

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-503546
(P2025-503546A)

(43)公表日 令和7年2月4日(2025.2.4)

(51)国際特許分類		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 1 2 N	5/0783(2010.01)	C 1 2 N	5/0783		4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 C 0 8 5
C 1 2 N	15/24 (2006.01)	C 1 2 N	15/24		4 C 0 8 7
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求
				(全170頁)	最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-539566(P2024-539566)	(71)出願人	523000846		
(86)(22)出願日	令和4年12月27日(2022.12.27)		ティーアール1エックス、インコーポレ		
(85)翻訳文提出日	令和6年8月27日(2024.8.27)		ーテッド		
(86)国際出願番号	PCT/US2022/082431		アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォル		
(87)国際公開番号	WO2023/129929		ニア州, ラ ホーヤ, ヒドウン ヴァレー		
(87)国際公開日	令和5年7月6日(2023.7.6)		ロード 2 5 6 6		
(31)優先権主張番号	63/295,491	(74)代理人	100092783		
(32)優先日	令和3年12月30日(2021.12.30)		弁理士 小林 浩		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100120134		
			弁理士 大森 規雄		
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ	(74)代理人	100141195		
	,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),		弁理士 西澤 恵美子		
	EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(	(72)発明者	デ フリーズ, ジャン エグバート		
	AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,		アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォル		
	FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV		ニア州, ラ ホーヤ, ヒドウン ヴァレー		
	最終頁に続く		最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 I L - 1 0 およびキメラ抗原受容体を発現する C D 4 + T細胞およびその使用

(57)【要約】

本開示は、I L - 1 0 およびキメラ抗原受容体を発現するようにC D 4 + T細胞を遺伝子改変することによって生成されたC D 4 I L - 1 0 / C A R細胞集団（自己または同種単一ドナーおよび同種ポリドナー）を提供する。さらに、C D 4 I L - 1 0 / C A R細胞を生成する方法、および免疫寛容のためにC D 4 I L - 1 0 / C A R細胞を使用する方法、G v H D、細胞および臓器移植、がん、ならびに他の自己免疫障害および炎症障害を処置する方法を提供する。

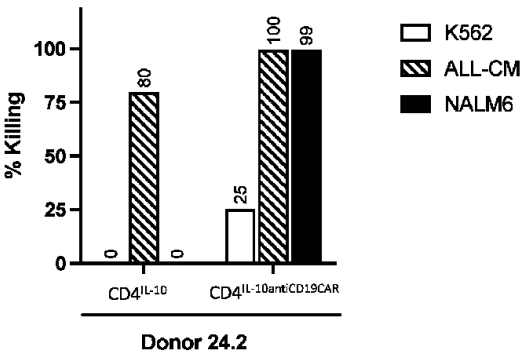


FIG. 10

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) キメラ抗原受容体 (CAR) をコードする第 1 の外因性ポリヌクレオチドセグメント; および

(b) インターロイキン-10 (IL-10) をコードする第 2 の外因性ポリヌクレオチドセグメント

を含む遺伝子改変 CD4⁺T 細胞 (CD4⁺IL-10 / CAR)。

【請求項 2】

前記第 1 の外因性ポリヌクレオチドセグメントが、前記 CAR のコード配列に作動可能に連結された第 1 の調節エレメントを含む、請求項 1 に記載の遺伝子改変 CD4⁺T 細胞。

10

【請求項 3】

前記調節エレメントが、前記 CAR の構成的発現を駆動する、請求項 2 に記載の遺伝子改変 CD4⁺T 細胞。

【請求項 4】

前記 CAR が、抗原結合ドメイン、ヒンジ領域、膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の遺伝子改変 CD4⁺T 細胞。

【請求項 5】

前記抗原結合ドメインが一本鎖抗体断片である、請求項 4 に記載の遺伝子改変 CD4⁺T 細胞。

20

【請求項 6】

前記一本鎖抗体断片が、一本鎖 Fv (scFv) を含む、請求項 5 に記載の遺伝子改変 CD4⁺T 細胞。

【請求項 7】

前記抗原結合ドメインが、自己免疫疾患、炎症障害、またはがんに関連する抗原を標的とする、請求項 4 ~ 6 のいずれか一項に記載の遺伝子改変 CD4⁺T 細胞。

【請求項 8】

前記抗原が、CD19、CD20、CD22、CD27、CD38、B7-H3、CD23、Lym1、Lym2、CLEC5A、CDH179b、FLT3、GCC、Muc、BCMA、CSF2RA、GFRa4、CD32、CD33、CEA、IL11Ra、IL13Ra、NYBRI、SLea、CD200R、TGFBetaR2、CD276、TROP2、LAMP1、PTK7、DLL3、CDH1、CDH6、CDH17、CDH19、TSHR、チロシナーゼ、HLA-A*02、HLA-A*24、またはシトルリン化ペプチド、インスリン、MOG、GAD65、IA2、グリアジン、およびデスメグレインからなる群から選択される、請求項 7 に記載の遺伝子改変 CD4⁺T 細胞。

30

【請求項 9】

前記抗原結合ドメインが、抗 CD19 抗原結合ドメインを含む、請求項 4 ~ 8 のいずれか一項に記載の遺伝子改変 CD4⁺T 細胞。

【請求項 10】

前記抗 CD19 抗原結合ドメインが、配列番号 11 の配列を有する、請求項 9 に記載の遺伝子改変 CD4⁺T 細胞。

40

【請求項 11】

抗原結合ドメインが、抗 BCMA 抗原結合ドメインである、請求項 4 ~ 8 のいずれか一項に記載の遺伝子改変 CD4⁺T 細胞。

【請求項 12】

前記抗 BCMA 抗原結合ドメインが、配列番号 50 ~ 53 の配列を含む、請求項 10 に記載の遺伝子改変 CD4⁺T 細胞。

【請求項 13】

前記ヒンジ領域が、ヒト CD8α ヒンジ領域、ヒト CD28 ヒンジ領域、IgG1 ヒン

50

ジ領域、または I g G 4 ヒンジ領域から選択される、請求項 1 ～ 1 2 のいずれか一項に記載の遺伝子改変 C D 4 ⁺ T 細胞。

【請求項 1 4】

前記ヒンジ領域がヒト C D 8 α に由来する、請求項 1 3 に記載の遺伝子改変 C D 4 ⁺ T 細胞。

【請求項 1 5】

前記膜貫通ドメインが、T N F R S F 1 9 膜貫通ドメイン、C D 3 ゼータ膜貫通ドメイン、C D 8 α 膜貫通ドメイン、C D 4 膜貫通ドメイン、C D 2 8 膜貫通ドメイン、または B 7 ファミリー誘導型共刺激 (I C O S) 膜貫通ドメインから選択される、請求項 1 ～ 1 4 のいずれか一項に記載の遺伝子改変 C D 4 ⁺ T 細胞。

10

【請求項 1 6】

前記膜貫通ドメインが C D 8 α に由来する、請求項 1 5 に記載の遺伝子改変 C D 4 ⁺ T 細胞。

【請求項 1 7】

前記 C A R が、1 つまたは複数の共刺激ドメインをさらに含む、請求項 1 ～ 1 6 のいずれか一項に記載の遺伝子改変 C D 4 ⁺ T 細胞。

【請求項 1 8】

前記 C A R が、2 つの共刺激ドメインを含む、請求項 1 7 に記載の遺伝子改変 C D 4 ⁺ T 細胞。

【請求項 1 9】

前記 1 つまたは複数の共刺激ドメインが、4 - 1 B B、C D 2 8、O X 4 0、I C O S、C D 2 7、M Y D 8 8 - C D 4 0、および K I R 2 D S 2 からなる群から選択される、請求項 1 ～ 1 8 のいずれか一項に記載の遺伝子改変 C D 4 ⁺ T 細胞。

20

【請求項 2 0】

前記 1 つまたは複数の共刺激ドメインのうちの 1 つが C D 2 8 に由来する、請求項 1 9 に記載の遺伝子改変 C D 4 ⁺ T 細胞。

【請求項 2 1】

第 2 の共刺激ドメインが 4 - 1 B B に由来する、請求項 1 8 ～ 2 0 のいずれか一項に記載の遺伝子改変 C D 4 ⁺ T 細胞。

【請求項 2 2】

前記細胞内シグナル伝達ドメインが、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ (I T A M) を含む、請求項 1 ～ 2 1 のいずれか一項に記載の遺伝子改変 C D 4 ⁺ T 細胞。

30

【請求項 2 3】

前記免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ (I T A M) が C D 3 ゼータに由来する、請求項 1 ～ 2 2 のいずれか一項に記載の遺伝子改変 C D 4 ⁺ T 細胞。

【請求項 2 4】

前記 C A R が、
抗 C D 1 9 抗原結合ドメイン、抗 B C M A 抗原結合ドメイン、または抗 C D 2 0 抗原結合ドメイン；

ヒト C D 8 α ヒンジ領域；

ヒト C D 8 α 膜貫通領域；

C D 2 8 共刺激ドメイン；および

C D 3 ゼータ鎖細胞内シグナル伝達ドメイン

を含む、請求項 1 ～ 2 3 のいずれか一項に記載の遺伝子改変 C D 4 ⁺ T 細胞。

40

【請求項 2 5】

前記 C A R が、配列番号 9、1 6、2 2、3 4、4 1 ～ 4 9、または 5 4 の配列を含む、請求項 1 ～ 2 4 のいずれか一項に記載の遺伝子改変 C D 4 ⁺ T 細胞。

【請求項 2 6】

前記第 1 の外因性ポリヌクレオチドセグメントが、配列番号 1 0、1 7、2 3、3 5、または 5 5 の配列を含む、請求項 2 5 に記載の遺伝子改変 C D 4 ⁺ T 細胞。

50

【請求項 27】

前記第1の外因性ポリヌクレオチドセグメントが、T細胞核ゲノムに組み込まれている、請求項1～26のいずれか一項に記載の遺伝子改変CD4⁺T細胞。

【請求項 28】

前記第1の外因性ポリヌクレオチドセグメントが、T細胞核ゲノムに組み込まれていない、請求項1～27のいずれか一項に記載の遺伝子改変CD4⁺T細胞。

【請求項 29】

前記第1の外因性ポリヌクレオチドセグメントがベクターに存在する、請求項27または28に記載の遺伝子改変CD4⁺T細胞。

【請求項 30】

前記第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントが、IL-10のコード配列に作動可能に連結された第2の調節エレメントを含む、請求項1～29のいずれか一項に記載の遺伝子改変CD4⁺T細胞。

【請求項 31】

前記IL-10がヒトIL-10である、請求項1～30のいずれか一項に記載の遺伝子改変CD4⁺T細胞。

【請求項 32】

前記IL-10がウイルスIL-10である、請求項1～30のいずれか一項に記載の遺伝子改変CD4⁺T細胞。

【請求項 33】

前記IL-10が、配列番号1の配列を有するタンパク質である、請求項1～30のいずれか一項に記載の遺伝子改変CD4⁺T細胞。

【請求項 34】

前記第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントが、配列番号2の配列を有する、請求項33に記載の遺伝子改変CD4⁺T細胞。

【請求項 35】

前記第2の調節エレメントが、前記IL-10の構成的または誘導型発現を駆動する、請求項30～34のいずれか一項に記載の遺伝子改変CD4⁺T細胞。

【請求項 36】

前記第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントが、T細胞核ゲノムに組み込まれている、請求項1～35のいずれか一項に記載の遺伝子改変CD4⁺T細胞。

【請求項 37】

前記第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントが、T細胞核ゲノムに組み込まれていない、請求項1～35のいずれか一項に記載の遺伝子改変CD4⁺T細胞。

【請求項 38】

前記第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントがベクターに存在する、請求項36または37に記載の遺伝子改変CD4⁺T細胞。

【請求項 39】

前記第1の外因性ポリヌクレオチドセグメントおよび前記第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントが、同じベクターに存在する、請求項1～38のいずれか一項に記載の遺伝子改変CD4⁺T細胞。

【請求項 40】

前記ベクターがウイルスベクターである、請求項29、38、または39のいずれかに記載の遺伝子改変CD4⁺T細胞。

【請求項 41】

前記ベクターがレンチウイルスベクターである、請求項40に記載の遺伝子改変CD4⁺T細胞。

【請求項 42】

CD4⁺T細胞10⁶個/mL培養培地あたり少なくとも100pgのIL-10を構成的に発現する、請求項1～41のいずれか一項に記載の遺伝子改変CD4⁺T細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 43】

CD4⁺T細胞 10⁶個/mLあたり少なくとも100pg、200pg、500pg、1ng、5ng、10ng、または50ngのIL-10を構成的に発現する、請求項42に記載の遺伝子改変CD4⁺T細胞。

【請求項 44】

抗CD3および抗CD28抗体による活性化後、CD4⁺T細胞 10⁶個/mLあたり、少なくとも1ngのIL-10を発現する、請求項1～43のいずれか一項に記載の遺伝子改変CD4⁺T細胞。

【請求項 45】

抗CD3および抗CD28抗体による活性化後、CD4⁺T細胞 10⁶個/mLあたり、少なくとも2ng、5ng、10ng、100ng、200ng、または500ngのIL-10を発現する、請求項44に記載の遺伝子改変CD4⁺T細胞。

10

【請求項 46】

非改変CD4⁺T細胞より少なくとも5倍高いレベルでIL-10を発現する、請求項1～45のいずれか一項に記載の遺伝子改変CD4⁺T細胞。

【請求項 47】

非改変CD4⁺T細胞より少なくとも10倍高いレベルでIL-10を発現する、請求項46に記載の遺伝子改変CD4⁺T細胞。

【請求項 48】

前記第1の外因性ポリヌクレオチドセグメント、第2の外因性ポリヌクレオチドセグメント、または両方が、選択マーカーをコードする配列をさらに含む、請求項1～47のいずれか一項に記載の遺伝子改変CD4⁺T細胞。

20

【請求項 49】

前記選択マーカーがΔNGFRである、請求項48に記載の遺伝子改変CD4⁺T細胞。

【請求項 50】

前記ΔNGFRが、配列番号3の配列を有する、請求項49に記載の遺伝子改変CD4⁺T細胞。

【請求項 51】

前記第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントが、配列番号4の配列を含む、請求項50に記載の遺伝子改変CD4⁺T細胞。

30

【請求項 52】

前記選択マーカーが、EGFRポリペプチドの切断型である、請求項48に記載の遺伝子改変CD4⁺T細胞。

【請求項 53】

CD19⁺標的細胞に対するin vitro細胞傷害が可能である、請求項9～10、または請求項9に従属する請求項13～52のいずれか一項に記載の遺伝子改変CD4⁺T細胞。

【請求項 54】

CD19⁺標的細胞に対するin vivo細胞傷害が可能である、請求項9～10、または請求項9に従属する請求項13～52のいずれか一項に記載の遺伝子改変CD4⁺T細胞。

40

【請求項 55】

前記CD19⁺標的細胞が、自己抗体産生B細胞である、請求項53または54に記載の遺伝子改変CD4⁺T細胞。

【請求項 56】

前記CD19⁺標的細胞がCD19⁺がん細胞である、請求項53または54に記載の遺伝子改変CD4⁺T細胞。

【請求項 57】

骨髄系標的細胞に対するin vitro細胞傷害が可能である、請求項1～56のい

50

ずれか一項に記載の遺伝子改変CD4⁺T細胞。

【請求項58】

骨髓系標的細胞に対する*in vivo*細胞傷害が可能である、請求項1～56のいずれか一項に記載の遺伝子改変CD4⁺T細胞。

【請求項59】

CD19⁺標的細胞および骨髓系標的細胞に対する細胞傷害が可能である、請求項53～58のいずれか一項に記載の遺伝子改変CD4⁺T細胞。

【請求項60】

前記骨髓系標的細胞が、クラスI MHC、CD13、CD54およびCD112の1つまたは複数を発現する、請求項57～59のいずれか一項に記載の遺伝子改変CD4⁺T細胞。

【請求項61】

CD19⁺標的細胞に対する前記細胞傷害性が、1回または複数回の*in vitro*再刺激後に維持される、請求項53～60のいずれか一項に記載の遺伝子改変CD4⁺T細胞。

【請求項62】

骨髓系標的細胞に対する前記細胞傷害性が、1回または複数回の*in vitro*再刺激後に維持される、請求項53～60のいずれか一項に記載の遺伝子改変CD4⁺T細胞。

【請求項63】

同種CD4⁺T細胞増殖を抑制することが可能である、請求項1～62のいずれか一項に記載の遺伝子改変CD4⁺T細胞。

【請求項64】

同種CD8⁺T細胞増殖を抑制することが可能である、請求項1～63のいずれか一項に記載の遺伝子改変CD4⁺T細胞。

【請求項65】

同種CD4⁺T細胞増殖、同種CD8⁺T細胞増殖、および同種PBMCを抑制することが可能である、請求項1～64のいずれか一項に記載の遺伝子改変CD4⁺T細胞。

【請求項66】

前記抑制特性が、1回または複数回の*in vitro*再刺激後に維持される、請求項63～65のいずれか一項に記載の遺伝子改変CD4⁺T細胞。

【請求項67】

請求項1～66のいずれか一項に記載の遺伝子改変CD4⁺細胞を含むCD4⁺T細胞集団。

【請求項68】

遺伝子改変前のCD4⁺T細胞が、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10人のT細胞ドナーから得られ、プールされた、請求項67に記載のCD4⁺T細胞集団。

【請求項69】

前記集団中のCD4⁺T細胞が、集合的に6、7、8、9、10、11、12個、またはそれより多くの異なるHLAハプロタイプを有する、請求項68に記載のCD4⁺T細胞集団。

【請求項70】

前記集団中の全てのCD4⁺T細胞が、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、およびHLA-DQB1座で互いに対して少なくとも1/10、2/10、3/10、4/10、5/10、6/10、7/10、8/10、または9/10の一致を有する、請求項67～69のいずれか一項に記載のCD4⁺T細胞集団。

【請求項71】

前記集団中の全てのCD4⁺T細胞が、前記HLA-A、HLA-B、HLA-C、およびHLA-DRB1座で互いに対して少なくとも1/8、2/8、3/8、4/8、5/8、6/8、7/8、または8/8の一致を有する、請求項67～70のいずれか一項

10

20

30

40

50

に記載の $CD4^+$ T細胞集団。

【請求項 7 2】

前記集団中の全ての $CD4^+$ T細胞が、前記 $HLA-A$ 座で互いに対して $2/2$ の一致を有する、請求項 6 7 ～ 7 1 のいずれか一項に記載の $CD4^+$ T細胞集団。

【請求項 7 3】

前記集団中の全ての $CD4^+$ T細胞が、前記 $HLA-B$ 座で互いに対して $2/2$ の一致を有する、請求項 6 7 ～ 7 2 のいずれか一項に記載の $CD4^+$ T細胞集団。

【請求項 7 4】

前記集団中の全ての $CD4^+$ T細胞が、前記 $HLA-C$ 座で互いに対して $2/2$ の一致を有する、請求項 6 7 ～ 7 3 のいずれか一項に記載の $CD4^+$ T細胞集団。

【請求項 7 5】

前記集団中の全ての $CD4^+$ T細胞が、前記 $HLA-DRB1$ および $HLA-DQB1$ 座で互いに対して少なくとも $3/4$ または $4/4$ の一致を有する、請求項 6 7 ～ 7 4 のいずれか一項に記載の $CD4^+$ T細胞集団。

【請求項 7 6】

前記集団中の全ての $CD4^+$ T細胞が、前記 $HLA-A$ 、 $HLA-B$ 、 $HLA-C$ 、 $HLA-DRB1$ 、および $HLA-DQB1$ 座で互いに対して $5/10$ 、 $6/10$ 、 $7/10$ 、 $8/10$ 、または $9/10$ 未満の一致を有する、請求項 6 7 ～ 6 9 のいずれか一項に記載の $CD4^+$ T細胞集団。

【請求項 7 7】

前記集団中の全ての $CD4^+$ T細胞が、前記 $HLA-A$ 、 $HLA-B$ 、 $HLA-C$ 、および $HLA-DRB1$ 座で互いに対して $4/8$ 、 $5/8$ 、 $6/8$ 、 $7/8$ 、または $8/8$ 未満の一致を有する、請求項 7 6 に記載の $CD4^+$ T細胞集団。

【請求項 7 8】

前記集団中の全ての $CD4^+$ T細胞が、前記 $HLA-A$ 座で互いに対して $2/2$ 未満の一致を有する、請求項 7 6 ～ 7 7 のいずれか一項に記載の $CD4^+$ T細胞集団。

【請求項 7 9】

前記集団中の全ての $CD4^+$ T細胞が、前記 $HLA-B$ 座で互いに対して $2/2$ 未満の一致を有する、請求項 7 6 ～ 7 8 のいずれか一項に記載の $CD4^+$ T細胞集団。

【請求項 8 0】

前記集団中の全ての $CD4^+$ T細胞が、前記 $HLA-C$ 座で互いに対して $2/2$ 未満の一致を有する、請求項 7 6 ～ 7 9 のいずれか一項に記載の $CD4^+$ T細胞集団。

【請求項 8 1】

前記集団中の全ての $CD4^+$ T細胞が、前記 $HLA-DRB1$ および $HLA-DQB1$ 座で互いに対して $2/4$ 、 $3/4$ 、または $4/4$ 未満の一致を有する、請求項 7 6 ～ 8 0 のいずれか一項に記載の $CD4^+$ T細胞集団。

【請求項 8 2】

前記集団中の全ての $CD4^+$ T細胞が、 A^*02 対立遺伝子を有するか、または全て A^*02 陰性である、請求項 6 7 ～ 8 1 のいずれか一項に記載の $CD4^+$ T細胞集団。

【請求項 8 3】

前記集団中の全ての $CD4^+$ T細胞が、 A^*24 対立遺伝子を有するか、または全て A^*24 陰性である、請求項 6 7 ～ 8 1 のいずれか一項に記載の $CD4^+$ T細胞集団。

【請求項 8 4】

$NGFR^+$ 細胞集団中の $CD4^+$ T細胞の少なくとも 30% が、 CAR を発現する、請求項 6 7 ～ 8 3 のいずれか一項に記載の $CD4^+$ T細胞集団。

【請求項 8 5】

$NGFR^+$ 細胞集団中の $CD4^+$ T細胞の少なくとも 60% が、 CAR を発現する、請求項 8 4 に記載の $CD4^+$ T細胞集団。

【請求項 8 6】

$NGFR^+$ 細胞集団中の $CD4^+$ T細胞の少なくとも 90% が、 CAR を発現する、請

10

20

30

40

50

求項 85 に記載の CD4⁺T 細胞集団。

【請求項 87】

前記 CD4⁺T 細胞が、凍結浮遊液中に存在する、請求項 67～86 のいずれか一項に記載の CD4⁺T 細胞集団。

【請求項 88】

前記 CD4⁺T 細胞が、液体浮遊液中に存在する、請求項 67～86 のいずれか一項に記載の CD4⁺T 細胞集団。

【請求項 89】

前記液体浮遊液が事前に凍結されている、請求項 88 に記載の CD4⁺T 細胞集団。

【請求項 90】

請求項 1～66 のいずれか一項に記載の遺伝子改変 CD4⁺T 細胞、または請求項 67～89 のいずれか一項に記載の CD4⁺T 細胞集団を含む医薬組成物。

【請求項 91】

遺伝子改変 CD4⁺T 細胞 (CD4⁺IL-10/CAR) 細胞を作製する方法であって、
(a) 1 人または複数の T 細胞ドナーから初代培養 CD4⁺T 細胞を得るステップ；ならびに

(b) (i) キメラ抗原受容体 (CAR) をコードする第 1 の外因性ポリヌクレオチドセグメント、および

(ii) IL-10 をコードする第 2 の外因性ポリヌクレオチドセグメント
を導入することによって前記 CD4⁺T 細胞を改変するステップ

を含む方法。

【請求項 92】

ステップ (a) において、前記初代培養 CD4⁺T 細胞が、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 人の異なる T 細胞ドナーから得られる、請求項 91 に記載の方法。

【請求項 93】

ステップ (b) からの前記遺伝子改変 CD4⁺T 細胞をプールするステップをさらに含む、請求項 92 に記載の方法。

【請求項 94】

ステップ (a) において、前記初代培養 CD4⁺T 細胞が、患者に対して自己である、請求項 91 に記載の方法。

【請求項 95】

ステップ (a) の後かつステップ (b) の前、またはステップ (b) の後に：

抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体、または抗 CD3 抗体および CD28 抗体コーティングビーズ、または CD3 および CD28 を介してヒト T 細胞を活性化および増大させるためのポリマーナノマトリックス試薬の存在下、または他の T 細胞特異的免疫細胞培養地、活性化剤、および補充剤の存在下で、前記 CD4⁺T 細胞をインキュベートするステップをさらに含む、請求項 91～94 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 96】

さらに IL-2 の存在下で、前記 CD4⁺T 細胞をインキュベートする、請求項 95 に記載の方法。

【請求項 97】

前記第 1 の外因性ポリヌクレオチドセグメント、第 2 の外因性ポリヌクレオチドセグメント、または両方が、1 つまたは複数のウイルスベクターを使用して前記初代培養 CD4⁺T 細胞に導入される、請求項 91～96 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 98】

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、請求項 97 に記載の方法。

【請求項 99】

前記 CAR が、自己免疫疾患、炎症障害、またはがんに関連する標的抗原に対して特異的である、請求項 91～98 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 100】

10

20

30

40

50

前記標的抗原が、自己免疫疾患、炎症障害、またはがんに関連する、請求項 99 に記載の方法。

【請求項 101】

前記 CAR が、抗 CD19 CAR、抗 CD20 CAR、抗 CD22 CAR、抗 B CMA CAR、抗 B7-H3 CAR、抗 CD27 CAR、または抗 CD38 CAR である、請求項 91～100 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 102】

前記 CAR が、配列番号 9、16、22、34、41～49、または 54 の配列を有する、請求項 91～101 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 103】

前記第 1 の外因性ポリヌクレオチドセグメントが、配列番号 10、17、23、35、または 55 の配列を有する、請求項 91～102 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 104】

前記 IL-10 が、配列番号 1 の配列を有する、請求項 91～103 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 105】

前記第 2 の外因性ポリヌクレオチドセグメントが、配列番号 2 の配列を有する、請求項 91～104 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 106】

前記第 1 の外因性ポリヌクレオチドセグメント、第 2 の外因性ポリヌクレオチドセグメント、または両方が、選択マーカーをコードするセグメントをさらに含む、請求項 91～105 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 107】

前記コードされる選択マーカーが ΔNGFR である、請求項 106 に記載の方法。

【請求項 108】

前記コードされる選択マーカーが、配列番号 3 の配列を有する、請求項 107 に記載の方法。

【請求項 109】

前記選択マーカーが、EGFR ポリペプチドの切断型である、請求項 106 に記載の方法。

【請求項 110】

ステップ (b) の後に、

(c) 前記選択マーカーを発現する前記遺伝子改変 CD4⁺T 細胞を単離し、それによって遺伝子改変 CD4⁺T 細胞の濃縮集団を生成するステップをさらに含む、請求項 91～109 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 111】

前記濃縮集団中の前記遺伝子改変 CD4⁺T 細胞の少なくとも 30% または少なくとも 60% が、IL-10 および CAR を発現する、請求項 110 に記載の方法。

【請求項 112】

前記濃縮集団中の前記遺伝子改変 CD4⁺T 細胞の少なくとも 90% が、IL-10 および CAR を発現する、請求項 111 に記載の方法。

【請求項 113】

前記濃縮集団中の前記遺伝子改変 CD4⁺T 細胞の少なくとも 75% が、選択マーカーを発現する、請求項 110～112 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 114】

前記濃縮集団中の前記遺伝子改変 CD4⁺T 細胞の少なくとも 90% が、選択マーカーを発現する、請求項 113 に記載の方法。

【請求項 115】

ステップ (c) の後、遺伝子改変 CD4⁺T 細胞の濃縮集団をインキュベートするステップをさらに含む、請求項 110～114 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 116】

前記遺伝子改変CD4⁺T細胞の濃縮集団をインキュベートするステップが、(i)抗CD3抗体および抗CD28抗体、または(ii)IL-2の存在下での抗CD3抗体および抗CD28抗体コーティングビーズ、またはCD3およびCD28を介してヒトT細胞を活性化および増大させるためのポリマーナノマトリックス試薬、または(iii)他のT細胞特異的免疫細胞培養培地、活性化剤、および補充剤の存在下で実施される、請求項115に記載の方法。

【請求項 117】

前記遺伝子改変CD4⁺T細胞を凍結する後のステップをさらに含む、請求項91～116のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 118】

前記少なくとも2人のT細胞ドナーが、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、およびHLA-DQB1座で互いに対して少なくとも1/10、2/10、3/10、4/10、5/10、6/10、7/10、8/10、または9/10の一致を有する、請求項92～117のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 119】

前記少なくとも2人のT細胞ドナーが、HLA-A、HLA-B、HLA-C、およびHLA-DRB1座で互いに対して少なくとも1/8、2/8、3/8、4/8、5/8、6/8、7/8、または8/8の一致を有する、請求項92～118のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 120】

前記少なくとも2人のT細胞ドナーが、前記HLA-A座で互いに対して2/2の一致を有する、請求項92～119のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 121】

前記少なくとも2人のT細胞ドナーが、前記HLA-B座で互いに対して2/2の一致を有する、請求項92～120のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 122】

前記少なくとも2人のT細胞ドナーが、前記HLA-C座で互いに対して2/2の一致を有する、請求項92～121のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 123】

前記少なくとも2人のT細胞ドナーが、前記HLA-DRB1およびHLA-DQB1座で互いに対して少なくとも3/4または4/4の一致を有する、請求項92～122のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 124】

前記少なくとも2人のT細胞ドナーが、前記HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、およびHLA-DQB1座で互いに対して5/10、6/10、7/10、8/10、または9/10未満の一致を有する、請求項92～117のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 125】

前記少なくとも2人のT細胞ドナーが、前記HLA-A、HLA-B、HLA-C、およびHLA-DRB1座で互いに対して4/8、5/8、6/8、7/8、または8/8未満の一致を有する、請求項124に記載の方法。

【請求項 126】

前記少なくとも2人のT細胞ドナーが、前記HLA-A座で互いに対して2/2未満の一致を有する、請求項124～125のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 127】

前記少なくとも2人のT細胞ドナーが、前記HLA-B座で互いに対して2/2未満の一致を有する、請求項124～126のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 128】

前記少なくとも2人のT細胞ドナーが、前記HLA-C座で互いに対して2/2未満の

10

20

30

40

50

一致を有する、請求項 1 2 4 ～ 1 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2 9】

前記少なくとも 2 人の T 細胞ドナーが、前記 H L A - D R B 1 および H L A D Q B 1 座で互いに対して 4 / 2、3 / 4、または 4 / 4 未満の一致を有する、請求項 1 2 4 ～ 1 2 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3 0】

前記少なくとも 2 人の T 細胞ドナーの各々が、A * 0 2 対立遺伝子を有するか、または A * 0 2 陰性である、請求項 9 2 ～ 1 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3 1】

前記少なくとも 2 人の T 細胞ドナーの各々が、A * 2 4 対立遺伝子を有するか、または A * 2 4 陰性である、請求項 9 2 ～ 1 2 9 のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 1 3 2】

ステップ (a) において、前記初代培養 C D 4 + T 細胞が、1 つまたは複数の凍結保存物から得られる、請求項 9 2 ～ 1 3 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3 3】

ステップ (a) において、前記初代培養 C D 4 + T 細胞が、前記少なくとも 2 人の異なる T 細胞ドナーの凍結していない末梢血単核細胞から得られる、請求項 9 2 ～ 1 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3 4】

前記末梢血単核細胞から C D 4 + T 細胞を単離するステップをさらに含む、請求項 1 3 3 に記載の方法。 20

【請求項 1 3 5】

血液がんを処置する方法であって、
血液がん患者に、抗がん効果を誘導するために十分な、請求項 1 ～ 6 6 のいずれか一項に記載の C D 4 I L - 1 0 / C A R 細胞、請求項 6 7 ～ 8 9 のいずれか一項に記載の C D 4 I L - 1 0 / C A R 細胞集団、または請求項 9 0 に記載の医薬組成物の治療有効量を投与するステップを含む方法。

【請求項 1 3 6】

前記 C D 4 I L - 1 0 / C A R の投与前または投与後に、前記患者にアロ - H S C T 移植片を投与するステップをさらに含む、請求項 1 3 5 に記載の方法。 30

【請求項 1 3 7】

悪性疾患を有する患者を処置する方法であって、
アロ - H S C T 移植片を前記患者に投与するステップ、および
請求項 1 ～ 6 6 のいずれか一項に記載の C D 4 I L - 1 0 / C A R 細胞、請求項 6 7 ～ 8 9 のいずれか一項に記載の C D 4 I L - 1 0 / C A R 細胞集団、または請求項 9 0 に記載の医薬組成物の治療有効量を投与するステップを含む方法。

【請求項 1 3 8】

前記 C D 4 I L - 1 0 / C A R 細胞の量が、前記アロ - H S C T の移植片対白血病 (G v L) または移植片対腫瘍 (G v T) 有効性を抑制することなく、移植片対宿主病 (G v H D) を抑制または防止するためにさらに十分である、請求項 1 3 7 に記載の方法。 40

【請求項 1 3 9】

前記悪性疾患または血液がんが、骨髄性白血病である、請求項 1 3 5 ～ 1 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 0】

前記 C D 4 I L - 1 0 / C A R 細胞が、C D 1 3 を発現するがん細胞を標的とし、かつ殺滅する、請求項 1 3 5 ～ 1 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 1】

前記 C D 4 I L - 1 0 / C A R 細胞が、H L A - クラス I を発現するがん細胞を標的とし 50

、かつ殺滅する、請求項 135～140 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 142】

前記骨髓性白血病が、急性骨髓性白血病（AML）である、請求項 135～141 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 143】

前記悪性疾患または血液がんが、CD19⁺、CD20⁺、CD22⁺、BCMA⁺、CD27⁺、CD38⁺、またはB7-H3⁺血液がんである、請求項 135～138 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 144】

前記CD19⁺、CD20⁺、CD22⁺、BCMA⁺、CD27⁺、CD38⁺、またはB7-H3⁺血液がんが、慢性リンパ性白血病、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、および非ホジキンリンパ腫から選択される、請求項 143 に記載の方法。

10

【請求項 145】

前記アロ-HSCT移植片が、前記患者に関して血縁のまたは非血縁のドナーから得られる、請求項 136～144 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 146】

前記CD4⁺IL-10⁺/CAR細胞が、前記患者に対して非自己である、請求項 135～144 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 147】

前記CD4⁺IL-10⁺/CAR細胞が、前記患者に対して自己である、請求項 135～144 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 148】

前記CD4⁺IL-10⁺/CAR細胞が、前記患者に対して同種である、請求項 135～144 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 149】

前記CD4⁺IL-10⁺/CAR細胞が、前記患者に投与される前に、宿主アロ抗原に対してアネルギー化されない、請求項 135～144 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 150】

前記CD4⁺IL-10⁺/CAR細胞がTr1様細胞である、請求項 135～144 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 151】

前記CD4⁺IL-10⁺/CAR細胞が多クローン性である、請求項 135～144 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 152】

前記CD4⁺IL-10⁺/CAR細胞が多クローン性であり、前記患者に対して非自己である、請求項 135～144 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 153】

前記CD4⁺IL-10⁺/CAR細胞が多クローン性であり、前記患者に対して自己である、請求項 135～144 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 154】

前記CD4⁺IL-10⁺/CAR細胞が、少なくとも2人のドナーから単離された後に遺伝子改変される、請求項 135～144 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 155】

前記少なくとも2人のドナーがいずれもアロ-HSCTドナーではない、請求項 154 に記載の方法。

【請求項 156】

前記アロ-HSCT移植片が、前記患者に関して一致または不一致のドナーから得られる、請求項 135～155 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 157】

前記CD4⁺IL-10⁺/CAR細胞が、CD19、CD20、またはBCMAを発現する

50

細胞を標的とし、かつ殺滅する、請求項 135～156 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 158】

前記 CD4⁺IL-10⁺/CAR 細胞が、CD54 を発現する細胞を標的とし、かつ殺滅する、請求項 135～157 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 159】

前記 CD4⁺IL-10⁺/CAR 細胞が、HLA-クラス I および CD54 を発現するがん細胞を標的とし、かつ殺滅する、請求項 135～158 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 160】

前記 CD4⁺IL-10⁺/CAR 細胞が、CD112 および CD155 を発現するがん細胞を標的とし、かつ殺滅する、請求項 135～159 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 161】

前記 CD4⁺IL-10⁺/CAR 細胞が、CD58 を発現するがん細胞を標的とし、かつ殺滅する、請求項 135～160 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 162】

前記 CD4⁺IL-10⁺/CAR 細胞が、前記患者におけるがん細胞を標的とし、かつ殺滅する、請求項 135～161 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 163】

前記 CD4⁺IL-10⁺/CAR 細胞が、前記患者における固形腫瘍細胞を標的とし、かつ殺滅する、請求項 135～162 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 164】

前記 CD4⁺IL-10⁺/CAR 細胞が、同種 CD4⁺T 細胞増殖を抑制する、請求項 136～163 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 165】

前記 CD4⁺IL-10⁺/CAR 細胞が、同種 CD8⁺T 細胞増殖を抑制する、請求項 136～164 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 166】

前記 CD4⁺IL-10⁺/CAR 細胞が、同種 CD4⁺T 細胞増殖、同種 CD8⁺T 細胞増殖、および PBMC を抑制する、請求項 136～163 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 167】

同種造血幹細胞移植（アロ-HSCT）によって血液がんを処置する方法であって、アロ-HSCT 移植片を患者に投与すること；

30

ある量の CD4⁺IL-10⁺/CAR 細胞を前記患者に投与することであって、任意選択で前記量が、前記アロ-HSCT 移植片の移植片対白血病（GvL）または移植片対腫瘍（GvT）有効性を抑制することなく、移植片対宿主病（GvHD）を抑制または防止するために十分である、投与することを含み、

前記 CD4⁺IL-10⁺/CAR 細胞が、構成的プロモーターまたは誘導型プロモーターの制御下にあるヒト IL-10 のコード配列のベクター媒介遺伝子導入、および構成的プロモーターまたは誘導型プロモーターの制御下にある CAR のコード配列のベクター媒介遺伝子導入によって遺伝子改変された CD4⁺T 細胞を含み；

40

前記 CD4⁺IL-10⁺/CAR 細胞が、前記患者におけるがん細胞を標的とし、かつ殺滅し；

前記 CD4⁺IL-10⁺/CAR 細胞が、前記患者に投与される前に宿主のアロ抗原に対してアネルギー化されず；ならびに

前記 CD4⁺IL-10⁺/CAR 細胞が、前記患者に対して非自己であり、Tr1 様である、方法。

【請求項 168】

同種造血幹細胞移植（アロ-HSCT）によって血液がんを処置する方法であって、アロ-HSCT 移植片を患者に投与すること；

50

ある量のCD4⁺IL-10⁺/CAR細胞を前記患者に投与することであって、任意選択で前記量が、前記アロ-HSCT移植片の移植片対白血病（GvL）または移植片対腫瘍（GvT）有効性を抑制することなく、移植片対宿主病（GvHD）を抑制または防止するために十分である、投与することを含み、

前記CD4⁺IL-10⁺/CAR細胞が、構成的プロモーターまたは誘導型プロモーターの制御下にあるヒトIL-10のコード配列のベクター媒介遺伝子導入、および構成的プロモーターまたは誘導型プロモーターの制御下にあるCARのコード配列のベクター媒介遺伝子導入によって遺伝子改変されたCD4⁺T細胞を含み；

前記CD4⁺IL-10⁺/CAR細胞が、前記患者におけるがん細胞を標的とし、かつ殺滅し；

前記CD4⁺IL-10⁺/CAR細胞が、前記患者への投与前に宿主のアロ抗原に対してアレルギー化されず；および

前記CD4⁺IL-10⁺/CAR細胞が、前記患者に対して自己であり、Tr1様である、方法。

【請求項169】

患者におけるCD19⁺、またはCD20⁺、CD22⁺、BCMA⁺、CD27⁺、CD38⁺、またはB7-H3⁺血液がんの再発を防止する方法であって、

CD19⁺、CD20⁺、CD22⁺、BCMA⁺、CD27⁺、CD38⁺、またはB7-H3⁺血液がんが再発するリスクがあると同定された患者に、請求項1～66のいずれか一項に記載のCD4⁺IL-10⁺/CAR細胞、請求項67～89のいずれか一項に記載のCD4⁺IL-10⁺/CAR細胞集団、または請求項90に記載の医薬組成物の治療有効量を投与すること

を含み、前記治療有効量が、抗がん効果を誘導するために十分である、方法。

【請求項170】

患者におけるB7-H3⁺がんの再発を防止する方法であって、

B7-H3⁺がんを有すると同定された患者に、抗がん効果を誘導するために十分な、請求項1～66のいずれか一項に記載のCD4⁺IL-10⁺/CAR細胞、請求項67～89のいずれか一項に記載のCD4⁺IL-10⁺/CAR細胞集団、または請求項90に記載の医薬組成物の治療有効量を投与すること

を含む方法。

【請求項171】

前記B7-H3⁺がんが、固形腫瘍である、請求項170に記載の方法。

【請求項172】

前記固形腫瘍が、乳がん、脳がん、肺がん、肝臓がん、胃がん、脾臓がん、結腸がん、腎臓がん、膵臓がん、前立腺がん、子宮がん、皮膚がん、頭部がん、頸部がん、肉腫、神経芽腫および卵巣がんからなる群から選択される、請求項171に記載の方法。

【請求項173】

微小残存病変を有するがん患者を処置する方法であって、

微小残存病変を有すると同定された、または微小残存病変を有するリスクがあると同定された患者に、請求項1～66のいずれか一項に記載のCD4⁺IL-10⁺/CAR細胞、請求項67～89のいずれか一項に記載のCD4⁺IL-10⁺/CAR細胞集団、または請求項90に記載の医薬組成物の治療有効量を投与すること

を含み、前記治療有効量が、抗がん効果を誘導するために十分である、方法。

【請求項174】

患者を処置する方法であって、

請求項1～66のいずれか一項に記載のCD4⁺IL-10⁺/CAR細胞、請求項67～89のいずれか一項に記載のCD4⁺IL-10⁺/CAR細胞集団、または請求項90に記載の医薬組成物の治療有効量を、免疫寛容を必要とする患者に投与すること

を含む方法。

【請求項 175】

CD4IL-10/CAR細胞またはCD4IL-10/CAR細胞集団の凍結浮遊液を融解する事前のステップをさらに含む、請求項174に記載の方法。

【請求項 176】

前記患者が、炎症疾患または自己免疫疾患を有する、請求項174または175に記載の方法。

【請求項 177】

前記炎症疾患または自己免疫疾患が、1型糖尿病、自己免疫性ぶどう膜炎、自己免疫性肝炎、リウマチ性関節炎、乾癬、乾癬性関節炎、白斑、円形脱毛症、多発性硬化症、全身性狼瘡、炎症性腸疾患、アジソン病、グレーブス病、シェーグレン症候群、橋本甲状腺炎、重症筋無力症、自己免疫性血管炎、悪性貧血、潰瘍性大腸炎、水疱疾患、強皮症、およびセリアック病からなる群から選択される、請求項176に記載の方法。

10

【請求項 178】

前記炎症疾患または自己免疫疾患が、クローン病、潰瘍性大腸炎、セリアック病、1型糖尿病、狼瘡、乾癬、乾癬性関節炎、強直性脊髄炎、またはリウマチ性関節炎である、請求項177に記載の方法。

【請求項 179】

前記患者が、NLRP3インフラマソームの過剰活性を伴う疾患または障害を有する、請求項174に記載の方法。

【請求項 180】

前記患者が、2型糖尿病、神経変性疾患、心血管疾患、または炎症性腸疾患を有する、請求項174に記載の方法。

20

【請求項 181】

前記患者が、活性化された単球、マクロファージ、または樹状細胞によるIL-1 β 産生の増加を伴う疾患または障害を有する、請求項174に記載の方法。

【請求項 182】

前記患者が、活性化された単球、マクロファージ、または樹状細胞によるIL-18産生の増加を伴う疾患または障害を有する、請求項174に記載の方法。

【請求項 183】

前記患者が、活性化された単球、マクロファージ、または樹状細胞による成熟カスパーゼ1産生の増加を伴う疾患または障害を有する、請求項174に記載の方法。

30

【請求項 184】

前記患者が、アレルギー性疾患またはアトピー性疾患を有する、請求項174に記載の方法。

【請求項 185】

前記アレルギー性疾患またはアトピー性疾患が、喘息、アトピー性皮膚炎、および鼻炎からなる群から選択される、請求項184に記載の方法。

【請求項 186】

前記患者が、食物アレルギーを有する、請求項174に記載の方法。

【請求項 187】

前記患者が、固形腫瘍を有する、請求項174に記載の方法。

40

【請求項 188】

前記固形腫瘍が、乳がん、脳がん、肺がん、肝臓がん、胃がん、脾臓がん、結腸がん、腎臓がん、膵臓がん、前立腺がん、子宮がん、皮膚がん、頭部がん、頸部がん、肉腫、神経芽腫および卵巣がんからなる群から選択される、請求項187に記載の方法。

【請求項 189】

前記CD4IL-10/CAR細胞、前記CD4IL-10/CAR細胞集団、または前記医薬組成物の投与前または投与後のいずれかに、前記患者に臓器移植を行うステップをさらに含む、請求項174に記載の方法。

【請求項 190】

50

前記CD4IL-10/CAR細胞、前記CD4IL-10/CAR細胞集団、または前記医薬組成物が、前記臓器移植の宿主拒絶を防止するかまたはその重症度を低減する、請求項189に記載の方法。

【請求項191】

前記CD4IL-10/CAR細胞、前記CD4IL-10/CAR細胞集団、または前記医薬組成物の投与前または投与後のいずれかに、前記患者にiPS細胞由来の細胞または組織を移植するステップをさらに含む、請求項174に記載の方法。

【請求項192】

前記CD4IL-10/CAR細胞、前記CD4IL-10/CAR細胞集団、または前記医薬組成物が、前記細胞移植の宿主拒絶を防止するかまたはその重症度を低減する、請求項191に記載の方法。

【請求項193】

前記CD4IL-10/CAR細胞、前記CD4IL-10/CAR細胞集団、または前記医薬組成物の投与前または投与後のいずれかに、組換えAAVを前記患者に投与するステップをさらに含む、請求項174に記載の方法。

【請求項194】

前記CD4IL-10/CAR細胞、前記CD4IL-10/CAR細胞集団、または前記医薬組成物が、前記組換えAAVに対する免疫応答を低減させる、請求項193に記載の方法。

【請求項195】

前記CD4IL-10/CAR細胞、前記CD4IL-10/CAR細胞集団、または前記医薬組成物の投与前または投与後のいずれかに、AAV以外の組換えウイルスベクターを前記患者に投与するステップをさらに含む、請求項174に記載の方法。

【請求項196】

前記CD4IL-10/CAR細胞、前記CD4IL-10/CAR細胞集団、または前記医薬組成物が、AAV以外の前記組換えウイルスベクターに対する免疫応答を低減させる、請求項195に記載の方法。

【請求項197】

前記CD4IL-10/CAR細胞、前記CD4IL-10/CAR細胞集団、または前記医薬組成物の投与前または投与後のいずれかに、免疫原性治療タンパク質を前記患者に投与することをさらに含む、請求項196に記載の方法。

【請求項198】

前記CD4IL-10/CAR細胞、前記CD4IL-10/CAR細胞集団、または前記医薬組成物が、前記免疫原性治療タンパク質に対する免疫応答を低減させる、請求項197に記載の方法。

【請求項199】

前記免疫原性治療タンパク質が、治療抗体、第VII因子置換、サイトカイン、およびサイトカイン変異タンパク質から選択される、請求項197または198に記載の方法。

【請求項200】

前記患者が、ウイルスまたは細菌感染症に対して過剰な免疫応答を有する、請求項174に記載の方法。

【請求項201】

前記患者が、コロナウイルス感染症を有する、請求項200に記載の方法。

【請求項202】

前記患者から得た生物試料中の選択マーカーを検出し、それによってCD4IL-10/CAR細胞の存在または非存在を検出するステップをさらに含む、請求項174に記載の方法。

【請求項203】

前記生物試料が、前記患者からの生検または血液である、請求項202に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 204】

患者における自己免疫疾患、アレルギー性疾患、または炎症疾患を処置または阻害する方法であって、

自己免疫疾患、アレルギー性疾患、または炎症疾患を有すると同定された患者に、自己免疫疾患、アレルギー性疾患、または炎症疾患を処置または阻害するために十分な、請求項 1～66 のいずれか一項に記載の CD4 IL-10 / CAR 細胞、請求項 67～89 のいずれか一項に記載の CD4 IL-10 / CAR 細胞集団、または請求項 90 に記載の医薬組成物の治療有効量を投与することを含む方法。

【請求項 205】

造血幹細胞、骨髄細胞、臍帯血細胞、組織幹細胞、または固形臓器を移植した患者における移植片拒絶を低減させる方法であって、

移植された造血幹細胞、骨髄細胞、または固形臓器の拒絶を有すると同定された患者に、移植片拒絶を低減させるために十分な、請求項 1～66 のいずれか一項に記載の CD4 IL-10 / CAR 細胞、請求項 67～89 のいずれか一項に記載の CD4 IL-10 / CAR 細胞集団、または請求項 90 に記載の医薬組成物の治療有効量を投与することを含む方法。

【請求項 206】

患者における移植片対宿主病 (GvHD) を処置する方法であって、

移植片対宿主病 (GvHD) を有すると同定された、または移植片対宿主病 (GvHD) を有するリスクがあると同定された患者に、GvHD を抑制または防止するために十分な、請求項 1～66 のいずれか一項に記載の CD4 IL-10 / CAR 細胞、請求項 67～89 のいずれか一項に記載の CD4 IL-10 / CAR 細胞集団、または請求項 90 に記載の医薬組成物の治療有効量を投与することを含む方法。

【請求項 207】

前記移植片対宿主病 (GvHD) が、急性 GvHD を含む、請求項 206 に記載の方法。

【請求項 208】

前記移植片対宿主病 (GvHD) が、慢性 GvHD を含む、請求項 206 に記載の方法。

【請求項 209】

患者における組織または臓器損傷を処置する方法であって、

組織もしくは臓器損傷を有すると同定された、または組織もしくは臓器損傷を有するリスクがあると同定された患者に、組織または臓器損傷の修復を誘導するために十分な、請求項 1～66 のいずれか一項に記載の CD4 IL-10 / CAR 細胞、請求項 67～89 のいずれか一項に記載の CD4 IL-10 / CAR 細胞集団、または請求項 90 に記載の医薬組成物の治療有効量を投与することを含む方法。

【請求項 210】

(a) キメラ抗原受容体 (CAR) をコードする第 1 のポリヌクレオチドセグメント；および

(b) インターロイキン-10 (IL-10) をコードする第 2 のポリヌクレオチドセグメント

を含むポリヌクレオチド構築物。

【請求項 211】

前記第 1 のポリヌクレオチドセグメントが、前記 CAR のコード配列に作動可能に連結された第 1 の調節エレメントを含む、請求項 210 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 212】

前記第 1 の調節エレメントが、前記 CAR の構成的発現を駆動する、請求項 211 に記

10

20

30

40

50

載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 2 1 3】

前記第 2 のポリヌクレオチドセグメントが、前記 I L - 1 0 のコード配列に作動可能に連結された第 2 の調節エレメントを含む、請求項 2 1 0 ~ 2 1 2 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 2 1 4】

前記第 2 の調節エレメントが前記 I L - 1 0 の構成的発現を駆動する、請求項 2 1 3 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 2 1 5】

前記第 1 のポリヌクレオチドセグメントと前記第 2 のポリヌクレオチドセグメントの間に、配列内リボソーム進入部位 (I R E S) または自己切断型ペプチドをさらに含む、請求項 2 1 0 ~ 2 1 4 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 2 1 6】

前記自己切断型ペプチドが、F 2 A、P 2 A、T 2 A および E 2 A からなる群から選択される、請求項 2 1 5 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 2 1 7】

前記 C A R が、抗原結合ドメイン、ヒンジ領域、膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む、請求項 2 1 0 ~ 2 1 6 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 2 1 8】

前記抗原結合ドメインが、一本鎖抗体断片を含む、請求項 2 1 7 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 2 1 9】

前記一本鎖抗体断片が、一本鎖 F v (s c F v) を含む、請求項 2 1 8 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 2 2 0】

前記抗原結合ドメインが、自己免疫疾患、炎症障害、またはがんに関連する抗原を標的とする、請求項 2 1 0 ~ 2 1 9 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 2 2 1】

前記抗原が、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 2、B C M A、C D 2 7、C D 3 8、C E A、B 7 - H 3、C D 2 3、L y m 1、L y m 2、C L E C 5 A、C D H 1 7 9 b、F L T 3、G C C、M u c、C S F 2 R A、G F R a 4、C D 3 2、C D 3 3、I L 1 l R a、I L 1 3 R a、N Y B R I、S L e a、C D 2 0 0 R、T G F ベータ R 2、C D 2 7 6、T R O P 2、L A M P 1、P T K 7、D L L 3、C D H 1、C D H 6、C D H 1 7、C D H 1 9、T S H R、チロシナーゼ、H L A - A * 0 2、H L A - A * 2 4 シトルリン化ペプチド、インスリン、M O G、G A D 6 5、I A 2、グリアジン、およびデスモグレインからなる群から選択される、請求項 2 2 0 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 2 2 2】

前記抗原結合ドメインが、抗 C D 1 9 抗原結合ドメインである、請求項 2 1 0 ~ 2 2 1 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 2 2 3】

前記抗 C D 1 9 抗原結合ドメインが配列番号 1 1 の配列を有する、請求項 2 2 2 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 2 2 4】

前記抗原結合ドメインが抗 B C M A 抗原結合ドメインである、請求項 2 1 0 ~ 2 2 1 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 2 2 5】

前記抗 B C M A 抗原結合ドメインが、配列番号 5 0 ~ 5 3 のいずれか 1 つの配列を有する、請求項 2 2 4 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 2 2 6】

前記ヒンジ領域が、ヒトCD8 α ヒンジ領域、ヒトCD28ヒンジ領域、IgG1ヒンジ領域、またはIgG4ヒンジ領域から選択される、請求項210～225のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項227】

前記ヒンジ領域が、ヒトCD8 α に由来する、請求項226に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項228】

前記膜貫通ドメインが、TNFRSF19膜貫通ドメイン、CD3ゼータ膜貫通ドメイン、CD8 α 膜貫通ドメイン、CD4膜貫通ドメイン、CD28膜貫通ドメイン、またはB7ファミリー誘導型共刺激（ICOS）膜貫通ドメインから選択される、請求項210～227のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項229】

前記膜貫通ドメインが、CD8 α に由来する、請求項228に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項230】

前記CARが、1つまたは複数の共刺激ドメインをさらに含む、請求項210～229のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項231】

前記CARが、2つの共刺激ドメインを含む、請求項230に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項232】

前記1つまたは複数の共刺激ドメインが、4-1BB、CD28、OX40、ICOS、CD27、MYD88-CD40、およびKIR2DS2からなる群から選択される、請求項210～231のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項233】

前記1つまたは複数の共刺激ドメインのうちの1つがCD28に由来する、請求項232に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項234】

第2の共刺激ドメインが、4-1BBに由来する、請求項231～233のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項235】

前記細胞内シグナル伝達ドメインが、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ（ITAM）を含む、請求項210～234のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項236】

前記免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ（ITAM）が、CD3ゼータに由来する、請求項210～235のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項237】

前記CARが、抗CD19抗原結合ドメイン、抗BCMA抗原結合ドメイン、または抗CD20抗原結合；

ヒトCD8ヒンジ領域；

CD8膜貫通領域；

CD28共刺激ドメイン；および

CD3ゼータ鎖細胞内シグナル伝達ドメイン

を含む、請求項210～236のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項238】

前記CARが、配列番号9、16、22、34、41～49、または54の配列を含む、請求項210～237のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項239】

前記第1のポリヌクレオチドセグメントが、配列番号10、17、23、35、または

10

20

30

40

50

5 5 の配列を含む、請求項 2 3 8 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 2 4 0】

前記 I L - 1 0 がヒト I L - 1 0 である、請求項 2 1 0 ~ 2 3 9 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 2 4 1】

前記 I L - 1 0 がウイルス I L - 1 0 である、請求項 2 1 0 ~ 2 3 9 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 2 4 2】

前記 I L - 1 0 が、配列番号 1 の配列を有するタンパク質である、請求項 2 1 0 ~ 2 3 9 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 2 4 3】

前記第 2 のポリヌクレオチドセグメントが、配列番号 2 の配列を有する、請求項 2 4 2 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 2 4 4】

前記第 1 のポリヌクレオチドセグメントまたは前記第 2 のポリヌクレオチドセグメントが、選択マーカをコードする配列をさらに含む、請求項 2 1 0 ~ 2 4 3 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 2 4 5】

前記選択マーカが Δ N G F R である、請求項 2 4 4 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 2 4 6】

前記 Δ N G F R が、配列番号 3 の配列を有する、請求項 2 4 5 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 2 4 7】

配列番号 4 の配列を含む、請求項 2 4 5 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 2 4 8】

前記選択マーカが、E G F R ポリペプチドの切断型である、請求項 2 4 4 ~ 2 4 7 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 2 4 9】

ベクターである、請求項 2 1 0 ~ 2 4 8 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 2 5 0】

前記ベクターがウイルスベクターである、請求項 2 4 9 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 2 5 1】

前記ベクターがレンチウイルスベクターである、請求項 2 5 0 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 2 5 2】

(a) 配列番号 1 0、1 7、2 3、3 5、または 5 5 の配列を有する第 1 のポリヌクレオチドセグメント；および

(b) 配列番号 2 の配列を有する第 2 のポリヌクレオチドセグメントを含むポリヌクレオチド構築物。

【請求項 2 5 3】

(a) 配列番号 1 0、1 7、2 3、3 5、または 5 5 の配列を有する第 1 のポリヌクレオチドセグメント；

(b) 配列番号 2 の配列を有する第 2 のポリヌクレオチドセグメント；および

(c) 前記第 1 のポリヌクレオチドセグメントと前記第 2 のポリヌクレオチドセグメントの間に、配列番号 3 3 の配列を有する第 3 のポリヌクレオチドセグメントを含むポリヌクレオチド構築物。

【請求項 2 5 4】

- (a) 配列番号 10、17、23、35、または 55 の配列を有する第 1 のポリヌクレオチドセグメント；
 - (b) 配列番号 2 の配列を有する第 2 のポリヌクレオチドセグメント；
 - (c) 前記第 1 のポリヌクレオチドセグメントと前記第 2 のポリヌクレオチドセグメントの間に、配列番号 27 の配列を有する第 3 のポリヌクレオチドセグメント；および
 - (d) 配列番号 4 の配列を有する第 4 のポリヌクレオチドセグメント
- を含むポリヌクレオチド構築物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

1. 関連出願への相互参照

本出願は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、2021年12月30日に
出願された米国仮特許出願第 63 / 295, 491 号明細書の利益を主張する。

【0002】

2. 配列表

本出願は、XML フォーマットで提出されており、その全体が参照により本明細書に組
み込まれる配列表を含有する。前記 XML コピーは、2022年12月24日に作成され
、名称は 37104-50735-Sequence-Listing.xml であり、
サイズは、95.2 キロバイト (KB) である。

【背景技術】

20

【0003】

3. 背景

制御性 T 細胞は、自己抗原および非病原性抗原に対する免疫寛容を維持し、免疫系の恒
常性を維持する小さいが重要な T 細胞サブセットに属する。制御性 T 細胞には 2 つの主要
な集団、すなわち CD4⁺ FOXP3⁺ CD25⁺ T 細胞 (FOXP3⁺) 細胞およ
び 1 型制御性 T (Tr1) 細胞が存在する。FOXP3⁺ および Tr1 細胞はいずれも、
様々な前臨床の臓器および脾臓移植モデル、移植片対宿主病 (GvHD)、ならびに様々
な自己免疫および炎症疾患において病原性の T 細胞応答を下方調節する。

【0004】

Tr1 細胞は、臨床試験において有効であることが示されている。クローン化した抗原
特異的な自己 Tr1 細胞を、進行中の中等度から重度クローン病を有する患者に投与する
と、客観的な一過性の寛解をもたらした (Desreumaux et al., Gastroenterology,
2012;143(5):1207-1217.e2.)。加えて、Tr1 細胞に関して濃縮したドナー由来
アロ特異的 CD4⁺ T 細胞集団を、同種造血幹細胞移植 (アロ-HSCT) 後の白血病患者
者に養子移入すると、重度の GvHD を引き起こすことなく、免疫系の迅速な再構成なら
びに微生物およびウイルス感染症に対する保護をもたらした。レスポンダーの患者では、
治癒をもたらす長期間の寛解および寛容 (> 7 年) が達成された (Bacchetta et al.,
Front Immunol. 2014;5:16)。

30

【0005】

これらの勇気づけられる結果にもかかわらず、アンメットメディカルニーズが高い患者
に関する大規模治療のためのドナー由来または自家 Tr1 細胞の産生は、必ずしも実現可
能ではなく、非常に面倒であり、純粋な Tr1 細胞を大量に生成することは可能ではない
。

40

【0006】

最近、Locafaro と共同研究者は、単一ドナーからの精製 CD4⁺ T 細胞に、ヒ
ト IL-10 遺伝子を含有する双方向性レンチウイルスベクターを形質導入することによ
ってこれらの問題の一部を回避した。得られた単一ドナー CD4⁺ IL-10 集団は、天然
に存在する Tr1 細胞の主な機能を共有した。Tr1 細胞と同様に、単一ドナー CD4⁺ IL-
10 細胞は、高レベルの IL-10 を産生し、同種 CD4⁺ T 細胞および同種 CD8⁺
T 細胞の両方の増殖を下方調節する。加えて、それらは、正常な骨髄系細胞 (抗原提示

50

細胞、APCを含む)および骨髄性白血病細胞の両方に対して直接細胞傷害性である。ヒト化異種移植片対宿主病(GvHD)モデルでは、これらの単一ドナーCD4⁺IL-10⁺細胞は、移植片対白血病(GvL)活性を保持しながらGvHDの低減において有効であることが示された。Locafaro et al. Mol Ther. 2017;25(10):2254-2269および国際公開第2016/146,542号パンフレットを参照されたい。

【0007】

これらの細胞の免疫抑制活性および免疫恒常性維持活性を同時に保持しながら、CD4⁺IL-10⁺細胞の細胞傷害能を非骨髄系細胞に再度方向付ける手段が必要である。

【発明の概要】

【0008】

4. 概要

本開示は、外因性のIL-10およびキメラ抗原受容体(CAR)の両方を発現するように操作された新規タイプの免疫細胞であるCD4⁺IL-10⁺/CAR細胞を提供する。本発明者らは、IL-10に加えてCARの発現が、驚くべきことに、細胞の免疫調節特性に影響を及ぼすことなく、これらのTr1様細胞の細胞傷害特性を、骨髄系標的以外の治療上有用な標的へと再方向付けすることを発見した。同様に、CD4⁺IL-10⁺/CAR細胞を使用する処置の方法、処置のためのCD4⁺IL-10⁺/CAR細胞の使用、および細胞の免疫調節特性に影響を及ぼすことなく、CARがこれらのTr1様細胞の細胞傷害特性を骨髄系細胞以外の治療上有用な標的に方向付ける、様々な障害を処置するための医薬の製造におけるCD4⁺IL-10⁺/CAR細胞の使用も記載する。

【0009】

本開示は、(a)キメラ抗原受容体(CAR)をコードする第1の外因性ポリヌクレオチドセグメント;および(b)インターロイキン-10(IL-10)をコードする第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントを含む遺伝子改変CD4⁺T細胞(CD4⁺IL-10⁺/CAR)を提供する。

【0010】

一部の実施形態では、第1の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、CARのコード配列に作動可能に連結された調節エレメントを含む。一部の実施形態では、調節エレメントは、CARの構成的発現を駆動する。

【0011】

一部の実施形態では、CARは、抗原結合ドメイン、ヒンジ領域、膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【0012】

一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、一本鎖抗体断片を含む。一部の実施形態では、一本鎖抗体断片は、一本鎖Fv(scFv)を含む。

【0013】

一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、自己免疫疾患、炎症障害、またはがんに関連する抗原を標的とする。

【0014】

一部の実施形態では、抗原は、関連するMHC分子の文脈において、CD19、CD20、CD22、BCMA、CD27、CD38、B7-H3、CD23、Lym1、Lym2、CLEC5A、CDH179b、FLT3、GCC、Muc、CSF2RA、GFRa4、CD32、CD33、CEA、IL11Ra、IL13Ra、NYBRI、SLea、CD200R、TGFβR2、CD276、TROP2、LAMP1、PTK7、DLL3、CDH1、CDH6、CDH17、CDH19、TSHR、チロシナーゼ、HLA-A*02、HLA-A*24、またはシトルリン化ペプチド、インスリン、MOG、GAD65、IA2、グリアジン、およびデスモグレインからなる群から選択される。

【0015】

一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、抗CD19抗原結合ドメインを含む。一部

10

20

30

40

50

の実施形態では、抗CD19抗原結合ドメインは、配列番号11の配列を含む。

【0016】

一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、抗CD20抗原結合ドメインである。一部の実施形態では、抗CD20抗原結合ドメインは、配列番号18の配列を含む。

【0017】

一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、抗BCMA抗原結合ドメインである。一部の実施形態では、抗BCMA抗原結合ドメインは、配列番号50～53の配列を含む。

【0018】

一部の実施形態では、ヒンジ領域は、ヒトCD8ヒンジ領域、ヒトCD28ヒンジ領域、IgG1ヒンジ領域、またはIgG4ヒンジ領域から選択される。一部の実施形態では、ヒンジ領域は、ヒトCD8に由来する。

【0019】

一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、TNFRSF19膜貫通ドメイン、CD3ゼータ膜貫通ドメイン、CD8α膜貫通ドメイン、CD4膜貫通ドメイン、CD28膜貫通ドメイン、またはB7ファミリー誘導型共刺激（ICOS）膜貫通ドメインから選択される。一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、CD8α膜貫通ドメインに由来する。

【0020】

一部の実施形態では、CARは、1つまたは複数の共刺激ドメインをさらに含む。一部の実施形態では、CARは、2つの共刺激ドメインを含む。

【0021】

一部の実施形態では、1つまたは複数の共刺激ドメインは、4-1BB、CD28、OX40、ICOS、CD27、MYD88-CD40、およびKIR2DS2からなる群から選択される。

【0022】

一部の実施形態では、1つまたは複数の共刺激ドメインの1つは、CD28に由来する。

【0023】

一部の実施形態では、第2の共刺激ドメインは、4-1BBに由来する。

【0024】

一部の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ（ITAM）を含む。一部の実施形態では、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ（ITAM）は、CD3ゼータに由来する。

【0025】

一部の実施形態では、CARは、抗CD19抗原結合ドメイン、抗BCMA抗原結合ドメイン、または抗CD20抗原結合ドメイン；ヒトCD8ヒンジ領域；TNFRSF19膜貫通領域；4-1BB共刺激ドメイン；およびCD3ゼータ鎖細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態では、CARは、抗CD19抗原結合ドメイン、抗BCMA抗原結合ドメイン、または抗CD20抗原結合ドメイン；ヒトCD8ヒンジ領域；CD8α膜貫通領域；4-1BB共刺激ドメイン；およびCD3ゼータ鎖細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【0026】

一部の実施形態では、CARは、配列番号9、16、22、34、41～49、または54の配列を含む。

【0027】

一部の実施形態では、第1の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、配列番号10、17、23、35、または55の配列を含む。

【0028】

一部の実施形態では、第1の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、T細胞核ゲノムに組み込まれている。

【0029】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、第1の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、T細胞核ゲノムに組み込まれていない。

【0030】

一部の実施形態では、第1の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、ベクター内に存在する。

【0031】

一部の実施形態では、第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、IL-10のコード配列に作動可能に連結された調節エレメントを含む。一部の実施形態では、IL-10は、ヒトIL-10である。一部の実施形態では、IL-10は、ウイルスIL-10である。

10

【0032】

一部の実施形態では、IL-10は、配列番号1の配列を有するタンパク質である。一部の実施形態では、第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、配列番号2の配列を含む。

【0033】

一部の実施形態では、調節エレメントは、IL-10の構成的発現を駆動する。

【0034】

一部の実施形態では、第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、T細胞核ゲノムに組み込まれている。

【0035】

一部の実施形態では、第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、T細胞核ゲノムに組み込まれていない。

20

【0036】

一部の実施形態では、第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、ベクター内に存在する。

【0037】

一部の実施形態では、第1の外因性ポリヌクレオチドセグメントおよび第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、同じベクター内に存在する。一部の実施形態では、ベクターはウイルスベクターである。一部の実施形態では、ベクターは、レンチウイルスベクターである。

30

【0038】

一部の実施形態では、CD4⁺T細胞は、CD4⁺T細胞10⁶個/mL培養培地あたり少なくとも100pgのIL-10を構成的に発現する。

【0039】

一部の実施形態では、CD4⁺T細胞は、CD4⁺T細胞10⁶個/mLあたり少なくとも100pg、200pg、500pg、1ng、5ng、10ng、または50ngのIL-10を構成的に発現する。

【0040】

一部の実施形態では、CD4⁺T細胞は、抗CD3および抗CD28抗体による活性化後、CD4⁺T細胞10⁶個/mLあたり少なくとも1ngのIL-10を発現する。

40

【0041】

一部の実施形態では、CD4⁺T細胞は、抗CD3および抗CD28抗体による活性化後、CD4⁺T細胞10⁶個/mLあたり少なくとも2ng、5ng、10ng、100ng、200ng、または500ngのIL-10を発現する。

【0042】

一部の実施形態では、CD4⁺T細胞は、非改変CD4⁺T細胞より少なくとも5倍高いレベルでIL-10を発現する。一部の実施形態では、CD4⁺T細胞は、非改変CD4⁺T細胞より少なくとも10倍高いレベルでIL-10を発現する。

【0043】

一部の実施形態では、CD4⁺T細胞は、CD4⁺T細胞10⁶個/mLあたり少なく

50

とも100 pgのIL-5を発現する。一部の実施形態では、CD4⁺T細胞は、CD4⁺T細胞10⁶個/mLあたり少なくとも100 pg、200 pg、500 pg、1 ng、5 ng、10 ng、または50 ngのIL-5を発現する。

【0044】

一部の実施形態では、CD4⁺T細胞は、抗CD3および抗CD28抗体による活性化後、CD4⁺T細胞10⁶個/mLあたり少なくとも1 ngのIL-5を発現する。

【0045】

一部の実施形態では、CD4⁺T細胞は、抗CD3および抗CD28抗体による活性化後、CD4⁺T細胞10⁶個/mLあたり少なくとも2 ng、5 ng、10 ng、100 ng、200 ng、または500 ngのIL-5を発現する。

10

【0046】

一部の実施形態では、CD4⁺T細胞は、CD4⁺T細胞10⁶個/mLあたり少なくとも100 pgのIFN- γ を発現する。

【0047】

一部の実施形態では、CD4⁺T細胞は、CD4⁺T細胞10⁶個/mLあたり少なくとも100 pg、200 pg、500 pg、1 ng、5 ng、10 ng、または50 ngのIFN- γ を発現する。

【0048】

一部の実施形態では、CD4⁺T細胞は、抗CD3および抗CD28抗体による活性化後、CD4⁺T細胞10⁶個/mLあたり少なくとも1 ngのIFN- γ を発現する。

20

【0049】

一部の実施形態では、CD4⁺T細胞は、抗CD3および抗CD28抗体による活性化後、CD4⁺T細胞10⁶個/mLあたり少なくとも2 ng、5 ng、10 ng、100 ng、200 ng、または500 ngのIFN- γ を発現する。

【0050】

一部の実施形態では、CD4⁺T細胞は、CD4⁺T細胞10⁶個/mLあたり少なくとも25 pgのIL-4を発現する。

【0051】

一部の実施形態では、CD4⁺T細胞は、CD4⁺T細胞10⁶個/mLあたり少なくとも25 pg、50 pg、75 pg、100 pg、200 pg、500 pg、1 ng、5 ng、10 ng、または50 ngのIL-4を発現する。

30

【0052】

一部の実施形態では、CD4⁺T細胞は、抗CD3および抗CD28抗体による活性化後、CD4⁺T細胞10⁶個/mLあたり少なくとも100 pgのIL-4を発現する。

【0053】

一部の実施形態では、CD4⁺T細胞は、抗CD3および抗CD28抗体による活性化後、CD4⁺T細胞10⁶個/mLあたり少なくとも100 pg、200 pg、300 pg、400 pg、500 pg、600 pg、700 pg、800 pg、900 pg、1000 pg、2 ng、5 ng、10 ng、100 ng、200 ng、または500 ngのIL-4を発現する。

40

【0054】

一部の実施形態では、IL-10、IL-4、IFN- γ 、およびIL-5の1つまたは複数の発現は、1回または複数回の再刺激後に安定である。

【0055】

一部の実施形態では、第1の外因性ポリヌクレオチドセグメント、または第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、選択マーカーをコードする配列をさらに含む。

【0056】

一部の実施形態では、選択マーカーはΔNGFRである。一部の実施形態では、ΔNGFRは、配列番号3の配列を有する。一部の実施形態では、第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、配列番号4の配列を含む。

50

【0057】

一部の実施形態では、選択マーカーは、EGFRポリペプチドの切断型である。

【0058】

一部の実施形態では、CD4⁺T細胞は、CD19⁺標的細胞に対する*in vitro*細胞傷害が可能である。

【0059】

一部の実施形態では、CD4⁺T細胞は、CD19⁺標的細胞に対する*in vivo*細胞傷害が可能である。

【0060】

一部の実施形態では、CD19⁺標的細胞は、自己抗体産生B細胞である。

10

【0061】

一部の実施形態では、CD19⁺標的細胞は、CD19⁺がん細胞である。

【0062】

一部の実施形態では、CD4⁺T細胞は、骨髄系標的細胞に対する*in vitro*細胞傷害が可能である。

【0063】

一部の実施形態では、CD4⁺T細胞は、骨髄系標的細胞に対する*in vivo*細胞傷害が可能である。

【0064】

一部の実施形態では、CD4⁺T細胞は、CD19⁺標的細胞および骨髄系標的細胞に対する細胞傷害が可能である。

20

【0065】

一部の実施形態では、骨髄系標的細胞は、クラスI MHC、CD13、CD54およびCD112の1つまたは複数を発現する。

【0066】

一部の実施形態では、CD19⁺標的細胞に対する細胞傷害性は、1回または複数回の*in vitro*再刺激後に維持される。一部の実施形態では、CD19⁺標的細胞に対する細胞傷害性は、1回または複数回の*in vitro*増大後に維持される。

【0067】

一部の実施形態では、骨髄系標的細胞に対する細胞傷害性は、1回または複数回の*in vitro*再刺激後に維持される。一部の実施形態では、骨髄系標的細胞に対する細胞傷害性は、1回または複数回の*in vitro*増大後に維持される。

30

【0068】

一部の実施形態では、CD4⁺T細胞は、同種CD4⁺T細胞増殖を抑制することが可能である。

【0069】

一部の実施形態では、CD4⁺T細胞は、同種CD8⁺T細胞増殖を抑制することが可能である。

【0070】

一部の実施形態では、CD4⁺T細胞は、同種CD4⁺T細胞増殖、同種CD8⁺T細胞増殖、およびPBM C増殖を抑制することが可能である。

40

【0071】

一部の実施形態では、抑制特性は、1回または複数回の再刺激後に維持される。

【0072】

別の態様では、本開示は、本明細書に提供される遺伝子改変CD4⁺細胞のいずれかを含むCD4⁺T細胞集団を特徴とする。

【0073】

一部の実施形態では、遺伝子改変前のCD4⁺T細胞は、2、3、4、5、6、7、8、9、または10人の異なるT細胞ドナーから得られ、プールされる。

【0074】

50

一部の実施形態では、集団におけるCD4⁺T細胞は集合的に、6、7、8、9、10、11、12、またはそれより多くの異なるHLAハプロタイプを有する。

【0075】

一部の実施形態では、集団における全てのCD4⁺T細胞は、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、およびHLA-DQB1座で互いに対して少なくとも1/10、2/10、3/10、4/10、5/10、6/10、7/10、8/10、または9/10の一致を有する。

【0076】

一部の実施形態では、集団における全てのCD4⁺T細胞は、HLA-A、HLA-B、HLA-C、およびHLA-DRB1座で互いに対して少なくとも1/8、2/8、3/8、4/8、5/8、6/8、7/8、または8/8の一致を有する。

10

【0077】

一部の実施形態では、集団における全てのCD4⁺T細胞は、HLA-A座で互いに対して2/2の一致を有する。

【0078】

一部の実施形態では、集団における全てのCD4⁺T細胞は、HLA-B座で互いに対して2/2の一致を有する。

【0079】

一部の実施形態では、集団における全てのCD4⁺T細胞は、HLA-C座で互いに対して2/2の一致を有する。

20

【0080】

一部の実施形態では、集団における全てのCD4⁺T細胞は、HLA-DRB1およびHLA-DQB1座で互いに対して少なくとも3/4または4/4の一致を有する。

【0081】

一部の実施形態では、集団における全てのCD4⁺T細胞は、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、およびHLA-DQB1座で互いに対して5/10、6/10、7/10、8/10、または9/10未満の一致を有する。

【0082】

一部の実施形態では、集団における全てのCD4⁺T細胞は、HLA-A、HLA-B、HLA-C、およびHLA-DRB1座で互いに対して4/8、5/8、6/8、7/8、または8/8未満の一致を有する。

30

【0083】

一部の実施形態では、集団における全てのCD4⁺T細胞は、HLA-A座で互いに対して2/2未満の一致を有する。

【0084】

一部の実施形態では、集団における全てのCD4⁺T細胞は、HLA-B座で互いに対して2/2未満の一致を有する。

【0085】

一部の実施形態では、集団における全てのCD4⁺T細胞は、HLA-C座で互いに対して2/2未満の一致を有する。

40

【0086】

一部の実施形態では、集団における全てのCD4⁺T細胞は、HLA-DRB1およびHLA-DQB1座で互いに対して4/2、3/4、または4/4未満の一致を有する。

【0087】

一部の実施形態では、集団における全てのCD4⁺T細胞は、A*02対立遺伝子を有するか、またはA*02陰性である。

【0088】

一部の実施形態では、集団における全てのCD4⁺T細胞は、A*24対立遺伝子を有するか、またはA*24陰性である。

【0089】

50

一部の実施形態では、 NGFR^+ 細胞集団内の CD4^+ T細胞の少なくとも30%が、CARを発現する。

【0090】

一部の実施形態では、 NGFR^+ 細胞集団内の CD4^+ T細胞の少なくとも60%が、CARを発現する。

【0091】

一部の実施形態では、 NGFR^+ 細胞集団内の CD4^+ T細胞の少なくとも90%が、CARを発現する。

【0092】

一部の実施形態では、 CD4^+ T細胞は、凍結浮遊液 (suspension) 中に存在する。

【0093】

一部の実施形態では、 CD4^+ T細胞は、液体浮遊液中に存在する。

【0094】

一部の実施形態では、液体浮遊液は、事前に凍結されている。

【0095】

別の態様では、本開示は、本明細書に提供される CD4^+ T細胞のいずれか、または本明細書に提供される CD4^+ T細胞集団のいずれかを含む、本明細書に提供される医薬組成物のいずれかを特徴とする。

【0096】

別の態様では、本開示は、 $\text{CD4IL10}/\text{CAR}$ 細胞を作製する方法であって、(a) 1人または複数のT細胞ドナーから初代培養 (primary) CD4^+ T細胞を得るステップ；ならびに (b) (i) キメラ抗原受容体 (CAR) をコードする第1の外因性ポリヌクレオチドセグメント、および (ii) IL-10 をコードする第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントを導入することによって CD4^+ T細胞を改変するステップを含む方法

を特徴とする。

【0097】

一部の実施形態では、ステップ (a) において、初代培養 CD4^+ T細胞は、2、3、4、5、6、7、8、9、または10人の異なるT細胞ドナーから得られる。

【0098】

一部の実施形態では、方法は、ステップ (b) からの遺伝子改変 CD4^+ T細胞をプールすることをさらに含む。

【0099】

一部の実施形態では、ステップ (a) において、初代培養 CD4^+ T細胞は、患者に対して自己 (autologous) である。

【0100】

一部の実施形態では、方法は、ステップ (a) の後でステップ (b) の前、またはステップ (b) の後に、抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体、または抗 CD3 抗体および CD28 抗体コーティングビーズ (anti-CD3 antibody and CD28 antibody coated beads) の存在下で CD4^+ T細胞をインキュベートするステップをさらに含む。

【0101】

一部の実施形態では、方法は、さらに IL-2 の存在下で CD4^+ T細胞をインキュベートすることをさらに含む。

【0102】

一部の実施形態では、第1の外因性ポリヌクレオチドセグメント、第2の外因性ポリヌクレオチドセグメント、または両方は、1つまたは複数のウイルスベクターを使用して初代培養 CD4^+ T細胞に導入される。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。

【0103】

一部の実施形態では、第1の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、CARのコード配列を含む。

10

20

30

40

50

【0104】

一部の実施形態では、CARは、自己免疫疾患、炎症障害、またはがんに関連する標的抗原に対して特異的である。

【0105】

一部の実施形態では、標的抗原は、自己免疫疾患、炎症障害、またはがんに関連する。

【0106】

一部の実施形態では、CARは、抗CD19 CAR、抗CD20 CAR、抗CD22 CAR、抗BCMA CAR、抗B7-H3 CAR、抗CD27 CAR、または抗CD38 CARである。

【0107】

一部の実施形態では、CARは、配列番号9、16、22、34、41～49、または54の配列を含む。

【0108】

一部の実施形態では、第1の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、配列番号10、17、23、35、または55の配列を含む。

【0109】

一部の実施形態では、IL-10は、配列番号1の配列を含む。一部の実施形態では、第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、配列番号2の配列を含む。

【0110】

一部の実施形態では、第1の外因性ポリヌクレオチドセグメント、または第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、選択マーカーをコードするセグメントをさらに含む。

【0111】

一部の実施形態では、コードされる選択マーカーはΔNGFRである。一部の実施形態では、コードされる選択マーカーは、配列番号3の配列を有する。

【0112】

一部の実施形態では、選択マーカーは、EGFRポリペプチドの切断型である。

【0113】

一部の実施形態では、方法は、ステップ(b)の後に、選択マーカーを発現する遺伝子改変CD4⁺T細胞を単離し、それによって遺伝子改変CD4⁺T細胞の濃縮集団を生成するステップをさらに含む。

【0114】

一部の実施形態では、濃縮集団中の遺伝子改変CD4⁺T細胞の少なくとも30%または少なくとも60%が、IL-10およびCARを発現する。

【0115】

一部の実施形態では、濃縮集団中の遺伝子改変CD4⁺T細胞の少なくとも90%が、IL-10およびCARを発現する。

【0116】

一部の実施形態では、濃縮集団中の遺伝子改変CD4⁺T細胞の少なくとも40%が、選択マーカーを発現する。

【0117】

一部の実施形態では、濃縮集団中の遺伝子改変CD4⁺T細胞の少なくとも75%が、選択マーカーを発現する。

【0118】

一部の実施形態では、濃縮集団中の遺伝子改変CD4⁺T細胞の少なくとも90%が、選択マーカーを発現する。

【0119】

一部の実施形態では、方法は、遺伝子改変CD4⁺T細胞の濃縮集団をインキュベートするステップをさらに含む。

【0120】

一部の実施形態では、遺伝子改変CD4⁺T細胞の濃縮集団をインキュベートするステ

10

20

30

40

50

ップは、IL-2の存在下、抗CD3抗体および抗CD28抗体、またはCD3抗体およびCD28抗体コーティングビーズの存在下で実施される。

【0121】

一部の実施形態では、方法は、遺伝子改変CD4⁺T細胞を凍結する後のステップをさらに含む。

【0122】

一部の実施形態では、少なくとも2人のT細胞ドナーは、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、およびHLA-DQB1座で互いに対して少なくとも1/10、2/10、3/10、4/10、5/10、6/10、7/10、8/10、または9/10の一致を有する。

10

【0123】

一部の実施形態では、少なくとも2人のT細胞ドナーは、HLA-A、HLA-B、HLA-C、およびHLA-DRB1座で互いに対して少なくとも1/8、2/8、3/8、4/8、5/8、6/8、7/8、または8/8の一致を有する。

【0124】

一部の実施形態では、少なくとも2人のT細胞ドナーは、HLA-A座で互いに対して2/2の一致を有する。一部の実施形態では、少なくとも2人のT細胞ドナーは、HLA-B座で互いに対して2/2の一致を有する。一部の実施形態では、少なくとも2人のT細胞ドナーは、HLA-C座で互いに対して2/2の一致を有する。

【0125】

一部の実施形態では、少なくとも2人のT細胞ドナーは、HLA-DRB1およびHLA-DQB1座で互いに対して少なくとも3/4または4/4の一致を有する。

20

【0126】

一部の実施形態では、少なくとも2人のT細胞ドナーは、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、およびHLA-DQB1座で互いに対して5/10、6/10、7/10、8/10、または9/10未満の一致を有する。

【0127】

一部の実施形態では、少なくとも2人のT細胞ドナーは、HLA-A、HLA-B、HLA-C、およびHLA-DRB1座で互いに対して4/8、5/8、6/8、7/8、または8/8未満の一致を有する。

30

【0128】

一部の実施形態では、少なくとも2人のT細胞ドナーは、HLA-A座で互いに対して2/2未満の一致を有する。一部の実施形態では、少なくとも2人のT細胞ドナーは、HLA-B座で互いに対して2/2未満の一致を有する。一部の実施形態では、少なくとも2人のT細胞ドナーは、HLA-C座で互いに対して2/2未満の一致を有する。

【0129】

一部の実施形態では、少なくとも2人のT細胞ドナーは、HLA-DRB1およびHLA-DQB1座で互いに対して4/2、3/4、または4/4未満の一致を有する。

【0130】

一部の実施形態では、少なくとも2人のT細胞ドナーの各々は、A*02対立遺伝子を有するか、またはA*02陰性である。一部の実施形態では、少なくとも2人のT細胞ドナーの各々は、A*02対立遺伝子を有するか、またはA*02陰性である。

40

【0131】

一部の実施形態では、ステップ(a)において、初代培養CD4⁺T細胞は、1つまたは複数の凍結保存物(stock)から得られる。

【0132】

一部の実施形態では、ステップ(a)において、初代培養CD4⁺T細胞は、少なくとも2人の異なるT細胞ドナーの凍結していない末梢血単核細胞から得られる。

【0133】

一部の実施形態では、方法は、末梢血単核細胞からCD4⁺T細胞を単離するステップ

50

をさらに含む。

【0134】

別の態様では、本開示は、血液がんを処置する方法であって、抗がん効果を誘導するために十分な、提供されるCD4IL-10/CAR細胞のいずれか、本明細書に提供されるCD4IL-10/CAR細胞集団のいずれか、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかの治療有効量を、血液がん患者に投与することを含む方法の特徴とする。

【0135】

一部の実施形態では、方法は、CD4IL-10/CARの投与前または投与後にアロ(allo)HSC T移植片を患者に投与するステップをさらに含む。

【0136】

別の態様では、本開示は、悪性疾患を有する患者を処置する方法であって、アロHSC T移植片を患者に投与すること、および提供されるCD4IL-10/CAR細胞のいずれか、本明細書に提供されるCD4IL-10/CAR細胞集団のいずれか、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかの治療有効量を投与することを含む方法の特徴とする。

【0137】

一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞の量は、アロHSC Tの移植片対白血病(GvL)または移植片対腫瘍(GvT)有効性を抑制することなく、移植片対宿主病(GvHD)を抑制または防止するためにさらに十分である。

【0138】

一部の実施形態では、悪性疾患または血液がんは、骨髄性白血病である。

【0139】

一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞は、CD13を発現するがん細胞をとし、かつ殺滅する。

【0140】

一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞は、HLA-クラスIを発現するがん細胞をとし、かつ殺滅する。

【0141】

一部の実施形態では、骨髄性白血病は、急性骨髄性白血病(AML)である。

【0142】

一部の実施形態では、悪性疾患または血液がんは、CD19⁺、CD20⁺、CD22⁺、CD27⁺、CD38⁺、BCMA⁺、またはB7-H3⁺血液がんである。

【0143】

一部の実施形態では、CD19⁺、CD20⁺、CD22⁺、CD27⁺、CD38⁺、BCMA⁺、またはB7-H3⁺血液がんは、慢性リンパ性白血病、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、および非ホジキンリンパ腫から選択される。

【0144】

一部の実施形態では、アロHSC T移植片は、患者に対する血縁ドナーまたは非血縁ドナーから得られる。

【0145】

一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞は、患者に対して非自己である。

【0146】

一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞は、患者に対して自己(autologous)である。

【0147】

一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞は、患者に対して同種(allogeneic)である。

【0148】

一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞は、患者に投与する前に宿主アロ抗原に対してアネルギー化(anergized)されない。

10

20

30

40

50

【0149】

一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞は、Tr1様細胞である。

【0150】

一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞は、多クローン性である。

【0151】

一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞は、多クローン性であり、患者に対して非自己である。

【0152】

一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞は、多クローン性であり、患者に対して自己である。

【0153】

一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞は、少なくとも2人のドナーから単離された後に遺伝子改変される。

【0154】

一部の実施形態では、少なくとも2人のドナーのいずれも、アロ-HSCTドナーと同じドナーではない。

【0155】

一部の実施形態では、アロHSCT移植片は、患者に関して一致または不一致のドナーから得られる。

【0156】

一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞は、CD19、CD20、またはB CMAを発現する細胞をとし、かつ殺滅する。一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞は、CD54を発現する細胞を標的とし、かつ殺滅する。一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞は、HLAクラスIおよびCD54を発現するがん細胞を標的とし、かつ殺滅する。一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞は、CD112およびCD155を発現するがん細胞を標的とし、かつ殺滅する。一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞は、CD58を発現するがん細胞を標的とし、かつ殺滅する。

【0157】

一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞は、患者におけるがん細胞を標的とし、かつ殺滅する。

【0158】

一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞は、患者における固形腫瘍細胞を標的とし、かつ殺滅する。

【0159】

別の態様では、本開示は、同種造血幹細胞移植（アロ-HSCT）によって血液がんを処置する方法であって、

アロHSCT移植片を患者に投与すること；

アロHSCT移植片の移植片対白血病（GvL）または移植片対腫瘍（GvT）有効性を抑制することなく、移植片対宿主病（GvHD）を抑制または防止するために十分な量のCD4 IL-10 / CAR細胞を患者に投与すること

を含み、

CD4 IL-10 / CAR細胞が、構成的プロモーターまたは誘導型プロモーターの制御下でヒトIL-10のコード配列および構成的プロモーターまたは誘導型プロモーターの制御下でCARのコード配列を含む1つまたは複数のベクターのベクター媒介遺伝子導入によって遺伝子改変されたCD4⁺T細胞を含み；

CD4 IL-10 / CAR細胞が、患者におけるがん細胞を標的とし、かつ殺滅し；

CD4 IL-10 / CAR細胞が、患者への投与前に宿主のアロ抗原に対してアネルギー化されず；および

CD4 IL-10 / CAR細胞が、患者に対して非自己であり、Tr1様である、

10

20

30

40

50

方法の特徴とする。

【0160】

別の態様では、本開示は、同種造血幹細胞移植（アロ-HSCT）によって血液がんを処置する方法であって、

アロHSCT移植片を患者に投与すること；

ある量のCD4IL-10/CAR細胞を患者に投与することであって、任意選択で量が、アロHSCT移植片の移植片対白血病（GvL）または移植片対腫瘍（GvT）有効性を抑制することなく、移植片対宿主病（GvHD）を抑制または防止するために十分である、投与すること

を含み、

CD4IL-10/CAR細胞が、構成的プロモーターまたは誘導型プロモーターの制御下でヒトIL-10のコード配列および構成的プロモーターまたは誘導型プロモーターの制御下でCARのコード配列を含む1つまたは複数のベクターのベクター媒介遺伝子導入によって遺伝子改変されたCD4⁺T細胞を含み；

CD4IL-10/CAR細胞が、患者におけるがん細胞を標的とし、かつ殺滅し；

CD4IL-10/CAR細胞が、患者への投与前に宿主のアロ抗原に対してアネルギー化されず；および

CD4IL-10/CAR細胞が、患者に対して自己であり、Tr1様である、方法の特徴とする。

【0161】

別の態様では、本開示は、患者におけるCD19⁺、CD20⁺、CD22⁺、CD27⁺、CD38⁺、BCMA⁺、またはB7-H3⁺血液がんの再発を防止する方法であって、CD19⁺、CD20⁺、CD22⁺、BCMA⁺、もしくはB7-H3⁺血液がんを有すると同定された患者、またはCD19⁺、CD20⁺、CD22⁺、BCMA⁺、もしくはB7-H3⁺血液がんが再発するリスクがあると同定された患者に、抗がん効果を誘導するために十分な、提供されるCD4IL-10/CAR細胞のいずれか、本明細書に提供されるCD4IL-10/CAR細胞集団のいずれか、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかの治療有効量を投与することを含む方法の特徴とする。一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞は、HSCTの投与後に投与される。

【0162】

別の態様では、本開示は、患者におけるB7-H3⁺がんの再発を防止する方法であって、B7-H3⁺がんを有すると同定された患者に、抗がん効果を誘導するために十分な、提供されるCD4IL-10/CAR細胞のいずれか、本明細書に提供されるCD4IL-10/CAR細胞集団のいずれか、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかの治療有効量を投与することを含む方法の特徴とする。

【0163】

一部の実施形態では、B7-H3⁺がんは、固形腫瘍である。

【0164】

一部の実施形態では、固形腫瘍は、乳がん、脳がん、肺がん、肝臓がん、胃がん、脾臓がん、結腸がん、腎臓がん、膵臓がん、前立腺がん、子宮がん、皮膚がん、頭部がん、頸部がん、肉腫、神経芽腫および卵巣がんからなる群から選択される。

【0165】

別の態様では、本開示は、微小残存病変（minimal residual disease）を有する患者を処置する方法であって、微小残存病変を有すると同定された、または微小残存病変を有するリスクがあると同定された患者に、抗がん効果を誘導するために十分な、提供されるCD4IL-10/CAR細胞のいずれか、本明細書に提供されるCD4IL-10/CAR細胞集団のいずれか、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかの治療有効量を投与することを含む方法の特徴とする。

【0166】

別の態様では、本開示は、患者を処置する方法であって、免疫寛容を必要とする患者に

10

20

30

40

50

、提供されるCD4IL-10/CAR細胞のいずれか、本明細書に提供されるCD4IL-10/CAR細胞集団のいずれか、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかの治療有効量を投与することを含む方法の特徴とする。

【0167】

一部の実施形態では、方法は、CD4IL-10/CAR細胞またはCD4IL-10/CAR細胞集団の凍結浮遊液を融解する事前のステップをさらに含む。

【0168】

一部の実施形態では、患者は炎症疾患または自己免疫疾患を有する。

【0169】

一部の実施形態では、炎症疾患または自己免疫疾患は、自己免疫性ぶどう膜炎、乾癬、白斑、円形脱毛症、乾癬性関節炎、炎症性腸疾患、橋本甲状腺炎、自己免疫性血管炎、潰瘍性大腸炎、水疱疾患、強皮症、セリアック病、グレーブス病、全身性硬化症、重症筋無力症、抗NMDA脳炎、天疱瘡疾患（尋常性および落葉状）、後天性表皮水疱症、血栓性血小板減少性紫斑病、特発性血小板性紫斑病、自己抗体誘発性血管炎症、自己抗体誘発性心臓炎、リウマチ性関節炎、自己抗体誘発性リウマチ性関節炎、視神経脊髄炎スペクトラム障害、全身性エリテマトーデス（SLE）、多発性硬化症（MS）、シェーグレン症候群、自己免疫性ミオパチー、I型糖尿病、アジソン病、悪性貧血、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性胆管炎（PBC）、自己免疫性脾炎、グッドパスチャー病、原発性膜性腎症、卵巣不全、自己免疫性精巣炎、ドライアイ疾患、再生不良性貧血、自己免疫性好中球減少症、および特発性間質性肺炎からなる群から選択される。

【0170】

一部の実施形態では、炎症疾患または自己免疫疾患は、クローン病、潰瘍性大腸炎、セリアック病、1型糖尿病、狼瘡、乾癬、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、またはリウマチ性関節炎である。

【0171】

一部の実施形態では、患者は、NLPR3インフラマソームの過剰活性を伴う疾患または障害を有する。

【0172】

一部の実施形態では、患者は、2型糖尿病、神経変性疾患、心血管疾患、または炎症性腸疾患を有する。

【0173】

一部の実施形態では、患者は、活性化された単球、マクロファージ、または樹状細胞によるIL-1β産生の増加を伴う疾患または障害を有する。

【0174】

一部の実施形態では、患者は、活性化された単球、マクロファージ、または樹状細胞によるIL-18産生の増加を伴う疾患または障害を有する。

【0175】

一部の実施形態では、患者は、活性化された単球、マクロファージ、または樹状細胞による成熟カスパーゼ1産生の増加を伴う疾患または障害を有する。

【0176】

一部の実施形態では、患者は、アレルギー疾患またはアトピー疾患を有する。

【0177】

一部の実施形態では、アレルギー疾患またはアトピー疾患は、喘息、アトピー性皮膚炎、および鼻炎からなる群から選択される。

【0178】

一部の実施形態では、患者は食物アレルギーを有する。

【0179】

一部の実施形態では、患者は固形腫瘍を有する。

【0180】

一部の実施形態では、固形腫瘍は、乳がん、脳がん、肺がん、肝臓がん、胃がん、脾臓

10

20

30

40

50

がん、結腸がん、腎臓がん、膵臓がん、前立腺がん、子宮がん、皮膚がん、頭部がん、頸部がん、肉腫、神経芽腫および卵巣がんからなる群から選択される。

【0181】

一部の実施形態では、方法は、CD4IL-10/CAR細胞、CD4IL-10/CAR細胞集団、または医薬組成物を投与する前または後のいずれかに、患者に臓器移植を行うステップをさらに含む。一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞、CD4IL-10/CAR細胞集団、または医薬組成物は、臓器移植の宿主拒絶を防止するかまたはその重症度を低減させる。

【0182】

一部の実施形態では、方法は、CD4IL-10/CAR細胞、CD4IL-10/CAR細胞集団、または医薬組成物を投与する前または後のいずれかに、iPS細胞由来細胞または組織を患者に移植するステップをさらに含む。一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞、CD4IL-10/CAR細胞集団、または医薬組成物は、細胞移植の宿主拒絶を防止するかまたはその重症度を低減させる。

【0183】

一部の実施形態では、方法は、CD4IL-10/CAR細胞、CD4IL-10/CAR細胞集団、または医薬組成物を投与する前または後のいずれかに、組換えAAVを患者に投与するステップをさらに含む。一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞、CD4IL-10/CAR細胞集団、または医薬組成物は、組換えAAVに対する免疫応答を低減させる。

【0184】

一部の実施形態では、方法は、CD4IL-10/CAR細胞、CD4IL-10/CAR細胞集団、または医薬組成物を投与する前または後のいずれかに、AAV以外の組換えウイルスベクターを患者に投与するステップをさらに含む。一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞、CD4IL-10/CAR細胞集団、または医薬組成物は、AAV以外の組換えウイルスベクターに対する免疫応答を低減させる。

【0185】

一部の実施形態では、方法は、CD4IL-10/CAR細胞、CD4IL-10/CAR細胞集団、または医薬組成物を投与する前または後のいずれかに、患者に免疫原性治療タンパク質を投与するステップをさらに含む。一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞、CD4IL-10/CAR細胞集団、または医薬組成物は、免疫原性治療タンパク質に対する免疫応答を低減させる。一部の実施形態では、免疫原性治療タンパク質は、治療抗体、第VII因子置換、サイトカイン、およびサイトカイン変異タンパク質から選択される。

【0186】

一部の実施形態では、患者は、ウイルスまたは細菌感染症に対して過剰な免疫応答を有する。一部の実施形態では、患者は、コロナウイルス感染症を有する。一部の実施形態では、患者は、臓器および/または組織の損傷を有する。

【0187】

一部の実施形態では、方法は、患者から得た生物試料中の選択マーカを検出し、それによってCD4IL-10/CAR細胞の存在または非存在を検出するステップをさらに含む。

【0188】

一部の実施形態では、生物試料は、患者からの生検または血液である。

【0189】

別の態様では、本開示は、患者における自己免疫疾患、アレルギー疾患、または炎症疾患を処置または阻害する方法であって、自己免疫疾患、アレルギー疾患、または炎症疾患を有すると同定された患者に、自己免疫疾患、アレルギー疾患、または炎症疾患を処置または阻害するために十分な、提供されるCD4IL-10/CAR細胞のいずれか、本明細書に提供されるCD4IL-10/CAR細胞集団のいずれか、または本明細書に提供され

10

20

30

40

50

る医薬組成物のいずれかの治療有効量を投与することを含む方法の特徴とする。

【0190】

別の態様では、本開示は、造血幹細胞、骨髄細胞、臍帯血細胞、組織幹細胞、または固形臓器を移植した患者における移植片拒絶を低減させる方法であって、移植された造血幹細胞、骨髄細胞、組織幹細胞、または固形臓器の拒絶を有すると同定された患者に、移植片の拒絶を低減させるために十分な、提供されるCD4IL-10/CAR細胞のいずれか、本明細書に提供されるCD4IL-10/CAR細胞集団のいずれか、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかの治療有効量を投与することを含む方法の特徴とする。

【0191】

別の態様では、本開示は、患者における移植片対宿主病（GvHD）を処置する方法であって、移植片対宿主病（GvHD）を有すると同定された、または移植片対宿主病（GvHD）を有するリスクがあると同定された患者に、GvHDを抑制または防止するために十分な、提供されるCD4IL-10/CAR細胞のいずれか、本明細書に提供されるCD4IL-10/CAR細胞集団のいずれか、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかの治療有効量を投与することを含む方法の特徴とする。

【0192】

一部の実施形態では、移植片対宿主病（GvHD）は、急性GvHDを含む。

【0193】

一部の実施形態では、移植片対宿主病（GvHD）は、慢性GvHDを含む。

【0194】

別の態様では、本開示は、患者における組織または臓器損傷を処置する方法であって、組織もしくは臓器損傷を有すると同定された、または組織もしくは臓器損傷を有するリスクがあると同定された患者に、組織または臓器損傷の修復を誘導するために十分な、本明細書に提供されるCD4IL-10/CAR細胞のいずれか、本明細書に提供されるCD4IL-10/CAR細胞集団のいずれか、または本明細書に提供される医薬組成物の治療有効量を投与することを含む方法の特徴とする。

【0195】

別の態様では、本開示は、（a）キメラ抗原受容体（CAR）をコードする第1のポリヌクレオチドセグメント；および（b）インターロイキン-10（IL-10）をコードする第2のポリヌクレオチドセグメントを含むポリヌクレオチド構築物の特徴とする。

【0196】

一部の実施形態では、第1のポリヌクレオチドセグメントは、CARのコード配列に作動可能に連結された調節エレメントを含む。一部の実施形態では、調節エレメントは、CARの構成的発現を駆動する。

【0197】

一部の実施形態では、第2のポリヌクレオチドセグメントは、IL-10のコード配列に作動可能に連結された調節エレメントを含む。一部の実施形態では、調節エレメントは、IL-10の構成的発現を駆動する。

【0198】

一部の実施形態では、方法は、第1のポリヌクレオチドセグメントと第2のポリヌクレオチドセグメントとの間に配列内リボソーム進入部位（IRES）または自己切断型ペプチドをさらに含む。一部の実施形態では、自己切断型ペプチドは、F2A、P2A、T2AおよびE2Aからなる群から選択される。

【0199】

一部の実施形態では、CARは、抗原結合ドメイン、ヒンジ領域、膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【0200】

一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、一本鎖抗体断片を含む。一部の実施形態では、一本鎖抗体断片は、一本鎖Fv（scFv）を含む。

【0201】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、自己免疫疾患、炎症障害、またはがんに関連する抗原を標的とする。

【0202】

一部の実施形態では、抗原は、CD19、CD20、CD22、BCMA、B7-H3、CD27、CD38、CEA、BCMA、CD23、Lym1、Lym2、CLEC5A、CDH179b、FLT3、GCC、Muc、CSF2RA、GFRA4、CD32、CD33、IL1LRa、IL13Ra、NYBRI、SLea、CD200R、TGFベータR2、CD276、TROP2、LAMP1、PTK7、DLL3、CDH1、CDH6、CDH17、CDH19、TSHR、チロシナーゼ、HLA-A2、シトルリン化ペプチド、インスリン、GAD65、IA2、グリアジン、およびデスモグレインからなる群から選択される。

10

【0203】

一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、抗CD19抗原結合ドメインである。一部の実施形態では、抗CD19抗原結合ドメインは、配列番号11の配列を含む。

【0204】

一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、抗CD20抗原結合ドメインである。一部の実施形態では、抗CD20抗原結合ドメインは、配列番号18の配列を含む。

【0205】

一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、抗BCMA抗原結合ドメインである。一部の実施形態では、抗BCMA抗原結合ドメインは、配列番号50～53の配列を含む。

20

【0206】

一部の実施形態では、ヒンジ領域は、ヒトCD8ヒンジ領域、ヒトCD28ヒンジ領域、IgG1ヒンジ領域、またはIgG4ヒンジ領域から選択される。一部の実施形態では、ヒンジ領域は、ヒトCD8に由来する。

【0207】

一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、TNFRSF19膜貫通ドメイン、CD3ゼータ膜貫通ドメイン、CD8α膜貫通ドメイン、CD4膜貫通ドメイン、CD28膜貫通ドメイン、またはB7ファミリー誘導型共刺激（ICOS）膜貫通ドメインから選択される。一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、CD8αに由来する。

【0208】

一部の実施形態では、CARは、1つまたは複数の共刺激ドメインをさらに含む。

30

【0209】

一部の実施形態では、CARは、2つの共刺激ドメインを含む。

【0210】

一部の実施形態では、1つまたは複数の共刺激ドメインは、4-1BB、CD28、OX40、ICOS、CD27、MYD88-CD40、およびKIR2DS2からなる群から選択される。

【0211】

一部の実施形態では、1つまたは複数の共刺激ドメインの1つは、CD28に由来する。

40

【0212】

一部の実施形態では、第2の共刺激ドメインは、4-1BBに由来する。

【0213】

一部の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ（ITAM）を含む。一部の実施形態では、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ（ITAM）は、CD3ゼータに由来する。

【0214】

一部の実施形態では、CARは、抗CD19抗原結合ドメイン、BCMA、または抗CD20抗原結合ドメイン；ヒトCD8ヒンジ領域；CD8膜貫通領域；CD28共刺激ドメイン；およびCD3ゼータ鎖細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

50

【0215】

一部の実施形態では、CARは、配列番号9、16、22、または34の配列を含む。

【0216】

一部の実施形態では、第1のポリヌクレオチドセグメントは、配列番号10、17、23、35、または55の配列を含む。

【0217】

一部の実施形態では、IL-10は、ヒトIL-10である。一部の実施形態では、IL-10は、ウイルスIL-10である。

【0218】

一部の実施形態では、IL-10は、配列番号1の配列を有するタンパク質である。一部の実施形態では、第2のポリヌクレオチドセグメントは、配列番号2の配列を含む。

【0219】

一部の実施形態では、第1のポリヌクレオチドセグメントまたは第2のポリヌクレオチドセグメントは、選択マーカをコードする配列をさらに含む。

【0220】

一部の実施形態では、選択マーカはΔNGFRである。一部の実施形態では、ΔNGFRは、配列番号3の配列を有する。一部の実施形態では、ポリヌクレオチド構築物は、配列番号4の配列を含む。

【0221】

一部の実施形態では、選択マーカは、EGFRポリペプチドの切断型である。

【0222】

一部の実施形態では、構築物はベクターである。一部の実施形態では、ベクターは、ウイルスベクターである。一部の実施形態では、ベクターはレンチウイルスベクターである。

【0223】

別の態様では、本開示は、配列番号10、17、23、35、または55の配列を有する第1のポリヌクレオチドセグメント；および配列番号2の配列を有する第2のポリヌクレオチドセグメントを含むポリヌクレオチド構築物を特徴とする。

【0224】

別の態様では、本開示は、配列番号10、17、23、35、または55の配列を有する第1のポリヌクレオチドセグメント；配列番号2の配列を有する第2のポリヌクレオチドセグメント；および第1のポリヌクレオチドセグメントと第2のポリヌクレオチドセグメントの間に、配列番号33の配列を有する第3のポリヌクレオチドセグメントを含むポリヌクレオチド構築物を特徴とする。

【0225】

別の態様では、本開示は、配列番号10、17、23、35、または55の配列を有する第1のポリヌクレオチドセグメント；配列番号2の配列を有する第2のポリヌクレオチドセグメント；第1のポリヌクレオチドセグメントと第2のポリヌクレオチドセグメントの間に、配列番号27の配列を有する第3のポリヌクレオチドセグメント；および配列番号4の配列を有する第4のポリヌクレオチドセグメントを含むポリヌクレオチド構築物を特徴とする。

【0226】

別の態様では、本開示は、単一のドナーまたは複数のドナーからのCD4⁺IL-10細胞であって、IL-10がウイルスIL-10であるCD4⁺IL-10細胞を特徴とする。ウイルスIL-10は、配列番号6または18の配列を有する。一部の実施形態では、ウイルスIL-10は、配列番号7の配列を有するポリヌクレオチドによってコードされる。一部の実施形態では、IL-10は、ヒトIL-10からの1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のアミノ酸がウイルスIL-10からの対応するアミノ酸配列によって交換されているヒトIL-10である。一部の実施形態では、CD4⁺T細胞は、構成的プロモーターの制御下で外因性のウイルスIL-10を形質導入される。一部

10

20

30

40

50

の実施形態では、発現制御エレメントは、活性化CD4⁺T細胞においてウイルスIL-10の発現を駆動する。一部の実施形態では、ウイルスIL-10をコードする外因性ポリヌクレオチドは、T細胞核ゲノムに組み込まれている。一部の実施形態では、ウイルスIL-10をコードする外因性ポリヌクレオチドは、T細胞核ゲノムに組み込まれていない。一部の実施形態では、ウイルスIL-10をコードする外因性ポリヌクレオチドは、配列番号7の配列を有する。

【0227】

別の態様では、本開示は、単一ドナーまたは複数のドナーからのCD4⁺IL-10細胞であって、IL-10が、ハツカネズミ (*Mus musculus*)、「MOUSE」(配列番号58)；ドブネズミ (*Rattus norvegicus*)、「RAT」(配列番号59)；アカゲザル (*Macaca mulatta*)、「MACMU」(配列番号60)；ニシゴリラ (*Gorilla gorilla*)、「GORILLA」(配列番号61)；カニクイザル (*Macaca fascicularis*)、「CYNO」(配列番号62)；アヌビスヒヒ (*Papio Anubis*)、「OLIVE BABOON」(配列番号63)；ボノボ (*Pan paniscus*)、「BONOB0」(配列番号64)；チンパンジー (*Pan troglodytes*)、「CHIMP」(配列番号65)；およびEBVB9 (配列番号66)のIL-10であるCD4⁺IL-10細胞を特徴とする。一部の実施形態では、IL-10は、ハツカネズミ (*Mus musculus*)、「MOUSE」(配列番号58)；ドブネズミ (*Rattus norvegicus*)、「RAT」(配列番号59)；アカゲザル (*Macaca mulatta*)、「MACMU」(配列番号60)；ニシゴリラ (*Gorilla gorilla*)、「GORILLA」(配列番号61)；カニクイザル (*Macaca fascicularis*)、「CYNO」(配列番号62)；アヌビスヒヒ (*Papio Anubis*)、「OLIVE BABOON」(配列番号63)；ボノボ (*Pan paniscus*)、「BONOB0」(配列番号64)；チンパンジー (*Pan troglodytes*)、「CHIMP」(配列番号65)；およびEBVB9 (配列番号66)のIL-10と少なくとも90%、95%、98%、または99%配列同一性を有するタンパク質である。

【0228】

別の態様では、本開示は、単一ドナーまたは複数のドナーからのCD4⁺IL-10細胞であって、IL-10がヒトIL-10のバリエーションであるCD4⁺IL-10細胞を特徴とする。ヒトIL-10のバリエーションは、配列番号67または配列番号68の配列を有する。一部の実施形態では、IL-10は、ヒトIL-10からの1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のアミノ酸が別の種のIL-10 (例えば、ハツカネズミ (*Mus musculus*)、「MOUSE」(配列番号58)；ドブネズミ (*Rattus norvegicus*)、「RAT」(配列番号59)；アカゲザル (*Macaca mulatta*)、「MACMU」(配列番号60)；ニシゴリラ (*Gorilla gorilla*)、「GORILLA」(配列番号61)；カニクイザル (*Macaca fascicularis*)、「CYNO」(配列番号62)；アヌビスヒヒ (*Papio Anubis*)、「OLIVE BABOON」(配列番号63)；ボノボ (*Pan paniscus*)、「BONOB0」(配列番号64)；チンパンジー (*Pan troglodytes*)、「CHIMP」(配列番号65)；およびEBVB9 (配列番号66)のIL-10)からの対応するアミノ酸配列によって交換されているヒトIL-10である。一部の実施形態では、CD4⁺T細胞は、構成的プロモーターの制御下で外因性のIL-10バリエーションを形質導入されている。一部の実施形態では、発現制御エレメントは、活性化CD4⁺T細胞においてIL-10バリエーションの発現を駆動する。一部の実施形態では、IL-10バリエーションをコードする外因性ポリヌクレオチドは、T細胞核ゲノムに組み込まれている。一部の実施形態では、IL-10バリエーションをコードする外因性ポリヌクレオチドは、T細胞核ゲノムに組み込まれていない。

【0229】

なお別の態様では、本開示は、ウイルスIL-10 CD4⁺IL-10を作製する方法であって、以下のステップ：

(i) 単一のT細胞ドナーから初代培養CD4⁺T細胞を得るステップ；および

(ii) ウイルスIL-10をコードする外因性ポリヌクレオチドを導入することによ

てドナーCD4⁺T細胞を改変し、それによって遺伝子改変CD4⁺T細胞を得るステップ

を含む方法を提供する。

【0230】

一部の実施形態では、方法は、ステップ(i)の後またはステップ(ii)の後に、抗CD3抗体および抗CD28抗体、または抗CD3抗体およびCD28抗体コーティングビーズの存在下で初代培養CD4⁺T細胞をインキュベートするステップをさらに含む。

【0231】

一部の実施形態では、方法は、さらにIL-2の存在下で初代培養CD4⁺T細胞をインキュベートすることを含む。一部の実施形態では、ベクターを使用してウイルスIL-10をコードする外因性ポリヌクレオチド。

【0232】

一部の実施形態では、ウイルスIL-10をコードする外因性ポリヌクレオチドは、選択マーカーをコードするセグメントを含む。一部の実施形態では、コードされる選択マーカーは、ΔNGFRである。一部の実施形態では、コードされる選択マーカーは、配列番号3の配列を有する。一部の実施形態では、コードされる選択マーカーは、切断型EGFRポリペプチドである。一部の実施形態では、コードされる選択マーカーは、切断型ヒトEGFRポリペプチドである。

【0233】

一部の実施形態では、方法は、ステップ(ii)の後に、選択マーカーを発現する遺伝子改変CD4⁺T細胞を単離し、それによって遺伝子改変CD4⁺T細胞の濃縮集団を生成するステップをさらに含む。

【0234】

一部の実施形態では、方法は、遺伝子改変CD4⁺T細胞の濃縮集団をインキュベートするステップをさらに含む。一部の実施形態では、遺伝子改変CD4⁺T細胞の濃縮集団をインキュベートするステップは、IL-2の存在下、抗CD3抗体および抗CD28抗体、またはCD3抗体およびCD28抗体コーティングビーズの存在下で実施される。

【0235】

一部の実施形態では、ステップ(i)において、初代培養CD4⁺T細胞は、凍結保存物から得られる。一部の実施形態では、ステップ(i)において、初代培養CD4⁺T細胞は、単一T細胞ドナーの凍結していない末梢血単核細胞から得られる。

【0236】

一部の実施形態では、方法は、末梢血単核細胞からCD4⁺T細胞を単離するステップをさらに含む。一部の実施形態では、末梢血単核細胞は、バフィーコートまたはアフエーシスから得られる。

【図面の簡単な説明】

【0237】

【図1】図1は、本明細書に提供される様々なキメラ抗原受容体(CAR)の構造の非限定的な例証である。

【図2-A】図2Aは、レンチウイルスベクターにおいて、抗CD19 CARをCD4⁺T細胞に送達してCD4⁺IL-10抗CD19 CAR細胞を産生するために使用される、完全なヒト抗CD19モノクローナル抗体FMC63からのscFv、CD8αヒンジ、CD8α膜貫通ドメイン、CD28共刺激ドメイン、およびCD3ζ活性化ドメインを含む抗CD19 CARコード配列の部分構造を例証する。

【図2-B】図2Bは、抗CD19 CARをCD4⁺T細胞に送達してCD4⁺IL-10抗CD19 CAR細胞を産生するために使用されるレンチウイルスベクター(pLV抗CD19 CAR)を例証する。

【図3-A】図3A~3Bは、ヒトIL-10およびΔNGFRコード配列をCD4⁺T細胞に送達してCD4⁺IL-10細胞またはCD4⁺IL-10抗CD19 CAR細胞を産生するために使用されるレンチウイルスベクター(LVV; LVVIL-10-NGFR)を生

10

20

30

40

50

成するために使用される双方向性プラスミド (pLVIL-10) を例証する。図 3 A は、ヒト IL-10 および ΔNGFR コード配列を複数のドナーからの CD4⁺T 細胞に送達して、ポリドナー (polydonor) CD4⁺IL-10 細胞を産生するための双方向性レンチウイルスベクターの部分構造を例証する。図 3 B は、ヒト IL-10 および ΔNGFR コード配列を複数のドナーからの CD4⁺T 細胞に送達して、ポリドナー CD4⁺IL-10 細胞を産生するための双方向性レンチウイルスベクター (hPGK, IL10, WPRE, mhCMV, ΔNGFR, SV40PA) の完全な環状構造を例証する。

【図 3-B】図 3-A と同じ。

【図 4】図 4 は、例示的目的のための、天然の B 細胞分化の間の抗原発現を示す。

【図 5-A】図 5 A ~ 5 C は、CD4⁺IL-10 抗 CD19 CAR 細胞を生成する方法の非限定的な例の概略図を示す。各々の方法において、ヒト CD4⁺T 細胞を、完全培養培地 (5% ヒト AB 血清および rhIL-2 (50 U/mL) を補充した X-vivo) 中、抗 CD3 / 抗 CD28 ビーズ (Miltenyi) (3:1 の細胞:ビーズ比) によって活性化した。図 5 A は、活性化 CD4⁺T 細胞に、活性化の 48 時間後に抗 CD19 CAR (LVVCD19-CAR) をコードするレンチウイルスベクターを形質導入し、24 時間後 (すなわち、活性化の 72 時間後) にヒト IL-10 およびヒト NGF 受容体の切断型をコードする双方向性レンチウイルスベクター (LVVIL-10-NGFR) を形質導入したことを示す。いずれの LVV も、感染多重度 (MOI) 20 で使用した。図 5 B は、活性化 CD4⁺T 細胞に、活性化の 48 時間後に LVVIL-10-NGFR を形質導入し、24 時間後 (すなわち、活性化の 24 時間後) に LVVCD19-CAR を形質導入したことを示す。図 5 C は、活性化 CD4⁺T 細胞に、活性化の 48 時間後に LVVIL-10-NGFR および LVVCD19-CAR を同時に形質導入したことを示す。対照 (CAR を発現しない) は、活性化の 48 時間後に活性化 CD4⁺T 細胞に LVVIL-10-NGFR のみを形質導入することによって生成した。図 5 A ~ 5 C の各々に関して、形質導入を、ポリブレン (8 μg/mL) の存在下で行った。加えて、図 5 A ~ 5 C の各々に関して、形質導入の 10 ~ 28 日後、形質導入細胞 (すなわち、ΔNGFR+細胞) を、抗 CD271 マイクロビーズ (Miltenyi) および抗 CD19 CAR マイクロビーズ (Miltenyi) を使用して精製した。精製細胞を、以前に記載されたように (Andolfi et al. Mol. Ther. 20(9):1778-1790(2012) および Locafaro et al. Mol. Ther. 25(10): 2254-2269(2017)) 14 日毎に再刺激した。2 回目 (TF2) および 3 回目 (TF3) の再刺激後、得られた細胞 (CD4⁺IL-10 抗 CD19 CAR 細胞、または対照 CD4⁺IL-10 細胞) を、in vitro および in vivo で特徴付けた。培養培地を、必要に応じて培養期間全体を通して 2 ~ 3 日毎に交換した。

【図 5-B】図 5-A と同じ。

【図 5-C】図 5-A と同じ。

【図 6-A】図 6 A は、図 5 A に記載した方法に従って産生した対照 (左のパネル) および CD4⁺IL-10 抗 CD19 CAR (右のパネル) に関するフローサイトメトリープロット (x 軸に抗 CD19 CAR 発現および y 軸に IL-10 の代用としての NGFR 発現) を示す。図 6 B は、図 5 B に記載した方法に従って産生した対照 (左のパネル) および CD4⁺IL-10 抗 CD19 CAR (右のパネル) に関するフローサイトメトリープロット (x 軸に CD19 および y 軸に NGFR) を示す。図 6 C は、図 5 C に記載した方法に従って産生した対照 (左のパネル) および CD4⁺IL-10 抗 CD19 CAR (右のパネル) に関するフローサイトメトリープロット (x 軸に CD19 および y 軸に NGFR) を示す。

【図 6-B】図 6-A と同じ。

【図 6-C】図 6-A と同じ。

【図 7】図 7 は、CD4⁺IL-10 T 細胞 (対照) および CD4⁺IL-10 抗 CD19 CAR T 細胞に関するフローサイトメトリープロット (x 軸に抗 CD19 CAR 発現および y 軸に NGFR 発現) を示す。上のパネルは、図 5 C に示す方法に従ってドナー 26.1 から生成した CD4⁺IL-10 T 細胞 (対照) および CD4⁺IL-10 抗 CD19 CAR T 細胞

胞を示す。下のパネルは、図5Cに示す方法に従ってドナー26.2から生成したCD4⁺IL-10⁺T細胞（対照）およびCD4⁺IL-10⁺抗CD19CAR⁺T細胞を示す。

【図8-A】図8A～8Dは、3人の異なるドナー（26.1、26.2、および26.3）から単離されたCD4⁺T細胞から生成したCD4⁺IL-10⁺T細胞（対照）およびCD4⁺IL-10⁺/CAR⁺T細胞に関するサイトカイン産生プロファイルを示す。サイトカイン産生プロファイルは、IL-10（図8A）、IFN- γ （図8B）、IL-4（図8C）、およびIL-5（図8D）を含む。

【図8-B】図8-Aと同じ。

【図8-C】図8-Aと同じ。

【図8-D】図8-Aと同じ。

【図9】図9は、ドナー24.2から単離されたCD4⁺T細胞から生成したCD4⁺IL-10⁺T細胞（対照）およびCD4⁺IL-10⁺/CAR⁺T細胞のサイトカイン産生プロファイルを示す。

【図10】図10は、ドナー24.2から単離されたCD4⁺T細胞から生成したCD4⁺IL-10⁺抗CD19CAR⁺細胞が、*in vitro*でCD19発現NALM6細胞を殺滅したことを示す。ALL-CMは、骨髓系細胞株であり、NK殺滅に対して感受性がある細胞株であるK562を対照として含めた。

【図11-A】図11Aは、3人の異なるドナー（26.1、26.2、および26.3）から単離されたCD4⁺T細胞から生成したCD4⁺IL-10⁺抗CD19CAR⁺細胞が、*in vitro*でCD19⁺NALM6細胞を殺滅したことを示す。

【図11-B】図11Bは、NALM6細胞およびCD4⁺IL-10⁺T細胞（対照）、またはNALM6細胞およびCD4⁺IL-10⁺抗CD19CAR⁺細胞を共培養（co-culture）した3日目の上清中のIL-10レベルを示す。BLQ：定量レベル（31pg/mL）未満。

【図12】図12は、2回目の再刺激（TF2）後に単離されたCD4⁺IL-10⁺T細胞（対照）およびCD4⁺IL-10⁺抗CD19CAR⁺細胞との共培養後の同種CD4⁺T細胞の増殖アッセイからのフローサイトメトリープロット（計数対eFluor（登録商標）670）を示す（図5Cを参照されたい）。上のパネルは、CD4⁺IL-10⁺抗CD19CAR⁺細胞と共培養後のCD4⁺T細胞の増殖を示す。下のパネルは、CD4⁺IL-10⁺T細胞（対照）と共培養後のCD4⁺T細胞の増殖を示す。フローサイトメトリープロットは、「非分裂」細胞および「分裂」細胞を示し、分裂中の細胞は、各分裂後の希釈のためにより小さくより少量のeFluor（登録商標）670を含む。CD4⁺IL-10⁺T細胞（対照）およびCD4⁺IL-10⁺抗CD19CAR⁺細胞によって媒介される抑制を、以下のように計算した： $100 - ([CD4^{+}IL-10^{+}T細胞(対照) または CD4^{+}IL-10^{+}抗CD19CAR^{+}細胞の存在下でのレスポンドの増殖 / レスポンドの増殖] \times 100)$ 。

【図13】図13は、2回目の再刺激（TF2）後に単離されたCD4⁺IL-10⁺T細胞（対照）およびCD4⁺IL-10⁺抗CD19CAR⁺細胞との共培養後の同種CD8⁺T細胞の増殖アッセイからのフローサイトメトリープロット（計数対eFluor（登録商標）670）を示す（図5Cを参照されたい）。上のパネルは、CD4⁺IL-10⁺抗CD19CAR⁺細胞との共培養後のCD8⁺T細胞の増殖を示す。下のパネルは、CD4⁺IL-10⁺T細胞（対照）との共培養後のCD8⁺T細胞の増殖を示す。フローサイトメトリープロットは、「非分裂」細胞および「分裂」細胞を示し、分裂中の細胞は、各分裂後の希釈のためにより小さくより少量のeFluor（登録商標）670を含む。CD4⁺IL-10⁺T細胞（対照）およびCD4⁺IL-10⁺抗CD19CAR⁺細胞によって媒介される抑制を、以下のように計算した： $100 - ([CD4^{+}IL-10^{+}T細胞(対照) または CD4^{+}IL-10^{+}抗CD19CAR^{+}細胞の存在下でのレスポンドの増殖 / レスポンドの増殖] \times 100)$ 。

【図14】図14は、3回目の再刺激（TF3）後に単離されたCD4⁺IL-10⁺T細胞（対照）およびCD4⁺IL-10⁺抗CD19CAR⁺細胞との共培養後の同種PBMCの増殖アッセイからのフローサイトメトリープロット（計数対eFluor（登録商標）670

10

20

30

40

50

）を示す（図 5 C を参照されたい）。フローサイトメトリープロットは「増殖性」の細胞を示し、分裂中の細胞は、各分裂後の希釈のためにより小さくより少量の e F l u o r （登録商標）670 を含む。C D 4 I L - 1 0 T 細胞（対照）および C D 4 I L - 1 0 抗 C D 1 9 C A R 細胞によって媒介される抑制を、以下のように計算した： $100 - ([C D 4 I L - 1 0 T 細胞（対照） または C D 4 I L - 1 0 抗 C D 1 9 C A R 細胞の存在下でのレスポ$

ンダーの増殖 / レスポンダーの増殖] $\times 100$) 。

【図 1 5】図 1 5 は、マウスにおいて *i n v i v o* で C D 1 9 + 腫瘍細胞成長を評価するための実験概要の概略図を示す。0 日目に、N S G マウスに、(i) N A L M 6 - ルシフェラーゼ (1×10^5 個 / マウス)、(i i) N A L M 6 - ルシフェラーゼ (1×10^5 個 / マウス) + P B M C (2.5×10^6 個 / マウス)、(i i i) N A L M 6 - ルシ

10

フェラーゼ (1×10^5 個 / マウス) + C D 4 I L - 1 0 抗 C D 1 9 C A R 細胞 (2.5×10^6 個 / マウス)、または (i v) N A L M 6 - ルシフェラーゼ (1×10^5 個 / マウス) + P B M C (2.5×10^6 個 / マウス) + C D 4 I L - 1 0 抗 C D 1 9 C A R 細胞 (2.5×10^6 個 / マウス) を注射した。

【図 1 6 - A】図 1 6 A は、図 1 5 に記載した条件 (i) ~ (i v) の注射後、3、6、9、および 12 日目の N S G マウスにおける N A L M 6 - ルシフェラーゼ細胞からの生物発光を示す。

【図 1 6 - B】図 1 6 B は、図 1 6 A における画像からの生物発光を定量する折れ線グラフを示す。図 1 5 に記載した条件 (i) ~ (i v) の各々に関する経時的な (N A L M 6 - ルシフェラーゼ注射後の日数) 総光束 [p / s] 。P 値を、条件 (i i) ~ (i v) を条件 (i) (N A L M 6 - ルシフェラーゼ単独) と比較するマンホイットニー検定を使用して 12 日目に測定した。

20

【図 1 7】図 1 7 は、条件 (i)、(i i)、および (i i i) について図 1 5 に記載したマウスに関する経時的な体重減少の折れ線グラフを示す。体重減少は、異種移植片対宿主病 (G v H D) の指標として使用される。

【図 1 8 - A】図 1 8 A ~ 1 8 C は、ヒト化 *x e n o - G v H D* マウスモデルにおける単一ドナー C D 4 I L - 1 0 抗 C D 1 9 C A R 細胞およびポリドナー C D 4 I L - 1 0 抗 C D 1 9 C A R 細胞を示す。図 1 8 A は、放射線照射した N S G マウスに、(i) 同種 P B M C (2.5×10^6 細胞 / マウス)、(i i) 単一ドナー C D 4 I L - 1 0 抗 C D 1 9 C A R 細胞 (2.5×10^6 細胞 / マウス)、(i i i) ポリドナー C D 4 I L - 1 0 抗 C D 1 9 C A R 細胞 (2.5×10^6 細胞 / マウス)、(i v) P B M C + 単一ドナー C D 4 I L - 1 0 抗 C D 1 9 C A R 細胞、または (v) P B M C + ポリドナー C D 4 I L - 1 0 抗 C D 1 9 C A R 細胞 (2.5×10^6 細胞 / マウス) を 3 日目に静脈内 (i . v .) 注射した、同種 P B M C によって誘導された *x e n o - G v H D* ヒト化マウスモデルにおいて試験した単一ドナー C D 4 I L - 1 0 抗 C D 1 9 C A R 細胞を示す。図 1 8 B は、放射線照射した N S G マウスに、同種 P B M C (2.5×10^6 細胞 / マウス) および / または単一ドナー C D 4 I L - 1 0 抗 C D 1 9 C A R 細胞を 3 日目に静脈内 (i . v .) 注射した、同種 P B M C によって誘導された *x e n o - G v H D* ヒト化マウスモデルにおいて試験した C D 4 I L - 1 0 抗 C D 1 9 C A R 細胞を示す。図 1 8 C は、放射線照射した N S G マウスに、同種 P B M C (2.5×10^6 細胞 / マウス) および / またはポリドナー C D 4 I L - 1 0 抗 C D 1 9 C A R 細胞 (2.5×10^6 細胞 / マウス) を 3 日目に静脈内 (i . v .) 注射した、同種 P B M C によって誘導された *x e n o - G v H D* ヒト化マウスモデルにおいて試験した C D 4 I L - 1 0 抗 C D 1 9 C A R 細胞を示す。P B M C : 末梢血単核細胞 ; G v H D : 移植片対宿主病。

30

40

【図 1 8 - B】図 1 8 - A と同じ。

【図 1 8 - C】図 1 8 - A と同じ。

【図 1 9】図 1 9 は、C D 4 I L - 1 0 細胞を生成するための例示的なプロトコールを例証する。

【図 2 0 - A】図 2 0 A は、L V - I L - 1 0 / Δ N G F R (ヒト I L - 1 0 およびヒト N G F 受容体の切断型をコードする双方向性レンチウイルスベクター) を形質導入したヒト C D 4 + T 細胞中の C D 4 + Δ N G F R + 細胞のパーセンテージ (平均値 $\pm$ S D、n =

50

10) およびベクターコピー数 (VCN、平均値 $\pm$ SD、 $n=10$) を示す。図20Bは、LV-IL-10/ Δ NGFRを形質導入し、抗CD271マイクロビーズを使用して精製した2人の代表的なドナー (ドナーBおよびドナーC) からのヒトCD4⁺T細胞におけるCD4および Δ NGFRの発現のFACS解析を示す。

【図20-B】図20-Aと同じ。

【図21】図21は、2回目 (TF2) および3回目 (TF3) の再刺激後の単ードナーCD4^{IL-10}細胞のサイトカイン産生プロファイルを示す。TF2およびTF3 CD4^{IL-10}細胞を、非刺激のままとしたか (矢印は、自然発生/非刺激試料を示す)、または固定CD3 (10 μ g/mL) および可溶性CD28 mAb (1 μ g/mL) によって48時間刺激した。培養上清を収集し、IL-10、IL-4、IL-5、IFN- γ およびIL-22のレベルをELISAによって決定した。全ての試料を、三連で試験した。試験した $n=8$ ドナーの平均値 $\pm$ SDを表す。

10

【図22】図22Aは、FACSによって解析した、第2ラウンドの刺激 (TF2) 後にグランザイムB (GzB) を発現するCD4^{IL-10}細胞のパーセンテージを示す。 $n=7$ のドナーおよび単ードナーの箱ひげ図を示す。図22Bは、CD4^{IL-10}細胞 (10⁵個/ウェル) をK562およびALL-CM細胞 (10⁵個/ウェル) と1:1の比で3日間共培養した場合の%死細胞を示す。箱ひげ図は、 $n=4$ のドナーからのデータを表し、ドットは、単ードナーからのデータを表す。

【図23-A】図23Aおよび23Bは、単ードナーCD4^{IL-10}細胞が、同種CD4⁺T細胞の増殖を抑制することができることを示す。同種PBMC細胞を、eFluor (登録商標) 670 (10⁵個/ウェル) によって標識し、CD4^{IL-10}細胞 (10⁵個/ウェル) の非存在下または存在下で同種成熟樹状 (DC) 細胞 (5 $\times$ 10⁴個/ウェル) および可溶性抗CD3 mAbによって1:1のレスポナー: サプレッサー比で刺激した。4日間培養後、増殖性のレスポナー細胞のパーセンテージを、CD4⁺ Δ NGFR-T細胞に関してゲート設定後、フローサイトメトリーによってeFluor (登録商標) 670の希釈により決定した。図23Aは、ドナーC、ドナーE、およびドナーFからの結果を示し、図23Bは、ドナーH、ドナーIおよびドナーLからの結果を示す。増殖および抑制のパーセンテージを示す。CD4^{IL-10}細胞によって媒介される抑制を、以下のように計算した: 100 - ([CD4^{IL-10}細胞の存在下でのレスポナーの増殖/レスポナー単独の増殖] $\times$ 100)。

20

30

【図23-B】図23-Aと同じ。

【図24-A】図24Aおよび24Bは、単ードナーCD4^{IL-10}細胞が、同種CD8⁺T細胞の増殖を抑制することができることを示す。同種PBMC細胞を、eFluor (登録商標) 670 (10⁵個/ウェル) によって標識し、CD4^{IL-10}細胞 (10⁵個/ウェル) の非存在下または存在下で同種成熟樹状 (DC) 細胞 (5 $\times$ 10⁴個/ウェル) および可溶性抗CD3 mAbによって1:1のレスポナー: サプレッサー比で刺激した。4日間培養後、増殖性のレスポナー細胞のパーセンテージを、CD4⁺ Δ NGFR-T細胞に関してゲート設定後、フローサイトメトリーによってeFluor (登録商標) 670の希釈により決定した。図24Aは、ドナーC、ドナーE、およびドナーFからの結果を示し、および図24Bは、ドナーH、ドナーIおよびドナーLからの結果を示す。増殖および抑制のパーセンテージを示す。CD4^{IL-10}細胞によって媒介される抑制を、以下のように計算した: 100 - ([CD4^{IL-10}細胞の存在下でのレスポナーの増殖/レスポナー単独の増殖] $\times$ 100)。

40

【図24-B】図24-Aと同じ。

【図25】図25は、8人の個々のドナーからのCD4^{IL-10}細胞によって産生された平均レベル ($\pm$ SD) と比較した、3回目の再刺激 (TF3) 後のポリドナーCD4^{IL-10}細胞のサイトカイン産生プロファイルを示す。3人のドナーからのTF3 CD4^{IL-10}細胞を1:1:1の比でプールし、固定CD3 (10 μ g/mL) および可溶性CD28 mAb (1 μ g/mL) によって48時間刺激した。培養上清を収集し、IL-10、IL-4、IL-5、IFN-ガンマおよびIL-22レベルをELISA

50

によって決定した。ドットは、ポリドナーCD4⁺IL-1⁰細胞の結果であり；灰色のバーは、n = 8の単一ドナーの平均値±SDを表す。

【図26】図26Aは、プールを生成するために使用したn = 3の単一ドナーのCD4⁺IL-1⁰細胞によるグランザイムB発現の平均%レベル（±SD）と比較した、グランザイムB（GzB）を発現するポリドナーCD4⁺IL-1⁰細胞のパーセンテージを示す。細胞を、3ラウンドの刺激（TF3）後にFACSによって解析した。図26Bは、ポリドナーCD4⁺IL-1⁰細胞（10⁵個／ウェル）をK562およびALL-CM細胞（10⁵個／ウェル）と1：1の比で3日間共培養した場合の%死細胞を示す。残存白血病細胞（CD45⁺CD33⁺）を、各標的細胞に関してFACSによって計数した。ドットは、ポリドナーCD4⁺IL-1⁰の結果であり、灰色のバーは、プールを生成するために使用したn = 3の単一ドナーの平均値±SDを表す。

10

【図27-A】図27Aおよび27Bは、ポリドナーCD4⁺IL-1⁰細胞が、同種CD4⁺T細胞およびCD8⁺T細胞の増殖を抑制することができることを示している。同種PBMC細胞をeFluor（登録商標）670（10⁵個／ウェル）によって標識し、ポリドナーCD4⁺IL-1⁰細胞（10⁵個／ウェル）の非存在下または存在下で、同種成熟樹状（DC）細胞（5×10⁴個／ウェル）および可溶性抗CD3 mAbによって1：1のレスポナー：サプレッサー比で刺激した。4日間培養後、増殖性のレスポナー細胞のパーセンテージを、CD4⁺ΔNGFR⁻T細胞およびCD8⁺ΔNGFR⁻T細胞に関してゲート設定後、フローサイトメトリーによってeFluor（登録商標）670の希釈により決定した。図27Aは、ドナーC、ドナーE、およびドナーFからプールしたCD4⁺細胞を含有するポリドナーCD4⁺IL-1⁰細胞からの結果を示す。図27Bは、ドナーH、ドナーI、およびドナーLからプールしたCD4⁺細胞を含有するポリドナーCD4⁺IL-1⁰細胞からの結果を示す。CD4⁺IL-1⁰細胞によって媒介される抑制を、以下のように計算した：100 - ([CD4⁺IL-1⁰細胞の存在下でのレスポナーの増殖／レスポナー単独の増殖] × 100)。

20

【図27-B】図27-Aと同じ。

【図28】図28は、放射線照射後0日目に注射したヒトPBMCおよび／またはポリドナーCD4⁺IL-1⁰細胞によるGvHDの誘導を試験するためのプロトコルを例証する。

【図29】図29は、PBMC（5×10⁶個／マウス）、ポリドナー（3人のドナー）CD4⁺IL-1⁰細胞（5×10⁶個／マウス）、またはポリドナーCD4⁺IL-1⁰細胞（3人のドナー）（5×10⁶個／マウス）と組み合わせたPBMC（5×10⁶個／マウス）の注射後、各々の日におけるGvHDを実証するNSGマウスの%を示す。

30

【図30】図30は、PBMC（5×10⁶個／マウス）、ポリドナー（3人のドナー）CD4⁺IL-1⁰細胞（5×10⁶個／マウス）、またはポリドナーCD4⁺IL-1⁰細胞（3人のドナー）（5×10⁶個／マウス）と組み合わせたPBMC（5×10⁶個／マウス）を注射したNSGマウスにおけるCD4⁺IL-1⁰細胞の脾臓（左のパネル）および骨髄（右のパネル）への遊走を示す。n = 8のドナーおよび単一ドナーの箱ひげ図を示す。

【図31】図31は、放射線照射後0日目に注射したCD4⁺T細胞およびポリドナーまたは単一ドナー（BC-H）CD4⁺IL-1⁰細胞によるGvHDの誘導を試験するためのプロトコルを例証する。

40

【図32】図32は、注射後の各々の日におけるGvHDを実証するNSGマウスの%を示す。

【図33-A】図33A～33Cは、循環中の白血病細胞の低減および長期間の白血病無病（leukemia free）生存に基づいて試験した移植片対白血病（GvL）効果を示す。白血病を以前に記載されたように（Locafaro G. et al Molecular Therapy 2017）測定した。NSGマウスに致死量下の放射線を照射して、0日目に骨髓性白血病細胞（ALL-CM）（5×10⁶個）を静脈内注射した。図33Aは、実験の例証である。図33Bは、PBMC（5×10⁶個）、または単一ドナー（ドナーBC-Iおよびドナー

50

BC-Hから) $CD4^{IL-10}$ 細胞 (2.5×10^6 個) を3日目に注射した動物の白血病無病生存率を示す。図33Cは、PBM C (5×10^6 個) またはポリドナー $CD4^{IL-10}$ 細胞 (ドナーBC-IおよびドナーBC-Hから) (2.5×10^6 個) を3日目に注射した動物における白血病無病生存率を示す。

【図33-B】図33-Aと同じ。

【図33-C】図33-Aと同じ。

【図34-A】図34A~34Cは、致死量下の放射線を照射し、ALL-CM細胞 (5×10^6 個) を0日目に静脈内注射したNSGマウスにおいて測定した長期間の白血病無病生存率を示す。図34Aは、実験の例証を示す。図34Bは、単核細胞 (PBM C) (5×10^6 個) 単独または単核細胞 (PBM C) (5×10^6 個) + 単一ドナー (ドナーBC-HおよびドナーBC-Iからの) $CD4^{IL-10}$ 細胞 (2.5×10^6 個) を3日目に注射した動物からのデータを示す。図34Cは、単核細胞 (PBM C) (5×10^6 個) 単独、または単核細胞 (PBM C) (5×10^6 個) + ポリドナー $CD4^{IL-10}$ 細胞 (BC-I/H) (2.5×10^6 個) を3日目に注射した動物からのデータを示す。

【図34-B】図34-Aと同じ。

【図34-C】図34-Aと同じ。

【図35-A】図35A~35Gは、 $CD4^{IL-10}$ 細胞によるNLPR3インフラマソーム活性化の阻害を示す。図35Aは、LPS活性化単球によるIL-1 β の産生に及ぼす単一ドナー (#1) からの $CD4^{IL-10}$ 細胞上清の効果を示す。図35Bは、LPS活性化単球によるIL-1 β の産生に及ぼす別の単一ドナー (#2) からの $CD4^{IL-10}$ 細胞上清の効果を示す。図35Cは、NLPR3インフラマソーム活性化剤ニゲリシン (NIG) によって増強されたLPS誘導IL-1 β 産生の阻害に及ぼす単一ドナー (#1) からの $CD4^{IL-10}$ 細胞上清の効果を示す。図35Dは、NLPR3インフラマソーム活性化剤ニゲリシン (NIG) によって増強されたLPS誘導IL-1 β 産生の阻害に及ぼす単一ドナー (#2) からの $CD4^{IL-10}$ 細胞上清の効果を示す。図35Eは、抗IL-10受容体 (抗IL-10R) mAbの存在下または非存在下における単球によるLPS誘導IL-1 β 産生に及ぼす、単一ドナーおよび2人の異なるドナーからプールした細胞からの $CD4^{IL-10}$ 細胞上清の効果を示す棒グラフである。図35Fは、抗IL-10受容体 (抗IL-10R) mAbの存在下または非存在下における単球によるIL-1 β 産生に及ぼすポリドナー $CD4^{IL-10}$ 細胞上清の効果を示す。図35Gは、抗IL-10R mAbの存在下または非存在下でニゲリシンと組み合わせたLPSによって誘導されたIL-18産生に及ぼすポリドナー $CD4^{IL-10}$ 細胞上清の効果を示す。

【図35-B】図35-Aと同じ。

【図35-C】図35-Aと同じ。

【図35-D】図35-Aと同じ。

【図35-E】図35-Aと同じ。

【図35-F】図35-Aと同じ。

【図35-G】図35-Aと同じ。

【図36】図36は、移植片対骨髄性白血病およびxeno-GvHD効果を試験するための実験プロトコルを例証する。NSGマウスに、0日目にALL-CM細胞 (2.5×10^6 個) を静脈内注射した。3日目に、マウスを5群に分け、各群を (i) 対照としての細胞なし、(ii) 同種単核細胞 (PBM C) ; (iii) 同種PBM Cおよびポリドナー $CD4^{IL-10}$ 細胞 (BC-E、BC-V、BC-Tを1:1:1でプールしたもの) ; (iv) 同種PBM Cおよび単一ドナー $CD4^{IL-10}$ 細胞 (BC-E) ; または (v) ポリドナー $CD4^{IL-10}$ 細胞によって、図36に表記の濃度で処置した。

【図37】図37は、単一ドナー (BC-T、BC-V、およびBC-E) およびポリドナー $CD4^{IL-10}$ 細胞 (POOL: BC-E、BC-VおよびBC-Tを1:1:1でプールしたもの) のサイトカイン分泌プロファイルを描写する棒グラフである。

【図38】図38は、同種 $CD4^+$ および $CD8^+$ T細胞の *in vitro* 増殖に及ぼ

す単一ドナー（BC-VおよびBC-E）およびポリドナーCD4⁺IL-1⁰細胞（BC-V/E/Tのプール）の抑制効果を示す。同種PBMC細胞を、eFluor（登録商標）670（ 5×10^4 個/ウェル）によって標識し、CD4⁺IL-1⁰細胞（ 5×10^4 個/ウェル）の非存在下または存在下で、同種成熟樹状（DC）細胞（ 1×10^4 個/ウェル）および可溶性抗CD3 mAbによって1:1のレスポナー：サブレッサー比で刺激した。3日間培養後、増殖性のレスポナー細胞のパーセンテージを、CD4⁺ΔNGFR⁻（上）、またはCD8⁺ΔNGFR⁻（下）T細胞に関してゲート設定後、フローサイトメトリーによってeFluor（登録商標）670の希釈により決定した。図38は、単一ドナーBC-VおよびBC-E、ならびにドナーBC-V、BC-EおよびBC-Tからプールした細胞の結果を示す。増殖および抑制のパーセンテージを示す。CD4⁺IL-1⁰細胞によって媒介される抑制を、以下のように計算した： $100 - ([CD4^+IL-1^0 \text{ 細胞の存在下でのレスポナーの増殖} / \text{レスポナー単独の増殖}] \times 100)$ 。

10

【図39】図39は、単一（BC-EおよびBC-V）またはポリドナーCD4⁺IL-1⁰細胞（BC-E+BC-V+BC-T）と、ALL-CM骨髓腫瘍細胞またはK562細胞との共培養における生存細胞の%を示す。結果は、ALL-CM骨髓腫瘍細胞に対する単一ドナーおよびポリドナーCD4⁺IL-1⁰細胞の選択的細胞傷害効果を示すが、クラスI MHC発現を欠如するK562細胞に対しては細胞傷害効果を示さない。

【図40】図40は、0日目にALL-CM細胞（ 2.5×10^6 個）を静脈内注射したNSGマウスにおいて測定した白血病無病生存率を示す。3日目に、マウスを5群に分け、各群を（i）対照としての細胞なし、（ii）同種単核細胞（PBMC）；（iii）同種PBMCおよびポリドナーCD4⁺IL-1⁰細胞（BC-V/T/ET）；（iv）同種PBMCおよび単一ドナーCD4⁺IL-1⁰細胞（BC-E）；または（v）ポリドナーCD4⁺IL-1⁰細胞によって処置した。グラフは、各群における動物の白血病無病生存率を示す。

20

【図41】図41は、ALL-CM細胞（ 2.5×10^6 個）の注射後、続いて（i）対照としての細胞なし；（ii）同種単核細胞（PBMC）；（iii）同種PBMCおよびポリドナーCD4⁺IL-1⁰細胞（BC-E、BC-V、BC-T）；（iv）同種PBMCおよび単一ドナーCD4⁺IL-1⁰細胞（BC-E）、または（v）ポリドナーCD4⁺IL-1⁰細胞の投与を3日目に行った、各々の日におけるGvHDを示さないNSGマウスの%を示す。

30

【図42】図42は、 2.5×10^6 のPBMC（ドナーC、E、FおよびHに対して同種）を投与したNSGマウスが全て、急性の致死性xeno-GvHDのために22日目に死亡したことを示している。PBMCと組み合わせた単一ドナーCD4⁺IL-1⁰細胞（ロットC）またはポリドナーCD4⁺IL-1⁰細胞（ロットCEFH）の投与はそれぞれ、マウスの75%（3/4マウス）および80%（4/5マウス）において致死性xeno-GvHDの発症を防止した。これに対し、 2.5×10^6 ポリドナーCD4⁺IL-1⁰細胞の導入は、GvHDのいかなる徴候も誘導しなかった。まとめると、これらの結果は、4人の異なるドナーからのポリドナーCD4⁺IL-1⁰細胞が、単一ドナーCD4⁺IL-1⁰細胞より強力に、またはわずかに強力に病原性のヒトT細胞応答を抑制することを示している。PBMC：末梢血単核細胞；GvHD：移植片対宿主病。

40

【図43-A】図43Aは、ヒト（配列番号1）、ハツカネズミ（*Mus musculus*）、「MOUSE」（配列番号58）；ドブネズミ（*Rattus norvegicus*）、「RAT」（配列番号59）；アカゲザル（*Macaca mulatta*）、「MACMU」（配列番号60）；ニシゴリラ（*Gorilla gorilla*）、「GORILLA」（配列番号61）；カニクイザル（*Macaca fascicularis*）、「CYN0」（配列番号62）；アヌビスヒヒ（*Papio Anubis*）、「OLIVE BABOON」（配列番号63）；ボノボ（*Pan paniscus*）、「BONOBO」（配列番号64）；チンパンジー（*Pan troglodytes*）、「CHIMP」（配列番号65）；およびEBVB9（配列番号66）を含む様々な種のIL-10タンパク質配列のアライメントを示す。

50

【図４３－Ｂ】図４３Ｂは、ヒトＩＬ－１０の１つまたは複数のアミノ酸を、対応する位置でウイルスＩＬ－１０（ＥＢＶＢ９）のアミノ酸に置換することによって生成されたＩＬ－１０バリエーションの配列を提供する。同様に、例示的なバリエーションである、可能性があるｈｕＩＬ－１０ハイブリッド＃１（配列番号６７）および可能性があるｈｕＩＬ－１０ハイブリッド＃２（配列番号６８）の配列も提供する。「＊」は、置換された１つまたは複数のアミノ酸位置を示す。「＃」は、ＩＬ－１０ハイブリッド＃２（配列番号６８）に関する好ましいＩ１０５からＡ１０５へのアミノ酸置換を示す。

【図４３－Ｃ】図４３Ｃは、ヒトＩＬ－１０（配列番号１）とＩＬ１０ ＥＢＶＢ９（配列番号６６）とのアライメントを示す。「＊」は、ＩＬ－１０ハイブリッド＃１において置換された１つまたは複数のアミノ酸位置を示す。「＃」は、ＩＬ－１０ハイブリッド＃２に関する好ましいＩ１０５からＡ１０５へのアミノ酸置換を示す。

10

【発明を実施するための形態】

【０２３８】

図面は、単なる例証目的で本発明の様々な実施形態を描写する。当業者は、本明細書に例証した構造および方法の代替の実施形態が、本明細書に記載される本発明の原理から逸脱することなく使用され得ることを、以下の考察から容易に認識するであろう。

【０２３９】

６．詳細な説明

６．１．定義

特に定義していない限り、本明細書で使用される全ての科学技術用語は、本発明が属する当業者によって一般的に理解される意味を有する。本明細書で使用される場合、以下の用語は、以下に割り当てられる意味を有する。

20

【０２４０】

「移植片対白血病効果」または「ＧｖＬ」は、同種造血幹細胞移植（ＨＳＣＴ）または骨髓移植（ＢＭＴ）後に出現する効果を指す。同種移植片中のＴリンパ球は、悪性の残存宿主白血病細胞を排除する。

【０２４１】

「移植片対腫瘍効果」または「ＧｖＴ」は、同種造血幹細胞移植（ＨＳＣＴ）または骨髓移植（ＢＭＴ）後に出現する効果を指す。同種移植片中のＴリンパ球は、悪性の残存宿主がん細胞、例えば骨髓腫ならびにリンパ性白血病および骨髓性白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫、およびおそらく乳がんの細胞を排除する。用語ＧｖＴは、ＧｖＬの一般形である。

30

【０２４２】

用語「処置」、「処置する」、および同様のものは、本明細書において医学の技術分野で理解されるその最も広い意味で使用される。特に、用語は一般的に、所望の薬理学的効果および／または生理学的効果を得ることを意味する。「処置」は、本明細書で使用される場合、哺乳動物、特にヒトの疾患または状態の任意の処置をその範囲に含み、（ａ）疾患もしくは状態に対して素因を有し得るが、まだそれを有すると診断されていない対象に疾患もしくは状態が起こるのを防止すること；（ｂ）疾患もしくは状態を阻害すること（例えば、その発症を停止させること）；または（ｃ）疾患もしくは状態を軽減すること（例えば、疾患または状態の退縮を引き起こすこと、１つまたは複数の症状の改善を提供すること）を含む。任意の状態の改善は、当技術分野で公知の標準的な方法および技術に従って容易に評価することができる。疾患の方法によって処置される対象集団は、望ましくない状態または疾患に罹っている対象、ならびに状態または疾患の発症のリスクがある対象を含む。

40

【０２４３】

「ＨＬＡ一致」とは、本明細書で使用される場合、ＨＬＡクラスＩ（ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、およびＨＬＡ－Ｃ）およびクラスＩＩ（ＨＬＡ－ＤＲＢ１およびＨＬＡ－ＤＱＢ１）座において、個体を互いに免疫学的に適合性にする、一致するＨＬＡ対立遺伝子を有する個体のペアを指す。ＨＬＡ適合性は、当技術分野で利用可能な方法のいずれか、例え

50

ば参照により本明細書に組み込まれる、Tiervy, Haematologica 2016 Volume 101(6):680-687に記載される方法を使用して決定することができる。

【0244】

所定の座に関して、個体のペアは、1人の個体の2つの対立遺伝子の各々が他の個体の2つの対立遺伝子と一致する場合、2/2の一致を有する。個体のペアは、1人の個体の2つの対立遺伝子の1つのみが他の個体の2つの対立遺伝子の1つと一致する場合、1/2の一致を有する。個体のペアは、1人の個体の10個の対立遺伝子（HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、およびHLA-DQB1座の各々の2つ）の全てが、他の個体の10個全ての対立遺伝子と一致する場合、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、およびHLA-DQB1座で10/10の一致を有する。

10

【0245】

好ましい実施形態では、対立遺伝子レベルタイピングを、HLA適合度の決定のために使用する。対立遺伝子レベルタイピングは、第1、第2、第3、および第4区域における全ての桁、例えばA*02:01:01:01を使用することによって定義される、HLA遺伝子の一意的ヌクレオチド配列に対応する。機能的には、それぞれコード配列におけるサイレント置換および非コード配列における置換によって異なる対立遺伝子の特徴付ける第3および第4区域は、置換がHLA対立遺伝子の発現を防止する場合（例えば、無効対立遺伝子B*15:01:01:02N）を除き無関係である。無効対立遺伝子の欠失は、アロ反応性T細胞によって認識される可能性が非常に高い不一致をもたらし、有害な臨床上的影響を有する。非コード配列における置換は、発現レベルに影響を及ぼし得る（例えば、A24low対立遺伝子A*24:02:01:02L）。そのような多様性もまた、抗HLAアロ認識に影響を及ぼし得る。

20

【0246】

用語「HLA不一致」は、本明細書で使用される場合、個体を互いに免疫学的に不適合にする、HLAクラスI（HLA-A、HLA-B、およびHLA-C）およびクラスII（HLA-DRB1およびHLA-DQB1）座に不一致のHLA対立遺伝子を有する個体のペアを指す。

【0247】

用語「部分的HLA不一致」は、本明細書で使用される場合、個体を互いに許容可能な程度に免疫学的に不適合にする、HLAクラスI（HLA-A、HLA-B、およびHLA-C）およびクラスII（HLA-DRB1およびHLA-DQB1）座に不一致のHLA対立遺伝子を有する個体のペアを指す。一部の研究は、許容される不一致を同定している。一部のHLAクラスI不適合は、より許容されると考えられる。

30

【0248】

「HLAハプロタイプ」は、母親から受け継がれた1つおよび父親から受け継がれた1つの染色体による一連のHLA座対立遺伝子を指す。HLAクラスI（HLA-A、HLA-B、およびHLA-C）およびクラスII（HLA-DRB1およびHLA-DQB1）座の遺伝子型を使用して、HLAハプロタイプを決定することができる。

【0249】

用語「治療有効量」は、疾患の症状を処置するため、およびこのように改善するために有効である量である。

40

【0250】

用語「予防有効量」は、疾患、状態、またはその症状の完全または部分的な防止に関して効果を有する量である。

【0251】

用語「改善する」は、予防、重症度もしくは進行を弱めること、寛解、またはその治療を含む、疾患状態、例えば神経変性疾患状態の処置における任意の治療的有益な結果を指す。

【0252】

用語「CD4IL-10/CAR」は、キメラ抗原受容体を発現するように遺伝子改変さ

50

れた任意の $CD4^{+}IL-10$ 細胞を指す。 $CD4^{+}IL-10/CAR$ が、特定のキメラ抗原受容体を指す場合、命名は、 CAR の特異性の呼称、例えば「 $CD4^{+}IL-10/抗[抗原]$ CAR 」細胞を含み得る。例えば、 $CD4^{+}IL-10/CAR$ および $CD4^{+}IL-10/CD19^{+}CAR$ は、互換的に使用され得る。

【0253】

用語「自己」は、本明細書で使用される場合、細胞が再導入される同じ個体（例えば、患者）に由来する細胞を指す。

【0254】

用語「同種」は、本明細書で使用される場合、遺伝的に同一ではない同じ種の2つまたはそれより多くの異なる個体から採取した細胞を指す。

【0255】

6.2. 他の解釈上の慣例

本明細書で列挙した範囲は、列挙した終点を含む範囲内の値の全ての短縮形であると理解される。例えば、1～50の範囲は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、および50からなる群からの任意の数、数の組合せ、または部分範囲を含むと理解される。

【0256】

6.3. $CD4^{+}IL-10/CAR$ 細胞

第1の態様では、 CAR をコードする第1の外因性ポリヌクレオチドからキメラ抗原受容体 (CAR) を発現するように、および $IL-10$ をコードする第2の外因性ポリヌクレオチドから $IL-10$ を発現するように遺伝子改変されている $CD4^{+}T$ 細胞または $CD4^{+}T$ 細胞集団 ($CD4^{+}IL-10/CAR$ 細胞) を記載する。

【0257】

6.3.1. $CD4^{+}T$ 細胞および T 細胞ドナー

$CD4^{+}IL-10/CAR$ (自己、または同種単一ドナー $CD4^{+}IL-10/CAR$ または同種ポリドナー $CD4^{+}IL-10/CAR$) 集団を生成するために使用される $CD4^{+}T$ 細胞は、当技術分野で利用可能な方法を使用して、ドナー、好ましくはヒトドナーの末梢血、臍帯血、または他の血液試料から単離することができる。典型的な実施形態では、 $CD4^{+}T$ 細胞は、末梢血から単離される。ある特定の実施形態では、 $CD4^{+}T$ 細胞は、ロイコフェレーシスおよびバフィーコートを使用して単離される。ある特定の実施形態では、 $CD4^{+}T$ 細胞は、第三者から得た末梢血から単離される。

【0258】

一部の実施形態では、 $CD4^{+}T$ 細胞は、血液の事前凍結保存物、または末梢血単核細胞 (PBMC) の事前凍結保存物、または $CD4^{+}T$ 細胞の事前凍結保存物から単離される。一部の実施形態では、 $CD4^{+}T$ 細胞は、事前に凍結されていない末梢血または PBMC から単離される。一部の実施形態では、 $CD4^{+}T$ 細胞は、個々のドナーから得た血液または PBMC から個別に単離された後、プールされる。一部の実施形態では、 $CD4^{+}T$ 細胞は、複数のドナーから最初にプールされている血液または PBMC から単離される。

【0259】

一部の実施形態では、 $CD4^{+}T$ 細胞は、単一の T 細胞ドナーから得られる。一部の実施形態では、 $CD4^{+}T$ 細胞は、2、3、4、5、6、7、8、9、または10人の異なる T 細胞ドナーから得られる。

【0260】

一部の実施形態では、 $CD4^{+}T$ 細胞は、 $CD4^{+}IL-10/CAR$ 細胞によって処置される患者から得られる。

【0261】

一部の実施形態では、1人または複数の T 細胞ドナーは、遺伝子型とは無関係に選択さ

10

20

30

40

50

れる。一部の実施形態では、1人または複数のT細胞ドナーは、遺伝子型に基づいて選択される。

【0262】

ある特定の実施形態では、1人または複数のT細胞ドナーは、そのHLAハプロタイプに基づいて選択される。

【0263】

一部の実施形態では、少なくとも2人の異なるT細胞ドナーの一部または全ては、一致するHLAハプロタイプを有する。一部の実施形態では、少なくとも2人の異なるT細胞ドナーの一部または全ては、不一致のHLAハプロタイプを有する。

【0264】

一部の実施形態では、集団中のCD4⁺T細胞は全て、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、およびHLA-DQB1座で互いに対して少なくとも1/10、2/10、3/10、4/10、5/10、6/10、7/10、8/10、または9/10の一致を有する。一部の実施形態では、集団中のCD4⁺T細胞は全て、HLA-A、HLA-B、HLA-C、およびHLA-DRB1座で互いに対して少なくとも1/8、2/8、3/8、4/8、5/8、6/8、7/8、または8/8の一致を有する。一部の実施形態では、集団中のCD4⁺T細胞は全て、HLA-A座で互いに対して2/2の一致を有する。一部の実施形態では、集団中のCD4⁺T細胞は全て、HLA-B座で互いに対して2/2の一致を有する。一部の実施形態では、集団中のCD4⁺T細胞は全て、HLA-C座で互いに対して2/2の一致を有する。一部の実施形態では、集団中のCD4⁺T細胞は全て、HLA-DRB1およびHLA-DQB1座で互いに対して少なくとも3/4または4/4の一致を有する。一部の実施形態では、集団中のCD4⁺T細胞は全て、A*02対立遺伝子、またはA*24対立遺伝子を有する。

【0265】

一部の実施形態では、1人または複数のT細胞ドナーのいずれも、CD4⁺IL-10/CA^R細胞によって処置される宿主ではない。一部の実施形態では、1人または複数のT細胞ドナーのいずれも、本明細書に記載される処置の方法においてCD4⁺IL-10/CA^R細胞と共に使用される幹細胞（例えば、HSC）、組織、または臓器のドナーではない。一部の実施形態では、T細胞ドナーの1人または複数は、CD4⁺IL-10/CA^R細胞によって処置される宿主である。

【0266】

一部の実施形態では、T細胞ドナーの1人または複数は、処置される患者（宿主）に対してHLA不一致であるか、または部分的にHLA不一致である。一部の実施形態では、T細胞ドナーの1人または複数は、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、およびHLA-DQB1座で患者に対して5/10、6/10、7/10、8/10、9/10、または10/10未満の一致を有する。一部の実施形態では、T細胞ドナーの1人または複数は、HLA-A、HLA-B、HLA-C、およびHLA-DRB1座で患者に対して4/8、5/8、6/8、7/8、または8/8未満の一致を有する。一部の実施形態では、T細胞ドナーの1人または複数は、HLA-A、HLA-B、またはHLA-C座で患者に対して2/2未満の一致を有する。一部の実施形態では、T細胞ドナーの1人または複数は、HLA-DRB1およびHLA-DQB1座で患者に対して2/4、3/4、または4/4未満の一致を有する。

【0267】

一部の実施形態では、T細胞ドナーの1人または複数は、HSCドナーとHLA不一致であるか、または部分的にHLA不一致である。一部の実施形態では、T細胞ドナーの1人または複数は、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、およびHLA-DQB1座でHSCドナーに対して5/10、6/10、7/10、8/10、9/10、または10/10未満の一致を有する。一部の実施形態では、T細胞ドナーの1人または複数は、HLA-A、HLA-B、HLA-C、およびHLA-DRB1座でHSCドナーに対して4/8、5/8、6/8、7/8、または8/8未満の一致を有する。

一部の実施形態では、T細胞ドナーの1人または複数は、HLA-A、HLA-B、またはHLA-C座でHSCドナーに対して2/2未満の一致を有する。一部の実施形態では、T細胞ドナーの1人または複数は、HLA-DRB1およびHLA-DQB1座でHSCドナーに対して3/4または4/4未満の一致を有する。

【0268】

好ましい実施形態では、CD4⁺T細胞はいずれも不死化されない。

【0269】

6.3.2. CARをコードする外因性ポリヌクレオチド

本開示のCD4⁺IL10⁺/CAR細胞は、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする第1の外因性ポリヌクレオチドセグメントを発現するように遺伝子改変されているCD4⁺T細胞である。CARは、4つの主成分：抗原結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを有するモジュール設計を有する。これらのエレメントの各々は、別個の機能を有し、CARの最適な分子設計は、Rafiq et al. (Nat. Rev. Clin. Oncol., 17: 147-167(2020)、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)に記載されているように構成成分のタンパク質ドメインの多くの多様性を通して達成することができる。

【0270】

一部の実施形態では、CARコードポリヌクレオチドセグメントは、第1世代CAR、第2世代CAR、または第3世代CARをコードする。一部の実施形態では、第1世代CARは、抗原結合ドメイン、ヒンジ領域、膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態では、第2世代CARは、抗原結合ドメイン、ヒンジ領域、膜貫通ドメイン、共刺激ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。第2世代CARの非限定的な例としては、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2004/0043401号明細書、第2013/0287748号明細書、第2014/0227237号明細書、第2014/0099309号明細書、および第2014/0050708号明細書；国際公開第2012/079000号パンフレット；および国際公開第2015/157252号パンフレットに記載されるものが挙げられる。

【0271】

一部の実施形態では、第2世代CARはpCARである。一部の実施形態では、pCARは、(i)(a)シグナル伝達領域；(b)共刺激シグナル伝達領域；(c)膜貫通ドメイン；および(d)標的抗原上の第1のエピトープと特異的に相互作用する第1の結合エレメント；ならびに(ii)(e)(b)の領域とは異なる共刺激シグナル伝達領域；(f)膜貫通ドメイン；および(g)第2の標的抗原上の第2のエピトープと特異的に相互作用する第2の結合エレメントを含むキメラ共刺激受容体(CCR)を含む第2世代CARを含む。pCARの非限定的な例は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第10,703,794号明細書に記載されるものである。

【0272】

一部の実施形態では、第3世代CARは、抗原結合ドメイン、ヒンジ領域、膜貫通ドメイン、第1の共刺激ドメインおよび第2の共刺激ドメイン、ならびに細胞内シグナル伝達ドメインを含む。第3世代CARの非限定的な例としては、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2014/0322275号明細書；第2019/0345217号明細書；第2019/0112380号明細書；および第2020/0031904号明細書に記載されるものが挙げられる。

【0273】

一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、一本鎖抗体断片(例えば、scFv)、ナノボディ(例えば、ラクダ科のV_HHドメイン)、サイトカイン、リガンド、またはペプチド(アデネクチンおよびDARPin)を含む。

【0274】

6.3.2.1. 抗原結合ドメイン

一部の実施形態では、CARの抗原結合ドメインは、一本鎖抗体断片を含む。一部の実施形態では、一本鎖抗体断片は一本鎖Fv (scFv) を含む。

【0275】

一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、自己免疫疾患、炎症障害、またはがんに関連する抗原を標的とする。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、自己抗原を標的とする。

【0276】

一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、自己免疫疾患、または炎症障害に関連する抗原を標的とする。一部の実施形態では、自己免疫疾患または炎症障害に関連する抗原は、関連するMHC分子の文脈で、これらに限定されないが、抗HLA-A*02、抗HLA-A*24、またはシトルリン化ペプチド、インスリン、MOG、GAD65、IA2、グリアジン、およびデスモグレインからなる群から選択される。一部の実施形態では、自己免疫疾患または炎症障害に関連する抗原は、CD19、CD20、CD22、CD27、BCMAおよびCD38からなる群から選択される。

【0277】

一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、がん関連抗原を標的とする。一部の実施形態では、がん関連抗原は、CD19、CD20、CD22、BCMA、B7-H3、CEA、BCMA、CD23、Lym1、Lym2、CLEC5A、CDH179b、FLT3、GCC、Muc、CSF2RA、GFRA4、CD32、CD33、IL11Ra、IL13Ra、NYBRI、SLea、CD200R、TGFBetaR2、CD276、TROP2、LAMP1、PTK7、DLL3、CDH1、CDH6、CDH17、CDH19、TSHRおよびチロシナーゼからなる群から選択される。

【0278】

一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、B細胞抗原を標的とする。一部の実施形態では、B細胞抗原は、例えば図4に示すように、B細胞分化の間のその発現に部分的に基づいて選択される。B細胞抗原を標的とする抗原結合ドメインの非限定的な例は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第2020/010235号パンフレットに記載される。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、CD19を標的とする。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、CD20を標的とする。一部の実施形態では、抗原結合ドメインはCD22を標的とする。一部の実施形態では、抗原結合ドメインはBCMAを標的とする。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、B7-H3を標的とする。一部の実施形態では、抗原結合ドメインはCD27を標的とする。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、CD38を標的とする。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、B細胞成熟抗原 (BCMA) を標的とする。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、癌胎児性抗原 (CEA) を標的とする。

【0279】

一部の実施形態では、一本鎖抗体断片は、CD19 (例えば、表面抗原分類19タンパク質 (CD19) (例えば、OMIM受託番号107265)) に結合する一本鎖Fv (scFv) を含む。

【0280】

一部の実施形態では、CD19を標的とするscFvは、抗ヒトCD19特異的mAbクローンFMC63に由来する (Nicholson et al., Mol. Immunol., 34(16-17): 1157-65(1997)、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)。一部の実施形態では、CD19を標的とするscFvは、その各々の全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2018/0355052号明細書、または第2020/0392200号明細書、または国際公開第2020/010235号パンフレットに記載されている。

【0281】

一部の実施形態では、抗CD19抗原結合ドメインは、配列番号11の配列を含む。一部の実施形態では、抗CD19抗原結合ドメインは、配列番号11と少なくとも80%、

85%、90%、95%、98%、または99%配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、抗CD19抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドセグメントは、配列番号12を含む。一部の実施形態では、抗CD19抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドセグメントは、配列番号12と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%配列同一性を有する配列を含む。

【0282】

一部の実施形態では、抗CD19抗原結合ドメインは、配列番号13と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%配列同一性を有する配列を含む重鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、抗CD19抗原結合ドメインは、配列番号14と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%配列同一性を有する配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、抗CD19抗原結合ドメインは、配列番号13と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%配列同一性を有する配列を含む重鎖可変ドメイン、および配列番号14と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%配列同一性を有する配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【0283】

一部の実施形態では、一本鎖抗体断片は、CD20（例えば、表面抗原分類20タンパク質（CD20）（例えば、OMIM受託番号112210））に結合する一本鎖Fv（scFv）を含む。CD20を標的とするscFvの非限定的な例としては、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第2020/010235号パンフレットおよび米国特許出願公開第2020/0392200号明細書に記載されるものが挙げられる。

【0284】

一部の実施形態では、抗CD20抗原結合ドメインは、配列番号18の配列を含む。一部の実施形態では、抗CD20抗原結合ドメインは、配列番号18と少なくとも90%、95%、98%、または99%配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、抗CD20抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドセグメントは、配列番号19を含む。一部の実施形態では、抗CD20抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドセグメントは、配列番号19と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%配列同一性を有する配列を含む。

【0285】

一部の実施形態では、抗CD20抗原結合ドメインは、配列番号20と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%配列同一性を有する配列を含む重鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、抗CD20抗原結合ドメインは、配列番号21と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%配列同一性を有する配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、抗CD20抗原結合ドメインは、配列番号20と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%配列同一性を有する配列を含む重鎖可変ドメイン、および配列番号21と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%配列同一性を有する配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【0286】

一部の実施形態では、一本鎖抗体断片は、CD22（例えば、表面抗原分類22タンパク質（CD22）（例えば、OMIM受託番号107266））に結合する一本鎖Fv（scFv）を含む。CD22を標的とするscFvの非限定的な例としては、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第2020/010235号パンフレットおよび米国特許出願公開第2020/0392200号明細書に記載されるものが挙げられる。

【0287】

一部の実施形態では、抗CD22抗原結合ドメインは、配列番号24の配列を含む。一部の実施形態では、抗CD22抗原結合ドメインは、配列番号24と少なくとも80%、

85%、90%、95%、98%、または99%配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、抗CD22抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドセグメントは、配列番号25を含む。一部の実施形態では、抗CD22抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドセグメントは、配列番号25と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%配列同一性を有する配列を含む。

【0288】

一部の実施形態では、抗CD22抗原結合ドメインは、配列番号26と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%配列同一性を有する配列を含む重鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、抗CD22抗原結合ドメインは、配列番号27と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%配列同一性を有する配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、抗CD22抗原結合ドメインは、配列番号26と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%配列同一性を有する配列を含む重鎖可変ドメイン、および配列番号27と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%配列同一性を有する配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【0289】

一部の実施形態では、一本鎖抗体断片は、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー17 (TNFRSF17) としても公知であるB細胞成熟抗原 (BCMA) に結合する一本鎖Fv (scFv) を含む。

【0290】

BCMAを標的とするscFvの非限定的な例としては、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第9765342号明細書または国際公開第2010/104949号パンフレットに記載されるものが挙げられる。例えば国際公開第2010/104949号パンフレットに記載されるように、抗BCMA scFvは、A7D12.2、C11D5.3、C12A3.2、またはC13F12.1抗体の抗原結合ドメインを含み得る。

【0291】

一部の実施形態では、抗BCMA抗原結合ドメインは、配列番号50または52と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%配列同一性を有する配列を含む重鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、抗BCMA抗原結合ドメインは、配列番号51または53と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%配列同一性を有する配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、抗BCMA抗原結合ドメインは、配列番号50または52と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%配列同一性を有する配列を含む重鎖可変ドメイン、および配列番号51または53と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%配列同一性を有する配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【0292】

一部の実施形態では、一本鎖抗体断片は、CD276 (例えば、表面抗原分類276タンパク質 (CD276) (例えば、OMIM受託番号605715)) としても公知のB7-H3に結合する一本鎖Fv (scFv) を含む。

【0293】

B7-H3を標的とするscFvの非限定的な例としては、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2016/0053017号明細書および第2018/0346544号明細書に記載されるものが挙げられる。例えば、米国特許出願公開第2018/0346544号明細書に記載されるように、抗CD276 scFvは、MGA271 (CD276.MG)、CD276.N1、CD276.N2、CD276.N3、CD276.N4、またはCD276.N5抗体の抗原結合ドメインを含み得る。

【0294】

一部の実施形態では、抗B7-H3抗原結合ドメインは、配列番号36の配列を含む。

一部の実施形態では、抗 B 7-H 3 抗原結合ドメインは、配列番号 36 と少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、または 99 % 配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、抗 B 7-H 3 抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドセグメントは、配列番号 37 を含む。一部の実施形態では、抗 B 7-H 3 抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドセグメントは、配列番号 37 と少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、または 99 % 配列同一性を有する配列を含む。

【0295】

一部の実施形態では、抗 B 7-H 3 抗原結合ドメインは、配列番号 38 と少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、または 99 % 配列同一性を有する配列を含む重鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、抗 B 7-H 3 抗原結合ドメインは、配列番号 39 と少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、または 99 % 配列同一性を有する配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、抗 B 7-H 3 抗原結合ドメインは、配列番号 38 と少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、または 99 % 配列同一性を有する配列を含む重鎖可変ドメイン、および配列番号 39 と少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、または 99 % 配列同一性を有する配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【0296】

一部の実施形態では、一本鎖抗体断片は、CD 27（例えば、OMIM 受託番号 186711）に結合する一本鎖 Fv（scFv）を含む。

【0297】

一部の実施形態では、一本鎖抗体断片は、CD 38（例えば、OMIM 受託番号 107270）に結合する一本鎖 Fv（scFv）を含む。

【0298】

一部の実施形態では、一本鎖抗体断片は、CEA（例えば、癌胎児性抗原タンパク質（CEA）（例えば、OMIM 受託番号 114890））に結合する一本鎖 Fv（scFv）を含む。

【0299】

一部の実施形態では、一本鎖抗体断片は、BCMA（例えば、B 細胞成熟抗原（BCMA）（例えば、OMIM 受託番号 109545））に結合する一本鎖 Fv（scFv）を含む。

【0300】

6.3.2.2. ヒンジ領域

ヒンジ領域は、細胞外抗原結合ドメインを、膜貫通ドメインを通して細胞内シグナル伝達ドメイン（例えば、1 つまたは複数の共刺激ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメイン）に接続する。ヒンジは、立体妨害を克服するために十分な柔軟性および抗原結合ドメインの標的抗原に対するアクセスおよび結合を容易にするために適切な長さを提供する。一部の実施形態では、ヒンジの長さおよび組成の差は、CAR を通しての抗原結合およびシグナル伝達に影響を及ぼし得る。例えば、ヒンジ領域におけるスペーサー配列またはヒンジ領域に追加されたスペーサー配列は、抗原結合ドメインの標的抗原に対するアクセスおよび結合を容易にする。一部の実施形態では、ヒンジ領域は、サイトカイン産生に影響を及ぼす。

【0301】

一部の実施形態では、ヒンジ領域は、ヒト CD 8 ヒンジ領域、ヒト CD 28 ヒンジ領域、IgG 1 ヒンジ領域、または IgG 4 ヒンジ領域から選択される。一部の実施形態では、ヒンジ領域は、ヒト CD 8 に由来する。一部の実施形態では、ヒト CD 8 に由来するヒンジ領域は、配列番号 28 の配列を含む。一部の実施形態では、ヒト CD 8 に由来するヒンジ領域は、配列番号 28 と少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、または 99 % 配列同一性を有する配列を含む。

【0302】

6.3.2.3. 膜貫通ドメイン

膜貫通領域は、CARをCD4IL10/CART細胞に固定する。一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、CARの安定性および機能に影響を及ぼす。

【0303】

一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、TNFRSF19膜貫通ドメイン、CD3ゼータ膜貫通ドメイン、CD8α膜貫通ドメイン、CD4膜貫通ドメイン、CD28膜貫通ドメイン、またはB7ファミリー誘導型共刺激（ICOS）膜貫通ドメインからなる群から選択される。一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、TNFRSF19に由来する。一部の実施形態では、TNFRSF19に由来する膜貫通ドメインは、配列番号29の配列を含む。一部の実施形態では、TNFRSF19に由来する膜貫通ドメインは、配列番号29と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%配列同一性を有する配列を含む。

10

【0304】

6.3.2.4. 細胞内シグナル伝達ドメインおよび共刺激ドメイン

細胞内シグナル伝達ドメインは、CD4IL10/CART細胞を活性化する。一部の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、T細胞の機能、代謝、および存続に関与する。

【0305】

一部の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ（ITAM）を含む。一部の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、2つまたはそれより多くの免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ（ITAM）を含む。一部の実施形態では、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ（ITAM）は、CD3ゼータに由来する。一部の実施形態では、CD3ゼータに由来する細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号30の配列を含む。一部の実施形態では、CD3ゼータに由来する細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号30と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%配列同一性を有する配列を含む。

20

【0306】

一部の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、1つまたは複数の共刺激ドメインをさらに含む。そのような場合、1つまたは複数の共刺激ドメインは、1つまたは複数の共刺激ドメインを含まないCARを含むCD4⁺T細胞と比較してT細胞の活性化、機能、代謝、および存続を増強する。活性化ドメインに加えて共刺激ドメインを含有するCARを有するCD4⁺（例えば、CD4IL10/CAR）T細胞は、IL-2を産生し、繰り返し抗原曝露によって増殖することができる。

30

【0307】

一部の実施形態では、異なる起源（例えば、4-1BBおよびCD28）に由来する共刺激ドメインは、CD4⁺（例えば、CD4IL10/CAR）T細胞において異なる機能および代謝プロファイルを誘導する。例えば、CD28に由来する共刺激ドメインを含むCARを有するCD4⁺（例えば、CD4IL10/CAR）T細胞は、エフェクターメモリーT細胞への分化の増強を経験する。別の例では、4-1BBに由来する共刺激ドメインを含むCARを有するCD4⁺（例えば、CD4IL10/CAR）T細胞は、セントラルメモリーT細胞への分化の増強を経験する。

40

【0308】

一部の実施形態では、1つまたは複数の共刺激ドメインは、4-1BB、CD28、OX40、ICOS、CD27、MYD88-CD40、およびKIR2DS2である。

【0309】

一部の実施形態では、1つまたは複数の共刺激ドメインは、4-1BBに由来する。一部の実施形態では、4-1BBに由来する共刺激ドメインは、配列番号31の配列を含む。一部の実施形態では、4-1BBに由来する共刺激ドメインは、配列番号31と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%配列同一性を有する配列を含む。

【0310】

50

一部の実施形態では、1つまたは複数の共刺激ドメインは、CD28に由来する。一部の実施形態では、1つまたは複数の共刺激ドメインは、CD28共刺激ドメインを含む。一部の実施形態では、CD28に由来する共刺激ドメインは、配列番号32の配列を含む。一部の実施形態では、CD28に由来する共刺激ドメインは、配列番号32と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%配列同一性を有する配列を含む。

【0311】

一部の実施形態では、CARは2つの共刺激ドメインを含む。一部の実施形態では、CARは、4-1BBに由来する共刺激ドメインを含む第1の共刺激ドメイン、およびCD28共刺激ドメインに由来する共刺激ドメインを含む第2の共刺激ドメインを含む。

10

【0312】

6.3.2.5. キメラ抗原受容体 (CAR)

一部の実施形態では、CARをコードするポリヌクレオチドセグメントは、自己免疫疾患、炎症障害、またはがんに関連する抗原を標的とする抗原結合ドメインを含むCARをコードする。

【0313】

一部の実施形態では、CARをコードするポリヌクレオチドセグメントは、自己免疫疾患、または炎症障害に関連する抗原を標的とする抗原結合ドメインを含むCARをコードする。一部の実施形態では、自己免疫疾患または炎症障害に関連する抗原は、関連するMHC分子の文脈において、これらに限定されないが、抗HLA-A*02、抗HLA-A*24、またはシトルリン化ペプチド、インスリン、MOG、GAD65、IA2、グリアジン、およびデスモグレインからなる群から選択される。

20

【0314】

一部の実施形態では、CARをコードするポリヌクレオチドセグメントは、がん関連抗原を標的とする抗原結合ドメインを含むCARをコードする。一部の実施形態では、がん関連抗原は、CD19、CD20、CD22、B7-H3、CEA、BCMA、CD23、Lym1、Lym2、CLEC5A、CDH179b、FLT3、GCC、Muc、CSF2RA、GFRa4、CD32、CD33、IL1LRa、IL13Ra、NYBR1、SLea、CD200R、TGFBetaR2、CD276、TROP2、LAMP1、PTK7、DLL3、CDH1、CDH6、CDH17、CDH19、TSHRおよびチロシナーゼからなる群から選択される。

30

【0315】

一部の実施形態では、CARをコードするポリヌクレオチドセグメントは、B細胞抗原を標的とする抗原結合ドメインを含むCARをコードする。一部の実施形態では、B細胞抗原は、例えば図4に示されるように、B細胞分化の間のその発現に一部基づいて選択される。B細胞抗原を標的とする抗原結合ドメインの非限定的な例は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第2020/010235号パンフレットに記載されている。一部の実施形態では、抗原結合ドメインはCD19を標的とする。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、CD20を標的とする。一部の実施形態では、抗原結合ドメインはCD22を標的とする。一部の実施形態では、抗原結合ドメインはB7-H3を標的とする。一部の実施形態では、抗原結合ドメインはCD27を標的とする。一部の実施形態では、抗原結合ドメインはCD38を標的とする。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、B細胞成熟抗原(BCMA)を標的とする。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、癌胎児性抗原(CEA)を標的とする。

40

【0316】

一部の実施形態では、CARをコードするポリヌクレオチドセグメントは、抗CD19抗原結合ドメインを含むCARをコードする。一部の実施形態では、CARをコードするポリヌクレオチドセグメントは、抗CD19抗原結合ドメインを含む第2世代CARをコードする。一部の実施形態では、CARをコードするポリヌクレオチドセグメントは、抗CD19抗原結合ドメインを含む第3世代CARをコードする。

50

【0317】

一部の実施形態では、CARをコードするポリヌクレオチドセグメントは、抗CD19抗原結合ドメイン、ヒンジ領域、膜貫通ドメイン、共刺激ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む抗CD19 CARをコードする。一部の実施形態では、CARをコードするポリヌクレオチドセグメントは、抗CD19抗原結合ドメイン；ヒトCD8ヒンジ領域；TNFRSF19膜貫通領域；4-1BB共刺激ドメイン；およびCD3ゼータ鎖細胞内シグナル伝達ドメインをコードする。一部の実施形態では、抗CD19 CARは、配列番号9の配列を含む。一部の実施形態では、抗CD19 CARは、配列番号9と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、第1の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、配列番号10の配列を含む。一部の実施形態では、第1の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、配列番号10と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%配列同一性を有する配列を含む。

10

【0318】

抗CD19抗原結合ドメインを含むCARの非限定的な例としては、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2020/0392200号明細書、国際公開第2020/010235号パンフレット、または国際公開第2012/079000号パンフレットが挙げられる。

【0319】

一部の実施形態では、CARをコードするポリヌクレオチドセグメントは、抗CD20抗原結合ドメインを含むCARをコードする。一部の実施形態では、CARをコードするポリヌクレオチドセグメントは、抗CD20抗原結合ドメインを含む第2世代CARをコードする。一部の実施形態では、CARをコードするポリヌクレオチドセグメントは、抗CD20抗原結合ドメインを含む第3世代CARをコードする。

20

【0320】

一部の実施形態では、CARをコードするポリヌクレオチドセグメントは、抗CD20抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、共刺激ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む抗CD20 CARをコードする。一部の実施形態では、CARをコードするポリヌクレオチドセグメントは、抗CD20抗原結合ドメイン；ヒトCD8膜貫通領域；4-1BB共刺激ドメイン；およびCD3ゼータ鎖細胞内シグナル伝達ドメインをコードする。一部の実施形態では、抗CD20 CARは、配列番号16の配列を含む。一部の実施形態では、抗CD20 CARは、配列番号16と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、第1の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、配列番号17の配列を含む。一部の実施形態では、第1の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、配列番号17と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%配列同一性を有する配列を含む。

30

【0321】

抗CD20抗原結合ドメインを含むCARの非限定的な例としては、その両方の全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2020/0392200号明細書、または国際公開第2020/010235号パンフレットが挙げられる。

40

【0322】

一部の実施形態では、CARをコードするポリヌクレオチドセグメントは、抗CD22抗原結合ドメインを含むCARをコードする。一部の実施形態では、CARをコードするポリヌクレオチドセグメントは、抗CD22抗原結合ドメインを含む第2世代CARをコードする。一部の実施形態では、CARをコードするポリヌクレオチドセグメントは、抗CD22抗原結合ドメインを含む第3世代CARをコードする。

【0323】

一部の実施形態では、抗CD22 CARは、配列番号22の配列を含む。一部の実施形態では、抗CD22 CARは、配列番号22と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、第1

50

の外因性ポリヌクレオチドセグメントは配列番号 23 の配列を含む。一部の実施形態では、第 1 の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、配列番号 23 と少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、または 99 % 配列同一性を有する配列を含む。

【0324】

抗 CD 22 CAR を含む CAR の非限定的な例としては、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第 2020/010235 号パンフレットおよび米国特許出願公開第 2020/039220 号明細書に記載されるものが挙げられる。

【0325】

抗 B7-H3 CAR を含む CAR の非限定的な例としては、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第 2016/0053017 号明細書、第 2017/0369585 号明細書、および第 2018/0346544 号明細書に記載されるものが挙げられる。

10

【0326】

一部の実施形態では、CAR をコードするポリヌクレオチドセグメントは、抗 B7-H3 抗原結合ドメインを含む CAR をコードする。一部の実施形態では、CAR をコードするポリヌクレオチドセグメントは、抗 B7-H3 抗原結合ドメインを含む第 2 世代 CAR をコードする。一部の実施形態では、CAR をコードするポリヌクレオチドセグメントは、抗 B7-H3 抗原結合ドメインを含む第 3 世代 CAR をコードする。

【0327】

一部の実施形態では、抗 B7-H3 CAR は、配列番号 34 の配列を含む。一部の実施形態では、抗 B7-H3 CAR は、配列番号 34 と少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、または 99 % 配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、第 1 の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、配列番号 35 の配列を含む。一部の実施形態では、第 1 の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、配列番号 35 と少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、または 99 % 配列同一性を有する配列を含む。

20

【0328】

一部の実施形態では、CAR をコードするポリヌクレオチドセグメントは、抗 CD 27 抗原結合ドメインを含む CAR をコードする。一部の実施形態では、CAR をコードするポリヌクレオチドセグメントは、抗 CD 27 抗原結合ドメインを含む第 2 世代 CAR をコードする。一部の実施形態では、CAR をコードするポリヌクレオチドセグメントは、抗 CD 27 抗原結合ドメインを含む第 3 世代 CAR をコードする。

30

【0329】

一部の実施形態では、CAR をコードするポリヌクレオチドセグメントは、抗 CD 38 抗原結合ドメインを含む CAR をコードする。一部の実施形態では、CAR をコードするポリヌクレオチドセグメントは、抗 CD 38 抗原結合ドメインを含む第 2 世代 CAR をコードする。一部の実施形態では、CAR をコードするポリヌクレオチドセグメントは、抗 CD 38 抗原結合ドメインを含む第 3 世代 CAR をコードする。

【0330】

一部の実施形態では、CAR をコードするポリヌクレオチドセグメントは、抗 CEA 抗原結合ドメインを含む CAR をコードする。一部の実施形態では、CAR をコードするポリヌクレオチドセグメントは、抗 CEA 抗原結合ドメインを含む第 2 世代 CAR をコードする。一部の実施形態では、CAR をコードするポリヌクレオチドセグメントは、抗 CEA 抗原結合ドメインを含む第 3 世代 CAR をコードする。

40

【0331】

一部の実施形態では、CAR をコードするポリヌクレオチドセグメントは、抗 BCMA 抗原結合ドメインを含む CAR をコードする。一部の実施形態では、CAR をコードするポリヌクレオチドセグメントは、抗 BCMA 抗原結合ドメインを含む第 2 世代 CAR をコードする。一部の実施形態では、CAR をコードするポリヌクレオチドセグメントは、抗 BCMA 抗原結合ドメインを含む第 3 世代 CAR をコードする。一部の実施形態では、抗 BCMA CAR は、配列番号 41 ~ 49 および 54 の配列を含む。一部の実施形態では

50

、抗BCMA CARは、配列番号41～49および54と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%配列同一性を有する配列を含む。

【0332】

第1の外因性ポリヌクレオチドは、CARのコード配列に作動可能に連結された1つまたは複数の調節エレメント（例えば、本明細書に記載されるまたは当技術分野で公知の任意の調節エレメント）をさらに含む。一部の実施形態では、調節エレメントはプロモーターである。

【0333】

一部の実施形態では、調節エレメントは、CD4⁺T細胞においてCARの発現を方向付けることが可能なプロモーターを含む。一部の実施形態では、プロモーターは、CD4⁺T細胞においてCARの構成的発現を駆動する。一部の実施形態では、プロモーターは、活性化CD4⁺T細胞においてCARの発現を駆動する。

【0334】

一部の実施形態では、第1の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、形質導入が成功したCD4⁺T細胞の選択を許容する選択マーカー（例えば、本明細書に記載されるまたは当技術分野で公知の任意の選択マーカー）をコードするセグメントをさらに含む。

【0335】

一部の実施形態では、第1の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、ベクターを使用してCD4⁺T細胞に送達される。一部の実施形態では、ベクターはプラスミドベクターである。一部の実施形態では、ベクターはウイルスベクターである。一部の実施形態では、ベクターはレトロウイルスベクター（例えば、ガンマレトロウイルスベクター）である。一部の実施形態では、ベクターはレンチウイルスベクターである。

【0336】

一部の実施形態では、第1の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、レンチウイルスベクターを使用してCD4⁺T細胞に送達され、第1の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、レンチウイルスベクター配列を含む。ある特定の実施形態では、参照により本明細書に組み込まれる、Matrai et al., Molecular Therapy 18(3):477-490(2010)（「Matrai」）に開示されるレンチウイルスベクターを使用する。一部の実施形態では、キメラ抗原受容体（CAR）をコードする第1の外因性ポリヌクレオチドセグメント；およびインターロイキン-10（IL-10）をコードする第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、単一のレンチウイルスベクターに存在する。そのような場合、第1の外因性ポリヌクレオチドおよび第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、第1のプロモーターに作動可能に連結される。例えば、レンチウイルスベクターは、ヒトPGKプロモーター、配列内リボソーム進入部位（IRES）を介して第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントに作動可能に連結された第1の外因性ポリヌクレオチド、または自己切断型ペプチド（例えば、2A自己切断型ペプチド）を含む。

【0337】

一部の実施形態では、第1の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、T細胞核ゲノムに組み込まれている。一部の実施形態では、第1の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、核ゲノムに組み込まれていない。一部の実施形態では、第1の外因性のセグメントポリヌクレオチドは、T細胞の細胞質に存在する。

【0338】

6.3.3. IL-10をコードする外因性ポリヌクレオチド

本開示の単ドナーCD4⁺IL-10/CAR細胞またはポリドナーCD4⁺IL-10/CAR細胞は、IL-10をコードする第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントを含むようにさらに遺伝子改変されている。第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、1つまたは複数の調節エレメント（例えば、本明細書に記載されるまたは当技術分野で公知の任意の1つまたは複数の調節エレメント）に作動可能に連結されたIL-10コードポリヌクレオチドセグメントを含む。

【0339】

10

20

30

40

50

IL-10コードポリヌクレオチドセグメントは、ヒト、ボノボ、またはアカゲザルのIL-10をコードし得る。一部の実施形態では、IL-10をコードするポリヌクレオチドセグメントは、配列番号1の配列を有するヒトIL-10をコードする。一部の実施形態では、IL-10をコードするポリヌクレオチドセグメントは、配列番号1と少なくとも90%、95%、98%、または99%配列同一性を有するヒトIL-10のバリエーションをコードする。一部の実施形態では、IL-10をコードするポリヌクレオチドセグメントは、配列番号2のヌクレオチド配列を有する。一部の実施形態では、IL-10をコードするポリヌクレオチドセグメントは、配列番号2と少なくとも90%、95%、98%、または99%配列同一性を有する。

【0340】

一部の実施形態では、外因性ポリヌクレオチドはウイルスIL-10をコードする。様々な実施形態では、外因性ポリペプチドは、HCMV、GMCMV、RhCMV、BaCMV、MOCMV、SMCMV、EBV、ボノボHV、BaLCV、OvHV-2、EHV-2、CyHV-3、AngHV-1、ORFV、BPSV、PCPV、LSDV、SPV、GPV、またはCNPVからのIL-10をコードする。一部の実施形態では、外因性ポリペプチドは、EBVまたはORFVからのウイルスIL-10をコードする。

【0341】

一部の実施形態では、ウイルスIL-10は、配列番号6の配列を含む。一部の実施形態では、ウイルスIL-10は、配列番号6または18と少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%、98%、または99%配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、ウイルスIL-10をコードする外因性ポリペプチドは、配列番号7の配列を含む。一部の実施形態では、ウイルスIL-10をコードする外因性ポリペプチドは、配列番号7と少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%、98%、または99%配列同一性を有する配列を含む。

【0342】

一部の実施形態では、IL-10は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のアミノ酸修飾を有するヒトIL-10を含むタンパク質である。一部の実施形態では、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のアミノ酸修飾は、対応するアミノ酸位置でウイルスIL-10のアミノ酸に置換されている。

【0343】

一部の実施形態では、IL-10をコードするポリヌクレオチドセグメントは、ヒトIL-10（例えば、配列番号1）と比較して1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれより多くのアミノ酸修飾を有するヒトIL-10のバリエーションをコードする。一部の実施形態では、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のアミノ酸置換は、対応するアミノ酸位置（複数可）でウイルスIL-10のアミノ酸（複数可）による置換（複数可）である。一部の実施形態では、IL-10をコードするポリヌクレオチドセグメントは、ヒトIL-10（例えば、配列番号1）と比較して1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれより多くのアミノ酸の挿入、欠失、または改変を有するヒトIL-10のバリエーションをコードする。一部の実施形態では、ヒトIL-10のバリエーションは、配列番号56または57の配列を有する。

【0344】

一部の実施形態では、IL-10をコードするポリヌクレオチドセグメントは、ハツカネズミ（*Mus musculus*）、「MOUSE」（配列番号58）；ドブネズミ（*Rattus norvegicus*）、「RAT」（配列番号59）；アカゲザル（*Macaca mulatta*）、「MACMU」（配列番号60）；ニシゴリラ（*Gorilla gorilla*）、「GORILLA」（配列番号61）；カニクイザル（*Macaca fascicularis*）、「CYNO」（配列番号62）；アヌビスヒヒ（*Papio Anubis*）、「OLIVE BABOON」（配列番号63）；ボノボ（*Pan paniscus*）、「BONOB0」（配列番号64）；チンパンジー（*Pan troglodytes*）、「CHIMP」（配列番号65）；およびEBVB9（配列番号66）のIL-10をコードする。一部の実施形態では、IL-10をコードするポ

10

20

30

40

50

リヌクレオチドセグメントは、ハツカネズミ (*Mus musculus*)、「MOUSE」(配列番号58)；ドブネズミ (*Rattus norvegicus*)、「RAT」(配列番号59)；アカゲザル (*Macaca mulatta*)、「MACMU」(配列番号60)；ニシゴリラ (*Gorilla gorilla*)、「GORILLA」(配列番号61)；カニクイザル (*Macaca fascicularis*)、「CYNO」(配列番号62)；アヌビスヒヒ (*Papio Anubis*)、「OLIVE BABOON」(配列番号63)；ボノボ (*Pan paniscus*)、「BONOBON」(配列番号64)；チンパンジー (*Pan troglodytes*)、「CHIMP」(配列番号65)；およびEBVB9 (配列番号66)のIL-10と少なくとも90%、95%、98%、または99%配列同一性を有するタンパク質をコードする。

【0345】

一部の実施形態では、IL-10をコードするポリヌクレオチドセグメントは、ヒトIL-10 (例えば、配列番号1)と比較して1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれより多くのアミノ酸の置換、挿入、および／または欠失を有するヒトIL-10のバリエーションをコードする。一部の実施形態では、改変は、対応する位置での、ハツカネズミ (*Mus musculus*)、「MOUSE」(配列番号58)；ドブネズミ (*Rattus norvegicus*)、「RAT」(配列番号59)；アカゲザル (*Macaca mulatta*)、「MACMU」(配列番号60)；ニシゴリラ (*Gorilla gorilla*)、「GORILLA」(配列番号61)；カニクイザル (*Macaca fascicularis*)、「CYNO」(配列番号62)；アヌビスヒヒ (*Papio Anubis*)、「OLIVE BABOON」(配列番号63)；ボノボ (*Pan paniscus*)、「BONOBON」(配列番号64)；チンパンジー (*Pan troglodytes*)、「CHIMP」(配列番号65)；およびEBVB9 (配列番号66)のアミノ酸による置換、挿入、および／または欠失である。一部の実施形態では、ヒトIL-10のバリエーションは、配列番号67または配列番号68の配列を有する。

【0346】

一部の実施形態では、IL-10をコードするポリヌクレオチドセグメントは、ヒトIL-10と比較して免疫刺激活性が低減されたヒトIL-10のバリエーションをコードする。一部の実施形態では、ヒトIL-10のバリエーションは、I105A置換を含む。一部の実施形態では、ヒトIL-10のバリエーションは、A Single Amino Acid Determines the Immunostimulatory Activity of Interleukin 10, *J Exp Med*, 191, 2, 2000, p.213-223に記載される方法を使用して作製される。

【0347】

第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、IL-10のコード配列に作動可能に連結された1つまたは複数の調節エレメントをさらに含み、1つまたは複数の調節エレメントは、形質導入されたCD4⁺T細胞においてコードされるIL-10の発現を方向付ける。

【0348】

一部の実施形態では、調節エレメント(複数可)は、CD4⁺T細胞においてIL-10の発現を方向付けることが可能なプロモーターを含む。一部の実施形態では、プロモーターは、CD4⁺T細胞においてIL-10の構成的発現を駆動する。一部の実施形態では、プロモーターは、活性化CD4⁺T細胞においてIL-10の発現を駆動する。

【0349】

一部の実施形態では、第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、形質導入が成功したCD4⁺T細胞の選択を許容する選択マーカー(例えば、本明細書に記載されるまたは当技術分野で公知の任意の選択マーカー)をコードするセグメントをさらに含む。

【0350】

典型的な実施形態では、外因性ポリヌクレオチドは、ベクターを使用してCD4⁺T細胞に送達される。一部の実施形態では、ベクターはプラスミドベクターである。一部の実施形態では、ベクターはウイルスベクターである。

【0351】

一部の実施形態では、CARをコードする第1の外因性ポリヌクレオチドセグメントおよびIL-10をコードする第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、同じベクターに存在する。一部の実施形態では、CARをコードする第1の外因性ポリヌクレオチドセグメントおよびIL-10をコードする第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、同じウイルスベクターに存在する。一部の実施形態では、CARをコードする第1の外因性ポリヌクレオチドセグメントおよびIL-10をコードする第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、同じレンチウイルスベクターに存在する。

【0352】

ある特定の実施形態では、外因性ポリヌクレオチドは、レンチウイルスベクターを使用してCD4⁺T細胞に送達され、外因性ポリヌクレオチドは、レンチウイルスベクター配列を含む。ある特定の実施形態では、参照により本明細書に組み込まれる、Matrai et al., Molecular Therapy 18(3):477-490(2010) (「Matrai」) に開示されるレンチウイルスベクターを使用する。

10

【0353】

一部の実施形態では、第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、T細胞核ゲノムに組み込まれている。一部の実施形態では、第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、核ゲノムに組み込まれていない。一部の実施形態では、第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、T細胞の細胞質に存在する。

【0354】

特定の実施形態では、第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、配列番号5の配列を有する。一部の実施形態では、外因性ポリヌクレオチドは、配列番号5と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%配列同一性を有する。

20

【0355】

6.3.4. 調節エレメント

一部の実施形態では、第1および／または第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントはそれぞれ、CARまたはIL-10のコード配列に作動可能に連結された調節エレメントをさらに含む。一部の実施形態では、調節エレメントは、プロモーター配列、エンハンサー配列、非コード配列、またはその任意の組合せを含む。

【0356】

一部の実施形態では、第1の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、CARのコード配列に作動可能に連結された調節エレメントをさらに含み、調節エレメントは、形質導入されたCD4⁺T細胞においてコードされるCARの発現を方向付ける。一部の実施形態では、治療的に適切である場合、誘導型プロモーターを使用してCARの発現を誘導する。

30

【0357】

一部の実施形態では、第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、IL-10のコード配列に作動可能に連結された調節エレメントをさらに含み、調節エレメントは、形質導入されたCD4⁺T細胞においてコードされるIL-10の発現を方向付ける。一部の実施形態では、治療的に適切である場合、誘導型プロモーターを使用して、IL-10の発現を誘導する。一部の実施形態では、IL-10プロモーターを使用する。

【0358】

一部の実施形態では、プロモーターは、組織特異的プロモーターである。一部の実施形態では、プロモーターは、系列特異的プロモーターである。一部の実施形態では、プロモーターは、CARまたはIL-10の遍在する発現を駆動するために使用することができるプロモーターである。

40

【0359】

一部の実施形態では、プロモーターは天然のヒトプロモーターである。一部の実施形態では、プロモーターは、ヒト伸長因子(EF)1 α プロモーターである。一部の実施形態では、プロモーターは、ヒトホスホグリセリン酸キナーゼプロモーター(PGK)である。一部の実施形態では、プロモーターは、ヒトユビキチンCプロモーター(UBI-C)である。

50

【0360】

一部の実施形態では、プロモーターは、合成プロモーターである。ある特定の実施形態では、プロモーターは、最小CMVコアプロモーターである。特定の実施形態では、プロモーターは、誘導型または構成的双方向性プロモーターである。特異的实施形態では、A mendola et al., Nature Biotechnology, 23(1):108-116(2005)に開示される合成の双方向性プロモーターを使用する。このプロモーターは、2つのmRNAの協調された転写を遍在的または組織特異的に媒介することができる。ある特定の実施形態では、双方向性プロモーターは、CARおよび選択マーカー、またはIL-10および選択マーカーの発現を誘導する。

【0361】

一部の実施形態では、プロモーターは、天然のヒトプロモーターである。一部の実施形態では、プロモーターは、ヒト伸長因子(EF)1 α プロモーターである。一部の実施形態では、プロモーターは、ヒトホスホグリセリン酸キナーゼプロモーター(PGK)である。一部の実施形態では、プロモーターは、ヒトユビキチンCプロモーター(UBI-C)である。

【0362】

一部の実施形態では、第1および／または第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、コード配列に対して3'の1つまたは複数の非コード配列をさらに含む。コード配列に対して3'の非コード配列の非限定的な例としては、3'非翻訳領域(UTR)、ポリ(A)シグナルおよびウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント(WPRE)が挙げられる。

【0363】

一部の実施形態では、外因性ポリヌクレオチドは、1つより多くのコード配列を含む。例えば、外因性ポリヌクレオチドは、単一の連続するポリヌクレオチド配列(例えば、単一のポリヌクレオチド構築物)上に第1の外因性ポリヌクレオチドセグメントおよび第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントを含む。一部の実施形態では、1つまたは複数のコード配列は、CARをコードする配列および選択マーカーをコードする配列を含む。一部の実施形態では、1つまたは複数のコード配列は、IL-10をコードする配列および選択マーカーをコードする配列を含む。一部の実施形態では、1つまたは複数のコード配列は、CARをコードする配列、IL-10をコードする配列、および選択マーカーをコードする1つまたは複数の配列を含む。一部の実施形態では、外因性ポリヌクレオチドは、選択マーカーを含まない。

【0364】

一部の実施形態では、複数のコード配列は、1つまたは複数の配列内リボソーム進入部位(IRES)によって隔てられる。

【0365】

一部の実施形態では、複数のコード配列は、1つまたは複数の自己切断型ペプチドによって隔てられる。一部の実施形態では、自己切断型ペプチドは、2A自己切断型ペプチドであり得る。自己切断型ペプチドの非限定的な例としては、手足口病ウイルス(F2A)からのペプチド、ブタテシオウイルス1(P2A)、トセアアシグナ(Thosea asigna)ウイルス(T2A)、またはウマ鼻炎Aウイルス(E2A)を含む、2Aペプチド(18~22アミノ酸)が挙げられる。一部の実施形態では、第1の外因性ポリヌクレオチド、第2の外因性ポリヌクレオチド、または両方は、フリンプ2Aペプチドをコードする配列を含む。一部の実施形態では、第1の外因性ポリヌクレオチド、第2の外因性ポリヌクレオチド、または両方は、T2Aペプチドをコードする配列を含む。一部の実施形態では、第1の外因性ポリヌクレオチド、第2の外因性ポリヌクレオチド、または両方は、E2Aペプチドをコードする配列を含む。

【0366】

一部の実施形態では、コード配列は、重鎖のコード配列と軽鎖のコード配列の間に自己切断型ペプチドをさらに含む。一部の実施形態では、自己切断型ペプチドは、F2A、P

10

20

30

40

50

2 A、T 2 AおよびE 2 Aからなる群から選択される。

【0367】

6. 3. 5. 選択マーカー

一部の実施形態では、第1の外因性ポリヌクレオチドセグメント、第2の外因性ヌクレオチドセグメント、または両方は、形質導入が成功したCD4⁺T細胞の選択を許容する選択マーカーをコードするポリヌクレオチドセグメントをさらに含む。一部の実施形態では、第1の外因性ポリヌクレオチドセグメント、第2の外因性ヌクレオチドセグメント、または両方は、選択マーカーを含まない。

【0368】

一部の実施形態では、外因性ポリヌクレオチドは、第1の外因性ポリヌクレオチドセグメントを含み、第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、単一の連続するポリヌクレオチド配列（例えば、単一のポリヌクレオチド構築物）に存在する。そのような場合、外因性ポリヌクレオチドは、形質導入が成功したCD4⁺T細胞の選択を許容する1つまたは複数の選択マーカーを含む。

【0369】

一部の実施形態では、選択マーカーはΔNGFRである。ある特定の実施形態では、選択マーカーは、配列番号3の配列を有するポリペプチドである。ある特定の実施形態では、選択マーカーは、配列番号3と少なくとも90%、95%、98%、または99%配列同一性を有するポリペプチドである。特定の実施形態では、ΔNGFR選択マーカーをコードするヌクレオチド配列は、配列番号4の配列を有する。一部の実施形態では、ΔNGFR選択マーカーをコードするヌクレオチド配列は、配列番号4と少なくとも90%、95%、98%、または99%配列同一性を有する。

【0370】

一部の実施形態では、選択マーカーの発現は、外因性ポリヌクレオチドからのIL-10の発現と相関する。一部の実施形態では、選択マーカーの発現は、外因性ポリヌクレオチドからのIL-10の発現と線形に相関する。したがって、一部の実施形態では、選択マーカーの発現を測定して、外因性ポリヌクレオチドからのIL-10の発現を推定する。

【0371】

一部の実施形態では、選択マーカーは、EGFRポリペプチドの切断型である。一部の実施形態では、選択マーカーは、ヒトEGFRポリペプチド、任意選択でその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Wang et al. "A transgene-encoded cell surface polypeptide for selection, in vivo tracking, and ablation of engineered cells", Blood, v. 118, n. 5(2011)に開示されるhuEGFRの切断型である。

【0372】

一部の実施形態では、外因性ポリヌクレオチドは、抗生物質耐性遺伝子をコードする配列をさらに含む。一部の実施形態では、外因性ポリヌクレオチドは、アンピシリン耐性遺伝子をコードする配列を含む。

【0373】

6. 3. 6. CD4 IL-10 / CAR細胞またはポリドナーCD4 IL-10 / CARの遺伝子発現

CD4 IL-10 / CAR細胞は、IL-10を発現する。一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞は、IL-10を構成的に発現する。一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞は、活性化されるとIL-10を発現する。

【0374】

一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞（例えば、自己単一ドナーまたは同種単一ドナー）またはポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞は、CD4⁺T細胞10⁶個/mL培養培地あたり少なくとも100 pgのIL-10を構成的に発現する。一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞またはポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞は、CD4⁺T細胞10⁶個/mL培養培地あたり少なくとも200 pg、500 pg

10

20

30

40

50

、1 ng、5 ng、10 ng、または50 ngのIL-10を構成的に発現する。

【0375】

一部の実施形態では、CD4⁺IL-10⁺/CAR細胞（例えば、自己単一ドナーまたは同種単一ドナー）またはポリドナーCD4⁺IL-10⁺/CAR細胞は、抗CD3および抗CD28抗体の組合せ、または抗CD3抗体および抗CD28抗体コーティングビーズの組合せによる活性化後、CD4⁺T細胞10⁶個/mL培養培地あたり少なくとも1 ngまたは2 ngのIL-10を発現する。一部の実施形態では、ポリドナーCD4⁺IL-10⁺T細胞は、抗CD3および抗CD28抗体、またはCD3抗体およびCD28抗体コーティングビーズによる活性化後、CD4⁺T細胞10⁶個/mL培養培地あたり少なくとも5 ng、10 ng、100 ng、200 ng、または500 ngのIL-10を発現する。

10

【0376】

様々な実施形態では、IL-10産生量は、タンパク質の検出および測定のための様々な方法、例えばELISA、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、分光手順、比色定量、アミノ酸分析、放射線標識、エドマン分解、HPLC、ウェスタンブロッティング等を使用して活性化の12時間、24時間、または48時間後に決定される。好ましい実施形態では、IL-10産生量は、抗CD3および抗CD28抗体による活性化の48時間後にELISAによって決定される。

【0377】

一部の実施形態では、CD4⁺IL-10⁺/CAR細胞（例えば、自己単一ドナーまたは同種単一ドナー）またはポリドナーCD4⁺IL-10⁺/CAR細胞は、非改変CD4⁺T細胞より少なくとも5倍高いレベルでIL-10を発現する。一部の実施形態では、ポリドナーCD4⁺IL-10⁺T細胞は、非改変CD4⁺T細胞より少なくとも6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、30、40、または50倍高いレベルでIL-10を発現する。

20

【0378】

一部の実施形態では、CD4⁺IL-10⁺/CAR細胞（例えば、自己単一ドナーまたは同種単一ドナー）またはポリドナーCD4⁺IL-10⁺/CAR細胞は、CD4⁺T細胞10⁶個/mLあたり少なくとも100 pgのIL-5を発現する。一部の実施形態では、CD4⁺IL-10⁺/CAR細胞（例えば、自己単一ドナー、または同種単一ドナー）またはポリドナーCD4⁺IL-10⁺/CAR細胞は、CD4⁺T細胞10⁶個/mLあたり少なくとも100 pg、200 pg、500 pg、1 ng、5 ng、10 ng、または50 ngのIL-5を発現する。

30

【0379】

一部の実施形態では、CD4⁺IL-10⁺/CAR細胞（例えば、自己単一ドナーまたは同種単一ドナー）またはポリドナーCD4⁺IL-10⁺/CAR細胞は、抗CD3および抗CD28抗体による活性化後、CD4⁺T細胞10⁶個/mLあたり少なくとも1 ngのIL-5を発現する。一部の実施形態では、CD4⁺IL-10⁺/CAR細胞（例えば、自己単一ドナーまたは同種単一ドナー）またはポリドナーCD4⁺IL-10⁺/CAR細胞は、抗CD3および抗CD28抗体による活性化後、CD4⁺T細胞10⁶個/mLあたり少なくとも2 ng、5 ng、10 ng、100 ng、200 ng、または500 ngのIL-5を発現する。

40

【0380】

様々な実施形態では、IL-5産生量は、タンパク質の検出および測定のための様々な方法、例えばELISA、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、分光手順、比色定量、アミノ酸分析、放射線標識、エドマン分解、HPLC、ウェスタンブロッティング等を使用して活性化の12時間、24時間、または48時間後に決定される。好ましい実施形態では、IL-5産生量は、抗CD3および抗CD28抗体による活性化の48時間後にELISAによって決定される。

【0381】

一部の実施形態では、CD4⁺IL-10⁺/CAR細胞（例えば、自己単一ドナーまたは同

50

種単一ドナー) またはポリドナーCD4IL-10/CAR細胞は、CD4⁺T細胞10⁶個/mLあたり少なくとも100pgのIFN-γを発現する。一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞(例えば、自己単一ドナーまたは同種単一ドナー) またはポリドナーCD4IL-10/CAR細胞は、CD4⁺T細胞10⁶個/mLあたり少なくとも100pg、200pg、500pg、1ng、5ng、10ng、または50ngのIFN-γを発現する。

【0382】

一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞(例えば、自己単一ドナーまたは同種単一ドナー) またはポリドナーCD4IL-10/CAR細胞は、抗CD3および抗CD28抗体による活性化後、CD4⁺T細胞10⁶個/mLあたり少なくとも1ngのIFN-γを発現する。一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞(例えば、自己単一ドナーまたは同種単一ドナー) またはポリドナーCD4IL-10/CAR細胞は、抗CD3および抗CD28抗体による活性化後、CD4⁺T細胞10⁶個/mLあたり少なくとも2ng、5ng、10ng、100ng、200ng、または500ngのIFN-γを発現する。

【0383】

様々な実施形態では、IFN-γ産生量は、タンパク質の検出および測定のための様々な方法、例えばELISA、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、分光手順、比色定量、アミノ酸分析、放射線標識、エドマン分解、HPLC、ウェスタンブロッティング等を使用して活性化の12時間、24時間、または48時間後に決定される。好ましい実施形態では、IFN-γ産生量は、抗CD3および抗CD28抗体による活性化の48時間後にELISAによって決定される。

【0384】

一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞(例えば、自己単一ドナーまたは同種単一ドナー) またはポリドナーCD4IL-10/CAR細胞は、CD4⁺T細胞10⁶個/mLあたり少なくとも25pgのIL-4を発現する。一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞(例えば、自己単一ドナーまたは同種単一ドナー) またはポリドナーCD4IL-10/CAR細胞は、CD4⁺T細胞10⁶個/mLあたり少なくとも25pg、50pg、75pg、100pg、200pg、500pg、1ng、5ng、10ng、または50ngのIL-4を発現する。

【0385】

一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞(例えば、自己単一ドナーまたは同種単一ドナー) またはポリドナーCD4IL-10/CAR細胞は、抗CD3および抗CD28抗体による活性化後、CD4⁺T細胞10⁶個/mLあたり少なくとも100pgのIL-4を発現する。一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞(例えば、自己単一ドナーまたは同種単一ドナー) またはポリドナーCD4IL-10/CAR細胞は、抗CD3および抗CD28抗体による活性化後、CD4⁺T細胞10⁶個/mLあたり少なくとも100pg、200pg、300pg、400pg、500pg、600pg、700pg、800pg、900pg、1000pg、2ng、5ng、10ng、100ng、200ng、または500ngのIL-4を発現する。

【0386】

様々な実施形態では、IL-4産生量は、タンパク質の検出および測定のための様々な方法、例えばELISA、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、分光手順、比色定量、アミノ酸分析、放射線標識、エドマン分解、HPLC、ウェスタンブロッティング等を使用して活性化の12時間、24時間、または48時間後に決定される。好ましい実施形態では、IL-4産生量は、抗CD3および抗CD28抗体による活性化の48時間後にELISAによって決定される。

【0387】

一部の実施形態では、IL-10、IL-4、IFN-γ、IL-22、およびIL-5の1つまたは複数の発現は、1回または複数回の再刺激後に安定である。

【0388】

一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞（例えば、自己単一ドナーまたは同種単一ドナー）またはポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞は、選択マーカーをさらに発現する。一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞またはポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞は、Tr1細胞において典型的に発現されるタンパク質を発現する。一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞またはポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞は、Tr1細胞の特徴であるマーカータンパク質を発現する。

【0389】

一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞（例えば、自己単一ドナーまたは同種単一ドナー）またはポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞は、CD49bを発現する。一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞またはポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞は、LAG-3を発現する。一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞またはポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞は、TGF-βを発現する。一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞またはポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞は、IFN-γを発現する。一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞またはポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞は、GzBを発現する。一部の実施形態では、ポリドナーCD4 IL-10細胞は、骨髄系の抗原提示細胞によって活性化した場合にGzBを放出する。一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞またはポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞は、パーフォリンを発現する。一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞またはポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞は、骨髄性の抗原提示細胞によって活性化した場合にパーフォリンを放出する。一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞またはポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞は、CD18を発現する。一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞またはポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞は、CD2を発現する。一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞またはポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞は、CD226を発現する。一部の実施形態では、ポリドナーCD4 IL-10細胞は、IL-22を発現する。一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞またはポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞は、IL-10を発現する。

【0390】

一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞（例えば、自己単一ドナーまたは同種単一ドナー）またはポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞は、Tr1細胞の少なくとも1つの機能を示す。様々な実施形態では、機能は、IL-10の分泌、TGF-βの分泌、ならびにグランザイムB（GzB）およびパーフォリンの放出を通しての骨髄系の抗原提示細胞の特異的殺滅である。

【0391】

6.3.7. CD4 IL-10 / CAR細胞の追加の特性

一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞は、抗CD19 CARを含む。一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞は、CD19⁺標的細胞に対する*in vitro*細胞傷害が可能である。一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞は、CD19⁺標的細胞に対する*in vivo*細胞傷害が可能である。一部の実施形態では、CD19⁺標的細胞は、自己抗体産生B細胞である。一部の実施形態では、CD19⁺標的細胞はCD19⁺がん細胞である。一部の実施形態では、CD19⁺標的細胞に対する細胞傷害性は、1回または複数回の再刺激後に維持される（例えば、図5A～5Cに記載される産生方法を参照されたい）。

【0392】

一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞は、骨髄系標的細胞に対する*in vitro*細胞傷害が可能である。一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞は、骨髄系標的細胞に対する*in vivo*細胞傷害が可能である。一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞は、CD19⁺標的細胞および骨髄系標的細胞に対する細胞傷害が可能である。一部の実施形態では、骨髄系標的細胞は、クラスI MHC、CD1

3、CD54およびCD112の1つまたは複数を発現する。一部の実施形態では、骨髄系標的細胞に対する細胞傷害性は、1回または複数回の再刺激後に維持される（例えば、図5A～5Cに記載される産生方法を参照されたい）。

【0393】

一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞は、同種CD4⁺T細胞増殖を抑制することが可能である。一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞は、同種CD4⁺T細胞増殖を少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、または少なくとも90%抑制することが可能である。

【0394】

一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞は、同種CD8⁺T細胞増殖を抑制することが可能である。一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞は、同種CD8⁺T細胞増殖を少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、または少なくとも90%抑制することが可能である。

【0395】

一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞は、同種CD4⁺T細胞増殖および同種CD8⁺T細胞増殖を抑制することが可能である。一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞は、同種CD4⁺T細胞増殖を少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、または少なくとも90%抑制することが可能であり、および同種CD8⁺T細胞増殖を少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、または少なくとも90%抑制することが可能である。

【0396】

一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞によって媒介される抑制は、以下のように計算される： $100 - ([CD4IL-10T細胞(対照)およびCD4IL-10/CART細胞の存在下でのレスポンスの増殖 / レスポンスの増殖] \times 100)$ 。

【0397】

一部の実施形態では、抑制特性は、1回または複数回の再刺激後に安定である。

【0398】

6.3.8. プロセスの産物

一部の実施形態では、CD4IL-10/CART細胞（自己、または同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4IL-10/CAR細胞）は、CD4⁺T細胞を、CARをコードする外因性ポリヌクレオチドセグメントおよびIL-10をコードする外因性ポリヌクレオチドセグメントによって改変することによって得られる。一部の実施形態では、CD4⁺T細胞を、CARをコードする第1の外因性ポリヌクレオチドセグメントおよびIL-10をコードする第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントによって改変することは、(i) IL-10をコードするポリヌクレオチドセグメントの第1の形質導入の後にCARをコードする外因性ポリヌクレオチドセグメントの第2の形質導入；(ii) CARをコードするポリヌクレオチドセグメントの第1の形質導入の後にIL-10をコードする外因性ポリヌクレオチドセグメントの第2の形質導入；(iii) IL-10をコードするポリヌクレオチドセグメントおよびCARをコードする外因性ポリヌクレオチドセグメントの同時形質導入（すなわち、共形質導入）；または(iv) IL-10をコードするポリヌクレオチドセグメントおよびCARをコードするポリヌクレオチドセグメントの両方を含む単一のポリヌクレオチド構築物の形質導入を含む。一部の実施形態では、IL-10をコードするポリヌクレオチドは、マーカータンパク質（例えば、デルタNGFR）のコード配列をさらに含む。

【0399】

一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞（単一ドナーもしくはポリドナーC

D4IL-10/CAR細胞)は、CD4⁺T細胞を、(i)CARをコードするポリヌクレオチドセグメントを含む第1のポリヌクレオチド構築物およびIL-10をコードするポリヌクレオチドセグメントを含む第2のポリヌクレオチド構築物、または(ii)CARをコードするポリヌクレオチドセグメントおよびIL-10をコードするポリヌクレオチドセグメントを含む単一のポリヌクレオチド構築物によって改変することによって得られる。

【0400】

一部の実施形態では、CARをコードする第1の外因性ポリヌクレオチドセグメント、IL-10をコードする第2の外因性ポリヌクレオチドセグメント、または第1および第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントを含むポリヌクレオチド構築物は、ウイルスベクターまたはプラスミドベクターによってCD4⁺T細胞に導入される。一部の実施形態では、CD4⁺T細胞は、IL-10をコードするポリヌクレオチドセグメントを含有する第1のウイルスベクター(例えば、本明細書に記載される任意のウイルスベクター)の形質導入の後に、CARをコードするポリヌクレオチドセグメントを含有する第2のウイルスベクター(例えば、本明細書に記載される任意のウイルスベクター)の第2の形質導入を受ける。別の実施形態では、CD4⁺T細胞は、第1の外因性ポリヌクレオチドセグメントを含有する第1のウイルスベクター(例えば、本明細書に記載される任意のウイルスベクター)および第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントを含有する第2のウイルスベクターを共形質導入される。なお別の実施形態では、CD4⁺T細胞は、第1および第2の両方の外因性ポリヌクレオチドセグメントを含有するウイルスベクター(例えば、本明細書に記載される任意のウイルスベクター)を形質導入される。

【0401】

一部の実施形態では、ポリドナーCD4IL-10/CARは、(i)少なくとも2人の異なるT細胞ドナーから得た初代培養CD4⁺T細胞をプールすること;および(ii)プールしたCD4⁺T細胞を、本明細書に記載される方法に従って改変することによって生成される。一部の実施形態では、ポリドナーCD4IL-10/CART細胞は、(i)少なくとも2人の異なるT細胞ドナーから初代培養CD4⁺T細胞を得ること;(ii)各ドナーのCD4⁺T細胞を、本明細書に記載される方法に従って個別に改変すること、次に(iii)遺伝子改変CD4⁺T細胞をプールすることによって生成される。

【0402】

一部の実施形態では、CD4IL-10/CART細胞は、CD4⁺T細胞を活性化することが可能なタンパク質の存在下で培養されている。一部の実施形態では、CD4IL-10/CART細胞は、抗CD3抗体および抗CD28抗体、または抗CD3抗体および抗CD28抗体コーティングビーズの存在下で培養されている。一部の実施形態では、CD4IL-10/CART細胞は、抗CD3抗体、抗CD28抗体、およびIL-2、または抗CD3抗体および抗CD28抗体コーティングビーズおよびIL-2の存在下で培養されている。一部の実施形態では、CD4IL-10/CART細胞は、CD3およびCD28を介してヒトT細胞を活性化および増大(expand)させるためにポリマーナノマトリックス試薬(polymeric nanomatrix reagent)の存在下で培養されている。一部の実施形態では、CD4IL-10/CART細胞は、他のT細胞特異的免疫細胞培養培地、活性化剤(activator)、および補充剤(supplement)の存在下で培養されている。

【0403】

一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR(単一ドナーもしくはポリドナーCD4IL-10/CART細胞)は、凍結保存物(例えば、凍結浮遊液)中に存在する。一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR(単一ドナーもしくはポリドナーCD4IL-10/CART細胞)は、液体浮遊液中に存在する。

【0404】

6.4. CD4IL10/CART細胞集団

別の態様では、本開示は、本明細書で上記のCD4IL10/CART細胞集団を特徴とする。一部の実施形態では、集団は、CD4⁺T細胞(例えば、初代培養CD4⁺T細胞

)をさらに含む。

【0405】

一部の実施形態では、CD4⁺T細胞集団は、自己、または同種単一T細胞ドナー（単一ドナーCD4⁺IL-10/CAR細胞）から得たCD4⁺T細胞を含む。一部の実施形態では、初代培養CD4⁺T細胞は、単一のT細胞ドナーに由来する。一部の実施形態では、初代培養CD4⁺T細胞は、同じ個体（すなわち、同じ患者）に由来する。一部の実施形態では、CD4⁺T細胞集団は、少なくとも2人の異なるT細胞ドナー（ポリドナーCD4⁺IL-10/CAR細胞）から得たCD4⁺T細胞を含む。一部の実施形態では、初代培養CD4⁺T細胞は、アローHSC Tのドナーに由来する。

【0406】

一部の実施形態では、CD4⁺T細胞は、2、3、4、5、6、7、8、9、または10人の異なるT細胞ドナーから得られ、プールされた。ポリドナーCD4⁺IL-10 T細胞およびそれらを作製して使用する方法は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、PCT/US2021/039464号明細書に記載されている。その中で記載されている方法および/または組成物を、ポリドナーCD4⁺IL-10/CAR細胞を生成するために採用することができる。

【0407】

一部の実施形態では、初代培養CD4⁺T細胞は、ドナーの遺伝情報を解析した後に、ドナーから選択されるドナーに由来する。一部の実施形態では、ドナー（すなわち、初代培養CD4⁺T細胞のドナー）の遺伝情報は解析されない。一部の実施形態では、初代培養CD4⁺T細胞は、そのHLAハプロタイプに基づいて選択されるドナーに由来する。一部の実施形態では、集団中のCD4⁺T細胞は、集合的に6、7、8、9、10、11、12個、またはそれより多くの異なるHLAハプロタイプを有する。一部の実施形態では、集団中の全てのCD4⁺T細胞は、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、およびHLA-DQB1座で互いに対して少なくとも1/10、2/10、3/10、4/10、5/10、6/10、7/10、8/10、または9/10の一致を有する。一部の実施形態では、集団中の全てのCD4⁺T細胞は、HLA-A、HLA-B、HLA-C、およびHLA-DRB1座で互いに対して少なくとも1/8、2/8、3/8、4/8、5/8、6/8、7/8、または8/8の一致を有する。

【0408】

一部の実施形態では、集団中の全てのCD4⁺T細胞は、HLA-A座で互いに対して2/2の一致を有する。一部の実施形態では、集団中の全てのCD4⁺T細胞は、HLA-B座で互いに対して2/2の一致を有する。一部の実施形態では、集団中の全てのCD4⁺T細胞は、HLA-C座で互いに対して2/2の一致を有する。一部の実施形態では、集団中の全てのCD4⁺T細胞は、HLA-DRB1およびHLA-DQB1座で互いに対して少なくとも3/4または4/4の一致を有する。一部の実施形態では、集団中の全てのCD4⁺T細胞は、A*02またはA*24対立遺伝子を有する。一部の実施形態では、全てのCD4⁺T細胞は、A*02またはA*24陰性である。

【0409】

一部の実施形態では、集団中の全てのCD4⁺T細胞は、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、およびHLA-DQB1座で互いに対して5/10、6/10、7/10、8/10、または9/10未満の一致を有する。一部の実施形態では、集団中の全てのCD4⁺T細胞は、HLA-A、HLA-B、HLA-C、およびHLA-DRB1座で互いに対して4/8、5/8、6/8、7/8、または8/8未満の一致を有する。一部の実施形態では、集団中の全てのCD4⁺T細胞は、HLA-A座で互いに対して2/2未満の一致を有する。一部の実施形態では、集団中の全てのCD4⁺T細胞は、HLA-B座で互いに対して2/2未満の一致を有する。一部の実施形態では、集団中の全てのCD4⁺T細胞は、HLA-C座で互いに対して2/2未満の一致を有する。一部の実施形態では、集団中の全てのCD4⁺T細胞は、HLA-DRB1およびHLA-DQB1座で互いに対して3/4または4/4未満の一致を有する。

【0410】

一部の実施形態では、集団内のCD4⁺T細胞の少なくとも30%（例えば、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも98%）が、ΔNGFRの発現によって推論した場合にCARおよびIL-10を発現する。

【0411】

一部の実施形態では、CD4⁺T細胞は、凍結浮遊液中に存在する。一部の実施形態では、CD4⁺T細胞は、液体浮遊液中に存在する。一部の実施形態では、液体浮遊液は以前に凍結されている。

10

【0412】

6.5. 医薬組成物

別の態様では、医薬組成物を提供する。一部の実施形態では、医薬組成物は、本明細書に提供される単ドナーCD4⁺IL-10/CAR T細胞のいずれか、本明細書に提供されるポリドナーCD4⁺IL-10/CAR T細胞のいずれか、または本明細書に提供されるポリドナーCD4⁺IL-10/CAR T細胞集団のいずれか、および薬学的に許容される担体または希釈剤を含む。

【0413】

医薬組成物は、ヒト医学または獣医学にとって適切な任意の投与経路によって投与するために製剤化することができる。典型的な実施形態では、組成物は、静脈内（IV）投与のために製剤化される。一部の実施形態では、組成物は、静脈内（IV）注入のために製剤化される。IV投与のために製剤化される実施形態では、医薬組成物は、発熱物質を含まず、好適なpH、等張性、および安定性を有する、非経口投与で許容される水溶液の形態である。

20

【0414】

一部の実施形態では、薬学的に許容される担体または希釈剤は、食塩水、乳酸加リンゲル液、または他の生理的に適合性の溶液である。様々な実施形態では、医薬組成物溶液は、2~20%、好ましくは5%ヒト血清アルブミンを含む。

【0415】

一部の実施形態では、全身投与、特に静脈内投与によって医薬組成物を投与するために適合される医薬組成物の単位投与剤形が提供される。

30

【0416】

一部の実施形態では、単位投与剤形は、 $10^4 \sim 10^{11}$ 個のCD4⁺IL-10/CAR細胞もしくはポリドナーCD4⁺IL-10/CAR細胞、 $10^4 \sim 10^{10}$ 個のCD4⁺IL-10/CAR細胞もしくはポリドナーCD4⁺IL-10/CAR細胞、 $10^4 \sim 10^9$ 個のCD4⁺IL-10/CAR T細胞もしくはポリドナーCD4⁺IL-10/CAR細胞、 $10^5 \sim 10^{10}$ 個のCD4⁺IL-10/CAR細胞もしくはポリドナーCD4⁺IL-10/CAR細胞、 $10^5 \sim 10^9$ 個のCD4⁺IL-10/CAR細胞もしくはポリドナーCD4⁺IL-10/CAR細胞、 $10^5 \sim 10^8$ 個のCD4⁺IL-10/CAR細胞もしくはポリドナーCD4⁺IL-10/CAR細胞、または $10^5 \sim 10^7$ 個のCD4⁺IL-10/CAR細胞もしくはポリドナーCD4⁺IL-10/CAR細胞を含有する。

40

【0417】

典型的な実施形態では、単位投与剤形の医薬組成物は液体形態で存在する。

【0418】

6.6. 単ドナーCD4⁺IL-10/CAR細胞またはポリドナーCD4⁺IL-10/CAR細胞を作製する方法

別の態様では、本開示は、CD4⁺IL-10/CAR細胞またはポリドナーCD4⁺IL-10/CAR細胞を作製する方法を提供する。

【0419】

一部の実施形態では、本明細書に提供される方法は、CARをコードする外因性ポリヌ

50

クレオチドセグメントおよび I L - 1 0 をコードする外因性ポリヌクレオチドセグメントを導入することによって、C D 4 + T 細胞またはプールした C D 4 + T 細胞を改変することを含む。一部の実施形態では、C D 4 + T 細胞またはプールした C D 4 + T 細胞を、C A R をコードする外因性ポリヌクレオチドセグメントおよび I L - 1 0 をコードする外因性ポリヌクレオチドセグメントによって改変することは、(i) I L - 1 0 をコードするポリヌクレオチドセグメントの第 1 の形質導入の後に、C A R をコードする外因性ポリヌクレオチドセグメントの第 2 の形質導入；(i i) C A R をコードするポリヌクレオチドセグメントの第 1 の形質導入の後に、I L - 1 0 をコードする外因性ポリヌクレオチドセグメントの第 2 の形質導入；(i i i) I L - 1 0 をコードするポリヌクレオチドセグメントおよび C A R をコードする外因性ポリヌクレオチドセグメントの同時形質導入（すなわち、共形質導入）；または(i v) I L - 1 0 をコードするポリヌクレオチドセグメントおよび C A R をコードするポリヌクレオチドセグメントの両方を含む単一のポリヌクレオチド構築物の形質導入を含む。

10

【 0 4 2 0 】

一部の実施形態では、I L - 1 0 をコードするポリヌクレオチドセグメントおよび C A R をコードするポリヌクレオチドセグメントを含む単一のポリヌクレオチド構築物は、I L - 1 0 が 1 つのプロモーター（例えば、P G K または E F 1 a）の制御下にあり、および C A R が第 2 のプロモーター（例えば、C M V）の制御下にある双方向性ベクターである。そのような場合、構築物が、選択マーカーをコードするポリヌクレオチド配列を含む場合、ポリヌクレオチド配列は、I L - 1 0 または C A R のいずれかの下流であり得る。

20

【 0 4 2 1 】

一部の実施形態では、I L - 1 0 をコードするポリヌクレオチドセグメントおよび C A R をコードするポリヌクレオチドセグメントを含む単一のポリヌクレオチド構築物は、5' から 3' に I L - 1 0 をコードする配列および C A R をコードする配列を含む。そのような実施形態では、I L - 1 0 をコードする配列および C A R をコードする配列は、単一のプロモーター（例えば、構成的または誘導型）に作動可能に連結される。そのような実施形態では、配列内リボソーム進入部位（I R E S）をコードする配列、または 2 A - ペプチドをコードする配列は、I L - 1 0 をコードする配列と、C A R をコードする配列の間に位置する。

【 0 4 2 2 】

一部の実施形態では、I L - 1 0 をコードするポリヌクレオチドセグメントおよび C A R をコードするポリヌクレオチドセグメントを含む単一のポリヌクレオチド構築物は、5' から 3' に、C A R をコードする配列および I L - 1 0 をコードする配列を含む。そのような実施形態では、C A R をコードする配列および I L - 1 0 をコードする配列は、単一のプロモーター（例えば、構成的または誘導型）に作動可能に連結される。そのような実施形態では、配列内リボソーム進入部位（I R E S）をコードする配列または 2 A - ペプチドをコードする配列は、C A R をコードする配列と I L - 1 0 をコードする配列の間に位置する。

30

【 0 4 2 3 】

一部の実施形態では、方法は、(a) 1 つまたは複数の T 細胞ドナーから得た初代培養 C D 4 + T 細胞をプールするステップ；および(b) 本明細書に提供される方法に従って、C A R をコードする第 1 の外因性ポリヌクレオチドセグメントおよび I L - 1 0 をコードする第 2 の外因性ポリヌクレオチドセグメントを導入することによって、プールした C D 4 + T 細胞を改変するステップを含む。他の実施形態では、方法は、(a) 1 人または複数の T 細胞ドナーから初代培養 C D 4 + T 細胞を得るステップ；(b) C A R をコードする第 1 の外因性ポリヌクレオチドセグメントおよび I L - 1 0 をコードする第 2 の外因性ポリヌクレオチドセグメントを導入することによって（例えば、本明細書に提供される方法に従って）各ドナーの C D 4 + T 細胞を個別に改変するステップ；次に遺伝子改変 C D 4 + T 細胞をプールして、それによって C D 4 I L - 1 0 / C A R 細胞を得るステップを含む。当技術分野で公知の様々な方法を使用して、C A R をコードする第 1 の外因性ポリ

40

50

ヌクレオチドセグメント、IL-10をコードする第2の外因性ポリヌクレオチドセグメント、または両方を初代培養CD4⁺T細胞に導入することができる。

【0424】

一部の実施形態では、方法は、初代培養CD4⁺T細胞または遺伝子改変CD4⁺T細胞を、抗CD3抗体および抗CD28抗体、または抗CD3抗体および抗CD28抗体コーティングビーズの存在下でインキュベートするステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、初代培養CD4⁺T細胞または遺伝子改変CD4⁺T細胞を、抗CD3抗体、抗CD28抗体およびIL-2、または抗CD3抗体および抗CD28抗体コーティングビーズおよびIL-2の存在下でインキュベートするステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、初代培養CD4⁺T細胞または遺伝子改変CD4⁺T細胞を、フィーダー細胞混合物の存在下でインキュベートするステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、初代培養CD4⁺T細胞または遺伝子改変CD4⁺T細胞を、抗CD3抗体および抗CD28抗体のナノ調製物の存在下でインキュベートするステップをさらに含む。一部の実施形態では、インキュベーションは、CD3およびCD28を介してヒトT細胞を活性化および増大させるためにポリマーナノマトリックス試薬の存在下で行われる。一部の実施形態では、CD4⁺IL-10/CAR細胞は、他のT細胞特異的免疫細胞培養培地、活性化剤、および補助剤の存在下で培養されている。

10

【0425】

一部の実施形態では、インキュベーションステップは、本明細書に提供される方法に従って、CARをコードする第1の外因性ポリヌクレオチドセグメントおよびIL-10をコードする第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントを導入する前に実施される。一部の実施形態では、インキュベーションステップは、(a) 1人または複数の異なるT細胞ドナーから得た初代培養CD4⁺T細胞をプールした後であるが；(b) プールしたCD4⁺T細胞を、本明細書に提供される方法に従って、CARをコードする第1の外因性ポリヌクレオチドセグメントおよびIL-10をコードする第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントを導入することによって改変する前に実施される。一部の実施形態では、インキュベーションステップは、(a) 1人または複数の異なるT細胞ドナーから初代培養CD4⁺T細胞を得た後であるが；(b) 本明細書に提供される方法に従って、CARをコードする第1の外因性ポリヌクレオチドセグメントおよびIL-10をコードする第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントを導入することによって、各ドナーのCD4⁺T細胞を個別に改変する前に実施される。

20

30

【0426】

一部の実施形態では、インキュベーションステップは、ステップ(b)の後に実施される。言い換えれば、一部の実施形態では、インキュベーションステップは、(b) 本明細書に提供される方法に従って、CARをコードする第1の外因性ポリヌクレオチドセグメントおよびIL-10をコードする第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントを導入することによって、プールしたCD4⁺T細胞を改変するステップの後に実施される。一部の実施形態では、インキュベーションステップは、(b) 本明細書に提供される方法に従って、CARをコードする第1の外因性ポリヌクレオチドセグメントおよびIL-10をコードする第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントを導入することによって各ドナーのCD4⁺T細胞を個別に改変した後であるが、遺伝子改変CD4⁺T細胞をプールして、それによって遺伝子改変CD4⁺T細胞を得る前に実施される。一部の実施形態では、インキュベーションステップは、遺伝子改変CD4⁺T細胞をプールして、それによってCD4⁺IL-10/CAR細胞を得た後に実施される。

40

【0427】

一部の実施形態では、インキュベーションステップは、1回より多く実施される。一部の実施形態では、インキュベーションステップは、CD4⁺T細胞の遺伝子改変の前および後の両方で実施される。

【0428】

一部の実施形態では、第1の外因性ポリヌクレオチドセグメント、第2の外因性ポリヌ

50

クレオチドセグメント、または両方は、ウイルスペクターを使用して初代培養 $CD4^+T$ 細胞に導入される。一部の実施形態では、第1および第2の外因性ポリヌクレオチドセグメントは、同じウイルスペクターに位置する。一部の実施形態では、ウイルスペクターは、レンチウイルスペクターである。

【0429】

一部の実施形態では、第1の外因性ポリヌクレオチドは、配列番号9、16、22、34、41～49、および54の配列を有するCARをコードするセグメントを含み、ならびに第2の外因性ポリヌクレオチドは、配列番号1の配列を有するIL-10をコードするセグメントを含む。一部の実施形態では、第1の外因性ポリヌクレオチドは、配列番号9、16、22、34、41～49、および54と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%配列同一性を有するCARをコードするセグメントを含み、ならびに第2の外因性ポリヌクレオチドは、配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%配列同一性を有するIL-10をコードするセグメントを含む。

10

【0430】

一部の実施形態では、CARをコードするポリヌクレオチドセグメントは、配列番号10、17、23、35、または55の配列を有し、およびIL-10をコードするポリヌクレオチドセグメントは配列番号2の配列を有する。一部の実施形態では、CARをコードするポリヌクレオチドセグメントは、配列番号10、17、22、35、または55と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%配列同一性を有し、IL-10をコードするポリヌクレオチドセグメントは、配列番号2と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%配列同一性を有する。一部の実施形態では、第1の外因性ポリヌクレオチドセグメント、第2の外因性ポリヌクレオチドセグメント、または両方は、形質導入が成功した $CD4^+T$ 細胞の選択を許容するマーカーをコードするセグメントをさらに含む。一部の実施形態では、コードされる選択マーカーはANGFRである。ある特定の実施形態では、コードされる選択マーカーは配列番号4の配列を有する。一部の実施形態では、コードされる選択マーカーは、ヒトEGFRポリペプチドの切断型である。

20

【0431】

一部の実施形態では、方法は、1つまたは複数の選択マーカーを発現する遺伝子改変 $CD4^+T$ 細胞を単離し、それによって遺伝子改変 $CD4^{IL-10}/CAR$ 細胞の濃縮集団を生成するステップをさらに含む。

30

【0432】

一部の実施形態では、濃縮集団中の遺伝子改変 $CD4^+T$ 細胞の少なくとも40%（例えば、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも98%）が選択マーカーを発現し、選択マーカーは、IL-10発現の代用である。一部の実施形態では、濃縮集団中の遺伝子改変 $CD4^+T$ 細胞の少なくとも75%（例えば、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも98%）が、選択マーカーを発現し、選択マーカーはIL-10発現の代用である。一部の実施形態では、濃縮集団中の遺伝子改変 $CD4^+T$ 細胞の少なくとも75%が、選択マーカーを発現する。一部の実施形態では、濃縮集団中の遺伝子改変 $CD4^+T$ 細胞の少なくとも95%が、選択マーカーを発現する。一部の実施形態では、濃縮集団中の遺伝子改変 $CD4^+T$ 細胞の少なくとも96%、97%、98%、または99%が、選択マーカーを発現する。

40

【0433】

一部の実施形態では、濃縮集団中の遺伝子改変 $CD4^+T$ 細胞の少なくとも75%（例えば、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも98%）が、IL-10を発現する。一部の実施形態では、濃縮集団中の遺伝子改変 $CD4^+T$ 細胞の少なくとも75%が、IL-10を発現する。一部の実施形態では、濃縮集団中の遺伝子改変 $CD4^+T$ 細胞の少なくとも95%がIL-10を発現する。一部の実施形

50

態では、濃縮集団中の遺伝子改変CD4⁺T細胞の少なくとも96、97、98、または99%がIL-10を発現する。

【0434】

一部の実施形態では、濃縮集団中の遺伝子改変CD4⁺T細胞の少なくとも30%（例えば、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも98%）が、CARを発現する。一部の実施形態では、濃縮集団中の遺伝子改変CD4⁺T細胞の少なくとも50%が、CARを発現する。一部の実施形態では、濃縮集団中の遺伝子改変CD4⁺T細胞の少なくとも75%が、CARを発現する。一部の実施形態では、濃縮集団中の遺伝子改変CD4⁺T細胞の少なくとも95%が、CARを発現する。一部の実施形態では、濃縮集団中の遺伝子改変CD4⁺T細胞の少なくとも96、97、98、または99%が、CARを発現する。

10

【0435】

一部の実施形態では、濃縮集団中の遺伝子改変CD4⁺T細胞の少なくとも30%（例えば、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも98%）が、IL-10およびCARを発現する。一部の実施形態では、濃縮集団中の遺伝子改変CD4⁺T細胞の少なくとも50%が、IL-10およびCARを発現する。一部の実施形態では、濃縮集団中の遺伝子改変CD4⁺T細胞の少なくとも75%が、IL-10およびCARを発現する。一部の実施形態では、濃縮集団中の遺伝子改変CD4⁺T細胞の少なくとも95%が、IL-10およびCARを発現する。一部の実施形態では、濃縮集団中の遺伝子改変CD4⁺T細胞の少なくとも96、97、98、または99%が、IL-10およびCARを発現する。

20

【0436】

一部の実施形態では、方法は、遺伝子改変CD4⁺T細胞の濃縮集団をインキュベートするステップをさらに含む。一部の実施形態では、インキュベーションは、抗CD3抗体および抗CD28抗体、または抗CD3抗体および抗CD28抗体コーティングビーズの存在下で実施される。一部の実施形態では、インキュベーションは、さらにIL-2の存在下で実施される。一部の実施形態では、インキュベーションは、フィーダー細胞の存在下で実施される。一部の実施形態では、インキュベーションは、抗CD3抗体および抗CD28抗体のナノ調製物の存在下で実施される。一部の実施形態では、インキュベーションは、CD3およびCD28を介してヒトT細胞を活性化および増大させるためにポリマー性のナノマトリックス試薬の存在下で実施される。一部の実施形態では、CD4⁺IL-10⁺/CAR⁺T細胞は、他のT細胞特異的免疫細胞培養培地、活性化剤、および補充剤の存在下で培養されている。

30

【0437】

一部の実施形態では、方法は、遺伝子改変CD4⁺T細胞を凍結するステップをさらに含む。

40

【0438】

一部の実施形態では、初代培養CD4⁺T細胞は、そのHLAハプロタイプに基づいて選択されるドナーに由来する。一部の実施形態では、方法は、その遺伝情報を解析することによってT細胞ドナーを選択するステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、潜在的T細胞ドナーの遺伝情報またはHLAハプロタイプを解析するステップを含む。

【0439】

一部の実施形態では、初代培養CD4⁺T細胞は、初代培養CD4⁺T細胞またはその改変によって処置される宿主と少なくとも部分的なHLA一致を有するドナーに由来する。一部の実施形態では、初代培養CD4⁺T細胞は、幹細胞（HSC）、組織、または臓器ドナーと少なくとも部分的なHLA一致を有するドナーに由来する。一部の実施形態では

50

、CD4⁺T細胞は、幹細胞（HSC）、組織、または臓器ドナーとHLAが一致するドナーに由来する。一部の実施形態では、初代培養CD4⁺T細胞は、宿主と生物学的血縁がない第三者ドナーから得られる。一部の実施形態では、初代培養CD4⁺T細胞は、幹細胞、組織、または臓器ドナーと生物学的血縁がない第三者ドナーから得られる。

【0440】

一部の実施形態では、ステップ（a）において、初代培養CD4⁺T細胞は、2、3、4、5、6、7、8、9、または10人の異なるT細胞ドナーから得られる。一部の実施形態では、少なくとも2人のT細胞ドナーは、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、およびHLA-DQB1座で互いに対して少なくとも1/10、2/10、3/10、4/10、5/10、6/10、7/10、8/10、または9/10の一致を有する。一部の実施形態では、少なくとも2人のT細胞ドナーは、HLA-A、HLA-B、HLA-C、およびHLA-DRB1座で互いに対して少なくとも1/8、2/8、3/8、4/8、5/8、6/8、7/8、または8/8の一致を有する。一部の実施形態では、少なくとも2人のT細胞ドナーは、HLA-A座で互いに対して2/2の一致を有する。一部の実施形態では、少なくとも2人のT細胞ドナーは、HLA-B座で互いに対して2/2の一致を有する。一部の実施形態では、少なくとも2人のT細胞ドナーは、HLA-C座で互いに対して2/2の一致を有する。一部の実施形態では、少なくとも2人のT細胞ドナーは、HLA-DRB1およびHLA-DQB1座で互いに対して少なくとも3/4または4/4の一致を有する。一部の実施形態では、少なくとも2人のT細胞ドナーの各々は、A*02またはA*24対立遺伝子を有する。一部の実施形態では、T細胞ドナーはHLA-A*02陰性である。一部の実施形態では、少なくとも2人のT細胞ドナーの各々は、HLA-A*02またはHLA-A*24陰性である。

【0441】

一部の実施形態では、少なくとも2人のT細胞ドナーは、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、およびHLA-DQB1座で互いに対して5/10、6/10、7/10、8/10、または9/10未満の一致を有する。一部の実施形態では、少なくとも2人のT細胞ドナーは、HLA-A、HLA-B、HLA-C、およびHLA-DRB1座で互いに対して4/8、5/8、6/8、7/8、または8/8未満の一致を有する。一部の実施形態では、少なくとも2人のT細胞ドナーは、HLA-A座で互いに対して2/2未満の一致を有する。一部の実施形態では、少なくとも2人のT細胞ドナーは、HLA-B座で互いに対して2/2未満の一致を有する。一部の実施形態では、少なくとも2人のT細胞ドナーは、HLA-C座で互いに対して2/2未満の一致を有する。一部の実施形態では、少なくとも2人のT細胞ドナーは、HLA-DRB1およびHLA-DQB1座で互いに対して3/4または4/4未満の一致を有する。

【0442】

一部の実施形態では、ステップ（a）において、初代培養CD4⁺T細胞は、1つまたは複数の凍結保存物から得られる。一部の実施形態では、ステップ（a）において、初代培養CD4⁺T細胞は、少なくとも2人の異なるT細胞ドナーの凍結していない末梢血単核細胞から得られる。一部の実施形態では、方法は、CD4⁺T細胞を末梢血単核細胞から単離するステップをさらに含む。一部の実施形態では、ステップ（a）において、初代培養CD4⁺T細胞は、液体浮遊液から得られる。一部の実施形態では、液体浮遊液は、事前に凍結した保存物から得られる。

【0443】

一部の実施形態では、方法は、宿主からの末梢血単核細胞（PBMC）の存在下でCD4⁺T細胞をアネルギー化するステップを含まない。一部の実施形態では、方法は、組換えIL-10タンパク質の存在下でCD4⁺T細胞をアネルギー化するステップを含まず、組換えIL-10タンパク質は、CD4⁺T細胞から発現されない。一部の実施形態では、方法は、宿主からのDC10細胞の存在下でCD4⁺T細胞をアネルギー化するステップを含まない。

【0444】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、本明細書に提供される方法は、プールするステップ、精製ステップ、再刺激ステップおよび増大ステップの1つまたは複数の後に、CARをコードする外因性ポリヌクレオチドセグメントおよびIL-10をコードする外因性ポリヌクレオチドセグメントを導入することによって、CD4⁺T細胞またはプールしたCD4⁺T細胞を改変することを含む。

【0445】

6. 7. CD4 IL-10 / CAR細胞またはポリドナーCD4 IL-10 / CARを使用する方法

別の態様では、本開示は、患者を処置する方法であって、本明細書に提供されるCD4 IL-10 / CAR細胞（例えば、自己単一ドナーまたは同種単一ドナー）のいずれか、本明細書に提供される同種ポリドナーCD4 IL-10 / CAR T細胞のいずれか、本明細書に提供されるポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞集団のいずれか、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかを、それを必要とする患者に投与するステップを含む方法を提供する。

10

【0446】

一部の実施形態では、方法は、CD4 IL-10 / CAR細胞の凍結浮遊液を融解する事前のステップをさらに含む。

【0447】

一部の実施形態では、自己単一ドナーもしくは同種単一ドナーCD4 IL-10 / CAR細胞、または同種ポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞、または医薬組成物は、患者における病原性のT細胞応答を防止するかまたはその重症度を低減させる。

20

【0448】

一部の実施形態では、ポリドナーCD4 IL-10細胞または医薬組成物は、炎症応答または自己免疫応答を防止するかまたはその重症度を低減させる。

【0449】

一部の実施形態では、ポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞または医薬組成物は、患者における病原性のT細胞応答を防止するかまたはその重症度を低減させる。一部の実施形態では、ポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞または医薬組成物は、炎症を低減させる。一部の実施形態では、ポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞または医薬組成物は、組織修復を増強する。一部の実施形態では、ポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞または医薬組成物は、自己および非病原性抗原に対する免疫寛容を増強し、免疫系の恒常性を維持する。一部の実施形態では、ポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞または医薬組成物は、臓器移植、GVHD、ならびに様々な自己免疫および炎症疾患に関連する病原性のT細胞応答を下方調節する。一部の実施形態では、ポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞または医薬組成物は、自己免疫疾患を処置する。一部の実施形態では、ポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞または医薬組成物は、NLRP3インフラマソームの過剰活性を低減させる、またはNLRP3インフラマソームの過剰活性に関連する症状を低減させる。一部の実施形態では、ポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞または医薬組成物は、腫瘍細胞の死を誘導する、または腫瘍成長を低減させる。一部の実施形態では、ポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞または医薬組成物は、無病生存期間（例えば、微小残存病変の非存在）を増加させる。一部の実施形態では、ポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞または医薬組成物は、創傷治癒または組織修復を誘導する。

30

40

【0450】

一部の実施形態では、ポリドナーCD4 IL-10細胞または医薬組成物は、患者における病原性のT細胞応答の重症度を防止または低減させるために有効な量で投与される。一部の実施形態では、ポリドナーCD4 IL-10細胞または医薬組成物は、炎症を低減させるために有効な量で投与される。一部の実施形態では、ポリドナーCD4 IL-10細胞または医薬組成物は、組織修復を増強するために有効な量で投与される。一部の実施形態では、ポリドナーCD4 IL-10細胞または医薬組成物は、自己および非病原性抗原に対する免疫寛容を増強するためならびに免疫系の恒常性を維持するために有効な量で

50

投与される。一部の実施形態では、ポリドナーCD4⁺IL-10⁺細胞または医薬組成物は、臓器移植、GVHDおよび様々な自己免疫または炎症疾患に関連する病原性のT細胞応答を下方調節するために有効な量で投与される。一部の実施形態では、ポリドナーCD4⁺IL-10⁺細胞または医薬組成物は、自己免疫疾患を処置するために有効な量で投与される。一部の実施形態では、ポリドナーCD4⁺IL-10⁺細胞または医薬組成物は、NLRP3インフラマソームの過剰活性を低減させるために、またはNLRP3インフラマソームの過剰活性に関連する症状を低減させるために有効な量で投与される。一部の実施形態では、ポリドナーCD4⁺IL-10⁺細胞または医薬組成物は、腫瘍細胞の死を誘導するために、または腫瘍の成長を低減させるために有効な量で投与される。一部の実施形態では、ポリドナーCD4⁺IL-10⁺細胞または医薬組成物は、無病生存期間（例えば、微小残存病変の非存在）を増加させるために有効な量で投与される。

10

【0451】

一部の実施形態では、単ドナーCD4⁺IL-10⁺/CAR細胞（例えば、自己または同種）または医薬組成物は、患者における病原性T細胞応答の重症度を防止または低減させる。一部の実施形態では、単ドナーCD4⁺IL-10⁺/CAR細胞または医薬組成物は、炎症を低減させる。一部の実施形態では、単ドナーCD4⁺IL-10⁺/CAR細胞または医薬組成物は、組織修復を増強する。一部の実施形態では、単ドナーCD4⁺IL-10⁺/CAR細胞または医薬組成物は、自己および非病原性抗原に対する免疫寛容を増強し、免疫系の恒常性を維持する。一部の実施形態では、単ドナーCD4⁺IL-10⁺/CAR細胞または医薬組成物は、臓器移植、GVHD、ならびに様々な自己免疫および炎症疾患に関連する病原性のT細胞応答を下方調節する。一部の実施形態では、単ドナーCD4⁺IL-10⁺/CAR細胞または医薬組成物は、自己免疫疾患を処置する。一部の実施形態では、単ドナーCD4⁺IL-10⁺/CAR細胞または医薬組成物は、NLRP3インフラマソームの過剰活性を低減させる、またはNLRP3インフラマソームの過剰活性に関連する症状を低減させる。一部の実施形態では、単ドナーCD4⁺IL-10⁺/CAR細胞または医薬組成物は、腫瘍細胞の死を誘導する、または腫瘍成長を低減させる。一部の実施形態では、単ドナーCD4⁺IL-10⁺/CAR細胞または医薬組成物は、無病生存期間（例えば、微小残存病変の非存在）を増加させる。一部の実施形態では、単ドナーCD4⁺IL-10⁺/CAR細胞または医薬組成物は、創傷治癒または組織修復を誘導する。

20

【0452】

一部の実施形態では、処置の方法は、投与後に患者におけるCD4⁺IL-10⁺/CAR細胞をモニターすることをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、患者から得た生物試料中の選択マーカーを検出し、それによってCD4⁺IL-10⁺/CAR細胞またはポリドナーCD4⁺IL-10⁺/CAR細胞の存在または非存在を検出するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、患者において選択マーカーを検出するステップ、ならびに選択マーカーの検出を使用して患者への投与後のCD4⁺IL-10⁺/CAR細胞を追跡および/またはモニターするステップを含む。一部の実施形態では、選択マーカーは、患者におけるCD4⁺IL-10⁺/CAR細胞の存在の変化を追跡するために複数の時点で検出される。一部の実施形態では、生物試料は、患者からの生検または血液試料である。

30

【0453】

CD4⁺IL-10⁺/CAR細胞（自己単ドナー、同種単ドナー、または同種ポリドナーCD4⁺IL-10⁺/CAR細胞）は、治療有効量で投与される。量は、体重および他の臨床要因に基づいて決定され得る。一部の実施形態では、細胞 $10^3 \sim 10^{11}$ 個/kgが投与される。一部の実施形態では、細胞 $10^3 \sim 10^{10}$ 個/kgが投与される。一部の実施形態では、細胞 $10^3 \sim 10^9$ 個/kgが投与される。一部の実施形態では、細胞 $10^3 \sim 10^8$ 個/kgが投与される。一部の実施形態では、細胞 $10^3 \sim 10^7$ 個/kgが投与される。一部の実施形態では、細胞 $10^3 \sim 10^6$ 個/kgが投与される。一部の実施形態では、細胞 $10^3 \sim 10^5$ 個/kgが投与される。一部の実施形態では、細胞 $10^3 \sim 10^4$ 個/kgが投与される。

40

【0454】

50

様々な実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4IL-10/CAR細胞）は、治療上有効なスケジュールで投与される。一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4IL-10/CAR細胞）は、1回投与される。一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4IL-10/CAR細胞）は、毎日、3日毎、7日毎、14日毎、21日毎、または毎月投与される。

【0455】

CD4IL-10/CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4IL-10/CAR細胞）は、異なる投与経路に従って、例えば全身、皮下、または腹腔内に投与され得る。一部の実施形態では、細胞は、2〜20%、好ましくは5%ヒト血清アルブミンを含有し得る食塩水または生理的溶液中で投与される。

10

【0456】

6. 7. 1. GvHDを低減または防止する方法

一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4IL-10/CAR細胞）、単一ドナーもしくはポリドナーCD4IL-10/CAR細胞の集団、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかを使用して、造血幹細胞（HSC）移植（HSCT）の前に、HSCTと同時に、またはHSCTの後に患者を処置する。

【0457】

様々な実施形態では、HSCTは、一致した血縁のHSCT、または一致した非血縁HSCTである。様々な実施形態では、HSCTは、ハプロタイプ一致HSCT、不一致の血縁HSCT、または不一致の非血縁HSCTである。

20

【0458】

一部の実施形態では、患者は、アロHSCTによる処置を必要とする血液悪性疾患を有する。一部の実施形態では、血液悪性疾患は、異常な骨髄系細胞によって媒介される。一部の実施形態では、悪性疾患または血液がんは、骨髄性白血病である。一部の実施形態では、悪性疾患または血液がんは、CD19⁺、CD20⁺、CD22⁺、BCMA⁺、またはB7-H3⁺血液がんである。一部の実施形態では、CD19⁺、CD20⁺、CD22⁺、またはB7-H3⁺血液がんは、慢性リンパ性白血病、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、および非ホジキンリンパ腫から選択される。

30

【0459】

一部の実施形態では、T細胞ドナーは、CD4IL-10/CAR（自己単一ドナー、または同種単一ドナー）もしくは同種ポリドナーCD4IL-10/CAR細胞およびHSCによって処置される患者の遺伝情報、および／またはHSCドナーの遺伝情報に基づいて選択される。一部の実施形態では、T細胞ドナーは、ポリドナーCD4IL-10細胞およびHSCによって処置される患者のHLAハプロタイプ、および／またはHSCドナーのHLAハプロタイプに基づいて選択される。一部の実施形態では、方法は、CD4IL-10細胞を投与する前に、T細胞ドナーの遺伝情報またはHLAハプロタイプを解析するステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、宿主の遺伝情報またはHLAハプロタイプを解析するステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、HSCドナーの遺伝情報またはHLAハプロタイプを解析するステップをさらに含む。

40

【0460】

一部の実施形態では、T細胞ドナー、宿主、およびHSCドナーは、生物学的に無関係である。一部の実施形態では、T細胞ドナー、宿主およびHSCドナーは、異なるHLAハプロタイプを有する。一部の実施形態では、T細胞ドナー、宿主、およびHSCドナーは、HLAハプロタイプに少なくとも部分的不一致を有する。一部の実施形態では、T細胞ドナーは、閾値より上のHLA一致を有するHLAハプロタイプを有する場合に選択される。

【0461】

50

一部の実施形態では、HSCドナーは、患者に対して部分的にHLA不一致である。一部の実施形態では、HSCドナーは、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、およびHLA-DQB1座で患者に対して5/10、6/10、7/10、8/10、9/10、または10/10未満の一致を有する。一部の実施形態では、HSCドナーは、HLA-A、HLA-B、HLA-C、およびHLA-DRB1座で患者に対して4/8、5/8、6/8、7/8、または8/8未満の一致を有する。一部の実施形態では、HSCドナーは、HLA-A、HLA-B、またはHLA-C座で患者に対して2/2未満の一致を有する。一部の実施形態では、HSCドナーは、HLA-DRB1およびHLA-DQB1座で患者に対して3/4または4/4未満の一致を有する。

【0462】

10

一部の実施形態では、T細胞ドナーの1人または複数は、患者に対してHLA不一致または部分的にHLA不一致である。一部の実施形態では、T細胞ドナーの1人または複数は、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、およびHLA-DQB1座で患者に対して5/10、6/10、7/10、8/10、9/10、または10/10未満の一致を有する。一部の実施形態では、T細胞ドナーの1人または複数は、HLA-A、HLA-B、HLA-C、およびHLA-DRB1座で患者に対して4/8、5/8、6/8、7/8、または8/8未満の一致を有する。一部の実施形態では、T細胞ドナーの1人または複数は、HLA-A、HLA-B、またはHLA-C座で患者に対して2/2未満の一致を有する。一部の実施形態では、T細胞ドナーの1人または複数は、HLA-DRB1およびHLA-DQB1座で患者に対して2/4、3/4、または4/4

20

【0463】

一部の実施形態では、T細胞ドナーの1人または複数は、HSCドナーとHLA不一致であるか、または部分的にHLA不一致である。一部の実施形態では、T細胞ドナーの1人または複数は、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、およびHLA-DQB1座でHSCドナーに対して5/10、6/10、7/10、8/10、9/10、または10/10未満の一致を有する。一部の実施形態では、T細胞ドナーの1人または複数は、HLA-A、HLA-B、HLA-C、およびHLA-DRB1座で、HSCドナーに対して4/8、5/8、6/8、7/8、または8/8未満の一致を有する。一部の実施形態では、T細胞ドナーの1人または複数は、HLA-A、HLA-B、またはHLA-C座でHSCドナーに対して2/2未満の一致を有する。一部の実施形態では、T細胞ドナーの1人または複数は、HLA-DRB1およびHLA-DQB1座でHSCドナーに対して3/4または4/4未満の一致を有する。

30

【0464】

一部の実施形態では、患者に投与される場合、CD4IL-10/CAR細胞（単一のドナーまたはポリドナーCD4IL-10/CAR細胞）、単一ドナーもしくはポリドナーCD4IL-10/CAR細胞の集団、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかは、移植された造血幹細胞によるGvHDを防止するかまたはその重症度を低減させる。

【0465】

一部の実施形態では、患者に投与される場合、CD4IL-10/CAR細胞（単一ドナーもしくはポリドナーCD4IL-10/CAR細胞）、単一ドナーもしくはポリドナーCD4IL-10/CAR細胞の集団、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかは、移植された造血細胞による病原性のT細胞応答を防止するかまたはその重症度を低減させる。特定の実施形態では、CD4IL-10/CARまたはポリドナーCD4IL-10/CAR細胞は、GvHDを防止するかまたは低減させる。

40

【0466】

一部の実施形態では、ポリドナーCD4IL-10細胞または医薬組成物は、病原性T細胞または炎症によって誘導される組織損傷を防止するかまたはその重症度を低減させる。

【0467】

50

6. 7. 2. がんを処置する方法

一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4IL-10/CAR細胞）、単一ドナーもしくはポリドナーCD4IL-10/CAR細胞の集団、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかは、がんを処置するために使用される。一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4IL-10/CAR細胞）、単一ドナーもしくはポリドナーCD4IL-10/CAR細胞の集団、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかは、悪性疾患を処置するために使用される。

【0468】

好ましい実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4IL-10/CAR細胞）は、抗腫瘍効果を直接媒介し、特定の実施形態では、抗白血病効果を媒介する。

【0469】

一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4IL-10/CAR細胞）、単一ドナーもしくはポリドナーCD4IL-10/CAR細胞の集団、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかおよび同種は、造血幹細胞移植（HSCT）、末梢血幹細胞（PBSC）、臍帯血（CB）、または骨髄（BM）移植の前または後に投与される。

【0470】

一部の実施形態では、腫瘍性（neoplastic）細胞はCD19を発現する。一部の実施形態では、腫瘍性細胞はCD20を発現する。一部の実施形態では、腫瘍性細胞はCD22を発現する。一部の実施形態では、腫瘍性細胞はBCMAを発現する。一部の実施形態では、腫瘍性細胞はB7-H3を発現する。一部の実施形態では、腫瘍性細胞はCD13を発現する。一部の実施形態では、腫瘍性細胞はHLA-クラスIを発現する。一部の実施形態では、腫瘍性細胞はCD54を発現する。一部の実施形態では、腫瘍性細胞は、CD13、HLA-クラスIおよびCD54を発現する。一部の実施形態では、腫瘍性細胞はCD112を発現する。一部の実施形態では、腫瘍性細胞はCD58を発現する。一部の実施形態では、腫瘍性細胞はCD155を発現する。一部の実施形態では、腫瘍は、CD112、CD58、またはCD155を発現する。様々な実施形態では、腫瘍は、固形腫瘍または血液腫瘍である。一部の実施形態では、腫瘍は固形腫瘍である。一部の実施形態では、固形腫瘍は、B7-H3を発現する。一部の実施形態では、固形腫瘍は、乳がん、脳がん、肺がん、肝臓がん、胃がん、脾臓がん、結腸がん、腎臓がん、膵臓がん、前立腺がん、子宮がん、皮膚がん、頭部がん、頭部がん、肉腫、神経芽腫および卵巣がんからなる群から選択される。

【0471】

一部の実施形態では、患者は、副腎がん、肛門がん、胆管がん、膀胱がん、骨がん、成人の脳/CNS腫瘍、小児の脳/CNS腫瘍、乳がん、男性乳がん、原発不明がん、キャッスルマン病、子宮頸がん、結腸/直腸がん、子宮内膜がん、食道がん、ユーイングファミリー腫瘍、眼がん、胆嚢がん、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍（GIST）、妊娠性絨毛性疾患、ホジキン病、カポジ肉腫、腎臓がん、喉頭下咽頭がん、急性リンパ性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML、骨髄肉腫および皮膚白血病を含む）、慢性リンパ性白血病（CLL）、慢性骨髄性（CML）白血病、慢性骨髄単球性白血病（CMML）、小児白血病、肝臓がん、肺がん、非小細胞肺がん、小細胞肺がん、肺カルチノイド腫瘍、リンパ腫、皮膚リンパ腫、悪性中皮腫、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、鼻腔および副鼻腔がん、鼻咽頭がん、神経芽腫、非ホジキンリンパ腫、小児非ホジキンリンパ腫、口腔中咽頭がん、骨肉腫、卵巣がん、膵臓がん、陰茎がん、下垂体腫瘍、前立腺がん、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、唾液腺がん、肉腫—成人軟部組織がん、皮膚がん、皮膚がん—基底細胞および扁平細胞、皮膚がん—黒色腫、皮膚がん—メルケル細胞、小腸がん、胃がん、精巣がん、胸腺がん、甲状腺がん、子宮肉腫、膣がん、外陰がん、ワルデンストレーママクログロブリン血症、およびウィルムス腫瘍からなる群から選択されるがん

10

20

30

40

50

を有する。

【0472】

一部の実施形態では、がんは骨髄腫瘍である。特定の実施形態では、がんは、AMLまたはCMLである。一部の実施形態では、がんは骨髄腫瘍である。一部の実施形態では、がんはALLである。

【0473】

一部の実施形態では、方法は、血液、骨髄、およびリンパ節に影響を及ぼす血液がんを処置するために使用される。様々な実施形態では、血液がんは、リンパ腫（例えば、ホジキンリンパ腫）、リンパ球性白血病、骨髄腫である。様々な実施形態では、血液がんは、急性または慢性骨髄性（骨髄性）白血病（AML、CML）、または骨髄異形成症候群である。

10

【0474】

一部の実施形態では、悪性疾患または血液がんは、CD19⁺、CD20⁺、CD22⁺、BCMA⁺、またはB7-H3⁺血液がんである。一部の実施形態では、CD19⁺、CD20⁺、CD22⁺、BCMA⁺、またはB7-H3⁺血液がんは、慢性リンパ性白血病、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、および非ホジキンリンパ腫である。

【0475】

一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4IL-10/CAR細胞）は、血液がんを有する患者を処置するために使用され、方法は、CD4IL-10/CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4IL-10/CAR細胞）、単一ドナーもしくはポリドナーCD4IL-10/CAR細胞の集団、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかの治療有効量を患者に投与することを含む。

20

【0476】

一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞は、CD19⁺血液がんを有する患者を処置するために使用され、方法は、CD4IL-10/抗CD19 CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4IL-10/抗CD19 CAR細胞）、単一ドナーもしくはポリドナーCD4IL-10/抗CD19 CAR細胞の集団、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかの治療有効量を患者に投与することを含む。

30

【0477】

一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞は、CD20⁺血液がんを有する患者を処置するために使用され、方法は、CD4IL-10/抗CD20 CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4IL-10/抗CD20 CAR細胞）、単一ドナーもしくはポリドナーCD4IL-10/抗CD20 CAR細胞の集団、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかの治療有効量を患者に投与することを含む。

【0478】

一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞は、CD22⁺血液がんを有する患者を処置するために使用され、方法は、CD4IL-10/抗CD22 CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4IL-10/抗CD22 CAR細胞）、単一ドナーもしくはポリドナーCD4IL-10/抗CD22 CAR細胞の集団、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかの治療有効量を患者に投与することを含む。

40

【0479】

一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞は、B7-H3⁺がん（例えば、固形がん）を有する患者を処置するために使用され、方法は、CD4IL-10/抗B7-H3 CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4IL-10/抗B7-H3 CAR細胞）、単一ドナーもしくはポリドナーCD4IL-10/抗B7-H3 CAR細胞の集団、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかの治療有効量を患

50

者に投与することを含む。

【0480】

一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞は、BCMA⁺がん（例えば、固形がん）を有する患者を処置するために使用され、方法は、CD4IL-10/抗BCMA CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4IL-10/抗BCMA CAR）、単一ドナーもしくはポリドナーCD4IL-10/抗BCMA CAR細胞の集団、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかの治療有効量を患者に投与することを含む。

【0481】

一部の実施形態では、がんは、難治性であるか、または治療介入に対して抵抗性である。 10

【0482】

一部の実施形態では、本明細書に提供される方法は、患者におけるCD19⁺、CD20⁺、CD22⁺、BCMA⁺、またはB7-H3⁺血液がんまたは固形がんの再発を防止するために使用され、CD19⁺、CD20⁺、CD22⁺BCMA⁺、もしくはB7-H3⁺血液がんもしくは固形がんを有すると同定された患者、またはCD19⁺、CD20⁺、CD22⁺、BCMA⁺、もしくはB7-H3⁺血液がんもしくは固形がんが再発するリスクがあると同定された患者に、抗がん効果を誘導するために十分な、CD4IL-10/CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4IL-10/CAR細胞）、単一ドナーもしくはポリドナーCD4IL-10/CAR細胞集団、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかの治療有効量を投与することを含む。 20

【0483】

一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4IL-10/CAR細胞）は、治療介入と組み合わせて使用される。組合せは、同時であってもよく、または異なる時間で行われてもよい。好ましくは、治療介入は、化学療法、放射線療法、アロ-HSCT免疫抑制、輸血、骨髄移植、成長因子、生物製剤からなる群から選択される。

【0484】

一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4IL-10/CAR細胞）は、悪性疾患を有する患者を処置するために使用され、方法は、アロHSCT移植片を患者に投与すること、およびCD4IL-10/CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4IL-10/CAR細胞）、単一ドナーもしくはポリドナーCD4IL-10/CAR細胞の集団、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかの治療有効量を患者に投与することを含む。 30

【0485】

一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4IL-10/CAR細胞）は、GvHDを防止するために、および長期間の寛容（直接の抗腫瘍効果に加えて）を誘導するために、同種HSCT（アロ-HSCT）を受けているがん患者を処置するために使用される。CD4IL-10/CAR細胞の量は、アロHSCT（幹細胞調製物に存在するドナーT細胞によって媒介される）の移植片対白血病（GvL）または移植片対腫瘍（GvT）の有効性を抑制することなく、移植片対宿主病（GvHD）を抑制または防止するために十分である。 40

【0486】

同様に、本明細書において微小残存病変を有する患者を処置する方法であって、微小残存病変を有すると同定された、または微小残存病変を有するリスクがあると同定された患者に、抗がん効果を誘導するために十分な、CD4IL-10/CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4IL-10/CAR細胞）、単一ドナーもしくはポリドナーCD4IL-10/CAR細胞の集団、または本明細書に提供される医 50

薬組成物のいずれかの治療有効量を投与することを含む方法も提供する。

【0487】

一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞）、単一ドナーもしくはポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞の集団、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかは、腫瘍浸潤性腫瘍成長促進性の骨髄系列細胞（例えば、単球、マクロファージ、好中球）の細胞死を誘導する。

【0488】

一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞）、単一ドナーもしくはポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞の集団、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかは、B細胞（例えば、CD19⁺B細胞、CD20⁺B細胞、CD22⁺B細胞、BCM A⁺、B7-H3⁺B細胞、またはB7-H3⁺固形腫瘍細胞）の細胞死を誘導する。

【0489】

6. 7. 3. 炎症疾患または自己免疫疾患を処置する方法

一部の実施形態では、単一ドナー、またはポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞は、炎症疾患または自己免疫疾患を処置するために投与される。一部の実施形態では、単一ドナーまたはポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞は、NLRP3インフラマソームの過剰活性を伴う疾患または障害を処置するために投与される。

【0490】

NOD様受容体ファミリー（NLR）タンパク質NLRP3は、病原体、環境、または内因性起源からの危険なシグナルを感知する細胞内シグナル伝達分子である。活性化後、NLRP3は、カスパーゼ-1と相互作用して、インフラマソームと呼ばれる複合体を形成する。これは、カスパーゼ-1の活性化をもたらし、これは炎症促進性サイトカインであるIL-1βおよびIL-18をその活性型へと切断し、パイロトーシスとして公知の炎症細胞死のタイプを媒介する。

【0491】

一部の実施形態では、単一ドナーまたはポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞は、マックルウェルズ症候群（MWS）、家族性寒冷自己炎症症候群（FCAS）および新生児発症型多系統炎症疾患（NOMID）から選択される炎症疾患を処置するために投与される。一部の実施形態では、単一ドナーまたはポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞は、メタボリックシンドローム、2型糖尿病、アテローム性動脈硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病、ALS、非アルコール性脂肪性肝炎、変形性関節症、珪肺症、石綿肺症、痛風、および肺線維症から選択される慢性疾患を処置するために投与される。一部の実施形態では、単一ドナーまたはポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞は、クローン病、潰瘍性大腸炎、多発性硬化症および全身性エリテマトーデス、または炎症性眼疾患、例えば糖尿病性網膜症、急性緑内障、および加齢関連黄斑変性症を処置するために投与される。

【0492】

一部の実施形態では、単一ドナーまたはポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞は、NLRP3に関連する疾患を処置するために投与される。疾患は、CAPS、NASH、アルツハイマー病、パーキンソン病、心血管疾患、変形性関節症、痛風、偽痛風、腎結石症、II型糖尿病、シェーグレン症候群、鎌状赤血球症（SCD）、AMD、感染症、脳マラリア、石綿肺症、接触型過敏症、日焼け、珪肺症、膿疱性線維症、炎症性腸疾患、ALS、骨髄異形成症候群、およびぶどう膜炎からなる群から選択され得る。

【0493】

一部の実施形態では、疾患は、パーキンソン病、アルツハイマー病、加齢関連認知障害、前頭側頭型認知症、外傷性脳損傷、脳内出血、敗血症関連脳症、脳虚血、くも膜下出血、てんかん、アクリルアミド中毒、オピオイド誘発性神経炎症、慢性偏頭痛、周術期神経認知障害、卒中後認知障害、心停止後認知障害、社会的孤立誘発性認知障害、不安、およ

10

20

30

40

50

び外傷後ストレス障害から選択される脳障害である。

【0494】

一部の実施形態では、疾患は、喘息、IR肺損傷、ARDS／COPD、粒子状物質誘発肺損傷、放射線肺炎、肺高血圧症、サルコイドーシス、嚢胞性線維症、およびアレルギー性鼻炎から選択される肺障害である。

【0495】

一部の実施形態では、疾患は、アテローム性動脈硬化症、心不全、高血圧症、心筋梗塞、心房細動、代謝機能障害によって誘発される心損傷、心不全、および内皮機能障害から選択される心障害である。

【0496】

一部の実施形態では、疾患は、消化器疾患、例えば大腸炎である。一部の実施形態では、疾患は、急性肝不全、免疫の概日リズム調節、NASH、糖尿病性認知機能障害、IR肝損傷、特異体質性薬物性肝損傷および肝線維症から選択される肝障害である。一部の実施形態では、疾患は、糖尿病性脳症、糖尿病性アテローム性動脈硬化症、インスリン抵抗性、島移植拒絶、慢性結晶腎症、腎線維症、I／R腎損傷、肥満関連腎疾患、および腎高血圧症から選択される腎障害または腎障害である。一部の実施形態では、疾患は、乾癬および網膜血管新生から選択される皮膚または眼障害である。一部の実施形態では、疾患は、生殖障害、例えば早産である。一部の実施形態では、疾患は、原発性月経困難症、自然免疫、自然免疫から獲得免疫、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、および多発性硬化症から選択される免疫障害である。一部の実施形態では、疾患は、マクルウェルズ症候群、リウマチ性関節炎、鎌状赤血球症、およびVCP関連疾患から選択される遺伝性障害である。一部の実施形態では、疾患は、多発性硬化症関連神経障害性疼痛、慢性前立腺炎／慢性骨盤痛、がん誘発性骨痛、および痛覚過敏から選択される疼痛障害である。一部の実施形態では、疾患は、がん、例えば頭部および頸部がんのヒト扁平上皮がんである。一部の実施形態では、疾患は、感染障害、例えば細菌、ウイルス、または寄生虫感染症である。

【0497】

一部の実施形態では、単一ドナーまたはポリドナーCD4IL-10／CAR細胞は、NLRP3関連疾患の現在利用可能な処置、例えばIL-1を標的とする生物剤と組み合わせて使用される。生物剤は、組換えIL-1受容体拮抗剤アナキンラ、中和性IL-1β抗体カナキヌマブおよび可溶性デコイIL-1受容体リロナセプトを含む。

【0498】

一部の実施形態では、単一ドナーまたはポリドナーCD4IL-10／CAR細胞は、2型糖尿病、メタボリックシンドローム、心血管疾患、SLE、MS、CD、潰瘍性大腸炎（UC）、変形性関節症、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）、パーキンソン病、ALS、肺線維症、珪肺症、石綿肺症、糖尿病性網膜症、および加齢関連黄斑変性から選択される疾患を処置するために投与される。

【0499】

一部の実施形態では、単一ドナーまたはポリドナーCD4IL-10／CAR細胞は、炎症を処置するために投与される。炎症は、これらに限定されないが、冠動脈疾患（CAD）、2型糖尿病、神経変性疾患、または炎症性腸疾患に関係し得る。

【0500】

一部の実施形態では、単一ドナーまたはポリドナーCD4IL-10／CAR細胞は、活性化された単球、マクロファージ、または樹状細胞によるIL-1β産生の増加を伴う疾患または障害を処置するために投与される。一部の実施形態では、単一ドナーまたはポリドナーCD4IL-10／CAR細胞は、活性化された単球、マクロファージ、または樹状細胞によるIL-18産生の増加を伴う疾患または障害を処置するために投与される。一部の実施形態では、単一ドナーまたはポリドナーCD4IL-10／CAR細胞は、活性化された単球、マクロファージ、または樹状細胞による成熟カスパーゼ-1産生の増加を伴う疾患または障害を処置するために投与される。

10

20

30

40

50

【0501】

一部の実施形態では、単一ドナーまたはポリドナーCD4IL-10/CAR細胞は、活性化された単球、マクロファージ、または樹状細胞によるIL-1 β 産生を低減させるために投与される。一部の実施形態では、単一ドナーまたはポリドナーCD4IL-10/CAR細胞は、活性化された単球、マクロファージ、または樹状細胞によるIL-18産生を低減させるために投与される。一部の実施形態では、単一ドナーまたはポリドナーCD4IL-10/CAR細胞は、活性化された単球、マクロファージ、または樹状細胞による成熟カスパーゼ-1産生を低減させるために投与される。

【0502】

6.7.4. 他の障害を処置する方法

一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4IL-10/CAR細胞）は、免疫寛容を必要とする患者に投与される。一部の実施形態では、本明細書に提供される方法は、CD4IL-10/CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4IL-10/CAR細胞）、単一ドナーもしくはポリドナーCD4IL-10/CAR細胞の集団、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかの治療有効量を、免疫寛容を必要とする患者に投与することを含む。

【0503】

一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4IL-10/CAR細胞）、単一ドナーもしくはポリドナーCD4IL-10/CAR細胞の集団、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかは、自己免疫疾患を処置するために患者に投与される。

【0504】

一部の実施形態では、自己免疫疾患は、自己免疫性ぶどう膜炎、乾癬、白斑、円形脱毛症、乾癬性関節炎、炎症性腸疾患、橋本甲状腺炎、自己免疫性血管炎、潰瘍性大腸炎、水疱疾患、強皮症、セリアック病、グレーブス病、全身性硬化症、重症筋無力症、抗NMDA脳炎、天疱瘡疾患（尋常性および落葉状）、後天性表皮水疱症、血栓性血小板減少性紫斑病、特発性血栓性紫斑病、自己抗体誘発性血管炎症、自己抗体誘発性心臓炎、リウマチ性関節炎、自己抗体誘発性リウマチ性関節炎、視神経脊髄炎スペクトラム障害、全身性エリテマトーデス（SLE）、多発性硬化症（MS）、シェーグレン症候群、自己免疫性ミオパチー、I型糖尿病、アジソン病、悪性貧血、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性胆管炎（PBC）、自己免疫性膵炎、グッドパスチャー病、原発性膜性腎症、卵巣不全、自己免疫性精巣炎、ドライアイ疾患、および特発性間質性肺炎からなる群から選択される。一部の実施形態では、自己免疫疾患は、クローン病、潰瘍性大腸炎、セリアック病、1型糖尿病、狼瘡、乾癬、乾癬性関節炎、またはリウマチ性関節炎である。一部の実施形態では、患者はアレルギー性またはアトピー性疾患を有する。アレルギー性またはアトピー性疾患は、喘息、アトピー性皮膚炎、および鼻炎からなる群から選択され得る。一部の実施形態では、患者は食物アレルギーを有する。

【0505】

一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4IL-10/CAR細胞）、単一ドナーもしくはポリドナーCD4IL-10/CAR細胞の集団、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかは、細胞およびHSC-T以外の臓器移植に対する病原性T細胞応答を防止するかまたはその重症度を低減させるために投与される。一部の実施形態では、方法は、CD4IL-10/CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4IL-10/CAR細胞）、単一ドナーもしくはポリドナーCD4IL-10/CAR細胞の集団、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかを投与する前または後のいずれかに、患者に臓器移植するステップを含む。ある特定の実施形態では、臓器は、腎臓、心臓、肺、肝臓、または膵島細胞である。好ましい実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4IL-10/CAR細胞）

10

20

30

40

50

、単一ドナーもしくはポリドナーCD4IL-10/CAR細胞の集団、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかは、臓器移植の宿主拒絶を防止するかまたはその重症度を低減させる。

【0506】

一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4IL-10/CAR細胞）、単一ドナーもしくはポリドナーCD4IL-10/CAR細胞の集団、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかは、遺伝子治療、例えば組換えアデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）、単純ヘルペスウイルス（HSV）、レトロウイルス、レンチウイルス、非組み込み型レンチウイルス、アルファウイルス、フラビウイルス、ラブドウイルス、麻疹ウイルス、ニューキャッスル病ウイルス、ポックスウイルスまたはピコルナウイルスの投与に関連する免疫応答を防止するかまたは低減させるために投与される。これらの実施形態では、方法は、組換えアデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）、単純ヘルペスウイルス（HSV）、レトロウイルス、レンチウイルス、非組み込み型レンチウイルス、アルファウイルス、フラビウイルス、ラブドウイルス、麻疹ウイルス、ニューキャッスル病ウイルス、ポックスウイルス、またはピコルナウイルスを、CD4IL-10/CAR細胞または医薬組成物を投与する前または後のいずれかに患者に投与するステップをさらに含む。

10

【0507】

一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4IL-10/CAR細胞）、単一ドナーもしくはポリドナーCD4IL-10/CAR細胞の集団、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかは、AAV以外の組換えウイルスベクターに対する免疫応答を防止するかまたは低減させるために投与される。これらの実施形態では、方法は、CD4IL-10/CAR細胞、CD4IL-10/CAR細胞集団、または医薬組成物の投与前または投与後のいずれかにAAV以外の組換えウイルスベクターを患者に投与するステップをさらに含む。AAV以外のウイルスベクターの非限定的な例としては、単純ヘルペスウイルス（HSV）、レトロウイルス、レンチウイルス、アルファウイルス、フラビウイルス、ラブドウイルス、麻疹ウイルス、ニューキャッスル病ウイルス、ポックスウイルス、またはピコルナウイルスが挙げられる。

20

【0508】

一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4IL-10/CAR細胞）、単一ドナーもしくはポリドナーCD4IL-10/CAR細胞の集団、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかは、iPS由来組織または細胞の移植に関連する免疫応答を防止するかまたは低減させるために投与される。iPS由来組織および細胞としては、これらに限定されないが、心筋細胞、肝細胞、上皮細胞、軟骨、骨および筋細胞、ニューロンが挙げられる。

30

【0509】

一部の実施形態では、方法は、CD4IL-10/CAR細胞、CD4IL-10/CAR細胞集団、または医薬組成物の投与前または投与後のいずれかに、免疫治療剤タンパク質を患者に投与するステップをさらに含む。一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞、CD4IL-10/CAR細胞集団、または医薬組成物は、免疫原性治療タンパク質に対する免疫応答を低減させる。一部の実施形態では、免疫治療タンパク質は、治療抗体、第VII因子置換、サイトカイン、およびサイトカイン変異タンパク質から選択される。

40

【0510】

一部の実施形態では、CD4IL-10/CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4IL-10/CAR細胞）、単一ドナーもしくはポリドナーCD4IL-10/CAR細胞の集団、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかは、炎症を処置するために投与される。炎症は、これらに限定されないが、冠動脈疾患（CAD）、2型糖尿病、神経変性疾患、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）、または

50

炎症性腸疾患に関係し得る。

【0511】

一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞）、単一ドナーもしくはポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞の集団、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかは、NLPR3インフラマソームの過剰活性を伴う疾患または障害を処置するために投与される。一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞）、単一ドナーもしくはポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞の集団、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかは、活性化された単球、マクロファージ、または樹状細胞によるIL-1β産生の増加を伴う疾患または障害を処置するために投与される。一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞）、単一ドナーもしくはポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞の集団、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかは、活性化された単球、マクロファージ、または樹状細胞によるIL-18産生の増加を伴う疾患または障害を処置するために投与される。一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞）、単一ドナーもしくはポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞の集団、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかは、活性化された単球、マクロファージ、または樹状細胞による成熟カスパーゼ-1産生の増加を伴う疾患または障害を処置するために投与される。

10

20

【0512】

一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞）、単一ドナーもしくはポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞の集団、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかは、活性化された単球、マクロファージ、または樹状細胞によるIL-1β産生を低減させるために投与される。一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞）、単一ドナーもしくはポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞の集団、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかは、活性化された単球、マクロファージ、または樹状細胞によるIL-18産生を低減させるために投与される。一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞）、単一ドナーもしくはポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞の集団、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかは、活性化された単球、マクロファージ、または樹状細胞による成熟カスパーゼ-1産生を低減させるために投与される。

30

【0513】

一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞）、単一ドナーもしくはポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞の集団、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかは、ウイルス感染症に対する患者の過剰活性免疫応答を低減させるために投与される。一部の実施形態では、ウイルスはSARS-CoV-2である。一部の実施形態では、CD4 IL-10 / CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞）、単一ドナーもしくはポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞の集団、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかは、細菌感染症、例えば毒素性ショック、サイトカインストーム、治療抗体、第V因子置換、サイトカイン、およびサイトカイン変異タンパク質に対する過剰活性免疫応答を低減させるために投与される。

40

【0514】

別の態様では、本開示は、患者における自己免疫疾患、アレルギー疾患、または炎症疾患を処置または阻害する方法であって、自己免疫疾患、アレルギー疾患、または炎症疾患を有すると同定された患者に、自己免疫疾患、アレルギー疾患、または炎症疾患を処置ま

50

たは阻害するために十分な、CD4 IL-10 / CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞）、単一ドナーもしくはポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞の集団、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかの治療有効量を投与するステップを含む方法を提供する。

【0515】

別の態様では、本開示は、造血幹細胞、骨髄細胞、または固形臓器を移植した患者における移植の拒絶を低減させる方法であって、移植された造血幹細胞、骨髄細胞、または固形臓器の拒絶を有すると同定された患者に、移植の拒絶を低減させるために十分な、CD4 IL-10 / CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞）、単一ドナーもしくはポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞の集団、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかの治療有効量を投与するステップを含む方法を提供する。

10

【0516】

別の態様では、本開示は、患者における移植片対宿主病（GvHD）を処置する方法であって、移植片対宿主病（GvHD）を有すると同定された、または移植片対宿主病（GvHD）を有するリスクがあると同定された患者に、GvHDを抑制または防止するために十分な、CD4 IL-10 / CAR細胞（自己単一ドナー、同種単一ドナー、または同種ポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞）、単一ドナーもしくはポリドナーCD4 IL-10 / CAR細胞の集団、または本明細書に提供される医薬組成物のいずれかの治療有効量を投与することを含む方法を提供する。一部の実施形態では、GvHDは急性GvHDである。一部の実施形態では、GvHDは慢性GvHDである。

20

【0517】

別の態様では、本開示は、患者における組織または臓器傷害（例えば、創傷治療）を処置する方法であって、組織もしくは臓器傷害を有すると同定された、または組織もしくは臓器傷害を有するリスクがあると同定された患者に、組織または臓器傷害の修復を誘導するために十分な、本明細書に提供されるCD4 IL-10 / CAR細胞のいずれか、本明細書に提供されるCD4 IL-10 / CAR細胞集団のいずれか、または本明細書に提供される医薬組成物の治療有効量を投与することを含む方法の特徴とする。

【0518】

6. 8. ポリヌクレオチドおよびベクター

30

本開示はまた、（a）キメラ抗原受容体（CAR）（例えば、本明細書に提供される任意のCAR）をコードする第1のポリヌクレオチドセグメント；および（b）インターロイキン-10（IL-10）をコードする第2のポリヌクレオチドセグメントおよび（c）切断型NGFRをコードする第3のポリヌクレオチドセグメントを含む1つまたは複数のポリヌクレオチド構築物も特徴とする。一部の実施形態では、第1のポリヌクレオチドセグメントおよび第2および第3のポリヌクレオチドは、同じ構築物に存在する。一部の実施形態では、第1のポリヌクレオチドは、第1のポリヌクレオチド構築物に存在し、第2および第3のポリヌクレオチドセグメントは、第2のポリヌクレオチド構築物に存在する。一部の実施形態では、第3のポリヌクレオチドセグメントは、任意選択である。

【0519】

40

一部の実施形態では、第1のポリヌクレオチドセグメントは、CARのコード配列に作動可能に連結された調節エレメント（例えば、本明細書に記載される任意の例示的な調節エレメント（例えば、任意のプロモーター））を含む。一部の実施形態では、調節エレメントは、CARの発現を駆動する。

【0520】

一部の実施形態では、第2のポリヌクレオチドセグメントは、IL-10のコード配列に作動可能に連結された調節エレメント（例えば、本明細書に記載される任意の例示的な調節エレメント（例えば、任意のプロモーター））を含む。一部の実施形態では、調節エレメントは、IL-10の構成的発現を駆動する。

【0521】

50

一部の実施形態では、第3のポリヌクレオチドセグメントは、選択マーカー（例えば、 $\Delta N G F R$ ）のコード配列に作動可能に連結された調節エレメント（例えば、本明細書に記載される任意の例示的な調節エレメント（例えば、任意のプロモーター））を含む。一部の実施形態では、調節エレメントは、 $\Delta N G F R$ の構成的発現を駆動する。

【0522】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチド構築物は、第1のポリヌクレオチドセグメントと第2のポリヌクレオチドセグメントとの間に配列内リボソーム進入部位（IRES）または自己切断型ペプチドを含む。一部の実施形態では、ポリヌクレオチド構築物は、第2のポリヌクレオチドセグメントと第1のポリヌクレオチドセグメントの間に配列内リボソーム進入部位（IRES）または自己切断型ペプチドを含む。一部の実施形態では、自己切断型ペプチドは、F2A、P2A、T2AおよびE2Aからなる群から選択される。

10

【0523】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチド構築物は、5'から3'に、第1のポリヌクレオチドセグメントに作動可能に連結されたプロモーター、自己切断型ペプチド、またはIRES、および第2のポリヌクレオチドセグメントを含む。一部の実施形態では、ポリヌクレオチド構築物は、5'から3'に、第1のポリヌクレオチドセグメントに作動可能に連結されたプロモーター、自己切断型ペプチド、またはIRES、および第2のポリヌクレオチドセグメント、および第3のポリヌクレオチドセグメントに作動可能に連結された第2のプロモーターを含む。

【0524】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチド構築物は、5'から3'に、第2のポリヌクレオチドセグメントに作動可能に連結されたプロモーター、自己切断型ペプチド、またはIRES、および第1のポリヌクレオチドセグメントを含む。

20

【0525】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチド構築物は、第1のポリヌクレオチドセグメントに作動可能に連結された第1のプロモーター、および第2のポリヌクレオチドセグメントに作動可能に連結された第2のプロモーターを含む。一部の実施形態では、ポリヌクレオチド構築物は、第1のポリヌクレオチドセグメントに作動可能に連結された第1のプロモーター、第2のポリヌクレオチドセグメントに作動可能に連結された第2のプロモーター、および第3のポリヌクレオチドセグメントに作動可能に連結された第3のプロモーターを含む。

30

【0526】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチド構築物は、自己免疫疾患、炎症障害、またはがんに関連する抗原を標的とする抗原結合ドメインをコードする。一部の実施形態では、抗原は、関連するMHC分子の文脈において、CD19、CD20、CD22、CD27、BCMA、CD38、HLA* A2、HLA* A24、またはシトルリン化ペプチド、インスリン、MOG、GAD65、IA2、グリアジン、およびデスモグレインからなる群から選択される。

【0527】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチド構築物は、がん関連抗原を標的とする抗原結合ドメインをコードする配列を含む。一部の実施形態では、がん関連抗原は、CD19、CD20、CD22、CD23、CD27、CD38、CEA、BCMA、Lym1、Lym2、CLEC5A、CDH179b、FLT3、GCC、Muc、CSF2RA、GFRa4、CD32、CD33、IL1LRa、IL13Ra、NYBRI、SLea、CD200R、TGFベータR2、CEA、CD276、TROP2、LAMP1、PTK7、DLL3、CDH1、CDH6、CDH17、CDH19、TSHR、B7-H3およびチロシナーゼからなる群から選択される。

40

【0528】

一部の実施形態では、第1のポリヌクレオチドセグメントは、配列番号10、17、23、35、または55の配列を含む。

50

【0529】

一部の実施形態では、第2のポリヌクレオチドセグメントは、配列番号2の配列を含む。

【0530】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチド構築物は、1つまたは複数の選択マーカ（例えば、本明細書に提供される任意の選択マーカ）をさらに含む。一部の実施形態では、第1のポリヌクレオチドセグメント、第2のポリヌクレオチドセグメント、または両方は、選択マーカをコードする配列をさらに含む。

【0531】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチド構築物は、選択マーカとしてΔNGFRを含む。

10

【0532】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチド構築物は、配列番号4の配列を含むΔNGFRを含む。

【0533】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチド構築物は、選択マーカとしてEGFRの切断型を含む。

【0534】

一部の実施形態では、1つまたは複数のポリヌクレオチド構築物は、1つまたは複数のベクターである。一部の実施形態では、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非限定的な例としては、レンチウイルス、レトロウイルス、ガンマレトロウイルス、アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、ヘルパー依存性アデノウイルス、センダイウイルス、またはバキュロウイルスが挙げられる。一部の実施形態では、ポリヌクレオチド構築物は、レンチウイルスベクターである。

20

【0535】

一部の実施形態では、第1のポリヌクレオチドは、第1のレンチウイルスベクターに存在し、第2のポリヌクレオチドセグメントは、第2のレンチウイルスベクターに存在する。

【0536】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクターは、T細胞核ゲノムに組み込まれることが可能である。一部の実施形態では、レンチウイルスベクターは、T細胞核ゲノムに組み込まれることが可能ではない。一部の実施形態では、組み込み能欠損型レンチウイルスベクターを使用する。例えば、一部の実施形態では、組み込み能欠損型またはMatraiに開示される他のレンチウイルスベクターを使用する。一部の実施形態では、インテグラーゼ欠損型レンチウイルスを使用する。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Matrai et al., Hepatology 53:1696-1707(2011)に記載される、インテグラーゼに不活化変異(D64V)を含有するインテグラーゼ欠損型レンチウイルスを使用することができる。

30

【実施例】

【0537】

40

6.9. 実施例

以下の実施例を、限定ではない例証として提供する。

【0538】

6.9.1. 実験上の知見の要約

全体として、以下に記載される実験のデータは、ヒトCD4⁺T細胞に、2つの異なるレンチウイルスベクター：1) ヒトB細胞表面抗原結合ドメイン、CD8αヒンジ、およびCD8α膜貫通ドメイン、CD28共刺激ドメイン、およびCD3ゼータ活性化ドメインを含む合成CARをコードするLVV、ならびに2) ヒトIL-10遺伝子、プラスNGFR遺伝子の切断型をコードする双方向性ベクターを形質導入することができることを実証した。得られた形質導入されたCD4⁺T細胞は、CD19 CAR (CD19発現

50

によって測定される) およびNGFR発現によって測定されるIL-10/NGFRの両方を発現した。2つの異なるレンチウイルスベクターの連続的または同時形質導入後に、二重形質導入CD4⁺T細胞(一般的に、CD4⁺IL-10/CAR細胞、または図2A~2Bに記載されるように抗CD19 CARを発現する場合はCD4⁺IL-10抗CD19 CAR細胞と呼ばれる)が生成される場合、形質導入効率の差は、見出されなかった。

【0539】

CD3およびCD28を通して活性化後、CD4⁺IL-10/CAR細胞は、CD4⁺IL-10細胞のプロファイルおよびTr1細胞に関して記載されるプロファイルと類似のサイトカイン産生プロファイルを示した。例えば、CD4⁺IL-10/CAR細胞は、高レベルのIL-10を産生し、ならびにIL-4、IFN- γ 、およびIL-5を産生しなかったか、もしくは低レベルを産生した。特に、このサイトカイン産生プロファイルは、長期の培養期間後でも安定であった。

【0540】

興味深いことに、CD19⁺標的細胞およびCD4⁺IL-10抗CD19 CAR細胞の共培養は、CD4⁺IL-10抗CD19 CAR細胞の特異的活性化およびIL-10産生の誘導をもたらした。

【0541】

CD4⁺IL-10抗CD19 CAR細胞は、CD4⁺IL-10細胞について認められるように、*in vitro*でPBMC増殖、同種CD4⁺T細胞増殖、および同種CD8⁺T細胞増殖を抑制した。

【0542】

CD4⁺IL-10抗CD19 CAR細胞は、CD19⁺標的細胞を*in vitro*で特異的に殺滅するが、CD4⁺IL-10細胞と同様に、それらは骨髄系の標的細胞を殺滅するその能力を維持し、これは、クラスI MHC、CD13、CD54およびCD112の1つまたは複数の発現に依存する。加えて、CD4⁺IL-10抗CD19 CAR T細胞は、*in vivo*でCD19⁺標的細胞の成長を強く阻害した。重要なことに、単一ドナーおよびポリドナーCD4⁺IL-10抗CD19 CAR細胞は、単一ドナーおよびポリドナーCD4⁺IL-10細胞に関する記載と同様に、*xeno-GvHD*を誘導しなかったが、PBMCは、重度の*xeno-GvHD*を誘導した。最後に、CD4⁺IL-10抗CD19 CAR細胞は、その抗腫瘍効果においてPBMCと相乗作用を示し、このことは、それらが、CD4⁺IL-10細胞に関して記載されるように保護的GvL応答を妨害しないことを示している(Locafaro et al. Mol Ther. 2017;25(10):2254-2269)。加えて、単一ドナーおよびポリドナーCD4⁺IL-10抗CD19 CAR細胞は、同種PBMCによって誘導されるGvHDのヒト化マウスモデルにおいて*xeno-GvHD*からマウスを保護した(図18A~18Cを参照されたい)。

【0543】

このデータは、標的細胞上で発現されたCD4⁺IL-10抗CD19 CARおよびCD19の間の特異的相互作用が、これらの細胞の活性化を誘導し、CD19⁺標的細胞の特異的殺滅およびIL-10産生をもたらすことを示した。

【0544】

まとめると、データは、CD4⁺IL-10/CAR T細胞が、全てのB細胞およびT細胞媒介自己免疫疾患の処置に関して一意的な臨床上的有用性を有することを示し、その理由はそれらが自己抗体産生B細胞を排除するのみならず、IL-10の産生を通して病原性の自己免疫性CD4⁺T細胞およびCD8⁺T細胞応答を同時に抑制するためである。データはまた、CD4⁺IL-10抗CD19 CAR細胞が、単独でGvHDを誘導しなかったこと、およびPBMCの保護的抗腫瘍効果(GvL効果)を妨害しなかったことから、単一ドナーもしくはポリドナーCD4⁺IL-10抗CD19 CAR細胞が、特に同種HSC Tを受けている患者においてCD19⁺腫瘍細胞の処置/排除および腫瘍再発の防止に関して一意的な臨床上的有用性を有することも示した。

【0545】

重要なことに、たとえ高濃度であっても、CD4 IL-10 抗CD19 CAR細胞（自己または同種のいずれか）は、単独でGVHDを誘導しなかった。これらの結果は、CD4 IL-10 / CAR細胞を、i) 標的抗原を発現する白血病および他の悪性疾患、ii) HSC TのGV LまたはGV T治療効果を保存しながらGVHDを低減させるために、同種HSC TまたはBM移植を受けている患者における白血病および他の悪性疾患、iii) 自己免疫性B細胞の除去および病原性T細胞応答およびNLP R3インフラマソームの下方調節を通しての自己免疫疾患、iv) 病原性のT細胞応答およびNLP R3インフラマソームの下方調節を通しての炎症疾患、v) 細胞および臓器移植拒絶、vi) これに限定されないがB7-H3を含む腫瘍関連抗原を発現する固形腫瘍、ならびにvii) 組織修復および創傷治癒を通しての免疫媒介疾患の処置のために使用することができることを実証する。

10

【0546】

[実施例1]

CD4 IL-10 / 抗CD19 CAR細胞の生成

6.9.2.1. IL-10 / ΔNGFRおよび抗CD19 CARのベクターによる産生

第2世代CD19 CARを、CD4 IL-10 抗CD19 CAR細胞の産生のために使用した。CD19 CARは、完全なヒト抗CD19モノクローナル抗体からのscFv（配列番号12）、CD8αヒンジ、およびCD8α膜貫通ドメイン、CD28共刺激ドメイン、およびCD3ζ（CD3 ゼータ）活性化ドメインを含んだ（図2A）。図2Aに示されるCD19 CARを、レンチウイルスベクター（LVV）に挿入した（図2Bを参照されたい）。CD19、CD20、CD22、BCMA、またはB7H3を標的とする例示的なCARの例証に関しては図1を参照されたい。レンチウイルスベクターを、抗CD19 scFv（FMC63）のコード配列を、ヒトCD8αヒンジ領域およびCD8α膜貫通領域、CD28共刺激ドメインおよびCD3ζ細胞内シグナル伝達ドメインを含むレンチウイルス骨格にライゲーションすることによって生成した。抗CD19 CARの表面発現を、抗CD19-CAR検出剤（Miltenyi）によってモニターした。

20

【0547】

IL-10をコードするポリヌクレオチドを、CD4⁺T細胞に導入してCD4 IL-10 抗CD19 CAR細胞を産生するために、ヒトIL-10（配列番号2）および切断型NGFR（CD271としても知られる）（ΔNGFR）（配列番号4）の両方のコード配列を含有するレンチウイルスベクター（LVV）（図4）を使用した。IL-10およびΔNGFRコード配列を含有するLVVは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第2016/146542号パンフレットにさらに記載されている。

30

【0548】

レンチウイルスベクターを、pH15C（ATCC 68192）の549bp断片からのヒトIL-10のコード配列をプラスミドpLVIL-10にライゲーションすることによって生成した。双方向性プロモーター（ヒトPGKプロモータープラス反対方向のCMVプロモーターの最小コアエレメント）の存在により、2つのトランスジーンの共発現が可能となった。プラスミドは、抗生物質耐性遺伝子（例えば、アンピシリンまたはカナマイシン）のコード配列をさらに含有した。IL-10構築物の例示的な例証に関しては、図3Aおよび図3Bを参照されたい。

40

【0549】

レンチウイルスベクターを、293T細胞へのCa₃PO₄-過性4プラスミド共トランスフェクションによって産生し、超遠心分離によって濃縮した。1μM酪酸ナトリウムをベクター収集のための培養物に添加した。力価を、293T細胞において限界希釈によって推定し、ベクター粒子を、HIV-1 Gag p24抗原免疫捕捉（NEN Life Science Products; Waltham, MA）によって測定する。ベクターの感染力を、力価と粒子の間の比として計算した。濃縮ベクターの場合、力価は、1×10⁸～6×10⁹形質導入単位/mLの範囲であり、感染力は、5×10⁴～

50

5×10^5 形質導入単位 / ng の範囲であった。

【0550】

6. 9. 2. 2. CD4 IL-10 / CAR 細胞の産生

図5A～5Cに示すように、3つの異なる方法を使用して、CD4 IL-10 抗CD19 CAR細胞を生成した。異なる方法の各々に関して、CD4⁺T細胞を、健康なヒトドナーから精製した。精製ヒトCD4⁺T細胞を、完全培養培地（5%ヒトAB血清およびrhIL-2（50 U/mL）を補充したX-vivo）中で、抗CD3 / 抗CD28ビーズ（Miltenyi）（3：1の細胞：ビーズ比）によって活性化した。

【0551】

図5Aは、活性化CD4⁺T細胞に、活性化の48時間後に抗CD19 CAR（LVV CD19-CAR）をコードするレンチウイルスベクターを形質導入し、24時間後（すなわち、活性化の72時間後）にヒトIL-10およびヒトNGF受容体の切断型（LVV IL-10-NGFR）をコードする双方向性レンチウイルスベクターを形質導入した。両方のLVVを、感染多重度（MOI）20で使用した。

【0552】

図5Bは、活性化CD4⁺T細胞に、活性化の48時間後にLVV IL-10-NGFRを形質導入し、その後24時間後（すなわち、活性化の27時間後）にLVV CD19-CARを形質導入したことを示す。

【0553】

図5Cは、活性化CD4⁺T細胞に、活性化の48時間後にLVV IL-10-NGFRおよびLVV CD19-CARを同時に形質導入したことを示す。対照CD4 IL-10細胞を、LVV IL-10-NGFRのみによる活性化の48時間後に活性化CD4⁺T細胞を形質導入することによって生成した。図5A～5Cの各々に関して、ポリブレン（8 μg/mL）の存在下で形質導入を行った。加えて、図5A～5Cの各々に関して、形質導入の10～28日後、形質導入細胞（すなわち、ΔNGFR⁺細胞）を、抗CD271マイクロビーズ（Miltenyi）および抗CD19 CARマイクロビーズ（Miltenyi）を使用して精製した。精製細胞を、以前に記載されたように（Andolfi et al. Mol. Ther. 20(9):1778-1790(2012)およびLocafaro et al. Mol. Ther. 25(10):2254-2269(2017)）14日毎に再刺激した。第2の（TF2）および第3の（TF3）再刺激後、得られた細胞（CD4 IL-10 抗CD19 CAR）を、in vitroおよびin vivoで特徴付けた。培養培地を、必要に応じて、全培養期間を通して2～3日毎に交換した。

【0554】

CD4 IL-10 抗CD19 CAR細胞を、TF3（すなわち、3回目の再刺激後）で、抗CD271 mAb（Biolegend）および抗CD19 CAR検出試薬（Miltenyi）によって染色することによって解析し、フローサイトメトリーによって解析した。染色は、3つの異なる形質導入法に関してNGFRおよび抗CD19 CARの共発現として決定されたCD4 IL-10 抗CD19 CAR細胞の同一性および純度がそれぞれ、88.6%（図5Aに記載される方法から図6A）、64.1%（図5Bに記載される方法からの図6B）および52.6%（図5Cに記載される方法からの図6C）であったことを示した。予想されるように、図5Cに記載される方法を使用して同じドナー（ドナー26.1および26.2）からそれぞれ生成された、および対照として使用したCD4 IL-10細胞は、CD19 CARを発現しなかった（図7）。

【0555】

図7に示されるように、CD4 IL-10 抗CD19 CAR細胞は、IL-10（NGFRの発現によって測定）および抗CD19 CARの両方を発現した。この実験では、2人の異なるドナー（26.1および26.2）からのCD4⁺T細胞に、ビーズ活性化の48時間後に、LVV IL-10-NGFRおよびLVV 抗CD19 CARを同時に形質導入した（方法5C）。CD4 IL-10 T細胞（対照）を生成するために、ドナー26.1および26.2からのCD4⁺T細胞に、ビーズ活性化の48時間後にLVV IL-

10-NGFRのみを形質導入した。この解析に関して、CD4⁺IL-10⁺細胞（対照）およびCD4⁺IL-10⁺抗CD19⁺CAR細胞を、フィーダー細胞による第2ラウンドの再刺激（すなわち、TF2）後に解析した。CD4⁺IL-10⁺細胞（対照）およびCD4⁺IL-10⁺抗CD19⁺CART細胞の両方を、抗CD271 mAb（Biolegend s）およびCD19-CAR検出試薬（Miltenyi）によって染色し、フローサイトメトリーによって解析した。図7に示されるように、LVVIL-10-NGFRおよびLVVCD19-CARを形質導入した細胞の大多数は、CD271およびCD19-CARを発現したが（図7、右のパネル）、LVVIL-10-NGFRのみを形質導入した細胞の大多数は、CD271を発現したが、CD19-CARを発現しなかった（図7、左のパネル）。

10

【0556】

これらの結果は、CD4⁺IL-10⁺抗CD19⁺CAR細胞を、2つの異なるLVVの形質導入の時期および順序とは無関係に首尾よく生成することができることを示している。加えて、このことは、CD4⁺IL-10⁺/CARを、IL-10およびCARの両方をコードする単一のLVVを使用して生成することができたことを示唆している。

【0557】

6.9.2.3. CD4⁺IL-10⁺抗CD19⁺CAR細胞は、天然由来のTr1細胞およびCD4⁺IL-10⁺細胞のプロファイルと同等であるサイトカイン産生プロファイルを有する

3人の異なる健康なドナー（26.1、26.2および26.3）からのCD4⁺IL-10⁺抗CD19⁺CAR細胞を、図5Cに記載される方法に従って、(i)抗CD19-CARを含有するLVV、ならびに(ii)IL-10およびΔNGFRを含有するLVVの同時形質導入によって生成した。特に、CD4⁺IL-10⁺抗CD19⁺CAR細胞を生成するために、3人の異なるドナー（26.1、26.2、および26.3）からのCD4⁺T細胞に、ビーズ活性化の48時間後にLVVIL-10-NGFRおよびLVVCD19-CARを同時に形質導入した。CD4⁺IL-10⁺T細胞（対照）を生成するために、3人の異なるドナー（26.1、26.2、および26.3）からのCD4⁺T細胞に、ビーズ活性化の48時間後にLVVIL-10-NGFRを形質導入した。

20

【0558】

この解析のために、各CD4⁺IL-10⁺細胞（対照）およびCD4⁺IL-10⁺/CART細胞に関して細胞 2×10^5 個（200 μL中）を、Andolfi et al. Mol. Ther. 20(9): 1778-1790(2012)およびLocafaro et al. Mol. Ther. 25(10): 2254-2269(2017)に以前に記載されたように再刺激した。第2ラウンドの再刺激（TF2）の14日後、細胞を、固定した抗CD3および可溶性抗CD28 mAbによって48時間刺激した。培養上清を収集し、IL-10、IL-4、IL-5、およびIFN-γのレベルを、ELISAによって決定した。

30

【0559】

図8A～8Dに示されるように、サイトカイン産生レベルの何らかの個々の差が観察されたが、CD4⁺IL-10⁺/CAR細胞は、CD4⁺IL-10⁺細胞およびTr1細胞（示していない）と同様に、高レベルのIL-10、低レベルのIL-4、ならびに多様なレベルのIFN-γおよびIL-5を産生した。

40

【0560】

類似の結果が、TF3で収集したドナー24.2に由来するCD4⁺IL-10⁺抗CD19⁺CAR細胞について得られた（図9）。この実験のためにCD4⁺IL-10⁺抗CD19⁺CAR細胞を生成するために、ドナー24.2からのCD4⁺T細胞に、LVVIL-10-NGFRおよびLVVCD19-CARを、ビーズ活性化の48時間後に同時に形質導入した（図5Cを参照されたい）。CD4⁺IL-10⁺T細胞（対照）を生成するために、ドナー24.2からのCD4⁺T細胞に、ビーズ活性化の48時間後にLVVIL-10-NGFRのみを形質導入した。この解析のために、各CD4⁺IL-10⁺T細胞（対照）およびCD4⁺IL-10⁺/CART細胞に関して細胞 2×10^5 個（200 μL中）を、Andolfi e

50

t al. Mol. Ther. 20(9): 1778-1790(2012)およびLocafaro et al. Mol. Ther. 25(10): 2254-2269(2017)に以前に記載されるように再刺激した。簡単に説明すると、第3ラウンドの再刺激(TF3)後14日目に、細胞を、固定抗CD3および可溶性抗CD28 mAbによって48時間刺激した。培養上清を収集し、IL-10、IL-4、IL-5、およびIFN- γ レベルをELISAによって決定した。

【0561】

図9に示すように、たとえ長期間の培養後であっても、これらの細胞は、なおも高レベルのIL-10、低レベルのIL-4、ならびに多様なレベルのIL-5およびIFN- γ を産生する。

【0562】

集合的に、図8A~8Dおよび図9のデータは、精製CD4 IL-10細胞にLVV IL-10-NGFRおよびLVV CD19-CARを同時に形質導入することが実現可能であること、ならびにCD4 IL-10 T細胞およびTr1細胞と同じ一意的かつ特徴的なサイトカイン産生プロファイルを有するCD4 IL-10-CART細胞の生成をもたらすことを示している。加えて、CD4 IL-10-CARTを、TF2またはTF3で採取した場合には、サイトカイン産生プロファイルの差は観察されず、このことは、これらのサイトカイン産生プロファイルが長期間にわたって安定であることを示している。

【0563】

[実施例2]

CD4 IL-10抗CD19 CAR細胞の細胞傷害性およびCD19⁺標的細胞とのエンゲージメント後の活性化

CD4 IL-10細胞が、規定の条件下でALL-CMなどの骨髄系腫瘍細胞を殺滅することができることは公知であった(Andolfi et al. Mol Ther. 2012;20(9):1778-1790)。この実験は、抗CD19 CARの共発現が、CD19を発現する細胞株(例えば、NALM6)と共培養した場合にCD19⁺細胞を殺滅することができる細胞(CD4 IL-10抗CD19 CAR)を産生するか否かを評価するために設計された。

【0564】

特に、CD4 IL-10細胞(対照)およびCD4 IL-10抗CD19 CAR細胞はいずれも、ドナー24.2から単離されたCD4⁺T細胞から生成され、3回目の再刺激(TF3)後に収集し(図5Cを参照されたい)、K562、NALM6(CD19⁺)、またはALL-CM標的細胞(10⁵個/ウェル)と1:1の比で3日間共培養した。3日間共培養後、フローサイトメトリーを使用して、各共培養における残存標的細胞の存在を決定した。

【0565】

データは、CD4 IL-10抗CD19 CAR細胞が、CD19-CARとCD19⁺標的細胞とのエンゲージメントを通して、CD19⁺ NALM6細胞を殺滅することを示した。これに対し、対照として使用したCD4 IL-10細胞は、無効であり、CD19⁺ NALM6細胞を殺滅しなかった(図10)。さらに、CD4 IL-10抗CD19 CAR細胞は、CD4 IL-10細胞と同様に、骨髄腫瘍細胞株ALL-CMを殺滅した。CD4 IL-10抗CD19 CAR細胞およびCD4 IL-10細胞はいずれも、非特異的細胞傷害性およびNK細胞による殺滅に対して高度に感受性であるK562細胞に対して細胞傷害作用を示さないかまたは非常に低い細胞傷害作用を有した(図10)。

【0566】

これらの結果は、CD4 IL-10抗CD19 CAR細胞上に発現されたCD19-CARとNALM6リンパ腫細胞上に発現されたCD19とのエンゲージメントが、CD4 IL-10抗CD19 CAR細胞の細胞傷害性機構を誘発し、CD19⁺標的細胞の選択的かつ効率的な殺滅をもたらすことを示す。加えて、CD4 IL-10抗CD19 CAR細胞は、CD4 IL-10細胞と同様に、以前に記載されたように(Andolfi et al. Mol Ther. 2012;20(9):1778-1790)、CD13、クラスI MHC抗原、CD54およびCD112の1つまたは複数を発現する骨髄系標的細胞を殺滅する能力を維持する。

【0567】

選択的細胞傷害活性を誘導することに加えて、CD4⁺IL-10⁺抗CD19⁺ CARとCD19⁺ NALM6標的細胞とのエンゲージメントは、CD4⁺IL-10⁺抗CD19⁺ CAR細胞による選択的活性化およびIL-10産生をもたらした。

【0568】

これらの実験に関して、CD4⁺IL-10⁺細胞（対照）およびCD4⁺IL-10⁺抗CD19⁺ CAR細胞を、3人の異なるドナー（26.1、26.2、および26.3）から単離されたCD4⁺T細胞から生成した。IL-10産生を評価する前に、CD19⁺細胞の選択的殺滅を、3人の異なるドナーの各々から生成されたCD4⁺IL-10⁺抗CD19⁺ CAR細胞に関して確認した。

【0569】

特に、3人の異なるドナー（26.1、26.2、および26.3）から単離されたCD4⁺T細胞から生成したCD4⁺IL-10⁺細胞（対照）およびCD4⁺IL-10⁺抗CD19⁺ CAR細胞を、2回目の再刺激（TF2）後に収集し（図5Cを参照されたい）、K562細胞、NALM6（CD19⁺）細胞、またはALL-CM標的細胞（10⁵個／ウェル）と1：1の比で3日間共培養した。3日間共培養後、フローサイトメトリーを使用して、各共培養物中の残存白血病標的細胞の存在を決定した。非特異的細胞傷害性およびNK細胞による殺滅に対して高度に感受性であるK562細胞株を対照とした。データを図11Aに示す。

【0570】

図11Aに示されるように、3人の異なるドナー（26.1、26.2および26.3）から生成したCD4⁺IL-10⁺抗CD19⁺ CAR細胞は、CD19⁺ NALM6細胞を効率的に殺滅した。CD4⁺IL-10⁺抗CD19⁺ CAR細胞は、骨髓腫瘍細胞株ALL-CMを殺滅するその能力を維持したが、それらは、CD19を発現しないが非特異的細胞傷害性およびNK細胞による殺滅に対して感受性であることが公知であるK562細胞に対して細胞傷害性ではないかまたはごく弱く細胞傷害性であった（図11A）。CD4⁺IL-10⁺抗CD19⁺ CARもまた、ALL-CM、骨髓性白血病細胞株を殺滅した。有意な量のIL-10が、NALM6細胞とわずか3日間共培養後に細胞傷害アッセイの上清において測定された（図11B）。これに対し、NALM6細胞と、同じドナーからのCD4⁺IL-10⁺細胞との共培養では、IL-10（定量の上限：31 pg/mL）を検出することができなかった（図11B）。

【0571】

まとめると、データは、CD4⁺IL-10⁺抗CD19⁺ CAR細胞が、CD19-CARと、関連する標的細胞上で発現されたCD19とのエンゲージメントによって選択的に活性化されることを示した。この活性化は、(i) CD19⁺標的細胞の殺滅をもたらす細胞の細胞傷害／溶解活性、ならびに(ii) CD4⁺IL-10⁺抗CD19⁺ CAR細胞の免疫調節機能およびサプレッサー機能にとって必要であるIL-10産生の誘導をもたらした。さらに、CD4⁺IL-10⁺抗CD19⁺ CAR細胞は、CD4⁺IL-10⁺細胞について以前に観察された、骨髓腫瘍標的細胞に対する同じ細胞傷害能を維持している。最後に、CD4⁺IL-10⁺細胞がCD19⁺ NALM6細胞を殺滅できないことは（図11B）、CD4⁺IL-10⁺抗CD19⁺ CAR細胞の細胞傷害活性が、抗CD19⁺ CARとCD19⁺標的細胞とのエンゲージメントによるものであったことを実証した。

【0572】

[実施例3]

CD4⁺IL-10⁺抗CD19⁺ CAR細胞は、同種CD4⁺およびCD8⁺T細胞の両方の増殖性応答を抑制する

TF2またはTF3で採取したCD4⁺IL-10⁺抗CD19⁺ CAR細胞およびCD4⁺IL-10⁺細胞は各々、高レベルのIL-10を産生することから、両方を、健康なドナーから得た同種CD4⁺およびCD8⁺T細胞の増殖の抑制能に関して試験した。

【0573】

同種CD4⁺T細胞の増殖を評価するために、同種PBMC細胞を、eFluor（登録商標）670（1×10⁵個／ウェル）によって標識し、CD4^{IL-10}細胞（対照）、または2回目の再刺激後に単離したCD4^{IL-10}抗CD19 CAR細胞（1×10⁵個／ウェル）（図5Cを参照されたい）の存在下または非存在下で、成熟同種樹状細胞（DC）（5×10⁴個／ウェル）および可溶性抗CD3 mAbによって1：1のレスポナー：サプレッサー比で刺激した。4日間培養後、CD4⁺増殖性レスポナーT細胞のパーセンテージを、フローサイトメトリーによってeFluor（登録商標）670の希釈により決定した。フローサイトメトリーに関して、細胞を、CD4⁺ΔNGFR-T細胞でゲート設定した。

【0574】

10

同種CD8⁺T細胞の増殖を評価するために、同種PBMC細胞を、eFluor（登録商標）670（1×10⁵個／ウェル）によって標識し、CD4^{IL-10}細胞（対照）または2回目の再刺激後に単離したCD4^{IL-10}抗CD19 CAR細胞（1×10⁵個／ウェル）（図5Cを参照されたい）の存在下または非存在下で、同種成熟樹状細胞（DC）（5×10⁴個／ウェル）および可溶性抗CD3 mAbによって1：1のレスポナー：サプレッサー比で刺激した。4日間培養後、CD8⁺増殖性レスポナーT細胞のパーセンテージを、フローサイトメトリーによってeFluor（登録商標）670の希釈により決定した。フローサイトメトリーに関して、細胞を、CD8⁺ΔNGFR-T細胞でゲート設定した。

【0575】

20

同種PBMCの増殖を評価するために、同種PBMC細胞を、eFluor（登録商標）670（1×10⁵個／ウェル）によって標識し、CD4^{IL-10}（対照）または2回目の再刺激後に単離したCD4^{IL-10}抗CD19 CAR細胞（1×10⁵個／ウェル）（図5Cを参照されたい）の存在下または非存在下で同種成熟樹状細胞（DC）（5×10⁴個／ウェル）および可溶性抗CD3 mAbによって1：1のレスポナー：サプレッサー比で刺激した。4日間培養後、CD8⁺増殖性レスポナーT細胞のパーセンテージを、フローサイトメトリーによってeFluor（登録商標）670の希釈により決定した。フローサイトメトリーに関して、細胞を、CD3⁺ΔNGFR-T細胞でゲート設定した。

【0576】

30

図12に示すように、TF2で採取した3人の異なる健康なドナー26.1、26.2、および26.3に由来するCD4^{IL-10}抗CD19 CAR細胞はそれぞれ、同種CD4⁺T細胞の増殖を78%、48%、および74%抑制する。それらはまた、同種CD8⁺T細胞の増殖もそれぞれ、77%、41%、および42%抑制する（図13）。同じ3人のドナー（すなわち、26.1、26.2、および26.3）から生成したCD4^{IL-10}細胞について同等の結果が得られ、これらは、同種CD4⁺T細胞の増殖をそれぞれ、83%、81%、および61%阻害し、CD8⁺T細胞の増殖をそれぞれ、77%、41%、および68%阻害した（図12および図13）。最後に、CD4^{IL-10}抗CD19 CAR細胞およびCD4^{IL-10}細胞はまた、TF3で採取した場合に同種T細胞の増殖の抑制においても有効であった。特に、CD4^{IL-10}抗CD19 CAR細胞は、CD4^{IL-10}細胞と同様に、PBMCの増殖をそれぞれ、69%および60%抑制した（図14）。

40

【0577】

まとめると、これらの結果は、CD4^{IL-10}/CAR細胞が、同種CD4⁺T細胞および同種CD8⁺T細胞の両方に対して免疫抑制効果を有し、免疫抑制効果が、CD4^{IL-10}細胞の免疫抑制効果と同等であり；CARの共発現が、CD4^{IL-10}細胞の免疫抑制効果を排除または変更しなかったことを示した。結果はまた、免疫抑制機能が、長期の培養期間後でも（すなわち、TF3後に単離したCD4^{IL-10}抗CD19 CAR T細胞において）安定であることを示した。

【0578】

50

[実施例 4]

CD4 IL-10 抗CD19 CAR細胞を使用するGvHDおよびがんの処置または防止
CD4 IL-10 抗CD19 CAR細胞の *in vivo* の効果

CD4 IL-10 抗CD19 CAR細胞集団を、ヒト化 *xeno-GvHD* 疾患および腫瘍移植NSGマウスモデルにおいて、CD19⁺腫瘍成長、GvL作用、およびGvHDの誘導に及ぼすその効果に関して試験した。

【0579】

NSGマウスに、その体重に従って致死量下の175~200Grを照射した。0日目、NSGマウスに、(i)NALM6-ルシフェラーゼ(1×10⁵個/マウス)、(ii)NALM6-ルシフェラーゼ(1×10⁵個/マウス)+PBMC(2.5×10⁶個/マウス)、(iii)NALM6-ルシフェラーゼ(1×10⁵個/マウス)+CD4 IL-10 抗CD19 CAR細胞(2.5×10⁶個/マウス)、または(iv)NALM6-ルシフェラーゼ(1×10⁵個/マウス)+PBMC(2.5×10⁶個/マウス)+CD4 IL-10 抗CD19 CAR細胞(2.5×10⁶個/マウス)を注射した(図15を参照されたい)。

10

【0580】

白血病細胞の成長に及ぼす効果を、標準的な生物発光測定によって決定した(図16A~16Bを参照されたい)。加えて、マウスを、PBMCおよび/またはCD4 IL-10 抗CD19 CAR細胞の投与後0、9、12、および15日目に体重を測定することによって、GvHDの発症に関してモニターした(図17を参照されたい)。

20

【0581】

図16A~16Bに示すように、PBMCは、ヒト患者におけるアロ-HSCTの移植片対白血病効果のモデルであるNALM6細胞の成長を阻害したが(図16A~16B)、それらは、ヒトアロ-HSCT療法で認められるGvHDと類似の*xeno-GvHD*をマウスにおいて誘導した(図17)。これに対し、CD4 IL-10 抗CD19 CAR細胞は、NALM6細胞の成長を阻害し(図16A~16B)、体重減少によって決定した場合に*xeno-GvHD*のいかなる徴候も引き起こさなかった(図17)。PBMC+CD4 IL-10/CART細胞による処置は、最大の抗白血病効果(図16A~16B)および最大の抗腫瘍効果(図17)を有した。

【0582】

これらのデータは、CD4 IL-10 抗CD19 CART細胞が、強く細胞傷害性であり、*in vivo*でCD19⁺標的細胞を選択的に殺滅することを示している。加えて、それらは、PBMCの保護的GvL効果を妨害せず、実際に、それらは相乗的に作用する。PBMCとは対照的に、CD4 IL-10 抗CD19 CART細胞単独またはPBMCとの組合せによる処置は、*xeno-GvHD*を誘導しなかった。

30

【0583】

[実施例 5]

CD4 IL-10 抗CD19 CAR細胞は *in vivo* で抑制活性を有し、および重度*xeno-GvHD*を有効に防止する

図18Aに記載する追加の試験を使用して、単ードナーもしくはポリドナーCD4 IL-10 抗CD19 CAR細胞がGvHDを誘導するか否か、およびそれらがPBMCによって誘導されるGvHDから保護するか否かを評価した。特に、ヒト化NSGマウスに、致死量下の放射線を照射し、GvHDを同種PBMCによって誘導した。マウスを、図18Aに従って処置した。3日目に、マウスに(i)PBMC(2.5E6細胞/マウス)、(ii)単ードナー(BC26.3)CD4 IL-10 抗CD19 CAR細胞(2.5E6細胞/マウス)、(iii)ポリドナー(BC-26.1、BC26.2、およびBC26.3)CD4 IL-10 抗CD19 CAR細胞(2.5E6細胞/マウス)、(iv)PBMC(2.5E6細胞/マウス)および単ードナー(BC26.3)CD4 IL-10 抗CD19 CAR細胞(2.5E6細胞/マウス)、または(v)PBMC(2.5E6細胞/マウス)およびポリドナー(BC-26.1、BC26.2、およびBC2

40

50

6.3) CD4 IL-10 抗CD19 CAR細胞 (2.5e6細胞/マウス) を静脈内投与した (図18Aを参照されたい)。GvHDを、体重減少、毛並みの外観、皮膚の外観、体を丸める、および活動度の複合スコアを使用して決定した (Bondanza et al. 2006)。複合スコア ≥ 6 のマウス、および/または体重減少 $\geq 20\%$ のマウスを、人道的理由から安楽死させた。PBMCのドナーは、単ドナーCD4 IL-10 抗CD19 CARおよびポリドナーCD4 IL-10 抗CD19 CARを生成するために使用したドナーとは非血縁であった。

【0584】

図18Bおよび図18Cに示すように、2.5E6 PBMC細胞の注射は、16日までに劇症型の急速に致死性のxeno-GvHDを誘導したが、2.5E6 単ドナーCD4 IL-10 抗CD19 CAR細胞 (図18B) または2.5E6 ポリドナーCD4 IL-10 抗CD19 CAR細胞 (図18C) を投与したマウスは、xeno-GvHDのいかなる徴候も示さなかった。さらに、マウスに、2.5E6 PBMCおよび2.5E6 単ドナーCD4 IL-10 抗CD19 CAR細胞 (図18B) または2.5E6 PBMCおよび2.5E6 ポリドナーCD4 IL-10 抗CD19 CAR細胞 (図18C) の両方を投与すると、PBMCおよび単ドナーCD4 IL-10 抗CD19 CAR細胞またはポリドナーCD4 IL-10 抗CD19 CARの共投与は、PBMC誘導xeno-GvHDに対してマウスを保護した。

【0585】

これらの結果は、単ドナーCD4 IL-10 抗CD19 CAR細胞およびポリドナーCD4 IL-10 抗CD19 CARが、in vivoでxeno-GvHDを誘導しないことを示している。加えて、単ドナーCD4 IL-10 抗CD19 CAR細胞およびポリドナーCD4 IL-10 抗CD19 CARは、PBMCによって誘導される重度xeno-GvHDを有効に防止し、それらがin vivoで抑制活性を有することを実証する。

【0586】

他の実験

処置群のマウスを、CD4 IL-10 / CAR細胞が長期間の生存に及ぼす効果を決定するために追加の期間モニターする。

【0587】

CD4 IL-10 / CAR細胞の量および局在をまた、投与後の末梢血および組織中でもモニターする。具体的には、CD4 IL-10 / CAR細胞の存在を、末梢血および炎症部位：リンパ節、脾臓、腸管、および骨髄でモニターする。処置群 (複数可) のマウスを、長期間の生存を決定するためにさらに3週間モニターする。

【0588】

結果は、xeno-GvHDの低減および防止が持続することを実証する。

【0589】

[実施例6]

CD4 IL-10 / CAR細胞を使用する慢性炎症および自己免疫疾患の処置

NLPR3インフラマソームの活性化は、多くの慢性炎症および自己免疫疾患に関係している。NLPR3インフラマソームは、単球/マクロファージによる炎症促進性サイトカインIL-1 β およびIL-18のカスパーゼ1媒介産生をもたらす「危険シグナル」によって活性化され得る。一連のin vitro実験を実施して、NLPR3インフラマソームおよびヒト単球によるIL-1 β / IL-18産生に及ぼすCD4 IL-10 / 抗CD19 CAR細胞の効果を調べる。

【0590】

最初に、ヒトPBMCを、Ficoll / Paque (Sigma-Aldrich) 上での標準的な密度勾配遠心分離によって末梢血から単離する。単球を、単球単離キットII (Miltenyi) を製造元の使用説明書に従って使用して負の選択によりヒトPBMCから単離する。正の選択または接着は、細胞の望ましくない活性化をもたらし得る

ことから、負の選択が好ましい。単離された単球を、96ウェルマイクロタイタープレートにおいて3%毒素フリーのヒトAB血清を含有する培養培地中、CD4⁺IL-10⁺/抗CD19⁺CAR細胞上清の様々な希釈液/200μl/ウェルの存在下、 5×10^4 個/200μlで播種する。

【0591】

表1は、各セットが6ウェルの細胞を含む、単球の異なるセットに適用した処置条件を要約する。単球を、LPSと、NLRP3インフラマソーム活性化剤であるニゲリシンとの組合せによって活性化する。カスパーゼ1阻害剤であるZ-YVADfmkおよび特異的NLRP3阻害剤MC950を、対照として示されるように添加する。

【0592】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1					
群#	単球	CD4 細胞/上清	YVADfmk*	LPS** プラス ニゲリシン	その他
培地対照					
インキュベーション時間: 1 時間;その後 LPS による 4 時間の活性化					
1	単球	なし	なし	なし	
2	単球	なし	なし	LPS + Nig	
3	単球	なし	Z-YVADfmk	LPS + Nig	
4	単球	なし	MCC950	LPS + Nig	
単一ドナーもしくはポリドナーCD4 ^{IL-10/CAR} 細胞または-CD4 ^{GFP} 細胞培養から得た 上清***の存在下での単球の培養					
5	単球	単一ドナー CD4 ^{IL-10/CAR} 細胞 の 50%上清	なし	LPS + Nig	
6	単球	単一ドナー CD4 ^{IL-10/CAR} 細胞 の 25%上清	なし	LPS + Nig	
7	単球	単一ドナー CD4 ^{IL-10/CAR} 細胞 の 12.5%上清	なし	LPS + Nig	
8	単球	単一ドナー CD4 ^{IL-10/CAR} 細胞 の 50%上清	なし	LPS + Nig	抗 IL-10 受容体 抗体
9	単球	ポリドナー CD4 ^{IL-10/CAR} 細胞 の 50%上清	なし	LPS + Nig	
10	単球	ポリドナー CD4 ^{IL-10/CAR} 細胞 の 25%上清	なし	LPS + Nig	
11	単球	ポリドナー CD4 ^{IL-10/CAR} 細胞 の 12.5%上清	なし	LPS + Nig	
12	単球	ポリドナー CD4 ^{IL-10/CAR} 細胞 の 50%上清	なし	LPS + Nig	抗 IL-10 受容体 抗体
13	単球	CD4 ^{GFP} 細胞の 50%上清	なし	LPS + Nig	

* Z-YVADfmk は、カスパーゼ 1 に対して特異的な阻害剤である。DMSO に溶解した 20 μM Z-YVADfmk (Biovision, Enzo Life Sciences, または Axxora Life Sciences) を使用する。

** LPS (Sigma-Aldrich) 100ng/mL プラスニゲリシン (Nig, Invivogen) 10 μM を、LPS インキュベーションの最後の 30 分間添加した。MCC950 (Invivogen) 10 μM。

*** CD4^{IL-10} および CD4^{GFP} または NGFR 培養の上清を、CD4^{IL-10} または CD4^{GFP} 細胞を 1×10⁶/mL で 3 日間インキュベートし、上清を収集することによって得る。IL-10 産生レベルを、IL-10 特異的 ELISA によって測定する。抗 IL-10R 抗体 (Biolegend) 30μg/mL。

【0593】

表 1 に概要した処置後、上清を、各群に関して 6 個のウェルから収集し、IL-1β / IL-18 産生を、成熟 IL-1β または IL-18 (Biolegend) に対して特異的な ELISA によって測定する。選択した群から収集した細胞を、ウェスタンブロットによって解析し、活性化カスパーゼ 1 のレベルを決定する。

【0594】

実験データは、自己単一ドナー、同種単一ドナー、および同種ポリドナー CD4^{IL-10} / 抗 CD19 CAR 細胞が、活性化された単球による IL-1β および IL-18 産生を下方調節することを示す。それらはさらに、自己単一ドナー、同種単一ドナー、およ

び同種ポリドナーCD4⁺IL-10⁺/抗CD19⁺CAR細胞が、活性化された単球による成熟カスパーゼ-1産生を下方調節することを示している。加えて、自己単一ドナー、同種単一ドナー、および同種ポリドナーCD4⁺IL-10⁺/抗CD19⁺CARおよびポリドナーCD4⁺IL-10⁺によって産生されたIL-10は、インフラマソームを下方調節する。

【0595】

類似の実験を、単球ではなくてヒトマクロファージまたは樹状細胞について実施する。実験結果は、CD4⁺IL-10⁺/抗CD19⁺CAR細胞が、活性化されたマクロファージおよび樹状細胞からのIL-1 β 、IL-18、および成熟カスパーゼ-1産生をさらに下方調節することを実証する。

【0596】

これらのデータは、自己単一ドナー、同種単一ドナー、および同種ポリドナーCD4⁺IL-10⁺/抗CD19⁺CAR細胞を使用して、NLRP3インフラマソームの過剰活性化を伴う疾患または障害を処置することができることを示している。特に、自己単一ドナー、同種単一ドナー、および同種ポリドナーCD4⁺IL-10⁺/抗CD19⁺CAR細胞を使用して、慢性炎症疾患および自己免疫疾患を処置することができる。NLRP3インフラマソームは、外因性または内因性の「危険シグナル」、例えば病原体関連分子パターン(PAMP)、シリカ、アスベスト、損傷を受けたミトコンドリア、壊死した細胞、およびストレスを受けた細胞からの危険関連分子パターン(DAMP)様産物、ならびに尿酸結晶によって活性化され得る。

【0597】

[実施例7]

ポリドナーCD4⁺IL-10⁺細胞の生成

ベクターの産生

ポリドナーCD4⁺IL-10⁺細胞を、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第2016/146542号パンフレットに記載されるように、ヒトIL-10およびNGFRの切断型(Δ NGFR)の両方のコード配列を含有するレンチウイルスベクターの形質導入によって産生した(図3A~3B)。ベクターの配列を配列番号5に提供する。簡単に説明すると、レンチウイルスベクターを、pH15C(ATCC 68192)の549bp断片からのヒトIL-10のコード配列を、プラスミド#1074.1071.hPGK.GFP.WPRE.mhCMV.dNGFR.SV40PAにライゲーションすることによって生成した。双方向性プロモーター(ヒトPGKプロモータープラス反対方向のCMVプロモーターの最小コアエレメント)の存在は、2つのトランスジーンの共発現を可能にする。プラスミドは、抗生物質耐性遺伝子(例えば、アンピシリンまたはカナマイシン)のコード配列をさらに含有する。

【0598】

レンチウイルスベクターを、293T細胞へのCa₃PO₄-過性4プラスミド共トランスフェクションによって産生し、超遠心分離によって濃縮した。1 μ M酪酸ナトリウムを、ベクター収集のために培養物に添加した。力価を、293T細胞において限界希釈によって推定し、ベクター粒子をHIV-1Gag-p24抗原免疫捕捉(NEN Life Science Products; Waltham, MA)によって測定した。ベクターの感染力を、力価と粒子の間の比として計算した。濃縮ベクターに関して、力価は、5 $\times$ 10⁸~6 $\times$ 10⁹形質導入単位/mL、および感染力は5 $\times$ 10⁴~5 $\times$ 10⁵形質導入単位/ngの範囲であった。

【0599】

CD4⁺IL-10⁺細胞の産生

図19は、CD4⁺IL-10⁺細胞の産生プロセスの概略図である。健康なドナーからのCD4⁺T細胞を精製した。ヒトCD4⁺T細胞を、可溶性抗CD3、可溶性抗CD28mAb、およびrhIL-2(50U/mL)によって48時間活性化後、ヒトIL-10およびヒトNGF受容体の切断型をコードする双方向性レンチウイルスベクター(LV

－IL－10／ΔNGFR）を感染多重度（MOI）20で形質導入した。

【0600】

11日後、形質導入した細胞を、ΔNGFRの発現に関してFACSによって解析し、ベクターコピー数（VCN）を、デジタルドロップレットPCR（ddPCR）によって定量した。

【0601】

10人の異なるドナーからのCD4⁺T細胞の平均形質導入効率は、45±17%であり、VCNは2.7±0.6%であった。図20Aは、LV－IL－10／ΔNGFR（ヒトIL－10およびヒトNGF受容体の切断型をコードする双方向性レンチウイルスベクター）を形質導入したヒトCD4⁺T細胞におけるCD4⁺ΔNGFR⁺細胞のパーセンテージ（平均値±SD、n=10、左の棒グラフ）およびベクターコピー数（VCN、平均値±SD、n=10、右の棒グラフ）を示す。CD4⁺ΔNGFR⁺細胞の頻度およびベクターコピー数を、CD4^{IL－10}細胞においてデジタルドロップレットPCR（ddPCR）によって定量した。

10

【0602】

ΔNGFR⁺T細胞を、抗CD271 mAb－コーティングマイクロビーズを使用して精製し、>95%純粋なCD4^{IL－10}細胞集団を得た。精製後、細胞を、CD4およびΔNGFRのマーカーによって染色し、FACSによって解析した。データは、精製ステップから得られた純度が98%を超えたことを示した。図20Bは、試験した10人のドナーのうち2人の代表的なドナー（ドナーBおよびドナーC）からのFACSデータを示す。精製CD4^{IL－10}細胞を、14日間隔で3回再刺激し、その*in vitro*および*in vivo*機能を、2回目（TF2）および／または3回目の再刺激（TF3）機能後に試験した。

20

【0603】

休止期CD4^{IL－10}細胞は、IL－10を構成的に産生した。活性化すると、産生されるIL－10レベルは強く増強された。

【0604】

CD4^{IL－10}細胞は、天然由来のTr1細胞のプロファイルと同等のサイトカイン産生プロファイルを有する

単一ドナーCD4^{IL－10}細胞のサイトカイン産生プロファイルを、2回目（TF2）および3回目（TF3）の再刺激後に解析し、結果を図21に提供する。具体的には、CD4^{IL－10}細胞（200μl中に細胞2×10⁵個）を、以前に記載されるように（Andolfi et al. Mol Ther. 2012;20(9):1778-1790およびLocafaro et al. Mol Ther. 2017;25(10):2254-2269）再刺激した。14日目、第2ラウンド（TF2）および第3ラウンド（TF3）の再刺激後、CD4^{IL－10}細胞を、非刺激のままとしたか（オレンジ色の棒グラフ）、または固定抗CD3および可溶性抗CD28 mAb（灰色の棒グラフ）によって48時間刺激した。培養上清を収集し、IL－10、IL－4、IL－5、IFN－γ、およびIL－22のレベルをELISAによって決定した。全ての試料を三連で試験した。試験したn=8ドナーの平均値±SDを示す。図21に提供される結果は、固定抗CD3および可溶性抗CD28 mAbによって刺激したCD4^{IL－10}細胞が、Tr1細胞サイトカイン産生プロファイルを示すことを示す。

30

【0605】

異なるドナー間にはかなりの変動が観察されたが、2回目（TF2）または3回目（TF3）の再刺激後の全体的なサイトカイン産生プロファイルは、同等であり、Tr1細胞のプロファイルを反映した（Roncarolo et al., Immunity, 2018）。Tr1細胞と同様に、CD4^{IL－10}細胞は、高レベルのIL－10、IL－5、IFN－γ、およびIL－22を産生したが、低レベルのIL－4および検出不能レベルのIL－2を産生した。

40

【0606】

CD4^{IL－10}細胞は、高レベルのグランザイムを発現し、骨髄性白血病細胞を選択的

50

に殺滅する

CD4^{IL-10}細胞を、第2ラウンド(TF2)の再刺激後にグランザイムB(GzB)の発現に関してさらに解析した。図22Aのデータは、ほとんどのCD4^{IL-10}細胞がGzBを発現したことを示している。7人の異なるドナーに由来する全てのCD4^{IL-10}細胞の95%より多くが、高レベルのグランザイムBを発現した。

【0607】

第2ラウンド(TF2)の再刺激からのCD4^{IL-10}細胞を、骨髄性白血病細胞(ALL-CM)および赤白血病細胞株(K562)に対するその細胞傷害効果に関してさらに解析した。CD4^{IL-10}細胞(10⁵個/ウェル)を、K562およびALL-CM細胞(10⁵個/ウェル)と1:1の比で3日間共培養した。残存白血病細胞株(CD45^{low}CD33⁺)を、各標的細胞に関してFACSによって計数した。

10

【0608】

CD4^{IL-10}細胞は、図22Bに示すように骨髄性白血病細胞(ALL-CM)を選択的に殺滅した。殺滅されたALL-CM細胞の%は、62%~100%の間で変動したが、赤白血病細胞株K562(非特異的細胞傷害活性に対して高度に感受性である)の殺滅は、0~27%の間で変動した(試験した4人の異なるドナー)。まとめると、これらのデータは、CD4^{IL-10}細胞がグランザイムBを発現し、骨髄性白血病細胞を有効に殺滅することを確認する。予想されたように、個々のドナーからのCD4^{IL-10}細胞の殺滅能の何らかの変動が観察された。

20

【0609】

CD4^{IL-10}細胞は、同種CD4⁺およびCD8⁺T細胞の両方の増殖応答を抑制する。CD4^{IL-10}細胞をまた、同種CD4⁺T細胞またはCD8⁺T細胞に及ぼすその効果に関して解析した。具体的には、同種PBMC細胞を、eFluor(登録商標)670(10⁵個/ウェル)によって標識し、CD4^{IL-10}細胞(10⁵個/ウェル)の存在下または非存在下で、同種成熟樹状(DC)細胞(5×10⁴個/ウェル)および可溶性抗CD3 mAbによって1:1のレスポナー:サプレッサー比で刺激した。4日間培養後、増殖性のレスポナー細胞のパーセンテージを、フローサイトメトリーによって、CD4⁺ΔNGFR⁻T細胞またはCD8⁺ΔNGFR⁻T細胞に関してゲート設定後、eFluor(登録商標)670の希釈により決定した。図23Aおよび23Bは、CD4⁺T細胞に及ぼす、6人の異なるプールされていないドナー(図23AではドナーC、ドナーE、およびドナーF、ならびに図23BではドナーH、ドナーI、およびドナーL)からのCD4^{IL-10}細胞の効果を、増殖および抑制のパーセンテージで示す。図24Aおよび24Bは、CD8⁺T細胞に及ぼす、6人の異なるプールされていないドナー(図24AではドナーC、ドナーE、およびドナーF、ならびに図24BではドナーH、ドナーI、およびドナーL)からのCD4^{IL-10}細胞の効果を示す。

30

【0610】

結果は、6人の異なるドナーからのプールされていない個別に試験したCD4^{IL-10}細胞が、同種CD4⁺およびCD8⁺T細胞の両方の増殖応答を下方調節したことを実証した。CD4⁺T細胞に及ぼす抑制効果は、51%~96%の間で変動したが、CD8⁺T細胞に及ぼす抑制効果は、62%~73%の間で変動した。

40

【0611】

ポリドナーCD4^{IL-10}細胞の産生および特徴付け

CD4^{IL-10}細胞を、複数のドナーからのCD4⁺細胞を使用して上記および図19に記載されるように生成した。各ドナーからのCD4^{IL-10}細胞を、2回目(TF2)および3回目(TF3)の再刺激によって刺激した。3回目の刺激後、3人のドナーからのCD4^{IL-10}細胞を、1:1:1の比でプールし、固定抗CD3および可溶性抗CD28 mAbによって48時間刺激した。

【0612】

ポリドナーCD4^{IL-10}細胞は、個々のドナーのCD4^{IL-10}細胞およびTr1細胞のプロファイルと同等であるサイトカイン産生プロファイルを有する

50

培養上清を収集し、IL-10、IL-4、IL-5、IFN- γ およびIL-22のレベルをELISAによって決定した。図25に提供した結果は、3人の異なる同種ドナーからプールした（1:1:1でプールした）ポリドナーCD4^{IL-10}細胞のサイトカイン産生（赤色のドット）が、個々のドナー（n=8）由来のCD4^{IL-10}細胞（灰色の棒グラフ）からのCD4^{IL-10}細胞のサイトカイン産生と同等であったことを示している。ポリドナーCD4^{IL-10}細胞は、高レベルのIL-10、IL-5、IFN- γ およびIL-22、ならびに低レベルのIL-4、および検出不能レベルのIL-2（示していない）を産生した。これらのデータは、CD4^{IL-10}細胞をプールのことが実現可能であること、およびこれらのポリドナーCD4^{IL-10}細胞が、単一ドナー由来のCD4^{IL-10}細胞およびTr1細胞のサイトカイン産生シグネチャーを維持することを示している。重要なことに、プールした同種細胞集団は、>95%の生存細胞を含有し、それらが互いを殺滅しなかったことを示している。

10

【0613】

ポリドナーCD4^{IL-10}細胞は、高レベルのグランザイムBを発現し、骨髄性白血病細胞株を殺滅する

ポリドナーCD4^{IL-10}細胞を、第3ラウンド（TF3）の再刺激後、グランザイムB（GzB）の発現に関してさらに解析した。図26Aのデータは、ほとんどのポリドナーCD4^{IL-10}細胞がGzBを発現することを示している。ポリドナーCD4^{IL-10}細胞の95%より多くが、単一ドナー由来CD4^{IL-10}細胞のGzB発現と同等であるグランザイムBを発現した。

20

【0614】

第3ラウンド（TF3）の再刺激からのCD4^{IL-10}細胞を、骨髄性白血病細胞（ALL-CM細胞株）またはK562に及ぼすその細胞傷害効果に関してさらに解析した。ポリドナーCD4^{IL-10}細胞（10⁵個/ウェル）を、K562およびALL-CM細胞（10⁵個/ウェル）と、1:1の比で3日間共培養した。残存白血病細胞株（CD45^{low}CD33⁺）を、各標的細胞に関してFACSにより計数した。図26Bに提供した結果は、非特異的細胞傷害性およびNK細胞の細胞傷害性に対して高度に感受性であるK562細胞に対する何らかのレベルの細胞傷害性を示す。それにもかかわらず、単一ドナー由来CD4^{IL-10}細胞のレベルと同等である骨髄性白血病細胞（ALL-CM）に対する選択性のレベルが得られた。

30

【0615】

ポリドナーCD4^{IL-10}細胞は、同種CD4⁺およびCD8⁺T細胞の両方の増殖応答を抑制する

ポリドナーCD4^{IL-10}細胞をまた、同種CD4⁺T細胞またはCD8⁺T細胞に及ぼすその効果に関して解析した。具体的には、同種PBMC細胞を、eFluor（登録商標）670（10⁵個/ウェル）によって標識し、ポリドナーCD4^{IL-10}細胞（10⁵個/ウェル）の存在下または非存在下、同種成熟樹状（DC）細胞（5×10⁴個/ウェル）および可溶性抗CD3 mAbによって1:1のレスポナー：サプレッサー比で刺激した。4日間培養後、増殖性のレスポナー細胞のパーセンテージを、フローサイトメトリーによって、CD4⁺ Δ NGFR⁻T細胞およびCD8⁺ Δ NGFR⁻T細胞に関してゲート設定後、eFluor（登録商標）670の希釈により決定した。図27Aは、ドナーC、ドナーE、およびドナーFからのCD4^{IL-10}細胞を含有するポリドナーCD4^{IL-10}細胞の結果を示す。図27Bは、試験前に凍結、保存、および融解されているドナーH、ドナーI、およびドナーLからのCD4^{IL-10}細胞を含有するポリドナーCD4^{IL-10}細胞の結果を示す。

40

【0616】

図27Aは、ポリドナーCD4^{IL-10}細胞（3人の異なるドナーから）がCD4⁺およびCD8⁺T細胞応答をそれぞれ、96%および74%抑制することを示す。試験前に細胞が凍結、保存および融解されていた後に試験したポリドナーCD4^{IL-10}細胞の第2の異なるバッチについて同等の結果が得られた（図27B）。CD4⁺およびCD

50

8⁺T細胞増殖の抑制はそれぞれ、68%および75%であった。これらのデータは、ポリドナーCD4⁺IL-10細胞を、機能を失うことなく凍結および保存することができることを示している。

【0617】

集散的に、ポリドナーCD4⁺IL-10細胞について得られたデータは、これらの細胞調製物を、いかなる問題もなくプールすることができることを示している。それらは、>95%の生存細胞を含有し、単ドナーCD4⁺IL-10細胞の全ての関連する機能（サイトカイン産生、細胞傷害能、および同種T細胞応答の抑制）を維持する。ポリドナーCD4⁺IL-10細胞のより大きいプールの使用は、異なる個々のドナーを起源とするCD4⁺IL-10細胞ロット間で観察される自然の変動を低減させるはずであり、ヒト治療のための大量の既製のCD4⁺IL-10細胞を提供するはずである。

10

【0618】

ポリドナーCD4⁺IL-10細胞産物は、良好に定義された、ロット間の変動が少ない、効力、および放出基準の決定を可能にするより均質な産物に関して有意な利点を有する。加えて、これは、連続的な大規模細胞産生プロセスの開発を可能にする。

【0619】

ポリドナーCD4⁺IL-10細胞の他の産生方法

レンチウイルス形質導入の前に、少なくとも3～5人の異なるドナーからのバフィーコートプールした。CD4⁺細胞を、抗CD4抗体を使用する正の選択によってバフィーコートから単離した。プールしたCD4⁺細胞の純度をFACSによってチェックした。あるいは、凍結したヒトCD4⁺細胞を、少なくとも3～5人の健常ドナーから得た。凍結したヒトCD4⁺細胞を、使用前に融解した。バフィーコートまたは凍結保存物からのCD4⁺細胞を、CD3およびCD28抗体の組合せ、またはCD3およびCD28抗体コーティングビーズによって、IL-2の存在下で24～48時間活性化した。一部の例では、バフィーコートまたは凍結保存物からのCD4⁺細胞を、可溶性抗CD3、可溶性抗CD28 mAbs、およびrhIL-2（50 U/mL）によって48時間活性化し、CD4⁺IL-10細胞を産生するために、上記のようにヒトIL-10をコードする双方向性レンチウイルスベクターを形質導入した。

20

【0620】

一部の例では、T細胞ドナー（またはドナーから単離されたCD4⁺細胞）のHLAハプロタイプを最初に決定し、所望のHLAハプロタイプを有するCD4⁺細胞を選択的にプールして使用する。

30

【0621】

ポリドナーCD4⁺IL-10細胞を、上記の活性化CD4⁺細胞に、上記のヒトIL-10およびΔNGFRコード配列を含有するレンチウイルスベクターを形質導入することによって生成した。

【0622】

形質導入の5～9日後である7～11日目に、細胞を収集し、形質導入が成功したT細胞を、抗NGFR抗体を利用して精製した。このプロセスは一般的に、ポリドナーCD4⁺IL-10細胞の95%純粋な集団をもたらす。

40

【0623】

精製されたポリドナーCD4⁺IL-10細胞を計数し、CD3およびCD28抗体の混合物、CD3およびCD28抗体コーティングビーズによって、任意選択でフィーダー細胞の存在下、IL-2の存在下でさらに8～10日間再刺激した。一部の例では、精製されたポリドナーCD4⁺IL-10細胞を、フィーダー細胞の存在下で再刺激した。

【0624】

14～18日間の総培養期間の後、CD4⁺IL-10細胞を採取し、計数し、自然発生の、またはCD3およびCD28抗体、もしくはCD3およびCD28抗体コーティングビーズによる活性化後の、IL-10の産生能に関して試験した。加えて、GrzBおよびパーフォリンのレベルを測定した。それらが、ヒトT細胞（PBMC）ならびに精製C

50

D4⁺およびCD8⁺T細胞増殖を抑制する能力もまた試験する。

【0625】

加えて、IL-22の産生を、構成的に、ならびにIFN- γ 、IL-10、IL-4およびIL-5などの他のサイトカインの産生に関して以前に記載されたCD3およびCD28抗体の組合せを使用して200マイクロリットルの容量中で、200,000個のCD4⁺IL-10細胞の活性化後に測定する。プールしたCD4⁺IL-10細胞を、凍結後、保存した。

【0626】

[実施例8]

ポリドナーCD4⁺IL-10細胞を使用するGvHDの処置または防止

10

ポリドナーCD4⁺IL-10細胞の*in vivo*での効果

ポリドナーCD4⁺IL-10細胞集団を、ヒト化*xeno* GvHD疾患モデル、NSGマウスモデルにおいて、図28に例証されるようにヒトPBMCによって誘導される*xeno*-GvHDに及ぼすその効果に関して試験した。NSGマウスに、致死量下の放射線を照射し、ヒトPBMC (5×10^6 個/マウス)、ポリドナー(3人のドナー)CD4⁺IL-10細胞 (5×10^6 個/マウス)、またはヒトPBMC (5×10^6 個/マウス)とポリドナーCD4⁺IL-10細胞 (BC-C/E/F) (5×10^6 個/マウス)の組合せを静脈内注射した。*Xeno*-GvHDを、以前に記載されるように(Bondanza et al. Blood 2006)、体重減少(>20%体重減少)、皮膚病変、毛並みの状態、活動度、および体を丸めることに基づいて評価した。

20

【0627】

図29は、注射後、各々の日において*xeno*-GvHDを実証するNSGマウスの%を示す。 5×10^6 個のヒトPBMCを、放射線照射したNSGマウスに投与すると、予想外にも異常な劇症GvHDをもたらした。全てのマウスが、10日目に死亡し、これは非常に致死性の*xeno*-GvHDを反映する。 5×10^6 個のポリドナーCD4⁺IL-10細胞を共投与すると、この劇症GvHDを遅らせたが、マウスが、14日目に殺基

30

【0628】

ヒトCD4⁺IL-10細胞の存在をまた、ヒトPBMC (5×10^6 個/マウス)、ポリドナー(3人のドナー; BC-C/E/F)CD4⁺IL-10細胞 (5×10^6 個/マウス)、またはヒトPBMC (5×10^6 個/マウス)とポリドナーCD4⁺IL-10細胞(3人のドナー; BC-C/E/F) (5×10^6 個/マウス)の組合せを、注射後14日目に注射したNSGマウスの脾臓(図30、左のパネル)および骨髓(図30、右のパネル)においても試験した。図30で提供される結果は、ポリドナーCD4⁺IL-10細胞が脾臓および骨髓に遊走したことを示す。これらの細胞の低いパーセンテージが、細胞注入の14日後に存在することが見出された。これらの結果は、ポリドナーCD4⁺IL-10細胞が、ヒトPBMCによって誘導される劇症*xeno*-GvHDを遅らせたが、それ自身はいかなる*xeno* GvHDも誘導しないことを示している。

40

【0629】

ポリドナーCD4⁺IL-10細胞は、精製CD4⁺細胞による重度*xeno*-GvHDを阻害する

ポリドナーCD4⁺IL-10細胞を、図31に例証されるように、GvHD疾患を2. 5×10^6 個の精製ヒトCD4⁺T細胞の投与によって誘導するヒト化*xeno*-GvHDモデルにおいて試験した。NSGマウスに、0日目に致死量下の放射線を照射し、3日目にヒトCD4⁺T細胞(2. 5×10^6 個/マウス)を単独で、またはポリドナーCD4⁺IL-10細胞(3人の異なるドナー; BC-H/I/L) (2. 5×10^6 個/マウス)

50

ス)との組合せ、またはプールからの単一ドナー (BC-H)からのCD4^{IL-10}細胞 (2.5×10⁶個/マウス)の組合せを静脈内に注射した。Xenograftを、以前に記載されるように (Bondanza et al. Blood 2006)、体重減少 (>20%体重減少)、皮膚病変、毛並みの状態、活動度、および体を丸めることに基づいて評価した。

【0630】

図32は、注射後の各々の日にGvHDを実証するNSGマウスの%を示す。結果は、ポリドナーCD4^{IL-10} (BC-H/I/L)細胞が、ヒト同種CD4⁺T細胞によって媒介されるxenograftを阻害することができることを示している。この実験では、xenograftは非常に重度であり、CD4⁺T細胞を投与した対照群の全てのマウスは、20日目で死亡した。これに対し、2.5×10⁶個のポリドナーCD4^{IL-10}の共投与は、GvHDを75%阻害した。単一ドナーCD4^{IL-10}細胞もまた、保護的であったが、効果はより弱かった。

【0631】

他の実験

ポリドナーCD4^{IL-10}細胞の治療効果を、4つの異なる群のマウスにおいて試験する：(i)CD4^{IL-10}細胞に対して非血縁のドナーからのヒトPBMCを投与したマウス (xenograft陽性対照)；(ii)ポリドナーCD4^{IL-10}細胞を投与したマウス (陰性対照)；(iii)PBMCとポリドナーCD4^{IL-10}細胞の1:1の比の組合せを投与したマウス；および(iv)PBMCとポリドナーCD4^{IL-10}細胞の2:1の比または異なる比の組合せを投与したマウス。PBMCおよびポリドナーCD4^{IL-10}細胞の組合せを投与した動物では、一部の動物に、PBMCおよびポリドナーCD4^{IL-10}細胞を同時に投与し、一部の動物に、PBMCを投与した数日 (例えば、5日)後にポリドナーCD4^{IL-10}細胞を投与し、および一部の動物には、PBMCを投与する数日 (例えば、5日)前にポリドナーCD4^{IL-10}細胞を投与する。

【0632】

マウスを、PBMCおよび/またはポリドナーCD4^{IL-10}細胞の投与後、1、2、3、4週目、および必要であれば5週目に体重を測定することにより、GvHDの発症に関してモニターする。体重減少に加えて、マウスを、皮膚病変、毛並みの状態および活動度に関して検査する。処置群のマウスを、追加の期間モニターして、ポリドナーCD4^{IL-10}細胞が長期の生存に及ぼす効果を決定する。

【0633】

ポリドナーCD4^{IL-10}細胞の量および局在もまた、投与後の末梢血および組織においてモニターする。具体的には、ポリドナーCD4^{IL-10}細胞の存在を、末梢血および炎症部位：リンパ節、脾臓、腸管、および骨髄でモニターする。処置群 (複数可)のマウスを、さらに3週間モニターして長期の生存を決定する。

【0634】

結果は、ポリドナーCD4^{IL-10}細胞がxenograftの低減および防止において有効であることを実証する。

【0635】

[実施例9]

GvHDの阻害およびがんの処置

ポリドナーCD4^{IL-10}細胞集団を、ヒトPBMCおよびAML腫瘍細胞を移植したNSGマウスモデルにおいて、ヒトPBMCによって誘導されたxenograftに及ぼすその効果および抗腫瘍効果に関して試験する。AML細胞 (ALL-CM)を、国際公開第2016/146542号パンフレットに以前に記載されるようにi.v.投与する。PBMCまたはポリドナーCD4^{IL-10}細胞、またはその組合せを、3日後に投与する。

【0636】

10

20

30

40

50

ポリドナーCD4^{IL-10}細胞を、実施例1に記載されるように得る。ポリドナーCD4^{IL-10}細胞の治療効果を、各々に放射線を照射し、0日目に 5×10^6 個のALL-CM細胞を投与したマウス（AMLマウス）の4つの異なる群において試験する：（i）追加の処置を行わないAMLマウス；（ii）ポリドナーCD4^{IL-10}細胞と非血縁のドナーからの 5×10^6 個のヒトPBMCを投与したAMLマウス—PBMCは重度のxeno-GvHDを引き起こす；（iii） 2.5×10^6 個のポリドナーCD4^{IL-10}細胞を投与したAMLマウス；ならびに（iv）PBMCおよびポリドナーCD4^{IL-10}細胞の1：1または2：1の比、または異なる比の組合せを投与したAMLマウス。マウスの1つの追加の群には、ALL-CM細胞を投与しないが、放射線照射の3日後に 5×10^6 個のヒトPBMCを投与する。

10

【0637】

ポリドナーCD4^{IL-10}細胞がヒトPBMCによって誘導されるxeno-GvHDに及ぼす効果を、体重減少、皮膚病変、毛並みの状態、活動度、死亡率、および長期生存に基づいて試験する。ポリドナーCD4^{IL-10}細胞の抗腫瘍または移植片対白血病（GvL）効果を、循環中の腫瘍細胞の低減および長期腫瘍無病生存に基づいて試験する。

【0638】

一部のマウスを、長期生存および完全な腫瘍退縮をモニターするために最大7週間モニターする。

【0639】

結果は、ポリドナーCD4^{IL-10}細胞が、xeno-GvHDの阻害およびがんの処置の両方において有効であることを実証する。

20

【0640】

[実施例10]

ポリドナーCD4^{IL-10}細胞を使用するがんの処置

ポリドナーCD4^{IL-10}細胞集団を、NSGマウスにおけるT細胞治療のALL-CM白血病モデルにおいて試験する。

【0641】

NSGマウスに、致死量下の放射線を照射して、0日目に骨髓性白血病細胞（ALL-CM）（ 5×10^6 個）を静脈内注射した（図33Aを参照されたい）。第1の群の動物では、PBMC（ 5×10^6 個）または単ドナー（ドナーBC-IおよびドナーBC-Hから）CD4^{IL-10}細胞（ 2.5×10^6 個）を3日目に注射した。第2の群の動物では、PBMC（ 5×10^6 個）またはポリドナーCD4^{IL-10}細胞（ 2.5×10^6 個）を、3日目に注射した。移植片対白血病（GvL）効果を、循環中の白血病細胞の低減および長期白血病無病生存に基づいて動物において試験した。白血病を、以前に記載されるように（Locafaro G. et al Molecular Therapy 2017）測定した。

30

【0642】

図33Bおよび図33Cに提供されるように、ALL-CM骨髓性白血病細胞を注射したマウスは全て、17日目に広範な白血病の進行を示した。 5×10^6 個のPBMCの投与は、白血病の進行の強い阻害をもたらした。興味深いことに、白血病進行阻害の同等のレベルが、より少ない数（ 2.5×10^6 個）の単ドナーCD4^{IL-10}（図33B）またはポリドナーCD4^{IL-10}（図33C）によって得られた。これらのデータは、単ドナーおよびポリドナーCD4^{IL-10}が、強い直接的な抗骨髓性白血病効果を有することを示している。

40

【0643】

単ドナーCD4^{IL-10}およびポリドナーCD4^{IL-10}の移植片対白血病（GvL）効果を、ALL-CM骨髓性白血病細胞を注射したマウスにおいてPBMCと組み合わせさらに試験した（図34Aを参照されたい）。 5×10^6 個のPBMCの投与は、白血病進行の強い阻害をもたらし、単ドナーCD4^{IL-10}（ 2.5×10^6 個）と組み合わせた 5×10^6 個のPBMCの投与は、相乗効果を有した（図34B）。興味深いこと

50

に、 2.5×10^6 個のポリドナー CD4^{IL-10} と組み合わせた 5×10^6 個の PBM C の投与は、同等の相乗的 G v L 効果を有した（図 3 4 C）。これらのデータは、ポリドナー CD4^{IL-10} が、PBM C と相乗的に作用して、強い G v L 効果を媒介することを示している。

【0644】

[実施例 11]

ポリドナー CD4^{IL-10} 細胞を使用する慢性炎症および自己免疫疾患の処置

NLP R3 インフラマソームの活性化は、多くの慢性炎症疾患および自己免疫疾患に関係している。NLP R3 インフラマソームは、単球／マクロファージによる炎症促進性サイトカイン IL-1 β および IL-18 のカスパーゼ-1 媒介産生をもたらす「危険シグナル」によって活性化され得る。一連の *in vitro* 実験を実施して、NLP R3 インフラマソームおよびヒト単球による IL-1 β / IL-18 産生に及ぼすポリドナー CD4^{IL-10} 細胞の効果を調べる。

【0645】

最初に、ヒト PBM C を、Ficoll / Paque (Sigma-Aldrich) 上での標準的な密度勾配遠心分離により末梢血から単離する。単球を、単球単離キット I I (Miltenyi) を使用して、製造元の使用説明書に従って負の選択によりヒト PBM C から単離する。正の選択または接着は、細胞の望ましくない活性化をもたらし得ることから、負の選択が好ましい。単離された単球を、96 ウェルマイクロタイタープレートにおいて 3% 毒素フリーのヒト AB 血清を含有する培養培地中、 2×10^5 または 1×10^5 個のポリドナー CD4^{IL-10} 個 / 200 μ l / ウェルの存在下、細胞 5×10^4 個 / 200 μ l で播種する。

【0646】

表 2 は、各セットが 6 ウェルの細胞を含む 17 セットの単球に適用した処置条件を要約する。LPS が、ATP によって提供される第 2 のシグナルがなくともヒト単球を単独で活性化することができることは公知である。

【0647】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2					
群#	単球	CD4 細胞/上清	YVADfmk*	LPS**	その他
培地対照 インキュベーション時間:1.5 時間;その後 LPS による 4 時間の活性化					
1	単球	なし	なし	なし	
2	単球	なし	なし	LPS	
3	単球	なし	YVADfmk	LPS	
単球とポリドナーCD4 ^{IL-10} 細胞の共培養					
4	単球	CD4 ^{IL-10} 細胞	なし	なし	
5	単球	CD4 ^{IL-10} 細胞	なし	LPS	
6	単球	CD4 ^{IL-10} 細胞	YVADfmk	LPS	
単球と対照 CD4 GFP+ 細胞の共培養					
7	単球	CD4 GFP細胞	なし	なし	
8	単球	CD4 GFP細胞	なし	LPS	
9	単球	CD4 GFP細胞	YVADfmk	LPS	
ポリドナーCD4 ^{IL-10} 細胞または CD4 GFP+ 細胞培養の上清*** の存在下での 単球の培養					
10	単球	CD4 ^{IL-10} 細胞の 50%上清	なし	LPS	
11	単球	CD4 ^{IL-10} 細胞の 25%上清	なし	LPS	
12	単球	CD4 ^{IL-10} 細胞の 12.5%上清	なし	LPS	
13	単球	CD4 ^{IL-10} 細胞の 50%上清	なし	LPS	抗 IL-10 抗体
14	単球	CD4 GFP 細胞の 50%上清	なし	LPS	
15	単球	CD4 GFP 細胞の 25%上清	なし	LPS	
16	単球	CD4 GFP 細胞の 12.5%上清	なし	LPS	
17	単球	CD4 GFP 細胞の 50%上清	なし	LPS	抗 IL-10 抗体

* YVADfmk は、カスパーゼ 1 に対して特異的な阻害剤である。DMSO に溶解した 20 mM Z-YVADfmk (Biovision, Enzo Life Sciences, または Axxora Life Sciences) を使用する。

** LPS (Sigma-Aldrich) 100ng/mL

*** CD4^{IL-10} および CD4 GFP または NGFR 培養の上清を、CD4^{IL-10} または CD4 GFP 細胞を 1×10⁶/mL で 3 日間インキュベートし、上清を収集することによって得る。IL-10 産生レベルを、IL-10 特異的 ELISA によって測定する。

【0648】

表 2 に概要する処置の後、上清を各群について 6 個のウェルから収集し、IL-1β / IL-18 産生を、成熟 IL-1β または IL-18 に対して特異的な ELISA (Biolegend) によって測定する。群 # 3、10、13、14、および 17 に関して 6 個のウェルから収集した細胞を、ウェスタンブロットによって解析して、活性化カスパーゼ 1 レベルを決定する。

【0649】

実験からのデータは、ポリドナー CD4^{IL-10} 細胞が、活性化された単球による IL-1β および IL-18 産生を下方調節することを示す。それらは、ポリドナー CD4

IL-10細胞が、活性化された単球における成熟カスパーゼ-1産生を下方調節することをさらに示す。加えて、ポリドナーCD4^{IL-10}およびポリドナーCD4^{IL-10}によって産生されるIL-10は、インフラマソームを下方調節する。

【0650】

類似の実験を、単球の代わりにヒトマクロファージまたは樹状細胞について実施する。実験結果は、ポリドナーCD4^{IL-10}細胞が、活性化されたマクロファージおよび樹状細胞によるIL-1 β 、IL-18、および成熟カスパーゼ-1産生をさらに下方調節することを実証する。

【0651】

これらは、ポリドナーCD4^{IL-10}細胞を使用してNLRP3インフラマソームの過剰活性化を伴う疾患または障害を処置することができることを示唆している。特に、ポリドナーCD4^{IL-10}細胞を使用して、慢性炎症疾患および自己免疫疾患を処置することができる。NLRP3インフラマソームは、外因性または内因性の「危険シグナル」、例えば病原体関連分子パターン(PAMP)、シリカ、アスベスト、損傷を受けたミトコンドリア、壊死した細胞、およびストレスを受けた細胞からの危険関連分子パターン(DAMP)様産物、ならびに尿酸結晶によって活性化され得る。

【0652】

[実施例12]

ポリドナーCD4^{IL-10}細胞上清は、NLRP3インフラマソーム活性化、ならびにヒト単球によるIL-1 β およびIL-18産生を阻害する

CD14⁺単球を、汎単球単離キット(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)を使用してPBMCから単離し、96ウェル平底マイクロタイターウェルに 2×10^5 個/ $200 \mu\text{L}$ /ウェルで播種し、LPSの存在下で培養した。細胞を、表1に要約するように、Z-YVADfmk($20 \mu\text{M}$)、MMC950($10 \mu\text{M}$)、IL-10(10 ng/mL)、または様々な濃度の単一もしくはプールしたドナーCD4^{IL-10}細胞上清の存在下でさらに培養した。

【0653】

上清を、以前に記載されたように(Andolfi et al. 2012, Mol. Therapy Vol. 20, 1778-1790, Locafaro et al. Mol Ther 2017, 25, 2254)、CD3およびCD28抗体の組合せによって72時間活性化した単一ドナーまたはプールしたドナーCD4^{IL-10}細胞から得た。一部の例では(図35Cおよび35D)、単球を、LPS活性化の最後の30分間に添加したNLRP3インフラマソーム活性化剤であるニゲリシン(「NIG」)と組み合わせてLPSと共にインキュベートした。

【0654】

NLRP3インフラマソームを、LPSによって活性化すると、成熟カスパーゼ1ならびにIL-1 β およびIL-18の生物活性型の産生をもたらした。LPS活性化の非存在下で播種した単球は、インキュベーション期間の間検出可能レベルのIL-10を産生しなかった(示していない)。

【0655】

単一ドナー由来CD4^{IL-10}細胞の上清(1769 pg IL-10/mL を含有する)を添加すると、ドナー#1および#2からのLPS活性化単球によるIL-1 β 産生をそれぞれ、50%、25%および12.5%の濃度で用量依存的に阻害した(図35Aおよび図35B)。GFPを形質導入したCD4⁺細胞の上清を対照として使用した。IL-1 β 産生の完全な阻害が、50%および25%の濃度で観察されるが、GFPを形質導入した対照CD4⁺細胞の上清は、濃度50%で無効であった。

【0656】

様々な濃度のCD4^{IL-10}T細胞上清(50%、25%、または12.5%)、Z-YVADfmk、またはMMC950を、LPSおよびニゲリシン(「NIG」)によって活性化した単球についてさらに試験した。単一ドナー(BC-E)またはプールしたドナーCD4^{IL-10}細胞からの上清はそれぞれ、5295または3532 pg IL

10

20

30

40

50

ー10/mLを含有した。単ードナーCD4^{IL-10}細胞の上清はまた、NLP R3インフラマソーム活性化剤ニゲリシンによって増強されたLPS誘導IL-1 β 産生の阻害においても非常に有効であった(図35Cおよび図35D)。

【0657】

データは、CD4^{IL-10}細胞からの上清が、50%の濃度で、不可逆的カスパーゼ1阻害剤Z-YVADfmk (Guo et al. 2015, Nature Med 21, 677)、選択的NLP R3インフラマソーム阻害剤MCC950 (Coll et al. 2019, Nature Chem. Biol 15, 556)、および組換えIL-10と同程度に有効であったことを実証し、IL-10含有上清が、NLP R3インフラマソーム活性化および成熟カスパーゼ1産生を阻害し、炎症促進性サイトカインIL-1 β の産生の強い阻害をもたらすことを示している(図35A~35D)。

10

【0658】

同等の結果が、単ードナー(BC-E)および2人の異なるドナー(BC-C/E)からプールしたCD4^{IL-10}細胞の上清による第2のシリーズの実験において得られた。CD4^{IL-10}細胞を、記載されるように(Andolfi et al. 2012) CD3およびCD28抗体の組合せによって活性化した。3日後、CD4^{IL-10}細胞からの上清を収集した。これらの上清はそれぞれ、5295および3532 pg IL-10/mLを含有し、ドナー#3からの単球によるLPS誘導IL-1 β 産生を用量依存的に阻害した(図35E)。上清は50%濃度で、Z-YVADfmkおよびMCC950と同程度に有効であった。プールしたCD4^{IL-10}細胞の上清の阻害効果は、抗IL-10受容体抗体によって完全に中和された。同様に、2589 pg IL-10/mLを含有する3人の異なるドナーからプールした上清は、ドナー#4からの単球によるIL-1 β 産生を用量依存的に阻害した(図35F)。上清の阻害効果は、IL-10受容体抗体によって完全に中和され、NLP R3活性化がIL-10によって媒介されることを実証している。結果は、炎症促進性サイトカインであるIL-1 β の産生が、ポリドナーCD4^{IL-10}T細胞によって産生されるIL-10によって強く阻害されることを示している。予想されるように、抗IL-10受容体抗体は、Z-YVADfmkおよびMCC950によって媒介されるIL-1 β 産生の阻害効果を有しなかった(図35E)。

20

【0659】

CD4^{IL-10}T細胞を、LPSおよびニゲリシンによって活性化されたドナー#4からの単球についてさらに試験した。2583または2589 pg IL-10/mLをそれぞれ含有する、様々な濃度の単ードナー(BC-V)またはポリドナー(3人のドナー; BC-T/U/V) CD4^{IL-10}細胞上清、Z-YVADfmk、またはMCC950を試験した。図35Gに提供するデータは、3人の異なるドナー(BC-T-U-V)のプールした上清が、LPSとニゲリシンとの組合せによって誘導されるIL-18産生を下方調節することを示す。

30

【0660】

集会的に、これらのデータは、単ードナーおよびポリドナーCD4^{IL-10}細胞によって産生されたIL-10が、NLP R3インフラマソームを強く下方調節し、炎症促進性サイトカインIL-1 β およびIL-18の強い阻害をもたらすことを示している。

40

【0661】

[実施例13]

単ードナーおよびポリドナーCD4^{IL-10}細胞は、xeno GvHDおよびin vivoでの骨髄腫瘍の成長を阻害する

単ードナー(BC-T、BC-V、およびBC-E)またはポリドナー(BC-V/E) CD4^{IL-10}細胞の機能的特性および品質を、Andolfi et al. Mol Ther 2012, 20, 177およびLocafaro et al. Mol Ther 2017, 25, 2254に記載されるように試験した。単ードナーおよびポリドナーCD4^{IL-10}細胞は、高レベルのIL-10、多様なレベルのIFN- γ 、非常に低レベルのIL-4および検出不能なIL-2(後者は示していない)を産生し、Tr1細胞の特徴的なサイトカイン産生プロファイ

50

ルを反映する（図37）。

【0662】

さらに、単ドナー（BC-T、BC-V、およびBC-E）またはポリドナー（BC-V/T/E）CD4^{IL-10}細胞がCD4+およびCD8+T細胞増殖に及ぼす抑制能を、*in vitro*で同種PBMCについて測定した。PBMCを、eFluor670（Invitrogen）によって標識した。標識したPBMC（ 1×10^5 個）を、固定CD3（10mg/mL）および可溶性CD28抗体（1mg/mL）によって活性化した。単ドナーおよびポリドナーCD4^{IL-10}細胞を、96ウェル丸底プレートに最終容量0.2mLで1:1の比で添加した。4日間共培養後、eFluor670標識レスポナー細胞の増殖に及ぼすその抑制効果を、記載されるように（Locafaro et al. Mol Ther 2017, 25, 2254）、フローサイトメトリーを使用してeFluor670の希釈により決定した。図38は、フローサイトメトリーの結果を提供する。単ドナーおよびポリドナーCD4^{IL-10}細胞は、同種CD4+およびCD8+T細胞の両方の*in vitro*増殖を80%より大きく強く阻害した（図38）。

10

【0663】

CD4^{IL-10}細胞を、骨髄性白血病細胞（ALL-CM）および赤白血病細胞株（K562）に対するその細胞傷害効果に関してさらに解析した。単ドナー（BC-EおよびBC-V）、またはポリドナー（BC-V/T/E）CD4^{IL-10}細胞を、ALL-CMまたはK562細胞と1:1の比で共培養した。3日後、細胞を採取し、生き残ったCD45^{low}、CD3-標的細胞を計数し、記載のように（Locafaro et al. Mol Ther 2017, 25, 2254）、FACSによって解析した。単ドナーおよびポリドナーCD4^{IL-10}細胞はまた、ALL-CM骨髄腫瘍細胞に対して強い直接の細胞傷害効果を媒介したが、それらは、その細胞傷害活性にとって必要なクラスI MHC発現を欠如する感受性のK562細胞を殺滅することはできなかった（図39）。単ドナー（BC-EおよびBC-V）またはポリドナー（BC-V/T/E）CD4^{IL-10}細胞は、これらの2つの標的細胞株（ALL-CMおよびK562）に対して同等の細胞傷害活性を有した。

20

【0664】

単ドナー（BC-E）およびポリドナー（BC-V/T/E）CD4^{IL-10}細胞の細胞傷害作用をまた、ヒト化xeno GvHD疾患モデル、すなわちALL-CM細胞（ 2.5×10^6 個）を静脈内注射したNSGマウスを使用して*in vivo*でも試験した。同種ドナーからのヒトPBMCによって誘導されたGvHDに及ぼすその効果ならびに治療状況での急性骨髄性白血病細胞株ALL-CMの成長に及ぼすその効果を、図36に例証するように試験した。

30

【0665】

8~10週齢の雌性NOD scidガンマ、（NSG）マウスを、Charles River Italia（Calco, Italy）から得た。実験プロトコルは、Ospedale San Raffaeleの動物試験に関する内部委員会（Institutional Animal Care and Use Committee（IACUC））の承認を受けた。0日目に、マウスに、線形加速器からの全身照射を行った。ALL-CM細胞（ 2.5×10^6 個）を0日目に注射した。0日目に、異なる群のマウスに、細胞なし、同種PBMC（ 2.5×10^6 個）、単ドナー（BC-E、 2.5×10^6 個）、または3人の異なるドナーから1:1:1の比でプールしたポリドナーCD4^{IL-10}細胞（BC-V/T/E、 2.5×10^6 個）と同種PBMC（ 2.5×10^6 ）またはポリドナーCD4^{IL-10}細胞（ 2.5×10^6 ）の組合せを3日目に注射した。全ての細胞を、イスコフ改変ダルベッコ培地250μLの容量でi.v.投与した。マウスを週に3~4回モニターした。

40

【0666】

NSGマウスを、マウス5匹の5つのコホートに分け、各群を、0日目に（i）対照としての細胞なし；（ii）同種単核細胞（PBMC）；（iii）同種PBMCおよびポ

50

リドナーCD4^{IL-10}細胞(BC-V/T/E);(iv)同種PBMCおよび単一ドナーCD4^{IL-10}細胞(BC-E);、または(v)ポリドナー(BC-V/T/E)CD4^{IL-10}細胞を3日目に投与することによって処置した。骨髄性白血病の進行を、以前に記載されたように(Locafaro et al. Mol Ther 2017, 25, 2254)測定した。

【0667】

ALL-CM細胞をNSGマウスに投与すると、これらの細胞の急速な増大をもたらし、全てのマウスが死亡したか、または20日目に殺しなければならなかった。PBMCの注射は、予想されたように白血病の進行を防止した。単一ドナーおよびポリドナーCD4^{IL-10}細胞の両方を、同種PBMCと組み合わせて投与しても、PBMCの抗骨髄性白血病効果を妨害しなかった。

10

【0668】

ポリドナーCD4^{IL-10}(BC-V/T/E)細胞を、ALL-CM細胞の投与の3日後(この時点で既にこれらの細胞の大量の増大が進行中である)に注射すると、腫瘍成長の阻害をもたらした。これらの結果は、ポリドナーCD4^{IL-10}細胞が、in vivoで直接の治療的抗骨髄性白血病効果を有することを示している(図40)。

【0669】

しかし、その有益な抗骨髄性白血病効果にもかかわらず、PBMCは、非常に重度のxeno-GvHDを誘導し、全てのマウスが24日までに死亡した(図41)。試験において、単一ドナー(BC-E)およびポリドナー(BC-V/T/E)CD4^{IL-10}細胞を、NSGマウスに投与後のPBMCによって誘導されるxeno-GvHDのその阻害能に関して試験した。0日目に、NSGマウスにALL-CM細胞(2.5×10^6 個)を注射した。マウスを5群に分け、各群を、(i)対照としての細胞なし;(ii)同種単核細胞(PBMC);(iii)同種PBMCおよびポリドナー(BC-V/T/E)CD4^{IL-10}細胞(BC-E、BC-V、BC-T);(iv)同種PBMCおよび単一ドナーCD4^{IL-10}細胞(BC-E)、またはポリドナー(BC-V/T/E)CD4^{IL-10}細胞を3日目に注射することによって処置した。動物において、xeno-GvHDを、生存および体重減少によって測定した。加えて、体を丸める、毛並みの状態および皮膚の完全性を、記載されるように(Bondanza et al, Blood, 2006, 107, 1828)モニターした。体重減少が20%より多くに達した場合、マウスを倫理的理由から殺した。図41は、ALL-CM細胞(2.5×10^6 個)を1日目に注射し、単一ドナーまたはポリドナーCD4^{IL-10}細胞の存在下または非存在下でPBMCによる処置を行った後、各々の日におけるGvHDを示さないNSDマウスの%を示す。

20

30

【0670】

結果は、ポリドナーCD4^{IL-10}細胞が、xeno-GvHDを誘導せず、同種PBMCによって誘導されるxeno-GvHDを下方調節したことを示す。集合的に、これらの結果は、ポリドナーCD4^{IL-10}細胞が、重度のxeno-GvHDを下方調節し、治療状況で直接の抗骨髄性白血病効果を有し、PBMCの保護的な抗骨髄性白血病効果を妨害しないことを示している。

【0671】

40

[実施例14]

4人の異なるドナーに由来するポリドナーCD4^{IL-10}細胞の養子移入

4人の異なるドナーに由来するポリドナーCD4^{IL-10}細胞の養子移入を、移入がPBMC誘導xeno-GvHDを阻害する能力に関して試験した。

【0672】

これらの実験では、単一ドナーCD4^{IL-10}細胞(ドナーC;ロットC)および4人の異なるドナーに由来するポリドナーCD4^{IL-10}細胞(ドナーC、E、F、およびH;ロットCEFH)を、同種PBMCによって誘導されるヒト化マウスGvHDモデルにおいて試験した。このモデルでは、NSGマウスに、0日目に致死量下の放射線を照射し、3日目に(i) 2.5×10^6 同種PBMC、(ii) 2.5×10^6 同種PBMC

50

Cと 2.5×10^6 単一ドナーCD4⁺IL-10⁺細胞（ロットC）の組合せ、(iii)
 2.5×10^6 同種PBMCと 2.5×10^6 細胞ポリドナーCD4⁺IL-10⁺細胞（ロ
 ットCEFH）の組合せ、または(iv) 2.5×10^6 細胞ポリドナーCD4⁺IL-1
 0⁺細胞（ロットCEFH）単独を注射（ゆっくりのボーラスi.v.）した。GvHDを
 、体重減少、毛並みの外観、皮膚の外観、体を丸める、および活動度の複合スコアを使用
 して決定した（Bondanza A, et al. Blood 2006;107:1828-36を参照されたい）。
 図42に示すように、ポリドナーCD4⁺IL-10⁺細胞を投与したマウスのみが試験終了
 時にGvHDを全く（100%）示さなかった。

【0673】

要約すると、このデータは、4人の異なるドナーに由来するポリドナーCD4⁺IL-1
 0⁺細胞の養子移入が、PBMC誘導xeno-GvHDを阻害するが、xeno GvH
 Dを誘導しないことを実証した。

【0674】

[実施例15]

IL-10のバリエーションの生成

ヒトIL-10のバリエーションを、他の種のIL-10配列に関してアミノ酸修飾（複数
 可）（例えば、置換、挿入、欠失）を導入することによって生成する。修飾部位を、図4
 3Aに提供される配列アライメントによって決定する。種の間で異なるアミノ酸を有する
 アミノ酸位置をアライメントから同定し、アミノ酸の置換、挿入、または欠失を導入する
 ことによって改変する。

【0675】

ヒトIL-10のバリエーションの2つの例を図43Bに提供する。可能性のあるhuIL
 -10ハイブリッド#1（配列番号21）は、ヒトIL-10の3つのアミノ酸（D、I
 およびA）を、対応する位置のウイルスIL-10（EBVB9）の3つの異なるアミノ
 酸（E、A、およびD）に置換することによって生成される。可能性のあるhuIL-1
 0ハイブリッド#2（配列番号22）は、ヒトIL-10の1つのアミノ酸（I105）
 を、対応する位置でウイルスIL-10（EBVB9）の別のアミノ酸（A105）に置
 換することによって生成される。図43Cは、ヒトIL-10（配列番号1）とIL10
 EBVB9（配列番号18）とのアライメントを示し、「*」は、IL-10ハイブリッ
 ド#1において置換されている1つまたは複数のアミノ酸位置を示し、「#」は、IL-
 10ハイブリッド#2に関する好ましいI105からA105へのアミノ酸置換を示す。

【0676】

ヒトIL-10のバリエーションを、上記の節で記載されるように発現ベクターにクローニ
 ングし、バリエーションタンパク質の発現および機能に関して試験する。ヒトIL-10の選
 択されたバリエーションを使用して、CD4⁺IL-10⁺細胞を生成する。CD4⁺IL-10⁺細胞
 の有効性を、本明細書に提供されるように試験する。

【0677】

実施例1～11に関する追加の実験方法および材料

細胞の調製および細胞株。末梢血単核細胞（PBMC）を、Ficoll-Hypaque
 勾配上での遠心分離によって調製した。CD4⁺T細胞を、CD4⁺T細胞単離キット
 （Miltenyi Biotec、Bergisch Gladbach、Germany）によって精製し、得られた純度は>95%であった。成熟樹状細胞（DC）を、C
 D14⁺マイクロビーズ（Miltenyi Biotech、Germany）を製造
 元の使用説明書に従って使用して正の選択を行った末梢血CD14⁺単球から生成し、1
 0%ウシ胎児血清（FBS；Lonza、Italy）、100U/mLペニシリン／ス
 トレプトマイシン（Lonza、Italy）、2mM L-グルタミン（Lonza、
 Italy）を補充したRPMI1640（Lonza、Italy）中、37℃で10
 ng/mL組換えヒト（rh）IL-4（R&D Systems、Minneapolis
 MN、USA）および100ng/mL rhGM-CSF（Genzyme、S
 eattle、WA、USA）の存在下で5日間培養し、1mg/mLリポ多糖類（LP

10

20

30

40

50

S、Sigma、CA、USA）によってさらに2日間成熟させた。

【0678】

プラスミドの構築。ヒトIL-10のコード配列を、pH15C（ATCC番号68192）から切り出し、549bp断片を、pBluKSM（Invitrogen）のマルチクローニングサイトにクローニングしてpBluKSM-hIL-10を得た。555bpの断片を、pBluKSM-hIL-10からhIL-10を切り出すことによって得て、1074・1071・hPGK・GFP・WPRE・mhcMV・dNGFR・SV40PA（本明細書においてLV-ΔNGFRと命名する）とのライゲーションによりLV-IL-10/ΔNGFRを得た。双方向性プロモーター（ヒトPGKプロモータープラス反対方向のCMVプロモーターの最小コアエレメント）の存在は、2つのトランスジーンの共発現を可能にする（Locafaro et al. Mol Ther. 2017;25(10):2254-2269）。LV-IL-10/ΔNGFRの配列をパイロシーケンシング（Primm）によって確認した。

10

【0679】

ベクターの産生および力価測定。VSV-G-シュードタイプ第3世代双方向性レンチウイルスベクターを、293T細胞へのCa₃PO₄-過性4プラスミド共トランスフェクションによって産生し、記載されるように（Locafaro et al. Mol Ther. 2017;25(10):2254-2269）超遠心分離によって濃縮した。力価を、限界希釈によって推定し、ベクター粒子をHIV-1 Gag p24抗原免疫捕捉（NEN Life Science Products; Waltham, MA）によって測定し、ベクターの感染力を、力価と粒子の間の比として計算した。力価は、 $5 \times 10^8 \sim 6 \times 10^9$ 形質導入単位/mLであり、感染力は、 $5 \times 10^4 \sim 10^5$ 形質導入単位/ng p24であった。

20

【0680】

CD4^{IL-10}細胞株の生成。ポリクローナルCD4形質導入細胞を、以前に記載されたように（Andolfi et al. Mol Ther. 2012;20(9):1778-1790）得た。簡単に説明すると、CD4精製T細胞を、可溶性抗CD3モノクローナル抗体（mAb、30ng/mL、OKT3、Janssen-Cilag, Raritan, NJ, USA）、抗CD28 mAb（1μg/mL、BD）およびrhIL-2（50U/mL、PROLEUKIN、Novartis, Italy）によって48時間活性化した。T細胞に、LV-IL-10/ΔNGFR（CD4^{IL-10}）を感染多重度（MOI）20で形質導入した。11日目、CD4⁺ΔNGFR⁺細胞を、CD271⁺マイクロビーズ（Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany）を使用してビーズ選別し、5%ヒト血清（BioWhittaker-Lonza, Washington）、100U/mLペニシリン-ストレプトマイシン（BioWhittaker）、および50U/mL rhIL-2（PROLEUKIN、Novartis, Italy）を有するX-VIVO15培地中で増大させた。7および10日目に、培地を、50U/mL rhIL-2を補充した新鮮な培地に交換した。14日目に、細胞を収集して洗浄し、以前に記載されたように（Andolfi et al. Mol Ther. 2012;20(9):1778-1790）同種フィーダー混合物によって再刺激した。14日後、細胞を収集して凍結した。融解したCD4^{IL-10}細胞を、再刺激し、2回目および3回目の再刺激後、増大をin vitroで機能的に特徴付け、in vivo実験のために使用した。

30

40

【0681】

ベクターコピー数解析。細胞を、非組み込みベクター形体を除外するために形質導入後11日間培養した。ゲノムDNAを、QIAamp DNA Blood Mini Kit（QIAGEN、51106）によって製造元の使用説明書に従って単離した。ベクターの組み込みを、QX200ドロップレットデジタルPCRシステム（Bio-Rad）によって製造元の使用説明書に従って定量した。

【0682】

サイトカインの決定。サイトカイン産生を測定するために、2回目および3回目の再刺

50

激後、単一ドナーおよびポリドナーCD4^{IL-10}細胞を非刺激のままとしたか、または培地200μLの最終容積中で固定抗CD3（10μg/mL）および可溶性抗CD28（1μg/mL）mAbによって刺激した（96ウェル丸底プレート、2×10⁵個/ウェル）。上清を、48時間培養後に採取し、IL-10、IL-4、IL-5、IFN-γ、およびIL-22のレベルを、ELISAによって製造元の使用説明書（BD Biosciences）に従って決定した。

【0683】

フローサイトメトリー解析。CD4による表面染色後のグランザイムB（クローンMHGB04、Invitrogen、USA）の発現に関して、CD4^{IL-10}細胞を、固定し、透過処理し、およびBD Cytotfix/Cytoperm（商標）キットを使用して製造元の使用説明書に従って染色した（カタログ番号554714、Biolegend、USA）。染色した細胞を、1%FBSを補充したPBSによって2回洗浄し、FlowJo 10ソフトウェアを利用して解析するBD LSRFortessaによって解析した。

【0684】

殺滅アッセイ。2回目および3回目の再刺激後、単一ドナーおよびポリドナーCD4^{IL-10}細胞の細胞傷害性を、共培養実験において解析した。簡単に説明すると、非骨髄性白血病および骨髄性白血病細胞株、K562およびALL-CMをそれぞれ、標的細胞として使用して、CD4^{IL-10}細胞と共に1:1の比（10⁵個の標的細胞および10⁵個のCD4^{IL-10}細胞）で3日間播種した。共培養の終了時、細胞を採取し、K562およびALL-CM細胞をFACSにより解析して計数した。

【0685】

抑制アッセイ。単一ドナーおよびポリドナーCD4^{IL-10}細胞の抑制能を測定するために、同種PBMCを、同種成熟DC（5×10⁴個/ウェル）および可溶性抗CD3（50ng/mL）mAbによる刺激の前に、細胞増殖色素eFluor（登録商標）670（Invitrogen、CA、USA）によって製造元の使用説明書に従って標識した。PBMCおよびサプレッサー細胞を、1:1の比（10⁵個のPBMCおよび10⁵個のCD4^{IL-10}細胞）で添加した。3日間培養後、レスポンダー細胞の増殖を、CD4⁺ΔNGFR⁻またはCD8⁺ΔNGFR⁻T細胞のeFluor670の希釈をFACSによって解析することによって決定した。

【0686】

移植片対宿主病モデル：全ての実験において、6/8週齢雌性NSGマウスを使用した。0日目に、マウスに、マウスの体重に従って線形加速器から175~200cGyの1回線量を全身に照射し、PBMC細胞（5×10⁶）、またはCD4^{IL-10}細胞（単一ドナーまたは3人のドナーのプールであるポリドナーの5×10⁶個または2.5×10⁶個）、またはPBMC（5×10⁶個）を、CD4^{IL-10}細胞（5×10⁶個または2.5×10⁶個）と組み合わせて静脈内注射した。生存、体重減少、活動度、毛並み、皮膚、および体を丸めることを、以前に記載されたように（Bondanza et al. Blood. 2006;107(5):1828-1836）週に少なくとも3回モニターした。マウスの体重減少が20%であった場合、マウスを倫理上の理由から安楽死させた。

【0687】

あるいは、0日目に、マウスに上記のように全身照射した。3日目に、マウスに、CD4⁺T細胞（5×10⁶個または2.5×10⁶個）、単一ドナーおよびポリドナー（3人のドナーからのプール）CD4^{IL-10}細胞（5×10⁶個または2.5×10⁶個）、またはCD4⁺T細胞（5×10⁶個または2.5×10⁶個）を、単一ドナーおよびポリドナー（3人のドナーからのプール）CD4^{IL-10}細胞（5×10⁶個または2.5×10⁶個）と組み合わせて注射した。GvHDの誘導を、上記のようにモニターした。

【0688】

7. 参照による組み入れ

10

20

30

40

50

本出願で引用した全ての刊行物、特許、特許出願、および他の文書は、各々の個々の刊行物、特許、特許出願、または他の文書が全ての目的に関して参照により本明細書に組み込まれることが個々に示されているのと同程度に、全ての目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0689】

8. 均等物

様々な特定の実施形態を説明し、記載してきたが、上記の明細書は限定的ではない。様々な変化を本発明の精神および範囲から逸脱することなく行うことができることが認識される。多くの変形形態が、本明細書を再検討することにより当業者に明らかとなるであろう。

10

【0690】

9. 配列

配列番号 1 (ヒト IL-10 アミノ酸配列-タンパク質配列: Ref P22301)

【0691】

【化1】

MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNL
LLKESLLEDFKGYLGCGALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRLRCHR
FLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN

20

配列番号 2 (ヒト IL-10 の例示的なポリヌクレオチド配列)

【0692】

【化2】

ATGCACAGCTCAGCACTGCTCTGTTGCCTGGTCCTCCTGACTGGGGTGAGGGCCAGCCCAGGCC
AGGGCACCCAGTCTGAGAACAGCTGCACCCACTTCCCAGGCAACCTGCCTAACATGCTTCGAGA
TCTCCGAGATGCCTTCAGCAGAGTGAAGACTTTCTTTCAAATGAAGGATCAGCTGGACAACTTG
TTGTTAAAGGAGTCCTTGCTGGAGGACTTTAAGGGTTACCTGGGTTGCCAAGCCTTGTCTGAGA
TGATCCAGTTTTTACCTGGAGGAGGTGATGCCCCAAGCTGAGAACCAAGACCCAGACATCAAGGC
GCATGTGAACCTCCCTGGGGGAGAACCTGAAGACCCTCAGGCTGAGGCTACGGCGCTGTCATCGA
TTTCTTCCCTGTGAAAACAAGAGCAAGGCCGTGGAGCAGGTGAAGAATGCCTTTAATAAGCTCC
AAGAGAAAGGCATCTACAAAGCCATGAGTGAGTTTGACATCTTCATCAACTACATAGAAGCCTA
CATGACAATGAAGATACGAACTGA

30

配列番号 3 (ΔNGFR アミノ酸配列)

【0693】

【化3】

MGAGATGRAMDGPRLLLLLLLGVSLGGAKEACPTGLYTHSGECCACNLGEGVAQPCGANQTV
EPCLDSVTFSDVVSATEPCKPCTECVGLQSMSAPCVEADDAVCRCAYGYYQDETTGRCEACRVC
EAGSGLVFCQDKQNTVCEECPDGTYSDEANHVDPCLPCTVCEDTERQLRECTRWADAEECEIP
GRWITRSTPPEGSSTAPSTQEPEAPPEQDLIASTVAGVVTTVMGSSQPVVTRGTTDNLIPVYC
SILA AVVVGLVAYIAFKRWNRGIL

40

配列番号 4 (ΔNGFR の例示的なポリヌクレオチド配列)

【0694】

50

【化 4】

ATGGGGGCAGGTGCCACCGGCCGCGCCATGGACGGGCGCGCCTGCTGCTGTTGCTGCTTCTGG
GGGTGTCCCTTGGAGGTGCCAAGGAGGCATGCCCCACAGGCCTGTACACACACAGCGGTGAGTG
CTGCAAAGCCTGCAACCTGGGCGAGGGTGTGGCCCAGCCTTGTGGAGCCAACCAGACCGTGTGT
GAGCCCTGCCTGGACAGCGTGACGTTCTCCGACGTGGTGAGCGCGACCGAGCCGTGCAAGCCGT
GCACCGAGTGCGTGGGGCTCCAGAGCATGTGGCGCCGTGCGTGGAGGCCGACGACGCCGTGTG
CCGCTGCGCCTACGGCTACTACCAGGATGAGACGACTGGGCGCTGCGAGGCGTGCCGCGTGTGC
GAGGCGGGCTCGGGCCTCGTGTTCCTGCCAGGACAAGCAGAACACCGTGTGCGAGGAGTGCC
CCGACGGCACGTATTCCGACGAGGCCAACCACGTGGACCCGTGCCTGCCCTGCACCGTGTGCGA
GGACACCGAGCGCCAGCTCCGCGAGTGACACGCTGGGCGGACGCCGAGTGCGAGGAGATCCCT
GGCCGTTGGATTACACGGTCCACACCCCCAGAGGGCTCGGACAGCACAGCCCCCAGCACCCAGG
AGCCTGAGGCACCTCCAGAACAAGACCTCATAGCCAGCACGGTGGCAGGTGTGGTGACCACAGT
GATGGGCAGCTCCCAGCCCGTGGTGACCCGAGGCACCACCGACAACCTCATCCCTGTCTATTGC
TCCATCCTGGCTGCTGTGTTGTGGGCCTTGTGGCCTACATAGCCTTCAAGAGGTGGAACAGGG
GGATCCTCTAG

10

配列番号 5 (p L V - I L 1 0 のヌクレオチド配列) :

【 0 6 9 5 】

20

30

40

50

【化 5 - 1】

TGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAACAT
TACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGT
TCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCG
CCCAACGACCCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGA
CTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGT
GTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTAT
GCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTA
TTACCATGGTGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTGACTCACGGGG
ATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGAC
TTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGG
AGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCC
TGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCCTGAGTGC
TTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCCTTTTA
GTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAG
AGGAGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGCG
ACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTGAAGTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGC
GTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAA
AGAAAAAATATAAATTAAAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTCGCAGTTAA
TCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTT
CAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATC
AAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAG
TAAGACCACCGCACAGCAAGCGGCCGCTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAA
TTGGAGAAGTGAATTATATAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACC
AAGGCAAGAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCCCTTG
GGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACATATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAG
ACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAG
CATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAA
GATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAAACTCATTTGCACCAC
TGCTGTGCCCTTGGAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATCACACGACC
TGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAAT
CGCAAAACCAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTG
GAATTGGTTTAAACATAACAAATTGGCTGTGGTATATAAAATTATTTCATAATGATAGTAGGAGGC
TTGGTAGGTTTAAAGAATAGTTTTTGTCTGACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATT
CACCATTATCGTTTTAGACCCACCTCCCAACCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGA
AGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTTCGATTAGTGAACGGATCTCGACGGTAT
CGGTAACTTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACA
TAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTAT
CGATCACGAGACTAGCCTCGAGAGATCTGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTT
ACTTGCTTTAAAAAACCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTT
GTTGTAACTTGTTTATTGACGCTTATAATGGTTACAAATAAGGCAATAGCATCACAAATTTCA
CAAATAAGGCATTTTTTTCAGTGCATTCIAGTTTTGGTTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTA
TCATGTCTGGATCTCAAATCCCTCGGAAGCTGCGCCTGTCTTAGGTTGGAGTGATACATTTTTA
TCATTTTTACCCGTCTTTGGATTAGGCAGTAGCTCTGACGGCCCTCCTGTCTTAGGTTAGTGAA

10

20

30

40

【0 6 9 6】

50

【化 5 - 2】

AAATGTCACTCTCTTACCCGTCATTGGCTGTCCAGCTTAGCTCGCAGGGGAGGTGGTCTGGATC
CACCATGTCTAGAGGATCCCCCTGTTCCACCTCTTGAAGGCTATGTAGGCCACAAGGCCACAA
CCACAGCAGCCAGGATGGAGCAATAGACAGGGATGAGGTTGTGCGGTGGTGCCTCGGGTCACCAC
GGGCTGGGAGCTGCCCATCACTGTGGTCACCACACCTGCCACCGTGTGGCTATGAGGTCTTGT
TCTGGAGGTGCCCTCAGGCTCCTGGGTGTGCGGGGCTGTGCTGTCCGAGCCCTCTGGGGGTGTGG
ACCGTGTAAATCCAACGGCCAGGGATCTCCTCGCACTCGGCGTCGGCCCCAGCGTGTGCACTCGCG
GAGCTGGCGCTCGGTGTCTCGCACACGGTGCAGGGCAGGCACGGGTCCACGTGGTTGGCCTCG
TCGGAATACGTGCCGTGCGGGCACTCCTCGCACACGGTGTCTGTCTTGTCTGGCAGGAGAACA
CGAGGCCCCGAGCCCGCTCGCACACCGGGCACGCCTCGCAGCGCCCCAGTCGTCTCATCCTGGTA
GTAGCCGTAGGCGCAGCGGCACACGGCGTGTGCGGCTCCACGCACGGCGCGACATGCTCTGG
AGCCCCACGCACTCGGTGCACGGCTTGCACGGCTCGGTGCGGCTCACCACGTGCGGAGAAGCTCA
CGCTGTCCAGGCAGGGCTCACACACGGTCTGGTTGGCTCCACAAGGCTGGGCCACACCCTCGCC
CAGGTTGCGAGGCTTTGCGAGCACTACCGCTGTGTGTGTACAGGCTGTGGGGCATGCTCCTTG
GCACCTCCAAGGGACACCCCGAGAAGCAGCAACAGCAGCAGGCGCGGCGCGTCCATGGCGCGGC
CGGTGGCACCTGCCCCCATCGCCCCGCTCCCGCGGCAGCGCTCGACTTCCAGCTCGGTCCGCTT
TGGCGACTGATGGGGCTGCGCTGCGCTGCGCTCCAGCGCCCCCCTGCCCGCGGAGCTGGCCG
CGGCCCGAATTCCTGCAGGAATTCGATGGAGGCTGGATCGGTCCCGGTGTCTTCTATGGAGGTC
AAAACAGCGTGGATGGCGTCTCCAGGCGATCTGACGGTTCACTAAACGAGCTCTGCTTATATAG
GCCTCCACCGTACACGCCTACCTCGAGAAGCTTGATATCGAATTCACCGGGGTTGGGGTTG
CGCCTTTTCCAAGGCAGCCCTGGGTCTGCGCAGGGACCGGCTGCTCTGGGCGTGGTTCCGSGA
AACGCAGCGGGCGCGACCCCTGGGTCTCGCACATTCTTCACGTCCGTTGCGAGCGTCACCCGGAT
CTTCGCGGCTACCTTGTGGGCCCCCGCGCAGCTTCTGCTCCGCCCCCTAAGTCGGGAAGGT
TCCTTGGCGTTGCGGGCGTGGCGACGTGACAAACGGAAGCCGCACGTCTCACTAGTACCTTCG
CAGACGGACAGCGCCAGGGAGCAATGGCAGCGCGCGACCGCGATGGGCTGTGGCCAATAGCGG
CTGCTCAGCGGGGCGCGCCGAGAGCAGCGCGCGGGAAGGGGCGGTGCGGGAGGCGGGGTGTGGG
GCGGTAGTGTGGGCGCTGTCTGCTGCGCGCGGTGTTCGCGATTCTGCAAGCCTCCGGAGCGCA
CGTCGGCAGTGGGTCCCTCGTTGACCGAATCACCGACCTCTCTCCCCAGGGGGATCCCCGGTC
TGCAGGAATTCATGCACAGCTCAGCACTGCTCTGTTGCCTGGTCCCTCTGACTGGGGTGAGGGC
CAGCCCAGGGCCAGGGCACCCAGTCTGAGAACAGCTGCACCCACTTCCCAGGCAACCTGCCTAAC
ATGCTTCGAGATCTCCGAGATGCCTTCAGCAGAGTGAAGACTTTCTTTCAAATGAAGGATCAGC
TGGACAACTTGTGTAAAGGAGTCTTGTGAGGAGCTTTAAGGGTTACCTGGGTGCGCAAGC
CTTGTCTGAGATGATCCAGTTTACCTGGAGGAGGTGATCCCCAACCTGAGAACCAAGACCCA
GACATCAAGGCGCATGTGAACTCCCTGGGGGAGAACCTGAAGACCCTCAGGCTGAGGCTACGGC
GCTGTCTATCGATTTCTTCCCTGTGAAAAACAAGAGCAAGGCCGTGGAGCAGGTGAAGAATGCCTT
TAATAAGCTCCAAGAGAAAGGCATCTACAAAGCCATGAGTGAGTTTGACATCTTCATCAACTAC
ATAGAAGCCTACATGACAATGAAGATACGAACTGAGTCGAGAATCAACCTCTGGATTACAAAA
TTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAAGTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGC
TTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAA
TCCTGGTGTGCTGTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTGAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCA
CTGTGTTTGTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTGAGCTCCTTTCCGG
GACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCTGCCTTGGCCGCTGC
TGGACAGGGGCTCGGCTGTGTTGGGCACTGACAATTCGGTGGTGTGTGCGGGGAAATCATCGTCCT
TTCCTTGGCTGCTCGCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCTTCTGCTACGTCCC
TTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCCTTCCCGCGGCTGTGCGCGCTCTGCGGCTCTTCCG
CGTCTTCGCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCGGCTCCCGGCTTGAATTC
GAGCTCGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAA
GAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACCTCCCAACGAAGACAAGATCTGCTTTTTGCTTGTA
CTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACT
GCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCGCTGTGTGTGTGAC
TCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAATCTCTAGCAGTAGTAGTT

10

20

30

40

【0 6 9 7】

50

【化 5 - 3】

CATGTCATCTTATTATTCAGTATTTATAACTTGCAAAGAAATGAATATCAGAGAGTGAGAGGAA
 CTTGTTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAA
 GCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCT
 GGCTCTAGCTATCCCGCCCCCTAACTCCGCCCCATCCCGCCCCCTAACTCCGCCCCAGTTCCGCCCCAT
 TCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTG
 AGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCCTCGAGACGTACCC
 AATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACGCGCGCTCACTGGCCGTCGTTTTTACAACGTCGTGACT
 GGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCCGCCAGCTGGCG
 TAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAAGCGGCCGCACGCTCAGTGGAACGAAAA
 CTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAACAATAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAG
 GGGTGTATGAGCCATATTCAACGGGAAACGTCTTGCTCTAGGCCGCGATTAAATTCACACATG
 GATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTCCGGCAATCAGGTGCGACAATCT
 ATCGATTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGC
 CAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTCCGACC
 ATCAAGCATTTTATCCGTACTCCTGATGATGCATGGTTACTCACCCTGCGATCCCCGGGAAAA
 CAGCATTCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAACATTGTTGATGCGCTGGCAGT
 GTTCTGCGCCGGTTGCATTCGATTCTGTTTGTAAATTGTCCTTTTAAACAGCGATCGCGTATTT
 CGTCTCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTGATGACG
 AGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAAGAAATGCATAAACTTTTGCCATTCTCACC
 GGATTCAGTCGTCACATCATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTA
 ATAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATAACCAGGATCTTGCCATCCTAT
 GGAACGCTCGGTGAGTTTTCTCCTTCATTACAGAAACGGCTTTTTTCAAAAATATGGTATTGA
 TAATCCTGATATGAATAAATTGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAAGAATTAATT
 CATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAAACAAATAGGGGTTCCGCGACTATGT
 CTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCC
 GTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAA
 CAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCC
 GAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTA
 GGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAG
 TGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACC GGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGA
 TAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTGCTGCACACAGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAA
 TACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAA
 AGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGG
 GGGAAACGCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTT
 TTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTTACGGT
 TCCTGGCCTTTTGCTGGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGA
 GCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAG
 AGCGCCCAATACGCAACCGCCTCTCCCCGCGGTTGTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGG
 AATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCCGAAT
 TAACCCTCACTAAAGGGAACAGCTAGC

10

20

30

配列番号 6 (ウイルスインターロイキン-10 ホモログ、別名インターロイキン-10
 BCRF1、別名 IL10H_EBV B9) タンパク質配列: Ref: P03180
 【0698】

40

【化 6】

MERRLVVTLQCLVLLYLAPECGGTDQCDNFPQMLRDLRDAFSRVKTFQTKDEVNLLLKESLL
 EDFKGYLGCAQALSEMIQFYLEEVMPQAENQDPEAKDHVNSLGENLKTLLRLRLRRCHRFPCENK
 SKAVEQIKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTIKAR

配列番号 7 (ウイルスインターロイキン-10 ホモログ cDNA 配列)
 ヌクレオチド配列 (cDNA): Ref: NC_007605.1
 【0699】

50

【化 7】

5'_ATGGAGCGAAGGTTAGTGGTCACTCTGCAGTGCCTGGTGCTGCTTTACCTGGCACCTGAGT
GTGGAGGTACAGACCAATGTGACAATTTTCCCCAAATGTTGAGGGACCTAAGAGATGCCTTCAG
TCGTGTTAAAACCTTTTTCCAGACAAAGGACGAGGTAGATAACCTTTTGCTCAAGGAGTCTCTG
CTAGAGGACTTTAAGGGCTACCTTGGATGCCAGGCCCTGTCAGAAATGATCCAATTCTACCTGG
AGGAAGTCATGCCACAGGCTGAAAACCAGGACCCTGAAGCCAAAGACCATGTCAATTCTTTGGG
TGAAAATCTAAAGACCCTACGGCTCCGCCTGCGCAGGTGCCACAGGTTCTGCGCTGTGAGAAC
AAGAGTAAAGCTGTGGAACAGATAAAAAATGCCTTTAACAAGCTGCAGGAAAAAGGAATTTACA
AAGCCATGAGTGAATTTGACATTTTTATTAATACTACATAGAAGCATACATGACAATTAAAGCCAG
GTGA_3'

10

配列番号 9 (抗 CD 19 CAR アミノ酸配列)

【0700】

【化 8】

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDG
TVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEI
TGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWL
GVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDBAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQ
GTSVTVSSAAAPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFDTALAAVICSALAT
VLLALLILCVIYCKRQPRRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSRS
ADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAY
SEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

20

配列番号 10 (抗 CD 19 CAR ポリヌクレオチド配列)

【0701】

【化 9】

ATGCTGCTGCTGGTCACCAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTCCCTCACCCCGCCTTTCTGCTTATCC
CGGACATTCAGATGACACAGACCACCTCGAGCTTGTCGCGCTGCTGGGCGATCGCGTGACCAT
CTCCTGCCGGGCTCCCAAGACATTTCAAAGTATCTCAACTGGTACCAGCAGAAGCCGGACGGA
ACCGTGAACTGCTGATCTACCATAACCAGCCGCTGCACTCCGGCGTGCCGTCCCGCTTCTCCG
GATCGGGTTCCGGAAGTACTACTGACTATCTCCAAGTGAACAAGAGGACATCGCCAC
TTACTTCTGTCAACAAGGAAATACCCCTCCCTACACCTTCGGGGGGGTACCAAGCTGGAGATC
ACTGGGGGCGGAGGCTCCGGTGAGGCGGATCCGGCGGTGGAGGGAGCGAAGTCAAGCTGCAGG
AATCAGGACCAGGACTCGTGCGCCATCCAGTCCCTGTGCGTGACCTGTACTGTCTCCGGAGT
CAGCTCCCCGATTACGGAGTGTATGGATTAGGCAACCCCAAGAAAAGGGCTGGAATGGCTC
GGAGTGATCTGGGGCTCCGAAACCACCTACTACAAGTGGCGCTGAAGTCCCGGCTGACCATCA
TCAAGGACAAGTCCAAGAGCCAAGTGTCTTGAAGATGAACAGCTTGCAAGCCGACGATACCGC
AATCTACTACTGTGCAAGCACTATTACTACGGGGGGTCTTACGCCATGGACTACTGGGGACAG
GGCACCTCCGTGACTGTGTGCTCCGCGGCCGCGCCCGCCCCCTCGGCCCCCGACTCCTGCCCCGA
CGATCGCTTCCCAACCTCTCTCGCTGCGCCCGGAAGCATGCCGGCCCCGCGCCGGTGGCGCTGT
CCACACTCGCGGACTGGACTTTGATACCGCACTGGCGGCCGTGATCTGTAGCGCCCTGGCCACC
GTGCTGCTGGCGCTGCTCATCCTTTGCGTGATCTACTGCAAGCGGCAGCCTAGGCGAAAGAAGC
TCCTCTACATTTTCAAGCAACCCTTCATGCGCCCCGTGCAAACCAACCAGGAGGAGGATGGATG
CTCATGCCGGTTCCCTGAGGAAGAAGAGGGCGGTTGCGAGCTCAGAGTGAAATTCAGCCGGTCG
GCTGACGCCCCGGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAATGAGCTCAACCTGGGGCGCC
GCGAAGAGTACGACGTGCTGGACAAGAGGAGAGGCAGAGATCCGAAAATGGGCGGAAAGCCAAG
GCGGAAGAACCCGAGGAAGGTCTTTACAACGAAGTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTAC
TCCGAGATTGGGATGAAGGGAGAAAGACGGAGGGGAAAGGGACATGACGGAAGTTTACCAGGGCC
TGAGCACTGCCACGAAGGACACCTATGATGCCCTGCACATGCAGGCGCTGCCGCCTCGG

30

40

配列番号 11 (FMC 63 の抗 CD 19 scFV アミノ酸配列)

【0702】

50

【化 1 0】

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDG
TVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEI
TGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWL
GVIWGSETTYNSALKSRLTI IKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQ
GTSVTVSS

配列番号 1 2 (抗 C D 1 9 s c F V ポリヌクレオチド配列)

【0 7 0 3】

【化 1 1】

10

ATGCTTCTCCTGGTCACCTCCCTGCTCCTCTGCGAACTGCCTCACCCCTGCCTTCCTTCTGATTC
CTGACATTAGATGACTCAGACCACCTCTTCCCTTGTCGCGCTCACTGGGAGACAGAGTGACCAT
CTCGTGTCGCGCAAGCCAGGATATCTCCAAGTACCTGAACTGGTACCAACAGAAGCCCGACGGG
ACTGTGAAGCTGCTGATCTACCACACCTCACGCCTGCACAGCGGAGTGCCAAGCAGATTCTCCG
GCTCCGGCTCGGGAACCGATTACTCGCTTACCATTAGCAACCTCGAGCAGGAGGACATCGCTAC
CTACTTCTGCCAGCAAGGAAATACCTGCCCTACACCTTCGGCGGAGGAACCAAATTGGAAATC
ACCGGCGGAGGAGGCTCCGGGGGAGGAGGTTCCGGGGGCGGGGGTTCCGAAGTGAAGCTCCAGG
AGTCCGGCCCCGGCTGGTGGCGCCGTCGCAATCACTCTCTGTGACCTGTACCGTGTCTGGGAGT
GTCCCTGCCTGATTACGGCGTGAGCTGGATTCTGGCAGCCGCCGCGGAAGGGCCTGGAATGGCTG
GGTGTCTCTGGGGATCCGAGACTACCTACTACAACCTCGGCCCTGAAGTCCCGCCTGACTATCA
TCAAAGACAACCTCGAAGTCCCAGGTCTTTCTGAAGATGAACTCCCTGCAAACCTGACGACACCGC
CATCTATTACTGTGCTAAGCACTACTACTACGGTGGAACTATGCTATGGACTACTGGGGGCAA
GGCACTTCGGTGACTGTGTCAAGCGCGGCCGCAACTACCACCCCTGCCCCCTCGGCCGCCGACTC
CGGCCCCAACCATCGCAAGCCAACCCCTCTCCTTGCGCCCCGAAGCTTGCCGCCCGGCCGCGGG
TGGAGCCGTGCATACCCGGGGGCTGGACTTTGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCCGCTGGCC
GGCACTTGCGGCGTGCTCCTGCTGTGCTGGTCATCACCTTTACTGCAAGAGGGGGCCGGAAGA
AGCTGCTTTACATCTTCAAGCAGCCGTTTCATGCGGCCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGG
ATGCTCGTGACGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGGATGCGAACTGCGCGTCAAGTTCTCACGG
TCCGCCGACGCCCCCGCATATCAACAGGGGCCAGAATCAGCTCTACAACGAGCTGAACCTGGGAA
GGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGACGCGGACGCGACCCGGAGATGGGGGGGAAACC
ACGGCGGAAAAACCTCAGGAAGGACTGTACAACGAACTCCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCC
TACTCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGAGGGGAAAGGGTCACGACGGGCTGTACCAGG
GACTGAGCACCGCCACTAAGGATACCTACGATGCCTTGCAATATGCAAGCACTCCCACCCCGG

20

30

配列番号 1 3 (F M C 6 3 の抗 C D 1 9 s c F V V H)

【0 7 0 4】

【化 1 2】

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDG
TVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEI
T

40

配列番号 1 4 (F M C 6 3 の抗 C D 1 9 s c F V V L)

【0 7 0 5】

【化 1 3】

EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGSETTYNSALK
SRLTI IKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSS

配列番号 1 6 (抗 C D 2 0 C A R アミノ酸配列)

【0 7 0 6】

50

【化 1 4】

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPG
QGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSY
WFFDVWGAGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMD
WYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPPPTF
GGGKLEIKAAATTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPL
AGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEEGGCELRVKFS
RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE
AYSEIGMKGERRRRGKGHDLGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

配列番号 17 (抗CD20 CARポリヌクレオチド配列)

【0707】

【化 1 5】

ATGCTCCTTCTCGTGACCTCCCTGCTTCTCTGCGAACTGCCCCATCCTGCCTTCTGCTGATTC
CCGAGGTGCAGTTGCAACAGTCAGGAGCTGAACTGGTCAAGCCAGGAGCCAGCGTGAAGATGAG
CTGCAAGGCCTCCGGTTACACCTTCACCTCCTACAACATGCACTGGGTGAAACAGACCCCGGGA
CAAGGGCTCGAATGGATTGGCGCCATCTACCCCGGGAATGGCGATACTTCGTACAACCAGAAGT
TCAAGGGAAAGGCCACCCTGACCGCCGACAAGAGCTCCTCCACCGCGTATATGCAGTTGAGCTC
CCTGACCTCCGAGGACTCCGCCGACTACTACTGCGCACGGTCCAATACTATGGAAGCTCGTAC
TGGTTCTTCGATGTCTGGGGGGCCGGCACCCTGTGACCGTCAGTCCGGGGGCGGAGGATCCG
GTGGAGGCGGAAGCGGGGTGGAGGATCCGACATTGTGCTGACTCAGTCCCGGGCAATCCTGTC
GGCCTCACCGGGCGAAAAGGTCACGATGACTTGTAGAGCGTCGTCCAGCGTGAATACTACATGGAT
TGGTACCAAAAGAAGCCTGGATCGTCACCCAAGCCTTGATCTACGCTACATCTAACCTGGCCT
CCGGCGTGCCAGCGCGGTTTACGCGGGTCCGGCTCGGGCACCTCATACTCGCTGACCATCTCCCG
CGTGGAGGCTGAGGACGCCGCGACCTACTACTGCCAGCAGTGGTTCCTTCAACCCGCCGACTTTT
GGAGGCGGTACTAAGCTGGAGATCAAAGCGGCCGCAACTACCACCCCTGCCCTCGGCCGCCGA
CTCCGGCCCCAACCATCGCAAGCCAACCCCTCTCCTTGCGCCCCGAAGCTTGCCGCCCGGCCGC
GGGTGGAGCCGTGCATACCCGGGGGCTGGACTTTGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCGCTG
GCCGGCACTTGCGGCGTGCTCCTGCTGTGCTGGTCATCACCTTTACTGCAAGAGGGGCCGGA
AGAAGCTGCTTTACATCTTCAAGCAGCCGTTTATGCGGCCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGA
CGGATGCTCGTGCAGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGGATGCGAACTGCGCGTCAAGTTCTCA
CGGTCCGCCGACGCCCCCGCATATCAACAGGGCCAGAATCAGCTCTACAACGAGCTGAACCTGG
GAAGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGACGCGGACGCGACCCGGAGATGGGGGGGAA
ACCACGGCGGAAAAACCCTCAGGAAGGACTGTACAACGAACTCCAGAAAGACAAGATGGCGGAA
GCCTACTCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGAGGGGAAAGGGTCACGACGGGCTGTACC
AGGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACCTACGATGCCTTGCCATATGCAAGCACTCCCACCCCG
G

20

30

配列番号 18 (抗CD20 scFVアミノ酸配列)

【0708】

【化 1 6】

EVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMEIWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQK
FKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSSGGGS
GGGGSGGGGSDIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKPWIYATSNLA
SGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPPPTFGGGKLEIK

40

配列番号 19 (抗CD20 scFVポリヌクレオチド配列)

【0709】

50

【化 1 7】

GAGGTGCAGTTGCAACAGTCAGGAGCTGAACTGGTCAAGCCAGGAGCCAGCGTGAAGATGAGCT
GCAAGGCCTCCGGTTACACCTTCACCTCCTACAACATGCACTGGGTGAAACAGACCCCGGGACA
AGGGCTCGAATGGATTGGCGCCATCTACCCCGGGAATGGCGATACTTCGTACAACCAGAAGTTC
AAGGGAAAGGCCACCCTGACCGCCGACAAGAGCTCCTCCACCGCGTATATGCAGTTGAGCTCCC
TGACCTCCGAGGACTCCGCCGACTACTACTGCGCACGGTCCAACACTACTATGGAAGCTCGTACTG
GTTCTTCGATGTCTGGGGGGCCGGCACCCTGTGACCGTCAGCTCCGGGGGGCGGAGGATCCGGT
GGAGGCGGAAGCGGGGGTGGAGGATCCGACATTGTGCTGACTCAGTCCCCGGCAATCCTGTCCG
CCTCACCGGGCGAAAAGGTCACGATGACTTGTAGAGCGTCGTCCAGCGTGAACCTACATGGATTG
GTACCAAAGAAGCCTGGATCGTCACCCAAGCCTTGATCTACGCTACATCTAACCTGGCCTCC
GGCGTGCCAGCGCGGTTTCAGCGGGTCCGGCTCGGGCACCTCATACTCGCTGACCATCTCCCGCG
TGGAGGCTGAGGACGCCGCGACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCCTTCAACCCGCCGACTTTTGG
AGGCGGTACTAAGCTGGAGATCAAA

10

配列番号 2 0 (抗 C D 2 0 s c F V V H)

【0 7 1 0】

【化 1 8】

EVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYFTSYNMEIWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQK
FKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSS

20

配列番号 2 1 (抗 C D 2 0 s c F V V L)

【0 7 1 1】

【化 1 9】

DIVLTQSPAILLSASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKPWYATSNLASGVPARFSGS
GSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPPTFGGGTKLEIK

配列番号 2 2 (抗 C D 2 2 C A R アミノ酸配列)

【0 7 1 2】

【化 2 0】

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPQVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSNSAAWNWIWRS
PSRGLEWLGRYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREVTGD
LEDAFDIWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTIWS
YLNWYQQRPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSRGRSGTDFTLTISLQAEDFATYYCQSYSIP
QTFGQGKLEIKAAATTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIW
APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRV
KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK
MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

30

40

配列番号 2 3 (抗 C D 2 2 C A R ポリヌクレオチド配列)

【0 7 1 3】

50

【化 2 1】

ATGCTTCTTTTGGTGAAGTTCCTTTTGCTGTGCGAGTTGCCACACCCCGCCTTCCTGCTTATTC
 CCCAGGTACAGCTCCAGCAGAGTGGCCCAGGGCTCGTGAAGCCAAGCCAGACGCTGTCCTGAC
 TTGTGCAATTTTCAGGGGATTTCAGTTTCATCAAATAGCGCGGCGTGGAATTGGATTTCGACAATCT
 CCTTCCCGAGGGTTGGAATGGCTTGGACGAACATATTACAGATCCAAATGGTATAACGACTATG
 CGGTATCAGTAAAGTCAAGAATAACCATTAACCCCGACACAAGCAAGAACCAATTCTCTTTGCA
 GCTTAAGTCTGTACGCCAGAAGACACGGCAGTCTATTATTGCGCTCGCGAGGTAACGGGTGAC
 CTGGAAGACGCTTTTGACATTTGGGGGCAGGGTACGATGGTGACAGTCAGTTCAGGGGGCGGTG
 GGAGTGGGGGAGGGGGTAGCGGGGGGGGAGGGTCAGACATTTCAGATGACCCAGTCCCTTTCATC
 CTTGTCTGCCTCCGTCGGTGACAGGGTGACAATAACATGCAGAGCAAGCCAAACAATCTGGAGC
 TATCTCAACTGGTACCAGCAGCGACCCAGGAAAAGCGCCAAACCTGCTGATTTACGCTGCTTCCT
 CCTCCAATCAGGCGTGCCTAGTAGATTTAGCGGTAGGGGCTCCGGCACCGATTTTACGCTCAC
 TATAAGCTCTCTTCAAGCAGAAGATTTTGCAGCTTATTACTGCCAGCAGTCCTATAGTATACCT
 CAGACTTTCGGACAGGGTACCAAGTTGGAGATTAAGGCGGCCGCAACTACCACCCCTGCCCTC
 GGCCGCCGACTCCGGCCCCAACCATCGCAAGCCAACCCCTCTCCTTGCGCCCCGAAGCTTGCCG
 CCCGGCCGCGGGTGGAGCCGTGCATACCCGGGGGCTGGACTTTGCCTGCGATATCTACATTTGG
 GCCCCGCTGGCCGGCACTTGCGGCGTGCTCCTGCTGTGCTGGTCATCACCTTTACTGCAAGA
 GGGGCCGGAAGAAGCTGCTTTACATCTTCAAGCAGCCGTTTCATGCGGCCCGTGCGAGCAGCTCA
 GGAAGAGGACGGATGCTCGTGACAGATTCCTTGAGGAGGAAGAGGGGGGATGCGAACTGCGCGTC
 AAGTTCTCACGGTCCGCCGACGCCCCGCATATCAACAGGGCCAGAATCAGCTCTACAACGAGC
 TGAACCTGGGAAGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGACGCGGACGCGACCCGGAGAT
 GGGGGGGAACCACGGCGGAAAAACCTCAGGAAGGACTGTACAACGAACTCCAGAAAGACAAG
 ATGGCGGAAGCCTACTCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGAGGGGAAAGGGTCACGACG
 GGCTGTACCAGGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACCTACGATGCCTTGCAATATGCAAGCACT
 CCCACCCCGG

10

20

配列番号 2 4 (抗 CD 2 2 s c F V アミノ酸配列)

【0 7 1 4】

【化 2 2】

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRITYYRSK
 WYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREVTGDLEDAFDIWGQ
 GTMVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQTIWSYLNW
 YQQRPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGRGSGTDFTLTISSLQAEDFATYYCQQSYSIPQ
 TFGQGTKLEIKAAA

30

配列番号 2 5 (抗 CD 2 2 s c F V ポリヌクレオチド配列)

【0 7 1 5】

【化 2 3】

CAGGTACAGCTCCAGCAGAGTGGCCCAGGGCTCGTGAAGCCAAGCCAGACGCTGTCCTGACTT
 GTGCAATTTTCAGGGGATTTCAGTTTCATCAAATAGCGCGGCGTGGAATTGGATTTCGACAATCTCC
 TTCCCGAGGGTTGGAATGGCTTGGACGAACATATTACAGATCCAAATGGTATAACGACTATGCG
 GTATCAGTAAAGTCAAGAATAACCATTAACCCCGACACAAGCAAGAACCAATTCTCTTTGCAGC
 TTAAGTCTGTACGCCAGAAGACACGGCAGTCTATTATTGCGCTCGCGAGGTAACGGGTGACCT
 GGAAGACGCTTTTGACATTTGGGGGCAGGGTACGATGGTGACAGTCAGTTCAGGGGGCGGTGGG
 AGTGGGGGAGGGGGTAGCGGGGGGGGAGGGTCAGACATTTCAGATGACCCAGTCCCTTTCATCCT
 TGTCTGCCTCCGTCGGTGACAGGGTGACAATAACATGCAGAGCAAGCCAAACAATCTGGAGCTA
 TCTCAACTGGTACCAGCAGCGACCCAGGAAAAGCGCCAAACCTGCTGATTTACGCTGCTTCCTCC
 CTCCAATCAGGCGTGCCTAGTAGATTTAGCGGTAGGGGCTCCGGCACCGATTTTACGCTCACTA
 TAAGCTCTCTTCAAGCAGAAGATTTTGCAGCTTATTACTGCCAGCAGTCCTATAGTATACCTCA
 GACTTTCGGACAGGGTACCAAGTTGGAGATTAAGGCGGCCGCA

40

配列番号 2 6 (抗 CD 2 2 s c F V V H)

50

【 0 7 1 6 】

【 化 2 4 】

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRITYYRSKWYNDYA
VSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREVTGDLEDAFDIWGQGTMTVSS

配列番号 27 (抗 CD 22 s c F V V L)

【 0 7 1 7 】

【 化 2 5 】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTIWSYLNWYQQRPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSG
RSGTDFTLTISSLQAEDFATYYCQQSYSIPQTFGQGTKLEIKAAA

10

配列番号 28 (ヒト CD 8 ヒンジ領域)

【 0 7 1 8 】

【 化 2 6 】

AAATTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLL
SLVITLYC

20

配列番号 29 (TNFRSF 19 膜貫通ドメイン)

【 0 7 1 9 】

【 化 2 7 】

DTALAAVICSALATVLLALLILCVIYCKRQ

配列番号 30 (CD 3 ゼータ)

【 0 7 2 0 】

【 化 2 8 】

RVKFSSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK
DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

30

配列番号 31 (4-1BB 共刺激ドメイン)

【 0 7 2 1 】

【 化 2 9 】

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

配列番号 32 (CD 28 共刺激ドメイン)

【 0 7 2 2 】

【 化 3 0 】

RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS

40

配列番号 33 (2A 配列)

【 0 7 2 3 】

【 化 3 1 】

RAKRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPRAKR

50

配列番号 3 4 (抗 B 7 - H 3 C A R アミノ酸配列)

【0 7 2 4】

【化 3 2】

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPQVQLQQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPG
 QGLEWMGGIIPILGIANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGGAGGSGS
 YYPLIWQGQTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCGASQSVSSSY
 LAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSSWPP
 TWTFGQGTKLEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLPFGPSKPFWVLVVG
 GVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKF
 SRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRKRRGRDPGEMGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA
 EAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

配列番号 3 5 (抗 B 7 - H 3 C A R ポリヌクレオチド配列)

【0 7 2 5】

【化 3 3】

ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGCGTTTCTGCTGATTC
 CGCAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGCGCGGAAGTAAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAGTGAG
 CTGCAAAGCGAGCGGCGGCACCTTTAGCAGCTATGCGATTAGCTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGC
 CAGGGCCTGGAATGGATGGGCGGCATTATTCCGATTCTGGGCATTGCGAACTATGCGCAGAAAT
 TTCAGGGCCGCGTGACCATTACCGCGGATGAAAGCACCAGCACCGCGTATATGGAAGTGAAGTGA
 CCTGCGCAGCGAAGATAACCGCGGTGTATTATTGCGCGCGCGGCGGGCGGGCGGCAGCGGCAGC
 TATTATCCGCTGATTTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGCGGCGGGCGGCAGCGG
 GCGGCGGGCGGCAGCGGCGGGCGGGCGGCAGCGAAATTGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGACCCCTGAG
 CCTGAGCCCGGGCGAACGCGCGACCCCTGAGCTGCGGCGCGAGCCAGAGCGTGAGCAGCAGCTAT
 CTGGCGTGGTATCAGCAGAAACCGGGCCAGGCGCCGCGCCTGCTGATTTATGATGCGAGCAGCC
 GCGCGACCGGCATTCCGGCGCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGACCAT
 TAGCAGCCTGGAACCGGAAGATTTTTCGGTGTATTATTGCGCAGCAGCGCAGCAGCTGGCCGCCG
 ACCTGGACCTTTGGCCAGGGCACCAAACTGGAATTAACCGCGCGGCGGCGATTGAAGTGATGT
 ATCCGCGCCGCTATCTGGATAACGAAAAAGCAACGGCACCATTTATTCATGTGAAAGGCAAACA
 TCTGTGCCCCGAGCCCGCTGTTTCCGGGCCCCGAGCAAACCGTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGG
 GGCGTGCTGGCGTGCTATAGCCTGCTGGTGACCGTGCGGCTTTATTATTTTTGGGTGCGCAGCA
 AACGCAGCCGCTGCTGCATAGCGATTATATGAACATGACCCGCGCCGCGCCGGGCCGACCCG
 CAAACATTATCAGCCGATGCGCCGCGCGCGATTTTTCGGCGTATCGCAGCCGCGTGAAATTT
 AGCCGCGAGCGCGGATGCGCCGCGGCTATCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTATAACGAACTGAACC
 TGGGCCGCGCGGAAGAATATGATGTGCTGGATAAACGCCGCGGCGCGATCCGGAATGGGCGG
 CAAACCGCGCGCGCAAAAACCCGAGGAAGGCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGATAAAATGGCG
 GAAGCGTATAGCGAAATTGGCATGAAAGGCGAACGCCGCGCGGCAAGGCCATGATGGCCTGT
 ATCAGGGCCTGAGCACCGCGACCAAAGATACCTATGATGCGCTGCATATGCAGGCGCTGCCGCC
 GCGC

20

30

配列番号 3 6 (抗 B 7 - H 3 s c F V アミノ酸配列)

【0 7 2 6】

【化 3 4】

QVQLQQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPILGIANYAQKF
 QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGGAGGSGSYYPPLIWQGQTTVTVSSGGGGSG
 GGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCGASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSR
 ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSSWPPWTWTFGQGTKLEIKRAAA

40

配列番号 3 7 (抗 B 7 - H 3 s c F V ポリヌクレオチド配列)

【0 7 2 7】

50

10

20

30

40

【化 4 0】

MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQK
PGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRTIPRTFGGGTK
LEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRAPG
KGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTAYLQINNLYEDTATYFCALDYSYAMDY
WGQGTSTVTSSFPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA
CDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPR
DFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEG
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

配列番号 4 3 (抗 B C M A C A R アミノ酸配列)

【0 7 3 3】

【化 4 1】

MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIYWYQQK
PGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRTIPRTFGGGTK
LEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTHYSMNWVKQAPG
KGLKWMGRINTETGEPLYADDFKGRFAFSLETSASTAYLVINNLYKNETATFFCSNDYLYSCDY
WGQGTTLTVSSFPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA
CDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPR
DFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEG
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

20

配列番号 4 4 (抗 B C M A C A R アミノ酸配列)

【0 7 3 4】

【化 4 2】

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPDIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQ
KPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRTIPRTFGGKT
KLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRAP
GKGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTAYLQINNLYEDTATYFCALDYSYAMD
YWGQGTSTVTSSAAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG
LDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPY
APPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKN
PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

30

配列番号 4 5 (抗 B C M A C A R アミノ酸配列)

【0 7 3 5】

【化 4 3】

MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQK
PGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRTIPRTFGGGTK
LEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRAPG
KGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTAYLQINNLYEDTATYFCALDYSYAMDY
WGQGTSTVTSSAAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL
DFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYA
PPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNP
QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

40

配列番号 4 6 (抗 B C M A C A R アミノ酸配列)

【0 7 3 6】

50

【化 4 4】

MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQK
PGQPPTLLLIQLASNVQTVGPARGSGSGSRDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRTIPRTFGGGTK
LEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRAPG
KGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTAYLQINNLYEDTATYFCALDYSYAMDY
WGQGSTSVTVSSAAAFVFPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL
DFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED
GCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGK
PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

配列番号 4 7 (抗 B C M A C A R アミノ酸配列)

【0 7 3 7】

【化 4 5】

MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQK
PGQPPTLLLIQLASNVQTVGPARGSGSGSRDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRTIPRTFGGGTK
LEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRAPG
KGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTAYLQINNLYEDTATYFCALDYSYAMDY
WGQGSTSVTVSSAAAFVFPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL
DFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTP IQEEQADAH
STLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGL
YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

20

配列番号 4 8 (抗 B C M A C A R アミノ酸配列)

【0 7 3 8】

【化 4 6】

MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQK
PGQPPTLLLIQLASNVQTVGPARGSGSGSRDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRTIPRTFGGGTK
LEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRAPG
KGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTAYLQINNLYEDTATYFCALDYSYAMDY
WGQGSTSVTVSSAAAFVFPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL
DFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED
GCSCRFPEEEEGGCELRRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTP IQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAP
AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG
MKGERRRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

30

配列番号 4 9 (抗 B C M A C A R アミノ酸配列)

【0 7 3 9】

【化 4 7】

DIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQPPTLLLIQLASNVQTVGPA
RFGSGSGSRDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRTIPRTFGGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTK
GQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRAPGKGLKWMGWINTETREPAYAYD
FRGRFAFSLETSASTAYLQINNLYEDTATYFCALDYSYAMDYWGQGSTSVTVSSAAATTPAPR
PPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKR
GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL
NLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGGHDG
LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

40

配列番号 5 0 (抗 B C M A 重鎖アミノ酸配列)

【0 7 4 0】

50

【化 4 8】

QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSGSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGITYYNPS
 LKSRVTISVDTSTKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHDGAVAGLFDYWGQGTTLVTVSSASTKGPS
 VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
 PSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
 TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

配列番号 5 1 (抗 B C M A 軽鎖 アミノ酸配列)

10

【0 7 4 1】

【化 4 9】

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQPPGQAPVVVVYDDSDRPSGIPERFSGS
 NSGNTATLTISRVEAGDEAVYYCQVWDSSSDHVVFGGGKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQ
 ANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKGDSSPVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRS
 YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

配列番号 5 2 (抗 B C M A C A R 重鎖 アミノ酸配列)

20

【0 7 4 2】

【化 5 0】

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSNYWMHWRQAPGQGLEWMGATYRGHSDTYYNQKF
 KGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGAIYDGYDVLNHWGQGTTLVTVSSASTKGPS
 VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
 PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
 ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
 KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
 PGK

30

配列番号 5 3 (抗 B C M A 軽鎖 アミノ酸配列)

【0 7 4 3】

【化 5 1】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSNLSHGVPSRFSG
 SGGSTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYRKLPWTFGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
 TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVY
 ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号 5 4 (抗 B C M A C A R アミノ酸配列)

40

【0 7 4 4】

【化 5 2】

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVKLEESGGGLVQAGRSLRLSCAASEHTFSSHVMGWFRQAPGK
 ERESVAVIGWRDISTSYADSVKGRFTISRDNAKKTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCAARRIDAADF
 SWGQGTQVTVSSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTMTGWFRQAPGKEREFVAA
 ISLSPTLAYYAESVKGRFTISRDNAKNTVVLQMNLSLKPEDTALYYCAADRKSVMISRPDYWGQG
 TQVTVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGT
 CGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSA
 DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYS
 EIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

50

配列番号 55 (抗BCMA CARコード配列を含む核酸配列)

【0745】

【化53-1】

TGTAGTCTTATGCAATACTCTTGTAGTCTTGCAACATGGTAACGATGAGTTAGCAACATGCCTT
ACAAGGAGAGAAAAAGCACCGTGCATGCCGATTGGTGGAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCCTTA
TTAGGAAGGCAACAGACGGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAATTGCCGCATTGCAGAG
ATATTGTATTTAAGTGCCTAGCTCGATACATAAACGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGC
CTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTG
CTTCAAGTAGTGTGTGCGCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTT
AGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCA
GAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGC
GACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGAG
CGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGA
AAGAAAAAATATAAATTAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTCGCAGTTA
ATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCT
TCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCAT
CAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAA
GTAAGACCACCGCACAGCAAGCGGCCGCGCTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGG
GACAATTGGAGAAGTGAATTATATAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCAC
CCACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTT
CCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAG

10

20

【0746】

30

40

50

【化 5 3 - 2】

GCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGC
 AACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGT
 GGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTGGGGTTGCTCTGGAAAACCTATTGTC
 ACCACTGCTGTGCCCTTGGAAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATCACA
 CGACCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGA
 AGAATCGCAAAACCAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGT
 TTGTGGAATTGGTTTAACATAACAAATTGGCTGTGGTATATAAAATTATTCATAATGATAGTAG
 GAGGCTTGGTAGGTTTAAGAATAGTTTTTGTCTGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGG
 ATATTCACCATTATCGTTTCAGACCCACCTCCCAACCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGA
 ATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTGATTAGTGAACGGATCTCGAC
 GGTATCGCCTTTAAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACA
 TAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAATTTTCG
 GGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTATCGATGAGTAATTCATACAAAAGGACTCGCC
 CCTGCCTTGGGGAATCCAGGGACCGTCGTAAACTCCCACTAACGTAGAACCCAGAGATCGCT
 GCGTTCGCCGCCCTCACCCGCCCGCTCTCGTCATCACTGAGGTGGAGAAGAGCATGCGTGAGG
 CTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCGGAGAAGTTGGGGGGAGGG
 GTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCTGT
 ACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAA
 CGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGG
 CCTGGCCCTCTTACGGGTATATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACGCCCTGGCTGCAG
 TACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTTCGAGGCCTTGCGCTT
 AAGGAGCCCCCTTCGCCCTGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCTTGGGCGCTGGGGCCGCGCGTGCG
 AATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAATTTT
 TGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGC
 ACCTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATG
 TTCGGCGAGGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGC
 CGGCCGTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGG
 CCCGGTCCGACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTC
 AAAATGGAGGACGCGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTACCCACACAAAGGAAAAGGGCC
 TTTCCGTCCTCAGCCGTGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCG
 ATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTGCTCTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGA
 GTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTTCTCC
 TTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGATCTTGTTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAA
 GTTTTTTCTTCCATTTACAGGTGTCTGAGGATCGCTAGCGCTACCGGACTCAGATCTCGAGCT
 CAAGCTTCGAATTCGCCGCCACCATGGCTCTGCCCGTACCGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCTCT
 GCTGCTGCACGCTGCTCGCCCTCAGGTCAAACCTGGAAGAATCTGGCGGAGGCCTGGTGCAGGCA
 GGACGGAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCAGCATCCGAGCACACCTTCAGCTCCCACGTGATGGGCT
 GGTTTCGGCAGGCCCCAGGCAAGGAGAGAGAGAGCGTGCCCGTGATCGGCTGGAGGGACATCTC
 CACATCTTACGCCGATTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAAGACA
 CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAAGCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGCGCAGCAAGGA
 GAATCGACGCAGCAGACTTTGATTCTGGGGCCAGGGCACCCAGGTGACAGTGTCTAGCGGAGG
 AGGAGGATCTGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGCGGCCTGGTGCAGGCCGAGGCTCTCTG
 AGGCTGAGCTGTGCAGCATCCGGAAGAACCTTCACAATGGGCTGGTTTAGGCAGGCACAGGAA
 AGGAGAGGGAGTTTCGTGGCAGCAATCAGCCTGTCCCCTACCCTGGCCTACTATGCCGAGAGCGT
 GAAGGGCAGGTTTACCATCTCCCGCGATAACGCCAAGAATACAGTGGTGTGCAGATGAACTCC
 CTGAAACCTGAGGACACAGCCCTGTACTATTGTGCCCGCGATCGGAAGAGCGTGATGAGCATT
 GACCAGACTATTGGGGGCGAGGGAACACAGGTGACCGTGAGCAGCACTAGTACCACGACGCCAGC
 GCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTGCAGCCCCGTGTCCTGCGCCAGAGGCG
 TGCCGGCCAGCGGCGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACA
 TCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTTACTG

10

20

30

40

【0 7 4 7】

【化 5 3 - 3】

CAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACT
 ACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGA
 GAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAA
 CGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCT
 GAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAG
 ATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCA
 CGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAG
 GCCCTGCCCCCTCGCTAATCTAGATCCGCGTCTGGAACAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTG
 TGAAGATTGACTGGTATTCTTAACCTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTA
 ATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCT
 GGTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGT
 GTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACT
 TTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACCTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGA
 CAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGTCGGGGAAGCTGACGTCCTTTCC
 ATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCTTCTGCTACGTCCTTTCC
 GCCCTCAATCCAGCGGACCTTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTC
 TTCGCTTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCTGGAATTAATTC
 TGCAGTCGAGACCTAGAAAAACATGGAGCAATCACAAGTAGCAATACAGCAGCTACCAATGCTG
 ATTGTGCCTGGCTAGAAGCACAAGAGGAGGAGGAGGTGGGTTTTCCAGTCACACCTCAGGTACC
 TTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGAGGGGA
 CTGGAAGGGCTAATTATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTCTGCTTTTTGTCTGTACTGGGTCTCTCT
 GGTAGACCAGCACTCCCAACGAAGACAAGATGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCA
 ATAAAGCTTGCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAG
 AGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGT

10

20

配列番号 5 6 (ウイルス IL-10 に基づく置換を有する例示的なヒト IL-10 バリアント)

【0 7 4 8】

【化 5 4】

MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQTKDEVDNL
 LLKESLLEDFKGYLGCAQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPEAKDHVNSLGENLKTLLRLRLRCHR
 FLPCENKSKAVEQIKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN

30

配列番号 5 7 (ウイルス IL-10 に基づくアミノ酸置換を有する例示的なヒト IL-10 バリアント)

【0 7 4 9】

【化 5 5】

MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNL
 LLKESLLEDFKGYLGCAQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDAKAHVNSLGENLKTLLRLRLRCHR
 FLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN

40

配列番号 5 8 (ハツカネズミ (Mus musculus) ; 「MOUSE」)

【0 7 5 0】

【化 5 6】

MPGSALLCCLLLLLTGMRI SRGQYSREDNNCTHFPVGQSHMLLELR TAFS QVKTFQTKDQLDNI
 LLTDSLMQDFKGYLGCAQALSEMIQFYLV EVMPPQA EKHGPEI KEHLNSLGEK LKTLRMRLRCHR
 FLPCENKSKAVEQVKSDFNKLQDQGVYKAMNEFDIFIN CIEAYMMIKMKS

50

配列番号 59 (ドブネズミ (*Rattus norvegicus*) ; 「R A T」)

【0751】

【化57】

MPGSALLCCLLLL LAGVKTSKGHSIRGDNNT HFPVSQTHMLRELRAAFSQVK TFFQKKDQLDNI
LLTDSL LQDFKGYLG CQALSEMIKFY LVEVMPQAENHGPEIKEHLNSLGEK LKTLWIQLRRCHR
FLPCENKSKAVEQVK NDFNKLQDKGVYKAMNEFDIFIN CIEAYVTLKMKN

配列番号 60 (アカゲザル (*Macaca mulatta*) ; 「M A C M U」)

【0752】

【化58】

MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSEN SCTRFPGNLPHMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNI
LLKESLLED FKG YLG CQALSEMIQFY LEEVMPQAENHDPDIKEHVNSLGENL KTLRLRLRRCHR
FLPCENKSKAVEQVK NAFSKLQEKGVYKAMSEFDIFIN YIEAYMTMKIQN

10

配列番号 61 (ニシゴリラ (*Gorilla gorilla*) ; 「G O R I L L A」)

【0753】

【化59】

MHSSALLCCLVLLTGVRASPGHGTQSEN SCTRFPGNLPMMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNI
LLKESLLED FKG YLG CQALSEMIQFY LEEVMPQAENQDPDIKAHVNSLGENL KTLRLRLRRCHR
FLPCENKSKAVEQVK NAFNKLQEKGVYKAMSEFDIFIN YIEAYMTMKIRN

20

配列番号 62 (カニクイザル (*Macaca fascicularis*) ; 「C Y N O」)

【0754】

【化60】

MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSEN SCTRFPGNLPHMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNI
LLKESLLED FKG YLG CQALSEMIQFY LEEVMPQAENHDPDIKEHVNSLGENL KTLRLRLRRCHR
FLPCENKSKAVEQVK NAFSKLQEKGVYKAMSEFDIFIN YIEAYMTMKIQN

30

配列番号 63 (アヌビスヒヒ (*Papio Anubis*) ; 「O L I V E B A B O O N」)

【0755】

【化61】

MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSEN SCTRFPGNLPHMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNI
LLKESLLED FKG YLG CQALSEMIQFY LEEVMPQAENHDPDIKEHVNSLGENL KTLRLRLRRCHR
FLPCENKSKAVEQVK NAFSKLQEKGVYKAMSEFDIFIN YIEAYMTMKIQN

40

配列番号 64 (ボノボ (*Pan paniscus*) ; 「B O N O B O」)

【0756】

【化62】

MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSEN SCTRFPGNLPMMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNI
LLKESLLED FKG YLG CQALSEMIQFY LEEVMPQAENQDPDIKVHVNSLGENL KTLRLRLRRCHR
FLPCENKSKAVEQVK NAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFIN YIEAYMTMKIRN

配列番号 65 (チンパンジー (*Pan troglodytes*) ; 「C H I M P」)

【0757】

50

【化 6 3】

MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLL
LLKESLLEDFKGYLGCGALXEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKVHVNSLGENLKTLLRLRLRCHR
FLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN

配列番号 6 6 (E B V B 9)

【 0 7 5 8 】

【化 6 4】

MERRLVVTLQCLVLLYLAPECGGTDQCDNFPQMLRDLRDAFSRVKTFFQTKDEVNLLLKESLL
EDFKGYLGCGALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPEAKDHVNSLGENLKTLLRLRLRCHRFLPCENK
SKAVEQIKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTIKAR

10

配列番号 6 7 h u I L - 1 0 ハイブリッド # 1

【 0 7 5 9 】

【化 6 5】

MHSSALLCCLVLLTGRASPGQGTQSENSCTHFPGNIPNMLRDIRDAFSRVKTEFQTKDEVNLL
LKESLLEDEKGYLGCGALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPEAKDHVNSLGENLKTLLRLRIRCHRF
LPCENKSKAVEQIKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN

20

配列番号 6 8 h u I L - 1 0 ハイブリッド # 2

【 0 7 6 0 】

【化 6 6】

MHSSALLCCLVLLTGRASPGQGTQSENSCTHFPGNIPNMLRDIRDAFSRVKTEFQMKDQLDNLL
LKESLLEDEKGYLGCGALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDAKAHVNSLGENLKTLLRLRIRCHRF
LPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN

30

40

50

【図面】
【図 1】

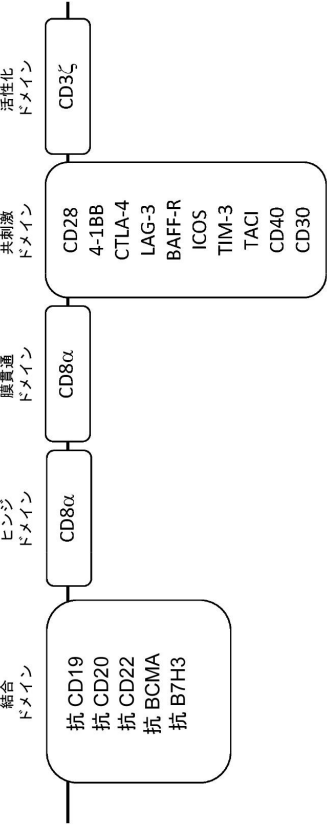


図 1

【図 2 - A】

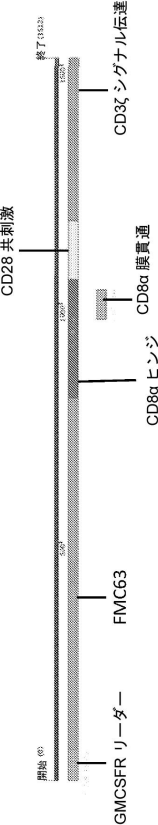


図 2A

【図 2 - B】

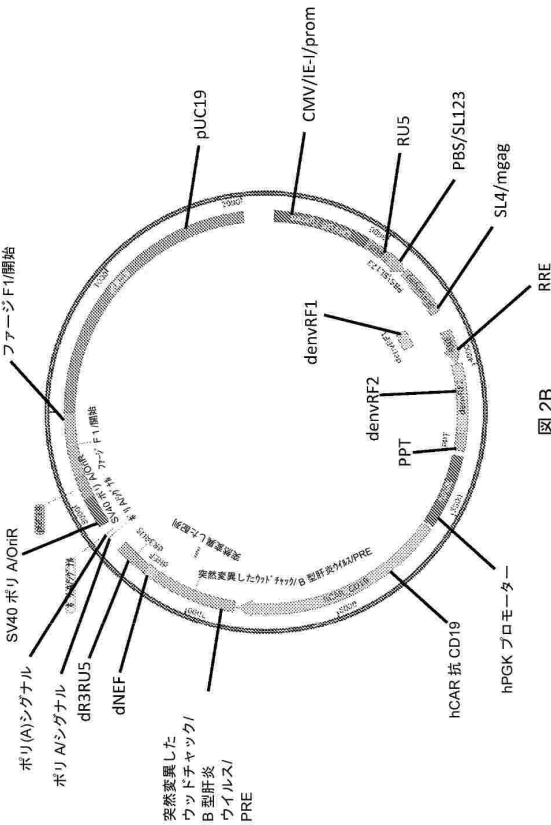


図 2B

【図 3 - A】

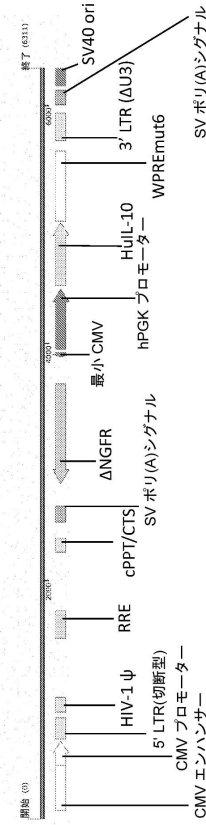


図 3A

10

20

30

40

50

【図 3 - B】

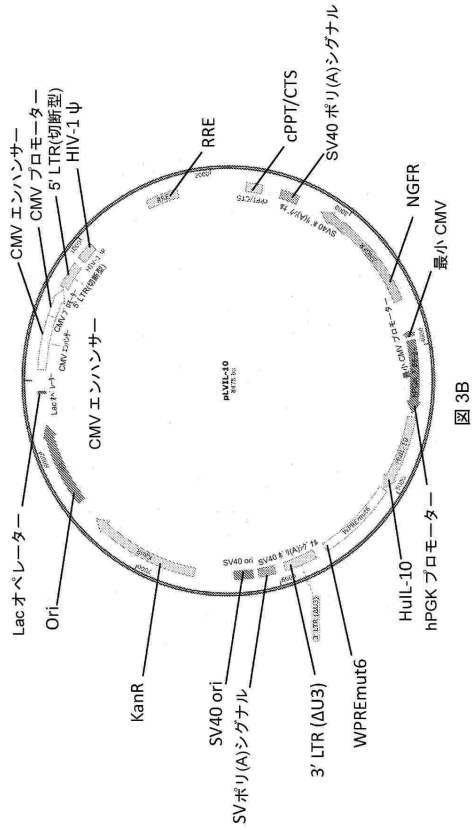
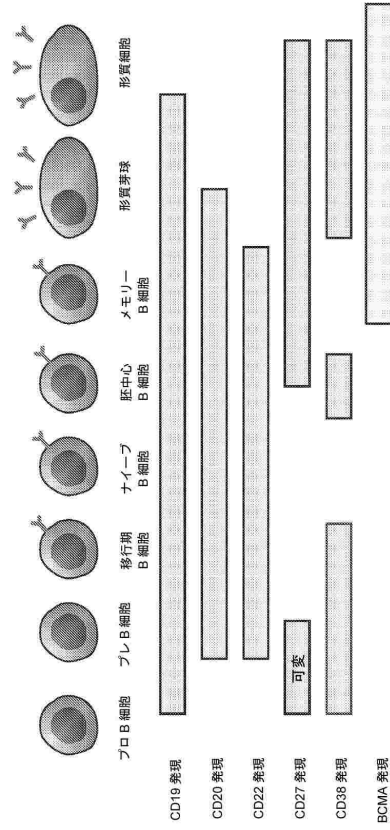


図 3B

【図 4】



骨髓および末梢におけるB細胞分化の間のCD19、CD20、CD22、CD27、CD38、およびBCMAの発現

図 4

【図 5 - A】

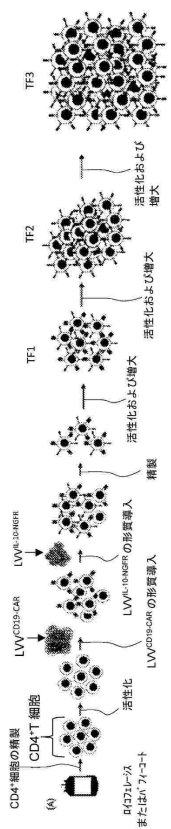


図 5A

【図 5 - B】

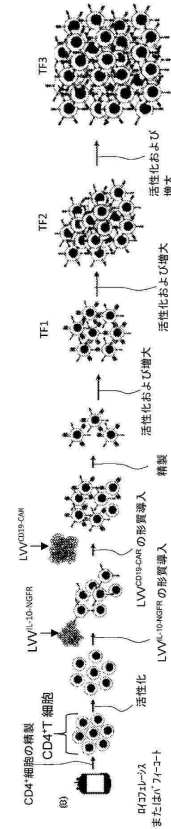


図 5B

10

20

30

40

50

【図 5 - C】

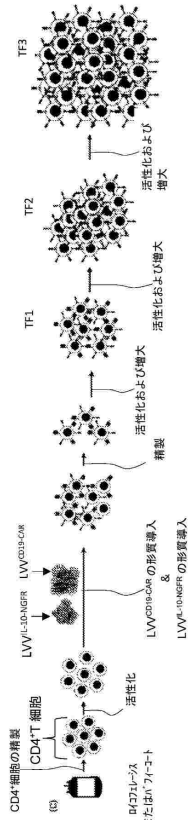


図 5C

【図 6 - A】

LW^{CD19-CAR} の後に LW^{IL-10-NGFR}

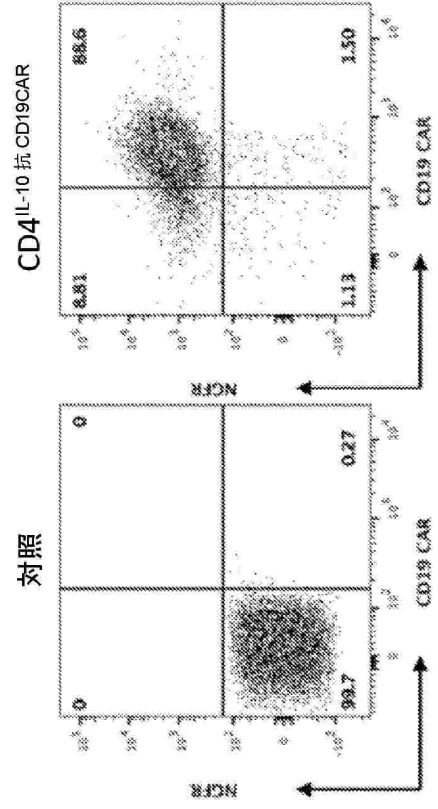


図 6A

【図 6 - B】

LW^{IL-10-NGFR} の後に LW^{CD19-CAR}

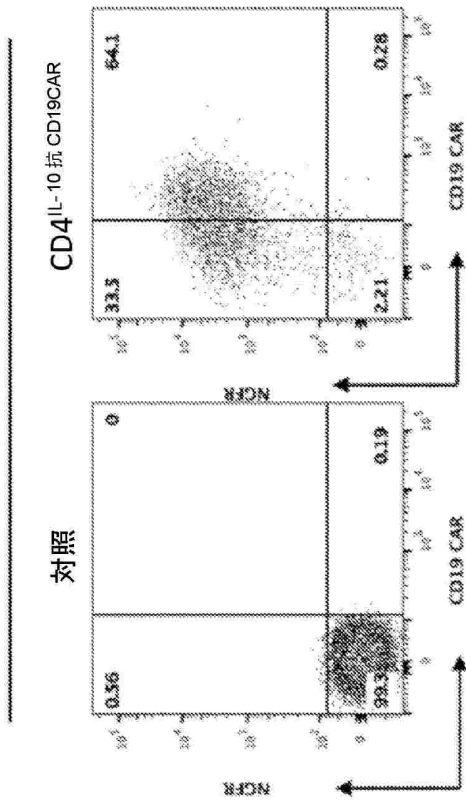


図 6B

【図 6 - C】

LW^{IL-10-NGFR} および LW^{CD19-CAR} を同時

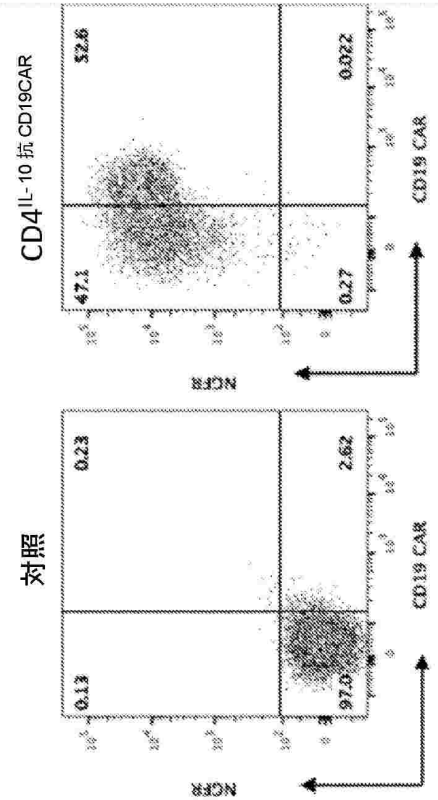


図 6C

10

20

30

40

50

【図 7】

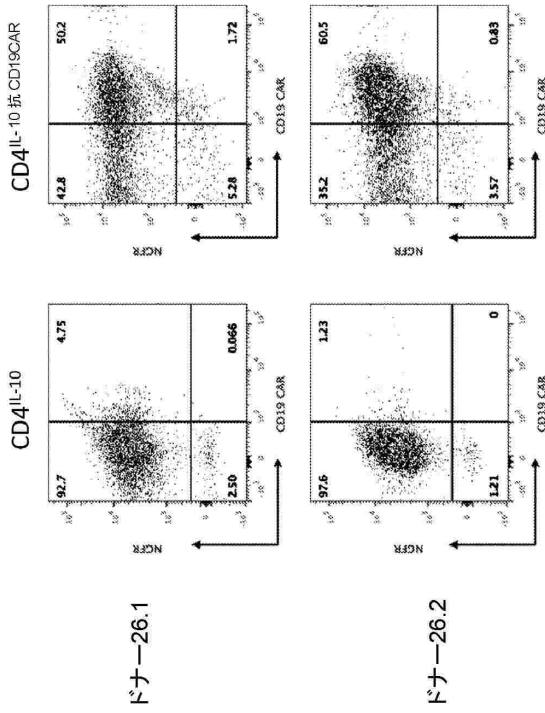


図 7

【図 8 - A】

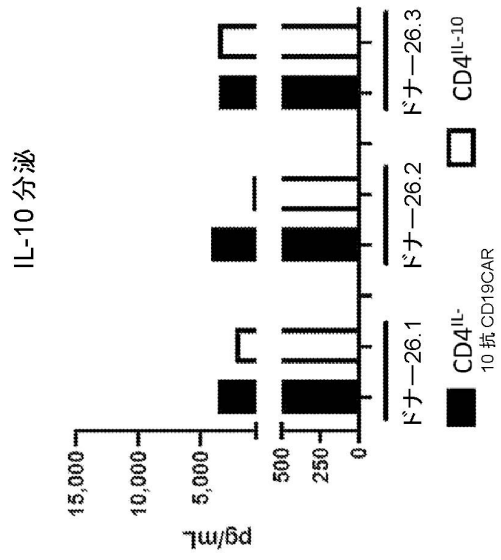


図 8A

【図 8 - B】

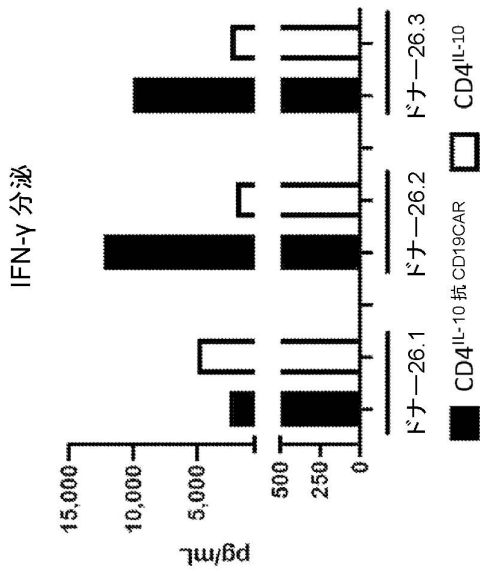


図 8B

【図 8 - C】

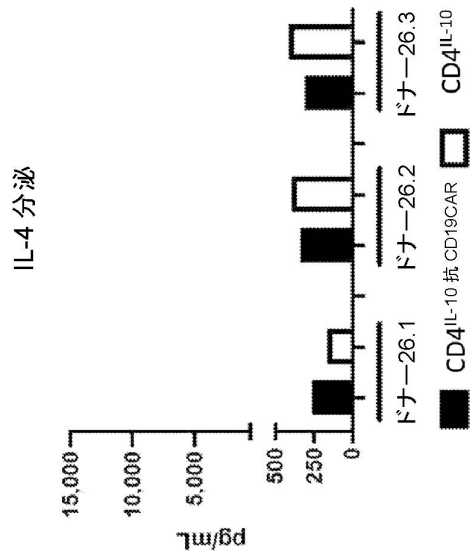


図 8C

10

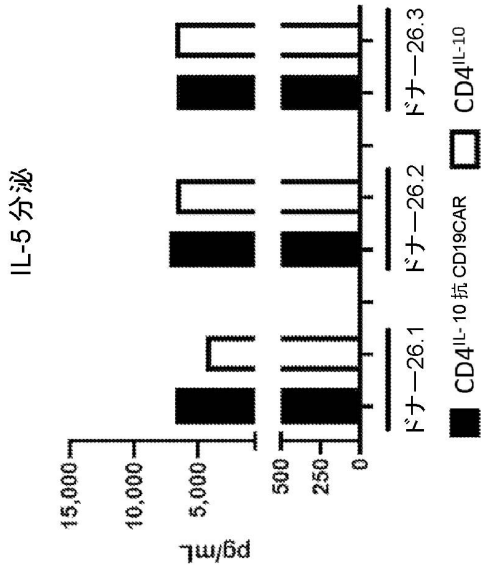
20

30

40

50

【図 8 - D】



【図 9】

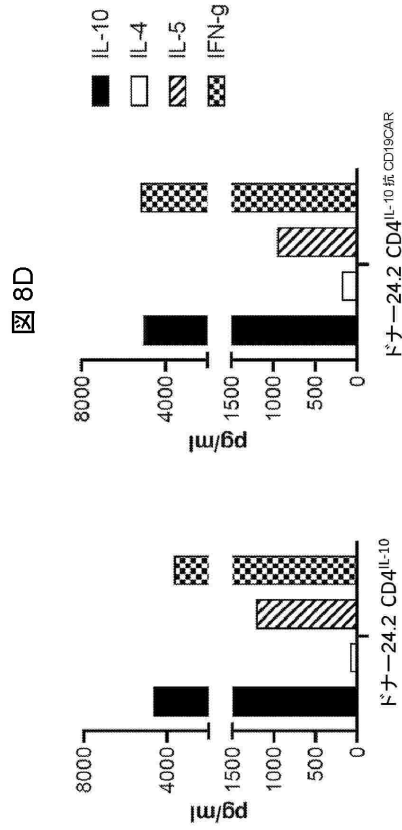
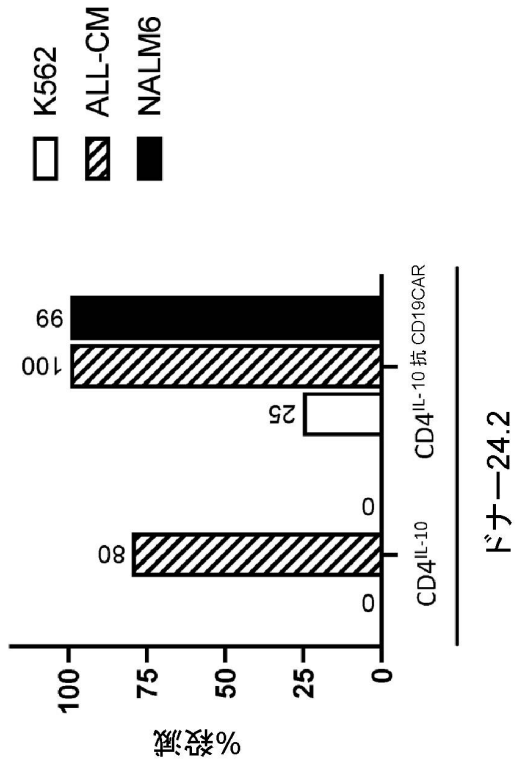


図 9

【図 10】



【図 11 - A】

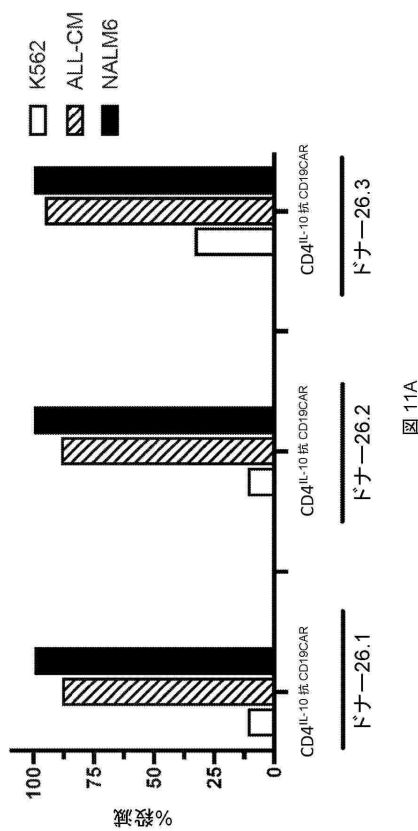


図 11A

図 10

10

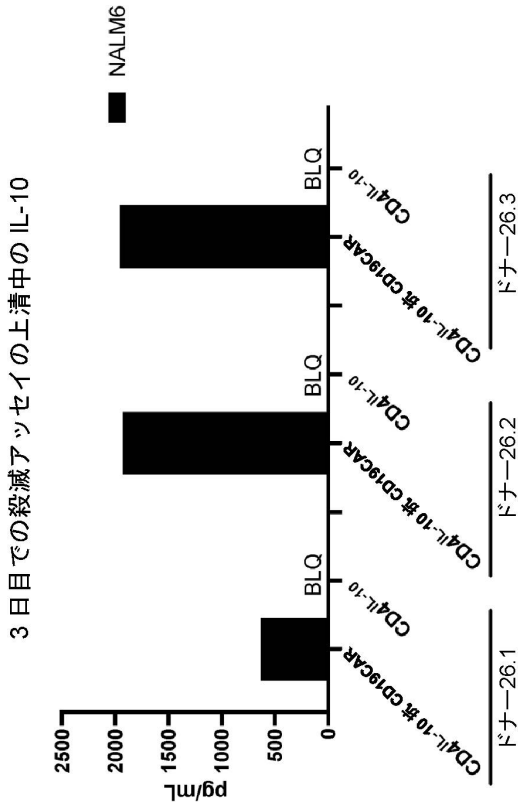
20

30

40

50

【図 1 1 - B】



【図 1 3】

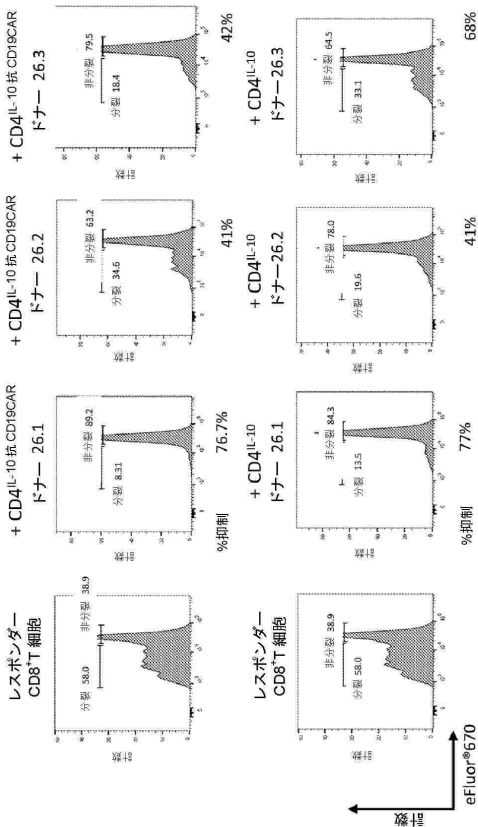


図 13

【図 1 2】

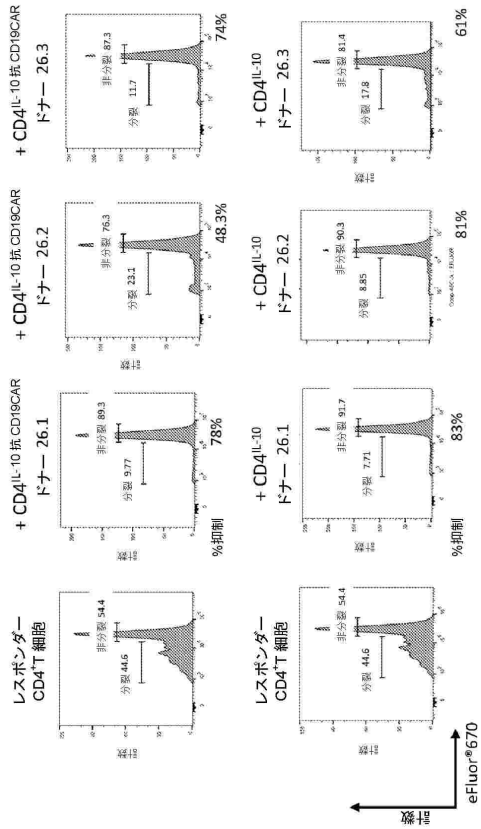


図 11B

図 12

【図 1 4】

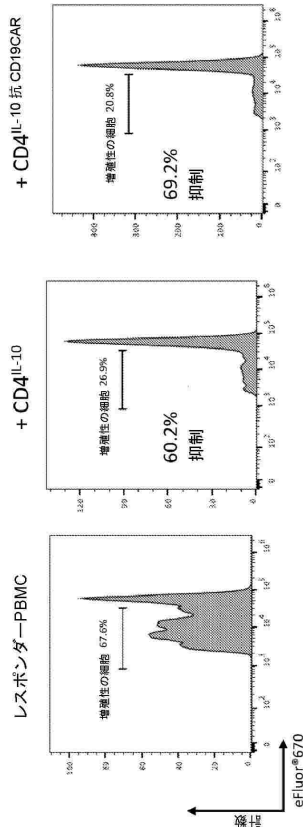


図 14

10

20

30

40

50

【図 15】

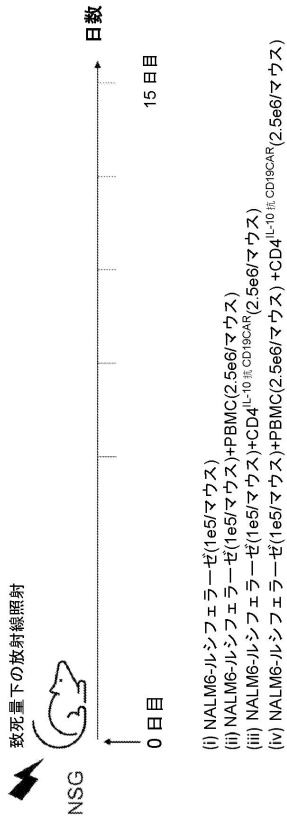
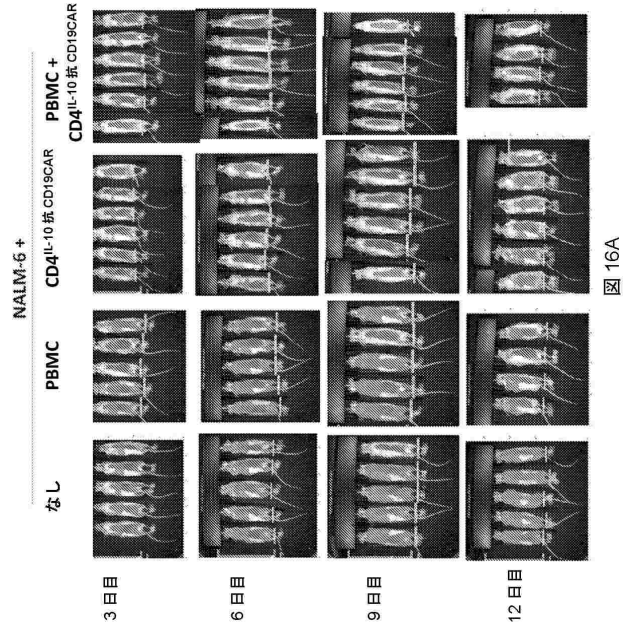


図 15

【図 16 - A】



10

20

【図 16 - B】

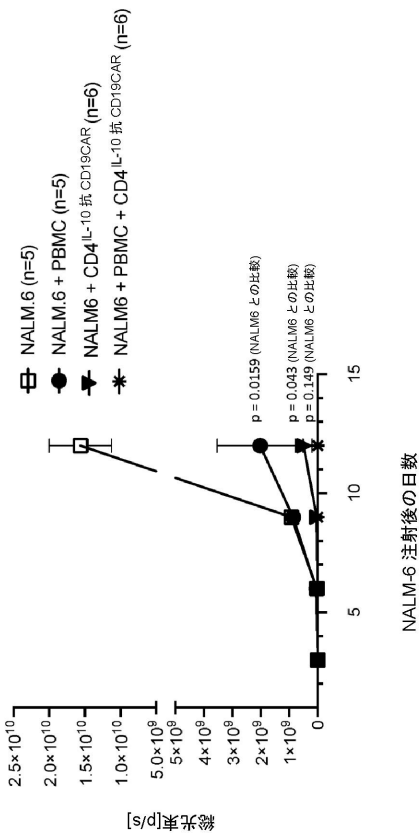


図 16B

【図 17】

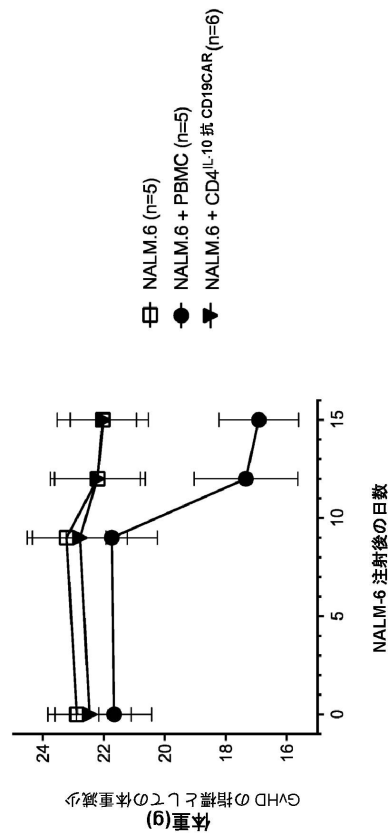


図 17

30

40

50

【図 18 - A】

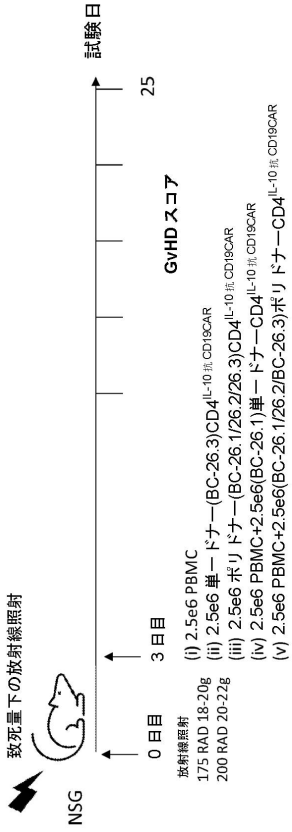


図 18A

【図 18 - B】

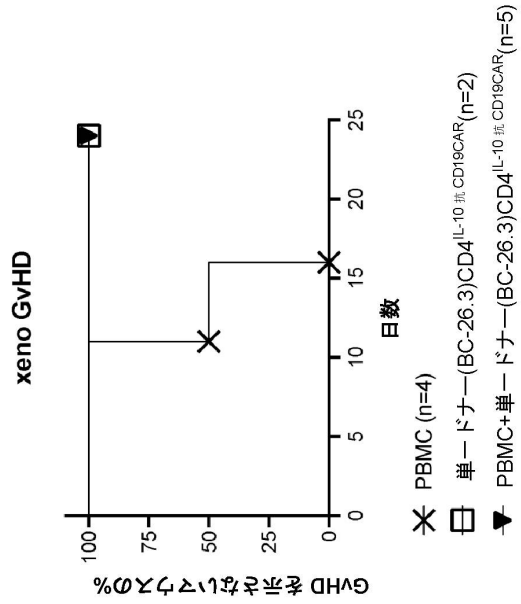


図 18B

【図 18 - C】

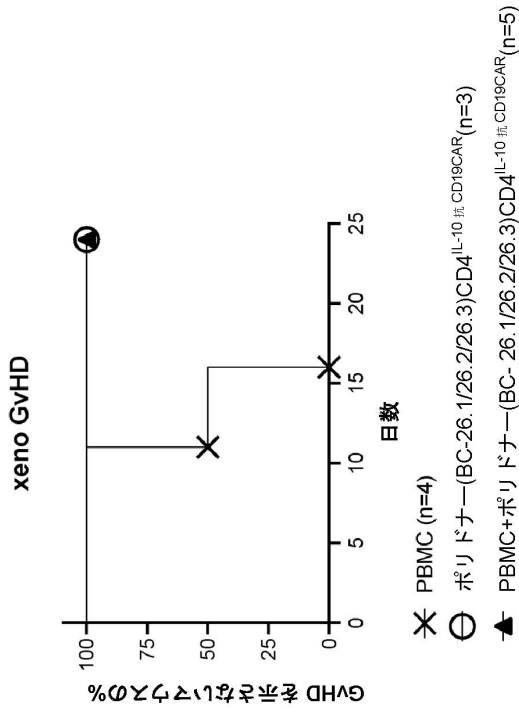


図 18C

【図 19】

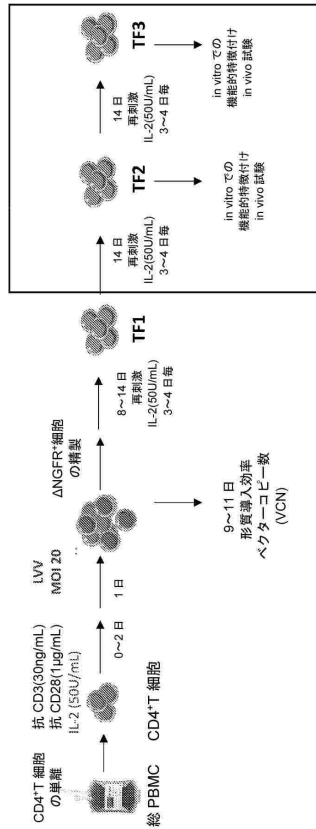
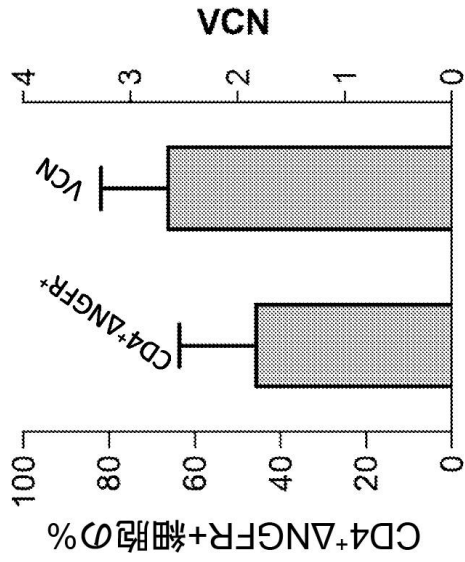


図 19

【図 20-A】



【図 20-B】

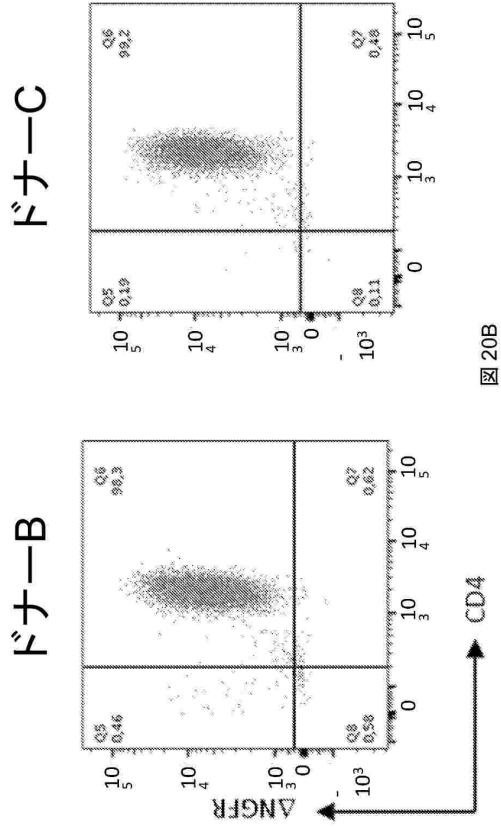


図 20A

図 20B

【図 21】

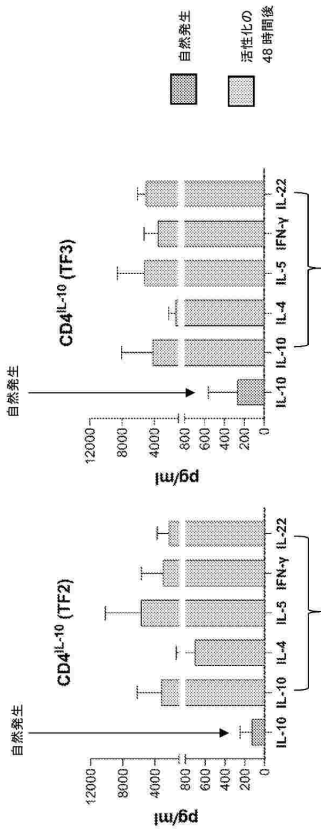


図 21

【図 22】

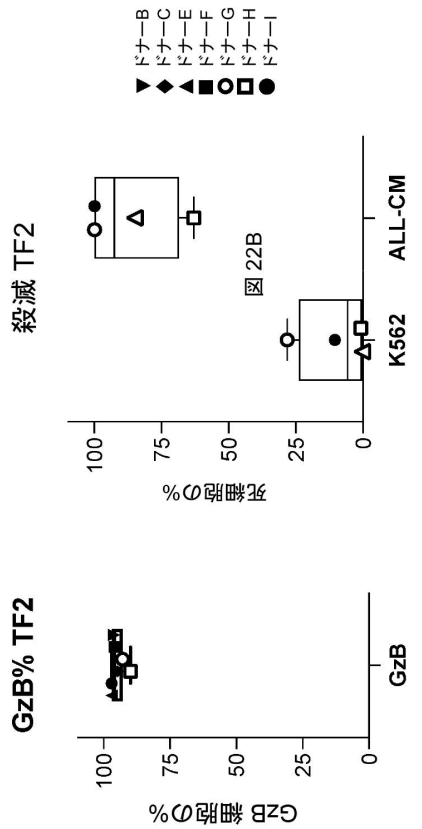


図 22B

図 22A

10

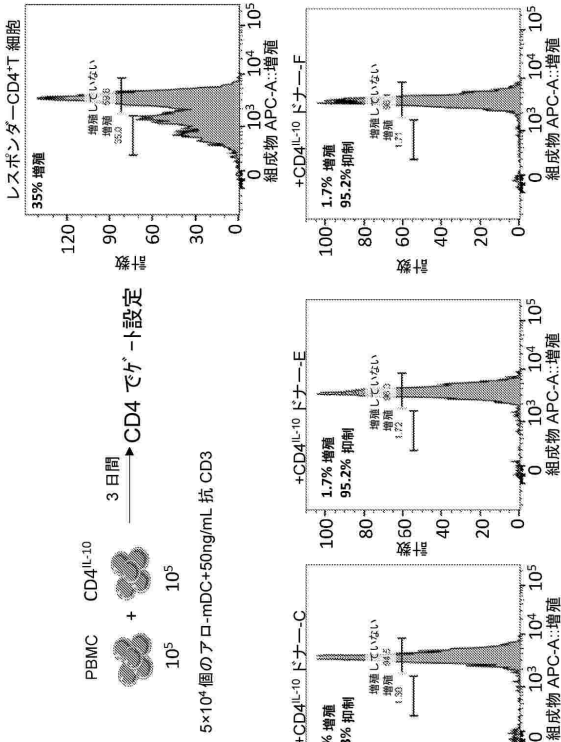
20

30

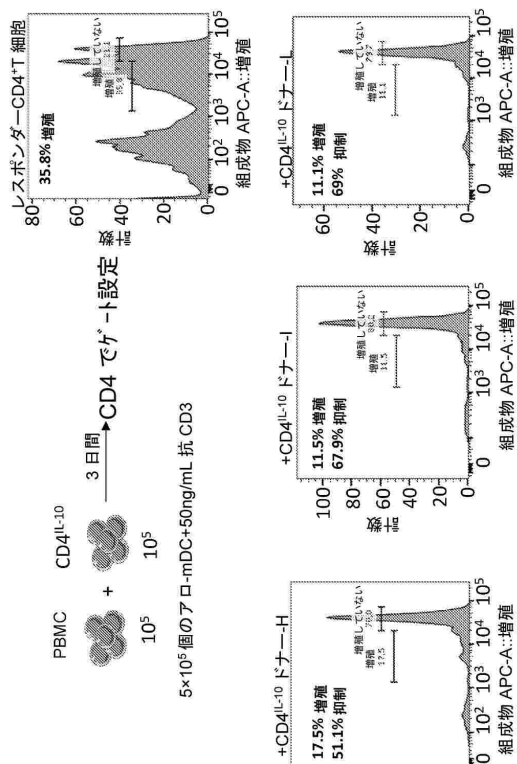
40

50

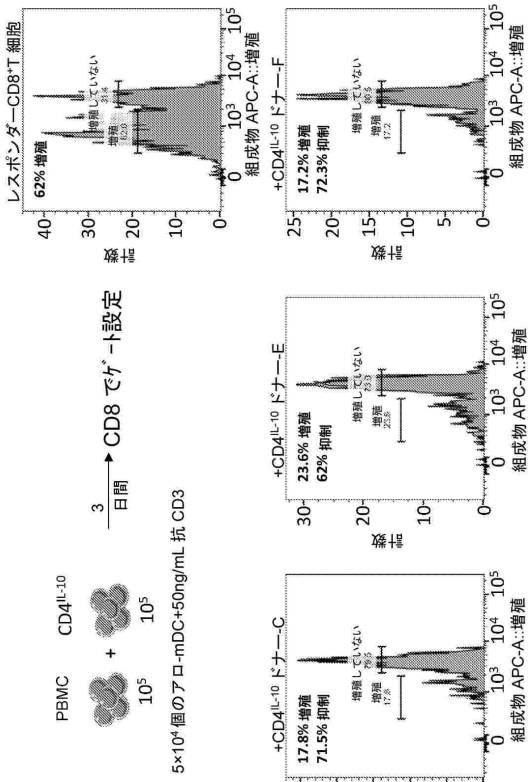
【図 23 - A】



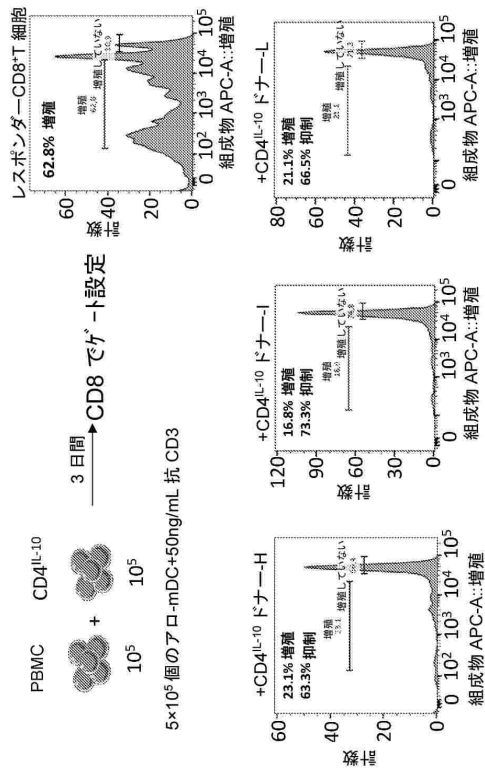
【図 23 - B】



【図 24 - A】



【図 24 - B】



10

20

30

40

50

【図 25】

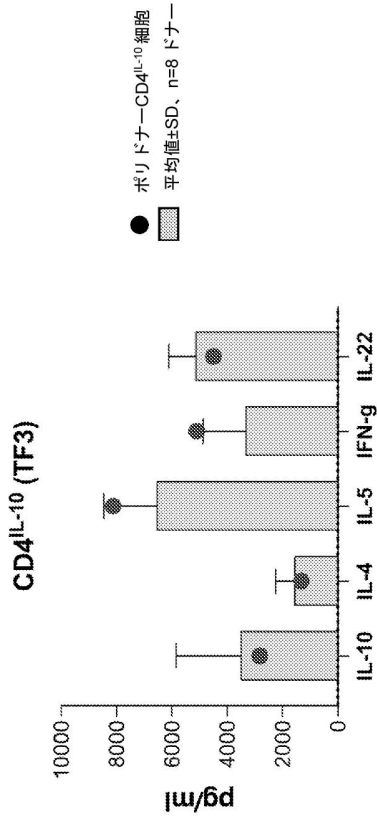


図 25

【図 26】

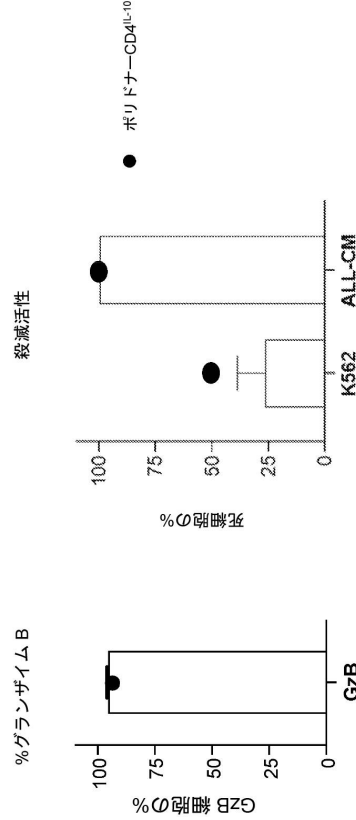


図 26B

図 26A

【図 27 - A】

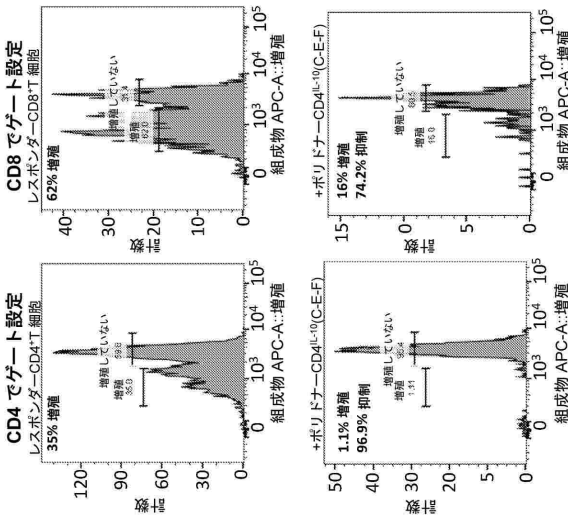


図 27A

【図 27 - B】

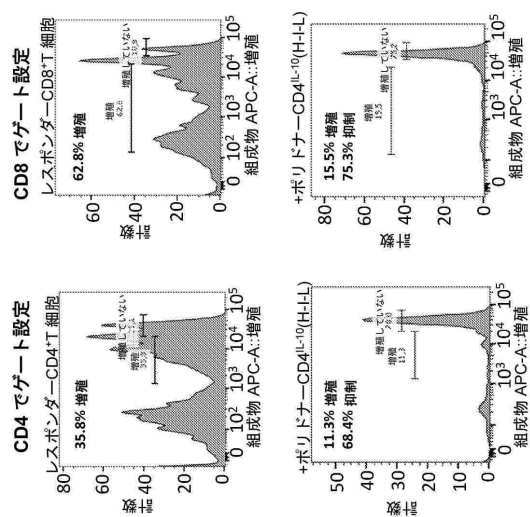
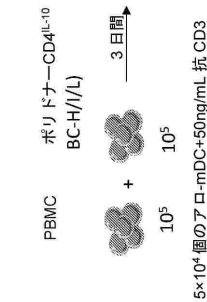
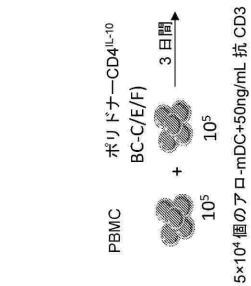


図 27B



10

20

30

40

50

【図 28】



図 28

【図 29】

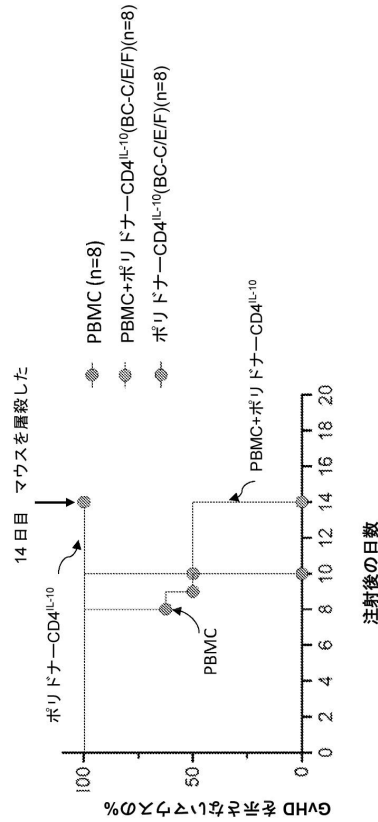


図 29

【図 30】

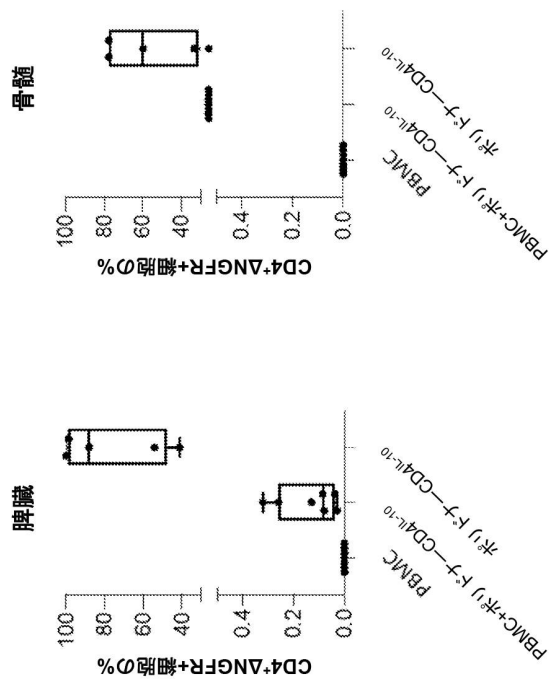


図 30

【図 31】

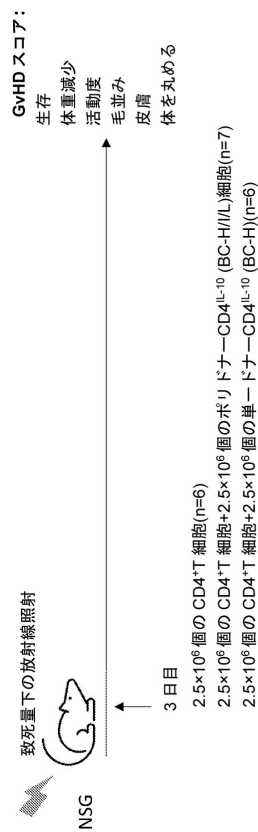


図 31

10

20

30

40

50

【図 3 2】

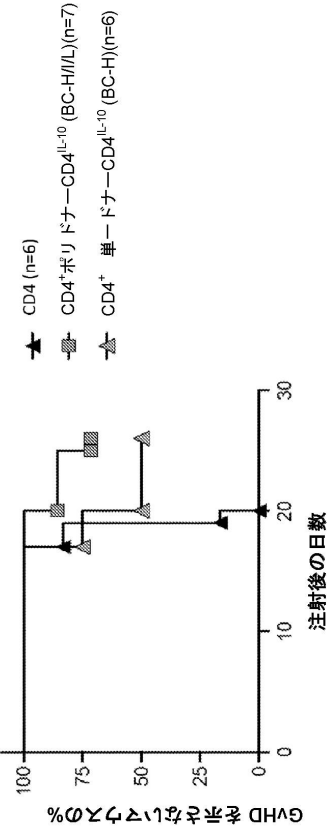


図 32

【図 3 3 - A】

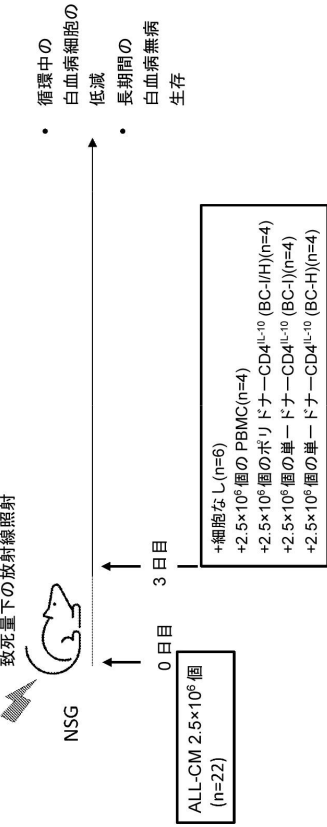


図 33A

【図 3 3 - B】

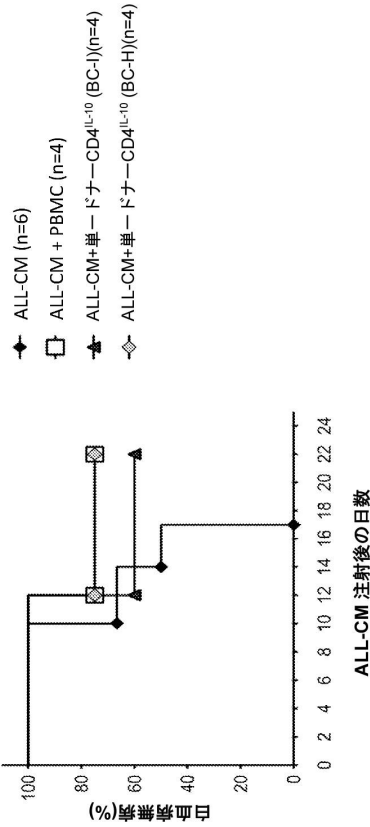


図 33B

【図 3 3 - C】

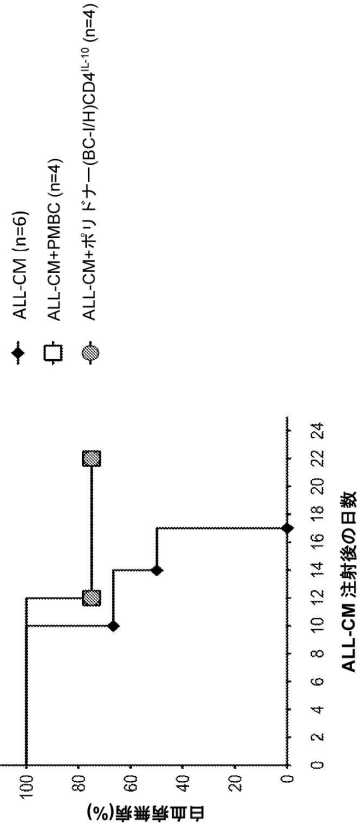


図 33C

【図 3 4 - A】

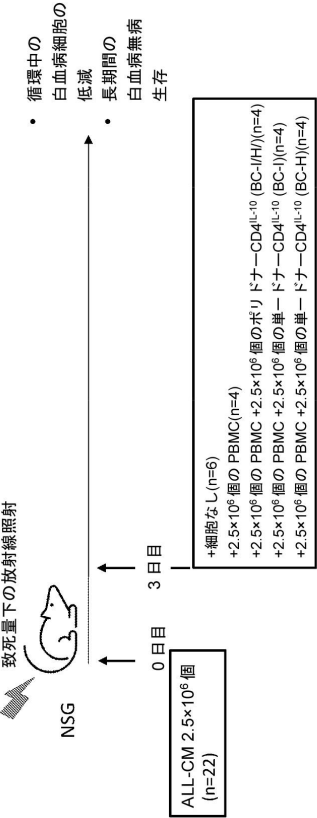


図 34A

【図 3 4 - B】

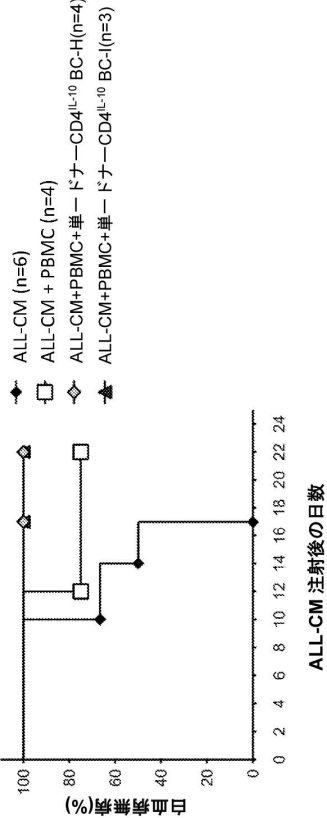


図 34B

【図 3 4 - C】

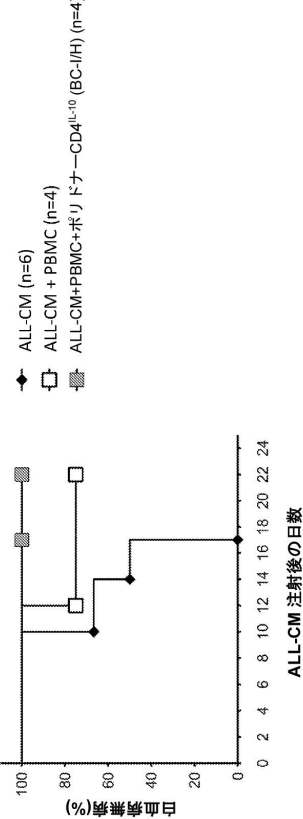


図 34C

【図 3 5 - A】

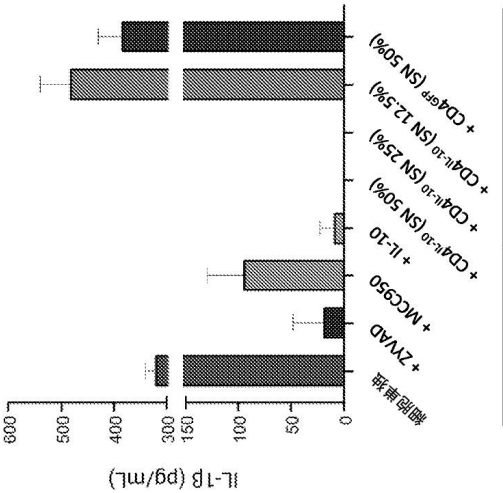


図 35A

10

20

30

40

50

【図 35-B】

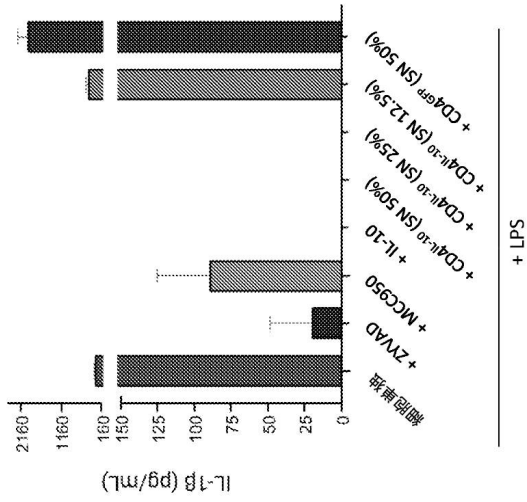
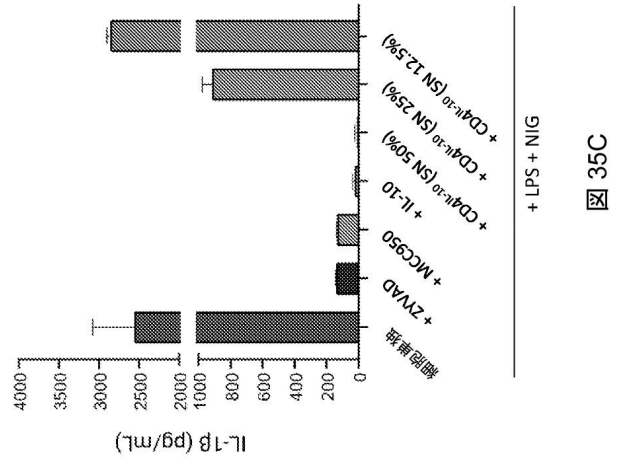


図 35B

【図 35-C】



【図 35-D】

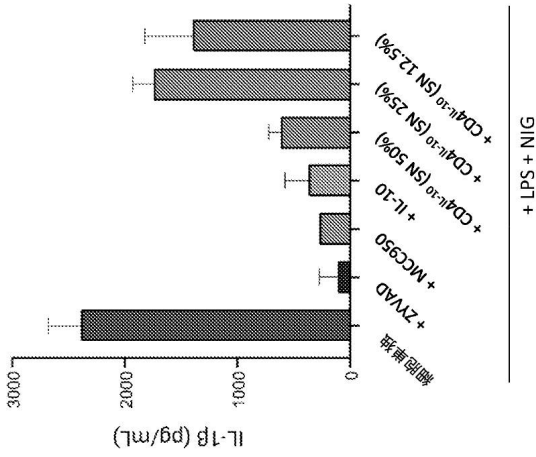
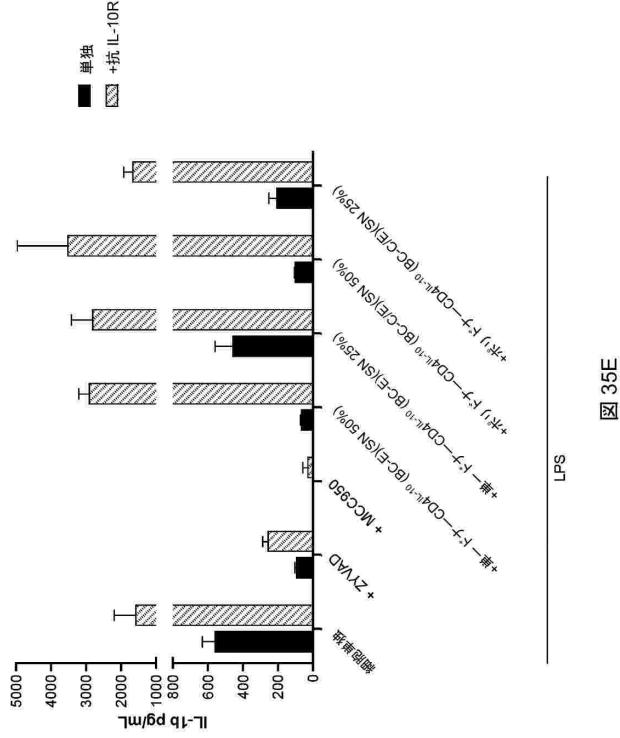


図 35D

【図 35-E】



10

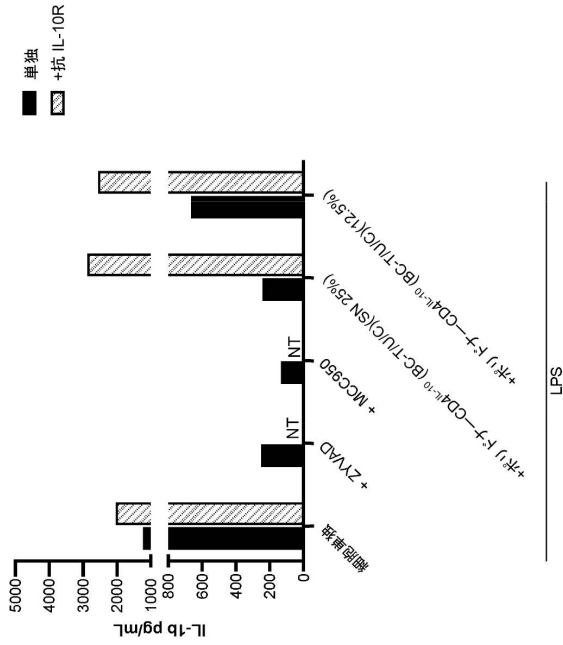
20

30

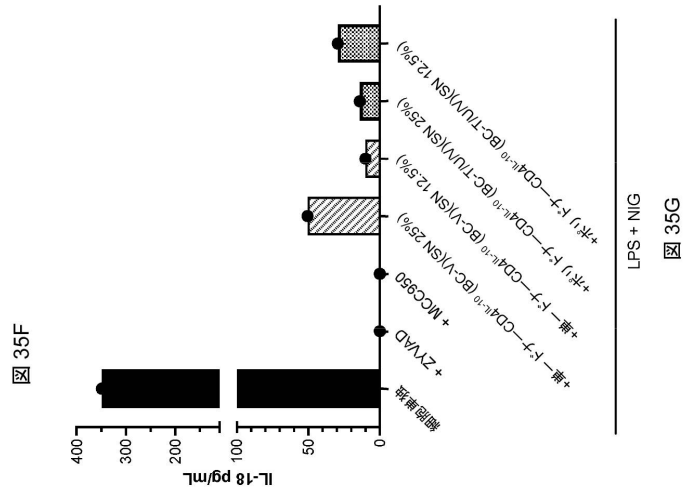
40

50

【図 35 - F】



【図 35 - G】



【図 36】

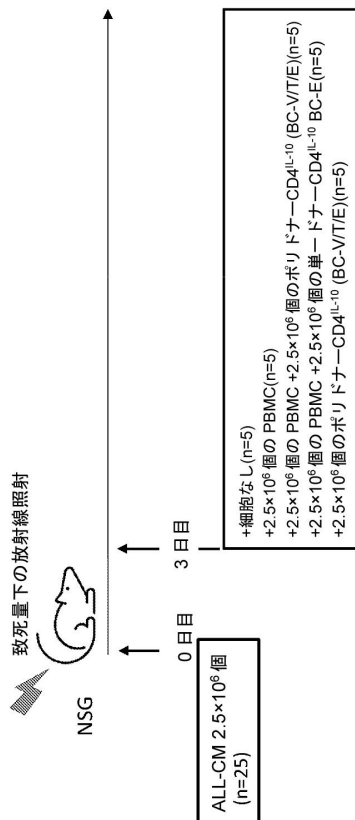


図 36

【図 37】

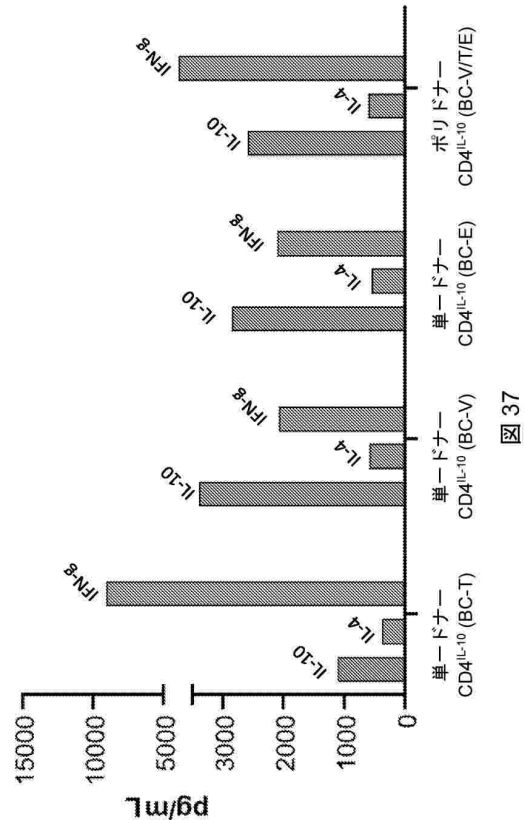


図 37

10

20

30

40

50

【図 38】

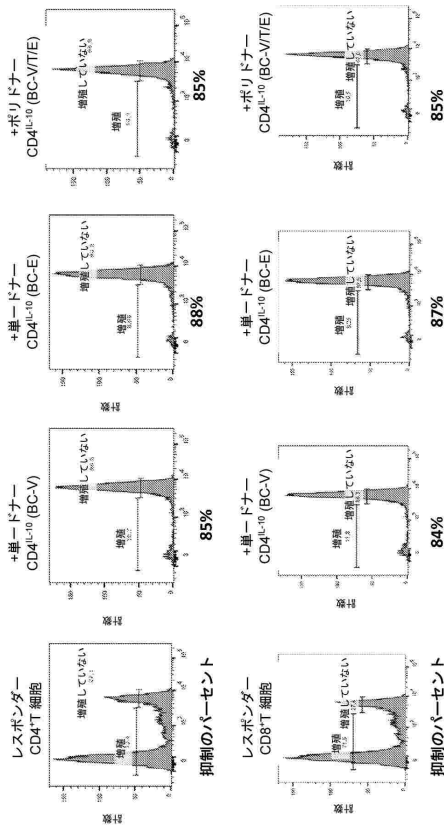


図 38

【図 39】

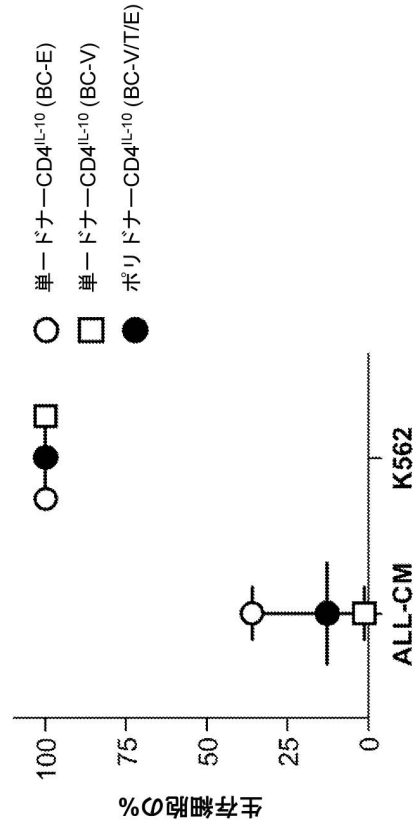


図 39

【図 40】

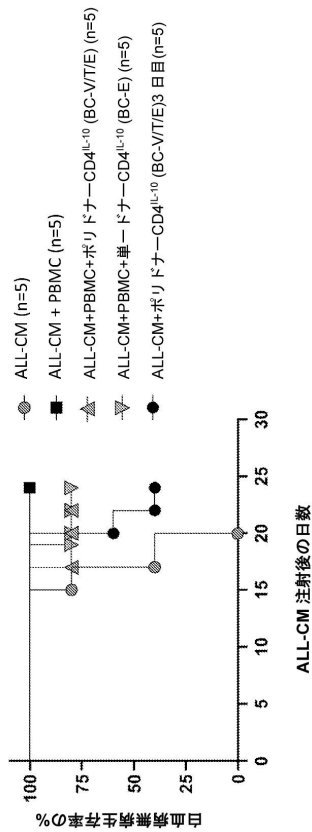


図 40

【図 41】

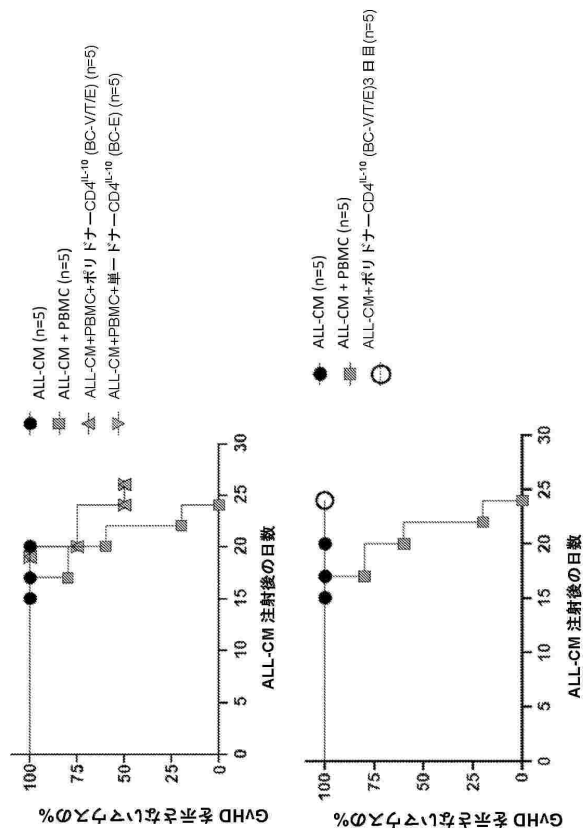


図 41

【配列表】

2025503546000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/082431

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	A61K48/00 A61K35/17 A61K39/00 C07K14/54 C07K14/725	
	C12N5/0783	
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MOHSENI YASMIN R. ET AL: "Chimeric antigen receptor-modified human regulatory T cells that constitutively express IL-10 maintain their phenotype and are potently suppressive", EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 51, no. 10, 8 October 2021 (2021-10-08), pages 2522-2530, XP055886483, Hoboken, USA ISSN: 0014-2980, DOI: 10.1002/eji.202048934 Retrieved from the Internet: URL:https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.202048934> abstract; p 2523, RHC, 2nd paragraph; p 2527, RHC, 2nd and 3rd paragraph; fig 1A and B; "Results" section ----- -/-	1-134
☒ 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 20 March 2023		Date of mailing of the international search report 24/05/2023
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Brero, Alessandro

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/082431

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/194306 A1 (GAVISH GALILEE BIO APPL LTD [IL]) 1 October 2020 (2020-10-01) abstract; claims 2, 30, 34; examples -----	1, 67, 91
X	WO 2019/245817 A1 (ARMO BIOSCIENCES INC [US]) 26 December 2019 (2019-12-26) p 9, 2nd paragraph; p 88, 3rd paragraph; paragraph bridging p 90 and 91; claims 1, 67 -----	1, 67, 91
A	SETOGUCHI K ET AL: "Antigen-specific T cells transduced with IL-10 ameliorate experimentally induced arthritis without impairing the systemic immune response to the antigen", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WILLIAMS & WILKINS CO, US, vol. 165, no. 10, 15 November 2000 (2000-11-15), pages 5980-5986, XP002196421, ISSN: 0022-1767 the whole document -----	1-134
A	OH JAE-WON ET AL: "CD4 T-helper cells engineered to produce IL-10 prevent allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation", JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, vol. 110, no. 3, 1 September 2002 (2002-09-01), pages 460-468, XP055852256, AMSTERDAM, NL ISSN: 0091-6749, DOI: 10.1067/mai.2002.127512 the whole document -----	1-134
A	WO 2016/146542 A1 (FOND TELETHON [IT]; OSPEDALE SAN RAFFAELE SRL [IT] ET AL.) 22 September 2016 (2016-09-22) cited in the application abstract; claims; p 1, 1st paragraph; examples -----	1-134
A	GRAZIA ANDOLFI ET AL: "Enforced IL-10 Expression Confers Type 1 Regulatory T Cell (Tr1) Phenotype and Function to Human CD4+ T Cells", MOLECULAR THERAPY, vol. 20, no. 9, 1 September 2012 (2012-09-01), pages 1778-1790, XP055592834, US ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1038/mt.2012.71 the whole document -----	1-134
	----- -/--	

1

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

page 2 of 3

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/082431

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VAN MONTFRANS CATHERINE ET AL: "Generation of regulatory gut-homing human T lymphocytes using ex vivo interleukin 10 gene transfer", GASTROENTEROLOGY, vol. 123, no. 6, 1 December 2002 (2002-12-01), pages 1877-1888, XP029482907, ISSN: 0016-5085, DOI: 10.1053/GAST.2002.37066 the whole document -----	1-134
A	WO 2019/002633 A1 (CELLECTIS [FR]) 3 January 2019 (2019-01-03) the whole document -----	1-134
E	WO 2023/025788 A1 (ECOLE POLYTECHNIQUE FED LAUSANNE EPFL [CH]) 2 March 2023 (2023-03-02) claims 1, 2; p 21, l 29 ff.; fig 1A -----	1, 67, 91

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/082431

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/082431**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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
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).

10

20

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:

see additional sheet

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 an 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.:
1-134

30

40

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 Application No. PCT/US2022/082431

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-134

A genetically modified CD4+ T cell (CD4IL-10/CAR) comprising: (a) a first exogenous polynucleotide segment encoding a chimeric antigen receptor (CAR); and (b) a second exogenous polynucleotide segment encoding interleukin-10 (IL-10); a population comprising said genetically modified CD4+ T cells and a method of making said genetically modified CD4+ T cell.

2. claims: 135-209

Methods of treatment using a genetically modified CD4+ T cell or a T cell population according to invention 1.

3. claims: 210-254

A polynucleotide construct comprising: (a) a first polynucleotide segment encoding a chimeric antigen receptor (CAR); and (b) a second polynucleotide segment encoding interleukin-10 (IL-10).

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2022/082431

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2020194306 A1	01-10-2020	AU 2020245329 A1	28-10-2021
		CA 3134878 A1	01-10-2020
		CN 114127297 A	01-03-2022
		EP 3947690 A1	09-02-2022
		IL 286644 A	31-10-2021
		JP 2022527162 A	31-05-2022
		KR 20210143856 A	29-11-2021
		US 2022186232 A1	16-06-2022
		WO 2020194306 A1	01-10-2020
WO 2019245817 A1	26-12-2019	CN 112533629 A	19-03-2021
		EP 3810189 A1	28-04-2021
		JP 7097465 B2	07-07-2022
		JP 2021527673 A	14-10-2021
		US 2021347842 A1	11-11-2021
		WO 2019245817 A1	26-12-2019
WO 2016146542 A1	22-09-2016	CA 2978655 A1	22-09-2016
		DK 3268013 T3	20-12-2021
		EP 3268013 A1	17-01-2018
		EP 3988106 A1	27-04-2022
		ES 2900632 T3	17-03-2022
		US 2018050092 A1	22-02-2018
		WO 2016146542 A1	22-09-2016
WO 2019002633 A1	03-01-2019	AU 2018292181 A1	23-01-2020
		CA 3067914 A1	03-01-2019
		EP 3645036 A1	06-05-2020
		JP 2020530277 A	22-10-2020
		US 2022233588 A1	28-07-2022
		WO 2019002633 A1	03-01-2019
WO 2023025788 A1	02-03-2023	NONE	

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	35/17	(2025.01)	A 6 1 K	35/17	
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	17/02	
A 6 1 P	21/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	21/04	
A 6 1 P	7/06	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	7/06	
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/08	
A 6 1 P	27/16	(2006.01)	A 6 1 P	11/06	
A 6 1 K	38/19	(2006.01)	A 6 1 P	27/16	
A 6 1 K	38/37	(2006.01)	A 6 1 K	38/19	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	38/37	
A 6 1 P	17/14	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 K	40/11	(2025.01)	A 6 1 K	39/395	T
C 0 7 K	14/705	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
C 0 7 K	16/28	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	E
C 1 2 N	15/867	(2006.01)	A 6 1 P	17/14	
C 0 7 K	14/55	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
			A 6 1 K	40/11	
			C 0 7 K	14/705	
			C 0 7 K	16/28	
			C 1 2 N	15/867	Z
			C 0 7 K	14/55	

,MC,ME,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,C
O,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,I
R,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX
,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,
SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

ロード 2 5 6 6

(72)発明者 ロンカロロ, マリア グラツィア

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州, ラ ホーヤ, ヒドゥン ヴァレー ロード 2 5 6 6

(72)発明者 バリアード, ザビエル

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州, ラ ホーヤ, ヒドゥン ヴァレー ロード 2 5 6 6

(72)発明者 デ フリーズ, デイビッド

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州, ラ ホーヤ, ヒドゥン ヴァレー ロード 2 5 6 6

F ターム (参考) 4B065 AA90X AA90Y AA94X AA94Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44

4C084 AA13 BA44 DA01 DC13 MA02 MA17 MA66 NA05 NA14 ZA021

ZA022 ZA331 ZA332 ZA361 ZA362 ZA661 ZA662 ZA681 ZA682 ZA751 ZA752

F ターム (参考)	ZA891 ZA892 ZA921 ZA922 ZA941 ZA942 ZA961 ZA962 ZB081 ZB082 ZB111 ZB112 ZB131 ZB132 ZB151 ZB152 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272 ZC351 ZC352 ZC751
4C085	AA13 AA14 CC22 CC23 EE03 GG01
4C087	AA01 AA02 AA03 BB65 MA02 MA17 MA66 NA05 NA14 ZA02 ZA33 ZA36 ZA66 ZA68 ZA75 ZA89 ZA92 ZA94 ZA96 ZB08 ZB11 ZB13 ZB15 ZB26 ZB27 ZC35 ZC75
4H045	AA10 AA30 BA41 CA40 DA02 DA04 DA75 DA76 EA20 FA72 FA74