(19)日本国特許庁(JP)　　(12)公表特許公報(A)　　(11)公表番号
特表2022-530037
(P2022-530037A)
(43)公表日　令和4年6月27日(2022.6.27)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ　15/62　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	15/62	ＺＺＮＡ	４Ｂ０６４
Ｃ１２Ｎ　15/12　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	15/12		４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ　15/13　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	15/13		４Ｃ０７６
Ｃ１２Ｎ　15/117(2010.01)		Ｃ１２Ｎ	15/117	Ｚ	４Ｃ０８４
Ｃ１２Ｎ　5/10　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	5/10		４Ｃ０８５

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全164頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2021-562962(P2021-562962)
(86)(22)出願日　令和2年4月22日(2020.4.22)
(85)翻訳文提出日　令和3年12月14日(2021.12.14)
(86)国際出願番号　PCT/US2020/029344
(87)国際公開番号　WO2020/219563
(87)国際公開日　令和2年10月29日(2020.10.29)
(31)優先権主張番号　62/836,977
(32)優先日　平成31年4月22日(2019.4.22)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/943,679
(32)優先日　令和1年12月4日(2019.12.4)
(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　519032826
ティーシーアール２　セラピューティクス　インク．
アメリカ合衆国　０２１４２　マサチューセッツ州　ケンブリッジ　ビニー・ストリート　１００　スイート　７１０
(74)代理人　100118902
弁理士　山本　修
(74)代理人　100106208
弁理士　宮前　徹
(74)代理人　100196508
弁理士　松尾　淳一
(74)代理人　100122644
弁理士　寺地　拓己
(72)発明者　キーファー－クォン，フィリップ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　融合タンパク質を使用するＴＣＲ再プログラミングのための組成物及び方法

(57)【要約】
本明細書で提供するのは、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）融合タンパク質（ＴＦＰ）をコードする組み換え核酸、コードされた分子を発現する改変ヒト免疫細胞、及びがんを含めた疾患の治療のためのその使用方法である。
【選択図】図１

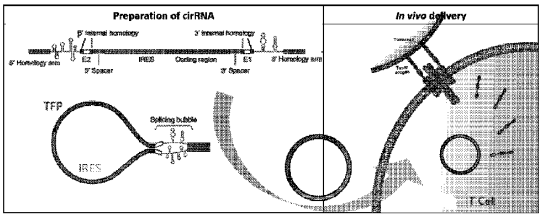


FIG. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
（Ａ）Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）融合タンパク質（ＴＦＰ）をコードする１つまたは複数のリボ核酸（ＲＮＡ）配列と、
（Ｂ）１つまたは複数の配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）と、を含み、
（Ａ）と（Ｂ）とが作動可能に連結されて環状組み換え核酸分子を形成する、単離された組み換え核酸分子であって、
前記ＴＦＰが、
（ａ）ＴＣＲサブユニットであって、
（ｉ）ＴＣＲ細胞外ドメインの少なくとも一部分
（ｉｉ）膜貫通ドメイン、及び
（ｉｉｉ）ＴＣＲ細胞内ドメイン
を含み、
前記ＴＣＲサブユニットの前記細胞外、膜貫通、及び／または細胞内ドメインが、ＣＤ３εまたはＣＤ３γまたはＣＤ３δまたはＴＣＲαまたはＴＣＲβまたはＴＣＲδまたはＴＣＲγに由来する、前記ＴＣＲサブユニットと、
（ｂ）抗原結合ドメインと
を含み、
前記ＴＣＲサブユニットと前記抗原結合ドメインとが作動可能に連結されており、
前記ＴＦＰが、Ｔ細胞に発現されたときにＴＣＲに組み込まれる、
前記単離された組み換え核酸分子。
【請求項２】
前記ＴＣＲ細胞内ドメインが、ＣＤ３εまたはＣＤ３γまたはＣＤ３δに由来する刺激ドメインを含む、請求項１に記載の単離された組み換え核酸分子。
【請求項３】
前記抗原結合ドメインが、抗体または抗体断片を含む、請求項１または２に記載の単離された組み換え核酸分子。
【請求項４】
（Ａ）の５’末端及び（Ｂ）の３’末端の近位にある（Ｃ）核酸スペーサー配列であって、
（Ｃ）が線状核酸の環状化によって形成される、前記核酸スペーサー配列をさらに含む、
請求項１～３のいずれか１項に記載の単離された組み換え核酸分子。
【請求項５】
前記スペーサー配列が約３０～１００ヌクレオチド長である、請求項４に記載の単離された組み換え核酸分子。
【請求項６】
前記線状核酸の環状化が環状ＲＮＡ分子を生成する、請求項１～５のいずれか１項に記載の単離された組み換え核酸分子。
【請求項７】
環状組み換え核酸分子が外因性である、請求項６に記載の単離された組み換え核酸分子。
【請求項８】
前記ＩＲＥＳが、コクサッキーウイルスＢ３（ＣＶＢ３）または脳心筋炎ウイルス（ＥＭＣＶ）からのＩＲＥＳ配列を含む、請求項１～７のいずれか１項に記載の単離された組み換え核酸分子。
【請求項９】
前記環状組み換え核酸分子が、同種異系または自己ヒト免疫細胞に形質移入または形質導入するのに適している、請求項１～８のいずれか１項に記載の単離された組み換え核酸分子。
【請求項１０】
（Ａ）キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）またはＴ細胞受容体（ＴＣＲ）をコードする１つまたは複数のリボ核酸（ＲＮＡ）配列と、（Ｂ）１つまたは複数の配列内リボソーム進入部位

（ＩＲＥＳ）とを含み、（Ａ）と（Ｂ）とが作動可能に連結されて環状組み換え核酸分子を形成する、単離された組み換え核酸分子。
【請求項１１】
（Ａ）の５’末端及び（Ｂ）の３’末端の近位にある（Ｃ）核酸スペーサー配列であって、（Ｃ）が線状核酸の環状化によって形成される、前記核酸スペーサー配列をさらに含む、請求項１０に記載の単離された組み換え核酸分子。
【請求項１２】
前記スペーサー配列が約３０～１００ヌクレオチド長である、請求項１１に記載の単離された組み換え核酸分子。
【請求項１３】
前記単離された組み換え核酸分子が外因性である、請求項１０～１２のいずれか１項に記載の環状組み換え核酸分子。
【請求項１４】
前記ＩＲＥＳが、コクサッキーウイルスＢ３（ＣＶＢ３）または脳心筋炎ウイルス（ＥＭＣＶ）から得られたＩＲＥＳをさらに含む、請求項１０～１３のいずれか１項に記載の単離された組み換え核酸分子。
【請求項１５】
（Ａ）Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）融合タンパク質（ＴＦＰ）をコードする１つまたは複数のデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）配列と、
（Ｂ）１つまたは複数の配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）を含む１つまたは複数のＤＮＡ配列と、
（Ｃ）５’相同配列の少なくとも１つ及び３’順序交換イントロン－エキソン（ＰＩＥ）配列を含む第１の環状化ドメインを含む１つまたは複数のＤＮＡ配列と、
（Ｄ）３’相同配列の少なくとも１つ及び５’ＰＩＥ配列を含む第２の環状化ドメインを含む１つまたは複数のＤＮＡ配列と
を含み、
（Ａ）と（Ｂ）とが作動可能に連結されている、単離された組み換え核酸分子であって、
前記ＴＦＰが、
（ａ）ＴＣＲサブユニットであって、
（ｉ）ＴＣＲ細胞外ドメインの少なくとも一部分、
（ｉｉ）膜貫通ドメイン、及び
（ｉｉｉ）ＴＣＲ細胞内ドメイン
を含み、
前記ＴＣＲサブユニットの前記細胞外、膜貫通、及び／または細胞内ドメインが、ＣＤ３εまたはＣＤ３γまたはＣＤ３δまたはＴＣＲαまたはＴＣＲβまたはＴＣＲδまたはＴＣＲγに由来する、前記ＴＣＲサブユニットと、
（ｂ）抗原結合ドメインと
を含み、
前記ＴＣＲサブユニットと前記抗原結合ドメインとが作動可能に連結されており、
前記ＴＦＰが、Ｔ細胞に発現されたときにＴＣＲに組み込まれる、
前記単離された組み換え核酸分子。
【請求項１６】
前記ＴＣＲ細胞内ドメインが、ＣＤ３εまたはＣＤ３γまたはＣＤ３δに由来する刺激ドメインを含む、請求項１５に記載の単離された組み換え核酸分子。
【請求項１７】
前記抗原結合ドメインが、抗体または抗体断片を含む、請求項１５または１６に記載の単離された組み換え核酸分子。
【請求項１８】
（Ａ）～（Ｄ）が、（Ｃ）－（Ｂ）－（Ａ）－（Ｄ）の向きで作動可能に連結されている、請求項１５～１７のいずれか１項に記載の単離された組み換え核酸分子。

【請求項１９】
前記１つまたは複数のＤＮＡ配列が、少なくとも１つのスペーサー配列をさらに含む、請求項１５～１８のいずれか１項に記載の単離された組み換え核酸分子。
【請求項２０】
前記スペーサー配列が、少なくとも約３０～１００ヌクレオチド長である、請求項１９に記載の単離された組み換え核酸分子。
【請求項２１】
前記核酸分子が外因性である、請求項１５～２０のいずれか１項に記載の単離された組み換え核酸分子。
【請求項２２】
前記核酸分子がプラスミドである、請求項１５～２１のいずれか１項に記載の単離された組み換え核酸分子。
【請求項２３】
前記核酸分子が、腫瘍関連抗原（ＴＡＡ）に特異的な抗原結合ドメインをさらに含む、請求項１５～２２のいずれか１項に記載の単離された組み換え核酸分子。
【請求項２４】
前記ＩＲＥＳが、コクサッキーウイルスＢ３（ＣＶＢ３）または脳心筋炎ウイルス（ＥＭＣＶ）からのＩＲＥＳ配列を含む、請求項１５～２３のいずれか１項に記載の単離された組み換え核酸分子。
【請求項２５】
少なくとも１つのさらなる５’相同性配列及び１つのさらなる３’相同性配列をさらに含む、請求項１５～２４のいずれか１項に記載の単離された組み換え核酸分子。
【請求項２６】
（Ａ）ＣＡＲまたはＴＣＲをコードする１つまたは複数のデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）配列と、
（Ｂ）１つまたは複数の配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）を含む１つまたは複数のＤＮＡ配列と、
（Ｃ）５’相同配列の少なくとも１つ及び３’順序交換イントロン－エキソン（ＰＩＥ）配列を含む第１の環状化ドメインを含む１つまたは複数のＤＮＡ配列と、
（Ｄ）３’相同配列の少なくとも１つ及び５’ＰＩＥ配列を含む第２の環状化ドメインを含む１つまたは複数のＤＮＡ配列と
を含み、
（Ａ）と（Ｂ）とが作動可能に連結されている、単離された組み換え核酸分子。
【請求項２７】
（Ａ）～（Ｄ）が、（Ｃ）－（Ｂ）－（Ａ）－（Ｄ）の向きで作動可能に連結されている、請求項２６に記載の単離された組み換え核酸分子。
【請求項２８】
１つまたは複数のＤＮＡ配列が、少なくとも１つのスペーサー配列をさらに含む、請求項２６または２７に記載の単離された組み換え核酸分子。
【請求項２９】
前記スペーサー配列が、少なくとも約３０～１００ヌクレオチド長である、請求項２８に記載の単離された組み換え核酸分子。
【請求項３０】
前記核酸分子が外因性である、請求項２６～２９のいずれか１項に記載の単離された組み換え核酸分子。
【請求項３１】
前記核酸分子がプラスミドである、請求項２６～３０のいずれか１項に記載の単離された組み換え核酸分子。
【請求項３２】
コードされた抗原結合ドメインをさらに含む、請求項２６～３１のいずれか１項に記載の

単離された組み換え核酸分子。
【請求項３３】
前記ＩＲＥＳが、コクサッキーウイルスＢ３（ＣＶＢ３）または脳心筋炎ウイルス（ＥＭＣＶ）からのＩＲＥＳ配列を含む、請求項２６～３２のいずれか１項に記載の単離された組み換え核酸分子。
【請求項３４】
少なくとも１つのさらなる５’相同性配列及び１つのさらなる３’相同性配列をさらに含む、請求項２６～３３のいずれか１項に記載の単離された組み換え核酸分子。
【請求項３５】
前記抗原結合ドメインをコードする配列が、前記ＴＣＲ細胞外ドメインをコードする配列にリンカー配列によって接続されている、請求項１～９または１５～２５のいずれか１項に記載の単離された組み換え核酸分子。
【請求項３６】
前記リンカー配列が、（Ｇ４Ｓ）ｎ（式中、ｎ＝１～４）を含む、請求項３５に記載の単離された組み換え核酸分子。
【請求項３７】
前記コードされた抗原結合ドメインが、腫瘍関連抗原に特異的に結合する、請求項１～９または１５～２５、または３２～３６のいずれか１項に記載の単離された組み換え核酸分子。
【請求項３８】
前記腫瘍関連抗原が、ＣＤ１９またはその変異体、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＢＣＭＡ、ＭＳＬＮ、ＩＬ１３Ｒａ２、ＥＧＦＲｖＩＩＩ、ＭＵＣ１６、ＭＵＣ１、ＲＯＲ１、またはそれらの組み合わせである、請求項３７に記載の単離された組み換え核酸分子。
【請求項３９】
前記コードされた膜貫通ドメインが、ＴＣＲα鎖、ＴＣＲβ鎖、ＴＣＲδ鎖、ＴＣＲγ鎖、ＣＤ３ζＴＣＲサブユニット、ＣＤ３εＴＣＲサブユニット、ＣＤ３γＴＣＲサブユニット、ＣＤ３δＴＣＲサブユニット、ＣＤ４５、ＣＤ４、ＣＤ５、ＣＤ８、ＣＤ９、ＣＤ１６、ＣＤ２２、ＣＤ３３、ＣＤ２８、ＣＤ３７、ＣＤ６４、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ１３４、ＣＤ１３７、ＣＤ１５４、それらの機能的断片、及びそれらに対する少なくとも１つであるが２０以下の改変を有するそれらのアミノ酸配列からなる群から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含む、請求項１～９または１５～２５、または３５～３８のいずれか１項に記載の単離された組み換え核酸分子。
【請求項４０】
共刺激ドメインをコードする配列をさらに含み、前記コードされた共刺激ドメインが、ＯＸ４０、ＣＤ２、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤ５、ＩＣＡＭ－１、ＬＦＡ－１（ＣＤ１１ａ／ＣＤ１８）、ＩＣＯＳ（ＣＤ２７８）、及び４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）、ならびにそれらに対する少なくとも１つであるが２０以下の改変を有するそれらのアミノ酸配列からなる群から選択されるタンパク質の機能的シグナル伝達ドメインである、請求項１～９または１５～２５、または３５～３９のいずれか１項に記載の単離された組み換え核酸分子。
【請求項４１】
前記それらに対する少なくとも１つであるが２０以下の改変が、細胞のシグナル伝達を媒介するアミノ酸の改変、または前記コードされたＴＦＰもしくはＣＡＲもしくはＴＣＲへのリガンド結合に応答してリン酸化されるアミノ酸の改変を含む、請求項１～４０のいずれか１項に記載の単離された組み換え核酸分子。
【請求項４２】
前記コードされたＴＦＰまたはＣＡＲまたはＴＣＲが、免疫受容活性化チロシンモチーフ（ＩＴＡＭ）またはその一部分をさらに含み、前記ＩＴＡＭまたはその一部分が、ＣＤ３ζＴＣＲサブユニット、ＣＤ３εＴＣＲサブユニット、ＣＤ３γＴＣＲサブユニット、ＣＤ３δＴＣＲサブユニット、Ｆｃε受容体１鎖、Ｆｃε受容体２鎖、Ｆｃγ受容体１鎖、Ｆｃγ受容体２ａ鎖、Ｆｃγ受容体２ｂ１鎖、Ｆｃγ受容体２ｂ２鎖、Ｆｃγ受容体３ａ

鎖、Ｆｃγ受容体３ｂ鎖、Ｆｃβ受容体１鎖、ＴＹＲＯＢＰ（ＤＡＰ１２）、ＣＤ５、ＣＤ１６ａ、ＣＤ１６ｂ、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ３２、ＣＤ６４、ＣＤ７９ａ、ＣＤ７９ｂ、ＣＤ８９、ＣＤ２７８、ＣＤ６６ｄ、それらの機能的断片、及びそれらに対する少なくとも１つであるが２０以下の改変を有するそれらのアミノ酸配列からなる群から選択されるタンパク質からのものである、請求項１～４１のいずれか１項に記載の単離された組み換え核酸分子。

【請求項４３】

前記ＩＴＡＭまたはその一部分が、前記ＴＣＲ細胞内ドメインのＩＴＡＭと置きかわり、前記ＴＣＲ細胞内ドメインの前記置きかえられたＩＴＡＭが、ＣＤ３εまたはＣＤ３γのみに由来し、それと置きかわったＩＴＡＭまたはその一部分とは異なる、請求項４２に記載の単離された組み換え核酸分子。

【請求項４４】

前記コードされたＴＦＰ分子が、内因性ＴＣＲ複合体、少なくとも１つの内因性ＴＣＲポリペプチド、またはそれらの組み合わせと機能的に相互作用することができる、請求項１～９、１５～２５、または３５～４３のいずれか１項に記載の単離された組み換え核酸分子。

【請求項４５】

前記抗原結合ドメインが、ｓｃＦｖまたはＶＨＨドメインである、請求項１～９、１５～２５、または３５～４４のいずれか１項に記載の単離された組み換え核酸分子。

【請求項４６】

前記単離された組み換え核酸分子が細胞内に含まれる、請求項１～４５のいずれか１項に記載の単離された組み換え核酸分子。

【請求項４７】

前記細胞が、ＣＤ８＋またはＣＤ４＋またはＣＤ８＋ＣＤ４＋ヒト免疫細胞である、請求項４６のいずれか１項に記載の単離された組み換え核酸分子。

【請求項４８】

前記抗原結合ドメインが、細胞表面抗原に結合する、請求項１～９、１５～２５、または３２～４７のいずれか１項に記載の単離された組み換え核酸分子。

【請求項４９】

前記抗原結合ドメインが、腫瘍細胞の表面上の細胞表面抗原に結合する、請求項１～９、１５～２５、または３２～４８のいずれか１項に記載の単離された組み換え核酸分子。

【請求項５０】

ＴＣＲ定常ドメインをコードする配列をさらに含み、前記ＴＣＲ定常ドメインが、Ｔ細胞に発現されたときに機能的ＴＣＲ複合体に組み込まれる、請求項１～９、１５～２５、または３５～４９のいずれか１項に記載の単離された組み換え核酸分子。

【請求項５１】

前記ＴＣＲ定常ドメインが、Ｔ細胞に発現されたときに前記ＴＦＰを組み込む機能的ＴＣＲ複合体と同じ機能的ＴＣＲ複合体に組み込まれる、請求項５０に記載の単離された組み換え核酸分子。

【請求項５２】

前記ＴＦＰをコードする配列及び前記ＴＣＲ定常ドメインをコードする配列が、同じ核酸分子内に含有される、請求項５０または５１に記載の単離された組み換え核酸分子。

【請求項５３】

前記膜貫通ドメインが、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、ＴＣＲα、ＴＣＲβ、ＴＣＲδ、またはＴＣＲγからのＴ細胞受容体複合体の膜貫通ドメインである、請求項１～９、１５～２５、または３５～５２のいずれか１項に記載の単離された組み換え核酸分子。

【請求項５４】

前記細胞内ドメインが、ＣＤ３εのみ、ＣＤ３γのみ、ＣＤ３δのみ、ＴＣＲαのみ、ＴＣＲβのみ、ＴＣＲδのみ、またはＴＣＲγのみに由来する、請求項１～９、１５～２５、または３５～５３のいずれか１項に記載の単離された組み換え核酸分子。

【請求項５５】
共刺激ドメインをコードする配列をさらに含む、請求項１～９、１５～２５、または３５～５４のいずれか１項に記載の単離された組み換え核酸分子。
【請求項５６】
前記共刺激ドメインが、ＯＸ４０、ＣＤ２、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤＳ、ＩＣＡＭ－１、ＬＦＡ－１（ＣＤ１１ａ／ＣＤ１８）、ＩＣＯＳ（ＣＤ２７８）、及び４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）、ならびにそれらに対する少なくとも１つであるが２０以下の改変を有するそれらのアミノ酸配列からなる群から選択されるタンパク質の機能的シグナル伝達ドメインを含む、請求項５５に記載の単離された組み換え核酸分子。
【請求項５７】
タンパク質形質導入ドメインまたは細胞透過性ペプチドをコードする配列をさらに含む、請求項１～９、１５～２５、または３５～５６のいずれか１項に記載の単離された組み換え核酸分子。
【請求項５８】
前記環状組み換え核酸分子が、Ｔ細胞に形質導入されたか、または形質移入されたときに、ｓｈＲＮＡ、または二本鎖ＲＮＡもしくはその類似体より免疫原性が低い、請求項１～１４、または３５～５７のいずれか１項に記載の単離された組み換え核酸分子。
【請求項５９】
前記二本鎖ＲＮＡまたはその類似体がポリＩ：Ｃである、請求項５８に記載の単離された組み換え核酸分子。
【請求項６０】
改変されたヒト免疫細胞をｅｘ　ｖｉｖｏで生成する方法であって、請求項１～５９に記載の単離された組み換え核酸分子を前記免疫細胞に形質導入または形質移入することを含む、方法。
【請求項６１】
前記免疫細胞がＴ細胞である、請求項６０に記載の方法。
【請求項６２】
前記免疫細胞が、ＣＤ４＋細胞、ＣＤ８細胞、ナイーブＴ細胞、メモリー幹Ｔ細胞、セントラルメモリーＴ細胞、二重陰性Ｔ細胞、エフェクターメモリーＴ細胞、エフェクターＴ細胞、Ｔｈ１細胞、Ｔｃ１細胞、Ｔｈ２細胞、Ｔｃ２細胞、Ｔｈ１７細胞、Ｔｈ２２細胞、γ／δＴ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、ナチュラルキラーＴ（ＮＫＴ）細胞、Ｂ細胞、造血幹細胞、及び多能性幹細胞を含む群から選択されるヒトＴ細胞である、請求項６０または６１に記載の方法。
【請求項６３】
Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）融合タンパク質（ＴＦＰ）をコードする環状ＲＮＡを生成する方法であって、
（ｉ）１つまたは複数のベクターを用意するステップであって、
前記ベクターが、
（Ａ）Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）融合タンパク質（ＴＦＰ）をコードする１つまたは複数の配列と、
（Ｂ）１つまたは複数の配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）を含む１つまたは複数のＤＮＡ配列と、
（Ｃ）５’相同配列の少なくとも１つ及び３’順序交換イントロン－エキソン（ＰＩＥ）配列を含む第１の環状化ドメインを含む１つまたは複数のＤＮＡ配列と、
（Ｄ）３’相同配列の少なくとも１つ及び５’ＰＩＥ配列を含む第２の環状化ドメインを含む１つまたは複数のＤＮＡ配列と
を含み、
（Ａ）と（Ｂ）とが作動可能に連結されており、
前記ＴＦＰが、
（ａ）ＴＣＲサブユニットであって、

（ｉ）ＴＣＲ細胞外ドメインの少なくとも一部分、
（ｉｉ）膜貫通ドメイン、及び
（ｉｉｉ）ＴＣＲ細胞内ドメイン
を含み、
前記ＴＣＲサブユニットの前記細胞外、膜貫通、及び／または細胞内ドメインが、ＣＤ３εまたはＣＤ３γまたはＣＤ３δまたはＴＣＲαまたはＴＣＲβまたはＴＣＲγまたはＴＣＲδに由来する、前記ＴＣＲサブユニットと、
（ｂ）抗原結合ドメインと
を含み、
前記ＴＣＲサブユニットと前記抗原結合ドメインとが作動可能に連結されており、
前記ＴＦＰが、Ｔ細胞に発現されたときにＴＣＲに組み込まれる、
前記１つまたは複数のベクターを用意するステップと、
（ｉｉ）前記１つまたは複数のベクターを転写して１つまたは複数の線状ＲＮＡを生成するステップと、
（ｉｉｉ）化学的方法、酵素的方法、またはリボザイム法を使用することによって前記線状ＲＮＡを自己スプライスさせ、それによって環状ＲＮＡを生成するステップと
を含む、前記方法。
【請求項６４】
前記ＴＣＲ細胞内ドメインが、ＣＤ３εまたはＣＤ３γまたはＣＤ３δに由来する刺激ドメインを含む、請求項６３に記載の方法。
【請求項６５】
前記抗原結合ドメインが、抗体または抗体断片を含む、請求項６３または６４に記載の方法。
【請求項６６】
前記ベクターがＤＮＡベクターである、請求項６３～６５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６７】
前記環状ＲＮＡがｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｅｘ　ｖｉｖｏで生成される、請求項６３～６６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６８】
前記環状ＲＮＡが少なくとも１つのスペーサー配列をさらに含む、請求項６３～６７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６９】
前記スペーサー配列が約３０～１００ヌクレオチド長である、請求項６８に記載の方法。
【請求項７０】
前記ベクターがプラスミドである、請求項６３～６９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７１】
前記環状ＲＮＡがｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写によって生成される、請求項６３～７０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７２】
前記ベクターが宿主細胞のゲノムに統合される、請求項６３～７１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７３】
前記ＩＲＥＳが、コクサッキーウイルスＢ３（ＣＶＢ３）または脳心筋炎ウイルス（ＥＭＣＶ）からのＩＲＥＳ配列を含む、請求項６３～７２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７４】
前記ベクターが、少なくとも１つのさらなる５’相同性配列及び１つのさらなる３’相同性配列をさらに含む。請求項６３～７３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７５】
ＣＡＲまたはＴＣＲをコードする環状ＲＮＡを生成する方法であって、
（ｉ）１つまたは複数のベクターを用意するステップであって、

前記ベクターが、
（Ａ）ＣＡＲまたはＴＣＲをコードする１つまたは複数の配列と、
（Ｂ）１つまたは複数の配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）を含む１つまたは複数のＤＮＡ配列と、
（Ｃ）５’相同配列の少なくとも１つ及び３’順序交換イントロン－エキソン（ＰＩＥ）配列を含む第１の環状化ドメインを含む１つまたは複数のＤＮＡ配列と、
（Ｄ）３’相同配列の少なくとも１つ及び５’ＰＩＥ配列を含む第２の環状化ドメインを含む１つまたは複数のＤＮＡ配列と
を含み、
（Ａ）と（Ｂ）とが作動可能に連結されている、前記１つまたは複数のベクターを用意するステップと、
（ｉｉ）前記１つまたは複数のベクターを転写して１つまたは複数の線状ＲＮＡを生成するステップと、
（ｉｉｉ）化学的方法、酵素的方法、またはリボザイム法を使用することによって前記線状ＲＮＡを自己スプライスさせ、それによって環状ＲＮＡを生成するステップと
を含む、前記方法。
【請求項７６】
前記環状ＲＮＡが少なくとも１つのスペーサー配列をさらに含む、請求項７５に記載の方法。
【請求項７７】
前記スペーサー配列が約３０～１００ヌクレオチド長である、請求項７６に記載の方法。
【請求項７８】
前記ベクターがプラスミドである、請求項７５～７７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７９】
前記環状ＲＮＡがｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写によって生成される、請求項７５～７８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８０】
前記ＣＡＲまたはＴＣＲが、腫瘍関連抗原に特異的な抗原結合ドメインを含む、請求項７５～７９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８１】
前記ＩＲＥＳが、コクサッキーウイルスＢ３（ＣＶＢ３）または脳心筋炎ウイルス（ＥＭＣＶ）からのＩＲＥＳ配列を含む、請求項７５～８０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８２】
前記ベクターが、少なくとも１つのさらなる５’相同性配列及び１つのさらなる３’相同性配列をさらに含む、請求項７５～８１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８３】
対象においてＴ細胞受容体（ＴＣＲ）融合タンパク質（ＴＦＰ）をコードする環状ＲＮＡを含有する改変免疫細胞を生成する方法であって、
（１）１つまたは複数の環状ＲＮＡベクターを用意するステップであって、
前記ベクターが、
（Ａ）Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）融合タンパク質（ＴＦＰ）をコードする１つまたは複数の配列と、
（Ｂ）１つまたは複数の配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）を含む１つまたは複数のＤＮＡ配列と、
（Ｃ）５’相同配列の少なくとも１つ及び３’順序交換イントロン－エキソン（ＰＩＥ）配列を含む第１の環状化ドメインを含む１つまたは複数のＤＮＡ配列と、
（Ｄ）３’相同配列の少なくとも１つ及び５’ＰＩＥ配列を含む第２の環状化ドメインを含む１つまたは複数のＤＮＡ配列と
を含み、
（Ａ）と（Ｂ）とが作動可能に連結されており、

前記ＴＦＰが、
（ａ）ＴＣＲサブユニットであって、
（ｉ）ＴＣＲ細胞外ドメインの少なくとも一部分、膜貫通ドメイン、
（ｉｉ）ＴＣＲ細胞内ドメイン
を含み、前記ＴＣＲサブユニットの前記細胞外、膜貫通、及び／または細胞内ドメインが、ＣＤ３εまたはＣＤ３γまたはＣＤ３δまたはＴＣＲαまたはＴＣＲβまたはＴＣＲγまたはＴＣＲδに由来する、前記ＴＣＲサブユニットと、
（ｉｉｉ）抗原結合ドメインと
を含み、
前記ＴＣＲサブユニットと前記抗原結合ドメインとが作動可能に連結されており、
前記ＴＦＰが、Ｔ細胞に発現されたときにＴＣＲに組み込まれる、
前記１つまたは複数の環状ＲＮＡベクターを用意するステップと、
（２）前記１つまたは複数の環状ＲＮＡベクターを、標的免疫細胞の集団を改変するのに有効な量で前記対象に投与するステップ
と、を含む、前記方法。
【請求項８４】
前記ＴＣＲ細胞内ドメインが、ＣＤ３εまたはＣＤ３γまたはＣＤ３δに由来する刺激ドメインを含む。請求項８３に記載の方法。
【請求項８５】
前記抗原結合ドメインが、抗体または抗体断片を含む、請求項８３または８４に記載の方法。
【請求項８６】
前記標的免疫細胞の集団が、ＣＤ４＋細胞、ＣＤ８細胞、ナイーブＴ細胞、メモリー幹Ｔ細胞、セントラルメモリーＴ細胞、二重陰性Ｔ細胞、エフェクターメモリーＴ細胞、エフェクターＴ細胞、Ｔｈ１細胞、Ｔｃ１細胞、Ｔｈ２細胞、Ｔｃ２細胞、Ｔｈ１７細胞、Ｔｈ２２細胞、γ／δＴ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、ナチュラルキラーＴ（ＮＫＴ）細胞、Ｂ細胞、造血幹細胞、及び多能性幹細胞を含む群から選択されるヒトＴ細胞を含む、請求項８３～８５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８７】
前記１つまたは複数の環状ＲＮＡベクターが、Ｔ細胞受容体モチーフに対する結合ドメインを含む少なくとも１つの細胞標的化リガンドをさらに含む、請求項８３～８６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８８】
前記１つまたは複数の環状ＲＮＡベクターが、巨大分子複合体、ナノカプセル、ナノ粒子、エキソソーム、エキソソーム－脂質コンジュゲート、微小球、ビーズ、水中油型エマルション、脂質－ナノ粒子コンジュゲート、ミセル、混合ミセル、及びリポソームから本質的になる群から選択される送達ビヒクルをさらに含む、請求項８３～８７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８９】
前記送達ビヒクルが、Ｔ細胞受容体モチーフに対する結合ドメインを含む少なくとも１つの細胞標的化リガンドをさらに含む、請求項８３～８８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９０】
前記細胞標的化リガンドが、Ｔ細胞α鎖、Ｔ細胞β鎖、Ｔ細胞γ鎖、Ｔ細胞δ鎖、ＣＣＲ７、ＣＤ１ａ、ＣＤ１ｂ、ＣＤ１ｃ、ＣＤ１ｄ、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ５、ＣＤ７、ＣＤ８、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１１ｃ、ＣＤ１６、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２１、ＣＤ２２、ＣＤ２５、ＣＤ２８、ＣＤ３４、ＣＤ３５、ＣＤ３９、ＣＤ４０、ＣＤ４５ＲＡ、ＣＤ４５ＲＯ、ＣＤ４６、ＣＤ５２、ＣＤ５６、ＣＤ６２Ｌ、ＣＤ６８、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ９５、ＣＤ１０１、ＣＤ１１７、ＣＤ１２７、ＣＤ１３３、ＣＤ１３７（４－１ＢＢ）、ＣＤ１４８、ＣＤ１６３、Ｆ４／８０、ＩＬ－４Ｒα、Ｓｃａ－１、ＣＴＬＡ－４、ＧＩＴＲ、ＧＡＲＰ、ＬＡＰ、グランザイムＢ、ＬＦＡ－１、トランスフェリン受容体、及

びそれらの組み合わせを含む群から選択される、請求項８３～８９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９１】
それを必要とする対象におけるがんを治療する方法であって、請求項１～９、１５～２５、または３５～５９のいずれか１項に記載のＴ細胞受容体融合タンパク質（ＴＦＰ）をコードする単離された組み換え核酸分子を前記対象に送達するための製剤中の、前記単離された組み換え核酸分子を前記対象に投与することを含み、前記単離された組み換え核酸分子がｉｎ　ｖｉｖｏで前記標的細胞に侵入する、前記方法。
【請求項９２】
前記単離された組み換え核酸分子が環状ＲＮＡ分子である、請求項９１に記載の方法。
【請求項９３】
前記組み換え核酸が、５’から３’の順に、ｉ）３’スプライス部位を含む外因性イントロンの３’部分、ｉｉ）ＲＮＡエキソンをコードする核酸配列、及びｉｉｉ）５’スプライス部位を含む外因性イントロンの５’部分を含み、前記組み換え核酸の転写によって生じるＲＮＡのスプライシングが、前記対象における前記環状ＲＮＡの産生をもたらす、請求項９１または９２に記載の方法。
【請求項９４】
前記環状ＲＮＡが、ＤＮＡベクターによってコードされる、請求項９２または９３に記載の方法。
【請求項９５】
前記環状ＲＮＡが、標的化部分にコンジュゲートされている、請求項９２～９４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９６】
前記環状ＲＮＡが、タンパク質形質導入ドメインまたは細胞透過性ペプチドを含む、請求項９２～９５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９７】
前記製剤がナノ粒子を含む、請求項９１～９６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９８】
前記ナノ粒子が、エキソソーム、リポソーム、またはエキソソーム－リポソームハイブリッドである、請求項９７に記載の方法。
【請求項９９】
前記ナノ粒子が、少なくとも１つの標的化部分を含む、請求項９７または９８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１００】
前記標的化部分が、結合リガンド、あるいはマウス抗体またはヒトもしくはヒト化抗体またはそれらの断片である、請求項９９に記載の方法。
【請求項１０１】
前記標的化部分が、ＣＤ３、ＣＤ４、またはＣＤ８に特異的に結合する、請求項９９または１００に記載の方法。
【請求項１０２】
前記標的細胞がヒト免疫細胞である、請求項９１～１０１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０３】
前記標的細胞が、ＣＤ４＋細胞、ＣＤ８細胞、ナイーブＴ細胞、メモリー幹Ｔ細胞、セントラルメモリーＴ細胞、二重陰性Ｔ細胞、エフェクターメモリーＴ細胞、エフェクターＴ細胞、Ｔｈ１細胞、Ｔｃ１細胞、Ｔｈ２細胞、Ｔｃ２細胞、Ｔｈ１７細胞、Ｔｈ２２細胞、γ／δＴ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、ナチュラルキラーＴ（ＮＫＴ）細胞、造血幹細胞、及び多能性幹細胞を含む群から選択されるヒトＴ細胞である、請求項９１～１０２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０４】
ａ．対象におけるがんを治療するのに十分な量で環状ＲＮＡを含有するヒト免疫細胞と、

医薬として許容される担体とを含む医薬製剤であって、
前記環状ＲＮＡが、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）融合タンパク質（ＴＦＰ）をコードし、
前記ＴＦＰが、
（Ａ）ＴＣＲサブユニットであって、
（ｉ）ＴＣＲ細胞外ドメインの少なくとも一部分、膜貫通ドメイン、
（ｉｉ）ＴＣＲ細胞内ドメイン
を含み、前記ＴＣＲサブユニットの前記細胞外、膜貫通、及び／または細胞内ドメインが、ＣＤ３εまたはＣＤ３γまたはＣＤ３δまたはＴＣＲαまたはＴＣＲβまたはＴＣＲγまたはＴＣＲδに由来する、前記ＴＣＲサブユニットと、
（ｉｉｉ）抗原結合ドメインと
を含み、
前記ＴＣＲサブユニットと前記抗原結合ドメインとが作動可能に連結されており、
前記ＴＦＰが、Ｔ細胞に発現されたときにＴＣＲに組み込まれる、
前記医薬組成物。
【請求項１０５】
前記抗原結合ドメインが、抗体または抗体断片を含む、請求項１０４に記載の医薬組成物。
【請求項１０６】
前記ＴＣＲ細胞内ドメインは、ＣＤ３εまたはＣＤ３γまたはＣＤ３δに由来する刺激ドメインを含む、請求項１０４または１０５に記載の医薬組成物。
【請求項１０７】
それを必要とする対象におけるがんを治療する方法であって、
前記対象に環状ＲＮＡを含有するヒト免疫細胞と医薬として許容される担体とを含む有効量の医薬組成物を投与することを含み、
前記環状ＲＮＡが、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）融合タンパク質（ＴＦＰ）をコードし、
前記ＴＦＰが、
（Ａ）ＴＣＲサブユニットであって、
（ｉ）ＴＣＲ細胞外ドメインの少なくとも一部分、膜貫通ドメイン、
（ｉｉ）ＴＣＲ細胞内ドメイン
を含み、前記ＴＣＲサブユニットの前記細胞外、膜貫通、及び／または細胞内ドメインが、ＣＤ３εまたはＣＤ３γまたはＣＤ３δまたはＴＣＲαまたはＴＣＲβまたはＴＣＲγまたはＴＣＲδに由来する、前記ＴＣＲサブユニットと、
（ｉｉｉ）抗原結合ドメインと
を含み、
前記ＴＣＲサブユニットと前記抗原結合ドメインとが作動可能に連結されており、
前記ＴＦＰが、Ｔ細胞に発現されたときにＴＣＲに組み込まれる、
前記方法。
【請求項１０８】
前記ＴＣＲ細胞内ドメインが、ＣＤ３εまたはＣＤ３γまたはＣＤ３δに由来する刺激ドメインを含む、請求項１０７に記載の方法。
【請求項１０９】
前記抗原結合ドメインが、抗体または抗体断片を含む、請求項１０７または１０８に記載の方法。
【請求項１１０】
前記製剤の単回投与を含む、請求項１０７～１０９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１１】
前記製剤の複数回投与を含む、請求項１０７～１１０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１２】
前記細胞が同種異系Ｔ細胞である、請求項１０７～１１１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１３】

前記細胞が自己Ｔ細胞である、請求項１０７～１１１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１４】
前記環状組み換え核酸分子が、例えばＴ細胞に形質導入または形質移入されたときに、非環状化ＲＮＡより免疫原性が低い、請求項１０７～１１３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１５】
非環状化ＲＮＡが二本鎖ＲＮＡである、請求項１１４に記載の方法。
【請求項１１６】
環状ＲＮＡと医薬として許容される担体とを含む医薬組成物であって、
前記環状ＲＮＡが、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）融合タンパク質（ＴＦＰ）をコードし、
前記ＴＦＰが、
（Ａ）ＴＣＲサブユニットであって、
（ｉ）ＴＣＲ細胞外ドメインの少なくとも一部分、膜貫通ドメイン、
（ｉｉ）ＴＣＲ細胞内ドメイン
を含み、前記ＴＣＲサブユニットの前記細胞外、膜貫通、及び／または細胞内ドメインが、ＣＤ３εまたはＣＤ３γまたはＣＤ３δまたはＴＣＲαまたはＴＣＲβまたはＴＣＲγまたはＴＣＲδに由来する、前記ＴＣＲサブユニットと、
（ｉｉｉ）抗原結合ドメインと
を含み、
前記ＴＣＲサブユニットと前記抗原結合ドメインとが作動可能に連結されており、
前記ＴＦＰが、Ｔ細胞に発現されたときにＴＣＲに組み込まれる、
前記医薬組成物。
【請求項１１７】
前記ＴＣＲ細胞内ドメインが、ＣＤ３εまたはＣＤ３γまたはＣＤ３δに由来する刺激ドメインを含む、請求項１１６に記載の医薬組成物。
【請求項１１８】
前記前記抗原結合ドメインが、抗体または抗体断片を含む、請求項１１６または１１７に記載の医薬組成物。
【請求項１１９】
前記環状ＲＮＡが、標的化部分にコンジュゲートされている、請求項１１６～１１８のいずれか１項に記載の医薬組成物。
【請求項１２０】
環状ＲＮＡが、タンパク質形質導入ドメイン、細胞透過性ペプチド、またはエンドソーム不安定化ペプチドの１つまたは複数を含む、請求項１１６～１１９のいずれか１項に記載の医薬組成物。
【請求項１２１】
前記製剤がナノ粒子を含む、請求項１１６～１２０のいずれか１項に記載の医薬組成物。
【請求項１２２】
前記ナノ粒子が、エキソソーム、リポソーム、またはエキソソーム－リポソームハイブリッドである、請求項１２１に記載の医薬組成物。
【請求項１２３】
前記ナノ粒子が、少なくとも１つの標的化部分を含む、請求項１２１または１２２に記載の医薬組成物。
【請求項１２４】
前記標的化部分が、結合リガンド、あるいはマウス抗体またはヒトもしくはヒト化抗体またはそれらの断片である、請求項１２３に記載の医薬組成物。
【請求項１２５】
前記標的化部分が、ＣＤ３、ＣＤ４、またはＣＤ８に特異的に結合する、請求項１２３または１２４に記載の医薬組成物。
【発明の詳細な説明】
【背景技術】

【０００１】
相互参照
[0001] 本出願は、２０１９年４月２２日に出願された米国特許仮出願第６２／８３６，９７７号及び２０１９年１２月４日に出願された米国特許仮出願第６２／９４３，６７９号の利益を主張するものであり、該仮出願の各々は、参照によりその全体が本明細書に援用される。
【０００２】
背景技術
[0002] がんは、米国及びその他の地域における主な死亡原因である。がんは、その種類に応じて、典型的には、手術、化学療法、及び／または放射線で治療される。これらの治療は失敗することが多く、単独でまたは現在の標準的治療と組み合わせて使用するための新たな療法が必要であることは明らかである。
【０００３】
[0003] 血液悪性腫瘍または末期の固形腫瘍を有するほとんどの患者は、標準的治療では治療不能である。加えて、従来の治療の選択肢には重篤な副作用があることが多い。がん細胞を退けるために患者の免疫系を関与させる数多くの試みがなされてきた。これらは総称してがん免疫療法と呼ばれる手法である。
【０００４】
[0004] 固形腫瘍を一掃する操作されたＴ細胞療法の成功は、免疫抑制性の腫瘍微小環境（ＴＭＥ）で機能する前記Ｔ細胞の能力にかかっている。ＴＭＥを克服するための数多くの戦略が展開されているかまたは開発中である。非常に多くの手法が、複数の共刺激ドメインを発現させて（例えば、ｃｄ４０の構成的発現）ＩＬ－１２などの炎症誘発性サイトカイン及び／または抑制シグナルをブロックする抗体（抗ＰＤ１など）を分泌するように、Ｔ細胞を直接改変及び操作している（例えば、Ｙｅｋｕ ＆ Ｂｒｅｎｔｊｅｎｓ，２０１６を参照されたい）。
【０００５】
[0005] 例えば、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を発現するように遺伝子改変することによる腫瘍特異的Ｔ細胞の生成は、強力な抗腫瘍効果を生み出す牽引力を獲得している（Ｊｅｎａ ｅｔ ａｌ．，２０１０，Ｂｌｏｏｄ．１１６：１０３５－１０４４；Ｂｏｎｉｎｉ ｅｔ ａｌ．，２０１１，Ｂｉｏｌ Ｂｌｏｏｄ Ｍａｒｒｏｗ Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ １７（１ Ｓｕｐｐｌ）：５１５－２０；Ｒｅｓｔｉｆｏ ｅｔ ａｌ．，２０１２，Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｉｍｍｕｎｏｌ １２：２６９－２８１；Ｋｏｈｎ ｅｔ ａｌ．，２０１１，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ １９：４３２－４３８；Ｓａｖｏｌｄｏ ｅｔ ａｌ．，２０１１，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ １２１：１８２２－１８２５；Ｅｒｔｌ ｅｔ ａｌ．，２０１１，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ７１：３１７５－３１８１）。
【０００６】
[0006] ＣＤ１９特異的ＣＡＲ Ｔ細胞（ＣＴＬ０１９と呼ばれる）での臨床結果から、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）ならびに小児急性リンパ球性白血病（ＡＬＬ）を患う患者において完全寛解が示されている（例えば、Ｋａｌｏｓ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉ Ｔｒａｎｓｌ Ｍｅｄ ３：９５ｒａ７３（２０１１）、Ｐｏｒｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，ＮＥＪＭ ３６５：７２５－７３３（２０１１）、Ｇｒｕｐｐ ｅｔ ａｌ．，ＮＥＪＭ ３６８：１５０９－１５１８（２０１３）を参照されたい）。代替的な手法は、腫瘍関連ペプチド抗原に対して選択されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）α及びβ鎖を自己Ｔ細胞の遺伝子操作に使用することである。これらのＴＣＲ鎖は、完全なＴＣＲ複合体を形成し、所定の第２の特異性のためのＴＣＲを有するＴ細胞をもたらすこととなる。滑膜癌を有する患者では、ＮＹ－ＥＳＯ－１特異的ＴＣＲα及びβ鎖を発現する操作された自己Ｔ細胞で有望な結果が得られた。より最近の手法は、遺伝子操作されたＴ細胞を、様々なヒト悪性腫瘍に対してより広く作用するように向上させることを目的としている。ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、及びＣＤ３δを含めた、ＴＣＲα及びＴＣＲβ鎖のＴＣＲサブユニットと、細胞表面抗原に対して特異的な結合ドメインとの新規融合タンパク質は、既存の手法の限界を超え

る可能性を示している。例えば、同時係属の２０１６年５月１８日に出願された国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１６／０３３１４６号；２０１７年８月２日に出願されたＰＣＴ／ＵＳ２０１７／０４５１５９；及び２０１８年６月１３日に出願されたＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０３７３８７（これらの各々は参照により本明細書に援用される）を参照されたい。

【０００７】

[0007] 残念なことに、これらの手法の多くは、効果的なタンパク質の発現を実現するためのＴ細胞内への医薬組成物の送達の技術的な限界に直面している。

[0008] 技術的な限界及び課題は、Ｔ細胞を操作するタンパク質、例えば融合タンパク質をコードする遺伝子のサイズが大きいことによってもたらされる。Ｔ細胞を生成するのに必要な、これらの大きい遺伝子を実行可能なベクター中にコードすることは複雑である。さらに、ベクターが成功裏に生成されたときであっても、Ｔ細胞の形質導入効率及び安定なタンパク質発現が常に観察されているわけではない。これは、転写、翻訳、及び最終的なタンパク質分泌に関連する長く複雑なプロセスに関連している可能性がある。推測では、これは、これらのタンパク質の多くがＴ細胞によって内因的に発現されないという事実によってさらに複雑化する可能性がある。

【０００８】

[0009] 例えば、組み換えＤＮＡが細胞内に送達された後であるがコードされたタンパク質が作製される前に行われる可能性がある複数のステップがあり、それによってタンパク質の発現が影響を受ける可能性がある。細胞内に入ると、ＤＮＡは核内に輸送されることが可能となり、そこでｍＲＮＡに転写される。ＤＮＡから転写されたｍＲＮＡは細胞質に侵入することができ、そこでタンパク質に翻訳される。投与されたＤＮＡからタンパク質にするのに複数の処理ステップが行われることによって、機能性タンパク質を生成する前に遅延時間が生じるだけでなく、各ステップが失敗及び細胞への損傷の機会となる。さらに、ＤＮＡを頻繁に細胞に侵入させても、発現されないか、または合理的な比率もしくは濃度で発現されないために、細胞内でＤＮＡ発現を得ることが難しいことが公知である。これは、ＤＮＡを初代細胞または改変細胞株に導入したときに特に問題になる可能性がある。

【発明の概要】

【０００９】

[0010] 本明細書において認識されるのは、ポリペプチドをコードする核酸の細胞内翻訳及び処理の調節を取り巻く潜在的な危険に対処するための生物学的モダリティを送達すること、したがって送達されたモダリティからのタンパク質の発現を最適化することに対する必要性である。

【００１０】

[0011] 様々なヒト悪性腫瘍、例えば、がんに対してより広く作用するように、遺伝子操作されたＴ細胞を向上させる必要があることは明らかである。

[0012] 以下の開示における組成物及び方法は、環状ＲＮＡ（ｃｉｒｃＲＮＡ）などの核酸を含む組成物を送達することによって、この必要性に対処するように設計されている。

【００１１】

[0013] よって、一態様では、本明細書に開示するのは、（Ａ）Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）融合タンパク質（ＴＦＰ）をコードする１つまたは複数のリボ核酸（ＲＮＡ）配列と、（Ｂ）１つまたは複数の配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）とを含み、（Ａ）と（Ｂ）とが作動可能に連結されて環状組み換え核酸分子を形成する、単離された組み換え核酸分子であって、該ＴＦＰが、（ａ）ＴＣＲサブユニットであって、（ｉ）ＴＣＲ細胞外ドメインの少なくとも一部分、（ｉｉ）膜貫通ドメイン、及び（ｉｉｉ）ＴＣＲ細胞内ドメインを含み、該ＴＣＲサブユニットの該細胞外、膜貫通、及び／または細胞内シグナル伝達ドメインが、ＣＤ３εまたはＣＤ３γまたはＣＤ３δまたはＴＣＲαまたはＴＣＲβまたはＴＣＲδまたはＴＣＲγに由来する、ＴＣＲサブユニットと、（ｂ）抗原結合ドメインとを含み、該ＴＣＲサブユニットと該抗原結合ドメインとが作動可能に連結されており

、該ＴＦＰが、Ｔ細胞に発現されたときにＴＣＲに組み込まれる、単離された組み換え核酸分子である。一実施形態では、ＴＣＲ細胞内ドメインは、ＣＤ３εまたはＣＤ３γまたはＣＤ３δに由来する刺激ドメインを含む。別の実施形態では、抗原結合ドメインは、抗体または抗体断片を含む。一実施形態では、単離された組み換え核酸分子は、（Ａ）の５’末端及び（Ｂ）の３’末端の近位にある（Ｃ）核酸スペーサー配列であって、（Ｃ）が線状核酸の環状化によって形成される、核酸スペーサー配列をさらに含む。一実施形態では、スペーサー配列は、約３０～１００ヌクレオチド長である。別の実施形態では、線状核酸の環状化によって環状ＲＮＡ分子が生成される。別の実施形態では、環状組み換え核酸分子は外因性である。別の実施形態では、ＩＲＥＳは、コクサッキーウイルスＢ３（ＣＶＢ３）または脳心筋炎ウイルス（ＥＭＣＶ）からのＩＲＥＳ配列を含む。別の実施形態では、環状組み換え核酸分子は、同種異系または自己ヒト免疫細胞に形質移入または形質導入するのに適している。

【００１２】

[0014] 別の態様では、（Ａ）キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）またはＴ細胞受容体（ＴＣＲ）をコードする１つまたは複数のリボ核酸（ＲＮＡ）配列と、（Ｂ）１つまたは複数の配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）とを含み、（Ａ）と（Ｂ）とが作動可能に連結されて環状組み換え核酸分子を形成する、単離された組み換え核酸分子を提供する。一実施形態では、単離された組み換え核酸分子は、（Ａ）の５’末端及び（Ｂ）の３’末端の近位にある（Ｃ）核酸スペーサー配列であって、（Ｃ）が線状核酸の環状化によって形成される、核酸スペーサー配列をさらに含む。一実施形態では、スペーサー配列は、約３０～１００ヌクレオチド長である。別の実施形態では、単離された組み換え核酸分子は外因性である。一実施形態では、ＩＲＥＳは、コクサッキーウイルスＢ３（ＣＶＢ３）または脳心筋炎ウイルス（ＥＭＣＶ）から得られたＩＲＥＳをさらに含む。

【００１３】

[0015] 別の態様では、（Ａ）Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）融合タンパク質（ＴＦＰ）をコードする１つまたは複数のデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）配列と、（Ｂ）１つまたは複数の配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）を含む１つまたは複数のＤＮＡ配列と、（Ｃ）５’相同性配列の少なくとも１つ及び３’順序交換（ｐｅｒｍｕｔａｔｅｄ）イントロン－エキソン（ＰＩＥ）配列を含む第１の環状化ドメインを含む１つまたは複数のＤＮＡ配列と、（Ｄ）３’相同性配列の少なくとも１つ及び５’ＰＩＥ配列を含む第２の環状化ドメインを含む１つまたは複数のＤＮＡ配列と、を含み、（Ａ）と（Ｂ）とが作動可能に連結されている、単離された組み換え核酸分子であって、該ＴＦＰが、（ａ）ＴＣＲサブユニットであって、（ｉ）ＴＣＲ細胞外ドメインの少なくとも一部分、（ｉｉ）膜貫通ドメイン、及び（ｉｉｉ）細胞内シグナル伝達ドメインからの刺激ドメインを含むＴＣＲ細胞内ドメインを含み、該ＴＣＲサブユニットの細胞外、膜貫通、及び／または細胞内シグナル伝達ドメインが、ＣＤ３εまたはＣＤ３γまたはＣＤ３δまたはＴＣＲαまたはＴＣＲβまたはＴＣＲδまたはＴＣＲγに由来する、ＴＣＲサブユニットと、（ｂ）抗原結合ドメインとを含み、該ＴＣＲサブユニットと該抗原結合ドメインとが作動可能に連結されており、該ＴＦＰが、Ｔ細胞に発現されたときにＴＣＲに組み込まれる、単離された組み換え核酸分子を提供する。一実施形態では、ＴＣＲ細胞内ドメインは、ＣＤ３εまたはＣＤ３γまたはＣＤ３δに由来する刺激ドメインを含む。別の実施形態では、抗原結合ドメインは、抗体または抗体断片を含む。一実施形態では、（Ａ）～（Ｄ）は、（Ｃ）－（Ｂ）－（Ａ）－（Ｄ）の向きで作動可能に連結されている。別の実施形態では、１つまたは複数のＤＮＡ配列は、少なくとも１つのスペーサー配列をさらに含む。一実施形態では、スペーサー配列は、少なくとも約３０～１００ヌクレオチド長である。一実施形態では、核酸分子は外因性である。別の実施形態では、核酸分子はプラスミドである。別の実施形態では、核酸分子は、腫瘍関連抗原（ＴＡＡ）に特異的な抗原結合ドメインをさらに含む。別の実施形態では、ＩＲＥＳは、コクサッキーウイルスＢ３（ＣＶＢ３）または脳心筋炎ウイルス（ＥＭＣＶ）からのＩＲＥＳ配列を含む。一実施形態では、単離された組み換え核酸分子は、少なくとも１つのさらなる５’相同性配列及び１つのさらなる３’相同性配列をさら

に含む。

【００１４】

[0016] 別の態様では、（Ａ）ＣＡＲまたはＴＣＲをコードする１つまたは複数のデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）配列と、（Ｂ）１つまたは複数の配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）を含む１つまたは複数のＤＮＡ配列と、（Ｃ）５’相同性配列の少なくとも１つ及び３’順序交換イントロン－エキソン（ＰＩＥ）配列を含む第１の環状化ドメインを含む１つまたは複数のＤＮＡ配列と、（Ｄ）３’相同性配列の少なくとも１つ及び５’ＰＩＥ配列を含む第２の環状化ドメインを含む１つまたは複数のＤＮＡ配列とを含み、（Ａ）と（Ｂ）とが作動可能に連結されている、単離された組み換え核酸分子を提供する。一実施形態では、（Ａ）～（Ｄ）は、（Ｃ）－（Ｂ）－（Ａ）－（Ｄ）の向きで作動可能に連結されている。別の実施形態では、１つまたは複数のＤＮＡ配列は、少なくとも１つのスペーサー配列をさらに含む。一実施形態では、スペーサー配列は、少なくとも約３０～１００ヌクレオチド長である。別の実施形態では、核酸分子は外因性である。一実施形態では、核酸分子はプラスミドである。一実施形態では、核酸分子は、コードされた抗原結合ドメインをさらに含む。一実施形態では、ＩＲＥＳは、コクサッキーウイルスＢ３（ＣＶＢ３）または脳心筋炎ウイルス（ＥＭＣＶ）からのＩＲＥＳ配列を含む。別の実施形態では、単離された組み換え核酸分子は、少なくとも１つのさらなる５’相同性配列及び１つのさらなる３’相同性配列をさらに含む。一実施形態では、抗原結合ドメインをコードする配列は、コードされたリンカー配列によって、ＴＣＲ細胞外ドメインをコードする配列に接続されている。一実施形態では、コードされたリンカー配列は、（Ｇ４Ｓ）ｎ（式中、ｎ＝１～４）を含む。別の実施形態では、コードされた抗原結合ドメインは、腫瘍関連抗原に特異的に結合する。一実施形態では、腫瘍関連抗原は、ＣＤ１９またはその変異体、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＢＣＭＡ、ＭＳＬＮ、ＩＬ１３Ｒａ２、ＥＧＦＲｖＩＩＩ、ＭＵＣ１６、ＭＵＣ１、ＲＯＲ１、ＰＤ１、ＥｐｈＡ２、またはそれらの組み合わせである。一実施形態では、コードされた膜貫通ドメインは、ＴＣＲα鎖、ＴＣＲβ鎖、ＴＣＲδ鎖、ＴＣＲγ鎖、ＣＤ３ζＴＣＲサブユニット、ＣＤ３εＴＣＲサブユニット、ＣＤ３γＴＣＲサブユニット、ＣＤ３δＴＣＲサブユニット、ＣＤ４５、ＣＤ４、ＣＤ５、ＣＤ８、ＣＤ９、ＣＤ１６、ＣＤ２２、ＣＤ３３、ＣＤ２８、ＣＤ３７、ＣＤ６４、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ１３４、ＣＤ１３７、ＣＤ１５４、それらの機能的断片、及びそれらに対する少なくとも１つであるが２０以下の改変を有するそれらのアミノ酸配列からなる群から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含む。

【００１５】

[0017] 一実施形態では、単離された組み換え核酸分子は、共刺激ドメインをコードする配列をさらに含み、コードされた共刺激ドメインは、ＯＸ４０、ＣＤ２、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤ５、ＩＣＡＭ－１、ＬＦＡ－１（ＣＤ１１ａ／ＣＤ１８）、ＩＣＯＳ（ＣＤ２７８）、及び４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）、ならびにそれらに対する少なくとも１つであるが２０以下の改変を有するそれらのアミノ酸配列からなる群から選択されるタンパク質の機能的シグナル伝達ドメインである。一実施形態では、アミノ酸配列に対する少なくとも１つであるが２０以下の改変は、細胞のシグナル伝達を媒介するアミノ酸の改変、またはコードされたＴＦＰもしくはＣＡＲもしくはＴＣＲへのリガンド結合に応答してリン酸化されるアミノ酸の改変を含む。一実施形態では、コードされたＴＦＰまたはＣＡＲまたはＴＣＲは、免疫受容活性化チロシンモチーフ（ＩＴＡＭ）またはその一部分をさらに含み、ＩＴＡＭまたはその一部分は、ＣＤ３ζＴＣＲサブユニット、ＣＤ３εＴＣＲサブユニット、ＣＤ３γＴＣＲサブユニット、ＣＤ３δＴＣＲサブユニット、ＴＣＲζ鎖、Ｆｃε受容体１鎖、Ｆｃε受容体２鎖、Ｆｃγ受容体１鎖、Ｆｃγ受容体２ａ鎖、Ｆｃγ受容体２ｂ１鎖、Ｆｃγ受容体２ｂ２鎖、Ｆｃγ受容体３ａ鎖、Ｆｃγ受容体３ｂ鎖、Ｆｃβ受容体１鎖、ＴＹＲＯＢＰ（ＤＡＰ１２）、ＣＤ５、ＣＤ１６ａ、ＣＤ１６ｂ、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ３２、ＣＤ６４、ＣＤ７９ａ、ＣＤ７９ｂ、ＣＤ８９、ＣＤ２７８、ＣＤ６６ｄ、それらの機能的断片、及びそれらに対する少なくとも１つであるが２０以下の改変を有するそれらのアミノ酸配列からなる群から選択されるタンパク質からのものであ

る。一実施形態では、ＩＴＡＭまたはその一部分は、ＴＣＲ細胞内ドメインのＩＴＡＭと置きかわり、ＴＣＲ細胞内ドメインの置きかえられたＩＴＡＭは、ＣＤ３εまたはＣＤ３γのみに由来し、それと置きかわったＩＴＡＭまたはその一部分とは異なる。一実施形態では、コードされたＴＦＰ分子は、内因性ＴＣＲ複合体、少なくとも１つの内因性ＴＣＲポリペプチド、またはそれらの組み合わせと機能的に相互作用することができる。一実施形態では、抗原結合ドメインは、ｓｃＦｖまたはＶＨＨドメインである。一実施形態では、単離された組み換え核酸分子は、細胞内に含まれる。一実施形態では、該細胞は、ＣＤ８＋またはＣＤ４＋またはＣＤ８＋ＣＤ４＋ヒト免疫細胞である。一実施形態では、抗体またはその断片は、細胞表面抗原に結合する。一実施形態では、抗体またはその断片は、腫瘍細胞の表面上の細胞表面抗原に結合する。一実施形態では、単離された組み換え核酸は、Ｔ細胞に発現されたときに機能的ＴＣＲ複合体に組み込まれるＴＣＲ定常ドメインをコードする配列をさらに含む。別の実施形態では、ＴＣＲ定常ドメインは、Ｔ細胞に発現されたときにＴＦＰを組み込む機能的ＴＣＲ複合体と同じ機能的ＴＣＲ複合体に組み込まれる。一実施形態では、ＴＦＰをコードする配列及びＴＣＲ定常ドメインをコードする配列は、同じ核酸分子内に含有される。一実施形態では、ＴＦＰをコードする配列及びＴＣＲ定常ドメインをコードする配列は、異なる核酸分子内に含有される。一実施形態では、ＴＣＲサブユニット及び抗体ドメイン、抗原結合ドメインは、コードされたリンカー配列によって作動可能に連結されている。

【００１６】

[0018] 一実施形態では、膜貫通ドメインは、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、ＴＣＲαまたはＴＣＲβまたはＴＣＲγまたはＴＣＲδからのＴ細胞受容体複合体の膜貫通ドメインである。一実施形態では、細胞内ドメインは、ＣＤ３εのみ、ＣＤ３γのみ、ＣＤ３δのみ、ＴＣＲαのみ、ＴＣＲβのみ、ＴＣＲγのみ、またはＴＣＲδのみに由来する。一実施形態では、単離された組み換え核酸は、共刺激ドメインをコードする配列をさらに含む。一実施形態では、共刺激ドメインは、ＯＸ４０、ＣＤ２、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤＳ、ＩＣＡＭ－１、ＬＦＡ－１（ＣＤ１１ａ／ＣＤ１８）、ＩＣＯＳ（ＣＤ２７８）、及び４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）、ならびにそれらに対する少なくとも１つであるが２０以下の改変を有するそれらのアミノ酸配列からなる群から選択されるタンパク質の機能的シグナル伝達ドメインを含む。一実施形態では、単離された組み換え核酸分子は、抗原結合ドメインをコードする配列をさらに含む。一実施形態では、単離された組み換え核酸分子は、タンパク質形質導入ドメインまたは細胞透過性ペプチドをコードする配列をさらに含む。

【００１７】

[0019] 別の態様では、改変されたヒト免疫細胞をｅｘ ｖｉｖｏで生成する方法であって、本明細書に開示する単離された組み換え核酸分子の１つまたは複数を該免疫細胞に形質導入または形質移入することを含む、方法を提供する。一実施形態では、免疫細胞はＴ細胞である。別の実施形態では、免疫細胞は、ＣＤ４＋細胞、ＣＤ８細胞、ナイーブＴ細胞、メモリー幹Ｔ細胞、セントラルメモリーＴ細胞、二重陰性Ｔ細胞、エフェクターメモリーＴ細胞、エフェクターＴ細胞、Ｔｈ１細胞、Ｔｃ１細胞、Ｔｈ２細胞、Ｔｃ２細胞、Ｔｈ１７細胞、Ｔｈ２２細胞、γ／δＴ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、ナチュラルキラーＴ（ＮＫＴ）細胞、Ｂ細胞、造血幹細胞、及び多能性幹細胞を含む群から選択されるヒトＴ細胞である。

【００１８】

[0020] 別の態様では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）融合タンパク質（ＴＦＰ）をコードする環状ＲＮＡを生成する方法であって、（ｉ）１つまたは複数のベクターを用意するステップであって、該ベクターが、（Ａ）Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）融合タンパク質（ＴＦＰ）をコードする１つまたは複数のＤＮＡ配列と、（Ｂ）１つまたは複数の配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）を含む１つまたは複数のＤＮＡ配列と、（Ｃ）５’相同性配列の少なくとも１つ及び３’順序交換イントロン－エキソン（ＰＩＥ）配列を含む第１の環状化ドメインを含む１つまたは複数のＤＮＡ配列と、（Ｄ）３’相同性配列の少なくとも１つ

及び５’ＰＩＥ配列を含む第２の環状化ドメインを含む１つまたは複数のＤＮＡ配列とを含み、（Ａ）と（Ｂ）とが作動可能に連結されており、該ＴＦＰが、（ａ）ＴＣＲサブユニットであって、（１）ＴＣＲ細胞外ドメインの少なくとも一部分、（２）膜貫通ドメイン、及び（３）ＴＣＲ細胞内ドメインを含み、該ＴＣＲサブユニットの該細胞外、膜貫通、及び／または細胞内シグナル伝達ドメインが、ＣＤ３εまたはＣＤ３γまたはＣＤ３δまたはＴＣＲαまたはＴＣＲβまたはＴＣＲδまたはＴＣＲγに由来する、ＴＣＲサブユニットと、（ｂ）抗原結合ドメインとを含み、該ＴＣＲサブユニットと該抗原結合ドメインとが作動可能に連結されており、該ＴＦＰが、Ｔ細胞に発現されたときにＴＣＲに組み込まれる、１つまたは複数のベクターを用意するステップと、（ｉｉ）該１つまたは複数のベクターを転写して１つまたは複数の線状ＲＮＡを生成するステップと、（ｉｉｉ）化学的方法、酵素的方法、またはリボザイム法を使用することによって該線状ＲＮＡを自己スプライスさせ、それによって環状ＲＮＡを生成するステップと、を含む、方法を提供する。一実施形態では、ＴＣＲ細胞内ドメインは、ＣＤ３εまたはＣＤ３γまたはＣＤ３δに由来する刺激ドメインを含む。別の実施形態では、抗原結合ドメインは、抗体または抗体断片を含む。一実施形態では、ベクターはＤＮＡベクターである。別の実施形態では、環状ＲＮＡは、ｉｎ ｖｉｔｒｏまたはｅｘ ｖｉｖｏで生成される。別の実施形態では、環状ＲＮＡは、少なくとも１つのスペーサー配列をさらに含む。一実施形態では、スペーサー配列は、約３０～１００ヌクレオチド長である。別の実施形態では、ベクターはプラスミドである。一実施形態では、環状ＲＮＡは、ｉｎ ｖｉｔｒｏ転写によって生成される。一実施形態では、ベクターは、宿主細胞のゲノムに統合される。一実施形態では、ＩＲＥＳは、コクサッキーウイルスＢ３（ＣＶＢ３）または脳心筋炎ウイルス（ＥＭＣＶ）からのＩＲＥＳ配列を含む。一実施形態では、ベクターは、少なくとも１つのさらなる５’相同性配列及び１つのさらなる３’相同性配列をさらに含む。幾つかの実施形態では、ベクターは、標的細胞のゲノムに組み込まれる。幾つかの実施形態では、ベクターは、送達ビヒクル（例えば、ナノ粒子、リポソーム、エンドソームなど）のペイロードとして対象に投与される。

【００１９】

[0021] 別の態様では、ＣＡＲまたはＴＣＲをコードする環状ＲＮＡを生成する方法であって、（ｉ）１つまたは複数のベクターを用意するステップであって、該ベクターが、（Ａ）ＣＡＲをコードする１つまたは複数のＤＮＡ配列、あるいは（Ｂ）１つまたは複数の配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）を含む１つまたは複数のＤＮＡ配列と、（Ｃ）５’相同性配列の少なくとも１つ及び３’順序交換イントロン－エキソン（ＰＩＥ）配列を含む第１の環状化ドメインを含む１つまたは複数のＤＮＡ配列と、（Ｄ）３’相同性配列の少なくとも１つ及び５’ＰＩＥ配列を含む第２の環状化ドメインを含む１つまたは複数のＤＮＡ配列と、を含み、（Ａ）と（Ｂ）とが作動可能に連結されている、１つまたは複数のベクターを用意するステップと、（ｉｉ）該１つまたは複数のベクターを転写して１つまたは複数の線状ＲＮＡを生成するステップと、（ｉｉｉ）化学的方法、酵素的方法、またはリボザイム法を使用することによって該線状ＲＮＡを自己スプライスさせ、それによって環状ＲＮＡを生成するステップとを含む、方法を提供する。一実施形態では、環状ＲＮＡは、少なくとも１つのスペーサー配列をさらに含む。一実施形態では、スペーサー配列は、約３０～１００ヌクレオチド長である。一実施形態では、ベクターはプラスミドである。別の実施形態では、環状ＲＮＡは、ｉｎ ｖｉｔｒｏ転写によって生成される。一実施形態では、コードされた抗原結合ドメインは、腫瘍関連抗原に特異的である。別の実施形態では、ＩＲＥＳは、コクサッキーウイルスＢ３（ＣＶＢ３）または脳心筋炎ウイルス（ＥＭＣＶ）からのＩＲＥＳ配列を含む。一実施形態では、ベクターは、少なくとも１つのさらなる５’相同性配列及び１つのさらなる３’相同性配列をさらに含む。

【００２０】

[0022] 別の態様では、対象においてＴ細胞受容体（ＴＣＲ）融合タンパク質（ＴＦＰ）をコードする環状ＲＮＡを含有する改変された免疫細胞を生成する方法であって、１）１つまたは複数の環状ＲＮＡベクターを用意するステップであって、該ベクターが、（Ａ

）Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）融合タンパク質（ＴＦＰ）をコードする１つまたは複数の配列と、（Ｂ）１つまたは複数の配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）を含む１つまたは複数のＤＮＡ配列と、（Ｃ）５’相同性配列の少なくとも１つ及び３’順序交換イントロン－エキソン（ＰＩＥ）配列を含む第１の環状化ドメインを含む１つまたは複数のＤＮＡ配列と、（Ｄ）３’相同性配列の少なくとも１つ及び５’ＰＩＥ配列を含む第２の環状化ドメインを含む１つまたは複数のＤＮＡ配列とを含み、（Ａ）と（Ｂ）とが作動可能に連結されており、該ＴＦＰが、（ａ）ＴＣＲサブユニットであって、（ｉ）ＴＣＲ細胞外ドメインの少なくとも一部分、膜貫通ドメイン、（ｉｉ）細胞内シグナルドメインからの刺激ドメインを含むＴＣＲ細胞内ドメインを含み、該ＴＣＲサブユニットの該細胞外、膜貫通、及び／または細胞内ドメインが、ＣＤ３εまたはＣＤ３γまたはＣＤ３δまたはＴＣＲαまたはＴＣＲβまたはＴＣＲδまたはＴＣＲγに由来する、ＴＣＲサブユニットと、（ｉｉｉ）抗原結合ドメインとを含み、該ＴＣＲサブユニットと該抗原結合ドメインとが作動可能に連結されており、該ＴＦＰが、Ｔ細胞に発現されたときにＴＣＲに組み込まれる、１つまたは複数の環状ＲＮＡベクターを用意するステップと、（２）該１つまたは複数の環状ＲＮＡベクターを、標的免疫細胞の集団を改変するのに効果的な量で該対象に投与するステップとを含む、方法を提供する。一実施形態では、ＴＣＲ細胞内ドメインは、ＣＤ３εまたはＣＤ３γまたはＣＤ３δに由来する刺激ドメインを含む。別の実施形態では、抗原結合ドメインは、抗体または抗体断片を含む。一実施形態では、標的免疫細胞の集団は、ＣＤ４＋細胞、ＣＤ８細胞、ナイーブＴ細胞、メモリー幹Ｔ細胞、セントラルメモリーＴ細胞、二重陰性Ｔ細胞、エフェクターメモリーＴ細胞、エフェクターＴ細胞、Ｔｈ１細胞、Ｔｃ１細胞、Ｔｈ２細胞、Ｔｃ２細胞、Ｔｈ１７細胞、Ｔｈ２２細胞、γ／δＴ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、ナチュラルキラーＴ（ＮＫＴ）細胞、Ｂ細胞、造血幹細胞、及び多能性幹細胞を含む群から選択されるヒトＴ細胞を含む。一実施形態では、１つまたは複数の環状ＲＮＡベクターは、Ｔ細胞受容体モチーフに対する結合ドメインを含む少なくとも１つの細胞標的化リガンドをさらに含む。一実施形態では、１つまたは複数の環状ＲＮＡベクターは、巨大分子複合体、ナノカプセル、ナノ粒子、エキソソーム、エキソソーム－脂質コンジュゲート、微小球、ビーズ、水中油型エマルション、脂質－ナノ粒子コンジュゲート、ミセル、混合ミセル、及びリポソームから本質的になる群から選択される送達ビヒクルをさらに含む。一実施形態では、送達ビヒクルは、Ｔ細胞受容体モチーフに対する結合ドメインを含む少なくとも１つの細胞標的化リガンドをさらに含む。別の実施形態では、細胞標的化リガンドは、Ｔ細胞α鎖、Ｔ細胞β鎖、Ｔ細胞γ鎖、Ｔ細胞δ鎖、ＣＣＲ７、ＣＤ１ａ、ＣＤ１ｂ、ＣＤ１ｃ、ＣＤ１ｄ、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ５、ＣＤ７、ＣＤ８、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１１ｃ、ＣＤ１６、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２１、ＣＤ２２、ＣＤ２５、ＣＤ２８、ＣＤ３４、ＣＤ３５、ＣＤ３９、ＣＤ４０、ＣＤ４５ＲＡ、ＣＤ４５ＲＯ、ＣＤ４６、ＣＤ５２、ＣＤ５６、ＣＤ６２Ｌ、ＣＤ６８、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ９５、ＣＤ１０１、ＣＤ１１７、ＣＤ１２７、ＣＤ１３３、ＣＤ１３７（４－１ＢＢ）、ＣＤ１４８、ＣＤ１６３、Ｆ４／８０、ＩＬ－４Ｒα、Ｓｃａ－１、ＣＴＬＡ－４、ＧＩＴＲ、ＧＡＲＰ、ＬＡＰ、グランザイムＢ、ＬＦＡ－１、トランスフェリン受容体、及びそれらの組み合わせを含む群から選択される。

【００２１】

[0023] 別の態様では、それを必要とする対象におけるがんを治療する方法であって、該方法は、請求項１または請求項１５に記載のＴ細胞受容体融合タンパク質（ＴＦＰ）をコードする単離された組み換え核酸分子を対象に送達するための製剤中の該単離された組み換え核酸分子を該対象に投与することを含み、該単離された組み換え核酸分子がｉｎｖｉｖｏで標的細胞に侵入する、方法を提供する。一実施形態では、単離された組み換え核酸分子は環状ＲＮＡ分子である。別の実施形態では、組み換え核酸は、５’から３’の順に、ｉ）３’スプライス部位を含む外因性イントロンの３’部分、ｉｉ）ＲＮＡエキソンをコードする核酸配列、及びｉｉｉ）５’スプライス部位を含む外因性イントロンの５’部分を含み、該組み換え核酸の転写によって生じるＲＮＡのスプライシングが、該対象における環状ＲＮＡの産生をもたらす。一実施形態では、環状ＲＮＡは、ＤＮＡベクターによっ

てコードされる。一実施形態では、環状ＲＮＡは、標的化部分にコンジュゲートされている。別の実施形態では、環状ＲＮＡは、タンパク質形質導入ドメインまたは細胞透過性ペプチドを含む。別の実施形態では、製剤はナノ粒子を含む。一実施形態では、ナノ粒子は、エキソソーム、リポソーム、またはエキソソーム－リポソームハイブリッドである。別の実施形態では、ナノ粒子は、少なくとも１つの標的化部分を含む。別の実施形態では、標的化部分は、結合リガンド、あるいはマウス抗体またはヒトもしくはヒト化抗体またはそれらの断片である。別の実施形態では、標的化部分は、ＣＤ３、ＣＤ４、またはＣＤ８に特異的に結合する。一実施形態では、標的細胞はヒト免疫細胞である。別の実施形態では、標的細胞は、ＣＤ４＋細胞、ＣＤ８細胞、ナイーブＴ細胞、メモリー幹Ｔ細胞、セントラルメモリーＴ細胞、二重陰性Ｔ細胞、エフェクターメモリーＴ細胞、エフェクターＴ細胞、Ｔｈ１細胞、Ｔｃ１細胞、Ｔｈ２細胞、Ｔｃ２細胞、Ｔｈ１７細胞、Ｔｈ２２細胞、γ／δＴ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、ナチュラルキラーＴ（ＮＫＴ）細胞、造血幹細胞、及び多能性幹細胞を含む群から選択されるヒトＴ細胞である。

【００２２】

[0024] 別の態様では、（ａ）対象におけるがんを治療するのに十分な量で環状ＲＮＡを含有するヒト免疫細胞と、（ｂ）医薬として許容される担体とを含む医薬製剤であって、該環状ＲＮＡが、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）融合タンパク質（ＴＦＰ）をコードし、該ＴＦＰが、（Ａ）ＴＣＲサブユニッであって、（ｉ）ＴＣＲ細胞外ドメインの少なくとも一部分、膜貫通ドメイン、（ｉｉ）細胞内シグナル伝達ドメインからの刺激ドメインを含むＴＣＲ細胞内ドメインを含み、該ＴＣＲサブユニットの該細胞外、膜貫通、及び／または細胞内シグナル伝達ドメインが、ＣＤ３εまたはＣＤ３γまたはＣＤ３δまたはＴＣＲαまたはＴＣＲβまたはＴＣＲδまたはＴＣＲγに由来する、ＴＣＲサブユニットと、（ｉｉｉ）抗原結合ドメインとを含み、該ＴＣＲサブユニットと抗原結合ドメインとが作動可能に連結されており、該ＴＦＰが、Ｔ細胞に発現されたときにＴＣＲに組み込まれる、医薬製剤を提供する。一実施形態では、ＴＣＲ細胞内ドメインは、ＣＤ３εまたはＣＤ３γまたはＣＤ３δに由来する刺激ドメインを含む。別の実施形態では、抗原結合ドメインは、抗体または抗体断片を含む。

【００２３】

[0025] 別の態様では、それを必要とする対象におけるがんを治療する方法であって、該方法は、該対象に環状ＲＮＡを含有するヒト免疫細胞と医薬として許容される担体とを含む有効量の医薬製剤を投与することを含み、該環状ＲＮＡが、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）融合タンパク質（ＴＦＰ）をコードし、該ＴＦＰが、（Ａ）ＴＣＲサブユニットであって、（ｉ）ＴＣＲ細胞外ドメインの少なくとも一部分、膜貫通ドメイン、（ｉｉ）細胞内シグナル伝達ドメインからの刺激ドメインを含むＴＣＲ細胞内ドメインとを含み、該ＴＣＲサブユニットの該細胞外、膜貫通、及び／または細胞内シグナル伝達ドメインが、ＣＤ３εまたはＣＤ３γまたはＣＤ３δまたはＴＣＲαまたはＴＣＲβまたはＴＣＲδまたはＴＣＲγに由来する、ＴＣＲサブユニットと、（ｉｉｉ）抗原結合ドメインとを含み、該ＴＣＲサブユニットと該抗原結合ドメインが作動可能に連結されており、該ＴＦＰが、Ｔ細胞に発現されたときにＴＣＲに組み込まれる、方法を提供する。一実施形態では、該方法は、製剤の単回投与を含む。一実施形態では、ＴＣＲ細胞内ドメインは、ＣＤ３εまたはＣＤ３γまたはＣＤ３δに由来する刺激ドメインを含む。別の実施形態では、抗原結合ドメインは、抗体または抗体断片を含む。一実施形態では、該方法は、製剤の複数回投与を含む。一実施形態では、細胞は、同種異系Ｔ細胞である。別の実施形態では、細胞は自己Ｔ細胞である。

【００２４】

[0026] 別の態様では、提供するのは、環状ＲＮＡと医薬として許容される担体とを含む医薬製剤であって、該環状ＲＮＡが、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）融合タンパク質（ＴＦＰ）をコードし、該ＴＦＰが、（Ａ）ＴＣＲサブユニットであって、（ｉ）ＴＣＲ細胞外ドメインの少なくとも一部分、膜貫通ドメイン、（ｉｉ）細胞内シグナル伝達ドメインから刺激ドメインを含むＴＣＲ細胞内ドメインを含み、該ＴＣＲサブユニットの該細胞外、膜

貫通、及び／または細胞内ドメインが、ＣＤ３εまたはＣＤ３γまたはＣＤ３δまたはＴＣＲαまたはＴＣＲβまたはＴＣＲδまたはＴＣＲγに由来する、ＴＣＲサブユニットと、（ｉｉｉ）抗原結合ドメインとを含み、該ＴＣＲサブユニットと該抗原結合ドメインとが作動可能に連結されており、該ＴＦＰが、Ｔ細胞に発現されたときにＴＣＲに組み込まれる、医薬製剤である。一実施形態では、環状ＲＮＡは、標的化部分にコンジュゲートされている。別の実施形態では、環状ＲＮＡは、タンパク質形質導入ドメイン、細胞透過性ペプチド、またはエンドソーム不安定化（ｅｎｄｏｓｏｍｏｌｙｔｉｃ　ｐｅｐｔｉｄｅ）ペプチドの１つまたは複数を含む。一実施形態では、ＴＣＲ細胞内ドメインは、ＣＤ３εまたはＣＤ３γまたはＣＤ３δに由来する刺激ドメインを含む。別の実施形態では、抗原結合ドメインは、抗体または抗体断片を含む。一実施形態では、製剤はナノ粒子を含む。別の実施形態では、ナノ粒子は、エキソソーム、リポソーム、またはエキソソーム－リポソームハイブリッドである。一実施形態では、ナノ粒子は、少なくとも１つの標的化部分を含む。別の実施形態では、標的化部分は、結合リガンド、あるいはマウス抗体またはヒトもしくはヒト化抗体またはそれらの断片である。一実施形態では、標的化部分は、ＣＤ３、ＣＤ４、またはＣＤ８に特異的に結合する。

【００２５】

参照による援用

[0027] 本明細書で言及されるすべての出版物、特許、及び特許出願は、１つ１つの出版物、特許、または特許出願が参照により援用されると明確にかつ個別に示される場合と同様に、参照により本明細書に援用される。

【００２６】

[0028] 本発明の新規な特徴は、添付の特許請求の範囲に詳細に記載されている。本発明の特徴及び利点のより良い理解が、本発明の原理を利用した例示的な実施形態を記載する以下の詳細な説明及び以下の添付の図面を参照することによって得られる。

【図面の簡単な説明】

【００２７】

【図１】[0029] ＴＦＰをコードしてｉｎ　ｖｉｖｏでＴ細胞に形質導入し、それによってＴＦＰの発現をもたらす、ｃｉｒｃＲＮＡの使用の概略図である。示すように、ｃｉｒｃＲＮＡは、ＴＦＰをコードする配列の上流にあるＩＲＥＳ配列を含む前駆体から生成される。ＴＦＰに連結されたＩＲＥＳには次いで、遠位に向かって、両端に内部相同性配列、続いて順序交換イントロン－エキソン配列、続いて外部相同性配列が隣接して配置される。構築物はこのときに自己スプライスしてｃｉｒｃＲＮＡを生じることが可能である。ｃｉｒｃＲＮＡは、ｍＲＮＡより長く機能性を持続し、保持することができる。ｃｉｒｃＲＮＡは、数キロベース（ｋｂ）のコード配列（ＣＤＳ）をコードすることができる。この概略図は、Ｗｅｓｓｅｌｈｏｅｆｔ　ｅｔ．ａｌ．，Ｎａｔ．Ｃｏｍｍｕｎ．，９：２６－２９．，２０１８から採用している。

【図２】[0030] 本明細書に記載するＧＦＰ　ｃｉｒｃＲＮＡを形成することができる配列番号１４６によってコードされるＲＮＡ前駆体の線状形態及び３次元構造体の概略図である。

【図３】[0031] ＣＶＢ３のＩＲＥＳを有するＧＦＰ　ｃｉｒｃＲＮＡとＥＭＣＶのＩＲＥＳを有するＧＦＰ　ｃｉｒｃＲＮＡの両方についての、ＲＮＡ前駆体及びｃｉｒｃＲＮＡを生成するためのｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写反応の産物を示すアガロースゲルの画像である。

【図４】[0032] ＧＦＰ及びＧＦＰスプライシング変異（配列番号１４７）を発現するＧＦＰ　ｃｉｒｃＲＮＡを形質導入したジャーカット細胞の割合を示すフローサイトメトリーデータのグラフ表示である。この実施例では、ｃｉｒｃＲＮＡは、エレクトロポレーションによってジャーカット細胞に送達された。

【図５】[0033] 本明細書に記載する抗ＣＤ１９－ＴＦＰ　ｃｉｒｃＲＮＡを形成することができる配列番号１４８によってコードされるＲＮＡ前駆体の線状形態及び３次元構造体の概略図である。

【図６】[0034] 実施例１１で生成された抗ＣＤ１９－ＴＦＰ ｃｉｒｃＲＮＡについての、ＲＮＡ前駆体及びｃｉｒｃＲＮＡを生成するためのｉｎ ｖｉｔｒｏ転写反応の産物を示すアガロースゲルの画像である。この実施例は、ＣＶＢ３ 抗ＣＤ１９ ＴＦＰ ｃｉｒｃＲＮＡの環状化を示す。

【図７】[0035] 抗ＣＤ１９－ＴＦＰを発現する抗ＣＤ１９－ＴＦＰ ｃｉｒｃＲＮＡを形質導入したジャーカット細胞の割合を示すフローサイトメトリーデータのグラフ表示である。

【図８】[0036] 本明細書に記載する抗ＭＳＬＮ－ＴＦＰ ｃｉｒｃＲＮＡを形成することができる配列番号１４９によってコードされるＲＮＡ前駆体の線状形態及び３次元構造体の概略図である。

【図９】[0037] 実施例１２で生成された抗ＭＳＬＮ－ＴＦＰ ｃｉｒｃＲＮＡを示すアガロースゲルの画像である。この実施例は、ＣＶＢ３ 抗ＭＳＬＮ ＴＦＰ ｃｉｒｃＲＮＡの環状化を示す。

【図１０】[0038] 抗ＭＳＬＮ－ＴＦＰを発現する抗ＭＳＬＮ－ＴＦＰ ｃｉｒｃＲＮＡを形質導入したジャーカット細胞の割合を示すフローサイトメトリーデータのグラフ表示である。ｃｉｒｃＲＮＡは、エレクトロポレーションによってジャーカット細胞に送達された。

【図１１】[0039] 抗ＭＳＬＮ－ＴＦＰを発現する抗ＭＳＬＮ－ＴＦＰ ｃｉｒｃＲＮＡを形質導入した活性化Ｔ細胞の割合を示すフローサイトメトリーデータのグラフ表示である。ｃｉｒｃＲＮＡは、エレクトロポレーションによって活性化Ｔ細胞に送達された。

【図１２】[0040] 抗ＭＳＬＮ－ＴＦＰを発現する抗ＭＳＬＮ－ＴＦＰ ｃｉｒｃＲＮＡを形質導入した活性化細胞の割合を示す、レンチウイルス抗ＭＳＬＮ－ＴＦＰまたは非形質導入対照と比較した、抗ＭＳＬＮ－ＴＦＰ ｃｉｒｃＲＮＡを形質導入した細胞に見られるエフェクター細胞致死（％）を比較する細胞傷害性アッセイのグラフ表示である。

【図１３】[0041] ＧＦＰ ｃｉｒｃＲＮＡ、示したＴＡＡ（Ｘ）．ＴＦＰ ｃｉｒｃＲＮＡをエレクトロポレーションした細胞、またはエレクトロポレーションしていない対照の表面上のＣＤ３ε及びＧＦＰまたはＶＨＨを検出するフローサイトメトリーデータのグラフ表示である。

【図１４】[0042] レンチウイルスＴＡＡ（Ｘ）．ＴＦＰを形質導入したＴ細胞または非形質導入対照と比較した、ＧＦＰ ｃｉｒｃＲＮＡまたはＴＡＡ（Ｘ）．ＴＦＰ ｃｉｒｃＲＮＡをエレクトロポレーションしたＴ細胞に見られるエフェクター細胞溶解（％）を比較する細胞傷害性アッセイのグラフ表示である。各々の形質導入した／エレクトロポレーションした構築物及び非形質導入対照について、左から右に示すのは、９：１、３：１、及び１：１のエフェクター：標的細胞比でのエフェクター細胞溶解（％）である。

【図１５】[0043] ０％、１０％、及び１００％のｍ６Ａを有する抗ＭＳＬＮ－ＴＦＰ ｃｉｒｃＲＮＡについての、ＲＮＡ前駆体及びｃｉｒｃＲＮＡを生成するためのｉｎ ｖｉｔｒｏ転写反応の産物を示すアガロースゲルの画像である。

【図１６】[0044] ０％、１０％、または１００％のｍ６Ａを有するｃｉｒｃＲＮＡをエレクトロポレーションした細胞または対照における抗ＭＳＬＮ－ＴＦＰの発現及びＭＦＩを示す一連のグラフである。

【発明を実施するための形態】

【００２８】

[0045] 本明細書で提供するのは、対象、例えば、がんを有する対象の治療に使用するための組み換え核酸である。ある特定の態様では、組み換え核酸は、環状ＲＮＡ配列を含む。ある特定の態様では、組み換え核酸は、環状ＲＮＡ配列をコードするＤＮＡを含む。幾つかの実施形態では、組み換え核酸配列は、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）、またはＴ細胞受容体（ＴＣＲ）融合タンパク質（ＴＦＰ）をコードし、該ＴＦＰは、（ａ）ＴＣＲサブユニットであって、（ｉ）ＴＣＲ細胞外ドメインの少なくとも一部分、（ｉｉ）膜貫通ドメイン、及び（ｉｉｉ）ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、ＴＣＲα、ＴＣＲβ、ＴＣＲγ、またはＴＣＲδのＴＣＲ細胞内ドメインを含む、ＴＣＲサ

ブユニットと、（ｂ）抗原結合ドメインとを含み、該ＴＣＲサブユニットと該抗原結合ドメインとは作動可能に連結されており、該ＴＦＰは、Ｔ細胞に発現されたときにＴＣＲに機能的に組み込まれる。幾つかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、刺激ドメイン、例えば、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、またはＣＤ３δからの刺激ドメインを含む。

【００２９】

特定の用語

[0046] 別段の定義がない限り、本明細書に使用されるすべての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって共通に理解される意味と同じ意味を有する。

【００３０】

[0047] 「ａ」及び「ａｎ」という用語は、該冠詞の文法上の目的語が１つまたは２つ以上（すなわち、少なくとも１つ）であることを指す。例として、「エレメント（ａｎ ｅｌｅｍｅｎｔ）」は、１つのエレメントまたは２つ以上のエレメントを意味する。

【００３１】

[0048] 本明細書で使用される場合、「約」は、状況、及び当業者が知っているかまたは知り得ることに応じて、プラスまたはマイナス１パーセント未満、または１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０パーセント、または３０パーセント超を意味し得る。

【００３２】

[0049] 本明細書で使用される場合、「対象（ｓｕｂｊｅｃｔ）」もしくは「対象（ｓｕｂｊｅｃｔｓ）」または「個体」として、哺乳動物、例えば、ヒトまたは非ヒト哺乳動物、例えば、家畜、農業用動物、もしくは野生動物、ならびに鳥類、及び水生動物が挙げることができるが、これらに限定されない。「患者」とは、疾患、障害、または状態を患っているか、またはそれらを発症するリスクがあるか、さもなければ本明細書で提供する組成物及び方法を必要とする対象である。

【００３３】

[0050] 本明細書で使用される場合、「治療すること」または「治療」は、疾患または状態の治療または改善における成功を示す任意の徴候を指す。治療は、例えば、疾患もしくは状態の１つもしくは複数の症状の重症度の低減、遅延、もしくは緩和を含むことができ、または患者が経験する疾患、欠陥、障害、もしくは有害な状態などの症状の頻度の低減を含むことができる。本明細書で使用される場合、「治療または予防する」は、疾患または状態のある程度の治療または改善をもたらす方法を指すために本明細書で使用されることがあり、限定するものではないが、状態の完全な予防を含めた、その目的に向けた様々な結果が企図される。

【００３４】

[0051] 本明細書で使用される場合、「予防すること」は、患者における疾患または状態、例えば腫瘍形成を防止することを指す。例えば、腫瘍または他の形態のがんを発症するリスクのある個体が本開示の方法で治療され、その後腫瘍または他の形態のがんを発症しないならば、疾患は、少なくともある期間にわたってその個体において予防されている。

【００３５】

[0052] 本明細書で使用される場合、「治療的有効量」は、組成物またはその活性成分の量であって、該組成物を投与される個体に対して、有益効果をもたらすか、さもなければ有害で非有益な事象を低減させるのに十分な量である。本明細書における「治療的有効用量」は、それが投与されたことに対して１つまたは複数の所望のまたは望ましい（例えば有益な）効果を生み出す用量を意味しており、そのような投与は所与の期間にわたって一回または複数回行われる。正確な用量は、治療の目的に応じて異なることとなり、当業者によって公知の技法を使用して確定されることとなる（例えば、Ｌｉｅｂｅｒｍａｎ，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ（ｖｏｌｓ．１－３，１９９２）；Ｌｌｏｙｄ，Ｔｈｅ Ａｒｔ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ

ｏｆ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｃｏｍｐｏｕｎｄｉｎｇ（１９９９）；及びＰｉｃｋａｒ，Ｄｏｓａｇｅ　Ｃａｌｃｕｌａｔｉｏｎｓ（１９９９）を参照されたい）。

【００３６】

[0053] 本明細書で使用される場合、「Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）融合タンパク質」または「ＴＦＰ」は、ＴＣＲを含む様々なポリペプチドに由来する組み換えポリペプチドを含み、該ＴＣＲは、一般に、ｉ）標的細胞の表面抗原に結合することができ、かつｉｉ）典型的にはＴ細胞内またはＴ細胞の表面上の同じ場所に位置するときに、インタクトなＴＣＲ複合体の他のポリペプチド成分と相互作用することができる。

【００３７】

[0054] 「刺激」という用語は、刺激ドメインまたは刺激分子（例えば、ＴＣＲ／ＣＤ３複合体）がその同族リガンドと結合し、それによってシグナル伝達事象、例えば、限定するものではないが、ＴＣＲ／ＣＤ３複合体を介するシグナル伝達を媒介することによって誘導される一次応答を指す。刺激は、ある種の分子の発現の変更、及び／または細胞骨格構造の再構築などを媒介し得る。

【００３８】

[0055] 「刺激分子」または「刺激ドメイン」という用語は、Ｔ細胞によって発現される分子またはその一部分であって、Ｔ細胞シグナル伝達経路の少なくともある側面に対して刺激を与えるようにＴＣＲ複合体の一次活性化を制御する一次細胞質シグナル伝達配列（複数可）を提供するものを指す。一態様では、一次シグナルは、例えば、ＴＣＲ／ＣＤ３複合体がペプチドを担持するＭＨＣ分子と結合することによって開始され、これによって、限定するものではないが、増殖、活性化、分化などのＴ細胞応答が媒介される。刺激を与えるように作用する一次細胞質シグナル伝達配列（「一次シグナル伝達ドメイン」とも呼ばれる）は、免疫受容活性化チロシンモチーフまたは「ＩＴＡＭ」として公知のシグナル伝達モチーフを含有し得る。本開示に特に有用な一次細胞質シグナル伝達配列を含有するＩＴＡＭの例として、ＴＣＲζ、ＦｃＲγ、ＦｃＲβ、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、ＣＤ３ε、ＣＤ５、ＣＤ２２、ＣＤ７９ａ、ＣＤ７９ｂ、ＣＤ２７８（「ＩＣＯＳ」としても公知である）及びＣＤ６６ｄに由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。

【００３９】

[0056] 「抗原提示細胞」または「ＡＰＣ」という用語は、アクセサリー細胞（例えば、Ｂ細胞、樹状細胞など）などの免疫系細胞であって、その表面上で主要組織適合抗原複合体（ＭＨＣ）と複合体化した外来抗原を表示するものを指す。Ｔ細胞は、それらのＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を使用して、これらの複合体を認識し得る。ＡＰＣは、抗原を処理し、それらをＴ細胞に提示する。

【００４０】

[0057] 主要組織適合抗原複合体（ＭＨＣ）分子は、典型的には、ペプチド：ＭＨＣ複合体の一部としてＴＣＲによって結合される。ＭＨＣ分子は、ＭＨＣクラスＩまたはＩＩ分子であり得る。該複合体は、樹状細胞もしくはＢ細胞などの抗原提示細胞、またはがん細胞を含めた任意の他の細胞の表面上に存在し得るか、あるいは、例えば、ビーズまたはプレートにコーティングすることによって、固定化されていることがある。

【００４１】

[0058] 「細胞内シグナル伝達ドメイン」は、この用語が本明細書で使用される場合、分子の細胞内部分を指す。細胞内シグナル伝達ドメインは、ＴＦＰ含有細胞、例えば、改変Ｔ－Ｔ細胞の免疫エフェクター機能を促進するシグナルを生成する。例えば、改変Ｔ－Ｔ細胞における免疫エフェクター機能の例として、細胞溶解活性、及びサイトカインの分泌を含めたヘルパーＴ細胞活性が挙げられる。ある実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、一次細胞内シグナル伝達ドメインを含み得る。例示的な一次細胞内シグナル伝達ドメインとして、一次刺激、または抗原依存性刺激に関与する分子に由来するものが挙げられる。ある実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激細胞内ドメインを含み得る。例示的な共刺激細胞内シグナル伝達ドメインとして、共刺激シグナルまたは抗原非依存性刺激に関与する分子に由来するものが挙げられる。

【００４２】
[0059] 一次細胞内シグナル伝達ドメインは、ＩＴＡＭ（「免疫受容活性化チロシンモチーフ」）を含み得る。ＩＴＡＭを含有する一次細胞質シグナル伝達配列の例として、ＣＤ３ζ、ＦｃＲγ、ＦｃＲβ、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、ＣＤ３ε、ＣＤ５、ＣＤ２２、ＣＤ７９ａ、ＣＤ７９ｂ、及びＣＤ６６ｄ　ＤＡＰ１０、及びＤＡＰ１２に由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。
【００４３】
[0060] 「共刺激分子」という用語は、共刺激リガンドに特異的に結合し、それによって、限定するものではないが、増殖などのＴ細胞による共刺激応答を媒介する、Ｔ細胞上の同族結合パートナーを指す。共刺激分子は、効率的な免疫応答に使用され得る、抗原受容体またはそれらのリガンド以外の細胞表面分子である。共刺激分子として、ＭＨＣクラス１分子、ＢＴＬＡ、及びＴｏｌｌリガンド受容体、ならびにＯＸ４０、ＣＤ２、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤＳ、ＩＣＡＭ－１、ＬＦＡ－１（ＣＤ１１ａ／ＣＤ１８）、及び４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）が挙げられるが、これらに限定されない。共刺激細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激分子の細胞内部分であり得る。共刺激分子は、次のタンパク質ファミリー：ＴＮＦ受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ球活性化分子（ＳＬＡＭタンパク質）、及び活性化ＮＫ細胞受容体に代表され得る。そのような分子の例として、ＣＤ２７、ＣＤ２８、４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）、ＯＸ４０、ＧＩＴＲ、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＩＣＯＳ、ＢＡＦＦＲ、ＨＶＥＭ、リンパ球機能関連抗原１（ＬＦＡ－１）、ＣＤ２、ＣＤ７、ＬＩＧＨＴ、ＮＫＧ２Ｃ、ＳＬＡＭＦ７、ＮＫｐ８０、ＣＤ１６０、Ｂ７－Ｈ３、及びＣＤ８３に特異的に結合するリガンドなどが挙げられる。細胞内シグナル伝達ドメインは、それが由来する分子の細胞内部分全体、もしくは本来の細胞内シグナル伝達ドメイン全体、またはそれらの機能的断片を含み得る。「４－１ＢＢ」という用語は、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＡＡ６２４７８．２として提供されるアミノ酸配列、または非ヒト種、例えば、マウス、げっ歯類、サル、類人猿などからの同等な残基を有する、ＴＮＦＲスーパーファミリーのメンバーを指し、「４－１ＢＢ共刺激ドメイン」は、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＡＡ６２４７８．２のアミノ酸残基２１４～２５５、または非ヒト種、例えば、マウス、げっ歯類、サル、類人猿などからの同等の残基として定義される。
【００４４】
[0061] 「抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、抗原に特異的に結合する免疫グロブリン分子に由来するタンパク質またはポリペプチド配列を指す。抗体は、ポリクローナルもしくはモノクローナル起源のインタクトな免疫グロブリンまたはそれらの断片であってもよく、天然源由来であっても組み換え源由来であってもよい。
【００４５】
[0062] 「抗体断片」という用語は、抗体の少なくとも一部分またはその組み換え変異体であって、抗原及びその所定のエピトープなどの標的に対する認識及び特異的結合を抗体断片に付与するのに十分な、インタクトな抗体の抗原結合ドメイン、すなわち抗原を決定する可変領域を含有するものを指す。抗体断片の例として、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、及びＦｖ断片、一本鎖（ｓｃ）Ｆｖ（「ｓｃＦｖ」）抗体断片、線状抗体、ｓｄＡｂなどの単一ドメイン抗体（V_LまたはV_Hのいずれか）、ラクダ科V_HHドメイン、及び抗体断片から形成される多重特異性抗体が挙げられるが、これらに限定されない。
【００４６】
[0063] 「ｓｃＦｖ」という用語は、軽鎖の可変領域を含む少なくとも１つの抗体断片と、重鎖の可変領域を含む少なくとも１つの抗体断片とを含む融合タンパク質であって、軽鎖可変領域と重鎖可変領域とが短いフレキシブルなポリペプチドリンカーによって隣接して連結され、単一のポリペプチド鎖として発現することが可能であり、該ｓｃＦｖが、その由来であるインタクトな抗体の特異性を保持しているものを指す。
【００４７】
[0064] 抗体に関する「重鎖可変領域」または「V_H」は、フレームワーク領域として

公知の隣接するストレッチ間に介在する３つのＣＤＲを含有する重鎖の断片を指し、これらのフレームワーク領域は一般に、ＣＤＲより高度に保存され、ＣＤＲを支持する足場を形成する。ラクダ科「V_HH」ドメインは、単一の可変抗体ドメインを含む重鎖である。

【００４８】

[0065] 指定されない限り、本明細書で使用される場合、ｓｃＦｖは、例えば、ポリペプチドのＮ末端及びＣ末端に対して、V_L及びV_H可変領域をいずれの順序で有してもよく、ｓｃＦｖは、V_L－リンカー－V_Hを含んでも、V_H－リンカー－V_Lを含んでもよい。

【００４９】

[0066] 抗体またはその抗体断片を含む本開示のＴＦＰ組成物の一部分は、例えば、マウス、ヒト化、またはヒト抗体に由来する単一ドメイン抗体断片（ｓｄＡｂ）、一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）を含めた、抗原結合ドメインが連続するポリペプチド鎖の一部として発現される種々の形態で存在してもよい（Ｈａｒｌｏｗ ｅｔ ａｌ．，１９９９，Ｉｎ：Ｕｓｉｎｇ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｎ．Ｙ．；Ｈａｒｌｏｗ ｅｔ ａｌ．，１９８９，Ｉｎ：Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．；Ｈｏｕｓｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，１９８８，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８５：５８７９－５８８３；Ｂｉｒｄ ｅｔ ａｌ．，１９８８，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４２：４２３－４２６）。一態様では、本開示のＴＦＰ組成物の抗原結合ドメインは、抗体断片を含む。さらなる態様では、ＴＦＰは、ｓｃＦｖまたはｓｄＡｂを含む抗体断片を含む。

【００５０】

[0067] 「組み換え抗体」という用語は、組み換えＤＮＡ技術を使用して生成される抗体、例えば、バクテリオファージまたは酵母発現系によって発現される抗体などを指す。この用語はまた、抗体をコードし、抗体タンパク質を発現するＤＮＡ分子、または抗体を特定するアミノ酸配列の合成によって生成された抗体を意味すると解釈されるものとし、該ＤＮＡまたはアミノ酸配列は、当技術分野で利用可能であり、周知されている組み換えＤＮＡまたはアミノ酸配列技術を使用して得られたものである。

【００５１】

[0068] 「抗原」または「Ａｇ」という用語は、抗体が特異的に結合することができる分子、さもなければ免疫応答を誘発する分子を指す。この免疫応答は、抗体産生、もしくは特定の免疫適格細胞の活性化、または両方を含み得る。

【００５２】

[0069] 当業者であれば、実質的にすべてのタンパク質またはペプチドを含めた任意の巨大分子が抗原として機能し得ることを理解するであろう。さらに、抗原は、組み換えまたはゲノムＤＮＡに由来し得る。したがって、当業者であれば、免疫応答を誘発するタンパク質をコードするヌクレオチド配列または部分的ヌクレオチド配列を含む任意のＤＮＡが、本明細書で使用される用語としての「抗原」をコードすることを理解するであろう。さらに、当業者であれば、抗原が遺伝子の完全長ヌクレオチド配列によってのみコードされる必要がないことを理解するであろう。本開示には、限定するものではないが、２つ以上の遺伝子の部分的なヌクレオチド配列の使用が含まれること、そしてこれらのヌクレオチド配列が所望の免疫応答を誘発するポリペプチドをコードするように様々な組み合わせで配置されることが容易に認められる。さらに、当業者であれば、抗原は、「遺伝子」によってコードされる必要が全くないことを理解するであろう。抗原は、合成で生成されてもよく、または生体試料に由来してもよく、またはポリペプチド以外の巨大分子であってもよいことが容易に認められる。そのような生体試料として、組織試料、腫瘍試料、細胞、または他の生体内成分を有する液体を挙げることができるが、これらに限定されない。

【００５３】

[0070]本明細書で使用される場合、「ＣＤ１９」という用語は、Ｂ細胞白血病前駆細胞、他の悪性Ｂ細胞、及び正常なＢ細胞系統のほとんどの細胞で検出可能な抗原決定基であ

る分化抗原群１９タンパク質を指す。

【００５４】

[0071]本明細書で使用される場合、「ＢＣＭＡ」という用語は、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー１７（ＴＮＦＲＳＦ１７）としても公知のＢ細胞成熟抗原を指し、分化抗原群２６９タンパク質（ＣＤ２６９）は、ヒトにおいてＴＮＦＲＳＦ１７遺伝子によってコードされるタンパク質である。ＴＮＦＲＳＦ１７は、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）を認識するＴＮＦ受容体スーパーファミリーの細胞表面受容体である（例えば、Ｌａａｂｉ　ｅｔ　ａｌ．，ＥＭＢＯ　１１（１１）：３８９７－９０４（１９９２）を参照されたい）。この受容体は成熟Ｂリンパ球に発現しており、Ｂ細胞の発生と自己免疫応答に重要であり得る。

【００５５】

[0072] 本明細書で使用される場合、「ＣＤ１６」（ＦｃγＲＩＩＩとしても公知である）という用語は、ナチュラルキラー細胞、好中球多形核白血球、単球、及びマクロファージの表面に見出される分化抗原群分子を指す。ＣＤ１６は、シグナル伝達に関与するＦｃ受容体ＦｃγＲＩＩＩａ（ＣＤ１６ａ）及びＦｃγＲＩＩＩｂ（ＣＤ１６ｂ）であると特定されている。ＣＤ１６は、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）に関与する免疫グロブリンスーパーファミリー（ＩｇＳＦ）の分子である。

【００５６】

[0073] 本明細書で使用される場合、「ＮＫＧ２Ｄ」は、Ｃ型レクチン様受容体のＣＤ９４／ＮＫＧ２ファミリーに属する膜貫通タンパク質を指す。ヒトでは、ＮＫＧ２Ｄは、ＮＫ細胞、γδＴ細胞、及びＣＤ８＋αβＴ細胞によって発現される。ＮＫＧ２Ｄは、ストレス細胞、悪性に形質転換された細胞、及び感染細胞の表面に出現するＭＩＣ及びＲＡＥＴ１／ＵＬＢＰファミリーの誘導性自己タンパク質を認識する。

【００５７】

[0074] メソテリン（ＭＳＬＮ）は、胸膜、腹膜、及び心膜の内側を覆う中皮細胞に通常存在する腫瘍分化抗原を指す。メソテリンは、中皮腫、卵巣腺癌、及び膵臓腺癌を含む幾つかのヒト腫瘍で過剰発現する。

【００５８】

[0075] 神経栄養チロシンキナーゼ受容体関連１（ＮＴＲＫＲ１）関連１（ＮＴＲＫＲ１）としても公知のチロシン－プロテインキナーゼ膜貫通受容体ＲＯＲ１は、受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体（ＲＯＲ）ファミリーのメンバーである。それはがんの転移に役割を果たしている。

【００５９】

[0076] 「ムチン１６、細胞表面関連」または「卵巣癌関連腫瘍マーカーＣＡ１２５」としても公知の「ＭＵＣ１６」という用語は、アミノ末端側に細胞外ドメイン、大きなタンデム繰返しドメイン、及び短い細胞質ドメインを有する膜貫通ドメインを含有する膜係留ムチンである。この遺伝子の産物は種々のがんのマーカーとして使用されており、発現レベルの上昇に伴って転帰が悪化する。

【００６０】

[0077] シアル酸結合Ｉｇ様レクチン２、ＳＩＧＬＥＣ－２、Ｔ細胞表面抗原ｌｅｕ－１４、及びＢ細胞受容体ＣＤ２２としても公知の「ＣＤ２２」という用語は、Ｂ細胞／Ｂ細胞相互作用を媒介するタンパク質であり、リンパ組織内でのＢ細胞の局在に関与していると考えられており、難治性血液癌及びヘアリーセル白血病を含めた疾患に関連している。本明細書に開示される方法での使用に適した完全ヒト抗ＣＤ２２モノクローナル抗体（「Ｍ９７１」）は、例えばＸｉａｏ　ｅｔ　ａｌ．，ＭＡｂｓ．２００９　Ｍａｙ－Ｊｕｎ；１（３）：２９７－３０３に記載されている。

【００６１】

[0078] 「ＣＤ７９α」及び「ＣＤ７９β」遺伝子は、Ｂリンパ球抗原受容体を構成するタンパク質、すなわち抗原特異的成分、表面免疫グロブリン（Ｉｇ）を含む多量体複合体をコードする。表面Ｉｇは、Ｂ細胞抗原受容体の発現及び機能に必要な、他の２つのタ

ンパク質であるＩｇ－α及びＩｇ－β（それぞれ、ＣＤ７９α及びそのパラログＣＤ７９βによってコードされる）と非共有結合する。この複合体の機能的破壊によって、例えばヒトＢ細胞慢性リンパ性白血病に至ることがある。

【００６２】

[0079] Ｂ細胞活性化因子、すなわち「ＢＡＦＦ」は、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）リガンドファミリーに属するサイトカインである。このサイトカインは、受容体ＴＮＦＲＳＦ１３Ｂ／ＴＡＣＩ、ＴＮＦＲＳＦ１７／ＢＣＭＡ、及びＴＮＦＲＳＦ１３Ｃ／ＢＡＦＦ－Ｒのリガンドである。このサイトカインはＢ細胞系統細胞で発現し、強力なＢ細胞活性化因子として機能する。また、Ｂ細胞の増殖と分化に重要な役割を果たすことも示されている。

【００６３】

[0080] 「抗腫瘍効果」という用語は、例えば、腫瘍体積の減少、腫瘍細胞数の減少、転移数の減少、期待余命の延長、腫瘍細胞増殖の減少、腫瘍細胞生存率の低下、またはがん病態に伴う様々な生理学的症状の改善を含むがこれらに限定されない、種々の手段によって顕在化し得る生物学的効果を指す。「抗腫瘍効果」はまた、本開示のペプチド、ポリヌクレオチド、細胞、及び抗体が、そもそも腫瘍の発生を予防する能力によっても顕在化することがある。

【００６４】

[0081] 「自己由来」という用語は、同じ個体に由来する任意の物質が、後にその個体へ再導入されることを指す。

[0082] 「同種異系」または代替的に「同種」という用語は、物質が導入される個体と同じ種の異なる動物または異なる患者に由来する任意の物質を指す。１つまたは複数の遺伝子座の遺伝子が同一でない場合に、２つ以上の個体は互いに同種異系であると言われる。幾つかの態様では、同じ種の個体からの同種異系の物質は、抗原的に相互作用するには十分に遺伝的に異なり得る。

【００６５】

[0083] 「異種」という用語は、異なる種の動物に由来する移植片を指す。

[0084] 「がん」という用語は、急速で無制御な異常細胞の増殖によって特徴付けられる疾患を指す。がん細胞は、局所的に、または血流及びリンパ系を通して体の他の部分に広がり得る。様々ながんの例は、本明細書に記載されており、それらとして、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、皮膚癌、膵癌、結腸直腸癌、腎癌、肝臓癌、脳癌、リンパ腫、白血病、肺癌などが挙げられるが、これらに限定されない。

【００６６】

[0085] 「コードする」という用語は、定義されたヌクレオチド配列（例えば、ｒＲＮＡ、ｔＲＮＡ、及びｍＲＮＡ）または定義されたアミノ酸配列のいずれか、及びそれに起因する生物学的特性を有する生物学的プロセスにおいて、他のポリマー及び巨大分子を合成するための鋳型として機能する、遺伝子、ｃＤＮＡ、またはｍＲＮＡなどの、ポリヌクレオチド中のヌクレオチドの特定の配列の固有特性を指す。よって、遺伝子、ｃＤＮＡ、またはＲＮＡは、その遺伝子に対応するｍＲＮＡの転写及び翻訳が細胞または他の生体系内でタンパク質を産生するならば、タンパク質をコードする。ｍＲＮＡの配列と同一であり、通常配列表に示されるヌクレオチド配列であるコード鎖と、遺伝子またはｃＤＮＡを転写するための鋳型として使用される非コード鎖は、両方とも、その遺伝子またはｃＤＮＡのタンパク質または他の産物をコードするとみなすことができる。

【００６７】

[0086] 別段の指定がない限り、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」には、互いの縮重型であって、同じアミノ酸配列をコードするすべてのヌクレオチド配列が含まれる。タンパク質またはＲＮＡをコードするヌクレオチド配列という語句には、該タンパク質をコードするヌクレオチド配列が幾つかの型において１つまたは複数のイントロンを含有することがあるという範囲でイントロンが含まれてもよい。

【００６８】

[0087] 「有効量」または「治療的有効量」という用語は、本明細書では相互に交換可能に使用され、本明細書に記載する通りの化合物、製剤、物質、または組成物の特定の生物学的または治療的結果を実現するのに有効な量を指す。

【００６９】

[0088] 「内因性」という用語は、生物、細胞、組織、または系の内部に由来するか、またはそれらの内部で生成される任意の物質を指す。

[0089] 「外因性」という用語は、生物、細胞、組織、または系の外部から導入されるか、またはそれらの外部で生成される任意の物質を指す。

【００７０】

[0090] 「発現」という用語は、プロモーターによって駆動される、特定のヌクレオチド配列の転写及び／または翻訳を指す。

[0091] 「機能的破壊」という用語は、特定の（例えば、標的）核酸に対する（例えば、遺伝子、ＲＮＡ転写物に対しての、それによってコードされるタンパク質の）物理的または生化学的変化であって、細胞内でのその正常な発現及び／または挙動を妨げるものを指す。一実施形態では、機能的破壊とは、遺伝子編集法による遺伝子の改変を指す。一実施形態では、機能的破壊は、標的遺伝子（例えば内因性遺伝子）の発現を妨げる。

【００７１】

[0092] 「移入ベクター」という用語は、単離された核酸を含む組成物であって、単離された核酸を細胞の内側に送達するために使用することができるものを指す。多数のベクターが当技術分野で公知であり、それらとして、線状ポリヌクレオチド、イオン性または両親媒性化合物に会合したポリヌクレオチド、プラスミド、及びウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。よって、「移入ベクター」という用語には、自己複製プラスミドまたはウイルスが含まれる。この用語にはまた、核酸の細胞への移入を促進する非プラスミドまたは非ウイルス化合物、例えば、ポリリジン化合物、リポソームなどがさらに含まれると解釈されるものとする。ウイルス移入ベクターの例として、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【００７２】

[0093] 「発現ベクター」という用語は、発現させようとするヌクレオチド配列に作動可能に連結された発現調節配列を含む組み換えポリヌクレオチドを含むベクターを指す。発現ベクターは、発現に十分なシス作用性エレメントを含み、発現のための他のエレメントは、宿主細胞によって、またはｉｎ ｖｉｔｒｏでの発現系において供給され得る。発現ベクターとして、当技術分野で公知のすべてのものが挙げられ、それらとして、組み換えポリヌクレオチドを組み込んだ、コスミド、プラスミド（例えば、裸のものまたはリポソーム中に含有されたもの）、及びウイルス（例えば、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、及びアデノ随伴ウイルス）が挙げられる。

【００７３】

[0094] 「レンチウイルス」という用語は、レトロウイルス科の属を指す。レンチウイルスは、非分裂細胞に感染することができるという点で、レトロウイルスの中でも独特である。それらは、宿主細胞のＤＮＡに相当量の遺伝情報を送達することができるので、遺伝子送達ベクターの最も効率的な方法のうちの一つである。ＨＩＶ、ＳＩＶ、及びＦＩＶは、すべてレンチウイルスの例である。

【００７４】

[0095] 「レンチウイルスベクター」という用語は、レンチウイルスゲノムの少なくとも一部分に由来するベクターを指し、それとして、とりわけ、Ｍｉｌｏｎｅ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．１７（８）：１４５３－１４６４（２００９）に示されるような自己不活性化レンチウイルスベクターが挙げられる。臨床で使用することができるレンチウイルスベクターの他の例として、Ｏｘｆｏｒｄ ＢｉｏＭｅｄｉｃａのＬＥＮＴＩＶＥＣＴＯＲ（商標）遺伝子送達技術、ＬｅｎｔｉｇｅｎのＬＥＮＴＩＭＡＸ（商標）ベクター系などが挙げられるが、これらに限定されない。非臨床タイプのレンチウイルスベクタ

ーも利用可能であり、当業者には公知であろう。
【００７５】
[0096] 「相同」または「同一性」という用語は、２つのポリマー分子間、例えば、２つのＤＮＡ分子もしくは２つのＲＮＡ分子などの２つの核酸分子間、または２つのポリペプチド分子間のサブユニット配列の同一性を指す。２つの分子の両方におけるあるサブユニット位置が同じ単量体のサブユニットで占められているとき、例えば、２つのＤＮＡ分子の各々におけるある位置がアデニンで占められているならば、それらは、その位置で相同または同一である。２つの配列間の相同性は、一致するまたは相同な位置の数の一次関数であり、例えば、２つの配列における位置の半分（例えば、長さ１０のサブユニットのポリマー中で５つの位置）が相同であるならば、２つの配列は５０％相同であり、位置の９０％（例えば、１０のうち９）が一致するまたは相同であるならば、２つの配列は９０％相同である。
【００７６】
[0097] 非ヒト（例えば、マウス）抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含有する、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、またはそれらの断片（Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、または抗体の他の抗原結合サブ配列など）である。ほとんどの部分で、ヒト化抗体及びその抗体断片はヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体または抗体断片）であり、それにおいて該レシピエントの相補性決定領域（ＣＤＲ）からの残基は、所望の特異性、親和性、及び能力を有するマウス、ラット、またはウサギなどの非ヒト種（ドナー抗体）のＣＤＲからの残基によって置きかえられている。幾つかの場合では、ヒト免疫グロブリンのＦｖフレームワーク領域（ＦＲ）残基が、対応する非ヒト残基によって置きかえられている。さらに、ヒト化抗体／抗体断片は、レシピエント抗体にも、移入されたＣＤＲまたはフレームワーク配列にも見出されない残基を含むことができる。これらの改変によって、抗体または抗体断片の性能をさらに洗練し、最適化することができる。一般に、ヒト化抗体またはその抗体断片は、少なくとも１つ、典型的には２つの可変ドメインの実質的にすべてを含むものであり、それにおいてＣＤＲ領域のすべてまたは実質的にすべてが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、ＦＲ領域のすべてまたは相当な部分がヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体または抗体断片は、免疫グロブリンの定常領域（Ｆｃ）、典型的にはヒト免疫グロブリンのものの少なくとも一部分も含むことができる。さらなる詳細については、Ｊｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３２１：５２２－５２５，１９８６；Ｒｅｉｃｈｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３３２：３２３－３２９，１９８８；Ｐｒｅｓｔａ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．，２：５９３－５９６，１９９２を参照されたい。
【００７７】
[0098] 「ヒト」または「完全ヒト」は、抗体または抗体断片などの免疫グロブリンであって、分子全体がヒト起源のものであるか、またはヒト型の抗体もしくは免疫グロブリンと同一のアミノ酸配列からなるものを指す。
【００７８】
[0099] 「単離された」という用語は、天然の状態から変更されたか、または取り出されたことを意味する。例えば、生きている動物に天然に存在する核酸またはペプチドは「単離された」ものではないが、同じ核酸またはペプチドであって、その天然の状態の共存する物質から部分的にまたは完全に分離されたものは、「単離された」ものである。単離された核酸またはタンパク質は、実質的に精製された形態で存在することができ、または、例えば、宿主細胞などの非天然環境で存在することができる。
【００７９】
[0100] 本開示との関係において、通常存在する核酸塩基について、次の略語が使用される。「Ａ」はアデノシンを指し、「Ｃ」はシトシンを指し、「Ｇ」はグアノシンを指し、「Ｔ」はチミジンを指し、「Ｕ」はウリジンを指す。
【００８０】
[0101] 「保存的配列改変」という用語は、アミノ酸配列を含有する抗体または抗体断

片の結合特性に有意な影響を与えないか、またはそれを変更しないアミノ酸改変を指す。そのような保存的改変には、アミノ酸の置換、付加、及び欠失が含まれる。改変は、部位特異的変異誘発及びＰＣＲ媒介変異誘発などの当技術分野で公知の標準的技法によって、本発明の抗体または抗体断片に導入することができる。保存的アミノ酸置換は、アミノ酸残基を、類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置きかえるものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野で定義されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、β分枝側鎖を有するアミノ酸（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）、及び芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が含まれる。よって、本開示のＴＦＰ中の１つまたは複数のアミノ酸残基は、同じ側鎖ファミリーからの他のアミノ酸残基で置きかえることができ、変更されたＴＦＰは、本明細書に記載する機能アッセイを使用して試験することができる。

【００８１】

[0102] 「作動可能に連結された」または「転写調節」という用語は、異種核酸配列の発現をもたらす、制御配列と異種核酸配列との間の機能的連結を指す。例えば、第１の核酸配列が第２の核酸配列と機能的な関係に置かれているとき、第１の核酸配列は第２の核酸配列と作動可能に連結されている。例えば、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響を与えるならば、該プロモーターは該コード配列に作動可能に連結されている。作動可能に連結されたＤＮＡ配列は、互いに隣接していてもよく、例えば、２つのタンパク質コード領域を結合するために必要な場合、同じリーディングフレーム内にある。

【００８２】

[0103] 免疫原性組成物の「非経口」投与という用語には、例えば、皮下（ｓ．ｃ．）、静脈内（ｉ．ｖ．）、筋肉内（ｉ．ｍ．）、もしくは胸骨内注射、腫瘍内または注入技法が含まれる。

【００８３】

[0104] 「核酸」または「ポリヌクレオチド」という用語は、一本鎖または二本鎖の形態のいずれかのデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）またはリボ核酸（ＲＮＡ）及びそれらのポリマーを指す。特に限定しない限り、この用語は、参照核酸と同様の結合特性を有し、天然に存在するヌクレオチドと同様に代謝される、天然のヌクレオチドの公知の類似体を含有する核酸を包含する。別段の指示がない限り、特定の核酸配列は、明確に示された配列だけでなく、保存的に改変されたその変異体（例えば、縮重コドン置換）、対立遺伝子、相同分子種、ＳＮＰ、及び相補的配列も暗黙的に包含する。具体的には、縮重コドン置換は、１つまたは複数の選択された（またはすべての）コドンの３番目の位置が混合塩基及び／またはデオキシイノシン残基で置換された配列を生成することによって実現することができる（Ｂａｔｚｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．１９：５０８１（１９９１）；Ｏｈｔｓｕｋａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６０：２６０５－２６０８（１９８５）；及びＲｏｓｓｏｌｉｎｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｐｒｏｂｅｓ ８：９１－９８（１９９４））。

【００８４】

[0105] 「ペプチド」、「ポリペプチド」、及び「タンパク質」という用語は、相互に交換可能に使用され、ペプチド結合によって共有結合的に連結されたアミノ酸残基からなる化合物を指す。タンパク質またはペプチドは、少なくとも２つのアミノ酸を含有することができ、タンパク質またはペプチド配列を構成することができるアミノ酸の最大数については、制限がない。ポリペプチドには、ペプチド結合によって互いに結合された２つ以上のアミノ酸を含む任意のペプチドまたはタンパク質が含まれる。本明細書で使用される場合、この用語は、例えば、通常、当技術分野でペプチド、オリゴペプチド、及びオリゴ

マーとも呼ばれる短鎖と、一般に当技術分野でタンパク質と呼ばれ、多くのタイプが存在する長鎖の両方を指す。「ポリペプチド」には、例えば、とりわけ、生物学的に活性な断片、実質的に相同なポリペプチド、オリゴペプチド、ホモ二量体、ヘテロ二量体、ポリペプチドの変異体、改変されたポリペプチド、誘導体、類似体、融合タンパク質が含まれる。ポリペプチドには、天然のペプチド、組み換えペプチド、またはそれらの組み合わせが含まれる。

【００８５】

[0106] 「プロモーター」という用語は、ポリヌクレオチド配列の特異的転写を開始するのに使用され得る、細胞の転写機構または導入された合成機構によって認識されるＤＮＡ配列を指す。

【００８６】

[0107] 「プロモーター／制御配列」という用語は、プロモーター／制御配列に作動可能に連結された遺伝子産物の発現に使用される核酸配列を指す。幾つかの場合では、この配列はコアプロモーター配列であってもよく、他の場合では、この配列は、エンハンサー配列及び遺伝子産物の発現に使用される他の制御エレメントも含んでもよい。プロモーター／制御配列は、例えば、遺伝子産物を組織特異的に発現するものであってもよい。

【００８７】

[0108] 「構成的」プロモーターという用語は、ヌクレオチド配列であって、遺伝子産物をコードするまたは特定するポリヌクレオチドと作動可能に連結されているとき、細胞のほとんどまたはすべての生理的条件下で該細胞内に該遺伝子産物を産生させるものを指す。

【００８８】

[0109] 「誘導性プロモーター」という用語は、ヌクレオチド配列であって、遺伝子産物をコードするまたは特定するポリヌクレオチドと作動可能に連結されているとき、実質的にプロモーターに対応する誘導物質が細胞内に存在するときのみ、該細胞内に該遺伝子産物を産生させるものを指す。

【００８９】

[0110] 「組織特異的」プロモーターという用語は、ヌクレオチド配列であって、遺伝子をコードするまたは遺伝子によって特定されるポリヌクレオチドと作動可能に連結されているとき、実質的に細胞が該プロモーターに対応する組織タイプの細胞である場合にのみ、該細胞内に該遺伝子産物を産生させるものを指す。

【００９０】

[0111] 「リンカー」及び「フレキシブルポリペプチドリンカー」という用語は、ｓｃＦｖとの関係において使用される場合、グリシン及び／またはセリン残基などのアミノ酸からなるペプチドリンカーであって、可変重鎖及び可変軽鎖領域を一緒に連結するために単独でまたは組み合わせて使用されるものを指す。一実施形態では、フレキシブルポリペプチドリンカーは、Ｇｌｙ／Ｓｅｒリンカーであり、アミノ酸配列（Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ）$_n$を含み、式中、ｎは、１以上の正の整数である。例えば、ｎ＝１、ｎ＝２、ｎ＝３、ｎ＝４、ｎ＝５、ｎ＝６、ｎ＝７、ｎ＝８、ｎ＝９、及びｎ＝１０である。一実施形態では、フレキシブルポリペプチドリンカーには、（Ｇｌｙ$_4$Ｓｅｒ）$_4$または（Ｇｌｙ$_4$Ｓｅｒ）$_3$が含まれるが、これらに限定されない。別の実施形態では、リンカーには、（Ｇｌｙ$_2$Ｓｅｒ）、（ＧｌｙＳｅｒ）、または（Ｇｌｙ$_3$Ｓｅｒ）の複数の繰返しが含まれる。本開示の範囲内に含まれるのはまた、ＷＯ２０１２／１３８４７５（参照により本明細書に援用される）に記載されるリンカーである。幾つかの場合では、リンカー配列は、長いリンカー（ＬＬ）配列を含む。幾つかの場合では、長いリンカー配列は、（Ｇ４Ｓ）$_n$（式中、ｎ＝２～４）を含む。幾つかの場合では、リンカー配列は、短い（ＳＬ）配列を含む。幾つかの場合では、短いリンカー配列は、（Ｇ４Ｓ）$_n$（式中、ｎ＝１～３）を含む。

【００９１】

[0112] 本明細書で使用される場合、５’キャップ（ＲＮＡキャップ、ＲＮＡ７－メチル

グアノシンキャップ、またはＲＮＡ　ｍ７Ｇキャップとも呼ばれる）は、転写の開始直後に真核生物メッセンジャーＲＮＡの「フロント」または５’末端に付加される改変されたグアニンヌクレオチドである。５’キャップは、最初に転写されたヌクレオチドに連結される末端基からなる。その存在は、リボソームによる認識及びリボヌクレアーゼからの保護に不可欠である。キャップ付加は転写と対であり、転写と同時に起こるため、互いに影響を与え合う。転写の開始直後に、合成中のｍＲＮＡの５’末端は、ＲＮＡポリメラーゼに会合しているキャップ合成複合体と結合する。この酵素複合体は、ｍＲＮＡのキャッピングに使用される化学反応に触媒作用を及ぼす。合成は、多段階の生化学反応として進行する。キャッピング部分は、ｍＲＮＡの機能性、例えば、その安定性または翻訳の効率を調節するために改変することができる。

【００９２】

[0113] 本明細書で使用される場合、「ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写ＲＮＡ」は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで合成されたＲＮＡ、好ましくはｍＲＮＡを指す。一般に、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写ＲＮＡは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写ベクターから生成される。ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写ベクターは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写ＲＮＡを生成するために使用される鋳型を含む。

【００９３】

[0114] 本明細書で使用される場合、「ポリ（Ａ）」は、ポリアデニル化によってｍＲＮＡに結合される一連のアデノシンである。一過性発現用の構築物の好ましい実施形態では、ポリＡは、５０～５０００の間、好ましくは６４超、より好ましくは１００超、最も好ましくは３００または４００超である。ポリ（Ａ）配列は、局在性、安定性、または翻訳の効率などのｍＲＮＡの機能性を調節するために、化学的または酵素的に改変することができる。

【００９４】

[0115] 本明細書で使用される場合、「ポリアデニル化」は、ポリアデニリル部分、またはその改変された変異体のメッセンジャーＲＮＡ分子への共有結合を指す。真核生物では、ほとんどのメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）分子は、３’末端でポリアデニル化される。３’ポリ（Ａ）テールは、ポリアデニル酸ポリメラーゼという酵素の作用を通してプレｍＲＮＡに付加された、アデニンヌクレオチドの長い配列（多くの場合、数百）である。高等真核生物では、ポリ（Ａ）テールは、特定配列、ポリアデニル化シグナルを含有する転写物に付加される。ポリ（Ａ）テール及びそれに結合したタンパク質は、エキソヌクレアーゼによる分解からｍＲＮＡを保護するのを助ける。ポリアデニル化は、転写終結、核からのｍＲＮＡの輸送、及び翻訳にも重要である。ポリアデニル化は、ＤＮＡをＲＮＡに転写した直後に核内で生じるが、それに加えて後で、細胞質内で生じることもある。転写が終結した後、ｍＲＮＡ鎖は、ＲＮＡポリメラーゼに会合したエンドヌクレアーゼ複合体の作用を通して切断される。切断部位は、通常、切断部位の近くに塩基配列ＡＡＵＡＡＡが存在することによって特徴付けられる。ｍＲＮＡが切断された後、アデノシン残基が切断部位の遊離３’末端に付加される。

【００９５】

[0116] 本明細書で使用される場合、「一過性」は、非統合導入遺伝子の数時間、数日、または数週間にわたる発現を指し、この発現期間は、ゲノムに統合された場合または宿主細胞内の安定したプラスミドレプリコン内に含有される場合の該遺伝子の発現期間より短い。

【００９６】

[0117] 「シグナル伝達経路」という用語は、細胞の一方の部分から細胞の他方の部分へのシグナル伝達に役割を果たす種々のシグナル伝達分子間の生化学的関係を指す。「細胞表面受容体」という語句には、シグナルを受け取り、細胞膜を越えてシグナルを伝達することができる分子及び分子の複合体が含まれる。

【００９７】

[0118] 「対象」という用語には、免疫応答が誘発され得る生体（例えば、哺乳動物、ヒト）が含まれることが意図される。

[0119] 「実質的に精製された」細胞という用語は、他の細胞型を本質的に含まない細胞を指す。実質的に精製された細胞はまた、それが天然に存在する状態で通常会合する他の細胞型から分離されている細胞を指す。幾つかの場合では、実質的に精製された細胞の集団は、均質な細胞集団を指す。他の場合では、この用語は、単に、その天然の状態で天然に会合している細胞から分離されている細胞を指す。幾つかの態様では、該細胞は、ｉｎ ｖｉｔｒｏで培養される。他の態様では、該細胞は、ｉｎ ｖｉｔｒｏで培養されない。

【００９８】

[0120] 「治療（の）（ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ）」という用語は、本明細書で使用される場合、治療（ｔｒｅａｔｍｅｎｔ）を意味する。治療効果は、病態の低減、阻害、寛解、または根絶によって得られる。

【００９９】

[0121] 「予防（ｐｒｏｐｈｙｌａｘｉｓ）という用語は、本明細書で使用される場合、疾患または病態の予防（ｐｒｅｖｅｎｔｉｏｎ）または保護的治療を意味する。

[0122] 本開示との関係において、「腫瘍抗原」または「過剰増殖性障害抗原」または「過剰増殖性障害に関連する抗原」は、特定の過剰増殖性障害に共通する抗原を指す。ある種の態様では、本開示の過剰増殖性障害抗原は、限定するものではないが、原発性または転移性黒色腫、胸腺腫、リンパ腫、肉腫、肺癌、肝臓癌、ＮＨＬ、白血病、子宮癌、子宮頸癌、膀胱癌、腎臓癌、及び腺癌、例えば、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、膵癌などを含めた、がんに由来する。

【０１００】

[0123] 「形質移入された」または「形質転換された」または「形質導入された」という用語は、外因性核酸が宿主細胞内に移入されるまたは導入されるプロセスを指す。「形質移入された」または「形質転換された」または「形質導入された」細胞は、外因性核酸によって形質移入された、形質転換された、または形質導入されたものである。該細胞には、初代対象細胞及びその子孫が含まれる。

【０１０１】

[0124] 「特異的に結合する」という用語は、試料中に存在する同族結合パートナー（例えば、ＣＤ１９）を認識し、結合するが、試料中の他の分子を必然的に及び実質的に認識または結合しない、抗体、抗体断片、または特異的リガンドを指す。

【０１０２】

[0125] 本明細書で使用される場合、「メガヌクレアーゼ」という用語は、認識配列が１２塩基対より大きい、二本鎖ＤＮＡと結合するエンドヌクレアーゼを指す。好ましくは、本開示のメガヌクレアーゼの認識配列は２２塩基対である。メガヌクレアーゼは、Ｉ－Ｃｒｅｌに由来するエンドヌクレアーゼであってよく、天然のＩ－Ｃｒｅｌと比較して、例えばＤＮＡ結合特異性、ＤＮＡ切断活性、ＤＮＡ結合親和性、または二量体化特性に関して改変された、Ｉ－Ｃｒｅｌの操作された変異体を指すこともある。そのように改変されたＩ－Ｃｒｅｌの変異体を生成する方法は、当技術分野で公知である（例えば、ＷＯ２００７／０４７８５９）。メガヌクレアーゼは、本明細書で使用される場合、ヘテロ二量体として、またはペプチドリンカーを使用してＤＮＡ結合ドメインの対が単一のポリペプチドに結合されている「一本鎖メガヌクレアーゼ」として二本鎖ＤＮＡに結合する。本開示のメガヌクレアーゼは、細胞、特にヒトＴ細胞で発現されたとき実質的に無毒であるため、本明細書に記載の方法を使用して測定したときに、細胞生存率への有害な影響またはメガヌクレアーゼ切断活性の相当な低減を認めることなく、細胞に形質移入し、３７℃で維持することができる。

【０１０３】

[0126] 本明細書で使用される場合、「一本鎖メガヌクレアーゼ」という用語は、リンカーによって結合されたヌクレアーゼサブユニットの対を含むポリペプチドを指す。一本鎖メガヌクレアーゼは、Ｎ末端サブユニット－リンカー－Ｃ末端サブユニットという構成を有する。これらの２つのメガヌクレアーゼサブユニットは一般に、アミノ酸配列が同一

ではなく、同一でないＤＮＡ配列を認識する。よって、一本鎖メガヌクレアーゼは、典型的には、偽パリンドローム認識配列または非パリンドローム認識配列を切断する。一本鎖メガヌクレアーゼは、実際には二量体ではないが、「一本鎖ヘテロ二量体」または「一本鎖ヘテロ二量体メガヌクレアーゼ」と呼ばれることもある。明確には、別段の指定がない限り、「メガヌクレアーゼ」という用語は、二量体メガヌクレアーゼを指すことも、一本鎖メガヌクレアーゼを指すこともある。

【０１０４】

[0127]本明細書で使用される場合、「ＴＡＬＥＮ」という用語は、Ｆｏｋ１ヌクレアーゼドメインの任意の部分に融合された１６～２２個のＴＡＬドメインの繰返しを含むＤＮＡ結合ドメインを含むエンドヌクレアーゼを指す。

【０１０５】

[0128] 本明細書で使用される場合、「コンパクトＴＡＬＥＮ」という用語は、Ｉ－Ｔｅｖ１ホーミングエンドヌクレアーゼのヌクレアーゼドメインの任意の触媒活性部分に任意の配向で融合された１６～２２個のＴＡＬドメインの繰返しを有するＤＮＡ結合ドメインを含むエンドヌクレアーゼを指す。

【０１０６】

[0129] 本明細書で使用される場合、「ＣＲＩＳＰＲ」という用語は、Ｃａｓ９などのカスパーゼと、ゲノムＤＮＡの認識部位にハイブリダイズすることによってカスパーゼのＤＮＡ切断を指示するガイドＲＮＡとを含む、カスパーゼベースのエンドヌクレアーゼを指す。

【０１０７】

[0130] 本明細書で使用される場合、「メガＴＡＬ」という用語は、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）ＤＮＡ結合ドメインを、操作された配列特異的ホーミングエンドヌクレアーゼと共に含む一本鎖ヌクレアーゼを指す。

【０１０８】

[0131] 範囲：本開示を通して、本開示の様々な態様は、範囲の形式で提示され得る。範囲の形式での説明は単に便宜上及び簡潔さのためであり、本開示の範囲に対する確固たる限定と解釈されるべきではないことが理解されるものとする。したがって、範囲の説明は、その範囲内の個々の数値だけでなく、すべての可能な部分範囲を具体的に開示しているとみなされるものとする。例えば、１～６などの範囲の説明は、その範囲内の個々の数字、例えば、１、２、２．７、３、４、５、５．３、及び６だけでなく、１～３、１～４、１～５、２～４、２～６、３～６などの部分範囲を具体的に開示しているとみなされるものとする。別の例として、９５～９９％の同一性などの範囲は、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するものを含み、かつ９６～９９％、９６～９８％、９６～９７％、９７～９９％、９７～９８％、及び９８～９９％の同一性などの部分範囲を含む。これは、範囲の幅にかかわらず適用される。

【０１０９】

説明

[0132] 本明細書に開示するのは、幾つかの実施形態では、ＴＦＰ、ＣＡＲ、ＴＣＲ、またはそれらの組み合わせをコードする配列を含む組み換え核酸である。より好ましい実施形態では、本明細書で提供するのは、ＴＦＰ、ＣＡＲ、ＴＣＲ、またはそれらの組み合わせをコードする配列を含むｃｉｒｃＲＮＡである。本明細書で提供する一態様によれば、本明細書で提供するのは、ＴＦＰ、ＣＡＲ、ＴＣＲ、またはそれらの組み合わせをコードする配列を含む移入ベクターである。

【０１１０】

[0133] 本明細書で提供するのは、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）融合タンパク質を含む改変されたヒト免疫細胞を使用する、がんなどの疾患の治療のための組成物及び使用方法である。本明細書で使用される場合、「Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）融合タンパク質」または「ＴＦＰ」は、ＴＣＲを含む様々なポリペプチドに由来する組み換えポリペプチドを含み、該ＴＣＲは一般に、ｉ）標的細胞上の表面抗原に結合すること、及びｉｉ）典型的にはＴ細

胞内またはその表面上に共存するとき、インタクトなＴＣＲ複合体の他のポリペプチド成分と相互作用することができる。本明細書に示すように、ＴＦＰは、キメラ抗原受容体と比較して大幅な利益をもたらす。「キメラ抗原受容体」または代替的に「ＣＡＲ」という用語は、ｓｃＦｖの形態の細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、及び以降に定義する刺激分子に由来する機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞質シグナル伝達ドメイン（本明細書では「細胞内シグナル伝達ドメイン」とも呼ぶ）を含む組み換えポリペプチドを指す。一般に、ＣＡＲの中央の細胞内シグナル伝達ドメインは、通常はＴＣＲ複合体と会合して見出されるＣＤ３ζ鎖に由来する。このＣＤ３ζシグナル伝達ドメインは、４－１ＢＢ（すなわちＣＤ１３７）、ＣＤ２７、及び／またはＣＤ２８などの少なくとも１つの共刺激分子に由来する１つまたは複数の機能的シグナル伝達ドメインと融合することができる。

【０１１１】

Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）融合タンパク質（ＴＦＰ）

[0134] 本開示は、ＴＦＰをコードする組み換え核酸構築物であって、該ＴＦＰが、腫瘍関連抗原（ＴＡＡ）、例えば、ヒトＴＡＡに特異的に結合する結合ドメイン、例えば、抗原結合ドメイン、例えば抗体断片またはリガンド結合ドメインを含むものを含み、該結合ドメインの配列が、ＴＣＲサブユニットまたはその一部分をコードする核酸配列に隣接し、同じリーディングフレーム内にある、核酸構築物を包含する。

【０１１２】

[0135] 一態様では、本開示のＴＦＰは、別名では抗原結合ドメインと呼ばれる、標的特異的結合エレメントを含む。部分の選択は、標的細胞の表面を定める標的抗原のタイプと数に依存する。例えば、抗原結合ドメインは、特定の病態に関連する標的細胞上の細胞表面マーカーとして作用する標的抗原を認識するように選択することができる。よって、本開示のＴＦＰ内の抗原結合ドメインの標的抗原として作用することができる細胞表面マーカーの例として、ウイルス感染症、細菌感染症、及び寄生虫感染症；自己免疫疾患；ならびにがん性疾患（例えば、悪性疾患）に関連するものが挙げられる。

【０１１３】

[0136] 一態様では、ＴＦＰ媒介性Ｔ細胞応答は、所望の抗原に特異的に結合する抗原結合ドメインを操作してＴＦＰに入れることによって、関心対象の抗原に指向させることができる。

【０１１４】

[0137] 一態様では、抗原結合ドメインを含むＴＦＰの一部分は、腫瘍関連抗原、例えばヒト腫瘍関連抗原を標的とする抗原結合ドメインを含む。幾つかの実施形態では、ＴＡＡは、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＢＣＭＡ、ＭＳＬＮ、ＩＬ１３Ｒａ２、ＥＧＦＲｖＩＩＩ、ＭＵＣ１６、ＲＯＲ１、ＨＥＲ２、ＢＡＦＦ、ＢＡＦＦ受容体、ＰＤ－Ｌ１、ＣＤ７９ｂ、またはＰＳＭＡである。一実施形態では、抗原結合ドメインは、抗体またはその断片を含む。ある態様では、抗原結合ドメインを含むＴＦＰの一部分は、ＮＫＧ２ＤまたはＣＤ１６などのリガンド結合ドメインを含む。抗原結合ドメインは、抗原に結合する任意のドメインであってもよく、それらとして、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、組み換え抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、及びそれらの機能的断片、例えば、限定するものではないが、単一ドメイン抗体、例えば、重鎖可変ドメイン（V_H）、軽鎖可変ドメイン（V_L）、及びラクダ科由来ナノボディの可変ドメイン（V_{HH}）、ならびに抗原結合ドメインとして機能することが当技術分野で公知の代替の足場、例えば、組み換えフィブロネクチンドメイン、アンチカリン、ＤＡＲＰＩＮなどが挙げられるが、これらに限定されない。同様に、標的抗原を特異的に認識し、結合する天然または合成リガンドを、ＴＦＰの抗原結合ドメインとして使用することができる。幾つかの場合では、抗原結合ドメインは、ＴＦＰが最終的に使用されることとなる種と同じ種に由来することが有益である。例えば、ヒトで使用する場合、ＴＦＰの抗原結合ドメインは、抗体または抗体断片の抗原結合ドメインにヒトまたはヒト化残基を含むことが有益であり得る。

【０１１５】

[0138] よって、一態様では、抗原結合ドメインは、ヒト化もしくはヒト抗体または抗体断片、あるいはマウス抗体もしくは抗体断片を含む。一実施形態では、ヒト化またはヒト抗ＴＡＡ結合ドメインは、本明細書に記載するヒト化またはヒト抗ＴＡＡ結合ドメインの１つまたは複数（例えば、３つすべて）の軽鎖相補性決定領域１（ＬＣ　ＣＤＲ１）、軽鎖相補性決定領域２（ＬＣ　ＣＤＲ２）、及び軽鎖相補性決定領域３（ＬＣ　ＣＤＲ３）、及び／または本明細書に記載するヒト化またはヒト抗ＴＡＡ結合ドメインの１つまたは複数（例えば、３つすべて）の重鎖相補性決定領域１（ＨＣ　ＣＤＲ１）、重鎖相補性決定領域２（ＨＣ　ＣＤＲ２）、及び重鎖相補性決定領域３（ＨＣ　ＣＤＲ３）を有するｓｃＦＶを含み、例えば、１つまたは複数の、例えば３つすべてのＬＣ　ＣＤＲ、及び１つまたは複数の、例えば３つすべてのＨＣ　ＣＤＲを含むヒト化またはヒト抗ＴＡＡ結合ドメインである。一実施形態では、ヒト化またはヒト抗ＴＡＡ結合ドメインは、本明細書に記載するヒト化またはヒト抗ＴＡＡ結合ドメインの１つまたは複数（例えば、３つすべて）の重鎖相補性決定領域１（ＨＣ　ＣＤＲ１）、重鎖相補性決定領域２（ＨＣ　ＣＤＲ２）、及び重鎖相補性決定領域３（ＨＣ　ＣＤＲ３）を含み、例えば、ヒト化またはヒト抗ＴＡＡ結合ドメインは、２つの可変重鎖領域を有し、各々が、本明細書に記載するＨＣ　ＣＤＲ１、ＨＣ　ＣＤＲ２、及びＨＣ　ＣＤＲ３を含む。一実施形態では、ヒト化またはヒト抗ＴＡＡ結合ドメインは、本明細書に記載するヒト化もしくはヒト軽鎖可変領域、及び／または本明細書に記載するヒト化もしくはヒト重鎖可変領域を含む。一実施形態では、ヒト化またはヒト抗ＴＡＡ結合ドメインは、本明細書に記載するヒト化重鎖可変領域、例えば、少なくとも２つの本明細書に記載するヒト化またはヒト重鎖可変領域を含む。一実施形態では、抗ＴＡＡ結合ドメインは、本明細書で提供するアミノ酸配列の軽鎖及び重鎖を含む、ｓｃＦｖである。ある実施形態では、抗ＴＡＡ結合ドメイン（例えば、ｓｃＦｖ）は、本明細書で提供する軽鎖可変領域のアミノ酸配列の少なくとも１つ、２つ、もしくは３つの改変（例えば、置換）であるが、３０、２０、もしくは１０以下の改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列、または本明細書で提供するアミノ酸配列に９５～９９％の同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域；及び／または本明細書で提供する重鎖可変領域のアミノ酸配列の少なくとも１つ、２つ、もしくは３つの改変（例えば、置換）であるが、３０、２０、もしくは１０以下の改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列、または本明細書で提供するアミノ酸配列に対して９５～９９％の同一性を有する配列を含む重鎖可変領域を含む。一実施形態では、ヒト化またはヒト抗ＴＡＡ結合ドメインはｓｃＦｖであり、本明細書に記載するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域が、本明細書に記載するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に、リンカー、例えば、本明細書に記載するリンカーを介して結合される。一実施形態では、ヒト化抗ＴＡＡ結合ドメインは、（Ｇｌｙ４－Ｓｅｒ）ｎリンカー（式中、ｎは、１、２、３、４、５、または６であり、好ましくは、３または４である）を含む。ｓｃＦｖの軽鎖可変領域及び重鎖可変領域は、例えば、次の配向：軽鎖可変領域－リンカー－重鎖可変領域または重鎖可変領域－リンカー－軽鎖可変領域のいずれかであり得る。幾つかの場合では、リンカー配列は、長いリンカー（ＬＬ）配列を含む。幾つかの場合では、長いリンカー配列は、（Ｇ４Ｓ）ｎ（式中、ｎ＝２～１０、例えば、２～４）を含む。幾つかの場合では、リンカー配列は、短いリンカー（ＳＬ）配列を含む。幾つかの場合では、短いリンカー配列は、（Ｇ４Ｓ）ｎ（式中、ｎ＝１～３）を含む。

【０１１６】

[0139] 幾つかの態様では、非ヒト抗体はヒト化されており、この場合、抗体の特定の配列または領域が、ヒトにおいて天然に産生される抗体またはそれらの断片に対する類似性を増大させるように改変されている。一態様では、抗原結合ドメインは、ヒト化されている。

【０１１７】

[0140] ヒト化抗体は、当技術分野で公知の種々の技法を使用して生成することができ、それらとして、ＣＤＲ移植（例えば、欧州特許第ＥＰ２３９，４００号；国際公開第ＷＯ９１／０９９６７号；ならびに米国特許第５，２２５，５３９号、第５，５３０，１０

１号、及び第５，５８５，０８９号（これらの各々は、参照によりその全体が本明細書に援用される）を参照されたい）、ベニアリングまたはリサーフェシング（例えば、欧州特許第ＥＰ５９２，１０６号及び第ＥＰ５１９，５９６号；Ｐａｄｌａｎ，１９９１，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，２８（４／５）：４８９－４９８；Ｓｔｕｄｎｉｃｋａ ｅｔ ａｌ．，１９９４，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，７（６）：８０５－８１４；ならびにＲｏｇｕｓｋａ ｅｔ ａｌ．，１９９４，ＰＮＡＳ，９１：９６９－９７３（これらの各々は、参照によりその全体が本明細書に援用される）を参照されたい）、鎖シャッフリング（例えば、米国特許第５，５６５，３３２号（参照によりその全体が本明細書に援用される）を参照されたい）、ならびに、例えば、米国特許出願公開第ＵＳ２００５／００４２６６４号、米国特許出願公開第ＵＳ２００５／００４８６１７号、米国特許第６，４０７，２１３号、米国特許第５，７６６，８８６号、国際公開第ＷＯ９３１７１０５号、Ｔａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１６９：１１１９－２５（２００２）、Ｃａｌｄａｓ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．，１３（５）：３５３－６０（２０００）、Ｍｏｒｅａ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ，２０（３）：２６７－７９（２０００）、Ｂａｃａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７２（１６）：１０６７８－８４（１９９７）、Ｒｏｇｕｓｋａ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．，９（１０）：８９５－９０４（１９９６）、Ｃｏｕｔｏ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，５５（２３ Ｓｕｐｐ）：５９７３ｓ－５９７７ｓ（１９９５）、Ｃｏｕｔｏ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，５５（８）：１７１７－２２（１９９５）、Ｓａｎｄｈｕ Ｊ Ｓ，Ｇｅｎｅ，１５０（２）：４０９－１０（１９９４）、及びＰｅｄｅｒｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２３５（３）：９５９－７３（１９９４）（これらの各々は、参照によりその全体が本明細書に援用される）に開示される技法が挙げられるが、これらに限定されない。多くの場合、フレームワーク領域内のフレームワーク残基は、例えば、抗原結合を変更する、例えば向上させるために、ＣＤＲドナー抗体からの対応する残基で置換される。これらのフレームワーク置換は、当技術分野で周知の方法によって特定され、例えば、ＣＤＲとフレームワーク残基との相互作用をモデル化して抗原結合に重要なフレームワーク残基を特定し、配列を比較して、特定の位置にある他とは異なるフレームワーク残基を特定することによって行われる（例えば、Ｑｕｅｅｎ ｅｔ ａｌ．，米国特許第５，５８５，０８９号；及びＲｉｅｃｈｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，１９８８，Ｎａｔｕｒｅ，３３２：３２３（これらは参照によりそれらの全体が本明細書に援用される）を参照されたい）。

【０１１８】

[0141] ヒト化抗体または抗体断片は、その中に残留する非ヒト源からの１つまたは複数のアミノ酸残基を含む。これらの非ヒトアミノ酸残基は、「移入」残基と呼ばれることが多く、典型的には「移入」可変ドメインから得られる。本明細書で提供する場合、ヒト化抗体または抗体断片は、非ヒト免疫グロブリン分子からの１つまたは複数のＣＤＲ、及びフレームワーク領域を含み、該フレームワークを構成するアミノ酸残基は、完全にまたはほとんどヒト生殖細胞系列に由来する。抗体または抗体断片をヒト化する複数の技法が当技術分野で周知であり、本質的にはＷｉｎｔｅｒ及び共同研究者による方法に従って（Ｊｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３２１：５２２－５２５（１９８６）；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３３２：３２３－３２７（１９８８）；Ｖｅｒｈｏｅｙｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２３９：１５３４－１５３６（１９８８））、げっ歯類のＣＤＲまたはＣＤＲ配列を、対応するヒト抗体の配列の代わりに置換することによって、すなわちＣＤＲ移植によって実施することができる（ＥＰ２３９，４００；ＰＣＴ公開第ＷＯ９１／０９９６７号；及び米国特許第４，８１６，５６７号；第６，３３１，４１５号；第５，２２５，５３９号；第５，５３０，１０１号；第５，５８５，０８９号；第６，５４８，６４０号（それらの内容は、参照によりそれらの全体が本明細書に援用される））。そのようなヒト化抗体及び抗体断片では、インタクトなヒト可変ドメインより実質的に小さい部分が、非ヒト種からの対応する配列によって置換されている。ヒト化抗体は、幾つかのＣＤＲ残基及び場合により幾つかのフレームワーク（

ＦＲ）残基がげっ歯類抗体の類似部位からの残基によって置換されているヒト抗体であることが多い。抗体及び抗体断片のヒト化は、ベニアリングもしくはリサーフェシング（ＥＰ５９２，１０６；ＥＰ５１９，５９６；Ｐａｄｌａｎ，１９９１，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，２８（４／５）：４８９－４９８；Ｓｔｕｄｎｉｃｋａ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，７（６）：８０５－８１４（１９９４）；及びＲｏｇｕｓｋａ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ，９１：９６９－９７３（１９９４））、または鎖シャッフリング（米国特許第５，５６５，３３２号）によっても実現することができる（これらの内容は、その全体が参照により本明細書に援用される）。

【０１１９】

[0142] ヒト化抗体の作製に使用しようとするヒト可変ドメインを（軽鎖と重鎖の両方とも）選択するのは、抗原性を低減させるためである。いわゆる「ベストフィット」法に従って、公知のヒト可変ドメイン配列のライブラリー全体に対してげっ歯類抗体の可変ドメインの配列がスクリーニングされる。次いで、げっ歯類のものに最も近いヒト配列が、ヒト化抗体用のヒトフレームワーク（ＦＲ）として許容される（Ｓｉｍｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１５１：２２９６（１９９３）；Ｃｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１９６：９０１（１９８７）（これらの内容は、その全体が参照により本明細書に援用される））。別の方法は、軽鎖または重鎖の特定のサブグループのすべてのヒト抗体のコンセンサス配列に由来する特定のフレームワークを使用する。同じフレームワークが、幾つかの異なるヒト化抗体に使用されてもよい（例えば、Ｎｉｃｈｏｌｓｏｎ ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎ．３４（１６－１７）：１１５７－１１６５（１９９７）；Ｃａｒｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８９：４２８５（１９９２）；Ｐｒｅｓｔａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１５１：２６２３（１９９３）（これらの内容は、その全体が参照により本明細書に援用される）を参照されたい）。幾つかの実施形態では、重鎖可変領域のフレームワーク領域、例えば、４つすべてのフレームワーク領域は、ＶＨ４－４－５９生殖細胞系列配列に由来する。一実施形態では、フレームワーク領域は、対応するマウス配列のアミノ酸からの１つ、２つ、３つ、４つ、または５つの改変、例えば置換を含むことができる。一実施形態では、軽鎖可変領域のフレームワーク領域、例えば４つすべてのフレームワーク領域は、ＶＫ３－１．２５生殖細胞系列配列に由来する。一実施形態では、フレームワーク領域は、対応するマウス配列のアミノ酸からの１つ、２つ、３つ、４つ、または５つの改変、例えば置換を含むことができる。

【０１２０】

[0143] 幾つかの態様では、抗体断片を含む本開示のＴＦＰ組成物の一部分は、標的抗原に対する高親和性及び他の好適な生物学的特性を保持したままヒト化される。本開示の一態様によれば、ヒト化抗体及び抗体断片は、親及びヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列及び様々な概念的ヒト化産物を解析するプロセスによって調製される。三次元免疫グロブリンモデルは、一般に利用可能であり、当業者には周知である。選択された候補免疫グロブリン配列の推定三次元立体配座構造を図解し、表示するコンピュータプログラムが利用可能である。これらの表示を詳細に調べることによって、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の考えられる役割の解析、例えば、候補免疫グロブリンが標的抗原に結合する能力に影響を与える残基の解析が可能になる。このようにして、ＦＲ残基は、標的抗原に対する親和性の増大などの所望の抗体または抗体断片の特性が実現されるように、レシピエント及び移入配列から選択し、組み合わせることができる。一般に、ＣＤＲ残基は、抗原結合への影響に直接的かつ最も実質的に関与している。

【０１２１】

[0144] ヒト化抗体または抗体断片は、元の抗体と類似する抗原特異性、例えば本開示では、ヒトＣＤ２０、ＣＤ２２、ＢＣＭＡ、ＭＳＬＮ、ＩＬ１３Ｒａ２、ＥｐｈＡ２、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＰＳＭＡ、ＢＡＦＦ、ＥＧＦＲｖＩＩＩ、ＭＵＣ１６、ＭＵＣ１、ＲＯＲ１、またはＣＤ１９との結合能を保持することができる。幾つかの実施形態では、ヒト化抗体または抗体断片は、ヒトＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＢＣＭＡ、ＭＳＬＮ、Ｉ

Ｌ１３Ｒａ２、ＥｐｈＡ２、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＰＳＭＡ、ＢＡＦＦ、ＥＧＦＲｖＩＩＩ、ＭＵＣ１６、ＭＵＣ１、またはＲＯＲ１に対する向上した結合親和性及び／または特異性を有することができる。

【０１２２】

[0145] 一態様では、抗ＴＡＡ結合ドメインは、抗体または抗体断片の特定の機能的特徴または特性によって特徴付けられる。例えば、一態様では、抗原結合ドメインを含む本開示のＴＦＰ組成物の一部は、ヒトＣＤ１９、ヒトＢＣＭＡ、ヒトＭＳＬＮ、ヒトＣＤ２０、ヒトＣＤ２２、ヒトＲＯＲ１、ヒトＢＡＦＦ、ヒトＭＵＣ１６、ヒトＥｐｈＡ２、ヒトＮＹ－ＥＳＯ－１、ヒトＰＳＭＡ、ヒトＩＬ１３Ｒａ２、及びヒトＥＧＦＲｖＩＩＩを含む群からの腫瘍関連抗原に特異的に結合する。一態様では、抗原結合ドメインは、ヒトＣＤ１９に対して、Ｎｉｃｈｏｌｓｏｎ ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎ．３４（１６－１７）：１１５７－１１６５（１９９７）に記載されるのと同じかまたは類似する結合特異性を有する。一態様では、本開示は、抗体または抗体断片を含む抗原結合ドメインであって、該抗体の結合ドメインがＴＡＡタンパク質またはその断片に特異的に結合し、該抗体または抗体断片が、本明細書で提供するアミノ酸配列を含む可変軽鎖及び／または可変重鎖を含む、抗原結合ドメインに関する。ある特定の態様では、ｓｃＦｖは、リーダー配列に隣接し、同一のリーディングフレーム内にある。

【０１２３】

[0146] 一態様では、抗ＴＡＡ結合ドメインは、断片、例えば、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）である。一態様では、抗ＴＡＡ結合ドメインは、Ｆｖ、Ｆａｂ、（Ｆａｂ’）$_2$、または二機能性（例えば、二重特異性）ハイブリッド抗体である（例えば、Ｌａｎｚａｖｅｃｃｈｉａ ｅｔ ａｌ．，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１７，１０５（１９８７））。一態様では、本開示の抗体及びその断片は、野生型のまたは親和性が強化されたＴＡＡタンパク質と結合する。一態様では、抗ＴＡＡ結合ドメインは、単一ドメイン（ｓｄＡｂ）抗体またはその断片である。別の態様では、抗ＴＡＡ結合ドメインはＶＨＨである。

【０１２４】

[0147] 本明細書で提供するのはまた、標的抗原（例えば、ＣＤ１９、ＢＣＭＡ、ＭＳＬＮなどの腫瘍関連抗原（ＴＡＡ）、または融合部分結合ドメインの標的に関して本明細書に別途記載する任意の標的抗原）に特異的な抗体抗原結合ドメインを得るための方法であり、該方法は、本明細書に述べるV_Hドメインのアミノ酸配列内の１つまたは複数のアミノ酸の付加、欠失、置換、または挿入によって、V_Hドメインのアミノ酸配列変異体であるV_Hドメインを用意すること、任意選択によりこのようにして用意したV_Hドメインを１つまたは複数のV_Lドメインと組み合わせること、及びV_HドメインまたはV_H／V_Lの組み合わせ（１つまたは複数）を試験して、関心対象の標的抗原に特異的であり、任意選択により１つまたは複数の所望の特性を有する、特異的結合メンバーまたは抗体抗原結合ドメインを特定することを含む。

【０１２５】

[0148] 幾つかの場合、V_Hドメイン及びｓｃＦｖは、当技術分野で公知の方法に従って調製することができる（例えば、Ｂｉｒｄ ｅｔ ａｌ．，（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４２：４２３－４２６、及びＨｕｓｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，（１９８８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８５：５８７９－５８８３を参照されたい）。ｓｃＦｖ分子は、フレキシブルポリペプチドリンカーを使用して、V_H及びV_L領域を一緒に連結することによって生成することができる。ｓｃＦｖ分子は、最適化された長さ及び／またはアミノ酸組成のリンカー（例えば、Ｓｅｒ－Ｇｌｙリンカー）を含む。リンカーの長さは、ｓｃＦｖの可変領域がどのように折り畳まれ、相互作用するかに大きく影響を与え得る。実際、短いポリペプチドリンカーが用いられるならば（例えば、５～１０のアミノ酸）、鎖内の折り畳みは妨げられる。鎖間の折り畳みも、２つの可変領域を一緒にして機能的エピトープ結合部位を形成させる。幾つかの場合では、リンカー配列は、長いリンカー（ＬＬ）配列を含む。幾つかの場合では、長いリンカー配列は、（Ｇ$_4$Ｓ）$_n$（式中、ｎ＝２～４）を含む。幾つかの場合では、リンカー配列は、短いリンカー（ＳＬ）

配列を含む。幾つかの場合では、短いリンカー配列は、（Ｇ４Ｓ）ｎ（式中、ｎ＝１～３）を含む。リンカーの配向及びサイズの例については、Ｈｏｌｌｉｎｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．１９９３　Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．９０：６４４４－６４４８、米国特許出願公開第２００５０１００５４３号及び第２００５０１７５６０６号、米国特許第７，６９５，９３６号、ならびにＰＣＴ公開第ＷＯ２００６／０２０２５８号及び第ＷＯ２００７／０２４７１５号（これらの各々は、参照により本明細書に援用される）を参照されたい。

【０１２６】

[0149] ｓｃＦｖは、そのＶＬ領域とＶＨ領域との間に、約１０、１１、１２、１３、１４、１５、または１５個超の残基のリンカーを含むことができる。リンカー配列は、任意の天然に存在するアミノ酸を含んでもよい。幾つかの実施形態では、リンカー配列は、アミノ酸のグリシン及びセリンを含む。別の実施形態では、リンカー配列は、（Ｇｌｙ４Ｓｅｒ）ｎ（式中、ｎは、１以上の正の整数である）などのグリシンとセリンとの組の繰返しを含む。一実施形態では、リンカーは、（Ｇｌｙ４Ｓｅｒ）４または（Ｇｌｙ４Ｓｅｒ）３であり得る。リンカーの長さを変動させると、活性を保持または強化することができ、それによって活性試験において優れた効力が生じる。幾つかの場合では、リンカー配列は、長いリンカー（ＬＬ）配列を含む。幾つかの場合では、長いリンカー配列は、（Ｇ４Ｓ）ｎ（式中、ｎ＝２～４）を含む。幾つかの場合では、リンカー配列は、短いリンカー（ＳＬ）配列を含む。幾つかの場合では、短いリンカー配列は、（Ｇ４Ｓ）ｎ（式中、ｎ＝１～３）を含む。

【０１２７】

安定性及び変異

[0150] 抗ＴＡＡ結合ドメイン、例えば、ｓｃＦｖ分子（例えば、可溶性ｓｃＦｖ）の安定性は、従来の対照ｓｃＦｖ分子または完全長抗体の生物物理学的特性（例えば、熱安定性）を基準にして評価することができる。一実施形態では、ヒト化またはヒトｓｃＦｖは、記載するアッセイにおいて、親のｓｃＦｖより約０．１、約０．２５、約０．５、約０．７５、約１、約１．２５、約１．５、約１．７５、約２、約２．５、約３、約３．５、約４、約４．５、約５、約５．５、約６、約６．５、約７、約７．５、約８、約８．５、約９、約９．５、約１０℃、約１１℃、約１２℃、約１３℃、約１４℃、または約１５℃高い熱安定性を有する。

【０１２８】

[0151] 抗ＴＡＡ結合ドメインの熱安定性の向上は、次にＣＤ１９－ＴＦＰ構築物全体にもたらされ、抗ＴＡＡ　ＴＦＰ構築物の治療特性の向上につながる。抗ＴＡＡ結合ドメイン、例えば、ｓｃＦｖの熱安定は、従来の抗体と比較したときに少なくとも約２℃または３℃向上し得る。一実施形態では、抗ＴＡＡ結合ドメイン、例えば、ｓｃＦｖは、従来の抗体と比較したときに１℃向上した熱安定性を有する。別の実施形態では、抗ＴＡＡ結合ドメイン、例えば、ｓｃＦｖまたはｓｄＡｂは、従来の抗体と比較したときに２℃向上した熱安定性を有する。別の実施形態では、ｓｃＦｖは、従来の抗体と比較したときに４℃、５℃、６℃、７℃、８℃、９℃、１０℃、１１℃、１２℃、１３℃、１４℃、または１５℃向上した熱安定性を有する。比較は、例えば、本明細書に開示するｓｃＦｖ分子と、該ｓｃＦｖのＶＨ及びＶＬが由来する抗体のｓｃＦｖ分子またはＦａｂ断片との間で行うことができる。熱安定性は、当技術分野で公知の方法を使用して測定することができる。例えば、一実施形態では、ＴＭを測定することができる。ＴＭを測定する方法及びタンパク質の安定性を決定する他の方法は、以降により詳細に記載する。

【０１２９】

[0152] ｓｃＦｖの変異（可溶性ｓｃＦｖのヒト化または直接的な変異誘発を通して生じる）によって、ｓｃＦｖの安定性が変更され、ｓｃＦｖ及び抗ＴＡＡ　ＴＦＰ構築物の全体的な安定性が向上する。ヒト化ｓｃＦｖの安定性は、ＴＭ、温度変性、及び温度凝集などの測定値を使用してマウスｓｃＦｖと比較される。一実施形態では、抗ＴＡＡ結合ドメイン、例えば、ｓｃＦｖは、ヒト化プロセスから生じる少なくとも１つの変異を含み、

それによって、変異したｓｃＦｖが抗ＴＡＡ　ＴＦＰ構築物に安定性の向上をもたらすようになる。別の実施形態では、抗ＴＡＡ結合ドメイン、例えば、ｓｃＦｖは、ヒト化プロセスから生じる少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０の変異を含み、それによって、変異したｓｃＦｖが抗ＴＡＡ　ＴＦＰ－構築物に安定性の向上をもたらすようになる。

【０１３０】

[0153] 一態様では、ＴＦＰの抗原結合ドメインは、本明細書に記載する抗原結合ドメインのアミノ酸配列と相同なアミノ酸配列を含み、該抗原結合ドメインは、本明細書に記載する抗ＴＡＡ抗体断片の所望の機能特性を保持する。特定の一態様では、本開示のＴＦＰ組成物は、抗体断片を含む。さらなる態様では、その抗体断片は、ｓｃＦｖを含む。さらなる実施形態では、抗体は、ＶＨドメインを含む。

【０１３１】

[0154] 様々な態様では、ＴＦＰの抗原結合ドメインは、一方または両方の可変領域（例えば、V_H及び／またはV_L）内、例えば、１つもしくは複数のＣＤＲ領域内及び／または１つもしくは複数のフレームワーク領域内の１つもしくは複数のアミノ酸を改変することによって操作される。特定の一態様では、本開示のＴＦＰ組成物は、抗体断片を含む。さらなる態様では、その抗体断片は、ｓｃＦｖを含む。

【０１３２】

[0155] 当業者であれば、本開示の抗体または抗体断片をさらに改変して、アミノ酸配列が（例えば、野生型から）変動しているが、所望の活性が変動していないようにすることができることを理解するであろう。例えば、「可欠」アミノ酸残基でアミノ酸置換を生じる追加のヌクレオチド置換が、タンパク質に施されてもよい。例えば、分子中の可欠アミノ酸残基は、同じ側鎖ファミリーからの別のアミノ酸残基で置きかえられてもよい。別の実施形態では、アミノ酸の鎖を、側鎖ファミリーメンバーの順序及び／または組成が異なる構造的に類似した鎖で置きかえることができ、例えば、アミノ酸残基が、類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置きかえられる保存的置換がなされてもよい。

【０１３３】

[0156] 類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野で定義されており、それらには、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、β分枝側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）、及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が含まれる。

【０１３４】

[0157] ２つ以上の核酸またはポリペプチド配列の関係における同一性（％）は、同じである２つ以上の配列を指す。２つの配列は、以下の配列比較アルゴリズムのうちの１つを使用して、または手動アラインメント及び目視検査によって、比較域または指定領域にわたって最大の一致が得られるように比較し、整列させたときに、２つの配列が特定の百分率の同じアミノ酸残基またはヌクレオチドを有するならば（例えば、特定の領域にわたって、または特定されていないときは配列全体にわたって、６０％の同一性、任意選択により７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性）、「実質的に同一」である。任意選択により、同一性は、少なくとも約５０ヌクレオチド長（または１０アミノ酸長）の領域にわたって、またはより好ましくは１００～５００もしくは１０００以上のヌクレオチド長（または２０、５０、２００以上のアミノ酸長）の領域にわたって存在する。

【０１３５】

[0158] 配列比較については、典型的には１つの配列が参照配列として機能し、それに対して試験配列が比較される。配列比較アルゴリズムを使用するとき、試験配列及び参照配列をコンピュータに入力し、必要であれば部分配列の座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムのパラメータを指定する。デフォルトのプログラムパラメータを使用してもよいし、または代替のパラメータを指定してもよい。次いで、配列比較アルゴリズムは、プログラムパラメータに基づいて、参照配列に対する試験配列の配列同一性（％）を算出する。比較のための配列のアラインメント方法は、当技術分野で周知である。比較のための最適な配列のアラインメントは、例えば、Ｓｍｉｔｈ ａｎｄ Ｗａｔｅｒｍａｎ，（１９７０） Ａｄｖ．Ａｐｐｌ．Ｍａｔｈ．２：４８２ｃの局所相同性アルゴリズム、Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ ａｎｄ Ｗｕｎｓｃｈ，（１９７０）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８：４４３の相同性アラインメントアルゴリズム、Ｐｅａｒｓｏｎ ａｎｄ Ｌｉｐｍａｎ，（１９８８）Ｐｒｏｃ Ｎａｔ’ｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８５：２４４４の類似性検索法、コンピュータによるこれらのアルゴリズムの実行（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｓｏｆｔｗａｒｅ ＰａｃｋａｇｅにおけるＧＡＰ、ＢＥＳＴＦＩＴ、ＦＡＳＴＡ、及びＴＦＡＳＴＡ、Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ，５７５ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｄｒ．，Ｍａｄｉｓｏｎ，Ｗｉｓ．）、または手動アラインメント及び目視検査（例えば、Ｂｒｅｎｔ ｅｔ ａｌ．，（２００３）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙを参照されたい）によって行うことができる。配列同一性（％）及び配列類似性を決定するのに適したアルゴリズムの２つの例は、ＢＬＡＳＴ及びＢＬＡＳＴ２．０アルゴリズムであり、これらは、Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．，（１９７７）Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３８９－３４０２；及びＡｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．，（１９９０）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３－４１０にそれぞれ記載されている。ＢＬＡＳＴ解析を実施するためのソフトウェアは、国立バイオテクノロジー情報センター（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ）を通して公的に利用可能である。

【０１３６】

[0159] 一態様では、本開示は、機能的に同等な分子を生成する、出発抗体または断片（例えば、ｓｃＦｖ）のアミノ酸配列の改変を企図する。例えば、ＴＦＰに含まれる抗ＴＡＡ結合ドメイン、例えば、ｓｃＦｖのV_HまたはV_Lは、抗ＣＤ１９結合ドメイン、例えば、ｓｃＦｖの出発V_HまたはV_Lフレームワーク領域の少なくとも約７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％の同一性を保持するように改変することができる。本開示は、機能的に同等な分子を生成するための、ＴＦＰ構築物全体の改変、例えば、ＴＦＰ構築物の様々なドメインの１つまたは複数のアミノ酸配列における改変を企図する。ＴＦＰ構築物は、出発ＴＦＰ構築物の少なくとも約７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％の同一性を保持するように改変することができる。

【０１３７】

細胞外ドメイン

[0160] 細胞外ドメインは、天然源由来または組み換え源由来のいずれであってもよい。その源が天然である場合、該ドメインはいずれのタンパク質に由来してもよいが、特に、膜結合または膜貫通タンパク質に由来してもよい。一態様では、細胞外ドメインは、膜貫通ドメインと会合することができる。本開示に特に有用な細胞外ドメインは、少なくとも、例えば、Ｔ細胞受容体のα、β、γ、もしくはδ鎖、またはＣＤ３ε、ＣＤ３γ、もしくはＣＤ３δ、あるいは、代替実施形態では、ＣＤ２８、ＣＤ４５、ＣＤ４、ＣＤ５、ＣＤ８、ＣＤ９、ＣＤ１６、ＣＤ２２、ＣＤ３３、ＣＤ３７、ＣＤ６４、ＣＤ８０、ＣＤ

８６、ＣＤ１３４、ＣＤ１３７、ＣＤ１５４の細胞外領域（複数可）を含んでもよい。

【０１３８】

膜貫通ドメイン

[0161] 一般に、ＴＦＰ配列は、単一のゲノム配列によってコードされる細胞外ドメイン及び膜貫通ドメインを含有する。代替実施形態では、ＴＦＰは、ＴＦＰの細胞外ドメインとは異種の膜貫通ドメインを含むように設計することができる。膜貫通ドメインは、膜貫通領域に隣接した１つまたは複数のさらなるアミノ酸、例えば、膜貫通が由来するタンパク質の細胞外領域に会合した１つまたは複数のアミノ酸（例えば、細胞外領域の少なくとも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、またはそれ以上のアミノ酸）、及び／または膜貫通タンパク質が由来するタンパク質の細胞内領域に会合した１つまたは複数のさらなるアミノ酸（例えば、細胞内領域の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、またはそれ以上のアミノ酸）を含むことができる。ある場合には、膜貫通ドメインは、細胞外領域の少なくとも３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、またはそれ以上のアミノ酸を含むことができる。ある場合には、膜貫通ドメインは、細胞内領域の少なくとも３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、またはそれ以上のアミノ酸を含むことができる。一態様では、膜貫通ドメインは、使用されるＴＦＰの他のドメインの１つに会合したものである。幾つかの場合では、膜貫通ドメインは、そのようなドメインが同じまたは異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインに結合しないように、例えば、受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最低限に抑えるように選択したり、またはアミノ酸置換によって改変したりすることができる。一態様では、膜貫通ドメインを、ＴＦＰ－Ｔ細胞表面上の別のＴＦＰとホモ二量体化することができる。異なる態様では、膜貫通ドメインのアミノ酸配列は、同じＴＦＰに存在する本来の結合パートナーの結合ドメインとの相互作用を最低限に抑えるように改変または置換されてもよい。

【０１３９】

[0162] 膜貫通ドメインは、天然源由来または組み換え源由来のいずれであってもよい。その源が天然である場合、該ドメインは、いずれの膜結合または膜貫通タンパク質に由来してもよい。一態様では、膜貫通ドメインは、ＴＦＰが標的に結合したときは必ず細胞内ドメイン（複数可）にシグナル伝達することができる。本開示に特に有用な膜貫通ドメインは、少なくとも、例えば、Ｔ細胞受容体のα、β、γ、もしくはδ鎖、またはＣＤ２８、ＣＤ３ε、ＣＤ３δ、ＣＤ３γ、ＣＤ３ζ、ＣＤ４５、ＣＤ４、ＣＤ５、ＣＤ８、ＣＤ９、ＣＤ１６、ＣＤ２２、ＣＤ３３、ＣＤ３７、ＣＤ６４、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ１３４、ＣＤ１３７、ＣＤ１５４の膜貫通領域（複数可）を含んでもよい。

【０１４０】

[0163] 幾つかの場合では、膜貫通ドメインは、ヒンジ、例えば、ヒトタンパク質からのヒンジを介して、ＴＦＰの細胞外領域、例えば、ＴＦＰの抗原結合ドメインに結合することができる。例えば、一実施形態では、ヒンジは、ヒト免疫グロブリン（Ｉｇ）のヒンジ、例えば、ＩｇＧ４のヒンジ、またはＣＤ８ａのヒンジであり得る。

【０１４１】

リンカー

[0164] 任意選択により、２～１０のアミノ酸長の短いオリゴペプチドまたはポリペプチドリンカーが、ＴＦＰの膜貫通ドメインと細胞質領域の間の連結を形成してもよい。ある場合には、リンカーは、少なくとも約５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、またはそれ以上の長さであり得る。グリシン－セリンのダブレットは、特に適切なリンカーを提供する。例えば、一態様では、リンカーは、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳのアミノ酸配列（配列番号３）を含む。幾つかの実施形態では、リンカーは、ＧＧＴＧＧＣＧＧＡＧＧＴＴＣＴＧＧＡＧＧＴＧＧＡＧＧＴＴＣＣのヌクレオチド配列（配列番号４）によってコードされる。

【０１４２】

細胞質ドメイン

[0165] ＴＦＰの細胞質ドメインは、細胞内ドメインを含むことができる。幾つかの実施形態では、細胞内ドメインは、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、ＣＤ３ε、ＴＣＲα、ＴＣＲβ、ＴＣＲγ、またはＴＣＲδからのものである。幾つかの実施形態では、細胞内ドメインは、ＴＦＰがＣＤ３γ、δ、またはεポリペプチドを含有し；ＴＣＲα、ＴＣＲβ、ＴＣＲγ、及びＴＣＲδサブユニットが概して短い（例えば、１～１９のアミノ酸長）細胞内ドメインを有し、かつ全体的にシグナル伝達ドメインを欠いているならば、シグナル伝達ドメインを含む。細胞内シグナル伝達ドメインは一般に、ＴＦＰが導入された免疫細胞の正常なエフェクター機能のうちの少なくとも１つの活性化に関与する。ＴＣＲα、ＴＣＲβ、ＴＣＲγ、及びＴＣＲδの細胞内ドメインはシグナル伝達ドメインを有していないが、それらは、本明細書に記載する一次細胞内シグナル伝達ドメインを有するタンパク質、例えば、細胞内シグナル伝達ドメインとして機能するＣＤ３ζを動員することができる。「エフェクター機能」という用語は、細胞の特殊化された機能を指す。Ｔ細胞のエフェクター機能は、例えば、細胞溶解活性、またはサイトカインの分泌を含めたヘルパー活性であり得る。よって、「細胞内シグナル伝達ドメイン」という用語は、エフェクター機能シグナルを伝達し、細胞に特殊化された機能を果たすように指示する、タンパク質の部分を指す。通常、細胞内シグナル伝達ドメイン全体を用いることができるが、多くの場合、鎖全体を使用する必要はない。細胞内シグナル伝達ドメインの切断部分が使用される限りにおいて、エフェクター機能シグナルを伝達するのであれば、そのような切断部分がインタクトな鎖の代わりに使用されてもよい。よって、細胞内シグナル伝達ドメインという用語には、エフェクター機能シグナルを伝達するのに十分な細胞内シグナル伝達ドメインの任意の切断部分が含まれることを意味する。

【０１４３】

[0166] 本開示のＴＦＰに使用される細胞内シグナル伝達ドメインの例として、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）及び抗原受容体の関与に続いてシグナル伝達を開始するように協調して作用することができる共受容体の細胞質配列、ならびにこれらの配列の任意の誘導体または変異体、及び同じ機能的能力を有する任意の組み換え配列が挙げられる。

【０１４４】

[0167] ＴＣＲのみを通して生成されるシグナルはナイーブＴ細胞の完全な活性化には不十分である場合があり、二次及び／または共刺激シグナルが使用される場合があることが公知である。よって、ナイーブＴ細胞の活性化は、２つの別個のクラスの細胞質シグナル伝達配列、すなわち、ＴＣＲを通して抗原依存性の一次活性化を開始するもの（一次細胞内シグナル伝達ドメイン）、及び抗原非依存的に作用して二次または共刺激シグナルをもたらすもの（二次細胞質ドメイン、例えば、共刺激ドメイン）によって媒介されると言うことができる。

【０１４５】

[0168] 一次シグナル伝達ドメインは、刺激的または抑制的のいずれかで、ＴＣＲ複合体の一次活性化を制御する。刺激的に作用する一次細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫受容活性化チロシンモチーフ（ＩＴＡＭ）として公知のシグナル伝達モチーフを含有し得る。

【０１４６】

[0169] 本開示に特に有用な、ＩＴＡＭを含有する一次細胞内シグナル伝達ドメインの例として、ＣＤ３ζ、ＦｃＲγ、ＦｃＲβ、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、ＣＤ３ε、ＣＤ５、ＣＤ２２、ＣＤ７９ａ、ＣＤ７９ｂ、及びＣＤ６６ｄのものが挙げられる。一実施形態では、本開示のＴＦＰは、細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、ＣＤ３εの一次シグナル伝達ドメインを含む。一実施形態では、一次シグナル伝達ドメインは、改変されたＩＴＡＭドメイン、例えば、本来のＩＴＡＭドメインと比較して変更された（例えば、増大されたまたは減少された）活性を有する変異ＩＴＡＭドメインを含む。一実施形態では、一次シグナル伝達ドメインは、改変されたＩＴＡＭを含有する一次細胞内シグナル伝達ドメイン

、例えば、最適化された及び／または切断されたＩＴＡＭを含有する一次細胞内シグナル伝達ドメインを含む。ある実施形態では、一次シグナル伝達ドメインは、１、２、３、４、またはそれ以上のＩＴＡＭモチーフを含む。

【０１４７】

[0170] ＴＦＰの細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ３シグナル伝達ドメイン、例えば、ＣＤ３ε、ＣＤ３δ、ＣＤ３γ、またはＣＤ３ζ、をそれ自体で含むことができ、またはそれを、本発明のＴＦＰとの関係において有用な任意の他の所望の細胞内シグナル伝達ドメイン（複数可）を組み合わせることができる。例えば、ＴＦＰの細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ３ε鎖部分と共刺激シグナル伝達ドメインとを含むことができる。共刺激シグナル伝達ドメインは、共刺激分子の細胞内ドメインを含む、ＴＦＰの一部分を指す。共刺激分子は、抗原に対するリンパ球の効率的な応答をもたらすことができる、抗原受容体またはそのリガンド以外の細胞表面分子である。そのような分子の例として、ＣＤ２７、ＣＤ２８、４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）、ＯＸ４０、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＰＤ１、ＩＣＯＳ、リンパ球機能関連抗原１（ＬＦＡ－１）、ＣＤ２、ＣＤ７、ＬＩＧＨＴ、ＮＫＧ２Ｃ、Ｂ７－Ｈ３、及びＣＤ８３に特異的に結合するリガンドなどが挙げられる。例えば、ＣＤ２７の共刺激は、ヒトＴＦＰ－Ｔ細胞のｉｎ ｖｉｔｒｏでの拡大、エフェクター機能、及び生存を強化することが実証されており、ヒトＴ細胞のｉｎ ｖｉｖｏでの持続性及び抗腫瘍活性を増強する（Ｓｏｎｇ ｅｔ ａｌ．Ｂｌｏｏｄ．２０１２；１１９（３）：６９６－７０６）。

【０１４８】

[0171] 本開示のＴＦＰの細胞質部分内の細胞内シグナル伝達配列は、ランダムなまたは特定の順序で互いに連結されてもよい。任意選択により、例えば、２～１０アミノ酸長（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０アミノ酸長）の、短いオリゴペプチドまたはポリペプチドリンカーによって、細胞内シグナル伝達配列間の連結が形成されてもよい。

【０１４９】

[0172] 一実施形態では、グリシン－セリンのダブレットを、適切なリンカーとして使用することができる。一実施形態では、単一のアミノ酸、例えば、アラニン、グリシンを、適切なリンカーとして使用することができる。

【０１５０】

[0173] 一態様では、ＴＦＰまたはＣＡＲまたはＴＣＲをコードするベクターまたは環状ＲＮＡは、ｉｎ ｖｉｔｒｏで発現される。別の態様では、該ＴＦＰまたはＣＡＲまたはＴＣＲは、ｉｎ ｖｉｖｏで細胞に送達される。別の態様では、該ＴＦＰまたはＣＡＲまたはＴＣＲは、ｅｘ－ｖｉｖｏで細胞に送達される。

【０１５１】

[0174] 一態様では、本明細書に記載するＴＦＰ発現細胞は、第２のＴＦＰ、例えば、異なる抗原結合ドメイン、例えば、同じ標的（同じＴＡＡ）または異なる標的（例えば、ＣＤ１２３）に対するものを含む第２のＴＦＰをさらに含むことができる。一実施形態では、ＴＦＰ発現細胞が２つ以上の異なるＴＦＰを含むとき、異なるＴＦＰの抗原結合ドメインは、抗原結合ドメインが互いに相互作用しないようなものであり得る。例えば、第１及び第２のＴＦＰを発現する細胞は、第１のＴＦＰの抗原結合ドメインを、例えば、断片、例えば、ｓｃＦｖとして含むことができ、これは、第２のＴＦＰの抗原結合ドメインとの会合を形成しないものであり、例えば、第２のＴＦＰの抗原結合ドメインは、V_{HH}である。

【０１５２】

[0175] 別の態様では、本明細書に記載するＴＦＰ発現細胞は、別の作用物質、例えば、改変されたヒト免疫細胞の活性を強化する作用物質をさらに発現することができる。例えば、一実施形態では、作用物質は、抑制分子を阻害する作用物質であり得る。抑制分子、例えば、ＰＤ１は、幾つかの実施形態では、改変されたヒト免疫細胞の免疫エフェクター応答開始能力を減少させることがある。抑制分子の例として、ＰＤ１、ＰＤ－Ｌ１、Ｃ

ＴＬＡ４、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３、ＶＩＳＴＡ、ＢＴＬＡ、ＴＩＧＩＴ、ＬＡＩＲ１、ＣＤ１６０、２Ｂ４、及びＴＧＦＲβが挙げられる。一実施形態では、抑制分子を阻害する作用物質は、第１のポリペプチド、例えば、抑制分子を含み、それは、細胞に正のシグナルをもたらす第２のポリペプチド、例えば、本明細書に記載する細胞内シグナル伝達ドメインに会合している。一実施形態では、作用物質は、例えば、ＰＤ１、ＬＡＧ３、ＣＴＬＡ４、ＣＤ１６０、ＢＴＬＡ、ＬＡＩＲ１、ＴＩＭ３、２Ｂ４、及びＴＩＧＩＴなどの抑制分子またはこれらのいずれかの断片（例えば、これらのいずれかの細胞外ドメインの少なくとも一部分）の第１のポリペプチドと、本明細書に記載する細胞内シグナル伝達ドメイン（例えば、共刺激ドメインを含むもの（例えば、４－１ＢＢ、ＣＤ２７、またはＣＤ２８、例えば、本明細書に記載するようなもの）及び／または一次シグナル伝達ドメイン（例えば、本明細書に記載するＣＤ３ζシグナル伝達ドメイン）である第２のポリペプチドと、を含む。一実施形態では、作用物質は、ＰＤ１またはその断片（例えば、ＰＤ１の細胞外ドメインの少なくとも一部分）の第１のポリペプチドと、本明細書に記載する細胞内シグナル伝達ドメイン（例えば、本明細書に記載するＣＤ２８シグナル伝達ドメイン及び／または本明細書に記載するＣＤ３ζシグナル伝達ドメイン）の第２のポリペプチドとを含む。ＰＤ１は、ＣＤ２８、ＣＴＬＡ－４、ＩＣＯＳ、及びＢＴＬＡも含むＣＤ２８受容体ファミリーの抑制性メンバーである。ＰＤ－１は、活性化されたＢ細胞、Ｔ細胞、及び骨髄細胞上に発現される（Ａｇａｔａ ｅｔ ａｌ．１９９６ Ｉｎｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ ８：７６５－７５）。ＰＤ１に対する２つのリガンド、ＰＤ－Ｌ１及びＰＤ－Ｌ２は、ＰＤ１に結合するとＴ細胞の活性化を下方制御することが示されている（Ｆｒｅｅｍａｎ ｅｔ ａｌ．２０００ Ｊ Ｅｘｐ Ｍｅｄ １９２：１０２７－３４；Ｌａｔｃｈｍａｎ ｅｔ ａｌ．２００１ Ｎａｔ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２：２６１－８；Ｃａｒｔｅｒ ｅｔ ａｌ．２００２ Ｅｕｒ Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ ３２：６３４－４３）。ＰＤ－Ｌ１は、ヒトのがんに豊富に存在する（Ｄｏｎｇ ｅｔ ａｌ．２００３ Ｊ Ｍｏｌ Ｍｅｄ ８１：２８１－７；Ｂｌａｎｋ ｅｔ ａｌ．２００５ Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ ５４：３０７－３１４；Ｋｏｎｉｓｈｉ ｅｔ ａｌ．２００４ Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ １０：５０９４）。免疫抑制は、ＰＤ１のＰＤ－Ｌ１との局所的相互作用を阻害することによって、逆転させることができる。

【０１５３】

[0176] 一実施形態では、作用物質は、抑制分子の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）を含み、例えば、プログラム死１（ＰＤ１）の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）を、膜貫通ドメイン、及び任意選択により、４１ＢＢ及びＣＤ３ζなどの細胞内シグナル伝達ドメインに融合させることができる（本明細書ではＰＤ１ ＴＦＰとも呼ばれる）。一実施形態では、ＰＤ１ＴＦＰは、本明細書に記載する抗ＴＡＡ ＴＦＰと組み合わせて使用すると、Ｔ細胞の持続性を向上させる。一実施形態では、ＴＦＰは、ＰＤ１の細胞外ドメインを含むＰＤ１ＴＦＰである。あるいは、提供するのは、プログラム死－リガンド１（ＰＤ－Ｌ１）またはプログラム死－リガンド２（ＰＤ－Ｌ２）に特異的に結合するｓｃＦｖなどの抗体または抗体断片を含有するＴＦＰである。

【０１５４】

[0177] 別の態様では、本開示は、ＴＦＰ発現Ｔ細胞、例えば、ＴＦＰ－Ｔ細胞の集団を提供する。幾つかの実施形態では、ＴＦＰ発現Ｔ細胞の集団は、異なるＴＦＰを発現する細胞の混合物を含む。例えば、一実施形態では、ＴＦＰ－Ｔ細胞の集団は、本明細書に記載する抗ＴＡＡ結合ドメインを有するＴＦＰを発現する第１の細胞と、異なる抗ＴＡＡ結合ドメイン、例えば、第１の細胞によって発現されるＴＦＰ内の抗ＴＡＡ結合ドメインとは異なる本明細書に記載される抗ＴＡＡ結合ドメインを有するＴＦＰを発現する第２の細胞とを含むことができる。別の例として、ＴＦＰ発現細胞の集団は、抗ＴＡＡ結合ドメイン、例えば本明細書に記載するようなものを含むＴＦＰを発現する第１の細胞と、ＣＤ１９またはＢＣＭＡ以外（例えば、別の腫瘍関連抗原）の標的に対する抗原結合ドメインを含むＴＦＰを発現する第２の細胞とを含むことができる。

【０１５５】

別の態様では、本開示は、細胞集団であって、該集団内の少なくとも１つの細胞が、本明細書に記載する抗ＴＡＡドメインを有するＴＦＰを発現し、第２の細胞が、別の作用物質、例えば、改変されたヒト免疫細胞の活性を強化する作用物質を発現する、細胞集団を提供する。例えば、一実施形態では、作用物質は、抑制分子を阻害する作用物質であり得る。抑制分子は、例えば、幾つかの実施形態では、改変されたヒト免疫細胞が免疫エフェクター応答を開始する能力を減少させ得る。抑制分子の例として、ＰＤ１、ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、ＣＴＬＡ４、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３、ＶＩＳＴＡ、ＢＴＬＡ、ＴＩＧＩＴ、ＬＡＩＲ１、ＣＤ１６０、２Ｂ４、及びＴＧＦＲβが挙げられる。一実施形態では、抑制分子を阻害する作用物質は、第１のポリペプチド、例えば、抑制分子を含み、それは、細胞に正のシグナルをもたらす第２のポリペプチド、例えば、本明細書に記載する細胞内シグナル伝達ドメインに会合している。

【０１５６】

環状ＲＮＡ（ｃｉｒｃＲＮＡ）

[0178] 本明細書に開示するのは、ＴＦＰ、ＣＡＲ、ＴＣＲ、またはそれらの組み合わせをコードするｉｎ ｖｉｔｒｏまたはｉｎ ｖｉｖｏ転写ＲＮＡを生成するための方法である。好ましい実施形態では、該ＲＮＡはｃｉｒｃＲＮＡである。幾つかの実施形態では、ｃｉｒｃＲＮＡは外因性である。他の実施形態では、ｃｉｒｃＲＮＡは内因性である。他の実施形態では、配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）を有するｃｉｒｃＲＮＡは、ｉｎ ｖｉｔｒｏまたはｅｘ ｖｉｖｏで翻訳される。

【０１５７】

[0179] 環状ＲＮＡ（ｃｉｒｃＲＮＡ）は、強化された安定性を有し、様々な細胞タンパク質との相互作用に必要な末端モチーフを欠いた、連続構造を有するクラスの一本鎖ＲＮＡである。ｃｉｒｃＲＮＡは、３－５’が共有結合で閉じたＲＮＡの環であり、ｃｉｒｃＲＮＡは、キャップまたはポリ（Ａ）テールを表示しない。ｃｉｒｃＲＮＡにはエキソヌクレアーゼに媒介される分解に必要な遊離末端がないため、ＲＮＡターンオーバーの幾つかのメカニズムに対して強くなり、それらに相当する線状ｍＲＮＡと比較して寿命が長くなる。このために、環状化は、一般に短い半減期に悩まされるｍＲＮＡの安定化を可能にすることができ、したがって種々の用途でのｍＲＮＡの全体的な効力を向上させることができる。その上、細胞内、例えばＴ細胞内に形質移入されたときに、ｃｉｒｃＲＮＡは、他の形態のＲＮＡ、例えば、ｓｈＲＮＡまたは二本鎖ＲＮＡよりも低減した免疫原性を有することができる。ｃｉｒｃＲＮＡは、スプライシングのプロセスによって生成され、環状化は、ほとんどの場合注釈付けされたエキソン境界にある従来のスプライス部位を使用して行われる（Ｓｔａｒｋｅ ｅｔ ａｌ．，２０１５；Ｓｚａｂｏ ｅｔ ａｌ．，２０１５）。環状化の場合、スプライス部位は逆に使用される。すなわち、下流のスプライスドナーが上流のスプライスアクセプターに「バックスプライス」される（総説には、Ｊｅｃｋ ａｎｄ Ｓｈａｒｐｌｅｓｓ，２０１４；Ｂａｒｒｅｔｔ ａｎｄ Ｓａｌｚｍａｎ，２０１６；Ｓｚａｂｏ ａｎｄ Ｓａｌｚｍａｎ，２０１６；Ｈｏｌｄｔ ｅｔ ａｌ．，２０１８を参照されたい）。

【０１５８】

[0180] 続いて細胞内に移入することができるｃｉｒｃＲＮＡを生成するために、自己触媒スプライシングイントロンを用いるｃｉｒｃＲＮＡのｉｎ ｖｉｔｒｏ生成をプログラムすることができる（図１）。ｃｉｒｃＲＮＡを生成するための方法は、特別に設計されたプライマーを用いる前駆体線状ＲＮＡ鋳型のｉｎ ｖｉｔｒｏ転写（ＩＶＴ）を含むことができる。ＲＮＡの環状化については、３つの一般的な戦略が今までに報告されている。すなわち、臭化シアンまたは類似の縮合剤を使用する化学的方法、ＲＮＡまたはＤＮＡリガーゼを使用する酵素的方法、及び自己スプライシングイントロンを使用するリボザイム法である。好ましい実施形態では、前駆体ＲＮＡはランオフ転写によって合成され、次いで環状化を促進するためにマグネシウムイオン及びＧＴＰの存在下で加熱される。そのように生成されたＲＮＡは、異なる種類の細胞に効率的に形質移入することができる。一態様では、鋳型は、ＴＦＰ、ＣＡＲ、及びＴＣＲ、またはそれらの組み合わせのための

配列を含む。
【０１５９】
[0181] ファージＴ４のチミジル酸シンターゼ（ｔｄ）遺伝子のグループＩイントロンは、エキソンを共に線状にスプライスしながら環状化することが十分に特徴付けられている（Ｃｈａｎｄｒｙ ａｎｄ Ｂｅｌ－ｆｏｒｔ，１９８７；Ｆｏｒｄ ａｎｄ Ａｒｅｓ，１９９４；Ｐｅｒｒｉｍａｎ ａｎｄ Ａｒｅｓ，１９９８）。このｔｄのイントロンの順序を任意のエキソン配列に隣接して順序交換すると、エキソンは２つの自己触媒エステル交換反応を介して環状化される（Ｆｏｒｄ ａｎｄ Ａｒｅｓ，１９９４；Ｐｕｔｔａｒａｊｕ ａｎｄ Ｂｅｅｎ，１９９５）。好ましい実施形態では、ファージＴ４のチミジル酸シンターゼ（ｔｄ）遺伝子のグループＩイントロンを使用して外因性ｃｉｒｃＲＮＡが生成される。
【０１６０】
[0182] 幾つかの例示的な実施形態では、順序交換グループＩ触媒イントロンを利用するリボザイム法が使用される。この方法は、長いＲＮＡの環状化により適用可能であり得、補助因子としてＧＴＰ及びのＭｇ$^{2+}$の付加のみを必要とし得る。この順序交換イントロン－エキソン（ＰＩＥ）スプライシング戦略は、半分のイントロン配列に隣接して融合された部分的エキソンからなる。ｉｎ ｖｉｔｒｏで、これらの構築物は、グループＩ触媒イントロンに特徴的な二重エステル交換反応を受けるが、エキソンが融合されているために、共有結合的に５’と３’が連結された円として切り取られる。
【０１６１】
[0183] 一態様では、本明細書に開示するのは、Ｔ４ファージのチミジル酸シンターゼ（Ｔｄ）遺伝子内の順序交換グループＩ触媒イントロンまたはＡｎａｂａｅｎａのｔＲＮＡ前駆体遺伝子内の順序交換グループＩ触媒イントロンの３’イントロンと５’イントロンの間に、完全長の脳心筋炎ウイルス（ＥＭＣＶなど）のＩＲＥＳ、ＴＦＰ、ＣＡＲ、ＴＣＲ、またはそれらの組み合わせをコードする遺伝子、ＰＩＥ構築物のエキソン断片に相当する２つの短い領域（Ｅ１及びＥ２）を含有する配列である。より好ましい実施形態では、言及した配列は、５’及び３’スプライス部位を互いに近接させることを目的として、ＲＮＡ前駆体の５’及び３’末端に配置された相補的な「相同性アーム」をさらに含む。主なスプライシング産物を確実に環状にするために、スプライシング反応は、ＲＮａｓｅ Ｒで処理することができる。
【０１６２】
[0184] 一態様では、抗ＴＡＡ ＴＦＰは、ｃｉｒｃＲＮＡによってコードされる。一態様では、抗ＴＡＡ ＴＦＰをコードするｃｉｒｃＲＮＡは、ＴＦＰ－Ｔ細胞を産生するためにＴ細胞に導入される。一実施形態では、ｉｎ ｖｉｔｒｏ転写ＲＮＡ ＴＦＰは、一過性形質移入の形態で細胞に導入することができる。
【０１６３】
[0185] 幾つかの態様では、線状ＲＮＡ前駆体は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）で生成された鋳型を使用するｉｎ ｖｉｔｒｏ転写によって生成される。任意の源からの関心対象のＤＮＡは、ＰＣＲによって、適正なプライマー及び緩衝液及びＲＮＡポリメラーゼ及び改変されたまたはされていないヌクレオチドを使用して、ｉｎ ｖｉｔｒｏ ＲＮＡ合成用の鋳型に直接変換することができる。ＤＮＡ源は、例えば、ゲノムＤＮＡ、プラスミドＤＮＡ、ファージＤＮＡ、ｃＤＮＡ、消化ＤＮＡ、合成ＤＮＡ配列、または任意の他の適正なＤＮＡ源であり得る。ｉｎ ｖｉｔｒｏ転写に望ましい鋳型は、本開示のＴＦＰである。一実施形態では、ＰＣＲに使用しようとするＤＮＡは、オープンリーディングフレームを含有する。ＤＮＡは、生物のゲノムに由来する天然に存在するＤＮＡ配列からのものであり得る。一実施形態では、核酸は、５’及び／または３’非翻訳領域（ＵＴＲ）の一部または全部を含むことができる。核酸は、エキソン及びイントロンを含むことができる。一実施形態では、ＰＣＲに使用しようとするＤＮＡは、ヒト核酸配列である。別の実施形態では、ＰＣＲに使用しようとするＤＮＡは、５’及び３’ＵＴＲを含むヒト核酸配列である。ＤＮＡは、あるいは、天然に存在する生物には通常発現されない人工ＤＮＡ配

列であり得る。例示的な人工ＤＮＡ配列は、融合タンパク質をコードするオープンリーディングフレームを形成するように一緒に連結された遺伝子部分を含有するものである。一緒に連結されたＤＮＡ部分は、単一の生物からのものでも、２種以上の生物からのものでもよい。

【０１６４】

[0186] 幾つかの例示的な実施形態では、形質移入に使用される線状ＲＮＡ前駆体のｉｎ ｖｉｔｒｏ転写用の鋳型を生成するのに、ＰＣＲが使用される。ＰＣＲの実施方法は、当技術分野で周知である。ＰＣＲに使用するためのプライマーは、ＰＣＲ用の鋳型として使用しようとするＤＮＡの領域に実質的に相補的な領域を有するように設計される。「実質的に相補的」とは、本明細書で使用される場合、プライマー配列内の塩基の大部分またはすべてが相補的であるか、または１つまたは複数の塩基が非相補的もしくは不一致である、ヌクレオチドの配列を指す。実質的に相補的な配列は、ＰＣＲに使用されるアニーリング条件下で、アニーリングまたは意図されるＤＮＡ標的とのハイブリッド形成が可能である。プライマーは、ＤＮＡ鋳型の任意の部分と実質的に相補的になるように設計することができる。例えば、プライマーは、細胞内で通常転写される核酸の部分（オープンリーディングフレーム）を、５’及び３’ＵＴＲを含めて増幅するように設計することができる。プライマーは、関心対象の特定のドメインをコードする核酸の一部分を増幅するように設計することもできる。一実施形態では、プライマーは、ヒトｃＤＮＡのコード領域を、５’及び３’ＵＴＲのすべてまたは部分を含めて増幅するように設計される。ＰＣＲに有用なプライマーは、当技術分野で周知の合成方法によって生成することができる。「フォワードプライマー」は、増幅しようとするＤＮＡ配列の上流にある、ＤＮＡ鋳型上のヌクレオチドと実質的に相補的なヌクレオチドの領域を含有するプライマーである。「上流」は、増幅しようとするＤＮＡ配列に対して、コーディング鎖の５’側の位置を指すために使用される。「リバースプライマー」は、増幅しようとするＤＮＡ配列の下流にある、二本鎖ＤＮＡ鋳型に実質的に相補的なヌクレオチドの領域を含有するプライマーである。「下流」は、増幅しようとするＤＮＡ配列に対して、コーディング鎖の３’側の位置を指すために本明細書において使用される。

【０１６５】

[0187] ＰＣＲに有用な任意のＤＮＡポリメラーゼを、本明細書に開示する方法に使用することができる。試薬及びポリメラーゼは、幾つもの供給業者から市販されている。

[0188] 安定性及び／または翻訳効率を促進する能力を有する化学構造も使用されてもよい。ＲＮＡは、好ましくは、５’及び３’ＵＴＲを有する。一実施形態では、５’ＵＴＲは、１～３０００ヌクレオチド長である。コーディング領域に付加しようとする５’及び３’ＵＴＲ配列の長さは、様々な方法によって変更することができ、それらとして、ＵＴＲの異なる領域にアニーリングするＰＣＲのためのプライマーを設計することが挙げられるが、これに限定されない。この手法を使用すれば、当業者であれば、転写されたＲＮＡの形質移入後に最適なＲＮＡの安定性及び／または翻訳効率を実現するために５’及び３’ＵＴＲの長さを改変することができる。

【０１６６】

[0189] ５’及び３’ＵＴＲは、天然に存在する、関心対象の核酸に内因性の５’及び３’ＵＴＲであり得る。あるいは、ＵＴＲ配列をフォワードまたはリバースプライマーに組み込むことによって、または鋳型の任意の他の改変によって、関心対象の核酸に内因性でないＵＴＲ配列を付加することができる。関心対象の核酸に内因性ではないＵＴＲ配列を使用することは、ＲＮＡの安定性及び／または翻訳効率を改変するのに有用であり得る。例えば、３’ＵＴＲ配列にＡＵリッチなエレメントがあると、ｍＲＮＡの安定性が減少することがあり、それに対してタンパク質結合モチーフがあると、ｍＲＮＡ及びｃｉｒｃＲＮＡの安定性が増大し得ることが公知である。したがって、３’ＵＴＲは、当技術分野で周知のＵＴＲの特性に基づいて、転写されたＲＮＡの安定性を増大させるように選択または設計することができる。

【０１６７】

[0190] 一実施形態では、５’ＵＴＲは、内因性核酸のコザック配列を含有することができる。あるいは、関心対象の核酸に内因性ではない５’ＵＴＲが上記のようにＰＣＲによって付加されているとき、この５’ＵＴＲ配列を付加することによって、コンセンサスコザック配列を再設計することができる。コザック配列は、幾つかのＲＮＡ転写物の翻訳の効率を増大させることができるが、効率的な翻訳を可能にするためにすべてのＲＮＡに必要とされるとは限らない可能性がある。当技術分野で公知の多くのｍＲＮＡは、コザック配列を含むことができる。他の実施形態では、５’ＵＴＲは、ＲＮＡゲノムが細胞内で安定であるＲＮＡウイルスの５’ＵＴＲであり得る。他の実施形態では、３’または５’ＵＴＲに様々なヌクレオチド類似体を使用して、ｍＲＮＡのエキソヌクレアーゼ分解を妨害させることができる。

【０１６８】

[0191] 遺伝子クローニングを必要とせずにＤＮＡ鋳型から線状ＲＮＡ前駆体を合成できるようにするには、転写しようとするＤＮＡ鋳型の配列の上流に、転写のプロモーターが結合されていなければならない。ＲＮＡポリメラーゼのプロモーターとして機能する配列がフォワードプライマーの５’末端に付加されると、ＲＮＡポリメラーゼプロモーターは、ＰＣＲ産物中に、転写しようとするオープンリーディングフレームの上流に組み込まれることとなる。好ましい一実施形態では、プロモーターは、本明細書に別途記載するようなＴ７ポリメラーゼプロモーターである。他の有用なプロモーターとして、Ｔ３及びＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。Ｔ７、Ｔ３、及びＳＰ６プロモーターのコンセンサスヌクレオチド配列は、当技術分野で公知である。

【０１６９】

[0192] 幾つかの実施形態では、ＲＮＡは、５’末端のキャップと３’ポリ（Ａ）テールの両方を有し、これらは、細胞内のｍＲＮＡのリボソーム結合、翻訳の開始、及び安定性を決定する。環状ＤＮＡ鋳型、例えば、プラスミドＤＮＡにおいて、ＲＮＡポリメラーゼは、真核細胞での発現に適さない長いコンカテマー産物を生成する。３’ＵＴＲの末端で線状化されたプラスミドＤＮＡを転写すると、通常のサイズのｍＲＮＡが生じるが、これは転写後にポリアデニル化されても、真核生物の形質移入に有効ではない。

【０１７０】

[0193] 線状ＤＮＡ鋳型において、ファージＴ７　ＲＮＡポリメラーゼは、転写物の３’末端を、鋳型の最後の塩基を越えて伸長させることができる（Ｓｃｈｅｎｂｏｒｎ　ａｎｄ　Ｍｉｅｒｅｎｄｏｒｆ，Ｎｕｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．，１３：６２２３－３６（１９８５）；Ｎａｃｈｅｖａ　ａｎｄ　Ｂｅｒｚａｌ－Ｈｅｒｒａｎｚ，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，２７０：１４８５－６５（２００３）。

【０１７１】

[0194] ポリＡ／Ｔストレッチを ＤＮＡ鋳型に組み込む従来の方法は、分子クローニングである。しかし、プラスミドＤＮＡに統合されたポリＡ／Ｔ配列は、プラスミドの不安定性を引き起こすことがあり、これが、細菌細胞から得られたプラスミドＤＮＡ鋳型に欠失及び他の異常が高度に混入していることが多い理由である。これによって、クローニング手順は、労力と時間を要するだけでなく、信用できないことが多くなる。これが、ポリＡ／Ｔ　３’ストレッチを有するＤＮＡ鋳型を、クローニングを用いずに構築することができる方法が非常に望ましい理由である。

【０１７２】

[0195] 転写ＤＮＡ鋳型のポリＡ／Ｔセグメントは、ＰＣＲ中に１００Ｔテール（サイズが５０～５０００Ｔであり得る）などのポリＴテールを含有するリバースプライマーを使用することによって、またはＰＣＲ後に、限定するものではないが、ＤＮＡライゲーションまたはｉｎ　ｖｉｔｒｏ組み換えを含めた任意の他の方法によって、生成することができる。ポリ（Ａ）テールはまた、ＲＮＡに安定性をもたらし、その分解を低減させる。一般に、ポリ（Ａ）テールの長さは、転写されたＲＮＡの安定性と正に相関する。一実施形態では、ポリ（Ａ）テールは、１００～５０００アデノシンである。

【０１７３】
[0196] ＲＮＡのポリ（Ａ）テールは、ｉｎ ｖｉｔｒｏ転写後に、Ｅ．ｃｏｌｉポリＡポリメラーゼ（Ｅ－ＰＡＰ）などのポリ（Ａ）ポリメラーゼを使用してさらに伸長させることができる。一実施形態では、ポリ（Ａ）テールの長さを、１００ヌクレオチドから３００～４００ヌクレオチドに増加させると、ＲＮＡの翻訳効率が約２倍増大する。加えて、異なる化学基を３’末端に結合させると、ｍＲＮＡの安定性が増大し得る。そのような結合は、改変／人工ヌクレオチド、アプタマー、及び他の化合物を含有し得る。例えば、ポリ（Ａ）ポリメラーゼを使用してＡＴＰ類似体をポリ（Ａ）テールに組み込むことができる。ＡＴＰ類自体は、ＲＮＡの安定性をさらに増加することができる。
【０１７４】
[0197] ５’キャップによっても、ＲＮＡ分子の安定性をもたらすことができる。幾つかの実施形態では、本明細書に開示する方法によって生成されるＲＮＡは、５’キャップを含む。５’キャップは、当技術分野で公知の、本明細書に記載する技法を使用して提供される（Ｃｏｕｇｏｔ，ｅｔ ａｌ．，Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｓｃｉ．，２９：４３６－４４４（２００１）；Ｓｔｅｐｉｎｓｋｉ，ｅｔ ａｌ．，ＲＮＡ，７：１４６８－９５（２００１）；Ｅｌａｎｇｏ，ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．，３３０：９５８－９６６（２００５））。
【０１７５】
[0198] 本明細書に開示する方法によって生成されるＲＮＡ（例えば、ｃｉｒｃＲＮＡ）は、配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）配列も含有することができる。ＩＲＥＳ配列は、任意のウイルス、染色体、または人工設計配列であってもよく、ｍＲＮＡへのキャップ非依存性リボソーム結合を開始し、翻訳の開始を促進する。細胞エレクトロポレーションに適した任意の溶質であって、糖、ペプチド、脂質、タンパク質、酸化防止剤、及び界面活性剤などの、細胞の透過性及び生存能を促進する因子を含有することができるものが含まれ得る。
【０１７６】
[0199] ＲＮＡは、幾つもの異なる方法、例えば、商業的に入手可能な方法のいずれかを使用して標的細胞に導入することができ、それらの方法として、エレクトロポレーション（Ａｍａｘａ Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ（登録商標）－ＩＩ（Ａｍａｘａ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ，Ｃｏｌｏｇｎｅ，Ｇｅｒｍａｎｙ））、ＥＣＭ ８３０（ＢＴＸ）（Ｈａｒｖａｒｄ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｂｏｓｔｏｎ，Ｍａｓｓ．）、Ｎｅｏｎ ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）、Ｃｅｌｌ ｓｑｕｅｅｚｉｎｇ（ＳＱＺ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、もしくはＧｅｎｅ Ｐｕｌｓｅｒ（登録商標）ＩＩ（ＢｉｏＲａｄ，Ｄｅｎｖｅｒ，Ｃｏｌｏ．）、Ｍｕｌｔｉｐｏｒａｔｏｒ（登録商標）（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ、Ｈａｍｂｕｒｇ Ｇｅｒｍａｎｙ）、リポフェクションを使用するカチオン性リポソーム媒介形質移入、ポリマーカプセル化、ペプチド媒介形質移入、または「遺伝子銃」などのパーティクルガン送達系（例えば、Ｎｉｓｈｉｋａｗａ，ｅｔ ａｌ．Ｈｕｍ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．，１２（８）：８６１－７０（２００１）を参照されたい）が挙げられるが、これらに限定されない。
【０１７７】
順序交換イントロン－エキソン（ＰＩＥ）スプライシング戦略に基づいたＰＩＥの選択
[0200] ｃｉｒｃＲＮＡは一般に、平均より長いエキソンから形成され、通常、それらが会合したプレｍＲＮＡ内で平均より長いイントロンに隣接する（Ｊｅｃｋ ｅｔ ａｌ．，２０１３；Ｓａｌｚｍａｎ ｅｔ ａｌ．，２０１２）。そのようなイントロンは、ヒトにおける多くのｃｉｒｃＲＮＡの生合成に役割を果たしていると考えられる相補的なＡＬＵエレメントに富んでいる（Ｊｅｃｋ ｅｔ ａｌ．，２０１３）。したがって、順序交換イントロン－エキソン（ＰＩＥ）スプライシング戦略は、半分のイントロン配列に隣接して融合された部分的エキソンからなる［Ｗｅｓｓｅｌｈｏｅｆｔ ｅｔ．ａｌ．，Ｎａｔ．Ｃｏｍｍｕｎ．，９：２６－２９．，２０１８］。ｃｉｒｃＲＮＡは、それらの隣接するイントロンの配列組成に基づいて予測することができる。

【０１７８】
[0201] ファージＴ４のチミジル酸シンターゼ（ｔｄ）遺伝子のグループＩイントロンは、エキソンを共に線状にスプライスしながら環状化することが十分に特徴付けられている（Ｃｈａｎｄｒｙ ａｎｄ Ｂｅｌ－ｆｏｒｔ，１９８７；Ｆｏｒｄ ａｎｄ Ａｒｅｓ，１９９４；Ｐｅｒｒｉｍａｎ ａｎｄ Ａｒｅｓ，１９９８）。このｔｄイントロンの順序を任意のエキソン配列に隣接して順序交換すると（５０の半分を３０の位置に配置し、その逆も同様）、エキソンは、２つの自己触媒エステル交換反応を介して環状化する（Ｆｏｒｄ ａｎｄ Ａｒｅｓ，１９９４；Ｐｕｔｔａｒａｊｕ ａｎｄ Ｂｅｅｎ，１９９５）。好ましい実施形態では、開示するｃｉｒｃＲＮＡの設計に自己スプライシングイントロン［Ｗｅｓｓｅｌｈｏｅｆｔ ｅｔ．ａｌ．，Ｎａｔ．Ｃｏｍｍｕｎ．，９：２６－２９．，２０１８］を使用する。より好ましい実施形態では、自己スプライシング及び環状化を促進するために、開示するｃｉｒｃＲＮＡの設計にグループＩイントロンを使用する。

【０１７９】
ＩＲＥＳ
[0202] キャップ非依存性翻訳は、真核生物における翻訳開始の代替的手段であり、配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）などの内部開始を誘導する特定のエレメントの存在に依存する。ＩＲＥＳ配列は、ウイルスＲＮＡで最初に報告され、ＲＮＡの内部にあるときに真核生物のリボソームに結合する（Ｃｈｅｎ ａｎｄ Ｓａｒｎｏｗ，１９９５；Ｐｅｒｒｉｍａｎ ａｎｄ Ａｒｅｓ，１９９８）。原則として、ＩＲＥＳに駆動される翻訳の鍵となる特徴は、キャップ非依存性ではなく、その５’末端非依存性である。

【０１８０】
[0203] 線状ｍＲＮＡとは異なり、ｃｉｒｃＲＮＡは、スプライシング及び翻訳に関して、順序交換グループＩイントロン及びＩＲＥＳを含めたＲＮＡの折り畳み構造に大きく依拠している。例えば、ＩＲＥＳに直接続くコード領域内を含めた、ＩＲＥＳの近位にある二次構造は、ＩＲＥＳの折り畳み及び翻訳開始を妨げ、環状化効率に影響を与える可能性がある。したがって、ＰＩＥの選択に応じて、異なる種類のＩＲＥＳ配列を選択し、試験するべきである。

【０１８１】
[0204] 幾つかの実施形態では、ＩＲＥＳ配列は、ＡＭＰＶ、ＣＳＦＶ、ＣＶＢ３、ＥＭＣＶ、ＥＶ７１、ＨＡＶ、ＨＲＶ２、ＨＴＬＶ、及びＰＶ（ポリオウイルス）などのウイルス配列を含む群から選択される。好ましい実施形態では、ＩＲＥＳ配列は、コクサッキーウイルスＢ３（ＣＶＢ３）から選択される。他の好ましい実施形態では、ＩＲＥＳ配列は、脳心筋炎ウイルス（ＥＭＣＶ）から選択される。

【０１８２】
環状化効率を向上させるための相同性アーム
[0205] 「相同性アーム」は、５’及び３’スプライス部位を互いに近接させることを目的として線状ＲＮＡ前駆体の５’及び３’末端に配置された相補的配列である。相同性アームがないと、ＲＮＡ前駆体の末端間で塩基対形成が起きないことが予測される、相同性アームを付加することによって、スプライシング効率だけでなく環状化効率も増大することが報告されている［Ｗｅｓｓｅｌｈｏｅｆｔ ｅｔ．ａｌ．，Ｎａｔ．Ｃｏｍｍｕｎ．，９：２６－２９．，２０１８］。ウィーン大学（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｖｉｅｎｎａ）によって提供されるＲＮＡＦｏｌｄ ＷｅｂＳｅｒｖｅｒは、一本鎖ＲＮＡまたはＤＮＡ配列の二次構造を予測する。ＲＮＡ前駆体の二次構造の予測は、相同性アームの設計についての情報をもたらす。幾つかの実施形態では、ＲＮＡｆｏｌｄを使用して、相同性アーム配列のための配列変異体が試験される。幾つかの実施形態では、配列長は、２０～１５０ヌクレオチドの範囲内で選択される。幾つかの実施形態では、２つ以上の相同性アーム配列が、線状ＲＮＡ前駆体の５’及び３’末端に存在する。

【０１８３】
[0206] 一態様では、本明細書で開示するのは、Ｔ４ファージのチミジル酸シンターゼ

（Ｔｄ）遺伝子内の順序交換グループＩ触媒イントロンまたはＡｎａｂａｅｎａのｔＲＮＡ前駆体遺伝子内の順序交換グループＩ触媒イントロンの３’イントロンと５’イントロンの間に、完全長の脳心筋炎ウイルス（ＥＭＣＶなど）のＩＲＥＳ、ＴＦＰ、ＣＡＲ、ＴＣＲ、またはそれらの組み合わせをコードする遺伝子、ＰＩＥ構築物のエキソン断片に相当する２つの短い領域（Ｅ１及びＥ２）を含有する線状ＲＮＡ前駆体配列である。より好ましい実施形態では、言及した配列は、５’及び３’スプライス部位を互いに近接させることを目的として、ＲＮＡ前駆体の５’及び３’末端に配置された相補的な「相同性アーム」をさらに含む。別の態様では、言及した線状ＲＮＡ配列から自己スプライスして得られたｃｉｒｃＲＮＡは、２つのエキソン断片（Ｅ１及びＥ２）の間にＩＲＥＳ、ＴＦＰ、ＣＡＲ、ＴＣＲ、またはそれらの組み合わせをコードする遺伝子、スペーサー配列（任意選択による）を含む領域、及び相同性アーム（任意選択による）を含む。

【０１８４】

スペーサー配列

[0207] 自己スプライシングＲＮＡ前駆体からのｃｉｒｃＲＮＡ生成の効率をさらに向上させるために、さらなる最適化を実施してもよい［Ｗｅｓｓｅｌｈｏｅｆｔ　ｅｔ．ａｌ．，Ｎａｔ．Ｃｏｍｍｕｎ．，９：２６－２９．，２０１８］。ＩＲＥＳ内の配列は、３’ＰＩＥスプライス部位がＩＲＥＳの近位にあるため、そして両方の配列が高度に構造化されているために、３’スプライス部位での近位で、または５’スプライス部位での遠位で長距離接触を介して、スプライシングリボザイムの折り畳みに干渉する可能性がある。スペーサー配列を付加すると、スプライシング効率が増大したスプライシングが可能になることが予測されている［Ｗｅｓｓｅｌｈｏｅｆｔ　ｅｔ．ａｌ．，Ｎａｔ．Ｃｏｍｍｕｎ．，９：２６－２９．，２０１８］。

【０１８５】

[0208] 幾つかの実施形態では、ＲＮＡｆｏｌｄを使用して、スペーサー配列のための配列変異体が試験される。幾つかの実施形態では、配列長は、２０～１５０ヌクレオチドの範囲内で選択される。

【０１８６】

ＴＦＰをコードする組み換え核酸

[0209] 本明細書に開示するのは、幾つかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）融合タンパク質（ＴＦＰ）をコードする配列を含む組み換え核酸であって、該ＴＦＰが、（ｉ）（１）ＴＣＲ細胞外ドメインの少なくとも一部分、（２）膜貫通ドメイン、及び（３）ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、ＴＣＲα、ＴＣＲβ、ＴＣＲδ、またはＴＣＲγの細胞内シグナル伝達ドメインからの細胞内ドメインを含むＴＣＲサブユニットと、（ｉｉ）抗原結合ドメインとを含み；該ＴＣＲサブユニットと該抗原結合ドメインとが作動可能に連結され、該ＴＦＰが、Ｔ細胞に発現されたときにＴＣＲ複合体に機能的に組み込まれる、組み換え核酸である。幾つかの実施形態では、細胞内ドメインは、刺激ドメイン、例えば、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、またはＣＤ３δからの刺激ドメインを含む。幾つかの実施形態では、組み換え核酸は、ＴＣＲ定常ドメインをコードする配列をさらに含む。幾つかの実施形態では、ＴＣＲ定常ドメインは、ＴＣＲα定常ドメイン、ＴＣＲβ定常ドメイン、またはＴＣＲα定常ドメイン及びＴＣＲβ定常ドメインである。幾つかの実施形態では、ＴＣＲ定常ドメインは、ＴＣＲγ定常ドメイン、ＴＣＲδ定常ドメイン、またはＴＣＲγ定常ドメイン及びＴＣＲδ定常ドメインである。

【０１８７】

[0210] 幾つかの場合では、ＴＣＲ定常ドメインは、Ｔ細胞に発現されたときに機能的ＴＣＲ複合体に組み込まれる。幾つかの場合では、ＴＣＲ定常ドメインは、Ｔ細胞に発現されたときにＴＦＰを組み込む機能的ＴＣＲ複合体と同じ機能的ＴＣＲ複合体に組み込まれる。幾つかの場合では、ＴＦＰをコードする配列及びＴＣＲ定常ドメインをコードする配列は、同じ核酸分子内に含有される。幾つかの場合では、ＴＦＰをコードする配列及びＴＣＲ定常ドメインをコードする配列は、異なる核酸分子内に含有される。

【０１８８】

[0211] 幾つかの場合では、ＴＣＲサブユニットと、抗体ドメイン、抗原ドメイン、または結合リガンドもしくはその断片とは、リンカー配列によって作動可能に連結されている。幾つかの場合では、リンカー配列は、（Ｇ４Ｓ）ｎ（式中、ｎ＝１～４）を含む。

【０１８９】

[0212] 幾つかの場合では、膜貫通ドメインは、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、ＴＣＲα、ＴＣＲβ、ＴＣＲγ、またはＴＣＲδからのＴＣＲ膜貫通ドメインである。幾つかの場合では、細胞内ドメインは、ＣＤ３εのみ、ＣＤ３γのみ、ＣＤ３δのみ、ＴＣＲαのみ、ＴＣＲβのみ、ＴＣＲγのみ、またはＴＣＲδのみに由来する。

【０１９０】

[0213] 幾つかの場合では、ＴＣＲサブユニットは、（ｉ）ＴＣＲ細胞外ドメインの少なくとも一部分、（ｉｉ）ＴＣＲ膜貫通ドメイン、及び（ｉｉｉ）ＴＣＲ細胞内ドメインを含み、（ｉ）、（ｉｉ）、及び（ｉｉｉ）の少なくとも２つは同じＴＣＲサブユニットからのものである。

【０１９１】

[0214] 幾つかの場合では、ＴＣＲ細胞外ドメインは、ＴＣＲα鎖、ＴＣＲβ鎖、ＴＣＲγ鎖、ＴＣＲδ鎖、ＣＤ３εＴＣＲサブユニット、ＣＤ３γＴＣＲサブユニット、ＣＤ３δＴＣＲサブユニット、それらの機能的断片、及び少なくとも１つであるが２０以下の改変を有するそれらのアミノ酸配列からなる群から選択されるタンパク質の細胞外ドメインまたはその一部分を含む。

【０１９２】

[0215] 幾つかの場合では、ＴＣＲサブユニットは、ＴＣＲα鎖、ＴＣＲβ鎖、ＴＣＲγ鎖、ＴＣＲδ鎖、ＣＤ３ζＴＣＲサブユニット、ＣＤ３εＴＣＲサブユニット、ＣＤ３γＴＣＲサブユニット、ＣＤ３δＴＣＲサブユニット、ＣＤ４５、ＣＤ４、ＣＤ５、ＣＤ８、ＣＤ９、ＣＤ１６、ＣＤ２２、ＣＤ３３、ＣＤ２８、ＣＤ３７、ＣＤ６４、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ１３４、ＣＤ１３７、ＣＤ１５４、それらの機能的断片、及び少なくとも１つであるが２０以下の改変を有するそれらのアミノ酸配列からなる群から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含む、膜貫通ドメインを含む。

【０１９３】

[0216] 幾つかの場合では、ＴＣＲサブユニットは、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、ＴＣＲα、ＴＣＲβ、ＴＣＲγ、またはＴＣＲδのＴＣＲ細胞内ドメインを含む。幾つかの実施形態では、細胞内ドメインは、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、もしくはＣＤ３δの細胞内シグナル伝達ドメイン、またはそれらに対する少なくとも１つの改変を有するアミノ酸配列から選択されるタンパク質の刺激ドメインを含む。

【０１９４】

[0217] 幾つかの場合では、ＴＣＲサブユニットは、４－１ＢＢの機能的シグナル伝達ドメイン及び／またはＣＤ３ζの機能的シグナル伝達ドメイン、またはそれらに対する少なくとも１つの改変を有するアミノ酸配列から選択されるタンパク質の刺激ドメインを含む細胞内ドメインを含む。

【０１９５】

[0218] 幾つかの場合では、組み換え核酸は、共刺激ドメインをコードする配列をさらに含む。幾つかの場合では、共刺激ドメインは、ＯＸ４０、ＣＤ２、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤＳ、ＩＣＡＭ－１、ＬＦＡ－１（ＣＤ１１ａ／ＣＤ１８）、ＩＣＯＳ（ＣＤ２７８）、及び４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）、ならびにそれらに対する少なくとも１つであるが２０以下の改変を有するそれらのアミノ酸配列からなる群から選択されるタンパク質の機能的シグナル伝達ドメインを含む。

【０１９６】

[0219] 幾つかの場合では、ＴＣＲサブユニットは、ＣＤ３ζＴＣＲサブユニット、ＣＤ３εＴＣＲサブユニット、ＣＤ３γＴＣＲサブユニット、ＣＤ３δＴＣＲサブユニット、Ｆｃε受容体１鎖、Ｆｃε受容体２鎖、Ｆｃγ受容体１鎖、Ｆｃγ受容体２ａ鎖、Ｆｃγ受容体２ｂ１鎖、Ｆｃγ受容体２ｂ２鎖、Ｆｃγ受容体３ａ鎖、Ｆｃγ受容体３ｂ鎖、

ＦｃβＲ受容体１鎖、ＴＹＲＯＢＰ（ＤＡＰ１２）、ＣＤ５、ＣＤ１６ａ、ＣＤ１６ｂ、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ３２、ＣＤ６４、ＣＤ７９ａ、ＣＤ７９ｂ、ＣＤ８９、ＣＤ２７８、ＣＤ６６ｄ、それらの機能的断片、及びそれらに対する少なくとも１つであるが２０以下の改変を有するそれらのアミノ酸配列からなる群から選択されるタンパク質の免疫受容活性化チロシンモチーフ（ＩＴＡＭ）またはその一部分を含む、ＴＣＲサブユニットのＩＴＡＭを含む。幾つかの場合では、ＩＴＡＭは、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、またはＣＤ３εのＩＴＡＭと置きかわる。幾つかの場合では、ＩＴＡＭは、ＣＤ３ζＴＣＲサブユニット、ＣＤ３εＴＣＲサブユニット、ＣＤ３γＴＣＲサブユニット、及びＣＤ３δＴＣＲサブユニットからなる群から選択され、ＣＤ３ζＴＣＲサブユニット、ＣＤ３εＴＣＲサブユニット、ＣＤ３γＴＣＲサブユニット、及びＣＤ３δＴＣＲサブユニットからなる群から選択される異なるＩＴＡＭと置きかわる。

【０１９７】

[0220] 幾つかの場合では、ＴＦＰ、ＴＣＲα定常ドメイン、ＴＣＲβ定常ドメイン、及びそれらの任意の組み合わせは、内因性ＴＣＲ複合体及び／または少なくとも１つの内因性ＴＣＲポリペプチドと機能的に相互作用することができる。幾つかの場合では、（ａ）ＴＣＲ定常ドメインがＴＣＲα定常ドメインであり、ＴＣＲβ、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、またはそれらの組み合わせの内因性サブユニットを含むＴＣＲ複合体にＴＦＰが機能的に統合されるか；（ｂ）ＴＣＲ定常ドメインがＴＣＲβ定常ドメインであり、ＴＣＲα、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、またはそれらの組み合わせの内因性サブユニットを含むＴＣＲ複合体にＴＦＰが機能的に統合されるか；あるいは（ｃ）ＴＣＲ定常ドメインがＴＣＲα定常ドメイン及びＴＣＲβ定常ドメインであり、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、またはそれらの組み合わせの内因性サブユニットを含むＴＣＲ複合体にＴＦＰが機能的に統合される。

【０１９８】

[0221] 幾つかの場合では、ＴＦＰ、ＴＣＲγ定常ドメイン、ＴＣＲδ定常ドメイン、及びそれらの任意の組み合わせは、内因性ＴＣＲ複合体及び／または少なくとも１つの内因性ＴＣＲポリペプチドと機能的に相互作用することができる。幾つかの場合では、（ａ）ＴＣＲ定常ドメインがＴＣＲγ定常ドメインであり、ＴＣＲδ、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、またはそれらの組み合わせの内因性サブユニットを含むＴＣＲ複合体にＴＦＰが機能的に統合されるか；（ｂ）ＴＣＲ定常ドメインがＴＣＲδ定常ドメインであり、ＴＣＲγ、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、またはそれらの組み合わせの内因性サブユニットを含むＴＣＲ複合体にＴＦＰが機能的に統合されるか；あるいは（ｃ）ＴＣＲ定常ドメインがＴＣＲγ定常ドメイン及びＴＣＲδ定常ドメインであり、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、またはそれらの組み合わせの内因性サブユニットを含むＴＣＲ複合体にＴＦＰが機能的に統合される。

【０１９９】

[0222] 幾つかの場合では、アミノ酸配列に対する少なくとも１つであるが２０以下の改変は、細胞のシグナル伝達を媒介するアミノ酸の改変、またはＴＦＰへのリガンド結合に応答してリン酸化されるアミノ酸の改変を含む。

【０２００】

[0223] 幾つかの実施形態では、抗原結合ドメインは、抗体または抗体断片を含む。幾つかの実施形態では、抗体または抗体断片は、マウス、ラクダ科、アルパカ、ヒトのもの、またはヒト化されたものである。幾つかの場合では、抗体断片は、ｓｃＦｖ、単一ドメインの抗体ドメイン、ＶＨＨ、ＶＨドメイン、またはＶＬドメインである。幾つかの場合では、抗原結合ドメインを含む抗体は、抗ＣＤ１９結合ドメイン、抗Ｂ細胞成熟抗原（ＢＣＭＡ）結合ドメイン、抗メソテリン（ＭＳＬＮ）結合ドメイン、抗ＣＤ２２結合ドメイン、抗ＰＤ－１結合ドメイン、抗ＢＡＦＦまたはＢＡＦＦ受容体結合ドメイン、及び抗ＲＯＲ－１結合ドメインからなる群から選択される。

【０２０１】

[0224] 幾つかの場合では、核酸は、ＤＮＡ及びＲＮＡからなる群から選択される。幾

つかの場合では、核酸はｍＲＮＡである。幾つかの場合では、組み換え核酸は核酸類似体を含み、該核酸類似体は、組み換え核酸のコード配列中にはない。幾つかの場合では、核酸類似体は、２’－Ｏ－メチル、２’－Ｏ－メトキシエチル（２’－Ｏ－ＭＯＥ）、２’－Ｏ－アミノプロピル、２’－デオキシ、Ｔ－デオキシ－２’－フルオロ、２’－Ｏ－アミノプロピル（２’－Ｏ－ＡＰ）、２’－Ｏ－ジメチルアミノエチル（２’－Ｏ－ＤＭＡＯＥ）、２’－Ｏ－ジメチルアミノプロピル（２’－Ｏ－ＤＭＡＰ）、Ｔ－Ｏ－ジメチルアミノエチルオキシエチル（２’－Ｏ－ＤＭＡＥＯＥ）、２’－Ｏ－Ｎ－メチルアセトアミド（２’－Ｏ－ＮＭＡ）（改変）、ロックド核酸（ＬＮＡ）、エチレン核酸（ＥＮＡ）、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、１’，５’－アンヒドロヘキシトール核酸（ＨＮＡ）、モルホリノ、メチルホスホン酸ヌクレオチド、チオールホスホン酸ヌクレオチド、及び２’－フルオロＮ３－Ｐ５’－ホスホラミダイトからなる群から選択される。

【０２０２】

[0225] 幾つかの実施形態では、核酸はＲＮＡである。幾つかの実施形態では、ＲＮＡは、ｍ６Ａを含まない。幾つかの実施形態では、ＲＮＡは、２０％未満、１９％未満、１８％未満、１７％未満、１６％未満、１５％未満、１４％未満、１３％未満、１２％未満、１１％未満、１０％未満、９％未満、８％未満、７％未満、６％未満、５％未満、４％未満、３％未満、２％未満、または１％未満のｍ６Ａを含む。

【０２０３】

[0226] 幾つかの場合では、組み換え核酸は、リーダー配列をさらに含む。幾つかの場合では、組み換え核酸は、プロモーター配列をさらに含む。幾つかの場合では、組み換え核酸は、ポリ（Ａ）テールをコードする配列をさらに含む。幾つかの場合では、組み換え核酸は、３’ＵＴＲ配列をさらに含む。幾つかの場合では、核酸は、単離された核酸または天然に存在しない核酸である。幾つかの場合では、核酸は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写核酸である。

【０２０４】

[0227] 幾つかの場合では、組み換え核酸は、ＴＣＲα膜貫通ドメインをコードする配列をさらに含む。幾つかの場合では、組み換え核酸は、ＴＣＲβ膜貫通ドメインをコードする配列をさらに含む。幾つかの場合では、組み換え核酸は、ＴＣＲα膜貫通ドメインをコードする配列及びＴＣＲβ膜貫通ドメインをコードする配列をさらに含む。

【０２０５】

[0228] 本明細書に開示するのは、幾つかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）融合タンパク質（ＴＦＰ）をコードする配列を含む組み換え核酸であって、該ＴＦＰが、（ｉ）（１）ＴＣＲ細胞外ドメインの少なくとも一部分、（２）膜貫通ドメイン、及び（３）細胞内ドメインを含むＴＣＲサブユニットと、（ｉｉ）抗体またはその断片に結合することができる結合リガンドまたはその断片とを含み；該ＴＣＲサブユニットと該結合リガンドまたはその断片とが作動可能に連結され、該ＴＦＰが、Ｔ細胞に発現されたときにＴＣＲ複合体に機能的に組み込まれる、組み換え核酸である。幾つかの実施形態では、組み換え核酸は、ＴＣＲ定常ドメインをコードする配列をさらに含む。幾つかの実施形態では、ＴＣＲ定常ドメインは、ＴＣＲα定常ドメイン、ＴＣＲβ定常ドメイン、またはＴＣＲα定常ドメイン及びＴＣＲβ定常ドメインである。幾つかの実施形態では、ＴＣＲ定常ドメインは、ＴＣＲγ定常ドメイン、ＴＣＲδ定常ドメイン、またはＴＣＲγ定常ドメイン及びＴＣＲδ定常ドメインである。幾つかの実施形態では、細胞内ドメインは、ＴＣＲαまたはＴＣＲβの細胞内ドメインを含む。幾つかの実施形態では、細胞内ドメインは、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、またはＣＤ３δの細胞内シグナル伝達ドメインからの刺激ドメインを含む。幾つかの場合では、結合リガンドは、抗体のＦｃドメインに結合することができる。幾つかの場合では、結合リガンドは、ＩｇＧ１抗体に選択的に結合することができる。幾つかの場合では、結合リガンドは、ＩｇＧ１抗体に特異的に結合することができる。幾つかの場合では、抗体またはその断片は、細胞表面抗原に結合する。幾つかの場合では、抗体またはその断片は、腫瘍細胞の表面上の細胞表面抗原に結合する。幾つかの場合では、結合リガンドは、単量体、二量体、三量体、四量体、五量体、六量体、七量体、八量体

、九量体、または十量体を含む。幾つかの場合では、結合リガンドは、抗体またはその断片を含まない。幾つかの場合では、結合リガンドは、ＣＤ１６ポリペプチドまたはその断片を含む。幾つかの場合では、結合リガンドは、ＣＤ１６結合ポリペプチドを含む。幾つかの場合では、結合リガンドは、ヒトのものまたはヒト化されたものである。幾つかの場合では、組み換え核酸は、結合リガンドが結合することができる抗体またはその断片をコードする核酸配列をさらに含む。幾つかの場合では、抗体またはその断片は、細胞から分泌可能である。

【０２０６】

[0229] 幾つかの場合では、ＴＣＲ定常ドメインは、Ｔ細胞に発現されたときにＴＣＲ複合体に機能的に組み込まれる。幾つかの場合では、ＴＣＲ定常ドメインは、Ｔ細胞に発現されたときにＴＦＰを組み込む機能的ＴＣＲ複合体と同じ機能的ＴＣＲ複合体に組み込まれる。幾つかの場合では、ＴＦＰをコードする配列及びＴＣＲ定常ドメインをコードする配列は、同じ核酸分子内に含有される。幾つかの場合では、ＴＦＰをコードする配列及びＴＣＲ定常ドメインをコードする配列は、異なる核酸分子内に含有される。

【０２０７】

[0230] 幾つかの場合では、ＴＣＲサブユニットと結合リガンドまたはその断片とは、リンカー配列によって作動可能に連結されている。幾つかの場合では、リンカー配列は、（Ｇ４Ｓ）ｎ（式中、ｎ＝１～４）を含む。

【０２０８】

[0231] 幾つかの場合では、膜貫通ドメインは、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、ＴＣＲα、ＴＣＲβ、ＴＣＲγ、またはＴＣＲδからのＴＣＲ膜貫通ドメインである。幾つかの場合では、細胞内ドメインは、ＣＤ３εのみ、ＣＤ３γのみ、ＣＤ３δのみ、ＴＣＲαのみ、ＴＣＲβのみ、ＴＣＲγのみ、またはＴＣＲδのみに由来する。

【０２０９】

[0232] 幾つかの場合では、ＴＣＲサブユニットは、（ｉ）ＴＣＲ細胞外ドメインの少なくとも一部分、（ｉｉ）ＴＣＲ膜貫通ドメイン、及び（ｉｉｉ）ＴＣＲ細胞内ドメインを含み、（ｉ）、（ｉｉ）、及び（ｉｉｉ）の少なくとも２つは同じＴＣＲサブユニットからのものである。

【０２１０】

[0233] 幾つかの場合では、ＴＣＲ細胞外ドメインは、ＴＣＲα鎖、ＴＣＲβ鎖、ＴＣＲγ鎖、ＴＣＲδ鎖、ＣＤ３εＴＣＲサブユニット、ＣＤ３γＴＣＲサブユニット、ＣＤ３δＴＣＲサブユニット、それらの機能的断片、及び少なくとも１つであるが２０以下の改変を有するそれらのアミノ酸配列からなる群から選択されるタンパク質の細胞外ドメインまたはその一部分を含む。

【０２１１】

[0234] 幾つかの場合では、ＴＣＲサブユニットは、ＴＣＲα鎖、ＴＣＲβ鎖、ＴＣＲγ鎖、ＴＣＲδ鎖、ＣＤ３ζＴＣＲサブユニット、ＣＤ３εＴＣＲサブユニット、ＣＤ３γＴＣＲサブユニット、ＣＤ３δＴＣＲサブユニット、ＣＤ４５、ＣＤ４、ＣＤ５、ＣＤ８、ＣＤ９、ＣＤ１６、ＣＤ２２、ＣＤ３３、ＣＤ２８、ＣＤ３７、ＣＤ６４、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ１３４、ＣＤ１３７、ＣＤ１５４、それらの機能的断片、及び少なくとも１つであるが２０以下の改変を有するそれらのアミノ酸配列からなる群から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含む、膜貫通ドメインを含む。

【０２１２】

[0235] 幾つかの場合では、ＴＣＲサブユニットは、ＴＣＲ細胞内ドメインを含む。幾つかの実施形態では、細胞内ドメインは、ＴＣＲα、ＴＣＲβ、ＴＣＲγ、もしくはＴＣＲδ、またはそれらに対する少なくとも１つの改変を有するアミノ酸配列の細胞内ドメインを含む。幾つかの実施形態では、ＴＣＲ細胞内ドメインは、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、もしくはＣＤ３δの細胞内シグナル伝達ドメイン、またはそれらに対する少なくとも１つの改変を有するアミノ酸配列から選択されるタンパク質の刺激ドメインを含む。

【０２１３】

[0236] 幾つかの場合では、ＴＣＲサブユニットは、４－１ＢＢの機能的シグナル伝達ドメイン及び／またはＣＤ３ζの機能的シグナル伝達ドメイン、またはそれらに対する少なくとも１つの改変を有するアミノ酸配列から選択されるタンパク質の刺激ドメインを含む細胞内ドメインを含む。

【０２１４】

[0237] 幾つかの場合では、組み換え核酸は、共刺激ドメインをコードする配列をさらに含む。幾つかの場合では、共刺激ドメインは、ＯＸ４０、ＣＤ２、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤＳ、ＩＣＡＭ－１、ＬＦＡ－１（ＣＤ１１ａ／ＣＤ１８）、ＩＣＯＳ（ＣＤ２７８）、及び４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）、ならびにそれらに対する少なくとも１つであるが２０以下の改変を有するそれらのアミノ酸配列からなる群から選択されるタンパク質の機能的シグナル伝達ドメインを含む。

【０２１５】

[0238] 幾つかの場合では、ＴＣＲサブユニットは、ＣＤ３ζＴＣＲサブユニット、ＣＤ３εＴＣＲサブユニット、ＣＤ３γＴＣＲサブユニット、ＣＤ３δＴＣＲサブユニット、Ｆｃε受容体１鎖、Ｆｃε受容体２鎖、Ｆｃγ受容体１鎖、Ｆｃγ受容体２ａ鎖、Ｆｃγ受容体２ｂ１鎖、Ｆｃγ受容体２ｂ２鎖、Ｆｃγ受容体３ａ鎖、Ｆｃγ受容体３ｂ鎖、Ｆｃβ受容体１鎖、ＴＹＲＯＢＰ（ＤＡＰ１２）、ＣＤ５、ＣＤ１６ａ、ＣＤ１６ｂ、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ３２、ＣＤ６４、ＣＤ７９ａ、ＣＤ７９ｂ、ＣＤ８９、ＣＤ２７８、ＣＤ６６ｄ、それらの機能的断片、及びそれらに対する少なくとも１つであるが２０以下の改変を有するそれらのアミノ酸配列からなる群から選択されるタンパク質の免疫受容活性化チロシンモチーフ（ＩＴＡＭ）またはその一部分を含む、ＴＣＲサブユニットのＩＴＡＭを含む。幾つかの場合では、該ＩＴＡＭは、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、またはＣＤ３εのＩＴＡＭと置きかわる。幾つかの場合では、ＩＴＡＭは、ＣＤ３ζＴＣＲサブユニット、ＣＤ３εＴＣＲサブユニット、ＣＤ３γＴＣＲサブユニット、及びＣＤ３δＴＣＲサブユニットからなる群から選択され、ＣＤ３ζＴＣＲサブユニット、ＣＤ３εＴＣＲサブユニット、ＣＤ３γＴＣＲサブユニット、及びＣＤ３δＴＣＲサブユニットからなる群から選択される異なるＩＴＡＭと置きかわる。

【０２１６】

[0239] 幾つかの場合では、ＴＦＰ、ＴＣＲα定常ドメイン、ＴＣＲβ定常ドメイン、及びそれらの任意の組み合わせは、内因性ＴＣＲ複合体及び／または少なくとも１つの内因性ＴＣＲポリペプチドと機能的に相互作用することができる。幾つかの場合では、（ａ）ＴＣＲ定常ドメインがＴＣＲα定常ドメインであり、ＴＣＲβ、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、またはそれらの組み合わせの内因性サブユニットを含むＴＣＲ複合体にＴＦＰが機能的に統合されるか；（ｂ）ＴＣＲ定常ドメインがＴＣＲβ定常ドメインであり、ＴＣＲα、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、またはそれらの組み合わせの内因性サブユニットを含むＴＣＲ複合体にＴＦＰが機能的に統合されるか；あるいは（ｃ）ＴＣＲ定常ドメインがＴＣＲα定常ドメイン及びＴＣＲβ定常ドメインであり、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、またはそれらの組み合わせの内因性サブユニットを含むＴＣＲ複合体にＴＦＰが機能的に統合される。

【０２１７】

[0240] 幾つかの場合では、ＴＦＰ、ＴＣＲγ定常ドメイン、ＴＣＲδ定常ドメイン、及びそれらの任意の組み合わせは、内因性ＴＣＲ複合体及び／または少なくとも１つの内因性ＴＣＲポリペプチドと機能的に相互作用することができる。幾つかの場合では、（ａ）ＴＣＲ定常ドメインがＴＣＲγ定常ドメインであり、ＴＣＲδ、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、またはそれらの組み合わせの内因性サブユニットを含むＴＣＲ複合体にＴＦＰが機能的に統合されるか；（ｂ）ＴＣＲ定常ドメインがＴＣＲδ定常ドメインであり、ＴＣＲγ、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、またはそれらの組み合わせの内因性サブユニットを含むＴＣＲ複合体にＴＦＰが機能的に統合されるか；あるいは（ｃ）ＴＣＲ定常ドメインがＴＣＲγ定常ドメイン及びＴＣＲδ定常ドメインであり、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、またはそれらの組み合わせの内因性サブユニットを含むＴＣＲ複合体にＴＦＰが

機能的に統合される。

【０２１８】

[0241] 幾つかの場合では、アミノ酸配列に対する少なくとも１つであるが２０以下の改変は、細胞のシグナル伝達を媒介するアミノ酸の改変、またはＴＦＰへのリガンド結合に応答してリン酸化されるアミノ酸の改変を含む。

【０２１９】

[0242] 幾つかの場合では、核酸は、ＤＮＡ及びＲＮＡからなる群から選択される。幾つかの場合では、核酸はｍＲＮＡである。幾つかの場合では、組み換え核酸は核酸類似体を含み、該核酸類似体は、組み換え核酸のコード配列中にはない。幾つかの場合では、核酸類似体は、２’－Ｏ－メチル、２’－Ｏ－メトキシエチル（２’－Ｏ－ＭＯＥ）、２’－Ｏ－アミノプロピル、２’－デオキシ、Ｔ－デオキシ－２’－フルオロ、２’－Ｏ－アミノプロピル（２’－Ｏ－ＡＰ）、２’－Ｏ－ジメチルアミノエチル（２’－Ｏ－ＤＭＡＯＥ）、２’－Ｏ－ジメチルアミノプロピル（２’－Ｏ－ＤＭＡＰ）、Ｔ－Ｏ－ジメチルアミノエチルオキシエチル（２’－Ｏ－ＤＭＡＥＯＥ）、２’－Ｏ－Ｎ－メチルアセトアミド（２’－Ｏ－ＮＭＡ）（改変）、ロックド核酸（ＬＮＡ）、エチレン核酸（ＥＮＡ）、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、１’，５’－アンヒドロヘキシトール核酸（ＨＮＡ）、モルホリノ、メチルホスホン酸ヌクレオチド、チオールホスホン酸ヌクレオチド、及び２’－フルオロＮ３－Ｐ５’－ホスホラミダイトからなる群から選択される。

【０２２０】

[0243] 幾つかの場合では、組み換え核酸は、リーダー配列をさらに含む。幾つかの場合では、組み換え核酸は、プロモーター配列をさらに含む。幾つかの場合では、組み換え核酸は、ポリ（Ａ）テールをコードする配列をさらに含む。幾つかの場合では、組み換え核酸は、３’ＵＴＲ配列をさらに含む。幾つかの場合では、核酸は、単離された核酸または天然に存在しない核酸である。幾つかの場合では、核酸は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写核酸である。

【０２２１】

[0244] 幾つかの場合では、組み換え核酸は、ＴＣＲα膜貫通ドメインをコードする配列をさらに含む。幾つかの場合では、組み換え核酸は、ＴＣＲβ膜貫通ドメインをコードする配列をさらに含む。幾つかの場合では、組み換え核酸は、ＴＣＲα膜貫通ドメインをコードする配列及びＴＣＲβ膜貫通ドメインをコードする配列をさらに含む。あるいは、組み換え核酸は、ＴＣＲγまたはＴＣＲδドメイン、例えば、膜貫通ドメインをコードする配列を含む。

【０２２２】

[0245] 本明細書に開示するのは、幾つかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）融合タンパク質（ＴＦＰ）をコードする配列を含む組み換え核酸であって、該ＴＦＰが、（ｉ）（１）ＴＣＲ細胞外ドメインの少なくとも一部分、（２）膜貫通ドメイン、及び（３）細胞内ドメインを含むＴＣＲサブユニットと、（ｉｉ）細胞の表面上に発現された受容体またはポリペプチドに結合するリガンドまたはその断片を含む抗原ドメインとを含み；該ＴＣＲサブユニットと該抗原ドメインとが作動可能に連結され、該ＴＦＰが、Ｔ細胞に発現されたときにＴＣＲ複合体に機能的に組み込まれる、組み換え核酸である。幾つかの実施形態では、組み換え核酸は、ＴＣＲ定常ドメインをコードする配列をさらに含む。幾つかの実施形態では、ＴＣＲ定常ドメインは、ＴＣＲα定常ドメイン、ＴＣＲβ定常ドメイン、またはＴＣＲα定常ドメイン及びＴＣＲβ定常ドメインである。幾つかの実施形態では、ＴＣＲ定常ドメインは、ＴＣＲγ定常ドメイン、ＴＣＲδ定常ドメイン、またはＴＣＲγ定常ドメイン及びＴＣＲδ定常ドメインである。幾つかの実施形態では，細胞内ドメインは、ＴＣＲα、ＴＣＲβ、ＴＣＲγ、またはＴＣＲδからの細胞内ドメインを含む。幾つかの実施形態では、細胞内ドメインは、ＣＤ３δ、ＣＤ３ε、またはＣＤ３γの細胞内シグナル伝達ドメインからの刺激ドメインを含む。幾つかの場合では、抗原ドメインは、リガンドを含む。幾つかの場合では、リガンドは、細胞の受容体に結合する。幾つかの場合では、リガンドは、細胞の表面上に発現されたポリペプチドに結合する。幾つかの

場合では、細胞の表面上に発現した受容体またはポリペプチドは、ストレス応答受容体またはポリペプチドを含む。幾つかの場合では、細胞の表面上に発現した受容体またはポリペプチドは、ＭＨＣクラスＩ関連糖タンパク質である。幾つかの場合では、ＭＨＣクラスＩ関連糖タンパク質は、ＭＩＣＡ、ＭＩＣＢ、ＲＡＥＴ１Ｅ、ＲＡＥＴ１Ｇ、ＵＬＢＰ１、ＵＬＢＰ２、ＵＬＢＰ３、ＵＬＢＰ４、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。幾つかの場合では、抗原ドメインは、単量体、二量体、三量体、四量体、五量体、六量体、七量体、八量体、九量体、または十量体を含む。幾つかの場合では、抗原ドメインは、リガンドまたはその断片の単量体または二量体を含む。幾つかの場合では、リガンドまたはその断片は、単量体、二量体、三量体、四量体、五量体、六量体、七量体、八量体、九量体、または十量体である。幾つかの場合では、リガンドまたはその断片は、単量体または二量体である。幾つかの場合では、抗原ドメインは、抗体またはその断片を含まない。幾つかの場合では、抗原ドメインは、可変領域を含まない。幾つかの場合では、抗原ドメインは、ＣＤＲを含まない。幾つかの場合では、リガンドまたはその断片は、ナチュラルキラーグループ２Ｄ（ＮＫＧ２Ｄ）リガンドまたはその断片である。

【０２２３】

[0246] 幾つかの場合では、ＴＣＲ定常ドメインは、Ｔ細胞に発現されたときに機能的ＴＣＲ複合体に組み込まれる。幾つかの場合では、ＴＣＲ定常ドメインは、Ｔ細胞に発現されたときにＴＦＰを組み込む機能的ＴＣＲ複合体と同じ機能的ＴＣＲ複合体に組み込まれる。幾つかの場合では、ＴＦＰをコードする配列及びＴＣＲ定常ドメインをコードする配列は、同じ核酸分子内に含有される。幾つかの場合では、ＴＦＰをコードする配列及びＴＣＲ定常ドメインをコードする配列は、異なる核酸分子内に含有される。

【０２２４】

[0247] 幾つかの場合では、ＴＣＲサブユニットと抗原ドメインとは、リンカー配列によって作動可能に連結されている。幾つかの場合では、リンカー配列は、（Ｇ４Ｓ）ｎ（式中、ｎ＝１～４）を含む。

【０２２５】

[0248] 幾つかの場合では、膜貫通ドメインは、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、ＴＣＲα、ＴＣＲβ、ＴＣＲγ、またはＴＣＲδからのＴＣＲ膜貫通ドメインである。幾つかの場合では、細胞内ドメインは、ＣＤ３εのみ、ＣＤ３γのみ、ＣＤ３δのみ、ＴＣＲαのみ、ＴＣＲβのみ、ＴＣＲγのみ、またはＴＣＲδのみに由来する。

【０２２６】

[0249] 幾つかの場合では、ＴＣＲサブユニットは、（ｉ）ＴＣＲ細胞外ドメインの少なくとも一部分、（ｉｉ）ＴＣＲ膜貫通ドメイン、及び（ｉｉｉ）ＴＣＲ細胞内ドメインを含み、（ｉ）、（ｉｉ）、及び（ｉｉｉ）の少なくとも２つは同じＴＣＲサブユニットからのものである。

【０２２７】

[0250] 幾つかの場合では、ＴＣＲ細胞外ドメインは、ＴＣＲα鎖、ＴＣＲβ鎖、ＴＣＲγ鎖、ＴＣＲδ鎖、ＣＤ３εＴＣＲサブユニット、ＣＤ３γＴＣＲサブユニット、ＣＤ３δＴＣＲサブユニット、それらの機能的断片、及び少なくとも１つであるが２０以下の改変を有するそれらのアミノ酸配列からなる群から選択されるタンパク質の細胞外ドメインまたはその一部分を含む。

【０２２８】

[0251] 幾つかの場合では、ＴＣＲサブユニットは、ＴＣＲα鎖、ＴＣＲβ鎖、ＴＣＲγ鎖、ＴＣＲδ鎖、ＣＤ３ζＴＣＲサブユニット、ＣＤ３εＴＣＲサブユニット、ＣＤ３γＴＣＲサブユニット、ＣＤ３δＴＣＲサブユニット、ＣＤ４５、ＣＤ４、ＣＤ５、ＣＤ８、ＣＤ９、ＣＤ１６、ＣＤ２２、ＣＤ３３、ＣＤ２８、ＣＤ３７、ＣＤ６４、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ１３４、ＣＤ１３７、ＣＤ１５４、それらの機能的断片、及び少なくとも１つであるが２０以下の改変を有するそれらのアミノ酸配列からなる群から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含む、膜貫通ドメインを含む。

【０２２９】

[0252] 幾つかの場合では、ＴＣＲサブユニットは、ＴＣＲ細胞内ドメインを含む。幾つかの実施形態では、細胞内ドメインは、ＴＣＲα、ＴＣＲβ、ＴＣＲγ、もしくはＴＣＲδ、またはそれらに対する少なくとも１つの改変を有するアミノ酸配列の細胞内ドメインを含む。幾つかの実施形態では、ＴＣＲ細胞内ドメインは、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、またはＣＤ３δの細胞内シグナル伝達ドメイン、またはそれらに対する少なくとも１つの改変を有するアミノ酸配列から選択されるタンパク質の刺激ドメインを含む。

【０２３０】

[0253] 幾つかの場合では、ＴＣＲサブユニットは、４－１ＢＢの機能的シグナル伝達ドメイン及び／またはＣＤ３ζの機能的シグナル伝達ドメイン、またはそれらに対する少なくとも１つの改変を有するアミノ酸配列から選択されるタンパク質の刺激ドメインを含む細胞内ドメインを含む。

【０２３１】

[0254] 幾つかの場合では、組み換え核酸は、共刺激ドメインをコードする配列をさらに含む。幾つかの場合では、共刺激ドメインは、ＯＸ４０、ＣＤ２、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤＳ、ＩＣＡＭ－１、ＬＦＡ－１（ＣＤ１１ａ／ＣＤ１８）、ＩＣＯＳ（ＣＤ２７８）、及び４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）、ならびにそれらに対する少なくとも１つであるが２０以下の改変を有するそれらのアミノ酸配列からなる群から選択されるタンパク質の機能的シグナル伝達ドメインを含む。

【０２３２】

[0255] 幾つかの場合では、ＴＣＲサブユニットは、ＣＤ３ζＴＣＲサブユニット、ＣＤ３εＴＣＲサブユニット、ＣＤ３γＴＣＲサブユニット、ＣＤ３δＴＣＲサブユニット、ＴＣＲζ鎖、Ｆｃε受容体１鎖、Ｆｃε受容体２鎖、Ｆｃγ受容体１鎖、Ｆｃγ受容体２ａ鎖、Ｆｃγ受容体２ｂ１鎖、Ｆｃγ受容体２ｂ２鎖、Ｆｃγ受容体３ａ鎖、Ｆｃγ受容体３ｂ鎖、Ｆｃβ受容体１鎖、ＴＹＲＯＢＰ（ＤＡＰ１２）、ＣＤ５、ＣＤ１６ａ、ＣＤ１６ｂ、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ３２、ＣＤ６４、ＣＤ７９ａ、ＣＤ７９ｂ、ＣＤ８９、ＣＤ２７８、ＣＤ６６ｄ、それらの機能的断片、及びそれらに対する少なくとも１つであるが２０以下の改変を有するそれらのアミノ酸配列からなる群から選択されるタンパク質の免疫受容活性化チロシンモチーフ（ＩＴＡＭ）またはその一部分を含む、ＴＣＲサブユニットのＩＴＡＭを含む。幾つかの場合では、該ＩＴＡＭは、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、またはＣＤ３εのＩＴＡＭと置きかわる。幾つかの場合では、該ＩＴＡＭは、ＣＤ３ζＴＣＲサブユニット、ＣＤ３εＴＣＲサブユニット、ＣＤ３γＴＣＲサブユニット、及びＣＤ３δＴＣＲサブユニットからなる群から選択され、ＣＤ３ζＴＣＲサブユニット、ＣＤ３εＴＣＲサブユニット、ＣＤ３γＴＣＲサブユニット、及びＣＤ３δＴＣＲサブユニットからなる群から選択される異なるＩＴＡＭと置きかわる。

【０２３３】

[0256] 幾つかの場合では、ＴＦＰ、ＴＣＲα定常ドメイン、ＴＣＲβ定常ドメイン、及びそれらの任意の組み合わせは、内因性ＴＣＲ複合体及び／または少なくとも１つの内因性ＴＣＲポリペプチドと機能的に相互作用することができる。幾つかの場合では、（ａ）ＴＣＲ定常ドメインがＴＣＲα定常ドメインであり、ＴＣＲβ、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、またはそれらの組み合わせの内因性サブユニットを含むＴＣＲ複合体にＴＦＰが機能的に統合されるか；（ｂ）ＴＣＲ定常ドメインがＴＣＲβ定常ドメインであり、ＴＣＲα、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、またはそれらの組み合わせの内因性サブユニットを含むＴＣＲ複合体にＴＦＰが機能的に統合されるか；あるいは（ｃ）ＴＣＲ定常ドメインがＴＣＲα定常ドメイン及びＴＣＲβ定常ドメインであり、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、またはそれらの組み合わせの内因性サブユニットを含むＴＣＲ複合体にＴＦＰが機能的に統合される。

【０２３４】

[0257] 幾つかの場合では、ＴＦＰ、ＴＣＲγ定常ドメイン、ＴＣＲδ定常ドメイン、及びそれらの任意の組み合わせは、内因性ＴＣＲ複合体及び／または少なくとも１つの内因性ＴＣＲポリペプチドと機能的に相互作用することができる。幾つかの場合では、（ａ

）ＴＣＲ定常ドメインがＴＣＲγ定常ドメインであり、ＴＣＲδ、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、またはそれらの組み合わせの内因性サブユニットを含むＴＣＲ複合体にＴＦＰが機能的に統合されるか；（ｂ）ＴＣＲ定常ドメインがＴＣＲδ定常ドメインであり、ＴＣＲγ、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、またはそれらの組み合わせの内因性サブユニットを含むＴＣＲ複合体にＴＦＰが機能的に統合されるか；あるいは（ｃ）ＴＣＲ定常ドメインがＴＣＲγ定常ドメイン及びＴＣＲδ定常ドメインであり、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、またはそれらの組み合わせの内因性サブユニットを含むＴＣＲ複合体にＴＦＰが機能的に統合される。

【０２３５】

[0258] 幾つかの場合では、アミノ酸配列に対する少なくとも１つであるが２０以下の改変は、細胞のシグナル伝達を媒介するアミノ酸の改変、またはＴＦＰへのリガンド結合に応答してリン酸化されるアミノ酸の改変を含む。

【０２３６】

[0259] 幾つかの実施形態では、ＴＦＰをコードする配列及びｃｉｒｃＲＮＡ結合部位を含む／コードする配列は、同じ核酸分子上にある。幾つかの実施形態では、ＴＣＲサブユニットの細胞外及び膜貫通ドメインは、ＴＣＲα、ＴＣＲβ、ＴＣＲγ、ＴＣＲδ、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、またはＣＤ３εに由来する。幾つかの実施形態では、抗原結合ドメインをコードする配列は、ＴＣＲ細胞外ドメインをコードする配列にリンカー配列によって接続されている。幾つかの実施形態では、コードされたリンカー配列は、（Ｇ４Ｓ）ｎ（式中、Ｇはグリシン、Ｓはセリンであり、ｎ＝１～４）を含む。幾つかの実施形態では、抗原結合ドメインは、抗腫瘍関連抗原（ＴＡＡ）結合ドメインである。幾つかの実施形態では、抗ＴＡＡ結合ドメインは、α－アクチニン－４、ＡＲＴＣ１、ＢＣＲ－ＡＢＬ融合タンパク質（ｂ３ａ２）、Ｂ－ＲＡＦ、ＣＡＳＰ－５、ＣＡＳＰ－８、β－カテニン、Ｃｄｃ２７、ＣＤＫ４、ＣＤＫ１２、ＣＤＫＮ２Ａ、ＣＬＰＰ、ＣＯＡ－１、ＣＳＮＫ１Ａ１、ｄｅｋ－ｃａｎ融合タンパク質、ＥＦＴＵＤ２、伸長因子２、ＥＴＶ６－ＡＭＬ１融合タンパク質、ＦＬＴ３－ＩＴＤ、ＦＮＤＣ３Ｂ、ＦＮ１、ＧＡＳ７、ＧＰＮＭＢ、ＨＡＵＳ３、ＨＳＤＬ１、ＬＤＬＲ－フコシルトランスフェラーゼＡＳ融合タンパク質、ＨＬＡ－Ａ２ｄ、ＨＬＡ－Ａ１１ｄ、ｈｓｐ７０－２、ＭＡＲＴ２、ＭＡＴＮ、ＭＥＩ、ＭＵＭ－１ｆ、ＭＵＭ－２、ＭＵＭ－３、ｎｅｏ－ＰＡＰ、Ｉ型ミオシン、ＮＦＹＣ、ＯＧＴ、ＯＳ－９、ｐ５３、ｐｍｌ－ＲＡＲα融合タンパク質、ＰＰＰ１Ｒ３Ｂ、ＰＲＤＸ５、ＰＴＰＲＫ、Ｋ－ｒａｓ、Ｎ－ｒａｓ、ＲＢＡＦ６００、ＳＩＲＴ２、ＳＮＲＰＤ１、ＳＹＴ－ＳＳＸ１もしくは－ＳＳＸ２融合タンパク質、ＴＧＦ－βＲＩＩ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ＢＡＧＥ－１、Ｄ３９３－ＣＤ２０ｎ、サイクリン－Ａ１、ＧＡＧＥ－１、ＧＡＧＥ－２、ＧＡＧＥ－８、ＧＡＧＥ－３、ＧＡＧＥ－４、ＧＡＧＥ－５、ＧＡＧＥ－６、ＧＡＧＥ－７、ＧｎＴＶｆ、ＨＥＲＶ－Ｋ－ＭＥＬ、ＫＫ－ＬＣ－１、ＫＭ－ＨＮ－１、ＬＡＧＥ－１、ＬＹ６Ｋ、ＭＡＧＥ－Ａ１、ＭＡＧＥ－Ａ２、ＭＡＧＥ－Ａ３、ＭＡＧＥ－Ａ４、ＭＡＧＥ－Ａ６、ＭＡＧＥ－Ａ９、ＭＡＧＥ－Ａ１０、ＭＡＧＥ－Ａ１２ｍ、ＭＡＧＥ－Ｃ１、ＭＡＧＥ－Ｃ２、ｍｕｃｉｎｋ、ＮＡ８８－Ａ、ＮＹ－ＥＳＯ－１／ＬＡＧＥ－２、ＳＡＧＥ、Ｓｐ１７、ＳＳＸ－２、ＳＳＸ－４、ＴＡＧ－１、ＴＡＧ－２、ＴＲＡＧ－３、ＴＲＰ２－ＩＮＴ２ｇ、ＸＡＧＥ－１ｂ／ＧＡＧＥＤ２ａ、ＣＥＡ、ｇｐ１００／Ｐｍｅｌ１７、マンマグロビン－Ａ、Ｍｅｌａｎ－Ａ／ＭＡＲＴ－１、ＮＹ－ＢＲ－１、ＯＡ１、ＰＡＰ、ＰＳＡ、ＲＡＢ３８／ＮＹ－ＭＥＬ－１、ＴＲＰ－１／ｇｐ７５、ＴＲＰ－２、チロシナーゼ、アディポフィリン、ＡＩＭ－２、ＡＬＤＨ１Ａ１、ＢＣＬＸ（Ｌ）、ＢＩＮＧ－４、ＣＡＬＣＡ、ＣＤ４５、ＣＤ２７４、ＣＰＳＦ、サイクリンＤ１、ＤＫＫ１、ＥＮＡＨ（ｈＭｅｎａ）、ＥｐＣＡＭ、ＥｐｈＡ２、ＥｐｈＡ３、ＥＺＨ２、ＦＧＦ５、グリピカン－３、Ｇ２５０／ＭＮ／ＣＡＩＸ、ＨＥＲ－２／ｎｅｕ、ＨＬＡ－ＤＯＢ、ヘプシン、ＩＤＯ１、ＩＧＦ２Ｂ３、ＩＬ１３Ｒα２、腸カルボキシエステラーゼ、α－フェトプロテイン、カリクレイン４、ＫＩＦ２０Ａ、Ｌｅｎｇｓｉｎ、Ｍ－ＣＳＦ、ＭＣＳＰ、ｍｄｍ－２、Ｍｅｌｏｅ、ミッドカイン、ＭＭＰ－２、ＭＭＰ－７、ＭＵＣ１、ＭＵＣ１６（ＣＡ１２５）、ＭＵＣ５ＡＣ、ｐ５３、ＰＡＸ５、ＰＢ

Ｆ、ＰＲＡＭＥ、ＰＳＭＡ、ＲＡＧＥ－１、ＲＧＳ５、ＲｈｏＣ、ＲＮＦ４３、ＲＵ２ＡＳ、セセルニン１、ＳＯＸ１０、ＳＴＥＡＰ１、サバイビン、テロメラーゼ、ＴＰＢＧ、ＶＥＧＦ、ＲＯＲ－１、ＥＧＦＲｖＩＩＩ、ＤＬＬ３、Ｃ４．４ａ、ＢＣＭＡ、ＭＳＬＮ、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＳＡＰ－１、ＮＫＧ２Ｄ、ＭＡＧＥ、ＥＴＡ、ＭＵＣ－１６（ＣＡ－１２５）、ＣＥＡ、ＡＦＰ、ＥＭＰ－２、またはＷＴ１に由来する抗原に結合する。幾つかの実施形態では、コードされた抗原結合ドメインは、抗ＣＤ１９結合ドメイン、抗ＢＣＭＡ結合ドメイン、抗メソテリン結合ドメイン、またはそれらの任意の組み合わせを含む。幾つかの実施形態では、コードされた膜貫通ドメインは、ＴＣＲα鎖、ＴＣＲβ鎖、ＴＣＲγ鎖、ＴＣＲδ鎖、ＣＤ３ζＴＣＲサブユニット、ＣＤ３εＴＣＲサブユニット、ＣＤ３γＴＣＲサブユニット、ＣＤ３δＴＣＲサブユニット、ＣＤ４５、ＣＤ４、ＣＤ５、ＣＤ８、ＣＤ９、ＣＤ１６、ＣＤ２２、ＣＤ３３、ＣＤ２８、ＣＤ３７、ＣＤ６４、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ１３４、ＣＤ１３７、ＣＤ１５４、それらの機能的断片、及びそれらに対する少なくとも１つであるが２０以下の改変を有するそれらのアミノ酸配列からなる群から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含む。

【０２３７】

[0260] 幾つかの場合では、核酸は、ＤＮＡ及びＲＮＡからなる群から選択される。幾つかの場合では、核酸はｍＲＮＡである。幾つかの場合では、核酸は線状ＲＮＡ前駆体である。幾つかの場合では、核酸は環状ＲＮＡである。幾つかの場合では、組み換え核酸は核酸類似体を含み、該核酸類似体は、組み換え核酸のコード配列中にはない。幾つかの場合では、核酸類似体は、２’－Ｏ－メチル、２’－Ｏ－メトキシエチル（２’－Ｏ－ＭＯＥ）、２’－Ｏ－アミノプロピル、２’－デオキシ、Ｔ－デオキシ－２’－フルオロ、２’－Ｏ－アミノプロピル（２’－Ｏ－ＡＰ）、２’－Ｏ－ジメチルアミノエチル（２’－Ｏ－ＤＭＡＯＥ）、２’－Ｏ－ジメチルアミノプロピル（２’－Ｏ－ＤＭＡＰ）、Ｔ－Ｏ－ジメチルアミノエチルオキシエチル（２’－Ｏ－ＤＭＡＥＯＥ）、２’－Ｏ－Ｎ－メチルアセトアミド（２’－Ｏ－ＮＭＡ）（改変）、ロックド核酸（ＬＮＡ）、エチレン核酸（ＥＮＡ）、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、１’，５’－アンヒドロヘキシトール核酸（ＨＮＡ）、モルホリノ、メチルホスホン酸ヌクレオチド、チオールホスホン酸ヌクレオチド、及び２’－フルオロＮ３－Ｐ５’－ホスホラミダイトからなる群から選択される。

【０２３８】

[0261] 幾つかの場合では、組み換え核酸は、リーダー配列をさらに含む。幾つかの場合では、組み換え核酸は、プロモーター配列をさらに含む。幾つかの場合では、組み換え核酸は、ポリ（Ａ）テールをコードする配列をさらに含む。幾つかの場合では、組み換え核酸は、３’ＵＴＲ配列をさらに含む。幾つかの場合では、核酸は、単離された核酸または天然に存在しない核酸である。幾つかの場合では、核酸は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写核酸である。

【０２３９】

[0262] 幾つかの場合では、組み換え核酸は、ＴＣＲα膜貫通ドメインをコードする配列をさらに含む。幾つかの場合では、組み換え核酸は、ＴＣＲβ膜貫通ドメインをコードする配列をさらに含む。幾つかの場合では、組み換え核酸は、ＴＣＲα膜貫通ドメインをコードする配列及びＴＣＲβ膜貫通ドメインをコードする配列をさらに含む。

【０２４０】

[0263] 本明細書にさらに開示するのは、幾つかの実施形態では、本明細書に開示する組み換え核酸を含むベクターである。幾つかの場合では、ベクターは、ＤＮＡ、ＲＮＡ、プラスミド、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター（ＡＡＶ）、ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）ベクター、またはレトロウイルスベクターからなる群から選択される。幾つかの場合では、ベクターはＡＡＶ６ベクターである。幾つかの場合では、ベクターは、プロモーターをさらに含む。幾つかの場合では、ベクターは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写ベクターである。さらに別の態様によれば、本明細書で提供するのは、本明細書で提供する組み換え核酸のいずれかのＴＦＰまたはＣＡＲまたはＴＣＲ分子をコードする核酸分子を含むベクターである。幾つかの実施形態では、ベクター

は、ＤＮＡ、ＲＮＡ、プラスミド、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、またはレトロウイルスベクターからなる群から選択される。幾つかの実施形態では、ベクターは、プロモーターをさらに含む。幾つかの実施形態では、ベクターは、ｉｎ ｖｉｔｒｏ転写ベクターである。幾つかの実施形態では、ベクター内の核酸分子は、ポリ（Ａ）テールをコードする配列をさらに含む。

【０２４１】

[0264] 所望の分子をコードする核酸配列は、当技術分野で公知の組み換え方法を使用して、例えば、該遺伝子を発現する細胞からのライブラリーをスクリーニングすること、該遺伝子を含むことが公知のベクターからそれを抽出すること、または該遺伝子を含有する細胞及び組織から直接それを単離することなどによって、標準的技法を使用して得ることができる。あるいは、関心対象の遺伝子は、クローニングではなく、合成的に生成することができる。

【０２４２】

[0265] 本開示はまた、本開示の核酸が挿入されるベクターを提供する。レンチウイルスなどのレトロウイルスに由来するベクターは、導入遺伝子の長期の安定な統合及び娘細胞におけるその伝播を可能にするために、長期の遺伝子移入を実現するのに適したツールである。レンチウイルスベクターは、肝細胞などの非増殖性細胞に形質導入することができるという点で、マウス白血病ウイルスなどのオンコレトロウイルスに由来するベクターに優るさらなる利点を有する。それは、低免疫原性というさらなる利点も有する。

【０２４３】

[0266] 別の実施形態では、本開示の所望のＴＦＰまたはＴＣＲまたはＣＡＲをコードする核酸を含むベクターは、アデノウイルスベクター（Ａ５／３５）である。別の実施形態では、ＴＦＰをコードする核酸の発現は、スリーピングビューティー、ｃｒｉｓｐｒ、ＣＡＳ９、及びジンクフィンガーヌクレアーゼなどのトランスポゾンを使用して遂行することができる。下記Ｊｕｎｅ ｅｔ ａｌ．２００９ Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖｉｅｗｓ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ９．１０：７０４－７１６（参照により本明細書に援用される）を参照されたい。

【０２４４】

[0267] さらに別の態様によれば、本明細書で提供するのは、ここで提供する請求項のいずれか一項に記載の組み換え核酸または本明細書で提供するベクターのいずれか一つのベクターを含む細胞である。幾つかの実施形態では、細胞は、ヒト免疫細胞である。幾つかの実施形態では、免疫細胞は、Ｔ細胞前駆体、例えば、リンパ芽球細胞である。幾つかの実施形態では、免疫細胞は、ＣＤ８＋もしくはＣＤ４＋Ｔ細胞、ＣＤ８＋ＣＤ４＋Ｔ細胞、ＮＫ細胞、またはＮＫＴ細胞である。さらに別の態様によれば、本明細書で提供するのは、ヒト免疫細胞に本明細書で提供する組み換え核酸または本明細書で提供するベクターを形質導入することを含む、細胞を作製する方法である。本明細書で提供するのはまた、疾患を有する哺乳動物に抗腫瘍免疫をもたらす方法であって、本明細書で提供するベクターを含む有効量の細胞を該哺乳動物に投与することを含む方法である。本明細書で提供するのはまた、疾患を有する哺乳動物に抗腫瘍免疫をもたらす方法であって、本明細書で提供するＴＦＰ及びｃｉｒｃＲＮＡをコードする核酸分子を含む有効量の細胞を該哺乳動物に投与することを含む方法である。本明細書で提供するのはまた、疾患を有する哺乳動物に抗腫瘍免疫をもたらす方法であって、本明細書で提供するｃｉｒｃＲＮＡ結合部位を有する核酸分子を含む有効量の細胞を該哺乳動物に投与することを含む方法である。

【０２４５】

[0268] 本明細書で提供するのはまた、疾患を有する哺乳動物に抗腫瘍免疫をもたらす方法であって、有効量の送達ビヒクル、例えば、リポソームまたはナノ粒子を該哺乳動物に投与することを含む方法である。幾つかの実施形態では、送達ビヒクルは、ＴＦＰ、ＴＣＲ、またはＣＡＲをコードする単離された組み換え核酸であるペイロードを含む。幾つかの実施形態では、単離された組み換え核酸は環状ＲＮＡである。幾つかの実施形態では、環状ＲＮＡは、標的化部分を含む。

【０２４６】
[0269] 本開示の発現構築物はまた、標準的な遺伝子送達プロトコルを使用して、核酸免疫化及び遺伝子療法に使用されてもよい。遺伝子送達のための方法は、当技術分野で公知である（例えば、米国特許第５，３９９，３４６号、第５，５８０，８５９号、第５，５８９，４６６号（参照によりそれらの全体が本明細書に援用される）を参照されたい）。別の実施形態では、本開示は、遺伝子療法用ベクターを提供する。
【０２４７】
[0270] 核酸は、幾つものタイプのベクターにクローニングすることができる。例えば、核酸は、限定するものではないが、プラスミド、ファージミド、ファージ誘導体、動物ウイルス、及びコスミドを含めたベクターにクローニングすることができる。特に関心対象のベクターとして、発現ベクター、複製ベクター、プローブ生成ベクター、及び配列決定ベクターが挙げられる。
【０２４８】
[0271] さらに、発現ベクターは、ウイルスベクターの形態で細胞に提供されてもよい。ウイルスベクター技術は、当技術分野で周知であり、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，２０１２，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，ｖｏｌｕｍｅｓ １－４，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ，ＮＹ、ならびに他のウイルス学及び分子生物学の手引き書に記載されている。ベクターとして有用なウイルスとして、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、及びレンチウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。一般に、適切なベクターは、少なくとも１種の生物で機能する複製開始点、プロモーター配列、便利な制限エンドヌクレアーゼ部位、及び１つまたは複数の選択マーカーを含有する（例えば、ＷＯ０１／９６５８４；ＷＯ０１／２９０５８；及び米国特許第６，３２６，１９３号）。
【０２４９】
[0272] 幾つものウイルスベースの系が、哺乳類細胞への遺伝子移入のために開発されてきた。例えば、レトロウイルスは、遺伝子送達系に便利なプラットフォームを提供する。当技術分野で公知の技法を使用して、選択された遺伝子をベクターに挿入し、レトロウイルス粒子にパッケージングすることができる。次いで組み換えウイルスを単離し、対象の細胞にｉｎ ｖｉｖｏまたはｅｘ ｖｉｖｏのいずれかで送達することができる。幾つものレトロウイルス系が、当技術分野で公知である。幾つかの実施形態では、アデノウイルスベクターが使用される。幾つものアデノウイルスベクターが、当技術分野で公知である。一実施形態では、レンチウイルスベクターが使用される。
【０２５０】
[0273] さらなるプロモーターエレメント、例えば、エンハンサーは、転写開始の頻度を制御する。典型的には、これらは、開始部位の３０～１１０ｂｐ上流の領域に位置しているが、幾つものプロモーターが、開始部位の下流にも機能的エレメントを含有することが示されている。プロモーターエレメント間の間隔は、多くの場合フレキシブルなので、エレメントが互いに逆転または移動してもプロモーター機能は保持される。チミジンキナーゼ（ｔｋ）プロモーターでは、プロモーターエレメント間の間隔は５０ｂｐ離れるまで増加させることができ、その後活性は低下し始める。個々のエレメントは、プロモーターに応じて協同的または独立に機能して転写を活性化することができると思われる。
【０２５１】
[0274] 哺乳動物のＴ細胞でＴＦＰ導入遺伝子を発現することができるプロモーターの例は、ＥＦ１ａプロモーターである。本来のＥＦ１ａプロモーターは、アミノアシルｔＲＮＡのリボソームへの酵素的送達に関与する、伸長因子１複合体のαサブユニットの発現を駆動する。ＥＦ１ａプロモーターは、哺乳動物の発現プラスミドに広く使用されており、レンチウイルスベクターにクローニングされた導入遺伝子からのＴＦＰ発現を駆動するのに有効であることが示されている（例えば、Ｍｉｌｏｎｅ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．１７（８）：１４５３－１４６４（２００９）を参照されたい）。プロモーター

の別の例は、前初期サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター配列である。このプロモーター配列は、これに作動可能に連結された任意のポリヌクレオチド配列の高レベルの発現を駆動することができる強力な構成的プロモーター配列である。しかし、他の構成的プロモーター配列も使用されてもよく、それらとして、サルウイルス４０（ＳＶ４０）初期プロモーター、マウス乳癌ウイルス（ＭＭＴＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）末端反復配列（ＬＴＲ）プロモーター、ＭｏＭｕＬＶプロモーター、トリ白血病ウイルスプロモーター、エプスタイン・バーウイルス前初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、ならびにヒト遺伝子プロモーター、例えば、限定するものではないが、アクチンプロモーター、ミオシンプロモーター、伸長因子１ａプロモーター、ヘモグロビンプロモーター、及びクレアチンキナーゼプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。さらに、本開示は、構成的プロモーターの使用に限定されるものではない。誘導性プロモーターも、本開示の一部として企図される。誘導性プロモーターを使用すると、それに作動可能に連結されたポリヌクレオチドの発現を、そのような発現が所望されるときにオンにしたり、発現が所望されないときにオフにしたりすることができる分子スイッチが得られる。誘導性プロモーターの例として、メタロチオネインプロモーター、糖質コルチコイドプロモーター、プロゲステロンプロモーター、及びテトラサイクリンにより制御されるプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。

【０２５２】

[0275] ＴＦＰもしくはＣＡＲもしくはＴＣＲポリペプチドまたはそれらの一部分の発現を査定するために、細胞または送達ビヒクルに導入しようとする発現ベクターはまた、選択マーカー遺伝子もしくはレポーター遺伝子のいずれかまたは両方を含有して、ウイルスベクターを通して形質移入または感染させようとする細胞集団からの発現細胞の特定または選択を容易にすることができる。他の態様では、選択マーカーを別々の核酸断片上に担持させて、同時形質移入手順に使用してもよい。選択マーカーとレポーター遺伝子の両方を適正な制御配列に隣接させて、宿主細胞内で発現できるようにしてもよい。有用な選択マーカーとして、例えば、ｎｅｏなどの抗生物質抵抗性遺伝子が挙げられる。

【０２５３】

[0276] レポーター遺伝子は、形質移入された可能性がある細胞の特定、及び制御配列の機能性の評価に使用される。一般に、レポーター遺伝子は、レシピエントの生物もしくは組織に存在しないか、またはそれらによって発現されない遺伝子であり、容易に検出可能な何らかの特性、例えば酵素活性によって発現が顕在化するポリペプチドをコードする。レポーター遺伝子の発現は、核酸がレシピエント細胞に導入された後の適切な時点でアッセイされる。適切なレポーター遺伝子として、ルシフェラーゼ、β－ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、分泌型アルカリホスファターゼをコードする遺伝子、または緑色蛍光タンパク質遺伝子を挙げることができる（例えば、Ｕｉ－Ｔｅｉ ｅｔ ａｌ．，２０００ ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔｅｒｓ ４７９：７９－８２）。適切な発現系は周知であり、公知の技法を使用して調製しても、商業的に得てもよい。一般に、レポーター遺伝子の最も高い発現レベルを示す最小限の５’隣接領域を有する構築物が、プロモーターとして特定される。そのようなプロモーター領域をレポーター遺伝子に連結し、これを使用して、プロモーター駆動転写を調節する能力について作用物質を評価してもよい。

【０２５４】

移入ベクター及びｉｎ ｖｉｖｏ／ｅｘ ｖｉｖｏで核酸を送達するための方法

[0277] 「移入ベクター」という用語は、単離された核酸を含む組成物であって、単離された核酸を細胞の内側に送達するために使用することができるものを指す。好ましい実施形態では、言及した単離された核酸はｃｉｒｃＲＮＡである。「移入ベクター」という用語には、非ウイルス、ウイルス、プラスミド、及び非プラスミドベクターが含まれる。

【０２５５】

[0278] 遺伝子を細胞に導入し、発現させる方法は、当技術分野で公知である。ベクターは、宿主細胞、例えば、哺乳動物、細菌、酵母、または昆虫の細胞に、当技術分野にお

ける任意の方法によって容易に導入することができる。例えば、発現ベクターは、物理的、化学、または生物学的手段によって宿主細胞に移入することができる。

【０２５６】

[0279] ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための物理的方法として、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、微粒子銃、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションなどが挙げられる。ベクター及び／または外因性核酸を含む細胞を生成するための方法は、当技術分野で周知である。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．，２０１２，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，ｖｏｌｕｍｅｓ　１－４，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｐｒｅｓｓ，ＮＹを参照されたい。ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するのに好ましい方法は、リン酸カルシウム形質移入である。幾つかの実施形態では、言及したポリヌクレオチドは核酸である。好ましい実施形態では、言及したポリヌクレオチドはｃｉｒｃＲＮＡである。

【０２５７】

[0280] 関心対象のポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための生物学的方法として、ＤＮＡ及びＲＮＡベクターの使用が挙げられる。ウイルスベクター、とりわけレトロウイルスベクターは、遺伝子を哺乳動物、例えばヒトの細胞に挿入するための最も広く使用される方法となっている。他のウイルスベクターは、レンチウイルス、ポックスウイルス、単純ヘルペスウイルスＩ型、アデノウイルス、及びアデノ随伴ウイルスなどから誘導することができる（例えば、米国特許第５，３５０，６７４号及び第５，５８５，３６２号を参照されたい）。

【０２５８】

[0281] ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための化学的手段として、コロイド分散系、例えば、巨大分子複合体、ナノカプセル、ナノ粒子、脂質－ナノ粒子コンジュゲート、微小球、ビーズ、ペプチドベースのポリプレックス、ならびに脂質ベースの系、例えば、水中油型エマルション、ミセル、混合ミセル、脂質ナノ粒子、及びリポソームが挙げられる。ｉｎ　ｖｉｔｒｏ及びｉｎ　ｖｉｖｏでの送達ビヒクルとして使用するための例示的なコロイド系は、リポソーム（例えば、人工膜小胞）である。核酸を標的化送達する現状技術の他の方法、例えば、標的化ナノ粒子または他の適切なサブミクロンサイズの送達系でのポリヌクレオチドの送達が利用可能である。

【０２５９】

[0282] 幾つかの実施形態では、適切なリポソームまたは脂質－ナノ粒子コンジュゲートは、１つまたは複数のカチオン性脂質、例えばｃＫＫ－Ｅ１２を含む。幾つかの実施形態では、言及したポリヌクレオチドは核酸である。好ましい実施形態では、言及したポリヌクレオチドはｃｉｒｃＲＮＡである。幾つかの実施形態では、ｃｉｒｃＲＮＡは、前記コロイド分散系内に封入される。他の実施形態では、ｃｉｒｃＲＮＡは、前記コロイド分散系の近傍に結合される。

【０２６０】

[0283] 好ましい実施形態では、移入ベクターはリポソームである。他の好ましい実施形態では、移入ベクターは、脂質ナノ粒子または脂質－ナノ粒子コンジュゲートの群から選択される。幾つかの実施形態では、タンパク質をコードするｃｉｒｃＲＮＡは、リポソーム内に封入され、該リポソームはカチオン性脂質を含む。好ましい実施形態では、ＴＦＰ、ＣＡＲ、ＴＣＲをコードするｃｉｒｃＲＮＡは、リポソーム内に封入され、該リポソームはカチオン性脂質を含む。

【０２６１】

[0284] 非ウイルス送達系が利用される場合、例示的な送達ビヒクルは、リポソームである。脂質製剤の使用は、宿主細胞に核酸を導入するために企図される（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ、ｅｘ　ｖｉｖｏ、またはｉｎ　ｖｉｖｏ）。好ましい実施形態では、言及した核酸はｃｉｒｃＲＮＡである。別の態様では、核酸は、脂質に会合されてもよい。脂質に会合された核酸は、リポソームの水性内部に封入されてもよく、リポソームの脂質二重層内に散在してもよく、リポソームとオリゴヌクレオチドの両方に会合する連結分子を介してリポ

ソームに結合されてもよく、リポソーム内に捕捉されてもよく、リポソームと複合体を形成してもよく、脂質を含有する溶液中に分散されてもよく、脂質と混合されてもよく、脂質と組み合わされてもよく、脂質中の懸濁液として含有されてもよく、ミセルに含有されてもミセルと複合体を形成してもよく、または脂質と別様に会合されてもよい。脂質、脂質／ＤＮＡ、または脂質／発現ベクター会合組成物は、溶液中のいずれの特定の構造にも限定されない。例えば、それらは、二重層構造内に存在しても、ミセルとして存在しても、「崩壊した」構造で存在してもよい。それらはまた、場合によりサイズまたは形状が均一でない凝集粒子を形成して、溶液中に単に散在しているだけでもよい。脂質は、天然に存在する脂質または合成脂質であり得る脂肪性物質である。例えば、脂質として、細胞質内に天然に存在する脂肪小滴、ならびに長鎖脂肪族炭化水素を含有する化合物及びそれらの誘導体の部類、例えば、脂肪酸、アルコール、アミン、アミノアルコール、及びアルデヒドが挙げられる。

【０２６２】

[0285] 使用に適した脂質は、商業的供給元から得ることができる。例えば、ジミリストイルホスファチジルコリン（ｄｉｍｙｒｉｓｔｙｌ ｐｈｏｓｐｈａｔｉｄｙｌｃｈｏｌｉｎｅ）（「ＤＭＰＣ」）は、Ｓｉｇｍａ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，Ｍｏ．から得ることができ；リン酸ジセチル（「ＤＣＰ」）は、Ｋ＆Ｋ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（Ｐｌａｉｎｖｉｅｗ，Ｎ．Ｙ．）から得ることができ；コレステロール（「Ｃｈｏｉ」）は、Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ－Ｂｅｈｒｉｎｇから得ることができ；ジミリストイルホスファチジルグリセロール（ｄｉｍｙｒｉｓｔｙｌ ｐｈｏｓｐｈａｔｉｄｙｌｇｌｙｃｅｒｏｌ）（「ＤＭＰＧ」）及び他の脂質は、Ａｖａｎｔｉ Ｐｏｌａｒ Ｌｉｐｉｄｓ，Ｉｎｃ．（Ｂｉｒｍｉｎｇｈａｍ，Ａｌａ．）から得てもよい。クロロホルムまたはクロロホルム／メタノール中の脂質のストック溶液は、約－２０℃で保存することができる。クロロホルムは、メタノールより容易に蒸発するので、唯一の溶媒として使用される。「リポソーム」は、閉鎖された脂質二重層または凝集粒子の生成によって形成される、種々の一重膜及び多重膜の脂質ビヒクルを包含する総称である。リポソームは、リン脂質の二重膜と内部の水性媒体とを有する小胞構造を有することを特徴とし得る。多重膜リポソームは、水性媒体によって隔てられた複数の脂質層を有する。それは、リン脂質を過剰な水溶液に懸濁させると自然に形成する。脂質成分は、自己再編成を経た後で、閉鎖構造を形成し、水及び溶解した溶質を脂質二重層の間に捕捉する（Ｇｈｏｓｈ ｅｔ ａｌ．，１９９１ Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ ５：５０５－１０）。しかし、溶液中で通常の小胞構造とは異なる構造を有する組成物も包含される。例えば、脂質は、ミセル構造であると想定されてもよいし、単に脂質分子の不均一な凝集粒子として存在すると想定されてもよい。リポフェクタミン－核酸複合体もまた企図される。

【０２６３】

[0286] 幾つかの実施形態では、適切なリポソームまたは脂質－ナノ粒子コンジュゲートは、１つもしくは複数の非カチオン性脂質、１つもしくは複数のコレステロール系脂質、及び／または１つもしくは複数のＰＥＧ改変脂質を含む。幾つかの実施形態では、１つまたは複数の非カチオン性脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（ＤＯＰＧ）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（ＤＰＰＧ）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、パルミトイルオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＰＯＰＥ）、ジオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＤＯＰＥ－ｍａｌ）、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＰＰＥ）、ジミリストイルホスホエタノールアミン（ＤＭＰＥ）、ジステアロイル－ホスファチジル－エタノールアミン（ＤＳＰＥ）、１６－Ｏ－モノメチルＰＥ、１６－Ｏ－ジメチルＰＥ、１８－１－ｔｒａｎｓ ＰＥ、１－ステアロイル－２－オレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ｐｈｏｓｐｈａｔｉｄｙｅｔｈａｎｏｌａｍｉｎｅ）（ＳＯ

ＰＥ）、またはこれらの混合物から選択される。
【０２６４】
[0287] 幾つかの実施形態では、適切なリポソームまたは脂質－ナノ粒子コンジュゲートは、ｃＫＫ－Ｅ１２、ＤＯＰＥ、コレステロール、ＤＭＧ－ＰＥＧ－２Ｋからなる群から選択される脂質を含む。他の実施形態では、タンパク質をコードするｃｉｒｃＲＮＡは、前記リポソームまたは脂質－ナノ粒子コンジュゲート内に封入される。幾つかの実施形態では、適切なリポソームまたは脂質－ナノ粒子コンジュゲートは、ｃＫＫ－Ｅ１２、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、コレステロール、及び１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［メトキシ－（ポリエチレングリコール）－２０００］（アンモニウム塩）（Ｃ１４－ＰＥＧ ２０００）からなる群から選択される脂質を含む。好ましい実施形態では、ｃｉｒｃＲＮＡは、前記の適切なリポソームまたは脂質－ナノ粒子コンジュゲートに会合される。より好ましい実施形態では、ｃｉｒｃＲＮＡは、前記の適切なリポソームまたは脂質－ナノ粒子コンジュゲートに組み込まれる。別の好ましい実施形態では、ＴＦＰ、ＣＡＲ、ＴＣＲをコードするｃｉｒｃＲＮＡは、前記の適切なリポソームまたは脂質－ナノ粒子コンジュゲートに組み込まれる。
【０２６５】
[0288] 幾つかの場合では、非ウイルス移入ベクターは、Ｉｎｖｉｖｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（登録商標）（ＩＦ）２．０試薬、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（商標）ＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭＡＸ（商標）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、ＡｔｅｌｏＧｅｎｅ（登録商標）（ＫＯＫＥＮ）、Ｌｉｐｏｆｅｃｔｅｍｉｎｅ（登録商標）、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（登録商標）２０００、またはＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ３０００を含む脂質ベースの送達系から選択される。
【０２６６】
[0289] 外因性核酸を宿主細胞に導入するために使用される方法であるか、または別様に細胞を本開示の阻害剤に曝露するために使用される方法であるかにかかわらず、宿主細胞におけるｃｉｒｃＲＮＡの存在を確認するために、種々のアッセイが実施されてもよい。そのようなアッセイとして、例えば、当業者に周知の「分子生物学的」アッセイ、例えば、サザン及びノーザンブロット法、ＲＴ－ＰＣＲ及びＰＣＲ；「生化学的」アッセイ、例えば、特定のペプチドの存在または非存在を、例えば、免疫学的手段（ＥＬＩＳＡ及びウエスタンブロット）または本開示の範囲内の作用物質を特定するための本明細書に記載するアッセイによって検出することが挙げられる。
【０２６７】
[0290] 本開示は、ＴＦＰ、ＣＡＲ、ＴＣＲをコードする核酸分子を含むベクターをさらに提供する。好ましい実施形態では、言及した核酸分子はｃｉｒｃＲＮＡである。一態様では、ベクターは、細胞、例えば、Ｔ細胞に直接形質導入することができる。一態様では、ベクターは、哺乳動物のＴ細胞でＴＦＰ構築物を発現することができる。一態様では、哺乳動物のＴ細胞は、ヒトＴ細胞である。
【０２６８】
選択された細胞標的化リガンド
[0291] 開示する移入ベクターの選択された細胞標的化リガンドは、不均一な細胞集団内で関心対象の免疫細胞に選択的に結合する。好ましい実施形態では、言及した標的化リガンドは、移入ベクターに会合される。他の好ましい実施形態では、標的化リガンドは、移入ベクターの表面全体にわたって配置される。より好ましい実施形態では、標的化リガンドは、ＴＦＰ、ＣＡＲ、またはＴＣＲをコードするｃｉｒｃＲＮＡを含む移入ベクターに会合される。他のより好ましい実施形態では、標的化リガンドは、ＴＦＰ、ＣＡＲ、またはＴＣＲをコードするｃｉｒｃＲＮＡを含む移入ベクターの表面全体にわたって配置される。
【０２６９】
[0292] 特定の実施形態では、関心対象の免疫細胞はリンパ球である。リンパ球には、

Ｔ細胞、Ｂ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、単球／マクロファージ、及びＨＳＣが含まれる。より好ましい実施形態では、リンパ球はＴ細胞である。

【０２７０】

[0293] 「選択的送達」とは、核酸が１つまたは複数の選択されたリンパ球集団に送達され、それらによって発現されることを意味する。特定の実施形態では、選択的送達は、選択されたリンパ球集団に限定される。特定の実施形態では、投与された核酸の少なくとも６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、または９９％が、選択されたリンパ球集団に送達され、及び／またはそれらによって発現される。特定の実施形態では、選択的送達は、非リンパ球細胞が確実に送達された核酸を発現しないようにする。例えば、標的化物質がＴ細胞受容体（ＴＣＲ）遺伝子であるとき、ＴＣＲを発現するためのζ鎖を有するのがＴ細胞だけであるために、選択性が確保される。選択的送達は、非選択細胞への核酸取り込みの欠如、または核酸配列内の特定のプロモーターの存在に基づくこともできる。例えば、一過性に発現される核酸は、Ｔ細胞特異的ＣＤ３－δプロモーターを含み得る。選択的送達を実現可能なさらなるプロモーターとして、Ｔ細胞もしくはＨＳＣにはマウス幹細胞ウイルスプロモーターもしくは遠位Ｌｃｋプロモーター；ＨＳＣにはＣＤ４５プロモーター、ＷＡＳＰプロモーター、もしくはＩＦＮ－βプロモーター；Ｂ細胞にはＢ２９プロモーター；または単球／マクロファージにはＣＤ１４プロモーターもしくはＣＤ１１ｂプロモーターが挙げられる。

【０２７１】

[0294] 幾つかの実施形態では、選択された細胞標的化リガンドは、リンパ球細胞に見出されるモチーフに対する結合ドメインを含むことができる。選択された細胞標的化リガンドはまた、リンパ球への選択的取り込みを可能にする任意の選択的結合メカニズムを含むことができる。特定の実施形態では、選択された細胞標的化リガンドには、Ｔ細胞受容体モチーフ；Ｔ細胞α鎖；Ｔ細胞β鎖；Ｔ細胞γ鎖；Ｔ細胞δ鎖；ＣＣＲ７；ＣＤ１ａ；ＣＤ１ｂ；ＣＤ１ｃ；ＣＤ１ｄ；ＣＤ３；ＣＤ４；ＣＤ５；ＣＤ７；ＣＤ８；ＣＤ１１ｂ；ＣＤ１１ｃ；ＣＤ１６；ＣＤ１９；ＣＤ２０；ＣＤ２１；ＣＤ２２；ＣＤ２５；ＣＤ２８；ＣＤ３４；ＣＤ３５；ＣＤ３９；ＣＤ４０；ＣＤ４５ＲＡ；ＣＤ４５ＲＯ；ＣＤ４６，ＣＤ５２；ＣＤ５６；ＣＤ６２Ｌ；ＣＤ６８；ＣＤ８０；ＣＤ８６；ＣＤ９５；ＣＤ１０１；ＣＤ１１７；ＣＤ１２７；ＣＤ１３３；ＣＤ１３７（４－１ＢＢ）；ＣＤ１４８；ＣＤ１６３；Ｆ４／８０；ＩＬ－４Ｒα；Ｓｃａ－１；ＣＴＬＡ－４；ＧＩＴＲ；ＧＡＲＰ；ＬＡＰ；グランザイムＢ；ＬＦＡ－１；トランスフェリン受容体；及びそれらの組み合わせに対する結合ドメインが含まれる。

【０２７２】

[0295] 特定の実施形態では、結合ドメインは、細胞マーカーリガンド、受容体リガンド、抗体、ペプチド、ペプチドアプタマー、核酸、核酸アプタマー、スピーゲルマー、またはそれらの組み合わせを含むことができる。選択された細胞標的化リガンドとの関係において、結合ドメインには、別の物質と結合してエンドサイトーシスを媒介することができる複合体を形成する任意の物質が含まれる。

【０２７３】

[0296] 「抗体」は結合ドメインの一例であり、それらには、全長抗体または抗体の結合断片、例えば、Ｆｖ、ＶＨＨ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｃ、及び一本鎖Ｆｖ断片（ｓｃＦｖ）、またはリンパ球によって発現されるモチーフに特異的に結合する免疫グロブリンの任意の生物学的に有効な断片が含まれる。抗体または抗原結合断片には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、合成抗体、キメラ抗体、二重特異性抗体、ミニボディ、及び線状抗体の全部または一部分が含まれる。

【０２７４】

[0297] ヒト起源の抗体またはヒト化抗体は、ヒトにおける免疫原性が低下しているか免疫原性がなく、非ヒト抗体と比較して非免疫原性エピトープの数が少ない。抗体およびそれらの断片は、ヒト対象における抗原性のレベルが低減するかなくなるように選択されるであろう。

【０２７５】
[0298] リンパ球によって発現されるモチーフに特異的に結合する抗体は、当業者に公知であるような、モノクローナル抗体を得る方法、ファージディスプレイの方法、ヒトもしくはヒト化抗体を生成する方法、または抗体を産生するように操作された遺伝子導入動物もしくは植物を使用する方法を使用して調製することができる（例えば、米国特許第６，２９１，１６１号及び第６，２９１，１５８号を参照されたい）。部分的または完全合成抗体のファージディプレイライブラリーが利用可能であり、リンパ球モチーフに結合することができる抗体またはその断片についてスクリーニングすることができる。例えば、関心対象の標的に特異的に結合するＦａｂ断片についてＦａｂファージライブラリーをスクリーニングすることによって、結合ドメインを特定してもよい（Ｈｏｅｔ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２３：３４４，２００５を参照されたい）。ヒト抗体のファージディプレイライブラリーも利用可能である。加えて、便利な系（例えば、マウス、ＨｕＭＡｂ Ｍｏｕｓｅ（登録商標）、ＴＣｍｏｕｓｅ（商標）、ＫＭ－Ｍｏｕｓｅ（登録商標）、ラマ、ニワトリ、ラット、ハムスター、ウサギなど）において免疫原として関心対象の標的を使用してハイブリドーマを開発する従来の戦略を使用して、結合ドメインを開発することができる。特定の実施形態では、抗体は、選択されたリンパ球によって発現されるモチーフに特異的に結合し、非特異的成分または無関係な標的とは交差反応しない。抗体をコードするアミノ酸配列または核酸配列を特定したら、それらを単離及び／または明確化することができる。
【０２７６】
[0299] 特定の実施形態では、選択された細胞標的化リガンドの結合ドメインには、Ｔ細胞受容体モチーフ抗体；Ｔ細胞α鎖抗体；Ｔ細胞β鎖抗体；Ｔ細胞γ鎖抗体；Ｔ細胞δ鎖抗体；ＣＣＲ７抗体；ＣＤ１ａ抗体；ＣＤ１ｂ抗体；ＣＤ１ｃ抗体；ＣＤ１ｄ抗体；ＣＤ３抗体；ＣＤ４抗体；ＣＤ５抗体；ＣＤ７抗体；ＣＤ８抗体；ＣＤ１１ｂ抗体；ＣＤ１１ｃ抗体；ＣＤ１６抗体；ＣＤ１９抗体；ＣＤ２０抗体；ＣＤ２１抗体；ＣＤ２２抗体；ＣＤ２５抗体；ＣＤ２８抗体；ＣＤ３４抗体；ＣＤ３５抗体；ＣＤ３９抗体；ＣＤ４０抗体；ＣＤ４５ＲＡ抗体；ＣＤ４５ＲＯ抗体；ＣＤ４６抗体；ＣＤ５２抗体；ＣＤ５６抗体；ＣＤ６２Ｌ抗体；ＣＤ６８抗体；ＣＤ８０抗体；ＣＤ８６抗体 ＣＤ９５抗体；ＣＤ１０１抗体；ＣＤ１１７抗体；ＣＤ１２７抗体；ＣＤ１３３抗体；ＣＤ１３７（４－１ＢＢ）抗体；ＣＤ１４８抗体；ＣＤ１６３抗体；Ｆ４／８０抗体；ＩＬ－４Ｒα抗体；Ｓｃａ－１抗体；ＣＴＬＡ－４抗体；ＧＩＴＲ抗体；ＧＡＲＰ抗体；ＬＡＰ抗体；グランザイムＢ抗体；ＬＦＡ－１抗体；またはトランスフェリン受容体抗体が含まれる。これらの結合ドメインは、前述の抗体のｓｃＦｖ断片からも構成することができる。
【０２７７】
[0300] ペプチドアプタマーは、タンパク質足場の両端に結合したペプチドループ（標的タンパク質に特異的な）を含む。この二重の構造的制約により、ペプチドアプタマーの結合親和性は抗体に匹敵するレベルまで大幅に増大する。この可変ループの長さは、典型的には８～２０アミノ酸（例えば、８～１２アミノ酸）であり、足場は、安定で可溶性であり、小さくて無毒性である任意のタンパク質（例えば、チオレドキシンＡ、ステフィンＡ三重突然変異体、緑色蛍光タンパク質、エグリンＣ、及び細胞転写因子Ｓｐｌ）であり得る。ペプチドアプタマーの選択は、酵母２ハイブリッド系（例えば、Ｇａｌ４酵母２ハイブリッド系）またはＬｅｘＡ相互作用トラップ系などの様々な系を使用して行うことができる。
【０２７８】
[0301] 核酸アプタマーは、Ｏｓｂｏｒｎｅ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．１：５－９，１９９７及びＣｅｒｃｈｉａ ｅｔ ａｌ．，ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔｅｒｓ ５２８：１２－１６，２００２に記載されるように、標的タンパク質または他の分子との高親和性及び特異性での結合を決定付ける特定の球状構造に折り畳まれることよって機能する一本鎖核酸（ＤＮＡまたはＲＮＡ）リガンドである。特定の実施形態では、アプタマーは小さい（１５ｋＤａ；または１５～８０ヌクレオチドまたは２０～

５０ヌクレオチド）。アプタマーは一般に、１０１４～１０１５のランダムなオリゴヌクレオチド配列からなるライブラリーから、ＳＥＬＥＸ（試験管内選択法；例えば、Ｔｕｅｒｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４９：５０５－５１０，１９９０；Ｇｒｅｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ．７５－８６，１９９１；及びＧｏｌｄ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，６４：７６３－７９７，１９９５を参照されたい）と呼ばれる手順によって単離される。アプタマーを生成するさらなる方法は、例えば、米国特許第６，３４４，３１８号；第６，３３１，３９８号；第６，１１０，９００号；第５，８１７，７８５号；第５，７５６，２９１号；第５，６９６，２４９号；第５，６７０，６３７号；第５，６３７，４６１号；第５，５９５，８７７号；第５，５２７，８９４号；第５，４９６，９３８号；第５，４７５，０９６号；及び第５，２７０，１６号に記載されている。スピーゲルマーは、少なくとも１つのβ－リボースユニットがβ－Ｄ－デオキシリボースまたは、例えば、β－Ｄ－リボース、α－Ｄ－リボース、β－Ｌ－リボースから選択される修飾糖ユニットで置きかえられていることを除いて、核酸アプタマーと同様である。

【０２７９】

[0302] リンパ球による内在化及び／またはリンパ球の形質移入を容易にすることができる他の作用物質、例えばポリ（エチレンイミン）／ＤＮＡ（ＰＥＩ／ＤＮＡ）エンドソーム不安定化ペプチド（ＥＬＰ）複合体も使用することができる。

【０２８０】

改変ヒト免疫細胞

[0303] 本明細書に開示するのは、幾つかの実施形態では、本明細書に開示する組み換え核酸または本明細書に開示するベクターを含む改変ヒト免疫細胞であり、該改変ヒト免疫細胞は、内因性ＴＣＲの機能的破壊を含む。本明細書に開示するのはまた、幾つかの実施形態では、本明細書に開示する核酸のＴＦＰをコードする配列または本明細書に開示する核酸の配列によってコードされたＴＦＰを含む改変ヒト免疫細胞であり、該改変ヒト免疫細胞は、内因性ＴＣＲの機能的破壊を含む。本明細書にさらに開示するのは、幾つかの実施形態では、本明細書に開示するＴＦＰをコードする配列または本明細書に開示する核酸の配列によってコードされたＴＦＰを含む、改変同種Ｔ細胞である。

【０２８１】

[0304] 幾つかの場合では、免疫細胞は、ＴＣＲ定常ドメインをコードする異種配列をさらに含み、該ＴＣＲ定常ドメインは、ＴＣＲα定常ドメイン、ＴＣＲβ定常ドメイン、またはＴＣＲα定常ドメイン及びＴＣＲβ定常ドメインである。幾つかの場合では、機能的に破壊された内因性ＴＣＲは、内因性ＴＣＲα鎖、内因性ＴＣＲβ鎖、または内因性ＴＣＲα鎖及び内因性ＴＣＲβ鎖である。幾つかの場合では、機能的に破壊された内因性ＴＣＲは、非改変対照免疫細胞のものと比較して、ＭＨＣペプチド複合体との低減した結合を有する。幾つかの場合では、機能的破壊は、内因性ＴＣＲをコードする遺伝子の破壊である。幾つかの場合では、内因性ＴＣＲをコードする遺伝子の破壊は、内因性ＴＣＲをコードする遺伝子の配列の、免疫細胞のゲノムからの除去である。幾つかの場合では、免疫細胞はヒトＴ細胞である。幾つかの場合では、Ｔ細胞は、ＣＤ８＋、ＣＤ４＋Ｔ細胞、ＣＤ８＋ＣＤ４＋Ｔ細胞、ＮＫＴ細胞、またはＮＫ細胞である。幾つかの場合では、Ｔ細胞は同種Ｔ細胞である。幾つかの場合では、改変ヒト免疫細胞は、細胞内シグナル伝達ドメインからの正のシグナルを含む第２のポリペプチドに会合された、抑制分子の少なくとも一部分を含む第１のポリペプチドを含む抑制分子をコードする核酸をさらに含む。幾つかの場合では、抑制分子は、ＰＤ１の少なくとも一部分を含む第１のポリペプチドと、共刺激ドメイン及び一次シグナル伝達ドメインを含む第２のポリペプチドとを含む。

【０２８２】

Ｔ細胞源

[0305] 拡大及び遺伝子改変の前に、Ｔ細胞源を対象から得る。「対象」という用語には、免疫応答を誘発することができる生体（例えば、哺乳動物）が含まれることが意図される。対象の例として、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ラット、及びそれらのトランスジェ

ニック種が挙げられる。Ｔ細胞は、末梢血単核球、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染症の部位からの組織、腹水、胸水、脾臓組織、及び腫瘍を含めた、幾つもの源から得ることができる。本開示のある種の態様では、当技術分野で入手可能な幾つものＴ細胞株が使用されてもよい。本開示のある種の態様では、Ｔ細胞は、Ｆｉｃｏｌｌ（商標）分離などの、当業者に公知の幾つもの技法を使用して、対象から収集した血液単位から得ることができる。好ましい一態様では、個体の循環血からの細胞は、アフェレーシスによって得られる。アフェレーシス産物は、典型的には、Ｔ細胞を含めたリンパ球、単球、顆粒球、Ｂ細胞、他の有核白血球、赤血球、及び血小板を含有する。一態様では、アフェレーシスによって収集された細胞は、洗浄して、血漿画分を除去し、後続の処理ステップのために適正な緩衝液または培地中に入れてもよい。本開示の一態様では、細胞は、リン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）で洗浄される。代替の態様では、洗浄溶液は、カルシウムを含まず、かつマグネシウムを含まなくてもよく、または全部とまでいかなくても多くの二価カチオンを含まなくてもよい。カルシウムの非存在下での初期活性化ステップは、活性化の拡大につながり得る。当業者であれば容易に理解するように、洗浄ステップは、当技術分野で公知の方法によって、例えば、半自動化「フロースルー」遠心分離機（例えば、Ｃｏｂｅ（登録商標）２９９１細胞処理装置、Ｂａｘｔｅｒ　ＯｎｃｏｌｏｇｙＣｙｔｏＭａｔｅ、またはＨａｅｍｏｎｅｔｉｃｓ（登録商標）Ｃｅｌｌ　Ｓａｖｅｒ（登録商標）５）を製造業者の使用説明書に従って使用することによって遂行することができる。洗浄後に、細胞は、種々の生体適合性緩衝液、例えば、Ｃａ非含有、Ｍｇ非含有ＰＢＳ、ＰｌａｓｍａＬｙｔｅ　Ａ、または緩衝液を含むもしくは含まない他の生理食塩水などに再懸濁させてもよい。あるいは、アフェレーシス試料の望ましくない成分を除去し、細胞を培養培地に直接再懸濁させてもよい。

【０２８３】

[0306] 一態様では、Ｔ細胞は、赤血球を溶解し、単球を除去することによって、例えば、ＰＥＲＣＯＬＬ（登録商標）勾配による遠心分離によって、または対向流遠心溶出法によって、末梢血リンパ球から単離される。ＣＤ３＋、ＣＤ２８＋、ＣＤ４＋、ＣＤ８＋、ＣＤ４５ＲＡ＋、及びＣＤ４５ＲＯ＋Ｔ細胞などのＴ細胞の特定の亜集団を、ポジティブまたはネガティブ選択技法によってさらに単離することができる。例えば、一態様では、Ｔ細胞は、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳ（登録商標）Ｍ－４５０　ＣＤ３／ＣＤ２８　Ｔなどの抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８（例えば、３×２８）結合ビーズと、所望のＴ細胞のポジティブ選択に十分な時間インキュベートすることによって単離される。一態様では、その時間は、約３０分である。さらなる態様では、その時間は、３０分～３６時間の範囲またはそれ以上、及びその間のすべての整数値である。さらなる態様では、その時間は、少なくとも１、２、３、４、５、または６時間である。さらに別の好ましい態様では、その時間は、１０～２４時間である。一態様では、インキュベーション時間は、２４時間である。腫瘍組織からまたは免疫不全の個体から腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を単離する際など、他の細胞型と比較してＴ細胞があまりないような状況では、より長いインキュベーション時間を使用してＴ細胞を単離してもよい。さらに、より長いインキュベーション時間を使用すると、ＣＤ８＋Ｔ細胞を捕捉する効率を上げることができる。よって、ＣＤ３／ＣＤ２８ビーズに結合することができる時間を単に短くするもしくは長くすることによって、及び／またはビーズのＴ細胞に対する比率を増加させるまたは減少させることによって（本明細書でさらに記載するように）、培養開始時またはプロセス中の他の時点で、Ｔ細胞の亜集団を優先的に選択するまたは反選択することができる。加えて、ビーズまたは他の表面上の抗ＣＤ３及び／または抗ＣＤ２８抗体の比率を増加させるまたは減少させることによって、培養開始時または他の所望の時点で、Ｔ細胞の亜集団を優先的に選択するまたは反選択することができる。当業者であれば、本開示との関係において複数回の選択も使用できることを認識するであろう。ある種の態様では、選択手順を実施し、「選択されていない」細胞を活性化及び拡大プロセスに使用することが望ましい場合がある。「選択されていない」細胞は、さらなる回の選択に供することもできる。

【０２８４】

[0307] ネガティブ選択によるＴ細胞集団の濃厚化は、ネガティブ選択された細胞に特有の表面マーカーに指向する抗体を組み合わせて遂行することができる。一方法は、ネガティブ選択された細胞上に存在する細胞表面マーカーに指向するモノクローナル抗体のカクテルを使用するネガティブ磁性免疫接着またはフローサイトメトリーを介した細胞選別及び／または選択である。例えば、ネガティブ選択によってＣＤ４＋細胞を濃厚化するために、モノクローナル抗体カクテルは、典型的には、ＣＤ１４、ＣＤ２０、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１６、ＨＬＡ－ＤＲ、及びＣＤ８に対する抗体を含む。ある種の態様では、典型的には、ＣＤ４＋、ＣＤ２５＋、ＣＤ６２Ｌｈｉ、ＧＩＴＲ＋、及びＦｏｘＰ３＋を発現する制御性Ｔ細胞を濃厚化するまたはポジティブ選択することが望ましい場合がある。あるいは、ある種の態様では、制御性Ｔ細胞は、抗Ｃ２５結合ビーズまたは他の同様の選択方法によって除去される。

【０２８５】

[0308] 一実施形態では、ＩＦＮ－γ、ＴＮＦ－α、ＩＬ－１７Ａ、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－１０、ＩＬ－１３、グランザイムＢ、及びパーフォリン、または他の適正な分子、例えば他のサイトカインの１つまたは複数を発現するＴ細胞集団を選択することができる。細胞発現をスクリーニングするための方法は、例えば、ＰＣＴ公開第ＷＯ２０１３／１２６７１２号に記載される方法によって決定することができる。

【０２８６】

[0309] 所望の細胞集団をポジティブまたはネガティブ選択によって単離するために、細胞及び表面（例えば、ビーズなどの粒子）の濃度を変動させることができる。ある種の態様では、細胞とビーズの最大限の接触を確実にするために、ビーズと細胞とが一緒に混合される体積を相当減少させる（例えば、細胞の濃度を増加させる）ことが望ましい場合がある。例えば、一態様では、２０億細胞／ｍＬの濃度が使用される。一態様では、１０億細胞／ｍＬの濃度が使用される。さらなる態様では、１億細胞／ｍＬ超が使用される。さらなる態様では、１０００万、１５００万、２０００万、２５００万、３０００万、３５００万、４０００万、４５００万、または５０００万細胞／ｍＬの濃度が使用される。さらなる一態様では、７５００万、８０００万、８５００万、９０００万、９５００万、または１億細胞／ｍＬからの濃度が使用される。さらなる態様では、１億２５００または１億５０００万細胞／ｍＬの濃度を使用することができる。高い濃度を使用すると、細胞収率、細胞活性化、及び細胞拡大を増大させることができる。さらに、高い細胞濃度を使用すると、ＣＤ２８－ネガティブＴ細胞などの、関心対象の標的抗原を弱く発現し得る細胞をより効率的に捕捉することができ、または多くの腫瘍細胞が存在する試料（例えば、白血病血液、腫瘍組織など）から、より効率的に捕捉することができる。そのような細胞集団は、治療的価値を有することがあり、得ることが望ましいと思われる。例えば、高濃度の細胞を使用すると、通常、より弱いＣＤ２８の発現を有するＣＤ８＋Ｔ細胞を、より効率的に選択することができる。

【０２８７】

[0310] 関連する態様では、低い方の細胞濃度を使用することが望ましい場合がある。Ｔ細胞と表面（例えば、ビーズなどの粒子）との混合物を相当希釈することによって、粒子と細胞の間の相互作用が最小限に抑えられる。これは、粒子に結合する所望の抗原を豊富に発現する細胞を選択する。例えば、ＣＤ４＋Ｔ細胞は、より高いレベルのＣＤ２８を発現し、希釈濃度でＣＤ８＋Ｔ細胞より効率的に捕捉される。一態様では、使用される細胞濃度は、５×１０^{6}／ｍＬである。他の態様では、使用される濃度は、約１×ｌ０^{5}／ｍＬ～１×ｌ０^{6}／ｍＬ、及びその間の任意の整数値であり得る。他の態様では、細胞は、ローテーター上で、様々な長さの時間、様々な速度で、２～１０℃または室温のいずれかでインキュベートされてもよい。

【０２８８】

[0311] 刺激のためのＴ細胞は、洗浄ステップ後に凍結することもできる。理論に束縛されることを望むものではないが、凍結及び後続の解凍ステップによって、細胞集団中の

顆粒球及びある程度の単球が除去されることによって、より均一な産物が得られる。血漿及び血小板を除去する洗浄ステップ後に、細胞は、凍結溶液中に懸濁されてもよい。多くの凍結溶液及びパラメータが当技術分野で公知であり、これとの関係で有用であるが、一方法は、２０％ＤＭＳＯ及び８％ヒト血清アルブミンを含有するＰＢＳ、または１０％デキストラン４０及び５％デキストロース、２０％ヒト血清アルブミン、及び７．５％ＤＭＳＯを含有する培養培地、もしくは３１．２５％Ｐｌａｓｍａｌｙｔｅ－Ａ、３１．２５％デキストロース５％、０．４５％ＮａＣｌ、１０％デキストラン４０及び５％デキストロース、２０％ヒト血清アルブミン、ならびに７．５％ＤＭＳＯを含有する培養培地、あるいは、例えば、Ｈｅｓｐａｎ及びＰｌａｓｍａＬｙｔｅ　Ａを含有する他の適切な細胞凍結培地を使用することを含み、次いで、細胞は、－８０℃まで１／分の速度で凍結され、液体窒素貯蔵タンクの気相で保存される。その他の制御凍結法だけでなく、即時に－２０℃にする、または液体窒素中での非制御凍結も使用されてもよい。ある種の態様では、凍結保存された細胞は、本明細書に記載するように解凍及び洗浄され、室温で１時間静置され、その後本開示の方法を使用して活性化される。

【０２８９】

[0312] 本開示との関係において企図するのはまた、本明細書に記載するように拡大させた細胞が必要になると思われる時期より前の時期に、対象から血液試料またはアフェレーシス産物を収集することである。そのため、拡大させようとする細胞の源は、任意の必要な時点で収集することができ、Ｔ細胞などの所望の細胞を単離及び凍結して、Ｔ細胞療法から利益を得ると思われる本明細書に記載するものなどの幾つもの疾患または状態のために、後でＴ細胞療法に使用することができる。一態様では、血液試料またはアフェレーシスは、全般的に健常な対象から採取される。ある種の態様では、血液試料またはアフェレーシスは、疾患を発症するリスクがあるが疾患をまだ発症していない、全般的に健常な対象から採取され、関心対象の細胞が、後で使用するために単離及び凍結される。ある種の態様では、Ｔ細胞は、拡大され、凍結され、後で使用されてもよい。ある種の態様では、試料は、本明細書に記載するような特定の疾患の診断の直後に、任意の治療の前に患者から収集される。さらなる態様では、細胞は、幾つもの関連する治療法、例えば、限定するものではないが、作用物質、例えば、ナタリズマブ、エファリズマブ、抗ウイルス剤、化学療法、放射線、免疫抑制剤、例えば、シクロスポリン、アザチオプリン、メトトレキサート、及びミコフェノレート、抗体、または他の免疫除去剤、例えば、アレムツズマブ、抗ＣＤ３抗体、シトキサン、フルダラビン、シクロスポリン、タクロリムス、ラパマイシン、ミコフェノール酸、ステロイド、ロミデプシン、ならびに放射線照射での治療の前に、対象からの血液試料またはアフェレーシスから単離される。

【０２９０】

[0313] 本開示のさらなる態様では、Ｔ細胞は、対象に機能性Ｔ細胞を残す治療に続いて、患者から直接得られる。これに関して、ある種のがん治療、特に免疫系を損傷する薬物での治療に続く、治療の直後で患者が通常治療から回復しようとする期間中に得られたＴ細胞の質は、ｅｘ　ｖｉｖｏでの拡大能力に関して最適であり得るか、または向上したものであり得ることが観察されている。同様に、本明細書に記載する方法を使用するｅｘ　ｖｉｖｏでの操作後に、これらの細胞は、生着及びｉｎ　ｖｉｖｏでの拡大の強化に好ましい状態にあり得る。よって、本開示との関係において、Ｔ細胞、樹状細胞、または他の造血系細胞を含む血液細胞をこの回復期の間に収集することが企図される。さらに、ある種の態様では、動員（例えば、ＧＭ－ＣＳＦでの動員）及び移植前処置を使用して、とりわけ、療法後の所定の時間枠の間に、対象に、特定の細胞型の再増殖、再循環、再生、及び／または拡大が好ましい状態を作り出すことができる。実例となる細胞型として、Ｔ細胞、Ｂ細胞、樹状細胞、及び免疫系の他の細胞が挙げられる。

【０２９１】

<u>Ｔ細胞の活性化及び拡大</u>

[0314] Ｔ細胞は、一般に、例えば、米国特許第６，３５２，６９４号；第６，５３４，０５５号；第６，９０５，６８０号；第６，６９２，９６４号；第５，８５８，３５８

号；第６，８８７，４６６号；第６，９０５，６８１号；第７，１４４，５７５号；第７，０６７，３１８号；第７，１７２，８６９号；第７，２３２，５６６号；第７，１７５，８４３号；第５，８８３，２２３号；第６，９０５，８７４号；第６，７９７，５１４号；第６，８６７，０４１号；及び第７，５７２，６３１号に記載される方法を使用して、活性化及び拡大させてもよい。

【０２９２】

[0315] 一般に、本開示のＴ細胞は、ＣＤ３／ＴＣＲ複合体に関連するシグナルを刺激する作用物質が結合された表面と、Ｔ細胞の表面上の共刺激分子を刺激するリガンドとの接触によって拡大し得る。特に、Ｔ細胞集団は、本明細書に記載するように、例えば、抗ＣＤ３抗体もしくはその抗原結合断片、または表面上に固定化された抗ＣＤ２抗体との接触によって、またはカルシウムイオノフォアと併せたプロテインキナーゼＣ活性化剤（例えば、ブリオスタチン）との接触によって刺激することができる。Ｔ細胞の表面上のアクセサリー分子の共刺激については、アクセサリー分子に結合するリガンドが使用される。例えば、Ｔ細胞の集団は、Ｔ細胞の増殖を刺激するのに適した条件下で、抗ＣＤ３抗体及び抗ＣＤ２８抗体と接触させることができる。ＣＤ４＋Ｔ細胞またはＣＤ８＋Ｔ細胞のいずれかの増殖を刺激するためには、抗ＣＤ３抗体及び抗ＣＤ２８抗体である。抗ＣＤ２８抗体の例として、９．３、Ｂ－Ｔ３、ＸＲ－ＣＤ２８（Ｄｉａｃｌｏｎｅ，Ｂｅｓａｎｃｏｎ，Ｆｒａｎｃｅ）が挙げられ、当技術分野で一般に公知の他の方法を使用することができる（Ｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．，Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ Ｐｒｏｃ．３０（８）：３９７５－３９７７，１９９８；Ｈａａｎｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１９０（９）：１３１９１３２８，１９９９；Ｇａｒｌａｎｄ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈ．２２７（１－２）：５３－６３，１９９９）。

【０２９３】

[0316] 異なる刺激時間に曝露されたＴ細胞は、異なる特徴を呈し得る。例えば、典型的な血液またはアフェレーシスで得られた末梢血の単核細胞産物は、細胞傷害性またはサプレッサーＴ細胞集団（ＴＣ、ＣＤ８＋）より多いヘルパーＴ細胞集団（ＴＨ、ＣＤ４＋）を有する。ＣＤ３及びＣＤ２８受容体を刺激することによってＴ細胞をｅｘ ｖｉｖｏで拡大させると、約８～９日目前では主にＴＨ細胞からなるＴ細胞集団が産生されるが、約８～９日目から後では、Ｔ細胞集団は、次第に大きくなるＴＣ細胞集団を含む。したがって、治療目的に応じて、主にＴＨ細胞を含むＴ細胞集団を対象に注入することが有利であり得る。同様に、ＴＣ細胞の抗原特異的サブセットを単離したならば、このサブセットをより大きく拡大させることが有益であり得る。

【０２９４】

[0317] さらに、ＣＤ４及びＣＤ８マーカーに加えて、他の表現型マーカーが相当に変動するが、大部分は、細胞拡大プロセスの過程において再現性が良い。よって、そのような再現性によって活性化Ｔ細胞産物を特定の目的に合わせる能力が可能になる。

【０２９５】

[0318] 抗ＣＤ１９ 抗ＢＣＭＡ、抗ＣＤ２２、抗ＰＤ１、抗ＭＵＣ１６、抗ＩＬ１３Ｒ２ａ２、抗ＥｐｈＡ２、抗ＥＧＦＲｖＩＩＩ、抗ＲＯＲ１、抗ＰＤ－１、または抗ＢＡＦＦ ＴＦＰ、ＣＡＲ、またはＴＣＲが構築されたら、様々なアッセイを使用して、限定するものではないが、抗原刺激に続いてＴ細胞を拡大させる能力、再刺激の非存在下でＴ細胞の拡大を持続する能力、及び適正なｉｎ ｖｉｔｒｏ及び動物モデルでの抗がん活性などの、分子の活性を評価することができる。抗ＴＡＡ ＴＦＰ、ＣＡＲ、またはＴＣＲの効果を評価するアッセイについては、以下でさらに詳述する。

【０２９６】

[0319] 初代Ｔ細胞でのＴＦＰ発現のウェエスタンブロット解析を使用して、単量体及び二量体の存在を検出することができる（例えば、Ｍｉｌｏｎｅ ｅｔ ａｌ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ １７（８）：１４５３－１４６４（２００９）を参照されたい）。極めて簡潔に述べると、ＴＦＰを発現するＴ細胞（ＣＤ４＋Ｔ細胞とＣＤ８＋Ｔ細胞との１：１混合物）をｉｎ ｖｉｔｒｏで１０日間より長く拡大させ、続いて溶解さ

せ、還元条件下でＳＤＳ－ＰＡＧＥを行う。ＴＦＰを、ＴＣＲ鎖に対する抗体を使用するウェエスタンブロット法によって検出する。同じＴ細胞サブセットを非還元条件下でＳＤＳ－ＰＡＧＥ解析に使用すれば、共有結合二量体の形成を評価することができる。

【０２９７】

[0320] 抗原刺激に続くＴＦＰ＋Ｔ細胞またはＣＡＲ＋Ｔ細胞またはＴＣＲ＋Ｔ細胞のｉｎ ｖｉｔｒｏでの拡大は、フローサイトメトリーによって測定することができる。例えば、ＣＤ４＋Ｔ細胞とＣＤ８＋Ｔ細胞との混合物をαＣＤ３／αＣＤ２８及びＡＰＣで刺激し、続いて、解析されるＧＦＰをプロモーターの制御下で発現するレンチウイルスベクターで形質導入する。例示的なプロモーターとして、ＣＭＶ ＩＥ遺伝子、ＥＦ－１α、ユビキチンＣ、またはホスホグリセロキナーゼ（ＰＧＫ）プロモーターが挙げられる。ＧＦＰの蛍光は、ＣＤ４＋及び／またはＣＤ８＋Ｔ細胞サブセットでの培養の６日目に、フローサイトメトリーによって評価する（例えば、Ｍｉｌｏｎｅ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ １７（８）：１４５３－１４６４（２００９）を参照されたい）。あるいは、ＣＤ４＋Ｔ細胞とＣＤ８＋Ｔ細胞との混合物をαＣＤ３／αＣＤ２８被覆磁気ビーズで０日目に刺激し、２Ａリボソームスキッピング配列を使用してＴＦＰと共にｅＧＦＰを発現するバイシストロニックレンチウイルスベクターを使用して、１日目にＴＦＰを形質導入する。培養物を、洗浄に続いて、ＣＤ１９＋Ｋ５６２細胞（Ｋ５６２－ＣＤ１９）、野生型Ｋ５６２細胞（Ｋ５６２野生型）、または抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８抗体の存在下でｈＣＤ３２及び４－１ＢＢＬを発現するＫ５６２細胞（Ｋ５６２－ＢＢＬ－３／２８）のいずれかで再刺激する。外因性ＩＬ－２を１日おきに１００ＩＵ／ｍＬで培養物に添加する。ＧＦＰ＋Ｔ細胞を、フローサイトメトリーによってビーズに基づく計数を使用して計数する（例えば、Ｍｉｌｏｎｅ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ １７（８）：１４５３－１４６４（２００９）を参照されたい）。

【０２９８】

[0321] 再刺激の非存在下でのＣＡＲ＋、ＴＣＲ＋、またはＴＦＰ＋Ｔ細胞の拡大の持続も測定することができる（例えば、Ｍｉｌｏｎｅ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ １７（８）：１４５３－１４６４（２００９）を参照されたい）。簡潔に述べると、０日目にαＣＤ３／αＣＤ２８被覆磁気ビーズで刺激し、１日目に指定のＴＦＰを形質導入した後、培養８日目にＣｏｕｌｔｅｒ Ｍｕｌｔｉｓｉｚｅｒ ＩＩＩ粒子計数器を使用して平均Ｔ細胞体積（ｆｌ）を測定する。

【０２９９】

[0322] 動物モデルを使用してＴＦＰ－Ｔ活性を測定することもできる。例えば、免疫不全マウスにおいて初代ヒトプレＢ ＡＬＬを治療するためのヒトＣＤ１９特異的ＴＦＰ＋Ｔ細胞を使用する異種移植モデルを使用することができる（例えば、Ｍｉｌｏｎｅ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ １７（８）：１４５３－１４６４（２００９）を参照されたい）。極めて簡潔に述べると、ＡＬＬの確立後、マウスを処置群に従って無作為化する。様々な数の操作したＴ細胞を、１：１の比率で、Ｂ－ＡＬＬを有するＮＯＤ／ＳＣＩＤ／γ－／－マウスに同時注射する。マウスからの脾臓ＤＮＡ中の各ベクターのコピー数を、Ｔ細胞注射後の様々な時点で評価する。動物は、１週間間隔で白血病について査定する。αＣＤ１９－ζＴＦＰ＋Ｔ細胞または偽の形質導入されたＴ細胞を注射されたマウスにおける末梢血ＣＤ１９＋Ｂ－ＡＬＬ芽細胞数を測定する。これらの群についての生存曲線を、ログランク検定を使用して比較する。加えて、ＮＯＤ／ＳＣＩＤ／γ－／－マウスにＴ細胞を注射してから４週間後の末梢血ＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞の絶対数も解析することができる。マウスに白血病細胞を注射し、３週間後に、ｅＧＦＰに連結されたＴＦＰをコードするバイシストロニックレンチウイルスベクターによってＴＦＰを発現するように操作したＴ細胞を注射する。Ｔ細胞は、注射前に偽の形質導入細胞と混合することによって４５～５０％入力ＧＦＰ＋Ｔ細胞に正規化し、フローサイトメトリーによって確認する。動物は、１週間間隔で白血病について査定する。ＴＦＰ＋Ｔ細胞群についての生存曲線を、ログランク検定を使用して比較する。

【０３００】

[0323] 用量依存的なＴＦＰ処置応答を評価することができる（例えば、Ｍｉｌｏｎｅ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ １７（８）：１４５３－１４６４（２００９）を参照されたい）。例えば、ＴＦＰ Ｔ細胞、同等数の偽の形質導入Ｔ細胞を２１日目に注射したマウス、またはＴ細胞を注射しなかったマウスにおける末梢血を、白血病の確立から３５～７０日後に得る。末梢血ＣＤ１９＋ＡＬＬ芽細胞数を決定するために各群からのマウスを無作為に採血し、３５日目及び４９日目に 殺する。残りの動物は、５７日目及び７０日目に評価する。

【０３０１】

[0324] 細胞増殖及びサイトカイン産生の査定については、例えば、Ｍｉｌｏｎｅ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ １７（８）：１４５３－１４６４（２００９）で前に記載されている。非限定的な一例では、ＴＦＰ媒介増殖の査定は、例えば、マイクロタイタープレート内で、洗浄したＴ細胞を、ＣＤ１９（Ｋ１９）またはＣＤ３２及びＣＤ１３７（ＫＴ３２－ＢＢＬ）を発現するＫ５６２細胞と、最終Ｔ細胞：Ｋ５６２の比率が２：１になるように混合することによって実施する。Ｋ５６２細胞には、使用前にγ放射線を照射する。抗ＣＤ３モノクローナル抗体（クローンＯＫＴ３）及び抗ＣＤ２８モノクローナル抗体（クローン９．３）をＫＴ３２－ＢＢＬ細胞を有する培養物に添加して、Ｔ細胞増殖刺激の陽性対照とする。何故なら、これらのシグナルは、ｅｘ ｖｉｖｏでの長期のＣＤ８＋Ｔ細胞の拡大を支援するからである。ＣｏｕｎｔＢｒｉｇｈｔ（商標）蛍光ビーズ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）及びフローサイトメトリーを製造業者によって記載されるように使用して、Ｔ細胞を培養物中で計数する。ＴＦＰ＋Ｔ細胞は、ｅＧＦＰ－２Ａを連結したＴＦＰ発現レンチウイルスベクターで操作したＴ細胞を使用して、ＧＦＰ発現によって特定する。ＧＦＰを発現しないＴＦＰ＋Ｔ細胞の場合、ＴＦＰ＋Ｔ細胞は、ビオチン化組み換えＣＤ１９タンパク質及び二次アビジン－ＰＥコンジュゲートを用いて検出する。Ｔ細胞上のＣＤ４＋及びＣＤ８＋の発現も、特異的モノクローナル抗体（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いて同時に検出する。サイトカインの測定は、ヒトＴＨ１／ＴＨ２サイトカインサイトメトリックビーズアレイキット（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を製造業者の使用説明書に従って使用して、再刺激から２４時間後に収集した上清で実施する。ＦＡＣＳｃａｌｉｂｕｒ（商標）フローサイトメーター（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して蛍光を査定し、製造業者の使用説明書に従ってデータを解析する。

【０３０２】

[0325] 細胞傷害性は、標準的な５１Ｃｒ放出アッセイによって査定することができる（例えば、Ｍｉｌｏｎｅ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ １７（８）：１４５３－１４６４（２００９）を参照されたい）。標的細胞（Ｋ５６２株及び初代ｐｒｏ－Ｂ－ＡＬＬ細胞）に、３７℃で２時間頻繁に撹拌しながら５１Ｃｒ（ＮａＣｒＯ４として、Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｎｕｃｌｅａｒ）を加え、完全ＲＰＭＩ中で２回洗浄し、マイクロタイタープレート内に播種する。エフェクターＴ細胞を、ウェル内の完全ＲＰＭＩ中で、様々なエフェクター細胞：標的細胞（Ｅ：Ｔ）比で標的細胞と混合する。培地のみ（自然放出、ＳＲ）またはＴｒｉｔｏｎ－Ｘ１００界面活性剤の１％溶液（全放出、ＴＲ）を含有するさらなるウェルも調製する。３７℃で４時間のインキュベーション後に、各ウェルからの上清を採集する。次いで、γ粒子カウンター（Ｐａｃｋａｒｄ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔ Ｃｏ．，Ｗａｌｔｈａｍ，Ｍａｓｓ）を使用して、放出される５１Ｃｒを測定する。各条件を少なくとも３連で実施し、次式を使用して溶解率（％）を算出する：溶解（％）＝（ＥＲ－ＳＲ）／（ＴＲ－ＳＲ）（式中、ＥＲは、各実験条件で放出された平均５１Ｃｒを表す）。

【０３０３】

[0326] イメージング技術を使用して、腫瘍を有する動物モデルにおけるＴＦＰの特異的輸送及び増殖を評価することができる。そのようなアッセイは、例えば、Ｂａｒｒｅｔｔ ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ２２：１５７５－１５８６（２０１１）に記載されている。ＮＯＤ／ＳＣＩＤ／γｃ－／－（ＮＳＧ）マウスにＮａ

ｌｍ－６細胞（ＡＴＣＣ（登録商標）ＣＲＬ－３２７３（商標））をＩＶ注射し、その７日後に、ＴＦＰ構築物でのエレクトロポレーションから４時間後のＴ細胞を注射する。そのＴ細胞に、ホタルルシフェラーゼを発現するようにレンチウイルス構築物で安定的に形質移入し、マウスを生物発光について撮像する。あるいは、Ｎａｌｍ－６異種移植モデルにおける単回注射のＴＦＰ＋Ｔ細胞の治療効力及び特異性を、次のように測定することができる。ＮＳＧマウスに、ホタルルシフェラーゼを安定的に発現するように形質導入したＮａｌｍ－６を注射し、続いて７日後に、ＣＤ１９　ＴＦＰをエレクトロポレーションしたＴ細胞を単回尾静脈注射する。注射後の様々な時点で、動物を撮像する。例えば、代表的なマウスにおけるホタルルシフェラーゼ陽性白血病の光子密度ヒートマップを、５日目（処置の２日前）及び８日目（ＴＦＰ＋　ＰＢＬの２４時間後）に生成することができる。

【０３０４】

[0327] 本明細書の実施例の項に記載するものだけでなく、当技術分野で公知のものを含めた他のアッセイも、本明細書に開示する抗ＣＤ１９、抗ＢＣＭＡ、抗ＩＬ１３Ｒａ２、ＭＵＣ１６、ＥｐｈＡ２　ＥＧＦＲｖＩＩＩ、抗ＣＤ２２、抗ＲＯＲ１、抗ＰＤ１、または抗ＢＡＦＦ　ＴＦＰ構築物を評価するために使用することができる。

【０３０５】

医薬組成物

[0328] 本明細書で開示するのは、幾つかの実施形態では、（ａ）本開示の改変免疫細胞と、（ｂ）医薬として許容される担体とを含む医薬組成物である。そのような組成物は、緩衝液、例えば、中性緩衝生理食塩水、リン酸緩衝食塩水など；炭水化物、例えば、グルコース、マンノース、スクロース、またはデキストラン、マンニトール；タンパク質；ポリペプチドまたはアミノ酸、例えば、グリシン；酸化防止剤；キレート剤、例えば、ＥＤＴＡ、またはグルタチオン；アジュバント（例えば、水酸化アルミニウム）；及び防腐剤を含んでもよい。本開示の組成物は、一態様では、静脈内投与用に製剤化される。

【０３０６】

[0329] 本開示の医薬組成物は、治療しようとする（または予防しようとする）疾患に適した方式で投与されてもよい。適正な投与量は、臨床試験によって決定されてもよいが、投与の分量及び頻度は、患者の状態、及び患者の疾患のタイプ及び重症度などの因子によって決定されることとなる。

【０３０７】

[0330] 一実施形態では、医薬組成物は、例えば、エンドトキシン、マイコプラズマ、複製可能なレンチウイルス（ＲＣＬ）、ｐ２４、ＶＳＶ－Ｇ核酸、ＨＩＶ　ｇａｇ、残留する抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８被覆ビーズ、マウス抗体、プールヒト血清、ウシ血清アルブミン、ウシ血清、培養培地成分、ベクターパッケージング細胞またはプラスミド成分、細菌、及び真菌からなる群から選択される混入物質を実質的に含まない。例えば、検出可能レベルのこれらの混入物質が存在しない。一実施形態では、細菌は、Ａｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ　ｆａｅｃａｌｉｓ、Ｃａｎｄｉｄａ　ａｌｂｉｃａｎｓ、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ、Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ　ｉｎｆｌｕｅｎｚａ、Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ　ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｅｓ、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｎｅｕｍｏｎｉａ、及びＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ａ群からなる群から選択される少なくとも１種である。

【０３０８】

[0331] 「免疫学的有効量」、「抗腫瘍有効量」、「腫瘍阻害有効量」、または「治療量」が示されるとき、投与しようとする本開示の組成物の正確な量は、患者（対象）の年齢、体重、腫瘍サイズ、感染症または転移の程度、及び状態の個体差を考慮して、医師によって決定され得る。一般論として述べると、本明細書に記載するＴ細胞を含む医薬組成物は、10^4～10^9細胞／ｋｇ体重、幾つかの場合では、10^5～10^6細胞／ｋｇ体重（これらの範囲内のすべての整数値を含む）の投与量で投与されてもよい。Ｔ細胞組成物はまた、これらの投与量で複数回投与されてもよい。細胞は、免疫療法で一般に公知の

注入技法を使用することによって投与することができる（例えば、Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎｅｗ Ｅｎｇ．Ｊ．ｏｆ Ｍｅｄ．３１９：１６７６，１９８８を参照されたい）

[0332] ある種の態様では、活性化Ｔ細胞を対象に投与し、その後続いて再採血し（またはアフェレーシスを行い）、そこからのＴ細胞を本開示に従って活性化し、活性化及び拡大させたＴ細胞を患者に再注入することが所望されることがある。このプロセスは、数週間毎に複数回実施することができる。ある種の態様では、Ｔ細胞は、１０ｃｃ～４００ｃｃの採取血液から活性化することができる。ある種の態様では、Ｔ細胞は、２０ｃｃ、３０ｃｃ、４０ｃｃ、５０ｃｃ、６０ｃｃ、７０ｃｃ、８０ｃｃ、９０ｃｃ、または１００ｃｃの採取血液から活性化される。

【０３０９】

[0333] 主題組成物の投与は、エアロゾル吸入、注射、経口摂取、輸血、埋め込み、または移植による方式を含めた、任意の便利な方式で行われてもよい。本明細書に記載する組成物は、患者に、経動脈的に、皮下に、皮内に、腫瘍内に、節内に、髄内に、筋肉内に、静脈内（ｉ．ｖ．）注射により、または腹腔内に投与されてもよい。一態様では、本開示のＴ細胞組成物は、患者に、皮内または皮下注射によって投与される。一態様では、本開示のＴ細胞組成物は、ｉ．ｖ．注射によって投与される。Ｔ細胞の組成物は、腫瘍、リンパ節、または感染症の部位に直接注射されてもよい。

【０３１０】

[0334] 特定の例示的な態様では、対象は、白血球搬出法を受けてもよく、この方法では、白血球が、ｅｘ ｖｉｖｏで収集、濃厚化、または除去されて、関心対象の細胞、例えば、Ｔ細胞が選択及び／または単離される。これらのＴ細胞単離物は、当技術分野で公知の方法によって拡大されてもよく、本開示の１つまたは複数のＴＦＰ構築物が導入され、それによって本開示の改変Ｔ－Ｔ細胞を作出することができるように処理されてもよい。それを必要とする対象は、その後、高用量の化学療法での標準的治療に続いて末梢血幹細胞移植を受けてもよい。ある種の態様では、移植に続いて、または移植と同時に、対象は、本開示の拡大された改変ヒト免疫細胞の注入を受ける。さらなる態様において、拡大された細胞は、手術の前または手術に続いて投与される。

【０３１１】

[0335] 患者に投与しようとする上記治療の投与量は、治療されている状態の正確な性質及び治療のレシピエントに応じて異なることとなる。ヒトに投与する場合の投与量の調整は、当技術分野に受け入れられている慣例に従って実施することができる。例えば、アレムツズマブの用量は、一般に、成人患者には１～約１００ｍｇの範囲内であり、通常、１～３０日間の期間にわたって毎日投与される。好ましい日用量は、１日当たり１～１０ｍｇであるが、幾つかの場合では、１日当たり４０ｍｇまでの、より多い用量が使用されてもよい（米国特許第６，１２０，７６６号に記載されている）。

【０３１２】

[0336] 一実施形態では、ＴＦＰは、Ｔ細胞に、例えば、ｉｎ ｖｉｔｒｏ転写を使用して導入され、対象（例えば、ヒト）は、本開示のＴＦＰ Ｔ細胞の初回投与、及び本開示のＴＦＰ Ｔ細胞の１回または複数回の後続投与を受け、１回または複数回の後続投与は、前の投与後１５日未満、例えば、１４、１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３、または２日未満に施される。一実施形態では、１週間当たり複数回以上の本開示のＴＦＰ Ｔ細胞の投与が、対象（例えば、ヒト）に施され、例えば、１週間当たり、２、３、または４回の本開示のＴＦＰ Ｔ細胞の投与が施される。一実施形態では、対象（例えば、ヒト対象）は、１週間当たり複数回以上のＴＦＰ Ｔ細胞の投与を受け（例えば、１週間当たり２、３、または４回の投与）（本明細書ではサイクルとも呼ばれる）、続いて１週間はＴＦＰ Ｔ細胞の投与を受けず、次いで１回または複数回のＴＦＰ Ｔ細胞の追加投与（例えば、１週間当たり複数回以上のＴＦＰ Ｔ細胞の投与）が対象に施される。別の実施形態では、対象（例えば、ヒト対象）は、２回以上のサイクルのＴＦＰ Ｔ細胞を受け、各サイクルの間の時間は、１０、９、８、７、６、５、４、または３日未

満である。一実施形態では、ＴＦＰ　Ｔ細胞は、１日おきに投与されて、１週間当たり３回投与される。一実施形態では、本開示のＴＦＰ　Ｔ細胞は、少なくとも２、３、４、５、６、７、８週間またはそれ以上にわたって投与される。

【０３１３】

[0337] 一態様では、抗ＴＡＡ　ＴＦＰ　Ｔ細胞またはＣＡＲ　Ｔ細胞またはＴＣＲ　Ｔ細胞は、レンチウイルスなどのレンチウイルスベクターを使用して生成される。そのように生成されたＴＦＰ－Ｔ細胞は、安定なＴＦＰ発現を有する。別の態様では、Ｔ抗ＴＡＡＴＦＰ　Ｔ細胞またはＣＡＲ　Ｔ細胞またはＴＣＲ　Ｔ細胞。

【０３１４】

[0338] 一態様では、ＴＦＰ　Ｔ細胞は、形質導入後、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５日間、ＴＦＰベクターを一過性に発現する。ＴＦＰの一過性発現は、ＲＮＡ　ＴＦＰベクター送達によって行うことができる。一態様では、ＴＦＰ　ＲＮＡは、エレクトロポレーションによってＴ細胞に形質導入される。

【０３１５】

[0339] 一過性に発現するＴＦＰ　Ｔ細胞（特に、マウスｓｃＦｖを有するＴＦＰ　Ｔ細胞）を使用して治療されている患者に生じるおそれがある潜在的な問題は、複数回の治療後のアナフィラキシーである。

【０３１６】

[0340] この理論に束縛されるものではないが、そのようなアナフィラキシー反応は、患者において体液性抗ＴＦＰ応答、すなわち、抗ＩｇＥアイソタイプを有する抗ＴＦＰ抗体が発生していることによって引き起こされる可能性があると考えられる。患者の抗体産生細胞は、抗原への曝露が１０～１４日間中断されると、ＩｇＧアイソタイプ（アナフィラキシーを引き起こさない）からＩｇＥアイソタイプへのクラススイッチを受けると思われる。

【０３１７】

[0341] 患者が一過性ＴＦＰ療法の過程で抗ＴＦＰ抗体応答（ＲＮＡ形質導入によって生成されるものなど）を生じるリスクが高いならば、ＴＦＰ　Ｔ細胞注入の中断は、１０日～１４日より長く続けるべきではない。

【０３１８】

治療方法

[0342] 本明細書に開示するのは、幾つかの実施形態では、それを必要とする対象においてがんを治療する方法であって、該対象に治療的有効量の本明細書に開示する医薬組成物及び製剤を投与することを含む方法である。本明細書にさらに開示するのは、幾つかの実施形態では、それを必要とする対象においてがんを治療する方法であって、該対象に（ａ）本明細書に開示する方法によって生成された改変ヒト免疫細胞と（ｂ）医薬として許容される担体とを含む医薬組成物を投与することを含む方法である。本明細書にさらに開示するのは、幾つかの実施形態では、それを必要とする対象においてがんを治療する方法であって、該対象に（ａ）本明細書に開示する環状ＲＮＡ分子またはベクターの１つを含むペイロードを含有する送達デバイス（例えば、リポソーム）と（ｂ）医薬として許容される担体とを含む医薬組成物を投与することを含む。

【０３１９】

[0343] 幾つかの場合では、改変ヒト免疫細胞は同種異系Ｔ細胞である。幾つかの実施形態では、改変ヒト免疫細胞は自己Ｔ細胞である。幾つかの実施形態では、改変ヒト免疫細胞はリンパ芽球細胞である。幾つかの場合では、該対象において、有効量の非改変対照Ｔ細胞を投与された対象と比較して少ないサイトカインが放出される。幾つかの場合では、該対象において、本明細書に開示する組み換え核酸または本明細書に開示するベクターを含む有効量の改変ヒト免疫細胞を投与された対象と比較して、少ないサイトカインが放出される。

【０３２０】

[0344] 幾つかの場合では、該方法は、医薬製剤を、医薬製剤の効力を増大させる作用

物質と組み合わせて投与することを含む。幾つかの場合では、該方法は、医薬製剤を、医薬組成物に関連する１つまたは複数の副作用を改善する作用物質と組み合わせて投与することを含む。

【０３２１】

[0345] 幾つかの場合では、がんは、固形がん、リンパ腫、または白血病である。幾つかの実施形態では、がんは、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、副腎皮質癌、肛門癌、虫垂癌、星状細胞腫、基底細胞癌、脳腫瘍、胆管癌、膀胱癌、骨癌、乳癌、気管支腫瘍、原発不明癌、心臓腫瘍、子宮頚癌、脊索腫、結腸癌、結腸直腸癌、頭蓋咽頭管腫瘍、腺管癌、胚芽腫、子宮内膜癌、脳室上衣腫、食道癌、感覚神経芽細胞腫、線維性組織球腫、ユーイング肉腫、眼癌、胚細胞腫瘍、胆嚢癌、胃癌、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍、妊娠性絨毛性疾患、神経膠腫、頭頸部癌、肝細胞癌、組織球増殖症、ホジキンリンパ腫、下咽頭癌、眼球内黒色腫、島細胞腫瘍、カポジ肉腫、腎臓癌、ランゲルハンス細胞組織球症、喉頭癌、口唇及び口腔癌、肝臓癌、上皮内小葉癌、肺癌、マクログロブリン血症、悪性線維性組織球腫、メラノーマ、メルケル細胞癌、中皮腫、原発不明の転移性頸部扁平上皮癌、ＮＵＴ遺伝子に関連する正中線上の癌、口腔癌、多発性内分泌腫瘍症候群、多発性骨髄腫、菌状息肉腫、骨髄異形成症候群、骨髄異形成／骨髄増殖性腫瘍、鼻副鼻腔癌（ｎａｓａｌ　ｃａｖｉｔｙ　ａｎｄ　ｐａｒ　ｎａｓａｌ　ｓｉｎｕｓ　ｃａｎｃｅｒ）、鼻咽頭癌、神経芽細胞腫、非小細胞肺癌、中咽頭癌、骨肉腫、卵巣癌、膵癌、乳頭腫症、傍神経節腫、副甲状腺癌、陰茎癌、咽頭癌、褐色細胞腫、下垂体腫瘍、胸膜肺芽腫、原発性中枢神経系リンパ腫、前立腺癌、直腸癌、腎細胞癌、腎盂尿管癌、網膜芽細胞腫、ラブドイド腫瘍、唾液腺癌、セザリー症候群、皮膚癌、小細胞肺癌、小腸癌、軟部肉腫、脊髄腫瘍、胃癌、Ｔ細胞リンパ腫、奇形腫、精巣癌、咽喉癌、胸腺腫及び胸腺癌、甲状腺癌、尿道癌、子宮癌、腟癌、外陰癌、ならびにウィルムス腫瘍からなる群から選択される。

【０３２２】

[0346] いかなる特定の理論にも束縛されることを望むものではないが、改変ヒト免疫細胞によって誘発される抗腫瘍免疫応答は、能動免疫応答でも受動免疫応答でもよく、あるいは、直接対間接免疫応答によるものであってもよい。

【０３２３】

[0347] 一態様では、本開示の改変ヒト免疫細胞は、哺乳動物におけるｅｘ　ｖｉｖｏでの免疫化及び／またはｉｎ　ｖｉｖｏ療法のためのワクチンの一種である。一態様では、哺乳動物はヒトである。

【０３２４】

[0348] ｅｘ　ｖｉｖｏでの免疫化に関して、細胞を哺乳動物に投与する前に、次のうちの少なくとも１つがｉｎ　ｖｉｔｒｏで行われる：ｉ）細胞の拡大、ｉｉ）ＴＦＰまたはＴＣＲまたはＣＡＲと、ＴＣＲα、β、γ、及び／またはδ定常ドメインとをコードする核酸の細胞への導入、あるいはｉｉｉ）細胞の凍結保存。

【０３２５】

[0349] ｅｘ　ｖｉｖｏでの手順は、当技術分野で周知であり、以下でより詳細に考察する。簡潔に述べると、細胞を哺乳動物（例えば、ヒト）から単離し、本明細書に開示するベクターで遺伝子改変する（すなわち、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで形質導入または形質移入する）。改変ヒト免疫細胞は、哺乳動物のレシピエントに投与して、治療上の利益をもたらすことができる。哺乳動物のレシピエントは、ヒトであってもよく、改変細胞は、レシピエントに対して自己由来であり得る。あるいは、細胞は、レシピエントに対して同種異系、同系、または異種であり得る。

【０３２６】

[0350] 造血幹細胞及び前駆細胞をｅｘ　ｖｉｖｏで拡大させる手順については、例えば、米国特許第５，１９９，９４２号（参照により本明細書に援用される）に記載されており、本開示の細胞に適用することができる。他の適切な方法が当技術分野で公知であり、したがって、本開示は、細胞をｅｘ　ｖｉｖｏで拡大させるいかなる特定の方法にも限

定されない。簡潔に述べると、Ｔ細胞のｅｘ　ｖｉｖｏでの培養及び拡大は、（１）哺乳動物からのＣＤ３４＋造血幹細胞及び前駆細胞を末梢血採集物または骨髄外植体から収集すること；ならびに（２）そのような細胞をｅｘ　ｖｉｖｏで拡大させることを含む。米国特許第５，１９９，９４２号に記載される細胞増殖因子に加えて、ｆｌｔ３－Ｌ、ＩＬ－１、ＩＬ－３、及びｃ－ｋｉｔリガンドなどの他の因子を細胞の培養及び拡大に使用することができる。

【０３２７】

[0351] ｅｘ　ｖｉｖｏでの免疫化に関する細胞ベースのワクチンに加えて、本開示はまた、患者において抗原に対する免疫応答を誘発するｉｎ　ｖｉｖｏでの免疫化のための組成物及び方法を提供する。

【０３２８】

[0352] 一般に、本明細書に記載するように活性化及び拡大させた細胞は、免疫不全の個体に生じる疾患の治療及び予防に利用することができる。

[0353] 本開示の改変ヒト免疫細胞は、単独で投与されても、あるいは希釈剤及び／または他の成分、例えば、ＩＬ－２または他のサイトカインまたは細胞集団と組み合わせた医薬組成物として投与されてもよい。

【０３２９】

<u>併用療法</u>

[0354] 本明細書に記載する改変ヒト免疫細胞または標的化環状ＲＮＡまたは標的化もしくは非標的化送達ビヒクル（例えば、リポソーム）は、他の公知の作用物質及び療法と組み合わせて使用されてもよい。「組み合わせて」投与されるとは、本明細書で使用される場合、対象が障害に罹患する間に２つ（またはそれ以上）の異なる治療が対象に送達されること、例えば、対象が障害と診断された後、かつ障害が治癒もしくは排除されるかまたは他の理由で治療が中止される前に、２つ以上の治療が送達されることを意味する。幾つかの実施形態では、一方の治療の送達が、第２の治療の送達の開始時に依然として行われており、そのために投与に関して重複がある。これは、本明細書において「同時（ｓｉｍｕｌｔａｎｅｏｕｓ）」また「同時（ｃｏｎｃｕｒｒｅｎｔ）送達」と呼ばれることがある。他の実施形態では、一方の治療の送達は、他方の治療の開始前に終了する。いずれかの場合の幾つかの実施形態では、治療は、併用投与であるために、より有効である。例えば、第２の治療は、より有効であり、例えば、第１の治療の非存在下で第２の治療を投与した場合に見られるよりも、少ない第２の治療で同等な効果が見られるか、もしくは第２の治療が症状を大幅に低減させるか、または同様な状況が第１の治療で見られる。幾つかの実施形態では、送達は、症状、または障害に関係する他のパラメータの低減が、一方の治療が他方の非存在下で送達されるときに観察されるものよりも大きくなるようなものである。２つの治療の効果は、部分的に相加的であるか、完全に相加的であるか、または相加的以上であり得る。送達は、送達される第１の治療の効果が、第２の治療が送達されても検出可能であるようなものであり得る。

【０３３０】

[0355] 幾つかの実施形態では、「少なくとも１つの追加治療剤」には、改変ヒト免疫細胞が含まれる。提供するのはまた、同じもしくは異なる標的抗原、または同じ標的抗原上の同じもしくは異なるエピトープに結合する、複数のＴＦＰを発現するＴ細胞である。提供するのはまた、第１のサブセットのＴ細胞が第１のＴＦＰとＴＣＲα及び／またはβ定常ドメインとを発現し、第２のサブセットのＴ細胞が第２のＴＦＰとＴＣＲα及び／またはβ定常ドメインとを発現する、Ｔ細胞の集団である。提供するのはまた、第１のサブセットのＴ細胞が第１のＴＦＰとＴＣＲγ及び／またはδ定常ドメインとを発現し、第２のサブセットのＴ細胞が第２のＴＦＰとＴＣＲγ及び／またはδ定常ドメインとを発現する、Ｔ細胞の集団である。

【０３３１】

[0356] 本明細書に記載する改変ヒト免疫細胞及び少なくとも１つの追加治療剤は、同じもしくは別々の組成物で同時に投与することも、または逐次投与することもできる。逐

次投与の場合、本明細書に記載する改変ヒト免疫細胞を１番目に、追加作用物質を２番目に投与することができ、または投与の順序を逆にすることができる。

【０３３２】

[0357] さらなる態様では、本明細書に記載する改変ヒト免疫細胞は、手術、化学療法、放射線、免疫抑制剤、例えば、シクロスポリン、アザチオプリン、メトトレキサート、ミコフェノレート、及びＦＫ５０６、抗体または他の免疫除去剤、例えば、アレムツズマブ、抗ＣＤ３抗体、もしくは他の抗体療法、サイトキサン（ｃｙｔｏｘｉｎ）、フルダラビン、シクロスポリン、タクロリムス、ラパマイシン、ミコフェノール酸、ステロイド、ロミデプシン、サイトカイン、及び放射線照射、ペプチドワクチン、例えば、Ｉｚｕｍｏｔｏ ｅｔ ａｌ．２００８ Ｊ Ｎｅｕｒｏｓｕｒｇ １０８：９６３－９７１に記載されるものと組み合わせた治療レジメンに使用されてもよい。

【０３３３】

[0358] 一実施形態では、対象に、改変ヒト免疫細胞の投与に関連する副作用を低減または改善する作用物質を投与することができる。改変ヒト免疫細胞の投与に関連する副作用として、サイトカイン放出症候群（ＣＲＳ）、及びマクロファージ活性化症候群（ＭＡＳ）とも呼ばれる血球貪食性リンパ組織球症（ＨＬＨ）が挙げられるが、これらに限定されない。ＣＲＳの症状として、高熱、嘔気、一過性低血圧、低酸素症などが挙げられる。したがって、本明細書に開示する方法は、本明細書に記載する改変ヒト免疫細胞を対象に投与すること、及び改変ヒト免疫細胞での治療に起因する可溶性因子のレベルの上昇を管理する作用物質をさらに投与することを含むことができる。一実施形態では、対象において上昇する可溶性因子は、ＩＦＮ－γ、ＴＮＦα、ＩＬ－２、及びＩＬ－６のうちの１つまたは複数である。したがって、この副作用を治療するために投与される作用物質は、これらの可溶性因子のうちの１つまたは複数を中和する作用物質であり得る。そのような作用物質として、ステロイド、ＴＮＦαの阻害剤、及びＩＬ－６の阻害剤が挙げられるが、これらに限定されない。ＴＮＦαの阻害剤の例は、エタネルセプトである。ＩＬ－６の阻害剤の例は、トシリズマブである。

【０３３４】

[0359] 一実施形態では、対象に、改変ヒト免疫細胞の活性を強化する作用物質を投与することができる。例えば、一実施形態では、作用物質は、抑制分子を阻害する作用物質であり得る。抑制分子、例えば、プログラム死１（ＰＤ１）は、幾つかの実施形態では、改変ヒト免疫細胞の免疫エフェクター応答開始能力を減少させることがある。抑制分子の例として、ＰＤ１、ＰＤ－Ｌ１、ＣＴＬＡ４、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３、ＶＩＳＴＡ、ＢＴＬＡ、ＴＩＧＩＴ、ＬＡＩＲ１、ＣＤ１６０、２Ｂ４、及びＴＧＦＲβが挙げられる。抑制分子の阻害は、例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡ、またはタンパク質レベルでの阻害によるものは、改変ヒト免疫細胞の性能を最適化することができる。実施形態では、抑制核酸、例えば、ｄｓＲＮＡ、例えば、ｓｉＲＮＡまたはｓｈＲＮＡを使用して、ＴＦＰ発現細胞内の抑制分子の発現を阻害することができる。ある実施形態では、阻害剤はｓｈＲＮＡである。ある実施形態では、抑制分子は、改変ヒト免疫細胞内で阻害される。これらの実施形態では、抑制分子の発現を阻害するｄｓＲＮＡ分子は、ＴＦＰの成分、例えば、成分のすべてをコードする核酸に連結される。一実施形態では、抑制シグナルの阻害剤は、例えば、抑制分子に結合する抗体または抗体断片であり得る。例えば、該作用物質は、ＰＤ１、ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、またはＣＴＬＡ４に結合する抗体または抗体断片（例えば、イピリムマブ（ＭＤＸ－０１０及びＭＤＸ－１０１とも呼ばれ、ＹＥＲＶＯＹ（登録商標）として市販されている；Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ Ｓｑｕｉｂｂ）；トレメリムマブ（Ｐｆｉｚｅｒから入手可能なＩｇＧ２モノクローナル抗体、以前はチシリムマブとして公知であったもの、ＣＰ－６７５，２０６））であり得る。ある実施形態では、該作用物質は、ＴＩＭ３に結合する抗体または抗体断片である。ある実施形態では、該作用物質は、ＬＡＧ３に結合する抗体または抗体断片である。

【０３３５】

[0360] 幾つかの実施形態では、改変ヒト免疫細胞の活性を強化する作用物質は、例え

ば、第１のドメインと第２のドメインを含む融合タンパク質であって、第１のドメインが、抑制分子、またはその断片であり、第２のドメインが、正のシグナルに関連するポリペプチド、例えば、本明細書に記載するような細胞内シグナル伝達ドメインを含むポリペプチドである、融合タンパク質であり得る。幾つかの実施形態では、正のシグナルに関連するポリペプチドは、ＣＤ２８、ＣＤ２７、ＩＣＯＳの共刺激ドメイン、例えば、ＣＤ２８、ＣＤ２７、及び／またはＩＣＯＳの細胞内シグナル伝達ドメイン、及び／または一次シグナル伝達ドメイン、例えば、ＣＤ３ζの、例えば、本明細書に記載するものを含むことができる。一実施形態では、融合タンパク質は、ＴＦＰを発現する細胞と同じ細胞によって発現される。別の実施形態では、融合タンパク質は、抗ＴＡＡ　ＴＦＰを発現しない細胞、例えばＴ細胞によって発現される。

【実施例】

【０３３６】

[0361] 以下の実験例を参照することによって、本発明をさらに詳述する。これらの実施例は、例示のみを目的として提供されており、別段の指定がない限り、限定は意図されていない。よって、本発明は、決して以下の実施例に限定されると解釈されるものではなく、本明細書で提供する教示の結果として明らかになる、ありとあらゆる変形を包含すると解釈されるものとする。さらなる説明はなくとも、当業者であれば、前述の説明及び以下の実例を使用して、本発明の化合物を作製及び利用することができ、特許請求する方法を実施することができると考えられる。以下の実施例は、本発明の様々な態様を具体的に指摘するものであり、決して本開示の残りの部分を限定するものとして解釈されるべきではない。

【０３３７】

<u>実施例１：　タンパク質をコードする環状ＲＮＡ（ｃｉｒｃＲＮＡ）の設計</u>

[0362] この実験のために発現するように選択された標的タンパク質はＧＦＰである。環状ＲＮＡからの機能性ＧＦＰの翻訳は、順序交換イントロン－エキソン（ＰＩＥ）スプライシング戦略におけるリボザイムを使用することによって実現される。ＧＦＰをコードするｃｉｒｃＲＮＡを作出するために、配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）、続いてＧＦＰコード配列を、ファージＴ４からのチミジル酸シンターゼ（Ｔｄ）遺伝子内のグループＩ触媒イントロンの下流及び上流の２つの短いＥ２及びＥ１エキソン断片の間に配置する。あるいは、グループＩ触媒イントロンのスプライシング効率は、Ａｎａｂａｅｎａのプレ tＲＮＡ遺伝子の方がファージＴ４のＴｄ遺伝子より効率的なので、Ａｎａｂａｅｎａのプレ tＲＮＡ遺伝子内のグループＩ触媒イントロンの下流及び上流のＥ２及びＥ１エキソンを使用することができる。［Ｐｕｔｔａｒａｊｕ，Ｍ．＆　Ｂｅｅｎ，Ｍ．Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２０，５３５７－５３６４（１９９２）］。最後に、グループＩ触媒イントロンの３’側半分をＥ２の上流にクローニングし、その一方でグループＩ触媒イントロンの５’側半分をＥ１の下流に配置する。３’ＰＩＥスプライス部位とＩＲＥＳの間のスペーサーを設計する。５’及び３’スプライス部位を互いに近接させることを目的として３３～３５ヌクレオチド長の相補的な「相同性アーム」を、ＲＮＡ前駆体の５’及び３’末端に配置し、スプリッティング効率を増大させるために環状プロセス中で使用する。

【０３３８】

<u>実施例２：　ＴＦＰをコードするｃｉｒｃＲＮＡの設計</u>

環状ＲＮＡ（ｃｉｒｃＲＮＡ）からの機能性ＴＦＰの翻訳は、順序交換イントロン－エキソン（ＰＩＥ）スプライシング戦略におけるリボザイムを使用することによって実現することができる。ＴＦＰをコードするｃｉｒｃＲＮＡを作出するために、配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）、続いてＴＦＰコード配列（ＣＤＳ）を、ファージＴ４からのチミジル酸シンターゼ（Ｔｄ）遺伝子内のグループＩ触媒イントロンの下流及び上流の２つの短いＥ２及びＥ１エキソン断片の間に配置する。あるいは、グループＩ触媒イントロンのスプライシング効率は、Ａｎａｂａｅｎａのプレ tＲＮＡ遺伝子の方がファージＴ４のＴｄ遺伝子より効率的なので、Ａｎａｂａｅｎａのプレ tＲＮＡ遺伝子内のグループＩ触媒

イントロンの下流及び上流のＥ２及びＥ１エキソンを使用することができる。［Ｐｕｔｔａｒａｊｕ，Ｍ．＆Ｂｅｅｎ，Ｍ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２０，５３５７－５３６４（１９９２）］。最後に、グループＩ触媒イントロンの５’側半分をＥ２の上流にクローニングし、その一方でグループＩ触媒イントロンの３’側半分をＥ１の下流に配置する。３’ＰＩＥスプライス部位とＩＲＥＳの間のスペーサーを設計する。５’及び３’スプライス部位を互いに近接させることを目的として、３３～３５ヌクレオチド長の外部「相同性アーム」をＲＮＡ前駆体の５’及び３’末端に配置し、スプリッティング効率を増大させるために環状プロセス中で使用する［Ｗｅｓｓｅｌｈｏｅｆｔ ｅｔ．ａｌ．，Ｎａｔ．Ｃｏｍｍｕｎ．，９：２６－２９．，２０１８］。幾つかの実施形態では、ｃｉｒｃＲＮＡの半減期を増加させるためにタンパク質結合モチーフがＴＦＰコード配列の外側に付加される。一実施形態では、タンパク質結合モチーフは、約２０ヌクレオチドを有するポリＡリンカーである。

【０３３９】

実施例３： ＣＡＲ、ＴＣＲをコードするｃｉｒｃＲＮＡの設計

環状ＲＮＡ（ｃｉｒｃＲＮＡ）からの機能性ＣＡＲ、ＴＣＲの翻訳は、順序交換イントロン－エキソン（ＰＩＥ）スプライシング戦略におけるリボザイムを使用することによって実現することができる。ＣＡＲ、ＴＣＲをコードするｃｉｒｃＲＮＡを作出するために、配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）、続いてＣＡＲ、ＴＣＲコード配列（ＣＤＳ）を、ファージＴ４からのチミジル酸シンターゼ（Ｔｄ）遺伝子内のグループＩ触媒イントロンの下流及び上流の２つの短いＥ２及びＥ１エキソン断片の間に配置する。あるいは、グループＩ触媒イントロンのスプライシング効率は、Ａｎａｂａｅｎａのプレ ｔＲＮＡ遺伝子の方がファージＴ４のＴｄ遺伝子より効率的なので、Ａｎａｂａｅｎａのプレ ｔＲＮＡ遺伝子内のグループＩ触媒イントロンの下流及び上流のＥ２及びＥ１エキソンを使用することができる。［Ｐｕｔｔａｒａｊｕ，Ｍ．＆ Ｂｅｅｎ，Ｍ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２０，５３５７－５３６４（１９９２）］。最後に、グループＩ触媒イントロンの５’側半分をＥ２の上流にクローニングし、その一方でグループＩ触媒イントロンの３’側半分をＥ１の下流に配置する。３’ＰＩＥスプライス部位とＩＲＥＳの間のスペーサーを設計する。５’及び３’スプライス部位を互いに近接させることを目的として３３～３５ヌクレオチド長の相補的な「相同性アーム」を、ＲＮＡ前駆体の５’及び３’末端に配置し、スプリッティング効率を増大させるために環状プロセス中で使用する。追加的に、ｃｉｒｃＲＮＡの半減期を増加させるために、Ａ＞２０ヌクレオチドを有するポリＡリンカーなどのタンパク質結合モチーフをＴＦＰコード配列の外側に付加することができる［Ｗｅｓｓｅｌｈｏｅｆｔ ｅｔ．ａｌ．，Ｎａｔ．Ｃｏｍｍｕｎ．，２０１８］。

【０３４０】

【表１－１】

表１：ペイロードをコードする環状ＲＮＡの設計に使用される配列

CVB3 IRES (配列番号:140)	TTAAAACAGCCTGTGGGTTGATCCCACCCACAGGCCCATTGGGCGCTAGCACTC TGGTATCACGGTACCTTTGTGCGCCTGTTTTATACCCCCTCCCCCAACTGTAAC TTAGAAGTAACACACACCGATCAACAGTCAGCGTGGCACACCAGCCACGTTTTG ATCAAGCACTTCTGTTACCCCGGACTGAGTATCAATAGACTGCTCACGCGGTTG AAGGAGAAAGCGTTCGTTATCCGGCCAACTACTTCGAAAAACCTAGTAACACCG TGGAAGTTGCAGAGTGTTTCGCTCAGCACTACCCCAGTGTAGATCAGGTCGATG AGTCACCGCATTCCCCACGGGCGACCGTGGCGGTGGCTGCGTTGGCGGCCTGCC CATGGGGAAACCCATGGGACGCTCTAATACAGACATGGTGCGAAGAGTCTATTG AGCTAGTTGGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCA CACACCCTCAAGCCAGAGGGCAGTGTGTCGTAACGGGCAACTCTGCAGCGGAAC CGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCATTTTATTCCTATACTGGCTGCTTATGGT GACAATTGAGAGATCGTTACCATATAGCTATTGGATTGGCCATCCGGTGACTAA TAGAGCTATTATATATCCCTTTGTTGGGTTTATACCACTTAGCTTGAAAGAGGT TAAAACATTACAATTCATTGTTAAGTTGAATACAGCAAA
EMCV IRES (配列番号:141)	TTGCCAGTCTGCTCGATATCGCAGGCTGGGTCCGTGACTACCCACTCCCCCTTT CAACGTGAAGGCTACGATAGTGCCAGGGCGGGTACTGCCGTAAGTGCCACCCCA AACAACAACAACAAAACAAACTCCCCCTCCCCCCCCTTACTATACTGGCCGAAG CCACTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTACATGCTATTTTCTACCGCATT ACCGTCTTATGGTAATGTGAGGGTCCAGAACCTGACCCTGTCTTCTTGACGAAC ACTCCTAGGGGTCTTTCCCCTCTCGACAAAGGAGTGTAAGGTCTGTTGAATGTC GTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTAAAGACAAACAACGTCTGTAGCG ACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCCACCTGGTGACAGGTGCCTCTGCGGCCAA AAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCAGTGCCACGTT GTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAAC AAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGG CCTCGGTGCACGTGCTTTACACGTGTTGAGTCGAGGTGAAAAAACGTCTAGGCC CCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCCTTTGAAAACCACGATTACAAT
スペーサー (配列番号:142)	GGTAGTGGTGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCA
Ana3.0(全長) (配列番	GGGAGACCCTCGACCGTCGATTGTCCACTGGTCAACAATAGATGACTTACAACT AATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTA

【０３４１】

【表１－２】

号:145)	AAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAA TGAAAATCCGTTGACCTTAAACGGTCGTGTGGGTTCAAGTCCCTCCACCCCCAC GCCGGAAACGCAATAGCCGAAAAACAAAAAACAAAAAAACCCCCCTCTCCCTCC CCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTC TATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAA CCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTTTCCCCTCTCGCCAAA GGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCT TGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCCACCT GGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAG GCGGCACAACCCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAA TGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCC CATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAG TCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCCTTT GAAAAACACGATGATAATATGGCCACAACCATGGGAGTCAAAGTTCTGTTTGCC CTGATCTGCATCGCTGTGGCCGAGGCCAAGCCCACCGAGAACAACGAAGACTTC AACATCGTGGCCGTGGCCAGCAACTTCGCGACCACGGATCTCGATGCTGACCGC GGGAAGTTGCCCGGCAAGAAGCTGCCGCTGGAGGTGCTCAAAGAGATGGAAGCC AATGCCCGGAAAGCTGGCTGCACCAGGGGCTGTCTGATCTGCCTGTCCCACATC AAGTGCACGCCCAAGATGAAGAAGTTCATCCCAGGACGCTGCCACACCTACGAA GGCGACAAAGAGTCCGCACAGGGCGGCATAGGCGAGGCGATCGTCGACATTCCT GAGATTCCTGGGTTCAAGGACTTGGAGCCCATGGAGCAGTTCATCGCACAGGTC GATCTGTGTGTGGACTGCACAACTGGCTGCCTCAAAGGGCTTGCCAACGTGCAG TGTTCTGACCTGCTCAAGAAGTGGCTGCCGCAACGCTGTGCGACCTTTGCCAGC AAGATCCAGGGCCAGGTGGACAAGATCAAGGGGGCCGGTGGTGACTAAAAAAAA CAAAAAACAAAACGGCTATTATGCGTTACCGGCGAGACGCTACGGACTTAAATA ATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAAC CTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGACCAGTGGACAATCGACGGATAACAGCATATCTAG

【０３４２】

【表２－１】

表２：ペイロードをコードする環状ＲＮＡを生成するための配列

Ana-CVB3-FMC63_CD3ε (配列番号:143)	GGGAGACCCTCGACCGTCGATTGTCCACTGGTCAACAATAGATGACTTACAACTA ATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAA GAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGA AAATCCGTTGACCTTAAACGGTCGTGTGGGTTCAAGTCCCTCCACCCCCACGCCG GAAACGCAATAGCCGAAAAACAAAAAACAAAAAAATTAAAACAGCCTGTGGGTTG ATCCCACCCACAGGCCCATTGGGCGCTAGCACTCTGGTATCACGGTACCTTTGTG CGCCTGTTTTATACCCCCTCCCCCAACTGTAACTTAGAAGTAACACACACCGATC AACAGTCAGCGTGGCACACCAGCCACGTTTTGATCAAGCACTTCTGTTACCCCGG ACTGAGTATCAATAGACTGCTCACGCGGTTGAAGGAGAAAGCGTTCGTTATCCGG CCAACTACTTCGAAAAACCTAGTAACACCGTGGAAGTTGCAGAGTGTTTCGCTCA GCACTACCCCAGTGTAGATCAGGTCGATGAGTCACCGCATTCCCCACGGGCGACC GTGGCGGTGGCTGCGTTGGCGGCCTGCCCATGGGGAAACCCATGGGACGCTCTAA TACAGACATGGTGCGAAGAGTCTATTGAGCTAGTTGGTAGTCCTCCGGCCCCTGA ATGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCACACACCCTCAAGCCAGAGGGCAGTGTGTC GTAACGGGCAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCATTTT ATTCCTATACTGGCTGCTTATGGTGACAATTGAGAGATCGTTACCATATAGCTAT TGGATTGGCCATCCGGTGACTAATAGAGCTATTATATATCCCTTTGTTGGGTTTA TACCACTTAGCTTGAAAGAGGTTAAAACATTACAATTCATTGTTAAGTTGAATAC AGCAAAATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAG CATTCCTCCTGATCCCAGACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGC CTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAA TATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACTGTTAAACTCCTGATCTACC ATACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGG AACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTAC TTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACTAAGTTGG AAATAACAGGCTCCACCTCTGGATCCGGCAAGCCCGGATCTGGCGAGGGATCCAC CAAGGGCGAGGTGAAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAG AGCCTGTCCGTCACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAA GCTGGATTCGCCAGCCTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGG TAGTGAAACCACATACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGACCATCATCAAG GACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGACA CAGCCATTTACTACTGTGCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGA CTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCGCGGCCGCGGGCGGTGGAGGC AGTGGTGGTGGCGGCTCTGGCGGTGGTGGTAGCCTCGAGGATGGTAATGAAGAAA TGGGTGGTATTACACAGACACCATATAAAGTCTCCATCTCTGGAACCACAGTAAT ATTGACATGCCCTCAGTATCCTGGATCTGAAATACTATGGCAACACAATGATAAA AACATAGGCGGTGATGAGGATGATAAAAACATAGGCAGTGATGAGGATCACCTGT CACTGAAGGAATTTTCAGAATTGGAGCAAAGTGGTTATTATGTCTGCTACCCCAG AGGAAGCAAACCAGAAGATGCGAACTTTTATCTCTACCTGAGGGCAAGAGTGTGT GAGAACTGCATGGAGATGGATGTGATGTCGGTGGCCACAATTGTCATAGTGGACA TCTGCATCACTGGGGGCTTGCTGCTGCTGGTTTACTACTGGAGCAAGAATAGAAA

【０３４３】

【表２－２】

	GGCCAAGGCCAAGCCTGTGACACGAGGAGCGGGTGCTGGCGGCAGGCAAAGGGGA CAAAACAAGGAGAGGCCACCACCTGTTCCCAACCCAGACTATGAGCCCATCCGGA AAGGCCAGCGGGACCTGTATTCTGGCCTGAATCAGAGACGCATCTGATAAAAAAA ACAAAAAACAAAACGGCTATTATGCGTTACCGGCGAGACGCTACGGACTTAAATA ATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACC TAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAA GACCAGTGGACAATCGACGGATAACAGCATATCTAG
Ana-EMCV- FMC63_CD3ε (配列番号:144)	GGGAGACCCTCGACCGTCGATTGTCCACTGGTCAACAATAGATGACTTACAACTA ATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAA GAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGA AAATCCGTTGACCTTAAACGGTCGTGTGGGTTCAAGTCCCTCCACCCCCACGCCG GAAACGCAATAGCCGAAAAACAAAAAACAAAAAAACCCCCCTCTCCCTCCCCCCC TAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATG TTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCC CTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTTTCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCA AGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAA ACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCCACCTGGCGACAGGT GCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACC CCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCA AGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCATTGTATGGGAT CTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAA CGTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCCTTTGAAAAACACGATGAT AATATGGCCACAACCATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTAC CACACCCAGCATTCCTCCTGATCCCAGACATCCAGATGACACAGACTACATCCTC CCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGAC ATTAGTAAATATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACTGTTAAACTCC TGATCTACCATACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAG TGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATT GCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCGTACACGTTCGGAGGGGGGA CTAAGTTGGAAATAACAGGCTCCACCTCTGGATCCGGCAAGCCCGGATCTGGCGA GGGATCCACCAAGGGCGAGGTGAAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCG CCCTCACAGAGCCTGTCCGTCACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACT ATGGTGTAAGCTGGATTCGCCAGCCTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGT AATATGGGGTAGTGAAACCACATACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGACC ATCATCAAGGACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAA CTGATGACACAGCCATTTACTACTGTGCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTA TGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCGCGGCCGCGGGC GGTGGAGGCAGTGGTGGTGGCGGCTCTGGCGGTGGTGGTAGCCTCGAGGATGGTA ATGAAGAAATGGGTGGTATTACACAGACACCATATAAAGTCTCCATCTCTGGAAC CACAGTAATATTGACATGCCCTCAGTATCCTGGATCTGAAATACTATGGCAACAC AATGATAAAAACATAGGCGGTGATGAGGATGATAAAAACATAGGCAGTGATGAGG ATCACCTGTCACTGAAGGAATTTTCAGAATTGGAGCAAAGTGGTTATTATGTCTG CTACCCCAGAGGAAGCAAACCAGAAGATGCGAACTTTTATCTCTACCTGAGGGCA

【０３４４】

【表２－３】

	AGAGTGTGTGAGAACTGCATGGAGATGGATGTGATGTCGGTGGCCACAATTGTCA TAGTGGACATCTGCATCACTGGGGGCTTGCTGCTGCTGGTTTACTACTGGAGCAA GAATAGAAAGGCCAAGGCCAAGCCTGTGACACGAGGAGCGGGTGCTGGCGGCAGG CAAAGGGGACAAAACAAGGAGAGGCCACCACCTGTTCCCAACCCAGACTATGAGC CCATCCGGAAAGGCCAGCGGGACCTGTATTCTGGCCTGAATCAGAGACGCATCTG ATAAAAAAAAACAAAAAACAAAACGGCTATTATGCGTTACCGGCGAGACGCTACGG ACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTC AGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGT AATTAGTAAGACCAGTGGACAATCGACGGATAACAGCATATCTAG
Ana_CVB3_IRES-eGFP(配列番号:146)	GGGAGACCCTCGACCGTCGATTGTCCACTGGTCAACAATAGATGACTTACAACTA ATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAA GAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGA AAATCCGTTGACCTTAAACGGTCGTGTGGGTTCAAGTCCCTCCACCCCCACGCCG GAAACGCAATAGCCGAAAAACAAAAAACAAAAAAATTAAAACAGCCTGTGGGTTG ATCCCACCCACAGGCCCATTGGGCGCTAGCACTCTGGTATCACGGTACCTTTGTG CGCCTGTTTTATACCCCCTCCCCCAACTGTAACTTAGAAGTAACACACACCGATC AACAGTCAGCGTGGCACACCAGCCACGTTTTGATCAAGCACTTCTGTTACCCCGG ACTGAGTATCAATAGACTGCTCACGCGGTTGAAGGAGAAAGCGTTCGTTATCCGG CCAACTACTTCGAAAAACCTAGTAACACCGTGGAAGTTGCAGAGTGTTTCGCTCA GCACTACCCCAGTGTAGATCAGGTCGATGAGTCACCGCATTCCCCACGGGCGACC GTGGCGGTGGCTGCGTTGGCGGCCTGCCCATGGGGAAACCCATGGGACGCTCTAA TACAGACATGGTGCGAAGAGTCTATTGAGCTAGTTGGTAGTCCTCCGGCCCCTGA ATGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCACACACCCTCAAGCCAGAGGGCAGTGTGTC GTAACGGGCAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCATTTT ATTCCTATACTGGCTGCTTATGGTGACAATTGAGAGATCGTTACCATATAGCTAT TGGATTGGCCATCCGGTGACTAATAGAGCTATTATATATCCCTTTGTTGGGTTTA TACCACTTAGCTTGAAAGAGGTTAAAACATTACAATTCATTGTTAAGTTGAATAC AGCAAAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGG TCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGA GGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAG CTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCT TCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCC CGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAG ACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGA AGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAA CTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAG GTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACC ACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCA CTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCAC ATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGC TGTACAAGTAAAAAAAAACAAAAAACAAAACGGCTATTATGCGTTACCGGCGAGAC GCTACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCT CAAACTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCG

【０３４５】

【表２－４】

	AAGTAGTAATTAGTAAGACCAGTGGACAATCGACGGATAACAGCATATCTAG
Ana_CVB3_IRES-eGFP-スプライシング_変異(配列番号:147)	GGGAGACCCTCGACCGTCGATTGTCCACTGGTCAACAATAGATGACTTACAACTA ATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAA GAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGGTCGTGTGGGTTCAAGTCCC TCCACCCCCACGCCGGAAACGCAATAGCCGAAAAACAAAAAACAAAAAAATTAAA ACAGCCTGTGGGTTGATCCCACCCACAGGCCCATTGGGCGCTAGCACTCTGGTAT CACGGTACCTTTGTGCGCCTGTTTTATACCCCCTCCCCCAACTGTAACTTAGAAG TAACACACACCGATCAACAGTCAGCGTGGCACACCAGCCACGTTTTGATCAAGCA CTTCTGTTACCCCGGACTGAGTATCAATAGACTGCTCACGCGGTTGAAGGAGAAA GCGTTCGTTATCCGGCCAACTACTTCGAAAAACCTAGTAACACCGTGGAAGTTGC AGAGTGTTTCGCTCAGCACTACCCCAGTGTAGATCAGGTCGATGAGTCACCGCAT TCCCCACGGGCGACCGTGGCGGTGGCTGCGTTGGCGGCCTGCCCATGGGGAAACC CATGGGACGCTCTAATACAGACATGGTGCGAAGAGTCTATTGAGCTAGTTGGTAG TCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCACACACCCTCAAGCC AGAGGGCAGTGTGTCGTAACGGGCAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTG TCCGTGTTTCATTTTATTCCTATACTGGCTGCTTATGGTGACAATTGAGAGATCG TTACCATATAGCTATTGGATTGGCCATCCGGTGACTAATAGAGCTATTATATATC CCTTTGTTGGGTTTATACCACTTAGCTTGAAAGAGGTTAAAACATTACAATTCAT TGTTAAGTTGAATACAGCAAAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGG TGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGT GTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATC TGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCT ACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTT CAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGAC GACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGA ACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCA CAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAG AAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCG TGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCT GCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAAC GAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTC TCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAAAAAACAAAAAACAAAACGGCTATTATG CGTTACCGGCGAGACG
Ana_CVB3_IRES-抗CD19 TFP(配列番号:148)	GGGAGACCCTCGACCGTCGATTGTCCACTGGTCAACAATAGATGACTTACAACTA ATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAA GAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGA AAATCCGTTGACCTTAAACGGTCGTGTGGGTTCAAGTCCCTCCACCCCCACGCCG GAAACGCAATAGCCGAAAAACAAAAAACAAAAAAATTAAAACAGCCTGTGGGTTG ATCCCACCCACAGGCCCATTGGGCGCTAGCACTCTGGTATCACGGTACCTTTGTG CGCCTGTTTTATACCCCCTCCCCCAACTGTAACTTAGAAGTAACACACACCGATC AACAGTCAGCGTGGCACACCAGCCACGTTTTGATCAAGCACTTCTGTTACCCCGG ACTGAGTATCAATAGACTGCTCACGCGGTTGAAGGAGAAAGCGTTCGTTATCCGG CCAACTACTTCGAAAAACCTAGTAACACCGTGGAAGTTGCAGAGTGTTTCGCTCA

【０３４６】

【表２－５】

	GCACTACCCCAGTGTAGATCAGGTCGATGAGTCACCGCATTCCCCACGGGCGACC GTGGCGGTGGCTGCGTTGGCGGCCTGCCCATGGGGAAACCCATGGGACGCTCTAA TACAGACATGGTGCGAAGAGTCTATTGAGCTAGTTGGTAGTCCTCCGGCCCCTGA ATGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCACACACCCTCAAGCCAGAGGGCAGTGTGTC GTAACGGGCAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCATTTT ATTCCTATACTGGCTGCTTATGGTGACAATTGAGAGATCGTTACCATATAGCTAT TGGATTGGCCATCCGGTGACTAATAGAGCTATTATATATCCCTTTGTTGGGTTTA TACCACTTAGCTTGAAAGAGGTTAAAACATTACAATTCATTGTTAAGTTGAATAC AGCAAAATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAG CATTCCTCCTGATCCCAGACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGC CTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAA TATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACTGTTAAACTCCTGATCTACC ATACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGG AACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTAC TTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACTAAGTTGG AAATAACAGGCTCCACCTCTGGATCCGGCAAGCCCGGATCTGGCGAGGGATCCAC CAAGGGCGAGGTGAAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAG AGCCTGTCCGTCACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAA GCTGGATTCGCCAGCCTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGG TAGTGAAACCACATACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGACCATCATCAAG GACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGACA CAGCCATTTACTACTGTGCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGA CTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCGCGGCCGCGGGCGGTGGAGGC AGTGGTGGTGGCGGCTCTGGCGGTGGTGGTAGCCTCGAGGATGGTAATGAAGAAA TGGGTGGTATTACACAGACACCATATAAAGTCTCCATCTCTGGAACCACAGTAAT ATTGACATGCCCTCAGTATCCTGGATCTGAAATACTATGGCAACACAATGATAAA AACATAGGCGGTGATGAGGATGATAAAAACATAGGCAGTGATGAGGATCACCTGT CACTGAAGGAATTTTCAGAATTGGAGCAAAGTGGTTATTATGTCTGCTACCCCAG AGGAAGCAAACCAGAAGATGCGAACTTTTATCTCTACCTGAGGGCAAGAGTGTGT GAGAACTGCATGGAGATGGATGTGATGTCGGTGGCCACAATTGTCATAGTGGACA TCTGCATCACTGGGGGCTTGCTGCTGCTGGTTTACTACTGGAGCAAGAATAGAAA GGCCAAGGCCAAGCCTGTGACACGAGGAGCGGGTGCTGGCGGCAGGCAAAGGGGA CAAAACAAGGAGAGGCCACCACCTGTTCCCAACCCAGACTATGAGCCCATCCGGA AAGGCCAGCGGGACCTGTATTCTGGCCTGAATCAGAGACGCATCTGATAAAAAAA ACAAAAAACAAAACGGCTATTATGCGTTACCGGCGAGACGCTACGGACTTAAATA ATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACC TAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAA GACCAGTGGACAATCGACGGATAACAGCATATCTAG
Ana_CVB3_IRES - 抗 MSLN TFP(配列番号:149)	GGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGGGAGACCCTCGACCGTCGATTGTCCACTGGTCA ACAATAGATGACTTACAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCC TAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTA GCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTTGACCTTAAACGGTCGTGTGGGTTCA AGTCCCTCCACCCCCACGCCGGAAACGCAATAGCCGAAAAACAAAAAACAAAAAA

【０３４７】

【表２－６】

	ATTAAAACAGCCTGTGGGTTGATCCCACCCACAGGCCCATTGGGCGCTAGCACTC TGGTATCACGGTACCTTTGTGCGCCTGTTTTATACCCCCTCCCCCAACTGTAACT TAGAAGTAACACACACCGATCAACAGTCAGCGTGGCACACCAGCCACGTTTTGAT CAAGCACTTCTGTTACCCCGGACTGAGTATCAATAGACTGCTCACGCGGTTGAAG GAGAAAGCGTTCGTTATCCGGCCAACTACTTCGAAAAACCTAGTAACACCGTGGA AGTTGCAGAGTGTTTCGCTCAGCACTACCCCAGTGTAGATCAGGTCGATGAGTCA CCGCATTCCCCACGGGCGACCGTGGCGGTGGCTGCGTTGGCGGCCTGCCCATGGG GAAACCCATGGGACGCTCTAATACAGACATGGTGCGAAGAGTCTATTGAGCTAGT TGGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCACACACCCT CAAGCCAGAGGGCAGTGTGTCGTAACGGGCAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTT TGGGTGTCCGTGTTTCATTTTATTCCTATACTGGCTGCTTATGGTGACAATTGAG AGATCGTTACCATATAGCTATTGGATTGGCCATCCGGTGACTAATAGAGCTATTA TATATCCCTTTGTTGGGTTTATACCACTTAGCTTGAAAGAGGTTAAAACATTACA ATTCATTGTTAAGTTGAATACAGCAAAATGCTTCTGCTTGTGACGTCCCTCCTGC TTTGTGAACTCCCGCATCCTGCCTTCCTGCTCATCCCGGAAGTTCAGCTGGTAGA GTCCGGTGGCGGGCTGGTACAGCCAGGGGGATCTCTCCGTCTCTCATGTGCTGCC AGTGGGGGAGATTGGTCCGCTAACTTTATGTACTGGTATCGTCAAGCACCTGGGA AACAACGCGAGCTGGTTGCACGGATCTCTGGACGAGGGGTAGTGGATTACGTGGA AAGTGTGAAAGGACGATTCACAATTTCCAGGGACAATTCTAAAAACACCCTTTAT TTGCAAATGAATAGTCTGAGAGCAGAAGACACAGCCGTATATTATTGTGCAGTCG CATCCTATTGGGGGCAGGGGACTCTTGTCACAGTCTCGAGTGCTGCAGCAGGCGG CGGGGGCTCAGGAGGGGGTGGGTCTGGAGGAGGTGGGAGTCTGGAGGATGGTAAT GAAGAAATGGGTGGTATTACACAGACACCATATAAAGTCTCCATCTCTGGAACCA CAGTAATATTGACATGCCCTCAGTATCCTGGATCTGAAATACTATGGCAACACAA TGATAAAAACATAGGCGGTGATGAGGATGATAAAAACATAGGCAGTGATGAGGAT CACCTGTCACTGAAGGAATTTTCAGAATTGGAGCAAAGTGGTTATTATGTCTGCT ACCCCAGAGGAAGCAAACCAGAAGATGCGAACTTTTATCTCTACCTGAGGGCAAG AGTGTGTGAGAACTGCATGGAGATGGATGTGATGTCGGTGGCCACAATTGTCATA GTGGACATCTGCATCACTGGCGGATTGCTGCTGCTGGTTTACTACTGGAGCAAGA ATAGAAAGGCCAAGGCCAAGCCTGTGACACGAGGAGCGGGTGCTGGCGGCAGGCA AAGGGGACAAAACAAGGAGAGGCCACCACCTGTTCCCAACCCAGACTATGAGCCC ATCCGGAAAGGCCAGCGGGACCTGTATTCTGGCCTGAATCAGAGACGCATCTAAA AAAAACAAAAAACAAAACGGCTATTATGCGTTACCGGCGAGACGCTACGGACTTA AATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGA AACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTA GTAAGACCAGTGGACAATCGACGGATAACAGCATATCTAGGGATC

【０３４８】

実施例４：　自己スプライシング線状ＲＮＡ前駆体の生成

ＴＦＰをコードする遺伝子座、Ａｎａｂａｅｎａ触媒イントロン、及び（コクサッキーウイルスＢ３（ＣＶＢ３）または脳心筋炎ウイルス（ＥＭＣＶ））ＩＲＥＳ配列は、Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓを使用することによって化学的に合成する。続いてこの配列を、ＮＥＢｕｉｌｄｅｒ（登録商標）ＨｉＦｉ　ＤＮＡ　Ａｓｓｅｍｂｌｙキットを使用するＧｉｂｓｏｎ　ａｓｓｅｍｂｌｙ（登録商標）（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）によって、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼプロモーターを含有する線状化プラスミドベクター中にクローニングする。スペーサー領域、相同性アーム

、及び他の変異は、Ｑ５（登録商標）Ｓｉｔｅ－Ｄｉｒｅｃｔｅｄ Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ Ｋｉｔ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）を使用して導入する。線状ＲＮＡ前駆体は、Ｔ７ Ｈｉｇｈ Ｙｉｅｌｄ ＲＮＡ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ Ｋｉｔ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）を使用する線状化プラスミドＤＮＡ鋳型またはＰＣＲ産物からのｉｎ ｖｉｔｒｏ転写によって合成する。

【０３４９】

実施例５： ＴＦＰをコードするｃｉｒｃＲＮＡの生成及び精製

[0363] ｉｎ ｖｉｔｒｏ転写後に、線状ＲＮＡ前駆体をＤＮａｓｅ Ｉ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）で２０分間処理する。次いで、ＭＥＧＡｃｌｅａｒ Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ Ｃｌｅａｎ ｕｐキット（Ａｍｂｉｏｎ）を使用して、このＲＮＡ試料をカラム精製する。次いで、本質的により短いＲＮＡの環状化について前述したように、環状化を促進するために線状ＲＮＡ前駆体をマグネシウムイオン及びＧＴＰの存在下で加熱する［Ｆｏｒｄ，Ｅ．＆ Ａｒｅｓ，Ｍ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．９１，３１１７－３１２１（１９９４）］。すなわち、ＲＮＡを５分間７０℃に加熱し、次いで直ちに氷上に３分間置き、その後ＧＴＰを、マグネシウムを含む緩衝液（５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、１０ｍＭ ＭｇＣｌ２、１ｍＭ ＤＴＴ、ｐＨ ７．５；Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）と共に２ｍＭの最終濃度になるまで添加する。次いでＲＮＡを４０分間５５℃に加熱し、次いでカラム精製する。

【０３５０】

[0364] ＲＮａｓｅ Ｒを使用するＲＮＡの環状性チェック： ｃｉｒｃＲＮＡを濃厚化するために、２０μｇのＲＮＡを水に溶解させ（最終体積８８μＬ）、次いで７０℃で２分間加熱し、氷上で２分間冷却する。２０ＵのＲＮａｓｅ Ｒ及び１０μＬの１０Å～ＲＮａｓｅ Ｒ緩衝液（Ｅｐｉｃｅｎｔｅｒ）を添加し、反応物を３７℃で４０分間インキュベートし、反応の途中でさらなる１０ＵのＲＮａｓｅ Ｒを添加する。Ｍｏｎａｒｃｈ（登録商標）ＲＮＡ Ｃｌｅａｎｕｐキット（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）を使用して、ＲＮａｓｅ Ｒで消化されたＲＮＡをカラム精製する。

【０３５１】

[0365] ＲＮＡを、プレキャスト１．５％ＴＢＥアガロースゲルまたはプレキャスト２％Ｅ－ゲルＥＸアガロースゲル（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）上で分離し、ｓｓＲＮＡ Ｌａｄｄｅｒｓ（ＮＥＢ、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を標準として使用する。バンドは、青色光透過照明を使用して可視化する。ゲル抽出のために、ｃｉｒｃＲＮＡに相当するバンドをゲルから切り取り、次いでＺｙｍｏｃｌｅａｎ（商標）Ｇｅｌ ＲＮＡ Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ Ｋｉｔ（Ｚｙｍｏｇｅｎ）を使用して抽出する。

【０３５２】

[0366] ｃｉｒｃＲＮＡ調製の純度は、ｃｉｒｃＲＮＡからのタンパク質産生を最大化し、先天的な細胞性免疫応答を回避するために不可欠な別の因子である［Ｋａｒｉｋｏ，Ｋ．，Ｍｕｒａｍａｔｓｕ，Ｈ．，Ｌｕｄｗｉｇ，Ｊ．＆ Ｗｅｉｓｓｍａｎ，Ｄ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．３９，ｅ１４２－ｅ１４２（２０１１）］。したがって、代替的なカラム精製方法として、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）、高速タンパク質液体クロマトグラフィー（ＦＰＬＣ）、またはサイズ排除クロマトグラフィーが適用される。ＨＰＬＣの場合、３０μｇのＲＮＡを３分間６５℃に加熱し、次いで３分間氷上に置く。Ａｇｉｌｅｎｔ １１００ Ｓｅｒｉｅｓ ＨＰＬＣ（Ａｇｉｌｅｎｔ）で、ＲＮＡを、５μｍの粒径及び２００Åの孔径を有する４．６×３００ｍｍのサイズ排除カラム（Ｓｅｐａｘ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ；部品番号：２１５９８０Ｐ－４６３０）に通して流す。ＲＮＡは、リボヌクレアーゼ不含ＴＥ緩衝液（１０ｍＭ Ｔｒｉｓ、１ｍＭ ＥＤＴＡ、ｐＨ：６）中で、０．３ｍＬ／分の流量で流す。ＲＮＡは、２６０ｎｍのＵＶ吸光度で検出するが、ＵＶ検出せずに収集する。得られたＲＮＡ画分を５Ｍ酢酸アンモニウムで沈殿させ、水に再懸濁させ、次いで場合によってＲｎａｓｅ Ｒで上記のように処理する。

【０３５３】

[0367] ＲＮＡは、直列に接続した５０ｍＬのスーパーループ及び３本の５ｍＬのＨｉＴｒａｐ　ＤＥＡＥ－セファロースＦＦカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を備えたＡＫＴＡ　ｐｒｉｍｅ　ＦＰＬＣシステムを使用する粗転写反応物から精製する。ＤＥＡＥカラムは、３カラム体積の緩衝液Ａ（５０ｍＭリン酸ナトリウム［ｐＨ　６．５］、１５０ｍＭ塩化ナトリウム、及び０．２ｍＭ　ＥＤＴＡ）で、室温で平衡化する。緩衝液Ｂは、同じ成分を２Ｍ塩化ナトリウムで含有する。緩衝液は両方とも、大量に調製し、滅菌ろ過し、塩化ナトリウムが沈殿しないように４℃（緩衝液Ａ）または室温（緩衝液Ｂ）で保存することができる。停止した転写反応物（１０～４０ｍＬ）を５０ｍＬのスーパーループにロードし、１０ｍＬの画分を１５ｍＬの滅菌プラスチックチューブに収集しながら、以下の勾配を使用して弱アニオン交換クロマトグラフィーを実施する：試料をＤＥＡＥカラムにロードするために０－７０ｍＬ（１ｍＬ／分で０％Ｂ）、残留するｒＮＴＰをカラムから洗い落とすために７０－１００ｍＬ（２ｍＬ／分で０％－１０％Ｂ）、小さい不成功の転写物、所望のＲＮＡ産物、及びプラスミドＤＮＡ鋳型を分離するために１００－３８０ｍＬ（２ｍＬ／分で１０％－３０％Ｂ）、３８０－４１０ｍＬ（４ｍＬ／分で３０％－１００％Ｂ）、４１０－４５５ｍＬ（４ｍＬ／分で１００％Ｂ）、及びカラムを終了させ（ｉｓｈ）、次の精製のために平衡化するために４５５－４８５ｍＬ（４ｍＬ／分で１００％－０％Ｂ）。１ｍＬを下回る小規模転写物の場合、反応混合物は、緩衝液Ａで２ｍＬに希釈してスーパーループへの完全なロードを確保し、クロマトグラフィーは、単一の１ｍＬのＨｉＴｒａｐ　ＤＥＡＥ－セファロースＦＦカラム及び同じ勾配プロファイルを使用し、緩衝液の体積を１／１５に低減して２ｍＬの画分を収集して実施する。所望のＲＮＡを含有する画分を５Ｍ酢酸アンモニウムで沈殿させ、水に再懸濁させ、次いで、幾つかの実施形態ではＲｎａｓｅ　Ｒで上記のように処理する。

【０３５４】

[0368] ＳＥＣの場合、ＡＫＴＡ　ｐｕｒｅシステムは、ＵＮＩＣＯＲＮ　７．０ソフトウェアスイートの制御下でＦＲ－９自動分取装置と接続して使用する。環状ＲＮＡは、０．５ｍｌの試料ループを通してＳｕｐｅｒｄｅｘ　２００　ｉｎｃｒｅａｓｅカラム（２４ｍｌ）に注入した。このカラムを、ＤＥＰＣ処理した水中で調製したＰＢＳ（ＮａＣｌ　０．１３８Ｍ；ＫＣｌ－０．００２７Ｍ）；ｐＨ＝７．２で平衡化する。クロマトグラフィーを０．２ｍＬ／分で実施し、０．５または０．２５ｍｌの画分を収集する。すべての実験は４℃で実施した。

【０３５５】

<u>実施例６：　エレクトロポレーションによるＴＦＰをコードするｃｉｒｃＲＮＡのジャーカット細胞への形質移入</u>

[0369] ジャーカット細胞を、エレクトロポレーションまで、１０％ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）及び３００ｍｇ／Ｌ　Ｌ－グルタミンを補給したＲＰＭＩ　１６４０培地中で１ｍＬ当たり０．２×10^6細胞に維持する。１～２μｇのｃｉｒｃＲＮＡを５×10^5個のＴ細胞と混合し、Ｎｅｏｎ（登録商標）Ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）の製造業者のプロトコルに従ってエレクトロポレーションする。エレクトロポレーションは、１６００Ｖ、１０ｍｓ、３パルスに設定する。パルス後に、細胞を温かい培地に直ちに移し、３７℃で３日～７日間インキュベートする。

【０３５６】

[0370] ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための物理的方法として、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、微粒子銃、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションなどが挙げられる。ベクター及び／または外因性核酸を含む細胞を生成するための方法は、当技術分野で周知である（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．，２０１２，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，ｖｏｌｕｍｅｓ　１－４，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｐｒｅｓｓ，ＮＹを参照されたい）。ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための一方法は、リン酸カルシウム形質移入である。

【０３５７】

実施例７：　ＴＦＰをコードするｃｉｒｃＲＮＡを形質導入したＴ細胞の調製

ＰＢＭＣの単離

[0371] 末梢血単核球（ＰＢＭＣ）は、全血またはバフィーコートのいずれかから調製する。全血を１０ｍＬのＨｅｐａｒｉｎバキュテナー内に収集し、直ちに処理するか、または４℃で一晩保存する。抗凝固処理したおよそ１０ｍＬの全血を、５０ｍＬの円錐状遠心分離管内で、滅菌リン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）緩衝液と混合して総体積を２０ｍＬとする（ＰＢＳ、ｐＨ７．４、Ca^{2+}／Mg^{2+}を含まない）。次いで、この血液／ＰＢＳ混合物２０ｍＬを、１５ｍＬのＦｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ（登録商標）ＰＬＵＳ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、１７－１４４０－０３）の表面上にそっと重ね、その後、ブレーキをかけずに４００ｇで３０～４０分間室温で遠心分離する。

【０３５８】

[0372] バフィーコートは、Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｂｌｏｏｄ　Ｃｏｍｐｏｎｅｎｔｓ（Ｂｏｓｔｏｎ，ＭＡ）から購入する。ＬｅｕｃｏＳｅｐ（登録商標）チューブ（Ｇｒｅｉｎｅｒ　ｂｉｏ－ｏｎｅ）は、１５ｍＬのＦｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ（登録商標）（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈ　Ｃａｒｅ）を添加することによって調製し、１０００ｇで１分間遠心分離する。バフィーコートをＰＢＳ（ｐＨ　７．４、Ca^{2+}またはMg^{2+}を含まない）中で１：３に希釈する。希釈したバフィーコートをＬｅｕｃｏｓｅｐチューブに移し、ブレーキをかけずに１０００ｇで１５分間遠心分離する。希釈した血漿／Ｆｉｃｏｌｌの界面に見られる、ＰＢＭＣを含有する細胞の層を、Ｆｉｃｏｌｌの混入が最小限になるように注意深く取り出す。次いで、ＰＢＭＣを４０ｍＬのＰＢＳで３回洗浄し、２００ｇで、１０分間室温で遠心分離することによって、残留するＦｉｃｏｌｌ、血小板、及び血漿タンパク質を除去する。次いで、細胞を血球計数器で計数する。この洗浄したＰＢＭＣを、５％ＡＢ血清及び１．２５μｇ／ｍＬアンフォテリシンＢ（Ｇｅｍｉｎｉ　Ｂｉｏｐｒｏｄｕｃｔｓ，Ｗｏｏｄｌａｎｄ，ＣＡ）、１００Ｕ／ｍＬペニシリン、及び１００μｇ／ｍＬストレプトマイシンを有するＣＡＲ　Ｔ培地（ＡＩＭ　Ｖ－ＡｌｂｕＭＡＸ（登録商標）（ＢＳＡ）（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）で一度洗浄する。あるいは、この洗浄したＰＢＭＣを断熱容器に移し、－８０℃で２４時間凍結させた後、後日の使用のために液体窒素中で保存する。

【０３５９】

Ｔ細胞の活性化

[0373] 全血またはバフィーコートのいずれかから調製したＰＢＭＣを抗ヒトＣＤ２８及びＣＤ３抗体結合磁気ビーズで２４時間刺激し、その後形質導入を行う。新たに単離したＰＢＭＣを、ｈｕＩＬ－２を含まないＣＡＲ　Ｔ培地（ＡＩＭ　Ｖ－ＡｌｂｕＭＡＸ（ＢＳＡ）（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）（５％ＡＢ血清及び１．２５μｇ／ｍＬアンフォテリシンＢ（Ｇｅｍｉｎｉ　Ｂｉｏ－ｐｒｏｄｕｃｔｓ）、１００Ｕ／ｍＬペニシリン、及び１００μｇ／ｍＬストレプトマイシンを有する）中で１回洗浄し、その後、３００ＩＵ／ｍＬヒトＩＬ－２（１０００×ストックからのもの；Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を有するＣＡＲ　Ｔ培地中に、1×10^{6}細胞／ｍＬの最終濃度で再懸濁させる。もしＰＢＭＣを予め凍結していたなら、それを解凍し、1×10^{7}細胞／ｍＬの最終濃度で、９ｍＬの予め温めておいた（３７℃）ｃＤＭＥＭ培地（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）に再懸濁させ、１０％ＦＢＳ、１００Ｕ／ｍＬペニシリン、及び１００μｇ／ｍＬストレプトマイシンの存在下で1×10^{6}細胞／ｍＬの濃度とし、その後ＣＡＲ　Ｔ培地中で１回洗浄し、1×10^{6}細胞／ｍＬでＣＡＲ　Ｔ培地に再懸濁させ、上記のようにＩＬ－２を添加する。

【０３６０】

[0374] 活性化の前に、抗ヒトＣＤ２８及びＣＤ３抗体結合磁気ビーズ（例えば、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから入手可能）を、１ｍＬの滅菌１×ＰＢＳ（ｐＨ　７．４）で３回洗浄し（ビーズを溶液から単離するのに磁気ラックを使用する）、その後、３００ＩＵ／ｍＬヒトＩＬ－２を有するＣＡＲ　Ｔ培地に再懸濁させ、４×ｌ0^{7}ビーズ／ｍＬの最終濃度にする。次いで、２５μＬ（1×10^{6}個のビ

ーズ）を１ｍＬのＰＢＭＣに移すことによって、ＰＢＭＣとビーズとを１：１のビーズ対細胞比で混合する。次いで、所望の数のアリコートを、１２ウェルの低付着性または非処理細胞培養プレートの単一ウェルに分注し、３７℃、５％CO_2で２４時間インキュベートし、その後形質導入を行う。

【０３６１】

Ｔ細胞の形質移入及び拡大

[0375] ＰＢＭＣの活性化に続き、細胞を４８時間、３７℃、５％CO_2でインキュベートする。次いで、４０～１００ｎｇのＲｎａｓｅ Ｒで処理したスプライシング反応物またはＴＦＰをコードする精製したｃｉｒｃＲＮＡを、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（登録商標）ＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭａｘ（商標）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）またはＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（登録商標）２０００（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１１６６８－０１９）を製造業者の使用説明書に従って使用して、９６ウェルプレートの１ウェル当たり１０，０００細胞／１００μＬに形質移入する。使用したキットは、脂質ナノ粒子ベースの技術である。タンパク質の発現が複数の時点で査定される実験では、各時点で培地を完全に除去し、交換する。試料のサイズは、パイロット実験に基づいて、アッセイの変動を決定し、試薬の消費を最低限にしながら条件間の有意味な差を識別できるように選択される。

【０３６２】

[0376] 次いで、細胞を、３００ＩＵ／ｍＬヒトＩＬ－２の継続的な存在下で６～１４日間増殖させる（総インキュベーション時間は、最終的なＣＡＲ－Ｔ細胞数に依存する）。細胞濃度を２～３日毎に解析し、その時点で培地を添加して、細胞懸濁液を1×10^6細胞／ｍＬに維持する。

【０３６３】

[0377] 幾つかの場合では、活性化したＰＢＭＣに、エレクトロポレーションによって形質移入する。一実施形態では、ヒトＰＢＭＣを、１対１の比率のＤｙｎａｂｅａｄｓ（登録商標）（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）で、３００ＩＵ／ｍｌの組み換えヒトＩＬ－２（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ）（Ｍｉｌｙｅｎｉ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ製のＴｒａｎｓＡｃｔ（登録商標）Ｔ Ｃｅｌｌ Ｒｅａｇｅｎｔなどの他の刺激試薬を使用してもよい）の存在下で３日間刺激する。ビーズは、エレクトロポレーションの前に除去する。細胞を洗浄し、ＯＰＴＩ－ＭＥＭ培地（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）に2.5×10^7細胞／ｍＬの濃度で再懸濁させる。２００μＬの細胞懸濁液（5×10^6細胞）を２mmのギャップのＥｌｅｃｔｒｏｐｏｒａｔｉｏｎ Ｃｕｖｅｔｔｅｓ Ｐｌｕｓ（商標）（Ｈａｒｖａｒｄ Ａｐｐａｒａｔｕｓ ＢＴＸ）に移し、氷上で予冷する。この細胞懸濁液にＴＰＦをコードする１０μｇのｃｉｒｃＲＮＡを添加する。次いで、ＥＣＭ８３０ Ｅｌｅｃｔｒｏ Ｓｑｕａｒｅ Ｗａｖｅ Ｐｏｒａｔｏｒ（Ｈａｒｖａｒｄ Ａｐｐａｒａｔｕｓ ＢＴＸ）を使用して、ｃｉｒｃＲＮＡ／細胞混合物を２００Ｖで２０ミリ秒間エレクトロポレーションする。エレクトロポレーションの直後に、細胞を新たな細胞培養培地（ＡＩＭ Ｖ ＡｌｂｕＭＡＸ（登録商標）（ＢＳＡ）無血清培地＋５％ヒトＡＢ血清＋３００ＩＵ／ｍｌ ＩＬ－２）に移し、３７℃でインキュベートする。

【０３６４】

[0378]と同様のプロトコルを使用して、Ｔ細胞にエレクトロポレーションで形質移入する。１～２μｇのｃｉｒｃＲＮＡを5×10^5個のＴ細胞と混合し、Ｎｅｏｎ．Ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）の製造業者のプロトコルに従ってエレクトロポレーションする。エレクトロポレーションは、１６００Ｖ、１０ｍｓ、３パルスに設定する。パルス後に、細胞を温かい培地に直ちに移し、３７℃でインキュベートする。

【０３６５】

[0379]

実施例８： 形質移入されたジャーカット及びＴ細胞のタンパク質発現分析

翻訳反応物のウェスタンブロット解析

[0380] Ｔ細胞及びジャーカット細胞におけるＴＦＰ発現のウェスタンブロット解析を使用して、単量体及び二量体の存在を検出する（例えば、Ｍｉｌｏｎｅ ｅｔ ａｌ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ １７（８）：１４５３－１４６４（２００９）を参照されたい）。極めて簡潔に述べると、ＴＦＰを発現するＴ細胞またはジャーカット細胞をｉｎ ｖｉｔｒｏで６～１４日間拡大させ、続いて溶解させ、還元条件下でＳＤＳ－ＰＡＧＥを行う。ＴＦＰを、ＴＣＲ鎖、例えば、抗ＴＣＲα、抗ＴＣＲβ、抗ＣＤ３ε、抗ＣＤ３γ、抗ＣＤ３δ、または抗ＣＤ３ζのいずれかに対する抗体を使用するウェエスタンブロット法によって検出する。同じＴ細胞サブセットを非還元条件下でドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）解析に使用して、共有結合二量体の形成を評価することができる。

【０３６６】

フローサイトメトリー

[0381] Ｔ細胞及びジャーカット細胞にｃｉｒｃＲＮＡが形質移入された後、ＴＦＰの発現、例えば、メソテリン、ＣＤ１９、ＢＣＭＡ、ＰＤ１、ＲＯＲ１、ＣＤ２２、ＩＬ１３Ｒａ２などに特異的な結合タンパク質を含むＴＦＰ、または二重特異性ＴＦＰの発現をフローサイトメトリーで確認する。Ｔ細胞は、抗ＣＤ３ ＡＰＣ（Ｃｌｏｎｅ、ＵＣＨＴ１．ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ カタログ番号３４０４４０、ロット番号６００５７８７）、抗ＣＤ４－Ｐａｃｉｆｉｃ ｂｌｕｅ（ＣｌｏｎｅＲＰＡＴ４、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ番号３００５２１、ロット番号Ｂ２３１６１１）、抗ＣＤ８－ＡＰＣＣＹ７（Ｃｌｏｎｅ ＳＫ１、ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、カタログ番号５５７８３４、ロット番号６０８２８６５）、メソテリン抗原（Ａｃｒｏ ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ、カタログ番号９０４ｘ－７２８９Ｆ１－Ｅ７、ロット番号９０４ｘ－３ＡＯＳ１－４Ｎ）、ＣＤ６９－ＡＦ ７００（Ｃｌｏｎｅ ＦＮ５０、カタログ番号５６０７３９、ロット番号７０５１８０２）、Ｚｅｎｏｎ Ｒ－Ｐｈｙｃｏｅｒｙｔｈｒｉｎ Ｈｕｍａｎ ＩｇＧ Ｌａｂｅｌｉｎｇ Ｋｉｔ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｃｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号Ｚ２５４０８、ロット番号１８６３２９０）及びアイソタイプコントロール、ＡＰＣ Ｍｏｕｓｅ ＩｇＧ１，ｋ Ｉｓｏｔｙｐｅ Ｃｏｎｔｒｏｌ（Ｃｌｏｎｅ Ｘ４０、ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、カタログ番号３４０４４２）、Ｐａｃｉｆｉｃ Ｂｌｕｅアイソタイプコントロール（Ｃｌｏｎｅ ＭＯＰＣ－２１、ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、カタログ番号５５８１２０）、ＡＰＣＣＹ７ ＩｇＧ１アイソタイプコントロール（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、カタログ番号５５７８７３）、ＡＦ７００ ＩｇＧ１アイソタイプコントロール（Ｃｌｏｎｅ ２７－３５、ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、カタログ番号５６０５４３）、ヒトＮＫＧ２Ｄ／ＣＤ３１４－ＡＰＣ（Ｒ＆Ｄ ｓｙｓｔｅｍｓ、ロット番号ＬＣＯ０６１３２１）、ならびにそのそれぞれのアイソタイプコントロール（ＢＤ ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して染色される。フローサイトメトリーは、ＢＤ－ＬＳＲＩＩ Ｆｏｒｔｅｓｓａ（登録商標）Ｘ２０（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して実施し、データはＦＡＣＳ ｄｉｖａソフトウェアを使用して取得し、ＦｌｏｗＪｏ（登録商標）（Ｔｒｅｅｓｔａｒ，Ｉｎｃ．Ａｓｈｌａｎｄ，ＯＲ）で解析する。

【０３６７】

実施例９： ＭＳＴＨ－ＴＦＰの細胞傷害性

[0382] ルシフェラーゼベースの細胞傷害性アッセイ（「Ｌｕｃ－Ｃｙｔｏ」アッセイ）は、共培養後に残留する生存標的細胞におけるルシフェラーゼ酵素活性を間接的に測定することによって、抗ＭＳＴＨ－ＴＦＰ発現Ｔ細胞の細胞傷害性を査定するものである。

【０３６８】

ホタルルシフェラーゼ（Ｌｕｃ）発現腫瘍細胞の生成

[0383] Ｌｕｃ－Ｃｙｔｏアッセイに使用する標的細胞は、Ｎａｌｍ６－Ｌｕｃ（ＣＤ１９陽性）及びＫ５６２－Ｌｕｃである（ＣＤ１９陰性は、Ｎａｌｍ６（ＤＳＭＺカタログ番号ＡＣＣ １２８）及びＫ５６２（（ＡＴＣＣ（登録商標）カタログ番号ＣＣＬ－２４３（商標））細胞に、ホタルルシフェラーゼを発現するように安定に形質導入するこ

とによって生成した。ホタルルシフェラーゼをコードするＤＮＡはＧｅｎｅＡｒｔ（登録商標）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）によって合成し、単一プロモーターレンチウイルスベクターｐＣＤＨ５２７Ａ－１（Ｓｙｓｔｅｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）の多重クローニング部位に挿入した。このレンチウイルスを製造業者の使用説明書に従ってパッケージングした。次いで腫瘍細胞にこのレンチウイルスを２４時間形質導入し、次いでピューロマイシン（５μｇ／ｍＬ）で選択した。Ｎａｌｍ６－Ｌｕｃ及びＫ５６２－Ｌｕｃ細胞が成功裏に生成されたことを、Ｂｒｉｇｈｔ－Ｇｌｏ（商標）Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ Ａｓｓａｙ Ｓｙｓｔｅｍ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を用いて細胞におけるルシフェラーゼ酵素活性を測定することによって確認した。

【０３６９】

Ｔ細胞の細胞傷害性を評価するＬｕｃ－Ｃｙｔｏアッセイ

[0384] Ｌｕｃ－Ｃｙｔｏアッセイは、Ｔ細胞を腫瘍細胞と、様々なエフェクター（Ｔ細胞）対標的（腫瘍細胞）（Ｅ対Ｔ）比で混合することによって構成する。標的細胞（Ｎａｌｍ６－ＬｕｃまたはＫ５６２－Ｌｕｃ）を、１０％熱不活性化（ＨＩ）ＦＢＳを補給したＲＰＭＩ－１６４０培地を有する９６ウェルプレート中にウェル当たり１０，０００細胞でプレーティングする。ＴＦＰ Ｔ細胞を、ウェル当たり１００００、３３３３、または１１１１細胞の腫瘍細胞に、１対１または１対３または１対９のＥ対Ｔ比になるように添加する。細胞の混合物を３７℃、５％ＣＯ２で２４時間インキュベートする。ルシフェラーゼ酵素活性は、Ｔ細胞と腫瘍細胞との共培養物中に残留する生存標的細胞からの活性を測定する、Ｂｒｉｇｈｔ－Ｇｌｏ（商標）Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ Ａｓｓａｙ Ｓｙｓｔｅｍ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用して測定する。

【０３７０】

実施例１０： ＧＦＰを発現するｃｉｒｃＲＮＡの生成及び形質導入

[0385] 配列番号１４６の配列を有するＧＦＰを発現するｃｉｒｃＲＮＡを生成するためのＲＮＡ前駆体の配列を、実施例１に記載する方法に従って設計した。図２及び図３に示すように、ＣＢＶ３またはＥＭＣＶのＩＲＥＳ、続いてＧＦＰを、Ａｎａｂａｅｎａプレｔ ＲＮＡ遺伝子内のグループＩ触媒イントロンの下流及び上流の２つの短いＥ２及びＥ１エキソン断片の間に配置した。グループＩ触媒イントロンの３’側半分をＥ２の上流に配置し、その一方でグループＩ触媒イントロンの５’側半分をＥ１の下流に配置した。スペーサーも３’スプライス部位とＩＲＥＳの間に導入した。３３～３５ヌクレオチド長の相補的な外部相同性アームを５’及び３’末端に配置した。ＣＢＶ３のＩＲＥＳを有するＲＮＡ前駆体の配列は、配列番号１４６である。図２は、このＲＮＡ前駆体によって形成される３次元構造体も示している。

【０３７１】

[0386] このＲＮＡ前駆体の配列を、最初に実施例４に記載する方法に従ってＤＮＡプラスミドにクローニングした。次いでこのプラスミドを線状化し、次いでＲＮＡ前駆体をＤＮＡ鋳型からｉｎ ｖｉｔｒｏ転写した。

【０３７２】

[0387] 次いで、実施例５に記載する方法に従って、線状ＲＮＡ前駆体からｃｉｒｃＲＮＡを生成した。次いで産物をアガロースゲルで泳動させた。図３に示すように、ＥＭＣＶ及びＣＢＶ３のＩＲＥＳを有するＲＮＡ前駆体は両方とも、遅く移動する方のバンドとして見えるｃｉｒｃＲＮＡ環状化産物を形成する。

【０３７３】

[0388] 次いでｃｉｒｃＲＮＡをジャーカット細胞に形質移入して、ＧＦＰタンパク質を発現する細胞の割合を評価した。ジャーカット細胞には、実施例６に記載する方法に従ってエレクトロポレーションによって形質移入した。細胞には、ＧＦＰ ｃｉｒｃＲＮＡを形質導入しなかったか、ＧＦＰ ｃｉｒｃＲＮＡを形質導入したか、またはグループＩ触媒イントロンの３’側半分とＥ２のスプライス部位にまたがる４０ヌクレオチド領域及びＥ１とイントロンの５’側半分のスプライス部位にまたがる３０ヌクレオチド領域を欠いているスプライス部位変異ＧＦＰ前駆体を形質導入した。この変異ＧＦＰ前駆体は、配

列番号１４７の配列を有するＲＮＡ前駆体から生成した。形質移入した細胞でのタンパク質発現は、実施例８に記載する方法に従って形質移入から２４時間後にフローサイトメトリーによって測定した。図４に示すように、形質導入しなかった（ＮＴ）細胞はＧＦＰを発現しなかったが、ＧＦＰ　ｃｉｒｃＲＮＡを形質導入した細胞はＧＦＰを少なくとも１５日間発現した。変異ＧＦＰ　ｃｉｒｃＲＮＡを形質導入した細胞は、ＧＦＰを１０日未満発現した。

【０３７４】

実施例１１：　抗ＣＤ１９－ＴＦＰを発現するｃｉｒｃＲＮＡの生成及び形質導入

[0389] 配列番号１４８の配列を有する抗ＣＤ１９－ＴＦＰを発現するｃｉｒｃＲＮＡを生成するためのＲＮＡ前駆体の配列を、実施例２に記載する方法に従って設計した。図５に示すように、ＣＢＶ３のＩＲＥＳ、続いて抗ＣＤ１９－ＴＦＰを、ＡｎａｂａｅｎａプレｔＲＮＡ遺伝子内のグループＩ触媒イントロンの下流及び上流の２つの短いＥ２及びＥ１エキソン断片の間に配置した。グループＩ触媒イントロンの３’側半分をＥ２の上流に配置し、その一方でグループＩ触媒イントロンの５’側半分をＥ１の下流に配置した。スペーサーも３’スプライス部位とＩＲＥＳの間に導入した。３３～３５ヌクレオチド長の相補的な外部相同性アームを５’及び３’末端に配置した。図５は、このＲＮＡ前駆体によって形成される３次元構造体も示している。

【０３７５】

[0390] このＲＮＡ前駆体の配列を、最初に実施例４に記載する方法に従ってＤＮＡプラスミドにクローニングした。次いでこのプラスミドを線状化し、次いでＲＮＡ前駆体をＤＮＡ鋳型からｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写した。

【０３７６】

[0391] 次いで、実施例５に記載する方法に従って、線状ＲＮＡ前駆体からｃｉｒｃＲＮＡを生成した。ＩＶＴ反応及び環状化に続いて、ＲＮＡをアガロースゲルで可視化した。図６に示すように、ＲＮＡ前駆体は、遅く移動する方のバンドとして見えるｃｉｒｃＲＮＡ環状化産物を形成する。

【０３７７】

[0392] 次いでｃｉｒｃＲＮＡをジャーカット細胞に形質移入して、抗ＣＤ１９－ＴＦＰタンパク質を発現する細胞の割合を評価した。ジャーカット細胞には、実施例６に記載する方法に従ってエレクトロポレーションによって形質移入した。細胞には、形質導入しなかったか、または抗ＣＤ１９－ＴＦＰ　ｃｉｒｃＲＮＡを形質導入した。形質移入した細胞でのタンパク質発現は、実施例８に記載する方法に従って形質移入から２４時間後にフローサイトメトリーによって測定した。図７に示すように、形質導入しなかった細胞は抗ＣＤ１９－ＴＦＰを発現しなかったが、抗ＣＤ１９－ＴＦＰ　ｃｉｒｃＲＮＡを形質導入した細胞は抗ＣＤ１９－ＴＦＰを少なくとも５日間発現した。

【０３７８】

実施例１２：　抗ＭＳＬＮ－ＴＦＰを発現するｃｉｒｃＲＮＡの生成及び形質導入

[0393] 配列番号１４９の配列を有する抗ＭＳＬＮ－ＴＦＰを発現するｃｉｒｃＲＮＡを生成するためのＲＮＡ前駆体の配列を、実施例２に記載する方法に従って設計した。図８に示すように、ＣＢＶ３のＩＲＥＳ、続いて抗ＭＳＬＮ－ＴＦＰを、ＡｎａｂａｅｎａプレｔＲＮＡ遺伝子内のグループＩ触媒イントロンの下流及び上流の２つの短いＥ２及びＥ１エキソン断片の間に配置した。グループＩ触媒イントロンの３’側半分をＥ２の上流に配置し、その一方でグループＩ触媒イントロンの５’側半分をＥ１の下流に配置した。スペーサーも３’スプライス部位とＩＲＥＳの間に導入した。３３～３５ヌクレオチド長の相補的な外部相同性アームを５’及び３’末端に配置した。図８は、このＲＮＡ前駆体によって形成される３次元構造体も示している。

【０３７９】

[0394] このＲＮＡ前駆体の配列を、最初に実施例４に記載する方法に従ってＤＮＡプラスミドにクローニングした。次いでこのプラスミドを線状化し、次いでＲＮＡ前駆体をＤＮＡ鋳型からｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写した。

【０３８０】
[0395] 次いで、実施例５に記載する方法に従って、線状ＲＮＡ前駆体からｃｉｒｃＲＮＡを生成した。ＩＶＴ反応及び環状化に続いて、ＲＮＡをアガロースゲルで可視化した。図９に示すように、ＲＮＡ前駆体は、遅く移動する方のバンドとして見えるｃｉｒｃＲＮＡ環状化産物を形成する。さらに、この環状化産物は、ＲＮＡｓｅ　Ｒでの処理に対して線状前駆体より耐性が高い。
【０３８１】
[0396] 次いでｃｉｒｃＲＮＡをジャーカット細胞及び活性化Ｔ細胞に形質移入して、抗ＭＳＬＮ－ＴＦＰタンパク質を発現する細胞の割合を評価した。ジャーカット細胞には、実施例６に記載する方法に従ってエレクトロポレーションによって形質移入し、Ｔ細胞には、実施例７に記載する方法に従ってエレクトロポレーションによって形質移入した。細胞には、形質導入しなかったか、または抗ＭＳＬＮ－ＴＦＰ　ｃｉｒｃＲＮＡを形質導入した。形質移入した細胞でのタンパク質発現は、実施例８に記載する方法に従って形質移入から２４時間後にフローサイトメトリーによって測定した。図１０に示すように、ジャーカット細胞において、形質導入しなかった細胞は抗ＭＳＬＮ－ＴＦＰを発現しなかったが、抗ＭＳＬＮ－ＴＦＰ　ｃｉｒｃＲＮＡを形質導入した細胞は抗ＭＳＬＮ－ＴＦＰを少なくとも７日間発現した。図１１に示すように、活性化Ｔ細胞において、形質導入しなかった細胞は抗ＭＳＬＮ－ＴＦＰを発現しなかったが、抗ＭＳＬＮ－ＴＦＰ　ｃｉｒｃＲＮＡを形質導入した細胞は抗ＭＳＬＮ－ＴＦＰを少なくとも５日間発現した。
【０３８２】
[0397] 抗ＭＳＬＮ－ＴＦＰを発現するＴ細胞の細胞傷害性を実施例９に記載する方法に従って測定した。使用した標的細胞は、ＭＳＬＮを過剰発現するＫ５６２－Ｌｕｃ細胞であり、Ｔ細胞には、抗ＭＳＬＮ－ＴＦＰ　ｃｉｒｃＲＮＡまたは抗ＭＳＬＮ－ＴＦＰレンチウイルスベクターを形質導入した。図１２に示すように、抗ＭＳＬＮ－ＴＦＰ　ｃｉｒｃＲＮＡを形質導入した細胞は、抗ＭＳＬＮ－ＴＦＰレンチウイルスベクターを形質導入した細胞と比較して、特に３：１のＴ対Ｅ比で、増大した細胞傷害性を実証した。
【０３８３】
実施例１３：　ＴＡＡ（Ｘ）－ＴＦＰを発現するｃｉｒｃＲＮＡの生成及び形質導入
[0398] 腫瘍細胞の表面上に見出される第３の抗原（腫瘍関連抗原Ｘ、それについて本明細書ではＴＡＡ（Ｘ）として特定する）を標的化するＴＦＰを発現するｃｉｒｃＲＮＡを生成するためのＲＮＡ前駆体の配列を、実施例２に記載する方法に従って設計した。ＴＡＡ（Ｘ）を標的化する４つの異なる結合ドメインを有するＴＦＰを使用した（ＴＡＡ（Ｘ）－ＴＦＰ１－４）。ＣＢＶ３のＩＲＥＳ、続いてＴＡＡ（Ｘ）－ＴＦＰ配列を、Ａｎａｂａｅｎａプレ tＲＮＡ遺伝子内のグループＩ触媒イントロンの下流及び上流の２つの短いＥ２及びＥ１エキソン断片の間に配置した。グループＩ触媒イントロンの３’側半分をＥ２の上流に配置し、その一方でグループＩ触媒イントロンの５’側半分をＥ１の下流に配置した。スペーサーも３’スプライス部位とＩＲＥＳの間に導入した。３３～３５ヌクレオチド長の相補的な外部相同性アームを５’及び３’末端に配置した。
【０３８４】
[0399] このＲＮＡ前駆体の配列を、最初に実施例４に記載する方法に従ってＤＮＡプラスミドにクローニングした。次いでこのプラスミドを線状化し、次いでＲＮＡ前駆体をＤＮＡ鋳型からｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写した。
【０３８５】
[0400] 次いで、実施例５に記載する方法に従って、線状ＲＮＡ前駆体からｃｉｒｃＲＮＡを生成した。
[0401] 次いでｃｉｒｃＲＮＡを３つのドナーからのＴ細胞に形質移入して、ＴＡＡ（Ｘ）－ＴＦＰタンパク質を発現する細胞の割合を評価した。Ｔ細胞には、実施例７に記載する方法に従ってエレクトロポレーションによって形質移入した。細胞には、形質導入しなかったか、またはＴＡＡ（Ｘ）－ＴＦＰ　ｃｉｒｃＲＮＡをエレクトロポレーションした。エレクトロポレーションした細胞におけるタンパク質発現は、実施例８に記載する方

法に従って形質移入から２４時間後にフローサイトメトリーによって測定した。図１３に示すように、形質導入しなかった細胞はＴＡＡ（Ｘ）－ＴＦＰを発現しなかったが、形質導入細胞では形質移入の２４時間後にＴＡＡ（Ｘ）－ＴＦＰの発現が検出された。

【０３８６】

[0402] ＴＡＡ（Ｘ）－ＴＦＰ－ＴＦＰを発現するＴ細胞の細胞傷害性を実施例９に記載する方法に従って測定した。使用した標的細胞は、対照であるＫ５６２－Ｌｕｃ細胞またはＴＦＰの標的となる抗原を有するＬｕｃ細胞であり、Ｔ細胞に、ＴＡＡ（Ｘ）－ＴＦＰ ｃｉｒｃＲＮＡをエレクトロポレーションしたか、またはＴＡＡ（Ｘ）－ＴＦＰレンチウイルスベクターを形質導入した。図１４に示すように、ＴＡＡ（Ｘ）－ＴＦＰ ｃｉｒｃＲＮＡを形質導入した細胞は、抗ＭＳＬＮ－ＴＦＰレンチウイルスベクターを形質導入した細胞と比較して同様の細胞傷害性を実証した。

【０３８７】

実施例１４： ｃｉｒｃＲＮＡに含まれるｍ６Ａの効果

[0403] ｃｉｒｃＲＮＡにＮ６－メチルアデノシン（ｍ６Ａ）があると免疫原性が低減することが以前に報告されている（Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｅｌｌ ２０１９）。ｍ６Ａがｃｉｒｃ ＲＮＡで生成されたＴＦＰ Ｔ細胞に果たす役割を調査するために、０％、１０％、または１００％のｍ６Ａを使用して、ＣＶＢ３－ＭＨ１ｅの線状ＲＮＡ前駆体をＩＶＴによって前述のように生成し、ＩＶＴ産物を環状化した。図１５に示すように、ＩＶＴ及び環状化産物をアガロースゲルで可視化した。環状化ステップの後で、１０％または１００％のｍ６Ａを含有する構築物は残留する目に見える線状産物を有しており、それに対してｍ６Ａのない構築物は有していなかったことから、ｍ６Ａは環状化を阻害することが示唆される。

【０３８８】

[0404] 次いで、ｃｉｒｃＲＮＡ構築物を、実施例７に記載するようにＴ細胞にエレクトロポレーションした。細胞表面発現を７日間にわたってフローサイトメトリーによって測定した。図１６に示すように、ｍ６Ａを含有する構築物は、ｍ６Ａのない構築物と比較して低減した割合のＴＦＰ陽性細胞及びＭＦＩ（平均蛍光強度）を有していた。

【０３８９】

実施例１５： Ｔ細胞におけるｃｉｒｃＲＮＡの免疫原性

[0405] 細胞性免疫応答は、Ｔ細胞（表３）及びＴＨＰ－１細胞（表４）において、エレクトロポレーションに続いてＲＴ－ＰＣＲを介してＩＦＮ－β１、ＲＡＮＴＥＳ、ＲＩＧ－１、及びＭＤＡ５の発現を測定することによって測定した。発現レベルは、ハウスキーピング遺伝子ＲＰＬ１３Ａの発現に対して正規化した。細胞に、形質導入しなかったか、偽エレクトロポレーションしたか、または（１）ＧＦＰ ｃｉｒｃＲＮＡ、（２）スプライス部位変異ＧＦＰ前駆体、（３）線状ＧＦＰ ＲＮＡ、（４）Ｔｒｉｌｉｎｋ ＧＦＰ ＲＮＡ、（５）ＭＨ１ｅ（ＭＳＬＮ） ｃｉｒｃＲＮＡ、（６）１０％ ｍ６Ａを有するＭＨ１ｅ （ＭＳＬＮ） ｃｉｒｃＲＮＡ、（７）スプライス部位変異ＭＨ１ｅ前駆体、（８）線状ＭＨ１ｅ ＲＮＡ、（９）０．１μｇ／ｍｌまたは１μｇ／ｍｌの３ｐ－ヘアピンＲＮＡ、もしくは（１０）１μｇ／ｍｌのポリＩ：Ｃをエレクトロポレーションした。ｓｈＲＮＡはＲＩＧ－Ｉリガンドに対するものであり、ポリＩ：ＣはＭＤＡ５リガンドに対するものである。ｄｓＲＮＡ（ポリＩ：Ｃ）及びヘアピンＲＮＡは、両方の細胞型において強い免疫応答を誘導し、一方、線状ＧＦＰ ＲＮＡ、ＧＦＰ ｃｉｒｃＲＮＡ、及び１０％ ｍ６Ａを有するｃｉｒｃＲＮＡは、相当な免疫応答をＴＨＰ－１で誘導するが、Ｔ細胞では誘導しない。

【０３９０】

【表３】

表３：示したＲＮＡをＴ細胞にエレクトロポレーションしてから２４時間後のＩＦＮ－β１、ＲＡＮＴＥＳ、ＲＩＧ－Ｉ、及びＭＤＡ－５転写物の誘導

	IFNB1	RANTES	RIG-I	MDA5
NT	1.00	1.00	1.00	1.00
偽	0.94	1.01	2.17	1.64
circGFP	2.63	0.79	0.95	1.00
circGFP 変異	0.91	0.77	0.96	1.08
GFP-線状	0.86	0.85	0.93	0.89
GFP Trilink	0.84	0.88	1.01	1.01
circMH1e	3.28	0.95	1.57	1.17
circMH1e 10% m6A	1.58	1.16	1.19	1.39
circMH1e 変異体	1.29	1.14	1.13	1.17
3p-phRNA (0.1ug/ml)	2.76	1.14	2.11	2.38
3p-phRNA (1ug/ml)	5.02	1.55	3.89	4.50
ポリ I:C (1ug/ul)	1105.57	7.07	30.49	10.43

【０３９１】

【表４】

表４：示したＲＮＡをＴＨＰ－１細胞にエレクトロポレーションしてから２４時間後のＩＦＮ－β１、ＲＡＮＴＥＳ、ＲＩＧ－Ｉ、及びＭＤＡ－５転写物の誘導

	IFNB1	RANTES	RIG-I	MDA5
NT	1	1	1	1
偽	0.91	1.97	1.12	1.27
circGFP	8.14	6.11	19.42	16.76
circGFP 変異	3.81	5.86	10.90	6.65
GFP-線状	5.94	3.69	5.42	5.93
GFP Trilink	1.89	3.20	2.19	2.65
circMH1e	2.75	2.70	10.70	6.86
circMH1e 10% m6A	5.43	4.77	18.06	12.55
circMH1e 変異	1.22	1.05	2.41	2.27
MH1e 線状	4.42	4.51	12.96	12.99
3p-phRNA 0.1ug/ml	33.22	44.02	81.44	71.25
3p-phRNA 1ug/ml	364.56	240.49	471.91	196.38
ポリ I:C 1ug/ml	4795.02	384.33	403.98	159.83

【０３９２】

実施例１６：　ｃｉｒｃＲＮＡをエレクトロポレーションしたＴ細胞の固形腫瘍異種移植マウスモデルへの送達

[0406]　ＴＦＰをコードするｃｉｒｃＲＮＡを形質移入したＴ細胞の効力を、ヒトＢＣＭＡを発現するＡＬＬ、ＣＬＬ、またはＮＨＬヒト細胞株に由来する皮下固形腫瘍を有する免疫不全マウスモデルで試験する。Ｔ細胞の処理に応答した腫瘍の縮小は、腫瘍サイズの測径器測定によって、またはＧＦＰ発現腫瘍細胞によって放出されるＧＦＰ蛍光シグナルの強度を追うことのいずれかによって査定することができる。

【０３９３】

[0407]　初代ヒト固形腫瘍細胞は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでの培養を必要とせずに免疫不全マウスで増殖させることができる。例示的な固形がん細胞として、Ｔｈｅ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｇｅｎｏｍｅ　Ａｔｌａｓ（ＴＣＧＡ）及び／またはＢｒｏａｄ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｃｅｌｌ　Ｌｉｎｅ　Ｅｎｃｙｃｌｏｐｅｄｉａ（ＣＣＬＥ、Ｂａｒｒｅｔｉｎａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　４８３：６０３（２０１２）を参照されたい）に示されるものなどの固形腫瘍細胞株が挙げられる。例示的な固形がん細胞として、中皮腫、腎細胞癌、胃癌、乳癌、肺癌、卵巣癌、前立腺癌、結腸癌、子宮頸癌、脳癌、肝臓癌、膵癌、腎臓、子宮内膜癌、または胃癌から単離される原発腫瘍細胞が挙げられる。幾つかの実施形態では、治療しようとするがんは、中皮腫、漿液性乳頭状卵巣腺癌、卵巣明細胞癌、ミュラー管混合

卵巣癌、類内膜（ｅｎｄｏｍｅｔｒｏｉｄ）粘液性卵巣癌、膵臓腺癌、膵管腺癌、子宮体部漿液性癌、肺腺癌、肝外胆管癌、胃腺癌、食道腺癌、結腸直腸腺癌、及び乳腺癌からなる群から選択される。

ＴＦＰをコードするｃｉｒｃＲＮＡをエレクトロポレーションしたＴ細胞の効力をヒト腫瘍異種移植モデルで試験するために、免疫不全マウスが使用される（例えば、Ｍｏｒｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｐｒｏｃｏｌ．２：２４７（２００７）を参照されたい）。１×１０^{6}～１×１０^{7}個の初代細胞（コラゲナーゼ処理したＥＣマトリックス材料中のバルク腫瘍懸濁液）または腫瘍断片（ＥＣマトリックス材料中の原発腫瘍断片）の皮下移植または皮下注射に続いて、腫瘍を２００～５００ｍｍ^{3}になるまで増殖させた後、治療を開始する。

【０３９４】

[0408] ＮＯＤ／ＳＣＩＤ（ＮＳＧ）マウスモデルを使用してｉｎ ｖｉｖｏ効力試験を行う。試験の開始前に少なくとも６週齢である雌のＮＯＤ／ＳＣＩＤ／ＩＬ－２Ｒγ－／－（ＮＳＧ－ＪＡＸ）マウスをＴｈｅ Ｊａｃｋｓｏｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（ストック番号００５５５７）から入手し、実験で使用する前に３日間順化させる。接種用のヒトＢＣＭＡ発現細胞株は、対数期培養に維持し、その後採集し、トリパンブルーで計数して生細胞数を決定する。腫瘍接種の当日に、細胞を３００ｇで５分間遠心分離し、予め温めておいた滅菌ＰＢＳ中に、０．５～１×１０^{6}細胞／１００μＬで再懸濁させる。３×１０^{6}個のＲＰＭＩ－８２２６－Ｌｕｃ細胞をＮＳＧマウスに皮下注射（ｓ．ｃ．）する。腫瘍接種の１９日後に、ＴＦＰをコードするｃｉｒｃＲＮＡを形質移入したＴ細胞をマウス当たり１５×１０^{6}細胞でマウスに静脈内投与する。群当たりの動物は７匹である。生物発光イメージングを、試験の３、７、１４、２１、２８、及び３５日目に実施する。腫瘍体積を測径器測定によって週当たり２日測定する。動物についての詳細な臨床所見を安楽死まで毎日記録する。すべての動物について死亡または安楽死まで体重測定を毎週行う。試験及び対照物質の養子移入から３５日後にすべての動物を安楽死させる。試験中に瀕死状態を呈するすべての動物は、獣医師と相談した上で、試験責任者の判断で安楽死させる。

【０３９５】

実施例１７： ＴＦＰをコードするｃｉｒｃＲＮＡの固形腫瘍異種移植マウスモデルへの送達

[0409] 理想的なｃｉｒｃＲＮＡのｉｎ ｖｉｖｏ送達系は、そのペイロードを腫瘍微小環境に存在する豊富なエンドヌクレアーゼに対して保持し、免疫検出を回避し、タンパク質または非標的細胞との非特異的相互作用を防止し、関心対象の組織への標的化送達を可能にし、細胞への侵入効力を促進することが期待される。送達戦略には、血管系への全身注射、皮下注射もしくはデポー、または局所適用が含まれる。

【０３９６】

[0410] 脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）は、以前に記載されているようにシリンジポンプを使用してマイクロ流体装置内でエタノールと水性相とを１：３の体積比で混合することによって調製される。簡潔に述べると、イオン性リピドイドｃＫＫ－Ｅ１２、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、コレステロール、及び１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［メトキシ－（ポリエチレングリコール）－２０００］（アンモニウム塩）（Ｃ１４－ＰＥＧ２０００）を３５：１６：４６．５：２．５のモル比で混合したものを可溶化することによってエタノール相を調製する。水性相は、１０ｍＭクエン酸緩衝液（ｐＨ ３）中にｃｉｒｃＲＮＡを加えて調製する。ＬＮＰを、Ｓｌｉｄｅ－Ａ－Ｌｙｚｅｒ Ｇ２ Ｄｉａｌｙｓｉｓ Ｃａｓｓｅｔｔｅｓ，２０，０００ ＭＷＣＯ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）中で、ＰＢＳに対して２時間室温で透析する。ＬＮＰナノ粒子に封入されたｃｉｒｃＲＮＡの濃度を、Ｑｕａｎｔ－ｉＴ（商標）ＲｉｂｏＧｒｅｅｎ（登録商標）アッセイ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）を使用して製造業者のプロトコルに従って解析する。ＬＮＰ中へのｃｉｒｃＲＮＡの封入効率を、１％（ｖ／ｖ）Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００の非存

在下及び存在下での測定値を比較することによって算出する。ナノ粒径、多分散性（ＰＤＩ）、及びζ電位を、Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ　Ｎａｎｏ　ＺＳ（Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｗｏｒｃｅｓｔｅｒｓｈｉｒｅ，ＵＫ）を使用する動的光散乱法（ＤＬＳ）によって解析する。

【０３９７】

[0411] 総体積５０ｍＬ中１．５～１５０ピコモルのＬＮＰ－ｃｉｒｃＲＮＡを、実施例９に記載するＡＮＯＤ／ＳＣＩＤ（ＮＳＧ）マウスモデルに１０分以内に静脈内注射する［Ｗｕ　ｅｔ　ａｌ．ＰｌｏＳ　ｏｎｅ．１０（３）．（２０１５）］。生物発光イメージングを、注射後３、７、１４、２１、２８、及び３５日目に実施する。腫瘍体積を、測径器測定によって注射後週当たり２日測定する。

【０３９８】

実施例１８：　ＴＦＰをコードするｃｉｒｃＲＮＡを固形腫瘍異種移植マウスモデルに送達するためのＬＰＮ製剤

[0412] ＬＰＮを標準的なエタノール注入法によって形成する（Ｐｏｎｓａ，Ｍ．；Ｆｏｒａｄａｄａ，Ｍ．；Ｅｓｔｅｌｒｉｃｈ，Ｊ．“Ｌｉｐｏｓｏｍｅｓ　ｏｂｔａｉｎｅｄ　ｂｙ　ｔｈｅ　ｅｔｈａｎｏｌ　ｉｎｊｅｃｔｉｏｎ　ｍｅｔｈｏｄ”Ｉｎｔ．Ｊ．Ｐｈａｒｍ．１９９３，９５，５１－５６）。様々な脂質成分について、５０ｍｇ／ｍｌエタノールストック溶液を調製し、－２０℃で保存する。

【０３９９】

[0413] 表５に一覧表示する脂質ナノ粒子製剤の調製において、示した各脂質成分を、予め設定した最終濃度及びモル比になるように、そしてエタノールの最終体積が３ｍｌになるように変倍してエタノール溶液に添加する。それとは別に、単離されたｃｉｒｃＲＮＡの水性緩衝液（１０ｍＭクエン酸塩／１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ　４．５）を１ｍｇ／ｍｌストックから調製する。脂質溶液を水性ｃｉｒｃＲＮＡ溶液に迅速に注入し、振盪して２０％エタノール中の最終懸濁液を得る。得られたナノ粒子懸濁液をろ過し、１×ＰＢＳ（ｐＨ　７．４）に対して透析し、濃縮し、２～８℃で保存する。ｃｉｒｃＲＮＡの封入を、０．１％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００の存在下及び非存在下でＲｉｂｏｇｒｅｅｎアッセイを実施することによって算出する。粒径（動的光散乱法（ＤＬＳ））及びζ電位を、Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ機器を使用して、それぞれ１×ＰＢＳ溶液中及び１ｍＭ　ＫＣｌ溶液中で決定する。

【０４００】

[0414] 総体積５０ｍＬ中１．５～１５０ピコモルのＬＮＰ－ｃｉｒｃＲＮＡを、実施例１７に記載するＡＮＯＤ／ＳＣＩＤ（ＮＳＧ）マウスモデルに１０分以内に静脈内注射する［Ｗｕ　ｅｔ　ａｌ．ＰｌｏＳ　ｏｎｅ．１０（３）．（２０１５）］。生物発光イメージングを、注射後３、７、１４、２１、２８、及び３５日目に実施する。腫瘍体積を、測径器測定によって注射後週当たり２日測定する。

【０４０１】

【表５】

表５：実施例１８における脂質ナノ粒子製剤

製剤の成分	脂質のモル比	最終 circRNA 濃度
cKK-E12	40:30:25:5	1.8 mg/ml
DOPE	40:30:25:5	1.8 mg/ml
コレステロール	40:30:25:5	1.8 mg/ml
DMG-PEG-2K	40:30:25:5	1.8 mg/ml

【０４０２】

【表６－１】

付録Ａ：配列概要

配列番号	名称	配列
1	ヒト CD3-ε	MQSGTHWRVLGLCLLSVGVWGQDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVIL TCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSG YYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICIT GGLLLLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDY EPIRKGQRDLYSGLNQRRI
2	ヒト CD3-γ	MEQGKGLAVLILAIILLQGTLAQSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCD AEAKNITWFKDGKMIGFLTEDKKKWNLGSNAKDPRGMYQCKGSQNKS KPLQVYYRMCQNCIELNAATISGFLFAEIVSIFVLAVGVYFIAGQDG VRQSRASDKQTLLPNDQLYQPLKDREDDQYSHLQGNQLRRN
3	ヒト CD3-δ	MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDRVFVNCNTSITWVEGT VGTLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQ SCVELDPATVAGIIVTDVIATLLLALGVFCFAGHETGRLSGAADTQA LLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNKS
4	ヒト CD3-ζ	MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILT ALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGL YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
5	ヒト TCR α-鎖	MAGTWLLLLLALGCPALPTGVGGTPFPSLAPPIMLLVDGKQQMVVVC LVLDVAPPGLDSPIWFSAGNGSALDAFTYGPSPATDGTWTNLAHLSL PSEELASWEPLVCHTGPGAEGHSRSTQPMHLSGEASTARTCPQEPLR GTPGGALWLGVLRLLLFKLLLFDLLLTCSCLCDPAGPLPSPATTTRL

【０４０３】

【表６－２】

		RALGSHRLHPATETGGREATSSPRPQPRDRRWGDTPPGRKPGSPVWG EGSYLSSYPTCPAQAWCSRSALRAPSSSLGAFFAGDLPPPLQAGA
6	ヒト TCR α-鎖 C 領域	PNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITD KTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPES SCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWS S
7	ヒト TCR α-鎖 V 領域 CTL-L17	MAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDDQQVKQNSPSLSVQEGRISIL NCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEGPTFLISISSIKDKNEDGRFTVFLNK SAKHLSLHIVPSQPGDSAVYFCAAKGAGTASKLTFGTGTRLQVTL
8	ヒト TCR β-鎖 C 領域	EDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWV NGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHF RCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQG VLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDF
9	ヒト TCR β-鎖 V 領域 CTL-L17	MGTSLLCWMALCLLGADHADTGVSQNPRHNITKRGQNVTFRCDPISE HNRLYWYRQTLGQGPEFLTYFQNEAQLEKSRLLSDRFSAERPKGSFS TLEIQRTEQGDSAMYLCASSLAGLNQPQHFGDGTRLSIL
10	ヒト TCR β-鎖 V 領域 YT35	MDSWTFCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISG HNSLFWYRQTMMRGLELLIYFNNNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFS TLKIQPSEPRDSAVYFCASSFSTCSANYGYTFGSGTRLTVV
11	MSLN アミノ酸配列:ヒトメソテリン配列(UniProt アクセッション番号 Q13421)	MALPTARPLLGSCGTPALGSLLFLLFSLGWVQPSRTLAGETGQEAAP LDGVLANPPNISSLSPRQLLGFPCAEVSGLSTERVRELAVALAQKNV KLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALPLDLLLFLNPDAFSGPQACTRFF SRITKANVDLLPRGAPERQRLLPAALACWGVRGSLLSEADVRALGGL ACDLPGRFVAESAEVLLPRLVSCPGPLDQDQQEAARAALQGGGPPYG PPSTWSVSTMDALRGLLPVLGQPIIRSIPQGIVAAWRQRSSRDPSWR QPERTILRPRFRREVEKTACPSGKKAREIDESLIFYKKWELEACVDA ALLATQMDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLDELYPQGYPESVIQHLGYLF LKMSPEDIRKWNVTSLETLKALLEVNKGHEMSPQVATLIDRFVKGRG QLDKDTLDTLTAFYPGYLCSLSPEELSSVPPSSIWAVRPQDLDTCDP RQLDVLYPKARLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQQNVS MDLATFMKLRTDAVLPLTVAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWIL RQRQDDLDTLGLGLQGGIPNGYLVLDLSMQEALSGTPCLLGPGPVLT VLALLLASTLA
12	p510_抗-MSLN_SS1_CD3ε DNA	acgcgtgtagtcttatgcaatactcttgtagtcttgcaacatggtaa cgatgagttagcaacatgccttacaaggagagaaaaagcaccgtgca tgccgattggtggaagtaaggtggtacgatcgtgccttattaggaag gcaacagacgggtctgacatggattggacgaaccactgaattgccgc attgcagagatattgtatttaagtgcctagctcgatacaataaacgg gtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaac tagggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgctt caagtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggtaactagagatc cctcagaccctttagtcagtgtggaaaatctctagcagtggcgccc

【０４０４】

【表６－３】

		gaacagggacctgaaagcgaaagggaaaccagagctctctcgacgca ggactcggcttgctgaagcgcgcacggcaagaggcgaggggcggcga ctggtgagtacgccaaaaattttgactagcggaggctagaaggagag agatgggtgcgagagcgtcagtattaagcgggggagaattagatcgc gatgggaaaaaattcggttaaggccaggggaaagaaaaaatataaa ttaaaacatatagtatgggcaagcagggagctagaacgattcgcagt taatcctggcctgttagaaacatcagaaggctgtagacaaatactgg gacagctacaaccatcccttcagacaggatcagaagaacttagatca ttatataatacagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaaggataga gataaaagacaccaaggaagctttagacaagatagaggaagagcaaa acaaaagtaagaccaccgcacagcaagcggccactgatcttcagacc tggaggaggagatatgagggacaattggagaagtgaattatataaat ataaagtagtaaaaattgaaccattaggagtagcacccaccaaggca aagagaagagtggtgcagagagaaaaaagagcagtgggaataggagc tttgttccttgggttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgcag cctcaatgacgctgacggtacaggccagacaattattgtctggtata gtgcagcagcagaacaatttgctgagggctattgaggcgcaacagca tctgttgcaactcacagtctggggcatcaagcagctccaggcaagaa tcctggctgtggaaagatacctaaaggatcaacagctcctggggatt tggggttgctctggaaaactcatttgcaccactgctgtgccttggaa tgctagttggagtaataaatctctggaacagattggaatcacacgac ctggatggagtgggacagagaaattaacaattacacaagcttaatac actccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaa gaattattggaattagataaatgggcaagtttgtggaattggtttaa cataacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagtag gaggcttggtaggtttaagaatagttttgctgtactttctatagtg aatagagttaggcagggatattcaccattatcgtttcagacccacct ccccaaccccgaggggacccgacaggcccgaaggaatagaagaagaag gtggagagagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatct cgacggtatcggttaacttttaaaagaaaaggggggattgggggggta cagtgcagggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacaaa ctaaagaattacaaaaacaaattacaaaattcaaaatttatcgata ctagtattatgcccagtacatgaccttatgggactttcctacttggc agtacatctacgtattagtcatcgctattaccatggtgatgcggttt tggcagtacatcaatgggcgtggatagcggtttgactcacggggatt tccaagtctccaccccattgacgtcaatgggagtttgttttggcacc aaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtaacaactccgccccattg acgcaaatgggcggtaggcgtgtacggtgggaggtttatataagcag agctcgtttagtgaaccgtcagatcgcctggagacgccatccacgct gttttgacctccatagaagattctagagccgccaccatgcttctcct ggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacacccagcattcctcc tgatcccagacattcagcaggtccagctccagcagtctggccctgaa ctcgaaaaacctggcgctagcgtgaaaatttcctgtaaagcctccgg

【０４０５】

【表６－４】

		ctactcttttactggctacacaatgaattgggtgaaacagtctcacg gcaaatccctcgaatggatcggactcatcacaccctacaatggcgcc tcttcctacaaccagaaattccggggcaaggcaacactcactgtgga caaatcatcctctaccgcctacatggatctgctctccctcacatctg aggactccgctgtctactttttgtgccccgaggaggatacgacggacga ggattcgattactggggacagggaacaactgtgaccgtgtctagtgg cggcggagggagtggaggcggaggatcttctggcgggggatccgata ttgaactcacacagtctcccgctatcatgtctgcttctccccggcgag aaagtgactatgacttgctctgcttcctcttctgtgtcctacatgca ctggtaccagcagaaatctggcacatccccctaaacggtggatctacg atactagcaaaactggcatccggcgtgcctgggcgattctctggctct ggctctggcaactcttactctctcacaatctcatctgtcgaggctga ggacgatgccacatactactgtcagcagtggtctaaacacccactca cattcggcgctggcactaaactggaaataaaagcggccgcaggtggc ggcggttctggtggcggcggttctggtggcggcggttctctcgagga tggtaatgaagaaatgggtggtattacacagacaccatataaagtct ccatctctggaaccacagtaatattgacatgccctcagtatcctgga tctgaaatactatggcaacacaatgataaaaacataggcggtgatga ggatgataaaaacataggcagtgatgaggatcacctgtcactgaagg aattttcagaattggagcaaagtggttattatgtctgctaccccaga ggaagcaaaccagaagatgcgaacttttatctctacctgagggcaag agtgtgtgagaactgcatggagatggatgtgatgtcggtggccacaa ttgtcatagtggacatctgcatcactgggggcttgctgctgctggtt tactactggagcaagaatagaaaggccaaggccaagcctgtgacacg aggagcgggtgctggcggcaggcaaagggacaaaacaaggagaggc caccacctgttcccaacccagactatgagcccatccggaaaggccag cgggacctgtattctggcctgaatcagagacgcatctgataagaatt cgatccgcggccgcgaaggatctgcgatcgctccggtgcccgtcagt gggcagagcgcacatcgcccacagtccccgagaagttgggggggaggg gtcggcaattgaacgggtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactg ggaaagtgatgtcgtgtactggctccgcctttttcccgagggtgggg gagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttctttttcgc aacgggtttgccgccagaacacagctgaagcttcgagggggctcgcat ctctccttcacgcgcccgccgccctacctgaggccgccatccacgcc ggttgagtcgcgttctgccgcctcccgcctgtggtgcctcctgaact gcgtccgccgtctaggtaagtttaaagctcaggtcgagaccgggcct ttgtccggcgctcccttggagcctacctagactcagccggctctcca cgctttgcctgaccctgcttgctcaactctacgtctttgtttcgttt tctgttctgcgccgttacagatccaagctgtgaccggcgcctacgct agatgaccgagtacaagcccacggtgcgcctcgccacccgcgacgac gtcccccagggccgtacgcaccctcgccgccgcgttcgccgactaccc cgccacgcgccacaccgtcgatccggaccgccacatcgagcgggtca ccgagctgcaagaactcttcctcacgcgcgtcgggctcgacatcggc

【０４０６】

【表６－５】

		aaggtgtgggtcgcggacgacggcgccgcggtggcggtctggaccac gccggagagcgtcgaagcgggggcggtgttcgccgagatcggccccgc gcatggccgagttgagcggttcccggctggccgcgcagcaacagatg gaaggcctcctggcgccgcaccggcccaaggagcccgcgtggttcct ggccaccgtcggcgtctcgcccgaccaccagggcaagggtctgggca gcgccgtcgtgctccccggagtggaggcggccgagcgcgccgggtg cccgccttcctggagacctccgcgcccccgcaacctccccttctacga gcggctcggcttcaccgtcaccgccgacgtcgaggtgcccgaaggac cgcgcacctggtgcatgacccgcaagcccggtgcctgagtcgacaat caacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggtattcttaa ctatgttgctccttttacgctatgtggatacgctgctttaatgcctt tgtatcatgctattgcttcccgtatggctttcattttctcctccttg tataaatcctggttgctgtctctttatgaggagttgtggcccgttgt caggcaacgtggcgtggtgtgcactgtgtttgctgacgcaacccccca ctggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttc gctttcccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgcctgcct tgcccgctgctggacaggggctcggctgttgggcactgacaattccg tggtgttgtcggggaaatcatcgtcctttccttggctgctcgcctgt gttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttc ggccctcaatccagcggaccttccttcccgcggcctgctgccggctc tgcggcctcttccgcgtcttcgccttcgccctcagacgagtcggatc tccctttgggccgcctccccgcctggtaccttaagaccaatgactt acaaggcagctgtagatcttagccactttttaaaagaaaaggggga ctggaagggctaattcactcccaacgaaaataagatctgctttttgc ttgtactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctct ctggctaactagggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgcct tgagtgcttcaagtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggtaa ctagagatccctcagacccttttagtcagtgtggaaaatctctagca gtagtagttcatgtcatcttattattcagtatttataacttgcaaag aaatgaatatcagagagtgagaggaacttgtttattgcagcttataa tggttacaaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcat tttttcactgcattctagttgtggtttgtccaaactcatcaatgta tcttatcatgtctggctctagctatcccgccctaactccgcccagt tccgcccattctccgccccatggctgactaatttttttatttatgc agaggccgaggccgcctcggcctctgagctattccagaagtagtgag gaggcttttttggaggcctagacttttgcagagacggcccaaattcg taatcatggtcatagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcac aattccacacaacatacgagccggaagcataaagtgtaaagcctggg gtgcctaatgagtgagctaactcacattaattgcgttgcgctcactg cccgctttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaat cggccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattgggcgctcttccg cttcctcgctcactgactcgctgcgctcggtcgttcggctgcggcga gcggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatc

【０４０７】

【表６－６】

		aggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaagg ccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcgttttccataggctc cgccccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtg gcgaaacccgacaggactataaagataccaggcgtttccccctggaa gctccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccggatac ctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctc acgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgg gctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccgaccgctgcgccttatcc ggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgcc actggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtag gcggtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacact agaaggacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccctt cggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctg gtagcggtggttttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaa aaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgc tcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatgagattat caaaaaggatcttcacctagatccttttaaattaaaaatgaagtttt aaatcaatctaaagtatatatgagtaaacttggtctgacagttacca atgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcgtt catccatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgg gagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccc acgctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaa gggccgagcgcagaagtggtcctgcaactttatccgcctccatccag tctattaattgttgccgggaagctagagtaagtagttcgccagttaa tagtttgcgcaacgttgttgccattgctacaggcatcgtggtgtcac gctcgtcgtttggtatggcttcattcagctccggttcccaacgatca aggcgagttacatgatcccccatgttgtgcaaaaaagcggttagctc cttcggtcctccgatcgttgtcagaagtaagttggccgcagtgttat cactcatggttatggcagcactgcataattctcttactgtcatgcca tccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcatt ctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctcttgcccggcgtcaa tacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgctcatc attggaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgct gttgagatccagttcgatgtaacccactcgtgcacccaactgatctt cagcatcttttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacagga aggcaaaatgccgcaaaaaagggaataagggcgacacggaaatgttg aatactcatactcttcctttttcaatattattgaagcatttatcagg gttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaat aaacaaataggggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctga cgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaataggc gtatcacgaggccctttcgtctcgcgcgtttcggtgatgacggtgaa aacctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagcttgtctgta agcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgtcagcgggtg

【０４０８】

【表６－７】

		ttggcgggtgtcggggctggcttaactatgcggcatcagagcagatt gtactgagagtgcaccatatgcggtgtgaaataccgcacagatgcgt aaggagaaaataccgcatcaggcgccattcgccattcaggctgcgca actgttgggaagggcgatcggtgcgggcctcttcgctattacgccag ctggcgaaaggggatgtgctgcaaggcgattaagttgggtaacgcc agggttttcccagtcacgacgttgtaaaacgacggccagtgccaagc tg
13	p510_抗-MSLN_SS1_CD3εアミノ酸	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQQVQLQQSGPELEKPGASVKISC KASGYSFTGYTMNWVKQSHGKSLEWIGLITPYNGASSYNQKFRGKAT LTVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYFCARGGYDGRGFDYWGQGTTVT VSSGGGGSGGGGSSGGGSDIELTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSV SYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPGRFSGSGSGNSYSLTISS VEAEDDATYYCQQWSKHPLTFGAGTKLEIKAAAGGGGSGGGGSGGGG SLEDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNI GGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLY LRARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGLLLLVYYWSKNRKAKAK PVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQRDLYSGLNQRRI *
14	抗-MSLN軽鎖アミノ酸(MHC1445LC.1)	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQ SPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKITRVEAEDLGVFFCS QSTHVPFTFGSGTKLEIK
15	抗-MSLN軽鎖DNA(MHC1445LC.1)	gatgttgtgatgacccaaactccactctccctgcctgtcagtcttgg agatcaagcctccatctcttgcagatctagtcagagccttgtacacaca gtaatggaaacacctatttacattggtacctgcagaagccaggccag tctccaaagctcctgatctacaaagtttccaaccgattttctggggt cccagacaggttcagtggcagtggatcagggactgatttcacactca agatcaccagagtggaggctgaggatctgggagttttttctgctct caaagtacacatgttccattcacgttcggctcggggacaaagttgga aataaaa
16	抗-MSLN重鎖アミノ酸(MHC1445HC.1)	QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFFDYEMHWVKQTPVHGLEW IGAIDPEIDGTAYNQKFKGKAILTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVY YCTDYYGSSYWYFDVWGTGTTVTVSS
17	抗-MSLN重鎖DNA(MHC1445HC.1)	caggttcaactgcagcagtctggggctgagctggtgaggcctggggc ttcagtgacgctgtcctgcaaggcttcgggctacacatttttgact atgaaatgcactgggtgaagcagacacctgtgcatggcctggaatgg attggagctattgatcctgaaattgatggtactgcctacaatcagaa gttcaagggcaaggccatactgactgcagacaaatcctccagcacag cctacatggagctccgcagcctgacatctgaggactctgccgtctat tactgtacagattactacggtagtagctactggtacttcgatgtctg gggcacagggaccacggtcaccgtctcctc
18	抗-MSLN軽鎖アミノ酸(MHC1446LC.1)	DVMMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWFLQKPGQ SPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCS QTTHVPLTFGAGTKLELK

【０４０９】

【表６－８】

19	抗-MSLN軽鎖DNA(MHC1446LC.1)	gatgttatgatgacccaaactccactctccctgcctgtcagtcttgg agatcaagcctccatctcttgcagatctagtcagagccttgtacaca gtaatggaaacacctatttacattggttcctgcagaagccaggccag tctccaaagctcctgatctacaaagtttccaaccgattttctggggt cccagacaggttcagtggcagtggatcagggacagatttcacactca agatcagcagagtggaggctgaggatctgggagtttatttctgctct caaactacacatgttccgctcacgttcggtgctgggaccaagctgga gctgaaa
20	抗-MSLN重鎖アミノ酸(MHC1446HC.3)	QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFTDYEMHWVKQTPVHGLEW IGAIDPEIAGTAYNQKFKGKAILTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVY YCSRYGGNYLYYFDYWGQGTTLTVSS
21	抗-MSLN重鎖DNA(MHC1446HC.3)	caggttcaactgcagcagtctggggctgagctggtgaggcctggggc ttcagtgacgctgtcctgcaaggcttcgggctacactttactgact atgaaatgcactgggtgaagcagacacctgtccatggcctggaatgg attggagctattgatcctgaaattgctggtactgcctacaatcagaa gttcaagggcaaggccatactgactgcagacaaatcctccagcacag cctacatggagctccgcagcctgacatctgaggactctgccgtctat tactgttcaagatacggtggtaactacctttactactttgactactg gggccaaggcaccactctcacagtctcctca
22	抗-MSLN軽鎖アミノ酸(MHC1447LC.5)	DVLMTQIPLSLPVSLGDQASISCRSSQNIVYSNGNTYLEWYLQKPGQ SPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCF QGSHVPFTFGSGTKLEIK
23	抗-MSLN軽鎖DNA(MHC1447LC.5)	gatgttttgatgacccaaattccactctccctgcctgtcagtcttgg agatcaagcctccatctcttgcagatctagtcagaacattgtgtata gtaatggaaacacctatttagagtggtacctgcagaaaccaggccag tctccaaagctcctgatctacaaagtttccaaccgattttctggggt cccagacaggttcagtggcagtggatcagggacagatttcacactca agatcagcagagtggaggctgaggatctgggagtttattactgcttt caaggttcacatgttccattcacgttcggctcggggacaaagttgga aataaaa
24	抗-MSLN重鎖アミノ酸(MHC1447HC.5)	QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFTDYEMHWVKQTPVHGLEW IGAIDPEIGGSAYNQKFKGRAILTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVY YCTGYDGYFWFAYWGQGTLVTVSS
25	抗-MSLN重鎖DNA(MHC1447HC.5)	caggttcaactgcagcagtccggggctgagctggtgaggcctggggc ttcagtgacgctgtcctgcaaggcttcgggctacacatttactgact atgaaatgcactgggtgaagcagacacctgtgcatggcctggaatgg attggagctattgatcctgaaattggtggttctgcctacaatcagaa gttcaagggcagggccatatttgactgcagacaaatcctccagcacag cctacatggagctccgcagcctgacatctgaggactctgccgtctat tattgtacgggctatgatggttacttttggtttgcttactggggcca agggactctggtcactgtctcttca
26	抗-MSLN軽鎖アミノ酸	ENVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSSTSPKLWI YDTSKLASGVPGRFSGSGSGNSYSLTISSMEAEDVATYYCFQGSGYP

【０４１０】

【表６－９】

	(MHC1448LC.4)	LTFGSGTKLEIK
27	抗-MSLN軽鎖DNA(MHC1448LC.4)	gaaaatgttctcacccagtctccagcaatcatgtccgcatctccagggaaaaggtcaccatgacctgcagtgctagctcaagtgtaagttacatgcactggtaccagcagaagtcaagcacctccccaaactctggattatgacacatccaaactggcttctggagtcccaggtcgcttcagtggcagtgggtctggaaactcttactctctcacgatcagcagcatggaggctgaagatgttgccacttattactgttttcaggggagtgggtacccactcacgttcggctcggggacaaagttggaaataaaa
28	抗-MSLN重鎖アミノ酸(MHC1448HC.3)	QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFTDYEMHWVKQTPVHGLEWIGGIDPETGGTAYNQKFKGKAILTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTSYYGSRVFWGTGTTVTVSS
29	抗-MSLN重鎖DNA(MHC1448HC.3)	caggttcaactgcagcagtctggggctgagctggtgaggcctggggcttcagtgacgctgtcctgcaaggcttcgggctacacatttactgactatgaaatgcactgggtgaaacagacacctgtgcatggcctggaatggattggaggtattgatcctgaaactggtggtactgcctacaatcagaagttcaagggtaaggccatactgactgcagacaaatcctccagcacagcctacatggagctccgcagcctgacatctgaggactctgccgtctatactgtacaagttactatggtagtagagtcttctggggcacagggaccacggtcaccgtctcctca
30	抗-MSLN軽鎖アミノ酸(MHC1449LC.3)	QIVLSQSPAILSAFPGEKVTMTCRASSSVSYMHWYQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSVEAEDAATYYCQQWSSNPPTLTFGAGTKLELK
31	抗-MSLN軽鎖DNA(MHC1449LC.3)	caaattgttctctcccagtctccagcaatcctgtctgcatttccaggggagaaggtcactatgacttgcagggccagctcaagtgtaagttacatgcactggtaccagcagaagccaggatcctccccaaaccctggattatgccacatccaacctggcttctggagtccctgctcgcttcagtggcagtgggtctgggacctcttactctctcacaatcagcagtgtggaggctgaagatgctgccacttattactgccagcagtggagtagtaacccacccacgctcacgttcggtgctgggaccaagctggagctgaaa
32	抗-MSLN重鎖アミノ酸(MHC1449HC.3)	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTSYGISWVKQRTGQGLEWIGEIYPRSGNTYYNESFKGKVTLTADKSSGTAYMELRSLTSEDSAVYFCARWGSYGSPPFYYGMDYWGQGTSVTVSS
33	抗-MSLN重鎖DNA(MHC1449HC.3)	caggttcagctgcagcagtctggagctgagctggcgaggcctggggcttcagtgaagctgtcctgcaaggcttctggctacaccttcacaagctatggtataagctgggtgaagcagaggactggacagggccttgagtggattggagagatttatcctagaagtggtaatacttactacaatgagagcttcaagggcaaggtcacactgaccgcagacaaatcttccggcacagcgtacatggagctccgcagcctgacatctgaggactctgcggtctatttctgtgcaagatggggctcctacggtagtccccccttttactatggtatggactactggggtcaaggaacctcagtcaccgtctcctca
34	抗-MSLN軽鎖アミノ酸(MHC1450LC.3)	DVLMTQTPLSLPVSLGNQASISCRSSQSIVHSSGSTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPYTFGGGTKLEIK

【０４１１】

【表６－１０】

35	抗-MSLN軽鎖DNA(MHC1450LC.3)	gatgttttgatgacccaaactccactctccctgcctgtcagtcttgg aaatcaagcctccatctcttgcagatctagtcagagcattgtacata gtagtggaagcacctatttagaatggtacctgcagaaaccaggccag tctccaaagctcctgatctacaaagtttccaaccgattttctggggt cccagacaggttcagtggcagtggatcagggacagatttcacactca agatcagcagagtggaggctgaggatctgggagtttattactgcttt caaggctcacatgttccatacacgttcggaggggggaccaagctgga aataaaa
36	抗-MSLN重鎖アミノ酸(MHC1450HC.5)	QVQLQQSGAELARPGTSVKVSCKASGYTFTSYGISWVKQRIGQGLEW IGEIHPRSGNSYYNEKIRGKATLTADKSSSTAYMELRSLISEDSAVY FCARLITTVVANYYAMDYWGQGTSVTVSS
37	抗-MSLN重鎖DNA(MHC1450HC.5)	caggttcagctgcagcagtctggagctgagctggcgaggcctgggac ttcagtgaaggtgtcctgcaaggcttctggctatacattcacaagtt atggtataagctgggtgaagcagagaattggacagggccttgagtgg attggagagattcatcctagaagtggtaatagttactataatgagaa gatcaggggcaaggccacactgactgcagacaaatcctccagcacag cgtacatggagctccgcagcctgatatctgaggactctgcggtctat ttctgtgcaaggctgattactacggtagttgctaattactatgctat ggactactggggtcaaggaacctcagtcaccgtctcctca
38	抗-MSLN軽鎖アミノ酸(MHC1451LC.1)	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPG QSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYC KQSYNLVTFGAGTKLELK
39	抗-MSLN軽鎖DNA(MHC1451LC.1)	gacattgtgatgtcacagtctccatcctccctggctgtgtcagcagg agagaaggtcactatgagctgcaaatccagtcagagtctgctcaaca gtagaaccccgaaagaactacttggcttggtaccagcagaaaccaggg cagtctcctaaactgctgatctactgggcatccactagggaatctgg ggtccctgatcgcttcacaggcagtggatctgggacagatttcactc tcaccatcagcagtgtgcaggctgaagacctggcagtttattactgc aaacaatcttataatctggtcacgttcggtgctgggaccaagctgga gctgaaa
40	抗-MSLN重鎖アミノ酸(MHC1451HC.2)	QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFFDYEMHWVKQTPVHGLEW IGAIDPEIDGTAYNQKFKGKAILTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVY YCTDYYGSSYWYFDVWGTGTTVTVSS
41	抗-MSLN重鎖DNA(MHC1451HC.2)	caggttcaactgcagcagtctggggctgagctggtgaggcctggggc ttcagtgacgctgtcctgcaaggcttcgggctacacatttttgtgact atgaaatgcactgggtgaagcagacacctgtgcatggcctggaatgg attggagctattgatcctgaaattgatggtactgcctacaatcagaa gttcaagggcaaggccatactgactgcagacaaatcctccagcacag cctacatggagctccgcagcctgacatctgaggactctgccgtctat tactgtacagattactacggtagtagctactggtacttcgatgtctg gggcacagggaccacggtcaccgtctcctc
42	抗-MSLN軽鎖ア	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTISCSASSSVSYMYWYQQKPGSSPKPWI

【０４１２】

【表６－１１】

	ミノ酸(MHC1452LC.1)	YRTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQYHSYPLTFGAGTKLELK
43	抗-MSLN軽鎖DNA(MHC1452LC.1)	caaattgttctcacccagtctccagcaatcatgtctgcatctccaggggagaaggtcaccatatcctgcagtgccagctcaagtgtaagttacatgtactggtaccagcagaagccaggatcctcccccaaaccctggattatcgcacatccaacctggcttctggagtccctgctcgcttcagtggcagtgggtctgggacctcttactctctcacaatcagcagcatggaggctgaagatgctgccacttattactgccagcagtatcatagttacccactcacgttcggtgctgggaccaagctggagctgaaa
44	抗-MSLN軽鎖アミノ酸(MHC1452LC.6)	QIVLTQSPAIMSASPGERVTMTCSASSSVSSSYLYWYQQKSGSSPKLWIYSISNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTINSMEAEDAATYYCQQWSSNPQLTFGAGTKLELK
45	抗-MSLN軽鎖DNA(MHC1452LC.6)	caaattgttctcacccagtctccagcaatcatgtctgcatctcctgggaacgggtcaccatgacctgcagtgccagctcaagtgtaagttccagctacttgtactggtaccagcagaagtcaggatcctccccaaaactctggatttatagcatatccaacctggcttctggagtcccagctcgcttcagtggcagtgggtctgggacctcttactctctcacaatcaacagcatggaggctgaagatgctgccacttattactgccagcagtggagtagtaacccacagctcacgttcggtgctgggaccaagctggagctgaaa
46	抗-MSLN重鎖アミノ酸(MHC1452HC.2)	QVQLKQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKQRPGQGLEWIGKIGPGSGSTYYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARTGYYVGYYAMDYWGQGTSVTVSS
47	抗-MSLN重鎖DNA(MHC1452HC.2)	caggtccagctgaagcagtctggagctgagctggtgaagcctggggcttcagtgaagatatcctgcaaggcttctggctacaccttcactgactactatataaactgggtgaagcagaggcctggacagggccttgagtggattggaaagattggtcctggaagtggtagtacttactacaatgagaagttcaagggcaaggccacactgactgcagacaaatcctccagcacagcctacatgcagctcagcagcctgacatctgaggactctgcagtctatttctgtgcaagaactggttactacgttggttactatgctatggactactggggtcaaggaacctcagtcaccgtctcctca
48	抗-MSLN重鎖アミノ酸(MHC1452HC.4)	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTIYGISWVKQRTGQGLEWIGEIYPRSDNTYYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCARWYSFYAMDYWGQGTSVTVSS
49	抗-MSLN重鎖DNA(MHC1452HC.4)	caggttcagctgcagcagtctggagctgagctggcgaggcctggggcttcagtgaagctgtcctgcaaggcttctggctacaccttcacaatctatggtataagctgggtgaaacagagaactggacagggccttgagtggattggagagatttatcctagaagtgataatacttactacaatgagaagttcaagggcaaggccacactgactgcagacaaatcctccagcacagcgtacatggagctccgcagcctgacatctgaggactctgcggtctatttctgtgcaagatggtactcgttctatgctatggactactggggtcaaggaacctcagtcaccgtctcctca
	単一ドメイン抗-MSLNバインダー	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGDWSANFMYWYRQAPGKQRELVARISGRGVVDYVESVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY

【０４１３】

【表６－１２】

	1(SD1)	CAVASYWGQGTLVTVSS
50	単一ドメイン抗-MSLN バインダー4(SD4)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTSSINTMYWYRQAPGKERELVAFISSGGSTNVRDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNTYIPYGGTLHDFWGQGTLVTVSS
51	単一ドメイン抗-MSLN バインダー6(SD6)	QVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGSTFSIRAMRWYRQAPGTERDLVAVIYGSSTYYADAVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNADTIGTARDYWGQGTLVTVSS
52	p514_BCMA(DNA)	acgcgtgtagtcttatgcaatactcttgtagtcttgcaacatggtaacgatgagttagcaacatgccttacaaggagagaaaaagcaccgtgcatgccgattggtggaagtaaggtggtacgatcgtgccttattaggaaggcaacagacgggtctgacatggattggacgaaccactgaattgccgcattgcagagatattgtatttaagtgcctagctcgatacataaacgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgcttcaagtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttttagtcagtgtggaaaatctctagcagtggcgcccgaacagggacctgaaagcgaaagggaaaccagagctctctcgacgcaggactcggcttgctgaagcgcgcacggcaagaggcgaggggcggcgactggtgagtacgccaaaaattttgactagcggaggctagaaggagagagatgggtgcgagagcgtcagtattaagcgggggagaattagatcgcgatgggaaaaaattcggttaaggccaggggaaagaaaaaatataaaattaaaacatatagtatgggcaagcagggagctagaacgattcgcagttaatcctggcctgttagaaacatcagaaggctgtagacaaatactgggacagctacaaccatcccttcagacaggatcagaagaacttagatcatatataatacagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaaggatagagataaaagacaccaaggaagctttagacaagatagaggaagagcaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcggccactgatcttcagacctggaggaggagatatgagggacaattggagaagtgaattatataaaatataaagtagtaaaaattgaaccattaggagtagcacccaccaaggcaaagagaagagtggtgcagagagaaaaaagagcagtgggaataggagcttttgttccttgggttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgcagcgtcaatgacgctgacggtacaggccagacaattattgtctggtatagtgcagcagcagaacaatttgctgagggctattgaggcgcaacagcatctgttgcaactcacagtctggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctgtggaaagatacctaaaggatcaacagctcctggggatttggggttgctctggaaaactcatttgcaccactgctgtgccttggaatgctagttggagtaataaatctctggaacagatttggaatcacacgacctggatggagtgggacagagaaattaacaattacaagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtttgtggaattggtttaacataacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagtaggaggcttggtaggtttaagaatagttttgctgtactttctatagtgaatagagttaggcagggatattcac

【０４１４】

【表６－１３】

		cattatcgtttcagacccacctcccaaccccgaggggacccgacagg cccgaaggaatagaagaagaaggtggagagagagacagagacagatc cattcgattagtgaacggatctcgacggtatcggttaacttttaaaa gaaaaggggggattgggggtacagtgcagggaaagaatagtagac ataatagcaacagacatacaaactaaagaattacaaaaacaaattac aaaattcaaaattttatcgatactagtattatgcccagtacatgacc ttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcatcgc tattaccatggtgatgcggttttggcagtacatcaatgggcgtggat agcggtttgactcacggggatttccaagtctccaccccattgacgtc aatgggagtttgttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatg tcgtaacaactccgccccattgacgcaaatgggcggtaggcgtgtac ggtgggaggtttatataagcagagctcgtttagtgaaccgtcagatc gcctggagacgccatccacgctgttttgacctccatagaagattcta gagctagcgccgccaccatgctccagatggctggccagtgcagccag aacgagtacttcgacagcctgctgcacgcctgcatcccttgccagct gcggtgcagcagcaacaccccaccctgacctgccagcggtactgca acgccagcgtgaccaacagcgtgaagggcaccaacgccatcctgtgg acctgcctgggcctgagcctgatcatcagcctggccgtgttcgtgct gatgttcctgctgcggaagatcaacagcgagccccctgaaggacgagt tcaagaacaccggcagcggcctgctgggcatggccaacatcgacctg gaaaagagccggaccggcgacgagatcatcctgcccagaggcctgga gtacaccgtggaagagtgtacctgcgaggactgcatcaagagcaagc ccaaggtggacagcgaccactgcttccctctgcccgccatggaagag ggcgccaccatcctggtgacaacaaagaccaacgactactgcaagag cctgcctgccgccctgagcgccaccgagatcgagaagtccatcagcg ccagatgaggatccgcggccgcaaggatctgcgatcgctccggtgcc cgtcagtgggcagagcgcacatcgcccacagtccccgagaagttggg gggagggtcggcaattgaacgggtgcctagagaaggtggcgcgggg taaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgccttttcccgag ggtggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttct ttttcgcaacgggtttgccgccagaacacagctgaagcttcgagggg ctcgcatctctccttcacgcgcccgccgccctacctgaggccgccat ccacgccggttgagtcgcgttctgccgcctcccgcctgtggtgcctc ctgaactgcgtccgccgtctaggtaagtttaaagctcaggtcgagac cgggcctttgtccggcgctcccttggagcctacctagactcagccgg ctctccacgctttgcctgaccctgcttgctcaactctacgtctttgt ttcgttttctgttctgcgccgttacagatccaagctgtgaccggcgc ctacgtcgagatgattgaacaagatggattgcacgcaggttctccgg ccgcttgggtggagaggctattcg gctatgactgggcacaacagacaatcggctgctctgatgccgccgtg ttccggctgtcagcgcaggggcgcccggttcttttgtcaagaccga cctgtccggtgccctgaatgaactgcaggacgaggcagcgcggctat cgtggctggccgcgacgggcgttccttgcgcagctgtgctcgacgtt

【０４１５】

【表６－１４】

		gtcactgaagcgggaagggactggctgctattgggcgaagtgccggg gcaggatctcctgtcatctcaccttgctcctgccgagaaagtatcca tcatggctgatgcaatgcggcggctgcatacgcttgatccggctacc tgcccattcgaccaccaagcgaaacatcgcatcgagcgagcacgtac tcggatggaagccggtcttgtcgatcaggatgatctggacgaagagc atcaggggctcgcgccagccgaactgttcgccaggctcaaggcgcgc atgcccgacggcgaggatctcgtcgtgacccatggcgatgcctgctt gccgaatatcatggtggaaaatggccgcttttctggattcatcgact gtggccggctgggtgtggcggaccgctatcaggacatagcgttggct acccgtgatattgctgaagagcttggcggcgaatgggctgaccgctt cctcgtgctttacggtatcgccgctcccgattcgcagcgcatcgcct tctatcgccttcttgacgagttcttctgactcgacaatcaacctctg gattacaaaatttgtgaaagattgactggtattcttaactatgttgc tcctttacgctatgtggatacgctgctttaatgcctttgtatcatg ctattgcttcccgtatggctttcattttctcctccttgtataaatcc tggttgctgtctctttatgaggagttgtggcccgttgtcaggcaacg tggcgtggtgtgcactgtgtttgctgacgcaacccccactggttggg gcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgctttcccc ctcgctattgccacggcggaactcatcgccgcctgccttgcccgctg ctggacagggctcggctgttgggcactgacaattccgtggtgttgt cggggaaatcatcgtcctttccttggctgctcgcctgtgttgccacc tggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaa tccagcggaccttccttcccgcggcctgctgccggctctgcggcctc ttccgcgtcttcgccttcgccctcagacgagtcggatctccctttgg gccgcctccccgcctggtaccttaagaccaatgacttacaaggcag ctgtagatcttagccactttttaaaagaaaaggggggactggaaggg ctaattcactcccaacgaagataagatctgcttttgcttgtactgg gtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaac tagggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgctt caagtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggtaactagagatc cctcagaccctttagtcagtgtggaaaatctctagcagtagtagtt catgtcatcttattattcagtatttataacttgcaaagaaatgaata tcagagagtgagaggaacttgtttattgcagcttataatggttacaa ataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcatttttttcac tgcattctagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttatcat gtctggctctagctatcccgcccctaactccgcccatcccgccccta actccgcccagttccgcccattctccgccccatggctgactaatttt ttttatttatgcagaggccgaggccgcctcggcctctgagctattcc agaagtagtgaggaggcttttttggaggcctagacttttgcagagac ggcccaaattcgtaatcatggtcatagctgtttcctgtgtgaaattg ttatccgctcacaattccacacaacatacgagccggaagcataaagt gtaaagcctggggtgcctaatgagtgagctaactcacattaattgcg ttgcgctcactgcccgctttccagtcgggaaacctgtcgtgccagct

【０４１６】

【表６－１５】

		gcattaatgaatcggccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattg ggcgctcttccgcttcctcgctcactgactcgctgcgctcggtcgtt cggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggtt atccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaag gccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcgttt ttccataggctccgcccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctc aagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcgt ttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccg cttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgct ttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttc gctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccgaccgc tgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagaca cgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagag cgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcctaac tacggctacactagaaggacagtatttggtatctgcgctctgctgaa gccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaac aaaccaccgctggtagcggtggttttttgtttgcaagcagcagatt acgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctac ggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttgg tcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaaattaa aaatgaagttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaacttggtc tgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatct gtctatttcgttcatccatagttgcctgactccccgtcgtgtagata actacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgat accgcgagacccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaacc agccagccggaagggccgagcgcagaagtggtcctgcaactttatcc gcctccatccagtctattaattgttgccgggaagctagagtaagtag ttcgccagttaatagtttgcgcaacgttgttgccattgctacaggca tcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttcattcagctccggt tcccaacgatcaaggcgagttacatgatcccccatgttgtgcaaaaa agcggttagctccttcggtcctccgatcgttgtcagaagtaagttgg ccgcagtgttatcactcatggttatggcagcactgcataattctctt actgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtactc aaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctctt gcccggcgtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaacttta aaagtgctcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaag gatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaacccactcgtgcac ccaactgatcttcagcatcttttactttcaccagcgtttctgggtga gcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataagggcgac acggaaatgttgaatactcatactcttcctttttcaatattattgaa gcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgt atttagaaaaataaacaaatagggttccgcgcacatttccccgaaa agtgccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacct

【０４１７】

【表６－１６】

		ataaaaataggcgtatcacgaggcccttcgtctcgcgcgtttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgtcggggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccatatgcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcatcaggcgccattcgccattcaggctgcgcaactgttgggaagggcgatcggtgcgggcctcttcgctattacgccagctggcgaaaggggatgtgctgcaaggcgattaagttgggtaacgccagggttttcccagtcacgacgttgtaaaacgacggccagtgccaagctg
53	抗-BCMA scFv 1 軽鎖 CDR1(DNA)	AAAAGCAGCCAGAGCCTGGTGCATAGCAACGGCAACACCTATCTGCAT
54	抗-BCMA scFv 1 軽鎖 CDR1(アミノ酸)	KSSQSLVHSNGNTYLH
55	抗-BCMA scFv 1 軽鎖 CDR2(DNA)	AAAGTGAGCAACCGCTTTAGC
56	抗-BCMA scFv 1 軽鎖 CDR2(アミノ酸)	KVSNRFS
57	抗-BCMA scFv 1 軽鎖 CDR3(DNA)	GCGGAAACCAGCCATGTGCCGTGGACC
58	抗-BCMA scFv 1 軽鎖 CDR3(アミノ酸)	AETSHVPWT
59	抗-BCMA scFv 1 重鎖 CDR1(DNA)	AAAGCGAGCGGCTATAGCTTTCCGGATTATTATATTAAC
60	抗-BCMA scFv1 重鎖 CDR1(アミノ酸)	KASGYSFPDYYIN
61	抗-BCMA scFv 1 重鎖 CDR2(DNA)	TGGATTTATTTTGCGAGCGGCAACAGCGAATATAACCAGAAATTTACCGGC
62	抗-BCMA scFv 1 重鎖 CDR2(アミノ酸)	WIYFASGNSEYNQKFTG
63	抗-BCMA scFv 1 重鎖 CDR3(DNA)	CTGTATGATTATGATTGGTATTTTGATGTG
64	抗-BCMA scFv 1 重鎖 CDR3(アミノ酸)	LYDYDWYFDV
65	抗-BCMA軽鎖可変領域(DNA)	GATATTGTGATGACCCAGACCCCGCTGAGCCTGAGCGTGACCCCGGGCGAACCGGCGAGCATTAGCTGCAAAAGCAGCCAGAGCCTGGTGCATAGCAACGGCAACACCTATCTGCATTGGTATCTGCAGAAACCGGGCCAG

【０４１８】

【表６－１７】

		AGCCCGCAGCTGCTGATTTATAAAGTGAGCAACCGCTTTAGCGGCGT GCCGGATCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCGCGGATTTTACCCTGA AAATTAGCCGCGTGGAAGCGGAAGATGTGGGCGTGTATTATTGCGCG GAAACCAGCCATGTGCCGTGGACCTTTGGCCAGGGCACCAAACTGGA AATTAAAAGC
66	抗-BCMA軽鎖可変領域(アミノ酸)	DIVMTQTPLSLSVTPGEPASISCKSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQ SPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGADFTLKISRVEAEDVGVYYCA ETSHVPWTFGQGTKLEIKS
67	抗-BCMA重鎖可変領域(DNA)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGCGC GAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTATAGCTTTCCGGATT ATTATATTAACTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGGAATGG ATGGGCTGGATTTATTTTGCGAGCGGCAACAGCGAATATAACCAGAA ATTTACCGGCCGCGTGACCATGACCCGCGATACCAGCAGCAGCACCG CGTATATGGAACTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACCGCGGTGTAT TTTTGCGCGAGCCTGTATGATTATGATTGGTATTTTGATGTGTGGGG CCAGGGCACCATGGTGACCGTGAGCAGC
68	抗-BCMA重鎖可変領域(アミノ酸)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFPDYYINWVRQAPGQGLEW MGWIYFASGNSEYNQKFTGRVTMTRDTSSSTAYMELSSLRSEDTAVY FCASLYDYDWYFDVWGQGTMVTVSS
69	抗-BCMA V_HH 1 DNA	ATGGCGGTGGTCCTGGCTGCTCTACTACAAGGTGTCCAGGCTCAGGT GCACCCGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGACTGGGGGGTCTC TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGCTGGTATCTTCAGTATCAATGTC ATGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAGCAGCGCGAATTGGTCGC GAGTATAACTAGTCGTGGTGATACAACGTATGCGAACTCCGTGAAGG GCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTATATCTG CAAATGAACGCCCTGAAACCTGAGGACACAGCCGTCTATTACTGTAA TTTAAAGGGGACAGACTATAGTGGTACATCCACCCAGACCTTCGACA GACAGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCTTCGGAACCCAAGACA CCAAAAACCACAACCACAACCACAACCACAACCACAACCCAATCCTAC AACAGAATCCAAGTGTCCCAAATGTCCAGCCCCTGAGCTCCTGGGAG GGCCCTCAGTCTTCATCTTCCCCCCGAAACCCAAGGACGTCCTCTCC ATC
70	抗-BCMA V_HH 1 アミノ酸	MAVVLAALLQGVQAQVHPVESGGGLVQTGGSLRLSCAASAGIFSINV MGWYRQAPGKQRELVASITSRGDTTYANSVKGRFTISRDNAKNTVYL QMNALKPEDTAVYYCNLKGTDYSGTSTQTFDRQGQGTQVTVSSEPKT PKPQPQPQPQPQPNPTTESKCPKCPAPELLGGPSVFIFPPKPKDVLS I
71	抗-BCMA V_HH1 CDR1	INVMG
72	抗-BCMA V_HH1 CDR2	SITSRGDTTYANSVKG
73	抗-BCMA V_HH1 CDR3	LKGTDYSGTSTQTFDR

【０４１９】

【表６－１８】

74	抗-BCMA V_HH2 アミノ酸	QVQLVESGGGLVQPGESLRLSCAASTNIFSISPMGWYRQAPGKQRELVAAIHGFSTLYADSVKGRFTISRDNAKNTIYLQMNSLKPEDTAVYYCNKVPWGDYHPRNVYWGQGTQVTVSSEPKTPKPQPQPQPQPQPQPNPTTESKCPKCPAPELLGGPSVFIFPPKPKDVLSI
75	抗-BCMA V_HH2 CDR1	ISPMG
76	抗-BCMA V_HH2 CDR2	AIHGFSTLYADSVKG
77	抗-BCMA V_HH2 CDR3	VPWGDYHPRNVY
78	NKG2Dタイプ II 膜内在性タンパク質、UniProt アクセッション番号 P26718-1	MGWIRGRRSRHSWEMSEFHNYNLDLKKSDFSTRWQKQRCPVVKSKCRENASPFFFCCFIAVAMGIRFIIMVAIWSAVFLNSLFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIIEMQKGDCALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTV
79	p502_NKG2D_CD3イプシロン細胞外ドメイン二量体(ECD)	NSLFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIIEMQKGDCALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTVGGGGSGGGGSGGGGSLENSLFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIIEMQKGDCALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTVAAAGGGGSGGGGSGGGGSLEDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMS
80	p502_NKG2D_CD3イプシロン ORF、二量体(アミノ酸配列)	NSLFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIIEMQKGDCALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTVGGGGSGGGGSGGGGSLENSLFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIIEMQKGDCALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTVAAAGGGGSGGGGSGGGGSLEDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGLLLLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQRDLYSGLNQRRI*
81	p502 NKG2D 単量体 DNA配列	acgcgtgtagtcttatgcaatactctgtagtcttgcaacatggtaacgatgagttagcaacatgccttacaaggagagaaaaagcaccgtgcatgccgattggtggaagtaaggtggtacgatcgtgccttattaggaaggcaacagacgggtctgacatggattggacgaaccactgaattgccgcattgcagagatattgtatttaagtgcctagctcgatacataaacgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaacta

【０４２０】

【表６－１９】

		gggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgcttca agtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggtaactagagatccc tcagacccttttagtcagtgtggaaaatctctagcagtggcgcccga acagggacttgaaagcgaaagggaaaccagaggagctctctcgacgc aggactcggcttgctgaagcgcgcacggcaagaggcgaggggcggcg actggtgagtacgccaaaaattttgactagcggaggctagaaggaga gagatgggtgcgagagcgtcagtattaagcgggggagaattagatcg cgatgggaaaaaattcggttaaggccaggggaaagaaaaaatataa attaaaacatatagtatgggcaagcagggagctagaacgattcgcag ttaatcctggcctgttagaaacatcagaaggctgtagacaaatactg ggacagctacaaccatcccttcagacaggatcagaagaacttagatc attatataatacagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaaggatag agataaaagacaccaaggaagctttagacaagatagaggaagagcaa aacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcggccactgatcttcagac ctggaggaggagatatgagggacaattggagaagtgaattatataaa tataaagtagtaaaaattgaaccattaggagtagcacccaccaaggc aaagagaagagtggtgcagagagaaaaaagagcagtgggaataggag ctttgttccttgggttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgca gcgtcaatgacgctgacggtacaggccagacaattattgtctggtat agtgcagcagcagaacaatttgctgagggctattgaggcgcaacagc atctgttgcaactcacagtctggggcatcaagcagctccaggcaaga atcctggctgtggaaagatacctaaaggatcaacagctcctggggat ttggggttgctctggaaaactcatttgcaccactgctgtgccttgga atgctagttggagtaataaaatctctggaacagatttggaatcacacg acctggatggagtgggacagagaaattaacaattacacaagcttaat acactccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaac aagaattattggaattagataaatgggcaagtttgtggaattggttt aacataacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagt aggaggcttggtaggtttaagaatagtttttgctgtactttctatag tgaatagagttaggcagggatattcaccattatcgtttcagacccac ctcccaaccccgaggggacccgacaggcccgaaggaatagaagaaga aggtggagagagagacagagacagatccattcgattagtgaacggat ctcgacggtatcggttaacttttaaaagaaaaggggggattgggggg tacagtgcaggggaaagaatagtagacataatagcaacagacataca aactaaagaattacaaaaacaaattacaaaattcaaaaattttatcga tactagtggatctgcgatcgctccggtgcccgtcagtgggcagagcg cacatcgcccacagtccccgagaagttgggggaggagggtcggcaatt gaacgggtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgat gtcgtgtactggctccgccttttcccgagggtgggggagaaccgta tataagtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttcgcaacgggtttg ccgccagaacacagctgaagcttcgaggggctcgcatctctccttca cgcgcccgccgccctacctgaggccgccatccacgccggttgagtcg cgttctgccgcctcccgcctgtggtgcctcctgaactgcgtccgccg

【０４２１】

【表６－２０】

		tctaggtaagtttaaagctcaggtcgagaccgggcctttgtccggcg ctcccttggagcctacctagactcagccggctctccacgctttgcct gaccctgcttgctcaactctacgtctttgtttcgttttctgttctgc gccgttacagatccaagctgtgaccggcgcctactctagagccgcca ccatgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacac ccagcattcctcctgatcccaaactccctcttcaaccaggaggtgca gatccccctcacagagagctactgcgggccctgtccaaagaattgga tatgttacaagaacaattgctaccagttcttcgatgagtcaaaaaat tggtatgagagccaagcttcctgcatgtctcagaatgccagccttct gaaggtgtactcaaaagaagaccaggacttgctgaaactggtcaagt cttaccactggatggggctcgtgcacattccaacgaacggtagctgg cagtgggaagatggctccatattgtctcctaaccttctcaccataat agagatgcagaagggtgattgcgctctgtacgctagtagcttcaagg gctatattgagaattgtagtacacccaacacatacatttgtatgcag agaaccgtgggaggtggtggcagcggtggcggtggaagtggtggcgg cggttctctcgaggatggtaatgaagaaatgggtggtattacacaga caccatataaagtctccatctctggaaccacagtaatattgacatgc cctcagtatcctggatctgaaatactatggcaacacaatgataaaaa cataggcggtgatgaggatgataaaaacataggcagtgatgaggatc acctgtcactgaaggaatttttcagaattggagcaaagtggttattat gtctgctaccccagaggaagcaaaccagaagatgcgaacttttatct ctacctgagggcaagagtgtgtgagaactgcatggagatggatgtga tgtcggtggccacaattgtcatagtggacatctgcatcactgggggc ttgctgctgctggtttactactggagcaagaatagaaaggccaaggc caagcctgtgacacgaggagcgggtgctggcggcaggcaaaggggac aaaacaaggagaggccaccacctgttcccaacccagactatgagccc atccggaaaggccagcgggacctgtattctggcctgaatcagagacg catctgataagaattcgaatttaaatcggatccgcggccgcgtcgac aatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggtattct taactatgttgctccttttacgctatgtggatacgctgctttaatgc ctttgtatcatgctattgcttcccgtatggctttcattttctcctcc ttgtataaatcctggttgctgtctctttatgaggagttgtggcccgt tgtcaggcaacgtggcgtggtgtgcactgtgtttgctgacgcaaccc ccactggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggact ttcgctttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgcctg ccttgcccgctgctggacagggctcggctgttgggcactgacaatt ccgtggtgttgtcggggaaatcatcgtcctttccttggctgctcgcc tgtgttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtccc ttcggccctcaatccagcggaccttccttcccgcggcctgctgccgg ctctgcggcctcttccgcgtcttcgccttcgccctcagacgagtcgg atctccctttgggccgcctccccgcctggtacctttaagaccaatga cttacaaggcagctgtagatcttagccactttttaaaagaaaaggggg ggactggaagggctaattcactcccaacgaagataagatctgctttt

【０４２２】

【表６－２１】

		tgcttgtactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagc tctctggctaactagggaacccactgcttaagcctcaataaagcttg ccttgagtgcttcaagtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctgg taactagagatccctcagacccttttagtcagtgtggaaaatctcta gcagtagtagttcatgtcatcttattattcagtatttataacttgca aagaaatgaatatcagagagtgagaggaacttgtttattgcagctta taatggttacaaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaag catttttttcactgcattctagttgtggtttgtccaaactcatcaat gtatcttatcatgtctggctctagctatcccgcccctaactccgccc atcccgcccctaactccgcccagttccgcccattctccgcccccatgg ctgactaatttttttttatttatgcagaggccgaggccgcctcggcct ctgagctattccagaagtagtgaggaggcttttttggaggcctagac ttttgcagagacggcccaaattcgtaatcatggtcatagctgtttcc tgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacaacatacgagccg gaagcataaagtgtaaagcctggggtgcctaatgagtgagctaactc acattaattgcgttgcgctcactgcccgctttccagtcgggaaacct gtcgtgccagctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagaggcg gtttgcgtattgggcgctcttccgcttcctcgctcactgactcgctg cgctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggc ggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaaca tgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcg ttgctggcgttttccataggctccgcccccctgacgagcatcacaa aaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaa gataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgtt ccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggg aagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgg tgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccccgtt cagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaa cccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaaca ggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaag tggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatttggtatctg cgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctctt gatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggttttttttgtttgc aagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatccttt gatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgtt aagggattttggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatc cttttaaattaaaaatgaagttttaaatcaatctaaagtatatatga gtaaacttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcaccta tctcagcgatctgtctatttcgttcatccatagttgcctgactcccc gtcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccag tgctgcaatgataccgcgagacccacgctcaccggctccagatttat cagcaataaaccagccagccggaagggccgagcgcagaagtggtcct gcaactttatccgcctccatccagtctattaattgttgccgggaagc

【０４２３】

【表６－２２】

		tagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacgttgttgcca ttgctacaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttca ttcagctccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatcccccat gttgtgcaaaaaagcggttagctccttcggtcctccgatcgttgtca gaagtaagttggccgcagtgttatcactcatggttatggcagcactg cataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgac tggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgac cgagttgctcttgcccggcgtcaatacgggataataccgcgccacat agcagaactttaaaagtgctcatcattggaaaacgttcttcggggcg aaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaac ccactcgtgcacccaactgatcttcagcatcttttactttcaccagc gtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaaggg aataagggcgacacggaaatgttgaatactcatactcttccttttc aatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatac atatttgaatgtatttagaaaaataaacaaataggggttccgcgcac atttccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaaccattattatca tgacattaacctataaaaataggcgtatcacgaggccctttcgtctc gcgcgtttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctccc ggagacggtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaag cccgtcagggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgtcggggctggctt aactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccatatgcg gtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcatcaggc gccattcgccattcaggctgcgcaactgttgggaagggcgatcggtg cgggcctcttcgctattacgccagctggcgaaaggggatgtgctgc aaggcgattaagttgggtaacgccagggttttcccagtcacgacgtt gtaaaacgacggccagtgccaagctg
82	p502_NKG2D二量体_ CD3イプシロン (DNA配列)	acgcgtgtagtcttatgcaatactctgtagtcttgcaacatggtaac gatgagttagcaacatgccttacaaggagagaaaaagcaccgtgcat gccgattggtggaagtaaggtggtacgatcgtgccttattaggaagg caacagacgggtctgacatggattggacgaaccactgaattgccgca ttgcagagatattgtatttaagtgcctagctcgatacataaacgggt ctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaacta gggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgcttca agtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggtaactagagatccc tcagacccttttagtcagtgtggaaaatctctagcagtggcgcccga acagggacttgaaagcgaaagggaaaccagaggagctctctcgacgc aggactcggcttgctgaagcgcgcacggcaagaggcgaggggcggcg actggtgagtacgccaaaaattttgactagcggaggctagaaggaga gagatgggtgcgagagcgtcagtattaagcgggggagaattagatcg cgatgggaaaaaattcggttaaggccaggggaaagaaaaaatataa attaaaacatatagtatgggcaagcagggagctagaacgattcgcag ttaatcctggcctgttagaaacatcagaaggctgtagacaaatactg ggacagctacaaccatcccttcagacaggatcagaagaacttagatc

【０４２４】

【表６－２３】

		attatataatacagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaaggatag agataaaagacaccaaggaagctttagacaagatagaggaagagcaa aacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcggccactgatcttcagac ctggaggaggagatatgagggacaattggagaagtgaattatataaa tataaagtagtaaaaattgaaccattaggagtagcacccaccaaggc aaagagaagagtggtgcagagagaaaaaagagcagtgggaataggag ctttgttccttgggttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgca gcgtcaatgacgctgacggtacaggccagacaattattgtctggtat agtgcagcagcagaacaatttgctgagggctattgaggcgcaacagc atctgttgcaactcacagtctggggcatcaagcagctccaggcaaga atcctggctgtggaaagatacctaaaggatcaacagctcctggggat ttggggttgctctggaaaactcatttgcaccactgctgtgccttgga atgctagttggagtaataaatctctggaacagatttggaatcacacg acctggatggagtgggacagagaaattaacaattacacaagcttaat acactccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaac aagaattattggaattagataaatgggcaagtttgtggaattggttt aacataacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagt aggaggcttggtaggtttaagaatagtttttgctgtactttctatag tgaatagagttaggcagggatattcaccattatcgtttcagacccac ctcccaacccccgaggggacccgacaggcccgaaggaatagaagaaga aggtggagagagagacagagacagatccattcgattagtgaacggat ctcgacggtatcggttaacttttaaaagaaaaggggggattgggggg tacagtgcaggggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacа aactaaagaattacaaaaacaaattacaaaattcaaaatttttatcga tactagtggatctgcgatcgctccggtgcccgtcagtgggcagagcg cacatcgcccacagtccccgagaagttgggggggagggtcggcaatt gaacgggtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgat gtcgtgtactggctccgcctttttcccgagggtgggggagaaccgta tataagtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttttcgcaacgggtttg ccgccagaacacagctgaagcttcgagggggctcgcatctctccttca cgcgcccgccgccctacctgaggccgccatccacgccggttgagtcg cgttctgccgcctcccgcctgtggtgcctcctgaactgcgtccgccg ctaggtaagtttaaagctcaggtcgagaccgggcctttgtccggcg ctcccttggagcctacctagactcagccggctctccacgctttgcct gaccctgcttgctcaactctacgtctttgtttcgttttctgttctgc gccgttacagatccaagctgtgaccggcgcctactctagagccgcca ccatgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacac ccagcattcctcctgatcccaaactccctcttcaaccaggaggtgca gatccccctcacagagagctactgcgggccctgtccaaagaattgga tatgttacaagaacaattgctaccagttcttcgatgagtcaaaaaat tggtatgagagccaagcttcctgcatgtctcagaatgccagccttct gaaggtgtactcaaaagaagaccaggacttgctgaaactggtcaagt cttaccactggatggggctcgtgcacattccaacgaacggtagctgg

【０４２５】

【表６－２４】

		cagtgggaagatggctccatattgtctcctaaccttctcaccataat agagatgcagaagggtgattgcgctctgtacgctagtagcttcaagg gctatattgagaattgtagtacacccaacacatacatttgtatgcag agaaccgtgggaggtggtggcagcggtggcggtggaagtggtggcgg tggcagtctcgagaactcattattcaaccaagaagttcaaattccct tgaccgaaagttactgtggcccatgtcctaaaaactggatatgttac aaaaataactgctaccaatttttgatgagagtaaaaactggtatga gagccaggcttcttgtatgtctcaaaatgccagccttctgaaagtat acagcaaagaggaccaggatttacttaaactggtgaagtcatatcat tggatgggactagtacacattccaacaaatggatcttggcagtggga agatggctccattctctcacccaacctactaacaataattgaaatgc agaagggagactgtgcactctatgcctctagctttaaaggctatata gaaaactgttcaactccaaatacatacatctgcatgcaaaggactgt ggcggccgcaggtggcggcggttctggtggcggcggttctggtggcg gcggttctctcgaggatggtaatgaagaaatgggtggtattacacag acaccatataaagtctccatctctggaaccacagtaatattgacatg ccctcagtatcctggatctgaaatactatggcaacacaatgataaaa acataggcggtgatgaggatgataaaaacataggcagtgatgaggat cacctgtcactgaaggaattttcagaattggagcaaagtggttatta tgtctgctaccccagaggaagcaaaccagaagatgcgaacttttatc tctacctgagggcaagagtgtgtgagaactgcatggagatggatgtg atgtcggtggccacaattgtcatagtggacatctgcatcactgggggg cttgctgctgctggtttactactggagcaagaatagaaaggccaagg ccaagcctgtgacacgaggagcgggtgctggcggcaggcaaagggga caaaacaaggagaggccaccacctgttcccaacccagactatgagcc catccggaaaggccagcgggacctgtattctggcctgaatcagagac gcatctgataagaattcgaatttaaatcggatccgcggccgcgtcga caatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggtattc ttaactatgttgctccttttacgctatgtggatacgctgctttaatg cctttgtatcatgctattgcttcccgtatggctttcattttctcctc cttgtataaatcctggttgctgtctctttatgaggagttgtggcccg ttgtcaggcaacgtggcgtggtgtgcactgtgtttgctgacgcaacc cccactggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggac tttcgctttcccctccctattgccacggcggaactcatcgccgcct gccttgcccgctgctggacaggggctcggctgttgggcactgacaat tccgtggtgttgtcggggaaatcatcgtcctttccttggctgctcgc ctgtgttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcc cttcggccctcaatccagcggaccttccttcccgcggcctgctgccg gctctgcggcctcttccgcgtcttcgccttcgccctcagacgagtcg gatctcccttgggccgcctccccgcctggtacctttaagaccaatg acttacaaggcagctgtagatcttagccactttttaaaagaaaaggg gggactggaagggctaattcactcccaacgaagataagatctgcttt ttgcttgtactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggag

【０４２６】

【表６－２５】

		ctctctggctaactagggaacccactgcttaagcctcaataaagctt gccttgagtgcttcaagtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctg gtaactagagatccctcagacccttttagtcagtgtggaaaatctct agcagtagtagttcatgtcatcttattattcagtatttataacttgc aaagaaatgaatatcagagagtgagaggaacttgtttattgcagctt ataatggttacaaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaa gcatttttttcactgcattctagttgtggtttgtccaaactcatcaa tgtatcttatcatgtctggctctagctatcccgcccctaactccgcc catcccgcccctaactccgcccagttccgcccattctccgccccatg gctgactaatttttttttatttatgcagaggccgaggccgcctcggcc tctgagctattccagaagtagtgaggaggcttttttggaggcctaga cttttgcagagacggcccaaattcgtaatcatggtcatagctgtttc ctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacaacatacgagcc ggaagcataaagtgtaaagcctggggtgcctaatgagtgagctaact cacattaattgcgttgcgctcactgcccgctttccagtcgggaaacc tgtcgtgccagctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagaggc ggtttgcgtattgggcgctcttccgcttcctcgctcactgactcgct gcgctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaagg cggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaac atgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgc gttgctggcgtttttccataggctccgcccccctgacgagcatcaca aaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataa agataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgt tccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgg gaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcg gtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgt tcagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtcca acccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaac aggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaa gtggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatttggtatct gcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctct tgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggttttttgtttg caagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctt tgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgt taagggattttggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagat ccttttaaattaaaaatgaagttttaaatcaatctaaagtatatatg agtaaacttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacct atctcagcgatctgtctatttcgttcatccatagttgcctgactccc cgtcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggcccca gtgctgcaatgataccgcgagacccacgctcaccggctccagattta tcagcaataaaccagccagccggaagggccgagcgcagaagtggtcc tgcaactttatccgcctccatccagtctattaattgttgccgggaag ctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacgttgttgcc

【０４２７】

【表６－２６】

		attgctacaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttc attcagctccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatcccccа tgttgtgcaaaaaagcggttagctccttcggtcctccgatcgttgtc agaagtaagttggccgcagtgttatcactcatggttatggcagcact gcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtga ctggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcga ccgagttgctcttgcccggcgtcaatacgggataataccgcgccaca tagcagaactttaaaagtgctcatcattggaaaacgttcttcggggc gaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaa cccactcgtgcacccaactgatcttcagcatcttttacttcaccag cgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagg gaataagggcgacacggaaatgttgaatactcatactcttcctttt caatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggata catatttgaatgtatttagaaaaataaacaaatagggttccgcgca catttccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaaccattattatc atgacattaacctataaaaataggcgtatcacgaggcccctttcgtct cgcgcgtttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcc cggagacggtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaa gcccgtcagggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgtcggggctggct taactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccatatgc ggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcatcagg cgccattcgccattcaggctgcgcaactgttgggaagggcgatcggt gcgggcctcttcgctattacgccagctggcgaaaggggatgtgctg caaggcgattaagttgggtaacgccagggttttcccagtcacgacgt tgtaaaacgacggccagtgccaagctg
83	ヒトROR1、アイソフォーム1(規範) UniProtアクセッション番号 Q01973-1	MHRPRRRGTRPPLLALLAALLLAARGAAAQETELSVSAELVPTSSWN ISSELNKDSYLTLDEPMNNITTSLGQTAELHCKVSGNPPPTIRWFKN DAPVVQEPRRLSFRSTIYGSRLRIRNLDTTDTGYFQCVATNGKEVVS STGVLFVKFGPPPTASPGYSDEYEEDGFCQPYRGIACARFIGNRTVY MESLHMQGEIENQITAAFTMIGTSSHLSDKCSQFAIPSLCHYAFPYC DETSSVPKPRDLCRDECEILENVLCQTEYIFARSNPMILMRLKLPNC EDLPQPESPEAANCIRIGIPMADPINKNHKCYNSTGVDYRGTVSVTK SGRQCQPWNSQYPHTHTFTALRFPELNGGHSYCRNPGNQKEAPWCFT LDENFKSDLCDIPACDSKDSKEKNKMEILYILVPSVAIPLAIALLFF FICVCRNNQKSSSAPVQRQPKHVRGQNVEMSMLNAYKPKSKAKELPL SAVRFMEELGECAFGKIYKGHLYLPGMDHAQLVAIKTLKDYNNPQQW TEFQQEASLMAELHHPNIVCLLGAVTQEQPVCMLFEYINQGDLHEFL IMRSPHSDVGCSSDEDGTVKSSLDHGDFLHIAIQIAAGMEYLSSHFF VHKDLAARNILIGEQLHVKISDLGLSREIYSADYYRVQSKSLLPIRW MPPEAIMYGKFSSDSDIWSFGVVLWEIFSFGLQPYYGFSNQEVIEMV RKRQLLPCSEDCPPRMYSLMTECWNEIPSRRPRFKDIHVRLRSWEGL SSHTSSTTPSGGNATTQTTSLSASPVSNLSNPRYPNYMFPSQGITPQ GQIAGFIGPPIPQNQRFIPINGYPIPPGYAAFPAAHYQPTGPPRVIQ

【０４２８】

【表６－２７】

		HCPPPKSRSPSSASGSTSTGHVTSLPSSGSNQEANIPLLPHMSIPNH PGGMGITVFGNKSQKPYKIDSKQASLLGDANIHGHTESMISAEL
84	ヒトROR1アイソフォーム2	mhrprrrgtrppllallaalllaargaaaqetelsvsaelvptsswn isselnkdsyltldepmnnittslgqtaelhckvsgnpppt irwfkn dapvvqeprrlsfrstiyggrlrirnldttdtgyfqcvatngkevvs stgvlfvkfgpppt aspgysdeyeedgfcqpyrgiacarfignrtvy meslhmqgeienqitaaftmigtsshlsdkcsqfaipslchyafpyc detssvpkprdlcrdeceilenvlcqteyifarsnpmilmrlklpnc edlpqpespeaanciri gipmadpinknhkcynstgvdyrgtvsvtk sgrqcqpwnsqyphthtftalrfpelngghsycrnpgnqkeapwcft ldenfksdlcdipacgk
85	ヒトROR1アイソフォーム3	MNNITTSLGQTAELHCKVSGNPPPTIRWFKNDAPVVQEPRRLSF RSTIYGSRLRIRNLDTTDTGYFQCVATNGKEVVSSTGVLFVKFGPPP TASPGYSDEYEEDGFCQPYRGIACARFIGNRTVYMESLHMQGEIENQ ITAAFTMIGTSSHLSDKCSQFAIPSLCHYAFPYCDETSSVPKPRDLC RDECEILENVLCQTEYIFARSNPMILMRLKLPNCEDLPQPESPEAAN CIRIGIPMADPINKNHKCYNSTGVDYRGTVSVTKSGRQCQPWNSQYP HTHTFTALRFPELNGGHSYCRNPGNQKEAPWCFTLDENFKSDLCDIP ACDSKDSKEKNKMEILYILVPSVAIPLAIALLFFFICVCRNNQKSSS APVQRQPKHVRGQNVEMSMLNAYKPKSKAKELPLSAVRFMEELGECA FGKIYKGHLYLPGMDHAQLVAIKTLKDYNNPQQWTEFQQEASLMAEL HHPNIVCLLGAVTQEQPVCMLFEYINQGDLHEFLIMRSPHSDVGCSS DEDGTVKSSLDHGDFLHIAIQIAAGMEYLSSHFFVHKDLAARNILIG EQLHVKISDLGLSREIYSADYYRVQSKSLLPIRWMPPEAIMYGKFSS DSDIWSFGVVLWEIFSFGLQPYYGFSNQEVIEMVRKRQLLPCSEDCP PRMYSLMTECWNEIPSRRPRFKDIHVRLRSWEGLSSHTSSTTPSGGN ATTQTTSLSASPVSNLSNPRYPNYMFPSQGITPQGQIAGFIGPPIPQ NQRFIPINGYPIPPGYAAFPAAHYQPTGPPRVIQHCPPPKSRSPSSA SGSTSTGHVTSLPSSGSNQEANIPLLPHMSIPNHPGGMGITVFGNKS QKPYKIDSKQASLLGDANIHGHTESMISAEL
86	CD16アイソフォームA、UniProtアクセッション番号P08637	MWQLLLPTALLLLVSAGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKC QGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLS TLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTY LQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLFGSKNVSSETVNI TITQGLAVSTISSFFPPGYQVSFCLVMVLLFAVDTGLYFSVKTNIRS STRDWKDHKFKWRKDPQDK
87	CD16 V158配列番号:23の変異体	MWQLLLPTALLLLVSAGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKC QGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLS TLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTY LQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSSETVNI TITQGLAVSTISSFFPPGYQVSFCLVMVLLFAVDTGLYFSVKTNIRS STRDWKDHKFKWRKDPQDK
88	抗-CD19軽鎖	AGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAA

【０４２９】

【表６－２８】

	CDR1(DNA)	
89	抗-CD19軽鎖CDR1(タンパク質)	RASQDISK
90	抗-CD19軽鎖CDR2(DNA)	ATCTACCATACATCAAGATTA
91	抗-CD19軽鎖CDR2(タンパク質)	IYHISRL
92	抗-CD19軽鎖CDR3(DNA)	CAACAGGGTAATACGCTTCCGTACACG
93	抗-CD19軽鎖CDR3(タンパク質)	QQGNTLPYT
94	抗-CD19重鎖CDR1(DNA)	GGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAGC
95	抗-CD19重鎖CDR1(タンパク質)	GVSLPDYGVS
96	抗-CD19重鎖CDR2(DNA)	GTAATATGGGGTAGTGAAACCACATACTATAATTCAGCTCTC
97	抗-CD19重鎖CDR2(タンパク質)	VIWGSETTYYNSAL
98	抗-CD19重鎖CDR3(DNA)	CATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTAC
99	抗-CD19重鎖CDR3(タンパク質)	HYYYGGSYAMDY
100	抗-CD19軽鎖可変領域(DNA)	GACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACTGTTAAACTCCTGATCTACCATACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACTAAGTTGGAAATAACA
101	抗-CD19軽鎖可変領域(タンパク質)	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIT
102	抗-CD19重鎖可変領域(DNA)	GAGGTGAAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCGTCACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAGCTGGATTCGCCAGCCTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAAACCACATACTATAATTCAGCTCT

【０４３０】

【表６－２９】

		CAAATCCAGACTGACCATCATCAAGGACAACTCCAAGAGCCAAGTTT TCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGACACAGCCATTTACTAC TGTGCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTG GGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
103	抗-CD19重鎖可変領域(タンパク質)	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEW LGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYY CAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS
104	抗-BCMA軽鎖CDR1(DNA)	AAAAGCAGCCAGAGCCTGGTGCATAGCAACGGCAACACCTATCTGCA T
105	抗-BCMA軽鎖CDR1(タンパク質)	KSSQSLVHSNGNTYLH
106	抗-BCMA軽鎖CDR2(DNA)	AAAGTGAGCAACCGCTTTAGC
107	抗-BCMA軽鎖CDR2(タンパク質)	KVSNRFS
108	抗-BCMA軽鎖CDR3(DNA)	GCGGAAACCAGCCATGTGCCGTGGACC
109	抗-BCMA軽鎖CDR3(タンパク質)	AETSHVPWT
110	抗-BCMA重鎖CDR1(DNA)	AAAGCGAGCGGCTATAGCTTTCCGGATTATTATATTAAC
111	抗-BCMA重鎖CDR1(タンパク質)	KASGYSFPDYYIN
112	抗-BCMA重鎖CDR2(DNA)	TGGATTTATTTTGCGAGCGGCAACAGCGAATATAACCAGAAATTTAC CGGC
113	抗-BCMA重鎖CDR2(タンパク質)	WIYFASGNSEYNQKFTG
114	抗-BCMA重鎖CDR3(DNA)	CTGTATGATTATGATTGGTATTTTGATGTG
115	抗-BCMA重鎖CDR3(タンパク質)	LYDYDWYFDV
116	抗-BCMA重鎖可変領域(DNA)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGCGC GAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTATAGCTTTCCGGATT ATTATATTAACTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGGAATGG ATGGGCTGGATTTATTTTGCGAGCGGCAACAGCGAATATAACCAGAA ATTTACCGGCCGCGTGACCATGACCCGCGATACCAGCAGCAGCACCG CGTATATGGAACTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACCGCGGTGTAT

【０４３１】

【表６－３０】

		TTTTGCGCGAGCCTGTATGATTATGATTGGTATTTTGATGTGTGGGG CCAGGGCACCATGGTGACCGTGAGCAGC
117	抗-BCMA重鎖可変領域(タンパク質)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFPDYYINWVRQAPGQGLEW MGWIYFASGNSEYNQKFTGRVTMTRDTSSSTAYMELSSLRSEDTAVY FCASLYDYDWYFDVWGQGTMVTVSS
118	抗-BCMA軽鎖可変領域(DNA)	GATATTGTGATGACCCAGACCCCGCTGAGCCTGAGCGTGACCCCGGG CGAACCGGCGAGCATTAGCTGCAAAAGCAGCCAGAGCCTGGTGCATA GCAACGGCAACACCTATCTGCATTGGTATCTGCAGAAACCGGGCCAG AGCCCGCAGCTGCTGATTTATAAAGTGAGCAACCGCTTTAGCGGCGT GCCGGATCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCGCGGATTTTACCCTGA AAATTAGCCGCGTGGAAGCGGAAGATGTGGGCGTGTATTATTGCGCG GAAACCAGCCATGTGCCGTGGACCTTTGGCCAGGGCACCAAACTGGA AATTAAAAGC
119	抗-BCMA軽鎖可変領域(タンパク質)	DIVMTQTPLSLSVTPGEPASISCKSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQ SPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGADFTLKISRVEAEDVGVYYCA ETSHVPWTFGQGTKLEIKS
120	抗-CD22軽鎖CDR1	QDIHGY
121	抗-CD22軽鎖CDR2	YTS
122	抗-CD22軽鎖CDR3	QQGNTLPWT
123	抗-CD22重鎖CDR1	GFAFSIYD
124	抗-CD22重鎖CDR2	ISSGGGTT
125	抗-CD22重鎖CDR3	ARHSGYGTHWGVLFAY
126	抗-CD22軽鎖可変領域	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTIWSYLNWYQQRPGKAPNLL IYAASSLQSGVPSRFSGRGSGTDFTLTISSLQAEDFATYYCQQSYSI PQTFGQGTKLEIKEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSIYDM SWVRQTPEKRLEWVAYISSGGGTTYYPDTVKGRFTISRDNAKNTLYL QMSSLKSEDTAMYYCARHSGYGTHWGVLFAYWQGTLVTVSA
127	抗-CD22重鎖可変領域	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGL EWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDT AVYYCARETVTGDLEDAFDIWGQGTMVTVSSGGSLAALTAHQACHLPL ETFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNAL ASPGSGGDLGEAIREQPEQARLALTLAAAESERFVRQGTGNDEAGAA NGPADSGDALLERNYPTGAEFLGDGGDVSFSTRGTQNWTVERLLQAH RQLEERGYVFVGYHGTFLEAAQSIVFGGVRARSQDLDAIWRGFYIAG DPALAYGYAQDQEPDAAGRIRNGALLRVYVPRSSLPGFYRTSLTLAA PEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRLETILGWPLAERTVVI PSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPREDLK

【０４３２】

【表６－３１】

128	抗-ROR1 scFv 2-7 VH_リンカー4_抗-ROR1 2-7 VL(DNA)	GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGTGGTCTGGTTCAGCCGGGTGG CAGCCTGCGTCTGAGCTGTGCGGCGAGCGGCTTTACCTTTAGCAGCT ATGCCATGAGCTGGGTGCGTCAGGCACCGGGTAAAGGCCTGGAATGG GTGAGCGCGATTAGCGGCAGCGGCGGCAGCACCTATTATGCGGATAG CGTGAAAGGCCGTTTTACCATTAGCCGTGATAACAGCAAAAACACCC TGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACCGCGGTGTAT TATTGCGCGAAAGATAAGGGTTGGTTTAACTGGCAATTCGATTATTG GGGCCAGGGCACCCTGGTTACCGTTAGCAGCGGTGGAGGCGGTTCTG GTGGAGGCGGTTCGGATGGCGGAGGTTCAGAAATTGTGCTGACCCAG AGCCCGGGCACGCTGTCTCTGAGCCCGGGTGAACGTGCGACCCTGAG CTGTCGTGCGAGCCAAAGCGTGAGCAGCAGCTATCTGGCCTGGTATC AgCAGAAACCGGGCCAGGCACCGCGTCTGCTGATTTATGGCGCGAGC AGCCgTGCGACCGGCATTCCGGATCGTTTTAGCGGCAGCGGTAGCGG CACCGATTTTACCCTGACCATTAGCCGTCTGGAACCGGAAGATTTTG CGGTGTATTATTGCCAGCAGTATGGCAGCAGCCCGTGGACCTTTGGC CAGGGCACCAAAGTGGAAATTAAA
129	抗-ROR1 scFv 2-7 VH(DNA)	GAAGTGCAACTTCTCGAGAGCGGTGGGGGACTCGTCCAGCCGGGAGG TTCCCTGCGACTCAGCTGTGCAGCCTCAGGCTTTACCTTTTCCAGTT ACGCAATGAGTTGGGTCCGGCAGGCGCCTGGTAAAGGACTCGAGTGG GTGAGTGCAATCAGCGGAAGTGGCGGGTCTACATACTATGCGGACTC TGTTAAAGGCAGGTTCACTATTTCAAGGGACAATTCCAAGAACACGC TCTACCTGCAGATGAATAGCCTTAGAGCTGAAGACACGGCCGTGTAC TATTGTGCCAAAGACAAGGGATGGTTCAACTGGCAGTTCGACTACTG GGGGCAGGGAACTCTCGTCACCGTGAGCTCC
130	抗-ROR1 scFv 2-7 VL(DNA)	GAAATTGTTCTCACACAGTCACCCGGAACCCTTTCATTGTCCCCCGG CGAGCGCGCCACCCTCAGCTGTCGGGCCAGTCAGAGCGTGTCTAGCT CTTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGGCAAGCTCCCAGACTC CTGATATATGGGGCCAGCAGCCGGGCCACTGGCATTCCGGACAGGTT TAGTGGATCAGGCTCTGGCACTGATTTTACACTGACGATTTCAAGGT TGGAACCCGAAGACTTCGCAGTGTACTATTGTCAGCAGTATGGGTCT AGCCCGTGGACTTTCGGGCAAGGCACCAAGGTGGAAATCAAG
131	抗-ROR1 2-9 VH_リンカー4_抗-ROR1 2-9 VL	GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGTGGTCTGGTTCAGCCGGGTGG CAGCCTGCGTCTGAGCTGTGCGGCGAGCGGCTTTACCTTTAGCAGCT ATGCCATGAGCTGGGTGCGTCAGGCACCGGGTAAAGGCCTGGAATGG GTGAGCGCGATTAGCGGCAGCGGCGGCAGCACCTATTATGCGGATAG CGTGAAAGGCCGTTTTACCATTAGCCGTGATAACAGCAAAAACACCC TGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACCGCGGTGTAT TATTGCGCGAAAAAACAATATCACTTCGATTATTGGGGCCAGGGCAC CCTGGTTACCGTTAGCAGCGGTGGAGGCGGTTCTGGTGGAGGCGGTT CGGGTGGCGGAGGTTCAGAAATTGTGCTGACCCAGAGCCCGGGCACG CTGTCTCTGAGCCCGGGTGAACGTGCGACCCTGAGCTGTCGTGCGAG CCAGAGCGTGAGCAGCAGCTATCTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCGG GCCAGGCACCGCGTCTGCTGATTTATGGCGCGAGCAGCCGTGCGACC

【０４３３】

【表６－３２】

		GGCATTCCGGATCGTTTTAGCGGCAGCGGTAGCGGCACCGATTTTAC CCTGACCATTAGCCGTCTGGAACCGGAAGATTTTGCGGTGTATTATT GCCAGCAGTATGGCAGCAGCCCGTGGACCTTTGGCCAGGGCACCAAA GTGGAAATTAAA
132	抗-ROR1 scFv 2-9 VH(DNA)	GAAGTGCAACTTCTCGAGAGCGGTGGGGGACTCGTCCAGCCGGGAGG TTCCCTGCGACTCAGCTGTGCAGCCTCAGGCTTTACCTTTTCCAGTT ACGCAATGAGTTGGGTCCGGCAGGCGCCTGGTAAAGGACTCGAGTGG GTGAGTGCAATCAGCGGAAGTGGCGGGTCTACATACTATGCGGACTC TGTTAAAGGCAGGTTCACTATTTCAAGGGACAATTCCAAGAACACGC TCTACCTGCAGATGAATAGCCTTAGAGCTGAAGACACGGCCGTGTAC TATTGTGCCAAAAAGCAGTACCATTTCGACTACTGGGGGCAGGGAAC CCTCGTCACCGTGAGCTCC
133	抗-ROR1 scFv 2-9 VL(DNA)	GAAATTGTTCTCACACAGTCACCCGGAACCCTTTCATTGTCCCCCGG CGAGCGCGCCACCCTCAGCTGTCGGGCCAGTCAGAGCGTGTCTAGCT CTTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGGCAAGCTCCCAGACTC CTGATATATGGGGCCAGCAGCCGGGCCACTGGCATTCCGGACAGGTT TAGTGGATCAGGCTCTGGCACTGATTTTACACTGACGATTTCAAGGT TGGAACCCGAAGACTTCGCAGTGTACTATTGTCAGCAGTATGGGTCT AGCCCGTGGACTTTCGGGCAAGGCACCAAGGTGGAAATCAAG
134	抗-ROR1 scFv 3-6(DNA)	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACA GTCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTT ATAACTATGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCCAAA GTCATGATTTATGATGTCAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTGATCG CTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTG GGCTCCAGGTTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAGCTCATATTCA ACCAGCATCACCCCAGTTTTCGGCGGGGGGACCAAGCTCACCGTCCT AGGAGAGGGTAAATCTTCCGGATCTGGTTCCGAAAGCAAGGCTAGCC AGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAG TCTCTGAAGATCTCCTGTGAGGCTTCTGGATACAGCTTTACCAGCTA CTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGA TGGGGATCATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCC TTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGC CTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATT ACTGTGCGAGACTGGAACTCGGTTACTACTACTACGGTATGGACGTC TGGGGCCAAGGAACCACGGTCACCGTCTCCTCA
135	リンカー5(DNA)	GGAGAGGGTAAATCTTCCGGATCTGGTTCCGAAAGCAAGGCTAGC
136	抗-ROR1 scFv 3-6VL(DNA)	CAGTCAGCTCTGACCCAACCTGCCTCCGTCTCTGGGAGTCCAGGCCA GAGTATCACAATTTCTTGTACAGGCACCTCATCTGATGTCGGCGGTT ACAATTACGTTAGTTGGTATCAGCAACATCCAGGTAAGGCTCCAAAG GTGATGATCTATGACGTCTCAAATAGACCCTCTGGCGTCAGCGACAG GTTTAGTGGTAGCAAATCCGGGAACACAGCTTCACTTACAATTAGCG GCCTCCAAGTAGAAGACGAAGCTGACTATTACTGCTCTAGTTATTCA ACGTCAATTACCCCTGTGTTTGGTGGCGGTACAAAACTCACAGTGCT

【０４３４】

【表６－３３】

		T
137	抗-ROR1 scFv 3-6VH(DNA)	CAAGTGCAACTTGTGCAATCAGGAGCTGAAGTCAAAAAGCCGGGAGA ATCCCTGAAAATAAGCTGCGAAGCAAGTGGTTACTCTTTTACTTCTT ACTGGATTGGATGGGTTCGGCAGATGCCCGGAAAGGGACTCGAGTGG ATGGGAATTATTTACCCTGGAGACAGCGACACAAGATACAGCCCTTC ATTCCAGGGGCAGGTGACCATTTCTGCTGACAAATCAATCAGTACAG CCTATCTGCAATGGAGTTCCCTCAAAGCCAGTGACACTGCTATGTAT TACTGCGCGCGACTGGAACTGGGATACTACTACTACGGAATGGACGT ATGGGGACAGGGAACCACCGTTACTGTTAGTAGC
139	pLRPO_抗ROR1 2-7 CD3イプシロン_I2A-eGFP	CCAATTAACCAATTCTGAttagaaaaactcatcgagcatcaaatgaa actgcaatttattcatcaggattatcaataccatattttgaaaa agccgtttctgtaatgaaggagaaaactcaccgaggcagttccatag gatggcaagatcctggtatcggtctgcgattccgactcgtccaacat caatacaacctattaatttcccctcgtcaaaaataaggttatcaagt gagaaatcaccatgagtgacgactgaatccggtgagaatggcaaaag tttatgcatttctttccagacttgttcaacaggccagccattacgct cgtcatcaaaatcactcgcatcaaccaaaccgttattcattcgtgat tgcgcctgagcaagacgaaatacgcgatcgctgttaaaaggacaatt acaaacaggaatcgaatgcaaccggcgcaggaacactgccagcgcat caacaatattttcacctgaatcaggatattcttctaatacctggaat gctgttttttccggggatcgcagtggtgagtaaccatgcatcatcagg agtacggataaaatgcttgatggtcggaagaggcataaattccgtca gccagtttagtctgaccatctcatctgtaacatcattggcaacgcta cctttgccatgtttcagaaacaactctggcgcatcgggcttcccata caagcgatagattgtcgcacctgattgcccgacattatcgcgagccc atttatacccatataaatcagcatccatgttggaatttaatcgcggc ctcgacgtttcccgttgaatatggctcataACACCCCTTGTATTACT GTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTCATGATGATATATTTTTAT CTTGTGCAATGTAACATCAGAGATTTTGAGACACAACGTGGCTTTCC CCCCCCCCCCCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGG CCAGCTTGGGAAACCATAAGACCGAGATAGAGTTGAGTGTTGTTCCA GTTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAA AGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCAT CACCCAAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAAT CGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCC GGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCG CTAAGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACCACCACA CCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTACTATGGTTGCTT TGACGTATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATA CCGCATCAGGCGccattcgccattcaggctgcgcaactgttgggaag ggcgatcggtgcgggcctcttcgctattacgccaGCTGGCGAAAGGG GGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCA GTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTGATCGAGATCGTGA

【０４３５】

【表６－３４】

		TCCGGATCAAGATCCAGATCGAATTGGAGGCTACAGTCAGTGGAGAG GACTTTCACTGACTGACTGACTGCGTCTCAACCTcctaggggacatt gattattgactagttattaatagtaatcaattacggggtcattagtt catagcccatatatggagttccgcgttacataacttacggtaaatgg cccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcccattgacgtcaataa tgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgt caatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagtacatca agtgtatcatatgccaagtacgcccccctattgacgtcaatgacggta aatggcccgcctggcattatgcccagtacatgaccttatgggacttt cctacttggcagtacatctacgtattagtcatcgctattaccatggt gatgcggttttggcagtacatcaatgggcgtggatagcggtttgact cacggggatttccaagtctccaccccattgacgtcaatgggagtttg ttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtaacaactc cgccccattgacgcaaatgggcggtaggcgtgtacggtgggaggtct atataagcagagctcgtttagtgaaccgggtctctctggttagacca gatctgagcctgggagctctctggctaactagggaacccactgctta agcctcaataaagcttgccttgagtgctcaaagtagtgtgtgcccgt ctgttgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttttagtc agtgtggaaaatctctagcagtggcgcccgaacagggacttgaaagc gaaagtaaagccagaggagatctctcgacgcaggactcggcttgctg aagcgcgcacggcaagaggcgaggggcggcgactggtgagtacgcca aaaattttgactagcggaggctagaaggagagagtagggtgcgagag cgtcggtattaagcgggggagaattagataaatgggaaaaaattcgg ttaaggccaggggggaaagaaacaatataaactaaaacatatagttag ggcaagcagggagctagaacgattcgcagttaatcctggcctttttag agacatcagaaggctgtagacaaatactgggacagctacaaccatcc cttcagacaggatcagaagaacttagatcattatataatacaatagc agtcctctattgtgtgcatcaaaggatagatgtaaaagacaccaagg aagccttagataagatagaggaagagcaaaacaaaagtaagaaaaag gcacagcaagcgatcttcagacctggaggaggcaggaggcgatatga gggacaattggagaagtgaattatataaatataaagtagtaaaaatt gaaccattaggagtagcacccaccaaggcaaagagaagagtggtgca gagagaaaaaagagcagtgggaataggagctttgttccttgggttct tgggagcagcaggaagcactatgggcgcagcgtcaatgacgctgacg gtacaggccagacaattattgtctgatatagtgcagcagcagaacaa tttgctgagggctattgaggcgcaacagcatctgttgcaactcacag tctggggcatcaaacagctccaggcaagaatcctggctgtggaaaga tacctaaaggatcaacagctcctggggatttggggttgctctggaaa actcatttgcaccactgctgtgccttggaatgctagttggagtaata aatctctggaacagatttggaataacatgacctggatggagtgggac agagaaattaacaattacacaagcttaatacactccttaattgaaga atcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattag ataaatgggcaagtttgtggaattggtttaacataacaaattggctg

【０４３６】

【表６－３５】

		tggtatataaaattattcataatgatagtaggaggcttggtaggttt aagaatagtttttgctgtactttctatagtgaatagagttaggcagg gatattcaccattatcgtttcagacccacctcccaatcccgagggga ccacgcgtacaaatggcagtattcatccacaattttaaaagaaaagg ggggattgggggtacagtgcaggggaaagaatagtagacataatag caacagacatacaaactaaagaattacaaaaacaaattacaaaaatt caaaattttcgggtttattacagggacagcagaaatccactttggaa agctgagcatccggctccggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatc gcccacagtccccgagaagttgggggggagggtcggcaattgaaccg gtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtg tactggctccgcctttttcccgagggtgggggagaaccgtatataag tgcagtagtcgccgtgaacgttcttttcgcaacgggtttgccgcca gaacacaggtaagtgccgtgtgtggttcccgcgggcctggcctcttt acgggttatggcccttgcgtgccttgaattacttccacgccctggc tgcagtacgtgattcttgatcccgagcttcgggttggaagtgggtgg gagagttcgaggccttgcgcttaaggagccccttcgcctcgtgcttg agttgaggcctggcctgggcgctgggcccgccgcgtgcgaatctggt ggcaccttcgcgcctgtctcgctgctttcgataagtctctagccatt taaaattttttgatgacctgctgcgacgctttttttctggcaagatag tcttgtaaatgcgggccaagatctgcacactggtatttcggttttttg gggccgcgggcggcgacggggcccgtgcgtcccagcgcacatgttcg gcgaggcggggcctgcgagcgcggccaccgagaatcggacgggggta gtctcaagctggccggcctgctctggtgcctggcctcgcgccgccgt gtatcgccccgcccctgggcggcaaggctggcccggtcggcaccagtt gcgtgagcggaaagatggccgcttcccggccctgctgcagggagctc aaaatggaggacgcggcgctcgggagagcgggcgggtgagtcaccca cacaaaggaaaagggccttccgtcctcagccgtcgcttcatgtgac tccacggagtaccgggcgccgtccaggcacctcgattagttctcgag cttttggagtacgtcgtctttaggttgggggggagggttttatgcga tggagtttcccacactgagtgggtggagactgaagttaggccagct tggcacttgatgtaattctccttggaatttgccctttttgagtttgg atcttggttcattctcaagcctcagacagtggttcaaagttttttc ttccatttcaggtgtcgtgaaaactaccccctctagagccgccaccAT GCTCCTCCTCGTGACTAGCCTTCTCCTGTGCGAGCTCCCACACCCTG CATTCCTCCTGATCCCAGAAGTGCAACTTCTCGAGAGCGGTGGGGGA CTCGTCCAGCCGGGAGGTTCCCTGCGACTCAGCTGTGCAGCCTCAGG CTTTACCTTTTCCAGTTACGCAATGAGTTGGGTCCGGCAGGCGCCTG GTAAAGGACTCGAGTGGGTGAGTGCAATCAGCGGAAGTGGCGGGTCT ACATACTATGCGGACTCTGTTAAAGGCAGGTTCACTATTTCAAGGGA CAATTCCAAGAACACGCTCTACCTGCAGATGAATAGCCTTAGAGCTG AAGACACGGCCGTGTACTATTGTGCCAAAGACAAGGGATGGTTCAAC TGGCAGTTCGACTACTGGGGGCAGGGAACTCTCGTCACCGTGAGCTC CGGCGGAGGTGGAAGCGGGGGAGGGGGCTCCGGTGGTGGGGGATCAG

【０４３７】

【表６－３６】

		AAATTGTTCTCACACAGTCACCCGGAACCCTTTCATTGTCCCCCGGC GAGCGCGCCACCCTCAGCTGTCGGGCCAGTCAGAGCGTGTCTAGCTC TTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGGCAAGCTCCCAGACTCC TGATATATGGGGCCAGCAGCCGGGCCACTGGCATTCCGGACAGGTTT AGTGGATCAGGCTCTGGCACTGATTTTACACTGACGATTTCAAGGTT GGAACCCGAAGACTTCGCAGTGTACTATTGTCAGCAGTATGGGTCTA GCCCGTGGACTTTCGGGCAAGGCACCAAGGTGGAAATCAAGGCAGCT GCTGGAGGTGGGGGAAGTGGCGGTGGTGGCTCAGGCGGCGGGGGGAG CCTCGAGGACGGTAATGAAGAGATGGGGGGCATTACACAAACCCCGT ACAAGGTCTCTATCAGTGGGACGACTGTGATTCTGACATGCCCACAG TATCCAGGTTCAGAAATCCTGTGGCAGCATAATGACAAGAACATCGG TGGGGATGAGGATGATAAGAATATCGGAAGCGACGAAGACCACCTGT CTCTCAAAGAGTTTAGCGAGCTGGAGCAGAGTGGGTATTATGTCTGC TATCCTAGAGGTAGCAAGCCAGAGGACGCAAACTTTTACCTTTACCT CAGAGCCAGGGTCTGCGAGAACTGCATGGAAATGGACGTGATGAGTG TTGCAACTATAGTGATAGTTGACATTTGCATCACCGGGGGTCTGCTC CTGCTGGTTTACTATTGGAGCAAGAACCGCAAGGCTAAAGCCAAGCC AGTAACACGGGGCGCAGGCGCGGGAGGCAGGCAGCGAGGGCAGAATA AGGAGCGCCCCCCACCCGTCCCGAATCCGGATTACGAACCCATTCGG AAAGGCCAGAGGGACTTGTACTCAGGGCTCAACCAAAGACGGATCGA GGGGCGAGGATCCTTGCTGACATGTGGTGACGTGGAGGAGAATCCTG GTCCTTCTCGCgccgccaccATGGTGTCTAAAGGCGAAGAGCTGTTC ACCGGTGTGGTGCCGATTCTTGTAGAGCTGGATGGAGATGTTAATGG TCACAAGTTTTCAGTGTCTGGGGAGGGCGAAGGCGACGCGACCTATG GTAAACTCACGCTTAAGTTTATCTGCACCACAGGGAAGCTCCCTGTT CCATGGCCAACCCTTGTGACAACACTTACTTACGGCGTGCAGTGTTT CAGCAGGTATCCTGACCATATGAAGCAGCACGATTTCTTCAAGTCTG CAATGCCCGAGGGGTACGTACAAGAGCGGACAATTTTCTTCAAGGAC GACGGAAATTACAAAACTAGGGCAGAGGTTAAGTTCGAAGGGGATAC ACTTGTTAATAGGATCGAACTGAAAGGCATTGATTTCAAGGAGGATG GAAACATACTCGGGGCACAAACTGGAATATAACTACAATTCACATAAT GTGTATATCATGGCTGATAAGCAGAAAAACGGTATCAAAGTGAACTT TAAGATCCGGCATAACATTGAAGACGGTAGCGTGCAGCTCGCTGACC ACTACCAGCAGAACACTCCAATCGGGGACGGGCCGGTCCTCCTGCCC GACAACCACTACCTCAGCACCCAGAGCGCACTTAGCAAAGACCCAAA CGAGAAGAGAGACCATATGGTGCTGCTGGAGTTCGTTACCGCAGCCG GAATCACCTTGGGCATGGACGAGCTCTATAAATGAgaattcgaacgg atatcgagcatcttaccgccatttatacccatatttgttctgttttt cttgatttgggtatacatttaaatgttaataaaacaaaatggtgggg caatcatttacattttagggatatgtaattactagttcaggtgtat tgccacaagacaaacatgttaagaaactttcccgttatttacgctct gttcctgttaatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgac tgatatttcttaactatgttgctccttttacgctgtgtggatatgctg

【０４３８】

【表６－３７】

		ctttatagcctctgtatctagctattgcttcccgtacggctttcgtt ttctcctccttgtataaatcctggttgctgtctctttttagaggagtt gtggcccgttgtccgtcaacgtggcgtggtgtgctctgtgtttgctg acgcaacccccactggctggggcattgccaccacctgtcaactcctt tctgggactttcgctttcccctccccgatcgccacggcagaactcat cgccgcctgccttgcccgctgctggacaggggctaggttgctgggca ctgataattccgtggtgttgtcagtactggtacctttaagaccaatg acttacaaggcagctgtagatcttagccactttttaaaagaaaaggg gggactggaagggctaattcactcccaaagaagacaagatctgcttt ttgcctgtactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggag ctctctggctaactagggaacccactgcttaagcctcaataaagctt gccttgagtgcttcaatgatcataatcaagccatatcacatctgtag aggtttacttgctttaaaaaacctccacacctcccccctgaacctgaa acataaaatgaatgcaattgttgttgttaacttgtttattgcagctt ataatggttacaaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaa gcatttttttcactgcattctagttgtggtttgtccaaactcatcaa tgtatcttatcatgtctggatctgcgtcgacACGAAGAGACGACTGA CTGACTGACTGGAAAGAGGAAGGGCTGGAAGAGGAAGGAGCTTGATC CAGATCCCGATCTCGATCCAGATCCGGATCGCAGCTTGGCGTAATCA TGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCC ACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCT AATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCT TTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCA ACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCT CGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTA TCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGA TAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGA ACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCC CCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAA CCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCC TCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCC GCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTG TAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTG TGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAAC TATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGC AGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTG CTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGA ACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAA AAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCG GTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGA TCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTG GAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAA GGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCA

【０４３９】

【表６－３８】

		ATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTT AATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCA TAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGC TTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCAGCTTGGGAAACC ATAAGAGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTT GATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGC AAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTT GATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTT AAGGGATTTTGGTCATGAGCTTGCGCCGTCCCGTCAAGTCAGCGTAA TGCTCTGCCAGTGTTACAA
	様々なウイルス転写物からのIRES	配列
140	CVB3	TTAAAACAGCCTGTGGGTTGATCCCACCCACAGGCCCATTGGGCGCT AGCACTCTGGTATCACGGTACCTTTGTGCGCCTGTTTTATACCCCCT CCCCCAACTGTAACTTAGAAGTAACACACACCGATCAACAGTCAGCG TGGCACACCAGCCACGTTTTGATCAAGCACTTCTGTTACCCCGGACT GAGTATCAATAGACTGCTCACGCGGTTGAAGGAGAAAGCGTTCGTTA TCCGGCCAACTACTTCGAAAAACCTAGTAACACCGTGGAAGTTGCAG AGTGTTTCGCTCAGCACTACCCCAGTGTAGATCAGGTCGATGAGTCA CCGCATTCCCCACGGGCGACCGTGGCGGTGGCTGCGTTGGCGGCCTG CCCATGGGGAAACCCATGGGACGCTCTAATACAGACATGGTGCGAAG AGTCTATTGAGCTAGTTGGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAA TCCTAACTGCGGAGCACACACCCTCAAGCCAGAGGGCAGTGTGTCGT AACGGGCAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTT CATTTTATTCCTATACTGGCTGCTTATGGTGACAATTGAGAGATCGT TACCATATAGCTATTGGATTGGCCATCCGGTGACTAATAGAGCTATT ATATATCCCTTTGTTGGGTTTATACCACTTAGCTTGAAAGAGGTTAA AACATTACAATTCATTGTTAAGTTGAATACAGCAAA
141	EMCV	TTGCCAGTCTGCTCGATATCGCAGGCTGGGTCCGTGACTACCCACTC CCCCTTTCAACGTGAAGGCTACGATAGTGCCAGGGCGGGTACTGCCG TAAGTGCCACCCCAAACAACAACAACAACAAAACAAACTCCCCCTCCCCC CCCTTACTATACTGGCCGAAGCCACTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGT TTGTCTACATGCTATTTTCTACCGCATTACCGTCTTATGGTAATGTG AGGGTCCAGAACCTGACCCTGTCTTCTTGACGAACACTCCTAGGGGT CTTTCCCCTCTCGACAAAGGAGTGTAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAA GGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTAAAGACAAACAACGTCTGTAG CGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCCACCTGGTGACAGGTGCCTC TGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACA ACCCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAAT GGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAG GTACCCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACGTGCTT TACACGTGTTGAGTCGAGGTGAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCA

【０４４０】

【表６－３９】

		CGGGGACGTGGTTTTCCTTTGAAAACCACGATTACAAT
142	スペーサー	GGTAGTGGTGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCA
143	Ana-CVB3-FMC63_CD3ε	GGGAGACCCTCGACCGTCGATTGTCCACTGGTCAACAATAGATGACT TACAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACG TCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCA GTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTTGACCTTAAACGGTC GTGTGGGTTCAAGTCCCTCCACCCCCACGCCGGAAACGCAATAGCCG AAAAACAAAAAACAAAAAAATTAAAACAGCCTGTGGGTTGATCCCAC CCACAGGCCCATTGGGCGCTAGCACTCTGGTATCACGGTACCTTTGT GCGCCTGTTTTATACCCCCTCCCCCAACTGTAACTTAGAAGTAACAC ACACCGATCAACAGTCAGCGTGGCACACCAGCCACGTTTTGATCAAG CACTTCTGTTACCCCGGACTGAGTATCAATAGACTGCTCACGCGGTT GAAGGAGAAAGCGTTCGTTATCCGGCCAACTACTTCGAAAAACCTAG TAACACCGTGGAAGTTGCAGAGTGTTTCGCTCAGCACTACCCCAGTG TAGATCAGGTCGATGAGTCACCGCATTCCCCACGGGCGACCGTGGCG GTGGCTGCGTTGGCGGCCTGCCCATGGGGAAACCCATGGGACGCTCT AATACAGACATGGTGCGAAGAGTCTATTGAGCTAGTTGGTAGTCCTC CGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCACACACCCTCAA GCCAGAGGGCAGTGTGTCGTAACGGGCAACTCTGCAGCGGAACCGAC TACTTTGGGTGTCCGTGTTTCATTTTATTCCTATACTGGCTGCTTAT GGTGACAATTGAGAGATCGTTACCATATAGCTATTGGATTGGCCATC CGGTGACTAATAGAGCTATTATATATCCCTTTGTTGGGTTTATACCA CTTAGCTTGAAAGAGGTTAAAACATTACAATTCATTGTTAAGTTGAA TACAGCAAAATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTT ACCACACCCAGCATTCCTCCTGATCCCAGACATCCAGATGACACAGA CTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGT TGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAATTGGTATCAGCA GAAACCAGATGGAACTGTTAAACTCCTGATCTACCATACATCAAGAT TACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACA GATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCAC TTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCGTACACGTTCGGAGGGG GGACTAAGTTGGAAATAACAGGCTCCACCTCTGGATCCGGCAAGCCC GGATCTGGCGAGGGATCCACCAAGGGCGAGGTGAAACTGCAGGAGTC AGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCGTCACATGCA CTGTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAGCTGGATTCGC CAGCCTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAG TGAAACCACATACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGACCATCA TCAAGGACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTG CAAACTGATGACACAGCCATTTACTACTGTGCCAAACATTATTACTA CGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCA CCGTCTCCGCGGCCGCGGGCGGTGGAGGCAGTGGTGGTGGCGGCTCT GGCGGTGGTGGTAGCCTCGAGGATGGTAATGAAGAAATGGGTGGTAT TACACAGACACCATATAAAGTCTCCATCTCTGGAACCACAGTAATAT

【０４４１】

【表６－４０】

		TGACATGCCCTCAGTATCCTGGATCTGAAATACTATGGCAACACAAT GATAAAAACATAGGCGGTGATGAGGATGATAAAAACATAGGCAGTGA TGAGGATCACCTGTCACTGAAGGAATTTTCAGAATTGGAGCAAAGTG GTTATTATGTCTGCTACCCCAGAGGAAGCAAACCAGAAGATGCGAAC TTTTATCTCTACCTGAGGGCAAGAGTGTGTGAGAACTGCATGGAGAT GGATGTGATGTCGGTGGCCACAATTGTCATAGTGGACATCTGCATCA CTGGGGGCTTGCTGCTGCTGGTTTACTACTGGAGCAAGAATAGAAAG GCCAAGGCCAAGCCTGTGACACGAGGAGCGGGTGCTGGCGGCAGGCA AAGGGGACAAAACAAGGAGAGGCCACCACCTGTTCCCAACCCAGACT ATGAGCCCATCCGGAAAGGCCAGCGGGACCTGTATTCTGGCCTGAAT CAGAGACGCATCTGATAAAAAAAACAAAAAACAAAACGGCTATTATG CGTTACCGGCGAGACGCTACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTA GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAA GACCAGTGGACAATCGACGGATAACAGCATATCTAG
144	Ana-EMCV- FMC63_CD3ε	GGGAGACCCTCGACCGTCGATTGTCCACTGGTCAACAATAGATGACT TACAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACG TCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCA GTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTTGACCTTAAACGGTC GTGTGGGTTCAAGTCCCTCCACCCCCACGCCGGAAACGCAATAGCCG AAAAACAAAAAACAAAAAAACCCCCCTCTCCCTCCCCCCCTAACGTT ACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATAT GTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGA AACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTTTCCCCT CTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGT TCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTT GCAGGCAGCGGAACCCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAA AAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCAGTG CCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCT CAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCAT TGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGT TTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGGACGT GGTTTTCCTTTGAAAAACACGATGATAATATGGCCACAACCATGCTT CTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATT CCTCCTGATCCCAGACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGT CTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAG GACATTAGTAAATATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAAC TGTTAAACTCCTGATCTACCATACATCAAGATTACACTCAGGAGTCC CATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACC ATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACA GGGTAATACGCTTCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACTAAGTTGGAAA TAACAGGCTCCACCTCTGGATCCGGCAAGCCCGGATCTGGCGAGGGA TCCACCAAGGGCGAGGTGAAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGT

【０４４２】

【表６－４１】

		GGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCGTCACATGCACTGTCTCAGGGGTCT CATTACCCGACTATGGTGTAAGCTGGATTCGCCAGCCTCCACGAAAG GGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAAACCACATACTA TAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGACCATCATCAAGGACAACTCCA AGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGACACA GCCATTTACTACTGTGCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGC TATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCGCGGCCG CGGGCGGTGGAGGCAGTGGTGGTGGCGGCTCTGGCGGTGGTGGTAGC CTCGAGGATGGTAATGAAGAAATGGGTGGTATTACACAGACACCATA TAAAGTCTCCATCTCTGGAACCACAGTAATATTGACATGCCCTCAGT ATCCTGGATCTGAAATACTATGGCAACACAATGATAAAAACATAGGC GGTGATGAGGATGATAAAAACATAGGCAGTGATGAGGATCACCTGTC ACTGAAGGAATTTTCAGAATTGGAGCAAAGTGGTTATTATGTCTGCT ACCCCAGAGGAAGCAAACCAGAAGATGCGAACTTTTATCTCTACCTG AGGGCAAGAGTGTGTGAGAACTGCATGGAGATGGATGTGATGTCGGT GGCCACAATTGTCATAGTGGACATCTGCATCACTGGGGGCTTGCTGC TGCTGGTTTACTACTGGAGCAAGAATAGAAAGGCCAAGGCCAAGCCT GTGACACGAGGAGCGGTGCTGGCGGCAGGCAAAGGGGACAAAACAA GGAGAGGCCACCACCTGTTCCCAACCCAGACTATGAGCCCATCCGGA AAGGCCAGCGGGACCTGTATTCTGGCCTGAATCAGAGACGCATCTGA TAAAAAAAACAAAAAACAAAACGGCTATTATGCGTTACCGGCGAGAC GCTACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAAGTG GATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCA ATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGACCAGTGGACAATC GACGGATAACAGCATATCTAG
145	Ana3.0(全長)	GGGAGACCCTCGACCGTCGATTGTCCACTGGTCAACAATAGATGACT TACAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACG TCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCA GTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTTGACCTTAAACGGTC GTGTGGGTTCAAGTCCCTCCACCCCCACGCCGGAAACGCAATAGCCG AAAAACAAAAAACAAAAAAACCCCCCTCTCCCTCCCCCCCTAACGTT ACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATAT GTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGA AACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTTTCCCCT CTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGT TCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTT GCAGGCAGCGGAACCCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAA AAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCAGTG CCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCT CAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCAT TGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGT TTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGGACGT GGTTTTCCTTTGAAAAACACGATGATAATATGGCCACAACCATGGGA

【０４４３】

【表６－４２】

		GTCAAAGTTCTGTTTGCCCTGATCTGCATCGCTGTGGCCGAGGCCAA GCCCACCGAGAACAACGAAGACTTCAACATCGTGGCCGTGGCCAGCA ACTTCGCGACCACGGATCTCGATGCTGACCGCGGGAAGTTGCCCGGC AAGAAGCTGCCGCTGGAGGTGCTCAAAGAGATGGAAGCCAATGCCCG GAAAGCTGGCTGCACCAGGGGCTGTCTGATCTGCCTGTCCCACATCA AGTGCACGCCCAAGATGAAGAAGTTCATCCCAGGACGCTGCCACACC TACGAAGGCGACAAAGAGTCCGCACAGGGCGGCATAGGCGAGGCGAT CGTCGACATTCCTGAGATTCCTGGGTTCAAGGACTTGGAGCCCATGG AGCAGTTCATCGCACAGGTCGATCTGTGTGTGGACTGCACAACTGGC TGCCTCAAAGGGCTTGCCAACGTGCAGTGTTCTGACCTGCTCAAGAA GTGGCTGCCGCAACGCTGTGCGACCTTTGCCAGCAAGATCCAGGGCC AGGTGGACAAGATCAAGGGGGCCGGTGGTGACTAAAAAAAAACAAAAA ACAAAACGGCTATTATGCGTTACCGGCGAGACGCTACGGACTTAAAT AATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTC AGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGACCAGTGGACAATCGACGGATAACAGCAT ATCTAG
146	Ana_CVB3_IRES-eGFP	GGGAGACCCTCGACCGTCGATTGTCCACTGGTCAACAATAGATGACT TACAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACG TCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCA GTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTTGACCTTAAACGGTC GTGTGGGTTCAAGTCCCTCCACCCCCACGCCGGAAACGCAATAGCCG AAAAACAAAAAAACAAAAAAATTAAAACAGCCTGTGGGTTGATCCCAC CCACAGGCCCATTGGGCGCTAGCACTCTGGTATCACGGTACCTTTGT GCGCCTGTTTTATACCCCCTCCCCCAACTGTAACTTAGAAGTAACAC ACACCGATCAACAGTCAGCGTGGCACACCAGCCACGTTTTGATCAAG CACTTCTGTTACCCCGGACTGAGTATCAATAGACTGCTCACGCGGTT GAAGGAGAAAGCGTTCGTTATCCGGCCAACTACTTCGAAAAACCTAG TAACACCGTGGAAGTTGCAGAGTGTTTCGCTCAGCACTACCCCAGTG TAGATCAGGTCGATGAGTCACCGCATTCCCCACGGGCGACCGTGGCG GTGGCTGCGTTGGCGGCCTGCCCATGGGGAAACCCATGGGACGCTCT AATACAGACATGGTGCGAAGAGTCTATTGAGCTAGTTGGTAGTCCTC CGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCACACACCCTCAA GCCAGAGGGCAGTGTGTCGTAACGGGCAACTCTGCAGCGGAACCGAC TACTTTGGGTGTCCGTGTTTCATTTTATTCCTATACTGGCTGCTTAT GGTGACAATTGAGAGATCGTTACCATATAGCTATTGGATTGGCCATC CGGTGACTAATAGAGCTATTATATATCCCTTTGTTGGGTTTATACCA CTTAGCTTGAAAGAGGTTAAAACATTACAATTCATTGTTAAGTTGAA TACAGCAAAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGT GCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCA GCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACC CTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCAC CCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACC

【０４４４】

【表６－４３】

		CCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAA GGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTA CAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACC GCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTG GGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCAT GGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCC ACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAG AACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTA CCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCG ATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTC GGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAAAAAACAAAAAACAAAACGGCT ATTATGCGTTACCGGCGAGACGCTACGGACTTAAATAATTGAGCCTT AAAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTA AATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAAT TAGTAAGACCAGTGGACAATCGACGGATAACAGCATATCTAG
147	Ana_CVB3_IRES-eGFP-スプライシング_変異	GGGAGACCCTCGACCGTCGATTGTCCACTGGTCAACAATAGATGACT TACAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACG TCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCA GTAGGTCGTGTGGGTTCAAGTCCCTCCACCCCCACGCCGGAAACGCA ATAGCCGAAAAACAAAAAACAAAAAAATTAAAACAGCCTGTGGGTTG ATCCCACCCACAGGCCCATTGGGCGCTAGCACTCTGGTATCACGGTA CCTTTGTGCGCCTGTTTTATACCCCCTCCCCCAACTGTAACTTAGAA GTAACACACACCGATCAACAGTCAGCGTGGCACACCAGCCACGTTTT GATCAAGCACTTCTGTTACCCCGGACTGAGTATCAATAGACTGCTCA CGCGGTTGAAGGAGAAAGCGTTCGTTATCCGGCCAACTACTTCGAAA AACCTAGTAACACCGTGGAAGTTGCAGAGTGTTTCGCTCAGCACTAC CCCAGTGTAGATCAGGTCGATGAGTCACCGCATTCCCCACGGGCGAC CGTGGCGGTGGCTGCGTTGGCGGCCTGCCCATGGGGAAACCCATGGG ACGCTCTAATACAGACATGGTGCGAAGAGTCTATTGAGCTAGTTGGT AGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCACACA CCCTCAAGCCAGAGGGCAGTGTGTCGTAACGGGCAACTCTGCAGCGG AACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCATTTTATTCCTATACTGGC TGCTTATGGTGACAATTGAGAGATCGTTACCATATAGCTATTGGATT GGCCATCCGGTGACTAATAGAGCTATTATATATCCCTTTGTTGGGTT TATACCACTTAGCTTGAAAGAGGTTAAAACATTACAATTCATTGTTA AGTTGAATACAGCAAAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCG GGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCAC AAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAA GCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCT GGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGC CGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCAT GCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACG GCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTG

【０４４５】

【表６－４４】

		GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAA CATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCT ATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAG ATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTA CCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACA ACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAG AAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGAT CACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAAAAAACAAAAAAACAA AACGGCTATTATGCGTTACCGGCGAGACG
148	Ana_CVB3_IRES-抗CD19 TFP	GGGAGACCCTCGACCGTCGATTGTCCACTGGTCAACAATAGATGACT TACAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACG TCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCA GTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTTGACCTTAAACGGTC GTGTGGGTTCAAGTCCCTCCACCCCCACGCCGGAAACGCAATAGCCG AAAAACAAAAAACAAAAAAATTAAAACAGCCTGTGGGTTGATCCCAC CCACAGGCCCATTGGGCGCTAGCACTCTGGTATCACGGTACCTTTGT GCGCCTGTTTTATACCCCCTCCCCCAACTGTAACTTAGAAGTAACAC ACACCGATCAACAGTCAGCGTGGCACACCAGCCACGTTTTGATCAAG CACTTCTGTTACCCCGGACTGAGTATCAATAGACTGCTCACGCGGTT GAAGGAGAAAGCGTTCGTTATCCGGCCAACTACTTCGAAAAACCTAG TAACACCGTGGAAGTTGCAGAGTGTTTCGCTCAGCACTACCCCAGTG TAGATCAGGTCGATGAGTCACCGCATTCCCCACGGGCGACCGTGGCG GTGGCTGCGTTGGCGGCCTGCCCATGGGGAAACCCATGGGACGCTCT AATACAGACATGGTGCGAAGAGTCTATTGAGCTAGTTGGTAGTCCTC CGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCACACACCCTCAA GCCAGAGGGCAGTGTGTCGTAACGGGCAACTCTGCAGCGGAACCGAC TACTTTGGGTGTCCGTGTTTCATTTTATTCCTATACTGGCTGCTTAT GGTGACAATTGAGAGATCGTTACCATATAGCTATTGGATTGGCCATC CGGTGACTAATAGAGCTATTATATATCCCTTTGTTGGGTTTATACCA CTTAGCTTGAAAGAGGTTAAAACATTACAATTCATTGTTAAGTTGAA TACAGCAAAATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTT ACCACACCCAGCATTCCTCCTGATCCCAGACATCCAGATGACACAGA CTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGT TGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAATTGGTATCAGCA GAAACCAGATGGAACTGTTAAACTCCTGATCTACCATACATCAAGAT TACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACA GATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCAC TTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCGTACACGTTCGGAGGGG GGACTAAGTTGGAAATAACAGGCTCCACCTCTGGATCCGGCAAGCCC GGATCTGGCGAGGGATCCACCAAGGGCGAGGTGAAACTGCAGGAGTC AGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCGTCACATGCA CTGTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAGCTGGATTCGC CAGCCTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAG

【０４４６】

【表６－４５】

		TGAAACCACATACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGACCATCA TCAAGGACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTG CAAACTGATGACACAGCCATTTACTACTGTGCCAAACATTATTACTA CGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCA CCGTCTCCGCGGCCGCGGGCGGTGGAGGCAGTGGTGGTGGCGGCTCT GGCGGTGGTGGTAGCCTCGAGGATGGTAATGAAGAAATGGGTGGTAT TACACAGACACCATATAAAGTCTCCATCTCTGGAACCACAGTAATAT TGACATGCCCTCAGTATCCTGGATCTGAAATACTATGGCAACACAAT GATAAAAACATAGGCGGTGATGAGGATGATAAAAACATAGGCAGTGA TGAGGATCACCTGTCACTGAAGGAATTTTCAGAATTGGAGCAAAGTG GTTATTATGTCTGCTACCCCAGAGGAAGCAAACCAGAAGATGCGAAC TTTTATCTCTACCTGAGGGCAAGAGTGTGTGAGAACTGCATGGAGAT GGATGTGATGTCGGTGGCCACAATTGTCATAGTGGACATCTGCATCA CTGGGGGCTTGCTGCTGCTGGTTTACTACTGGAGCAAGAATAGAAAG GCCAAGGCCAAGCCTGTGACACGAGGAGCGGGTGCTGGCGGCAGGCA AAGGGGACAAAACAAGGAGAGGCCACCACCTGTTCCCAACCCAGACT ATGAGCCCATCCGGAAAGGCCAGCGGGACCTGTATTCTGGCCTGAAT CAGAGACGCATCTGATAAAAAAAACAAAAAACAAAACGGCTATTATG CGTTACCGGCGAGACGCTACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTA GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAA GACCAGTGGACAATCGACGGATAACAGCATATCTAG
149	Ana_CVB3_IRES-抗MSLN TFP	GGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGGGAGACCCTCGACCGTCGATTGTCC ACTGGTCAACAATAGATGACTTACAACTAATCGGAAGGTGCAGAGAC TCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCC AATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAA ATCCGTTGACCTTAAACGGTCGTGTGGGTTCAAGTCCCTCCACCCCC ACGCCGGAAACGCAATAGCCGAAAAACAAAAAACAAAAAAATTAAAA CAGCCTGTGGGTTGATCCCACCCACAGGCCCATTGGGCGCTAGCACT CTGGTATCACGGTACCTTTGTGCGCCTGTTTTATACCCCCTCCCCCA ACTGTAACTTAGAAGTAACACACACCGATCAACAGTCAGCGTGGCAC ACCAGCCACGTTTTGATCAAGCACTTCTGTTACCCCGGACTGAGTAT CAATAGACTGCTCACGCGGTTGAAGGAGAAAGCGTTCGTTATCCGGC CAACTACTTCGAAAAACCTAGTAACACCGTGGAAGTTGCAGAGTGTT TCGCTCAGCACTACCCCAGTGTAGATCAGGTCGATGAGTCACCGCAT TCCCCACGGGCGACCGTGGCGGTGGCTGCGTTGGCGGCCTGCCCATG GGGAAACCCATGGGACGCTCTAATACAGACATGGTGCGAAGAGTCTA TTGAGCTAGTTGGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCTAA CTGCGGAGCACACACCCTCAAGCCAGAGGGCAGTGTGTCGTAACGGG CAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCATTTT ATTCCTATACTGGCTGCTTATGGTGACAATTGAGAGATCGTTACCAT ATAGCTATTGGATTGGCCATCCGGTGACTAATAGAGCTATTATATAT CCCTTTGTTGGGTTTATACCACTTAGCTTGAAAGAGGTTAAAACATT

【０４４７】

【表６－４６】

		ACAATTCATTGTTAAGTTGAATACAGCAAAATGCTTCTGCTTGTGAC GTCCCTCCTGCTTTGTGAACTCCCGCATCCTGCCTTCCTGCTCATCC CGGAAGTTCAGCTGGTAGAGTCCGGTGGCGGGCTGGTACAGCCAGGG GGATCTCTCCGTCTCTCATGTGCTGCCAGTGGGGGAGATTGGTCCGC TAACTTTATGTACTGGTATCGTCAAGCACCTGGGAAACAACGCGAGC TGGTTGCACGGATCTCTGGACGAGGGGTAGTGGATTACGTGGAAAGT GTGAAAGGACGATTCACAATTTCCAGGGACAATTCTAAAAACACCCT TTATTTGCAAATGAATAGTCTGAGAGCAGAAGACACAGCCGTATATT ATTGTGCAGTCGCATCCTATTGGGGGCAGGGGACTCTTGTCACAGTC TCGAGTGCTGCAGCAGGCGGCGGGGGCTCAGGAGGGGGTGGGTCTGG AGGAGGTGGGAGTCTGGAGGATGGTAATGAAGAAATGGGTGGTATTA CACAGACACCATATAAAGTCTCCATCTCTGGAACCACAGTAATATTG ACATGCCCTCAGTATCCTGGATCTGAAATACTATGGCAACACAATGA TAAAAACATAGGCGGTGATGAGGATGATAAAAACATAGGCAGTGATG AGGATCACCTGTCACTGAAGGAATTTTCAGAATTGGAGCAAAGTGGT TATTATGTCTGCTACCCCAGAGGAAGCAAACCAGAAGATGCGAACTT TTATCTCTACCTGAGGGCAAGAGTGTGTGAGAACTGCATGGAGATGG ATGTGATGTCGGTGGCCACAATTGTCATAGTGGACATCTGCATCACT GGCGGATTGCTGCTGCTGGTTTACTACTGGAGCAAGAATAGAAAGGC CAAGGCCAAGCCTGTGACACGAGGAGCGGGTGCTGGCGGCAGGCAAA GGGGACAAAACAAGGAGAGGCCACCACCTGTTCCCAACCCAGACTAT GAGCCCATCCGGAAAGGCCAGCGGGACCTGTATTCTGGCCTGAATCA GAGACGCATCTAAAAAAAAACAAAAAACAAAACGGCTATTATGCGTTA CCGGCGAGACGCTACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTAT AGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGACCA GTGGACAATCGACGGATAACAGCATATCTAGGGATC

10

20

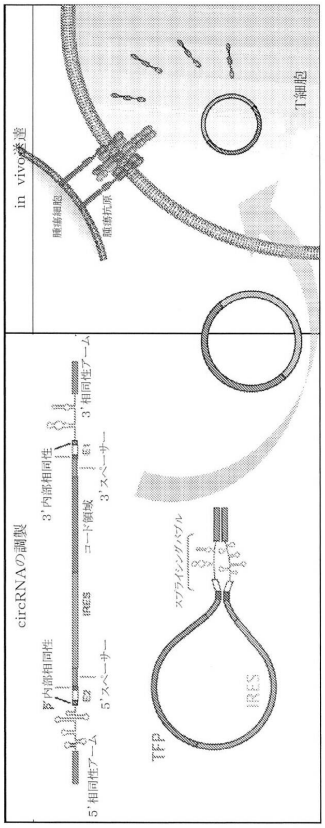
30

40

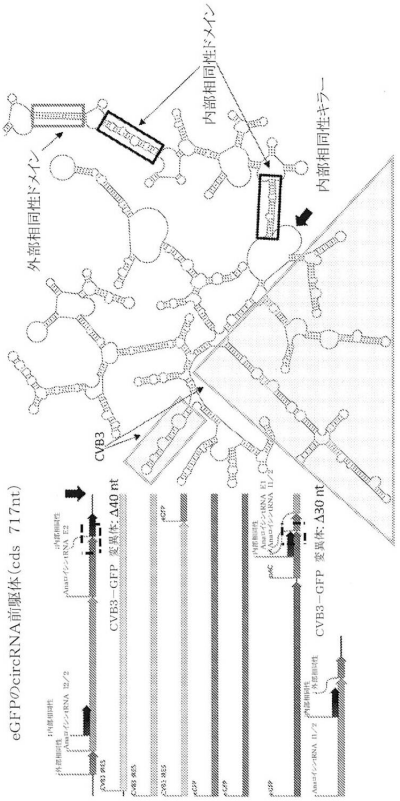
50

【図面】

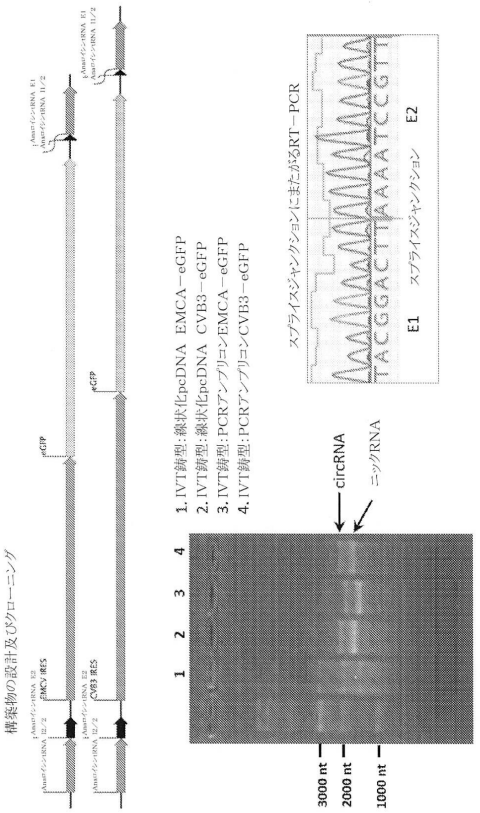
【図１】


circRNAの調製
in vivo送達
T細胞
IRES
TFP

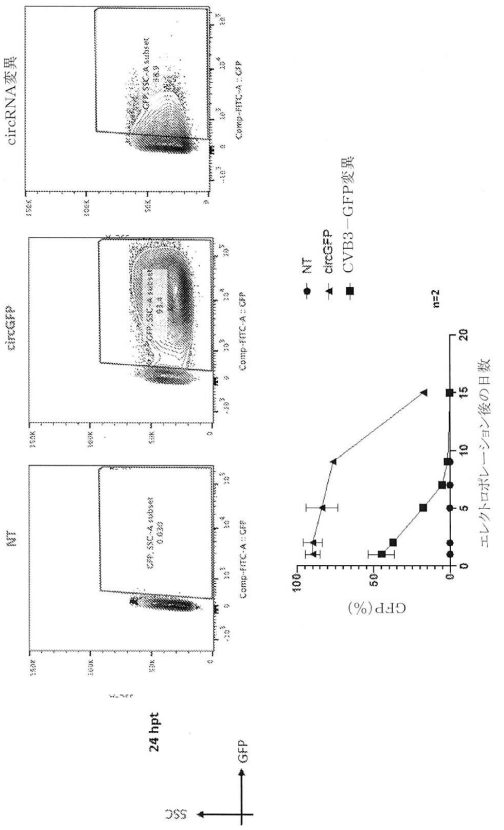
【図２】


eGFPのcircRNA前駆体(cds 717nt)
外部相同性ドメイン
内部相同性ドメイン
内部相同性キラー
CVB3
CVB3−GFP 変異体:Δ40 nt
CVB3−GFP 変異体:Δ30 nt

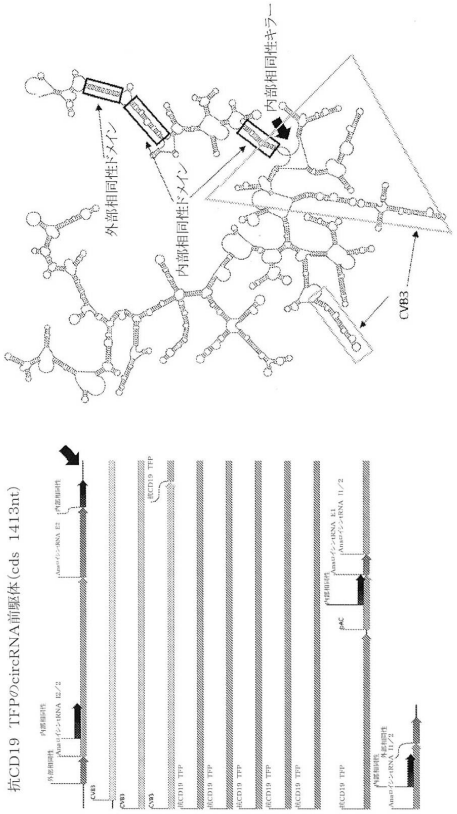
【図３】


構築物の設計及びクローニング
1. IVT鋳型:線状化pcDNA EMCA−eGFP
2. IVT鋳型:線状化pcDNA CVB3−eGFP
3. IVT鋳型:PCRアンプリコンEMCA−eGFP
4. IVT鋳型:PCRアンプリコンCVB3−eGFP
スプライスジャンクションにまたがるRT−PCR
E1
E2
circRNA
ニックRNA
3000 nt
2000 nt
1000 nt

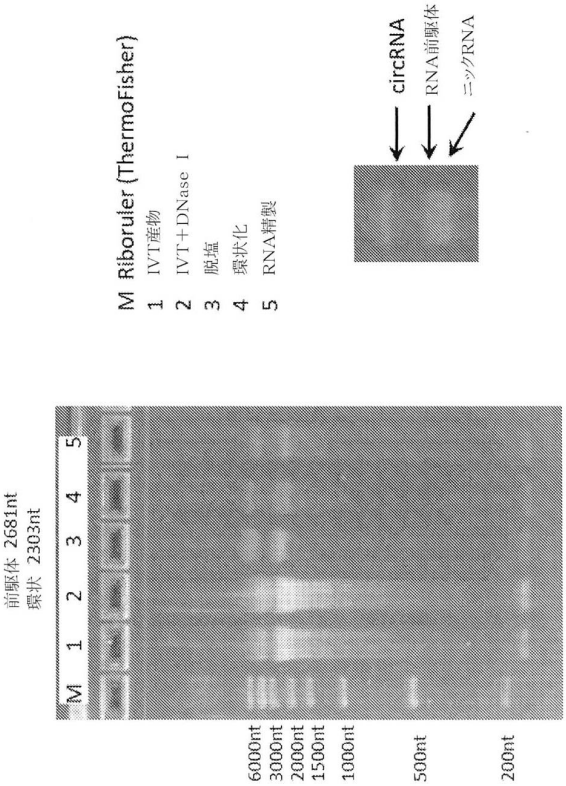
【図４】


circRNA変異
circGFP
NT
24 hpt
SSC
GFP
GFP(%)
エレクトロポレーション後の日数
n=2

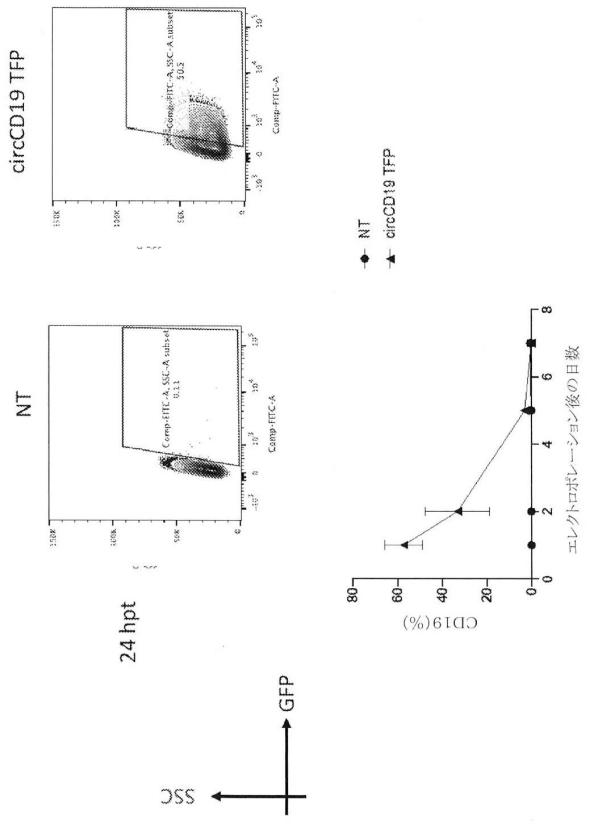
【図５】


外部相同性ドメイン
内部相同性ドメイン
内部相同性キラー
CVB3
抗CD19 TFPのcircRNA前駆体(cds 1413nt)

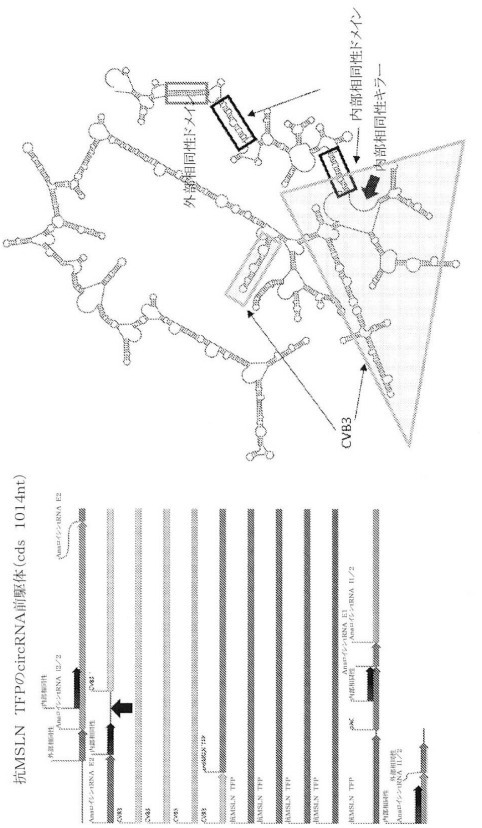
【図６】


M Riboruler (ThermoFisher)
1 IVT産物
2 IVT+DNase I
3 脱塩
4 環状化
5 RNA精製
circRNA
RNA前駆体
ニックRNA
前駆体 2681nt
環状 2303nt
M 1 2 3 4 5
6000nt
3000nt
2000nt
1500nt
1000nt
500nt
200nt

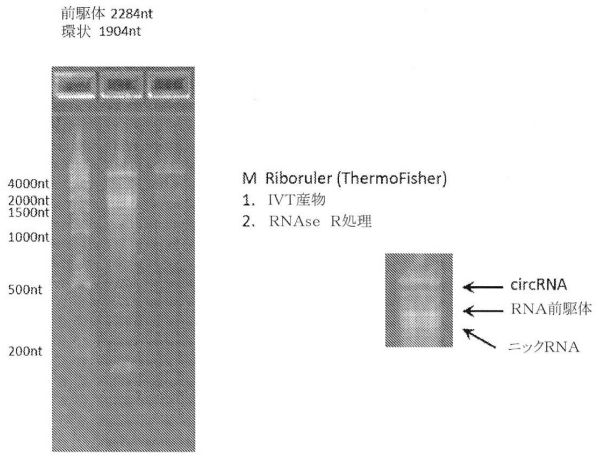
【図７】


circCD19 TFP
NT
24 hpt
SSC
GFP
NT
circCD19 TFP
CD19(%)
エレクトロポレーション後の日数

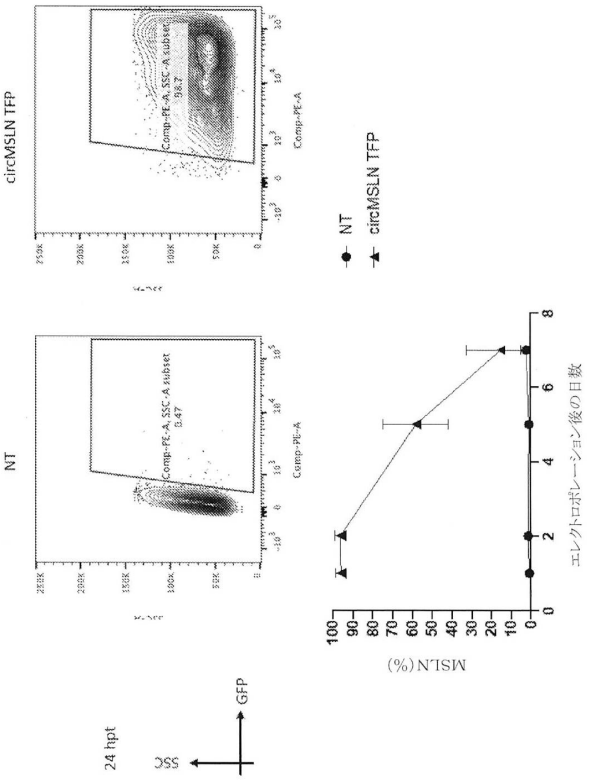
【図８】


外部相同性ドメイン
内部相同性ドメイン
内部相同性キラー
CVB3
抗MSLN TFPのcircRNA前駆体(cds 1014nt)

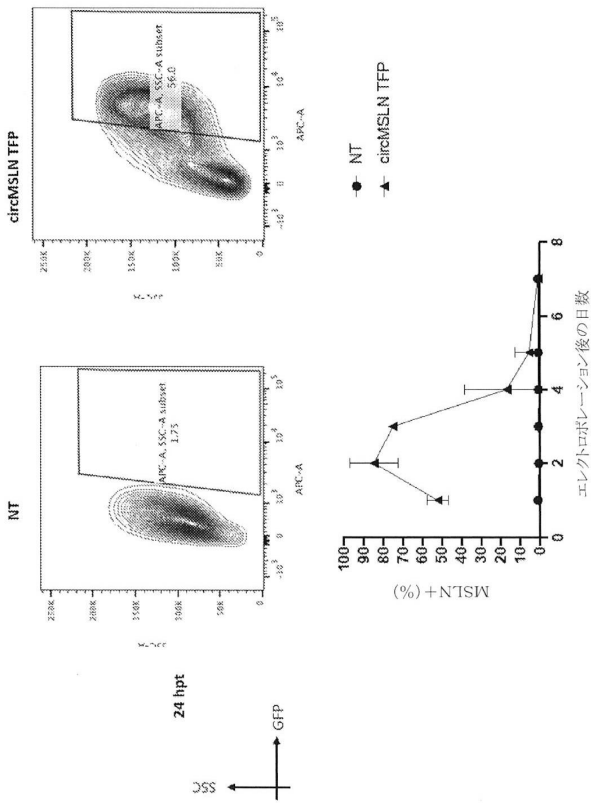
【図９】



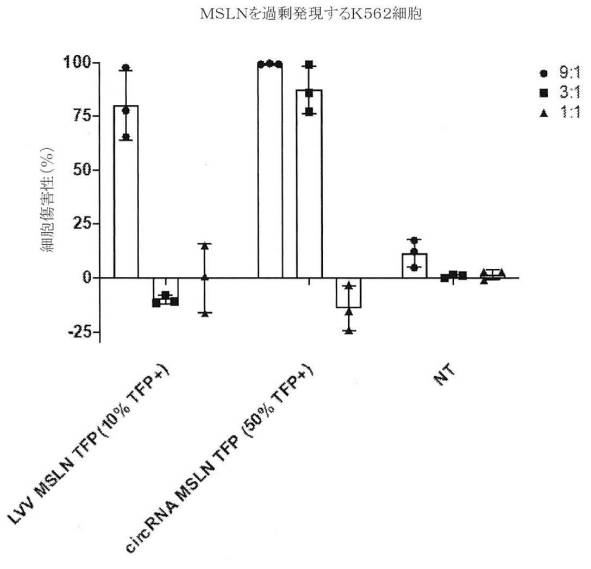
【図１０】



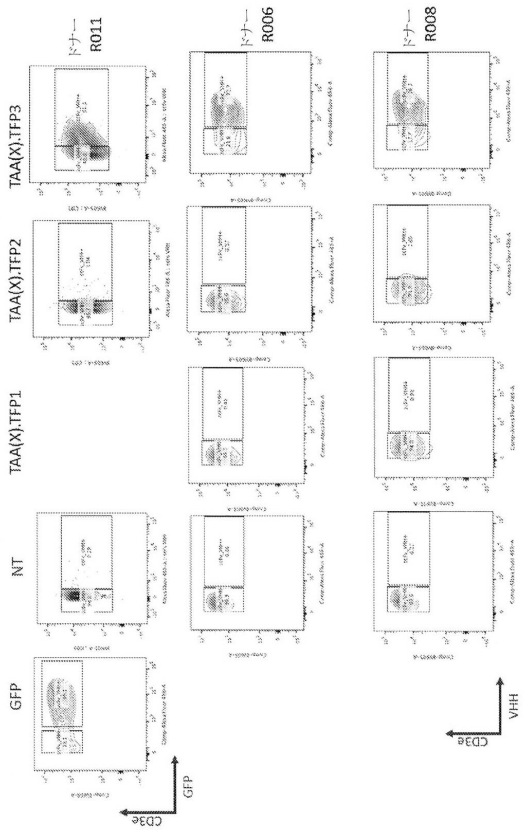
【図１１】



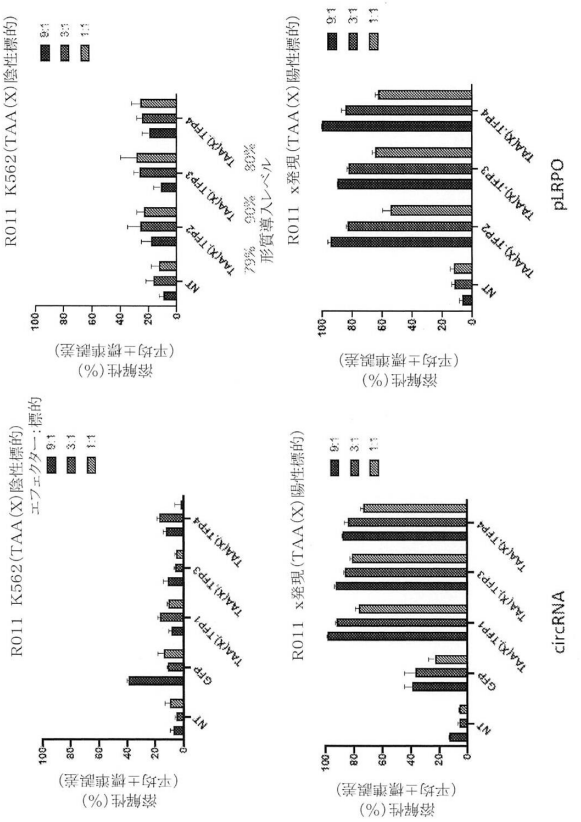
【図１２】



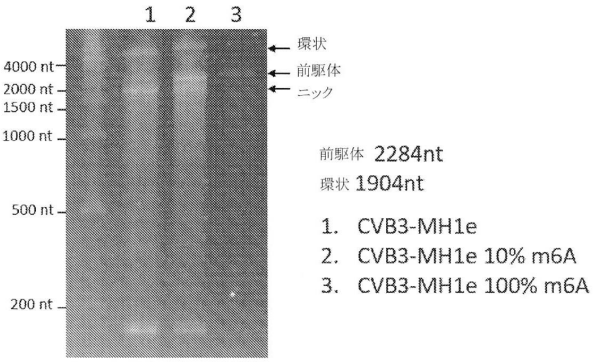
【図１３】



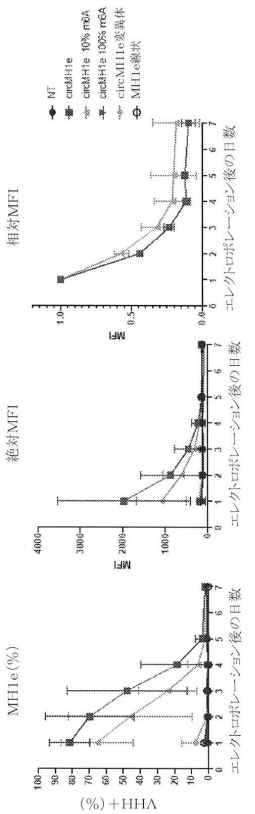
【図１４】



【図１５】



【図１６】



【配列表】
20225300370000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US20/29344

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - C12N 15/66, 15/62; A61K 35/17, 38/17; C07K 14/705 (2020.01)

CPC - C12N 15/66, 15/625, 15/62; A61K 35/17, 38/1774, 38/177, 38/17; C07K 14/7051, 14/705

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.
Y	WO 2018/232020 A1 (TCR2 THERAPEUTICS INC.) 20 December 2018; paragraphs [0011], [00115], [00141], [00153], [00162], [00268], [00282]; Claim 1	1-2, 3/1-2, 10-12, 13/10-12, 15-16, 17/15-16, 26-27, 28/26-27, 29/28/26-27, 63-64, 65/63-64, 75-77, 78/75-77, 83-84, 85/83-84, 104-105, 106/104-105, 107-108, 109/107-108, 116-117, 118/116-117
Y	US 2016/0194368 A1 (MODERNA THERAPEUTICS, INC.) 7 July 2016; paragraphs [0009], [0133], [0166], [0184], [0271]-[0276]	1-2, 3/1-2, 10-12, 13/10-12, 28/26-27, 29/28/26-27, 76-77, 78/76-77, 104-105, 106/104-105, 107-108, 109/107-108, 116-117, 118/116-117
Y	(UMEKAGE, S et al.) In Vivo Circular RNA Expression by the Permuted Intron-Exon Method. Innovations in Biotechnology, 17 February 2012; Dr. Eddy C. Agbo (Ed.), ISBN: 978-953-51-0096-6, pages 75-90; Figure 1; Figure 3a-b; page 75, 2nd paragraph; page 78, 2nd paragraph; page 86, 2nd paragraph; DOI:10.5772/28220	15-16, 17/15-16, 26-27, 28/26-27, 29/28/26-27, 63-64, 65/63-64, 75-77, 78/75-77, 83-84, 85/83-84

☒ 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
24 July 2020 (24.07.2020)	23 SEP 2020
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 Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US20/29344

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	(OCHI, A et al.) Non-enzymatic in vitro production of circular hammerhead ribozyme targeting the template region of human telomerase RNA. Nucleic Acids Symposium Series. 2009, Vol. 53; pages 275-276; DOI: 10.1093/nass/nrp138	1-2, 3/1-2, 10-12, 13/10-12, 15-16, 17/15-16, 26-27, 28/26-27, 29/28/26-27, 63-64, 65/63-64, 75-77, 78/75-77, 83-84, 85/83-84, 104-105, 106/104-105, 107-108, 109/107-108, 116-117, 118/116-117
P, X	WO 2019/222275 A2 (TCR2 THERAPEUTICS INC.) 21 November 2019; entire document	1-2, 3/1-2, 10-12, 13/10-12, 15-16, 17/15-16, 26-27, 28/26-27, 29/28/26-27, 63-64, 65/63-64, 75-77, 78/75-77, 83-84, 85/83-84, 104-105, 106/104-105, 107-108, 109/107-108, 116-117, 118/116-117

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US20/29344

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.: 4-9, 14, 18-25, 30-62, 66-74, 79-82, 86-103, 110-115, 119-125
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

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

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2019)

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）
Ｃ１２Ｐ	*19/34 (2006.01)*	Ｃ１２Ｐ	19/34	Ａ	４Ｃ０８６
Ａ６１Ｐ	*35/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		４Ｃ０８７
Ａ６１Ｋ	*48/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00		
Ａ６１Ｋ	*35/17 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/17	Ｚ	
Ａ６１Ｋ	*39/395(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｅ	
Ａ６１Ｋ	*31/7105(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｔ	
Ａ６１Ｋ	*9/127(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7105		
Ａ６１Ｋ	*9/14 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/127		
Ａ６１Ｋ	*47/68 (2017.01)*	Ａ６１Ｋ	9/14		
Ｃ１２Ｎ	*5/0783(2010.01)*	Ａ６１Ｋ	47/68		
Ｃ１２Ｎ	*15/63 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/0783		
		Ｃ１２Ｎ	15/63	Ｚ	

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

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＲＩＴＯＮ

アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２１４２，ケンブリッジ，ビニー・ストリート １００，スウィート ７１０

(72)発明者 リバーソン，エラ

アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２１４２，ケンブリッジ，ビニー・ストリート １００，スウィート ７１０

(72)発明者 ホフマイスター，ロバート

アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２１４２，ケンブリッジ，ビニー・ストリート １００，スウィート ７１０

(72)発明者 バウアリー，パトリック・アレクサンダー

アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２１４２，ケンブリッジ，ビニー・ストリート １００，スウィート ７１０

(72)発明者 ゲッツ，ダニエル

アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２１４２，ケンブリッジ，ビニー・ストリート １００，スウィート ７１０

Ｆターム（参考） 4B064 AF27 CA21 CA50 CC24 DA01
4B065 AA90X AB01 AC14 BA01 CA24 CA44
4C076 AA19 AA29 AA95 CC27 EE41 EE59
4C084 AA13 MA02 MA41 NA14 ZB26
4C085 AA13 AA14 BB31 CC22 DD61 EE03
4C086 AA01 AA02 EA16 MA03 MA05 MA41 NA14 ZB26
4C087 AA01 AA02 BB63 MA41 NA14 ZB26