

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-502094
(P2024-502094A)

(43)公表日 令和6年1月17日(2024.1.17)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/85 (2006.01)	C 1 2 N	15/85	Z	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/86 (2006.01)	C 1 2 N	15/86	Z Z N A	4 C 0 8 7
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		4 H 0 4 5
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		
A 6 1 K	35/12 (2015.01)	A 6 1 K	35/12		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全163頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-540746(P2023-540746)			(71)出願人	523248415
(86)(22)出願日	令和3年12月29日(2021.12.29)				アラウノス セラピューティクス インコ
(85)翻訳文提出日	令和5年8月18日(2023.8.18)				ーポレイテッド
(86)国際出願番号	PCT/US2021/073145				アメリカ合衆国 7 7 0 5 4 テキサス州
(87)国際公開番号	WO2022/147444				, ヒューストン, エル リオ ストリート
(87)国際公開日	令和4年7月7日(2022.7.7)				8 0 3 0
(31)優先権主張番号	63/132,434			(74)代理人	110001656
(32)優先日	令和2年12月30日(2020.12.30)				弁理士法人谷川国際特許事務所
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			(72)発明者	オリバレス, サイモン
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く				アメリカ合衆国 7 7 0 3 0 テキサス州
				(72)発明者	シン, ハージート
					アメリカ合衆国 7 7 0 3 0 テキサス州
					, ヒューストン, ホルコム ブールバード
					1 5 1 5
					最終頁に続く

(54)【発明の名称】 多シストロン性発現カセットを含む組換えベクター及びそれらの使用方法

(57)【要約】

多シストロン性発現カセットを含むベクターであって、C D 1 9 特異的キメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドと、サイトカインをコードするポリヌクレオチドと、マーカートンパク質をコードするポリヌクレオチドと、を含み、C D 1 9 特異的キメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド及びサイトカインコード配列をコードするポリヌクレオチドが、F 2 Aエレメントを含むポリヌクレオチド配列によって分離され、サイトカインをコードするポリヌクレオチド及びマーカートンパク質をコードするポリヌクレオチドが、T 2 Aエレメントを含むポリヌクレオチド配列によって分離される、ベクターが本明細書で提供される。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

多シストロン性発現カセットを含む組換えベクターであって、前記多シストロン性発現カセットが、5'から3'に、

a. CD19に特異的に結合する細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞質ドメインを含むキメラ抗原受容体（CAR）をコードする第1のポリヌクレオチド配列と、

b. F2Aエレメントを含む第2のポリヌクレオチド配列と、

c. IL-15、又はその機能的断片若しくは機能的バリエーション、及びIL-15Rα、又はその機能的断片若しくは機能的バリエーションを含む融合タンパク質をコードする第3のポリヌクレオチド配列と、

d. T2Aエレメントを含む第4のポリヌクレオチド配列と、

e. マーカータンパク質をコードする第5のポリヌクレオチド配列と、を含むポリヌクレオチドに作動可能に連結された転写調節エレメントを含む、組換えベクター。

【請求項 2】

前記F2Aエレメントが、配列番号137のアミノ酸配列、又は1、2、若しくは3個のアミノ酸修飾を含む配列番号137の前記アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む、請求項1に記載の組換えベクター。

【請求項 3】

前記F2Aエレメントが、配列番号141のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列を含む、請求項1に記載の組換えベクター。

【請求項 4】

前記F2Aエレメントが、配列番号138のアミノ酸配列、又は1、2、若しくは3個のアミノ酸修飾を含む配列番号138の前記アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む、請求項1に記載の組換えベクター。

【請求項 5】

前記F2Aエレメントが、配列番号142のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列を含む、請求項1に記載の組換えベクター。

【請求項 6】

前記T2Aエレメントが、配列番号139のアミノ酸配列、又は1、2、若しくは3個のアミノ酸修飾を含む配列番号139の前記アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の組換えベクター。

【請求項 7】

前記T2Aエレメントが、配列番号143のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列を含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の組換えベクター。

【請求項 8】

前記T2Aエレメントが、配列番号140若しくは182のアミノ酸配列、又は1、2、若しくは3個のアミノ酸修飾を含む配列番号140若しくは182のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の組換えベクター。

【請求項 9】

前記T2Aエレメントが、配列番号144、145、又は165のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列を含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の組換えベクター。

【請求項 10】

前記抗原結合ドメインが、相補性決定領域 V H C D R 1、V H C D R 2、及び V H C D R 3 を含む重鎖可変領域 (V H) と、相補性決定領域 V L C D R 1、V L C D R 2、及び V L C D R 3 を含む軽鎖可変領域 (V L) と、を含む、請求項 1～9 のいずれか一項に記載の組換えベクター。

【請求項 1 1】

前記抗原結合ドメインが、第 1 のペプチドリンカーを介して作動可能に連結された前記 V H 及び前記 V L を含む s c F v を含む、請求項 1 0 に記載の組換えベクター。

【請求項 1 2】

前記 V H が、配列番号 2 に示される V H C D R 1、V H C D R 2、及び V H C D R 3 アミノ酸配列を含む、請求項 1 0 又は 1 1 に記載の組換えベクター。

10

【請求項 1 3】

a. 前記 V H C D R 1 が、配列番号 6 のアミノ酸配列、又は 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含む配列番号 6 の前記アミノ酸配列を含み、

b. 前記 V H C D R 2 が、配列番号 7 のアミノ酸配列、又は 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含む配列番号 7 の前記アミノ酸配列を含み、

c. 前記 V H C D R 3 が、配列番号 8 のアミノ酸配列、又は 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含む配列番号 8 の前記アミノ酸配列を含む、請求項 1 0 又は 1 1 に記載の組換えベクター。

【請求項 1 4】

前記 V L が、配列番号 1 に示される V L C D R 1、V L C D R 2、及び V L C D R 3 アミノ酸配列を含む、請求項 1 0～1 3 のいずれか一項に記載の組換えベクター。

20

【請求項 1 5】

a. 前記 V L C D R 1 が、配列番号 3 のアミノ酸配列、又は 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含む配列番号 3 の前記アミノ酸配列を含み、

b. 前記 V L C D R 2 が、配列番号 4 のアミノ酸配列、又は 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含む配列番号 4 の前記アミノ酸配列を含み、

c. 前記 V L C D R 3 が、配列番号 5 のアミノ酸配列、又は 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含む配列番号 5 の前記アミノ酸配列を含む、請求項 1 0～1 3 のいずれか一項に記載の組換えベクター。

【請求項 1 6】

前記 V H が、配列番号 2 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 1 0～1 5 のいずれか一項に記載の組換えベクター。

30

【請求項 1 7】

前記 V H が、配列番号 2 0 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる、請求項 1 0～1 6 のいずれか一項に記載の組換えベクター。

【請求項 1 8】

前記 V L が、配列番号 1 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 1 0～1 7 のいずれか一項に記載の組換えベクター。

40

【請求項 1 9】

前記 V L が、配列番号 1 9 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる、請求項 1 0～1 8 のいずれか一項に記載の組換えベクター。

【請求項 2 0】

前記第 1 のペプチドリンカーが、配列番号 9 若しくは配列番号 1 7 のアミノ酸配列、又は 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含む配列番号 9 若しくは 1 7 の前記アミノ酸配

50

列を含む、請求項 11～19 のいずれか一項に記載の組換えベクター。

【請求項 21】

前記第 1 のペプチドリンカーが、配列番号 27 又は配列番号 35 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % 同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる、請求項 11～20 のいずれか一項に記載の組換えベクター。

【請求項 22】

前記第 1 のペプチドリンカーが、配列番号 27 の前記ポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % 同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる、請求項 21 に記載の組換えベクター。

10

【請求項 23】

前記 CAR が、前記 CAR の前記抗原結合ドメインと前記膜貫通ドメインとの間に位置するヒンジ領域を更に含む、請求項 1～22 のいずれか一項に記載の組換えベクター。

【請求項 24】

前記ヒンジ領域が、配列番号 37、38、若しくは 39 のアミノ酸配列、又は 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含む配列番号 37、38、若しくは 39 の前記アミノ酸配列を含む、請求項 23 に記載の組換えベクター。

【請求項 25】

前記ヒンジ領域が、配列番号 40、41、又は 42 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % 同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる、請求項 23 に記載の組換えベクター。

20

【請求項 26】

前記 CAR の前記膜貫通ドメインが、配列番号 43、44 若しくは 45 のアミノ酸配列、又は 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含む配列番号 43、44 若しくは 45 の前記アミノ酸配列を含む、請求項 1～25 のいずれか一項に記載の組換えベクター。

【請求項 27】

前記 CAR の前記膜貫通ドメインが、配列番号 49、50、51、又は 52 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % 同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる、請求項 1～25 のいずれか一項に記載の組換えベクター。

30

【請求項 28】

前記ヒンジ領域及び前記膜貫通ドメインが、配列番号 46、47、若しくは 48 のアミノ酸配列、又は 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含む配列番号 46、47、若しくは 48 の前記アミノ酸配列を合わせて含む、請求項 23～27 のいずれか一項に記載の組換えベクター。

【請求項 29】

前記ヒンジ領域及び前記膜貫通ドメインが、合わせて、配列番号 53、54、55、又は 56 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % 同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる、請求項 23～27 のいずれか一項に記載の組換えベクター。

40

【請求項 30】

前記細胞質ドメインが、ヒト CD3ζ の一次シグナル伝達ドメイン、又はその機能的断片若しくは機能的バリエーションを含む、請求項 1～29 のいずれか一項に記載の組換えベクター。

【請求項 31】

前記細胞質ドメインが、配列番号 60 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 30 に記載の組換えベクター。

50

【請求項 3 2】

前記細胞質ドメインが、配列番号 6 7 又は 6 8 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる、請求項 3 0 に記載の組換えベクター。

【請求項 3 3】

前記細胞質ドメインが、C D 2 8、4 - 1 B B、O X 4 0、C D 2、C D 7、C D 2 7、C D 3 0、C D 4 0、C D S、I C A M - 1、L F A - 1、B 7 - H 3、及び I C O S からなる群から選択されるタンパク質の共刺激ドメイン、又はその機能的断片若しくはバリエーションを含む、請求項 1 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の組換えベクター。

10

【請求項 3 4】

前記タンパク質が、C D 2 8 又は 4 - 1 B B である、請求項 3 3 に記載の組換えベクター。

【請求項 3 5】

前記タンパク質が、C D 2 8 である、請求項 3 3 又は 3 4 に記載の組換えベクター。

【請求項 3 6】

前記細胞質ドメインが、配列番号 5 7 若しくは配列番号 5 8 のアミノ酸配列、又は 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含む配列番号 5 7 若しくは 5 8 の前記アミノ酸配列を含む、請求項 3 3 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の組換えベクター。

【請求項 3 7】

前記細胞質ドメインが、配列番号 6 4 又は 6 5 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる、請求項 3 3 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の組換えベクター。

20

【請求項 3 8】

前記タンパク質が、4 - 1 B B である、請求項 3 3 又は 3 4 に記載の組換えベクター。

【請求項 3 9】

前記細胞質ドメインが、配列番号 5 9 のアミノ酸配列、又は 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含む配列番号 5 9 の前記アミノ酸配列を含む、請求項 3 3、3 4、又は 3 8 に記載の組換えベクター。

30

【請求項 4 0】

前記細胞質ドメインが、配列番号 6 6 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる、請求項 3 3、3 4、3 8、又は 3 9 に記載の組換えベクター。

【請求項 4 1】

前記細胞質ドメインが、配列番号 6 1、6 2 若しくは配列番号 6 3 のアミノ酸配列、又は 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含む配列番号 6 1、6 2 若しくは 6 3 の前記アミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 4 0 のいずれか一項に記載の組換えベクター。

【請求項 4 2】

前記細胞質ドメインが、配列番号 6 9、7 0 又は 7 1 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる、請求項 1 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の組換えベクター。

40

【請求項 4 3】

前記 C A R が、配列番号 7 2、7 4、7 6、7 7、7 8、7 9、8 0、又は 8 1 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 4 2 のいずれか一項に記載の組換えベクター。

【請求項 4 4】

50

前記CARが、配列番号82、83、86、87、90、91、92、93、94、又は95のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる、請求項1～43のいずれか一項に記載の組換えベクター。

【請求項45】

前記IL-15、又はその機能的断片若しくは機能的バリエーションが、第2のペプチドリンカーを介して、前記IL-15R α 、又はその機能的断片若しくは機能的バリエーションに作動可能に連結される、請求項1～44のいずれか一項に記載の組換えベクター。

【請求項46】

前記融合タンパク質が、配列番号119、121、又は180のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列を含む、請求項1～45のいずれか一項に記載の組換えベクター。

10

【請求項47】

前記融合タンパク質が、配列番号126、127、130、131、又は181のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる、請求項1～46のいずれか一項に記載の組換えベクター。

【請求項48】

前記マーカータンパク質が、HER1のドメインIII、又はその機能的断片若しくは機能的バリエーション、HER1のドメインIVのN末端部分、及びCD28の膜貫通ドメイン、又はその機能的断片若しくは機能的バリエーションを含む、請求項1～47のいずれか一項に記載の組換えベクター。

20

【請求項49】

前記HER1のドメインIII、又はその機能的断片若しくは機能的バリエーションが、配列番号98のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列を含む、請求項48に記載の組換えベクター。

【請求項50】

前記HER1のドメインIII、又はその機能的断片若しくは機能的バリエーションが、配列番号110又は164のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる、請求項48に記載の組換えベクター。

30

【請求項51】

前記HER1のドメインIVのN末端部分が、配列番号99のアミノ酸1～40、1～39、1～38、1～37、1～36、1～35、1～34、1～33、1～32、1～31、1～30、1～29、1～28、1～27、1～26、1～25、1～24、1～23、1～22、1～21、1～20、1～19、1～18、1～17、1～16、1～15、1～14、1～13、1～12、1～11、又は1～10を含む、請求項48～50のいずれか一項に記載の組換えベクター。

【請求項52】

前記HER1のドメインIVのN末端部分が、配列番号99のアミノ酸1～21を含む、請求項48～51のいずれか一項に記載の組換えベクター。

40

【請求項53】

前記HER1のドメインIVのN末端部分が、配列番号100のアミノ酸配列、又は1、2、若しくは3個のアミノ酸修飾を含む配列番号100の前記アミノ酸配列を含む、請求項48～52のいずれか一項に記載の組換えベクター。

【請求項54】

前記HER1のドメインIVのN末端部分が、配列番号112のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる、請求項48～53のいずれか一項に記載の組換えベクター。

50

【請求項 55】

C D 2 8 の前記膜貫通領域が、配列番号 1 0 1 のアミノ酸配列、又は 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含む配列番号 1 0 1 の前記アミノ酸配列を含む、請求項 4 8 ～ 5 4 のいずれか一項に記載の組換えベクター。

【請求項 56】

C D 2 8 の前記膜貫通領域が、配列番号 1 1 3 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる、請求項 4 8 ～ 5 5 のいずれか一項に記載の組換えベクター。

【請求項 57】

前記マーカートンパク質が、配列番号 9 6、9 7、1 6 6、又は 1 6 7 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ～ 5 6 のいずれか一項に記載の組換えベクター。

【請求項 58】

前記マーカートンパク質が、配列番号 1 0 7、1 0 8、1 0 9、1 6 2、1 7 3、又は 1 7 4 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる、請求項 1 ～ 5 7 のいずれか一項に記載の組換えベクター。

【請求項 59】

前記調節エレメントが、プロモーターを含む、請求項 1 ～ 5 8 のいずれか一項に記載の組換えベクター。

【請求項 60】

前記プロモーターが、ヒト伸長因子 1 - アルファ (h E F - 1 α) ハイブリッドプロモーターである、請求項 5 9 に記載の組換えベクター。

【請求項 61】

前記プロモーターが、配列番号 1 4 6 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一のポリヌクレオチド配列を含む、請求項 5 9 又は 6 0 に記載の組換えベクター。

【請求項 62】

前記ベクターが、前記第 5 のポリヌクレオチド配列のポリ A 配列 3 ' を更に含む、請求項 1 ～ 6 1 のいずれか一項に記載の組換えベクター。

【請求項 63】

前記ポリ A 配列が、配列番号 1 4 8 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一のポリヌクレオチド配列を含む、請求項 6 2 に記載の組換えベクター。

【請求項 64】

多シストロン性発現カセットを含む組換えベクターであって、前記多シストロン性発現カセットが、5 ' から 3 ' に、

a. 配列番号 7 2 又は 7 4 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含む C A R をコードする第 1 のポリヌクレオチド配列と、

b. F 2 A エレメントを含む第 2 のポリヌクレオチド配列と、

c. 配列番号 1 1 9、1 2 1、又は 1 8 0 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含む融合タンパク質をコードする第 3 のポリヌクレオチド配列と、

d. T 2 A エレメントを含む第 4 のポリヌクレオチド配列と、

e. 配列番号 9 6 又は 9 7 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含むマーカートンパク質をコードする第 5 のポリヌクレオチド配列と、を含むポリヌクレオチドに作動可能に連結された転写調節エレメントを含む、組換えベクター。

10

20

30

40

50

【請求項 6 5】

前記 F 2 A エlement が、配列番号 1 3 7 のアミノ酸配列、又は 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含む配列番号 1 3 7 の前記アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む、請求項 6 4 に記載の組換えベクター。

【請求項 6 6】

前記 F 2 A エlement が、配列番号 1 4 1 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一のポリヌクレオチド配列を含む、請求項 6 4 に記載の組換えベクター。

【請求項 6 7】

前記 F 2 A エlement が、配列番号 1 3 8 のアミノ酸配列、又は 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含む配列番号 1 3 8 の前記アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む、請求項 6 4 に記載の組換えベクター。

【請求項 6 8】

前記 F 2 A エlement が、配列番号 1 4 2 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一のポリヌクレオチド配列を含む、請求項 6 4 に記載の組換えベクター。

【請求項 6 9】

前記 T 2 A エlement が、配列番号 1 3 9 のアミノ酸配列、又は 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含む配列番号 1 3 9 の前記アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む、請求項 6 4～6 8 のいずれか一項に記載の組換えベクター。

【請求項 7 0】

前記 T 2 A エlement が、配列番号 1 4 3 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一のポリヌクレオチド配列を含む、請求項 6 4～6 8 のいずれか一項に記載の組換えベクター。

【請求項 7 1】

前記 T 2 A エlement が、配列番号 1 4 0 若しくは 1 8 2 のアミノ酸配列、又は 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含む配列番号 1 4 0 若しくは 1 8 2 の前記アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む、請求項 6 4～6 8 のいずれか一項に記載の組換えベクター。

【請求項 7 2】

前記 T 2 A エlement が、配列番号 1 4 4、1 4 5、又は 1 6 5 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一のポリヌクレオチド配列を含む、請求項 6 4～6 8 のいずれか一項に記載の組換えベクター。

【請求項 7 3】

多シストロン性発現カセットを含む組換えベクターであって、前記多シストロン性発現カセットが、5' から 3' に、

a. 配列番号 8 2、8 3、8 6、又は 8 7 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一の第 1 のポリヌクレオチド配列と、

b. F 2 A エlement を含む第 2 のポリヌクレオチド配列と、

c. 配列番号 1 2 6、1 2 7、1 3 0、1 3 1、又は 1 8 1 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一の第 3 のポリヌクレオチド配列と、

d. T 2 A エlement を含む第 4 のポリヌクレオチド配列と、

e. 配列番号 1 0 7、1 0 8、1 0 9、又は 1 6 2 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一の第 5 のポリヌクレオチド配列と、を含むポリヌクレオチドに作動可能に連結された転写調節Elementを含む、組換えベクター。

10

20

30

40

50

【請求項 7 4】

前記 F 2 A エLEMENT が、配列番号 1 3 7 のアミノ酸配列、又は 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含む配列番号 1 3 7 の前記アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む、請求項 7 3 に記載の組換えベクター。

【請求項 7 5】

前記 F 2 A エLEMENT が、配列番号 1 4 1 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一のポリヌクレオチド配列を含む、請求項 7 3 に記載の組換えベクター。

【請求項 7 6】

前記 F 2 A エLEMENT が、配列番号 1 3 8 のアミノ酸配列、又は 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含む配列番号 1 3 8 の前記アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む、請求項 7 3 に記載の組換えベクター。

10

【請求項 7 7】

前記 F 2 A エLEMENT が、配列番号 1 4 2 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一のポリヌクレオチド配列を含む、請求項 7 3 に記載の組換えベクター。

【請求項 7 8】

前記 T 2 A エLEMENT が、配列番号 1 3 9 のアミノ酸配列、又は 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含む配列番号 1 3 9 の前記アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む、請求項 7 3 ～ 7 7 のいずれか一項に記載の組換えベクター。

20

【請求項 7 9】

前記 T 2 A エLEMENT が、配列番号 1 4 3 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一のポリヌクレオチド配列を含む、請求項 7 3 ～ 7 7 のいずれか一項に記載の組換えベクター。

【請求項 8 0】

前記 T 2 A エLEMENT が、配列番号 1 4 0 若しくは 1 8 2 のアミノ酸配列、又は 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含む配列番号 1 4 0 若しくは 1 8 2 の前記アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む、請求項 7 3 ～ 7 7 のいずれか一項に記載の組換えベクター。

30

【請求項 8 1】

前記 T 2 A エLEMENT が、配列番号 1 4 4、1 4 5、又は 1 6 5 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一のポリヌクレオチド配列を含む、請求項 7 3 ～ 7 7 のいずれか一項に記載の組換えベクター。

【請求項 8 2】

左逆方向末端反復 (I T R) と右 I T R とを更に含み、前記左 I T R 及び前記右 I T R が、前記多シストロン性発現カセットに隣接する、請求項 1 ～ 8 1 のいずれか一項に記載の組換えベクター。

【請求項 8 3】

40

5' から 3' に、

a. 前記左 I T R と、

b. 前記転写調節ELEMENTと、

c. 前記第 1 のポリヌクレオチド配列と、

d. 前記第 2 のポリヌクレオチド配列と、

e. 前記第 3 のポリヌクレオチド配列と、

f. 前記第 4 のポリヌクレオチド配列と、

g. 前記第 5 のポリヌクレオチド配列と、

h. 前記右 I T R と、を含む、請求項 8 2 に記載の組換えベクター。

【請求項 8 4】

50

多シストロン性発現カセットを含む組換えベクターであって、前記多シストロン性発現カセットが、配列番号 149 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % 同一のポリヌクレオチド配列に作動可能に連結された転写調節エレメントを含む、組換えベクター。

【請求項 85】

多シストロン性発現カセットを含む組換えベクターであって、前記多シストロン性発現カセットが、配列番号 152 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % 同一のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結された転写調節エレメントを含む、組換えベクター。

【請求項 86】

左逆方向末端反復 (ITR) と右 ITR とを更に含み、前記左 ITR 及び前記右 ITR が、前記多シストロン性発現カセットに隣接する、請求項 84 又は 85 に記載の組換えベクター。

【請求項 87】

前記左 ITR 及び前記右 ITR が、Sleeping Beauty トランスポゾン、piggyBac トランスポゾン、TcBuster トランスポゾン、及び Tol2 トランスポゾンからなる群から選択される DNA トランスポゾンの ITR である、請求項 82、83、又は 86 に記載の組換えベクター。

【請求項 88】

前記 DNA トランスポゾンが、前記 Sleeping Beauty トランスポゾンである、請求項 87 に記載の組換えベクター。

【請求項 89】

前記ベクターが、非ウイルスベクターである、請求項 1 ~ 88 のいずれか一項に記載の組換えベクター。

【請求項 90】

前記非ウイルスベクターが、プラスミドである、請求項 89 に記載の組換えベクター。

【請求項 91】

前記ベクターが、ウイルスベクターである、請求項 1 ~ 90 のいずれか一項に記載の組換えベクター。

【請求項 92】

前記ベクターが、ポリヌクレオチドである、請求項 1 ~ 91 のいずれか一項に記載の組換えベクター。

【請求項 93】

配列番号 152 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % 同一のアミノ酸配列をコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項 94】

請求項 1 ~ 92 のいずれか一項に記載のベクターを含む、細胞集団。

【請求項 95】

前記ベクターが、前記細胞集団のゲノムに組み込まれる、請求項 94 に記載の細胞集団。

【請求項 96】

請求項 93 に記載のポリヌクレオチドを含む、細胞集団。

【請求項 97】

前記ポリヌクレオチドが、前記細胞集団のゲノムに組み込まれる、請求項 96 に記載の細胞集団。

【請求項 98】

請求項 93 に記載のポリヌクレオチドによってコードされたアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む、細胞集団。

【請求項 99】

配列番号 72、73、74、75、76、77、78、79、80、又は 81 の前記ア

10

20

30

40

50

ミノ酸配列を含むCARと、配列番号119、120、121、122、180、又は183の前記アミノ酸配列を含む融合タンパク質と、配列番号96、97、166、又は167の前記アミノ酸配列を含むマーカータンパク質と、を含む、請求項94～98のいずれか一項に記載の細胞集団。

【請求項100】

配列番号74の前記アミノ酸配列を含むCARと、配列番号121の前記アミノ酸配列を含む融合タンパク質と、配列番号97の前記アミノ酸配列を含むマーカータンパク質と、を含む、請求項94～98のいずれか一項に記載の細胞集団。

【請求項101】

配列番号75の前記アミノ酸配列を含むCARと、配列番号122の前記アミノ酸配列を含む融合タンパク質と、配列番号97の前記アミノ酸配列を含むマーカータンパク質と、を含む、請求項94～98のいずれか一項に記載の細胞集団。

【請求項102】

前記細胞が、免疫エフェクター細胞である、請求項94～101のいずれか一項に記載の細胞集団。

【請求項103】

前記免疫エフェクター細胞が、T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、B細胞、肥満細胞、及び骨髄由来の食細胞からなる群から選択される、請求項102に記載の細胞集団。

【請求項104】

前記免疫エフェクター細胞が、T細胞である、請求項103に記載の細胞集団。

【請求項105】

アルファ／ベータT細胞、ガンマ／デルタT細胞、又はナチュラルキラーT（NK-T）細胞を含む、請求項104に記載の細胞集団。

【請求項106】

CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、又はCD4⁺T細胞及びCD8⁺T細胞の両方を含む、請求項104又は105に記載の細胞集団。

【請求項107】

前記細胞が、エクスピボである、請求項94～106のいずれか一項に記載の細胞集団。

【請求項108】

前記細胞が、ヒトである、請求項94～107のいずれか一項に記載の細胞集団。

【請求項109】

操作された細胞の集団を産生する方法であって、
a．請求項82、83、又は86～88のいずれか一項に記載の組換えベクター、及びDNAトランスポザラーゼ、又はDNAトランスポザラーゼをコードするポリヌクレオチドを細胞集団に導入することと、
b．前記トランスポザラーゼが前記多シストロン性発現カセットを前記細胞集団の前記ゲノムに組み込む条件下で前記細胞集団を培養することと、を含み、
それによって、前記操作された細胞の集団を産生する、方法。

【請求項110】

前記左ITR及び前記右ITRが、Sleeping Beautyトランスポゾン、piggyBacトランスポゾン、TcBusterトランスポゾン、及びTol2トランスポゾンからなる群から選択されるDNAトランスポゾンのITRである、請求項109に記載の方法。

【請求項111】

前記DNAトランスポゾンが、前記Sleeping Beautyトランスポゾンである、請求項109又は110に記載の方法。

【請求項112】

前記トランスポザラーゼが、Sleeping Beautyトランスポザラーゼである、

請求項 1 0 9 ～ 1 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 1 3】

前記 S l e e p i n g B e a u t y トランスポザーゼが、S B 1 1、S B 1 0 0 X、h S B 1 1 0、及び h S B 8 1 からなる群から選択される、請求項 1 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 1 4】

前記 S l e e p i n g B e a u t y トランスポザーゼが、S B 1 1 である、請求項 1 1 2 又は 1 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 1 5】

前記 S B 1 1 が、配列番号 1 6 0 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 1 1 4 に記載の方法。

10

【請求項 1 1 6】

前記 S B 1 1 が、配列番号 1 6 1 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる、請求項 1 1 4 又は 1 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 1 7】

前記 D N A トランスポザーゼをコードする前記ポリヌクレオチドが、D N A ベクター又は R N A ベクターである、請求項 1 0 9 ～ 1 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 1 8】

前記左 I T R が、配列番号 1 5 5 又は 1 5 6 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一のポリヌクレオチド配列を含み、前記右 I T R が、配列番号 1 5 7、1 5 9、又は 1 8 4 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一のポリヌクレオチド配列を含む、請求項 1 0 9 ～ 1 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 1 1 9】

前記組換えベクター、及び前記 D N A トランスポザーゼ又は前記 D N A トランスポザーゼをコードするポリヌクレオチドが、電子移動、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、粒子衝撃、マイクロインジェクション、マイクロ流体デバイスを通過することによる機械的変形、又はコロイド分散系を使用して、前記細胞集団に導入される、請求項 1 0 9 ～ 1 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 1 2 0】

前記組換えベクター、及び前記 D N A トランスポザーゼ又は前記 D N A トランスポザーゼをコードするポリヌクレオチドが、電子移動を使用して前記細胞集団に導入される、請求項 1 1 9 に記載の方法。

【請求項 1 2 1】

前記方法が、2 日未満で完了する、請求項 1 0 9 ～ 1 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2 2】

前記方法が、1 ～ 2 日で完了する、請求項 1 0 9 ～ 1 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 1 2 3】

前記方法が、2 日超で完了する、請求項 1 0 9 ～ 1 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2 4】

前記細胞集団が、前記組換えベクター、並びに前記 D N A トランスポザーゼ又は前記 D N A トランスポザーゼをコードするポリヌクレオチドの導入前に、凍結保存され、解凍される、請求項 1 0 9 ～ 1 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2 5】

前記細胞集団が、前記組換えベクター、並びに前記 D N A トランスポザーゼ又は前記 D

50

N A トランスポザーゼをコードするポリヌクレオチドの導入前に、休息される、請求項 109～124 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 126】

前記細胞集団が、ヒトエクスピボ細胞を含む、請求項 109～125 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 127】

前記細胞集団が、エクスピボで活性化されない、請求項 109～126 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 128】

前記細胞集団が、T 細胞を含む、請求項 109～127 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 129】

がんを治療することを必要とする対象においてそれを行う方法であって、前記対象に治療有効量の請求項 94～108 のいずれか一項に記載の細胞集団を投与し、それによって、前記がんを治療することを含む、方法。

【請求項 130】

がんを治療することを必要とする対象においてそれを行う方法であって、前記対象に治療有効量の請求項 109～128 のいずれか一項に記載の方法によって産生された操作された細胞集団を投与し、それによって、前記がんを治療することを含む、方法。

【請求項 131】

自己免疫疾患又は障害を治療することを必要とする対象においてそれを行う方法であって、前記対象に治療有効量の請求項 94～108 のいずれか一項に記載の細胞集団を投与し、それによって、前記自己免疫疾患又は障害を治療することを含む、方法。

【請求項 132】

自己免疫疾患又は障害を治療することを必要とする対象においてそれを行う方法であって、前記対象に治療有効量の請求項 109～128 のいずれか一項に記載の方法によって産生された操作された細胞集団を投与し、それによって、前記自己免疫疾患又は障害を治療することを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

配列表の組み込み

261,925 バイトであり (MS-Windows (登録商標) で測定された)、2022 年 1 月 7 日に作成された「P35188WO00__SL.TXT」という名称のファイルに含まれる配列表は、本明細書とともに電子的に提出され、参照によりその全体が組み込まれる。

【0002】

本開示は、少なくとも 3 つのシストロンを含む多シストロン性ベクター及びそれを使用する方法に関する。

【背景技術】

【0003】

集団の各細胞における複数の遺伝子の共発現は、養子細胞療法、例えば、キメラ抗原受容体 T 細胞 (CAR T 細胞) 療法を含む多種多様な生物医学的用途にとって重要である。多重遺伝子発現のための標準的な戦略は、導入遺伝子を複数のベクターに組み込み、各ベクターを細胞内に導入することである。しかしながら、複数のベクターの使用は、多くの場合、操作された細胞の実質的に不均一な集団を生成し、すべての細胞が、導入遺伝子の各々を発現するわけではないか、又は導入遺伝子の各々を同様の程度に発現しない。そのような不均一性は、特に、例えば、インビボでの所望の操作された細胞表現型の持続性の低下、複雑な製造及び精製要件、並びに操作された細胞産物のロット間ばらつきを含む、治療用途のためのいくつかの問題を引き起こす。

【0004】

単一の細胞において複数の遺伝子を共発現させるための複数のベクターの使用に関連する問題を考慮すると、単一の細胞において複数の導入遺伝子を発現させることができるだけでなく、細胞集団にわたって同様の程度にいくつか又はすべての導入遺伝子を発現させることができる、治療用途に最適化された操作された細胞集団をもたらす、単一の多シストロン性ベクターの必要性が満たされていない。

【発明の概要】

【0005】

本開示は、多シストロン性発現カセットを含む組換えベクターであって、抗CD19キメラ抗原受容体（CAR）をコードするポリヌクレオチドと、IL-15及びIL-15R α を含む融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドと、マーカータンパク質をコードするポリヌクレオチドと、を含み、抗CD19 CARをコードするポリヌクレオチドが、F2Aエレメントを含むポリヌクレオチド配列によって融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドから分離され、融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドが、T2Aエレメントを含むポリヌクレオチド配列によってマーカータンパク質をコードするポリヌクレオチド配列から分離される、ベクターを提供する。また、本明細書に記載のベクターを利用して操作された細胞、例えば、免疫エフェクター細胞を含む薬学的組成物、及びこれらの薬学的組成物を使用して対象を治療する方法も提供される。本明細書に開示される組換えベクターは、養子細胞療法で使用するための免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞）の修飾に特に有用である。

【0006】

したがって、一態様では、本開示は、多シストロン性発現カセットを含む組換えベクターであって、上述の多シストロン性発現カセットが、5'から3'に、CD19に特異的に結合する細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞質ドメインを含むキメラ抗原受容体（CAR）をコードする第1のポリヌクレオチド配列と、F2Aエレメントを含む第2のポリヌクレオチド配列と、IL-15、又はその機能的断片若しくは機能的バリエーション、及びIL-15R α 、又はその機能的断片若しくは機能的バリエーションを含む融合タンパク質をコードする第3のポリヌクレオチド配列と、T2Aエレメントを含む第4のポリヌクレオチド配列と、マーカータンパク質をコードする第5のポリヌクレオチド配列と、を含むポリヌクレオチドに作動可能に連結された転写調節エレメントを含む、組換えベクターを提供する。

【0007】

いくつかの実施形態では、上述のF2Aエレメントは、配列番号137のアミノ酸配列、又は1、2、若しくは3個のアミノ酸修飾を含む配列番号137のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、上述のF2Aエレメントは、配列番号141のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、上述のF2Aエレメントは、配列番号138のアミノ酸配列、又は1、2、若しくは3個のアミノ酸修飾を含む配列番号138のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、上述のF2Aエレメントは、配列番号142のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列を含む。

【0008】

いくつかの実施形態では、上述のT2Aエレメントは、配列番号139のアミノ酸配列、又は1、2、若しくは3個のアミノ酸修飾を含む配列番号139のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、上述のT2Aエレメントは、ポリヌクレオチド配列の配列番号143に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、上述のT2Aエレメントは、配列番号140若しくは182のアミノ酸配列、又は1、2、若しくは3個のアミノ酸修飾を含む配列番

号 1 4 0 若しくは 1 8 2 のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、上述の T 2 A エLEMENT は、配列番号 1 4 4、1 4 5、又は 1 6 5 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一のポリヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 0 9 】

いくつかの実施形態では、上述の抗原結合ドメインは、相補性決定領域 V H C D R 1、V H C D R 2、及び V H C D R 3 を含む重鎖可変領域 (V H) と、相補性決定領域 V L C D R 1、V L C D R 2、及び V L C D R 3 を含む軽鎖可変領域 (V L) と、を含む。いくつかの実施形態では、上述の抗原結合ドメインは、第 1 のペプチドリンカーを介して作動可能に連結された上述の V H 及び上述の V L を含む s c F v を含む。

10

【 0 0 1 0 】

いくつかの実施形態では、上述の V H は、配列番号 2 に示される V H C D R 1、V H C D R 2、及び V H C D R 3 アミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、上述の V H C D R 1 は、配列番号 6 のアミノ酸配列、又は 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含む配列番号 6 のアミノ酸配列を含み、上述の V H C D R 2 は、配列番号 7 のアミノ酸配列、又は 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含む配列番号 7 のアミノ酸配列を含み、上述の V H C D R 3 は、配列番号 8 のアミノ酸配列、又は 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含む配列番号 8 のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 1 1 】

いくつかの実施形態では、上述の V L は、配列番号 1 に示される V L C D R 1、V L C D R 2、及び V L C D R 3 アミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、上述の V L C D R 1 は、配列番号 3 のアミノ酸配列、又は 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含む配列番号 3 のアミノ酸配列を含み、上述の V L C D R 2 は、配列番号 4 のアミノ酸配列、又は 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含む配列番号 4 のアミノ酸配列を含み、上述の V L C D R 3 は、配列番号 5 のアミノ酸配列、又は 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含む配列番号 5 のアミノ酸配列を含む。

20

【 0 0 1 2 】

いくつかの実施形態では、上述の V H は、配列番号 2 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、上述の V H は、配列番号 2 0 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。

30

【 0 0 1 3 】

いくつかの実施形態では、上述の V L は、配列番号 1 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、上述の V L は、配列番号 1 9 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。

【 0 0 1 4 】

いくつかの実施形態では、上述の第 1 のペプチドリンカーは、配列番号 9 若しくは配列番号 1 7 のアミノ酸配列、又は 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含む配列番号 9 若しくは 1 7 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、上述の第 1 のペプチドリンカーは、配列番号 2 7 又は配列番号 3 5 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、上述の第 1 のペプチドリンカーは、配列番号 2 7 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。

40

【 0 0 1 5 】

いくつかの実施形態では、上述の C A R は、上述の C A R の上述の抗原結合ドメインと

50

上述の膜貫通ドメインとの間に位置するヒンジ領域を更に含む。いくつかの実施形態では、上述のヒンジ領域は、配列番号 37、38、若しくは 39 のアミノ酸配列、又は 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含む配列番号 37、38、若しくは 39 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、上述のヒンジ領域は、配列番号 40、41、又は 42 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% 同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。

【0016】

いくつかの実施形態では、上述の CAR の上述の膜貫通ドメインは、配列番号 43、44 若しくは 45 のアミノ酸配列、又は 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含む配列番号 43、44 若しくは 45 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、上述の CAR の上述の膜貫通ドメインは、配列番号 49、50、51、又は 52 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% 同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。

10

【0017】

いくつかの実施形態では、上述のヒンジ領域及び上述の膜貫通ドメインは、配列番号 46、47、若しくは 48 のアミノ酸配列、又は 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含む配列番号 46、47、若しくは 48 のアミノ酸配列を合わせて含む。いくつかの実施形態では、上述のヒンジ領域及び上述の膜貫通ドメインは、合わせて、配列番号 53、54、55、又は 56 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% 同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。

20

【0018】

いくつかの実施形態では、上述の細胞質ドメインは、ヒト CD3ζ の一次シグナル伝達ドメイン、又はその機能的断片若しくは機能的バリエーションを含む。いくつかの実施形態では、上述の細胞質ドメインは、配列番号 60 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% 同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、上述の細胞質ドメインは、配列番号 67 又は 68 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% 同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。

30

【0019】

いくつかの実施形態では、上述の細胞質ドメインは、CD28、4-1BB、OX40、CD2、CD7、CD27、CD30、CD40、CD5、ICAM-1、LFA-1、B7-H3、及びICOS からなる群から選択されるタンパク質の共刺激ドメイン、又はその機能的断片若しくはバリエーションを含む。いくつかの実施形態では、上述のタンパク質は、CD28 又は 4-1BB である。

【0020】

いくつかの実施形態では、上述のタンパク質は、CD28 である。いくつかの実施形態では、上述の細胞質ドメインは、配列番号 57 若しくは 58 のアミノ酸配列、又は 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含む配列番号 57 若しくは 58 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、上述の細胞質ドメインは、配列番号 64 又は 65 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% 同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。

40

【0021】

いくつかの実施形態では、上述のタンパク質は、4-1BB である。いくつかの実施形態では、上述の細胞質ドメインは、配列番号 59 のアミノ酸配列、又は 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含む配列番号 59 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、上述の細胞質ドメインは、配列番号 66 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% 同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。

50

【0022】

いくつかの実施形態では、上述の細胞質ドメインは、配列番号61、62若しくは63のアミノ酸配列、又は1、2、若しくは3個のアミノ酸修飾を含む配列番号61、62若しくは63のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、上述の細胞質ドメインは、配列番号69、70又は71のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。

【0023】

いくつかの実施形態では、上述のCARは、配列番号72、74、76、77、78、79、80、又は81のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、上述のCARは、配列番号82、83、86、87、90、91、92、93、94、又は95のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。

【0024】

いくつかの実施形態では、上述のIL-15、又は上述のその機能的断片若しくは機能的バリエーションは、第2のペプチドリンカーを介して、上述のIL-15R α 、又は上述のその機能的断片若しくは機能的バリエーションに作動可能に連結される。いくつかの実施形態では、上述の融合タンパク質は、配列番号119、121、又は180のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、上述の融合タンパク質は、配列番号126、127、130、131又は181のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。

【0025】

いくつかの実施形態では、上述のマーカータンパク質は、HER1のドメインIII、又はその機能的断片若しくは機能的バリエーション、HER1のドメインIVのN末端部分、及びCD28の膜貫通ドメイン、又はその機能的断片若しくは機能的バリエーションを含む。

【0026】

いくつかの実施形態では、上述のHER1のドメインIII、又はその機能的断片若しくは機能的バリエーションは、配列番号98のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、上述のHER1のドメインIII、又はその機能的断片若しくは機能的バリエーションは、配列番号110又は164のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。

【0027】

いくつかの実施形態では、上述のHER1のドメインIVのN末端部分は、配列番号99のアミノ酸1~40、1~39、1~38、1~37、1~36、1~35、1~34、1~33、1~32、1~31、1~30、1~29、1~28、1~27、1~26、1~25、1~24、1~23、1~22、1~21、1~20、1~19、1~18、1~17、1~16、1~15、1~14、1~13、1~12、1~11、又は1~10を含む。いくつかの実施形態では、上述のHER1のドメインIVのN末端部分は、配列番号99のアミノ酸1~21を含む。いくつかの実施形態では、上述のHER1のドメインIVのN末端部分は、配列番号100のアミノ酸配列、又は1、2、若しくは3個のアミノ酸修飾を含む配列番号100のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、上述のHER1のドメインIVのN末端部分は、配列番号112のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。

【0028】

いくつかの実施形態では、上述のCD28の膜貫通領域は、配列番号101のアミノ酸配列、又は1、2、若しくは3個のアミノ酸修飾を含む配列番号101のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、上述のCD28の膜貫通領域は、配列番号113のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。

【0029】

いくつかの実施形態では、上述のマーカータンパク質は、配列番号96、97、166、又は167のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、上述のマーカータンパク質は、配列番号107、108、109、162、173又は174のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。

10

【0030】

いくつかの実施形態では、上述の調節エレメントは、プロモーターを含む。いくつかの実施形態では、上述のプロモーターは、ヒト伸長因子1-アルファ（hEF-1 α ）ハイブリッドプロモーターである。いくつかの実施形態では、上述のプロモーターは、配列番号146のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列を含む。

20

【0031】

いくつかの実施形態では、上述のベクターは、上述の第5のポリヌクレオチド配列のポリA配列3'を更に含む。いくつかの実施形態では、上述のポリA配列は、配列番号148のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列を含む。

【0032】

別の態様では、本開示は、多シストロン性発現カセットを含む組換えベクターであって、上述の多シストロン性発現カセットが、5'から3'に、配列番号72又は74のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列を含むCARをコードする第1のポリヌクレオチド配列と、F2Aエレメントを含む第2のポリヌクレオチド配列と、配列番号119、121、又は180のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列を含む融合タンパク質をコードする第3のポリヌクレオチド配列と、T2Aエレメントを含む第4のポリヌクレオチド配列と、配列番号96又は97のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列を含むマーカータンパク質をコードする第5のポリヌクレオチド配列と、を含むポリヌクレオチドに作動可能に連結された転写調節エレメントを含む、組換えベクターを提供する。

40

【0033】

いくつかの実施形態では、上述のF2Aエレメントは、配列番号137のアミノ酸配列、又は1、2、若しくは3個のアミノ酸修飾を含む配列番号137のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、上述のF2Aエレメントは、配列番号141のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、上述のF2Aエレメントは、配列番号138のアミノ酸配列、又は1、2、若しくは3個のアミノ酸修飾を含む配列番号138のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、上述のF2Aエレメントは、配列番号142のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、

50

80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列を含む。

【0034】

いくつかの実施形態では、上述のT2Aエレメントは、配列番号139のアミノ酸配列、又は1、2、若しくは3個のアミノ酸修飾を含む配列番号139のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、上述のT2Aエレメントは、ポリヌクレオチド配列の配列番号143に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、上述のT2Aエレメントは、配列番号140若しくは182のアミノ酸配列、又は1、2、若しくは3個のアミノ酸修飾を含む配列番号140若しくは182のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、上述のT2Aエレメントは、配列番号144、145、又は165のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列を含む。

10

【0035】

別の態様では、本開示は、多シストロン性発現カセットを含む組換えベクターであって、上述の多シストロン性発現カセットが、5'から3'に、配列番号82、83、86、又は87のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一の第1のポリヌクレオチド配列と、F2Aエレメントを含む第2のポリヌクレオチド配列と、配列番号126、127、130、131、又は181のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一の第3のポリヌクレオチド配列と、T2Aエレメントを含む第4のポリヌクレオチド配列と、配列番号107、108、109、又は162のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一の第5のポリヌクレオチド配列と、を含むポリヌクレオチドに作動可能に連結された転写調節エレメントを含む、組換えベクターを提供する。

20

【0036】

いくつかの実施形態では、上述のF2Aエレメントは、配列番号137のアミノ酸配列、又は1、2、若しくは3個のアミノ酸修飾を含む配列番号137のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、上述のF2Aエレメントは、配列番号141のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、上述のF2Aエレメントは、配列番号138のアミノ酸配列、又は1、2、若しくは3個のアミノ酸修飾を含む配列番号138のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、上述のF2Aエレメントは、配列番号142のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列を含む。

30

【0037】

いくつかの実施形態では、上述のT2Aエレメントは、配列番号139のアミノ酸配列、又は1、2、若しくは3個のアミノ酸修飾を含む配列番号139のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、上述のT2Aエレメントは、ポリヌクレオチド配列の配列番号143に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、上述のT2Aエレメントは、配列番号140若しくは182のアミノ酸配列、又は1、2、若しくは3個のアミノ酸修飾を含む配列番号140若しくは182のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、上述のT2Aエレメントは、配列番号144、145、又は165のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、

40

50

96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列を含む。

【0038】

本明細書に記載の組換えベクターのいくつかの実施形態では、ベクターは、左逆方向末端反復（ITR）と右ITRとを更に含み、上述の左ITR及び上述の右ITRは、上述の多シストロン性発現カセットに隣接する。いくつかの実施形態では、組換えベクターは、5'から3'に、上述の左ITRと、上述の転写調節エレメントと、上述の第1のポリヌクレオチド配列と、上述の第2のポリヌクレオチド配列と、上述の第3のポリヌクレオチド配列と、上述の第4のポリヌクレオチド配列と、上述の第5のポリヌクレオチド配列と、上述の右ITRと、を含む。

【0039】

別の態様では、本開示は、多シストロン性発現カセットを含む組換えベクターであって、上述の多シストロン性発現カセットが、配列番号149のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列に作動可能に連結された転写調節エレメントを含む、組換えベクターを提供する。別の態様では、本開示は、多シストロン性発現カセットを含む組換えベクターであって、上述の多シストロン性発現カセットが、配列番号152のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結された転写調節エレメントを含む、組換えベクターを提供する。

【0040】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組換えベクターのいずれかは、左逆方向末端反復（ITR）と右ITRとを更に含み、上述の左ITR及び上述の右ITRは、上述の多シストロン性発現カセットに隣接する。いくつかの実施形態では、上述の左ITR及び上述の右ITRは、Sleeping Beautyトランスポゾン、piggyBacトランスポゾン、TcBusterトランスポゾン、及びTol2トランスポゾンからなる群から選択されるDNAトランスポゾンのITRである。いくつかの実施形態では、上述のDNAトランスポゾンは、上述のSleeping Beautyトランスポゾンである。

【0041】

本明細書に記載の組換えベクターのいくつかの実施形態では、上述のベクターは、非ウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、上述の非ウイルスベクターは、プラスミドである。本明細書に記載の組換えベクターのいくつかの実施形態では、上述のベクターは、ウイルスベクターである。本明細書に記載の組換えベクターのいくつかの実施形態では、上述のベクターは、ポリヌクレオチドである。

【0042】

別の態様では、本開示は、配列番号152のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列をコードする、ポリヌクレオチドを提供する。

【0043】

別の態様では、本開示は、本明細書に記載のベクターを含む、細胞集団を提供する。いくつかの実施形態では、上述のベクターは、上述の細胞集団のゲノムに組み込まれる。

【0044】

別の態様では、本開示は、配列番号152のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを含む、細胞集団を提供する。いくつかの実施形態では、上述のポリヌクレオチドは、上述の細胞集団のゲノムに組み込まれる。

【0045】

別の態様では、本開示は、配列番号152のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされたアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む、細胞集団を提

10

20

30

40

50

供する。

【0046】

本明細書に記載の細胞集団のいくつかの実施形態では、細胞は、配列番号72、73、74、75、76、77、78、79、80、又は81のアミノ酸配列を含むCARと、配列番号119、120、121、122、180、又は183のアミノ酸配列を含む融合タンパク質と、配列番号96、97、166、又は167のアミノ酸配列を含むマーカータンパク質と、を含む。本明細書に記載の細胞集団のいくつかの実施形態では、細胞は、配列番号74のアミノ酸配列を含むCARと、配列番号121のアミノ酸配列を含む融合タンパク質と、配列番号97のアミノ酸配列を含むマーカータンパク質と、を含む。本明細書に記載の細胞集団のいくつかの実施形態では、細胞は、配列番号75のアミノ酸配列を含むCARと、配列番号122のアミノ酸配列を含む融合タンパク質と、配列番号97のアミノ酸配列を含むマーカータンパク質と、を含む。

10

【0047】

本明細書に記載の細胞集団のいくつかの実施形態では、細胞は、免疫エフェクター細胞である。いくつかの実施形態では、上述の免疫エフェクター細胞は、T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、B細胞、肥満細胞、及び骨髄由来の食細胞からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、上述の免疫エフェクター細胞は、T細胞である。いくつかの実施形態では、T細胞集団は、アルファ／ベータT細胞、ガンマ／デルタT細胞、又はナチュラルキラーT（NK-T）細胞を含む。いくつかの実施形態では、T細胞集団は、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、又はCD4⁺T細胞及びCD8⁺T細胞の両方を含む。

20

【0048】

本明細書に記載の細胞集団のいくつかの実施形態では、細胞は、エキスピボである。本明細書に記載の細胞集団のいくつかの実施形態では、細胞は、ヒトである。

【0049】

別の態様では、本開示は、操作された細胞の集団を産生する方法であって、左ITR及び右ITRを含む組換えベクターを細胞集団に導入することであって、上述の左ITR及び上述の右ITRが、上述の多シストロン性発現カセットに隣接する、導入することと、上述のトランスポザーゼが、多シストロン性発現カセットを上述の細胞集団のゲノムに組み込む条件下で上述の細胞集団を培養することと、を含み、それによって、操作された細胞の集団を産生する、方法を提供する。いくつかの実施形態では、組換えベクターは、5'から3'に、上述の左ITRと、上述の転写調節エレメントと、上述の第1のポリヌクレオチド配列と、上述の第2のポリヌクレオチド配列と、上述の第3のポリヌクレオチド配列と、上述の第4のポリヌクレオチド配列と、上述の第5のポリヌクレオチド配列と、上述の右ITRと、を含む。

30

【0050】

いくつかの実施形態では、上述の左ITR及び上述の右ITRは、Sleeping Beautyトランスポゾン、piggyBacトランスポゾン、TcBusterトランスポゾン、及びTo12トランスポゾンからなる群から選択されるDNAトランスポゾンのITRである。いくつかの実施形態では、上述のDNAトランスポゾンは、上述のSleeping Beautyトランスポゾンである。いくつかの実施形態では、上述のトランスポザーゼは、Sleeping Beautyトランスポザーゼである。いくつかの実施形態では、上述のSleeping Beautyトランスポザーゼは、SB11、SB100X、hSB110、及びhSB81からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、上述のSleeping Beautyトランスポザーゼは、SB11である。いくつかの実施形態では、上述のSB11は、配列番号160のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、上述のSB11は、配列番号161のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコ

40

50

ードされる。いくつかの実施形態では、上述のDNAトランスポザーゼをコードする上述のポリヌクレオチドは、DNAベクター又はRNAベクターである。

【0051】

いくつかの実施形態では、上述の左ITRは、配列番号155又は156のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列を含み、上述の右ITRは、配列番号157、159、又は184のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列を含む。

【0052】

いくつかの実施形態では、上述の組換えベクター、及び上述のDNAトランスポザーゼ又は上述のDNAトランスポザーゼをコードするポリヌクレオチドは、電子移動、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、粒子衝撃、マイクロインジェクション、マイクロ流体デバイスを通することによる機械的変形、又はコロイド分散系を使用して、上述の細胞集団に導入される。いくつかの実施形態では、上述の組換えベクター、及び上述のDNAトランスポザーゼ又は上述のDNAトランスポザーゼをコードするポリヌクレオチドは、電子移動を使用して上述の細胞集団に導入される。いくつかの実施形態では、上述の方法は、2日未満で完了する。いくつかの実施形態では、上述の方法は、1～2日で完了する。いくつかの実施形態では、上述の方法は、2日超で完了する。

【0053】

いくつかの実施形態では、上述の細胞集団は、上述の組換えベクター、並びに上述のDNAトランスポザーゼ又は上述のDNAトランスポザーゼをコードするポリヌクレオチドの導入前に、凍結保存され、解凍される。いくつかの実施形態では、上述の細胞集団は、上述の組換えベクター、並びに上述のDNAトランスポザーゼ又は上述のDNAトランスポザーゼをコードするポリヌクレオチドの導入前に、休息される。いくつかの実施形態では、上述の細胞集団は、ヒトエクスピボ細胞を含む。いくつかの実施形態では、上述の細胞集団は、エクスピボで活性化されない。いくつかの実施形態では、上述の細胞集団は、T細胞を含む。

【0054】

別の態様では、本開示は、がんを治療することを必要とする対象においてそれを行う方法であって、対象に治療有効量の本明細書に記載の細胞集団を投与し、それによって、がんを治療することを含む、方法を提供する。

【0055】

別の態様では、本開示は、がんを治療することを必要とする対象においてそれを行う方法であって、対象に治療有効量の本明細書に記載の操作された細胞集団を産生する方法によって産生された操作された細胞集団を投与し、それによって、がんを治療することを含む、方法を提供する。

【0056】

別の態様では、本開示は、自己免疫疾患又は障害を治療することを必要とする対象においてそれを行う方法であって、対象に治療有効量の本明細書に記載の細胞集団を投与し、それによって、自己免疫疾患又は障害を治療することを含む、方法を提供する。

【0057】

別の態様では、本開示は、自己免疫疾患又は障害を治療することを必要とする対象においてそれを行う方法であって、対象に治療有効量の本明細書に記載の操作された細胞集団を産生する方法によって産生された操作された細胞集団を投与し、それによって、自己免疫疾患又は障害を治療することを含む、方法を提供する。

【0058】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリヌクレオチド配列（例えば、表1～7、10、11、及び13に記載されるポリヌクレオチド配列）のいずれかに、介在ポリヌクレオチド配列の有無にかかわらず、3'末端に終止コドン（例えば、TAA、TAG、

10

20

30

40

50

又はTGA)が続いてもよい。

【図面の簡単な説明】

【0059】

【図1】図1AはN末端からC末端まで、N末端シグナル配列、抗ヒトCD19 VL、ペプチドリンカー、抗ヒトCD19 VH、ヒトCD8 α ヒンジドメイン、ヒトCD8 α 膜貫通(TM)ドメイン、ヒトCD28細胞質ドメイン、及びヒトCD3 ζ 細胞質ドメインを組み込んだ、CD19特異的CAR CD19CARの概略図である。図1BはN末端からC末端まで、N末端シグナル配列、ヒトIL-15、リンカーペプチド、及びヒトIL-15R α を組み込んだ、膜結合IL-15/IL-15R α 融合タンパク質mbIL15の概略図である。図1CはN末端からC末端まで、N末端シグナル配列、ヒトHER1のドメインIII、ヒトHER1の先端切断ドメインIV、ペプチドリンカー、及びヒトCD28 TMドメインを組み込んだ、マーカータンパク質HER1tの概略図である。

10

【図2】CD19CAR、mbIL15、及びHER1tを発現するCAR-T細胞を生成するためのSB11トランスポゾン/トランスポザーゼ系を使用した二重トランスポジクション(dTp)及び単一トランスポジクション(sTp)アプローチを示す概略図である。

【図3-1】図3A~3Eはプラスミドなし(陰性対照)、プラスミドDP1及びDP2の1:1の組み合わせ(dTp対照)、又はプラスミドA~Fを用いた3つの別個のドナー由来のT細胞濃縮凍結保存細胞産物のエレクトロポレーション後1日目の細胞生存率(図3A)、CD3頻度(図3B)、CD19CAR発現(図3C)、mbIL15発現(図3D)、及びHER1t発現(図3E)を示すグラフである。

20

【図3-2】図3A~3Eはプラスミドなし(陰性対照)、プラスミドDP1及びDP2の1:1の組み合わせ(dTp対照)、又はプラスミドA~Fを用いた3つの別個のドナー由来のT細胞濃縮凍結保存細胞産物のエレクトロポレーション後1日目の細胞生存率(図3A)、CD3頻度(図3B)、CD19CAR発現(図3C)、mbIL15発現(図3D)、及びHER1t発現(図3E)を示すグラフである。

【図4】図4A~4FはドナーA由来のdTp対照修飾T細胞について、1日目、並びにAaPC刺激サイクル(「Stims」)1、2、3、及び4の終了時に評価される導入遺伝子の共発現を示す、一連の2パラメータフロープロットである。細胞のパーセントを、各象限に示す。具体的には、図4Aは、CD3発現に対する、CD19CAR発現を示す一連のフロープロットである。図4Bは、CD3発現に対する、HER1t発現を示す一連のフロープロットである。図4Cは、CD3発現に対する、mbIL15発現を示す一連のフロープロットである。図4Dは、HER1t発現に対する、CD19CAR発現を示す一連のフロープロットである。図4Eは、mbIL15発現に対する、CD19CAR発現を示す一連のフロープロットである。図4Fは、mbIL15発現に対する、HER1t発現を示す一連のフロープロットである。図4D~4Fのフロープロットは、CD3⁺ゲートされた細胞上の導入遺伝子発現を示す。

30

【図5】図5A~5FはドナーA由来のプラスミドA修飾T細胞について、1日目、並びにStim1、2、3、及び4の終了時に評価される導入遺伝子の共発現を示す、一連の2パラメータフロープロットである。細胞のパーセントを、各象限に示す。具体的には、図5Aは、CD3発現に対する、CD19CAR発現を示す一連のフロープロットである。図5Bは、CD3発現に対する、HER1t発現を示す一連のフロープロットである。図5Cは、CD3発現に対する、mbIL15発現を示す一連のフロープロットである。図5Dは、HER1t発現に対する、CD19CAR発現を示す一連のフロープロットである。図5Eは、mbIL15発現に対する、CD19CAR発現を示す一連のフロープロットである。図5Fは、mbIL15発現に対する、HER1t発現を示す一連のフロープロットである。図5D~5Fのフロープロットは、CD3⁺ゲートされた細胞上の導入遺伝子発現を示す。

40

【図6】図6A~6FはドナーA由来のプラスミドB修飾T細胞について、1日目、並び

50

に S t i m 1、2、3、及び 4 の終了時に評価される導入遺伝子の共発現を示す、一連の 2 パラメータフロープロットである。細胞のパーセントを、各象限に示す。具体的には、図 6 A は、C D 3 発現に対する、C D 1 9 C A R 発現を示す一連のフロープロットである。図 6 B は、C D 3 発現に対する、H E R 1 t 発現を示す一連のフロープロットである。図 6 C は、C D 3 発現に対する、m b I L 1 5 発現を示す一連のフロープロットである。図 6 D は、H E R 1 t 発現に対する、C D 1 9 C A R 発現を示す一連のフロープロットである。図 6 E は、m b I L 1 5 発現に対する、C D 1 9 C A R 発現を示す一連のフロープロットである。図 6 F は、m b I L 1 5 発現に対する、H E R 1 t 発現を示す一連のフロープロットである。図 6 D ~ 6 F のフロープロットは、C D 3 + ゲートされた細胞上の導入遺伝子発現を示す。

10

【図 7】図 7 A ~ 7 F はドナー A 由来のプラスミド C 修飾 T 細胞について、1 日目、並びに S t i m 1、2、3、及び 4 の終了時に評価される導入遺伝子の共発現を示す、一連の 2 パラメータフロープロットである。細胞のパーセントを、各象限に示す。具体的には、図 7 A は、C D 3 発現に対する、C D 1 9 C A R 発現を示す一連のフロープロットである。図 7 B は、C D 3 発現に対する、H E R 1 t 発現を示す一連のフロープロットである。図 7 C は、C D 3 発現に対する、m b I L 1 5 発現を示す一連のフロープロットである。図 7 D は、H E R 1 t 発現に対する、C D 1 9 C A R 発現を示す一連のフロープロットである。図 7 E は、m b I L 1 5 発現に対する、C D 1 9 C A R 発現を示す一連のフロープロットである。図 7 F は、m b I L 1 5 発現に対する、H E R 1 t 発現を示す一連のフロープロットである。図 7 D ~ 7 F のフロープロットは、C D 3 + ゲートされた細胞上の導入遺伝子発現を示す。

20

【図 8】図 8 A ~ 8 F はドナー A 由来のプラスミド D 修飾 T 細胞について、1 日目、並びに S t i m 1、2、3、及び 4 の終了時に評価される導入遺伝子の共発現を示す、一連の 2 パラメータフロープロットである。細胞のパーセントを、各象限に示す。具体的には、図 8 A は、C D 3 発現に対する、C D 1 9 C A R 発現を示す一連のフロープロットである。図 8 B は、C D 3 発現に対する、H E R 1 t 発現を示す一連のフロープロットである。図 8 C は、C D 3 発現に対する、m b I L 1 5 発現を示す一連のフロープロットである。図 8 D は、H E R 1 t 発現に対する、C D 1 9 C A R 発現を示す一連のフロープロットである。図 8 E は、m b I L 1 5 発現に対する、C D 1 9 C A R 発現を示す一連のフロープロットである。図 8 F は、m b I L 1 5 発現に対する、H E R 1 t 発現を示す一連のフロープロットである。図 8 D ~ 8 F のフロープロットは、C D 3 + ゲートされた細胞上の導入遺伝子発現を示す。

30

【図 9】図 9 A ~ 9 F はドナー A 由来のプラスミド E 修飾 T 細胞について、1 日目、並びに S t i m 1、2、3、及び 4 の終了時に評価される導入遺伝子の共発現を示す、一連の 2 パラメータフロープロットである。細胞のパーセントを、各象限に示す。具体的には、図 9 A は、C D 3 発現に対する、C D 1 9 C A R 発現を示す一連のフロープロットである。図 9 B は、C D 3 発現に対する、H E R 1 t 発現を示す一連のフロープロットである。図 9 C は、C D 3 発現に対する、m b I L 1 5 発現を示す一連のフロープロットである。図 9 D は、H E R 1 t 発現に対する、C D 1 9 C A R 発現を示す一連のフロープロットである。図 9 E は、m b I L 1 5 発現に対する、C D 1 9 C A R 発現を示す一連のフロープロットである。図 9 F は、m b I L 1 5 発現に対する、H E R 1 t 発現を示す一連のフロープロットである。図 9 D ~ 9 F のフロープロットは、C D 3 + ゲートされた細胞上の導入遺伝子発現を示す。

40

【図 10】図 10 A ~ 10 F はドナー A 由来のプラスミド F 修飾 T 細胞について、1 日目、並びに S t i m 1、2、3、及び 4 の終了時に評価される導入遺伝子の共発現を示す、一連の 2 パラメータフロープロットである。細胞のパーセントを、各象限に示す。具体的には、図 10 A は、C D 3 発現に対する、C D 1 9 C A R 発現を示す一連のフロープロットである。図 10 B は、C D 3 発現に対する、H E R 1 t 発現を示す一連のフロープロットである。図 10 C は、C D 3 発現に対する、m b I L 1 5 発現を示す一連のフロープロットである。図 10 D は、H E R 1 t 発現に対する、C D 1 9 C A R 発現を示す一連のフ

50

ロープロットである。図10Eは、mbIL15発現に対する、CD19CAR発現を示す一連のフロープロットである。図10Fは、mbIL15発現に対する、HER1t発現を示す一連のフロープロットである。図10D～10Fのフロープロットは、CD3⁺ゲートされた細胞上の導入遺伝子発現を示す。

【図11-1】図11A～11CはdTp対照又はプラスミドA～FでトランスフェクトされたドナーA由来のCD3濃縮T細胞について、1日目、並びにStim1、2、3、及び4の終了時に評価される導入遺伝子発現を示す棒グラフである。棒グラフは、CD19CAR（図11A）、mbIL15（図11B）、及びHER1t（図11C）の発現（CD3⁺ゲートされた）を示す。

【図11-2】図11A～11CはdTp対照又はプラスミドA～FでトランスフェクトされたドナーA由来のCD3濃縮T細胞について、1日目、並びにStim1、2、3、及び4の終了時に評価される導入遺伝子発現を示す棒グラフである。棒グラフは、CD19CAR（図11A）、mbIL15（図11B）、及びHER1t（図11C）の発現（CD3⁺ゲートされた）を示す。

【図12-1】図12A～12Cはエキスピボ拡張されたCD19CAR-mbIL15-CAR-T細胞由来の細胞溶解物におけるCD19CAR（図12A）、mbIL15（図12B）、及びHER1t（図12C）の発現を確認するウェスタンブロットの画像である。（Zとラベル付けされる試料において）追加のドナーが示された場合を除き、1つの正常ドナー由来の細胞が示される。

【図12-2】図12A～12Cはエキスピボ拡張されたCD19CAR-mbIL15-CAR-T細胞由来の細胞溶解物におけるCD19CAR（図12A）、mbIL15（図12B）、及びHER1t（図12C）の発現を確認するウェスタンブロットの画像である。（Zとラベル付けされる試料において）追加のドナーが示された場合を除き、1つの正常ドナー由来の細胞が示される。

【図13】図13A～13CはdTp対照又はプラスミドA～Fでトランスフェクトされ、エキスピボ拡張されたドナーA由来のT細胞濃縮出発産物について、1日目、並びにStim1、2、3、及び4の終了時に評価される、推定細胞数を示すグラフである。CD3ゲートされたCD19CAR⁺（図13A）、mbIL15⁺（図13B）、及びHER1t⁺（図13C）についての推定細胞数を経時的にプロットした。

【図14-1】図14A～14Hは放射線標識された（⁵¹Cr）標的細胞の溶解を測定することによって、異なるエフェクター対標的（E:T）比率でCD19⁺（Dauidβ2M、NALM-6、及びCD19EL-4）、並びにCD19陰性（親EL-4）標的細胞に対するクロム放出アッセイによって決定されるような、トランスフェクトされていない（陰性対照）（図14A）、又はdTp対照（図14B）、プラスミドA（図14C）、プラスミドB（図14D）、プラスミドC（図14E）、プラスミドD（図14F）、プラスミドE（図14G）、及びプラスミドF（図14H）でトランスフェクトされているかのいずれかのエキスピボで拡張されたCD19特異的T細胞の細胞傷害性を示すグラフである。いくつかのE:Tの三重ウェルの平均±標準偏差（SD）溶解パーセントは、ドナーAに由来する細胞について示される。エラーバーは、SDを表し、記号によって隠されている場合がある。

【図14-2】図14A～14Hは放射線標識された（⁵¹Cr）標的細胞の溶解を測定することによって、異なるエフェクター対標的（E:T）比率でCD19⁺（Dauidβ2M、NALM-6、及びCD19EL-4）、並びにCD19陰性（親EL-4）標的細胞に対するクロム放出アッセイによって決定されるような、トランスフェクトされていない（陰性対照）（図14A）、又はdTp対照（図14B）、プラスミドA（図14C）、プラスミドB（図14D）、プラスミドC（図14E）、プラスミドD（図14F）、プラスミドE（図14G）、及びプラスミドF（図14H）でトランスフェクトされているかのいずれかのエキスピボで拡張されたCD19特異的T細胞の細胞傷害性を示すグラフである。いくつかのE:Tの三重ウェルの平均±標準偏差（SD）溶解パーセントは、ドナーAに由来する細胞について示される。エラーバーは、SDを表し、記号によ

10

20

30

40

50

って隠されている場合がある。

【図15】エキスピボで拡張されたCD19CAR-mbIL15-HER1t T細胞の抗体依存性細胞傷害性(ADCC)を示すグラフである。遺伝子修飾されたT細胞は、Fc受容体発現NK細胞をエフェクターとして使用して、セツキシマブ(EGFR特異的抗体)又はリツキシマブ(CD20特異的抗体、陰性対照)の存在下で、クロム放出アッセイの標的として機能した。モックトランスフェクトされた(DNAなし)T細胞を陰性対照として使用した。40:1のE:T比でのドナーAのデータを示す。棒グラフは、最大NK細胞溶解パーセントに対して正規化された遺伝子修飾T細胞の平均溶解値を意味する。

【図16】二重トランスポゾン対照又は試験プラスミド(それぞれ、dTp対照又はプラスミドA~F)、モックトランスフェクトされたCD3(DNAなしの陰性対照)でトランスフェクトされたドナーA由来のエキスピボで拡張されたCD19CAR-mbIL15-HER1t T細胞、CD19CAR⁺Jurkat細胞(CD19CARについての陽性対照)、mbIL15⁺Jurkat細胞(mbIL15についての陽性対象)、又はCD19CAR⁺HER1t⁺T細胞(HER1tについての陽性対照)の導入遺伝子コピー数を示すグラフである。コピー数を、ddPCRを使用して、各試料について五重で評価し、ヒト参照遺伝子EIF2C1に対して正規化した。

【図17】図17A~17Cは放射線照射されたクローン9 AaPC上での共培養によってエキスピボで拡張されたdTp対照(図17A)、プラスミドA(図17B)、及びプラスミドD(図17C)でエレクトロポレーションされたT細胞濃縮産物について、1日目、並びにStim1、2、3、及び4の終了時に評価される推定細胞数を示すグラフである。全細胞、CD3⁺、CD3⁺ゲートされたCD19CAR⁺、及びCD3⁺ゲートされたHER1t⁺の経時的な拡張をプロットし、複数の実験からプールされた複数のドナー試料の平均±SDとして示す。エラーバーは、SDを表し、記号によって隠されている場合がある。

【図18-1】図18A~18Cは放射線照射されたクローン9 AaPC上での共培養によってエキスピボで拡張されたdTp対照(図18A)、プラスミドA(図18B)、及びプラスミドD(図18C)でエレクトロポレーションされたT細胞濃縮産物について、エレクトロポレーション後18時間(1日目)及びStims4の時点でプロットされた導入遺伝子垂集団不均一性(CD19CAR⁺HER1t^{陰性}、CD19CAR⁺HER1t⁺、CD19CAR^{陰性}HER1t⁺、CD19CAR^{陰性}HER1t^{陰性})パーセントを示す棒グラフである。データは、複数の実験からプールされた複数のドナー試料の平均±SDとして示される。

【図18-2】図18A~18Cは放射線照射されたクローン9 AaPC上での共培養によってエキスピボで拡張されたdTp対照(図18A)、プラスミドA(図18B)、及びプラスミドD(図18C)でエレクトロポレーションされたT細胞濃縮産物について、エレクトロポレーション後18時間(1日目)及びStims4の時点でプロットされた導入遺伝子垂集団不均一性(CD19CAR⁺HER1t^{陰性}、CD19CAR⁺HER1t⁺、CD19CAR^{陰性}HER1t⁺、CD19CAR^{陰性}HER1t^{陰性})パーセントを示す棒グラフである。データは、複数の実験からプールされた複数のドナー試料の平均±SDとして示される。

【図19】図19A~19Cは放射線標識された(⁵¹Cr)標的細胞の溶解を測定することによって、異なるエフェクター対標的(E:T)比率でCD19⁺(Dauidi β2M、NALM-6、及びCD19 EL-4)、並びにCD19^{陰性}(親EL-4)標的細胞に対するクロム放出アッセイによって決定されるような、dTp対照(図19A)、プラスミドA(図19B)、又はプラスミドD(図19C)でトランスフェクトされたエキスピボで拡張されたCD19特異的T細胞の細胞傷害性を示すグラフである。平均±SD溶解パーセントを、複数の実験からプールされた複数のドナーについて示す。エラーバーは、SDを表し、記号によって隠されている場合がある。

【図20】エキスピボで拡張されたCD19CAR-mbIL15-HER1t T細胞

の抗体依存性細胞傷害性 (ADCC) を示すグラフである。遺伝子修飾された T 細胞は、Fc 受容体発現 NK 細胞をエフェクターとして使用して、セツキシマブ (EGFR 特異的抗体) 又はリツキシマブ (CD20 特異的抗体、陰性対照) の存在下で、クロム放出アッセイの標的として機能した。40:1 の E:T 比での平均±SD 溶解パーセントを、複数の実験からプールされた複数のドナーについて示す。棒グラフは、最大 NK 細胞溶解パーセントに対して正規化された遺伝子修飾 T 細胞の平均溶解値を意味する。

【図 21】 dTp Control、プラスミド A、又はプラスミド D、又はトランスフェクトされた CD3 (DNA なしの陰性対照) でトランスフェクトされたエキスピボで拡張された CD19CAR-mbIL15-HER1t T 細胞の導入遺伝子コピー数を示すグラフである。コピー数を、ddPCR を使用して、各試料について三重で評価し、ヒト参照遺伝子 EIF2C1 に対して正規化した。データは、細胞当たりの平均±SD 導入遺伝子コピーとして示され、複数の実験からプールされた複数のドナー試料を表す。

【図 22】 図 22A~22C は実施例 4 で定義されるように、モック PBMC、dTp 対照 (P、5e6)、プラスミド A (P、5e6)、及びプラスミド A (T、1e6) / プラスミド A (T、0.5e6) について評価されるような、導入遺伝子共発現を示す一連の 2 パラメータフロープロットである。細胞のパーセントを、各象限に示す。具体的には、図 22A は、CD3 発現に対する、CD19CAR 発現を示す一連のフロープロットである。図 22B は、HER1t 発現に対する、CD19CAR 発現を示す一連のフロープロットである。図 22C は、mbIL15 発現に対する、HER1t 発現を示す一連のフロープロットである。ゲーティング戦略：リンパ球>シングレット>生存可能>CD3⁺ 事象。

【図 23】 図 23A~23C はモック PBMC、dTp 対照 (P、5e6)、及びプラスミド A (P、5e6) のエキスピボ拡張から得られた細胞について評価されるような、導入遺伝子共発現を示す一連の 2 パラメータフロープロットである。細胞のパーセントを、各象限に示す。具体的には、図 23A は、CD3 発現に対する、CD19CAR 発現を示す一連のフロープロットである。図 23B は、HER1t 発現に対する、CD19CAR 発現を示す一連のフロープロットである。図 23C は、mbIL15 発現に対する、HER1t 発現を示す一連のフロープロットである。ゲーティング戦略：リンパ球>シングレット>生存可能>CD3⁺ 事象。

【図 24-1】 図 24A~24G はホタルルシフェラーゼ (fLUC) を発現する 1.5×10^4 個の CD19⁺NALM-6 白血病細胞を静脈内注射し、その後に、治療しないままである (腫瘍のみ、図 24A) か、又はモック PBMC (図 24B)、モック CD3 (図 24C)、dTp 対照 (P、5e6) (図 24D)、プラスミド A (P、5e6) (図 24E)、プラスミド A (T、1e6) (図 24F)、若しくはプラスミド A (T、0.5e6) (図 24G) RPM T 細胞で 7 日目に治療されたかのいずれかである NOD.Cg-Prkdc^{scid}IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) マウスについての経時的な腫瘍フラックスを示すグラフである。経時的な腫瘍フラックスは、各治療群について提示され、各々の線は、個々の動物を表す。点線は、無病マウスを決定するための「2×バックグラウンド」閾値を表す。

【図 24-2】 図 24A~24G はホタルルシフェラーゼ (fLUC) を発現する 1.5×10^4 個の CD19⁺NALM-6 白血病細胞を静脈内注射し、その後に、治療しないままである (腫瘍のみ、図 24A) か、又はモック PBMC (図 24B)、モック CD3 (図 24C)、dTp 対照 (P、5e6) (図 24D)、プラスミド A (P、5e6) (図 24E)、プラスミド A (T、1e6) (図 24F)、若しくはプラスミド A (T、0.5e6) (図 24G) RPM T 細胞で 7 日目に治療されたかのいずれかである NOD.Cg-Prkdc^{scid}IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) マウスについての経時的な腫瘍フラックスを示すグラフである。経時的な腫瘍フラックスは、各治療群について提示され、各々の線は、個々の動物を表す。点線は、無病マウスを決定するための「2×バックグラウンド」閾値を表す。

【図 25】 死亡又は安楽死の前の最終 BLI での個々のマウスの腫瘍フラックスを示す散

布図である。バーは、幾何平均及びSDを表し、有意性を、一元配置ANOVA（ダネット事後検定）によって決定した。エラーバーは、SDを表し、記号によって隠されている場合がある。

【図26】図26A～26Cは各マウス治療群についての全生存率（OS）を示す Kaplan-Meier 生存曲線である。具体的には、図26Aは、腫瘍のみの治療群（群A）の生存曲線である。図26Bは、モックPBMC（群B）、dTp対照（群D）、及びプラスミドA（P、5e6）（群E）の治療群の生存曲線である。図26Cは、モックCD3（群C）、プラスミドA（T、1e6）（群F）、及びプラスミドA（T、0.5e6）（群G）治療群の生存曲線である。

【図27】図27A～27Cは各マウス治療群についての無xGvHD生存率を示す Kaplan-Meier 生存曲線である。無xGvHD生存率分析は、死亡率がxGvHDに起因する可能性が高い、低い腫瘍負荷（すなわち、総フラックス $<1 \times 10^8$ p/s）で死亡したマウスを打ち切るものであった。具体的には、図27Aは、腫瘍のみの治療群（群A）の生存曲線である。図27Bは、モックPBMC（群B）、dTp対照（群D）、及びプラスミドA（P、5e6）（群E）の治療群の生存曲線である。図27Cは、モックCD3（群C）、プラスミドA（T、1e6）（群F）、及びプラスミドA（T、0.5e6）（群G）治療群の生存曲線である。

【図28】図28A～28Cは腫瘍のみ（群A）、モックPBMC（群B）、モックCD3（群C）、dTp対照（群D）、プラスミドA（P、5e6）（群E）、プラスミドA（T、1e6）（群F）、及びプラスミドA（T、0.5e6）（群G）治療群の各々について、末梢血（PB）（図28A）、骨髄（BM）（図28B）、及び脾臓（図28C）における生存可能CD45⁺細胞に対するパーセントとしてのCD3⁺頻度を示す棒グラフである。細胞を、抗CD45及び抗CD3を含む抗体で共染色し、続いてフローサイトメトリー分析を行った。円形は、個々のマウスを表し、棒グラフは、平均及び範囲を示す。

【図29-1】図29Aは7つの治療群の各々において、試験終了時に瀕死のマウス又はマウス由来の末梢血からの細胞における、CD3に対するCD19CARの発現を示す一連の代表的な2パラメータフロープロットである。細胞を、抗CD3、抗CD19CAR、抗HER1t、及び抗IL-15を含む抗体で共染色し、続いてフローサイトメトリー分析を行った。フロープロットを、シングレット、生存可能hCD45⁺、及びCD3⁺事象に対してゲーティングし、それぞれの導入遺伝子の頻度を分析した。細胞のパーセントを、各ゲートに示す。

【図29-2】図29B～29DモックPBMC（群B）、モックCD3（群C）、dTp対照（群D）、プラスミドA（P、5e6）（群E）、プラスミドA（T、1e6）（群F）、及びプラスミドA（T、0.5e6）（群G）治療群の各々について、末梢血（PB）（図29B）、骨髄（BM）（図29C）、及び脾臓（図29D）における生存可能CD45⁺CD3⁺細胞のパーセンテージとしてのCD19CAR⁺CD3⁺頻度を示す棒グラフである。腫瘍のみ（群A）マウスにおいてCD3生着が起らなかったことに起因して、この群を、提示から除外した。円形は、個々のマウスを表し、棒グラフは、平均及び範囲を示す。エラーバーは、SDを表し、記号によって隠されている場合がある。

【図30】7つの治療群の各々において、試験終了時に瀕死のマウス又はマウス由来の末梢血からの細胞における、HER1tに対するCD19CARの発現を示す一連の代表的な2パラメータフロープロットである。細胞を、抗CD3、抗CD19CAR、抗HER1t、及び抗IL-15を含む抗体で共染色し、続いてフローサイトメトリー分析を行った。表示されたフロープロットを、シングレット、生存可能hCD45⁺、及びCD3⁺事象に対してゲーティングした。細胞のパーセントを、各象限に示す。

【図31】7つの治療群の各々において、試験終了時に瀕死のマウス又はマウス由来の末梢血からの細胞における、mbIL15に対するHER1tの発現を示す一連の代表的な2パラメータフロープロットである。細胞を、抗CD3、抗CD19CAR、抗HER1t、及び抗IL-15を含む抗体で共染色し、続いてフローサイトメトリー分析を行った

【図32】図32A及び32BはdTp対照（P、5e6）（群D）、プラスミドA（P、5e6）（群E）、プラスミドA（T、1e6）（群F）、及びプラスミドA（T、0.5e6）（群G）治療群の各々において、試験終了時に瀕死のマウス又はマウス由来の末梢血からの細胞における、CCR7に対するCD45RO（図32A）、又はCD27に対するCD45RO（図32B）の発現を示す一連の代表的な2パラメータフロープロットである。細胞を、抗CD3、抗CD19CAR、抗CD45RO、抗CCR7、及び抗CD27を含む抗体で共染色し、続いてフローサイトメトリー分析を行った。表示されたフロープロットを、シングレット、生存可能hCD45⁺、及びCD3⁺CD19CAR⁺事象に対してゲーティングした。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 6 0 】

本開示は、少なくとも3つのシストロンを含む組換え多シストロン性核酸ベクターであって、5'から3'に、第1のシストロンが、抗CD19キメラ抗原受容体(CAR)(例えば、CD19CAR)をコードし、第2のシストロンが、IL-15及びIL-15Rαを含む融合タンパク質(例えば、mbIL15)、又はその機能的断片若しくは機能的バリエーションをコードし、第3のシストロンが、マーカータンパク質(例えば、HER1t)をコードし、第1及び第2のシストロンが、F2Aエレメントを含むポリヌクレオチド配列によって分離され、第2のシストロン及び第3のシストロンが、T2Aエレメントを含むポリヌクレオチド配列によって分離される、組換え多シストロン性核酸ベクターを提供する。また、これらのベクターを含む免疫エフェクター細胞、ベクターによってコードされる3つのタンパク質を発現するためにベクターを利用してエクスピボで操作された免疫エフェクター細胞、これらのベクター又はこれらのベクターを利用して作製された操作された免疫エフェクター細胞を含む薬学的組成物、並びにこれらのベクター又はこれらのベクターを利用して作製された操作された免疫エフェクター細胞を使用して対象を治療する方法も提供される。

【 0 0 6 1 】

本明細書に記載の多シストロン性ベクターは、3つのタンパク質の発現のために少なくとも2つのベクターを利用した従来技術の系と比較して実質的に均質である操作された細胞（例えば、免疫エフェクター細胞）の集団を製造する方法において特に有用である。驚くべきことに、シストロンの5'から3'の順序、すなわち、5'-抗CD19 CAR-F2Aエレメント-I L-15/I L-15 R α 融合-T2Aエレメント-マーカートンパク質-3'は、別の向きと比較して、T細胞の表面上の3つのタンパク質コードポリヌクレオチド配列、すなわち、抗CD19 CAR、I L-15/I L-15 R α 融合、及びマーカートンパク質の優れた発現を提供することが更に示されている。

【 0 0 6 2 】

5.1 定義

別途定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語及び科学用語は、請求される主題が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。前述の一般的な説明及び以下の詳細な説明は、単に例示的かつ説明的であり、請求される任意の主題を限定するものではないことを理解されたい。本出願では、特に断りのない限り、単数形の使用は、複数形を含む。本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「*a*」、「*an*」、及び「*the*」は、文脈が明示的に別様に示さない限り、複数の参照物を含むことに留意する必要がある。本出願では、「又は」の使用は、別段明記されない限り、「及び／又は」を意味する。更に、「～を含む（*including*）」という用語、並びに「～を含む（*include*）」、「～を含む（*inc l u d e*）」

es)」及び「含まれる (included)」という他の形態は、限定的ではない。本明細書で使用されるセクションの見出しは、構成の目的のためにのみ使用され、記載される主題を限定するものとして解釈されるべきではない。

【0063】

本明細書で使用される場合、数値又は数値範囲を修正するために使用される場合、「約」及び「およそ」という用語は、その値又は範囲より5%～10%上（例えば、最大で5%～10%上）及び5%～10%下（例えば、最大で5%～10%下）の偏差が、引用された値又は範囲の意図された意味内に留まることを示す。

【0064】

本明細書で使用される場合、「シストロン」という用語は、そこから導入遺伝子産物が産生され得るポリヌクレオチド配列を指す。

【0065】

本明細書で使用される場合、「多シストロン性ベクター」という用語は、多シストロン性発現カセットを含むポリヌクレオチドベクターを指す。

【0066】

本明細書で使用される場合、「多シストロン性発現カセット」という用語は、3つ以上の導入遺伝子の発現が共通の転写調節エレメント（例えば、共通のプロモーター）によって調節され、同じmRNAから3つ以上の別個のタンパク質を同時に発現することができるポリヌクレオチド配列を指す。例示的な多シストロン性ベクターは、限定されないが、トリシストロン性ベクター（3つのシストロンを含有する）及びテトラシストロン性ベクター（4つのシストロンを含有する）を含む。

【0067】

本明細書で使用される場合、「転写調節エレメント」という用語は、別のポリヌクレオチド配列の転写の調節を媒介するポリヌクレオチド配列を指す。例示的な転写調節エレメントとしては、限定されないが、プロモーター及びエンハンサーが挙げられる。

【0068】

本明細書で使用される場合、「F2Aエレメント」という用語は、(i) 配列番号141若しくは142のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列を含むか、(ii) 配列番号137若しくは138のアミノ酸配列をコードするか、又は(iii) 1、2、若しくは3個のアミノ酸修飾を含む配列番号137若しくは138のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを指す。いくつかの実施形態では、第1のタンパク質をコードする第1のポリヌクレオチド配列と第2のタンパク質をコードする第2のポリヌクレオチド配列との間のベクター中に位置するとき、F2Aエレメントは、例えば、F2Aエレメントの翻訳産物のC末端における最後から2番目の残基（例えば、グリシン）と最後の残基（例えば、プロリン）との間のペプチド結合の合成を防止することによって、同じmRNA分子から2つの別個のポリペプチドとして第1のポリヌクレオチド配列及び第2のポリヌクレオチド配列の翻訳を媒介することができ、例えば、その結果、最後から2番目の残基（例えば、グリシン）は、第1のタンパク質のC末端残基になり、最後の残基（例えば、プロリン）は、第2のタンパク質のN末端残基になる。いくつかの実施形態では、F2Aエレメントは、その5'末端に、フリン切断部位、例えば、RAKR（配列番号187）をコードするポリヌクレオチド配列を更に含む。

【0069】

本明細書で使用される場合、「T2Aエレメント」という用語は、(i) 配列番号143、144、145若しくは165のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列を含むか、(ii) 配列番号139、140若しくは182のアミノ酸配列をコードするか、又は(iii) 1、2、若しくは3個のアミノ酸修飾を含む配列番号139、140若しくは182のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを指す。いくつかの実施形態では、第1のタンパク質をコードする第1のポリヌクレオ

10

20

30

40

50

チド配列と第2のタンパク質をコードする第2のポリヌクレオチド配列との間のベクター中に位置するとき、T2Aエレメントは、例えば、T2Aエレメントの翻訳産物のC末端における最後から2番目の残基（例えば、グリシン）と最後の残基（例えば、プロリン）との間のペプチド結合の合成を防止することによって、同じmRNA分子から2つの別個のポリペプチドとして第1のポリヌクレオチド配列及び第2のポリヌクレオチド配列の翻訳を媒介することができ、例えば、その結果、最後から2番目の残基（例えば、グリシン）は、第1のタンパク質のC末端残基になり、最後の残基（例えば、プロリン）は、第2のタンパク質のN末端残基になる。いくつかの実施形態では、T2Aエレメントは、その5'末端に、プリン切断部位、例えば、RAKR（配列番号187）をコードするポリヌクレオチド配列を更に含む。

10

【0070】

本明細書で使用される場合、「逆方向末端反復」、「ITR」、「逆方向反復／直接反復」、及び「IR／DR」という用語は、互換的に使用され、例えば、約230個のヌクレオチド（例えば、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、若しくは240個のヌクレオチド）を有し、発現カセット（例えば、多シストロン性発現カセット）の反対側の末端に（例えば、介在するポリヌクレオチド配列の有無にかかわらず）隣接する、例えば、対応する、例えば、逆相補的な（例えば、完全若しくは不完全に逆相補的な）ポリヌクレオチド配列と組み合わせて使用される場合、約230個のヌクレオチド（例えば、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、若しくは240個のヌクレオチド）を有し、トランスポザーゼポリペプチドによって切断可能な発現カセット（例えば、多シストロン性発現カセット）の一方の末端に（例えば、介在するポリヌクレオチド配列の有無にかかわらず）隣接するポリヌクレオチド配列を指す（例えば、その内容が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれるCui et al., J. Mol. Biol. 2002; 318(5): 1221-35に記載されるように）。いくつかの実施形態では、ITR、例えば、DNAトランスポゾン（例えば、Sleeping Beautyトランスポゾン、piggyBacトランスポゾン、TcBusterトランスポゾン、及びTol2トランスポゾン）は、ITRの各末端に配置される、例えば、2つの直接反復（「DR」）、例えば、約30個のヌクレオチド（例えば、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、又は35個のヌクレオチド）の不完全な直接反復を含有する。「ITR」及び「DR」という用語は、一本鎖又は二本鎖DNAベクターを参照しつつ使用される場合、センス鎖のDNA配列を指す。トランスポザーゼポリペプチドは、DNAのセンス鎖及び／又はアンチセンス鎖を認識し得る。

20

30

【0071】

本明細書で使用される場合、「左ITR」という用語は、線形一本鎖又は二本鎖DNAベクターを参照しつつ使用される場合、多シストロン性発現カセットの5'に位置するITRを指す。本明細書で使用される場合、「右ITR」という用語は、線形一本鎖又は二本鎖DNAベクターを参照しつつ使用される場合、多シストロン性発現カセットの3'に位置するITRを指す。環状ベクターを使用する場合、左ITRは、右ITRよりも、多シストロン性発現カセットの5'末端に近く、右ITRは、左ITRよりも、多シストロン性発現カセットの3'末端に近い。

40

【0072】

本明細書で使用される場合、「作動可能に連結された」という用語は、機能的関係にあるポリヌクレオチド配列エレメント又はアミノ酸配列エレメントの連結を指す。例えば、ポリヌクレオチド配列は、それが別のポリヌクレオチド配列と機能的関係に置かれるときに、作動可能に連結される。いくつかの実施形態では、転写調節ポリヌクレオチド配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、又は他の発現制御エレメントは、タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列の転写に影響を及ぼす場合、タンパク質をコードするポリ

50

ヌクレオチド配列に作動可能に連結される。

【0073】

「ポリヌクレオチド」という用語は、本明細書で使用される場合、DNA又はRNAのポリマーを指す。ポリヌクレオチド配列は、一本鎖又は二本鎖であってもよく、天然、非天然、又は改変されたヌクレオチドを含有してもよく、非修飾ポリヌクレオチド配列のヌクレオチド間にみられるホスホジエステルの代わりに、ホスホロアミデート結合又はホスホロチオエート結合などの天然、非天然、又は改変されたヌクレオチド間結合を含有してもよい。ポリヌクレオチド配列は、限定されないが、当該技術分野で利用可能な任意の手段によって得られるすべてのポリヌクレオチド配列を含み、任意の手段としては、限定されないが、組換え手段、例えば、組換えライブラリ又は細胞ゲノムからのポリヌクレオチド配列のクローニング、通常のクローニング技術及びポリメラーゼ連鎖反応を使用するなど、また、合成手段によるものを含む。

10

【0074】

本明細書で互換的に使用される「アミノ酸配列」及び「ポリペプチド」という用語は、1つ以上のペプチド結合によって接続されたアミノ酸のポリマーを指す。

【0075】

タンパク質又はポリペプチドを参照しつつ本明細書で使用する「機能的バリエーション」という用語は、参照タンパク質のアミノ酸配列と比較して、少なくとも1つの特定の機能を保持する少なくとも1つのアミノ酸修飾（例えば、置換、欠失、付加）を含むタンパク質を指す。いくつかの実施形態では、参照タンパク質は、野生型タンパク質である。例えば、IL-2タンパク質の機能的バリエーションは、野生型IL-2タンパク質と比較して、中間の親和性のIL-2受容体に結合する能力を保持するが、高親和性のIL-2受容体に結合するタンパク質の能力が失われている、アミノ酸置換を含むIL-2タンパク質を指し得る。参照野生型タンパク質のすべての機能が、タンパク質の機能的バリエーションによって保持される必要はない。場合によっては、1つ以上の機能が選択的に低減するか、又は排除される。

20

【0076】

タンパク質又はポリペプチドを参照しつつ本明細書で 사용되는場合、「機能的断片」という用語は、少なくとも1つの特定の機能を保持する参照タンパク質の断片を指す。例えば、抗HER2抗体の機能的断片は、HER2抗原に特異的に結合する能力を保持する抗HER2抗体の断片を指し得る。参照タンパク質のすべての機能が、タンパク質の機能的断片によって保持される必要はない。場合によっては、1つ以上の機能が選択的に低減するか、又は排除される。

30

【0077】

本明細書で 사용되는場合、ポリヌクレオチド配列を参照しつつ、「修飾」という用語は、参照ポリヌクレオチド配列と比較して、ヌクレオチドの少なくとも1つの置換、改変、反転、付加、又は欠失を含むポリヌクレオチド配列を指す。本明細書で 사용되는場合、アミノ酸配列を参照しつつ、「修飾」という用語は、参照アミノ酸配列と比較して、アミノ酸残基の少なくとも1つの置換、改変、反転、付加、又は欠失を含むアミノ酸配列を指す。

40

【0078】

本明細書で 사용되는場合、ポリヌクレオチド配列を参照しつつ、「～に由来する」という用語は、それが由来する参照の天然に存在する核酸配列に対して少なくとも85%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を指す。アミノ酸配列を参照しつつ、「～に由来する」という用語は、それが由来する参照の天然に存在するアミノ酸配列に対して少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列を指す。本明細書で 사용되는「～に由来する」という用語は、ポリヌクレオチド又はアミノ酸配列を得るための任意の具体的なプロセス又は方法を示すものではない。例えば、ポリヌクレオチド又はアミノ酸配列を化学的に合成することができる。

【0079】

50

本明細書で使用される場合、「抗体 (antibody)」及び「抗体 (antibodies)」という用語は、完全長抗体、完全長抗体の抗原結合断片、並びに抗体 CDR、VH 領域、及び／又は VL 領域を含む分子を含む。抗体の例としては、限定されないが、モノクローナル抗体、組み換え産生された抗体、単一特異性抗体、多重特異性抗体（二重特異性抗体を含む）、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、免疫グロブリン、合成抗体、2つの重鎖及び2つの軽鎖分子を含む四量体抗体、抗体軽鎖単量体、抗体重鎖単量体、抗体軽鎖二量体、抗体重鎖二量体、抗体軽鎖－抗体重鎖対、イントラボディ、ヘテロコンジュゲート抗体、抗体－薬物コンジュゲート、単ドメイン抗体、一価抗体、一本鎖抗体又は一本鎖 Fv (scFv)、ラクダ化抗体、アフィボディ、Fab 断片、F(ab')₂ 断片、ジスルフィド連結 Fv (sdFv)、抗イディオタイプ（抗 Id）抗体（例えば、抗抗 Id 抗体を含む）、並びに上述のいずれかの抗原結合断片、及び上述のいずれかを含むコンジュゲート又は融合タンパク質が挙げられる。特定の実施形態では、本明細書に記載の抗体は、ポリクローナル抗体集団を指す。抗体は、免疫グロブリン分子の任意の型（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、若しくは IgY）、任意のクラス（例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、若しくは IgA₂）、又は任意のサブクラス（例えば、IgG_{2a}、若しくは IgG_{2b}）の抗体であり得る。特定の実施形態では、本明細書に記載の抗体は、IgG 抗体、又はそのクラス（例えば、ヒト IgG₁ 若しくは IgG₄）、又はそのサブクラスである。具体的な実施形態では、抗体は、ヒトモノクローナル抗体である。

10

20

【0080】

本明細書で使用される場合、「VH 領域」及び「VL 領域」という用語は、それぞれ、FR（フレームワーク領域）1、2、3 及び 4、並びに CDR（相補性決定領域）1、2 及び 3 を含む単一の抗体重鎖及び軽鎖可変領域を指す（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Kabata et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (NIH Publication No. 91-3242, Bethesda) を参照されたい）。

【0081】

本明細書で使用される場合、「CDR」又は「相補性決定領域」という用語は、重鎖及び軽鎖ポリペプチドの両方の可変領域内に見られる非隣接抗原結合部位を意味する。これらの特定の領域は、Kabata et al., J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977)、及び Kabata et al., Sequences of protein of immunological interest. (1991) に記載されており、そのすべてが、参照によりそれらの全体が組み込まれる。特に明記しない限り、「CDR」という用語は、Kabata et al., J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977)、及び Kabata et al., Sequences of protein of immunological interest. (1991) に定義されるような CDR である。

30

【0082】

本明細書で使用される場合、「フレームワーク (FR) アミノ酸残基」という用語は、抗体可変領域のフレームワーク領域内のそれらのアミノ酸を指す。本明細書で使用される「フレームワーク領域」又は「FR 領域」という用語は、可変領域の一部であるが、（例えば、CDR の Kabata 定義を使用して）CDR の一部ではない、アミノ酸残基を含む。

40

【0083】

本明細書で使用される場合、「可変領域」という用語は、抗体間で配列が大きく異なり、その特定の抗原に対する特定の抗体の結合及び特異性において使用される、抗体の一部分、一般に、軽鎖又は重鎖の一部分、典型的には、成熟重鎖中のほぼアミノ末端の 110～120 個又は 110～125 個のアミノ酸、及び成熟軽鎖中の約 90～115 個のアミノ酸を指す。配列の可変性は、相補性決定領域 (CDR) と呼ばれるそれらの領域に集中

50

しており、一方、可変ドメイン内のより高度に保存された領域は、フレームワーク領域（FR）と呼ばれる。任意の特定の機構又は理論に拘束されることを望むものではないが、軽鎖及び重鎖のCDRは、抗体と抗原との相互作用及び特異性に主に関与すると考えられる。特定の実施形態では、可変領域は、ヒト可変領域である。特定の実施形態では、可変領域は、げっ歯類又はマウスCDRと、ヒトフレームワーク領域（FR）と、を含む。特定の実施形態では、可変領域は、霊長類（例えば、非ヒト霊長類）可変領域である。特定の実施形態では、可変領域は、げっ歯類又はマウスのCDRと、霊長類（例えば、非ヒト霊長類）フレームワーク領域（FR）と、を含む。

【0084】

「VL」及び「VLドメイン」という用語は、互換的に使用され、抗体の軽鎖可変領域を指す。

10

【0085】

「VH」及び「VHドメイン」という用語は、互換的に使用され、抗体の重鎖可変領域を指す。

【0086】

本明細書で使用される場合、「定常領域」及び「定常ドメイン」という用語は、互換的であり、当該技術分野で一般的である。定常領域は、抗体部分、例えば、抗原に対する抗体の結合に直接的には関与しないが、Fc受容体（例えば、Fcガンマ受容体）との相互作用などの種々のエフェクター機能を示すことができる軽鎖及び／又は重鎖のカルボキシル末端部分である。免疫グロブリン分子の定常領域は、一般に、免疫グロブリン可変ドメインに対して、より保存されたアミノ酸配列を有する。

20

【0087】

本明細書で使用される場合、「重鎖」という用語は、抗体を参照しつつ使用される場合、定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、任意の異なる型、例えば、アルファ（ α ）、デルタ（ δ ）、エプシロン（ ϵ ）、ガンマ（ γ ）、及びミュー（ μ ）を指していてもよく、これらはそれぞれ、IgGのサブクラス、例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、及びIgG₄を含む、IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMクラスの抗体を生じる。

【0088】

本明細書で使用される場合、「軽鎖」という用語は、抗体を参照しつつ使用される場合、定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、任意の異なる型、例えば、カッパ（ κ ）又はラムダ（ λ ）を指し得る。軽鎖アミノ酸配列は、当該技術分野で周知である。具体的な実施形態では、軽鎖は、ヒト軽鎖である。

30

【0089】

本明細書で使用される場合、「EU付番システム」という用語は、その各々が参照によってその全体が本明細書に組み込まれるEdelman, G. M. et al., Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969)、及びKabateal, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U. S. Dept. Health and Human Services, 5th edition, 1991に記載される抗体の定常領域についてのEU付番規則を指す。

40

【0090】

本明細書で使用される場合、「特異的に結合する」という用語は、抗原（例えば、エピトープ又は免疫複合体）に結合する分子であって、そのような結合が当業者によって理解されるものを指す。例えば、抗原に特異的に結合する分子は、例えば、イムノアッセイ、BIAcore（登録商標）、KinExA 3000機器（Sapidyne Instruments, Boise, ID）、又は当該技術分野で既知の他のアッセイによって決定されるように、一般的により低い親和性で他のペプチド又はポリペプチドに結合することができる。具体的な実施形態では、抗原に特異的に結合する分子は、分子が別の抗原に非特異的に結合する場合、K_Aより少なくとも2 log（例えば、10倍）、2.5

50

log、3 log、4 log 以上大きい K_A で抗原に結合する。当業者は、本明細書に記載の抗体が1つより多い抗原に（例えば、抗体分子の異なる領域を介して）特異的に結合することができることを理解するであろう。

【0091】

本明細書で使用される場合、「～に連結された」という用語は、2つの分子又は部分の間の共有結合又は非共有結合を指す。当業者は、第1の分子又は部分が第2の分子又は部分に連結されるとき、その連結は直接的である必要はなく、代わりに、介在する分子又は部分を介してもよいことを理解するであろう。例えば、完全長抗体の重鎖可変領域が、リガンド結合部分に連結している場合、リガンド結合部分は、重鎖可変領域に直接結合するのではなく、完全長抗体の定常領域（例えば、重鎖定常領域）に（例えば、ペプチド結合を介して）結合することができる。

10

【0092】

本明細書で使用される場合、「キメラ抗原受容体」又は「CAR」という用語は、少なくとも1つの細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞質ドメインに作動可能に連結された、膜貫通ドメインに作動可能に連結された抗原結合ドメインを含む膜貫通タンパク質を指す。CARは、インビボで標的抗原に結合したときの活性化を媒介するために、宿主細胞（例えば、免疫エフェクター細胞）の表面上に発現され得る。いくつかの実施形態では、CARは、CD19に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、CARは、ヒトCD19（hCD19）に特異的に結合する。

【0093】

本明細書で使用される場合、「CD19」という用語（Bリンパ球抗原CD19、分化クラスター19、及びBリンパ球表面抗原B4としても知られる）は、ヒトにおいてCD19遺伝子によってコードされるタンパク質を指す。本明細書で使用される場合、「ヒトCD19」又はhCD19という用語は、ヒトCD19遺伝子（例えば、野生型ヒトCD19遺伝子）によってコードされるCD19タンパク質を指す。例示的な野生型ヒトCD19タンパク質は、GenBank（商標）受託番号AAB60697.1、AAA69966.1、及びBAB60954.1によって提供される。

20

【0094】

本明細書で使用される場合、「細胞外」という用語は、細胞の外側に配置される膜貫通タンパク質の1つ以上の部分を指す。いくつかの実施形態では、膜貫通タンパク質は、組換え膜貫通タンパク質である。いくつかの実施形態では、組換え膜貫通タンパク質は、CARである。

30

【0095】

本明細書で使用される場合、CARに関する「抗原結合ドメイン」という用語は、抗原に特異的に結合する任意の好適な抗体又は非抗体ベースの分子を含むCARのドメインを指す。いくつかの実施形態では、抗原は、細胞の表面上に発現される。いくつかの実施形態では、抗原は、CD19である。いくつかの実施形態では、抗原は、hCD19である。いくつかの実施形態では、抗体ベースの分子は、一本鎖可変断片（scFv）を含む。

【0096】

本明細書で使用される場合、CARに関する「細胞外抗原結合ドメイン」という用語は、細胞の外側に配置される抗原結合ドメインを指す。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、少なくとも1つの細胞内シグナル伝達ドメインと、CARが細胞中で発現されている細胞の外側に配置されるように配向されている抗原結合ドメインと、を含む細胞質ドメインに作動可能に連結される膜貫通ドメインに作動可能に連結されている。

40

【0097】

本明細書で使用される場合、CARに関する「膜貫通ドメイン」という用語は、CARが細胞中で発現されるときに細胞の形質膜に埋め込まれるCARの1つ以上の部分を指す。

【0098】

本明細書で使用される場合、CARに関する「細胞質ドメイン」という用語は、CAR

50

が細胞中で発現されるときに細胞の細胞質内に配置されるCARの1つ以上の部分を指す。

【0099】

本明細書で使用される場合、「細胞内シグナル伝達ドメイン」という用語は、一次シグナル伝達ドメイン及び／又は共刺激ドメインを含むCARの細胞質ドメインの一部を指す。

【0100】

本明細書で使用される場合、「一次シグナル伝達ドメイン」という用語は、細胞内シグナル伝達事象を媒介することに関与するシグナル伝達分子の細胞内部分を指す。

【0101】

本明細書で使用される場合、「共刺激ドメイン」という用語は、細胞内シグナル伝達事象を媒介することに関与する共刺激分子の細胞内部分を指す。

【0102】

本明細書で使用される場合、「サイトカイン」という用語は、生物学的又は細胞的な機能又はプロセス（例えば、免疫、炎症、及び造血）を媒介及び／又は調節する分子を指す。本明細書で使用される場合、サイトカインは、限定されないが、リンホカイン、ケモカイン、モノカイン、及びインターロイキンを含む。本明細書で使用されるサイトカインという用語はまた、野生型サイトカインの機能的バリエーション及び機能的バリエーションを包含する。

【0103】

本明細書で使用される場合、「マーカー」タンパク質又はポリペプチドという用語は、細胞の表面上で発現され得るタンパク質又はポリペプチドであって、これを利用して、マーカータンパク質又はポリペプチドを発現する細胞をマーキングするか、又は枯渇させることができるものを指す。いくつかの実施形態では、マーカータンパク質又はポリペプチドを発現する細胞の枯渇は、マーカータンパク質又はポリペプチドに特異的に結合する分子（例えば、抗体が媒介する細胞傷害性を媒介する抗体）の投与によって行われる。

【0104】

本明細書で使用される場合、「免疫エフェクター細胞」は、免疫エフェクター機能の促進に関与する細胞を指す。免疫エフェクター細胞の例としては、限定されないが、T細胞（例えば、アルファ／ベータT細胞及びガンマ／デルタT細胞、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、ナチュラルキラーT（NK-T）細胞）、ナチュラルキラー（NK）細胞、B細胞、肥満細胞、及び骨髄由来食細胞が挙げられる。

【0105】

本明細書で使用される場合、「免疫エフェクター機能」という用語は、免疫エフェクター細胞の特殊な機能を指す。任意の所与の免疫エフェクター細胞のエフェクター機能は、異なってもよい。例えば、CD8⁺T細胞のエフェクター機能は、細胞溶解活性であり、CD4⁺T細胞のエフェクター機能は、サイトカインの分泌である。

【0106】

本明細書で使用される場合、「治療する」、「治療すること」、及び「治療」という用語は、本明細書に記載される治療的措置又は予防的措置を指す。「治療」の方法は、疾患若しくは障害、又は再発性疾患若しくは障害のうちの1つ以上の症状を予防し、治療し、遅延させ、その重症度を軽減し、又は改善するために、あるいはそのような治療がない場合に予想される生存期間を超えて対象の生存期間を延長させるために、多シストロン性発現カセットを含む組換えベクターを細胞に投与すること、及びいくつかの実施形態では、疾患若しくは障害を有するか、又はそのような疾患若しくは障害を有すると事前に診断された対象に操作された細胞を投与することを使用する。

【0107】

本明細書で使用される場合、療法を対象に行う文脈において、「有効量」という用語は、所望の予防効果又は治療効果を達成する療法の量を指す。

【0108】

10

20

30

40

50

本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、任意のヒト又は非ヒト動物を含む。一実施形態では、対象は、ヒト又は非ヒト哺乳動物である。一実施形態では、対象は、ヒトである。

【0109】

2つの配列（例えば、アミノ酸配列又は核酸配列）間の「同一性パーセント」の決定は、数学アルゴリズムを使用して達成することができる。2つの配列の比較に利用される数学アルゴリズムの具体的な非限定的な例は、Karlin S & Altschul SF (1993) PNAS 90:5873-5877におけるように修正された、Karlin S & Altschul SF (1990) PNAS 87:2264-2268のアルゴリズムであり、その各々が、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。かかるアルゴリズムは、Altschul SF et al., (1990) J Mol Biol 215:403のNBLAST及びXBLASTプログラムに組み込まれ、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。本明細書に記載の核酸分子と相同のヌクレオチド配列を得るために、例えば、スコア=100、ワード長=12などのNBLASTヌクレオチドプログラムパラメータセットを使用して、BLASTヌクレオチド検索を実施することができる。本明細書に記載のタンパク質分子と相同のアミノ酸配列を得るために、例えば、スコア50、ワード長=3などのXBLASTプログラムパラメータセットを使用して、BLASTタンパク質検索を実施することができる。比較目的のためにギャップドアライメントを得るために、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるAltschul SF et al., (1997) Nuc Acids Res 25:3389-3402に記載されるように、Gapped BLASTを利用することができる。あるいは、PSI BLASTを使用して、分子間の距離関係を検出する反復検索を行うことができる（同文献）。BLAST、Gapped BLAST、及びPSI Blastプログラムを利用する場合、それぞれのプログラムの（例えば、XBLAST及びNBLASTの）デフォルトパラメータを使用してもよい（例えば、National Center for Biotechnology Information (NCBI) on the worldwide web, ncbi.nlm.nih.govを参照されたい）。配列の比較に利用される数学的アルゴリズムの別の具体的な非限定的な例は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるMyers and Miller, 1988, CABIOS 4:11-17のアルゴリズムである。かかるアルゴリズムは、GCG配列アライメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれている。アミノ酸配列を比較するためにALIGNプログラムを利用する場合、PAM120重み残基表、ギャップ長ペナルティ12、及びギャップペナルティ4が使用され得る。

【0110】

2つの配列間の同一性パーセントは、ギャップを許容して又はギャップを許容することなく、上述の技術と同様の技術を使用して決定され得る。同一性パーセントを計算して、典型的には、正確な一致のみが計数される。

【0111】

5.2 キメラ抗原受容体 (CAR)

CARは、少なくとも1つの細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞質ドメインに作動可能に連結された、膜貫通ドメインに作動可能に連結された抗原結合ドメインを含む膜貫通タンパク質である。CARは、インビボで標的抗原に結合したときの活性化を媒介するために、宿主細胞（例えば、免疫エフェクター細胞）の表面上に発現され得る。いくつかの実施形態では、CARは、CD19に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、CARは、ヒトCD19 (hCD19) に特異的に結合する。

【0112】

5.2.1 hCD19結合ドメイン

hCD19結合ドメインは、細胞の表面上に発現されるhCD19に特異的に結合する任意の好適な抗体又は非抗体系の分子を含む。例示的なhCD19結合ドメインには、限

定されないが、抗体、並びにその機能的断片及び機能的バリエーションが含まれる。いくつかの実施形態では、hCD19結合ドメインは、単鎖可変断片（scFv）、Fab、Fab'、Fv、完全長抗体、ダイアボディ、又はアドネクチンを含む。いくつかの実施形態では、hCD19結合ドメインは、scFvを含む。

【0113】

いくつかの実施形態では、hCD19結合ドメインは、重鎖可変領域（VH）と、軽鎖可変領域（VL）と、を含む。いくつかの実施形態では、hCD19結合ドメインは、ペプチドリンカーを介して作動可能に連結されたVH及びVLを含む。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、グリシン（G）及びセリン（S）を含む。

【0114】

いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、配列番号9のアミノ酸配列、又は配列番号9のアミノ酸配列に対する1個、2個、3個、4個若しくは5個のアミノ酸修飾を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーのアミノ酸配列は、配列番号9のアミノ酸配列、又は配列番号9のアミノ酸配列に対する1、2、3、4若しくは5個のアミノ酸修飾を含むアミノ酸配列からなる。

【0115】

いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、配列番号17のアミノ酸配列、又は配列番号17のアミノ酸配列に対する1個、2個、3個、4個若しくは5個のアミノ酸修飾を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーのアミノ酸配列は、配列番号17のアミノ酸配列、又は配列番号17のアミノ酸配列に対する1、2、3、4若しくは5個のアミノ酸修飾を含むアミノ酸配列からなる。

【0116】

いくつかの実施形態では、リンカーは、配列番号27のポリヌクレオチドに対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、リンカーは、配列番号27のポリヌクレオチドによってコードされる。

【0117】

いくつかの実施形態では、リンカーは、配列番号35のポリヌクレオチドに対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、リンカーは、配列番号35のポリヌクレオチドによってコードされる。

【0118】

いくつかの実施形態では、VHは、3つの相補性決定領域（CDR）であるVH CDR1、VH CDR2、及びVH CDR3を含む。いくつかの実施形態では、VHは、配列番号2に示されるVH CDR1、VH CDR2、及びVH CDR3を含む。いくつかの実施形態では、VH CDR1のアミノ酸配列は、配列番号6のアミノ酸配列、又は配列番号6のアミノ酸配列に対する1、2、若しくは3個のアミノ酸修飾を含むアミノ酸配列を含み、VH CDR2のアミノ酸配列は、配列番号7のアミノ酸配列、又は配列番号7のアミノ酸配列に対する1、2、若しくは3個のアミノ酸修飾を含むアミノ酸配列を含み、VH CDR3のアミノ酸配列は、配列番号8のアミノ酸配列、又は配列番号8のアミノ酸配列に対する1、2、若しくは3個のアミノ酸修飾を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、VH CDR1のアミノ酸配列は、配列番号6のアミノ酸配列を含み、VH CDR2のアミノ酸配列は、配列番号7のアミノ酸配列を含み、VH CDR3のアミノ酸配列は、配列番号8のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、VH CDR1のアミノ酸配列は、配列番号6のアミノ酸配列からなり、VH CDR2のアミノ酸配列は、配列番号7のアミノ酸配列からなり、VH CDR3のアミノ酸配列は、配列番号8のアミノ酸配列からなる。

【0119】

いくつかの実施形態では、VLは、3つのCDRであるVL CDR1、VL CDR2、及びVL CDR3を含む。いくつかの実施形態では、VLは、配列番号1のVL

10

20

30

40

50

C D R 1、V L C D R 2、及び V L C D R 3を含む。いくつかの実施形態では、V L C D R 1のアミノ酸配列は、配列番号 3 のアミノ酸配列、又は配列番号 3 のアミノ酸配列に対する 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含むアミノ酸配列を含み、V L C D R 2のアミノ酸配列は、配列番号 4 のアミノ酸配列、又は配列番号 4 のアミノ酸配列に対する 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含むアミノ酸配列を含み、V L C D R 3のアミノ酸配列は、配列番号 5 のアミノ酸配列、又は配列番号 5 のアミノ酸配列に対する 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V L C D R 1のアミノ酸配列は、配列番号 3 のアミノ酸配列を含み、V L C D R 2のアミノ酸配列は、配列番号 4 のアミノ酸配列を含み、V L C D R 3のアミノ酸配列は、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V L C D R 1のアミノ酸配列は、配列番号 3 のアミノ酸配列からなり、V L C D R 2のアミノ酸配列は、配列番号 4 のアミノ酸配列からなり、V L C D R 3のアミノ酸配列は、配列番号 5 のアミノ酸配列からなる。

10

【0120】

いくつかの実施形態では、V H は、配列番号 2 の V H C D R 1、V H C D R 2、及び V H C D R 3を含み、V L は、配列番号 1 の V L C D R 1、V L C D R 2、及び V L C D R 3を含む。いくつかの実施形態では、V H C D R 1のアミノ酸配列は、配列番号 6 のアミノ酸配列、又は配列番号 6 のアミノ酸配列に対する 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含むアミノ酸配列を含み、V H C D R 2のアミノ酸配列は、配列番号 7 のアミノ酸配列、又は配列番号 7 のアミノ酸配列に対する 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含むアミノ酸配列を含み、V H C D R 3のアミノ酸配列は、配列番号 8 のアミノ酸配列、又は配列番号 8 のアミノ酸配列に対する 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含むアミノ酸配列を含み、V L C D R 1のアミノ酸配列は、配列番号 3 のアミノ酸配列、又は配列番号 3 のアミノ酸配列に対する 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含むアミノ酸配列を含み、V L C D R 2のアミノ酸配列は、配列番号 4 のアミノ酸配列、又は配列番号 4 のアミノ酸配列に対する 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含むアミノ酸配列を含み、V L C D R 3のアミノ酸配列は、配列番号 5 のアミノ酸配列、又は配列番号 5 のアミノ酸配列に対する 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸修飾を含むアミノ酸配列を含む。

20

【0121】

いくつかの実施形態では、V H C D R 1のアミノ酸配列は、配列番号 6 のアミノ酸配列を含み、V H C D R 2のアミノ酸配列は、配列番号 7 のアミノ酸配列を含み、V H C D R 3のアミノ酸配列は、配列番号 8 のアミノ酸配列を含み、V L C D R 1のアミノ酸配列は、配列番号 3 のアミノ酸配列を含み、V L C D R 2のアミノ酸配列は、配列番号 4 のアミノ酸配列を含み、V L C D R 3のアミノ酸配列は、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む。

30

【0122】

いくつかの実施形態では、V H C D R 1のアミノ酸配列は、配列番号 6 のアミノ酸配列からなり、V H C D R 2のアミノ酸配列は、配列番号 7 のアミノ酸配列からなり、V H C D R 3のアミノ酸配列は、配列番号 8 のアミノ酸配列からなり、V L C D R 1のアミノ酸配列は、配列番号 3 のアミノ酸配列からなり、V L C D R 2のアミノ酸配列は、配列番号 4 のアミノ酸配列からなり、V L C D R 3のアミノ酸配列は、配列番号 5 のアミノ酸配列からなる。

40

【0123】

いくつかの実施形態では、V H は、配列番号 2 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V H は、配列番号 2 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V H のアミノ酸配列は、配列番号 2 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一の配列からなる。いくつかの実施形態では、V H のアミノ酸配列は、配列番号 2 のアミノ酸配列からなる。

50

10

20

30

40

50

[illegible]

。いくつかの実施形態では、hCD19結合ドメインのアミノ酸配列は、配列番号15のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一の配列からなる。いくつかの実施形態では、hCD19結合ドメインのアミノ酸配列は、配列番号15のアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、hCD19結合ドメインは、配列番号16のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、hCD19結合ドメインは、配列番号16のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、hCD19結合ドメインのアミノ酸配列は、配列番号16のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一の配列からなる。いくつかの実施形態では、hCD19結合ドメインのアミノ酸配列は、配列番号16のアミノ酸配列からなる。

10

【0127】

いくつかの実施形態では、VHは、配列番号24のポリヌクレオチド配列、又は配列番号24のポリヌクレオチド酸配列に対する1、2、3、4、5、6、7、8若しくは9個のヌクレオチド修飾を含むポリヌクレオチド配列によってコードされるVH CDR1と、配列番号25のポリヌクレオチド配列、又は配列番号25のポリヌクレオチド酸配列に対する1、2、3、4、5、6、7、8若しくは9個のヌクレオチド修飾を含むポリヌクレオチド配列によってコードされるVH CDR2と、配列番号26のポリヌクレオチド配列、又は配列番号26のポリヌクレオチド酸配列に対する1、2、3、4、5、6、7、8若しくは9個のヌクレオチド修飾を含むポリヌクレオチド配列によってコードされるVH CDR3と、を含む。いくつかの実施形態では、VHは、配列番号24のポリヌクレオチド配列によってコードされるVH CDR1と、配列番号25のポリヌクレオチド配列によってコードされるVH CDR2と、配列番号26のポリヌクレオチド配列によってコードされるVH CDR3と、を含む。

20

【0128】

いくつかの実施形態では、VLは、配列番号21のポリヌクレオチド配列、又は配列番号21のポリヌクレオチド酸配列に対する1、2、3、4、5、6、7、8若しくは9個のヌクレオチド修飾を含むポリヌクレオチド配列によってコードされるVL CDR1と、配列番号22のポリヌクレオチド配列、又は配列番号22のポリヌクレオチド酸配列に対する1、2、3、4、5、6、7、8若しくは9個のヌクレオチド修飾を含むポリヌクレオチド配列によってコードされるVL CDR2と、配列番号23のポリヌクレオチド配列、又は配列番号23のポリヌクレオチド酸配列に対する1、2、3、4、5、6、7、8若しくは9個のヌクレオチド修飾を含むポリヌクレオチド配列によってコードされるVL CDR3と、を含む。いくつかの実施形態では、VLは、配列番号21のポリヌクレオチド配列によってコードされるVL CDR1と、配列番号22のポリヌクレオチド配列によってコードされるVL CDR2と、配列番号23のポリヌクレオチド配列によってコードされるVL CDR3と、を含む。

30

【0129】

いくつかの実施形態では、VHは、配列番号24のポリヌクレオチド配列、又は配列番号24のポリヌクレオチド酸配列に対する1、2、3、4、5、6、7、8若しくは9個のヌクレオチド修飾を含むポリヌクレオチド配列によってコードされるVH CDR1と、配列番号25のポリヌクレオチド配列、又は配列番号25のポリヌクレオチド酸配列に対する1、2、3、4、5、6、7、8若しくは9個のヌクレオチド修飾を含むポリヌクレオチド配列によってコードされるVH CDR2と、配列番号26のポリヌクレオチド配列、又は配列番号26のポリヌクレオチド酸配列に対する1、2、3、4、5、6、7、8若しくは9個のヌクレオチド修飾を含むポリヌクレオチド配列によってコードされるVH CDR3と、配列番号21のポリヌクレオチド配列、又は配列番号21のポリヌクレオチド酸配列に対する1、2、3、4、5、6、7、8若しくは9個のヌクレオチド修飾を含むポリヌクレオチド配列によってコードされるVL CDR1と、配列番号22のポリヌクレオチド配列、又は配列番号22のポリヌクレオチド酸配列に対する1、2、3

40

50

、4、5、6、7、8若しくは9個のヌクレオチド修飾を含むポリヌクレオチド配列によってコードされるV L C D R 2と、配列番号23のポリヌクレオチド配列、又は配列番号23のポリヌクレオチド酸配列に対する1、2、3、4、5、6、7、8若しくは9個のヌクレオチド修飾を含むポリヌクレオチド配列によってコードされるV L C D R 3と、を含む。

【0130】

いくつかの実施形態では、V Hは、配列番号24のポリヌクレオチド配列によってコードされるV H C D R 1と、配列番号25のポリヌクレオチド配列によってコードされるV H C D R 2と、配列番号26のポリヌクレオチド配列によってコードされるV H C D R 3と、配列番号21のポリヌクレオチド配列によってコードされるV L C D R 1と、配列番号22のポリヌクレオチド配列によってコードされるV L C D R 2と、配列番号23のポリヌクレオチド配列によってコードされるV L C D R 3と、を含む。

10

【0131】

いくつかの実施形態では、V Hは、配列番号20のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、V Hは、配列番号20のポリヌクレオチド配列によってコードされる。

【0132】

いくつかの実施形態では、V Lは、配列番号19のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、V Lは、配列番号19のポリヌクレオチド配列によってコードされる。

20

【0133】

いくつかの実施形態では、V Hは、配列番号20のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされ、V Lは、配列番号19のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、V Hは、配列番号20のポリヌクレオチド配列によってコードされ、配列番号19のポリヌクレオチド配列によってコードされるV L。

30

【0134】

いくつかの実施形態では、h C D 19結合ドメインは、配列番号29のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、h C D 19結合ドメインは、配列番号30のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、h C D 19結合ドメインは、配列番号31のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、h C D 19結合ドメインは、配列番号32のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、h C D 19結合ドメインは、配列番号33のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、h C D 19結合ドメインは、配列番号34のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。

40

【0135】

50

例示的な hCD19 結合ドメインのアミノ酸配列及びポリヌクレオチド配列を本明細書の表 1 に示す。

【0136】

【表 1-1】

表 1. 例示的な hCD19 結合ドメインのアミノ酸及びポリヌクレオチド配列。

説明	アミノ酸配列	配列番号	ポリヌクレオチド配列	配列番号
FMC63 VL (N 末端シグナル配列を含まない)	DIQMTQTSSLSASL GDRVITISCRASQDIS KYLNWYQQKPDGTVK LLIYHTSRLHSGVPS RFSGSGSGTDYSLTI SNLEQEDIATYFCQQ GNTLPYTFGGGKLE IT	1	GACATCCAGATGACCCAGAACCCCTCCAGCC TGAGCGCCAGCCTGGGCGACCGGGTGACCAT CAGCTGCCGGGCCAGCCAGGACATCAGCAAG TACCTGAAGTGGTATCAGCAGAAGCCCGACG GCACCGTCAAGCTGCTGATCTACCACACCAG CCGGCTGCACAGCGGCGTGCCAGCCGGTTT AGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTACAGCC TGACCATCTCCAACCTGGAGCAGGAGGACAT CGCCACCTACTTTTGCCAGCAGGGCAACACA CTGCCCTACACCTTTGGCGGCGGAACAAAGC TGGAGATCACC	19
FMC63 VH (N 末端シグナル配列を含まない)	EVKLQESGPGLVAPS QSLSVTCTVSGVSLP DYGVSIRQPPRKGL EWLGVIWGSETTYYN SALKSRLTIKDNSK SQVFLKMNSLQDDT AIYYCAKHYYGGSY AMDYWGQTSVTVSS	2	GAGGTGAAGTGCAGGAGAGCGGCCCTGGCC TGGTGGCCCCCAGCCAGAGCCTGAGCGTGAC CTGTACCGTGTCCGGCGTGTCCCTGCCGAC TACGGCGTGTCTGGATCCGGCAGCCCCCTA GGAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTG GGGCAGCGAGACCACCTACTACACAGCGCC CTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACA ACAGCAAGAGCCAGGTGTCTCTGAAGATGAA CAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATCTAC TACTGTGCCAAGCACTACTACTACGGCGGCA GCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCAC CAGCGTGACCGTGTCCAGC	20
FMC63 VL CDR1	RASQDISKYLN	3	CGGGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGA AC	21
FMC63 VL CDR2	HTSRLHS	4	CACACCAGCCGGCTGCACAGC	22
FMC63 VL CDR3	QQGNTLPYT	5	CAGCAGGGCAACACACTGCCCTACAAC	23
FMC63 VH CDR1	DYGVS	6	GAATACGGCGTGTC	24
FMC63 VH CDR2	VIWGSETTYNSALK S	7	GTGATCTGGGGCAGCGAGACCACCTACTACA ACAGCGCCCTGAAGAGC	25
FMC63 VH CDR3	HYYYGGSYAMDY	8	CACTACTACTACGGCGGCAGCTACGCCATGG ACTAC	26
Whitlow リンカー	GSTSGSGKPGSGEGS TKG	9	GGCAGCACCTCCGGCAGCGGCAAGCCTGGCA GCGGCGAGGGCAGCACCAGGGC	27
ヒト GM-CSF 受容体 α 鎖 N 末端シグナル配列	MLLLVTSILLCELP PAFLIP	10	ATGCTGCTGCTGGTGACAGCCTGCTGCTGT GTGAGCTGCCCCACCCCGCCTTTCTGCTGAT CCCC	28

【0137】

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

説明	アミノ酸配列	配列番号	ポリヌクレオチド配列	配列番号
FMC63 VL-VH scFv (N末端シグナル配列を含まない)	MLLLVTSLLLCELP PAFLLLIPDIQMTQT SSLSASLGDRVITIS RASQDISKYLNWYQQ KPDGTVKLLIYHTSR LHSGVPSRFSGSGSG TDYSLTISNLEQEDI ATYFCQQGNTLPYTF GGGTKLEITGSTSGS GKPGSGEGSTKGEVK LQESGPGLVAPSQSL SVTCTVSGVSLPDYG VSWIRQPPRKGLEWL GVIWGSETTYNSAL KSRLTIKDNSKSQV FLKMNSLQTDDAIY YCAKHYYYGGSYAMD YWGQGTSVTVSS	11	ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGT GTGAGCTGCCCCACCCCGCCTTTCTGCTGAT CCCCGACATCCAGATGACCCAGACCACCTCC AGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGACCGGGTGA CCATCAGCTGCCGGGCCAGCCAGGACATCAG CAAGTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCC GACGGCAOCCGTCAAGCTGCTGATCTACCACA CCAGCCGGCTGCACAGCGGCGTGCCAGCCG GTTTAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTAC AGCCTGACCATCTCCAACCTGGAGCAGGAGG ACATCGCCACCTACTTTTGCCAGCAGGGCAA CACACTGCCCTACACCTTTGGCGGCGGAACA AAGCTGGAGATCACCGGCAGCACCTCCGGCA GCGGCAAGCCTGGCAGCGGCGAGGGCAGCAC CAAGGGCAGGTGAAGCTGCAGGAGAGCGGC CCTGGCCTGGTGGCCCCCAGCCAGAGCCTGA GCGTGACCTGTACCGTGTCCGGCGTGTCCCT GCCCGACTACGGCGTGTCTGGATCCGGCAG CCCCCTAGGAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGCG TGATCTGGGGCAGCGAGACCACCTACTACAA CAGCGCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATC AAGGACAACAGCAAGAGCCAGGTGTCTCTGA AGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGC CATCTACTACTGTGCCAAGCACTACTACTAC GGCGGCAGCTACGCCATGGACTACTGGGGCC AGGGCACCAAGCGTGACCGTGTCCAGC	29
FMC63 VL-VH scFv (N末端シグナル配列を含まない)	DIQMTQTSSLSASL GDRVITISCRASQDIS KYLNWYQQKPDGTVK LLIYHTSR LHSGVPS RFSGSGSGTDYSLTI SNLEQEDIATYFCQQ GNTLPYTFGGGKLE ITGSTSGSGKPGSGE GSTKGEVKLQESGPG LVAPSQSLSVTCTVS GVSLPDYGVSWIRQP PRKGLEWLGVWGSE TTYNSALKSRLTII KDNSKSQVFLKMNSL QTDDAIYYCAKHYY YGGSYAMDYWGQGT SVTVSS	12	GACATCCAGATGACCCAGACCACCTCCAGCC TGAGCGCCAGCCTGGGCGACCGGGTGACCAT CAGCTGCCGGGCCAGCCAGGACATCAGCAAG TACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGACG GCACCGTCAAGCTGCTGATCTACCACACCAG CCGGCTGCACAGCGGCGTGCCAGCCGGTTT AGCGGCAGCGGCTCCGGCAOCCACTACAGCC TGACCATCTCCAACCTGGAGCAGGAGGACAT CGCCACCTACTTTTGCCAGCAGGGCAACACA CTGCCCTACACCTTTGGCGGCGGAACAAAGC TGGAGATCACCGGCAGCACCTCCGGCAGCGG CAAGCCTGGCAGCGGCAGGGCAGCACCAAG GGCGAGGTGAAGCTGCAGGAGAGCGGCCCTG GCCTGGTGGCCCCAGCCAGAGCCTGAGCGT GACCTGTACCGTGTCCGGCGTGTCCCTGCC GACTACGGCGTGTCTGGATCCGGCAGCCCC CTAGGAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGCGTGAT CTGGGGCAGCGAGACCCTACTACAAACAGC GCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGG ACAACAGCAAGAGCCAGGTGTCTCTGAAGAT GAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATC TACTACTGTGCCAAGCACTACTACTACGGCG GCAGCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGG CACCAGCGTGACCGTGTCCAGC	30

【0138】

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

説明	アミノ酸配列	配列番号	ポリヌクレオチド配列	配列番号
FMC63 VH-VL scFv (N末端シグナル配列を含まない)	MLLLVTSLLLCELP PAFLLIPEVKLQESG PGLVAPSQSLSVTCT VSGVSLPFDYGVSWIR QPFRKLEWLGVWIG SETTYYNALKSRLT IIKDNSKSQVFLKMN SLQTDDTAIYYCAKH YYYGGSYAMDYWGQG TSVTVSSGSTSGSGK PGSGEGSTKGDIQMT QTTSSLSASLGDRVT ISCRASQDISKYLNW YQQKPDGTVKLLIYH TSRLHSGVPSRFSGS GSGTDYSLTISNLEQ EDIATYFCQQGNTLP YTFGGGTKEIT	13	ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGT GTGAGCTGCCCCACCCCGCCTTTCTGCTGAT CCCCGAGGTGAAGCTGCAGGAGAGCGGCCCT GGCCTGGTGGCCCCAGCCAGAGCCTGAGCG TGACCTGTACCGTGTCCGGCGTGTCCCTGCC CGACTACGGCGTGTCTGGATCCGGCAGCCC CCTAGGAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGCGTGA TCTGGGGCAGCGAGACCACCTACTACAACAG CGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAG GACAACAGCAAGAGCCAGGTGTCTTGAAGA TGAACAGCCTGCAGACCGACACCGCCAT CTACTACTGTGCCAAGCACTACTACTACGGC GGCAGCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGG GCACAGCGTGACCGTGTCCAGCGGCAGCAC CTCCGGCAGCGGCAAGCCTGGCAGCGCGAG GGCAGCAACAGGGCGACATCCAGATGACCC AGACCACCTCCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGG CGACCGGGTGACCATCAGCTGCCGGGCCAGC CAGGACATCAGCAAGTACCTGAACCTGGTATC AGCAGAAGCCCGACGGCACCGTCAAGCTGCT GATCTAACCACACCGCCGGCTGCACAGCGGC GTGCCAGCGGTTTAGCGGCAGCGGCTCCG GCACCGACTACAGCCTGACCATCTCCAACCT GGAGCAGGAGACATCGCCACCTACTTTTGC CAGCAGGGCAACACACTGCCCTACACCTTTG GCGCGGAACAAAGCTGGAGATCACC	31
FMC63 VH-VL scFv (N末端シグナル配列を含まない)	EVKLQESGPGLVAPS QSLSVTCTVSGVSLP DYGVSWIRQPFRKGL EWLGVIWGETTYYN SALKSRLTIKDNSK SQVFLKMNSLQTDDT AIYYCAKHYYYGGSY AMDYWGQGSVTVSS GSTSGSGKPGSGEGS TKGDIQMTQTTSSLS ASLGDRVTISCRASQ DISKYLNWYQQKPDG TVKLLIYHTSRLHSG VPSRFSGSGSGTDYS LTISNLEQEDIATYF CQQGNTLPYTFGGGT KLEIT	14	GAGGTGAAGCTGCAGGAGAGCGGCCCTGGCC TGGTGGCCCCCAGCCAGAGCCTGAGCGTGAC CTGTACCGTGTCCGGCGTGTCCCTGCCCAGC TACGGCGTGTCTGGATCCGGCAGCCCCCTA GGAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTG GGGCAGCGAGACCACCTACTACAACAGCGCC CTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACA ACAGCAAGAGCCAGGTGTCTTGAAGATGAA CAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATCTAC TACTGTGCCAAGCACTACTACTACGGCGGCA GCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCAC CAGCGTGACCGTGTCCAGCGGCAGCACCTCC GGCAGCGGCAAGCCTGGCAGCGGCAGGGGCA GCACCAAGGGCGACATCCAGATGACCCAGAC CACCTCCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGAC CGGGTGACCATCAGCTGCCGGGCCAGCCAGG ACATCAGCAAGTACCTGAACTGGTATCAGCA GAAGCCCAGCGGCACCGTCAAGCTGCTGATC TACCACACCAGCGGCTGCACAGCGGCGTGC CCAGCCGGTTTAGCGGCAGCGGCTCCGGCAC CGACTACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAG CAGGAGGACATCGCCACCTACTTTTGCCAGC AGGGCAACACACTGCCCTACACCTTTGGCGG CGGAACAAAGCTGGAGATCACC	32

【0139】

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

説明	アミノ酸配列	配列番号	ポリヌクレオチド配列	配列番号
FMC63 VL-VH scFv バリアント A (N 末端シグナル配列を含む)	MALFVTAALLPLALL LHAARPDIQMTQTTS SLSASLGDRVITISCR ASQDISKYLWYQQK PDGTVKLLIYHTSRL HSGVFSRFSGSGSGT DYSLTISNLEQEDIA TYFCQQGNTLPYTFG GGTKLEITGGGSGGG GGSGGGSEVKKLQES GPGLVAFPSQSLSVTC TVSGVSLPDYGVSWI RQPPRKGLLEWLGVW GSETTYYNALKSRL TIIKDNSKSVFLKM NSLQTDITAIYYCAK HYYYGGSYAMDYWGQ GTSVTVSS	15	ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGC CGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCC GGACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCC CTGTCTGCTCTCTGGGAGACAGAGTCAACA TCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAA ATATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGAT GGAAGTGTAAACTCCTGATCTACCATACAT CAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTT CAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATCT CTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATA TTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATAC GCTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAG CTGGAGATCACAGGTGGCGGTGGCTCGGGCG GTGGTGGGTGGGTGGCGGCGGATCTGAGGT GAAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTG GCGCCCTCACAGAGCCTGTCCGTACATGCA CTGTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGG TGTAAGCTGGATTCCGCAGCCTCCACGAAAG GGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTA GTGAAACCACATACTATAAATTCAGCTCTCAA ATCCAGACTGACCATCATCAAGGCAACTCC AAGAGCCAAGTTTCTTAAAAATGAACAGTC TGCAAACTGATGACACAGCCATTTACTACTG TGCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTAT GCTATGGACTACTGGGGCCAAGGAACCTCAG TCACCGTCTCCTCA	33
FMC63 VL-VH scFv バリアント A (N 末端シグナル配列を含まない)	DIQMTQTTSLSASL GDRVITISCRASQDIS KYLWYQQKPDGTVK LLIYHTSRLHSGVPS RFSGSGSGTDYSLTI SNLEQEDIATYFCQQ GNTLPYTFGGGKLE ITGGGSGGGGSGGG GSEVKKLQESGPGIVA PSQSLSVTCTVSGVS LPDYGVSWIRQPPRK GLEWLGVWGGSETTY YNSALKSRLTIIKDN SKSVFLKMNLSLQTD DTAIYYCAKHYYYGG SYAMDYWGQTSVTV SS	16	GACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCC TGCTGCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCAT CAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAA TATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGATG GAAGTGTAAACTCCTGATCTACCATACATC AAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTT AGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATCTC TCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATAT TGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACG CTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGC TGGAGATCACAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGG TGGTGGGTGGGTGGCGGCGGATCTGAGGTG AAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCTGGTGG CGCCCTCACAGAGCCTGTCCGTACATGCAC TGCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGT GTAAGCTGGATTGCGCCAGCCTCCACGAAAG GTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAG TGAAACCACATACTATAAATTCAGCTCTCAA TCCAGACTGACCATCATCAAGGCAACTCCA AGAGCCAAGTTTCTTAAAAATGAACAGTCT GCAAACTGATGACACAGCCATTTACTACTGT GCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATG CTATGGACTACTGGGGCCAAGGAACCTCAGT CACCGTCTCCTCA	34
バリアント A リンカー	GGGSGGGSGGGSGGS	17	GGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGG GTGGCGGCGGATCT	35
バリアント A N 末端シグナル配列	MALFVTAALLPLALL LHAARF	18	ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGC CGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCC G	36

【0140】

5. 2. 2 ヒンジドメイン

いくつかの実施形態では、CARは、本明細書でヒンジドメインと称される抗原結合ドメインと膜貫通ドメインとの間に位置するアミノ酸配列を含む。ヒンジドメインは、CARが細胞表面上で発現されるとき、細胞の膜からの抗原結合ドメインの最適な距離を提供することができる。ヒンジドメインはまた、抗原結合ドメインがその標的抗原に結合するための最適な柔軟性を提供することができる。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、免疫エフェクター細胞の表面上に発現される天然に存在するタンパク質の細胞外領域に由来する。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、免疫エフェクター細胞の表面

上に発現される天然に存在するタンパク質のヒンジドメインに由来する。いくつかの実施形態では、免疫エフェクター細胞は、T細胞である。いくつかの実施形態では、T細胞は、CD4+T細胞である。いくつかの実施形態では、T細胞は、CD8+T細胞である。

【0141】

いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、抗原結合ドメインのC末端に直接的に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、抗原結合ドメインのC末端に間接的に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、ペプチドリinkerを介して、抗原結合ドメインのC末端に間接的に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、膜貫通ドメインのN末端に直接的に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、膜貫通ドメインのN末端に間接的に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、ペプチドリinkerを介して、膜貫通ドメインのN末端に間接的に作動可能に連結されている。

10

【0142】

いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、ヒトCD8 α (hCD8 α) に由来する。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、hCD8 α のヒンジドメインを含む。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、配列番号37のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、配列番号37のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインのアミノ酸配列は、配列番号37のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一の配列からなる。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインのアミノ酸配列は、配列番号37のアミノ酸配列からなる。

20

【0143】

いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、配列番号38のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、配列番号38のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインのアミノ酸配列は、配列番号38のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一の配列からなる。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインのアミノ酸配列は、配列番号38のアミノ酸配列からなる。

30

【0144】

いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、配列番号40のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、配列番号40のポリヌクレオチド配列によってコードされる。

【0145】

いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、配列番号41のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、配列番号41のポリヌクレオチド配列によってコードされる。

40

【0146】

いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、ヒトCD28 (hCD28) に由来する。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、hCD28のヒンジドメインを含む。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、配列番号39のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、配列番号39のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインのアミノ酸配列は、配列番号39のアミノ酸配列

50

に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一の配列からなる。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインのアミノ酸配列は、配列番号39のアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、配列番号42のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、配列番号42のポリヌクレオチド配列をコードされる。

【0147】

例示的なヒンジドメインのアミノ酸配列及びポリヌクレオチド配列を本明細書の表2に示す。

【0148】

【表2】

表2. 例示的なヒンジドメインのアミノ酸及びポリヌクレオチド配列。

説明	アミノ酸配列	配列番号	ポリヌクレオチド配列	配列番号
hCD8 α ヒンジドメイン	KPTTTPAPRPPTPAPTIASQP LSLRPEACRPAAGGAVHTRGL DFACD	37	AAGCCCAACCACACCCCTGCC CTAGACCTCCAACCCAGCCCC TACAATCGCCAGCCAGCCCTG AGCCTGAGGCCCGAAGCCTGTA GACCTGCCGCTGGCGGAGCCGT GCACACCAGAGGCCTGGATTTC GCCTGCGAC	40
hCD8 α ヒンジドメイン (修飾された)	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACD	38	ACCACGACGCCAGCGCCGCGAC CACCAACACCGGCGCCACCAT CGCGTGCAGCCCTGTCCCTG CGCCAGAGGCGTGCCGGCCAG CGCGGGGGGCGCAGTGCACAC GAGGGGGCTGGACTTCGCCTGT GAT	41
hCD28 ヒンジドメイン	AAAIEVMYPPFYLDNEKSNGT IIHVKGKHLCPSPFPGPSKP	39	GCGGCCGCAATTGAAGTTATGT ATCCTCCTCCTTACCTAGACAA TGAGAAGAGCAATGGAACCATT ATCCATGTGAAAGGGAACACC TTTGTCCAAGTCCCCTATTTC CGGACCTTCTAAGCCC	42

【0149】

5.2.3 膜貫通ドメイン

CARの膜貫通ドメインは、CARを細胞の形質膜に埋め込むように機能する。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、抗原結合ドメインのC末端に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、抗原結合ドメインのC末端に直接的に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、抗原結合ドメインのC末端に間接的に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、ペプチドリンカーを介して、抗原結合ドメインのC末端に間接的に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、ヒンジドメインを介して、抗原結合ドメインのC末端に間接的に作動可能に連結されている。

【0150】

いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、ヒンジドメインのC末端に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、ヒンジドメインのC末端に直接的に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、ヒンジドメインのC末端に間接的に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、ペプチドリンカーを介して、ヒンジドメインのC末端に間接的に作動可能に連結されている。

【0151】

いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、細胞質ドメインのN末端に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、細胞質ドメインのN末端に直接的に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、細胞

質ドメインのN末端に間接的に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、ペプチドリンカーを介して、細胞質ドメインのN末端に間接的に作動可能に連結されている。

【0152】

いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、免疫エフェクター細胞の表面上に発現される天然に存在する膜貫通タンパク質の膜貫通ドメインに由来する。いくつかの実施形態では、免疫エフェクター細胞は、T細胞である。いくつかの実施形態では、T細胞は、CD8+T細胞である。いくつかの実施形態では、T細胞は、CD4+T細胞である。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメイン及びヒンジドメインは、免疫エフェクター細胞の表面上に発現される同じ天然に存在する膜貫通タンパク質に由来する。

10

【0153】

いくつかの実施形態では、膜貫通は、CD8 α 、CD28、TCR α 、TCR β 、TCR ζ 、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CDS、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、及びCD154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に由来する。

【0154】

あるいは、膜貫通ドメインは、合成（すなわち、天然に存在する膜貫通タンパク質に由来しない）であり得る。いくつかの実施形態では、合成膜貫通ドメインは、主に疎水性アミノ酸残基（例えば、ロイシン及びバリン）を含む。いくつかの実施形態では、フェニルアラニン、トリプトファン、及びバリンのトリプレットは、合成膜貫通ドメインの各末端に見出される。

20

【0155】

いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、hCD8 α の膜貫通ドメイン、又はその機能的断片若しくは機能的バリエーションを含む。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、配列番号43のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、配列番号43のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインのアミノ酸配列は、配列番号43のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一の配列からなる。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインのアミノ酸配列は、配列番号43のアミノ酸配列からなる。

30

【0156】

いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、配列番号44のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、配列番号44のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインのアミノ酸配列は、配列番号44のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一の配列からなる。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインのアミノ酸配列は、配列番号44のアミノ酸配列からなる。

【0157】

いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、hCD28の膜貫通ドメイン、又はその機能的断片若しくは機能的バリエーションを含む。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、配列番号45のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、配列番号45のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインのアミノ酸配列は、配列番号45のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一の配列からなる。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインのアミノ酸配列は、配列番号45のアミノ酸配列からなる。

40

【0158】

いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、配列番号49のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、

50

10

20

30

40

50

50

いくつかの実施形態では、ヒンジ領域及び膜貫通ドメインは、合わせて、配列番号 53 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % 同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ヒンジ領域及び膜貫通ドメインは、合わせて、配列番号 53 のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ヒンジ領域及び膜貫通ドメインは、合わせて、配列番号 54 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99

%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ヒンジ領域及び膜貫通ドメインは、合わせて、配列番号54のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ヒンジ領域及び膜貫通ドメインは、合わせて、配列番号55のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ヒンジ領域及び膜貫通ドメインは、合わせて、配列番号55のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、合わせて配列番号56のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされるヒンジ領域及び膜貫通ドメイン。いくつかの実施形態では、ヒンジ領域及び膜貫通ドメインは、合わせて、配列番号56のポリヌクレオチド配列によってコードされる。

10

【0163】

例示的な膜貫通ドメイン及びヒンジ、並びに膜貫通ドメインのアミノ酸配列及びポリヌクレオチド配列を本明細書の表3に示す。

【0164】

20

30

40

50

【表 3】

表 3. 例示的な膜貫通ドメインのアミノ酸及びポリヌクレオチド配列、並びにヒンジ領域及び膜貫通ドメイン融合物。

説明	アミノ酸配列	配列番号	ポリヌクレオチド配列	配列番号
ヒト CD8 α 膜貫通ドメイン	IYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCNHRN	43	ATCTACATCTGGGCCCTCTGG CCGGCACCTGTGGCGTCTGCT GCTGAGCCTGGTCATCACCTG TACTGCAACCACCGGAAT	49
			ATCTACATCTGGGCCCTCTGG CCGGCACCTGTGGCGTCTGCT GCTGAGCCTGGTCATCACCTG TACTGCAACCACCGGAAT	50
ヒト CD8 α 膜貫通ドメイン (修飾された)	IYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYC	44	ATCTACATCTGGGCCCTCTGG CCGGGACTTGTGGGGTCTTCT CCTGTCACTGGTTATCACCTT TACTGC	51
ヒト CD28 膜貫通ドメイン	FWVLVVVGGVLACYSLLVTA FIIFWV	45	TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTG GGGGAGTCTCTGGCTTGCTATAG CTTGCTAGTAACAGTGGCCTTT ATTATTTCTGGGTG	52
ヒト CD8 α ヒンジ及びヒト CD8 α 膜貫通ドメイン	KPTTTPAPRPPTPAPTIASQP LSLRPEACRPAAGGAVHTRGL DFACDIYIWAPLAGTCGVLLSL VITLYCNHRN	46	AAGCCCAACCACCCCTGCCC CTAGACCTCCAACCCAGCCCC TACAATCGCCAGCCAGCCCTG AGCCTGAGGCCCGAAGCCTGTA GACCTGCCGCTGGCGGAGCCGT GCACACCAGAGGCCTGGATTTC GCCTGCGACATCTACATCTGGG CCCCCTGTGGCCGGCACCTGTGG CGTGCTGCTGCTGAGCCTGGTC ATCACCTGTACTGCAACCACC GGAAT	53
			AAGCCCAACCACCCCTGCCC CTAGACCTCCAACCCAGCCCC TACAATCGCCAGCCAGCCCTG AGCCTGAGGCCCGAAGCCTGTA GACCTGCCGCTGGCGGAGCCGT GCACACCAGAGGCCTGGATTTC GCCTGCGACATCTACATCTGGG CACCTGTGGCCGGCACCTGTGG CGTGCTGCTGCTGAGCCTGGTC ATCACCTGTACTGCAACCACC GGAAT	54
ヒト CD8 α ヒンジ (修飾された) 及びヒト CD8 α 膜貫通ドメイン (修飾された)	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACDIYIWAPLAGTCGVLLSL VITLYC	47	ACCACGACGCCAGCGCCGCGAC CACCACACCCGGCGCCACCAT CGCGTCGACGCCCTGTCCCTG CGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAG CGGCGGGGGCGCAGTGCACAC GAGGGGGCTGGACTTCGCCCTGT GATATCTACATCTGGGCGCCCT TGGCCGGGACTTGTGGGGTCT TCTCCTGTCACTGGTTATCACC CTTTACTGC	55
ヒト CD28 ヒンジ及びヒト CD28 膜貫通ドメイン	AAAIEVMYPPPYLDNEKSN GTIIHVKGKHLCPSPLEPGPSKP FWVLVVVGGVLACYSLLVTA FIIFWV	48	GCGGCGCAATTGAAGTTATGT ATCCTCCTCCTTACCTAGACAA TGAGAAGAGCAATGGAACCATT ATCCATGTGAAAGGGAAACACC TTTGTCCAAGTCCCTATTTC CGGACCTTCTAAGCCCTTTTGG GTGCTGGTGGTGGTTGGGGGAG TCCTGGCTTGCTATAGCTTGCT AGTAACAGTGGCCTTATTATT TTCTGGGTG	56

【0165】

5. 2. 4 細胞質ドメイン

本明細書に記載の CAR の細胞質ドメインは、少なくとも、抗原依存性一次活性化を開始する一次シグナル伝達ドメインと、任意選択的に、共刺激シグナルを提供するための 1 つ以上の共刺激ドメインと、を含む。

【0166】

いくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、膜貫通ドメインの C 末端に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、膜貫通ドメインの C 末端に直接的に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、膜貫

10

20

30

40

50

通ドメインのC末端に間接的に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、ペプチドリンカーを介して、膜貫通ドメインのC末端に間接的に作動可能に連結されている。

【0167】

いくつかの実施形態では、一次シグナル伝達ドメインは、少なくとも1つの免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ（ITAM）を含む。例示的な一次シグナル伝達ドメインとしては、限定されないが、CD3 ζ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、FcR γ 、FcR β 、CDS、CD22、CD79a、CD79b、及びCD66dのシグナル伝達ドメイン、並びにその機能的断片及び機能的バリエーションが挙げられる。いくつかの実施形態では、一次シグナル伝達ドメインは、CD3 ζ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、FcR γ 、FcR β 、CDS、CD22、CD79a、CD79b、又はCD66dに由来する。いくつかの実施形態では、一次シグナル伝達ドメインは、CD3 ζ 細胞内シグナル伝達ドメイン、又はその機能的断片若しくは機能的バリエーションを含む。いくつかの実施形態では、一次シグナル伝達ドメインは、ヒトCD3 ζ に由来する。

10

【0168】

いくつかの実施形態では、一次シグナル伝達ドメインを含む細胞質ドメインは、配列番号60のアミノ酸配列に対して少なくとも少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、一次シグナル伝達ドメインを含む細胞質ドメインは、配列番号60のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、一次シグナル伝達ドメインを含む細胞質ドメインのアミノ酸配列は、配列番号60のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一の配列からなる。いくつかの実施形態では、一次シグナル伝達ドメインを含む細胞質ドメインのアミノ酸配列は、配列番号60のアミノ酸配列からなる。

20

【0169】

いくつかの実施形態では、一次シグナル伝達ドメインを含む細胞質ドメインは、配列番号67のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、一次シグナル伝達ドメインを含む細胞質ドメインは、配列番号67のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、一次シグナル伝達ドメインを含む細胞質ドメインは、配列番号68のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、一次シグナル伝達ドメインを含む細胞質ドメインは、配列番号68のポリヌクレオチド配列によってコードされる。

30

【0170】

いくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、少なくとも1つの共刺激ドメインを含む。いくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、複数の共刺激ドメインを含む。いくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、一次シグナル伝達ドメインと、1つの共刺激ドメインと、を含む。いくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、一次シグナル伝達ドメインと、2つの共刺激ドメインと、を含み、2つの共刺激ドメインは、同じであってもよく、又は異なってもよい。いくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、一次シグナル伝達ドメインと、3つの共刺激ドメインと、を含み、3つの共刺激ドメインは、各々独立して、3つの共刺激ドメインのうちの別の1つと同じであってもよく、又は異なってもよい。

40

【0171】

いくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、CD28、4-1BB、OX40、CD27、CD30、CD40、PD-1、ICOS、LFA1、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、DAP10、及びDAP12からなる群から選択されるタンパク質の共刺激ドメイン、又はその機能的断片若しくはバリエーションを含む。いくつかの実施形態では、タンパク質は、CD28である。いくつかの実施形態では、タンパク質は

50

、 4-1BB である。

【0172】

いくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、CD28の共刺激ドメイン、又はその機能的断片若しくは機能的バリエーションを含む。いくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、配列番号57のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、配列番号57のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、配列番号58のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、配列番号58のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、細胞質ドメインのアミノ酸配列は、配列番号57のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一の配列からなる。いくつかの実施形態では、細胞質ドメインのアミノ酸配列は、配列番号57のアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、細胞質ドメインのアミノ酸配列は、配列番号58のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一の配列からなる。いくつかの実施形態では、細胞質ドメインのアミノ酸配列は、配列番号58のアミノ酸配列からなる。

10

【0173】

いくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、配列番号64のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、配列番号64のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、配列番号65のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、配列番号65のポリヌクレオチド配列によってコードされる。

20

【0174】

いくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、4-1BBの共刺激ドメイン、又はその機能的断片若しくは機能的バリエーションを含む。いくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、配列番号59のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、配列番号59のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、細胞質ドメインのアミノ酸配列は、配列番号59のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一の配列からなる。いくつかの実施形態では、細胞質ドメインのアミノ酸配列は、配列番号59のアミノ酸配列からなる。

30

【0175】

いくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、配列番号66のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、配列番号66のポリヌクレオチド配列によってコードされる。

40

【0176】

一次シグナル伝達ドメインは、1つ以上の共刺激ドメインに直接的又は間接的に作動可能に連結され得る。いくつかの実施形態では、一次シグナル伝達は、共刺激ドメインに直接的に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、一次シグナル伝達ドメインは、共刺激ドメインに間接的に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、一次シグナル伝達ドメインは、ペプチドリンカーを介して、共刺激ドメインに間接的に作動可能に連結される。いくつかの実施形態では、共刺激ドメインは、一次シグナル伝達ドメインのN末端に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、共刺激ドメインは

50

、一次シグナル伝達ドメインのN末端に直接的に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、共刺激ドメインは、一次シグナル伝達ドメインのN末端に間接的に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、共刺激ドメインは、ペプチドリinkerを介して、一次シグナル伝達ドメインのN末端に間接的に作動可能に連結されている。

【0177】

一次シグナル伝達ドメインは、膜貫通ドメインに直接的又は間接的に作動可能に連結され得る。いくつかの実施形態では、一次シグナル伝達ドメインは、膜貫通ドメインに直接的に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、一次シグナル伝達ドメインは、膜貫通ドメインに間接的に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、一次シグナル伝達ドメインは、ペプチドリinkerを介して、膜貫通ドメインに間接的に作動可能に連結されている。

10

【0178】

共刺激ドメインは、膜貫通ドメインに直接的又は間接的に作動可能に連結され得る。いくつかの実施形態では、共刺激ドメインは、膜貫通ドメインに直接的に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、共刺激ドメインは、膜貫通ドメインに間接的に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、共刺激ドメインは、ペプチドリinkerを介して、膜貫通ドメインに間接的に作動可能に連結されている。

【0179】

いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD28の共刺激ドメイン、又はその機能的バリエーション若しくは機能的断片と、CD3ζのシグナル伝達ドメイン、又はその機能的断片若しくは機能的バリエーションと、を含む。いくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、配列番号61のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、配列番号61のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、配列番号63のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、配列番号63のアミノ酸配列を含む。

20

【0180】

いくつかの実施形態では、細胞質ドメインのアミノ酸配列は、配列番号61のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一の配列からなる。いくつかの実施形態では、細胞質ドメインのアミノ酸配列は、配列番号61のアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、細胞質ドメインのアミノ酸配列は、配列番号63のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一の配列からなる。いくつかの実施形態では、細胞質ドメインのアミノ酸配列は、配列番号63のアミノ酸配列からなる。

30

【0181】

いくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、配列番号69のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、配列番号69のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、配列番号71のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、配列番号71のポリヌクレオチド配列によってコードされる。

40

【0182】

いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、4-1BBの共刺激ドメイン、又はその機能的バリエーション若しくは機能的断片と、CD3ζの一次シグナル伝達ドメイン、又はその機能的断片若しくは機能的バリエーションと、を含む。いくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、配列番号62のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%

50

、 97 %、 98 %、 99 %、 又は 100 % 同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、配列番号 62 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、細胞質ドメインのアミノ酸配列は、配列番号 62 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 %、 96 %、 97 %、 98 %、 99 %、 又は 100 % 同一の配列からなる。いくつかの実施形態では、細胞質ドメインのアミノ酸配列は、配列番号 62 のアミノ酸配列からなる。

【 0 1 8 3 】

いくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、配列番号 70 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 75 %、 80 %、 85 %、 90 %、 95 %、 96 %、 97 %、 98 %、 99 %、 又は 100 % 同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、配列番号 70 のポリヌクレオチド配列によってコードされる。

10

【 0 1 8 4 】

一次シグナル伝達ドメイン、共刺激ドメイン、及び細胞内シグナル伝達ドメインを含む例示的な細胞質ドメインのアミノ酸配列及びポリヌクレオチド配列を本明細書の表 4 に示す。

【 0 1 8 5 】

20

30

40

50

【表 4 - 1】

表 4. 例示的な細胞質ドメインのアミノ酸及びポリヌクレオチド配列。

説明	アミノ酸配列	配列番号	ポリヌクレオチド配列	配列番号
ヒト CD28 細胞質ドメイン(修飾された)	RSKRSRGHSDYMNMTPRRPG PTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	57	AGGAGCAAGCGGAGCAGAGGCG GCCACAGCGACTACATGAACAT GACCCCCCGGAGGCCTGGCCCC ACCCGGAAGCACTACCAGCCCT ACGCCCCCTCCAGGGACTTCGC CGCCTACCGGAGC	64
ヒト CD28 細胞質ドメイン	RSKRSRLHSDYMNMTPRRPG PTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	58	AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCC TGCACAGTGA CTACATGAACAT GACTCCCCCGCGCCCCGGGCC ACCCGCAAGCATTACCAGCCCT ATGCCCCACCAAGCGACTTCGC AGCCTATCGCTCC	65
ヒト 4-1BB 細胞質ドメイン	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT TQEEDGCSCRFEEEEGGCEL	59	AAACGGGGCAGAAAGAACTCC TGTATATATTCAAACAACCATT TATGAGACCAGTACAACTACT CAAGAGGAAGATGGCTGTAGCT GCCGATTTCCAGAAGAAGAAGA AGGAGGATGTGAACTG	66
ヒト CD3ζ細胞質ドメイン	RVKFSRSADAPAYQQGNQLY NELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALH MQALPPR	60	CGGGTGAAGTTCAGCCGGAGCG CCGACGCCCTGCCTACCAGCA GGGCCAGAACCACTGTACAAC GAGCTGAACCTGGGCCGGAGGG AGGAGTACGACGTGCTGGACAA GCGGAGAGGCCGGGACCCTGAG ATGGGCGGCAAGCCCCGGAGAA AGAACCCTCAGGAGGGCCTGTA TAACGAACCTGCAGAAAGACAAG ATGGCCGAGGCCTACAGCGAGA TCGGCATGAAGGGCGAGCGCG GAGGGGCAAGGGCCACGACGGC CTGTACCAGGGCCTGAGCAACG CCACCAAGGATACCTACGACGC CCTGCACATGCAGGCCCTGCCC CCCAGA	67
			AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCG CAGACGCCCCCGGTACCAGCA GGGCCAGAACCACTCTATAAC GAGCTCAATCTAGGACGAAGAG AGGAGTACGATGTTTTGGACAA GAGACGTGGCCGGGACCCTGAG ATGGGGGGAAGCCGAGAAGGA AGAACCCTCAGGAAGGCCTGTA CAATGAACCTGCAGAAAGATAAG ATGGCGGAGGCCTACAGTGAGA TTGGGATGAAAGGCGAGCGCCG GAGGGGCAAGGGGCACGATGGC CTTTACCAGGGTCTCAGTACAG CCACCAAGGACACCTACGACGC CCTTCACATGCAGGCCCTGCCC CCTCGC	68

【 0 1 8 6 】

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

説明	アミノ酸配列	配列番号	ポリヌクレオチド配列	配列番号
ヒト CD28 細胞質 ドメイン(修飾さ れた)及びヒト CD3ζ細胞質ドメ イン	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPG PTRKHYQPYAPPRDFAAYRSR VKFSRSADAPAYQQGQNQLYN ELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKG HDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR	61	AGGAGCAAGCGGAGCAGAGGCG GCCACAGCGACTACATGAACAT GACCCCCCGAGGCCTGGCCCC ACCCGGAAGCACTACCAGCCCT ACGCCCCCTCCAGGGACTTCGC CGCCTACCGGAGCGGGTGAAG TTCAGCCGGAGCGCCGACGCC CTGCCTACCAGCAGGGCCAGAA CCAGCTGTACAACGAGCTGAAC CTGGGCCCGAGGGAGGAGTACG ACGTGCTGGACAAGCGGAGAGG CCGGGACCCCTGAGATGGGCGGC AAGCCCCGGAGAAAGAACCCTC AGGAGGGCCTGTATAACGAACT GCAGAAAGACAAGATGGCCGAG GCCTACAGCGAGATCGGCATGA AGGGCGAGCGCGGAGGGGCAA GGGCCACGACGGCCTGTACCAG GGCCTGAGCACCGCCACCAGG ATACCTACGACGCCCTGCACAT GCAGGCCCTGCCCCCA	69
ヒト 4-1BB 細胞 質ドメイン及び ヒト CD3ζ細胞 質ドメイン	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT TQEEDGCSRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLY NELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALH MQALPPR	62	AAACGGGGCAGAAAGAACTCC TGTATATATTCAAACAACCATT TATGAGACCAGTACAACTACT CAAGAGGAAGATGGCTGTAGCT GCCGATTTCCAGAAGAAGAAGA AGGAGGATGTGAACTGAGAGTG AAGTTCAGCAGGAGCGCAGACG CCCCCGCGTACCAGCAGGGCCA GAACCAAGCTCTATAACGAGCTC AATCTAGGACGAAGAGAGGAGT ACGATGTTTTGGACAAGAGACG TGGCCGGGACCCCTGAGATGGGG GGAAAGCCGAGAAGGAAGAAC CTCAGGAAGGCTGTACAATGA ACTGCAGAAAGATAAGATGGCG GAGGCCTACAGTGAGATTGGGA TGAAAGGCGAGCGCCGAGGGG CAAGGGGCACGATGGCCTTAC CAGGGTCTCAGTACAGCCACCA AGGACACCTACGACGCCCTTCA CATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC	70

【 0 1 8 7 】

10

20

30

40

50

【表 4-3】

説明	アミノ酸配列	配列番号	ポリヌクレオチド配列	配列番号
ヒト CD28 細胞質 ドメイン及びヒ ト CD3 ζ 細胞質 ドメイン	RSKRSRLHSDYMNMTPRPG PTRKHYQPYAPPRDFAAYRSR VKFSRSADAPAYQQGQNLN ELNLGRREYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKG HDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPFR	63	AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCC TGCACAGTGACTACATGAACAT GACTCCCCGCGCCCCGGGCC ACCCGCAAGCATACCAGCCCT ATGCCCCACCACGCGACTTCGC AGCCTATCGCTCCAGAGTGAAG TTCAGCAGGAGCGCAGACGCC CCGCGTACCAGCAGGGCCAGAA CCAGCTCTATAACGAGCTCAAT CTAGGACGAAGAGAGGAGTACG ATGTTTTGGACAAGAGACGTGG CCGGGACCCTGAGATGGGGGA AAGCCGAGAAGGAAGAACCCTC AGGAAGGCCTGTACAATGAAC GCAGAAAGATAAGATGGCGGAG GCCTACAGTGAGATTGGGATGA AAGGCGAGCGCCGAGGGGCAA GGGGCACGATGGCCTTTACCAG GGTCTCAGTACAGCCACCAAGG ACACCTACGACGCCCTTCACAT GCAGGCCCTGCCCTTCGC	71

10

【0188】

5.2.5 例示的な CD19 特異的 CAR

20

例示的な CD19 特異的 CAR のアミノ酸及びポリヌクレオチド配列を、本明細書の表 5 に提供する。いくつかの実施形態では、上述の CAR は、配列番号 72、73、74、75、76、77、78、79、80、又は 81 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% 同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CAR は、配列番号 72 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% 同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CAR は、配列番号 73 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% 同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CAR は、配列番号 74 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% 同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CAR は、配列番号 75 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% 同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CAR は、配列番号 76 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% 同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CAR は、配列番号 77 のアミノ酸配列に対して 95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% 同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CAR は、配列番号 78 のアミノ酸配列に対して 95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% 同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CAR は、配列番号 79 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% 同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CAR は、配列番号 80 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% 同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CAR は、配列番号 81 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% 同一のアミノ酸配列を含む。

30

40

【0189】

いくつかの実施形態では、CAR は、配列番号 72、73、74、75、76、77、78、79、80、又は 81 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CAR は、配列番号 72 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CAR は、配列番号 73 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CAR は、配列番号 74 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CAR は、配列番号 75 のアミノ酸配列を含む。

50

10

20

30

40

50

50

いくつかの実施形態では、CARは、配列番号82、83、84、86、87、88、90、91、92、93、94、又は95のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる

40

50

いくつかの実施形態では、CARは、配列番号82、83、84、86、87、88、90、91、92、93、94、又は95のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、CARは、配列番号82のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、CARは、配列番号83のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、CARは、配列番号84のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、CARは、配列番号86のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、CARは、配列番号87のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド配

列によってコードされる。いくつかの実施形態では、CARは、配列番号88のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、CARは、配列番号90のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、CARは、配列番号91のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、CARは、配列番号92のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、CARは、配列番号93のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、CARは、配列番号94のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、CARは、配列番号95のポリヌクレオチド配列によってコードされる。

【0194】

いくつかの実施形態では、CARは、CAR CTL019のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CARは、CAR CTL019である。いくつかの実施形態では、CARは、CAR T細胞チサゲンレクルユーセルによって発現されるCARのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CARは、CAR T細胞チサゲンレクルユーセルによって発現されるCARである。いくつかの実施形態では、CARは、CAR T細胞KYMRIAH（登録商標）によって発現されるCARのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CARは、CAR T細胞KYMRIAH（登録商標）によって発現されるCARである。いくつかの実施形態では、CARは、CAR KTE-C19のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CARは、CAR KTE-C19である。いくつかの実施形態では、CARは、CAR T細胞アキシカブタゲンシロルユーセル（*axicabtagene ciloleucel*）によって発現されたCARのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CARは、CAR T細胞アキシカブタゲンシロルユーセルによって発現されたCARである。いくつかの実施形態では、CARは、CAR T細胞YESCARTA（登録商標）によって発現されるCARのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CARは、CAR T細胞YESCARTA（登録商標）によって発現されるCARである。

【0195】

追加の例示的なCD19特異的CARは、例えば、US89006682、WO2019/213282、US2020/0268860、WO2020/227177、US10457730、WO2019/159193、US10287350、US10221245、US2019/0125799、WO2018/201794、US2017/0368098、US2016/0145337、US9701758、WO2014/153270、WO2012/079000、WO2019/160956、WO2019/161796、WO2020/222176、WO2020/219848、US2019/0135894、US10774388、WO2020/180882、US10765701、WO2020/172641、WO2020/172440、WO2016/149578、WO2020/124021、WO2020/108646、WO2020/108643、WO2020/113188、WO2020/108644、WO2020/108645、WO2020/108642、US10669549、WO2020/102770、US10501539、WO2020/069409、US10603380、US10533055、WO2020/010235、WO2019/246546に開示され、その各々の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【0196】

10

20

30

40

50

【表 5 - 1】

表 5. 例示的な hCD19 特異的 CAR のアミノ酸及びポリヌクレオチド配列。

説明	アミノ酸配列	配列番号	ポリヌクレオチド配列	配列番号
CD19CAR(N 末端シグナル配列を含み、C 末端テールを含まない)	MLLLVTSLLLCELPHPAFL LIPDIQMTQTSSLSASLG DRVTTISCRASQDISKYLNW YQQKPDGTVKLLIYHTSRL HSGVPSRFSGSGSGTDYSL TISNLEQEDIATYFCQQGN TLPYTFGGGKLEITGSTS GSGKPGSGEGSTKGEVKLQ ESGPGLVAFSQSLSVTCTV SGVSLPDYGVSWIRQPPRK GLEWLGVWIGSETTYNSA LKRLTIKDNSKSQVFLK MNSLQTDDTAIYYCAKHYY YGGSYAMDYWGQGSVTVS SKPTTTPAPRPPTPAPTIA SQPLSLRFEACRPAAGGAV HTRGLDFACDIYIWAPLAG TCGVLLSLVITLYCNHRN RSKRSRGHSDYMNMTFRR FGPTRKHYPYAPPRDFAA YRSRVKFSRSADAPAYQQG QNQLYNELNLGRREYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRGKGHDGLYQG LSTATKDTYDALHMQALP R	72	ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGTG AGCTGCCCCACCCCGCCTTTCTGCTGATCCCCGA CATCCAGATGACCCAGACCACCTCCAGCCTGAGC GCCAGCCTGGGCGACCGGGTGACCATCAGCTGCC GGGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAAGT GTATCAGCAGAAGCCCGACGGCACCGTCAAGCTG CTGATCTACCACACCAGCCGGCTGCACAGCGGCG TGCCAGCCGGTTTAGCGGCAGCGGCTCCGGCAC CGACTACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAGCAG GAGGACATCGCCAOCCTACTTTTGCCAGCAGGGCA ACACACTGCCCTACACCTTTGGCGGCGGAACAAA GCTGGAGATCACCGGCAGCACCTCCGGCAGCGGC AAGCCTGGCAGCGGCAGGGCAGCACCAAGGGCG AGGTGAAGCTGCAGGAGAGCGGCCCTGGCCTGGT GGCCCCAGCCAGAGCCTGAGCGTGACCTGTACC GTGTCCGGCGTGTCCCTGCCCGACTACGGCGTGT CCTGGATCCGGCAGCCCCCTAGGAAGGGCCTGGA GTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGCGAGACCACC TACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCGCGCTGACCA TCATCAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGTGTTCCT GAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCC ATCTACTACTGTGCCAAGCACTACTACTACGGCG GCAGCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCAC CAGCGTGACCGTGTCCAGCAAGCCCACCACCACC CCTGCCCCCTAGACCTCCAACCCAGCCCCCTACAA TCGCCAGCCAGCCCCCTGAGCCTGAGGCCCGAAGC CTGTAGACCTGCCGCTGGCGGAGCCGTGCACACC AGAGGCCTGGATTTCGCCTGCGACATCTACATCT GGGCCCCCTCTGGCCGGCACCTGTGGCGTGCTGCT GCTGAGCCTGGTCATCACCTGTACTGCAACCAC CGGAATAGGAGCAAGCGGAGCAGAGGCGGCCACA GCAGCTACATGAACATGACCCCCCGGAGGCCTGG CCCCACCCGGAAGCACTACCAGCCCTACGCCCT CCCAGGGACTTCGCCGCCTACCGGAGCCGGGTGA AGTTCAGCCGGAGCGCCGACGCCCTGCCTACCA GCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAAC CTGGGCCGGAGGGAGGAGTACGACGTGCTGGACA AGCGGAGAGGCGGGACCTGAGATGGGCGGCAA GCCCCGAGAAAGAACCCTCAGGAGGGCCTGTAT AACGAACCTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCT ACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGCGGAG GGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTACCAGGGCCTG AGCACCGCCACCAAGGATACCTACGACGCCCTGC ACATGCAGGCCCTGCCCCCAGA	82

10

20

30

40

50

【 0 1 9 7 】

【表 5 - 2】

説明	アミノ酸配列	配列番号	ポリヌクレオチド配列	配列番号
			ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGTG AGCTGCCCCACCCCGCCTTTCTGCTGATCCCCGA CATCCAGATGACCCAGACCACCTCCAGCCTGAGC GCCAGCCTGGGCGACCGGGTGACCATCAGCTGCC GGGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTG GTATCAGCAGAAGCCCGACGGCACCGTCAAGCTG CTGATCTACACACACAGCCGGCTGCACAGCGGCG TGCCACAGCCGGTTTAGCGGCAGCGGCTCCGGCAC CGACTACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAGCAG GAGGACATCGCCACCTACTTTTGCCAGCAGGGCA ACACACTGCCCTACACCTTTGGCGGCGGAACAAA GCTGGAGATCACCGGCAGCACCTCCGGCAGCGGC AAGCCTGGCAGCGGCGAGGGCAGCACCAAGGGCG AGGTGAAGCTGCAGGAGAGCGGCCCTGGCCTGGT GGCCCCCAGCCAGAGCCTGAGCGTGACCTGTACC GTGTCCGGCGTGTCCCTGCCCGACTACGGCGTGT CCTGGATCCGGCAGCCCCCTAGGAAGGGCCTGGA GTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGCGAGACCACC TACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCA TCATCAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGTGTCTCT GAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACACACCGCC ATCTACTACTGTGCCAAGCACTACTACTACGGCG GCAGCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCAC CAGCGTGACCGTGTCCAGCAAGCCCACCACCACC CCTGCCCTAGACCTCCAACCCCAGCCCCCTACAA TCGCCAGCCAGCCCTGAGCCTGAGGCCCGAAGC CTGTAGACCTGCCGCTGGCGGAGCCGTGCACACC AGAGGCCTGGATTTCGCCCTGCGACATCTACATCT GGGCACCTCTGGCCGGCACCTGTGGCGTGCTGCT GCTGAGCCTGGTCATCACCCCTGTACTGCAACCAC CGGAATAGGAGCAAGCGGAGCAGAGCGGCCACA GCGACTACATGAACATGACCCCCCGGAGGCCTGG CCCCACCCGGAAGCACTACCAGCCCTACGCCCT CCCAGGGACTTCGCCGCCCTACCGGAGCCGGGTGA AGTTCAGCCGGAGCGCCGACGCCCTGCCTACCA GCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAAC CTGGGCCGGAGGGAGGAGTACGACGTGCTGGACA AGCGGAGAGGCGGGACCCCTGAGATGGGCGGCAA GCCCCGGAGAAAGAACCCTCAGGAGGGCCTGTAT AACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCT ACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGCGGAG GGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTACCAGGGCCTG AGCACCGCCACCAAGGATACCTACGACGCCCTGC ACATGCAGGCCCTGCCCCCAGA	83
				10
				20
				30
				40
				50

【 0 1 9 8 】

【表 5 - 3】

説明	アミノ酸配列	配列番号	ポリヌクレオチド配列	配列番号
CD19CAR(N末端シグナル配列を含み、C末端テールを含む)	MLLLVTSLLLCELPHPAFL LIPDIQMTQTSSLSASLG DRVVISCRASQDISKYLNW YQQKPDGTVKLLIYHTSRL HSGVPSRFSGSGSGTDYSL TISNLEQEDIATYFCQQGN TLPYTFGGGKLEITGSTS GSGKPGSGEGSTKGEVKLQ ESGPGLVAPSQSLSVTCTV SGVSLPDYGVSWIRQPPRK GLEWLGVWGGSETTYNSA LKSRLLTIKDNSKSQVFLK MNSLQTDDTAIYYCAKHYY YGGSYAMDYWGQTSVTVS SKPTTTPAPRPPTPAPTIA SQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDIYIWAPLAG TCGVLLLSLVITLYCNHRN RSKRSRGHS DYMNMTPRR PGPTRKHYPYAPPRDEFAA YRSRVKFSRSADAPAYQQG QNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPFEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRGKGGHDGLYQG LSTATKDYDALHMQALFP RGSGVKQTLNFDLLKLAGD VESNPG	73	ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGTG AGCTGCCCCACCCCGCCTTTCTGCTGATCCCCGA CATCCAGATGACCCAGACCACCTCCAGCCTGAGC GCCAGCCTGGGCGACCGGGTGACCATCAGCTGCC GGGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAAGTG GTATCAGCAGAAAGCCCGACGGCACCGTCAAGCTG CTGATCTACCACACCAGCCGGCTGCACAGCGGCG TGCCACAGCCGGTTTAGCGGCAGCGGCTCCGGCAC CGACTACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAGCAG GAGGACATCGCCACCTACTTTTGCCAGCAGGGCA ACACACTGCCCTACACCTTTGGCGGCGGAACAAA GCTGGAGATCACCGGCAGCACCTCCGGCAGCGGC AAGCCTGGCAGCGGCAGGGCAGCACCAAGGGCG AGGTGAAGCTGCAGGAGAGCGGCCCTGGCCTGGT GGCCCCCAGCCAGAGCCTGAGCGTGACCTGTACC GTGTCCGGCGTGTCCCTGCCCGACTACGGCGTGT CCTGGATCCGGCAGCCCCCTAGGAAGGGCCTGGA GTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGCGAGACCACC TACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCA TCATCAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGTGTTCCT GAAGATGAACAGCCTGCAGACCAGCACACCGCC ATCTACTACTGTGCCAAGCACTACTACTACGGCG GCAGCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCAC CAGCGTGACCGTGTCAGCAAGCCACCACCACC CCTGCCCCCTAGACCTCCAACCCAGCCCTACAA TCGCCAGCCAGCCCTGAGCCTGAGGCCCGAAGC CTGTAGACCTGCCGCTGGCGGAGCCGTGCACACC AGAGGCCTGGATTTCGCCTGCGACATCTACATCT GGGCCCCCTCTGGCGGGCACCTGTGGCGTGCTGCT GCTGAGCCTGGTCATCACCTGTACTGCAACCAC CGGAATAGGAGCAAGCGGAGCAGAGCGGGCCACA GCGACTACATGAACATGACCCCCCGGAGGCCTGG CCCCACCCGGAAGCACTACCAGCCCTACGCCCT CCCAGGGACTTCGCCCGCTACCGGAGCCGGGTGA AGTTCAGCCGGAGCGCCGACGCCCTGCCTACCA GCAGGGCCAGAACAGCTGTACAACGAGCTGAAC CTGGGCCGGAGGGAGGAGTACGACGTGCTGGACA AGCGGAGAGGCCGGGACCTGAGATGGGCGGCAA GCCCCGGAGAAAGAACCCTCAGGAGGGCCTGTAT AACGAAGTGCAGAAAGACAGATGGCCGAGGCCT ACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGCGGAG GGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTACCAGGGCCTG AGCACCGCCACCAAGGATACCTACGACGCCCTGC ACATGCAGGCCCTGCCCCCAGAGGCTCCGGAGT GAAGCAGACCCTGAATTTGACCTGCTGAAGCTG GCCGGGGACGTGGAGAGCAACCCTGGC	84

10

20

30

40

50

【0199】

【表 5 - 4】

説明	アミノ酸配列	配列番号	ポリヌクレオチド配列	配列番号
CD19CAR(N末端シグナル配列を含まず、C末端テールを含まない)	DIQMTQTSSLSASLGDRV TISCRASQDISKYLWYQQ KPDGTVKLLIYHTSRLHSG VPSRFSGSGSGTDYSLTIS NLEQEDIATYFCQQGNTLP YTFGGGKLEITGSTSGSG KPGSGEGSTKGEVKLQESG PGLVAPSQSLSVTCTVSGV SLFDYGVSWIRQPPRKGLE WLGVIWGETTYYSALKS RLTIIKDNSKSVFLKMNS LQTDDTAIYYCAKHYYYGG SYAMDYWGQTSVTVSKEP TTTPAPRPPTPAPTIASQP LSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCG VLLLSLVITLYCNHRNRSK RSRGGHSDYMNMTPRRPGF TRKHYPYAPPRDFAAYS RVKFSRSADAPAYQQQONQ LYNELNLGRREYDVLDR RGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQDKMAEAYSEIGM KGERRRGKHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQALPPR	74	GACATCCAGATGACCCAGACCACTCCAGCCTGA GCGCCAGCCTGGGCGACCGGGTGACCATCAGCTG CCGGGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAAC TGGTATCAGCAGAAGCCCGACGGCACCGTCAAGC TGCTGATCTACCACACCAGCCGGCTGCACAGCGG CGTGCCAGCCGGTTTAGCGGCAGCGGCTCCGGC ACCGACTACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAGC AGGAGGACATCGCCACCTACTTTTGCCAGCAGGG CAACACACTGCCCTACACCTTTTGGCGGCGGAACA AAGCTGGAGATCACCGGCAGCACCTCCGGCAGCG GCAAGCCTGGCAGCGGCGAGGGCAGCACCAAGGG CGAGGTGAAGCTGCAGGAGAGCGGCCCTGGCCTG GTGGCCCCCAGCCAGAGCCTGAGCGTGACCTGTA CCGTGTCCGGCGTGTCCCTGCCCGACTACGGCGT GTCTTGATCCGGCAGCCCCCTAGGAAGGGCCTG GAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGCGAGACCA CCTACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGAC CATCATCAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGTGTTT CTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCAGACACCG CCATCTACTACTGTGCCAAGCACTACTACTACGG CGGCAGCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGC ACCGCGTGACCGTGTCCAGCAAGCCCAACCA CCCCCTGCCCTTAGACCTCCAACCCAGCCCCCTAC AATCGCCAGCCAGCCCCCTGAGCCTGAGGCCCGAA GCCTGTAGACCTGCCGCTGGCGGAGCCGTGCACA CCAGAGGCCCTGGATTTCCGCTGCGACATCTACAT CTGGGCCCCCTCTGGCCGGCACTGTGGCGTGCTG CTGCTGAGCCTGGTCATCACCTGTACTGCAACC ACCGGAATAGGAGCAAGCGGAGCAGAGGGGCCA CAGCGACTACATGAACATGACCCCCCGAGGCCCT GGCCCCACCGGAAGCACTACCAGCCCTACGCC CTCCAGGGACTTCGCCGCCCTACCGGAGCCGGGT GAAGTTCAGCCGAGCGCCGACGCCCTGCCTAC CAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGA ACCTGGGCGGAGGGAGGAGTACGACGTGCTGGA CAAGCGGAGAGGCCGGGACCTGAGATGGGCGGC AAGCCCCGAGAAAGAACCCTCAGGAGGGCCTGT ATAACGAAC'TGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGC CTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGCGG AGGGGCAAGGGGACGACGGCCTGTACCAGGGCC TGAGCACCGCCACCAAGGATACCTACGACGCCCT GCACATGCAGGCCCTGCCCCCAGA	86

10

20

30

40

50

【0200】

【表 5 - 5】

説明	アミノ酸配列	配列番号	ポリヌクレオチド配列	配列番号
			GACATCCAGATGACCCAGACACCTCCAGCCTGA GCGCCAGCCTGGGCGACCGGGTGACCATCAGCTG CCGGGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAAC TGGTATCAGCAGAAGCCCGACGGCACCGTCAAGC TGCTGATCTACCACACCAGCCGGCTGCACAGCGG CGTGCCAGCCGGTTTAGCGGCAGCGGCTCCGGC ACCGACTACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAGC AGGAGGACATCGCCACCTACTTTTGCCAGCAGGG CAACACACTGCCCTACACCTTTGGCGGCGGAACA AAGCTGGAGATCACCGGCAGCACCTCCGGCAGCG GCAAGCCTGGCAGCGGCGAGGGCAGCACCAAGGG CGAGGTGAAGCTGCAGGAGAGCGGCCCTGGCCTG GTGGCCCCCAGCCAGAGCCTGAGCGTGACCTGTA CCGTGTCCGGCGTGTCCCTGCCCGACTACGGCGT GTCTTGATCCGGCAGCCCCCTAGGAAGGGCCTG GAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGCGAGACCA CCTACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGAC CATCATCAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGTGTTT CTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCG CCATCTACTACTGTGCCAAGCACTACTACTACGG CGGCAGCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGC ACCAGCGTGACCGTGTCCAGCAAGCCCAOCCOA CCCCCTGCCCTAGACCTCCAACCCCAAGCCCTAC AATCGCCAGCCAGCCCTGAGCCTGAGGCCCGAA GCCTGTAGACCTGCCGCTGGCGGAGCCGTGCACA CCAGAGGCCCTGGATTTTCGCCTGCGACATCTACAT CTGGGCACCTCTGGCCGGCACTGTGGCGTGCTG CTGCTGAGCCTGGTCATCACCTGTACTGCAACC ACCGGAATAGGAGCAAGCGGAGCAGAGCGGCCA CAGCGACTACATGAACATGACCCCCCGAGGCCCT GGCCCCACCCGGAAGCACTACCAGCCCTACGCC CTCCAGGGACTTCGCCGCCTACCGGAGCCGGGT GAAGTTCAGCCGAGCGCCGACGCCCTGCCTAC CAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGA ACCTGGGCCGGAGGGAGGAGTACGACGTGCTGGA CAAGCGGAGAGGCCGGGACCTGAGATGGGCGGC AAGCCCCGAGAAAGAACCCTCAGGAGGGCCTGT ATAACGAAC'TGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGC CTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGCGG AGGGGCAAGGGCTACGACGGCCTGTACCAGGGCC TGAGCACCGCCACCAAGGATACCTACGACGCCCT GCACATGCAGGCCCTGCCCCCAGA	87
				10
				20
				30

【0201】

【表 5 - 6】

説明	アミノ酸配列	配列番号	ポリヌクレオチド配列	配列番号
CD19CAR(N末端シグナル配列を含まず、C末端テールを含む)	DIQMTQTSSLSASLGDRV TISCRASQDISKYLNWYQQ KPDGTVKLLIYHTSRLHSG VPSRFSGSGSGTDYSLTIS NLEQEDIATYFCQQGNTLP YTFGGGKLEITGSTSGSG KPGSGEGSTKGEVKLQESG PGLVAPSQSLSVTCTVSGV SLFDYGVSWIRQPPRKGLE WLGVIWGSETTYYNALKS RLTIKDNSSKQVFLKMS LQTDDTAIYYCAKHYYYGG SYAMDYWGQTSVTVSSKP TTTPAPRPPTPAPTIASQP LSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCG VLLLSLVITLYCNHRNRSK RSRGGHSDYMNMTPRRPGF TRKHYPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNG LYNELNLGRREYDVLDR RGRDFEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQALPFRGS GVKQTLNFDLLKLAGDVES NPG	75	GACATCCAGATGACCCAGACCACCTCCAGCCTGA GCGCCAGCCTGGGCGACCGGGTGACCATCAGCTG CCGGGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAAC TGGTATCAGCAGAAGCCCGACGGCACCCTCAAGC TGCTGATCTACCACACCAGCCGGCTGCACAGCGG CGTGCCAGCCGGTTTAGCGGCAGCGGGCTCCGGC ACCGACTACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAGC AGGAGGACATCGCCACCTACTTTTGCCAGCAGGG CAACACACTGCCCTACACCTTTGGCGGCAGGAACA AAGCTGGAGATCACCAGCAGCACTCCGCGAGCG GCAAGCCTGGCAGCGCGAGGGCAGCACCAGGG CGAGGTGAAGCTGCAGGAGAGCGGGCCCTGGCCTG GTGGCCCCCAGCCAGAGCCTGAGCGTGACCTGTA CCGTGTCCGGCGTGTCCCTGCCCGACTACGGCGT GTCTGGATCCGGCAGCCCCCTAGGAAGGGCCTG GAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGCGAGACCA CCTACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGAC CATCATCAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGTGTTC CTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCAGCAGACCCG CCATCTACTACTGTGCCAAGCACTACTACTACGG CGGCAGCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGC ACCAAGCGTGACCGTGTCCAGCAAGCCCCACCA CCCCTGCCCCCTAGACCTCCAACCCAGCCCCCTAC AATCGCCAGCCAGCCCCCTGAGCCTGAGGCCCGAA GCCTGTAGACCTGCCGCTGGCGGAGCCGTGCACA CCAGAGGCCCTGGATTTTCGCTGCGACATCTACAT CTGGGCCCTCTGGCCGGCACCTGTGGCGTGCTG CTGCTGAGCCTGGTCATCACCTGTACTGCAACC ACCGGAATAGGAGCAAGCGGAGCAGAGGCGGCCA CAGCGACTACATGAACATGACCCCCCGGAGGCC GGCCCCACCCGGAAGCACTACCAGCCCTACGCC CTCCAGGGACTTCGCCGCTACCGGAGCCGGGT GAAGTTCAGCCGAGCGCCGACGCCCTGCCTAC CAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGA ACCTGGGCGGAGGGAGGAGTACGACGTGCTGGA CAAGCGGAGAGGCCGGGACCTGAGATGGGCGGC AAGCCCCGGAGAAAGAACCTCAGGAGGGCTGT ATAACGAACAGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGC CTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGCGG AGGGCAAGGGCCACGACGGCTGTACCAGGGCC TGAGCACCGCCACCAAGGATACCTACGACGCCCT GCACATGCAGGCCCTGCCCGCCAGAGGCTCCGGA GTGAAGCAGACCCTGAATTTGACCTGCTGAAGC TGGCCGGGACGTGGAGAGCAACCTGGC	88

【 0 2 0 2 】

10

20

30

40

50

【表 5 - 7】

説明	アミノ酸配列	配列番号	ポリヌクレオチド配列	配列番号
CAR バリエーション 1 (N 末端シグナル配列を含む)	MLLLVTSLLLCELPHPAFL LIFEVKLQESGPGLVAPSQ SLSVTCTVSGVSLPDYGV WIRQPPRKGLEWLGVIWGS ETTYNSALKSRLTIKDN SKSQVFLKMNSLQDDTAI YYCAKHYYGGSYAMDYWG QGTSVTVSSGSTSGSGKPG SGEGSTKQDIQMTQTSSL SASLGDRVTISCRASQDIS KYLNWYQQKPDGTVKLLIY HTRSRLHSGVPSRFSGSGSG TDYSLTISNLEQEDIATYF CQQGNTLPYTFGGGTKLEI TKPTTTPAPRPPTPAPTIA SQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDIYIWAPLAG TCGVLLLSLVITLYCNHRN RSKRSRGHSDYMNMTPRR PGPTRKHYPYAPPRDEFAA YRSRVKFSRSADAPAYQQG QNQLYNELNLGRREYDVL DKRRGRDPFEMGGKPRKNE QEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRGKGHDGLYQG LSTATKDYDALHMQALP R	76	ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGTG AGCTGCCCCACCCCGCCTTTCTGCTGATCCCCGA GGTGAAGCTGCAGGAGAGCGGCCCTGGCCTGGTG GCCCCAGCCAGAGCCTGAGCGTGACCTGTACCG TGTCGGCGGTGTCCCTGCCCGACTACGGCGGTGTC CTGGATCCGGCAGCCCCCTAGGAAGGGCCTGGAG TGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGCGAGACCACT ACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGAOCAT CATCAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGTGTTCTG AAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCA TCTACTACTGTGCCAAGCACTACTACTACGGCGG CAGCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACC AGCGTGACCGGTGTCCAGCGGCAGCACCTCCGGCA GCGGCAAGCCTGGCAGCGGCGAGGGCAGCAACAA GGGCGACATCCAGATGACCCAGACCACCTCCAGC CTGAGCGCCAGCCTGGGGCAGCGGGTGACCATCA GCTGCGGGGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCT GAAGTGGTATCAGCAGAAGCCGACGGCACCGTC AAGCTGCTGATCTACCAACACAGCCGGCTGCACA GCGGCGTGCCAGCGCGTTTAGCGGCAGCGGCTC CGGCACCGACTACAGCCTGACCATCTCCAACCTG GAGCAGGAGGACATCGCCACCTACTTTTGCCAGC AGGGCAACACACTGCCCTACACCTTTGGCGGCGG AACAAAGCTGGAGATCACCAGCCACCACCACC CCTGCCCTAGACCTCCAACCCAGCCCTACAA TCGCCAGCCAGCCCTGAGCCTGAGGCCCGAAGC CTGTAGACCTGCCGCTGGCGGAGCCGTGCACACC AGAGGCCTGGATTTCGCTTGGGACATCTACATCT GGGCACCTCTGGCCGGCACCTGTGGCGTGCTGCT GCTGAGCCTGGTCATCACCTGTACTGCAACCAC CGGAATAGGAGCAAGCGGAGCAGAGCGGCCACA GCGACTACATGAACATGACCCCCGGAGGCTGG CCCCACCGGAAGCACTACCAGCCCTACGCCCT CCCAGGGACTTCGCCGCTTACCAGGAGCCGGGTGA AGTTCAGCCGGAGCGCGGACGCCCCCTGCCTACCA GCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAAC CTGGGCCGGAGGGAGGAGTACGACGTGCTGGACA AGCGGAGAGGCGGGACCTGAGATGGCGGGCAA GCCCCGGAGAAAGAACCTCAGGAGGGCCTGTAT AACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCT ACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGCGGAG GGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTACCAGGGCCTG AGCACCGCCACCAAGGATACCTACGACGCCCTGC ACATGCAGGCCCTGCCCCCAGA	90

10

20

30

40

50

【 0 2 0 3 】

【表 5 - 8】

説明	アミノ酸配列	配列番号	ポリヌクレオチド配列	配列番号
CAR バリエーション 1 (N 末端シグナル配列を含まない)	EVKLQESGPGLVAPSQSL VTCTVSGVSLPDYGVSWIR QPFRKGLEWLGVWGSSETT YYNSALKSRLTIKDNSKS QVFLKMNSLQTDDBTAIYYC AKHYYYGGSYAMDYWGQGT SVTVSSGSTSGSGKPGSGE GSTKGDIQMTQTSSLSAS LGDRVTISCRASQDISKYL NWXQQKPDGTVKLLIYHTS RLHSGVPSRFSGSGSGTDY SLTISNLEQEDIATYFCQQ GNTLPYTFGGGKLEITKP TTTPAPRPPTPAPTIASQP LSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCG VLLLSLVITLYCNHRNRSK RSRGGHSDYMNMTPRRPGF TRKHYQPYAPPRDFAYRS RVKFSRSADAPAYQQQGNQ LYNELNLGRREYDVLDR RGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGDGLYQGLST ATKDTYDALHMQALPPR	77	GAGGTGAAGCTGCAGGAGAGCGGCCCTGGCCTGG TGGCCCCCAGCCAGAGCCTGAGCGTGACCTGTAC CGTGTCCGGCGTGTCCCTGCCCGACTACGGCGTG TCCTGGATCCGGCAGCCCCCTAGGAAGGGCCTGG AGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGCGAGACCAC CTACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCGCGGTGACC ATCATCAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGTGTTC TGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGC CATCTACTACTGTGCCAAGCACTACTACTACGGC GGCAGCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCA CCAGCGTGACCGTGTCCAGCGGCAGCACCTCCGG CAGCGGCAAGCCTGGCAGCGGCAGGGCAGCACC AAGGGCGACATCCAGATGACCCAGACCACCTCCA GCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGACCGGGTGACCAT CAGCTGCCGGGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTAC CTGAAGTGGTATCAGCAGAAGCCCGACGGCACCG TCAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCCGGCTGCA CAGCGCGCTGCCAGCCGGTTAGCGGCAGCGGC TCCGGCACCGACTACAGCCTGACCATCTCCAACC TGGAGCAGGAGGACATCGCCACCTACTTTTGCCA GCAGGGCAACACACTGCCCTACACCTTTGGCGGC GGAACAAAGCTGGAGATCACCAAGCCCAACCA CCCCCTGCCCTTAGACCTCCAACCCAGCCCTAC AATCGCCAGCCAGCCCTGAGCCTGAGGCCCGAA GCCTGTAGACCTGCCGCTGGCGGAGCCGTGCACA CCAGAGGCCCTGGATTTCCGCTGCGACATCTACAT CTGGGCACCTCTGGCCGGCACCTGTGGCGTGCTG CTGCTGAGCCTGGTCATCACCTGTACTGCAACC ACCGGAATAGGAGCAAGCGGAGCAGAGCGGCCA CAGCGACTACATGAACATGACCCCCCGAGGCCT GGCCCCACCGGAAGCACTACCAGCCCTACGCC CTCCAGGGACTTCGCCGCCCTACCGGAGCCGGGT GAAGTTCAGCCGAGCGCCGACGCCCTGCCTAC CAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGA ACCTGGGCCGGAGGGAGGTACGACGTGCTGGA CAAGCGGAGAGGCCGGGACCTGAGATGGGCGGC AAGCCCCGGAGAAAGAACCCTCAGGAGGGCCTGT ATAACGAAC'TGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGC CTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGCGG AGGGGCAAGGGGCACGACGGCCTGTACCAGGGCC TGAGCACCGCCACCAAGGATACCTACGACGCCCT GCACATGCAGGCCCTGCCCCCAGA	91

10

20

30

40

50

【 0 2 0 4 】

【表 5 - 9】

説明	アミノ酸配列	配列 番号	ポリヌクレオチド配列	配列 番号
CAR バリエーション 2 (N 末端シグナル配列を含む)	MALPVTALLLPLALLLHAA RPDIQMTQTSSLSASLGD RVTISCRASQDISKYLWY QQKFDGTVKLLIYHTSRLH SGVPSRFSGSGSGTDYSLT ISNLEQEDIATYFCQQGNT LPYTFGGGKLEITGGGGS GGGSGGGGSEVKLQESGP GLVAPSQSLSVTCTVSGVS LPDYGVSWIRQPPRKGLEW LGVIWGSETTYNSALKSR LTIKDNSKSQVFLKMNSL QTDDTAIYYCAKHYYGGS YAMDYWGQTSVTVSSTTT PAPRPPTFAPTIASQPLSL RPEACRPAAGGAVHTRGLD FACDIYIWAPLAGTCGVLL LSLVITLYCKRGRKLLYI FKQPFMRPVQTTQEEDGCS CRFPEEEEGGCELRVKFSR SADAPAYKQGQNQLYNELN LGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTY DALHMQALPFR	78	ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGC TGGCCTTGCTGCTCCACGCGCCAGGCCGGACAT CCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCC TCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGG CAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAATTGGTA TCAGCAGAAAACCAGATGGAACGTGTTAAACTCCTG ATCTACCATACATCAAGATTACACTCAGGAGTCC CATCAAGGTTCTAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGA TTATCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAA GATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATA CGCTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCT GGAGATCACAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGT GGGTGGGTGGCGCGGATCTGAGGTGAACTGC AGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCTCACA GAGCCTGTCCGTACATGCACTGTCTCAGGGGTC TCATTACCCGACTATGGTGTAAAGCTGGATTGCGC AGCCTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGT AATATGGGGTAGTGAAACCACATACTATAATTCA GCTCTCAAATCCAGACTGACCATCATCAAGGACA ACTCCAAGAGCCAAGTTTCTTAAAAATGAACAG TCTGCAAACTGATGACACAGCCATTTACTACTGT GCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTA TGGACTACTGGGGCCAAGGAACCTCAGTCACCGT CTCCTCAACCACGACGCCAGCGCCGCGACCA ACACCGGCGCCCAACATCGCGTCGCGAGCCCTGT CCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGCGCCAGCGGCGGG GGGCGCAGTGACACGAGGGGGCTGGACTTCGCC TGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGCGCGGSA CTTGTTGGGGTCTCTCTCTGTCAGTGGTTATCAC CCTTTACTGCAAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTG TATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTAC AACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCG ATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG AGAGTGAAGTTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCG CGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGA GCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTT TTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGG GGGGAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGG CCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCG GAGGCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGCGGAGC GCCGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCA GGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGAC GCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC	92

【 0 2 0 5 】

10

20

30

40

50

【表 5 - 10】

説明	アミノ酸配列	配列番号	ポリヌクレオチド配列	配列番号
CAR バリエーション 2 (N 末端シグナル配列を含まない)	DIQMTQTSSLSASLGDRV TISCRASQDISKYLNWYQQ KPDGTVKLLIYHTSRLHSG VPSRFSGSGSGTDYSLTIS NLEQEDIATYFCQQGNTLP YTFGGGKLEITGGGSGG GSGGGGSEVKLQESGPG VAPSQSLSVTCTVSGVSLP DYGVSWIRQPPRKLEWL VIWGETTYNSALKSRLT IIKDNSKQVFLKMNSLQT DDTAIYYCAKHYYYGGSYA MDYWGQTSVTVSSTTTPA PRPPTPAPTIASQPLSLRP EACRPAAGGAVHTRGLDFA CDIYIWAFLAGTCGVLLLS LVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGCSCR FPEEEEGGCELRVKFSRSA DAPAYKQGQNQLYNELNLG RREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKD KMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDA LHMQUALPFR	79	GACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGT CTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTG CAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAAT TGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACGTGTTAAAC TCCTGATCTACCATAACATCAAGATTACACTCAGG AGTCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGA ACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGC AAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGG TAATACGCTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACC AAGCTGGAGATCACAGGTGGCGGTGGCTGGGGCG GTGGTGGGTGGGTGGCGGGGATCTGAGGTGAA ACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCC TCACAGAGCCTGTCCGTACATGCACTGTCTCAG GGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAGCTGGAT TCGCCAGCCTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTG GGAGTAATATGGGGTAGTGAACCCACATACTATA ATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGACCATCATCAA GGACAACCTCCAGAGCCAAGTTTCTTAAAAATG AACAGTCTGCAAACCTGATGACACAGCCATTTACT ACTGTGCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTA TGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGAACCTCAGTC ACCGTCTCCTCAACCACGACGCCAGCGCGCGAC CACCAACACCGCGCGCCACCATCGCGTCGCAGCC CCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGGCGGCCAGCG GCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACT TCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGC CGGGACTTGTGGGGTCTCTCCTGTCACTGGTT ATCACCCCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAAAC TCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACC AGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGC TGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAGGAGGATGTG AACTGAGAGTGAAGTTTACGACGAGGCGCAGACGC CCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTAT AACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACG ATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGA GATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCCTCAG GAAGGCTGTACAATGAAGTGCAGAAAGATAAGA TGGCGGAGGCTTACAGTGAGATTGGGATGAAAGG CGAGCGCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTT TACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCT ACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCG C	93

10

20

30

40

50

【0206】

【表 5 - 1 1】

説明	アミノ酸配列	配列番号	ポリヌクレオチド配列	配列番号
CAR バリエーション 3 (N 末端シグナル配列を含む)	MLLLVTSLLLCELPHPAFL LIPDIQMTQTSSLSASLG DRVITISCRASQDISKYLNW YQQKPDGTVKLLIYHTSRL HSGVPSRFSGSGSGTDYSL TISNLEQEDIATYFCQQGN TLPYTFGGGKLEITGSTS SGSGKPGSGEGSTKGEVKLQ ESGFGVLVAPSQSLSVTCTV SGVSLPDYGVSWIRQPPRK GLEWLGVWIGSETTYNSA LKSRLLTIKDNSKSQVFLK MNSLQTDDTAIYYCAKHYY YGGSYAMDYWGQGSTVTVS SAAAIEVMYPPPYLDNEKS NGTIIHVKGKHLCPSPLEP GPSKPFWVLVVVGGVLACY SLLVTVAFIIFWVRSKRSR LLHSDYMNMTPRRPGPTRK HYQPYAPPRDFAAYRSRVK FSRSADAFAYQQGQNQLYN ELNLGRREEYDVLDKRRGR DPFMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEAYSEIGMKGE RRRGKGHDGLYQGLSTATK DTYDALHMQALPPR	80	ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTG AGTTACCACACCCAGCATTCCTCCTGATCCCAGA CATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCTGTCT GCCTCTCTGGGAGACAGAGTCAACATCAGTTGCA GGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAATTG GTATCAGCAGAAACCAGATGGAACTGTTAAACTC CTGATCTACCATACATCAAGATTACACTCAGGAG TCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGAAC AGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAA GAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTA ATACGCTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACTAA GTTGGAAATAACAGGCTCCACCTCTGGATCCGGC AAGCCCGGATCTGGCGAGGGATCCACCAAGGGCG AGGTGAAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGT GGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCGTACATGCACT GTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTA GCTGGATTCCGACGCTCCACGAAAGGGTCTGGA GTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAAACCACA TACTATAATTCAAGCTCTCAAATCCAGACTGACCA TCATCAAGGACAACTCCAAGAGCCAAGTTTCTT AAAAATGAACAGTCTGCAAAGTATGACACAGCC ATTTACTACTGTGCCAAACATTATTACTACGGTG GTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAAC CTCAGTCACCGTCTCCTCAGCGCCCGCAATTGAA GTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGA AGAGCAATGGAACCATTTATCCATGTGAAAGGGAA ACACCTTTGTCCAAGTCCCTATTTCCCGGACCT TCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGGG GAGTCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGT GGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGG AGCAGGCTCCTGCACAGTGAATACATGAACATGA CTCCCCGCGCGCCGGGCCCCACCCGCAAGCATT CCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCGAGC TATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAG ACGCCCCGCGGTACAGCAGGGCCAGAACAGCT CTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAG TACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACC CTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCC TCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGAT AAGATGGCGGAGGCCCTACAGTGAATTTGGGATGA AAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCCAGATGG CCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGAC ACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCGCTGCCCC CTCGC	94

10

20

30

40

50

【 0 2 0 7 】

【表 5 - 1 2】

説明	アミノ酸配列	配列番号	ポリヌクレオチド配列	配列番号
CAR バリアント 3 (N 末端シグナル配列を含まない)	DIQMTQTSSLSASLGDRV TISCRASQDISKYNWYQQ KPDGTVKLLIYHTSRLHSG VPSRFSGSGSGTDYSLTIS NLEQEDIATYFCQQGNTLP YTFGGGKLEITGSTSGSG KPGSGEGSTKGEVKLQESG PGLVAPSQSLSVTCTVSGV SLFDYGVSWIRQPPRKGLE WLGVIWGETTYYSALKS RLTIIKDNSKSQVFLKMNS LQTDDTAIYYCAKHYYYGG SYAMDYWGQTSVTVSAA AIEVMYPPPYLDNEKSNGT IIHVKGKHLCPSPLEFPGPS KPFWVLVVGGVLACYSL VTVAFIIFWVRSKRRLH SDYMNMTPRRPGFTRKHYQ FYAPPRDFAAYRSRVKFSR SADAPAYQQGQNQLYNELN LGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTY DALHMQALPPR	81	GACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGT CTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTG CAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTAAAT TGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACGTGTTAAAC TCCTGATCTACCATAACATCAAGATTACACTCAGG AGTCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGA ACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGC AAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGG TAATACGCTTCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACT AAGTTGGAAATAACAGGCTCCACCTCTGGATCCG GCAAGCCCGGATCTGGCGAGGGATCCACCAAGGG CGAGGTGAAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTG GTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCGTACATGCA CTGTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGT AAGCTGGATTCCGCCAGCTCCACGAAAGGGTCTG GAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAAACCA CATACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGAC CATCATCAAGGACAACCTCCAGAGCCAAGTTTTC TTAAAAATGAACAGTCTGCAAACCTGATGACACAG CCATTTACTACTGTGCCAAACATTATTACTACGG TGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGA ACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCGCAATTG AAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGA GAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGG AAACACCTTTGTCCAAGTCCCTATTTCCCGGAC CTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGG GGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACA GTGGCCTTTATTATTTCTGGGTGAGGAGTAAGA GGAGCAGGCTCCTGCACAGTGAATACATGAACAT GACTCCCCGCCGCCCGGGGCCACCCGCAAGCAT TACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCGAG CCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGC AGAGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACAG CTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGG AGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGA CCCTGAGATGGGGGGAAGCCGAGAAGGAAGAAC CCTCAGGAAGGCTGTACAATGAAGTGCAGAAAG ATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGAT GAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGAT GGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGG ACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCC CCCTCGC	95

10

20

30

40

50

【0208】

5.3 サイトカイン

本開示はまた、サイトカインを含む組換えベクターも提供する。いくつかの実施形態では、サイトカインは、インターロイキンである。例示的なインターロイキンとしては、限定されないが、IL-15、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26、IL-27、IL-28、IL-29、IL-30、IL-31、IL-32、IL-33、及びそれらの機能的バリエーション及び機能的断片が挙げられる。いくつかの実施形態では、サイトカインは、可溶性である。いくつかの実施形態では、サイトカインは、膜結合している。

【0209】

いくつかの実施形態では、サイトカインは、サイトカインの同族受容体の可溶性形態、又はその機能的断片若しくは機能的バリエーションに作動可能に連結された、可溶性サイトカインを含む融合タンパク質、又はその機能的断片若しくは機能的バリエーションである。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、ヒトIL-15R α 受容体 (hIL-15R α

）の可溶性形態に作動可能に連結されたヒトIL-15（hIL-15）を含む。この融合タンパク質は、本明細書ではIL-15スーパーアゴニスト（IL-15SA）とも称される。いくつかの実施形態では、hIL-15は、hIL-15R α に直接的に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、hIL-15は、hIL-15R α の可溶性形態に間接的に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、hIL-15は、ペプチドリンカーを介して、hIL-15R α の可溶性形態に間接的に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、IL-15／IL-15RaFc融合タンパク質であるALT-803である。ALT-803は、WO2008／143794に開示されており、その全内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【0210】

いくつかの実施形態では、サイトカインは、サイトカインの同族受容体の膜結合形態、又はその機能的断片若しくは機能的バリエーションに作動可能に連結された、可溶性サイトカインを含む融合タンパク質、又はその機能的断片若しくは機能的バリエーションである。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、ヒトIL-15R α 受容体（hIL-15R α ）に作動可能に連結されたヒトIL-15（hIL-15）を含む。この融合タンパク質は、本明細書において膜結合IL-15（mbIL15）とも称される。いくつかの実施形態では、hIL-15は、hIL-15R α に直接的に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、hIL-15は、hIL-15R α に間接的に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、hIL-15は、ペプチドリンカーを介して、hIL-15R α に間接的に作動可能に連結されている。

【0211】

いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、配列番号125のアミノ酸配列、又は配列番号125のアミノ酸配列に対する1個、2個、3個、4個若しくは5個のアミノ酸修飾を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、配列番号125のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、リンカーのアミノ酸は、配列番号125のアミノ酸配列、又は配列番号125のアミノ酸配列に対する1、2、3、4若しくは5個のアミノ酸修飾を含むアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、リンカーのアミノ酸は、配列番号125のアミノ酸配列からなる。

【0212】

いくつかの実施形態では、リンカーは、配列番号136のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、リンカーは、配列番号136のポリヌクレオチド配列によってコードされる。

【0213】

いくつかの実施形態では、hIL-15は、配列番号123のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、hIL-15は、配列番号123のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、hIL-15のアミノ酸配列は、配列番号123のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一の配列からなる。いくつかの実施形態では、hIL-15のアミノ酸配列は、配列番号123のアミノ酸配列からなる。

【0214】

いくつかの実施形態では、IL-15は、配列番号134のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、IL-15は、配列番号134のポリヌクレオチド配列によってコードされる。

【0215】

いくつかの実施形態では、hIL-15R α は、配列番号124のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配

10

20

30

40

50

【 0 2 1 6 】

10

20

30

40

50

10

20

30

40

50

。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号130のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号131のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号132のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号132のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号181のポリヌクレオチド配列によってコードされる。

【0221】

例示的なサイトカイン融合タンパク質及びその成分が、表6に開示される。更なる例示的なmbIL15融合物は、Hurton et al., “Tethered IL-15 augments antitumor activity and promotes a stem-cell memory subset in tumor-specific T cells,” PNAS, 113 (48) E7788–E7797 (2016) に開示されており、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0222】

例示的なサイトカイン融合タンパク質及び成分ポリペプチドのアミノ酸配列及びポリヌクレオチド配列を、本明細書の表6に提供する。

【0223】

20

30

40

50

【表 6 - 1】

表 6. 例示的なサイトカイン融合タンパク質及び成分ポリペプチドのアミノ酸及びポリヌクレオチド配列。

説明	アミノ酸配列	配列番号	ポリヌクレオチド配列	配列番号
mbIL15(N末端シグナル配列を含み、C末端テールを含まない)	MDWTWILFLVAAATRVHSNWVNVIS DLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVH PSCKVTAMKCFLELQVISLESGBA SIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTE SGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIV QMFINTSSGGSGGGSGGGSGGGSGGG GSGGSLQITCPPMSVEHADIWVK SYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSL TECVLNKATNVAHWTTPLSKCIRD ALVHQRPAFPSTVTTAGVTPQPESL SPSGKEPAASSPSSNNTAATTAIV PGSQLMPKSPSTGTTEISSHESSH GTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVY PQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVS LLACYLKSRQTPPLASVEMEAMEAL FVTWGTSSRDEDLNCSHHL	119	ATGGATTGGACCTGGATTCTGTTTCTGGT GGCCGCTGCCACAAGAGTGCACAGCAACT GGGTGAATGTGATCAGCGACCTGAAGAAG ATCGAGGATCTGATCCAGAGCATGCACAT TGATGCCACCCTGTACACAGAATCTGATG TGCACCCTAGCTGTAAAGTGACCGCCATG AAGTGTTCCTGCTGGAGCTGCAGGTGAT TTCTCTGGAAGCGGAGATGCCTCTATCC ACGACACAGTGGAGAATCTGATCATCCTG GCCAACAATAGCCTGAGCAGCAATGGCAA TGTGACAGAGTCTGGCTGTAAGGAGTGTG AGGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAG TTTCTGCAGAGCTTTGTGCACATCTGTGCA GATGTTTCATCAATACAAGCTCTGGCGGAG GATCTGGAGGAGGCGGATCTGGAGGAGGA GGCAGTGGAGGCGGAGGATCTGGCGGAGG ATCTCTGCAGATTACATGCCCTOCTCCAA TGTCTGTGGAGCACGCCGATATTTGGGTG AAGTCCCTACAGCCTGTACAGCAGAGAGAG ATACATCTGCAACAGCGGCTTTAAGAGAA AGGCCGGCACCTCTTCTCTGACAGAGTGC GTGCTGAATAAGGCCACAAATGTGGCCCA CTGGACAACACCTAGCCTGAAGTGCATTA GAGATCCTGCCCTGGTCCACCAGAGGCCT GCCCCCTCCATCTACAGTGACAACAGCCGG AGTGACACCTCAGCCTGAATCTCTGAGCC CTTCTGGAAAAGAACCTGCCGCCAGCTCT CCTAGCTCTAATAATACCGCCGCCACAAC AGCCGCCATTGTGCCTGGATCTCAGCTGA TGCCTAGCAAGTCTCCTAGCACAGGCACA ACAGAGATCAGCAGCCACGAATCTTCTCA CGGAACACCTTCTCAGACCACCGCCAAGA ATTGGGAGCTGACAGCCTCTGCCTCTCAC CAGCCTCCAGGAGTGTATCCTCAGGGCCA CTCTGATACAACAGTGGCCATCAGCACAT CTACAGTGTCTGTGTGGACTGTCTGCC GTGTCTCTGTGGCCTGTACCTGAAGTC TAGACAGACACCTCCTCTGGCCTCTGTGG AGATGGAGGCCATGGAAGCCCTGCCTGTG ACATGGGGAACAAGCAGCAGAGATGAAGA CCTGGAGAATTGTTCTCACCACCTG	126

10

20

30

【 0 2 2 4 】

40

50

【表 6 - 2】

説明	アミノ酸配列	配列 番号	ポリヌクレオチド配列	配列 番号
			ATGGATTGGACCTGGATTCTGTTTCTGGT GGCCGCTGCCACAAGAGTGCACAGCAACT GGGTGAATGTGATCAGCGACCTGAAGAAG ATCGAGGATCTGATCCAGAGCATGCACAT TGATGCCACCCTGTACACAGAATCTGATG TGCACCCCTAGCTGTAAAGTGACCGCCATG AAGTGTTTCTGCTGGAGCTGCAGGTGAT TTCTCTGGAAAGCGGAGATGCCTCTATCC ACGACACAGTGGAGAATCTGATCATCCTG GCGAACAATAGCCTGAGCAGCAATGGCAA TGTGACAGAGTCTGGCTGTAAGGAGTGTG AGGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAG TTTCTGCAGAGCTTTGTGCACATCGTGCA GATGTTTCATCAATACAAGCTCTGGCGGAG GATCTGGAGGAGGCGGATCTGGAGGAGGA GGCAGTGGAGGCGGAGGATCTGGCGGAGG ATCTCTGCAGATTACATGCCCTCCTCCAA TGTCTGTGGAGCACGCCGATATTTGGGTG AAGTCCTACAGCCTGTACAGCAGAGAGAG ATACATCTGCAACAGCGGCTTTAAGAGAA AGGCCGGCACCTCTTCTCTGACAGAGTGC GTGCTGAATAAGGCCACAAATGTGGCCCA CTGGACAACACCTAGCCTGAAGTGCATTA GAGATCCTGCCCTGGTCCACCAGAGGCCT GCCCCCTCCATCTACAGTGACAACAGCCGG AGTGACACCTCAGCCTGAATCTCTGAGCC CTTCTGGAAAAGAACCTGCCGCCAGCTCT CCTAGCTCTAATAATACCGCCGCCACAAC AGCCGCCATTTGTGCTGGATCTCAGCTGA TGCCCTAGCAAGTCTCCTAGCACAGGCACA ACAGAGATCAGCAGCCACGAATCTTCTCA CGGAACACCTTCTCAGACCACCGCCAAGA ATTGGGAGCTGACAGCCTCTGCCTCTCAC CAGCCTCCAGGAGTGTATCCTCAGGGCCA CTCTGATACAACAGTGGCCATCAGCACAT CTACAGTGCTGCTGTGTGGACTGTCTGCC GTGTCTCTGCTGGCCTGTTACCTGAAGTC TAGACAGACACCTCCTCTGGCCTCTGTGG AGATGGAGGCCATGGAAGCCCTGCCCTGTG ACATGGGGAACAAGCAGCAGAGATGAGGA CCTGGAGAATTGTTCTCACCACCTG	127
				10
				20
				30

【 0 2 2 5 】

【表 6 - 3】

説明	アミノ酸配列	配列 番号	ポリヌクレオチド配列	配列 番号
mbIL15 (バリ アント N 末 端シグナル 配列を含 み、C 末端テ ールを含ま ない)	PMDWTWILFLVAAATRVHSNWNVI SDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDV HPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDI ASIHDTVENLIILANNSLSNGNVT ESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHI VQMFINTSSGGSGGGSGGGSGG GGSGGSLQITCFFPMSVEHADIWV KSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSS LTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRD PALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQES LSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAI VPGSQIMPSKSPSTGTTEISSHES HGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGV YPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAV SLLACYLKSRQTPPLASVEMEAMEA LPVTWGTSSRDEDLNCSHHL	180	CCCATGGATTGGACCTGGATTCTGTTTCT GGTGGCCGCTGCCACAAGAGTGCACAGCA ACTGGGTGAATGTGATCAGCGACCTGAAG AAGATCGAGGATCTGATCCAGAGCATGCA CATTGATGCCACCCTGTACACAGAATCTG ATGTGCACCCTAGCTGTAAAGTGACCGCC ATGAAGTGTTTCTGCTGGAGCTGCAGGT GATTTCTCTGGAAGCGGAGATGCCTCTA TCCACGACACAGTGGAGAATCTGATCATC CTGGCCAACAATAGCCTGAGCAGCAATGG CAATGTGACAGAGTCTGGCTGTAAGGAGT GTGAGGAGCTGGAGGAGAAGAATCAAG GAGTTTCTGCAGAGCTTTGTGCACATCGT GCAGATGTTCAATACAAGCTCTGGCG GAGGATCTGGAGGAGCGGATCTGGAGGA GGAGGCAGTGGAGGCGGAGGATCTGGCGG AGGATCTCTGCAGATTACATGCCCTCCTC CAATGTCTGTGGAGCACGCCGATATTGG GTGAAGTCCTACAGCCTGTACAGCAGAGA GAGATACATCTGCAACAGCGGCTTTAAGA GAAAGGCCGCGACCTCTTCTCTGACAGAG TGCGTGCTGAATAAGGCCACAAATGTGGC CCACTGGACAACACCTAGCCTGAAGTGCA TTAGAGATCCTGCCCTGGTCCACCAGAGG CCTGCCCTCCATCTACAGTGACAACAGC CGGAGTGACACCTCAGCCTGAATCTCTGA GCCCTTCTGGAAAAGAACCTGCCGCCAGC TCTCCTAGCTCTAATAATACCGCCGCCAC AACAGCCGCCATTGTGCCTGGATCTCAGC TGATGCCTAGCAAGTCTCCTAGCACAGGC ACAACAGAGATCAGCAGCCACGAATCTTC TCACGGAACACCTTCTCAGACCACCGCCA AGAATTGGGAGCTGACAGCCTCTGCCTCT CACCAGCCTCCAGGAGTGATCCTCAGGG CCACTCTGATACAACAGTGGCCATCAGCA CATCTACAGTGCTGCTGTGTGGACTGTCT GCCGTGCTCTGCTGGCCTGTACCTGAA GTCTAGACAGACACCTCCTCTGGCCTCTG TGGAGATGGAGGCCATGGAAGCCCTGCC GTGACATGGGGAACAAGCAGCAGAGATGA AGACCTGGAGAATTGTTCTCACCACCTG	181

【 0 2 2 6 】

10

20

30

40

50

【表 6 - 4】

説明	アミノ酸配列	配列 番号	ポリヌクレオチド配列	配列 番号
mbIL15(N末端シグナル配列を含み、C末端テールを含む)	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVIS DLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVH PSCKVTAMKCFLELQVISLESGBA SIHDTVENLIILANSLSSNGNVTE SGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIV QMFINTSSGGSGGGSGGGSGGGSGGG GSGGSLQITCPPPMSVEHADIWVK SYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSL TECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDF ALVHQRPAFPSTVTTAGVTPQPESL SPSGKEPAASSPSSNNTAATTAIV PGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESH GTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVY PQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVS LLACYLKSRQTPPLASVEMEAMEAL FVTWGTSSRDELENCSHHLEGGG EGRGSLTTCGDVEENPG	120	ATGGATTGGACCTGGATTCTGTTTCTGGT GGCCGCTGCCACAAGAGTGCACAGCAACT GGGTGAATGTGATCAGCGACCTGAAGAAG ATCGAGGATCTGATCCAGAGCATGCACAT TGATGCCACCCTGTACACAGAATCTGATG TGCAACCTAGCTGTAAAGTGACCGCCATG AAGTGTTTTCTGCTGGAGCTGCAGGTGAT TTCTCTGGAAGCGGAGATGCCTCTATCC ACGACACAGTGGAGAATCTGATCATCCTG GCCAACAATAGCCTGAGCAGCAATGCCAA TGTGACAGAGTCTGGCTGTAAGGAGTGTG AGGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAG TTTCTGCAGAGCTTTGTGCACATCTGTGCA GATGTTTCATCAATACAAGCTCTGGCGGAG GATCTGGAGGAGGCGGATCTGGAGGAGGA GGCAGTGGAGGCGGAGGATCTGGCGGAGG ATCTCTGCAGATTACATGCCCTCCTCCAA TGTCTGTGGAGCACGCCGATATTTGGGTG AAGTCCTACAGCCTGTACAGCAGAGAGAG ATACATCTGCAACAGCGGCTTTAAGAGAA AGGCCGGCACCTCTTCTCTGACAGAGTGC GTGCTGAATAAGGCCACAAATGTGGCCCA CTGGACAACACCTAGCCTGAAGTGCATTA GAGATCCTGCCCTGGTCCACCAGAGGCCT GCCCTCCATCTACAGTGACAACAGCCGG AGTGACACCTCAGCCTGAATCTCTGAGCC CTTCTGGAAGAAGAACCTGCCGCCAGCTCT CCTAGCTCTAATAATACCGCCGCCACAAC AGCCGCCATTGTGCTGGATCTCAGCTGA TGCTAGCAAGTCTCCTAGCACAGGCACA ACAGAGATCAGCAGCCACGAATCTTCTCA CGGAACACCTTCTCAGACCACCGCCAAGA ATTGGGAGCTGACAGCCTCTGCCTCTCAC CAGCCTCCAGGAGTGTATCCTCAGGGCCA CTCTGATACAACAGTGGCCATCAGCACAT CTACAGTGCTGCTGTGTGGACTGTCTGCC GTGTCTCTGCTGGCCTGTTACCTGAAGTC TAGACAGACACCTCCTCTGGCCTCTGTGG AGATGGAGGCCATGGAAGCCCTGCCTGTG ACATGGGGAACAAGCAGCAGAGATGAAGA CCTGGAGAATTGTTCTCACCACCTGCTGG AGGGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTT CTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCC CGGC	128

10

20

30

40

50

【 0 2 2 7 】

【表 6 - 5】

説明	アミノ酸配列	配列 番号	ポリヌクレオチド配列	配列 番号
mbIL15 (バリ アント N 末 端シグナル 配列を含 み、C 末端テ ールを含む)	PMDWTWILFLVAAATRVHSNWNVI SDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDV HPSCKVTAMKCFLELQVISLES ASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVT ESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHI VQMFINTSSGGSGGGSGGGSGG GGSGGSLQITCPPFMSVEHADIWV KSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSS LTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRD PALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQPE LSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAI VPGSQLMPFSKSPSTGTTEISSHES HGTSPQTTAKNWELTASASHQPPGV YFQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAV SLLACYLKSRQTPPLASVEMEAMEA LPVTWGTSSRDEDLENCSSHLEGG GEGRGSLLTCGDVEENPG	183	CCCATGGATTGGACCTGGATTCTGTTTCT GGTGGCCGCTGCCACAAGAGTGCACAGCA ACTGGGTGAATGTGATCAGCGACCTGAAG AAGATCGAGGATCTGATCCAGAGCATGCA CATTGATGCCACCCTGTACACAGAATCTG ATGTGCACCCTAGCTGTAAAGTGACCGCC ATGAAGTGTTTTCTGCTGGAGCTGCAGGT GATTTCTCTGGAAAGCGGAGATGCCCTCTA TCCACGACACAGTGGAGAATCTGATCATC CTGGCCAACAATAGCCTGAGCAGCAATGG CAATGTGACAGAGTCTGGCTGTAAGGAGT GTGAGGAGCTGGAGGAGAAGAATCAAG GAGTTTCTGCAGAGCTTTGTGCACATCGT GCAGATGTTCAATACAAGCTCTGGCG GAGGATCTGGAGGAGCGGATCTGGAGGA GGAGGCAGTGGAGCGGAGGATCTGGCGG AGGATCTCTGCAGATTACATGCCCTCCTC CAATGTCTGTGGAGCAGCCGATATTGG GTGAAGTCTTACAGCCTGTACAGCAGAGA GAGATACATCTGCAACAGCGGCTTTAAGA GAAAGCGCGCACCTCTTCTCTGACAGAG TGCGTGCTGAATAAGGCCACAAATGTGGC CCACTGGACAACACCTAGCCTGAAGTGCA TTAGAGATCCTGCCCTGGTCCACCAGAGG CCTGCCCTCCATCTACAGTGACAACAGC CGGAGTGACACCTCAGCCTGAATCTCTGA GCCCTTCTGGAAAAGAACCTGCCGCCAGC TCTCCTAGCTCTAATAATACCGCCGCCAC AACAGCCGCCATTGTGCCTGGATCTCAGC TGATGCCTAGCAAGTCTCCTAGCACAGGC ACAACAGAGATCAGCAGCCACGAATCTTC TCACGGAACACCTTCTCAGACCACCGCCA AGAATTGGGAGCTGACAGCCTCTGCCTCT CACCAGCCTCCAGGAGTGATCCTCAGGG CCACTCTGATACAACAGTGGCCATCAGCA CATCTACAGTGCTGCTGTGTGGACTGTCT GCCGTGCTCTGCTGGCCTGTTACCTGAA GTCTAGACAGACACCTCCTCTGGCCTCTG TGGAGATGGAGGCCATGGAAGCCCTGCC GTGACATGGGAACAAGCAGCAGAGATGA AGACCTGGAGAATTGTTCTCACCACCTGC TGGAGGGCGCGGAGAGGGCAGAGGAAGT CTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAA TCCCGGC	129

10

20

30

40

50

【 0 2 2 8 】

【表 6 - 6】

説明	アミノ酸配列	配列番号	ポリヌクレオチド配列	配列番号
mbIL15 (N末端シグナル配列を含まず、C末端テールを含まない)	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATL YTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVI SLESGDASIHDVTENLIILANNSLS SNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFL QSFVHIVQMFINTSSGGSGGGGSG GGGSGGGSGGGSLQITCPPPMSVE HADIWVKSYSLSRERYICNSGFKR KAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPS LKCIKDPALVHQRPAPPSTVTTAGV TPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTA ATTAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEI SSHESSHGTPSQTTAKNWELTASAS HQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLL CGLSAVSL LACYLKSRQTPPLASVE MEAMEALFVTWGTSSRDELENC SH HL	121	AACTGGGTGAATGTGATCAGCGACCTGAA GAAGATCGAGGATCTGATCCAGAGCATGC ACATTGATGCCACCCTGTACACAGAATCT GATGTGCACCCTAGCTGTAAAGTGACCGC CATGAAGTGTCTTCTGCTGGAGCTGCAGG TGATTTCTCTGGAAAGCGGAGATGCCTCT ATCCACGACACAGTGGAGAATCTGATCAT CCTGGCCAACAATAGCCTGAGCAGCAATG GCAATGTGACAGAGTCTGGCTGTAAGGAG TGTGAGGAGCTGGAGGAGAAGAATCAA GGAGTTTCTGCAGAGCTTTGTGCACATCG TGCAGATGTTTCATCAATACAAGCTCTGGC GGAGGATCTGGAGGAGCGGATCTGGAGG AGGAGGCAGTGGAGGCGGAGGATCTGGCG GAGGATCTCTGCAGATTACATGCCCTCCT CCAATGTCTGTGGAGCAGCCGATATTTG GGTGAAGTCCTACAGCCTGTACAGCAGAG AGAGATACATCTGCAACAGCGGCTTTAAG AGAAAGGCCGGCACCTCTTCTCTGACAGA GTGCGTGCTGAATAAGGCCACAAATGTGG CCCACTGGACAACACCTAGCCTGAAGTGC ATTAGAGATCCTGCCCTGGTCCACCAGAG GCCTGCCCTCCATCTACAGTGACAACAG CCGGAGTGACACCTCAGCCTGAATCTCTG AGCCCTTCTGGAAAAGAACCTGCCGCCAG CTCTCCTAGCTCTAATAATACCGCCGCCA CAACAGCCGCCATTGTGCTGGATCTCAG CTGATGCCTAGCAAGTCTCCTAGCACAGG CACAACAGAGATCAGCAGCCACGAATCTT CTCACGGAACACCTTCTCAGACCACCGCC AAGAATTGGGAGCTGACAGCCTCTGCCTC TCACCAGCCTCCAGGAGTGTATCCTCAGG GCCACTCTGATACAACAGTGGCCATCAGC ACATCTACAGTGCTGCTGTGTGGACTGTC TGCCGTGTCTCTGCTGGCCTGTTACCTGA AGTCTAGACAGACACCTCCTCTGGCCTCT GTGGAGATGGAGGCCATGGAAGCCCTGCC TGTGACATGGGGAACAAGCAGCAGAGATG AAGACCTGGAGAATTGTTCTCACCACCTG	130

10

20

30

【 0 2 2 9】

40

50

【表 6 - 7】

説明	アミノ酸配列	配列番号	ポリヌクレオチド配列	配列番号
			AACTGGGTGAATGTGATCAGCGACCTGAA GAAGATCGAGGATCTGATCCAGAGCATGC ACATTGATGCCACCCCTGTACACAGAATCT GATGTGCACCCTAGCTGTAAAGTGACCGC CATGAAGTGTTTTCTGCTGGAGCTGCAGG TGATTTCTCTGGAAAGCGGAGATGCCTCT ATCCACGACACAGTGGAGAATCTGATCAT CCTGGCCAACAATAGCCTGAGCAGCAATG GCAATGTGACAGAGTCTGGCTGTAAGGAG TGTGAGGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAA GGAGTTTCTGCAGAGCTTTGTGCACATCG TGCAGATGTTTCATCAATACAAGCTCTGGC GGAGGATCTGGAGGAGGCGGATCTGGAGG AGGAGGCAGTGGAGGCGGAGGATCTGGCG GAGGATCTCTGCAGATTACATGCCCTCCT CCAATGTCTGTGGAGCACGCCGATATTTG GGTGAAGTCCTACAGCCTGTACAGCAGAG AGAGATACATCTGCAACAGCGGCTTTAAG AGAAAGGCCGGCACCTCTTCTCTGACAGA GTGCGTGCTGAATAAGGCCACAAATGTGG CCCACTGGACAACACCTAGCCTGAAGTGC ATTAGAGATCCTGCCCTGGTCCACCAGAG GCCTGCCCTCCATCTACAGTGACAACAG CCGGAGTGACACCTCAGCCTGAATCTCTG AGCCCTTCTGGAAAAGAACCTGCCGCCAG CTCTCCTAGCTCTAATAATACCGCCGCCA CAACAGCCGCCATTGTGCTGGATCTCAG CTGATGCCTAGCAAGTCTCCTAGCACAGG CACAACAGAGATCAGCAGCCACGAATCTT CTCACGGAACACCTTCTCAGACCACCGCC AAGAATTGGGAGCTGACAGCCTCTGCCTC TCACCAGCCTCCAGGAGTGTATCCTCAGG GCCACTCTGATAACAACAGTGGCCATCAGC ACATCTACAGTGCTGCTGTGTGGACTGTC TGCCGTGTCTCTGCTGGCCTGTTACCTGA AGTCTAGACAGACACCTCCTCTGGCCTCT GTGGAGATGGAGGCCATGGAAGCCCTGCC TGTGACATGGGGAACAAGCAGCAGAGATG AGGACCTGGAGAATTGTTCTCACCACCTG	131
				10
				20
				30

【 0 2 3 0 】

10

20

30

40

50

【表 6 - 8】

説明	アミノ酸配列	配列番号	ポリヌクレオチド配列	配列番号
mbIL15(N末端シグナル配列を含まず、C末端テールを含む)	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATL YTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVI SLESGDASIHDVTENLIILANNSLS SNGNVTESGCKECELEEKNIKEFL QSFVHIVQMFINSSGGSGGGSG GGSGGGSGGGSLQITCPPMSVE HADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKR KAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPS LKCIRDPALVHQRPAFPSTVTTAGV TPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTA ATTAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEI SSHESHGTPSQTTAKNWELTASAS HQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLL CGLSAVSLACYLKSRQTPPLASVE MEAMEALFVTWGTSSRDELENCSH HLEGGGEGRGSLLTCGDVEENPG	122	AACTGGGTGAATGTGATCAGCGACCTGAA GAAGATCGAGGATCTGATCCAGAGCATGC ACATTGATGCCACCCCTGTACACAGAATCT GATGTGCACCCTAGCTGTAAAGTGACCGC CATGAAGTGTTTTCTGCTGGAGCTGCAGG TGATTTCTCTGGAAAAGCGGAGATGCCTCT ATCCACGACACAGTGGAGAATCTGATCAT CCTGGCCAACAATAGCCTGAGCAGCAATG GCAATGTGACAGAGTCTGGCTGTAAGGAG TGTGAGGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAA GGAGTTTCTGCAGAGCTTTGTGCACATCG TGCAGATGTTTCATCAATACAAGCTCTGGC GGAGGATCTGGAGGAGCGGATCTGGAGG AGGAGGCAGTGGAGGCGGAGGATCTGGCG GAGGATCTCTGCAGATTACATGCCCTCCT CCAATGTCTGTGGAGCACGCCGATATTTG GGTGAAGTCTTACAGCCTGTACAGCAGAG AGAGATACATCTGCAACAGCGGCTTTAAG AGAAAGGCCGGCACCTCTTCTCTGACAGA GTGCGTGCTGAATAAGGCCACAAATGTGG CCCCTGGACAACACCTAGCCTGAAGTGC ATTAGAGATCCTGCCCTGGTCCACCAGAG GCCTGCCCCCTCCATCTACAGTGACAACAG CCGGAGTGACACCTCAGCCTGAATCTCTG AGCCCTTCTGGAAAAGAACCTGCCGCCAG CTCTCCTAGCTCTAATAATACCGCCGCCA CAACAGCCGCCATTGTGCTGGATCTCAG CTGATGCCCTAGCAAGTCTCCTAGCACAGG CACAACAGAGATCAGCAGCCACGAATCTT CTCAGGAACACCTTCTCAGACCACCGCC AAGAATTGGGAGCTGACAGCCTCTGCCCT TCACCAGCCTCCAGGAGTGTATCCTCAGG GCCACTCTGATACAACAGTGGCCATCAGC ACATCTACAGTGCTGCTGTGTGGACTGTC TGCCGTGTCTCTGCTGGCCTGTTACCTGA AGTCTAGACAGACACCTCCTCTGGCCTCT GTGGAGATGGAGGCCATGGAAGCCTGCC TGTGACATGGGGAACAAGCAGCAGAGATG AAGACCTGGAGAATTGTTCTCACCACCTG CTGGAGGGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAG TCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGA ATCCCGGC	132
可溶性 hIL-15	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATL YTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVI SLESGDASIHDVTENLIILANNSLS SNGNVTESGCKECELEEKNIKEFL QSFVHIVQMFINSS	123	AACTGGGTGAATGTGATCAGCGACCTGAA GAAGATCGAGGATCTGATCCAGAGCATGC ACATTGATGCCACCCCTGTACACAGAATCT GATGTGCACCCTAGCTGTAAAGTGACCGC CATGAAGTGTTTTCTGCTGGAGCTGCAGG TGATTTCTCTGGAAAAGCGGAGATGCCTCT ATCCACGACACAGTGGAGAATCTGATCAT CCTGGCCAACAATAGCCTGAGCAGCAATG GCAATGTGACAGAGTCTGGCTGTAAGGAG TGTGAGGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAA GGAGTTTCTGCAGAGCTTTGTGCACATCG TGCAGATGTTTCATCAATACAAGC	134

【 0 2 3 1 】

10

20

30

40

【表 6 - 9】

説明	アミノ酸配列	配列番号	ポリヌクレオチド配列	配列番号
hIL-15R α	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSRE RYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKA TNVAHWTTPLSKCIRDPAHVQRPA PPSTVTAGVTPQFESLSPSGKEPA ASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPS KSPSTGTTEISSHESHGTPSQTTA KNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTT VAISTSTVLLCGLSAVSLACYLKS RQTFPLASVEMEAMEALPVTWGTSS RDEDLNCSHHL	124	ATTACATGCCCTCCTCCAATGTCTGTGGA GCACGCCGATATTTGGGTGAAGTCTACA GCCTGTACAGCAGAGAGAGATACATCTGC AACAGCGGCTTTAAGAGAAAGCGGCAC CTCTTCTCTGACAGAGTGCCTGCTGAATA AGGCCACAAATGTGGCCCACTGGACAACA CCTAGCCTGAAGTGCATTAGAGATCCTGC CCTGGTCCACCAGAGGCTGCCCTCCAT CTACAGTGACAACAGCCGGAGTGACACCT CAGCCTGAATCTCTGAGCCCTTCTGGAAA AGAACCTGCCGCCAGCTCTCCTAGCTCTA ATAATACCGCCGCCACAACAGCCGCCATT GTGCCTGGATCTCAGCTGATGCCTAGCAA GTCTCCTAGCACAGGCACAACAGAGATCA GCAGCCACGAATCTTCTACGGAACACCT TCTCAGACCACCGCCAAGAATTGGGAGCT GACAGCCTCTGCCTCTCACCAGCCTCCAG GAGTGTATCCTCAGGGCCACTCTGATACA ACAGTGGCCATCAGCACATCTACAGTGCT GCTGTGTGGACTGTCTGCCGTGTCTCTGC TGGCCTGTTACCTGAAGTCTAGACAGACA CCTCCTCTGGCCTCTGTGGAGATGGAGGC CATGGAAGCCCTGCCTGTGACATGGGGAA CAAGCAGCAGAGATGAAGACCTGGAGAAT TGTTCTCACCACCTG	135
			ATTACATGCCCTCCTCCAATGTCTGTGGA GCACGCCGATATTTGGGTGAAGTCTACA GCCTGTACAGCAGAGAGAGATACATCTGC AACAGCGGCTTTAAGAGAAAGCGGCAC CTCTTCTCTGACAGAGTGCCTGCTGAATA AGGCCACAAATGTGGCCCACTGGACAACA CCTAGCCTGAAGTGCATTAGAGATCCTGC CCTGGTCCACCAGAGGCTGCCCTCCAT CTACAGTGACAACAGCCGGAGTGACACCT CAGCCTGAATCTCTGAGCCCTTCTGGAAA AGAACCTGCCGCCAGCTCTCCTAGCTCTA ATAATACCGCCGCCACAACAGCCGCCATT GTGCCTGGATCTCAGCTGATGCCTAGCAA GTCTCCTAGCACAGGCACAACAGAGATCA GCAGCCACGAATCTTCTACGGAACACCT TCTCAGACCACCGCCAAGAATTGGGAGCT GACAGCCTCTGCCTCTCACCAGCCTCCAG GAGTGTATCCTCAGGGCCACTCTGATACA ACAGTGGCCATCAGCACATCTACAGTGCT GCTGTGTGGACTGTCTGCCGTGTCTCTGC TGGCCTGTTACCTGAAGTCTAGACAGACA CCTCCTCTGGCCTCTGTGGAGATGGAGGC CATGGAAGCCCTGCCTGTGACATGGGGAA CAAGCAGCAGAGATGAAGACCTGGAGAAT TGTTCTCACCACCTG	163
リンカー	SGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSL Q	125	TCTGGCGGAGGATCTGGAGGAGCGGATC TGGAGGAGGAGGAGTGGAGGCGGAGGAT CTGGCGGAGGATCTCTGCAG	136
IgE N末端シグナル配列	MDWTWILFLVAAATRVHS	176	ATGGATTGGACCTGGATTCTGTTTCTGGT GGCCGCTGCCACAAGAGTGACACAGC	177

10

20

30

40

【0232】

5.4 マーカートンパク質

本明細書に記載のマーカートンパク質は、マーカートンパク質に特異的に結合し、かつ抗CD19 CAR発現細胞の死滅を媒介するか、又は触媒する薬剤（例えば、抗体）の投与を介して、インビボでの抗CD19 CAR発現細胞の選択的枯渇を可能にするように機能する。いくつかの実施形態では、マーカートンパク質は、抗CD19 CARを発現する細胞の表面上に発現される。

【0233】

いくつかの実施形態では、マーカートンパク質は、細胞表面タンパク質の細胞外ドメイ

50

ン、又はその機能的断片若しくは機能的バリエーションを含む。いくつかの実施形態では、細胞表面タンパク質は、ヒト上皮成長因子受容体1（hHER1）である。いくつかの実施形態では、マーカータンパク質は、抗hHER1抗体によって結合することができる先端切断HER1タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、マーカータンパク質は、抗hHER1抗体によって結合することができる先端切断hHER1タンパク質のバリエーションを含む。いくつかの実施形態では、hHER1マーカータンパク質は、抗CD19 CAR発現細胞の表面上で発現されるhHER1マーカータンパク質を認識する抗体を投与することによって、注入されたCAR-T細胞の枯渇を可能にすることによって安全機構を提供する。hHER1マーカータンパク質に結合する例示的な抗体は、セツキシマブである。

10

【0234】

いくつかの実施形態では、hHER1マーカータンパク質は、N末端からC末端まで、hHER1のドメインIII、又はその機能的断片若しくは機能的バリエーションと、hHER1のドメインIVのN末端部分と、ヒトCD28の膜貫通領域と、を含む。

【0235】

いくつかの実施形態では、hHER1のドメインIIIは、配列番号98のアミノ酸配列、又は1、2、若しくは3個のアミノ酸修飾を含む配列番号98のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、hHER1のドメインIIIのアミノ酸配列は、配列番号98のアミノ酸配列、又は1、2、若しくは3個のアミノ酸修飾を含む配列番号98のアミノ酸配列からなる。

20

【0236】

いくつかの実施形態では、hHER1のドメインIIIは、配列番号110のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、hHER1のドメインIIIは、配列番号110のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、hHER1のドメインIIIは、配列番号164のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、hHER1のドメインIIIは、配列番号164のポリヌクレオチド配列によってコードされる。

30

【0237】

いくつかの実施形態では、hHER1のドメインIVのN末端部分は、配列番号99のアミノ酸1~40、1~39、1~38、1~37、1~36、1~35、1~34、1~33、1~32、1~31、1~30、1~29、1~28、1~27、1~26、1~25、1~24、1~23、1~22、1~21、1~20、1~19、1~18、1~17、1~16、1~15、1~14、1~13、1~12、1~11、又は1~10を含む。いくつかの実施形態では、hHER1のドメインIIIのC末端は、hHER1のドメインIVのN末端部分のN末端に直接的に融合される。

【0238】

いくつかの実施形態では、hHER1のドメインIVのN末端部分のC末端は、ペプチドリンカーを介して、CD28膜貫通ドメインのN末端に間接的に融合される。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、グリシン及びセリンアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、約5~25、5~20、5~15、5~10、10~20、又は10~15アミノ酸長である。

40

【0239】

いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、配列番号102のアミノ酸配列、又は配列番号102のアミノ酸配列に対する1個、2個、3個、4個若しくは5個のアミノ酸修飾を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、配列番号102のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーのアミノ酸配列は、配列番号102のアミノ酸配列、又は配列番号102のアミノ酸配列に対する1

50

、2、3、4若しくは5個のアミノ酸修飾を含むアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーのアミノ酸配列は、配列番号102のアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、配列番号114のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、配列番号114のポリヌクレオチド配列によってコードされる。

【0240】

いくつかの実施形態では、マーカートンパク質は、配列番号96、97、103、104、166、又は167のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、マーカートンパク質は、配列番号96のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、マーカートンパク質は、配列番号97のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、マーカートンパク質は、配列番号103のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、マーカートンパク質は、配列番号104のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、マーカートンパク質は、配列番号166のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、マーカートンパク質は、配列番号167のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列を含む。

【0241】

いくつかの実施形態では、マーカートンパク質は、配列番号96のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、マーカートンパク質は、配列番号97のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、マーカートンパク質は、配列番号96、97、103、又は104のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、マーカートンパク質は、配列番号103のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、マーカートンパク質は、配列番号104のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、マーカートンパク質は、配列番号166のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、マーカートンパク質は、配列番号167のアミノ酸配列を含む。

【0242】

いくつかの実施形態では、マーカートンパク質は、配列番号96、97、103、104、166、又は167のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、マーカートンパク質は、配列番号96のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、マーカートンパク質は、配列番号97のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、マーカートンパク質は、配列番号103のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、マーカートンパク質は、配列番号104のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、マーカートンパク質は、配列番号166のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、マーカートンパク質は、配列番号167のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列からなる。

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、マーカートンパク質は、配列番号107、162、108、109、115、116、173、又は174のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、マーカートンパク質は、配列番号107のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、マーカートンパク質は、配列番号162のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、マーカートンパク質は、配列番号108のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、マーカートンパク質は、配列番号109のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、マーカートンパク質は、配列番号115のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、マーカートンパク質は、配列番号116のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、マーカートンパク質は、配列番号173のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施

形態では、マーカータンパク質は、配列番号 174 のポリヌクレオチド配列によってコードされる。

【0246】

いくつかの実施形態では、マーカータンパク質は、ヒト CD20 (hCD20) に由来する。いくつかの実施形態では、マーカータンパク質は、細胞外領域 (hCD20t) を含む先端切断 hCD20 タンパク質、又はその機能的断片若しくは機能的バリエーションを含む。いくつかの実施形態では、hCD20 マーカータンパク質は、CAR 発現細胞の表面上で発現される hCD20 マーカータンパク質を認識する抗体を投与することによって、注入された CAR-T 細胞の枯渇を可能にすることによって安全機構を提供する。hCD20 マーカータンパク質に結合する例示的な抗体は、リツキシマブである。

10

【0247】

いくつかの実施形態では、マーカータンパク質は、配列番号 105 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% 同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、マーカータンパク質は、配列番号 106 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% 同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、マーカータンパク質は、配列番号 105 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、マーカータンパク質は、配列番号 106 のアミノ酸配列を含む。

【0248】

いくつかの実施形態では、マーカータンパク質のアミノ酸配列は、配列番号 105 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% 同一の配列からなる。いくつかの実施形態では、マーカータンパク質のアミノ酸配列は、配列番号 106 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% 同一の配列からなる。いくつかの実施形態では、マーカータンパク質のアミノ酸配列は、配列番号 105 のアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、マーカータンパク質のアミノ酸配列は、配列番号 106 のアミノ酸配列からなる。

20

【0249】

いくつかの実施形態では、マーカータンパク質は、配列番号 117 又は 118 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% 同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、マーカータンパク質は、配列番号 117 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% 同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、マーカータンパク質は、配列番号 118 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% 同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、マーカータンパク質は、配列番号 117 又は 118 のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、マーカータンパク質は、配列番号 117 のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、マーカータンパク質は、配列番号 118 のポリヌクレオチド配列によってコードされる。

30

40

【0250】

例示的なマーカータンパク質のアミノ酸配列及びポリヌクレオチド配列を本明細書の表 7 に提供する。

【0251】

【表 7 - 1】

表 7. 例示的なマーカートンパク質のアミノ酸及びポリヌクレオチド配列。

説明	アミノ酸配列	配列 番号	ポリヌクレオチド配列	配列 番号
HER1t (N 末端シグナル配列を含む)	MRLPAQLLGLLMLWVPGSSGRKVCN GIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCT SISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLD PQELDILKTVKEITGFLLIQAWPEN RTDLHAFENLEIIRGRKQHGQFSL AVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVII SGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKT KIISNRGENSCKATGQVCHALCSPE GCWGPPEPRDCVSGGGSGGGSGGG GSGGGSEFWLVVVGGVLACYSLLV TVAFIIFWVRSKRS	96	ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGG GCTGCTAATGCTCTGGGTGCCAGGAT CCAGTGGGCGCAAAGTGTGTAACGGA ATAGGTATTGGTGAATTAAAGACTC ACTCTCCATAAAATGCTACGAATATTA AACACTTCAAAAACGACCTCCATC AGTGGCGATCTCCACATCCTGCCGGT GGCATTTAGGGGTGACTCCTTCACAC ATACTCCTCCTCTGGATCCACAGGAA CTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGA AATCACAGGGTTTTTGTGATTACAGG CTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTC CATGCCTTTGAGAACCTAGAAATCAT ACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTC AGTTTTCTCTTGCAGTCGTCAGCCTG AACATAACATCCTTGGGATTACGCTC CCTCAAGGAGATAAGTGATGGAGATG TGATAATTTGAGGAAACAAAATTG TGCTATGCAATAACAATAAACTGGAA AAAACGTGTTTGGTACCTCCGGTCAGA AAACCAAATTATAAGCAACAGAGGT GAAAACAGCTGCAAGGCCACAGGCCA GGCTGCCATGCCTTGTGCTCCCCCG AGGGCTGCTGGGGCCCCGGAGCCCAGG GACTGCGTCTCTGGTGGCGGTGGCTC GGGCGGTGGTGGGTGGGTGGCGGCG GATCTGGTGGCGGTGGCTCGTTTTGG GTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCT GGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAG TGGCCTTTATATTTTCTGGGTGAGG AGTAAGAGGAGC	107

【 0 2 5 2 】

【表 7 - 2】

説明	アミノ酸配列	配列 番号	ポリヌクレオチド配列	配列 番号
			ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGG GCTGCTAATGCTCTGGGTCCCAGGAT CCAGTGGGCGCAAAGTGTGTAACGGA ATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACTC ACTCTCCATAAATGCTACGAATATTA AACACTTCAAAAACCTGCACCTCCATC AGTGGCGATCTCCACATCCTGCCGGT GGCATTTAGGGGTGACTCCTTCACAC ATACTCCTCCTCTGGATCCACAGGAA CTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGA AATCACAGGGTTTTTGCTGATTTCAGG CTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTC CATGCCTTTGAGAACCTAGAAATCAT ACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTC AGTTTCTCTTGCAGTCTGCAGCCTG AACATAACATCCTTGGGATTACGCTC CCTCAAGGAGATAAGTGATGGAGATG TGATAATTTTCAGGAAACAAAAATTTG TGCTATGCAAATACAATAAACTGGAA AAAAC TGTTGGGACCTCCGGTCAGA AAACCAAAATTATAAGCAACAGAGGT GAAAACAGCTGCAAGGCCACAGGCCA GGTCTGCCATGCCTTGTGCTCCCCCG AGGGCTGCTGGGGCCCGGAGCCCAGG GACTGCGTCTCTGGTGGCGGTGGCTC GGGCGGTGGTGGGTGCGGTGCGGCG GATCTGGTGGCGGTGGCTCGTTTGG GTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCT GGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAG TGGCCTTTATTATTTCTGGGTGAGG AGTAAGAGGAGC	162

10

20

【 0 2 5 3】

30

40

50

【表 7 - 3】

説明	アミノ酸配列	配列 番号	ポリヌクレオチド配列	配列 番号
HER1t (バリエ ント 1 N 末端シグ ナル配列を含 む)	MRMRLPAQLLGLLMLWVPGSSGRKV CNGIGIGIEFKDLSINATNIKHFKN CTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPP LDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWP ENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGF SLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDV IISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQ KTKIISNRGENSCKATGQVCHALCS PEGCWGPEPRDCVSGGGSGGGGSG GGGSGGGGSEFWVLVVVGVLACYSL LVTVAFIIFWVRSKRS	166	ATGAGGATGAGGCTCCCTGCTCAGCT CCTGGGGCTGCTAATGCTCTGGGTCC CAGGATCCAGTGGGCGCAAAGTGTGT AACGGAATAGGTATTGGTGAATTTAA AGACTCACTCTCCATAAATGCTACGA ATATTAAACACTTCAAAAACCTGCACC TCCATCAGTGGCGATCTCCACATCCT GCCGGTGGCATTTAGGGGTGACTCCT TCACACATACTCCTCCTCTGGATCCA CAGGAACCTGGATATTCTGAAAACCGT AAAGGAAATCACAGGGTTTTTGCTGA TTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACG GACCTCCATGCCTTTGAGAACCTAGA AATCATACGCGGCAGGACCAAGCAAC ATGGTCAGTTTTCTCTTGCACTCGTC AGCCTGAACATAACATCCTTGGGATT ACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGATG GAGATGTGATAATTTACAGGAAACAAA AATTTGTGCTATGCAAATACAATAAA CTGGAAAAAACTGTTTGGGACCTCCG GTCAGAAAACCAAAATTATAAGCAAC AGAGGTGAAAACAGCTGCAAGGCCAC AGGCCAGGTCTGCCATGCCTTGCTGCT CCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCGGAG CCCAGGGACTGCGTCTCTGTTGGCGG TGGCTCGGGCGGTGGTGGGTCCGGTG GCGGCGGATCTGGTGGCGGTGGCTCG TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGG AGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAG TAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGG GTGAGGAGTAAGAGGAGC	173

10

20

【 0 2 5 4 】

30

40

50

【表 7 - 4】

説明	アミノ酸配列	配列番号	ポリヌクレオチド配列	配列番号
HER1t (バリエーション 2 N 末端シグナル配列を含む)	FRMRLPAQLLGLLMLWVPGSSGRKV CNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKN CTSIISGDLHLPLVAFRGDSFHTFP LDPQLDILKTVKEITGFLLIQAWP ENRTDLHAFENLEIIRGRKQHGQF SLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDV IISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQ KTKIISNRGENSCKATGQVCHALCS PEGCWGPEPRDCVSGGGSGGGGSG GGGSGGGGSFWVLVVVGGVLACYSL LVTVAFLIIFWVRSKRS	167	CCTAGGATGAGGCTCCCTGCTCAGCT CCTGGGGCTGCTAATGCTCTGGGTGC CAGGATCCAGTGGGCGCAAGTGTGT AACGGAATAGGTATTGGTGAATTTAA AGACTCAGTCTCCATAAATGCTACGA ATATTAACACTTCAAAACTGCACC TCCATCAGTGGCGATCTCCACATCCT GCCGGTGGCATTAGGGGTGACTCCT TCACACATACTCCTCCTCTGGATCCA CAGGAACGGATATTCTGAAAACCGT AAAGGAAATCACAGGGTTTTTGCTGA TTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACG GACCTCCATGCCTTTGAGAACCTAGA AATCATACGCGGCGAGGACCAAGCAAC ATGGTCAGTTTTCTCTGCGAGTCGTC AGCCTGAACATAACATCCTTGGGATT ACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGATG GAGATGTGATAATTTAGGAAACAAA AATTTGTGCTATGCAATAACAATAAA CTGGAAAAAACTGTTTGGTAOCTCCG GTCAGAAAAACCAAAATTATAAGCAAC AGAGGTGAAAACAGCTGCAAGGCCAC AGGCCAGGTCTGCCATGCCCTTGTGCT CCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCGGAG CCCAGGGACTGCGTCTCTGGTGGCGG TGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTG GCGGCGGATCTGGTGGCGGTGGCTCG TTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGG AGTCCTGGCTTGTATAGCTTGCTAG TAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGG GTGAGGAGTAAGAGGAGC	174
	RKVCNIGIGIGEFKDSLSINATNIKH FKNCTSIISGDLHLPLVAFRGDSFTH TPPLDQLDILKTVKEITGFLLIQ AWPENRTDLHAFENLEIIRGRKQH GQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISD GDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGT SGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHA LCSPEGCWGPEPRDCVSGGGSGGG GSGGGSGGGGSFWVLVVVGGVLAC YSLLVTVAFIIFWVRSKRS	97	CGCAAGTGTGTAACGGAATAGGTAT TGGTGAATTTAAGACTCACTCTCCA TAAATGCTACGAATATTAAACACTTC AAAACTGCACCTCCATCAGTGGCGA TCTCCACATCCTGCCGGTGGCATTTA GGGGTGACTCCTTCACACATACTCCT CCTCTGGATCCACAGGAACCTGGATAT TCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAG GGTTTTTGTGCTGATTGAGCTTGGCCT GAAAACAGGACGGACCTCCATGCCTT TGAGAACCTAGAAATCATACGCGGCA GGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCT CTTGCACTGCTCAGCCTGAACATAAC ATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGG AGATAAGTGATGGAGATGTGATAATT TCAGGAAACAAAAATTTGTGCTATGC AAATACAATAAACTGAAAAAACTGT TTGGTACCTCCGGTCAGAAAACCAAA ATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAG CTGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCC ATGCCCTGTGCTCCCCGAGGGCTGC TGGGGCCCGGAGCCAGGGACTGCGT CTCTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTG GTGGGTGGGTGGCGGGGATCTGGT GGCGGTGGCTCGTTTTGGGTGCTGGT GGTGGTTGGTGGAGTCTGGCTTGCT ATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTT ATTATTTTCTGGGTGAGAGTAAGAG GAGC	108

10

20

30

40

【 0 2 5 5 】

【表 7 - 5】

説明	アミノ酸配列	配列番号	ポリヌクレオチド配列	配列番号
			CGCAAAGTGTGTAACGGAATAGGTAT TGGTGAATTTAAAGACTCACTCTCCA TAAATGCTACGAATATTAAACACTTC AAAAACTGCACCTCCATCAGTGGCGA TCTCCACATCCTGCCGGTGGCATTTA GGGGTGACTCCTTCACACATACTCCT CCTCTGGATCCACAGGAACCTGGATAT TCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAG GGTTTTTGCTGATTTCAGGCTTGGCCT GAAAACAGGACGGACCTCCATGCCTT TGAGAACCCTAGAAATCATAACGCGGCA GGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCT CTTGCAAGTCCGTCAGCCTGAACATAAC ATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGG AGATAAGTGATGGAGATGTGATAATT TCAGGAAACAAAAATTTGTGCTATGC AAATACAATAAACTGGAAAAAACTGT TTGGGACCTCCGGTCAGAAAACCAAA ATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAG CTGCAAGGCCACAGGCCAGGCTGCC ATGCCTTGTGCTCCCCCGAGGGCTGC TGGGGCCCCGAGCCCAGGGACTGCGT CTCTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTG GTGGGTGGGTGGCGGGGATCTGGT GGCGGTGGCTCGTTTTGGGTGCTGGT GGTGGTTGGTGGAGTCCCTGGCTTGCT ATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTT ATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAG GAGC	109
hHER1 のドメイン III	RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKH FKNCTSIGDLHILEVAFRGDSFTH TPPLDPQELDKTVKEITGFLLIQ AWPENRTDLHAFENLEIRGRKQH GQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISD GDVVISGNKNLCYANTINWKKLFGT SGQKTKIISNRGENSCKATGQ	98	CGCAAAGTGTGTAACGGAATAGGTAT TGGTGAATTTAAAGACTCACTCTCCA TAAATGCTACGAATATTAAACACTTC AAAAACTGCACCTCCATCAGTGGCGA TCTCCACATCCTGCCGGTGGCATTTA GGGGTGACTCCTTCACACATACTCCT CCTCTGGATCCACAGGAACCTGGATAT TCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAG GGTTTTTGCTGATTTCAGGCTTGGCCT GAAAACAGGACGGACCTCCATGCCTT TGAGAACCCTAGAAATCATAACGCGGCA GGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCT CTTGCAAGTCCGTCAGCCTGAACATAAC ATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGG AGATAAGTGATGGAGATGTGATAATT TCAGGAAACAAAAATTTGTGCTATGC AAATACAATAAACTGGAAAAAACTGT TTGGTACCTCCGGTCAGAAAACCAAA ATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAG CTGCAAGGCCACAGGCCAG	110

【 0 2 5 6 】

【表 7 - 6】

説明	アミノ酸配列	配列番号	ポリヌクレオチド配列	配列番号
			CGCAAAGTGTGTAACGGAATAGGTAT TGGTGAATTTAAAGACTCACTCTCCA TAAATGCTACGAATATTAAACACTTC AAAAACTGCACCTCCATCAGTGGCGA TCTCCACATCCTGCCGGTGGCATTTA GGGGTGACTCCTTCACACATACTCCT CCTCTGGATCCACAGGAAGTGGATAT TCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAG GGTTTTTGCTGATTACAGGCTTGGCCT GAAAACAGGACGGACCTCCATGCCTT TGAGAACCTAGAAATCATACGCGGCA GGACCAAGCAACATGGTCAGTTTCT CTTGCACTCGTCAGCCTGAACATAAC ATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGG AGATAAGTGATGGAGATGTGATAATT TCAGGAAACAAAAATTTGTGCTATGC AAATACAATAAACTGGAAAAACTGT TTGGGACCTCGGTCAGAAACCAA ATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAG CTGCAAGGCCACAGGCCAG	164
hHER1 のドメイン IV	VCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNV SRGRECVDKCNLLEGEPRFVENSE CIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNC IQCAHYIDGPHCVKTCPPAGVMGENN TLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCT GPGLEGCPNTNGPKIPS	99	GTCTGCCATGCCTTGTGCTCCCCGA GGGCTGCTGGGGCCCGAGCCCAGGG ACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTGAGC CGAGGCAGGGAATGCGTGGACAAGTG CAACCTTCTGGAGGGTGAGCCAAGGG AGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGCATA CAGTGCCACCCAGAGTGCCCTGCCA GGCCATGAACATCACTGCACAGGAC GGGGAOCAGACAACGTATCCAGTGT GCCCCACTACATTGACGGCCCCACTG CGTCAAGACCTGCCCGGCAAGGAGTCA TGGGAGAAAAACAACCCCTGGTCTGG AAGTACGCAGACGCGGCCATGTGTG CCACCTGTGCCATCCAAACTGCACT ACGGATGCACTGGGCCAGGTCTTGAA GGCTGTCCAACGAATGGGCCTAAGAT CCCGTCC	111
hHER1 の先端切断されたドメイン IV	VCHALCSPEGCWGPEPRDCVS	100	GTCTGCCATGCCTTGTGCTCCCCGA GGGCTGCTGGGGCCCGAGCCCAGGG ACTGCGTCTCT	112
CD28 膜貫通ドメイン	FWVLVVVGGVLACYLLVTVAFIIF WVRSKRS	101	TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGG AGTCCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAG TAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGG GTGAGGAGTAAGAGGAGC	113
リンカー	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS	102	GGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGG GTGCGGTGGCGGCGGATCTGGTGGCG GTGGCTCG	114
Igκ N 末端シグナル配列	MRRLPAQLLGLLMLWVPGSSG	169	ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGG GCTGCTAATGCTCTGGGTGCCAGGAT CCAGTGGG	185
			ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGG GCTGCTAATGCTCTGGGTGCCAGGAT CCAGTGGG	186
Igκ バリエント 1 N 末端シグナル配列	MRRLPAQLLGLLMLWVPGSSG	170	ATGAGGATGAGGCTCCCTGCTCAGCT CCTGGGCTGCTAATGCTCTGGGTCC CAGGATCCAGTGGG	178
Igκ バリエント 2 N 末端シグナル配列	FRRLPAQLLGLLMLWVPGSSG	171	CCTAGGATGAGGCTCCCTGCTCAGCT CCTGGGCTGCTAATGCTCTGGGTGC CAGGATCCAGTGGG	179

【 0 2 5 7 】

10

20

30

40

50

【表 7 - 7】

説明	アミノ酸配列	配列 番号	ポリヌクレオチド配列	配列 番号
HER1t-2 (N 末端シグナル配列を含む)	MRLPAQLLGLMLWVPSSGRKVCN GIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCT SISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLD PQELDILKTVKEITGFLLIQAWPEN RTDLHAFENLEIIRGRKQHGQFSL AVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVII SGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKT KIISNRGENSCKATGQVCHALCSPE GCWGFEPDRDCVSCRNVSRGRECVDK CNLLEGEPRFVENSECIQCHPECL PQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDG PHCVKTCFAGVMGENNTLVWKYADA GHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCP NGPKIPSIATGMVGAALLLVVALG IGLFM	103	ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGG GCTGCTAATGCTCTGGGTGCCAGGAT CCAGTGGGCGCAAAGTGTAAACGGA ATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACTC ACTCTCCATAAATGCTACGAATATTA AACACTTCAAAAACCTGCACCTCCATC AGTGGCGATCTCCACATCCTGCCGGT GGCATTTAGGGGTGACTCCTTCACAC ATACTCCTCCTCTGGATCCACAGGAA CTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGA AATCACAGGGTTTTTGTCTGATTTCAGG CTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTC CATGCCTTTGAGAACCTAGAAATCAT ACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTC AGTTTTCTCTTGCACTGCTCAGCCTG AACATAACATCCTTGGGATTACGCTC CCTCAAGGAGATAAGTGATGGAGATG TGATAATTTTCAGGAAACAAAATTTG TGCTATGCAAATACAATAAACTGGAA AAAACCTGTTTGGGAOCTCCGGTCAGA AAACCAAAATTATAAGCAACAGAGGT GAAAACAGCTGCAAGGCCACAGGCCA GGTCTGCCATGCCTTGTGCTCCCCCG AGGGCTGCTGGGGCCCCGGAGCCCAGG GACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTCAG CCGAGGCAGGGAATGCGTGGACAAGT GCAACCTTCTGGAGGGTGAGCCAAGG GAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGCAT ACAGTGCCACCCAGAGTGCCCTGCCTC AGGCCATGAACATCACCTGCACAGGA CGGGGACCAGACAACCTGTATCCAGTG TGCCCCACTACATTGACGGCCCCCACT GCGTCAAGACCTGCCCCGGCAGGAGTC ATGGGAGAAAACAACACCTGGTCTG GAAGTACGCAGACGCCGGCCATGTGT GCCACCTGTGCCATCCAACTGCACC TACGGATGCACTGGGCCAGGTCTTGA AGGCTGTCCAACGAATGGGCCTAAGA TCCCGTCCATCGCCACTGGGATGGTG GGGGCCCTCCTCTTGTGCTGGTGGT GGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCATG	115

10

20

30

40

50

【 0 2 5 8 】

【表 7 - 8】

説明	アミノ酸配列	配列番号	ポリヌクレオチド配列	配列番号
HER1t-2 (N末端シグナル配列を含まない)	RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKH FKNCTISISGDLHILPVAFRGDSFTH TPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQ AWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQH GQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISD GDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGT SGQKTKIISNRGENSKATGQVCHA LCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGR ECVDKCNLLEGEPRFVENSECIQC HPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCA HYIDGPHCVKTCFAGVMGENNTLVW KYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGGL EGCPTNGPKIPSIATGMVGALLLLL VVALGIGLFM	104	CGCAAAGTGTGTAACGGAATAGGTAT TGGTGAATTTAAAGACTCACTCTCCA TAAATGCTACGAATATTAAACACTTC AAAAACTGCACCTCCATCAGTGGCGA TCTCCACATCCTGCCGGTGGCATTTA GGGGTGAATCCTTCACACATACTCCT CCTCTGGATCCACAGGAACCTGGATAT TCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAG GGTTTTTGTCTGATTGAGGCTTGGCCT GAAAACAGGACGGACCTCCATGCCTT TGAGAACCTAGAAATCATACGCGGCA GGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCT CTTGCACTCGTCAGCCTGAACATAAC ATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGG AGATAAGTGATGGAGATGTGATAATT TCAGGAAACAAAAATTTGTGCTATGC AAATACAATAAACTGGAAAAAACTGT TTGGGACCTCCGGTCAGAAAACCAAA ATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAG CTGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCC ATGCCTTGTGCTCCCCGAGGGCTGC TGGGGCCCGAGGCCAGGGACTGCGT CTCTTGCCGGAATGTACGCCGAGGCA GGGAATGCGTGGACAAGTGCAACCTT CTGGAGGGTGAGCCAAGGGAGTTTGT GGAGAACTCTGAGTGCATACAGTGCC ACCCAGAGTGCCCTGCCCTCAGGCCATG AACATCACCTGCACAGGACGGGGACC AGACAACCTGTATCCAGTGTGCCCACT ACATTGACGGCCCCCACTGCGTCAAG ACCTGCCCGGCAGGAGTCATGGGAGA AAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACG CAGACGCCGGCCATGTGTGCCACCTG TGCCATCCAACTGCACCTACGGATG CACTGGGCCAGGTCTTGAAGGCTGTC CAACGAATGGGCCTAAGATCCCGTCC ATCGCCACTGGGATGGTGGGGGCCCT CCTCTTGCTGCTGGTGGTGGCCCTGG GGATCGGCCTCTTCATG	116

10

20

30

【 0 2 5 9】

40

50

【表 7 - 9】

説明	アミノ酸配列	配列 番号	ポリヌクレオチド配列	配列 番号
hCD20 (全長)	MTTPRNSVNGTFPAEPMKGFIAMQS GPKPLFRMRSSLVGPQTQSFFMRESK TLGAVQIMNGLFHIALGGLLMIPAG IYAPICVTWYPLWGGIMYIISGSL LAATEKNSRKCLVKGKMIMNSLSLF AAISGMILSIMDILNIKISHFLKME SINFIRAHTFYINIYNCEPANFSEK NSPSTQYCYSIQSLFLGILSVMLIF AFFQELVIAGIVENEWKRTCSRPKS NIVLLSAEEKKEQTIEIKEEVVGLT ETSSQPKNEEDIEIIPIQEEEEET ETNFPEPPQDQESSPIENDSSP	105	ATGACAACACCCAGAAATTCAGTAAA TGGGACTTTCCCGGCAGAGCCAATGA AAGGCCCTATGCTATGCAATCTGGT CCAAAACCACTCTTCAGGAGGATGTC TTCAGTGGTGGGCCCCACGCAAAGCT TCTTCATGAGGGAATCTAAGACTTTG GGGGCTGTCCAGATTATGAATGGGCT CTTCCACATTGCCCTGGGGGGTCTTC TGATGATCCCAGCAGGGATCTATGCA CCCATCTGTGTGACTGTGTGTACCC TCTCTGGGGAGGCATTATGTATATTA TTTCCGGATCACTCCTGGCAGCAACG GAGAAAACTCCAGGAAGTGTGTTGGT CAAAGGAAAAATGATAATGAATTCAT TGAGCCTCTTTGCTGCCATTCTCTGGA ATGATTCTTTCAATCATGGACATACT TAATATTAATAATTTCCCATTTTTTAA AAATGGAGAGTCTGAATTTTATTAGA GCTCACACACCATATATTAACATATA CAACTGTGAACCAGCTAATCCCTCTG AGAAAACTCCCATCTACCCAATAC TGTTACAGCATACAATCTCTGTCTTT GGGCATTTTGTCAGTGATGCTGATCT TTGCCTTCTTCCAGGAAGTTGTAATA GCTGGCATCGTTGAGAATGAATGGAA AAGAACGTGCTCCAGACCCAAATCTA ACATAGTTCTCTGTGTCAGCAGAAGAA AAAAAAGAACAGACTATTGAAATAAA AGAAGAAGTGGTTGGGCTAACTGAAA CATCTTCCCAACCAAGAAATGAAGAA GACATTGAAATTATTCCAATCCAAGA AGAGGAAGAAGAAGAAACAGAGACGA ACTTTCAGAAOCTCCCCAAGATCAG GAATCCTCACCAATAGAAAATGACAG CTCTCCT	117

10

20

【 0 2 6 0 】

30

40

50

【表 7 - 1 0】

説明	アミノ酸配列	配列番号	ポリヌクレオチド配列	配列番号
hCD20t-1	MTTPRNSVNGTFPAEPMKGPIAMQS GPKPLFRMSSLVGPTQSFFMRESK TLGAVQIMNGLFHIALGGLLMIPAG IYAPICVTWVYPLWGGIMYIISGSL LAATEKNSRKCLVKGKMIMNSLSLF AAISGMILSIMDILNIKISHFLKME SLNFIRAHTFYINIYNCEPANPSEK NSPSTQYCYSIQSLFLGILSVMLIF AFFQELVIAGIVENEWKRTCSRPKS NIVLLSAEEKKEQTIEIKEEVVGLT ETSSQPKNEEDIE	106	ATGACCACACCACGGAAGCTCTGTGAA TGGCACCTTCCCAGCAGAGCCAATGA AGGGACCAATCGCAATGCAGAGCGGA CCCAAGCCTCTGTTCGGAGAATGAG CTCCCTGGTGGGCCCCAACCCAGTCCT TCTTTATGAGAGAGTCTAAGACACTG GGCGCCGTGCAGATCATGAACGGACT GTTCCACATCGCCCTGGGAGGAGTGC TGATGATCCCAGCCGGCATCTACGCC CCTATCTGCGTGACCGTGTGTACCC TCTGTGGGGCGGCATCATGTATATCA TCTCCGGCTCTCTGCTGGCCGCCACA GAGAAGAACAGCAGGAAGTGTCTGCT GAAGGGCAAGATGATCATGAATAGCC TGTCCTGTGTTGCCGCCATCTCTGGC ATGATCCTGAGCATCATGGACATCCT GAACATCAAGATCAGCCACTTCCTGA AGATGGAGAGCCTGAACCTCATCAGA GCCACACCCCTTACATCAACATCTA TAATTGCGAGCCTGCCAACCCATCCG AGAAGAATTCTCCAAGCACACAGTAC TGTTATTCCATCCAGTCTCTGTCTCT GGGCATCCTGTCTGTGATGCTGATCT TTGCCTTCTTTTCAGGAGCTGGTCATC GCCGGCATCGTGGAGAACGAGTGGAA GAGGACCTGCAGCCGCCCAAGTCCA ATATCGTGCTGCTGTCCGCCGAGGAG AAGAAGGAGCAGACAATCGAGATCAA GGAGGAGGTGTTGGGCTGACCGAGA CATCTAGCCAGCCTAAGAATGAGGAG GATATCGAG	118

10

20

【0261】

5.5 ベクター

一態様では、少なくとも3つのシストロンを含む多シストロン性発現カセットを含む組換えベクターが本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、多シストロン性発現カセットは、少なくとも4、5、又は6つのシストロンを含む。いくつかの実施形態では、多シストロン性発現カセットは、3つのシストロンを含む。いくつかの実施形態では、多シストロン性発現カセットは、4つのシストロンを含む。いくつかの実施形態では、多シストロン性発現カセットは、5つのシストロンを含む。

30

【0262】

いくつかの実施形態では、ベクターは、非ウイルスベクターである。例示的な非ウイルスベクターとしては、限定されないが、プラスミドDNA、エピソームプラスミド、ミニサークル、ミニストリング、オリゴヌクレオチド（例えば、mRNA、裸のDNA）が挙げられる。いくつかの実施形態では、多シストロン性ベクターは、DNAプラスミドベクターである。

40

【0263】

いくつかの実施形態では、ベクターは、ウイルスベクターである。ウイルスベクターは、複製能又は複製不能であり得る。ウイルスベクターは、組み込み型又は非組み込み型であり得る。哺乳動物細胞への遺伝子移入のために、いくつかのウイルスベクターの系が開発されており、好適なウイルスベクターは、当業者によって選択され得る。例示的なウイルスベクターとしては、限定されないが、アデノウイルスベクター（例えば、アデノウイルス5）、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター（例えば、AAV2、3、5、6、8、9）、レトロウイルスベクター（MMSV、MSCV）、レンチウイルスベクター（例えば、HIV-1、HIV-2）、ガンマレトロウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター（例えば、HSV1、HSV2）、アルファウイルスベクター（例えば、SFV、S

50

IN、VEE、M1)、フラビウイルス(例えば、クンジン、ウエストナイル、デングウイルス)、ラブドウイルスベクター(例えば、狂犬病ウイルス、VSV)、麻しんウイルスベクター(例えば、MV-E dm)、ニューカッスル病ウイルスベクター、ポックスウイルスベクター(例えば、VV)、麻疹ウイルス、及びピコルナウイルスベクター(例えば、コクサッキーウイルス)が挙げられる。

【0264】

一態様では、ベクターは、5'から3'に、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする第1のポリヌクレオチド配列と、F2Aエレメントを含む第2のポリヌクレオチド配列と、サイトカインをコードする第3のポリヌクレオチド配列と、T2Aエレメントを含む第4のポリヌクレオチド配列と、マーカータンパク質をコードする第5のポリヌクレオチド配列と、を含む多シストロン性発現カセットを含む。

10

【0265】

いくつかの実施形態では、F2Aエレメントは、配列番号137のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、F2Aエレメントは、配列番号137のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、F2Aエレメントは、配列番号141のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、F2Aエレメントは、配列番号141のポリヌクレオチド配列を含む。

20

【0266】

いくつかの実施形態では、F2Aエレメントは、配列番号138のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、F2Aエレメントは、配列番号138のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、F2Aエレメントは、配列番号142のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、F2Aエレメントは、配列番号142のポリヌクレオチド配列を含む。

30

【0267】

いくつかの実施形態では、T2Aエレメントは、配列番号139のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、T2Aエレメントは、配列番号139のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、T2Aエレメントは、配列番号143のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、T2Aエレメントは、配列番号143のポリヌクレオチド配列を含む。

【0268】

いくつかの実施形態では、T2Aエレメントは、配列番号140又は182のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、T2Aエレメントは、配列番号140のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、T2Aエレメントは、配列番号182のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、T2Aエレメントは、配列番号140又は182のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、T2Aエレメントは、配列番号140のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、T2Aエレメントは、

40

50

配列番号 182 のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む。

【0269】

いくつかの実施形態では、T2A エLEMENT は、配列番号 144、145、又は 165 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% 同一のポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、T2A エLEMENT は、配列番号 144 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% 同一のポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、T2A エLEMENT は、配列番号 145 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% 同一のポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、T2A エLEMENT は、配列番号 144、145、又は 165 のポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、T2A エLEMENT は、配列番号 144 のポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、T2A エLEMENT は、配列番号 145 のポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、T2A エLEMENT は、配列番号 165 のポリヌクレオチド配列を含む。

10

【0270】

F2A 及び P2A エLEMENT をコードする例示的なポリヌクレオチド配列を本明細書の表 8 に提供する。

20

【0271】

【表 8】

表 8. 例示的な 2A エLEMENT のアミノ酸及びポリヌクレオチド配列。

説明	アミノ酸配列	配列番号	ポリヌクレオチド配列	配列番号
F2A	VKQTLNFDLLKLAGDVESNP GP	137	GTGAAGCAGACCCCTGAATTT CGACCTGCTGAAGCTGGCCG GGGACGTGGAGAGCAACCCCT GGCCCC	141
F2A (隣接残基を含む)	GSGVKQTLNFDLLKLAGDVE SNPGP	138	GGCTCCGGAGTGAAGCAGAC CCTGAATTTTCGACCTGCTGA AGCTGGCCGGGACGTGGAG AGCAACCCCTGGCCCC	142
T2A	EGRGSLITCGDVEENPGP	139	GAGGGCAGAGGAAGTCTTCT AACATGCGGTGACGTGGAGG AGAAATCCCGGCCCT	143
T2A (隣接残基を含む)	LEGGGEGRGSLITCGDVEEN PGPR	140	CTGGAGGGCGGCGGAGAGGG CAGAGGAAGTCTTCTAACAT GCGGTGACGTGGAGGAGAAT CCCGGCCCTAGG	144
			CTCGAGGGCGGCGGAGAGGG CAGAGGAAGTCTTCTAACAT GCGGTGACGTGGAGGAGAAT CCCGGCCCTAGG	145
T2A (バリエーション隣接残基を含む)	LEGGGEGRGSLITCGDVEEN PGP	182	CTCGAGGGCGGCGGAGAGGG CAGAGGAAGTCTTCTAACAT GCGGTGACGTGGAGGAGAAT CCCGGCCCT	165

30

40

【0272】

いくつかの実施形態では、ベクター又は多シストロン性発現カセットは、1つ以上の追加のエLEMENTを含む。追加のエLEMENTとしては、限定されないが、プロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化 (ポリA) 配列、及び選択遺伝子が挙げられる。

【0273】

いくつかの実施形態では、ベクターは、選択可能なマーカーが発現される細胞に特異的形質を付与し、それらの細胞の人工選択を可能にする選択可能なマーカーをコードするポリヌクレオチド配列を含む。例示的な選択可能なマーカーとしては、限定されないが、抗

50

生物質耐性（例えば、カナマイシン、アンピシリン、又はトリクロサンに対する耐性）遺伝子が挙げられる。

【0274】

いくつかの実施形態では、多シストロン性発現カセットは、転写調節エレメントを含む。例示的な転写調節エレメントとしては、限定されないが、プロモーター及びエンハンサーが挙げられる。いくつかの実施形態では、多シストロン性発現カセットは、第1の5'シストロンの5'にプロモーター配列を含む。いくつかの実施形態では、プロモーターは、配列番号146のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、プロモーターは、配列番号146のポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、プロモーターのポリヌクレオチド配列は、配列番号146のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列からなる。いくつかの実施形態では、プロモーターのポリヌクレオチド配列は、配列番号146のポリヌクレオチド配列からなる。

【0275】

いくつかの実施形態では、多シストロン性発現カセットは、3'末端シストロンのポリA配列3'を含む。いくつかの実施形態では、ポリA配列は、配列番号148のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、ポリA配列は、配列番号148の核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ポリA配列は、配列番号148のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一の配列からなる。いくつかの実施形態では、ポリA配列は、配列番号148の核酸配列からなる。

【0276】

例示的なプロモーター及びポリA配列のポリヌクレオチド配列を本明細書の表9に提供する。

【0277】

【表9】

表9. 例示的なプロモーター及びポリA配列のポリヌクレオチド配列。

説明	核酸配列	配列番号
hEF-1 α ハイブリッドプロモーター	GGATCTGCGATCGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCA CAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGAGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGA GAAGGTGGCGCGGGGTAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTAAGTGGCTCCGCC TTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGA ACGTCTCTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGCTGAAGCTTCGAG GGGCTCGCATCTCTCCTTCACGCGCCCGCCGCCCTACCTGAGGCGGCCATC CACGCCGGTTGAGTCGCGTTCTGCGCGCTCCCGCCTGTGGTGCCTCCTGAA CTGCGTCCGCCGTCTAGGTAAGTTTAAAGCTCAGGTCGAGACCGGGCCTTT GTCCGGCGCTCCCTTGAGGCCTACCTAGACTCAGCCGGCTCTCCACGCTTT GCCTGACCCGTGCTTGCCTCAACTCTACGTCTTTGTTTCGTTTCTGTTCTGC GCCGTTACAGATCCAAGCTGTGACCGGCGCCTACCTGAGAT	146
BGHポリA配列	GATCTGCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCGCG TGCTTCTCTTGACCCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCCTAATAAA ATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGG GTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGC ATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGG	148

【0278】

例示的な多シストロン性発現カセットのポリヌクレオチド配列を、本明細書の表10に提供する。いくつかの実施形態では、多シストロン性発現カセットは、配列番号149、150、又は151のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、多シストロン性発現カセットは、発現番号1

49のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、多シストロン性発現カセットは、発現番号150のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、多シストロン性発現カセットは、発現番号151のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列を含む。

【0279】

いくつかの実施形態では、多シストロン性発現カセットは、配列番号149、150、又は151のポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、多シストロン性発現カセットは、配列番号149のポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、多シストロン性発現カセットは、配列番号150のポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、多シストロン性発現カセットは、配列番号151のポリヌクレオチド配列を含む。

【0280】

10

20

30

40

50

【表 10 - 1】

表 10. 例示的な多シストロン性発現カセットのポリヌクレオチド配列。

名称	ポリヌクレオチド配列	配列番号
カセット 1 (プラスミド A 及びプラスミド D から、 CD19CAR—F2A— mbIL15—T2A— HER1t)	ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGTGAGCTGCCCAACCCCGCCTTTCTGCTGATCC CCGACATCCAGATGACCCAGACCACCTCCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGACCGGGTGACCAT CAGCTGCCGGGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACCTGGTATCAGCAGAAGCCCCGACGGC ACCGTCAAGCTGCTGATCTACACACACAGCCGGCTGCACAGCGCGGTGCCAGCCGGTTTAGCG GCAGCGGCTCCGGCACCGACTACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAGCAGGAGGACATCGCCAC CTACTTTTGCCAGCAGGGCAACACACTGCCCTACACCTTTGGCGGGGGAACAAAGCTGGAGATC AOCGGCAGCAOCTCCGGCAGCGCAAGCCTGGCAGCGGGCAGGGCAGCAOCAAAGGGCGAGGTGA AGCTGCAGGAGAGCGGCCCTGGCCTGGTGGCCCCCAGCCAGAGCCTGAGCGTGACCTGTACCGT GTCCGGCGGTGTCCCTGCCCGACTACGGCGTGTCCCTGGATCCGGCAGCCCCCTAGGAAGGGCCTG GAGTGGCTGGCGGTGATCTGGGGCAGCGAGACCAOCTACTACAACAGCGOCTGAAGAGCCCGGC TGACCATCATCAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGTGTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGA CGACACCGCCATCTACTACTGTGCCAAGCACTACTACTACGGCGGCAGCTACGCCATGGACTAC TGGGGCCAGGGCAACCAGCGTGACCGTGTGCCAGCAAGCCCCACCACCCCTGCCCTAGACCTC CAACCCAGCCCTTACAATCGCCAGCCAGCCCCCTGAGCCTGAGGGCCGAGCCCTGTAGACCTGC CTGTGGCGGAGCGGTGCACACCAGAGGCCCTGGATTTCGCCTGCGACATCTACATCTGGGCCCT CGTCCGGGCAOCTGTGGCGTGTGCTGCTGAGCCTGGTCATCACCTGTACTGCAACCACCGGA ATAGGAGCAAGCGGAGCAGAGGCGGCCACAGCGACTACATGAACATGACCCCCGGAGGCCCTGG CCCCACCCGGAAGCACTACAGCCCTACGCCCTTCCAGGGACTTCGCCGCCCTACCGGAGCCGG GTGAAGTTTACCGCGGAGCGCCGACGCCCTGCTTACCAGCAGGGCCAGAACAGCTGTACAACG AGCTGAACCTGGGCGGAGGGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGGCCGGGACCTGA GATGGCGGGCAAGCCCCGGAGAAAGAACCTCAGGAGGGCTGTATAACGAAGTGCAGAAAGAC AAGATGGCCGAGGCCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGCGGAGGGGCAAGGGCCACG ACGGCCTGTACAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGATAOCTACGACGCCCTGCACATGCAGGC CCTGCCCCCCAGAGGCTCCGGAGTGAAGCAGACCTGAATTTTGACCTGCTGAAGCTGGCCGGG GACGTGGAGAGCAACCTGGCCCCATGGATTGGACCTGGATTCTGTTCTGGTGGCCGCTGCCA CAAGATGTCACAGCAACTGGGTGAATGTGATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAGGATCTGATCCA GAGCATGCACATTGATGCCACCTGTACACAGAATCTGATGTGCACCTAGCTGTAAAGTGACC GCCATGAAGTGTTCCTGCTGGAGCTGCAGGTGATTCTCTGGAAGCGGAGATGCCTCTATCC ACGACACAGTGGAGAACTGTATCATCCTGGCCAACAATAGCCTGAGCAGCAATGGCAATGTGAC AGAGTCTGGCTGTAAAGAGTGTGAGGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAGAGC TTTGTGCACATCGTGCAGATGTTCAATACAAGCTCTGGCGGAGGATCTGGAGGAGCGGAT CTGGAGGAGGAGGCGAGTGGAGGCGGAGGATCTGGCGGAGGATCTCTGCAGATTACATGCCCTCC TCCAATGTCTGTGGAGCACGCCGATATTTGGGTGAAGTCTACAGCCTGTACAGCAGAGAGAGA TACATCTGCAACAGCGGCTTTAAGAGAAAGGCCGCCACCTCTTCTCTGACAGAGTGCCTGCTGA ATAAGGCCCAAAATGTGGCCCACTGGACAACACCTAGCCTGAAGTGCAATAGAGATCCTGCCCT GGTCCACCAGAGGCCCTGCCCTCCATCTACAGTGACAACAGCCGGAGTGACACCTCAGCCTGAA TCTCTGAGCCCTTCTGAAAAGAACTGCCGCCAGCTCTCTAGCTCTAATAATACCGCGCCA CAACAGCCGCCATTGTGCCCTGGATCTCAGCTGATGCCCTAGCAAGTCTCCTAGCACAGGCACAAC AGAGATCAGCAGCCACGAATCTTCTCACGGAACAACCTTCTCAGACCACCGCCAAGAATTGGGAG CTGACAGCCTCTGCCCTCACCAGCCTCCAGGAGTGATCTCAGGGCCACTCTGATACAACAG TGGCCATCAGCACATCTACAGTGTGCTGTGTGGACTGTCTGCCGTGTCTGTCTGGCTGTTA CCTGAAGTCTAGACAGACACCTCCTCTGGCTCTGTGGAGATGGAGGCCATGGAAGCCCTGCC GTGACATGGGGAACAAGCAGCAGAGATGAAGACCTGGAGAATTGTTCTCACCACCTGCTGGAGG GGCGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAG GATGAGGCTCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTAATGCTCTGGGTGCCAGGATCCAGTGGCGC AAAGTGTGTAACGGAAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACTCACCTCTCCATAAATGCTACGAATA TTAAACACTTCAAAAACCTGCACCTCCATCAGTGGCGATCTCCACATCTGCCGGTGGCATTTAG GGGTGACTCCTTACACATACTCCTCCTCTGGATCCACAGGAACCTGGATATTCTGAAAACCGTA AAGGAAATCAGAGGGTTTTGTCTGATTGAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCC TTGAGAACCTAGAAATCATACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTCTCTTGCAGTCGT CAGCCTGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCTCAAGGAGATAAGTGATGGAGATGTGATA ATTTGAGGAAACAAAAATTTGTGCTATGCAAAATACAATAAACTGGAAAAAACTGTTTGGTAOCT CCGGTCAGAAAACCAAAATTTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGCTGCAAGGCCACAGGCCAGGT CTGCCATGCCCTTGTGCTCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCGGAGCCAGGGACTGCGTCTCTGGT GGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGCGGGCGGATCTGGTGGCGGTGGCTCGTTTGGG TGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCTGGCTTGTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTAT TTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGC	149

【0281】

10

20

30

40

50

【表 10-2】

名称	ポリヌクレオチド配列	配列番号
カセット 2 (プラス ミドB及 びプラス ミドE、 mbIL15- T2A- HER1- F2A- CD19CAR)	ATGGATTGGACCTGGATTCTGTTTCTGGTGGCCGCTGCCACAAGAGTGCACAGCAACTGGGTGA ATGTGATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAGGATCTGATCCAGAGCATGCACATTGATGCCACCCCT GTACACAGAATCTGATGTGCACCCCTAGCTGTAAAGTGACCGCCATGAAGTGTTTTCTGCTGGAG CTGCAGGTGATTTCTCTGGAAAGCGGAGATGCTTCTATCCACGACACAGTGGAGAATCTGATCA TCCTGGCCAACAATAGCCTGAGCAGCAATGGCAATGTGACAGAGTCTGGCTGTAAGGAGTGTGA GGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAGAGCTTTGTGCACATCTGTCAGATGTTT ATCAATACAAGCTCTGCGGAGGATCTGGAGGAGGCGGATCTGGAGGAGGAGGAGTGGAGGCG GAGGATCTGGCGGAGGATCTCTGCAGATTACATGCCCTCCTCCAAATGTCTGTGGAGCACGCCGA TATTTGGGTGAAGTCTTACAGCCTGTACAGCAGAGAGATACATCTGCAACAGCGGCTTTAAG AGAAAGGCCCGCACCTCTTCTCTGACAGAGTGCCTGCTGAATAAGGCCACAAATGTGGCCACT GGACAACACCTAGCCTGAAGTGCATTAGAGATCCTGCCCTGGTCCACCAGAGGCCCTGCCCTCC ATCTACAGTGACAACAGCCGGAGTGACAACCTAGCCTGAATCTCTGAGCCCTCTCTGGAAAAGAA CCTGCCGCCAGCTCTCTAGCTCTAATAATACCGCCGCCACAACAGCCGCCATTGTGCTGGAT CTCAGCTGATGGCTAGCAAGTCTCCTAGCACAGGCACAACAGAGATCAGCAGCCACGAATCTTC TCACGGAACACCTTCTCAGACCACCGCCAAGAATTGGGAGCTGACAGCCTCTGCCCTCTCACCAG CCTCCAGGAGTGTATCTCAGGGCCACTCTGATACAACAGTGGCCATCAGCACATCTACAGTGC TGCTGTGTGGACTGTCTGCCGTGTCTCTGCTGGCCTGTTACCTGAAGTCTAGACAGACACCTCC TCTGGCCTCTGTGGAGATGGAGGCCATGGAAGCCCTGCCTGTGACATGGGGAACAAGCAGCAGA GATGAGGACCTGGAGAATTGTTCTCACCACCTGCTCGAGGGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTC TTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGGATGAGGCTCCTGTCTCAGCTCCT GGGGCTGCTAATGCTCTGGGTCCCAGGATCCAGTGGGCGCAAAGTGTGTAACGGAATAGGTATT GGTGAAATTTAAAGACTCACTCTCCATAAATGTACGAATATTAAACACTTCAAAAACCTGCACT CCATCAGTGGCGATCTCCACATCCTGCCGCTGGCATTAGGGGTGACTCCTTCACACATACTCC TCCTCTGGATCCACAGGAATGGATATTCTGAAAACCGTAAGGAAATCACAGGGTTTGTGCTG ATTGAGCTTGGCCTGAAAACAGGACCGACCTCCATGCTTTGAGAACCTAGAAATCATAACGG GCAGGACCAAGCAACATGGTCACTTTTCTCTTGCAGTGTGACCTGAACATAACATCCTTGGG ATTACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGTGGAGATGTGATAATTTGAGAAACAAAAATTTGTGC TATGCAAAATACATAAACTGGAAAAAAGTGTGGGACCTCCGGTCAGAAAACAAAAATTATAA GCAACAGAGGTGAAAAACAGCTGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCCTGTGTCTCCCCGA GGGCTGCTGGGGCCCGGAGGCCAGGGACTGCGTCTCTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGG TCGGGTGGCGGGGATCTGGTGGCGGTGGCTCGTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCC TGGCTTGTATAGCTTGTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAG CGGCTCCGGAGTGAAGCAGACCTGAATTTCGACCTGCTGAAGCTGGCCGGGACGTGGAGAGC AACCCTGGCCCATGCTGCTGCTGGTGAACAGCCTGCTGCTGTGTGAGCTGCCCCACCCCGCT TTCTGCTGATCCCGACATCCAGATGACCCAGACCCTCCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGA CCGGGTGACCATCAGCTGCCGGGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACCTGGTATCAGCAG AAGCCCAGCGGACCGTCAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCCGGCTGCACAGCGGCTGCCCA GCCGTTTAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTACAGCCTGACCATCTCAACCTGGAGCAGGA GGACATCGCCACCTACTTTTGCAGCAGGGCAACACACTGCCCTACACCTTTGGCGGGGGAACA AAGCTGGAGATCACCGGCAGCACCTCCGGCAGCGGCAAGCCTGGCAGCGGCAGGGGCAGCACA AGGGCGAGGTGAAGCTGCAGGAGAGCGGCCCTGGCCTGGTGGCCCCAGCCAGAGCCTGAGCGT GACCTGTACCGTGTCCGGCGTGTCCCTGCCGACTACGGCGTGTCTGGATCCGGCAGCCCT AGGAAGGGCCTGGAGTGGCTGGCGGTGATCTGGGGCAGCGAGACCACTACTACAACAGCGGCC TGAAAGAGCGGCTGACCATCATCAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGTGTTCTGAAGATGAACAG CCTGCAGACCGGACACCGCATCTACTACTGTGCCAAGCACTACTACTACGGCGGCAGCTAC GCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACAGCGTGACCTGTGTCAGCAAGCCCAACACCCCTG CCCCAGACCTCAACCCAGCCCTACAATCGCCAGCCCTGAGCCTGAGGCCCGAAGC CTGTAGACCTGCCGCTGGCGGAGCCGTGCACACCAGAGGCTTGATTTCGCCCTGCACATCTAC ATCTGGGCACCTCTGGCGGCACTGTGGCGTGTGCTGTGCTGAGCCTGGTCATCAACCTGTACT GCAACCACCGGAATAGGAGCAAGCGGAGCAGAGGCGGCCACAGCGACTACATGAACATGACCCC CCGGAGGCTTGGCCCCACCGGAAGCACTACAGCCCTACGCCCTCCAGGGACTTCGCCGCC TACCGGAGCCGGGTGAAGTTTACGCCGAGCGCCGACGCCCTGCCCTACAGCAGGGCCAGAACC AGCTGTACAACAGCTGAACCTGGGCCGGAGGGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGG CCGGGACCTGAGATGGCGGCAAGCCCCGAGAAAGAACCTCAGGAGGGCTGTATAACGAA CTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGCGGAGGG GCAAGGGCCACGACGGCTGTACAGGGCTGAGCACCGCCACCAAGGATACCTACGACGCCCT GCACATGCAGGCCCTGCCCCCA	150

10

20

30

40

【0282】

【表 10-3】

名称	ポリヌクレオチド配列	配列番号
カセット 3 (プラス ミドC及 びプラス ミドFか ら、 HER1t- T2A- mIL15- F2A- CD19CAR)	ATGAGGATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTAATGCTCTGGGTCCCAGGATCCAGTG GGCGCAAAGTGTGTAAACGGAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACTCACTCTCCATAAATGCTAC GAATATTAAACACTTCAAAAACCTGCACCTCCATCAGTGGCGATCTCCACATCCTGOCGGTGGCA TTTAGGGGTGACTCCTTCACACATACTCCTCCTCTGGATCCACAGGAACCTGGATATTCTGAAAA CCGTAAGAGGAAATCACAGGGTTTTTGTGCTGATTACAGGCTTGGCTGAAAAACAGGACGGACCTCCA TGCCCTTTGAGAACCTAGAAATCATACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTTGCA GTGCTCAGCCTGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGATGGAGATG TGATAATTTTCAGGAAACAAAAATTTGTGCTATGCAAAATACAATAAACTGGAaaaaaactgTTTTGG GACCTCCGGTCAGAAAACCAAAATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGCTGCAAGGCCACAGGC CAGGTCCTGCCATGCCTTGTGCTCCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCGAGCCCCAGGGACTGCGTCT CTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGGCGGGGATCTGGTGGCGGTGGCTCGTT TTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCTGCTTGTATAGCTTGTAGTAAACAGTGGCCTTT ATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCCTCAGGGCGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTC TAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTATGGATTGGACCTGGATTCTGTTTCTGGT GGCCGCTGCCACAAGAGTGCACAGCAACTGGGTGAATGTATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAG GATCTGATCCAGAGCATGCACATTGATGCCACCTGTACACAGAATCTGATGTGCACCTAGCT GTAAAGTGACCGCCATGAAGTGTCTTCTGCTGGAGCTGCAGGTGATTCTCTGGAAGCGGAGA TGCCCTCTATCCACGACACAGTGGAGAATCTGATCATCTTGCCCAACATAGCCTGAGCAGCAAT GGCAATGTGACAGAGTCTGGCTGTAAGGAGTGTGAGGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGT TTCTGCAGAGCTTTGTGCACATCGTGCAGATGTTTATCAATACAAGCTCTGGCGGAGGATCTGG AGGAGGGCGGATCTGGAGGAGGAGGCGAGTGGAGGCGGAGGATCTGGCGGAGGATCTCTGCAGATT ACATGCCCTCCCTCCAATGTCTGTGGAGCACGCCGATATTTGGGTGAAGTCTACAGCCTGTACA GCAGAGAGAGATACATCTGCAACAGCGGCTTTAAGAGAAAGGCCCGGCACCTCTCTCTGACAGA GAGCTGCTGAATAAGGCCACAAATGTGGCCCACTGGACAACACCTAGCCTGAAGTGCATTAGA GATCCTGCCCTGGTCCACCAGAGGCCTGCCCTCCATCTACAGTGACAACAGCCGGAGTGACAC CTCAGCCTGAATCTCTGAGCCTTCTGGAAAAGAACCTGCCCGCAGCTCTCCTAGCTCTAATAA TACCGCGGCCACAACAGCCGCCATTGTGCTGGATCTCAGCTGATGCTAGCAAGTCTCCTAGC ACAGGCACAACAGAGATCAGCAGCCACGAATCTCTCACGGAACACCTCTCAGACCCGCCCA AGAATTGGGAGCTCAGAGCCTCTGCCTCTCACCAGCTCCAGGAGTGTATGCTCAGGGCCACTC TGATACAACAGTGGCCATCAGCACATCTACAGTGTCTGTGTGGACTGTCTGCCGTGCTCTGTG CTGGCCTGTTACTGAAGTCTAGACAGACACCTCCTCTGGCCTCTGTGGAGATGGAGGCCATGG AAGCCCTGCCTGTGACATGGGGAACAAGCAGCAGAGATGAGGACCTGGAGAATTTGTCTCACCA CCTGGGCTCCGGAGTGAAGCAGACCTGAATTTGACCTGCTGAAGCTGGCCGGGAGCTGGAG AGCAACCTTGGCCCATGCTGCTGTGCTGGTGACCAAGCTGCTGCTGTGTGAGCTGCCCCACCCCG CCTTTCTGCTGATCCCGACATCCAGATGACCCAGACACCTCCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGG CGACCGGTGACCATCAGCTGCCGGGCGAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACCTGGTATCAG CAGAAGCCCGACGGCACCGTCAAGCTGCTGATCTACCACACCGCCGGCTGCACAGCGGCGTGC CCAGCCGTTTAGCGGCAGCGGCTCCGGCACGACTACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAGCA GGAGGACATCGCCACCTACTTTTGCCAGCAGGGCAACACACTGCCCTTACACCTTTGGCGGCGGA ACAAAGCTGGAGATCACCGGCAGCACCTCCGGCAGCGGCAAGCCTGGCAGCGGCGAGGGCAGCA CCAAGGGCGAGGTGAAGCTGCAGGAGAGCGGCCCTGGCTGGTGGCCCCAGCCAGAGCCTGAG CGTGACCTGTACCGTGTCCCGCGTGTCCCTGCCCGACTACGGCGTGTCTGGATCCGGCAGCCC CCTAGGAGAGGGCTTGGAGTGGTGGGCGTGAATCTGGGCGAGCGAGACCACTACTACAACAGCG CCTGAAGAGCCGCTGACCATCATCAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGTGTCTCTGAAGATGAA CAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATCTACTACTGTGCCAAGCACTACTACTACGGCGGCAGC TACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACAGCGTGACCGTGTCCAGCAAGCCCACCAACCCC CTGCCCTTAGACCTCCAACCCAGCCCTTACAATCGCCAGCCAGCCCTGAGCCTGAGGCCCGGA AGCCTGTAGACCTGCCCTTGGCGGAGCGGTGCACACAGAGGCTGGATTTCCCTTGCACATC TACATCTGGGCACCTCTGGCCGCACTGTGGCGTGTGCTGTGAGCCTGGTTCATCACCCCTGT ACTGCAACCACCGGAATAGGAGCAAGCGGAGCAGAGGGGCCACAGCGACTACATGAACATGAC CCCCCGGAGGCTTGGCCCCACCGGAAGCACTACAGCCCTACGCCCTCCAGGGACTTCGCC GCCTACCGGAGCGGGTGAAGTTCAGCCGGAGCGCCGACGCCCTGCTACAGCAGGGCCAGA ACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCCGGAGGGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAG AGGCCGGGACCTTGAGATGGGCGGCAAGCCCGGAGAAAGAACCTCAGGAGGGCTGTATAAC GAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCTTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGCGGA GGGGCAAGGGCCACGACGGCTGTACCAGGGCTGAGCACCGCCACCAAGGATACCTACGACGC CCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCGAGA	151

10

20

30

40

【0283】

例示的な多シストロン性発現カセットのポリヌクレオチド配列によってコードされたアミノ酸配列を本明細書の表 11 に提供する。いくつかの実施形態では、多シストロン性発現カセットは、配列番号 152、153 又は 154 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% 同一のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、多シストロン性発現カセットは、配列番号 152 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% 同一のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、多シストロン性発現カセットは、配列番号 153 のアミノ酸配列

50

に対して少なくとも 95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% 同一のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、多シストロン性発現カセットは、配列番号 154 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% 同一のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む。

【0284】

いくつかの実施形態では、多シストロン性発現カセットは、配列番号 152、153、又は 154 のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、多シストロン性発現カセットは、配列番号 152 のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、多シストロン性発現カセットは、配列番号 153 のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、多シストロン性発現カセットは、配列番号 154 のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む。

【0285】

10

20

30

40

50

【表 11-1】

表 11. 例示的な多シストロン性発現カセットによってコードされるタンパク質のアミノ酸配列。

説明	アミノ酸配列	配列番号
プラスミド A 及びプラスミド D からの発現カセットの翻訳 (CD19CAR-F2A-mbIL15-T2A-HER1t)	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGETTYYNALSKSRLLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDATAIYYCAKHYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSSKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAA GGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSGGHSYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGMDWTWILFLVAAATRVHSNWNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFIN TSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLQITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPAALVHQRAPAPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPSPKSPSTGTTEISSHESHGTPSQTTAKNWELETASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLACYLKSRQTPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRDEDLNCSHLLLEGGEGRGSLTTCGDVEENPGPRMRLPAQLLGLLMLWVPGSSGRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSIISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCGWGEPRDCVSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGFWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRS	152
プラスミド B 及びプラスミド E からの発現カセットの翻訳 (mbIL15-T2A-HER1t-F2A-CD19CAR)	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFIN TSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLQITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPAALVHQRAPAPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPSPKSPSTGTTEISSHESHGTPSQTTAKNWELETASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLACYLKSRQTPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRDEDLNCSHLLLEGGEGRGSLTTCGDVEENPGPRMRLPAQLLGLLMLWVPGSSGRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSIISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCGWGEPRDCVSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGFWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSGSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGMMLLVTSLLLCELPHPAFLIPDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGETTYYNALSKSRLLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDATAIYYCAKHYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSSKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSGGHSYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	153

【0286】

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 2】

説明	アミノ酸配列	配列番号
プラスミド C 及びプラスミド F からの発現カセットの翻訳 (HER1t-T2A-mbIL15-F2A-CD19CAR)	MRMRLPAQLLGLMLWVPGSSGRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKN CTISISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVEITGFLLIQAWP ENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGOFS LAVVSLNITSIGLRSLKEISDGDV IISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCS PEGCWGPEPRDCVSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGFWLVVVGGVLACYSL LVTVAFIIFWVRSKRSLEGGEGGRGSLTTCGDVEENPGFMDWTWILFLVA AATRVHSNWNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCF LLEDQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECELEE KNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQITC PPPMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNV AHWTTPSLKCIRDPA LVHQRPAFPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASS PSSNNTAATTAATVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESHSHTPSQTAKNW ELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSL LACYLKSRQT PPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRDEDLNCSHHLGSGVKQTLNFDLLKLA GDVESNPGPMLLLVTSLLLCELPHPAFLIPDIQMTQTSSLSASLGDRV TISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGST DYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSG EGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKG LEWLGVWGSSETTYINSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYY CAKHYYGGSYANDYWGQGTSTVTVSSKPTTTPAPRPPTPAPTIA SQPLSL RPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCNHR NRSKRSRGHSDYMNMTPRRFGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSA DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVLDRRGRDPEMGGKPRKPNQEG YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA LPPR	154

10

20

【0287】

5.6 トランスポゾン及びトランスポザーゼ系

いくつかの実施形態では、多シストロン性ベクターの導入遺伝子は、合成DNA転移可能エレメント、例えば、DNAトランスポゾン／トランスポザーゼ系、例えば、Sleeping Beauty (SB) を介して、免疫エフェクター細胞に導入される。SBは、DNAトランスポゾンのTc1／マリナースーパーファミリーに属する。DNAトランスポゾンは、あるDNA部位から別のDNA部位へと、単一のカットアンドペースト方式で転座する。トランスポジションは、定義されたDNAセグメントが1つのDNA分子から切除され、同じ若しくは異なるDNA分子又はゲノム中の別の部位に移動される正確なプロセスである。

30

【0288】

例示的なDNAトランスポゾン／トランスポザーゼ系としては、限定されないが、Sleeping Beauty (例えば、その各々の内容が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれるUS6489458、US8227432を参照されたい)、piggy Bac トランスポゾン系 (例えば、その各々の内容が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれるUS9228180、Wilson et al, "Piggy Bac Transposon-mediated Gene Transfer in Human Cells," Molecular Therapy, 15:139-145 (2007) を参照されたい)、piggy Bat トランスポゾン系 (例えば、その内容が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれるMitra et al., "Functional characterization of piggy Bat from the bat Myotis lucifugus unveils an active mammalian DNA transposon," Proc. Natl. Acad. Sci USA 110:234-239 (2013) を参照されたい)、TcBuster (例えば、その内容が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれるWoodard et al. "Comparative Analysis of the Recently Discovered hAT Transposon TcBuster in Human Cells," PLOS ONE, 7(11):e42666 (Nov. 2012) を参照されたい)、及びTol2トランスポゾン系 (例え

40

50

ば、その各々の内容が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれるKawakami, "Tol2: a versatile gene transfer vector in vertebrates," *Genome Biol.* 2007; 8 (Suppl 1): S7を参照されたい)が挙げられる。更なる例示的なトランスポゾン／トランスポザーゼ系は、US7148203、US8227432、US20110117072、Mates et al., *Nat Genet*, 41 (6): 753-61 (2009)、及びIvies et al., *Cell*, 91 (4): 501-10, (1997)で提供されており、その各々の内容が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる)。

【0289】

10

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の導入遺伝子は、SBトランスポゾン／トランスポザーゼ系を介して、免疫エフェクター細胞に導入される。SBトランスポゾン系は、SBトランスポザーゼ及びSBトランスポゾンを含む。SBトランスポゾン系は、天然に存在するSBトランスポザーゼ、又は活性を保持する誘導体、バリエーション、及び／若しくは断片、及び天然に存在するSBトランスポゾン、又は活性を保持する誘導体、バリエーション、及び／若しくは断片を含み得る。例示的なSB系は、Hackett et al., "A Transposon and Transposase System for Human Application," *Mol Ther* 18: 674-83, (2010))に記載され、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0290】

20

いくつかの実施形態では、ベクターは、左逆方向末端反復(LTR)(すなわち、発現カセットに対して5'であるLTR)と、右LTR(すなわち、発現カセットに対して3'であるLTR)と、を含む。左LTR及び右LTRは、ベクターの多シストロン性発現カセットに隣接する。いくつかの実施形態では、左LTRは、多シストロン性発現カセットに対して逆の向きであり、右LTRは、多シストロン性発現カセットに対して同じ向きである。いくつかの実施形態では、右LTRは、多シストロン性発現カセットに対して逆の向きであり、左LTRは、多シストロン性発現カセットに対して同じ向きである。

【0291】

いくつかの実施形態では、左LTR及び右LTRは、Sleeping Beautyトランスポゾン、piggyBacトランスポゾン、TcBusterトランスポゾン、及びTol2トランスポゾンからなる群から選択されるDNAトランスポゾンのLTRである。いくつかの実施形態では、左LTR及び右LTRは、Sleeping Beauty DNAトランスポゾンのLTRである。

30

【0292】

いくつかの実施形態では、左LTRは、配列番号155又は156のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、左LTRは、配列番号155のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、左LTRは、配列番号155のポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、左LTRは、配列番号156のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、左LTRは、配列番号156のポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、右LTRは、配列番号157、159、又は184のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、右LTRは、配列番号15

40

50

9 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % 同一のポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、右 ITR は、配列番号 184 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % 同一のポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、右 ITR は、配列番号 157 のポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、右 ITR は、配列番号 159 のポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、右 ITR は、配列番号 184 のポリヌクレオチド配列を含む。

【0293】

例示的な SB ITR のポリヌクレオチド配列を本明細書の表 12 に提供する。

10

【0294】

【表 12】

表 12. 例示的な SB ITR のポリヌクレオチド配列。

説明	ポリヌクレオチド配列	配列番号
左 ITR-A	AGTTGAAGTCGGAAGTTTACATACACTTAAGTTGGAGTCATTAAAACTCGTTTTTCA ACTACTCCACAAATTTCTTGTTAACAACAATAGTTTGGCAAGTCAGTTAGGACAT CTACTTTGTGCATGACACAAGTCATTTTCCACAATTGTTTACAGACAGATTATTT CACTTATAATTCACCTGTATCACAATTCAGTGGGTCAGAAGTTTACATACACTAA	155
左 ITR-B	ATATCAATTGAGTTGAAGTCGGAAGTTTACATACACTTAAGTTGGAGTCATTAAAC TCGTTTTTCAACTACACCACAAATTTCTTGTTAACAACAATAGTTTGGCAAGTCA GTTAGGACATCTACTTTGTGCATGACACAAGTCATTTTCCACAATTGTTTACAGA CAGATTATTTCACCTATAATTCACCTGTATCACAATTCAGTGGGTCAGAAGTTTACA TACACTAACAATTGATAT	156
右 ITR-A	TTGAGTGTATGTAACTTCTGACCCACTGGGAATGTGATGAAAGAAATAAAAGCTGA AATGAATCATTCTCTCTACTATTATCTGATATTTACATTCTTAAATAAAAGTGGT GATCCTAAGTACCTAAGACAGGGAATTTTACTAGGATTAAATGTCAGGAATTGTG AAAAAGTGAGTTTAAATGTATTTGGCTAAGGTGTATGTAACTTCCGACTTCAACTG	157
右 ITR-B	TTGAGTGTATGTAACTTCTGACCCACTGGGAATGTGATGAAAGAAATAAAAGCTGA AATGAATCATTCTCTCTACTATTATCTGATATTTACATTCTTAAATAAAAGTGGT GATCCTAAGTACCTTAAAGACAGGGAATCTTTACTCGGATTAAATGTCAGGAATTGT GAAAAAGTGAGTTTAAATGTATTTGGCTAAGGTGTATGTAACTTCCGACTTCAACT	184
右 ITR-C	ATATCTCGAGTTGAGTGTATGTTAACTTCTGACCCACTGGGAATGTGATGAAAGAA TAAAGCTGAAATGAATCATTCTCTCTACTATTATCTGATATTTACATTCTTAA ATAAAGTGGTGATCCTAACTGACCTTAAGACAGGGAATCTTACTCGGATTAAATGT CAGGAATTGTGAAAAAGTGAGTTTAAATGTATTTGGCTAAGGTGTATGTAACTTCC GACTTCAACTCTCGAGATAT	159

20

30

【0295】

いくつかの実施形態では、DNA トランスポザーゼは、SB トランスポザーゼである。いくつかの実施形態では、SB トランスポザーゼは、SB11、SB100X、hSB110、及び hSB81 からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、SB トランスポザーゼは、SB11 である。例示的な SB トランスポザーゼは、US9840696、US2016/0264949、US9228180、WO2019/038197、US10174309、及び US10570382 に記載されており、それぞれの全内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【0296】

いくつかの実施形態では、DNA トランスポザーゼは、配列番号 160 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % 同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、DNA トランスポザーゼは、配列番号 160 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、DNA トランスポザーゼのアミノ酸配列は、配列番号 160 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % 同一の配列からなる。いくつかの実施形態では、DNA トランスポザーゼのアミノ酸配列は、配列番号 160 のアミノ酸配列からなる。

40

【0297】

いくつかの実施形態では、DNA トランスポザーゼは、その N 末端メチオニンを欠くアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、DNA トランスポザーゼは、その N 末端メチオニン、すなわち、配列番号 160 のアミノ酸 2～340 を欠く、配列番号 160 のア

50

ミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、DNAトランスポザーゼは、そのN末端メチオニン、すなわち、配列番号160のアミノ酸2~340を欠く、配列番号160のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、DNAトランスポザーゼのアミノ酸配列は、そのN末端メチオニン、すなわち、配列番号160のアミノ酸2~340を欠く、配列番号160のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一の配列からなる。いくつかの実施形態では、DNAトランスポザーゼのアミノ酸配列は、そのN末端メチオニン、すなわち、配列番号160のアミノ酸2~340を欠く、配列番号160のアミノ酸配列からなる。

【0298】

10

いくつかの実施形態では、DNAトランスポザーゼは、配列番号161のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、DNAトランスポザーゼは、配列番号161のポリヌクレオチド配列によってコードされる。

【0299】

いくつかの実施形態では、DNAトランスポザーゼは、細胞に導入されるポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、DNAトランスポザーゼをコードするポリヌクレオチドは、DNAベクターである。いくつかの実施形態では、DNAトランスポザーゼをコードするポリヌクレオチドは、RNAベクターである。いくつかの実施形態では、DNAトランスポザーゼは、第1のベクター上でコードされ、導入遺伝子は、第2のベクター上でコードされる。いくつかの実施形態では、DNAトランスポザーゼは、ポリペプチドとして細胞集団に直接的に導入される。

20

【0300】

例示的なSBトランスポザーゼのアミノ酸及びポリヌクレオチド配列を本明細書の表13に提供する。

【0301】

30

40

50

【表 13】

表 13. 例示的な SB トランスポザーゼのアミノ酸及びポリヌクレオチド配列。

説明	アミノ酸配列	配列番号	ポリヌクレオチド配列	配列番号
SB11	MGKSKEISQDLRKKIVDLHKS GSSLGAISKRLKVPRSSVQTI VRKYKHHGTTQPSYRSRRRV LSPRDERTLVRKVQINPRTTA KDLVKMLEETGTVKVSISTVKR VLYRHNLIKGRSARKKPELLQNR HKARLRFARAHGDKDRTFWR NVLWSEDETKIELFGHNDHRYV WRKKGEACKPKNTIPTVKHGG GSIMLWGCFAAGGTGALHKID GIMRKENYVDILKQHLKTSVR KLKLGRKWVFQDNDPKHTSK HVRKWLKDNKVQVLEWPSQSP DLNPIENLWAEKKRVRARRP TNLTQLHQLCQEEWAKIHPTY CGKLVEGYPKRLTQVKQFKGN ATKY	160	ATGGGAAAATCAAAAGAAATCAGCCAAGA CCTCAGAAAAAAATTTGTAGACCTCCACA AGTCTGGTTCATCCTTTGGGAGCAATTTCC AAACGCCTGAAAGTACCACGTTTCATCTGT ACAAACAATAGTACGCAAGTATAAACACC ATGGGACCACGCGAGCCGTCATACCGCTCA GGAAGGAGACGCGTTCTGTCTCCTAGAGA TGAACGTACTTTGGTGCGAAAAGTGCAAA TCAATCCCAGAACACAGCAAAGGACCTT GTGAAGATGCTGGAGGAAACAGGTACAAA AGTATCTATATCCACAGTAAAACGAGTCC TATATCGACATAACCTGAAAGGCCGCTCA GCAAGGAAGAAGCCACTGCTCCAAAACCG ACATAAGAAAGCCAGACTACGGTTTGCAA GAGCACATGGGGACAAAGATCGTACTTTT TGGAGAAATGTCTCTGGTCTGATGAAAC AAAAATAGAACTGTTTGGCCATAATGACC ATCGTTATGTTTGGAGGAAGAAGGGGGAG GCTTGCAAGCCGAAGAACACCATCCCAAC CGTGAAGCACGGGGGTGGCAGCATCATGT TGTGGGGGTGCTTTGGTGCAAGGAGGACT GGTGCACTTCACAAAATAGATGGCATCAT GAGGAAGGAAAATTATGTGGATATATTGA AGCAACATCTCAAGACATCAGTCAGGAAG TTAAAGCTTGGTCGCAAATGGGTCTTCCA ACAAGACAATGACCCCAAGCATACTTCCA AACACGTGAGAAAATGGCTTAAGGACAAC AAAGTCAAGGTATTGGAGTGGCCATCACA AAGCCCTGACCTCAATCCTATAGAAAATT TGTGGGCAGAACTGAAAAAGCGTGTGCGA GCAAGGAGGCCTACAAACCTGACTCAGTT ACACCAGCTCTGTTCAGGAGGAATGGGCCA AAATTACCCAACTTATTTGTGGGAAGCTT GTGGAAGGCTACCCGAAACGTTTGACCCA AGTTAAACAATTTAAAGGCAATGCTACCA AATAC	161

10

20

30

40

50

【0302】

5. 7 免疫エフェクター細胞及び操作方法

一態様では、多シストロン性発現カセットを含む組換えベクター（例えば、本明細書に記載のベクター）を含む細胞、例えば、免疫エフェクター細胞が本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、免疫エフェクター細胞は、T細胞である。いくつかの実施形態では、免疫エフェクター細胞は、CD4+T細胞である。いくつかの実施形態では、免疫エフェクター細胞は、CD8+T細胞である。一態様では、本明細書に記載の多シストロン性ベクターを含む、集団免疫エフェクター細胞が本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、免疫エフェクター細胞の集団は、CD4+T細胞及びCD8+T細胞を含む。いくつかの実施形態では、免疫エフェクター細胞の集団は、エクスピボ培養物である。

【0303】

一態様では、本明細書に記載のベクターを複数の細胞、例えば、免疫エフェクター細胞に導入して、複数の操作された細胞、例えば、免疫エフェクター細胞を産生する方法が本明細書で提供される。ベクターを細胞に導入及び発現する方法は、当該技術分野で周知である。発現ベクターの文脈において、ベクターは、当該技術分野における任意の方法によって、宿主細胞、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト）に容易に導入され得る。例えば、発現ベクターは、トランスフェクション又は形質導入によって宿主細胞内に移入することができる。宿主細胞にベクターを導入するための例示的な方法は、限定されないが、エレクトロポレーション（本明細書では電子移動とも称される）、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、粒子衝撃、マイクロインジェクション、マイクロ流体デバイスを通することによる機械的変形などが含まれ、例えば、その内容全体が参照により本明細書に組み

込まれる Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001) を参照されたい。いくつかの実施形態では、多シストロン性ベクターは、エレクトロポレーションを介して、免疫エフェクター細胞、又は免疫エフェクター細胞の集団に導入される。代替的な送達系としては、例えば、巨大分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビーズなどのコロイド分散系、並びに水中油エマルション、ミセル、混合ミセル、及びリポソームを含む、脂質ベースの系が含まれる。いくつかの実施形態では、多シストロン性ベクターは、エクスビボ、インビトロ、又はインビボで、細胞、例えば、免疫エフェクター細胞の集団に導入される。いくつかの実施形態では、多シストロン性ベクターは、エクスビボで細胞、例えば、免疫エフェクター細胞の集団に導入される。

10

【0304】

5.7.1 免疫エフェクター細胞の供給源

免疫エフェクター細胞は、当該技術分野で知られる任意の好適な方法によって、対象から得られ得る。例えば、T細胞（例えば、CD4+T細胞及びCD8+T細胞）は、末梢血単核細胞、骨髓、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位由来の組織、腹水、胸水、脾臓組織、及び腫瘍を含む、いくつかの供給源から得ることができる。いくつかの実施形態では、免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞）は、当業者に既知の任意の数の技術を使用して、対象から収集された血液から得られる。いくつかの実施形態では、個体の循環血液由来の細胞は、アフエーシスによって得られる。アフエーシス産物は、典型的には、T細胞、単球、顆粒球、B細胞、他の有核白血球、赤血球、及び血小板を含む、リンパ球を含有する。T細胞は、赤血球を溶解し、単球を枯渇させることによって、例えば、パーコール勾配による遠心分離によって、又は対向流遠心溶出によって、末梢血リンパ球から単離される。

20

【0305】

アフエーシスによって収集された細胞を洗浄して、血漿画分を除去し、細胞を適切な緩衝液（例えば、リン酸緩衝化生理食塩水（PBS））又はその後の処理ステップのための培地に入れてもよい。洗浄ステップは、例えば、半自動化された「フロースルー」遠心分離器を使用することによるものなど、当業者に既知の方法によって達成され得る。洗浄後、細胞は、様々な生体適合性緩衝液、例えば、Ca非含有PBS、Mg非含有PBS、PlasmaLyte Aなど、又は緩衝液を伴うか、若しくは伴わない他の生理食塩水中で再懸濁され得る。代替的に、アフエーシス試料の望ましくない成分を除去し、細胞を培養培地中に直接再懸濁させてもよい。

30

【0306】

細胞の具体的な亜集団は、陽性又は陰性選択技術（例えば、抗体コーティングされたビーズ、フローサイトメトリーなど）によって更に単離され得る。いくつかの実施形態では、CD3+、CD28+、CD4+、CD8+、CD45RA+、及びCD45RO+T細胞などのT細胞の具体的な亜集団は、陽性又は陰性選択技術（例えば、抗体コーティングされたビーズ、フローサイトメトリーなど）によって更に単離され得る。

40

【0307】

5.7.2 活性化及び拡張

いくつかの実施形態では、T細胞は、本明細書に記載の多シストロン性ベクターの導入の前に活性化される。いくつかの実施形態では、T細胞は、CD3に特異的に結合する分子を、任意選択的にCD28に特異的に結合する分子と組み合わせて、細胞と接触させることによって、活性化される。例示的な活性化方法は、抗CD3及び任意選択的に抗CD28抗体と共有結合したビーズと、T細胞とをエクスビボで接触させることを含む。いくつかの実施形態では、T細胞は、本明細書に記載の多シストロン性ベクターの導入の後に拡張される。いくつかの実施形態では、拡張は、CD3に特異的に結合する分子を、任意選択的にCD28に特異的に結合する分子と組み合わせて、細胞と接触させることを含む。例示的な活性化方法は、抗CD3及び任意選択的に抗CD28抗体と共有結合したビー

50

ズと、T細胞とをエキスピボで接触させることを含む。

【0308】

5. 7. 3 迅速な個別化された製造 (RPM)

一態様では、本明細書に記載の多シストロン性ベクターを細胞の集団に導入して、操作された細胞集団を産生する方法が本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、細胞集団は、免疫エフェクター細胞を含む。いくつかの実施形態では、免疫エフェクター細胞は、T細胞である。いくつかの実施形態では、細胞集団は、CD8+T細胞を含む。いくつかの実施形態では、細胞集団は、CD4+T細胞を含む。いくつかの実施形態では、細胞集団は、CD8+T細胞及びCD8+T細胞を含む。

【0309】

いくつかの実施形態では、本方法は、本明細書に記載の組換えベクター、及びDNAトランスポザーゼ（例えば、本明細書に記載のDNAトランスポザーゼ）、又はDNAトランスポザーゼ（例えば、本明細書に記載のDNAトランスポザーゼ）をコードするポリヌクレオチドを細胞集団に導入することと、トランスポザーゼが多シストロン性発現カセットを細胞集団のゲノムに組み込む条件下で細胞集団を培養することと、を含む。いくつかの実施形態では、組換えベクター、及びDNAトランスポザーゼ、又はDNAトランスポザーゼをコードするポリヌクレオチドは、電子移動、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、粒子衝撃、マイクロインジェクション、マイクロ流体デバイスを通することによる機械的変形、又はコロイド分散系を使用して、細胞集団に導入される。

【0310】

いくつかの実施形態では、操作された細胞集団は、約1～5日、1～4日、1～3日、又は1～2日で産生される。いくつかの実施形態では、操作された細胞の集団は、5日未満、4日未満、3日未満、2日未満、又は1日未満で産生される。いくつかの実施形態では、操作された細胞集団は、1日、2日、3日、4日、又は5日より長く産生される。

【0311】

いくつかの実施形態では、細胞は、エキスピボで外因的に活性化されない。いくつかの実施形態では、細胞は、エキスピボで外因性サイトカイン存在下で培養されない。いくつかの実施形態では、多シストロン性ベクターは、エキスピボで休息T細胞に（例えば、エレクトロポレーションによって）導入される。いくつかの実施形態では、T細胞は、細胞表面上でCCR7を発現し、検出可能なレベルのCD45ROを発現しない。

【0312】

いくつかの実施形態では、細胞は、本明細書に記載の多シストロン性ベクターの（例えば、エレクトロポレーションによる）導入後96時間以下、72時間以下、48時間以下、24時間以下、12時間以下、又は6時間以下、エキスピボで培養される。いくつかの実施形態では、細胞は、本明細書に記載の多シストロン性ベクターの（例えば、エレクトロポレーションによる）導入後約96時間、約72時間、約48時間、約24時間、約12時間、又は約6時間、エキスピボで培養される。いくつかの実施形態では、細胞は、本明細書に記載の多シストロン性ベクターの（例えば、エレクトロポレーションによる）導入後約6～96時間、約6～72時間、約6～48時間、約6～24時間、約6～12時間、約12～96時間、約12～72時間、約12～48時間、約12～24時間、約24～96時間、約24～72時間、約24～48時間、約48～96時間、又は約48～72時間、エキスピボで培養される。

【0313】

いくつかの実施形態では、細胞は、本明細書に記載の多シストロン性ベクターの（例えば、エレクトロポレーションによる）導入後96時間以下、72時間以下、48時間以下、24時間以下、12時間以下、又は6時間以下、それを必要とする対象に投与される。いくつかの実施形態では、細胞は、本明細書に記載の多シストロン性ベクターの（例えば、エレクトロポレーションによる）導入後約96時間、約72時間、約48時間、約24時間、約12時間、又は約6時間、それを必要とする対象に投与される。いくつかの実施形態では、細胞は、本明細書に記載の多シストロン性ベクターの（例えば、エレクトロポ

10

20

30

40

50

レーションによる) 導入後約 6 ~ 9 6 時間、約 6 ~ 7 2 時間、約 6 ~ 4 8 時間、約 6 ~ 2 4 時間、約 6 ~ 1 2 時間、約 1 2 ~ 9 6 時間、約 1 2 ~ 7 2 時間、約 1 2 ~ 4 8 時間、約 1 2 ~ 2 4 時間、約 2 4 ~ 9 6 時間、約 2 4 ~ 7 2 時間、約 2 4 ~ 4 8 時間、約 4 8 ~ 9 6 時間、又は約 4 8 ~ 7 2 時間、それを必要とする対象に投与される。

【0314】

5. 8 薬学的組成物

生理学的に許容される担体、賦形剤又は安定剤中に、所望の純度を有する本明細書に開示される操作された免疫エフェクター細胞の集団を含む薬学的組成物が本明細書に提供される(例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PAを参照されたい)。許容される担体、賦形剤、又は安定剤は、用いられる投薬量及び濃度でレシピエントに非毒性であり、これらには、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸などの緩衝液、アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤、防腐剤(例えば、塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム、塩化ヘキサメトニウム、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、フェノール、ブチル、若しくはベンジルアルコール、メチル若しくはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、3-ペンタノール、及びm-クレゾール)、低分子量(約10残基未満)のポリペプチド、血清、アルブミン、ゼラチン、若しくは免疫グロブリンなどのタンパク質、ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、若しくはリジンなどのアミノ酸、グルコース、マンノース、若しくはデキストリンを含む単糖、二糖、及び他の炭水化物、EDTAなどのキレート剤、スクロース、マンニトール、トレハロース、若しくはソルビトールなどの糖、ナトリウムなどの塩形成対イオン金属錯体(例えば、亜鉛-タンパク質錯体)、及び/又はTWEEN(商標)、PLURONICS(商標)、又はポリエチレングリコール(PEG)などの非イオン性界面活性剤が含まれる。

【0315】

本明細書に記載の薬学的組成物は、対象における免疫応答を誘導し、がんなどの状態を治療するのに有用であり得る。一実施形態では、本開示は、医薬として使用するために本明細書に記載の操作された免疫エフェクター細胞の集団を含む薬学的組成物を提供する。別の実施形態では、本開示は、がんの治療方法において使用するための薬学的組成物を提供する。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、本明細書に開示される操作された免疫エフェクター細胞の集団と、任意選択的に、1つ以上の追加の予防薬剤又は療法薬剤を薬学的に許容される担体中に含む。

【0316】

薬学的組成物は、対象への任意の投与経路のために製剤化され得る。投与経路の具体例としては、非経口投与(例えば、静脈内、皮下、筋肉内)が挙げられる。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、静脈内投与のために製剤化される。注射剤は、液体溶液又は懸濁液のいずれかの従来の形態で調製することができる。注射剤は、1つ以上の賦形剤を含有し得る。例示的な賦形剤には、例えば、水、食塩水、デキストロース、グリセロール又はエタノールが含まれる。加えて、所望な場合、投与される薬学的組成物はまた、湿潤剤又は乳化剤、pH緩衝剤、安定剤、溶解度向上剤、及び他のそのような薬剤、例えば、酢酸ナトリウム、ソルビタンモノラウレート、トリエタノールアミンオレエート、及びシクロデキストリンなどの少量の非毒性補助物質を含有することができる。

【0317】

いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、静脈内投与のために製剤化される。静脈内投与に好適な担体としては、生理食塩水又はリン酸緩衝食塩水(PBS)、及びグルコース、ポリエチレングリコール、及びポリプロピレングリコールなどの増粘剤及び可溶化剤を含有する溶液、並びにそれらの混合物が挙げられる。

【0318】

インビボ投与に使用される製剤は、滅菌してもよい。これは、例えば、無菌濾過膜を通

した濾過によって容易に達成される。

【0319】

非経口製剤で使用される薬学的に許容される担体としては、例えば、水性ビヒクル、非水性ビヒクル、抗菌剤、等張剤、緩衝液、抗酸化剤、局所麻酔剤、懸濁剤及び分散剤、乳化剤、隔離剤又はキレート剤、並びに他の薬学的に許容される物質が挙げられる。水性ビヒクルの例としては、塩化ナトリウム注射液、リンゲル注射液、等張性デキストロース注射液、滅菌水注射液、デキストロース及び乳酸リンゲル注射液が挙げられる。非水性非経口ビヒクルには、植物由来の固定油、綿実油、トウモロコシ油、ゴマ油、及びピーナッツ油が含まれる。フェノール又はクレゾール、水銀、ベンジルアルコール、クロロブタノール、メチル及びプロピル p-ヒドロキシ安息香酸エステル、チメロサル、塩化ベンザルコニウム及び塩化ベンゼトニウムを含む静菌濃度又は静真菌濃度の抗菌剤は、複数用量容器に包装された非経口製剤に添加することができる。等張剤としては、塩化ナトリウム及びデキストロースが挙げられる。緩衝液としては、リン酸塩及びクエン酸塩が挙げられる。抗酸化剤としては、重硫酸ナトリウムが挙げられる。局所麻酔剤には、プロカイン塩酸塩が含まれる。懸濁剤及び分散剤としては、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、及びポリビニルピロリドンが挙げられる。乳化剤としては、ポリソルベート 80 (TWEEN (登録商標) 80) が挙げられる。金属イオンの隔離剤又はキレート剤としては、EDTA が挙げられる。薬学的担体はまた、水混和性ビヒクルのためのエチルアルコール、ポリエチレングリコール、及びプロピレングリコール、並びに pH 調整のための水酸化ナトリウム、塩酸、クエン酸、又は乳酸を含む。

10

20

【0320】

薬学的組成物に使用される正確な用量は、投与経路、及びそれによって引き起こされる状態の重症度にも依存し、施術者の判断及び各対象の状況に応じて決定されるべきである。例えば、有効用量はまた、投与手段、標的部位、対象の生理学的状態（年齢、体重、及び健康を含む）、投与される他の医薬、又は治療が予防的であるか、若しくは治療的であるかに応じて変化し得る。治療投薬量は、最適には、安全性及び有効性を最適化するために滴定され得る。

【0321】

5.9 治療的使用方法及び応用

別の態様では、本開示は、免疫応答を誘導することを必要とする対象においてそれを行う方法であって、本明細書に記載の操作された免疫エフェクター細胞の集団、ベクター、ポリヌクレオチド、又は薬学的組成物を投与することを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、対象は、がんを有する。別の態様では、本開示は、疾患又は障害、例えば、がん又は自己免疫疾患若しくは障害を治療することを必要とする対象においてそれを行う方法であって、本明細書に記載の操作された免疫エフェクター細胞の集団、ベクター、ポリヌクレオチド、又は薬学的組成物を投与することを含む、方法を提供する。別の態様では、本開示は、疾患又は障害、例えば、がん又は自己免疫疾患若しくは障害を治療することを必要とする対象においてそれを行う方法であって、本明細書に記載の操作された免疫エフェクター細胞の集団、ベクター、ポリヌクレオチド、又は薬学的組成物を投与することを含む、方法を提供する。

30

40

【0322】

いくつかの実施形態では、細胞は、上述の操作された免疫エフェクター細胞の集団を投与される対象に対して自己である。いくつかの実施形態では、細胞は、上述の操作された免疫エフェクター細胞の集団を投与される対象に対して同種異系である。

【0323】

いくつかの実施形態では、疾患又は障害は、がんである。いくつかの実施形態では、がんは、非がん細胞と比較して、がん細胞の表面上の CD19 の発現又は過剰発現に関連している。いくつかの実施形態では、疾患又は障害は、血液がんである。いくつかの実施形態では、血液がんは、白血病又はリンパ腫、例えば、急性白血病、急性リンパ腫、慢性白血病、又は慢性リンパ腫である。例示的ながんとしては、限定されないが、CD19 の発

50

現に関連するがん、B細胞急性リンパ性白血病（B-A L L）（B細胞急性リンパ芽球性白血病又はB細胞急性リンパ球性白血病としても知られる）、t（v；11q23.3）を有するBリンパ芽球性白血病、t（v；11q23.3）を有するKMT2A再構成B急性リンパ芽球性白血病、KMT2A再構成T細胞急性リンパ性白血病（T-A L L）（T細胞急性リンパ芽球性白血病又はT細胞急性リンパ球性白血病としても知られる）、急性リンパ性白血病（A L L）（急性リンパ芽球性白血病又は急性リンパ球性白血病としても知られる）、Ph様リンパ性白血病（Ph様A L L）（Ph様急性リンパ芽球性白血病又はPh様急性リンパ球性白血病としても知られる）、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性リンパ性白血病（C L L）（慢性リンパ芽球性白血病又は慢性リンパ球性白血病としても知られる）、慢性リンパ球性白血病、小リンパ球性リンパ腫（S L L）、B細胞前リンパ球性白血病、芽球性形質細胞様樹状細胞新生物、バーキットリンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（D L B C L）、原発性縦隔（例えば、胸腺）大細胞型B細胞リンパ腫（P M B C L）、濾胞性リンパ腫、有毛細胞白血病、小細胞濾胞性リンパ腫、大細胞濾胞性リンパ腫、M A L Tリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、多発性骨髄腫、骨髄異形成、骨髄異形成症候群、非ホジキンリンパ腫（N H L）、形質芽細胞性リンパ腫、形質細胞様樹状細胞新生物、ワルデンストレームマクログロブリン血症、及び微小残存病変が挙げられる。

10

【0324】

いくつかの実施形態では、血液がんは、B細胞がんである。いくつかの実施形態では、B細胞がんは、白血病又はリンパ腫である。いくつかの実施形態では、血液悪性腫瘍は、B-A L L、T-A L L、A L L、C L L、S L L、N H L、D L B C L、急性二重表現型白血病、又は微小残存病変（minimal residual disease）である。

20

【0325】

いくつかの実施形態では、がんは、再発性がんである。いくつかの実施形態では、再発性がんは、非がん細胞と比較して、がん細胞の表面上のCD19の発現又は過剰発現に関連する。いくつかの実施形態では、疾患又は障害は、再発性血液がんである。いくつかの実施形態では、再発性血液がんは、再発性白血病又は再発性リンパ腫である。例示的な再発性がんとしては、限定されないが、CD19の発現に関連する再発性がん、再発性B細胞急性リンパ性白血病（再発性B-A L L）（再発性B細胞急性リンパ芽球性白血病又は再発性B細胞急性リンパ球性白血病としても知られる）、t（v；11q23.3）を有する再発性Bリンパ芽球性白血病、t（v；11q23.3）を有するKMT2A再構成再発性B急性リンパ芽球性白血病、KMT2A再構成再発性T細胞急性リンパ性白血病（再発性T-A L L）（再発性T細胞急性リンパ芽球性白血病又は再発性T細胞急性リンパ球性白血病としても知られる）、再発性急性リンパ性白血病（再発性A L L）（再発性急性リンパ芽球性白血病又は再発性急性リンパ球性白血病としても知られる）、再発性Ph様リンパ性白血病（再発性Ph様A L L）（再発性Ph様急性リンパ芽球性白血病又は再発性Ph様急性リンパ球性白血病としても知られる）、再発性慢性骨髄性白血病（再発性CML）、再発性慢性リンパ性白血病（再発性C L L）（再発性慢性リンパ芽球性白血病又は再発性慢性リンパ球性白血病としても知られる）、再発性慢性リンパ球性白血病、再発性小リンパ球性リンパ腫（再発性S L L）、再発性B細胞前リンパ球性白血病、再発性芽球性形質細胞様樹状細胞新生物、再発性バーキットリンパ腫、再発性びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（再発性D L B C L）、再発性原発性縦隔（例えば、胸腺）大細胞型B細胞リンパ腫（再発性P M B C L）、再発性濾胞性リンパ腫、再発性有毛細胞白血病、再発性小細胞濾胞性リンパ腫、再発性大細胞濾胞性リンパ腫、再発性M A L Tリンパ腫、再発性マントル細胞リンパ腫、再発性辺縁帯リンパ腫、再発性多発性骨髄腫、再発性骨髄異形成、再発性骨髄異形成症候群、再発性非ホジキンリンパ腫（N H L）、再発性形質芽細胞性リンパ腫、再発性形質細胞様樹状細胞新生物、再発性ワルデンストレームマクログロブリン血症、及び再発性微小残存病変が挙げられる。

30

40

【0326】

50

いくつかの実施形態では、再発性血液がんは、再発性B細胞がんである。いくつかの実施形態では、再発性血液悪性腫瘍は、再発性B-A L L、再発性T-A L L、再発性A L L、再発性C L L、再発性S L L、再発性N H L、再発性D L B C L、再発性急性二重表現型白血病、又は再発性微小残存病変である。

【0327】

いくつかの実施形態では、がんは、難治性がん、例えば、治療（例えば、標準治療）に耐性であるがん、又は時間経過とともに治療に耐性になるがんである。いくつかの実施形態では、難治性がんは、非がん細胞と比較して、がん細胞の表面上のC D 1 9の発現又は過剰発現に関連する。いくつかの実施形態では、疾患又は障害は、難治性血液がんである。いくつかの実施形態では、難治性血液がんは、難治性白血病又は難治性リンパ腫である。例示的な難治性がんとしては、限定されないが、C D 1 9の発現に関連する難治性がん、難治性B細胞急性リンパ性白血病（難治性B-A L L）（難治性B細胞急性リンパ芽球性白血病又は難治性B細胞急性リンパ球性白血病としても知られる）、t（v；11q23.3）を有する難治性Bリンパ芽球性白血病、t（v；11q23.3）を有するK M T 2 A再構成難治性B急性リンパ芽球性白血病、K M T 2 A再構成難治性T細胞急性リンパ性白血病（難治性T-A L L）（難治性T細胞急性リンパ芽球性白血病又は難治性T細胞急性リンパ球性白血病としても知られる）、難治性急性リンパ性白血病（難治性A L L）（難治性急性リンパ芽球性白血病又は難治性急性リンパ球性白血病としても知られる）、難治性P h様リンパ性白血病（難治性P h様A L L）（難治性P h様急性リンパ芽球性白血病又は難治性P h様急性リンパ球性白血病としても知られる）、難治性慢性骨髄性白血病（難治性C M L）、難治性慢性リンパ性白血病（難治性C L L）（難治性慢性リンパ芽球性白血病又は難治性慢性リンパ球性白血病としても知られる）、難治性慢性リンパ球性白血病、難治性小リンパ球性リンパ腫（難治性S L L）、難治性B細胞前リンパ球性白血病、難治性芽球性形質細胞様樹状細胞新生物、難治性バーキットリンパ腫、難治性びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（難治性D L B C L）、難治性原発性縦隔（例えば、胸腺）大細胞型B細胞リンパ腫（難治性P M B C L）、難治性濾胞性リンパ腫、難治性有毛細胞白血病、難治性小細胞濾胞性リンパ腫、難治性大細胞濾胞性リンパ腫、難治性M A L T リンパ腫、難治性マントル細胞リンパ腫、難治性辺縁帯リンパ腫、難治性多発性骨髄腫、難治性骨髄異形成、難治性骨髄異形成症候群、難治性非ホジキンリンパ腫（N H L）、難治性形質芽細胞性リンパ腫、難治性形質細胞様樹状細胞新生物、難治性ワルデンストレームマクログロブリン血症、及び難治性微小残存病変が挙げられる。

【0328】

いくつかの実施形態では、難治性血液がんは、難治性B細胞がんである。いくつかの実施形態では、難治性血液悪性腫瘍は、難治性B-A L L、難治性T-A L L、難治性A L L、難治性C L L、難治性S L L、難治性N H L、難治性D L B C L、難治性急性二重表現型白血病、又は難治性微小残存病変である。

【0329】

いくつかの実施形態では、疾患又は障害は、自己免疫疾患若しくは障害、例えば、再発性自己免疫疾患若しくは障害、又は難治性自己免疫疾患若しくは障害である。

【0330】

いくつかの実施形態では、操作された細胞の集団は、造血幹細胞移植の後に対象に投与される。

【0331】

いくつかの実施形態では、操作された細胞の集団は、1つ以上の追加の予防薬剤又は療法薬剤と組み合わせて（例えば、その前に、同時に、又はその後に）対象に投与される。いくつかの実施形態では、療法薬剤は、化学療法薬剤、抗がん剤、抗血管新生剤、抗線維化剤、免疫療法剤、療法用抗体、二重特異性抗体、「抗体様」療法用タンパク質（例えば、D A R T s（登録商標）、D u o b o d i e s（登録商標）、B i t e s（登録商標）、X m A b s（登録商標）、T a n d A b s（登録商標）、F a b誘導体）、抗体-薬物コンジュゲート（A D C）、放射線療法剤、抗新生物剤、抗増殖剤、腫瘍溶解性ウイルス

10

20

30

40

50

、遺伝子修飾剤若しくは編集剤（例えば、C R I S P R / C a s 9、ジンクフィンガーヌクレアーゼ又は合成ヌクレアーゼ、又はT A L E N）、C A R T細胞免疫療法薬剤、操作されたT細胞受容体（T C R - T）、又はそれらの任意の組み合わせである。いくつかの実施形態では、療法薬剤は、抗がん剤である。いくつかの実施形態では、療法薬剤は、化学療法薬剤である。これらの療法薬剤は、化合物、抗体、ポリペプチド、又はポリヌクレオチドの形態であり得る。

【0332】

いくつかの実施形態では、操作された免疫エフェクター細胞の集団、ベクター、ポリヌクレオチド、又は薬学的組成物は、リンパ枯渇調製レジメンの投与後に対象に投与される。いくつかの実施形態では、リンパ枯渇調製レジメンは、少なくとも1つの化学療法剤を含む。いくつかの実施形態では、リンパ枯渇調製レジメンは、少なくとも2つの異なる化学療法剤を含む。いくつかの実施形態では、リンパ枯渇調製レジメンは、シクロホスファミドを含む。いくつかの実施形態では、リンパ枯渇調製レジメンは、対象における免疫応答を低減させるのに十分な量で対象に投与されたシクロホスファミドを含む。いくつかの実施形態では、リンパ枯渇調製レジメンは、フルダラビンを含む。いくつかの実施形態では、リンパ枯渇調製レジメンは、対象における免疫応答を低減させるのに十分な量で対象に投与されたフルダラビンを含む。いくつかの実施形態では、リンパ枯渇調製レジメンは、シクロホスファミド及びフルダラビンを含む。いくつかの実施形態では、リンパ枯渇調製レジメンは、各々が対象における免疫応答を低減させるのに十分な量で対象に投与されたシクロホスファミド及びフルダラビンを含む。

【0333】

5.10 キット

一態様では、本明細書に記載の1つ以上の薬学的組成物、操作された免疫エフェクター細胞の集団、ポリヌクレオチド、又はベクターと、使用説明書と、を含むキットが本明細書で提供される。そのようなキットは、例えば、バイアル、チューブなどの1つ以上の容器を受け入れるように区画化されている担体、パッケージ、又は容器を含み得る。好適な容器には、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、及び試験管が含まれる。一実施形態では、容器は、様々な材料、例えば、ガラス又はプラスチックから形成され得る。

【0334】

具体的な実施形態では、本明細書に記載の薬学的組成物の成分、本明細書で提供される操作された免疫エフェクター細胞の集団、ポリヌクレオチド、又はベクターのうちの1つ以上を充填した1つ以上の容器を含む薬学的キットが本明細書で提供される。一実施形態では、キットは、本明細書に記載の操作された免疫エフェクター細胞の集団を含む薬学的組成物を含む。一実施形態では、キットは、本明細書に記載の方法に従って操作された免疫エフェクター細胞の集団を含む薬学的組成物を含む。いくつかの実施形態では、キットは、本明細書に記載の薬学的組成物と、予防薬剤又は療法薬剤と、薬を含有する。任意選択的に、医薬品又は生物学的製品の製造、使用、又は販売を規制する政府機関によって規定される形式の通知が、かかる容器に付随してもよく、通知は、ヒト投与のための製造、使用、又は販売の機関の承認を反映する。

【実施例】

【0335】

本セクション（すなわち、セクション6）の実施例は、図示のために提供されるものであり、制限するために提供されるものではない。

【0336】

6.1 実施例1：CD19CAR、mbIL15、及びHER1tをコードするトランスポゾンプラスミドの構築

多重遺伝子共発現の均一性及び産物製造可能性を改善するために、多シストロン性発現カセットを含む組換え核酸Sleeping Beautyトランスポゾンプラスミドを構築した。多シストロン性発現プラスミドは、各々、配列番号72の抗CD19CAR（CD19CAR）をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結された転写調節エレ

メントと、配列番号119の膜結合IL-15/IL-15R α 融合タンパク質(m b I L 1 5)と、配列番号96又は配列番号166の「キルスイッチ(k i l l s w i t c h)」マーカートンパク質(H E R 1 t)と、を含み、各々が別個のポリペプチド鎖の発現を可能にするようにリボソームスキッピングを媒介するF 2 Aエレメント又はT 2 Aエレメントによって分離されている。コードされたタンパク質の各々の概略図を、それぞれN末端(左)からC末端(右)まで、図1A~1Cに示す。

【0337】

簡潔に述べると、CD19CARは、マウスモノクローナル抗体FMC63の軽鎖可変領域(VL)(配列番号1)及び重鎖可変領域(VH)(配列番号2)を使用して生成した。VLを、CD19CARの成熟N末端に配置し、VLに、Whitlowリンカーペプチド(配列番号9)を介して接続し、VLのN末端にヒトGM-CSF受容体アルファ鎖シグナル配列(配列番号10)を有する。得られたscFvを、N末端からC末端までの順に、ヒトCD8 α ヒンジドメイン(配列番号37)、ヒトCD8 α 膜貫通ドメイン(配列番号43)、ヒトCD28細胞質ドメイン(配列番号57)、及びヒトCD3 ζ 細胞質ドメイン(配列番号60)に接続させた。CAR発現を増強するために、ヒトCD28細胞質ドメインのアミノ酸配列を、配列番号57のアミノ酸7~8に、野生型配列Leu-Leuではなく、アミノ酸配列Gly-Glyを組み込むように修飾した。

【0338】

m b I L 1 5は、Gly-Serが豊富なリンカーペプチド(配列番号125)を介して、ヒトIL-15(配列番号123)をヒトIL-15Ra(配列番号124)に接続させることによって構築し、ヒトIL-15のN末端にIgEシグナル配列(配列番号176)を有する。

【0339】

H E R 1 tは、ヒトH E R 1のドメインIII(配列番号98)を、ヒトH E R 1のドメイン4のアミノ酸1~21(配列番号100)に接続することによって構築され、ドメインIIIのN末端にIg κ シグナル配列(配列番号169又は配列番号170)を有する。得られた配列を、Gly-Serが豊富なリンカーペプチド(配列番号102)を介して、ヒトCD28膜貫通ドメイン(配列番号101)に接続した。

【0340】

発現及び機能に対する遺伝子/エレメントの順序の効果を探索するために、3つのトリシストロン性ポリヌクレオチド発現カセット(カセット1~3)を生成した。各発現カセット中のエレメントの5'から3'の順序は、次のとおりである。カセット1:CD19CAR-F2A-m b I L 1 5-T2A-H E R 1 t、カセット2:m b I L 1 5-T2A-H E R 1 t-F2A-CD19CAR、及びカセット3:H E R 1 t-T2A-m b I L 1 5-F2A-CD19CAR。各発現カセットのポリヌクレオチド配列を、表10に示す。

【0341】

各F2A及びT2A部位におけるN末端シグナル配列切断又はリボソームスキッピングを考慮しない、各発現カセットの対応する理論的なポリペプチド翻訳産物を表11に示す。

【0342】

前述の発現カセットを組み込んだ6つの組換え核酸Sleeping Beautyトランスポゾンプラスミドを生成した。各プラスミドにおいて、カセット1~3のうちの1つ、及び好適な転写調節エレメントは、Sleeping BeautyトランスポザーゼSB11によって認識される一対の逆方向末端反復配列(ITR)が隣接していた。各発現カセットについて、2対のITR ITR対 α 及びITR対 β を評価した。得られた6つのトランスポゾンプラスミドを表14に要約する。

【0343】

10

20

30

40

50

【表 1 4】

表 14. トリシストロン性 Sleeping Beauty トランスポゾンプラスミド。

名称	カセット	ITR 対	エレメントの順序 (5' から 3')
プラスミド A	1	α	CD19CAR—F2A—mbIL15—T2A—HER1t
プラスミド B	2	α	mbIL15—T2A—HER1t—F2A—CD19CAR
プラスミド C	3	α	HER1t—T2A—mbIL15—F2A—CD19CAR
プラスミド D	4	β	CD19CAR—F2A—mbIL15—T2A—HER1t
プラスミド E	5	β	mbIL15—T2A—HER1t—F2A—CD19CAR
プラスミド F	6	β	HER1t—T2A—mbIL15—F2A—CD19CAR

【0 3 4 4】

対照目的のために、2つの更なるトランスポゾンプラスミドである、CD19CARをコードするプラスミドDP1、及びN末端からCmattタンまでmbIL15—T2A—HER1tをコードする発現カセットを含有するプラスミドDP2を調製した。プラスミドDP1及びプラスミドDP2は、1：1の比率で組み合わせられるとき、本明細書において「dTp対照」と称される。

【0 3 4 5】

6. 2 実施例2：CD19CAR、mbIL15、及びHER1tを共発現するT細胞の生成及び評価

この実施例は、実施例1に記載のプラスミド由来のCD19CAR、mbIL15、及びHER1tを共発現するT細胞の生成及び評価について説明する。

【0 3 4 6】

6. 2. 1 材料及び方法

6. 2. 1. 1 細胞株

CD64、CD86、CD137L、及び先端切断CD19を発現する、クローン9として指定されるK562由来の活性化し増殖する細胞（AaPC）（例えば、その内容が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれるDenman et al., PLoS One. 2012; 7 (1): e30264に記載されるような）を、遺伝子修飾T細胞の拡張のためにエキスピボで使用した。細胞傷害性アッセイのための標的細胞株は、CD19⁺（NALM-6、Daudi、CD19-EL4、及びCD19陰性（親EL4）腫瘍細胞株であり、American Type Culture Collection (Manassas, VA) から得られた（又は、例えば、その内容が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれるSingh et al., PLoS One. 2013; 8 (5): e64138に記載されるように）。細胞を、R10（10%の熱不活性化したウシ胎児血清（FBS、Hyclone/GE Healthcare、Logan, UT）及び1%のGlutamax-100（ThermoFisher Scientific、Waltham, MA）を含有するRPMI 1640）中で、通常のように培養した。細胞を、37℃、5%のCO₂の標準的な条件で培養した。細胞を試験し、マイコプラズマについて陰性であることを見出した。短いタンデム反復DNAフィンガープリンティングにより、細胞株の同一性を確認した。

【0 3 4 7】

6. 2. 1. 2 正常ドナーヒトT細胞

末梢血又は白血球除去輸血産物は、正常なドナー（Key Biologics、Memphis, TN）から入手した。T細胞濃縮出発産物を使用した。アフレーシス産物を、0.5%（v/v）のHSAを含むCliniMACS（登録商標）PBS/EDTA緩衝液を使用して希釈し、血小板枯渇ステップを、室温（RT）、400×gで10分間遠心分離することによって実施し、続いて同じ緩衝液中で再懸濁させた。製造業者のプロトコルに従って、CD4及びCD8特異的CliniMACS（凍結保存）マイクロビーズ（CD4 GMP MicroBeads #170-076-702、CD8 GMP MicroBeads #170-076-703、Miltenyi）を、その後CliniMACS Plusでの常磁性選択を受けて、T細胞についての出発産物

10

20

30

40

50

を濃縮するための混合条件下で、細胞とともに室温で30分間インキュベートした。生／死細胞は、Cellometer機器(Nexcelom Bioscience、Lawrence, MA)で数えあげた。単離されたT細胞を、Cryostor CS10中で凍結保存し、液体窒素タンクの気相に保存した。

【0348】

6.2.1.3 SB系を使用したRPM CD19CAR-mbIL15-HER1t T細胞の生成

この実施例に記載されるCAR-T細胞を生成するために、Nucleofector(凍結保存)2bデバイス(Lonza、Basel, Switzerland)を使用して、実施例1に記載されるように、dTp対照又はプラスミドA～Fを、T細胞濃縮出

10

【0349】

エレクトロポレーションの前日に、凍結保存されたCD3濃縮細胞をR10中で解凍し、R10中で洗浄し、再懸濁させ、37℃/5%CO₂インキュベーターに一晩置いた。各試験物品のエレクトロポレーションの詳細は次のとおりである。

20

【0350】

モックCD3細胞(DNAなし、本明細書で「陰性対照」とも称される)：休息細胞を採取し、スピンドウンし、任意のDNAプラスミドを含まないデバイス固有のNucleofector緩衝液(Human T Cell Nucleofector Kit、Lonza)に再懸濁させた。

【0351】

dTp対照RPM CD19CAR-mbIL15-HER1t T細胞：休息細胞を採取し、スピンドウンし、トランスポゾンDNA(dTp対照)及びトランスポザーゼDNA(プラスミドTA、SB11トランスポザーゼをコードする)を最終トランスポゾン：トランスポザーゼ3：1で含有するNucleofector緩衝液に再懸濁させた。

30

【0352】

sTp RPM CD19CAR-mbIL15-HER1t T細胞：休息細胞を採取し、スピンドウンし、トランスポゾンDNA(プラスミドA～Fのうちの1つ)及びトランスポザーゼDNA(プラスミドTA)を最終トランスポゾン：トランスポザーゼ比率3：1で含有するNucleofector緩衝液に再懸濁させた。

【0353】

電子移動の直後に、各キュベットからの内容物を再懸濁させ、37℃/5%CO₂インキュベーター中での1～2時間のインキュベーションのために、DNaseを含有するR10培地に移した。その後、全培地交換をR10培地で行い、細胞を、37℃/5%CO₂インキュベーター中の一晩置いた。電子移動(1日目)後24時間以内(及び少なくとも16時間以内)に、細胞を培養物から採取し、フローサイトメトリーによってサンプリングして、CD19CAR、mbIL15、及びHER1tの細胞表面発現を決定した。

40

【0354】

1日目に、トランスフェクトされたT細胞を、γ放射線照射された(100Gy)K562-AaPCKクローン9を用い、1：1のT細胞/AaPCK比率で刺激した。更なるγ放射線照射されたAaPCKクローン9を、同じ比率で7～10日毎に添加した。可溶性組織換えヒトIL-21(カタログ番号34-8219-85、eBioscience、San Diego, CA)を、エレクトロポレーションの翌日から開始して30ng/mLの濃度で添加し、AaPCKの添加によってマーキングされる7～10日の刺激サイクル(「Stim」と称される各々のそのような刺激サイクル)の間、週に3回補充した。T細胞は、各Stimの終了時に数えあげられ、生存細胞は、Cellometer自動化

50

細胞計数器を使用して、A O P I 除外に基づいて計数された。T 細胞マーカー、C D 1 9 C A R、m b I L 1 5、及び H E R 1 t の発現を、7 ～ 1 0 日毎にフローサイトメトリーを使用して評価した。培養物中の不要な N K 細胞の拡張は、製造業者の指示に従って、枯渇（C D 5 6 マイクロビーズ、M i l t e n y i を使用した陽性選択）を行うことによって対処した。S t i m 1、2、3、及び 4 の終了時に、総細胞、C D 3 ⁺、C D 1 9 C A R ⁺、及び H E R 1 t ⁺ T 細胞の拡張を決定した。

【0355】

6. 2. 1. 4 フローサイトメトリー

最大 1×10^6 個の細胞を、ヒト特異的蛍光色素をコンジュゲートした抗体で染色した。試料及び対応する対照上の細胞表面マーカーの染色は、まず、F c 受容体遮断ステップを行い、4 °C で 1 0 分間、F A C S 緩衝液（P B S、2 % F B S、0. 1 % ナトリウムアジド）中で 5 0 % マウス血清（J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h, P A）とともにインキュベートすることによって、バックグラウンド染色を低減した。免疫染色は、B r i l l i a n t S t a i n B u f f e r（B D B i o s c i e n c e s）で希釈した表 1 5 に列挙された抗体の組み合わせの抗体マスターミックス 1 0 0 μ L を添加することによって行った。簡潔に述べると、C D 1 9 C A R 発現を、C D 1 9 C A R の抗 C D 1 9 部分に特異的な A l e x a F l u o r（凍結保存）（A F）4 8 8 がコンジュゲートされた抗イディオタイプ抗体（クローン番号 1 3 6. 2 0. 1）を使用して検出した（例えば、その内容が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる J e n a e t a l., P L o S. 2 0 1 3; 8 (3): e 5 7 8 3 8 に記載されるように）。C D 1 9 C A R 抗イディオタイプ抗体を、I n v i t r o g e n / T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c（W a l t h a m, M A）による A F - 4 8 8 フルオロフォアにコンジュゲートした。H E R 1 t 分子を、蛍光的にコンジュゲートされたセツキシマブ抗体を使用して検出した。蛍光コンジュゲートされたセツキシマブ試薬は、I n v i t r o g e n / T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c によって A F - 6 4 7 にコンジュゲートされた、商業的に購入された E r b i t u x であった。使用された蛍光的にコンジュゲートされた抗体としては、C D 3（クローン S K 7）、I L - 1 5（3 4 5 5 9）、C D 4 5（クローン H I 3 0）、及び C D 1 9 - C A R イディオタイプ（クローン 1 3 6. 2 0. 1）が含まれていた（表 1 5）。

【0356】

【表 1 5】

表 15. 蛍光的にコンジュゲートされた抗体。

抗体標的	クローン	フルオロフォア	会社
CD45	HI30	BV-786	BD Biosciences
CD3	SK7	PE-Cy7	BD Biosciences
CD19CAR	136.20.1	AF-488	Invitrogen
IL-15	34559	PE	R&D Systems
HER1t	C225	AF-647	Invitrogen

【0357】

表 1 5 の抗体の組み合わせを含有するマスターミックスを、連続的に添加し（C D 1 9 C A R、m b I L 1 5、続いて残りの抗体カクテル）、4 °C で 3 0 分間インキュベートした。細胞を F A C S 緩衝液で洗浄し、次いで、固定可能な生存率染色（f i x a b l e v i a b i l i t y s t a i n）- 6 2 0 生存率染料（v i a b i l i t y d y e）（P B S 中 1 : 1 0 0 0、B D B i o s c i e n c e s）で 1 0 分間、4 °C でインキュベートし、続いて F A C S 緩衝液で洗浄した。F A C S D i v a ソフトウェア（v. 8. 0. 1、B D B i o s c i e n c e s）を含む L S R F o r t e s s a（B D B i o s c i e n c e s）を使用して、データを取得し、F l o w J o ソフトウェア（バージョン 1 0. 4. 2、T r e e S t a r、A s h l a n d, O R）で分析した。別段の記載がない限り、導入遺伝子の発現を、ゲーティングされた細胞事象、シングレット、生存可能事象、及び C D 3 ⁺ 細胞について評価した。

【0358】

6.2.1.5 ウェスタンブロット分析

エキスピボで拡張されたCD19CAR修飾T細胞を遠心分離し、ペレットを、プロテアーゼ阻害剤を含有するRIPA緩衝液(Complete Mini、Roche)で溶解させた。溶解物を4℃で20分間インキュベートし、上清を-20℃で保存した。ビスニコニン酸(BCA)アッセイ(Thermo Fisher Scientific、23227)を実施して、溶解物の総タンパク質濃度を決定した。ウェスタンブロットを、製造業者の指示に従って、Wes 2010ウェスタンブロットプラットフォーム(ProteinSimple、Wes 2010)で行った。各試料について、0.1~0.2 μg/mLのタンパク質溶解物を、5×蛍光マスター混合物(ProteinSimple、DM-002)と混合し、熱変性させ、氷上で冷却し、カートリッジ(ProteinSimple、SM-W004)上にロードした。CD19CARタンパク質の検出のために、マウス抗ヒトCD247(BD Biosciences、551033)一次抗体及びHRPヤギ抗マウス(ProteinSimple、DM-002)二次抗体を使用した。CD19 CARを発現するJurkat細胞を、陽性対照として使用した。mbIL15キメラタンパク質の検出のために、一次抗体であるヤギ抗ヒトIL-15抗体(R&D、AF315)及び二次抗体であるHRP抗ヤギ(ProteinSimple、043-552-2)を使用した。組換えヒトIL-15タンパク質(R&D、247-ILB)を、陽性対照としてロードした。HER1tキメラタンパク質の検出のために、一次抗体であるマウス抗ヒトEGFR(Sigma、AMAB90819-100 μL)及び二次抗体であるHRP抗マウス抗体(ProteinSimple、DM-002)を使用した。ヒトEGFRタンパク質(Biosystems Acro、EGR-H5252-100 μg)を陽性対照として使用した。

10

20

【0359】

6.2.1.6 クロム放出アッセイ

dTp対照、プラスミドA、及びプラスミドDを使用して生成されたエキスピボで拡張されたCD19特異的T細胞の抗原特異的細胞傷害性を、異なるエフェクター対標的(E:T)比率(20:1、10:1、5:1、2.5:1、及び1.25:1)での放射線標識(^{51}Cr)標的細胞の溶解によって決定した。CD19⁺(NALM-6、Daudi、CD19-EL4)及びCD19陰性(EL4)腫瘍細胞株を標的として使用した。T細胞及び放射性標識された標的細胞を三重で共インキュベートし、4時間のインキュベーション終了時に上清中の放射能を測定することによって溶解を決定した。TopCount NXT(Perkin Elmer)を使用してクロム放出を検出し、特異的溶解を以下のように計算した。

30

【0360】

【数1】

$$\% ^{51}\text{Cr 溶解} = \frac{\text{実験的な溶解} - \text{バックグラウンド溶解}}{\text{最大溶解} - \text{バックグラウンド溶解}} \times 100$$

40

【0361】

培地及びTriton-X 100処理された標的細胞は、それぞれ、バックグラウンド及び最大溶解の対照として機能した。各E:T比率における、dTp対照(N=6)、プラスミドA(N=4)、及びプラスミドD(N=1)溶解の平均±SDを計算した。

【0362】

6.2.1.7 抗体依存性細胞傷害性(ADCC)

mbIL15-HER1tを発現するCD19特異的T細胞のADCCは、修正された4時間のクロム放出アッセイによって決定され、それによって、T細胞(特異的抗体処理を伴う)が、標的細胞として機能し、Fc受容体を発現するエキスピボで活性化され、拡張されたNK細胞が、エフェクター細胞として使用された。5つの異なるエフェクター対

50

標的 (E : T) 比率の範囲 (40 : 1、20 : 1、10 : 1、5 : 1、及び 2.5 : 1) を試験し、放射線標識された標的 T 細胞からの ^{51}Cr 放出の検出によって、標的溶解物の量の測定を確立した。エキスピボで拡張された (Stim4) CD19CAR-mbIL15-HER1t T 細胞を、 $20\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ の HER1t 特異的抗体セツキシマブ (Imclone LLC、NDC 66733-948-23) 又は非特異的 (無関係) 抗体リツキシマブ (Biogen Inc. 及び Genentech USA Inc.、NDC 50242-051-21) とともに室温で 20~30 分間インキュベートし、これらの T 細胞を標的として使用した。NALM-6 及び K562 細胞株を、それぞれ (抗体処理を行わずに) 陰性対照及び陽性対照として使用し、NK 細胞の細胞溶解活性を評価した。培地のみ、又は Triton X-100 (Sigma) で処理された標的細胞を、それぞれ、自発的溶解及び最大溶解のための対照として使用した。パーセント (%) ^{51}Cr 溶解を、以下のように計算した。

10

【0363】

【数2】

$$\%^{51}\text{Cr 溶解} = \frac{\text{実験的な溶解} - \text{バックグラウンド溶解}}{\text{最大溶解} - \text{バックグラウンド溶解}} \times 100$$

【0364】

溶解パーセントデータを、NK 細胞によって観察された最大細胞溶解に対して正規化した。dTp 対照 (N=6)、プラスミド A (N=4)、及びプラスミド D (N=1) の平均 $\pm$ SD を計算した。

20

【0365】

6.2.1.8 導入遺伝子コピー数を決定するための定量的ドロップレットデジタル PCR (ddPCR)

ddPCR 法を使用して、遺伝子修飾 T 細胞の細胞当たりの CD19CAR、mbIL15、及び HER1t 平均導入遺伝子組み込み事象の存在及び定量化を決定した。二重トランスポゾン対照又は試験プラスミド (それぞれ、Dtp 対照又はプラスミド A~F)、モックトランスフェクトされた CD3 (DNA なしの陰性対照) でトランスフェクトされたエキスピボで拡張された (Stim4) CD19CAR-mbIL15-HER1t T 細胞、CD19CAR⁺Jurkat 細胞 (CD19CAR についての陽性対照)、mbIL15⁺Jurkat 細胞 (mbIL15 についての陽性対象)、及び CD19CAR⁺HER1t⁺T 細胞 (HER1t についての陽性対照) に由来するゲノム DNA (gDNA) を、市販のキット (Qiagen) を使用して単離した。プライマー/プローブ配列は、CD19CAR、mbIL15、及び HER1t 導入遺伝子に特異的であるように設計された。標的プライマー/プローブを、FAM 標識されたプローブを用いた Bio-Rad システム (Bio-Rad) によって合成した。すべての試料を、HEX 標識プローブ (Bio-Rad) を使用して、特定のヒト内因性参照遺伝子 EIF2C1 を用いて二重化した。QX-100 液滴生成器を使用して、製造業者のプロトコルに従って、DG8 カートリッジ (Bio-Rad) で PCR 液滴を生成し、各 $20\text{ }\mu\text{L}$ の PCR 混合物を、およそ 20,000 ナノリットルサイズの液滴に分配した。PCR 液滴を 96 ウェル PCR プレートに移し、ホイルで密封した。PCR は、Bio-Rad C1000 サーマルサイクラー [95°C (10 分); 94°C (30 秒)、58°C (30 秒)、及び 98°C (10 分) の 40 サイクル; 12°C (無期限)] を用いて行った。DNA コピー数を、QX-100 Digital Droplet PCR システム (Bio-Rad) を使用して評価した。すべての試料を三重に試行した。サーモサイクラーでの反応が完了した後、PCR プレートを QX200 (商標) Droplet Digital (商標) PCR System リーダーに移して、データを取得した。データを、QuantaSoft (商標) ソフトウェア (バージョン 1.7.4、Bio-Rad) を使用して分析した。導入遺伝子コピー数を決定するために、各細胞が参照 EIF2C1 遺伝子の 2 つのコピ

30

40

50

ーを含有するため、参照遺伝子（E I F 2 C 1）に対する標的（C D 1 9 C A R、m b I L 1 5、及びH E R 1 t）の比率に2を乗算した。コピー数多型（C N V）設定をソフトウェアプログラムで利用し、参照遺伝子を2コピー／細胞に設定した（例えば、その各々の内容が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれるB e l g r a d e r e t a l. , C l i n i c a l C h e m i s t r y , 2 0 1 3 ; 5 9 (6) : 9 9 1 - 9 9 4、及びH i n d s o n e t a l. , A n a l C h e m . 2 0 1 1 ; 8 3 : 8 6 0 4 - 8 6 1 0を参照されたい）。Q u a n t a S o f t（商標）ソフトウェアでは、コピー数は、参照分子濃度に対する標的分子濃度の比率に、ゲノム中の参照種のコピー数を乗算して計算することによって自動的に決定される。

【0366】

6.2.1.9 統計分析

統計的検定は、各統計の報告とともに記載されている。事後分析を行って、治療群間の違いを比較し、各統計結果とともに報告する。エラーは、標準偏差（S D）として報告される。G r a p h P a d P r i s m（バージョン8）ソフトウェアを使用して、統計分析を行った。P < 0.05は、統計的に有意と考えられた。

【0367】

6.2.2 C D 1 9 C A R、m b I L 1 5、及びH E R 1 tを共発現するC A R - T細胞の遺伝子修飾、発現特性決定、及び拡張

ドナーT細胞濃縮出発産物を、トランスポゾンプラスミドなし（陰性対照）、d T p対照、又はプラスミドA～Fのいずれかでトランスフェクトした。R P M C D 1 9 C A R - m b I L 1 5 H E R 1 t T細胞を、S B系を使用したエレクトロポレーションによって、3つのドナーから生成し、R P M T細胞産物中に存在する得られたトランスジェニック亜集団（C D 1 9 C A R⁺ - m b I L 1 5 - H E R 1 t⁺、C D 1 9 C A R⁺ m b I L 1 5 - H E R 1 t^{陰性}、C D 1 9 C A R^{陰性} - m b I L 1 5 - H E R 1 t⁺、C D 1 9 C A R^{陰性} - m b I L 1 5 - H E R 1 t^{陰性}）を、トランスフェクションの1日後に実施した（表16）。

【0368】

【表16】

表 16. RPM CD19CAR-mbIL15-HER1t T細胞のエレクトロポレーション後1日目の仕様及び導入遺伝子の発現。

ドナー	パラメータ	DNA 対照なし	dTp 対照	プラスミドA	プラスミドB	プラスミドC	プラスミドD	プラスミドE	プラスミドF
A	生存率 (%)	69.2	56.8	55.7	55.2	60.1	57.5	63.3	60.4
	CD3 (%)	95.8	99.0	98.3	98.6	98.7	98.5	97.8	98.5
	mbIL15 ⁺ (%)	0.0	6.1	13.7	26.2	10.7	25.3	24.2	19.9
	CD19CAR (%)	0.0	15.0	21.2	26.2	16.4	25.6	25.4	30.8
	HER1t (%)	0.7	6.4	22.0	6.8	22.3	30.6	6.7	34.4
B	生存率 (%)	86.2	73.2	72.3	71.8	71.2	73.8	72.7	67.4
	CD3 (%)	98.1	98.5	98.4	98.5	98.6	98.5	98.7	98.3
	mbIL15 ⁺ (%)	0.3	18.8	17.9	31.2	8.2	20.6	28.0	13.0
	CD19CAR (%)	0.2	37.2	46.1	44.0	24.3	46.2	34.9	31.9
	HER1t (%)	0.1	27.9	43.0	15.7	30.7	43.1	13.3	38.5
C	生存率 (%)	78.8	59.3	60.1	58.3	58.1	58.3	55.4	61.5
	CD3 (%)	94.9	94.2	94.7	95.1	93.7	94.0	95.1	95.1
	mbIL15 ⁺ (%)	0.6	3.3	7.4	14.4	1.7	2.7	7.7	4.6
	CD19CAR (%)	0.1	7.9	25.3	14.7	3.1	13.2	6.9	7.3
	HER1t (%)	0.6	5.6	25.3	7.9	16.5	13.1	3.6	28.9

【0369】

1日目に、R P M C A R - T細胞群の各々は、同等の平均生存率（62%～64%）

(表 16 及び図 3 A)、並びに 97%の平均 CD3⁺ 頻度 (表 16 及び図 3 B) を示した。個々の導入遺伝子発現の評価に関して、プラスミド A (31%±13%)、プラスミド B (28%±15%)、及びプラスミド D (28%±17%) は、sTp バリエーション間で最も高い CD19 CAR 発現をもたらした、これらは dTp 対照 (20%±15%) よりも約 1.5 倍大きな発現であり、位置 1 (ほとんど N 末端) 又は 3 (ほとんど C 末端) における CD19 CAR 導入遺伝子に対応していた (表 16 及び図 3 C)。プラスミド B (24%±9%) 及びプラスミド E (20%±11%) は、最も高い mbIL15 の発現を示し、続いてプラスミド A (13%±5%) 及びプラスミド D (16%±12%) であり、これらは dTp 対照修飾 T 細胞によって観察された 9%±8% の発現よりも高く、位置 1 における mbIL15 導入遺伝子に対応しており、位置 2 (中間位置) にあるときの中間の発現が続いた (表 16 及び図 3 D)。プラスミド A、プラスミド D、及びプラスミド F は、最も高い HER1t 発現 (それぞれ 30%±11%、29%±15%、及び 34%±5%) を有しており、これらは dTp 対照 (13%±13%) よりも約 2 倍大きな発現であり、位置 1 又は 3 における HER1t に対応していた (表 16 及び図 3 E)。

10

20

30

40

50

【0370】

ドナー A 由来の細胞を、K562-AaPC クローン 9 上での 4 回の再帰的刺激により、エクスピボで拡張させた。図 4 A~4 F、5 A~5 F、6 A~6 F、7 A~7 F、8 A~8 F、9 A~9 F、及び 10 A~10 F に示されるように、導入遺伝子共発現を、2 パラメータフロープロットを介して、1 日目、並びに Stim1、2、3、及び 4 の終了時に評価した。1 日目に、dTp 対照修飾 T 細胞が、CD19 CAR⁺HER1t⁺ (5%) / CD19 CAR⁺mbIL15⁺ (3%) T 細胞の小集団 (それぞれ図 4 D 及び 4 E)、並びに CD19 CAR⁺HER1t^{陰性} (9%) T 細胞の約 2 倍大きい集団の標準的な異種導入遺伝子発現パターンを示したことが観察された (図 4 D)。HER1t 及び mbIL15 について、2% の低レベルの共発現が観察された (図 4 F)。プラスミド A 修飾 T 細胞は、CD19 CAR 及び HER1t (17%) 並びに 8% の HER1t⁺mbIL15⁺ T 細胞 (それぞれ、図 5 D 及び 5 F) と、12% の HER1t⁺mbIL15^{陰性} (図 5 F)、及び 8% の CD19 CAR⁺mbIL15⁺ サブセットの共発現を示した。プラスミド B 修飾 T 細胞は、不良な HER1t 発現 (21% の CD19 CAR⁺HER1t^{陰性} 及び 5% の CD19 CAR⁺HER1t⁺) を示した (図 6 D 及び 11 C) が、mbIL15 (16% の CD19 CAR⁺mbIL15⁺) の発現を改善した (図 6 E 及び 11 B)。プラスミド C 修飾 T 細胞は、CD19 CAR 及び HER1t (13%) (図 7 D) の共発現を示したが、プラスミド A と比較して、より低い HER1t⁺mbIL15⁺ の共発現を示した (図 7 F)。プラスミド D 修飾 T 細胞は、27% の CD19 CAR⁺HER1t⁺ サブセット及び 8% の CD19 CAR⁺HER1t^{陰性} サブセットを示した (図 8 D)。MbIL15 も良好な発現を示し、18% の CD19 CAR⁺mbIL15⁺ 細胞が検出された (図 8 E)。HER1t 及び mbIL15 の共発現と、mbIL15 を上回る HER1t 発現 (13% の HER1t⁺mbIL15^{陰性} 及び 16% の HER1t⁺mbIL15⁺) とには、ある程度の不均一性があった (図 8 F)。プラスミド B 修飾 T 細胞と同様に、プラスミド E 修飾 T 細胞は、不良な HER1t 発現 (20% の CD19 CAR⁺HER1t^{陰性} 及び 5% の CD19 CAR⁺HER1t⁺) を示した (図 9 D 及び 11 C) が、mbIL15 (16% の CD19 CAR⁺mbIL15⁺) の発現を改善した (図 9 E 及び 11 B)。プラスミド C 修飾 T 細胞と同様に、プラスミド F 修飾 T 細胞は、CD19 CAR 及び HER1t (25%) の共発現 (図 10 D)、並びに 13% の HER1t⁺mbIL15⁺ 発現 (図 10 F) を示した。全体として、RPM T 細胞における 1 日目の導入遺伝子発現パターンは、プラスミド A 及びプラスミド D において最も好ましい CD19 CAR / HER1t 共発現及び総 mbIL15 発現を示し、プラスミド F が続いた。

【0371】

Stim4 のエクスピボで拡張された T 細胞は、すべての治療において、90% を超える CAR 発現を得た。最も高い mbIL15 発現は、dTp 対照修飾 T 細胞での 63% (

図 4 C) と比較して、プラスミド A 及びプラスミド D 修飾細胞 (それぞれ、66% 及び 72%) で観察された (それぞれ、図 5 C 及び 8 C、並びに図 11 B)。更に、最も高い総 HER1 t 発現は、プラスミド A 及びプラスミド D 修飾細胞 (それぞれ 95%) (図 5 B、8 B、及び 11 C) においてのみ観察され、これらは dTp 対照 (78%) (図 4 B 及び 11 C) を上回っており、すべてが 44% 未満の発現を示した他の sTp バリエーションより決定的に優れていた (図 6 B、7 B、9 B、10 B、及び 11 C)。

【0372】

特に、プラスミド A 修飾細胞 (94%) 及びプラスミド D 修飾細胞 (94%) において、Stim4 のエキスピボで拡張された CD19 CAR⁺HER1 t⁺ 共発現が最も高かっただけでなく、更に、CD19 CAR 及び HER1 t の発現レベルも高度に関連しており、一様な CAR⁺HER1 t⁺ 発現パターンをもたらした (図 5 D 及び 8 D)。これは、dTp 対照修飾細胞によって示されるびまん性 CAR⁺HER1 t⁺ 集団とは対照的であった (図 4 D)。同様に、プラスミド A 修飾細胞及びプラスミド D 修飾細胞における CAR⁺mbIL15⁺ 発現パターンは、dTp 対照修飾細胞において観察された拡散パターンとは対照的に、高度に関連し、一様であった (それぞれ、図 5 E、図 8 E、及び図 4 E)。

【0373】

ウェスタンブロットによって、Stim4 のエキスピボで拡張された CD19 CAR-mbIL15-HER1 t T 細胞由来の細胞溶解物に対して、タンパク質発現の確認を行った。細胞を調製し、修飾細胞上の CD19 CAR タンパク質の検出のための抗ヒト CD247 (図 12 A)、mbIL15 の検出のための抗ヒト IL-15 (図 12 B)、及び HER1 t の検出のための抗ヒト EGFR (図 12 C) を用いてタンパク質移入及びブローディングを行った。適切な特異性を有する二次 HRP 抗体を検出に使用した。CD19 CAR を発現する Jurkat 細胞を、CD19 CAR 検出のための陽性対照として使用した。組換えヒト IL-15 (rhIL-15) 及び DNA なし (陰性対照) T 細胞は、それぞれ、キメラ IL-15 の検出のために、陽性対照及び陰性対照として機能した。組換えヒト EGFR を、先端切断 EGFR (tEGFR) の検出のための陽性対照として使用した。

【0374】

CD19 CAR 発現は、抗 CD3 ζ 抗体を使用した CD3 ζ のウェスタンブロット分析によって確認された。図 12 A に示されるように、内因性 CD3 ζ バンド (約 16 kDa) の検出が、すべての T 細胞試料において観察された。約 60 kDa のバンド/バンドは、CD19 特異的 CAR のキメラ CD3 ζ タンパク質を表す。対照 rhIL-15 の検出は、予想された約 15 kDa に生じ、キメラ mbIL15 バンドは、約 140 kDa に観察された (図 12 B)。HER1 t (先端切断 EGFR、tEGFR) 発現は、約 50 kDa で修飾 T 細胞において観察され、rhEGFR において、約 190 kDa で全長 EGFR が検出された (図 12 C)。

【0375】

すべてのトランスポゾンバリエーションについて、ドナー A において数値的な拡張を評価した。T 細胞濃縮出発産物を解凍し、一晩休息させた。dTp 対照とともに、Amara Nucleofector 溶液を使用して細胞をエレクトロポレーションし、ドナー A についてプラスミド A~F と比較した。翌日、細胞を γ 放射線照射された (100 Gy) K562-AAPC クローン 9 で刺激した。追加の再帰的刺激 (Stim) を、7~10 日毎に行った。T 細胞は、1 日目に、及び各 Stim の終了時に数えあげられ、生存細胞は、Cellometer 自動化細胞計数器を使用して、AOP1 除外に基づいて計数された。全体的に、すべての培養物が、数値的な拡張を達成した。CD19 CAR 特異的拡張は、すべての sTp バリエーションについて、dTp 対照よりも約 0.5~1 log 大きかった (図 13 A)。mbIL15 特異的拡張は、dTp 対照と同等の拡張を有していたプラスミド E を除き、すべての sTp バリエーションについて、dTp 対照よりも約 0.5~1 log 大きかった (図 13 B)。HER1 t-特異的拡張は、様々であった。プラスミド B

及びプラスミド E は、HER1 t + T 細胞の最も低い拡張を示し、プラスミド C 及びプラスミド F は、dTp 対照と同等の拡張を示し、プラスミド A 及びプラスミド D は、最も大きな数的拡張を示した（図 13 C）。

【0376】

この実施例は、プラスミド A 及びプラスミド D が、CD19 CAR-mbIL15-HER1 t トリシストロン性トランスポゾンプラスミドを用いた T 細胞の遺伝子修飾の主要な目的、すなわち、CD19 CAR への抗原特異性のリダイレクト、mbIL15⁺ 細胞の条件付き除去を可能にする HER1 t 共発現、mbIL15 の許容される総発現、及び 3 つの導入遺伝子すべての効率的かつ一様な共発現を最もよく満たすことを示す。これらの基準を考慮すると、CD19 CAR-F2A-mbIL15-T2A-HER1 t のエレメント順序を有するプラスミド A 及びプラスミド D 単一トランスポゾン構築物は、所望の基準を最良に満たす。

10

【0377】

6.2.3 CD19 CAR、mbIL15、及び HER1 t を共発現する CAR-T 細胞の機能的特性決定

アッセイを実施して、CD19 CAR、mbIL15、及び HER1 t を共発現する CAR-T 細胞の機能的特徴を評価した。

【0378】

6.2.3.1 CD19 CAR、mbIL15、及び HER1 t を発現する CAR-T 細胞を用いた CD19 指向性細胞傷害性及びサイトカイン発現の特異性

20

細胞傷害性アッセイを行って、CD19⁺ 腫瘍細胞を標的とする特異性を示した。CD19⁺ 腫瘍標的に対する特異性は、CD19 発現腫瘍細胞株（NALM-6、Daudi β2M、及び操作された CD19 EL-4）と CD19^{陰性} 親 EL-4 細胞株の活性を比較することによって示された。細胞傷害性アッセイは、標準的な 4 時間クロム放出アッセイにおいて、20:1~1.25:1 の範囲の E:T 比率を試験した。プラスミド A~F でトランスフェクトされた CD19 CAR-mbIL15-HER1 t T 細胞は、最も低い E:T で約 50% のすべての CD19⁺ 標的の特異的溶解を示し、dTp 対照細胞と同等であった（図 14 A~14 H）。CD19^{陰性} 標的の溶解は、低い E:T で最小であった。要約すると、単一のトランスポゾン由来の導入遺伝子の共発現をもたらすプラスミド A~F による T 細胞の修飾は、dTp 対照で修飾された細胞と比較して、CD19 CAR-mbIL15-HER1 t T 細胞の細胞傷害性機能を変化させなかった。

30

【0379】

6.2.3.2 ADCC を介した CD19 CAR-mbIL15-HER1 t T 細胞の HER1 t 媒介性枯渇

細胞表面上で mbIL15 及び CD19 CAR と HER1 t を共発現させ、注入された mbIL15⁺ T 細胞を選択的に枯渇させる機構を提供するために、HER1 t をトリシストロン設計に含めた。HER1 t に結合し、抗体依存性細胞傷害性（ADCC）を媒介する臨床的に利用可能なモノクローナル抗体であるセツキシマブの投与によって、HER1 t 発現細胞を除去することができる。インビトロ評価を実施して、エクスビボで拡張された CD19 CAR-mbIL15-HER1 t T 細胞に対して ADCC を誘導するセツキシマブの能力を確認した。遺伝子修飾された T 細胞は、Fc 受容体発現 NK 細胞をエフェクターとして使用して、セツキシマブ（抗 HER1 t 抗体）又はリツキシマブ（抗 CD20 抗体、陰性対照）の存在下での標準的な 4 時間クロム放出アッセイであったこのアッセイで、標的として機能した。図 15 に示されるように、セツキシマブの添加は、dTp 対照、プラスミド A、プラスミド C、プラスミド D、及びプラスミド F で生成された標的 HER1 t 修飾 T 細胞の枯渇を引き起こした。プラスミド A 及びプラスミド D で生成された CD19 CAR-mbIL15-HER1 t T 細胞は、最高レベルの選択的枯渇（それぞれ、約 60% 及び約 50%）を示した。セツキシマブは、陰性対照（HER1 t^{陰性}）細胞の溶解を示すことができず、HER1 t 特異的な作用機序を確認するものである。

40

50

【0380】

これらのデータは、枯渇戦略を必要とする有害な臨床効果の場合に、プラスミド A 及びプラスミド D を使用して生成された CD19CAR-mbIL15-HER1t T 細胞を枯渇させるためのセツキシマブの使用を裏付けるものである。

【0381】

6.2.3.3 SB系で修飾された CD19CAR-mbIL15-HER1t T 細胞のエキスピボ拡張の後の CD19CAR、mbIL15、及び HER1t 導入遺伝子の安定な組み込み

エキスピボで拡張された CD19CAR-mbIL15-HER1t T 細胞における CD19CAR、mbIL15、及び HER1t 導入遺伝子のコピー数は、ddPCR、及び CD19CAR、mbIL15、及び HER1t に特異的なプライマー／プローブセットを使用して調べられた。結果を図 16 に示す。コピー数を、2 コピー／細胞で存在することが知られているヒト参照遺伝子 EIF2C1 に対して正規化した。dTp 対照が、CD19CAR と mbIL15 及び HER1t のそれぞれとの間で異なる組み込みレベルを有することが観察された（CD19CAR については細胞当たり約 2.5 コピー、mbIL15 及び HER1t については細胞当たり約 8 コピー）。プラスミド C 及びプラスミド F で生成された T 細胞は、細胞当たり 10 超の導入遺伝子コピーを示した。プラスミド A、プラスミド D、及びプラスミド E で生成された細胞は、細胞当たり約 5 の平均コピー数を示したが、プラスミド B で生成された細胞は、細胞当たり約 7 の平均コピー数を示した。陽性対照 T 細胞（AaPC 上で増殖）は、1 細胞当たり平均約 1 コピーでの導入遺伝子挿入を示した。

【0382】

要約すると、RPM 下で製造された細胞の初代ヒト T 細胞ゲノムへのトランスポゾン挿入の数の分析に基づいて、そのような細胞は、導入遺伝子の安定した組み込みを受け、プラスミド A、プラスミド D、及びプラスミド E によって生成された CD19-mbIL15-HER1t T 細胞は、他の sTp バリエーション及び dTp 対照と比較して、最も好ましい（低い）組み込み値を示した。加えて、すべての sTp バリエーションによって生成された T 細胞は、dTp 対照によって生成された T 細胞よりも、3 つの導入遺伝子すべてにわたってはるかに一貫した組み込み値を示した。

【0383】

6.3 実施例 3：候補トリシストロン性 sTp SB DNA プラスミドのマルチドナー評価

実施例 2 における sTp プラスミドの評価は、以下に基づいて、更なる試験を進めるための候補としてプラスミド A 及びプラスミド D を特定した。（i）フローサイトメトリーによって検出されるような、1 日目及び Stim4 での導入遺伝子の好ましい共発現、（ii）ウェスタンブロットによって検出されるような、全体的な導入遺伝子発現 Stim4、（iii）許容される導入遺伝子特異的数値拡張、（iv）影響を受けない細胞傷害性、及び（v）好ましい選択的排除。この実施例は、追加のドナーにおける候補プラスミド A の継続的な評価について説明する。単一のドナーのプラスミド D データは、参照のために含まれ、導入遺伝子の順序が同じであるため、プラスミド A と同等である。

【0384】

6.3.1 材料及び方法

材料及び方法は、示されている場合を除き、セクション 6.2.1 に記載のとおりであった。

【0385】

6.3.2 CD19CAR、mbIL15、及び HER1t を共発現する CAR-T 細胞の遺伝子修飾、発現特性決定、及び拡張

実施例 2 と同様に、T 細胞濃縮産物を、dTp 対照、プラスミド A、及びプラスミド D によりエレクトロポレーションして、放射線照射されたクローン 9 AaPC 上での共培養によってエキスピボで拡張させ、RPM T 細胞（1 日目）及び Stim4 の増殖した

細胞を評価した。d T p 対照 (n = 10、1日目; n = 5、S t i m 1; n = 7、S t i m 2; n = 6、S t i m 3; n = 5、S t i m 4、図 17 A)、プラスミド A (n = 8、1日目; n = 3、S t i m 1; n = 4、S t i m 2; n = 4、S t i m 3; n = 4、S t i m 4、図 17 B)、及びプラスミド D (n = 7、1日目; n = 2、S t i m 1; n = 2、S t i m 2; n = 1、S t i m 3; n = 1、S t i m 4、図 17 C) を使用して生成された T 細胞の成長動態及び導入遺伝子特異的拡張は、約 $10^{1.1}$ 個の細胞での治療にわたって同等であった。

【0386】

同様に、T 細胞濃縮産物を、d T p 対照 (n = 6、1日目; n = 3、S t i m 4) (図 18 A)、プラスミド A (n = 3、1日目; n = 3、S t i m 4) (図 18 B)、及びプラスミド D (n = 1、1日目; n = 1、S t i m 4) (図 18 C) でエレクトロポレーションして、放射線照射されたクローン 9 A a P C 上での共培養によってエクスピボで拡張させた。1日目の R P M T 細胞における C D 19 C A R / H E R 1 t 共発現の評価は、プラスミド A 又はプラスミド D で修飾された細胞が、d T p 対照修飾細胞と比較して、標的 C D 19 C A R + H E R 1 t + T 細胞集団のより高い頻度を有していることを示した (それぞれ、7 % ± 9 %、27 % ± 0 %、2 % ± 2 %)。S t i m 4 の終了時に、プラスミド A 修飾細胞及びプラスミド D 修飾細胞は両方とも、d T p 対照修飾細胞と比較して、標的 C D 19 C A R + H E R 1 t + T 細胞集団のより高い頻度を有していた (それぞれ、67 % ± 27 %、94 % ± 0 %、50 % ± 34 %)。d T p 対照及びプラスミド A についての追加のドナー評価は、d T p 対照と比較して、導入遺伝子の共発現がプラスミド A 及びプラスミド D (同じ導入遺伝子の順序を共有する) の使用によって改善されるという実施例 2 の観察を裏付けている。

【0387】

6.3.3 C D 19 C A R、m b I L 15、及び H E R 1 t を共発現する C A R - T 細胞の機能的特性決定

アッセイを実施して、C D 19 C A R、m b I L 15、及び H E R 1 t を共発現する C A R - T 細胞の機能的特徴を評価した。

【0388】

6.3.3.1 C D 19 C A R、m b I L 15、及び H E R 1 t を発現する C A R - T 細胞を用いた C D 19 指向性細胞傷害性及びサイトカイン発現の特異性

セクション 6.2.3.1 と同様に、細胞傷害性を、標準的な 4 時間のクロム放出アッセイにおいて、d T p 対照 (n = 6)、プラスミド A (n = 4)、及びプラスミド D (n = 1) によって生成され、エクスピボで拡張された C D 19 C A R - m b I L 15 - H E R 1 t T 細胞のための追加のドナーにおいて、評価した。C D 19 + 標的細胞株の細胞傷害性は、3つの条件にわたって同等であり、d T p 対照 (図 19 A) 及びプラスミド A (図 19 B) については約 40 %、プラスミド D (図 19 C) については約 50 % の特異的溶解が 1.25 : 1 の E : T 比率で観察された。C D 19 陰性細胞溶解は、無視できるほどであった。要約すると、これらのデータは、プラスミド A 及びプラスミド D が細胞傷害性能力を変化させないことを示し、セクション 6.2.3.1 の観察を更に裏付けている。

【0389】

6.3.3.2 A D C C を介した C D 19 C A R - m b I L 15 - H E R 1 t T 細胞の H E R 1 t 媒介性枯渇

セクション 6.2.3.2 と同様に、A D C C を介した C D 19 C A R - m b I L 15 - H E R 1 t T 細胞の選択的排除を、d T p 対照 (n = 6)、プラスミド A (n = 4)、及びプラスミド D (n = 1) によって生成され、エクスピボで拡張された C D 19 C A R - m b I L 15 - H E R 1 t T 細胞のための追加のドナーにおいて、評価した。3つの条件すべてについて、セツキシマブ治療は、エフェクター N K 細胞による標的 C D 19 C A R - m b I L 15 - H E R 1 t T 細胞の約 50 % の溶解をもたらした (図 20)。これらのデータは、プラスミド A 及びプラスミド D が、セツキシマブを使用して A D C C

を介して選択的に枯渇され得るCD19CAR-mbIL15-HER1t T細胞を生成することを示す、セクション6.2.3.2のデータに対する更なる裏付けを提供する。

【0390】

6.3.3.3 SB系で修飾されたCD19CAR-mbIL15-HER1t T細胞のエキスピボ拡張の後のCD19CAR、mbIL15、及びHER1t導入遺伝子の安定な組み込み

セクション6.2.3.3と同様に、dTp対照(n=7)、プラスミドA(n=5)、又はプラスミドD(n=1)を使用して生成された、エキスピボで拡張されたStim4のCD19CAR-mbIL15-HER1t T細胞を、図21に示されるように、CD19CAR、mbIL15、及びHER1tに特異的なddPCR及びプライマー/プローブセットを使用して、導入遺伝子コピー数について評価した。dTp対照で生成された細胞は、CD19CARについて平均で約3コピー/細胞、mbIL15について約11コピー/細胞、及びHER1tについて約11コピー/細胞を示した。プラスミドAで生成された細胞は、3つの導入遺伝子について約6の平均コピー/細胞を有しており、プラスミドDで生成された細胞は、3つの導入遺伝子について約5の平均コピー/細胞を有していた。

【0391】

要約すると、これらのデータは、セクション6.2.3.3からの観察を裏付けるものであり、プラスミドA及びプラスミドDがそれぞれ、3つの導入遺伝子すべてに対してほぼ同一の組み込み数を有するCD19CAR-mbIL15-HER1t T細胞を生成したが、一方で、dTp対照は、一方ではCD19CARと他方ではmbIL15及びHER1tとの間で実質的に異なる組み込み数を有する細胞を生成し、mbIL15及びHER1tが、実質的により高いレベルで組み込まれることを示している。

【0392】

6.4 実施例4：CD19CAR、mbIL15、及びHER1tを共発現するRPM T細胞のインビボでの生成及び評価

この実施例は、dTp対照又はプラスミドA由来のCD19CAR、mbIL15、及びHER1tを共発現するRPM T細胞のインビボでの生成及び評価を記載する。

【0393】

6.4.1 材料及び方法

6.4.1.1 細胞株

ヒト腫瘍細胞株NALM-6/fLUCは、MD Anderson Cancer Center (MDACC、Houston, TX)で、親プレ-B細胞CD19⁺NALM-6細胞株(American Type Culture Collection (ATCC、Manassas, VA))から生成された(又は、例えば、その内容が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれるSingh et al., Cancer Res. 2011; 71(10): 3516-3527に記載されるように)。これらの腫瘍細胞は、非侵襲的生物発光イメージング(BLI)のためのホタルルシフェラーゼ(fLUC)及び蛍光イメージングのための高感度緑色蛍光タンパク質(EGFP)を共発現する。細胞を、RPMI 1640又は10% FBS(Hyclone/GE Healthcare、Logan, UT)及び1% Glutamax-100(ThermoFisher Scientific、Waltham, MA)を含有するHyclone:R10培地中で通常のように培養した。細胞を、37°C、5%のCO₂の通常の条件で培養した。細胞を試験し、マイコプラズマについて陰性であることを見出した。短いタンデム反復DNAフィンガープリンティングにより、細胞株の同一性を確認した。

【0394】

6.4.1.2 正常ドナーヒトT細胞

末梢血又は白血球除去輸血産物は、正常なドナー(Key Biologics、Me

mph is, TN) から入手した。同じドナーから複数の収集物を得た。RPM T細胞の製造のための2つの出発細胞産物の試験を可能にするように、アフェレーシス産物を分割した。

【0395】

アフェレーシスの一部を、Sepax S-100 Cell Separation System (BioSafe, Newark, DE) を使用してPBMCを単離するために処理した。生/死細胞は、Cellometer 機器 (Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA) で数えあげた。単離されたPBMCを、Cryosstor CS10 (Biolife Solutions, Bothell, WA、又は等価物) 中で凍結保存し、液体窒素タンクの気相に保存した。

10

【0396】

T細胞濃縮出発産物 (CD3 治療群の場合) の調製物であるアフェレーシス産物の他の部分を、0.5% (v/v) のHSAを含むCliniMACS (登録商標) PBS/EDTA緩衝液を使用して希釈し、血小板枯渇ステップを、室温 (RT)、400×gで10分間遠心分離することによって実施し、続いて同じ緩衝液中で再懸濁させた。CD4及びCD8特異的CliniMACS (登録商標) マイクロビーズを両方とも、室温で30分間、混合条件下で細胞とともにインキュベートし、CliniMACS Plusで常磁性選択を行い、T細胞の出発産物を濃縮した。生/死細胞は、Cellometer 機器 (Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA) で数えあげた。単離されたT細胞を、Cryosstor CS10中で凍結保存し、液体窒素タンクの気相に保存した。

20

【0397】

6.4.1.3 SB系を使用したRPM CD19CAR-mbIL15-HER1t T細胞の生成

この試験で評価されるRPM CD19CAR-mbIL15-HER1t T細胞の試験物品群を生成するために、PBMC又はT細胞濃縮出発産物のいずれかを使用し、遺伝子移入は、実施例1にそれぞれ記載されるように、Nucleofector (商標) 2bデバイス (Lonza, Basel, Switzerland) を用いて、dTp対照又はプラスミドAのいずれかを使用した。各試験物品の生成の詳細は次のとおりである。

30

【0398】

モックPBMC：エレクトロポレーションの前日に、凍結保存されたPBMCを、RPMI 1640培地 (フェノールレッド非含有培地 (Hyclone)、10% FBS、及び1% Glutamax-100 (R10)) 中で解凍し、R10で洗浄し、再懸濁させ、37℃/5% CO₂ インキュベーターに一晩置いた。休息細胞を採取し、スピンドウンし、任意のトランスポゾン又はトランスポザーゼDNAプラスミドを含まないNucleofector 緩衝液 (Human T Cell Nucleofector Kit, Lonza) に再懸濁させた。

【0399】

モックCD3：凍結保存されたCD3濃縮細胞を解凍し、モックPBMCについて上に記載したように処理した。

40

【0400】

dTp対照 (P、5e6)：凍結保存されたPBMCを解凍し、1時間休息させた。休息細胞を採取し、スピンドウンし、dTp対照及びプラスミドTA (実施例1に記載されるように、SB11トランスポザーゼをコードする) を最終トランスポゾン：トランスポザーゼ比率3：1で含有するNucleofector 緩衝液に再懸濁させた (表17)。「(P、5e6)」は、注入された 5×10^6 個のPBMC由来細胞を指す。

【0401】

プラスミドA (P、5e6)：凍結保存されたPBMCを解凍し、1時間休息させた。休息細胞を採取し、プラスミドA及びプラスミドTAを最終トランスポゾン：トランスポ

50

ザーゼ比率 3 : 1 で含有する *Nucleofector* 緩衝液に再懸濁させた (表 17)。
。dTp 対照と同様に、「(P、5e6)」は、注入された 5×10^6 個の PBM C 由来細胞を指す。

【0402】

プラスミド A (T、1e6) 及びプラスミド A (T、0.5e6) : 凍結保存された CD3 濃縮細胞を解凍し、モック CD3 について上に記載したように処理した。休息細胞を採取し、プラスミド A 及びプラスミド TA を最終トランスポゾン : トランスポザーゼ比率 3 : 1 で含有する *Nucleofector* 緩衝液に再懸濁させた (表 17)。「(T、1e6)」は、注入された 1×10^6 個の CD19CAR⁺CD3⁺細胞を指し、「(T、0.5e6)」は、注入された 0.5×10^6 個の CD19CAR⁺CD3⁺細胞を指す。

10

【0403】

PBM C 由来の RPM 細胞について、電子移動の直後に、各キュベットからの内容物を再懸濁させ、R10 培地に移し、37℃ / 5% CO₂ インキュベーター中で 1 ~ 2 時間休息させた。その後、全培地交換を R10 培地で行い、細胞を、37℃ / 5% CO₂ インキュベーター中に一晩置いた。電子移動後 24 時間以内に、細胞を培養物から採取し、フローサイトメトリーによってサンプリングして、CD19CAR、mbIL15、及び HER1t、並びに他の T 細胞マーカーの細胞表面発現を決定し、例えば、T 細胞メモリサブセットを特性決定した。マウスへの注射のために製剤化するために、マウス当たり 300 μL の注射量を達成するように、各試験物品の所望の細胞数を Plasmalyte A に再懸濁させた。

20

【0404】

T 細胞由来 RPM 細胞について、電子移動の直後に、各キュベットからの内容物を再懸濁させ、37℃ / 5% CO₂ インキュベーター中での 1 ~ 2 時間のインキュベーションのために、DNase を含有する R10 培地に移した。その後、全培地交換を R10 培地で行い、細胞を、37℃ / 5% CO₂ インキュベーター中に一晩置いた。電子移動後 24 時間以内に、細胞を培養物から採取し、フローサイトメトリーによってサンプリングして、CD19CAR、mbIL15、及び HER1t、並びに他の T 細胞マーカーの細胞表面発現を決定し、例えば、T 細胞メモリサブセットを特性決定した。更に、採取された細胞から死細胞及び破片を除去し、細胞を生存細胞について濃縮した。マウスへの注射のために製剤化するために、マウス当たり 300 μL の注射量を達成するように、各試験物品の所望の細胞数を Plasmalyte A に再懸濁させた。

30

【0405】

40

50

【表 17】

表 17. 試験物品。

試験物品 (細胞)	出発細胞 産物	トランスポゾン	注入された 総細胞 (× 10 ⁶)	注入された CD19CAR +CD3 ⁺ 細胞 (×10 ⁶)	動物群
腫瘍のみ	N/A	N/A	N/A	N/A	A
モック PBMC	PBMC	N/A	5.00	N/A	B
モック CD3	T 細胞濃 縮	N/A	3.94	N/A	C
dTp 対照 (P、5e6)	PBMC	dTp 対照 (実施 例 1 に記載され るような)	5.00	N/A	D
プラスミド A (P、 5e6)	PBMC	プラスミド A (実施例 1 に記 載されるよう な)	5.00	N/A	E
プラスミド A (T、 1e6)	T 細胞濃 縮	プラスミド A (実施例 1 に記 載されるよう な)	3.94	1.00	F
プラスミド A (T、 0.5e6)	T 細胞濃 縮	プラスミド A (実施例 1 に記 載されるよう な)	1.97	0.50	G

10

【0406】

20

6. 4. 1. 4 動物

およそ 8 週齢の雌 NOD / SCID / ガンママウス (NOD. Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl} / SzJ、NSG) を、Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) から購入した。NSG マウスは、B リンパ球及び T リンパ球、並びに NK 細胞の両方を欠く (例えば、その内容が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる Ali et al., PLoS ONE. 2012; 7 (8): e44219 に記載されるように)。この株は、ヒト造血細胞の優れた生着、及び末梢血中の芽球を検出する能力を有する ALL を有する (例えば、その各々の内容が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる Agliano et al., Int J Cancer. 2008; 123: 2222-2227、及び Santos et al., Nat Med. 2009; 15 (3): 338-344 に記載されるように)。試験物品を製造し、試験を、MDACC において、その Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) 及び Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (Eighth Edition, NRC, 2011、National Academy Press によって公開された、その内容が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる) 及び Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals, Office of Laboratory Animal Welfare, Department of Health and Human Services (OLAW / NIH, 2002、その内容が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる) に準拠して行った。以前の報告では、6 ~ 12 週齢の NSG マウスが、宿主の事前調整を行わずに 10⁷ 個のヒト PBMC で効率的に生着し、加速された体重減少及び著しく速い疾患発症 (生存期間中央値 (MST) = 40 日) ととともに一貫して xGvHD を発症したことが示されている (例えば、その内容が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる Ali et al., PLoS ONE. 2012; 7 (8): e44219 に記載されるように)。

30

40

【0407】

6. 4. 1. 5 試験設計

1 日目に、NSG マウスに、尾静脈を介して、0.2 mL の滅菌 PBS 中の 1.5 × 1

50

0⁴個の生存可能NALM-6／fLUC細胞を注射した。6日目に、動物は、腫瘍の存在を検出するためにバイオルミネセンスイメージング（BLI）を受けた。これらのデータに基づき、動物を治療群に層別化し、すべてが、同様の平均腫瘍フラックスシグナルを観察した。動物は、表18に示されるように、7日目に試験物品の治療を受け、対照群B及びC中の総細胞数は、対応する遺伝子修飾T細胞治療群の総細胞数と一致していた。

【0408】

【表18】

表 18. 動物実験の試験設計。

群	N	投与経路（体積、濃度）		注射日	試験物品	投与経路（体積、濃度）		注射日
		μL／マウス	細胞／mL			μL／マウス	細胞／mL	
A	10	200	7.5×10 ⁴	1	N/A	N/A	N/A	N/A
B	6	200	7.5×10 ⁴	1	モック PBMC	300	1.67×10 ⁷	7
C	5	200	7.5×10 ⁴	1	モック CD3	300	1.31×10 ⁷	7
D	10	200	7.5×10 ⁴	1	dTp 対照 (P、5e6)	300	1.67×10 ⁷	7
E	9	200	7.5×10 ⁴	1	プラスミド A (P、5e6)	300	1.67×10 ⁷	7
F	10	200	7.5×10 ⁴	1	プラスミド A (T、1e6)	300	1.31×10 ⁷	7
G	4	200	7.5×10 ⁴	1	プラスミド A (T、0.5e6)	300	6.57×10 ⁶	7

10

20

【0409】

6.4.1.6 動物の取り扱い及びイメージングの方法論

6.4.1.6.1 体重測定

動物を、試験期間中、週に2～3回体重測定した。

【0410】

6.4.1.6.2 インビボBLI

BLIは、動物における特定の細胞活動を視覚化し、追跡し、監視するために使用される高感度で低ノイズの非侵襲的な技術である。発光シグナルの長期的な監視は、腫瘍負荷の定量的評価を提供する。NALM6由来のホタルルシフェラーゼ（fLUC）を、基質として提供されるD-ルシフェリンを有する生物発光レポーターとして使用した。6、14、19、22、25、28、32、35、39、42、43、46、49、53、56、60、及び62日目に、BLIを、Xenogen IVIS Spectrum In Vivo Imaging System（Xenogen、Caliper Life Sciences、Hopkinton, MA）を使用して行った。Living Imageソフトウェア（v. 4.5、Xenogen、Caliper Life Sciences、Hopkinton, MA）を使用して、生物発光イメージングデータセットを取得し、定量化した。撮像時間の10分前に、150μLのPBS中の214.5μgのD-ルシフェリン（1.43mg/mLの作業ストック溶液、Caliper）の単回の皮下（s.q.）注射を各マウスに投与した。動物を2%イソフルランで維持し、生物学的封じ込めデバイス内に配置した（例えば、その内容が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれるGade et al., Cancer Res. 2005; 65(19): 9080-9088に記載されるように）。マウスを、4分間の曝露取得も実施した6日目を除き、自動曝露によって決定される曝露時間で撮像した。各動物について腹部画像を取得し、定量化した。総フラックス値は、各マウスにわたって等価なサイズの関心領域（ROI）を描画することによって決定され、光子/s（p/s）で提示された（例えば、その各々の内容が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれるGade et al., Cancer Res. 2005; 65(19): 9080-908

30

40

50

8、及びCooke et al., Blood, 1996; 8 (8): 3230-3239に記載されるように)。腫瘍を有さないマウス（すなわち、フラックス≦バックグラウンドの2倍）を定義する「バックグラウンド」BLIは、ルシフェリンを注射したが、腹部画像をキャプチャして、NALM-6を有さない（したがって、fLUC活性を有さない）NSGマウスを使用して確立される。

【0411】

6.4.1.6.3 血液収集

最終的な出血を後眼窩出血によって収集し、ヘパリンナトリウムでコーティングされたチューブに収集した。CAR⁺T細胞及び腫瘍の存在は、フローサイトメトリーによって決定された。可能な限り、瀕死の動物から血液を収集した。試料をACK溶解緩衝液（Thermo-Fisher）中でインキュベートして赤血球細胞を溶解させ、PBS及び2% FBSに再懸濁させ、免疫染色が行われるまで（典型的には、組織採取の4時間以内）4℃で維持して、フローサイトメトリーによってT細胞上のCD19CAR、mBI15、及びHER1tの存在を評価した。

【0412】

6.4.1.6.4 臨床観察及びエンドポイント

ヒドラゲルを、回復を助けるために、病気のように見える動物のケージに配置した。マウスを、処理に起因する疼痛又は他の不快感の何らかの徴候について、毎日監視した。動物が患う任意の兆候が記録された。以下の兆候を経験している動物は、以下のIACUCプロトコルに従って、PIに通知し、同意を得た後、頸椎脱臼によって人道的に安楽死させた。1) 24～48時間にわたって食べたり飲んだりせず、消耗又は脱水を引き起こした、2) マウス、又は年齢を一致させたビヒクル処理された対照の処理前の体重と比較して、任意の時点で一貫した、若しくは急速な体重減少が20%に達するか、又は15%の減少が72時間維持された、3) 持続的な低体温症、4) 任意の開口部からの血液汚染又は粘液膿性分泌物、5) 特に鼻分泌物及び／又はチアノーシスを伴う場合の努力呼吸、6) リンパ節又は脾臓の拡大、7) 後肢麻痺又は脱力感、8) 著しい腹部膨張、又は腹水負荷が年齢を一致させた対照の体重の10%を超える、9) 48時間にわたる尿失禁又は下痢、10) 刺激に対する応答の欠如。

【0413】

6.4.1.6.4.1 生体分析アッセイ

末梢血（PB）、脾臓、及びBM試料を、免疫表現型決定し、NALM-6／fLUC腫瘍細胞及び遺伝子修飾T細胞の存在についてフローサイトメトリーによって評価した。

【0414】

6.4.1.6.4.2 フローサイトメトリー

最大 2×10^6 個の細胞を、ヒト特異的な（特に明記しない限り）蛍光色素をコンジュゲートした抗体で染色した。試料及び対応する対照上の細胞表面マーカーの染色は、まず、Fc受容体遮断ステップを行い、4℃で10分間、FACS緩衝液（PBS、2% FBS、0.1%ナトリウムアジド）中で50%マウス血清（Jackson ImmunoResearch, PA）とともにインキュベートすることによって、バックグラウンド染色を低減した。免疫染色は、Brilliant Stain Buffer（BD Biosciences）で希釈した表19に列挙された抗体の組み合わせの抗体マスターミックス100μLを添加することによって行った。簡潔に述べると、CD19CAR発現を、CD19CARの抗CD19部分に特異的なAlexa Fluor（凍結保存）（AF）488がコンジュゲートされた抗イディオタイプ抗体（クローン番号136.20.1）を使用して検出した（例えば、その内容が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれるJena et al., PLoS, 2013; 8 (3): e57838に記載されるように）。CD19CAR抗イディオタイプ抗体を、Invitrogen／Thermo Fisher Scientific（Waltham, MA）によるAF-488フルオロフォアにコンジュゲートした。HER1t分子を、蛍光的にコンジュゲートされたセツキシマブ抗体を使用して検出した。蛍光コンジュゲートされたセツキ

シマブ試薬は、Invitrogen/Thermo Fisher ScientificによってAF-647にコンジュゲートされた、商業的に購入されたErbittuxであった。蛍光的にコンジュゲートされた抗体には、CD8（クローンRPA-T8）、CD3（クローンSK7）、CD45RO（UCHL1）、IL-15（34559）、CD45（クローンHI30）、CCR7（クローンG043H7）、CD19CARイディオタイプ（クローン136.20.1）、及びマウスCD45.1（クローンA20）が含まれていた（表19）。

【0415】

【表19】

表19. 抗体。

抗体標的	クローン	フルオロフォア	会社
CD45	HI30	BV-786	BD Biosciences
マウス CD45.1	A20	CF-594	BD Biosciences
CD3	SK7	PE-Cy7	BD Biosciences
CD8	RPA-T8	AF-700	BD Biosciences
CD19CAR	136.20.1	AF-488	Invitrogen
IL-15	34559	PE	R&D Systems
CD45RO	UCHL1	各種	BD Biosciences
CCR7	G043H7	BV-421	BioLegend
CD95	DX2	BV-711	BD Biosciences
HER1t	C225	AF-647	Invitrogen

10

20

【0416】

表19の抗体の組み合わせを含有するマスターミックスを、連続的に添加し（CD19CAR、mbIL15、続いて残りの抗体カクテル）、4℃で各々の添加時に最大で30分間インキュベートした。細胞をFACS緩衝液で洗浄し、次いで、固定可能な生存率染色-620生存率染料（PBS中1:1000、BD Biosciences）で10分間、4℃でインキュベートし、続いてFACS緩衝液で洗浄した。FACS Divaソフトウェア（v. 8.0.1、BD Biosciences）を含むLSR Fortessa（BD Biosciences）を使用して、データを取得し、FlowJoソフトウェア（バージョン10.4.2、TreeStar, Ashland, OR）で分析した。

30

【0417】

6.4.1.6.5 統計分析

統計的検定は、各統計の報告とともに記載されている。事後分析を行って、治療群間の違いを比較し、各統計結果とともに報告する。エラーは、標準偏差（SD）として報告される。GraphPad Prism（バージョン8）ソフトウェアを使用して、統計分析を行った。P<0.05は、統計的に有意と考えられた。統計分析のための総フラックス値の具体的な取扱い、有意性検定の前に分散不均一性に対処するためにフラックス値をログ変換することを伴っていた。

【0418】

6.4.2 CD19CAR、mbIL15、及びHER1tをインビボで共発現するRPM T細胞の生成及び評価

6.4.2.1 RPM CD19CAR-mbIL15-HER1t T細胞を製造するためのSB系を用いたT細胞の遺伝子修飾

細胞プロセス1日目に、PBMC由来のRPM T細胞の生成は、1時間休息させ、エレクトロポレーションした合計 3.68×10^9 個のPBMCから始まった。 1.12×10^9 個のPBMC/群を使用して、表17に記載されるように、PBMC由来の試験物品dTp対照（P、5e6）及びプラスミドA（P、5e6）を製造した。2日目（電子移動からおよそ18時間後）に、 $1.25 \times 10^8 \sim 1.29 \times 10^8$ 個の生存細胞を回収した。

40

50

【0419】

T細胞由来RPM T細胞試験アームについて、 3.00×10^9 個の濃縮T細胞を解凍し、 1.70×10^9 個の細胞を一晩休息した後に回復させた。 1.26×10^9 個の細胞を電子移動に使用して、プラスミドA (T、 $1e6$)及びプラスミドA (T、 $0.5e6$)を製造した。3日目(電子移動のおよそ18時間後)に、 4.23×10^8 個の生存細胞を回収した。

【0420】

電子移動のおよそ18時間後、T細胞は、シングレット/生細胞/CD3⁺事象にゲートされるように、フローサイトメリーによって導入遺伝子発現について評価された(図22A~22C)。PBMC由来の試験物品では低い導入遺伝子発現が検出されたため、マウスの投薬量は、 1×10^6 個のCAR⁺細胞ではなく、合計 5×10^6 個の総生存細胞に設定した。

【0421】

その後、残りのPBMC由来の試験物品を、活性化し増殖する細胞(AaPC)に対する3回の再帰的刺激によりエクスピボで拡張させ、IL-21(30ng/mL)を補充して、遺伝子移入を確認した。これらの増殖した細胞を、導入遺伝子陽性T細胞の予想される抗原特異的成長が生じるかどうかについて評価した。エレクトロポレーションの18時間後に検出された1%未満のCAR⁺、1%未満のmbIL15⁺、及び4%未満のHER1t発現にもかかわらず、これらのRPM T細胞は、数的拡張の後に、観察可能であり、かつ高い導入遺伝子発現を示した(図23A~23C)。拡張された細胞のCD3⁺CAR⁺事象は、dTp対照(P、 $5e6$)及びプラスミドA(P、 $5e6$)RPM T細胞についてそれぞれ86%及び98%であった。dTp対照(P、 $5e6$)細胞は、前述の実施例と一貫して、集団不均一性を示した。図23Bに示されるように、以下のパーセンテージのCD19CAR/Her1t表現型が観察された。CD19CAR⁺HER1t⁺(50%)、CD19CAR⁺HER1t^{陰性}(27%)、CD19CAR^{陰性}HER1t⁺(7%)、及びCD19CAR^{陰性}HER1t^{陰性}(16%)。同様に、図23Cに示されるように、以下のパーセンテージのHER1t/mbIL15表現型が観察された。HER1t⁺mbIL15^{陰性}(49%)、HER1t⁺mbIL15⁺(7%)、HER1t^{陰性}mbIL15⁺(<1%)、及びHER1t^{陰性}mbIL15^{陰性}(44%)。

【0422】

対照的に、図23Bに示されるように、一様なCAR及びHER1tの共発現が、プラスミドA(P、 $5e6$)細胞において観察された。CAR⁺HER1t⁺(94%)、CAR⁺HER1t^{陰性}(3%)、CAR^{陰性}HER1t⁺(<1%)、及びCAR^{陰性}HER1t^{陰性}(2%)。同様に、図23Cに示されるように、HER1t及びmbIL15の共発現が改善された。HER1t⁺mbIL15^{陰性}(69%)、HER1t⁺mbIL15⁺(26%)、HER1t^{陰性}mbIL15⁺(<1%)、及びHER1t^{陰性}mbIL15^{陰性}(5%)。

【0423】

6.4.2.2 RPM CD19CAR-mbIL15-HER1t T細胞の抗腫瘍効果
RPM CD19CAR-mbIL15-HER1t T細胞の抗腫瘍効果を、NALM-6マウス異種移植片モデルにおいて調べた。試験設計を表18に示し、腫瘍負荷結果を図24A~24Gに示す。特に、治療を受けていない腫瘍を有するマウスは、すべて、35日目までに疾患に罹患した(図24A)。モックPBMCを受けたマウスは、注射合併症に起因して7日目に死亡した1匹のマウス、及び46日目に到達した1匹のマウスを除き、35日目までに疾患に罹患した(図24B)。モックCD3治療群では、5匹のマウスのうちの3匹が、39日目から53日目の間に疾患に罹患した(腫瘍フラックス> 1×10^9 p/s)。2匹のマウスは、39日目及び49日目に、ヒトリンパ球を生着したNSGモデルにおいて予想される転帰である、xGvHDの疑い(腫瘍フラックス< 6×10^7 p/s)から瀕死になり、マウスのうちの1匹は、バックグラウンドの2倍のフラ

10

20

30

40

50

ックス ($< 1.2 \times 10^6 \text{ p/s}$) に達した (図 24C)。dTp 対照 (P、5e6) で治療されたマウスは、概して、35日目から62日目の間に瀕死になり、10匹のマウスのうちの2匹は、高い疾患負荷 ($> 5 \times 10^9 \text{ p/s}$) を有し、したがって、疾患関連死亡である可能性が高い。残りのマウスは、安定した疾患又は低い腫瘍負荷 (xGvHD 関連死亡) を示し、それらのうちの63%は、バックグラウンドフラックスの2倍の閾値を下回るか、又はそれに近かった (図 24D)。プラスミド A (P、5e6) で治療されたマウスは、35日目から60日目の間に死亡を示し、1匹のマウスは、高い腫瘍負荷を有し、残りの8匹のマウスは、低い腫瘍負荷 ($< 7 \times 10^7 \text{ p/s}$) を有し、xGvHD 関連死亡の可能性が高く、それらのうちの75%は、バックグラウンドの2倍のフラックス閾値に満たないか、又はバックグラウンドの2倍のフラックス閾値に近かった (図 24E)。プラスミド A (T、1e6) で治療されたマウスは、35日目~52日目まで生存し、10匹のうちの9匹のマウスは、低い腫瘍量 ($< 5 \times 10^7 \text{ p/s}$) を示し、エンドポイントの前の日に明らかな腫瘍シグナル低下を示し、したがって、xGvHD 関連の罹患を示した。急速に減少する腫瘍を有する9匹のマウスのうち、4匹のマウス (44%) は、腫瘍シグナルがバックグラウンドの2倍のフラックス閾値を下回ることを示した (図 24F)。プラスミド A (T、0.5e6) で治療されたマウスは、32日目から60日目の間まで生存し、4匹のマウスのうちの4匹は、エンドポイントで低腫瘍負荷 ($< 8 \times 10^7 \text{ p/s}$) を示し、したがって、xGvHD 関連罹患の可能性が高く、それらのうちの50%は、バックグラウンドの2倍のフラックス閾値に近かった (図 24G)。要約すると、すべての RPM CD19CAR-mbIL15-HER1t T細胞試験物品は、無治療対照と比較して、有意な抗腫瘍活性を示し (すべての群で < 0.0006 、 $n = 4 \sim 10$ 、一元配置 ANOVA、ダネット事後検定)、試験された群サイズで統計的有意性が達成されなかったプラスミド A (T、0.5e6) 治療を除き、すべてが、モック対照細胞と比較して、有意に低い腫瘍負荷を示した (図 25)。抗腫瘍応答の動態は、以前の試験と一致しており、典型的には、腫瘍注射後20日後、したがってT細胞移入のおよそ2週間後に開始することが観察される。

10

20

30

40

50

【0424】

全体として、その結果は、ALLの確立されたCD19⁺NALM-6異種移植片モデルにおけるRPM CD19CAR-mbIL15-HER1t T細胞による強力な抗腫瘍応答を明確に示す。

【0425】

6.4.2.3 RPM CD19CAR-mbIL15-HER1t T細胞で治療された動物における全生存期間及び無病生存期間

RPM CD19CAR-mbIL15-HER1t T細胞試験物品のいずれか (それぞれ、動物群D~Gに対応する、dTp対照 (P、5e6)、プラスミド A (P、5e6)、プラスミド A (T、1e6)、又はプラスミド A (T、0.5e6)) の投与は、腫瘍のみの対照群と比較した場合、マウスのOSを有意に増強した (それぞれ、群D~Gについて、 $P = 0.0002$ 、 $P = 0.0004$ 、 $P < 0.0002$ 、及び $P = 0.0098$ 、 $n = 4 \sim 10$ 、logランク、Mantel-Cox、図26A~26C)。疾患から瀕死の腫瘍のみのマウスが、 $5 \times 10^9 \text{ p/s}$ を超える総フラックスを示したため、マウスにおいて疾患の進行よりもむしろxGvHDに起因する可能性が高い、低い腫瘍負荷 (総フラックス $< 1 \times 10^8 \text{ p/s}$) を有するマウスにおいて、死亡が観察された。

【0426】

xGvHDの誘導は、ヒトリンパ球を生着させたNSGモデルにおける予想されるプロセスである (例えば、その内容が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれるAli et al., PLoS ONE. 2012; 7(8): e44219に記載されるように)。その因子を考慮して、無xGvHD生存率を計算し、それによって、総フラックス $< 1 \times 10^8 \text{ p/s}$ を有する動物を打ち切った。この分析では、腫瘍のみの対照群と比較して、RPM CD19CAR-mbIL15-HER1t T細胞試験物品のすべてについて、生存率が増加した (それぞれ、群D~Gについて、 $P = 0.0002$ 、 $P <$

0.0001、 $P < 0.0001$ 、及び $P = 0.0018$ 、 $n = 4 \sim 10$ 、log ランク、Mantel-Cox、図27A~27C)。

【0427】

要約すると、これらの結果により、PBMC及びT細胞濃縮産物の両方に由来する試験されたRPM CD19CAR-mbIL15-HER1t T細胞が、腫瘍のみの対照群と比較して、顕著なOSの増加をもたらすことが示される。

【0428】

6.4.2.4 xGvHDの決定、及びマウスにおけるRPM CD19CAR-mbIL15-HER1t T細胞の毒性の欠如

xGvHDプロセスの可能な誘導前(すなわち、T細胞養子移入後1週間以内)に、RPM CD19-mbIL15-CAR-T細胞試験物品に関連する体重の変化は観察されなかったが、一方で、モックPBMC及びモックCD3治療は、この期間中に体重減少を示した。更に、実験の過程にわたって、モックPBMC及びモックCD3治療は、マウスにおいて累進的な体重減少を引き起こした(すなわち、線形回帰勾配は負であり、0とは有意に異なる;それぞれ、 $R^2 = 0.14$ 及び $R^2 = 0.44$ 、勾配 -0.06 及び -0.11 、 $P = 0.0123$ 及び $P < 0.001$)。実験期間中、マウス体重の有意な低下は、群D~Gにおいて観察されなかった(すなわち、線形回帰勾配は、正±0からの有意差であった、 $R^2 < 0.05$ 、勾配 > 0.03 、群D~Gについて $P > 0.02$)。このことは、グループB及びCが、試験の大部分を通じてxGvHD効果を経験した一方で、グループD~Gは、瀕死になる直前により突然の罹患を経験したことを示唆している。腫瘍のみのマウスは、腫瘍負荷に起因して、瀕死になるまで体重増加を示した。

【0429】

要約すると、NALM-6を有するマウスにおけるRPM CD19CAR-mbIL15-HER1t T細胞の静脈内投与(群D~G)は、十分に忍容性であった。RPM試験物品(D~G群)の投与の付近で毒性は観察されず、安楽死の付近での体重変化は、xGvHDに起因する可能性が高い。

【0430】

6.4.2.5 RPM CD19CAR-mbIL15-HER1t T細胞の持続性、局在化、及びメモリー表現型

RPM CD19CAR-mbIL15-HER1t T細胞の持続性、局在化、及びメモリー表現型を評価するために、マウスから単離された末梢血(PB)、骨髄(BM)、及び脾臓に対してフローサイトメトリー分析を行った。試料は、マウスが瀕死になったとき、又は試験終了時(試験32~62日目)に得た。すべてのT細胞治療マウス(モックPBMC、モックCD3、dTp対照(P、5e6)、プラスミドA(P、5e6)、プラスミドA(T、1e6)、及びプラスミドA(T、0.5e6、それぞれ群B~G、図28A~28C)において、T細胞生着が観察された。生着したCD3⁺細胞のうち、CAR⁺T細胞は、それぞれ0%~52%、2%~100%、8%~46%、及び15%~74%の範囲のRPM CD19CAR-mbIL15-HER1t T細胞で治療されたマウス(群D~G)のPB、BM、及び脾臓において(図29A)、PBにおいて(図29B)、顕著なレベルで持続することが観察され、モックPBMC及びモックCD3治療群においては、明らかなCD19CAR⁺集団は検出されなかった。CAR⁺T細胞の同様の頻度が、BM及び脾臓で観察された(図29C~29D)。

【0431】

T細胞のトリシストロン性プラスミドA遺伝子修飾を導入する主な目的は、導入遺伝子集団の不均一性を減少させることであった。このことは、PBから単離された細胞からのCD19CAR及びHER1tの共発現について評価された試料において観察された。プラスミドA試験物品は、dTp対照(P、5e6)と比較して、CAR⁺HER1t⁺T細胞の発現の改善された均一性を示した(図30)。HER1t及びmbIL15との検出された共発現、したがってmbIL15の発現は、より可変性であり(図31)、mbIL15の循環動態の影響を受けた可能性が高いが、これはおそらく、提示細胞から切断

されるIL-15R α に結合したIL-15を内在化する細胞に応答するための機構に起因するものである（例えば、その内容が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれるTamzalit et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2014; 111(23): 8565-8570を参照されたい）。それにもかかわらず、HER1⁺及びmbIL15⁺との高い共発現の事例があった（例えば、プラスミドA（T, 0.5e6）試料において）。重要なことに、インビボ条件下で存在するHER1⁺陰性mbIL15⁺細胞の著しい集団は存在しなかった（図31）。

【0432】

メモリー表現型を、瀕死のマウスのPBにおいて持続するCD19CAR⁺CD3⁺T細胞について評価した。T細胞メモリーサブセットは、次のように定義される。CD45RO⁺CCR7⁺: セントラルメモリー (T_{CM}) ; CD45RO^{陰性}CCR7⁺: ナイーブ/幹細胞メモリー (T_{N/SCM}) ; CD45RO⁺CCR7^{陰性}: エフェクターメモリー (T_{EM})、及びCD45RO^{陰性}CCR7^{陰性}: エフェクターT (T_{Eff})。更に、T細胞分化（低～高）は、CD45RO^{陰性}CD27⁺、CD45RO⁺CD27⁺、CD45RO⁺CD27^{陰性}、及びCD45RO^{陰性}CD27^{陰性}として表されてもよい。持続することが見出されたCD19CAR⁺CD3⁺T細胞は、主にT_{EM}であり（図32A）、CD45RO及びCCR7を分類基準として使用する場合、RPM試験物品（群D～G）において平均は59%～70%の範囲であった（図33A）。しかしながら、優勢なCD27発現は、群D～Gで観察され（図32B）、平均は、CD45RO⁺CD27⁺CD19CAR⁺CD3⁺T細胞で33%～51%、ほとんど分化していないCD45RO^{陰性}CD27⁺CAR⁺CD3⁺T細胞で14%～31%の範囲であった（図33B）。CD27の発現は、最終分化していない、ほとんど分化していないメモリー表現型を示す（例えば、その内容が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれるLarbi and Fulop, Cytometry A. 2014; 85(1): 25-35を参照されたい）。

【0433】

全体として、これらのデータは、評価されたRPM CD19CAR-mbIL15-HER1⁺T細胞試験物品のすべてが、CD27を発現するT_{EM}として主にエンドポイントまでインビボで持続したことを示す。

【0434】

本発明は、本明細書に記載の具体的な実施形態によって範囲が限定されるものではない。実際に、記載されるものに加えて、本発明の様々な修正は、前述の説明及び添付の図面から当業者には明白になるであろう。そのような修正は、添付の特許請求の範囲内に含まれることが意図されている。

【0435】

本明細書で引用されるすべての参考文献（例えば、刊行物又は特許又は特許出願）は、各々の個々の参考文献（例えば、刊行物又は特許又は特許出願）が、あらゆる目的において参照によりその全体が組み込まれることが具体的かつ個々に示されたのと同じ程度まで、あらゆる目的において参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0436】

他の実施形態は、以下の特許請求の範囲の範囲内である。

10

20

30

40

50

【凶面】

【図 1】

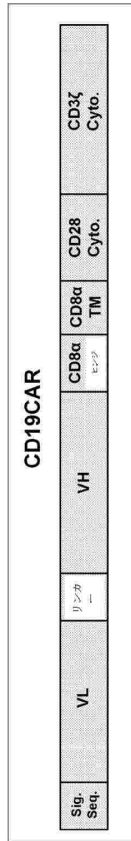


图 1 A

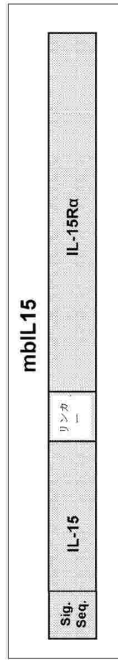


图 1 B

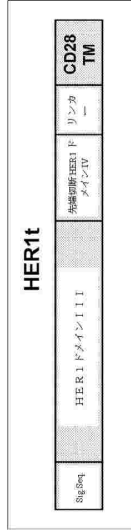
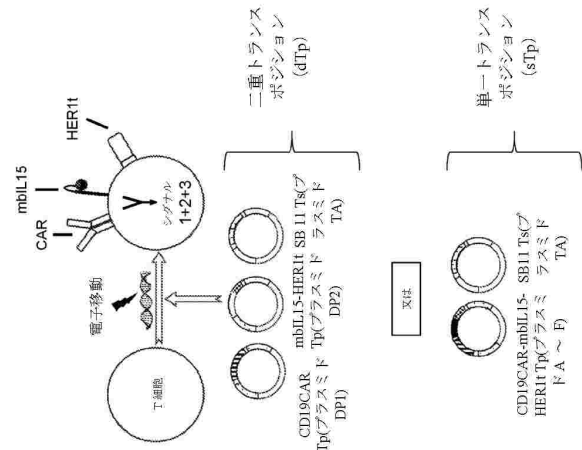
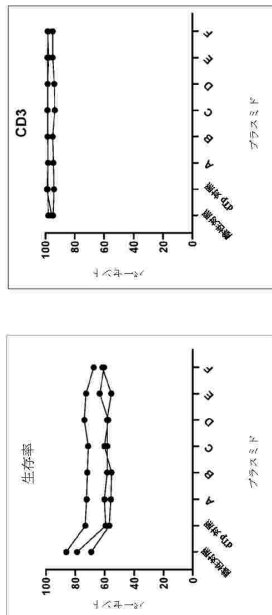
☒ 1C

図 1 C
Sleeping Beauty を使用して CD19CAR-mbIL15-HER11T 細胞を生成する遺伝子改変

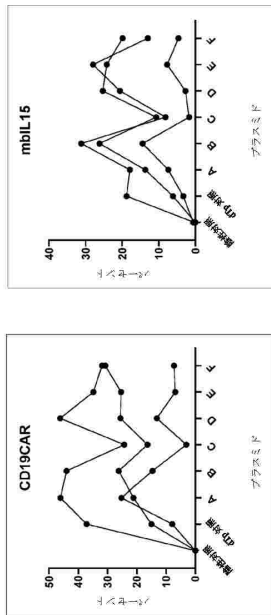
【圖 2】

☒ 1C

【図 3 - 1】

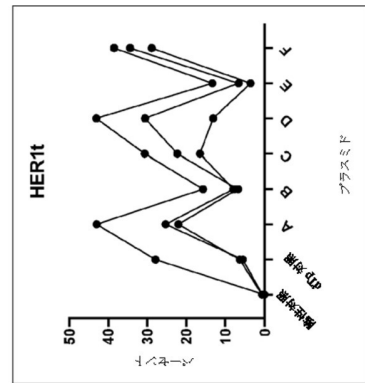


☒ 3 B

☒ 3D

エレクトロポレーション後1日目

【圖 3-2】



3E

【図 4】

フローサイトメトリによる導入遺伝子発現：dTp 対照

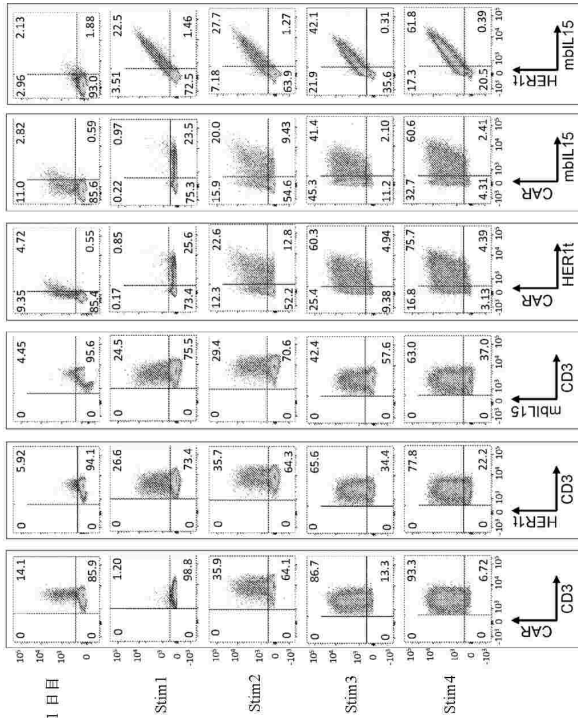


図 4 F

図 4 E

図 4 D

図 4 C

図 4 B

図 4 A

【図 5】

フローサイトメトリによる導入遺伝子発現：プラスミド A

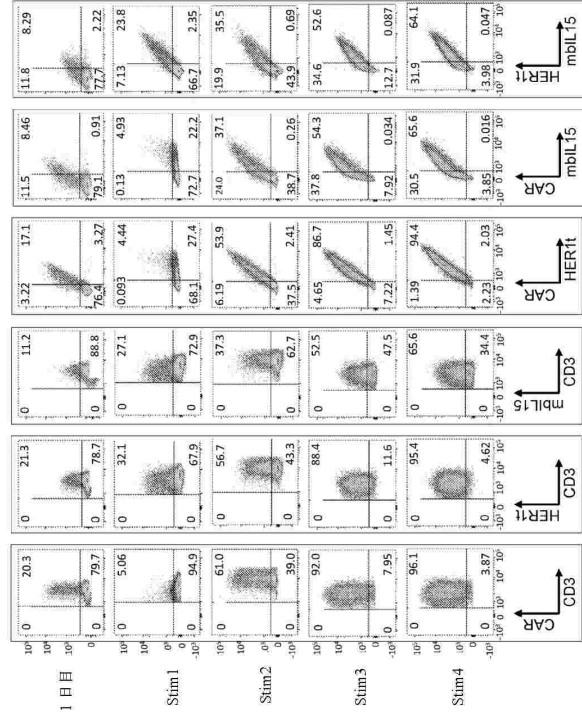


図 5 F

図 5 E

図 5 D

図 5 C

図 5 B

図 5 A

【図 6】

フローサイトメトリによる導入遺伝子発現：プラスミド A

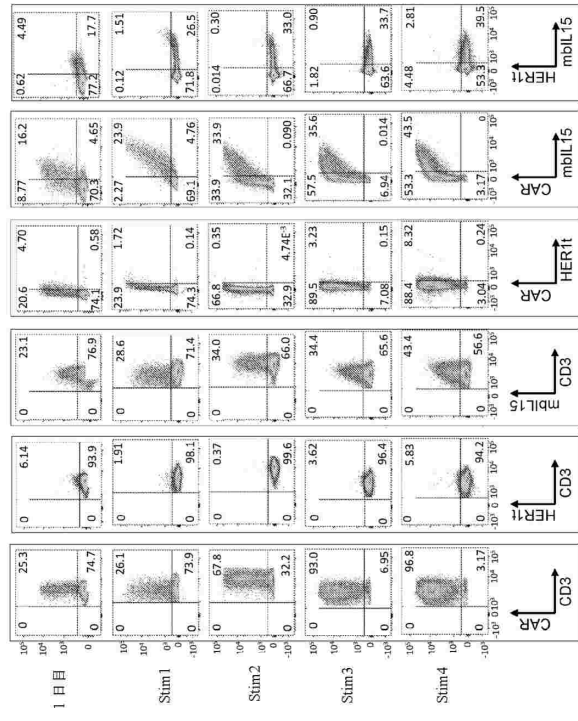


図 6 F

図 6 E

図 6 D

図 6 C

図 6 B

図 6 A

【図 7】

フローサイトメトリによる導入遺伝子発現：プラスミド C

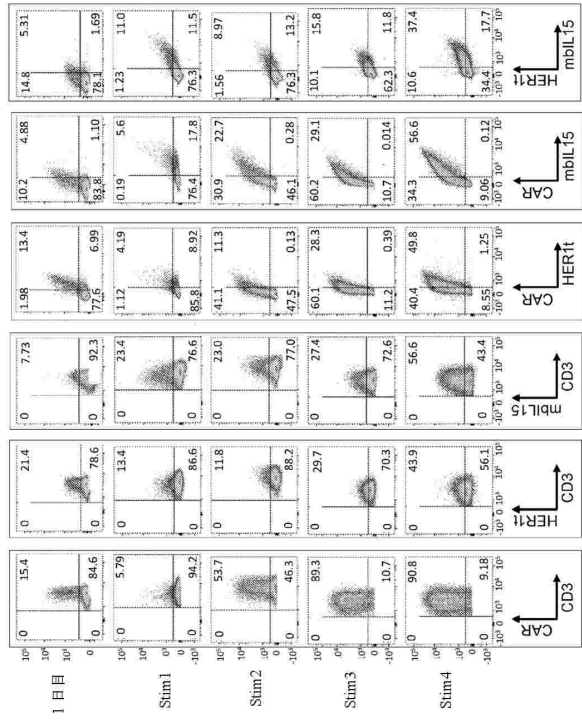


図 7 F

図 7 E

図 7 D

図 7 C

図 7 B

図 7 A

10

20

30

40

50

【図 8】

フローサイトメトリによる導入遺伝子共発現：プラスミド D

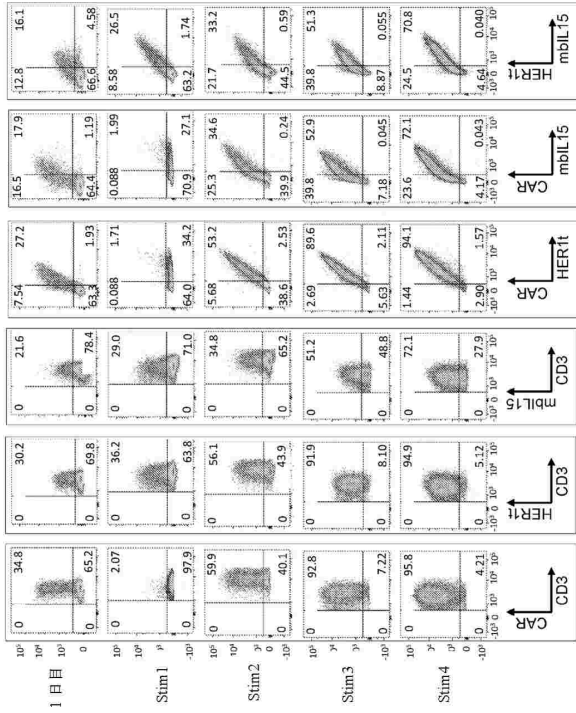


図 8 A 図 8 B 図 8 C 図 8 D 図 8 E 図 8 F

【図 9】

フローサイトメトリによる導入遺伝子共発現：プラスミド E

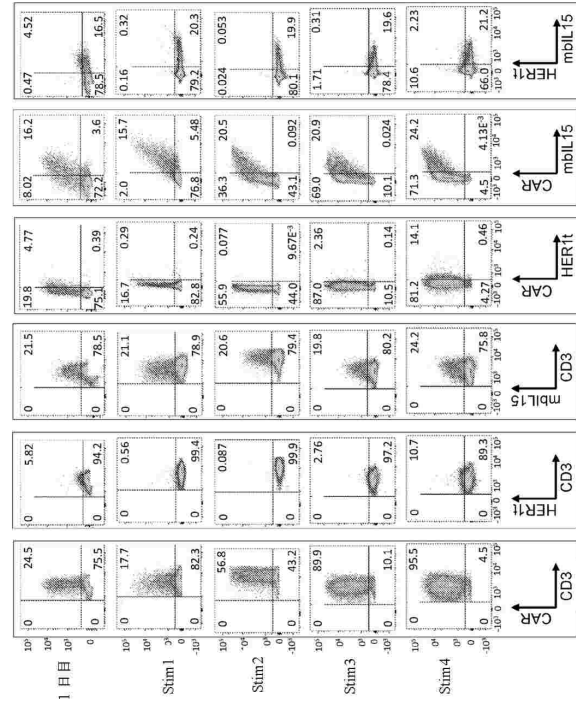


図 9 A 図 9 B 図 9 C 図 9 D 図 9 E 図 9 F

【図 10】

フローサイトメトリによる導入遺伝子共発現：プラスミド F

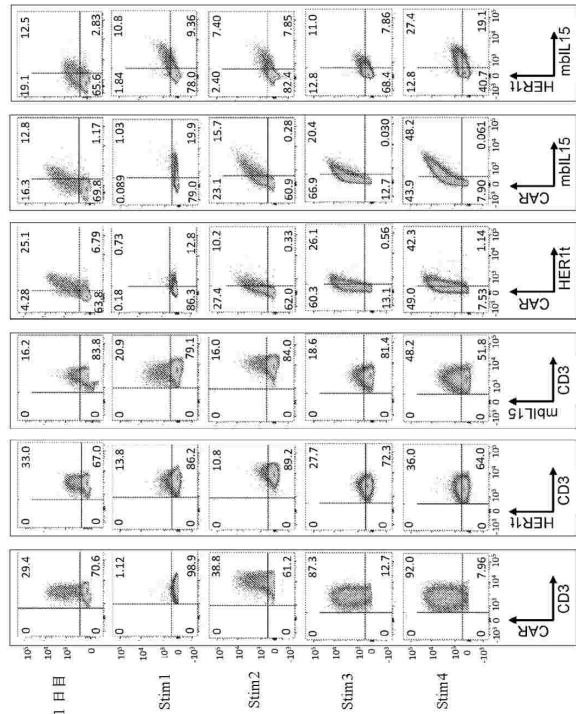


図 10 A 図 10 B 図 10 C 図 10 D 図 10 E 図 10 F

【図 11-1】

フローサイトメトリによる導入遺伝子共発現

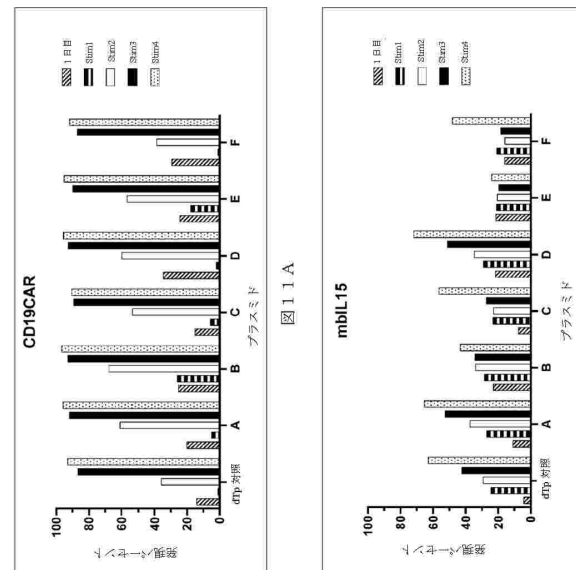


図 11 A 図 11 B

10

20

30

40

50

【図 14-1】

エクスポゾで拡張された細胞の細胞傷害活性

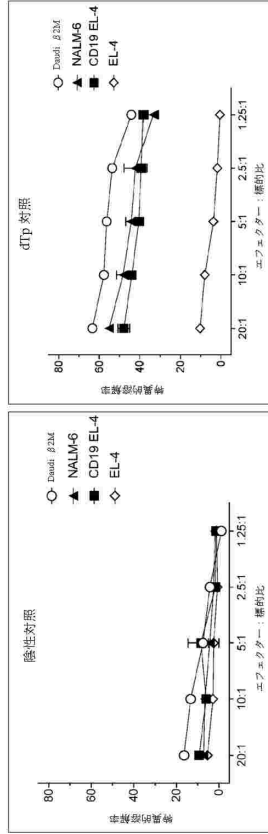


図 14 A

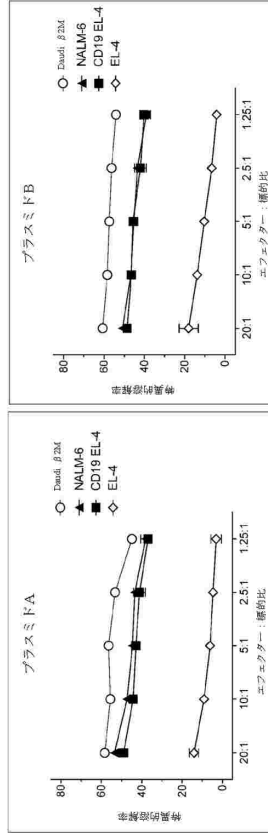


図 14 B

エクスポゾで拡張された細胞の細胞傷害活性

【図 14-2】

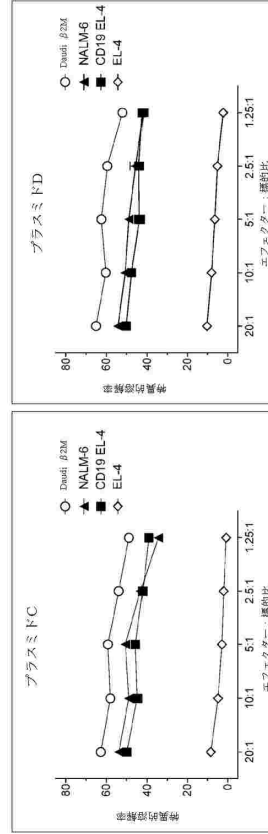


図 14 C

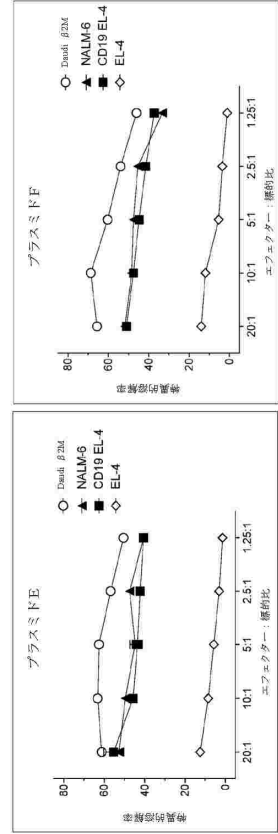


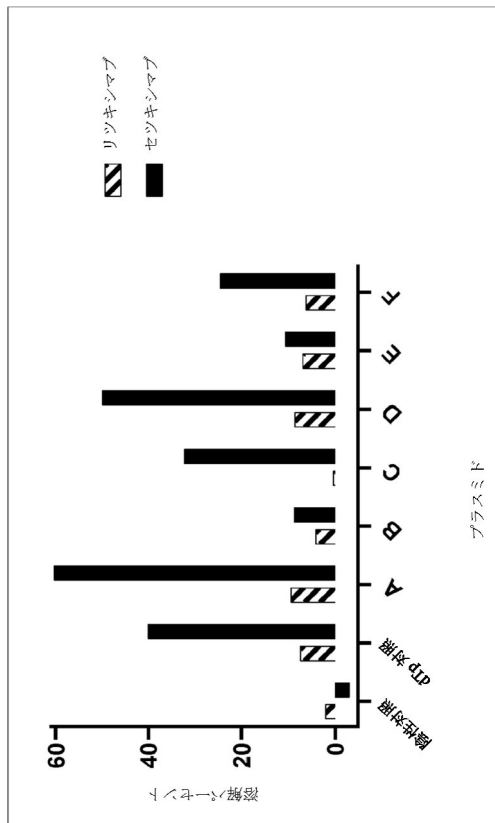
図 14 D

10

20

【図 15】

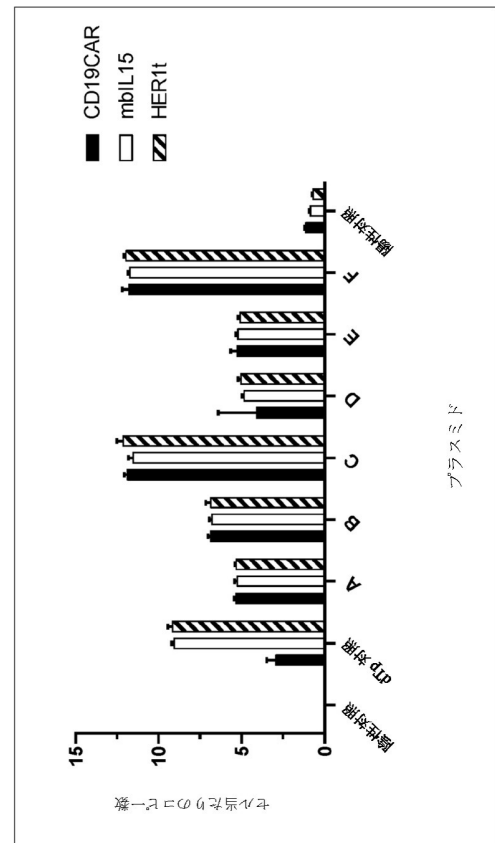
エクスポゾで拡張された細胞のADCC



プラスミド

エクスポゾで拡張された細胞の導入遺伝子コピー数

【図 16】



プラスミド

30

40

50

エクスピボで拡張された細胞の細胞拡張

【図 17】

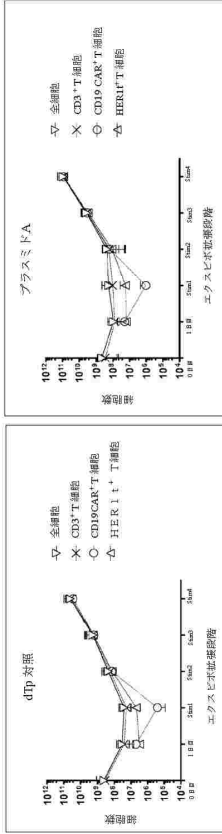


図 17 A

図 17 B

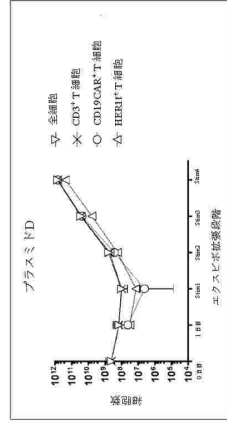


図 17 C

CD19CAR/HER11 亜集団の不均一性

【図 18 - 1】

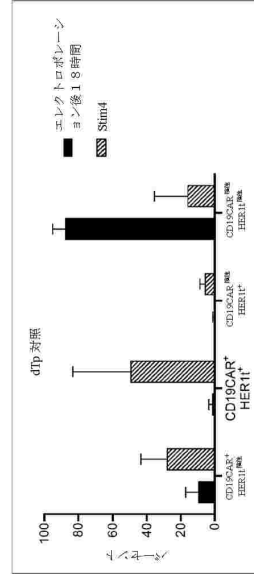


図 18 A

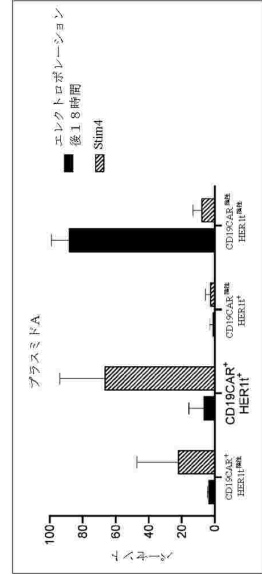


図 18 B

10

20

【図 18 - 2】

CD19CAR/HER11 亜集団の不均一性

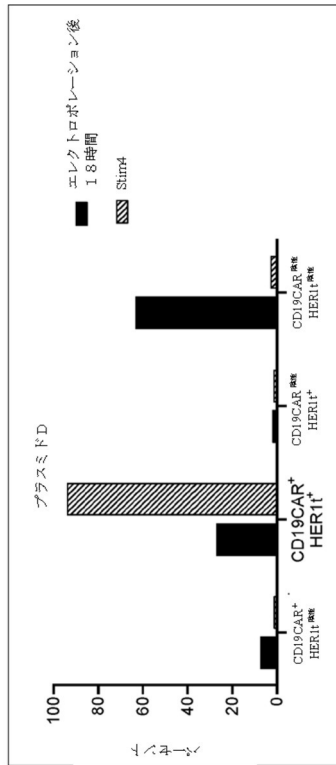


図 18 C

エクスピボで拡張された細胞の細胞傷害活性

【図 19】

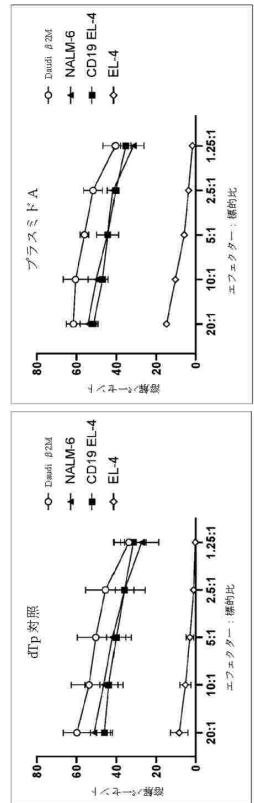


図 19 A

図 19 B

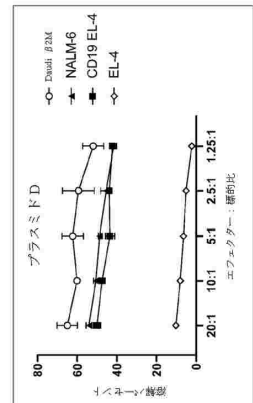


図 19 C

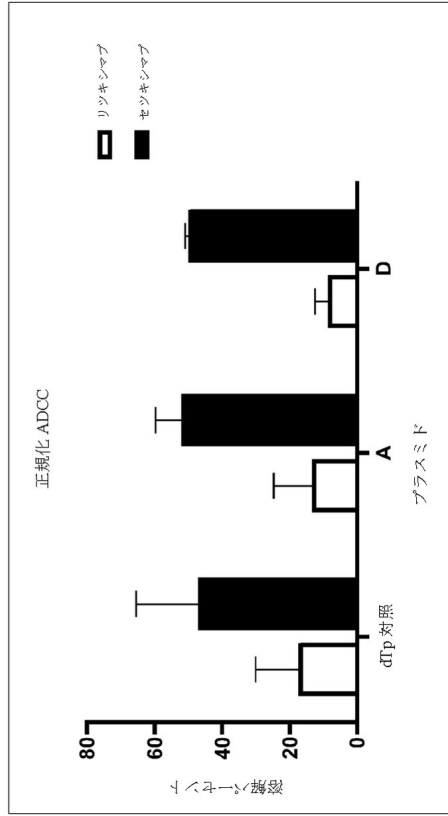
30

40

50

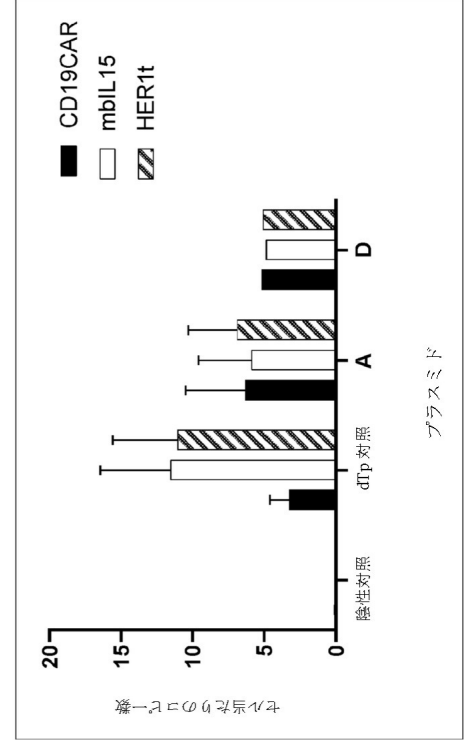
エクスピボで拡張された細胞のADCC

【図 20】



エクスピボで拡張された細胞の導入遺伝子コピー数

【図 21】



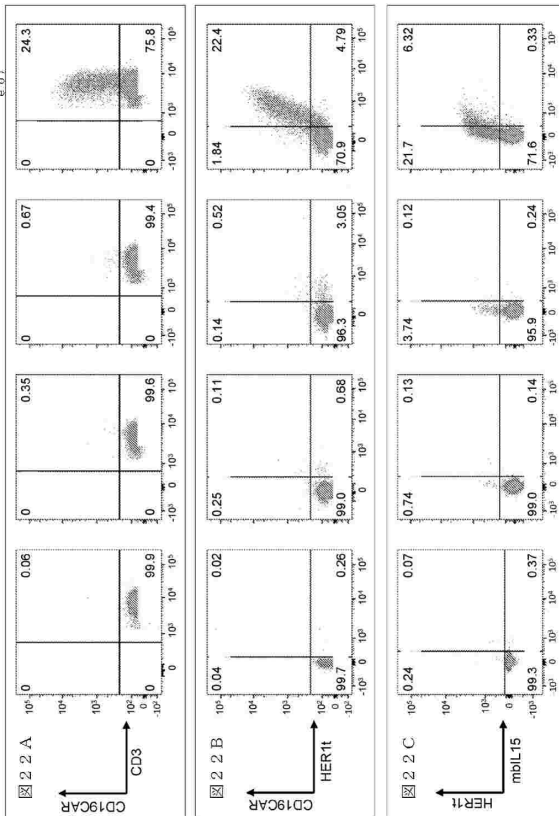
10

20

【図 22】

プラスミド A (T, 1 e6) 及び
プラスミド B (T, 0.5 e6)

RPM技術によって生成されるT細胞の表現型



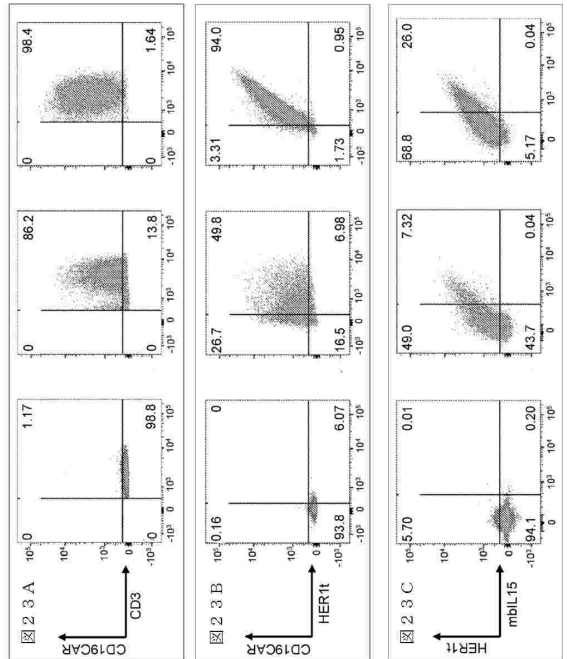
【図 23】

エクスピボで拡張された PBMC 由来 RPM T 細胞の表現型

(DNA 対照なし)

dTp 対照 (P, 5e6)

プラスミド A (P, 5e6)



30

40

50

カプラン・マイヤー生存曲線-無xGvHD生存率

【図 27】

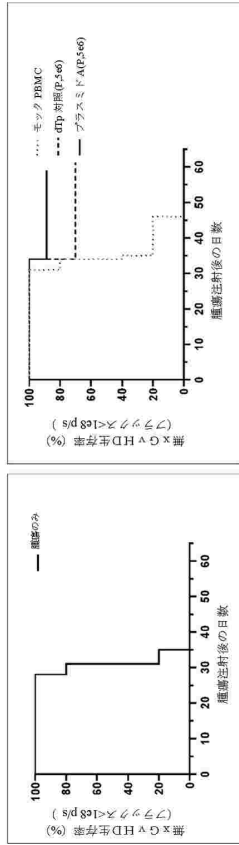


図 27 B

図 27 A

【図 28】

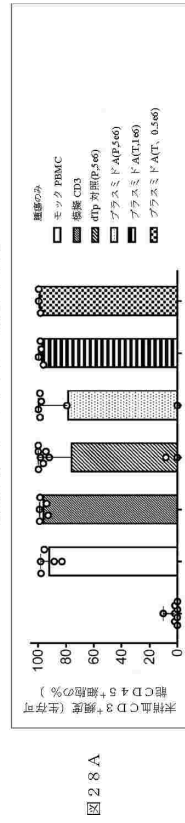


図 28 C

腫瘍保有マウスにおける T 細胞の持続性

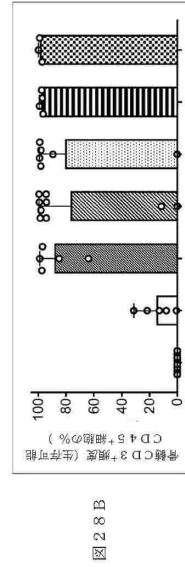
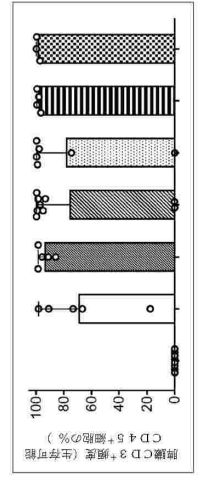


図 28 C



10

20

30

40

50

【図 29 - 1】

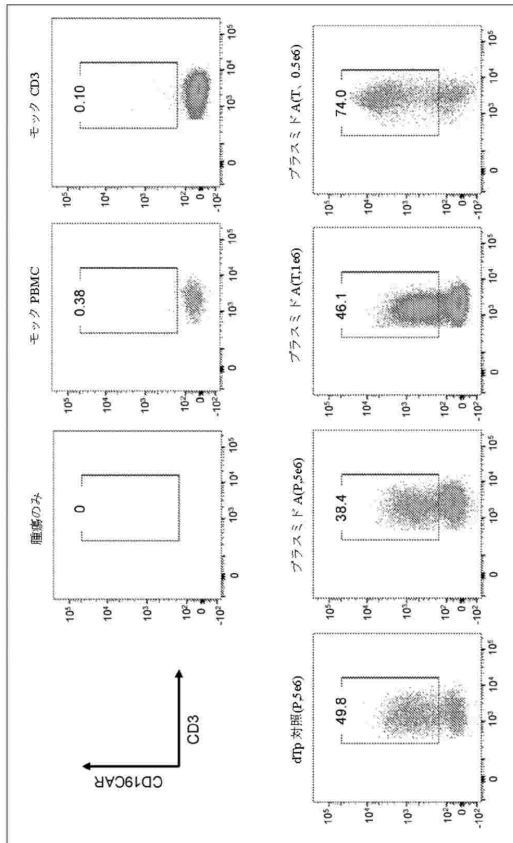


図 29 A

腫瘍保有マウスのPFB、BM、及び脾臓で検出されたヒトT細胞におけるCD19CAR発現

【図 29 - 2】

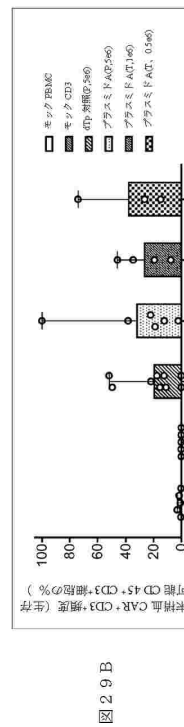


図 29 C

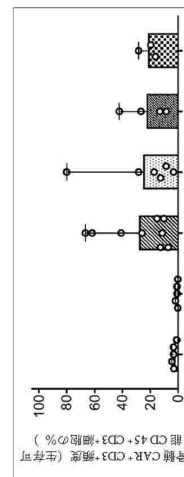
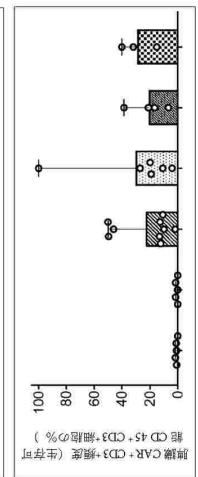


図 29 D



10

20

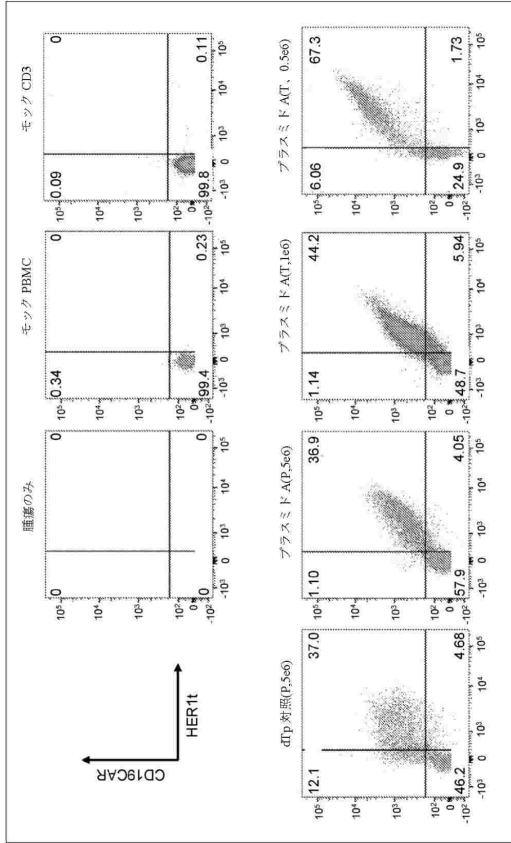
30

40

50

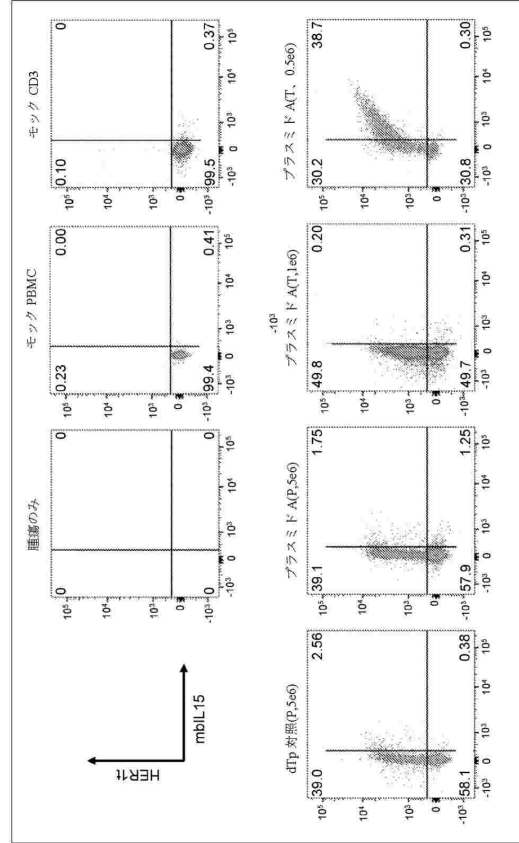
【図 3 0】

腫瘍保有マウスのPBで検出されたヒトT細胞におけるCD19CAR／HER1t共発現



【図 3 1】

腫瘍保有マウスのPBで検出されたヒトT細胞におけるHER1t／mbil.1.5共発現



【図 3 2】

腫瘍保有マウスのPBで検出したヒトT細胞のメモリー表現型

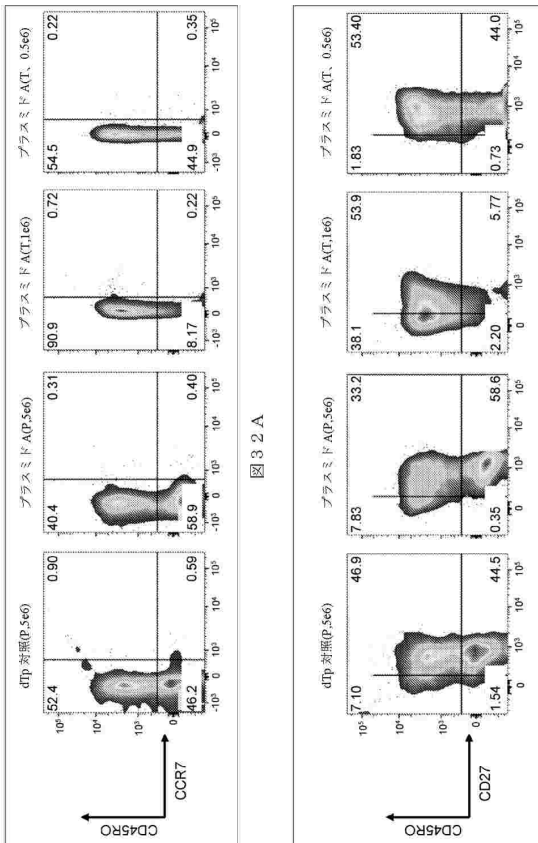


図 3 2 B

腫瘍保有マウスのPBで検出したヒトT細胞のメモリー表現型

【図 3 3】

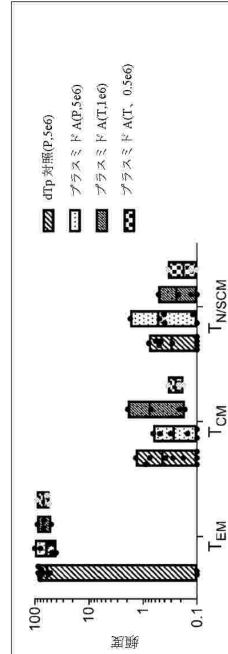


図 3 3 A

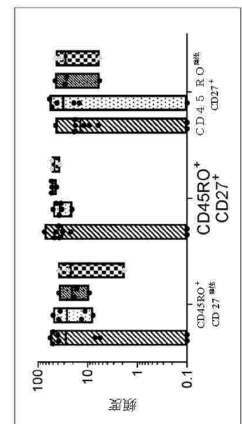


図 3 3 B

【配列表】
2024502094000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/073145

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C12N15/63	A61K39/00	A61P35/00
C12N5/10		A61P37/06
		C12N15/62
ADD. C07K14/725	C07K19/00	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
A61K C40B C12N A61P C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 108 728 459 A (SHANGHAI HENGRUN DASHENG BIOLOGICAL TECH CO LTD) 2 November 2018 (2018-11-02) claims 1-10; sequences 1, 2 -----	1-132
Y	WO 2018/226897 A1 (INTREXON CORP [US]) 13 December 2018 (2018-12-13) paragraph [0022] - paragraph [0027]; claims 1-9, 18-23, 46-59, 69, 73, 76; sequence 180 -----	1-132
Y	WO 2018/132494 A1 (INTREXON CORP [US]) 19 July 2018 (2018-07-19) paragraphs [0010] - [0012], [0014] - [0016]; examples 1-73; sequence 142 ----- -/-	1-132
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention		
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone		
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art		
"&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
8 July 2022		19/07/2022
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Schmidt-Yodlee, H

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/073145

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2019/209991 A1 (BAYLOR COLLEGE MEDICINE [US]) 31 October 2019 (2019-10-31) claims 1-59; figure 1 -----	1-132
Y	HURTON LENKA V ET AL: "Rapid Personalized Manufacture (RPM) of Sleeping Beauty System-Generated NY-ESO-1-Specific TCR-T Cells Co-Expressing Membrane-Bound IL-15 Yields Anti-Tumor Responses", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 134, 13 November 2019 (2019-11-13), page 3218, XP086667884, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/BLOOD-2019-131419 the whole document -----	1-132
Y	WO 2019/126748 A1 (FATE THERAPEUTICS INC [US]) 27 June 2019 (2019-06-27) claims 1-36 -----	1-132

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US2021/073145
Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)	
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☐ forming part of the international application as filed: ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file. ☐ on paper or in the form of an image file. b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file. c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)). ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713). 10 2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished. 3. Additional comments: 20 30 40 50	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/073145**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.: **1-132 (partially)**
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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims.; it is covered by claims Nos.:

30

40

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2021/073145

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 1-132 (partially)

The reasons as to why claims 1 to 132 were partially searched are specified in the explanations with regard to the scope of the search.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guidelines C-IV, 7.2), should the problems which led to the Article 17(2) PCT declaration be overcome.

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2021/073145

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
CN 108728459	A	02-11-2018	NONE	
WO 2018226897	A1	13-12-2018	AU 2018281316 A1 CA 3065930 A1 CN 110997920 A EP 3635132 A1 JP 2020527937 A KR 20200015939 A RU 2019142086 A US 2018362940 A1 US 2021324350 A1 US 2022064609 A1 WO 2018226897 A1 ZA 201908215 B	02-01-2020 13-12-2018 10-04-2020 15-04-2020 17-09-2020 13-02-2020 09-07-2021 20-12-2018 21-10-2021 03-03-2022 13-12-2018 30-03-2022
WO 2018132494	A1	19-07-2018	AU 2018207281 A1 CA 3049652 A1 CN 110462040 A EP 3568474 A1 JP 2020513777 A KR 20190102259 A SG 11201906213U A US 2018291384 A1 US 2020283778 A1 WO 2018132494 A1	18-07-2019 19-07-2018 15-11-2019 20-11-2019 21-05-2020 03-09-2019 27-08-2019 11-10-2018 10-09-2020 19-07-2018
WO 2019209991	A1	31-10-2019	AU 2019261617 A1 CA 3098171 A1 CN 112218944 A EP 3561053 A1 EP 3784775 A1 JP 2021521818 A KR 20210005695 A SG 11202010570V A US 2021252056 A1 WO 2019209991 A1	17-12-2020 31-10-2019 12-01-2021 30-10-2019 03-03-2021 30-08-2021 14-01-2021 27-11-2020 19-08-2021 31-10-2019
WO 2019126748	A1	27-06-2019	AU 2018388413 A1 BR 112020011017 A2 CA 3083779 A1 CN 111542594 A EP 3728563 A1 JP 2021506236 A KR 20200102454 A SG 112020051738 A US 2020069734 A1 US 2021087537 A1 US 2021163895 A1 US 2021180017 A1 WO 2019126748 A1	11-06-2020 17-11-2020 27-06-2019 14-08-2020 28-10-2020 22-02-2021 31-08-2020 29-06-2020 05-03-2020 25-03-2021 03-06-2021 17-06-2021 27-06-2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	37/06	
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	
C 1 2 N	15/24 (2006.01)	C 1 2 N	15/24	
C 1 2 N	5/0783(2010.01)	C 1 2 N	5/0783	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	
C 0 7 K	14/54 (2006.01)	C 0 7 K	14/54	
C 0 7 K	14/725 (2006.01)	C 0 7 K	14/725	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28	

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,N
E,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,IT,JO,JP,K
E,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,N
G,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

1 5 1 5

(72)発明者 クーパー, ローレンス ジェームス ニール

アメリカ合衆国 7 7 0 5 4 テキサス州, ヒューストン, エル リオ ストリート 8 0 3 0

(72)発明者 ハートン, レンカ ヴィクトリア

アメリカ合衆国 7 7 0 5 4 テキサス州, ヒューストン, エル リオ ストリート 8 0 3 0

F ターム (参考) 4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA01 BA02 CA24 CA44

4C087 BB65 NA05 NA14 ZB08 ZB26

4H045 AA20 AA30 BA41 CA40 DA02 DA50 DA76 EA20 FA74