(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-533109
(P2024-533109A)
(43)公表日　令和6年9月12日(2024.9.12)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10	ＺＮＡ	４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ	*5/0783(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/0783		４Ｃ０８４
Ｃ１２Ｎ	*5/0786(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/0786		４Ｃ０８５
Ｃ１２Ｎ	*5/0775(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/0775		４Ｃ０８７
Ｃ１２Ｎ	*5/0784(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/0784		４Ｈ０４５

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全46頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-513689(P2024-513689)
(86)(22)出願日　令和4年8月31日(2022.8.31)
(85)翻訳文提出日　令和6年4月30日(2024.4.30)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/042193
(87)国際公開番号　WO2023/034408
(87)国際公開日　令和5年3月9日(2023.3.9)
(31)優先権主張番号　63/238,927
(32)優先日　令和3年8月31日(2021.8.31)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/355,396
(32)優先日　令和4年6月24日(2022.6.24)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA
最終頁に続く

(71)出願人　502334319
ザ テキサス エーアンドエム ユニヴァーシティ システム
アメリカ合衆国・テキサス・７７８４３・カレッジ・ステーション・センチュリー・スクウェア・ドライブ・１７５・スイート・２００
(71)出願人　519096172
ザ リサーチ インスティテュート アットネーションワイド チルドレンズ ホスピタル
アメリカ合衆国 オハイオ州 ４３２０５ コロンバス チルドレンズ ドライヴ ７００
(74)代理人　110002077
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）Ｔ細胞療法プラットフォーム

(57)【要約】
本出願は、ＣＡＲ Ｔ細胞療法プラットフォームを使用して、がんを治療するための方法および組成物を提供する。がんのような疾患および状態、特に上昇したアデノシンまたは他の関連マーカーと関連した任意の疾患および状態、を治療するための、ＣＡＲ Ｔ細胞の方法および使用も提供される。
【選択図】図１

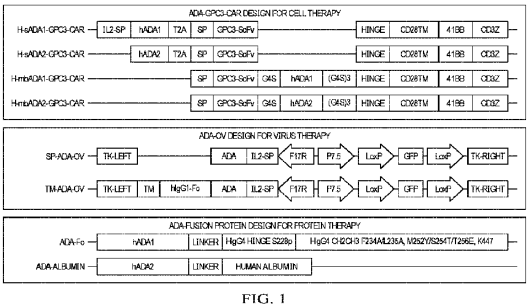


FIG. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
アデノシンデアミナーゼ（ＡＤＡ）をコードするヌクレオチド配列を含む、操作された細胞。
【請求項２】
細胞がＴ細胞、ナチュラルキラー細胞、ナチュラルキラーＴ細胞、樹状細胞、マクロファージ、間葉系幹細胞、およびこれらの誘導体である、請求項１に記載の細胞。
【請求項３】
細胞がキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含む、請求項１または２に記載の細胞。
【請求項４】
ＣＡＲが、（ＮからＣ末端の、以下の順序であるかまたはないかもしれない）抗原結合ドメイン、ＡＤＡ、細胞外連結ドメイン、膜貫通ドメイン、共刺激シグナル領域、およびシグナルドメインを含む、請求項１から３のいずれか一項に記載の細胞。
【請求項５】
ＡＤＡが、アデノシンデアミナーゼ活性を有するタンパク質である、請求項１から４のいずれか一項に記載の細胞。
【請求項６】
ＡＤＡがヒトＡＤＡまたはその誘導体である、請求項１から５のいずれか一項に記載の細胞。
【請求項７】
ＡＤＡがヒトＡＤＡ１である、請求項１から６のいずれか一項に記載の細胞。
【請求項８】
ＡＤＡ１が分泌タンパク質である、請求項７に記載の細胞。
【請求項９】
ＡＤＡ１が、ＡＤＡに作動可能に連結された最適化されたヒトＩＬ２シグナルペプチドと、リンカー配列およびヒトＣＤ３特異的リガンド、抗体、ＳｃＦｖ、またはそれらの誘導体とを含む、請求項８に記載の細胞。
【請求項１０】
ＣＡＲが、配列番号：１、３、５，７、９、１８、２０、２２、および２４からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも７０％、または少なくとも７５％、または少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９５％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項９に記載の細胞。
【請求項１１】
ＡＤＡ１が膜結合タンパク質である、請求項７に記載の細胞。
【請求項１２】
ＣＡＲが、配列番号１０、１２、１４、および１６からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも７０％、または少なくとも７５％、または少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９５％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１１に記載の細胞。
【請求項１３】
ＡＤＡがヒトＡＤＡ２である、請求項１から１２のいずれか一項に記載の細胞。
【請求項１４】
ＡＤＡ２が分泌タンパク質である、請求項７に記載の細胞。
【請求項１５】
ＡＤＡ２が、ＡＤＡ２に作動可能に連結された天然または人工のシグナルペプチドと、リンカー配列およびヒトＣＤ３特異的リガンド、抗体、ＳｃＦｖ、またはそれらの誘導体とを含む、請求項１４に記載の細胞。
【請求項１６】
ＣＡＲが、配列番号２、４、６、８、９、１９、２１、２３および２５からなる群から

選択されるアミノ酸配列と少なくとも７０％、または少なくとも７５％、または少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９５％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１５に記載の細胞。
【請求項１７】
ＡＤＡ２が膜結合タンパク質である、請求項７に記載の細胞。
【請求項１８】
ＣＡＲが、配列番号１１、１３、１５、および１７からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも７０％、または少なくとも７５％、または少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９５％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１７に記載の細胞。
【請求項１９】
ヒトＣＤ２６またはその誘導体をさらに含む、請求項１から１８のいずれか一項に記載の細胞。
【請求項２０】
請求項１から１９のいずれか一項に記載の操作された細胞および薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。
【請求項２１】
治療の方法であって、請求項１から２０のいずれか一項に記載の操作された細胞を、がんの治療のための有効量で患者に投与することを含む、方法。
【請求項２２】
ＡＤＡをコードするヌクレオチド配列を含む組換え腫瘍溶解性ウイルスであって、該ＡＤＡをコードするヌクレオチド配列が作動可能にプロモーターに連結されている、組換え腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項２３】
腫瘍溶解性ウイルスが、ワクシニアウイルス、レオウイルス、センカバレーウイルス（ＳＶＶ）、水疱性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）、ニューカッスル病ウイルス（ＮＤＶ）、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、モルビリウイルスウイルス、レトロウイルス、インフルエンザウイルス、シンビスウイルス、ポックスウイルス、麻しんウイルス、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、レンチウイルス、アデノウイルス、コクサッキーウイルス、およびそれらの誘導体からなる群から選択される、請求項２２に記載の腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項２４】
腫瘍溶解性ウイルスがポックスウイルスである、請求項２３に記載の腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項２５】
ポックスウイルスがワクシニアウイルスである、請求項２４に記載の腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項２６】
ワクシニアウイルスが、Ｄｒｙｖａｘ、Ｌｉｓｔｅｒ、Ｍ６３、ＬＩＶＰ、ＴｉａｎＴａｎ、Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｖａｃｃｉｎｉａ ａｎｋａｒａ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ Ｃｉｔｙ Ｂｏａｒｄ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ（ＮＹＣＢＯＨ）、Ｄａｉｒｅｎ、Ｉｋｅｄａ、ＬＣ１６Ｍ８、Ｔａｓｈｋｅｎｔ、ＩＨＤ－Ｊ、Ｂｒｉｇｈｔｏｎ、Ｄａｉｒｅｎ Ｉ、Ｃｏｎｎａｕｇｈｔ、Ｗｙｅｔｈ、Ｃｏｐｅｎｈａｇｅｎ、Ｗｅｓｔｅｒｎ Ｒｅｓｅｒｖｅ、Ｅｌｓｔｒｅｅ、ＣＬ、Ｌｅｄｅｒｌｅ－Ｃｈｏｒｉｏａｌｌａｎｔｏｉｃ、ＡＳ、およびそれらの誘導体からなる群から選択される株のものである、請求項２５に記載の腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項２７】
ウイルスが、ワクシニアウイルスＷｅｓｔｅｒｎ Ｒｅｓｅｒｖｅである、請求項２５に記載の組換え腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項２８】
腫瘍溶解性ウイルスが、Ｔａｌｉｍｏｇｅｎｅ Ｌａｈｅｒｐａｒｅｐｖｅｃである、

請求項２２から２５のいずれか一項に記載の組換え腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項２９】
ウイルスが、レオウイルスである、請求項２２から２５のいずれか一項に記載の組換え腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項３０】
ウイルスが、Ｅ１およびＥ２欠失を有するアデノウイルスである、請求項２２から２５のいずれか一項に記載の組換え腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項３１】
ＡＤＡが、アデノシンデアミナーゼ活性を有するタンパク質である、請求項２２から３０のいずれか一項に記載の腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項３２】
ＡＤＡがヒトＡＤＡまたはその誘導体である、請求項２２から３０のいずれか一項に記載の腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項３３】
ＡＤＡがＡＤＡ１である、請求項２２から３０のいずれか一項に記載の腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項３４】
ＡＤＡ１が分泌タンパク質である、請求項３３に記載の腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項３５】
シグナルペプチドが、最適化されたヒトＩＬ２シグナルペプチド、および、リンカー配列およびヒトＣＤ３特異的リガンド、抗体、ｓｃＦｖ、またはその誘導体である、請求項３４に記載の腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項３６】
腫瘍溶解性ウイルスが、配列番号５、７、９、２２、および２４からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも７０％、または少なくとも７５％、または少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９５％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項３５に記載の腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項３７】
ＡＤＡ１が膜結合タンパク質である、請求項３２に記載の腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項３８】
ＡＤＡ１が、ヒトＩｇＧ１ヒンジ、ＣＨ２ＣＨ３ドメイン、および膜貫通ドメインと連結している、請求項３６に記載の腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項３９】
シグナルペプチドが、最適化されたヒトＩＬ２シグナルペプチドである、請求項３６に記載の腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項４０】
腫瘍溶解性ウイルスが、配列番号１４および１６からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも７０％、または少なくとも７５％、または少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９５％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項３６に記載の腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項４１】
ＡＤＡがＡＤＡ２である、請求項２２から３１のいずれか一項に記載の腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項４２】
ＡＤＡ２が、分泌タンパク質、および、リンカー配列およびヒトＣＤ３特異的リガンド、抗体、ｓｃＦｖ、またはその誘導体である、請求項４０に記載の腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項４３】
ＡＤＡが、ＡＤＡに作動可能に連結された天然または人工のシグナルペプチドを含む、請求項４０に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項４４】
ＡＤＡ２が膜結合タンパク質である、請求項２２から３１のいずれか一項に記載の腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項４５】
ＡＤＡが、ヒトＩｇＧ１－Ｆｃドメイン、および膜貫通ドメインと連結している、請求項４３に記載の腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項４６】
ＣＤ２６をさらに含む、請求項１から４５のいずれか一項に記載の腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項４７】
請求項２１から４４のいずれか一項に記載の組換え腫瘍溶解性ウイルスおよび薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。
【請求項４８】
治療方法であって、請求項４５に記載の組換え腫瘍溶解性ウイルスを、がんの治療のための有効量で患者に投与することを含む、方法。
【請求項４９】
ＡＤＡをコードするアミノ酸配列を含む、組換えタンパク質。
【請求項５０】
ＡＤＡがアデノシンデアミナーゼ活性を有するタンパク質である、請求項４７に記載の組換えタンパク質。
【請求項５１】
ＡＤＡがヒトＡＤＡまたはその誘導体である、請求項４７または４８に記載の組換えタンパク質。
【請求項５２】
ＡＤＡが、ＡＤＡ１、および、リンカー配列およびヒトＣＤ３特異的リガンド、抗体、ｓｃＦｖまたはその誘導体である、請求項４７から４９のいずれか一項に記載の組換えタンパク質。
【請求項５３】
ＡＤＡが、連結ドメイン、ヒトＩｇＧ４ヒンジ、およびヒトＩｇＧ４　ＣＨ２ＣＨ３ドメインまたはそれらの誘導体と連結されている、請求項５０に記載の組換えタンパク質。
【請求項５４】
ヒトＩｇＧ４ヒンジがＳ２２８Ｐの変異を有する、請求項５１に記載の組換えタンパク質。
【請求項５５】
ヒトＩｇＧ４　ＣＨ２Ｃｈ３ドメインが、Ｆ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、Ｍ２５２Ｙ、Ｓ２５４Ｔ、Ｔ２５６Ｅ、Ｋ４４７欠失の変異を有する、請求項５１に記載の組換えタンパク質。
【請求項５６】
タンパク質が、配列番号７からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも７０％、または少なくとも７５％、または少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９５％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項５０から５３のいずれか一項に記載の組換えタンパク質。
【請求項５７】
ＡＤＡが、ＡＤＡ２、および、リンカー配列およびヒトＣＤ３特異的リガンド、抗体、ｓｃＦｖまたはその誘導体である、請求項４７に記載の組換えタンパク質。
【請求項５８】
ＡＤＡが連結ドメインおよびヒトアルブミンに連結されている、請求項５５に記載の組換えタンパク質。
【請求項５９】
タンパク質が、配列番号８からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも７０％

、または少なくとも７５％、または少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９５％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項５６に記載の組換えタンパク質。
【請求項６０】
請求項４７から５７のいずれか一項に記載の組換えタンパク質および薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。
【請求項６１】
請求項５８に記載の組換えタンパク質を、がんの治療のための有効量で患者に投与する方法。
【請求項６２】
Ｔ細胞免疫調節の方法であって、
アデノシンデアミナーゼ（ＡＤＡ）および膜結合ＣＤ２６をコードするヌクレオチド配列を含む操作された細胞組成物を、対象に投与すること；
アデノシン媒介性免疫抑制から、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）Ｔ細胞を解放すること；
エネルギー源を供給し、対象の中でＴ細胞の増殖および機能をサポートすること；
対象の中でＴ細胞の移動性と活性化を促進すること；
を含む、方法。
【請求項６３】
ＣＡＲ　Ｔ細胞のためのエネルギー源としてイノシンを供給している間、ＣＡＲ　Ｔ細胞をアデノシン駆動性免疫抑制から解放するために、アデノシンをイノシンに変換することをさらに含む、請求項６２に記載の方法。
【請求項６４】
有効な共刺激シグナルを媒介し、そのことにより、Ｔ細胞の活性化をそれの酵素活性と独立して促進することをさらに含む、請求項６２に記載の方法。
【請求項６５】
ＣＡＲ分子によって、Ｔ細胞を、腫瘍Ａｇ陽性腫瘍細胞を殺傷するように標的化および方向付けすることをさらに含む、請求項６２に記載の方法。
【請求項６６】
腫瘍微小環境内でアデノシンをイノシンに変換することによって、ＣＡＲ　Ｔ細胞のための炭素源としてイノシンを供給することにより、ＡＤＡ／ＣＤ２６複合体がアデノシン媒介性免疫抑制を解除するように、ＣＤ２６シグナルを介してＡＤＡによりＣＡＲ　Ｔ細胞が共刺激される、請求項６２に記載の方法。
【請求項６７】
膜結合ＣＤ２６がＣＡＲ　Ｔ細胞の輸送およびＡＤＡの受容体としての機能を媒介し、可溶性ＡＤＡタンパク質を捕らえる、請求項６６に記載の方法。
【請求項６８】
操作された細胞組成物が、Ｔ細胞、ナチュラルキラー細胞、ナチュラルキラーＴ細胞、樹状細胞、マクロファージ、間葉系幹細胞、またはそれらの誘導体を含む、請求項６２に記載の方法。
【請求項６９】
ＣＡＲが、抗原結合ドメイン、ＡＤＡ、細胞外連結ドメイン、膜貫通ドメイン、共刺激シグナル領域、およびシグナルドメインを含む、請求項６２に記載の方法。
【請求項７０】
ＡＤＡがアデノシンデアミナーゼ活性を有するタンパク質である、請求項６２に記載の方法。
【請求項７１】
ＡＤＡがヒトＡＤＡまたはその誘導体である、請求項６２に記載の方法。
【請求項７２】
ＡＤＡがヒトＡＤＡ１である、請求項６２に記載の方法。
【請求項７３】

ＡＤＡ１が細胞質タンパク質でありＴ細胞ストレス状態において分泌されうる、請求項７２に記載の方法。
【請求項７４】
ＡＤＡ１が、ＡＤＡに作動可能に連結された最適化されたヒトＩＬ２シグナルペプチドと、リンカー配列およびヒトＣＤ３特異的リガンド、抗体、ＳｃＦｖ、またはそれらの誘導体とを含む、請求項７２に記載の方法。
【請求項７５】
ＡＤＡ１が膜結合タンパク質である、請求項７２に記載の方法。
【請求項７６】
ＡＤＡが、ヒトＡＤＡ２である、請求項６２に記載の方法。
【請求項７７】
ＡＤＡ２が分泌タンパク質である、請求項７６に記載の方法。
【請求項７８】
ＡＤＡ２が、ＡＤＡ２に作動可能に連結された天然または人工のシグナルペプチドと、リンカー配列およびヒトＣＤ３特異的リガンド、抗体、ＳｃＦｖ、またはそれらの誘導体とを含む、請求項７６に記載の方法。
【請求項７９】
ＡＤＡ２が膜結合タンパク質である、請求項７６に記載の方法。
【請求項８０】
ＣＡＲが、配列番号２、４、６、８、９、１９、２１、２３および２５からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも７０％、または少なくとも７５％、または少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９５％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項６２に記載の方法。
【請求項８１】
ＣＡＲが、配列番号１、３、５、７、９、１８、２０、２２および２４をからなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも７０％、または少なくとも７５％、または少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９５％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項６２に記載の方法。
【請求項８２】
ＣＡＲが、配列番号１０、１２、１４、および１６からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも７０％、または少なくとも７５％、または少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９５％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項６２に記載の方法。
【請求項８３】
ＣＡＲが、配列番号１１、１３、１５、および１７からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも７０％、または少なくとも７５％、または少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９５％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項６２に記載の方法。
【請求項８４】
操作された細胞組成物が、ヒトＣＤ２６またはその誘導体をさらに含む、請求項６２に記載の方法。
【請求項８５】
操作された細胞組成物が、配列番号５、７、９、２２、および２４からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも７０％、または少なくとも７５％、または少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９５％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む腫瘍溶解性ウイルスを含む、請求項６２に記載の方法。
【請求項８６】
操作された細胞組成物が、配列番号１４および１６からなる群から選択されるアミノ酸

配列と少なくとも７０％、または少なくとも７５％、または少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９５％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む腫瘍溶解性ウイルスを含む、請求項６２に記載の方法。

【請求項８７】

操作された細胞組成物が、配列番号７からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも７０％、または少なくとも７５％、または少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９５％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む組換えタンパク質を含む、請求項６２に記載の方法。

【請求項８８】

操作された細胞組成物が、配列番号８からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも７０％、または少なくとも７５％、または少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９５％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む組換えタンパク質を含む、請求項６２に記載の方法。

【請求項８９】

ＡＤＡが、連結ドメイン、ヒトＩｇＧ４ヒンジ、およびヒトＩｇＧ４　ＣＨ２ＣＨ３ドメインまたはそれらの誘導体と連結されている、請求項６２に記載の方法。

【請求項９０】

ヒトＩｇＧ４ヒンジがＳ２２８Ｐの変異を有する、請求項８９に記載の方法。

【請求項９１】

ヒトＩｇＧ４　ＣＨ２Ｃｈ３ドメインが、Ｆ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、Ｍ２５２Ｙ、Ｓ２５４Ｔ、Ｔ２５６Ｅ、またはＫ４４７欠失の変異を有する、請求項８９に記載の方法。

【請求項９２】

操作された細胞組成物が、薬学的に許容される担体を含む医薬組成物の形態である、請求項６２に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連する出願の相互参照

この出願は、２０２１年８月３１日に出願された米国仮特許出願番号６３／２３８９２７および２０２２年６月２４日に出願された米国仮特許出願番号６３／３５５３９６からの優先権を主張し、その全体の開示を参照により援用する。

【０００２】

ＣＡＲ　Ｔ細胞療法は、造血器腫瘍の患者の治療法に刺激的なブレイクスルーを示し、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、および多発性骨髄腫（ＭＭ）のためのＣＡＲ　Ｔ細胞療法のＦＤＡ承認につながった。しかしながら、これまでのところ臨床研究において、固形腫瘍におけるＣＡＲ　Ｔ細胞療法の抗腫瘍活性は、控えめであった。現在のＣＡＲ　Ｔ細胞療法の固形腫瘍への最適ではない効果は、ｉ）免疫抑制的な固形腫瘍微小環境、ｉｉ）細胞注入後のｉｎ　ｖｉｖｏの最適ではないＴ細胞持続性、およびｉｉｉ）ｉｎ　ｖｉｖｏでの最適ではないＣＡＲ　Ｔ細胞の輸送、による可能性が高い。したがって、腫瘍、特に固形腫瘍に対する向上した細胞傷害性を示す新規ＣＡＲ－Ｔ細胞療法技術プラットフォームを開発することが望まれている。

【背景技術】

【０００３】

重要なしかしほとんど見落とされている、腫瘍、特に固形腫瘍に対するＣＡＲ　Ｔ細胞療法の問題は、養分が乏しい腫瘍微小環境（ＴＭＥ）における腫瘍細胞とＴ細胞の間の養分競合である。ＴＭＥは代謝的負荷の劇的な例を表しており、ここでがん細胞の高い代謝的要求は、養分（つまりグルコース）についての競争を通して、かつ免疫抑制的な代謝物（例えばアデノシン）を産生することによって、ＣＡＲ　Ｔ細胞の機能を制限する可能性がある。したがって、ＣＡＲ　Ｔ細胞療法が効果的であるためには、信頼性のある栄養源

が必要である。

【０００４】

イノシンは食品の一般的な成分であり、かつ研究によりイノシンは神経保護、心臓保護および免疫調節の効果が示されている。イノシンはアデノシン受容体と弱い結合親和性を有するが、初期の研究が、イノシンは、アデノシン受容体、主にその活性化が炎症誘発性サイトカインの減少に寄与し得るＡ２ａおよびＡ３受容体、の活性化に関連した抗炎症効果、ならびに、エンドトキシン誘導性および２，４，６－トリニトロベンゼンスルホン酸（ＴＮＢＳ）誘導性の炎症からの組織保護効果を生むこと示した。しかしながら、イノシンアナログが炎症誘発性になり得、かつマウスでＡ２ＡＲシグナルがＴｈ１および抗腫瘍免疫を維持し得るという、反対の知見を文献の一部が示していた。イノシンが、Ｔ細胞特異的Ａ２ＡＲシグナルを介して文脈依存的な方法でＴｈ１細胞活性化を促進するように作用する、重要な細菌による代謝物であることを、最近の研究が示した。具体的には、ＩＦＮ－ガンマ存在下において、イノシンは未変性Ｔ細胞のＴｈ１分化を強くブーストし、一方ＩＦＮ－ガンマ非存在下では、イノシンはＴｈ分化を阻害した。養子Ｔ細胞の移植および免疫チェックポイント阻害剤が、抑制的なＴＭＥを支持的なＴＭＥに変える可能性を示したため、イノシンがＴ細胞療法または免疫チェックポイント阻害剤の抗腫瘍効果を増幅しうることは、合理的である。加えて、独立した研究が、イノシンは腫瘍免疫原性を向上させることにより、免疫細胞の細胞溶解性効果に対し腫瘍細胞を強く感作させうることが示された。

【０００５】

アデノシンデアミナーゼ（ＡＤＡ）は抗腫瘍活性を有することが知られている。いくつかのグループが、ＡＤＡをがん治療法として開発した。例えば、ＰＥＧ－ＡＤＡ２（アデノシンデアミナーゼ２）が開発され、マウスモデルにおいて抗腫瘍活性を示した。ＡＤＡの半減期は数時間のみの長さであり、かつＰＥＧのコンジュゲート化はタンパク質の半減期を著しく増加させることはなかった。したがって、ＡＤＡが効果的ながん治療法として役立つためには、半減期が改善されなければならない。

【０００６】

ＡＤＡは、不可逆的にアデノシンをイノシンに変換することにより、免疫抑制的代謝物であるアデノシンのレベルを減少させる。ＡＤＡは、食物からのアデノシンの分解および組織の核酸の代謝回転に必要な、プリン代謝の重要酵素である。ＡＤＡ１およびＡＤＡ２がヒトの２つのＡＤＡアイソエンザイムである。ＡＤＡ１は主に、ほとんどの体細胞、特にリンパ球の細胞内活性に関与する。ヒトのＡＤＡ１欠損は、重症複合免疫不全症（ＳＣＩＤ）を誘導する。ＡＤＡ２は、ヒト血漿に存在する主な形態である。ＡＤＡ１およびＡＤＡ２は、それらのＡＤＡ活性とは独立して、免疫応答制御において異なる役割を果たしているのかもしれない。研究により、ＡＤＡ１は、ＣＤ２６を発現するＴｅｆｆおよびＣＴＬに結合することにより、Ｔ細胞媒介性免疫において共刺激効果を有することが示された。対照的に、ＡＤＡ２は、ＣＤ２６を発現しない、好中球、ＣＤ１６＋単球、ＮＫ細胞、Ｂ細胞およびＣＤ３９＋Ｔｒｅｇに結合する。最近の研究により、マウスにおいてＰＥＧ化されたＡＤＡ２が、酵素活性依存的な方法でアデノシンを標的とし、かつ免疫応答を調節することにより、腫瘍の増殖を阻害したことが示された。加えて、ＡＤＡ１はＡＤＡ２より１００倍高いアデノシンへの親和性を有する。

【０００７】

アデノシンシグナルは、腫瘍の重要な免疫代謝チェックポイントとして現れた。ＡＴＰまたはＮＡＤ＋はＴＭＥ内で蓄積し、ＣＤ３９、ＣＤ７３、ＣＤ３８、ＣＤ２０３ａ、ＡＬＰおよびＰＡＰ５３－６１を含むエクトヌクレオチダーゼによってアデノシンを生成しうる。研究により、Ｔ細胞、ＤＣ、ＮＫ細胞、マクロファージおよび好中球を含む複数の潜在的防御免疫細胞の機能を抑制し、その一方でＭＤＳＣやＴｒｅｇのような免疫抑制的な細胞の活性を向上させることにより、アデノシンは腫瘍細胞を免疫監視から逃れさせうることが示された。加えて、アデノシンはがん関連線維芽細胞を活性化し、新しい血管の形成を誘発する。

【０００８】
ＣＤ７３およびＣＤ３８を標的としそれの産生を制限する、あるいはＡ２ＡＲおよびＡ２ＢＲを標的とし免疫細胞へのそれの結合を制限する、低分子やｍＡｂｓなどのいくつかの薬剤が開発され、かつ前臨床研究では、単体で、ならびに免疫チェックポイント阻害剤および養子細胞移植を含む他の免疫療法との組み合わせで、それらの抗腫瘍活性が示された。しかしながら、早期臨床研究はそれらの抗腫瘍効果が最適ではないことを示す。これは、複数のエクトヌクレオチダーゼが細胞外のアデノシンの産生に寄与しており、かつアデノシンはＡ２ＡＲ、Ａ２ＢＲおよびＡ３Ｒのような複数の受容体に結合して抗腫瘍免疫を抑制するという事実により説明可能である。
【０００９】
いくつかの悪性腫瘍の治癒率は著しく改善したが、進行性固形腫瘍を有する患者についての結果は最近何十年も変わらず厳しいままで、新しい治療法についての必要性を強調している。腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは、それらの安全性および、感染し、複製し、腫瘍細胞を消化する潜在力により、固形腫瘍の現在の治療選択肢に加えることが魅力的である。臨床研究では、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの腫瘍内または静脈内への注射は安全であり、腫瘍溶解を誘導し得ることが示されたが、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの抗腫瘍効力は最適ではなく、ほとんどの腫瘍が発生した。これは、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの腫瘍および免疫抑制的な腫瘍環境の中での抗腫瘍Ｔ細胞応答の制限された活性化によることが最も可能性が高い。したがって、１）免疫抑制的な腫瘍微小環境を覆す、および２）Ｔ細胞機能を効果的にサポートする、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスが、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの現在の限界を克服するだろう。
【００１０】
疾患の初期および後期ステージ双方のがん患者の中で、Ｔ細胞が腫瘍の増殖および生存をコントロールできるという証拠が増えつつある。例えば、Ｔ細胞の養子移植はホジキンリンパ腫、鼻咽腔癌、神経芽腫および悪性黒色腫を含む散在性の腫瘍を効果的に治療すると示されてきた。しかしながら、腫瘍特異的Ｔ細胞応答は、がん患者の中に組み込みかつ維持することが難しく、かつ免疫編集のあいだに選択された腫瘍細胞の多数の免疫回避機構によって制限される。したがって、腫瘍の免疫回避機構を克服する能力を有するがん治療法にＴ細胞を利用する、代替戦略の開発が望ましいであろう。
【００１１】
本出願は現在のがん治療法に存在する不利益に対処する。操作された免疫細胞（例えば、ＣＡＲ－Ｔ細胞、ＣＡＲ－ＮＫ細胞、ＣＡＲ－ＮＫＴ細胞、マクロファージ）またはアデノシンデアミナーゼをコードする組換え腫瘍溶解性ウイルスを用いてがんを治療するための方法および組成物が提供される。操作された免疫細胞または組換え腫瘍溶解性ウイルスは、一以上の他の異種タンパク質をコードする。本出願はまた、がんのような疾患および状態、特に上昇したアデノシンまたは他の関連マーカーに関連する任意の疾患および状態、を治療するための、操作された免疫細胞または腫瘍溶解性ウイルスの方法および使用も提供する。
【発明の概要】
【００１２】
請求項に係る発明の実施形態は、アデノシンデアミナーゼ（ＡＤＡ）をコードするヌクレオチド配列を含む、操作された細胞を対象とする。ある実施形態において、細胞はＴ細胞、ナチュラルキラー細胞、ナチュラルキラーＴ細胞、樹状細胞、マクロファージ、間葉系幹細胞、およびそれらの誘導体である。
【００１３】
請求項に係る発明の実施形態は、操作された細胞を含む医薬組成物を対象とする。
【００１４】
請求項に係る発明のさらなる実施形態は、操作された細胞を含む医薬組成物を、がんの治療に効果的な量で患者に投与する方法を対象とする。
【００１５】

本発明の別の実施形態は、ＡＤＡをコードするヌクレオチド配列が作動可能にプロモーターに連結されている、ＡＤＡをコードするヌクレオチド配列を含む組換え腫瘍溶解性ウイルスを対象とする。

【００１６】

本発明の実施の形態は、ＡＤＡをコードするヌクレオチド配列を含む組換えタンパク質を対象とする。

【図面の簡単な説明】

【００１７】

【図１】図１は、発明の実施形態で使用される、コンジュゲート化されたＡＤＡ設計を示す。

【図２】図２は、ＣＤ２６／ＡＤＡ－ＣＤ３－ｓｃＦｖ発現ＣＡＲ　Ｔ細胞療法についての原理を示す。ＣＡＲ　Ｔ細胞は操作され、腫瘍特異的ＣＡＲ、膜ＣＤ２６および分泌された二重特異的ＡＤＡ－ＣＤ３－ｓｃＦｖを発現する。これらのＣＡＲ　Ｔ細胞は、１）特異的腫瘍細胞を標的とし、かつ殺傷し；２）ＡＤＡ－ＣＤ３－ｓｃＦｖによってＣＡＲ　Ｔ細胞を刺激し（ＣＤ３およびＣＤ３－ｓｃＦｖの結合親和性は、ＡＤＡ－ＣＤ２６のそれより高いため、ＣＤ３－ｓｃＦｖはＡＤＡをＴ細胞に繋留し、その一方でＣＤ３－ｓｃＦｖ自体がＴ細胞を活性化しうる）、ＣＡＲ　Ｔ細胞の活性化および遊走を誘導する；３）ＣＡＲ　Ｔ細胞をアデノシン媒介性免疫抑制から解放し；かつ４）ＣＡＲ　Ｔ細胞のための代替炭素源としてイノシンを提供し、かつＣＡＲ　Ｔ細胞療法の抗腫瘍活性を向上させる。

【図３】図３は、ＨＥＲ２を標的としたＣＤ２６／ＡＤＡ－ＣＤ３－ｓｃＦｖ発現ＣＡＲレトロウイルスベクターおよびＣＤ２６／ＡＤＡ－ＣＤ３－ｓｃＦｖ発現レトロウイルスベクターの構造を示す。

【図４】図４は、Ｒｖ－ＣＤ２６を形質導入されたＣＡＲ　Ｔ細胞が、ＴＧＦ－ベータのＣＤ２６発現への抑制に抵抗し得ること、一方でＲｖ－ＣＤ２６を形質導入されていないＣＡＲ　Ｔ細胞上のＣＤ２６発現はＴＧＦ－ベータによって抑制されたことを示す。

【図５Ａ－Ｂ】図５Ａおよび図５Ｂは、Ｒｖ－ＣＤ２６を形質導入されたＣＡＲ　Ｔ細胞が蛍光遊走アッセイ（図５Ａ）およびトランスウェル遊走アッセイ（図５Ｂ）において向上した遊走能力を示したことを示す。

【図６】図６は、代謝リプログラミングされたＣＡＲ　Ｔ細胞へのＡＤＡ－ＣＤ３－ｓｃＦｖの作用機構を示す：（Ａ）ＣＤ３およびＣＤ３－ｓｃＦｖはＣＤ２６－ＡＤＡのそれより高い結合親和性を有するため、ＣＤ３－ｓｃＦｖはＡＤＡをＴ細胞に繋留する一方、ＣＤ３－ｓｃＦｖがＣＤ３を介してＴ細胞を直接活性化しうる；（Ｂ）ＡＤＡはＣＤ２６をエンゲージし、ＣＡＲ　Ｔ細胞を共刺激する；かつ（Ｃ）ＡＤＡはＡＤＯをＩＮＯに変換し、ＣＡＲ　Ｔ細胞におけるＡＤＯ媒介性の免疫抑制を克服する一方、ＩＮＯをＣＡＲ　Ｔ細胞の生存および増殖のための代替エネルギー源として提供する。

【図７Ａ】レトロウイルスベクターを形質導入されたＨＥＫ２９３ＴまたはＪｕｒｋａｔ　Ｔ細胞による、ＡＤＡ－ＣＤ３（ＡＤＡ－ＣＤ３－ｓｃＦｖ）の発現を示す：（図７Ａ）形質導入されていないＨＥＫ２９３Ｔ細胞と比較した、ヒトＩＬ２シグナルペプチドと共にまたはなしでＡＤＡ－ＣＤ３－ｓｃＦｖを発現するレトロウイルスベクターで、形質導入されたＨＥＫ２９３Ｔ細胞の、ＡＤＡに対するモノクローナルＡｂを用いたＡＤＡ－ＣＤ３－ｓｃＦｖのウェスタンブロッティング。

【図７Ｂ】（図７Ｂ）形質導入されていないＪｕｒｋａｔ　Ｔ細胞と比較した、ＡＤＡ－ＣＤ３－ｓｃＦｖをヒトＩＬ２シグナルペプチドと共に発現するレトロウイルスベクター、またはＣＲＩＳＰＲ　ＡＤＡ活性化エレメントを発現するレンチウイルスベクターで形質導入されたＪｕｒｋａｔ　Ｔ細胞の、ＡＤＡに対するモノクローナルＡｂを用いたＡＤＡ－ＣＤ３－ｓｃＦｖのウェスタンブロッティング。

【図８Ａ－Ｂ】ＡＤＡ－ＣＤ３－ｓｃＦｖ（ＡＤＡ－ＣＤ３）の発現を示す：（図８Ａ）Ｒｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３－ＩＬ２ｓｐ（シグナルペプチド）を形質導入された、Ｒｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３（ＩＬ２ｓｐなし）を形質導入された、または形質導入されていないＨＥＫ２

９３Ｔ細胞の上清または細胞溶解物中のＡＤＡのＥＬＩＳＡ測定；（図８Ｂ）Ｒｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３－ＩＬ２ｓｐ（シグナルペプチド）を形質導入された、Ｒｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３（ＩＬ２ｓｐなし）を形質導入された、または形質導入されていないＨＥＫ２９３Ｔ細胞との、Ｊｕｒｋａｔ　Ｔ細胞の共培養の、１日目と４日目の上清のＡＤＡのＥＬＩＳＡ測定。

【図８Ｃ】（図８Ｃ）Ｒｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３－ＩＬ２ｓｐ（シグナルペプチド）を形質導入された、Ｒｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３（ＩＬ２ｓｐなし）を形質導入された、または形質導入されていないＨＥＫ２９３Ｔ細胞との共培養後の、Ｊｕｒｋａｔ　Ｔ細胞またはＲｖ－ＣＤ２６を形質導入されたＪｕｒｋａｔ　Ｔ細胞上のＡＤＡ－ＣＤ３のフロー分析。

【図９Ａ】ＡＤＡ酵素活性アッセイによるＡＤＡ（ＡＤＡ１）の活性を示す：（図９Ａ）Ｊｕｒｋａｔ　Ｔ細胞と、Ｒｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３（ＩＬ２ｓｐあり）を形質導入された、または形質導入されていないＨＥＫ２９３Ｔ細胞との、共培養物のＡＤＡ酵素活性アッセイ（上：元の読み取り；下：形質導入されていないＨＥＫ２９３Ｔ細胞のバックグラウンドの読み取りが差し引かれた）；

【図９Ｂ－Ｃ】（図９Ｂ）Ｊｕｒｋａｔ－ＤｕａｌまたはＪｕｒｋａｔ－Ｄｕａｌ－ＣＤ２６　Ｔ細胞株のＡＤＡ結合アッセイ；および（図９Ｃ）Ｊｕｒｋａｔ－ＮＥＦＡまたはＪｕｒｋａｔ－ＮＦＡＴ－ＣＤ２６　Ｔ細胞株のＡＤＡ結合アッセイ。

【図１０Ａ】Ｊｕｒｋａｔ　ＮＦＡＴレポーターＴ細胞株を用いた、Ｔ細胞活性化を示す：（図１０Ａ）Ｊｕｒｋａｔ　ＮＦＡＴレポーターＴ細胞は、Ｒｖ－ＡＤＡまたはＲｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３を形質導入されたＨＥＫ２９３Ｔ細胞の上清を６時間添加され、ルシフェラーゼアッセイを受けた；

【図１０Ｂ】（図１０Ｂ）Ｊｕｒｋａｔ　ＮＦＡＴレポーターＴ細胞は、Ｒｖ－ＡＤＡまたはＲｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３を形質導入されたＨＥＫ２９３Ｔ細胞の上清を２４時間添加され、ルシフェラーゼアッセイを受けた；

【図１０Ｃ】（図１０Ｃ）Ｊｕｒｋａｔ　ＮＦＡＴレポーターＴ細胞は、Ｒｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３またはＲｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３（ＩＬ２ｓｐ）を形質導入されたＨＥＫ２９３Ｔ細胞の上清を６時間または２４時間添加され、ルシフェラーゼアッセイを受けた；

【図１０Ｄ】（図１０Ｄ）ＡＤＡ－ＣＤ３（ＩＬ２ｓｐ）の発現レベルが算出された。

【図１１Ａ】ｉｎ　ｖｉｔｒｏ　ＬＤＨアッセイを用いたＡＤＡ－ＣＡＲ－Ｔ細胞の抗腫瘍活性を示す：（図１１Ａ）フロー分析による、異なる群の細胞のＧＰＣ３　ＣＡＲの発現レベル；

【図１１Ｂ】ＧＰＣ陽性のＨｅｐＧ２またはＨｕｈ７肝臓腫瘍細胞株に対する、ＣＡＲ　Ｔ細胞の群のＬＤＨアッセイ。

【図１１Ｃ】ＧＰＣ陽性のＨｅｐＧ２またはＨｕｈ７肝臓腫瘍細胞株に対する、ＣＡＲ　Ｔ細胞の群のＬＤＨアッセイ。

【図１１Ｄ】ＧＰＣ陽性のＨｅｐＧ２またはＨｕｈ７肝臓腫瘍細胞株に対する、ＣＡＲ　Ｔ細胞の群のＬＤＨアッセイ。

【図１１Ｅ】ＧＰＣ陽性のＨｅｐＧ２またはＨｕｈ７肝臓腫瘍細胞株に対する、ＣＡＲ　Ｔ細胞の群のＬＤＨアッセイ。

【図１２Ａ】マウスで実施された抗腫瘍効果および毒性試験の結果を示す。

【図１２Ｂ】マウスで実施された抗腫瘍効果および毒性試験の結果を示す。

【図１２Ｃ】マウスで実施された抗腫瘍効果および毒性試験の結果を示す。

【図１２Ｄ】マウスで実施された抗腫瘍効果および毒性試験の結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【００１８】

本発明の実施形態は、腫瘍特異的ＣＡＲを発現し、かつＡＤＡを発現する、操作されたＣＡＲ　Ｔ細胞に関する（図１および３）。操作された細胞は、１）腫瘍抗原特異的腫瘍細胞を標的とし、殺傷する；２）ＣＡＲ　Ｔ細胞がＣ２６シグナルを介してＡＤＡによって共刺激される；３）ＣＡＲ　Ｔ細胞がアデノシン媒介性免疫抑制から解放される；かつ、４）ＣＡＲ　Ｔ細胞のための代替炭素源としてイノシンが提供され、ＣＡＲ　Ｔ細胞療

法の抗腫瘍活性を向上させる。

【００１９】

研究により、ＴＭＥにおける細胞外アデノシンは免疫反応に顕著な抑制効果を有し、Ｔ細胞機能を抑制すること及び免疫抑制の制御細胞を安定化することが示された。したがって、アデノシンをイノシンに不可逆的に変換するＡＤＡは、ＣＡＲ　Ｔ細胞をアデノシン駆動性免疫抑制から解放する一方、ＣＡＲ　Ｔ細胞のためのエネルギー源を提供する。加えて、ＡＤＡは効果的な共刺激シグナルを媒介し、かつそれの酵素活性とは独立してＴ－細胞増殖を促進する。図１は、ＡＤＡ－ＣＡＲ　Ｔ細胞コンジュゲート化の例を説明する。

【００２０】

ＡＤＡ－ＣＤ３－ｓｃＦｖ／ＣＤ２６過剰発現代謝リプログラミングされた（ＭＲ）ＣＡＲ　Ｔ細胞療法プラットフォームの概要は、図２に示されている。腫瘍Ａｇ－特異的ＣＡＲおよびＡＤＡ－ＣＤ３－ｓｃＦｖ／ＣＤ２６複合体を発現する、ＡＤＡ－ＣＤ３－ｓｃＦｖ／ＣＤ２６－ＭＲＣＡＲ　Ｔ細胞は、ｉ）ＣＡＲ分子が、腫瘍Ａｇ陽性腫瘍細胞を殺傷するように、Ｔ細胞を標的化および方向付けする、ｉｉ）ＴＭＥにおいてアデノシンをイノシンに変換することにより、ＣＡＲ　Ｔ細胞のための炭素源としてイノシンを提供することにより、ＡＤＡ／ＣＤ２６複合体がアデノシン媒介性免疫抑制を解放する、およびｉｉｉ）ＣＤ２６がＣＡＲ　Ｔ細胞輸送を媒介し、ＡＤＡを介してＴ細胞表面へ結合したままとなる、という一連の機構を介して、ＣＡＲ　Ｔ細胞療法の抗腫瘍活性を向上させる。このようなＡＤＡ－ＣＤ３－ｓｃＦｖ／ＣＤ２６－ＭＲＣＡＲ　Ｔ細胞は、固形腫瘍に対するＣＡＲ　Ｔ細胞療法における現在の限界を克服する可能性を有する。

【００２１】

図３のＡＤＡ－ＣＤ３－ｓｃＦｖ／ＣＤ２６－ＭＲＣＡＲは、以下の構成を含む：腫瘍抗原（例えばＨＥＲ２、ＧＰＣ３）特異的ｓｃＦｖ（ｓｍａｌｌ　ｃｈａｉｎ　ｖａｒｉａｂｌｅ　ｆｒａｇｍｅｎｔ）、スペーサー、ヒンジ、膜貫通ドメイン（例えばＣＤ２８および／または４－１ＢＢＬ）、ＣＤ３　ｚｅｔａドメインを含むキメラ抗原受容体；ＡＤＡ－ＣＤ３－ｓｃＦｖ二重特異的融合タンパク質、およびＣＤ２６。これらの構成成分は２Ａ配列と連結されるか、または個別のウイルスで発現された（例えばレトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター）。Ｅｃｔｏ－ＡＤＡは、アデノシン媒介性免疫抑制からＴ細胞を守るために重要である一方、セルフリーＡＤＡはそうではない。したがって、Ｔ細胞の表面上にＡＤＡを繋留する効果的な戦略の開発が望まれている。Ｒｖ－ＡＤＡ　Ｔ細胞は２４時間あたり～ｎｇ　ＡＤＡ／ｍｌを発現することができ、Ｒｖ－ＡＤＡ　Ｔ細胞によるＡＤＡの発現は、改変されていないＴ細胞のそれと比較して２０％増加するのみである。しかしながら、ヒトの乳房腫瘍組織、正常組織、または血清におけるＡＤＡ濃度は、それぞれ１６．４－４７．７ｕｇ／ｇ、１１．５ｕｇ／ｇ、または１６０－２４２ｎｇ／ｍｌである。したがって、ＡＤＡを備えたＴ細胞療法は、Ｔ細胞のＡＤＡ発現レベルによって著しく制限される。ＣＤ２６のＴ細胞表面上へのエンゲージによって、ＡＤＡを細胞表面に繋留することが、この制限を克服する。

【００２２】

ある実施形態において、ＣＡＲは、配列番号：１、３、５，７、９、１８、２０、２２、および２４、１０、１２、１４、および１６、２、４、６、８、９、１９、２１、２３および２５、１１、１３、１５、および１７からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも７０％、または少なくとも７５％、または少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９５％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【００２３】

図２に示されるとおり、ＡＤＡをＴ細胞表面上に繋留すること、およびＡＤＡ－ＣＤ２６のエンゲージを促進すること、およびＣＤ３シグナルを介してＴ細胞を活性化することによって、注入されたＣＡＲ－Ｔ細胞または内在性のＴ細胞上で、ＣＤ３－ｓｃＦｖはＣＤ３とエンゲージする。ＡＤＡがＣＤ２６とエンゲージするとき、それは注入されたＣＡＲ　Ｔ細胞または内在性Ｔ細胞を活性化する。ＡＤＡはアデノシンをイノシンに変換して

、ＣＡＲ　Ｔ細胞におけるアデノシン媒介性免疫抑制を克服し、かつＣＡＲ　Ｔ細胞のための代替エネルギー源としてイノシンを提供する。

【００２４】

図３はＡＤＡ－ＣＤ３－ｓｃＦｖ二重特異的融合タンパク質およびＣＤ２６のみを含むベクターも示す。ＭＲＣＡＲ　Ｔ細胞を産生するようにヒトＴ細胞を形質導入するために、このベクターは任意のタイプの腫瘍抗原に対するＣＡＲを発現するベクターと共に使用される可能性がある。

【００２５】

レトロウイルスベクターシステムは、ＨＥＲ２特異的ＣＡＲ、膜ＣＤ２６および分泌ＡＤＡ－ＣＤ３－ｓｃＦｖを発現するために使用される（図３）。レトロウイルスベクターシステムは、膜ＣＤ２６および分泌ＡＤＡ－ＣＤ３－ｓｃＦｖのみを発現するためにも使用された（図３）。Ｔ細胞コドン最適化は、ヒトＴ細胞におけるＡＤＡの導入遺伝子発現を向上させるために使用された。最適化されたヒトＩＬ２シグナルペプチドは、ヒトＴ細胞によってＡＤＡを発現するために加えられた。ヒト末梢血単球は、プレートに結合したＣＤ３およびＣＤ２８抗体によって２日間活性化され、続いてウイルス形質導入された。Ｔ細胞によるＡＤＡ１の発現および分泌は、ウェスタンブロッティング（図７）およびＥＬＩＳＡ（図８）により確認された。ＡＤＡ発現は、効果的にアデノシンをイノシンに変換した（図９）。図１０に示されたとおり、ＡＤＡ－ＣＤ３発現は効果的にヒトＴ細胞を活性化した（図１０）。Ｉｎ　ｖｉｔｒｏ　ＬＤＨ細胞傷害性アッセイは、ＧＰＣ３特異的ＭＲ－ＣＡＲが、ＨｅｐＧ２やＨｕｈ７のようなＧＰＣ３陽性の肝臓がん細胞株に対し、向上した細胞傷害性を示したことを、示した（図１１）。

【００２６】

ＣＡＲ　Ｔ細胞におけるＣＤ２６の過剰発現は、ＣＡＲ　Ｔ細胞療法に重要である。図４に示されるように、ＴＧＦ－ベータの存在下でＣＡＲ　Ｔ細胞上のＣＤ２６の発現は４８時間以内に減少し、ＣＤ２６の発現が腫瘍微小環境によって抑制され得ることが示唆された。Ｒｖ－ＣＤ２６は、ＣＡＲ　Ｔ細胞におけるＣＤ２６発現を回復させることができる。図４に示されるとおり、Ｒｖ－ＣＤ２６を形質導入されたＴ細胞は、改変されていないＴ細胞と比較して、より高いレベルでＣＤ２６を発現した。加えて、Ｒｖ－ＣＤ２６を形質導入されたＴ細胞は、ＴＧＦ－ベータ媒介性免疫抑制に抵抗し、ＣＤ２６発現を高いレベルで維持した。加えて、Ｒｖ－ＣＤ２６を形質導入されたＴ細胞は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ蛍光遊走アッセイおよびトランスウェル遊走アッセイ（図５）によって実証されるように、遊走能力を向上させた。

【００２７】

本発明のさらなる実施形態は、移植可能なマウス腫瘍モデルにおけるＡＤＡ－ＣＡＲ　Ｔ細胞療法に関する。結果は、ＣＡＲ　Ｔ細胞療法モデルの効果および抗腫瘍特性を示す。ＭＲ－ＣＡＲ　Ｔ細胞は、２つのマウスモデルで向上した抗腫瘍効果を示した。第一のモデルでは、ＮＳＧマウスは０日目に、2×10^{6}　Ｈｕｈ７　ＨＣＣ腫瘍細胞を右側腹に接種された。７日目に、Ｈｕｈ７腫瘍を有するマウスは、尾の血管を介してＰＢＳ、2×10^{6}　ＧＰＣ３－ＣＡＲ　Ｔ細胞、または2×10^{6}　ＧＰＣ３－ＡＤＡ１－ＣＤ３－ＣＤ２６－ＣＡＲ（ＧＰＣ３－ＭＲ－ＣＡＲと表す）で治療され、続いてノギス（図１２Ａ）および体重測定（図１２Ｂ）で腫瘍観察された。第二のモデルでは、ＮＳＧマウスは０日目に、2×10^{6}　Ａ５４９　ＮＳＣＬＣ腫瘍細胞を右側腹に接種された。７日目に、Ａ５４９腫瘍を有するマウスは、尾の血管を介してＰＢＳ、2×10^{6}　ＨＥＲ２－ＣＡＲ　Ｔ細胞、または2×10^{6}　ＨＥＲ２－ＡＤＡ１－ＣＤ３－ＣＤ２６－ＣＡＲ（ＨＥＲ２－ＭＲ－ＣＡＲと表す）で治療され、続いてノギス（図１２Ｃ）および体重測定（図１２Ｄ）で腫瘍観察された。両モデルにおいて、ＭＲ－ＣＡＲ　Ｔ細胞は向上した抗腫瘍活性を示した。ＭＲ－ＣＡＲ　Ｔ細胞は、Ｈｕｈ７　ＨＣＣおよびＡ５４９　ＮＳＣＬＣマウスモデル双方で、腫瘍の増殖を顕著に阻害する一方、在来のＣＡＲ　Ｔ細胞はＨｕｈ７またはＡ５４９腫瘍の増殖を中程度に阻害したのみである。加えて、Ｈｕｈ７　ＨＣＣまたはＡ５４９　ＮＳＣＬＣマウスモデルどちらでも顕著な体重の違いは

観察されず、ＭＲ－ＣＡＲ　Ｔ細胞がマウスモデルに毒性を誘導しなかったことを示唆した。マウスモデルにおける有望な結果は、ヒトの対象におけるＣＡＲ　Ｔ細胞プラットフォームの効果の、良好な予測を提供する。

【００２８】

本発明の別の実施形態は、在来のＡＤＡと比較して向上したＡＤＡ活性を示す、最適化されたＡＤＡに関する。ある実施形態において、最適化されたＡＤＡは、顕著にＡＤＡの半減期を延長し、かつそれの抗腫瘍活性を改善する、ＡＤＡ－Ｆｃ融合タンパク質である（図１）。他の実施形態では、最適化されたＡＤＡは、抗体とコンジュゲート化されたＡＤＡである（図１）。

【００２９】

本発明の別の実施形態は、ＡＤＡまたはＡＤＡ－ＦｃのようなＡＤＡ誘導体を発現する、操作された腫瘍溶解性ウイルスに関する（図１）。ＡＤＡを発現する操作された腫瘍溶解性ウイルスは、腫瘍細胞内で感染および複製し、かつ腫瘍組織内でＡＤＯをＩＮＯに変換できるＡＤＡまたはＡＤＡ－Ｆｃを発現して、腫瘍溶解性ウイルスの抗腫瘍効果を向上させるだろう。

【００３０】

ある実施形態において、操作された腫瘍溶解性ウイルスは、配列番号５、７、９、２２、および２４からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも７０％、または少なくとも７５％、または少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９５％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【実施例】

【００３１】

ＣＡＲ　Ｔ細胞生成

材料：

ＯＫＴ３（ｏｒｔｈｏ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）－１ｍｇ／ｍｌ

ＣＤ２８（アジ化物なし（ＮＡ）／低エンドトキシン（ＮＥ）（Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ＃３３７４０Ｄ）－１ｍｇ／ｍｌ

プレート：非組織培養用処理２４ウェルプレート（Ｆａｌｃｏｎ＃１１４７）

【００３２】

プロトコール：

０日目：

１．　抗体を滅菌水で終濃度１ｕｇ／ｍｌに希釈する（例えば、６ウェルをコートするために、３ｕＬのＯＫＴ３および３ｕＬのＣＤ２８を３ｍｌの滅菌水に加える）

２．　１ウェルあたり０．５ｍｌ（＝０．５ｕｇの抗体）の抗体溶液を２４ウェルプレートに加える；パラフィルムで密閉する。

３．　＋４℃で一晩インキュベートする。

１日目：

１．　５ｘ１０^{6}のＰＢＭＣを１０ｍｌのｃｏｍｐｌｅｔｅ　ＲＰＭＩ（１０％ＦＣＳ）に再懸濁する。

２．　抗体溶液を吸引し、ウェルをＲＰＭＩまたはＤＭＥＭ　ｃｏｍｐｌｅｔｅで１回洗浄する。

３．　培地を吸引し、１ウェルあたり１ｘ１０^{6}のＰＢＭＣを最終容量２ｍｌの完全培地に蒔く。

２日目：

１．　各ウェルから約１ｍｌを吸引し廃棄し、２００Ｕ／ｍｌのＩＬ－２を含む１ｍｌのｃｏｍｐｌｅｔｅ　ＲＰＭＩ培地を戻し入れる。

２．　非組織培養処理２４ウェルプレートを、レトロネクチンでコートする；パラフィルムで密閉する。

３．　レトロネクチンコートされたプレートを、＋４℃で一晩置く。

３日目：
１．　レトロネクチン溶液を除去し、ウェルをＲＰＭＩまたはＤＭＥＭ　ｃｏｍｐｌｅｔｅで１回洗浄する。（レトロネクチンは１５ｃｃチューブで＋４℃で保管してください；１か月以内に一回再利用可能）
２．　５００－７００ｕｌのウイルス上清を、ウェルに加える。プレートをインキュベーターに３０分間置く。
３．　ウイルス上清を取り除く；ステップ２を繰り返す。
４．　インキュベーション時間の間に、４００Ｕ／ｃｃのＩＬ－２と共に芽細胞を５ｘ１０^{5}細胞／ｃｃに調製する。
５．　ウイルス上清を除去する。１．５ｃｃのウイルス上清を加える。
６．　５００ｕｌの芽細胞を加える（２．５ｘ１０^{5}細胞）
７．　プレートを１０００ｇで３０分間遠心し、それからプレートをインキュベーターに戻す（任意）
５／６日目：
１．　１ｃｃの培地をウェルから除去する；レトロネクチンコートされたプレートの細胞を（掻爬によって）新しいウェルに移す；１００Ｕ／ｍｌのＩＬ－２を含む１ｃｃの完全培地を加える。
２．　２－３日ごとにＩＬ－２（１００Ｕ／ｍｌ）を与える。再凍結または７から２１日以内に実験に使用する。

【００３３】
ＭＲ－ＣＡＲが、ＣＡＲ　Ｔ細胞上のＴＧＦ－ベータ媒介性のＣＤ２６発現の抑制に抵抗し、より大きな遊走能力を示した。

前記の通り、ヒトＰＢＭＣはＣＤ３／ＣＤ２８抗体によって活性化され、続けてＲｖ－ＣＤ２６で形質導入された。Ｒｖ－ＣＤ２６を形質導入されたＴ細胞（Ｒｖ－ＣＤ２６）または形質導入されていないＴ細胞（ＮＴ）は、５ｎｇ／ｍｌ、１０ｎｇ／ｍｌまたは２０ｎｇ／ｍｌのＴＧＦ－ベータ存在下または非存在下で４８時間培養された。Ｔ細胞は回収され、ＦＩＴＣコンジュゲート化ヒトＣＤ２６特異的抗体で染色された。Ｔ細胞上のＣＤ２６発現は、その後、フロー分析によって検出され、ＭＦＩ（蛍光強度の中央値）として示された。ＴＧＦ－ベータの非存在下で、Ｒｖ－ＣＤ２６を形質導入されたヒトＴ細胞は、形質導入されていないＴ細胞と比較して、ＣＤ２６をより高いレベルで発現した（図４、Ｒｖ－ＣＤ２６対ＮＴ＝ＭＦＩ　１４２０対ＭＦＩ　８０１）。ＮＴ　Ｔ細胞が、ＴＧＦ－ベータ存在下（５ｎｇ／ｍｌ、１０ｎｇ／ｍｌ、または２０ｎｇ／ｍｌ）で４８時間培養された際に、ＣＤ２６発現はＭＦＩ　８０１からＭＦＩ　６０３、ＭＦＩ　５９９、またはＭＦＩ　６２６へとそれぞれ減少した一方で、Ｒｖ－ＣＤ２６を形質導入されたＴ細胞上のＣＤ２６発現は、ＴＧＦ－ベータ存在下（５ｎｇ／ｍｌ、１０ｎｇ／ｍｌ、または２０ｎｇ／ｍｌ）で４８時間培養後も変わらないままであった。これらの結果は、Ｒｖ－ＣＤ２６を形質導入されたＣＡＲ　Ｔ細胞は、ＣＤ２６発現へのＴＧＦ－ベータの抑制に抵抗し得る一方で、Ｒｖ－ＣＤ２６を形質導入されていないＣＡＲ　Ｔ細胞のＣＤ２６発現は、ＴＧＦ－ベータによって抑制されることを示した。

【００３４】
ヒトＴ細胞の遊走能力を調べるために、ｉｎ　ｖｉｔｒｏトランスウェル遊走アッセイおよび蛍光遊走アッセイが実施された。
Ａ．トランスウェル細胞遊走アッセイプロトコール（細胞計数による）
１．　所望する培地および培養条件で、細胞遊走アッセイをおこなうのに十分な細胞（Ｒｖ－ＣＤ２６を形質導入されたＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔ細胞または対照ＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔ細胞）を育てる。
２．　細胞を回収し、無血清培地に細胞を再懸濁し、血球計算盤を用いて細胞の数を数える。細胞を無血清培地に１．５ｘ１０^{6}細胞／ｍＬで再懸濁するか、またはあなたの所望する濃度の細胞にする。
３．　下部チャンバー：ＮＴ（形質導入なし）およびＣＤ２６を形質導入されたＨＥＲ２

－ＣＡＲ　Ｔ細胞双方の下部チャンバーに、２３５μＬのＨＥＲ２陽性Ａ５４９細胞上清（化学誘因物質）および３６５μＬの無血清培地を加えて６００μＬとする。
４．　上部チャンバー（トランスウェル、５ｍｍ）を注意深く下部チャンバーに設置し、空気の泡が上部および下部チャンバーの間に引っかからないようにする。
５．　上部チャンバー：３００μＬ（５，０００００細胞）の細胞懸濁液（ＮＴおよびＲｖ－ＣＤ２６を形質導入された双方）を上部チャンバーの各ウェルに加える。
６．　注意深くプレートカバーを設置し、細胞遊走チャンバーをCO_2インキュベーターの中で、３７℃で２－２４時間インキュベートする。
７．　異なる時点（２、４、２２／２４時間）で、血球計算盤を用いて細胞を計数する。

【００３５】

Ｂ．蛍光細胞遊走アッセイプロトコール（Ａｂｃａｍ　ｔｒａｎｓｗｅｌｌ　ｍｉｇｒａｔｉｏｎ　ａｓｓａｙ　ｋｉｔ　ａｂ２３５６９６を用いて、蛍光強度による）

標準曲線：

１．　各細胞タイプは個別の標準曲線を必要とする。５０μＬの細胞懸濁液（１．８ｘ１０^{6}細胞／ｍＬ、９０，０００細胞または１ｘ１０^{6}細胞／ｍＬで５００００とする）を添加することにより、標準曲線を準備する。
２．　細胞を１：１で洗浄バッファーに連続的に希釈し、９６ウェル白色プレート、合計容量１００μＬに細胞の標準曲線（９００００、４５０００、２２５００、１１２５０、５６２５、２８１２、１４０６および７０３）を作成する。
３．　ブランクとして、１００μＬの洗浄バッファーを用いる。
４．　各ウェルに１０μＬの細胞染料を加える。
５．　３７℃で１時間インキュベートする。
６．　Ｅｘ／Ｅｍ＝５３０／５９０ｎｍにて蛍光を読み取る。
７．　細胞の数対、得られたＲＦＵの標準曲線をプロットする。
８．　直線の近似曲線を用いて、データポイントを合わせる。

【００３６】

遊走細胞を計数する：

１．　ウェルの数に応じて、所望する細胞染色溶液を作製する。１００μＬの細胞染料を１ｍＬの細胞解離溶液に加える。よく混ぜる。
２．　混合液５５０μＬを下部チャンバーの各ウェルに加える（２２時間後、ステップＡ６）。実験デザインに応じて、２時間または４時間後も可能である。
３．　CO_2インキュベーター内で、３７℃で６０分間インキュベートする。
４．　インキュベーション後に混合液１１０μＬを下部チャンバーから９６ウェル白色プレートへ移す。Ｅｘ／Ｅｍ＝５３０／５９０ｎｍでプレートを読み取る。２４ウェルプレートの各ウェルが５倍高い容量であることを考慮して、読み取り値を５倍する。

【００３７】

データ分析：

標準曲線から得られた直線方程式を用いて、遊走した細胞の数が算出された。

【００３８】

図５に示される通り、蛍光遊走アッセイおよびトランスウェル遊走アッセイの結果は、Ｒｖ－ＣＤ２６を形質導入されたＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔ細胞が、ＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔ細胞と比較して、向上した遊走能力を示したことを、示した。

【００３９】

ＭＲ－ＣＡＲ　Ｔ細胞によるＡＤＡ－ＣＤ３－ｓｃＦｖ発現は、生物学的に機能的である

図７でＡＤＡ－ＣＤ３（ｓｃＦｖ）の発現を測定するためにウェスタンブロッティングが使用された。Ｒｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３（ｓｃＦｖ）またはＲｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３（ｓｃＦｖ）－ＩＬ２ｓｐ（ヒトＩＬ２シグナルペプチドは、ＡＤＡ－ＣＤ３（ｓｃＦｖ）の発現を増加させるために、ＡＤＡ－ＣＤ３（ｓｃＦｖ）の５´末端に挿入された）は、２９３Ｔ細胞に形質導入され、細胞溶解物は抗ＡＤＡ抗体を用いたウェスタンブロッティングを受ける（図７Ａ）。結果は、Ｒｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３－ＩＬ２ｓｐが、ＲＶ－ＡＤＡ－ＣＤ

３（ＩＬ２ｓｐなし）と比較して、ＡＤＡ－ＣＤ３をより高いレベルで発現したことを示した。それから、Ｒｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３－ＩＬ２ｓｐは、ＡＤＡ　ＣＲＩＳＰＲ活性化エレメントを発現するレンチウイルスベクターと比較された。Ｌｖ－ＡＤＡ（ＣＲＩＳＰＲ活性化）ウイルスまたはＲｖ－ＡＤＡ－ＩＬ２ｓｐは、Ｊｕｒｋａｔ　Ｔ細胞に形質導入された。Ｌｖ－ＡＤＡ（ＣＲＩＳＰＲ活性化）を形質導入されたＪｕｒｋａｔ　Ｔ細胞は、ピューロマイシンによって選択された。ＡＤＡ発現は、Ｔ細胞培養の７、１４または１８日目に、抗ＡＤＡ　ｍＡｂを用いたウェスタンブロッティングによって測定された。図７Ｂに示されるように、Ｒｖ－ＡＤＡ１－ＩＬ２ｓｐは、レンチ－ＡＤＡ活性化と比較して、ＡＤＡをより高いレベルで発現した。これらの結果は、Ｒｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３－ＩＬ２ｓｐが、ＡＤＡ－ＣＤ３（ｓｃＦｖ）をＣＡＲ　Ｔ細胞で発現するための最適化された戦略であることを支持した。

【００４０】

ＭＲＣＡＲ　Ｔ細胞によるＡＤＡ－ＣＤ３（ｓｃＦｖ）の分泌は、ヒトＡＤＡに対するＥＬＩＳＡによって測定された。図８Ａに示されるように、Ｒｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３－ＩＬ２ｓｐ（シグナルペプチド）を形質導入された、Ｒｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３（ＩＬ２ｓｐなし）を形質導入された、または形質導入されていない（ＮＴ）ＨＥＫ２９３Ｔ細胞の、上清または細胞溶解物中のＡＤＡは、ＥＬＩＳＡにより測定された。結果は、上清または細胞溶解物の双方において、Ｒｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３－ｓｃＦｖ－ＩＬ２ｓｐ（ＡＤＡ１－ＣＤ３－ＩＬ２ｓｐ）またはＲｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３－ｓｃＦｖ（ＩＬ２ｓｐなし、ＡＤＡ１－ＣＤ３）が、ＡＤＡ－ＣＤ３を発現したことを示した。そして、Ｒｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３－ＩＬ２ｓｐは、Ｒｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３よりも、より高いレベルのＡＤＡ－ＣＤ３を発現した。

【００４１】

それから、Ｒｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３－ＩＬ２ｓｐまたはＲｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３を形質導入されたＨＥＫ２９３Ｔ細胞は、ＡＤＡ－ＣＤ３発現を確認するために、Ｊｕｒｋａｔ　Ｔ細胞と共培養されて細胞培養についてストレス状態（増加した細胞密度および細胞接触）を模倣した。共培養の１日目または４日目に、細胞培養培地は回収され、ＡＤＡのＥＬＩＳＡ測定を受けた。結果は、Ｒｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３－ＩＬ２ｓｐがＮＴまたはＲｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３より、より高いＡＤＡ発現を誘導したことを示した。我々は、ＮＴ群がＡＤＡ発現を有したことを観察した（図８Ｂ）。これは、Ｊｕｒｋａｔ　Ｔ細胞またはＨＥＫ２９３Ｔ細胞によるＡＤＡのバックグラウンド発現によって説明され得る。

【００４２】

次に、我々はＡＤＡ－ＣＤ３が、ＣＤ３発現Ｊｕｒｋａｔ　Ｔ細胞またはＲｖ－ＣＤ２６を形質導入されたＣＤ３／ＣＤ２６二重陽性ＣＤ２６－Ｊｕｒｋａｔ　Ｔ細胞をエンゲージするかどうか調べた。Ｒｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３－ＩＬ２ｓｐを形質導入されたＪｕｒｋａｔ　Ｔ細胞またはＣＤ２６－Ｊｕｒｋａｔ　Ｔ細胞は２４時間培養され、ＡＤＡに対するＰＥコンジュゲート化ｍＡｂで染色され、ＡＤＡ発現のフロー分析を受けた。図８Ｃに示されるように、Ｒｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３を形質導入されたＪｕｒｋａｔ　Ｔ細胞上のＡＤＡレベルは、Ｊｕｒｋａｔ　Ｔ細胞のそれよりも高く、ＣＤ３－ｓｃＦｖがＡＤＡ－ＣＤ３をＪｕｒｋａｔ　Ｔ細胞の表面上に繋留したことを示唆した。Ｒｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３を形質導入されたＪｕｒｋａｔ　Ｔ細胞上のＡＤＡレベルと比較して、Ｒｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３を形質導入されたＣＤ２６－Ｊｕｒｋａｔ　Ｔ細胞上のＡＤＡレベルはさらに増加し、ＡＤＡおよびＣＤ２６のエンゲージが、ＣＤ２６－Ｊｕｒｋａｔ　Ｔ細胞とのＡＤＡ－ＣＤ３の結合をさらに向上させたことを示唆した。したがって、これらのデータは、我々がデザインしたＡＤＡ－ＣＤ３が、Ｔ細胞から分泌され、かつＴ細胞とエンゲージし得ることを示唆した。

【００４３】

次に、分泌されたＡＤＡ－ＣＤ３の酵素活性が調べられた。ＡＤＡ－ＣＤ３はＴ細胞と高い結合親和性を有し、Ｔ細胞の表面上にエンゲージするだろうので、ＡＤＡ－ＣＤ３酵素活性を測定するために、Ｔ細胞が直接使用された。最初に、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞はＲｖ

－ＡＤＡ－ＣＤ３で形質導入され、異なる密度で９６ウェルプレートに一晩播種された。２４時間後に、細胞が計数され、細胞密度が図９Ａに示された。同じ量のＪｕｒｋａｔ Ｔ細胞が、細胞培養物に６時間加えられた。細胞培養培地が除去され、細胞は直接ＡＤＡ活性アッセイを受けた。図９Ａに示されるように、１０ｅ５／ウェルまたは５ｘ１０ｅ５／ウェルの細胞培養密度において、対照群と比較して、Ｒｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３はＡＤＯをＩＮＯに変換するより高い酵素活性をもたらし、ＡＤＡ分泌はストレス状態媒介性であることを示唆した（左：元の読み取り；右：形質導入されていないＨＥＫ２９３Ｔ細胞のバックグラウンドの読み取りが差し引かれた）。

【００４４】

次に、我々はＴ細胞上のＡＤＡ－ＣＤ３の結合効率を調べた。Ｊｕｒｋａｔ－Ｄｕａｌ（ＮＦ－ｋＢおよびＩＲＦ／ＩＦＮ）、Ｒｖ－ＣＤ２６で形質導入されたＪｕｒｋａｔ－Ｄｕａｌ（Ｊｕｒｋａｔ－Ｄｕａｌ－ＣＤ２６）、Ｊｕｒｋａｔ－ＮＦＡＴ、またはＲｖ－ＣＤ２６で形質導入されたＪｕｒｋａｔ－ＮＦＡＴ（Ｊｕｒｋａｔ－ＮＦＡＴ－ＣＤ２６）レポーター細胞株は、Ｒｖ－ＡＤＡまたはＲｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３（ｓｃＦｖ）を形質導入された２９３Ｔ細胞と、２４時間共培養された。細胞培養培地はそれから、ＡＤＡ活性アッセイによりＡＤＡを測定するために使用された。ＡＤＡ膜結合効率は、Ｒｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３－２９３Ｔ／ＣＤ２６－Ｊｕｒｋａｔ Ｔを最大値とし、２９３Ｔ／ＪｕｒｋａｔＴ Ｗ／Ｏ ＣＤ２６をバックグラウンドとして使用して算出された。結果は、分泌されたＡＤＡ－ＣＤ３がＪｕｒｋａｔ－ＤｕａｌおよびＣＤ２６－Ｊｕｒｋａｔ－Ｄｕａｌ（図９Ｂ）、または、Ｊｕｒｋａｔ－ＮＦＡＴおよびＣＤ２６－Ｊｕｒｋａｔ－ＮＦＡＴ（図９Ｃ）の双方と完全にエンゲージしたことを示し、その一方で分泌されたＡＤＡ（ＣＤ３－ｓｃＦｖなし）は、ＣＤ２６－Ｊｕｒｋａｔ－Ｄｕａｌ（図９Ｂ）またはＣＤ２６－Ｊｕｒｋａｔ－ＮＦＡＴ（図９Ｃ）と、分泌されたＡＤＡ－ＣＤ３の４０％の効率でエンゲージしたのみであったことを示した。したがって、これらの結果は、ＡＤＡ－ＣＤ３がＡＤＡのエンゲージを改善したことを示した。

【００４５】

ＣＤ３－ｓｃＦｖまたはＡＤＡのいずれかがヒトＴ細胞に刺激または共刺激シグナルを提供し得るため、次に、我々は、分泌されたＡＤＡ－ＣＤ３（ｓｃＦｖ）がヒトＴ細胞を活性化できるかどうか調べた。図１０Ａおよび１０Ｂに示されるように、Ｒｖ－ＡＤＡ（ＡＤＡ１）またはＲｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３（ＡＤＡ１－ＣＤ３）は２９３Ｔ細胞に形質導入された。２９３Ｔ細胞培養培地（上清）または２９３Ｔ細胞は、ＮＦＡＴ－ルシフェラーゼＪｕｒｋａｔレポーター細胞株の培養物に加えられた。細胞は６時間（図１０Ａ）または２４時間（図１０Ｂ）培養され、それから細胞培養培地は回収され、ルシフェラーゼアッセイを受けた。Ｒｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３を形質導入された２９３Ｔ細胞のみが、２４時間でＴ細胞活性化を誘導し、ＡＤＡ－ＣＤ３の分泌はストレス状態（高い細胞密度での２４時間の細胞培養）によって媒介されることを示唆した。我々はＲｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３およびＲｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３－ＩＬ２ｓｐも比較した。Ｊｕｒｋａｔ ＮＦＡＴレポーターＴ細胞は、Ｒｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３またはＲｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３（ＩＬ２ｓｐ）を形質導入されたＨＥＫ２９３Ｔ細胞の上清と、６時間または２４時間添加され、ルシフェラーゼアッセイを受けた。結果は、Ｒｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３－ＩＬ２ｓｐが、Ｒｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３より効果的にＴ細胞活性化を誘導したことを示した。ＡＤＡ－ＣＤ３（ＩＬ２ｓｐ）発現レベルは、図１０Ｄに示されるように算出された。Ｒｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３またはＲｖ－ＡＤＡ－ＣＤ３－ＩＬ２ｓｐは、２４時間でそれぞれ０．３ｕｇ／ｍｌまたは＞０．５ｕｇ／ｍｌのＡＤＡ－ＣＤ３発現を誘導することができる。

【００４６】

ＭＲ－ＣＡＲ Ｔ細胞のＬＤＨ細胞傷害性アッセイ

ＬＤＨアッセイプロトコール

１日目：９６ウェルＵ底細胞培養プレートで、腫瘍細胞（１×１０ｅ４）が、エフェクター細胞ＣＡＲ－ＴおよびＮＴ－Ｔ（陰性対照として形質導入されていないＴ細胞）と、以下のようなＥ：Ｔ比の勾配で２００ｕｌのＤＭＥＭ培地において４時間共培養された。最

大負荷（陽性対照）ウェルは２０ｕｌの細胞溶解バッファーを加えられ、３０分間培養する。

Ｅ：Ｔ比	ＣＡＲ－Ｔ（エフェクター）	腫瘍細胞（標的）
１：１	１×１０ｅ４	１×１０ｅ４
５：１	５×１０ｅ４	１×１０ｅ４
１０：１	１×１０ｅ５	１×１０ｅ４
２０：１	２×１０ｅ５	１×１０ｅ４
最大負荷（陽性対照）	２０ｕｌの細胞溶解バッファー	１×１０ｅ４

４時間後：乳酸脱水素酵素（ＬＤＨ）の検出は、Ｅｎｚｏ　ＬＤＨ　ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ　ＥＳＴ　ａｓｓａｙ（Ｃａｔ＃　ＥＮＺ－ＫＩＴ１５７）を使用して、製造者により指定されたとおりに実施された。

１．　細胞を沈殿させるために、プレートは２５０×ｇで２分間遠心されるだろう。

２．　１００ｕｌの細胞上清を、新しい平底の光学透明９６ウェルプレートの各ウェルに移す。

３．　１００ｕｌのワーキング溶液を、各ウェルに加える。

４．　プレートを遮光し、室温で３０分間インキュベートする。

５．　５０ｕｌの停止溶液を、各ウェルに加える。

６．　マイクロプレートリーダーによって、４９０ｎｍの吸光を測定する。

特異的溶解は、以下の式を用いて算出された：

（実験上の－自発的解放）／（最大負荷－自発的解放）×１００％

【００４７】

図１１に示されるように、ＣＡＲ　Ｔ細胞はＨｅｐＧ２またはＨｕｈ７肝臓がん細胞と共培養され、上記のようにＬＤＨアッセイを受けた。図１１Ｂおよび図１１Ｃは、共培養の４時間で、ＭＲ－ＣＡＲ（ＧＰＣ３－ＡＤＡ１－ＣＤ３－ＣＤ２６）Ｔ細胞が、ＧＰＣ３－ＣＡＲ　Ｔ細胞と比較して、２０：１のＥ：Ｔ比においてＨｅｐＧ２（図１１Ｂ）またはＨｕｈ７（図１１Ｃ）に対する向上した細胞傷害性を示したことを示したが、その一方で１：１のＥ：Ｔ比においては顕著な違いは観察されなかった。これは、ＡＤＡ－ＣＤ３（ｓｃＦｖ）の発現および分泌が、時間を要するためである可能性が高い。結果として、１：１のＥ：Ｔ比においては、ＭＲ－ＣＡＲがＨｅｐＧ２（図１１Ｄ）またはＨｕｈ７（図１１Ｅ）に対し、ＭＲ－ＣＡＲ　Ｔ細胞および腫瘍細胞の共培養の１８時間または２４時間いずれかにおいて、顕著に向上した細胞傷害性を示した。これらの結果は、ＭＲ－ＣＡＲ　Ｔ細胞が、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで特定の腫瘍細胞に対して向上した細胞傷害性を示したことを示唆した。

【００４８】

ＭＲ－ＣＡＲ　Ｔ細胞療法のＩｎ　ｖｉｖｏマウス研究

６週齢のＮＳＧマウスは、Ｊａｘ　ｌａｂｏｒａｔｏｒｙから購入され、各群５マウスを有する。肝臓がんにおけるＭＲ－ＣＡＲ　Ｔ細胞療法の効果を調べるために、ＮＳＧマウスの群は最初に０日目に、２００ｕｌの培地中の２ｘ１０ｅ６　Ｈｕｈ７　ＨＣＣ腫瘍細胞を、右側腹に皮下接種された。７日目に、Ｈｕｈ７腫瘍を有するマウスは、尾の血管を介して、２００ｕｌのＰＢＳ、２００ｕｌの培地中の２ｘ１０ｅ６　ＧＰＣ３－ＣＡＲ　Ｔ細胞、または２００ｕｌの培地中の２ｘ１０ｅ６　ＧＰＣ３－ＡＤＡ１－ＣＤ３－ＣＤ２６－ＣＡＲ　Ｔ細胞（ＧＰＣ３－ＭＲ－ＣＡＲと表す）で治療された。マウスは２、３日ごとにモニターされた。腫瘍サイズはノギスで測定され、腫瘍サイズは、腫瘍サイズ＝ＬｘＷｘＷ／２（Ｌ：腫瘍の長さ、Ｗ；腫瘍の幅）として算出された。マウスの体重も、ＭＲ－ＣＡＲ　Ｔ細胞療法の毒性をモニターするために測定された。

【００４９】
ＭＲ－ＣＡＲ　Ｔ細胞療法の肺がんにおける効果を調べるために、ＮＳＧマウスの群は最初に０日目に、２００ｕｌの培地中の２ｘ１０ｅ６　Ａ５４９　ＮＳＣＬＣ腫瘍細胞を、右側腹に皮下接種された。７日目に、Ａ５４９腫瘍を有するマウスは、尾の血管を介して、２００ｕｌの培地中の２ｘ１０ｅ６　ＨＥＲ２－ＣＡＲ　Ｔ細胞、または２ｘ１０ｅ６　ＨＥＲ２－ＡＤＡ１－ＣＤ３－ＣＤ２６－ＣＡＲ　Ｔ細胞（ＨＥＲ２－ＭＲ－ＣＡＲとして表す）、または対照として治療なし（ＮＴ）、で治療された。腫瘍のサイズおよび体重は、上記のように測定された。

【００５０】
両モデルにおいて、ＭＲ－ＣＡＲ　Ｔ細胞は向上した抗腫瘍活性を示した。ＭＲ－ＣＡＲ　Ｔ細胞がＨｕｈ７　ＨＣＣまたはＡ５４９　ＮＳＣＬＣマウスモデルの双方で腫瘍の増殖を顕著に阻害し、その一方で元のＣＡＲ　Ｔ細胞は、Ｈｕｈ７またはＡ５４９腫瘍の増殖を中程度に阻害したのみであった。加えて、Ｈｕｈ７　ＨＣＣおよびＡ５４９　ＮＳＣＬＣマウスモデルの双方で体重に顕著な違いは観察されず、ＭＲ－ＣＡＲ　Ｔ細胞がこれらのマウスモデルにおいて毒性を誘導しなかったことを示唆した。

【００５１】
配列表：以下の配列表は、本開示の一部である。

【００５２】
HER2-scFv-CD28TM-CD3zeta-ADA1-CD26（配列番号１）

MDWIWRILFLVGAATGAHSEVQLQQSGPELKKPGETVKISCKASGYPFTNYGMNWV
KQAPGQGLKWMGWINTSTGESTFADDFKGRFDFSLETSANTAYLQINNLKSEDMAT
YFCARWEVYHGYVPYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSHKFLSTSV
GDRVSITCKASQDVYNAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASSRYTGVPSRFTGSGSGPDFT
FTISSVQAEDLAVYFCQQHFRTPFTFGSGTKLEIKALDLEPKSCDKTHTCPPCPDPKF
WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPY
APPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM
GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY
DALHMQALPPRDPKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNM
TPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG
HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPMRRMQLLL
LIALSLALVTNSMAQTPAFDKPKVELHVHLDGSIKPETILYYGRRRGIALPANTAEGL
LNVIGMDKPLTLPDFLAKFDYYMPAIAGCREAIKRIAYEFVEMKAKEGVVYVEVRYS
PHLLANSKVEPIPWNQAEGDLTPDEVVALVGQGLQEGERDFGVKARSILCCMRHQP
NWSPKVVELCKKYQQQTVVAIDLAGDETIPGSSLLPGHVQAYQEAVKSGIHRTVHA
GEVGSAEVVKEAVDILKTERLGHGYHTLEDQALYNRLRQENMHFEICPWSSYLTGA
WKPDTEHAVIRLKNDQANYSLNTDDPLIFKSTLDTDYQMTKRDMGFTEEEFKRLNI
NAAKSSFLPEDEKRELLDLLYKAYGMPPSASAGQNLGSGATNFSLLKQAGDVEENPG
PMKTPWKVLLGLLGAAALVTIITVPVVLLNKGTDDATADSRKTYTLTDYLKNTYRLK
LYSLRWISDHEYLYKQENNILVFNAEYGNSSVFLENSTFDEFGHSINDYSISPDGQFI
LLEYNYVKQWRHSYTASYDIYDLNKRQLITEERIPNNTQWVTWSPVGHKLAYVWN
NDIYVKIEPNLPSYRITWTGKEDIIYNGITDWVYEEEVFSAYSALWWSPNGTFLAYA
QFNDTEVPLIEYSFYSDESLQYPKTVRVPYPKAGAVNPTVKFFVVNTDSLSSVTNAT
SIQITAPASMLIGDHYLCDVTWATQERISLQWLRRIQNYSVMDICDYDESSGRWNCL
VARQHIEMSTTGWVGRFRPSEPHFTLDGNSFYKIISNEEGYRHICYFQIDKKDCTFIT
KGTWEVIGIEALTSDYLYYISNEYKGMPGGRNLYKIQLSDYTKVTCLSCELNPERCQ
YYSVSFSKEAKYYQLRCSGPGLPLYTLHSSVNDKGLRVLEDNSALDKMLQNVQMPS
KKLDFIILNETKFWYQMILPPHFDKSKKYPLLLDVYAGPCSQKADTVFRLNWATYLA
STENIIVASFDGRGSGYQGDKIMHAINRRLGTFEVEDQIEAARQFSKMGFVDNKRIAI
WGWSYGGYVTSMVLGSGSGVFKCGIAVAPVSRWEYYDSVYTERYMGLPTPEDNLD

HYRNSTVMSRAENFKQVEYLLIHGTADDNVHFQQSAQISKALVDVGVDFQAMWYT
DEDHGIASSTAHQHIYTHMSHFIKQCFSLP

【００５３】

HER2-scFv-CD28TM-CD3zeta-ADA2-CD26（配列番号２）

MDWIWRILFLVGAATGAHSEVQLQQSGPELKKPGETVKISCKASGYPFTNYGMNWV
KQAPGQGLKWMGWINTSTGESTFADDFKGRFDFSLETSANTAYLQINNLKSEDMAT
YFCARWEVYHGYVPYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSHKFLSTSV
GDRVSITCKASQDVYNAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASSRYTGVPSRFTGSGSGPDFT
FTISSVQAEDLAVYFCQQHFRTPFTFGSGTKLEIKALDLEPKSCDKTHTCPPCPDPKF
WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPY
APPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM
GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY
DALHMQALPPRDPKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNM
TPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG
HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPMLVDGPSE
RPALCFLLLAVAMSFFGSALSIDETRAHLLLKEKMMRLGGRLVLNTKEELANERLMT
LKIAEMKEAMRTLIFPPSMHFFQAKHLIERSQVFNILRMMPKGAALHLHDIGIVTMD
WLVRNVTYRPHCHICFTPRGIMQFRFAHPTPRPSEKCSKWILLEDYRKRVQNVTEF
DDSLLRNFTLVTQHPEVIYTNQNVVWSKFETIFFTISGLIHYAPVFRDYVFRSMQEF
YEDNVLYMEIRARLLPVYELSGEHHDEEWSVKTYQEVAQKFVETHPEFIGIKIIYSDH
RSKDVAVIAESIRMAMGLRIKFPTVVAGFDLVGHEDTGHSLHDYKEALMIPAKDGVK
LPYFFHAGETDWQGTSIDRNILDALMLNTTRIGHGFALSKHPAVRTYSWKKDIPIEV
CPISNQVLKLVSDLRNHPVATLMATGHPMVISSDDPAMFGAKGLSYDFYEVFMGIG
GMKADLRTLKQLAMNSIKYSTLLESEKNTFMEIWKKRWDKFIADVATKGSGATNFS
LLKQAGDVEENPGPMKTPWKVLLGLLGAAALVTIITVPVVLLNKGTDDATADSRKT
YTLTDYLKNTYRLKLYSLRWISDHEYLYKQENNILVFNAEYGNSSVFLENSTFDEFG
HSINDYSISPDGQFILLEYNYVKQWRHSYTASYDIYDLNKRQLITEERIPNNTQWVT
WSPVGHKLAYVWNNDIYVKIEPNLPSYRITWTGKEDIIYNGITDWVYEEEVFSAYSA
LWWSPNGTFLAYAQFNDTEVPLIEYSFYSDESLQYPKTVRVPYPKAGAVNPTVKFF
VVNTDSLSSVTNATSIQITAPASMLIGDHYLCDVTWATQERISLQWLRRIQNYSVMD
ICDYDESSGRWNCLVARQHIEMSTTGWVGRFRPSEPHFTLDGNSFYKIISNEEGYRH
ICYFQIDKKDCTFITKGTWEVIGIEALTSDYLYYISNEYKGMPGGRNLYKIQLSDYTK
VTCLSCELNPERCQYYSVSFSKEAKYYQLRCSGPGLPLYTLHSSVNDKGLRVLEDNS
ALDKMLQNVQMPSKKLDFIILNETKFWYQMILPPHFDKSKKYPLLLDVYAGPCSQK
ADTVFRLNWATYLASTENIIVASFDGRGSGYQGDKIMHAINRRLGTFEVEDQIEAAR
QFSKMGFVDNKRIAIWGWSYGGYVTSMVLGSGSGVFKCGIAVAPVSRWEYYDSVYT
ERYMGLPTPEDNLDHYRNSTVMSRAENFKQVEYLLIHGTADDNVHFQQSAQISKAL
VDVGVDFQAMWYTDEDHGIASSTAHQHIYTHMSHFIKQCFSLP

【００５４】

HER2-scFv-CD28TM-CD3zeta-ADA1（配列番号３）

MDWIWRILFLVGAATGAHSEVQLQQSGPELKKPGETVKISCKASGYPFTNYGMNWV
KQAPGQGLKWMGWINTSTGESTFADDFKGRFDFSLETSANTAYLQINNLKSEDMAT
YFCARWEVYHGYVPYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSHKFLSTSV
GDRVSITCKASQDVYNAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASSRYTGVPSRFTGSGSGPDFT
FTISSVQAEDLAVYFCQQHFRTPFTFGSGTKLEIKALDLEPKSCDKTHTCPPCPDPKF
WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPY
APPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM
GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY
DALHMQALPPRDPKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNM

TPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG
HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPMRRMQLLL
LIALSLALVTNSMAQTPAFDKPKVELHVHLDGSIKPETILYYGRRRGIALPANTAEGL
LNVIGMDKPLTLPDFLAKFDYYMPAIAGCREAIKRIAYEFVEMKAKEGVVYVEVRYS
PHLLANSKVEPIPWNQAEGDLTPDEVVALVGQGLQEGERDFGVKARSILCCMRHQP
NWSPKVVELCKKYQQQTVVAIDLAGDETIPGSSLLPGHVQAYQEAVKSGIHRTVHA
GEVGSAEVVKEAVDILKTERLGHGYHTLEDQALYNRLRQENMHFEICPWSSYLTGA
WKPDTEHAVIRLKNDQANYSLNTDDPLIFKSTLDTDYQMTKRDMGFTEEEFKRLNI
NAAKSSFLPEDEKRELLDLLYKAYGMPPSASAGQNL

【００５５】

HER2-scFv-CD28TM-CD3zeta-ADA2（配列番号４）

MDWIWRILFLVGAATGAHSEVQLQQSGPELKKPGETVKISCKASGYPFTNYGMNWV
KQAPGQGLKWMGWINTSTGESTFADDFKGRFDFSLETSANTAYLQINNLKSEDMAT
YFCARWEVYHGYVPYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSHKFLSTSV
GDRVSITCKASQDVYNAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASSRYTGVPSRFTGSGSGPDFT
FTISSVQAEDLAVYFCQQHFRTPFTFGSGTKLEIKALDLEPKSCDKTHTCPPCPDPKF
WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPY
APPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM
GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY
DALHMQALPPRDPKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNM
TPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG
HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPMLVDGPSE
RPALCFLLLAVAMSFFGSALSIDETRAHLLLKEKMMRLGGRLVLNTKEELANERLMT
LKIAEMKEAMRTLIFPPSMHFFQAKHLIERSQVFNILRMMPKGAALHLHDIGIVTMD
WLVRNVTYRPHCHICFTPRGIMQFRFAHPTPRPSEKCSKWILLEDYRKRVQNVTEF
DDSLLRNFTLVTQHPEVIYTNQNVVWSKFETIFFTISGLIHYAPVFRDYVFRSMQEF
YEDNVLYMEIRARLLPVYELSGEHHDEEWSVKTYQEVAQKFVETHPEFIGIKIIYSDH
RSKDVAVIAESIRMAMGLRIKFPTVVAGFDLVGHEDTGHSLHDYKEALMIPAKDGVK
LPYFFHAGETDWQGTSIDRNILDALMLNTTRIGHGFALSKHPAVRTYSWKKDIPIEV
CPISNQVLKLVSDLRNHPVATLMATGHPMVISSDDPAMFGAKGLSYDFYEVFMGIG
GMKADLRTLKQLAMNSIKYSTLLESEKNTFMEIWKKR WDKFIADVATK

【００５６】

IL2SP-ADA1-CD26（配列番号５）

MRRMQLLLLIALSLALVTNSMAQTPAFDKPKVELHVHLDGSIKPETILYYGRRRGIA
LPANTAEGLLNVIGMDKPLTLPDFLAKFDYYMPAIAGCREAIKRIAYEFVEMKAKEG
VVYVEVRYSPHLLANSKVEPIPWNQAEGDLTPDEVVALVGQGLQEGERDFGVKARS
ILCCMRHQPNWSPKVVELCKKYQQQTVVAIDLAGDETIPGSSLLPGHVQAYQEAVK
SGIHRTVHAGEVGSAEVVKEAVDILKTERLGHGYHTLEDQALYNRLRQENMHFEICP
WSSYLTGAWKPDTEHAVIRLKNDQANYSLNTDDPLIFKSTLDTDYQMTKRDMGFTE
EEFKRLNINAAKSSFLPEDEKRELLDLLYKAYGMPPSASAGQNLGSGEGRGSLLTCGD
VEENPGPMKTPWKVLLGLLGAAALVTIITVPVVLLNKGTDDATADSRKTYTLTDYLK
NTYRLKLYSLRWISDHEYLYKQENNILVFNAEYGNSSVFLENSTFDEFGHSINDYSIS
PDGQFILLEYNYVKQWRHSYTASYDIYDLNKRQLITEERIPNNTQWVTWSPVGHKL
AYVWNNDIYVKIEPNLPSYRITWTGKEDIIYNGITDWVYEEEVFSAYSALWWSPNGT
FLAYAQFNDTEVPLIEYSFYSDESLQYPKTVRVPYPKAGAVNPTVKFFVVNTDSLSS
VTNATSIQITAPASMLIGDHYLCDVTWATQERISLQWLRRIQNYSVMDICDYDESSG
RWNCLVARQHIEMSTTGWVGRFRPSEPHFTLDGNSFYKIISNEEGYRHICYFQIDKK
DCTFITKGTWEVIGIEALTSDYLYYISNEYKGMPGGRNLYKIQLSDYTKVTCLSCELN

PERCQYYSVSFSKEAKYYQLRCSGPGLPLYTLHSSVNDKGLRVLEDNSALDKMLQNV
QMPSKKLDFIILNETKFWYQMILPPHFDKSKKYPLLLDVYAGPCSQKADTVFRLNW
ATYLASTENIIVASFDGRGSGYQGDKIMHAINRRLGTFEVEDQIEAARQFSKMGFVD
NKRIAIWGWSYGGYVTSMVLGSGSGVFKCGIAVAPVSRWEYYDSVYTERYMGLPTP
EDNLDHYRNSTVMSRAENFKQVEYLLIHGTADDNVHFQQSAQISKALVDVGVDFQA
MWYTDEDHGIASSTAHQHIYTHMSHFIKQCFSLP

【００５７】

ADA2-CD26（配列番号６）

MLVDGPSERPALCFLLLAVAMSFFGSALSIDETRAHLLLKEKMMRLGGRLVLNTK
EELANERLMTLKIAEMKEAMRTLIFPPSMHFFQAKHLIERSQVFNILRMMPKGAAL
HLHDIGIVTMDWLVRNVTYRPHCHICFTPRGIMQFRFAHPTPRPSEKCSKWILLEDY
RKRVQNVTEFDDSLLRNFTLVTQHPEVIYTNQNVVWSKFETIFFTISGLIHYAPVFR
DYVFRSMQEFYEDNVLYMEIRARLLPVYELSGEHHDEEWSVKTYQEVAQKFVETHP
EFIGIKIIYSDHRSKDVAVIAESIRMAMGLRIKFPTVVAGFDLVGHEDTGHSLHDYKE
ALMIPAKDGVKLPYFFHAGETDWQGTSIDRNILDALMLNTTRIGHGFALSKHPAVRT
YSWKKDIPIEVCPISNQVLKLVSDLRNHPVATLMATGHPMVISSDDPAMFGAKGLSY
DFYEVFMGIGGMKADLRTLKQLAMNSIKYSTLLESEKNTFMEIWKKRWDKFIADVA
TKGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPMKTPWKVLLGLLGAAALVTIITVPVVLLNKGTDD
ATADSRKTYTLTDYLKNTYRLKLYSLRWISDHEYLYKQENNILVFNAEYGNSSVFLE
NSTFDEFGHSINDYSISPDGQFILLEYNYVKQWRHSYTASYDIYDLNKRQLITEERIP
NNTQWVTWSPVGHKLAYVWNNDIYVKIEPNLPSYRITWTGKEDIIYNGITDWVYEE
EVFSAYSALWWSPNGTFLAYAQFNDTEVPLIEYSFYSDESLQYPKTVRVPYPKAGAV
NPTVKFFVVNTDSLSSVTNATSIQITAPASMLIGDHYLCDVTWATQERISLQWLRRI
QNYSVMDICDYDESSGRWNCLVARQHIEMSTTGWVGRFRPSEPHFTLDGNSFYKIIS
NEEGYRHICYFQIDKKDCTFITKGTWEVIGIEALTSDYLYYISNEYKGMPGGRNLYKI
QLSDYTKVTCLSCELNPERCQYYSVSFSKEAKYYQLRCSGPGLPLYTLHSSVNDKGL
RVLEDNSALDKMLQNVQMPSKKLDFIILNETKFWYQMILPPHFDKSKKYPLLLDVY
AGPCSQKADTVFRLNWATYLASTENIIVASFDGRGSGYQGDKIMHAINRRLGTFEVE
DQIEAARQFSKMGFVDNKRIAIWGWSYGGYVTSMVLGSGSGVFKCGIAVAPVSRWE
YYDSVYTERYMGLPTPEDNLDHYRNSTVMSRAENFKQVEYLLIHGTADDNVHFQQS
AQISKALVDVGVDFQAMWYTDEDHGIASSTAHQHIYTHMSHFIKQCFSLP

【００５８】

IL2SP-ADA1（配列番号７）

MRRMQLLLLIALSLALVTNSMAQTPAFDKPKVELHVHLDGSIKPETILYYGRRRGIA
LPANTAEGLLNVIGMDKPLTLPDFLAKFDYYMPAIAGCREAIKRIAYEFVEMKAKEG
VVYVEVRYSPHLLANSKVEPIPWNQAEGDLTPDEVVALVGQGLQEGERDFGVKARS
ILCCMRHQPNWSPKVVELCKKYQQQTVVAIDLAGDETIPGSSLLPGHVQAYQEAVK
SGIHRTVHAGEVGSAEVVKEAVDILKTERLGHGYHTLEDQALYNRLRQENMHFEICP
WSSYLTGAWKPDTEHAVIRLKNDQANYSLNTDDPLIFKSTLDTDYQMTKRDMGFTE
EEFKRLNINAAKSSFLPEDEKRELLDLLYKA YGMPPSASAGQNL

【００５９】

ADA2（配列番号８）

MLVDGPSERPALCFLLLAVAMSFFGSALSIDETRAHLLLKEKMMRLGGRLVLNTKEE
LANERLMTLKIAEMKEAMRTLIFPPSMHFFQAKHLIERSQVFNILRMMPKGAALHL
HDIGIVTMDWLVRNVTYRPHCHICFTPRGIMQFRFAHPTPRPSEKCSKWILLEDYRK
RVQNVTEFDDSLLRNFTLVTQHPEVIYTNQNVVWSKFETIFFTISGLIHYAPVFRDY
VFRSMQEFYEDNVLYMEIRARLLPVYELSGEHHDEEWSVKTYQEVAQKFVETHPEFI
GIKIIYSDHRSKDVAVIAESIRMAMGLRIKFPTVVAGFDLVGHEDTGHSLHDYKEAL
MIPAKDGVKLPYFFHAGETDWQGTSIDRNILDALMLNTTRIGHGFALSKHPAVRTYS
WKKDIPIEVCPISNQVLKLVSDLRNHPVATLMATGHPMVISSDDPAMFGAKGLSYD

FYEVFMGIGGMKADLRTLKQLAMNSIKYSTLLESEKNTFMEIWKKRWDKFIADVATK

【００６０】

CD26（配列番号９）

MKTPWKVLLGLLGAAALVTIITVPVVLLNKGTDDATADSRKTYTLTDYLKNTYRLKL
YSLRWISDHEYLYKQENNILVFNAEYGNSSVFLENSTFDEFGHSINDYSISPDGQFIL
LEYNYVKQWRHSYTASYDIYDLNKRQLITEERIPNNTQWVTWSPVGHKLAYVWNN
DIYVKIEPNLPSYRITWTGKEDIIYNGITDWVYEEEVFSAYSALWWSPNGTFLAYAQ
FNDTEVPLIEYSFYSDESLQYPKTVRVPYPKAGAVNPTVKFFVVNTDSLSSVTNATSI
QITAPASMLIGDHYLCDVTWATQERISLQWLRRIQNYSVMDICDYDESSGRWNCLV
ARQHIEMSTTGWVGRFRPSEPHFTLDGNSFYKIISNEEGYRHICYFQIDKKDCTFITK
GTWEVIGIEALTSDYLYYISNEYKGMPGGRNLYKIQLSDYTKVTCLSCELNPERCQY
YSVSFSKEAKYYQLRCSGPGLPLYTLHSSVNDKGLRVLEDNSALDKMLQNVQMPSK
KLDFIILNETKFWYQMILPPHFDKSKKYPLLLDVYAGPCSQKADTVFRLNWATYLAS
TENIIVASFDGRGSGYQGDKIMHAINRRLGTFEVEDQIEAARQFSKMGFVDNKRIAIW
GWSYGGYVTSMVLGSGSGVFKCGIAVAPVSRWEYYDSVYTERYMGLPTPEDNLDHY
RNSTVMSRAENFKQVEYLLIHGTADDNVHFQQSAQISKALVDVGVDFQAMWYTDE
DH GIASSTAHQHIYTHMSHFIKQCFSLP

【００６１】

HER2-scFv-ADA1-CD28TM-CD3zeta-CD26（配列番号１０）

MDWIWRILFLVGAATGAHSEVQLQQSGPELKKPGETVKISCKASGYPFTNYGMNWV
KQAPGQGLKWMGWINTSTGESTFADDFKGRFDFSLETSANTAYLQINNLKSEDMAT
YFCARWEVYHGYVPYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSHKFLSTSV
GDRVSITCKASQDVYNAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASSRYTGVPSRFTGSGSGPDFT
FTISSVQAEDLAVYFCQQHFRTPFTFGSGTKLEIKALDLEPKSCDKTHTCPPCPDPKF
WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPY
APPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM
GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY
DALHMQALPPRSSMAQTPAFDKPKVELHVHLDGSIKPETILYYGRRRGIALPANTAE
GLLNVIGMDKPLTLPDFLAKFDYYMPAIAGCREAIKRIAYEFVEMKAKEGVVYVEVR
YSPHLLANSKVEPIPWNQAEGDLTPDEVVALVGQGLQEGERDFGVKARSILCCMRH
QPNWSPKVVELCKKYQQQTVVAIDLAGDETIPGSSLLPGHVQAYQEAVKSGIHRTV
HAGEVGSAEVVKEAVDILKTERLGHGYHTLEDQALYNRLRQENMHFEICPWSSYLT
GAWKPDTEHAVIRLKNDQANYSLNTDDPLIFKSTLDTDYQMTKRDMGFTEEEFKRL
NINAAKSSFLPEDEKRELLDLLYKAYGMPPSASAGQNLSSDPKFWVLVVVGGVLACY
SLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVK
FSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY
NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

【００６２】

HER2-scFv-ADA2-CD28TM-CD3zeta-CD26（配列番号１１）

MDWIWRILFLVGAATGAHSEVQLQQSGPELKKPGETVKISCKASGYPFTNYGMNWV
KQAPGQGLKWMGWINTSTGESTFADDFKGRFDFSLETSANTAYLQINNLKSEDMAT
YFCARWEVYHGYVPYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSHKFLSTSV
GDRVSITCKASQDVYNAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASSRYTGVPSRFTGSGSGPDFT
FTISSVQAEDLAVYFCQQHFRTPFTFGSGTKLEIKALDLEPKSCDKTHTCPPCPDPKF
WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPY
APPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM
GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY
DALHMQALPPRSSMLVDGPSERPALCFLLLAVAMSFFGSALSIDETRAHLLLKEKM
MRLGGRLVLNTKEELANERLMTLKIAEMKEAMRTLIFPPSMHFFQAKHLIERSQVFN
ILRMMPKGAALHLHDIGIVTMDWLVRNVTYRPHCHICFTPRGIMQFRFAHPTPRPS

EKCSKWILLEDYRKRVQNVTEFDDSLLRNFTLVTQHPEVIYTNQNVVWSKFETIFFT
ISGLIHYAPVFRDYVFRSMQEFYEDNVLYMEIRARLLPVYELSGEHHDEEWSVKTYQ
EVAQKFVETHPEFIGIKIIYSDHRSKDVAVIAESIRMAMGLRIKFPTVVAGFDLVGHE
DTGHSLHDYKEALMIPAKDGVKLPYFFHAGETDWQGTSIDRNILDALMLNTTRIGH
GFALSKHPAVRTYSWKKDIPIEVCPISNQVLKLVSDLRNHPVATLMATGHPMVISSD
DPAMFGAKGLSYDFYEVFMGIGGMKADLRTLKQLAMNSIKYSTLLESEKNTFMEIW
KKRWDKFIADVATKSSDPKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSD
YMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN
LGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR
RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

【００６３】

HER2-scFv-CD28TM-CD3zeta-ADA1-CD28TM-CD3zeta-CD26（配列番号１２）

MDWIWRILFLVGAATGAHSEVQLQQSGPELKKPGETVKISCKASGYPFTNYGMNWV
KQAPGQGLKWMGWINTSTGESTFADDFKGRFDFSLETSANTAYLQINNLKSEDMAT
YFCARWEVYHGYVPYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSHKFLSTSV
GDRVSITCKASQDVYNAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASSRYTGVPSRFTGSGSGPDFT
FTISSVQAEDLAVYFCQQHFRTPFTFGSGTKLEIKALDLEPKSCDKTHTCPPCPDPKF
WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPY
APPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM
GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY
DALHMQALPPRDPKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNM
TPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG
HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMRRMQL
LLLIALSLALVTNSMAQTPAFDKPKVELHVHLDGSIKPETILYYGRRRGIALPANTAE
GLLNVIGMDKPLTLPDFLAKFDYYMPAIAGCREAIKRIAYEFVEMKAKEGVVYVEVR
YSPHLLANSKVEPIPWNQAEGDLTPDEVVALVGQGLQEGERDFGVKARSILCCMRH
QPNWSPKVVELCKKYQQQTVVAIDLAGDETIPGSSLLPGHVQAYQEAVKSGIHRTV
HAGEVGSAEVVKEAVDILKTERLGHGYHTLEDQALYNRLRQENMHFEICPWSSYLT
GAWKPDTEHAVIRLKNDQANYSLNTDDPLIFKSTLDTDYQMTKRDMGFTEEEFKRL
NINAAKSSFLPEDEKRELLDLLYKAYGMPPSASAGQNLSSDPKFWVLVVVGGVLACY
SLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVK
FSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY
NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSG
EGRGSLLTCGDVEENPGPMKTPWKVLLGLLGAAALVTIITVPVVLLNKGTDDATADS
RKTYTLTDYLKNTYRLKLYSLRWISDHEYLYKQENNILVFNAEYGNSSVFLENSTFD
EFGHSINDYSISPDGQFILLEYNYVKQWRHSYTASYDIYDLNKRQLITEERIPNNTQW
VTWSPVGHKLAYVWNNDIYVKIEPNLPSYRITWTGKEDIIYNGITDWVYEEEVFSAY
SALWWSPNGTFLAYAQFNDTEVPLIEYSFYSDESLQYPKTVRVPYPKAGAVNPTVKF
FVVNTDSLSSVTNATSIQITAPASMLIGDHYLCDVTWATQERISLQWLRRIQNYSVM
DICDYDESSGRWNCLVARQHIEMSTTGWVGRFRPSEPHFTLDGNSFYKIISNEEGYR
HICYFQIDKKDCTFITKGTWEVIGIEALTSDYLYYISNEYKGMPGGRNLYKIQLSDYT
KVTCLSCELNPERCQYYSVSFSKEAKYYQLRCSGPGLPLYTLHSSVNDKGLRVLEDN
SALDKMLQNVQMPSKKLDFIILNETKFWYQMILPPHFDKSKKYPLLLDVYAGPCSQ
KADTVFRLNWATYLASTENIIVASFDGRGSGYQGDKIMHAINRRLGTFEVEDQIEAA
RQFSKMGFVDNKRIAIWGWSYGGYVTSMVLGSGSGVFKCGIAVAPVSRWEYYDSVY
TERYMGLPTPEDNLDHYRNSTVMSRAENFKQVEYLLIHGTADDNVHFQQSAQISKA
LVDVGVDFQAMWYTDEDHGIASSTAHQHIYTHMSHFIKQCFSLP

【００６４】

HER2-scFv-CD28TM-CD3zeta-ADA2-CD28TM-CD3zeta-CD26（配列番号１３）

MDWIWRILFLVGAATGAHSEVQLQQSGPELKKPGETVKISCKASGYPFTNYGMNWV
KQAPGQGLKWMGWINTSTGESTFADDFKGRFDFSLETSANTAYLQINNLKSEDMAT
YFCARWEVYHGYVPYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSHKFLSTSV
GDRVSITCKASQDVYNAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASSRYTGVPSRFTGSGSGPDFT
FTISSVQAEDLAVYFCQQHFRTPFTFGSGTKLEIKALDLEPKSCDKTHTCPPCPDPKF
WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPY
APPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM
GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY
DALHMQALPPRDPKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNM
TPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE 10
EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG
HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMRRMQL
LLLIALSLALVTNSMAQTPAFDKPKVELHVHLDGSIKPETILYYGRRRGIALPANTAE
GLLNVIGMDKPLTLPDFLAKFDYYMPAIAGCREAIKRIAYEFVEMKAKEGVVYVEVR
YSPHLLANSKVEPIPWNQAEGDLTPDEVVALVGQGLQEGERDFGVKARSILCCMRH
QPNWSPKVVELCKKYQQQTVVAIDLAGDETIPGSSLLPGHVQAYQEAVKSGIHRTV
HAGEVGSAEVVKEAVDILKTERLGHGYHTLEDQALYNRLRQENMHFEICPWSSYLT
GAWKPDTEHAVIRLKNDQANYSLNTDDPLIFKSTLDTDYQMTKRDMGFTEEEFKRL
NINAAKSSFLPEDEKRELLDLLYKAYGMPPSASAGQNLSSDPKFWVLVVVGGVLACY
SLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVK 20
FSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY
NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSG
EGRGSLLTCGDVEENPGPMKTPWKVLLGLLGAAALVTIITVPVVLLNKGTDDATADS
RKTYTLTDYLKNTYRLKLYSLRWISDHEYLYKQENNILVFNAEYGNSSVFLENSTFD
EFGHSINDYSISPDGQFILLEYNYVKQWRHSYTASYDIYDLNKRQLITEERIPNNTQW
VTWSPVGHKLAYVWNNDIYVKIEPNLPSYRITWTGKEDIIYNGITDWVYEEEVFSAY
SALWWSPNGTFLAYAQFNDTEVPLIEYSFYSDESLQYPKTVRVPYPKAGAVNPTVKF
FVVNTDSLSSVTNATSIQITAPASMLIGDHYLCDVTWATQERISLQWLRRIQNYSVM
DICDYDESSGRWNCLVARQHIEMSTTGWVGRFRPSEPHFTLDGNSFYKIISNEEGYR
HICYFQIDKKDCTFITKGTWEVIGIEALTSDYLYYISNEYKGMPGGRNLYKIQLSDYT 30
KVTCLSCELNPERCQYYSVSFSKEAKYYQLRCSGPGLPLYTLHSSVNDKGLRVLEDN
SALDKMLQNVQMPSKKLDFIILNETKFWYQMILPPHFDKSKKYPLLLDVYAGPCSQ
KADTVFRLNWATYLASTENIIVASFDGRGSGYQGDKIMHAINRRLGTFEVEDQIEAA
RQFSKMGFVDNKRIAIWGWSYGGYVTSMVLGSGSGVFKCGIAVAPVSRWEYYDSVY
TERYMGLPTPEDNLDHYRNSTVMSRAENFKQVEYLLIHGTADDNVHFQQSAQISKA
LVDVGVDFQAMWYTDEDHGIASSTAHQHIYTHMSHFIKQCFSLP

【００６５】

ADA1-CD28TM-CD3zeta-CD26（配列番号１４）

MRRMQLLLLIALSLALVTNSMAQTPAFDKPKVELHVHLDGSIKPETILYYGRRRGIA
LPANTAEGLLNVIGMDKPLTLPDFLAKFDYYMPAIAGCREAIKRIAYEFVEMKAKEG 40
VVYVEVRYSPHLLANSKVEPIPWNQAEGDLTPDEVVALVGQGLQEGERDFGVKARS
ILCCMRHQPNWSPKVVELCKKYQQQTVVAIDLAGDETIPGSSLLPGHVQAYQEAVK
SGIHRTVHAGEVGSAEVVKEAVDILKTERLGHGYHTLEDQALYNRLRQENMHFEICP
WSSYLTGAWKPDTEHAVIRLKNDQANYSLNTDDPLIFKSTLDTDYQMTKRDMGFTE
EEFKRLNINAAKSSFLPEDEKRELLDLLYKAYGMPPSASAGQNLSSDPKFWVLVVVG
GVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFA
AYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ
ALPPRGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPMKTPWKVLLGLLGAAALVTIITVPVVLLNKG
TDDATADSRKTYTLTDYLKNTYRLKLYSLRWISDHEYLYKQENNILVFNAEYGNSSV 50

FLENSTFDEFGHSINDYSISPDGQFILLEYNYVKQWRHSYTASYDIYDLNKRQLITEE
RIPNNTQWVTWSPVGHKLAYVWNNDIYVKIEPNLPSYRITWTGKEDIIYNGITDWV
YEEEVFSAYSALWWSPNGTFLAYAQFNDTEVPLIEYSFYSDESLQYPKTVRVPYPKA
GAVNPTVKFFVVNTDSLSSVTNATSIQITAPASMLIGDHYLCDVTWATQERISLQWL
RRIQNYSVMDICDYDESSGRWNCLVARQHIEMSTTGWVGRFRPSEPHFTLDGNSFY
KIISNEEGYRHICYFQIDKKDCTFITKGTWEVIGIEALTSDYLYYISNEYKGMPGGRNL
YKIQLSDYTKVTCLSCELNPERCQYYSVSFSKEAKYYQLRCSGPGLPLYTLHSSVNDK
GLRVLEDNSALDKMLQNVQMPSKKLDFIILNETKFWYQMILPPHFDKSKKYPLLLD
VYAGPCSQKADTVFRLNWATYLASTENIIVASFDGRGSGYQGDKIMHAINRRLGTFE
VEDQIEAARQFSKMGFVDNKRIAIWGWSYGGYVTSMVLGSGSGVFKCGIAVAPVSR
WEYYDSVYTERYMGLPTPEDNLDHYRNSTVMSRAENFKQVEYLLIHGTADDNVHF
QQSAQISKALVDVGVDFQAMWYTDEDHGIASSTAHQHIYTHMSHFIKQCFSLP

【００６６】

ADA2-CD28TM-CD3zeta-CD26（配列番号１５）

MLVDGPSERPALCFLLLAVAMSFFGSALSIDETRAHLLLKEKMMRLGGRLVLNTKEE
LANERLMTLKIAEMKEAMRTLIFPPSMHFFQAKHLIERSQVFNILRMMPKGAALHL
HDIGIVTMDWLVRNVTYRPHCHICFTPRGIMQFRFAHPTPRPSEKCSKWILLEDYRK
RVQNVTEFDDSLLRNFTLVTQHPEVIYTNQNVVWSKFETIFFTISGLIHYAPVFRDY
VFRSMQEFYEDNVLYMEIRARLLPVYELSGEHHDEEWSVKTYQEVAQKFVETHPEFI
GIKIIYSDHRSKDVAVIAESIRMAMGLRIKFPTVVAGFDLVGHEDTGHSLHDYKEAL
MIPAKDGVKLPYFFHAGETDWQGTSIDRNILDALMLNTTRIGHGFALSKHPAVRTYS
WKKDIPIEVCPISNQVLKLVSDLRNHPVATLMATGHPMVISSDDPAMFGAKGLSYD
FYEVFMGIGGMKADLRTLKQLAMNSIKYSTLLESEKNTFMEIWKKRWDKFIADVAT
KSSDPKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPT
RKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR
RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLS
TATKDTYDALHMQALPPRGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPMKTPWKVLLGLLGAAAL
VTIITVPVVLLNKGTDDATADSRKTYTLTDYLKNTYRLKLYSLRWISDHEYLYKQEN
NILVFNAEYGNSSVFLENSTFDEFGHSINDYSISPDGQFILLEYNYVKQWRHSYTASY
DIYDLNKRQLITEERIPNNTQWVTWSPVGHKLAYVWNNDIYVKIEPNLPSYRITWT
GKEDIIYNGITDWVYEEEVFSAYSALWWSPNGTFLAYAQFNDTEVPLIEYSFYSDESL
QYPKTVRVPYPKAGAVNPTVKFFVVNTDSLSSVTNATSIQITAPASMLIGDHYLCDV
TWATQERISLQWLRRIQNYSVMDICDYDESSGRWNCLVARQHIEMSTTGWVGRFRP
SEPHFTLDGNSFYKIISNEEGYRHICYFQIDKKDCTFITKGTWEVIGIEALTSDYLYYI
SNEYKGMPGGRNLYKIQLSDYTKVTCLSCELNPERCQYYSVSFSKEAKYYQLRCSGP
GLPLYTLHSSVNDKGLRVLEDNSALDKMLQNVQMPSKKLDFIILNETKFWYQMILP
PHFDKSKKYPLLLDVYAGPCSQKADTVFRLNWATYLASTENIIVASFDGRGSGYQGD
KIMHAINRRLGTFEVEDQIEAARQFSKMGFVDNKRIAIWGWSYGGYVTSMVLGSGS
GVFKCGIAVAPVSRWEYYDSVYTERYMGLPTPEDNLDHYRNSTVMSRAENFKQVEY
LLIHGTADDNVHFQQSAQISKALVDVGVDFQAMWYTDEDHGIASSTAHQHIYTHMS
HF IKQCFSLP

【００６７】

ADA1-CD28TM-CD3zeta（配列番号１６）

MRRMQLLLLIALSLALVTNSMAQTPAFDKPKVELHVHLDGSIKPETILYYGRRRGIA
LPANTAEGLLNVIGMDKPLTLPDFLAKFDYYMPAIAGCREAIKRIAYEFVEMKAKEG
VVYVEVRYSPHLLANSKVEPIPWNQAEGDLTPDEVVALVGQGLQEGERDFGVKARS
ILCCMRHQPNWSPKVVELCKKYQQQTVVAIDLAGDETIPGSSLLPGHVQAYQEAVK
SGIHRTVHAGEVGSAEVVKEAVDILKTERLGHGYHTLEDQALYNRLRQENMHFEICP
WSSYLTGAWKPDTEHAVIRLKNDQANYSLNTDDPLIFKSTLDTDYQMTKRDMGFTE
EEFKRLNINAAKSSFLPEDEKRELLDLLYKAYGMPPSASAGQNLSSDPKFWVLVVVG

GVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFA
AYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ
ALPPR

【００６８】

ADA2-CD28TM-CD3zeta（配列番号１７）

MLVDGPSERPALCFLLLAVAMSFFGSALSIDETRAHLLLKEKMMRLGGRLVLNTKEE
LANERLMTLKIAEMKEAMRTLIFPPSMHFFQAKHLIERSQVFNILRMMPKGAALHL
HDIGIVTMDWLVRNVTYRPHCHICFTPRGIMQFRFAHPTPRPSEKCSKWILLEDYRK
RVQNVTEFDDSLLRNFTLVTQHPEVIYTNQNVVWSKFETIFFTISGLIHYAPVFRDY
VFRSMQEFYEDNVLYMEIRARLLPVYELSGEHHDEEWSVKTYQEVAQKFVETHPEFI
GIKIIYSDHRSKDVAVIAESIRMAMGLRIKFPTVVAGFDLVGHEDTGHSLHDYKEAL
MIPAKDGVKLPYFFHAGETDWQGTSIDRNILDALMLNTTRIGHGFALSKHPAVRTYS
WKKDIPIEVCPISNQVLKLVSDLRNHPVATLMATGHPMVISSDDPAMFGAKGLSYD
FYEVFMGIGGMKADLRTLKQLAMNSIKYSTLLESEKNTFMEIWKKRWDKFIADVAT
KSSDPKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPT
RKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR
RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGHDGLYQGL
STATKDTYDALHMQALPPR

【００６９】

HER2-scFv-CD28TM-CD3zeta-ADA1-CD3-scFv-CD26（配列番号１８）

MDWIWRILFLVGAATGAHSEVQLQQSGPELKKPGETVKISCKASGYPFTNYGMNWV
KQAPGQGLKWMGWINTSTGESTFADDFKGRFDFSLETSANTAYLQINNLKSEDMAT
YFCARWEVYHGYVPYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSHKFLSTSV
GDRVSITCKASQDVYNAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASSRYTGVPSRFTGSGSGPDFT
FTISSVQAEDLAVYFCQQHFRTPFTFGSGTKLEIKALDLEPKSCDKTHTCPPCPDPKF
WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPY
APPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM
GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY
DALHMQALPPRDPKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNM
TPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG
HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMRRMQL
LLLIALSLALVTNSMAQTPAFDKPKVELHVHLDGSIKPETILYYGRRRGIALPANTAE
GLLNVIGMDKPLTLPDFLAKFDYYMPAIAGCREAIKRIAYEFVEMKAKEGVVYVEVR
YSPHLLANSKVEPIPWNQAEGDLTPDEVVALVGQGLQEGERDFGVKARSILCCMRH
QPNWSPKVVELCKKYQQQTVVAIDLAGDETIPGSSLLPGHVQAYQEAVKSGIHRTV
HAGEVGSAEVVKEAVDILKTERLGHGYHTLEDQALYNRLRQENMHFEICPWSSYLT
GAWKPDTEHAVIRLKNDQANYSLNTDDPLIFKSTLDTDYQMTKRDMGFTEEEFKRL
NINAAKSSFLPEDEKRELLDLLYKAYGMPPSASAGQNLSSGGGGSDIKLQQSGAELAR
PGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKAT
LTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGGSG
GGGSGGGGSDIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWI
YDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLE
LKSGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPMKTPWKVLLGLLGAAALVTIITVPVVLLNKGTD
DATADSRKTYTLTDYLKNTYRLKLYSLRWISDHEYLYKQENNILVFNAEYGNSSVFL
ENSTFDEFGHSINDYSISPDGQFILLEYNYVKQWRHSYTASYDIYDLNKRQLITEERI
PNNTQWVTWSPVGHKLAYVWNNDIYVKIEPNLPSYRITWTGKEDIIYNGITDWVYE
EEVFSAYSALWWSPNGTFLAYAQFNDTEVPLIEYSFYSDESLQYPKTVRVPYPKAGA
VNPTVKFFVVNTDSLSSVTNATSIQITAPASMLIGDHYLCDVTWATQERISLQWLRR

IQNYSVMDICDYDESSGRWNCLVARQHIEMSTTGWVGRFRPSEPHFTLDGNSFYKII
SNEEGYRHICYFQIDKKDCTFITKGTWEVIGIEALTSDYLYYISNEYKGMPGGRNLYK
IQLSDYTKVTCLSCELNPERCQYYSVSFSKEAKYYQLRCSGPGLPLYTLHSSVNDKGL
RVLEDNSALDKMLQNVQMPSKKLDFIILNETKFWYQMILPPHFDKSKKYPLLLDVY
AGPCSQKADTVFRLNWATYLASTENIIVASFDGRGSGYQGDKIMHAINRRLGTFEVE
DQIEAARQFSKMGFVDNKRIAIWGWSYGGYVTSMVLGSGSGVFKCGIAVAPVSRWE
YYDSVYTERYMGLPTPEDNLDHYRNSTVMSRAENFKQVEYLLIHGTADDNVHFQQS
AQISKALVDVGVDFQAMWYTDEDHGIASSTAHQHIYTHMSHFIKQCFSLP

【００７０】

HER2-scFv-CD28TM-CD3zeta-ADA2-CD3-scFv-CD26（配列番号１９）

MDWIWRILFLVGAATGAHSEVQLQQSGPELKKPGETVKISCKASGYPFTNYGMNWV
KQAPGQGLKWMGWINTSTGESTFADDFKGRFDFSLETSANTAYLQINNLKSEDMAT
YFCARWEVYHGYVPYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSHKFLSTSV
GDRVSITCKASQDVYNAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASSRYTGVPSRFTGSGSGPDFT
FTISSVQAEDLAVYFCQQHFRTPFTFGSGTKLEIKALDLEPKSCDKTHTCPPCPDPKF
WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPY
APPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM
GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY
DALHMQALPPRDPKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNM
TPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG
HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPGSGEGRG
SLLTCGDVEENPGPMLVDGPSERPALCFLLLAVAMSFFGSALSIDETRAHLLLKEKM
MRLGGRLVLNTKEELANERLMTLKIAEMKEAMRTLIFPPSMHFFQAKHLIERSQVFN
ILRMMPKGAALHLHDIGIVTMDWLVRNVTYRPHCHICFTPRGIMQFRFAHPTPRPS
EKCSKWILLEDYRKRVQNVTEFDDSLLRNFTLVTQHPEVIYTNQNVVWSKFETIFFT
ISGLIHYAPVFRDYVFRSMQEFYEDNVLYMEIRARLLPVYELSGEHHDEEWSVKTYQ
EVAQKFVETHPEFIGIKIIYSDHRSKDVAVIAESIRMAMGLRIKFPTVVAGFDLVGHE
DTGHSLHDYKEALMIPAKDGVKLPYFFHAGETDWQGTSIDRNILDALMLNTTRIGH
GFALSKHPAVTYSWKKDIPIEVCPISNQVLKLVSDLRNHPVATLMATGHPMVISSDD
PAMFGAKGLSYDFYEVFMGIGGMKADLRTLKQLAMNSIKYSTLLESEKNTFMEIWK
KRWDKFIADVATKSSGGGGSDIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHW
VKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAV
YYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPAIMSASP
GEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYS
LTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELKSGSGEGRGSLLTCGDVEENPGP
MKTPWKVLLGLLGAAALVTIITVPVVLLNKGTDDATADSRKTYTLTDYLKNTYRLKL
YSLRWISDHEYLYKQENNILVFNAEYGNSSVFLENSTFDEFGHSINDYSISPDGQFIL
LEYNYVKQWRHSYTASYDIYDLNKRQLITEERIPNNTQWVTWSPVGHKLAYVWNN
DIYVKIEPNLPSYRITWTGKEDIIYNGITDWVYEEEVFSAYSALWWSPNGTFLAYAQ
FNDTEVPLIEYSFYSDESLQYPKTVRVPYPKAGAVNPTVKFFVVNTDSLSSVTNATSI
QITAPASMLIGDHYLCDVTWATQERISLQWLRRIQNYSVMDICDYDESSGRWNCLV
ARQHIEMSTTGWVGRFRPSEPHFTLDGNSFYKIISNEEGYRHICYFQIDKKDCTFITK
GTWEVIGIEALTSDYLYYISNEYKGMPGGRNLYKIQLSDYTKVTCLSCELNPERCQY
YSVSFSKEAKYYQLRCSGPGLPLYTLHSSVNDKGLRVLEDNSALDKMLQNVQMPSK
KLDFIILNETKFWYQMILPPHFDKSKKYPLLLDVYAGPCSQKADTVFRLNWATYLAS
TENIIVASFDGRGSGYQGDKIMHAINRRLGTFEVEDQIEAARQFSKMGFVDNKRIAIW
GWSYGGYVTSMVLGSGSGVFKCGIAVAPVSRWEYYDSVYTERYMGLPTPEDNLDHY
RNSTVMSRAENFKQVEYLLIHGTADDNVHFQQSAQISKALVDVGVDFQAMWYTDE
DHGIASSTAHQHIYTHMSHFIKQCFSLP

【００７１】

HER2-scFv-CD28TM-CD3zeta-ADA1-CD3-scFv（配列番号２０）

MDWIWRILFLVGAATGAHSEVQLQQSGPELKKPGETVKISCKASGYPFTNYGMNWV
KQAPGQGLKWMGWINTSTGESTFADDFKGRFDFSLETSANTAYLQINNLKSEDMAT
YFCARWEVYHGYVPYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSHKFLSTSV
GDRVSITCKASQDVYNAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASSRYTGVPSRFTGSGSGPDFT
FTISSVQAEDLAVYFCQQHFRTPFTFGSGTKLEIKALDLEPKSCDKTHTCPPCPDPKF
WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPY
APPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM
GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY
DALHMQALPPRDPKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNM
TPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG
HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPMRRMQLLL
LIALSLALVTNSMAQTPAFDKPKVELHVHLDGSIKPETILYYGRRRGIALPANTAEGL
LNVIGMDKPLTLPDFLAKFDYYMPAIAGCREAIKRIAYEFVEMKAKEGVVYVEVRYS
PHLLANSKVEPIPWNQAEGDLTPDEVVALVGQGLQEGERDFGVKARSILCCMRHQP
NWSPKVVELCKKYQQQTVVAIDLAGDETIPGSSLLPGHVQAYQEAVKSGIHRTVHA
GEVGSAEVVKEAVDILKTERLGHGYHTLEDQALYNRLRQENMHFEICPWSSYLTGA
WKPDTEHAVIRLKNDQANYSLNTDDPLIFKSTLDTDYQMTKRDMGFTEEEFKRLNI
NAAKSSFLPEDEKRELLDLLYKAYGMPPSASAGQNLSSGGGGSDIKLQQSGAELARP
GASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATL
TTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGG
GGSGGGGSDIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIY
DTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLEL
KS

【００７２】

HER2-scFv-CD28TM-CD3zeta-ADA2-CD3-scFv（配列番号２１）

MDWIWRILFLVGAATGAHSEVQLQQSGPELKKPGETVKISCKASGYPFTNYGMNWV
KQAPGQGLKWMGWINTSTGESTFADDFKGRFDFSLETSANTAYLQINNLKSEDMAT
YFCARWEVYHGYVPYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSHKFLSTSV
GDRVSITCKASQDVYNAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASSRYTGVPSRFTGSGSGPDFT
FTISSVQAEDLAVYFCQQHFRTPFTFGSGTKLEIKALDLEPKSCDKTHTCPPCPDPKF
WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPY
APPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM
GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY
DALHMQALPPRDPKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNM
TPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG
HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPMLVDGPSE
RPALCFLLLAVAMSFFGSALSIDETRAHLLLKEKMMRLGGRLVLNTKEELANERLMT
LKIAEMKEAMRTLIFPPSMHFFQAKHLIERSQVFNILRMMPKGAALHLHDIGIVTMD
WLVRNVTYRPHCHICFTPRGIMQFRFAHPTPRPSEKCSKWILLEDYRKRVQNVTEF
DDSLLRNFTLVTQHPEVIYTNQNVVWSKFETIFFTISGLIHYAPVFRDYVFRSMQEF
YEDNVLYMEIRARLLPVYELSGEHHDEEWSVKTYQEVAQKFVETHPEFIGIKIIYSDH
RSKDVAVIAESIRMAMGLRIKFPTVVAGFDLVGHEDTGHSLHDYKEALMIPAKDGVK
LPYFFHAGETDWQGTSIDRNILDALMLNTTRIGHGFALSKHPAVRTYSWKKDIPIEV
CPISNQVLKLVSDLRNHPVATLMATGHPMVISSDDPAMFGAKGLSYDFYEVFMGIG
GMKADLRTLKQLAMNSIKYSTLLESEKNTFMEIWKRWDKFIADVATKSSGGGGSDIK
LQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTN

YNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTL
TVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQ
KSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNP
LTFGAGTKLELKS

【００７３】

ADA1-CD3-scFv-CD26（配列番号２２）

MRRMQLLLLIALSLALVTNSMAQTPAFDKPKVELHVHLDGSIKPETILYYGRRRGIA
LPANTAEGLLNVIGMDKPLTLPDFLAKFDYYMPAIAGCREAIKRIAYEFVEMKAKEG
VVYVEVRYSPHLLANSKVEPIPWNQAEGDLTPDEVVALVGQGLQEGERDFGVKARS
ILCCMRHQPNWSPKVVELCKKYQQQTVVAIDLAGDETIPGSSLLPGHVQAYQEAVK
SGIHRTVHAGEVGSAEVVKEAVDILKTERLGHGYHTLEDQALYNRLRQENMHFEICP
WSSYLTGAWKPDTEHAVIRLKNDQANYSLNTDDPLIFKSTLDTDYQMTKRDMGFTE
EEFKRLNINAAKSSFLPEDEKRELLDLLYKAYGMPPSASAGQNLSSGGGGSDIKLQQS
GAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQK
FKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS
GGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGT
SPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFG
AGTKLELKSGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPMKTPWKVLLGLLGAAALVTIITVPVVL
LNKGTDDATADSRKTYTLTDYLKNTYRLKLYSLRWISDHEYLYKQENNILVFNAEYG
NSSVFLENSTFDEFGHSINDYSISPDGQFILLEYNYVKQWRHSYTASYDIYDLNKRQL
ITEERIPNNTQWVTWSPVGHKLAYVWNNDIYVKIEPNLPSYRITWTGKEDIIYNGIT
DWVYEEEVFSAYSALWWSPNGTFLAYAQFNDTEVPLIEYSFYSDESLQYPKTVRVP
YPKAGAVNPTVKFFVVNTDSLSSVTNATSIQITAPASMLIGDHYLCDVTWATQERIS
LQWLRRIQNYSVMDICDYDESSGRWNCLVARQHIEMSTTGWVGRFRPSEPHFTLDG
NSFYKIISNEEGYRHICYFQIDKKDCTFITKGTWEVIGIEALTSDYLYYISNEYKGMPG
GRNLYKIQLSDYTKVTCLSCELNPERCQYYSVSFSKEAKYYQLRCSGPGLPLYTLHSS
VNDKGLRVLEDNSALDKMLQNVQMPSKKLDFIILNETKFWYQMILPPHFDKSKKYP
LLLDVYAGPCSQKADTVFRLNWATYLASTENIIVASFDGRGSGYQGDKIMHAINRRL
GTFEVEDQIEAARQFSKMGFVDNKRIAIWGWSYGGYVTSMVLGSGSGVFKCGIAVAP
VSRWEYYDSVYTERYMGLPTPEDNLDHYRNSTVMSRAENFKQVEYLLIHGTADDNV
HFQQSAQISKALVDVGVDFQAMWYTDEDHGIA SSTAHQHIYTHMSHFIKQCFSLP

【００７４】

ADA2-CD3-scFv-CD26（配列番号２３）

MLVDGPSERPALCFLLLAVAMSFFGSALSIDETRAHLLLKEKMMRLGGRLVLNTKEE
LANERLMTLKIAEMKEAMRTLIFPPSMHFFQAKHLIERSQVFNILRMMPKGAALHL
HDIGIVTMDWLVRNVTYRPHCHICFTPRGIMQFRFAHPTPRPSEKCSKWILLEDYRK
RVQNVTEFDDSLLRNFTLVTQHPEVIYTNQNVVWSKFETIFFTISGLIHYAPVFRDY
VFRSMQEFYEDNVLYMEIRARLLPVYELSGEHHDEEWSVKTYQEVAQKFVETHPEFI
GIKIIYSDHRSKDVAVIAESIRMAMGLRIKFPTVVAGFDLVGHEDTGHSLHDYKEAL
MIPAKDGVKLPYFFHAGETDWQGTSIDRNILDALMLNTTRIGHGFALSKHPAVRTYS
WKKDIPIEVCPISNQVLKLVSDLRNHPVATLMATGHPMVISSDDPAMFGAKGLSYD
FYEVFMGIGGMKADLRTLKQLAMNSIKYSTLLESEKNTFMEIWKKRWDKFIADVAT
KSSGGGGSDIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWI
GYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYC
LDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSS
VSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEADAATYY
CQQWSSNPLTFGAGTKLELKSGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPMKTPWKVLLGLLGA
AALVTIITVPVVLLNKGTDDATADSRKTYTLTDYLKNTYRLKLYSLRWISDHEYLYK
QENNILVFNAEYGNSSVFLENSTFDEFGHSINDYSISPDGQFILLEYNYVKQWRHSYT
ASYDIYDLNKRQLITEERIPNNTQWVTWSPVGHKLAYVWNNDIYVKIEPNLPSYRIT

WTGKEDIIYNGITDWVYEEEVFSAYSALWWSPNGTFLAYAQFNDTEVPLIEYSFYSD
ESLQYPKTVRVPYPKAGAVNPTVKFFVVNTDSLSSVTNATSIQITAPASMLIGDHYL
CDVTWATQERISLQWLRRIQNYSVMDICDYDESSGRWNCLVARQHIEMSTTGWVG
RFRPSEPHFTLDGNSFYKIISNEEGYRHICYFQIDKKDCTFITKGTWEVIGIEALTSDY
LYYISNEYKGMPGGRNLYKIQLSDYTKVTCLSCELNPERCQYYSVSFSKEAKYYQLR
CSGPGLPLYTLHSSVNDKGLRVLEDNSALDKMLQNVQMPSKKLDFIILNETKFWYQ
MILPPHFDKSKKYPLLLDVYAGPCSQKADTVFRLNWATYLASTENIIVASFDGRGSG
YQGDKIMHAINRRLGTFEVEDQIEAARQFSKMGFVDNKRIAIWGWSYGGYVTSMVL
GSGSGVFKCGIAVAPVSRWEYYDSVYTERYMGLPTPEDNLDHYRNSTVMSRAENFK
QVEYLLIHGTADDNVHFQQSAQISKALVDVGVDFQAMWYTDEDHGIASSTAHQHIY
THMSHFIKQCFSLP

【００７５】

ＡＤＡ１-ＣＤ３-ｓｃＦｖ（配列番号２４）

MRRMQLLLLIALSLALVTNSMAQTPAFDKPKVELHVHLDGSIKPETILYYGRRRGIA
LPANTAEGLLNVIGMDKPLTLPDFLAKFDYYMPAIAGCREAIKRIAYEFVEMKAKEG
VVYVEVRYSPHLLANSKVEPIPWNQAEGDLTPDEVVALVGQGLQEGERDFGVKARS
ILCCMRHQPNWSPKVVELCKKYQQQTVVAIDLAGDETIPGSSLLPGHVQAYQEAVK
SGIHRTVHAGEVGSAEVVKEAVDILKTERLGHGYHTLEDQALYNRLRQENMHFEICP
WSSYLTGAWKPDTEHAVIRLKNDQANYSLNTDDPLIFKSTLDTDYQMTKRDMGFTE
EEFKRLNINAAKSSFLPEDEKRELLDLLYKAYGMPPSASAGQNLSSGGGGSDIKLQQS
GAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQK
FKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS
GGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGT
SPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFG
AGTKLELKS

【００７６】

ＡＤＡ２-ＣＤ３-ｓｃＦｖ（配列番号２５）

MLVDGPSERPALCFLLLAVAMSFFGSALSIDETRAHLLLKEKMMRLGGRLVLNTKEE
LANERLMTLKIAEMKEAMRTLIFPPSMHFFQAKHLIERSQVFNILRMMPKGAALHL
HDIGIVTMDWLVRNVTYRPHCHICFTPRGIMQFRFAHPTPRPSEKCSKWILLEDYRK
RVQNVTEFDDSLLRNFTLVTQHPEVIYTNQNVVWSKFETIFFTISGLIHYAPVFRDY
VFRSMQEFYEDNVLYMEIRARLLPVYELSGEHHDEEWSVKTYQEVAQKFVETHPEFI
GIKIIYSDHRSKDVAVIAESIRMAMGLRIKFPTVVAGFDLVGHEDTGHSLHDYKEAL
MIPAKDGVKLPYFFHAGETDWQGTSIDRNILDALMLNTTRIGHGFALSKHPAVRTYS
WKKDIPIEVCPISNQVLKLVSDLRNHPVATLMATGHPMVISSDDPAMFGAKGLSYD
FYEVFMGIGGMKADLRTLKQLAMNSIKYSTLLESEKNTFMEIWKKRWDKFIADVAT
KSSGGGGSDIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWI
GYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYC
LDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSS
VSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATY
YCQQWSSNPLTFGAGTKLELKS

【００７７】

ＣＤ２８-ＴＭ（配列番号２６）

DPKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRK
HYQPYAPPRDFAAYRS

【００７８】

ＣＤ３-ｚｅｔａ（配列番号２７）

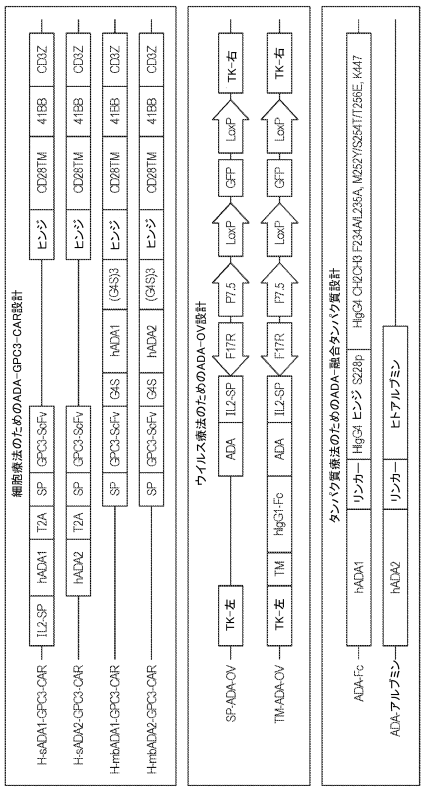
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE
GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

【００７９】

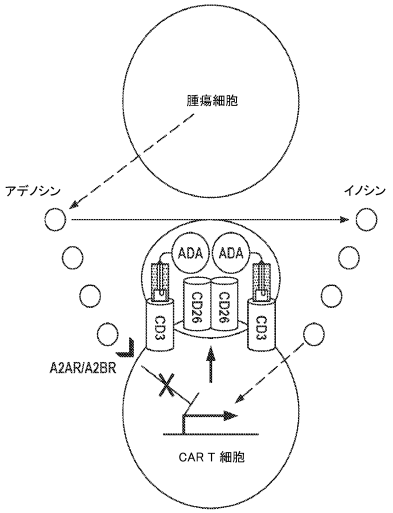
G4S linker（配列番号２８）
GGGGSGGGGSGGGGS
【００８０】
CD3-scFv（配列番号２９）
DIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRG
YTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQG
TTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWY
QQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSS
NPLTFGAGTKLELKS
【００８１】
T2A sequence（配列番号３０）
GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP
【００８２】
P2A sequence（配列番号３１）
GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP
【００８３】
IL2 leadersequence（配列番号３２）
MRRMQLLLLIALSLALVTNS
【００８４】
「実質的に」という用語は、大部分がしかし必ずしも完全にではなく、指定されたものであると、当業者によって理解されるものとして定義される。任意の開示された実施形態において、「実質的に」「約」「一般的に」および「おおよそ」は、指定されたものの「［パーセント］以内」で代用されるかもしれず、パーセントは０．１、１、５、および１０パーセントを含む。
【００８５】
前述は、当業者が本開示の様態をより理解できるように、いくつかの実施形態の特徴を概説する。当業者は、彼らが本開示を、同じ目的を遂行するためのほかのプロセスや構造をデザインまたは修正すること、および／またはここで紹介された実施形態と同じ利点を実現することのための根拠として、容易に利用できることを認めるべきである。当業者はまた、そのような等価構造が、本開示の趣旨及び範囲から逸脱しないこと、及び、本開示の趣旨及び範囲から逸脱することなく、彼らがここで様々な変更、置換、および代替をおこなうかもしれないこと、を認識するべきである。本発明の範囲は、以下の特許請求の範囲の文言によってのみ決定されるべきである。特許請求の範囲内で「含む」は、請求項内の列挙された要素のリストがオープングループであるような「少なくとも含む」を意味することを意図している。用語「ａ」、「ａｎ」および他の単数形は、特に除外されない限りそれらの複数形を含むことを意図している。

【図面】

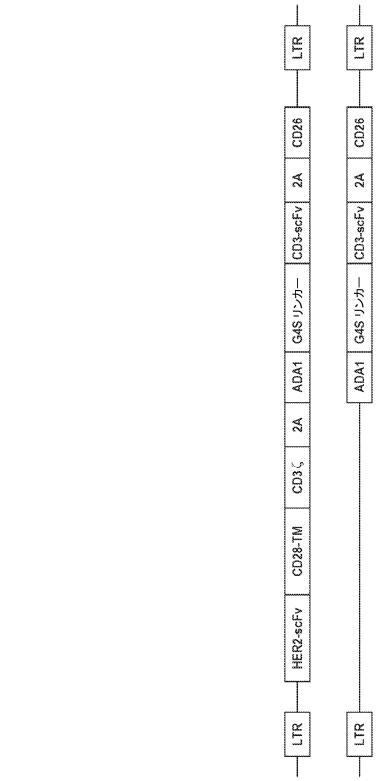
【図１】


細胞療法のためのADA-GPC3-CAR設計
H-sADA1-GPC3-CAR
H-sADA2-GPC3-CAR
H-mtADA1-GPC3-CAR
H-mtADA2-GPC3-CAR
IL2-SP
hADA1
hADA2
T2A
SP
GPC3-ScFv
GPC3-ScFv
GPC3-ScFv
GPC3-ScFv
GAS
hADA1
hADA2
(GAS)3
ヒンジ
CD28TM
4-1BB
CD3Z
ウイルス療法のためのADA-OV設計
SP-ADA-OV
TM-ADA-OV
TK-左
TM
HgG1-Fc
ADA
IL2-SP
F17R
F7.5
LoxP
GFP
TK-右
タンパク質療法のためのADA-融合タンパク質設計
ADA-Fc
ADA-アルブミン
hADA1
hADA2
リンカー
HgG4
ヒンジ
S228p
HgG4 CH2CH3 F234A/L235A, M252Y/S254T/T256E, K447
ヒトアルブミン

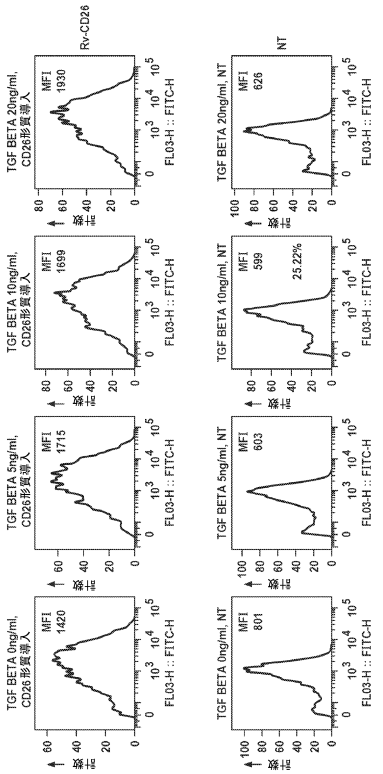
【図２】


腫瘍細胞
アデノシン
イノシン
ADA
ADA
CD26
CD26
CD3
CD3
A2AR/A2BR
CAR T 細胞

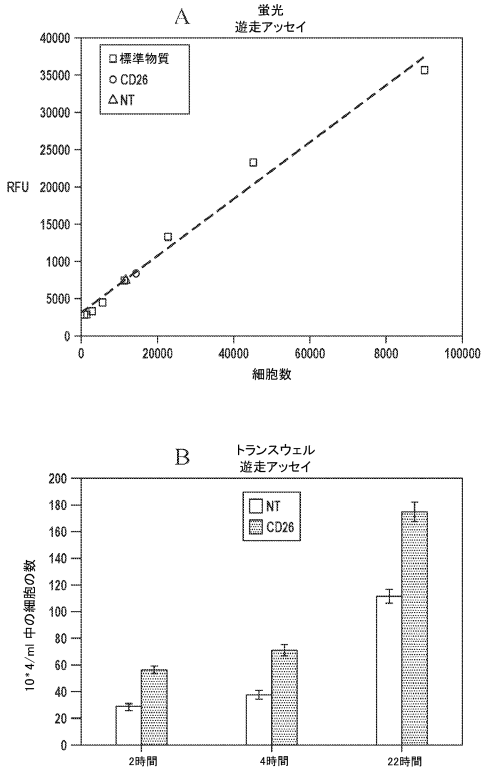
【図３】


LTR
HER2-scFv
CD28-TM
CD3ζ
2A
ADA1
G4S リンカー
CD3-scFv
2A
CD26
LTR
ADA1
G4S リンカー
CD3-scFv
2A
CD26
LTR

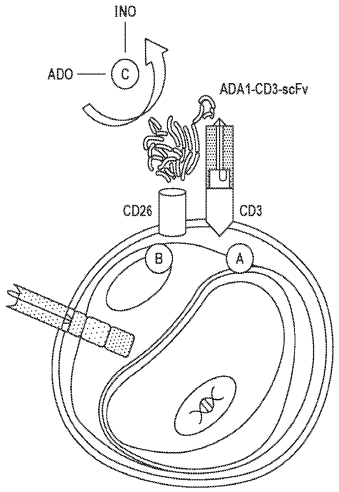
【図４】


Rv-CD26
NT
TGF BETA 20ng/ml, CD26形質導入
TGF BETA 10ng/ml, CD26形質導入
TGF BETA 5ng/ml, CD26形質導入
TGF BETA 0ng/ml, CD26形質導入
TGF BETA 20ng/ml, NT
TGF BETA 10ng/ml, NT
TGF BETA 5ng/ml, NT
TGF BETA 0ng/ml, NT
MFI 1930
MFI 1699
MFI 1715
MFI 1420
MFI 626
MFI 599
25.22%
MFI 603
MFI 801
FL03-H :: FITC-H
頻度

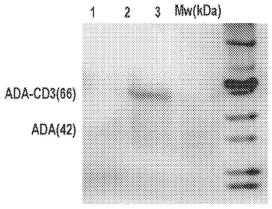
【図５Ａ－Ｂ】



【図６】

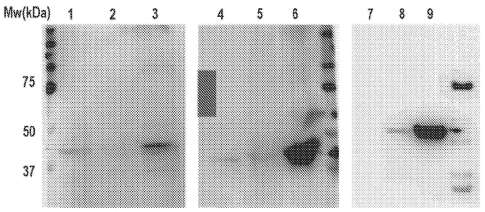


【図７Ａ】



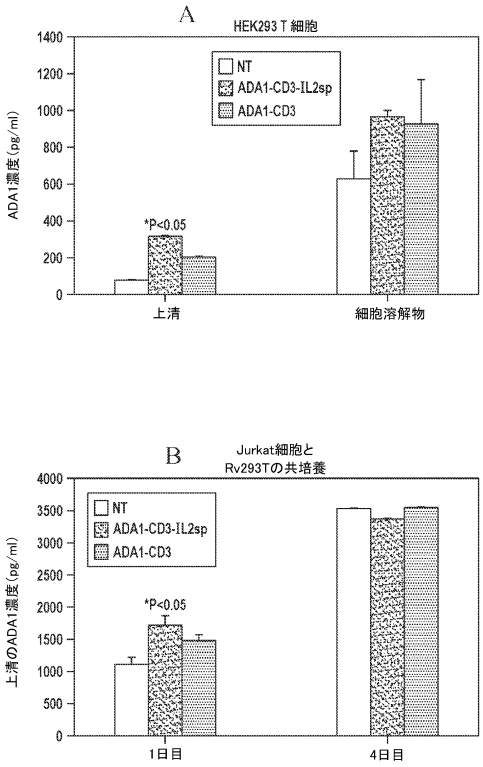
1. HEK293T細胞　NT
2. HEK293T細胞　Rv-ADA-CD3-IL2sp
3. HEK293T細胞
Rv-ADA-CD3 (IL2spなし)

【図７Ｂ】

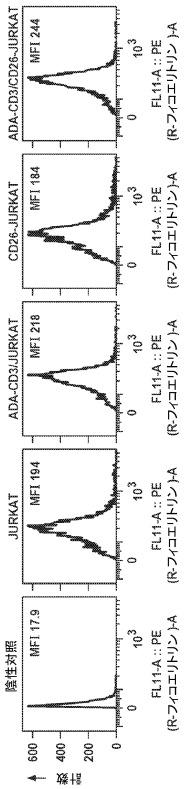


1. Jurkat細胞 NT
2. Jurkat細胞 LENTI-ADA活性化（7日目）
3. Jurkat細胞 Rv-ADA-IL2sp（7日目）
4. Jurkat細胞 NT
5. Jurkat細胞 LENTI-ADA活性化（14日目）
6. Jurkat細胞 Rv-ADA-IL2sp（14日目）
7. Jurkat細胞 NT
8. Jurkat細胞 LENTI-ADA活性化（18日目）
9.Jurkat細胞 Rv-ADA-IL2sp（18日目）

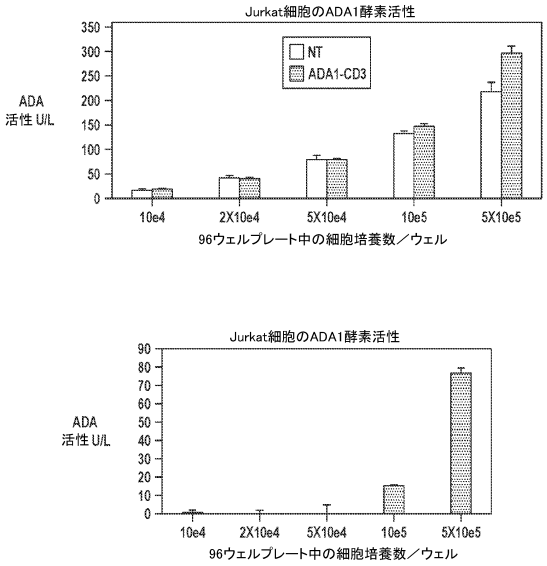
【図８Ａ－Ｂ】



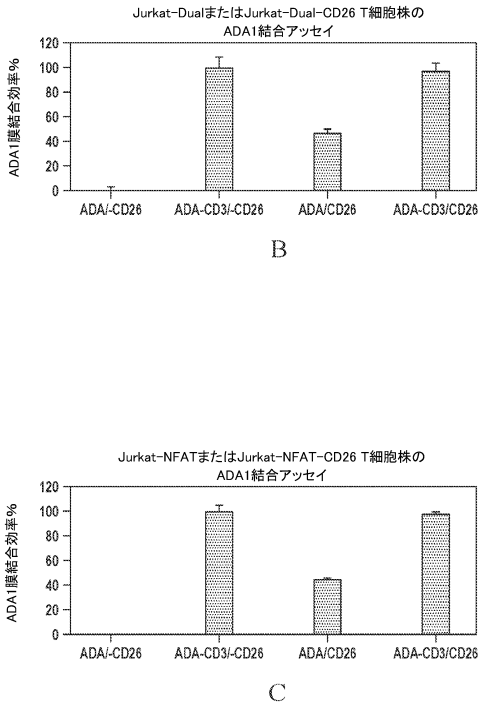
【図８Ｃ】



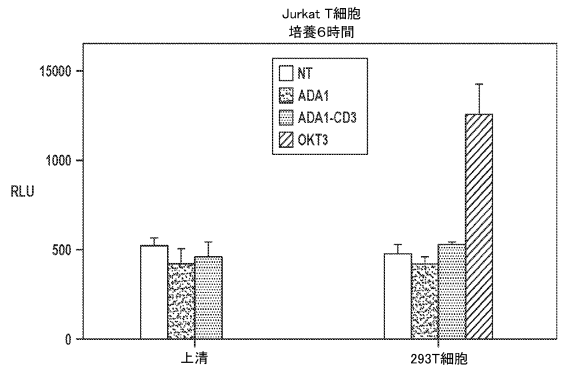
【図９Ａ】



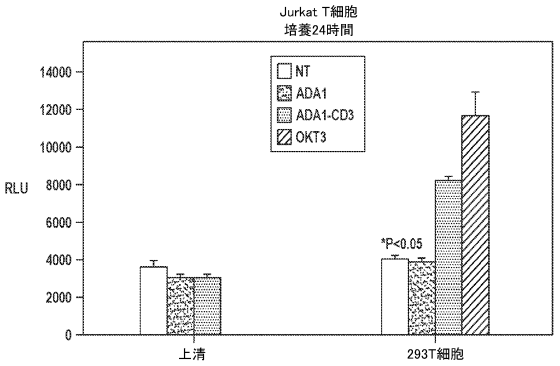
【図９Ｂ－Ｃ】



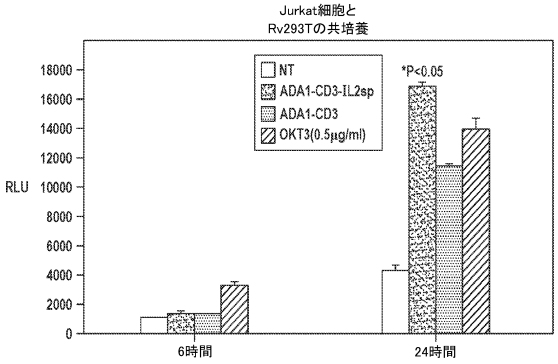
【図１０Ａ】



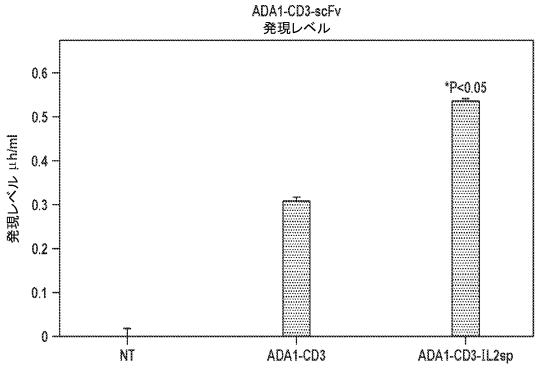
【図１０Ｂ】



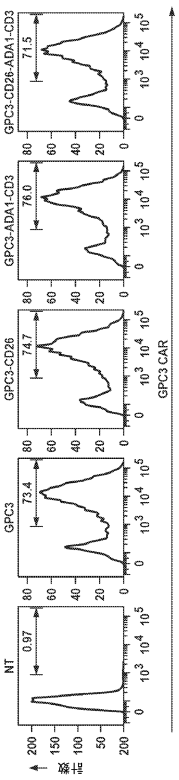
【図１０Ｃ】



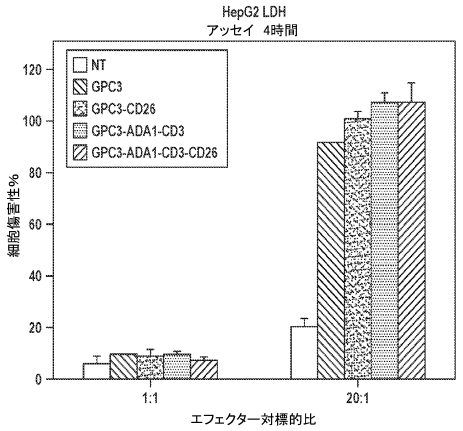
【図１０Ｄ】



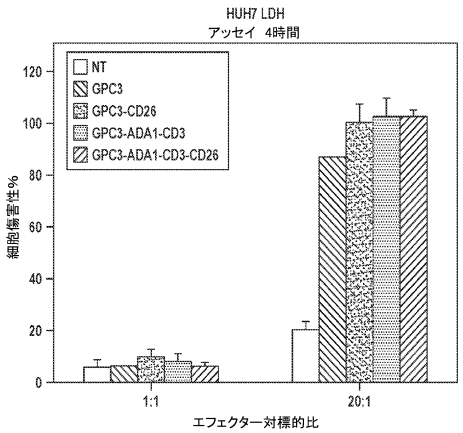
【図１１Ａ】



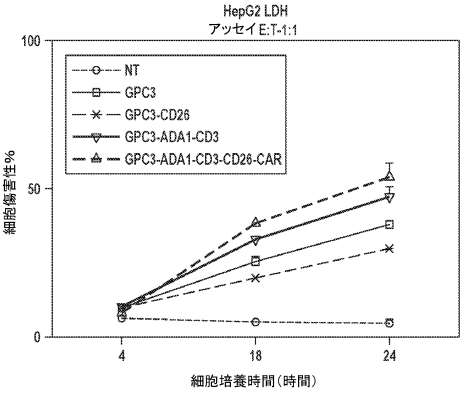
【図１１Ｂ】



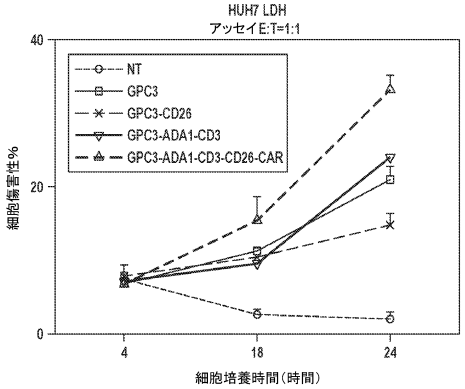
【図１１Ｃ】



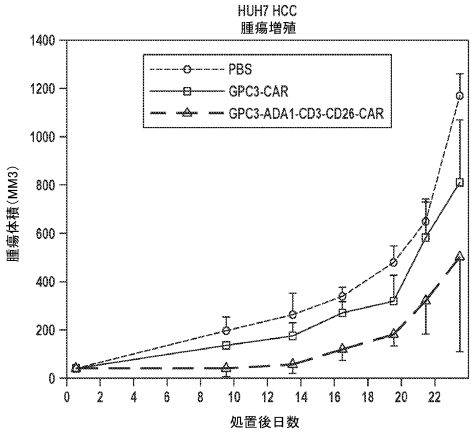
【図１１Ｄ】



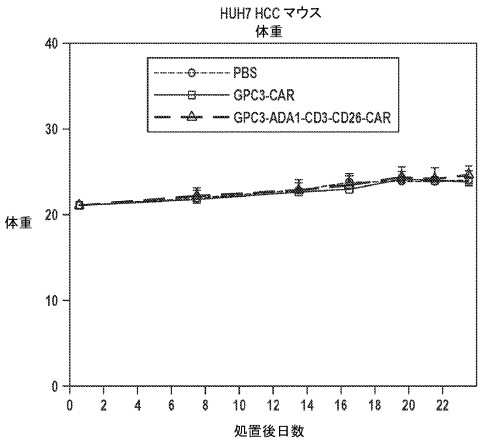
【図１１Ｅ】



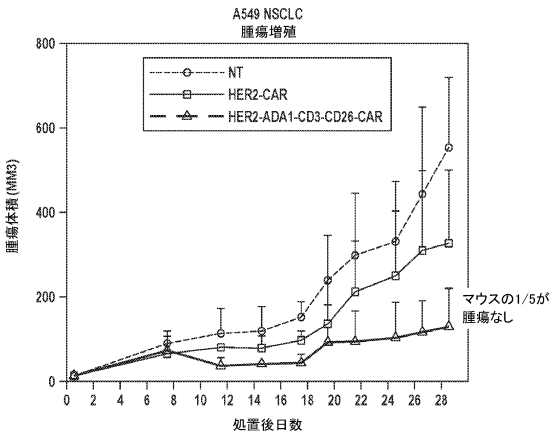
【図１２Ａ】



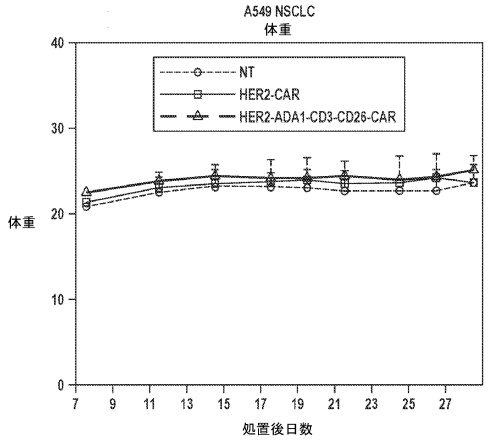
【図１２Ｂ】



【図１２Ｃ】



【図１２Ｄ】



【配列表】

<u>２０２４５３３１０９０００００１．ｘｍｌ</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/42183

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - INV. C12N 9/78, A61K 35/17, C12N 5/0783 (2022.01)
ADD. A61P 35/00 (2022.01)
CPC - INV. C12N 9/78, C12Y 305/04004, A61K 35/17, C12N 5/0636, C07K 2319/01
ADD. A61P 35/00, C12N 2510/00, C12N 2310/20
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)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/120982 A2 (AUTOLUS LIMITED) 18 June 2020 (18.06.2020) pg 4 ln 13, pg 34 ln 24-32, claims 1, 12-14.	1-3
A	WO 2020/168122 A1 (BEAM THERAPEUTICS, INC.) 20 August 2020 (20.08.2020) pg 2 ln 24-25, claim 1, claim 47.	1-3
A	US 2018/0216095 A1 (HALOZYME, INC.) 2 August 2018 (02.08.2018) claims 31-35.	1-3

☐ 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"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	Date of mailing of the international search report
22 November 2022	JAN 13 2023
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Kari Rodriquez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/42193

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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/42193

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.: 4-21, 28-48, 51-52, 56, 59-61
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
---continued on Extra 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 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.:
Claims 1-3

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/42193

Continuation of Box III: Observations where Unity of Invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I: Claims 1-3, drawn to an engineered cell comprising a nucleotide sequence encoding an Adenosine deaminase (ADA).

Group II: Claims 22-27, drawn to a recombinant oncolytic virus comprising a nucleotide sequence encoding an ADA, wherein the nucleotide sequence encoding the ADA is operably linked to a promoter.

Group III: Claims 49-50, 53-55, 57-58, drawn to a recombinant protein comprising an amino acid sequence encoding an ADA.

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features:

Group I has the special technical feature of an engineered cell comprising a nucleotide sequence encoding an Adenosine deaminase (ADA), not required by Groups II or III.

Group II has the special technical feature of a recombinant oncolytic virus comprising a nucleotide sequence encoding an ADA, wherein the nucleotide sequence encoding the ADA is operably linked to a promoter, not required by Groups I or III.

Group III has the special technical feature of a recombinant protein comprising an amino acid sequence encoding an ADA, not required by Groups I or II.

Common Technical Feature:

Groups I-III share the common technical feature of the enzyme, adenosine deaminase (ADA), or a nucleic acid encoding it.

However, said common technical feature does not represent a contribution over the prior art, and is disclosed by US 8,071,741 B2 to Filpula et al. (hereinafter "Filpula").

As to the common technical feature, Filpula discloses the recombinant enzyme, adenosine deaminase (ADA), and a nucleic acid encoding it (claims 1-2; 1. "An isolated recombinant adenosine deaminase comprising the polypeptide of SEQ ID NO:1, or an isolated recombinant adenosine deaminase variant polypeptide of SEQ ID NO:1, wherein the polypeptide variant of SEQ ID NO:1 comprises one or more amino acid substitutions selected from the group consisting of: Gln in place of Lys198; Ala in place of Thr245; and Arg in place of Gly351. 2. The recombinant adenosine deaminase of claim 1 that is encoded by the DNA molecule of SEQ ID NO: 2").

As the common technical feature was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a common special technical feature that would otherwise unify the groups. The inventions lack unity with one another.

Therefore, Groups I-III lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Note concerning claim 50: Claim 50 is written to depend from claim 47, but claim 47 does not have antecedent precedence to "recombinant protein". For the purposes of the International Search & Opinion, claim 50 is interpreted to depend from claim 49, which does have antecedent precedent to "recombinant protein".

Note concerning claim 57: Claim 57 is written to depend from claim 47, but claim 47 does not have antecedent precedence to "recombinant protein". For the purposes of the International Search & Opinion, claim 57 is interpreted to depend from claim 49, which does have antecedent precedent to "recombinant protein".

Item 4 (continued): Claims 4-21, 28-48, 51-52, 56, 59-61 are dependent claims and are not drafted according to the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*7/01 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	7/01		
Ｃ１２Ｎ	*9/80 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	9/80		
Ａ６１Ｋ	*39/395 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｎ	
Ａ６１Ｐ	*35/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
Ａ６１Ｋ	*35/768 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/768		
Ａ６１Ｋ	*35/763 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/763		
Ａ６１Ｋ	*35/761 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/761		
Ａ６１Ｋ	*38/16 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/16		
Ｃ０７Ｋ	*19/00 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	19/00		
Ｃ０７Ｋ	*16/00 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/00		
Ｃ０７Ｋ	*14/705 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/705		
Ｃ０７Ｋ	*14/76 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/76		
Ｃ１２Ｎ	*15/13 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/13		
Ｃ１２Ｎ	*15/62 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/62	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/55 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/55		
Ａ６１Ｋ	*35/17 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/17		
Ａ６１Ｋ	*35/28 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/28		

,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,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,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

園田・小林弁理士法人

(72)発明者　ソン， シャオトン

アメリカ合衆国 テキサス ７７５８４， パーランド， ロッキー ポイント ドライブ ３０１２

(72)発明者　ワン， ルオニン

アメリカ合衆国 オハイオ ４３２０５， コロンバス， チルドレンズ ドライブ ７００， ルーム ダブリューエー５０１６

(72)発明者　サルカール， アビジット

アメリカ合衆国 テキサス ７７０３０， ヒューストン， ウェスト ホルコム ブールヴァード ２１２１

(72)発明者　フー， ユエ

中華人民共和国 ベイジン， フェンタイ ディストリクト， イーハイフアユアン

Ｆターム（参考）　4B065　AA90X AA90Y AA94X AA94Y AA95X AA95Y AB01 AC14 CA24 CA25 CA44

4C084　AA02 AA03 BA01 BA08 BA22 BA23 DC50 NA05 ZB26

4C085　AA16 BB01 CC23

4C087　AA01 AA02 BC83 CA12 NA05 ZB26

4H045　AA10 AA20 AA30 BA41 CA40 DA50 DA76 DA89 EA20 FA74