGCCACGCCCTTGTGGAGCCAACCAGACCGTGTGTGAGCCCTGCCTGGACAGCGTG
 ACGTTCTCCGACGTGGTGAGCGCGACCGAGCCGTGCAAGCCGTGCACCGAGTGCCTGGGGCTCC
 AGAGCATGTGCGCGCCGTGCGTGGAGGCCGACGACGCCGTGTGCCGCTGCGCCTACGGCTACTA
 CCAGGATGAGACGACTGGGCGCTGCGAGGCGTGCAGCGTGTGCGAGGCGGGCTCGGGCCTCGT
 GTTCTCTGCCAGGACAAGCAGAACACCGTGTGCGAGGAGTGCCCCGACGGCACGTATTCCGACG
 AGGCCAACACGTGGACCCGTGCCTGCCCTGCACCGTGTGCGAGGACACCGAGCGCCAGCTCCG
 CGAGTGCACACGCTGGGCCGACGCCGAGTGCAGGAGATCCCTGGCCGTTGGATTACACGGTCC
 ACACCCCCAGAGGGGCTCGGACAGCACAGCCCCAGCACCCAGGAGCCTGAGGCACCTCCAGAAC
 AAGACCTCATAGCCAGCACGGTGGCAGGTGTGGTGACCACAGTGATGGGCAGCTCCCAGCCCGTG
 GTGACCCGAGGCACACCGACAACCTCATCCCTGTCTATTGCTCCATCCTGGCTGCTGTGGTTGTG
 GCCTTGTGGCCTACATAGCCTTC^{gatctaga}

10

20

配列番号 25 (HIV1 Ne f-T2A-Puro 核酸配列; HIV1 Ne f 配列は太字であり、T2A 配列には下線が引かれており、Puro 配列はイタリック体であり、制限部位は小文字である)

【化 2 7】

gaattcATGGGTGGCAAGTGGTCAAAAAGTAGTGTGATTGGATGGCCTACTGTAAGGGAAA
 GAATGAGACGAGCTGAGCCAGCAGCAGATAGGGTGGGAGCAGCATCTCGAGACCTGGA
 AAAACATGGAGCAATCACAAGTAGCAATACAGCAGCTACCAATGCTGCTTGTGCCTGGC
 TAGAAGCACAAGAGGAGGAGGAGGTGGGTTTTCCAGTCAACCTCAGGTACCTTTAAG
 ACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTTAAAAAGAAAGGGGGGAC
 TGGAAGGGCTAATTCACTCCCAAAGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCAC
 ACACAAGGCTACTTCCCTGATT^gGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTCAGATATCC
 ACTGACCTTTGGATGGTGCTACAAGCTAGTACCAGTTGAGCCAGATAAGATAGAAGAGG
 CCAATAAAGGAGAGAAACACCAGCTTGTTACACCCTGTGAGCCTGCATGGGATGGATGAC

30

【化 2 8】

CCGGAGAGAGAAGTGTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCGCTAGCATTTTCATCACGTGG
 CCCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAACTGC^{actagt}GGCAGTGGAGAGGGCAGAGG
 AAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGGAGAATCCTGGCCCA^{acgct}ATGACCGAGTACAAGC
 CCACGGTGCCTCGCCACCCGCGACGACGTCCCCAGGGCCGTACGCACCTCGCCGCCGCGTT
 CGCCGACTACCCCGCCACGCGCCACACCGTCGATCCGGACCGCCACATCGAGCGGGTCAACGAG
 CTGCAAGAACTCTTCTCACGCGCGTCGGGCTCGACATCGGCAAGGTGTGGGTGCGGGACGACG
 GCGCCGCGGTGGCGGTCTGGACCACGCCGAGAGCGTCAAGCGGGGGCGGTGTTGCGCCGAGA
 TCGGCCCCGCGCATGGCCGAGTTGAGCGGTTCCCGGCTGGCCGCGCAGCAACAGATGGAAGGCCT
 CCTGGCGCCGACCGGCCCAAGGAGCCCCGCGTGGTTCCTGGCCACCGTCGGCGTCTCGCCGA
 CCACCAGGGCAAGGGTCTGGGACGCGCCGTCGTGCTCCCCGAGTGAGGCGGGCCGAGCGCGC
 CGGGGTGCCCCGCTTCTGGAGACCTCCGCGCCCCGCAACCTCCCCCTTCTACGAGCGGCTCGGC
 TTCACCGTCACCGCCGACGTCGAGGTGCCCGAAGGACCGCGCACCTGGTGCATGACCCGCAAGC
 CCGGTGCCTG^{Aggatcc}

40

配列番号 26 (HIV2 Ne f-T2A-Puro 核酸配列; HIV1 Ne f 配列は太字であり、T2A 配列には下線が引かれており、Puro 配列はイタリック体であり、制限部位は小文字である)

【化 2 9】

gaattcATGGGTGCGAGTGGATCCAAGAAGCTTTCCAAGCATTGCGGAGGACTACGAGAGA
 GACTCTTGCGGGCGCGTGGGGATGGTTATGGGAAGCAGCGCGACGCATCGGGAGGGG
 AATACTCGCAGTTCCAAGAAGAATCAGGCAGGGAGCAGAACTCGCCCTCCTGTGAGGG
 ACAGCAGTATCAGCAGGGAGAGTACATGAACAGCCCATGGAGAAAACCCAGCAACAGAA
 AGACAGAAAAGATTTGTATAGGCAGCAAAATATGGATGATGTAGATTCTGATGATGATGAC
 CTAATAGGAGTTCTGTACACCAAGAGTACCACGGAGAGAAATGACCTATAAATTGGC
 AATAGATATGTCACATTTTATAAAAAGAAAAAGGGGGACTGCAAGGGATGTTTTACAGTAG
 GAGGAGACATAGAATCCTAGACATATACCTAGAAAAAGAGGAAGGGATAATACCAGATT
 GGCAGAATTATACTCATGGGCCAGGAGTAAGGTACCCAATGTACTTCGGGTGGCTGTGG
 AAGCTAGTATCAGTAGAACTCTCACAAGAGGCAGAGGAAGATGAGGCCAACTGCTTAGT
 ACACCCAGCACAAACAAGCAGACATGATGATGAGCATGGGGAGACATTAGTGTGGCAG
 TTTGACTCCATGCTGGCCTATAACTACAAGGCCTTCACTCTGTACCCAGAAGAGTTTGG
 GCACAAGTCAGGATTGCCAGAGAAAAGAAATGGAAGGCCAAAACCTGAAAGCAAGAGGGATA
 CCATATAGTGAAactagtGGCAGTGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCTG
 AGGAGAATCCTGGCCCAacgcgtATGACCGAGTACAAGCCACGGTGCGCCTCGCCACCCGCGAC
 GACGTCCCAGGGCCGTACGCACCCTCGCCGCCGCGTTTCGCCGACTACCCCGCCACGCGCCACA
 CCGTCGATCCGGACCGCCACATCGAGCGGGTACCGAGCTGCAAGAACTCTTCTCACGCGCGTC
 GGGCTCGACATCGGCAAGGTGTGGGTTCGCGGACGACGGCGCCGCGGTGGCGGTCTGGACCACG
 CCGGAGAGCGTCGAAGCGGGGGCGGTGTTTCGCCGAGATCGGCCCGCGCATGGCCGAGTTGAGC
 GGTTCGCCGGCTGGCCGCGCAGCAACAGATGGAAGGCCTCTGGCGCCGACCCGGCCCAAGGAG
 CCCGCGTGGTTCCTGGCCACCGTCGGCGTCTCGCCCCGACCACAGGGCAAGGGTCTGGGCAGC
 GCCGTCGTGCTCCCGGAGTGGAGGCGGCCGAGCGCGCCGGGGTGCCCGCCTTCTGGAGACC
 TCCGCGCCCCGCAACCTCCCCCTTCTACGAGCGGCTCGGCTTACCGTCAACGCCGACGTCGAGGT
 GCCCCAAGGACCGCGCACCTGGTGCATGACCCGCAAGCCCCGGTGCCTGAggalcc

10

20

配列番号 27 (S I V N e f - P 2 A - L N G F R アミノ酸配列; S I V N e f 配列は太字であり、P 2 A 配列には下線が引かれており、L N G F R 配列はイタリック体であり、制限部位は灰色である)

【化 3 0】

EFMGSSNSKRQQQGLLKLWRGLRGKPGADWVLLSDPLIGQSSTVQEECGKALKKSWGKG
 KMTPDGRRLQEGDTFDEWDDDEEEVGFPVQPRVPLRQMTYKLAVDFSHFLKSKGGLDGIY
 YSERREKILNLYALNEWGIIDDWQAYSPGPGIRYPRVFGFCFKLPVDLHEEARNRERHCLM
 HPAQMGEDPDGIDHGEVLVWKFDPKLAVEYRPFDMFKDMHEHAKRTIRGSGATNFSLLKQAG
 DVEENPGPGSMGAGATGRAMDGPRLLLLLLVSLGGAKEACPTGLYTHSGECCACNLGEGVAQP
 CGANQTVCEPCLDSVTFSDVVSATEPCKPCTECVGLQSMSAPCVEADDAVCRCAYGYQDETGRCEA
 CRVCEAGSGLVFSCQDKQNTVCEECPDGTYSDEANHVDPCLPCTVCEDTERQLRECTRWADAECEFI
 PGRWITRSTPPEGSDSTAPSTQEPEAPPEQDLIASTVAGVVTTVMGSSQPVVTRGTTDLIPVYCSILAAV

30

【化 3 1】

VVGLVAYIAFSR

配列番号 28 (H I V 1 N e f - T 2 A - P u r o アミノ酸配列; H I V 1 N e f 配列は太字であり、T 2 A 配列には下線が引かれており、P u r o 配列はイタリック体であり、制限部位は灰色である)

【化 3 2】

EFMGKWSKSSVIGWPTVRERMRRAEPAADRVGAASRDLEKHGAITSSNTAATNAACAWL
 EAQEEEEVGFPVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQRRQDILDWYHTQG
 YFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWICYKLVPVEPDKIEEANKGENTSLLHPVSLHGMDDPERE
 VLEWRFDLSRLAFHHVARELHPEYFKNCTSGSGEGRGSLTCDVEENPGPTRMTEYKPTVRLA
 TRDDVPRAVRTLAAAFADYPATRHVDPDRHIERVTELQELFLTRVGLDIGKVVVADDGAAVAVWTP
 ESVEAGAVFAEIGPRMAELSGSRLAAQQQMEGLLAPHRPKEPAWFLATVGVSPDHQKGKLSAVVLP
 GVEAAERAGVPAFLETSAPRNLPFYERLGFVTADVEVPEGPRTWCMTRKPGA-GS

40

配列番号 29 (H I V 2 N e f - T 2 A - P u r o アミノ酸配列; H I V 2 N e f 配列は太字であり、T 2 A 配列には下線が引かれており、P u r o 配列はイタリック体であり、制限部位は灰色である)

【化 3 3】

EEFMGASGSKKLSKHSRGLRERLLRARGDGYGKQRDASGGEYSQFQEESGREQNSPSCGQ
 QYQQGEYMNSPWRNPATERQKDLRQQNMDDVSDDDDLIGVPVTPRVRREMTYKLAI
 DMSHFIKEKGGGLQGMFYSSRRHRILDIYLEKEEGHDPDWQNYTHGPGVRYPMYFGWLWKL
 VSVELSQEAEEDEANCLVHPAQTSRHDEHGETLVWQFDSMLAYNYKAFTLYPEEFGHKS
 GLPEKEWKAKLKARGIPYSETSGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPTRMTEYKPTVRLATRDDVPRA
 VRTLAAAFADYPATRHITVDPDRHIERVTELQELFLTRVGLDIGKVWVADDGA AVAVWTTPESEAGAV
 FAEIGPRMAELSGSRLAAQQQMEGLLAPHRPKEPAWFLATVGVSPDHQKGKLGSAVVLPGVEAAERA
 GVPAFLETSAPRNLPFYERLGFVTADVEVPEGPRTWCMTRKPGA-GS

配列番号 3 0 (P 2 A 核酸配列)

【化 3 4】

GGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTG
 GACCT

配列番号 3 1 (T 2 A 核酸配列)

【化 3 5】

GGCAGTGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGGAGAATCCTGGCC
 CA

配列番号 3 2 (E 2 A 核酸配列)

【化 3 6】

GGAAGCGGACAGTGTACTAATTATGCTCTCTTGA AATTGGCTGGAGATGTTGAGAGC
 AACCTGGACCT

配列番号 3 3 (F 2 A 核酸配列)

【化 3 7】

GGAAGCGGAGTGAAACAGACTTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTTGGCGGGAGACGT
 GGAGTCCAACCCTGGACCT

配列番号 3 4 (I R E S 核酸配列)

【化 3 8】

CCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCC
 GGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGCTTTTGGCAATGTGAG
 GGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTTTCCCCTCTC
 GCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGC
 TTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCACC
 TGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGG
 CGGCACAACCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGG
 CTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCATTTGT
 ATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTA

【化 3 9】

AAAAAACGTCTAGGCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACACG
 ATGATAATATGGCCACA

配列番号 3 5 (P G K 核酸配列)

【化 4 0】

GGGTAGGGGAGGCGCTTTTCCCAAGGCAGTCTGGAGCATGCGCTTTAGCAGCCCCG
 CTGGGCACTTGGCGCTACACAAGTGGCCTCTGGCCTCGCACACATTCCACATCCACC
 GGTAGGCGCCAACCGGCTCCGTTCTTTGGTGGCCCCCTTCGCGCCACCTTCTACTCCTC
 CCTAGTCAGGAAGTTCCCCCCCCGCCCGCAGCTCGCGTCGTGCAGGACGTGACAA
 ATGGAAGTAGCACGTCTCACTAGTCTCGTGCAGATGGACAGCACCGCTGAGCAATG
 GAAGCGGGTAGGCCTTTGGGGCAGCGGCCAATAGCAGCTTTGCTCCTTCGCTTTCTG
 GGCTCAGAGGCTGGGAAGGGGTGGGTCCGGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGCTCAGG
 GGCGGGGCGGGCGCCCGAAGGTCTCCGGAGGCCCCGGCATTCTGCACGCTTCAAAA
 GCGCACGTCTGCCGCGCTGTTCTCCTCTTCTCATCTCCGGGCCTTTCGACCTGCAGC
 CCAAGCTTACC

10

20

30

40

50

配列番号 36 (P2A アミノ酸配列)

G S G A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P

配列番号 37 (T2A アミノ酸配列)

G S G E G R G S L L T C G D V E E N P G P

配列番号 38 (E2A アミノ酸配列)

G S G Q C T N Y A L L K L A G D V E S N P G P

配列番号 39 (F2A アミノ酸配列)

G S G V K Q T L N F D L L K L A G D V E S N P G P

配列番号 40 (リンカーアミノ酸配列)

G G G G S

10

配列番号 41 (リンカーアミノ酸配列)

(G G G G S)₂

配列番号 42 (リンカーアミノ酸配列)

(G G G S)₃

配列番号 43 (リンカーアミノ酸配列)

(G G G S)₄

配列番号 44 (リンカーアミノ酸配列)

G G G G S G G G G S G G G G G S G S G G G G S

配列番号 45 (リンカーアミノ酸配列)

G G G G S G G G G S G G G G G S G S G G G G S G G G G S G G G G S

20

配列番号 46 (リンカーアミノ酸配列)

(G G G G S)₃

配列番号 47 (リンカーアミノ酸配列)

(G G G G S)₄

配列番号 48 (M167、SIV Ne f - I R E S - C D 2 0 s c F v (リツキシマ
ブ) C A R 核酸配列)

ATGGGCTCCAGCAACTCCAAGAGGAGCAACAGGCGTTGCTCAAGCTCTGGCGAGGGCTGC
GAGGGAAGCCTGGGGCAGACTGGGTGCTATTGTCCGATCCGCTTATCGGGCAGTCATCAACA
GTCCAAGAAGAGTGCGGCAAGGCCTTGAAAAAGTCCTGGGGTAAAGGTAAAATGACTCCAG
ACGGCCGCCGCTGCAAGAAGGAGACACCTTTGATGAGTGGGATGATGATGAAGAAGAAGT
AGGCTTCCCTGTGCAACCTCGAGTCCCCCTTAAGACAGATGACCTATAAATTAGCAGTGGACT
TTTCCCACTTTTTAAAAATCAAAGGGGGGACTGGATGGGATATATTACTCTGAAAGAAGAGAA
AAGATCCTGAATTTGTATGCCTTGAACGAGTGGGGAATAATAGATGATTGGCAAGCTTACTC
ACCAGGCCCGGGGATAAGGTACCCGAGAGTCTTTGGCTTCTGCTTTAAGCTAGTCCCACTGG
ACCTGCATGAGGAGGCACGCAACTGTGAGAGACACTGTCTGATGCATCCAGCACAGATGGG
GGAAGATCCTGATGGAATAGATCATGGAGAAGTCTTGGTCTGGAAGTTTGACCCGAAGTTG
GCGGTGGAGTACCGCCCGGACATGTTTAAGGACATGCACGAACATGCAAAGCGCtgaacgcgtG
CCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGAATAAAGGCCGGTGTG
CGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATAATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAAC
CTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAG
GTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCT
GTAGCGACCCCTTTCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAA
AGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGGCGGACAACCCCACTGCCACGTTGTGAGTTG
GATAGTTGTGGAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGAT
GCCCAGAAGGTACCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATG
TGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCCCTTT
GAAAAACACGATGATAATATGGCCACAggatacgcgcgcaccATGGCCCTGCCAGTGACCGCCTTGC
TCCTTCCCTGGCTCTTCTGCTGCACGCTGCTAGACCTCAGGTGCAGCTTCAGCAGCCTGGCG
CTGAGCTGGTGAAGCCCGGAGCTAGCGTGAAGATGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTATACCTTC
ACCTCATACAACATGCACTGGGTGAAGCAGACCCCTGGAAGAGGCCTCGAGTGGATTGGAG
CTATCTACCCTGGAACGGGAGACACCAGCTATAACCAGAAGTTCAAGGGAAAGGCTACCTT
GACCGCTGACAAAGAGCAGCAGCACCGCTTACATGCAGCTGAGCAGCCTTACAAGCGAGGAC
TCTGCCGTGTACTACTGCGCCAGAAGCACCTATTACGGCGGCGACTGGTACTTCAACGTGTG
GGGAGCTGGAACCACCGTGACCGTTAGCGCCGGCGGCGGAGGCTCTGGCGGCGGAGGAAGC
GGCGGCGGCGGCTCCAGATCGTGCTGTCTCAGAGCCCCGCTATCTTGAGCGCCTCCCCTGG
AGAGAAGGTGACCATGACTTGCAGAGCTAGCAGCAGCGTGAGCTACATCCACTGGTTCCAA
CAGAAGCCAGGCAGCTCCCCTAAGCCTTGGATCTACGCTACCAGCAACCTTGCCTCAGGCGT
TCCCGTGAGATTCTCTGGATCTGGAAGCGGCACATCCTACTCCCTGACCATCTCCCAGGTCG
AGGCTGAGGACGCTGTCTACTTACTACTGCCAGCAGTGGACTAGCAACCCCCCAACATTGGC
GGCGGCAACAACTGGAGATCAAGActagtaccacgacgccagcgccgcgaccaccaacacccggcgccaccatcgctcg
cagccctgtccctgcgcccagaggcgctgcgcgccagcgccggggggcgagtcgacacgagggggctggacttcgctgtgatattacatctgg
gcgcccctggccgggacttltggggctccttctcctgtcactgtgtatcacccttactgcaaacggggcgagaagaactcgttatatattcaaacacat
ltatgagaccagatacaactactcaagaggaagtgtgtagctgcgcgatttcagaagaagaagagagagatgtgaactgagagtgaagtacga
ggagcgacagacccccgcgtaccagagggcccaaacagctctataacgagctcaatctagagcaagagagaggtacagatgttttggacaaga
gactgtggcggggacctgagatggggggaagccgagaaaggaagaaacccaggaagcgtgtacaaactcagaaagaatagatggcgag
gcctacagtgtgagattgggatgaaggcgagcgccggggcaaggggcacgaltggcctttaccagggtctcagtagcaccaccaagggacacatc
gagcccttcacatgcaggccctccccctcctctaa

20

30

【化 4 2】

ATGGGCTCCAGCAACTCCAAGAGGCAGCAACAGGGCTTGCTCAAGCTCTGGCGAGGGCTGC
GAGGGAAGCCTGGGGCAGACTGGGTGCTATTGTCCGATCCGCTTATCGGGCAGTCATCAACA
GTCCAAGAAGAGTGCGGCAAGGCCTTGAAAAAGTCCTGGGGTAAAGGTAAAATGACTCCAG
ACGGCCGCCGCTGCAAGAAGGAGACACCTTTGATGAGTGGGATGATGATGAAGAAGAAGT
AGGCTTCCCTGTGCAACCTCGAGTCCCCTTAAGACAGATGACCTATAAATTAGCAGTGGACT
TTTCCCACTTTTTAAAATCAAAGGGGGGGACTGGATGGGATATATTACTCTGAAAGAAGAGAA

40

【化 4 3】

AAGATCCTGAATTTGTATGCCTTGAACGAGTGGGGAATAATAGATGATTGGCAAGCTTACTC
 ACCAGGCCCGGGGATAAGGTACCCGAGAGTCTTTGGCTTCTGCTTTAAGCTAGTCCCAGTGG
 ACCTGCATGAGGAGGCACGCAACTGTGAGAGACACTGTCTGATGCATCCAGCACAGATGGG
 GGAAGATCCTGATGGAATAGATCATGGAGAAGTCTTGGTCTGGAAGTTTGACCCGAAGTTG
 GCGGTGGAGTACCGCCCGGACATGTTTAAGGACATGCACGAACATGCAAAGCGCtgaacgcgtG
 CCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTG
 CGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAAC
 CTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCTAGGGGTCTTTCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAG
 GTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCT
 GTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAA
 AGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAGTGCCACGTTGTGAGTTG
 GATAGTTGTGGAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGAT
 GCCCAGAAGGTACCCCATTTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATG
 TGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCTTT
 GAAAAACACGATGATAATATGGCCACAggatcegcgcaccATGGCCCTGCCAGTGACCGCCTTGC
 TCCTTCCCCTGGCTCTTCTGCTGCACGCTGCTAGACCTGAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGA
 GCTGAGCTGGTGAAGCCTGGCGCTAGCGTGAAGATGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCT
 TCACCAGCTATAACATGCACTGGGTGAAGCAGACCCCTGGACAGGGACTGGAGTGGATCGG
 AGCTATCTACCCTGGAAACGGAGACACCTCATACAACAGAAAGTTCAAGGGAAAGGCTACC
 CTGACCGCTGACAAGAGCAGCAGCACCGCTTACATGCAGCTGAGCTCACTGACCAGCGAGG
 ACTCCGCCGACTACTACTGCGCCAGAAGCAACTACTACGGAAGCAGCTACTGGTTCTTCGAC
 GTGTGGGGAGCTGGAACCAACCGTGACCGTGTCAAGCGGCGGCGGAGGcTCCGGAGGCGGAG
 GATCTGGCGGCGGCGGCAGCGACATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGCTATCCTGTCTGCCAGC
 CCTGGAGAGAAGGTGACCATGACCTGCAGAGCTAGCAGCAGCGTGAACCTACATGGACTGGT
 ATCAGAAAAAGCCCGGCAGCTCACCTAAGCCTTGATCTACGCTACCAGCAACTTAGCCAGC
 GGCGTGCTGCTAGATTCTCCGGAAGCGGCTCTGGAACCAGCTACTCCCTTACCATCAGCAG
 AGTGGAGGCTGAGGACGCTGCTACCTACTACTGCCAGCAGTGGAGCTTCAACCCTCTACCT
 TCGGAGGAGGAACCAAGCTGGAGATCAAgaactagtaacgacgcccagcgcgcgacccaacaaccgcccacca
 tcgctgcagccccctgtccctgcgcagagggcgtgcgcgcccagcggcgggcgagtgacacagaggggctggaattcgcctgtatatt
 acatctggcgcccccttgccgggacttggtgggtccttctctgtcactggttatccctttactgcaaaggggcagaaagaaactcctgtatatattcaa
 acaaccattatgagaccagtaaaactactcaagagggaagatggctgtactgcccattccagaagaagaagagagatgtgaactgagagtga
 gttcagcaggagcgcagacgccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgtttg
 gacaagagacgtggccgggacctgagatgggggaaagccgagaaggaagaacctcagggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagat
 ggcgagggcctacagtgaattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtaacgccaagg
 acacctacgacgcccccttcacatgcaggccctgccccctcgctaa

10

20

30

配列番号 50 (M169、SIV Nef-IRES-CD19×CD20 scFv
CAR 核酸配列)

【化 4 4】

ATGGGCTCCAGCAACTCCAAGAGGCAGCAACAGGGCTTGCTCAAGCTCTGGCGAGGGCTGC
 GAGGGAAGCCTGGGGCAGACTGGGTGCTATTGTCCGATCCGCTTATCGGGCAGTCATCAACA
 GTCCAAGAAGAGTGCGGCAAGGCCTTAAAAAGTCCTGGGGTAAAAGGTAAATGACTCCAG
 ACGGCCGCCGCTGCAAGAAGGAGACACCTTTGATGAGTGGGATGATGATGAAGAAGAAGT
 AGGCTTCCCTGTGCAACCTCGAGTCCCCTTAAGACAGATGACCTATAAATTAGCAGTGGACT
 TTTCCCACTTTTTAAAAATCAAAGGGGGGACTGGATGGGATATATTACTCTGAAAGAAGAGAA
 AAGATCCTGAATTTGTATGCCTTGAACGAGTGGGGAATAATAGATGATTGGCAAGCTTACTC
 ACCAGGCCCGGGGATAAGGTACCCGAGAGTCTTTGGCTTCTGCTTTAAGCTAGTCCCAGTGG
 ACCTGCATGAGGAGGCACGCAACTGTGAGAGACACTGTCTGATGCATCCAGCACAGATGGG
 GGAAGATCCTGATGGAATAGATCATGGAGAAGTCTTGGTCTGGAAGTTTGACCCGAAGTTG
 GCGGTGGAGTACCGCCCGGACATGTTTAAGGACATGCACGAACATGCAAAGCGCtgaacgcgtG
 CCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTG
 CGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAAC
 CTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCTAGGGGTCTTTCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAG

40

【化 4 5】

GTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCT
 GTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAA
 AGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAGTGCCACGTTGTGAGTTG
 GATAGTTGTGGAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGAT
 GCCAGAAGGTACCCCATTTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATG
 TGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCTTT
 GAAAAACACGATGATAATATGGCCACAggatacggcgccaccATGGCCCTGCCTGTCACCGCCCTGC
 TGCTGCCCCCTGGCTCTGCTGCTGCACGCCGCAAGACCTGAAGTCCAGCTGCAGCAGTCCGGG
 GCAGAGCTGGTGAAGCCAGGAGCCTCCGTGAAGATGTCTTGTAAAGGCCAGCGGCTACACCT
 TCACATCCTATAACATGCACTGGGTGAAGCAGACCCCTGGACAGGGCCTGGAGTGGATCGG
 AGCAATCTACCCAGGCAACGGCGACACAAGCTATAATCAGAAGTTTAAGGGCAAGGCCACC
 CTGACAGCCGATAAGAGCTCCTCTACCGCTACATGCAGCTGAGCTCCCTGACAAGCGAGGA
 CTCCGCCGATTACTATTGCGCCCGGTCCAATTACTATGGCTCTAGCTACTGGTTCTTTGACGT
 GTGGGGAGCAGGAACCACAGTGACCGTGTCTCTGGAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGG
 ATCTGGCGGCGGCGGCTCTGATATCGTGCTGACACAGAGCCCAGCAATCCTGTCCGCCTCTC
 CAGGAGAGAAGGTGACCATGACATGTCGGGCCAGCTCCTCTGTGAACCTACATGGACTGGTA
 TCAGAAGAAGCCCGGCAGCTCCCCTAAGCCATGGATCTACGCCACCTCCAATCTGGCATCTG
 GAGTGCCTGCAAGGTTACGCGGcTCCGGATCTGGCACACAGCTATTCCCTGACAATCTCTCGC
 GTGGAGGCAGAGGATGCAGCAACCTACTATTGCCAGCAGTGGAGCTTCAACCCCCCTACCTT
 TGGCGGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAGGGCGGCGGCGGCTCCGGCGGCGGCGGGAGCGG
 CGGCGGCGGCTCTGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCTCCGACATCCAGATGACCCAG
 ACCACATCTAGCCTGTCTGCCAGCCTGGGCGACAGGGTGACAATCAGCTGTGCGCCTCCCA
 GGATATCTCTAAGTACCTGAATTGGTATCAGCAGAAGCCAGATGGCACCGTGAAGCTGCTGA
 TCTACCACACAAGCCGGCTGCACTCCGGAGTGCCAAGCCGGTTTCAGCGGCTCTGGCAGCGGC
 ACCGACTATAGCCTGACAATCTCCAACCTGGAGCAGGAGGATATCGCCACCTACTTCTGCCA
 GCAGGGCAATACCCTGCCTTATACATTTGGCGGAGGAACAAAGCTGGAGATCACCGGCTCC
 ACATCTGGAAGCGGCAAGCCAGGATCTGGAGAGGGAAGCACCAGGGAGAGGTGAAGCTG
 CAGGAGTCCGGACCAGGCCTGGTGGCACCTTCCCAGTCTCTGAGCGTGACCTGTACAGTGTG
 TGGCGTGAGCCTGCCTGACTACGGCGTGTCTGGATCAGGCAGCCACCAAGAAAGGGCCTG
 GAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGCGAGACAACATACTATAACTCCGCCCTGAAGAGCC
 GGCTGACCATCATCAAGGATAACTCCAAGTCTCAGGTGTTCTCTGAAGATGAATAGCCTGCAG
 ACCGACGATACAGCCATCTACTATTGCGCCAAGCACTACTATTATGGAGGCAGTTATGCTAT
 GGACTATTGGGGGCAGGGCACAAGCGTCACCGTCTCATCAactagtaccacgacgccagcgcgcgaccacca
 acaccggcgccaccatcgctgcagccccgtccctgcgcccagaggcggtgcggccagcggcgggggcgagtcacacgagggggctgg
 acttcgctgtgatctacatctggcgcccttggccgggacttgtggggctctctcctgtcactggttatcaccccttactgcaaacggggcagaaga
 aactcctgtatataatcaacaaccalltatgagaccaglacaaactactcaagagggaagatggctgtagctgccgattccagaagaagaagaaggagg
 atgtgaactgagagtgaagtlcagcaggagcgagacgcccccgctaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaalctaggacgaaga
 gaggagtlacgatlttggacaagagacgtggccgggacccctgagatggggggaagccgagaagggaagaacccctcagggaaggcctgtacaatgaa
 ctgcagaaagataagatggcgaggccctacagtgaattggatgaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggccttaccagggtctc
 agtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgccccctcgctaa

10

20

30

40

配列番号 51 (M170、SIV Ne f - IRES - CD19 scFv CAR 核酸配列)

【化 4 6】

ATGGGCTCCAGCAACTCCAAGAGGCAGCAACAGGGCTTGCTCAAGCTCTGGCGAGGGCTGC
 GAGGGAAGCCTGGGGCAGACTGGGTGCTATTGTCCGATCCGCTTATCGGGCAGTCATCAACA
 GTCCAAGAAGAGTGCGGCAAGGCCTTGAAAAAGTCTGGGGTAAAGGTAAAATGACTCCAG
 ACGGCCCGCCGCTGCAAGAAGGAGACACCTTTGATGAGTGGGATGATGATGAAGAAGAAGT
 AGGCTTCCCTGTGCAACCTCGAGTCCCCTTAAGACAGATGACCTATAAATTAGCAGTGGACT
 TTTCCCACTTTTTTAAATCAAAGGGGGGACTGGATGGGATATATTACTCTGAAAGAAGAGAA
 AAGATCCTGAATTTGTATGCCTTGAACGAGTGGGGAATAATAGATGATTGGCAAGCTTACTC
 ACCAGGCCCGGGGATAAGGTACCCGAGAGTCTTTGGCTTCTGCTTTAAGCTAGTCCCAGTGG
 ACCTGCATGAGGAGGCACGCAACTGTGAGAGACACTGTCTGATGCATCCAGCACAGATGGG

GGGAAGATCCTGATGGAATAGATCATGGAGAAGTCTTGGTCTGGAAGTTTGACCCGAAGTTG
GCGGTGGAGTACCGCCCGGACATGTTTAAAGGACATGCACGAACATGCAAAGCGCtgaacgcgtG
CCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGGAATAAGGCCGGTGTG
CGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGCTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCCGAAAC
CTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAG
GTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCT
GTAGCGACCCCTTTCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAA
AGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAGTGCCACGTTGTGAGTTG
GATAGTTGTGGAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGAT
GCCCAGAAGGTACCCCATTTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATG
TGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCCCTTT
GAAAAACACGATGATAATATGGCCACAggatecgcgcgcaccATGGCCCTGCCTGTGACCGCCCTGC
TGCTGCCCTGGCCCTGCTGCTGCACGCTGCTAGACCTGATATTCAGATGACCCAGACCACT
AGCTCCCTGTCCGCCTCTCTGGGCGACAGAGTGACAATCAGCTGCAGGGCCTCCAGGATAT
CTCTAAGTATCTGAACTGGTACCAGCAGAAAGCCAGACGGCACAGTGAAGCTGCTGATCTATC
ACACCAGCCGCCTGCACTCCGGAGTGCCATCTCGGTTACGCGGcTCCGGATCTGGCACAGAC
TACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAGCAGGAGGATATCGCCACCTATTTCTGCCAGCAGGG
CAATACACTGCCCTACACCTTTGGCGGCGGCACAAAGCTGGAGATCACCGGAGGAGGAGGA
AGCGGCGGAGGAGGCTCCGGCGGCGGCGGCTCTGAGGTGAAGCTGCAGGAGTCCGGACCTG
GCCTGGTGGCACCAAGCCAGTCCCTGTCTGTGACATGTACCGTGTCCGGCGTGTCTCTGCCT
GATTACGGCGTGTCTTGGATCAGGCAGCCACCTAGGAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGCGTGA
TCTGGGGCAGCGAGACAACATACTATAATTCTGCCCTGAAGAGCAGACTGACCATCATCAA
GGACAACAGCAAGTCCAGGTGTTCTTGAAGATGAATAGCCTGCAGACAGACGATACCGCC
ATCTACTATTGCGCCAAGCACTACTATTACGGCGGCAGCTATGCCATGGATTACTGGGGCCA
GGGCACATCCGTGACCGTGTCTAGCactagtagcagcagcagcgcgcgaccaccaacacccggcgccaccategcgtcg
cagccctgtccctgcgcccagaggcgtgcgggccagcggcggggggcgcagtgacacagagggggctggacttcgctgtgatatacatctgg
gcgcccttgccgggactgtgtggggtccttctctgtcactggttataccctttactgcaaacggggcagaagaagaactctgtatattcaacaacct
ttatgagaccagtagaactactcaagaggagaagatgctgtagctgcgcatttcagaagaagaagaggagatgtgaactgagagtgaagttcagca
ggagcgcagacgccccgcgtaccagcaggggccagaaacagctctataacagagctcaatctaggacgaagagaggagtagcatgtttggacaaga
gacgtggccgggacccatgagatgggggggaaagccgagaaaggaagaacctcagggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagalaagatggcggag
gcctacagttagattgggatgaaaggcgagcgcgggagggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtagcagccaccaaggacacctac
gagcgccttcacatgcaggccctgcgccctcgtctaa

20

30

ATGGGCTCCAGCAACTCCAAGAGGGCAGCAACAGGGCTTGCTCAAGCTCTGGCGAGGGCTGC
GAGGGAAGCCTGGGGCAGACTGGGTGCTATTGTCCGATCCGCTTATCGGGCAGTCATCAACA
GTCCAAGAAGAGTGCGGCAAGGCCTTGAAAAAGTCCTGGGGTAAAGGTA AAAATGACTCCAG
ACGGCCGCCGCTGCAAGAAGGAGACACCTTTGATGAGTGGGATGATGATGAAGAAGAAGT
AGGCTTCCCTGTGCAACCTCGAGTCCCCTTAAGACAGATGACCTATAAATTAGCAGTGGACT
TTTCCCACTTTTTAAAATCAAAGGGGGGACTGGATGGGATATATTACTCTGAAAGAAGAGAA
AAGATCCTGAATTTGTATGCCTTGAACGAGTGGGGAATAATAGATGATTGGCAAGCTTACTC
ACCAGGCCCGGGGATAAGGTACCCGAGAGTCTTTGGCTTCTGCTTTAAGCTAGTCCCAGTGG
ACCTGCATGAGGAGGCACGCAACTGTGAGAGACACTGTCTGATGCATCCAGCACAGATGGG
GGAAGATCCTGATGGAATAGATCATGGAGAAGTCTTGGTCTGGAAGTTTGACCCGAAGTTG
GCGGTGGAGTACCGCCCGGACATGTTTAAGGACATGCACGAACATGCAAAGCGCtgaacgegtG
CCCCTCTCCCTCCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTG
CGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGAATGTGAGGGCCCGGAAAC
CTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAG
GTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCT
GTAGCGACCCCTTTCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAA
AGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCAGTGCCACGTTGTGAGTTG

40

【化 4 9】

GATAGTTGTGGAAGAGTCAAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGAT
 GCCCAGAAGGTACCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATG
 TGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCTTT
 GAAAAACACGATGATAATATGGCCACAggatacggcgccaccatggctctgcccgtaccgctctgctgctctgctct
 gctgctgacgctgctgcccacaggtaaacggaagaatctggcgaggcctggfagcaggcaggacggagcctgcgcctgagctgagcagatcc
 gagcacaccttcagctcccacgtgatgggctggttcggcaggccccaggcaaggagagagagagcgtggccgtgacggctggaggacatccca
 catcttacggcgattccgtgaaggcgccggttcacatcagccgggacaacgccaagaagacactgtatctgcagatgaacagcctgaagccccaggac
 accgcccgtgactattgcgcagcaaggagaategacgcagcagacttggattcctggggccagggcacccagggtgacagtgctctagcggaggaggag
 gatctgaggtgagcgtggtggagagcggaggcgccctggfagcaggccggaggctctctgaggctgagctgtgcagcagcgggaagaaccttcacaat
 gggctgggttaggcaggcaccaggaaaggagaggagggttcgtggcagcaatcagcctgtccctaccctggcctactatgccgagagcgtgaagggc
 aggtttaccatctcccgcgataacgccaagaatcagtggtgctgcagatgaactcctgaaacctgaggacacagccctgtactattgtccgcccgtac
 ggaagagcgtgatgagcattagaccagactattggggcagggaacacaggtgaccgtgagcagcactagaccacgacgccagcggcgccgacca
 ccaacacccggcgccaccatcgctgcagccccgtccctgcgcccaggcggtgcggccagcggcgggggcgagtgacacagagggggc
 tggacttgcctgtgatctacatctggcgcccttggccgggacttggggctcctctcctgtaactggttaccacctttactgcaaacggggcgagaaa
 gaaactcctgtatattcaacaacatttatgagaccagtaacaactactcaagaggaagatggctgtagct.gccgatttcagaagaagaagaagga
 ggatgtgaactgagagtgaaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtaccagcaggccagaaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaa
 gagaggagtagatgttttgacaagagacgtggccgggaccctgagatggggggaaagccgagaaggaagaacctcagggaagggcctgtacaaatg
 aactgcagaaagataagatggcgaggcctacagtgagattgggatgaagggcagcggcgaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggt
 ctcatgacgccaaggaacacacacgacgccccttcacatgcaggccctccccctcgtctaa

10

配列番号 5 3 (M 1 7 2、S I V N e f - I R E S - B C M A B i V H H C A R 2
 核酸配列)

【化 5 0】

ATGGGCTCCAGCAACTCCAAGAGGCAGCAACAGGGCTTGCTCAAGCTCTGGCGAGGGCTGC
 GAGGGAAGCCTGGGGCAGACTGGGTGCTATTGTCCGATCCGCTTATCGGGCAGTCATCAACA
 GTCCAAGAAGAGTGCGGCAAGGCCTTGAAAAAGTCCTGGGGTAAAGGTAAATGACTCCAG
 ACGGCCCGCCGCTGCAAGAAGGAGACACCTTTGATGAGTGGGATGATGATGAAGAAGAAGT
 AGGCTTCCCTGTGCAACCTCGAGTCCCCTTAAGACAGATGACCTATAAATTAGCAGTGGACT
 TTTCCCACTTTTAAAAATCAAAGGGGGGACTGGATGGGATATATTACTCTGAAAGAAGAGAA
 AAGATCCTGAATTTGTATGCCTTGAACGAGTGGGGAATAATAGATGATTGGCAAGCTTACTC
 ACCAGGCCCGGGGATAAGGTACCCGAGAGTCTTTGGCTTCTGCTTTAAGCTAGTCCCACTGG
 ACCTGCATGAGGAGGCACGCAACTGTGAGAGACACTGTCTGATGCATCCAGCACAGATGGG
 GGAAGATCCTGATGGAATAGATCATGGAGAAGTCTTGGTCTGGAAGTTTGACCCGAAGTTG
 GCGGTGGAGTACCGCCCGGACATGTTTAAGGACATGCACGAACATGCAAAGCGCtgaacgcgtG
 CCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTG
 CGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATAATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCCGAAAC
 CTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAG
 GTCTGTTGAATGTCTGTGAAGGAAGCAGTTCCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCT
 GTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAA
 AGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCACTGCCACGTTGTGAGTTG
 GATAGTTGTGGAAGAGTCAAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGAT
 GCCCAGAAGGTACCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATG
 TGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCTTT
 GAAAAACACGATGATAATATGGCCACAggatacggcgccaccATGGCTCTGCCCCGTACCCGCACTGC
 TGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCACGCTGCTCGCCCTCAGGTCAAACCTGGAAGAATCTGGC
 GGAGGCCTGGTGCAGGCAGGCAGGTCCCTGAGGCTGTCTTGCGCAGCAAGCGAGCACACCT
 TTAGCTCCACGTGATGGGATGGTTACAGGCAGGCACCAGGCAAGGAGAGAGAGTCCGTGGC
 CGTGATCGGCTGGAGGGACATCTCCACATCTTACGCCGATTCTGTGAAGGGCCGGTTTACCA
 TCAGCAGAGACAACGCCAAGAAGACACTGTATCTGCAGATGAATAGCCTGAAGCCTGAGGA
 CACCGCCGTGTACTATTGCGCAGCAAGGAGAATCGATGCAGCAGACTTCGATTCTGGGGAC
 AGGGAACCCAGGTGACAGTGTCTAGCGGAGGAGGAGGAAGCGCCGTGCAGCTGGTGGAGTC
 CGGCGGCGGCCCTGGTGCAGGCCGGCGATTCTCTGCGGCTGACCTGTACAGCCTCCGGCAGAG
 CCTTCTCTACCTACTTTATGGCCTGGTTTAGACAGGCCCTGGCAAGGAGAGGGAGTTTGTG

20

30

40

【化 5 1】

GCAGGAATCGCATGGAGCGGAGGcTCCACAGCATAACGCCGACTCCGTGAAGGGCAGGTTCA
 CCATCTCTCGGATAACGCCAAGAATACAGTGTATCTGCAGATGAACTCTCTGAAGAGCGAG
 GACACAGCCGTGTACTATTGTGCCAGCCGGGGAATCGAGGTGGAGGAATTTGGGGCTTGGG
 GGCAGGGAACCTCAGGTGACCGTCTCATCAactagtagcaagcagccagcgcgcgaccaccaacaccggcgccaccat
 cgcgtcgagccctgtccctgcgcccagagcgtgccggccagcggcgggggcgagcgcacacaggggggctggactcgcctgtgatacta
 catctggcgcccttggcgggacttgggggcttctctgtcactgggtatcacccttactgcaaacggggcagaaagaaactcctgtatataa
 caaccatttatgagaccagtaaaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgattccagaagaagaaggaggatgtgaactgagagtgaag
 ttacagcaggagcgcagacgcccccggtaccagcagggccagaaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtagcatgtttgg
 acaagagacgtggcgccgggacccgtgagatggggggaagccgagaaggaagaaacccctcagggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatg
 gcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcgaaggggcgacgatggcctttaccagggtctcagtagaccaccaagga
 cactacagcgccttcacatgcaggccctgccccctcgttaa

10

配列番号 5 4 (M173、SIV Ne f - IRES - BCMA mono - VHH C
 A R 核酸配列)

【化 5 2】

ATGGGCTCCAGCAACTCCAAGAGGCAGCAACAGGGCTTGCTCAAGCTCTGGCGAGGGCTGC
 GAGGGAAGCCTGGGGCAGACTGGGTGCTATTGTCCGATCCGCTTATCGGGCAGTCATCAACA
 GTCCAAGAAGAGTGC GGCAAGGCCTTGAAAAAGTCTTGGGGTAAAGGTAAAATGACTCCAG
 ACGGCCGCCGCTGCAAGAAGGAGACACCTTTGATGAGTGGGATGATGATGAAGAAGAAGT
 AGGCTTCCCTGTGCAACCTCGAGTCCCTTAAGACAGATGACCTATAAATTAGCAGTGGACT
 TTTCCCACTTTTAAAAATCAAAGGGGGGACTGGATGGGATATATTACTCTGAAAAGAAGAGAA
 AAGATCCTGAATTTGTATGCCTTGAACGAGTGGGGAATAATAGATGATTGGCAAGCTTACTC
 ACCAGGCCCCGGGATAAAGGTACCCGAGAGTCTTTGGCTTCTGCTTTAAGCTAGTCCCAGTGG
 ACCTGCATGAGGAGGCACGCAACTGTGAGAGACACTGTCTGATGCATCCAGCACAGATGGG
 GGAAGATCCTGATGGAATAGATCATGGAGAAGTCTTGGTCTGGAAGTTTGACCCGAAGTTG
 GCGGTGGAGTACCGCCCCGACATGTTTAAGGACATGCACGAACATGCAAAGCGCtgaacgggtG
 CCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTG
 CGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCCGAAAC
 CTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAG
 GTCTGTTGAATGTGCTGAAGGAAGCAGTTCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCT
 GTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAA
 AGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAGTGCCACGTTGTGAGTTG
 GATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGAT
 GCCAGTAAGTACCCCATTTGATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATG
 TGTTTAGTCGAGGTTAAAAAAACGTCTAGGCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCCTTT
 GAAAAACACGATGATAATATGGCCACAagatccgcgcgccaccatggctctgcccgtcaccgctctgctgctcctctggctct
 gctgctgcacgctgctgcccctcaggtcaaaactggagaactctggcgaggcctgggtgcaggcaggacggagcctgcctgagctgcgcagcatcc
 gagcacaccttcagctcccacgtgagggcgtggttcggcagggcccgcaaggagagagagcgtggccgtgaltcggtggaggacatctcca
 catcttacgccgaltccgtgaaggcgccgttcaccatcagccgggacaacgccaagaagacactgtatctgcagatgaacagcctgaagcccaggac
 accgccgtgtactattgcgcagcaaggagaatcgaacgcagcagacttggatctctggggccagggcacccaggtgacagtgtctagcactagtaccac
 gaegccagcgcgcgaccaccaacaccggcgcccaccatcgctgcagccctgtccctgcgcccagaggcgtgccggccagcggcggggggc
 gcagtgcacacaggggggctggacttgcctgtgatactacatctggcgcccttggccgggacttgggggtccttctctgtcactgggtatcaccctt
 tactgcaaacggggcagaaagaaactcctgtatataaacaaccatttatgagaccagtaaaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgalt
 tccagaagaagaaggaggatgtgaactgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtaccagcaggccagaaaccagctctataa
 cgagctcaatctaggacgaagagaggagtagatgtttggacaagagacgtggccgggaccctgagatggggggaagccgagaagggaagacc
 ctcagggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcgaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgcggaggggcgaagggg
 cacgatggcctttaccagggtctcagtagaccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgccccctcgttaa

20

30

40

配列番号 5 5 (抗 CD 20 sc Fv (リツキシマブ) C A R アミノ酸配列)

【化 5 3】

MALPVTALLPLALLLHAARPQVQLQPPGAEVKGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTP
 GRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGD
 WYFNVWGAGTTVTVSAGGGSGGGSGGGGSQIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIH
 WFQQKPGSSPKPWYIATSNLASGVPVRFSGSGSSTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFG

【化 5 4】

GGTKLEIKTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTC
GVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAP
AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE
IGMKGERRRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

配列番号 5 6 (抗 C D 2 0 s c F v (L e u - 1 6) C A R アミノ酸配列)

【化 5 5】

MALPVTALLPLALLLHAARPEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPG
QGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYGSSY
WFFDVWGAGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYM
DWYQKKPGSSPKPWYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPTF
GGGKLEIKTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGT
CGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSAD
APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA
YSEIGMKGERRRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

配列番号 5 7 (C D 1 9 × C D 2 0 s c F v C A R アミノ酸配列)

【化 5 6】

MALPVTALLPLALLLHAARPEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPG
QGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYGSSY
WFFDVWGAGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYM
DWYQKKPGSSPKPWYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPTF
GGGKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISK
YLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPY
TFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVQLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWI
RQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYY
GGSYAMDYWGQGTSVTVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC
DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCE
LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNE
LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

20

配列番号 5 8 (抗 C D 1 9 s c F v C A R アミノ酸配列)

【化 5 7】

MALPVTALLPLALLLHAARPDQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTV
KLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGG
SGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWG
SETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSV
TVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLL
SLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQ
GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK
GERRRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

30

配列番号 5 9 (抗 B C M A B i V H H C A R 1 アミノ酸配列)

【化 5 8】

MALPVTALLPLALLLHAARPQVKLEESGGGLVQAGRSLRLSCAASEHTFSSHVMGWFRQAPG
KERESVAVIGWRDISTSYADSVKGRFTISRDNAKKTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAARRIDAADF
DSWGQGTQVTVSSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTFMGWFRQAPGKEREFV
AAISLPTLAYYAESVKGRFTISRDNAKNTVVLQMNSLKPEDTALYYCAADRKSVMISIRPDYWG
QGTQVTVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGT
CGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSAD
APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA
YSEIGMKGERRRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

40

配列番号 6 0 (抗 B C M A B i V H H C A R 2 アミノ酸配列)

MALPVTALLPLALLHAARPQVKLEESGGGLVQAGRSRLSCAASEHTFSSHVMGWFRQAPG
KERESVAVIGWRDISTSYADSVKGRFTISRDNAKTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAARRIDAADF
DSWGQGTQVTVSSGGGSAVQLVESGGGLVQAGDSLRLTCTASGRAFTSYFMAWFRQAPGKE
REFVAGIAWSGGSTAYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSKSEDTAVYYCASRGIEVEEFGA
WGQGTQVTVSSTSTTPAPRPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLA
GTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSA
DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAE
AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYOGLSATKDTYDALHMOALPPR

【化 6 0】

MALPVTALLPLALLHAARPQVKLEESGGGLVQAGRSRLSCAAASEHTFSSHVMGWFRQAPG
KERESVAVIGWRDISTSYADSVKGRFTISRDNAKKTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAARRIDAADF
DSWGQGTQVTVSSTSTTTPAPRPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA
LAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFS
RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM
AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMOALPPR

【化 6 1】

[illegible]

40

【化 6 2】

GAGGAGGCACGCAACTGTGAGAGACACTGT_{gctgca}CATCCAGCACAGATGGGGGAAGATCCT
 GATGGAATAGATCATGGAGAAGTCTTGGTCTGGAAAGTTTGACCCGAAGTTGGCGGTGGAGT
 ACCGCCCCGGACATGTTTAAAGGACATGCACGAACATGCAAAGCGC_{taa}

配列番号 6 3 (M 5 7 2、S I V N e f M 1 1 6 - I R E S - C D 2 0 キメラ T C R
 核酸配列)

【化 6 3】

ATGGGCTCCAGCAACTCCAAGAGGCAGCAACAGGGCTTGCTCAAGCTCTGGCGAGGGCTGC
 GAGGGAAGCCTGGGGCAGACTGGGTGCTATTGTCCGATCCGCTTATCGGGCAGTCATCAACA
 GTCCAAGAAGAGTGGCGCAAGGCCTTGAAAAAGTCCTGGGGTAAAGGTAATAATGACTCCAG
 ACGGCCCGCCCTGCAAGAAGGAGACACCTTTGTAGTGGGATGATGATGAAGAAGAAGT
 AGGCTTCCCTGTGCAACCTCGAGTCCCCCTTAAGACAGATGACCTATAAATTAGCAGTGGACT
 TTTCCCACTTTTTTAAAAATCAAAGGGGGGACTGGATGGGATATATTACTCTGAAAAGAGAGAA
 AAGATCCTGAATTTGTATGCCTTGAACGAGTGGGGAATAATAGATGATTGGCAAGCTTACTC
 ACCAGGCCCGGGGATAAGGTACCCGAGAGTCTTTGGCTTCTGCTTTAAGCTAGTCCCAGTGG
 ACCTGCATGAGGAGGCACGCAACTGTGAGAGACACTGT_{gctgca}CATCCAGCACAGATGGGGG
 AAGATCCTGATGGAATAGATCATGGAGAAGTCTTGGTCTGGAAGTTTGACCCGAAGTTGGCG
 GTGGAGTACCGCCCCGGACATGTTTAAAGGACATGCACGAACATGCAAAGCGC_{tgaacgct}GCCCC
 TCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTT
 GTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGC
 CCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTG
 TTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGC
 GACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCA
 CGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCACAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGT
 TGTGGAAGAGTCAAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAG
 AAGGTACCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTA
 GTCGAGGTTAAAAAACGTTCTAGGCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCCTTTGAAAAA
 CACGATGATAATATGGCCACAG_{gatcegcgcaccatgcagctctggaaccactggagggtgctgggactgtcctgtgagcg}
_{tggcgctgtggggacag}GAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGAGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGCGCTAG
 CGTGAAGATGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTACCAGCTATAACATGCACACTGGGTG
 AAGCAGACCCCTGGACAGGGACTGGAGTGGATCGGAGCTATCTACCCTGGAACCGGAGACA
 CCTCATACAACCAGAAGTTCAAGGGAAAGGCTACCCTGACCGCTGACAAGAGCAGCAGCAC
 CGCTTACATGCAGCTGAGCTCACTGACCAGCGAGGACTCCGCCGACTACTACTGCGCCAGAA
 GCAACTACTACGGAAGCAGCTACTGGTTCTTCGACGTGTGGGGAGCTGGAACCACCGTGACC
 GTGTCAAGCGGCGGCGGAGGcTCCGGAGGCGGAGGATCTGGCGGCGGCGGCAGCGACATCG
 TGCTGACCCAGAGCCCTGCTATCCTGTCTGCCAGCCCTGGAGAGAAGGTGACCATGACCTGC
 AGAGCTAGCAGCAGCGTGAACCTACATGGACTGGTATCAGAAAAAGCCCGGCAGCTCACCTA
 AGCCTTGGATCTACGCTACCAGCAACTTAGCCAGCGGCGTGCCTGCTAGATTCTCCGGAAGC
 GGCTCTGGAACCAGCTACTCCCTTACCATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGACGCTGCTACCTA
 CTA CTGCCAGCAGTGGAGCTTCAACCTCCTACCTTCGGAGGAGGAACCAAGCTGGAGATCA
 AGactagtGGCGGCGGAGGCTCTGGCGGCGGAGGAAGCGGCGGCGGCGGCTCC_{gatggcaacgaggag}
_{atggcgcgcatcaccagacacctacaaggtgtccatctctggcaccacagtgtcctgtaccatgtccacaglatccggctctgagatcctgtggcagc}
_{acaacgacaagaataatcgccggcgatgaggacgataagaataatcgccagcgacgaggatcacctgtctctgaaggagttcagcgagctggagcagtc}
_{cggtactacgtgtgtacccctcgggctccaagccagaggacgccaactttacctgtatctgcgggccaagtggtgcgagaattgtatggagatggac}
_{gtgatgtccgtggccaccatcgtgacgtgtgatactgtatcacaggcgccctgctgctgtgtgtactattggagcaagaaccggaagccaagcca}
_{agcctgtgaccagaggacaggagcaggagcaggagggacagaacaaggagagggccacctccagtgcaccaatcctgactacgagccaat}
_{cagggaaggccagcgcatctgtatagcggcctgaatcagaggcgcatctgataa}

配列番号 6 4 (抗 C D 2 0 キメラ T C R アミノ酸配列；C D 3 ε ([シグナルペプチドな
 し] 細胞外ーヘリックスー細胞質) アミノ酸配列には下線が引かれている)

【化 6 4】

MQSGTHWRVLGLCLLSVGVWGQEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQ
 TPGQGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYG
 SSYWFFDVWGAGTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSVN

【化 6 5】

YMDWYQKKPGSSPKWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNP
 PTFGGGTKLEIKTSGGGGSGGGGSGGGSDGNEEMGGITOTPYKVSISGTTVILTCPOYPGSEILW
QHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCM
EMDVMSVATIVIDICITGGLLLL VYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRQONKERPPPVPNP
DYEPIRKGQDRLYSGLNQRI

配列番号 6 5 (M 5 7 4、S I V N e f M 1 1 6 - I R E S - C D 2 0 T A C 核酸配列)

【化 6 6】

ATGGGCTCCAGCAACTCCAAGAGGCAGCAACAGGGCTTGCTCAAGCTCTGGCGAGGGCTGC 10
 GAGGGAAGCCTGGGGCAGACTGGGTGCTATTGTCCGATCCGCTTATCGGGCAGTCATCAACA
 GTCCAAGAAGAGTGCGGCAAGGCCCTGAAAAAGTCTGGGGTAAAGGTAATAAGTACTCCAG
 ACGGCCGCCGCTGCAAGAAGGAGACACCTTTGATGAGTGGGATGATGATGAAGAAGAAGT
 AGGCTTCCCTGTGCAACCTCGAGTCCCCTTAAGACAGATGACCTATAAATTAGCAGTGGACT
 TTTCCCACTTTTAAAAATCAAAGGGGGGACTGGATGGGATATATTACTCTGAAAGAAGAGAA
 AAGATCCTGAATTTGTATGCCTTGAACGAGTGGGGAATAATAGATGATTGGCAAGCTTACTC
 ACCAGGCCCCGGGATAAAGTACCCGAGAGTCTTTGGCTTCTGCTTTAAGCTAGTCCCAGTGG
 ACCTGCATGAGGAGGCACGCAACTGTGAGAGACACTGT_{gctgca}CATCCAGCACAGATGGGGG
 AAGATCCTGATGGAATAGATCATGGAGAAGTCTTGGTCTGGAAGTTTGACCCGAAGTTGGCG
 GTGGAGTACCGCCCGGACATGTTTAAGGACATGCACGAACATGCAAAGCGC_{tgaacgcgt}GCCCC
 TCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGAATAAAGCCGGTGTGCGTTT
 GTCTATATGTTATTTTCCACCATAATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGC 20
 CCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTG
 TTGAATGTGCTGAAGGAAGCAGTTCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGC
 GACCTTTTGACAGGACGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAGGCCA
 CGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCCGACAAACCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGT
 TGTGGAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCAG
 AAGGTACCCCATTTGATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTA
 GTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCGAACACGGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAA
 CACGATGATAATATGGCCACAGGATCC_{gcegccaccatgcagcttggaacccactggagggtgctgggactgtgctgctga}
_{gcgtggcgctgtggggacag}GAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGAGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGCGCT
 AGCGTGAAGATGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTATAACATGCACTGGG
 TGAAGCAGACCCCTGGACAGGGACTGGAGTGGATCGGAGCTATCTACCCTGGAAACGGAGA
 CACCTCATACAACCAGAAGTTCAAGGGAAAGGCTACCTGACCGCTGACAAGAGCAGCAGC
 ACCGCTTACATGCAGCTGAGCTCACTGACCAGCGAGGACTCCGCCGACTACTACTGCGCCAG 30
 AAGCAACTACTACGGAAGCAGCTACTGGTTCTTCGACGTGTGGGGAGCTGGAACCAACCGTG
 ACCGTGTCAAGCGGCGGGCGGAGG_cTCCGGAGGCGGAGGATCTGGCGGCGGCGGCAGCGACA
 TCGTGCTGACCCAGAGCCCTGCTATCCTGTCTGCCAGCCCTGGAGAGAAGGTGACCATGACC
 TGCAGAGCTAGCAGCAGCGTGAACATACATGGACTGGTATCAGAAAAAGCCCGGCAGCTCAC
 CTAAGCCTTGATCTACGCTACCAGCAACTTAGCCAGCGGCGTGCCTGCTAGATTCTCCGGA
 AGCGGCTCTGGAACCAGCTACTCCCTTACCATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGACGCTGCTAC
 CTACTACTGCCAGCAGTGGAGCTTCAACCTCCTACCTTCGGAGGAGGAACCAAGCTGGAGA
 TCAAGactagtgccggcgccgctctggaggaggaggcagcgccggcgaggctccggcgccggcgctctatggacattcagatgaccag
 tccccaaagctccctgtctgccagcgtgggagacagagtaccatcacatgcagggccagccagatccgcaactatctgaattggatcagcagaaa
 cccggcaaggccctaagctgctgatctattaccagcaggctggagtcggagtgccatcaagattctccggctctggcagcggaaccgactacac
 cctgacaatcttagcctgcagccagaggatttgcacatatattgcagcagggaacacctgcccctggacatttggcaggggaccaaaggtgga
 gatcaaggaggaggaggcagcgccggcgccggctccggaggaggcggctctgaggtgcagctggtggagagcgaggaggactggtgcagcc
 tggaggcagcctgcggctgtctgtgccagcggtattcttcacggctacacaatgaattgggtcagacagccaccaggaaaggactggagt
 ggggtggccctgatcaacctaccaaggcgctgtccacatataatcagaagttcaaggacaggtttaccatctctgttgataagagcaagaacacagccta
 cctgcagatgaatagcctgagggccgaggacaccgctgtattactgcgcagcagcgatattacggagactccgattggtacttgcgtgtggg
 ccagggcaccctggtgacagtgctctccggcgaggaggcagctccggacaggtgctgctggagtcacatcaaggtgctgccaacctggtctacac
 ctgtgcagccaatggcactgatctgtctgggaggagtgccagactgctgctgttcacggactggcactctcttltgcgtgctgtaggcaccggag

【化 6 7】

aaggcaggcagagagatgtctcagatcaagagactgctgagcgagaagaagacctgccagtgtcctcaccgcttcagaagacatgtagcccaatct
 gataa

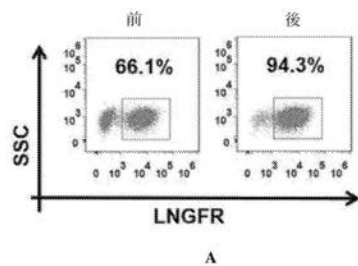
配列番号 6 6 (抗 C D 2 0 T A C アミノ酸配列；C D 4 (部分的細胞外ヘリックスー細胞質) アミノ酸配列には下線が引かれている)

【化 6 8】

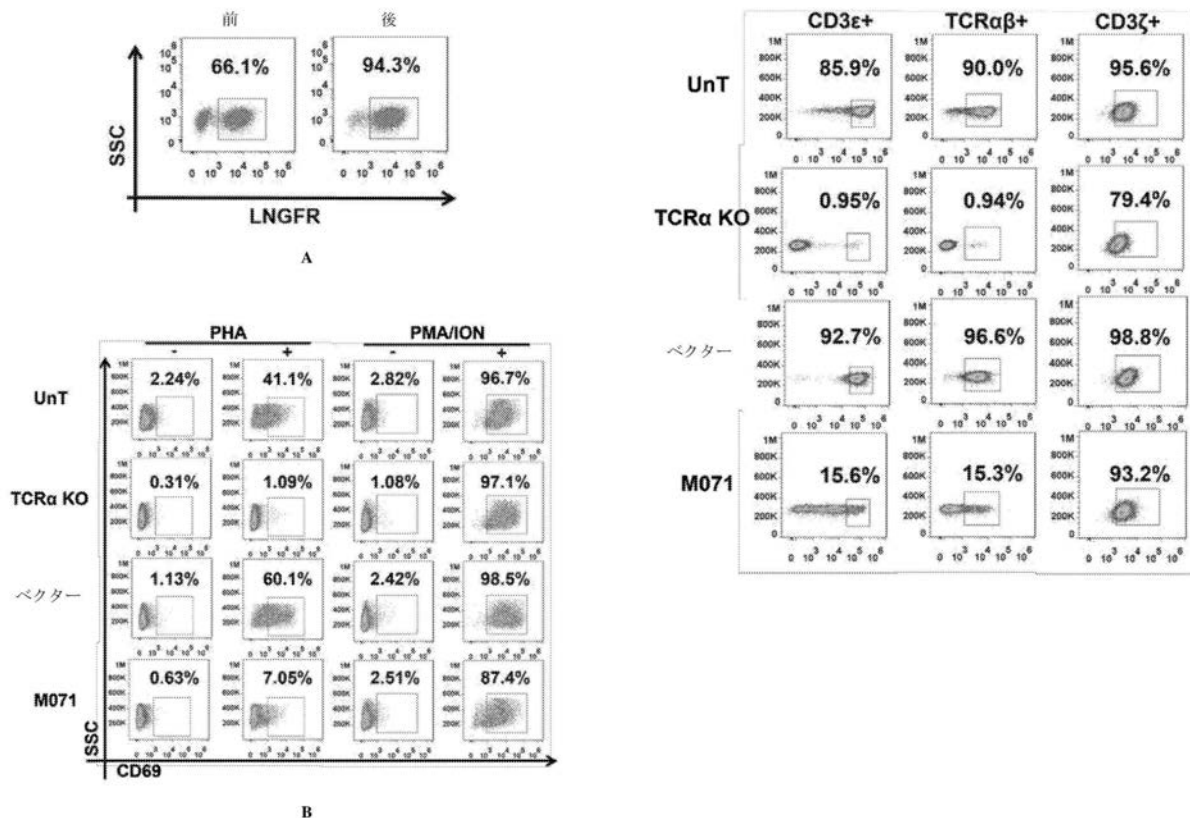
MQSGTHWRVLGLCLLSVGVWGQEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQ
 TPGQGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYG
 SSYWFFDVWGAGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVN
 YMDWYQKPKPGSSPKPWYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNP
 PTFGGGTKLEIKTSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSMDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIR
 NYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLP
 WTFGQGTKVEIKGGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYTMN
 WVRQAPGKGLEWVALINPTKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
 SGYYGDSDWYFDVWGQGLVTVSSGGGGSSGQVLLESNIKVLPTWSTPVQPMALIVLGGVAGL
 LLFIGLGIFFCVRRCRHRRRQAERMSQIKRLLSEKKTCCPHRFQKTCSP

10

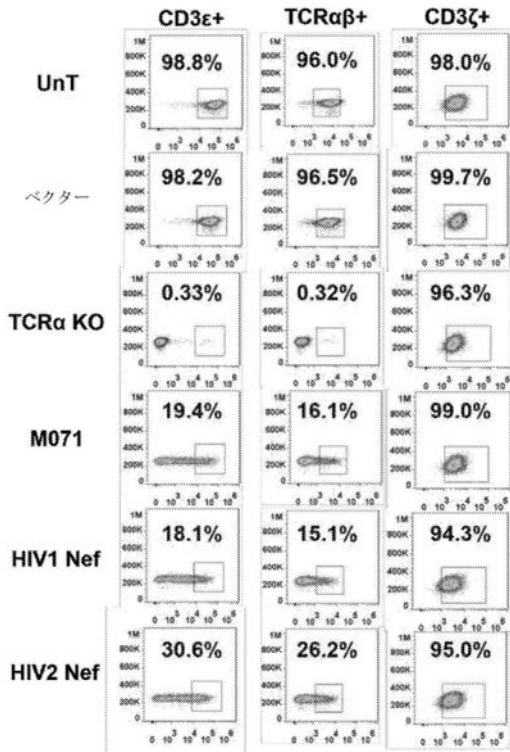
【図 1】



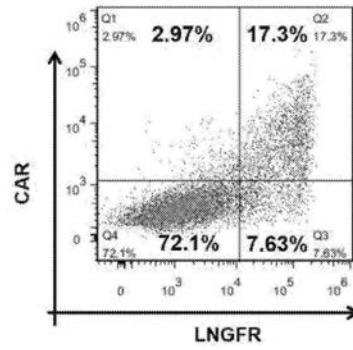
【図 2】



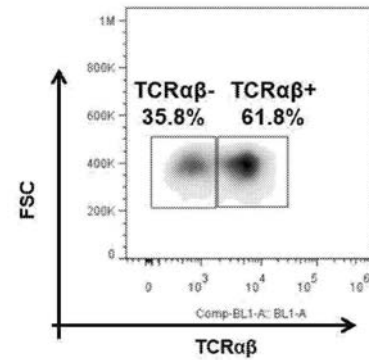
【図 3】



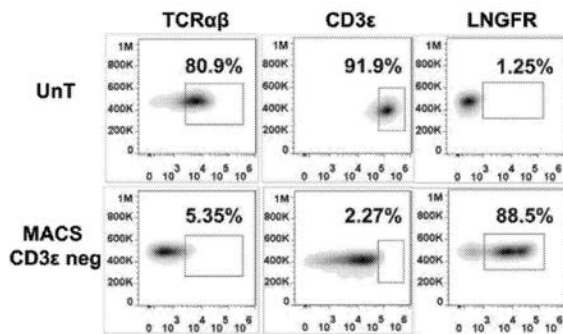
【図 4 A】



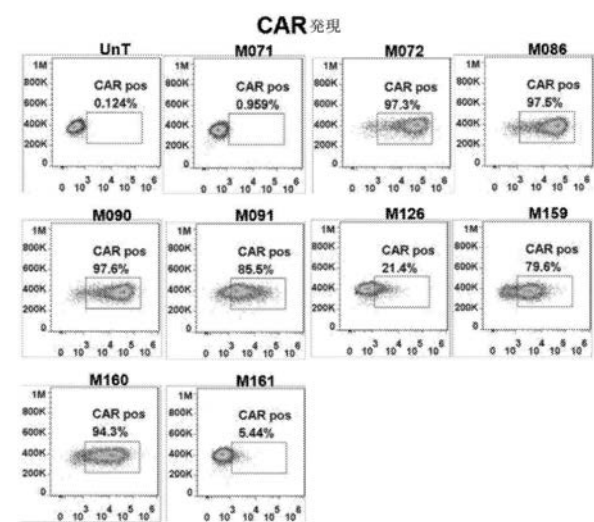
【図 4 B】



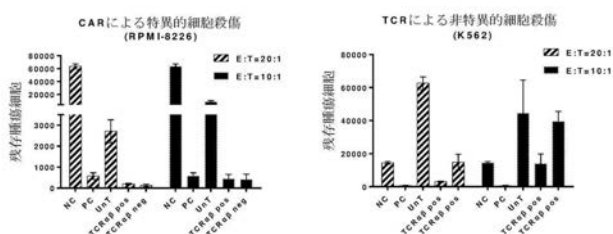
【図 4 C】



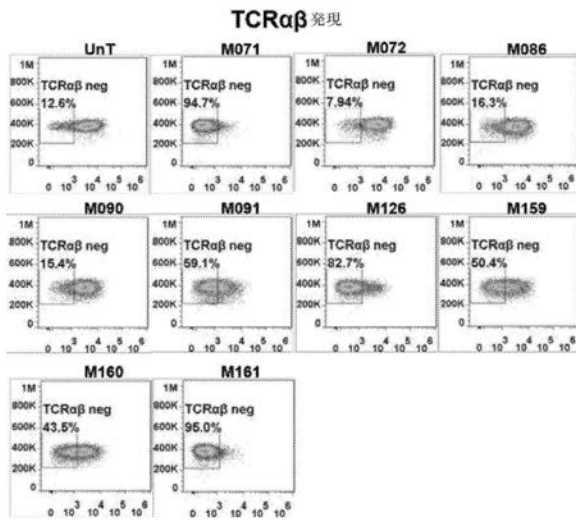
【図 5 A】



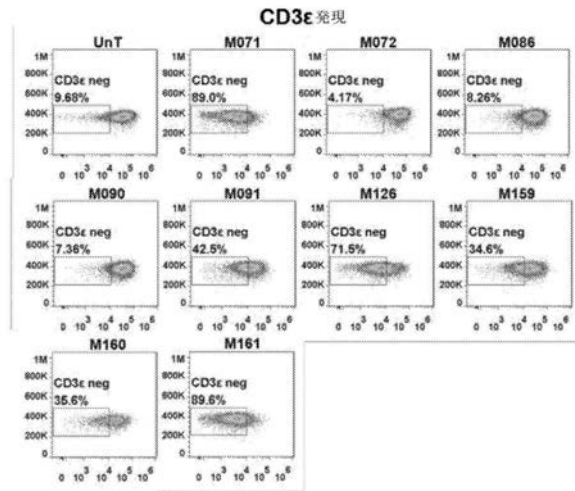
【図 4 D】



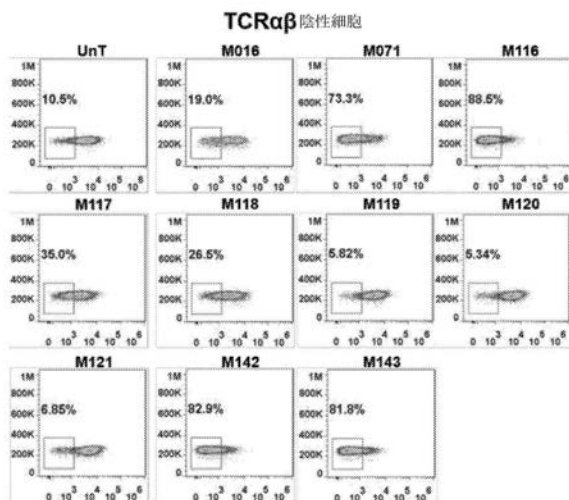
【図 5 B】



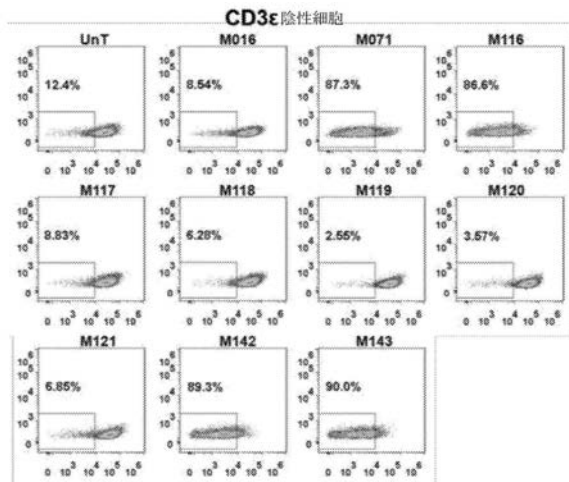
【図 5 C】



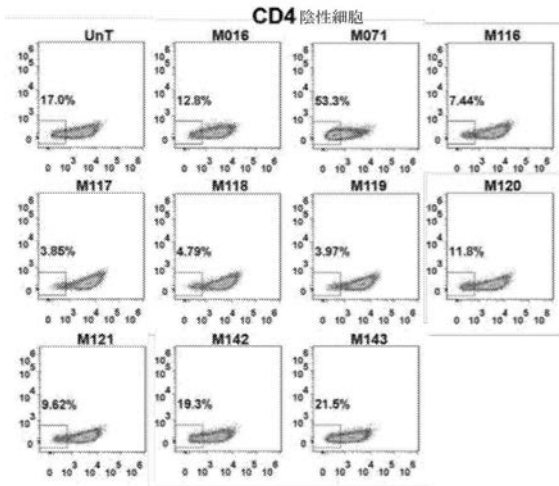
【図 6 A】



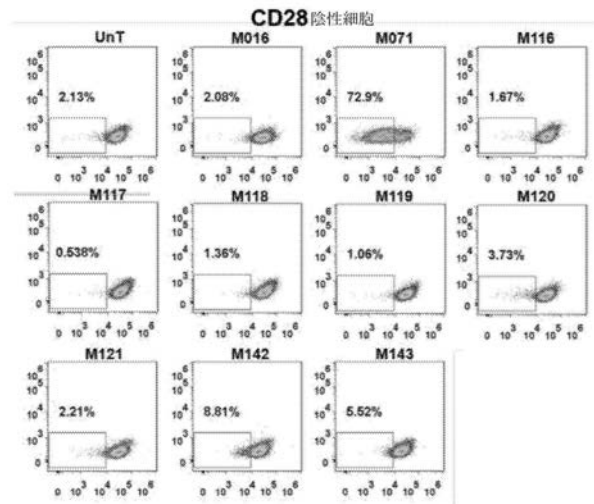
【図 6 B】



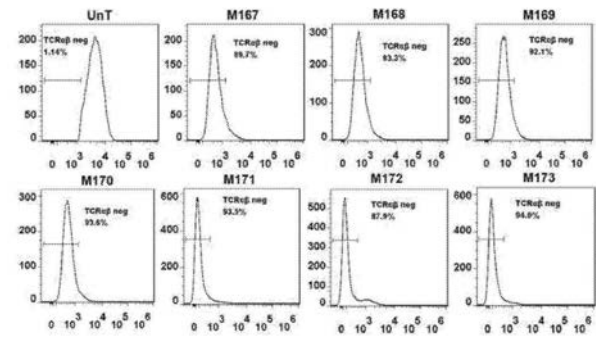
【図 6 C】



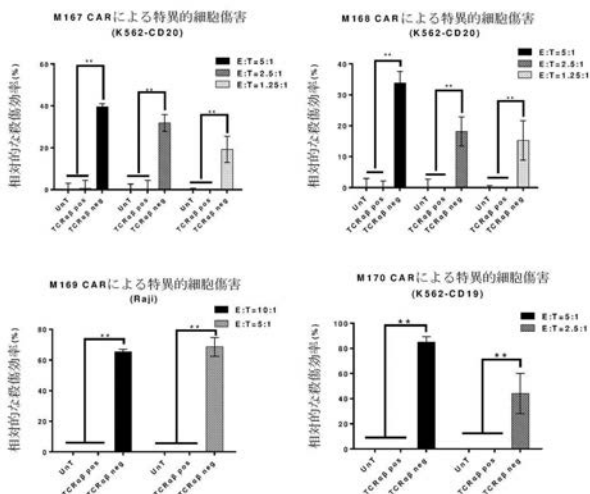
【図 6 D】



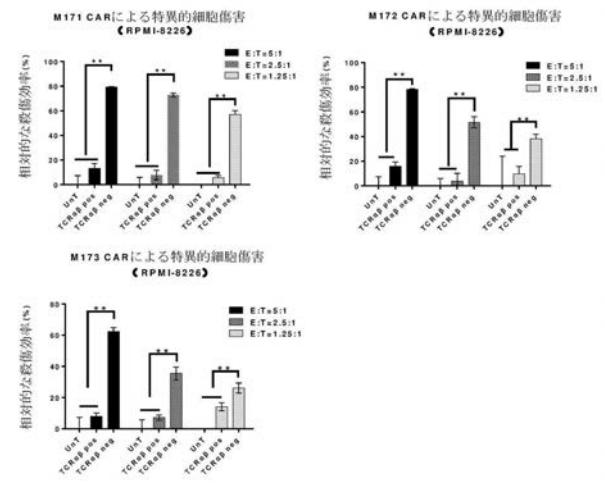
【図 7】



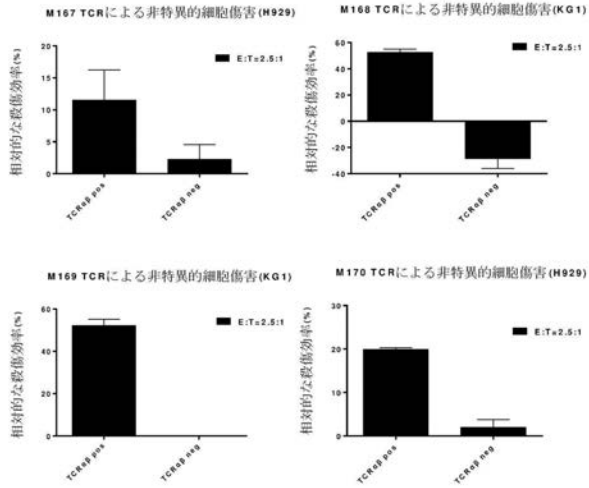
【図 8 A】



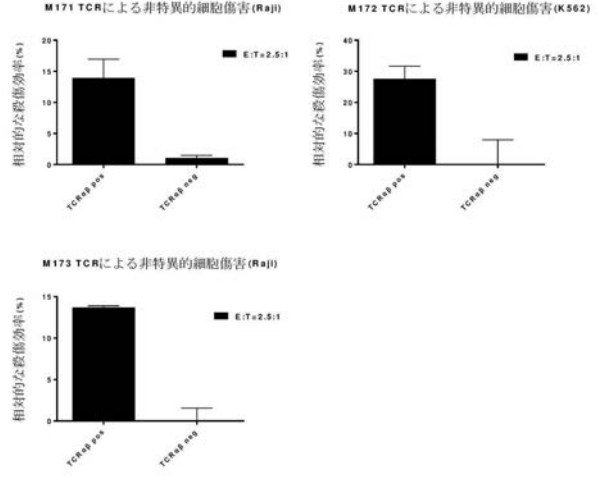
【図 8 B】



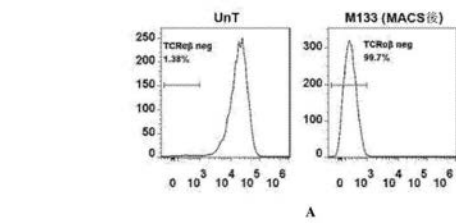
【図 9 A】



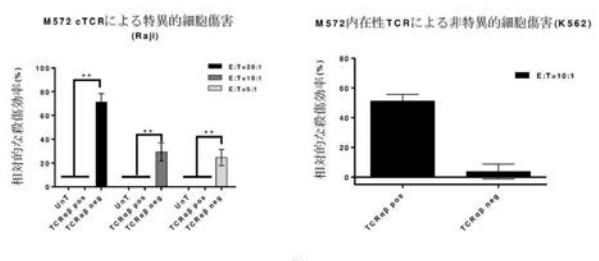
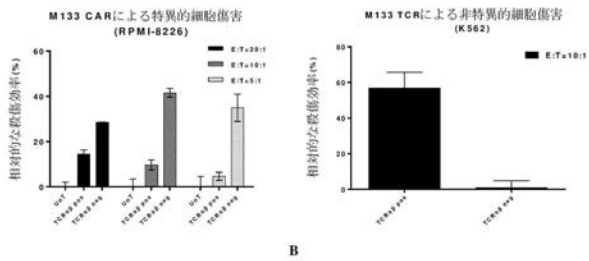
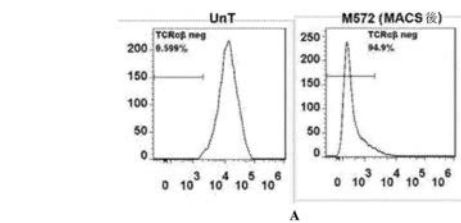
【図 9 B】



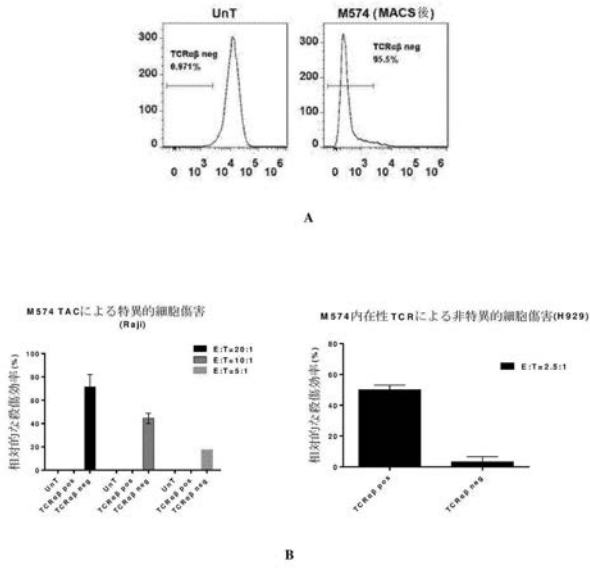
【図 10】



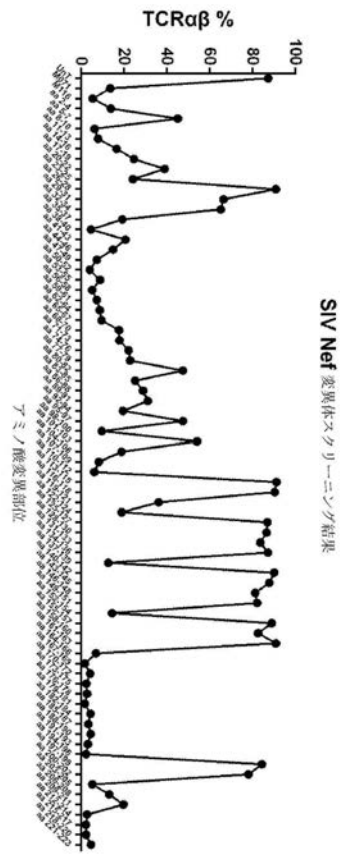
【図 11】



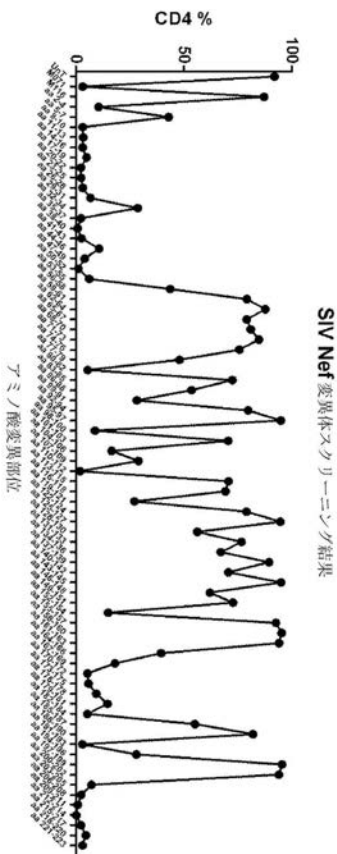
【図 1 2】



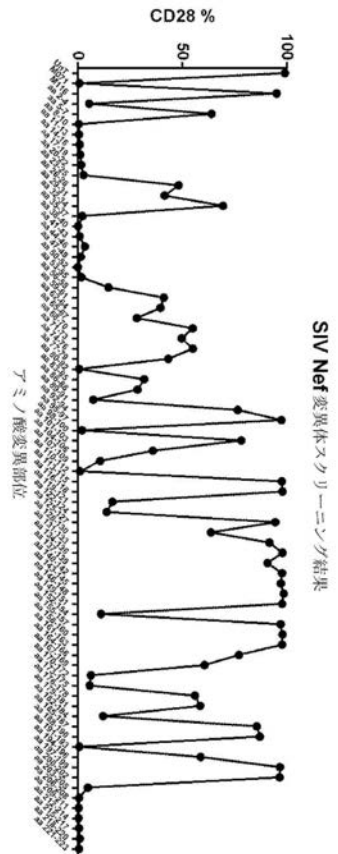
【図 1 3 A】



【図 1 3 B】



【図 1 3 C】



【配列表】

2021532742000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/097969

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 5/0783(2010.01)i; C12N 15/85(2006.01)i; C12N 15/86(2006.01)i; C12N 15/49(2006.01)i; A61K 35/17(2015.01)i; A61P 37/06(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N; A61K; A61P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, CPRSABS, CNTXT, CSCD, CJFD, SIPONPL, DWPI, SIPOABS, CATXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, KRTXT, JPTXT, CPEA, CNKI, ISI WEB OF SCIENCE, PUBMED: T cell receptor?, TCR, down, modulation, T cell?, nef, endogenous, mutation?, mutant?, siv, hiv; EMBL+GENBANK+DDBJ+Retrieving Sys'te for Biological Sequence of Chinese Patent: sequence search on SEQ ID NOs: 18-22		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 101027084 A (古斯达威罗斯研究所等) 29 August 2007 (2007-08-29) see the whole document	1-49 and 52-66
X	Santiago Manrique et al. "Endocytic sorting motif interactions involved in Nef-mediated downmodulation of CD4 and CD3" <i>Nat Commun.</i> , Vol. 8, No. 1, 05 September 2017 (2017-09-05), ISSN: 2041-1723, 442, pages 1-14, see page 4, right column, last paragraph to page 12, the abstract, fig.6	1,2,4-7,21-23, 48,49,52-65
X	Todd MSchaefer et al. "The Conserved Process of TCR/CD3 Complex Down-Modulation by SIV Nef Is Mediated by the Central Core, Not Endocytic Motifs" <i>Virology</i> , Vol. 1, No. 302, 10 October 2002 (2002-10-10), ISSN: 0042-6822, pages 106-122, see pages 114-116, fig.7	52-65
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 October 2019		Date of mailing of the international search report 30 October 2019
Name and mailing address of the ISA/CN National Intellectual Property Administration, PRC 6, Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing 100088 China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer PAN, Junyu Telephone No. 62411108

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/097969

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Martin A. Pulè et al. "A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells" <i>MOLECULAR THERAPY</i> , Vol. 12, No. 5, 23 June 2005 (2005-06-23), ISSN: 1525-0016, pages 933-941, see the whole document	1-49 and 52-66
X	Ian Bell et al. "Association of simian immunodeficiency virus Nef with the T-cell receptor (TCR) zeta chain leads to TCR down-modulation" <i>Journal of General Virology</i> , Vol. 79, No. Pt 11, 30 November 1998 (1998-11-30), ISSN: 0022-1317, pages 2717-2727, see table 2	1, 2, 4-7, 21-23, 48, 49, 52-65
A	"UniProtKB accession number:Q02840" <i>UniProtKB</i> , 01 July 1993 (1993-07-01), see the sequence and information related	1-49 and 52-66

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/097969

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **50 and 51**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] The subject matter of claims 50 and 51 relates to a treatment method of the human or animal body, and therefore, according to the criteria set out in Rule 39.1(iv), relates to subject matter for which an international search is not required.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- [1] Invention 1: claims 1-4, 8-49(all partially) and 5: drawn to the technical solution related to a method of producing a modified T cell comprising introducing into a precursor T cell a first nucleic acid encoding a Nef protein, wherein the Nef protein is a wild type Nef, a modified T cell, a pharmaceutical composition comprising the modified T cell.
- [2] Invention 2: claims 1-4, 6-49 and 52-66(all partially): drawn to the technical solution related to a method of producing a modified T cell comprising introducing into a precursor T cell a first nucleic acid encoding a Nef protein, wherein the Nef protein is a mutant Nef and comprises an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 18, a modified T cell, a pharmaceutical composition comprising the modified T cell, a non-naturally occurring Nef protein comprising an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 18.
- [3] Invention 3: claims 1-4, 6-49 and 52-66(all partially): drawn to the technical solution related to a method of producing a modified T cell comprising introducing into a precursor T cell a first nucleic acid encoding a Nef protein, wherein the Nef protein is a mutant Nef and comprises an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 19, a modified T cell, a pharmaceutical composition comprising the modified T cell, a non-naturally occurring Nef protein comprising an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 19.
- [4]
- [5] Invention 6: claims 1-4, 6-49 and 52-66(all partially): drawn to the technical solution related to a method of producing a modified T cell comprising introducing into a precursor T cell a first nucleic acid encoding a Nef protein, wherein the Nef protein is a mutant Nef and comprises an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 22, a modified T cell, a pharmaceutical composition comprising the modified T cell, a non-naturally occurring Nef protein comprising an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 22.
- [6] Invention 7: claims 1-4, 6-49 and 52-66(all partially): drawn to the technical solution related to a method of producing a modified T cell comprising introducing into a precursor T cell a first nucleic acid encoding a Nef protein, wherein the Nef protein is mutant Nef other than any of mutant Nefs of Inventions 2-6, a modified T cell, a pharmaceutical composition comprising the modified T cell, a non-naturally occurring Nef protein other than any of mutant Nefs of Inventions 2-6.
- [7] The same or corresponding technical feature among Inventions 1-7 is Nef protein. The prior document(Association of simian immunodeficiency virus Nef with the T-cell receptor (TCR) ζ chain leads to TCR down-modulation, Ian Bell et al., Journal of General Virology, vol.79, no.11, pages 2717-2727, 01.November 1998 (01.11.1998), see page 2724) discloses JJK T cells transfected SIV Nef expression plasmids. It demonstrates that SIV Nef decreases the surface expression of the antigen-specific TCR complex. Hence, the Nef protein, or a modified T cell comprising a nucleic acid encoding Nef protein is not a special technical

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/097969

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

feature. That is to say, Inventions 1-7 do not share a same or corresponding special technical feature that makes a contribution over the prior art. Above all, unity of invention is lacking and thus does not meet the requirements of PCT Rule 13.1, 13.2.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/097969

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	101027084	A	29 August 2007	EP	1778282	A1	02 May 2007
				JP	4926060	B2	09 May 2012
				CA	2577183	A1	23 February 2006
				WO	2006018289	A1	23 February 2006
				MX	2007001916	A	11 July 2007
				CN	101027084	B	22 February 2012
				CA	2577183	C	18 February 2014
				ZA	200701180	A	26 November 2008
				IL	180921	A	31 July 2013
				AU	2005274324	B2	23 June 2011
				ZA	200701180	B	26 November 2008
				EP	1778282	B1	30 March 2016
				DK	1778282	T3	06 June 2016
				BR	PI0514447	A	10 June 2008
				US	2008220008	A1	11 September 2008
				ES	2572132	T3	30 May 2016
				AU	2005274324	A1	23 February 2006
				JP	2008509691	A	03 April 2008
				US	8795685	B2	05 August 2014
				IL	180921	D0	04 July 2007
				EP	2420248	A1	22 February 2012

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 9/08 (2006.01)	A 6 1 K 9/08	
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	
C 1 2 N 15/49 (2006.01)	C 1 2 N 15/49	
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	
C 1 2 N 15/64 (2006.01)	C 1 2 N 15/64	Z
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 16/30 (2006.01)	C 0 7 K 16/30	

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

(71)出願人 518261261

ナンジン レジェンド バイオテック カンパニー, リミテッド

NANJING LEGEND BIOTECH CO., LTD.

中華人民共和国, ジャンスー, ナンジン シティ, ジャンニン ディストリクト, ロンミャン アベニュー ナンバー 568, ビルディング オブ ナンジン ライフ サイエンス タウン ナンバー 6

No. 6 Building of Nanjing Life Science Town, No. 568 Longmian Avenue, Jiangning District, Nanjing city, Jiangsu, China

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ファン, シャオフー

カナダ国 ティー6ダブリュー 0ケー3 アルバータ, エドモントン, アーミテージ クレセント エスダブリュー 1607

(72)発明者 ジャオ, ユンチェン

中華人民共和国 210000 ジャンスー, ナンジン, ジアンニン ディストリクト, ロンミャン アベニュー 618, 8ティーエイチ ビルディング, ルーム 302

(72)発明者 ユー, ダウエイ

中華人民共和国 231100 アンフイ, ヘフェイ, シュイジャフー タウン, ユガン ビレッジ

(72)発明者 ジー, ウジナン

中華人民共和国 421000 フナン, ヘンヤン, ジューファイ ディストリクト, ドンフエン ブランチ 142, 2ティーエイチ ビルディング, ルーム 301

- (72)発明者 ワン, チェンチェン
中華人民共和国 210000 ジャンスー, シュージュウ, ペイシャン カウンティー,
アングオ タウン, ヤオフー ビレッジ 35
- (72)発明者 ジュアン, チウチュアン
中華人民共和国 210012 ジャンスー, ナンジン, ユーフアタイ ディストリクト,
ファシェン ストリート ナンバー 9, ユエチェン インターナショナル ガーデン, 36
ティーエイチ ビルディング, ルーム 104
- (72)発明者 ワン, ピンヤン
中華人民共和国 233113 アンフイ, フェンヤン, ウーディアン タウン
- (72)発明者 グオ, シュアンシュアン
中華人民共和国 215300 ジャンスー, スージュウ, クンシャン, ジョウシー タウン
, チンヤン ノース ロード 138, 2ティーエイチ ビルディング, ルーム 605
- F ターム(参考) 4B065 AA93X AA94X AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44
4C076 AA11 BB11 BB13 CC27 FF11
4C084 AA02 AA03 BA44 MA16 MA66 NA14 ZB26
4C087 AA01 AA02 BB37 BB65 MA16 MA66 NA14 ZB26
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA01 DA76 EA22 EA28
FA72 FA74