(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6986190号
(P6986190)
(45)発行日　令和3年12月22日(2021.12.22)　(24)登録日　令和3年12月1日(2021.12.1)

(51)Int.Cl.		F I		
C07K 19/00	(2006.01)	C07K	19/00	ZNA
A61K 35/17	(2015.01)	A61K	35/17	A
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	E
A61K 47/68	(2017.01)	A61K	39/395	T
A61P 35/00	(2006.01)	A61K	47/68	

請求項の数 14　外国語出願　(全 38 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2020-17583(P2020-17583)
(22)出願日　令和2年2月5日(2020.2.5)
(62)分割の表示　特願2017-515139(P2017-515139)の分割
原出願日　平成27年9月18日(2015.9.18)
(65)公開番号　特開2020-100626(P2020-100626A)
(43)公開日　令和2年7月2日(2020.7.2)
審査請求日　令和2年3月5日(2020.3.5)
(31)優先権主張番号　62/053,068
(32)優先日　平成26年9月19日(2014.9.19)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者　598004424
シティ・オブ・ホープ
Ｃｉｔｙ　ｏｆ　Ｈｏｐｅ
アメリカ合衆国カリフォルニア州９１０１０－０２６９，デュアーテ，イースト・デュアーテ・ロード　１５００
１５００　Ｅａｓｔ，Ｄｕａｒｔｅ　Ｒｏａｄ，Ｄｕａｒｔｅ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ　９１０１０－０２６９，Ｕｎｉｔｅｄ　Ｓｔａｔｅｓ　ｏｆ　Ａｍｅｒｉｃａ
(74)代理人　100107766
弁理士　伊東　忠重
(74)代理人　100070150
弁理士　伊東　忠彦

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＩＬ１３Ｒα２を標的とする共刺激性キメラ抗原受容体Ｔ細胞Ｌ１３Ｒα２を標的とする共刺激性キメラ抗原レセプターＴ細胞

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
キメラ抗原受容体であって、以下の、
（ｉ）配列番号３を含む、結合ドメイン；
（ｉｉ）配列番号４、２０、５０又は５１を含む、スペーサードメイン；
（ｉｉｉ）ＣＤ４膜貫通ドメイン；
（ｉｖ）単一の４－ＩＢＢ共刺激ドメイン；及び、
（ｖ）ＣＤ３ζシグナル伝達ドメイン；
を含み、前記キメラ抗原レセプターは配列番号１０を含むキメラ抗原レセプターではない、キメラ抗原受容体。
【請求項２】
ＧＭＣＳＦＲａシグナル配列をさらに含む、請求項１に記載の、キメラ抗原受容体。
【請求項３】
ＧＭＣＳＦＲａシグナル配列が配列番号２を含む、請求項２記載の、キメラ抗原受容体。
【請求項４】
Ｔ２Ａリボソームスキップをさらに含む、請求項１～３のいずれか一項に記載の、キメラ抗原受容体。
【請求項５】
Ｔ２Ａリボソームスキップ配列は配列番号８を含む、請求項４に記載の、キメラ抗原受

容体。
【請求項６】
切断型ＣＤ１９をさらに含む、請求項１～５のいずれか一項記載の、キメラ抗原受容体。
【請求項７】
切断型ＣＤ１９が配列番号９を含む、請求項６記載の、キメラ抗原受容体。
【請求項８】
請求項１～７のいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体を発現する、ヒトＴ細胞集団。
【請求項９】
Ｔ細胞が中央記憶Ｔ細胞を含む、請求項８に記載の、ヒトＴ細胞集団。
【請求項１０】
請求項８又は９に記載のヒトＴ細胞集団を含む、患者のがんの治療に用いる、組成物。
【請求項１１】
ヒトＴ細胞が、患者の自己由来である、請求項１０に記載の、組成物。
【請求項１２】
ヒトＴ細胞が、患者の同種異系である、請求項１０に記載の、組成物。
【請求項１３】
前記がんが、膠芽細胞腫である、請求項１０～１２のいずれか一項に記載の、組成物。
【請求項１４】
キメラ抗原受容体であって、以下の、
（ｉ）配列番号３を含む、結合ドメイン；
（ｉｉ）配列番号４，２０，５０又は５１を含む、スペーサードメイン；
（ｉｉｉ）配列番号５を含む、ＣＤ４膜貫通ドメイン；
（ｉｖ）配列番号２９を含む、単一の４－ＩＢＢ共刺激ドメイン；及び、
（ｖ）配列番号４９を含む、ＣＤ３ζシグナル伝達ドメイン；
を含み、前記キメラ抗原レセプターは配列番号１０を含むキメラ抗原レセプターではない、キメラ抗原受容体。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
［００１］　抗腫瘍治療について、改変Ｔ細胞を用いる治療を含む、腫瘍特異的Ｔ細胞に基づく免疫療法が研究されてきた。当該治療に用いられるＴ細胞は、インビボで十分な期間、活性を維持しない場合がある。Ｔ細胞の腫瘍特異性が比較的低い場合がある。したがって、本技術分野では、抗腫瘍作用（functioning）がより長期に及ぶ腫瘍特異的がん治療が必要とされている。
【背景技術】
【０００２】
［００２］　未分化星状細胞腫（ＡＡ－グレードＩＩＩ）、及び膠芽細胞腫（ＧＢＭグレードＩＶ）を含む、悪性神経膠腫（Malignant　gliomas，　ＭＧ）の発生率は、米国で毎年約２万例と診断されている。米国脳腫瘍協会によると、米国の２０１０年の国勢調査データに基づく悪性脳腫瘍がある個人の総有病者数は約１４万人である。ＭＧは希少疾患であるが、悪性挙動に関してきわめて攻撃的で不均一であり、かつ、ほぼ一様に致死的である。高グレードＭＧの現在の標準治療法では、短期的利益しかもたらさず、かつ、当該脳腫瘍は事実上治癒不可能である。実際、現代の外科的、及び放射線治療技術をもってしても、病巣が中枢神経系（ＣＮＳ）に存在するため、すでに重度である病的状態を悪化させることが多く、５年生存率はかなり低い。さらに、疾患が再発した大部分の患者にとって、治療選択肢はほとんどない。したがって、特に、最先端(frontline)療法後に、再発／進行した患者に対する、より効果的な治療法、及び、これらの患者集団の臨床試験への参加の保証が強く望まれている。
【０００３】

［００３］　キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）Ｔ細胞は、抗原特異的な腫瘍集団を特異的に認識するように操作でき（非特許文献１～５）、かつ、Ｔ細胞は脳実質を通過して移動し、浸潤性悪性細胞を標的として殺傷できる（非特許文献６～８）ため、ＣＡＲ改変Ｔ細胞を利用する養子Ｔ細胞療法（adoptive T cell therapy；ＡＣＴ）は、ＭＧの再発率を低下させる、安全かつ有効な方法を提供することができる。前臨床試験では、ＩＬ１３Ｒα２標的化ＣＡＲ＋Ｔ細胞が、幹様(stem-like)、及び分化した神経膠腫細胞に対して、強力な主要組織適合複合体（ＭＨＣ）非依存性のＩＬ１３Ｒα２特異的細胞溶解活性を呈し、かつ、確立された神経膠腫異種移植の退縮をインビボでを誘発することが実証されている（非特許文献４、及び９）。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００４】

【非特許文献１】Cartellieri et al. 2010 JBiomed Biotechnol 2010:956304
【非特許文献２】Ahmed et al. 2010 Clin Cancer Res 16:474
【非特許文献３】Sampson et al. 2014 Clin Cancer Res 20:972
【非特許文献４】Brown et al. 2013 Clin Cancer Res 2012 18:2199
【非特許文献５】Chow et al. 2013 Mol Ther 21 :629
【非特許文献６】Hong et al. 2010 Clin Cancer Res 16:4892
【非特許文献７】Brown et al. 2007 J Immunol 179:3332
【非特許文献８】Yaghoubi 2009 Nat Clin PRact Oncol 6:53
【非特許文献９】Kahlon et al. 2004 Cancer Res 64:9160

【発明の概要】

【０００５】

［００４］　本明細書は、細胞外ドメイン、膜貫通領域、及び細胞内シグナル伝達ドメイン、を含むキメラ膜貫通免疫受容体（キメラ抗原受容体、又はＣＡＲ）に関する。細胞外ドメインは、インターロイキン－１３Ｒα２（ＩＬ１３Ｒα２）に結合するＩＬ－１３リガンド、及び場合によっては、例えばヒトＦｃドメインの一部を含む、スペーサーで構成される。膜貫通部分としては、ＣＤ４膜貫通ドメイン、ＣＤ８膜貫通ドメイン、ＣＤ２８膜貫通ドメイン、ＣＤ３膜貫通ドメイン、又は４－ＩＢＢ膜貫通ドメインがあげられる。細胞内シグナル伝達ドメインとしては、ヒトＣＤ３複合体のゼータ鎖由来のシグナル伝達ドメイン（ＣＤ３ζ）、及び１又はそれ以上の共刺激ドメイン、例えば、４－１ＢＢ共刺激ドメインがあげられる。細胞外ドメインにより、ＣＡＲが、Ｔ細胞の表面上に発現されると、Ｔ細胞の活性を、神経膠腫を含む腫瘍細胞の表面上に発現される受容体である、ＩＬ１３Ｒα２を発現させることができるようにする。ＣＡＲのＩＬ１３Ｒα２結合部分は、結合特異性を高めるアミノ酸改変、例えばＥ１３Ｙ変異を含むことが重要である。細胞内領域に、ＣＤ３ζと直列の４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）共刺激ドメイン等の共刺激ドメインを含めることにより、Ｔ細胞は共刺激シグナルを受け取ることができる。Ｔ細胞、例えば患者特異的な自己Ｔ細胞は、本明細書に関するＣＡＲを発現するように改変でき、かつ、改変細胞は、ＡＣＴで増殖され、用いられうる。様々なＴ細胞サブセットを用いうる。さらに、ＣＡＲは、ＮＫ細胞等の他の免疫細胞でも発現されうる。患者が本明細書に関するＣＡＲを発現する免疫細胞で治療される場合、当該細胞は、自己由来(autologous)、又は同種異系の(allogenic)Ｔ細胞でありうる。場合によっては、ＣＤ４５ＲＯ＋ＣＤ６２Ｌ＋である、ＣＤ４＋、及びＣＤ８＋中央記憶(central memory)Ｔ細胞（T_{CM}）であり、当該細胞を用いると、他の患者特異的Ｔ細胞と比較して、養子移入(adoptive transfer)後の細胞の長期持続性を改善することができる。

【０００６】

［００５］　本明細書は、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）ｒをコードする核酸分子であって、前記キメラ抗原受容体が、以下の：ヒトＩＬ－１３、又は１～１０個（例えば、１又は２）のアミノ酸改変があるその変異体(variant)；ＣＤ４膜貫通ドメイン、又は１～１０個（例えば、１又は２）のアミノ酸改変があるその変異体、ＣＤ８膜貫通ドメイン、又

は１～１０個（例えば、１又は２）のアミノ酸改変があるその変異体、ＣＤ２８膜貫通ドメイン、又は１～１０個（例えば、１又は２）のアミノ酸改変があるその変異体、及びＣＤ３ζ膜貫通ドメイン、又は１～１０個（例えば、１又は２）のアミノ酸改変があるその変異体、から選択される膜貫通ドメイン；共刺激ドメイン；及び、ＣＤ３ζシグナル伝達ドメイン、又は１～１０個（例えば、１又は２）のアミノ酸改変があるその変異体；を含む、核酸分子に関する。

【０００７】

［００６］　様々な実施形態では、共刺激ドメインは、ＣＤ２８共刺激ドメイン、又は１～１０個（例えば、１又は２）のアミノ酸改変があるその変異体、４－ＩＢＢ共刺激ドメイン、又は１～１０個（例えば、１又は２）のアミノ酸改変があるその変異体、及びＯＸ４０共刺激ドメイン、又は１～１０個（例えば、１又は２）のアミノ酸改変があるその変異体、からなる群から選択される。特定の実施形態では、４－ＩＢＢ共刺激ドメイン、又は１～１０個（例えば、１又は２）のアミノ酸改変があるその変異体が存在する。

【０００８】

［００７］　さらなる実施形態では、前記ＣＡＲは、以下の：ＩＬ１３Ｒα２とＩＬ１３Ｒα１の結合特異性を高める、１～１０個のアミノ酸改変がある、ヒトＩＬ１３の変異体；前記ヒトＩＬ－１３、又はその変異体が、配列番号３の第１１位のアミノ酸がＥ以外であり、１～５個のアミノ酸改変がある、配列番号３のアミノ酸配列を含む、ＩＬ－１３変異体であり；ＣＤ２８共刺激ドメイン、又は１～１０個（例えば、１又は２）のアミノ酸改変があるその変異体、４－ＩＢＢ共刺激ドメイン、又は１～１０個（例えば、１又は２）のアミノ酸改変があるその変異体、及びＯＸ４０共刺激ドメイ、又は１～１０個（例えば、１又は２）のアミノ酸改変があるその変異体、からなる群から選択される、異なる２つの共刺激ドメイン；ＣＤ２８共刺激ドメイン、又は１～２個のアミノ酸改変があるその変異体、４－ＩＢＢ共刺激ドメイン、又は１～２個のアミノ酸改変があるその変異体、及びＯＸ４０共刺激ドメイン、又は１～２個のアミノ酸改変があるその変異体、からなる群から選択される、異なる２つの共刺激ドメイン；ヒトＩＬ－１３、又は１～２個のアミノ酸改変があるその変異体；ＣＤ４膜貫通ドメイン、又は１～２個のアミノ酸改変があるその変異体、ＣＤ８膜貫通ドメイン、又は１～２個のアミノ酸改変があるその変異体、ＣＤ２８膜貫通ドメイン、又は１～２個のアミノ酸改変があるその変異体、ＣＤ３ζ膜貫通ドメイン、又は１～２個のアミノ酸改変があるその変異体、からなる群から選択される、膜貫通ドメイン；共刺激ドメイン；かつ、ＣＤ３ζシグナル伝達ドメイン、又は１～２個のアミノ酸改変があるその変異体；前記ＩＬ－１３、又はその変異体と、前記膜貫通ドメインとの間に位置するスペーサー領域（例えば、前記スペーサー領域が、配列番号４，１４～２０，５０、及び５２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む）；前記スペーサーが、ＩｇＧヒンジ領域を含み；前記スペーサー領域が１０～１５０のアミノ酸を含み；前記４－１ＢＢシグナル伝達ドメインが、配列番号６のアミノ酸配列を含み；前記ＣＤ３ζシグナル伝達ドメインが、配列番号７のアミノ酸配列を含み；及び、３～１５個のアミノ酸のリンカーが、前記共刺激ドメインと前記ＣＤ３ζシグナル伝達ドメイン、又はその変異体との間に位置する；を含む。２つの共刺激ドメインが存在する特定の実施形態では、一方は４－ＩＢＢ共刺激ドメインであり、他方はＣＤ２８、及びＣＤ２８ｇｇから選択される、共刺激ドメインである。

【０００９】

［００８］　いくつかの実施形態では、核酸分子は、配列番号１０，３１～４８、及び５２から選択されるアミノ酸配列を含む、ポリペプチドを発現し；前記キメラ抗原受容体は、配列番号１１のアミノ酸を含む、ＩＬ－１３／ＩｇＧ４／ＣＤ４ｔ／４１－ＢＢ領域、及び配列番号７のアミノ酸配列を含む、ＣＤ３ζシグナル伝達ドメインを含み；前記キメラ抗原受容体は、配列番号１０，３１～４８、及び５２のアミノ酸配列を含む。

【００１０】

［００９］　また、キメラ抗原受容体をコードする発現カセットを含むベクターによって形質導入されたヒトＴ細胞集団であって、キメラ抗原受容体が、以下の：ヒトＩＬ－１

３、又は１～１０個のアミノ酸改変があるその変異体；ＣＤ４膜貫通ドメイン、又は１～１０個のアミノ酸改変があるその変異体、ＣＤ８膜貫通ドメイン、又は１～１０個のアミノ酸改変があるその変異体、ＣＤ２８膜貫通ドメイン、又は１～１０個のアミノ酸改変があるその変異体、及びＣＤ３ζ膜貫通ドメイン、又は１～１０個のアミノ酸改変があるその変異体、から選択される膜貫通ドメイン；共刺激ドメイン；及び、ＣＤ３ζシグナル伝達ドメイン、又は１～１０個のアミノ酸改変があるその変異体；を含む、Ｔ細胞集団が開示される。様々な実施形態では、ヒトＴ細胞集団は、配列番号１０，３１～４８、及び５２から選択されるアミノ酸配列を含むキメラ抗原受容体を発現するベクターを含み；前記Ｔ細胞集団が、中央記憶Ｔ細胞（Ｔｃｍ細胞）を含み（例えば、前記細胞の少なくとも、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％は、Ｔｃｍ細胞であり；前記Ｔｃｍ細胞の少なくとも、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％は、ＣＤ４＋であり、前記Ｔｃｍ細胞の少なくとも、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％が、ＣＤ８＋細胞である）。

【００１１】

［００１０］　また、患者のがんを治療する方法であって、キメラ抗原受容体をコードする発現カセットを含むベクターによって形質導入された自己、又は同種異系のヒトＴ細胞集団（例えば、Ｔｃｍ細胞を含む、自己又は同種異系のヒトＴ細胞、例えば細胞の少なくとも、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％は、Ｔｃｍ細胞であり；Ｔｃｍ細胞の少なくとも、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％は、ＣＤ４＋であり、Ｔｃｍ細胞の少なくとも、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％は、ＣＤ８＋である）を投与することを含み、ここで、キメラ抗原受容体が、配列番号１０，３１～４８、及び５２から選択されるアミノ酸配列を含む、方法に関する。様々な実施形態では、ヒトＴ細胞集団は、中央記憶Ｔ細胞を含み；がんは膠芽腫(glioblastoma)であり；かつ、形質導入されたヒトＴ細胞は、前記患者からＴ細胞を得る工程と、前記Ｔ細胞を処理して中央記憶Ｔ細胞を単離する工程と、及び前記中央記憶細胞の少なくとも一部分を、キメラ抗原受容体をコードする発現カセットを含むウイルスベクターで形質変換する工程と、を含む方法により作製され；ここで、前記キメラ抗原受容体は、配列番号１０，３１～４８、及び５２から選択されるアミノ酸配列を含む。

【００１２】

［００１１］　配列番号１０、並びに配列番号１０，３１～４８、及び５２、から選択されるアミノ酸配列と、少なくとも９５％同一であるアミノ酸配列を含む、ポリペプチドをコードする核酸分子；５個以下のアミノ酸置換、欠失、又は挿入の存在を除き、配列番号１０，３１～４８、及び５２、から選択されるアミノ酸配列と同一であるアミノ酸配列を含む、ポリペプチドをコードする核酸分子；５個以下のアミノ酸置換の存在を除き、配列番号１０、並びに配列番号１０，３１～４８、及び５２、から選択されるアミノ酸配列と同一であるアミノ酸配列を含む、ポリペプチドをコードする核酸分子；及び、２個以下のアミノ酸置換の存在を除き、配列番号１０、並びに配列番号１０，３１～４８、及び５２、から選択されるアミノ酸配列を含む、ポリペプチドをコードする核酸分子；もまた、本明細書に関する。

【００１３】

［００１２］　本明細書に関する、あるＣＡＲ、例えばＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζＣＡＲ、及びＩＬ１３（ＥＱ）ＣＤ２８－ＢＢζＣＡＲには、特定の他のＩＬ１３標的化ＣＡＲと比較して、特定の有利な特徴がある。例えば、これらのＩＬ１３Ｒαに対する選択性は向上されており、Ｔｈ２サイトカイン産生、特に、ＩＬ１３産生をより抑制させる。

【００１４】

［００１３］　ＩＬ１３Ｒα２を標的とする、ＣＡＲを発現するＴ細胞は、膠芽細胞腫等のがん、並びに髄芽細胞腫、乳がん、頭頸部がん、腎がん、卵巣がん、及びカポジ肉腫を含むが、これらに限定されない、ＩＬ１３Ｒα２を発現する他のがんの治療に有用でありうる。したがって、本開示は、本明細書に関するＣＡＲを発現するＴ細胞を用いて、がんを治療するための方法を含む。

【００１５】
［００１４］　本開示はまた、本明細書に関するＣＡＲのいずれかをコードする核酸分子（例えば、ＣＡＲのうちの１つをコードする核酸配列を含むベクター）、及び本明細書に関するＣＡＲのいずれかを発現する、単離されたＴリンパ球を開示する。
【００１６】
［００１５］　本明細書に関するＣＡＲは、ＩＬ１３ドメインと、膜貫通ドメインとの間に位置する、スペーサー領域を含むことができる。様々な、異なるスペーサーを用いることができる。それらのいくつかは、ヒトＦｃ領域の少なくとも一部、例えばヒトＦｃ領域のヒンジ部分、又はＣＨ３ドメイン、又はその変異体を含む。以下の表１は、本明細書に関するＣＡＲに用いられることができる、様々なスペーサーを提供する。
【００１７】
表１：スペーサーの例示
【００１８】

【表１】

名称	長さ	配列
a3	3 aa	AAA
リンカー	10 aa	GGGSSGGGSG (SEQ ID NO:14)
IgG4 ヒンジ (S→P) (S228P)	12 aa	ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO:15)
IgG4 ヒンジ	12 aa	ESKYGPPCPSCP (SEQ ID NO:52)
IgG4 ヒンジ + リンカー	22 aa	ESKYGPPCPPCPGGGSSGGGSG (SEQ ID NO:16)
CD28 ヒンジ	39 aa	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHL CPSPLFPGPSKP (SEQ ID NO:17)
CD8 ヒンジ -48aa	48 aa	AKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE ACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO:18)
CD8 ヒンジ -45aa	45aa	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACR PAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO:19)
IgG4(HL-CH3)	129 aa	ESKYGPPCPPCPGGGSSGGGSGGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:20)
IgG4(L235E,N297Q)	229 aa	ESKYGPPCPSCPAPEFEGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHQAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:4)
IgG4(S228P, L235E,N297Q)	229 aa	ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHQAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK

【００１９】

【表２】

		VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:51)
IgG4(CH3)	107 aa	GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS LGK (SEQ ID NO:50)

いくつかのスペーサー領域は、免疫グロブリン（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４）ヒンジ領域、すなわち免疫グロブリンのＣＨ１ドメイン、とＣＨ２ドメインとの間にある配列の全部、又は一部、例えばＩｇＧ４　Ｆｃヒンジ、又はＣＤ８ヒンジ、を含む。いくつかのスペーサー領域は、免疫グロブリンＣＨ３ドメイン、又はＣＨ３ドメイン、及びＣＨ２ドメインをともに含む。免疫グロブリン由来の配列は、１又はそれ以上のアミノ酸改変、例えば、１，２，３，４又は５個の置換、例えば、オフターゲット結合を低下させる置換、を含むことができる。

【００２０】

［００１６］　「アミノ酸改変」とは、タンパク質、又はペプチド配列におけるアミノ酸の置換、挿入、及び/又は欠失をいう。「アミノ酸置換」、又は「置換」とは、親ペプチド、又は親タンパク質配列の特定の位置のアミノ酸を、別のアミノ酸で置換することをいう。置換は、得られるタンパク質中のアミノ酸を非保存的に（すなわち、特定の大きさ、又は特徴があるアミノ酸のグループに属するアミノ酸から、他のグループに属するアミノ酸に、コドンを変化させて）、又は保存的に（すなわち、特定の大きさ、又は特徴があるアミノ酸のグループに属するアミノ酸から、同じグループに属するアミノ酸へ、コドンを変化させて）、変える置換をすることができる。このような保存的変化によれば、一般に、得られるタンパク質の構造、及び機能の変化はより小さい。以下はアミノ酸の様々なグループの例である：

１）非極性Ｒ基があるアミノ酸：アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニン；

２）極性Ｒ基が非荷電であるアミノ酸：グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミン；

３）荷電した極性Ｒ基があるアミノ酸（ｐＨ６．０で負に荷電）：アスパラギン酸、グルタミン酸；

４）塩基性アミノ酸（ｐＨ６．０で正に帯電）：リジン、アルギニン、ヒスチジン（ｐＨ６．０）。他のグループとしては、フェニル基がある、フェニルアラニン、トリプトファン、及びチロシン、のアミノ酸であってよい。

【００２１】

［００１７］　ある実施形態では、スペーサーは、非修飾スペーサー中に存在するアミノ酸残基とは異なるアミノ酸残基で置換された、１又はそれ以上のアミノ酸残基を含むＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、又はＩｇＧ４に由来する。１又はそれ以上の置換されたアミノ酸残基は、限定されないが、２２０，２２６，２２８，２２９，２３０，２３３，２３４，２３５，２３４，２３７，２３８，２３９，２４３，２４７，２６７，２６８，２８０，２９０，２９２，２９７，２９８，２９９，３００，３０５，３０９，２１８，３

２６，３３０，３３１，３３２，３３３，３３４，３３６，３３９位における、１以上のアミノ酸残基、又はそれらの組み合わせから選択される。以下でより詳細に説明するこの番号付けスキームでは、表１のＩｇＧ４（Ｌ２３５Ｅ、Ｎ２９７Ｑ）スペーサーの最初のアミノ酸は２１９であり、かつ表１のＩｇＧ４（ＨＬ－ＣＨ３）スペーサーの最初のアミノ酸は２１９であり、表１のＩｇＧヒンジ配列の最初のアミノ酸、かつＩｇＧ４ヒンジリンカー（ＨＬ）配列の最初のアミノ酸である。

【００２２】

［００１８］　いくつかの実施形態では、改変スペーサーは、以下のアミノ酸残基置換：Ｃ２２０Ｓ，Ｃ２２６Ｓ，Ｓ２２８Ｐ，Ｃ２２９Ｓ，Ｐ２３０Ｓ，Ｅ２３３Ｐ，Ｖ２３４Ａ，Ｌ２３４Ｖ，Ｌ２３４Ｆ，Ｌ２３４Ａ，Ｌ２３５Ａ，Ｌ２３５Ｅ，Ｇ２３６Ａ，Ｇ２３７Ａ，Ｐ２３８Ｓ，Ｓ２３９Ｄ，Ｆ２４３Ｌ，Ｐ２４７Ｉ，Ｓ２６７Ｅ，Ｈ２６８Ｑ，Ｓ２８０Ｈ，Ｋ２９０Ｓ，Ｋ２９０Ｅ，Ｋ２９０Ｎ，Ｒ２９２Ｐ，Ｎ２９７Ａ，Ｎ２９７Ｑ，Ｓ２９８Ａ，Ｓ２９８Ｇ，Ｓ２９８Ｄ，Ｓ２９８Ｖ，Ｔ２９９Ａ，Ｙ３００Ｌ，Ｖ３０５Ｉ，Ｖ３０９Ｌ，Ｅ３１８Ａ，Ｋ３２６Ａ，Ｋ３２６Ｗ，Ｋ３２６Ｅ，Ｌ３２８Ｆ，Ａ３３０Ｌ，Ａ３３０Ｓ，Ａ３３１Ｓ，Ｐ３３１Ｓ，Ｉ３３２Ｅ，Ｅ３３３Ａ，Ｅ３３３Ｓ，Ｅ３３３Ｓ，Ｋ３３４Ａ，Ａ３３９Ｄ，Ａ３３９Ｑ，Ｐ３９６Ｌ、又はそれらの組み合わせ、を含むが、これらに限定されない、ＩｇＧ１，ＩｇＧ２，ＩｇＧ３，又はＩｇＧ４由来である。

【００２３】

［００１９］　ある実施形態では、当該改変スペーサーは、未改変領域に存在するものとは異なるアミノ酸残基で置換された、１又はそれ以上のアミノ酸残基を含む、ＩｇＧ４領域由来である。１又はそれ以上の置換アミノ酸残基は、位置２２０，２２６，２２８，２２９，２３０，２３３，２３４，２３５，２３４，２３７，２３８，２３９，２４３，２４７，２６７，２６８，２８０，２９０，２９２，２９７，２９８，２９９，３００，３０５，３０９，２１８，３２６，３３０，３３１，３３２，３３３，３３４，３３６，３３９の１又はそれ以上のアミノ酸残基、又はそれらの組合せ、から選択されるが、それらに限定されない。

【００２４】

［００２０］　いくつかの実施形態では、当該改変スペーサーは、以下のアミノ酸残基置換：２２０Ｓ，２２６Ｓ，２２８Ｐ，２２９Ｓ，２３０Ｓ，２３３Ｐ，２３４Ａ，２３４Ｖ，２３４Ｆ，２３４Ａ，２３５Ａ，２３５Ｅ，２３６Ａ，２３７Ａ，２３８Ｓ，２３９Ｄ，２４３Ｌ，２４７Ｉ，２６７Ｅ，２６８Ｑ，２８０Ｈ，２９０Ｓ，２９０Ｅ，２９０Ｎ，２９２Ｐ，２９７Ａ，２９７Ｑ，２９８Ａ，２９８Ｇ，２９８Ｄ，２９８Ｖ，２９９Ａ，３００Ｌ，３０５Ｉ，３０９Ｌ，３１８Ａ，３２６Ａ，３２６Ｗ，３２６Ｅ，３２８Ｆ，３３０Ｌ，３３０Ｓ，３３１Ｓ，３３１Ｓ，３３２Ｅ，３３３Ａ，３３３Ｓ，３３３Ｓ，３３４Ａ，３３９Ｄ，３３９Ｑ，３９６Ｌ、又はそれらの組み合わせのうちの１又はそれ以上を含むが、これらに限定されない、ＩｇＧ４領域由来であり、未改変スペーサーのアミノ酸は、示された位置で上記の同定されたアミノ酸で置換される。

【００２５】

［００２１］　本明細書に関する免疫グロブリンのアミノ酸位置について、番号付けは、ＥＵインデックス、又はＥＵ番号付けスキームによる（本明細書にその全体が参考として援用されるKabat et al.1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.,United States Public Health Service,National Institutes of Health, Bethesda, hereby entirely incorporated by reference）。ＥＵインデックス、又はＫａｂａｔ、若しくはＥＵ番号付けスキーム等のＥＵインデックスは、ＥＵ抗体の番号付けをいう（Edelman et al.1969 Proc Natl Acad Sci USA 63:78-85）。

【００２６】

［００２２］　様々な膜貫通ドメインを、ＩＬ１３Ｒａ２に対するＣＡＲに用いることができる。表２は、適当な膜貫通ドメインの例を含む。スペーサードメインが存在する場合、膜貫通ドメインはスペーサードメインに対するカルボキシ末端に位置する。

【００２７】
表２：　膜貫通ドメインの例示
【００２８】
【表３】

名称	受託番号	長さ	配列
CD3z	J04132.1	21 aa	LCYLLDGILFIYGVILTALFL (SEQ ID NO:21)
CD28	NM_006139	27aa	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO:22)
CD28(M)	NM_006139	28aa	MFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO:22)
CD4	M35160	22aa	MALIVLGGVAGLLLFIGLGIFF (SEQ ID NO:5)
CD8tm	NM_001768	21aa	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT (SEQ ID NO:23)

【００２９】
【表４】

CD8tm2	NM_001768	23aa	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY (SEQ ID NO:24)
CD8tm3	NM_001768	24aa	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO:25)
41BB	NM_001561	27aa	IISFFLALTSTALLFLLFF LTLRFSVV (SEQ ID NO:26)

本明細書に関するＣＡＲの多くは、１又はそれ以上（例えば、２つ）の共刺激ドメインを含む。共刺激ドメイン（複数可）は、膜貫通ドメインと、ＣＤ３ζシグナル伝達ドメインとの間に位置する。表３は、ＣＤ３ζシグナル伝達ドメインの配列、及び適当な共刺激ドメインの例示である。
【００３０】
表３：共刺激ドメインの例示
【００３１】

【表５】

名称	受託番号	長さ	配列
CD3ζ	J04132.1	113 aa	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL PPR
CD28	NM_006139	42aa	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQ PYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO: 27)
CD28gg*	NM_006139	42aa	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHY QPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO:28)
41BB	NM_001561	42 aa	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO:29)
OX40		42 aa	ALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQ EEQADAHSTLAKI (SEQ ID NO:30)

【図面の簡単な説明】

【００３２】

【図１】［００２３］　ＩＬ１３Ｒα２特異的ヒトＩＬ－１３変異体（ｈｕＩＬ－１３（Ｅ１３Ｙ））、ヒトＩｇＧ４　Ｆｃスペーサー（ｈｕγ$_4$Ｆｃ）、ヒトＣＤ４膜貫通（ｈｕＣＤ４ｔｍ）、ヒトＣＤ３ζ鎖の細胞質（ｈｕＣＤ３ζｃｙｔ）部分から構成される、ＩＬ１３（Ｅ１３Ｙ）－ゼータカインＣＡＲ（左）の概略図である。さらに、ＩｇＧ４スペーサーのＣＨ２ドメインに位置する２つの点変異Ｌ２３５Ｅ、及びＮ２９７Ｑ（赤で表示）を除いて、ＩＬ１３（Ｅ１３Ｙ）－ゼータカインと同じ、ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζＣＡＲ、及び共刺激４－１ＢＢ細胞質ドメイン（４－１ＢＢ細胞）の挿入も示される。

【図２】［００２４］　図２Ａ～Ｃは、オープンリーディングフレームのいくつかのベクターを示す。Ａは、２６７０ヌクレオチドＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢＺ－Ｔ２ＡＣＤ１９ｔ構築物のｃＤＮＡオープンリーディングフレームの図であり、ここで、ＩＬ１３Ｒα２特異的リガンドＩＬ１３（Ｅ１３Ｙ）、ＩｇＧ４（ＥＱ）Ｆｃヒンジ、ＣＤ４膜貫通、４－１ＢＢ細胞質シグナル伝達、３つのグリシンリンカー、及びＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢＺ　ＣＡＲのＣＤ３ζ細胞質シグナル伝達ドメイン、並びにＴ２Ａリボソームスキップ、及び切断型ＣＤ１９配列が示される。ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζＣＡＲ、及びＣＤ１９ｔの表面発現を駆動するヒトＧＭ－ＣＳＦ受容体α、及びＣＤ１９シグナル配列もまた示される。Ｂは、宿主ゲノムに組み込まれるであろう長い末端反復（「Ｒ」で示される）の隣接(flanked)配列の図である。Ｃは、ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢＺ－Ｔ２Ａ－ＣＤ１９ｔ＿ｅｐＨＩＶ７プラスミドのマップである。

【図３】［００２５］　ｐＨＩＶ７の構築物を示す。

【図４】［００２６］　ｐＨＩＶ７の要素を示す。

【図５】［００２７］　ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζ／ＣＤ１９ｔ＋Ｔ$_{CM}$の作製スキームを示す。

【図６】［００２８］　図６Ａ～Ｃは、表面導入遺伝子、及びＴ細胞マーカー発現のフローサイトメトリー分析の結果を示す。ＩＬ－１３（ＥＱ）ＢＢζ／ＣＤ１９ｔ＋Ｔ$_{CM}$のＨＤ００６．５、及びＨＤ１８７．１を、抗ＩＬ－１３－ＰＥ、及び抗ＣＤ８－ＦＩＴＣで同時染色して、ＣＤ８＋ＣＡＲ＋、及びＣＤ４＋（すなわちＣＤ８陰性）ＣＡＲ＋細胞（Ａ）を検出するか、抗ＣＤ１９－ＰＥ、及び抗ＣＤ４－ＦＩＴＣで、ＣＤ４＋ＣＤ１９

ｔ＋、及びＣＤ８＋（すなわちＣＤ４陰性）ＣＡＲ＋細胞（Ｂ）を検出する。蛍光色素結合抗ＣＤ３、ＴＣＲ、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ６２Ｌ、及びＣＤ２８（灰色ヒストグラム）、又はアイソタイプ対照（黒色ヒストグラム）で染色した、ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζ／ＣＤ１９ｔ＋$Ｔ_{ＣＭ}$のＨＤ００６．５、及びＨＤ１８７．１（Ｃ）。すべて、上記アイソタイプを染色した生存リンパ球に基づく比率（ＤＡＰＩ陰性）。

【図７】［００２９］　図７Ａ～Ｂは、ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢＺ＋$Ｔ_{ＣＭ}$のＩＬ１３Ｒα２特異的エフェクター機能のインビトロ機能的特徴付けを示す。ＩＬ１９（ＥＱ）ＢＢＺ／ＣＤ１９ｔ＋$Ｔ_{ＣＭ}$のＨＤ００６．５、及びＨＤ１８７．１を、ＣＤ１９ｔ発現に基づく１０：１のＥ：Ｔ比を用いた、６時間^{51}Ｃｒ放出アッセイにおいて、エフェクターとして用いた。ＩＬ１３Ｒα２陽性腫瘍標的は、ＩＬ１３Ｒα２（Ｋ５６２－ＩＬ１３Ｒα２）、及び一次神経膠腫系統ＰＢＴ０３０－２を発現するように改変されたＫ５６２であり、ＩＬ１３Ｒα２陰性腫瘍標的対照は、Ｋ５６２親系統であった（Ａ）。ＩＬ１３Ｒα２陽性、及び陰性標的との１０：１のＥ：Ｔ比での一晩の同時培養後、ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢＺ／ＣＤ１９ｔ＋$Ｔ_{ＣＭ}$のＨＤ００６．５、及びＨＤ１８７．１を抗原依存性サイトカイン産生について評価した。サイトカインレベルは、Bio-PlexProヒトサイトカイン$TH1/TH2$アッセイキットを用いて測定し、ＩＮＦ－γを報告した（Ｂ）。

【図８】［００３０］　図８Ａ～Ｃは、ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζ／ＣＤ１９ｔ＋$Ｔ_{ＣＭ}$の養子移入後の、確立された神経膠腫腫瘍異種移植片の退縮を実証する実験結果を示す。ＥＧＦＰ－ｆｆＬｕｃ＋ＰＢＴ０３０－２腫瘍細胞（１×１０^{5}）を、ＮＳＧマウスの右前脳に定位固定した。５日目に、マウスに、２×１０^{6}のＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζ／ＣＤ１９ｔ＋$Ｔ_{ＣＭ}$（１．１×１０^{6}のＣＡＲ＋；ｎ＝６）、２×１０^{6}モック(mock)ＴＣＭ（ＣＡＲなし、ｎ＝６）、又はＰＢＳ（ｎ＝６）のいずれかを注入した。Xenogen Living Imageを用いて、各群の代表的なマウスの相対的な腫瘍負荷を示した（Ａ）。ｆｆＬｕｃフラックス（フォトン／秒）の定量化は、モック(mock)形質導入ＴＣＭ、及びＰＢＳと比較してＩＬ１３ＢＱζ／ＣＤ１９ｔ＋$Ｔ_{ＣＭ}$が腫瘍退縮を誘導することを示す（＃ｐ＜０．０２、＊ｐ＜０．００１、反復測定ＡＮＯＶＡ）（Ｂ）。カプランマイヤー生存曲線（ｎ＝６／グループ）によれば、ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζ／ＣＤ１９ｔ＋$Ｔ_{ＣＭ}$で処置したマウスの生存率（ｐ＝０．０００８；対数ランク検定）が有意に改善されたことが示された（Ｃ）。

【図９】［００３１］　図９Ａ～Ｃは、ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢＺ$Ｔ_{ＣＭ}$、及びＩＬ１３－ゼータカインＣＴＬクローンの抗腫瘍効果を比較する実験結果を示す。ＥＧＦＰ－ｆｆＬｕｃ＋ＰＢＴ０３０－２ＴＳｓ（１×１０^{5}）をＮＳＧマウスの右前脳内に定位固定的に移植した。８日目に、マウスに、１．６×１０^{6}モックＴＣＭ（ＣＡＲなし）か、１．０×１０^{6}ＣＡＲ＋ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζ$Ｔ_{ＣＭ}$（１．６×１０^{6}総Ｔ細胞、６３％ＣＡＲ）か、１．０×１０^{6}ＩＬ１３－ゼータカインＣＤ８＋ＣＴＬ　ｃｌ．２Ｄ７（クローナルＣＡＲ＋）かを注入するか、又は処置なしとした（１群当たりｎ＝６）。Xenogen Living Imageを用いて、各グループの代表的なマウスの、相対的な腫瘍負荷を示した（Ａ）。経時的なｆｆＬｕｃフラックス(flux)（フォトン／秒）の自然対数の線形回帰線であり、Ｐ値は、時間ごとの相互作用比較である（Ｂ）。カプランマイヤー生存分析（１群あたりｎ＝６）では、ＩＬ１３－ゼータカインＣＤ８＋ＣＴＬ　ｃｌ．２Ｄ７と比較して、ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζ$Ｔ_{ＣＭ}$で処置したマウスの生存が、有意に改善された（ｐ＝０．０２；対数ランク検定）（Ｃ）。

【図１０】［００３２］　図１０Ａ～Ｃは、ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζ$Ｔ_{ＣＭ}$、及びＩＬ１３－ゼータカインＣＴＬクローンの抗腫瘍効果を比較する実験結果を示す。ＥＧＦＰ－ｆｆＬｕｃ＋ＰＢＴ０３０－２　ＴＳｓ（１×１０^{5}）をＮＳＧマウスの右前脳内に定位固定的に移植した。８日目、マウスに、１．３×１０^{6}モックＴＣＭ（ＣＡＲなし；ｎ＝６）、１．０、０．３か、０．１×１０^{6}ＣＡＲ＋ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζ$Ｔ_{ＣＭ}$（７８％ＣＡＲ＋；ｎ＝６）、１．０、０．３か、０．１×１０^{6}のＩＬ１３－ゼータカインＣＤ８＋ＣＴＬ　ｃｌ．２Ｄ７（クローナルＣＡＲ＋；ｎ＝６～７）を注入するか、又は処置なしとした（ｎ＝５）。Xenogen Living Imageを用いて、各グループの代表的なマウスの

相対的な腫瘍負荷を示した（Ａ）。ｆｆＬｕｃフラックス(flux)（フォトン／秒）の自然対数の線形回帰線では、ＩＬ－１３（ＥＱ）ＢＢζ$Ｔ_{ＣＭ}$は、第１世代のＩＬ１３－ゼータカインＣＴＬ　ｃｌ．２Ｄ７、モック（ｍｏｃｋ）$Ｔ_{ＣＭ}$、及び腫瘍のみと比較して、優れた腫瘍退縮を達成することが示される（Ｂ）。腫瘍注射後２７日の一群あたりの平均フラックス(flux)は、０．１×１０^{6}のＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζ$Ｔ_{ＣＭ}$用量が、ＩＬ１３－ゼータカインＣＤ８＋ＣＴＬ　ｃｌ．２Ｄ７の１．０×１０^{6}用量よりも１０倍優れていることを実証する（ｐ＝０．０４３；ウェルチ２サンプルｔ－検定）（Ｃ）。

【図１１】［００３３］　図１１は、ＩＬ１３－ゼータカインＣＴＬクローンと比較して、持続性が改善されたＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζＴｃｍディスプレイを実証する実験結果を示す。ＣＤ３免疫組織化学は、Ｔ細胞注入後７日目の腫瘍部位におけるＴ細胞持続性を評価する。有意数のＴ細胞がＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζＴｃｍについて検出される（上パネル）。対照的に、検出された、生存可能なＣＤ３＋ＩＬ１３－ゼータカインＴ細胞はごくわずかであった（下パネル）。

【図１２】［００３４］　図１２Ａ～Ｄは、大きな確立された腫瘍のＣＡＲ＋Ｔ細胞送達（頭蓋内注射、対静脈内注射）の経路を比較する実験の結果を示す。ＥＧＦＰ－ｆｆＬｕｃ＋　ＰＢＴ０３０－２ＴＳｓ（１×１０^{5}）をＮＳＧマウスの右前脳内に移植した。１９、及び２６日目に、マウスに５×１０^{6}ＣＡＲ＋ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζ＋Ｔｃｍ（１１．８×１０^{6}全細胞；ｎ＝４）か、又はモックＴｃｍ（１１．８×１０^{6}細胞；ｎ＝４）のいずれかを、尾静脈を介して静脈内注入した。あるいは、１９、２２、２６、及び２９日目に、マウスに、１×１０^{6}ＣＡＲ＋ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζ＋Ｔｃｍ（２．４×１０^{6}個の全細胞；ｎ＝４）か、又はモックＴｃｍ（２．４×１０^{6}細胞；ｎ＝５）のいずれかを、頭蓋内注入した。経時的な平均ｆｆＬｕｃフラックス(flux)（フォトン／秒）によれば、頭蓋内送達されたＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζＴｃｍは、１９日目の腫瘍退縮を介在する。静脈内送達されたＴ細胞は、未処理、又はモックＴｃｍ対照と比較して、腫瘍負荷が低下しなかった（Ａ）。カプランマイヤー生存曲線から、静脈内投与したＣＡＲ＋Ｔｃｍで処置したマウスと比較して、ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢＺＴｃｍで頭蓋内処置したマウスの生存率が改善したことが示される（ｐ＝０．０００３対数ランク検定）（Ｂ）。ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢＺＴｃｍで静脈内処置したマウス（Ｃ）、対頭蓋内処置したマウス（Ｄ）の代表的なＨ＆Ｅ、及びＣＤ３　ＩＨＣにおいて、ＣＤ３＋Ｔ細胞は、頭蓋内処置した群においてのみ検出され、静脈内処置したマウスの場合、腫瘍、又は周囲の脳実質ではＣＤ３＋細胞は検出されなかった。

【図１３】［００３５］　図１３Ａ～Ｂは、頭蓋内、腫瘍内（ｉ．ｃ．ｔ）か、又は脳室内（ｉ．ｃ．ｖ．）に注入されたＣＡＲ＋Ｔ細胞が、半球上の反対側のある腫瘍に移動できることを示す実験結果を示す図である。ＥＧＦＰ－ｆｆＬｕｃ＋ＰＢＴ０３０－２　ＴＳｓ（１×１０^{5}）を、ＮＳＧマウスの左右の前脳部に定位移植した。６日目に、マウスの右腫瘍部位に、１．０×１０^{6}ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζ＋Ｔｃｍを、頭蓋内注入した（１．６×１０^{6}総細胞；６３％ＣＡＲ；ｎ＝４）。多巣性神経膠腫実験モデルの模式図（Ａ）。ＣＤ３ＩＨＣは、左右の腫瘍部位ともに浸潤するＴ細胞を示す（Ｂ）。

【図１４】［００３６］　図１４Ａ～Ｃは、ＩＬ１３Ｒα２特異的ＣＡＲの共刺激ドメインを評価する一連の実験結果を示す。ＣＤ２８、及び４１ＢＢの両方を含む第３世代のＣＡＲに対して、４－１ＢＢ、又はＣＤ２８のいずれかを組み込んだ第２世代のＣＡＲに対して、補助刺激がない第１世代のＣＤ３ｚＣＡＲを含む、様々な細胞内エンド／シグナル伝達ドメインを比較する、ＩＬ１３Ｒａ２特異的ＣＡＲ構築物の概略図である。すべてのＣＡＲカセットはまた、形質導入された細胞のマーカーとして、Ｔ２Ａリボソームスキップ、及び切断型ＣＤ１９（ＣＤ１９ｔ）配列を含む（Ａ）。ＣＤ４、及びＣＤ８ＴＣＭをレンチウイルスで形質導入し、ＣＡＲ発現Ｔ細胞を、抗ＣＤ１９を介して、免疫学的に濃縮した。ＣＤ１９、及びＩＬ１３（すなわち、ＣＡＲ）発現レベルをフローサイトメトリーで測定した（Ｂ）。各ＣＡＲ構築物の安定性は、ＣＡＲ（ＩＬ１３）平均蛍光強度（ＭＦＩ）を形質導入マーカー（ＣＤ１９ｔ）のそれで除することにより、決定した（Ｃ）。ＣＡＲを含む４－１ＢＢの発現レベルは、ＣＤ１９ｔ形質導入マーカーと比較して、最も

低かった。

【図１５】［００３７］　図１５Ａ～Ｂは、４－１ＢＢ補助刺激ドメインを含む、ＩＬ１３Ｒα２特異的ＣＡＲがより少ないＴｈ１、及びＴｈ２サイトカインを産生することを実証する実験結果を示す。Ｌ１３Ｒα２発現ＰＢＴ０３０－２腫瘍細胞標的を殺傷する指示されたモック形質導入、又はＣＡＲ発現Ｔ細胞の能力を、示されたエフェクター：標的比で、４時間^{51}Ｃｒ放出アッセイで測定した。３重の(triplicate)ウェルの平均％クロム放出＋Ｓ．Ｄ．を示す（Ａ）。予想通り、モック形質導入Ｔ細胞は、標的を効率的に溶解しなかった。対照的に、ＣＡＲ発現Ｔ細胞はすべて、同様に腫瘍細胞を溶解した。指示されたモック形質導入、又はＣＡＲ発現Ｔ細胞を、ＩＬ１３Ｒα２発現ＰＢＴ０３０－２腫瘍細胞と１０：１の比で一晩共培養し、サイトメトリービーズアレイで、上清のＩＬ－１３、及びＩＦＮ－γレベルについて分析した（Ｂ）。３重のウェルの平均＋Ｓ．Ｄ．を示す。興味深いことに、ζ、４１ＢＢ－ζ、又はＣＤ２８－４１ＢＢ－ζＣＡＲを発現するＴ細胞の抗原刺激性サイトカイン産生は、ＣＤ２８－ζＣＡＲを発現するＴ細胞の抗原刺激性サイトカイン産生よりも、低かった。

【図１６】［００３８］　図１６Ａ～Ｃは、ＩＬ１３Ｒα２特異的ＣＡＲのインビボ有効性の一連の実験結果を示す。ＮＳＧマウスに、０日目にｆｆＬｕｃ＋ＰＢＴ０３０－２腫瘍細胞を頭蓋内注射し、８日目に、頭蓋内処置して、ＰＢＳ（腫瘍のみ）か、モック形質導入Ｔ細胞か、又は指定されたＩＬ１３Ｒα２特異的ＣＡＲを発現するＴ細胞のいずれか（ｎ＝９～１０マウス／群）で、６群に無作為に分けた。次いで、定量的生物発光イメージングを行って、経時的に、腫瘍増殖をモニターした。図１６Ａは、各グループの代表的なマウスの生物発光画像である。図１６Ｂは、各群の経時的なルシフェラーゼ活性の総フラックスレベルの平均＋Ｓ．Ｅ．を示す。２７日目の、各マウスのフラックスレベルでは、ＣＤ２７－ＣＡＲを発現するＴ細胞で処置したもの以外の、ＩＬ１３Ｒα２特異的ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置した全ての群の腫瘍体積は、模擬形質導入Ｔ細胞で処置したマウスと比較して、統計的に有意に減少した（Ｃ）。

【図１７】［００３９］　図１７は、ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζ／ＣＤ１９ｔ＋（配列番号１０）のアミノ酸配列を示す。

【図１８】［００４０］　図１８は、ＩＬ１３（ＥＱ）４１ＢＢζ［ＩＬ１３（ＥＱ）４１ＢＢζＴ２Ａ－ＣＤ１９ｔ＿ｅｐＨＩＶ７；ｐＦ０２６３０］（配列番号１２）、及びＣＤ１９Ｒｏｐ＿ｅｐＨＩＶ７（ｐＪ０１６８３）（配列番号１３）の配列比較を示す。黄色の強調表示は、ＧＭＣＳＦシグナル配列（ＩＬ１３ｏｐ）を含む、ＩＬ－１３最適化コドン領域を示す。強調表示は、ＩｇＧ４最適化コドン領域（ＩｇＧ４ｏｐ［Ｌ２３５Ｅ、Ｎ２９７Ｑ］）を示す。強調表示は、ＩｇＧ４ヒンジ領域（Ｌ２３５Ｅ、及びＮ２９７Ｑ）内の予想される２つのアミノ酸変化を示す。強調表示は、ＣＤ４膜貫通型の最適化コドン領域を示す。強調表示は４１ＢＢ細胞質シグナル伝達領域（４１ＢＢｃｙｔｏ）を示す。灰強調表示は、３つのグリシンリンカー（ｇ３）を示す。灰色の強調表示は、ＣＤ３ゼータ最適化コドン領域（ｚｅｔａ　ｏｐ）を示す。強調表示はＴ２Ａ配列（Ｔ２Ａ）を示す。強調表示は、切断型ＣＤ１９配列（ＣＤ１９ｔ）を示す。

【図１９】［００４１］　図１９は、ＩＬ１３（ＥｍＹ）－ＣＤ８ｈ３－ＣＤ８ｔｍ２－４１ＢＢゼータ（ＧＭＳＣＦＲａシグナルペプチドがある配列番号３１；ＧＭＳＣＦＲａシグナルペプチドを含まない配列番号３９）のアミノ酸配列を示す。

【図２０】［００４２］　図２０は、ＩＬ１３（ＥｍＹ）－ＣＤ８ｈ３－ＣＤ２８ｔｍ－ＣＤ２８ｇｇ－４１ＢＢ－ゼータ（ＧＭＳＣＦＲａシグナルペプチドがある配列番号３２；ＧＭＳＣＦＲａシグナルペプチドを含まない配列番号４０）のアミノ酸配列を示す。

【図２１】［００４３］　図２１は、ＩＬ１３（ＥｍＹ）－ＩｇＧ４（ＨＬ－ＣＨ３）－ＣＤ４ｔｍ－４１ＢＢ－ゼータ（ＧＭＳＣＦＲａシグナルペプチドがある配列番号３３；ＧＭＳＣＦＲａシグナルペプチドを含まない配列番号４１）のアミノ酸配列を示す。

【図２２】［００４４］　図２２は、ＩＬ１３（ＥｍＹ）－ＩｇＧ４（Ｌ２３５Ｅ、Ｎ２９７Ｑ）－ＣＤ８ｔｍ－４１ＢＢ－ゼータ（ＧＭＳＣＦＲａシグナルペプチドがある配列番号３４；ＧＭＳＣＦＲａシグナルペプチドを含まない配列番号４２）のアミノ酸配列を

示す。
【図２３】［００４５］　図２３は、ＩＬ１３（ＥｍＹ）－リンカー－ＣＤ２８ｔｍ－ＣＤ２８ｇｇ－４１ＢＢ－ゼータのアミノ酸配列を示す（ＧＭＳＣＦＲａシグナルペプチドがある配列番号３５；ＧＭＳＣＦＲａシグナルペプチドを含まない配列番号４３を示す。
【図２４】［００４６］　図２４は、ＩＬ１３（ＥｍＹ）－ＨＬ－ＣＤ２８ｍ－ＣＤ２８ｇｇ－４１ＢＢ－ゼータのアミノ酸配列を示す（ＧＭＳＣＦＲａシグナルペプチドがある配列番号３６；ＧＭＳＣＦＲａシグナルペプチドを含まない配列番号４４）を示す。
【図２５】［００４７］　図２５は、ＩＬ１３（ＥｍＹ）－ＩｇＧ４（ＨＬ－ＣＨ３）－ＣＤ２８ｔｍ－ＣＤ２８ｇｇ－４１ＢＢ－ゼータのアミノ酸配列を示す（ＧＭＳＣＦＲａシグナルペプチドがある配列番号３７；ＧＭＳＣＦＲａシグナルペプチドを含まない配列番号４５）を示す。
【図２６】［００４８］　図２６は、ＩＬ１３（ＥｍＹ）ＩｇＧ４を示す（Ｌ２３５Ｅ、Ｎ２９７Ｑ）－ＣＤ２８ｔｍ－ＣＤ２８ｇｇ－４１ＢＢ－ゼータのアミノ酸配列（ＧＭＳＣＦＲａシグナルペプチドがある配列番号３８；ＧＭＳＣＦＲａシグナルペプチドを含まない配列番号４６）を示す。
【図２７】［００４９］　図２７は、ＩＬ１３（ＥｍＹ）－ＣＤ８ｈ３－ＣＤ８ｔｍ－４１ＢＢゼータのアミノ酸配列を示す（ＧＭＳＣＦＲａシグナルペプチドがある配列番号４７；ＧＭＳＣＦＲａシグナルペプチドを含まない配列番号４８）を示す。
【発明を実施するための形態】
【００３３】
［００５１］　以下に、様々なＩＬ１３Ｒα２特異的キメラ抗原受容体の構造、構築、及び特徴付けについて説明する。キメラ抗原（ＣＡＲ）は、少なくとも細胞外認識ドメイン、膜貫通領域、及び細胞内シグナル伝達ドメインを含む、組換え生体分子である。したがって、用語「抗原」は、抗体に結合する分子に限定されず、標的に特異的に結合することができるいかなる分子にも限定されない。例えば、ＣＡＲは、細胞表面受容体に特異的に結合するリガンドを含むことができる。細胞外認識ドメイン（細胞外ドメインともいい、又は単にそれが含む認識要素によっても言及される）は、標的細胞の細胞表面上に存在する分子に特異的に結合する、認識要素を含む。膜貫通領域は、膜中のＣＡＲを固定する。細胞内シグナル伝達ドメインは、ヒトＣＤ３複合体のζ鎖由来のシグナル伝達ドメインを含み、かつ、必要に応じて、１又はそれ以上の共刺激シグナル伝達ドメインを含む。ＣＡＲは、ＭＨＣ制限とは無関係に、抗原に結合し、かつ、Ｔ細胞活性化を形質導入することができる。したがって、ＣＡＲは、それらのＨＬＡ遺伝子型にかかわらず、抗原陽性腫瘍がある患者集団を治療することができる「普遍的な(universal)」免疫受容体である。腫瘍特異的ＣＡＲを発現するＴリンパ球を用いる養子免疫療法は、がんの治療の強力な治療戦略でありうる。
【００３４】
［００５２］　本明細書に関する、１つのＩＬ１３Ｒα２特異的ＣＡＲは、ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζという。このＣＡＲには、様々な重要な機能があり、ＩＬ１３α２への結合特異性を改善するようにアミノ酸が変化した、ＩＬ１３α２リガンド；有益な共刺激を提供するＣＤ３ζと直列のＣＤ１３７（４－１ＢＢ）のドメイン；Ｆｃ受容体（ＦｃＲ）による結合を減少させるように、ＣＨ２領域内の２つの部位（Ｌ２３５Ｅ；Ｎ２９７Ｑ）で変異したＩｇＧ４Ｆｃ領域を含む。本明細書に関する他のＣＡＲは、第２の共刺激ドメインを含む。
【００３５】
［００５３］　ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζＣＡＲを含む本明細書に関するＣＡＲは、ＣＡＲオープンリーディングフレーム後に、Ｔ２Ａリボソームスキップ配列、及び切断型ＣＤ１９（ＣＤ１９ｔ）（細胞質シグナル伝達テイルを欠損（アミノ酸３２３切断型））が配置されるベクターを用いて作製することができる場合がある。この配置では、ＣＤ１９ｔの共発現により、遺伝子改変細胞を正確に測定することができ、かつ、遺伝子改変細胞をポジティブに選択できる、不活性で非免疫原性の表面マーカーを提供するだけでなく、細

胞を効率的に追跡でき、及び／又は養子移入後のインビボでの治療用Ｔ細胞のイメージングが可能となる。ＣＤ１９ｔの共発現は、臨床的に利用可能な抗体、及び／又は治療細胞を選択的に除去して、自殺スイッチとして機能する免疫毒素試薬を用いて、インビボでの形質導入細胞の免疫学的標的化マーカーを提供する。

【００３６】

［００５４］　グリオーマは、ＩＬ１３受容体、及び、特に、高親和性ＩＬ１３受容体を発現する。しかし、ＩＬ１３受容体とは異なり、神経膠腫(glioma)細胞は、ＩＬ４Ｒβ、又はγｃ４４の必要条件とは無関係に、ＩＬ１３に結合できるユニークなＩＬ１３Ｒα２鎖を過剰発現する。そのホモログＩＬ４と同様、ＩＬ１３は、ＣＮＳの外側に多面的(pleotropic)免疫調節活性がある。ＩＬ１３、及びＩＬ４はともに、Ｂリンパ球によるＩｇＥ産生を刺激し、かつ、マクロファージによる前炎症性サイトカイン産生を抑制する。

【００３７】

［００５５］　放射性標識ＩＬ１３によるオートラジオグラフィーを用いた詳細な実験では、試験された概ねすべての悪性神経膠腫組織において、十分なＩＬ１３結合性が呈示された。この結合は、腫瘍切片内で、及び単一細胞分析できわめて同質である。しかしながら、ＩＬ１３Ｒα２ｍＲＮＡに特異的な分子プローブ分析では、正常な脳要素による神経膠腫特異的受容体の発現が検出されず、かつ、放射性標識ＩＬ１３によるオートラジオグラフィーにおいても、正常なＣＮＳでの特異的ＩＬ１３結合が検出できなかった。当該実験は、共有されたＩＬ１３Ｒα１／ＩＬ４β／γｃ受容体が正常なＣＮＳでは、検出可能に発現されないことを示唆する。したがって、ＩＬ１３Ｒα２は、神経膠腫のきわめて特異的な細胞表面標的であり、かつ、神経膠腫治療用に設計されるＣＡＲの適当な標的である。

【００３８】

［００５６］　しかし、ＩＬ１３に基づく治療分子が、広く発現されるＩＬ１３Ｒα１／ＩＬ４β／γｃ受容体複合体へ結合する場合、ＣＮＳ外側の正常組織に対する不要な毒性を媒介する可能性があり、したがって、当該薬剤の全身投与が制限される。天然グルタミン酸からチロシンへのアミノ酸１３位におけるＩＬ１３アルファヘリックスＡでのアミノ酸置換は、ＩＬ１３Ｒα１／ＩＬ４β／γｃ受容体に対するＩＬ１３の親和性を選択的に低下させる。しかしながら、この変異体（ＩＬ１３（Ｅ１３Ｙ））のＩＬ１３Ｒα２への結合は、野生型ＩＬ１３と比較して、高まった。したがって、この最小限に改変されたＩＬ１３類似体は、グリオーマ細胞に対するＩＬ１３の特異性、及び親和性を同時に高める。したがって、本明細書に関するＣＡＲは、アミノ酸１３位が変異（ＥからＹ、又はＥから他のアミノ酸、例えばＫ、又はＲ、又はＬ、又はＶ等）したＩＬ１３を含む（Debinski et al.1999 Clin Cancer Res5:3143sのナンバリングによる）。しかしながら、天然の配列であるＩＬ１３も用いることができ、及び特に、改変Ｔ細胞を腫瘍塊に直接注射する等の局所的投与の場合に有用でありうる。

【００３９】

［００５７］　本明細書に関するＣＡＲは、当技術分野で公知のいかなる手段で作製しうるが、好ましくは、組換えＤＮＡ技術を用いて作製される。キメラ受容体のいくつかの領域をコードする核酸は、当該分野で公知の標準的な分子クローニング技術（ゲノムライブラリースクリーニング、ＰＣＲ、プライマーアシストライゲーション、部位特異的突然変異誘発等）によって作製され、完全なコード配列に構成しうる。得られたコード領域は、好ましくは発現ベクターに挿入され、適当な発現宿主細胞株、好ましくは、Ｔリンパ球細胞株、及び最も好ましくは、自己Ｔリンパ球細胞株を形質転換するのに用いられる。

【００４０】

［００５８］　選択されていないＰＢＭＣ、又は富化ＣＤ３Ｔ細胞、又は富化ＣＤ３又は記憶Ｔ細胞サブセットを含む、患者から単離された、様々なＴ細胞サブセットは、ＣＡＲ発現用ベクターで形質導入されることができる。中央記憶Ｔ細胞は、１つの有用なＴ細胞サブセットである。中央記憶Ｔ細胞は、所望の受容体を発現する細胞を免疫学的に選択するため、例えば、CliniMACS（登録商標）装置を用いて、ＣＤ４５ＲＯ＋／ＣＤ６２Ｌ

＋細胞を選択して、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）から単離することができる。中央記憶Ｔ細胞用に富化された細胞は、例えば、ＩＬ１３Ｒα２特異的ＣＡＲ（例えば、ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζ）の発現を導くＳＩＮレンチウイルスベクターで形質導入された、抗ＣＤ３／ＣＤ２８、並びに、インビボ検出、及び潜在的な生体外選択用の非免疫原性表面マーカーである、切断型ヒトＣＤ１９（ＣＤ１９ｔ）で、活性化されうる。活性化／遺伝子改変された中央記憶Ｔ細胞は、ＩＬ－２／ＩＬ－１５で、インビトロで増殖後、凍結保存されることができる。

【実施例１】

【００４１】

ＩＬ１３Ｒα２特異的ＣＡＲの構築及び構造

［００５９］　有用なＩＬ１３Ｒα２特異的ＣＡＲの構造を、以下に記載する。コドン最適化ＣＡＲ配列は、Ｆｃ受容体媒介認識モデルを大幅に低下させる２つの変異（Ｌ２３５Ｅ；Ｎ２９７Ｑ）を含む、ＩｇＧ４Ｆｃスペーサーである、ＩＬ１３Ｒα１への潜在的結合を低下させるため、単一部位で変異した膜結合(membrane-tethered)ＩＬ－１３リガンド（Ｅ１３Ｙ）、ＣＤ４膜貫通ドメイン、共刺激４－１ＢＢ細胞質シグナル伝達ドメイン、及びＣＤ３ζ細胞質シグナル伝達ドメインを含む。Ｔ２Ａリボソームスキップ配列は、このＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζＣＡＲ配列を、不活性な非免疫原性細胞表面検出／選択マーカーである、ＣＤ１９ｔから分離する。このＴ２Ａ結合は、単一の転写産物由来のＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζ、及びＣＤ１９ｔの座標発現をともにもたらす。図１Ａは、ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢＺ－Ｔ２ＡＣＤ１９ｔ構築物をコードする２６７０ヌクレオチドのオープンリーディングフレームの概略図である。図１では、ＩＬ１３Ｒα２特異的リガンドＩＬ１３（Ｅ１３Ｙ）、ＩｇＧ４（ＥＱ）Ｆｃ、ＣＤ４膜貫通、４－１ＢＢ細胞質シグナル伝達、３－グリシンリンカー、及びＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢＺ　ＣＡＲのＣＤ３ζ細胞質シグナル伝達ドメイン、並びにＴ２Ａリボソームスキップ、及びＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢＺ　ＣＡＲの切断型ＣＤ１９配列が、すべて示されている。ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢＺ　ＣＡＲ、及びＣＤ１９ｔの表面発現を駆動するヒトＧＭ－ＣＳＦ受容体α、及びＣＤ１９シグナル配列も示される。したがって、ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢＺ－Ｔ２ＡＣＤ１９ｔ構築物は、ＩＬ１３Ｒα２特異的ヒンジ最適化、共刺激性キメラ免疫受容体配列（ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢＺ）、リボソームスキップＴ２Ａ配列、及びＣＤ１９ｔ配列を含む。

【００４２】

［００６０］　ヒトＧＭ－ＣＳＦ受容体αリーダーペプチドとＩＬ１３（Ｅ１３Ｙ）リガンド５Ｌ２３５Ｅ／Ｎ２９７Ｑ改変ＩｇＧ４Ｆｃヒンジ（二重変異がＦｃＲ認識を妨害する）、ＣＤ４膜貫通、４－１ＢＢ細胞質シグナル伝達ドメイン、及びＣＤ３ζ細胞質シグナル伝達ドメイン配列との融合により、ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢＺ配列を生成した。この配列は、コドン最適化の後、新規にデノボ合成された。Ｔ２Ａ配列は、Ｔ２Ａ含有プラスミドの消化から得た。ＣＤ１９ｔ配列は、リーダーペプチド配列にまたがるものから、ＣＤ１９含有プラスミドの膜貫通成分（すなわち、塩基対１～９７２）まで得られた。全３つの断片、１）ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢＺ、２）Ｔ２Ａ、及び３）ＣＤ１９ｔを、ｅｐＨＩＶ７レンチウイルスベクターの多重クローニング部位にクローニングした。ベクターの適当な細胞への形質転換により、図１Ｂに模式的に示された配列を、宿主細胞ゲノムに組み込む。図１Ｃは、９５１５塩基対ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢＺ－Ｔ２Ａ－ＣＤ１９ｔ＿ｅｐＨＩＶ７プラスミドそれ自体の模式図である。

【００４３】

［００６１］　図２に概略的に示すように、ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢＺ　ＣＡＲは、ＩＬ１３（Ｅ１３Ｙ）Ｒ－ゼータカインである、上記ＩＬ１３Ｒα２特異的ＣＡＲとはいくつかの重要な点で、異なる（非特許文献４）。ＩＬ１３（Ｅ１３Ｙ）－ゼータカインは、示されるように、ＩＬ１３Ｒα２特異的ヒトＩＬ－１３ムテイン（ｈｕＩＬ－１３（Ｅ１３Ｙ））、ヒトＩｇＧ４Ｆｃスペーサー（ｈｕγ４Ｆｃ）、ヒトＣＤ４膜貫通（ｈｕＣＤ４ｔｍ）、及びヒトＣＤ３ζ鎖細胞質ｈｕＣＤ３ζｃｙｔ）部分から構成される。対照的に、ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζ）には、ＩｇＧ４スペーサーのＣＨ２ドメインに位置する２つ

の点変異、Ｌ２３５Ｅ、及びＮ２９７Ｑ、及び共刺激４－１ＢＢ細胞質ドメイン（４－１ＢＢ細胞）がある。

【実施例２】

【００４４】

ＩＬ１３Ｒα２特異的ＣＡＲの発現用ｅｐＨＩＶ７の構築及び構造

［００６２］　ｐＨＩＶ７プラスミドは、臨床ベクターＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢＺ－Ｔ２Ａ－ＣＤ１９ｔ＿ｅｐＨＩＶ７が、ＣｉｔｙｏｆＨｏｐｅ（ＣＯＨ）のＴ細胞治療研究所（ＴＣＴＲＬ）で得られた、親プラスミドである。ＣＡＲの発現に用いたｅｐＨＩＶ７ベクターは、ｐＨＩＶ７ベクターから作製した。重要なことに、このベクターは、ヒトＥＦ１プロモーターを用いてＣＡＲの発現を駆動する。ベクターの５’、及び３’配列はいずれも、以前にＨＸＢｃ２プロウイルスから得られたように、ｐｖ６５３ＲＳＮ由来であった。ポリプリン領域のＤＮＡフラップ配列（ｃＰＰＴ）は、NIH AIDS Reagent RepositoryのＨＩＶ－１株ｐＮＬ４－３由来であった。ウッドチャック転写後調節エレメント（ＷＰＲＥ）配列はすでに説明されている。

【００４５】

［００６３］　ｐＨＩＶ７の構築物を図３に概略的に示す。簡潔には、介在するＳＬ３－ネオマイシンリン酸転移酵素遺伝子（Ｎｅｏ）を有するｇａｇ－ｐｏｌプラス５’、及び３’長末端反復配列（ＬＴＲ）由来の６５３ｂｐを含むｐｖ６５３ＲＳＮを、以下のようにpBluescriptにサブクローニングした：工程１では、５’ＬＴＲからｒｅｖ－応答エレメント（ＲＲＥ）までの配列が、ｐ５’ＨＩＶ－１　５１となり、次に５’ＬＴＲが、ＴＡＴＡボックスの上流の配列が除去されて改変され、その後、まずＣＭＶエンハンサーに連結され、次にＳＶ４０複製起点に連結された（ｐ５’ＨＩＶ－２）。工程２では、３’ＬＴＲをpBluescriptにクローニングして、ｐ３’ＨＩＶ－１を作製後、３’ＬＴＲエンハンサー／プロモーターの４００ｂｐを欠失し、ＨＩＶ　Ｕ３のシス調節エレメントを除去し、ｐ３’ＨＩＶ－２を生成した。工程３では、ｐ５’ＨＩＶ－３、及びｐ３’ＨＩＶ－２から単離した断片をライゲーションして、ｐＨＩＶ－３を作製した。工程４では、余分な上流のＨＩＶ配列を除去してｐ３’ＨＩＶ－２をさらに改変して、ｐ３’ＨＩＶ－３を生成し、ｐ３’ＨＩＶ－３にＷＰＲＥを含む６００ｂｐのＢａｍＨＩ－ＳａｌＩ断片を挿入して、ｐ３’ＨＩＶ－４を作製した。工程５では、ＰＣＲにより、ｐＨＩＶ－３ＲＲＥの大きさを小さくし、ｐＨＩＶ－３（示さず）由来の５’断片にｐ３’ＨＩＶ－４をライゲーションして、ｐＨＩＶ－６を作製した。工程６では、ＨＩＶ－１　ｐＮＬ４－３（５５）由来のｃＰＰＴ　ＤＮＡフラップ配列を含む、１９０ｂｐのＢｇｌＩＩ－ＢａｍＨＩ断片をｐＮＬ４－３から増幅し、ｐＨＩＶ６のＲＲＥ配列とＷＰＲＥ配列の間に配置して、ｐＨＩＶ－７を作製した。この親プラスミドｐＨＩＶ７－ＧＦＰ（ＧＦＰ、緑色蛍光タンパク質）を用いた、４－プラスミド系を用いて、親ベクターをパッケージングした。

【００４６】

［００６４］　ウイルスゲノムをベクターに効率的にパッケージングするためには、パッケージングシグナル、ｐｓｉΨを要する。ＲＲＥ、及びＷＰＲＥは、ＲＮＡ転写物の輸送、及び導入遺伝子の発現を増強する。フラップ配列は、ＷＰＲＥと組み合わせて、哺乳類細胞におけるレンチウイルスベクターの形質導入効率を高めることが実証された。

【００４７】

［００６５］　ウイルスベクター作製に必要なヘルパー機能は、組換えによる複製コンピテントレンチウイルス生成の可能性を低減させるために、３つの異なるプラスミドに分割される：

１）ｐＣｇｐは、ウイルスベクター構築に必要なｇａｇ／ｐｏｌタンパク質をコードする；

２）ｐＣＭＶ－Ｒｅｖ２は、効率的なパッケージングのため、ウイルスゲノムの輸送を補助するＲＲＥ配列に作用するＲｅｖタンパク質をコードする；

３）ｐＣＭＶ－Ｇは、ウイルスベクターの感染に必要な、水疱性口炎ウイルス（ＶＳＶ

）の糖タンパク質をコードする。

【００４８】

［００６６］　ｐＨＩＶ７にコードされたベクターゲノムとヘルパープラスミドとの間のＤＮＡ配列相同性は最小限である。相同性の領域としては、ｐＣｇｐヘルパープラスミドのｇａｇ／ｐｏｌ配列にある約６００ヌクレオチドのパッケージングシグナル領域；３種のヘルパープラスミド全てのＣＭＶプロモーター配列；及び、ヘルパープラスミドｐＣｇｐのＲＲＥ配列、があげられる。複数の組換えイベントを要するため、当該領域の相同性に起因した、複製コンピテント組換えウイルスが生成される可能性はきわめて低い。さらに、得られたいずれの組換え体も、レンチウイルス複製に必要な機能的ＬＴＲ、及びｔａｔ配列を欠損しているであろう。

【００４９】

［００６７］　ＣＭＶプロモーターを、ＥＦ１α－ＨＴＬＶプロモーター（ＥＦ１ｐ）で置換し、新しいプラスミドをｅｐＨＩＶ７とした（図４）。ＥＦ１ｐの長さは５６３ｂｐであり、ＣＭＶプロモーターを切除後、ＮｒｕＩ、及びＮｈｅＩを用いてｅｐＨＩＶ７に導入した。

【００５０】

［００６８］　野生型ウイルスの病原性に必須で、かつ、標的細胞の生産的感染に必須のｇａｇ／ｐｏｌ、及びｒｅｖを欠損するレンチウイルスゲノムは、当該系から除いた。さらに、ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢＺ－Ｔ２ＡＣＤ１９ｔ＿ｅｐＨＩＶ７ベクター構築物は、完全３’ＬＴＲプロモーターを含有しないため、標的細胞での発現、及び逆転写ＤＮＡプロウイルスゲノムのＬＴＲは、不活性である。当該設計ため、ＨＩＶ－１由来の配列はプロウイルスから転写されず、各プロモーターが発現するのは治療的配列のみである。ＳＩＮベクターでのＬＴＲプロモーター活性が除かれると、宿主遺伝子の意図せぬ活性化の可能性が有意に軽減されることが期待される（５６）。表４は、ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢＺ－Ｔ２ＡＣＤ１９ｔ＿ｅｐＨＩＶ７に存在する様々な調節因子要素をまとめたものである。

【００５１】

表４：　ＩＬ１３（ＥＱ）４１ＢＢＺ－Ｔ２Ａ－ＣＤ１９ｔ＿ｅｐＨＩＶ７の機能的要素

【００５２】

【表６】

表4 IL13(EQ)41BBZ-T2A-CD19t_epHIV7の機能的要素

調節要素及び遺伝子	位置（ヌクレオチド数）	コメント
U5	87-171	5’ 固有の配列
psi	233-345	パッケージングシグナル
RRE	957-1289	Rev- 応答要素
flap	1290-1466	ポリプリン領域配列及び、中央終結配列を含み、前結合複合体の核輸送を促進する
EF1p Promoter	1524-2067	ＣＤ１９Ｒｏｐの発現を駆動するＥＦ１-アルファ真核プロモーター配列
IL13-IgG4 (EQ)-41BB-Zeta-T2A-CD19t	2084-4753	治療的挿入
WPRE	4790-5390	ウッドチャック肝炎ウイルスの調節因子であって、ウイルス性ＲＮＡ輸送を促進する
delU3	5405-5509	ＳＩＮベクターを生成するための欠損型３’Ｕ３
R	5510-5590	ＬＴＲ内の反復配列
U5	5591-5704	ＬＴＲ内の３’Ｕ５配列
Amp^R	6540-7398	アンピシリン耐性遺伝子
CoE1 ori	7461-8342	プラスミドの複製起点
SV40 ori	8639-8838	ＳＶ４０の複製起点
CMV promoter	8852-9451	ウイルスＲＮＡ生成用ＣＭＶプロモーター
R	9507-86	ＬＴＲ内の反復配列

【実施例３】

【００５３】

患者Ｔ細胞への形質導入用ベクターの作製

［００６９］　各プラスミド（ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢＺ－Ｔ２Ａ－ＣＤ１９ｔ＿ｅｐＨＩＶ７；ｐＣｇｐ；ｐＣＭＶ－Ｇ；及びｐＣＭＶ－Ｒｅｖ２）について、発酵槽への接種に用いられるシードバンクを生成して、十分量のプラスミドＤＮＡを作製する。プラスミドＤＮＡの同一性、無菌性、及びエンドトキシンを試験してから、レンチウイルスベクターの作製に用いる。

【００５４】

［００７０］　簡潔には、２９３Ｔ機能細胞（ＷＣＢ）から細胞を増殖させ、無菌性、及びウイルス汚染の存在の確認試験を行った。２９３Ｔ　ＷＣＢ由来の２９３Ｔ細胞のバイアルを解凍した。ベクター作製、及び細胞株培養の維持用の適当数の１０層細胞ファクトリー（ＣＦ）の平板培地に存在する細胞が十分数になるまで、細胞を培養して、増殖させた。単一の細胞株を作製に用いることができる。

【００５５】

［００７１］　レンチウイルスベクターを、１０ＣＦまでのサブバッチで作製した。同一週に２つのサブバッチを作製でき、約２０Ｌのレンチウイルス上清／週を作製しうる。全サブバッチで作製された材料を下流の処理段階でプールして、１つのロットの製品とした。２９３Ｔ細胞を２９３Ｔ培地（１０％ＦＢＳ含ＤＭＥＭ）のＣＦに播種した。ファクトリーを３７℃のインキュベーターに放置し、水平かつ平らにして、ＣＦの全層上に細胞を均一に分布させた。２日後、Tris:EDTA、2M$CaCl_2$、2XHBS、及び４つのＤＮＡプラスミドの混合物を含む、ＣａPO_4法を用いて、上記４つのレンチウイルスプラスミドを細胞に形質転換した。形質転換後３日目に、分泌されたレンチウイルスベクターを含む上清を回収し、精製し、濃縮した。上清をＣＦから除去した後、各ＣＦからEnd-of-Production Cellsを回収した。各ファクトリーの細胞をトリプシン処理し、遠心分離により収集した。細胞を凍結培地に再懸濁し、凍結保存した。当該細胞を、その後、複製能(replicati

on-competent)レンチウイルス（ＲＣＬ）試験に用いた。

【００５６】

［００７２］　膜濾過を行って細胞の破片を除去して、粗上清を清澄化して、ベクターを精製、及び調製した。宿主細胞ＤＮＡ、及び残存プラスミドＤＮＡを、エンドヌクレアーゼ消化（Benzonase（登録商標））により、分解した。０．４５μｍのフィルターを用いて、ウイルス上清中の細胞破片を清澄化した。清澄化された上清を予め秤量した容器に採取し、そこにBenzonase（登録商標）を加えた（最終濃度５０Ｕ／ｍＬ）。残存プラスミドＤＮＡ、及び宿主ゲノムＤＮＡのエンドヌクレアーゼ消化を、３７℃で６時間行った。エンドヌクレアーゼ処理された上清の初期接線流限外濾過（ＴＦＦ）濃度を用いて、粗上清から、残留低分子成分を除去し、ウイルスを約２０倍濃縮した。清澄化エンドヌクレアーゼ処理ウイルス上清を、５００ｋＤのＮＭＷＣＯを備える中空繊維カートリッジに、最大流速で、剪断速度を約４，０００／秒以下に維持するように設計された流速で循環させた。ヌクレアーゼ処理された上清の透析ろ過は、カートリッジの性能を維持するための濃縮プロセス中に開始した。透析ろ過緩衝液として４％ラクトース含ＰＢＳを用いて、８０％透過物置換率を確立した。ウイルス上清を、２０倍濃度の粗上清に相当する標的体積にして、透析液交換率を１００％として、４回の追加交換容量の透析ろ過を続けた。

【００５７】

［００７３］　高速遠心分離技術を用いて、ウイルス産物をさらに濃縮した。レンチウイルスの各サブバッチを、Sorvall　RC-26plusを用いて、６０００ＲＰＭ（６，０８８ＲＣＦ）、６℃で１６－２０時間遠心分離して、ペレット化した。その後、各サブバッチのウイルスペレットを、５０ｍＬ容量の４％ラクトース含ＰＢＳで再構成した。当該緩衝液の再構成ペレットは、ウイルス調製用最終製剤となる。ベクター濃縮プロセス全体で、体積は約２００分の一に減少した。全てのサブバッチ完了後、材料を－８０℃に放置し、各サブバッチの試料の無菌性を試験した。試料の無菌性の確認後、サブバッチを３７℃で頻繁に撹拌しながら、急速解凍した。その後、この物質をプールし、ウイルスベクタースイートのクラスＩＩ型Ａ／Ｂ３バイオセーフティキャビネット内に、手動で分注した。滅菌ＵＳＰクラス６での濃縮レンチウイルス１ｍＬの充填構成には、外ネジ付Ｏリングクリオバイアルを用いた。ＣＯＨの応用技術開発センター（ＣＡＴＤ）の品質システム（ＱＳ）は、ＣＢＧのポリシーと標準的な運用手順に従い、現在の適正製造基準（ｃＧＭＰ）に準拠してすべての材料をリリースした。

【００５８】

［００７４］　残留宿主ＤＮＡ混入物、並びに残留宿主、及びプラスミドＤＮＡの移入について試験して、レンチウイルスベクター製造物の純度を確保した。他の試験でも、ＲＴ－ＰＣＲにより、ベクター同一性を評価して、正確なベクターの存在を確実にした。本試験での利用が意図されたベクターは、すべての放出基準を満たしていた。

【実施例４】

【００５９】

ＡＣＴ用に適するＴ細胞の作製

［００７５］　患者から、白血球除去輸血により、Ｔリンパ球を獲得し、適当な同種異系、又は自己Ｔ細胞サブセット、例えば中央記憶Ｔ細胞（T_{CM}）を遺伝的に改変して、ＣＡＲを発現させた後、いずれかの臨床上許容される手段で患者に投与されて、抗がん治療を達成する。

【００６０】

［００７６］　T_{CM}の作製戦略の概要を図８（ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζ／ＣＤ１９ｔ＋T_{CM}の製造スキーム）に示す。具体的には、同意を得た研究参加者から得た、アフェレーシス(apheresis)産物を、フィコールし、洗浄し、一晩インキュベートする。ＧＭＰグレードの抗ＣＤ１４、抗ＣＤ２５、及び抗ＣＤ４５ＲＡ試薬（Miltenyi　Biotec）、及びＣｌｉｎｉＭＡＣＳ（登録商標）分離装置を用いて、単球、調節性Ｔ細胞、及びナイーブＴ細胞集団を細胞から除去する。除去後、ＣｌｉｎｉＭＡＣＳ（登録商標）分離装置で、ＤＲＥＧ５６－ビオチン（ＣＯＨ臨床グレード）、及び抗ビオチンマイクロビーズ（Mi

ltenyi Biotec）を用いて、ＣＤ６２Ｌ＋ＴＣＭ細胞の陰性画分細胞を濃縮する。

【００６１】

［００７７］ 濃縮後、ＴＣＭ細胞を、完全X-Vivo15プラス５０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、及び０．５ｎｇ／ｍＬのＩＬ－１５に配合し、テフロン（登録商標）細胞培養バッグに移し、DynalClinEx（登録商標）VivoCD3/CD28ビーズで刺激した。刺激後５日目まで、ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢＺ－Ｔ２Ａ－ＣＤ１９ｔ＿ｅｐＨＩＶ７レンチウイルスベクターを用いて、感染多重度（ＭＯＩ）１．０～０．３で細胞に形質導入する。細胞増殖に必要な完全X-Vivo15、並びにＩＬ－２、及びＩＬ－１５サイトカインを添加して、培養を４２日目まで続ける（細胞密度は3×10^{5}～2×10^{6}生存細胞／ｍＬ、培養中、毎週月、水、及び金曜日にサイトカインの補充を続けた）。細胞は、通常、２１日以内に、当該条件下で約10^{9}細胞に増殖する。培養終期に、細胞を採取し、２回洗浄し、臨床グレードでの凍結保存培地（Cryostore CS5, BioLife Solutions）で製剤化する。

【００６２】

［００７８］ Ｔ細胞注入日（複数可）に、低温保存、及び放出された生成物を解凍し、洗浄し、再注入用に処方する。放出された細胞産物を含有する低温保存バイアルを液体窒素貯蔵から取り出し、解凍し、冷却し、ＰＢＳ／２％ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）洗浄緩衝液で洗浄する。遠心分離後、上清を除去し、細胞を防腐剤非含有通常生理食塩水（ＰＦＮＳ）／２％ＨＳＡ輸液希釈液に再懸濁する。試料を、品質管理試験用に取り分ける。

【００６３】

［００７９］ 上記製造プラットフォームを用いて、健常人ドナーから入手した細胞の、２つの認定試験を実施した。各前臨床試験に供した製品として、ヒトドナー（ＨＤ）番号ＨＤ００６．５、及びＨＤ１８７．１が、割り当てられた。重要なことに、表５に示すように、当該認定試験では、２８日以内に＞８０倍に増殖し、当該増殖細胞は、ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢγ／ＣＤ１９ｔ導入遺伝子を発現した。

【００６４】

表５： 前臨床試験に供した製品の発現データの概要

【００６５】

【表７】

細胞製品	CAR	CD19	CD4+	CD8+	増殖倍増
HD006.5	20%	22%	24%	76%	84- 倍（２８日間）
Hd187.1	18%	25%	37%	63%	259- 倍（２８日間）

【実施例５】

【００６６】

ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢγ／ＣＤ１９ｔ＋T_{CM}の表面導入遺伝子、及びＴ細胞マーカー発現のフローサイトメトリー分析

［００８０］ 実施例４に記載の２つの前臨床試験製品を、以下に記載する前臨床試験で用いた。図６Ａ～Ｃは、表面導入遺伝子、及びＴ細胞マーカー発現のフローサイトメトリー分析の結果を示す。ＩＬ－１３（ＥＱ）ＢＢγ／ＣＤ１９ｔ＋T_{CM}のＨＤ００６．５、及びＨＤ１８７．１を、抗ＩＬ－１３－ＰＥ、及び抗ＣＤ８－ＦＩＴＣで共染色してＣＤ８＋ＣＡＲ＋、及びＣＤ４＋（すなわちＣＤ８陰性）ＣＡＲ＋細胞を検出した（図６Ａ）。あるいは、抗ＣＤ１９－ＰＥ、及び抗ＣＤ４－ＦＩＴＣを用いて、ＣＤ４＋ＣＤ１９ｔ＋、及びＣＤ８＋（すなわちＣＤ４陰性）ＣＡＲ＋細胞を検出した（図６Ｂ）。ＴＣＲ

、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ６２Ｌ、及びＣＤ２８（灰色ヒストグラム）、又はアイソタイプ対照（黒色ヒストグラム）で、ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢγ／ＣＤ１９ｔ＋T_{CM}のＨＤ００６．５、及びＨＤ１８７．１を染色した。（図６Ｃ）。図６Ａ～Ｃで示された比率は各々、アイソタイプ上に染色された生存リンパ球（ＤＡＰＩ陰性）に基づく。

【実施例６】

【００６７】

ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢγ／ＣＤ１９ｔ＋T_{CM}のエフェクター活性

［００８１］　ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζ／ＣＤ１９ｔ＋T_{CM}のエフェクター活性を評価し、当該分析の結果を、図７Ａ～Ｂに示す。簡単に説明すると、ＩＬ１９（ＥＱ）ＢＢγ／ＣＤ１９ｔ＋T_{CM}のＨＤ００６．５、及びＨＤ１８７．１を、ＣＤ１９ｔ発現に基づく１０Ｅ：１Ｔ比を用いる、６時間^{51}Ｃｒ放出アッセイにおいてエフェクターとして用いた。ＩＬ１３Ｒα２陽性腫瘍標的は、ＩＬ１３Ｒα２（Ｋ５６２－ＩＬ１３Ｒα２）、及び一次神経膠腫系統ＰＢＴ０３０－２を発現するように改変されたＫ５６２であり、ＩＬ１３Ｒα２陰性腫瘍標的対照はＫ５６２親系統であった（図７Ａ）。ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢγ／ＣＤ１９ｔ＋のＨＤ００６．５、及びＨＤ１８７．１を、上記のように、同じＩＬ１３Ｒα２陽性、及び陰性標的を用いて、１０Ｅ：１Ｔ比で一晩の共培養後の、抗原依存性サイトカイン産生について、評価した。サイトカインレベルは、Bio-PlexProヒトサイトカインTH1/TH2アッセイキットを用いて測定した、ＩＮＦ－γレベルを示す（図７Ｂ）。

【実施例７】

【００６８】

ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢγ／ＣＤ１９ｔ＋T_{CM}のインビボ抗腫瘍活性

［００８２］　以下に記載の実験は、ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢγ／ＣＤ１９ｔ＋T_{CM}がインビボマウスモデルで抗腫瘍効果を示すことを実証する。具体的には、我々は、ＥＧＦＰ、及びホタルルシフェラーゼ（ｆｆＬｕｃ）レポーター遺伝子をともに発現するように改変したＩＬ１３Ｒα２＋初代低－継代膠芽細胞腫腫瘍球系ＰＢＴ０３０－２（ＰＢＴ０３０－２　ＥＧＦＰ：ｆｆＬｕｃ）に対する、ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢγ／ＣＤ１９ｔ＋T_{CM}の抗腫瘍効力を評価した（６）。患者の神経膠芽細胞腫標本由来の一次系統（ＰＢＴ）のパネルは、無血清培地中で、腫瘍球（ＴＳ）として増殖した。当該増殖ＴＳ系は、幹細胞マーカーの発現、多細胞分化、及び少細胞数での免疫無防備マウス（ＮＳＧ）の同所性腫瘍の開始能を含む、幹細胞様の特徴を示す。以前、ＰＢＴ０３０－２ＥＧＦＰ：ｆｆＬｕｃＴＳ開始異種移植片モデル（０．１×10^6細胞；５日生着）を用いて評価した、ＩＬ－１３Ｒα２特異的ＣＡＲ発現Ｔ細胞の、ＮＳＧマウスでのインビボ抗腫瘍活性から、２×10^6細胞溶解性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）を２週間で３回注入すると、腫瘍増殖が低下することが示されている。しかし、当該実験では、ＰＢＴ０３０－２腫瘍の大部分が、最終的に再発した。対照的に、ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢγ／ＣＤ１９ｔ＋T_{CM}（１．１×10^6ＣＡＲ＋T_{CM}；２×10^6全ＴＣＭ）の単一回注射は、ＰＢＴ０３０－２ＥＧＦＰ：ｆｆＬｕｃＴＳ開始腫瘍（０．１×10^6細胞；５日生着）に対して、図８Ａ～Ｃに示すように、安定した抗腫瘍活性を示した。ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢγ／ＣＤ１９ｔ＋T_{CM}は、ＰＢＳ、又はモック(mock)形質導入ＴＣＭ（ＣＡＲ無し）で処置したＮＳＧマウスと比較して、ｆｆＬｕｃフラックス(flux)を有意に減少させ（ｐ＜０．００１、＞１８日）、生存率を有意に改善する（ｐ＝０．０００８）。

【００６９】

［００８３］　簡潔には、ＥＧＦＰ－ｆｆＬｕｃ＋　ＰＢＴ０３０－２腫瘍細胞（１×10^5）を、ＮＳＧマウスの右前脳内に、定位固定的に移植した。５日目、マウスに、２×10^6ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢγ／ＣＤ１９ｔ＋T_{CM}（１．１×10^6ＣＡＲ＋；ｎ＝６）、２×10^6モックＴＣＭ（ＣＡＲ無し、ｎ＝６）又はＰＢＳ（ｎ＝６）のいずれかを注入した。図８Ａは、各群の代表的なマウスを示し、Xenogen Living Imageを用いた、相対腫瘍負荷を示す。ｆｆＬｕｃフラックス（フォトン／秒）の定量化によれば、モック形質導入ＴＣＭ、及びＰＢＳと比較して、ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζ／ＣＤ１９ｔ＋T_{C}

$_{M}$は、腫瘍退縮を誘導することが示された（＃ｐ＜０．０２、＊ｐ＜０．００１、反復測定ＡＮＯＶＡ）（図８Ｂ）。図８Ｃに示すように、ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢγ／ＣＤ１９ｔ＋Ｔ$_{CM}$で処置したマウスの生存率は、カプランマイヤー生存曲線（１群につきｎ＝６）によれば、有意に改善された（ｐ＝０．０００８；対数ランク検定）。

【実施例８】

【００７０】

ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζ＋Ｔｃｍ及び非ＴｃｍＩＬ１３－ゼータカインＣＤ８＋ＣＴＬクローンの抗腫瘍効力及びＴ細胞持続性の比較

［００８４］　以下に記載の試験では、ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζ＋Ｔｃｍと、以前作製された、ＩＬ１３Ｒα２特異的ヒトＣＤ８＋ＣＴＬ（ＩＬ１３－ゼータカインＣＤ８＋ＣＴＬ（非特許文献４、及び９に記載））を比較した。ＩＬ１３－ゼータカインは、ＣＤ３ζ刺激ドメインを用いるが、共刺激ドメインが欠損し、ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζ＋と同じＩＬ１３変異体を用いる。ＩＬ１３－ゼータカインは、ＣＤ３ζ刺激ドメインを用いるが、共刺激ドメインを欠き、ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζ＋と同じＩＬ１３変異体を用いる。

【００７１】

［００８５］　無血清培地中で腫瘍球（ＴＳ）として増殖させた患者の神経膠芽細胞腫検体由来の一次系統（ＰＢＴ）のパネルを作製した（非特許文献４；Brown et al.2009 Cancer Res69:8886）。当該増殖ＴＳ系は、幹細胞マーカーの発現、多系統分化、及び少細胞数での免疫無防備マウス（ＮＳＧ）の同所性腫瘍の開始能を含む、幹細胞様の特徴を示す。ＥＧＦＰ、及びホタルルシフェラーゼ（ｆｆＬｕｃ）レポーター遺伝子（ＰＢＴ０３０－２ＥＧＦＰ：ｆｆＬｕｃ）（非特許文献４）をともに発現するように改変された、ＩＬ１３Ｒα２＋初代低－継代膠芽細胞腫ＴＳ系ＰＢＴ０３０－２を、以下に概説する実験に用いた。

【００７２】

［００８６］　最初に、ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζ＋Ｔｃｍ産物の単一回投与（１×１０^{6}ＣＡＲＴ細胞）後８日目に、ＰＢＴ０３０－２ＥＧＦＰ：ｆｆｕｃＴＳ開始異種移植片（０．１×１０^{6}細胞）に対して評価した、ＩＬ１３－ゼータカインＣＤ８＋ＣＴＬクローンと比較した。ＩＬ１３Ｒα２特異的ＣＡＲ　Ｔ細胞（ＩＬ１３－ゼータカインＣＴＬ、及びＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζＴｃｍ）は、未処理、及びモックＴｃｍ（ＣＡＲ陰性）コントロールと比較して、確立されたＰＢＴ０３０－２腫瘍に対する抗腫瘍活性を示した（図９Ａ、及び９Ｂ）が、発明者らの第１世代ＩＬ１３－ゼータカインＣＤ８＋ＣＴＬクローンと比較して、ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢＺ＋Ｔｃｍは、１５０日以上生存するマウスで有意に改善された生存率、及び耐性腫瘍寛解を介在した（図９Ｃ）。

【００７３】

［００８７］　さらに、当該２つのＩＬ１３Ｒα２－ＣＡＲ　Ｔ細胞産物の治療有効性を比較するため、８日目に、ＰＢＴ０３０－２ＥＧＦＰ：ｆｆＬｕｃＴＳ開始腫瘍に対して、１．０，０．３、及び０．１×１０^{6}で、ＣＡＲ　Ｔ細胞の用量滴定を行った（図１０Ａ～Ｃ）。６匹中３匹の動物における、ＩＬ１３－ゼータカインＣＤ８＋ＣＴＬ　ｃｌ．２Ｄ７の最高用量（１×１０^{6}）媒介性抗腫瘍応答を、Xenogen Fluxによって測定したが（図１０Ｃ）、ＣＡＲ　Ｔ細胞用量が低い場合には、有意な抗腫瘍応答は観察されなかった。比較すると、ＩＬｘ（ＥＱ）ＢＢζ＋Ｔｃｍ製品の注入により、０．１×１０^{6}といった少量でのＣＡＲ　Ｔ細胞処置を含む、全ての用量レベルで、大部分のマウスで完全腫瘍退縮が導かれた。当該データは、ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζ＋Ｔｃｍの、抗腫瘍効力が、ＩＬ１３－ゼータカインＣＤ８＋ＣＴＬクローンより少なくとも１０倍強力であることを実証する。抗腫瘍効果が改善されたのは、腫瘍微小環境でのＴ細胞持続性が改善されたためである。頭蓋内注入後７日目のＣＤ３＋Ｔ細胞の評価では、腫瘍微小環境での有意数のＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζ＋Ｔｃｍが示されたが、第１世代ＩＬ１３－ゼータＣＴＬはほとんど存在しなかった（図１１）。

【実施例９】

【００７４】

大ＴＳ開始ＰＢＴ腫瘍治療用ＣＡＲ　Ｔ細胞送達経路の比較

［００８８］　以下は、侵襲性原発性ＰＢＴ系統に対する抗腫瘍活性について、静脈内（ｉ．ｖ．）、又は頭蓋内（ｉ．ｃ．）の送達経路を比較する試験である。パイロット実験（データ示さず）では、予想外に、静脈内ＰＢＴ０３０－２ＥＧＦＰ：ｆｆＬｕｃ腫瘍治療用ＰＢＳと比較して、ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζ＋Ｔｃｍ投与の治療効果は得られなかった。これは、頭蓋内投与したＣＡＲ＋Ｔ細胞で観察された、頑強な治療効果とは対照的である。５日目のＰＢＴ０３０－２腫瘍の大きさでは小さすぎて、末梢から治療用Ｔ細胞を補充できないと推論し、１９日目のより大きいＰＢＴ０３０－２ＥＧＦＰ：ｆｆＬｕｃ腫瘍に対する、静脈内送達対頭蓋内送達を、比較した。当該実験のため、ＰＢＴ０３０－２移植マウスを、ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢＺ＋Ｔｃｍ、又はモックＴｃｍ（ＣＡＲ無し）について、２回の静脈内注入（５×１０^{6}ＣＡＲ＋Ｔｃｍ；１９、及び２６日目）、又は４回の頭蓋内注入（１×１０^{6}ＣＡＲ＋Ｔｃｍ；１９、２２、２６、及び２９日目）で処置した。ここでも、静脈内投与されたＣＡＲ＋Ｔ細胞に対する、Ｘｅｎｏｇｅｎイメージング、又はカプランマイヤー生存分析によって治療上の利益はモニターされなかった（図１２Ａ、及び１２Ｂ）。対照的に、頭蓋内投与したＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζ＋Ｔｃｍでは、強力な抗腫瘍活性が観察された（図１２Ａ～Ｂ）。次に、Ｔ細胞注入後７日目のマウス集団から脳を採取し、ＩＨＣでＣＤ３＋ヒトＴ細胞について評価した。驚くべきことに、モックＴｃｍ、又はＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζＴｃｍのいずれかで静脈内処置したマウスでは、腫瘍、又はヒトＴ細胞が通常存在するマウス脳領域（すなわち、軟髄膜）では、検出可能なＣＤ３＋ヒトＴ細胞は存在せず（図１２Ｃ）、これより、腫瘍親和性(tropism)の欠損が示唆された。これは、頭蓋内処置したマウスで検出された、有意数のＴ細胞とは対照的である（図１２Ｄ）。

【００７５】

［００８９］　腫瘍由来サイトカイン、特にＭＣＰ－１／ＣＣＬ２は、腫瘍へのＴ細胞の補充に重要である。そこで、ＰＢＴ０３０－２腫瘍細胞を評価したところ、これまでに頭蓋内移植腫瘍に静脈内投与されたエフェクターＣＤ８＋Ｔ細胞を誘引することが示されている神経膠腫系統、Ｕ２５１Ｔ細胞に匹敵する、高レベルのＭＣＰ－１／ＣＣＬ２を産生することが見出された（データ非表示）。悪性神経膠腫は、高度に浸潤性の腫瘍であり、多発性の症状を呈することが多い。上記実験は、ＩＬ１３ＢＢＺ　ＴＣＭが浸潤したＰＢＴ０３０－２等の腫瘍を排除し、長期耐久性抗腫瘍活性を媒介しうることを立証する。頭蓋内送達ＣＡＲＴ細胞の多巣性疾患への移動能もまた試験した。当該実験のため、ＰＢＴ０３０－２ＥＧＦＰ：ｆｆＬｕｃＴＳを左半球、及び右半球に移植し（図１３Ａ）、ＣＡＲ＋Ｔ細胞を腫瘍右部位にのみ注射した。発明者らは、評価した全てのマウス（ｎ＝３）について、Ｔ細胞注入後７日目、ＣＤ３　ＩＨＣにより、注射部位（右腫瘍）、及び左半球の腫瘍内の両部位で、Ｔ細胞を検出した（図１３Ｂ）。当該知見は、ＣＡＲ＋Ｔ細胞が遠隔部位からでも、腫瘍病巣に移動し、かつ、浸潤しうる証拠となる。同様の知見は、Ｕ２５１Ｔ神経膠腫細胞系を用いた第２腫瘍モデルにおいても、観察された（データ非表示）。

【実施例１０】

【００７６】

共刺激ドメインの比較

［００９０］　様々な共刺激ドメインを評価するために、一連の実験を行った。共刺激ドメインがない第１世代ＣＤ３ζＣＡＲ、４－１ＢＢ共刺激ドメイン、又はＣＤ２８共刺激ドメインのいずれかを組み込んだ２つの第２世代ＣＡＲ、及びＣＤ２８共刺激ドメイン、及び４１ＢＢ共刺激ドメインをともに含有する第３世代ＣＡＲを含む、評価した様々なＣＡＲを、図１４Ａに模式的に示した。全てのＣＡＲ構築物はまた、形質導入細胞のマーカーとして、Ｔ２Ａリボソームスキップ配列、及び切断型ＣＤ１９（ＣＤ１９ｔ）配列を含む。

【００７７】

［００９１］　ＣＤ４、及びＣＤ８　ＴＣＭをレンチウイルスで形質導入し、ＣＡＲ発

現Ｔ細胞を、抗ＣＤ１９を介して免疫学的に濃縮した。ＣＤ１９、及びＩＬ１３（すなわち、ＣＡＲ）の発現レベルを、フローサイトメトリーで測定した。結果を、図１４Ｂに示す。各ＣＡＲ構築物の安定性は、ＣＡＲ（ＩＬ１３）平均蛍光強度（ＭＦＩ）を形質導入マーカー（ＣＤ１９ｔ）で除することで、決定した（図１４Ｃ）。４－１ＢＢ共刺激ドメインを含む２つのＣＡＲの発現レベルは、ＣＤ１９ｔ形質導入マーカーと比較して、最も低かった。

【００７８】

［００９２］　指示されたモック形質導入、又はＣＡＲ発現Ｔ細胞の、ＩＬ１３Ｒα２発現ＰＢＴ０３０－２腫瘍細胞標的の殺傷能を、指示されたエフェクター：標的比で、４時間^{51}Ｃｒ放出アッセイで、決定した。当該実験結果を、図１５Ａに示す（３重(triplicate)ウェルの平均クロム放出％±Ｓ．Ｄ．が示される）。予想通り、モック形質導入Ｔ細胞は、標的を効率的には溶解しなかった。対照的に、全てのＣＡＲ発現Ｔ細胞は同様の方法で、腫瘍細胞を溶解した。図１５Ｂは、示されたモック形質導入、又はＣＡＲ発現Ｔ細胞を、ＩＬ１３Ｒα２発現ＰＢＴ０３０－２腫瘍細胞と１０：１の比で一晩共培養し、上清をサイトメトリービーズアレイによる、ＩＬ－１３、及びＩＦＮ－γレベルについて分析した実験結果を示す。興味深いことに、ζ、４１ＢＢ－ζ又はＣＤ２８－４１ＢＢ－ζＣＡＲを発現するＴ細胞で産生される抗原刺激性サイトカインは、ＣＤ２８－ζＣＡＲを発現するＴ細胞よりもその産生は低かった。

【００７９】

［００９３］　様々なＣＡＲのインビボ効能を、以下のように試験した。簡潔には、ＮＳＧマウスは、０日目のｆｆＬｕｃ＋ＰＢＴ０３０－２腫瘍細胞を頭蓋内注射後８日目に、ＰＢＳ（腫瘍のみ）、模擬形質導入Ｔ細胞、又は指定されたＩＬ１３Ｒα２特異的ＣＡＲを発現するＴ細胞、のいずれかで頭蓋内処置した６群に（６～１０マウス／群）に、無作為に分けた。その後、定量的生物発光イメージングを行い、腫瘍増殖を経時的にモニターした。図１６Ａは、各群における代表的なマウスの生物発光画像を示す。図１６Ｂは、２７日目の各マウスについてのフラックスレベルを示す。ＣＤ２８－ＣＡＲを発現するＴ細胞で処置した群以外の、ＩＬ１３Ｒα２特異的ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置した全ての群の腫瘍体積は、モック形質導入Ｔ細胞で処置したマウスと比較して、統計的に有意に減少した（図１６Ｃ）。

【実施例１１】

【００８０】

ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζ／ＣＤ１９ｔのアミノ酸配列

［００９４］　ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζ／ＣＤ１９ｔの完全アミノ酸配列を図１７に示す。全配列（配列番号１）は、２２アミノ酸のＧＭＣＳＦシグナルペプチド（配列番号２）、１１２アミノ酸のＩＬ－１３配列（配列番号３；アミノ酸置換Ｅ１３Ｙを太字で示す）；２２９アミノ酸のＩｇＧ４配列（配列番号４；太字で示す、アミノ酸置換Ｌ２３５Ｅ、及びＮ２９７Ｑがある）；２２アミノ酸のＣＤ４膜貫通配列（配列番号５）；４２アミノ酸４－１ＢＢ配列（配列番号６）；３アミノ酸のＧｌｙリンカー；１１２アミノ酸のＣＤ３ζ配列（配列番号７）；２４アミノ酸Ｔ２Ａ配列（配列番号８）；及び、３２３アミノ酸のＣＤ１９ｔ配列（配列番号９）；を含む。

【００８１】

［００９５］　成熟キメラ抗原受容体配列（配列番号１０）は、１１２アミノ酸のＩＬ－１３配列（配列番号３；アミノ酸置換Ｅ１３Ｙを太字で示す）；２２９アミノ酸のＩｇＧ４配列（太字で示す、アミノ酸置換Ｌ２３５Ｅ、及びＮ２９７Ｑがある）；２２アミノ酸のＣＤ４配列（配列番号５）；４２アミノ酸４－１ＢＢ配列（配列番号６）；３アミノ酸のＧｌｙリンカー；及び、１１２アミノ酸のＣＤ３ζ配列（配列番号７）；を含む。このＣＡＲ配列（配列番号１０）内には、ＩＬ－１３／ＩｇＧ４／ＣＤ４ｔ／４１－ＢＢ配列（配列番号１１）が含まれるが、これには、１１２アミノ酸のＩＬ－１３配列（配列番号３；アミノ酸置換Ｅ１３Ｙを太字で示す）；２２９アミノ酸のＩｇＧ４配列（配列番号４；太字で示す、アミノ酸置換Ｌ２３５Ｅ、及びＮ２９７Ｑがある）；２２アミノ酸のＣ

Ｄ４配列（配列番号５）；及び、４２アミノ酸の４－１ＢＢ配列（配列番号６）；を含む。ＩＬ１３／ＩｇＧ４／ＣＤ４ｔ／４－１ＢＢ配列（配列番号１１）は、ＧｌｙＧｌｙＧｌｙリンカー等のリンカーにより、１１２アミノ酸のＣＤ３ζ配列（配列番号７）に連結できる。ＣＡＲ配列（配列番号１０）の前に、２２アミノ酸のＧＭＣＳＦシグナルペプチド（配列番号２）を配置することができる。

【００８２】

［００９６］　図１８は、ＩＬ１３（ＥＱ）４１ＢＢζ［ＩＬ１３（ＥＱ）４１ＢＢζＴ２Ａ－ＣＤ１９ｔ＿ｅｐＨＩＶ７；ｐＦ０２６３０］（配列番号１２）、及びＣＤ１９Ｒｏｐ＿ｅｐＨＩＶ７（ｐＪ０１６８３）（配列番号１３）の配列の比較を示す。

【実施例１２】

【００８３】

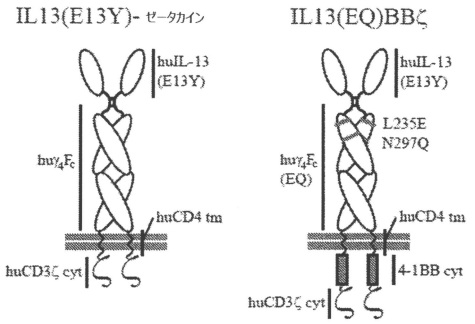
ＩＬ１３（ＥＱ）ＢＢζ／ＣＤ１９ｔのアミノ酸配列

［００９７］　図１９～２６は、特定の細胞内ドメインの間に位置するＧｌｙＧｌｙＧｌｙスペーサーを除き、様々なドメインが各々標識される場合の、ＩＬ１３Ｒα２に対するさらなるＣＡＲのアミノ酸配列を示す。各々、ＧｌｕがＴｙｒに置換された、ヒトＩＬ１３（配列番号３；アミノ酸置換Ｅ１３Ｙが強調される）が含まれる。当該ＣＡＲ発現用の発現ベクターでは、発現されるアミノ酸配列は、２４アミノ酸Ｔ２Ａ配列（配列番号８）；及び３２３アミノ酸のＣＤ１９ｔ配列（配列番号９）、を含むことができ、これにより、ＣＡＲ発現細胞の表面上で、切断型ＣＤ１９配列の協調的発現が可能となる。

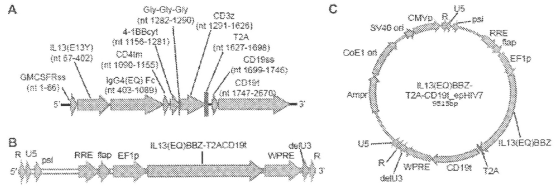
【００８４】

［００９８］　ヒトＩＬ１３（Ｅ１３Ｙ）ドメイン、ＣＤ２８ｔｍドメイン、ＣＤ２８ｇｇ共刺激ドメイン、４－１ＢＢ共刺激ドメイン、及びＣＤ３ζドメインＣＡＲ骨格を含み、かつ、ＨＬ（２２アミノ酸）スペーサー、ＣＤ８ヒンジ（４８アミノ酸）スペーサー、ＩｇＧ４－ＨＬ－ＣＨ３（１２９アミノ酸）スペーサーか、又はＩｇＧ４（ＥＱ）（２２９アミノ酸）スペーサーを含む、ＣＡＲのパネルを、ＩＬ－１３Ｒａ２特異的殺傷介在能について、７２時間共培養アッセイで評価されるように、試験した。この系では、ＣＡＲ発現が低いらしいＨＬ（２２個のアミノ酸）を除き、全て活性があった。

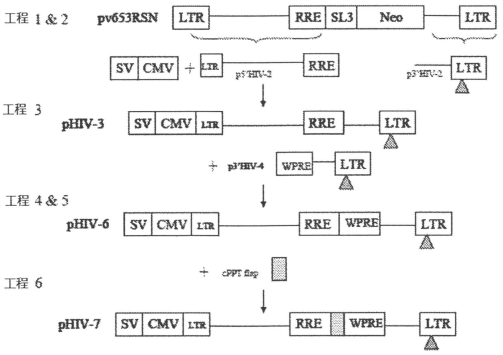
【図１】



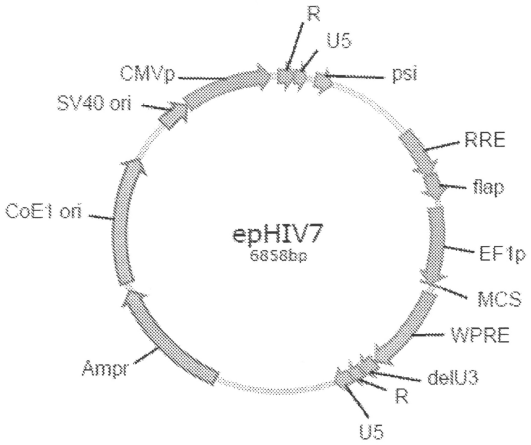
【図２】



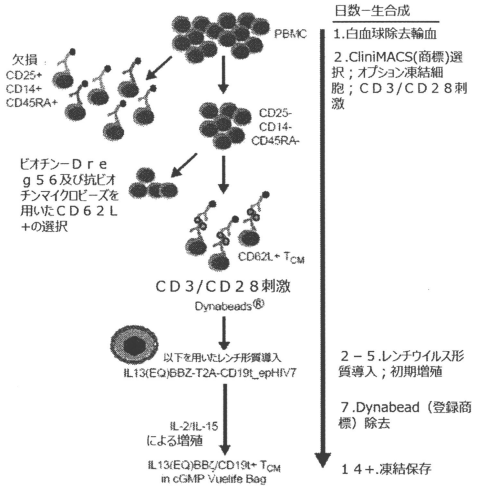
【図３】



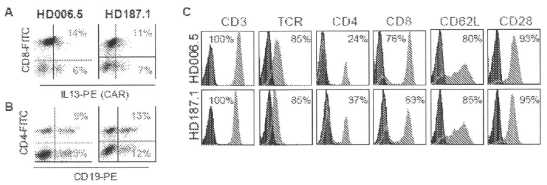
【図４】



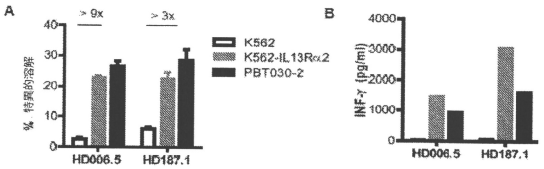
【図５】



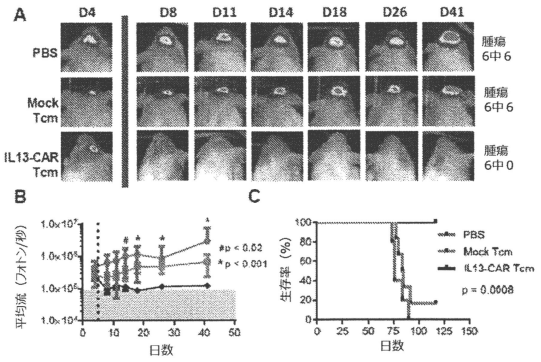
【図６】



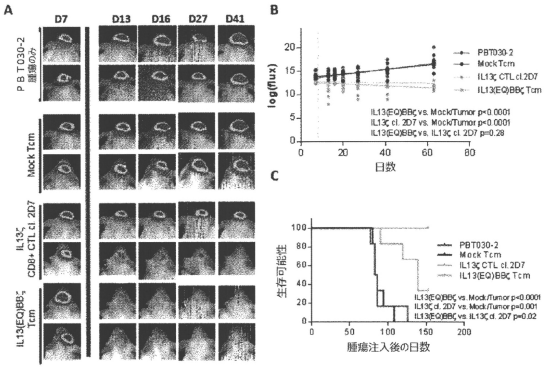
【図７】



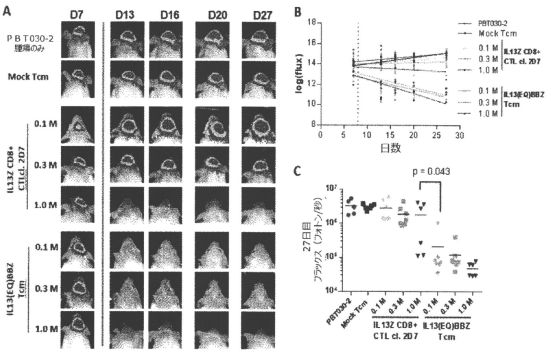
【図８】



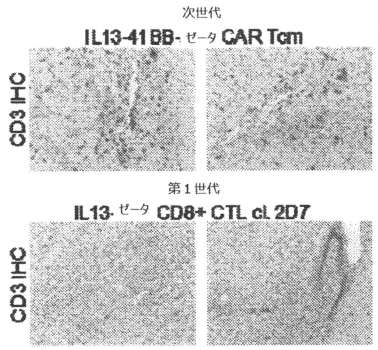
【図９】



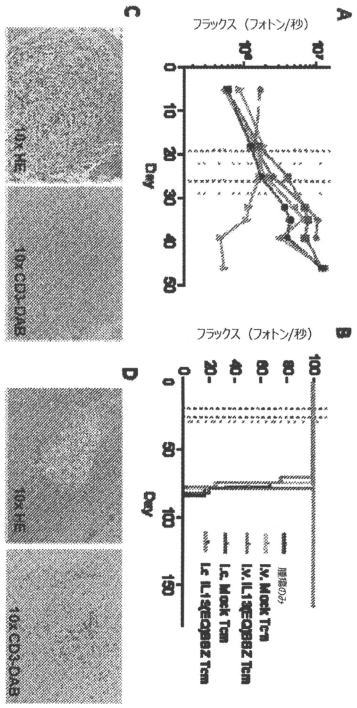
【図１０】



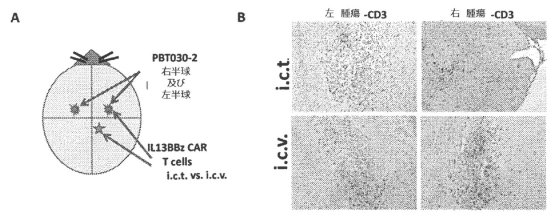
【図１１】



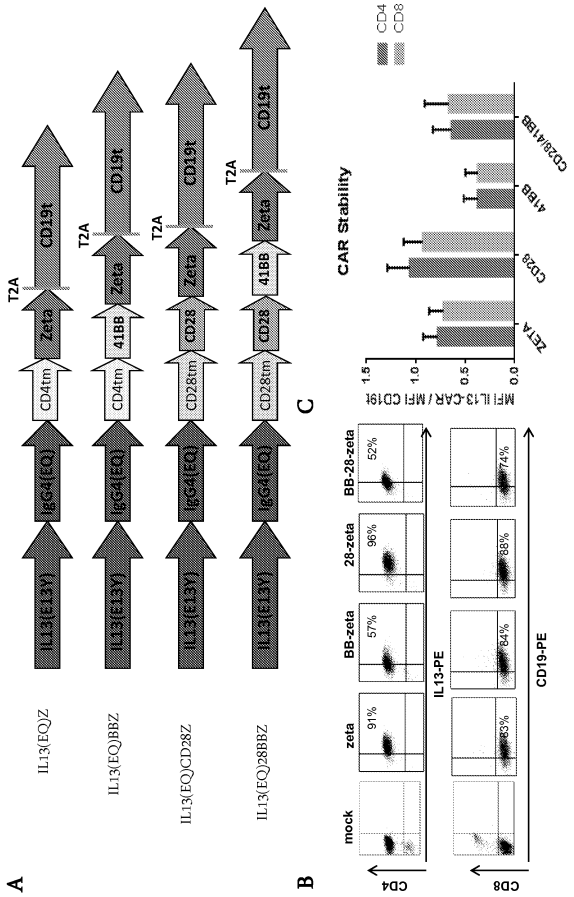
【図１２】



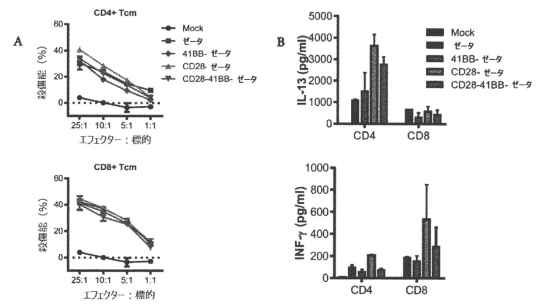
【図１３】



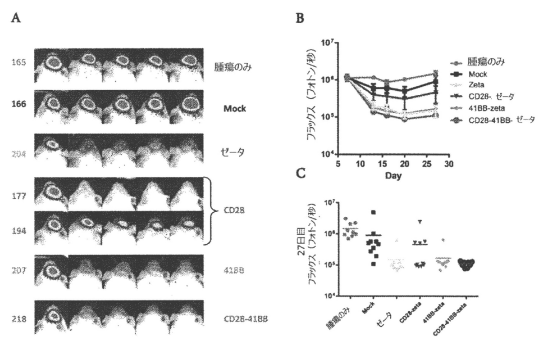
【図１４】



【図１５】



【図１６】



【図１７】

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPGPVPPSTALRYLIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGM

GMCSFRa シグナルペプチド (22 aa) IL13 (112 aa)

YCAALESLINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLLHLKKLF

REGRFNESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF

IgG4(L235E, N297Q 太字) (229 aa)

NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS

KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL

DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKMALIVLGGVAGLL

CD4tm (22 aa)

LFIGLGIFFKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELGGGRVKFSRSADA

41BB (42 aa) Gly3 ゼータ (112 aa)

PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE

AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRLEGGGEGRGSLLTCGDV

T2A (24 aa)

EENPGPRMPPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRE

CD19t (323 aa)

SPLKPFLKLSLGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVE

GSGELFRWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIWEGEPPCVPPR

DSLNQSLSQDLTMAPGSTLWLSCGVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKDDRPARD

MWVMETGLLLPRATAQDAGKYYCHRGNLTMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWKVSAVTL

AYLIFCLCSLVGILHLQRALVLRRKR

【図１８－１】

Yellow highlighting indicates the IL-13 optimized codon region including the GMCSF signal sequence (IL13op).
highlighting indicates the IgG4 optimized codon region (IgG4op[L235E, N297Q]).
highlighting indicates the two anticipated amino acid changes within the IgG4 hinge region(L235E and N297Q).
highlighting indicates the CD4 transmembrane optimized codon region.
highlighting indicates the 41BB cytoplasmic signaling region (41BB cyto).
highlighting indicates the 3 glycine linkers (g3).
Gray Highlighting indicates the CD3 zeta optimized codon region (zeta op).
highlighting indicates the T2A sequence (T2A).
highlighting Indicates the truncated CD19 sequence (CD19t).

```
                          1                                                  50
IL13(EQ)41BBZeta      (1) GTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCAC
CD19Rop_epHIV7        (1) GTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCAC
      Consensus       (1) GTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCAC
                         51                                                 100
IL13(EQ)41BBZeta     (51) TGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCC
CD19Rop_epHIV7       (51) TGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCC
      Consensus      (51) TGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCC
                        101                                                 150
IL13(EQ)41BBZeta    (101) CGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTC
CD19Rop_epHIV7      (101) CGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTC
      Consensus     (101) CGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTC
                        151                                                 200
IL13(EQ)41BBZeta    (151) AGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAA
CD19Rop_epHIV7      (151) AGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAA
      Consensus     (151) AGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAA
                        201                                                 250
IL13(EQ)41BBZeta    (201) AGGGAAACCAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGC
CD19Rop_epHIV7      (201) AGGGAAACCAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGC
      Consensus     (201) AGGGAAACCAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGC
                        251                                                 300
IL13(EQ)41BBZeta    (251) GCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTG
CD19Rop_epHIV7      (251) GCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTG
      Consensus     (251) GCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTG
                        301                                                 350
IL13(EQ)41BBZeta    (301) ACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAA
CD19Rop_epHIV7      (301) ACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAA
      Consensus     (301) ACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAA
                        351                                                 400
IL13(EQ)41BBZeta    (351) GCGGGGGAGAATTAGATCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGA
CD19Rop_epHIV7      (351) GCGGGGGAGAATTAGATCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGA
      Consensus     (351) GCGGGGGAGAATTAGATCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGA
                        401                                                 450
IL13(EQ)41BBZeta    (401) AAGAAAAAATATAAATTAAAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGA
CD19Rop_epHIV7      (401) AAGAAAAAATATAAATTAAAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGA
      Consensus     (401) AAGAAAAAATATAAATTAAAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGA
                        451                                                 500
```

【図１８－２】

```
IL13(EQ)41BBZeta    (451) ACGATTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGAC
CD19Rop_epHIV7      (451) ACGATTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGAC
      Consensus     (451) ACGATTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGAC
                        501                                                 550
IL13(EQ)41BBZeta    (501) AAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTT
CD19Rop_epHIV7      (501) AAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTT
      Consensus     (501) AAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTT
                        551                                                 600
IL13(EQ)41BBZeta    (551) AGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGAT
CD19Rop_epHIV7      (551) AGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGAT
      Consensus     (551) AGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGAT
                        601                                                 650
IL13(EQ)41BBZeta    (601) AGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAA
CD19Rop_epHIV7      (601) AGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAA
      Consensus     (601) AGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAA
                        651                                                 700
IL13(EQ)41BBZeta    (651) ACAAAAGTAAGAAAAAAGCACAGCAAGCAGCAGCTGACACAGGACACAGC
CD19Rop_epHIV7      (651) ACAAAAGTAAGAAAAAAGCACAGCAAGCAGCAGCTGACACAGGACACAGC
      Consensus     (651) ACAAAAGTAAGAAAAAAGCACAGCAAGCAGCAGCTGACACAGGACACAGC
                        701                                                 750
IL13(EQ)41BBZeta    (701) AATCAGGTCAGCCAAAATTACCCTATAGTGCAGAACATCCAGGGGCAAAT
CD19Rop_epHIV7      (701) AATCAGGTCAGCCAAAATTACCCTATAGTGCAGAACATCCAGGGGCAAAT
      Consensus     (701) AATCAGGTCAGCCAAAATTACCCTATAGTGCAGAACATCCAGGGGCAAAT
                        751                                                 800
IL13(EQ)41BBZeta    (751) GGTACATCAGGCCATATCACCTAGAACTTTAAATGCATGGGTAAAAGTAG
CD19Rop_epHIV7      (751) GGTACATCAGGCCATATCACCTAGAACTTTAAATGCATGGGTAAAAGTAG
      Consensus     (751) GGTACATCAGGCCATATCACCTAGAACTTTAAATGCATGGGTAAAAGTAG
                        801                                                 850
IL13(EQ)41BBZeta    (801) TAGAAGAGAAGGCTTTCAGCCCAGAAGTGATACCCATGTTTTCAGCATTA
CD19Rop_epHIV7      (801) TAGAAGAGAAGGCTTTCAGCCCAGAAGTGATACCCATGTTTTCAGCATTA
      Consensus     (801) TAGAAGAGAAGGCTTTCAGCCCAGAAGTGATACCCATGTTTTCAGCATTA
                        851                                                 900
IL13(EQ)41BBZeta    (851) TCAGAAGGAGCCACCCCACAAGATTTAAACACCATGCTAAACACAGTGGG
CD19Rop_epHIV7      (851) TCAGAAGGAGCCACCCCACAAGATTTAAACACCATGCTAAACACAGTGGG
      Consensus     (851) TCAGAAGGAGCCACCCCACAAGATTTAAACACCATGCTAAACACAGTGGG
                        901                                                 950
IL13(EQ)41BBZeta    (901) GGGACATCAAGCAGCCATGCAAATGTTAAAAGAGACCATCAATGAGGAAG
CD19Rop_epHIV7      (901) GGGACATCAAGCAGCCATGCAAATGTTAAAAGAGACCATCAATGAGGAAG
      Consensus     (901) GGGACATCAAGCAGCCATGCAAATGTTAAAAGAGACCATCAATGAGGAAG
                        951                                                1000
IL13(EQ)41BBZeta    (951) CTGCAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAAGAGCAGTGGGAAT
CD19Rop_epHIV7      (951) CTGCAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAAGAGCAGTGGGAAT
      Consensus     (951) CTGCAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAAGAGCAGTGGGAAT
                       1001                                                1050
IL13(EQ)41BBZeta   (1001) AGGAGCTTTGTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCG
CD19Rop_epHIV7     (1001) AGGAGCTTTGTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCG
      Consensus    (1001) AGGAGCTTTGTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCG
                       1051                                                1100
IL13(EQ)41BBZeta   (1051) CAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATA
CD19Rop_epHIV7     (1051) CAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATA
      Consensus    (1051) CAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATA
                       1101                                                1150
IL13(EQ)41BBZeta   (1101) GTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCT
CD19Rop_epHIV7     (1101) GTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCT
      Consensus    (1101) GTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCT
```

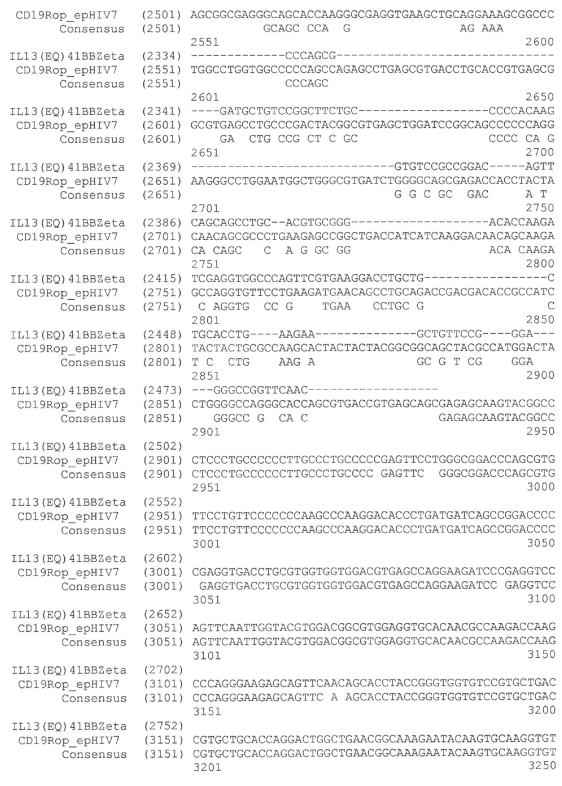
【図１８－３】

```
                       1151                                                1200
IL13(EQ)41BBZeta   (1151) GTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGG
CD19Rop_epHIV7     (1151) GTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGG
      Consensus    (1151) GTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGG
                       1201                                                1250
IL13(EQ)41BBZeta   (1201) CTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTTGGGGTTGC
CD19Rop_epHIV7     (1201) CTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTTGGGGTTGC
      Consensus    (1201) CTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTTGGGGTTGC
                       1251                                                1300
IL13(EQ)41BBZeta   (1251) TCTGGAAAACTCATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGATCTACAAATGGCA
CD19Rop_epHIV7     (1251) TCTGGAAAACTCATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGATCTACAAATGGCA
      Consensus    (1251) TCTGGAAAACTCATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGATCTACAAATGGCA
                       1301                                                1350
IL13(EQ)41BBZeta   (1301) GTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGC
CD19Rop_epHIV7     (1301) GTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGC
      Consensus    (1301) GTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGC
                       1351                                                1400
IL13(EQ)41BBZeta   (1351) AGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAAACTAAAGAAT
CD19Rop_epHIV7     (1351) AGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAAACTAAAGAAT
      Consensus    (1351) AGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAAACTAAAGAAT
                       1401                                                1450
IL13(EQ)41BBZeta   (1401) TACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGAC
CD19Rop_epHIV7     (1401) TACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGAC
      Consensus    (1401) TACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGAC
                       1451                                                1500
IL13(EQ)41BBZeta   (1451) AGCAGAGATCCAGTTTGGGGATCAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTT
CD19Rop_epHIV7     (1451) AGCAGAGATCCAGTTTGGGGATCAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTT
      Consensus    (1451) AGCAGAGATCCAGTTTGGGGATCAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTT
                       1501                                                1550
IL13(EQ)41BBZeta   (1501) AGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGAGGATCTGCGATCGCTCCGGTGCCCGTC
CD19Rop_epHIV7     (1501) AGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGAGGATCTGCGATCGCTCCGGTGCCCGTC
      Consensus    (1501) AGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGAGGATCTGCGATCGCTCCGGTGCCCGTC
                       1551                                                1600
IL13(EQ)41BBZeta   (1551) AGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGG
CD19Rop_epHIV7     (1551) AGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGG
      Consensus    (1551) AGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGG
                       1601                                                1650
IL13(EQ)41BBZeta   (1601) GTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGA
CD19Rop_epHIV7     (1601) GTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGA
      Consensus    (1601) GTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGA
                       1651                                                1700
IL13(EQ)41BBZeta   (1651) AAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAAC
CD19Rop_epHIV7     (1651) AAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAAC
      Consensus    (1651) AAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAAC
                       1701                                                1750
IL13(EQ)41BBZeta   (1701) CGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTT
CD19Rop_epHIV7     (1701) CGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTT
      Consensus    (1701) CGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTT
                       1751                                                1800
IL13(EQ)41BBZeta   (1751) GCCGCCAGAACACAGCTGAAGCTTCGAGGGGCTCGCATCTCTCCTTCACG
CD19Rop_epHIV7     (1751) GCCGCCAGAACACAGCTGAAGCTTCGAGGGGCTCGCATCTCTCCTTCACG
      Consensus    (1751) GCCGCCAGAACACAGCTGAAGCTTCGAGGGGCTCGCATCTCTCCTTCACG
                       1801                                                1850
IL13(EQ)41BBZeta   (1801) CGCCCGCCGCCCTACCTGAGGCCGCCATCCACGCCGGTTGAGTCGCGTTC
CD19Rop_epHIV7     (1801) CGCCCGCCGCCCTACCTGAGGCCGCCATCCACGCCGGTTGAGTCGCGTTC
```

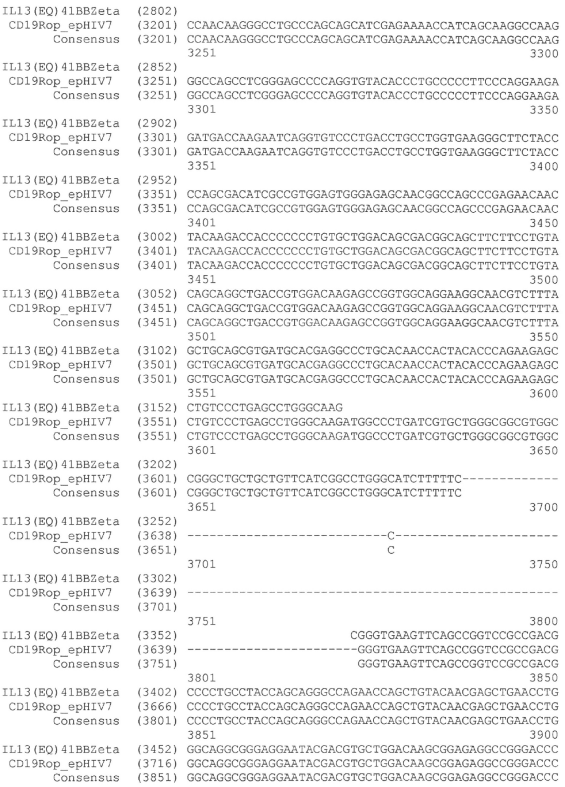
【図１８－４】

```
      Consensus    (1801) CGCCCGCCGCCCTACCTGAGGCCGCCATCCACGCCGGTTGAGTCGCGTTC
                       1851                                                1900
IL13(EQ)41BBZeta   (1851) TGCCGCCTCCCGCCTGTGGTGCCTCCTGAACTGCGTCCGCCGTCTAGGTA
CD19Rop_epHIV7     (1851) TGCCGCCTCCCGCCTGTGGTGCCTCCTGAACTGCGTCCGCCGTCTAGGTA
      Consensus    (1851) TGCCGCCTCCCGCCTGTGGTGCCTCCTGAACTGCGTCCGCCGTCTAGGTA
                       1901                                                1950
IL13(EQ)41BBZeta   (1901) AGTTTAAAGCTCAGGTCGAGACCGGGCCTTTGTCCGGCGCTCCCTTGGAG
CD19Rop_epHIV7     (1901) AGTTTAAAGCTCAGGTCGAGACCGGGCCTTTGTCCGGCGCTCCCTTGGAG
      Consensus    (1901) AGTTTAAAGCTCAGGTCGAGACCGGGCCTTTGTCCGGCGCTCCCTTGGAG
                       1951                                                2000
IL13(EQ)41BBZeta   (1951) CCTACCTAGACTCAGCCGGCTCTCCACGCTTTGCCTGACCCTGCTTGCTC
CD19Rop_epHIV7     (1951) CCTACCTAGACTCAGCCGGCTCTCCACGCTTTGCCTGACCCTGCTTGCTC
      Consensus    (1951) CCTACCTAGACTCAGCCGGCTCTCCACGCTTTGCCTGACCCTGCTTGCTC
                       2001                                                2050
IL13(EQ)41BBZeta   (2001) AACTCTACGTCTTTGTTTCGTTTTCTGTTCTGCGCCGTTACAGATCCAAG
CD19Rop_epHIV7     (2001) AACTCTACGTCTTTGTTTCGTTTTCTGTTCTGCGCCGTTACAGATCCAAG
      Consensus    (2001) AACTCTACGTCTTTGTTTCGTTTTCTGTTCTGCGCCGTTACAGATCCAAG
                       2051                                                2100
IL13(EQ)41BBZeta   (2051) CTGTGACCGGCGCCTACGGCTAGCGCCGCCACCATGCTGCTGCTGGTGAC
CD19Rop_epHIV7     (2051) CTGTGACCGGCGCCTACGGCTAGCGCCGCCACCATGCTGCTGCTGGTGAC
      Consensus    (2051) CTGTGACCGGCGCCTACGGCTAGCGCCGCCACCATGCTGCTGCTGGTGAC
                       2101                                                2150
IL13(EQ)41BBZeta   (2101) CAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCCACACCCGCCTTTCTGCTGATCCCTG
CD19Rop_epHIV7     (2101) CAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCCACACCCGCCTTTCTGCTGATCCCCG
      Consensus    (2101) CAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCCACACCCGCCTTTCTGCTGATCCC G
                       2151                                                2200
IL13(EQ)41BBZeta   (2151) GC--CCCG-TGCCCCCTAGCACCGCC---CTGCGCTACCTGATCGAGGAA
CD19Rop_epHIV7     (2151) ACATCCAGATGACCCAGACCACCTCCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGAC
      Consensus    (2151)  C  CC G TG CCC  A CACC CC   CTG GC  C    T G  GA
                       2201                                                2250
IL13(EQ)41BBZeta   (2195) CTGGTGA----------------------ACATCACCCAGAACCAGAA
CD19Rop_epHIV7     (2201) CGGGTGACCATCAGCTGCCGGGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAA
      Consensus    (2201) C GGTGA                      ACATCA C AG ACC GAA
                       2251                                                2300
IL13(EQ)41BBZeta   (2221) ----------AGCCC-------CC----------CTGTGCAAC-----
CD19Rop_epHIV7     (2251) CTGGTATCAGCAGAAGCCCGACGGCACCGTCAAGCTGCTGATCTACCACA
      Consensus    (2251)           AGCCC       CC          CTG  C AC
                       2301                                                2350
IL13(EQ)41BBZeta   (2237) ------GGCAGCAT---GGTGTG----------------------------
CD19Rop_epHIV7     (2301) CCAGCCGGCTGCACAGCGGCGTGCCCAGCCGGTTTAGCGGCAGCGGCTCC
      Consensus    (2301)       GGC GCA    GG GTG
                       2351                                                2400
IL13(EQ)41BBZeta   (2251) ------------------GAGCATC---AACCTG------------------
CD19Rop_epHIV7     (2351) GGCACCGACTACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAACAGGAAGATATCGC
      Consensus    (2351)                  GA CATC   AACCTG
                       2401                                                2450
IL13(EQ)41BBZeta   (2264) -ACC-------GCCGGCATGT-------ACTG-----------TGCCGCC-
CD19Rop_epHIV7     (2401) CACCTACTTTTGCCAGCAGGGCAACACACTGCCCTACACCTTTGGCGGCG
      Consensus    (2401)  ACC       GCC GCA G        ACTG           TG CG C
                       2451                                                2500
IL13(EQ)41BBZeta   (2288) --------CTGGAAA------GCCTGATCAACGTGAGCGGCT---------
CD19Rop_epHIV7     (2451) GAACAAAGCTGGAAATCACCGGCAGCACCTCCGGCAGCGGCAAGCCTGGC
      Consensus    (2451)         CTGGAAA      GC   A C  CG  AGCGGC
                       2501                                                2550
IL13(EQ)41BBZeta   (2316) ----------GCAGCGCCATCG----------------AGAAAA-------
```

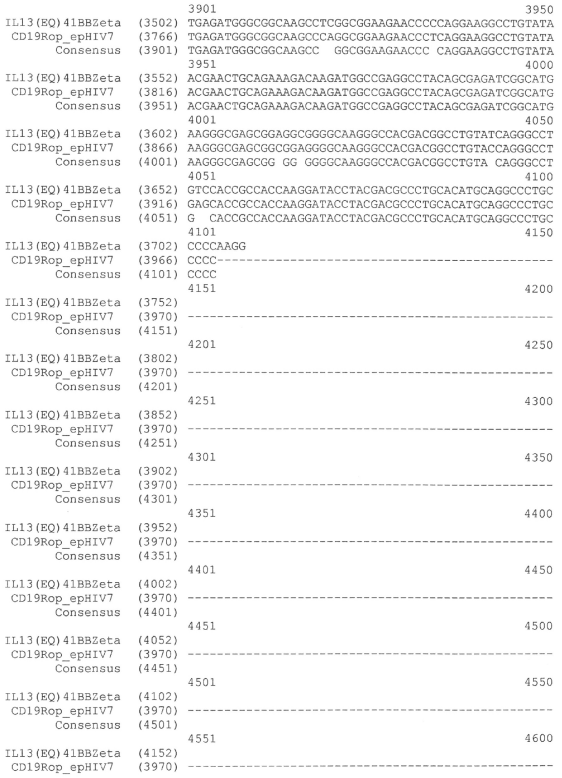
【図１８－５】



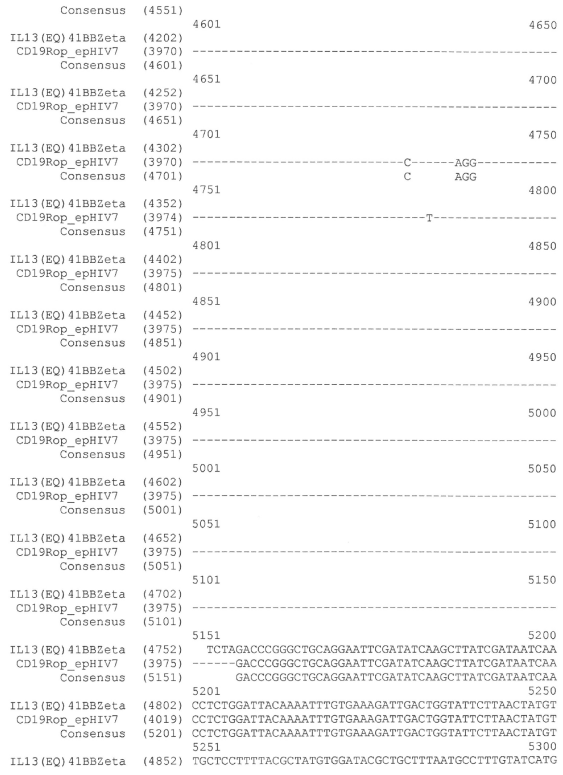
【図１８－６】



【図１８－７】



【図１８－８】



【図１８－９】

```
CD19Rop_epHIV7   (4069) TGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATG
      Consensus  (5251) TGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATG
                        5301                                          5350
IL13(EQ)41BBZeta (4902) CTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGG
CD19Rop_epHIV7   (4119) CTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGG
      Consensus  (5301) CTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGG
                        5351                                          5400
IL13(EQ)41BBZeta (4952) TTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGT
CD19Rop_epHIV7   (4169) TTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGT
      Consensus  (5351) TTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGT
                        5401                                          5450
IL13(EQ)41BBZeta (5002) GGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCA
CD19Rop_epHIV7   (4219) GGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCA
      Consensus  (5401) GGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCA
                        5451                                          5500
IL13(EQ)41BBZeta (5052) CCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCC
CD19Rop_epHIV7   (4269) CCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCC
      Consensus  (5451) CCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCC
                        5501                                          5550
IL13(EQ)41BBZeta (5102) ACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCG
CD19Rop_epHIV7   (4319) ACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCG
      Consensus  (5501) ACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCG
                        5551                                          5600
IL13(EQ)41BBZeta (5152) GCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAATCATCGTCCT
CD19Rop_epHIV7   (4369) GCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAATCATCGTCCT
      Consensus  (5551) GCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAATCATCGTCCT
                        5601                                          5650
IL13(EQ)41BBZeta (5202) TTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCC
CD19Rop_epHIV7   (4419) TTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCC
      Consensus  (5601) TTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCC
                        5651                                          5700
IL13(EQ)41BBZeta (5252) TTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGG
CD19Rop_epHIV7   (4469) TTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGG
      Consensus  (5651) TTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGG
                        5701                                          5750
IL13(EQ)41BBZeta (5302) CCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGA
CD19Rop_epHIV7   (4519) CCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGA
      Consensus  (5701) CCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGA
                        5751                                          5800
IL13(EQ)41BBZeta (5352) CGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCATCGATACCGTCGACTA
CD19Rop_epHIV7   (4569) CGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCATCGATACCGTCGACTA
      Consensus  (5751) CGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCATCGATACCGTCGACTA
                        5801                                          5850
IL13(EQ)41BBZeta (5402) GCCGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCA
CD19Rop_epHIV7   (4619) GCCGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCA
      Consensus  (5801) GCCGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCA
                        5851                                          5900
IL13(EQ)41BBZeta (5452) CTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACTCCCAAAGAA
CD19Rop_epHIV7   (4669) CTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACTCCCAAAGAA
      Consensus  (5851) CTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACTCCCAAAGAA
                        5901                                          5950
IL13(EQ)41BBZeta (5502) GACAAGATCTGCTTTTTGCCTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATC
CD19Rop_epHIV7   (4719) GACAAGATCTGCTTTTTGCCTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATC
      Consensus  (5901) GACAAGATCTGCTTTTTGCCTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATC
                        5951                                          6000
```

【図１８－１０】

```
IL13(EQ)41BBZeta (5552) TGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCA
CD19Rop_epHIV7   (4769) TGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCA
      Consensus  (5951) TGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCA
                        6001                                          6050
IL13(EQ)41BBZeta (5602) ATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTG
CD19Rop_epHIV7   (4819) ATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTG
      Consensus  (6001) ATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTG
                        6051                                          6100
IL13(EQ)41BBZeta (5652) ACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATC
CD19Rop_epHIV7   (4869) ACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATC
      Consensus  (6051) ACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATC
                        6101                                          6150
IL13(EQ)41BBZeta (5702) TCTAGCAGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGGGGG
CD19Rop_epHIV7   (4919) TCTAGCAGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGGGGG
      Consensus  (6101) TCTAGCAGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGGGGG
                        6151                                          6200
IL13(EQ)41BBZeta (5752) GGCCCGGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGGC
CD19Rop_epHIV7   (4969) GGCCCGGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGGC
      Consensus  (6151) GGCCCGGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGGC
                        6201                                          6250
IL13(EQ)41BBZeta (5802) CGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTA
CD19Rop_epHIV7   (5019) CGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTA
      Consensus  (6201) CGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTA
                        6251                                          6300
IL13(EQ)41BBZeta (5852) ATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG
CD19Rop_epHIV7   (5069) ATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG
      Consensus  (6251) ATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG
                        6301                                          6350
IL13(EQ)41BBZeta (5902) GCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATG
CD19Rop_epHIV7   (5119) GCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATG
      Consensus  (6301) GCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATG
                        6351                                          6400
IL13(EQ)41BBZeta (5952) GAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTA
CD19Rop_epHIV7   (5169) GAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTA
      Consensus  (6351) GAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTA
                        6401                                          6450
IL13(EQ)41BBZeta (6002) AATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATA
CD19Rop_epHIV7   (5219) AATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATA
      Consensus  (6401) AATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATA
                        6451                                          6500
IL13(EQ)41BBZeta (6052) AATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGAAC
CD19Rop_epHIV7   (5269) AATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGAAC
      Consensus  (6451) AATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGAAC
                        6501                                          6550
IL13(EQ)41BBZeta (6102) AAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAAC
CD19Rop_epHIV7   (5319) AAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAAC
      Consensus  (6501) AAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAAC
                        6551                                          6600
IL13(EQ)41BBZeta (6152) CGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCTAATCAAGTT
CD19Rop_epHIV7   (5369) CGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCTAATCAAGTT
      Consensus  (6551) CGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCTAATCAAGTT
                        6601                                          6650
IL13(EQ)41BBZeta (6202) TTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGC
CD19Rop_epHIV7   (5419) TTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGC
      Consensus  (6601) TTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGC
```

【図１８－１１】

```
                        6651                                          6700
IL13(EQ)41BBZeta (6252) CCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGA
CD19Rop_epHIV7   (5469) CCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGA
      Consensus  (6651) CCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGA
                        6701                                          6750
IL13(EQ)41BBZeta (6302) AGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGG
CD19Rop_epHIV7   (5519) AGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGG
      Consensus  (6701) AGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGG
                        6751                                          6800
IL13(EQ)41BBZeta (6352) TCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAG
CD19Rop_epHIV7   (5569) TCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAG
      Consensus  (6751) TCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAG
                        6801                                          6850
IL13(EQ)41BBZeta (6402) GGCGCGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTG
CD19Rop_epHIV7   (5619) GGCGCGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTG
      Consensus  (6801) GGCGCGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTG
                        6851                                          6900
IL13(EQ)41BBZeta (6452) TTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAAC
CD19Rop_epHIV7   (5669) TTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAAC
      Consensus  (6851) TTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAAC
                        6901                                          6950
IL13(EQ)41BBZeta (6502) CCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAA
CD19Rop_epHIV7   (5719) CCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAA
      Consensus  (6901) CCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAA
                        6951                                          7000
IL13(EQ)41BBZeta (6552) CATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGT
CD19Rop_epHIV7   (5769) CATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGT
      Consensus  (6951) CATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGT
                        7001                                          7050
IL13(EQ)41BBZeta (6602) TTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGT
CD19Rop_epHIV7   (5819) TTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGT
      Consensus  (7001) TTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGT
                        7051                                          7100
IL13(EQ)41BBZeta (6652) TGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATC
CD19Rop_epHIV7   (5869) TGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATC
      Consensus  (7051) TGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATC
                        7101                                          7150
IL13(EQ)41BBZeta (6702) CTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAA
CD19Rop_epHIV7   (5919) CTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAA
      Consensus  (7101) CTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAA
                        7151                                          7200
IL13(EQ)41BBZeta (6752) AGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGC
CD19Rop_epHIV7   (5969) AGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGC
      Consensus  (7151) AGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGC
                        7201                                          7250
IL13(EQ)41BBZeta (6802) AACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCA
CD19Rop_epHIV7   (6019) AACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCA
      Consensus  (7201) AACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCA
                        7251                                          7300
IL13(EQ)41BBZeta (6852) CCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATG
CD19Rop_epHIV7   (6069) CCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATG
      Consensus  (7251) CCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATG
                        7301                                          7350
IL13(EQ)41BBZeta (6902) CAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGA
CD19Rop_epHIV7   (6119) CAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGA
```

【図１８－１２】

```
      Consensus  (7301) CAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGA
                        7351                                          7400
IL13(EQ)41BBZeta (6952) CAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGG
CD19Rop_epHIV7   (6169) CAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGG
      Consensus  (7351) CAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGG
                        7401                                          7450
IL13(EQ)41BBZeta (7002) GATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCAT
CD19Rop_epHIV7   (6219) GATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCAT
      Consensus  (7401) GATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCAT
                        7451                                          7500
IL13(EQ)41BBZeta (7052) ACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGT
CD19Rop_epHIV7   (6269) ACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGT
      Consensus  (7451) ACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGT
                        7501                                          7550
IL13(EQ)41BBZeta (7102) TGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAA
CD19Rop_epHIV7   (6319) TGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAA
      Consensus  (7501) TGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAA
                        7551                                          7600
IL13(EQ)41BBZeta (7152) TTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTC
CD19Rop_epHIV7   (6369) TTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTC
      Consensus  (7551) TTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTC
                        7601                                          7650
IL13(EQ)41BBZeta (7202) GGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGC
CD19Rop_epHIV7   (6419) GGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGC
      Consensus  (7601) GGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGC
                        7651                                          7700
IL13(EQ)41BBZeta (7252) GTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCC
CD19Rop_epHIV7   (6469) GTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCC
      Consensus  (7651) GTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCC
                        7701                                          7750
IL13(EQ)41BBZeta (7302) CGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACG
CD19Rop_epHIV7   (6519) CGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACG
      Consensus  (7701) CGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACG
                        7751                                          7800
IL13(EQ)41BBZeta (7352) AAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAAC
CD19Rop_epHIV7   (6569) AAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAAC
      Consensus  (7751) AAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAAC
                        7801                                          7850
IL13(EQ)41BBZeta (7402) TGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCAT
CD19Rop_epHIV7   (6619) TGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCAT
      Consensus  (7801) TGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCAT
                        7851                                          7900
IL13(EQ)41BBZeta (7452) TTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGAC
CD19Rop_epHIV7   (6669) TTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGAC
      Consensus  (7851) TTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGAC
                        7901                                          7950
IL13(EQ)41BBZeta (7502) CAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAG
CD19Rop_epHIV7   (6719) CAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAG
      Consensus  (7901) CAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAG
                        7951                                          8000
IL13(EQ)41BBZeta (7552) AAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGC
CD19Rop_epHIV7   (6769) AAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGC
      Consensus  (7951) AAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGC
                        8001                                          8050
IL13(EQ)41BBZeta (7602) TGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGA
```

【図１８－１３】

```
CD19Rop_epHIV7   (6819) TGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGA
      Consensus  (8001) TGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGA
                        8051                                          8100
IL13(EQ)41BBZeta (7652) TCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGC
CD19Rop_epHIV7   (6869) TCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGC
      Consensus  (8051) TCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGC
                        8101                                          8150
IL13(EQ)41BBZeta (7702) AGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTC
CD19Rop_epHIV7   (6919) AGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTC
      Consensus  (8101) AGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTC
                        8151                                          8200
IL13(EQ)41BBZeta (7752) AAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACC
CD19Rop_epHIV7   (6969) AAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACC
      Consensus  (8151) AAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACC
                        8201                                          8250
IL13(EQ)41BBZeta (7802) AGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAA
CD19Rop_epHIV7   (7019) AGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAA
      Consensus  (8201) AGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAA
                        8251                                          8300
IL13(EQ)41BBZeta (7852) GACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCG
CD19Rop_epHIV7   (7069) GACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCG
      Consensus  (8251) GACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCG
                        8301                                          8350
IL13(EQ)41BBZeta (7902) TGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCT
CD19Rop_epHIV7   (7119) TGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCT
      Consensus  (8301) TGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCT
                        8351                                          8400
IL13(EQ)41BBZeta (7952) ACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGG
CD19Rop_epHIV7   (7169) ACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGG
      Consensus  (8351) ACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGG
                        8401                                          8450
IL13(EQ)41BBZeta (8002) ACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAG
CD19Rop_epHIV7   (7219) ACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAG
      Consensus  (8401) ACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAG
                        8451                                          8500
IL13(EQ)41BBZeta (8052) CTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCA
CD19Rop_epHIV7   (7269) CTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCA
      Consensus  (8451) CTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCA
                        8501                                          8550
IL13(EQ)41BBZeta (8102) CCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCC
CD19Rop_epHIV7   (7319) CCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCC
      Consensus  (8501) CCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCC
                        8551                                          8600
IL13(EQ)41BBZeta (8152) TATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGC
CD19Rop_epHIV7   (7369) TATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGC
      Consensus  (8551) TATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGC
                        8601                                          8650
IL13(EQ)41BBZeta (8202) TGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGA
CD19Rop_epHIV7   (7419) TGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGA
      Consensus  (8601) TGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGA
                        8651                                          8700
IL13(EQ)41BBZeta (8252) TAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAA
CD19Rop_epHIV7   (7469) TAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAA
      Consensus  (8651) TAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAA
                        8701                                          8750
```

【図１８－１４】

```
IL13(EQ)41BBZeta (8302) CGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATA
CD19Rop_epHIV7   (7519) CGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATA
      Consensus  (8701) CGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATA
                        8751                                          8800
IL13(EQ)41BBZeta (8352) CGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCA
CD19Rop_epHIV7   (7569) CGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCA
      Consensus  (8751) CGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCA
                        8801                                          8850
IL13(EQ)41BBZeta (8402) CGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATG
CD19Rop_epHIV7   (7619) CGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATG
      Consensus  (8801) CGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATG
                        8851                                          8900
IL13(EQ)41BBZeta (8452) TGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCG
CD19Rop_epHIV7   (7669) TGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCG
      Consensus  (8851) TGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCG
                        8901                                          8950
IL13(EQ)41BBZeta (8502) GCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAA
CD19Rop_epHIV7   (7719) GCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAA
      Consensus  (8901) GCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAA
                        8951                                          9000
IL13(EQ)41BBZeta (8552) CAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCGAAATTAACCCTCACTAAAGGG
CD19Rop_epHIV7   (7769) CAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCGAAATTAACCCTCACTAAAGGG
      Consensus  (8951) CAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCGAAATTAACCCTCACTAAAGGG
                        9001                                          9050
IL13(EQ)41BBZeta (8602) AACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCTCGAGGTCGAGATCCGG
CD19Rop_epHIV7   (7819) AACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCTCGAGGTCGAGATCCGG
      Consensus  (9001) AACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCTCGAGGTCGAGATCCGG
                        9051                                          9100
IL13(EQ)41BBZeta (8652) TCGACCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAA
CD19Rop_epHIV7   (7869) TCGACCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAA
      Consensus  (9051) TCGACCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAA
                        9101                                          9150
IL13(EQ)41BBZeta (8702) CTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTT
CD19Rop_epHIV7   (7919) CTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTT
      Consensus  (9101) CTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTT
                        9151                                          9200
IL13(EQ)41BBZeta (8752) ATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTA
CD19Rop_epHIV7   (7969) ATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTA
      Consensus  (9151) ATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTA
                        9201                                          9250
IL13(EQ)41BBZeta (8802) GTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTCGACGGT
CD19Rop_epHIV7   (8019) GTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTCGACGGT
      Consensus  (9201) GTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTCGACGGT
                        9251                                          9300
IL13(EQ)41BBZeta (8852) ATCGATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGA
CD19Rop_epHIV7   (8069) ATCGATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGA
      Consensus  (9251) ATCGATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGA
                        9301                                          9350
IL13(EQ)41BBZeta (8902) CTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATAT
CD19Rop_epHIV7   (8119) CTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATAT
      Consensus  (9301) CTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATAT
                        9351                                          9400
IL13(EQ)41BBZeta (8952) ATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACC
CD19Rop_epHIV7   (8169) ATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACC
      Consensus  (9351) ATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACC
```

【図１８－１５】

```
                        9401                                          9450
IL13(EQ)41BBZeta (9002) GCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAG
CD19Rop_epHIV7   (8219) GCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAG
      Consensus  (9401) GCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAG
                        9451                                          9500
IL13(EQ)41BBZeta (9052) TAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGG
CD19Rop_epHIV7   (8269) TAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGG
      Consensus  (9451) TAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGG
                        9501                                          9550
IL13(EQ)41BBZeta (9102) TAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCC
CD19Rop_epHIV7   (8319) TAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCC
      Consensus  (9501) TAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCC
                        9551                                          9600
IL13(EQ)41BBZeta (9152) CCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGT
CD19Rop_epHIV7   (8369) CCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGT
      Consensus  (9551) CCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGT
                        9601                                          9650
IL13(EQ)41BBZeta (9202) ACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTC
CD19Rop_epHIV7   (8419) ACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTC
      Consensus  (9601) ACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTC
                        9651                                          9700
IL13(EQ)41BBZeta (9252) ATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGG
CD19Rop_epHIV7   (8469) ATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGG
      Consensus  (9651) ATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGG
                        9701                                          9750
IL13(EQ)41BBZeta (9302) ATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCA
CD19Rop_epHIV7   (8519) ATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCA
      Consensus  (9701) ATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCA
                        9751                                          9800
IL13(EQ)41BBZeta (9352) ATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGT
CD19Rop_epHIV7   (8569) ATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGT
      Consensus  (9751) ATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGT
                        9801                                          9850
IL13(EQ)41BBZeta (9402) AACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGAATTC
CD19Rop_epHIV7   (8619) AACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGAATTC
      Consensus  (9801) AACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGAATTC
                        9851                                          9900
IL13(EQ)41BBZeta (9452) GGAGTGGCGAGCCCTCAGATCCTGCATATAAGCAGCTGCTTTTTGCCTGT
CD19Rop_epHIV7   (8669) GGAGTGGCGAGCCCTCAGATCCTGCATATAAGCAGCTGCTTTTTGCCTGT
      Consensus  (9851) GGAGTGGCGAGCCCTCAGATCCTGCATATAAGCAGCTGCTTTTTGCCTGT
                        9901      9914
IL13(EQ)41BBZeta (9502) ACTGGGTCTCTCTG
CD19Rop_epHIV7   (8719) ACTGGGTCTCTCTG
      Consensus  (9901) ACTGGGTCTCTCTG
```

【図１９】

【図２０】

【図２１】

【図２２】

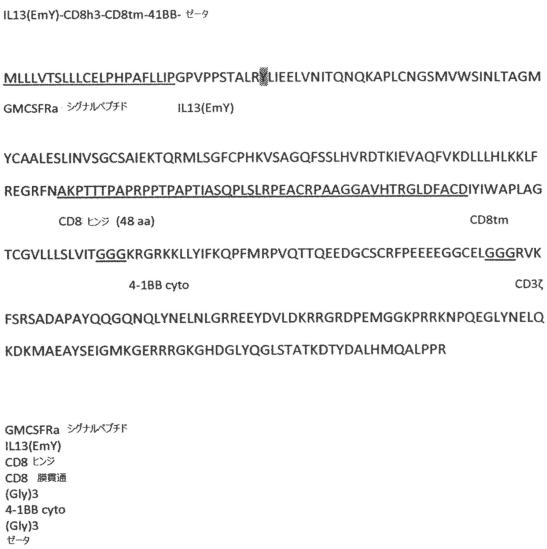
【図２３】

【図２４】

【図２５】

【図２６】

【図２７】



【配列表】
0006986190000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
C07K	***14/705***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	35/00	
C07K	***16/00***	***(2006.01)***	Ｃ０７Ｋ	14/705	
C12N	***5/0783***	***(2010.01)***	Ｃ０７Ｋ	16/00	
C12N	***5/10***	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｎ	5/0783	
C12N	*15/62*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10	
			Ｃ１２Ｎ	15/62	Ｚ

(74)代理人 100091214
弁理士 大貫 進介
(72)発明者 ブラウン，クリスティン イー
アメリカ合衆国 ９１０１０ カリフォルニア州，デュアート，イースト・デュアート・ロード １５００
(72)発明者 フォーマン，スティーブン ジェイ
アメリカ合衆国 ９１０１０ カリフォルニア州，デュアート，イースト・デュアート・ロード １５００
(72)発明者 アーメン，マルディロス
アメリカ合衆国 ９１２０２ カリフォルニア州，グレンデール，ノース・コロンバス・アヴェニュー １１１２

審査官 馬場 亮人

(56)参考文献 特表２０１２－５０１１８０（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１４／０３１６８７（WO，Ａ１）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ０７Ｋ １９／００
Ａ６１Ｋ ３５／１７
Ａ６１Ｋ ３９／３９５
Ａ６１Ｋ ４７／６８
Ａ６１Ｐ ３５／００
Ｃ０７Ｋ １４／７０５
Ｃ０７Ｋ １６／００
Ｃ１２Ｎ ５／０７８３
Ｃ１２Ｎ ５／１０
Ｃ１２Ｎ １５／６２
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）