

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-506647
(P2024-506647A)

(43)公表日 令和6年2月14日(2024.2.14)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 C 0 7 6
C 1 2 N	15/861 (2006.01)	C 1 2 N	15/861	Z	4 C 0 8 7
C 1 2 N	15/867 (2006.01)	C 1 2 N	15/867	Z	4 H 0 4 5
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z	
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全127頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-548583(P2023-548583)			(71)出願人	500429103
(86)(22)出願日	令和4年2月10日(2022.2.10)				ザ トラスティーズ オブ ザ ユニバーシ
(85)翻訳文提出日	令和5年9月21日(2023.9.21)				ティ オブ ペンシルバニア
(86)国際出願番号	PCT/US2022/015981				アメリカ合衆国 1 9 1 0 4 ペンシルベ
(87)国際公開番号	WO2022/173950				ニア州 フィラデルフィア シビック セ
(87)国際公開日	令和4年8月18日(2022.8.18)				ンター ブールバード 3 6 0 0 ナインス
(31)優先権主張番号	63/148,489				フロア
(32)優先日	令和3年2月11日(2021.2.11)			(71)出願人	510097747
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				国立研究開発法人国立がん研究センター
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA			(74)代理人	100102978
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(				弁理士 清水 初志
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A			(74)代理人	100205707
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR				弁理士 小寺 秀紀
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,			(74)代理人	100160923
	最終頁に続く				最終頁に続く

(54)【発明の名称】 C C R 4 ターゲティングキメラ抗原受容体細胞療法

(57)【要約】
本開示は、抗CCR4キメラ抗原受容体（CAR）、ならびに、抗CCR4 CARを含む改変免疫細胞またはその前駆体（例えば、改変T細胞）のための組成物および方法を提供する。また、がんを治療するために抗CCR4 CAR発現細胞を使用する方法、および抗CCR4 CAR T細胞療法と組み合わせて使用するためのT細胞枯渇系も提供される。

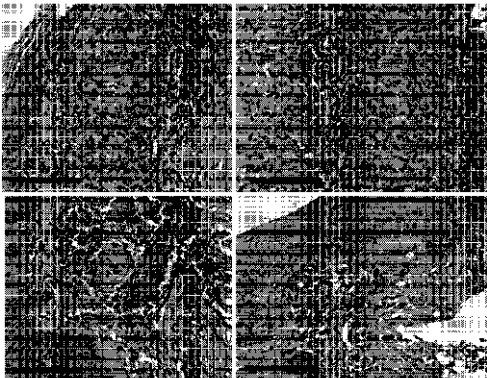


FIG. 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

抗CCR4抗原結合ドメインと膜貫通ドメインと細胞内ドメインとを含む、抗CCケモカイン受容体4（CCR4）キメラ抗原受容体（CAR）。

【請求項 2】

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、SEQ ID NO：2、SEQ ID NO：4、およびSEQ ID NO：6からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つの重鎖可変領域（HC DR）を含む、請求項1記載のCAR。

【請求項 3】

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、SEQ ID NO：8、SEQ ID NO：10、およびSEQ ID NO：12からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つの軽鎖可変領域（LC DR）を含む、請求項1または請求項2記載のCAR。

10

【請求項 4】

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、完全長抗体もしくはその抗原結合断片、Fab、単鎖可変断片（scFv）、または単一ドメイン抗体からなる群より選択される、請求項1～3のいずれか一項記載のCAR。

【請求項 5】

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、抗CCR4単鎖可変断片（scFv）である、請求項1～4のいずれか一項記載のCAR。

【請求項 6】

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、モガムリズマブに由来する重鎖および軽鎖を有する抗CCR4単鎖可変断片（scFv）である、請求項1～5のいずれか一項記載のCAR。

20

【請求項 7】

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、SEQ ID NO：112と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、請求項1～6のいずれか一項記載のCAR。

【請求項 8】

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、SEQ ID NO：114と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項1～7のいずれか一項記載のCAR。

30

【請求項 9】

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、SEQ ID NO：16と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項1～8のいずれか一項記載のCAR。

【請求項 10】

前記CARが、CD8アルファヒンジをさらに含み、任意で、前記CD8アルファヒンジが、SEQ ID NO：34に示されるアミノ酸配列を含む、前記請求項のいずれか一項記載のCAR。

【請求項 11】

前記膜貫通ドメインが、

40

人工疎水性配列、ならびにI型膜貫通タンパク質の膜貫通ドメイン、T細胞受容体のアルファ、ベータ、もしくはゼータ鎖の膜貫通ドメイン、CD28の膜貫通ドメイン、CD3イプシロンの膜貫通ドメイン、CD45の膜貫通ドメイン、CD4の膜貫通ドメイン、CD5の膜貫通ドメイン、CD8の膜貫通ドメイン、CD9の膜貫通ドメイン、CD16の膜貫通ドメイン、CD22の膜貫通ドメイン、CD33の膜貫通ドメイン、CD37の膜貫通ドメイン、CD64の膜貫通ドメイン、CD80の膜貫通ドメイン、CD86の膜貫通ドメイン、OX40（CD134）の膜貫通ドメイン、4-1BB（CD137）の膜貫通ドメイン、ICOSの膜貫通ドメイン、およびCD154の膜貫通ドメイン

からなる群より選択される膜貫通ドメイン、または、キラー免疫グロブリン様受容体（KIR）に由来する膜貫通ドメインを含む、前記請求項のいずれか一項記載のCAR。

50

【請求項 1 2】

前記膜貫通ドメインが、CD8アルファ膜貫通ドメインを含み、任意で、前記CD8アルファ膜貫通ドメインが、SEQ ID NO：36に示されるアミノ酸配列を含む、前記請求項のいずれか一項記載のCAR。

【請求項 1 3】

前記細胞内ドメインが、共刺激性ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含む、前記請求項のいずれか一項記載のCAR。

【請求項 1 4】

前記細胞内ドメインが、TNFRスーパーファミリー内のタンパク質、CD28、4-1BB（CD137）、OX40（CD134）、PD-1、CD7、LIGHT、CD83L、DAP10、DAP12、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、ICOS、NKG2C、およびB7-H3（CD276）、もしくはそれらのバリエーションからなる群より選択されるタンパク質の共刺激性ドメイン、またはキラー免疫グロブリン様受容体（KIR）に由来する細胞内ドメインを含む、前記請求項のいずれか一項記載のCAR。

10

【請求項 1 5】

前記細胞内ドメインが、SEQ ID NO：38に示されるアミノ酸配列を任意で含む、4-1BBの共刺激性ドメインを含む、前記請求項のいずれか一項記載のCAR。

【請求項 1 6】

前記細胞内ドメインが、ヒトCD3ゼータ鎖（CD3ζ）、FcγRIII、FcεRI、Fc受容体の細胞質テール、免疫受容活性化チロシンモチーフ（ITAM）を有する細胞質受容体、TCRゼータ、FcRガンマ、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD5、CD22、CD79a、CD79b、およびCD66d、またはそれらのバリエーションからなる群より選択されるタンパク質の細胞内シグナル伝達ドメインを含む、前記請求項のいずれか一項記載のCAR。

20

【請求項 1 7】

前記細胞内シグナル伝達ドメインが、SEQ ID NO：40に示されるアミノ酸配列を任意で含む、CD3ζまたはそのバリエーションの細胞内シグナル伝達ドメインを含む、前記請求項のいずれか一項記載のCAR。

30

【請求項 1 8】

抗CCR4 scFvを含む抗CCR4抗原結合ドメイン、CD8アルファヒンジ、CD8アルファ膜貫通ドメイン、4-1BB共刺激性ドメインとCD3ζ細胞内シグナル伝達ドメインとを含む細胞内ドメインを含む、前記請求項のいずれか一項記載のCAR。

【請求項 1 9】

SEQ ID NO：32に示されるアミノ酸配列を任意で含むCD8リーダー配列をさらに含む、請求項18記載のCAR。

【請求項 2 0】

SEQ ID NO：30、54、62、70、82、90、および102のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む、前記請求項のいずれか一項記載のCAR。

40

【請求項 2 1】

SEQ ID NO：29、53、61、69、81、89、および101のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるヌクレオチド配列によってコードされる、前記請求項のいずれか一項記載のCAR。

【請求項 2 2】

前記CARが、自己切断可能リンカーを介してセーフティスイッチに連結されており、かつ前記セーフティスイッチがセーフティスイッチ物質に結合する、前記請求項のいずれか一項記載のCAR。

【請求項 2 3】

50

前記セーフティスイッチが、

(a) セーフティスイッチ物質が、抗EFGR抗体、任意でセツキシマブである、短縮型EGFR (EGFRt) ;

(b) セーフティスイッチ物質が、抗CD20抗体、任意でリツキシマブである、CD20 ;

(c) セーフティスイッチ物質がAP1903である、誘導性カスパーゼ9 (iCasp9) ;

および

(d) セーフティスイッチ物質がガンシクロビル (GCV) である、単純ヘルペスウイルス1型チミジンキナーゼ (HSVTK)

から選択される、請求項22記載のCAR。

【請求項24】

自己切断可能リンカーを介してドミナントネガティブTGFB受容体II型 (dnTGFBRII) に連結されている、請求項22または請求項23記載のCAR。

【請求項25】

前記セーフティスイッチが、自己切断可能リンカーを介してドミナントネガティブTGFB受容体II型 (dnTGFBRII) に連結されている、請求項22または請求項23記載のCAR。

【請求項26】

抗CCR4 CARをコードするポリヌクレオチド配列を含む核酸であって、前記CARが、抗CCR4抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインを含む、前記核酸。

【請求項27】

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、およびSEQ ID NO: 6からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つの重鎖可変領域 (HCDR) を含む、請求項26記載の核酸。

【請求項28】

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、およびSEQ ID NO: 12からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つの軽鎖可変領域 (LCDR) を含む、請求項25または請求項27記載の核酸。

【請求項29】

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、完全長抗体もしくはその抗原結合断片、Fab、単鎖可変断片 (scFv)、または単ドメイン抗体からなる群より選択される、請求項26~28のいずれか一項記載の核酸。

【請求項30】

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、抗CCR4単鎖可変断片 (scFv) である、請求項26~29のいずれか一項記載の核酸。

【請求項31】

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、モガムリズマブに由来する重鎖および軽鎖を有する抗CCR4単鎖可変断片 (scFv) である、請求項26~30のいずれか一項記載の核酸。

【請求項32】

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、SEQ ID NO: 112と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、請求項26~31のいずれか一項記載の核酸。

【請求項33】

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、SEQ ID NO: 114と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項26~32のいずれか一項記載の核酸。

【請求項34】

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、SEQ ID NO: 16と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項26~33のいずれか一項記載の核酸。

【請求項35】

10

20

30

40

50

前記CARが、CD8アルファヒンジをさらに含み、任意で、前記CD8アルファヒンジが、SEQ ID NO: 34に示されるアミノ酸配列を含む、前記請求項のいずれか一項記載の核酸。

【請求項36】

前記膜貫通ドメインが、

人工疎水性配列、ならびにI型膜貫通タンパク質の膜貫通ドメイン、T細胞受容体のアルファ、ベータ、もしくはゼータ鎖の膜貫通ドメイン、CD28の膜貫通ドメイン、CD3イプシロンの膜貫通ドメイン、CD45の膜貫通ドメイン、CD4の膜貫通ドメイン、CD5の膜貫通ドメイン、CD8の膜貫通ドメイン、CD9の膜貫通ドメイン、CD16の膜貫通ドメイン、CD22の膜貫通ドメイン、CD33の膜貫通ドメイン、CD37の膜貫通ドメイン、CD64の膜貫通ドメイン、CD80の膜貫通ドメイン、CD86の膜貫通ドメイン、OX40 (CD134) の膜貫通ドメイン、4-1BB (CD137) の膜貫通ドメイン、ICOSの膜貫通ドメイン、およびCD154の膜貫通ドメイン

からなる群より選択される膜貫通ドメイン、または、キラー免疫グロブリン様受容体 (KIR) に由来する膜貫通ドメインを含む、前記請求項のいずれか一項記載の核酸。

【請求項37】

前記膜貫通ドメインが、CD8アルファ膜貫通ドメインを含み、任意で、前記CD8アルファ膜貫通ドメインが、SEQ ID NO: 36に示されるアミノ酸配列を含む、前記請求項のいずれか一項記載の核酸。

【請求項38】

前記細胞内ドメインが、共刺激性ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含む、前記請求項のいずれか一項記載の核酸。

【請求項39】

前記細胞内ドメインが、TNFRスーパーファミリー内のタンパク質、CD28、4-1BB (CD137)、OX40 (CD134)、PD-1、CD7、LIGHT、CD83L、DAP10、DAP12、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、ICOS、NKG2C、およびB7-H3 (CD276)、もしくはそれらのバリエーションからなる群より選択されるタンパク質の共刺激性ドメイン、またはキラー免疫グロブリン様受容体 (KIR) に由来する細胞内ドメインを含む、前記請求項のいずれか一項記載の核酸。

【請求項40】

前記細胞内ドメインが、

SEQ ID NO: 38に示されるアミノ酸配列を任意で含む、4-1BBの共刺激性ドメインを含む、前記請求項のいずれか一項記載の核酸。

【請求項41】

前記細胞内ドメインが、ヒトCD3ゼータ鎖 (CD3ζ)、FcγRIII、FcγRI、Fc受容体の細胞質テール、免疫受容活性化チロシンモチーフ (ITAM) を有する細胞質受容体、TCRゼータ、FcRガンマ、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD5、CD22、CD79a、CD79b、およびCD66d、またはそれらのバリエーションからなる群より選択されるタンパク質の細胞内シグナル伝達ドメインを含む、前記請求項のいずれか一項記載の核酸。

【請求項42】

前記細胞内シグナル伝達ドメインが、

SEQ ID NO: 40に示されるアミノ酸配列を任意で含む、CD3ζまたはそのバリエーションの細胞内シグナル伝達ドメインを含む、前記請求項のいずれか一項記載の核酸。

【請求項43】

前記CARが、抗CCR4 scFvを含む抗CCR4抗原結合ドメイン、CD8アルファヒンジ、CD8アルファ膜貫通ドメイン、4-1BB共刺激性ドメインとCD3ζ細胞内シグナル伝達ドメインとを含む細胞内ドメインを含む、前記請求項のいずれか一項記載の核酸。

【請求項44】

10

20

30

40

50

前記CARが、SEQ ID NO：32に示されるアミノ酸配列を任意で含むCD8リーダー配列をさらに含む、請求項43記載の核酸。

【請求項45】

前記CARが、SEQ ID NO：30、54、62、70、82、90、および102のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む、前記請求項のいずれか一項記載の核酸。

【請求項46】

前記CARが、SEQ ID NO：29、53、61、69、81、89、および101のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるヌクレオチド配列によってコードされる、前記請求項のいずれか一項記載の核酸。 10

【請求項47】

前記CARが、自己切断可能リンカーを介してセーフティスイッチに連結されており、かつ前記セーフティスイッチがセーフティスイッチ物質に結合する、前記請求項のいずれか一項記載の核酸。

【請求項48】

前記セーフティスイッチが、

- (a) セーフティスイッチ物質が、抗EGFR抗体、任意でセツキシマブである、短縮型EGFR (EGFRt) ;
 - (b) セーフティスイッチ物質が、抗CD20抗体、任意でリツキシマブである、CD20 ; 20
 - (c) セーフティスイッチ物質がAP1903である、誘導性カスパーゼ9 (iCasp9) ;
 - および
 - (d) セーフティスイッチ物質がガンシクロビル (GCV) である、単純ヘルペスウイルス1型チミジンキナーゼ (HSVTK)
- から選択される、請求項47記載の核酸。

【請求項49】

前記CARが、自己切断可能リンカーを介してドミナントネガティブTGFβ受容体II型 (dnTGFβRII) に連結されている、請求項47または請求項48記載の核酸。

【請求項50】

前記セーフティスイッチが、自己切断可能リンカーを介してドミナントネガティブTGFβ受容体II型 (dnTGFβRII) に連結されている、請求項47または請求項48記載の核酸。 30

【請求項51】

請求項26～50のいずれか一項記載の核酸を含む、ベクター。

【請求項52】

レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、およびアデノ随伴ウイルスベクターからなる群より選択されるウイルスベクターである、請求項51記載のベクター。

【請求項53】

前記ウイルスベクターがレンチウイルスベクターである、請求項52記載のベクター。 40

【請求項54】

請求項1～25のいずれか一項記載のCAR、請求項26～50のいずれか一項記載の核酸、および／または請求項51～53のいずれか一項記載のベクターを含む、改変免疫細胞またはその前駆細胞。

【請求項55】

- (a) CCR4ヌルノックアウト対立遺伝子 ;
 - (b) 抑制されたCCR4遺伝子発現 ; ならびに
 - (c) 抗CCR4 scFvとKDELモチーフとを含む融合タンパク質、および／または前記融合タンパク質をコードする核酸
- のうちの1つまたは複数をさらに含む、請求項54記載の改変免疫細胞またはその前駆細胞 50

胞。

【請求項56】

クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（CRISPR）関連ヌクレアーゼ、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、およびジンクフィンガーヌクレアーゼからなる群より選択されるヌクレアーゼを含む遺伝子操作技術を介して、前記CCR4ヌルノックアウト対立遺伝子または抑制されたCCR4遺伝子発現が得られる、請求項55記載の改変免疫細胞またはその前駆細胞。

【請求項57】

CCR4遺伝子発現を抑制する阻害性RNA分子をさらに含む、請求項55または56記載の改変免疫細胞またはその前駆細胞。

【請求項58】

前記阻害性RNA分子が、RNA干渉（RNAi）RNA、短鎖ヘアピンRNA（shRNA）、低分子干渉RNA（siRNA）、トランス作用性siRNA（tasiRNA）、マイクロRNA（miRNA）、アンチセンスRNA（asRNA）、長鎖ノンコーディングRNA（lncRNA）、CRISPR RNA（crRNA）、トランス活性化crRNA（tracrRNA）、ガイドRNA（gRNA）、単一ガイドRNA（sgRNA）、二本鎖RNA（dsRNA）、リボザイム、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、請求項57記載の改変免疫細胞またはその前駆細胞。

【請求項59】

前記改変細胞が自己由来細胞である、請求項54～58のいずれか一項記載の改変免疫細胞またはその前駆細胞。

【請求項60】

前記改変免疫細胞が末梢血単核細胞（PBMC）に由来する、請求項54～59のいずれか一項記載の改変免疫細胞またはその前駆細胞。

【請求項61】

前記PBMCが腫瘍細胞を含む、請求項60記載の改変免疫細胞またはその前駆細胞。

【請求項62】

ヒト対象から単離された細胞である、請求項54～61のいずれか一項記載の改変免疫細胞またはその前駆細胞。

【請求項63】

前記改変免疫細胞が改変T細胞である、請求項54～62のいずれか一項記載の改変免疫細胞またはその前駆細胞。

【請求項64】

改変免疫細胞またはその前駆細胞を作製するための方法であって、前記免疫細胞またはその前駆細胞に、請求項26～50のいずれか一項記載の核酸または請求項51～53のいずれか一項記載のベクターを導入することを含む、前記方法。

【請求項65】

前記ベクターが、ウイルス形質導入を介して導入される、請求項58記載の方法。

【請求項66】

その必要がある対象におけるがんを治療する方法であって、前記対象に、請求項54～63のいずれか一項記載の改変免疫細胞もしくは前駆細胞、または請求項64もしくは請求項65記載の方法によって作製された改変免疫細胞もしくはその前駆細胞を投与することを含む、前記方法。

【請求項67】

前記改変細胞が、前記対象においてCCR4陽性T細胞を枯渇させかつCCR4陰性T細胞を枯渇させず、それにより、前記がんを治療する、請求項66記載の方法。

【請求項68】

前記対象が、以前にモガムリズマブを投与されたことがある、請求項66または67記載の方法。

【請求項69】

10

20

30

40

50

前記がんがモガムリズマブに不応性である、請求項66～68のいずれか一項記載の方法

。

【請求項70】

その必要がある対象におけるがんを治療する方法であって、前記対象に、抗CCR4 CARを含む改変T細胞を投与することを含み、前記CARが、抗CCR4抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインを含む、前記方法。

【請求項71】

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、およびSEQ ID NO:6からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つの重鎖可変領域（HCDR）を含む、請求項70記載の方法。

10

【請求項72】

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、およびSEQ ID NO:12からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つの軽鎖可変領域（LCDR）を含む、請求項70または請求項71記載の方法。

【請求項73】

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、完全長抗体もしくはその抗原結合断片、Fab、単鎖可変断片（scFv）、または単ドメイン抗体からなる群より選択される、請求項70～72のいずれか一項記載の方法。

【請求項74】

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、抗CCR4単鎖可変断片（scFv）である、請求項70～73のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項75】

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、モガムリズマブに由来する重鎖および軽鎖を有する抗CCR4単鎖可変断片（scFv）である、請求項70～74のいずれか一項記載の方法。

【請求項76】

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、SEQ ID NO:112と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、請求項70～75のいずれか一項記載の方法。

【請求項77】

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、SEQ ID NO:114と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項70～76のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項78】

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、SEQ ID NO:16と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項70～77のいずれか一項記載の方法。

【請求項79】

前記CARが、CD8アルファヒンジをさらに含み、任意で、前記CD8アルファヒンジが、SEQ ID NO:34に示されるアミノ酸配列を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項80】

前記膜貫通ドメインが、人工疎水性配列、ならびにI型膜貫通タンパク質の膜貫通ドメイン、T細胞受容体のアルファ、ベータ、もしくはゼータ鎖の膜貫通ドメイン、CD28の膜貫通ドメイン、CD3イプシロンの膜貫通ドメイン、CD45の膜貫通ドメイン、CD4の膜貫通ドメイン、CD5の膜貫通ドメイン、CD8の膜貫通ドメイン、CD9の膜貫通ドメイン、CD16の膜貫通ドメイン、CD22の膜貫通ドメイン、CD33の膜貫通ドメイン、CD37の膜貫通ドメイン、CD64の膜貫通ドメイン、CD80の膜貫通ドメイン、CD86の膜貫通ドメイン、OX40（CD134）の膜貫通ドメイン、4-1BB（CD137）の膜貫通ドメイン、ICOSの膜貫通ドメイン、およびCD154の膜貫通ドメイン

50

からなる群より選択される膜貫通ドメイン、または、キラー免疫グロブリン様受容体（KIR）に由来する膜貫通ドメインを含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8 1】

前記膜貫通ドメインが、CD8アルファ膜貫通ドメインを含み、任意で、前記CD8アルファ膜貫通ドメインが、SEQ ID NO：36に示されるアミノ酸配列を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8 2】

前記細胞内ドメインが、共刺激性ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8 3】

前記細胞内ドメインが、TNFRスーパーファミリー内のタンパク質、CD28、4-1BB（CD137）、OX40（CD134）、PD-1、CD7、LIGHT、CD83L、DAP10、DAP12、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、ICOS、NKG2C、およびB7-H3（CD276）、もしくはそれらのバリエーションからなる群より選択されるタンパク質の共刺激性ドメイン、またはキラー免疫グロブリン様受容体（KIR）に由来する細胞内ドメインを含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8 4】

前記細胞内ドメインが、

SEQ ID NO：38に示されるアミノ酸配列を任意で含む、4-1BBの共刺激性ドメインを含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8 5】

前記細胞内ドメインが、ヒトCD3ゼータ鎖（CD3ζ）、FcγRIII、FcεRI、Fc受容体の細胞質テール、免疫受容活性化チロシンモチーフ（ITAM）を有する細胞質受容体、TCRゼータ、FcRガンマ、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD5、CD22、CD79a、CD79b、およびCD66d、またはそれらのバリエーションからなる群より選択されるタンパク質の細胞内シグナル伝達ドメインを含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8 6】

前記細胞内シグナル伝達ドメインが、

SEQ ID NO：40に示されるアミノ酸配列を任意で含む、CD3ζまたはそのバリエーションの細胞内シグナル伝達ドメインを含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8 7】

前記CARが、抗CCR4 scFvを含む抗CCR4抗原結合ドメイン、CD8アルファヒンジ、CD8アルファ膜貫通ドメイン、4-1BB共刺激性ドメインとCD3ζ細胞内シグナル伝達ドメインとを含む細胞内ドメインを含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8 8】

前記CARが、SEQ ID NO：32に示されるアミノ酸配列を任意で含むCD8リーダー配列をさらに含む、請求項87記載の方法。

【請求項 8 9】

前記CARが、SEQ ID NO：30、54、62、70、82、90、および102のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9 0】

前記CARが、SEQ ID NO：29、53、61、69、81、89、および101のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるヌクレオチド配列によってコードされる、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9 1】

前記CARが、自己切断可能リンカーを介してセーフティスイッチに連結されており、

10

20

30

40

50

かつ前記セーフティスイッチがセーフティスイッチ物質に結合する、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9 2】

前記セーフティスイッチが、

(a) セーフティスイッチ物質が、抗EGFR抗体、任意でセツキシマブである、短縮型EGFR (EGFRt) ;

(b) セーフティスイッチ物質が、抗CD20抗体、任意でリツキシマブである、CD20 ;

(c) セーフティスイッチ物質がAP1903である、誘導性カスパーゼ9 (iCasp9) ;

および

(d) セーフティスイッチ物質がガンシクロビル (GCV) である、単純ヘルペスウイルス1型チミジンキナーゼ (HSVTK)

から選択される、請求項91記載の方法。

【請求項 9 3】

前記CARが、自己切断可能リンカーを介してドミナントネガティブTGFB受容体II型 (dnTGFBRII) に連結されている、請求項91または請求項92記載の方法。

【請求項 9 4】

前記セーフティスイッチが、自己切断可能リンカーを介してドミナントネガティブTGFB受容体II型 (dnTGFBRII) に連結されている、請求項91または請求項92記載の方法。

【請求項 9 5】

前記セーフティスイッチ物質を前記対象に投与することをさらに含む、請求項91～94のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9 6】

前記改変T細胞が、前記対象においてCCR4陽性T細胞を枯渇させかつCCR4陰性T細胞を枯渇させず、それにより、前記がんを治療する、請求項70～95のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9 7】

前記改変T細胞がPBMCに由来する、請求項70～96のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9 8】

前記PBMCが腫瘍細胞を含む、請求項97記載の方法。

【請求項 9 9】

前記改変T細胞がヒトT細胞である、請求項70～98のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 0 0】

前記改変T細胞が自己由来である、請求項70～99のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 0 1】

前記対象がヒトである、請求項70～100のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 0 2】

前記対象が、以前にモガムリズマブを投与されたことがある、請求項70～101のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 0 3】

前記がんがモガムリズマブに不応性である、請求項70～102のいずれか一項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、米国特許法119条(e)の下、2021年2月11日に出願された米国仮特許出願第63/148,489号の優先権を主張するものであり、前記仮特許出願は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

T細胞リンパ腫をキメラ抗原受容体（CAR）T細胞療法によってターゲティングする際の課題は、標的抗原が、しばしば、T細胞と腫瘍細胞との間で共有され、その結果、正常T細胞とCAR T細胞産物の同胞相争い（fratricidal）による喪失をもたらすことである。CCケモカイン受容体4（CCR4）は、ケモカインCCL17/TARCおよびCCL22/MDC1に結合するGタンパク質共役7回膜貫通ドメインケモカイン受容体である。CCR4は、多くの成熟T細胞悪性腫瘍、例えば大部分の成人T細胞白血病／リンパ腫（ATLL）、皮膚T細胞リンパ腫（CTCL）および末梢性T細胞リンパ腫（PTCL）症例の30～40%によって高度に発現され、正常T細胞上で特有の発現プロファイルを有する。具体的には、CCR4は、2型および17型ヘルパーT細胞（Th2およびTh17）、エフェクター型制御性T細胞（Treg）サブセットならびに皮膚リンパ球抗原（CLA）+皮膚ホーミングT細胞によって優位に発現されるが、他のヘルパーT細胞サブセットおよびCD8+ T細胞にはほとんど発現されない。CCR4を発現するすべてのT細胞悪性腫瘍は、予後不良を示し、治癒的治療はほとんどない。加えて、腫瘍上のCCR4は、機能的であり、その発現は、より不良の疾患転帰と関連する。よって、CCR4は、成熟T細胞悪性腫瘍の治療のための標的候補である。

10

【0003】

CCR4ターゲティング療法の実現可能性は、モノクローナル抗体（mAb）治療との関連で提唱されてきた。モガムリズマブ（KW-0761）は、増強された抗体依存性細胞傷害（ADCC）を誘導するように設計された脱フコシル化ヒト化抗CCR4 mAbである。CTCLまたはATLLに対するモガムリズマブの第I/II相試験は、許容可能な安全性プロファイルおよびいくらかの有効性を示し、第III相試験は、モガムリズマブが、CTCLの標準治療の1つであるポリノスタットと比較して、CTCLを有する患者の無増悪生存期間を有意に延長させることを実証した。有害事象は、ポリノスタットと同等であり、それらのほとんどは管理可能であったが、重度の皮膚過敏性反応（スティーブンス・ジョンソン症候群）の症例が報告されている。これらの治験に基づき、モガムリズマブは、日本において医薬品医療機器総合機構（PMDA）により難治性ATLL、CTCLおよびPTCLの治療に対して承認され、最近になって、米国においてFDAによりCTCLに対して承認された。しかしながら、モガムリズマブで治療された患者の大部分は、再発を経験し、したがって、治療が達成されることはほとんどない。さらに加えて、過去の報告では、機能的なCCR4再指向型キメラ抗原受容体（CCR4-CAR）T細胞を確立できることが提案された（Perera LP, et al. Am J Hematol. 2017;92(9):892-901（非特許文献1））。しかしながら、同胞相争い事象の正確な機序、ならびにそのT細胞増大、形質導入、機能、ターゲットセンシング、表現型、および抗腫瘍効果との関連性は、依然として不明確なままである。したがって、当技術分野において、これらの障害および課題を克服するT細胞悪性腫瘍に対する新規の抗CCR4 CARベース療法の必要性が存在する。本発明は、この必要性に応えるものである。

20

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

40

【0004】

【非特許文献1】 Perera LP, et al. Am J Hematol. 2017;92(9):892-901

【発明の概要】

【0005】

いくつかの局面では、本発明は、抗CCR4抗原結合ドメインと膜貫通ドメインと細胞内ドメインとを含む、抗CCケモカイン受容体4（CCR4）キメラ抗原受容体（CAR）を提供する。

【0006】

いくつかの態様では、抗CCR4抗原結合ドメインは、SEQ ID NO：2、SEQ ID NO：4、およびSEQ ID NO：6からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つ

50

の重鎖可変領域（HCDR）を含む。

【0007】

いくつかの態様では、抗CCR4抗原結合ドメインは、SEQ ID NO：8、SEQ ID NO：10、およびSEQ ID NO：12からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つの軽鎖可変領域（LCDR）を含む。

【0008】

いくつかの態様では、抗CCR4抗原結合ドメインは、完全長抗体もしくはその抗原結合断片、Fab、単鎖可変断片（scFv）、または単ドメイン抗体からなる群より選択される。

【0009】

いくつかの態様では、抗CCR4抗原結合ドメインは、抗CCR4単鎖可変断片（scFv）である。

【0010】

いくつかの態様では、抗CCR4抗原結合ドメインは、モガムリズマブに由来する重鎖および軽鎖を有する抗CCR4単鎖可変断片（scFv）である。

【0011】

いくつかの態様では、抗CCR4抗原結合ドメインは、SEQ ID NO：112と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。

【0012】

いくつかの態様では、抗CCR4抗原結合ドメインは、SEQ ID NO：114と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0013】

いくつかの態様では、抗CCR4抗原結合ドメインは、SEQ ID NO：16と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0014】

いくつかの態様では、CARは、CD8アルファヒンジをさらに含み、任意で、CD8アルファヒンジは、SEQ ID NO：34に示されるアミノ酸配列を含む。

【0015】

いくつかの態様では、膜貫通ドメインは、人工疎水性配列、ならびにI型膜貫通タンパク質の膜貫通ドメイン、T細胞受容体のアルファ、ベータ、もしくはゼータ鎖の膜貫通ドメイン、CD28の膜貫通ドメイン、CD3イプシロンの膜貫通ドメイン、CD45の膜貫通ドメイン、CD4の膜貫通ドメイン、CD5の膜貫通ドメイン、CD8の膜貫通ドメイン、CD9の膜貫通ドメイン、CD16の膜貫通ドメイン、CD22の膜貫通ドメイン、CD33の膜貫通ドメイン、CD37の膜貫通ドメイン、CD64の膜貫通ドメイン、CD80の膜貫通ドメイン、CD86の膜貫通ドメイン、OX40（CD134）の膜貫通ドメイン、4-1BB（CD137）の膜貫通ドメイン、ICOSの膜貫通ドメイン、およびCD154の膜貫通ドメイン、からなる群より選択される膜貫通ドメイン、または、キラー免疫グロブリン様受容体（KIR）に由来する膜貫通ドメインを含む。

【0016】

いくつかの態様では、膜貫通ドメインは、CD8アルファ膜貫通ドメインを含み、任意で、CD8アルファ膜貫通ドメインは、SEQ ID NO：36に示されるアミノ酸配列を含む。

【0017】

いくつかの態様では、細胞内ドメインは、共刺激性ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【0018】

いくつかの態様では、細胞内ドメインは、TNFRスーパーファミリー内のタンパク質、CD28、4-1BB（CD137）、OX40（CD134）、PD-1、CD7、LIGHT、CD83L、DA

10

20

30

40

50

P10、DAP12、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、ICOS、NKG2C、およびB7-H3（CD276）、もしくはそれらのバリエーションからなる群より選択されるタンパク質の共刺激性ドメイン、またはキラー免疫グロブリン様受容体（KIR）に由来する細胞内ドメインを含む。

【0019】

いくつかの態様では、細胞内ドメインは、SEQ ID NO：38に示されるアミノ酸配列を任意で含む、4-1BBの共刺激性ドメインを含む。

【0020】

いくつかの態様では、細胞内ドメインは、ヒトCD3ゼータ鎖（CD3ζ）、FcγRIII、FcεRI、Fc受容体の細胞質テール、免疫受容体活性化チロシンモチーフ（ITAM）を有する細胞質受容体、TCRゼータ、FcRガンマ、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD5、CD22、CD79a、CD79b、およびCD66d、またはそれらのバリエーションからなる群より選択されるタンパク質の細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【0021】

いくつかの態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO：40に示されるアミノ酸配列を任意で含む、CD3ζまたはそのバリエーションの細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【0022】

いくつかの態様では、CARは、抗CCR4 scFvを含む抗CCR4抗原結合ドメイン、CD8アルファヒンジ、CD8アルファ膜貫通ドメイン、4-1BB共刺激性ドメインとCD3ζ細胞内シグナル伝達ドメインとを含む細胞内ドメインを含む。

【0023】

いくつかの態様では、CARは、SEQ ID NO：32に示されるアミノ酸配列を任意で含む、CD8リーダー配列をさらに含む。

【0024】

いくつかの態様では、CARは、SEQ ID NO：30、54、62、70、82、90、および102のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0025】

いくつかの態様では、CARは、SEQ ID NO：29、53、61、69、81、89、および101のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるヌクレオチド配列によってコードされる。

【0026】

いくつかの態様では、CARは、自己切断可能リンカーを介してセーフティスイッチに連結され、かつセーフティスイッチは、セーフティスイッチ物質に結合する。

【0027】

いくつかの態様では、セーフティスイッチは、（a）セーフティスイッチ物質が、抗EGFR抗体、任意でセツキシマブである、短縮型EGFR（EGFRt）；（b）セーフティスイッチ物質が、抗CD20抗体、任意でリツキシマブである、CD20；（c）セーフティスイッチ物質がAP1903である、誘導性カスパーゼ9（iCasp9）；および（d）セーフティスイッチ物質がガンシクロビル（GCV）である、単純ヘルペスウイルス1型チミジンキナーゼ（HSVTK）、から選択される。

【0028】

いくつかの態様では、CARは、自己切断可能リンカーを介してドミナントネガティブTGFβ受容体II型（dnTGFβRII）に連結される。

【0029】

いくつかの態様では、セーフティスイッチは、自己切断可能リンカーを介してドミナントネガティブTGFβ受容体II型（dnTGFβRII）に連結される。

【0030】

いくつかの局面では、本発明は、抗CCR4 CARをコードするポリヌクレオチド配列を

10

20

30

40

50

含む核酸であって、CARが、抗CCR4抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインを含む、核酸を提供する。

【0031】

いくつかの態様では、抗CCR4抗原結合ドメインは、SEQ ID NO：2、SEQ ID NO：4、およびSEQ ID NO：6からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つの重鎖可変領域（HCDR）を含む。

【0032】

いくつかの態様では、抗CCR4抗原結合ドメインは、SEQ ID NO：8、SEQ ID NO：10、およびSEQ ID NO：12からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つの軽鎖可変領域（LCDR）を含む。

10

【0033】

いくつかの態様では、抗CCR4抗原結合ドメインは、完全長抗体もしくはその抗原結合断片、Fab、単鎖可変断片（scFv）、または単ドメイン抗体からなる群より選択される。

【0034】

いくつかの態様では、抗CCR4抗原結合ドメインは、抗CCR4単鎖可変断片（scFv）である。

【0035】

いくつかの態様では、抗CCR4抗原結合ドメインは、モガムリズマブに由来する重鎖および軽鎖を有する抗CCR4単鎖可変断片（scFv）である。

20

【0036】

いくつかの態様では、抗CCR4抗原結合ドメインは、SEQ ID NO：112と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。

【0037】

いくつかの態様では、抗CCR4抗原結合ドメインは、SEQ ID NO：114と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0038】

いくつかの態様では、抗CCR4抗原結合ドメインは、SEQ ID NO：16と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む。

30

【0039】

いくつかの態様では、CARは、CD8アルファヒンジをさらに含み、任意で、CD8アルファヒンジは、SEQ ID NO：34に示されるアミノ酸配列を含む。

【0040】

いくつかの態様では、膜貫通ドメインは、人工疎水性配列、ならびにI型膜貫通タンパク質の膜貫通ドメイン、T細胞受容体のアルファ、ベータ、もしくはゼータ鎖の膜貫通ドメイン、CD28の膜貫通ドメイン、CD3イプシロンの膜貫通ドメイン、CD45の膜貫通ドメイン、CD4の膜貫通ドメイン、CD5の膜貫通ドメイン、CD8の膜貫通ドメイン、CD9の膜貫通ドメイン、CD16の膜貫通ドメイン、CD22の膜貫通ドメイン、CD33の膜貫通ドメイン、CD37の膜貫通ドメイン、CD64の膜貫通ドメイン、CD80の膜貫通ドメイン、CD86の膜貫通ドメイン、OX40（CD134）の膜貫通ドメイン、4-1BB（CD137）の膜貫通ドメイン、ICOSの膜貫通ドメイン、およびCD154の膜貫通ドメイン、からなる群より選択される膜貫通ドメイン、または、キラー免疫グロブリン様受容体（KIR）に由来する膜貫通ドメインを含む。

40

【0041】

いくつかの態様では、膜貫通ドメインは、CD8アルファ膜貫通ドメインを含み、任意で、CD8アルファ膜貫通ドメインは、SEQ ID NO：36に示されるアミノ酸配列を含む。

【0042】

50

いくつかの態様では、細胞内ドメインは、共刺激性ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【0043】

いくつかの態様では、細胞内ドメインは、TNFRスーパーファミリー内のタンパク質、CD28、4-1BB (CD137)、OX40 (CD134)、PD-1、CD7、LIGHT、CD83L、DAP10、DAP12、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、ICOS、NKG2C、およびB7-H3 (CD276)、もしくはそれらのバリエーションからなる群より選択されるタンパク質の共刺激性ドメイン、またはキラー免疫グロブリン様受容体 (KIR) に由来する細胞内ドメインを含む。

【0044】

いくつかの態様では、細胞内ドメインは、SEQ ID NO: 38に示されるアミノ酸配列を任意で含む、4-1BBの共刺激性ドメインを含む。

【0045】

いくつかの態様では、細胞内ドメインは、ヒトCD3ゼータ鎖 (CD3ζ)、FcγRIII、FcεRI、Fc受容体の細胞質テール、免疫受容体活性化チロシンモチーフ (ITAM) を有する細胞質受容体、TCRゼータ、FcRガンマ、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD5、CD22、CD79a、CD79b、およびCD66d、またはそれらのバリエーションからなる群より選択されるタンパク質の細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【0046】

いくつかの態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO: 40に示されるアミノ酸配列を任意で含む、CD3ζまたはそのバリエーションの細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【0047】

いくつかの態様では、CARは、抗CCR4 scFvを含む抗CCR4抗原結合ドメイン、CD8アルファヒンジ、CD8アルファ膜貫通ドメイン、4-1BB共刺激性ドメインとCD3ζ細胞内シグナル伝達ドメインとを含む細胞内ドメインを含む。

【0048】

いくつかの態様では、CARは、SEQ ID NO: 32に示されるアミノ酸配列を任意で含む、CD8リーダー配列をさらに含む。

【0049】

いくつかの態様では、CARは、SEQ ID NO: 30、54、62、70、82、90、および102のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0050】

いくつかの態様では、CARは、SEQ ID NO: 29、53、61、69、81、89、および101のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるヌクレオチド配列によってコードされる。

【0051】

いくつかの態様では、CARは、自己切断可能リンカーを介してセーフティスイッチに連結され、かつセーフティスイッチは、セーフティスイッチ物質に結合する。

【0052】

いくつかの態様では、セーフティスイッチは、(a) セーフティスイッチ物質が、抗EGFR抗体、任意でセツキシマブである、短縮型EGFR (EGFRt) ; (b) セーフティスイッチ物質が、抗CD20抗体、任意でリツキシマブである、CD20 ; (c) セーフティスイッチ物質がAP1903である、誘導性カスパーゼ9 (iCasp9) ; および (d) セーフティスイッチ物質がガンシクロビル (GCV) である、単純ヘルペスウイルス1型チミジンキナーゼ (HSVTK) 、から選択される。

【0053】

いくつかの態様では、CARは、自己切断可能リンカーを介してドミナントネガティブTGFβ受容体II型 (dnTGFβRII) に連結される。

10

20

30

40

50

【0054】

いくつかの態様では、セーフティスイッチは、自己切断可能リンカーを介してドミナントネガティブTGFB受容体II型（dnTGFBRII）に連結される。

【0055】

いくつかの局面では、本発明は、本明細書に記載される核酸を含むベクターを提供する。

【0056】

いくつかの態様では、ベクターは、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、およびアデノ随伴ウイルスベクターからなる群より選択されるウイルスベクターである。

【0057】

いくつかの態様では、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。

【0058】

いくつかの局面では、本発明は、本明細書に記載されるCAR、本明細書に記載される核酸、および／または本明細書に記載されるベクターを含む、改変免疫細胞またはその前駆細胞を提供する。

【0059】

いくつかの態様では、改変免疫細胞またはその前駆細胞は、

- (a) CCR4ヌルノックアウト対立遺伝子；
- (b) 抑制されたCCR4遺伝子発現；ならびに

(c) 抗CCR4 scFvとKDELモチーフとを含む融合タンパク質、および／または前記融合タンパク質をコードする核酸
のうちの1つまたは複数をさらに含む。

【0060】

いくつかの態様では、CCR4ヌルノックアウト対立遺伝子、または抑制されたCCR4遺伝子発現は、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（CRISPR）関連ヌクレアーゼ、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、およびジンクフィンガーヌクレアーゼからなる群より選択されるヌクレアーゼを含む遺伝子操作技術を用いて得られる。

【0061】

いくつかの態様では、改変免疫細胞またはその前駆細胞は、CCR4遺伝子発現を抑制する阻害性RNA分子をさらに含む。

【0062】

いくつかの態様では、阻害性RNA分子は、RNA干渉（RNAi）RNA、短鎖ヘアピンRNA（shRNA）、低分子干渉RNA（siRNA）、トランス作用性siRNA（tasRNA）、マイクロRNA（miRNA）、アンチセンスRNA（asRNA）、長鎖ノンコーディングRNA（lncRNA）、CRISPR RNA（crRNA）、トランス活性化crRNA（tracrRNA）、ガイドRNA（gRNA）、単一ガイドRNA（sgRNA）、二本鎖RNA（dsRNA）、リボザイム、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される。

【0063】

いくつかの態様では、改変細胞は、自己由来細胞である。

【0064】

いくつかの態様では、改変免疫細胞は、末梢血単核細胞（PBMC）に由来する。

【0065】

いくつかの態様では、PBMCは、腫瘍細胞を含む。

【0066】

いくつかの態様では、改変免疫細胞またはその前駆細胞は、ヒト対象から単離された細胞である。

【0067】

いくつかの態様では、改変免疫細胞は、改変T細胞である。

10

20

30

40

50

【0068】

いくつかの局面では、本発明は、改変免疫細胞またはその前駆細胞を作製するための方法であって、前記免疫細胞またはその前駆細胞に、本明細書に記載される核酸または本明細書に記載されるベクターを導入することを含む、方法を提供する。

【0069】

いくつかの態様では、ベクターは、ウイルス形質導入を介して導入される。

【0070】

いくつかの局面では、本発明は、その必要がある対象におけるがんを治療する方法であって、対象に、態様54～63のいずれか1つの改変免疫細胞もしくは前駆細胞、または態様64もしくは態様65の方法によって作製された改変免疫細胞もしくはその前駆細胞を投与することを含む、方法を提供する。

10

【0071】

いくつかの態様では、改変細胞は、対象においてCCR4陽性T細胞を枯渇させかつCCR4陰性T細胞を枯渇させず、それにより、がんを治療する。

【0072】

いくつかの態様では、対象は、以前にモガムリズマブを投与されたことがある。

【0073】

いくつかの態様では、がんは、モガムリズマブに不応性である。

【0074】

いくつかの局面では、本発明は、その必要がある対象におけるがんを治療する方法であって、対象に、抗CCR4 CARを含む改変T細胞を投与することを含み、CARが、抗CCR4抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインを含む、方法を提供する。

20

【0075】

いくつかの態様では、抗CCR4抗原結合ドメインは、SEQ ID NO：2、SEQ ID NO：4、およびSEQ ID NO：6からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つの重鎖可変領域（HCDR）を含む。

【0076】

いくつかの態様では、抗CCR4抗原結合ドメインは、SEQ ID NO：8、SEQ ID NO：10、およびSEQ ID NO：12からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つの軽鎖可変領域（LCDR）を含む。

30

【0077】

いくつかの態様では、抗CCR4抗原結合ドメインは、完全長抗体もしくはその抗原結合断片、Fab、単鎖可変断片（scFv）、または単ドメイン抗体からなる群より選択される。

【0078】

いくつかの態様では、抗CCR4抗原結合ドメインは、抗CCR4単鎖可変断片（scFv）である。

【0079】

いくつかの態様では、抗CCR4抗原結合ドメインは、モガムリズマブに由来する重鎖および軽鎖を有する抗CCR4単鎖可変断片（scFv）である。

40

【0080】

いくつかの態様では、抗CCR4抗原結合ドメインは、SEQ ID NO：112と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。

【0081】

いくつかの態様では、抗CCR4抗原結合ドメインは、SEQ ID NO：114と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0082】

いくつかの態様では、抗CCR4抗原結合ドメインは、SEQ ID NO：16と少なくとも8

50

0%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0083】

いくつかの態様では、CARは、CD8アルファヒンジをさらに含み、任意で、CD8アルファヒンジは、SEQ ID NO: 34に示されるアミノ酸配列を含む。

【0084】

いくつかの態様では、膜貫通ドメインは、人工疎水性配列、ならびにI型膜貫通タンパク質の膜貫通ドメイン、T細胞受容体のアルファ、ベータ、もしくはゼータ鎖の膜貫通ドメイン、CD28の膜貫通ドメイン、CD3イプシロンの膜貫通ドメイン、CD45の膜貫通ドメイン、CD4の膜貫通ドメイン、CD5の膜貫通ドメイン、CD8の膜貫通ドメイン、CD9の膜貫通ドメイン、CD16の膜貫通ドメイン、CD22の膜貫通ドメイン、CD33の膜貫通ドメイン、CD37の膜貫通ドメイン、CD64の膜貫通ドメイン、CD80の膜貫通ドメイン、CD86の膜貫通ドメイン、OX40 (CD134) の膜貫通ドメイン、4-1BB (CD137) の膜貫通ドメイン、ICOSの膜貫通ドメイン、およびCD154の膜貫通ドメイン、からなる群より選択される膜貫通ドメイン、または、キラー免疫グロブリン様受容体 (KIR) に由来する膜貫通ドメインを含む。

10

【0085】

いくつかの態様では、膜貫通ドメインは、CD8アルファ膜貫通ドメインを含み、任意で、CD8アルファ膜貫通ドメインは、SEQ ID NO: 36に示されるアミノ酸配列を含む。

【0086】

いくつかの態様では、細胞内ドメインは、共刺激性ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

20

【0087】

いくつかの態様では、細胞内ドメインは、TNFRスーパーファミリー内のタンパク質、CD28、4-1BB (CD137)、OX40 (CD134)、PD-1、CD7、LIGHT、CD83L、DAP10、DAP12、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、ICOS、NKG2C、およびB7-H3 (CD276)、もしくはそれらのバリエーションからなる群より選択されるタンパク質の共刺激性ドメイン、またはキラー免疫グロブリン様受容体 (KIR) に由来する細胞内ドメインを含む。

【0088】

いくつかの態様では、細胞内ドメインは、SEQ ID NO: 38に示されるアミノ酸配列を任意で含む、4-1BBの共刺激性ドメインを含む。

30

【0089】

いくつかの態様では、細胞内ドメインは、ヒトCD3ゼータ鎖 (CD3ζ)、FcγRIII、FcεRI、Fc受容体の細胞質テール、免疫受容体活性化チロシンモチーフ (ITAM) を有する細胞質受容体、TCRゼータ、FcRガンマ、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD5、CD22、CD79a、CD79b、およびCD66d、またはそれらのバリエーションからなる群より選択されるタンパク質の細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【0090】

いくつかの態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO: 40に示されるアミノ酸配列を任意で含む、CD3ζまたはそのバリエーションの細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

40

【0091】

いくつかの態様では、CARは、抗CCR4 scFvを含む抗CCR4抗原結合ドメイン、CD8アルファヒンジ、CD8アルファ膜貫通ドメイン、4-1BB共刺激性ドメインとCD3ζ細胞内シグナル伝達ドメインとを含む細胞内ドメインを含む。

【0092】

いくつかの態様では、CARは、SEQ ID NO: 32に示されるアミノ酸配列を任意で含む、CD8リーダー配列をさらに含む。

【0093】

50

いくつかの態様では、CARは、SEQ ID NO : 30、54、62、70、82、90、および102のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0094】

いくつかの態様では、CARは、SEQ ID NO : 29、53、61、69、81、89、および101のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるヌクレオチド配列によってコードされる。

【0095】

いくつかの態様では、CARは、自己切断可能リンカーを介してセーフティスイッチに連結され、かつセーフティスイッチは、セーフティスイッチ物質に結合する。

10

【0096】

いくつかの態様では、セーフティスイッチは、(a) セーフティスイッチ物質が、抗EGFR抗体、任意でセツキシマブである、短縮型EGFR (EGFRt) ; (b) セーフティスイッチ物質が、抗CD20抗体、任意でリツキシマブである、CD20 ; (c) セーフティスイッチ物質がAP1903である、誘導性カスパーゼ9 (iCasp9) ; および (d) セーフティスイッチ物質がガンシクロビル (GCV) である、単純ヘルペスウイルス1型チミジンキナーゼ (HSVTK) 、から選択される。

【0097】

いくつかの態様では、CARは、自己切断可能リンカーを介してドミナントネガティブTGFB受容体II型 (dnTGFBRII) に連結される。

20

【0098】

いくつかの態様では、セーフティスイッチは、自己切断可能リンカーを介してドミナントネガティブTGFB受容体II型 (dnTGFBRII) に連結される。

【0099】

いくつかの態様では、前記方法は、セーフティスイッチ物質を対象に投与することをさらに含む。

【0100】

いくつかの態様では、改変T細胞は、対象においてCCR4陽性T細胞を枯渇させかつCCR4陰性T細胞を枯渇させず、それにより、がんを治療する。

【0101】

30

いくつかの態様では、改変T細胞は、PBMCに由来する。

【0102】

いくつかの態様では、PBMCは、腫瘍細胞を含む。

【0103】

いくつかの態様では、改変T細胞は、ヒトT細胞である。

【0104】

いくつかの態様では、改変T細胞は、自己由来である。

【0105】

いくつかの態様では、対象は、ヒトである。

【0106】

40

いくつかの態様では、対象は、以前にモガムリズマブを投与されたことがある。

【0107】

いくつかの態様では、がんは、モガムリズマブに不応性である。

【図面の簡単な説明】

【0108】

本発明の前述のおよび他の特徴および利点は、添付の図面と併せて、以下の例示的な態様の詳細な説明からさらに十分に理解されよう。

【図1】皮下T細胞リンパ腫細胞が高レベルのCCR4を発現するという調査結果を図示する。CTCLを有する4名の患者由来の皮膚生検試料上のCCR4発現を免疫組織染色 (IHC) で評価した。各スケールバーは、100umを表す。

50

【図2】正常組織がCCR4をほとんど発現しないという調査結果を図示する。27の器官についての正常組織マイクロアレイ（TMA）上のCCR4発現（3連）を分析した。下の表は、TMAのマップを表す。

【図3】CCR4-CAR構築物の概略図を描写する。CD8リーダー、CD8リーダー配列；scFv、単鎖可変断片；TM、膜貫通ドメイン。

【図4】CCR4発現T細胞を枯渇させながらCCR4-CAR T細胞が増大できるという調査結果を図示する。CCR4-CARを形質導入したT細胞の21日間の増大（左パネル）および10日目の総倍加数（右パネル）。左パネルは、代表するT細胞増大曲線を示す。T細胞を計数し、新鮮培地を毎日から1日おきに加えることによって 0.7×10^6 個の細胞/mlに希釈した。T細胞のサイズが $350 \mu\text{m}^3$ まで縮小したら、後続実験のためにT細胞を採取し、その時、計数を継続するために細胞の一部を取っておいた。右パネルは、抗CD3/28刺激後10日目の総T細胞増大の集計データを示す。ドットおよびバーは、平均値および平均値の標準誤差（SEM）を表す（ $n=5$ ）。データは、5名のドナーからの5つの実験の代表（左パネル）または集計（右パネル）である。ns、有意ではない；*、 $p<0.05$ ；**、 $p<0.01$ ；***、 $p<0.001$ ；****、 $p<0.0001$ （対CD19CART群）、1元配置分散分析とチューキーの事後検定による。

10

【図5】CAR T細胞産物の最終収量を描写する。T細胞を、抗CD3/CD28ビーズで刺激し、次いで、CCR4-CAR、対照CD19-CARを形質導入したか、または形質導入しなかった。細胞のサイズが $350 \mu\text{m}^3$ まで縮小したら（典型的には、ビーズ刺激後10日目～14日目）、後続実験のためにT細胞を採取し、凍結した。採取当日のT細胞の全倍加数を示す。バーは、平均値およびSEMを表す。データは、5名のドナーからの5つの実験の集計である。ns、有意ではない；*、 $p<0.05$ ；***、 $p<0.001$ （対19CART群）、1元配置分散分析とチューキーの事後検定による。

20

【図6】CAR T細胞増大中のT細胞のサイズを描写する。細胞計数装置（Coulter counter）によってT細胞のサイズを毎日から1日おきに分析した（右パネル）。集計データからの10日目のサイズを右パネルに示す。データは、5名のドナーからの5つの実験の代表または集計である。

【図7】CCR4発現T細胞を枯渇させながらCCR4-CAR T細胞が増大できるという調査結果を図示する。T細胞生存率の時間経過分析。細胞生存率を、アミン反応性色素染色（LIVE-DEAD染色）およびFCMによって分析した。ドットおよびバーは、平均値およびSEMを表す（ $n=5$ ）。統計分析を10日目のデータに適用した。データは、5名のドナーからの5つの実験の集計である。ns、有意ではない；*、 $p<0.05$ ；**、 $p<0.01$ ；***、 $p<0.001$ ；****、 $p<0.0001$ （対CD19CART群）、1元配置分散分析とチューキーの事後検定による。

30

【図8】10日目のCD45ROおよびCCR7発現によるT細胞メモリー表現型を描写する。数字は、各四分円中の細胞の百分率を示す。

【図9】CCR4発現T細胞を枯渇させながらCCR4-CAR T細胞が増大できるという調査結果を図示する。数種類のCAR T細胞におけるCAR陽性細胞選択を示しているT細胞のCAR発現の時間経過分析。ドットおよびバーは、平均値およびSEMを表す（ $n=5$ ）。統計分析を10日目のデータに適用した。データは、5名のドナーからの5つの実験の集計である。ns、有意ではない；*、 $p<0.05$ ；**、 $p<0.01$ ；***、 $p<0.001$ ；****、 $p<0.0001$ （対CD19CART群）、1元配置分散分析とチューキーの事後検定による。

40

【図10】T細胞の表面のCARの発現を描写する。刺激後10日目にFCMによってCAR発現を分析した。ゲートは、CAR陽性集団を表し、数字は、CAR陽性百分率を示す。

【図11】CCR4-CAR構築に使用した抗CCR4 mAbが、CCR4のエピトープを検出抗体と共有しないことを描写する。HH細胞上のCCR4を、精製CCR4 mAbクローンKW-0761またはh1567のいずれかでブロックし、次いで、クローンKW-0761（Ax647コンジュゲート）、h1567（PEコンジュゲート）またはD8SEE（PEコンジュゲート）のいずれかで染色した。CCR4をFCMによって分析した。CCR4は、クローンKW-0761およびh1567によるCCR4ブロッキング後も依然として検出可能であったが、KW-0761は

50

、検出mAb (D8SEE) による検出効率をわずかに減少させた。

【図12】CCR4発現T細胞を枯渇させながらCCR4-CAR T細胞が増大できるという調査結果を図示する。刺激後6日目のT細胞上のCARおよびCCR4の発現を示している代表フロープロット。数字は、各四分円中の細胞の百分率を示す。データは、5名のドナーからの5つの実験の代表である。ns、有意ではない；*、 $p < 0.05$ ；**、 $p < 0.01$ ；***、 $p < 0.001$ ；****、 $p < 0.0001$ （対CD19CAR T群）、1元配置分散分析とテューキーの事後検定による。

【図13】CCR4発現T細胞を枯渇させながらCCR4-CAR T細胞が増大できるという調査結果を図示する。代表するCCR4発現の動力学（左パネル）および10日目のCCR4発現の集計データ（右パネル）。バーは、平均値およびSEMを表す（ $n=5$ ）。データは、5名のドナーからの5つの実験の代表（左パネル）または集計（右パネル）である。ns、有意ではない；*、 $p < 0.05$ ；**、 $p < 0.01$ ；***、 $p < 0.001$ ；****、 $p < 0.0001$ （対CD19CAR T群）、1元配置分散分析とテューキーの事後検定による。

10

【図14】CAR T細胞増大中のCD4/8比の変化を描写する。各時点でのCAR陽性集団（上パネル）およびCAR陰性集団（下パネル）におけるCD4/8比をFCMによって分析した。データは、5名のドナーからの5つの実験の集計である。ns、有意ではない；*、 $p < 0.05$ ；**、 $p < 0.01$ （対10日目の19CAR T群）、1元配置分散分析とテューキーの事後検定による。

【図15】2つの異なるCCR4-CAR；CCR4-CAR (KW_L2H) およびCCR4-CAR (h1567_L2H) を形質導入したHH細胞を描写する（図16に關係する）。HH細胞上のCCR4-CAR発現をFCMによって分析した。

20

【図16】CCR4発現T細胞を枯渇させながらCCR4-CAR T細胞が増大できるという調査結果を図示する。HH細胞上のCCR4-CARによるCCR4のエピトープ特異的ブロッキング。表示するCCR4 CARを形質導入したHH細胞上の、抗CCR4 mAbクローンh1567（左パネル）または抗CCR4 mAbクローンKW-0761（右パネル）のいずれかで検出されたCCR4発現を示す。データは、2つの実験の代表である。ns、有意ではない；*、 $p < 0.05$ ；**、 $p < 0.01$ ；***、 $p < 0.001$ ；****、 $p < 0.0001$ （対CD19CAR T群）、1元配置分散分析とテューキーの事後検定による。

【図17】同胞相争いが、Thサブセットの割合を変化させ、Th2、Th17およびTregサイトカイン産生を減少させる一方で、Th1サイトカイン産生を温存するという調査結果を図示する。CAR T細胞産物のTh1サブセットおよびTh2サブセットの比。Th1サブセットは、CD4(+)、CXCR3(+), CCR4(-), CCR6(-)およびCCR10(-)として定義された。Th2サブセットは、FCMによってCD4(+), CXCR3(-), CCR4(+), CCR6(-)およびCCR10(-)として定義された。UTD群を除いたCAR陽性集団をゲーティングすることによって表現型を分析した。データは、3名のドナーからの3つの実験の集計である。バーは、平均値およびSEMを表す（ $n=3$ ）。ns、有意ではない；***、 $p < 0.001$ ；****、 $p < 0.0001$ （対CD19-CAR T群）、1元配置分散分析とテューキーの事後検定による。

30

【図18】同胞相争いが、Thサブセットの割合を変化させ、Th2、Th17およびTregサイトカイン産生を減少させる一方で、Th1サイトカイン産生を温存するという調査結果を図示する。CD19-CAR T細胞と比べた、CCR4-CAR T細胞によるTh関連サイトカイン産生のヒートマップ。CAR T細胞をPMA/Ionoで刺激した。刺激後24時間の上清のサイトカインレベルを、LUMINEXアッセイによって分析した。CD19-CAR T細胞からのサイトカインレベルを1に設定した。データは、2名のドナーからの2つの実験の代表である。

40

【図19】同胞相争いが、Thサブセットの割合を変化させ、Th2、Th17およびTregサイトカイン産生を減少させる一方で、Th1サイトカイン産生を温存するという調査結果を図示する。CD19-CAR T細胞にCCR4-CAR T細胞を加えることによるCCR4陽性サブセットの枯渇。T細胞を刺激し、CCR4 CARまたはCD19 CARのいずれかを別々に形質導入した。刺激後5日目に、CD19-CAR T細胞に10%の数のCCR4-CAR T細胞を加えた。10日目に、CD19-CAR陽性細胞におけるCCR4発現を分析した。数字は、各四分円

50

中の細胞の百分率を示す。データは、2名のドナーからの2つの実験の代表である。

【図20】 同胞相争いが、Thサブセットの割合を変化させ、Th2、Th17およびTregサイトカイン産生を減少させる一方で、Th1サイトカイン産生を温存するという調査結果を図示する。未処理CD19-CAR T細胞と比べた、CCR4-CAR T細胞で事前処理したCD19-CAR T細胞によるTh関連サイトカイン産生のヒートマップ。CAR T細胞を、表示する刺激因子で刺激した。刺激後24時間の上清のサイトカインレベルを、LUMINEXアッセイによって分析した。未処理CD19-CAR T細胞からのサイトカインレベルを1に設定した。

【図21】 FCMによる腫瘍細胞株上のCCR4の発現を描写する。各カラム中の数字は、CCR4-PEのMFIを示す。Nalm6、HH、MJ、およびHuT78は、それぞれ、B-ALL、白血病的CTCL、セザリー症候群、およびHTLV-1陽性MFを有する患者に由来する細胞株である。

【図22】 腫瘍細胞株に対するCAR T細胞の溶解活性を描写する。CAR T細胞とルシフェラーゼを発現する腫瘍細胞とを、表示するE:T比でインキュベートした。共培養の16時間の特異的溶解を発光に基づいて決定した。バーは、平均値およびSDを表す(3連)。データは、3名のドナーからの3つの実験の代表である。

【図23】 CCR4-CAR T細胞による脱顆粒およびサイトカイン産生を描写する。CAR T細胞を、モネンシンおよびCD107a検出抗体の存在下、培地、PMA-Ionoまたは表示する細胞のいずれかにより、1:4のR:S比で刺激した。6時間の共培養後、細胞を、FoxP3染色緩衝液セットを使用して細胞内サイトカインについて染色し、FCMによって分析した。バーは、平均値およびSDを表す(2連)。データは、3名のドナーからの3つの実験の代表である。

【図24】 CCR4-CAR (KW_L2H) が、HH細胞異種移植マウスを治癒し、優れたT細胞生着を誘導するという調査結果を図示する。実験の図解。NSGマウスに、ルシフェラーゼを発現するHH細胞 (HH-CGB-GFP) 1×10^6 個を静脈内接種した。腫瘍細胞接種の7日後、生着した腫瘍を、 0.5×10^6 個のCCR4-CAR陽性T細胞または非形質導入T細胞のいずれかで静脈内処置した。データは、2名のドナーからの2つの実験の代表である。

【図25】 CCR4-CAR (KW_L2H) が、HH細胞異種移植マウスを治癒し、優れたT細胞生着を誘導するという調査結果を図示する。BLIによる腫瘍負荷の全体的な動力学。破線は、腫瘍のないマウスをイメージングすることによって決定された光子のバックグラウンドレベルを表す。ドットおよびバーは、平均値およびSEMを表す(UTD群についてn=4、他の群についてn=5)。データは、2名のドナーからの2つの実験の代表である。

【図26】 CCR4-CAR (KW_L2H) が、HH細胞異種移植マウスを治癒し、優れたT細胞生着を誘導するという調査結果を図示する。カプラン・マイヤー法による生存曲線。^{*}、 $p < 0.05$ ；^{**}、 $p < 0.01$ (対KW_L2H群)、ログランク検定による。データは、2名のドナーからの2つの実験の代表である。

【図27】 CCR4-CAR (KW_L2H) が、HH細胞異種移植マウスを治癒し、優れたT細胞生着を誘導するという調査結果を図示する。FCMによる12日目および19日目の末梢血のT細胞数。^{*}、 $p < 0.05$ ；^{**}、 $p < 0.01$ ；^{***}、 $p < 0.001$ ；^{****}、 $p < 0.0001$ (対KW_L2H群)、1元配置分散分析とテューキーの事後検定による。データは、2名のドナーからの2つの実験の代表である。

【図28】 CCR4-CAR T細胞処置中のBW変化を描写する。ドットおよびバーは、平均値およびSEMを表す(UTD群についてn=4、他の群についてn=5)。数匹のマウスは、処置後30日以内に急速なBW増加を示し、これは、腫瘍浸潤によって引き起こされる肝脾腫を反映した。KW_L2H群からのマウスのすべてが、処置の間、CRを維持していたので、KW_L2H群の緩やかなBW増加は、マウスの正常な成長と関係していた。

【図29】 短縮型CD19を形質導入したHH細胞上のCD19発現を描写する。HH細胞に、短縮型CD19を形質導入し、繰り返しソーティングしてCD19陽性集団を精製した。ドットプロットは、FCMにおけるCD19発現の純度100%を示している。ゲートは、CD19陽性集団を表し、数字は、陽性細胞の百分率(左パネル)またはPEのMFI(右パネル)を

10

20

30

40

50

示す。

【図30】CCR4-CAR (KW_L2H) が、CD19を発現するHH (HH-CBG-GFP-t19) を生着させたNSGマウスにおいてCD19-CARのものと同等の抗腫瘍効果を誘導するという調査結果を図示する。実験の図解。NSGマウスに、ルシフェラーゼおよび短縮型CD19を発現するHH細胞 (HH-CGB-GFP-t19) 1×10^6 個を静脈内接種した。腫瘍細胞接種の7日後、生着した腫瘍を、 2×10^6 個のCCR4-CAR陽性T細胞またはUTD T細胞のいずれかで静脈内処置した。

【図31】CCR4-CAR (KW_L2H) が、CD19を発現するHH (HH-CBG-GFP-t19) を生着させたNSGマウスにおいてCD19-CARのものと同等の抗腫瘍効果を誘導するという調査結果を図示する。BLIによる腫瘍負荷の全体的な動力学。破線は、腫瘍のないマウスをイメージングすることによって決定された光子のバックグラウンドレベルを表す。ドットおよびバーは、平均値およびSEMを表す (UTD群についてn=5、他の群についてn=7)。データは、2名のドナーからの2つの実験の代表である。

【図32】CCR4-CAR (KW_L2H) が、CD19を発現するHH (HH-CBG-GFP-t19) を生着させたNSGマウスにおいてCD19-CARのものと同等の抗腫瘍効果を誘導するという調査結果を図示する。7日目および14日目の末梢血のT細胞数。7日目および14日目に、末梢血を、カウンティングビーズを使用したFCMによって、T細胞数について分析した。バーは、平均値およびSEMを表す (UTD群についてn=5、他の群についてn=7)。データは、2名のドナーからの2つの実験の代表である。

【図33】7日目、14日目および28日目の末梢血のT細胞数を描写する (図32と関係する)。末梢血を、FCMによって、総T細胞、CD4およびCD8 T細胞数について分析した。バーは、平均値およびSEMを表す。ドットおよびバーは、平均値およびSEMを表す。データは、2名のドナーからの2つの実験の代表である。

【図34】CCR4-CAR (KW_L2H) が、CD19を発現するHH (HH-CBG-GFP-t19) を生着させたNSGマウスにおいてCD19-CARのものと同等の抗腫瘍効果を誘導するという調査結果を図示する。6日目の血清のサイトカインレベル。6日目に、図A、BおよびCと同じ実験スケジュールを使用して、マウス全血から血清を収集した。サイトカインを高感度LUMINEXアッセイによって分析した。バーは、平均値およびSEMを表す (UTD群についてn=4、他の群について5)。ns、有意ではない；*、 $p < 0.05$ ；**、 $p < 0.01$ ；****、 $p < 0.0001$ 、1元配置分散分析とテューキーの事後検定による。

【図35】初代CTCL細胞の表現型を描写する。初代CTCL細胞を、セザリー症候群を有する患者から得た。腫瘍細胞の表現型をFCMによって分析した。正常T細胞集団 (CD8陽性またはCD4、CD7およびCD26陽性) は、ほとんどなかった。

【図36】CCR4-CAR T細胞が、患者由来初代CTCL細胞を溶解し、かつそれに応答できるという調査結果を図示する。初代CTCL細胞の刺激時のCCR4-CAR T細胞によるサイトカイン産生。刺激後6時間のCAR T細胞のサイトカイン産生を、細胞内染色およびFCMによって分析した。ゲートは、CAR陽性細胞中の表示するサイトカインの陽性集団を表す。データは、2名のドナーからの2つの実験の代表である。

【図37】CCR4-CAR T細胞が、患者由来初代CTCL細胞を溶解し、かつそれに応答できるという調査結果を図示する。初代CTCL細胞に対するCCR4-CAR T細胞の溶解活性。共培養の4時間の時点の各細胞に対するCAR T細胞の殺傷活性を、 ^{51}Cr 放出アッセイによって分析した。ドットおよびバーは、平均値およびSDを表す (3連)。データは、2名のドナーからの2つの実験の代表である。

【図38】CCR4CAR_KW_L2H_tEGFRベクターマップを図示する。

【図39】CCR4CAR_KW_L2H_CD20ベクターマップを図示する。

【図40】CCR4CAR_KW_L2H_iCasp9ベクターマップを図示する。

【図41】CCR4CAR_KW_L2H_HSVTKベクターマップを図示する。

【図42】HSVTK枯渇系を使用した7日間培養でのCAR T細胞のGCV誘導枯渇を図示しているプロットである。

【図43】dnTGFbR-T2A-CCR4CAR-P2A-HSVTKベクターマップを図示する。

10

20

30

40

50

【図 4 4】 CCR4CAR-P2A-dnTGFbR-T2A-HSVTKベクターマップを図示する。

【図 4 5】 CCR4CAR-P2A-HSVTK-T2A-dnTGFbRベクターマップを図示する。

【図 4 6】 CCR4CAR-HSVTK-dnTGFbRIIの細胞傷害性を図示しているプロットである。

【図 4 7】 CCR4を標的とするshRNA (shCCR4) が、CCR4発現T細胞株HHおよびATN-1においてCCR4を効率的にノックダウンするという調査結果を図示しているデータを提供する。HH細胞 (左パネル) およびATN-1細胞 (右パネル) に、レンチウイルスを使用してsh-CCR4またはsh-Cre (陰性対照) を形質導入した。sh-RNA後2日目に、FCMによってCCR4発現を分析した。

【図 4 8 A】 sh-CCR4標的配列の精選によってCCR4ノックダウンCCR4CART細胞を効率的に産生できるという調査結果を図示する。図48Aは、shCCR4とCCR4-CARの二重形質導入のスケジュールを提供する。

【図 4 8 B】 sh-CCR4標的配列の精選によってCCR4ノックダウンCCR4CART細胞を効率的に産生できるという調査結果を図示する。図48Bは、抗CD3/28刺激後3日目 (sh-RNA導入後2日目) のT細胞上の減少したCCR4発現を示しているデータを提供する。

【図 4 8 C】 sh-CCR4標的配列の精選によってCCR4ノックダウンCCR4CART細胞を効率的に産生できるという調査結果を図示する。図48Cは、CCR4ノックダウンCCR4-CART細胞調製中のCART細胞の増大を示す。最低のノックダウン効率を提供するSh-CCR4#3は、より大きなT細胞増大を誘導した。

【図 4 8 D - 1】 sh-CCR4標的配列の精選によってCCR4ノックダウンCCR4CART細胞を効率的に産生できるという調査結果を図示する。図48Dは、T細胞刺激後5日目および10日目のCCR4-CAR発現を示す。最低のCCR4ノックダウン効率を有するSh-CCR4#3は、より大きなT細胞増大およびCAR形質導入効率を誘導した。

【図 4 8 D - 2】 図48D-1の説明を参照のこと。

【図 4 9 A】 CCR4-CART細胞が、モガムリズマブ抵抗性腫瘍を治癒できるという調査結果を図示する。図49Aは、モガムリズマブ抵抗性HH腫瘍異種移植マウスモデルの概略図である。

【図 4 9 B】 CCR4-CART細胞が、モガムリズマブ抵抗性腫瘍を治癒できるという調査結果を図示する。図49Bは、CCR4-CART細胞が、モガムリズマブ不応性HH腫瘍を治癒できるという調査結果を図示しているデータを提供する。

【図 5 0 A】 患者由来PBMCから効率的かつ安全にCCR4-CART細胞を確立できるという調査結果を図示する。図50Aは、T細胞刺激後7日目、14日目および24日目のT細胞上のCCR4-CARおよびCD19-CARの発現を示す。

【図 5 0 B】 患者由来PBMCから効率的かつ安全にCCR4-CART細胞を確立できるという調査結果を図示する。図50Bは、CD19-CART細胞産物ではなくCCR4-CART細胞産物における混入ATLL細胞の有意な減少を示す。

【発明を実施するための形態】

【0109】

詳細な説明

本発明は、モガムリズマブに由来する抗CCR4 CARを含むCCR4-CART細胞が、モガムリズマブ不応性腫瘍細胞を含む腫瘍細胞を殺傷するのに非常に効果的であるという発見に基づく。有効性は、Th1サブセット (CCR4陰性) を温存しながらTh2、TregおよびTh17サブセット (すべてCCR4陽性) を同士打ちにより枯渇させることに関連することが示された。

【0110】

本発明は、CCR4に結合可能なキメラ抗原受容体 (CAR) (抗CCR4 CAR) を含む改変免疫細胞またはその前駆体 (例えば、改変T細胞) のための組成物および方法を提供する。また、がんを治療するために抗CCR4 CAR発現細胞を使用する方法、および抗CCR4 CAR細胞療法と組み合わせて使用するためのT細胞枯渇系も提供される。一局面では、本発明は、がんを有する対象に抗CCR4 CARを含む改変細胞を投与することを含む、がん

10

20

30

40

50

を治療する方法であって、改変細胞が、対象においてCCR4陽性T細胞を枯渇させかつCCR4陰性T細胞を枯渇させず、それにより、がんを治療する、方法を提供する。

【0111】

CAR構築物、特にscFvの最適化は、CAR効力を増強させ得る。それゆえ、一態様では、本開示は、T細胞悪性腫瘍の治療に非常に効果的なCCR4-CAR T細胞を特定し、潜在的なCCR4-CAR媒介性の正常T細胞とCAR T細胞産物の同胞相争いの影響を究明する。他の態様では、本開示は、腫瘍外毒性が観察されたときにCAR T細胞をシャットダウンするために抗CCR4 CAR細胞療法と組み合わせてセーフティスイッチとして使用するためのT細胞枯渇系を提供する。

【0112】

本開示に記載される方法は、本明細書において開示される特定の方法および／または実験条件が変動し得るので、そのような方法および条件に限定されないことを理解されたい。また、本明細書において使用される用語法は、特定の態様だけを説明することを目的とし、限定的であることは意図しないことも理解されたい。

【0113】

さらに、本明細書に記載される実験は、特に示さないかぎり、当業者の技能の範囲内で従来の分子細胞生物学および免疫学的技法を使用する。そのような技法は、熟練の作業者に周知であり、文献に十分に説明されている。例えば、すべての補遺を含むAusubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, N.Y. (1987-2008)、MR GreenおよびJ. SambrookによるMolecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition)ならびにHarlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Chapter 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (2013, 2nd edition)を参照されたい。

【0114】

A. 定義

特に定義されないかぎり、本明細書において用いられる科学用語および技術用語は、当業者によって広く理解されている意味を有する。何らかの潜在的意味不確定が発生した場合、本明細書において提供される定義が、任意の辞書または外部の定義よりも優先される。状況により特に必要とされないかぎり、単数の用語は複数を含むものとし、複数の用語は単数を含むものとする。特に述べないかぎり、「または」の使用は「および／または」を意味する。「含んでいる (including)」という用語ならびに「含む (includes)」および「含んだ (included)」などの他の形態の使用は、非限定的である。

【0115】

一般的に、本明細書に記載される細胞および組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学ならびにタンパク質および核酸の化学およびハイブリダイゼーションに関連して使用される命名法は周知であり、当技術分野において広く使用される。本明細書において提供される方法および技法は、特に示さないかぎり一般的に当技術分野において周知の従来法に従って、本明細書全体にわたり引用され、論じられる様々な一般的でより具体的な参考文献に記載されるように行われる。酵素反応および精製技法は、当技術分野において広く成し遂げられる、または本明細書に記載されるように製造業者の規格に従って行われる。本明細書に記載される分析化学、合成有機化学、および医薬化学に関連して使用される命名法ならびにその検査手技および技法は、周知であり、当技術分野において広く使用されるものである。化学合成、化学分析、薬学的調製、製剤化、および送達ならびに患者の処置のために標準的な技法が使用される。

【0116】

本開示がより容易に理解され得るように、選ばれた用語を以下に定義する。

【0117】

「1つの (a)」および「1つの (an)」という冠詞は、本明細書においてその冠詞の文法的対象物の1つまたは1つよりも多く (すなわち、少なくとも1つ) をいうように用いられる。例として、「1つの (an) 要素」は、1つの要素または1つよりも多い要素を

10

20

30

40

50

意味する。

【0118】

量、時間的持続期間などのような測定可能な値をいう場合に本明細書において用いられる「約」は、特定された値から±20%または±10%、より好ましくは±5%、さらにより好ましくは±1%、なおより好ましくは±0.1%のばらつきを包含するものとするが、これはそのようなばらつきが、開示された方法を実施する上で妥当なためである。

【0119】

本明細書において用いられる「活性化」とは、検出可能な細胞増殖を誘導するように十分に刺激されたT細胞の状態のことを指す。活性化はまた、誘導されたサイトカイン産生、および検出可能なエフェクター機能に関連することができる。「活性化T細胞」という用語は、特に、細胞分裂を起こしているT細胞のことを指す。

10

【0120】

本明細書において使用される場合、疾患を「緩和する」は、疾患の1つまたは複数の症状の重症度を低減することを意味する。

【0121】

本明細書において用いられる「抗原」という用語は、免疫応答を引き起こす分子と定義される。この免疫応答には、抗体産生、または特異的免疫適格細胞の活性化のいずれかまたは両方が含まれ得る。当業者は、事実上、すべてのタンパク質またはペプチドを含む任意の高分子が抗原として働くことができることを理解するであろう。

【0122】

さらに、抗原は、組み換えDNAまたはゲノムDNAに由来することができる。当業者は、免疫応答を誘発するタンパク質をコードするヌクレオチド配列または部分ヌクレオチド配列を含む任意のDNAが、それゆえ、本明細書においてその用語が用いられる通りの「抗原」をコードすることを理解するであろう。さらに、当業者は、抗原が遺伝子の完全長ヌクレオチド配列のみによってコードされる必要はないことを理解するであろう。本発明が、1つよりも多い遺伝子の部分ヌクレオチド配列の使用を含むが、これに限定されるわけではないこと、およびこれらのヌクレオチド配列が、所望の免疫応答を誘発するために様々な組み合わせで配置されることは、容易に明らかである。さらに、当業者は、抗原が「遺伝子」によってコードされる必要はまったくないことを理解するであろう。抗原が生物学的試料から生成、合成または由来することができることは、容易に明らかである。そのような生物学的試料は、組織試料、腫瘍試料、細胞または生体液を含むことができるが、これに限定されるわけではない。

20

30

【0123】

本明細書において用いられる場合、「自己由来」という用語は、後にその個体に再び導入される、同じ個体に由来する任意の材料をいうよう意図される。

【0124】

「共刺激分子」は、共刺激リガンドと特異的に結合し、それにより、非限定的に増殖などのT細胞による共刺激応答を媒介する、T細胞上の同族結合パートナーを指す。共刺激分子には、MHCクラスI分子、BTLAおよびTollリガンド受容体が含まれるが、これに限定されるわけではない。

40

【0125】

「共刺激シグナル」は、本明細書において使用される場合、TCR/CD3の連結などの一次シグナルとの組み合わせで、T細胞増殖および／または鍵となる分子のアップレギュレーションもしくはダウンレギュレーションを導くシグナルを指す。

【0126】

「疾患」は、動物が恒常性を維持できず、疾患が改善されなければその動物の健康が悪化し続ける、動物の健康状態である。対照的に、動物における「障害」は、その動物が恒常性を維持できるが、その動物の健康状態が障害のない場合よりも好ましくない健康状態である。未処置のまま放置されても、障害が必ずしも動物の健康状態のさらなる低下を引き起こすとは限らない。

50

【0127】

用語「ダウンレギュレーション」は、本明細書において使用される場合、1つまたは複数の遺伝子の遺伝子発現の減少または消失を指す。

【0128】

「有効量」または「治療的有效量」は、本明細書において互換的に用いられ、特定の生物学的結果を達成するのに有効な、または治療的もしくは予防的利益をもたらす、本明細書において記述される化合物、製剤、材料または組成物の量を指す。そのような結果には、哺乳動物に投与した場合に、本発明の組成物の非存在下で検出される免疫応答と比較して検出可能なレベルの免疫抑制または耐容性を引き起こす量が含まれ得るが、それに限定されるわけではない。免疫応答は、おびただしい数の当技術分野において認識されている方法によって容易に評価することができる。当業者は、本明細書において投与される組成物の量が、変動すること、そして、処置されている疾患または状態、処置されている哺乳動物の齢および健康および身体の状態、疾患の重症度、投与されている特定の化合物などの多数の要因に基づいてこれを容易に決定できることを理解するであろう。

10

【0129】

「コードする」とは、定義されたヌクレオチド（すなわち、rRNA、tRNAおよびmRNA）配列または定義されたアミノ酸配列のいずれかを有する、生物学的過程において他のポリマーおよび高分子の合成のための鋳型として働く、遺伝子、cDNAまたはmRNAのようなポリヌクレオチドにおける特定のヌクレオチド配列の固有の特性ならびにそれに起因する生物学的特性をいう。したがって、遺伝子は、その遺伝子に対応するmRNAの転写および翻訳によって細胞または他の生体系においてタンパク質が産生される場合、タンパク質をコードする。mRNA配列と同一であり通常は配列表に示されるヌクレオチド配列であるコード鎖も、遺伝子またはcDNAの転写のための鋳型として用いられる非コード鎖も共に、その遺伝子またはcDNAのタンパク質または他の産物をコードするということができる。

20

【0130】

本明細書において用いられる場合、「内因性」とは、生物、細胞、組織もしくは系の内部に由来するか、またはそれらの内部で産生される、任意の材料をいう。

【0131】

用語「エピトープ」は、本明細書において使用される場合、免疫応答を誘発し、B細胞応答および／またはT細胞応答を誘導することができる、抗原上の小化学分子として定義される。抗原は、1つまたは複数のエピトープを有することができる。ほとんどの抗原は、多くのエピトープを有する；すなわち、これらは多価である。一般に、エピトープは、おおよそ約10アミノ酸および／または糖のサイズである。好ましくは、エピトープは、約4～18アミノ酸、より好ましくは約5～16アミノ酸、さらにより最も好ましくは6～14アミノ酸、より好ましくは約7～12、そして、最も好ましくは約8～10アミノ酸である。一般には、分子の特定の直鎖状配列よりも全体の三次元構造が抗原の特異性の主な基準であること、それゆえ、これによってあるエピトープが別のエピトープと区別されることを、当業者は理解する。本開示に基づいて、本発明で用いられるペプチドは、エピトープであることができる。

30

40

【0132】

本明細書において用いられる場合、「外因性」という用語は、生物、細胞、組織もしくは系の外部から導入されるか、またはそれらの外部で産生される、任意の材料をいう。

【0133】

本明細書において用いられる「増大する」という用語は、T細胞の数の増加のように、数が増加することをいう。一態様では、エクスピボで増大したT細胞は、培養物中に当初存在している数と比べて数が増加する。別の態様では、エクスピボで増大したT細胞は、培養物中の他の細胞型と比べて数が増加する。本明細書において用いられる「エクスピボ」という用語は、生物（例えば、ヒト）から取り出され、生物の外側で（例えば、培養皿、試験管、またはバイオリアクタ中で）繁殖させた細胞をいう。

50

【0134】

本明細書において用いられる「発現」という用語は、そのプロモーターによって駆動される特定のヌクレオチド配列の転写および／または翻訳と定義される。

【0135】

「発現ベクター」とは、発現されるべきヌクレオチド配列に機能的に連結された発現制御配列を含む組み換えポリヌクレオチドを含むベクターをいう。発現ベクターは、発現のために十分なシス作用性エレメントを含み；発現のための他のエレメントは、宿主細胞によって、またはインビトロ発現系において供給されることができる。発現ベクターには、組み換えポリヌクレオチドを組み入れたコスミド、プラスミド（例えば、裸のもの、またはリボソーム中に含まれるもの）ならびにウイルス（例えば、センダイウイルス、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス）のような、当技術分野において公知のすべてのものが含まれる。

10

【0136】

本明細書において用いられる「同一性」とは、2つのポリマー分子間の、特に2つのポリペプチド分子間のような2つのアミノ酸分子間のサブユニット配列の同一性をいう。2つのアミノ酸配列が同じ位置に同じ残基を有する場合；例えば、2つのポリペプチド分子の各々における位置がアルギニンによって占有されているなら、それらはその位置で同一である。2つのアミノ酸配列がアライメントにおいて同じ位置に同じ残基を有する同一性または程度は、百分率として表現されることが多い。2つのアミノ酸配列間の同一性は、一致しているまたは同一である位置の数の一次関数である；例えば、2つの配列における位置の半分（例えば、10アミノ酸長のポリマーにおける5つの位置）が同一であるなら、2つの配列は50%同一であり；位置の90%（例えば、10中9）が一致しているまたは同一であるなら、2つのアミノ酸配列は90%同一である。

20

【0137】

本明細書において用いられる「免疫応答」という用語は、リンパ球が抗原分子を異物と同定し、抗体の形成を誘導し、かつ／またはリンパ球を活性化して抗原を除去する場合に起きる、抗原に対する細胞応答と定義される。

【0138】

「免疫抑制」という用語は、本明細書において免疫応答全体を低減することを指すために使用される。

30

【0139】

「単離された」とは、天然の状態から変えられたまたは取り出されたことを意味する。例えば、生きている動物に天然に存在する核酸またはペプチドは「単離されて」いないが、その天然状態の共存物質から部分的にまたは完全に分離された同じ核酸またはペプチドは「単離されて」いる。単離された核酸またはタンパク質は、実質的に精製された形態で存在することができ、または例えば、宿主細胞のような、非天然環境で存在することができる。

【0140】

本明細書において用いられる「レンチウイルス」とは、レトロウイルス科（Retroviridae）ファミリーの属をいう。レンチウイルスは、非分裂細胞に感染できるという点で、レトロウイルスの中でも独特である；それらはかなりの量の遺伝情報を宿主細胞のDNA中に送達することができるため、それらは遺伝子送達ベクターの最も効率的な方法の1つである。HIV、SIVおよびFIVはすべて、レンチウイルスの例である。レンチウイルスに由来するベクターは、インビボで有意なレベルの遺伝子移入を達成するための手段を与える。

40

【0141】

本明細書において用いられる用語「改変された」とは、本発明の分子または細胞の変化した状態または構造を意味する。分子は化学的に、構造的に、および機能的になど、多くの方法で改変され得る。細胞は、核酸の導入によって改変され得る。

【0142】

50

本明細書において用いられる用語「モジュレートする」とは、処置もしくは化合物の非存在下での対象における応答のレベルと比較して、および／または他の点では同一であるが処置を受けていない対象における応答のレベルと比較して、対象における応答のレベルの検出可能な増加または減少を媒介することを意味する。この用語は、対象、好ましくはヒトにおいて、天然のシグナルもしくは応答を攪乱させ、かつ／またはそれに影響を与え、それにより有益な治療応答を媒介することを包含する。

【0143】

本発明の文脈において、一般的に存在する核酸塩基に関する以下の略語が用いられる。「A」はアデノシンをいい、「C」はシトシンをいい、「G」はグアノシンをいい、「T」はチミジンをいい、そして「U」はウリジンをいう。

10

【0144】

「オリゴヌクレオチド」という用語は、典型的には、短いポリヌクレオチドのことを指す。ヌクレオチド配列がDNA配列（すなわち、A、T、C、G）によって表される場合、このヌクレオチド配列はRNA配列（すなわち、A、U、C、G）（「U」が「T」に置き換わる）も含むことが理解されよう。

【0145】

別途指定がなされないかぎり、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」は、互いに縮重したバージョンでありかつ同じアミノ酸配列をコードするすべてのヌクレオチド配列を含む。タンパク質またはRNAをコードするヌクレオチド配列という語句は、前記タンパク質をコードするヌクレオチド配列が、あるバージョンにおいてイントロンを含有し得るかぎり、イントロンも含み得る。

20

【0146】

免疫原性組成物の「非経口」投与は、例えば、皮下（s.c.）、静脈内（i.v.）、筋肉内（i.m.）、もしくは胸骨内注射、または注入技術を含む。

【0147】

本明細書において用いられる「ポリヌクレオチド」という用語は、ヌクレオチドの鎖と定義される。さらに、核酸はヌクレオチドのポリマーである。したがって、本明細書において用いられる核酸およびポリヌクレオチドは互換的である。当業者は、核酸がポリヌクレオチドであり、それらは単量体「ヌクレオチド」に加水分解することができるという一般知識を有する。単量体ヌクレオチドは、ヌクレオシドに加水分解することができる。本明細書において用いられる場合、ポリヌクレオチドには、非限定的に、組み換え手段、すなわち通常のクローニング技術およびPCRなどを用いた組み換えライブラリーまたは細胞ゲノムからの核酸配列のクローニングを含む、当技術分野において利用可能な任意の手段により、ならびに合成手段により得られるすべての核酸配列が含まれるが、それに限定されるわけではない。

30

【0148】

本明細書において用いられる場合、「ペプチド」、「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、互換的に用いられ、ペプチド結合によって共有結合されたアミノ酸残基で構成される化合物をいう。タンパク質またはペプチドは、少なくとも2つのアミノ酸を含まなくてはならず、タンパク質またはペプチドの配列を構成することができるアミノ酸の最大数に制限はない。ポリペプチドには、ペプチド結合によって相互につなが合わされた2つまたはそれよりも多いアミノ酸を含む任意のペプチドまたはタンパク質が含まれる。本明細書において用いられる場合、この用語は、例えば、当技術分野において一般的にはペプチド、オリゴペプチドおよびオリゴマーともいわれる短鎖と、当技術分野において一般にタンパク質といわれる長鎖の両方をいい、その中には多くのタイプがある。「ポリペプチド」には、とりわけ、例えば、生物学的に活性なフラグメント、実質的に相同なポリペプチド、オリゴペプチド、ホモ二量体、ヘテロ二量体、ポリペプチドのバリエーション、修飾ポリペプチド、誘導体、類似体、融合タンパク質が含まれる。ポリペプチドには、天然ペプチド、組み換えペプチド、合成ペプチド、またはそれらの組み合わせが含まれる。

40

50

【0149】

抗体に関して本明細書において用いられる用語「特異的に結合する」とは、特異的抗原を認識するが、試料中の他の分子を実質的に認識またはそれと結合しない抗体を意味する。例えば、1つの種由来の抗原に特異的に結合する抗体が、1つまたは複数の種由来のその抗原にも結合する場合がある。しかし、そのような異種間反応性はそれ自体で、特異的としての抗体の分類を変化させることはない。別の例において、抗原に特異的に結合する抗体が、その抗原の異なる対立遺伝子型にも結合する場合がある。しかし、そのような交差反応性はそれ自体で、特異的としての抗体の分類を変化させることはない。場合によっては、「特異的結合」または「特異的に結合する」という用語を、抗体、タンパク質またはペプチドと第2の化学種との相互作用に関連して用いて、相互作用が化学種上の特定の構造（例えば、抗原決定基またはエピトープ）の存在に依存することを意味することができる；例えば、抗体は、タンパク質全体ではなく特定のタンパク質構造を認識し、それに結合する。抗体がエピトープ「A」に特異的であるなら、標識された「A」およびその抗体を含む反応物中にエピトープAを含む分子（または遊離した、標識されていないA）が存在することにより、その抗体に結合した標識されたAの量が低減するであろう。

10

【0150】

「刺激」という用語は、刺激分子（例えば、TCR/CD3複合体）がその同族リガンドと結合し、それによって、非限定的に、TCR/CD3複合体を介するシグナル伝達のような、シグナル伝達事象を媒介することにより誘導される一次応答を意味する。刺激は、TGF-βのダウンレギュレーション、および／または細胞骨格構造の再編成などのような、ある特定の分子の発現の変化を媒介することができる。

20

【0151】

「刺激分子」とは、この用語が本明細書において用いられる場合、抗原提示細胞上に存在する同族刺激リガンドと特異的に結合する、T細胞上の分子を意味する。

【0152】

本明細書において用いられる「刺激リガンド」は、抗原提示細胞（例えば、aAPC、樹状細胞、B細胞など）に存在する場合、T細胞上の同族結合パートナー（本明細書において「刺激分子」といわれる）と特異的に結合でき、それによって、活性化、免疫応答の開始、増殖などを含むが、それに限定されるわけではない、T細胞による一次応答を媒介するリガンドを意味する。刺激リガンドは当技術分野において周知であり、とりわけ、ペプチドが負荷されたMHCクラスI分子、抗CD3抗体、スーパーアゴニスト抗CD28抗体、およびスーパーアゴニスト抗CD2抗体を包含する。

30

【0153】

「対象」という用語は、免疫応答を誘発することができる生物（例えば、哺乳動物）を含むよう意図される。本明細書において用いられる「対象」または「患者」は、ヒトまたは非ヒト哺乳動物であり得る。非ヒト哺乳動物には、例えば、ヒツジ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコおよびマウス哺乳動物、ならびにサルおよび非ヒト霊長類哺乳動物などの、家畜およびペットが含まれる。好ましくは、対象はヒトである。

【0154】

「標的部位」または「標的配列」とは、結合が起きるのに十分な条件の下で結合分子が特異的に結合し得る核酸の一部分を規定する核酸配列をいう。いくつかの態様では、標的配列は、結合が起こるのに十分な条件下で結合分子が特異的に結合し得る核酸の一部を規定するゲノム核酸配列のことを指す。

40

【0155】

本明細書において使用される場合、「T細胞受容体」または「TCR」という用語は、抗原の提示に応答してT細胞の活性化に関与する膜タンパク質の複合体のことを指す。TCRは、主要組織適合性複合体分子に結合した抗原を認識する役割を担う。TCRは、アルファ（α）およびベータ（β）鎖のヘテロ二量体から構成されるが、一部の細胞では、TCRはガンマおよびデルタ（γ/δ）鎖からなる。TCRは、構造的に類似しているが異なる解剖学的位置および機能を有する、アルファ/ベータおよびガンマ/デルタ形態で存在し

50

得る。各鎖は、2つの細胞外ドメイン、すなわち可変ドメインおよび定常ドメインから構成される。いくつかの態様では、TCRは、TCRを含む任意の細胞（例えば、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、メモリーT細胞、制御性T細胞、ナチュラルキラーT細胞、およびガンマデルタT細胞を含む）上で改変され得る。

【0156】

本明細書において用いられる「治療的」という用語は、処置および／または予防を意味する。治療効果は、疾患状態の抑制、寛解または根絶によって得られる。

【0157】

本明細書において用いられる「トランスフェクションされた」または「形質転換された」または「形質導入された」という用語は、外因性核酸が宿主細胞に移入または導入される過程をいう。「トランスフェクションされた」または「形質転換された」または「形質導入された」細胞は、外因性核酸でトランスフェクションされた、形質転換された、または形質導入されたものである。この細胞には初代対象細胞およびその子孫が含まれる。

【0158】

疾患を「処置する」とは、この用語が本明細書において用いられる場合、対象が被っている疾患または障害の少なくとも1つの徴候または症状の頻度または重症度を低減することを意味する。

【0159】

「ベクター」は、単離された核酸を含み、かつ単離された核酸を細胞の内部に送達するために使用できる材料の組成物である。直鎖状ポリヌクレオチド、イオン性または両親媒性化合物と結び付いたポリヌクレオチド、プラスミドおよびウイルスを含むが、それに限定されるわけではない、多数のベクターが当技術分野において公知である。したがって、「ベクター」という用語は、自律的に複製するプラスミドまたはウイルスを含む。この用語はまた、例えばポリリシン化合物、リポソームなどのような、細胞内への核酸の移入を容易にする非プラスミド性および非ウイルス性の化合物を含むと解釈されるべきである。ウイルスベクターの例としては、センダイウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターなどが挙げられるが、それに限定されるわけではない。

【0160】

範囲：本開示の全体を通じて、本発明の様々な局面を範囲の形式で提示することができる。範囲の形式の記述は、単に便宜および簡略化のためのものであり、本発明の範囲に対する柔軟性のない制限と解釈されるべきではないことが理解されるべきである。したがって、範囲の記述は、可能なすべての部分範囲およびその範囲内の個々の数値を具体的に開示したものとみなされるべきである。例えば、1～6のような範囲の記述は、1～3、1～4、1～5、2～4、2～6、3～6などのような部分範囲、ならびにその範囲内の個々の数、例えば、1、2、2.7、3、4、5、5.3および6を具体的に開示したものとみなされるべきである。これは、範囲の幅に関係なく適用される。

【0161】

B. キメラ抗原受容体

本発明は、CCR4に結合可能なキメラ抗原受容体（CAR）を含む組成物および方法を提供する。本発明のCARは、抗CCR4抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインを含む。ある特定の態様では、抗CCR4抗原結合ドメインは、抗CCR4 scFvである。いくつかの態様では、CARは、抗CCR4 scFv、膜貫通ドメイン、4-1BB共刺激性ドメイン、およびCD3ζシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様では、CARは、リーダー配列およびヒンジドメインをさらに含む。好ましい態様では、抗CCR4 scFvは、モガムリズマブに由来する重鎖および軽鎖を有する。

【0162】

また、CARを含む、改変免疫細胞またはその前駆体、例えば、改変T細胞のための組成物および方法も提供される。したがって、いくつかの態様では、免疫細胞は、CARを発現するように遺伝子改変されている。CARをコードする核酸、前記核酸を含むベクター

、および前記CAR、ベクターまたは核酸を含む改変細胞（例えば、改変T細胞）も提供される。ある特定の態様では、核酸は、抗CCR4抗原結合ドメインと膜貫通ドメインと細胞内ドメインとを含むCARをコードし、セーフティスイッチ物質が投与されたときに対象においてCAR T細胞枯渇を誘導するためのセーフティスイッチをさらにコードする。CARは、P2AまたはT2A配列などの本明細書に記載されるような2A自己切断配列を介して、セーフティスイッチに連結され得る。一態様では、セーフティスイッチは、短縮型EGFR（EGFRt）であり、セーフティスイッチ物質は、セツキシマブなどの抗EGFR抗体である。一態様では、セーフティスイッチは、CD20であり、セーフティスイッチ物質は、リツキシマブなどの抗CD20抗体である。一態様では、セーフティスイッチは、誘導性カスパーゼ9（iCasp9）であり、セーフティスイッチ物質は、AP1903などの二量体化薬である。一態様では、セーフティスイッチは、単純ヘルペスウイルス1型チミジンキナーゼ（HSVTK）であり、セーフティスイッチ物質は、ガンシクロビル（GCV）である。

10

20

30

40

50

【0163】

ある特定の態様では、CAR連結セーフティスイッチは、ドミナントネガティブTGFb受容体II型（dnTGFbRII）をさらに含む。いくつかの態様では、CAR連結セーフティスイッチのCARは、dnTGFbRIIに、例えば、P2AまたはT2A配列などの本明細書に記載されるような2A自己切断配列を介して連結される。いくつかの態様では、CAR連結セーフティスイッチのセーフティスイッチは、dnTGFbRIIに、例えば、P2AまたはT2A配列などの本明細書に記載されるような2A自己切断配列を介して連結される。いくつかの態様では、CAR連結セーフティスイッチのCARおよびセーフティスイッチは、各々、dnTGFbRIIに、例えば、P2AまたはT2A配列などの本明細書に記載されるような2A自己切断配列を介して連結される。いくつかの態様では、CAR連結セーフティスイッチは、抗CCR4 CAR、HSVTKセーフティスイッチ、およびdnTGFbRIIを含み、抗CCR4 CAR、HSVTK、およびdnTGFbRIIは、CAR連結セーフティスイッチのN末端からC末端へ任意の順序で存在し得る。

【0164】

CARの抗原結合ドメインは、細胞における発現のために、各々本明細書の他の箇所に記載されるヒンジ、膜貫通ドメインまたは細胞内ドメインなどの、CARの別のドメインに機能的に連結される。一態様では、抗原結合ドメインをコードする第1の核酸配列は、ヒンジおよび／または膜貫通ドメインをコードする第2の核酸に機能的に連結され、さらに、細胞内ドメインをコードする第3の核酸配列に機能的に連結される。

【0165】

本明細書に記載される抗原結合ドメインは、本明細書に記載される膜貫通ドメインのいずれか、本明細書に記載される細胞内ドメインもしくは細胞質ドメインのいずれか、または本発明のCAR中に含まれ得る本明細書に記載される他のドメインのいずれかと組み合わせることができる。本発明のCARはまた、本明細書に記載されるようなリーダー配列も含み得る。本発明のCARはまた、本明細書に記載されるようなヒンジドメインも含み得る。本発明のCARはまた、CARの1つのドメインを次のドメインに連結する役割を果たし得る本明細書に記載されるような1つまたは複数のスペーサドメインまたはリンカーも含み得る。

【0166】

抗原結合ドメイン

CARの抗原結合ドメインは、タンパク質、炭水化物および糖脂質を含む特定の標的抗原に結合するためのCARの細胞外領域である。本発明のCARは、CCR4に結合可能である抗原結合ドメインを含む。

【0167】

抗原結合ドメインは、抗原に結合する任意のドメインを含むことができ、モノクローナル抗体（mAb）、ポリクローナル抗体、合成抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、非ヒト抗体、単ドメイン抗体、完全長抗体またはそのいずれかの抗原結合断片、Fab、および単鎖可変断片（scFv）を含み得るが、それらに限定されない。いくつかの態様では、抗原結

合ドメインは、脱グリコシル化抗体またはその断片もしくはそのscFvを含む。ある特定の態様では、抗原結合ドメインは、脱フコシル化ヒト化抗CCR4 mAbを含む。ある特定の態様では、抗原結合ドメインは、モガムリズマブに由来する重鎖および軽鎖を有するscFvである。

【0168】

本明細書において使用される場合、「単鎖可変断片」または「scFv」という用語は、VH：：VLヘテロ二量体を形成するように共有結合で連結された、免疫グロブリン（例えば、マウスまたはヒト）の重鎖可変領域（VH）および軽鎖可変領域（VL）の融合タンパク質である。可変の重鎖（VH）と軽鎖（VL）は、直接的に接合されるか、またはVHのN末端をVLのC末端と接続するもしくはVHのC末端をVLのN末端と接続するペプチドリンカーによって接合されるかのいずれかである。いくつかの態様では、抗原結合ドメイン（例えば、CCR4結合ドメイン）は、N末端からC末端へVH－リンカー－VLという配置を有するscFvを含む。いくつかの態様では、抗原結合ドメインは、N末端からC末端へVL－リンカー－VHという配置を有するscFvを含む。当業者は、本発明において使用するための適切な配置を選択できるであろう。

【0169】

リンカーは、通常、可動性のためにグリシンリッチであるだけでなく、溶解性のためにセリンまたはトレオニンリッチでもある。リンカーは、細胞外抗原結合ドメインの重鎖可変領域と軽鎖可変領域とを連結することができる。リンカーの非限定例は、Shen et al., Anal. Chem. 80(6):1910-1917 (2008)およびWO 2014/087010に開示されており、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。様々なリンカー配列が当技術分野において公知であり、非限定的に、グリシンセリン(GS)リンカー、例えば、(GS)_n、(SG)_n、(GSGGS)_n (SEQ ID NO: 115)、(GGGS)_n (SEQ ID NO: 116)、および(GGGGS)_n (SEQ ID NO: 117)を含み、ここで、nは、少なくとも1の整数を表す。例示的なリンカー配列は、GGSG (SEQ ID NO: 118)、GGSGG (SEQ ID NO: 119)、GSGSG (SEQ ID NO: 120)、GSGGG (SEQ ID NO: 121)、GGGSG (SEQ ID NO: 122)、GSSSG (SEQ ID NO: 123)、GGGGS (SEQ ID NO: 124)、GGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 125)などを非限定的に含むアミノ酸配列を含むことができる。当業者は、本発明において使用するための適切なリンカー配列を選択できるであろう。一態様では、本発明の抗原結合ドメインは、重鎖可変領域（VH）および軽鎖可変領域（VL）を含み、VHおよびVLは、核酸配列 GGAGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGAAGCGGGGAGGAGGTTCCGCGGCGGAGGATCA (SEQ ID NO: 126)

によってコードされ得るアミノ酸配列GGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 125)を有するリンカー配列によって隔てられる。

【0170】

定常領域の除去およびリンカーの導入にもかかわらず、scFvタンパク質は、元の免疫グロブリンの特異性を保持する。単鎖Fvポリペプチド抗体は、Hustonら (Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883, 1988) によって記載されているように、VHコード配列およびVLコード配列を含む核酸から発現させることができる。また、米国特許第5,091,513号、同第5,132,405号および同第4,956,778号；ならびに米国特許公開番号20050196754および20050196754も参照されたい。阻害活性を有するアンタゴニスト性scFvが記載されている（例えば、Zhao et al., Hybridoma (Larchmt) 2008 27(6):455-51; Peter et al., J Cachexia Sarcopenia Muscle 2012 August 12; Shieh et al., J Immunol 2009 183(4):2277-85; Giomarelli et al., Thromb Haemost 2007 97(6):955-63; Fife et al., J Clin Invest 2006 116(8):2252-61; Brocks et al., Immunotechnology 1997 3(3):173-84; Moosmay et al., Ther Immunol 1995 2(10):31-40)を参照のこと）。刺激活性を有する

アゴニスト性scFvが記載されている（例えば、Peter et al., J Bioi Chem 2003 25 278(38):36740-7 ; Xie et al., Nat Biotech 1997 15(8):768-71 ; Ledbetter et al., Crit Rev Immunol 1997 17(5-6):427-55 ; Ho et al., BioChim Biophys Acta 2003 1638(3):257-66を参照のこと）。

【0171】

本明細書において使用される場合、「Fab」は、抗原に結合するが一価であってFc部分を有しない抗体構造の断片のことを指し、例えば、酵素パインによって消化された抗体は、2つのFab断片およびFc断片（例えば、重（H）鎖定常領域；抗原に結合しないFc領域）を生じる。

【0172】

本明細書において使用される場合、「F(ab')₂」は、IgG抗体全体のペプシン消化によって生成される抗体断片のことを指し、この断片は、2つの抗原結合(ab')（二価）領域を有し、ここで、各(ab')領域は、抗原に結合するためのS-S結合によって連結されたH鎖の一部および軽（L）鎖という2つの別々のアミノ酸鎖を含み、残ったH鎖部分は、一緒に連結している。「F(ab')₂」断片は、2つの個別のFab'断片に分割することができる。

【0173】

いくつかの態様では、抗原結合ドメインは、CARが最終的に使用される種と同じ種に由来し得る。例えば、ヒトにおいて使用するために、CARの抗原結合ドメインは、ヒト抗体またはその断片を含み得る。いくつかの態様では、抗原結合ドメインは、CARが最終的に使用される種と異なる種に由来し得る。例えば、ヒトにおいて使用するために、CARの抗原結合ドメインは、マウス抗体もしくはその断片、またはヒト化マウス抗体もしくはその断片を含み得る。

【0174】

ある特定の態様では、抗原結合ドメインは、3つの重鎖相補性決定領域（HCDR）を含む重鎖可変領域および3つの軽鎖相補性決定領域（LCDR）を含む軽鎖可変領域を含む。ある特定の態様では、HCDR1は、SEQ ID NO：2のアミノ酸配列を含み、かつ／または、HCDR2は、SEQ ID NO：4のアミノ酸配列を含み、かつ／または、HCDR3は、SEQ ID NO：6のアミノ酸配列を含む、および／または、LCDR1は、SEQ ID NO：8のアミノ酸配列を含み、かつ／または、LCDR2は、SEQ ID NO：10のアミノ酸配列を含み、かつ／または、LCDR3は、SEQ ID NO：12のアミノ酸配列を含む。

【0175】

ある特定の態様では、抗原結合ドメインの重鎖可変領域（VH）は、SEQ ID NO：11と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含み、かつ／または、軽鎖可変領域（VL）は、SEQ ID NO：114と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0176】

ある特定の態様では、抗原結合ドメインは、SEQ ID NO：16と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む単鎖可変断片（scFv）である。

【0177】

ある特定の態様では、抗原結合ドメインは、リンカーを含む。ある特定の態様では、リンカーは、SEQ ID NO：125を含む。

【0178】

抗原結合ドメイン配列の許容可能な変形は、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、抗原結合ドメインは、SEQ ID NO：2、4、6、8、10、12、16、112、114、および125のいずれか1つに示されるアミノ酸配列のいずれか1つとの少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少

10

20

30

40

50

なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0179】

膜貫通ドメイン

本発明のCARは、CARの抗原結合ドメインをCARの細胞内ドメインに接続する膜貫通ドメインを含み得る。CARの膜貫通ドメインは、細胞（例えば、免疫細胞またはその前駆体）の原形質膜を貫通可能な領域である。膜貫通ドメインは、細胞膜、例えば、真核生物の細胞膜への挿入のためのものである。いくつかの態様では、膜貫通ドメインは、CARの抗原結合ドメインと細胞内ドメインとの間に介在する。

10

【0180】

いくつかの態様では、膜貫通ドメインは、CAR中のドメインのうちの1つまたは複数と天然に会合する。いくつかの態様では、膜貫通ドメインは、受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小にするために、そのようなドメインが同じまたは異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインに結合するのを避けるように、選択することができるか、または1つもしくは複数のアミノ酸置換によって修飾することができる。

【0181】

膜貫通ドメインは、天然または合成のいずれかの供給源に由来し得る。供給源が天然物である場合、ドメインは、任意の膜結合または膜貫通タンパク質、例えば、I型膜貫通タンパク質に由来し得る。供給源が合成物である場合、膜貫通ドメインは、細胞膜へのCARの挿入を容易にする任意の人工配列、例えば、人工疎水性配列であり得る。本発明において特に有用な膜貫通ドメインの例は、非限定的に、T細胞受容体のアルファ、ベータ、もしくはゼータ鎖、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD7、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134（OX-40）、CD137（4-1BB）、CD154（CD40L）、ICOS、CD278、Toll様受容体1（TLR1）、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9に由来する膜貫通ドメイン（すなわち、少なくともその膜貫通領域を含む）、またはキラー免疫グロブリン様受容体（KIR）に由来する膜貫通ドメインを含む。

20

【0182】

ある特定の態様では、膜貫通ドメインは、CD8の膜貫通ドメインを含む。ある特定の態様では、CD8の膜貫通ドメインは、CD8 α の膜貫通ドメインである。ある特定の態様では、膜貫通ドメインは、SEQ ID NO：36に示されるアミノ酸配列を含む。

30

【0183】

いくつかの態様では、膜貫通ドメインは、合成物であり得るが、この場合、膜貫通ドメインは、ロイシンおよびバリンなどの主に疎水性の残基を含む。好ましくは、合成の膜貫通ドメインの各端にフェニルアラニン、トリプトファンおよびバリンの三つ組が見いだされる。

【0184】

本明細書に記載される膜貫通ドメインは、本明細書に記載される抗原結合ドメインのいずれか、本明細書に記載される細胞内ドメインのいずれか、またはCARに含まれ得る本明細書に記載される他のドメインのいずれかと組み合わせることができる。

40

【0185】

いくつかの態様では、膜貫通ドメインは、ヒンジ領域をさらに含む。本発明のCARはまた、ヒンジ領域も含み得る。CARのヒンジ領域は、抗原結合ドメインと膜貫通ドメインとの間に位置する親水性領域である。いくつかの態様では、このドメインは、CARのための適切なタンパク質フォールディングを容易にする。ヒンジ領域は、CARのための任意の成分である。ヒンジ領域は、抗体のFc断片、抗体のヒンジ領域、抗体のCH2領域、抗体のCH3領域、人工ヒンジ配列、またはそれらの組み合わせから選択されるドメインを含み得る。ヒンジ領域の例は、非限定的に、CD8 α ヒンジ、3つのグリシン（Gly）ほどの小さなものであり得るポリペプチドから構成される人工ヒンジ、ならびにIgG（ヒ

50

トIgG4など)のCH1およびCH3ドメインを含む。

【0186】

いくつかの態様では、本開示のCARは、抗原結合ドメインを膜貫通ドメインと接続してこれを次いで細胞内ドメインに接続する、ヒンジ領域を含む。ヒンジ領域は、好ましくは、抗原結合ドメインが標的細胞上の標的抗原を認識してこれに結合するように支援することができる(例えば、Hudecek et al., Cancer Immunol. Res. (2015) 3(2): 125-135を参照のこと)。いくつかの態様では、ヒンジ領域は、可動性ドメインであり、したがって、それにより、抗原結合ドメインは、腫瘍細胞などの細胞上の標的抗原の特異的な構造および密度を最適に認識する構造を有することが可能となる(Hudecek et al., 上記)。ヒンジ領域の可動性は、ヒンジ領域が多く異なる立体構造を採用することを許容する。

10

【0187】

いくつかの態様では、ヒンジ領域は、免疫グロブリン重鎖ヒンジ領域である。いくつかの態様では、ヒンジ領域は、受容体に由来するヒンジ領域ポリペプチド(例えば、CD8由来ヒンジ領域)である。ある特定の態様では、ヒンジ領域は、CD8 α ヒンジである。ある特定の態様では、ヒンジ領域は、SEQ ID NO: 34に示されるアミノ酸配列を含む。

【0188】

ヒンジ領域は、約4個のアミノ酸～約50個のアミノ酸、例えば、約4個のaa～約10個のaa、約10個のaa～約15個のaa、約15個のaa～約20個のaa、約20個のaa～約25個のaa、約25個のaa～約30個のaa、約30個のaa～約40個のaa、または約40個のaa～約50個のaaの長さを有することができる。いくつかの態様では、ヒンジ領域は、5個超のaa、10個超のaa、15個超のaa、20個超のaa、25個超のaa、30個超のaa、35個超のaa、40個超のaa、45個超のaa、50個超のaa、55個超のaa、またはそれ以上の長さを有することができる。

20

【0189】

好適なヒンジ領域は、容易に選択することができ、そして、4個のアミノ酸～10個のアミノ酸、5個のアミノ酸～9個のアミノ酸、6個のアミノ酸～8個のアミノ酸、または7個のアミノ酸～8個のアミノ酸も含めて、1個のアミノ酸(例えば、Gly)～20個のアミノ酸、2個のアミノ酸～15個のアミノ酸、3個のアミノ酸～12個のアミノ酸などのいくつかの好適な長さのいずれであってもよく、1、2、3、4、5、6、または7個のアミノ酸であることができる。好適なヒンジ領域は、20個超のアミノ酸(例えば、30、40、50、60個またはそれ以上のアミノ酸)の長さを有することができる。

30

【0190】

例えば、ヒンジ領域は、グリシンポリマー(G)_n、グリシン-セリンポリマー(例えば、(GS)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO: 115)および(GGGGS)_n(SEQ ID NO: 116)を含み、式中、nは、少なくとも1の整数である)、グリシン-アラニンポリマー、アラニン-セリンポリマー、および当技術分野において公知の他の可動性リンカーを含む。グリシンポリマーおよびグリシン-セリンポリマーを使用することができる; GlyとSerは共に、それほど構造化されておらず、それゆえ、成分間の中立的テザー(neutral tether)としての役割を果たすことができる。グリシンポリマーを使用することができる; グリシンは、同等なアラニンよりも顕著にphi-psi空間に接近し、より長い側鎖を有する残基よりもはるかに制限は少ない(例えば、Scheraga, Rev. Computational. Chem. (1992) 2: 73-142を参照のこと)。例示的なヒンジ領域は、(GGGGS)_n(SEQ ID NO: 117)、GSGG(SEQ ID NO: 118)、GSGGG(SEQ ID NO: 119)、GSGSG(SEQ ID NO: 120)、GSGGG(SEQ ID NO: 121)、GGGSG(SEQ ID NO: 122)、GSSSG(SEQ ID NO: 123)、GGGGS(SEQ ID NO: 124)などを含むがそれらに限定されないアミノ酸配列を含むことができる。

40

【0191】

いくつかの態様では、ヒンジ領域は、免疫グロブリン重鎖ヒンジ領域である。免疫グロブリンヒンジ領域アミノ酸配列は、当技術分野において公知である; 例えば、Tan et al

50

., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87(1):162-166 ; および Huck et al., Nucleic Acids Res. (1986) 14(4): 1779-1789を参照されたい。非限定例として、免疫グロブリンヒンジ領域は、以下のアミノ酸配列：

DKTHT (SEQ ID NO:132); CPPC (SEQ ID NO:133);

CPEPKSCDTPPPCPR (SEQ ID NO:134) (例えば、Glaser et al., *J. Biol. Chem.* (2005) 280:41494-41503を参照のこと); ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO:135); KSCDKTHTTCP (SEQ ID NO:136); KCCVDCP (SEQ ID NO:137); KYGPPCP (SEQ ID NO:138); EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:139) (ヒトIgG1ヒンジ); ERKCCVECP (SEQ ID NO:140) (ヒトIgG2ヒンジ); ELKTPLGDTTHTCPRCP (SEQ ID NO:141) (ヒトIgG3ヒンジ); SPNMVPHAHHAQ (SEQ ID NO:142) (ヒトIgG4ヒンジ)

10

など、のうちの1つを含むことができる。

【0192】

ヒンジ領域は、ヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4ヒンジ領域のアミノ酸配列を含むことができる。一態様では、ヒンジ領域は、野生型（天然に存在する）ヒンジ領域と比較して1つまたは複数のアミノ酸置換および／または挿入および／または欠失を含むことができる。例えば、ヒンジ領域が、配列 EPKSCDKTYTCPPCP (SEQ ID NO: 143)

20

を含むように、ヒトIgG1ヒンジのHis229をTyrで置換することができる；例えば、Yan et al., *J. Biol. Chem.* (2012) 287: 5891-5897を参照されたい。一態様では、ヒンジ領域は、ヒトCD8に由来するアミノ酸配列、またはそのバリエーションを含むことができる。

【0193】

細胞内シグナル伝達ドメイン

本発明のCARはまた、細胞内シグナル伝達ドメインも含む。「細胞内シグナル伝達ドメイン」および「細胞内ドメイン」という用語は、本明細書において互換的に使用される。CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、CARが発現される細胞（例えば、免疫細胞）のエフェクター機能のうちの少なくとも1つの活性化を担っている。細胞内シグナル伝達ドメインは、エフェクター機能シグナルを伝達し、細胞（例えば、免疫細胞）がその特殊な機能、例えば、標的細胞の損傷および／または破壊を遂行するように指示する。

30

【0194】

本発明において使用するための細胞内ドメインの例は、表面受容体の細胞質部分、共刺激性分子、およびT細胞においてシグナル伝達を開始するように協力して作用する任意の分子、ならびにこれらのエレメントの任意の誘導体またはバリエーションおよび同じ機能的な能力を有する任意の合成配列を含むが、それらに限定されない。

【0195】

細胞内シグナル伝達ドメインの例は、非限定的に、T細胞受容体複合体のζ鎖またはそのホモログのいずれか、例えば、η鎖、FcεRIγおよびβ鎖、MB1 (Igα) 鎖、B29 (Igγ) 鎖など、ヒトCD3ゼータ鎖、CD3ポリペプチド (Δ、δ、およびε)、sykファミリーチロシンキナーゼ (Syk、ZAP 70など)、srcファミリーチロシンキナーゼ (Lck、Fyn、Lynなど)、ならびにT細胞伝達に關与する他の分子、例えばCD2、CD5およびCD28を含む。一態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、ヒトCD3ゼータ鎖、FcγRIII、FcεRI、Fc受容体の細胞質尾部、免疫受容体活性化チロシンモチーフ (ITAM) を有する細胞質受容体、およびそれらの組み合わせであり得る。

40

【0196】

一態様では、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、CD2、CD3、CD8、CD27、CD

50

28、ICOS、4-1BB、PD-1、それらの任意の誘導体またはバリエーション、同じ機能的能力を有するそれらの任意の合成配列、およびそれらの任意の組み合わせからの少なくとも1つのシグナル伝達ドメインなどの、1つまたは複数の共刺激性分子の任意の部分を含む。

【0197】

細胞内ドメインの他の例には、TCR、CD3ゼータ、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD86、共通FcRガンマ、FcRベータ（FcイプシロンRib）、CD79a、CD79b、FcガンマRIIa、DAP10、DAP12、T細胞受容体（TCR）、CD8、CD27、CD28、4-1BB（CD137）、OX9、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、KIRファミリータンパク質、リンパ球機能関連抗原-1（LFA-1）、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83と特異的に結合するリガンド、CD5、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM（LIGHTR）、SLAMF7、NKp80（KLRF1）、CD127、CD160、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL2Rベータ、IL2Rガンマ、IL7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1（CD226）、SLAMF4（CD244、2B4）、CD84、CD96（Tactile）、CEACAM1、CRTAM、Ly9（CD229）、CD160（BY55）、PSGL1、CD100（SEMA4D）、CD69、SLAMF6（NTB-A、Ly108）、SLAM（SLAMF1、CD150、IPO-3）、BLAME（SLAMF8）、SELPLG（CD162）、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D、Toll様受容体1（TLR1）、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、本明細書に記載される他の共刺激分子、それらの任意の誘導体、バリエーション、またはフラグメント、同じ機能的能力を有する共刺激分子の任意の合成配列、およびそれらの任意の組み合わせを含むが、それに限定されるわけではない1つまたは複数の分子または受容体に由来するフラグメントまたはドメインが含まれる。

10

20

30

40

50

【0198】

細胞内ドメインの追加的な例には、非限定的に、CD3、B7ファミリー共刺激受容体および腫瘍壊死因子受容体（TNFR）スーパーファミリー受容体を含む第1、第2および第3世代のT細胞シグナル伝達タンパク質を非限定的に含む、数種類の様々な他の免疫シグナル伝達受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが含まれる（例えば、Park and Brentjens, J. Clin. Oncol. (2015) 33(6): 651-653を参照されたい）。追加的に、細胞内シグナル伝達ドメインは、NK細胞およびNKT細胞によって使用されるシグナル伝達ドメイン（例えば、Hermanson and Kaufman, Front. Immunol. (2015) 6: 195を参照されたい）、例えば、NKp30（B7-H6）（例えば、Zhang et al., J. Immunol. (2012) 189(5): 2290-2299を参照されたい）、およびDAP12（例えば、Topfer et al., J. Immunol. (2015) 194(7): 3201-3212を参照されたい）、NKG2D、NKp44、NKp46、DAP10、およびCD3zのシグナル伝達ドメインを含み得る。

【0199】

本発明のCARにおいて使用するために適した細胞内シグナル伝達ドメインは、CARの活性化（すなわち、抗原および二量体化剤によって活性化される）に反応して別個のかつ検出可能なシグナル（例えば、細胞による1つまたは複数のサイトカインの産生の増加；標的遺伝子の転写の変化；タンパク質の活性の変化；細胞挙動の変化、例えば、細胞死；細胞増殖；細胞分化；細胞生存；細胞シグナル伝達応答のモジュレーションなど）を提供する任意の所望のシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、以下に記載のような少なくとも1つ（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つなど）のITAMモチーフを含む。いくつかの態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、DAP10/CD28型シグナル伝達鎖を含む。いくつかの態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、膜結合CARに共有結合することなく、代わりに細胞質中に拡散される。

【0200】

本発明のCARにおいて使用するために適した細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫受

容体チロシン活性化モチーフ (ITAM) 含有細胞内シグナル伝達ポリペプチドを含む。いくつかの態様では、ITAMモチーフは、細胞内シグナル伝達ドメイン内で二度反復され、そこで、ITAMモチーフの第1および第2の例は、6〜8アミノ酸により互いに隔てられている。一態様では、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、3つのITAMモチーフを含む。

【0201】

いくつかの態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、非限定的に、Fcガンマリ、FcガンマRIIA、FcガンマRIIC、FcガンマRIIIA、FcRL5などの、免疫受容体チロシン活性化モチーフ (ITAM) を含有するヒト免疫グロブリン受容体のシグナル伝達ドメインを含む (例えば、Gillis et al., Front. Immunol. (2014) 5:254を参照されたい)。

10

【0202】

適切な細胞内シグナル伝達ドメインは、ITAMモチーフを含有するポリペプチドに由来する、ITAMモチーフ含有部分であることができる。例えば、適切な細胞内シグナル伝達ドメインは、任意のITAMモチーフ含有タンパク質由来のITAMモチーフ含有ドメインであることができる。したがって、適切な細胞内シグナル伝達ドメインは、それが由来するタンパク質全体の配列全体を含有する必要はない。適切なITAMモチーフ含有ポリペプチドの例は、DAP12、FCER1G (Fcイプシロン受容体Iガンマ鎖)、CD3D (CD3デルタ)、CD3E (CD3イプシロン)、CD3G (CD3ガンマ)、CD3Z (CD3ゼータ)、およびCD79A (抗原受容体複合体関連タンパク質アルファ鎖) を含むが、それに限定されるわけではない。

20

【0203】

一態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、DAP12 (TYROBP; TYROタンパク質チロシンキナーゼ結合タンパク質; KARAP; PLOSL; DNAX活性化タンパク質12; KAR関連タンパク質; TYROタンパク質チロシンキナーゼ結合タンパク質; キラー活性化受容体関連タンパク質; キラー活性化受容体関連タンパク質などとしても知られている) に由来する。一態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、FCER1G (FCRG; Fcイプシロン受容体Iガンマ鎖; Fc受容体ガンマ鎖; fc-イプシロンRI-ガンマ; fcRガンマ; fceRIガンマ; 高親和性免疫グロブリンイプシロン受容体サブユニットガンマ; 免疫グロブリンE受容体、高親和性ガンマ鎖などとしても知られている) に由来する。一態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、T細胞表面糖タンパク質CD3デルタ鎖 (CD3D; CD3-DELTA; T3D; CD3抗原、デルタサブユニット; CD3デルタ; CD3d抗原、デルタポリペプチド (TiT3複合体); OKT3、デルタ鎖; T細胞受容体T3デルタ鎖; T細胞表面糖タンパク質CD3デルタ鎖などとしても知られている) に由来する。一態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、T細胞表面糖タンパク質CD3イプシロン鎖 (CD3e、T細胞表面抗原T3/Leu-4イプシロン鎖、T細胞表面糖タンパク質CD3イプシロン鎖、A1504783、CD3、CD3イプシロン、T3eなどとしても知られている) に由来する。一態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、T細胞表面糖タンパク質CD3ガンマ鎖 (CD3G、T細胞受容体T3ガンマ鎖、CD3-GAMMA、T3G、ガンマポリペプチド (TiT3複合体) などとしても知られている) に由来する。一態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、T細胞表面糖タンパク質CD3ゼータ鎖 (CD3Z、T細胞受容体T3ゼータ鎖、CD247、CD3-ZETA、CD3H、CD3Q、T3Z、TCRZなどとしても知られている) に由来する。一態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD79A (B細胞抗原受容体複合体関連タンパク質アルファ鎖; CD79a抗原 (免疫グロブリン関連アルファ); MB-1膜糖タンパク質; ig-アルファ; 膜結合免疫グロブリン関連タンパク質; 表面IgM関連タンパク質などとしても知られている) に由来する。一態様では、本開示のFN3 CARにおいて使用するために適した細胞内シグナル伝達ドメインは、DAP10/CD28型シグナル伝達鎖を含む。一態様では、本開示のFN3 CARにおいて使用するために適した細胞内シグナル伝達ドメインは、ZAP70ポリペプチドを含む。いくつかの態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、TCRゼータ、FcRガンマ、FcRベータ、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD5、CD22、CD79a、CD79bまたはCD66dの細胞質シグナル伝達ドメインを含む。一態

30

40

50

様では、CAR中の細胞内シグナル伝達ドメインは、ヒトCD3ゼータの細胞質シグナル伝達ドメインを含む。

【0204】

通常、細胞内シグナル伝達ドメイン全体を用いることができるが、多くの場合、必ずしも鎖全体を使用する必要はない。細胞内シグナル伝達ドメインの切断型部分が使用される範囲内で、そのような切断型部分は、エフェクター機能シグナルを伝達するかぎり、無傷の鎖の代わりに使用され得る。細胞内シグナル伝達ドメインは、エフェクター機能シグナルを伝達するのに十分な細胞内シグナル伝達ドメインの任意の切断型部分を含む。

【0205】

本明細書に記載の細胞内ドメインを、本明細書に記載の抗原結合ドメインのいずれか、本明細書に記載の膜貫通ドメインのいずれか、またはCARに含まれ得る本明細書に記載の他のドメインのいずれかと組み合わせることができる。

【0206】

ある特定の態様では、細胞内ドメインは、4-1BBの共刺激性ドメインを含む。ある特定の態様では、4-1BBの共刺激性ドメインは、SEQ ID NO: 38に示されるアミノ酸配列を含む。ある特定の態様では、細胞内ドメインは、CD3ζまたはそのバリエーションの細胞内ドメインを含む。ある特定の態様では、CD3ζの細胞内ドメインは、SEQ ID NO: 40に示されるアミノ酸配列を含む。ある特定の態様では、細胞内ドメインは、4-1BBおよびCD3ζを含む。ある特定の態様では、細胞内ドメインは、SEQ ID NO: 38およびSEQ ID NO: 40に示されるアミノ酸配列を含む。

【0207】

個々のCARDメイン配列（リーダー、抗原結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通、および細胞内ドメイン）の許容可能な変形は、当業者に公知であろう。例えば、ある特定の態様では、CARDメインは、SEQ ID NO: 16、32、34、36、38、および40に示されるアミノ酸配列のいずれかとの少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0208】

一局面では、本発明は、抗CCR4抗原結合ドメインと膜貫通ドメインと細胞内ドメインとを含む、キメラ抗原受容体（CAR）を提供する。ある特定の態様では、CARは、SEQ ID NO: 30、54、62、70、82、90、および102のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、CARは、自己切断可能リンカーを介してセーフティスイッチに連結され、CAR連結セーフティスイッチは、SEQ ID NO: 42、52、60、68、76、88、および100に示されるアミノ酸配列のいずれか1つを含む。

【0209】

CAR配列およびCAR連結セーフティスイッチ配列の許容可能な変形は、当業者に公知であろう。例えば、ある特定の態様では、CARは、SEQ ID NO: 30、54、62、70、82、90、および102のいずれか1つに示されるアミノ酸配列との少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。ある特定の態様では、CAR連結セーフティスイッチは、SEQ ID NO: 42、52、60、68、76、88、および100に示されるアミノ酸配列のいずれか1つとの少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%

%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0210】

(表1)ヌクレオチドおよびアミノ酸配列

A. CCR4 CAR (枯渴系なし)	
SEQ ID NO: 1	CCR4(KW_L2H) HCDR1 –ヌクレオチド
aactacggca tgagc	15
SEQ ID NO: 2	CCR4(KW_L2H) HCDR1 –アミノ酸
NYGMS	5
SEQ ID NO: 3	CCR4(KW_L2H) HCDR2 –ヌクレオチド
acaatcagca gcgccagcac ctacagctac taccccgata gcgtgaaggg c	51
SEQ ID NO: 4	CCR4(KW_L2H) HCDR2 –アミノ酸
TISSASTYSY YPDSVKG	17
SEQ ID NO: 5	CCR4(KW_L2H) HCDR3 –ヌクレオチド
cacagcgacg gcaacttcgc ctttggtat	30
SEQ ID NO: 6	CCR4(KW_L2H) HCDR3 –アミノ酸
HSDGNFAFGY	10
SEQ ID NO: 7	CCR4(KW_L2H) LCDR1 –ヌクレオチド
agatccagcc ggaacatcgt gcacatcaac ggcgacacct acctggaa	48
SEQ ID NO: 8	CCR4(KW_L2H) LCDR1 –アミノ酸
RSSRNIVHIN GDTYLE	16
SEQ ID NO: 9	CCR4(KW_L2H) LCDR2 –ヌクレオチド
aaggtgtcca accggttcag c	21
SEQ ID NO: 10	CCR4(KW_L2H) LCDR2 –アミノ酸
KVSNRFS	7
SEQ ID NO: 11	CCR4(KW_L2H) LCDR3 –ヌクレオチド
ttccaaggct ctctgctgcc ctggaca	27
SEQ ID NO: 12	CCR4(KW_L2H) LCDR3 –アミノ酸
FQGSLLPWT	9
SEQ ID NO: 111	CCR4(KW_L2H) VH鎖 –ヌクレオチド
gaagttcagc tggttgagtc tggcggcgac ctggttcagc ctggcagatc tctgagactg	60
agctgtgccc ccagcggcct catcttcagc aactacggca tgagctgggt ccgacaggcc	120
cctggaaaag gactggaatg ggctcgccaca atcagcagcg ccagcaccta cagctactac	180
cccgatagcg tgaagggcag attcaccatc agccgggaca acgccaagaa cagcctgtac	240
ctgcagatga actccctgcg cgtggaagat acagccctgt actattgcgg cagacacagc	300
gacggcaact tcgcctttgg ctattggggc cagggaaccc tggtcaccgt ttctagt	357
SEQ ID NO: 112	CCR4(KW_L2H) VH鎖 –アミノ酸
EVQLVESGGD LVQPGRSLRL SCAASGFIFS NYGMSWVRQA PGKGLEWVAT ISSASTYSY	60
PDSVKGRETI SRDNAKNSLY LQMNSLRVED TALYYCGRHS DGNFAFGYWG QGTLVTVSS	119
SEQ ID NO: 113	CCR4(KW_L2H) VL鎖 –ヌクレオチド
gacgtgtgta tgacacagag ccctctgagc ctgcctgtga cacctggcga acctgccagc	60
atcagctgca gatccagccg gaacatcgtg cacatcaacg gcgacaccta cctggaatgg	120
tatctgcaga agcccgccca gtctctcag ctgctgatct acaagggtgc caaccggttc	180
agcggcgtgc ccgatagatt ttctggcagc ggctctggca ccgacttcac cctgaagatc	240
tccagagtgg aagccgagga cgtgggcgtg tactactgct tccaaggctc tctgctgccc	300
tggacatttg gccagggcac caaggtggaa atcaag	336
SEQ ID NO: 114	CCR4(KW_L2H) VL鎖 –アミノ酸
DVLMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSRNIV HINGDTYLEW YLQKPGQSPQ LLIYKVSNRF	60

10

20

30

40

50

SGVPDFRFSGS	SGTDFTLKI	SRVEAEDVGV	YYCFQGSLLP	WTFGQGTKVE	IK	112
SEQ ID NO: 13		CCR4(KW H2L) scFv – スクレオチド				
gaagtgcagc	tgggttgatc	tggcggagat	ctggtgcagc	ctggcagaag	cctgagactg	60
tcttgtgccg	ccagcggcct	catcttcagc	aactacggca	tgagctgggt	ccgacaggcc	120
cctggaaaag	gccttgaatg	ggtcgccaca	atcagcagcg	ccagcaccta	cagctactac	180
cccgatagcg	tgaaggcgag	attcaccatc	agccgggaca	acgccaaaga	cagcctgtac	240
ctgcagatga	actccctgcg	cgtggaagat	acagccctgt	actactgcgg	cagacacagc	300
gacggcaatt	tcgccttttg	ctattggggc	cagggcaccc	tggttaccgt	ttctagcgga	360
ggaggtggat	caggtggag	tggaagcggg	ggaggagggt	ccggcgggcg	aggatcagat	420
gttctgatga	cacagagccc	tctgagcctg	cctgtgacac	ctggcgaaac	tgccagcatc	480
agctgcagat	ccagccggaa	catcgtgcac	atcaacggcg	acacctacct	ggaatggtat	540
ctgcagaagc	ccggccagtc	tctcagctcg	ctgatctaca	aggtgtccaa	ccggttcagc	600
ggcgtgcccg	atagattttc	tggcagcggc	tctggcaccg	acttcaccct	gaagatctcc	660
agagtggaa	ccgaggacgt	ggcgctctac	tactgcttcc	aaggctctct	gctgccctgg	720
acatttggac	agggcaccaa	ggtggaatc	aag			753
SEQ ID NO: 14		CCR4(KW H2L) scFv – アミノ酸				
EVQLVESGGD	LVQPGRLRL	SCAASGFIFS	NYGMSWVRQA	PGKGLEWVAT	ISSASTYSYY	60
PDSVKGRFTI	SRDNNAKNSLY	LQMNSLRVED	TALYYCGRHS	DGNFAFGYWG	QGTLLVTSSG	120
GGSGGGSGSG	GGSGGGGSDI	VLMTQSPSL	PVTPGEPASI	SCRSSRNIVH	INGDTYLEWY	180
LQKPGQSPQL	LIYKVSNNRS	GVPDRFSGSG	SGTDFTLKIS	RVEAEDVGVI	YCFQGSLLPW	240
TFGQGTKVEI	K					251
SEQ ID NO: 15		CCR4(KW L2H) scFv – スクレオチド				
gacgtgctga	tgacacagag	ccctctgagc	ctgcctgtga	cacctggcga	acctgccagc	60
atcagctgca	gatccagccg	gaacatcggt	cacatcaacg	gcgacacctc	cctgggaatg	120
tatctgcaga	agcccgccca	gtctcctcag	ctgctgatct	acaaggtgtc	caaccggttc	180
agcggcgtgc	ccgatagatt	ttctggcagc	ggctctggca	ccgacttcac	cctgaagatc	240
tccagagtgg	aagccgagga	cgtgggcgtg	tactactgct	tccaaggctc	tctgctgcc	300
tggaacattg	gccagggcac	caaggtggaa	atcaaggagg	gaggtggatc	aggtggaggt	360
ggaagcgggg	gaggaggttc	cggcgccgga	ggatcagaag	ttcagctggt	tgagtctggc	420
ggcgacctgg	ttcagcctgg	cagatctctg	agactgagct	gtgccgccag	cggcttcac	480
ttcagcaact	acggcatgag	ctgggtccga	caggccctcg	gaaaaggact	ggaatgggtc	540
gccacaatca	gcagcgccag	cacctacagc	tactaccccg	atagcgtgaa	gggcagattc	600
accatcagcc	gggacaacgc	caagaacagc	ctgtacctgc	agatgaactc	cctgcgcgtg	660
gaagatacac	ccctgtacta	ttgcggcaga	cacagcgacg	gcaacttcgc	ctttggctat	720
tgggggccagg	gaacctgtgt	caccgtttct	agt			753
SEQ ID NO: 16		CCR4(KW L2H) scFv – アミノ酸				
DVLTQSPFLS	LPVTPGEPAS	ISCRSSRNIV	HINGDTYLEW	YLQKPGQSPQ	LLIYKVSNNR	60
SGVPDFRFSGS	SGTDFTLKI	SRVEAEDVGV	YYCFQGSLLP	WTFGQGTKVE	IKGGGSGGGG	120
GGSGGGSGGG	GSEVLVESG	GDLVQPGRL	RLSCAASGFI	FSNYGMSWVR	QAPKGLEWV	180
ATISSASTYS	YYPDSVKGR	TISRDNNAKNS	LYLQMNSLRV	EDTALYYCGR	HSDGNFAFGY	240
WGQGLVTVS	S					251
SEQ ID NO: 17		CCR4(1-49 H2L) scFv – スクレオチド				
caggtgcagc	tgggtgcagag	cggagccgag	gtgaagaagc	ctggagcttc	cgtaagggtg	60
tcttgcaagg	ccagcggcta	caccttcgcc	agcagctgga	tgcaactggat	gcggcaggca	120
cctggacagg	gcctcgaatg	gatcggtctg	atcaaccccg	gcaactgtga	caccaagtac	180
aacgagaagt	tcaaggcgag	ggccaccctg	accgtggaca	ccagcaccaa	caccgcctac	240
atggaactga	gcagcctgcg	gagcaggagc	accgccgtgt	actactgcgc	cagaagcacg	300
tggtatcggc	cgaatgacta	ctggggccag	ggcaccctgg	tgaccgtgag	cagcggagga	360
ggtggatcag	gtggaggttg	aagcggggga	ggaggttccg	gcggcggagg	atcagacatc	420
gtgatgaccc	agagcccgca	cagcctggcc	gtgagcctgg	gcgagcgggc	caccatcaac	480
tgcaagagca	gccagagcat	cctgtacagc	agcaaccaga	agaactacct	ggcctggtat	540
cagcagaagc	ccggccagag	ccccaaagct	ctgatctact	gggccagcac	ccgggagagc	600
ggcgtgcccg	accggtttag	cggcagcggc	tccggcaccg	acttcacctc	gacctcagc	660
agcctgcagg	ccgaggacgt	ggcctgttac	tactgccacc	agtacaaaag	cagctacacc	720
ttcggccagg	gcacaaagct	ggaatcaag				750
SEQ ID NO: 18		CCR4(1-49 H2L) scFv – アミノ酸				
QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SKASGYTFA	SSWMHWMRQA	PGQGLEWIGW	INPGNVNTKY	60
NEKFKGRATL	TVDTSTNTAY	MELSSLRSER	TAVYYCARST	WYRPNDYWGG	GTLLVTSSGG	120
GGSGGGSGGG	GGSGGGGSDI	VMTQSPDSL	VSLGERATIN	CKSSQSILYS	SNQKNYLAWY	180
QQKPGQSPKL	LIYWASTRES	GVPDRFSGSG	SGTDFTLTIS	SLQAEDVAVY	YCHQYKSSYT	240
FGQGTKLEIK						250
SEQ ID NO: 19		CCR4(1-49 L2H) scFv – スクレオチド				
gacatcgctga	tgaccagag	ccccgacagc	ctggccgtga	gcctggggca	gcggggcacc	60
atcaactgca	agagcagcca	gagcatcctg	tacagcagca	accagaagaa	ctacctggcc	120

10

20

30

40

50

tggtatcagc	agaagcccg	ccagagcccc	aagctgctga	tctactgggc	cagcaccg	180
gagagcgcg	tgcccgacc	gtttagcg	agcgctccg	gcaccgactt	cacctgacc	240
atcagcagcc	tgccagccga	ggacgtggcc	gtgtactact	gccaccagta	caaaagcagc	300
tacaccttcg	gccaggccac	aaagctggaa	atcaagggag	gaggtggatc	aggtggaggt	360
ggaagcgggg	gaggaggttc	cggcgccgga	ggatcacagg	tgacgtggt	gcagagcgga	420
gccgaggtga	agaagcctgg	agcttccgtc	aaggtgtcct	gcaaggccag	cggctacacc	480
ttcgccagca	gctggatgca	ctggatgcgg	caggcacctg	gacaggccct	cgaatggatc	540
ggctggatca	accccgccaa	cgtgaacacc	aagtacaacg	agaagtcca	ggcgagggcc	600
acctgaccg	tggacaccag	caccaacacc	gcctacatgg	aactgagcag	cctgcggagc	660
gaggacaccg	ccgtgtacta	ctgcgccaga	agcacgtggt	atcgcccgaa	tgactactgg	720
ggccaggcca	ccctggtgac	cgtgagcagc				750
SEQ ID NO: 20 CCR4(1-49 L2H) scFv – アミノ酸						
DIVMTQSPDS	LAVSLGERAT	INCKSSQSIL	YSSNQKNYLA	WYQQKPGQSP	KLLIYWASTR	60
ESGVPDFRFSG	SGSGTDFTLT	ISSLQAEDVA	VYYCHQYKSS	YTFGQGTKLE	IKGGGSGGG	120
SGGGGSGGG	GSQVQLVQSG	AEVKKPGASV	KVSKKASGYT	FASSWMHWMR	QAPGQGLEWI	180
GWINPQNVNT	KYNEKFKGRA	TLTVDTSINT	AYMELSSLRS	EDTAVYYCAR	STWYRPNDYW	240
GQGLVTVSS						250
SEQ ID NO: 21 CCR4(2-3 H2L) scFv – スクレオチド						
caggtgcagc	tggtgcagag	cggagccgag	gtgaagaagc	ctggagcttc	cgtcaaggtg	60
tcctgcaagg	ccagcggtca	caccttcgcc	agcgctgga	tgcaactggat	gcggcaggca	120
cctggacagg	gcctcgaatg	gacggctgg	atcaaccccg	gcaacgtgaa	caccaagtac	180
aacgagaagt	tcaagggcag	ggccaccctg	accgtggaca	ccagcaccaa	caccgcctac	240
atggaactga	gcagctgcg	gagcgaggac	accgctgtg	actactgcgc	cagaagcacg	300
tattaccggc	cgctggacta	ctggggccag	ggcacccctg	tgaccgtgag	cagcggagga	360
ggtggatcag	gtggaggtgg	aagcggggga	ggaggttcg	gcggcgagg	atcagacatc	420
gtgatgaccc	agagccccga	cagcctggcc	gtgagcctgg	gcgagcgggc	caccatcaac	480
tgcaagagca	gccagagcat	cctgtacagc	agcaaccaga	agaactacct	ggcctggtat	540
cagcagaagc	ccggccagag	ccccaagctg	ctgatctact	gggccagcac	ccgggagagc	600
ggcgtgcccg	accggtttag	cggcagcgcc	tcggccaccg	acttcaccct	gaccatcagc	660
agcctgcagg	ccgaggacgt	ggcgtgtac	tactgccacc	agtacatgag	cagctacacc	720
ttcgggccagg	gcacaaagct	ggaaatcaag				750
SEQ ID NO: 22 CCR4(2-3 H2L) scFv – アミノ酸						
QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SKKASGYTFA	SAWMHWMRQA	PGQGLEWIGW	INPQNVNTKY	60
NEKFKGRATL	TVDTSTNTAY	MELSSLRSED	TAVYYCARST	YRPLDYWGQ	GLVTVSSGG	120
GGSGGGSGGG	GSQVQLVQSG	VMTQSPDSL	VSLGERATIN	CKSSQSILYS	SNQKNYLAWY	180
QQKPGQSPKL	LIYWASTRES	GVPDRFSGSG	SGTDFTLTIS	SLQAEDVAVY	YCHQYMSSTY	240
FGQGTKLEIK						250
SEQ ID NO: 23 CCR4(2-3 L2H) scFv – スクレオチド						
gacatcgtag	tgaccagag	ccccgacagc	ctggccgtga	gcctgggcga	gcgggccacc	60
atcaactgca	agagcagcca	gagcatcctg	tacagcagca	accagaagaa	ctacctggcc	120
tggtatcagc	agaagcccg	ccagagcccc	aagctgctga	tctactgggc	cagcaccg	180
gagagcgcg	tgcccgacc	gtttagcg	agcgctccg	gcaccgactt	cacctgacc	240
atcagcagcc	tgccagccga	ggacgtggcc	gtgtactact	gccaccagta	catgagcagc	300
tacaccttcg	gccagggcac	aaagctggaa	atcaagggag	gaggtggatc	aggtggaggt	360
ggaagcgggg	gaggaggttc	cggcgccgga	ggatcacagg	tgacgtggt	gcagagcgga	420
gccgaggtga	agaagcctgg	agcttccgtc	aaggtgtcct	gcaaggccag	cggctacacc	480
ttcgccagcg	cgtggatgca	ctggatgcgg	caggcacctg	gacaggccct	cgaatggatc	540
ggctggatca	accccgccaa	cgtgaacacc	aagtacaacg	agaagtcca	ggcgagggcc	600
acctgaccg	tggacaccag	caccaacacc	gcctacatgg	aactgagcag	cctgcggagc	660
gaggacaccg	ccgtgtacta	ctgcgccaga	agcacgtatt	accggccgct	ggactactgg	720
ggccaggcca	ccctggtgac	cgtgagcagc				750
SEQ ID NO: 24 CCR4(2-3 L2H) scFv – アミノ酸						
DIVMTQSPDS	LAVSLGERAT	INCKSSQSIL	YSSNQKNYLA	WYQQKPGQSP	KLLIYWASTR	60
ESGVPDFRFSG	SGSGTDFTLT	ISSLQAEDVA	VYYCHQYMSS	YTFGQGTKLE	IKGGGSGGG	120
SGGGGSGGG	GSQVQLVQSG	AEVKKPGASV	KVSKKASGYT	FASAWMHWMR	QAPGQGLEWI	180
GWINPQNVNT	KYNEKFKGRA	TLTVDTSINT	AYMELSSLRS	EDTAVYYCAR	STYRPLDYW	240
GQGLVTVSS						250
SEQ ID NO: 25 CCR4(h1567 H2L) scFv – スクレオチド						
caggtgcagc	tggtgcagag	cggagccgag	gtgaagaagc	ctggagcttc	cgtcaaggtg	60
tcctgcaagg	ccagcggtca	caccttcgcc	agctactaca	tgcaactggat	gcggcaggca	120
cctggacagg	gcctcgaatg	gacggctgg	atcaaccccg	gcaacgtgaa	caccaagtac	180
aacgagaagt	tcaagggcag	ggccaccctg	accgtggaca	ccagcaccaa	caccgcctac	240
atggaactga	gcagcctgcg	gagcgaggac	accgctgtg	actactgcgc	cagaagcacc	300
tactaccggc	ccctggacta	ctggggccag	ggcacccctg	tgaccgtgag	cagcggagga	360

10

20

30

40

50

ggtggatcag	gtggaggttg	aagcggggga	ggaggttccg	gcggcggagg	atcagacatc	420
gtgatgaccc	agagccccga	cagcctggcc	gtgagcctgg	gcgagcgggc	caccatcaac	480
tgcaagagca	gccagagcat	cctgtacagc	agcaaccaga	agaactacct	ggcctgggat	540
cagcagaagc	ccggccagag	ccccaagctg	ctgatctact	gggccagcac	ccgggagagc	600
ggcgtgcccg	accggtttag	cggcagcggc	tccggcaccg	acttcaccct	gaccatcagc	660
agcctgcagg	ccgaggacgt	ggcgtgtac	tactgccacc	agtacctgag	cagctacacc	720
ttcggccagg	gcacaaagct	ggaatcaag				750
SEQ ID NO: 26 CCR4(h1567 H2L) scFv – アミノ酸						
QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SKASGYTFA	SYMHWMRQA	PGQGLEWIGW	INPGNVNTKY	60
NEKFKGRATL	TVDTSNTAY	MELSSLRSED	TAVYYCARST	YRPLDYWGQ	GLVTVSSGG	120
GGSGGGSGGG	GGSGGGGSDI	VMTQSPDSL	VSLGERATIN	CKSSQSILYS	SNQKNYLAWY	180
QQKPGQSPKL	LIYWASTRES	GVPDRFSGSG	SGTDFTLTIS	SLQAEDVAVY	YCHQYLSSYT	240
FGQGTKLEIK						250
SEQ ID NO: 27 CCR4(h1567 L2H) scFv – スクレオチド						
gacatcgtga	tgacccagag	ccccgacagc	ctggccgtga	gcctgggcga	gcggggccacc	60
atcaactgca	agagcagcca	gagcatcctg	tacagcagca	accagaagaa	ctacctggcc	120
tggtatcagc	agaagcccgg	ccagagcccc	aagctgctga	tctactgggc	cagcaccggg	180
gagagcggcg	tgcccagacc	gtttagcggc	agcggctccg	gcaccgactt	caccctgacc	240
atcagcagcc	tgacggccga	ggacgtggcc	gtgtactact	gccaccagta	cctgagcagc	300
tacaccttcg	gccagggcac	aaagctggaa	atcaagggag	gaggtggatc	aggtggaggt	360
ggaagcgggg	gaggaggttc	cggcggcgga	ggatcacagg	tgacgtcgtg	gcagagcggg	420
gccgaggtga	agaagcctgg	agcttccgtc	aaggtgtcct	gcaaggccag	cggtacaccc	480
ttcgccagct	actacatgca	ctggatcgcg	caggcacctg	gacagggcct	cgaatggatc	540
ggctggatca	accccgggca	cgtgaacacc	aagtacaacg	agaagttaa	gggcaggggc	600
acctgaccg	tggacaccag	caccaacacc	gcctacatgg	aactgagcag	cctgcggagc	660
gaggacaccg	ccgtgtacta	ctgcggccaga	agcacctact	accggccctt	ggactactgg	720
ggccaggggca	ccctggtgac	cgtgagcagc				750
SEQ ID NO: 28 CCR4(h1567 L2H) scFv – アミノ酸						
DIVMTQSPDS	LAVSLGERAT	INCKSSQSIL	YSSNQKNYLA	WYQKPGQSP	KLLIYWASTR	60
ESGVPDRFSG	SGSGDFTLT	ISSLQAEDVA	VYYCHQYLSS	YTFGQGTKLE	IKGGGSGGG	120
GGSGGGSGGG	GSQVQLVQSG	AEVKKPGASV	KVSCKASGYT	FASYMHWMR	QAPGQGLEWI	180
GWINPGNVNT	KYNEKFKGRA	TLTVDTSNT	AYMELSSLR	EDTAVYYCAR	STYRPLDYW	240
GQGLVTVSS						250
SEQ ID NO: 29 CCR4(KW L2H) CAR – スクレオチド						
atggccctgc	ctgtgacagc	cctgtctgctg	cctctggctc	tgtctgtgca	tgccgctaga	60
cccggatccg	acgtgctgat	gacacagagc	cctctgagcc	tgccctgtgac	acctggcgaa	120
cctgccagca	tcagctgcag	atccagccgg	aacatcgtgc	acatcaacgg	cgacacctac	180
ctggaatggg	atctgcagaa	gcccgccag	tctctcagc	tgtctgatcta	caaggtgtcc	240
aaccggttca	gcggcgtgcc	cgatagattt	tctggcagcg	gctctggcac	cgacttcacc	300
ctgaagatct	ccagagtggg	agccgaggac	gtgggctgtg	actactgctt	ccaaggctct	360
ctgctgccct	ggacatttgg	ccagggcac	aaggtggaaa	tcaagggagg	aggtggatca	420
ggtggaggtg	gaagcggggg	aggaggttcc	ggcggcgagg	gatcagaagt	tcagctgggt	480
gagctctggc	gcgacctggt	tcagcctggc	agatctctga	gactgagctg	tgccgccagc	540
ggcttcatct	tcagcaacta	cggcatgagc	tgggtccgac	aggcccttgg	aaaaggactg	600
gaatgggtct	ccacaatcag	cagcgccagc	acctacagct	actacccgga	tagcgtgaag	660
ggcagattca	ccatcagccg	ggacaacgcc	aagaacagcc	tgtacctgca	gatgaactcc	720
ctgcgcgtgg	aagatacagc	cctgtactat	tgcggcagac	acagcgacgg	caacttcgcc	780
tttggctatt	ggggccaggg	aacctgtgtc	accgtttcta	gttccgggaa	cacgacgcca	840
gcgcgcgac	caccaacacc	ggcggccacc	atcgctgcgc	agccctgtgc	cctgcgcca	900
gaggcgtgcc	ggccagcgcc	ggggggcgca	gtgcacacga	gggggctgga	cttcgcctgt	960
gatatctaca	tctggggcgc	cctggccggg	acttgtgggg	tccttctcct	gtcactgggt	1020
atcacccctt	actggcaacg	gggcagaaa	aaactcctgt	atatattcaa	acaaccattt	1080
atgagaccag	tacaaactac	tcaagaggaa	gatggctgta	gctgccgatt	tccagaagaa	1140
gaagaaggag	gatgtgaact	gagagtgaag	ttcagcagga	gcgcagacgc	ccccgcgtac	1200
aagcagggcc	agaaccagct	ctataacgag	ctcaatctag	gacgaagaga	ggagtacgat	1260
gttttgagca	agagacgtgg	ccgggaccct	gagatggggg	gaaagccgag	aaggaagaac	1320
cctcaggaag	gcctgtacaa	tgaactgcag	aaagataaga	tggcgagggc	ctacagtggg	1380
attgggatga	aaggcgagcg	ccggaggggc	aaggggcacg	atggccttta	ccagggtctc	1440
agtagagcca	ccaaggacac	ctacgacgcc	cttcacatgc	aggccctgcc	ccctcgctaa	1500
SEQ ID NO: 30 CCR4(KW L2H) CAR – アミノ酸						
MALPVTALLL	PLALLLHAAR	PGSDVLMTQS	PLSLPVTPE	PASISCRSSR	NIVHINGDTY	60
LEWYLQKPGQ	SPQLLIYKVS	NRFSGVPDRF	SGSGSGTDFT	LKISRVEAED	VGYYCFQGS	120
LLPWTFGQGT	KVEIKGGGGS	GGGGSGGGGS	GGGGSEVQLV	ESGGDLVQPG	RSRLRLSCAAS	180
GFIFSNYGMS	WVRQAPGKGL	EWVATISSAS	TYSYYPDSVK	GRFTISRDN	KNSLYLQMNS	240
LRVEDTALYY	CGRHSDGNFA	FGYWGQGLV	TVSSSGTTP	APRPPTPAPT	IASQPLSLRP	300

10

20

30

40

50

EACRPAAGGA	VHTRGLDFAC	DIYIWAPLAG	TCGVLLLSLV	ITLYCKRGRK	KLLYIFKQPF	360
MRPVQTTQEE	DGCSRCFPPE	EEGGCELRVK	FSRSADAPAY	KQGQNQLYNE	LNLGRREEYD	420
VLDKRRGRDP	EMGGKPRRN	PQEGLYNELQ	KDKMAEAYSE	IGMKGERRRG	KGHDGLYQGL	480
STATKDTYDA	LHMQUALPFR					499
SEQ ID NO: 31	CD8リーダー-ヌクレオチド					
atggccctgc	ctgtgacagc	cctgtgtctg	cctctggctc	tgtctgtgca	tgccgctaga	60
ccc						63
SEQ ID NO: 32	CD8リーダー-アミノ酸					
MALPVTALLL	PLALLLHAAR	P				21
SEQ ID NO: 33	CD8ヒンジ-ヌクレオチド					
accacgacgc	cagcgccgcg	accaccaaca	ccggcgccca	ccatcgctgc	gcagcccttg	60
tccctgcgcc	cagagggctg	ccggccagcg	gcggggggcg	cagtgcacac	gagggggctg	120
gacttcgcct	gtgat					135
SEQ ID NO: 34	CD8ヒンジ-アミノ酸					
TTTTAPRPPT	PAPTIASQPL	SLRPEACRPA	AGGAVHTRGL	DFACD		45
SEQ ID NO: 35	CD8膜貫通-ヌクレオチド					
atctacatct	gggcccctt	ggcggggact	tgtggggctc	ttctcctgtc	actggttacc	60
accctttact	gc					72
SEQ ID NO: 36	CD8膜貫通-アミノ酸					
IYIWAPLAGT	CGVLLLSLVI	TLYC				24
SEQ ID NO: 37	4-1BB細胞内ドメイン-ヌクレオチド					
aaacggggca	gaaagaaact	cctgtatata	ttcaaacac	catttatgag	accagtacaa	60
actactcaag	aggaagatgg	ctgtagctgc	cgatttccag	aagaagaaga	aggaggatgt	120
gaactg						126
SEQ ID NO: 38	4-1BB細胞内ドメイン-アミノ酸					
KRGRKLLLYI	FKQPFMRPVQ	TQEEEDGCSC	RFEEEEEGGC	EL		42
SEQ ID NO: 39	CD3ゼータ-ヌクレオチド					
agagtgaagt	tcagcaggag	cgcagacgcc	cccgcgtaca	agcaggggcca	gaaccagctc	60
tataacgagc	tcaatctagg	acgaagagag	gagtacgatg	ttttggacaa	gagacgtggc	120
cgggaccctg	agatgggggg	aaagccgaga	aggaagaacc	ctcagggaag	cctgtacaaat	180
gaactgcaga	aagataagat	ggcggaggcc	tacagtgaga	ttgggatgaa	aggcgagcgc	240
cggaggggca	aggggcacga	tggccctttac	cagggtctca	gtacagccac	caaggacacc	300
tacgacgccc	ttcacatgca	ggccctgccc	cctcgctaa			339
SEQ ID NO: 40	CD3ゼータ-アミノ酸					
RVKFSRSADA	PAYKQGNQL	YNELNLGRRE	EYDVLDRRRG	RDPEMGGKPR	RKNPQEGLYN	60
ELQKDKMAEA	YSEIGMKGER	RRGKGHDGLY	QGLSTATKDT	YDALHMQALP	PR	112
B. CCR4(KW L2H)-短縮型 EGFR (tEGFR) 枯渇系						
SEQ ID NO: 41	CCR4(KW L2H)-tEGFR-ヌクレオチド					
atggccctgc	ctgtgacagc	cctgtgtctg	cctctggctc	tgtctgtgca	tgccgctaga	60
cccgatccg	acgtgtctgt	gacacagagc	cctctgagcc	tgccgtgtgac	acctggcgaa	120
cctgccagca	tcagctgcag	atccagccgg	aacatcgtgc	acatcaacgg	cgacacctac	180
ctggaatggt	atctgcagaa	gcccggccag	tctcctcagc	tgtctgtacta	caagggtgtcc	240
aaccggttca	gcggcggtgc	cgatagattt	tctggcagcg	gctctggcac	cgacttcacc	300
ctgaagatct	ccagagtggg	agccgaggac	gtggggctgt	actactgctt	ccaaggctct	360
ctgctgccct	ggacatttgg	ccagggcacc	aaggttgaaa	tcaaggagg	aggtggatca	420
ggtggagggtg	gaagcggggg	aggaggttcc	ggcggcggag	gacagaagt	tcagctggtt	480
gagtctggcg	gcgacctggt	tcagcctggc	agatctctga	gactgagctg	tgccgccagc	540
ggcttcatct	tcagcaacta	cggcatgagc	tgggtccgac	aggccctgg	aaaaggactg	600
gaatgggtcg	ccacaatcag	cagcgccagc	acctacagct	actccccga	tagcgtgaag	660
ggcagattca	ccatcagccg	ggacaacgcc	aagaacagcc	tgtacctgca	gatgaactcc	720
ctgcgcgtgg	aagatacagc	cctgtactat	tgcggcagac	acagcgacgg	caacttcgcc	780
tttggctatt	ggggccaggg	aacctgtgtc	accgtttcta	gttcgggaac	cacgacgcca	840
gcgcgcgac	caccaacacc	ggcgcccacc	atcgctgcgc	agccctgtgc	cctgcgcccc	900
gaggcgtgcc	ggccagcgcg	ggggggcgca	gtgcacacga	gggggctgga	cttcgcctgt	960
gatatctaca	tctgggcgcc	cttggccggg	acttgtgggg	tccttctcct	gtcactggtt	1020
atcacccttt	actgcaaacg	gggcagaaag	aaactcctgt	atatattcaa	acaaccattt	1080
atgagaccag	tacaactac	tcaagaggaa	gatggctgta	gctgccgatt	tccagaagaa	1140
gaagaaggag	gatgtgaact	gagagtgaag	ttcagcagga	gcgcagacgc	ccccgcgtac	1200
aagcagggcc	agaaccagct	ctataacgag	ctcaatctag	gacgaagaga	ggagtacgat	1260
gtttttggaca	agagacgtgg	ccgggaccct	gagatggggg	gaaagccgag	aaggaagaac	1320
cctcaggaag	gcctgtacaa	tgaactgcag	aaagataaga	tggcggaggc	ctacagttag	1380
attgggatga	aagcgagcg	ccggaggggc	aaggggcacg	atggccttta	ccagggtctc	1440
agtacagcca	ccaaggacac	ctacgacgcc	cttcacatgc	aggccctgcc	ccctcgccat	1500

10

20

30

40

50

atgggaagcg	gagctactaa	cttcagcctg	ctgaagcagg	ctggagacgt	ggaggagAAC	1560
cctggaccta	tgcttctcct	ggtgacaagc	cttctgctct	gtgagttacc	acaccagca	1620
ttctctcctga	tccccagcaa	agtgtgtaac	ggaataggta	ttgggtgaatt	taaagactca	1680
ctctccataa	atgctacgaa	tattaaacac	ttcaaaaact	gcacctccat	cagtggcgat	1740
ctccacatcc	tgccggtggc	atttaggggt	gactccttca	cacatactcc	tcctctggac	1800
ccacaggAAC	tggatattct	gaaaaccgta	aaggaaatca	cagggttttt	gctgattcag	1860
gcttggcctg	aaaacaggac	ggacctccat	gcctttgaga	acctagaaat	catacgcggc	1920
aggaccaagc	aacatggtca	gttttctcct	gcagtcgtca	gcctgaacat	aacatccttg	1980
ggattacgct	ccctcaaggA	gataagtgat	ggagatgtga	taatttcagg	aaacaaaaat	2040
ttgtgctatg	caaatacaat	aaactggaaa	aaactgtttg	ggacctccgg	tcagaaaaacc	2100
aaaattataa	gcaacagagg	tgaaaaacagc	tgcaaggcca	caggccagggt	ctgccatgcc	2160
ttgtgctccc	ccgagggcgt	ctggggcccg	gagcccagggt	actgctcttc	ttgccggaat	2220
gtcagccgag	gcagggaatg	cgtggacaag	tgcaaccttc	tggagggtga	gccaaaggag	2280
tttgtggaga	actctgagtg	catacagtgc	caccagagtg	gcctgcctca	ggccatgaac	2340
atcacctgca	caggacgggg	accagacaac	tgatccagtg	gtgcccaacta	cattgacggc	2400
ccccactcgc	tcaagacctg	cccggcaggA	gtcatgggag	aaaacaacac	cctggtcttg	2460
aagtacgcag	acgcccggca	tgtgtgccac	ctgtgccatc	caaactgcac	ctacggatgc	2520
actgggcag	gtcttgaagg	ctgtccaacg	aatgggccta	agatcccgtc	catcgccact	2580
gggatgggtg	gggcctcctc	cttgcctgctg	gtgggtggccc	tggggatcgg	cctcttcctg	2640
tag						2643

SEQ ID NO: 42	CCR4(KW L2H)-EGFR - アミノ酸					
MALPVTALLL	PLALLLHAAR	PGSDVLMTQS	PLSLPVTPE	PASISCRSSR	NIVHINGDTY	60
LEWYLQKPGQ	SPQLLIYKVS	NRFSGVPDRF	SGSGSGTDF	LKISRVEAED	VGYYCFQGS	120
LLPWFQGGT	KVEIKGGGS	GGGSGGGGS	GGGSGEVQLV	ESGGDLVQPG	RSLRLSCAAS	180
GFIFSNYGMS	WVRQAPGKGL	EWVATISSAS	TYSYYPDSVK	GRTISRDN	KNSLYLQMNS	240
LRVEDTALYY	CGRHSDGNFA	FGYWGQGLV	TVSSSGTTP	APRPPTPAPT	IASQPLSLRP	300
EACRPAAGGA	VHTRGLDFAC	DIYIWAPLAG	TCGVLLLSLV	ITLYCKRGRK	KLLYIFKQPF	360
MRPVQTTQEE	DGCSCRFPEE	EEGGCELRVK	FSRSADAPAY	KQQNQQLYNE	LNLGRREEYD	420
VLDKRRGRDP	EMGGKPRRN	PQEGLYNELQ	KDKMAEAYSE	IGMKGERRRR	KGHDGLYQGL	480
STATKDTYDA	LHMQLPFRH	MGSGATNFSL	LKQAGDVEEN	PGPMLLLVTS	LLLCELPHPA	540
FLLLPRKVCN	GIGIGEFKDS	LSINATNIKH	FKNCTISISD	LHLPLVAFRG	DSFTHTPPLD	600
PQELDLIKTV	KEITGFLLIQ	AWPENRTDLH	AFENLEIIRG	RTKQHGQFSL	AVVSLNITSLS	660
GLRSLKEISD	GDVIISGNKN	LCYANTINWK	KLFGTSGQKT	KIISNRGENS	CKATGQVCHA	720
LCSPEGCGWP	EPRDCVSCRN	VSRGRECVDK	CNLEGEPRE	FVENSECIQC	HPECLPQAMN	780
ITCTGRGPDN	CIQCAHYIDG	PHCVKTCFAG	VMGENTTLVW	KYADAGHVCH	LCHPNCTYGC	840
TGPGLEGCP	NGPKIPSIAT	GMVGALLLLL	VVALGIGLFM			880

SEQ ID NO: 43	CCR4(KW L2H) CAR - スクレオチド					
atggccctgc	ctgtgacagc	cctgctgctg	cctctggctc	tgctgctgca	tgccgctaga	60
cccgatccg	acgtgctgat	gacacagagc	cctctgagcc	tgccctgtgac	acctggcgaa	120
cctgccagca	tcagctgcag	atccagccgg	aacatcgtgc	acatcaacgg	cgacacctac	180
ctggaaatgg	atctgcagaa	gcccgccag	tctctcagc	tgctgatcta	caagggttcc	240
aaccggttca	gcggcggtgc	cgatagattt	tctggcagcg	gctctggcac	cgacttcacc	300
ctgaagatct	ccagagtggA	agccgaggac	gtgggcgtgt	actactgctt	ccaaggctct	360
ctgctgccct	ggacatttgg	ccagggcacc	aaggtggaaa	tcaagggagg	aggtggatca	420
ggtggagggtg	gaagcggggg	aggaggttcc	ggcgccggag	gatcagaagt	tcagctggtt	480
gagctctggc	gcgacctggt	tcagcctggc	agatctctga	gactgagctg	tgccgccagc	540
ggcttcatct	tcagcaacta	cggcattgagc	tgggtccgac	aggccctctg	aaaaggactg	600
gaatgggtcg	ccacaatcag	cagcgccagc	acctacagct	actaccccca	tagcgtgaag	660
ggcagattca	ccatcagccg	ggacaacgcc	aagaacagcc	tgtaacctgca	gatgaactcc	720
ctgcgcgtgg	aagatacagc	cctgtactat	tgccgcagac	acagcgacgg	caacttcgcc	780
tttggctatt	ggggccaggg	aaccctggtc	accgtttcta	gttcgggaac	cacgacgcca	840
gcgcccgcag	caccaaacacc	ggcgcccacc	atcgcgctgc	agccctctgt	cctgcgccca	900
gaggcgtgcc	ggccagcggc	ggggggcgca	gtgcacacga	gggggctgga	cttcgcctgt	960
gatatctaca	tctggggccc	cttggccggg	acttgtgggg	tccttctcct	gtcactggtt	1020
atcacctttt	actgcaaaag	gggcagaaag	aaactcctgt	atatattcaa	acaacctttt	1080
atgagaccag	tacaaactac	tcaagaggaa	gatggctgta	gctgccgatt	tccagaagaa	1140
gaagaaggag	gatgtgaact	gagagtgaag	ttcagcaggA	gcgcagacgc	ccccgcgtac	1200
aagcagggcc	agaaccagct	ctataacgag	ctcaatctag	gacgaagaga	ggagtacgat	1260
gttttgagca	agagacgtgg	ccgggaccct	gagatggggg	gaaagccgag	aaggaagaac	1320
cctcaggaa	gcctgtacaa	tgaactgcag	aaagataaga	tggcggaggc	ctacagtgcg	1380
attgggatga	aaggcgagcg	ccggaggggc	aaggggcacg	atggccttta	ccagggtctc	1440
agtacagcca	ccaaggacac	ctacgacgcc	cttcacatgc	aggccctgcc	ccctcgccat	1500
atg						1503

SEQ ID NO: 44	CCR4(KW L2H) CAR - アミノ酸					
MALPVTALLL	PLALLLHAAR	PGSDVLMTQS	PLSLPVTPE	PASISCRSSR	NIVHINGDTY	60

10

20

30

40

50

LEWYLQKPGQ	SPQLLIYKVS	NRFSGVPDRF	SGSGSGTDFT	LKISRVEAED	VGYYCFQGS	120
LLPWTFGGGT	KVEIKGGGGS	GGGGSGGGGS	GGGGSEVLV	ESGGDLVQPG	RSRLRSCAAS	180
GFIFSNYGMS	WVRQAPGKGL	EWVATISSAS	TYSYYPDSVK	GRFTISRDNA	KNSLYLQMNS	240
LRVEDTALYY	CGRHSDGNFA	FGYWGQGTLV	TVSSSGTTP	APRPPTPAPT	IASQPLSLRP	300
EACRPAAGGA	VHTRGLDFAC	DIYIWAPLAG	TCGVLLLSLV	ITLYCKRGRK	KLLYIFKQPF	360
MRPVQTTQEE	DGCSCRFPPE	EEGGCELRVK	FSSADAPAY	KQGQNLQYNE	LNLGRREEYD	420
VLDKRRGRDP	EMGGKPRRN	PQEGLYNELQ	KDKMAEAYSE	IGMKGERRRG	KGHDGLYQGL	480
STATKDTYDA	LHMQUALPRH	M				501
SEQ ID NO: 45 P2A – スクレオチド						
ggaagcggag	ctactaaact	cagcctgctg	aagcaggctg	gagacgtgga	ggagaacct	60
ggacct						66
SEQ ID NO: 46 P2A – アミノ酸						
GSGATNFSLL	KQAGDVEENP	GP				22
SEQ ID NO: 47 GMSCFRリーダー – スクレオチド						
atgcttctcc	tggtgacaag	ccttctgctc	tgtgagttac	cacaccagc	attcctcctg	60
atccca						66
SEQ ID NO: 48 GMSCFRリーダー – アミノ酸						
MLLLVTSLLL	CELPHPAFLI	IP				22
SEQ ID NO: 49 tEGFR – スクレオチド						
cgcaaagtgt	gtaacggaat	aggatttggg	gaatttaaag	actcactctc	cataaatgct	60
acgaatatta	aacacttcaa	aaactgcacc	tccatcagtg	gcgatctcca	catcctgccg	120
gtggcattta	ggggtgactc	cttcacacat	actcctctct	tggaccacac	ggaactggat	180
attctgaaaa	ccgtaaaagg	aatcacaggg	tttttgctga	tccaggcttg	gctgaaaaac	240
aggacggacc	tccatgcctt	tgagaacctc	gaaatcatac	gcggcaggac	caagcaacat	300
ggtcagtttt	ctcttgcaat	cgtcagcctg	aacataacat	ccttgggatt	acgctccctc	360
aaggagataa	gtgatggaga	tgtgataatt	tcaggaaaca	aaaatttgtg	ctatgcaaat	420
acaataaact	ggaaaaaact	gtttgggacc	tccggtcaga	aaacccaaat	tataagcaac	480
agaggtgaaa	acagctgcaa	ggccacaggc	caggtctgcc	atgccttgtg	ctccccgag	540
ggctgctggg	gccccggagg	cagggaactgc	gtctcttgcc	ggaatgtcag	ccgaggcagg	600
gaatgcgtgg	acaagtgcaa	ccttctggag	ggtgagccaa	gggagtttgt	ggagaactct	660
gagtgcatac	agtgcacccc	agagtgcctg	cctcaggcca	tgaacatcac	ctgcacagga	720
cggggaccag	acaactgtat	ccagtgtgcc	cactacattg	acggccccc	ctgcgtcaag	780
acctgcccgg	caggagtcat	gggagaaaac	aacaccctgg	tctggaagta	cgcacagccc	840
ggccatgtgt	gccacctgtg	ccatccaaac	tgcacctacg	gatgcactgg	gccaggctct	900
gaaggctgtc	caacgaatgg	gcctaagatc	ccgtccatcg	ccactgggat	ggtggggggc	960
ctctctctgc	tgtgtgtgtg	ggccctgggg	atcggcctct	tcattgtag		1008
SEQ ID NO: 50 tEGFR – アミノ酸						
RKVCNGIGIG	EFKDLSLSINA	TNKHFKNCT	SISGDLHILP	VAFRGDSFTH	TPPLDPQELD	60
ILKTVKEITG	FLLIQAWPEN	RTDLHAFENL	EIIIRGRTKQH	GQFSLAVVSL	NITSLGLRSL	120
KEISDGDVII	SGNKNLCYAN	TINWKKLFGT	SGQKTKIISN	RGENSCKATG	QVCHALCSPE	180
GCWGPEPRDC	VSCRNVSRGR	ECVDKCNLLE	GEPREFVENS	ECIQCHPECL	PQAMNITCTG	240
RGPDNCIQCA	HYIDGPHCVK	TCPAGVMGEN	NTLVWKYADA	GHVCHLCHPN	CTYGCTGPGI	300
EGCPTNGPKI	PSIATGMVGA	LLLLLVVALG	IGLFM			335
C. CCR4(KW L2H)-CD20枯渴系						
SEQ ID NO: 51 CCR4(KW L2H)-CD20 – スクレオチド						
atggccctgc	ctgtgacagc	cctgtgctg	cctctggctc	tgtgtgtgca	tgcgctaga	60
cccgatccg	acgtgctgat	gacacagagc	cctctgagcc	tgcctgtgac	acctggcgaa	120
cctgccagca	tcagctgcag	atccagccgg	aacatcgtgc	acatcaacgg	cgacacctac	180
ctggaatggt	atctgcagaa	gcccggccag	tctctctcag	tgtgtatcta	caagggtgtc	240
aaaccggttca	gcggcggtgc	cgatagattt	tctggcagcg	gctctggcac	cgacttcacc	300
ctgaagatct	ccagagtggg	agccgaggac	gtggcgctgt	actactgctt	ccaaggctct	360
ctgctgccct	ggacatttgg	ccagggcacc	aaggtggaaa	tcaaggagg	aggtggatca	420
ggtggagggtg	gaagcggggg	aggaggttcc	ggcgcgagg	gatcagaagt	tcagctgggt	480
gagtctggcg	gcgacctggt	tcagcctggc	agatctctga	gactgagctg	tgccgccagc	540
ggcttcatct	tcagcaacta	cggcctgagc	tgggtccgac	agggccctgg	aaaaggactg	600
gaatgggtcg	ccacaatcag	cagcgccagc	acctacagct	actaccccca	tagcgtgaag	660
ggcagattca	ccatcagccg	ggacaacgcc	aagaacagcc	tgtacctgca	gatgaactcc	720
ctgcgcgtgg	aagatacagc	cctgtactat	tgcggcagac	acagcgacgg	caacttcgcc	780
tttggctatt	ggggccaggg	aacctgtgct	accgtttcta	gttccggaac	cacgacgcca	840
gcgcgcgag	caccaacacc	ggcgccacc	atcgctgcgc	agccctgtgc	cctgcgccca	900
gaggcgtgcc	ggcagcgccc	ggggggcgca	gtgcacacga	gggggctgga	cttcgctgtg	960
gatatctaca	tctggcgccc	cttggccggg	acttgtgggg	tccttctctc	gtcactgggt	1020
atcacccctt	actgcaaacg	gggcagaaag	aaactcctgt	atatattcaa	acaaccattt	1080
atgagaccag	tacaaactac	tcaagaggaa	gatggctgta	gctgccgatt	tccagaagaa	1140

10

20

30

40

50

gaagaaggag	gatgtgaact	gagagtgaag	ttcagcagga	gcgcagacgc	ccccgcgtac	1200
aagcagggcc	agaaccagct	ctataacgag	ctcaatctag	gacgaagaga	ggagtacgat	1260
gttttgga	agagacgtgg	ccgggaccct	gagatggggg	gaaagccgag	aaggaaagaac	1320
cctcaggaag	gcctgtacaa	tgaactgcag	aaagataaga	tggcggaggc	ctacagttag	1380
attgggatga	aaggcgagcg	ccggaggggc	aaggggcacg	atggccttta	ccagggtctc	1440
agtacagcca	ccaaggacac	ctacgacgcc	cttcacatgc	aggccctgcc	ccctcgccat	1500
atgggaagcg	gagctactaa	cttcagcctg	ctgaagcagg	ctggagacgt	ggaggagaaac	1560
cctggaccta	tgacaacacc	cagaaattca	gtaaatggga	ctttcccggc	agagccaatg	1620
aaaggcccta	ttgctatgca	atctgggtcca	aaaccactct	tcaggaggat	gtcttctactg	1680
gtgggcccga	cgcaatcctt	cttcgatagg	gaatctaaga	ctttgggggc	tgctccagatt	1740
atgaatgggc	tcttccacat	tgccttgggg	gggtcttctga	tgatcccagc	agggatctat	1800
gcacccatct	gtgtgactgt	gtgggtatcct	ctctggggag	gcattatgta	tattattttcc	1860
ggatcactcc	tggcagcaac	ggagaaaaac	tccaggaagt	gttttggtcaa	aggaaaaatg	1920
ataatgaact	catttagcct	ctttgtctgcc	atctctggaa	tgtattctttc	aatcatggac	1980
atacttaata	ttaaaatttc	ccatttttta	aaaatggaga	gtctgaattt	tattagagct	2040
cacacacccat	atattaacat	atacaactgt	gaaccagcta	atccctctga	gaaaaactcc	2100
ccatctaccc	aatactgtta	cagcatataca	tctctgttct	tgggcatttt	gtcagttagt	2160
ctgatctttg	ccttcttcca	ggaacttgta	atagctggca	tcgttgagaa	tgaatggaaa	2220
agaacgtgct	ccagacccaa	atctaacata	gttctcctgt	cagcagaaga	aaaaaaagaa	2280
cagactattg	aaataaaaga	agaagtgggt	gggctaactg	aaacatcttc	ccaaccaaag	2340
aatgaagaag	acattgaaat	tattccaatc	caagaagagg	aagaagaaga	aacagagacg	2400
aactttccag	aacctcccca	agatcaggaa	tcctcaccaa	tagaaaatga	cagctctcct	2460
taa						2463
SEQ ID NO: 52 CCR4(KW L2H)-CD20 - アミノ酸						
MALPVTALLL	PLALLLHAAR	PGSDVLMTQS	PLSLPVTGPE	PASISCRSSR	NIVHINGDTY	60
LEWYLQKPGQ	SPQLLIYKVS	NRFSGVPDRF	SGSGSGTDFT	LKISRVEAED	VGVIYCFQGS	120
LLPWTFGQGT	KVEIKGGGGS	GGGGSGGGGS	GGGGSEVQLV	ESGGDLVQPG	RSLRLSCAAS	180
GFIFSNYQMS	WVRQAPGKGL	EWATISSAS	TYSYYPDSVK	GRETISRDNA	KNSLYLQMNS	240
LRVEDTALYY	CGRHSDGNFA	FGYWGQGTIV	TVSSSGTTPP	APRPPTPAPT	IASQPLSLRP	300
EACRPAAGGA	VHTRGLDFAC	DIYIWAFLAG	TCGVLLLSLV	ITLYCKRGRK	KLLYIFKQFF	360
MRPVQTTQEE	DGCSCRFPEE	EEGGCELRVK	FSRADAPAY	KQGNQLYNE	LNLGRREEYD	420
VLDKRRGRDP	EMGGKPRRN	PQEGLYNELQ	KDKMAEAYSE	IGMKGERRRG	KGHDGLYQGL	480
STATKDTYDA	LHMQLPFRH	MGSGATNFSL	LKQAGDVEEN	PGPMTTPRNS	VNGTFPAEPM	540
KGPILAMQSGP	KPLFRMRSSL	VGPTQSFMR	ESKTLGAVQI	MNGLFHIALG	GLLMI PAGIY	600
APICVTWVYP	LWGGIMYIIS	GSLLAATEKN	SRKCLVKGKM	IMNSLSLFAA	ISGMILSMD	660
ILNIKISHFL	KMESLNFIRA	HTPYINIYNC	EPANPSEKNS	PSTQYCYSIQ	SLFLGILSVM	720
LIFAFFQELV	IAGIVENEWK	RTCSRPKSNI	VLLSAEEKKE	QTIEIKEEVV	GLTETSSQPK	780
NEEDIEIIFI	QEEEEETET	NFPEPPQDQE	SSPIENDSSP			820
SEQ ID NO: 53 CCR4(KW L2H) CAR - スクレオチド						
atggccctgc	ctgtgacagc	cctgctgctg	cctctggctc	tgtctgtgca	tgcgcgtaga	60
cccgatccg	acgtgtctgat	gacacagagc	cctctgagcc	tgccgtgtgac	acctggcgaa	120
cctgccagca	tcagctgcag	atccagccgg	aacatcgtgc	acatcaacgg	cgacacctac	180
ctggaatggt	atctgcagaa	gcccggccag	tctcctcagc	tgtctgatcta	caagggtgtcc	240
aaecgggtca	gcggcggtgc	cgatagattt	tctggcagcg	gctctggcac	cgacttcacc	300
ctgaagatct	ccagagtggg	agccgaggac	gtggcggtgt	actactgctt	ccaaggctct	360
ctgctgccct	ggacatttgg	ccagggcacc	aagggtggaaa	tcaaggggagg	agggtgatca	420
gggtggagggt	gaagcggggg	aggaggttcc	ggcgcgagg	gatcagaagt	tcagctggtt	480
gagtcgtggc	gcgacctggt	tcagcctggc	agatctctga	gactgagctg	tgcgcgcagc	540
ggcttcatct	tcagcaacta	cgccatgagc	tggttccgac	aggccctggg	aaaaggactg	600
gaatgggtcg	ccacaatcag	cagcgccagc	acctacagct	actaccccca	tagcgtgaag	660
ggcagattca	ccatcagccg	ggacaacgcc	agaacagcc	tgtacctgca	gatgaactcc	720
ctgcgcgtgg	aagatacagc	cctgtactat	tgcggcagac	acagcgacgg	caacttcgcc	780
tttggttatt	ggggccaggg	aaccctggtc	accgtttcta	gttccggaac	cacgacgcca	840
gcgcgcgac	caccaacacc	ggcgccacc	atcgcgctgc	agccctgtgc	cctgcgccca	900
gaggcggtgc	ggccagcgcc	ggggggcgca	gtgcacacga	gggggctgga	cttcgcctgt	960
gatatctaca	tctgggcggc	cttggccggg	acttgtgggg	tccttctcct	gtcactggtt	1020
atcacccttt	actgcaaacy	gggcagaaag	aaactcctgt	atatattcaa	acaaccatth	1080
atgagaccag	tacaaactac	tcaagaggaa	gatggctgta	gctgccgatt	tccagaagaa	1140
gaagaaggag	gatgtgaact	gagagtgaag	ttcagcagga	gcgcagacgc	ccccgcgtac	1200
aagcagggcc	agaaccagct	ctataacgag	ctcaatctag	gacgaagaga	ggagtacgat	1260
gttttgga	agagacgtgg	ccgggaccct	gagatggggg	gaaagccgag	aaggaaagaac	1320
cctcaggaag	gcctgtacaa	tgaactgcag	aaagataaga	tggcggaggc	ctacagttag	1380
attgggatga	aaggcgagcg	ccggaggggc	aaggggcacg	atggccttta	ccagggtctc	1440
agtacagcca	ccaaggacac	ctacgacgcc	cttcacatgc	aggccctgcc	ccctcgccat	1500
atg						1503

10

20

30

40

50

SEQ ID NO: 54	CCR4(KW L2H) CAR-アミノ酸				
MALPVTALLL	PLALLLHAAR	PGSDVMTQS	PLSLPVTPE	PASISCRSSR	NIVHINGDTY 60
LEWYLQKPGQ	SPQLLIYKVS	NRFSGVPDRF	SGSGSGTDFT	LKISRVEAED	VGVIYCFQGS 120
LLPWTFFGQT	KVEIKGGGGS	GGGSGGGGS	GGGSEVLV	ESGGDLVQPG	RSRLRSCAAS 180
GFIFSNYGMS	WVRQAPGKGL	EWVATISSAS	TYSYYPDSVK	GRFTISRDNA	KNSLYLQMNS 240
LRVEDTALYY	CGRHSDGNFA	FGYWGQGLV	TVSSSGTTTP	APRPPTPAPT	IASQPLSLRP 300
EACRPAAGGA	VHTRGLDFAC	DIYIWAPLAG	TCGVLLLSLV	ITLYCKRGRK	KLLYIFKQPF 360
MRPVQTTQEE	DGCSRFPPEE	EEGGCELRVK	FSRSADAPAY	KQGQNLQYNE	LNLGRREEYD 420
VLDKRRGRDP	EMGGKPRRN	PQEGLYNELQ	KDKMAEAYSE	IGMKGERRRG	KGHDGLYQGL 480
STATKDTYDA	LHMQALPPRH	M			501
SEQ ID NO: 55	P2A-スクレオチド				
ggaagcggag	ctactaaatt	cagcctgctg	aagcaggctg	gagacgtgga	ggagaacctt 60
ggacct					66
SEQ ID NO: 56	P2A-アミノ酸				
GSATNFSL	KQAGDVEENP	GP			22
SEQ ID NO: 57	CD20-スクレオチド				
atgacaacac	ccagaaattc	agtaaatggg	actttcccg	cagagccaat	gaaaggccct 60
attgctatgc	aattctggcc	aaaaccactc	ttcaggagga	tgtcttcact	ggtgggcccc 120
acgcaatcct	tcttcatgag	ggaatctaag	actttggggg	ctgtccagat	tatgaatggg 180
ctcttccaca	ttgcctctgg	gggtcttctg	atgatccag	cagggatcta	tgcacccatc 240
tgtgtgactg	tgtggtatcc	tctctgggga	ggcattatgt	atattatttc	cggatcactc 300
ctggcagcaa	cggagaaaaa	ctccaggaag	tggttggtca	aaggaaaaat	gataatgaac 360
tcatttgagcc	tctttgctgc	catcttctgga	atgattcttt	caatcatgga	catacttaat 420
attaaaattt	cccatttttt	aaaaatggag	agtctgaatt	ttatttagagc	tcacacacca 480
tataataaca	tatacaactg	tgaaccagct	aatccctctg	agaaaaactc	cccatctacc 540
caatactgtt	acagcataca	atctctgttc	ttgggcattt	tgtcagtgat	gctgatcttt 600
gccttcttcc	aggaacttgt	aatagctggc	atcgttgaga	atgaatggaa	aagaacgtgc 660
tccagaccaca	aattctaacat	agttctcctg	tcagcagaag	aaaaaaaaaga	acagactatt 720
gaaataaaag	aagaagtggg	tgggctaact	gaaacatctt	cccaacccaa	gaatgaagaa 780
gacattgaaa	ttattccaat	ccaagaagag	gaagaagaag	aaacagagac	gaactttcca 840
gaacctcccc	aagatcagga	atctctacca	atagaaaaatg	acagctctcc	ttaa 894
SEQ ID NO: 58	CD20-アミノ酸				
MTTPRNSVNG	TFAPEPMKGP	IAMQSGPKPL	FRMSSLVGP	TQSFFMRESK	TLGAVQIMNG 60
LFHIALGGLL	MIPAGIYAPI	CVTVWYPLWG	GIMYIISGSL	LAATEKNRSR	CLVKGKMINN 120
SLSLFAAISG	MILSIMDILN	IKISHFLKME	SLNFIRAHTP	YINIYNCEPA	NPSEKNSPST 180
QYCYSIQSLF	LGILSVMLIF	AFQQLVLAG	IVENEWKRTC	SRPKSNIVLL	SAEEKKEQTI 240
EIKEEVVGLT	ETSSQPKNEE	DIEIPIQEE	EEEEETETNF	EPFQDQESSP	IENDSSP 297
D. CCR4(KW L2H)-FKBP-iCasp9枯渇系					
SEQ ID NO: 59	CCR4(KW L2H)-FKBP-iCasp9-スクレオチド				
atggccctgc	ctgtgacagc	cctgtgctgc	cctctggctc	tgtgtgtgca	tgcctgtaga 60
cccggatccg	acgtgctgat	gacacagagc	cctctgagcc	tgcctgtgac	acctggcgaa 120
cctgccagca	tcagctgcag	atccagccgg	aacatcgtgc	acatcaacgg	cgacacctac 180
ctggaatggt	atctgcagaa	gcccggccag	tctcctcagc	tgtgtgtgca	caagggtgct 240
aaccgggtca	gcggtgtgct	cgatagattt	tctggcagcg	gctctggcac	cgacttcacc 300
ctgaagatct	ccagagtggg	agccgaggac	gtgggcgtgt	actactgctt	ccaaggctct 360
ctgctgcctt	ggacatttgg	ccagggcacc	aaggtggaaa	tcaaggaggg	aggtggatca 420
ggttgagggtg	gaagcggggg	aggaggttcc	ggcggcggag	gatcagaagt	tcagctgggt 480
gagtctggcg	gcgacctggt	tcagcctggc	agatctctga	gactgagctg	tgcgcgcagc 540
ggcttcatct	tcagcaacta	cggcatgagc	tgggtccgac	aggccctctg	aaaaggactg 600
gaatgggtcg	ccacaatcag	cagcgccagc	acctacagct	actaccccca	tagcgtgaag 660
ggcagattca	ccatcagccg	ggacaacgcc	aagaacagcc	tgtacctgca	gatgaactcc 720
ctgcgcgtgg	aagatacagc	cctgtactat	tgcggcagac	acagcgacgg	caacttcgcc 780
tttggctatt	ggggccaggg	aacctgtgtc	accgtttcta	gttccggaac	cacgacgcca 840
gcgccgcgac	caccaacacc	ggcgccacc	atcgctgcgc	agccctgtgc	cctgcgcccc 900
gaggcgtgcc	ggccagcgcc	ggggggcgca	gtgcacacga	gggggctgga	cttcgctggt 960
gatatctaca	tctgggcgcc	cctggccggg	acttgtgggg	tcttctctct	gtcactgggt 1020
atcacccttt	actgcaaacg	gggcagaaa	aaactcctgt	atataattcaa	acaaccattt 1080
atgagaccag	tacaaactac	tcaagaggaa	gatggctgta	gctgcccatt	tcagaaagaa 1140
gaagaaggag	gatgtgaact	gagagtgaag	ttcagcagga	gcgcagacgc	ccccgcgtac 1200
aagcagggcc	agaaccagct	ctataacgag	ctcaatctag	gacgaagaga	ggagtacgat 1260
gttttggaca	agagacgtgg	ccgggacctg	gagatggggg	gaaagccgag	aaggagaagaa 1320
cctcaggaag	gcctgtacaa	tgaactgcag	aaagataaga	tggcggaggc	ctacagttag 1380
attgggatga	aaggcgagcg	ccggaggggc	aaggggcacg	atggccttta	ccagggtctc 1440
agtacagcca	ccaaggacac	ctacgacgcc	cttcacatgc	aggccctgcc	ccctcgccat 1500

10

20

30

40

50

atgggaagcg	gagctactaa	cttcagcctg	ctgaagcagg	ctggagacgt	ggaggagAAC	1560
cctggacctg	gagtgacagg	ggagactatc	tccccaggag	acggggcgac	cttccccaaG	1620
cgcggccaga	cctgcgtggt	gcactacacc	gggatgcttg	aagatggaaa	gaaagttagt	1680
tcttccccgg	acagaaacaa	gccctttaag	tttatgctag	gcaagcagga	ggtgatccga	1740
ggctgggaag	aaggggttgc	ccagatgagt	gtgggtcaga	gagccaaact	gactatatct	1800
ccagattatg	cctatggtgc	cactgggcac	ccaggcatca	tcccaccaca	tgccactctc	1860
gtcttcgatg	tggagcttct	aaaactggaa	tctggcggtg	gctccggatt	tggtagtgtc	1920
ggtgctcttg	agagtttgag	gggaaatgca	gatttggtct	acatcctgag	catggagccc	1980
tgtggccact	gcctcattat	caacaatgtg	aacttctgcc	gtgagtcagg	gctccgcacc	2040
cgcactggct	ccaacatcga	ctgtgagaag	ttgcggcgct	gcttctcctc	gctgcatttc	2100
atggtggagg	tgaagggcga	cctgactgcc	aagaaaatgg	tgctggcttt	gctggagctg	2160
gcgcggcagg	accacggtgc	tctggactgc	tgcgtggtgg	tcattctctc	tcacggctgt	2220
caggccagcc	acctgcagtt	cccaggggct	gtctacggca	cagatggatg	ccctgtgtcg	2280
gtcgagaaga	ttgtgaacat	cttcaatggg	accagctgcc	ccagcctggg	aggggaagccc	2340
aagctctttt	tcatccaggc	ctgtggtggg	gagcagaaa	accatgggtt	tgaggtggcc	2400
tccacttccc	ctgaagacga	gtccccctgg	agtaaccccg	agccagatgc	caccccgttc	2460
cagggaaggt	tgaggacett	cgaccagctg	gacgccatat	ctagtttgcc	cacaccaggt	2520
gacatctttg	tgtctacttc	tactttccca	ggttttgttt	cctggaggga	ccccaaagag	2580
ggctcctggg	acgttgagac	cctggacgac	atctttgagc	agtgggctca	ctctgaagac	2640
ctgcagtcct	tcctgcttag	ggtcgctaag	gctgtttcgg	tgaagggat	ttataaacag	2700
atgctcggtt	gctttaattt	cctccggaag	aaacttttct	ttaaaacatc	ataa	2754
SEQ ID NO: 60 CCR4(KW L2H)-FKBP-iCasp9-アミノ酸						
MALPVTALLL	PLALLLHAAR	PGSDVLMTQS	PLSLPVTPE	PASISCRSSR	NIVHINGDITY	60
LEWYLQKPGQ	SPQLLIYKVS	NRFSGVPDRF	SGSGSGTDF	LKISRVEAED	VGYYCFQGS	120
LLPWTFGQGT	KVEIKGGGGS	GGGSGGGGGS	GGGSGEVQLV	ESGGDLVQPG	RSLRLSCAAS	180
GFIFSNYGMS	WVRQAPGKGL	EWVATISSAS	TYSYYPDSVK	GRETFISRDN	KNSLYLQMNS	240
LRVEDTALY	CGRHSDGNFA	FGWVGQGLV	TVSSSGTTFP	APRPPTPAPT	IASQPLSLRP	300
EACRPAAGGA	VHTRGLDFAC	DIYIWAFLAG	TCGVLLLSLV	ITLYCKRGRK	KLLYIFKQPF	360
MRPVQTTQEE	DGCSCRFPPE	EEGGCELVRK	FSRSADAPAY	KQGQNQLYNE	LNLGRREEYD	420
VLDKRRGRDP	EMGGKRRRKN	PQEGLYNELQ	KDKMAEAYSE	IGMKGERRRR	KGHDGLYQGL	480
STATKDTYDA	LHMQLAPPRH	MMSGATNFSL	LKQAGDVEEN	PGPGVQVETI	SPGDGRTPFK	540
RGQTCVVHYT	GMLEDGKKVD	SSRDRNKPFK	FMLGKQEVIR	GWEEGVAQMS	VGQRAKLTI	600
PDYAYGATGH	PGIIPPHATL	FDVVELLKLK	SGGSGGFGDV	GALESRLRGA	DLAYILSMEP	660
CGHCLIIINV	NFCRESGLRT	RTGSNIDCEK	LRRRFSSLHF	MVEVKGDLTA	KKMYLALLEL	720
ARQDHGALDC	CVVVLISHGC	QASHLQFFGA	VYGTGCGPVS	VEKIVNIFNG	TSCPSLGGKP	780
KLFFIQACGG	EQKDHGFEVA	STSPEDSPFG	SNPEPDATPF	QEGLRTFDQL	DAISSLPTPS	840
DIFVSYSTFP	GFVSWRDPKS	GSWYVETLDD	IFEQWAHSED	LQSLLLRVAN	AVSVKGIYKQ	900
MPGCFNFLRK	KLFFKTS					917
SEQ ID NO: 61 CCR4(KW L2H) CAR-ヌクレオチド						
atggccctgc	ctgtgacagc	cctgctgctg	cctctggctc	tgtctgtgca	tgcgctaga	60
cccgatccg	acgtgctgat	gacacagagc	cctctgagcc	tgctgtgac	acctggcgaa	120
cctgccagca	tcagctgcag	atccagccgg	aacatcgctg	acatcaacgg	cgacacctac	180
ctggaatggt	atctgcagaa	gcccggccag	tctcctcagc	tgtctgatca	caaggtgtcc	240
aaaccggttc	gcggcggtgc	cgatagattt	tctggcagcg	gctctggcac	cgacttcacc	300
ctgaagatct	ccagagtggg	agccgaggac	gtggcggtgt	actactgctt	ccaaggtctc	360
ctgctgccct	ggacatttgg	ccagggcacc	aaggtggaaa	tcaagggagg	aggtggatca	420
ggtggagggt	gaagcggggg	aggaggttcc	ggcggcggag	gatcagaagt	tcagctggtt	480
gagtctggcg	gcgacctggt	tcagcctggc	agatctctga	gactgagctg	tgcgccagc	540
ggcttcatct	tcagcaacta	cgcatgagc	tgggtccgac	aggccctggg	aaaaggactg	600
gaatgggtcg	ccacaatcag	cagcgccagc	acctacagct	actaccccca	tagcgtgaag	660
ggcagattca	ccatcagccg	ggacaacgcc	aagaacagcc	tgtacctgca	gatgaactcc	720
ctgcrcgtgg	aagatacagc	cctgtactat	tgcggcagac	acagcgacgg	caacttcgcc	780
tttggtctatt	ggggccaggg	aaccctggtc	accgtttcta	gttccggaac	cacgacgcca	840
gcgcccgcac	caccaacacc	ggcgccacc	atcgcgctgc	agccctgtgc	cctgcgccca	900
gaggcggtgc	ggccagcgcc	ggggggcgca	gtgcacacga	gggggctgga	cttcgctgtg	960
gatatctaca	tctggggcgc	cttggccggg	acttgtgggg	tccttctcct	gtcactggtt	1020
atcacccttt	actgcaaacg	gggcagaaag	aaactcctgt	atatattcaa	acaaccattt	1080
atgagaccag	tacaaactac	tcaagaggaa	gatggctgta	gctgccgatt	tccagaagaa	1140
gaagaaggag	gatgtgaact	gagagtgaag	ttcagcagga	gcgcagacgc	ccccgcgtac	1200
aagcaggggc	agaaccagct	ctataacgag	ctcaatctag	gacgaagaga	ggagtacgat	1260
gttttgga	agagacgtgg	ccgggaccct	gagatggggg	gaaagccgag	aagggaagaa	1320
cctcaggaa	gcctgtacaa	tgaactgcag	aaagataaga	tggcggaggg	ctacagttag	1380
attgggatga	aaggcgagcg	ccggaggggc	aaggggcacg	atggccttta	ccagggtctc	1440
agtacagcca	ccaaggacac	ctacgacgcc	cttcacatgc	aggccctgcc	ccctcgccat	1500
atg						1503

10

20

30

40

SEQ ID NO: 62	CCR4(KW L2H) CAR – アミノ酸		
MALPVTALLL	PLALLLHAAR	PGSDVLMTQS	PLSLPVTPE PASISCRSSR NIVHINGDTY 60
LEWYLQKPGQ	SPQLLIYKVS	NRFSGVPDRF	SGSGSGTDFE LKISRVEAED VGVYYCFQGS 120
LLPWTFGQGT	KVEIKGGGGS	GGGGSGGGGS	GGGGSEVQLV ESGGDLVQPG RSLRLSCAAS 180
GFIESNYGMS	WVRQAPGKGL	EWVATISSAS	TYSYYPDSVK GRFTISRDNA KNSLYLQMNS 240
LRVEDTALYY	CGRHSDGNFA	FGYWGQGTLV	TVSSSGTTTP APRPPTPAPT IASQPLSLRP 300
EACRPAAGGA	VHTRGLDFAC	DIYIWAPLAG	TCGVLLLSLV ITLYCKRGRK KLLYIFKQPF 360
MRPVQTTQEE	DGCSCRFPEE	EEGGCELRVK	FSRSADAPAY KQGQNQLYNE LNLGRREEYD 420
VLDKRRGRDP	EMGGKPRRKN	PQEGLYNELQ	KDKMAEAYSE IGMKGERRRG KGHGDLYQGL 480
STATKDTYDA	LHMQLPPRH	M	501
SEQ ID NO: 63	P2A – スクレオチド		
ggaagcggag	ctactaacct	cagcctgctg	aagcaggctg gagacgtgga ggagaacct 60
ggacct			66
SEQ ID NO: 64	P2A – アミノ酸		
GSATNFSL	KQAGDVEENP	GP	22
SEQ ID NO: 65	FKBP-iCasp9 – スクレオチド		
ggagtgcagg	tggagactat	ctccccagga	gacggggcgca ccttccccaa gcgcggccag 60
acctgctggg	tgcactacac	cgggatgctt	gaagatggaa agaaagtga ttctctcccg 120
gacagaaaca	agccctttaa	gtttatgcta	ggcaagcagg aggtgatccg aggctgggaa 180
gaaggggttg	cccagatgag	tgtgggtcag	agagccaaac tgactatata tccagattat 240
gcctatgggt	ccactgggca	cccaggcatc	atccccaccac atgccactct cgtcttcgat 300
gtggagcttc	taaaactgga	atctggcggt	ggctccggat ttggtgatgt cgtgtctctt 360
gagagtttga	ggggaatgct	agatttggct	tacatcctga gcatggagcc ctgtggccac 420
tgctcattta	tcaacaatgt	gaacttctgc	cgtgagtcgc ggctccgcac ccgcactggc 480
tccaacatcg	actgtgagaa	gttgccggct	cgcttctcct cgctgcattt catggtggag 540
gtgaagggcg	acctgactgc	caagaaaatg	gtgctggctt tgctggagct ggccggcgag 600
gaccacgggtg	ctctggactg	ctgcgtgggt	gtcattctct ctacggctg tcaggccagc 660
cacctgcagt	tcccaggggc	tgtctacggc	acagatggat gccctgtgtc ggtcgagaag 720
attgtgaaca	tcttcaatgg	gaccagctgc	cccagcctgg gaggaagcc caagctcttt 780
tteatccagg	cctgtgggtg	ggagcagaaa	gaccatgggt ttgaggtggc ctccacttcc 840
cctgaagacg	agtcacctgg	cagtaacccc	gagccagatg ccaccccggt ccaggaaagt 900
ttgaggacct	tcgaccagct	ggacgccata	tctagtttgc ccacacccag tgacatcttt 960
gtgtcctact	ctactttccc	aggttttgtt	tcctggaggg accccaagag ttgctcctgg 1020
tacgttgaga	ccctggacga	catcttttag	cagtgggctc actctgaaga cctgcagctc 1080
ctcctgctta	gggtcgctaa	tgctgtttcg	gtgaaaggga ttataaaca gatgcctggg 1140
tgctttaatt	tcctccggaa	aaaacttttc	tttaaaacat cataa 1185
SEQ ID NO: 66	FKBP-iCasp9 – アミノ酸		
GVQVETISPG	DGRTFPKRGQ	TCVVHYTGML	EDGKKVDSSR DRNKPFKFML GKQEVIRGWE 60
EGVAQMSVGG	RAKLITSPDY	AYGATGHPGI	IPPHATLVFD VELLKLESGG GSGFGDVGAL 120
ESLRGNADLA	YILSMPCGHH	CLINNVNFC	RESGLRTRTG SNIDCEKLRR RFSSLFHFMVE 180
VKGDLTAKKM	VLALLELARQ	DHGALDCCVV	VILSHGCQAS HLQFPGAVYG TDGCPVSVKE 240
IVNIFNGTSC	PSLGKPKLF	FIQACGGEQK	DHGFVAVSTS PEDESPGSNP EPDAPFQEG 300
LRTFDQLDAI	SSLPTPSDIF	VSYSTFPGFV	SWRDPKSGSW YVETLDDIFE QWAHSEDLQS 360
LLLVRVANA	VKGIYQMPG	CENFLRKLF	FKTS 394
E. CCR4(KW L2H)-単純ヘルペスウイルス1型チミジンキナーゼ (HSVTK) 枯渴系			
SEQ ID NO: 67	CCR4(KW L2H)-HSVTK – スクレオチド		
atggccctgc	ctgtgacagc	cctgtgctgc	cctctggctc tgctgtgca tgccgctaga 60
cccgatcccg	acgtgctgat	gacacagagc	cctctgagcc tgccgtgtgac acctggcgaa 120
cctgccagca	tcagctgcag	atccagccgg	aacatcgtgc acatcaacgg cgacacctac 180
ctggaatggt	atctgcagaa	gcccgccag	tctcctcagc tgctgatcta caaggtgtcc 240
aaccgggttca	gcggcggtgc	cgatagattt	tctggcagcg gctctggcac cgacttcacc 300
ctgaagatct	ccagagtggg	agccgaggac	gtggcgctgt actactgctt ccaaggctct 360
ctgctgcctc	ggacatttgg	ccaggggcacc	aaggtggaaa tcaagggagg aggtggatca 420
gggtggagggtg	gaagcggggg	aggaggttcc	ggcgggcgag gatcagaagt tcagctgggt 480
gagtcctggcg	gcgacctggt	tcagcctggc	agatctctga gactgagctg tgccgccagc 540
ggcttcatct	tcagcaacta	cgcatgagc	tgggtccgac agggccctgg aaaaggactg 600
gaatgggtcg	ccacaatcag	cagcgccagc	acctacagct actacccga tagcgtgaag 660
ggcagattca	ccatcagccg	ggacaacgcc	aagaacagcc tgtacctgca gatgaactcc 720
ctgcgcgtgg	aagatacagg	cctgtactat	tgcggcagac acagcgacgg caacttcgcc 780
tttggctatt	ggggccaggg	aaccctggtc	accgtttcta gttccgggaa cacgacgcca 840
gcgcgcgcgc	caccaacacc	ggcgccacc	atcgctgcgc agccctgtc cctgcgccc 900
gaggcggtgc	ggccagcgcc	ggggggcgca	gtgcacacga gggggctgga cttcgccgtg 960
gatattctaca	tctgggcgcc	cttggccggg	acttgtgggg tccttctcct gtcactgggt 1020

10

20

30

40

50

atcaccccttt	actgcaaacg	gggcagaaag	aaactcctgt	atatattcaa	acaaccattt	1080
atgagaccag	tacaaactac	tcaagaggaa	gatggctgta	gctgccgatt	tccagaagaa	1140
gaagaaggag	gatgtgaaat	gagagtgaag	ttcagcagga	gcgcagacgc	ccccgcgtac	1200
aagcagggcc	agaaccagct	ctataacgag	ctcaatctag	gacgaagaga	ggagtacgat	1260
gttttggaca	agagacgtgg	ccgggacctg	gagatggggg	gaaagccgag	aaggaagaa	1320
cctcagggaag	gcctgtacaa	tgaactgcag	aaagataaga	tggcggaggc	ctacagtgaag	1380
attgggatga	aaggcgagcg	ccggaggggc	aaggggcacg	atggccctta	ccagggtctc	1440
agtacagcca	cacaacaccg	cctcgaccag	cttcacatgc	agggccctgc	ccctcgcgga	1500
agcggagcta	ctaacttcag	cctgctgaag	caggctggag	acgtggagga	gaaccttgga	1560
cctatggcct	cgtacccctg	ccatcaacac	gcgtctcgct	tcgaccagcg	tgcgcgttct	1620
cgcgcccata	gcaaccgacg	tacggcgctt	cgccctcgcc	ggcagcaaga	agccacggaa	1680
gtccgcctgg	agcagaaaaa	gcccacgcta	ctgcccgttt	atatagacgg	tcctcacggg	1740
atggggaaaa	ccaccaccac	gcaactgctg	gtggccctgg	gttcgcgcga	cgatatcgct	1800
tacgtacccg	agccgatgac	ttactggcag	gtgctggggg	cttcagagac	aatcgcgaa	1860
atctacacca	cacaacaccg	cctcgaccag	ggcgagatat	cggccgggga	cgcgccggtg	1920
gtaatgacaa	gcgcccagat	aacaatgggc	atgccttatg	ccgtgaccga	cgccgttctg	1980
gctcctcatg	tcggggggga	ggctgggagt	tcacatgccc	cggcccccgc	cctcaccctc	2040
atcttcgacc	gcccctccat	cgccgccttc	ctgtgctacc	cgccgcgcgc	ataccttatg	2100
ggcagcatga	ccccccagcg	cgtgctggcg	ttcgtggccc	tcaccccgcc	gaccttgccc	2160
ggcacaacaa	tcgtgttggg	ggcccttccg	gaggacagac	acatcgaccg	cctggccaaa	2220
cgccagcgcc	ccggcgagcg	gcttgacctg	gctatgctgg	ccgcgattcg	ccgcgtttac	2280
gggctgcttg	ccaataccgt	cggggtatct	cagggcgcgc	ggctggtgtg	ggaggattgg	2340
ggacagcttt	cggggacggc	cgtgcccgcg	cagggtgccc	agccccagag	caacgcgggc	2400
ccacgacccc	atatcgggga	cacggttatt	accctgtttc	gggccccga	gttgcctggc	2460
cccaacggcg	acctgtataa	cgtgtttgcc	tggcccttgg	acgtcttggc	caaacgcctc	2520
cgtcccatgc	acgtctttat	cctggattac	gaccaatcgc	ccgcggcgtg	ccgggacgcc	2580
ctgctgcaac	ttacctccgg	gatggtccag	accacgctca	ccaccccagg	ctccataaccg	2640
acgatctgcg	acctggcgcg	cacgtttgcc	cgggagatgg	gggagggctaa	ctaa	2694
SEQ ID NO: 68 CCR4(KW L2H)-HSVTK-アミノ酸						
MALPVTALLL	PLALLLHAAR	PGSDVLMTQS	PLSLPVTPE	PASISCRSSR	NIVHINGDTY	60
LEWYLQKPGQ	SPQLLIYKVS	NRFSGVPDRF	SGSGSGTDFT	LKISRVEAED	VGVIYCFQGS	120
LLPWTFGQGT	KVEIKGGGGS	GGGSGGGGGS	GGGSEVQLV	ESGGLVQPG	RSLRLSCAAS	180
GFIFSNYGMS	WVRQAPGKGL	EWVATISSAS	TYSYYPDSVK	GRFTISRDNA	KNSLYLQMNS	240
LRVEDTALYY	CGRHSDGNFA	FGYWGGTTLV	TVSSSGTTTP	APRPPTPAPT	IASQPLSLRP	300
EACRPAAGGA	VHTRGLDFAC	DIYIWAFLAG	TCGVLLLSLV	ITLYCKRGRK	KLLYIFKQPF	360
MRPVQTTQEE	DGSCRFPEE	EEGGCELVRK	FSRSADAPAY	KQQNQLYNE	LNLGRREEYD	420
VLDKRRGRDP	EMGGKPRRRN	PQEGLYNELQ	KDKMAEAYSE	IGMKGERRRG	KGHDGLYQGL	480
STATKDYTDA	LHMQALPPRG	SGATNFSLLK	QAGDVEENPG	PMASYPCHQH	ASAFDQAARS	540
RGHSNRRRTAL	RPRRQQEATE	VRLEQKMPPL	LRVIDGPHG	MGKTTTTLQL	VALGSRDDIV	600
YVPEPMTYWQ	VLGASETIAN	IYTTQHRLDQ	GEISAGDAAV	VMTSAQITMG	MPYAVTDAVL	660
APHVGGGEAGS	SHAPPALTL	IFDRHPHIAL	LCYPAARYLM	GSMTPOAVLA	FVALIPTPLP	720
GTNIVLGALP	EDRHIDRLAK	RQRPGERLDD	AMLAAIRRVY	GLLANTVRYL	QGGGSWWEDW	780
GQLSGTAVFP	QGAEPQSNAG	PRPHIGDTLF	TLFRAPELLA	PNGDLNVFA	WALDVLAKRL	840
RPMHVFIIDY	DQSPAGCRDA	LLQLTSGMVQ	THVTTPGSIP	TICDLARTFA	REMGEAN	897
SEQ ID NO: 69 CCR4(KW L2H) CAR-ヌクレオチド						
atggccctgc	ctgtgacagc	cctgctgctg	cctctggctc	tgctgctgca	tgccgctaga	60
cccggatccg	acgtgctgat	gacacagagc	cctctgagcc	tgccgtgtgac	acctggcgaa	120
cctgccagca	tcagctgcag	atccagccgg	aacatcgtgc	acatcaacgg	cgacacctac	180
ctggaatggt	atctgcagaa	gcccggccag	tctcctcagc	tgctgatcta	caaggtgtcc	240
aaccggttca	gcggcggtgc	cgatagattt	tctggcagcg	gctctggcac	cgacttcacc	300
ctgaagatct	ccagagtggg	agccgaggac	gtggcgctgt	actactgctt	ccaaggctct	360
ctgctgccct	ggacatttgg	ccagggcacc	aagggtgaaa	tcaagggagg	aggtggatca	420
ggtggagggt	gaagcggggg	aggaggttcc	ggcggcgagg	gatcagaagt	tcagctggtt	480
gagtctggcg	gcgacctggt	tcagcctggc	agatctctga	gactgagctg	tgccgccagc	540
ggcttcatct	tcagcaacta	cggcattgag	tgggtccgac	agggccctgg	aaaaggactg	600
gaatgggtcg	ccacaatcag	cagcgccagc	acctacagct	actaccccca	tagcgtgaag	660
ggcagattca	ccatcagccg	ggacaacgcc	aagaacagcc	tgtacctgca	gatgaactcc	720
ctgcgcgtgg	aagatacagc	cctgtactat	tgcggcagac	acagcgacgg	caacttcgcc	780
tttggtctatt	ggggccaggg	aacctgggtc	accgtttcta	gttcgggaac	cacgacgcca	840
gcgcgcgcag	caccaacacc	ggcgccacc	atcgctgcgc	agccctgtgc	cctgcgccca	900
gaggcggtgcc	ggccagcggc	ggggggcgca	gtgcacacga	gggggctgga	cttcgcctgt	960
gatatctaca	tctgggcggc	cttggccggg	acttgtgggg	tcctctctct	gtcactggtt	1020
atcacccctt	actgcaaacg	gggcagaaag	aaactcctgt	atatattcaa	acaaccattt	1080
atgagaccag	tacaaactac	tcaagaggaa	gatggctgta	gctgccgatt	tccagaagaa	1140
gaagaaggag	gatgtgaaat	gagagtgaag	ttcagcagga	gcgcagacgc	ccccgcgtac	1200
aagcagggcc	agaaccagct	ctataacgag	ctcaatctag	gacgaagaga	ggagtacgat	1260

10

20

30

40

50

gttttgga	agagacgtg	ccgggacct	gagatgggg	gaaagccgag	aaggaagaac	1320
cctcaggaag	gcctgtacaa	tgaactgcag	aaagataaga	tggcggaggg	ctacagtgag	1380
attgggatga	aaggcgagcg	ccggaggggc	aaggggcacg	atggccttta	ccagggtctc	1440
agtacagcca	ccaaggacac	ctacgacgcc	cttcacatgc	aggccctgcc	ccctcgccat	1500
atg						1503
SEQ ID NO: 70 CCR4(KW L2H) CAR-アミノ酸						
MALPVTALLL	PLALLLHAAR	PGSDVLMTQS	PLSLPVTPE	PASISCRSSR	NIVHINGDTY	60
LEWYLQKPGQ	SPQLLIYKVS	NRFSGVPDRF	SGSGSGTDFT	LKISRVEAED	VGVYYCFQGS	120
LLPWTFGGGT	KVEIKGGGGS	GGGSGGGGGS	GGGSEVQLV	ESGGDLVQPG	RSRLRLSCAAS	180
GFIFSNYGMS	WVRQAPGKGL	EWVATISSAS	TYSYYPDSVK	GRFTISRDN	KNSLYLQMNS	240
LRVEDTALYY	CGRHSDGNFA	FGYWGQGTLV	TVSSSGTTP	APRPPTPAPT	IASQPLSLRP	300
EACRPAAGGA	VHTRGLDFAC	DIYIWAPLAG	TCGVLLLSLV	ITLYCKRGRK	KLLYIFKQPF	360
MRPVQTTQEE	DGCSRFPFEE	EEGGCELRVK	FSRSADAPAY	KQGQNQLYNE	LNLRREEYD	420
VLDKRRGRDP	EMGGKERRKN	PQEGLYNELQ	KDKMAEAYSE	IGMKGERRRG	KGHGDLVQGL	480
STATKDTYDA	LHMQLFPRH	M				501
SEQ ID NO: 71 P2A-ヌクレオチド						
ggaagcggag	ctactaacct	cagcctgctg	aagcaggctg	gagacgtgga	ggagaacctt	60
ggacct						66
SEQ ID NO: 72 P2A-アミノ酸						
GSGATNFSLL	KQAGDVEENP	GP				22
SEQ ID NO: 73 HSVTK-ヌクレオチド						
atggcttcgt	acccctgcca	tcaacacgcg	tctgcgttcg	accagcgtgc	gcgttctcgc	60
ggccatagca	accgacgtac	ggcgttgcgc	cctcgccggc	agcaagaagc	cacggaagtc	120
cgctcggagc	agaaaatgcc	cacgtactgc	cgggtttata	tagacggtec	tcacgggatg	180
gggaaaacca	ccaccacgca	actgctgggt	gccctgggtt	cgcgcgacga	tatcgtctac	240
gtacccgagc	cgatgactta	ctggcaggtg	ctgggggctt	ccgagacaat	cgcgaacatc	300
tacaccacac	aacaccgcct	cgaccagggc	gagatatcgg	ccgggggacgc	ggcggtggta	360
atgacaagcg	ccagataaac	aatgggcatg	ccttatgccg	tgaccgacgc	cgttctggct	420
cctcatgtcg	ggggggaggc	tgggagttca	catgccccgc	ccccggccct	cacctcatc	480
ttcgaccgcc	atcccatcgc	cgcctcctgc	tgtaccgcgc	ccgcgcgata	ccttatgggc	540
agcatgaccc	cccaggccgt	gctggcgctc	gtggccctca	tcccgcgcgc	cctgcccggc	600
acaaacatcg	tgttgggggc	ccttccggag	gacagacaca	tcgaccgcct	ggccaaacgc	660
cagcgccccc	gcgagcggct	tgacctggct	atgctggccg	cgattcgcgc	cgtttacggg	720
ctgcttgcca	ataggttgcg	gtatctgcag	ggcgccgggt	cgtggtggga	ggattgggga	780
cagcttttcg	ggacggccgt	gcgcgccag	ggtgccgagc	cccagagcaa	cgcgggcccc	840
cgaccccata	tcggggacac	gttatttacc	ctgtttcggg	cccccgagtt	gctggccccc	900
aacggcgacc	tgtataacgt	gtttgcctgg	gccttggaag	tcttgggcaa	acgcctccgt	960
cccatgcacg	tctttatcct	ggattacgac	caatcgccgc	ccggctgcgc	ggacgcctgc	1020
ctgcaactta	cctccgggat	ggtccagacc	cacgtcacca	ccccaggctc	cataccgacg	1080
atctgcgacc	tggcgcgcac	gtttgcctcg	gagatggggg	aggctaacta	a	1131
SEQ ID NO: 74 HSVTK-アミノ酸						
MASYFCHQHA	SAFDQAARSR	GHSNRRRTALR	PRRQQEATEV	RLEQKMPTLL	RVYIDGPHGM	60
GKTTTTLQLL	ALGSRDDIVY	VPEPMTYWQV	LGASETIANI	YTTQHRDLQG	EISAGDAAVV	120
MTSAQITMGM	PYAVTDAVLA	PHVGGEAGSS	HAPPPALTLI	FDRHPIAALL	CYPAARYLMG	180
SMTQAVALAF	VALIPTPLPG	TNIVLGLALPE	DRHIDRLAKR	QRPGERLDLA	MLAAIRRVYG	240
LLANTVRYLQ	GGGSWWEDWG	QLSGTAVPPQ	GAEPQSNAGP	RPHIGDTLFT	LFRAPELLAP	300
NGDLNVNFAW	ALDVLAKRLR	PMHVFIIDYD	QSPAGCRDAL	LQLTSGMVQT	HVTTPGSIPT	360
ICDLARTFAR	EMGEAN					376
F. dnTGFRII-CCR4(KW L2H)-HSVTK(最前部) 枯渇系						
SEQ ID NO: 75 dnTGFRII-CCR4(KW L2H)-HSVTK-ヌクレオチド						
atgggtcggg	ggctgctcag	gggcctgtgg	ccgctgcaca	tcgtcctgtg	gacgcgtatc	60
gccagcacga	tcccaccgca	cgttcagaag	tcggatgtgg	aaatggaggg	ccagaaagat	120
gaaatcatct	gccccagctg	taataggact	gcccattccac	tgagacatat	taataacgac	180
atgatatgca	ctgacaacaa	cgggtgcagtc	aagtttccac	aactgtgtaa	attttgtgat	240
gtgagatttt	ccacctgtga	caaccagaaa	tcctgcatga	gcaactgcag	catcacctcc	300
atctgtgaga	agccacagga	agtctgtgtg	gctgtatgga	gaaagaatga	cgagaacata	360
acactagaga	cagtttgcca	tgaccccaag	ctcccctacc	atgactttat	tctggaagat	420
gctgcttctc	caaagtgcac	tatgaaggaa	aaaaaaaagc	ctggtgagac	tttcttcatg	480
tgcttctgta	gctctgatga	gtgcaatgac	aacatcatct	tctcagaaga	atataacacc	540
agcaatctcg	acttgttgct	agtcataatt	caagtgcagc	gcacagccct	cctgccacca	600
ctgggagttg	ccatatctgt	catcatcatc	ttctactgct	accgcgttaa	ccggcagcag	660
aagctgggca	gcggcgaggg	cagaggcagc	ctgctgacct	gcggcgacgt	ggaggagaac	720
cccgacaccta	tggccctgcc	tgtgacagcc	ctgctgctgc	ctctggctct	gctgctgcat	780
gccgctagac	ccggatccga	cgtgctgatg	acacagagcc	ctctgagcct	gctgtgaca	840

10

20

30

40

50

cctggcgaa	ctgccagcat	cagctgcaga	tccagccgga	acatcgtgca	catcaacggc	900
gacaccta	tggaatgga	tctgcagaag	cccgccag	ctctcagct	gctgatctac	960
aaggtgtcca	accggttcag	cggcggtgcc	gatagatttt	ctggcagcgg	ctctggcacc	1020
gacttcaccc	tgaagatctc	cagagtggaa	gccgaggacg	tgggcgtgta	ctactgtctc	1080
caaggctctc	tgctgccctg	gacatttggc	cagggcacca	aggtggaaat	caaggaggga	1140
ggtggatcag	gtggagggtg	aagcggggga	ggaggttccg	gcggcggagg	atcagaagtt	1200
cagctggttg	agtctggcgg	cgacctggtt	cagcctggca	gatctctgag	actgagctgt	1260
gccgccagcg	gcttcatctt	cagcaactac	ggcatgagct	gggtccgaca	ggcccttggg	1320
aaaggactgg	aatgggtcgc	cacaatcagc	agcgccagca	cctacagcta	ctaccccgat	1380
agcgtgaagg	gcagattcac	catcagccgg	gacaacgcca	agaacagcct	gtacctgcag	1440
atgaactccc	tgcgcgtgga	agatacagcc	ctgtactatt	gcggcagaca	cagcgacggc	1500
aacttcgctt	ttggctattg	gggccaggga	accctggcca	ccgtttctag	ttccggaacc	1560
acgacgccag	cgccgcgacc	accaaacacc	gcgcccacca	tcgcgtcgca	gccctgtctc	1620
ctgcgcccag	aggcgtgccg	gccagcgggc	gggggcgcag	tgcacacgag	ggggctggag	1680
ttcgccctgtg	atatctacat	ctgggcgccc	ttggccggga	cttgtggggt	cttctcctcg	1740
tcactggtta	tcacccttta	ctgcaaacgg	ggcagaaaga	aactcctgta	tatattcaaa	1800
caaccattta	tgagaccagt	acaaactact	caagaggaa	atggctgtag	ctgccgattt	1860
ccagaagaag	aagaaggagg	atgtgaactg	agagtgaagt	tcagcaggag	cgcagacgcc	1920
cccgcgtaca	agcagggcca	gaaccagctc	tataacgagc	tcaatctagg	acgaagagag	1980
gagtacgatg	ttttggacaa	gagacgtggc	cgggaccctg	agatgggggg	aaagccgaga	2040
aggaagaacc	ctcaggaagg	cctgtacaat	gaactgcaga	aagataagat	ggcggaggcc	2100
tacagtgaga	ttgggatgaa	aggcgagcgc	cggaggggca	aggggcacga	tgccctttac	2160
cagggtctca	gtacagccac	caaggacacc	tacgacgccc	ttcacatgca	ggccctgccc	2220
cctcgcgga	gcggagctac	taacttcagc	ctgctgaagc	aggctggaga	cgtggaggag	2280
aacctgggac	ctatggcttc	gtacccctgc	catcaacacg	cgctctgcgt	cgaccaggct	2340
gcgcgtttct	gcggccatag	caaccgacgt	acggcgttgc	gccctcgccg	gcagcaagaa	2400
gccacggaag	tccgcctgga	gcagaaaatg	cccacgctac	tgccgggtta	tatagacggt	2460
cctcacggga	tggggaaaac	caccaccacg	caactgctgg	tggccctggg	ttcgcgcgac	2520
gatatcgtct	acgtacccga	gccgatgact	tactggcagg	tgctgggggc	ttccgagaca	2580
atcgcgaaac	tctacaccac	acaacaccgc	ctcgaccagg	gcgagatata	ggccggggag	2640
gcggcggttg	taatgacaag	cgcccagata	acaatgggca	tgcccttatg	cgtgaccgac	2700
gcgcttcttg	ctcctcatgt	cgggggggag	cggtggagtt	caacatgccc	gcccccgggc	2760
ctcaccctca	tcttcgacgg	ccatcccatc	gccgcccctc	tggtctaccc	ggccgcgcga	2820
taccttatgg	gcagcatgac	cccccaggcc	gtgctggcgt	tcgtggccct	catcccgcgc	2880
accttgcccg	gcacaaacat	cgtgttgggg	gcccttcggg	aggacagaca	catcgaccgc	2940
ctggccaaac	gccagcgccc	cggcgagcgg	cttgacctgg	ctatgctggc	cgcgattcgc	3000
cgcgttttac	ggctgcttgc	caatacgggt	cggtatctgc	agggcgcgcg	gtcgtggttg	3060
gaggattggg	gacagcttct	ggggacgggc	gtgcgcggcc	agggtgccga	gccccagagc	3120
aacgcggggc	cagcacccca	tatcggggac	acgttattta	ccctgtttcg	ggcccccgag	3180
ttgctgcccc	ccaacggcga	cctgtataac	gtgtttgctc	gggccttgga	cgtcttgggc	3240
aaacgcctcc	gtcccatgca	cgtctttatc	ctggattacg	accaatcgcc	cgccggetgc	3300
cgggacgccc	tgctgcaact	tacctcggg	atggtccaga	cccacgtcac	cacccagggc	3360
tccataccga	cgatctcgca	cctggcgcg	acgtttgccc	gggagatggg	ggaggctaac	3420
taa						3423

SEQ ID NO: 76	dnTGFRII-CCR4(KW L2H)-HSVTK - アミノ酸	
MGRGLRLGLW	FLHIVLWTRI	ASTIPPHVQK
MIVTDNNGAV	KFPQLCKFC	VRFTCDNQK
TLETVCHDPK	LPYHDFILED	AASPKCIMKE
SNPDLLLVI	QVTGISLLPP	LGVAISVII
PGPMALPVTA	LLLPLALLLH	AARPGSDVLM
DTYLEWYLQK	PGQSPQLLIY	KVSNRFGVFP
QGSLLPWTFG	QGTKEIKKG	GGSGGGSGG
AASGFIFSNY	GMSWVRQAPG	KGLEWVATIS
MNSLRVEDTA	LYYCGRHS	NEAFGYWQ
LRPEACRPAA	GGAVHTRGLD	FACDIYIWAP
QPFMRPVQTT	QEEDGCSCRF	PEEEEGGCEL
EYDVLDKRRG	RDPEMGCKPR	RKNPQEGLYN
QGLSTATKDT	YDALHMQALP	PRGSGATNFS
ARSRGHSNRR	TALRRPRRQE	ATEVRLEQKM
DIVYVPEPMT	YWQVLGASET	IANIYTTQHR
AVLAPHVGGG	AGSSHAPPPA	LTLIFDRHPI
TLPGTNIVLG	ALPEDRHIDR	LAKRQRPGER
EDWGQLSGTA	VPPQGAEPQS	NAGPRPHIGD
KRLRPMHVFI	LDYDQSPAGC	RDALLQLTSG
		MVQTHVTPPG
		SIPTICDLAR
		TFAREMG
		AN
SEQ ID NO: 77	dnTGNbRII - スクレオチド	
atgggctggg	ggctgctcag	gggctctgtg
ccgctgcaca	tcgtcctgtg	gacgcgtatc
		60

10

20

30

40

50

gccagcacga	teccaccgca	cggtcagaag	tcggatgtgg	aaatggaggc	ccagaaagat	120
gaaatcatct	gccccagctg	taataggact	gcccattccac	tgagacatat	taataacgac	180
atgatagtea	ctgacaacaa	cggtgcagtc	aagtttccac	aactgtgtaa	attttgtgat	240
gtgagatttt	ccacctgtga	caaccagaaa	tcctgcatga	gcaactgcag	catcacctcc	300
atctgtgaga	agccacagga	agtctgtgtg	gctgtatgga	gaaagaatga	cgagaacata	360
acactagaga	cagtttgcca	tgacccaag	ctccccacc	atgactttat	tctggaagat	420
gctgcttctc	caaagtgcac	tatgaaggaa	aaaaaaaagc	ctgggtgagac	tttcttcatg	480
tgttctctga	gctctgatga	gtgcaatgac	aacatcatct	tctcagaaga	atataacacc	540
agcaatcctg	acttgttgct	agtcataatt	caagtgcagc	gcatacagct	cctgccacca	600
ctggggagttg	ccatactctg	catcatcatc	ttctactgct	accgcgttaa	ccggcagcag	660
aagctg						666
SEQ ID NO: 78 dnTGNbRII – アミノ酸						
MGRGLLRGLW	PLHIVLWTRI	ASTIPPHVQK	SDVEMEAQKD	EIICPSCNRT	AHPLRHINND	60
MIVTDNNGAV	KFPQLCKFCF	VRESTCDNQK	SCMSNCSITS	ICEKPQEVCV	AVWRKNDENI	120
TLETVCHDFK	LPYHDFILED	AASPKCLMKE	KKKPGETFEM	CSCSSDECND	NIIFSEYNT	180
SNPDLVLVIF	QVTGISLLPP	LGVAISVIII	FYCYRVNRQQ	KL		222
SEQ ID NO: 79 T2A – スクレオチド						
ggcagcgggc	agggcagagg	cagcctgctg	acctgcgggc	acgtggagga	gaaccccgga	60
cct						63
SEQ ID NO: 80 T2A – アミノ酸						
GSGEGRGSL	TCGDVEENP	G				21
SEQ ID NO: 81 CCR4(KW L2H) CAR – スクレオチド						
atggccctgc	ctgtgacagc	cctgtgctg	cctctggctc	tgtgtgtgca	tgcgctaga	60
cccggatccg	acgtgctgat	gacacagagc	cctctgagcc	tgctgtgac	acctggcgaa	120
cctgccagca	tcagctgcag	atccagccgg	aacatcgtgc	acatcaacgg	cgacacctac	180
ctggaatggt	atctgcagaa	gcccggccag	tctctcagc	tgctgatcta	caagggtgctc	240
aaccggttca	gcggcggtgc	cgatagattt	ttggcagcg	gctctggcac	cgacttcacc	300
ctgaagatct	ccagagtgga	agccgaggac	gtggcgctgt	actactgctt	ccaaggctct	360
ctgctgcctc	ggacatttgg	ccagggcacc	aagtggaata	tcaaggggag	aggtggatca	420
ggtggagggtg	gaagcggggg	aggaggttcc	ggcgggcgag	gatcagaagt	tcagctgggt	480
gagctctggc	gcgacctggt	tcagctggc	agatctctga	gactgagctg	tgccgccagc	540
ggcttcatct	tcagcaacta	cgcatgagc	tggttccgac	aggcccttgg	aaaaggactg	600
gaatgggtcg	ccacaatcag	cagcgccagc	acctacagct	actaccccca	tagcgtgaag	660
ggcagattca	ccatcagccg	ggacaacgcc	aagaacagcc	tgtacctgca	gatgaactcc	720
ctgcgctgg	aagatacagc	cctgtactat	tgccgcagac	acagcgacgg	caacttcgcc	780
tttggctatt	ggggccaggg	aaccctggct	accgtttcta	gttccggaac	cacgacgcca	840
gcgcccgcac	caccaaacacc	ggcgcccacc	atcgctctgc	agccctctgc	cctgcgcccc	900
gaggcgctgc	ggccagcgcc	ggggggcgca	gtgcacacga	gggggctgga	cttcgctgtg	960
gatatctaca	tctgggcgcc	cttggccggg	acttggtggg	tccttctcct	gtcactggtt	1020
atcacccctt	actgcaaacg	gggcagaaag	aaactcctgt	atatattcaa	acaaccattt	1080
atgagaccag	tacaaactac	tcaagaggaa	gatggctgta	gctgccgatt	tccagaagaa	1140
gaagaaggag	gatgtgaact	gagagtgaag	ttcagcagga	gcgcagacgc	cccccgctac	1200
aagcaggggc	agaaccagct	ctataacgag	ctcaatctag	gacgaagaga	ggagtacgat	1260
gttttggaca	agagacgtgg	ccgggacctt	gagatggggg	gaaagccgag	aaggaagaac	1320
cctcaggaag	gcctgtacaa	tgaactgcag	aaagataaga	tgggcgaggc	ctacagttag	1380
attgggatga	aagggcgagc	ccggaggggc	aaggggcacg	atggccttta	ccagggtctc	1440
agtacagcca	ccaaggacac	ctacgacgcc	cttcacatgc	aggccctgcc	ccctcgc	1497
SEQ ID NO: 82 CCR4(KW L2H) CAR – アミノ酸						
MALPVTALLL	PLALLLHAAR	PGSDVLMTQS	PLSLFVTPGE	PASISCRSSR	NIVHINGDTY	60
LEWYLQKPGQ	SPQLLIYKVS	NRFSGVPDRF	SGSGSGTDFT	LKISRVEAED	VGYYCFQGS	120
LLPWTFGQGT	KVEIKGGGGS	GGGSGGGGS	GGGSGEVQLV	ESGGDLVQPG	RSRLRLSCAAS	180
GFIFSNYGMS	WVRQAPGKGL	EWVATISSAS	TYSYYPDSVK	GRFTISRDN	KNSLYLQMN	240
LRVEDTALYY	CGRHSDGNFA	FGYWGQGTLV	TVSSSGTTTP	APRPPTPAPT	IASQPLSLRP	300
EACRPAAGGA	VHTRGLDFAC	DIYIWAPLAG	TCGVLLLSLV	ITLYCKRGRK	KLLYIFKQPF	360
MRPVTQTE	DGCSRFPEE	EEGGCELRVK	FSRSADAPAY	KQGQNLQYNE	LNLGRREEYD	420
VLDKRRGRDP	EMGGKPRRN	PQEGLYNELQ	KDKMAEAYSE	IGMKGERRRG	KGHDGLYQGL	480
STATKDTYDA	LHMQLPFR					499
SEQ ID NO: 83 P2A – スクレオチド						
ggaagcgag	ctactaaatt	cagcctgctg	aagcaggctg	gagacgtgga	ggagaacctt	60
ggacct						66
SEQ ID NO: 84 P2A – アミノ酸						
SGGATNFSLL	KQAGDVEENP	GP				22
SEQ ID NO: 85 HSVTK – スクレオチド						
atggcttctg	accctgccca	tcaacacgcg	tctgcgttcg	accaggctgc	gcgttctcgc	60

10

20

30

40

50

ggccatagca	accgacgtac	ggcggttgccg	cctcgccggc	agcaagaagc	cacggaagtc	120
cgcttgagc	agaaaatgcc	cacgctactg	cggtgttata	tagacgggcc	tcacgggatg	180
gggaaaacca	ccaccacgca	actgctgggt	gcccctgggt	cgcgcgacga	tatcgtctac	240
gtacccgagc	cgatgactta	ctggcaggtg	ctgggggctt	ccgagacaat	cgcaaacatc	300
tacaccacac	aacaccgcct	cgaccagggc	gagatatcgg	ccggggagcg	ggcggttgta	360
atgacaagcg	cccagataac	aatgggcatg	ccttatgccg	tgaccgacgc	cgttctggct	420
cctcatgtcg	ggggggaggc	tgggagttca	catgccccgc	ccccggccct	caccctcacc	480
ttcgaccgcc	atcccatcgc	cgccctcctg	tgtaccccg	ccgcgcgata	ccttatgggc	540
agcatgaccc	cccaggccgt	gctggcgctc	gtggccctca	tcccgcggac	cttgcccggc	600
acaacatcgc	tgttgggggc	ccttcgggag	gacagacaca	tcgaccgcct	ggccaaacgc	660
cagcgccccg	gcgagcggt	tgacctggct	atgctggccg	cgattcgccg	cgtttacggg	720
ctgcttgcca	atacggtgcg	gtatctcgag	ggcggggggt	cggtgtggga	ggattgggga	780
cagctttcgg	ggacggccgt	gcccggccag	ggtgcccagc	cccagagcaa	cgcgggccca	840
cgaccccata	tcggggacac	gttatttacc	ctgtttcggg	cccccgagtt	gctggccccc	900
aacggcgacc	tgataaacgt	gtttgcctgg	gccttggaag	tcttgcccaa	acgcctccgt	960
cccattgcacg	tctttatcct	ggattacgac	caatcgcccg	ccggctgcgc	ggacgcctcg	1020
ctgcaactta	cctccgggat	ggtccagacc	cagtcacca	ccccaggttc	cataccgacg	1080
atctgcgacc	tgcgcgcac	gtttgcccgg	gagatggggg	aggctaacta	a	1131

SEQ ID NO: 86	HSVTK - アミノ酸					
MASYPCHQHA	SAFDQAARSR	GHSNRRTALR	PRRQGEATEV	RLEQKMPTLL	RVYIDGPHGM	60
GKTTTTLQLLV	ALGSRDDIVY	VPEFMTYWQV	LGASETIANI	YTTQHRLLDQG	EISAGDAAVV	120
MTSAQITMGM	PYAVTDAVLA	PHVGGEAGSS	HAPPALTLI	FDRHPAALL	CYPAARYLMG	180
SMTQAVLAF	VALIPTPLPG	TNIVLGLALPE	DRHIDRLAKR	QRPGERLDLA	MLAAIRRVYG	240
LLANTVRYLQ	GGGSWWEDWG	QLSGTAVFPQ	GAEPQSNAGP	RPHIGDTLFT	LFRAPELLAP	300
NGDLNVFAW	ALDVLAKRLR	PMHVFIIDYD	QSPAGCRDAL	LQLTSGMVQT	HVTTPGSIPT	360
ICDLARTFAR	EMGEAN					376

G. CCR4(KW L2H)-dnTGFbRII-HSVTK(中央部) 枯渴系						
SEQ ID NO: 87	CCR4(KW L2H)-dnTGFbRII-HSVTK - スクレオチド					
atggccctgc	ctgtgacagc	cctgctgctg	cctctggctc	tgtctgtgca	tgcctgtaga	60
cccggatccg	acgtgctgat	gacacagagc	cctctgagcc	tgccctgtgac	acctggcgaa	120
cctgccagca	tcagctgcag	atccagccgg	aacatcgctg	acatcaacgg	cgacacctac	180
ctggaatggt	atctgcagaa	gcccggccag	tctcctcagc	tgtctgacta	caagggtgcc	240
aaccggttca	cgggcgctgc	cgatagattt	tctggcagcg	gctctggcac	cgacttcacc	300
ctgaagatct	ccagattgga	agccgaggac	gtggcgctgt	actactgctt	ccaaggctct	360
ctgctgccct	ggacattgga	ccagggcacc	aaggtggaaa	tcaagggagg	aggtaggatca	420
ggtaggagtg	gaagcggggg	aggaggttcc	ggcgccggag	gatcagaagt	tcagctgggt	480
gagctggcgg	gcgacctggt	tcagcctggc	agatctctga	gactgagctg	tgcggccagc	540
ggcttcatct	tcagcaacta	cgccatgagc	tgggtccgac	aggcccttgg	aaaaggactg	600
gaatgggtcg	ccacaatcag	cagcgccagc	acctacagct	actaccccca	tagcgtgaag	660
ggcagattca	ccatcagccg	ggacaacgcc	aagaacagcc	tgtacctgca	gatgaactcc	720
ctgcgcgtgg	aagatagcgc	cctgtactat	tgcggcagac	acagcgacgg	caacttcgcc	780
tttggtctatt	ggggccaggg	aaccctggtc	accgtttcta	gttccggaac	cacgacgcca	840
gcgcgcgcgc	caccaacacc	ggcgccacc	atcgcgctgc	agccctgtgc	cctgcgccca	900
gaggcggtgc	ggccagcgcc	ggggggcgca	gtgcacacga	gggggctgga	cttcgcctgt	960
gatatctaca	tctgggcgcg	cctggccggg	acttggtggg	tccttctcct	gtcactgggt	1020
atcacccttt	actgcaaacg	gggcagaaag	aaactcctgt	atatattcaa	acaaccattt	1080
atgagaccag	tacaaactac	tcaagaggaa	gatggctgta	gctgccgatt	tccagaagaa	1140
gaagaaggag	gatgtgaact	gagagtgaag	ttcagcagga	gcgcagacgc	ccccgcgtac	1200
aagcagggcc	agaaccagct	ctataacgag	ctcaatctag	gacgaagaga	ggagtacgat	1260
gttttgagca	agagacgtgg	ccgggaccct	gagatggggg	gaaagccgag	aaggagaagc	1320
cctcagggaag	gcctgtacaa	tgaactgcag	aaagataaga	tggcggaggc	ctacagttag	1380
attgggatga	aaggcgagcg	ccggaggggc	aaggggcagc	atggcccttta	ccagggtctc	1440
agtacagcca	ccaaggacac	ctacgacgcc	cttcacatgc	aggccctgcc	ccctgcggga	1500
agcggagcta	ctaacttcag	cctgctgaag	caggctggag	acgtggagga	gaaccctgga	1560
cctatgggtc	gggggctgct	caggggcctg	tggccgctgc	acatcgctct	gtggacgcgt	1620
atcgccagca	cgatccacc	gcacgttcag	aagtcggatg	tggaaatgga	ggcccagaaa	1680
gatgaaatca	tctgccccag	ctgtaatagg	actgcccata	cactgagaca	tattaataac	1740
gacatgatag	tcactgacaa	caacggtgca	gtcaagtttc	cacaactgtg	taaattttgt	1800
gatgtgagat	tttccacctg	tgacaaccag	aaatcctgca	tgagcaactg	cagcatcacc	1860
tccatctgtg	agaagccaca	ggaagtctgt	gtggctgtat	ggagaaagaa	tgacgagaa	1920
ataacactag	agacagtttg	ccatgacccc	aagctccctt	accatgactt	tattctggaa	1980
gatgctgctt	ctccaaagtg	cattatgaag	gaaaaaaaaa	agcctggtga	gactttcttc	2040
atgtgttctt	gtagctctga	tgagtgcaat	gacaacatca	tcttctcaga	agaatataac	2100
accagcaatc	ctgacttggt	gctagtcata	tttcaagtga	caggcatcag	cctcctgcca	2160
ccactgggag	ttgccatctc	tgtcatctac	atcttctact	gctaccgcgt	taaccggcag	2220

10

20

30

40

50

cagaagctgg	gcagcggcga	gggcagaggc	agcctgctga	cctgcggcga	cgtggaggag	2280
aaccccgga	ctatggttc	gtaccctgc	catcaacacg	cgtctgcgtt	cgaccaggct	2340
gcgcgttctc	gcggccatag	caaccgacgt	acggcggttc	gcccctgcgg	gcagcaagaa	2400
gccacggaag	tccgcctgga	gcagaaaatg	cccacgctac	tgcgggttta	tatagacggt	2460
cctcacggga	tggggaatac	caccaccacg	caactgctgg	tggccctggg	ttcgcgcgac	2520
gatatcgtct	acgtacccca	gccgatgact	tactggcagg	tgcctggggg	ttccgagaca	2580
atcggaaca	tctacaccac	acaacaccgc	ctcgaccagg	gcgagatata	ggccggggag	2640
gcggcggtgg	taatgacaag	cgcccagata	acaatgggca	tgcccttatg	cgtgaccgac	2700
gccgttctgg	ctcctcatgt	cgggggggag	gctgggagtt	cacatgcccc	gcccccgggc	2760
ctcaccctca	tcttcgaccg	ccatcccatc	gcccgcctcc	tgtgctaccc	ggccgcgcga	2820
taccttatgg	gcagcatgac	cccccaggcc	gtgctggcgt	tcgtggccct	catcccgccg	2880
accttgcccg	gcacaaacat	cgtgttgggg	gcccttcggg	aggacagaca	catcgaccgc	2940
ctggcccaac	gccagcgccc	cggcgagcgg	cttgacctgg	ctatgctggc	cgcgattcgc	3000
cgcgtttacg	ggctgcttgc	caatacgggt	cggatatctg	agggcgggcg	gtcgtggtgg	3060
gaggattggg	gacagctttc	ggggacggcc	gtgcgcggcc	agggtgccga	gccccagagc	3120
aacgcggggc	cacgacccca	tatcggggac	acgttattta	ccctgtttcg	ggcccccgag	3180
ttgctggccc	ccaacggcga	cctgtataac	gtgtttgcct	gggccttgga	cgtcttgggc	3240
aaacgcctcc	gtcccatgca	cgtctttatc	ctggattacg	accaatcgcc	cgcgcgctgc	3300
cgggacgccc	tgtgtcaact	tacctccggg	atggtccaga	cccacgtcac	caccccgagg	3360
tccataccga	cgatctgcga	cctggcgcg	acgtttgccc	gggagatggg	ggaggctaac	3420
taa						3423
SEQ ID NO: 88						CCR4(KW L2H)-dnTGFbRII-HSVTK - アミノ酸
MALPVTALLL	PLALLLHAAR	PGSDVLMTQS	PLSLPVTPE	PASISCRSSR	NIVHINGDTY	60
LEWYLQKPGQ	SPQLLIYKVS	NRFSGVPDRF	SGSGSGTDFT	LKISRVEAED	VGVIYCFQGS	120
LLPWTFTGGT	KVEIKGGGGS	GGGSGGGGGS	GGGSEVQLV	ESGGLDLPQG	RLRLSCAAS	180
GFISNYGMS	WVRQAPGKGL	EWVATISSAS	TYSYYPDSVK	GRFTISRDNA	KNSLYLQMNS	240
LRVEDTALYY	CGRHSDGNFA	FGYWGGTTLV	TVSSSGTTP	APRPPTPAPT	IASQLSLLRP	300
EACRPAAGGA	VHTRGLDFAC	DIYIWAFLAG	TCGVLLLSLV	ITLYCKRGRK	KLLYIFKQPF	360
MRPVQTTQEE	DGCSRFPFEE	EEGGCELRVK	FSRSADAPAY	KQQGNQLYNE	LNLGRREEYD	420
VLDKRRGRDP	EMGGKPRRKN	PQEGLYNELQ	KDKMAEAYSE	IGMKGERRRG	KGHDGLYQGL	480
STATKDTYDA	LHMQLPPRG	SGATNFSLLK	QAGDVEENPG	PMGRGLLRGL	WPLHIVLWTR	540
IASTIPPHVQ	KSDVEMEAQK	DELICPSCNR	TAHPLRHINN	DMIVTDNNGA	VKFPQLCKFC	600
DVRFSTCDNQ	KSCMSNCSIT	SICEKPQEV	VAVWRKNDEN	ITLETVCNDP	KLPYHDFILE	660
DAASPKCIMK	EKKKPGETTF	MCSCSSDECN	DNIIFSEYEN	TSNPDLLLVI	FQVTGISLLP	720
PLGVAISVII	IFYCYRVNRQ	QKLGSSEGRG	SLLTGSDVEE	NPGPMASYP	HQHASAFDQA	780
ARSRGHSNRR	TALRPRRQOE	ATEVRLEQKM	PTLLRVYIDG	PHGMKTTT	QLLVALGSRD	840
DIVVPEPMT	YWQVLGASST	IANIYTTQHR	LDQGEISAGD	AAVMTSAQI	TMGMPYAVTD	900
AVLAPHVGG	AGSSHAPPPA	LTLIFDRHPI	AALLCYPAA	YLMGSMTPQA	VLAFFVALIPP	960
TLPGTNIVLG	ALPEDRHIDR	LAKRQRPGER	LDLAMLAAIR	RVYGLLANTV	RYLQGGGSSW	1020
EDWGQLSGTA	VPPQGAEPQS	NAGPRPHIGD	TLFTLFRAP	LLAPNGDLYN	VFAWALDVLA	1080
KRLRPMHVFI	LDYDQSPAGC	RDALLQLTSG	MVQTHVTPFG	SIPTICDLAR	TFAREMGAN	1140
SEQ ID NO: 89						CCR4(KW L2H) CAR - スクレオチド
atggccctgc	ctgtgacagc	cctgtgctgc	cctctggctc	tgcctgctga	tgcgcctaga	60
cccgatccg	acgtgctgat	gacacagagc	cctctgagcc	tgcctgtgac	acctggcgaa	120
cctgccagca	tcagctgcag	atccagccgg	aacatcgtgc	acatcaacgg	cgacacctac	180
ctggaatggt	atctgcagaa	gcccggccag	tctcctcagc	tgcctgatca	caaggtgtcc	240
aaccggttca	gcggcggtgc	cgatagattt	tctggcagcg	gctctggcac	cgacttcacc	300
ctgaagatct	ccagagtggg	agccgaggac	gtggcgctgt	actactgctt	ccaaggctct	360
ctgctgcctt	ggacatttgg	ccagggcacc	aaggtggaaa	tcaaggaggg	aggtggatca	420
ggtggagggtg	gaagcggggg	aggaggttcc	ggcgccggag	gacagaaagt	tcagctggtt	480
gagctcggcg	gcgacctggt	tcagcctggc	agatctctga	gactgagctg	tgcgcgccag	540
ggcttcatct	tcagcaacta	cggcatgagc	tgggtccgac	aggccctggg	aaaaggactg	600
gaatgggtcg	ccacaatcag	cagcgccagc	acctacagct	actaccccca	tagcgtgaag	660
ggcagattca	ccatcagccg	ggacaacgcc	aagaacagcc	tgtacctgca	gatgaactcc	720
ctgcgcgtgg	aagatacagc	cctgtactat	tgcggcagac	acagcgacgg	caacttcgcc	780
tttggtctat	ggggccaggg	aaccctggtc	accgtttcta	gttccggaac	cacgacgcca	840
gcgcgcgcgac	caccaacacc	ggcgcccaac	atcgcgctgc	agccctgtgc	cctgcgccca	900
gaggcggtgcc	ggccaagcgc	ggggggcgca	gtgcacacga	gggggctgga	cttcgcctgt	960
gatatctaca	tctgggcgcc	cttggccggg	acttgtgggg	tccttctcct	gtcactggtt	1020
atcccccttt	actgcaaacg	gggcagaaag	aaactcctgt	atataattcaa	acaaccattt	1080
atgagaccag	tacaaactac	tcaagaggaa	gatggctgta	gctgccgatt	tccagaagaa	1140
gaagaaggag	gatgtgaact	gagagtgaag	ttcagcagga	gcgcagacgc	cccccgctac	1200
aagcagggcc	agaaccagct	ctataacgag	ctcaatctag	gacgaagaga	ggagtacgat	1260
gttttgaca	agagacgtgg	ccgggacctc	gagatggggg	gaaagccgag	aaggaagaac	1320
cctcagggaag	gcctgtacaa	tgaactgcag	aaagataaga	tggcggaggc	ctacagttag	1380
attgggatga	aaggcgagcg	ccggaggggc	aaggggcacg	atggccttta	ccagggtctc	1440

10

20

30

40

agtacagecca ccaaggagac ctacgaagcc ctacacatgc aggcctgtcc ccctcgc	1497
SEQ ID NO: 90	CCR4(KW L2H) CAR – アミノ酸
MALPVTALLL PLALLLHAAR PGSDVLMTQS PLSLPVTPGE PASISCRSSR NIVHINGDTY	60
LEWYLQKPGQ SPQLLLYKVS NRESGVPDRF SGSGSGTDFT LKISRVEAED VGVYYCFQGS	120
LLPWTFGQGT KVEIKGGGGS GGGSGGGGGS GGGSEVQLV ESGGDLVQPG RSLRLSCAAS	180
GFIFSNYGMS WVRQAPGKGL EWVATISSAS TSYYPDSVK GRFTISRDNA KNSLYLQMNS	240
LRVEDTALYY CGRHSDGNFA FGYWGQGLV TVSSSGTTTP APRPPTPAPT IASQPLSLRP	300
EACRPAAGGA VHTRLDFAC DIYIWAPLAG TCGVLLLSLV ITLYCKRGRK KLLYIFKQPF	360
MRPVQTTQEE DGCSCRFPEE EEEGCELVRK FSRADAPAY KQGQNLVNE LNLGRREEYD	420
VLDKRRGRDP EMGGKPRRN PQEGLYNELQ KDKMAEAYSE IGMKGERRRG KGHGGLYQGL	480
STATKDTYDA LHMQLPFR	499
SEQ ID NO: 91	P2A – スクレオチド
ggaagcggag ctactaactt cagcctgtcg aagcaggctg gagacgtgga ggagaaccct	60
ggacct	66
SEQ ID NO: 92	P2A – アミノ酸
GSATNFSL KQAGDVEENP GP	22
SEQ ID NO: 93	dnTGFbRII – スクレオチド
atgggtcggg ggctgctcag ggcctgtgg cgcgtgcaca tcgtcctgtg gacgcgtatc	60
gccagcacga tcccacgcga cgttcagaag tcggatgtgg aaatggaggc ccagaaagat	120
gaaatcatct gcccagctg taataggact gcccattccac tgagacatat taataacgac	180
atgatagtca ctgacaacaa cgggtgcagtc aagtttccac aactgtgtaa attttgtgat	240
gtgagatttt ccacctgtga caaccagaaa tctgcatga gcaactgcag catcacctcc	300
atctgtgaga agccacagga agtctgtgtg gctgtatgga gaaagaatga cgagaacata	360
acactagaga cagtttgcca tgaccccaag ctcccctacc atgactttat tctggaagat	420
gctgcttctc caaagtgcac tatgaaggaa aaaaaaaagc ctgggtgagac tttcttcacg	480
tgttctctga gctctgatga gtgcaatgac aacatcatct tctcagaaga atataacacc	540
agcaatctcg acttgtgtgt agtcatatct caagtgcacg gcatcagcct cctgccacca	600
ctggggagttg ccatactgt catcatcatc ttctactgct accgcgttaa ccggcagcag	660
aagctg	666
SEQ ID NO: 94	dnTGFbRII – アミノ酸
MGRGLLRGLW PLHIVLWTRI ASTIPPHVQK SDVEMEAQKD EIICPSCNRT AHPLRHINND	60
MIVTDNNGAV KFPQLCKFCD VRFSTCDNQK SCMSNCSITS ICEKPQEVCV AVWRKNDENI	120
TLETVCHDPK LPYHDFILED AASPFCIMKE KKKPGETFFM CSCSSDECND NIIFSEYNT	180
SNPDLVLFV QVTGISLLFP LGVAISVII FYCYRVNRQQ KL	222
SEQ ID NO: 95	T2A – スクレオチド
ggcagcggcg agggcagagg cagcctgtcg acctgcggcg acgtggagga gaaccccgga	60
cct	63
SEQ ID NO: 96	T2A – アミノ酸
SGEGRGSLL TCGDVEENP P	21
SEQ ID NO: 97	HSVTK – スクレオチド
atggcttcgt acccctgcca tcaacacgag tctgcgttcg accaggtgc gcgttctcgc	60
ggccatagca accgacgtac ggcggttcgc cctcgccgag agcaagaagc cacggaagtc	120
cgcttgagc agaaaatgcc cagctactg cgggtttata tagacggtcc tcacgggatg	180
gggaaaacca ccaccacgca actgctggtg gccctgggtt cgcgcgacga tatcgtctac	240
gtacccgagc cgatgactta ctggcaggtg ctgggggctt ccgagacaat cgcgaacatc	300
tacaccacac aacaccgcct cgaccagggc gagatategg ccggggagcg ggcggttgta	360
atgacaagcg ccagataac aatgggcatg ccttatgccg tgaccgacgc cgttctggct	420
cctcatgtcg ggggggaggc tgggagttca catgccccgc ccccgccct caccctcatc	480
ttcgaccgcg atcccatcg cgccctcctg tgetacccg ccgcgcgata ccttatgggc	540
agcatgaccc ccagggcgt gctggcgctt gtggccctca tcccgccgac cttgcccggc	600
acaaacatcg tgttgggggc ccttcgggag gacagacaca tcgaccgcct ggccaaacgc	660
cagcgcccg gcgagcggct tgacctggct atgctggcgc cgattcgccg cgtttacggg	720
ctgcttgcca atacggtgag gtatctgcag ggcgccgggt cgtggtggga ggattgggga	780
cagctttcgg ggaagggcgt gccgccccag ggtgccgagc ccagagcaa cgcgggcccc	840
cgaccccata tcggggacac gttatttacc ctgtttcggg ccccgagtt gctggcccc	900
aacggcgacc tgtataacgt gtttgctgg gccttggaag tcttgccaa acgcctccgt	960
cccatgcagc tctttatcct ggattacgac caatcgccg ccggctgcgc ggacgcctg	1020
ctgcaactta cctccgggag ggtccagacc cagtcacca cccaggtc cataccgagc	1080
atctgcgacc tggcgcgac gtttgcccg gagatggggg aggctaacta a	1131
SEQ ID NO: 98	HSVTK – アミノ酸
MASYPCHQHA SAFDQAARSR GHSNRRTALR PRRQEQATEV RLEQKMPTLL RVYIDGPHGM	60
GKTTTTLV ALGSRDIDV VPEPMTYWQV LGASETIANI YTTQHRLDQG EISAGDAAVV	120
MTSAQITMGM PYAVTDAVLA PHVGGEAGSS HAPPALTLI FDRHPAALL CYPAARYLMG	180

10

20

30

40

50

SMTPQAVLAF	VALIPPTLPG	TNIVLGLALPE	DRHIDRLAKR	QRFGERLDLA	MLAAIRRVYG	240
LLANTVRYLQ	GGGSWWEDWG	QLSGTAVFPQ	GAEPQSNAGP	RPHIGDTLFT	LFRAPELLAP	300
NGDLYNVFAW	ALDVLAKRLR	PMHVFIIDYD	QSPAGCRDAL	LQLTSGMVQT	HVTTPGSIPT	360
ICDLARTFAK	EMGEAN					376
H. CCR4(KW L2H)-HSVTK-dnTGFbRII(最後部) 枯渇系						
SEQ ID NO: 99		CCR4(KW L2H)-HSVTK-dnTGFbRII – スクレオチド				
atggccctgc	ctgtgacagc	cctgctgctg	cctctggctc	tgtctgtgca	tgccgctaga	60
cccggatccg	acgtgctgat	gacacagagc	cctctgagcc	tgccctgtgac	acctggcgaa	120
cctgccagca	tcagctgcag	atccagcccg	aacatcgtgc	acatcaacgg	cgacacctac	180
ctggaatggt	atctgcagaa	gcccggccag	tctctcagc	tgtctgatcta	caagggtgcc	240
aaccggttca	gcggcgctgc	cgatagattt	tctggcagcg	gctctggcac	cgacttcacc	300
ctgaagatct	ccagagtggg	agccgaggac	gtgggctgt	actactgctt	ccaaggctct	360
ctgctgccct	ggacatttgg	ccagggcacc	aaggtggaaa	tcaaggagg	aggtggatca	420
ggtggagggtg	gaagcggggg	aggaggttcc	ggcggcggag	gatcagaagt	tcagctggtt	480
gagctctggc	gcgacctggt	tcagcctggc	agatctctga	gactgagctg	tgccgccagc	540
ggcttcatct	tcagcaacta	cggcatgagc	tgggtccgac	aggccccctg	aaaaggactg	600
gaatgggtcg	ccacaatcag	cagcgccagc	acctacagct	actaccccga	tagcgtgaag	660
ggcagattca	ccatcagccg	ggacaacgcc	aagaacagcc	tgtacctgca	gatgaactcc	720
ctgcgcgtgg	aagatacagc	cctgtactat	tgcggcagac	acagcgacgg	caacttcgcc	780
tttggctatt	ggggccaggg	aaccctggtc	accgtttcta	gttcgggaac	cacgacgcca	840
gcgcgcgac	caccaacacc	ggcgcccacc	atcgcgctgc	agccccctgc	cctgcgcccc	900
gaggcgtgcc	ggccagcggc	ggggggcgca	gtgcacacga	gggggctgga	cttcgctgt	960
gatatctaca	tctgggcgcc	cctggccggg	acttgtgggg	tccttctcct	gtcactggtt	1020
atcacccctt	actgcaaacg	gggcagaaag	aaactcctgt	atatattcaa	acaaccattt	1080
atgagaccag	tacaaactac	tcaagaggaa	gatggctgta	gctgccgatt	tccagaagaa	1140
gaagaaggag	gatgtgaact	gagagtgaag	ttcagcagga	gcgcagacgc	ccccgcgtac	1200
aagcagggcc	agaaccagct	ctataacgag	ctcaatctag	gacgaagaga	ggagtacgat	1260
gttttgga	agagacgtgg	ccgggacctt	gagatggggg	gaaagccgag	aaggaagaac	1320
cctcaggaa	gcctgtacaa	tgaactcgag	aaagataaga	tggcggaggc	ctacagtgag	1380
attgggatga	aaggcgagac	ccggaggggc	aaggggcacg	atggccctta	ccagggtctc	1440
agtcagacca	ccaaggacac	ctacgacgcc	cttcacatgc	aggccctgcc	ccctcgcgga	1500
agcggagcta	ctaacttcag	cctgctgaag	caggctggag	acgtggagga	gaaccctgga	1560
cctatggctt	cgtacccctg	ccatcaacac	gcgtctgcgt	tcgaccaggc	tgcgcgttct	1620
cgcgccata	gcaaccgacg	tacggcgctg	cgccctcgcc	ggcagcaaga	agccacggaa	1680
gtccgcctgg	agcagaaaat	gcccacgcta	ctgcgggttt	atatagacgg	tcctcacggg	1740
atggggaaaa	ccaccaccac	gcaactcgct	gtggccctgg	gttcgcgcga	cgatatcgtc	1800
tacgtaccgc	agccgatgac	ttactggcag	gtgctggggg	cttcgagac	aatcgcgaa	1860
atctacacca	cacaacaccg	cctcgaccag	ggcgagatat	cggcggggga	cgcggcggtg	1920
gtaatgacaa	gcgccagat	aacaatgggc	atgccttatg	ccgtgaccga	cgcggttctg	1980
gctcctcatg	tcggggggga	ggctgggagt	tcacatgcc	cgccccgggc	cctcaccttc	2040
atcttcgacc	gccatcccat	cgccgccttc	ctgtgctacc	cggccgcgcg	ataccttatg	2100
ggcagcatga	ccccccaggc	cgtgctggcg	ttcgtggccc	tcaccccgcc	gaccttgccc	2160
ggcacaacaa	tcgtgttggg	ggcccttcgc	gaggacagac	acatcgaccg	cctggccaaa	2220
cgcagcgcc	cgccgagcgc	gcttgacctg	gctatgctgg	cgcgattcgc	cgcggtttac	2280
gggctgcttg	ccaatacgg	gcggtatctg	caggggcgcg	ggctggtgtg	ggaggattgg	2340
ggacagcttt	cggggacggc	cgtgcgcgcc	cagggtgccc	agccccagag	caacgcgggc	2400
ccacgacccc	atatcgggga	cacgttat	accctgtt	gggccccga	gttctgtggc	2460
cccaacggcg	acctgtataa	cgtgtttgcc	tgggccttgg	acgtcttggc	caaacgcctc	2520
cgtcccatgc	acgtctttat	cctggattac	gaccaatcgc	ccgcggcgctg	cgggacgcc	2580
ctgctgcaac	ttacctccgg	gatggctcag	acccacgtca	ccacccagag	ctccataccg	2640
acgatctgcg	acctggcgcg	cacgtttgcc	cgggagatgg	gggaggctaa	cgcgagcggc	2700
gagggcagag	gcagcctgct	gacctgcggc	gacgtggagg	agaaccccg	acctatgggt	2760
cgggggctgc	tcaggggcct	gtggccgctg	cacatcgctc	tgtggacgcg	tatcgccagc	2820
acgatccca	cgcacgttca	gaagtcggat	gtggaaatgg	aggcccagaa	agatgaaatc	2880
atctgcccc	gctgtaatat	gactgcccat	ccactgagac	atattaataa	cgacatgata	2940
gtcactgaca	acaacggtgc	agtcaagt	ccacaactgt	gtaaat	tgatgtgaga	3000
ttttccacct	gtgacaacca	gaaatctgc	atgagcaact	gcagcatcac	ctccatctgt	3060
gagaagccac	aggaagtctg	tgtggctgta	tggagaaa	atgacgagaa	cataacacta	3120
gagacagttt	gccaatgacc	caagctcccc	taccatgact	ttattctgga	agatgctgct	3180
tctccaaagt	gcattatgaa	ggaaaaaaa	aagcctgggtg	agactttctt	catgtgttcc	3240
tgtagctctg	atgagtgc	tgacaacatc	atcttctcag	aagaatataa	caccagcaat	3300
cctgacttgt	tgctagtcat	atttcaagt	acaggcatca	gcctcctgcc	accactggga	3360
gttgccatat	ctgtcatcat	catcttctac	tgctaccgcg	taaaccggca	gcagaagctg	3420
taa						3423
SEQ ID NO: 100		CCR4(KW L2H)-HSVTK-dnTGFbRII – アミノ酸				

10

20

30

40

50

MALPVTALLL	PLALLLHAAR	PGSDVLMTQS	PLSLPVTPE	PASISCRSSR	NIVHINGDTY	60
LEWYLQKPGQ	SPQLLIYKVS	NRFSGVPDRF	SGSGSGTDFT	LKISRVEAED	VGYYCFQGS	120
LLPWTFGQGT	KVEIKGGGGS	GGGGSGGGGS	GGGGSEVQLV	ESGGDLVQPG	RSRLRLSCAAS	180
GFIFSNYGMS	WVRQAPGKGL	EWVATISSAS	TYSYYPDSVK	GRFTISRDNA	KNSLYLQMNNS	240
LRVEDTALYY	CGRHSDGNFA	FGYWGQGTLV	TVSSSGTTP	APRPPTPAPT	IASQPLSLRP	300
EACRPAAGGA	VHTRGLDFAC	DIYIWAPLAG	TCGVLLLSLV	ITLYCKRGRK	KLLYIFKQPF	360
MRPVQTTQEE	DGCSCRFPEE	EEGGCELVRK	FSRSADAPAY	KQGQNQLYNE	LNLGRREEYD	420
VLDKRRGRDP	EMGGKPRRN	PQEGLYNELQ	KDKMAEAYSE	IGMKGERRRG	KGHDGLYQGL	480
STATKDTYDA	LHMQLPFRG	SGATNFSLLK	QAGDVEENFG	PMASYPCHQH	ASAFDQAARS	540
RGHSNRRTAL	RPRRQEQEATE	VRLEQKMPTL	LRVYIDGPHG	MGKTTTTLQLL	VALGSRDDIV	600
YVPEPMTYWQ	VLGASETIAN	IYTTQHRDLQ	GEISAGDAAV	VM TSAQITMG	MPYAVTDAVL	660
APHVGGEGAGS	SHAPPALTL	IFDRHPAAL	LCYPAARYLM	GSMT PQAVLA	FVALIPPTLP	720
GTNIVLGALP	EDRHIDRLAK	RQRPGERLDL	AMLAAIRRVY	GLLANTVRYL	QGGGSWWEDW	780
GQLSGTAVFP	QGAEPQSNAG	PRRHIGDTLF	TLFRAPELLA	PNGDLYNVFA	WALDVLAKRL	840
RPMHVFIIDY	DQSPAGCRDA	LLQLTSGMVQ	THVTTPGSIP	TICDLARTFA	REMGEANGSG	900
EGRSRLTTCG	DVEENPGPMG	RGLLRGLWPL	HIVLWTRIAS	TIPPHVQKSD	VEMEAQKDEI	960
ICPSCNRTAH	WRHINNDI	PLNNNGAVKE	PQLCKFCQDVR	FSTCDNQKSC	MSNCSITSIC	1020
EKPQEVCCVAV	PRKNENITFL	ETVCHDPKPL	YHDFILEDAA	SPKCIKKEKK	KPGETFFMCS	1080
CSSDECNDNI	IFSEEYNTSN	PDLILLVIFQV	TGISLLPPLG	VAISVIIIFY	CYRVNRQQKL	1140
SEQ ID NO: 101 CCR4(KW L2H) CAR – スクレオチド						
atggccctgc	ctgtgacagc	cctgtgctgc	cctctggctc	tgtctgtgca	tgcccgctaga	60
cccgatccg	acgtgtctgat	gacacagagc	cctctgagcc	tgccctgtgac	acctggcgaa	120
cctgccagca	tcagctgagc	atccagccgg	aacatcgtgc	acatcaacgg	cgacacctac	180
ctggaatggt	atctgcagaa	gcccggccag	tctcctcagc	tgtctgatcta	caagggtgtcc	240
aaccgggtca	gcggcggtgcc	cgatagattt	tctggcagcg	gctctggcac	cgacttcacc	300
ctgaagatct	ccagagtggg	agccgaggac	gtgggcgtgt	actactgctt	ccaaggctct	360
ctgctgcct	ggacatttgg	ccagggcacc	aaggtggaaa	tcaaggagg	aggtggatca	420
ggtggagggtg	gaagcggggg	aggaggttcc	ggcggcgag	gatcagaagt	tcagctggtt	480
gagctgtggc	gcgacctggt	tcagcctggc	agatctctga	gactgagctg	tgccgcagc	540
ggcttcatct	tcagcaacta	cggcatgagc	tgggtccgac	aggccctgg	aaaaggactg	600
gaatgggtcg	ccacaatcag	cagcgccagc	acctacagct	actaccccca	tagcgtgaag	660
ggcagattca	ccatcagccg	ggacaacgcc	aagaacagcc	tgtacctgca	gatgaactcc	720
ctgcgcgtgg	aagatacagc	cctgtactat	tgccgcagac	acagcgacgg	caacttcgcc	780
tttggctatt	ggggccaggg	aacctgtgtc	accgttttcta	gttccggaac	cacgacgcca	840
gcgccgcgac	caccaacacc	ggcgccacc	atcgctgcgc	agccctgtc	cctgcgcccc	900
gaggcggtgc	ggccagcgcc	ggggggcgca	gtgcacacga	gggggctgga	cttcgctgt	960
gatatctaca	tctgggcgcc	cttggccggg	acttgtgggg	tccttctcct	gtcactggtt	1020
atcacccctt	actgcaaacg	gggcagaaa	aaactcctgt	atataattcaa	acaaccattt	1080
atgagaccag	tacaaactac	tcaagaggaa	gatggctgta	gctgcgcat	tccagaagaa	1140
gaagaaggag	gatgtgaact	gagagtgaag	ttcagcagga	gcgcagacgc	ccccgcgtac	1200
aagcagggcc	agaaccagct	ctataacgag	ctcaatctag	gacgaagaga	ggagtacgat	1260
gtttttggaca	agcaactgtg	ccgggaccct	gagatggggg	gaaagccgag	aagggaagaa	1320
cctcagggaag	gcctgtacaa	tgaactgcag	aaagataaga	tgccggaggc	ctacagtga	1380
attgggatga	aaggcgagcg	ccggaggggc	aaggggcagc	atggccttta	ccagggtctc	1440
agtacagcca	ccaaggacac	ctacgacgcc	cttcacatgc	aggccctgcc	ccctcgc	1497
SEQ ID NO: 102 CCR4(KW L2H) CAR – アミノ酸						
MALPVTALLL	PLALLLHAAR	PGSDVLMTQS	PLSLPVTPE	PASISCRSSR	NIVHINGDTY	60
LEWYLQKPGQ	SPQLLIYKVS	NRFSGVPDRF	SGSGSGTDFT	LKISRVEAED	VGYYCFQGS	120
LLPWTFGQGT	KVEIKGGGGS	GGGGSGGGGS	GGGGSEVQLV	ESGGDLVQPG	RSRLRLSCAAS	180
GFIFSNYGMS	WVRQAPGKGL	EWVATISSAS	TYSYYPDSVK	GRFTISRDNA	KNSLYLQMNNS	240
LRVEDTALYY	CGRHSDGNFA	FGYWGQGTLV	TVSSSGTTP	APRPPTPAPT	IASQPLSLRP	300
EACRPAAGGA	VHTRGLDFAC	DIYIWAPLAG	TCGVLLLSLV	ITLYCKRGRK	KLLYIFKQPF	360
MRPVQTTQEE	DGCSCRFPEE	EEGGCELVRK	FSRSADAPAY	KQGQNQLYNE	LNLGRREEYD	420
VLDKRRGRDP	EMGGKPRRN	PQEGLYNELQ	KDKMAEAYSE	IGMKGERRRG	KGHDGLYQGL	480
STATKDTYDA	LHMQLPFRG					499
SEQ ID NO: 103 P2A – スクレオチド						
ggaagcggag	ctactaaatt	cagcctgctg	aagcaggctg	gagacgtgga	ggagaaccct	60
ggacct						66
SEQ ID NO: 104 P2A – アミノ酸						
SGATNFSLL	KQAGDVEENP	GP				22
SEQ ID NO: 105 HSVTK – スクレオチド						
atggcttcgt	acccctgcca	tcaacacgcg	tctgcgttcg	accagctgc	gcgttctcgc	60
ggccatagca	accgacgtac	ggcggttcgc	cctcgccggc	agcaagaagc	cacggaagtc	120
cgcttgagc	agaaaatgcc	cacgctactg	cggttttata	tagacgggtc	tcacgggatg	180
gggaaaacca	ccaccacgca	actgctggtg	gcctgggtt	cgcgcgacga	tatcgtctac	240

10

20

30

40

50

gtacccgagc	cgtgactta	ctggcaggtg	ctgggggctt	cgcagacaat	cgcgaacatc	300
tacaccacac	aacaccgect	cgaccagggc	gagatatcgg	cgggggacgc	ggcgggtgta	360
atgacaagcg	cccagataac	aatgggcatg	ccttatgcgc	tgaccgacgc	cgttctggct	420
cctcatgtcg	ggggggaggc	tgggagttca	catgccccgc	ccccggccct	caccctcatc	480
ttcgaccgce	atcccatcgc	cgccctcctg	tgctaccggg	cgcgcgata	ccttatgggc	540
agcatgaccc	cccaggccgt	gctggcggtc	gtggccctca	tcccgcgcac	cttgcccggc	600
acaaacatcg	tgttgggggc	ccttcgcgag	gacagacaca	tgcaccgcct	ggccaaacgc	660
cagcgccccg	gcgagcggct	tgacctggct	atgctggccg	cgattcgccg	cgtttacggg	720
ctgcttgcca	atacgggtgcg	gtatctgcag	ggcggcgggt	cgtggtggga	ggattgggga	780
cagctttcgg	ggacggccgt	gccgccccag	ggtgccgagc	cccagagcaa	cgcggggcca	840
cgaccccata	tcgggggacac	gttatttacc	ctgtttcggg	cccccgagtt	gctggccccc	900
aacggcgacc	tgtataacgt	gtttgcctgg	gccttggacg	tcttgcccaa	acgcctccgt	960
cccatgcacg	tctttatcct	ggattacgac	caatcgcccg	cgggtgcgcg	ggacgcctcg	1020
ctgcaactta	cctccgggat	ggtccagacc	cacgtcacca	ccccaggtc	cataccgacg	1080
atctgcgacc	tggcgcgcac	gtttgcccgc	gagatggggg	aggctaac		1128
SEQ ID NO: 106 HSVTK-アミノ酸						
MASYPCHQHA	SAFDQAARSR	GHSNRRALR	PRRQQEATEV	RLEQKMPILL	RVYIDGPHGM	60
GKTTTTQLLV	ALGSRDDIVY	VPEPMTYWQV	LGASETIANI	YTTQHRLDQG	EISAGDAVV	120
MTSAQITMGM	FYAVTDAVLA	PHVGEAGSS	HAPPPALTLI	FDRHPAALL	CYPAARYLMG	180
SMTPTQAVLAF	VALIPPTLPG	TNIVLGALPE	DRHIDRLAKR	QRPGERLDLA	MLAAIRRVYG	240
LLANTVRYLQ	GGGSWWEDWG	QLSGTAVFPQ	GAEPQSNAGP	RPHIGDTLFT	LFRAPELLAP	300
NGDLYNVFAW	ALDVLAKRLR	PMHVFILDYD	QSPAGCRDAL	LQLTSGMVQT	HVTTPGSIPT	360
ICDLARTFAR	EMGEAN					376
SEQ ID NO: 107 T2A-ヌクレオチド						
ggcagcggcg	agggcagagg	cagcctgctg	acctgcggcg	acgtggagga	gaaccccgga	60
cct						63
SEQ ID NO: 108 T2A-アミノ酸						
GSGEGRGSL	TCGDVEENPG	P				21
SEQ ID NO: 109 dnTGFbRII-ヌクレオチド						
atgggtcggg	ggctgctcag	gggcctgtgg	ccgctgcaca	tctctctgtg	gacgcgtatc	60
gccagcacga	tcccaccgca	cggttcagaag	tcggatgtgg	aaatggaggc	ccagaaaagat	120
gaaatcatct	gccccagctg	taataggact	gcccattcac	tgagacatat	taataacgac	180
atgatagtca	ctgacaacaa	cggtgcagtc	aagtttccac	aactgtgtaa	attttgtgat	240
gtgagatttt	ccacctgtga	caaccagaaa	tctgtcatga	gcaactgcag	catcacctcc	300
atctgtgaga	agccacagga	agtctgtgtg	gctgtatgga	gaaagaatga	cgagaacata	360
acactagaga	cagtttgcca	tgaccccaag	ctcccctacc	atgactttat	tctggaagat	420
gctgtctctc	caaagtgcac	tatgaaggaa	aaaaaaaagc	ctggtgagac	tttcttcatg	480
tgttctctga	gctctgatga	gtgcaatgac	aacatcatct	tctcagaaga	atataacacc	540
agcaatcctg	acttgttgct	agtcataatt	caagtgcacg	gcacagccct	cctgccacca	600
ctgggagttg	ccatcatctg	catcatcatc	ttctactgct	accgcgttaa	ccggcagcag	660
aagctgtaa						669
SEQ ID NO: 110 dnTGFbRII-アミノ酸						
MGRGLLRGLW	PLHIVLWTRI	ASTIPPHVQK	SDVEMEAQKD	EIICPSCNRT	AHPLRHINND	60
MIVTDNNGAV	KFPQLCKFCD	VRFSTCDNQK	SCMSNCSITS	ICEKPQEVCV	AVWRKNDENI	120
TLETVCHDPK	LPYHDFILED	AASPKCIMKE	KKKPGETFFM	CSCSSDECND	NIIFSEYNT	180
SNPDLLLVIF	QVTGISLLPP	LGVAISVIII	FYCYRVNRQQ	KL		222

10

20

30

40

50

【0211】

C. 核酸および発現ベクター

本開示は、CARをコードする核酸を提供する。本開示の核酸は、本明細書に開示されるCARのいずれか1つをコードするポリヌクレオチド配列を含み得る。

【0212】

ある特定の局面では、本発明は、抗CCR4抗原結合ドメインと膜貫通ドメインと細胞内ドメインとを含むキメラ抗原受容体（CAR）をコードするポリヌクレオチド配列を含む核酸を含み、抗原結合ドメインは、3つの重鎖相補性決定領域（HCDR）を含む重鎖可変領域であって、HCDR1が、SEQ ID NO: 2に示されるアミノ酸配列を含み、HCDR2が、SEQ ID NO: 4に示されるアミノ酸配列を含み、かつ、HCDR3が、SEQ ID NO: 6に示されるアミノ酸配列を含む、重鎖可変領域；および3つの軽鎖相補性決定領域（LCDR）を含む軽鎖可変領域であって、LCDR1が、SEQ ID NO: 8に示されるアミノ酸配列を含み、LCDR2が、SEQ ID NO: 10に示されるアミノ酸配列を含み、かつ、LCDR3が、SEQ ID NO: 12に示されるアミノ酸配列を含む、軽鎖可変領域を含む、核酸を含む。

【0213】

ある特定の態様では、抗原結合ドメインは、SEQ ID NO: 111と少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であるポリヌクレオチド配列によってコードされる重鎖可変領域、および／または、SEQ ID NO: 113と少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であるポリヌクレオチド配列によってコードされる軽鎖可変領域を含む。

【0214】

ある特定の態様では、抗原結合ドメインは、SEQ ID NO: 15と少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるポリヌクレオチド配列によってコードされる単鎖可変断片 (scFv) である。

10

【0215】

ある特定の態様では、本開示の核酸は、第1のポリヌクレオチド配列および第2のポリヌクレオチド配列を含む。第1および第2のポリヌクレオチド配列は、リンカーによって隔てられていてもよい。本開示において使用するためのリンカーは、複数のタンパク質が、同じ核酸配列によってコードされることを可能にし（例えば、マルチシストロン性またはバイシストロン性配列）、これらは、別々のタンパク質成分へと解離されるポリタンパク質として翻訳される。ある特定の態様では、核酸は、5'から3'へ、第1のポリヌクレオチド配列、リンカー、および第2のポリヌクレオチド配列を含む。ある特定の態様では、核酸は、5'から3'へ、第2のポリヌクレオチド配列、リンカー、および第1のポリヌクレオチド配列を含む。

20

【0216】

いくつかの態様では、リンカーは、配列内リボソーム進入部位 (IRES) をコードする核酸配列を含む。本明細書において使用される場合、「配列内リボソーム進入部位」または「IRES」は、タンパク質コード領域のATGなどの開始コドンへの直接的な配列内リボソーム進入を促進し、遺伝子のキャップ非依存的翻訳を導くエレメントのことを指す。様々な配列内リボソーム進入部位が、当業者に公知であり、非限定的に、ウイルスまたは細胞のmRNA供給源から入手可能なIRES、例えば、免疫グロブリン重鎖結合タンパク質 (BiP) ; 血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) ; 線維芽細胞増殖因子2 ; インスリン様成長因子 ; 翻訳開始因子eIF4G ; 酵母転写因子TFIIDおよびHAP4 ; ならびに、例えば、カルジオウイルス、ライノウイルス、アフトウイルス、HCV、フレンドマウス白血病ウイルス (FrMLV) 、およびモロニーマウス白血病ウイルス (MoMLV) から入手可能なIRESを含む。当業者は、本発明において使用するための適切なIRESを選択することができるであろう。

30

【0217】

いくつかの態様では、リンカーは、自己切断ペプチドをコードする核酸配列を含む。本明細書において使用される場合、「自己切断ペプチド」または「2Aペプチド」は、複数のタンパク質がポリタンパク質としてコードされることを可能にするオリゴペプチドのことを指し、これらは、翻訳後に構成タンパク質へと解離する。「自己切断」という用語の使用は、タンパク質分解切断反応を意味することを意図していない。様々な自己切断ペプチドまたは2Aペプチドが、当業者に公知であり、非限定的に、ピコルナウイルス科 (Picornaviridae) ウイルスファミリーのメンバー、例えば、口蹄疫ウイルス (FMDV) 、ウマ鼻炎Aウイルス (ERAV) 、ゾセアアシグナウイルス (Thosaea asigna virus) (TaV) 、およびブタテッシュウウイルス-1 (PTV-1) ; ならびにタイロウイルスおよび脳心筋炎ウイルスなどのカルジオウイルスに見いだされるものを含む。FMDV、ERAV、PTV-1およびTaVに由来する2Aペプチドは、本明細書において、それぞれ「F2A」、「E2A」、「P2A」および「T2A」と称される。当業者は、本発明において使用するための適切な自己切断ペプチドを選択することができるであろう。

40

【0218】

いくつかの態様では、リンカーは、フーリン切断部位をコードする核酸配列をさらに含

50

む。フリーリンは、トランスゴルジ中に存在し、タンパク質前駆体を分泌の前にプロセッシングする、遍在的に発現されるプロテアーゼである。フリーリンは、そのコンセンサス認識配列のCOOH-末端で切断する。様々なフリーリンコンセンサス認識配列（または「フリーリン切断部位」）が、当業者に公知であり、非限定的に、Arg-X1-Lys-Arg（SEQ ID NO：127）またはArg-X1-Arg-Arg（SEQ ID NO：128）、X2-Arg-X1-X3-Arg（SEQ ID NO：129）およびArg-X1-X1-Arg（SEQ ID NO：130）、例えば、Arg-Gln-Lys-Arg（SEQ ID NO：131）を含み、ここで、X1は、任意の天然に存在するアミノ酸であり、X2は、LysまたはArgであり、X3は、LysまたはArgである。当業者は、本発明において使用するための適切なフリーリン切断部位を選択することができるであろう。

【0219】

10

いくつかの態様では、リンカーは、フリーリン切断部位と2Aペプチドの組み合わせをコードする核酸配列を含む。例は、非限定的に、フリーリン切断部位およびF2Aをコードする核酸配列を含むリンカー、フリーリン切断部位およびE2Aをコードする核酸配列を含むリンカー、フリーリン切断部位およびP2Aをコードする核酸配列を含むリンカー、フリーリン切断部位およびT2Aをコードする核酸配列を含むリンカーを含む。当業者は、本発明において使用するための適切な組み合わせを選択することができるであろう。そのような態様では、リンカーは、フリーリン切断部位と2Aペプチドとの間にスペーサー配列をさらに含み得る。いくつかの態様では、リンカーは、2Aペプチドの5'にフリーリン切断部位を含む。いくつかの態様では、リンカーは、フリーリン切断部位の5'に2Aペプチドを含む。様々なスペーサー配列が、当技術分野において公知であり、非限定的に、グリシンセリン（GS）スペーサー（GSリンカーとしても）、例えば、（GS）_n、（SG）_n、（GSGGS）_n（SEQ ID NO：115）および（GGGS）_n（SEQ ID NO：116）を含み、ここで、_nは、少なくとも1の整数を表す。例示的なスペーサー配列は、非限定的に、GSGG（SEQ ID NO：118）、GSGGG（SEQ ID NO：119）、GSGSG（SEQ ID NO：120）、GSGGG（SEQ ID NO：121）、GGGSG（SEQ ID NO：122）、GSSSG（SEQ ID NO：123）などを含むアミノ酸配列を含むことができる。当業者は、本発明において使用するための適切なスペーサー配列を選択することができるであろう。

20

【0220】

いくつかの態様では、本開示の核酸は、転写調節エレメント、例えば、プロモーターおよびエンハンサーなどに機能的に連結され得る。適切なプロモーターおよびエンハンサーエレメントは、当業者に公知である。

30

【0221】

ある特定の態様では、外因性CARをコードする核酸が、プロモーターと機能的連結状態にある。ある特定の態様では、プロモーターは、ホスホグリセリン酸キナーゼ-1（PGK）プロモーターである。

【0222】

細菌細胞における発現に適したプロモーターには、lacI、lacZ、T3、T7、gpt、ラムダPおよびtrcが含まれるが、それに限定されるわけではない。真核細胞における発現に適したプロモーターには、軽鎖および／または重鎖免疫グロブリン遺伝子プロモーターおよびエンハンサーエレメント；サイトメガロウイルス前初期プロモーター；単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼプロモーター；初期および後期SV40プロモーター；レトロウイルス由来の長鎖末端反復配列に存在するプロモーター；マウスメタロチオネイン-Iプロモーター；ならびに当技術分野において公知の様々な組織特異的プロモーターが含まれるが、それに限定されるわけではない。可逆誘導性プロモーターを含む、適切な可逆プロモーターは、当技術分野において公知である。そのような可逆プロモーターは、多数の生物、例えば、真核生物および原核生物から単離され、それに由来する場合がある。第2の生物における使用のために第1の生物に由来する可逆プロモーターの改変（例えば、第1の原核生物および第2の真核生物、第1の真核生物および第2の原核生物など）は、当技術分野において周知である。そのような可逆プロモーター、およびそのような可逆プロモーターに基づくが、追加的な制御タンパク質も含むシステムには、アルコール調節プロモ-

40

50

ター（例えば、アルコールデヒドロゲナーゼI (alcA) 遺伝子プロモーター、アルコールトランス活性化因子タンパク質 (A1cR) 応答プロモーターなど）、テトラサイクリン調節プロモーター、（例えば、TetActivator、TetON、TetOFFなどを含むプロモーターシステム）、ステロイド調節プロモーター（例えば、ラットグルココルチコイド受容体プロモーターシステム、ヒトエストロゲン受容体プロモーターシステム、レチノイドプロモーターシステム、甲状腺プロモーターシステム、エクジソンプロモーターシステム、ミフェプリストンプロモーターシステムなど）、金属調節プロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーターシステムなど）、病原性関連調節プロモーター（例えば、サリチル酸調節プロモーター、エチレン調節プロモーター、ベンゾチアジアゾール調節プロモーターなど）、温度調節プロモーター（例えば、熱ショック誘導プロモーター（例えば、HSP-70、HSP-90、ダイズ熱ショックプロモーターなど）、光調節プロモーター、合成誘導プロモーターなどが含まれるが、それに限定されるわけではない。

10

【0223】

いくつかの態様では、プロモーターは、CD8細胞特異的プロモーター、CD4細胞特異的プロモーター、好中球特異的プロモーター、またはNK特異的プロモーターである。例えば、CD4遺伝子プロモーターを使用することができる；例えば、Salmon et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90:7739；およびMarodon et al. (2003) Blood 101:3416を参照されたい。別の例として、CD8遺伝子プロモーターを使用することができる。NK細胞特異的発現は、Ncrl (p46) プロモーターの使用により達成することができる；例えば、Eckelhart et al. Blood (2011) 117:1565を参照されたい。

20

【0224】

酵母細胞における発現に適したプロモーターは、ADH1プロモーター、PGK1プロモーター、ENOプロモーター、PYK1プロモーターなどのような構成的プロモーター；またはGAL1プロモーター、GAL10プロモーター、ADH2プロモーター、PHOSプロモーター、CUP1プロモーター、GALTプロモーター、MET25プロモーター、MET3プロモーター、CYC1プロモーター、HIS3プロモーター、ADH1プロモーター、PGKプロモーター、GAPDHプロモーター、ADC1プロモーター、TRP1プロモーター、URA3プロモーター、LEU2プロモーター、ENOプロモーター、TP1プロモーター、およびAOX1（例えば、ピキア (Pichia) における使用のため）のような調節可能なプロモーターである。適切なベクターおよびプロモーターの選択は、十分に当業者のレベルの範囲内である。原核生物宿主細胞における使用に適したプロモーターには、バクテリオファージT7 RNAポリメラーゼプロモーター；trpプロモーター；lacオペロンプロモーター；ハイブリッドプロモーター、例えば、lac/tacハイブリッドプロモーター、tac/trcハイブリッドプロモーター、trp/lacプロモーター、T7/lacプロモーター；trcプロモーター；tacプロモーターなど；araBADプロモーター；ssaGプロモーターなどのインピボ調節プロモーターまたは関連プロモーター（例えば、米国特許出願公開第20040131637号を参照されたい）、pagCプロモーター(Pulkkinen and Miller, J. Bacteriol. (1991) 173(1): 86-93；Alpuche-Aranda et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89(21): 10079-83)、nirBプロモーター(Harborne et al. Mol. Micro. (1992) 6:2805-2813) など(例えば、Dunstan et al., Infect. Immun. (1999) 67:5133-5141；McKelvie et al., Vaccine (2004) 22:3243-3255；およびChatfield et al., Biotechnol. (1992) 10:888-892を参照されたい)；sigma70プロモーター、例えば、コンセンサスsigma70プロモーター（例えば、GenBankアクセッション番号AX798980、AX798961、およびAX798183を参照されたい)；静止期プロモーター、例えば、dpsプロモーター、spvプロモーターなど；病原性アイランドSPI-2に由来するプロモーター（例えば、W096/17951を参照されたい)；actAプロモーター（例えば、Shetron-Rama et al., Infect. Immun. (2002) 70:1087-1096を参照されたい)；rpsMプロモーター（例えば、Valdivia and Falkow Mol. Microbiol. (1996). 22:367を参照されたい)；tetプロモーター（例えば、Hillen, W. and Wissmann, A. (1989) In Saenger, W. and Heinemann, U. (eds), Topics in Molecu

30

40

50

lar and Structural Biology, Protein--Nucleic Acid Interaction. Macmillan, London, UK, Vol. 10, pp. 143-162を参照されたい) ; SP6プロモーター (例えば, Melton et al., Nucl. Acids Res. (1984) 12:7035を参照されたい) などが含まれるが、それに限定されるわけではない。大腸菌 (*Escherichia coli*) などの原核生物における使用に適した強力なプロモーターには、Trc、Tac、T5、T7、およびPラムダが含まれるが、それに限定されるわけではない。細菌宿主細胞における使用のためのオペレーターの非限定的な例には、ラクトースプロモーターオペレーター (LacIリプレッサータンパク質は、ラクトースと接触した場合に立体配座を変化させ、それにより、Ladリプレッサータンパク質がオペレーターに結合するのを阻止する)、トリプトファンプロモーターオペレーター (トリプトファンと複合体化した場合、TrpRリプレッサータンパク質は、オペレーターと結合する立体配座を有し; トリプトファンの非存在下で、TrpRリプレッサータンパク質は、オペレーターに結合しない立体配座を有する)、およびtacプロモーターオペレーターが含まれる (例えば、deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1983) 80:21-25を参照されたい)。

10

20

30

40

50

【0225】

適切なプロモーターの他の例には、前初期サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター配列が含まれる。このプロモーター配列は、それに機能的に連結される任意のポリヌクレオチド配列の高レベルの発現を推進することが可能な、強力な構成的プロモーター配列である。サルウイルス40 (SV40) 初期プロモーター、マウス乳がんウイルス (MMTV) またはヒト免疫不全ウイルス (HIV) 長鎖末端反復配列 (LTR) プロモーター、MoMuLVプロモーター、トリ白血病毒プロモーター、エプスタイン-バーウイルス前初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、EF-1アルファプロモーター、ならびに非限定的にアクチンプロモーター、ミオシンプロモーター、ヘモグロビンプロモーター、およびクレアチンキナーゼプロモーターなどのヒト遺伝子プロモーターを含むが、それに限定されるわけではない他の構成的プロモーター配列も使用される場合がある。さらに、本発明は、構成的プロモーターの使用に限定されるべきではない。誘導プロモーターもまた、本発明の一部として考えられている。誘導プロモーターの使用は、それが機能的に連結されるポリヌクレオチド配列の発現が望ましい場合に、そのような発現をオンにすること、または発現が望ましくない場合に発現をオフにすることが可能な分子スイッチを提供する。誘導プロモーターの例には、メタロチオニン (metallothionine) プロモーター、グルココルチコイドプロモーター、プロゲステロンプロモーター、およびテトラサイクリンプロモーターが含まれるが、それに限定されるわけではない。

【0226】

いくつかの態様では、適切なプロモーターを含有する遺伝子座または構築物または導入遺伝子は、誘導システムの誘導を経由して不可逆的にスイッチされる。不可逆スイッチの誘導に適したシステムは、当技術分野において周知であり、例えば、不可逆スイッチの誘導は、Cre-lox媒介組み換えを利用する場合がある (例えば、その開示が参照により本明細書に組み入れられる、Fuhrmann-Benzakein, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2000) 28:e99を参照されたい)。当技術分野において公知であるリコンビナーゼ、エンドヌクレアーゼ、リガーゼ、組み換え部位などの任意の適切な組み合わせが、不可逆的にスイッチ可能なプロモーターを生成するために使用される場合がある。本明細書の他の箇所に記載される部位特異的組み換えを行うための方法、メカニズム、および要件が、不可逆的にスイッチされたプロモーターの生成に用いられ、当技術分野において周知である。例えば、その開示が、参照により本明細書に組み入れられる、Grindley et al., Annual Review of Biochemistry (2006) 567-605; および Tropp, Molecular Biology (2012) (Jones & Bartlett Publishers, Sudbury, Mass.) を参照されたい。

【0227】

いくつかの態様では、本開示の核酸は、CAR誘導発現カセットをコードする核酸配列をさらに含む。一態様では、CAR誘導発現カセットは、CARシグナル伝達の際に放出さ

れるトランスジェニックポリペプチド産物の産生のためである。例えば、Chmielewski and Abken, *Expert Opin. Biol. Ther.* (2015) 15(8): 1145-1154 ; および Abken, *Immunotherapy* (2015) 7(5): 535-544 を参照されたい。いくつかの態様では、本開示の核酸は、T細胞活性化応答プロモーターに機能的に連結されるサイトカインをコードする核酸配列をさらに含む。いくつかの態様では、T細胞活性化応答プロモーターに機能的に連結されるサイトカインは、別々の核酸配列上に存在する。一態様では、サイトカインはIL-12である。

【0228】

本開示の核酸は、発現ベクターおよび／またはクローニングベクター内に存在し得る。発現ベクターは、選択マーカー、複製起点、ならびにベクターの複製および／または維持を提供する他の特徴を含むことができる。適切な発現ベクターには、例えば、プラスミド、ウイルスベクターなどが含まれる。多数の適切なベクターおよびプロモーターが、当業者に公知であり；対象の組み換え構築物を生成するために多くが市販されている。以下のベクターが例として提供されるが、これらは、いかようにも限定として解釈されるべきではない：細菌：pBs、phagescript、PsiX174、pBluescript SK、pBs KS、pNH8a、pNH16a、pNH18a、pNH46a (Stratagene, La Jolla, Calif., USA) ; pTrc99A、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、およびpRIT5 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) 。原核生物：pWLneo、pSV2cat、pOG44、PXR1、pSG (Stratagene) pSVK3、pBPV、pMSGおよびpSVL (Pharmacia) 。

【0229】

発現ベクターは、一般的に、プロモーター配列近くに位置する好都合な制限部位を有して、異種タンパク質をコードする核酸配列の挿入を提供する。発現宿主において作動する選択マーカーが存在する場合がある。適切な発現ベクターには、ウイルスベクター（例えば、ワクシニアウイルス；ポリオウイルス；アデノウイルス（例えば、Li et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* (1994) 35: 2543-2549 ; Borrás et al., *Gene Ther.* (1999) 6: 515-524 ; Li and Davidson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92: 7700-7704 ; Sakamoto et al., *H. Gene Ther.* (1999) 5: 1088-1097 ; 国際公開公報第94/12649号、同第93/03769号；同第93/19191号；同第94/28938号；同第95/11984号および同第95/00655号を参照されたい）；アデノ随伴ウイルス（例えば、Ali et al., *Hum. Gene Ther.* (1998) 9: 81-86, Flannery et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997) 94: 6916-6921 ; Bennett et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* (1997) 38: 2857-2863 ; Jomary et al., *Gene Ther.* (1997) 4: 683-690, Rolling et al., *Hum. Gene Ther.* (1999) 10: 641-648 ; Ali et al., *Hum. Mol. Genet.* (1996) 5: 591-594 ; 国際公開公報第93/09239号におけるSrivastava、Samulski et al., *J. Vir.* (1989) 63: 3822-3828 ; Mendelson et al., *Virol.* (1988) 166: 154-165 ; およびFlotte et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1993) 90: 10613-10617を参照されたい）；SV40；単純ヘルペスウイルス；ヒト免疫不全ウイルス（例えば、Miyoshi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997) 94: 10319-23 ; Takahashi et al., *J. Virol.* (1999) 73: 7812-7816を参照されたい）に基づくウイルスベクター；レトロウイルスベクター（例えば、マウス白血病ウイルス、脾臓壊死ウイルス、ならびにラウス肉腫ウイルス、ハーベイ肉腫ウイルス、トリ白血病ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルス、および乳がんウイルスなどのレトロウイルスに由来するベクター）などが含まれるが、それに限定されるわけではない。

【0230】

使用に適した追加的な発現ベクターは、例えば、非限定的に、レンチウイルスベクター、ガンマレトロウイルスベクター、泡沫状ウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、操作ハイブリッドウイルスベクター、トランスポゾン媒介ベクターなどである。ウイルスベクター技法は、当技術分野において周知であり、例えば、Sambrook et al., 2012,

Molecular Cloning: A Laboratory Manual, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY) ならびに他のウイルス学および分子生物学のマニュアルに記載されている。ベクターとして有用なウイルスには、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、およびレンチウイルスが含まれるが、それに限定されるわけではない。

【0231】

一般に、適切なベクターは、少なくとも1つの生物において機能性の複製起点、プロモーター配列、好都合な制限エンドヌクレアーゼ部位、および1つまたは複数の選択マーカ含有する（例えば、国際公開公報第01/96584号；同第01/29058号；および米国特許第6,326,193号）。

【0232】

いくつかの態様では、免疫細胞またはその前駆細胞（例えば、T細胞）中にCARを導入するために、発現ベクター（例えば、レンチウイルスベクター）が使用される場合がある。したがって、本発明の発現ベクター（例えば、レンチウイルスベクター）は、CARをコードする核酸を含む場合がある。いくつかの態様では、発現ベクター（例えば、レンチウイルスベクター）は、その中にコードされるCARの機能的発現を助ける追加的なエレメントを含むであろう。いくつかの態様では、CARをコードする核酸を含む発現ベクターは、哺乳動物プロモーターをさらに含む。一態様では、ベクターは、伸長因子-1-アルファプロモーター（EF-1 α プロモーター）をさらに含む。EF-1 α プロモーターの使用は、下流の導入遺伝子（例えば、CARをコードする核酸配列）の発現における効率を上げる場合がある。生理的プロモーター（例えば、EF-1 α プロモーター）は、組み込み媒介遺伝毒性を誘導する可能性が低い場合があり、レトロウイルスベクターが幹細胞を形質転換する能力を打ち消す場合がある。ベクター（例えば、レンチウイルスベクター）における使用に適した他の生理的プロモーターは、当業者に公知であり、本発明のベクターに組み込まれる場合がある。いくつかの態様では、ベクター（例えば、レンチウイルスベクター）は、力価および遺伝子発現を改善する場合がある、必須ではないシス作用配列をさらに含む。必須ではないシス作用配列の非限定的な一例は、効率的な逆転写および核内輸送に重要なセントラルポリプリントラクトおよびセントラルターミネーション配列（cPPT/CTS）である。他の必須ではないシス作用配列は、当業者に公知であり、本発明のベクター（例えば、レンチウイルスベクター）に組み込まれる場合がある。いくつかの態様では、ベクターは、転写後調節エレメントをさらに含む。転写後調節エレメントは、RNAの翻訳を改善し、導入遺伝子の発現を改善し、RNA転写物を安定化する場合がある。転写後調節エレメントの一例は、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント（WP RE）である。したがって、いくつかの態様では、本発明のためのベクターは、WP RE配列をさらに含む。様々な転写後調節因子エレメントは、当業者に公知であり、本発明のベクター（例えば、レンチウイルスベクター）に組み込まれる場合がある。本発明のベクターは、RNAの輸送のためのrev応答エレメント（RRE）、パッケージング配列、ならびに5'および3'長鎖末端反復配列（LTR）などの追加的なエレメントをさらに含む場合がある。「長鎖末端反復配列」または「LTR」という用語は、U3、RおよびU5領域を含むレトロウイルスDNAの末端に位置する塩基対のドメインを指す。LTRは、一般的にレトロウイルス遺伝子の発現（例えば、プロモーション、イニシエーションおよび遺伝子転写物のポリアデニル化）およびウイルス複製に必要な機能を提供する。一態様では、本発明のベクター（例えば、レンチウイルスベクター）は、3' U3欠失LTRを含む。したがって、本発明のベクター（例えば、レンチウイルスベクター）は、本明細書に記載されるエレメントの任意の組み合わせを含んで、導入遺伝子の機能的発現の効率を高める場合がある。例えば、本発明のベクター（例えば、レンチウイルスベクター）は、CARをコードする核酸に加えてWP RE配列、cPPT配列、RRE配列、5'LTR、3' U3欠失LTRを含む場合がある。

【0233】

本発明のベクターは、自己不活化ベクターであり得る。本明細書に用いられる「自己不

10

20

30

40

50

活化ベクター」という用語は、3' LTRエンハンサープロモーター領域（U3領域）が改変されている（例えば、欠失または置換により）、ベクターを指す。自己不活化ベクターは、ウイルス複製の第1ラウンドを超えたウイルス転写を防止し得る。結果として、自己不活化ベクターは、感染して、次いで宿主ゲノム（例えば、哺乳動物ゲノム）中に1回だけ組み込まれることができ得るが、さらに継代され得ない。したがって、自己不活化ベクターは、複製適格ウイルスを生み出すリスクを大きく低減し得る。

【0234】

いくつかの態様では、本発明の核酸は、RNA、例えば、インビトロ合成されたRNAであり得る。RNAのインビトロ合成のための方法は、当業者に公知であり；任意の公知の方法を使用して、本開示のCARをコードする配列を含むRNAを合成することができる。宿主細胞内にRNAを導入するための方法は、当技術分野において公知である。例えば、Zhao et al. Cancer Res. (2010) 15: 9053を参照されたい。本開示のCARをコードするヌクレオチド配列を含むRNAを宿主細胞中に導入することは、インビトロまたはエキスピボまたはインピボで実施することができる。例えば、宿主細胞（例えば、NK細胞、細胞傷害性Tリンパ球など）に、本開示のCARをコードするヌクレオチド配列を含むRNAをインビトロまたはエキスピボでエレクトロポレーションすることができる。

【0235】

ポリペプチドまたはその部分の発現を評価するために、細胞内に導入されるべき発現ベクターはまた、ウイルスベクターによりトランスフェクションまたは感染させようとする細胞集団から発現している細胞の特定および選択を容易にするために、選択マーカー遺伝子またはレポーター遺伝子の一方または両方を含む場合がある。いくつかの態様では、選択マーカーは、別々のDNA片上に保有され、共トランスフェクション手順に使用される場合がある。選択マーカーおよびレポーター遺伝子の両方は、宿主細胞における発現を可能にするために適切な調節配列に隣接する場合がある。有用な選択マーカーには抗生物質耐性遺伝子が含まれるが、それに限定されるわけではない。

【0236】

トランスフェクションされた可能性のある細胞を特定するためおよび調節配列の機能性を評価するために、レポーター遺伝子が使用される。一般に、レポーター遺伝子は、レシピエント生物または組織中に存在することもそれによって発現されることもない遺伝子であり、かつ、いくつかの容易に検出可能な特性、例えば、酵素活性によってその発現が明らかにされるポリペプチドをコードする遺伝子である。レポーター遺伝子の発現は、DNAがレシピエント細胞内に導入された後の適切な時間に評価される。適切なレポーター遺伝子には、ルシフェラーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、分泌アルカリホスファターゼをコードする遺伝子、または緑色蛍光タンパク質遺伝子が含まれる場合があるが、それに限定されるわけではない（例えば、U i-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82）。

【0237】

いくつかの態様では、本開示の核酸は、本明細書に記載されるようなCARの、例えば、哺乳動物細胞中での産生を提供する。いくつかの態様では、本開示の核酸は、CARをコードする核酸の増幅を提供する。

【0238】

D. 改変免疫細胞

本発明は、本明細書に記載されるようなCARを含む改変免疫細胞またはその前駆体（例えば、T細胞）を提供する。また、CARをコードする核酸を含む改変免疫細胞またはその前駆細胞も提供される。したがって、そのような改変細胞は、その中で発現されるCARによって指向される特異性を保有する。例えば、CARを含む本開示の改変細胞は、標的細胞（例えば、がん細胞）上のCCR4に対する特異性を保有する。一局面では、本発明は、がんを有する対象に抗CCR4 CARを含む改変細胞を投与することを含む、がんを治療する方法であって、改変細胞が、対象においてCCR4陽性T細胞を枯渇させかつCCR4陰性T細胞を枯渇させず、それにより、がんを治療する、方法を提供する。

【0239】

また、CARをコードしかつセーフティスイッチをさらにコードする核酸を含む、改変免疫細胞またはその前駆細胞であって、セーフティスイッチが、セーフティスイッチ物質が投与されたときに対象においてCAR T細胞枯渇を誘導する、改変免疫細胞またはその前駆細胞も提供される。CARは、P2AまたはT2A配列などの本明細書に記載されるような2A自己切断配列を介して、セーフティスイッチに連結され得る。したがって、セーフティスイッチ枯渇系は、自己切断可能リンカーを介してセーフティスイッチに連結された抗CCR4 CAR（すなわち、CAR連結セーフティスイッチ）を含み、さらにセーフティスイッチ物質を含む。一態様では、セーフティスイッチは、短縮型EGFR（EGFRt）であり、セーフティスイッチ物質は、セツキシマブなどの抗EGFR抗体である。一態様では、セーフティスイッチは、CD20であり、セーフティスイッチ物質は、リツキシマブなどの抗CD20抗体である。一態様では、セーフティスイッチは、誘導性カスパーゼ9であり、セーフティスイッチ物質は、AP1903などの二量体化薬である。一態様では、セーフティスイッチは、単純ヘルペスウイルス1型チミジンキナーゼ（HSVTK）であり、セーフティスイッチ物質は、ガンシクロビル（GCV）である。

10

【0240】

ある特定の態様では、CAR連結セーフティスイッチは、ドミナントネガティブTGFb受容体II型（dnTGFbRII）をさらに含む。いくつかの態様では、CAR連結セーフティスイッチのCARは、dnTGFbRIIに、例えば、P2AまたはT2A配列などの本明細書に記載されるような2A自己切断配列を介して連結される。いくつかの態様では、CAR連結セーフティスイッチのセーフティスイッチは、dnTGFbRIIに、例えば、P2AまたはT2A配列などの本明細書に記載されるような2A自己切断配列を介して連結される。いくつかの態様では、CAR連結セーフティスイッチのCARおよびセーフティスイッチは、各々、dnTGFbRIIに、例えば、P2AまたはT2A配列などの2A自己切断配列を介して連結される。いくつかの態様では、CAR連結セーフティスイッチは、抗CCR4 CAR、HSVTKセーフティスイッチ、およびdnTGFbRIIを含み、抗CCR4 CAR、HSVTK、およびdnTGFbRIIは、CAR連結セーフティスイッチのN末端からC末端へ任意の順序で存在し得る。

20

【0241】

いくつかの態様では、CAR連結セーフティスイッチは、SEQ ID NO：42、52、60、68、76、88、および100に示されるアミノ酸配列のいずれか1つを含む。CAR配列およびCAR連結セーフティスイッチ配列の許容可能な変形は、当業者に公知であろう。例えば、ある特定の態様では、CARは、SEQ ID NO：30、54、62、70、82、90、および102のいずれか1つに示されるアミノ酸配列との少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。ある特定の態様では、CAR連結セーフティスイッチは、SEQ ID NO：42、52、60、68、76、88、および100に示されるアミノ酸配列のいずれか1つとの少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

30

40

【0242】

一局面では、本発明は、抗CCR4抗原結合ドメインと膜貫通ドメインと細胞内ドメインとを含むCARを含む、改変免疫細胞またはその前駆細胞を含む。別の局面では、本発明は、抗CCR4抗原結合ドメインと膜貫通ドメインと細胞内ドメインとを含むCARをコードする核酸を含む、改変免疫細胞またはその前駆細胞を含む。いくつかの態様では、核酸はさらに、セーフティスイッチをコードし、セーフティスイッチは、セーフティスイッチ物

50

質が投与されたときに対象においてCAR T細胞枯渇を誘導する。

【0243】

ある特定の態様では、改変細胞は、改変免疫細胞である。ある特定の態様では、改変細胞は、自己由来細胞である。ある特定の態様では、改変細胞は、ヒト対象から得られた自己由来細胞である。ある特定の態様では、改変細胞は、T細胞である。

【0244】

ある特定の態様では、改変免疫細胞またはその前駆細胞は、未改変免疫細胞におけるCCR4発現レベルと比べてCCR4発現を低減または排除するようにさらに改変される。細胞におけるCCR4のノックダウン (k/d) またはノックアウト (k/o) は、CCR4-CAR形質導入の前に、それと同時に、またはその後達成することができる。いくつかの態様では、CCR4 k/dまたはk/oは、遺伝子k/dまたはk/oのための当技術分野において公知の任意の方法、例えば、RNAi (shRNAまたはsiRNA)、遺伝子操作 (例えば、CRISPR/Cas9を介する)、またはタンパク質に基づく系 (例えば、1つまたは複数のC末端KDELモチーフを有する抗CCR4 scFv) を用いた細胞の改変によって達成することができる。いくつかの態様では、改変免疫細胞またはその前駆細胞は、(a) CCR4ヌルノックアウト対立遺伝子；(b) 抑制されたCCR4遺伝子発現；ならびに(c) 抗CCR4 scFvとKDELモチーフとを含む融合タンパク質、および／または前記融合タンパク質をコードする核酸、のうちの1つまたは複数をさらに含む。ある特定の態様では、CCR4ヌルノックアウト対立遺伝子、または抑制されたCCR4遺伝子発現は、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート (CRISPR) 関連ヌクレアーゼ、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、およびジンクフィンガーヌクレアーゼからなる群より選択されるヌクレアーゼを含む遺伝子操作技術を介して得られる。いくつかの態様では、改変免疫細胞またはその前駆細胞は、CCR4遺伝子発現を抑制する阻害性RNA分子をさらに含む。阻害性RNA分子の例は、RNA干渉 (RNAi) RNA、短鎖ヘアピンRNA (shRNA)、低分子干渉RNA (siRNA)、トランス作用性siRNA (tasiRNA)、マイクロRNA (miRNA)、アンチセンスRNA (asRNA)、長鎖ノンコーディングRNA (lncRNA)、CRISPR RNA (crRNA)、トランス活性化crRNA (tracrRNA)、ガイドRNA (gRNA)、単一ガイドRNA (sgRNA)、二本鎖RNA (dsRNA)、リボザイム、およびそれらの任意の組み合わせを含むが、それらに限定されない。

【0245】

いくつかの態様では、改変免疫細胞またはその前駆細胞は、CCR4ターゲティングRNA (例えば、shRNA) で、または前記shRNAをコードする核酸でさらに改変される。いくつかの態様では、細胞は、CCR4ターゲティングRNA (例えば、ガイドRNA) およびCasヌクレアーゼで、またはCCR4ターゲティングRNAおよびCasヌクレアーゼをコードする核酸でさらに改変される。いくつかの態様では、細胞は、抗CCR4 scFv-KDELモチーフ融合タンパク質で、または抗CCR4 scFv-KDELモチーフ融合タンパク質をコードする核酸でさらに改変される。

【0246】

いくつかの態様では、改変免疫細胞は、CCR4ターゲティングshRNA (sh-CCR4) をさらに含む。例示的なsh-CCR4配列を、表4に示し、対照shRNA (すなわち、CreリコンビナーゼターゲティングshRNA配列 (sh-Cre)) も同様に示す。いくつかの態様では、CCR4は、NCBI Accession No. NM_005508.4のmRNA配列を有するヒトCCR4である。いくつかの態様では、Cre遺伝子配列は、NCBI Accession No. NC_005856.1のCre遺伝子配列である。いくつかの態様では、改変免疫細胞は、SEQ ID NO: 144~147のいずれか1つを含むCCR4ターゲティングshRNA、またはSEQ ID NO: 144~147のいずれか1つを含むCCR4ターゲティングshRNAをコードする核酸をさらに含む。いくつかの態様では、改変免疫細胞は、CCR4ターゲティングshRNAをコードする核酸をさらに含み、前記核酸は、SEQ ID NO: 149~152のいずれか1つを含む。

【0247】

(表4) shRNA配列

10

20

30

40

50

SEQ ID NO.	shRNA	標的領域
144	sh-CCR4#1	1519-1541
GAAUGAAGUUGUAGGUAAUAUcugugaagccacagaugggAUAUUACCUACAACUUCAUUC uuuuuuu		
145	sh-CCR4#2	1482-1504
GCAUGAGUCAGUCUGAUGAGAcugugaagccacagaugggUCUCAUCAGACUGACUCAUGC uuuuuuu		
146	sh-CCR4#3	1609-1631
GCUGAUGGAGUAAAUCGCUACcugugaagccacagaugggGUAGCGAUUUACUCCAUCAGC uuuuuuu		
147	sh-CCR4#4	1526-1548
GUUGUAGGUAAUAUUGCAAGGcugugaagccacagaugggCCUUGCAAUAUUACCUACAAC uuuuuuu		
148	sh-Cre	811-833
GAUUUACGGCGCUAAGGAUGAcugugaagccacagaugggUCAUCCUUAGCGCCGUAAAUC uuuuuuu		
SEQ ID NO.	DNAコードshRNA	標的領域
149	sh-CCR4#1	1519-1541
GAATGAAGTTGTAGGTAATATctgtgaagccacagatgggATATTACCTACAACCTTCATTCttttt		
150	sh-CCR4#2	1482-1504
GCATGAGTCAGTCTGATGAGActgtgaagccacagatgggTCTCATCAGACTGACTCATGCttttt		
151	sh-CCR4#3	1609-1631
GCTGATGGAGTAAATCGCTACctgtgaagccacagatgggGTAGCGATTTACTCCATCAGCttttt		
152	sh-CCR4#4	1526-1548
GTTGTAGGTAATATTGCAAGGctgtgaagccacagatgggCCTTGCAATATTACCTACAACttttt		
153	sh-Cre	811-833
GATTTACGGCGCTAAGGATGActgtgaagccacagatgggTCATCCTTAGCGCCGTAAATCttttt		

10

20

30

40

50

【0248】

ある特定の態様では、改変免疫細胞は、患者の末梢血単核細胞（PBMC）に由来する。したがって、いくつかの態様では、PBMCは、腫瘍細胞を含む。いくつかの態様では、対象は、以前にモガムリズマブを投与されたことがある。いくつかの態様では、がんは、モガムリズマブに不応性である。

【0249】

E. 治療の方法

本明細書に記載される改変細胞（例えば、T細胞）は、免疫療法のための組成物中に含まれ得る。組成物は、薬学的組成物を含み得、薬学的に許容される担体をさらに含み得る

。改変T細胞を含む薬学的組成物の治療有効量が投与され得る。

【0250】

一局面では、本発明は、その必要がある対象に本発明の改変T細胞を投与することを含む、養子細胞移入療法のための方法を含む。別の局面では、本発明は、その必要がある対象に改変T細胞の集団を投与することを含む、対象における疾患または病態を治療する方法を含む。一局面では、本発明は、がんを有する対象に抗CCR4 CARを含む改変細胞を投与することを含む、がんを治療する方法であって、改変細胞が、対象においてCCR4陽性T細胞を枯渇させかつCCR4陰性T細胞を枯渇させず、それにより、がんを治療する、方法を提供する。

【0251】

養子細胞療法のための免疫細胞の投与のための方法は、公知であり、提供される方法および組成物と共に使用される場合がある。例えば、養子T細胞療法は、例えば、Gruenbergらの米国特許出願公開第2003/0170238号；Rosenbergの米国特許第4,690,915号；Rosenberg (2011) Nat Rev Clin Oncol. 8(10):577-85)に記載されている。例えば、Themeli et al. (2013) Nat Biotechnol. 31(10): 928-933；Tsukahara et al. (2013) Biochem Biophys Res Commun 438(1): 84-9；Davila et al. (2013) PLoS ONE 8(4): e61338を参照されたい。いくつかの態様では、細胞療法、例えば、養子T細胞療法は、細胞療法を受けることになる対象もしくはそのような対象に由来する試料から細胞が単離され、かつ／またはその他の方法で調製される、自己移入によって実施される。したがって、いくつかの局面では、細胞は、処置を必要とする対象、例えば、患者に由来し、細胞は、単離および処理の後に同じ対象に投与される。

【0252】

いくつかの態様では、細胞療法、例えば、養子T細胞療法は、細胞が、細胞療法を受けることになる、または最終的に受ける対象、例えば、第1の対象以外の対象から単離され、かつ／またはその他の方法で調製される、同種移入によって実施される。そのような態様では、次いで細胞は、同じ種の異なる対象、例えば、第2の対象に投与される。いくつかの態様では、第1および第2の対象は、遺伝的に同一である。いくつかの態様では、第1および第2の対象は、遺伝的に類似である。いくつかの態様では、第2の対象は、第1の対象と同じHLAクラスまたは上位タイプを発現する。

【0253】

いくつかの態様では、対象は、細胞または細胞を含有する組成物の投与前に疾患または状態、例えば、腫瘍を標的とする治療剤により処置されている。いくつかの局面では、対象は、他の治療剤に対して抗療性または非応答性である。いくつかの態様では、対象は、例えば、化学療法、放射線、および／または造血幹細胞移植（HSCT）、例えば、同種HSCTを含む別の治療的介入による処置の後に持続性疾患または再発性疾患を有する。いくつかの態様では、対象は、以前にモガムリズマブを投与されたことがある。いくつかの態様では、がんはモガムリズマブに対して抗療性である。いくつかの態様では、投与は、対象が別の治療法（モガムリズマブ）に抵抗性になったにもかかわらず、対象を効果的に処置する。

【0254】

いくつかの態様では、対象は、他の治療剤に応答性であり、治療剤による処置は、疾病負担を低減する。いくつかの局面では、対象は、最初は治療剤に応答性であるが、時間が経つにつれて疾患または状態の再発を示す。いくつかの態様では、対象は再発していない。いくつかのそのような態様では、対象は、再発の危険性がある、例えば再発の高い危険性があると決定され、したがって細胞は、例えば、再発の可能性を低減するまたは再発を防止するために、予防的に投与される。いくつかの局面では、対象は、別の治療剤による事前の処置を受けたことがない。

【0255】

いくつかの態様では、対象は、例えば、化学療法、放射線、および／または造血幹細胞移植（HSCT）、例えば、同種HSCTを含む別の治療的介入による処置の後で、持続性疾

10

20

30

40

50

患または再発性疾患を有する。いくつかの態様では、投与は、対象が別の治療法に抵抗性になったにもかかわらず、対象を効果的に処置する。

【0256】

本発明の改変された免疫細胞を、動物、好ましくは哺乳動物、なおより好ましくはヒトに投与して、がんを処置することができる。加えて、本発明の細胞は、疾患を処置または軽減することが望ましい場合に、がんに関係する任意の状態の処置、特に腫瘍細胞に対する細胞媒介免疫応答のために使用することができる。本発明の改変された細胞または薬学的組成物により処置されるべきがんの種類には、ある特定の白血病またはリンパ系腫瘍、良性腫瘍および悪性腫瘍、ならびに悪性疾患、例えば、肉腫、がん腫、および黒色腫が含まれる。例示的ながんは、成熟T細胞悪性腫瘍、例えば成人T細胞白血病／リンパ腫（ATLL）、皮膚T細胞リンパ腫（CTCL）、末梢性T細胞リンパ腫（PTCL）など、ならびに大腸がん、乳がん、卵巣がん、腎臓がん、非小細胞肺がん、黒色腫、リンパ腫および肝細胞がんを含むが、それらに限定されない。がんは、非固形腫瘍（血液腫瘍など）または固形腫瘍であり得る。また、成人の腫瘍／がんおよび小児の腫瘍／がんも含まれる。一態様では、がんは、固形腫瘍または血液腫瘍である。ある特定の態様では、がんは、白血病および／またはリンパ腫である。ある特定の態様では、がん細胞は、CCR4を発現する。

10

【0257】

投与されるべき本発明の細胞は、治療を受けている対象に対して自己であり得る。

【0258】

本発明の細胞の投与は、当業者に公知の任意の好都合な方法で実施される場合がある。本発明の細胞は、エアロゾル吸入、注射、経口摂取、輸注、埋め込みまたは移植により対象に投与される場合がある。本明細書に記載される組成物は、患者に経動脈的、皮下、皮内、腫瘍内、結節内、髄内、筋肉内に、静脈内（i.v.）注射により、または腹腔内に投与される場合がある。他の例では、本発明の細胞は、対象における炎症部位、対象における局所疾患部位、リンパ節、器官、腫瘍などに直接注射される。

20

【0259】

いくつかの態様では、細胞は、所望の投薬量で投与され、投薬量は、いくつかの局面では、細胞もしくは細胞型の所望の用量もしくは数および／または細胞型の所望の比を含む。したがって、細胞の投薬量は、いくつかの態様では細胞の合計数（またはkg体重あたりの数）およびCD4⁺対CD8⁺の比のように個別の集団またはサブタイプの所望の比に基づく。いくつかの態様では、細胞の投薬量は、個別の集団における、または個別の細胞型の細胞の所望の合計数（またはkg体重あたりの数）に基づく。いくつかの態様では、投薬量は、所望の総細胞数、所望の比、および個別の集団中の所望の細胞合計数などの、そのような特徴の組み合わせに基づく。

30

【0260】

いくつかの態様では、CD8⁺ T細胞およびCD4⁺ T細胞などの細胞の集団またはサブタイプは、所望の用量の総細胞、例えば所望の用量のT細胞の許容される差異または差異内で投与される。いくつかの局面では、所望の用量は、所望の細胞数、または細胞が投与される対象の単位体重あたりの所望の細胞数、例えば、個/kgである。いくつかの局面では、所望の用量は、最小細胞数または単位体重あたりの最小細胞数である、またはそれを超える。いくつかの局面では、所望の用量で投与される総細胞の中で、個別の集団またはサブタイプは、所望のアウトプット比（CD4⁺対CD8⁺の比など）でまたはそれ近くで、例えば、そのような比のある特定の許容される差異または誤差内で存在する。

40

【0261】

いくつかの態様では、細胞は、細胞の個別の集団またはサブタイプのうち1つまたは複数の所望の用量、例えば、CD4⁺細胞の所望の用量および／またはCD8⁺細胞の所望の用量の許容される差異または差異内で投与される。いくつかの局面では、所望の用量は、サブタイプもしくは集団の所望の細胞数、または細胞が投与される対象の単位体重あたりのそのような細胞の所望の数、例えば、個/kgである。いくつかの局面では、所望の用量は、集団もしくはサブタイプの最小細胞数、または単位体重あたりの集団もしくはサブタ

50

タイプの最小細胞数である、またはそれを超える。したがって、いくつかの態様では、投薬量は、総細胞の所望の固定用量および所望の比に基づき、かつ／または個別のサブタイプもしくは部分集団のうちの1つもしくは複数、例えば、それぞれの所望の固定用量に基づく。したがって、いくつかの態様では、投薬量は、T細胞の所望の固定用量もしくは最小用量およびCD4⁺細胞対CD8⁺細胞の所望の比に基づき、かつ／またはCD4⁺細胞および／もしくはCD8⁺細胞の所望の固定用量もしくは最小用量に基づく。

【0262】

ある特定の態様では、細胞、または細胞のサブタイプの個別の集団は、対象に、約100万～約1000億個の細胞の範囲で、例えば、100万～約500億個の細胞（例えば、約500万個の細胞、約2500万個の細胞、約5億個の細胞、約10億個の細胞、約50億個の細胞、約200億個の細胞、約300億個の細胞、約400億個の細胞、または前記値の任意の2つにより定義される範囲）、例えば約1000万～約1000億個の細胞（例えば、約2000万個の細胞、約3000万個の細胞、約4000万個の細胞、約6000万個の細胞、約7000万個の細胞、約8000万個の細胞、約9000万個の細胞、約100億個の細胞、約250億個の細胞、約500億個の細胞、約750億個の細胞、約900億個の細胞、または前記値の任意の2つにより定義される範囲）で、場合によっては約1億個の細胞～約500億個の細胞（例えば、約1億2000万個の細胞、約2億5000万個の細胞、約3億5000万個の細胞、約4億5000万個の細胞、約6億5000万個の細胞、約8億個の細胞、約9億個の細胞、約30億個の細胞、約300億個の細胞、約450億個の細胞）またはこれらの範囲の間の任意の値で投与される。

【0263】

いくつかの態様では、総細胞の用量および／または細胞の個別の部分集団の用量は、細胞 1×10^5 個または約 1×10^5 個/kg～約 1×10^{11} 個/kg、細胞 10^4 個～ 10^{11} 個または約 10^{11} 個/キログラム（kg）体重、例えば、細胞 $10^5 \sim 10^6$ 個/kg体重の範囲内であり、例えば、細胞 1×10^5 個または約 1×10^5 個/kg、細胞 1.5×10^5 個/kg、細胞 2×10^5 個/kg、または細胞 1×10^6 個/kg体重である。例えば、いくつかの態様では、細胞は、T細胞 10^4 個または約 10^4 個～ 10^9 個または約 10^9 個/キログラム（kg）体重、例えば、T細胞 10^5 個～ 10^6 個/kg体重で、またはその誤差のある特定の範囲内で、例えば、T細胞 1×10^5 個もしくは約 1×10^5 個/kg、T細胞 1.5×10^5 個/kg、T細胞 2×10^5 個/kg、またはT細胞 1×10^6 個/kg体重で投与される。他の例示的な態様では、本開示の方法に使用するために適した、改変された細胞の投薬量範囲は、細胞約 1×10^5 個/kg～細胞約 1×10^6 個/kg、細胞約 1×10^6 個/kg～細胞約 1×10^7 個/kg、細胞約 1×10^7 個/kg～細胞約 1×10^8 個/kg、細胞約 1×10^8 個/kg～細胞約 1×10^9 個/kg、細胞約 1×10^9 個/kg～細胞約 1×10^{10} 個/kg、細胞約 1×10^{10} 個/kg～細胞約 1×10^{11} 個/kgを含むが、それに限定されるわけではない。例示的な態様では、本開示の方法に使用するために適した投薬量は、細胞約 1×10^8 個/kgである。例示的な態様では、本開示の方法に使用するために適した投薬量は、細胞約 1×10^7 個/kgである。他の態様では、適切な投薬量は、総細胞約 1×10^7 個～総細胞約 5×10^7 個である。いくつかの態様では、適切な投薬量は、総細胞約 1×10^8 個～総細胞約 5×10^8 個である。いくつかの態様では、適切な投薬量は、総細胞約 1.4×10^7 個～総細胞約 1.1×10^9 個である。例示的な態様では、本開示の方法に使用するために適した投薬量は、総細胞約 7×10^9 個である。

【0264】

いくつかの態様では、細胞は、 10^4 または約 $10^4 \sim 10^9$ または約 10^9 個/キログラム（kg）体重のCD4⁺および／またはCD8⁺細胞、例えば、 $10^5 \sim 10^6$ 個/kg体重のCD4⁺および／またはCD8⁺細胞で、またはその誤差のある特定の範囲内で、例えば、 1×10^5 もしくは約 1×10^5 個/kgのCD4⁺および／もしくはCD8⁺細胞、 1.5×10^5 個/kgのCD4⁺および／もしくはCD8⁺細胞、 2×10^5 個/kgのCD4⁺および／もしくはCD8⁺細胞、または 1×10^6 個/kg体重のCD4⁺および／もしくはCD8⁺細胞で投与される。いくつかの態様では、細胞は、約 1×10^6 個、約 2.5×10^6 個、約 5×10^6 個、約 7.5×10^6 個、もしくは約 9×10^6 個を超える、もしくは少なくとも約 1×10^6 個、約 2.5×10^6 個、約 5×10^6 個

、約 7.5×10^6 個、もしくは約 9×10^6 個の $CD4^+$ 細胞、および／または少なくとも約 1×10^6 個、約 2.5×10^6 個、約 5×10^6 個、約 7.5×10^6 個、もしくは約 9×10^6 個の $CD8^+$ 細胞、および／または少なくとも約 1×10^6 個、約 2.5×10^6 個、約 5×10^6 個、約 7.5×10^6 個、もしくは約 9×10^6 個のT細胞で、またはその誤差のある特定の範囲内で投与される。いくつかの態様では、細胞は、約 10^8 個～ 10^{12} 個もしくは約 10^{10} 個～ 10^{11} 個のT細胞、約 10^8 個～ 10^{12} 個もしくは約 10^{10} 個～ 10^{11} 個の $CD4^+$ 細胞、および／または約 10^8 個～ 10^{12} 個もしくは約 10^{10} 個～ 10^{11} 個の $CD8^+$ 細胞で、またはその誤差のある特定の範囲内で投与される。

【0265】

いくつかの態様では、細胞は、 $CD4^+$ および $CD8^+$ 細胞またはサブタイプなどの、複数の細胞集団またはサブタイプの所望のアウトプット比で、またはその耐容される範囲内で投与される。いくつかの局面では、所望の比は、特定の比であることができる、または比の範囲であることができ、例えば、いくつかの態様では、所望の比（例えば、 $CD4^+$ 細胞対 $CD8^+$ 細胞の比）は、5：1もしくは約5：1～5：1もしくは約5：1（または約1：5よりも大きく、約5：1よりも小さい）、または1：3もしくは約1：3～3：1もしくは約3：1（または約1：3よりも大きく、約3：1よりも小さい）、例えば、2：1もしくは約2：1～1：5もしくは約1：5（または約1：5よりも大きく、約2：1よりも小さい、例えば、5：1、4.5：1、4：1、3.5：1、3：1、2.5：1、2：1、1.9：1、1.8：1、1.7：1、1.6：1、1.5：1、1.4：1、1.3：1、1.2：1、1.1：1、1：1、1：1.1、1：1.2、1：1.3、1：1.4、1：1.5、1：1.6、1：1.7、1：1.8、1：1.9、1：2、1：2.5、1：3、1：3.5、1：4、1：4.5、もしくは1：5、または約5：1、約4.5：1、約4：1、約3.5：1、約3：1、約2.5：1、約2：1、約1.9：1、約1.8：1、約1.7：1、約1.6：1、約1.5：1、約1.4：1、約1.3：1、約1.2：1、約1.1：1、約1：1、約1：1.1、約1：1.2、約1：1.3、約1：1.4、約1：1.5、約1：1.6、約1：1.7、約1：1.8、約1：1.9、約1：2、約1：2.5、約1：3、約1：3.5、約1：4、約1：4.5、もしくは約1：5である。いくつかの局面では、耐容される差は、所望の比の約1%、約2%、約3%、約4%、約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%以内であり、これらの範囲の間の任意の値を含む。

【0266】

いくつかの態様では、改変された細胞の用量は、その必要がある対象に単回用量または複数回用量で投与される。いくつかの態様では、改変された細胞の用量は、複数回用量で、例えば、週1回または7日毎、2週1回または14日毎、3週1回または21日毎、4週1回または28日毎に投与される。例示的な態様では、改変された細胞の単回用量が、その必要がある対象に投与される。例示的な態様では、改変された細胞の単回用量は、急速静脈内注入によりその必要がある対象に投与される。

【0267】

疾患の予防または治療に適した投薬量は、処置されるべき疾患の種類、細胞もしくは組み換え受容体の種類、疾患の重症度および経過、細胞が予防目的それとも治療目的で投与されるか、事前の療法、対象の臨床歴および細胞に対する応答、ならびに担当医師の判断に依存する場合がある。組成物および細胞は、いくつかの態様では、対象に1回でまたは一連の処置にわたり適宜投与される。

【0268】

いくつかの態様では、細胞は、組み合わせ処置の部分として、例えば、別の治療的介入、例えば、抗体または操作された細胞または受容体または作用物質、例えば細胞傷害剤もしくは治療剤と同時にまたは任意の順序で順次に投与される。細胞は、いくつかの態様では、1つまたは複数の追加的な治療剤と共に、または別の治療的介入に関連して、同時にまたは任意の順序で順次に共投与される。いくつかの状況では、細胞は、細胞集団が1つまたは複数の追加的な治療剤の効果を高めるように十分に近い時間で別の療法と共に、またはその逆で共投与される。いくつかの態様では、細胞は、1つまたは複数の追加的な治療剤の前に投与される。いくつかの態様では、細胞は、1つまたは複数の追加的な治療剤

10

20

30

40

50

の後に投与される。いくつかの態様では、1つまたは複数の追加的な作用物質は、例えば持続性を高めるための、IL-2などのサイトカインを含む。いくつかの態様では、この方法は、化学療法剤の投与を含む。

【0269】

ある特定の態様では、本発明の改変された細胞（例えば、CARを含む改変された細胞）は、免疫チェックポイント抗体（例えば、抗PD1抗体、抗CTLA-4抗体、または抗PD-L1抗体）と組み合わせて対象に投与され得る。例えば、改変された細胞は、例えば、PD-1（プログラム死1タンパク質）を標的とする抗体または抗体フラグメントと組み合わせて投与され得る。抗PD-1抗体の例は、ペムブロリズマブ（KEYTRUDA（登録商標）、以前はランプロリズマブ、MK-3475としても知られている）、およびニボルマブ（BMS-936558、MDX-1106、ONO-4538、OPDIVA（登録商標））またはその抗原結合フラグメントを含むが、それらに限定されない。ある特定の態様では、改変された細胞は、抗PD-L1抗体またはその抗原結合フラグメントと組み合わせて投与され得る。抗PD-L1抗体の例は、BMS-936559、MPDL3280A（TECENTRIQ（登録商標）、アテゾリズマブ）、およびMEDI4736（デュルバルマブ、イミフィンジ）を含むが、それらに限定されない。ある特定の態様では、改変された細胞は、抗CTLA-4抗体またはその抗原結合フラグメントと組み合わせて投与され得る。抗CTLA-4抗体の例は、イピリムマブ（商標名Yervoy）を含むが、それに限定されない。低分子、siRNA、miRNAおよびCRISPR系を非限定的に含む他のタイプの免疫チェックポイントモジュレーターを使用してもよい。免疫チェックポイントモジュレーターは、CARを含む改変された細胞の前に、その後、またはそれと同時に投与され得る。ある特定の態様では、免疫チェックポイントモジュレーターを含む併用処置は、本発明の改変された細胞を含む療法の治療有効性を高め得る。

【0270】

細胞の投与に続いて、いくつかの態様では、操作された細胞集団の生物学的活性が、例えば、多数の公知の方法のいずれかによって測定される。評価するためのパラメーターは、例えば画像化によるインビボ、または例えばELISAもしくはフローサイトメトリーによるエクスピボの、抗原への操作されたまたは天然のT細胞または他の免疫細胞の特異的結合を含む。ある特定の態様では、操作された細胞の標的細胞を破壊する能力を、例えば、Kochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009)、および Herman et al. J. Immunological Methods, 285(1): 25-40 (2004)に記載されている細胞傷害アッセイなどの当技術分野において公知の任意の適切な方法を使用して測定することができる。ある特定の態様では、細胞の生物学的活性は、CD 107a、IFN γ 、IL-2およびTNFなどの1つまたは複数のサイトカインの発現および／または分泌をアッセイすることによって測定される。いくつかの局面では、生物学的活性は、全身腫瘍組織量または腫瘍負荷量の減少などの臨床結果を評価することによって測定される。

【0271】

ある特定の態様では、対象に二次的処置が提供される。二次的処置は、化学療法、放射線照射、外科手術および薬物治療を含むが、それらに限定されない。

【0272】

いくつかの態様では、CAR T細胞療法の前に、対象に条件づけ療法を実施することができる。いくつかの態様では、条件づけ療法は、シクロホスファミドの有効量を対象に投与することを含む。いくつかの態様では、条件づけ療法は、フルダラビンの有効量を対象に投与することを含む。好ましい態様では、条件づけ療法は、シクロホスファミドとフルダラビンの組み合わせの有効量を対象に投与することを含む。CAR T細胞療法の前の条件づけ療法の実施は、CAR T細胞療法の有効性を高め得る。T細胞療法のための患者を条件づける方法は、米国特許第9,855,298号に記載されており、それは、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0273】

いくつかの態様では、本開示の特定の投薬レジメンは、改変されたT細胞の投与前にリ

ンパ球枯渇工程を含む。例示的な態様では、リンパ球枯渇工程は、シクロホスファミドおよび／またはフルダラビンの投与を含む。

【0274】

いくつかの態様では、リンパ球枯渇工程は、約 $200\text{ mg/m}^2/\text{日}$ ～約 $2000\text{ mg/m}^2/\text{日}$ （例えば、 $200\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、 $300\text{ mg/m}^2/\text{日}$ または $500\text{ mg/m}^2/\text{日}$ ）の用量のシクロホスファミドの投与を含む。例示的な態様では、シクロホスファミドの用量は、約 $300\text{ mg/m}^2/\text{日}$ である。いくつかの態様では、リンパ球枯渇工程は、約 $20\text{ mg/m}^2/\text{日}$ ～約 $900\text{ mg/m}^2/\text{日}$ （例えば、 $20\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、 $25\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、 $30\text{ mg/m}^2/\text{日}$ または $60\text{ mg/m}^2/\text{日}$ ）の用量のフルダラビンの投与を含む。例示的な態様では、フルダラビンの用量は、約 $30\text{ mg/m}^2/\text{日}$ である。

10

【0275】

一部の態様では、リンパ球枯渇工程は、約 $200\text{ mg/m}^2/\text{日}$ ～約 $2000\text{ mg/m}^2/\text{日}$ （例えば、 $200\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、 $300\text{ mg/m}^2/\text{日}$ または $500\text{ mg/m}^2/\text{日}$ ）の用量のシクロホスファミドおよび約 $20\text{ mg/m}^2/\text{日}$ ～約 $900\text{ mg/m}^2/\text{日}$ （例えば、 $20\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、 $25\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、 $30\text{ mg/m}^2/\text{日}$ または $60\text{ mg/m}^2/\text{日}$ ）の用量のフルダラビンの投与を含む。例示的な態様では、リンパ球枯渇工程は、約 $300\text{ mg/m}^2/\text{日}$ の用量のシクロホスファミドおよび約 $30\text{ mg/m}^2/\text{日}$ の用量のフルダラビンの投与を含む。

【0276】

例示的な態様では、シクロホスファミドの投薬は、3日間にわたる $300\text{ mg/m}^2/\text{日}$ であり、フルダラビンの投薬は、3日間にわたる $30\text{ mg/m}^2/\text{日}$ である。

20

【0277】

リンパ球枯渇化学療法の投薬は、0日目のT細胞（例えば、CAR-T、TCR-T、改変されたT細胞など）注入に対して、-6日目～-4日目（-1日枠あり、すなわち、-7日目～-5日目に投薬）で計画され得る。

【0278】

例示的な態様では、がんを有する対象について、対象は、改変されたT細胞の投与の3日前に静脈内注入によって 300 mg/m^2 のシクロホスファミドを含むリンパ球枯渇化学療法を受ける。例示的な態様では、がんを有する対象について、対象は、改変されたT細胞の投与前の3日間静脈内注入によって 300 mg/m^2 のシクロホスファミドを含むリンパ球枯渇化学療法を受ける。

30

【0279】

例示的な態様では、がんを有する対象について、対象は、約 $20\text{ mg/m}^2/\text{日}$ ～約 $900\text{ mg/m}^2/\text{日}$ （例えば、 $20\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、 $25\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、 $30\text{ mg/m}^2/\text{日}$ または $60\text{ mg/m}^2/\text{日}$ ）の用量のフルダラビンを含むリンパ球枯渇化学療法を受ける。例示的な態様では、がんを有する対象について、対象は、 30 mg/m^2 の用量のフルダラビンを含むリンパ球枯渇化学療法を3日間受ける。

【0280】

例示的な態様では、がんを有する対象について、対象は、約 $200\text{ mg/m}^2/\text{日}$ ～約 $2000\text{ mg/m}^2/\text{日}$ （例えば、 $200\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、 $300\text{ mg/m}^2/\text{日}$ または $500\text{ mg/m}^2/\text{日}$ ）の用量のシクロホスファミドおよび約 $20\text{ mg/m}^2/\text{日}$ ～約 $900\text{ mg/m}^2/\text{日}$ （例えば、 $20\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、 $25\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、 $30\text{ mg/m}^2/\text{日}$ または $60\text{ mg/m}^2/\text{日}$ ）の用量のフルダラビンを含むリンパ球枯渇化学療法を受ける。例示的な態様では、がんを有する対象について、対象は、約 $300\text{ mg/m}^2/\text{日}$ の用量のシクロホスファミドおよび 30 mg/m^2 の用量のフルダラビンを含むリンパ球枯渇化学療法を3日間受ける。

40

【0281】

本発明の細胞は、適切な前臨床および臨床の実験および試験で決定されるべき投与量および経路かつ回数で投与することができる。細胞組成物は、これらの範囲内の投与量で複数回投与され得る。本発明の細胞の投与は、当業者によって決定されるような所望の疾患または病態を処置するのに有用な他の方法と併用してもよい。

【0282】

50

CAR T細胞の注入後の有害作用の1つが、サイトカイン放出症候群（CRS）として知られている免疫活性化の開始であることが当技術分野において公知である。CRSは、上昇した炎症性サイトカインを招く免疫活性化である。CRSは、公知のオンターゲット毒性であり、その発生は、有効性と相関する可能性が高い。臨床尺度および検査尺度は、軽度のCRS（全身症状および／またはグレード2の臓器毒性）～重度のCRS（sCRS；グレード≥3の臓器毒性、積極的な臨床介入および／または潜在的に生死にかかわる）の範囲である。臨床特徴は、高熱、倦怠感、疲労、筋肉痛、悪心、食欲不振、頻脈／低血圧、毛細血管漏出、心機能不全、腎機能障害、肝不全、および播種性血管内凝固を含む。インターフェロン-ガンマ、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、IL-10およびIL-6を含むサイトカインの劇的な上昇が、CAR T細胞注入後に示されている。1つのCRSの徴候は、IL-6（重度上昇）、IFN-ガンマ、TNF-アルファ（中度）およびIL-2（軽度）を含むサイトカインの上昇である。また、フェリチンおよびC反応性タンパク質（CRP）を含む炎症の臨床利用可能なマーカーの上昇も、CRS症候群と相関することが観察されている。CRSの存在は、一般的に、養子移入された細胞の増大および進行性免疫活性化と相関する。高い腫瘍量を有する患者は、より大きいsCRSを経験するので、CRSの重症度は注入時の疾病負荷により決まることが実証されている。

10

【0283】

したがって、本発明は、CRSの診断後に、操作された細胞（例えば、CAR T細胞）の抗腫瘍有効性を弱めずに、制御されない炎症の生理的症状を緩和するために適したCRS管理戦略を提供する。CRS管理戦略は、当技術分野において公知である。例えば、全身コルチコステロイドは、最初の抗腫瘍応答を損なわずに、sCRS（例えば、グレード3のCRS）の症状を急速に後退させるために投与される場合がある。

20

【0284】

いくつかの態様では、抗IL-6R抗体が投与される場合がある。抗IL-6R抗体の例は、米国食品医薬品局に承認された、アトリズマブとしても知られるモノクローナル抗体トシリズマブである（ActemraまたはRoActemraとして市販されている）。トシリズマブは、インターロイキン-6受容体（IL-6R）に対するヒト化モノクローナル抗体である。トシリズマブの投与は、CRSのほぼ即時の後退を実証した。

【0285】

CRSは、一般的に、観察される症候群の重症度に基づき管理され、介入はそのように個別化される。CRSの管理の決定は、単に臨床検査値だけではなく、臨床徴候および症状ならびに介入に対する応答に基づき得る。

30

【0286】

軽症例～中等症例は、一般的に、症状の十分な緩和のために必要に応じて輸液療法、非ステロイド系抗炎症薬（NSAID）および抗ヒスタミン薬を用いた症状管理で処置される。より重症の例は、任意の程度の血行動態不安定を有する患者を含み；任意の血行動態不安定では、トシリズマブの投与が推奨される。CRSの第一選択管理は、いくつかの実施形態では、表示用量8mg/kg（800mg/回を超えない）の60分間にわたるIVのトシリズマブであり得；トシリズマブは反復Q8時間であることができる。トシリズマブの初回用量に対する応答が最適以下である場合、トシリズマブの追加的な用量が考慮される場合がある。トシリズマブは、単独で、またはコルチコステロイド療法と組み合わせて投与することができる。トシリズマブに対して12～18時間で不十分な臨床改善または応答不良の、継続性または進行性のCRS症状を有する患者は、高用量コルチコステロイド療法、一般的にヒドロコルチゾン100mg IVまたはメチルプレドニゾロン1～2mg/kgで処置される場合がある。より重症の血行動態不安定またはより重症の呼吸器症状を有する患者では、患者は、CRSのクールの初期に高用量コルチコステロイド療法が実施される場合がある。CRS管理のガイダンスは、公表された基準に基づき得る（Lee et al. (2019) Biol Blood Marrow Transplant, doi.org/10.1016/j.bbmt.2018.12.758; Neelapu et al. (2018) Nat Rev Clin Oncology, 15:47; Teachey et al. (2016) Cancer Discov, 6(6):664-679）。

40

50

【0287】

CRSの臨床徴候と同時発生的に、マクロファージ活性化症候群（MAS）または血球貪食性リンパ組織球症（HLH）に一致する特徴が、CAR-T療法で処置された患者で観察されている（Henter, 2007）。MASは、CRSから起こる免疫活性化に対する反応のよう見え、したがって、CRSの徴候とみなすべきである。MASは、HLH（同じく免疫刺激に対する反応）と類似している。MASの臨床的症候群は、高グレードの非弛張性の発熱、3系統のうち少なくとも2つを冒す血球減少、および肝脾腫によって特徴付けられる。これは、高い血清フェリチン、可溶性インターロイキン-2受容体、およびトリグリセリド、ならびに循環ナチュラルキラー（NK）活性の減少に関連する。

【0288】

一局面では、本発明は、本明細書に開示される改変された免疫細胞または前駆細胞のいずれか1つを対象に投与する工程を含む、その必要がある対象におけるがんを処置する方法を含む。本発明のさらに別の局面は、本明細書に開示される方法のいずれか1つによって生成される改変された免疫細胞または前駆細胞を対象に投与する工程を含む、その必要がある対象におけるがんを処置する方法を含む。

【0289】

F. 免疫細胞の供給源

ある特定の態様では、免疫細胞（例えば、T細胞）の供給源は、エクスピボ操作のために対象から得られる。エクスピボ操作のための標的細胞の供給源はまた、例えば、自己由来または異種ドナー血液、臍帯血または骨髄も含み得る。例えば、免疫細胞の供給源は、本発明の改変免疫細胞で治療しようとする対象に由来するもの、例えば、対象の血液、対象の臍帯血、または対象の骨髄であり得る。対象の非限定例は、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ラット、およびそれらのトランスジェニック種を含む。好ましくは、対象は、ヒトである。

【0290】

免疫細胞は、血液、末梢血単核細胞、骨髄、リンパ節組織、脾臓組織、臍帯、リンパ液またはリンパ器官を含むいくつかの供給源から得ることができる。免疫細胞は、免疫系の細胞、例えば自然免疫または適応免疫の細胞、例えば、リンパ球、典型的にはT細胞および／またはNK細胞を含む骨髄系細胞またはリンパ球系細胞である。他の例示的な細胞は、人工多能性幹細胞（iPSC）を含む、複能性および多能性幹細胞などの幹細胞を含む。いくつかの局面では、細胞は、ヒト細胞である。治療しようとする対象に関して、細胞は、同種および／または自己由来であり得る。細胞は、典型的には、初代細胞、例えば、対象から直接単離された、および／または対象から単離され凍結されたものである。

【0291】

ある特定の態様では、免疫細胞は、T細胞、例えば、CD8+ T細胞（例えば、CD8+ ナイーブT細胞、セントラルメモリーT細胞、またはエフェクターメモリーT細胞）、CD4+ T細胞、ナチュラルキラーT細胞（NKT細胞）、制御性T細胞（Treg）、幹細胞メモリーT細胞、リンパ球系前駆細胞、造血幹細胞、ナチュラルキラー細胞（NK細胞）または樹状細胞である。いくつかの態様では、細胞は、単球または顆粒球、例えば、骨髄系細胞、マクロファージ、好中球、樹状細胞、マスト細胞、好酸球、および／または好塩基球である。ある態様では、標的細胞は、人工多能性幹（iPS）細胞またはiPS細胞に由来する細胞、例えば、対象から生成され、1つまたは複数の標的遺伝子の発現を変化させる（例えば、それに変異を誘導する）または操作するように操作され、そして、例えば、T細胞、例えば、CD8+ T細胞（例えば、CD8+ ナイーブT細胞、セントラルメモリーT細胞、またはエフェクターメモリーT細胞）、CD4+ T細胞、幹細胞メモリーT細胞、リンパ球系前駆細胞または造血幹細胞へと分化させた、iPS細胞である。

【0292】

いくつかの態様では、細胞は、T細胞または他の細胞型の1つまたは複数のサブセット、例えば、全T細胞集団、CD4+細胞、CD8+細胞、およびその部分集団、例えば、機能、活性化状態、成熟、分化能、増大、再循環、局在、および／もしくは持続能、抗原特異

10

20

30

40

50

性、抗原受容体の種類、特定の器官もしくは区画における存在、マーカーもしくはサイトカイン分泌プロファイル、および／または分化の度合いによって定義されるものを含む。中でも、T細胞のならびに／またはCD4+および／もしくはCD8+ T細胞のサブタイプおよび部分集団は、ナイーブT (TN) 細胞、エフェクターT細胞 (TEFF)、メモリーT細胞およびそれらのサブタイプ、例えば、幹細胞メモリーT (TSCM)、セントラルメモリーT (TCM)、エフェクターメモリーT (TEM)、または最終分化エフェクターメモリーT細胞、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL)、未熟T細胞、成熟T細胞、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、粘膜関連インバリアントT (MAIT) 細胞、天然に存在しかつ適応性の制御性T (Treg) 細胞、ヘルパーT細胞、例えばTH1細胞、TH2細胞、TH3細胞、TH17細胞、TH9細胞、TH22細胞、濾胞性ヘルパーT細胞、アルファ／ベータT細胞、およびデルタ／ガンマT細胞である。ある特定の態様では、当技術分野において入手可能ないくつかのT細胞株が使用され得る。

10

【0293】

いくつかの態様では、前記方法は、対象から免疫細胞を単離すること、それらを調製すること、処理すること、培養すること、および／または操作することを含む。いくつかの態様では、操作された細胞の調製は、1つまたは複数の培養および／または調製工程を含む。記載するような操作のための細胞は、試料、例えば生体試料、例えば、対象から得られたまたは対象に由来するものから単離され得る。いくつかの態様では、細胞が単離される対象は、疾患もしくは病態を有する対象、または細胞療法を必要とする対象、または細胞療法が実施されることになる対象である。対象は、いくつかの態様では、そのために細胞が単離、処理および／または操作される養子細胞療法などの、特定の治療的介入を必要とするヒトである。したがって、細胞は、いくつかの態様では、初代細胞、例えば、初代ヒト細胞である。試料は、対象から直接採取された組織、流体、および他の試料も、分離、遠心分離、遺伝子操作（例えば、ウイルスベクターによる形質導入）、洗浄および／またはインキュベーションなどの1つまたは複数の処理工程から生じた試料も含む。生体試料は、生物学的供給源から直接得られた試料または処理された試料であることができる。生体試料は、血液、血漿、血清、脳脊髄液、滑液、尿および汗などの体液、組織ならびに器官の試料を、それらに由来する処理された試料を含め含むが、それらに限定されない。

20

【0294】

いくつかの局面では、細胞が由来するまたは単離される試料は、血液もしくは血液由来試料であるか、またはアフエーシスもしくは白血球アフエーシス産物であるもしくはそれに由来する。例示的な試料は、全血、末梢血単核細胞 (PBMC)、白血球、骨髓、胸腺、組織生検、腫瘍、白血病、リンパ腫、リンパ節、腸管関連リンパ組織、粘膜関連リンパ組織、脾臓、他のリンパ組織、肝臓、肺、胃、腸、結腸、腎臓、膵臓、乳房、骨、前立腺、子宮頸、精巣、卵巣、扁桃、もしくは他の器官、および／またはそれらに由来する細胞を含む。試料は、細胞療法、例えば、養子細胞療法との関連で、自己由来および同種供給源からの試料を含む。ある特定の態様では、改変免疫細胞は、患者の末梢血単核細胞 (PBMC) に由来する。したがって、いくつかの態様では、PBMCは、腫瘍細胞を含む。

30

【0295】

いくつかの態様では、細胞は、細胞株、例えば、T細胞株に由来する。細胞は、いくつかの態様では、異種供給源から、例えば、マウス、ラット、非ヒト霊長類、およびブタから得られる。いくつかの態様では、細胞の単離は、1つまたは複数の調製および／または親和性に基づかない細胞分離工程を含む。いくつかの例では、細胞は、例えば、不要な成分を除去するために、所望の成分を濃縮するために、特定の試薬に感受性の細胞を溶解または除去するために、洗浄され、遠心分離され、かつ／または1つもしくは複数の試薬の存在下でインキュベートされる。いくつかの例では、細胞は、密度、接着特性、サイズ、特定の成分に対する感受性および／または耐性などの1つまたは複数の特性に基づいて分離される。

40

【0296】

いくつかの例では、対象の循環血からの細胞は、例えば、アフエーシスまたは白血球

50

アフエレーションによって得られる。試料は、いくつかの局面では、T細胞、単球、顆粒球、B細胞を含むリンパ球、他の有核白血球、赤血球、および／または血小板を含有し、いくつかの局面では、赤血球および血小板以外の細胞を含有する。いくつかの態様では、対象から収集された血液細胞は、例えば、血漿画分を除去するために、およびその後の処理工程に向けて適切な緩衝液または媒質中に細胞を入れるために洗浄される。いくつかの態様では、細胞は、リン酸緩衝食塩水（PBS）で洗浄される。いくつかの局面では、洗浄工程は、タンジェント流濾過（TFF）により、製造業者の指示に従って成し遂げられる。いくつかの態様では、細胞は、洗浄後に多様な生体適合性緩衝液中に再懸濁される。ある特定の態様では、血液細胞試料の成分が除去され、細胞が培養培地中に直接再懸濁される。いくつかの態様では、前記方法は、赤血球の溶解およびPercollまたはFicoll勾配による遠心分離によって末梢血から白血球を調製するなどの、密度に基づく細胞分離法を含む。

10

【0297】

一態様では、免疫は、アフエレーションまたは白血球アフエレーションによって得られた個体の循環血から得られた細胞である。アフエレーション産物は、典型的には、T細胞、単球、顆粒球、B細胞を含むリンパ球、他の有核白血球、赤血球、および血小板を含有する。アフエレーションによって収集された細胞は、血漿画分を除去するために、およびその後の処理工程に向けて適切な緩衝液または媒質、例えば、リン酸緩衝食塩水（PBS）に細胞を入れるために、洗浄されてよく、または洗浄溶液は、カルシウムを欠如しており、マグネシウムを欠如し得るかもしれないが多くの二価陽イオンを欠如し得る。洗浄後、細胞は、例えば、Ca不含、Mg不含PBSなどの多様な生体適合性緩衝液中に再懸濁され得る。あるいは、アフエレーション試料の望ましくない成分が、除去されてよく、細胞が培養培地中に直接再懸濁される。

20

【0298】

いくつかの態様では、単離法は、細胞中の、1つまたは複数の特定の分子、例えば、表面マーカー、例えば表面タンパク質、細胞内マーカー、または核酸の発現または存在に基づく、異なる細胞型の分離を含む。いくつかの態様では、そのようなマーカーに基づく任意の公知の分離のための方法が使用され得る。いくつかの態様では、分離は、親和性または免疫親和性に基づく分離である。例えば、単離は、いくつかの局面では、1つまたは複数のマーカー、典型的には細胞表面マーカーの細胞の発現または発現レベルに基づく、細胞および細胞集団の分離を含み、この分離は、例えば、そのようなマーカーに特異的に結合する抗体または結合パートナーとのインキュベーションとそれに一般的に続く洗浄工程、および抗体または結合パートナーに結合していない細胞からの抗体または結合パートナーに結合している細胞の分離によるものである。

30

【0299】

そのような分離工程は、試薬に結合している細胞がさらなる使用のために保持される陽性選択、および／または抗体もしくは結合パートナーに結合していない細胞が保持される陰性選択に基づくことができる。いくつかの例では、両方の画分がさらなる使用のために保持される。いくつかの局面では、不均一集団中のある細胞型を特異的に特定する抗体が利用不能な場合に、陰性選択が特に有用であることができ、それにより、所望の集団以外の細胞によって発現されるマーカーに基づいて分離が最も良好に行われる。分離は、特定の細胞集団または特定のマーカーを発現する細胞の100%の濃縮または除去をもたらす必要はない。例えば、特定の種類の細胞、例えばマーカーを発現する細胞の陽性選択または濃縮は、そのような細胞の数または百分率を増加させることを指すが、マーカーを発現していない細胞の完全な欠如をもたらす必要はない。同様に、マーカーを発現する細胞などの特定の種類の細胞の陰性選択、除去または枯渇は、そのような細胞の数または百分率を減少させることを指すが、そのような細胞のすべての完全な除去をもたらす必要はない。

40

【0300】

いくつかの例では、複数ラウンドの分離工程が実施され、その際、1つの工程から陽性

50

または陰性選択をされた画分が、後続の陽性または陰性選択などの別の分離工程に供される。いくつかの例では、それぞれが陰性選択の標的となるマーカーに特異的な複数の抗体または結合パートナーと細胞をインキュベートすることなどによって、複数のマーカーを発現する細胞を単一の分離工程で同時に枯渇させることができる。同様に、様々な細胞型に発現される複数の抗体または結合パートナーと細胞をインキュベートすることによって、複数の細胞型を同時に陽性選択することができる。

【0301】

いくつかの態様では、T細胞集団のうちの1つまたは複数の、1つもしくは複数の特定のマーカー、例えば表面マーカーについて陽性である（マーカー⁺）もしくはそれを高レベルで発現する（マーカー^{high}）細胞、または1つもしくは複数のマーカーについて陰性である（マーカー⁻）もしくはそれを比較的低レベルで発現する（マーカー^{low}）細胞が濃縮または枯渇される。例えば、いくつかの局面では、1つまたは複数の表面マーカーについて陽性であるまたはそれを高レベルで発現する細胞などの、T細胞の特定の部分集団、例えば、CD28⁺、CD62L⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD127⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺および／またはCD45RO⁺ T細胞が、陽性または陰性選択技法により単離される。いくつかの場合、そのようなマーカーは、T細胞のある特定の集団（非メモリー細胞など）に存在しないまたは比較的低レベルで発現されるが、T細胞のある特定の他の集団（メモリー細胞など）に存在するまたは比較的高レベルで発現される、マーカーである。一態様では、細胞（CD8⁺細胞またはT細胞、例えば、CD3⁺細胞など）は、CD45RO、CCR7、CD28、CD27、CD44、CD 127および／もしくはCD62Lについて陽性であるもしくはそれを高い表面レベルで発現する細胞が濃縮される（すなわち、陽性選択される）、ならびに／または、CD45RAについて陽性であるもしくはそれを高い表面レベルで発現する細胞が枯渇される（例えば、陰性選択される）。いくつかの態様では、細胞は、CD 122、CD95、CD25、CD27および／またはIL7-Rα（CD 127）について陽性であるまたはそれを高い表面レベルで発現する細胞が濃縮または枯渇される。いくつかの例では、CD8⁺ T細胞は、CD45ROについて陽性（CD45RAについて陰性）でありかつCD62Lについて陽性である細胞が濃縮される。例えば、CD3⁺、CD28⁺ T細胞を、CD3/CD28コンジュゲート磁気ビーズ（例えば、DYNABEADS（登録商標）M-450 CD3/CD28 T Cell Expander）を使用して陽性選択することができる。

【0302】

いくつかの態様では、T細胞は、B細胞などの非T細胞上、単球上、またはCD14などの他の白血球上に発現されるマーカーの陰性選択によって、PBMC試料から分離される。いくつかの局面では、CD4⁺またはCD8⁺選択工程は、CD4⁺ヘルパーおよびCD8⁺細胞傷害性T細胞を分離するために使用される。そのようなCD4⁺およびCD8⁺集団は、1つまたは複数のナイーブ、メモリーおよび／またはエフェクターT細胞部分集団上に発現されるまたは比較的高い度合いで発現されるマーカーの陽性または陰性選択によって、部分集団にさらに選別することができる。いくつかの態様では、CD8⁺細胞は、ナイーブ、セントラルメモリー、エフェクターメモリーおよび／またはセントラルメモリー幹細胞が、例えばそれぞれの部分集団と関連する表面抗原に基づく陽性または陰性選択によって、さらに濃縮または枯渇される。いくつかの態様では、セントラルメモリーT（TCM）細胞の濃縮は、有効性を高めるために、例えば、投与後の長期生存、増大および／または生着を改善するために行われ、それは、いくつかの局面では、そのような部分集団において特に堅牢である。いくつかの態様では、TCMが濃縮されたCD8⁺ T細胞およびCD4⁺ T細胞を組み合わせることで、有効性がさらに増強される。

【0303】

いくつかの態様では、メモリーT細胞は、CD8⁺末梢血リンパ球のCD62L⁺およびCD62L⁻サブセットの両方に存在する。PBMCは、CD62L⁻CD8⁺および／またはCD62L⁺CD8⁺画分を、例えば抗CD8および抗CD62L抗体を使用して、濃縮または枯渇させることができる。いくつかの態様では、CD4⁺ T細胞集団およびCD8⁺ T細胞部分集団、例えば、セントラルメモリー（TCM）細胞が濃縮された部分集団。いくつかの態様では、セン

10

20

30

40

50

トラルメモリーT (TCM) 細胞の濃縮は、CD45RO、CD62L、CCR7、CD28、CD3および／またはCD 127について陽性または高い表面発現に基づき；いくつかの局面では、それは、CD45RAおよび／またはグランザイムBを発現するまたは高度に発現する細胞の陰性選択に基づく。いくつかの局面では、TCM細胞が濃縮されたCD8+集団の単離は、CD4、CD 14、CD45RAを発現する細胞の枯渇、およびCD62Lを発現する細胞の陽性選択または濃縮によって行われる。一局面では、セントラルメモリーT (TCM) 細胞の濃縮は、CD4発現に基づいて選択された細胞の陰性画分から開始して行われ、それが、CD 14およびCD45RAの発現に基づく陰性選択、ならびにCD62Lに基づく陽性選択に供される。そのような選択は、いくつかの局面では、同時に行われ、他の局面では、いずれかの順序で連続して行われる。いくつかの局面では、CD8+細胞集団または部分集団の調製に使用される同じCD4発現に基づく選択工程はまた、CD4+細胞集団または部分集団を生成するために使用され、その結果、CD4に基づく分離からの陽性画分と陰性画分の両方が、任意で1つまたは複数のさらなる陽性または陰性選択工程に続いて、前記方法のその後の工程において保持および使用される。

10

20

30

40

50

【0304】

CD4+ Tヘルパー細胞は、細胞表面抗原を有する細胞集団を識別することによってナイーブ、セントラルメモリーおよびエフェクター細胞に選別される。CD4+リンパ球は、標準的な方法によって得ることができる。いくつかの態様では、ナイーブCD4+ Tリンパ球は、CD45RO-、CD45RA+、CD62L+、CD4+ T細胞である。いくつかの態様では、セントラルメモリーCD4+細胞は、CD62L+およびCD45RO+である。いくつかの態様では、エフェクターCD4+細胞は、CD62L-およびCD45RO-である。一例では、CD4+細胞を陰性選択によって濃縮するために、モノクローナル抗体カクテルは、典型的には、CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR、およびCD8に対する抗体を含む。いくつかの態様では、抗体または結合パートナーは、陽性および／または陰性選択のための細胞の分離を可能にするために、磁気ビーズまたは常磁性ビーズなどの固体支持体またはマトリックスに結合される。

【0305】

いくつかの態様では、細胞は、遺伝子操作の前にまたはそれに関連してインキュベートおよび／または培養される。インキュベーション工程は、培養、カルチベーション、刺激、活性化、および／または繁殖を含むことができる。いくつかの態様では、組成物または細胞は、刺激条件または刺激物質の存在下でインキュベートされる。そのような条件は、集団中の細胞の増殖、増大、活性化および／もしくは生存を誘導するように、抗原曝露を模倣するように、ならびに／または、遺伝子操作、例えば組換え抗原受容体の導入のために細胞をプライミングするように設計されたものを含む。前記条件は、特定の媒質、温度、酸素含量、二酸化炭素含量、時間、作用物質、例えば、栄養素、アミノ酸、抗生物質、イオン、および／または刺激因子、例えばサイトカイン、ケモカイン、抗原、結合パートナー、融合タンパク質、組換え可溶性受容体、および細胞を活性化するように設計された任意の他の作用物質のうちの1つまたは複数を含むことができる。いくつかの態様では、刺激条件または物質は、TCR複合体の細胞内シグナル伝達ドメインを活性化可能な1つまたは複数の作用物質、例えば、リガンドを含む。いくつかの局面では、作用物質は、T細胞におけるTCR/CD3細胞内シグナル伝達カスケードを始動するか、または開始する。そのような作用物質は、抗体、例えば、TCR成分および／または共刺激性受容体に特異的なもの、例えば、抗CD3、抗CD28（例えば、ビーズなどの固体支持体に結合した）、ならびに／または1つもしくは複数のサイトカインを含むことができる。任意で、増大方法は、培養培地に、抗CD3および／または抗CD28抗体を（例えば、少なくとも約0.5 ng/mlの濃度で）添加することをさらに含み得る。いくつかの態様では、刺激物質は、IL-2および／またはIL-15、例えば、少なくとも約10ユニット/mlの濃度のIL-2を含む。

【0306】

別の態様では、T細胞は、赤血球を溶解し、単球を、例えば、PERCOLL（商標）勾配による遠心分離によって枯渇させることによって、末梢血から単離される。あるいは、T

細胞を、臍帯から単離することができる。いずれのイベントでも、T細胞の特定の部分集団を、陽性または陰性選択技法によってさらに単離することができる。

【0307】

そのように単離された臍帯血単核細胞は、CD34、CD8、CD14、CD19およびCD56を含むがそれらに限定されない特定の抗原を発現する細胞を枯渇させることができる。これらの細胞の枯渇は、単離抗体、抗体を含む生体試料、例えば腹水、物理的支持体に結合した抗体、および細胞結合抗体を使用して成し遂げることができる。

【0308】

陰性選択によるT細胞集団の濃縮は、陰性選択された細胞に特有の表面マーカーに指向される抗体の組み合わせを使用して成し遂げることができる。好ましい方法は、陰性選択された細胞上に存在する細胞表面マーカーに指向されるモノクローナル抗体のカクテルを使用する負磁気免疫接着またはフローサイトメトリーを介した、細胞選別および／または選択である。例えば、CD4⁺細胞を陰性選択によって濃縮するために、モノクローナル抗体カクテルは、典型的には、CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DRおよびCD8に対する抗体を含む。

【0309】

陽性または陰性選択による細胞の所望の集団の単離のために、細胞の濃度および表面（例えば、ビーズなどの粒子）を変更することができる。ある特定の態様では、ビーズおよび細胞と一緒に混合される体積を大幅に減少させて（すなわち、細胞の濃度を増加させて）、細胞とビーズの接触が最大になるようにすることが望ましい場合がある。例えば、一態様では、20億個の細胞/mlの濃度が使用される。一態様では、10億個の細胞/mlの濃度が使用される。さらなる態様では、1億個の細胞/ml超が使用される。さらなる態様では、1000万、1500万、2000万、2500万、3000万、3500万、4000万、4500万または5000万個の細胞/mlの細胞濃度が使用される。さらに別の態様では、7500万、8000万、8500万、9000万、9500万または1億個の細胞/mlの細胞濃度が使用される。さらなる態様では、1億2500万または1億5000万個の細胞/mlの濃度が使用される。高濃度を使用することは、増加した細胞収量、細胞活性化、および細胞増大をもたらすことができる。

【0310】

T細胞はまた、単球の除去工程を必要としない洗浄工程の後に凍結することができる。理論に縛られることを望むわけではないが、凍結およびその後の解凍工程は、細胞集団中の顆粒球およびある程度の単球を除去することによって、より均一な産物を提供する。血漿および血小板を除去する洗浄工程後、細胞は、凍結溶液中に懸濁され得る。多くの凍結溶液およびパラメーターが当技術分野において公知であり、この状況で有用であろうが、非限定的な例では、1つの方法は、20% DMSOおよび8%ヒト血清アルブミンを含有するPBS、または他の好適な細胞凍結媒体を使用することを伴う。細胞は、次いで、1℃/分の速度で-80℃に凍結され、液体窒素保存タンクの気相中で保管される。制御凍結の他の方法が使用されてもよく、-20℃または液体窒素中での即時の非制御凍結が使用されてもよい。

【0311】

一態様では、T細胞の集団は、末梢血単核細胞、臍帯血細胞、T細胞の精製集団およびT細胞株などの細胞内に含まれる。別の態様では、末梢血単核細胞は、T細胞の集団を含む。さらに別の態様では、精製T細胞は、T細胞の集団を含む。

【0312】

ある特定の態様では、T制御性細胞（Treg）を試料から単離することができる。試料は、臍帯血または末梢血を含むことができるが、それらに限定されない。ある特定の態様では、Tregは、フローサイトメトリー選別によって単離される。試料は、当技術分野において公知の任意の手段によって単離前にTregを濃縮させることができる。単離されたTregを、凍結保存し、かつ／または使用前に増大させることができる。Tregを単離するための方法は、米国特許第7,754,482号、同第8,722,400号および同第9,555,105号

、ならびに米国特許出願第13/639,927号に記載されており、その内容は、その全体が本明細書に組み入れられる。

【0313】

G. 免疫細胞の増大

CARを発現させる細胞改変の前か後かを問わず、細胞を、例えば、米国特許第6,352,694号；同第6,534,055号；同第6,905,680号；同第6,692,964号；同第5,858,358号；同第6,887,466号；同第6,905,681号；同第7,144,575号；同第7,067,318号；同第7,172,869号；同第7,232,566号；同第7,175,843号；同第5,883,223号；同第6,905,874号；同第6,797,514号；同第6,867,041号；および米国特許出願公開第20060121005号に記載されているような方法を使用して、活性化し、その数を増大させることができる。例えば、本発明のT細胞は、CD3/TCR複合体関連シグナルを刺激する作用物質およびT細胞表面の共刺激性分子を刺激するリガンドが付着している表面との接触により増大され得る。特に、T細胞集団は、表面に固定化された抗CD3抗体もしくはその抗原結合フラグメント、または抗CD2抗体との接触によって、あるいはカルシウムイオノフォアと一緒にプロテインキナーゼC活性化因子（例えば、ブリオスタチン）との接触によって刺激され得る。T細胞表面のアクセサリー分子の共刺激のために、アクセサリー分子に結合するリガンドが使用される。例えば、T細胞は、T細胞の増殖を刺激するために適した条件下で抗CD3抗体および抗CD28抗体と接触させることができる。抗CD28抗体の例は、9.3、B-T3、XR-CD28（Diaclone, Besancon, France）を含み、これらを本発明において使用することができるが、当技術分野において公知の他の方法および試薬も同様に使用することができる（例えば、ten Berge et al., Transplant Proc. (1998) 30(8): 3975-3977；Haanen et al., J. Exp. Med. (1999) 190(9): 1319-1328；およびGarland et al., J. Immunol. Methods (1999) 227(1-2): 53-63を参照のこと）。

10

20

【0314】

本明細書に開示される方法によるT細胞の増大は、約10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍、2000倍、3000倍、4000倍、5000倍、6000倍、7000倍、8000倍、9000倍、10,000倍、100,000倍、1,000,000倍、10,000,000倍またはそれ以上、およびそれらの間の任意およびすべての整数（whole integer）および分数（partial integer）倍にすることができる。一態様では、T細胞は、約20倍～約50倍の範囲で増大する。

30

【0315】

培養に続き、別の培養装置に細胞を継代する前に、T細胞を、培養装置内の細胞培地中で、一定期間または細胞がコンフルエンスに達するか最適な継代のための高い細胞密度に達するまで、インキュベートすることができる。培養装置は、細胞をインビトロ培養するために一般に使用される任意の培養装置であることができる。好ましくは、コンフルエンスのレベルは、別の培養装置に細胞を継代する前に70%またはそれ以上である。より好ましくは、コンフルエンスのレベルは、90%またはそれ以上である。期間は、インビトロ細胞培養に適した任意の時間であることができる。T細胞培地は、T細胞の培養中、任意の時間で交換され得る。好ましくは、T細胞培地は、約2～3日毎に交換される。次いで、T細胞を培養装置から回収し、その後、T細胞を直ちに使用するか、後で使用するために凍結保存して貯蔵することができる。一態様では、本発明は、増大したT細胞を凍結保存することを含む。凍結保存されたT細胞は、T細胞中に核酸を導入する前に融解される。

40

【0316】

別の態様では、前記方法は、T細胞を単離する工程およびT細胞を増大させる工程を含む。別の態様では、本発明はさらに、増大の前にT細胞を凍結保存する工程を含む。さらに別の態様では、凍結保存されたT細胞は、キメラ膜タンパク質をコードするRNAをエレクトロポレーションするために融解される。

50

【0317】

細胞をエクスピボ増大させるための別の手順は、米国特許第5,199,942号（参照により本明細書に組み入れられる）に記載されている。米国特許第5,199,942号に記載されるような増大は、本明細書に記載される他の増大法の代替または追加であることができる。簡潔に述べると、T細胞のエクスピボ培養および増大は、米国特許第5,199,942号に記載されるものなどの細胞増殖因子または他の因子、例えばflt3-L、IL-1、IL-3およびc-kitリガンドの添加を含む。一態様では、T細胞を増大させることは、flt3-L、IL-1、IL-3およびc-kitリガンドからなる群より選択される因子と共にT細胞を培養することを含む。

【0318】

本明細書に記載されるような培養工程（本明細書に記載されるような作用物質との接触またはエレクトロポレーション後）は、非常に短く、例えば、24時間未満、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、または23時間であることができる。本明細書にさらに記載されるような培養工程（本明細書に記載されるような作用物質との接触）は、より長く、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、またはそれを超える日数であることができる。

【0319】

培養細胞を記述するために様々な用語が使用される。細胞培養物は、一般に、生きた生物から採取され、制御された条件下で成長させた細胞のことを指す。初代細胞培養物は、生物から直接採取された細胞、組織または器官の培養物であり、最初の植え継ぎ前の培養物である。細胞の成長および／または分裂を容易にする条件下で細胞が成長培地中に入れられた場合に、細胞は培養で増大され、より大きい細胞集団をもたらす。細胞が培養で増大される場合、細胞の増殖速度は、典型的には、細胞の数が倍加するのに必要な時間、別の言い方で倍加時間として知られる時間によって測定される。

【0320】

植え継ぎの各ラウンドは、継代と称される。細胞が植え継がれたとき、それらの細胞は継代されたと称される。特定の細胞集団または細胞株は、時に、継代された回数によって称される、または特徴付けられる。例えば、10回継代された培養細胞集団は、P10培養物と称され得る。初代培養物、すなわち、組織から細胞を単離した後の最初の培養物は、P0と呼ばれる。1回目の植え継ぎの後、細胞は二次培養物（P1または継代1）と記述される。2回目の植え継ぎの後、細胞は、三次培養物（P2または継代2）になる（等々）。継代期間の間に多くの集団倍加があり得ることが、当業者によって理解されるであろう；それゆえ、培養物の集団倍加数は、継代数よりも大きい。継代と継代の間の細胞の増大（すなわち、集団倍加数）は、非限定的に播種密度、基質、培地および継代間隔を含む多くの要因に依存する。

【0321】

一態様では、細胞は、数時間（約3時間）～約14日間またはその間の任意の時間整数値の間、培養され得る。T細胞培養に適した条件は、血清（例えば、ウシ胎児血清またはヒト血清）、インターロイキン-2（IL-2）、インスリン、IFN-ガンマ、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF-ベータおよびTNF- α または当業者に公知の細胞の成長のための任意の他の添加剤を含む、増殖および生存に必要な因子を含有し得る適切な培地（例えば、最小必須培地またはRPMI Media 1640またはX-vivo 15（Lonza））を含む。細胞の成長のための他の添加剤は、界面活性剤、プラスマネート（plasm anate）、ならびにN-アセチル-システインおよび2-メルカプトエタノールなどの還元剤を含むが、それらに限定されない。培地は、アミノ酸、ビルビン酸ナトリウムおよびビタミンが添加された、無血清であるか適切な量の血清（または血漿）もしくは規定のホルモン群ならびに／またはT細胞の成長および増大に十分な量のサイトカインが補充された、RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-Vivo 15およびX-Vivo 20、Optimizerを含むことができる。抗生物質、例えば、ペニシリンおよびストレプト

10

20

30

40

50

マイシンは、実験培養物中にのみ含まれ、対象に注入されるべき細胞の培養物中には含まれない。標的細胞は、成長を支援するために必要な条件下、例えば、適切な温度（例えば、37℃）および雰囲気（例えば、空気+5% CO₂）下で維持される。

【0322】

T細胞を培養するために使用される培地は、T細胞を共刺激することができる作用物質を含み得る。例えば、CD3を刺激することができる作用物質は、CD3に対する抗体であり、CD28を刺激することができる作用物質は、CD28に対する抗体である。本明細書に開示される方法によって単離される細胞は、およそ10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍、2000倍、3000倍、4000倍、5000倍、6000倍、7000倍、8000倍、9000倍、10,000倍、100,000倍、1,000,000倍、10,000,000倍、またはそれ以上増大させることができる。一態様では、T細胞は、約20倍～約50倍の範囲、またはそれ以上増大する。一態様では、ヒト制御性T細胞は、抗CD3抗体で被覆されたKT64.86人工抗原提示細胞（aAPC）を介して増大される。T細胞を増大および活性化するための方法は、米国特許第7,754,482号、8,722,400号および9,555,105号に見いだすことができ、それらの内容は、その全体が本明細書に組み入れられる。

10

【0323】

一態様では、T細胞を増大させる方法はさらに、増大されたT細胞をさらなる適用のために単離する工程を含むことができる。別の態様では、増大させる方法はさらに、それに続く増大されたT細胞のエレクトロポレーションを培養前に含むことができる。後続のエレクトロポレーションは、核酸を用いて、増大されたT細胞を形質導入すること、増大されたT細胞にトランスフェクションすること、または増大されたT細胞にエレクトロポレーションすることなど、増大されたT細胞集団に、作用物質をコードする核酸を導入することを含んでもよく、前記作用物質が、T細胞をさらに刺激する。作用物質は、さらなる増大、エフェクター機能または別のT細胞機能を刺激するなどによって、T細胞を刺激し得る。

20

【0324】

H. 薬学的組成物および製剤

また、本発明の免疫細胞集団、そのような細胞を含有するおよび／またはそのような細胞が濃縮された組成物、例えば、CARを発現する細胞が、組成物中の総細胞またはT細胞もしくはCD8+細胞もしくはCD4+細胞などのある特定の種類の細胞に対して、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上を占める、組成物も提供される。組成物の中でも、養子細胞療法のためなどの、投与のための薬学的組成物および製剤である。また、細胞および組成物を、対象、例えば、患者に投与するための治療法も提供される。

30

【0325】

また、薬学的組成物および製剤を含めた投与のための細胞を含む組成物、例えば、所与の用量またはその画分での投与のための細胞数を含む単位用量形態組成物も提供される。薬学的組成物および製剤は、一般には、1つまたは複数の任意の薬学的に許容される担体または賦形剤を含む。いくつかの態様では、組成物は、少なくとも1つの追加の治療剤を含む。

40

【0326】

用語「薬学的製剤」は、それに含有される活性成分の生物学的活性を有効にさせるような形態の調製物であって、製剤が投与されるであろう対象に対して許容できないほど有毒な追加の成分を含有しない、調製物を指す。「薬学的に許容される担体」は、対象に対して無毒である、活性成分以外の薬学的製剤中の成分を指す。薬学的に許容される担体は、緩衝液、賦形剤、安定剤または保存料を含むが、それに限定されるわけではない。いくつかの局面では、担体の選択は、一部には、特定の細胞によっておよび／または投与方法によって決定される。したがって、多種多様な適切な製剤がある。例えば、薬学的組成物は、保存料を含有することができる。適切な保存料は、例えば、メチルパラベン、プロピル

50

パラベン、安息香酸ナトリウムおよび塩化ベンザルコニウムを含み得る。いくつかの局面では、2つまたはそれよりも多い保存料の混合物が使用される。保存料またはその混合物は、典型的には、全組成物の重量に対して約0.0001%～約2%の量で存在する。担体は、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)により記載されている。薬学的に許容される担体は、一般には、採用される投与量および濃度でレシピエントに対して無毒であり、リン酸塩、クエン酸塩および他の有機酸などの緩衝液；アスコルビン酸およびメチオニンを含む酸化防止剤；保存料（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、ブチルアルコールもしくはベンジルアルコール；メチルパラベンもしくはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン類；カテコール；レソルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾールなど）；低分子量（約10残基未満の）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチンも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、アルギニンもしくはリシンなどのアミノ酸；グルコース、マンノースもしくはデキストリンを含む単糖、二糖および他の炭水化物；EDTAなどのキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロースも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、Zn-タンパク質錯体）；ならびに／また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を含むが、それに限定されるわけではない。

10

20

【0327】

いくつかの局面では、緩衝剤が組成物中に含まれる。適切な緩衝剤は、例えば、クエン酸、クエン酸ナトリウム、リン酸、リン酸カリウムならびに様々な他の酸および塩を含む。いくつかの局面では、2種またはそれよりも多くの緩衝剤の混合物が使用される。緩衝剤またはその混合物は、典型的には、全組成物の重量に対して約0.001%～約4%の量で存在する。投与可能な薬学的組成物を調製するための方法は公知である。例示的な方法は、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005)に、より詳細に記載されている。

【0328】

前記製剤は、水溶液を含むことができる。製剤または組成物はまた、細胞により処置される特定の適応症、疾患、または状態に有用な1つよりも多い活性成分、好ましくは細胞を補完する活性であって、それぞれが、互いに悪影響を及ぼさない、活性を有するもの、を含有し得る。そのような活性成分は、適切には、意図する目的に効果的な量で組み合わせられて存在する。したがって、いくつかの態様では、薬学的組成物は、他の薬学的に活性な作用物質または薬物、例えば、化学療法剤、例えば、アスパラギナーゼ、ブスルファン、カルボプラチン、シスプラチン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、フルオロウラシル、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、メトトレキサート、パクリタキセル、リツキシマブ、ビンブラスチンおよび／またはビンクリスチンをさらに含む。薬学的組成物は、いくつかの態様では、疾患または状態を治療または予防するのに有効な量、例えば、治療有効量または予防有効量で細胞を含有する。治療有効性または予防有効性は、いくつかの態様では、処置される対象を定期的に評価することによってモニタリングされる。細胞の単回ボラス投与によって、細胞の複数回ボラス投与によって、または細胞の連続注入投与によって、所望の投与量を送達することができる。

30

40

【0329】

製剤は、経口、静脈内、腹腔内、皮下、肺内、経皮、筋肉内、鼻腔内、口腔、舌下または坐剤投与のための製剤を含む。いくつかの態様では、細胞集団は、非経口投与される。用語「非経口」は、本明細書において使用される場合、静脈内、筋肉内、皮下、直腸、膈内および腹腔内投与を含む。いくつかの態様では、細胞は、静脈内、腹腔内または皮下注射による末梢全身送達を使用して対象に投与される。組成物は、いくつかの態様では、無菌の液体調製物、例えば、等張性水溶液、懸濁液、エマルジョン、分散液または粘性組成物として提供され、これらは、いくつかの局面では、選択されたpHに緩衝化され得る。

50

液体調製物は、通常、ゲル、他の粘性組成物および固体組成物よりも調製しやすい。追加的に、液体組成物が、投与に、とりわけ、注射による投与にいくらか便利である。他方で、粘性組成物を、特定の組織とのより長い接触期間をもたらすのに適した粘性範囲内で製剤化することができる。液体組成物または粘性組成物は、例えば、水、食塩水、リン酸緩衝食塩水、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール）およびそれらの適切な混合物を含有する溶媒または分散媒であることができる、担体を含むことができる。

【0330】

無菌注射液は、溶媒中に、例えば、滅菌水、生理食塩水、グルコース、デキストロースなどの適切な担体、希釈剤または賦形剤と混合された溶媒中に細胞を取り入れることによって、調製することができる。組成物は、所望の投与経路および調製に応じて、湿潤剤、分散剤、または乳化剤（例えば、メチルセルロース）、pH緩衝剤、ゲル化もしくは粘性増強添加物、保存料、着香剤および／または着色剤などの補助物質を含有することができる。いくつかの局面では、適切な調製物を調製するために標準的な教科書に助言を求めている。

10

【0331】

抗菌保存料、酸化防止剤、キレート剤、および緩衝液を含む、組成物の安定性および無菌性を増強する様々な添加物を添加することができる。微生物の作用の防止は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノールおよびソルビン酸によって保証することができる。注射用薬学的剤形の長期吸収は、吸収を遅延させる作用物質、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを使用することによってもたすことができる。

20

【0332】

インビボ投与に使用されるべき製剤は、一般に無菌のものである。無菌は、例えば滅菌濾過膜で濾過することによって、容易に達成され得る。

【0333】

本明細書において言及または引用される論文、特許および特許出願、ならびにすべての他の文書および電子的に入手可能な情報の内容は、それぞれの個々の刊行物が参照によって組み入れられることが具体的かつ個々に示されているかのように、参照によってそれらの全体が同程度に本明細書に組み入れられる。出願人等は、そのような任意の論文、特許、特許出願または他の物理的および電子的文書からのあらゆる資料および情報を本出願中に物理的に組み入れる権利を有する。

30

【0334】

本発明は、その具体的な態様を参照しながら記載されてきたが、本発明の真の精神および範囲から逸脱しなければ、様々な変更を行っても等価物に置換してもよいことが、当業者によって理解されるべきである。本明細書に開示の態様の範囲から逸脱しなければ、適切な等価物を使用して本明細書に記載の方法の他の適切な改変および適合を行ってよいことが、当業者には容易に明らかとなろう。加えて、多くの改変を行って、特定の状況、材料、物質の組成、プロセス、1つまたは複数のプロセス段階を本発明の目的、精神および範囲に適合させてもよい。そのような改変はすべて、添付の特許請求の範囲内であることが意図される。ここでは特定の態様を詳細に記載してきたが、同じものが以下の実施例を参照することによってより明確に理解され、以下の実施例は、例証を目的としてのみ含まれるものであり、限定を意図するものではない。

40

【実施例】

【0335】

実験的实施例

以下の実施例を参照して本発明をこれから説明する。これらの実施例は、例証だけの目的で提供されるものであり、本発明は、これらの実施例に限定されるわけではなく、本明細書において提供される教示の結果として明白であるすべての変形を包含する。

【0336】

50

材料および方法

CCR4-CAR T細胞の作製：4種類の抗CCR4 mAbから8種類の抗CCR4 scFvを構築した。各重鎖可変領域（H）および軽鎖可変領域（L）を、HからLまたはLからHのいずれかの配向で、4回反復リンカーを介して融合させた（表2）。scFvを、4-1BBおよびCD3ζを含有する第2世代骨格CARにサブクローニングした（補足図S1A）。4-1BBおよびCD3ζを含有する対照CD19-CARを、以前に記載されているように構築した（Milone MC, et al. Mol Ther. 2009;17(8):1453-1464.）。正常ドナー由来のT細胞を、抗CD3/28ビーズで刺激し、感染多重度（MOI）4でレンチウイルスを使用してCARを形質導入し、いかなるサイトカイン補充もなしに増大させた。

【0337】

（表2）CCR4-CARおよびこれらの由来元のmAbの一覧

#	CAR	scFv	mAb クローン	親和性 (Kd)	CCR4エピトープ	以下からの配列
1	KW_H2L	HからL	KW-0761	ND (緩やかな解離)	NT 12から29 (DESIYSNYYLYESIPKPC)	WO2015179236A1
2	KW_L2H	LからH				
3	1-49_H2L	HからL	mAb 1-49	77.98 nM	ND (NTとECLの 組み合わせ)	WO2013166500A1
4	1-49_L2H	LからH				
5	2-3_H2L	HからL	mAb 2-3	1.39 nM		
6	2-3_L2H	LからH				
7	h1567_H2L	HからL	h1567	2.54 nM		
8	h1567_L2H	LからH				

NT、N末端；ECL、細胞外ループ；ND、未決定；Kd値は、scFvとしてではなく抗体としてのデータからのものである。

【0338】

細胞株：T細胞リンパ腫由来細胞株HH（ATCC CRL-2105）、MJ（ATCC CRL-8294）およびHuT78（ATCC TIB-161）は、米国培養細胞系統保存機関（ATCC）から入手した。B-ALL由来細胞株Nalm6は、ペンシルベニア大学のJoseph A Fraiettaから寄贈された。クリックビートルルシフェラーゼグリーンおよびGFP（CBG-GFP）を発現するようにレンチウイルスを細胞株に形質導入した。短縮型CD19を発現するようにHH細胞をさらに形質導入し（HH-CBG-GFP-t19）、次いで、精製のためにINFLUXセルソーター（BD Biosciences）によって選別した。CCR4およびCAR二重陽性T細胞集団を模倣するために、HH細胞に、CCR4(KW_L2H)-CARまたはCCR4(h1567_L2H)-CARのいずれかを、通常のT細胞形質導入に使用される同じレンチウイルスを使用して形質導入した；それぞれ、HH-CCR4(KW_L2H)CARおよびHHCCR4(h1567_L2H)CAR。すべての細胞株は、アリゾナ大学のジェネティクス・コア（Genetics Core）によって認証され、マイコプラズマ汚染の存在について試験された（MycoAlert Mycoplasma Detection Kit, Lonza）。HHおよびNalm6は、10%ウシ胎児血清（FBS）（Sera digm）を補充したRPMI（Gibco, Life Technologies）での培養で維持し、MJおよびHuT78は、20% FBSを補充したIMDM（Gibco, Life Technologies）での培養で維持した。

【0339】

ルシフェラーゼに基づく殺傷アッセイ：CAR T細胞とルシフェラーゼを発現する1×1

0⁴個の標的細胞とを、丸底96ウェルプレート (Coster) 中、表示するエフェクター標的比 (E:T比) で共培養した。総溶解対照のためにTriton X-100を加えた。16時間の共培養後、細胞をPBSで洗浄し、100ulのルシフェラーゼ細胞培養溶解緩衝液 (Promega) で溶解し、続いて、1サイクルの凍結融解を行って完全な溶解を得た。溶解物を、Luciferase Assay System (Promega) を使用して、Synergy H4プレートリーダー (BioTek) でルシフェラーゼ活性について分析した。特異的溶解パーセントは、式；特異的溶解% = [(実験の溶解 - 自然の溶解) / (最大溶解 - 自然の溶解)] × 100を使用して算出した。

【0340】

⁵¹Cr放出アッセイ：標的細胞を⁵¹Cr (PerkinElmer) で2時間標識し、RPMI培地で2回洗浄した。CAR T細胞および1×10⁴個の標識細胞を、96ウェル丸底プレート中、表示するE:T比で4時間共培養した。総細胞溶解対照のためにドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を加えた。各ウェルからの上清をLumaPlate-96 (PerkinElmer) に移し、Top Countプレートリーダー (PerkinElmer) を使用して、⁵¹Crによって放出された放射線量をカウント毎分 (CPM) として決定した。特異的溶解パーセントは、式；特異的溶解% = [(実験のcpm - 自然のcpm) / (最大cpm - 自然のcpm)] × 100を使用して算出した。

【0341】

患者試料の収集：臨床試料 (腫瘍) は、ペンシルベニア大学の臨床診療において、治験審査委員会 (IRB) が承認したプロトコル下で得た。対象はすべて、ヘルシンキ宣言に基づいて書面によるインフォームドコンセントを提出した。

【0342】

マウス実験および生物発光イメージング (BLI)：5~7週齢のNOD.Cg-Prkdc^{scid} l2rgt^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) マウス (Jackson Laboratories) にHH-CBG-GFPまたはHH-CBG-GFP-t19を静脈内接種し、腫瘍接種後7日目に、0.5または2×10⁶個のCAR陽性T細胞または非形質導入 (UTD) T細胞のいずれかで処置した。Xenogen IVIS-200 Spectrum camera (Caliper Life Sciences) でBLIにより腫瘍負荷を追跡し、LivingImage software (PerkinElmer) でデータを分析した。ペンシルベニア大学の施設内動物実験委員会は、すべての動物実験を承認し、すべての動物処置は、連邦政府および施設内動物実験委員会の要件に従ってペンシルベニア大学の動物施設で実施した。

【0343】

マウス末梢血の分析：後眼窩採血または心臓穿刺によって末梢血を得て、TruCountチューブ (BD Biosciences) を使用してFCMにより各T細胞サブセット (総T細胞、CD4、CD8) の細胞数を定量した。高感度LUMINEXアッセイを製造業者の指示 (Merck Millipore) の通りに使用して、血清中のサイトカインを分析した。

【0344】

免疫組織染色 (IHC)：パラホルムアルデヒド固定パラフィン包埋試料でIHCを実施した。CCR4に特異的な抗体 (クローン：ポリクローナル、カタログ番号HPA031613) をSigma-Aldrichから購入した。CCL17に特異的な抗体 (EPR15861、ab195044) およびCCL22に特異的な抗体 (ポリクローナル、ab9847) をabcmから購入した。染色したスライドを×20の倍率でスキャンした。

【0345】

フローサイトメトリー (FCM) 分析および抗体：FCM分析に使用する抗体を表3に列挙する。バイオレットアミン反応性生死判別色素LIVE-DEADバイオレット (Invitrogen) での染色によって、死細胞をゲートアウトした。細胞内染色は、Foxp3/Transcription Factor Staining Kit (Affymetrix) を製造業者の指示の通りに使用して実施した。CCR4-CARおよびCD19-CARの発現を、それぞれビオチン化抗ヒトFab抗体および抗マウスFab抗体 (Jackson ImmunoResearch) によって検出した。Alexa Fluor (商標) 680 Antibody Labeling Kit (Thermo Fisher Scientific) を使用して、精製抗CCR4 mAb (クローンKW-0761) をAlexa Fluor (商標) 680とコンジュゲー

トした。Fortessa LSRIIまたはLSR IIサイトメーター（BD Biosciences）のいずれかによってデータを収集し、FlowJoバージョン10ソフトウェア（Tree Star）を使用して分析した。

【 0 3 4 6 】

（表 3）FCMおよびブロッキングアッセイのためのmAbの一覧

標的	クローン	蛍光色素	製造業者	カタログ番号
CD19	4G7	PE	BD	349209
CD26	BA5b	PE-Cy TM 5	Biolegend	302708
CD3	OKT3	Briliant Violet 605	Biolegend	317322
CD45	2D1	PerCP-Cy TM 5.5	Thermo Fisher Scientific	4334219
CD4	OKT4	Briliant Violet 510	Biolegend	317444
CD7	M-T701	BV605	BD	740392
CD7	eBio 124-1D1	PE-Cy TM 7	eBioscience	25-0079-42
CD8	RPA-T8	APC/Fire750	Biolegend	301066
CCR10	1B5	PerCP-Cy TM 5.5	BD	564772
CCR4(CD194)	D8SEE	PE	Thermo Fisher Scientific	4346573
CCR4(CD194)	h1567(205410)	PE	R and D	FAB1567P
CCR4(CD194)	KW-0761 (モガムリズマブ)	精製	absolute antibody	Ab00726-23.0
CCR5(CD195)	2D7/CCR5	PE-Cy TM 7	BD	557752
CCR6(CD196)	G04E3	Briliant Violet 605	Biolegend	353420
CCR7(CD197)	3D12	PE-Cy TM 7	BD	557648
CXCR3(CD183)	G025H7	Alexa Fluor 488	Biolegend	353710
CD107a	H4A3	PE-Cy TM 7	Biolegend	328618
CD158k	539304	APC	R and D	FAB2878A
IFN-g	B27	PE-CF594	BD	562392
マウス IgG, Fab	na	ビオチン	Jackson	115-065-072
IgG, Fab	na	ビオチン	Jackson	109-066-006
IL-2	MQ1-17H12	PerCP-eFluor710	Thermo Fisher Scientific	46-7029-42
TNF-a	MAb11	Briliant Violet 650	Biolegend	502938

【 0 3 4 7 】

脱顆粒および細胞内サイトカイン産生アッセイ：T細胞を、モネンシン（BD biosciences）およびCD107a検出抗体の存在下、対照培地、ホルボール 12-ミリストート 13-アセタートおよびイオノマイシン（PMA-Iono）（Sigma-Aldrich）または腫瘍細胞のいずれかにより、1：4のレスポンドー：刺激因子（R：S）比で刺激した。FCMおよび抗体のセクションに記載したように共培養の6時間の時点で、細胞を、LIVEDEADバイオレット、表面抗原、次に、細胞内サイトカインについて染色した。

【 0 3 4 8 】

統計学：統計分析をPrism 8（GraphPad Software）で実施した。2群を比較する

ために両側スチューデントのt検定を使用し、3群またはそれ以上を比較するために一元配置分散分析とテューキーの事後検定を使用した。生存曲線は、カプラン・マイヤー法を使用して描写し、2つの曲線の相違は、ログランク検定で比較した。P値<0.05を有意と見なした。

【0349】

実施例1：CCR4はCART細胞療法のための合理的な標的である

CCR4がCART細胞療法のための合理的な標的であるかどうかを確認するために、CTCLを有する患者由来の皮膚病変および27の器官に由来する正常組織アレイ（TMA）上のCCR4発現を分析した（図1および図2）。すべての患者の皮膚腫瘍細胞は、CCR4を高度に発現していた一方で、正常組織は、CCR4をほとんど発現しなかった。臨床において抗CCR4 mAb（モガムリズマブ）療法の許容可能な安全性プロファイルに対応可能である。

10

【0350】

実施例2：異なるscFvを有する8種類の抗CCR4-CARの確立

T細胞リンパ腫および他のがんの養子細胞療法のためのCCR4を標的とするCARを作製するために、ヒト化抗CCR4モノクローナル抗体；KW-0761（モガムリズマブ）（Ishii T, et al. Clin Cancer Res. 2010;16(5):1520-1531）、h1567、およびその親和性調整誘導体（Chang DK, et al. Mol Cancer Ther. 2012;11(11):2451-2461）から得られる重（H）および軽（L）結合ドメインの空間的組み合わせがそれぞれ異なる、8つの抗CCR4-CAR（CCR4-CAR）のパネルを操作した。構築したscFvを、4-1BB共刺激性ドメインおよびCD3ζシグナル伝達ドメインを有するCAR骨格プラスミドにクローニングした（表2および図3）。CCR4-CARのパネル内のCAR形質導入効率、T細胞増大および表現型を、CD19指向CAR（CD19-CAR）対照と比較した。CCR4-CAR T細胞のすべてのバリエーションが抗CD3/28ビーズ刺激で増大したが、KW-0761由来scFvを発現するT細胞であるCCR4(KW_H2L/L2H)-CAR T細胞は、優れた増大を示し、最高のCAR T細胞産物収量をもたらした（図4および図5）。CCR4(KW_L2H)-CAR T細胞は、8種類のCCR4-CAR T細胞の中で最低であったが（図6）、このことは、活性化状態がより低いことを示唆している。優れたT細胞増大は、高いT細胞生存率と関連した（図7）。すべてのCCR4-CAR T細胞は、CD19-CAR T細胞およびUTD細胞と比較して、分化の程度がより小さいセントラルメモリー表現型を維持した（図8）。興味深いことに、8つのCCR4-CAR T細胞産物のうち6つでCAR陽性細胞の自動選択が異なる度合いで観察された。特に、CCR4(KW_H2L/L2H)-CAR T細胞は、2日目に形質導入効果が他のCCR4-CAR T細胞と同等かまたはより低かったものの、10日目に100%近いCAR発現を示した（図9および図10）。

20

30

【0351】

実施例3：CCR4(KW_H2LおよびKW_L2H)-CAR T細胞はCCR4陽性細胞の完全枯渇を誘導する

T細胞同胞相争いが、CCR4-CAR T細胞産物中のCCR4-CAR T細胞発現の濃縮に寄与するかどうかを評価するために、CAR T細胞増大後のCAR陽性および陰性集団上のCCR4発現レベルを、CCR4-CAR構築に使用したモノクローナル抗体と同じエピトープに結合しない抗CCR4モノクローナル抗体D8SEEを使用して、フローサイトメトリーによって測定した（図11）。CCR4発現の急速な喪失と対応するCD4/8比の減少が、すべてのCAR陰性T細胞集団において生じた（図12、図13および図14）。同様に、CCR4(KW_H2L/L2H)-CAR T細胞は、CCR4発現を急速に喪失したが（図12および図13）、このことは、T細胞同胞相争いが、産物中のCCR4-CAR陽性T細胞の濃縮に寄与していたことを示唆している。驚くべきことに、CCR4(h1567、1-49)-CAR陽性細胞集団は、同胞相争いに対して比較的耐性であった；6日目および10日目でもCAR陽性集団中に大量のCCR4陽性細胞が残っていたが（図12および図13）、このことは、CAR陽性集団中の同胞相争いの度合いが抗CCR4 scFvに依存的であったことを示唆している。表面検出可能なCCR4を発現するいくつかのCCR4-CAR T細胞が、同胞相争いを受けやすい他のバリエーションのCCR4発現CCR4-CAR T細胞とは対照的に、隣接するCCR4発現CCR4-CAR T細胞

40

50

胞を殺傷しなかった理由を理解するために、そして、CCR4陽性T細胞集団の同胞相争いに対する耐性機序を調査するために、CCR4陽性T細胞株（HH）にCCR4(KW_L2H)-CARまたはCCR4(h1567_L2H)-CARのいずれかを形質導入して、CCR4-CARおよびCCR4二重陽性T細胞集団を模倣した（図15）。CCR4(h1567_L2H)-CARは、CCR4エピトープの認識がブロックされるためにCCR4発現CCR4(h1567_L2H)-CAR T細胞を殺傷できないと仮説を立てた。したがって、CCR4(h1567_L2H)-CARまたはCCR4(KW_L2H)-CARのいずれかを発現するHH細胞への抗CCR4クローンh1567およびクローンKW-0761モノクローナル抗体の結合を試験した。HH細胞がCCR4(h1567_L2H)-CARを発現したとき、抗CCR4クローンh1567モノクローナル抗体は、CAR T細胞の表面に発現されるCCR4を認識できなかったが、抗CCR4クローンKW-0761は、CCR4表面発現を検出した。CCR4(KW_L2H)-CARを発現するHH細胞では、抗CCR4クローンKWモノクローナル抗体を使用してCCR4発現レベルを評価したとき、CCR4検出は低下した（図17）。これらの結果は、CCR4-CARが、CCR4エピトープを特異的にシスブロックし、それにより、同胞相争いに対する耐性を引き起こすことを示唆しており、そして、CCR4への抗CCR4 scFvのシス結合の度合いがscFv依存的であることを示している。この現象は、CD19陽性細胞上のCD19-CARの発現が、CD19エピトープをシスブロックでき、CAR媒介殺傷に対する耐性をもたらすという過去の調査結果と整合する。

10

【0352】

実施例4：Th2、Th17、およびTreg関連サイトカイン産生の減少を伴ってヘルパーT細胞サブセットの割合が同胞相争いによって変化する

20

CCR4-CAR T細胞の同胞相争いが、CCR4-CAR T細胞産物中のCD4+ T細胞サブセットの分布にどのように影響するかを調査するために、Th1、Th2、Th17およびTregサブセットのレベルならびにサイトカインプロファイルを測定した。CD19-CAR T細胞と比較して、CCR4-CAR T細胞産物は、以下のフローサイトメトリーシグネチャ；CD4(+) CCR4(-) CXCR3(+) CCR6(-) CCR10(-)によって定義されるようなCD4+ Th2サブセットを有意に減少した百分率で含有したが、CD4+ Th1サブセット；CD4(+) CCR4(-) CXCR3(+) CCR6(-)およびCCR10(-)のレベルを維持したことが観察された（図17）。FoxP3およびCD25によって識別されるTregサブセットは、ほとんどなく、CD19-CAR T細胞産物とCCR4-CAR T細胞産物との間で差はなかった（データ示さず）。加えて、PMA-イオノマイシンで刺激すると、CCR4-CAR T細胞は、Th1関連サイトカイン、INF- γ および炎症誘発性サイトカイン（TNF- α およびIL-2）の産生を維持しつつ、減少したレベルのTh2、Th17およびT-reg関連サイトカインを産生した（図18）。これらの結果は、CCR4-CARによるT細胞の形質導入が、CCR4陽性Th2およびTh17およびTregサブセットの同胞相争いによる枯渇をもたらし、CCR4陰性Th1 CD4+サブセットを維持することを示唆した。この枯渇は、Thサブセットプロファイルを変化させることによって他のCAR T細胞産物にも有益であり得る。これに取り組むために、CCR4-CAR T細胞を利用して、Th1リッチなCD19-CAR T細胞産物を作った。ほんの10%のCCR4-CAR T細胞の添加だけで、CD19-CAR T細胞中の総CCR4陽性T細胞サブセットを枯渇させ（図19）、結果として、比較的Th1優位なCD19-CAR T細胞産物をもたらした（図20）。

30

40

【0353】

実施例5：CCR4-CAR T細胞はインビトロでCCR4陽性T細胞腫瘍細胞株に応答してそれを溶解する

標的抗原密度がCAR T細胞応答に影響するので、広範なCCR4発現を提示するT細胞悪性腫瘍を有する患者に由来する3つの細胞株に対して、CCR4-CAR T細胞のパネルの溶解活性を試験した（図21）。CCR4-CAR T細胞のすべてがCCR4発現細胞株を溶解した。最も高いCCR4を発現する細胞株であるHHに対して、CCR4-CAR T細胞間で溶解活性に差は観察されなかった。中間および低CCR4発現細胞株、それぞれMJおよびHuT78の両方で、CCR4(KW_H2L/L2H)-CAR T細胞は最高の殺傷能を示し、CCR4(1-49_H2L/L2H)-CAR T細胞は最低の殺傷能を有した（図22）。CCR4-CAR T細胞のすべてが

50

、CD107aアップレギュレーションによって反映されるようにCCR4刺激時に脱顆粒したが、抗CCR4(1-49_H2L/L2H)-CAR T細胞およびCCR4(h1567_H2L/L2H)-CAR T細胞は、ベースライン時に標的細胞に非依存的な脱顆粒を示した(図23)。CCR4-CAR T細胞はすべて、PMA/イオノマイシンによる抗原非依存的刺激時にIFN- γ 、IL-2およびTNF- α を分泌した。

【0354】

実施例6：CCR4-CAR T細胞はHH細胞異種移植マウスモデルにおいて腫瘍細胞を根絶する

CCR4-CARのインビボ抗腫瘍効果を比較するために、HH細胞異種移植マウスを低用量(0.5×10^6 個)のCAR陽性T細胞または対照UTD T細胞で処置して、有効性の違いを明らかにした(図24)。BLIにより腫瘍負荷を6ヶ月にわたり追跡して、長期寛解を評価した。CCR4(KW_H2L/L2H)-CAR T細胞は、優れた抗腫瘍効果を示したが、CCR4(KW_L2H)-CAR T細胞だけがすべてのマウスを治癒し(図25)、実験を通して100%の生存効果があった(図26)。優れた抗腫瘍効果は、より良好なT細胞生着と関連した；抗CCR4(KW_H2L/L2H)-CAR T細胞は、堅牢なT細胞生着を誘導した(図27)。さらに加えて、CCR4(h1567_L2H)-CAR T細胞は、穏やかな抗腫瘍効果および延長された生存効果を示した。実験全体を通して、GVHDおよび体重減少を含む明白な非腫瘍関連毒性は観察されなかった(図28)。これらの結果に基づき、CCR4(KW_L2H)-CAR T細胞およびCCR4(h1567_L2H)-CAR T細胞をさらなる評価のために選択した。

【0355】

実施例7：CCR4-CAR T細胞の抗腫瘍効果およびT細胞生着はCD19-CAR T細胞と同等かまたはより優れている

CCR4-CAR T細胞のインビボ有効性をさらに評価するために、CCR4とCD19の両方を発現する腫瘍を取り除く能力を、検証済みの抗CD19-CAR T細胞のものと比較した。HH細胞にCD19を形質導入して、CCR4およびCD19二重陽性細胞を得た。FCMによるCD19の100%発現が達成されるように、細胞を選別した(HH-CBG-GFP-t19)(図29)。NSGマウスに、 1×10^6 個のHH-CBG-GFP-t19細胞を接種し、腫瘍接種後7日目に、 2×10^6 個のCAR陽性T細胞またはUTD細胞で処置した(図30)。CD19-CAR T細胞およびCCR4(h1567_L2H)-CAR T細胞は、CCR4およびCD19発現腫瘍に対して類似の抗腫瘍効果を示したが、CCR4(KW_L2H)-CAR T細胞は、完全寛解を誘導した(図31)。さらに加えて、CCR4(KW_L2H)-CAR T細胞は、より早い段階で(7日目)、CD19-CAR T細胞よりも高いレベルのT細胞生着を示し、より遅い段階で同等なT細胞生着を示した(14日目；図32および図33)。GVHDを発症し、末梢血中のT細胞の急速な増加を示したCD19-CAR T細胞群のマウス1匹を除き、28日目に末梢血中に極めて少ないT細胞が検出可能であった(図33)。CCR4(KW_L2H)-CAR T細胞およびCD19-CAR T細胞は、同等レベルのIFN- γ およびTNF- α を産生したが、CCR4(h1567_L2H)-CAR T細胞は、より低レベルのサイトカインを分泌した(図34)。これらの結果は、主要なCCR4(KW_L2H)-CAR T細胞のCCR4発現腫瘍株に対するインビトロおよびインビボ有効性を確立する。

【0356】

実施例8：CCR4-CAR T細胞は初代CTCL細胞に応答してそれを溶解する

CCR4(KW_L2H) CAR T細胞がT細胞リンパ腫患者試料を標的としかつ殺傷できるかを検証するために、患者由来初代CTCL細胞に対するそれらの溶解活性を試験した。最初に、単離された腫瘍細胞が、フローサイトメトリー32によって、CTCLに特徴的な表現型マーカー；CD4(+), CCR4(+), CD7(-), CD25(-), CD157(-)を発現し、またCCR4も発現したことが確認された(図35)。加えて、患者試料が低頻度の正常細胞(5%未満)を含有したことも確認された。CTCL患者試料と共培養すると、CCR4(KW_L2H)-CAR T細胞は、CD107aアップレギュレーションによって実証されるように活性化され、IFN- γ 、IL-2およびTNF- α サイトカインを分泌した(図36)。重要なことに、CCR4(KW_L2H)-CAR T細胞は、CTCL患者腫瘍細胞を特異的かつ効果的に溶解した(図37

）。

【0357】

実施例9：抗CCR4キメラ抗原受容体T細胞はT細胞枯渇系を備える

抗CCR4-CAR T細胞（CCR4CART細胞）は、標的腫瘍細胞も、制御性T細胞（Treg）および2型ヘルパーT細胞（Th2）を含む正常なCCR4発現T細胞も効果的に溶解した。これらの細胞画分の枯渇は、Th1およびCD8 T細胞を相対的に増加させることによりCCR4CART細胞産物を「増強」することができた一方で、正常Tregの完全な喪失は、臨床転換した際に重度の自己免疫反応を潜在的に引き起こす。モガムリズマブ療法後にCD8 T細胞の高い浸潤を伴う報告されたスティーブンス・ジョンソン症候群の症例は、Treg枯渇と関連し得る。さらに、いくつかのデータベースの腎臓、肺および脾臓を含め、正常器官でCCR4発現が報告されているが、幸運にも、その発現レベルは、低く、モガムリズマブの臨床研究において、管理可能な血小板減少以外に重度の器官特異的な有害作用は報告されていない。とはいえ、本明細書に記載されるCCR4-CAR T細胞療法の増強された活性は、そのような毒性を誘導し得る。それゆえ、自殺系を介したCCR4-CARのモジュレーション、化学療法もしくは抗生物質によるCAR T細胞の枯渇戦略、または誘導性CAR発現が、本明細書において想定される戦略である。

10

【0358】

抗CCR4 CAR T細胞媒介毒性が観察および／または検出されたときにCART細胞をシャットダウンするためのセーフティスイッチとして、P2A自己切断配列を介して短縮型EGFR（EGFRt）（Michael C. Jensen et al. US Patent No. US8802374B2）、CD20（Sarah K. Tasian et al. Blood. 2017 Apr 27; 129(17): 2395-2407）、誘導性カスパーゼ9（Karin C. Straathof et al. Blood. 2005 Jun 1; 105(11): 4247-4254）、または単純ヘルペスウイルス1型チミジンキナーゼ（HSVTK）（Science. 1997 Jun 13; 276(5319): 1719-24）を含むセーフティスイッチを有するように、CCR4CAR(KW_L2H)レンチウイルスベクターをさらに改変した（図38～図41）。これらの系の各々は、それぞれ対応するセーフティスイッチ物質、すなわち、抗EGFRモノクローナル抗体（mAb）（例えば、セツキシマブ）、抗CD20 mAb（例えば、リツキシマブ）、二量体化薬（AP1903）、およびガンシクロビル（GCV）を投与すると、CART細胞枯渇を誘導すると予想される。T細胞上のtEGFRとCCR4CARの共発現が確認されている（データ示さず）。さらに加えて、HSVTK枯渇系を使用して、CCR4CART細胞は、GCVによって用量依存的な様式で枯渇される（図42）。

20

30

【0359】

ATLLを含む腫瘍のいくつかは、高TGFBの腫瘍微小環境を生み出し（Blood (2011) 118 (7): 1865-1876.）、それが免疫細胞の機能不全を誘導し得る。加えて、TGFBは、抗CD3または抗CD3/28発現後にT細胞上のCCR4発現を誘導し、それは、望ましくない同士打ちによるCART細胞の殺傷をもたらし得る。したがって、TGFBシグナル伝達をブロックできるドミナントネガティブTGFB受容体II型（dnTGFBRII）を挿入することによって、抗CCR4CAR(KW-L2H)-HSVTKプラスミドベクターをさらに改変した（Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Mar 18; 94(6): 2386-91.）。CAR、HSVTKおよびdnTGFBRIIの順序が異なる3つのCCR4CAR(KWL2H)-HSVTK-dnTGFBRII構築物を作製した；dnTGFBRII-CCR4CAR(KW_L2H)-HSVTK（最前部）、CCR4CAR(KW_L2H)-dnTGFBRII-HSVTK（中央部）およびCCR4CAR(KW_L2H)-HSVTK-dnTGFBRII（最後部）（図43～図45）。これらのベクターは、サイトカインを同様に産生し（データ示さず）、dnTGFBRII-CCR4CAR(KW_L2H)-HSVTK（最前部）は、最高の殺傷活性を誘導する傾向があった（図46）。

40

【0360】

これらの系をCCR4-CARと組み合わせることで、CCR4-CAR T細胞療法にとって最も重要な問題、すなわち、腫瘍外毒性を克服することができ、臨床使用へのその実現可能性を高めることができる。また、CCR4CART細胞の標的腫瘍であるATLLは、高レベルのTGFBを産生する。TGFBRIIをブロックすることは、腫瘍微小環境での機能不全からCAR

50

T細胞を救出することができる。加えて、TGFbシグナル伝達をブロックすることは、CCR4過剰発現を抑止することもでき、効果的なCAR T細胞の望ましくない同胞相争いによる喪失を回避することができる。

【0361】

実施例10：同胞相争い事象のないCCR4-CAR T細胞産物を調製するためのCCR4のノックダウン (CCR4 k/d CCR4-CAR T細胞)

本明細書において実証するように、CCR4-CAR T細胞は、CAR T細胞産物中のCCR4陽性T細胞を相互殺傷し、最終的に根絶させ、増強されたCCR4-CAR T細胞産生効率および機能を導く。CCR4発現T細胞の同胞相争いを低減または排除するための本明細書において想定されるさらなるアプローチは、CCR4-CAR形質導入に先立ち、細胞においてCCR4をノックダウン (k/d) またはノックアウト (k/o) をすることを伴う。これは、当技術分野において公知の任意の方法によって、例えば、RNAi (shRNAまたはsiRNA)、遺伝子操作 (例えば、CRISPR/Cas9を介する)、またはタンパク質に基づく系 (例えば、C末端KDELモチーフ融合物を有する抗CCR4 scFv) を用いたT細胞のさらなる改変によって達成することができる。この目的に向かって、4つのCCR4ターゲティングshRNA (sh-CCR4) を構築し、対照としてCreターゲティングshRNA (sh-Cre) も同様に構築した (表4)。sh-Creまたはsh-CCR4 shRNAを、EcaRIおよびBamHI部位を使用してpLVSIN-mU6-MCS-PGK-Neoプラスミドにクローニングした。shRNAを、CCR4を発現する細胞株HHおよびATN-1において試験した (図47)。すべてのsh-CCR4が、CCR4ノックダウンを様々なレベルの効率で誘導できた；sh-CCR4#1および#2は、効率的なCCR4 k/dを同様に誘導した一方で、sh-CCR4#4は、適度なCCR4 k/dを誘導し、CCR4#3は軽度なCCR4 k/dを示した。

10

20

【0362】

同胞相争い事象が最小または全くないCCR4-CAR T細胞を確立するために、初代T細胞に、抗CD3/28ビーズ刺激後1日目にCCR4 k/dのためにsh-CCR4を形質導入し、次いで、3日目および4日目にCCR4CAR(KW_L2H)を形質導入した (図48A)。細胞株に対する効率と同様に、いずれのshCCR4も、効率は様々であるがCCR4 k/dを誘導した；sh-CCR4#1および#2は、最も効率的なCCR4 k/dを同様に誘導した一方で、sh-CCR4#4は、適度なCCR4 k/dを誘導し、CCR4#3は軽度なCCR4 k/dを示した (図48B)。

30

【0363】

重要なことに、shCCR4を形質導入しなかったCAR T細胞において最も効率的なT細胞増殖およびCAR形質導入が達成され、最も効率が悪いshCCR4 (shCCR4#3) を形質導入したCAR T細胞について類似の効率が達成された (図48Cおよび図48D)。加えて、CCR4 k/dについて最も効率的なsh-CCR4 (sh-CCR4#1) は、効率的なT細胞増殖およびCAR形質導入をむしろ悪化させた。

【0364】

これらの結果は、同胞相争い事象 (CCR4-CAR T細胞産物中のCCR4陽性細胞の相互殺傷) がCCR4-CAR T産生にとって有益であることを裏付けている。とはいえ、sh-CCR4構築物を精選することで、元のCCR4-CAR T細胞産物のものと同様なCAR形質導入およびT細胞増殖効率レベルを達成することができる。

40

【0365】

実施例11：CCR4-CAR T細胞 (KW_L2H) はインビボでモガムリズマブ抵抗性T細胞腫瘍を根絶することができる

臨床の場で、CCR4-CAR T細胞は、モガムリズマブ治療後に難治性または再発性の疾患を有する患者に投与される。懸念は、先行mAb療法によるエピトープブロッキングであるが、それは、CCR4-CAR T細胞とモガムリズマブがCCR4抗原上のそのエピトープを共有するからである。これに取り組むために、CCR4-CAR T細胞を、モガムリズマブ不応性T細胞リンパ腫マウスモデルで試験した (図49A)。2つの用量のモガムリズマブをPBMCと組み合わせて用いてNSCマウスのHH腫瘍を処置し、その結果、不応性疾患を

50

生じた。その後、不応性腫瘍をCCR4-CAR (KW_L2H) T細胞で処置した。CCR4-CAR T細胞は、先行モガムリズマブ処置を行っていない腫瘍に対しても同様に腫瘍を効果的に抑制かつ根絶したが、このことは、モガムリズマブ前処置および不応性の腫瘍に対するCCR4-CAR T細胞療法の実現可能性を示唆している (図49B)。

【0366】

実施例12：腫瘍細胞が高度に混入した患者由来PBMCからCCR4-CAR T細胞を安全かつ効率的に確立できる

ATLL患者は、典型的には、あらゆる治療を受けており、これらの患者からのPBMCには、腫瘍細胞が混入している。CCR4-CAR T細胞がそのような患者から産生され得るかどうかを調べるために、ATLLを有する患者からPBMCを収集し (血液細胞の70%が腫瘍細胞であった)、CAR産生を試験した。患者および正常ドナーからのPBMCに、抗CD3/28刺激後1日目に、CD19CARまたはCCR4CAR (KWL2H) のいずれかを形質導入した。患者由来PBMCは、正常ドナーからのものと比較してより低い形質導入効果を示したが、最終的に、患者と正常ドナーに由来する両産物において、CCR4-CAR陽性細胞の百分率は増加し、90%超に達した (図50A)。加えて、混入しているCD7(-)、CADM1 (+) およびCCR4(+) 腫瘍細胞はほとんどが、CCR4-CAR T細胞産物において根絶されたが、CD19-CAR T細胞産物においてはそうならなかった (CAR陽性T細胞集団において3.03%対40.2%、CAR陰性T細胞集団において0%対24.5%) (図50B)。この結果は、腫瘍細胞が高度に混入している患者由来PBMCからCCR4-CAR T細胞を安全かつ効率的に確立できることを裏付けている。

【0367】

実施例13：T細胞悪性腫瘍および固形腫瘍をインビボで治療するためのCCR4-CAR T細胞

CTCL、ATLLおよびPTCLを含む成熟T細胞リンパ腫は、一般的に予後不良と関連する。抗CCR4 mAb (モガムリズマブ) などの新たな療法は、腫瘍の進行を遅らせることができるが、治癒的治療はほとんど達成されていない。本研究は、モガムリズマブ由来CCR4-CAR T細胞が、CCR4陽性腫瘍細胞株と初代CTCL細胞の両方を効果的に標的化でき、前臨床モデルにおいて確立された腫瘍を根絶することができ、それは、以前に報告されたh1567およびmAb2-3由来CAR T細胞 (Perera LP, et al. Am J Hematol. 2017;92(9):892-901) よりも優れていたことを実証する。本研究はまた、同胞相争い事象の機序およびそのCAR T細胞機能との関連性も実証する；CCR4-CAR T細胞の優れた抗腫瘍効果は、急速かつ完全な同胞相争いによるCCR4陽性T細胞の枯渇と関連する。さらに加えて、本明細書において提示するデータは、同胞相争いの度合いが、scFv依存적であり、CCR4-CARが標的CCR4をシスにマスクできる度合いに影響することを明らかにしている。KW-0761は、部分的にしかCCR4にシス結合せず、妨害なく同胞相争いを容認するが、h1567およびその誘導体に由来するCARは、エピトープをほとんど完全にシスブロックし、CCR4-CAR陽性細胞を持続可能にする。この観察は、白血病性B細胞に意図せず導入されたCD19-CARが、白血病細胞の表面のCD19エピトープに結合し、それがCD19-CAR T細胞による認識からマスクされることによって、白血病耐性を誘導したという過去の報告と一致する。

【0368】

Th1サブセットは抗がん免疫において中心的な役割を果たすが、Th2およびTregはおそらくそれに対して反対に作用するので、Th2およびTregと比べてTh1優位なCAR T細胞産物は、CAR T細胞の抗腫瘍活性を増強すると本明細書において想定される。CD19-CAR T細胞は、少量のCCR4 CAR T細胞と混合することによってそのような「増強された」CAR T細胞産物を達成したが、このことは、CCR4-CAR T細胞が、他のCAR T細胞産物を改善するためのツールとして利用できることを示している。この結果はまた、モガムリズマブ処置において示されているように、宿主の正常なCCR4陽性T細胞がCCR4-CAR T細胞によって枯渇され得ることも示している。Th2媒介炎症は、しばしば、腫瘍成長およびがん免疫回避にとって有益であり、より高いTh2浸潤は、治療転帰不良と関連する。Tregもまた、腫瘍成長および免疫回避に重要な役割を有する。Tregは、エフェク

ターT細胞媒介腫瘍殺傷を抑制することができ、TMEへの高いTreg浸潤は、大腸、乳房、卵巣、腎臓、非小細胞肺、黒色腫、リンパ腫および肝細胞がんを含む多くの種類の腫瘍の転帰不良と関連する。Tregの一時的な枯渇であっても、動物モデルにおいて腫瘍ワクチン療法の有効性を増強させることができる。それゆえ、CCR4-CAR T細胞によるCCR4陽性TregおよびTh2の枯渇は、一般にCCR4陽性腫瘍細胞の直接的殺傷に加えて、がんに対する抗腫瘍免疫に寄与すると本明細書において想定される。実際に、モガムリズマブは、固形腫瘍患者においてTreg枯渇療法として試験されてきた。CCR4陽性T細胞の有意な低下ならびにがん／精巣（CT）抗原に対する免疫応答および甲状腺ペルオキシダーゼに対する自己抗体応答が、モガムリズマブ後、数名の患者において観察された。

【0369】

まとめると、本研究は、KW-0761（モガムリズマブ）に由来する高度に活性なCCR4-CAR T細胞を特定する。有効性は、Th1サブセット（CCR4陰性）を温存しながらTh2、TregおよびTh17サブセット（すべてCCR4陽性）を同士打ちにより枯渇させることに関連することが示された。さらに、本明細書において、CCR4-CAR T細胞フォーマットは、T細胞悪性腫瘍を有する患者の治療にとっても、固形腫瘍を含む他のがんを治療するためのTh2およびTreg枯渇療法にとっても有益であることが想定される。

【0370】

列挙された態様

以下の列挙された態様が提供されるが、その番号付けは、重要性のレベルを指定するものとして解釈されるべきではない。

態様1は、以下を提供する：

抗CCR4抗原結合ドメインと膜貫通ドメインと細胞内ドメインとを含む、抗CCケモカイン受容体4（CCR4）キメラ抗原受容体（CAR）。

態様2は、以下を提供する：

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、SEQ ID NO：2、SEQ ID NO：4、およびSEQ ID NO：6からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つの重鎖可変領域（HCDR）を含む、態様1のCAR。

態様3は、以下を提供する：

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、SEQ ID NO：8、SEQ ID NO：10、およびSEQ ID NO：12からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つの軽鎖可変領域（LCDR）を含む、態様1または態様2のCAR。

態様4は、以下を提供する：

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、完全長抗体もしくはその抗原結合断片、Fab、単鎖可変断片（scFv）、または単一ドメイン抗体からなる群より選択される、態様1～3のいずれかのCAR。

態様5は、以下を提供する：

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、抗CCR4単鎖可変断片（scFv）である、態様1～4のいずれかのCAR。

態様6は、以下を提供する：

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、モガムリズマブに由来する重鎖および軽鎖を有する抗CCR4単鎖可変断片（scFv）である、態様1～5のいずれかのCAR。

態様7は、以下を提供する：

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、SEQ ID NO：112と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、態様1～6のいずれかのCAR。

態様8は、以下を提供する：

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、SEQ ID NO：114と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、態様1～7のいずれかのCAR。

態様9は、以下を提供する：

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、SEQ ID NO：16と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む、態様1～8のいずれかのCAR。

態様10は、以下を提供する：

前記CARが、CD8アルファヒンジをさらに含み、任意で、前記CD8アルファヒンジが、SEQ ID NO：34に示されるアミノ酸配列を含む、前記態様のいずれかのCAR。

態様11は、以下を提供する：

前記膜貫通ドメインが、

人工疎水性配列、ならびにI型膜貫通タンパク質の膜貫通ドメイン、T細胞受容体のアルファ、ベータ、もしくはゼータ鎖の膜貫通ドメイン、CD28の膜貫通ドメイン、CD3イプシロンの膜貫通ドメイン、CD45の膜貫通ドメイン、CD4の膜貫通ドメイン、CD5の膜貫通ドメイン、CD8の膜貫通ドメイン、CD9の膜貫通ドメイン、CD16の膜貫通ドメイン、CD22の膜貫通ドメイン、CD33の膜貫通ドメイン、CD37の膜貫通ドメイン、CD64の膜貫通ドメイン、CD80の膜貫通ドメイン、CD86の膜貫通ドメイン、OX40（CD134）の膜貫通ドメイン、4-1BB（CD137）の膜貫通ドメイン、ICOSの膜貫通ドメイン、およびCD154の膜貫通ドメイン

からなる群より選択される膜貫通ドメイン、または、キラー免疫グロブリン様受容体（KIR）に由来する膜貫通ドメインを含む、前記態様のいずれかのCAR。

態様12は、以下を提供する：

前記膜貫通ドメインが、CD8アルファ膜貫通ドメインを含み、任意で、前記CD8アルファ膜貫通ドメインが、SEQ ID NO：36に示されるアミノ酸配列を含む、前記態様のいずれかのCAR。

態様13は、以下を提供する：

前記細胞内ドメインが、共刺激性ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含む、前記態様のいずれかのCAR。

態様14は、以下を提供する：

前記細胞内ドメインが、TNFRスーパーファミリー内のタンパク質、CD28、4-1BB（CD137）、OX40（CD134）、PD-1、CD7、LIGHT、CD83L、DAP10、DAP12、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、ICOS、NKG2C、およびB7-H3（CD276）、もしくはそれらのバリエーションからなる群より選択されるタンパク質の共刺激性ドメイン、またはキラー免疫グロブリン様受容体（KIR）に由来する細胞内ドメインを含む、前記態様のいずれかのCAR。

態様15は、以下を提供する：

前記細胞内ドメインが、

SEQ ID NO：38に示されるアミノ酸配列を任意で含む、4-1BBの共刺激性ドメインを含む、前記態様のいずれかのCAR。

態様16は、以下を提供する：

前記細胞内ドメインが、ヒトCD3ゼータ鎖（CD3ζ）、FcγRIII、FcγRI、Fc受容体の細胞質テール、免疫受容活性化チロシンモチーフ（ITAM）を有する細胞質受容体、TCRゼータ、FcRガンマ、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD5、CD22、CD79a、CD79b、およびCD66d、またはそれらのバリエーションからなる群より選択されるタンパク質の細胞内シグナル伝達ドメインを含む、前記態様のいずれかのCAR。

態様17は、以下を提供する：

前記細胞内シグナル伝達ドメインが、

SEQ ID NO：40に示されるアミノ酸配列を任意で含む、CD3ζまたはそのバリエーションの細胞内シグナル伝達ドメインを含む、前記態様のいずれかのCAR。

態様18は、以下を提供する：

抗CCR4 scFvを含む抗CCR4抗原結合ドメイン、CD8アルファヒンジ、CD8アルファ膜貫通ドメイン、4-1BB共刺激性ドメインとCD3ζ細胞内シグナル伝達ドメインとを含

10

20

30

40

50

む細胞内ドメインを含む、前記態様のいずれかのCAR。

態様19は、以下を提供する：

SEQ ID NO：32に示されるアミノ酸配列を任意で含むCD8リーダー配列をさらに含む、態様18のCAR。

態様20は、以下を提供する：

SEQ ID NO：30、54、62、70、82、90、および102のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む、前記態様のいずれかのCAR。

態様21は、以下を提供する：

SEQ ID NO：29、53、61、69、81、89、および101のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるヌクレオチド配列によってコードされる、前記態様のいずれかのCAR。

態様22は、以下を提供する：

前記CARが、自己切断可能リンカーを介してセーフティスイッチに連結されており、かつ前記セーフティスイッチがセーフティスイッチ物質に結合する、前記態様のいずれかのCAR。

態様23は、以下を提供する：

前記セーフティスイッチが、(a) セーフティスイッチ物質が、抗EFGR抗体、任意でセツキシマブである、短縮型EGFR (EGFRt)；(b) セーフティスイッチ物質が、抗CD20抗体、任意でリツキシマブである、CD20；(c) セーフティスイッチ物質がAP1903である、誘導性カスパーゼ9 (iCasp9)；および(d) セーフティスイッチ物質がガンシクロビル (GCV) である、単純ヘルペスウイルス1型チミジンキナーゼ (HSVTK) から選択される、態様22のCAR。

態様24は、以下を提供する：

自己切断可能リンカーを介してドミナントネガティブTGFB受容体II型 (dnTGFBRII) に連結されている、態様22または態様23のCAR。

態様25は、以下を提供する：

前記セーフティスイッチが、自己切断可能リンカーを介してドミナントネガティブTGFB受容体II型 (dnTGFBRII) に連結されている、態様22または態様23のCAR。

態様26は、以下を提供する：

抗CCR4 CARをコードするポリヌクレオチド配列を含む核酸であって、前記CARが、抗CCR4抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインを含む、前記核酸。

態様27は、以下を提供する：

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、SEQ ID NO：2、SEQ ID NO：4、およびSEQ ID NO：6からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つの重鎖可変領域 (HCDR) を含む、態様26の核酸。

態様28は、以下を提供する：

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、SEQ ID NO：8、SEQ ID NO：10、およびSEQ ID NO：12からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つの軽鎖可変領域 (LCDR) を含む、態様25または態様27の核酸。

態様29は、以下を提供する：

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、完全長抗体もしくはその抗原結合断片、Fab、単鎖可変断片 (scFv)、または単ドメイン抗体からなる群より選択される、態様26～28のいずれかの核酸。

態様30は、以下を提供する：

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、抗CCR4単鎖可変断片 (scFv) である、態様26～29のいずれかの核酸。

態様31は、以下を提供する：

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、モガムリズマブに由来する重鎖および軽鎖を有する抗CCR4単鎖可変断片 (scFv) である、態様26～30のいずれかの核酸。

態様32は、以下を提供する：

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、SEQ ID NO：112と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、態様26～31のいずれかの核酸。

態様33は、以下を提供する：

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、SEQ ID NO：114と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、態様26～32のいずれかの核酸。

態様34は、以下を提供する：

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、SEQ ID NO：16と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む、態様26～33のいずれかの核酸。

態様35は、以下を提供する：

前記CARが、CD8アルファヒンジをさらに含み、任意で、前記CD8アルファヒンジが、SEQ ID NO：34に示されるアミノ酸配列を含む、前記態様のいずれかの核酸。

態様36は、以下を提供する：

前記膜貫通ドメインが、

人工疎水性配列、ならびにI型膜貫通タンパク質の膜貫通ドメイン、T細胞受容体のアルファ、ベータ、もしくはゼータ鎖の膜貫通ドメイン、CD28の膜貫通ドメイン、CD3イブシロンの膜貫通ドメイン、CD45の膜貫通ドメイン、CD4の膜貫通ドメイン、CD5の膜貫通ドメイン、CD8の膜貫通ドメイン、CD9の膜貫通ドメイン、CD16の膜貫通ドメイン、CD22の膜貫通ドメイン、CD33の膜貫通ドメイン、CD37の膜貫通ドメイン、CD64の膜貫通ドメイン、CD80の膜貫通ドメイン、CD86の膜貫通ドメイン、OX40（CD134）の膜貫通ドメイン、4-1BB（CD137）の膜貫通ドメイン、ICOSの膜貫通ドメイン、およびCD154の膜貫通ドメインからなる群より選択される膜貫通ドメイン、または、キラー免疫グロブリン様受容体（KIR）に由来する膜貫通ドメインを含む、前記態様のいずれかの核酸。

態様37は、以下を提供する：

前記膜貫通ドメインが、CD8アルファ膜貫通ドメインを含み、任意で、前記CD8アルファ膜貫通ドメインが、SEQ ID NO：36に示されるアミノ酸配列を含む、前記態様のいずれかの核酸。

態様38は、以下を提供する：

前記細胞内ドメインが、共刺激性ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含む、前記態様のいずれかの核酸。

態様39は、以下を提供する：

前記細胞内ドメインが、TNFRスーパーファミリー内のタンパク質、CD28、4-1BB（CD137）、OX40（CD134）、PD-1、CD7、LIGHT、CD83L、DAP10、DAP12、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、ICOS、NKG2C、およびB7-H3（CD276）、もしくはそれらのバリエーションからなる群より選択されるタンパク質の共刺激性ドメイン、またはキラー免疫グロブリン様受容体（KIR）に由来する細胞内ドメインを含む、前記態様のいずれかの核酸。

態様40は、以下を提供する：

前記細胞内ドメインが、

SEQ ID NO：38に示されるアミノ酸配列を任意で含む、4-1BBの共刺激性ドメインを含む、前記態様のいずれかの核酸。

態様41は、以下を提供する：

前記細胞内ドメインが、ヒトCD3ゼータ鎖（CD3ζ）、FcγRIII、FcγRI、Fc受容体の細胞質テール、免疫受容活性化チロシンモチーフ（ITAM）を有する細胞質受容体、TCRゼータ、Fcγガンマ、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イブシロン、CD5、CD22、CD79a、CD79b、およびCD66d、またはそれらのバリエーションからなる群より選択される

タンパク質の細胞内シグナル伝達ドメインを含む、前記態様のいずれかの核酸。

態様42は、以下を提供する：

前記細胞内シグナル伝達ドメインが、

SEQ ID NO：40に示されるアミノ酸配列を任意で含む、CD3ζまたはそのバリエーションの細胞内シグナル伝達ドメインを含む、前記態様のいずれかの核酸。

態様43は、以下を提供する：

前記CARが、抗CCR4 scFvを含む抗CCR4抗原結合ドメイン、CD8アルファヒンジ、CD8アルファ膜貫通ドメイン、4-1BB共刺激性ドメインとCD3ζ細胞内シグナル伝達ドメインとを含む細胞内ドメインを含む、前記態様のいずれかの核酸。

10

態様44は、以下を提供する：

前記CARが、SEQ ID NO：32に示されるアミノ酸配列を任意で含むCD8リーダー配列をさらに含む、態様43の核酸。

態様45は、以下を提供する：

前記CARが、SEQ ID NO：30、54、62、70、82、90、および102のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む、前記態様のいずれかの核酸。

態様46は、以下を提供する：

前記CARが、SEQ ID NO：29、53、61、69、81、89、および101のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるヌクレオチド配列によってコードされる、前記態様のいずれかの核酸。

20

態様47は、以下を提供する：

前記CARが、自己切断可能リンカーを介してセーフティスイッチに連結されており、かつ前記セーフティスイッチがセーフティスイッチ物質に結合する、前記態様のいずれかの核酸。

態様48は、以下を提供する：

前記セーフティスイッチが、(a) セーフティスイッチ物質が、抗EFGR抗体、任意でセツキシマブである、短縮型EGFR (EGFRt)；(b) セーフティスイッチ物質が、抗CD20抗体、任意でリツキシマブである、CD20；(c) セーフティスイッチ物質がAP1903である、誘導性カスパーゼ9 (iCasp9)；および(d) セーフティスイッチ物質がガンシクロビル (GCV) である、単純ヘルペスウイルス1型チミジンキナーゼ (HSVTK) から選択される、態様47の核酸。

30

態様49は、以下を提供する：

前記CARが、自己切断可能リンカーを介してドミナントネガティブTGFB受容体II型 (dnTGFBRII) に連結されている、態様47または態様48の核酸。

態様50は、以下を提供する：

前記セーフティスイッチが、自己切断可能リンカーを介してドミナントネガティブTGFB受容体II型 (dnTGFBRII) に連結されている、態様47または態様48の核酸。

態様51は、以下を提供する：

態様26～50のいずれかの核酸を含む、ベクター。

40

態様52は、以下を提供する：

レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、およびアデノ随伴ウイルスベクターからなる群より選択されるウイルスベクターである、態様51のベクター。

態様53は、以下を提供する：

前記ウイルスベクターがレンチウイルスベクターである、態様52のベクター。

態様54は、以下を提供する：

態様1～25のいずれかのCAR、態様26～50のいずれかの核酸、および／または態様51～53のいずれかのベクターを含む、改変免疫細胞またはその前駆細胞。

態様55は、以下を提供する：

50

- (a) CCR4ヌルノックアウト対立遺伝子；
- (b) 抑制されたCCR4遺伝子発現；ならびに

(c) 抗CCR4 scFvとKDELモチーフとを含む融合タンパク質、および／または前記融合タンパク質をコードする核酸

のうちの1つまたは複数をさらに含む、態様54の改変免疫細胞またはその前駆細胞。

態様56は、以下を提供する：

クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（CRISPR）関連ヌクレアーゼ、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、およびジンクフィンガーヌクレアーゼからなる群より選択されるヌクレアーゼを含む遺伝子操作技術を介して、前記CCR4ヌルノックアウト対立遺伝子または抑制されたCCR4遺伝子発現が得られる、態様55の改変免疫細胞またはその前駆細胞。

10

態様57は、以下を提供する：

CCR4遺伝子発現を抑制する阻害性RNA分子をさらに含む、態様55または56の改変免疫細胞またはその前駆細胞。

態様58は、以下を提供する：

前記阻害性RNA分子が、RNA干渉（RNAi）RNA、短鎖ヘアピンRNA（shRNA）、低分子干渉RNA（siRNA）、トランス作用性siRNA（tasiRNA）、マイクロRNA（miRNA）、アンチセンスRNA（asRNA）、長鎖ノンコーディングRNA（lncRNA）、CRISPR RNA（crRNA）、トランス活性化crRNA（tracrRNA）、ガイドRNA（gRNA）、単一ガイドRNA（sgRNA）、二本鎖RNA（dsRNA）、リボザイム、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、態様57の改変免疫細胞またはその前駆細胞。

20

態様59は、以下を提供する：

前記改変細胞が自己由来細胞である、態様54～58のいずれかの改変免疫細胞またはその前駆細胞。

態様60は、以下を提供する：

前記改変免疫細胞が末梢血単核細胞（PBMC）に由来する、態様54～59のいずれかの改変免疫細胞またはその前駆細胞。

態様61は、以下を提供する：

前記PBMCが腫瘍細胞を含む、態様60の改変免疫細胞またはその前駆細胞。

態様62は、以下を提供する：

30

ヒト対象から単離された細胞である、態様54～61のいずれかの改変免疫細胞またはその前駆細胞。

態様63は、以下を提供する：

前記改変免疫細胞が改変T細胞である、態様54～62のいずれかの改変免疫細胞またはその前駆細胞。

態様64は、以下を提供する：

改変免疫細胞またはその前駆細胞を作製するための方法であって、前記免疫細胞またはその前駆細胞に、態様26～50のいずれかの核酸または態様51～53のいずれかのベクターを導入することを含む、前記方法。

態様65は、以下を提供する：

40

前記ベクターが、ウイルス形質導入を介して導入される、態様58の方法。

態様66は、以下を提供する：

その必要がある対象におけるがんを治療する方法であって、前記対象に、態様54～63のいずれかの改変免疫細胞もしくは前駆細胞、または態様64もしくは態様65の方法によって作製された改変免疫細胞もしくはその前駆細胞を投与することを含む、前記方法。

態様67は、以下を提供する：

前記改変細胞が、前記対象においてCCR4陽性T細胞を枯渇させかつCCR4陰性T細胞を枯渇させず、それにより、前記がんを治療する、態様66の方法。

態様68は、以下を提供する：

前記対象が、以前にモガムリズマブを投与されたことがある、態様66または67の方法

50

。

態様69は、以下を提供する：

前記がんがモガムリズマブに不応性である、態様66～68のいずれかの方法。

態様70は、以下を提供する：

その必要がある対象におけるがんを治療する方法であって、前記対象に、抗CCR4 CARを含む改変T細胞を投与することを含み、前記CARが、抗CCR4抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインを含む、前記方法。

態様71は、以下を提供する：

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、SEQ ID NO：2、SEQ ID NO：4、およびSEQ ID NO：6からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つの重鎖可変領域（H CDR）を含む、態様70の方法。

10

態様72は、以下を提供する：

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、SEQ ID NO：8、SEQ ID NO：10、およびSEQ ID NO：12からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つの軽鎖可変領域（LCDR）を含む、態様70または態様71の方法。

態様73は、以下を提供する：

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、完全長抗体もしくはその抗原結合断片、Fab、単鎖可変断片（scFv）、または単ドメイン抗体からなる群より選択される、態様70～72のいずれかの方法。

態様74は、以下を提供する：

20

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、抗CCR4単鎖可変断片（scFv）である、態様70～73のいずれかの方法。

態様75は、以下を提供する：

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、モガムリズマブに由来する重鎖および軽鎖を有する抗CCR4単鎖可変断片（scFv）である、態様70～74のいずれかの方法。

態様76は、以下を提供する：

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、SEQ ID NO：112と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、態様70～75のいずれかの方法。

態様77は、以下を提供する：

30

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、SEQ ID NO：114と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、態様70～76のいずれかの方法。

態様78は、以下を提供する：

前記抗CCR4抗原結合ドメインが、SEQ ID NO：16と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む、態様70～77のいずれかの方法。

態様79は、以下を提供する：

前記CARが、CD8アルファヒンジをさらに含み、任意で、前記CD8アルファヒンジが、SEQ ID NO：34に示されるアミノ酸配列を含む、前記態様のいずれかの方法。

40

態様80は、以下を提供する：

前記膜貫通ドメインが、

人工疎水性配列、ならびにI型膜貫通タンパク質の膜貫通ドメイン、T細胞受容体のアルファ、ベータ、もしくはゼータ鎖の膜貫通ドメイン、CD28の膜貫通ドメイン、CD3イプシロンの膜貫通ドメイン、CD45の膜貫通ドメイン、CD4の膜貫通ドメイン、CD5の膜貫通ドメイン、CD8の膜貫通ドメイン、CD9の膜貫通ドメイン、CD16の膜貫通ドメイン、CD22の膜貫通ドメイン、CD33の膜貫通ドメイン、CD37の膜貫通ドメイン、CD64の膜貫通ドメイン、CD80の膜貫通ドメイン、CD86の膜貫通ドメイン、OX40（CD134）の膜貫通ドメイン、4-1BB（CD137）の膜貫通ドメイン、ICOSの膜貫通ドメイン、およびCD154の膜貫通ドメイン

50

からなる群より選択される膜貫通ドメイン、または、キラー免疫グロブリン様受容体（KIR）に由来する膜貫通ドメインを含む、前記態様のいずれかの方法。

態様81は、以下を提供する：

前記膜貫通ドメインが、CD8アルファ膜貫通ドメインを含み、任意で、前記CD8アルファ膜貫通ドメインが、SEQ ID NO：36に示されるアミノ酸配列を含む、前記態様のいずれかの方法。

態様82は、以下を提供する：

前記細胞内ドメインが、共刺激性ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含む、前記態様のいずれかの方法。

態様83は、以下を提供する：

前記細胞内ドメインが、TNFRスーパーファミリー内のタンパク質、CD28、4-1BB（CD137）、OX40（CD134）、PD-1、CD7、LIGHT、CD83L、DAP10、DAP12、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、ICOS、NKG2C、およびB7-H3（CD276）、もしくはそれらのバリエーションからなる群より選択されるタンパク質の共刺激性ドメイン、またはキラー免疫グロブリン様受容体（KIR）に由来する細胞内ドメインを含む、前記態様のいずれかの方法。

態様84は、以下を提供する：

前記細胞内ドメインが、

SEQ ID NO：38に示されるアミノ酸配列を任意で含む、4-1BBの共刺激性ドメインを含む、前記態様のいずれかの方法。

態様85は、以下を提供する：

前記細胞内ドメインが、ヒトCD3ゼータ鎖（CD3ζ）、FcγRIII、FcεRI、Fc受容体の細胞質テール、免疫受容活性化チロシンモチーフ（ITAM）を有する細胞質受容体、TCRゼータ、FcRガンマ、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD5、CD22、CD79a、CD79b、およびCD66d、またはそれらのバリエーションからなる群より選択されるタンパク質の細胞内シグナル伝達ドメインを含む、前記態様のいずれかの方法。

態様86は、以下を提供する：

前記細胞内シグナル伝達ドメインが、

SEQ ID NO：40に示されるアミノ酸配列を任意で含む、CD3ζまたはそのバリエーションの細胞内シグナル伝達ドメインを含む、前記態様のいずれかの方法。

態様87は、以下を提供する：

前記CARが、抗CCR4 scFvを含む抗CCR4抗原結合ドメイン、CD8アルファヒンジ、CD8アルファ膜貫通ドメイン、4-1BB共刺激性ドメインとCD3ζ細胞内シグナル伝達ドメインとを含む細胞内ドメインを含む、前記態様のいずれかの方法。

態様88は、以下を提供する：

前記CARが、SEQ ID NO：32に示されるアミノ酸配列を任意で含むCD8リーダー配列をさらに含む、態様87の方法。

態様89は、以下を提供する：

前記CARが、SEQ ID NO：30、54、62、70、82、90、および102のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む、前記態様のいずれかの方法。

態様90は、以下を提供する：

前記CARが、SEQ ID NO：29、53、61、69、81、89、および101のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるヌクレオチド配列によってコードされる、前記態様のいずれかの方法。

態様91は、以下を提供する：

前記CARが、自己切断可能リンカーを介してセーフティスイッチに連結されており、かつ前記セーフティスイッチがセーフティスイッチ物質に結合する、前記態様のいずれかの方法。

10

20

30

40

50

態様92は、以下を提供する：

前記セーフティスイッチが、(a) セーフティスイッチ物質が、抗EGFR抗体、任意でセツキシマブである、短縮型EGFR (EGFRt)；(b) セーフティスイッチ物質が、抗CD20抗体、任意でリツキシマブである、CD20；(c) セーフティスイッチ物質がAP1903である、誘導性カスパーゼ9 (iCasp9)；および(d) セーフティスイッチ物質がガンシクロビル (GCV) である、単純ヘルペスウイルス1型チミジンキナーゼ (HSVTK) から選択される、態様91の方法。

態様93は、以下を提供する：

前記CARが、自己切断可能リンカーを介してドミナントネガティブTGFb受容体II型 (dnTGFbRII) に連結されている、態様91または態様92の方法。

態様94は、以下を提供する：

前記セーフティスイッチが、自己切断可能リンカーを介してドミナントネガティブTGFb受容体II型 (dnTGFbRII) に連結されている、態様91または態様92の方法。

態様95は、以下を提供する：

前記セーフティスイッチ物質を前記対象に投与することをさらに含む、態様91～94のいずれかの方法。

態様96は、以下を提供する：

前記改変T細胞が、前記対象においてCCR4陽性T細胞を枯渇させかつCCR4陰性T細胞を枯渇させず、それにより、前記がんを治療する、態様70～95のいずれかの方法。

態様97は、以下を提供する：

前記改変T細胞がPBMCに由来する、態様70～96のいずれかの方法。

態様98は、以下を提供する：

前記PBMCが腫瘍細胞を含む、態様97の方法。

態様99は、以下を提供する：

前記改変T細胞がヒトT細胞である、態様70～98のいずれかの方法。

態様100は、以下を提供する：

前記改変T細胞が自己由来である、態様70～99のいずれかの方法。

態様101は、以下を提供する：

前記対象がヒトである、態様70～100のいずれかの方法。

態様102は、以下を提供する：

前記対象が、以前にモガムリズマブを投与されたことがある、態様70～101のいずれかの方法。

態様103は、以下を提供する：

前記がんがモガムリズマブに不応性である、態様70～102のいずれかの方法。

【0371】

他の態様

本明細書において引用されるありとあらゆる特許、特許出願および刊行物の開示は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。本発明は、具体的な態様を参照して開示しているが、本発明の精神および範囲から逸脱することなしに当業者によって本発明の他の態様および変形が考案されてよいことが明らかである。添付の特許請求の範囲は、そのような態様および等価な変形のすべてを包含すると解釈されるものとする。

10

20

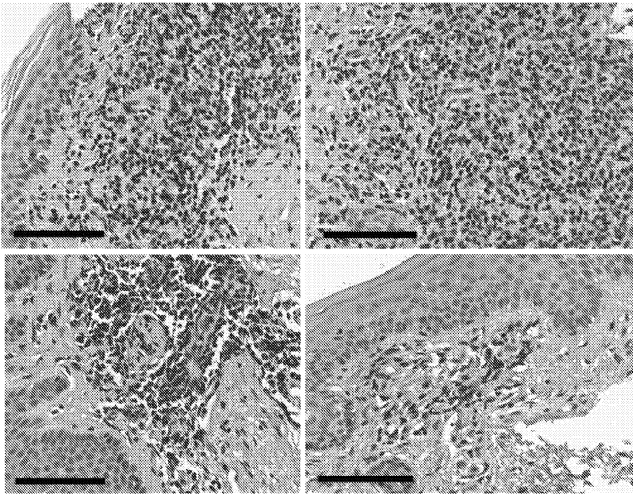
30

40

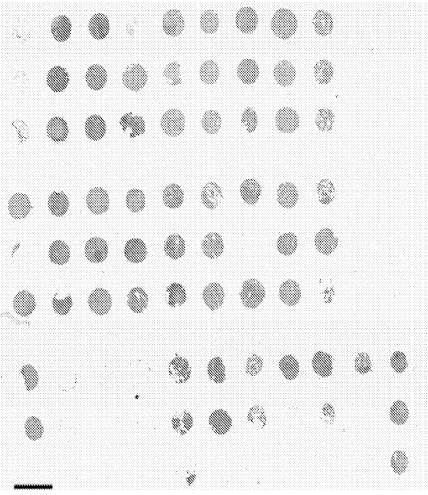
50

【図面】

【図 1】



【図 2】

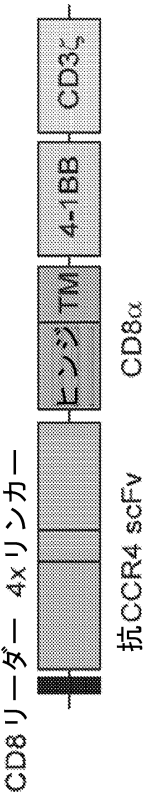


10

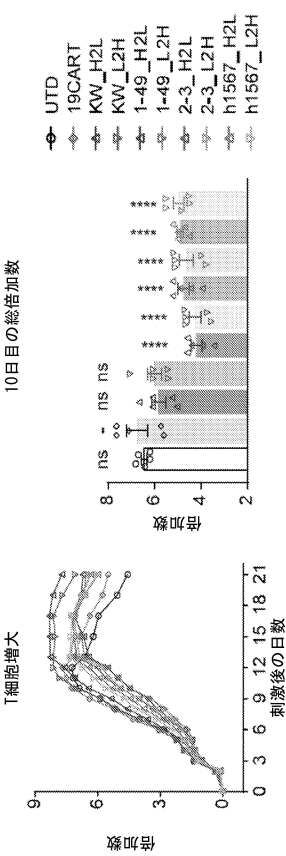
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	脂肪	胸腺	脾臓	乳房	甲状腺	肝臓	虫垂	前立腺	精巣		
2	脂肪	胸腺	脾臓	乳房	甲状腺	肝臓	虫垂	前立腺	精巣		
3	脂肪	胸腺	脾臓	乳房	甲状腺	肝臓	虫垂	前立腺	精巣		
4	筋肉	腎臓	リンパ	脾臓	副甲状腺	心臓	食道	副腎	結腸		
5	筋肉	腎臓	リンパ	脾臓	副甲状腺	心臓	食道	副腎	結腸		
6	筋肉	腎臓	リンパ	脾臓	副甲状腺	心臓	食道	副腎	結腸		
7	小脳	小脳	子宮内膜	胎盤	唾液腺	膵臓	肺	腎臓	胃	子宮頸部	子宮頸部
8	小脳	小脳	子宮内膜	胎盤	唾液腺	膵臓	肺	腎臓	胃	子宮頸部	子宮頸部
9	小脳	小脳	子宮内膜	胎盤	唾液腺	膵臓	肺	腎臓	胃	子宮頸部	子宮頸部

20

【図 3】



【図 4】

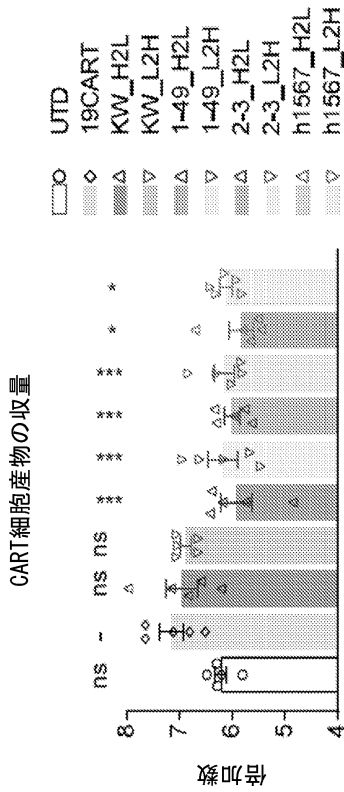


30

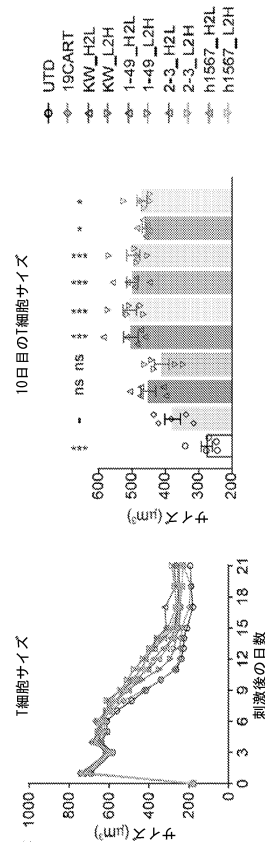
40

50

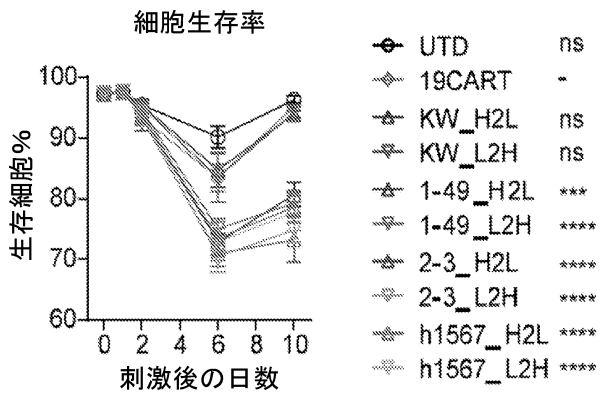
【図 5】



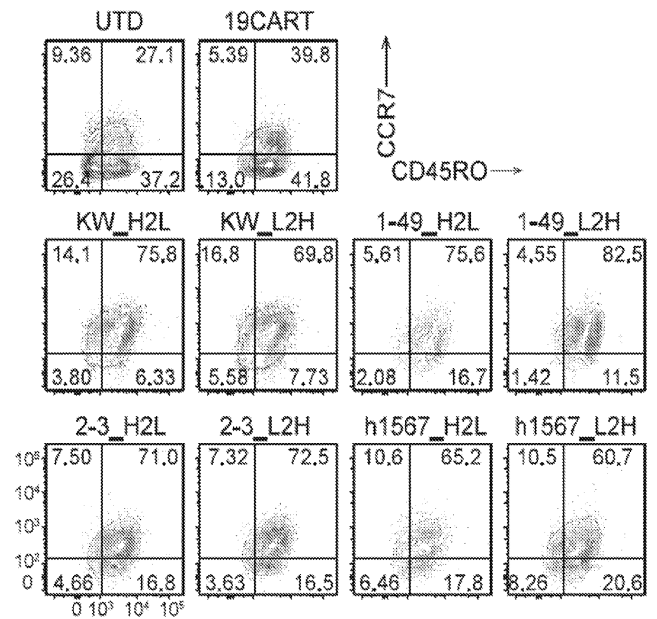
【図 6】



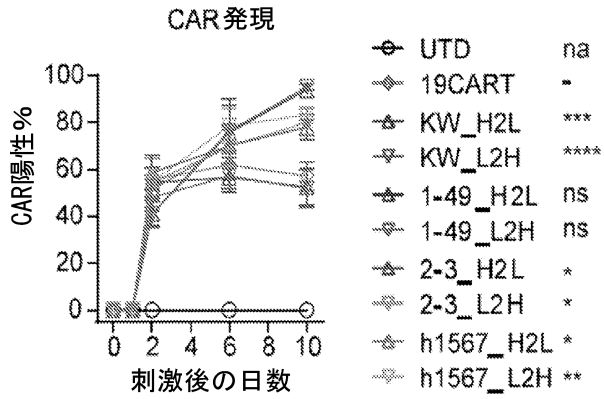
【図 7】



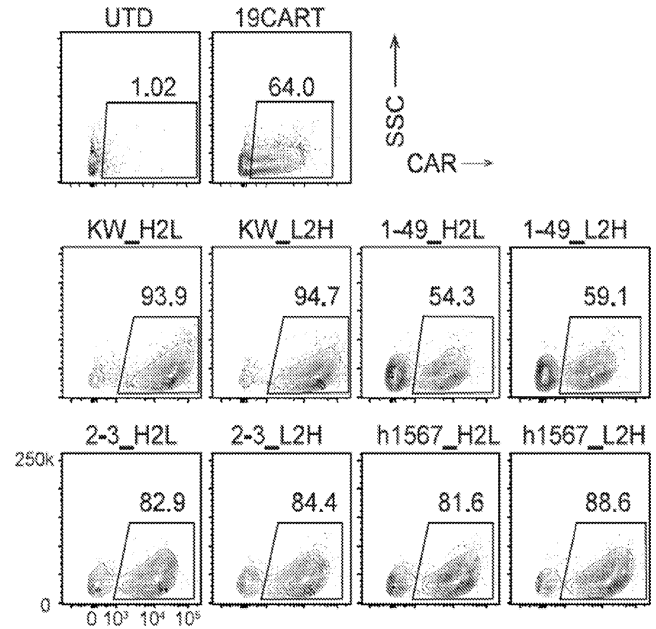
【図 8】



【図 9】



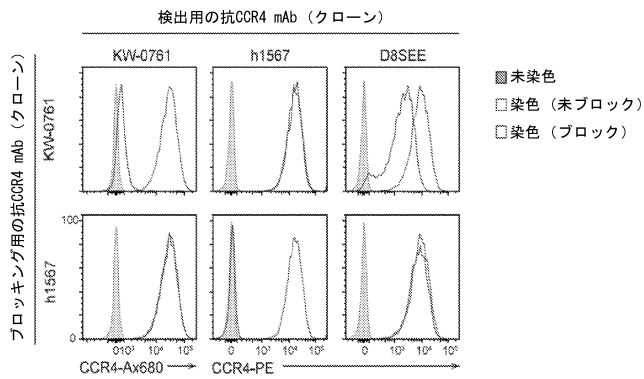
【図 10】



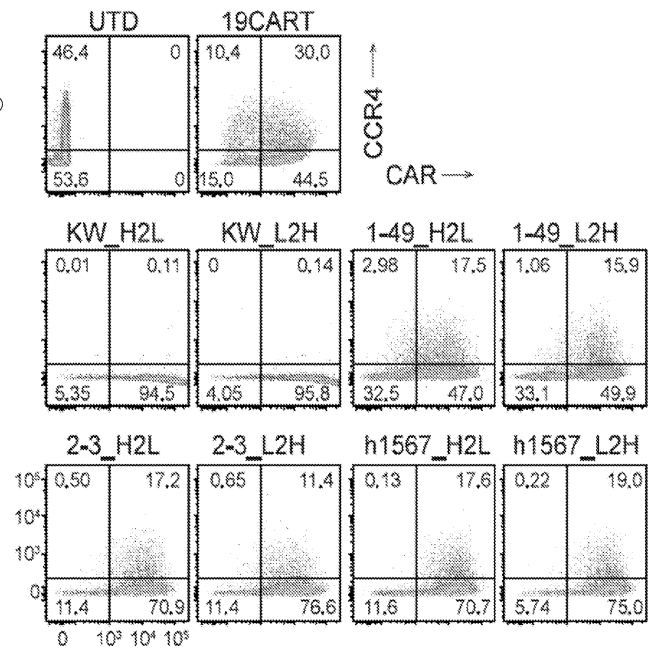
10

20

【図 11】



【図 12】

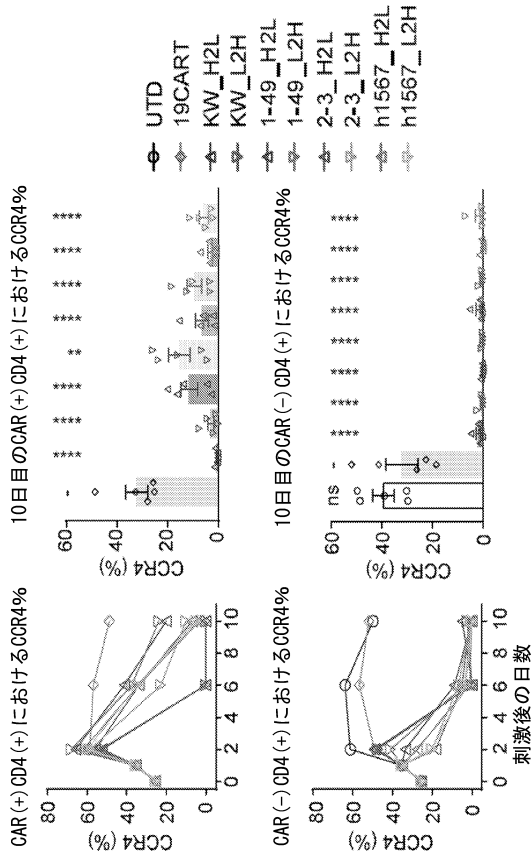


30

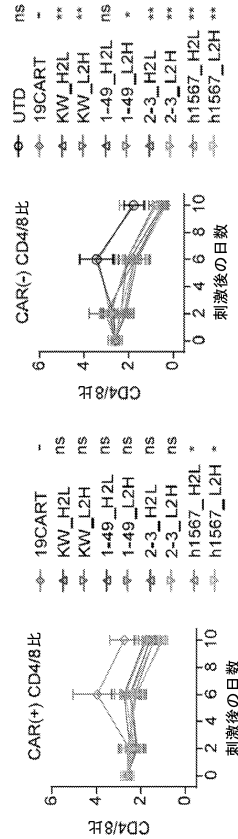
40

50

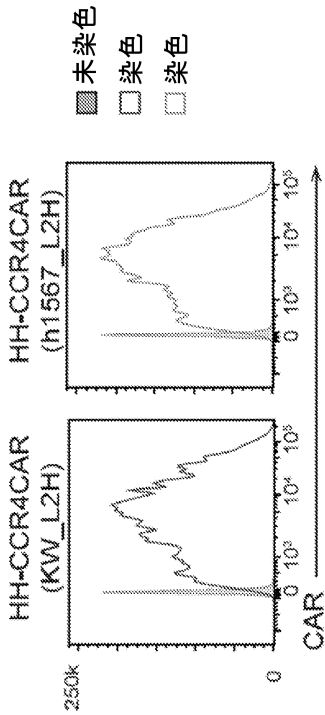
【図 1 3】



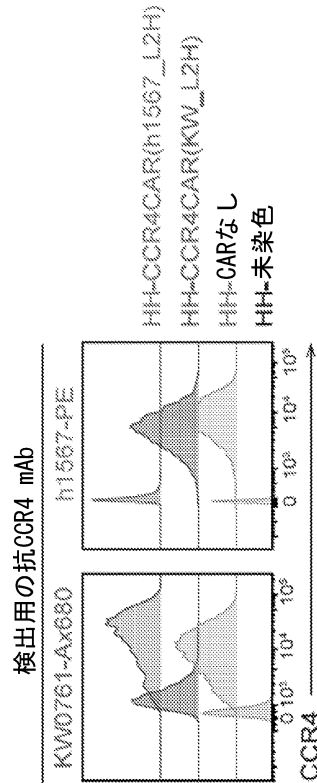
【図 1 4】



【図 1 5】



【図 1 6】



10

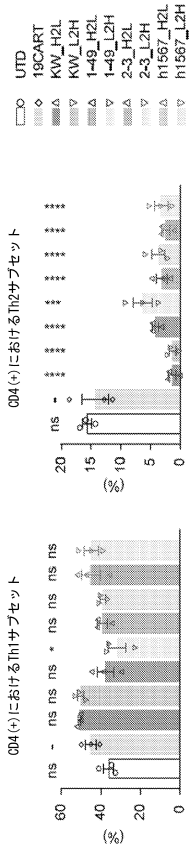
20

30

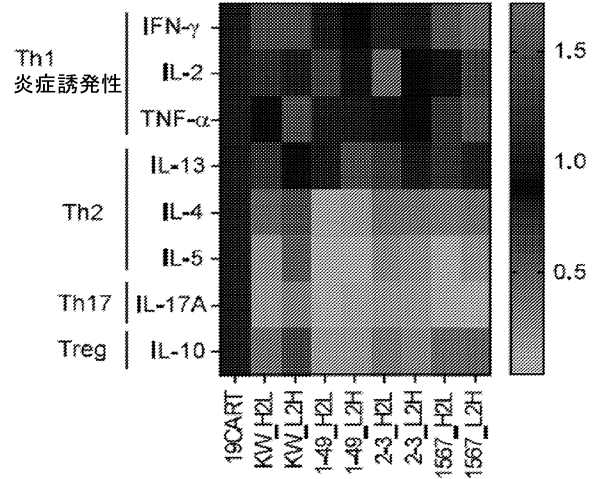
40

50

【図 17】



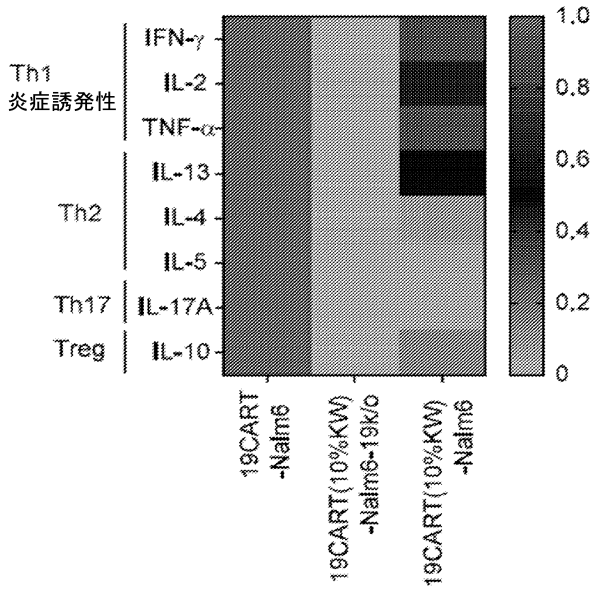
【図 18】



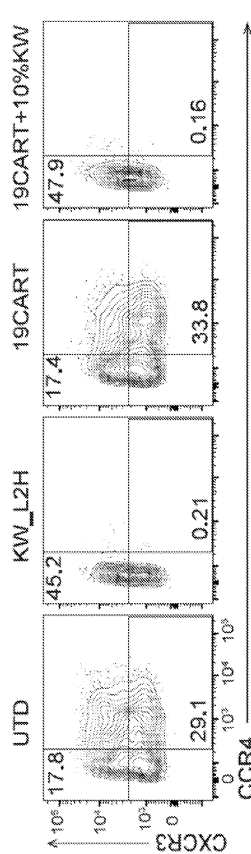
10

20

【図 19】



【図 20】

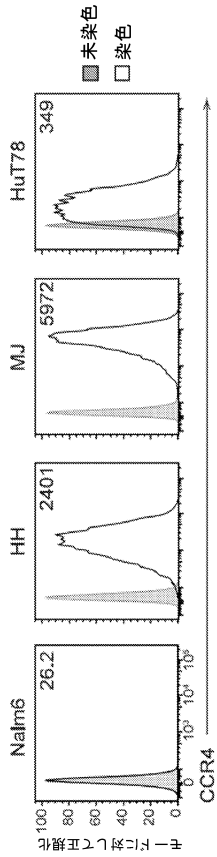


30

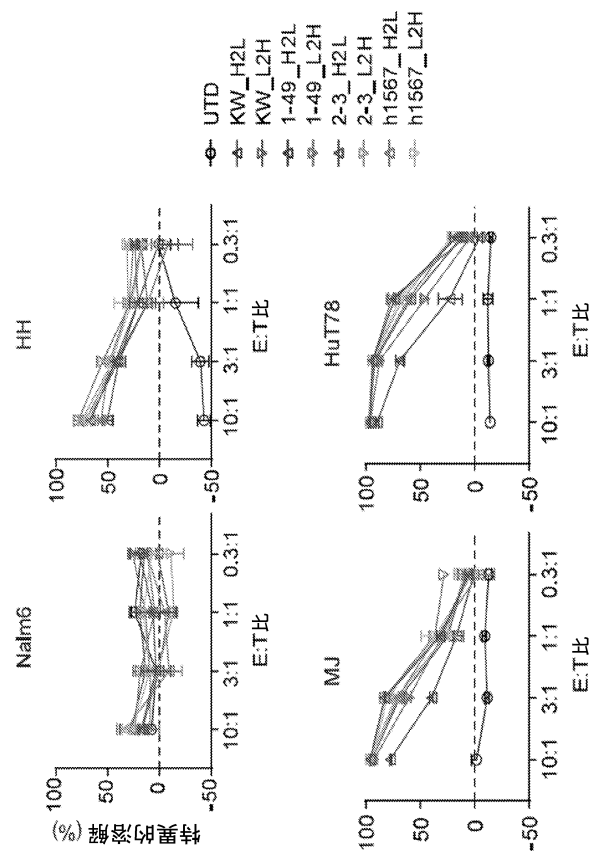
40

50

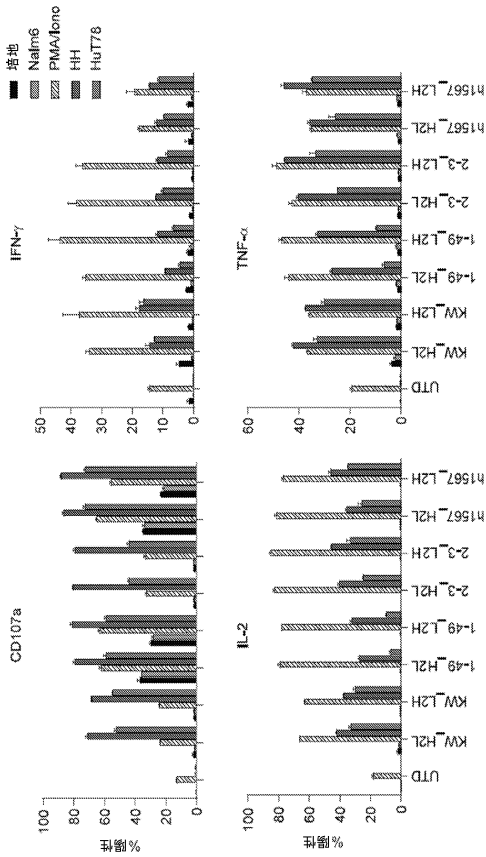
【図 2 1】



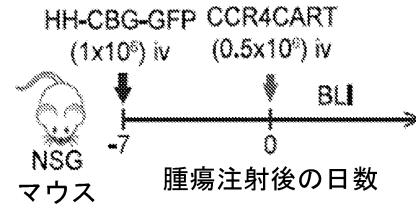
【図 2 2】



【図 2 3】



【図 2 4】



10

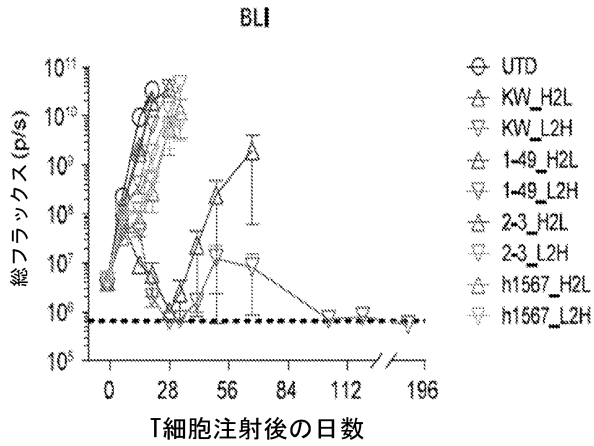
20

30

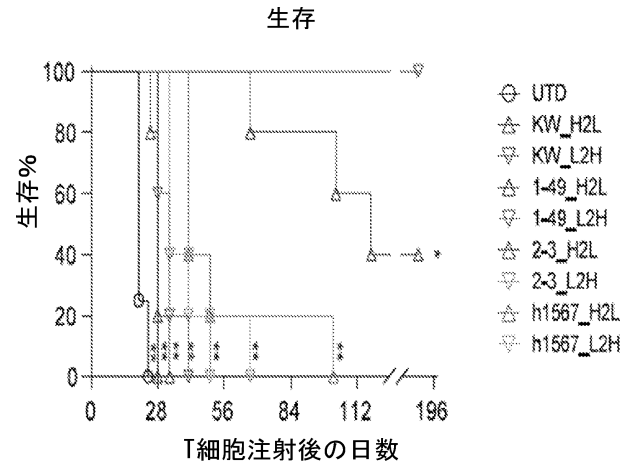
40

50

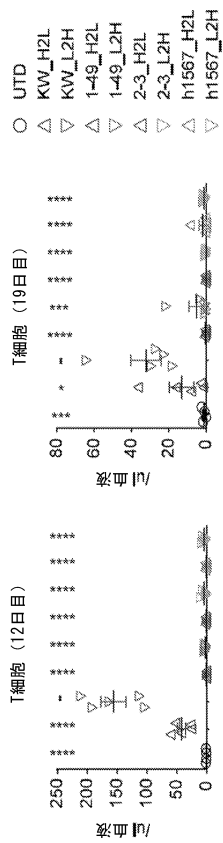
【図 25】



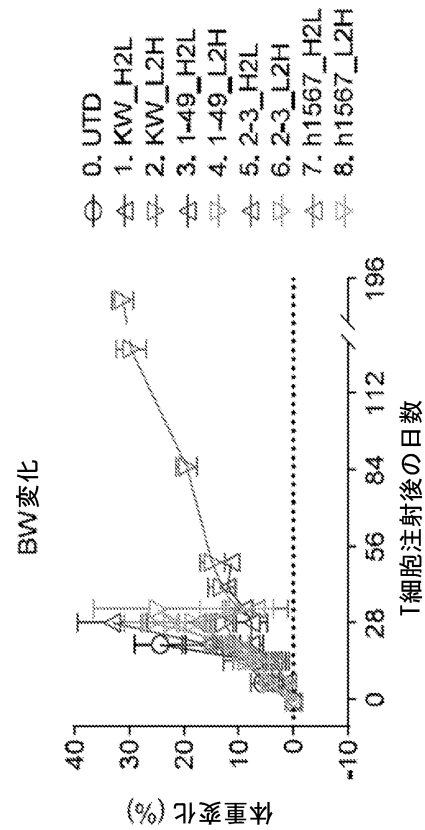
【図 26】



【図 27】



【図 28】



10

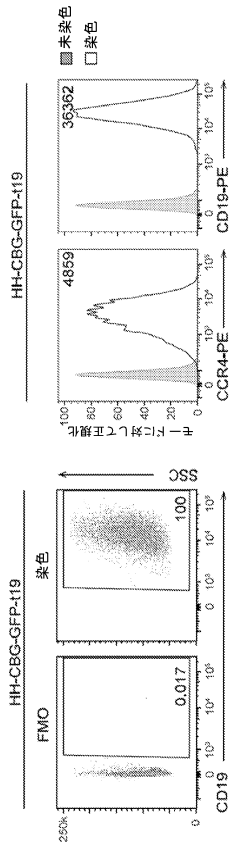
20

30

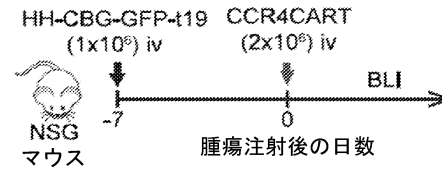
40

50

【図 29】



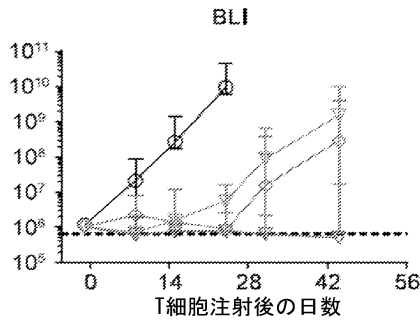
【図 30】



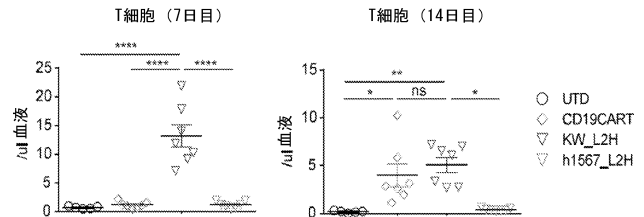
10

20

【図 31】



【図 32】

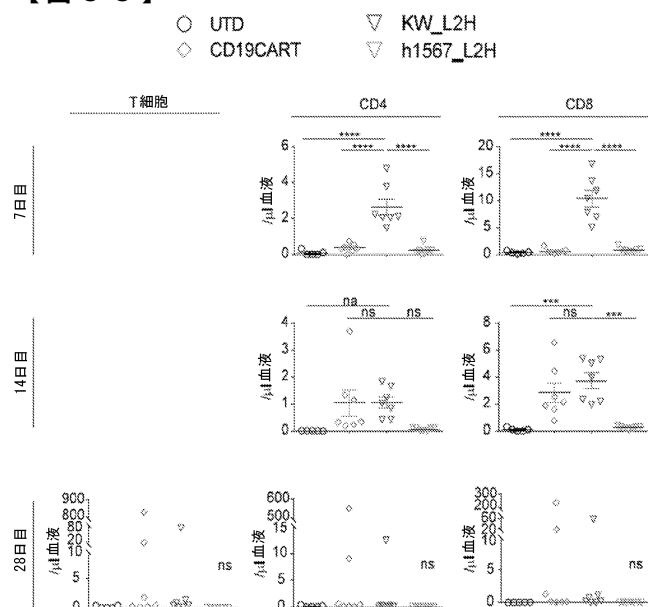


30

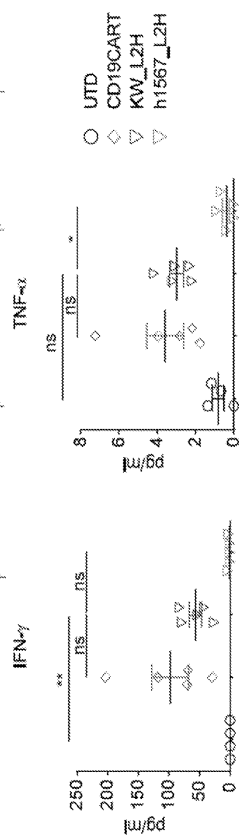
40

50

【圖 3 3】



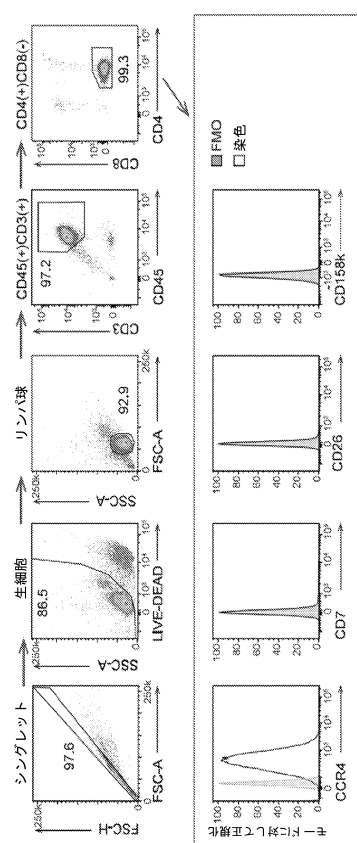
【圖 3 4】



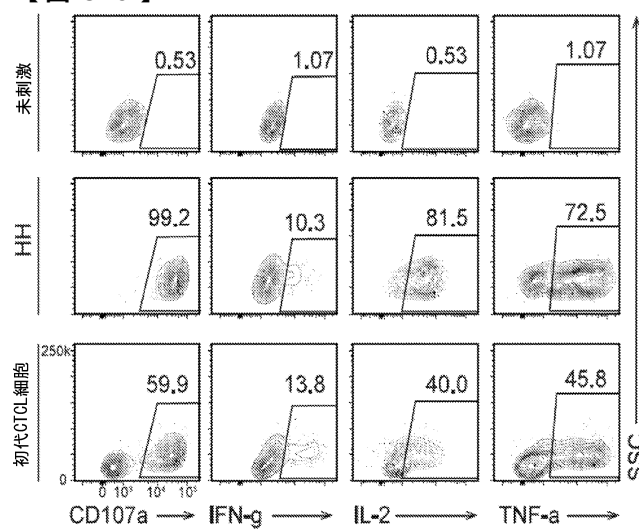
10

20

【圖 3 5】



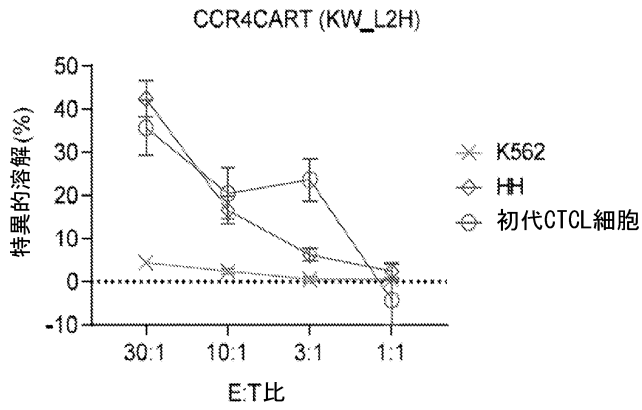
【圖 3 6】



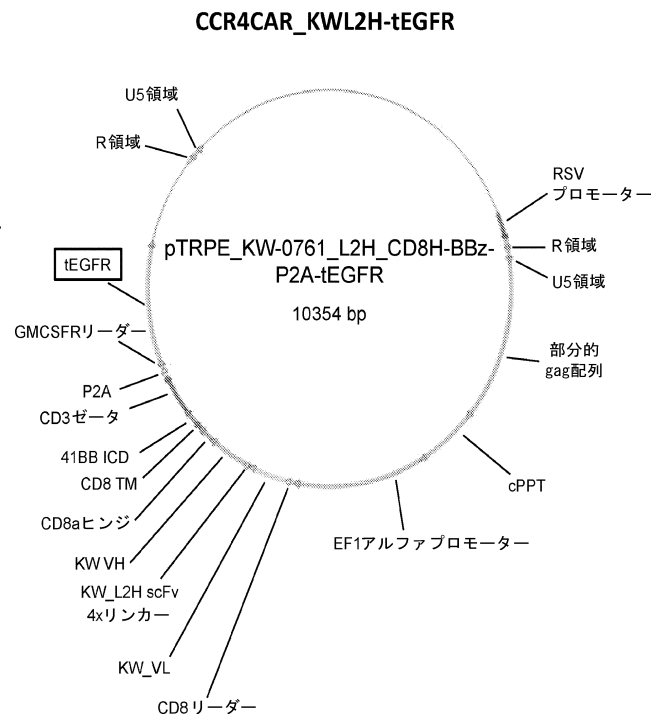
30

40

【図 3 7】



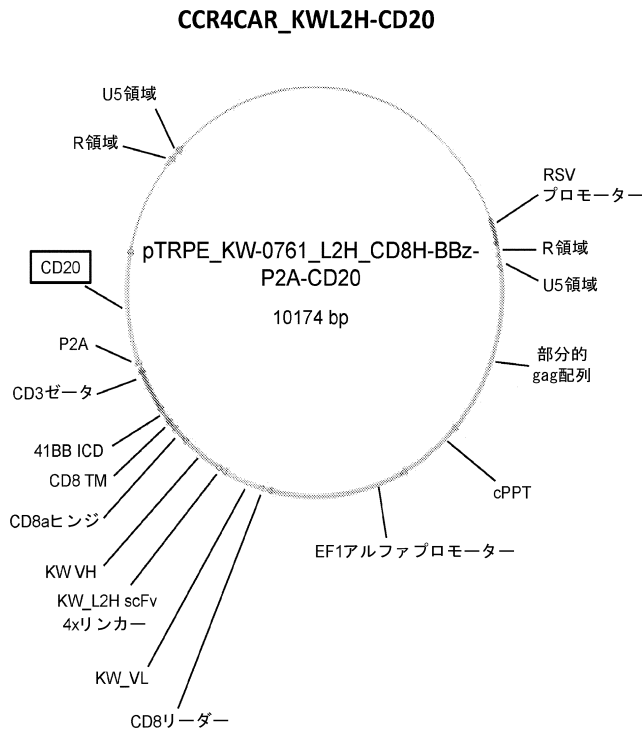
【図 3 8】



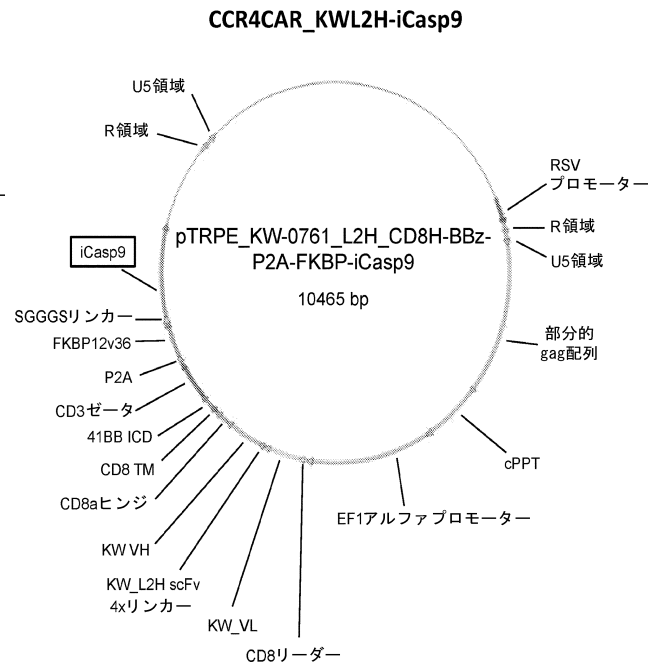
10

20

【図 3 9】



【図 4 0】

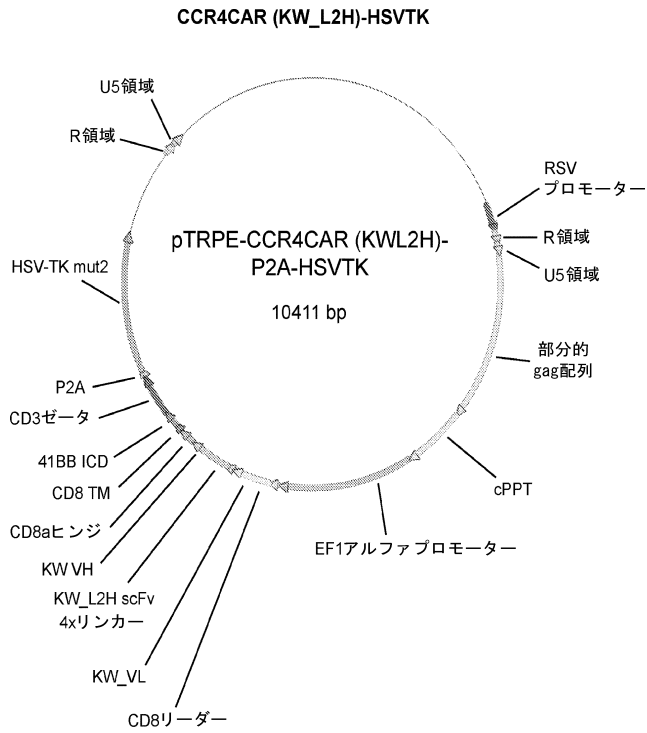


30

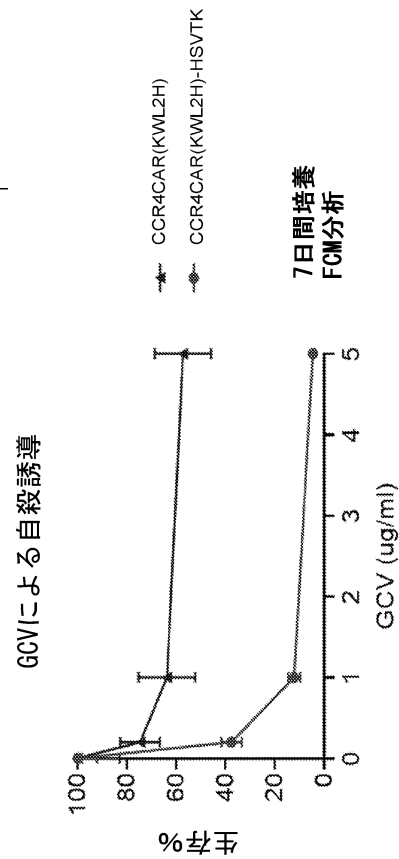
40

50

【図 4 1】



【図 4 2】

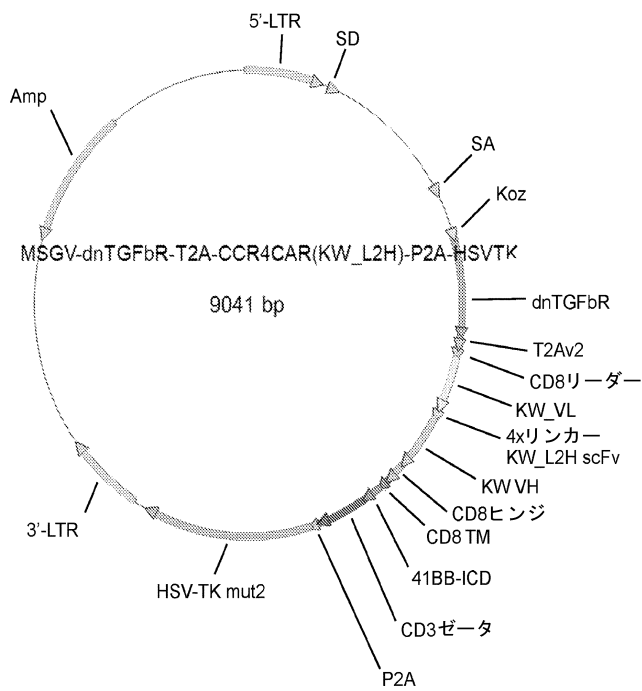


10

20

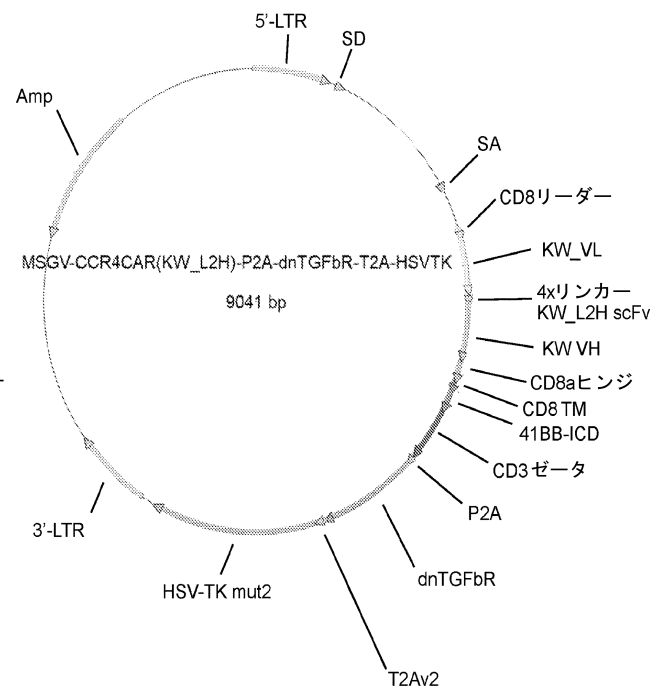
【図 4 3】

CCR4CAR(KW_L2H)-HSVTK-dnTGFbRII (最前部)



【図 4 4】

CCR4CAR(KW_L2H)-HSVTK-dnTGFbRII (中央部)



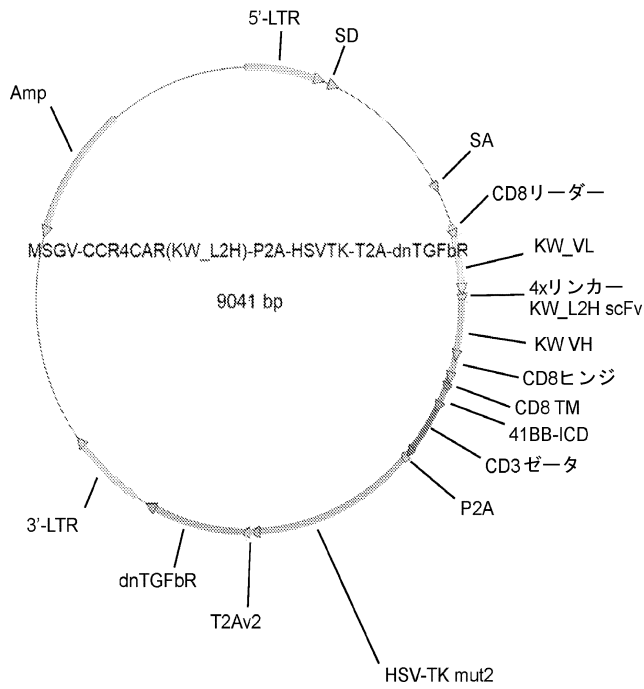
30

40

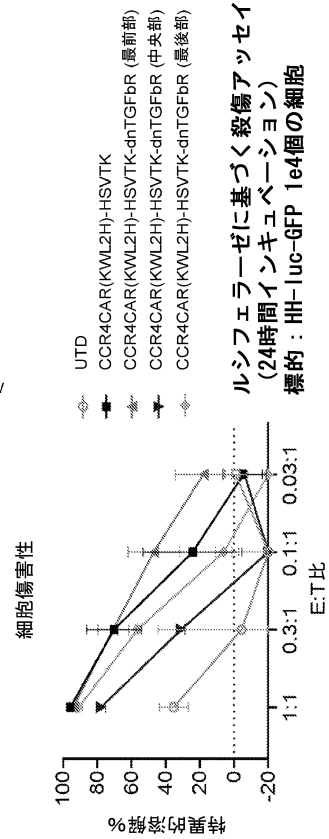
50

【図 4 5】

CCR4CAR(KW_L2H)-HSVTK-dnTGFbRII (最後部)



【図 4 6】

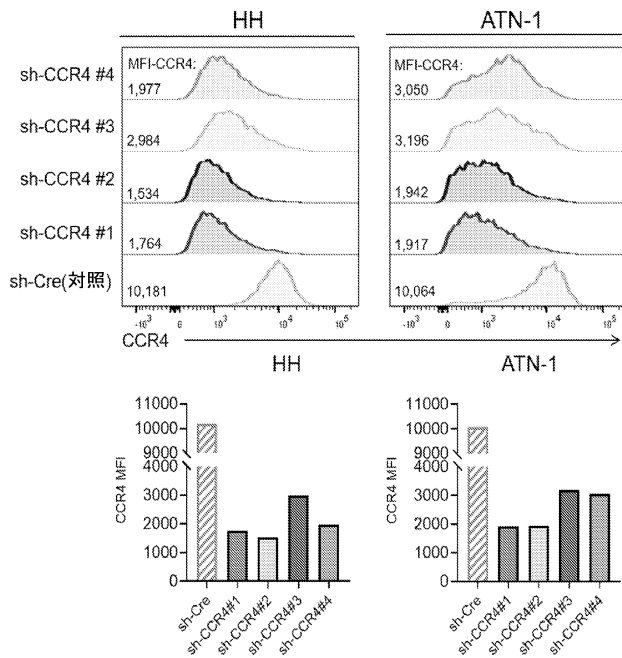


10

20

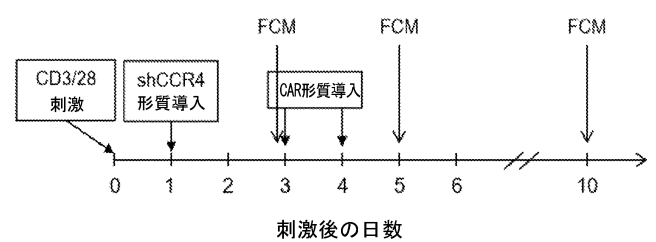
【図 4 7】

T細胞株に対するsh-CCR4のk/d効率 (sh-CCR4形質導入、2日目)



【図 4 8 A】

sh-CCR4/CAR二重形質導入

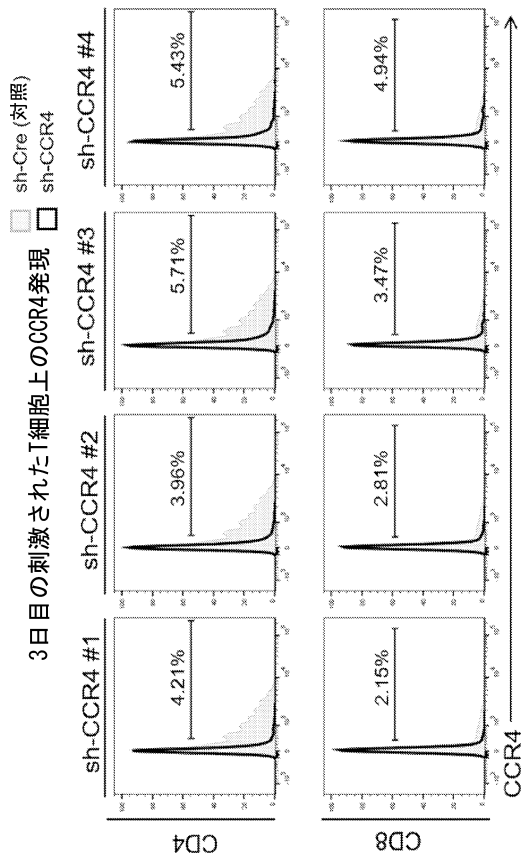


30

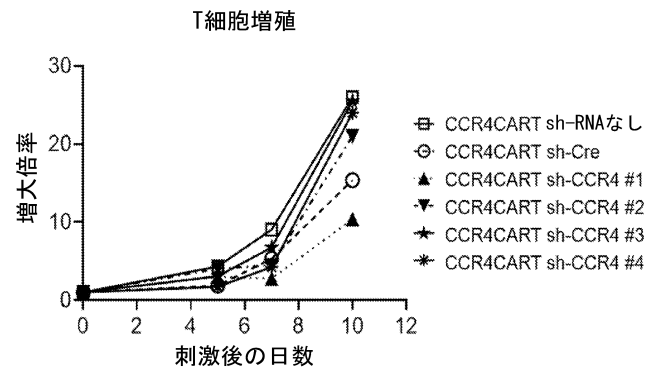
40

50

【図 4 8 B】

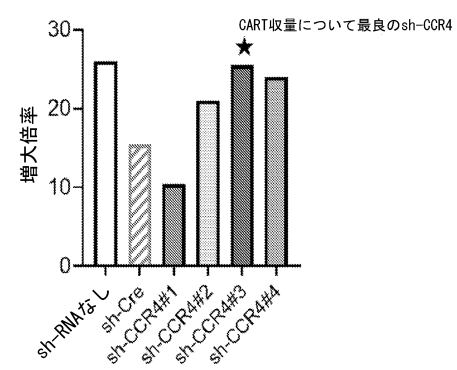


【図 4 8 C】



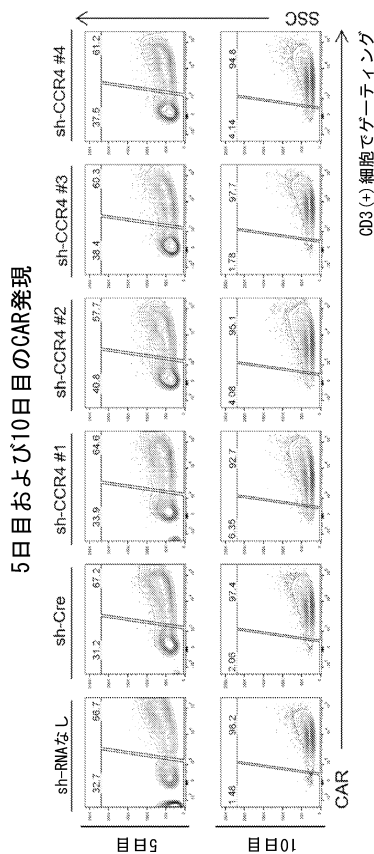
10

CCR4CART細胞増殖 (10日目)



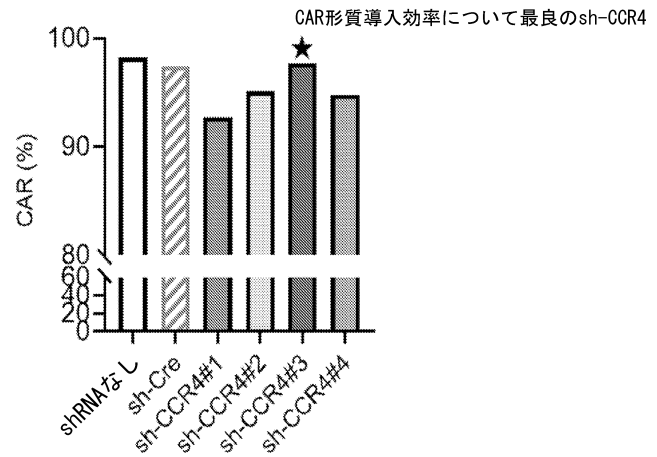
20

【図 4 8 D - 1】



【図 4 8 D - 2】

CCR4CAR発現 (10日目)



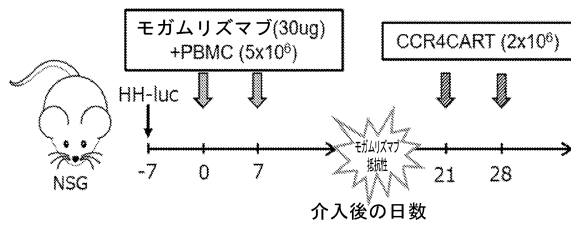
30

40

50

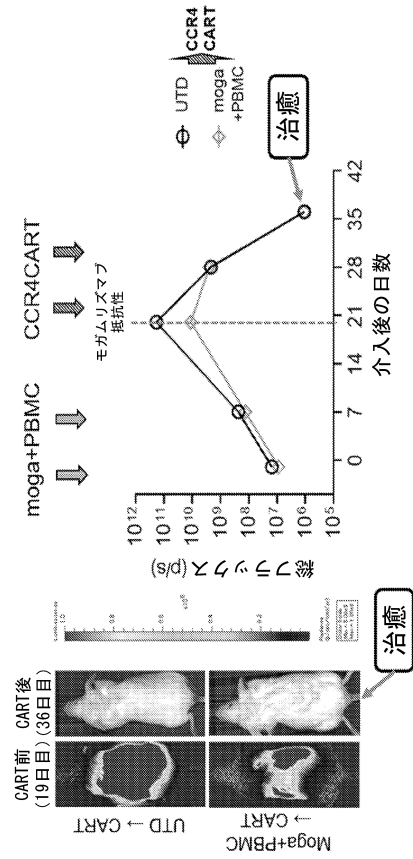
【図 49 A】

モガムリズマブ抵抗性腫瘍に対するCARによるレスキュー



【図 49 B】

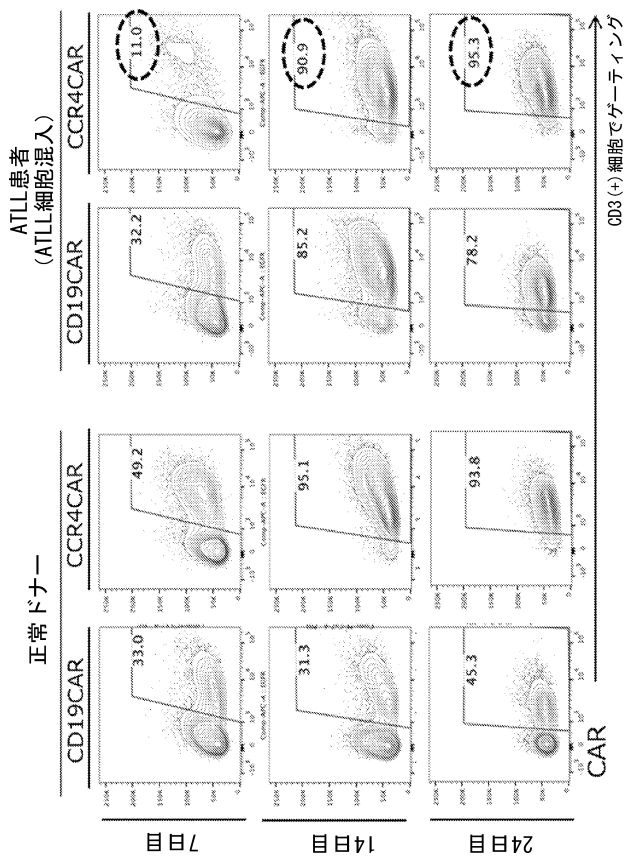
モガムリズマブ抵抗性腫瘍に対するCARによるレスキュー (BLI)



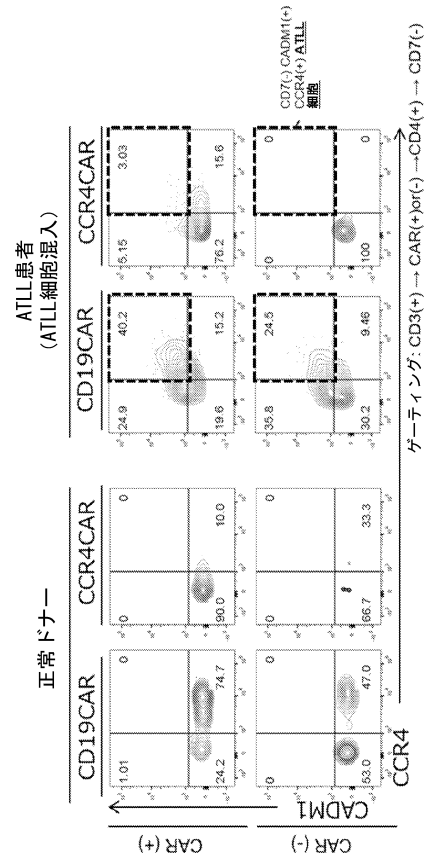
10

20

【図 50 A】



【図 50 B】



30

40

50

【配列表】

2024506647000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/015981

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(B) - A61K 35/12; A61K 35/15; A61K 35/17; A61K 39/395; A61P 35/00; C07K 16/46 (2022.01) CPC - A61K 35/15; A61K 35/17; A61P 35/00; C07K 2317/56; C07K 2317/565; C07K 2319/02; C07K 2319/03; C12N 5/0636; C12N 5/10; C12N 15/62; C12N 2510/00 (2022.02)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) see Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched see Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) see Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2017/0362297 A1 (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE INC.) 21 December 2017 (21.12.2017) entire document	1, 26, 70
---		2, 3, 27, 28, 71, 72
Y	US 2011/0262431 A1 (ISHII et al) 27 October 2011 (27.10.2011) entire document	2, 3, 27, 28, 71, 72
A	US 2007/0172476 A1 (UEDA et al) 26 July 2007 (26.07.2007) entire document	1-3, 26-28, 70-72
A	US 2019/0112380 A1 (UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA) 18 April 2019 (18.04.2019) entire document	1-3, 26-28, 70-72
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 April 2022		Date of mailing of the international search report MAY 03 2022
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Harry Kim Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/015981

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).

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:

SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10 and 12 were searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/015981

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 4-25, 29-69, 73-103
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

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

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

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)
C 1 2 N 15/86 (2006.01)	C 1 2 N 15/86	Z
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 47/68	

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,JM,JO,J
P,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,N
A,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,
TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T R I T O N

- 弁理士 山口 裕孝
(74)代理人 100119507
弁理士 刑部 俊
(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100188433
弁理士 梅村 幸輔
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100214396
弁理士 塩田 真紀
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(74)代理人 100221741
弁理士 酒井 直子
(74)代理人 100114926
弁理士 枝松 義恵
(72)発明者 ジューン カール エイチ.
アメリカ合衆国 1 9 0 6 6 ペンシルベニア州 メリオン ステーション ベアード ロード 4 0 9
(72)発明者 渡邊 慶介
愛知県名古屋市中千種区法王町2-5 グランドヒルズ覚王山法王町2 1 8
(72)発明者 ヤング レジーナ エム.
アメリカ合衆国 1 9 0 1 0 ペンシルベニア州 ブリンマー オールド ガルフ ロード 4 0 7
(72)発明者 シェラー ジョン
アメリカ合衆国 1 9 1 4 6 ペンシルベニア州 フィラデルフィア サウス シックスティーンズ
ストリート 9 2 2 ユニット ディー
(72)発明者 西川 博嘉

千葉県柏市柏の葉 6-5-2-3 1 8

F ターム (参考) 4B065 AA94X AB01 BA02 CA24 CA44
 4C076 CC41 EE41 EE59 FF34
 4C087 AA01 AA02 BB37 BB65 NA05 NA14 ZB26
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 DA50 DA75 EA20 FA72
 FA74

【要約の続き】

