(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-544836
(P2023-544836A)
(43)公表日　令和5年10月25日(2023.10.25)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/62 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/62	ＺＺＮＡ	４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ	*15/63 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/63	Ｚ	４Ｃ０８７
Ｃ１２Ｎ	*15/867(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/867	Ｚ	４Ｈ０４５
Ｃ０７Ｋ	*19/00 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	19/00		
Ｃ０７Ｋ	*14/705(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/705		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全59頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-521532(P2023-521532)
(86)(22)出願日　令和3年10月11日(2021.10.11)
(85)翻訳文提出日　令和5年6月5日(2023.6.5)
(86)国際出願番号　PCT/US2021/054437
(87)国際公開番号　WO2022/081486
(87)国際公開日　令和4年4月21日(2022.4.21)
(31)優先権主張番号　63/090,440
(32)優先日　令和2年10月12日(2020.10.12)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　514291864
ソレント・セラピューティクス・インコーポレイテッド
Ｓｏｒｒｅｎｔｏ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，Ｉｎｃ．
アメリカ合衆国９２１２１カリフォルニア州サンディエゴ、ダイレクターズ・プレイス４９５５番
(74)代理人　100078282
弁理士　山本 秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下 夏樹
(74)代理人　100181674
弁理士　飯田 貴敏
(74)代理人　100181641
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＣＤ１９に指向されたキメラ抗原受容体構築物

(57)【要約】
抗ＣＤ１９抗体のドメインをコードするＣＡＲ構築物、ＣＤ１９　ＣＡＲ構築物を含み、それを発現するＴ細胞、および、血液がんを含む疾患を、ＣＤ１９　ＣＡＲ構築物を発現するＣＡＲ－Ｔ細胞を使用して処置する方法などの使用方法が本出願で開示される。本開示は、ＣＤ１９に指向されたＣＡＲ（キメラ抗原受容体）構築物およびＣＤ１９　ＣＡＲを発現するＴ細胞集団を提供する。Ｔ細胞は、ＣＤ１９を発現する腫瘍細胞に対する細胞傷害を示し、がんなどの疾患の処置に使用することができる。

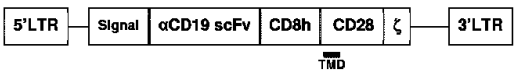


Fig. 1B

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ｉ）ＣＤ１９に結合するｓｃＦｖ抗体であって、配列番号１のアミノ酸配列と少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変（ＶＨ）ドメインと、配列番号２のアミノ酸配列と少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変（ＶＬ）ドメインとを含む、ｓｃＦｖ抗体；
ｉｉ）少なくとも６５アミノ酸長のヒンジ領域；
ｉｉｉ）膜貫通ドメイン；ならびに
ｉｖ）配列番号７に対して少なくとも９５％の同一性を有する第１の細胞内ドメインおよび配列番号８に対して少なくとも９５％の同一性を有する第２の細胞内ドメイン；
をコードする核酸配列を含むＣＤ１９キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）核酸構築物であって、
前記構築物によってコードされるＣＡＲを発現するＴ細胞が、ＣＤ１９陽性腫瘍細胞に対して、前記構築物によってコードされるＣＡＲを発現しないＴ細胞によって示されるものよりも高い細胞傷害を示す、
ＣＤ１９　ＣＡＲ核酸構築物。
【請求項２】
前記ｓｃＦｖ抗体が、前記重鎖可変（ＶＨ）ドメインと前記軽鎖可変（ＶＬ）ドメインとの間にペプチドリンカーを含む、請求項１に記載のＣＤ１９　ＣＡＲ構築物。
【請求項３】
前記ペプチドリンカーが、配列番号３のアミノ酸配列を含む、請求項１に記載のＣＤ１９　ＣＡＲ構築物。
【請求項４】
前記ｓｃＦｖ抗体が、配列番号１２のアミノ酸配列または配列番号１２に対して少なくとも９５％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１に記載のＣＤ１９　ＣＡＲ構築物。
【請求項５】
前記ヒンジ領域が、配列番号４に対して少なくとも９５％の同一性を有する第１のアミノ酸配列および配列番号５に対して少なくとも９５％の同一性を有する第２のアミノ酸配列を含む、請求項１に記載のＣＤ１９　ＣＡＲ構築物。
【請求項６】
前記ヒンジ領域が、配列番号１３に対して少なくとも９５％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１に記載のＣＤ１９　ＣＡＲ構築物。
【請求項７】
前記膜貫通領域が、配列番号６に対して少なくとも９５％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１に記載のＣＤ１９　ＣＡＲ構築物。
【請求項８】
前記ＣＡＲが、シグナルペプチドを含む、請求項１に記載のＣＤ１９　ＣＡＲ構築物。
【請求項９】
前記ＣＡＲが、ｍｙｃタグ（配列番号１５）を含む、請求項１に記載のＣＤ１９　ＣＡＲ構築物。
【請求項１０】
前記ＣＡＲが、配列番号２４のアミノ酸配列と少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を含む、請求項１に記載のＣＤ１９　ＣＡＲ構築物。
【請求項１１】
前記ＣＡＲが、配列番号２４のアミノ酸配列を含む、請求項１に記載のＣＤ１９　ＣＡＲ構築物。
【請求項１２】
前記ＣＡＲが、配列番号１４のアミノ酸配列と少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を含む、請求項１に記載のＣＤ１９　ＣＡＲ構築物。
【請求項１３】

請求項１から１２のいずれかに記載のＣＤ１９　ＣＡＲ構築物を含む核酸分子であって、前記ＣＡＲ構築物が、プロモーターに作動可能に連結している、核酸分子。
【請求項１４】
請求項１から１２のいずれかに記載のＣＡＲ構築物を含むベクター。
【請求項１５】
前記ＣＡＲ構築物に作動可能に連結したプロモーターをさらに含む、請求項１４に記載のベクター。
【請求項１６】
レンチウイルスベクターまたはレトロウイルスベクターである、請求項１４に記載のベクター。
【請求項１７】
ガンマレトロウイルスベクターである、請求項１６に記載のベクター。
【請求項１８】
前記ＣＡＲ構築物に作動可能に連結したプロモーターを含む、請求項１６または１７のいずれかに記載のレトロウイルスベクター。
【請求項１９】
請求項１から１２のいずれかに記載のＣＤ１９　ＣＡＲを発現する宿主細胞または宿主細胞の集団。
【請求項２０】
ＰＢＭＣ由来Ｔ細胞（またはその集団）、胎盤由来Ｔ細胞（またはその集団）、および臍帯血由来Ｔ細胞（またはその集団）からなる群より選択される、請求項１９に記載の宿主細胞または宿主細胞の集団。
【請求項２１】
前記宿主細胞（１つまたは複数）が、前記ＣＤ１９　ＣＡＲをコードするレトロウイルスまたはレンチウイルス発現ベクターを含む、請求項２０に記載の宿主細胞または宿主細胞の集団。
【請求項２２】
前記宿主細胞（１つまたは複数）が、前記ＣＤ１９　ＣＡＲをコードするレトロウイルス発現ベクターを含む、請求項２０に記載の宿主細胞または宿主細胞の集団。
【請求項２３】
前記宿主細胞（１つまたは複数）が、汎Ｔ細胞またはｇｄ　Ｔ細胞である、請求項１９に記載の宿主細胞または宿主細胞の集団。
【請求項２４】
前記宿主細胞（１つまたは複数）が、前記ＣＤ１９　ＣＡＲをコードするレトロウイルス発現ベクターを含む、請求項２３に記載の宿主細胞または宿主細胞の集団。
【請求項２５】
対象におけるがんを処置する方法であって、前記対象に、請求項１９から２４のいずれかに記載の宿主細胞の集団を投与するステップを含む、方法。
【請求項２６】
患者におけるＣＤ１９を発現する腫瘍の成長を阻害する方法であって、前記患者に、請求項１９から２４のいずれかに記載のＣＤ１９　ＣＡＲを含むＴ細胞の集団を投与するステップを含む、方法。
【請求項２７】
前記Ｔ細胞の集団が、ＰＢＭＣから単離されたものである、請求項２５または２６に記載の方法。
【請求項２８】
前記Ｔ細胞の集団が、胎盤組織または臍帯血から単離されたものである、請求項２５または２６に記載の方法。
【請求項２９】
前記Ｔ細胞の集団が、前記対象または患者に対して同種異系である、請求項２５または

２６に記載の方法。
【請求項３０】
前記がんが、血液がんである、請求項２５から２９のいずれかに記載の方法。
【請求項３１】
前記がんが、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、Ｂ細胞性慢性リンパ性白血病（Ｂ－ＣＬＬ）、またはＢ細胞性急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）である、請求項３０に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、「ＣＤ１９－Ｄｉｒｅｃｔｅｄ　Ｃｈｉｍｅｒｉｃ　Ａｎｔｉｇｅｎ　Ｒｅｃｅｐｔｏｒ　Ｃｏｎｓｔｒｕｃｔｓ」という表題の２０２０年１０月１２日出願の米国仮出願第６３／０９０，４４０号に対する優先権の利益を米国特許法第１１９条の下に主張するものである。
【０００２】
配列表
本出願は、２０２１年１０月１１日に作成された、サイズが５６，９９７バイトであり、２０２１－１０－１１＿０１２２３－００８７－００ＰＣＴ＿Ｓｅｑｕｅｎｃｅ＿Ｌｉｓｔｉｎｇ＿ＳＴ２５．ｔｘｔという名称の配列表を含有する。配列表は、ＡＳＣＩＩフォーマットで電子的に出願されており、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【０００３】
技術分野
本開示は、ＣＤ１９に指向されたＣＡＲ（キメラ抗原受容体）構築物およびＣＤ１９ＣＡＲを発現するＴ細胞集団を提供する。Ｔ細胞は、ＣＤ１９を発現する腫瘍細胞に対する細胞傷害を示し、がんなどの疾患の処置に使用することができる。
【背景技術】
【０００４】
背景
キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）は、単一の融合分子において標的化部分が１つまたは複数のシグナル伝達ドメインと結合した合成受容体である。目的の標的に特異的に結合することができるＣＡＲをコードする構築物の遺伝子移入により、新規の特異性を有するＴ細胞が生成されている。ＣＡＲは、Ｔ細胞を、リンパ腫および固形腫瘍を含む種々の悪性疾患由来の腫瘍細胞の表面に発現される抗原に指向されるように操作するために首尾よく使用されている。
【０００５】
一般に、ＣＡＲの細胞外標的化部分は、柔軟なリンカーによって接合されたモノクローナル抗体の軽鎖可変断片と重鎖可変断片を含む単鎖抗体（ｓｃＦｖ）の抗原結合性ドメインからなる。第１世代ＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ３ゼータまたはＦｃ受容体ガンマ鎖の細胞質領域に由来する。第１世代ＣＡＲは、Ｔ細胞の細胞傷害を首尾よく再指向させる（ｒｅｄｉｒｅｃｔ）ことが示されているが、ｉｎ　ｖｉｖｏにおける延長した拡大増殖（ｅｘｐａｎｓｉｏｎ）および抗腫瘍活性をもたらすことはできない。ＣＡＲにより改変されたＴ細胞の生存を増強し、その増殖を増大させるために、ＣＤ２８、ＯＸ－４０（ＣＤ１３４）、および４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）を含む共刺激分子由来のシグナル伝達ドメインが、単独で付加されているか（第２世代ＣＡＲ）または組合せで付加されている（第３世代ＣＡＲ）。
【０００６】
Ｔ細胞は、ウイルス性疾患および自己免疫疾患において見られるように、また、がんの稀な自然寛解においても見られるように、正常細胞または悪性細胞を排除する力を有する。しかし、Ｔ細胞は、自己抗原または腫瘍抗原に対して容易に寛容化され、「免疫監視」によって臨床的に明らかなあらゆるがんの腫瘍増悪を防止することができなくなっている。ＣＡＲ－Ｔ研究の目標は、患者のＴ細胞に対して、それらの「内因性」Ｔ細胞受容体（

ＴＣＲ）レパートリーに関係なく、ＣＡＲによって認識される抗原の発現に基づいて悪性細胞を死滅させるための抗体により規定される抗悪性細胞マーカー認識をもたらすことにより、特異性および親和性を供給することである。

【０００７】

殺腫瘍性活性を再指向するためにＣＡＲが操作されたＴ細胞を注入することによる養子免疫療法が、転移性がんを処置するために探究されている。ＣＡＲは、抗体の抗原認識ドメインとＴ細胞由来の受容体のシグナル伝達ドメインを接合することによって構築される。Ｔ細胞をＣＡＲ遺伝子で改変することにより、Ｔ細胞に、再標的化された抗体型抗腫瘍細胞傷害を備えさせる。死滅は主要組織適合性遺伝子複合体（ＭＨＣ）により制限されていないので、この手法により、同じ抗原を有する全ての患者のための一般的な療法がもたらされる。抗原特異的ＣＡＲで操作されたＴ細胞は、「ＣＡＲ－Ｔ細胞」または「Ｔ－ボディ（Ｔ－ｂｏｄｙ）」と称される（Eshar, et al., 1993 Proc. Nat'l. Acad. of Sci. USA 90 (2): 720-724）。第１世代ＣＡＲである免疫グロブリン－Ｔ細胞受容体（ＩｇＴＣＲ）は、活性化刺激（シグナル１）のみを送達するシグナル伝達ドメイン（ＴＣＲ－ＣＤ３ζ）を含有するように操作されたものである（Gross, et al., 1989 Proc. Nat'l. Acad. of Sci. USA 86 (24): 10024-10028；Eshar, et al., 1993 Proc. Nat'l. Acad. of Sci. USA 90 (2): 720-724；Haynes, et al., 2001 J Immunol. 166 (1): 182-187）。第１世代ＣＡＲを単独で発現するように操作されたＴ細胞は、活性化が最適に至らないことに起因して、限定された抗腫瘍有効性を示す。第２世代ＣＡＲである免疫グロブリンＣＤ２８－ＣＤ３ζ－Ｔ細胞受容体（ＩｇＣＤ２８ＴＣＲ）は、第１世代受容体に共刺激ＣＤ２８（シグナル２）が組み入れられ、それによりＣＡＲ－Ｔ細胞の抗腫瘍能が増大したものである（Finney, et al., 1998 J Immunol. 161 (6): 2791-2797；Hombach, et al., 2001 J Immunol. 167 (11): 6123-6131；Maher, et al., 2002 Nat Biotechnol. 20 (1): 70-7；Emtage, et al., 2008 Clin Cancer Res. 14 (24): 8112-812；Lo, et al., 2010 Clin Cancer Res. 16 (10): 2769-2780）。

【０００８】

養子免疫療法を使用して患者を処置するための現行のプロトコールは、自己細胞移入に基づく。この手法では、Ｔリンパ球を患者から回収し、ｅｘ ｖｉｖｏで遺伝子改変または選択を行い、必要であれば細胞の数を増幅させるためにｉｎ ｖｉｔｒｏで培養し、最終的に患者に注入する。リンパ球注入に加えて、宿主（患者）を、Ｔ細胞の生着またはＴ細胞の免疫応答への関与を支持する他の方法で操作すること、例えば、プレコンディショニング（照射または化学療法を用いて）およびリンパ球増殖因子（例えば、ＩＬ－２など）の投与を行うことができる。各患者は、患者自身のリンパ球を使用して個別に組み立てられた処置（すなわち、自己療法）を受ける。

【０００９】

あるいは、ドナー由来のＴ細胞を患者に注入する同種異系戦略を使用することができる。がんの処置に先立って、健康なドナー由来の同種異系Ｔ細胞にＣＡＲ構築物をトランスフェクトし、高価かつ時間のかかる個々の患者のＴ細胞それぞれの調製および試験を回避することができる。ドナー細胞と患者の不適合性を回避するために、ドナーを患者とＨＬＡ適合させ得る、または、ＣＡＲ構築物を発現する同種異系Ｔ細胞に対して、内因性Ｔ細胞受容体の発現が排除されるようにさらに遺伝子変更を行うことができる。

ＣＤ１９は、Ｂ細胞系列の細胞によって発現される長いＣ末端細胞質ドメインを有する免疫グロブリンスーパーファミリーの９５ｋＤのＩＩ型膜貫通糖タンパク質である。個体発生の間に、ＣＤ１９はＢ細胞系に拘束された幹細胞上に出現し、その発現はＢ細胞成熟化と共に増加し、成熟Ｂ細胞では未成熟Ｂ細胞での表面密度のおよそ３倍で発現される。ＣＤ１９はまた、悪性Ｂ細胞上にも発現され、例えば、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、および慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）を含むＢ細胞系列を起源とする、抗腫瘍療法の標的として使用されている。

【先行技術文献】
【非特許文献】
【００１０】
【非特許文献１】Ｅｓｈａｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ．Ａｃａｄ．ｏｆ　Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９９３）９０（２）：７２０～７２４
【非特許文献２】Ｇｒｏｓｓら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ．Ａｃａｄ．ｏｆ　Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９８９）８６（２４）：１００２４～１００２８
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【００１１】
概要
本開示は、ＣＤ１９を発現する腫瘍細胞を標的とすることが可能な抗ＣＤ１９抗体を含むキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードする核酸分子を提供する。より詳細には、本開示は、ＣＤ１９　ＣＡＲ核酸構築物であって、コードされるＣＡＲが、ＣＤ１９に特異的に結合する単鎖抗体（ｓｃＦｖ）を含み、ｓｃＦｖ抗体が、配列番号１のアミノ酸配列と少なくとも９５％相同なアミノ酸配列を有する軽鎖可変（ＶＬ）ドメインと配列番号２のアミノ酸配列と少なくとも９５％相同なアミノ酸配列を有する重鎖可変（ＶＨ）ドメインとを有する、ＣＤ１９　ＣＡＲ核酸構築物を提供する。コードされるＣＤ１９　ＣＡＲは、膜貫通ドメインおよび少なくとも１つの細胞内シグナル伝達ドメインをさらに含み、抗原結合性タンパク質と膜貫通ドメインの間にヒンジ領域をさらに含むことが好ましい。種々の実施形態では、ヒンジ領域は、長いヒンジ領域、例えば、約６５アミノ酸長（例えば、少なくとも７０、少なくとも７５、少なくとも８０、または少なくとも８５アミノ酸長）よりも長いヒンジ領域であり、２つまたはそれよりも多くのポリペプチドのヒンジ領域に由来するものであってよい。一部の実施形態では、ヒンジ領域は、配列番号１３のアミノ酸配列に対して少なくとも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％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。
【００１２】
したがって、本明細書で提供される核酸分子によってコードされるＣＤ１９　ＣＡＲは、ＣＤ１９に特異的に結合する抗体に由来する単鎖抗体であって、軽鎖可変（ＶＬ）ドメインが、配列番号１のアミノ酸配列と少なくとも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％同一であるアミノ酸配列を含み、重鎖可変（ＶＨ）ドメインが、配列番号２のアミノ酸配列と少なくとも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％同一であるアミノ酸配列を含む、単鎖抗体を含み、膜貫通ドメインおよび少なくとも１つの細胞内ドメインをさらに含む。ＣＡＲの抗ＣＤ１９単鎖抗体は、一部の実施形態では、配列番号１２のアミノ酸配列を含み得る、または配列番号１２のアミノ酸配列に対して少なくとも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％の同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。代替の実施形態では、ＣＡＲの抗ＣＤ１９単鎖抗体は、配列番号２２のアミノ酸配列を含み得る、または配列番号２２のアミノ酸配列に対して少なくとも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％の同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。
【００１３】
本明細書で提供される核酸構築物によってコードされるＣＤ１９　ＣＡＲは、少なくとも１つの細胞内シグナル伝達ドメインを含み、２つの細胞内シグナル伝達ドメインを含むことが好ましい。ＣＤ１９　ＣＡＲが第１の細胞内シグナル伝達ドメインおよび第２の細胞内シグナル伝達ドメインを含む実施形態では、第１のシグナル伝達ドメインは、ＣＤ２８細胞内シグナル伝達ドメイン、ＯＸ－４０（ＣＤ１３４）シグナル伝達ドメイン、および４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）シグナル伝達ドメインのうちのいずれかであってよい。第２のシグナル伝達ドメインは、例えば、ＣＤ３－ζシグナル伝達ドメインであってよい。一部の好ましい実施形態では、第１のシグナル伝達ドメインは、配列番号７のアミノ酸配列

を有する、または配列番号７に対して少なくとも９５％の同一性を有するアミノ酸配列を有するＣＤ２８シグナル伝達ドメインである。一部の好ましい実施形態では、第２のシグナル伝達ドメインは、ＣＤ３－ζシグナル伝達ドメイン（配列番号８）、またはそれに由来する、配列番号８と少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を有するシグナル伝達ドメインである。

【００１４】

ＣＤ１９　ＣＡＲは、非限定的な例として、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ１６、ＣＤ２８、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ１３４、ＣＤ１３７、ＩｇＧ１、またはＩｇＧ４などの膜貫通ポリペプチドに由来する膜貫通ドメインを含み得る。一部の実施形態では、本明細書で提供される核酸分子によってコードされるＣＤ１９　ＣＡＲは、ＣＤ２８に由来する膜貫通ドメインを有し、その膜貫通ドメインは、配列番号６に対して少なくとも９５％の同一性を有する膜貫通ドメインであり得る。種々の例では、本明細書で提供される核酸構築物によってコードされるＣＤ１９　ＣＡＲは、ｓｃＦｖと膜貫通ドメインの間に位置付けられたＣＤ８ヒンジ領域、例えば、ＣＤ８αヒンジ領域、および／またはＣＤ２８ヒンジ領域を含む。ヒンジ領域は、例えば、配列番号４に対して少なくとも９５％の同一性を有するアミノ酸配列および配列番号５に対して少なくとも９５％の同一性を有するアミノ酸配列を含み得、例えば、ヒンジ領域は、ＣＤ８に由来する配列とＣＤ２８に由来する配列の両方を有し、例えば、ヒンジ領域は、配列番号１３に対して少なくとも９５％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【００１５】

核酸構築物は、合成されたＣＡＲが細胞膜に局在化すると除去され得る、ＣＡＲのＮ末端におけるシグナルペプチドをコードする核酸配列をさらに含むことが好ましい。例えば、配列番号９のシグナルペプチドをまたはそれに対して少なくとも９５％の同一性を有するシグナルペプチドを使用することができる、または別のシグナルペプチドを使用することができる。

【００１６】

一部の実施形態では、構築物は、合成されたＣＡＲを検出するためのペプチドタグ、例えば、ｍｙｃタグ（配列番号１０）または別のペプチドタグをコードする配列を必要に応じて含み得る。一部の実施形態では、ペプチドタグは、成熟ＣＤ１９　ＣＡＲのＮ末端、例えば、本明細書で提供される構築物によってコードされる前駆ＣＡＲのシグナルペプチドとｓｃＦｖの間に位置付けられる。

【００１７】

本明細書で提供される核酸分子によってコードされるＣＤ１９　ＣＡＲは、一部の実施形態では、配列番号１４のＣＡＲまたは配列番号１４のＣＡＲに対して少なくとも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％の同一性を有するＣＡＲであり得る。例えば、核酸分子は、配列番号１５の核酸配列またはそれと少なくとも６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、または９５％の同一性を有する核酸配列を含み得、核酸配列は、配列番号１４に対して少なくとも９５％の同一性を有するＣＤ１９　ＣＡＲをコードする。代替の実施形態では、本明細書で提供される核酸分子によってコードされるＣＤ１９　ＣＡＲは、配列番号２４のＣＡＲまたは配列番号２４のＣＡＲに対して少なくとも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％の同一性を有するＣＡＲであり得る。例えば、核酸分子は、配列番号２５の核酸配列またはそれと少なくとも６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、または９５％の同一性を有する核酸配列を含み得、核酸配列は、配列番号２４に対して少なくとも９５％の同一性を有するＣＤ１９　ＣＡＲをコードする。

【００１８】

本明細書に開示されるＣＤ１９　ＣＡＲをコードする配列を含む核酸分子は、非限定的な例として、ＤＮＡ分子またはＲＮＡ分子であり得、１つまたは複数の修飾されたヌクレオチドおよび／または１つまたは複数の骨格修飾を必要に応じて含み得る。核酸分子は、

直鎖状核酸分子または環状核酸分子であり得、また、二本鎖または一本鎖であり得る。本明細書で提供される核酸分子は、ＣＡＲをコードする配列を含むベクターであり得る。核酸分子は、ウイルスベクターまたはウイルスゲノム（環状または直鎖状の形態）であり得る。一部の実施形態では、ベクターは、レンチウイルスまたはレトロウイルス移入ベクター、例えば、レンチウイルスまたはレトロウイルスパッケージング配列を含む、複製欠損レンチウイルスまたはレトロウイルス（例えば、ガンマレトロウイルス）移入ベクターであり得る。ＣＤ１９　ＣＡＲをコードする核酸配列を含むレンチウイルスまたはレトロウイルスが本明細書にさらに含まれる。一部の実施形態では、レトロウイルスは、ガンマレトロウイルスである。本明細書で提供される核酸分子のＣＡＲをコードする配列は、これだけに限定されないが、プロモーターなどの発現制御配列に作動可能に連結していてよい。ＣＤ１９　ＣＡＲをコードする配列に作動可能に連結したプロモーターは、ヒト細胞において活性なプロモーターであることが好ましく、一部の実施形態では、レトロウイルスプロモーター、例えば、レトロウイルスのＬＴＲプロモーターであり得る。

【００１９】

種々の実施形態では、ＣＤ１９　ＣＡＲ、例えば、配列番号１４のＣＤ１９　ＣＡＲまたは配列番号１４のＣＡＲに対して少なくとも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％の同一性を有するＣＡＲなどをコードする核酸配列を含むガンマレトロウイルスベクターが本明細書で提供される。一部の例示的な実施形態では、ガンマレトロウイルスベクターは配列番号１４のＣＤ１９　ＣＡＲをコードし、配列番号１６の配列を有するまたは配列番号１６に対して少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％の同一性を有する配列を有する配列を含む。

【００２０】

さらなる実施形態では、ＣＤ１９　ＣＡＲ、例えば、配列番号２４のＣＤ１９　ＣＡＲまたは配列番号２４のＣＡＲに対して少なくとも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％の同一性を有する配列などをコードする核酸配列を含むガンマレトロウイルスベクターが本明細書で提供される。一部の例示的な実施形態では、ガンマレトロウイルスベクターは、配列番号２４のＣＤ１９　ＣＡＲをコードし、配列番号２６の配列を有するまたは配列番号２６に対して少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％の同一性を有する配列を有する。

【００２１】

さらなる態様では、ｓｃＦｖ抗体が配列番号１のアミノ酸配列と少なくとも９５％相同なアミノ酸配列を有するV_Lドメインと、配列番号２のアミノ酸配列と少なくとも９５％相同なアミノ酸配列を有するV_Hドメインとを含む抗ＣＤ１９　ｓｃＦｖを含むＣＤ１９キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）が本明細書で提供される。ＣＤ１９　ＣＡＲは、膜貫通ドメインおよび少なくとも１つの細胞内シグナル伝達ドメインをさらに含み、抗原結合性タンパク質と膜貫通ドメインの間にヒンジ領域、例えば、配列番号１３のアミノ酸配列に対して少なくとも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％の同一性を有するアミノ酸配列を含む長いヒンジ領域をさらに含む。膜貫通ドメインは、非限定的な例として、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ１６、ＣＤ２８、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ１３４、ＣＤ１３７、ＩｇＧ１、もしくはＩｇＧ４ポリペプチドの膜貫通ドメイン、またはこれらのいずれかに対して少なくとも９５％の同一性を有する膜貫通ドメインであり得る。ＣＡＲは、２つの細胞内シグナル伝達ドメインを含むことが好ましく、それらは、例えば、ＣＤ２８シグナル伝達ドメインおよびＣＤ３ζシグナル伝達ドメインであり得る。一部の実施形態では、ＣＤ１９　ＣＡＲは、配列番号２７のアミノ酸配列に対して少なくとも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％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＣＤ１９　ＣＡＲは、配列番号２３のアミノ酸配列に対して少なくとも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％の同一性を有

するアミノ酸配列を含む。ＣＤ１９　ＣＡＲは、単離されたポリペプチドであり得る。ＣＤ１９　ＣＡＲは、本明細書に開示される操作された宿主細胞などのトランスジェニック細胞の膜に挿入されたポリペプチドであり得る。

【００２２】

本開示は、さらに、本明細書で提供されるいずれかなどのＣＤ１９　ＣＡＲ構築物を含む宿主細胞または宿主細胞の集団を提供する。種々の実施形態では、ＣＤ１９　ＣＡＲは、（ｉ）ＣＤ１９に結合するｓｃＦｖであって、配列番号１のアミノ酸配列と少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変（ＶＬ）ドメインと配列番号２のアミノ酸配列と少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変（ＶＨ）ドメインとを含む、ｓｃＦｖ；（ｉｉ）膜貫通ドメイン；および（ｉｉｉ）少なくとも１つの細胞内シグナル伝達ドメインを含み得る。種々の実施形態では、宿主細胞は、（ｉ）ＣＤ１９に結合するｓｃＦｖであって、配列番号１のアミノ酸配列と少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変（ＶＬ）ドメインと配列番号２のアミノ酸配列と少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変（ＶＨ）ドメインとを含む、ｓｃＦｖ；（ｉｉ）膜貫通ドメイン；および（ｉｉｉ）第１の細胞内シグナル伝達ドメインが、ＣＤ２８、ＯＸ－４０、または４－１ＢＢ細胞内シグナル伝達ドメインであり、第２の細胞内シグナル伝達ドメインが、ＣＤ３－ζシグナル伝達ドメインである、２つの細胞内シグナル伝達ドメインを含む、本明細書に開示されるＣＤ１９　ＣＡＲ構築物を含む。種々の実施形態では、ＣＡＲは、抗ＣＤ１９　ｓｃＦｖと膜貫通ドメインの間にヒンジ領域をさらに含み、このヒンジ領域は、一部の実施形態では、約６５アミノ酸長を超える長いヒンジ領域であり得、ＣＤ８ヒンジ配列に由来する配列およびＣＤ２８ヒンジ配列に由来する配列を含み得る。例えば、宿主細胞または宿主細胞の集団は、配列番号１２に対して少なくとも９５％の同一性または配列番号２２に対して少なくとも９５％の同一性を有する抗ＣＤ１９　ｓｃＦｖを含み、配列番号１３に対して少なくとも９５％の同一性を有するヒンジ領域；配列番号６に対して少なくとも９５％の同一性を有する膜貫通ドメイン；配列番号７に対して少なくとも９５％の同一性を有する第１のシグナル伝達ドメイン；および配列番号８と少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を有する第２のシグナル伝達ドメインをさらに含み得るＣＤ１９　ＣＡＲをコードするネイティブではない核酸配列を含み得る。ＣＡＲ構築物は、ＣＡＲをコードする配列のＮ末端におけるシグナルペプチドをコードする配列、例えば、配列番号９またはそれに対して少なくとも９５％の同一性を有するシグナルペプチドをコードする配列をさらに含むことが好ましい。構築物は、合成されたＣＡＲを検出するためのペプチドタグ、例えば、ｍｙｃタグ（配列番号１０）または別のペプチドタグなどをコードする配列も必要に応じて含み得る。

【００２３】

本明細書で提供されるＣＤ１９　ＣＡＲをコードする配列を含む核酸分子を発現するように操作された細胞は、ＣＤ１９に特異的に結合し得る。ＣＤ１９　ＣＡＲをコードする例示的な核酸配列は、配列番号２５および配列番号１５を含む。

【００２４】

宿主細胞または宿主細胞の集団は、例えば、Ｔ細胞であってよく、ＰＢＭＣ由来Ｔ細胞、胎盤由来Ｔ細胞、もしくは臍帯血由来Ｔ細胞であり得る汎Ｔ細胞であってもよく、またはＴ細胞は、ＰＢＭＣ、胎盤、もしくは臍帯血から単離されたＴ細胞の亜集団であってもよい。種々の実施形態では、宿主細胞は、本明細書で提供されるＣＤ１９　ＣＡＲをコードする核酸配列を有するレンチウイルスまたはレトロウイルス（例えば、ガンマレトロウイルス）を用いて形質導入された細胞である。ＣＤ１９キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードする核酸配列は、形質導入された宿主細胞または宿主細胞の集団におけるＣＤ１９　ＣＡＲ構築物の発現を誘導するプロモーターに作動可能に連結している。プロモーターは、一部の実施形態では、レトロウイルスプロモーター、例えば、レトロウイルスベクターのＬＴＲのプロモーターであり得る。

【００２５】

一部の実施例では、宿主細胞または宿主細胞の集団は、配列番号１４または配列番号１

４に対して少なくとも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％の同一性を有するアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む。一部の実施例では、宿主細胞または宿主細胞の集団は、配列番号１５の核酸配列または配列番号１５に対して少なくとも８５％、少なくとも９０％、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％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【００２６】

一部の実施例では、宿主細胞または宿主細胞の集団は、配列番号２４または配列番号２４に対して少なくとも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％の同一性を有するアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む。一部の実施例では、宿主細胞または宿主細胞の集団は、配列番号２５の核酸配列または配列番号２５に対して少なくとも８５％、少なくとも９０％、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％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【００２７】

ＣＡＲをコードする核酸配列を細胞のゲノム内に挿入することができる。一部の実施例では、宿主細胞、例えば、Ｔ細胞に、レトロウイルスプロモーター（例えば、レトロウイルスＬＴＲのプロモーター）であり得るプロモーターに作動可能に連結していることが好ましい本明細書に開示されるＣＤ１９　ＣＡＲをコードする遺伝子を含むように操作したレトロウイルスによって形質導入を行い、形質導入された宿主細胞は、ＣＤ１９　ＣＡＲをコードする核酸配列のレトロウイルスにより媒介された挿入を含む。形質導入された宿主細胞は、例えば、レトロウイルス（例えば、ガンマレトロウイルス）パッケージングシグナルの少なくとも一部分などの、ＣＡＲ構築物に付随する追加的なレトロウイルス配列も含み得る。

【００２８】

本明細書で提供される宿主細胞または宿主細胞の集団は、ＣＤ１９キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）構築物を発現し、宿主細胞または宿主細胞の集団において発現されたＣＤ１９　ＣＡＲは、ＣＤ１９に特異的に結合する。ＣＤ１９キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）構築物を発現するＴ細胞またはＴ細胞の集団は、ＣＤ１９を発現する細胞（例えば、標的細胞）を優先的に死滅させる（それらに対して細胞傷害性である）。

【００２９】

本開示は、配列番号１のアミノ酸配列と少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変（ＶＬ）ドメインおよび配列番号２のアミノ酸配列と少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変（ＶＨ）ドメイン；ヒンジ領域、膜貫通ドメイン；ならびに少なくとも１つの細胞内ドメインを含むＣＤ１９　ＣＡＲを発現する宿主細胞または宿主細胞の集団を提供する。宿主細胞または宿主細胞の集団は、ＣＤ１９　ＣＡＲ、例えば、本明細書に開示されるいずれか、例えば、配列番号１２に対して少なくとも９５％の同一性を有するＣＤ１９　ｓｃＦｖを含み、配列番号４に対して少なくとも９５％の同一性を有するヒンジ領域および配列番号５に対して少なくとも９５％の同一性を有するアミノ酸配列；配列番号６に対して少なくとも９５％の同一性を有する膜貫通ドメイン；配列番号７に対して少なくとも９５％の同一性を有する第１のシグナル伝達ドメイン；ならびに配列番号８と少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を有する第２のシグナル伝達ドメインをさらに含むＣＤ１９　ＣＡＲを発現し得る。ＣＡＲは、合成されたＣＡＲを検出するためのペプチドタグ、例えば、ｍｙｃタグ（配列番号１０）または別のペプチドタグなども必要に応じて含み得る。ペプチドタグは、一部の実施形態では、ＣＡＲのｓｃＦｖに対してＮ末端側にあり得る。

【００３０】

本明細書で提供されるＣＤ１９　ＣＡＲ構築物を含む宿主細胞または宿主細胞の集団は、破壊されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）サブユニットをコードする１つまたは複数の遺伝子を有することができる。例えば、ＴＣＲαまたはＴＣＲβ遺伝子の１つまたは複数を、機

能的なサブユニットが産生されないように変異させることができる。ＴＣＲサブユニット遺伝子を、例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ法、Ｔａｌｅｎ、またはジンクフィンガーヌクレアーゼを用いて破壊することができる。

【００３１】

一部の実施形態では、ＣＤ１９　ＣＡＲを発現する宿主細胞または宿主細胞の集団は、Ｔ細胞（またはその集団）であり得、Ｔ細胞（またはその集団）は、例えば、末梢血由来Ｔ細胞（またはその集団）、胎盤由来Ｔ細胞（またはその集団）または臍帯血由来Ｔ細胞（またはその集団）であり得る。

【００３２】

本開示は、さらに、処置を必要とする対象におけるがんを処置するまたは腫瘍成長を阻害するための方法であって、対象に、本明細書で提供されるＣＤ１９　ＣＡＲを発現するＴ細胞の集団を投与するステップを含む、方法を提供する。対象に投与されるＴ細胞は、本明細書で提供されるＣＤ１９　ＣＡＲをコードする核酸分子を含む、本明細書に記載の宿主細胞である。Ｔ細胞は、例えば、末梢血由来Ｔ細胞であり得る、または、胎盤および／もしくは臍帯血に由来するＴ細胞であり得る。

【００３３】

したがって、本開示は、処置を必要とする対象におけるがんを処置するまたは腫瘍成長を阻害するための方法であって、対象に、本明細書に開示されるＣＤ１９　ＣＡＲを発現するＴ細胞の集団を投与するステップを含み、ＣＡＲが、配列番号１のアミノ酸配列と少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変（ＶＬ）ドメインおよび配列番号２のアミノ酸配列と少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変（ＶＨ）ドメイン；ヒンジ領域；膜貫通ドメイン；および２つの細胞内ドメインを含む細胞内領域を含む、方法を提供する。宿主細胞または宿主細胞の集団は、本明細書に開示されるいずれかなどのＣＤ１９　ＣＡＲをコードする核酸配列を含み得、例えば、配列番号１２に対して少なくとも９５％の同一性を有する抗ＣＤ１９　ｓｃＦｖを含み、配列番号１３に対して少なくとも９５％の同一性を有するヒンジ領域；配列番号６に対して少なくとも９５％の同一性を有する膜貫通ドメイン；配列番号７に対して少なくとも９５％の同一性を有する第１のシグナル伝達ドメイン；および配列番号８と少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を有する第２のシグナル伝達ドメインをさらに含むＣＤ１９　ＣＡＲを発現し得る。Ｔ細胞によって発現されるＣＡＲは、発現されたＣＡＲを検出するためのペプチドタグ、例えば、ｍｙｃタグ（配列番号１０）または別のペプチドタグなどを必要に応じて含み得る。

【００３４】

本開示は、対象に、提供されるＣＤ１９　ＣＡＲのいずれかを発現する遺伝子操作された細胞を投与することによって養子細胞療法を行うための方法を提供する。本明細書で提供される方法は、例えば、ヒト対象に、本明細書に記載のＣＤ１９　ＣＡＲを発現する宿主細胞（または本明細書に記載のＣＤ１９　ＣＡＲをコードする核酸配列を含むように形質導入された宿主細胞）を投与するステップを含む。本開示は、処置を必要とする対象におけるがんを処置するまたは腫瘍成長を阻害するための方法であって、対象に、本明細書で提供されるいずれかなどのＣＤ１９　ＣＡＲを発現するＴ細胞の集団を投与するステップを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、Ｔ細胞によって発現されるＣＤ１９　ＣＡＲは、配列番号２４のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【００３５】

障害は、これだけに限定されないが、血液のがん、乳がん、卵巣がん、前立腺がん、頭頸部がん、肺がん、膀胱がん、黒色腫、結腸直腸がん、膵がん、肺がん、肝がん、腎がん、食道がん、平滑筋腫、平滑筋肉腫、神経膠腫、および神経膠芽腫を含む、がんであることが好ましい。

【００３６】

種々の実施形態では、がんは、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）、Ｂ細胞性慢性リンパ性白血病（Ｂ－ＣＬＬ）、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、およびバーキットリンパ腫（Ｂ

Ｌ）、Ｔ細胞リンパ腫（ＴＣＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、ヘアリー細胞白血病（ＨＣＬ）、ホジキンリンパ腫（ＨＬ）、および慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）からなる群より選択される血液のがんである。一部の実施形態では、血液のがんは、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、バーキットリンパ腫（ＢＬ）、Ｂ細胞性慢性リンパ性白血病（Ｂ－ＣＬＬ）、および急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）からなる群より選択される。

【図面の簡単な説明】

【００３７】

【図１】図１Ａは、抗ＣＤ１９抗体のｓｃＦｖとＣＤ８αおよびＣＤ２８のヒンジ領域、ＣＤ２８膜貫通ドメイン（ＴＭＤ）ならびにＣＤ２８およびＣＤ３ζ細胞内シグナル伝達ドメインを連結することによって創出したＣＤ１９　ＣＡＲをコードする構築物の略図である。シグナルペプチドおよびＣＡＲ発現を検出するためのｍｙｃタグをＮ末端に付加した。図１Ｂは、抗ＣＤ１９抗体のｓｃＦｖとＣＤ８αおよびＣＤ２８のヒンジ領域、ＣＤ２８膜貫通ドメイン（ＴＭＤ）ならびにＣＤ２８およびＣＤ３ζ細胞内シグナル伝達ドメインを連結することによって創出したＣＤ１９　ＣＡＲをコードする構築物の略図である。シグナルペプチドをＮ末端に付加した。図は一定の拡大縮小比ではない。

【００３８】

【図２】図２は、図１Ｂに示されているＣＡＲをコードする核酸配列を含むレトロウイルスベクターのベクターマップを提示する。

【００３９】

【図３－１】図３は、Ｔ細胞受容体の発現を検出するためにＣＤ３に対する抗体を用いて染色した（Ｙ軸）、およびＣＤ１９　ＣＡＲ発現を検出するためにＦｃ領域と連結したＣＤ１９抗原を用いて染色した（Ｘ軸）、配列番号１５のＣＤ１９　ＣＡＲ構築物（ＣＤ１９　ＣＡＲ２－６３）を含むように第１の実験において形質導入したＴ細胞集団のフローサイトメトリー分析を提示する。上のグラフは、形質導入していない対照Ｔ細胞を示し、中央のグラフは、ＣＤ１９　ＣＡＲ２－６３を形質導入した、ＰＢＭＣから単離されたＴ細胞を示し、下のグラフは、臍帯血（ＣＢ）から単離されたＴ細胞を示す。

【図３－２】図３は、Ｔ細胞受容体の発現を検出するためにＣＤ３に対する抗体を用いて染色した（Ｙ軸）、およびＣＤ１９　ＣＡＲ発現を検出するためにＦｃ領域と連結したＣＤ１９抗原を用いて染色した（Ｘ軸）、配列番号１５のＣＤ１９　ＣＡＲ構築物（ＣＤ１９　ＣＡＲ２－６３）を含むように第１の実験において形質導入したＴ細胞集団のフローサイトメトリー分析を提示する。上のグラフは、形質導入していない対照Ｔ細胞を示し、中央のグラフは、ＣＤ１９　ＣＡＲ２－６３を形質導入した、ＰＢＭＣから単離されたＴ細胞を示し、下のグラフは、臍帯血（ＣＢ）から単離されたＴ細胞を示す。

【００４０】

【図４】図４は、ＣＤ１９　ＣＡＲ発現を検出するために、Ｆｃ領域と連結したＣＤ１９抗原によって認識した（Ｙ軸）、配列番号１５のＣＤ１９　ＣＡＲ構築物（ＣＤ１９　ＣＡＲ２－６３）を含むように第２の実験において形質導入したＴ細胞集団のフローサイトメトリー分析を提示する。左上のグラフは、形質導入していない対照である、ＰＢＭＣから単離されたＴ細胞を示し、右上のグラフは、ＣＤ１９　ＣＡＲ２－６３を形質導入した、ＰＢＭＣから単離されたＴ細胞を示す。左下のグラフは、形質導入していない対照である、ＣＢから単離されたＴ細胞を示し、右上のグラフは、ＣＤ１９　ＣＡＲ２－６３を形質導入した、ＣＢから単離されたＴ細胞を示す。

【００４１】

【図５】図５は、形質導入していない、ＰＢＭＣから単離されたＴ細胞およびＣＢから単離されたＴ細胞、ならびにＣＤ１９　ＣＡＲ２－６３を形質導入した、ＰＢＭＣから単離されたＴ細胞およびＣＢから単離されたＴ細胞によるインターフェロンガンマ（ＩＦＮγ）の産生を示す。Ｔ細胞を、ＣＤ１９を発現しないＫ５６２腫瘍細胞と一緒に、ＣＤ１９を発現するように操作されたＫ５６２腫瘍細胞と一緒に、および、ＣＤ１９を発現するＲａｊｉ腫瘍細胞と一緒に、培養した。

【００４２】

【図６】図６は、形質導入していない、ＰＢＭＣから単離されたＴ細胞およびＣＢから単離されたＴ細胞、ならびにＣＤ１９　ＣＡＲ２－６３を形質導入した、ＰＢＭＣから単離されたＴ細胞およびＣＢから単離されたＴ細胞によるインターロイキン２（ＩＬ－２）の産生を示す。Ｔ細胞を、ＣＤ１９を発現しないＫ５６２腫瘍細胞と一緒に、ＣＤ１９を発現するように操作されたＫ５６２腫瘍細胞と一緒に、および、ＣＤ１９を発現するＲａｊｉ腫瘍細胞と一緒に、培養した。

【００４３】

【図７】図７は、形質導入していない、ＰＢＭＣから単離されたＴ細胞およびＣＢから単離されたＴ細胞、ならびにＣＤ１９　ＣＡＲ２－６３を形質導入した、ＰＢＭＣから単離されたＴ細胞およびＣＢから単離されたＴ細胞による腫瘍壊死因子アルファ（ＴＮＦα）の産生を示す。Ｔ細胞を、ＣＤ１９を発現しないＫ５６２腫瘍細胞と一緒に、ＣＤ１９を発現するように操作されたＫ５６２腫瘍細胞と一緒に、および、ＣＤ１９を発現するＲａｊｉ腫瘍細胞と一緒に、培養した。

【００４４】

【図８】図８は、ＣＤ１９　ＣＡＲ２－６３を形質導入した、ＰＢＭＣもしくは臍帯血（ＣＢ）のいずれか由来のＴ細胞、または、形質導入していない、ＰＢＭＣもしくは臍帯血（ＣＢ）のいずれか由来のＴ細胞を使用した細胞傷害アッセイの結果を提示する。形質導入していない対照およびＣＤ１９　ＣＡＲを形質導入したＴ細胞を、ＣＤ１９を発現するＫ５６２腫瘍細胞と一緒に、示されている比で、２日間インキュベートした。

【００４５】

【図９】図９は、ＣＤ１９　ＣＡＲ２－６３を形質導入した、ＰＢＭＣもしくは臍帯血（ＣＢ）のいずれか由来のＴ細胞、または、形質導入していない、ＰＢＭＣもしくは臍帯血（ＣＢ）のいずれか由来のＴ細胞を使用した細胞傷害アッセイの結果を提示する。形質導入していない対照およびＣＤ１９　ＣＡＲを形質導入したＴ細胞を、ＣＤ１９を発現するＲａｊｉ腫瘍細胞と一緒に、示されている比で、２日間インキュベートした。

【００４６】

【図１０－１】図１０は、腫瘍細胞を接種し、次いで、処置しなかったか、またはＣＤ１９　ＣＡＲ２－６３を形質導入したＴ細胞、または対照としてＣＡＲを形質導入していないＴ細胞を用いて処置したマウスのｉｎ　ｖｉｖｏイメージングを提示する。免疫無防備状態のＮＳＧマウスに、標識したＲａｊｉ（ＣＤ１９発現）腫瘍細胞を静脈内接種した。マウスを、種々の用量のＣＤ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞を用いて静脈内に処置し、その場合、Ｔ細胞は汎Ｔ細胞またはｇｄ　Ｔ細胞のいずれかであった。または、対照として、マウスを処置しなかったか、もしくはＣＤ１９　ＣＡＲ構築物を形質導入していないＴ細胞を用いて処置した。腫瘍負荷を毎週、生物発光イメージング（ＩＶＩＳ）によって評価した。Ｔ細胞で処置したマウスについて、抗ＣＤ１９－ＣＡＲ２－６３構築物を発現するＴ細胞は形質導入していないＴ細胞よりも有効な処置であり、細胞10^7個の用量で送達された抗ＣＤ１９－ＣＡＲ２－６３構築物を発現する汎Ｔ細胞で最大の利益がもたらされた。

【図１０－２】図１０は、腫瘍細胞を接種し、次いで、処置しなかったか、またはＣＤ１９　ＣＡＲ２－６３を形質導入したＴ細胞、または対照としてＣＡＲを形質導入していないＴ細胞を用いて処置したマウスのｉｎ　ｖｉｖｏイメージングを提示する。免疫無防備状態のＮＳＧマウスに、標識したＲａｊｉ（ＣＤ１９発現）腫瘍細胞を静脈内接種した。マウスを、種々の用量のＣＤ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞を用いて静脈内に処置し、その場合、Ｔ細胞は汎Ｔ細胞またはｇｄ　Ｔ細胞のいずれかであった。または、対照として、マウスを処置しなかったか、もしくはＣＤ１９　ＣＡＲ構築物を形質導入していないＴ細胞を用いて処置した。腫瘍負荷を毎週、生物発光イメージング（ＩＶＩＳ）によって評価した。Ｔ細胞で処置したマウスについて、抗ＣＤ１９－ＣＡＲ２－６３構築物を発現するＴ細胞は形質導入していないＴ細胞よりも有効な処置であり、細胞10^7個の用量で送達された抗ＣＤ１９－ＣＡＲ２－６３構築物を発現する汎Ｔ細胞で最大の利益がもたらされた。

【００４７】

【図１１－１】図１１は、腫瘍細胞を接種し、次いで、処置しなかったか、または、ＣＡ

Ｒを形質導入していないｇｄ　Ｔ細胞もしくは汎Ｔ細胞、もしくは、ＣＤ１９　ＣＡＲ２－６３を形質導入したｇｄ　Ｔ細胞もしくは汎Ｔ細胞を用いて処置したマウスのｉｎ　ｖｉｖｏイメージングに基づく腫瘍サイズのグラフを提示する。処置の経過にわたるマウスの体重変化を提示するグラフも示されている。

【図１１－２】図１１は、腫瘍細胞を接種し、次いで、処置しなかったか、または、ＣＡＲを形質導入していないｇｄ　Ｔ細胞もしくは汎Ｔ細胞、もしくは、ＣＤ１９　ＣＡＲ２－６３を形質導入したｇｄ　Ｔ細胞もしくは汎Ｔ細胞を用いて処置したマウスのｉｎ　ｖｉｖｏイメージングに基づく腫瘍サイズのグラフを提示する。処置の経過にわたるマウスの体重変化を提示するグラフも示されている。

【００４８】

【図１２－１】図１２は、腫瘍細胞を接種し、処置しなかったか、またはＣＤ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞もしくは形質導入していないＴ細胞を用いて処置したマウスの生存曲線を提示する。

【図１２－２】図１２は、腫瘍細胞を接種し、処置しなかったか、またはＣＤ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞もしくは形質導入していないＴ細胞を用いて処置したマウスの生存曲線を提示する。

【００４９】

【図１３－１】図１３は、腫瘍細胞を接種し、処置しなかったか、またはＣＤ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞もしくは形質導入していないＴ細胞を用いて処置したマウスの生存曲線を提示する。

【図１３－２】図１３は、腫瘍細胞を接種し、処置しなかったか、またはＣＤ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞もしくは形質導入していないＴ細胞を用いて処置したマウスの生存曲線を提示する。

【発明を実施するための形態】

【００５０】

詳細な説明

開示されるキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）構築物は、ＣＤ１９を発現する腫瘍細胞に優先的に結合する。配列番号１のアミノ酸配列と少なくとも９５％相同なアミノ酸配列を含む軽鎖可変（ＶＬ）ドメインと配列番号２のアミノ酸配列と少なくとも９５％相同なアミノ酸配列を含む重鎖可変（ＶＨ）ドメインとを有するｓｃＦｖ抗体をコードするＣＤ１９ＣＡＲ構築物を含む形質転換されたＴ細胞が提供される。

【００５１】

定義

別段の定義のない限り、本明細書で使用される科学技術用語は、別段の定義のない限り、当業者に一般に理解される意味を有する。一般に、本明細書に記載されてい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、トランスジェニック細胞作製、タンパク質化学および核酸化学ならびにハイブリダイゼーションの技法に関する用語法は周知であり、当技術分野で一般に使用されるものである。

【００５２】

本明細書で提供される方法および技法は、別段の指定のない限り、一般に、当技術分野で周知の従来の手順に従い、本明細書において引用および考察されている種々の一般的なおよびより詳細な参考文献に記載されている通り実施される。

【００５３】

本出願全体を通して、種々の刊行物、特許、および／または特許出願が参照されている。刊行物、特許および／または特許出願の開示は、本開示が関する技術分野の状態をより詳細に記載するために、これによりそれらの全体が参照により本出願に組み込まれる。

【００５４】

本明細書に提示される表題は、本開示の種々の態様を限定するものではなく、それら態様は、本明細書全体を参照することによって理解することができる。

【００５５】

本明細書において文脈により必要とされない限り、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。「１つの（ａ）」、「１つの（ａｎ）」および「その（ｔｈｅ）」という単数形、ならびに任意の単語の単数での使用は、明白にかつ明確に１つの指示対象に限定される場合を除き、複数の指示対象を包含する。

【００５６】

選択肢（例えば、「または（ｏｒ）」）の使用は、本明細書では選択肢の１つもしくは両方、またはそれらの任意の組合せを意味すると解釈されることが理解される。

【００５７】

本明細書で使用される「および／または」という用語は、指定の特色または構成成分のそれぞれの、他の特色または構成成分を伴うまたは伴わない特定の開示を意味するとみなされるべきである。例えば、「および／または」という語は、本明細書において「ＡおよびＢ」などの句で使用される場合、「ＡおよびＢ」、「ＡまたはＢ」、「Ａ」（単独）、および「Ｂ」（単独）を含むものとする。同様に、「および／または」という語は、「Ａ、Ｂ、および／またはＣ」などの句で使用される場合、以下の態様：Ａ、Ｂ、およびＣ；Ａ、Ｂ、またはＣ；ＡまたはＣ；ＡまたはＢ；ＢまたはＣ；ＡおよびＣ；ＡおよびＢ；ＢおよびＣ；Ａ（単独）；Ｂ（単独）；およびＣ（単独）のそれぞれを包含することが意図されている。

【００５８】

本明細書で使用される場合、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」、「有する（ｈａｖｉｎｇ）」および「含有する（ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ）」という用語およびそれらの文法上の変形は、本明細書で使用される場合、非限定的であることが意図されており、したがって、一覧中の１つの項目または複数の項目により他の項目は排除されず、列挙された項目の置換または列挙された項目への追加を行うことができる。態様が本明細書において「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」という語と共に記載されている場合はいつでも、「からなる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｏｆ）」および／または「から本質的になる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ）」という用語で記載される他の点では類似の態様も提供されることが理解される。

【００５９】

「約」または「およそ」という用語は、当業者によって決定される特定の値についての許容される誤差を意味し、この誤差は、その値の測定または決定の仕方に一部依存する。例えば、「約」または「およそ」という用語は、所与の値または範囲の３０％以内、２５％以内、２０％以内、１５％以内、１０％以内、９％以内、８％以内、７％以内、６％以内、５％以内、４％以内、３％以内、２％以内、１％以内、０．５％以内、０．１％以内、または０．０５％以内を意味する。

【００６０】

「単離された」という用語は、他の細胞材料を実質的に含まないタンパク質（例えば、抗体）またはポリヌクレオチドを指す。タンパク質を、当技術分野で周知のタンパク質精製技法を使用して単離することにより、天然に付随する構成成分（または抗体を産生させるために使用される細胞の発現系に付随する構成成分）を実質的に含まないものにすることができる。単離された細胞は、それらのｉｎ　ｖｉｖｏにおける細胞の環境から取り出されたものであり、例えば、ｉｎ　ｖｉｖｏでは付随していた組織（例えば、血液、腫瘍）にもはや付随しておらず、ｉｎ　ｖｉｖｏでは付随していた組織に存在する他の細胞型から部分的にもしくは実質的に単離された、またはそれらに対して富化されたものであり得る。種々の実施形態では、ＣＤ１９キメラ抗原受容体をコードする本開示の構築物、またはＣＤ１９キメラ抗原受容体をコードする開示される構築物を含むおよび／または発現する宿主細胞は、単離されたものである。

【００６１】

「核酸」、「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」という用語は互換的に使用され、ヌクレオチドのポリマーを指す。核酸は、天然に存在する形態および組換え形態を包含する。核酸は、ＤＮＡ分子（ｃＤＮＡまたはゲノムＤＮＡ）、ＲＮＡ分子（例え

ば、ｍＲＮＡ）、ヌクレオチド類似体（例えば、ペプチド核酸および天然に存在しないヌクレオチド類似体）を使用して生成されるＤＮＡまたはＲＮＡの類似体、およびこれらのハイブリッドを包含する。核酸分子は、一本鎖または二本鎖であり得る。一実施形態では、本開示の核酸分子は、抗体、またはその断片もしくはｓｃＦｖ、誘導体、変異タンパク質、もしくはバリアントをコードする連続したオープンリーディングフレームを含む。

【００６２】

「ペプチド」、「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、互換的に使用され、アミノ酸のポリマーを指し、いかなる特定の長さにも限定されない。ポリペプチドは、天然アミノ酸および非天然アミノ酸を含む。ポリペプチドは、天然に存在する形態または組換え形態であり得る。これらの用語は、ネイティブなおよび人工的なタンパク質、タンパク質断片およびタンパク質配列のポリペプチド類似体（例えば、変異タンパク質、バリアント、キメラタンパク質および融合タンパク質など）、ならびに、翻訳後にまたは他の方法で共有結合的にまたは非共有結合的に修飾されたタンパク質を包含する。ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質は、単量体またはポリマーであり得る。ポリペプチドは、抗体、抗体鎖、ｓｃＦｖおよびキメラ抗原受容体構築物を包含する。

【００６３】

「パーセント同一性」または「パーセント相同性」は、２つのポリペプチド間または２つのポリヌクレオチド配列間の類似性の定量的測定値を指す。２つのポリペプチド配列間のパーセント同一性は、２つのポリペプチド配列のアラインメントを最適化するために導入する必要があり得るギャップの数、および各ギャップの長さを考慮に入れた、アラインメントされた位置において２つのポリペプチド配列間で共有される同一のアミノ酸の数の関数である。同様に、２つのポリヌクレオチド配列間のパーセント同一性は、２つのポリヌクレオチド配列のアラインメントを最適化するために導入する必要があり得るギャップの数、および各ギャップの長さを考慮に入れた、アラインメントされた位置において２つのポリヌクレオチド配列間で共有される同一のヌクレオチドの数の関数である。２つのポリペプチド配列間または２つのポリヌクレオチド配列間の配列の比較およびパーセント同一性の決定は、数学的アルゴリズムを使用して実現することができる。例えば、２つのポリペプチドまたは２つのポリヌクレオチド配列の「パーセント同一性」または「パーセント相同性」を、ＧＡＰコンピュータプログラム（ＧＣＧ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｐａｃｋａｇｅ、バージョン１０．３（Ａｃｃｅｌｒｙｓ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、Ｃａｌｉｆ．）の一部）を使用し、そのデフォルトパラメータを使用して配列を比較することによって決定することができる。

【００６４】

「キメラ抗原受容体」または「ＣＡＲ」という用語は、免疫細胞を活性化または刺激することが可能な細胞内シグナル伝達ドメインに融合される細胞外抗原結合性タンパク質、好ましくは、モノクローナル抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域を融合することによって引き出される単鎖可変断片（ｓｃＦｖまたはｓＦｖ）を含む、融合タンパク質を記載するものである。あるいは、Ｆａｂに由来するｓｃＦｖ（抗体由来ではなく、例えば、Ｆａｂライブラリーから得たもの）を使用することができる。ＣＤ１９に特異的に結合する標的化部分を含むＣＤ１９　ＣＡＲが本明細書に開示される。

【００６５】

「抗体」という用語は、４つのポリペプチド鎖、２つの重（Ｈ）鎖および２つの軽（Ｌ）鎖で構成される免疫グロブリン（Ｉｇ）分子、またはＩｇ分子の必須のエピトープ結合特色を保持する任意のその機能性断片、変異体、バリアント、もしくは誘導体を記載するものである。抗体という用語は、例えば、単鎖可変断片抗体（ｓｃＦｖ）を包含する。

【００６６】

「抗ＣＤ１９抗体」および「ＣＤ１９に結合する抗体」という用語は、ＣＤ１９に特異的に結合することが可能な抗体を指す。

【００６７】

「単鎖抗体」または「ｓｃＦｖ」または「単鎖可変断片［抗体］」は、V_L領域とV_H

領域がリンカー（例えば、アミノ酸残基の合成配列）を介して接合して、連続的なタンパク質鎖を形成した、抗体である。一実施形態では、リンカーは、タンパク質鎖自体を折り返して一価抗原結合性部位を形成するために十分に長いものである（例えば、Bird et al., 1988, Science 242: 423-26およびHuston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-83を参照されたい）。

【００６８】

Ｆａｂ断片は、V_L、V_H、C_LおよびC_{H1}ドメインを有する一価断片である；Ｆ（ａｂ’）$_2$断片は、ヒンジ領域においてジスルフィド架橋によって連結した２つのＦａｂ断片を有する二価断片である；Ｆｄ断片は、V_HおよびC_{H1}ドメインを有する；Ｆｖ断片は、抗体の単一アームのV_LおよびV_Hドメインを有する；ｄＡｂ断片は、V_Hドメイン、V_Lドメイン、またはV_HもしくはV_Lドメインの抗原結合性断片を有する（米国特許第６，８４６，６３４号および同第６，６９６，２４５号）。

【００６９】

「ヒンジ」という用語は、一般にタンパク質の２つのドメイン間に見いだされ、構築物全体の柔軟性およびドメインの片方または両方の互いに対する移動を可能にし得る、アミノ酸セグメントを指す。構造的に、ヒンジ領域は、一般には、約８アミノ酸から約１００アミノ酸まで、例えば、約９アミノ酸から約７５アミノ酸まで、約１０アミノ酸から約７０アミノ酸まで、または約２０アミノ酸から約６５アミノ酸までを含む。種々の実施形態では、ヒンジ領域は、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、または１００アミノ酸長である。ＣＡＲのヒンジ領域は、天然に存在するタンパク質のヒンジ領域に由来するもの、例えば、ＣＤ８ヒンジ領域、ＣＤ８αヒンジ領域、ＣＤ２８ヒンジ領域、ＣＤ３ζヒンジ領域、ＣＤ４ヒンジ領域、抗体（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＭ、ＩｇＥ、もしくはＩｇＤ抗体）のヒンジ領域、または抗体もしくは任意のその断片の定常ドメインＣＨ１とＣＨ２を接合するヒンジ領域などであってよい。ヒンジ領域は、免疫グロブリンスーパーファミリーメンバーまたは抗体に由来するものであってよく、抗体の１つまたは複数の定常領域を含んでもよく、含まなくてもよい。ヒンジ領域は、抗体のヒンジ領域および抗体のＣＨ３定常領域を含んでもよく、ヒンジ領域は、抗体のヒンジ領域ならびに抗体のＣＨ２およびＣＨ３定常領域を含んでもよい。ヒンジ領域はまた、天然に存在しないペプチドであってもよい。ヒンジ領域は、ＣＡＲのｓｃＦｖ部分のＣ末端とＣＡＲの膜貫通ドメインのＮ末端の間に位置付けることができる。一部の実施形態では、ヒンジ領域は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３またはＩｇＧ４免疫グロブリン分子由来の上部、中心部、または下部ヒンジ配列を含む２つまたはそれよりも多くの領域のうちの任意の１つまたは任意の組合せを含む。一部の実施形態では、ヒンジ領域は、ＩｇＧ１上部ヒンジ配列ＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴ（配列番号１７）を含む。一部の実施形態では、ヒンジ領域は、ＩｇＧ１中心部ヒンジ配列ＣＰ<u>Ｘ</u>Ｃを含み、ここで、<u>Ｘ</u>は、Ｐ、ＲまたはＳである。一部の実施形態では、ヒンジ領域は、下部ヒンジ／ＣＨ２配列ＰＡＰＥＬＬＧＧＰ（配列番号１８）を含む。一部の実施形態では、ヒンジは、アミノ酸配列ＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴ（配列番号１９）を有するＦｃ領域（ＣＨ２）と接合している。一実施形態では、ヒンジ領域は、上部、中心部および下部ヒンジのアミノ酸配列を含み、ＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰ（配列番号２０）を含む。一部の実施形態では、ヒンジ領域は、少なくとも１つ、２つ、３つまたはそれよりも多くの鎖間ジスルフィド結合を形成し得る１つ、２つ、３つまたはそれよりも多くのシステインを含む。

【００７０】

「ベクター」は、外来遺伝子材料（例えば、核酸導入遺伝子）に作動可能に連結することができる核酸分子（例えば、ＤＮＡまたはＲＮＡ）を指す。ベクターは、一本鎖または二本鎖核酸分子であり得る。ベクターは、直鎖状または環状核酸分子であり得る。ベクターをビヒクルとして使用して、外来遺伝子材料を細胞（例えば、宿主細胞）に導入することができる。ベクターの１つの型は「プラスミド」であり、これは、導入遺伝子と連結す

ることができ、宿主細胞において導入遺伝子を複製し、その導入遺伝子を転写および翻訳することが可能な直鎖状または環状二本鎖染色体外ＤＮＡ分子を指す。ウイルスベクターは、一般には、導入遺伝子と連結することができるウイルスＲＮＡまたはＤＮＡ骨格配列を含有する。ウイルス骨格配列を、感染は無効になるが、ウイルス骨格および共連結された導入遺伝子の宿主細胞のゲノムへの挿入は保持するように改変することができる。ウイルスベクターの例としては、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターおよびアデノウイルスベクターが挙げられる。ある特定のベクターは、それらが導入された宿主細胞において自律複製することが可能である（例えば、細菌複製起点を含む細菌ベクターおよびエピソーム哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター）は、宿主細胞に導入されると宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それにより、宿主ゲノムと一緒に複製される。「発現ベクター」は、ベクターのひとつの型であり、宿主細胞に形質導入される、発現ベクターと連結した導入遺伝子の転写、または転写および翻訳を誘導する１つまたは複数の調節配列、例えば、誘導性および／もしくは構成的プロモーター、またはリボソーム結合性部位を含有し得る。

【００７１】

導入遺伝子とベクターの間に、ベクターに含有されるベクター配列の機能または発現を可能にする連結が存在する場合、導入遺伝子はそのベクターに「作動可能に連結」している。ベクター配列は、複製起点配列、誘導性プロモーターもしくは構成的プロモーターまたはエンハンサー配列、少なくとも１つの選択マーカー配列、５’および３’ＬＴＲ配列、ならびに必要に応じてウイルスｅｎｖ、ｐｏｌおよび／もしくはｇａｇ配列のうちの任意の１つまたは任意の組合せであり得る。

【００７２】

調節配列が導入遺伝子の発現（例えば、発現のレベル、タイミング、または位置）に影響を及ぼす場合、導入遺伝子はその調節配列に「作動可能に連結」している。「調節配列」は、それが作動可能に連結している導入遺伝子の発現（例えば、発現のレベル、タイミング、または位置）に影響を及ぼす核酸配列である。調節配列は、例えば、その効果を、調節される核酸に対して直接、または１つもしくは複数の他の分子（例えば、調節配列および／もしくは核酸に結合するポリペプチド）の作用を通じて発揮し得る。調節配列は、ベクターの一部であり得る。調節配列の例としては、プロモーター、エンハンサー、リボソーム結合性部位および他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）が挙げられる。調節配列のさらなる例は、例えば、Goeddel, 1990, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. and Baron et al., 1995, Nucleic Acids Res. 23: 3605-3606に記載されている。

【００７３】

「宿主細胞」または「または宿主細胞の集団」は、外来（外因性）核酸が導入されている細胞（またはその集団）を指す。外来核酸は、導入遺伝子と作動可能に連結した発現ベクターを含み得、宿主細胞を使用して、外来核酸（導入遺伝子）を発現させることができる。一実施例では、宿主細胞（またはその集団）に、本明細書に記載のキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードする核酸と作動可能に連結した発現ベクターを導入することができる。宿主細胞（またはその集団）は、培養された細胞であってもよく、対象から抽出することもできる。宿主細胞（またはその集団）は、対象の初代細胞および継代数にかかわらずその子孫を包含する。子孫細胞は、親細胞と比較して同一の遺伝子材料を有する場合もあり有さない場合もある。宿主細胞は子孫細胞を包含する。

【００７４】

宿主細胞は、原核細胞、例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞であり得る、または、宿主細胞は、真核細胞、例えば、単細胞真核生物（例えば、酵母もしくは他の真菌）、植物細胞（例えば、タバコもしくはトマト植物細胞）、動物細胞（例えば、ヒト細胞、サル細胞、ハムスター細胞、ラット細胞、マウス細胞、もしくは昆虫細胞）またはハイブリドーマであり得る。宿主細胞の例としては、ＲＰＭＩ８２２６（Gentry et al., 2004 Leuk. Re

s. 28 (3): 307-313）、およびヒト慢性骨髄性白血病細胞株Ｋ５６２が挙げられる。他の例としては、サル腎臓細胞のＣＯＳ－７株（ＡＴＣＣ ＣＲＬ １６５１）（Gluzman et al., 1981, Cell 23: 175）、Ｌ細胞、Ｃ１２７細胞、３Ｔ３細胞（ＡＴＣＣ ＣＣＬ １６３）、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞もしくはＶｅｇｇｉｅ ＣＨＯおよび無血清培地で成長する関連する細胞株（Rasmussen et al., 1998, Cytotechnology 28: 31）もしくはＤＨＦＲが欠損しているＣＨＯ ＤＸ－Ｂ１１株（Urlaub et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-20）などのそれらの誘導体、ＨｅＬａ細胞、ＢＨＫ（ＡＴＣＣ ＣＲＬ １０）細胞株、アフリカミドリザル腎細胞株ＣＶ１（ＡＴＣＣ ＣＣＬ ７０）に由来するＣＶ１／ＥＢＮＡ細胞株（McMahan et al., 1991, EMBO J. 10:2821）、２９３、２９３ ＥＢＮＡもしくはＭＳＲ ２９３などのヒト胎児由来腎臓細胞、ヒト表皮Ａ４３１細胞、ヒトＣｏｌｏ２０５細胞、他の形質転換された霊長類細胞株、正常二倍体細胞、初代組織、初代外植片のｉｎ ｖｉｔｒｏ培養に由来する細胞株、ＨＬ－６０、Ｕ９３７、ＨａＫまたはジャーカット細胞が挙げられる。一実施形態では、宿主細胞は、哺乳動物宿主細胞、例えば、ヒト宿主細胞である。一般には、宿主細胞は、外因性ポリペプチドコード核酸を導入することができる初代細胞または培養された細胞であり、次いで、その核酸を宿主細胞において発現させることができる。宿主細胞という用語は、特定の対象の細胞を指し、また、そのような細胞の子孫または潜在的な子孫も指すことが理解される。次世代において、例えば変異または環境の影響に起因してある特定の改変が生じる可能性があるので、そのような子孫は、実際には、親細胞と同一ではない可能性があるが、それでも、本明細書で使用されるこの用語の範囲に包含される。

【００７５】

宿主細胞は、本明細書に開示される抗ＣＤ１９－ＣＡＲ構築物を発現する任意の方法で改変、トランスフェクト、形質導入、形質転換、および／または操作された任意の細胞（その子孫を含む）を記載するものである。宿主細胞は、ヒトＴ細胞、胎盤細胞またはＮＫ細胞であることが好ましい。

【００７６】

「汎Ｔ細胞」は、Ｔ細胞型によって選択されたものではなく、それらを得た生体試料のＴ細胞型の全てを含むＴ細胞の集団を指し、例えば、汎Ｔ細胞は、ＣＤ４＋「ヘルパー」Ｔ細胞、ＣＤ４＋ＣＤ２５＋調節性Ｔ細胞、ＣＤ８＋細胞傷害性Ｔ細胞、ガンマデルタ（γδまたはｇｄ）Ｔ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）Ｔ細胞、および「ダブルネガティブ」Ｔ細胞を含み得る。生物学的供給源は、非限定的な例として、末梢血、ＰＢＭＣ、臍帯血（ＣＢ）、または胎盤血であり得る。

【００７７】

本明細書で使用される場合、「同種異系」は、材料が導入される個体と同じ種の異なる個体に由来する任意の材料（例えば、細胞など）を指す。２個体またはそれよりも多くの個体は、１つまたは複数の遺伝子座において遺伝子が同一でない場合、互いに同種異系であると言える。

【００７８】

「トランスフェクトされた（ｔｒａｎｓｆｅｃｔｅｄ）」または「形質転換された（ｔｒａｎｓｆｏｒｍｅｄ）」または「形質導入された（ｔｒａｎｓｄｕｓｅｄ）」という用語は、外因性核酸（例えば、導入遺伝子）が宿主細胞に移入または導入されるプロセスを指す。「形質導入された」という用語は、ウイルスベクターによって、例えば宿主細胞へのウイルス感染によって核酸を宿主細胞に導入することを指すために使用される。「トランスフェクト」、「形質転換」または「形質導入」された宿主細胞は、外因性核酸がトランスフェクト、形質転換、もしくは形質導入された細胞である、または直接形質転換、トランスフェクト、もしくは形質導入された細胞の子孫である。

【００７９】

ＣＤ１９キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）構築物をコードする開示される核酸配列などの導入遺伝子を、導入遺伝子を宿主細胞に導入するためにビヒクルとして使用されるウイルス

ベクターを含むベクターに作動可能に連結することができる。宿主細胞に導入される（例えば、形質導入、トランスフェクションまたは形質転換によって）導入遺伝子を、一過性に導入することもでき、好ましくは宿主細胞のゲノムに安定に組み込むこともできる。宿主細胞に導入される導入遺伝子を子孫細胞において増やすことができる。ベクターは、一本鎖または二本鎖ＤＮＡまたはＲＮＡベクターであり得る。ベクターには、宿主細胞における導入遺伝子の発現を誘導する発現ベクターが含まれる。適切なベクターとしては、複製起点配列、誘導性プロモーターまたは構成的プロモーター配列、および少なくとも１つの選択マーカー配列を含有し得る発現ベクターが挙げられ、その場合、これらの配列は、パッケージング細胞および／または宿主細胞において機能的なものである。導入遺伝子を宿主細胞に導入するために使用されるウイルスベクターとしては、レトロウイルスおよびレンチウイルスベクターを含むレトロウイルス科に由来するベクターが挙げられる。レトロウイルスベクターは、分裂している宿主細胞への形質導入に使用することができ、レンチウイルスベクターは、分裂していない宿主細胞への形質導入に使用することができる。発現ベクターと連結した所望の導入遺伝子が形質導入される宿主細胞としては、Ｔ細胞、胎盤由来ナチュラルキラー宿主細胞、および臍帯血由来ナチュラルキラー宿主細胞が挙げられる。

【００８０】

レトロウイルスベクターは、任意のトリまたは哺乳動物供給源に由来するものであってよい。レトロウイルスベクターは、マウス、ラットおよびヒトを含むいくつかの異なる種の宿主細胞に感染することが可能なもの（例えば、両種指向性）であってもよく、宿主域が限定されたもの（例えば、狭宿主性）であってもよい。レトロウイルスベクターは、モロニーマウス白血病ウイルス（ＭｏＭＬＶ）（例えば、ＭＦＧベクターまたはその誘導体、Riviere et al. (1995) Proc. Nat'l. Acad. of Sci. USA 92: 6733-6737）、骨髄増殖性肉腫ウイルス（ＭＰＳＶ）、マウス胚性幹細胞ウイルス（ＭＥＳＶ）、マウス幹細胞ウイルス（ＭＳＣＶ）、脾フォーカス形成ウイルス（ＳＦＦＶ）に由来するものであってよい。

【００８１】

典型的な第１世代レトロウイルス移入ベクター（例えば、ガンマレトロウイルスベクター）系では、レトロウイルスｇａｇ、ｐｏｌおよびｅｎｖをコードする配列を所望の導入遺伝子で置き換えることができ、導入遺伝子の両側にシス作用性の末端反復（ＬＴＲ）配列を隣接させることができる。ｇａｇおよびｐｏｌ配列をパッケージングプラスミドに保有させることができ、ｅｎｖ配列を別々にエンベローププラスミドに保有させることができ、これらの３種のウイルス配列の発現をトランスに作用させる。移入ベクター（導入遺伝子を含有する）をパッケージングおよびエンベローププラスミドと一緒に、トランスフェクション試薬の存在下でパッケージング細胞と反応させて、ベクターおよびプラスミドをパッケージング細胞に形質導入する。形質導入されたパッケージング細胞により、導入遺伝子を有する移入ベクターを有する感染性ビリオンを含有する細胞培養上清が産生される。宿主細胞をこのビリオン上清と反応させることにより、形質導入された宿主細胞を生成する。形質導入時に、レトロウイルス移入ベクター（導入遺伝子を有する）が宿主細胞のゲノムに組み込まれる（Morgan and Boyerinas 2016 Biomedicines 4 (2): 9 "Review: Genetic Modification of T Cells"）。レトロウイルス移入ベクターは、導入遺伝子の誘導性または構成的転写を誘導するプロモーターも含有し得る。第２世代レトロウイルスベクター系は、一般には、パッケージング細胞株において安定に発現されるｇａｇ、ｐｏｌおよびｅｎｖ配列を含み、したがって、別々のパッケージングおよびエンベローププラスミドが不必要になる。パッケージング細胞株をパッケージングベクター（導入遺伝子を有する）と反応させて、形質導入されたパッケージング細胞およびビリオン上清を生成する。第２世代レトロウイルス系の例はＰｈｏｅｎｉｘヘルパーフリーレトロウイルスパッケージング細胞株である。宿主細胞への形質導入にレトロウイルスベクターが使用される（ＷＯ２０１４／０５５６６８）。

【００８２】

ＨＩＶ、ＳＩＶまたはＦＩＶに由来するレンチウイルスベクターを使用して、導入遺伝子を宿主細胞に導入することができる。いくつかの世代のレンチウイルスベクターが開発されている。第１世代レンチウイルス系は、移入ベクター（導入遺伝子を有する）、パッケージングプラスミド（ｇａｇ、ｐｏｌ、ｔａｔ、ｒｅｖおよびアクセサリー配列を有する）、およびエンベローププラスミド（異種ｅｎｖ配列を有する）を使用するという点で、第１世代レトロウイルス系と同様である。第２世代レンチウイルス系では、移入ベクター（導入遺伝子）、パッケージングプラスミド（ｇａｇ、ｐｏｌ、ｔａｔおよびｒｅｖ、アクセサリー配列は取り除かれる）、ならびにエンベローププラスミド（異種ｅｎｖ配列を有する）を使用する。第３世代レンチウイルス系は、時には自己不活化（ＳＩＮ）系と称され、移入ベクター（導入遺伝子およびｔａｔが取り除かれた３’ＬＴＲ）、第１のパッケージングプラスミド（ｇａｇおよびｐｏｌ）、第２のパッケージングプラスミド（ｒｅｖ）、およびエンベローププラスミド（異種ｅｎｖ配列を有する）を使用するものである。レトロウイルス系と同様に、これらのレンチウイルス系はいずれも、ベクター／プラスミドをパッケージング細胞および形質導入試薬と反応させて、ビリオンを含有する細胞培養上清を産生させ、次いでそれを使用して宿主細胞への形質導入を行うことを伴う。レンチウイルスベクターを使用して宿主細胞への形質導入を行う（ＷＯ２０１２／０３１７４４；米国特許第８，８０２，３７４号；およびＵ．Ｓ．２０１６／０１５２７２３）。

【００８３】

導入遺伝子を宿主細胞に導入するために使用される他のウイルスベクターとしては、シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）、単純ヘルペスウイルス１、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）およびラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）が挙げられる（Gross 1989 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10024-10028）。

【００８４】

発現ベクターは、一般には、導入遺伝子が導入されるパッケージング細胞および／または宿主細胞における誘導性または構成的発現（例えば、転写）を誘導するプロモーターおよび／またはエンハンサー配列を含む。構成的プロモーターとしては、レトロウイルスＬＴＲ、最初期サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター、伸長増殖因子１アルファ（ＥＦ－１α）、シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）初期プロモーター、マウス乳房腫瘍ウイルス（ＭＭＴＶ）プロモーター、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）末端反復（ＬＴＲ）プロモーター、モロニーマウス白血病ウイルス（ＭｏＭｕＬＶ）ＬＴＲプロモーター、トリ白血病ウイルスプロモーター、エプスタイン・バーウイルス最初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、ＰＧＫ（ホスホグリセリン酸キナーゼ）、ＵｂＣ（ユビキチンＣ）、ＭＬＶ（モロニー白血病ウイルス）およびＣＡＧ（サイトメガロウイルス初期エンハンサーエレメント、ニワトリベータアクチンの第１のエクソンおよびイントロン由来のプロモーター、およびウサギベータ－グロビンのスプライスアクセプター）エンハンサー配列が挙げられる。誘導性プロモーター配列としては、テトラサイクリンオペレーター（ＴｅｔＯ）部位（Sakemura 2016 Cancer Immunology Research 4 (8): 658-668）およびＥ．ｃｏｌｉ由来のｌａｃリプレッサー系が挙げられる。レンチウイルスベクターからの高発現に適したプロモーターとしては、ヒトユビキチン、ＭＨＣクラスＩ、ＭＨＣクラスＩＩ、およびβ２ミクログロブリンプロモーターが挙げられる（ＷＯ２０１６／０１２６２３）。レトロウイルスおよびレンチウイルス発現ベクターは、Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｍａｔｅｒｉａｌｓ（ＡＢＭ）（Ｖａｎｃｏｕｖｅｒ、Ｃａｎａｄａ）およびＡｄｄｇｅｎｅ（Ｗａｔｅｒｔｏｗｎ、Ｍａｓｓａｃｈｕｓｅｔｔｓ）を含むいくつかの供給源から市販されている。

【００８５】

「標的細胞」という用語は、細胞を抗体または抗体誘導体によって認識できるものにする１つまたは複数の標的ポリペプチドを発現する細胞である。一実施形態では、標的細胞には、本開示のキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）構築物による結合のために認識されるＣＤ１９ポリペプチドを発現するがん（腫瘍）標的細胞が含まれる。

【００８６】

ＣＤ１９キメラ抗原受容体（ＣＤ１９　ＣＡＲ）

本開示は、第２世代ＣＡＲ構築物足場に抗ＣＤ１９抗体を含み、一般に、異なる構成成分である膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインを伴う、新しいＣＡＲ構築物について記載するものである。本開示は、汎Ｔ細胞、胎盤組織または臍帯血から単離されたＴ細胞、またはガンマデルタ（ｇｄ）Ｔ細胞を含むＴ細胞への形質導入のための、ＣＤ１９　ＣＡＲによりＴ細胞がＣＤ１９を発現する腫瘍細胞に誘導される、ＣＤ１９　ＣＡＲをコードする核酸配列を提供する。

【００８７】

ＣＡＲは、一般に、抗体の抗原認識ドメインとＴ細胞由来の受容体のシグナル伝達ドメインを接合することによって構築される。ＣＡＲ構築物は、一般には、細胞外領域、例えば、がん細胞上に存在する抗原（例えば、ＣＤ１９など）を認識する抗体の単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）をコードする配列、細胞内領域、例えば、ＴＣＲ活性化を模倣する（ＴＣＲ）ゼータ鎖などのＴ細胞受容体をコードする配列、および共刺激を模倣するためのＣＤ２８または４－ＡＢＢに由来する少なくとも１つのシグナル伝達ドメインをコードする配列を含有する。Ｔ細胞を、ＣＡＲをコードする核酸配列を用いて改変することにより、Ｔ細胞が、再標的化された抗体型抗腫瘍細胞傷害を備えたものになる。死滅はＭＨＣにより制限されるものではないので、この手法により、同じ抗原を有する全ての患者に対する一般的な療法がもたらされる。ＣＡＲを用いて操作されたこれらのＴ細胞は、多くの場合、「ＣＡＲ－Ｔ細胞」、「デザイナーＴ細胞」、または「Ｔ－ボディ」と称される（Eshhar et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (2): 720-724, 1993；Ma et al., Cancer Chemother. Bio. l Response Modif. 20: 315-341, 2002）。

【００８８】

抗ＣＤ１９抗体軽鎖は、配列番号１のアミノ酸配列または配列番号１に対して少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含み得、重鎖は、配列番号２のアミノ酸配列または配列番号２に対して少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。抗ＣＤ１９　ｓｃＦｖ抗体は、配列番号１２のアミノ酸配列または配列番号１２に対して少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。

【００８９】

開示されるＣＤ１９　ＣＡＲは、ＣＤ８ヒンジ領域（例えば、配列番号４）、配列番号４に対して少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、もしくは９９％の同一性を有する配列、または配列番号４の機能性断片を含むことが好ましいヒンジ領域をさらに含む。開示されるＣＤ１９　ＣＡＲは、さらなる細胞外ドメイン、好ましくはＣＤ２８細胞外ドメインまたはヒンジ領域（配列番号５）、配列番号５に対して少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するヒンジ領域、またはその機能性断片をさらに含むことが好ましい。ヒンジ領域全体は、少なくとも６５、７０、７５、８０、または８５アミノ酸の長さを有し得、また、配列番号１３に対して少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有し得る。

【００９０】

開示されるＣＤ１９　ＣＡＲは、膜貫通ドメイン、好ましくは、Ｔ細胞受容体のアルファ鎖、Ｔ細胞受容体のベータ鎖、Ｔ細胞受容体のゼータ鎖、ＣＤ２８、ＣＤ３イプシロン、ＣＤ４５、ＣＤ４、ＣＤ５、ＣＤ８、ＣＤ９、ＣＤ１６、ＣＤ２２、ＣＤ３３、ＣＤ３７、ＣＤ６４、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ１３４、ＣＤ１３７、ＣＤ１５４、ＬＦＡ－１Ｔ細胞補助受容体、ＣＤ２　Ｔ細胞補助受容体／接着分子、ＣＤ８アルファ、およびこれらの組合せからなる群より選択されるタンパク質の膜貫通ドメイン由来の膜貫通ドメインをさらに含む。膜貫通ドメインは、ＣＤ２８膜貫通ドメイン（配列番号６）、またはその機能性断片由来であることが好ましい。

【００９１】

開示されるＣＤ１９　ＣＡＲは、ＣＤ３－ゼータ鎖、４－１ＢＢ、ＣＤ２８、およびこ

れらの組合せからなる群よりのシグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインをさらに含む。シグナル伝達ドメインが２つ存在する場合、第２のシグナル伝達ドメインは、共刺激シグナル伝達ドメインと称される。共刺激シグナル伝達ドメインは、これだけに限定されないが、以下のタンパク質：ＣＤ２７、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、ＯＸ４０、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＰＤ－１、ＩＣＯＳ、リンパ球機能関連抗原－１（ＬＦＡ－１）、ＣＤ２、ＣＤ７、ＬＩＧＨＴ、ＮＫＧ２Ｃ、Ｂ７－Ｈ３、ＣＤ８３リガンド、およびこれらの任意の組合せの細胞内ドメイン、またはその断片を含むことが好ましい。一部の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ２８シグナル伝達ドメインを含む。さらなる実施形態では、ＣＤ２８シグナル伝達ドメインは、配列番号７のアミノ酸配列、またはその機能性断片を含む。一部の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ３－ζシグナル伝達ドメインを含む。さらなる実施形態では、ＣＤ３－ζシグナル伝達ドメインは、配列番号８のアミノ酸配列、またはその機能性断片を含む。

【００９２】

したがって、本開示は、開示されるＣＤ１９　ＣＡＲ構築物をコードする配列を含む単離された核酸分子を包含する。アミノ酸配列が記載される場合、そのアミノ酸配列をコードする核酸配列も包含されることに留意するべきである。

【００９３】

１．細胞外抗ＣＤ１９結合性タンパク質

本開示は、ＣＤ１９に結合する抗原結合性タンパク質を含むＣＤ１９　ＣＡＲであって、抗原結合性タンパク質が、配列番号１のアミノ酸配列と少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変（ＶＬ）ドメインを含む、ＣＤ１９　ＣＡＲを提供する。ＶＬドメインは配列番号１のアミノ酸配列と少なくとも９６％相同なアミノ酸配列を含む、またはＶＬドメインは配列番号１のアミノ酸配列と少なくとも９７％同一のアミノ酸配列を含む、またはＶＬドメインは配列番号１のアミノ酸配列と少なくとも９８％同一のアミノ酸配列を含む、またはＶＬドメインは配列番号１のアミノ酸配列と少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含むことが好ましい。

【００９４】

ＶＬドメインとＶＨドメインは、ｓｃＦｖにおいて、これだけに限定されないが、例えば、１つから８つの間のG_4Sの反復単位を有し得るＧＳ（G_4S）リンカーなどのリンカーによって接合していてよい。一部の実施例では、リンカーは、３つのG_4S単位を有する。

【００９５】

さらに、本開示は、ＣＤ１９に結合する抗原結合性タンパク質を含むＣＡＲであって、抗原結合性タンパク質が、配列番号２のアミノ酸配列と少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変（ＶＨ）ドメインを含む、または、ＶＨドメインが、配列番号２のアミノ酸配列と少なくとも９６％同一のアミノ酸配列を含む、または、ＶＨドメインが、配列番号２のアミノ酸配列と少なくとも９７％同一のアミノ酸配列を含む、または、ＶＨドメインが、２を含む、または、ＶＨドメインが、配列番号２のアミノ酸配列と少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む、ＣＡＲを提供する。一部の好ましい実施形態では、開示されるＣＤ１９　ＣＡＲは、配列番号１のアミノ酸配列を含む可変ドメインを有する軽鎖と、配列番号２のアミノ酸配列を含む可変ドメインを有する重鎖とを含むｓｃＦｖを含む。

【００９６】

本明細書に提示される一部の実施形態では、ＣＤ１９　ＣＡＲは、バリアントＣＡＲが配列番号１４と少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を含む限りは、本明細書に記載のＣＡＲ構築物のアミノ酸配列と比較して、アミノ酸置換、欠失および／または挿入を含む１つまたは複数の変動を有する。

【００９７】

開示されるＣＤ１９　ＣＡＲは、配列番号１のアミノ酸配列を含む可変ドメインを有する軽鎖と、配列番号２のアミノ酸配列を含む可変ドメインを有する重鎖とを含むｓｃＦｖ

を含むことが好ましい。

【００９８】

単鎖抗体は、重鎖および軽鎖可変ドメイン（Ｆｖ領域）断片をアミノ酸架橋（短いペプチドリンカー）によって連結し、それにより、単一のポリペプチド鎖をもたらすことによって形成することができる。そのような単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）は、２つの可変ドメインポリペプチド（ＶＬおよびＶＨ）をコードするＤＮＡ間にペプチドリンカーをコードするＤＮＡを融合することによって調製されている。得られるポリペプチドは、それ自体が折り返されて、抗原結合性単量体が形成され得る、または、２つの可変ドメイン間の柔軟なリンカーの長さに応じて多量体（例えば、二量体、三量体、または四量体）を形成し得る（Kortt et al., 1997, Prot. Eng. 10: 423；Kortt et al., 2001, Biomol. Eng. 18: 95-108）。異なるＶＬを含むポリペプチドとＶＨを含むポリペプチドを組み合わせることにより、異なるエピトープに結合する多量体ｓｃＦｖを形成することができる（Kriangkum et al., 2001, Biomol. Eng. 18: 31-40）。単鎖抗体の作製のために開発された技法としては、米国特許第４，９４６，７７８号；Bird, 1988, Science 242: 423；Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879；Ward et al., 1989, Nature 334: 544、およびde Graaf et al., 2002, Methods Mol. Biol. 178: 379-87に記載されているものが挙げられる。本明細書で提供されるＣＤ１９　ＣＡＲにおけるｓｃＦｖのＶＬ領域とＶＨ領域を接合することができるリンカーの１つの例は、配列番号３のリンカーである。

【００９９】

２．膜貫通ドメイン

開示されるＣＤ１９　ＣＡＲ構築物の膜貫通ドメインは、細胞膜、好ましくは哺乳動物細胞膜において熱力学的に安定である任意のポリペプチド構造を記載するものである。開示されるＣＤ１９　ＣＡＲ構築物における使用に適合する膜貫通ドメインは、任意の天然の膜貫通タンパク質またはその断片から得ることができる。あるいは、膜貫通ドメインは、合成の天然に存在しない膜貫通タンパク質またはその断片、例えば、細胞膜（例えば、哺乳動物細胞膜）において熱力学的に安定である疎水性タンパク質セグメントであり得る。

【０１００】

ＣＡＲに使用される膜貫通ドメインは、ＣＤ８α、ＣＤ８β、４－１ＢＢ／ＣＤ１３７、ＣＤ２８、ＣＤ３４、ＣＤ４、ＦｃεＲＩγ、ＣＤ１６、ＯＸ４０／ＣＤ１３４、ＣＤ３ζ、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、ＴＣＲα、ＴＣＲβ、ＴＣＲζ、ＣＤ３２、ＣＤ６４、ＣＤ６４、ＣＤ４５、ＣＤ５、ＣＤ９、ＣＤ２２、ＣＤ３３、ＣＤ３７、ＣＤ６４、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ１３７、ＣＤ１５４、ＬＦＡ－１　Ｔ細胞補助受容体、ＣＤ２　Ｔ細胞補助受容体／接着分子、ＣＤ４０、ＣＤ４ＯＬ／ＣＤ１５４、ＶＥＧＦＲ２、ＦＡＳ、およびＦＧＦＲ２Ｂからなる群より選択される膜タンパク質に由来するものであることが好ましい。膜貫通ドメインは、ＣＤ８α、４－１ＢＢ／ＣＤ１３７、ＣＤ２８、またはＣＤ３４に由来するものであることが好ましい。

【０１０１】

本明細書に提示される種々の実施形態では、ＣＤ１９　ＣＡＲの膜貫通ドメインは、ＣＤ２８に由来するアミノ酸配列、例えば、配列番号６のアミノ酸配列と少なくとも９５％同一、配列番号６のアミノ酸配列と少なくとも９６％同一、または配列番号６のアミノ酸配列と少なくとも９７％同一のアミノ酸配列を含む、または、膜貫通ドメインは、配列番号６のアミノ酸配列と少なくとも９８％同一、または配列番号６のアミノ酸配列と少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む。ＣＤ１９　ＣＡＲの一部の実施形態では、ＣＡＲは、配列番号６のアミノ酸配列を含む。

【０１０２】

３．細胞内ドメイン

本明細書に開示されるＣＤ１９　ＣＡＲは、少なくとも１つの細胞内シグナル伝達ドメ

インを含む。シグナル伝達ドメインは、一般に、細胞の正常なエフェクター機能の少なくとも１つの活性化に関与する。「エフェクター機能」という用語は、細胞の特殊化された機能を記載するものである。例えば、Ｔ細胞またはＮＫ細胞のエフェクター機能は、細胞溶解活性またはヘルパー活性を含み得る。「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、特殊化された機能を実施するように細胞を誘導する、タンパク質の一部分を記載するものである。通常は細胞内シグナル伝達ドメイン全体が使用され得るが、多くの場合、鎖またはドメイン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短縮された一部分を使用する範囲内で、そのような短縮された一部分によりエフェクター機能シグナルが伝達される限りは、そのような短縮された一部分をインタクトなドメインの代わりに使用することができる。

【０１０３】

一次シグナル伝達ドメインにより、ＴＣＲ複合体の刺激性または抑制性のいずれかでの一次活性化が調節される。刺激性に作用する一次シグナル伝達ドメインは、免疫受容活性化チロシンモチーフ（ＩＴＡＭ）として公知のシグナル伝達モチーフを含有し得る。ＣＤ１９　ＣＡＲにおける使用のための、ＩＴＡＭを含有する一次シグナル伝達ドメインとしては、ＴＣＲゼータ（ＣＤ３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、およびＣＤ６６ｄのシグナル伝達ドメインが挙げられる。一次シグナル伝達ドメインはＣＤ３ζまたはＣＤ２８であることが好ましい。

【０１０４】

種々の実施形態では、ＣＤ１９　ＣＡＲは、共刺激シグナル伝達ドメインをさらに含み得る。キメラ受容体における使用のための共刺激シグナル伝達ドメインの例は、Ｂ７／ＣＤ２８ファミリーのメンバー（Ｂ７－１／ＣＤ８０、Ｂ７－２／ＣＤ８６、Ｂ７－Ｈ１／ＰＤ－Ｌ１、Ｂ７－Ｈ２、Ｂ７－Ｈ３、Ｂ７－Ｈ４、Ｂ７－Ｈ６、Ｂ７－Ｈ７、ＢＴＬＡ／ＣＤ２７２、ＣＤ２８、ＣＴＬＡ－４、Ｇｉ２４／ＶＩＳＴＡ／Ｂ７－Ｈ５、ＩＣＯＳ／ＣＤ２７８、ＰＤ－１、ＰＤ－Ｌ２／Ｂ７－ＤＣ、およびＰＤＣＤ６）；ＴＮＦスーパーファミリーのメンバー（４－１ＢＢ／ＴＮＦＳＦ９／ＣＤ１３７、４－１ＢＢリガンド／ＴＮＦＳＦ９、ＢＡＦＦ／ＢＬｙＳ／ＴＮＦＳＦ１３Ｂ、ＢＡＦＦ　Ｒ／ＴＮＦＲＳＦ１３Ｃ、ＣＤ２７／ＴＮＦＲＳＦ７、ＣＤ２７リガンド／ＴＮＦＳＦ７、ＣＤ３０／ＴＮＦＲＳＦ８、ＣＤ３０リガンド／ＴＮＦＳＦ８、ＣＤ４０／ＴＮＦＲＳＦ５、ＣＤ４０／ＴＮＦＳＦ５、ＣＤ４０リガンド／ＴＮＦＳＦ５、ＤＲ３／ＴＮＦＲＳＦ２５、ＧＩＴＲ／ＴＮＦＲＳＦ１８、ＧＩＴＲリガンド／ＴＮＦＳＦ１８、ＨＶＥＭ／ＴＮＦＲＳＦ１４、ＬＩＧＨＴ／ＴＮＦＳＦ１４、リンホトキシン－アルファ／ＴＮＦ－ベータ、ＯＸ４０／ＴＮＦＲＳＦ４、ＯＸ４０リガンド／ＴＮＦＳＦ４、ＲＥＬＴ／ＴＮＦＲＳＦ１９Ｌ、ＴＡＣＩ／ＴＮＦＲＳＦ１３Ｂ、ＴＬ１Ａ／ＴＮＦＳＦ１５、ＴＮＦ－α、およびＴＮＦＲＩＩ／ＴＮＦＲＳＦ１Ｂ）；インターロイキン－１受容体／ｔｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）スーパーファミリーのメンバー（ＴＬＲ１、ＴＬＲ２、ＴＬＲ３、ＴＬＲ４、ＴＬＲ５、ＴＬＲ６、ＴＬＲ７、ＴＬＲ８、ＴＬＲ９、およびＴＬＲ１０）；ＳＬＡＭファミリーのメンバー（２Ｂ４／ＣＤ２４４／ＳＬＡＭＦ４、ＢＬＡＭＥ／ＳＬＡＭＦ８、ＣＤ２、ＣＤ２Ｆ－１０／ＳＬＡＭＦ９、ＣＤ４８／ＳＬＡＭＦ２、ＣＤ５８／ＬＦＡ－３、ＣＤ８４／ＳＬＡＭＦ５、ＣＤ２２９／ＳＬＡＭＦ３、ＣＲＡＣＣ／ＳＬＡＭＦ７、ＮＴＢ－Ａ／ＳＬＡＭＦ６、およびＳＬＡＭ／ＣＤ１５０）；ＣＤ２、ＣＤ７、ＣＤ５３、ＣＤ８２／Ｋａｉ－１、ＣＤ９０／Ｔｈｙ１、ＣＤ９６、ＣＤ１６０、ＣＤ２００、ＣＤ３００ａ／ＬＭＩＲ１、ＨＬＡクラスＩ、ＨＬＡ－ＤＲ、イカロス、インテグリンアルファ４／ＣＤ４９ｄ、インテグリンアルファ４ベータ１、インテグリンアルファ４ベータ７／ＬＰＡＭ－１、ＬＡＧ－３、ＴＣＬ１Ａ、ＴＣＬ１Ｂ、ＣＲＴＡＭ、ＤＡＰ１０、ＤＡＰ１２、ＭＹＤ８８、ＴＲＩＦ、ＴＩＲＡＰ、ＴＲＡＦ、デクチン－１／ＣＬＥＣ７Ａ、ＤＰＰＩＶ／ＣＤ２６、ＥｐｈＢ６、ＴＩＭ－１／ＫＩＭ－１／ＨＡＶＣＲ、ＴＩＭ－４、ＴＳＬＰ、ＴＳＬＰ　Ｒ、リンパ球機能関連抗原－１（ＬＦＡ－１）、ならびにＮＫＧ２Ｃからなる群より選択される共刺激タンパク質の細胞質シグナル伝達ドメインである。共刺激

ドメインは、α４β１インテグリン、β２インテグリン（ＣＤ１１ａ－ＣＤ１８、ＣＤ１１ｂ－ＣＤ１８、ＣＤ１１ｂ－ＣＤ１８）、ＣＤ２２６、ＣＲＴＡＭ、ＣＤ２７、ＮＫｐ４６、ＣＤ１６、ＮＫｐ３０、ＮＫｐ４４、ＮＫｐ８０、ＮＫＧ２Ｄ、ＫＩＲ－Ｓ、ＣＤ１００、ＣＤ９４／ＮＫＧ２Ｃ、ＣＤ９４／ＮＫＧ２Ｅ、ＮＫＧ２Ｄ、ＰＥＮ５、ＣＥＡＣＡＭ１、ＢＹ５５、ＣＲＡＣＣ、Ｌｙ９、ＣＤ８４、ＮＴＢＡ、２Ｂ４、ＳＡＰ、ＤＡＰ１０、ＤＡＰ１２、ＥＡＴ２、ＦｃＲγ、ＣＤ３ζ、およびＥＲＴからなる群より選択される活性化受容体タンパク質の細胞内ドメインを含むことが好ましい。共刺激ドメインは、ＫＩＲ－Ｌ、ＬＩＬＲＢ１、ＣＤ９４／ＮＫＧ２Ａ、ＫＬＲＧ－１、ＮＫＲ－Ｐ１Ａ、ＴＩＧＩＴ、ＣＥＡＣＡＭ、ＳＩＧＬＥＣ　３、ＳＩＧＬＥＣ　７、ＳＩＧＬＥＣ９、およびＬＡＩＲ－１からなる群より選択される抑制性受容体タンパク質の細胞内ドメインを含むことが好ましい。共刺激ドメインは、ＣＤ２７、ＣＤ２８、４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）、ＯＸ４０、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＰＤ１、ＩＣＯＳ、リンパ球機能関連抗原－１（ＬＦＡ－１）、ＣＤ２、ＣＤ７、ＬＩＧＨＴ、ＮＫＧ２Ｃ、Ｂ７－Ｈ３、およびＣＤ８３に特異的に結合するリガンドからなる群より選択されるタンパク質の細胞内ドメインを含むことが好ましい。

【０１０５】

本明細書で提供されるＣＤ１９　ＣＡＲの種々の実施形態では、ＣＤ１９　ＣＡＲは、第１のシグナル伝達ドメインおよび第２のシグナル伝達ドメインを含む。例えば、ＣＤ１９　ＣＡＲの第１のシグナル伝達ドメインは、ＣＤ２８、例えば、配列番号７に由来するシグナル伝達ドメインを含み得る。第１のシグナル伝達ドメインは、配列番号７のアミノ酸配列と少なくとも９５％同一、配列番号７のアミノ酸配列と少なくとも９６％同一、もしくは配列番号７のアミノ酸配列と少なくとも９７％同一のアミノ酸配列を含み得る、または、第１のシグナル伝達ドメインは、配列番号７のアミノ酸配列と少なくとも９８％もしくは少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含み得る。一部の実施形態では、第１のシグナル伝達ドメインは、配列番号７のアミノ酸配列を含む。

【０１０６】

第２のシグナル伝達ドメインを含む本明細書で提供されるＣＤ１９　ＣＡＲは、例えば、ＣＤ３ζ、例えば、配列番号８に由来するシグナル伝達ドメインを含み得る。第２のシグナル伝達ドメインは、配列番号８のアミノ酸配列と少なくとも９５％同一、配列番号８のアミノ酸配列と少なくとも９６％同一、もしくは配列番号８のアミノ酸配列と少なくとも９７％同一のアミノ酸配列を含み得る、または、第２のシグナル伝達ドメインは、配列番号８のアミノ酸配列と少なくとも９８％もしくは少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含み得る。一部の実施形態では、第２のシグナル伝達ドメインは、配列番号８のアミノ酸配列を含む。

【０１０７】

４．ヒンジ領域

ＣＤ１９　ＣＡＲは、ヒンジ領域をさらに含み得る。ヒンジ領域は、ｓｃＦｖ抗体領域と膜貫通ドメインの間に位置する。ヒンジ領域は、一般に、タンパク質の２つのドメイン間に見いだされ、ＣＤ１９　ＣＡＲの柔軟性およびドメインの片方または両方の互いに対する移動を可能にするアミノ酸セグメントである。ヒンジ領域は、約７アミノ酸から約１２０アミノ酸まで、例えば、約８アミノ酸から約１００アミノ酸まで、約１０アミノ酸から約９０アミノ酸まで、または約５０アミノ酸から約９０アミノ酸までを含み得る。ヒンジ領域は、少なくとも６５アミノ酸、例えば、少なくとも６５、少なくとも７０、少なくとも７５、少なくとも８０、または少なくとも８５アミノ酸を含むことが好ましい。ヒンジ領域は、天然に存在するタンパク質のヒンジ領域であっても天然に存在するタンパク質のヒンジ領域に由来するヒンジ領域であってもよく、また、１つよりも多くのポリペプチドのヒンジ領域に由来するものであってよい。種々の実施形態では、ヒンジ領域は、ＣＤ８ヒンジ領域、例えば、ＣＤ８αヒンジ領域またはそれに対して少なくとも９５％の同一性を有する配列を含み、ＣＤ２８ヒンジ領域またはそれに対して少なくとも９５％の同一性を有する配列をさらに含む。ヒンジ領域は、ｓｃＦｖのＣ末端とＣＡＲの膜貫通ドメイ

ンのＮ末端の間に配置されることが好ましい。
【０１０８】
ＣＤ１９　ＣＡＲのヒンジ領域は、配列番号４のアミノ酸配列と少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を含むことが好ましい。例えば、ヒンジ領域は、配列番号４のアミノ酸配列を含み得る。ＣＤ１９　ＣＡＲのヒンジ領域は、配列番号５のアミノ酸配列と少なくとも９５％同一のアミノ酸配列をさらに含むことが好ましく、例えば、ヒンジ領域は、配列番号５のアミノ酸配列を含み得る。一部の好ましい実施形態では、ヒンジ領域は、配列番号１３の配列またはそれに対して少なくとも９５％の同一性を有する配列を含む。
５．シグナルペプチド
【０１０９】
シグナル配列は、ポリペプチドを、細胞の分泌経路などの細胞内の所望の部位にターゲティングし、細胞膜の脂質二重層へのＣＤ１９　ＣＡＲの組込みおよび係留を可能にするペプチド配列である。ＣＤ１９　ＣＡＲ構築物によってコードされるシグナルペプチドは、コードされるＣＡＲのＮ末端に位置付けることができ、ＣＡＲを発現させる細胞型において作動可能なものである。シグナルペプチドは、細胞膜へのＣＡＲの組込みの間に切断され、宿主細胞によって発現される成熟ＣＡＲには存在しないことが好ましい。
【０１１０】
種々の例では、本明細書で提供されるＣＤ１９　ＣＡＲのシグナル配列は、免疫グロブリンスーパーファミリーのタンパク質のシグナル配列に由来するものであり、例えば、免疫グロブリン重鎖シグナル配列、または細胞膜上に発現される分子、例えば、ＣＤ８α、ＣＤ２８、またはＣＤ１６などのシグナル配列に由来するものであってよい。一部の実施形態では、本明細書で提供されるＣＤ１９　ＣＡＲのシグナル配列は、配列番号９のアミノ酸配列と少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を含む、または、シグナル配列は、配列番号９のアミノ酸配列と少なくとも９６％同一もしくは９７％同一のアミノ酸配列を含む、または、シグナル配列は、配列番号９のアミノ酸配列と少なくとも９８％同一もしくは配列番号９のアミノ酸配列と少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む。例示的な実施形態では、シグナル配列は、配列番号９のアミノ酸配列を含む。
【０１１１】
宿主細胞
単離された宿主細胞または宿主細胞の集団に、開示されるＣＤ１９構築物を形質導入して、ＣＤ１９　ＣＡＲを発現させる。例えば本明細書に開示されるレンチウイルスまたはレトロウイルスを用いて宿主細胞に形質導入することができる。代替として、例えば、参照により本明細書に組み込まれるＵＳ２０２００２２４１６０およびＷＯ２０２０１８５８６７に開示されるＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ法によって宿主細胞を作製することができる。
【０１１２】
一部の実施形態では、宿主細胞は、患者由来の単離されたＴ細胞、すなわち、自己Ｔ細胞である。そのような自己Ｔ細胞の集団を、患者から得（例えば、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）（これからＴ細胞を単離する）を提供するように末梢血を処理する）、単離し、拡大増殖させる。次いで、患者を起源とする単離および拡大増殖されたＴ細胞に、本明細書に開示されるＣＤ１９　ＣＡＲ構築物を形質導入して、形質導入されたＣＤ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞の集団を達成し、これらの形質導入されたＣＤ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞の集団を、一般には、拡大増殖させ、個々の患者に戻す（投与する）。
【０１１３】
他の実施形態では、宿主細胞は、妊娠後の胎盤または臍帯血（ＣＢ）に由来する、培養されたＴ細胞である。そのようなＴ細胞の集団は、患者に由来するものではない組織から得られる（同種異系）。Ｔ細胞を単離し、次いで、拡大増殖させる。次いで、拡大増殖させた胎盤またはＣＢ　Ｔ細胞に、本明細書に開示されるＣＤ１９　ＣＡＲ構築物を形質導入して、形質導入されたＣＤ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞の集団を達成する。形質導入されたＣＡＲ－Ｔ細胞を拡大増殖させ、Ｔ細胞の供給源とは無関係の患者に投与する。
【０１１４】

本開示は、ＣＤ１９　ＣＡＲを発現する、本明細書で提供されるＣＤ１９　ＣＡＲ構築物を形質導入した、培養されたＴ細胞を提供する。Ｔ細胞は、ＰＢＭＣから単離されたものであり得る、または、胎盤組織もしくは臍帯血（ＣＢ）から単離されたものであり得る。

【０１１５】

治療方法およびＣＤ１９　ＣＡＲの使用

本開示は、それを必要とする対象においてがんを処置するまたは腫瘍成長を阻害するための方法であって、対象に、ＣＤ１９　ＣＡＲを含む単離された宿主細胞、または形質導入された宿主細胞の集団を投与するステップを含む、方法を提供する。血液のがんを、本明細書に開示されるＣＤ１９　ＣＡＲを使用して処置することができる。本開示の方法を使用して処置することができる血液のがんの例としては、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、バーキットリンパ腫（ＢＬ）、Ｂ細胞性慢性リンパ性白血病（Ｂ－ＣＬＬ）、Ｂ細胞性急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）、Ｔ細胞リンパ腫（ＴＣＬ）、Ｔ細胞性急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、ヘアリー細胞白血病（ＨＣＬ）、ホジキンリンパ腫（ＨＬ）、および慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）が挙げられる。例えば、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、Ｂ細胞性慢性リンパ性白血病（Ｂ－ＣＬＬ）、またはＢ細胞性急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）を処置するために、患者に、単離されたＣＤ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞を投与することができる。

【０１１６】

本開示は、がん関連抗原を発現する腫瘍の成長を阻害する方法であって、腫瘍のがん細胞に、ＣＤ１９　ＣＡＲを含む形質導入された宿主細胞または形質導入された宿主細胞の集団を接触させるステップを含み、宿主細胞が、自己Ｔ細胞または胎盤由来もしくはＣＢ由来Ｔ細胞である、方法を提供する。

【０１１７】

形質導入された宿主細胞を体重１ｋｇ当たり細胞約10^1～約10^9個の投薬量で投与することができる。上記の投薬量の中間の範囲、例えば、体重１ｋｇ当たり細胞約10^2～約10^8個、体重１ｋｇ当たり細胞約10^4～約10^7個、体重１ｋｇ当たり細胞約10^5～約10^6個も本開示の一部であることが意図されている。

【０１１８】

対象または患者に投与される宿主細胞は、その対象または患者にとって同種異系のものであり得る。

【０１１９】

形質導入された宿主細胞を単回用量または複数回用量として投与することができ、また、毎日、または好ましくはより低頻度で投与することができる。

【実施例】

【０１２０】

以下の実施例は、例示的なものとして意図されており、本開示の実施形態をさらに理解するために使用することができ、本教示の範囲をいかようにも限定するものと解釈されるべきではない。

（実施例１）

ＣＤ１９　ＣＡＲ２構築物。

ＣＤ１９　ＣＡＲ２構築物（図１Ａに概略的に表されている）を、配列番号３のペプチドリンカー配列によって接合した配列番号１の軽鎖可変領域と配列番号２の重鎖可変領域とを含む単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）抗体（配列番号１２）をコードする配列をインフレームで融合することによってアセンブルした。シグナルペプチド（配列番号９）をコードする配列を抗ＣＤ１９　ｓｃＦｖをコードする配列の上流に融合し、ｍｙｃタグ（配列番号１０）をコードする配列を、シグナルペプチドをコードする配列と抗ＣＤ１９　ｓｃＦｖをコードする配列の間に挿入し、その前にアミノ酸アスパラギン酸およびイソロイシンを導入した（配列番号１１）。抗ＣＤ１９　ｓｃＦｖをコードする配列の下流は、順番に（Ｎ末端からＣ末端へ）：ＣＤ８に由来するヒンジ領域（配列番号４）、リンカーとして追

加的な２つのアミノ酸（ＰＲ）、ＣＤ２８に由来する細胞外ヒンジ領域（配列番号５）、ＣＤ２８に由来する膜貫通ドメイン（配列番号６）、ＣＤ２８に由来する細胞内シグナル伝達ドメイン（配列番号７）、およびＣＤ３ζに由来するシグナル伝達ドメイン（配列番号８）をコードする配列とした。本明細書では「ＣＤ１９　ＣＡＲ２－６３」と称されるＣＤ１９　ＣＡＲ２前駆体全体（シグナルペプチドを伴う）のアミノ酸配列は配列番号１４として提示され、配列番号１５の核酸配列によってコードされる。ＣＤ１９　ＣＡＲ２－６３構築物をレトロウイルスベクターにクローニングして、図２に示されているレトロウイルスベクター構築物（配列番号１６）をもたらし、ここで、ＣＤ１９　ＣＡＲの発現を駆動するためのプロモーターをもたらすために５’ＬＴＲを使用した。ＣＤ１９　ＣＡＲ２－６３の成熟ポリペプチドは配列番号２３として提示される。

ｍｙｃタグ配列を欠く以外は第１の構築物と本質的に同一である第２の構築物を作製した（図１Ｂに概略的に表されている）。この構築物には、配列番号３のペプチドリンカー配列によって接合した配列番号１の軽鎖可変領域と配列番号２の重鎖可変領域を含む、単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）抗体（配列番号１２）をコードする配列を含めた。抗ＣＤ１９　ｓｃＦｖ（配列番号１２）をコードする核酸配列を、配列（Ｎ末端からＣ末端へに進んで）：ＣＤ８に由来するヒンジ領域（配列番号４）、リンカーとして追加的な２つのアミノ酸（ＰＲ）、ＣＤ２８に由来するヒンジ領域（配列番号５）、ＣＤ２８に由来する膜貫通ドメイン（配列番号６）、ＣＤ２８に由来する細胞内シグナル伝達ドメイン（配列番号７）、およびＣＤζに由来するシグナル伝達ドメイン（配列番号８）とインフレームで融合した。この構築物には、ポリペプチド全体のＮ末端に位置付けられるシグナルペプチドをコードする配列も含めた。本明細書では「ＣＤ１９　ＣＡＲ２－６３ａ」と称されるＣＤ１９　ＣＡＲ２前駆体全体（シグナルペプチドを伴い、ｍｙｃタグを欠く）のアミノ酸配列は配列番号２４として提示され、配列番号２５の核酸配列によってコードされる。ＣＤ１９　ＣＡＲ２－６３ａ構築物をレトロウイルスベクターにクローニングして、図２に概略的に示されているレトロウイルスベクター構築物（配列番号２６）をもたらし、ここで、ＣＤ１９　ＣＡＲの発現を駆動するためのプロモーターをもたらすために５’ＬＴＲを使用した。ＣＤ１９　ＣＡＲ２－６３ａの成熟ポリペプチドは配列番号２７として提示される。

表１．配列

【表１－１】

配列番号	配列	説明
1	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIT	抗CD19抗体、可変軽鎖
2	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS	抗CD19抗体、可変重鎖
3	GGGGSGGGGSGGGGS	VHとVLを接続するペプチドリンカー
4	AKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA	CD8αヒンジ領域
5	KIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP	CD28ヒンジ領域(細胞外ドメイン/スペーサー)
6	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28膜貫通ドメイン
7	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	CD28細胞内シグナル伝達ドメイン
8	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3-ζシグナル伝達ドメイン
9	MEWSWVFLFFLSVTTGVHS	マウス抗体重鎖由来のシグナルペプチド
10	EQKLISEEDL	mycタグ
11	DIEQKLISEEDL	2つの追加的なアミノ酸を伴うmycタグ
12	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS	CD19 scFv: V_L-$(G_4S)_3$-V_H
13	AKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAPRKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP	CD8プラスCD28ヒンジ配列
14	MEWSWVFLFFLSVTTGVHSDIEQKLISEEDLDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQES	CD19 CAR2-63 (シグナルペプチドを伴う前駆体)

【表１－２】

配列番号	配列	説明
	GPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEW LGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQT DDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAKPTTTP APRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAP RKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSK PFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDY MNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAP AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQALPPR	
15	ATGGAGTGGTCCTGGGTGTTCCTGTTTTTCCTGAGCGTCACAAC CGGTGTGCATAGTGATATTGAGCAGAAGCTGATTAGCGAAGAGG ACCTGGATATCCAGATGACACAGACCACCAGCAGCCTGAGCGCC AGCCTGGGCGACCGAGTGACTATCAGCTGCCGGGCATCCCAGGA TATTTCTAAGTATCTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCCGACGGCA CTGTCAAACTGCTGATCTACCACACCAGTAGACTGCATTCAGGG GTGCCTAGCAGGTTCTCCGGATCTGGCAGTGGGACTGACTACTC CCTGACCATCTCTAACCTGGAGCAGGAAGATATTGCCACCTATT TCTGCCAGCAGGGCAATACACTGCCTTACACTTTTGGCGGGGGA ACAAAGCTGGAGATCACTGGCGGAGGAGGATCTGGAGGAGGAGG AAGTGGAGGAGGAGGATCAGAGGTGAAACTGCAGGAAAGCGGAC CAGGACTGGTCGCACCTTCACAGAGCCTGTCCGTGACATGTACT GTCTCCGGAGTGTCTCTGCCCGATTACGGCGTCTCTTGGATCCG GCAGCCCCCTAGAAAGGGACTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGG GAAGTGAAACTACCTACTATAATAGTGCTCTGAAATCAAGACTG ACCATCATTAAGGACAACTCTAAAAGTCAGGTGTTTCTGAAGAT GAATTCCCTGCAGACCGACGATACAGCAATCTACTATTGCGCCA AACACTACTATTACGGCGGGAGCTATGCCATGGATTACTGGGGG CAGGGAACTTCCGTCACCGTGAGCAGCgcTAAGCCCACCACGAC GCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTCGC AGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGG GGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCCCTAGGAAAAT TGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCA ATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGT CCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGT GGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGG CCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTG CACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCCCAC CCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAG CCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCC GCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCT AGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCC GGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAG GAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGC	CD19 CAR2-63をコードするDNA配列

【表１－３】

配列番号	配列	説明
	CTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGG GGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGAC ACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA	
16	aagcttgcatgcctgcaggtcgactctaggcacataaagaaaaacataactaaccaagctg cagccgagacagtgaaaagaaccgttaaaacggtttgttttaaataaactgaattatttaga gtcatttctttggtaggaaagtacattggcacgtaaaggagcccaaagcaatctgtggaaa gcccaggctgggagcccagcagtttgcatcccctcctggcgtgtacctaagggtttcttaatt gtgtggtttctaaatcttccagagggtttgtctcattcacttccacttcggtgcacaatacttgg acgcggatttactgtcttagcatctatcggtggcccttcgattgaggctgaacctgaggccca cttcttcagcttgttaaggagagcacaagcaccagaagaggctgacccggcagacctgtgg gcatttttaacaagggcctcctgggtctgtgggaggcaggcttacataaggtgcaaattaga aatataaataataagcccatatcaatttgtcatctttttttaagctcaagttttgaaagacccc acctgtaggtttggcaagctagcttaagtaacgccattttgcaaggcatggaaaatacataa ctgagaatagagaagttcagatcaaggttaggaacagagagacagcagaatatgggcca aacaggatatctgtggtaagcagttcctgccccgctcagggccaagaacagttggaacagg agaatatgggccaaacaggatatctgtggtaagcagttcctgccccggctcagggccaaga acagatggtccccagatgcggtcccgccctcagcagtttctagagaaccatcagatgtttcc agggtgccccaaggacctgaaatgaccctgtgccttatttgaactaaccaatcagttcgctt ctcgcttctgttcgcgcgcttctgctccccgagctcaataaaagagcccacaacccctcactc ggcgcgccagtcctccgatagactgcgtcgcccgggtacccgtattcccaataaagcctctt gctgtttgcatccgaatcgtggactcgctgatccttgggagggtctcctcagattgattgact gcccacctcgggggtctttcatttggaggttccaccgagatttggagacccctgcccaggga ccaccgacccccccgccgggaggtaagctggccagcaacttatctgtgtctgtccgattgtc tagtgtctatgactgattttatgcgcctgcgtcggtactagttagctaactagctctgtatctg gcggacccgtggtggaactgacgagttcggaacacccggccgcaaccctgggagacgtcc cagggacttcgggggccgtttttgtggcccgacctgagtcctaaaatcccgatcgtttagga ctctttggtgcacccccctagaggagggatatgtggttctggtaggagacgagaacctaaa acagttcccgcctccgtctgaatttttgctttcggtttgggaccgaagccgcgccgcgcgtctt gtctgctgcagcatcgttctgtgttgtctctgtctgactgtgtttctgtatttgtctgaaaatatg ggcccgggctagactgttaccactcccttaagtttgaccttaggtcactggaaagatgtcga gcggatcgctcacaaccagtcggtagatgtcaagaagagacgttgggttaccttctgctctg cagaatggccaaccttaacgtcggatggccgcgagacggcacctttaaccgagacctcat cacccaggttaagatcaaggtcttttcacctggcccgcatggacacccagaccaggtcccct acatcgtgacctgggaagccttggcttttgacccccctccctgggtcaagccctttgtacacc ctaagcctccgcctcctcttcctccatccgccccgtctctcccccttgaacctcctcgttcgacc ccgcctcgatcctccctttatccagccctcactccttctctaggcgcccccatatggccatatg agatcttatatggggcacccccgccccttgtaaacttccctgaccctgacatgacaagagtt actaacagcccctctctccaagctcacttacaggctctctacttagtccagcacgaagtctgg agacctctggcggcagcctaccaagaacaactggaccgaccggtggtacctcacccttacc gagtcggcgacacagtgtgggtccgccgacaccagactaagaacctagaacctcgctgga	CD19 CAR2-63をコードするレトロウイルスベクターのDNA配列

【表１－４】

配列番号	配列	説明
	aaggaccttacacagtcctgctgaccacccccaccgccctcaaagtagacggcatcgcagc ttggatacacgccgcccacgtgaaggctgccgaccccgggggtggaccatcctctagactg cctcgcgaggatccctcgaggccgccaccATGGAGTGGTCCTGGGTGTTCCTGT TTTTCCTGAGCGTCACAACCGGTGTGCATAGTGATATTGAGCAGAAG CTGATTAGCGAAGAGGACCTGGATATCCAGATGACACAGACCACCAG CAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGACCGAGTGACTATCAGCTGCCGG GCATCCCAGGATATTTCTAAGTATCTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCC GACGGCACTGTCAAACTGCTGATCTACCACACCAGTAGACTGCATTCA GGGGTGCCTAGCAGGTTCTCCGGATCTGGCAGTGGGACTGACTACTC CCTGACCATCTCTAACCTGGAGCAGGAAGATATTGCCACCTATTTCTG CCAGCAGGGCAATACACTGCCTTACACTTTTGGCGGGGGAACAAAGC TGGAGATCACTGGCGGAGGAGGATCTGGAGGAGGAGGAAGTGGAG GAGGAGGATCAGAGGTGAAACTGCAGGAAAGCGGACCAGGACTGG TCGCACCTTCACAGAGCCTGTCCGTGACATGTACTGTCTCCGGAGTGT CTCTGCCCGATTACGGCGTCTCTTGGATCCGGCAGCCCCCTAGAAAG GGACTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGAAGTGAAACTACCTACT ATAATAGTGCTCTGAAATCAAGACTGACCATCATTAAGGACAACTCTA AAAGTCAGGTGTTTCTGAAGATGAATTCCCTGCAGACCGACGATACA GCAATCTACTATTGCGCCAAACACTACTATTACGGCGGGAGCTATGCC ATGGATTACTGGGGGCAGGGAACTTCCGTCACCGTGAGCAGCgcTAA GCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCA TCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCG GCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCCCTAGGA AAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCA ATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCC TATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTG GAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTT CTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATG AACATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCC CTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTT CAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAG CTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTT GGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAG AAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGAT AAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCC GGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGC CACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCG CTAAcagccaggggccgcccaagggcgaattcgcggccgcatcgatgcataggccttccg gattagtccaatttgttaaagacaggatatcagtggtccaggctctagttttgactcaacaat atcaccagctgaagcctatagagtacgagccatagataaaataaaagattttatttagtctc cagaaaaaggggggaatgaaagaccccacctgtaggtttggcaagctagcttaagtaacg	

【表１－５】

配列番号	配列	説明
	ccattttgcaaggcatggaaaatacataactgagaatagagaagttcagatcaaggttagg aacagagagacagcagaatatgggccaaacaggatatctgtggtaagcagttcctgcccc gctcagggccaagaacagttggaacaggagaatatgggccaaacaggatatctgtggtaa gcagttcctgccccggctcagggccaagaacagatggtccccagatgcggtcccgccctca gcagtttctagagaaccatcagatgtttccagggtgccccaaggacctgaaatgaccctgtg ccttatttgaactaaccaatcagttcgcttctcgcttctgttcgcgcgcttctgctccccgagct caataaaagagcccacaacccctcactcggcgcgccagtcctccgatagactgcgtcgccc gggtacccgtgttctcaataaaccctcttgcagttgcatccgactcgtggtctcgctgttcctt gggagggtctcctctgagtgattgactacccgtcagcggggtctttcagtttctcccacctac acaggtctcactaacattcctgatgtgccgcagggactccgtcagcccggtttttgtttataat aaaatgcaagaacagtgttcccttcaagccagactacatcctgactctcggctttataaaag aatgttgaagggctctgtggactatctgccacacgacttttaagatttttatgcctcctggat gagggatttagtcaatctatcctcgtctattttgctggcttctccgtattttaaatttctagtttg cactcccttcctgagagcacggcgattgcagagtagttaatactctgagggcaggcttctgt gaaaaggttgcctgggctcagtgtgagattttgccataaaaaggggtcctgcccctgtgtac agacagatcggaatctagagtgcatactcagagtccccgcggttccggggctctgatctcag ggcatctttgcctagagatcctctacgccggacgcatcgtggccgggtaccgagctcgaatt cgtaatcatggtcatagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacaacat acgagccggaagcataaagtgtaaagcctggggtgcctaatgagtgagctaactcacatta attgcgttgcgctcactgcccgctttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatga atcggccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattgggcgctcttccgcttcctcgctcact gactcgctgcgctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtaat acggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagc aaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcgtttttccataggctccgccccct gacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactata aagataccaggcgtttcccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgct taccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgt aggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgtt cagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacga cttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggt gctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatttggtat ctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaac aaaccaccgctggtagcggtggtttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaa ggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactc acgttaagggattttggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaaatta aaaatgaagttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaacttggtctgacagttaccaat gcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcgttcatccatagttgcctgact ccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatga taccgcgagacccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaag ggccgagcgcagaagtggtcctgcaactttatccgcctccatccagtctattaattgttgccg ggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacgttgttgccattgctacag	

10 20 30 40 50

【表１－６】

配列番号	配列	説明
	gcatcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttcattcagctccggttcccaacgatcaa ggcgagttacatgatcccccatgttgtgcaaaaaagcggttagctccttcggtcctccgatcg ttgtcagaagtaagttggccgcagtgttatcactcatggttatggcagcactgcataattctc ttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctg agaatagtgtatgcggcgaccgagttgctcttgcccggcgtcaatacgggataataccgcg ccacatagcagaactttaaaagtgctcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaactctc aaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaacccactcgtgcacccaactgatcttc agcatcttttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgca aaaaagggaataagggcgacacggaaatgttgaatactcatactcttcctttttcaatatta ttgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaa taaacaaataggggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaacc attattatcatgacattaacctataaaaataggcgtatcacgaggccctttcgtctcgcgcgt ttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagcttgtct gtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgtcagcgggtgttggcgggtg tcggggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccatatgcggt gtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcatcaggcgccattcgccattca ggctgcgcaactgttgggaagggcgatcggtgcgggcctcttcgctattacgccagctggcg aaaggggatgtgctgcaaggcgattaagttgggtaacgccagggttttcccagtcacgac gttgtaaaacgacggccagtgcc	
22	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQP PRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFL KMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRA SQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGS GSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLE IT	CD19 scFv V_H-$(G_4S)_3$-V_L
23	DIEQKLISEEDLDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQD ISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSG TDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITG GGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSG VSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSR LTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYA MDYWGQGTSVTVSSAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR PEACRPAAGGAVHTRGLDFAPRKIEVMYPPPYLDNEKSNG TIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLV TVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYA PPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA	CD19 CAR2-63 （成熟ポリペプチド、シグナルペプチドなし）

【表１－７】

配列番号	配列	説明
	YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP PR	
24	MEWSWVFLFFLSVTTGVHSDIQMTQTTSSLSASLGDRVTI SCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSR FSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGG TKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLS VTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYY NSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHY YYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAKPTTTPAPRPPTPAPTIA SQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAPRKIEVMYPPPYL DNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVL ACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTR KHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDA LHMQALPPR	CD19 CAR2-63a（シグナルペプチドを伴う前駆体）
25	ATGGAATGGTCATGGGTCTTTCTCTTTTTTCTCAGCGTGACCACCGGA GTCCACTCCGATATCCAGATGACACAGACCACCAGCAGCCTGAGCGC CAGCCTGGGCGACCGAGTGACTATCAGCTGCCGGGCATCCCAGGATA TTTCTAAGTATCTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCCGACGGCACTGTC AAACTGCTGATCTACCACACCAGTAGACTGCATTCAGGGGTGCCTAG CAGGTTCTCCGGATCTGGCAGTGGGACTGACTACTCCCTGACCATCTC TAACCTGGAGCAGGAAGATATTGCCACCTATTTCTGCCAGCAGGGCA ATACACTGCCTTACACTTTTGGCGGGGGAACAAAGCTGGAGATCACT GGCGGAGGAGGATCTGGAGGAGGAGGAAGTGGAGGAGGAGGATC AGAGGTGAAACTGCAGGAAAGCGGACCAGGACTGGTCGCACCTTCA CAGAGCCTGTCCGTGACATGTACTGTCTCCGGAGTGTCTCTGCCCGAT TACGGCGTCTCTTGGATCCGGCAGCCCCCTAGAAAGGGACTGGAGTG GCTGGGCGTGATCTGGGGAAGTGAAACTACCTACTATAATAGTGCTC TGAAATCAAGACTGACCATCATTAAGGACAACTCTAAAAGTCAGGTG TTTCTGAAGATGAATTCCCTGCAGACCGACGATACAGCAATCTACTAT TGCGCCAAACACTACTATTACGGCGGGAGCTATGCCATGGATTACTG GGGGCAGGGAACTTCCGTCACCGTGAGCAGCgcTAAGCCCACCACGA CGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAG CCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCG CAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCCCTAGGAAAATTGAAGTT ATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATT ATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGA CCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCT TGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGG AGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCC	CD19 CAR2-63aをコードするDNA配列

【表１－８】

配列番号	配列	説明
	CCGCCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACC ACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCG CAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAG CTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGAC GTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACC CTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGA GGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAA GGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACA CCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA	
26	aagcttgcatgcctgcaggtcgactctaggcacataaagaaaaacataactaaccaagctg cagccgagacagtgaaaagaaccgttaaaacggtttgttttaaataaactgaattatttaga gtcatttctttggtaggaaagtacattggcacgtaaaggagcccaaagcaatctgtggaaa gcccaggctgggagcccagcagtttgcatcccctcctggcgtgtacctaagggtttcttaatt gtgtggtttctaaatcttccagagggtttgtctcattcacttccacttcggtgcacaatacttgg acgcggatttactgtcttagcatctatcggtggcccttcgattgaggctgaacctgaggccca cttcttcagcttgttaaggagagcacaagcaccagaagaggctgacccggcagacctgtgg gcatttttaacaagggcctcctgggtctgtgggaggcaggcttacataaggtgcaaattaga aatataaataataagcccatatcaatttgtcatctttttttaagctcaagttttgaaagacccc acctgtaggtttggcaagctagcttaagtaacgccattttgcaaggcatggaaaatacataa ctgagaatagagaagttcagatcaaggttaggaacagagagacagcagaatatgggcca aacaggatatctgtggtaagcagttcctgccccgctcagggccaagaacagttggaacagg agaatatgggccaaacaggatatctgtggtaagcagttcctgccccggctcagggccaaga acagatggtccccagatgcggtcccgccctcagcagtttctagagaaccatcagatgtttcc agggtgccccaaggacctgaaatgaccctgtgccttatttgaactaaccaatcagttcgctt ctcgcttctgttcgcgcgcttctgctccccgagctcaataaaagagcccacaacccctcactc ggcgcgccagtcctccgatagactgcgtcgcccgggtacccgtattcccaataaagcctctt gctgtttgcatccgaatcgtggactcgctgatccttgggagggtctcctcagattgattgact gcccacctcgggggtctttcatttggaggttccaccgagatttggagacccctgcccaggga ccaccgacccccccgccgggaggtaagctggccagcaacttatctgtgtctgtccgattgtc tagtgtctatgactgattttatgcgcctgcgtcggtactagttagctaactagctctgtatctg gcggacccgtggtggaactgacgagttcggaacacccggccgcaaccctgggagacgtcc cagggacttcgggggccgtttttgtggcccgacctgagtcctaaaatcccgatcgtttagga ctctttggtgcacccccctagaggagggatatgtggttctggtaggagacgagaacctaaa acagttcccgcctccgtctgaatttttgctttcggtttgggaccgaagccgcgccgcgcgtctt gtctgctgcagcatcgttctgtgttgtctctgtctgactgtgtttctgtatttgtctgaaaatatg ggcccgggctagactgttaccactcccttaagtttgaccttaggtcactggaaagatgtcga gcggatcgctcacaaccagtcggtagatgtcaagaagagacgttgggttaccttctgctctg cagaatggccaacctttaacgtcggatggccgcgagacggcacctttaaccgagacctcat cacccaggttaagatcaaggtcttttcacctggcccgcatggacacccagaccaggtcccct	CD19 CAR2-63aをコードするレトロウイルスベクターのDNA配列(開始コドンから終止コドンまで)

【表１－９】

配列番号	配列	説明
	acatcgtgacctgggaagccttggcttttgacccccctccctgggtcaagccctttgtacacc ctaagcctccgcctcctcttcctccatccgccccgtctctcccccttgaacctcctcgttcgacc ccgcctcgatcctccctttatccagccctcactccttctctaggcgcccccatatggccatatg agatcttatatggggcaccccgccccttgtaaacttccctgaccctgacatgacaagagtt actaacagcccctctctccaagctcacttacaggctctctacttagtccagcacgaagtctgg agacctctggcggcagcctaccaagaacaactggaccgaccggtggtacctcacccttacc gagtcggcgacacagtgtgggtccgccgacaccagactaagaacctagaacctcgctgga aaggaccttacacagtcctgctgaccacccccaccgccctcaaagtagacggcatcgcagc ttggatacacgccgcccacgtgaaggctgccgaccccgggggtggaccatcctctagactg cctcgcgaggatccCTCGAGGCCGCCACCATGGAATGGTCATGGGTCTTTC TCTTTTTTCTCAGCGTGACCACCGGAGTCCACTCCGATATCCAGATGA CACAGACCACCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGACCGAGTGAC TATCAGCTGCCGGGCATCCCAGGATATTTCTAAGTATCTGAACTGGTA CCAGCAGAAGCCCGACGGCACTGTCAAACTGCTGATCTACCACACCA GTAGACTGCATTCAGGGGTGCCTAGCAGGTTCTCCGGATCTGGCAGT GGGACTGACTACTCCCTGACCATCTCTAACCTGGAGCAGGAAGATAT TGCCACCTATTTCTGCCAGCAGGGCAATACACTGCCTTACACTTTTGG CGGGGGAACAAAGCTGGAGATCACTGGCGGAGGAGGATCTGGAGG AGGAGGAAGTGGAGGAGGAGGATCAGAGGTGAAACTGCAGGAAAG CGGACCAGGACTGGTCGCACCTTCACAGAGCCTGTCCGTGACATGTA CTGTCTCCGGAGTGTCTCTGCCCGATTACGGCGTCTCTTGGATCCGGC AGCCCCCTAGAAAGGGACTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGAAG TGAAACTACCTACTATAATAGTGCTCTGAAATCAAGACTGACCATCAT TAAGGACAACTCTAAAAGTCAGGTGTTTCTGAAGATGAATTCCCTGCA GACCGACGATACAGCAATCTACTATTGCGCCAAACACTACTATTACGG CGGGAGCTATGCCATGGATTACTGGGGGCAGGGAACTTCCGTCACCG TGAGCAGCgcTAAGCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACA CCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGC GTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGA CTTCGCCCCTAGGAAAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGAC AATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCT TTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTG GTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGT GGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGC ACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCCCACCCGC AAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGC TCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGC AGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGA GGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATG GGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATG AACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGAT	

10 20 30 40 50

【表１－１０】

配列番号	配列	説明
	GAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCA GGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGC AGGCCCTGCCCCCTCGCTAACAGCCAGGGGCCGCCCAAGGGCGAATT CGCggccgcatcgatcataggccttccggattagtccaatttgttaaagacaggatatcag tggtccaggctctagttttgactcaacaatatcaccagctgaagcctatagagtacgagcca tagataaaataaaagattttatttagtctccagaaaaaggggggaatgaaagaccccacct gtaggtttggcaagctagcttaagtaacgccattttgcaaggcatggaaaatacataactga gaatagagaagttcagatcaaggttaggaacagagagacagcagaatatgggccaaaca ggatatctgtggtaagcagttcctgccccgctcagggccaagaacagttggaacaggagaa tatgggccaaacaggatatctgtggtaagcagttcctgccccggctcagggccaagaacag atggtccccagatgcggtcccgccctcagcagtttctagagaaccatcagatgtttccaggg tgccccaaggacctgaaatgaccctgtgccttatttgaactaaccaatcagttcgcttctcgc ttctgttcgcgcgcttctgctccccgagctcaataaaagagcccacaacccctcactcggcg cgccagtcctccgatagactgcgtcgcccgggtacccgtgttctcaataaaccctcttgcagt tgcatccgactcgtggtctcgctgttccttgggagggtctcctctgagtgattgactacccgtc agcggggtctttcagtttctcccacctacacaggtctcactaacattcctgatgtgccgcagg gactccgtcagcccggtttttgtttataataaaatgcaagaacagtgttcccttcaagccaga ctacatcctgactctcggctttataaaagaatgttgaagggctctgtggactatctgccacac gacttttaagattttatgcctcctggatgagggatttagtcaatctatcctcgtctattttgct ggcttctccgtattttaaatttctagtttgcactcccttcctgagagcacggcgattgcagagt agttaatactctgagggcaggcttctgtgaaaaggttgcctgggctcagtgtgagattttgcc ataaaaaggggtcctgcccctgtgtacagacagatcggaatctagagtgcatactcagagt ccccgcggttccggggctctgatctcagggcatctttgcctagagatcctctacgccggacgc atcgtggccgggtaccgagctcgaattcgtaatcatggtcatagctgtttcctgtgtgaaatt gttatccgctcacaattccacacaacatacgagccggaagcataaagtgtaaagcctgggg tgcctaatgagtgagctaactcacattaattgcgttgcgctcactgcccgctttccagtcggg aaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagaggcggtttgcgt attgggcgctcttccgcttcctcgctcactgactcgctgcgctcggtcgttcggctgcggcga gcggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcag gaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttg ctggcgtttttccataggctccgccccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtca gaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcgtttcccccctggaagctccctc gtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaa gcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaa gctgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatc gtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacag gattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactac ggctacactagaaggacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaa aagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggttttttgtttg caagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacg gggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatgagattatcaaa	

【表１－１１】

配列番号	配列	説明
	aaggatcttcacctagatccttttaaattaaaaatgaagttttaaatcaatctaaagtatata tgagtaaacttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctg tctatttcgttcatccatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggaggg cttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagacccacgctcaccggctccagatt tatcagcaataaaccagccagccggaagggccgagcgcagaagtggtcctgcaactttatc cgcctccatccagtctattaattgttgccgggaagctagagtaagtagttcgccagttaatag tttgcgcaacgttgttgccattgctacaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtatggct tcattcagctccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatcccccatgttgtgcaaaaa agcggttagctccttcggtcctccgatcgttgtcagaagtaagttggccgcagtgttatcact catggttatggcagcactgcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtg actggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctcttg cccggcgtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgctcatcatt ggaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgat gtaacccactcgtgcacccaactgatcttcagcatcttttactttcaccagcgtttctgggtga gcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataagggcgacacggaaatgtt gaatactcatactcttcctttttcaatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagc ggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaaatagggttccgcgcacatttccccg aaaagtgccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaatagg cgtatcacgaggccctttcgtctcgcgcgtttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatg cagctcccggagacggtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtc agggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgtcggggctggcttaactatgcggcatcagagca gattgtactgagagtgcaccatatgcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaa ataccgcatcaggcgccattcgccattcaggctgcgcaactgttgggaagggcgatcggtg cgggcctcttcgctattacgccagctggcgaaaggggatgtgctgcaaggcgattaagttg ggtaacgccagggttttcccagtcacgacgttgtaaaacgacggccagtgcc	
27	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKP DGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQ EDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGG GSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIR QPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQV FLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTV SSAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFAPRKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCP SPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSK RSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRV KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD19 CAR2-63a （成熟ポリペプチド、シグナルペプチドなし）

【０１２１】

（実施例２）

ＰＢＭＣから単離されたＴ細胞および臍帯血から単離されたＴ細胞への抗ＣＤ１９　ＣＡＲ構築物の形質導入

５’および３’レトロウイルスＬＴＲに挟まれた配列番号１４のＣＤ１９　ＣＡＲ２－６３　ＣＡＲをコードするガンマレトロウイルスベクター（図２；配列番号１６）を、Ｔ細胞に、細胞をヒトＣＤ３に対する抗体を用いて４８～７２時間にわたって活性化した後、レトロウイルス形質導入によって導入した。

【０１２２】

活性化された、ＰＢＭＣまたは臍帯血のいずれかから単離されたヒトＴ細胞を、以前に凍結されていた正常な健康なドナー末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）または臍帯血（ＣＢ）細胞を３７℃のウォーターバス中で解凍し、次いで、解凍した細胞を、１０％ＦＢＳおよび３００ｕ／ｍｌのＩＬ－２を補充したＡＩＭ－Ｖ成長培地（ＧＩＢＣＯ－Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｗａｌｔｈａｍ、ＭＡ）１０ｍｌに希釈することによって調製した。細胞をＴ２５培養フラスコに移し、それに、５０ｎｇ／ｍｌのマウス抗ヒトＣＤ３抗体ＯＫＴ３（Ｏｒｔｈ Ｂｉｏｔｅｃｈ、Ｒａｒｔｉａｎ、ＮＪ）を添加した。細胞を３７℃で２日間インキュベートした。

【０１２３】

ＣＤ１９ ＣＡＲ構築物（配列番号１６）を含むレトロウイルスベクターをトランスフェクトしたＰＧ１３パッケージング細胞によって産生されたレトロウイルス上清を凍結させたものを、３７℃のウォーターバス中で解凍した。活性化されたＰＢＭＣまたは臍帯血活性化Ｔ細胞を遠心分離し（１５００ｒｐｍで５分間）、ＰＧ１３パッケージング細胞のレトロウイルス上清中に再懸濁させ（１．５ｍｌ／ウェル、全部で２ウェル）、それにＩＬ－２（１０００ｕ／ｍｌ）を添加し、次いで、レトロネクチン（ＰＢＳ中１０μｇ／ｍｌ）をコーティングした１２ウェルプレートのウェルに移した（２ウェル、ウェル当たり細胞２×１０^{6}個）。プレートをパラフィルムで覆い、２，５００ｒｐｍ、室温で１時間遠心分離し、次いで、３７℃でさらに３時間インキュベートした。形質導入プロセスを繰り返し（プレートを遠心分離し、上清を除去し、細胞を新鮮なパッケージング細胞ウイルス上清に再懸濁させ、室温で１時間遠心分離した）。２回形質導入した細胞を３７℃で１時間インキュベートし、その後、ＦＢＳおよびＣＤ３抗体を補充した培地を各ウェルにさらに１ｍｌ添加し、細胞を３７℃で３～４日間インキュベートした。

【０１２４】

（実施例３）

ＣＤ１９ ＣＡＲを形質導入したＴ細胞のフローサイトメトリー分析

形質導入した、ＰＢＭＣから単離されたＴ細胞およびＣＢから単離されたＴ細胞の細胞表面上のＣＤ１９の発現を検出するために、フローサイトメトリーアッセイを実施した。Ｔ細胞受容体を検出するために、１０^{6}個の細胞を１５００ｒｐｍで５分間遠心分離し、次いで、細胞をＣＤ１９－Ｆｃタンパク質５０μｌ中、８μｇ／ｍｌの濃度まで再懸濁させた。細胞プラスＣＤ１９タンパク質を室温で１時間インキュベートし、その後、洗浄としてＰＢＳ１ｍｌを添加し、細胞を１５００ｒｐｍで５分間遠心分離し、ＡＰＣ抗ヒトＩｇＧ ＦｃγにＦｃγに２μｇ／ｍｌで再懸濁させた。細胞をＰＢＳ１ｍｌで洗浄し（１５００ｒｐｍで５分間遠心分離）、ＦＡＣＳ染色緩衝液に再懸濁させた。試料をＩｎｔｅｌｌｉｃｙｔｅフローサイトメーターで分析した。

【０１２５】

図３Ａ～Ｃは、活性化されたＰＢＭＣ由来Ｔ細胞および活性化されたＣＢ細胞由来Ｔ細胞の両方にＣＤ１９ ＣＡＲ２－６３レトロウイルスを形質導入した第１の形質導入実験からのフローサイトメトリーの結果を示す。ＣＤ１９ ＣＡＲ２－６３レトロウイルスを形質導入していない活性化されたＴ細胞はＣＤ１９ ＣＡＲを発現しなかった（図３Ａ）。ＣＤ１９ ＣＡＲ２－６３を形質導入したＰＢＭＣ由来Ｔ細胞のおよそ６２．６％が抗ＣＤ１９抗体を発現し（図３Ｂ）、ＣＢ由来Ｔ細胞の５５．４％（図３Ｃ）が抗ＣＤ１９抗体について陽性であった。図４Ａ～Ｄは、活性化されたＰＢＭＣ由来Ｔ細胞および活性化されたＣＢ由来細胞の両方にＣＤ１９ ＣＡＲ２－６３レトロウイルスを形質導入した第２の独立した形質導入実験からのフローサイトメトリーの結果を示す。この実験では、形質導入していない、活性化された、ＰＢＭＣ（図４Ａ）または臍帯血（図４Ｃ）から単離されたＴ細胞は、ＣＤ１９ ＣＡＲを発現しなかったが、一方、ＣＤ１９ ＣＡＲ２－６３を形質導入したＰＢＭＣ由来Ｔ細胞の５４％（図４Ｂ）およびＣＤ１９ ＣＡＲ２－６３を形質導入したＣＢ由来Ｔ細胞の４３％（図４Ｃ）がＣＤ１９ ＣＡＲを発現した。

【０１２６】

（実施例４）

ＣＤ１９　ＣＡＲを形質導入したＴ細胞の活性化アッセイ

形質導入していない対照のＣＢ由来のＴ細胞およびＰＢＭＣ由来のＴ細胞、ならびに抗ＣＤ１９　ＣＡＲ２－６３を形質導入したＣＢ由来のＴ細胞およびＰＢＭＣ由来のＴ細胞を、マイクロタイタープレート中、Ｋ５６２細胞、ＣＤ１９遺伝子をトランスフェクトしたＫ５６２細胞、またはＣＤ１９を通常発現するＲａｊｉ腫瘍細胞を用いて別々に刺激した。サイトカイン産生アッセイのために、ウェル当たり細胞１×１０^{5}個の、形質導入していない対照Ｔ細胞またはＣＡＲ２－抗ＣＤ１９　ＣＡＲを形質導入したＴ細胞を、成長培地中、ウェル当たり細胞１×１０^{5}個の、Ｋ５６２細胞、ＣＤ１９を発現するＫ５６２細胞、またはＲａｊｉ腫瘍細胞と混合した。２４時間培養した後、培養上清を収集し、ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ（Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）のＥＬＩＳＡアッセイキットを用いてＩＦＮγ、ＩＬ－２、およびＴＮＦαの測定を行った。全ての実験は３連で行った。

【０１２７】

図５は、形質導入していない、ＰＢＭＣから単離されたＴ細胞が、Ｋ５６２細胞と一緒に培養した場合、Ｋ５６２細胞がＣＤ１９を発現しているかどうかにかかわらず、２０００ｐｇ／ｍｌ未満のＩＦＮγを放出したことを示す。形質導入していないＣＢ由来Ｔ細胞は、Ｒａｊｉ細胞と共培養した場合にのみ、中程度の量のＩＦＮγを産生した。対照的に、ＣＤ１９　ＣＡＲ２－６３をコードする構築物を形質導入したＰＢＭＣ由来Ｔ細胞およびＣＢ由来Ｔ細胞はどちらも、ＣＤ１９を発現する細胞（ＣＤ１９導入遺伝子を発現するＫ５６２細胞またはＲａｊｉ細胞のいずれか）と共培養した場合にＩＦＮγの産生が劇的に増大した。形質導入したＰＢＭＣ由来Ｔ細胞は、ＣＤ１９＋細胞と共培養した場合に、形質導入していないＰＢＭＣ由来Ｔ細胞によって産生されたＩＦＮγの８倍を超える量のＩＦＮγを産生した。ＣＤ１９　ＣＡＲを形質導入したＣＢ由来Ｔ細胞は、ＣＤ１９を発現しない細胞と共培養した場合に、形質導入していないＣＢ　Ｔ細胞によって産生されたＩＦＮγの３倍を超えるＩＦＮγを産生した。どちらの型のＴ細胞（ＰＢＭＣ由来および臍帯血由来）も、ＣＤ１９＋細胞－ＣＢ由来細胞と共培養した場合に、ＣＤ１９－細胞と共培養した場合よりもはるかに多くのＩＦＮγを産生した。例えば、ＣＤ１９　ＣＡＲ２－６３を形質導入したＣＢ　Ｔ細胞は、ＣＤ１９＋細胞と共培養した場合に、少なくとも２．５倍のＩＦＮγを産生し、ＣＤ１９　ＣＡＲ２－６３を形質導入したＰＢＭＣ　Ｔ細胞は、ＣＤ１９＋細胞と共培養した場合に、ほぼ１０倍のＩＦＮγを産生した。

【０１２８】

図６は、ＣＤ１９　ＣＡＲ２－６３を発現する、ＰＢＭＣまたはＣＢのいずれかに由来するＴ細胞によるＩＬ－２の産生について、ＣＤ１９を発現するＫ５６２細胞と共培養した場合に、多量のＩＬ－２が放出された（しかしいずれの供給源の形質導入していないＴ細胞でもこの多量のＩＬ－２の放出は見られなかった）ことを示す。図７は、ＣＤ１９　ＣＡＲ２－６３を発現するＣＢ　Ｔ細胞およびＰＢＭＣ　Ｔ細胞によるＴＮＦα放出は、これらのＴ細胞を、ＣＤ－１９を発現するＫ５６２細胞と共培養した場合および（ＣＤ１９＋）Ｒａｊｉ細胞と共培養した場合に生じたが、ＣＤ１９を発現しないＫ５６２細胞と共培養した場合には生じなかったことを示す。ＣＡＲを形質導入していないＣＢ　Ｔ細胞およびＰＢＭＣ　Ｔ細胞は、Ｒａｊｉ細胞と共培養した場合にのみ、非常にわずかなＴＮＦαを産生した。

【０１２９】

（実施例５）

ＣＤ１９　ＣＡＲを形質導入したＴ細胞を使用した細胞傷害アッセイ

ＣＡＲ２－抗ＣＤ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞の細胞傷害も評価した。細胞傷害を測定するための１つのアッセイは、ＤＥＬＦＩＡ細胞傷害アッセイ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ、Ｗａｌｔｈａｍ、ＭＡ）である。このアッセイでは、標的細胞（例えば、腫瘍細胞）に、まず、蛍光増強リガンドを３７℃で２５分にわたって負荷させる。次いで、ウェル当たり細胞２．５×１０^{3}個のＫ５６２細胞またはウェル当たり細胞５×１０^{3}個のＲａｊｉ腫瘍細胞を形質導入していない対照または形質導入したＴ細胞と種々のエフェクター：標的（Ｅ：Ｔ）比で混合し、２時間インキュベートした。２０μｌ／ウェルの上清を収集し、放出

されたリガンドについて、ユウロピウム溶液を添加して蛍光キレートを形成させることによって分析した。時間分解蛍光（ＴＲＦ）をＴＲＦ対応プレートリーダーＣｙｔａｔｉｏｎ　５（ＢｉｏＴｅｋ　ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ、Ｗｉｎｏｏｓｋｉ、ＶＴ）で測定することができる。細胞傷害を次式：％特異的溶解＝（実験－自然）／（最大－自然）＊１００を使用することによって算出することができる。

【０１３０】

図８は、ＣＤ１９　ＣＡＲを発現するＰＢＭＣまたはＣＢ由来Ｔ細胞を、ＣＤ１９を発現するＫ５６２細胞に対するエフェクター細胞として使用して細胞傷害アッセイを実施した場合、エフェクター：標的比が０．１：１から０．３３：１まで大きくなるにつれて％細胞傷害レベルが着実に上昇し、１：１のエフェクター：標的比において９７％でピークに達したことを示す。エフェクター細胞を形質導入していないＣＢ由来またはＰＢＭＣ由来Ｔ細胞とした場合、ＰＢＭＣ由来Ｔ細胞は、ＣＢ由来Ｔ細胞で達した％細胞傷害よりも高い％細胞傷害を示したが、％細胞傷害は３：１　３：１のエフェクター：標的比で４９．５％にしか達しなかった（ＣＢ由来Ｔ細胞をエフェクターとした場合は２８％）。

【０１３１】

図９は、ＣＤ１９　ＣＡＲを発現するＰＢＭＣまたはＣＢ由来Ｔ細胞を、天然にＣＤ１９を発現するＲａｊｉ細胞に対するエフェクター細胞として使用して細胞傷害アッセイを実施した場合、エフェクター：標的比が０．１：１から１：１まで大きくなるにつれて％細胞傷害レベルが着実に上昇し、１：１の時点で細胞傷害が９５％を超えて横ばい状態になりはじめることを示す。しかし、エフェクター細胞を形質導入していないＣＢ由来またはＰＢＭＣ由来Ｔ細胞とした場合、細胞傷害は、１：１の比で約３９％にしか達せず、３：１の比では約４４％までわずかに高く上昇した。

【０１３２】

（実施例６）

ｇｄＴ細胞の単離。

いくつかの実験のために、ガンマデルタＴ細胞（ｇｄＴ細胞）を末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）から単離した。ガンマデルタＴ細胞の単離は、Ｓｔｅｍｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｈｕｍａｎ　Ｇａｍｍａ／Ｄｅｌｔａ　Ｔ　Ｃｅｌｌ　Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（Ｓｔｅｍｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｓｅａｔｔｌｅ、ＷＡ）を使用して実施することができる。

【０１３３】

１つのプロトコールでは、新たに解凍したＰＢＭＣ懸濁物を、２５％ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）を含有するダルベッコリン酸緩衝食塩水（ＤＰＢＳ）３０ｍＬに懸濁させた。（ＰＢＭＣは、ＨｅｍａＣａｒｅで注文したＬｅｕｋｏｐａｋｓから単離されたものであり、バイアル中、１ｍｌ当たり細胞1×10^{8}個の濃度で凍結されたものである。ｇｄＴ細胞を単離するために、バイアル１０個を解凍し、単一の５０ｍＬ遠心管中、２５％ＦＢＳを含有するＤＰＢＳ培地３０ｍＬに入れ、それにより、５０ｍＬ管当たりおよそ8×10^{8}～1×10^{9}個の細胞をもたらすことができる。）ＰＢＭＣを、４０μｍの細胞濾過器を通過させ、細胞数を決定した。およそ3×10^{5}個の細胞をフローサイトメトリー用に確保し、残りを遠心分離によって収集した。上清を除去し、細胞ペレットを、５０ｍＬ管中、細胞10^{7}個当たりＭＡＣＳ分離緩衝液（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃｈ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）６０μＬに再懸濁させ、それに、細胞10^{7}個当たり２０μＬのＦｃＲブロッキング試薬を添加する。細胞をブロッキング試薬と一緒に室温で５分間インキュベートし、その後、細胞5×10^{7}個当たり、ＥａｓｙＳｅｐ（商標）Ｈｕｍａｎ　Ｇａｍｍａ／Ｄｅｌｔａ　Ｔ　Ｃｅｌｌ　Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ　Ｃｏｃｋｔａｉｌ（Ｓｔｅｍｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｓｅａｔｔｌｅ、ＷＡ）１２．５μＬを添加する。簡単に混合した後、細胞を、室温で、プレート振とう機で混合しながらさらに１５分間インキュベートする。次いで、細胞10^{7}個当たり１～２ｍＬの緩衝液を添加し、１４００ｒｐｍで５分間遠心分離することにより、細胞を洗浄して、結合しなかった一次抗体を除去する。上清を吸引し、細胞ペレットをＭＡＣＳ分離緩衝液に再懸濁させる（細胞１０

^{7}個当たり８０μＬ）。

【０１３４】

ｐａｎ細胞枯渇のために、磁気粒子（抗ビオチンマイクロビーズ、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ）をボルテックスした後、細胞５×１０^{7}個当たり懸濁したビーズ１２．５μＬを取り出し、それを懸濁した細胞調製物に添加する。細胞および磁気ビーズを室温で振とうせずに１０分間インキュベートし、次いで、追加的なＭＡＣＳ分離緩衝液を添加して体積を２５ｍＬ（元の体積が１０ｍＬ未満の場合）または５０ｍＬ（元の体積が１０ｍＬよりも大きい場合）にする。細胞を穏やかにピペットで２～３回吸引・排出して混合し、管を（蓋をせずに）磁石スタンド（ＭＡＣＳ Ｃｏｌｕｍｎ Ｓｅｐａｒａｔｏｒ、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ）に室温で１０分間置く。富化された細胞懸濁物を新しい５０ｍＬ管に慎重にピペットで移す。細胞を１４００ｒｐｍで５分間遠心分離し、その後、上清を除去する。次いで、細胞をＭＡＣＳ分離緩衝液中に１ｍＬ当たり細胞およそ１０^{7}個で再懸濁させる。

【０１３５】

ｐａｎ細胞を枯渇させた細胞に、細胞１０^{7}個当たり、抗ＴＣＲ α／β－ビオチンヒト抗体（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ）２．５μＬを添加し、抗体と細胞をピペットチップで混合し、次いで、暗所において４℃で１０分間インキュベートする。次いで、ＭＡＣＳ分離緩衝液１３ｍＬを添加し、懸濁した細胞を１５ｍＬ管に移し、１４００ｒｐｍで５分間遠心分離し、上清を吸引することによって細胞を洗浄する。洗浄を繰り返し、最終的なペレットを細胞１０^{7}個当たりＭＡＣＳ分離緩衝液９７．５μＬに再懸濁させ、次いで、細胞１０^{7}個当たり２．５ｕｌの抗ビオチンマイクロビーズを細胞に添加する。懸濁物をピペットで数回吸引・排出して混合し、ピペットチップで混合し、暗所において４℃で１５分間インキュベートする。

【０１３６】

次いで、緩衝液１３ｍＬを添加し、試料を１４００ｒｐｍで５分間遠心分離することによって細胞を洗浄する。上清を完全に吸引し、細胞を、細胞１０^{8}個当たり最大５００μＬのＭＡＣＳ分離緩衝液に再懸濁させる。

【０１３７】

α／βＴ細胞を枯渇させるために、ＬＤカラム（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ）をＭＡＣＳ分離緩衝液２ｍＬですすぎ、細胞懸濁物をカラムに適用する。標識されなかった細胞のフロースルーを収集し、カラムを５回、毎回１ｍＬの緩衝液で洗浄する。洗浄物をフロースルーに加え、細胞数を決定する。細胞３×１０^{5}個のアリコートを、細胞純度を評価するためのフローサイトメトリー用に取り出す。残りの細胞を遠心沈澱させ、Ｔ細胞培地に１ｍＬ当たり細胞２×１０^{6}個の濃度まで再懸濁させ、６ウェル培養プレートのウェルに分注する。

【０１３８】

Ｔ細胞を拡大増殖させるために、Ｔ ｃｅｌｌ ＴｒａｎｓＡｃｔ溶液（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ、細胞１０^{6}個当たり５μＬ）をＴ Ｃｅｌｌ Ｍｅｄｉｕｍ、例えば、１％ｇｌｕｔａｍａｘ、５％ヒト血清、ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ ２６ｍｌ、１：１０００ゲンタマイシン、および３００ＵのＩＬ－２を含むように改変したＴ ｃｅｌｌ ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）ＣＴＳ（商標）Ｍｅｄｉｕｍ（Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）中の細胞に添加する。プレートを細胞インキュベーター内に２～３日間置く。次いで、培養培地を新鮮なＴ細胞培地と交換し、Ｔ ｃｅｌｌ ＴｒａｎｓＡｃｔ溶液（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ）の添加は行わない。

【０１３９】

９日目に、Ｔ細胞成長の対数期の間に、ｇｄＴ細胞を適切な組織培養バッグに移す。細胞を１ｍｌ当たり細胞０．５×１０^{6}個の密度で維持する。１３日目に、細胞を、再懸濁後に計数し、細胞密度が１ｍｌ当たり細胞０．５×１０^{6}個に維持されるように組織培養バッグに移す。１６日目に、細胞を再度計数し、その後、細胞密度を、組織培養バッグ中

、３００Ｕ／ｍｌのｒＩＬ－２を含有する培養培地中１ｍｌ当たり細胞１×１０^{6}個に維持する。２０日目に、細胞を計数し、凍結させる。

【０１４０】

（実施例７）

ＮＳＧマウスにおけるＲａｊｉ異種移植片の処置

ｉｎ　ｖｉｖｏ試験のために、基本的に記載されている通りＴ細胞をＰＢＭＣから単離し、形質導入前に３日間、ＣＤ３抗体（ＯＫＴ３、５０ｎｇ／ｍｌ）を用いて細胞を活性化させ、形質導入をウェル中にＴ細胞とそれに加えてウイルス上清を含む６ウェルプレートを３７℃で１時間遠心分離し、その後、プレートを３７℃で１時間インキュベートし、次いで、さらに３ｍｌの培養培地を添加し、プレートを一晩インキュベートすることによって実施した以外は、基本的に実施例２に記載の通り、図２に示されているＣＤ１９　ＣＡＲ２－６３（配列番号１４）をコードする構築物（配列番号１６）をトランスフェクトした、培養したＰＧ１３パッケージング細胞からのウイルス上清を用いて形質導入した。翌日に形質導入プロセスを繰り返し、次いで、細胞を組織培養フラスコ中、３７℃で３日間インキュベートした後、フローサイトメトリーによって分析した。

【０１４１】

さらに、一部の実験では、ｉｎ　ｖｉｖｏ実験に使用するために、単離されたガンマデルタＴ細胞（ｇｄＴ細胞）にＣＤ１９　ＣＡＲ２－６３構築物を形質導入した。ｇｄ　Ｔ細胞を、ネガティブ選択キットを用いたｐａｎ細胞枯渇およびαβ抗体を用いたαβＴ細胞枯渇を使用してＰＢＭＣから単離した。ガンマデルタＴ細胞の純度および細胞数をＦＡＣＳによって評価した。

【０１４２】

単離されたγδＴ細胞を、ＭＡＣＳからの可溶性ＣＤ３／ＣＤ２８抗体を用いて７２時間にわたって活性化し、次いで、ＣＤ１９　ＣＡＲ２－６３をコードするレトロウイルスベクターを用いてパッケージングしたＰＧ１３細胞により産生されたレトロウイルス上清を用いて形質導入を行った。形質導入プロセスを２回連続して実施した。形質導入の４日後に形質導入効率をフローサイトメトリーによって調査した。総ＣＡＲ＋Ｔ細胞数のパーセンテージを算出した。汎ＡＴＣ（形質導入していない）、汎Ｔ　ＣＤ１９　ＣＡＲ２－６３、ｇｄＴ細胞ＡＴＣ（形質導入していない）、およびＣＤ１９　ＣＡＲ２－６３　ｇｄＴ細胞を培養物中で拡大増殖させて、さらなるｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏ試験のための総細胞数に到達させた。形質導入効率をフローサイトメトリーによって調査した後、さらなる試験のために細胞を凍結させた。

表２:実験群

【表２】

群	処置	群のサイズ	0日目における処置（腫瘍注射の1日後）	
			処置量	TE
1	無処置対照	10	n/a	n/a
2	ATC	10	適合する総細胞数	n/a
3	CAR-T	10	CAR+細胞1×10^7個	43%
4	γδ-T	10	適合する総細胞数	n/a
5	γδ-CAR-T	10	CAR+細胞1×10^7個	40%
6	CAR-T	5	CAR+細胞2×10^6個	43%
7	γδ-CAR-T	5	CAR+細胞2×10^6個	40%

【０１４３】
全ての動物実験について、実験動物の管理と使用に関するガイドラインに従って処置および維持を行った。Ｊａｃｋｓｏｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（Ｂａｒ Ｈａｒｂｏｒ，ＭＥ）から購入した８週齢の雌ＮＳＧ免疫不全マウスに、－１日目に、Ｌｕｃ－ＧＦＰ標識したＲａｊｉ細胞１×１０^{6}個を尾静脈から静脈内（ｉ．ｖ．）接種した。１日後（０日目）、下記の表に従ったＴ細胞を静脈内投与した。

【０１４４】
動物を、体重減少、後肢麻痺、移動性の低下、または窮迫の徴候について注意深くモニタリングした。後肢麻痺、瀕死の挙動、または２０％を超える体重減少を示した動物は安楽死させた。

【０１４５】
腫瘍負荷を毎週、ＩＶＩＳ Ｓｐｅｃｔｒｕｍ Ｉｎ Ｖｉｖｏ Ｉｍａｇｉｎｇ Ｓｙｓｔｅｍ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ、Ｗａｌｔｈａｍ、ＭＡ）を使用して生物発光イメージングによって測定した。Ｔ細胞注射後３時間、１日目、２日目、その後、毎週、末梢血試料を尾静脈採血によって取得し、群ごとにまとめてプールした。Ｔ細胞生着および拡大増殖を、ＡＰＣとコンジュゲートしたマウス抗ヒトＣＤ３およびＰＥとコンジュゲートしたマウス抗ｍｙｃ抗体を用いたフローサイトメトリーアッセイによって測定した。ヒトサイトカインＩＦＮγ、ＩＬ２、およびＴＮＦαの血中レベルを、Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｌｕｍｉｎｅｘ Ａｓｓａｙｓ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ、Ｈｅｒｃｕｌｅｓ、ＣＡ）を使用することによって測定した。動物を、＞１５％の体重減少、脱毛（ｌｏｓｓ ｏｆ ｆｕｒ）、および瀕死になることによって証明される、疾患増悪および移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）などの明白な毒性の徴候についてモニタリングした。生存試験の終点は、マウスの体重が１５％を超えて減少したかまたは瀕死になった日とした。

【０１４６】
６週間の試験の経過にわたるマウスの画像が図１０ＡおよびＢに示されている。図１０Ａは、無処置のマウスおよび改変されていないγδＴ細胞で処置したマウスは第２週を越えて生存せず、一方、改変されていない汎Ｔ細胞（ＡＴＣ）で処置したマウスは、移植片対宿主病により、第４週を越えて生存しなかったことを示す。ＣＤ１９ ＣＡＲ構築物を

発現する汎Ｔ細胞（群３）は、最良の生存を有し、１０匹のマウス全てが６週間の時点で生存していた。図１０Ｂは、ＣＤ１９　ＣＡＲを発現するγδＴ細胞10^7個で処置した第５群のマウス１０匹全てが第５週まで生存していたことを示す。より少数のＣＡＲ－Ｔ細胞で処置した第６群および第７群では、より少数のマウスが第６週まで生存した：（汎）ＣＡＲ－Ｔ細胞2×10^6個で処置した第６群のマウス１０匹のうち３匹のみ、およびγδＣＡＲ－Ｔ細胞2×10^6個で処置した第７群のマウス５匹のうち１匹が第６週まで生存した。

【０１４７】

図１１Ａに、処置群における照射量に基づいた腫瘍サイズのグラフを提示する。腫瘍は、無処置群または改変されていないγδＴ細胞（ＣＤ１９　ＣＡＲ構築物を形質導入していないγδＴ細胞）で処置した群で最も急速に成長した。汎Ｔ細胞（ＣＡＲ構築物を形質導入していない）1×10^7個で処置したマウスでは、腫瘍が最初は急速に成長したが、その後、縮小した。γδＣＡＲ－Ｔ細胞2×10^6個、γδＣＡＲ－Ｔ細胞1×10^7個、および汎Ｔ細胞2×10^6個（ＣＡＲ構築物を形質導入していない）で処置したマウスでは腫瘍が少し遅れて成長した。ＣＡＲ－Ｔ細胞1×10^7個で処置したマウスでは腫瘍が最も緩徐に成長した。図１１Ｂに、同じ期間にわたる各群のマウスの体重を提示し、無処置群、汎Ｔ処置群、およびｇｄＴ処置群における劇的な体重減少が示される。

【０１４８】

図１２Ａに、処置群の生存曲線が提示されている。いかなる細胞処置も受けていないマウス（破線）および改変されていないγδＴ細胞を受けたマウス（四角）の１４日時点での生存の降下が明らかである。汎Ｔ　ＣＡＲ－Ｔ細胞で処置したマウス（丸）で最大生存が示された：この処置群のマウスは６週間の試験の終わりまで１匹も死亡しなかった。ｇｄＴ　ＣＡＲ－Ｔ細胞で処置したマウスは５週間生存した。図１２Ｂに、ＣＡＲ－Ｔ細胞をより低い細胞用量で受けた第６群および第７群を除いた、生存の別のグラフを提示する。汎Ｔ処置群（ＣＡＲ発現なし）では、２８日目から生存の減退が示され、３５日目までに全てのマウスが死んだ。ｇｄ　ＣＡＲ－Ｔ処置群では、３５日目までの生存が示され、その時点で全てのマウスが死んだ（縦線）。横線から、汎ＣＡＲ－Ｔ細胞処置群の全てのマウスが４２日目まで生存したことが実証される。図１２Ｃに、ｇｄＴ細胞で処置した第４群、第５群、および第７群を除いた、生存の別のグラフを提示する。このグラフでは、無処置マウス（１４日目に縦線）、汎Ｔ細胞で処置したマウス（２８日目と３５日目の間で生存が減退する）、汎ＣＡＲＴ－Ｔ細胞で処置したマウス（横線により死亡率ゼロが示される）、および低用量の汎ＣＡＲＴ－Ｔ細胞で処置したマウス（全てのマウスが３５日目までに死んだ）の生存が比較される。

【０１４９】

図１３Ａに、無処置群（１４日目に縦線）、汎Ｔ細胞処置群（２８日目から３５日目まで生存が減退する）、および汎ＣＡＲ－Ｔ細胞処置群（横線により６週間の実験全体を通して生存の減退がないことが示される）についての生存を示す別のグラフを提示する。図１３Ｂは、無処置群（１４日目に縦線）、ｇｄＴ細胞処置群（１４日目まで生存）、ｇｄＴ　細胞10^7個処置群（３５日目まで生存）、およびｇｄＴ細胞2×10^6個処置群（２８日目から３５日目まで生存が減退する）の生存を比較するものである。図１３Ｃは、無処置群（１４日目に縦線）、ｇｄＴ細胞処置群（１４日目まで生存）、およびｇｄＴ細胞10^7個処置群（３５日目まで生存）の生存を比較するものである。

【０１５０】

群の一部の生存の差異の有意水準を表３に提示する。

表3:生存有意水準

【表３】

	無処置	汎 T	汎 CAR-T	gdT	gd CAR-T	汎 CAR-T 2e6	gd CAR-T 2e6
無処置			>0.0001 ****		>0.0001 ****		
汎 T			>0.0001 ****				
汎 CAR-T					>0.0001 ****	>0.0001 ****	
gdT					>0.0001 ****		
gdCAR-T							0.0011
汎 CAR-T 2e6							0.17 (ns)
gd CAR-T 2e6							

【図面】

【図１】

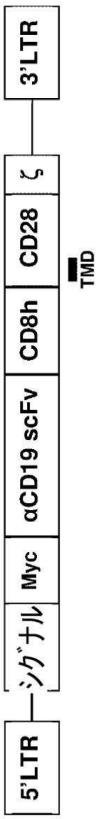


Fig. 1A

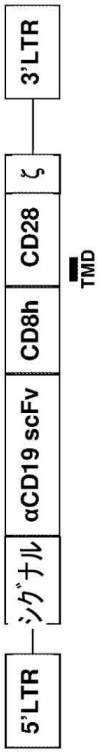


Fig. 1B

【図２】

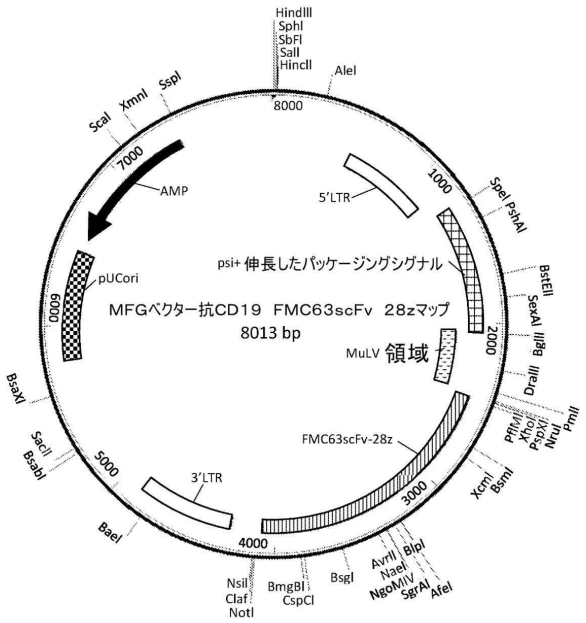


Fig. 2

【図３－１】

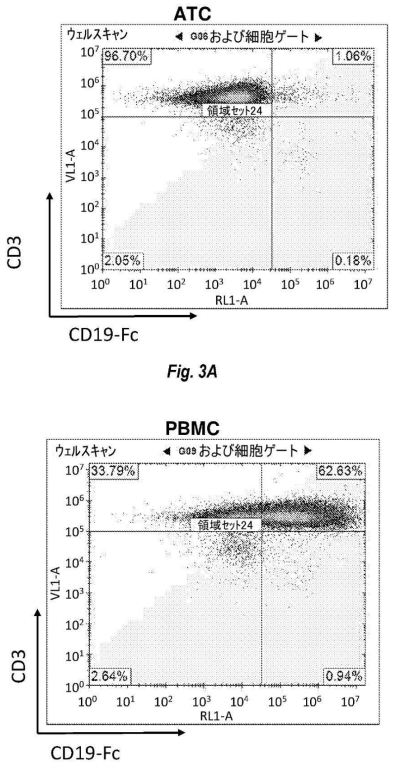


Fig. 3A

Fig. 3B

【図３－２】

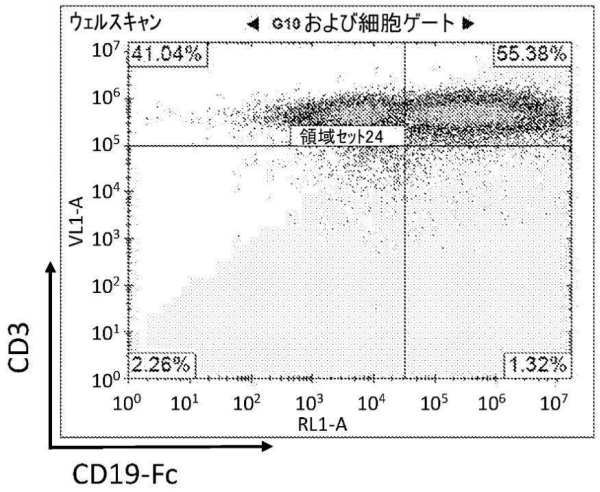


Fig. 3C

【図４】

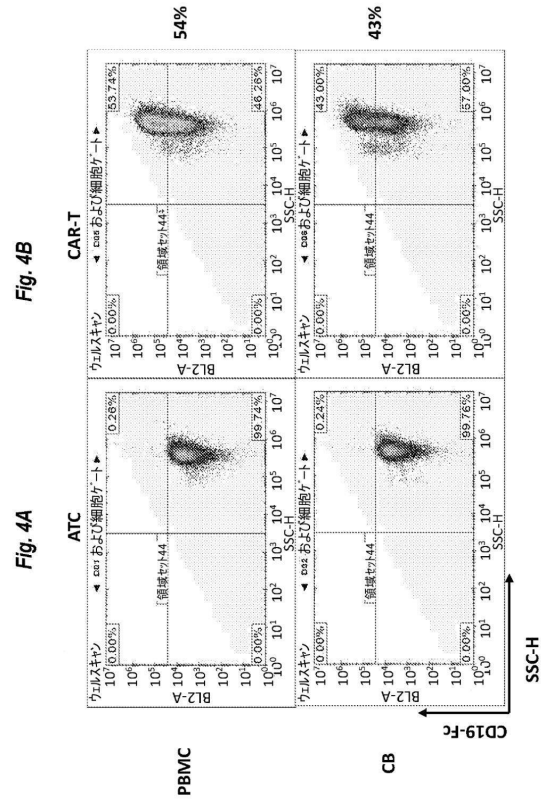


Fig. 4B

Fig. 4A

Fig. 4D

Fig. 4C

【図５】

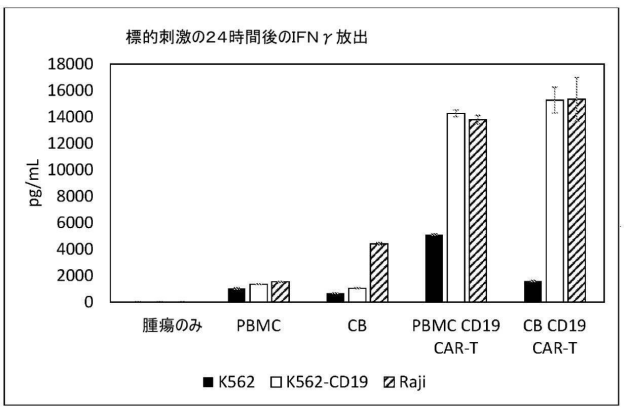


Fig. 5

【図６】

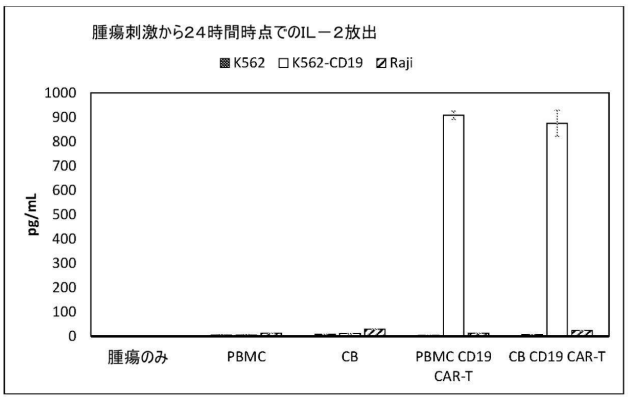


Fig. 6

【図７】

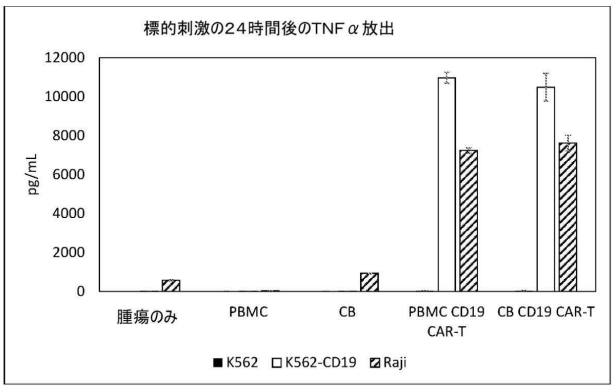


Fig. 7

【図８】

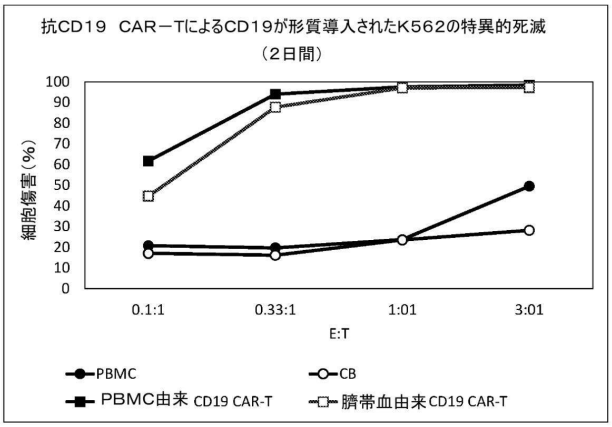


Fig. 8

【図９】

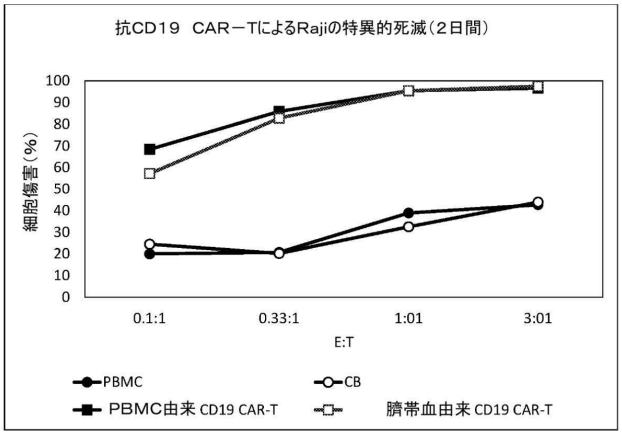


Fig. 9

【図１０－１】

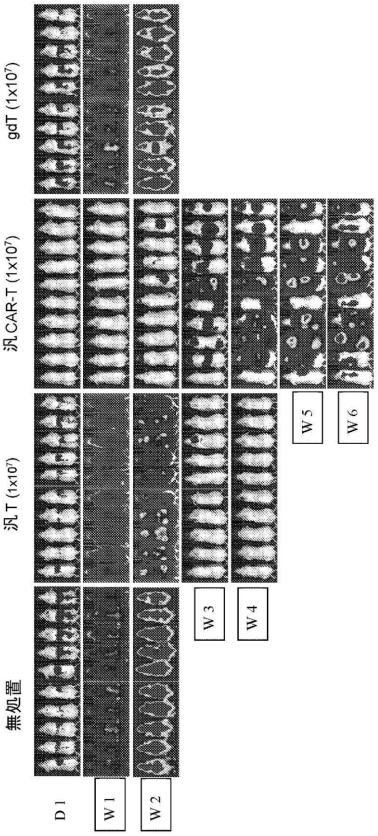


Fig. 10A

【図１０－２】

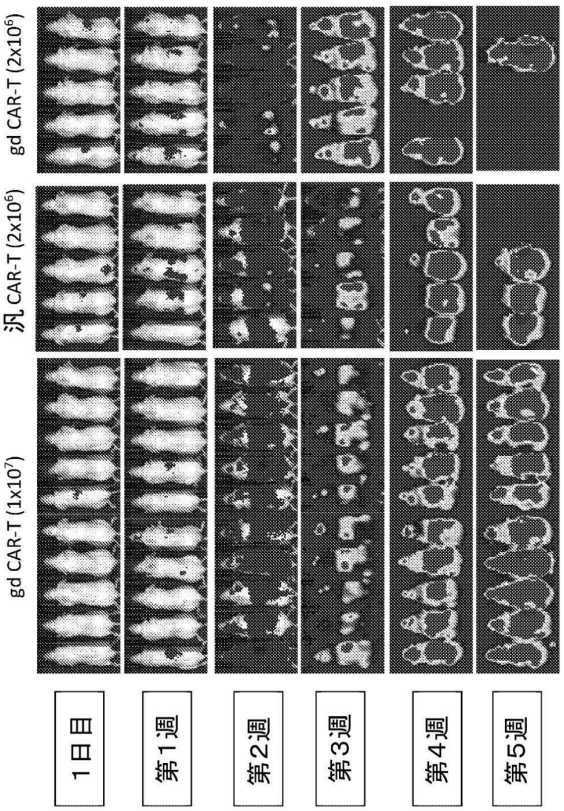


Fig. 10B

【図１１－１】

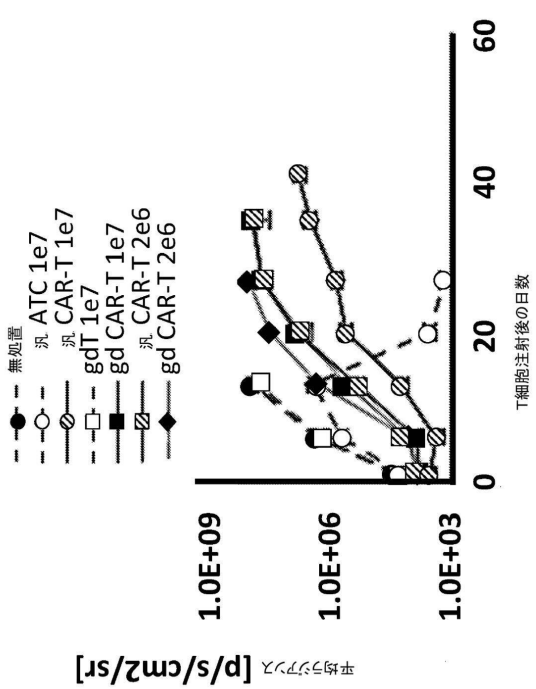


Fig. 11A

【図１１－２】

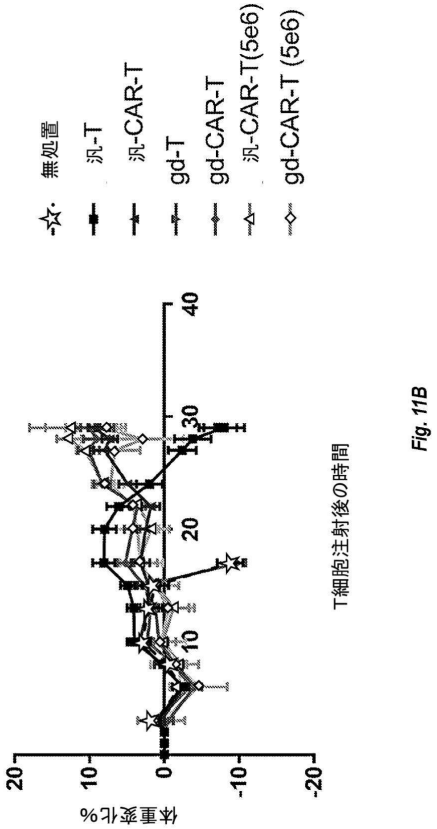


Fig. 11B

【図１２－１】

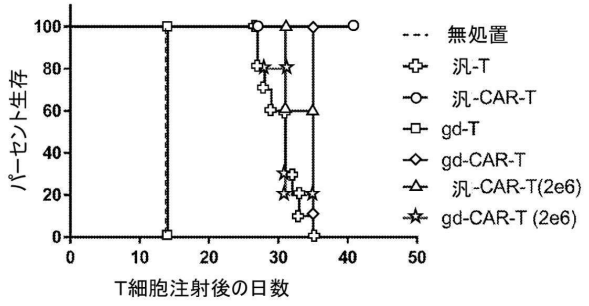


Fig. 12A

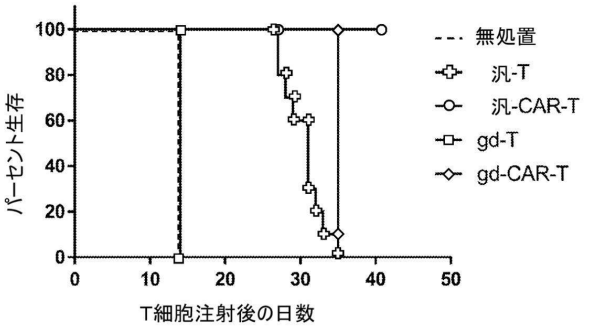


Fig. 12B

【図１２－２】

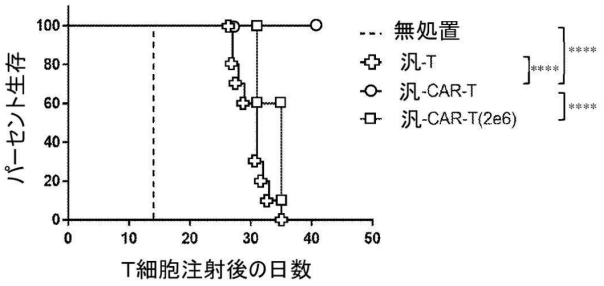


Fig. 12C

【図１３－１】

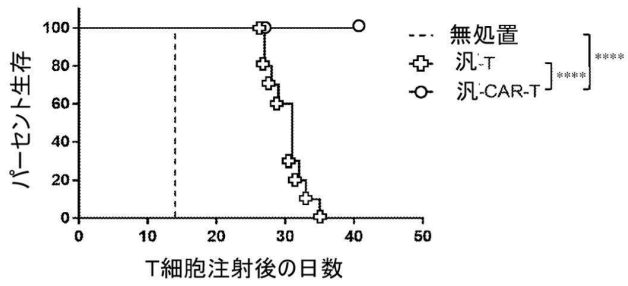


Fig. 13A

【図１３－２】

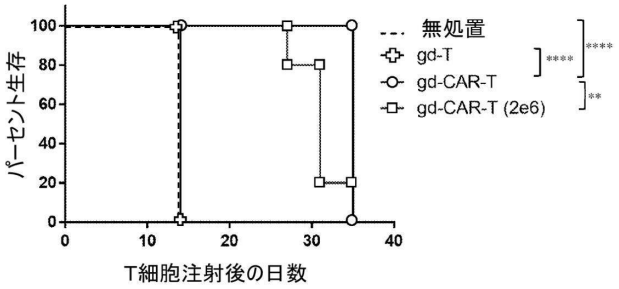


Fig. 13B

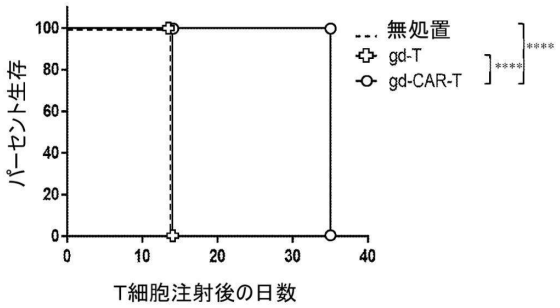


Fig. 13C

【配列表】
2023544836000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 21/54437

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - C07K 16/28, C07K 16/46, A61K 35/28, A61K 39/395 (2022.01)
CPC - A61K 35/15, A61K 35/17, A61K 2039/5156, C07K 16/2803, C07K 2317/622, C07K 2319/33

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2017/0112878 A1 (SORRENTO THERAPEUTICS, INC.) 27 April 2017 (27.04.2017) abstract; para [0007], [0011]-[0012], [0014]-[0017], [0077], [0102], [0132], [0149], [0202]-[0203], [0206]; Table 7; SEQ ID NOs: 1-2, 7-8, 24, 55, 105	1-11, (13-17, 19-24)/(1-11)
Y	US 2013/0266551 A1 (ST. JUDE CHILDREN'S RESEARCH HOSPITAL, INC.) 10 October 2013 (10.10.2013) para [0014]-[0016], [0021], [0179]; SEQ ID NO: 10	1-11, (13-17, 19-24)/(1-11)

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
7 February 2022 (07.02.2022)	FEB 22 2022
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Kari Rodriquez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 21/54437

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 13*ter*.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 13*ter*.1(a)).

      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 21/54437

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.: 18, 25-31
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:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

See Supplemental Page

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.:
1-11, (13-17, 19-24)(in part) limited to SEQ ID NO: 24

Remark on Protest

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

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

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 21/54437

Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking

Groups I+: Claims 1-17, 19-24, drawn to a CD19 chimeric antigen receptor (CAR). The composition will be searched to the extent that the CD19 CAR encompasses SEQ ID NO: 24. It is believed that claims 1-11, (13-17, 19-24)(in part) encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 24. Additional CD19 CAR(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected CD19 CAR(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a CD19 CAR encompassing SEQ ID NO: 14 (Claims 1-9, 12, (13-17, 19-24)(in part).).

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

No technical features are shared between the amino acid sequences of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features of including: a CD19 chimeric antigen receptor (CAR) nucleic acid construct comprising a nucleic acid sequence encoding:
an scFv antibody that binds to CD19, a hinge region, a transmembrane domain; and a first intracellular domain and a second intracellular domain, these shared technical features are previously disclosed by WO 2020/180882 A1 to Nkarta, Inc. (hereinafter 'Nkarta') and WO 2019/173837 A1 to Sorrento Therapeutics, Inc. et al. (hereinafter 'Sorrento').

Nkarta discloses (instant claim 1) a CD19 chimeric antigen receptor (CAR) (abstract - "Provided for herein in several embodiments are immune cell-based (e.g., natural killer (NK) cell) compositions comprising CD19-directed chimeric antigen receptors"; para [0006] - "Also provided for herein are polynucleotides (as well as vectors for transfecting cells with the same) encoding a CD19-directed chimeric antigen receptor ...") nucleic acid construct comprising a nucleic acid sequence encoding: i) an scFv antibody that binds to CD19, wherein the scFv antibody comprises a heavy chain variable (VH) domain and a light chain variable (VL) domain; ii) a hinge region; iii) a transmembrane domain; and iv) a first intracellular domain and a second intracellular domain (para [0014] - "the CAR comprises an extracellular anti-CD19 binding moiety, wherein the anti-CD19 binding moiety comprises a variable heavy (VH) domain of a single chain Fragment variable (scFv) and a variable light (VL) domain of a scFv, a hinge, such as a CD8 alpha hinge, a transmembrane domain, such as a CD8 alpha transmembrane domain; and an intracellular signaling domain comprising an 0X40 subdomain and a CD3 zeta subdomain, and wherein the cell also expresses membrane-bound interleukin-15 (mbIL15).").
Nkarta does not specifically disclose ii) a hinge region of at least 65 amino acids in length; and wherein a T cell expressing the antigen receptor encoded by the construct has exhibits higher cytotoxicity toward CD19-positive tumor cells than is exhibited by T cells not expressing the antigen receptor encoded by the construct.
Sorrento discloses a dimeric antigen receptor nucleic acid construct comprising a nucleic acid sequence encoding:
ii) a hinge region of at least 65 amino acids in length (para [00166] - "In one embodiment, the hinge region comprises a CD28 hinge comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:5, or a CD8 hinge comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2l, or a hinge region comprising a CD28 and CD8 hinge sequences of SEQ ID NO: 19 (e.g., long hinge)."; para [00119] - "In one embodiment, the hinge region is 10, 11, 12... 100 amino acids in length");
iii) a transmembrane domain (para [0010] - "In one embodiment, the precursor polypeptide comprises a transmembrane region"); and
iv) a first intracellular domain and a second intracellular domain (para [0011] - "In one embodiment, the precursor polypeptide comprises an intracellular signaling region comprises an intracellular signaling sequence in any order and of any combination of two to five signaling sequences from 4-1BB, CD3zeta, CD28, CD27, 0X40, CD30, CD40, PD-l, ICOS, lymphocyte function-associated antigen-l (LFA-l), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, GITR (TNFRSF18), DR3 (TNFRSF25), TNFR2 and/or CD226."; para [0072] - "The CD38 DAR (V1) construct includes a long hinge sequence having CD8 and CD28 hinge sequences, and signaling regions include CD28 and long CD3zeta intracellular signaling sequences.");
wherein a T cell expressing the antigen receptor encoded by the construct has exhibits higher cytotoxicity toward CD-positive tumor cells than is exhibited by T cells not expressing the antigen receptor encoded by the construct (para [00362] - "Cell killing capability of T cells expressing either anti-CD38 chimeric antigen receptor (CAR) or anti-CD38 dimeric antigen receptor (DAR) Version 1 were compared in an in vitro cytotoxicity assay. Transgenic T cells expressing the Version 1 DAR construct (B dotted line) were comparable, but not better, at in vitro cell killing compared to transgenic T cells expressing the CAR construct (line C) (Figure 10)."); and where CAR variants comprising the same hinge, transmembrane, and intracellular domains may be made (para [00147] - "the DAR and CAR formats directly compare because the hinge regions, transmembrane regions and two intracellular signaling regions are the same"; para [00129] - "Transgenic host cells can be prepared... The donor DNA carries the transgene, for example any of the nucleic acids encoding a CAR or DAR construct described herein..."), which comprise an scFv antibody, wherein the scFv antibody comprises a heavy chain variable (VH) domain and a light chain variable (VL) domain (para [00121] - "The CAR extracellular binding domain is a single chain variable fragment (scFv or sFv) derived from fusing the variable heavy and light regions of a monoclonal antibody, such as a human monoclonal antibody."); and CD19 CAR constructs (para [0005] - "CAR-T cells targeting CD 19, a molecule expressed on B cells, have shown success in treatment of B cell malignancies and have received FDA approval, with some trials showing up to 70% of response, including sustained complete response.").
Since Nkarta discloses anti-CD19 CAR with a hinge domain, and Sorrento discloses where a hinge domain may be at least 65 amino acids in length, and contemplates CAR variants, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to modify the CAR, as disclosed by Nkarta, to instead use a hinge of at least 65 amino acids, as disclosed by Sorrento, affording any improved T cell cytotoxicity compared to T cells not expressing the CAR, and therefore affording any improvement in clinical outcome when used in a cell therapy to treat a subject.

Continued on Next Supplemental Page

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 21/54437

Continued from Previous Supplemental Page

As said technical features were known in the art at the time of the invention, these cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Groups I+ therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Item 4 (continued):
Claims 18, 25-31 are improper multiple dependent claims because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*5/10*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10	
Ａ６１Ｐ	*35/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00	
Ａ６１Ｐ	*35/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/02	
Ａ６１Ｐ	*7/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	7/00	
Ａ６１Ｋ	*35/17*	*(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/17	
Ａ６１Ｋ	*35/50*	*(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/50	
Ａ６１Ｋ	*35/51*	*(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/51	

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

弁理士　石川 大輔

(74)代理人　230113332

弁護士　山本 健策

(72)発明者　マ， チャンジョン

アメリカ合衆国 カリフォルニア ９２１２１， サンディエゴ， ディレクターズ プレイス ４９５５

(72)発明者　グオ， ウェンジョン

アメリカ合衆国 カリフォルニア ９２１２１， サンディエゴ， ディレクターズ プレイス ４９５５

(72)発明者　ディン， ベイ ベイ

アメリカ合衆国 カリフォルニア ９２１２１， サンディエゴ， ディレクターズ プレイス ４９５５

(72)発明者　ジャン， ヤンリャン

アメリカ合衆国 カリフォルニア ９２１２１， サンディエゴ， ディレクターズ プレイス ４９５５

Ｆターム（参考）　4B065　AA94X AA94Y AB01 BA02 CA44

4C087　AA01 AA02 BB37 BB58 BB59 NA14 ZB26 ZB27

4H045　AA10 AA11 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA76 EA20