

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-512379

(P2018-512379A)

(43) 公表日 **平成30年5月17日(2018.5.17)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28 ZNA	4B063
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B064
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00	4B065
C07K 14/705 (2006.01)	C07K 14/705	4C085
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/10	4H045
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 161 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2017-542004 (P2017-542004)
 (86) (22) 出願日 平成28年2月10日 (2016.2.10)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年9月25日 (2017.9.25)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/017422
 (87) 国際公開番号 W02016/130726
 (87) 国際公開日 平成28年8月18日 (2016.8.18)
 (31) 優先権主張番号 62/114,526
 (32) 優先日 平成27年2月10日 (2015.2.10)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 507081094
 ミネルバ バイオテクノロジーズ コーポ
 レーション
 米国, エムエー 02451, ウォルサム
 , 40 ベアー ヒル ロード
 (74) 代理人 100088904
 弁理士 庄司 隆
 (74) 代理人 100124453
 弁理士 資延 由利子
 (74) 代理人 100135208
 弁理士 大杉 卓也
 (74) 代理人 100163544
 弁理士 平田 緑

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト化抗MUC1* 抗体

(57) 【要約】

本発明は、ヒト化抗MUC1*抗体、その抗体様タンパク質及び断片及びその製造方法及びその使用用途に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

タンデムリピート領域が欠けているMUC1アイソフォーム若しくは分解産物の細胞外ドメイン部位へ結合する、ヒト若しくはヒト化-抗MUC1*抗体若しくは抗体断片若しくは抗体様タンパク質。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のヒト若しくはヒト化-抗MUC1*抗体若しくは抗体断片若しくは抗体様タンパク質であって、それは特異的に以下に結合する；

(i) MUC 1のPSMGFR部位；

(ii) PSMGFRペプチド；

(iii) SNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQYKTEAASRY(配列番号：620)のアミノ酸配列を持つペプチド；

(iv) SVVVQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQYKTEAASRYのアミノ酸配列を持つペプチド(配列番号：621)；

(v) VQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQY(配列番号：622)のアミノ酸配列を持つペプチド；又は

(vi) SNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTIN(配列番号：623)のアミノ酸配列を持つペプチド。

【請求項 3】

ヒト若しくはヒト化-抗体が、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4若しくはIgMである、請求項 1 に記載のヒト若しくはヒト化-抗MUC1*抗体若しくは抗体断片若しくは抗体様タンパク質。

【請求項 4】

ヒト若しくはヒト化-抗体断片若しくは抗体様タンパク質が、scFv若しくはscFv-Fcである、請求項 1 に記載のヒト若しくはヒト化-抗MUC1*抗体若しくは抗体断片若しくは抗体様タンパク質。

【請求項 5】

請求項 1 に記載のヒト若しくはヒト化-抗体若しくは抗体断片若しくは抗体様タンパク質であって、それはマウス単クローンMN-E6抗体に由来する、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、及び該マウス単クローンMN-E6抗体に少なくとも80%若しくは90%若しくは95%若しくは98%の配列同一性をもつ。

【請求項 6】

請求項 5 に記載のヒト若しくはヒト化-抗体若しくは抗体断片若しくは抗体様タンパク質であって、その重鎖可変領域は、配列番号:13に少なくとも90%若しくは95%若しくは98%の配列同一性をもち、及びその軽鎖可変領域は、配列番号:66に少なくとも90%若しくは95%若しくは98%の配列同一性をもつ。

【請求項 7】

請求項 5 に記載のヒト若しくはヒト化-抗体若しくは抗体断片若しくは抗体様タンパク質であって、次の配列をもつCDR1、CDR2若しくはCDR3領域に、少なくとも90%若しくは95%若しくは98%の配列同一性をもつ、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域における相補性決定領域(CDR)を含む：

CDR1重鎖配列番号:17、

CDR1軽鎖配列番号:70、

CDR2重鎖配列番号:21、

CDR2軽鎖配列番号:74、

CDR3重鎖配列番号:25、

CDR3軽鎖配列番号:78。

【請求項 8】

ヒト若しくはヒト化-抗体が、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4若しくはIgMである、請求項 5 に記載のヒト若しくはヒト化-抗MUC1*抗体若しくは抗体断片若しくは抗体様タンパク質。

【請求項 9】

ヒト若しくはヒト化-抗体断片若しくは抗体様タンパク質がscFv若しくはscFv-Fcである、請求項 5 に記載のヒト若しくはヒト化-抗MUC1*抗体若しくは抗体断片若しくは抗体様タン

10

20

30

40

50

パク質。

【請求項 1 0】

請求項 1 に記載のヒト若しくはヒト化-抗体若しくは抗体断片若しくは抗体様タンパク質であって、それはマウス単クローンMN-C2抗体に由来する、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、及び該マウス単クローンMN-C2抗体に少なくとも80%若しくは90%若しくは95%若しくは98%の配列同一性をもつ。

【請求項 1 1】

請求項 1 0 に記載のヒト若しくはヒト化-抗体若しくは抗体断片若しくは抗体様タンパク質であって、その重鎖可変領域は、配列番号:119に少なくとも90%若しくは95%若しくは98%の配列同一性をもち、及びその軽鎖可変領域は、配列番号:169に少なくとも90%若しくは95%若しくは98%の配列同一性をもつ。

10

【請求項 1 2】

請求項 1 0 に記載の抗体であって、次の配列をもつCDR1、CDR2若しくはCDR3領域に、少なくとも90%若しくは95%若しくは98%の配列同一性をもつ、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域における相補性決定領域(CDR)を含む：

CDR1重鎖配列番号:123、
 CDR1軽鎖配列番号:173、
 CDR2重鎖配列番号:127、
 CDR2軽鎖配列番号:177、
 CDR3重鎖配列番号:131、
 CDR3軽鎖配列番号:181。

20

【請求項 1 3】

ヒト若しくはヒト化-抗体が、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4若しくはIgMである、請求項 1 0 に記載のヒト若しくはヒト化-抗MUC1*抗体若しくは抗体断片若しくは抗体様タンパク質。

【請求項 1 4】

ヒト若しくはヒト化-抗体断片若しくは抗体様タンパク質が、scFv若しくはscFv-Fcである、請求項 1 0 に記載のヒト若しくはヒト化-抗MUC1*抗体若しくは抗体断片若しくは抗体様タンパク質。

【請求項 1 5】

請求項 1 に記載のヒト若しくはヒト化-抗体若しくは抗体断片若しくは抗体様タンパク質であって、それはマウス単クローンMN-C3抗体に由来する、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、及び該マウス単クローンMN-C3抗体に少なくとも80%若しくは90%若しくは95%若しくは98%の配列同一性をもつ。

30

【請求項 1 6】

請求項 1 5 に記載のヒト若しくはヒト化-抗体若しくは抗体断片若しくは抗体様タンパク質であって、その重鎖可変領域は、配列番号:414に少なくとも90%若しくは95%若しくは98%の配列同一性をもち、及びその軽鎖可変領域は、配列番号:459に少なくとも90%若しくは95%若しくは98%の配列同一性をもつ。

【請求項 1 7】

請求項 1 5 に記載の抗体であって、次の配列をもつCDR1、CDR2若しくはCDR3領域に、少なくとも90%若しくは95%若しくは98%の配列同一性をもち、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域における相補性決定領域(CDR)を含む：

40

CDR1重鎖配列番号:418、
 CDR1軽鎖配列番号:463、
 CDR2重鎖配列番号:422、
 CDR2軽鎖配列番号:467、
 CDR3重鎖配列番号:426、
 CDR3軽鎖配列番号:471。

【請求項 1 8】

ヒト若しくはヒト化-抗体が、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4若しくはIgMである、請求項 1 5 に

50

記載のヒト若しくはヒト化-抗MUC1*抗体若しくは抗体断片若しくは抗体様タンパク質。

【請求項 19】

ヒト若しくはヒト化-抗体断片若しくは抗体様タンパク質が、scFv若しくはscFv-Fcである、請求項 15 に記載のヒト若しくはヒト化-抗MUC1*抗体若しくは抗体断片若しくは抗体様タンパク質。

【請求項 20】

請求項 1 に記載のヒト若しくはヒト化-抗体若しくは抗体断片若しくは抗体様タンパク質であって、それはマウス単クローンMN-C8抗体に由来する、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、及び該マウス単クローンMN-C8抗体に少なくとも80%若しくは90%若しくは95%若しくは98%の配列同一性をもつ。

10

【請求項 21】

請求項 20 に記載のヒト若しくはヒト化-抗体若しくは抗体断片若しくは抗体様タンパク質であって、その重鎖可変領域は、配列番号:506に少なくとも90%若しくは95%若しくは98%の配列同一性をもち、及びその軽鎖可変領域は、配列番号:544に少なくとも90%若しくは95%若しくは98%の配列同一性をもつ。

【請求項 22】

請求項 20 に記載の抗体であって、次の配列をもつCDR1、CDR2若しくはCDR3領域に、少なくとも90%若しくは95%若しくは98%の配列同一性をもち、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域における相補性決定領域(CDR)を含む：

CDR1重鎖配列番号:508、

CDR1軽鎖配列番号:546、

CDR2重鎖配列番号:510、

CDR2軽鎖配列番号:548、

CDR3重鎖配列番号:512、

CDR3軽鎖配列番号:550。

20

【請求項 23】

ヒト若しくはヒト化-抗体が、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4若しくはIgMである、請求項 20 に記載のヒト若しくはヒト化-抗MUC1*抗体若しくは抗体断片若しくは抗体様タンパク質。

【請求項 24】

ヒト若しくはヒト化-抗体断片若しくは抗体様タンパク質が、scFv若しくはscFv-Fcである、請求項 20 に記載のヒト若しくはヒト化-抗MUC1*抗体若しくは抗体断片若しくは抗体様タンパク質。

30

【請求項 25】

ヒト化 軽鎖若しくはヒト化 軽鎖とペアとなって、ヒト化IgG2重鎖若しくはヒト化IgG1重鎖によって表されたヒト化MN-E6の配列を含む抗MUC1*細胞外ドメイン抗体。

【請求項 26】

請求項 25 に記載の抗体であって、ここでヒト化IgG2重鎖は配列番号:53、ヒト化IgG1重鎖は配列番号:57、ヒト化 軽鎖は配列番号:108、及びヒト化 軽鎖は配列番号:112であるか、又はこれらと90%、95%若しくは98%の配列同一性をもつ配列。

【請求項 27】

ヒト化 軽鎖若しくはヒト化 軽鎖とペアとなって、ヒト化IgG2重鎖若しくはヒト化IgG1重鎖によって表されたヒト化MN-C2の配列を含む抗MUC1*細胞外ドメイン抗体。

40

【請求項 28】

請求項 27 に記載の抗体であって、 軽鎖（配列番号:213）若しくは 軽鎖（配列番号:219）とペアとなるヒト化-IgG1重鎖MN-C2（配列番号:159）若しくはIgG2重鎖（配列番号:164）、又はこれらと90%、95%若しくは98%の配列同一性をもつ配列。

【請求項 29】

ヒト化 軽鎖若しくはヒト化 軽鎖とペアとなって、ヒト化IgG2重鎖若しくはヒト化IgG1重鎖によって表されたヒト化MN-C3の配列を含む抗MUC1*細胞外ドメイン抗体。

【請求項 30】

50

請求項 29 に記載の抗体であって、ここでヒト化MN-C3 IgG1重鎖は配列番号:454、IgG2重鎖は配列番号:456、軽鎖は配列番号:503、及び軽鎖は配列番号:501であるか、又はこれらと90%、95%若しくは98%の配列同一性をもつ配列。

【請求項 31】

ヒト化軽鎖若しくはヒト化軽鎖とペアとなつて、ヒト化IgG2重鎖若しくはヒト化IgG1重鎖によって表されたヒト化MN-C8の配列を含む抗MUC1*細胞外ドメイン抗体。

【請求項 32】

請求項 31 に記載の抗体であって、ここでヒト化MN-C8 IgG1重鎖は配列番号:540、IgG2重鎖は配列番号:542、軽鎖は配列番号:582、及び軽鎖は配列番号:580であるか、又はこれらと90%、95%若しくは98%の配列同一性をもつ配列。

10

【請求項 33】

請求項 1 に記載のヒト若しくはヒト化-抗MUC1*抗体若しくは抗体断片若しくは抗体様タンパク質であって、それは、MUC1*へのNMEタンパク質の結合を阻害する。

【請求項 34】

NMEが、NME7またはNME1である、請求項 33 に記載のヒト若しくはヒト化-抗MUC1*抗体若しくは抗体断片若しくは抗体様タンパク質。

【請求項 35】

NMEが、NME6またはNME8である、請求項 33 に記載のヒト若しくはヒト化-抗MUC1*抗体若しくは抗体断片若しくは抗体様タンパク質。

【請求項 36】

ヒト若しくはヒト化-抗体が、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4若しくはIgMである、請求項 33 に記載のヒト若しくはヒト化-抗MUC1*抗体若しくは抗体断片若しくは抗体様タンパク質。

20

【請求項 37】

ヒト若しくはヒト化-抗体断片若しくは抗体様タンパク質が、scFv若しくはscFv-Fcである、請求項 33 に記載のヒト若しくはヒト化-抗MUC1*抗体若しくは抗体断片若しくは抗体様タンパク質。

【請求項 38】

MUC1*細胞外ドメインに結合する抗体のCDRをさらに含む、リンカーを経て結合された重鎖及び軽鎖可変領域を含む一本鎖可変断片(scFv)。

【請求項 39】

抗MUC1*抗体のCDRが、MN-E6、MN-C2、MN-C3若しくはMN-C8抗体に由来する、請求項 38 に記載のscFv。

30

【請求項 40】

抗MUC1*抗体のCDRが、ヒト化MN-E6、MN-C2、MN-C3若しくはMN-C8抗体に由来する、請求項 39 に記載のscFv。

【請求項 41】

配列番号:233、235及び237(E6)のグループから選ばれた、請求項 38 に記載のscFv。

【請求項 42】

配列番号:239、241及び243(C2)のグループから選ばれた、請求項 38 に記載のscFv。

【請求項 43】

配列番号:245、247及び249(C3)のグループから選ばれた、請求項 38 に記載のscFv。

40

【請求項 44】

配列番号:251、253及び255(C8)のグループから選ばれた、請求項 38 に記載のscFv。

【請求項 45】

縦列(タンデム)反復、リンカー分子、膜貫通領域及び細胞質領域が欠けているMUC1の細胞外ドメインへ結合するscFv若しくはヒト化可変領域を含むキメラ抗原リセプター(CAR)。

【請求項 46】

請求項 45 に記載のCARであって、一本鎖抗体断片は以下に結合する；

(i) MUC1のPSMGFR部位、

50

- (ii) PSMGFRペプチド、
- (iii) SNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQYKTEAASRY(配列番号: 620)のアミノ酸配列をもつペプチド;
- (iv) SVVVQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQYKTEAASRY(配列番号: 621)のアミノ酸配列を持つペプチド;
- (v) VQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQY(配列番号: 622)のアミノ酸配列を持つペプチド;若しくは
- (vi) SNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTIN(配列番号: 623)のアミノ酸配列を持つペプチド。

【請求項 4 7】

請求項 2 5 ~ 3 2 のいずれかに記載の可変領域のいずれかの部分を含む、又は細胞外ドメイン、膜貫通部位、及び免疫系賦活をシグナルする配列モチーフを含む細胞質尾部におけるそれらの組み合わせを含む、請求項 4 6 に記載のCAR。

10

【請求項 4 8】

細胞外ドメインが、MN-E6 scFv、MN-C2 scFv、MN-C3 scFv若しくはMN-C8 scFvのヒト化一本鎖抗体断片を含む、請求項 4 5 に記載のCAR。

【請求項 4 9】

細胞外ドメインが、配列番号:233、235、若しくは237であるMN-E6 scFv、MN-C2 scFv(配列番号: 239、241、若しくは243)、MN-C3 scFv(配列番号: 245、247、若しくは249)又はMN-C8 scFv(配列番号: 251、253、若しくは255)のヒト化一本鎖抗体断片を含む、請求項 4 8 に記載のCAR。

【請求項 5 0】

細胞質尾部が、シグナル配列モチーフCD3-ZETA、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICAm-1、LFA-1、ICOS、CD2、CD5若しくはCD7の1つ以上を含む、請求項 4 5 に記載のCAR。

20

【請求項 5 1】

その配列が、CARMN-E6 CD3z(配列番号: 295);CARMN-E6 CD28/CD3z(配列番号: 298);CARMN-E6 4-1BB/CD3z(配列番号: 301);CARMN-E6 OX40/CD3z(配列番号: 617);CARMN-E6 CD28/4-1BB/CD3z(配列番号: 304);CARMN-E6 CD28/OX40/CD3z(配列番号: 619);CAR MN-C2 CD3z(配列番号: 607);CAR MN-C2 CD28/CD3z(配列番号: 609);CAR MN-C2 4-1BB/CD3z(配列番号: 611);CAR MN-C2 OX40/CD3z(配列番号: 613);CAR MN-C2 CD28/4-1BB/CD3z(配列番号: 307);若しくはCAR MN-C2 CD28/OX40/CD3z(配列番号: 615)である、請求項 4 5 に記載のCAR。

30

【請求項 5 2】

MUC1*形質転換若しくは形質導入した細胞に結合する、細胞外ドメインをもったCARを含む細胞。

【請求項 5 3】

CARを含む細胞が、免疫系細胞である請求項 5 2 に記載の細胞。

【請求項 5 4】

免疫系細胞が、T細胞である請求項 5 3 に記載の細胞。

【請求項 5 5】

免疫系細胞が、樹状細胞である請求項 5 3 に記載の細胞。

【請求項 5 6】

免疫系細胞が、肥満細胞である請求項 5 3 に記載の細胞。

40

【請求項 5 7】

細胞外ドメインユニットが、あるペプチドを認識するCAR分子。

【請求項 5 8】

該ペプチドが、PSMGFR(配列番号: 2)である請求項 5 7 に記載のCAR分子。

【請求項 5 9】

該ペプチドが、NME7に由来したペプチドである請求項 5 7 に記載のCAR分子。

【請求項 6 0】

該ペプチドが、以下から選ばれる請求項 5 9 に記載のCAR分子;

NME7Aペプチド1(A領域):MLSRKEALDFHVDHQS(配列番号: 7);

50

NME7Aペプチド2(A領域):SGVARTDASES(配列番号:8);
 NME7Bペプチド1(B領域):DAGFEISAMQMFNMDRVNVE(配列番号:9);
 NME7Bペプチド2(B領域):EVYKGVVTEYHDMVTE(配列番号:10);若しくは
 NME7Bペプチド3(B領域):AIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF(配列番号:11)。

【請求項61】

同じ細胞ヘトランスフェクトされた異なる細胞外ドメインユニットをもった少なくとも2つのCARを含む組成物。

【請求項62】

同じ細胞ヘトランスフェクトされた異なる細胞外ドメインユニットをもった少なくとも2つのCARを含む組成物であって、そこにおいて、1つのCARはターゲット認識ユニットを持っておらず、別のCARがターゲット認識ユニットを持っている、組成物。

10

【請求項63】

細胞外ドメイン認識ユニットのうちの1つが、MUC1*細胞外ドメインに結合する、請求項61に記載の少なくとも2つのCARを含む組成物。

【請求項64】

細胞外ドメイン認識ユニットのうちの1つが、PD-1を結合する、請求項61に記載の少なくとも2つのCARを含む組成物。

【請求項65】

細胞外ドメイン認識ユニットのうちの1つが、抗体断片であり他方がペプチドである、請求項61に記載の少なくとも2つのCARを含む組成物。

20

【請求項66】

1つは、MN-E6抗体のscFv、MN-C2抗体のscFv、MN-C3抗体のscFv若しくはMN-C8抗体のscFvから成るグループから選ばれた抗MUC1* scFvであり、他方が、NME7に由来する若しくは以下のグループから選択されるペプチドである、請求項61に記載の少なくとも2つのCARを含む組成物；

NME7Aペプチド1(A領域):MLSRKEALDFHVDHQS(配列番号:7);

NME7Aペプチド2(A領域):SGVARTDASES(配列番号:8);

NME7Bペプチド1(B領域):DAGFEISAMQMFNMDRVNVE(配列番号:9);

NME7Bペプチド2(B領域):EVYKGVVTEYHDMVTE(配列番号:10);及び

NME7Bペプチド3(B領域):AIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF(配列番号:11)。

30

【請求項67】

抗体が、操作された抗体様タンパク質である、請求項1に記載の抗体。

【請求項68】

ヒトである、抗体若しくは抗体断片のライブラリーをスクリーニングする方法であって、それは以下に結合することによる；

(i) PSMGFRペプチド；

(ii) SNIKFRPGSVVQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQYKTEAASRY(配列番号:620)のアミノ酸配列をもつペプチド；

(iii) SVVQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQYKTEAASRY(配列番号:621)のアミノ酸配列を持つペプチド；

40

(iv) VQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQY(配列番号:622)のアミノ酸配列を持つペプチド；

(v) SNIKFRPGSVVQLTLAFREGTIN(配列番号:623)のアミノ酸配列を持つペプチド；

(vi) NME7タンパク質；若しくは

(vii)NME7タンパク質のペプチド断片。

【請求項69】

上記請求項1～68のいずれかーに記載の抗体を、疾患を被ったヒトに投与することを含む対象の該疾患を処置する方法であって、該対象はMUC1を異常に発現する、対象の該疾患を処置する方法。

【請求項70】

疾患が、癌である請求項69に記載の対象の該疾患を処置する方法。

50

【請求項 7 1】

NMEペプチドを、疾患を被ったヒトに投与することを含む対象の該疾患を処置する方法であって、該対象はMUC1を異常に発現する、対象の該疾患を処置する方法。

【請求項 7 2】

上記請求項 1 ~ 6 8 のいずれかーに記載の抗体を、細胞と接触させることを含む、幹細胞個体群を増殖又は拡張する方法。

【請求項 7 3】

ヒト化MN-C3若しくはMN-C8抗体、その抗体断片若しくはその一本鎖抗体で、表面を被覆し、そして、該表面に幹細胞を接触させることを含む、表面への幹細胞付着を促進する方法。

【請求項 7 4】

ヒト化MN-C3若しくはMN-C8抗体、その抗体断片若しくはその一本鎖抗体で、表面を被覆し、そして、該表面に幹細胞を接触させ、そして特別な部位に該幹細胞を輸送するステップを含む、体外若しくは体内で、幹細胞を輸送する方法。

【請求項 7 5】

ヒト化MN-C3若しくはMN-C8抗体、その抗体断片若しくはその一本鎖抗体で、表面を被覆し、そして、その表面に細胞の混合個体群を接触させそして幹細胞を分離するステップを含む、幹細胞の分離方法。

【請求項 7 6】

タンDEMリポート領域が欠けているMUC1アイソフォーム若しくは分解産物の細胞外ドメインに結合する抗体に由来する可変領域断片を含むscFv。

【請求項 7 7】

可変領域断片が、マウス単クローン抗体MN-E6(配列番号: 13及び66)、ヒト化MN-E6(配列番号: 39及び94)、若しくはMN-E6 scFv(配列番号: 233、235及び237)に由来する、請求項 7 6 に記載のscFv。

【請求項 7 8】

可変領域断片が、マウス単クローン抗体MN-C2(配列番号: 119及び169)、ヒト化MN-C2(配列番号: 145及び195)、若しくはMN-C2 scFv(配列番号: 239、241及び243)に由来する、請求項 7 6 に記載のscFv。

【請求項 7 9】

可変領域断片が、マウス単クローン抗体MN-C3(配列番号: 414及び459)、ヒト化MN-C3(配列番号: 440及び487)、若しくはMN-C3 scFv(配列番号: 245、247及び249)に由来する、請求項 7 6 に記載のscFv。

【請求項 8 0】

可変領域断片が、マウス単クローン抗体MN-C8(配列番号: 505及び544)、ヒト化MN-C8(配列番号: 526及び566)、若しくはMN-C8 scFv(配列番号: 251、253、255)に由来する、請求項 7 6 に記載のscFv。

【請求項 8 1】

請求項 7 6 ~ 8 0 のいずれかーに記載のscFvの有効な量をヒトに投与することを含む、MUC1またはMUC1*陽性癌も持つ若しくは進展のリスクが診断され、疑われるヒトの処置方法。

【請求項 8 2】

請求項 7 6 ~ 8 0 のいずれかーに記載のscFv含むscFv-Fc構築物。

【請求項 8 3】

二量化している、請求項 8 2 に記載のscFv-Fc構築物。

【請求項 8 4】

scFv-Fcがモノマーであるように、Fcコンポーネントが変異している、請求項 8 2 に記載のscFv-Fc構築物。

【請求項 8 5】

変異が、配列番号:281、279、285及び287に表されるFcにおいて、F405Q、Y407R、T366W/L

10

20

30

40

50

368W及びT364R/L368R突然変異若しくはその組み合わせを作る、Fcのヒンジ領域を変異させる若しくは削除することを含む、請求項 8 4 に記載のscFv-Fc構築物。

【請求項 8 6】

少なくとも2つの異なるscFv配列を含むポリペプチドであって、そこでscFv配列のうちの1つは、タンデムリピート領域が欠けているMUC1アイソフォーム若しくは分解産物の細胞外ドメインへ結合する配列である、ポリペプチド。

【請求項 8 7】

ポリペプチドが、以下に結合する、請求項 8 6 に記載のポリペプチド；

(i) MUC1のPSMGFR部位；

(ii) PSMGFRペプチド；

(iii) SNIKFRPGSVVQLTLAFREGTINVHVDVETQFNQYKTEAASRY(配列番号：620)のアミノ酸配列を持つペプチド；

(iv) VQLTLAFREGTINVHVDVETQFNQYKTEAASRY(配列番号：621)のアミノ酸配列を持つペプチド；

(v) VQLTLAFREGTINVHVDVETQFNQY(配列番号：622)のアミノ酸配列を持つペプチド；若しくは

(vi) SNIKFRPGSVVQLTLAFREGTIN(配列番号：623)のアミノ酸配列を持つペプチド。

【請求項 8 8】

ポリペプチドが、免疫細胞上のリセプタに結合する、請求項 8 6 に記載のポリペプチド。

【請求項 8 9】

ポリペプチドが、T細胞上のリセプタに結合する、請求項 8 8 に記載のポリペプチド。

【請求項 9 0】

ポリペプチドは、T細胞上のCD3に結合する、請求項 8 9 に記載のポリペプチド。

【請求項 9 1】

請求項 8 2 に記載のscFv-Fcと細胞のサンプルを接触させ、細胞へのscFv-Fcの結合の存在を検出することを含む、MUC1*を異常に発現する細胞の存在を検出する方法。

【請求項 9 2】

細胞が、癌細胞である、請求項 9 1 に記載の方法。

【請求項 9 3】

相応するMN-E6 scFv-Fc、MN-C3 scFv-Fc、MN-C3 scFv-Fc若しくはMN-C8 scFv-Fcと、患者からの身体標品の部分を接触させるステップを含む、MN-E6、MN-C2、MN-C3若しくはMN-C8の可変領域の部分を含む組成による治療の適応性に関して対象癌をテストする方法。

【請求項 9 4】

成熟の様々な段階によって、T細胞がMUC1*特異リセプターを展開する、対象からのT細胞をMUC1*に曝し、アダプティッドT細胞を作り出し、拡張し、MUC1*陽性癌も持つ若しくは進展のリスクが診断され、疑われるドナー患者に該アダプティッドT細胞を投与することを含む、疾患をもつ対象を処置する方法。

【請求項 9 5】

MUC1*標的CARで、形質導入された免疫細胞の有効量を投与することを含む、MUC1陽性またはMUC1*陽性癌も持つ若しくは進展のリスクが診断され、疑われる患者を処置する方法。

【請求項 9 6】

免疫細胞は患者から単離されたT細胞であり、それはCARの標的ヘッドがMUC1*に結合するCARsが形質導入され、形質導入されたT細胞の拡張後、そのCAR T細胞は患者に有効量で投与される、請求項 9 5 に記載の方法。

【請求項 9 7】

免疫細胞は患者から単離されたT細胞であり、それはCARの標的ヘッドがhuMN-E6、huMN-C2、huMN-C3若しくはhuMN-C8の部分を含む、CARsが形質導入され、形質導入されたT細胞のオプションでの拡張後、そのCAR T細胞は患者に有効量で投与される、請求項 9 5 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50

【0001】

本発明は、ヒト化抗MUC1*抗体、及びその製造方法及びその使用用途に関する。

【背景技術】

【0002】

本発明者は、MUC1(配列番号: 1)膜貫通型タンパク質の開裂型が、すべてのヒト癌の75%以上の増殖を引き出す成長因子リセプタであることを以前に見出した。

【0003】

本発明者はそれをMUC1*(ムック 1スターと発音)と呼び、このMUC1の開裂型は、強力な成長因子リセプタである。

【0004】

MUC1の細胞外ドメインの大部分の開裂及び遊離は、リガンド二量体のNME1、NME6若しくはNME7を活性化するための結合部位を露呈する。それは、すべての癌の75%以上で異常に発現され、恐らく転移癌において高い割合で過剰発現されるので、制癌剤の理想的な標的である (Fessler SP, Wotkowicz MT, Mahanta SK and Bamdad C. (2009)). MUC1*は、乳癌細胞において、トラスツズマブ(ハーセプチン)抵抗性の決定因子である。Breast Cancer Res Treat. 118(1)113-124. MUC1開裂の後、ほとんどのその細胞外ドメインは、細胞表面からおとされる。残りの部分は、一次成長要因子リセプタ配列、PSMGFR(配列番号: 2)、を少なくとも含む欠失細胞外ドメインをもつ。

【0005】

抗体はヒト疾病を治療するためにますます使用されている。馬抗体のような人以外の種で生成された抗体が、ヒトでの治療手段として歴史的に使用されてきた。より最近、それらが異種抗体の一般的な拒否反応を回避するために、ほとんどヒト配列を含んでいるように、抗体は巧みに設計され若しくは選択されている。ヒト抗体への非人抗体の認識断片を操作する過程は、「ヒト化」と一般に呼ばれている。ヒト抗体配列を置き換えるために使用される、非ヒト配列の量は、それらがキメラ若しくはヒト化若しくは完全ヒトと呼ばれるかどうか決定する。

【0006】

ヒト化抗体若しくは完全ヒト抗体の生成を可能にする代替技術は存在する。これらの方法は、ヒト抗体若しくは抗体断片のライブラリーをスクリーニングし、そして、抗原で動物を免疫するのではなく、標的抗原に結合するものを同定することを含んでいる。別のアプローチは、抗体様分子中へ、抗体の可変領域の導入操作をすることである。本発明は、MUC1*の細胞外ドメインへ結合する、発明者が決定した、抗体の認識断片での使用アプローチを包含するように意図されている。

【0007】

抗体での患者の治療に加えて、癌免疫療法は、癌の治療に有効なことが最近示された。T細胞に基づいた癌免疫療法は、免疫系からの癌細胞の逃避を克服する、魅力的なアプローチである。CAR-T(キメラ抗原リセプター-T細胞)療法と呼ばれた、最初の免疫療法は、養子T細胞療法のために患者のT細胞の表面でのCARの発現によるものであった(Dai H, Wang Y, Lu X, Han W. (2016) Chimeric Antigen Receptors Modified T-Cells for Cancer Therapy. J Natl Cancer Inst. 108(7): djv439)。そのようなリセプタは、T細胞膜貫通及びシグナリングドメインにリンクされた抗癌scFvからできている。

癌関連抗原へのリセプタの結合で、信号が送信され、T細胞賦活、増殖及び癌細胞の標的化された撲殺に帰着する。実際、患者のT細胞は、単離され、CARで形質導入され、増幅され、そして患者へ注入して還される。患者のCAR T細胞が、癌細胞上の抗原に結合する場合、CAR T細胞は増幅し、癌細胞を攻撃する。この方法の欠点は、ほとんどの癌抗原がいくつかの健康な組織で発現されるが、ガン組織で過剰発現するとき、標的抗原を担持する細胞を破壊するために患者の免疫系を活性化することのリスクである。オフ腫瘍/オン標的の効果のリスクを最小化するために、癌抗原は、健康な組織について最小に発現されるべきである。

【0008】

第2の癌免疫療法は、BiTEs(2重特異的T細胞関与物)を含んでいる。BiTEアプローチは、CAR T関連オフ腫瘍/オン標的の効果のリスクを排除するために試みられた。CAR Tと異なり、BiTEsは、一般的な抗体に基づいた療法よりどんな大きなリスクももたらさないであろう二重特異性抗体である。しかしながら、癌抗原に結合し、阻止する典型的な癌治療抗体と異なり、BiTEsは、腫瘍細胞上の抗原に結合するように設計され、かつ同時にT細胞のような免疫細胞上の抗原に結合するように設計される。このように、BiTEは、腫瘍に対しT細胞を補充する。BiTEsは、癌関連抗原及びCD3イプシロンのようなT細胞の表面タンパク質に同時に結合する改変蛋白質である。BiTEsは、癌抗原に結合する治療用単クローン抗体のscFvに、抗CD3イプシロンのような、T細胞抗原に結合する抗体のscFvを遺伝子操作的にリンクすることにより作られた抗体である(Patrick A. Baeuerle, and Carsten Reinhardt (2009) Bispecific T-cell engaging antibodies for cancer therapy. *Cancer Res.* 69(12):4941-4944)。

10

【発明の概要】

【0009】

1つの観点で、本発明はヒト若しくはヒト化抗MUC1*抗体若しくは抗体断片又は抗体様タンパク質を志向し、それはタンデムリピート領域が欠けているMUC1アイソフォーム若しくは開裂産物の細胞外ドメイン上の部位へ結合する。ヒト若しくはヒト化抗MUC1*抗体若しくは抗体断片又は抗体様タンパク質は、特異的に以下に結合しうる；

【0010】

(i) MUC1のPSMGFR部位；

20

【0011】

(ii) PSMGFRペプチド；

【0012】

(iii) SNIKFRPGSVVQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQYKTEAASRY(配列番号：620)のアミノ酸配列をもつペプチド；

【0013】

(iv) SVVQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQYKTEASRY(配列番号：621)のアミノ酸配列を持つペプチド；

【0014】

(v) VQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQY(配列番号：622)のアミノ酸配列を持つペプチド；

30

若しくは

【0015】

(vi) SNIKFRPGSVVQLTLAFREGTIN(配列番号：623)のアミノ酸配列を持つペプチド。

【0016】

ヒト若しくはヒト化抗体は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4若しくはIgMでありうる。ヒト若しくはヒト化抗体断片若しくは抗体様タンパク質は、scFv若しくはscFv-Fcでありうる。

【0017】

上記のような、ヒト若しくはヒト化抗体、抗体断片若しくは抗体様タンパク質は、マウス単クローンのMN-E6抗体に由来する重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含んでいてもよい、またマウス単クローンのMN-E6抗体に少なくとも80%、90%若しくは95%若しくは98%の配列同一性を持つ。重鎖可変領域は、配列番号13に、少なくとも90%若しくは95%若しくは98%の配列同一性を持ちうる。軽鎖可変領域は、配列番号66に、少なくとも90%若しくは95%若しくは98%の配列同一性を持ちうる。

40

【0018】

上記によるヒト若しくはヒト化抗体、抗体断片若しくは抗体様タンパク質は、以下のような配列をもつ、CDR1、CDR2若しくはCDR3部位に、少なくとも90%若しくは95%若しくは98%の配列同一性をもつ、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域において相補性決定領域(CDR)を含みうる；

【0019】

CDR1重鎖配列番号：17

50

【 0 0 2 0 】

CDR1軽鎖配列番号:70、

【 0 0 2 1 】

CDR2重鎖配列番号:21

【 0 0 2 2 】

CDR2軽鎖配列番号:74、

【 0 0 2 3 】

CDR3重鎖配列番号:25

【 0 0 2 4 】

CDR3軽鎖配列番号:78 .

10

【 0 0 2 5 】

上述のヒト若しくはヒト化抗体、抗体断片若しくは抗体様タンパク質は、マウス単クローンのMN-C2抗体に由来する重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含むことができ、またマウス単クローンのMN-C2抗体に、少なくとも80%、90%若しくは95%若しくは98%の配列同一性を持っている。重鎖可変領域は、配列番号119に、少なくとも90%若しくは95%若しくは98%の配列同一性を持ちえ、及び軽鎖可変領域は、配列番号169に、少なくとも90%若しくは95%若しくは98%の配列同一性を持つ。重鎖可変領域及び軽鎖可変領域における相補性決定領域(CDR)は、以下のような配列をもつ、CDR1、CDR2若しくはCDR3部位に、少なくとも90%若しくは95%若しくは98%の配列同一性を持ちうる:

【 0 0 2 6 】

20

CDR1重鎖配列番号: 123

【 0 0 2 7 】

CDR1軽鎖配列番号: 173、

【 0 0 2 8 】

CDR2重鎖配列番号: 127

【 0 0 2 9 】

CDR2軽鎖配列番号: 177、

【 0 0 3 0 】

CDR3重鎖配列番号: 131

【 0 0 3 1 】

30

CDR3軽鎖配列番号: 181 .

【 0 0 3 2 】

上記におけるように、ヒト若しくはヒト化抗体、抗体断片若しくは抗体様タンパク質は、マウス単クローンのMN-C3抗体に由来する重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含みうる、またマウス単クローンのMN-C3抗体に少なくとも80%、90%若しくは95%若しくは98%の配列同一性を持ちうる。重鎖可変領域は、配列番号:414に、少なくとも90%若しくは95%若しくは98%の配列同一性を持ちうる、及び軽鎖可変領域は、配列番号:459へ、少なくとも90%若しくは95%若しくは98%の配列同一性を持ちうる。重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の相補性決定領域(CDR)は、以下のような配列をもつ、CDR1、CDR2若しくはCDR3部位に、少なくとも90%若しくは95%若しくは98%の配列同一性を持ちうる:

40

【 0 0 3 3 】

CDR1重鎖配列番号:418、

【 0 0 3 4 】

CDR1軽鎖配列番号:463、

【 0 0 3 5 】

CDR2重鎖配列番号:422、

【 0 0 3 6 】

CDR2軽鎖配列番号:467、

【 0 0 3 7 】

CDR3重鎖配列番号:426、

50

【0038】

CDR3軽鎖配列番号:471。

【0039】

上記の、ヒト若しくはヒト化抗体、抗体断片若しくは抗体様タンパク質は、マウス単クローンのMN-C8抗体に由来する重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含みうる、またマウス単クローンのMN-C8抗体に少なくとも80%、90%若しくは95%若しくは98%の配列同一性を持ちうる。重鎖可変領域は、配列番号:506に、少なくとも90%若しくは95%若しくは98%の配列同一性を持ちうる、及び軽鎖可変領域は、配列番号:544へ、少なくとも90%若しくは95%若しくは98%の配列同一性を持ちうる。重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の相補性決定領域(CDR)は、以下のように配列をもつ、CDR1、CDR2若しくはCDR3部位へ、少なくとも90%若しくは95%若しくは98%の配列同一性を持ちうる:

10

【0040】

CDR1重鎖配列番号:508、

【0041】

CDR1軽鎖配列番号:546、

【0042】

CDR2重鎖配列番号:510、

【0043】

CDR2軽鎖配列番号:548、

【0044】

CDR3重鎖配列番号:512、

20

【0045】

CDR3軽鎖配列番号:550。

【0046】

別の観点では、本発明は、ヒト化カップー()軽鎖若しくはヒト化ラムダ()軽鎖とペアになって、ヒト化IgG2重鎖若しくはヒト化IgG1重鎖によって表わされる、ヒト化MN-E6の配列で構成された抗MUC1*細胞外ドメイン抗体を志向する。ヒト化IgG2重鎖は、配列番号:53でありえ、ヒト化IgG1重鎖は、配列番号:57でありえ、ヒト化カップー軽鎖は配列番号:108でありえ、またヒト化ラムダ軽鎖は配列番号:112でありえ、又は各々の90%、95%若しくは98%の配列同一性を持つ配列である。

30

【0047】

別の観点では、本発明は、ヒト化カップー軽鎖及びヒト化ラムダ軽鎖とペアになって、ヒト化IgG2重鎖若しくはヒト化IgG1重鎖によって表わされる、ヒト化MN-C2の配列で構成された抗MUC1*細胞外ドメイン抗体を志向する。ヒト化IgG1重鎖MN-C2は、配列番号:159でありえ、IgG2重鎖は、配列番号:164でありえ、カップー軽鎖(配列番号:213)若しくはラムダ軽鎖(配列番号:219)とペアとなる。又は各々の90%、95%若しくは98%の配列同一性を持つ配列である。

【0048】

別の観点では、本発明は、ヒト化カップー軽鎖若しくはヒト化ラムダ軽鎖とペアになって、ヒト化IgG2重鎖若しくはヒト化IgG1重鎖によって表わされる、ヒト化MN-C3の配列で構成された抗MUC1*細胞外ドメイン抗体を志向する。ヒト化MN-C3IgG1重鎖は、配列番号:454でありえ、IgG2重鎖は、配列番号:456でありえ、カップー軽鎖は配列番号:503でありえ、またラムダ軽鎖は配列番号:501でありえ、又は各々の90%、95%若しくは98%の配列同一性を持つ配列である。

40

【0049】

別の観点では、本発明は、ヒト化カップー軽鎖若しくはヒト化ラムダ軽鎖とペアになって、ヒト化IgG2重鎖若しくはヒト化IgG1重鎖によって表わされる、ヒト化MN-C8の配列で構成された抗MUC1*細胞外ドメイン抗体を志向する。ヒト化MN-C8IgG1重鎖は、配列番号:540でありえ、IgG2重鎖は、配列番号:542でありえ、カップー軽鎖は配列番号:582でありえ、またラムダ軽鎖は配列番号:580でありえ、又は各々の90%、95%若しくは98%の配列同一

50

性を持つ配列である。

【0050】

別の観点では、本発明は、上記によるヒト若しくはヒト化抗MUC1*抗体、抗体断片若しくは抗体様タンパク質を志向し、それはMUC1*へのNMEタンパク質の結合を阻害する。NMEは、NME1、NME6、NME7AB、NME7若しくはNME8でありうる。

【0051】

まだ別の観点では、本発明は、リンカーによって接続している重及び軽鎖可変領域を含み、さらにMUC1*細胞外ドメインに結合する抗体のCDRsを含む一本鎖可変断片(scFv)を志向する。CDRsは、MN-E6、MN-C2、MN-C3若しくはMN-C8抗体若しくはそのヒト化抗体に由来しうる。scFvは、配列番号:233、235及び237(E6);配列番号:239、241及び243(C2);配列番号:245、247及び249(C3);若しくは配列番号:251、253及び255(C8)をもつものでありうる。

10

【0052】

まだ別の観点では、本発明は、縦列(タンデム)反復を欠くMUC 1の細胞外ドメインへ結合するscFv若しくはヒト化可変領域、リンカー分子、膜貫通領域及び細胞質領域を含む、キメラ抗原リセプター(CAR)を志向する。一本鎖抗体断片は、以下に結合しうる;

【0053】

(i) MUC1のPSMGFR部位

【0054】

(ii) PSMGFRペプチド

【0055】

(iii) 以下のアミノ酸配列をもつペプチド

SNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQYKTEAASRY(配列番号:620);

20

【0056】

(iv) 以下のアミノ酸配列をもつペプチド

SVVVQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQYKTEAASRY(配列番号:621);

【0057】

(v) 以下のアミノ酸配列をもつペプチド

VQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQY(配列番号:622);若しくは

【0058】

(vi) 以下のアミノ酸配列をもつペプチド

SNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTIN(配列番号:623)。

30

【0059】

上記CARにおいて、可変領域のうちのいずれかの部分は先に表示されそして上記した。あるいは、その組合せは、細胞外ドメイン、膜貫通部位、及び免疫系賦活をシグナルする配列モチーフを含む細胞質尾部で使用されてもよい。細胞外ドメインは、MN-E6 scFv、MN-C2 scFv、MN-C3 scFv若しくはMN-C8 scFvのヒト化一本鎖抗体断片で構成されうる。

【0060】

上記のようなCARにおいて、細胞外ドメインは、配列番号:233、235、若しくは237として表示されるMN-E6 scFv、若しくはMN-C2 scFv(配列番号:239、241、若しくは243)、MN-C3 scFv(配列番号:245、247、若しくは249)、若しくはMN-C8 scFv(配列番号:251、253、若しくは255)のヒト化一本鎖抗体断片を含んでいる。

40

【0061】

上述されたCARのうちのどれでも、細胞質尾部は、シグナル配列モチーフCD3-zeta、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICAm-1、LFA-1、ICOS、CD2、CD5若しくはCD7の1つ以上で構成されうる。

【0062】

上述されたCARのうちのどれでも、配列は以下でありうる;

CARMN-E6 CD3z(配列番号:295);CARMN-E6 CD28/CD3z(配列番号:298);CARMN-E6 4-1BB/CD3z(配列番号:301);CARMN-E6 OX40/CD3z(配列番号:617);CARMN-E6CD28/4-1BB/CD3z(配列番号:304);CARMN-E6 CD28/OX40/CD3z(配列番号:619);CAR MN-C2 CD3z(配列番号:607);

50

CAR MN-C2 CD28/CD3z(配列番号: 609); CAR MN-C24-1BB/CD3z(配列番号: 611); CAR MN-C2 OX40/CD3z(配列番号: 613); CAR MN-C2 CD28/4-1BB/CD3z(配列番号: 307);若しくはCAR MN-C2 CD28/OX40/CD3z(配列番号: 615)。

【0063】

別の観点では、CARは、ペプチドを認識する細胞外ドメインユニットを持ちうる。該ペプチドはPSMGFR(配列番号: 2)でありうる。該ペプチドはNME7に由来したペプチドでありうる。該ペプチドは以下でありうる；

【0064】

NME7Aペプチド1(A領域): MLRSRKEALDFHVDHQS(配列番号: 7);

【0065】

NME7Aペプチド2(A領域): SGVARTDASES(配列番号: 8);

【0066】

NME7Bペプチド1(B領域): DAGFEISAMQMFNMDRVNVE(配列番号: 9);

【0067】

NME7Bペプチド2(B領域): EVYKGVVTEYHDMVTE(配列番号: 10);若しくは

【0068】

NME7Bペプチド3(B領域): AIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF(配列番号: 11)。

【0069】

別の観点では、本発明は、同じ細胞へトランスフェクトされた異なる細胞外ドメインユニットをもった少なくとも2つのCARを含んでいる組成物を志向する。

【0070】

該少なくとも2つのCARは、ターゲットとする認識ユニットを持っていない1つのCARをもち、そして、別のCARはターゲットとする認識ユニットを持っている。若しくは、細胞外ドメイン認識ユニットのうち1つは、MUC1*細胞外ドメインに結合しうる。若しくは、細胞外ドメイン認識ユニットのうち1つは、PD-1を結合しうる。若しくは、細胞外ドメイン認識ユニットのうち1つは、抗体断片でありえ、また、他方はペプチドである。若しくは、一つは、MN-E6抗体のscFv、MN-C2抗体のscFv、MN-C3抗体のscFv若しくはMN-C8抗体のscFvから成るグループから選ばれた抗MUC1* scFvであり、他はNME7に由来するペプチド若しくは以下のグループから選ばれる；

【0071】

NME7Aペプチド1(A領域): MLRSRKEALDFHVDHQS(配列番号: 7);

【0072】

NME7Aペプチド2(A領域): SGVARTDASES(配列番号: 8);

【0073】

NME7Bペプチド1(B領域): DAGFEISAMQMFNMDRVNVE(配列番号: 9);

【0074】

NME7Bペプチド2(B領域): EVYKGVVTEYHDMVTE(配列番号: 10);そして

【0075】

NME7Bペプチド3(B領域): AIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF(配列番号: 11)。

【0076】

別の観点では、本発明は、MUC1*トランスフェクトされた若しくは形質導入された細胞に結合する細胞外ドメインをもったCARを含む細胞を志向する。CARを含んでいる該細胞は、免疫系細胞、好適にはT細胞、樹状細胞、若しくは肥満細胞でありうる。

【0077】

別の観点では、本発明は、操作された抗体様タンパク質を志向する。

【0078】

別の観点では、本発明は、ヒトである、抗体若しくは抗体断片ライブラリーをスクリーニングする方法を志向し、それは以下に結合する；

【0079】

(i)PSMGFRペプチド；

10

20

30

40

50

【 0 0 8 0 】

(ii) 以下のアミノ酸配列を持つペプチド

SNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQYKTEAASRY(配列番号: 620);

【 0 0 8 1 】

(iii) 以下のアミノ酸配列を持つペプチド

SVVVQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQYKTEAASRY(配列番号: 621);

【 0 0 8 2 】

(iv) 以下のアミノ酸配列を持つペプチド

VQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQY(配列番号: 622);

【 0 0 8 3 】

(v) 以下のアミノ酸配列を持つペプチド

SNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTIN(配列番号: 623);

【 0 0 8 4 】

(vi) NME7タンパク質;若しくは

【 0 0 8 5 】

(vii) NME7タンパク質のペプチド断片。

【 0 0 8 6 】

別の観点では、本発明は、その病気に苦しむ人に、任意の上記の抗体を投与することを含む対象の病気を治療する方法を志向し、ここでは該対象はMUC1を異常に発現する。該病気は、乳癌、肺癌、結腸癌、胃癌のような癌でありうる。

【 0 0 8 7 】

別の観点では、本発明は、その病気に苦しむ人に、NMEペプチドを投与することを含む対象の病気を治療する方法を志向する。ここでは該対象はMUC1を異常に発現する。

【 0 0 8 8 】

別の観点では、本発明は、細胞を、上記の任意の方法による若しくは上記の組成による抗体と接触させることを含む、幹細胞個体群を増殖若しくは拡張する方法を志向する。

【 0 0 8 9 】

別の観点では、本発明は、ヒト化MN-C3若しくはMN-C8抗体、その抗体断片若しくはその一本鎖抗体で表面を被覆し、そして該表面へ幹細胞を接触させることを含む、表面への幹細胞付着を促進する方法を志向する。

【 0 0 9 0 】

別の観点では、本発明は、ヒト化MN-C3若しくはMN-C8抗体、その抗体断片若しくはその一本鎖抗体で表面をコート(被覆)し、該表面に幹細胞を接触させ、特定の位置に該幹細胞を輸送するステップを含む、生体内若しくは生体外での幹細胞の移送方法を志向する。

【 0 0 9 1 】

別の観点では、本発明は、ヒト化MN-C3若しくはMN-C8抗体、抗体断片若しくはその一本鎖抗体で表面を被覆し、該表面に細胞の混合個体群と接触させ、そして幹細胞を分離するステップを含む、幹細胞を分離する方法を志向する。

【 0 0 9 2 】

別の観点では、本発明は、タンデムリピート領域が欠けているMUC1アイソフォーム若しくは分解産物の細胞外ドメインへ結合する抗体に由来した可変領域断片を含むscFvを志向する。該可変領域断片は、マウス単クローン抗体MN-E6(配列番号: 13と66)、ヒト化MN-E6(配列番号: 39と94)、若しくはMN-E6 scFv(配列番号: 233、235と237)に由来しうる。若しくは、該可変領域断片は、マウス単クローン抗体MN-C2(配列番号: 119と169)、ヒト化MN-C2(配列番号: 145と195)、若しくはMN-C2 scFv(配列番号: 239、241と243)に由来しうる。若しくは、該可変領域断片は、マウス単クローン抗体MN-C3(配列番号: 414と459)、ヒト化MN-C3(配列番号: 440と487)、若しくはMN-C3 scFv(配列番号: 245、247及び249)に由来しうる。若しくは、該可変領域断片は、マウス単クローン抗体MN-C8(配列番号: 505と544)、ヒト化MN-C8(配列番号: 526と566)、若しくはMN-C8 scFv(配列番号: 251、253と255)に由来しうる。

10

20

30

40

50

【0093】

別の観点で、本発明は、上記scFvの有効な量を投与することを含む、MUC1またはMUC1*陽性癌も持つ若しくは進展のリスクが診断され、疑われるヒトの処置方法を志向する。

【0094】

別の観点では、本発明は、上述のscFvを含むscFv-Fc構築物を志向する。scFv-Fcは二量化しうる。若しくは、scFv-Fcがモノマーのように、Fcコンポーネントが変異させられうる。該変異は、Fcのヒンジ部を変異若しくは欠失させることを含みえ、配列番号281、279、285及び287によって代表される該FcにおけるF405Q、Y407R、T366W/L368W及びT364R/L368R変異若しくはその組み合わせをつくる。

【0095】

別の観点では、本発明は、少なくとも2つの異なるscFv配列を含むポリペプチドを志向し、そこで、scFv配列の1つは、タンデムリピート領域が欠けているMUC1アイソフォーム若しくは分解産物の細胞外ドメインへ結合する配列である。

ポリペプチドは以下に結合しうる；

【0096】

(i) MUC1のPSMGFR部位；

【0097】

(ii) PSMGFRペプチド；

【0098】

(iii) SNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTINVHVDVETQFNQYKTEAASRY (配列番号：620)

のアミノ酸配列を持つペプチド；

【0099】

(iv) VQLTLAFREGTINVHVDVETQFNQYKTEAASRY(配列番号：621)

のアミノ酸配列を持つペプチド；

【0100】

(v) VQLTLAFREGTINVHVDVETQFNQY(配列番号：622)

のアミノ酸配列を持つペプチド；若しくは

【0101】

(vi) SNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTIN(配列番号：623)

のアミノ酸配列を持つペプチド。

【0102】

該ポリペプチドは、T細胞のような、特にT細胞におけるCD3のような、免疫細胞上のリセプターに結合しうる。

【0103】

別の観点では、本発明は、上述されたscFv-Fcを細胞のサンプルと接触させ、該細胞へのscFv-Fcの結合の存在を検出することを含む、MUC1*を異常に発現する細胞の存在を検出するための方法を志向する。該細胞は癌細胞でありうる。

【0104】

別の観点では、本発明は、相当するMN-E6 scFv-Fc、MN-C3 scFv-Fc、MN-C3 scFv-Fc若しくはMN-C8 scFv-Fcで、患者からの肉体標本と接触させるステップを含む、MN-E6、MN-C2、MN-C3若しくはMN-C8の可変領域の部分を含む組成での治療の適応性に関して患者の癌をテストする方法を志向する。

【0105】

別の観点では、本発明は、成熟の様々な段階によって、T細胞がMUC1*特異リセプターを進展させる、MUC1*ペプチドに患者からのT細胞を呈示させ、適合(アドプティッド)T細胞作り、該適合T細胞を拡張させ、MUC1*陽性癌を持つ若しくは進展のリスクが診断され若しくは疑われるドナー患者に投与させることを含む疾患をもつ患者の処置の方法を志向する。

【0106】

本発明のこれら及び他の目的は、以下の本発明の詳細な説明、ここに開示された参照図面

10

20

30

40

50

、及びここに特定された請求項からより完全に理解されうる。

【0107】

本発明は、ここに以下に記述の詳細な説明、及び図示のみで開示された添付図面からより完全に理解されうる。

【図面の簡単な説明】

【0108】

【図1】図1A~Dは、二価「bv」抗MUC1*抗体、一価「mv」若しくはFab、NM23-H1二量体若しくはNME7-ABで処置された、MUC1*陽性細胞の細胞増殖分析グラフを示す。二価の抗MUC1*抗体は、癌細胞の増殖を刺激するが、一価のFabは増殖を阻害する(A、B)。古典的な正規曲線は、リガンド誘導二量体化が、増殖を刺激することを示す。二量体のNM23-H1、aka NME1、は、MUC1*陽性癌細胞の増殖を刺激するが、MUC1発現を抑えるsiRNAがその効果を排除する(C)。NME7-ABは、また、MUC1*陽性細胞の増殖を刺激する(D)。

10

【0109】

【図2】図2 A-FはELISA分析の結果を示す。MUC1*ペプチドPSMGFR、N末端からPSMGFRマイナス10アミノ酸aka N-10、若しくはC末端からPSMGFRマイナス10アミノ酸aka C-10がプレート上に固定され次の結合分析をおこなった：NME7-AB(A)、MN-C2単クローン抗体(B)、MN-E6単クローン抗体(C)若しくは二量体NME1(D)。これらの分析は、NME1、NME7-AB、及び単クローン抗体MN-C2及びMN-E6がすべて、結合のために、MUC1*細胞外ドメインの第一の膜の近位10アミノ酸を必要とすることを示す。N末端からPSMGFRマイナス10アミノ酸aka N-10又はC末端からPSMGFRマイナス10アミノ酸aka C-10がプレート上に固定され次の結合分析をおこなった：MN-C3(E)及びMN-C8(F)。

20

【0110】

【図3】図3は、競合ELISA分析の結果を示す。PSMGFR MUC1*ペプチドが、プレート上で固定化され、そして、二量体のNM23-H1、aka NME1、が単独で若しくはMN-E6抗体の添加後に加えられた(A)。同様の実験がおこなわれ、そこではNM23-H7、NME7-ABが単独で加えられるか、MN-E6の添加後に加えられた(B)。結果は、MN-E6が、MUC1*活性化リガンド(MUC1* activating ligands)NME1及びNME7の結合を競争的に阻害することを示す。同様の実験(C)では、PSMGFR若しくはN末端からPSMGFRマイナス10アミノ酸、aka N-10、が、プレート上で固定化された。その後、二量体のNM23-H1が添加された。その後、抗MUC1*抗体MN-E6、MN-C2、MN-C3若しくはMN-C8が、NM23-H1を競争的にオフするそれらの能力に関してテストされた。結果は、3つのすべての抗体は、PSMGFRペプチドに結合するが、MN-E6及びMN-C2は、MUC1*活性化リガンドの結合を競争的に阻害することを示す。

30

【0111】

【図4】図4 A-Fは、抗MUC1*抗体が特異的にMUC1*陽性癌細胞とMUC1*形質転換細胞に結合すること、非MUC1*若しくはMUC1の陰性細胞には結合しないことを、FACSスキャンで示す。ZR-75-1、aka 1500、MUC1*陽性乳癌細胞が、1.5 µg/mlヒト化MN-C2の1:2若しくは1:10希釈で染色された。2回の洗浄の後、細胞は、huMN-C2scFvにおいて、6x His tagを検出するために、1:200(A)、1:50(B)若しくは1:10のAlexa488 (Qiagen)希釈への共役で、2次抗体、抗Pent-His抗体、で染色された。フロー血球計算分析は、特異的結合を示して、細胞の部分集合の濃度依存性のシフトを明らかにした。それはMN-C2 scFvの欠如(A~C)で見られない。別の場合では、MN-E6が、空のベクター、シングル細胞クローン#8、で形質転換されたMUC1陰性結腸癌細胞HCT-116(D)、MUC1*シングル細胞クローン#10で形質転換されたHCT-116結腸癌細胞(E)、若しくはZR-75-1、aka 1500、MUC1*の陽性乳癌細胞を染色するのに使われた。FACSが示すように、両方のMN-C2及びMN-E6のみが、MUC1*陽性細胞を染色し、非MUC1若しくはMUC1*陰性の細胞ではされなかった。

40

【0112】

【図5】図5は、MUC1* PSMGFRペプチド若しくはコントロールペプチドのいずれかで表面が被覆されるELISAでのグラフを示す。その後、ヒト化MN-C2 scFvが、その表面でインキュベートされ、洗浄され、標準分析法によって検出された。ELISAは、huMN-C2 scFvが、約333nMのEC-50でMUC1*ペプチドに結合することを示す。

50

【 0 1 1 3 】

【図 6】図 6 A-Bは、MUC1*抗体可変領域断片ヒト化MN-C2 scFvによる癌細胞増殖阻害のグラフを示す。hMN-C2 scFvは、インビトロELISAと同じEC-50で、強力に、ZR-75-1、aka 15 00、MUC1*陽性乳癌細胞(A)及びT47D MUC1*陽性乳癌細胞(B)、の増殖を阻害した。

【 0 1 1 4 】

【図 7】図 7 A-Bは、ヒト癌を移植され、その後、抗MUC1*抗体MN-E6若しくはモックで処理された免疫寛容マウスでの癌成長のグラフを示す。90日間発情ホルモンペレット剤が埋め込まれた雌のnu/nuマウスに、Matrigelと50/50に調合された600万T47Dヒト乳癌細胞が注入された。少なくとも150mm³であり、そして腫瘍容積の3連続増加のあった腫瘍を担持するマウスが、処置に選ばれた。動物は、80 mg/kg MN-E6 Fabを皮下に週当たり2度注入された、また、同じ選択基準に適合する等しい数のマウスが、ビヒクルを単独で注入された(A)。オスのNOD/SCIDマウスに、Matrigelと50/50で調合された600万DU-145ヒト前立腺癌細胞が注入された。少なくとも150mm³であり、そして腫瘍容積の3連続増加のあった腫瘍を担持するマウスが、処置に選ばれた。動物は、48時間ごとに160 mg/kg MN-E6 Fabを皮下に注入され、また、同じ選択基準に適合する等しい数のマウスに、ビヒクルを単独で注入された(B)。腫瘍は、2人の研究者によって独立して週当たり2度測定され記録した。統計は、各々のために0.0001のP valueを与え、独立した統計者によってブラインド的に計算された。抗MUC1*Fabは、乳癌増殖及び前立腺癌増殖を阻害した。処置は、重量、骨髓細胞タイプ若しくは数に影響がなかった。

【 0 1 1 5 】

【図 8】図 8 は、軽鎖がカッパ若しくはラムダだったか、可変部分がヒトIgG1かIgG2に融合しているかどうか依存して、ヒト化MN-E6抗MUC1*抗体の発現の異なるレベルを示すELISA分析のグラフである。

【 0 1 1 6 】

【図 9】図 9 は、MN-E6抗体のヒト化バージョンに対する親マウスMN-E6抗体について、MUC1*細胞外ドメインに由来したPSMGFRペプチドを示す表面への結合を比較するELISA分析のグラフである。

【 0 1 1 7 】

【図 10】図 10 は、軽鎖がカッパ若しくはラムダだったか、可変部分がヒトIgG1かIgG2に融合しているかどうか依存して、ヒト化MN-C2抗MUC1*抗体の発現の異なるレベルを示すELISA分析のグラフである。

【 0 1 1 8 】

【図 11】図 11 は、MN-C2抗体のヒト化バージョンに対する親マウスMN-C2抗体について、MUC1*細胞外ドメインに由来したPSMGFRペプチドを示す表面への結合を比較するELISA分析のグラフである。

【 0 1 1 9 】

【図 12】図 12 は、MUC1*細胞外ドメインから由来するPSMGFRペプチドを提示する表面へ結合している、ヒト化一本鎖(scFv)MN-C2 及びMN-E6抗体の結合を示すELISA分析のグラフである。

【 0 1 2 0 】

【図 13】図 13 A~Cは、プロテインAアフィニティカムでの、低IgG FBSで増加されたMN-E6 scFv-Fc融合蛋白質の精製に関するFPLCトレースを示す。A)はフロースルーのトレースである。B)は溶離のトレースである。C)は、還元若しくは非還元ゲルでの精製タンパク質を示す。

【 0 1 2 1 】

【図 14】図 14 A-Bは、非還元ゲルでの、精製されたMN-E6 scFv-Fc融合蛋白質のSDS-PAGE特性の写真を示し、そこではMN-E6に融合されたFc部分は、野生型(wt)若しくは以下のように変異させた:A) F405Q、Y407R、T394D;B) T366W/L368W、T364R/L368R、T366W/L368W若しくはT364R/L368R。Fc突然変異体F405Q、Y407R、T366W/L368W、T364R/L368R、T366W/L368W及びT364R/L368Rはすべて、ダイマー型に対しモノマーを好適とした。示された突然

10

20

30

40

50

変異のための参照構成アミノ酸配列は、配列番号:273である。

【0122】

【図15】図15 A-Bは、プロテインAアフィニティカラムでの、低IgG FBSで育てられたMN-E6 scFv-Fc Y407R融合蛋白質の精製に関するFPLCトレースを示す。A)はフロースルーのトレースである。B)は溶離のトレースである。該タンパク質は、S200カラムでのサイズ排除法によってさらに精製された(C)。(D)は、どの分画がモノマーの優勢を持っていたか示すSDS-PAGEゲルの写真である。示された突然変異のための参照構成アミノ酸配列は、配列番号:273である。

【0123】

【図16】図16は、非還元ゲル上での精製されたMN-E6 scFv-Fc突然変異体融合蛋白質のSDS-PAGE特性の写真を示し、そこで、MN-E6 scFvに融合されたFc部分は、野生型(wt)若しくはFcのヒンジ部、DHinge、の欠失によって変異させられた若しくはFcのヒンジ部欠失とともにY407R突然変異を担持する。Fc突然変異体はすべてダイマー型よりモノマーを好適とした。示された突然変異のための参照構成アミノ酸配列は配列番号:273である。

10

【0124】

【図17】図17A~C: AとBは、それがモノマーであることを示す、MN-E6 scFv-Fcヒンジレス突然変異体の大規模発現と精製の非還元SDS-PAGE特性の写真を示す。MN-E6 scFv-Fcヒンジレス突然変異体のFPLC特性及び精製が示される(C)。

【0125】

【図18】図18A~Cは、非還元ゲル(A)若しくは還元ゲル(B)での精製されたMN-C3 scFv-Fc融合蛋白質のSDS-PAGE特性の写真を示す。該タンパク質は、サイズ排除法によって精製された。FPLCトレースが示される(C)。

20

【0126】

【図19】図19 A-Bは、MN-C3若しくはMN-E6 Fabs、scFv、scFv-FcのNativeゲルでの写真を示し、そこで、Fc部分は、野生型又はモノマーを好適とするか若しくはもっぱらモノマーである突然変異体である。Native型ゲルは、Y407R Fc突然変異(A)及び二重突然変異体Y407Rと欠失されたヒンジ(B)は、二量体に対しモノマーを最大好適とすることを示す。タンパク質が、典型的な使用濃度よりはるかに高い濃度でゲルに装填されることに注意がある。他のFc突然変異体のダイマー型は、装填濃度が非常に高いという事実のみを反映しうる。

30

【0127】

【図20】図20は、表面が、PSMGFRペプチド、N末端からPSMGFRマイナス10アミノ酸若しくはC末端からマイナス10アミノ酸で固定されたELISAのグラフを示す。hu MN-E6 scFv-Fcは、PSMGFRペプチド及びPSMGFR N-10ペプチドへは結合するが、PSMGFR C-10ペプチドには結合しない。親(parent)MN-E6抗体及びヒト化MN-E6は、結合のために、PSMGFRのC末端10アミノ酸を必要とする。

【0128】

【図21】図21 A-Bは、いくつかの抗MUC1* scFv-Fc融合蛋白質のELISAグラフを示し、そこでFc部位は除去されたか変異させられた。hu MN-E6 scFv-Fc-wt、hu MN-E6 scFv-Fc-Y407R、hu MN-E6 scFv-Fc-ヒンジレス及びhu MN-E6 scFv-Fc Y407R-ヒンジレスが示される。突然変異体はすべて、MUC1*細胞外ドメインのPSMGFRペプチドに結合する(A)。Fc部位が野生型である若しくは変異型である、いくつかの抗MUC1* scFv-Fc融合蛋白質のELISAグラフが示される。hu MN-E6 scFv-Fc-wt、hu MN-E6 scFv-Fc –ヒンジレス、及びhu MN-C3scFv-Fcが示される(B)。すべては、MUC1*細胞外ドメインのPSMGFRペプチドに結合する。

40

【0129】

【図22】図22A~Cは、分析プレート面が、PSMGFRペプチド、N末端からPSMGFRマイナス10アミノ酸若しくはC末端からマイナス10アミノ酸で固定されたELISAのグラフを示す。その後、MN-C3抗体variantが、様々なMUC1*ペプチドへの結合について分析された。A) 精製マウス単クローンMN-C3抗体; B) 不純ヒト化MN-C3抗体;そしてC)、ヒト化MN-C3 scFv-Fc。

50

ELISAは、ある欠失ペプチドに対してと同様にPSMGFRペプチドにも結合を示す。

【 0 1 3 0 】

【 図 2 3 】 図23は、MUC1*ペプチドPSMGFRへの、ヒト化MN-E6 scFv-Fcデルタヒンジ、akA Dヒンジ若しくはヒンジレス、及びヒト化MN-E6 scFvの結合を定量するELISA分析のグラフを示す。

【 0 1 3 1 】

【 図 2 4 】 図24は、免疫蛍光実験の写真を示し、そこでヒト化MN-C2 scFvかMN-E6 scFvが、同一の濃度依存法で、特異的に、MUC1*陽性乳癌細胞に結合する。A~G: 示された濃度で、T47D乳癌細胞に結合するhu MN-C2 scFv。H~Nは、蛍光ラベルされたscFv及びDAPIを示す。O~U: 示された濃度で、T47D乳癌細胞に結合するhu MN-E6 scFv。V~B'は、蛍光ラベルされたscFv及びDAPIを示す。C'は2次抗体コントロールである。

10

【 0 1 3 2 】

【 図 2 5 】 図25 A-Lは、通常培地若しくはヒト化MN-E6 scFvが存在する状態で培養された1500のMUC1*陽性乳癌細胞の写真を示す。A~Dは、4X拡大で得られた明るいフィールドイメージである。E~Hは、4X拡大で得られたカルセイン蛍光画像である。I~Lは、10X拡大で得られたカルセイン蛍光画像である。A、E、Iは、通常RPMI培地で培養されたコントロール細胞を示す。B、F、Jは、通常RPMI培地に、実験ウェルに加えられるPBS中のMN-E6 scFvの量と等しいPBS量をプラスした培地で培養されたコントロール細胞を示す。C、G、Kは、500 µg/mL MN-E6 scFvをプラスされた通常RPMI培地中で培養された細胞を示す。D、H、Lは、5 µg/mL MN-E6 scFvをプラスされた通常RPMI培地中で培養された細胞を示す。写真は、より大きな効果の500 µg/mL及び5 µg/mLのMN-E6 scFvによる、MUC1*陽性細胞の死滅及び/又は増殖阻害を示す。イメージは、テスト分子の96時間後の添加で得られた。

20

【 0 1 3 3 】

【 図 2 6 】 図26 A~Lは、ヒンジレス若しくはデルタヒンジ変異体であるヒト化MN-E6 scFv-Fc Dヒンジの存在下で又は通常培地で培養された1500のMUC1*陽性乳癌細胞の写真を示す。A~Fは、20X拡大で得られた明るいフィールド・イメージである。G~Lは、4X拡大で得られたカルセイン蛍光画像である。A、Gは、通常RPMI培地中で培養されたコントロール細胞を示す。B、Hは、100 µg/mL hMN-E6 scFv-Fc Dヒンジをプラスされた通常RPMI培地で培養された細胞を示す。C、Iは、50 µg/mL hMN-E6 scFv-Fc Dヒンジをプラスされた通常RPMI培地で培養された細胞を示す。D、Jは、5 µg/mL hMN-E6 scFv-Fc Dヒンジをプラスされた通常RPMI培地で培養された細胞を示す。E、Kは、0.5 µg/mL hMN-E6 scFv-Fc Dヒンジをプラスされた通常RPMI培地で培養された細胞を示す。F、Lは、MN-E6 Fabの500 µg/mLをプラスされた通常RPMI培地の中で培養された細胞を示す。写真は、より大きな効果の100 µg/mL及び大きな効果の50 µg/mL及び5 µg/mLのhMN-E6 scFv-Fc Dヒンジによる、MUC1*陽性細胞の死滅及び/又は増殖阻害を示す。細胞形態をコントロール細胞と比較して、MN-E6 Fabで若しくは有効な量のhMN-E6 scFv-Fc Dヒンジで育てられた癌細胞は、細胞死前に形態変更が生じる細胞の円形化を示す。イメージは、テスト分子の96時間後の添加で得られた。

30

【 0 1 3 4 】

【 図 2 7 】 図27は、図25及び26の蛍光画像の画像分析のグラフを示す。イメージJは、ヒト化MN-E6scFv若しくはMN-E6 scFv-Fcデルタヒンジ、akA Dヒンジ、における96時間処置後に残存する細胞の数の計算するために使用された。分析ソフトウェアは各写真の細胞の数の量を計算するためにピクセル蛍光強度及びピクセル計算を使用する。分析は全イメージ512X512ピクセル、8ビットイメージ上で行なわれた。比較のために、マウス単クローンMN-E6Fabの阻害も分析された。

40

【 0 1 3 5 】

【 図 2 8 】 図28A~Cは、CAR配列コンポーネントの概略を示す。

【 0 1 3 6 】

【 図 2 9 】 図29は、CAR T細胞がK562-wt細胞若しくはMUC1*でトランスフェクトされたK562細胞に露出された時の、MN-E6-CD8-3z、MN-E6-CD8-CD28-3z、MN-E6-CD8-41BB-3z、MN-E6

50

-CD4-CD28-3z及びMN-E6-CD4-CD28-41BB-3zを含むCARのパネルで変換されたJurkat T細胞によるIL-2サイトカイン分泌を測定する実験のグラフである。

【0137】

【図30】図30は、CAR T細胞がK562-wt細胞若しくはMUC1*でトランスフェクトされたK562細胞に露出された時の、MN-E6-CD8-CD28-3z、MN-E6-CD8-41BB-3z、MN-E6-CD4-CD28-3z及びMN-E6-CD4-41BB-3zを含むCARのパネルで変換されたJurkat T細胞によるIL-2サイトカイン分泌を測定する実験のグラフである。

【0138】

【図31】図31は、CAR T細胞がK562-wt細胞若しくはMUC1*でトランスフェクトされたK562細胞に露出された時の、MN-E6-CD8-CD28-3z、MN-E6-CD8-41BB-3z及びMN-E6-CD4-41BB-3zを含むCARのパネルで変換された、ヒト血液から単離された、初代ヒトT細胞によるIL-2サイトカイン分泌を測定する実験のグラフである。

10

【0139】

【図32】図32は、CAR T細胞がK562-wt細胞若しくはMUC1*でトランスフェクトされたK562細胞に露出された時の、MN-E6-CD8-CD28-3z及びMN-E6-CD4-41BB-3zを含むCARのパネルで変換された、ヒト血液から単離された、初代ヒトT細胞によるインターフェロンガンマ(IFNg)分泌を測定する実験のグラフである。

【0140】

【図33】図33は、CAR T細胞がK562-wt細胞、MUC1*でトランスフェクトされたK562細胞、又は前立腺癌、乳癌若しくは膵臓癌のMUC1*陽性癌に露出された時の、MN-E6-CD8-CD28-3z、MN-E6-CD8-41BB-3z及びMN-E6-CD8-CD28-41BB-3zを含むCARのパネルで変換された、ヒト血液から単離された、初代ヒトT細胞によるインターフェロンガンマ(IFNg)分泌を測定する実験のグラフである。

20

【0141】

【図34】図34は、CAR T細胞がK562-wt細胞若しくはMUC1*でトランスフェクトされたK562細胞に露出された時の、MN-E6-CD8-CD28-3z、MN-E6-CD8-41BB-3z及びMN-E6-CD4-41BB-3zを含むCARのパネルで変換された、ヒト血液から単離された、初代ヒトT細胞時の標的細胞死を測定する実験のグラフである。T細胞対標的細胞の比率は1: 1で、細胞は24時間共培養された。

【0142】

【図35】図35 A-Bは、1日目から3日目までの標的細胞生存の時間的経過を測定するFACSのグラフである。血液サンプルから分離された、初代ヒトT細胞は、ヒト化MN-E6-CD8-3z、MN-E6-CD8-CD28-3z、MN-E6-CD8-41BB-3z及びMN-E6-CD8-CD28-41BB-3zを含むCARのパネルで変換された。その後、CAR T細胞は、MUC1*の低レベルを自然に発現するK562-wt細胞、若しくはMUC1*ハイ(high)でトランスフェクトされたK562細胞に露出された。標的細胞に対するMUC1*標的化CAR T細胞(MUC1* targeting CAR-T cell)の比率は、1: 1、10: 1、または20: 1であった。生存細胞は、1日目(A)若しくは3日目(B)で検出され測定された。

30

【0143】

【図36】図36は、共培養実験の3日目の標的細胞生存のFACS測定のグラフである。初代ヒトT細胞は、ヒト化MN-E6-CD8-3z、MN-E6-CD8-CD28-3z、MN-E6-CD8-41BB-3z及びMN-E6-CD8-CD28-41BB-3zを含むCARのパネルで変換された。その後、該CAR T細胞は、MUC1*陽性T47D乳癌細胞若しくはMUC1*陽性1500 aka ZR-75-1乳癌細胞に露出された。標的細胞に対するMUC1*標的化CAR T細胞(MUC1* targeting CAR-T cell)の比率は、1: 1または10: 1であった。グラフから見ることで、MUC1*標的化CAR(MUC1* targeting CAR)で変換されたT細胞は、変換されていないコントロールT細胞より、MUC1*癌細胞に対し、はるかに大きな殺効果がある。さらに、殺結果は、T細胞: 標的細胞の比率が上昇するとき、さらに増加する。

40

【0144】

【図37】図37は、共培養実験の一日目の標的細胞生存のFACS測定のグラフである。初代

50

ヒトT細胞は、ヒト化MN-E6-CD8-41BB-3z、MN-E6-CD4-41BB-3z及びMN-E6-CD8-CD28-41BB-3zを含むCARのパネルで変換された。その後、該CAR T細胞は、次のMUC1*陽性癌細胞に露出された：T47D乳癌；capan2膵臓癌；若しくはDU-145前立腺癌。標的細胞に対するMUC1*標的化CAR T細胞（MUC1* targeting CAR-T cell）の比率は、5:1であった。グラフから見るように、MUC1*標的化CAR（MUC1* targeting CAR）で変換されたT細胞は、変換されていないコントロールT細胞よりはるかに大きなMUC1*癌細胞に対し殺効果がある。測定が、5:1（標的細胞へのT細胞）比で24時間の後におこなわれたことに注意。さらにCD8構築物と十分等しく、CD4細胞外ドメイン - 膜貫通 - 細胞質尾部をもつMUC1*標的化CAR（MUC1* targeting CAR）は機能することも注意。

【0145】

10

【図38】図38は、共培養実験の3日目での標的細胞生存のFACS測定のグラフである。初代ヒトT細胞は、ヒト化MN-E6-CD8-41BB-3z、MN-E6-CD4-41BB-3z及びMN-E6-CD8-CD28-41BB-3zを含むCARのパネルで変換された。その後、CAR T細胞は次のMUC1*陽性癌細胞に露出された：MUC1*でトランスフェクトされたK562白血病細胞；T47D乳癌；1500 aka ZR-75-1乳癌細胞；若しくはCAPAN-2膵癌細胞。変換されていないT細胞コントロールに加えて、分析はPC3 MUC1*陰性前立腺癌細胞で行なわれた。標的細胞に対するMUC1*標的化CAR T細胞（MUC1* targeting CAR-T cell）の比率は、1:1である。グラフから見るように、MUC1*標的化CAR（MUC1* targeting CAR）で変換されたT細胞は、変換されていないコントロールT細胞よりはるかに大きなMUC1*癌細胞に対し殺効果がある。さらに、殺結果は、MUC1*陽性細胞に特異的である。CD8構築物と十分等しく、CD4細胞外ドメイン - 膜貫通 - 細胞質尾部をもつMUC1*標的化CAR（MUC1* targeting CAR）は機能することに注意。

20

【0146】

【図39】図39は、標的細胞へのCAR T細胞、5:1比率で、標的細胞と共培養での24時間以上のCAR T細胞増殖のFACS測定のグラフである。初代ヒトT細胞は、ヒト化MN-E6-CD8-41BB-3z、MN-E6-CD4-41BB-3z及びMN-E6-CD8-CD28-41BB-3zを含むCARのパネルで変換された。CAR T細胞は、MUC1*陽性T47D乳癌細胞、MUC1*陽性Capan膵癌細胞、及びMUC1陰性細胞HCT-116結腸癌細胞及びHEK-293ヒト胚腎臓細胞と、共培養された。グラフから見るように、CAR T個体群は、MUC1*陽性細胞の存在する状態で増加されている。

【0147】

【図40】図40は、MUC1*標的化CARs（MUC1* targeting CARs）のウェスタンブロットの写真を示す。1~9まで、次のものがある：1. E6scFv-Fc-8-41BB-CD3z(CD8 TMをもったヒンジ部としてのヒトFc)；2: E6scFv-FcH-8-41BB-CD3z(CD8 TMをもったヒンジ部としてのヒトFc ヒンジレス)3: E6scFv-Fc-4-41BB-CD3z(CD4 TMをもったヒンジ部としてのヒトFc)4: E6scFv-FcH-4-41BB-CD3z(CD4 TMをもったヒンジレスヒンジ部としてのヒトFc)5: E6scFv-IgD-8-41BB-CD3z(CD8 TMをもったヒトIgDからのヒンジ部)6: E6scFv-IgD-4-41BB-CD3z(CD4 TMをもったヒトIgDからのヒンジ部)7: E6scFv-X4-8-41BB-CD3z(CD8 TMをもったヒンジ部としての長フレキシブルリンカー)8: E6scFv-X4-4-41BB-CD3z(CD4 TMをもったヒンジ部としての長フレキシブルリンカー)9: E6scFv-8-4-41BB-CD3z。(CD4 TMをもったCD8とCD4からのヒンジ部)。

30

【0148】

40

【図41】図41は、MN-E6scFv-Fc-8-41BB-CD3z、MN-E6scFv-FcH-8-41BB-CD3z、MN-E6scFv-Fc-4-41BB-CD3z、MN-E6scFv-IgD-8-41BB-CD3z、MN-E6scFv-X4-8-41BB-CD3z及びMN-E6scFv-X4-4-41BB-CD3zで変換されたヒトT細胞と共培養されたT47D乳癌細胞のFACSスキャンのグラフを示す。T細胞と癌細胞は、1:1の比率で、48時間共培養された。T細胞計算は、すべての変換されていないT細胞の平均に標準化され、そして、標的細胞は、変換されていないT細胞と共培養された時の個々の特定の細胞型に標準化された。グラフは、CAR T細胞がMUC1*陽性癌細胞と共培養される場合、T細胞個体群は拡大し、ターゲットとされた癌細胞群は減少することを示す。

【0149】

【図42】図42は、MN-E6scFv-Fc-8-41BB-CD3z、MN-E6scFv-FcH-8-41BB-CD3z、MN-E6scFv

50

-Fc-4-41BB-CD3z、MN-E6scFv-IgD-8-41BB-CD3z、MN-E6scFv-X4-8-41BB-CD3z及びMN-E6scFv-X4-4-41BB-CD3zで変換されたヒトT細胞と共培養された、T47D乳癌細胞、Capan-2膵癌細胞、K562-MUC1*トランスフェクト細胞、及びK562-wt細胞のFACSスキンのグラフを示す。T細胞と癌細胞は、48時間1:1の比率で共培養された。T細胞計算はすべての変換されていないT細胞の平均に標準化された。また、変換されていないT細胞で共培養された時、標的細胞は個々の特定の細胞型に標準化された。T細胞計算は、すべての変換されていないT細胞の平均に標準化され、そして、標的細胞は、変換されていないT細胞と共培養された時の個々の特定の細胞型に標準化された。グラフは、CAR T細胞がMUC1*陽性癌細胞と共培養される場合、T細胞個体群は拡大し、ターゲットとされた癌細胞群は減少することを示す。

10

【0150】

【図43】図43 A、Bは乳癌組織アレイの写真である。A)は、MUC1-FL(全長)を認識するVU4H5で染色された;B)は、癌性MUC1*を認識するマウス単クローン抗体MN-C2で染色された。自動染色(Clarient診断)によって、組織染色は、強度スコア及び分布スコアを組み合わせるオールレッド・スコアリング方法を使用してスコア化された。C、D、E、Fは、各患者の組織のMUC1全長染色のために計算されたスコアを示すカラーコード化グラフである。G、H、I、Jは、各患者の組織のMUC1*染色のために計算されたスコアを示すカラーコード化グラフである。

【0151】

【図44】図44 A、Bは乳癌組織アレイの写真である。A)は、MUC1-FL(全長)を認識するVU4H5で染色された;B)は、癌性MUC1*を認識するマウス単クローン抗体MN-C2で染色された。自動染色(Clarient診断)によって、組織染色は、強度スコア及び分布スコアを組み合わせるオールレッド・スコアリング方法を使用してスコア化された。C、D、E、Fは、各患者の組織のMUC1全長染色のために計算されたスコアを示すカラーコード化グラフである。G、H、I、Jは、各患者の組織のMUC1*染色のために計算されたスコアを示すカラーコード化グラフである。

20

【0152】

【図45】図45は、2.5 µg/mLのヒト化MN-E6-scFv-Fcビオチン化抗MUC1*抗体で染色され、その後、第2のstreptavidin HRP抗体で染色された乳癌組織及び正常乳の写真を示す。A)は、正常乳組織である。B-Dは、図で表示されるような患者からの乳癌組織である。E-H

30

【0153】

【図46】2.5 µg/mLのヒト化MN-E6-scFv-Fcビオチン化抗MUC1*抗体で染色され、その後、2次streptavidin HRP抗体で染色された乳癌組織及び正常乳の写真を示す。A)は、正常な乳組織である。B-Cは、図で表示されるような患者からの乳癌組織である。D-Fは、2次抗体単独で染色された、対応する連続切片の写真である。

【0154】

【図47】図47は、10 µg/mLのMN-E6抗MUC1*抗体で染色され、次に、ウサギ抗マウス2次HRP抗体で染色された乳癌組織の写真である。A~Dは、患者#300からの乳癌組織である。E~Hは、転移癌患者#291からの乳癌組織である。

40

【0155】

【図48】図48は、2.5 µg/mLのヒト化MN-E6-scFv-Fcビオチン化抗MUC1*抗体で染色され、その後、2次streptavidin HRP抗体で染色された肺癌組織及び正常肺の写真を示す。A)は、正常な肺組織である。B、Cは、図で表示されるような患者からの肺癌組織である。D~Fは、2次抗体単独で染色された、対応する連続切片の写真である。

【0156】

【図49】図49は、2.5 µg/mLのヒト化MN-E6-scFv-Fcビオチン化抗MUC1*抗体で染色され、その後、2次streptavidin HRP抗体で染色された肺癌組織及び正常肺の写真を示す。A)は、正常な肺組織である。B、Cは、図で表示されるような患者からの肺癌組織である。D~Fは、2次抗体単独で染色された、対応する連続切片の写真である。

50

【 0 1 5 7 】

【図 5 0】図50は、25 µg/mLのヒト化MN-E6-scFv-Fcビオチン化抗MUC1*抗体で染色され、その後、2次streptavidin HRP抗体で染色された肺癌組織及び正常肺の写真を示す。A)は、正常な肺組織である。B、Cは、図で表示されるような患者からの肺癌組織である。D~Fは、2次抗体単独で染色された、対応する連続切片の写真である。

【 0 1 5 8 】

【図 5 1】図51は、25 µg/mLのヒト化MN-E6-scFv-Fcビオチン化抗MUC1*抗体で染色され、その後、2次streptavidin HRP抗体で染色された肺癌組織及び正常肺の写真を示す。A)は、正常な肺組織である。B、Cは、図で表示されるような患者からの肺癌組織である。D~Fは、2次抗体単独で染色された、対応する連続切片の写真である。

10

【 0 1 5 9 】

【図 5 2】図52は、5 µg/mLのヒト化MN-E6-scFv-Fcビオチン化抗MUC1*抗体で染色され、その後、2次streptavidin HRP抗体で染色された小腸癌組織及び正常小腸の写真を示す。A)は、正常な小腸組織である。B)は、図で表示されるような患者からの小腸癌組織である。C、Dは、2次抗体単独で染色された、対応する連続切片の写真である。

【 0 1 6 0 】

【図 5 3】図53は、50 µg/mLのヒト化MN-E6-scFv-Fc抗MUC1*抗体で染色され、その後、2次ヤギ抗ヒトHRP抗体で染色された小腸癌組織及び正常小腸の写真を示す。A~Dは、正常な小腸組織である。E~Hは、2次抗体単独で染色された、対応する連続切片の写真である。

20

【 0 1 6 1 】

【図 5 4】図54は、50 µg/mLのヒト化MN-E6-scFv-Fc抗MUC1*抗体で染色され、その後、2次ヤギ抗ヒトHRP抗体で染色された小腸癌組織及び正常小腸の写真を示す。A~Dは、図で表示されるような患者からの小腸癌組織である。E~Hは、2次抗体単独で染色された、対応する連続切片の写真である。

【 0 1 6 2 】

【図 5 5】図55は、50 µg/mLのヒト化MN-E6-scFv-Fc抗MUC1*抗体で染色され、その後、2次ヤギ抗ヒトHRP抗体で染色された小腸癌組織の写真を示す。A~Dは、図で表示されるような患者からの小腸癌組織である。E~Hは、2次抗体単独で染色された、対応する連続切片の写真である。

30

【 0 1 6 3 】

【図 5 6】図56は、50 µg/mLのヒト化MN-E6-scFv-Fc抗MUC1*抗体で染色され、その後、2次ヤギ抗ヒトHRP抗体で染色された正常結腸組織の写真を示す。A~Dは、正常結腸組織である。E~Hは、2次抗体単独で染色された、対応する連続切片の写真である。

【 0 1 6 4 】

【図 5 7】図57は、50 µg/mLのヒト化MN-E6-scFv-Fc抗MUC1*抗体で染色され、その後、2次ヤギ抗ヒトHRP抗体で染色された結腸癌組織の写真を示す。A~Dは、図で表示されるような転移性癌患者からの結腸癌組織である。E~Hは、2次抗体単独で染色された、対応する連続切片の写真である。

【 0 1 6 5 】

【図 5 8】図58は、50 µg/mLのヒト化MN-E6-scFv-Fc抗MUC1*抗体で染色され、その後、2次ヤギ抗ヒトHRP抗体で染色された結腸癌組織の写真を示す。A~Dは、図で表示されるようなグレード2の癌患者からの結腸癌組織である。E~Hは、2次抗体単独で染色された、対応する連続切片の写真である。

40

【 0 1 6 6 】

【図 5 9】図59は、50 µg/mLのヒト化MN-E6-scFv-Fc抗MUC1*抗体で染色され、その後、2次ヤギ抗ヒトHRP抗体で染色された結腸癌組織の写真を示す。A~Dは、図で表示されるような転移性癌患者からの結腸癌組織である。E~Hは、2次抗体単独で染色された、対応する連続切片の写真である。

【 0 1 6 7 】

50

【図60】図60は、50 µg/mLのヒト化MN-E6-scFv-Fc抗MUC1*抗体で染色され、その後、2次ヤギ抗ヒトHRP抗体で染色された前立腺癌組織の写真を示す。A~Dは、図で表示されるような患者からの前立腺癌組織である。E~Hは、2次抗体単独で染色された、対応する連続切片の写真である。

【0168】

【図61】図61は、50 µg/mLのヒト化MN-E6-scFv-Fc抗MUC1*抗体で染色され、その後、2次ヤギ抗ヒトHRP抗体で染色された前立腺癌組織の写真を示す。A~Dは、図で表示されるような患者からの前立腺癌組織である。E~Hは、2次抗体単独で染色された、対応する連続切片の写真である。

【0169】

【図62】図62は、50 µg/mLのヒト化MN-E6-scFv-Fc抗MUC1*抗体で染色され、その後、2次ヤギ抗ヒトHRP抗体で染色された前立腺癌組織の写真を示す。A~Dは、図で表示されるような患者からの前立腺癌組織である。E~Hは、2次抗体単独で染色された、対応する連続切片の写真である。

【発明を実施するための形態】

【0170】

本発明で、「a」及び「an」は、単一及び複数対象の両方を参照するために使用されている。

【0171】

ここに使用されるように、抗体構築物の前に記述された「h」若しくは「hu」は、ヒト化のための略号である。

【0172】

ここに使用されるように、「抗体様」の用語はそれが抗体の部分を含んでいるが、自然界に自然に生じる抗体ではないような、操作調製される分子を意味する。例示は、限定されないが、CAR(キメラ抗原リセプター)T細胞技術及びYlanthia™技術である。CAR技術は、T細胞の一部に融合された抗体エピトープを使用し、その結果、身体の免疫系が、特異的な標的タンパク質若しくは細胞を攻撃するように指示される。Ylanthia™技術は、合成ヒトFabのコレクションである抗体様ライブラリーからなり、標的タンパク質からペプチドエピトープへの結合についてスクリーンされる。選択されたFab部位は、足場若しくはフレームワーク中に操作設計され、その結果それらは抗体に類似する。

【0173】

ここに使用されたように、抗体MN-C2、MN-E6、MN-C3及びMN-C8は、またそれぞれC2、E6、C3及びC8にリファーされる。

【0174】

ここに使用されるように、「PSMGFR」は、配列番号:2によって特定されるMUC1成長因子リセプターの一次配列のための省略語である。かくして、6つのアミノ酸配列と混同されない。「PSMGFRペプチド」若しくは「PSMGFR部位」は、MUC1成長因子リセプター(配列番号:2)の一次配列を含むペプチド若しくは部位をリファーする。

【0175】

ここに使用されるように、「MUC1*」細胞外ドメインは、主としてPSMGFR配列(GTINVHD VETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPPFSAQSGA(配列番号:2))によって定義される。MUC1開裂の正確なサイトは、それを切り取る酵素に依存し、開裂酵素が細胞型、組織型若しくは細胞の進化での時間に依存して変化する酵素に依存するので、MUC1*細胞外ドメインの正確な配列は、N末端で変化する。

【0176】

他の切り取られたアミノ酸配列は以下を含みうる；
 SNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQYKTEAASRY(配列番号:620);若しくは
 SVVVQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQYKTEAASRY(配列番号:621)。

【0177】

ここに使用されるように、用語「PSMGFR」は、

10

20

30

40

50

GTINVHDEVETQFNQYKTE AASRYNLTISDVSVDVPPFPFSAQSGA(配列番号: 2)

として述べられるMUC1成長因子リセプターの一次配列の頭字語である。

この点で、「N-10 PSMGFR」、「N-15 PSMGFR」若しくは「N-20 PSMGFR」でのような「N-数」は、PSMGFRのN末端で削除されたアミノ酸残基の数を指す。同様に「C-10 PSMGFR」、「C-15 PSMGFR」若しくは「C-20 PSMGFR」でのような「C-数」は、PSMGFRのC末端で削除されたアミノ酸残基の数を指す。

【0178】

ここに使用されたように、MUC1*細胞外ドメインは、タンデムリピート領域が欠けているMUC1タンパク質の細胞外の部分を指す。ほとんどの場合、MUC1*は、開裂産物であり、ここでMUC1*部分は、タンデムリピート、膜貫通領域及び細胞質尾部を欠く、短い細胞外ドメインからなる。恐らく1つを超える酵素によってそれを開裂することができるようなので、MUC1の開裂の正確な位置は知られていない。MUC1*細胞外ドメインは、ほとんどのPSMGFR配列を含んでいるが、さらに付加的な10-20のN-末端アミノ酸があってもよい。

10

【0179】

ここに使用されるように、ホモローガスなペプチドの機能が参照ペプチドか核酸と同じであるように、「配列同一性」は、特別のポリペプチド若しくは核酸の配列において、核酸またはアミノ酸の参照配列に、相同を意味する。このような相同とは、2つの配列が90%、95%若しくは98%同一ある時に、なお、結合若しくは他の生物活性において同じ機能を所有しうるように、参照ペプチドに非常に近接する。

【0180】

癌の治療若しくは予防用のMUC1*抗体(抗PSMGFR)

20

【0181】

本発明者は、MUC1(配列番号: 1)膜貫通型タンパク質の開裂型が、すべてのヒト癌の75%以上の成長を導く成長因子リセプターであることを見出した。MUC1の開裂型、本発明者はそれをMUC1*(ムック1スターと呼ぶ)、は、強力な成長因子リセプターである。酵素的開裂は、MUC1細胞外ドメインの大部分をリリースする。それは、切断細胞外ドメイン、膜貫通及び細胞質尾部を含む、残部であり、MUC1*と呼ぶ。MUC1の細胞外ドメインの大部分の開裂及び遊離は、リガンド二量体NME1、NME6、NME8、NME7-AB若しくはNME7を活性化するための結合部位をむき出しにする。細胞増殖分析は、増殖を促進するのは、MUC1*細胞外ドメインのリガンド誘導二量体化であることを示す(図1 A~D)。MUC1*陽性細胞は、二価「bv」抗MUC1*抗体、一価「mv」若しくはFab、NM23-H1二量体若しくはNME7-ABで処置した。二価抗MUC1*抗体は、癌細胞の増殖を刺激するが、一価Fabは増殖を阻害する。古典的正規曲線は、リガンド誘導二量体化は、増殖を刺激することを示す。二量体NM23-H1、aka NME1は、MUC1*陽性癌細胞の増殖を刺激するが、MUC1発現を抑制するsiRNAは、その効果を排除する(C)。NME7-ABは、また、MUC1*陽性細胞の増殖を刺激する(D)。

30

【0182】

MUC1*は、すべての癌の75%以上で異常に発現され、恐らく転移癌のさらに高い割合上で過剰発現されるので制癌剤の理想的標的である(Fessler SP, Wotkowicz MT, Mahanta SK and Bamdad C. (2009))。MUC1*は、乳癌細胞のトラスツズマブ(ハーセプチン)抵抗性の決定因子である(Breast Cancer Res Treat. 118(1): 113-124)。MUC1開裂の後、ほとんどのその細胞外ドメインは、細胞表面から放れる。残りの部分には、一次的成長要因子リセプター配列、PSMGFR(配列番号: 2)、を少なくとも含む、欠失細胞外ドメインがある。PSMGFR配列に結合する、特にNME1、NME6、NME8及びNME7を含むNMEタンパク質のようなリガンドを活性化する結合を競合的に阻害する抗体は、理想的な治療剤であり、MUC1陽性若しくはMUC1*陽性癌を処置若しくは予防のために、他に類をみない抗体、二重特異抗体中へ組み入れられたその抗体断片若しくは可変領域断片、又はCARとも呼ばれるキメラ抗原リセプターとして、使用されうる。治療用抗MUC1*抗体は、単クローン、多クローンで、抗体模倣、操作された抗体様分子、完全抗体若しくは抗体断片でありうる。抗体断片の例示は、限られないが、Fab、scFv及びscFv-Fcを含む。ヒト若しくはヒト化抗体は、癌の治療若しくは予防で使用するために好適である。これらの抗体様分子において、突然変異は、ダイ

40

50

マー形成を防ぐ若しくは最小化するために導入することができる。MUC1*機能は、リガンド誘導二量体化によって活性化されるので、一価若しくは二重特異的な抗MUC1*抗体は好適である。典型的な結合分析は、NME1とNME7が、MUC1*のPSMGFRペプチド部分に結合することを示す(図2 A~Dは、)。さらに、それらは、もし10C末端アミノ酸が欠失の場合、それらがPSMGFRペプチドに結合しないので、これらの活性化成長因子が、MUC1*の膜近位部分に結合することを示す。同様に、抗MUC1*抗体MN-C2及びMN-E6は、10C末端アミノ酸が存在する場合のみ、PSMGFRペプチドに結合する(図2 B、C)。抗体、MN-C3及びMN-C8は、MN-C2及びMN-E6とは異なるエピトープに結合し、それらがPSMGFRペプチドの10C末端アミノ酸の存在に依存しない(図2E、F)。他に類を見ない抗体として又は二重特異抗体、BiTEs若しくはCARとも呼ばれる免疫細胞によって発現されたキメラ抗原リセプター中に取り込まれたものとして、抗体、MN-C2、MN-E6、MN-C3、若しくはMN-C8、若しくはそれら由来の断片は、すべて有力な癌治療剤である。

10

【0183】

他に類を見ない抗体治療薬として、又はBiTE若しくはCARへの取り込みに、使用される治療用抗MUC1*抗体は、特異性の基準に基づいて選択することができる。親抗体は、動物中の単クローン抗体を生成する典型的な方法を使用して生成することができる。若しくは、それらはMUC1*ペプチドに結合する能力について、抗体及び抗体断片ライブラリーをスクリーニングすることにより選択することができる。それは、

PSMGFRペプチド(配列番号: 2)、

SNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQYKTEAASRY(配列番号: 620);若しくは

SVVVQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQYKTEAASRY(配列番号: 621)

でありうる。

20

【0184】

このように生成され若しくは選択された得られた抗体若しくは抗体断片は、次いで、追加のスクリーン(選別)をへるによりさらに選択することができる。例えば、抗体または抗体断片は、MUC1*の陽性癌細胞若しくは組織に結合するが、MUC1陰性の癌細胞若しくは組織には結合しない能力に基づいて、より好適になりえる。さらに、抗MUC1*抗体若しくは抗体断片は、それらが幹若しくは始原細胞に結合するならば、抗癌治療薬として、脱落させることができる。抗MUC1*抗体若しくは抗体断片は、それらがMUC1*へのリガンドを活性化する結合を競合的に阻害する能力を持っているならば、より好適になる。

30

図3A~Cは、MN-E6及びMN-C2が、MUC1*へのリガンドNME1及びNME7を活性化する結合を競合的に阻害することを示す。MUC1陽性癌と、MUC1陽性癌になるリスクで、若しくはMUC1陽性癌を持つことが疑われる、と診察された患者の治療で使用される抗MUC1*抗体の選択プロセスは、抗体若しくは抗体断片を選択する次のステップの1つ以上を含む；

1)PSMGFRペプチドへ結合すること；

2)N-10 PSMGFRペプチドへ結合すること；

3)癌細胞へ結合すること；

4)幹または始原細胞に結合しないこと；そして、

5)競合的に、PSMGFRペプチドへの、二量体NME1若しくはNME7-ABの結合を阻害されること

。

40

例えば、図3A~Cは、単クローンMN-E6及びMN-C2は、5つの基準をすべて満たし、一方単クローンMN-C3及びMN-C8は、リガンドNME1及びNME7を活性化する結合を、競合的に阻害しない(図3C)。しかしながら、MN-C3及びMN-C8に由来した抗体または抗体断片は、これらの方法では、免疫細胞の殺効果がリガンドを活性化する結合を阻害する能力より重要であるので、BiTEまたはCARへ統合された時、抗がん剤として等しく有力である。さらに、MN-E6、MN-C2、MN-C3若しくはMN-C8に結合した毒性物質は、有力な癌治療剤である。MUC1*成長因子リセプターが、その細胞外ドメインのリガンド誘導二量体化によって活性化されることに留意がいる。したがって、治療の理想的な抗体は、MUC1*細胞外ドメインを二量化させるべきではない。むしろ、適切な抗体は、この点に関して、ラマとラクダで生成されたもののような一価抗体、Fab、scFvの、単一領域抗体(sdAb)、それがホモ二量化しな

50

いように、Fc部分が構築されているかぎり、scFv-Fcを含む。

【0185】

FACSスクリーンは、抗MUC1*抗体MN-C2、MN-E6、MN-C3及びMN-C8が、MUC1*陽性癌細胞及びMUC1*トランスフェクト細胞には結合するが、非MUC1*若しくはMUC1陰性細胞には結合しないことを示す。1例において、ヒト化MN-C2 scFvは、ZR-75-1、aka 1500、MUC1*陽性乳癌細胞に結合することが示されている(図4A~C)。MN-E6は、それらがMUC1*でトランスフェクトされた場合のみ、MUC1陰性HCT-116結腸癌細胞へ結合することが示された。MN-E6も又、ZR-75-1、 aka 1500、MUC1*陽性乳癌細胞のようなMUC1*陽性癌細胞に結合する(図4 D-F)。ELISA、免疫蛍光法などのような結合分析は、すべては、MN-C2及びMN-E6が、PSMGFRペプチドに及び生きたMUC1陽性癌細胞に結合することを証明する。ヒト化抗MUC1*抗体は、またPSMGFRペプチド若しくはMUC1陽性癌細胞に結合するそれらの能力に基づいて選択される。図5は、ヒト化MN-C2 scFvが、約333nMのEC-50で、MUC1*ペプチドPSMGFRへの高い親和性をもって結合することを示す。ヒト化MN-C2 scFvは、Fabのように、図6 A、Bの1例において示されるように、強力に、MUC1*陽性癌細胞の増殖を阻害する。

10

【0186】

MN-E6とMN-C2のFab、若しくはそれらに由来した比較可能な一本鎖可変部位は、生体内及び生体外で、MUC1*陽性癌の増殖を強力に阻害する。いくつかの例において、抗MUC1*抗体のFabは、ヒトMUC1*陽性癌の増殖を生体内で阻害した。1つのケースでは、免疫妥協(compromised)マウスに、ヒト乳癌が移植され、移植後、FabMN-E6で処置された。

図7Aは、FabMN-E6が、強力に、MUC1*陽性乳癌の増殖を阻害したことを示す。90日間発情ホルモン物質ペレット剤が注入された雌のニュー/ニュー・マウスに、Matrigelで50/50に調合された600万のT47Dヒト乳癌細胞を移植された。少なくとも150 mm³で、腫瘍容積の3連続の増加があった腫瘍担持マウスが、処置のために選ばれた。動物は、80mg/kg MN-E6 Fabで週当たり2度皮下注入され、また、同じ選択基準に適合する等しい数のマウスが、ビヒクルを単独で注入された(A)。別の観点では、MN-E6が、前立腺癌の増殖を停止させることが示された。

20

図7Bは、MN-E6Fabが、MUC1*陽性前立腺癌の増殖を強力に阻害したことを示す。オスのNOD/SCIDマウスに、Matrigelで50/50に調合された600万のDU-145ヒト前立腺癌細胞が注入された。少なくとも150 mm³で、腫瘍容積の3連続の増加があった腫瘍担持マウスが、処置に選ばれた。動物は、48時間ごとに160mg/kgMN-E6Fabを皮下注入され、また、同じ選択基準に適合する等しい数のマウスが、ビヒクルを単独で注入された(B)。腫瘍は、2人の研究者によって独立して週当たり2度測定され記録された。統計は、各々0.0001のP値を与え、独立した統計家によって盲目的に計算された。

30

抗MUC1*Fabは、乳癌増殖及び前立腺癌増殖を阻害した。治療は、ウェイト、骨髄細胞のタイプ若しくは数に、影響がなかった。FabMN-E6は、腫瘍の増殖を有効に阻害し、一方、対照群の腫瘍は、殺処理まで成長し続けた。処置の副作用は、観察されなかったし検出されなかった。

【0187】

Fabのように、モノマーである、組み換えMN-E6が構築された。このケースで、MN-E6はヒト化された。抗体のヒト化については、当業者に知られる多くの方法がある。ヒト化に加えて、ヒト抗体のライブラリーは、PSMGFRに結合する他の完全ヒト抗体を同定するためにスクリーニングされうる。scFvと呼ばれる、ヒト化MN-E6可変領域一本鎖が、遺伝子的に操作調製され、該抗体のFc部分に接続された(配列番号: 256と257)。Fc部位は、治療用に使用のための抗体断片にある有益性を与える。抗体のFc部分は、補体を補充し、一般的な意味で、それは、免疫系の他の観点を補充し、このように、標的を単に阻害すること以上に、抗腫瘍性反応を増幅することができる。

40

Fc部分の付加は、さらに抗体断片の半減期を増加させる(Czajkowsky DM, Hu J, Shao Z and Pleass RJ. (2012) Fc-fusion proteins: new developments and future perspectives. *EMBO Mol Med.* 4(10): 1015- 1028)。しかしながら、抗体のFc部分はホモ二量化し、それは治療における抗MUC1*抗体の場合には、MUC1*リセプタのリガンド誘導二量体化が増

50

殖を刺激するので、最適ではない。

図13 Bで見ることができるよう、ヒト化MN-E6scFv-Fcは、部分的に、ジスルフィド結合による、二量体である。したがって、ダイマー型に抵抗するFc部位の突然変異は、抗MUC1*抗癌治療治療のために好適である。

ヒンジ部の欠失(いくつかの図及び実施例の配列番号: 288と289で、ヒンジレスはデルタヒンジ若しくはDhingeとも呼ばれた)、及び二量体化抵抗性Fc突然変異体にする、Fc部位の他の突然変異が、作られた。

モノマーのscFv-Fc融合蛋白質を調製するために、次の突然変異が、CH3領域で作られた: Y407R (配列番号: 278 及び 279), F405Q (配列番号: 280 及び281), T394D (配列番号: 282 及び 283), T366W/L368W (配列番号: 284 及び285), T364R/L368R (SE ID NO: 286 及び 287)。

図14は、非還元ゲル剤における、精製MN-E6scFv-Fc融合蛋白質のSDS-PAGE特性の写真を示し、そこではMN-E6に融合されたFc部分は、野生型(wt)若しくは以下のように変異させられた: A) F405Q, Y407R, T394D; B) T366W/L368W, T364R/L368R, T366W/L368W若しくはT364R/L368R。Fc突然変異体F405Q, Y407R, T366W/L368W, T364R/L368R, T366W/L368W及びT364R/L368Rはすべて、ダイマー型よりモノマーを好適とした。

図15は、プロテインAアフィニティカム上で低IgG FBS中で育てられたMN-E6 scFv-Fc Y407Q融合蛋白質の精製のFPLCトレースを示す。

A)は、通り抜けフローのトレースである。

B)は、溶離のトレースである。

タンパク質は、S200カラムでのサイズ排除によってさらに精製された(C)。

D)は、どの分画がモノマーの優位を持っていたかを示すSDS-PAGEゲルの写真である。

図16は、非還元ゲル上で、精製MN-E6scFv-Fc突然変異体融合蛋白質のSDS-PAGE特性の写真を示し、そこではMN-E6 scFvに融合されたFc部分が、野生型(wt)だった若しくはFcのヒンジ部の消失「DHinge」によって変異させられた若しくはFcのヒンジ部は消失し及びY407R突然変異を担持する。Fc突然変異体は、すべてダイマー型よりモノマーを好適とした。示された突然変異のための参照構築物アミノ酸配列は配列番号:273である。他の適切な配列は、配列番号:289と279である。

図17A~C。A及びBは、それがモノマーであることを示している、MN-E6 scFv-Fcヒンジレス突然変異体の大規模発現と精製の、非還元SDS-PAGE特性の写真を示す。MN-E6 scFv-Fcヒンジレス突然変異体のFPLC特性及び精製は(C)に示されている。

図18A~Cは、非還元ゲル(A)若しくは還元ゲル(B)上での、精製MN-C3 scFv-Fc融合蛋白質の、SDS-PAGE特性の写真を示す。タンパク質は、サイズ排除によって精製された。FPLCトレースは、(C)に示されている。

図19 A-Bは、MN-C3若しくはMN-E6 Fab、scFv、scFv-Fcのネイティブゲルの写真を示し、そこで、Fc部は、野生型である、若しくはモノマーを好むか若しくはもっぱらモノマーである突然変異体である。ネイティブゲル剤は、Y407R Fc突然変異(A)及び二重突然変異体Y407R及び欠失ヒンジ(B)は、最上で、二量体に対してモノマーも好適とする。タンパク質が、典型的な使用濃度よりはるかに高い濃度でゲルに装填されていることに注意されたい。他のFc突然変異体のダイマー型は、単に、装填濃度が非常に高いという事実を反映しうる。

【0188】

いくつかの突然変異若しくは欠失は、非常に有効で、それらは、高濃度でゲルに装填せられた時でさえ、ダイマー形成に抵抗する(図14 A, B)。Y407R突然変異は、二量体scFv-Fcのほとんど純粋な個体群になる(図10)。同様に、Fcのヒンジ部の欠失は、二量体というよりむしろモノマーである融合蛋白質になる。突然変異のコンビネーションは、ダイマー形成のより有効な抵抗に帰着しうる(図16及び17)。これら及び他の突然変異及びそれらのコンビネーションは、CH2-CH3(配列番号: 274と275)及びscFvのようなCH3(配列番号: 276と277)融合蛋白質へ導入され、若しくはscFvのようなヒンジレスFc融合蛋白質で導入され、そして、二量体化を排除するか最小化することが示された。

10

20

30

40

50

【0189】

一本鎖構築物scFv、scFv-Fc融合体若しくはscFv-Fc突然変異体と同様に、親マウス単クローン抗体のように、ヒト若しくはヒト化抗体は、特異的に合成MUC1*ペプチドに結合する(図20-22)。図E23は、ヒト化MN-E6 scFv-Fcデルタヒンジ、akA Dhinge若しくはhingeless、ヒト化MN-E6 scFvのMUC1*ペプチドPSMGFRへの結合を定量するELISA分析のグラフを示す。

【0190】

ここで記述されたヒト若しくはヒト化抗MUC1*抗体断片は、MUC1及びMUC1*陽性癌細胞に特異的に結合する。図24は、免疫蛍光法実験の写真を示し、そこで、ヒト化MN-C2 scFvがMN-E6 scFvは、同一の濃度依存のやり方で、MUC1*陽性乳癌細胞に特異的に結合する。

AG: 示された濃度でのT47D乳癌細胞へのhu MN-C2 scFv結合。

H-Nは、蛍光性ラベル付加scFv及びDAPIを示す。

O-U: 示された濃度でのT47D乳癌細胞へのhu MN-E6 scFv結合。

V-B'は、蛍光性ラベル付加scFv及びDAPIを示す。

C'は、2次抗体コントロールである。

【0191】

MUC1*陽性癌細胞に結合することに加えて、抗MUC1*抗体可変領域断片、scFv'、scFv-Fc'及びscFv-Fc突然変異体は、MUC1陽性癌細胞の増殖を阻害した。

図25 A~Lは、通常培地若しくはヒト化MN-E6 scFvが存在する状態で培養されたMUC1*陽性乳癌細胞の写真を示す。写真は、5 µg/mL及び500 µg/mLのより大きな影響での、MN-E6 scFvによる、MUC1*陽性細胞の死滅及び/または増殖阻害を示す。

図26 A~Lは、通常培地若しくはヒト化MN-E6 scFv Dhinge、ヒンジレスかデルタヒンジ突然変異体である、が存在する状態で培養されたMUC1*陽性乳癌細胞の写真を示す。写真は、5 µg/mL及び50 µg/mLのより大きな影響で及び100 µg/mLのさらに大きな影響で、MN-E6 scFvDhingeによる、MUC1*陽性細胞の死滅及び/または増殖阻害を示す。

図27は、図25及び26の蛍光画像の画像分析のグラフを示す。イメージJは、ヒト化MN-E6 scFv若しくはMN-E6 scFv-Fcデルタヒンジ、akA Dhinge、での96時間処置の後に残存する細胞の数の定量のために使用された。

分析ソフトウェアは、各写真の細胞の数の定量のために、ピクセルを数えること及びピクセル蛍光強度を使用する。分析は、全イメージ512X512ピクセル、8ビットのイメージ上で行なわれた。比較のために、マウス単クローンMN-E6Fabの阻害も分析された。

【0192】

これらのデータは、ヒト若しくはヒト化MN-E6抗体若しくは抗体断片、Fab、MN-E6 scFv若しくはhu MN-E6 scFv-Fc_{mut}は、MUC1若しくはMUC1*陽性癌、MUC1若しくはMUC1*陽性癌を持つ疑いをかけられた、若しくはMUC1若しくはMUC1*陽性癌進展のリスクをもつ、と診断された人に投与することができる、有効な制癌剤である。

【0193】

これらの個々の実施例において、抗体断片若しくはscFvに融合された2量体抵抗性Fcは、hu MN-E7 scFvである。しかしながら、二量体化を排除するか最小化するこれらのFc部位突然変異若しくはそのコンビネーションのうちのもので、MN-E6、MN-C2、MN-C3、MN-C8抗体若しくは他の抗体、それは癌細胞若しくは組織に存在するのでMUC1*に選択的に結合すると同定された、の可変領域断片か一本鎖構築物に融合されうる。さらに、これらの抗体のFabは、抗癌治療剤として使用することができる。

本発明の1つの観点で、MUC1若しくはMUC1*陽性癌、MUC1若しくはMUC1*陽性癌を持つ疑いをかけられた、若しくはMUC1若しくはMUC1*陽性癌進展のリスクをもつ、と診断された人は、有効な量のヒト若しくはヒト化MN-E6scFv、MN-C2 scFv、MN-C3 scFv若しくはMN-C8 scFvで処置できる。

本発明の別の観点で、MUC1若しくはMUC1*陽性癌、MUC1若しくはMUC1*陽性癌を持つ疑いをかけられた、若しくはMUC1若しくはMUC1*陽性癌進展のリスクをもつ、と診断された人は、有効な量のヒト若しくはヒト化MN-E6SCFV-FC_{Y407R}及びMN-C2 scFv-Fc_{Y407R}及びMN-C3

10

20

30

40

50

scFv-Fc_{y407R}で処置できる。

本発明の別の観点で、MUC1若しくはMUC1*陽性癌、MUC1若しくはMUC1*陽性癌を持つ疑いをかけられた、若しくはMUC1若しくはMUC1*陽性癌進展のリスクをもつ、と診断された人は、有効な量のヒト若しくはヒト化MN-E6scFv-Fc mutant_{Dhinge}、MN-C2 scFv-Fc mutant_{Dhinge}、MN-C3 scFv-Fc mutant_{Dhinge}若しくはMN-C8 scFv-Fc mutant_{Dhinge}で処置できる。

さらに本発明の別の観点で、MUC1若しくはMUC1*陽性癌、MUC1若しくはMUC1*陽性癌を持つ疑いをかけられた、若しくはMUC1若しくはMUC1*陽性癌進展のリスクをもつ、と診断された人は、有効な量のヒト若しくはヒト化MN-E6scFv-Fc mutant_{y407R-Dhinge}、MN-C2 scFv-Fc mutant_{y407R-Dhinge}、MN-C3 scFv-Fc mutant_{y407R-Dhinge}若しくはMN-C8 scFv-Fc mutant_{y407R-Dhinge}で処置できる。

本発明の一の観点で、MUC1若しくはMUC1*陽性癌、MUC1若しくはMUC1*陽性癌を持つ疑いをかけられた、若しくはMUC1若しくはMUC1*陽性癌進展のリスクをもつ、と診断された人を処置する方法であり、患者は、有効な量のモノマーMN-E6 scFv、MN-C2 scFv、MN-C3 scFv、MN-C8 scFv、若しくはMN-E6 scFv-Fc、MN-C2 scFv-Fc、MN-C3 scFv-Fc、MN-C8 scFv-Fcを投与され、そこでは抗体様タンパク質のFc部分は変位され、それがダイマー形成に抵抗する。

【0194】

ヒト化

【0195】

MUC1*細胞外ドメインへ結合する、ヒト化抗体若しくは抗体断片、若しくは完全ヒト化抗体は、治療使用のために好適である。ヒト化抗体のためにここに記述された技術は、当業者に知られていた様々な方法の少数である。本発明は、抗体をヒト化するために使用される該技術によって制限されるのが目的ではない。

【0196】

ヒト化は、その結合特異性及び親和性を変更せずに、治療の抗体、通常マウス単クローン抗体、の非ヒトの部位をヒトものに取り替える操作である。ヒト化の主なゴールは、ヒトに投与された時の治療用単クローン抗体の免疫原性を減少することである。別個の3つのタイプのヒト化が可能である。第1に、キメラ抗体は、抗体の非ヒト定常領域をヒト定常領域に取り替えることにより作られる。そのような抗体は、マウスFab部位を含み、ヒト配列の約80-90%を含む。第2に、ヒト化抗体は、ヒトCDR(CDR移植法)に交換して、ヒト化抗体の可変領域上にマウスCDR部位(結合特異性を担う)を移植することにより作られる。そのような抗体は、ヒト配列の約90-95%を含む。第3に、そして最後に、ファージディスプレイによって、そこではヒト化抗体のライブラリーが抗原特異ヒト抗体を選択するためにスクリーニングされる、若しくはヒト化抗体を発現している遺伝子組み換えのマウスを免疫することによって、完全ヒト抗体(100%のヒト配列)は、調製することができる。

【0197】

抗体をヒト化するための一般的な技術は、ほぼ以下のように履行されている。単クローン抗体が、宿主動物、典型的にはマウス、で生成される。その後、単クローン抗体は、標的に結合する親和性と特異性についてスクリーニングされる。所望の効果があり、所望の特性もつ単クローン抗体が同定されれば、それ配列が特定される。その後、動物に生成された抗体の配列は、動物抗体へ最も相同である配列をもったヒト化抗体を見つけるために、多くのヒト化抗体の配列とアラインされる。生化学技術は、ヒト化抗体配列及び動物抗体配列をともにつなげるために使用される。典型的には、非ヒトCDRは、非ヒト抗体への最も高い相同があるヒト化抗体へつながれる。このプロセスは、どの抗体または複数の抗体が、所望の親和性及び特異性を持つかを同定するために必要な、多くの候補ヒト化抗体を生成することができる。

【0198】

一旦、ヒト抗体若しくはヒト化抗体が生成されたならば、それは、さらにFab断片として、完全抗体として、又はscFv若しくはscFv-Fcのような可変領域を含んでいる一本鎖状分

子のような抗体様物質として使用のために修飾することができる。ある場合には、抗体のFc部分を、若しくは、それが二量化しないようなものに変異させた、抗体様分子をもつことが好適である。

【0199】

非ヒト種において生成された抗体へヒト配列を導入する方法に加えて、完全ヒト抗体は、抗原のペプチド断片でヒト化抗体ライブラリーをスクリーニングすることにより得ることができる。MN-E6若しくはMN-C2のように機能する完全ヒト抗体は、PSMGFR N-10ペプチドの配列をもつペプチドで、ヒト抗体ライブラリーをスクリーニングすることにより生成されうる。MN-C3若しくはMN-C8のように機能する完全ヒト抗体は、PSMGFR C-10ペプチドの配列をもつペプチドで、ヒト抗体ライブラリーをスクリーニングすることにより生成されうる。

10

【0200】

ヒト化抗MUC1*抗体は、マウス単クローン抗体MN-E6、MN-C2、MN-C3及びMN-C8の配列に基づいて生成された。本発明の1つの観点では、MUC1*陽性癌をもつと診断された患者が、有効な量のヒト化MN-E6、MN-C2、MN-C3若しくはMN-C8で処置される。好ましい態様では、MUC1*陽性癌をもつと診断された患者が、有効な量のヒト化MN-E6、MN-C2で処置される。本発明の別の観点で、MUC1*陽性癌をもつと診断された患者が、有効な量のヒト化一価MN-E6、MN-C2、MN-C3若しくはMN-C8で処置され、そこでは一価とは、相当するFab断片、相当するscFv若しくは相当するscFv-Fc融合体を意味する。好ましい態様では、MUC1*陽性癌をもつと診断された患者が、有効な量のヒト化scFv又はMN-E6若しくはMN-C2の一価ヒト化scFv-Fcで処置される。MUC1*成長因子リセプターが、その細胞外ドメインのリガンド誘導二量化によって活性化され、また、抗体のFc部分がホモ二量化するので、Fc部分を含んでいる構築物は二量化を阻止するか最小化する変位Fc部位を使用することが好適である。

20

【0201】

MUC1*リセプターの細胞外ドメインのPSMGFR(配列番号:2)ペプチドに結合する抗体は、MUC1*陽性癌の治療か予防に有効である、有力な癌治療治療薬である。それらは、リガンド二量体のNME1(配列番号:3と4)及びNME7(配列番号:5と6)を活性化する、MUC1*細胞外ドメインへの結合を阻害することが示された。特異的に、PSMGFR配列に結合する抗MUC1*抗体は、それらがリガンド誘導リセプター二量化を阻害する場合、MUC1*陽性癌細胞の増殖を阻害する。抗MUC1*抗体のFabは、動物での、腫瘍成長を阻むことが実証された。したがって、MUC1*細胞外ドメインへ結合する抗体若しくは抗体断片は、ガン組織がMUC1*を発現する癌の治療には有益である。

30

【0202】

MUC1*のPSMGFR部位へ結合するか、合成PSMGFRペプチドに結合する抗体は好適である。本発明者は、MUC1*細胞外ドメインへ結合するいくつかの単クローン抗体を同定した。このグループには、マウス単クローン抗体MN-E6、MN-C2、MN-C3及びMN-C8があり、それらの可変領域は配列決定され、MN-E6について配列番号12-13と65-66、MN-C2について配列番号18-119と168-169、MN-C3について配列番号413-414と458-459、そしてMN-C8について配列番号505-506と543-554が与えられている。これらの抗体のCDRは、抗体の認識ユニットを構築し、ヒト化抗体へつなぐ場合、保持されるべきマウス抗体の最も重要な部分である。各マウス単クローンのCDRの配列は以下のとおりで、軽鎖が重鎖配列に後続する：

40

MN-E6 CDR1(配列番号:16-17及び69-70)、CDR2(配列番号:20-21及び73-74)、CDR3(配列番号:24-25及び77-78)、MN-C2 CDR1(配列番号:122-123及び172-173)、CDR2(配列番号:126-127及び176-177)、CDR3(配列番号:130-131及び180-181)、MN-C3 CDR1(配列番号:417-418及び462-463)、CDR2(配列番号:421-422及び466-467)、CDR3(配列番号:425-426及び470-471)、MN-C8 CDR1(配列番号:507-508及び545-546)、CDR2(配列番号:509-510及び547-548)、CDR3(配列番号:511-512及び549-550)。

ある場合には、モデリングによって、CDRの3次元構造にとって重要であると思われる、フレームワーク領域の部分も、マウス配列から導入される。

【0203】

50

単クローン抗体MN-E6及びMN-C2は、MUC1*、それは幹細胞に現われる、へのより大きな親和性をもつ。それが幹細胞に現われるとともに、単クローン抗体MN-C3及びMN-C8にはMUC1*へのより大きな類似性がある。配列アラインメントによって、次のヒト抗体は、マウスCDRの置換が標的を認識する能力を保持した抗体になるように、マウス抗体に十分にホモローガスであるように選ばれた。

マウスMN-E6重鎖可変領域は、ヒトIGHV3-21*03重鎖可変領域(配列番号: 26-27)にホモローガスであり、また、軽鎖可変領域はヒトIGKV3-11*02軽鎖可変領域(配列番号:79-80)にホモローガスであった。マウスMN-C2重鎖可変領域は、ヒトIGHV3-21*04重鎖可変領域(配列番号: 132-133)にホモローガスであり、また、軽鎖可変領域は、ヒトIGKV7-3*01軽鎖可変領域(配列番号: 182-183)にホモローガスであった。マウスMN-C3重鎖可変領域は、ヒトIGHV1-18*04重鎖可変領域(配列番号: 427-428)にホモローガスであり、また、軽鎖可変領域は、ヒトIGKV2-29*03軽鎖可変領域(配列番号: 472-473)にホモローガスであった。マウスMN-C8重鎖可変領域は、ヒトIGHV3-21*04重鎖可変領域(配列番号: 513-514)にホモローガスであり、また、軽鎖可変領域は、ヒトZ00023軽鎖可変領域(配列番号: 551-552)にホモローガスであった。

10

【0204】

4つの抗体はすべてヒト化され、そのプロセスは各抗体のいくつかのヒト化形式に依存した。マウス抗体の可変領域に由来したCDRは、ホモローガスなヒト抗体可変領域配列へ生化学的につながれた。

MN-E6(配列番号: 38-39と93-94)、MN-C2(配列番号: 144-145と194-195)、MN-C3(配列番号: 439-440と486-487)及びMN-C8(配列番号: 525-526と543-544)のヒト化可変領域は、ホモローガスなヒト化抗体の可変領域へ、マウスCDRをつなぐことにより生成された。ヒト化重鎖可変構築物は、その後、ヒトIgG1重鎖定常領域(配列番号: 58-59)若しくはヒトIgG2重鎖定常領域(配列番号: 54-55)のいずれかの定常領域へ融合された。その際、それは、ヒト鎖(配列番号: 109-110)に融合したヒト化軽鎖可変構築物が、ヒト鎖(配列番号: 113-114)定常領域とペアになっている。他のIgGアイソタイプは、IgG3またはIgG4を含む定常領域として使用することができる。

20

【0205】

IgG2重鎖(配列番号: 52-53)中へ及びIgG1重鎖(配列番号: 56-57)中へのヒト化MN-E6可変領域、IgG1重鎖(配列番号: 158-159)中へ若しくは軽鎖(配列番号: 111-112と216-219)若しくは鎖(配列番号: 107-108と210-213)のいずれかとペアになったIgG2重鎖(配列番号: 163-164)へのヒト化MN-C2可変領域、そして、ヒト化MN-C3(配列番号: 455-456、453-454及び500-501、502-503)及びMN-C8(配列番号: 541-542、539-540及び579-580、581-582)抗体の例が、生成された。

30

それぞれのアイソタイプにそれ自身の特徴的活性があるので、どのIgG定常領域がヒト化可変領域へ融合されるかは所望の効果に基づく。ヒト定常領域のアイソタイプは、抗体依存性細胞傷害(ADCC)若しくは補体依存細胞毒性(CDC)が所望かどうか、さらに細胞ベースのタンパク質発現システムで生成される抗体の産生量に依存産出を信頼することというような事柄に基づいて選択される。好ましい態様では、ヒト化抗MUC1*抗体若しくは抗体断片は、MUC1陽性癌を持つ若しくはその展開のリスクをもつと診断された人に投与される。

40

【0206】

癌を持つ若しくはその展開のリスクをもつ人の治療にとっても役立つヒト化抗MUC1*抗体をテスト及び選択する1つの方法は、MUC1*細胞外ドメインへのリガンドを活性化する結合を阻害するそれらの能力に関して、それらをテストすることである。二量体のNME1は、MUC1*細胞外ドメインに結合し二量化させることができ、そしてそうすることで、癌細胞増殖を刺激する。したがって、NME1とMUC1*細胞外ドメインへの結合を競合する抗体及び抗体断片は、抗ガン剤である。NME7は、MUC1*の別の活性化リガンドである。ある場合には、MUC1*細胞外ドメインへの、NME7若しくはNME7欠失、分解産物の結合を阻害する抗体を同定することが望ましい。MUC1*細胞外ドメインへの結合に関し、NME7とNME7変種と競合する

50

抗体及び抗体断片は、癌治療治療剤として有用である。これらの抗体は、それらの抗体の scFv のような一本鎖バージョン及びそれらのヒト化バージョンと同様に、MN-E6、MN-C2、MN-C3、MN-C8 を含み、これらに制限されない。他の NME タンパク質は、さらに、NME6 と NME8 を含む MUC1* 若しくは MUC1 に結合する。MUC1* への結合について、これらのタンパク質と競合する抗体は、さらに治療剤として有用でありうる。好ましい態様では、ヒト化抗 MUC1* 抗体若しくは抗体断片は、MUC1 陽性癌を持つ若しくは MUC1 陽性癌になるリスクをもつと診断された人に投与される。もっと好ましい態様では、MN-E6 及び MN-C2 のヒト化配列に由来した、一本鎖抗体断片、若しくはモノマーの scFv-Fc 融合体は、MUC1 陽性癌を持つ若しくは MUC1 陽性癌になるリスクをもつと診断された人に投与される。

【0207】

一本鎖可変断片、scFv 又は一価抗体若しくは抗体様タンパク質になる他の形態も有用である。ある場合には、それが、MUC1* 細胞外ドメインの二量体化を防ぐことが好適である。一本鎖可変断片、Fab 及び他の一価の抗体様タンパク質は、MUC1* の細胞外ドメインへ結合及び MUC1* 二量体化のブロックに有効なことを示された。これら一本鎖可変断片、Fab 及び他の一価抗体様分子は、インビトロでそしてヒト MUC1 陽性癌細胞を異種移植された動物で、癌増殖を効果的にブロックする。したがって、ヒト化一本鎖可変断片若しくは一価の抗 MUC1* 抗体若しくは抗体様分子は、癌治療剤として非常に有用である。このようなヒト化一本鎖抗体、Fab 又は、MUC1* 細胞外ドメインへ若しくは PSMGFR ペプチドに結合する他の一価抗体様分子は、それゆえ、抗癌治療剤として有用である。抗 MUC1* 一本鎖可変断片が、ホモローガスな可変領域ヒト抗体のフレームワークへ、抗体、それらは MUC1* 細胞外ドメインへ結合する若しくは PSMGFR ペプチド結合する、の非ヒト CDR をつなぐことで、生成される。得られたヒト化重鎖及び軽鎖可変領域は、その後、適切なリンカーによって互いに接続され、ここで該リンカーはフレキシブル及び軽鎖への重鎖結合を許容する長さで、それは、軽鎖への重鎖の結合を許容するが、別のものの軽鎖へのある分子の重鎖の結合を阻止する。例えば約 10-15 残基のリンカー。好適には、リンカーは [(Glycine)₄(Serine)₁]₃ (配列番号: 401-402) を含んでいる、しかし他の配列が可能であるので、この配列に制限されていない。

【0208】

1 つの観点では、MN-E6 (配列番号: 38-39 と 93-94)、MN-C2 (配列番号: 144-145 と 194-195)、MN-C3 (配列番号: 439-440 と 486-487) 及び MN-C8 (配列番号: 525-526 と 565-566) のヒト化可変領域は、リンカーを経て重鎖及び軽鎖を接続する構築物へ生化学的に接続されている。MN-E6、MN-C2、MN-C3 及び MN-C8 の可変領域からのヒト化配列を含む、ヒト化一本鎖抗 MUC1* 抗体の例が生成された。

いくつかのヒト化 MN-E6 一本鎖タンパク質は生成された (配列番号: 232-237)。

いくつかのヒト化 MN-C2 一本鎖タンパク質は生成された (配列番号: 238-243)。

いくつかのヒト化 MN-C3 一本鎖タンパク質は生成された (配列番号: 244-249)。

いくつかのヒト化 MN-C8 一本鎖タンパク質は生成された (配列番号: 250-255)。

好ましい態様の中で、可変構築物断片を含んでいる、ヒト化抗 MUC1* 抗体断片、scFv 抗体断片 MN-E6 scFv、MN-C2 scFv、MN-C3 scFv、若しくは MN-C8 scFv は、MUC1 陽性癌を持つ若しくは MUC1 陽性癌になるリスクをもつと診断された人に投与される。もっと好ましい態様では、MN-E6 及び MN-C2 のヒト化配列に由来した可変断片のような、一本鎖抗体断片は、MUC1 陽性癌を持つ若しくは MUC1 陽性癌になるリスクをもつと診断された人に投与される。

【0209】

別の観点では、MN-E6 (配列番号: 38-39 と 93-94)、MN-C2 (配列番号: 144-145 と 194-195)、MN-C3 (配列番号: 439-440 と 486-487) 及び MN-C8 (配列番号: 525-526 と 565-566) のヒト化可変領域は、抗体の Fc 部分をさらに含んでいる、一本鎖可変断片、scFv、へ生化学的につながれている。抗体の Fc 部位へ融合された MN-E6、MN-C2、MN-C3 及び MN-C8 のヒト化一本鎖可変断片の例が生成された (配列番号: 256-257、260-261、264-265 及び 268-269)。

Fc 部位の含有物は、いくつかの目的に役立つ。それは、抗体断片の分子量を増加させ、崩壊を遅くし、半減期を増加させる。Fc 部位は、さらに腫瘍部位への免疫系補体を補充す

10

20

30

40

50

る。さらに、2次抗体がFc部分を検出しラベルを付けるので、抗体Fc部位の添加は、scFvを便利な診断ツールにする。しかしながら、Fc部分は、ホモ二量化する。したがって、scFv-Fcは、二価であり、MUC1*成長因子リセプターを二量化させ、活性化する。

MUC1*二量化を引き起こす欠点なしで、抗MUC1*scFvに付けられたFcをもつことの有益性を得るために、Fc部位はFcホモ二量化を最小化するか除去するために変異させられる。モノマーのscFv-Fc融合蛋白質を調製するために、次の突然変異がCH3領域で作られた:Y407R(配列番号:278と279)、F405Q(配列番号:280と281)、T394D(配列番号:282と283)、T366W/L368W(配列番号D:284と285)、T364R/L368R(配列番号:286と285)。

それらの突然変異のどんなコンビネーションも、テストすることができ、Fc(配列番号:272-273)、CH2-CH3(配列番号:274-275)若しくはCH3(配列番号:276-277)融合タンパク質中へ、又はヒンジレスFc融合蛋白質(配列番号:288-289)において、導入することができた。

【0210】

本発明の1つの観点では、MUC1陽性癌を持つ若しくはMUC1陽性癌になるリスクをもつと診断された人を処置する方法に関し、有効な量のモノマーMN-E6scFv、MN-C2 scFv、MN-C3 scFv、MN-C8 scFv、若しくはMN-E6 scFv-Fc及びMN-C2 scFv-Fc及びMN-C3 scFv-Fc及びMN-C8 scFv-Fcが該患者に投与され、そこでは、抗体可変断片部分は、ヒト若しくはヒト化され、そして、そこではそれがダイマー形成に抵抗するように、抗体様タンパク質のFc部分は変位された。

【0211】

CAR T及び癌免疫療法技術

【0212】

本発明の別の観点では、抗MUC1*抗体断片一本鎖部分のうちいくつか若しくはすべては、いくつかの異なるキメラ抗原リセプター、'CAR'戦略、を使用して、免疫系分子上に生化学的に融合されている。考え方は、免疫系を活性化する信号を送信することができる細胞質尾部及び膜貫通領域をもつ免疫系分子に、典型的に一本鎖可変断片のような、抗体の認識部分を融合させることである。認識ユニットは、抗体断片、一本鎖可変断片、scFv若しくはペプチドでありえる。

1つの観点で、CARの細胞外ドメインの認識部分は、MN-E6(配列番号:38-39と93-94)、MN-C2(配列番号:144-145と194-195)、MN-C3(配列番号:439-440と486-487)及びMN-C8(配列番号:525-526と565-566)のヒト化可変領域からの配列を含む。別の観点では、それは一本鎖可変断片からの配列を含む。

単一鎖構築物の例が与えられている。

いくつかのヒト化MN-E6一本鎖タンパク質、scFv、が生成された(配列番号:232-237)。

いくつかのヒト化MN-C2一本鎖タンパク質、scFv、が生成された(配列番号:238-243)。

いくつかのヒト化MN-C3一本鎖タンパク質、scFv、が生成された(配列番号:244-249)。

いくつかのヒト化MN-C8一本鎖タンパク質、scFv、が生成された(配列番号:250-255)。

CARの膜貫通部位は、近位の細胞質の共刺激的な領域の膜貫通部位を含む、CD8、CD4、抗体領域若しくは他の膜貫通部位に由来しうる。CARの細胞質尾部は、免疫系賦活をシグナルする1つ以上のモチーフを含む。細胞質のシグナリングモチーフのこのグループは、時々共刺激細胞質領域とリファーされる、限定されないが、CD3-zeta、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICAM-1、LFA-1、ICOS、CD2、CD5、CD7及びFc受容体ガンマ領域を含む。最小のCARは、CD3-zeta若しくはFc受容体ガンマ領域を持ち得、上記領域の1つ若しくは2つが、細胞質尾部でタンデムにある。1つの観点では、細胞質尾部は、CD3-ZETA、CD28、4-1BB及び/またはOX40を含む。

ヒト化MN-E6 CARのいくつかの例が生成された:

CAR MN-E6 CD3z(配列番号:294-295);

CAR MN-E6 CD28/CD3z(配列番号:297-298);

CAR MN-E6 4-1BB/CD3z(配列番号:300-301);

CAR MN-E6 OX40/CD3z(配列番号:616-617);

10

20

30

40

50

CAR MN-E6 CD28/OX40/CD3z(配列番号: 618-619);
 CAR MN-E6 CD28/4-IBB/CD3z(配列番号: 303-304)。
 ヒト化MN-C2 CARのいくつかの例が生成された:
 CAR MN-C2 CD3z(配列番号: 606-607);
 CAR MN-C2 CD28/CD3z(配列番号: 608-609);
 CAR MN-C2 4-IBB/CD3z(配列番号: 610-611);
 CAR MN-C2 OX40/CD3z(配列番号: 612-613);
 CAR MN-C2 CD28/4-IBB/CD3z(配列番号: 306-307);
 CAR MN-C2 CD28/OX40/CD3z(配列番号: 614-615)。

ヒト化MN-C3 CARが生成された:
 CAR MN-C3 4-IBB/CD3z(配列番号: 600-601)。

10

【0213】

異なるヒンジ部(配列番号: 345-360)をもったヒト化MN-E6 CARのいくつかの例が生成された:

CAR MN-E6-Fc/8/41BB/CD3z(配列番号: 310-311);
 CAR MN-E6 FcH/8/41BB/CD3z(配列番号: 315-316);
 CAR MN-E6 Fc/4/41BB/CD3z(配列番号: 318-319);
 CAR MN-E6 FcH/4/41BB/CD3z(配列番号: 321-322);
 CAR MN-E6 IgD/8/41BB/CD3z(配列番号: 323-324);
 CAR MN-E6 IgD/4/41BB/CD3z(配列番号: 327-328);
 CAR MN-E6 X4/8/41BB/CD3z(配列番号: 330-331);
 CAR MN-E6 X4/4/41BB/CD3z(配列番号: 333-334);
 CAR MN-E6 8+4/4/4のIBB/CD3z(配列番号: 336-337)。

20

さらに、いくつかのヒト化MN-C3一本鎖可変断片及びヒト化MN-C8一本鎖可変断片も生成された。

【0214】

MUC1*標的化CAR細胞外ドメイン認識ユニットは、MUC1*若しくはPSMGFRペプチドのPSMGFR部分に結合する、ヒト化MN-E6、MN-C2、MN-C3若しくはMN-C8若しくは他の抗体の可変領域を含むことができる。1つの観点では、CARの細胞外ドメイン認識ユニットは、ヒト化MN-E6、MN-C2、MN-C3若しくはMN-C8一本鎖可変断片scFvから本質的に構成されている。CARの膜貫通部位は、CD8(配列番号: 363-364)に由来することができ、若しくはCD3-ZETA、CD28、41bb、OX40若しくは他の膜貫通部位(配列番号: 361-372)の膜貫通領域でありえる。そして、MUC1*細胞外ドメインを標的とする抗体断片をもつCARの細胞質領域は、免疫系共刺激細胞質領域を含むグループから選ばれた一つ若しくは二つを含みえる。免疫系共刺激領域のグループは、限定されないが、CD3-zeta、CD27、CD28、4-IBB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICAm-1、LFA-1、ICOS、CD2、CD5、CD7及びFc受容体ガンマ領域(配列番号: 373-382)を含む。若しくは、CARの認識ユニット部分は、当該ペプチドが標的に結合するペプチドを含むことができる。NME7は、MUC1*に結合し活性化する。

30

本発明の1つの観点では、CARの認識ユニットは、NME7(配列番号: 5-6)に由来したペプチド若しくはNME7に由来したペプチドであり、それは、限定されないが、NME7ペプチドA1(配列番号: 7)、NME7ペプチドA2(配列番号: 8)、NME7ペプチドB1(配列番号: 9)、NME7ペプチドB2(配列番号: 10)及びNME7ペプチドB3(配列番号: 11)を含む。

40

【0215】

CARを生成するためのいくつかの戦略は、それ自体で二量化する分子の一部を含んでいる。ある場合には、標的の二量化は望ましくない。したがって、それらがヘテロ二量化するように、CARは構築することができる。1つのケースでは、第一のCARの認識ユニットは、第一の標的に結合し、その一方で第二のCARの認識ユニットは、第二の標的に結合する。両方の認識ユニットは、抗体断片でありえ、両方はペプチドでありえ、若しくは、一つは抗体断片で他方はペプチドでありえる。

CARの第一の標的はMUC1*細胞外ドメインでありえる。CARの認識ユニットは、MUC1*細胞

50

外ドメインに若しくはPSMGFRペプチドに結合する抗体断片で構成されうる。若しくは、CARの認識ユニットは、MUC1*細胞外ドメインに結合するペプチドで構成され、そのようなペプチドは、NME1若しくはNME7のようなNMEタンパク質に由来したペプチド、特に配列番号：7-11としてリストされたNME7由来ペプチドを含む。

異種ダイマーCARの第二の標的は、NME7に結合するペプチド若しくは抗体断片でありうる。若しくは、異種ダイマーCARの第二の標的は、PD1若しくはMUC1*提示セル上の他の標的に結合するペプチド若しくは抗体断片でありうる。第二の標的は、NME1に結合するペプチド若しくは抗体断片でありうる。

CARによって引き起こされたMUC1の二量体化を防ぐことは望ましいので、異種ダイマーCARは、1つの分子の細胞外ドメインだけが標的(配列番号：584-587)に結合する細胞外認識ユニットを持つように、構築することができる。別の分子は、標的認識ユニット若しくは抗体断片(配列番号：588-599)が欠けている欠失細胞外ドメインをもつことができる。記述されたCARは、免疫系の細胞へトランスフェクトするか形質導入することができる。好ましい態様では、MUC1*標的化CARは、T細胞へトランスフェクトされるか形質導入される。

1つの観点では、T細胞はCD3+/CD28+ T細胞である。別の場合では、それは樹状細胞である。別の場合では、それはB細胞である。別の場合では、それは肥満細胞である。受容細胞は患者若しくはドナーから得られる。ドナーからの場合、それは拒絶反応を引き起こす分子を除去するように操作することができる。

本発明のCARでトランスフェクトされたか形質導入された細胞は、生体外若しくは生体内で拡張され、その後患者に投与される。投与ルートは、限定されないが、骨髄移植、静脈注射、インサイチュー注入若しくは移植を含むグループから選ばれる。好ましい態様では、MUC1*標的化CARは、MUC1陽性癌をもつ若しくはMUC1陽性癌になるリスクが診断された人に投与される。

【0216】

MUC1*陽性癌の治療若しくは予防用のT細胞若しくは他の免疫細胞へ形質導入することができる多くの可能な抗MUC1*CAR構築物がある。CARが、複数モジュールから構成され、他のモジュールのアイデンティティーが決定的に重要な間、そのモジュールのうちのいくつかのアイデンティティーは比較的重要ではない。

【0217】

本発明者の実験は、それが腫瘍部位へのCARを担持する免疫細胞を標的とするので、CARの最も外側の部分の抗体認識断片は決定的に重要であることを実証した。さらに、細胞内シグナル伝達モチーフは、非常に重要であるが、また交換することができる。図28は、CARとCARに含まれる様々な配列のコンポーネントのモデルを示す。図28の参照、

【0218】

RIは：何もない；又は

【0219】

癌関連抗原のリガンドの断片又はリガンド；又は

【0220】

MUC 1若しくはMUC 1*のリガンドの断片又はリガンド；又は

【0221】

抗体若しくは抗体断片、そこでは抗体若しくは抗体断片は、MUC1若しくはMUC1*に結合する；又は抗体若しくは抗体断片、そこでは抗体若しくは抗体断片は、PSMGFR*に結合し、そこでは該抗体はヒト若しくはヒト化である；又はMN-E6、MN-C2、MN-C3若しくはMN-C8若しくはヒト化MN-E6、MN-C2、MN-C3若しくはMN-C8の抗体若しくは抗体断片；又は開裂MUC1かMUC1*に結合する、抗体、scFv、一本鎖可変断片；又はMN-E6、MN-C2、MN-C3若しくはMN-C8のscFvであって、それはヒト化されうる；又はMUC1*若しくはPSMGFRペプチドに結合するペプチド；又はMUC1*のPSMGFR部分を結合する抗体断片、scFv若しくはペプチドである；又はMN-E6(配列番号：38-39と93-94)、MN-C2(配列番号：144-145と194-195)、MN-C3(配列番号：439-440と486-487)及びMN-C8(配列番号：525-526と565-566)のヒト化可変領域からの

10

20

30

40

50

配列を含む。

1つの観点で、R1は、scFvであって、それは、ヒト化MN-E6 scFv(配列番号：232-237)、ヒト化MN-C2 scFv(配列番号：238-243)、ヒト化MN-C3 scFv(配列番号：244-249)若しくはヒト化MN-C8 scFv(配列番号：250-255)からの配列で構成されたMUC1*のPSMGFR部分を結合する。

別の観点では、R1は、scFvであって、それは、ヒト化MN-E6 scFv(配列番号：232-237)若しくはヒト化MN-C2 scFv(配列番号：238-243)からの配列で構成されたMUC1*のPSMGFR部分を結合する。

1例において、R1は、scFvであって、それは、ヒト化MN-E6 scFv(配列番号：232-237)からの配列で構成されたMUC1*のPSMGFR部分を結合する。

【0222】

R2は、CARの膜貫通領域に認識部分を接続する、ポリペプチドフレキシブルリンカーである。1つの観点では、R2は、異なる長さの、5から250のアミノ酸のポリペプチドリンカーでありえる。別の観点では、R2は、ヒト起源のポリペプチドリンカーである。1つの観点では、R2は、ヒト免疫グロブリン(IgG、IgA、IgE、IgM若しくはIgD)のFc部位の変異から作られ、若しくは変異でありうる。別の観点では、R2は、ヒト免疫グロブリン(IgG、IgA、IgE、IgM若しくはIgD)のヒンジ領域若しくはヒンジ領域の変異でありえる。1つの観点では、R2は、T細胞受容体(CD8a、CD28若しくはCD4)のヒンジ領域若しくはヒンジ領域の変異でありえる。1例において、R2は、CD8aのヒンジ部、ヒトIgDのヒンジ部若しくはヒトIgGのFc領域である。

【0223】

R3は、膜貫通領域である。1つの観点では、R3は、膜貫通領域若しくは任意の膜貫通ヒトタンパク質の膜貫通領域の変異でありえる。別の観点では、R3は、膜貫通領域若しくはヒト細胞リセプターからの膜貫通領域の変異でありえる。1つの観点では、R3は、膜貫通領域若しくはT細胞受容体(CD8a、CD4、CD28、CD3z、OX40若しくは41-BB)の膜貫通領域の変異でありえる。別の観点では、R3は、CARの最初の細胞質の共刺激領域からの膜貫通領域である。1つの観点では、R3は、膜貫通領域若しくは膜貫通領域へ関連した細胞質領域の1、2、3、4若しくは5アミノ酸で拡張された、T細胞受容体の膜貫通領域の変異でありえる。別の観点では、R3は、膜貫通領域若しくはジスルフィド結合形成用のシステインが行われる膜貫通領域へ関連した細胞質領域の1、2、3、4若しくは5アミノ酸で拡張されたT細胞受容体の膜貫通領域の変異でありえる。1例において、R3は、CD8aまたはCD4の膜貫通領域である。

【0224】

R4は、T細胞受容体からのシグナリング領域である。1つの観点では、R4は、CD3-zeta、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICAm-1、LFA-1、ICOS、CD2、CD5、CD7及びFc受容体ガンマ領域の細胞質のシグナリング領域でありえる。1例において、R4は、CD3-zetaの細胞質領域である。単一のシグナリング領域(CAR I)をもったヒト化CARのいくつかの例が、再度生成された：

CAR MN-E6 CD3z(配列番号：294-295)；

CAR MN-C2 CD3z(配列番号：606-607)。

【0225】

R5は、T細胞受容体からの共刺激領域である。1つの観点では、R5は、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICAm-1、LFA-1、ICOS、CD2、CD5、CD7及びFc受容体ガンマ領域の細胞質のシグナリング領域でありえる。R5は、R4及びR6とは異なる。1例において、R5は、CD28、4-1BB若しくはOX40の細胞質領域である。

2つのシグナリング領域(CAR II)をもったヒト化CARのいくつかの例が再度生成された：

CAR MN-E6 CD28/CD3z(配列番号：297-298)；

CAR MN-E6 4-1BB/CD3z(配列番号：300-301)；

CAR MN-E6 OX40/CD3z(配列番号：616-617)；

CAR MN-C2 CD28/CD3z(配列番号：608-609)；

10

20

30

40

50

CAR MN-C2 4-1BB/CD3z(配列番号: 610-611);
 CAR MN-C2 OX40/CD3z(配列番号: 612-613);
 CAR MN-C3 4-1BB/CD3z(配列番号: 600-601);
 CAR MN-E6-Fc/8/41BB/CD3z(配列番号: 310-311);
 CAR MN-E6 FcH/8/41BB/CD3z(配列番号: 315-316);
 CAR MN-E6 Fc/4/41BB/CD3z(配列番号: 318-319);
 CAR MN-E6 FcH/4/41BB/CD3z(配列番号: 321-322);;
 CAR MN-E6 IgD/8/41BB/CD3z(配列番号: 323-324);
 CAR MN-E6 IgD/4/41BB/CD3z(配列番号: 327-328);
 CAR MN-E6 X4/8/41BB/CD3z(配列番号: 330-331);
 CAR MN-E6 X4/4/41BB/CD3z(配列番号: 333-334);
 CAR MN-E6 8+4/4/4の1BB/CD3z(配列番号: 336-337)。

10

【0226】

R6は、T細胞受容体からの共刺激領域である。1つの観点では、R6は、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICAm-1、LFA-1、ICOS、CD2、CD5、CD7及びFc受容体ガンマ領域の細胞質のシグナリング領域でありえる。R6は、R4とR5とは異なる。1例において、R5は、CD28の細胞質領域である。

2つのシグナリング領域(CAR III)をもったヒト化CARのいくつかの例が再度生成された:

CAR MN-E6 CD28/OX40/CD3z(配列番号: 618-619);
 CAR MN-E6 CD28/4-1BB/CD3z(配列番号: 303-304);
 CAR MN-C2 CD28/4-1BB/CD3z(配列番号: 306-307);
 CAR MN-C2 CD28/OX40/CD3z(配列番号: 614-615)。

20

【0227】

本発明者と他が引用される〔Pule MA, Straathof KC, Dotti G, Heslop HE, Rooney CM and Brenner MK.(2005)〕: サイトカイン・リリースを増大し、初代ヒトT細胞のクローン性増殖をサポートする、キメラT細胞抗原リセプター。Mol Ther.12(5):933-941; Hombach A, Heiders J, Foppe M, Chmielewski M and Abken H.(2012)1;キメラ的抗原リセプターによるOX40共刺激は、リダイレクトCD4(+)T細胞によるIL-2誘導IL-10分泌とCD28を抑制する。Oncoimmunology.1(4):458-466; Kowolik CM, Topp MS, Gonzalez S, Pfeiffer T, Olivares S, Gonzalez N, Smith DD, Forman SJ, Jensen MC and Cooper LJ. (2006) : CD 19特異キメラ抗原リセプターによって提供されるCD28共刺激は、アドプティブに移入されたT細胞の生体内の持続性及び抗腫瘍効能を増強する。CancerRes. 66(22): 10995- 11004 ; Loskog A, Giandomenico V, Rossig C, Pule M, Dotti Gand Brenner MK. (2006) : キメラT細胞受容体へのCD28シグナリング領域の追加は、T調節細胞に対するキメラT細胞抵抗を増強する。Leukemia.20(10): 1819- 1828; Milone MC, Fish JD, Carpenito C, Carroll RG, Binder GK, Teachey D, Samanta M, Lakhai M, Gloss B, Danet-Desnoyers G, Campana A-Dは、, Riley JL, Grupp SA and June CH. (2009) : CD 137 ; 信号伝達領域メディエートを含んでいるキメラ受容体は、T細胞の生存を増強し、生体内における抗白血病効能を増加した。Mol Ther.17(8): 1453-1464; Song DG, Ye Q, Carpenito C, Poussin M, Wang LP, Ji C, Figini M, June CH, Coukos G, Powell DJ Jr. (2011) : 生体内での持続 において、CAR操作T細胞の腫瘍の局在化及び抗腫瘍活性は、CD137(4-1BB)による共刺激シグナリングによって増強されている。CancerRes. 71(13):4617-4627) ; CD3-zeta(配列番号: 373-376)、CD28(配列番号: 377-378)及び41BB(配列番号: 379-380)のような細胞内シグナル伝達モジュールが、単独で若しくは一緒に、免疫細胞拡張、サイトカイン分泌及び標的腫瘍細胞の免疫細胞仲介殺害を刺激する〕。

30

40

それほど重要でないのは、抗体断片、膜貫通領域、及び細胞内シグナル伝達モチーフの前に来る短細胞質尾部を示す短細胞外ピースのアイデンティティである。

【0228】

腫瘍へのCARをターゲットとする認識抗体断片のアイデンティティは、決定的に重要である。MUC1陽性の若しくはMUC1*陽性癌の処置のために、その抗体認識断片は、タンデム

50

リピート領域を含む、細胞外ドメインの大部分の開裂及び脱落の後に残るMUC1の部分の細胞外ドメインへ結合しなければならない。本発明の1つの観点では、残る該部分はPSMGFR配列を含む。本発明の別の観点では、開裂及び脱落の後に残るMUC1の部分は、PSMGFR配列プラスN末端で延長した9より多いアミノ酸を含んでいる。本発明の別の観点では、開裂及び脱落の後に残るMUC1の部分は、PSMGFR配列プラスN末端で延長した21より多いアミノ酸を含んでいる。1つの観点では、抗体認識断片は、PSMGFRペプチドに結合する。

本発明の別の観点では、抗体認識断片は配列

SNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQYKTEAASRY(配列番号: 620);若しくは

SVVVQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQYKTEAASRY(配列番号: 621)

を含むペプチドに結合する。

デモンストレーションとして、MN-E6若しくはMN-C2と呼ばれる単クローン抗MUC1*抗体の可変領域を含んだ一本鎖抗体断片は、CARのパネルに操作調製された。その後、MUC1*標的化CARは、免疫細胞へ、別々に若しくはコンビネーションで形質導入された。MUC1*ペプチド、MUC1*でトランスフェクトされた抗原提示細胞若しくはMUC1*陽性癌細胞を示す表面でチャンレンジされた時、MUC1*標的化CARで形質導入された免疫細胞は、サイトカインリリース、標的細胞の殺害、及び免疫細胞の拡張を含む、免疫反応を誘発した。1つのケースでは、ヒトjurkat細胞は、MUC1*標的化CARで、及びPSMGFRペプチドを提示する表面への露出によって、MUC1*若しくはMUC1*でトランスフェクトされたK562抗原提示細胞で、形質導入され、該jurkat細胞はIL-2を分泌した。別の場合では、精製ヒトT細胞は、MUC1*標的化CARで、及びPSMGFRペプチドを提示する表面への露出によって、MUC1*若しくはMUC1*でトランスフェクトされたK562抗原提示細胞で、形質導入され、該T細胞は、IL-2、インターフェロンを分泌し、また標的化抗原提示細胞及び癌細胞を殺し、一方T細胞は拡張した。

実証されるように、抗体断片を含むCARは、そこで抗体断片はPSMGFRペプチド、膜貫通領域及び共刺激領域をもつ細胞質尾部に結合することができ、該CARがT細胞を含む、免疫細胞へ形質導入されるとき、免疫系抗腫瘍細胞反応を誘発する。したがって、他の抗体、抗体断片若しくは抗体模倣、それはPSMGFRペプチドに結合することができる、は、同様に履行し、癌を処置するか防止するために使用することができる。当業者は、CARで細胞をトランスフェクトするか形質導入することに利用可能な多くの技術があることを認識し、本発明は、免疫細胞にMUC1*標的化CARを発現させるために使用された方法によって制限されない。例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、レンチウイルスなどは、使用することができる。同様に、非標的部分、細胞外ドメイン、膜貫通領域及び細胞質領域の膜近位部分のようなCARの部分、を作る分子のアイデンティティーは、MUC1*標的化CARの機能にとって本質的ではない。例えば、細胞外ドメイン、膜貫通領域及び細胞質領域膜近位部分は、CD8、CD4、CD28若しくはFc、CH2CH3若しくはCH3のようなジェネリック抗体領域の部分で構成することができる。さらに、CARの非標的化部分は、これらの分子若しくは他のファミリーメンバーの1つ以上の部分の複合物でありえる。

【0229】

本発明の1つの観点は、MUC1陽性若しくはMUC1*の陽性癌を、持つ若しくは進展のリスクを、診断若しくは疑われた、患者を治療する方法であり、そこではMUC1*標的化CARで形質導入された免疫細胞の有効量を投与された。本発明の別の観点では、免疫細胞は、患者から分離されたT細胞であり、それは、MUC1*へCARの標的化ヘッドが結合するCARで形質導入され、そして形質導入T細胞の拡張の後、CAR T細胞は患者へ有効な量で投与される。さらに本発明の別の観点では、免疫細胞は、患者から分離されたT細胞であり、それは、CARの標的化ヘッドは、huMN-E6、huMN-C2、huMN-C3若しくはhuMN-C8の部分を含み、そして形質導入T細胞のオプショナルな拡張の後、CAR T細胞は患者へ有効な量で投与される。

【0230】

作られテストされたCARの特性

【0231】

多くのMUC1*標的化CARが生成され、そこで、該CARの遠位端における標的化抗体断片は、M

10

20

30

40

50

N-E6、MN-C2、MN-C3若しくはMN-C8であった。各CARのDNAは、クローニングが正確に行われたことを確認するために配列決定された。その後、各構築物は、発現プラスミドへ混ぜられ、次に、細胞へトランスフェクトされ、次に、構築物が成功裡に挿入されたことをウェスタンブロットで確認した。表面の発現は、FACSによって確認された。その後、MUC1*標的化CARは、免疫細胞へウイルスで形質導入された。1つの観点では、それらはJurkat細胞へ形質導入された。別の観点では、それらは、血液から精製された初代ヒトT細胞へ形質導入された。一連の機能分析が行なわれ、CARが機能的であることを確認した。機能分析は次のことを示し、MUC1*標的化CARで形質導入されたJurkat細胞及び初代T細胞の両方が、MUC1*を表示する細胞でチャンレンジされた時、サイトカインIL-2を分泌した。

図29は、MN-E6 CD8/CD3z、MN-E6 CD8/CD28/CD3z、MN-E6 CD8/41BB/CD3z、MN-E6 CD4/CD28/CD3z及びMN-E6CD4/CD28/41BB/CD3zを含む、CARのパネルで形質導入されたJurkat細胞によるIL-2サイトカイン分泌を実験的に測定するグラフである。CAR Jurkat細胞は、MUC1*でトランスフェクトされたK562細胞若しくはK562-wt細胞に、露出された時だけ、IL-2が分泌された。親K562-wt細胞が、MUC1*の大変低レベルを発現することは注目されるべきである。Jurkat細胞へトランスフェクトされたCARの別のグループは、サイトカイン分泌に関して同様にテストされた。

図30は、CAR T細胞が、MUC1*でトランスフェクトされたK562細胞若しくはK562-wt細胞に、露出された時における、MN-E6 CD8/CD28/CD3z、MN-E6 CD8/41BB/CD3z、MN-E6 CD4/CD28/CD3z若しくはMN-E6 CD4/41BB/CD3zで形質導入されたJurkat T細胞によるIL-2分泌を示す。同様に、図31は、MN-E6 CD8/CD28/CD3z、MN-E6 CD8/41BB/CD3z若しくはMN-E6 CD4/41BB/CD3zで形質導入された初代ヒトT細胞によるIL-2サイトカイン分泌を示す。サイトカイン分泌は、MUC1*標的化CAR T細胞が、MUC1*でトランスフェクトされたK562細胞若しくはK562-wt細胞に露出された時のみ、生じた。彼らが標的細胞をみると、活性化T細胞によって分泌される別のサイトカインは、インターフェロン (IFN γ)である。

図32は、MN-E6 CD8/CD28/CD3z及びMN-E6 CD4/41BB/CD3zを含むCARのパネルで、形質導入された初代ヒトT細胞が、該CAR T細胞がMUC1*でトランスフェクトされたK562細胞若しくはK562-wt細胞に露出された時、インターフェロン が分泌されたことを示す。インターフェロン は、初代ヒトT細胞が、MN-E6 CD8/CD28/CD3z、MN-E6 CD8/41BB/CD3z及びMN-E6 CD8/CD28/41BB/CD3zを含むCARのパネルで形質導入され、MUC1*標的化CAR T細胞が、前立腺癌(DU145)、乳癌(1500)若しくは膵臓癌(Capan)のMUC1*陽性癌細胞若しくはMUC1*でトランスフェクトされたK562細胞若しくはK562-wt細胞に露出された時、分泌する。(図33)。

【 0 2 3 2 】

CAR T細胞の機能の別の手段は、それらが標的細胞の殺害を引き起こすかどうかである。MUC1*のPSMGFR配列に結合する抗体断片を含む様々なCARでトランスフェクトされたT細胞は、共培養分析で、MUC1*発現細胞を殺した。1つの分析では、標的MUC1*発現細胞は、カルセインで培養される。それらが、MN-E6、MN-C2、MN-C3若しくはMN-C8のような抗体断片を含むCAR T細胞と混合された場合、該CAR T細胞は、MUC1*提示細胞を殺し、それは標的細胞を溶解させ、上澄みへカルセインをリリースする。

図34は標的細胞死を実験的に測定するグラフであり、血液サンプルから分離された、初代ヒトT細胞であって、それは、MN-E6 CD8/41BB/CD3z及びMN-E6 CD4/41BB/CD3zを含むCARのパネルで形質導入され、該CAR T細胞が、MUC1*でトランスフェクトされたK562細胞若しくはK562-wt細胞に露出された時のグラフである。T細胞対標的細胞の比率は1:1であり、細胞は24時間共培養された。

図35 A-Bは、1日目から3日目までの、標的細胞生存の時間的経過を測定するFACSのグラフである。血液サンプルから分離された、初代ヒトT細胞は、ヒト化MN-E6-CD8-3z、MN-E6-CD8-CD28-3z、MN-E6-CD8-41BB-3z及びMN-E6-CD8-CD28-41BB-3zを含むCARのパネルで形質導入された。その後、CAR T細胞は、自然にMUC1*の低レベルを発現するK562-wt細胞に、若しくは、高MUC1*でトランスフェクトされたK562細胞に露出される。MUC1*標的化CAR T細胞の標的細胞への比率は、1:1、10:1、または20:1である。生存細胞は、一日目(A)

または三日目 (B) で検出され測定された。

【 0 2 3 3 】

図36は、共培養実験の3日目での標的細胞生存のFACS測定のグラフである。初代ヒトT細胞は、ヒト化MN-E6-CD8-3z、MN-E6-CD8-CD28-3z、MN-E6-CD8-41BB-3z及びMN-E6-CD8-CD28-41BB-3zを含むCARのパネルで形質導入された。その後、CAR T細胞は、MUC1*陽性T47D乳癌細胞若しくはMUC1*陽性1500 aka ZR-75-1乳癌細胞に露出された。MUC1*標的化CAR T細胞の標的細胞に対する比率は、1:1または10:1であった。グラフから見るように、MUC1*標的化CARで形質導入されたT細胞は、無形質導入コントロールT細胞より、MUC1*癌細胞に、はるかに大きな殺効果がある。さらに、殺結果は、T細胞の標的細胞への比率が増加するとき、はるかにおおきかった。

10

図37は、共培養実験の一日目の標的細胞生存のFACS測定のグラフである。初代ヒトT細胞は、ヒト化MN-E6-CD8-41BB-3z、MN-E6-CD4-41BB-3z及びMN-E6-CD8-CD28-41BB-3zを含むCARのパネルで形質導入された。その後、CAR T細胞は、次のMUC1*陽性癌細胞に露出された:T47D乳癌; capan2膵臓癌;若しくはDU-145前立腺癌。MUC1*標的化CAR T細胞の標的細胞への比率は、5:1であった。グラフから見るように、MUC1*標的化CARで形質導入されたT細胞は、無形質導入コントロールT細胞より、MUC1*癌細胞に、はるかに大きな殺効果がある。測定が、T細胞:標的細胞比5:1のみで、24時間後にされたことに注意されたい。さらにCD8構築物のように、CD4細胞外ドメイン膜内外の細胞質尾部をもつ、MUC1*標的化CARは同様に等しくはたらくことに注意されたい。

図38は、共培養実験の3日目の標的細胞生存のFACS測定のグラフである。初代ヒトT細胞は、ヒト化MN-E6-CD8-41BB-3z、MN-E6-CD4-41BB-3z及びMN-E6-CD8-CD28-41BB-3zを含むCARのパネルで形質導入された。その後、CAR T細胞は次のMUC1*陽性癌細胞に露出された:MUC1*でトランスフェクトされたK562白血病細胞;T47D乳癌;1500aka ZR-75-1乳癌細胞;若しくはCAPAN-2膵癌細胞。無形質導入T細胞コントロールに加えて、分析はPC3 MUC1*陰性前立腺癌細胞で行なわれた。MUC1*標的化CAR T細胞の標的細胞への比率は、1:1であった。グラフから見るように、MUC1*標的化CARで形質導入されたT細胞は、無形質導入コントロールT細胞より、MUC1*癌細胞に、はるかに大きな殺効果がある。さらに、殺す結果は、MUC1*陽性細胞に特異的である。さらにCD8構築物のように、CD4細胞外ドメイン膜内外の細胞質尾部をもつ、MUC1*標的化CARは同様に等しくはたらくことに留意されたい。

20

30

図39は、CAR T細胞の標的細胞への比率5:1で、標的細胞との共培養での24時間をこえて、CAR T細胞拡張のFACS測定のグラフである。初代ヒトT細胞は、ヒト化MN-E6-CD8-41BB-3z、MN-E6-CD4-41BB-3z及びMN-E6-CD8-CD28-41BB-3zを含むCARのパネルで形質導入された。CAR T細胞は、MUC1*陽性T47D乳癌細胞、MUC1*陽性Capan膵癌細胞、及びMUC1陰性細胞HCT-116結腸癌細胞及びHEK-293のヒト胚の腎臓細胞とで共培養された。グラフから見るように、CAR T個体群は、MUC1*陽性細胞の存在する状態で増加されている。

図40は、MUC1*標的化CARのウェスタンプロットの写真を示す。1~9まで、次のものがある:

- 1: MN-E6scFv-Fc-8-41BB-CD3z(CD8 TMをもったヒンジ部としてのヒトFc);
- 2: MN-E6scFv-FcH-8-41BB-CD3z(CD8 TMをもったヒンジ部としてのヒトFcヒンジレス);
- 3: MN-E6scFv-Fc-4-41BB-CD3z(CD4 TMをもったヒンジ部としてのヒトFc);
- 4: MN-E6scFv-FcH-4-41BB-CD3z(CD4 TMをもったヒンジレスヒンジ部としてのヒトFc);
- 5: MN-E6scFv-IgD-8-41BB-CD3z(CD8 TMをもったヒトIgDからのヒンジ部);
- 6: MN-E6scFv-IgD-4-41BB-CD3z(CD4 TMをもったヒトIgDからのヒンジ部);
- 7: MN-E6scFv-X4-8-41BB-CD3z(CD8 TMをもったヒンジ部としてのロングフレキシブルリンカー);
- 8: MN-E6scFv-X4-4-41BB-CD3z(CD4 TMをもったヒンジ部としてのロングフレキシブルリンカー);
- 9: MN-E6scFv-8-4-41BB-CD3z (CD4 TMをもったCD8とCD4からのヒンジ部)。

40

【 0 2 3 4 】

50

図41は、MN-E6scFv-Fc-8-41BB-CD3z、MN-E6scFv-FcH-8-41BB-CD3z(hingeless)、MN-E6scFv-Fc-4-41BB-CD3z、MN-E6scFv-IgD-8-41BB-CD3z、MN-E6scFv-X4-8-41BB-CD3z及びMN-E6scFv-X4-4-41BB-CD3zで形質導入されたヒトT細胞と共培養されたT47D乳癌細胞のFACSスキンのグラフを示す。T細胞と癌細胞は、48時間の1:1の比率で共培養された。T細胞カウントは、すべての変換されていないT細胞の平均に標準化され、また、標的細胞は、変換されていないT細胞と共培養された時の、個々の特定の細胞型に対し標準化された。CAR T細胞が、MUC1*陽性癌細胞と共培養される場合、T細胞個体群は拡大し、またターゲットとされた癌細胞集合は減少するということがグラフは示す。

【 0 2 3 5 】

図42は、MN-E6scFv-Fc-8-41BB-CD3z、MN-E6scFv-FcH-8-41BB-CD3z、MN-E6scFv-Fc-4-41BB-CD3z、MN-E6scFv-IgD-8-41BB-CD3z、MN-E6scFv-X4-8-41BB-CD3z及びMN-E6scFv-X4-4-41BB-CD3zで形質導入されたヒトT細胞と共培養された、T47D乳癌細胞、Capan-2膵癌細胞、K562-MUC1*トランスフェクト細胞、及びK562-wt細胞のFACSスキンのグラフを示す。T細胞と癌細胞は、48時間、1:1の比率で共培養された。T細胞カウントは、すべての変換されていないT細胞の平均に標準化され、また、標的細胞は、変換されていないT細胞と共培養された時の、個々の特定の細胞型に対し標準化された。グラフは、CAR T細胞がMUC1*陽性癌細胞と共培養されるとき、T細胞個体群は拡大し、また標的癌細胞個体群は減少した。

【 0 2 3 6 】

これらの実験が実証するように、CARの重要な部分は、腫瘍細胞に免疫細胞を志向させる抗体断片である。本発明者が次のセクションで示すように、MN-E6及びMN-C2は、腫瘍細胞上で発現されるMUC1*の形式に特異的である。CARの次の最も重要な部分は、免疫系共刺激部位を担持する細胞質尾部である。これらの領域のアイデンティティーは、免疫反応の程度を調整するが、特異性へ決して影響しない。示されるように、CARの膜貫通部分のアイデンティティーはそれほど重要ではない。膜貫通部分がある柔軟性を持ち、抗体断片が腫瘍細胞上のその同系統のリセプターに達することを可能にする十分な長さである限り、十分であるように見える。これは、図40-42に実証されている。

MN-E6ターゲット化抗体断片及び細胞内共刺激領域4-1BB及びCD3-zetaを含むが、様々な異なる細胞外、膜貫通、短細胞質尾部を持っているCARsは、宿主T細胞の拡大を刺激する間、それらが特異的に標的細胞を殺した状態ですべて働いた。可変中間部をもったこれらのCARは次のとおりである：

- 1: MN-E6scFv-Fc-8-41BB-CD3z(CD8 TMをもったヒンジ部としてのヒトFc)；
- 2: MN-E6scFv-FcH-8-41BB-CD3z(CD8 TMをもったヒンジ部としてのヒトFc ヒンジレス:hingeless)；
- 3: MN-E6scFv-Fc-4-41BB-CD3z(CD4 TMをもったヒンジ部としてのヒトFc)；
- 4: MN-E6scFv-FcH-4-41BB-CD3z(CD4 TMをもったヒンジレスヒンジ部としてのヒトFc)；
- 5: MN-E6scFv-IgD-8-41BB-CD3z(CD8 TMをもったヒトIgDからのヒンジ部)；
- 6: MN-E6scFv-IgD-4-41BB-CD3z(CD4 TMをもったヒトIgDからのヒンジ部)；
- 7: MN-E6scFv-X4-8-41BB-CD3z(CD8 TMをもったヒンジ部としてのロングフレキシブルリンカー)；
- 8: MN-E6scFv-X4-4-41BB-CD3z(CD4 TMをもったヒンジ部としてのロングフレキシブルリンカー)；
- 9: MN-E6scFv-8-4-41BB-CD3z(CD4 TMをもったCD8とCD4からのヒンジ部)。

【 0 2 3 7 】

本発明の1つの観点では、MUC1陽性若しくはMUC1*陽性癌をもつ、又はMUC1陽性若しくはMUC1*陽性癌を持つ疑いがある、又はMUC1陽性若しくはMUC1*陽性癌への展開のリスクを持つと、診断された、患者を治療する方法で、そこで患者はMUC1*標的化CARで形質導入された免疫細胞の有効な量を投与される。そこでCARは、以下から成るグループの中から選ばれる；

MN-E6-CD8-3z；

MN-E6-CD4-3z；

10

20

30

40

50

MN-E6-CD8-CD28-3z;
 MN-E6-CD4-CD28-3z;
 MN-E6-CD8-41BB-3z;
 MN-E6-CD4-41BB-3z;
 MN-E6-CD8-CD28-41BB-3z;
 MN-E6-CD4-CD28-41BB-3z;
 MN-E6scFv-Fc-8-41BB-CD3z;
 MN-E6scFv-FcH-8-41BB-CD3z;
 MN-E6scFv-Fc-4-41BB-CD3z;
 MN-E6scFv-FcH-4-41BB-CD3z;
 MN-E6scFv-IgD-8-41BB-CD3z;
 MN-E6scFv-IgD-4-41BB-CD3z;
 MN-E6scFv-X4-8-41BB-CD3z;
 MN-E6scFv-X4-4-41BB-CD3z;
 MN-E6scFv-8-4-41BB-CD3z、若しくは

MN-C2、MN-C3若しくはMN-C8とMN-E6が取り替えられる上記のCARのいずれか。

本発明の別の観点は、癌をもつ、又は癌を持つ疑いがある、又は癌への展開のリスクを持つと、診断された、患者を治療する方法で、そこで患者は上記CARの一つで形質導入された免疫細胞の有効な量を投与され、該MN-E6は、癌抗原に特異的である抗体可変ドメイン断片をペプチドと取り替えられている。上記の方法のうちのどれでも、免疫細胞はT細胞でありえ、治療される患者から、さらに分離されうる。

【0238】

抗MUC1*標的化抗体の特異性

【0239】

抗体特異性を実証する最も正確な方法は、ガン組織標本と比較して、正常ヒト組織標本で、抗体をテストすることである。MN-C2及びMN-E6は、特異的にMUC1若しくはMUC1*陽性癌細胞に結合することが示された。いくつかの乳癌アレイが、いくつかの抗MUC1若しくはMUC1*抗体を使用して分析された。本質的に、1,200人以上の異なる乳癌患者からの乳癌組織標本の連続切片に関する研究は、ほとんど、全長MUC1が乳癌組織に残らないことを示した。発現されたMUC1の大部分は、MUC1*であり、MN-C2によって染色される。その分析は、Clariant診断法によって行なわれ、また、組織染色はアルフレッド法を使用してスコア化された。

例えば、図43は、VU4H5、タンデム反復に結合する市販の抗MUC1抗体、若しくはMUC1*に結合するMN-C2で、染色された乳癌組織アレイの連続切片を示す。図43及び44は、MUC1-FL(全長)を認識するVU4H5、若しくは癌MUC1*を認識するMN-C2のいずれかで染色された乳癌組織アレイの写真である。組織染色は、強度スコア及び分配スコアを組み合わせるアルフレッド・スコアリング法を使用して得点された。組織アレイの写真下部は、結果を表示する色分けされたグラフがある。確認できるように、VU4H5で染色されたアレイは、非常に軽く、また、多くの組織が、核酸ベースの診断法によって証拠づけられるようなすべての乳癌の96%以上にMUC1が異常に発現されるという、公表された報告書にもかかわらず、全く染色しなかった。対照的に、MN-C2で染色されたアレイは、非常に暗い(グラフにおいて、黄色に対して赤い若しくは白い)。さらに、多くの組織が、抗全長MUC1で全く染色されず、MN-C2で大変暗く染色された(グラフにおいて、グリーンボックスを参照)、同様に、本発明者は、ヒト化MN-E6 scFv-Fcで、正常若しくは癌の乳組織を染色した。抗体断片が、第2に基づく第2 streptavidinによってそれを視覚化することができるように、ビオチン化された。

図45で見ることができるよう、hMN-E6scFv-Fcは、正常乳組織を染色しないが、癌の乳組織を染色する。さらに、腫瘍のグレード及び/又は患者の転移性グレードで、染色の強度及び均質性は、増加する(図45及び46)。同様に、hMN-E6 scFv-Fcは、正常肺組織を染色しなかったが肺癌組織を染色し(図47-51)、染色強度及び分布は、腫瘍グレード若しく

10

20

30

40

50

は転移性グレードが増加したように、増加した。

図52は、5 µg/mLのヒト化MN-E6-scFv-Fcビオチン化抗MUC1*抗体で染色され、その後、第2のstreptavidin HRP抗体で染色された、正常小腸及び癌の小腸組織の写真を示す。

A)は正常小腸組織である。B)は図の中で表示されるような患者からの小腸癌である。CとDは、2次抗体単独で染色された、相当する連続切片の写真である。

図53は、50 µg/mLのヒト化MN-E6-scFv-Fc抗MUC1*抗体で染色され、その後、第2のヤギ抗ヒトHRP抗体で染色された、正常小腸組織の写真を示す。A~Dは、正常小腸組織である。E~Hは、2次抗体単独で染色された、相当する連続切片の写真である。

図54は、50 µg/mLのヒト化MN-E6-scFv-Fc抗MUC1*抗体で染色され、その後、第2のヤギ抗ヒトHRP抗体で染色された、癌の小腸組織の写真を示す。A~Dは、図の中で表示されるような患者からの癌の小腸組織である。E~Hは、2次抗体単独で染色された、相当する連続切片の写真である。

図55は、50 µg/mLのヒト化MN-E6-scFv-Fc抗MUC1*抗体で染色され、その後、第2のヤギ抗ヒトHRP抗体で染色された、癌の小腸組織の写真を示し、A~Dは、図の中で表示されるような患者からの癌の小腸組織である。E~Hは、2次抗体単独で染色された、相当する連続切片の写真である。

図56は、50 µg/mLのヒト化MN-E6-scFv-Fc抗MUC1*抗体で染色され、その後、第2のヤギ抗ヒトHRP抗体で染色された、正常結腸組織の写真を示す。A~Dは、正常結腸である。E~Hは、2次抗体単独で染色された、相当する連続切片の写真である。

図57は、50 µg/mLのヒト化MN-E6-scFv-Fc抗MUC1*抗体で染色され、その後、第2のヤギ抗ヒトHRP抗体で染色された、結腸癌組織の写真を示す。A~Dは、図の中で表示されるような転移の患者からの結腸癌組織である。E~Hは、2次抗体単独で染色された、相応する連続切片の写真である。

図58は、50 µg/mLのヒト化MN-E6-scFv-Fc抗MUC1*抗体で染色され、その後、第2のヤギ抗ヒトHRP抗体で染色された、結腸癌組織の写真を示す。A~Dは、図の中で表示されるようなグレード2の患者からの結腸癌組織である。E~Hは、2次抗体単独で染色された、相応する連続切片の写真である。

図59は、50 µg/mLのヒト化MN-E6-scFv-Fc抗MUC1*抗体で染色され、その後、第2のヤギ抗ヒトHRP抗体で染色された、結腸癌組織の写真を示す。A~Dは、図の中で表示されるような転移性の患者からの結腸癌組織である。E~Hは、2次抗体単独で染色された、相応する連続切片の写真である。

図60は、50 µg/mLのヒト化MN-E6-scFv-Fc抗MUC1*抗体で染色され、その後、第2のヤギ抗ヒトHRP抗体で染色された、前立腺癌組織の写真を示す。A~Dは、図の中で表示されるような患者からの前立腺癌組織である。E~Hは、2次抗体単独で染色された、相応する連続切片の写真である。

図61は、50 µg/mLのヒト化MN-E6-scFv-Fc抗MUC1*抗体で染色され、その後、第2のヤギ抗ヒトHRP抗体で染色された、前立腺癌組織の写真を示す。A~Dは、図の中で表示されるような患者からの前立腺癌組織である。E~Hは、2次抗体単独で染色された、相応する連続切片の写真である。

図62は、50 µg/mLのヒト化MN-E6-scFv-Fc抗MUC1*抗体で染色され、その後、第2のヤギ抗ヒトHRP抗体で染色された、前立腺癌組織の写真を示す。A~Dは、図の中で表示されるような患者からの前立腺癌組織である。E~Hは、2次抗体単独で染色された、相応する連続切片の写真である。

【0240】

本発明の1つの観点は、MUC1陽性若しくはMUC1*陽性癌を持つ、持つと疑われる、若しくは展開のリスクがあると診断された患者を処置する方法であり、そこでは標本は患者の癌から得られ、

PSMGFR配列番号:2、

SNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQYKTEAASRY(配列番号:620)、若しくは

SVVVQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQYKTEAASRY(配列番号:621)

10

20

30

40

50

に結合する抗体との反応性がテストされる。その後、患者は、それらの癌標本で反応した抗体からの抗体可変構築物断片を含むscFv、scFv-Fc若しくはCAR Tで治療される。本発明の別の観点は、MUC1陽性若しくはMUC1*陽性癌を持つ、持つと疑われる、若しくは展開のリスクがあると診断された患者を処置する方法であり、そこでは標本は、患者の癌から得られ、MN-E6-scFv、MN-C2-scFv、MN-C3-scFv若しくはMN-C8-scFvとの反応性に関してテストされ、その後、患者は、それらの癌標本で反応した抗体の部分を含むscFv、scFv-Fc-mut若しくはCAR Tで治療される。

【0241】

BITES

【0242】

二価の(ディバレント若しくはビバレント)一本鎖可変断片(di-scFvs、bi-scFvs)は、2つのscFvsのリンクにより操作調製される。これはタンデムscFvsを生じる、2つのV_H及び2つのV_L部位をもった単一ペプチド鎖を作り出すことにより行うことができる。別の可能性は、scFvsに二量化することを強いて、2つの可変領域が、ともに折り重なるにはあまりに短いリンカー・ペプチド(約5つのアミノ酸)でのscFvsの生成である。このタイプはダイアボディー(diabodies)として知られる。ダイアボディーは、それらが標的へのはるかに高い親和性を持っていることを意味し、相応するscFvsより40倍低いまでの解離定数を持つことが示された。従って、ダイアボディー薬は、他の治療用抗体よりはるかに低投与量で投薬することができ、生体内で癌に対する高い特異性をもった標的化が可能である。さらに短いリンカー(1つ若しくは2つのアミノ酸)は、三量体、いわゆるトリアボディー(triabodies)若しくはトリボディー(tribodies)の形成を可能にする。テトラボディー(Tetrabodies)も生産された。それらは、ダイアボディー(diabodies)より、標的へのさらに高い親和性を示す。

【0243】

これらのフォーマットの全ては、2つの異なる抗原への特異性をもった可変断片から構成することができ、その場合には、それらは二重特異性抗体のタイプである。その、最も早く開発されていた、二重特異T細胞エンゲージャー(engager)(BiTE抗体構築物)として知られている、二重特異タンデムdi-scFvsがある。BITESは、約55のキロダルトンの単一のペプチド鎖上に、異なる抗体の2 scFvsから成る融合蛋白質である。そのscFvsのうちの1つは、CD3リセプターによってT細胞に結合し、他は、MUC1*を異常に発現するような、腫瘍特異分子を経て腫瘍細胞に結合する。

【0244】

本発明の別の観点は、MUC1陽性若しくはMUC1*陽性癌を持つ、持つと疑われる、若しくは展開のリスクがあると診断された患者を処置する方法であり、そこではBiTEの有効量が投与され、それはBiTEの1個の抗体可変断片が、T細胞表面抗原に結合し及びBiTEの別の抗体可変断片は、

PSMGFR配列番号:2、

SNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQYKTEAASRY(配列番号:620)、若しくは

SVVVQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQYKTEAASRY(配列番号:621)

に結合する。1つのケースでは、MUC1*に結合するBiTEの抗体可変断片は、huMN-E6、huMN-C2、huMN-C3若しくはhuMN-C8の部分を含む。

【0245】

本発明の別の観点で、

PSMGFR(配列番号:2)、

SNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQYKTEAASRY(配列番号:620)、

若しくはSVVVQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQYKTEAASRY(配列番号:621)の全て若しくは部分、を含むMUC1*ペプチドは、養子関係の(adoptive)T細胞アプローチで使用される。この場合、患者のT細胞は、MUC1*ペプチドに露出され、また、成熟の様々なラウンドによって、T細胞は、MUC1*特異的リセプターを展開する。その後、適合(adapted)T細胞は、拡張され、MUC1*陽性癌を持つ、持つと疑われる、若しくは展開のリスクがあると診断された患者

10

20

30

40

50

に投与される。

【0246】

他のMUC1開裂部位

【0247】

しかしながら、MUC1は、癌細胞に加えて、いくつかの正常細胞で、成長因子リセプター型、MUC1*、に開裂される。例えば、MUC1は、健康な幹及び始原細胞でMUC1*に開裂される。骨髓細胞の大きな割合は、MUC1*陽性である。腸の部分は、MUC1*陽性である。

【0248】

本発明者は、MUC1は互いに比較的接近している異なる位置で開裂することができ、しかし、開裂の位置は、細胞外ドメインの残りの部分のフォールドを変更する。その結果、最初の位置で開裂されたMUC1*に結合するが、別の位置で開裂されたMUC1*には結合しない、単クローン抗体が同定することができる。この発見は、2013年8月14日に出願のWO2014/028668に示され、それらの内容は、その全体が参照によってここに組込まれる。本発明者は、それが癌細胞に現われるようなMUC1*に結合するが、それが幹と始原細胞に現われるようなMUC1*には結合しない、1セットの抗MUC1*単クローン抗体を同定した。反対に、本発明者は、幹及び始原細胞に結合するが、癌細胞に結合しない、単クローン抗体の別のセットを同定した。

10

幹特異抗体を同定するために使用される1つの方法は、以下のとおりである：

単クローンのハイブリドーマからの上澄みが、2つマルチウェルプレート上に、別々に吸着された。幹細胞、それらは非付着細胞である、が1枚のプレートにおかれ、また、付着性の癌細胞が、同一のプレートにおかれた。インキュベーションの後、プレートは、すすめられ転回させた。非付着幹細胞が、プレートにくっついた場合、その特別なウェルの単クローンは、幹細胞を認識し、そして癌細胞を認識しないであろう。幹細胞を捕らえない抗体若しくは癌細胞を捕らえた抗体は、癌特異的幹細胞と同定された。FACS分析は、この方法での研究を確定した。抗体MN-E6及びMN-C2は、癌特異抗体の例である。抗体MN-C3及びMN-C8は、幹特異抗体の例である。

20

抗体の両方のセットは、PSMGFR配列をもつペプチドに結合することができるが、FACS分析は、抗MUC1*多クローン性抗体及びMN-C3が、MUC1*陽性骨髓細胞に結合するが、MN-E6には結合しないことを示す。MUC1*多クローン性抗体は、PSMGFRペプチドでウサギを免疫にすることにより生成された。同様に、MN-C3は、腸陰窩の幹細胞に結合するが、MN-E6には結合しない。反対に、MN-E6抗体、はガン組織に結合するが、一方、幹特異的MN-C3は結合しない。

30

競合ELISA実験は、PSMGFRペプチドのC末端10アミノ酸が、MN-E6及びMN-C2結合に必要であるが、MN-C3及びMN-C8には必要でないことを示す。したがって、癌特異的である抗体を同定する別の方法は、PSMGFRペプチドマイナス10 N-末端アミノ酸の配列をもつペプチドで免疫すること又は癌特異的である抗体若しくは抗体断片をスクリーニングするためにそのペプチドを使用することである。PSMGFRペプチドマイナスN末端10アミノ酸の配列をもつペプチドに結合するが、PSMGFRペプチドマイナスC末端10アミノ酸の配列をもつペプチドに結合しない、抗体は、癌の治療若しくは予防に使用される癌特異抗体である。

40

【0249】

MUC1の細胞外ドメインは、又、幹細胞及びいくつかの始原細胞において開裂され、ここでは、ダイマー型若しくはNME7で、リガンドNME1による開裂MUC1の賦活は、増殖と多分化能を促進し、分化を阻害する。開裂後に残るMUC1の膜貫通部分は、MUC1*と呼ばれ及びその細胞外ドメインは、MUC1成長因子リセプター(PSMGFR)配列の一次配列で本質的に構成されている。

しかしながら、開裂の正確なサイトは、細胞型、組織タイプ若しくは個々の人がどの開裂酵素を発現するか過剰発現するかに依存して変わりうる。本発明者が以前に同定した、それはPSMGFR配列番号:2の殆ど若しくは全てを含むMUC1*の膜貫通部分をすてる、開裂部位に加え、他の開裂部位は、

SNIKFRPGSVVQLTLAFREGTINVHVDVETQFNQYKTEAASRY(配列番号:620);若しくは、

50

SVVVQLTLAFREGTINVHVDVETQFNQYKTEAASRY(配列番号: 621)。

のほとんど若しくは全てで構成された拡張MUC1*をもたらす。MUC1開裂のサイトは、どのように、残る細胞外ドメインはフォールドするかに影響する。本発明者は、癌細胞において、開裂MUC1*に結合するが、健康な幹及び始原細胞に存在するような、開裂MUC1*に結合しない、単クローン抗体を同定した。

【0250】

抗MUC1*抗体若しくは抗体様分子は、それがNME1、NME6、NME8若しくはNME7若しくはNME7-ABのMUC1*への結合を競合的に阻害するならば、とても有効でありうる、例えば、もし当該抗体がPSMGFRペプチドに結合できない、もし10C末端アミノ酸が欠失の場合、特にPSMGFR配列に結合する抗体、ペイロードを担持する、抗体若しくは抗体様分子は、競争的に、抗ガン剤として有効なMUC1*リガンドの結合を阻害する必要はない。例えば、毒素に結合する抗体若しくは抗体様分子は、活性化リガンドの結合を必然的に阻害することなしに、標的癌細胞を殺すことで有効でありえる。

例えば、抗体断片結合が、NME1、NME6、NME8、NME7-AB若しくはNME7の結合を競合的に阻害しないような、該抗体断片がMUC1*の一部をターゲットとするとして、患者の腫瘍への免疫系を補充するCARs若しくはBiTEsのような抗体様分子若しくは抗体は、抗ガン剤として有効でありうる。好ましい態様では、CAR、アダプティブ(adaptive)T細胞リセプター若しくはBiTEに組み入れられた抗体断片は、競争的に、MUC1*への、NME1、NME6、NME8、NME7-AB若しくはNME7の結合を阻害する。

【0251】

残る膜貫通部分の細胞外ドメインへ結合することができる抗体は、MUC1*細胞外ドメイン及び活性化リガンドの間の相互作用を遮断し、そして、この方法で、治療薬として、例えば癌の治療に使用することができる。さらに、抗MUC1*抗体は、生体外及び生体内の両方で、幹細胞の、増殖、運搬、同定若しくは単離に役立つ。

【0252】

MUC1*の細胞外ドメインをターゲットとする抗体、抗体断片及びCARsを使用するための一般的な戦略

【0253】

単クローン抗体、MN-C3及びMN-C8は、癌細胞より幹細胞に、より大きな結合親和性をもつ。ヒト化MN-C3及びMN-C8の可変領域に由来した配列を含んでいる、ヒト化抗体及び抗体断片は、ヒト幹細胞用の付着表面コーティングとして使用することができる。

【0254】

若しくは、MN-C3及びMN-C8の可変領域に由来した配列を含んでいる、ヒト化抗体及び抗体断片は、イン・シトゥーなヒト治療のために特定の位置に幹細胞を輸送するために使用することができる。1つのケースでは、ヒト化MN-C3若しくはMN-C8由来抗体、若しくは抗体断片でコートされた基質は、幹細胞に装填され、そして、患者に投与される。別の場合は、ヒト化MN-C3若しくはMN-C8由来抗体、若しくは抗体断片でコートされた基質は、治療のために特定のエリアへ患者自身の幹細胞を補充するために患者に投与される。ヒト幹細胞に結合する抗体が治療に役に立つヒト療法は、脊髄修復を含んでいる。ヒト化MN-C3若しくはMN-C8由来抗体、若しくは抗体断片でコートされた基質は、ヒト抗体の同定若しくは単離するために使用される。ヒト化MN-C3若しくはMN-C8由来抗体は、又、幹細胞の増殖を刺激するためにも使用されうる。

【0255】

配列リストのフリーテキスト

【0256】

a、g、c、t以外のヌクレオチド・シンボルの使用について、それらは、WIPOスタンダードST.25、付録2、表1で規定された約束にしたがい、そこでkはt若しくはgを表わし；nはa、c、t若しくはgを表わし；mはa若しくはcを表し、rはa若しくはgを表し；sはc若しくはgを表わし；wはa若しくはtを表し；そしてyはc若しくはtを表わす。

MUC1 Receptor

10

20

30

40

50

tggataattag (配列番号: 5)

(アミノ酸)

MNHSERFVFIAEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGVSVMHDVKNHRTFLKRTKYDNLHLEDLFI GNKVNVSFRQLVLI DYGD
QYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAGEIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFNELIQFITTGPI I
AMEILRDDAICEWKRLGVPANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSFASAAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFTNC
TCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQNNATK
TFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN- (配列番号: 6)

NME7ペプチド

NME7A peptide 1 (A domain) MLSRKEALDFHVDHQS (配列番号: 7)

10

NME7A peptide 2 (A domain) SGVARTDASES (配列番号: 8)

NME7B peptide 1 (B domain) DAGFEISAMQMFNMDRVNVE (配列番号: 9)

NME7B peptide 2 (B domain) EVYKGVVTEYHDMVTE (配列番号: 10)

NME7B peptide 3 (B domain) AIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF (配列番号: 11)

マウスE6重鎖、可変領域配列:

(DNA)

gaggatgaaggtaggtggagtagctgggggagacttagtgaagcctggagggtccctgaaactctcctgtgtagtctctggatt
cactttcagtagatagggatgtcttgggttcgccagactccaggcaagaggctggagtaggtcgcaaccattagtggtg
gcggtacttacatctactatccagacagtgtagaagggcgattcaccatctccagagacaatgccagaacaccctgtac
ctgcaaatgagcagctgaagctgaggacacagccatgtatcactgtacaagggataactacggtaggaactacgacta
cggtagtgactactggggccaaggaacctcagtcaccgtctcctca (配列番号: 12)

20

(アミノ酸)

EVKVVESGGDLVKPGGSLKLSCWSGFTFSRYGMSWVRQTPGKRLEWVATISGGGTIYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLY
LQMSLKSSEDAMHYHCTRDNYGRNYDYGMDYWGQTSVTVSS (配列番号: 13)

マウスE6重鎖可変フレームワーク領域1 (FWR1) 配列:

(DNA)

gaggatgaaggtaggtggagtagctgggggagacttagtgaagcctggagggtccctgaaactctcctgtgtagtctct (配列
番号: 14)

30

(アミノ酸)

EVKVVESGGDLVKPGGSLKLSCWSGFTFS (配列番号: 15)

マウスE6重鎖可変相補性決定領域1(CDR1) 配列:

(DNA)

ggattcactttcagtagatagggatgtct (配列番号: 16)

(アミノ酸)

RYGMS (配列番号: 17)

マウスE6重鎖可変フレームワーク領域2(FWR2) 配列:

40

(DNA)

tgggttcgccagactccaggcaagaggctggagtaggtcgca (配列番号: 18)

(アミノ酸)

WVRQTPGKRLEWVA (配列番号: 19)

マウスE6重鎖可変相補性決定領域2(CDR2) 配列:

(DNA)

accattagtggtggcggtacttacatctactatccagacagtgtagaagggg (配列番号: 20)

(アミノ酸)

TISGGGTIYYPDSVKG (配列番号: 21)

50

マウスE6重鎖可変フレームワーク領域3(FWR3)配列:

(DNA)

cgattcacatctccagagacaatgccagaacacccctgtacctgcaaatgagcagctctgaagtctgaggacacagccat
gtatcactgtacaagg(配列番号: 22)

(アミノ酸)

RFTISRDNKNTLYLQMSLKSSEDAMYPHCTR(配列番号: 23)

マウスE6重鎖可変相補性決定領域3(CDR3)配列:

(DNA)

gataactacggtaggaactacgactacgggtatggactac(配列番号: 24)

(アミノ酸)

DNYGRNYDYGMDY(配列番号: 25)

IGHV3-21*03重鎖可変領域配列:

(DNA)

gaggtgcagctggaggagtctgggggaggccctggccaagcctggggggctccctgagactctcctgtgcagcctctggatt
caccttcagtagctatagcatgaactgggtccgccaggctccaggggaaggggctggagtggggtctcatccattagtagta
gtagtagttacatatactacgcagactcagtgaagggccgattcacatctccagagacaacgccaagaactcactgtat
ctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgaga(配列番号: 26)

(アミノ酸)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAR(配列番号: 27)

IGHV3-21*01重鎖可変フレームワーク領域1(FWR1)配列:

(DNA)

gaggtgcagctggaggagtctgggggaggccctggccaagcctggggggctccctgagactctcctgtgcagcctctggatt
caccttcagt(配列番号: 28)

(アミノ酸)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS(配列番号: 29)

IGHV3-21*01重鎖可変相補性決定領域1(CDR1)配列:

(DNA)

agctatagcatgaac(配列番号: 30)

(アミノ酸)

YSYMN(配列番号: 31)

IGHV3-21*01重鎖可変フレームワーク領域2(FWR2)配列:

(DNA)

tgggtccgccaggctccaggggaaggggctggagtggtctca(配列番号: 32)

(アミノ酸)

WVRQAPGKGLEWVS(配列番号: 33)

IGHV3-21*01重鎖可変相補性決定領域2(CDR2)配列:

(DNA)

tccattagtagtagtagtagttacatatactacgcagactcagtgaagggc(配列番号: 34)

(アミノ酸)

SISSSSSYIYYADSVK(配列番号: 35)

IGHV3-21*01重鎖可変フレームワーク領域3(FWR3)配列:

10

20

30

40

50

(DNA)

cgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgt
gtattactgtgcgaga(配列番号: 36)

(アミノ酸)

RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR(配列番号: 37)

ヒト化E6重鎖可変領域配列:

(DNA)

gaggatgcagctggaggagctctgggggaggcctgggcaagcctgggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggatt
caccttcagtaggtatggcatgagctgggtccgccaggctccaggaagaggctggagtggtctcaaccattagtggtg
gaggcacctacataactaccagactcagtgaaaggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaacacccctgtat
ctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtaccagagataactatggccgcaactatgatta
tggcatggattattggggccagggcacccctggtgaccgtgagcagc(配列番号: 38)

(アミノ酸)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEWVSTISGGGTYYYPDSVKGRFTISRDNAKNTL
YLQMNSLRAEDTAVYYCTRNDYGRNYDYGMDYWGQGLTVTVSS(配列番号: 39)

ヒト化E6重鎖可変フレームワーク領域1(FWR1)酸配列:

(DNA)

gaggatgcagctggaggagctctgggggaggcctgggcaagcctgggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggatt
caccttcagt(配列番号: 40)

(アミノ酸)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS(配列番号: 41)

ヒト化E6重鎖可変相補性決定領域1(CDR1)配列:

(DNA)

aggtatggcatgagc(配列番号: 42)

(アミノ酸)

RYGMS(配列番号: 43)

ヒト化E6重鎖可変フレームワーク領域2(FWR2)酸配列:

(DNA)

tgggtccgccaggctccaggaagaggctggagtggtctca(配列番号: 44)

(アミノ酸)

WVRQAPGKRLEWVS(配列番号: 45)

ヒト化E6重鎖可変相補性決定領域2(CDR2)配列:

(DNA)

accattagtggtggaggcacctacataactaccagactcagtgaaaggc(配列番号: 46)

(アミノ酸)

TISGGGTYYYPDSVKG(配列番号: 47)

ヒト化E6重鎖可変フレームワーク領域3(FWR3)酸配列:

(DNA)

cgattcaccatctccagagacaacgccaagaacacccctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgt
gtattactgtaccaga(配列番号: 48)

(アミノ酸)

RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR(配列番号: 49)

ヒト化E6重鎖可変相補性決定領域3(CDR3)配列:

10

20

30

40

50

(DNA)

gataactatggccgcaactatgattatggcatggattat (配列番号: 50)

(アミノ酸)

DNYGRNYDYGMDY (配列番号: 51)

Genescriptによって合成された、ヒト化E6 IgG2重鎖:

(DNA)

gaattctaagcttggccaccatggaactggggctccgctgggttttccctgttgctat t ttagaagggtgccagtgtaga
 ggtagcagctggtaggagcttgggggaggcctgggcaagcctgggggggtccctgagacctctcctgtgcagcctctggattca
 ccttcagtaggtatggcatgagctgggtccgcccaggctccagggaagaggctggagtggtctcaaccattagtgccgga
 ggaccctacataactaccagacctcagtggaaggccgat t caccatctccagagacaacgccaagaacacccctgtatct
 gcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtat t actgtaccagagataactatggccgcaactatgattatg
 gcatggattat tggggccagggcacccctggtagcctgtagcagcgcctccaccaagggcccatcggtcttccccctggcg
 cctgtctccaggagcaccctccgagagcacagccgcccctgggctgacctgggcaaggactacttccccgaaccgggtgacggt
 gtcgtggaactcaggcgcctctgac cagcggcgtgcacaccttcccagctgtcctacagtcctcaggactctactccctc
 agcagcgtggtagcctgcccctccagcaacttccggcaccagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaaac
 caaggtggacaagacagttgagcgcgaatgtgtgtcgagtgccaccctgtgccagcaccacctgtggcaggaccgtcag
 tcttccctcttcccccaaaacccaaggacacccctcatgatctcccggacccctgaggtcacgtgctgtggggggacgtg
 agccacgaagaccccgaggctccagttcaactggtagctggcggcgtggaggtgcaataatgccaagacaaagccacggga
 ggagcagttcaacagcacgttccgtgtggtagcgtcctcaccgtgtgaccagcagctggctgaacggcaaggagtaca
 agtgcaaggtctccaacaaaggcctcccagccccatcgagaaaacctctccaaaaccaaagggcagccccgagaacca
 cagggtgtacacctgccccca tcccgggaggagatgaccaagaaccaggctcagcctgacctgacctgggcaaggcttcta
 ccccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccgggagaacaactacaagaccacacctcccatgctggact
 ccgacggctccttcttccctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctcc
 gtgatgcatgaggctctgcacaaccctacacgcagaagagcctctcccgtctccgggtaaatagtaagtttaaacctct
 aga (配列番号: 52)

(アミノ酸)

EF*AWATMELGLRWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEWVSTISGG
 GTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDN YGRNYDYGMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLA
 PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNT
 KVDKTKVERKCCVECPAPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QFNSTFRWVSLTWHQDNLNGKEYCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
 IAVEWESNGQPENNYKTTTPMMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK* *V*TLX
 (配列番号: 53)

ヒトIgG2重鎖定常領域配列:

(DNA)

gctccaccaaggcccatcggtcttccccctggcgccctgctccaggagcaccctccgagagcacagccgcccctgggctg
 cctggtagcagctggtaggagcttccccgaaccggtagcgggtgctcgtaggaactcaggcgcctctgaccagcggcgtgcacaccttcc
 cagctgtcttacagtcctcaggacctactcccctcagcagcgtggtagcctgcccctccagcaacttccggcaccagacc
 tacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaagggtggacaagacagttgagcgcgaatgtgtgtcgagtggcc
 accgtgcccagcaccacctgtggcaggaccgtcagctcttccctcttcccccaaaacccaaggacacccctcatgatctccc
 ggacccctgaggctcagctgctgtggggggagctgagcagcgaagaccccgaggctccagttcaactggtagctggcggc
 gtaggagtgcaataatgccaagacaaagccacgggaggagcagttcaacagcacgttccgtgtggtagcgtcctcaccgt
 tgtgaccagcagctggctgaacggcaaggagtacaagtgaaggctctccaacaaaggcctcccagccccatcgagaaaa
 ccatctccaaaaccaaaggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccca tcccgggaggagatgaccaagaac
 caggctcagctgacctgctgggcaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccgg
 agaacaactacaagaccacacctcccatgctggactccgacggctccttcttccctctacagcaagctcaccgtggacaag
 agcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccctacacgcagaagagcct
 ctcccctgtctccgggtaaatag (配列番号: 54)

10

20

30

40

50

(アミノ酸)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQT
YTCNVDPKPSNTKVDKTVERKCCVECPAPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVQFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQFNSTFRWVSLTWHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHHEALHNHYTQKSLSLS
PGK (配列番号: 55)

ヒト化E6 IgG1重鎖配列:

(DNA)

gaggtagcagctggtaggagctgggggaggccctggccaagcctggggggctccctgagactctcctgtgcagcctctggatt
caccttcagtaggtatggcatgagctgggtccgccaggctccagggaagaggctggagtgggctctcaaccttagtgggc
gaggcaccataatactaccagactcagtagaaggccgatcaccatctccagagacaacgccaagaaccactgtat
ctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtatctctgctcccagagataactatggccgcaactatgatt
tggaatggaatattggggccaggccacctggtagaccgtgagcagcgcctagcaccaggcccatcggtcttccccctgg
cacctctccaagagcactctgggggcacagcggccctgggctgctggtagaggactacttccccgaaccggtgacg
gtgtcgtggaactcaggcggcctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtctacagtctcaggactctactccct
cagcagcgtggtagagtgccctccagcagctgggacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaaca
ccaagtggaacaagaagttagagcccaaatctgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcaccctgaactcctg
gggggaccgtcagctcttctcttcccccaaaaaccaaggacacctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgctg
ggtaggtagcgtgagccacgaagacctgaggccaagtcaactggtagcgtggaggtgcaataatgccaaga
caaagccgaggaggagcagtaaacagcagctaccgtgtggtagcgtctcaccgtctgcaccaggactggctgaat
ggcaaggagtaaaagtgaaggtctccaacaaaagccctcccagccccatcgagaaaacctctccaagccaaaggga
gccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggctcagcctgacctgctgg
tcaaaggtctctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccagcct
cccgtgctggactccgacggctcttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgt
cttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatgat
aa (配列番号: 56)

(アミノ酸)

EVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEWVSTISGGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNP
LQMNLSRAEDTAVYYCPRDNYGRNYDYGMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHWDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHHEALHNHYTQKSLSLSPGK* * (配列番号: 57)

ヒトIgG1重鎖定常領域配列:

(DNA)

gctagcaccaggcccatcggtcttccccctggcaccctctccaagagcaccctctgggggcacagcggccctgggctg
cctggtagaggactacttccccgaaccggtgacgggtgtcgtggaactcaggcggcctgaccagcggcgtgcacaccttcc
cggctgtcttacagctctcaggactctactcccctcagcagcgtggtagagtgccctccagcagcttgggcaccagac
ctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaaaccaaggtaggacaagaaagttagagcccaaatctgtgacaaaactc
acacatgcccaccgtgcccagcaccctgaactcttggggggaccgtcagctcttctcttcccccaaaaaccaaggacacc
ctcatgactctcccggaccctgaggtcacatgctggtggtagcgtgagccacgaagaccctgaggccaagtcaactg
gtacgtggacggcgtggaggtagcaataatgccaagacaaaagccgaggaggagcagtaaacagcagctaccgtgtggtag
gctctcaccgtctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaaagccctcccagcc
cccatcgagaaaacctctccaagccaaaagggcagccccgagaaccacagggtgtacacctgcccccatcccgggagga
gatgaccaagaaccaggctcagcctgacctgctggtagcaaggtctctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagagca
atgggcagccggagaacaactacaagaccagcctcccgtgctggactccgacggctcttcttctctacagcaagctc
accgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacac
gcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatgataa (配列番号: 58)

(アミノ酸)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
 YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQ
 KSLSLSPGK* * (配列番号: 59)

ヒトIgG1重鎖定常領域gBLOCK#1配列:

(DNA)

atggcatggattattggggccagggcaccctggtagccgtgagcagcgttagcaccaagggcccatcggctcttccccctg
 gcacctcctccaagagcaccctctgggggcacagcggccctgggctgccctggccaaggactacttccccgaaccgggtgac
 ggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccc
 tcagcagcgtggtgacagtccccccagcagcttgggcaaccagacctacatctgcaactggaatcacaagcccagcaac
 accaagtggaagaagaagttagagccaaatcttggacaaaactcacacatgccaccctgcccagcaccctgaactcc
 tggggggaccgtcagctcttcttccccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgc
 gttggtggtggactgagccacgaagacctgaggccaagtcaactggtagctggacggcgtggaggtgcataaatgcca
 g (配列番号: 60)

ヒトIgG1重鎖定常領域gBLOCK#2配列:

(DNA)

tacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtagcaacagcacgtaccgtgtggtcag
 cgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaaaggcaaggagtacaagtgcaaggcttccaacaaagccctcccagccc
 ccatcgagaaaacctctccaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatcccgggaggag
 atgaccaagaaccaggtagcctgacctggctggcaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaa
 tgggcagccggagaacaactacaagaccacgctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctca
 ccgtggacaagagcaggtagcagcaggggaacgtcttcteatgetccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacg
 cagaagagcctctcccgtctccgggtaaatgataagtttaaaccgcgtgatcagcctcgactgtgccttctagtgtg (配列番号: 61)

E6重鎖可変領域重複配列:

(DNA)

atggcatggattattggggccagggcaccct (配列番号: 62)

IgG1重鎖定常領域重複領域配列:

(DNA)

tacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaag (配列番号: 63)

pCDNA3.1 V5及pSECTag2:

(DNA)

ccgctgatcagcctcgactgtgccttctagtgtg (配列番号: 64)

マウスE6軽鎖可変領域配列:

(DNA)

caaatgttctcaccagctctccagcaatcatgtctgcatctccaggggaggaggcaccctaacctgcagtgccacctc
 aagtgtaagttacatacactggttccagcagaggccaggcacttctccaaactctggatttatagcacatccaacctgg
 ctcttgagctccctgttgcctcagtggcagtggaatgggacctctactctctcacaatcagccgaaatggaggctgaa
 gatgctgccacttattactgccagcaaa ggagtagtccccattcacgttcggctcggggacaaaagtggaaataaaa
 (配列番号: 65)

(アミノ酸)

QIVLTQSPAIMASPGEEVTLTCSATSSVSYIHWFQQRPGTSPKLWIYSTSNLASGVPVRFSGSGYGTSYSLTISRMEAE

10

20

30

40

50

DAATYYCQQRSSSPFTFGSGTKLEIK (配列番号: 66)

マウスE6軽鎖可変フレームワーク領域1(FWR1)配列:

(DNA)

caaatgttctcaccagctccagcaatcatgtctgcatctccaggggaggagggtcacctaacctgc(配列番号: 67)

(アミノ酸)

QIVLTQSPA IMSASPGEEVTLTC(配列番号: 68)

マウスE6軽鎖可変相補性決定領域1(CDR1)配列:

(DNA)

AGTGCCACCTCAAGTGTAAGTTACATACAC(配列番号: 69)

(アミノ酸)

SATSSVSYIH(配列番号: 70)

10

マウスE6軽鎖可変フレームワーク領域2(FWR2)配列:

(DNA)

tggttccagcagaggccaggcacttctcccaaactctggatttat(配列番号: 71)

(アミノ酸)

WFQQRPGTSPKLWIY(配列番号: 72)

20

マウスE6軽鎖可変相補性決定領域2(CDR2)配列:

(DNA)

agcacatccaacctggcttct(配列番号: 73)

(アミノ酸)

STSNLAS(配列番号: 74)

マウスE6軽鎖可変フレームワーク領域3(FWR3)配列:

(DNA)

ggagtccctgttgccttcagtggcagtggaatgggacctcttactctctcacaatcagccgaatggaggctgaagatgctgccacttattactgc(配列番号: 75)

(アミノ酸)

GVPVRFSGSGYGTSLTISRMEAEDAATYYC(配列番号: 76)

30

マウスE6軽鎖可変相補性決定領域3(CDR3)配列:

(DNA)

cagcaaaggagtagttcccatcacg(配列番号: 77)

(アミノ酸)

QQRSSSPFT(配列番号: 78)

40

IGKV3-11*02軽鎖可変領域配列:

(DNA)

gaaatgtgttgacacagctccagccaccctgtcttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgcagggccagtcagagttagcagctactfagectggtagcaaacagaaacctggccaggctccaggctccteatetatgatgcatccaacagggccactggcatccagccaggctcagtggcagtggtctgggagagacttactctcaccatcagcagcctagagcctgaagatttgcagtttattactgtcagcagcgtagcaactggcctcc(配列番号: 79)

(アミノ酸)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGRDFTLTSSLEPEDFAVYYCQQRSNWPP(配列番号: 80)

50

IGKV3-11*02軽鎖可変フレームワーク領域1(FWR1)配列:

(DNA)

gaaattgtgttgacacagctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgc(配列番号: 81)

(アミノ酸)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC(配列番号: 82)

IGKV3-11*02軽鎖可変相補性決定領域1(CDR1)配列:

(DNA)

agggccagtcagagtgttagcagctacttagcc(配列番号: 83)

(アミノ酸)

RASQSVSSYLA(配列番号: 84)

IGKV3-11*02軽鎖可変フレームワーク領域2(FWR2)配列:

(DNA)

tggtagcaacagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctat(配列番号: 85)

(アミノ酸)

WYQQKPGQAPRLLIY(配列番号: 86)

IGKV3-11*02軽鎖可変相補性決定領域2(CDR2)配列:

(DNA)

gatgcatccaacagggccact(配列番号: 87)

(アミノ酸)

DASNRAT(配列番号: 88)

IGKV3-11*02軽鎖可変フレームワーク領域3(FWR3)配列:

(DNA)

ggcatcccagccaggttcagtgccagtggtctgggagagacttcactctcacatcagcagcctagagcctgaagattttgagctttattactgt(配列番号: 89)

(アミノ酸)

GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC(配列番号: 90)

IGKV3-11*02軽鎖可変相補性決定領域3(CDR3)配列

(DNA)

cagcagcgtagcaactggcctcc(配列番号: 91)

(アミノ酸)

QQRSNWPP(配列番号: 92)

ヒト化E6軽鎖可変領域配列:

(DNA)

gaaattgtgttgacacagctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctcacctgcagcggccaccagcagtgtagctacatccactggtagcaacagaggcctggccagagccccaggctcctcatctatagcacctccaacctggccagcggcatcccagccaggttcagtgccagtggtctgggagcagctacactctcacatcagcagcctagagcctgaagattttgagctttattactgtcagcagcgtagcagctccccctttcacctttggcagcggcaccaaagtggaaattaaa(配列番号: 93)

(アミノ酸)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLTCSATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGSDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIK(配列番号: 94)

ヒト化E6軽鎖可変フレームワーク領域1(FWR1)配列:

40

50

(DNA)

gaaattgtgttgacacagctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctcacctgc(配列番号: 95)

(アミノ酸)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLTC(配列番号: 96)

ヒト化E6軽鎖可変相補性決定領域1(CDR1)配列:

(DNA)

agcgccaccagcagtgtagctacatccac(配列番号: 97)

(アミノ酸)

SATSSVSYIH(配列番号: 98)

10

ヒト化E6重鎖可変フレームワーク領域2(FWR2)酸配列:

(DNA)

tggtagcaaacagaggcctggccagagccccaggctcctcatctat(配列番号: 99)

(アミノ酸)

WYQQRPGQSPRLLIY(配列番号: 100)

ヒト化E6軽鎖可変相補性決定領域2(CDR2)配列:

(DNA)

agcacctccaacctggccagc(配列番号: 101)

(アミノ酸)

STSNLAS(配列番号: 102)

20

ヒト化E6軽鎖可変フレームワーク領域3(FWR3)酸配列:

(DNA)

ggcatcccagccaggttcagtgccagtggtctgggagcgactacactctcacatcagcagcctagagcctgaagatttgagctttattactgt(配列番号: 103)

(アミノ酸)

GIPARFSGSGSGSDYTLTSSLEPEDFAVYYC(配列番号: 104)

30

ヒト化E6軽鎖可変相補性決定領域3(CDR3)配列:

(DNA)

cagcagcgtagcagctcccctttcacc(配列番号: 105)

(アミノ酸)

QQRSSSPFT(配列番号: 106)

Genescriptによって合成された、ヒト化E6 軽鎖:

(DNA)

gaattctaagcttggccaccatggaagcccagcgcagcttctcttctcctcctgctactctggctcccagataccactgg
 agaaattgtgttgacacagctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctcacctgcagcgcacca
 gcagtgtagctacatccactggtaccaacagagggcctggccagagccccaggctcctcatctatagcacctccaacctg
 gccagcggcatcccagccaggttcagtgccagtggtctgggagcgactacactctcacatcagcagcctagagcctga
 agattttgagctttattactgtcagcagcgtagcagctcccctttcacctttggcagcggcaccaaagtggaaataaaa
 ggacggtggctgcacatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgc
 ctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataaacgccctccaatcgggtaactcccagga
 gagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcactacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgaga
 aacacaaagtctacgctgcaagtcacccatcagggcctgagctcgccgtcacaagagcttcaacaggggagagtg
 tagtaagtttaaactctaga(配列番号: 107)

(アミノ酸)

40

50

EF*AWATMEAPAQLLFLLLLWLPD TTGE I VLTQSPATLSLSPGERATLTCSATSSVSY I HWYQQRPGQSPRLL I YSTSNL
 ASG I PARFSGSGSGSDYTLT I SSLEPEDFAVYYCQQRSSSPFTFGSGTKVE I KRTVAAPSVF I FPPSDEQLKSGTASVV
 CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
 C* *V*TLX (配列番号: 108)

ヒト 軽鎖定常領域配列:

(DNA)

aaggacgggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgt
 gccctgtgaaacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaagggtggataacgccctccaatcgggtaactcccag
 gagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcaccacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacga
 gaaacacaaagtctacgctgccaagtacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagt
 gttag (配列番号: 109)

10

(アミノ酸)

RTVAAPSVF I FPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEK
 HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号: 110)

ヒト化E6 軽鎖配列:

(DNA)

gaaatgtgttgacacagctccagccaccctgtcttctgtctccaggggaaagagccaccctcacctgcagcggccaccag
 cagtgtagctacatccactggtagcaacagaggcctggccagagccccaggctcctcatctatagcaccctccaacctgg
 ccagcggcatcccagccaggttcagtgccagtggtctgggagcagctacactctcacatcagcagcctagagcctgaa
 gatcttgagcttatfactgtcagcagcgtagcagctcccccttccaccttggcagcggcaccacaaagtggaaataaagg
 tcagcccaaggctgccccctcggctcactctgttcccgccctcctctgaggagcttcaagccaacaaggccacactgggtg
 gctcctaagtgactctaccgggagccgtgacagtgccctggaaggcagatagcagccccgtcaaggcgggagtgagg
 accaccacaccctccaaacaaagcaacaacaagtagcggccagcagctatctgagcctgacgctgagcagtggaagt
 ccacagaagctacagctgccaggtcacgcatgaaggagcaccgtggagaagacagtgccccctacagaatgttcatagt
 aa (配列番号: 111)

20

(アミノ酸)

E I VLTQSPATLSLSPGERATLTCSATSSVSY I HWYQQRPGQSPRLL I YSTSNLASG I PARFSGSGSGSDYTLT I SSLEPE
 DFAVYYCQQRSSSPFTFGSGTKVE I KGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL I SDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVE
 TTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS * * (配列番号: 112)

30

ヒト化 軽鎖定常領域配列:

(DNA)

ggtcagcccaaggctgccccctcggctcactctgttcccgccctcctctgaggagcttcaagccaacaaggccacactgg
 gtgtctcataagtgactctaccgggagccgtgacagtgccctggaaggcagatagcagccccgtcaaggcgggagtg
 agaccaccacaccctccaaacaaagcaacaacaagtagcggccagcagctatctgagc ctgacgctgagcagtgga
 gtcacacagaagctacagctgccaggtcacgcatgaaggagcaccgtggagaagacagtgccccctacagaatgttcat
 agtaa (配列番号: 113)

40

(アミノ酸)

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL I SDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWK
 SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS* * (配列番号: 114)

ヒト 軽鎖定常領域gBLOCK#3配列:

(DNA)

agcggcaccagcagtgtagctacatccactggtagcaacagaggcctggccagagccccaggctcctcatctatagcac
 ctccaacctggccagcggcatcccagccaggttcagtgccagtggtctgggagcagctacactctcacatcagcagcc
 tagagcctgaagatcttgagcttatfactgtcagcagcgtagcagctcccccttccaccttggcagcggcaccacaaagt
 gaaataaaggctcagcccaaggctgccccctcggctcactctgttcccgccctcctctgaggagcttcaagccaacaaggc
 cacactgggtgtgtctcataagtgactctaccgggagccgtgacagtgccctggaaggcagatagcagccccgtcaagg

50

cgggagtggagaccaccacacccctccaaacaaagcaacaacaagtacgcggccagcagctatctgagcctgacgcctgag
cagtggaagtcccacagaagctacagctgccaggtcacgcatgaagggagcaccgtggagaagacagtgccccctacaga
atgttcatagtaagtttaaaccgcgtgatcagcctcgactgtgccttctagttg(配列番号: 115)

E6軽鎖可変領域重複配列:

(DNA)

agcgccaccagcagtgtagctacatccact(配列番号: 116)

pCDNA3.1 V5及びpSECTag2重複配列:

(DNA)

ccgctgatcagcctcgactgtgccttctagttg(配列番号: 117)

10

マウスC2重鎖可変領域配列:

(DNA)

gaggtccagctggaggagttagggggaggcttagtgaagcctggagggtccctgaaactctcctgtgcagcctctggatt
cactttcagtggtatgccatgtctgggttcgccagactccggagaagaggctggagtgggtcgcaaccattagtagtg
gtggtacttatactactatccagacagtgtagggggcgattcaccatctccagagacaatgccaagaacaccctgtac
ctgcaaatgagcagctctgaggtctgaggacacggccatgtattactgtgcaagacttgggggggataatfactacgaata
cttcgatgtctggggcgaggaccacggtcaccgtctcctccgcaaaacgacacccccatctgtctat(SEQ ID (

配列番号: 118)

(アミノ酸)

EVQLEESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSGYAMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNKNTLY
LQMSSLRSEDAMYYCARLGGDNYYEYFDVWGAGTTTVTVSSAKTTPPSVY(配列番号: 119)

20

マウスC2重鎖可変フレームワーク領域1(FWR1)配列:

(DNA)

gaggtccagctggaggagttagggggaggcttagtgaagcctggagggtccctgaaactctcctgtgcagcctctggatt
cactttcagt(配列番号: 120)

(アミノ酸)

EVQLEESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFS(配列番号: 121)

30

マウスC2重鎖可変相補性決定領域1(CDR1)配列:

(DNA)

ggctatgccatgtct(配列番号: 122)

(アミノ酸)

GYAMS(配列番号: 123)

マウスC2重鎖可変フレームワーク領域2(FWR2)配列:

(DNA)

tgggttcgccagactccggagaagaggctggagtgggtcgca(配列番号: 124)

(アミノ酸)

WVRQTPEKRLEWVA(配列番号: 125)

40

マウスC2重鎖可変相補性決定領域2(CDR2)配列:

(DNA)

accattagtagtggtggtacttatactactatccagacagtgtaggggg(配列番号: 126)

(アミノ酸)

TISSGGTYIYYPDSVKG(配列番号: 127)

マウスC2重鎖可変フレームワーク領域3(FWR3)配列:

50

(DNA)

cgattcaccatctccagagacaatgccagaacacccctgtacctgcaaatgagcagctctgaggtctgaggacacggccat
gtattactgtgcaaga(配列番号: 128)

(アミノ酸)

RFTISRDNKNTLYLQMSSLRSEDAMYYCAR(配列番号: 129)

マウスC2重鎖可変相補性決定領域3(CDR3)配列:

(DNA)

cttgggggggataattactacgaatacttcgatgtc(配列番号: 130)

(アミノ酸)

LGGDNYEYFDV(配列番号: 131)

10

IGHV3-21*04重鎖可変領域配列:

(DNA)

gaggtgcagctggaggagctctgggggaggccctggccaagcctgggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggatt
caccttcagtagctatagcatgaactgggtccgcccaggctccaggggaaggggctggagtggtctcatccattagtagta
gtagtagttacataactacgcagactcagtgaggggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcactgtat
ctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgaga(配列番号: 132)

(アミノ酸)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAR(配列番号: 133)

20

IGHV3-21*04重鎖可変フレームワーク領域1(FWR1)配列:

(DNA)

gaggtgcagctggaggagctctgggggaggccctggccaagcctgggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggatt
caccttcagt(配列番号: 134)

(アミノ酸)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS(配列番号: 135)

IGHV3-21*04重鎖可変相補性決定領域1(CDR1)配列:

(DNA)

agctatagcatgaac(配列番号: 136)

(アミノ酸)

SYSMN(配列番号: 137)

IGHV3-21*04重鎖可変フレームワーク領域2(FWR2)配列:

(DNA)

gggtccgcccaggctccaggggaaggggctggagtggtctca(配列番号: 138)

(アミノ酸)

WVRQAPGKGLEWVS(配列番号: 139)

40

IGHV3-21*04重鎖可変相補性決定領域2(CDR2)配列:

(DNA)

tccattagtagtagtagtagttacataactacgcagactcagtgaggggc(配列番号: 140)

(アミノ酸)

SISSSSYIYYADSVKG(配列番号: 141)

IGHV3-21*04重鎖可変フレームワーク領域3(FWR3)配列:

(DNA)

cgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgt
gtattactgtgcgaga(配列番号: 142)

50

(アミノ酸)

RFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR(配列番号: 143)

ヒト化C2重鎖可変領域配列:

(DNA)

gagggtgcagctgggtggagtctgggggaggcctgggtcaagcctgggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggatt
 caccttcagtggctatgccatgagctgggtccgccaggctccaggaaggggctggagtgggtctcaaccattagtagtg
 gcggaacctacataactacccccgactcagtgaagggccgattcaccaatctccagagacaacgccaagaactcactgtat
 ctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgagacttgggggggataaattactacgaata
 ctctcgatgtctggggcaaaggaccacggtcaccgtctcctcc (配列番号: 144)

10

(アミノ酸)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNANKNSLY
 LQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYEYFDVWGKGTTVTVSS (配列番号: 145)

ヒト化C2重鎖可変フレームワーク領域1(FWR1)配列:

(DNA)

gagggtgcagctgggtggagtctgggggaggcctgggtcaagcctgggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggatt
 caccttcagt (配列番号: 146)

(アミノ酸)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS(配列番号: 147)

20

ヒト化C2重鎖可変相補性決定領域1(CDR1)配列:

(DNA)

ggctatgccatgagc(配列番号: 148)

(アミノ酸)

GYAMS(配列番号: 149)

ヒト化C2重鎖可変フレームワーク領域2(FWR2)配列:

(DNA)

tgggtccgccaggctccaggaaggggctggagtgggtctcaa(配列番号: 150)

30

(アミノ酸)

WVRQAPGKGLEWVS(配列番号: 151)

ヒト化C2重鎖可変相補性決定領域2(CDR2)配列:

(DNA)

accattagtagtggcggaacctacataactacccccgactcagtgaagggc(配列番号: 152)

(アミノ酸)

TISSGGTYIYYPDSVKG(配列番号: 153)

ヒト化C2重鎖可変フレームワーク領域3(FWR3)配列:

(DNA)

cgattcaccaatctccagagacaacgccaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgt
 gtattactgtgagaga(配列番号: 154)

40

(アミノ酸)

RFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR(配列番号: 155)

ヒト化C2重鎖可変相補性決定領域3(CDR3)配列:

(DNA)

cttgggggggataaattactacgaataactctcgatgtc(配列番号: 156)

(アミノ酸)

50

LGGDNYEYFDV(配列番号: 157)

ヒト化C2 IgG1重鎖配列

(DNA)

gagg tgcagc tgg tggag tct gggggaggcct gg tcaagcct ggggggt cct gagact cct cct g tgcagcct c tggat t
cacct t cag tggc t atgccat gac tggg tccgccaggc tccagggaagggc tggag tgggt c tcaacct atag tag t g
gcggaacc tacatatact accccgact cag tgaagggccgat t caccat c tccagagacaacgccaagaact cact g t at
ct gcaaa tgaacagcct gagagccgaggacacggccg t g t at t ac t g tgcgagact tgggggggataat t actacgaata
ct t cga t g t c tggggcaaagggaccacgg t caccg t c t c t c c g c t a g c a c c a a g g g c c c a t c g g t c t t c c c c c t g g c a c
c c t c c t c c a a g a g c a c c t c t g g g g g c a c a g c g g c c c t g g g c t g c c t g g t c a a g g a c t a c t t c c c c g a a c c g g t g a c g g t g
t c g t g g a a c t c a g g c g c c c t g a c c a g c g g c g t g c a c a c c t t c c c g g c t g t c c t a c a g t c c t c a g g a c t c t a c t c c c t c a g
c a g c g t g g t g a c a g t g c c c t c c a g c a g c t t g g g c a c c c a g a c c t a c a t c t g c a a c g t g a a t c a c a a g c c c a g c a a c a c c a
a g g t g g a c a a g a a a g t t g a g c c c a a a t c t t g t g a c a a a a c t c a c a c a t g c c c a c c g t g c c c a g c a c c t g a a c t c c t g g g g
g g a c c g t c a g t c t t c c t c t t c c c c c a a a a c c c a a g g a c a c c c t c a t g a t c t c c c g g a c c c c t g a g g t c a c a t g c g t g g t
g g t g g a c g t g a g c c a c g a a g a c c c t g a g g t c a a g t t c a a c t g g t a c g t g g a c g g c g t g g a g g t g c a t a a t g c c a a g a c a a
a g c c g c g g g a g g a g c a g t a c a a c a g c a c g t a c c g t g t g g t c a g c g t c c t c a c c g t c c t g c a c c a g g a c t g g c t g a a t g g c
a a g g a g t a c a a g t g c a a g g t c t c c a a c a a a g c c c t c c c a g c c c c a t c g a g a a a c c a t c t c c a a a g c c a a a g g g c a g c c
c c g a g a a c c a c a g g t g t a c a c c c t g c c c c a t c c c g g g a g g a g a t g a c c a a g a a c c a g g t c a g c c t g a c c t g c c t g g t c a
a a g g c t t c t a t c c c a g c g a c a t c g c c g t g g a g t g g g a g a g c a a t g g g c a g c c g g a g a a c a c t a c a a g a c c a c g c c t c c c
g t g c t g g a c t c c g a c g g c t c c t t c t t c c t c t a c a g c a a g c t c a c c g t g g a c a a g a g c a g g t g g c a g c a g g g g a a c g t c t t
c t c a t g c t c c g t g a t g c a t g a g g c t c t g c a c a a c c a c t a c a c g c a g a a g a g c c t c t c c c t g t c t c c g g g t a a a t g a t a a

(配列番号: 158)

(アミノ酸)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLY
LQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYEYFDVWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* * (配列番号: 159)

ヒト化C2 gBLOCK#4配列:

(DNA)

actcactatagggagacccaagctggcctagtttaagcttggggccaccatggagacagacacactcctgctatgggtactgc
tgcctctgggtfccaggtfccactggtagcagggtgcagctgggtggagctctggggggaggcctggtaagcctgggggggtcc
ctgagactcctgtgcagcctctggattcaccttcagtggctatgccatgagctgggtccgccaggctccagggaaggg
gctggagtggtctcaaccatagtagtggcggaaacctacatatactaccgactcagtgaagggccgatcaccatct
ccagagacaacgccaagaactcactgtatctgcaaa tgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtat t actgtgcg
agact tgggggggataat t actacgaatact t cga t g t c t g g g g c a a a g g g a c c a c g g t c a c c g t c t c c t c c g c t a g c a c
caagggcccatcggctctccccctggcaccctcctccaagagcaccctctgggggcacagcggccctgggctgcctggta
aggactact tccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagc (配列番号: 160)

pCDNA3.1 V5重複配列:

(DNA)

actcactatagggagacccaagctggcctagtt (配列番号: 161)

ヒトIgG1定常領域重複配列:

(DNA)

gacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagc (配列番号: 162)

ヒト化C2 IgG2重鎖配列

10

20

30

40

50

(DNA)

gagg tgcagc tgg tggag tct gggggaggcc tgg tcaagcc tgggggg tccc tgcagact cct cctgtgcagcct cttggatt
cacct t cag tggc t atgccat gagc tggg tccgccaggc tccagggaaagggc tggag tggg tct caacat tagt tagt g
gcggaacct acata t act accccgact cag tgaagggccgatt cacca tct ccagagacaacgccaagaact cact g t at
ctgcaaa tgaacagc tgcagagccgaggacacggccgt g t at t act g tgcgagact tgggggggataat t act acgaata
ct t cga t g t c t ggggcaaaggaccacgg t caccg t c t c c t c c g c c t c c a c c a a g g g c c c a t c g g t c t t c c c c c t g g c g c
c c t g c t c c a g g a g c a c c t c c g a g a g c a c a g c c g c c c t g g g c t g c c t g g t c a a g g a c t a c t t c c c c g a a c c g g t g a c g g t g
t c g t g g a a c t c a g g c g c t c t g a c c a g c g g c g t g c a c a c c t t c c c a g c t g t c c t a c a g t c c t c a g g a c t c t a c t c c c t c a g
c a g c g t g g t g a c c g t g c c c t c c a g c a a c t t c g g c a c c c a g a c c t a c a c c t g c a a c g t a g a t c a c a a g c c c a g c a a c a c c a
a g g t g g a c a a g a c a g t t g a g c g c a a a t g t t g t g t c g a g t g c c c a c c g t g c c c a g c a c c a c c t g t g g c a g g a c c g t c a g t c
t t c c t c t t c c c c c a a a c c c a a g g a c a c c c t c a t g a t c t c c c g g a c c c c t g a g g t c a c g t g c g t g g t g g t g g a c g t g a
g c c a c g a a g a c c c c g a g g t c c a g t t c a a c t g g t a c g t g g a c g g c g t g g a g g t g c a t a a t g c c a a g a c a a a g c c a c g g g a g
g a g c a g t t c a a c a g c a c g t t c c g t g t g g t c a g c g t c c t c a c c g t g t g c a c c a g g a c t g g c t g a a c g g c a a g g a g t a c a a
g t g c a a g g t c t c c a a c a a a g g c t c c c a g c c c c a t c g a g a a a c c a t c t c c a a a a c c a a a g g g c a g c c c c g a g a a c c a c
a g g t g t a c a c c t t g c c c c a t c c c g g g a g g a g a t g a c c a a g a a c c a g g t c a g c c t g a c c t g c c t g g t c a a a g g c t t c t a c
c c c a g c g a c a t c g c c g t g g a g t g g g a g a g c a a t g g g c a g c c g g a g a a c a a c t a c a a g a c c a c a c c t c c c a t g c t g g a c t c
c g a c g g c t c c t t c t t c c t c t a c a g c a a g c t c a c c g t g g a c a a g a g c a g g t g g c a g c a g g g g a a c g t c t t c t c a t g c t c c g
t g a t g c a t g a g g c t c t g c a c a a c c a c t a c a c g c a g a a g a g c c t c t c c c t g t c t c c g g g t a a a t a g t a a (配列番号:
163)

10

(アミノ酸)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRD NAKNSL
YLQMNSLR AEDTAVYYCARLGGDNYEYFDVWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVV
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPVSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCCVECPAPPVAGPSV
FLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCWVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYK
CKVSNKGLPAPI EKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK* * (配列番号: 164)

20

ヒト化C2 gBLOCK#5配列:

(DNA)

tgctctgggt tccaggt tccactgg tgcgcggccagccggccgaggtgcagctgg tggag tct gggggaggcc tgg t c
aagcc tgggggg tccc tgcagact cct cctgtgcagcct cttggattcacct t cag tggc t atgccat gagc tggg tccgcca
ggc tccagggaaagggc tggag tggg tct caacat tagt tagtggcggaaacctacata t act accccgact cag tgaagg
gccgattcacca tctccagagacaacgccaagaact cact g t at c t g c a a a t g a a c a g c c t g a g a g c c g a g g a c a c g g c c
g t g t a t t a c t g t g c g a g a c t t g g g g g g a t a a t t a c t a c g a a t a c t t c g a t g t c t g g g g c a a a g g g a c c a c g g t c a c c g t
c t c c t c c g c c t c c a c c a a g g g c c a t c g g t c t t c c c c t g g c g c c c t g c t c c a g g a g c a c c t c c g a g a g c a c a g c c g c c c
t g g g c t g c c t g g t c a a g g a c t a c t t c c c c g a a c c g g t g a c g g t g t c g t g g a a c t c a g g c g c t c t g a c c a (配列番号:
165)

30

pSEC Tag2重複配列:

(DNA)

tgctctgggt tccaggt tccactgg tgcgc (配列番号: 166)

40

ヒトIgG2定常領域重複配列:

(DNA)

gacggtg t c g t g g a a c t c a g g c g c t c t g a c c a (配列番号: 167)

マウスC2軽鎖可変領域配列:

(DNA)

gacattgtgatcacacagctctacagcttcc ttaggtgtatctctggggcagagggccaccatctcatgcagggccagcaa
aagtg t c a g t a c a t c t g g c t a t a g t t a t a t g c a c t g g t a c c a a c a g a g a c c a g g a c a g c c a c c c a a a c t c c t c a t c t a t c

50

ttgcatccaacctagaatctgggggtccctgccaggttcagtgccagtgggctctgggacagacttcaccctcaacatccat
 cctgtggaggaggaggatgctgcaacctattactgtcagcacagtagggagcttccgttcacgttcggagggggggaccaa
 gctggagataaaacgggctgatgctgcaccaactgtatcc (配列番号: 168)

(アミノ酸)

DIVITQSTASLGVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHWYQQRPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIH
 PVEEEDAATYYCQHSRELPFTFGGGTKLEIKRADAAPTVS (配列番号: 169)

マウスC2軽鎖可変フレームワーク領域1(FWR1)配列:

(DNA)

gacattgtgatcacacagctctacagcttccttaggtgtatctctggggcagagggccaccatctcatgc(配列番号: 170)

(アミノ酸)

DIVITQSTASLGVSLGQRATISC(配列番号: 171)

マウスC2軽鎖可変相補性決定領域1(CDR1)配列:

(DNA)

agggccagcaaaaagtgctcagtacatctggctatagttatatgcac(配列番号: 172)

(アミノ酸)

RASKSVSTSGYSYMH(配列番号: 173)

マウスC2軽鎖可変フレームワーク領域2(FWR2)配列:

(DNA)

tggtaccaacagagaccaggacagccacccaaactcctcatctat(配列番号: 174)

(アミノ酸)

WYQQRPGQPPKLLIY(配列番号: 175)

マウスC2軽鎖可変相補性決定領域2(CDR2)配列:

(DNA)

cttgcattccaacctagaatc(配列番号: 176)

(アミノ酸)

LASNLES(配列番号: 177)

マウスC2軽鎖可変フレームワーク領域3(FWR3)配列:

(DNA)

tgggggtccctgccaggttcagtgccagtgggctctgggacagacttcaccctcaacatccatcctgtggaggaggaggatg
 ctgcaacctattactgt(配列番号: 178)

(アミノ酸)

GVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYC(配列番号: 179)

マウスC2軽鎖可変相補性決定領域3(CDR3)配列:

(DNA)

cagcacagtagggagcttccgttcacg(配列番号: 180)

(アミノ酸)

QHSRELPFT(配列番号: 181)

IGKV7-3*01軽鎖可変領域配列:

(DNA)

gacattgtgctgaccagctctccagcctccttggccgtgtctccaggacagagggccaccatcacctgcagagccagtg
 gagtgtcagtttcttgggaataaaacttaattcactggatcagcagaaaccaggacaacctcctaaactcctgatftacc
 aagcatccaataaagacactgggggtcccagccaggttcagcggcagtggtctgggaccgatftaccctcacaattaat

10

20

30

40

50

cctgtggaagctaatactgatactgcaaat tattactgtctgcagagtaagaat t t t cctcccaca(配列番号: 182)
(アミノ酸)

DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVSFLGILIHVYQQKPGQPPKLLIYQASNKDTGVPARFSGSGSGTDFTLTINP
VEANDTANYCYLQSKNFPPT(配列番号: 183)

IGKV7-3*01軽鎖可変フレームワーク領域1(FWR1)配列:

(DNA)

gacattgtgctgaccagctctccagcctccttggccgtgtctccaggacagagggccaccatcacctgc(配列番号:
184)

(アミノ酸)

DIVLTQSPASLAVSPGQRATITC(配列番号: 185)

10

IGKV7-3*01軽鎖可変相補性決定領域1(CDR1)配列:

(DNA)

agagccagtgagagtgctcagtttcttgggaataaaacttaattcac(配列番号: 186)

(アミノ酸)

RASESVSFLGINLIH(配列番号: 187)

IGKV7-3*01軽鎖可変フレームワーク領域2(FWR2)配列:

(DNA)

tggtatcagcagaaaccaggacaacctcctaaactcctgatttac(配列番号: 188)

(アミノ酸)

WYQQKPGQPPKLLIY(配列番号: 189)

20

IGKV7-3*01軽鎖可変相補性決定領域2(CDR2)配列:

(DNA)

caagcatccaataaagacact(配列番号: 190)

(アミノ酸)

QASNKDT(配列番号: 191)

30

IGKV7-3*01軽鎖可変フレームワーク領域3(FWR3)配列:

(DNA)

gggtcccagccaggttcagcggcagtggtctgggaccgatttcaccctcacaattaatcctgtggaagctaatactgatac
tgcaaat tattactgt(配列番号: 192)

(アミノ酸)

GVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYCY(配列番号: 193)

ヒト化C2軽鎖可変領域配列:

(DNA)

gacattgtgctgaccagctctccagcctccttggccgtgtctccaggacagagggccaccatcacctgcagagccagtaa
gagtgctcagctaccagcggatactcctacatgcactgggtatcagcagaaaccaggacaacctcctaaactcctgatttacc
tggcatccaatctggagagcgggtcccagccaggttcagcggcagtggtctgggaccgatttcaccctcacaattaat
cctgtggaagctaatactgatactgcaaat tattactgtcagcacagtagggagctgcctttcacattcggcggagggaccaa
ggtggagatcaaacgaact(配列番号: 194)

(アミノ酸)

DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASKSVSTSGYSYMHVYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTIN
PVEANDTANYCYQHSRELPFTFGGKVEIKRT(配列番号: 195)

40

ヒト化C2軽鎖可変フレームワーク領域1(FWR1)酸配列:

(DNA)

50

gacattgtgctgacccagctctccagcctccttggccgtgtctccaggacagagggccaccatcacctgc(配列番号: 196)

(アミノ酸)

DIVLTQSPASLAVSPGQRATITC(配列番号: 197)

ヒト化C2軽鎖可変相補性決定領域1(CDR1)配列:

(DNA)

agagccagtaagagtgtcagtaccagcggatactcctacatgcac(配列番号: 198)

(アミノ酸)

RASKSVSTSGYSYMH(配列番号: 199)

10

ヒト化C2重軽可変フレームワーク領域2(FWR2)酸配列:

(DNA)

tggatcagcagaaaccaggacaacctcctaaactcctgatttac(配列番号: 200)

(アミノ酸)

WYQKPGQPPKLLIY(配列番号: 201)

ヒト化C2軽鎖可変相補性決定領域2(CDR2)配列:

(DNA)

ctggcatccaatctggagagc(配列番号: 202)

(アミノ酸)

LASNLES(配列番号: 203)

20

ヒト化C2軽鎖可変フレームワーク領域3(FWR3)酸配列:

(DNA)

ggggtcccagccaggttcagcggcagtggtctgggaccgatctcaccctcacaataatcctgtggaagctaataatgatactgcaaatattactgt(配列番号: 204)

(アミノ酸)

GVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYC(配列番号: 205)

30

ヒト化C2軽鎖可変相補性決定領域3(CDR3)配列:

(DNA)

cagcacagtagggagctgcctttcaca(配列番号: 206)

(アミノ酸)

QHSRELPFT(配列番号: 207)

ヒト化C2軽鎖可変相補性決定領域3(CDR3)配列:

(DNA)

ctgcagagtaagaattttcctcccaca(配列番号: 208)

(アミノ酸)

LQSKNFPPT(配列番号: 209)

40

ヒト化C2 gBLOCK#6配列(pCDNA3.1 V5における 軽鎖):

(DNA)

actcactataggagaccaagctggctagttaagcttgggccaccatggagacagacacactcctgctatgggtactgctgctctgggttccaggttccactggtgacgacatgtgctgacccagctccagcctccttggccgtgtctccaggacagaggccaccatcactgcagagccagtaagagtgtcagtaccagcggatactcctacatgcactggatcagcagaaaccaggacaacctcctaaactcctgatttacctggcatccaatctggagagcgggtcccagccaggttcagcggcagtggtctgggaccgatctcaccctcacaataatcctgtggaagctaatactgcaaatattactgtcagcacagtagggagctgcctttcacaatcggcggagggaaccaaggtggagatcaaacgaactacgggtggctgcaccatctgtcttcatcttccc

50

gccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaag
 tacagtggaaggtggataaacgccc tccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacc
 tacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaaagctacgctgccaagtacccatca
 gggctgagetcgcccgtcacaagagcttcaacaggggagagtgttagtaagtttaaaccgctgatcaccctcgactg
 gccttctagttg(配列番号: 210)

pCDNA3.1 V5 5' 重複配列:
 (DNA)

actcactatagggagaccaagctggctagtt(配列番号: 211)

10

pCDNA3.1 V5 3' 重複配列:
 (DNA)

ccgctgatcagcctcgactgtgccttctagttg(配列番号: 212)

ヒト化C2 gBLOCK#7配列(pSEC Tag2における 軽鎖):
 (DNA)

tgctctgggttccaggttccactggtgacgcggcccagccggccgacatgtgctgaccagctctccagcctccttggcc
 gtgtctccaggacagagggccaccatcaccctgcagagccagtaagagtgtcagtaccagcggatactcctacatgcactg
 gtafcagcagaaaccaggacaacctcctaaactcctgatftacctggcatccaatctggagagcgggggtcccagccaggt
 tcagcggcagtggttctgggaccgatftcaccctcacaataatcctgtggaagctaatgatactgcaaatattactgt
 cagcacagtaggagctgcttftcacatfcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaactacggctggctgcaccatc
 tgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatc
 ccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataaacgccc tccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggac
 agcaaggacagcacc tacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaaagctacgctg
 cgaagtacccatcagggcctgagetcgcccgtcacaagagcttcaacaggggagagtgttagtaagtttaaaccgct
 gatcaccctcgactgtgccttctagttg(配列番号: 213)

20

pSEC Tag2 5' 重複配列
 (DNA)

tgctctgggttccaggttccactggtgacgc(配列番号: 214)

30

pSEC Tag2 3' 重複配列:
 (DNA)

ccgctgatcagcctcgactgtgccttctagttg(配列番号: 215)

ヒト化C2 gBLOCK#8配列(pCDNA3.1 V5における 軽鎖)
 (DNA)

actcactatagggagaccaagctggctagttaaagcttgggcccaccatggagacagacacactcctgctatgggtactgc
 tgctctgggttccaggttccactggtgacgacatgtgctgaccagctctccagcctccttggccgtgtctccaggacag
 agggccaccatcaccctgcagagccagtaagagtgtcagtaccagcggatactcctacatgcactggtatcagcagaaacc
 aggacaacctcctaaactcctgatftacctggcatccaatctggagagcgggggtcccagccaggttcagcggcagtggt
 ctgggaccgatftcaccctcacaataatcctgtggaagctaatgatactgcaaatattactgtcagcacagtaggag
 ctgcttftcacatfcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaactggctcagcccaaggctgccccctcggtcactct
 gttcccgccctcctctgaggagcttcaagccaacaaggccacactgggtgtgtctcataagtgacttctaccgggagccg
 tgacagtggctggaaggcagatagcagccccgtcaaggcgggagtggagaccaccacaccctccaaacaaagcaacaac
 aagtacgcggccagcagctatctgagcctgacgctgagcagtggaagtcccacagaagctacagctgccaggctcacgca
 tgaaggagcaccgtggagaagacagtggcccc tacagaatgttcatagtaagtttaaaccgctgatcaccctcgactg
 gccttctagttg(配列番号: 216)

40

pCDNA3.1 V5 5' 重複配列:

50

(DNA)

actcactataggagaccaagctggctagtt(配列番号: 217)

pCDNA3.1 V5 3' 重複配列:

(DNA)

ccgctgatcagcctcgactgtgccttctagttg(配列番号: 218)

ヒト化C2 gBLOCK#9配列(pSEC Tag2における 軽鎖):

(DNA)

tgctctgggttccaggttccactggtgacgcggcccagccggccgacattgtgctgaccagctctccagcctccttggcc
 gtgtctccaggacagagggccaccatcacctgcagagccagtaagagtgtcagtagcagcggatactcctacatgcactg
 gtaacagcagaaccaggacaacctcctaaactcctgatttacctggcatccaatctggagagcggggtcccagccaggt
 tcagcggcagtggttctgggaccgatttaccctcacaataatcctgtggaagctaatgatactgcaaatattactgt
 cagcacagtagggagctgcctttcacattcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaactggtcagcccaaggctgc
 cccctcggctcactctgttcccgccctcctctgaggagcttcaagccaacaaggccacactgggtgtgtctcataagtgact
 tctaccgggagccgtgacagtgacctggaaggcagatagcagccccgtcaaggcgggagtgagaccaccacacctcc
 aaacaaagcaacaacaagtacgcggccagcagctatctgagcctgacgcctgagcagtggaagtcacacagaagctacag
 ctgccaggtcacgcatgaaggagcaccgtggagaagacagtgccccctacagaatgttcatagtaagtttaaaccgctg
 gatcagcctcgactgtgccttctagttg(配列番号: 219)

10

20

pSEC Tag2 5' 重複配列

(DNA)

tgctctgggttccaggttccactggtgacgc(配列番号: 220)

pSEC Tag2 3' 重複配列:

(DNA)

ccgctgatcagcctcgactgtgccttctagttg(配列番号: 221)

ネズミ科Ig 鎖リーダー配列

(DNA)

atggagacagacacactcctgctatgggtactgctgctctgggttccaggttccactggtgac(配列番号: 222)

(アミノ酸)

METDTLLLWVLLLWPGSTGD(配列番号: 223)

30

インターロイキン2(IL-2)リーダー配列

(DNA)

atgtacaggatgcaactcctgtcttgcatgcaactaagtcttgcaactgtcacaacagct(配列番号: 224)

(アミノ酸)

MYRMQLLSCIALSLALVTNS(配列番号: 225)

40

CD33リーダー配列

(DNA)

atgcctctctgcttctgcttccctctgctttgggctggagctcttgct(配列番号: 226)

(アミノ酸)

MPLLLLLLPLLWAGALA(配列番号: 227)

IGHV3-21*03リーダー配列

(DNA)

atggaactggggctccgctgggttttccctgttgctattttagaagggtgctccagttg(配列番号: 228)

(アミノ酸)

50

MELGLRWWFLVAILEGVQC(配列番号: 229)

IGHV3-11*02リーダー配列

(DNA)

atggaagccccagcgcagcttctcttccctcctgctactctggctcccagataccactgga(配列番号: 230)

(アミノ酸)

MEAPAQLLFLLLLWLPDTTG(配列番号: 231)

ヒト化E6一本鎖GS3

(DNA)

gaggTgcagctggTggagTctgggggaggccTggtcaagccTggggggTccctgagactctcctgtgcagcctctggatt
caccTtcagtaggtatggcatgagctgggtccgccaggctccaggggaagaggctggagTgggtctcaaccattagTggcg
gaggcaccTacataTactaccagactcagTgaagggccgatTcaccatctccagagacaacgccaagaacaccctgtat
ctgcaaaTgaacagccTgagagccgaggacacggctgtgtatTactgtaccagagataactatggccgcaactatgatt
TggcatggattatTggggccagggcacccTggtgaccTgagcagcggcgTggcggaTccggcgTggcggaTccggcg
gtggcggaTccgaaatTgtgtgacacagTctccagccaccctgtctTgtctccaggggaaagagccaccctcaccTgc
agcggcaccagcagTgttagctacatccactggTaccaacagaggccTggccagagccccaggctcctcatctatagcac
ctccaaccTggccagcggaTcccagccaggTcagTggcagTgggtctgggagcgactacactctcaccatcagcagcc
tagagccTgaagatTtTgcagTtTatTactgtcagcagcTtagcagctcccctTtTcaccTtTggcagcggcaccTaaagTg
gaaatTaaa(配列番号: 232)

(アミノ酸)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEWVSTISGGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCTRDNYGRNYDYGMDYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLTC
SATSSVSYIHWHYQQRPGQSPRLLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGSDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSSPFTFGSGTKV
EIK(配列番号: 233)

ヒト化E6一本鎖IgGInoC

(DNA)

gaggTgcagctggTggagTctgggggaggccTggtcaagccTggggggTccctgagactctcctgtgcagcctctggatt
caccTtcagtaggtatggcatgagctgggtccgccaggctccaggggaagaggctggagTgggtctcaaccattagTggcg
gaggcaccTacataTactaccagactcagTgaagggccgatTcaccatctccagagacaacgccaagaacaccctgtat
ctgcaaaTgaacagccTgagagccgaggacacggctgtgtatTactgtaccagagataactatggccgcaactatgatt
TggcatggattatTggggccagggcacccTggtgaccTgagcagcgaTaaaaccataactaaaccgcaaaaccggcgc
cggaactgcTgggtggTccTggTaccggTgaaatTgtgtgacacagTctccagccaccctgtctTgtctccaggggaa
agagccaccctcaccTgcagcgcaccagca gTgttagctacatccactggTaccaacagaggccTggccagagcccca
ggctcctcatctatagcaccTccaaccTggccagcggcatcccagccaggTcagTggcagTgggtctgggagcgactac
actctcaccatcagcagccTtagagccTgaagatTtTgcagTtTatTactgtcagcagcTtagcagctcccctTtTcaccTt
TggcagcggcaccTaaagTgaaatTaaa(配列番号: 234)

(アミノ酸)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEWVSTISGGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLY
YLQMNSLRAEDTAVYYCTRDNYGRNYDYGMDYWGQGTLLVTVSSDKTHTKPKPAPELLGGPGTGEIVLTQSPATLSLSPG
ERATLTCATSSVSYIHWHYQQRPGQSPRLLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGSDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSSPFT
FGSGTKVEIK(配列番号: 235)

ヒト化E6一本鎖X4(リンカーはIgG1及びIgG2修飾ヒンジ部である)

(DNA)

gaggTgcagctggTggagTctgggggaggccTggtcaagccTggggggTccctgagactctcctgtgcagcctctggatt
caccTtcagtaggtatggcatgagctgggtccgccaggctccaggggaagaggctggagTgggtctcaaccattagTggcg
gaggcaccTacataTactaccagactcagTgaagggccgatTcaccatctccagagacaacgccaagaacaccctgtat
ctgcaaaTgaacagccTgagagccgaggacacggctgtgtatTactgtaccagagataactatggccgcaactatgatt
a

10

20

30

40

50

tggcatggatttat tggggccagggcaccctgg t gaccgtgagcagcgataaaaaccataactaaaccgcaaaaaccggcgc
 cggaactgctgggtgg tcc tgg taccgg tacc tgg tgg tccgactat taaacctccgaaacctccgaaacctgctccgaac
 ctgctgggtgg tccggaaa t g t g t gacacag t c t c c a g c c a c c c t g t c t t g t c t c c a g g g g a a a g a g c c a c c c t c a c
 ctgcagcgcaccagcag t g t a g c t a c a t c c a c t g g t a c c a a c a g a g g c c t g g c c a g a g c c c c a g g c t c c t c a t c t a t a
 gcacctccaacctggccagcggcatcccagccaggttcag tggcag tgggtctgggagcagactacactctcaccatcagc
 agcctagagcctgaagatt t t g c a g t t t a t t a c t g t c a g c a g c g t a g c a g c t c c c c t t t c a c c t t t g g c a g c g g c a c c a a
 agtggaaat taaa(配列番号: 236)

(アミノ酸)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRD NAKNTL
 YLQMNSLRAEDTAVYYCTRDN YGRNYDYGMDYWGQGLTVTVSSDKTHTKPPKPAPELLGGPGTGTGGPTIKPPKPPKPPAP
 NLLGGPEIVLTQSPATLSLSPGERATLTCSATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGSDYTLTI
 SSLEPEDFAVYYCQRSSSPFTFGSGTKVEIK(配列番号: 237)

10

ヒト化C2一本鎖GS3

(DNA)

gaggtgcagctgg tggag tctgggggagggcctgg tcaagcctgggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggatt
 cacc t t c a g t g g c t a t g c c a t g a g c t g g g t c c g c c a g g c t c c a g g g a a g g g g c t g g a g t g g g t c t c a a c c a t t a g t a g t g
 gcggaacctacata t a c t a c c c c g a c t c a g t g a a g g g c c g a t t c a c c a t c t c c a g a g a c a a c g c c a a g a a c t c a c t g t a t
 ctgcaaa t g a a c a g c c t g a g a g c c g a g g a c a c g g c c g t g t a t t a c t g t g c g a g a c t g g g g g g g a t a a t t a c t a c g a a t a
 ct t c g a t g t c t g g g g c a a a g g g a c c a c g g t c a c c g t c t c c t c c g g c g g t g g c g g a t c c g g c g g t g g c g g a t c c g g c g g t g
 gcgga t c c g a c a t t g t g c t g a c c c a g t c t c c a g c c t c c t t g g c c g t g t c t c c a g g a c a g a g g g c c a c c a t c a c c t g c a g a
 gccag t a a g a g t g t c a g t a c c a g c g g a t a c t c c t a c a t g c a c t g g t a t c a g c a g a a a c c a g g a c a a c c t c c t a a a c t c c t
 g a t t a c c t g g c a t c c a a t c t g g a g a g c g g g g t c c c a g c c a g g t t c a g c g g c a g t g g g t c t g g g a c c g a t t t c a c c c t c a
 c a a t t a a t c c t g t g g a a g c t a a t g a t a c t g c a a a t t a t t a c t g t c a g c a c a g t a g g g a g c t g c c t t t c a c a t t c g g c g g a
 g g g a c c a a g g t g g a g a t c a a a c g a a c t (配列番号: 238)

20

(アミノ酸)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRD NAKNSL
 YLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYYEYFDVWVGKGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPASLAVSPGQRATITC
 RASKSVSTSGYSYMHWYQKPGQPPKLLIYLASNLESVGPVRFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYCQHSRELPFTFG
 GGTKVEIKRT(配列番号: 239)

30

ヒト化C2一本鎖IgG(システインなし)

(DNA)

gaggtgcagctgg tggag tctgggggagggcctgg tcaagcctgggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggatt
 cacc t t c a g t g g c t a t g c c a t g a g c t g g g t c c g c c a g g c t c c a g g g a a g g g g c t g g a g t g g g t c t c a a c c a t t a g t a g t g
 gcggaacctacata t a c t a c c c c g a c t c a g t g a a g g g c c g a t t c a c c a t c t c c a g a g a c a a c g c c a a g a a c t c a c t g t a t
 ctgcaaa t g a a c a g c c t g a g a g c c g a g g a c a c g g c c g t g t a t t a c t g t g c g a g a c t g g g g g g g a t a a t t a c t a c g a a t a
 ct t c g a t g t c t g g g g c a a a g g g a c c a c g g t c a c c g t c t c c t c c g a t a a a a c c c a t a c t a a a c c g c a a a a c c g g c g c c g g
 a a c t g c t g g g t g g t c c t g g t a c c g g t g a c a t t g t g c t g a c c c a g t c t c c a g c c t c c t t g g c c g t g t c t c c a g g a c a g a g g
 gccacca t c a c c t g c a g a g c c a g t a a g a g t g t c a g t a c c a g c g g a t a c t c c t a c a t g c a c t g g t a t c a g c a g a a a c c a g g
 a c a a c c t c c t a a a c t c c t g a t t a c c t g g c a t c c a a t c t g g a g a g c g g g g t c c c a g c c a g g t t c a g c g g c a g t g g g t c t g
 g g a c c g a t t t c a c c c t c a c a a t t a a t c c t g t g g a a g c t a a t g a t a c t g c a a a t t a t t a c t g t c a g c a c a g t a g g g a g c t g
 c c t t t c a c a t t c g g c g g a g g g a c c a a g g t g g a g a t c a a a c g a a c t (配列番号: 240)

40

(アミノ酸)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRD NAKNSL
 YLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYYEYFDVWVGKGTTVTVSSDKTHTKPPKPAPELLGGPGTGDIVLTQSPASLAVSPGQ
 RATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQKPGQPPKLLIYLASNLESVGPVRFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYCQHSRE
 LPFTFGGGTKVEIKRT(配列番号: 241)

50

ヒト化C2一本鎖X4(リンカーはIgG1及びIgG2修飾ヒンジ部である)

(DNA)

gagg tgcagc tgg tggag tct gggggaggcc tgg tcaagcc tgggggt ccc t g a g a c t c t c c t g t g c a g c c t c t g g a t t
 c a c c t t c a g t g g c t a t g c c a t g a g c t g g g t c c g c c a g g c t c c a g g g a a g g g g c t g g a g t g g g t c t c a a c c a t t a g t a g t g
 g c g g a a c c t a c a t a t a c t a c c c c g a c t c a g t g a a g g g c c g a t t c a c c a t c t c c a g a g a c a a c g c c a a g a a c t c a c t g t a t
 c t g c a a a t g a a c a g c c t g a g a g c c g a g g a c a c g g c c g t g t a t t a c t g t g c g a g a c t t g g g g g g a t a a t t a c t a c g a a t a
 c t t c g a t g t c t g g g g c a a a g g g a c c a c g g t c a c c g t c t c c t c c g a t a a a a c c c a t a c t a a a c c g c c a a a a c c g g c g c c g g
 a a c t g c t g g g t g g t c c t g g t a c c g g t a c t g g t g g t c c g a c t a t t a a a c c t c c g a a a c c t c c g a a a c c t g c t c c g a a c c t g
 c t g g g t g g t c c g g a c a t t g t g c t g a c c c a g t c t c c a g c c t c c t t g g c c g t g t c t c c a g g a c a g a g g g c c a c c a t c a c c t g
 c a g a g c c a g t a a g a g t g t c a g t a c c a g c g g a t a c t c c t a c a t g c a c t g g t a t c a g c a g a a a c c a g g a c a a c c t c c t a a a c
 t c c t g a t t t a c c t g g c a t c c a a t c t g g a g a g c g g g g t c c c a g c c a g g t t c a g c g g c a g t g g g t c t g g g a c c g a t t t c a c c
 c t c a c a a t t a a t c c t g t g g a a g c t a a t g a t a c t g c a a a t t a t t a c t g t c a g c a c a g t a g g g a g c t g c c t t t c a c a t t c g g
 c g g a g g g a c c a a g g t g g a g a t c a a a c g a a c t (配列番号: 242)

10

(アミノ酸)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRD NAKNSL
 YLQMNLSRAEDTAVYYCARLGGDNYEYFDVWGKGTTVVSSDKTHTKPPKPAPELLGGPGTGTGGPTIKPPKPPKPAPN
 LLGGPDIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPKGPPKLLIYLASNLESVGPVRFSGSGSGTDFTL
 TLINPVEANDTANYCQHSRELPFTFGGGTKVEIKRT(配列番号: 243)

ヒト化C3一本鎖GS3

(DNA)

c a g g t t c a g c t g g t g c a g t c t g g a g c t g a g g t g a a g a a g c c t g g g g c c t c a g t g a a g g t c t c c t g c a a g g c t t c t g g t t a
 c a c c t t t a c c g a c t a c g c c a t g a a c t g g g t g c g a c a g g c c c c t g g a c a a g g g c t t g a g t g g a t g g g a g t g a t c a g c a c c t
 t c a g c g g t a a c a c a a a c t t c a a c c a g a a g t t c a a g g g c a g a g t c a c c a t g a c c a c a g a c a c a t c c a c g a g a c a c a g c c t a c
 a t g g a g c t g a g g a g c c t g a g a t c t g a c g a c a c g g c c g t g t a t t a c t g t g c g a g a a g c g a c t a c t a c g g c c c a t a c t t c g a
 c t a c t g g g g c c a g g g c a c c a c c c t g a c c g t g t c c a g c g g c g g t g g c g g a t c c g g c g g t g g c g g a t c c g g c g g t g g c g g a t
 c c g a t a t g t g a t g a c c c a g a c t c c a c t c t c t c t g t c c g t c a c c c c t g g a c a g c c g g c c t c c a t c t c c t g c a g g t c t a g t
 c a g a c c a t t g t c c a t a g t a a t g g a a a c a c c t a t t t g g a g t g g t a c c t g c a g a a g c c a g g c c a g t c t c c a c a g c t c c t g a t
 c t a t a a g g t t t c c a a c c g g t t c t c t g g a g t g c c a g a t a g g t t c a g t g g c a g c g g g t c a g g g a c a g a t t t c a c a c t g a a a a
 t c a g c c g g g t g g a g g c t g a g g a t g t t g g g g t t t a t t a c t g c t t c c a a g g t a g c c a c g t g c c t t t c a c c t t c g g c g g a g g
 a c c a a g g t g g a g a t c a a a c g a a c t (配列番号: 244)

20

30

(アミノ酸)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMNWRQAPGQGLEWMGVISTFSGNTNFNQKFKGRVTMTTDTSTSTAY
 MELRSLRSDDTAVYYCARSDYYGPFYFDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSS
 QTIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSVGPDRFSGSGSGTDFTLISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVPTFGGG
 TKVEIKRT(配列番号: 245)

ヒト化C3一本鎖IgG1(システインはない)

(DNA)

c a g g t t c a g c t g g t g c a g t c t g g a g c t g a g g t g a a g a a g c c t g g g g c c t c a g t g a a g g t c t c c t g c a a g g c t t c t g g t t a
 c a c c t t t a c c g a c t a c g c c a t g a a c t g g g t g c g a c a g g c c c c t g g a c a a g g g c t t g a g t g g a t g g g a g t g a t c a g c a c c t
 t c a g c g g t a a c a c a a a c t t c a a c c a g a a g t t c a a g g g c a g a g t c a c c a t g a c c a c a g a c a c a t c c a c g a g a c a c a g c c t a c
 a t g g a g c t g a g g a g c c t g a g a t c t g a c g a c a c g g c c g t g t a t t a c t g t g c g a g a a g c g a c t a c t a c g g c c c a t a c t t c g a
 c t a c t g g g g c c a g g g c a c c a c c c t g a c c g t g t c c a g c g a t a a a a c c c a t a c t a a a c c g c c a a a a c c g g c g c c g g a a c t g c
 t g g g t g g t c c t g g t a c c g g t g a t a t t g t g a t g a c c c a g a c t c c a c t c t c t c t g t c c g t c a c c c c t g g a c a g c c g g c c t c c
 a t c t c c t g c a g g t c t a g t c a g a c c a t t g t c c a t a g t a a t g g a a a c a c c t a t t t g g a g t g g t a c c t g c a g a a g c c a g g c c a
 g t c t c c a c a g c t c c t g a t c t a t a a g g t t t c c a a c c g g t t c t c t g g a g t g c c a g a t a g g t t c a g t g g c a g c g g g t c a g g g a
 c a g a t t t c a c a c t g a a a a t c a g c c g g g t g g a g g c t g a g g a t g t t g g g g t t t a t t a c t g c t t c c a a g g t a g c c a c g t g c c t
 t t c a c c t t c g g c g g a g g g a c c a a g g t g g a g a t c a a a c g a a c t (配列番号: 246)

40

(アミノ酸)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMNWRQAPGQGLEWMGVISTFSGNTNFNQKFKGRVTMTTDTSTSTAY

50

MELRSLRSDDTAVYYCARSDYYGPYFDYWGGQTTLTVSSDKHTHKPPKPAPELLGGPGTGDIVMTQTPLSLSVTPGQPAS
 ISCRSSQTI VHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLI YKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCFQGSHPV
 FTFGGGTKVEIKRT(配列番号: 247)

ヒト化C3一本鎖X4(リンカーはIgG1及びIgG2修飾ヒンジ部である)

(DNA)

caggttcagctgggtgcagctctggagctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaaggtctcctgcaaggcttctggtta
 cacctttaccgactacgccaatgaactgggtgcgacaggccccggacaagggtctgagtggaatgggagtgatcagcacct
 tcagcggtaacacaaacttcaaccagaagttcaagggcagagtcaccaatgaccacagacacatccacgagcacagcctac
 atggagctgaggagcctgagatctgacgacacggccgtgtattactgtgcgagaagcgactactacggcccatacttcca
 ctactggggccagggcaccacccctgaccgtgtccagcgataaaaaccataactaaaccgcaaaaaccggcgccggaactgc
 tgggtgggtccctgggtaccggtactgggtgggtccgactattaaacctccgaaacctccgaaacctgctccgaaacctgctgggt
 ggtccggatattgtgatgaccagactccactctctctgtccgtcaccctggacagccggcctccatctcctgcaggctc
 tagtcagaccattgtccatagtaattgaaacacctatttggagtggtacctgcagaagccaggccagctctccacagctcc
 tgatctataaggtttccaaccggttctctggagtgccagataggttcagtggcagcgggtcagggacagatttcacactg
 aaaaacagccgggtggaggtgaggatgttgggtttattactgettccaaggtagccacgtgccctttcaccttcggcgg
 agggaccaaggtggagatcaaacgaact(配列番号: 248)

10

(アミノ酸)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDYMNNWRQAPGQGLEWMGVISTFSGNTNFNQKFKGRVTMTTDTSTSTAY
 MELRSLRSDDTAVYYCARSDYYGPYFDYWGGQTTLTVSSDKHTHKPPKPAPELLGGPGTGTGGPTIKPPKPPKAPNLLG
 GPDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQTI VHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLI YKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTL
 KISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVFTFGGGTKVEIKRT(配列番号: 249)

20

ヒト化C8一本鎖GS3(リンカーは[Gly₄Ser₁]₃である)

(DNA)

gaggtgcagctgggtggagctctgggggaggcctgggtcaagcctgggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggatt
 caccttcagtggtatgccaatgagctgggtccgcccaggctccagggaaaggggtggagtggtctcaaccattagtagtg
 gcggaacctacataatactacctgactcagtgaaagggccgattaccaatctccagagacaacgccaagaactcactgtat
 ctgcaaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagactgggcccgcgataactattatgaata
 ttggggcaaagggaccacggtcaccgtctcctccggcgggtggcggatccggcgggtggcggatccggcgggtggcggatccg
 acatcgtgatgaccagctccagactccctggctgtgtctctgggcgagagggccaccatcaactgcagggccagcaag
 agtgttagcaccagcggctacagctacatgcactgggtaccagcagaaaccaggacagcctcctaagctgctcattacct
 ggtgtctaacctggaaatccgggtccctgaccgatcagtggcagcgggtctgggacagatttcactctcaccatcagca
 gccctgcaggctgaagatgtggcagtttattactgtcaacacattcgggaactgaccaggagtgaattcggcggaggggacc
 aaggtggagatcaaacgaact(配列番号: 250)

30

(アミノ酸)

EVQLVESGGGLVFKPGGSLRSLCAASGFTFSGYAMSWWRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLY
 LQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYEYWGKGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASK
 SVSTSGYSYMHYQQKPGQPPKLLIYLVSNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHIRLSTRSEFGGGT
 KVEIKRT(配列番号: 251)

40

ヒト化C8一本鎖IgG1(システインはない)

(DNA)

gaggtgcagctgggtggagctctgggggaggcctgggtcaagcctgggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggatt
 caccttcagtggtatgccaatgagctgggtccgcccaggctccagggaaaggggtggagtggtctcaaccattagtagtg
 gcggaacctacataatactacctgactcagtgaaagggccgattaccaatctccagagacaacgccaagaactcactgtat
 ctgcaaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagactgggcccgcgataactattatgaata
 ttggggcaaagggaccacggtcaccgtctcctccgataaaaaccataactaaaccgcaaaaaccggcgccggaactgctgg
 gtgggtccctgggtaccggtgacatcgtgatgaccagctctccagactccctggctgtgtctctgggcgagagggccaccatc
 aactgcagggccagcaagagtgtagcaccagcggctacagctacatgcactgggtaccagcagaaaccaggacagcctcc

50

taagctgctcatttacctgggtgtctaacctggaatccggggccccgaccgattcagtgccagcgggtctgggacagatt
 tcacttcacatcagcagccgcaggctgaagatgtggcagtttattactgtcaacacattcggaactgaccaggagt
 gaattcgccggaggaccgaaggtggagatcaaacgaact (配列番号: 252)

(アミノ酸)

EVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLY
 LQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYEYWGKGTITVSSDKTHTKPPKPAPELLGGPGTGDIVMTQSPDSLAVSLGERATI
 NCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLVSNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQHIRLTRS
 EFGGGTKVEIKRT (配列番号: 253)

ヒト化C8一本鎖X4(リンカーはIgG1及びIgG2修飾ヒンジ部である)

(DNA)

gaggcgcagctggaggagctcgggggaggccctggccaagccctggggggccccgagactctcctgtgcagcctctggatt
 caccctcagtggtatgccatgagctgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggctcacaaccttagtagtg
 gcggaacctacatactaccagactcagtgaagggccgattcacctctccagagacaacgccaagaactcactgtat
 ctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagactgggcggcgacaattactatgagta
 ttggggcaaaggaccacggtcaccgtctcctccgataaaaacctactaaaccgcaaaaaccggcgccggaactgctgg
 gtggctcctggtagccgtactggtagccgactataaacctccgaaacctccgaaacctgctccgaacctgctgggtgg
 ccggacatcgtgatgaccagctccagactccccggctgtgtctctgggcgagagggccaccatcaactgcagggccag
 caagagtgttagcaccagcggctacagctacatgcactggtagcagcagaaccaggacagcctcctaagctgctcattt
 acctgggtgtctaacctggaatccggggccccgaccgattcagtgccagcgggtctgggacagatttcacttcacatc
 agcagcctgcaggctgaagatgtggcagtttattactgtcaacacattcggaactgaccaggagtgaattcgccggagg
 gaccaaggtggagatcaaacgaact (配列番号: 254)

(アミノ酸)

EVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLY
 LQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYEYWGKGTITVSSDKTHTKPPKPAPELLGGPGTGTGGPTIKPPKPPKAPNLLGG
 PDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLVSNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQHIRLTRSEFGGGTKVEIKRT (配列番号: 255)

pSECTag2 E6 scFV-FC

(DNA)

atggagacagacacactcctgctatgggtactgctgctctgggttccaggttccactggtgacgcggcccagccggccga
 ggtgcagctggaggagctcgggggaggccctggccaagccctggggggccccgagactctcctgtgcagcctctggattca
 ccttcagtaggtatggcatgagctgggtccgccaggctccagggaagaggctggagtgggctcacaaccttagtggcggga
 ggcacctacatactaccagactcagtgaagggccgattcacctctccagagacaacgccaagaacacctgtatct
 gcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtaccagagataactatggccgcaactatgattatg
 gcatggattatggggccagggcacccctggtagccgtgagcagcggcggggcggatccggcgggtggcggatccggcgg
 ggccgatccgaaattgtgtgacacagctccagccaccctgtcttgtctccaggggaaagagccaccctcactgcag
 cgccaccagcaggttagctacatccactggtaccaacagaggctggccagagcccaggctcctcatctatagcacc
 ccaacctggccagcggcatccagccaggctcagtgccagtggtctgggagcgactacacttcacatcagcagccta
 gagcctgaagatttgcagtttattactgtcagcagcgtagcagctcccccttcacctttggcagcggcaccaaagtgga
 aataaagagcccaaatctgtgacaaaactcacacatgccaccctgcccagcaccctgaactcctggggggaccgtcag
 tcttctcttcccccaaaaaccaaggacacccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgctgtgggtggacgtg
 agccacgaagaccctgaggccaagtcaactggtagctggcggcgtggaggtgcataatgccaaagcaaaagccgcggga
 ggagcagtaaacagcagctaccgtgtggtagcgtctcaccgtctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtaca
 agtgcaaggctccaacaaagcccctccagccccatcgagaaaacctcctcaaagccaaagggcagccccgagaacca
 cagggtgtacacctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggctcagcctgacctgacctggtaaaaggcttcta
 tccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggact
 ccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctcc
 gtgatgcatgaggctctgcacaaccctacacgcagaagagcctctcctgtctccgggtaaaatgataa (配列番号:
 256)

10

20

30

40

50

(アミノ酸)

METDTLLLLWLLLLWPGSTGDAAQPAEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEWVSTI SG
 GGTIYYYPDSVKGRFTI SRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDNVGRNYDYGMDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGS
 GGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLTCSATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGSDYTLTIS
 SLEPEDFAVYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIKEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV
 DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPR
 EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
 CSMVHEALHNHYTQKSLSLSPGK** (配列番号: 257)

E6 scFC-FC 1 gBLOCK配列:

10

tgctctgggttccaggttccactggtgacgcggcccagccggccgaggtgcagctggtggagctctgggggaggccctggtc
 aagcctgggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcacctcagtaggtatggcatgagctgggtccgcca
 ggcctccaggaagaggctggagtggtctcaaccttagtggcggaggcaccataatactaccagactcagtgaaagg
 gccgatcacctctccagagacaacccaagaacacctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggct
 gtgtattactgtaccagagataactatggccgcaactatgatattggcatggattattggggccaggccacctggtgac
 cgtgagcagcggcgggtggcggatccggcgggtggcggatccggcgggtggcggatccgaaattgtgttgacacagctccag
 ccacctgtctttgtc (配列番号: 258)

E6 scFC-FC 2 gBLOCK配列:

20

aattgtgttgacacagctccagccacctgtctttgtctccaggggaaagagccacctcacctgcagcggccaccagca
 gtgttagctacatccactggtaccaacagaggctggccagagcccaggctcctcatctatagcacctccaacctggcc
 agcggcatcccagccaggctcagtggcagtggtctgggagcgactacactctcaccaatcagcagcctagagcctgaaga
 ttttgagctttattactgtcagcagcgtagcagctccccctttcacctttggcagcggcaccaaagtggaaatataagagc
 ccaaatctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcaccgaactcctggggggaccgtcagcttctctctc
 cccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgctgtgtggaggcgtgagccacgaaga
 cctgaggtaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcaaatgccaagacaaagccgcgggaggagcagta
 acagcagctaccgtgtggtcagc (配列番号: 259)

pSECTag2 C2 scFV-FC
(DNA)

30

atggagacagacacactcctgctatgggtactgctgctctgggttccaggttccactggtgacgcggcccagccggccga
 ggtgcagctggtggagctctgggggaggccgtgcaagcctgggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattca
 ccttcagtggtatgccaatgagctgggtccgcccaggctccaggaaggggctggagtggtctcaaccttagtagtggc
 ggaacctacataatactaccccagctcagtgaaaggccgatcaccaatctccagagacaacccaagaactcactgtatct
 gcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggcgtgtattactgtgagcagctgggggggataatfactacgaatact
 tcgagtctctggggcaaggaccaggtcaccgtctcctccggcgggtggcggatccggcgggtggcggatccggcgggtggc
 ggtccgacattgtgctgaccagctctccagcctccttgccgtgtctccaggacagagggccaccatcactgcagagc
 cagtaagagtgtcagtaaccagcggatctcctacatgcactggtatcagcagaaaccaggacaacctcctaaactcctga
 tttacctggcatccaatctggagagcgggttccagccaggctcagcggcagtggtctgggaccgatctcaccctcaca
 attaaaccctgtggaagctaatgatactgcaaatattactgtcagcagtagggagctgcctttcacattcggcggagg
 gaccaagggtggagatcaaacgaactgagcccaaatctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcaccgtgaac
 tctggggggaccgtcagcttctctctcccccaaaaacccaaggacacctcatgatctcccgaccctgaggtcaca
 tgcgtgggtggaggcgtgagccacgaagacctgaggtaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcaataatgc
 caagacaaagccgcgggaggagcagtaaacagcagctaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtctgcaccaggactggc
 tgaatggcaaggagtacaagtgaaggctccaacaaagccctccagccccatcgagaaaacctcctcaaagccaaa
 gggcagccccgagaaccacagggtgtacacctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggctcagcctgacctg
 ccctggtaaaaggctctatcccagcagatcgccgtggagtgaggagacaaatgggcagccgggagaacaactacaagacca
 cgctcccgtgctggactccgacggctcctctctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagggtggcagcgggg
 aacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccctacacgcagaagagcctctcccgtctccgggtaa
 atgataa (配列番号: 260)

40

50

(アミノ酸)

METDTLLLLWLLLLWVPGSTGDAAQPAEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSG
 GTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYEYFDVWGKTTTVTVSSGGGSGGGGSGGG
 GSDIVLTQSPASLAIVSPGQRATITCRASKSVSTSGYSYMHVYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLT
 INPVEANDTANYYCQHSRELPFTFGGGTKVEIKRTEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVT
 CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAK
 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
 NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK* *(配列番号: 261)

C2 scFV-FC 1 gBlock配列:

10

(DNA)

tgcctgggttccaggttccactggtgacgcggcccagccggccgaggtgcagctggtggagtctggggaggcctggtc
 aagcctgggggttccctgagactctcctgtgcagcctctggattcacctcagtggtatgccatgagctgggtccgcca
 ggtccaggaagggctggagtgggtctcaaccttagtagtggcgaacctacataactaccccgactcagtgagg
 gccgattcacctctccagagacaacgccaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggcc
 gtgtattactgtgcgagacttgggggggataattactacgaatacttcgatgtctggggcaaaggaccacggtcaccgt
 ctctccggcgggtggcggatccggcgggtggcggatccggcgggtggcggatccgacattgtgctgaccagctctccagcct
 ccttggc(配列番号: 262)

C2 scFV-FC 2 gBlock配列:

20

(DNA)

catgtgctgaccagctctccagcctccttggccgtgtctccaggacagagggccaccatcacctgcagagccagtaaga
 gtgtcagtagcagcggatactcctacatgcactggtatcagcagaaaccaggacaacctcctaaactcctgatftacctg
 gcatccaatctggagagcgggttccagccaggttcagcggcagtggtctgggaccgattcacctcacaattaatcc
 tgtggaagcfaatgatactgcaaaattatfactgtcagcacagtagggagctgcctttcacattcggcggaggggaccaag
 tggagatacaacgaactgagcccaaatctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcaccctgaactcctgggg
 ggaccgtcagctctcctcttcccccaaaaacccaaggacacctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgctggg
 ggtagcgtgagccacgaagacctgaggtcaagtccaactggtagctggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaa
 agccgcgggaggagcagtaaacagcacgtaccgtgtggtcagc(配列番号: 263)

30

pSECTag2 C3 scFV-FC

(DNA)

atggagacagacacactcctgctatgggtactgctgctctgggttccaggttccactggtgacgcggcccagccggccca
 ggttcagctggtgcagctctggagctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaggctctcctgcaaggctctctggttaca
 cctttaccgactacgcatgaactgggtgcgacagggccctggacaagggcttgagtggatgggagtgatcagcaccttc
 agcggtaacacaaacttcaaccagaagttcaagggcagagtaecatgaccacagacacatccacgagcacagcctacat
 ggagctgaggagcctgagatctgacgacacggccgtgtatfactgtgcgagaagcgactactacggcccaatacttcgact
 actggggccagggcaccacctgaccgtgtccagcggcgggtggcggatccggcgggtggcggatccgacattgctgca
 gatattgtgatgaccagactccactctctctgtccgtcaccctggacagccggcctccatctcctgcaggtctagtca
 gacattgtccaatagtaattgaaacacctatttggagtggtagctgcagaagccaggccagctctccacagctcctgatct
 ataaggcttccaaccggtctctggagtgccagataggctcagtggcagcgggtcagggacagatttcacactgaaaaatc
 agccgggtggaggctgaggatgttgggtttatfactgetccaaggttagccacgtgcctttcaccttcggcggaggggac
 caaggtgagatacaacgaactgagcccaaatctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcaccctgaactcc
 tggggggaccgtcagctctcctcttcccccaaaaacccaaggacacctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgc
 gtgggtggtagcgtgagccacgaagacctgaggtcaagtccaactggtagctggacggcgtggaggtgcataatgcaa
 gacaaagccgcgggaggagcagtaaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctga
 atggcaaggagtaaacgtgcaaggctccaacaaagcctcccagccccatcgagaaaacctctcaaagccaaaggg
 cagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccaatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgct
 ggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgc
 ctcccgtgctggactccgacggctcctctctcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaac

40

50

gtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatg
ataa (配列番号: 264)

(アミノ酸)

METDTLLLWLLLLWPGSTGDAAPQAVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYAMNWRQAPGQGLEWMGVISTF
SGNTNFNQKFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSDYYGPFYDWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGS
D|VMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQTI VHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLI YKVSNRFSVGPDRFSGSGSGLTFLK
SRVEAEDVGVYYCFQGSHPFTFGGGTKVEIKRTEPKSCDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
WVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* *(配列番号: 265)

10

C3 GS scFV FC1 gBLOCK配列:

(DNA)

tgcctgggttccaggttccactggtgacgcggcccagccggcccaggtt cagctggtgcagtctggagctgaggtgaag
aagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaaggtctctggttacaccttaccgactacgccaatgaactgggtgcgaca
ggccccggacaagggcttgagtggatgggagtgatcagcaccttcagcggtaacacaaacttcaaccagaagttcaagg
gcagagtcaecatgaccacagacacatccacgagcacagcctacatggagctgaggagcctgagatctgacgacacggcc
gtgtattactgtgcgagaagcgactactacggcccaatacttcgactactggggccagggcaccacccctgaccgtgtccag
cggcgggtggcggatccggcgggtggcggatccggcgggtggcggatccgatatgtgatgaccagactccactctctctgt
(配列番号: 266)

20

C3 scFV FC2 gBLOCK配列:

(DNA)

tattgtgatgaccagactccactctctctgtccgtcaccctggacagccggcctccatctcctgcaggtctagt caga
ccattgtccatagtaattgaaacacctatttggagtggtacctgcagaagccaggccagctccacagctcctgatctat
aaggtttccaaccggtctctggagtgccagataggttcagtggcagcgggtcagggacagatttcacactgaaaatcag
ccgggtggaggctgaggaatgttgggtttattactgettccaaggtagccacgtgccctttcaccttcggcggagggacca
aggtgagatacaacgaactgagccaaaatctgtgacaaaactcacacatgccaccctgcccagcaccctgaactcctg
gggggaccgtcagctctcctcttcccccaaaaaccaaggacacctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgt
ggtggtggactgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtagctggacggcgtggagggtgcaataatgccaaga
caaagccgcgggaggagcagtaaacagcacgtaccgtgtggtcagc (配列番号: 267)

30

pSECTag2 C8 scFV-FC

(DNA)

atggagacagacacactcctgctatgggtactgctgctctgggttccaggttccactggtgacgcggcccagccggccga
ggtgcagctggaggctctgggggaggcctggccaagcctggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattca
ccttcagtggtatgccaatgagctgggtccgcccaggctccagggaaggggctggagtggtctcaaccattagtagtggc
ggaacctacataatactaccctgactcagtgaagggccgatccacatctccagagacaacgccaagaactcactgtatct
gcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagactgggcccgtataactattatgaatatt
ggggcaaaggaccacggtcaccgtctcctccggcgggtggcggatccggcgggtggcggatccggcgggtggcggatccgac
atcgtgatgaccagctccagactcccggctgtgtctctgggcgagagggccaccatcaactgcagggccagcaagag
tgttagcaccagcggctacagctacatgcactggtagcagcagaaccaggacagcctcctaagctgctcatttacctgg
tgtctaacctggaaatccggggtccctgaccgatcagtggcagcgggtctgggacagatttactctcaccatcagcag
cctgcaggctgaagatgtggcagtttattactgtcaacacatctcggaactgaccaggagtgaattcggcggaggggacca
aggtgagatacaacgaactgagccaaaatctgtgacaaaactcacacatgccaccctgcccagcaccctgaactcctg
gggggaccgtcagctctcctcttcccccaaaaaccaaggacacctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgt
ggtggtggactgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtagctggacggcgtggagggtgcaataatgccaaga
caaagccgcgggaggagcagtaaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaat
ggcaaggagtaaacgtgcaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaacctctccaagccaaagggca
gccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgacctgg

40

50

tcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgct
cccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgt
cttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatgat
aa(配列番号: 268)

(アミノ酸)

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQPAEVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSG
GTIYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYEYWGKGTITVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSD
IVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYMHYQQKPGQPPKLLIYLVSNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISS
LQAEDVAVYYCQHI RELTRSEFGGGTKVEIKRTEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV
WDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* * (配列番号: 269)

10

C8 scFV FC 1 gBLOCK配列:

(DNA)

tgctctgggttccaggttccactggtagcgcggcccagccggccgaggtgcagctggaggagtctgggggaggcctggtc
aagcctgggggggtcccgtgagactctcctgtgcagcctctggattcacctcagtggtatgccatgagctgggtccgcca
ggctccaggaaggggtggagtgggtctcaaccttagtagtgccggaacctacataactacctgactcagtggaagg
gccgatcacctctccagagacaacgccaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggcc
gtgtattactgtgagactggcgccgataactatatagaatatggggcaaaaggaccacgggtcaccgtctcctccgg
cgtggcggatccggcggtagcggatccggcggtagcggatccgacatcgtgatgaccagctctccagactcctgg(配
列番号: 270)

20

C8 scFV FC2 gBLOCK配列:

(DNA)

catcgtgatgaccagcttccagactccttggctgtgtctctgggcgagagggccaccatcaactgcagggccagcaaga
gtgttagcaccagcggctacagctacatgcactggtagcagcagaaccaggacagcctcctaagctgctcatftacctg
gtgttaacctggaaatccgggttcccgtgaccgatcagtgccagcgggtctgggacagatctcactctcaccatcagcag
cctgcaggtgaagatgtggcagtttatctactgtcaacacatctcggaactgaccaggagtgaattcggcggaggggacca
aggtaggagatcaaacgaactgagcccaaatctgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcaccctgaactcctg
gggggaccgtcagctctcctcttcccccaaaaaccaaggacacctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgt
ggtaggtagcgtgagccacgaagacccctgaggtaagttcaactggtagctggacggcgtggaggtagcataatgccaaaga
caaagccgaggaggagcagtaaacagcagctaccgtgtggtcagc(配列番号: 271)

30

ヒトIgG1 Fc配列:

(DNA)

gagccaaaatctgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcaccctgaactcctggggggaccgtcagctctcct
cttcccccaaaaaccaaggacacctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtaggtagcgtgagccacg
aagaccctgaggtaagttcaactggtagctggacggcgtggaggtagcataatgccaaag acaaagccgaggaggagca
gtacaacagcagctaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtga
aggctccaacaaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccaatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacagggt
tacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggctcagcctgaccctgctgcaaaagcctctatcccag
cgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacg
gctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatg
catgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatgataa(配列番号: 272)

40

(アミノ酸)

EPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* *(配列
番号: 273)

50

ヒトIgG1 CH2-CH3領域配列:

(DNA)

ccgtgccagcacc tgaactcctggggggaccgtcagtccttccctcttcccccaaaacccaaggacacctcatgatctc
 ccggacccctgaggtcacatgctggggggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtagctggacg
 gctggagg tgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacc
 gtcc tgcaccaggactggctgaa tggcaaggagtacaagt gcaaggctctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaa
 aacctctccaaagccaaaggcagccccgagaaccacagggttacacctgcccccatcccgggaggagatgaccaaga
 accaggtcagctgacctgctgg tcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccg
 gagaacaactacaagaccacgctcccgtgctggactccgacggctccttcttccctctacagcaagctcaccgtggacia
 gagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcc
 tctccctgtctccgggtaaatgataa(配列番号: 274)

10

(アミノ酸)

PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
 LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPE
 NNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK** (配列番号: 275)

ヒトIgG1 CH3領域配列:

(DNA)

gggcagccccgagaaccacagggtgtacacctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctg
 cctgg tcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagacca
 cgctcccgtgctggactccgacggctccttcttccctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggg
 aagctcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaa
 atgataa(配列番号: 276)

20

(アミノ酸)

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
 NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK* *(配列番号: 277)

ヒトIgG1 Fc Y407R配列:

(DNA)

gagcccaaa tctgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgccagcacc tgaactcctggggggaccgtcagtccttccct
 cttcccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgctggggggacgtgagccacg
 aagacctgaggtcaagttcaactggtagctggacggcgtggagg tgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcag
 tacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaa tggcaaggagtacaagt gcaa
 ggcttccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaacctctccaaagccaaaggcagccccgagaaccacagggtgt
 acacctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgg tcaaaggcttctatcccagc
 gacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgctcccgtgctggactccgacgg
 ctcttcttccctcaggagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgc
 atgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatgataa(配列番号: 278)

30

(アミノ酸)

EPKSCDKTHTCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
 I AVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLRSLKSLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK* *(配列
 番号: 279)

40

ヒトIgG1 Fc F405Q配列:

(DNA)

gagcccaaa tctgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgccagcacc tgaactcctggggggaccgtcagtccttccct
 cttcccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgctggggggacgtgagccacg
 aagacctgaggtcaagttcaactggtagctggacggcgtggagg tgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcag

50

tacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaaaggcaaggagtacaagtgcaagggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgacctggctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggc agccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttccagctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcccgtctccgggtaaatgataa(配列番号: 280)

(アミノ酸)

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP I EKT I SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFQLYSLKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* *(配列番号: 281)

10

ヒトIgG1 Fc T394D配列:

(DNA)

gagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgccagcaccctgaactcctggggggaccgtcagcttctctcttcccccaaaaccaaggacacctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgctgtggaggacgtgagccacgaagacctgaggccaagtcaactggtagctggacggcgtggaggtgataatgccaagacaaagccgaggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaaaggcaaggagtacaagtgcaagggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgacctggctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccgacctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcccgtctccgggtaaatgataa(配列番号: 282)

(アミノ酸)

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP I EKT I SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTDPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* *(配列番号: 283)

20

ヒトIgG1 Fc T366W/L368W配列:

(DNA)

gagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgccagcaccctgaactcctggggggaccgtcagcttctctcttcccccaaaaccaaggacacctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgctgtggaggacgtgagccacgaagacctgaggccaagtcaactggtagctggacggcgtggaggtgataatgccaagacaaagccgaggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaaaggcaaggagtacaagtgcaagggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgtggctgctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcccgtctccgggtaaatgataa(配列番号: 284)

(アミノ酸)

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP I EKT I SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCWVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* *(配列番号: 285)

30

40

ヒトIgG1 Fc T364R/L368R配列:

(DNA)

gagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgccagcaccctgaactcctggggggaccgtcagcttctctcttcccccaaaaccaaggacacctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgctgtggaggacgtgagccacg

50

aagacctgaggtcaagttcaactggtagctggacggcgtggaggtgcaataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcag
 tacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaaatggcaaggagtacaagtgcaa
 ggtctccaacaaagccccccagcccccatcgagaaaacatctccaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgt
 acacctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccagggtcaggctgacctgcagggtcaaaggcttctatcccagc
 gacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacgg
 ctcttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatg
 atgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatgataa(配列番号: 286)

(アミノ酸)

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP I EKT I SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVRLTTCRVKGFYPS
 DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* *(配列
 番号: 287)

10

ヒトIgG1 Fcヒンジレス配列:

(DNA)

gcacctgaactcctggggggaccgtcagttcttcttcccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccggacccc
 tgaggtcacatgctggagggtggacgtgagccacgaagacctgaggtaagttcaactggtagctggacggcgtggagg
 tgcaataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtaacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcac
 caggactggctgaaatggcaaggagtacaagtgaaggctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaacatctc
 caaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccagggtca
 gcctgacctgctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccgggagaacaac
 tacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagggtg
 gcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgt
 ctccgggtaaatgataa(配列番号: 288)

(アミノ酸)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAP I EKT I SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 KTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* *(配列番号: 289)

20

ヒトIgG1 G237A FC配列:

(DNA)

gagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggccccgtcagttctcct
 ctcccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccggaccccagggtcacatgctggagggtggacgtgagccacg
 aagacctgaggtcaagttcaactggtagctggacggcgtggaggtgcaataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcag
 tacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaaatggcaaggagtacaagtgcaa
 ggtctccaacaaagccccccagcccccatcgagaaaacatctccaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgt
 acacctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccagggtcagcctgacctgacctgggtcaaaggcttctatcccag
 cgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacg
 gctcttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatg
 catgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa(配列番号: 290)

(アミノ酸)

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP I EKT I SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
 DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(配列番
 号: 291)

30

40

ヒトIgG1 L234A/L235A FC配列:

(DNA)

gagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaagccgccccgggggaccgtcagttctcct
 ctcccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccggaccccagggtcacatgctggagggtggacgtgagccacg

50

aagacctgaggtcaagttcaactggtagctggacggcgtggaggtgcaataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcag
 tacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtccctaccgtccctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaa
 ggtctccaacaaagccccccagccccctcgagaaaacctctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgt
 acacctgcccccaatcccgggaggagatgaccaagaaccaggctcagccctgacctgacctgggtcaaaggcttctatcccagc
 gacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacgg
 ctcttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggctggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgc
 atgaggctctgcacaaccactacacgcaga agagcctctccctgtctccgggtaaa(配列番号: 292)

(アミノ酸)

EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLLVKGFYPS
 DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(配列番
 号: 293)

10

CAR-T E6 CD3z 配列:

(DNA)

atggccctgcccgtgaccgctttgctgctccccctggcgcgtgctgctgcacgccgcccaggccagaggctccagctggttga
 gagtggcggagggtgggttaagcctggcggctccctgcggctgagctgcgccgagtggaatttactttcagccgatatg
 ggaatgagttgggtgctggcaagctcccgggaagaggctggaaatgggtctcaacaatctccggggggggcacttacatctat
 taccggactcagtaaggggagattaccattcacgagacaacgctaagaataacctgatttgcagatgaattctct
 gagagcagaggacacagctgtttactattgtacccgcgacaactatggcaggaactacgactacggtatggactatggg
 gacaagggacattggttacagtgagcagtgccggcggggcagcggaggaggaggcagcgggtggggggggcagcgagata
 gtgctcacgcagctaccccgacgtctcagctctcaccctggggaacgagctacctgacgtgctctgctacctcctcag
 gtcatatattcactggatcagcaacggccccggcagctccccctagattgctcatattatagctacctctaacttgccctcag
 gtaacctgcagattttctggatctgggtcaggctctgatfacacctcactatctctagcctggagcctgaagacttt
 gccgtttattactgccagcagaggcttagctccccattcacccttgggagtgaggaccaagggtgaaatataaacgacaac
 cccggccccagaccaccaacgccagccccaccatcgccagccaacccctgtctctgagaccagaagcctgtaggcctg
 ccgcccgtggagctgtgcacacaagaggactggatttcgcccgtgatatctacatttgggccccgctcgaggcacaatgt
 ggagtgcctcctctccttgggtgattacctgtactgccgcgttaagttctcccgatcagccgacgcgcctgcttaca
 gcagggccagaaccaactgtacaacgagctgaaatctcggtagacgggaagagtagcagctgtggacaaacggagaggcc
 gcgaccagaaaatgggcggcaagcctcgaggaaaaaacccccaggagggactgtacaaatgagttgcagaaaagataagatg
 gcagaa gcttataagcgagatcggaatgaagggggaaaggagacgagggaaaggacacgacggcctttatcagggcctgt
 ccacagcaaaaaagatagctatgacgcccccatatgcaggcacttccaccacgggtgata a (配列番号: 294)

20

30

(アミノ酸)

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEWVSTISGGGTIY
 YPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCTRDNYGRNYDYGMDYWGGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEI
 VLTQSPATLSLSPGERATLTCSATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGSDYTLTISSELPEDF
 AVYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTC
 GVLVLLSLVITLYCRVKFSRSADAPAYKQQNQLYNELNLRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM
 AEAYSEIGMKGERRRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR* *** (配列番号: 295)

40

CAR-T E6 CD3z gBLOCK 配列:

(DNA)

tggagctgtgcacacaagaggactggatttcgctgtgatatctacatttgggccccgctcgaggcacaatgtggagtge
 tctctctctccttgggtgattacctgtactgccgcgttaagttctcccgatcagccgacgcgcctgcttacaagcagggc
 cagaaccaactgtacaacgagctgaaatctcggtagacgggaagagtagcagctgtggacaaacggagaggccgcgaccc
 agaaaatgggcggcaagcctcgaggaaaaaacccccaggagggactgtacaaatgagttgcagaaaagataagatggcagaag
 cttaatagcgagatcggaatgaagggggaaaggagacgagggaaaggacacgacggcctttatcagggcctgtccacagca
 acaaaaagatagctatgacgcccccatatgcaggcacttccaccacgggtgataagtttaaaccgctgatcagcctcgac
 tgtgc(配列番号: 296)

50

CAR-T E6 CD28/CD3z 配列 :

(DNA)

atggccc tggccg t gaccgc t t t gct gct ccccc tggcgc t gct gct gca cgc ccg ccagg ccagagg t ccagc t ggt t ga
gag tggcgg tgggc tgg t taagcc tggcggc tccc tgcggc t gacg tgcgccg gagg tggat t t act t t cagccgata t g
gga t g a g t t g g g t g c g g c a a g c t c c c g g g a a g a g g c t g g a a t g g g t c t c a c a a t c t c c g g g g g g g c a c t t a c a t c t a t
t a c c c g g a c t c a g t c a a g g g g a g a t t t a c c a t t t c a c g a g a c a a c g c t a a g a a t a c c c t g t a t t t g c a g a t g a a t t c t c t
g a g a g c a g a g g a c a c a g c t g t t t a c t a t t g t a c c c g c g a c a a c t a t g g c a g g a a c t a c g a c t a c g g t a t g g a c t a t t g g g
g a c a a g g g a c a t t g g t t a c a g t g a g c a g t g g c g g c g g g g c a g c g g a g g a g g a g g c a g c g g t g g g g g g g c a g c g a g a t a
g t g c t a c g c a g t c a c c c g c g a c t c t c a g t c t c t c a c c t g g g g a a c g a g c t a c c c t g a c g t g c t c t g c t a c c t c c t c a g t
g t c a t a t a t t c a c t g g t a t c a g c a a c g g c c c g g g c a g t c c c c t a g a t t g c t c a t t t a t a g t a c c t c t a a t c t g g c c t c a g
g t a t c c c t g c a c g a t t t t c t g g a t c t g g t t c a g g t t c t g a t t a c a c c c t c a c t a t c t c t a g c c t g g a g c c t g a a g a c t t t
g c c g t t t a t t a c t g c c a g c a g a g g t c t a g c t c c c c a t t c a c c t t t g g g a g t g g g a c c a a g g t t g a a a t t a a a c g a c a a c
c c c g g c c c c a g a c c a c c a a c g c c a g c c c c a c c a t c g c c a g c c a a c c c c t g t c t c t g a g a c c a g a a g c c t g t a g g c c t g
c c g c c g g t g g a g c t g t g c a c a c a a g a g g a c t g g a t t t c g c c t g t g a t a t c t a c a t t t g g g c c c g c t c g c a g g c a c a t g
t g g a g t g e t c c t c c t c t c c c t g g t g a t t a c c c t g t a c t g c a g a a g c a a g c g g t c t c g g c t c c t g c a t t c t g a t t a c a t g a
a c a t g a c c c c a a g a a g a c c a g g c c c a c c a g g a a a c a t t a c c a g c c c t a c g c t c c g c c a c g c g a c t t c g c t g c c t a c c g g
t c c c g c g t t a a g t t c t c c c g a t c a g c c g a c g c g c c t g c t t a c a a g c a g g g c c a g a a c c a a c t g t a c a a c g a g c t g a a t c t
c g g t a g a c g g g a a g a g t a c g a c g t g t t g g a c a a a c g g a g a g g c c g c g a c c c a g a a a t g g g c g g c a a g c c t c g c a g g a a a a
a c c c c a g g a g g g a c t g t a c a a t g a g t t g c a g a a a g a t a a g a t g g c a g a a g c t t a t a g c g a g a t c g g a a t g a a g g g g g a a
a g g a g a c g a g g g a a a g g a c a c g a c g c g c c t t t a t c a g g g c c t g t c c a c a g c a a c a a a a g a t a c g t a t g a c g c c c t c c a t a t
g c a g g c a c t t c c a c c a c g g t g a t a a

(配列番号:297)

(アミノ酸)

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEWVSTI SGGGTYI
YYPDSVKGRFTI SRDNAKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCTRDNYGRNYDYGM DYWGQGLTVVSSGGGGSGGGGSGGGGSE
IVLTQSPATLSLSPGERATLTCSATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGSDYTLTISSLEPED
FAVYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGT
CGVLLLSLVITLYCRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELN
LGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGGLSTATKDTYDALH
MQALPPR* * (配列番号: 298)

CAR-T E6 CD28/CD3z g BLOCK配列 :

(DNA)

tggagc t g t g c a c a c a a g a g g a c t g g a t t t c g c c t g t g a t a t c t a c a t t t g g g c c c c g c t c g c a g g c a c a t g t g g a g t g c
t c c t c c t c t c c c t g g t g a t t a c c c t g t a c t g c a g a a g c a a g c g g t c t c g g c t c c t g c a t t c t g a t t a c a t g a a c a t g a c c
c c a a g a a g a c c a g g c c c c a c c a g g a a a c a t t a c c a g c c c t a c g c t c c g c c a c g c g a c t t c g c t g c c t a c c g g t c c c g c g t
t a a g t t c t c c c g a t c a g c c g a c g c g c c t g c t t a c a a g c a g g g c c a g a a c c a a c t g t a c a a c g a g c t g a a t c t c g g t a g a c
g g g a a g a g t a c g a c g t g t t g g a c a a a c g g a g a g g c c g c g a c c a g a a a t g g g c g g c a a g c c t c g c a g g a a a a c c c c c a g
g a g g g a c t g t a c a a t g a g t t g c a g a a a g a t a a g a t g g c a g a a g c t t a t a g c g a g a t c g g a a t g a a g g g g g a a a g g a g a c g
a g g g a a a g g a c a c g a c g c g c c t t t a t c a g g g c c t g t c c a c a g c a a c a a a a g a t a c g t a t g a c g c c c t c c a t a t g c a g g c a c
t t c c a c c a c g g t g a t a a g t t t a a a c c c g c t g a t c a g c c t c g a c t g t g c (配列番号: 299)

CAR-T E6 4-1BB/CD3z 配列 :

(DNA)

atggccc tggccg t gaccgc t t t gct gct ccccc tggcgc t gct gct gca cgc ccg ccagg ccagagg t ccagc t ggt t ga
gag tggcgg tgggc tgg t taagcc tggcggc tccc tgcggc t gacg tgcgccg gagg tggat t t act t t cagccgata t g
gga t g a g t t g g g t g c g g c a a g c t c c c g g g a a g a g g c t g g a a t g g g t c t c a c a a t c t c c g g g g g g g c a c t t a c a t c t a t
t a c c c g g a c t c a g t c a a g g g g a g a t t t a c c a t t t c a c g a g a c a a c g c t a a g a a t a c c c t g t a t t t g c a g a t g a a t t c t c t
g a g a g c a g a g g a c a c a g c t g t t t a c t a t t g t a c c c g c g a c a a c t a t g g c a g g a a c t a c g a c t a c g g t a t g g a c t a t t g g g
g a c a a g g g a c a t t g g t t a c a g t g a g c a g t g g c g g c g g g g c a g c g g a g g a g g a g g c a g c g g t g g g g g g g c a g c g a g a t a

gtgctcacgcagtcacccgcgactctcagtcctccacctggggaacgagctacctgacgtgctctgctacctcctcagtg
 gtacataatcacctggatcagcaacggcccggcagtcacctagattgctcattatagctacctctaatctggcctcag
 gtatccctgcacgatctctggatctggctcaggctctgatctacacctcactatctctagcctggagcctgaagacttt
 gccgtttatctgcccagcagaggtctagctccccattcacctttgggagtgaggaccaaggttgaaatataaacgacaac
 cccggccccagaccaccaacgccagccccaccatcgccagcaacccctgtctctgagaccagaagcctgtaggcctg
 ccgcccgtggagctgtgcacacaagaggactggatttcgctctgtgatatctacatttgggccccgctcgaggcacaatg
 ggagtgcctcctctcccctgggtgattaccctgtactgcaaaagggggccgcaaaaaactcctttacatttttaagcagcc
 ttttatgaggccagtacagacgactcaagaggaagacgggtgctcatgccgctttcctgaggaggaggaaggagggtgcg
 aactgcgcttaagtctcccgatcagccgacgcgctgcttacaagcagggccagaaccaactgtacaacgagctgaat
 ctggtagacgggaagagtacgacgtgtggacaaacggagaggccgacccagaaaatgggcccgaagcctcgaggaa
 aaacccccaggaggactgtacaatgagttgcagaaagataagatggcagaagcttatagcgagatcggaatgaaggggg
 aaaggagacgaggaaaggacacgacggcctttatcagggcctgtccacagcaacaaaagatacgatgacgccctccat
 atgcaggcacttccaccacggtgataa (配列番号:300)

(アミノ酸)

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEWVSTISGGGTYIY
 YPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDNYGRNYDYGMDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEI
 VLTQSPATLSLSPGERATLTCSATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGSDYTLTISSELEPDF
 AVYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTC
 GVLLLSLVITLYCKRGRKLLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELN
 LGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRKGKHDGLYQGLSTATKDTYDALH
 MQALPPR* *(配列番号:301)

CAR-T E6 4-IBB/CD3z gBLOCK配列:

(DNA)

tggagctgtgcacacaagaggactggatttcgctctgtgatatctacatttgggccccgctcgaggcacaatgtggagtgc
 tccctcctctcccctgggtgattaccctgtactgcaaaagggggccgcaaaaaactcctttacatttttaagcagccttttatg
 aggccagtacagacgactcaagaggaagacgggtgctcatgccgctttcctgaggaggaggaaggagggtgccaactgcg
 cgttaagtctcccgatcagccgacgcgctgcttacaagcagggccagaaccaactgtacaacgagctgaatctcggt
 gacgggaagagtacgacgtgtggacaaacggagaggccgacccagaaaatgggcccgaagcctcgaggaaaaacccc
 caggaggactgtacaatgagttgcagaaagataagatggcagaagcttatagcgagatcggaatgaagggggaaaggag
 acgagggaaggacacgacggcctttatcagggcctgtccacagcaacaaaagatacgatgacgccctccatgacagg
 cacttccaccacggtgataagtttaaacccgctgatcagcctcgactgtgc (配列番号:302)

CAR-T E6 CD28/4-IBB/CD3z配列:

(DNA)

atggcccctgcccgtgaccgctttgctgctccccctggcgtgctgctgcacgccgcccaggccagaggccagctgggtga
 gagtggcgtgggctgggttaagcctggcggctcccctgcggtgagctgcccgcgagtgaggatttactttcagccgatat
 gggatgagttgggtgcccgaagctcccgggaagaggctggaaatgggtctcaacaatctccggggggggcacttacatcta
 ttaccccgactcagtcaaggggagatttaccatttcacgagacaacgctaagaaatacctgtatttgcagatgaattctc
 tgagagcagaggacacagctgtttactatgtaccgcgacaactatggcaggaactacgactacggtatggactatgg
 ggacaagggacattggttacagtgagcagtgccggcggggggcagcggaggaggaggcagcgggtggggggggcagcggat
 agtgcctcacgcagtcacccgcgactctcagtcctccacctggggaacgagctacctgacgtgctctgctacctcctcag
 gtacataatcacctggatcagcaacggcccggcagtcacctagattgctcattatagctacctctaatctggcctca
 ggatccctgcacgatctctggatctggctcaggctctgatctacacctcactatctctagcctggagcctgaagactt
 tggcgtttatctgcccagcagaggtctagctccccattcacctttgggagtgaggaccaaggttgaaatataaacgacaa
 cccggccccagaccaccaacgccagccccaccatcgccagcaacccctgtctctgagaccagaagcctgtaggcct
 gccgcccgtggagctgtgcacacaagaggactggatttcgctctgtgatatctacatttgggccccgctcgaggcacaatg
 tggagtgcctcctcctctcccctgggtgattaccctgtactgcaaaagcaagcggctctcggtcctgcatctgatctacatga
 acatgaccccaagaagaccaggccccaccaggaaacattaccagcccctacgctccgccacgcgacttgcctgacctaccgg
 tccaaaagggggccgcaaaaaactcctttacatttttaagcagccttttatgaggccagtacagacgactcaagaggaaga

10
20
30
40
50

cgggtgctcatgccgctttcctgaggaggaggaaggagggtgcgaactgcgcgtaagtctcccgatcagccgacgcgc
 ctgcttacaagcagggccagaaccaactgtacaacgagctgaatctcggtagacgggaagagtagcagctgttggacaaa
 cggagagggccgcgacccagaaaaggcggcaagcctcgcaggaaaaacccccaggagggactgtacaatgagttgcagaa
 agataagatggcagaagcttataagcgagatcggaatgaagggggaaaggagacgagggaaaggacacgacggcctttatc
 agggcctgtccacagcaacaaaagatacgtatgacgccctccatatagcaggcacttccaccacggtgataa (配列番
 号:303)

(アミノ酸)

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEWVSTISGGGTYIY
 YPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDNYGRNYDYGMDYWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSEI
 VLTQSPATLSLSPGERATLTCSATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLLIYSTSNLASGIPARFSGSGSDYTLTISSELEPDF
 AVYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTC
 GVLLLSLVITLYCRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED
 GCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNLNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQK
 DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR* * (配列番号: 304)

10

20

30

CAR-T E6 CD28/4-IBB/CD3z gBLOCK配列:

(DNA)

ataggagacccaagctggctagtttaagcttggtagcagggccaccatggccctgcccgtgaccgctttgctgctcccc
 ctggcgtgctgctgcacgccagggccagaggtccagctgggtgagagtgccggggggctgggttaagcctggcggctc
 cctgcggctgagctgcgccgagtggtatttactttcagccgataatgggatgagttgggtgcggcaagctcccgggaaga
 ggcggaaagggtctcaacaatctccggggggggcacttacaatctattaccccgactcagtaaggggagatttaccatt
 tcacgagacaacgc taagaa taccctgtatttgcagatgaattctctgagagcagaggacacagctgtttactatgtac
 ccgcaacaactatggcaggaactacgactacggtatggactatggggacaagggacattgggttacagtgagcagtgccg
 gcggggggcagcggaggaggagcagcgggtggggggggcagcgagatagtgctcacgcagtcacccgcgactctcagctct
 tcaccggggaacgagctaccctgacgtgctctgctaccctctcagtgctcatatattcactgggtatcagcaacggcccg
 gcagtcccc tagatgctcat t t atagtagctctaatctggcctcaggtatccctgcacgat t t t c t ggatctgggtcag
 gttctgattacacccctcactatctctagcctggagcctgaagactttgccgtttattactgccagcagaggtctagctcc
 ccat t cacc t t t gggag t gggaccaaggt t gaaat t aaaacgacaacccccggccccccagaccaccaacgccagccccac
 catcgccagccaacccccgtctctgagaccagaagcctgtaggcctgccgccggtggagctgtgcacacaagaggactgg
 at t t c g c c t g t g a t a t c t a c a t t t g g g c c c c g c t c g c a g g c a c a t g t g g a g t g c t c c t c c t c c c t g g t g a t t a c c c t g
 t a c t g c a g a a g c a a g c g g t c t c g g c t c c t g c a t t c t g a t t a c a t g a a c a t g a c c c c a a g a a g a c c a g g c c c c a c c a g g a a
 a c a t t a c c a g c c c t a c g c t c c g c c a c g c g a c t t c g c t g c c t a c c g g t c c a a a a g g g g c c g c a a a a a a c t c c t t t a c a t t t
 t t a a g c a g c c t t t t a t g a g g c c a g t a c a g a c g a c t c a a g a g g a a g a c g g g t g c t c a t g c c g c t t t c c t g a g g a g g a g g a
 a g g a g g g t g c g a a c t g c g c g t a a g t t c t c c c g a t c a g c c g a c g c g c c t g c t t a c a a g c a g g g c c a g a a c c a a c t g t a c a
 a c g a g c t g a a t c t c g g t a g a c g g g a a g a g t a c g a c g t g t t g g a c a a a c g g a g a g g c c g c g a c c c a g a a a t g g g c g g c a a g
 c c t c g c a g g a a a a c c c c c a g g a g g g a c t g t a c a a t g a g t t g c a g a a a g a t a a g a t g g c a g a a g c t t a t a g c g a g a t c g g
 a a t g a a g g g g g a a a g g a g a c g a g g g a a a g g a c a c g a c g g c c t t t a t c a g g g c c t g t c c a c a g c a a c a a a a g a t a c g t a t g
 a c g c c c t c c a t a t g c a g g c a c t t c c a c c a c g g t g a t a a g t t t a a a c c c g c t g a t c a g c c t c g a c t g t g c (配列番号:
 305)

40

CAR-T C2 CD28/4-IBB/CD3z配列:

(DNA)

atggccttgccagtgacggcccctgctgctgccattggctcttctgttgcacgctgccaggcctgaagtgcagctcgtaga
 gagtgccggggggactgggtgaagcccgggtggaagcctcagactcagttgcccggcctcaggtttctacttttctcaggttacg
 ccatgtctgggtaagacagggaccggggaaaggactcgagtggtgtctactatcagctcaggaggcacttataatata
 tatcctgactctgtaaaaggccgat t tacgat t t c t c g c g a c a a t g c a a a g a a c t c c c t c t a c c t c c a a a t g a a c a g t c t
 tagggcagaagacactgctgtatactatgttgcacgctcggcggcgacaactactacgagtaactttgacgtgtggggga
 aagggactaccgtgacagtttcaagcggaggagggtggctcagggtggaggcgggtcaggggggggagggaagtgatattgtg
 ctcacacaa t c c c c a g c c t c c c t g g c t g t g t c t c c c g g c c a a c g c g t a c a a t t a c a t g t c g g g c c t c c a a a a g c g t g a g
 c a c c a g c g g c t a c a g c t a c a t g c a c t g g t a t c a a c a g a a a c c a g g a c a a c c c c c a a a c t g t g a t t a t c t c g c t t c a a

50

act tggag tccggc tgcct ggcgct t t t cagggag tgggagcggcacagat t t tacgt gact at caacccg tagaa
gcaaacgatacagcgaat t at t at t gt caacat tcccgggaact cccct t t tacgt t cggcgggggacacaaagg t cgaat
taagagaaccacgacaacccccggccccagaccaccaacgccageccccacat cgcagecaacccct g t c t c t g g a c
cagaagcct g t a g g c c t g c c g c c g g t g g a g c t g t g c a c a c a a g a g g a c t g g a t t t c g c c t g t g a t a t c t a c a t t t g g g c c
ccgct cgcaggcaca t g t g g a g t g c t c c t c c t c c c t g g t g a t t a c c c t g t a c t g c a g a a g c a a g c g g t c t c g g c t c c t
g c a t t c t g a t t a c a t g a a c a t g a c c c c a a g a a g a c c a g g c c c c a c c a g g a a a c a t t a c c a g c c c t a c g c t c c g c c a c g c g
a c t t c g c t g c c t a c c g g t c c a a a a g g g g c c g c a a a a a a c t c c t t t a c a t t t t a a g c a g c c t t t t a t g a g g c c a g t a c a g
a c g a c t c a a g a g g a a g a c g g g t g c t c a t g c c g c t t t c c t g a g g a g g a g g a a g g a g g g t g c g a a c t g c g c g t a a g t t c t c
c c g a t c a g c c g a c g c g c t g c t t a c a a g c a g g g c c a g a a c c a a c t g t a c a a c g a g c t g a a t c t c g g t a g a c g g g a a g a g t
a c g a c g t g t t g g a c a a a c g g a g a g g c c g c g a c c a g a a a t g g g c g g c a a g c c t c g c a g g a a a a c c c c c a g g a g g g a c t g
t a c a a t g a g t t g c a g a a a g a t a a g a t g g c a g a a g c t t a t a g c g a g a t c g g a a t g a a g g g g g a a a g g a g a c g a g g g a a a g g
a c a c g a c g g c c t t t a t c a g g g c c t g t c c a c a g c a a c a a a a g a t a c g t a t g a c g c c c t c c a t a t g c a g g c a c t t c c a c c a c
g g t g a t a a (配列番号: 306)

(アミノ酸)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVST I SSGGTY I YYPDSVKGRFT I SRDNAKNSLY
LQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYEYFDVWGKGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSD I VLTQSPASLAVSPGQRAT I TCR
ASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLL I YLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLT I NPVEANDTANYYCQHSREL PFTFGG
GTKVE I KRTTTTPAPRPPTPAPT I ASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD I Y I WAPLAGTCGVLLLSLV I TLYCRS
KRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSKRGRKLLY I FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCE
LRVKFSRSADAPAYKQGQNLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE I GMKGE
RRRGKGHGDL YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR** (配列番号: 307)

CAR-T C2-1 gBLOCK配列:

(DNA)

a t a g g g a g a c c c a a g c t g g c t a g t t a a g c t t g g t a c c g a g g g c c a c c a t g g c c t t g c c a g t g a c g g c c c t g c t g c t g c c a
t t g g c t c t t c t g t t g c a c g c t g c c a g g c c t g a a g t g c a g c t c g t a g a g a g t g g c g g g g a c t g g t g a a g c c c g g t g g a a g
c c t c a g a c t c a g t t g c g c c g c c t c a g g t t t c a c t t t t c a g g t t a c g c c a t g t c c t g g g t a a g a c a g g c a c c g g g g a a a g
g a c t c g a g t g g g t g t c t a c t a t c a g c t c a g g a g g c a c t t a t a t a t a t t a t c c t g a c t c t g t a a a a g g c c g a t t t a c g a t t
t c t c g c g a c a a t g c a a a g a a c t c c c t c t a c c t c c a a a t g a a c a g t c t t a g g g c a g a a g a c a c t g c t g t a t a c t a t t g t g c
a c g c c t c g g c g g c g a c a a c t a c t a c g a g t a c t t t g a c g t g t g g g g g a a a g g g a c t a c c g t g a c a g t t t c a a g c g g a g g a g
g t g g c t c a g g t g g a g g c g g g t c a g g g g g g g a g g a a g t g a t a t t g t g c t c a c a c a a t c c c c a g c c t c c c t g g c (配列番
号: 308)

CAR-T C2-2 gBLOCK配列:

(DNA)

a a g t g a t a t g t g c t c a c a c a a t c c c c a g c c t c c c t g g c t g t g t c t c c c g g c c a a c g c g c t a c a a t t a c a t g t c g g g c c t
c c a a a a g c g t g a g c a c c a g c g g c t a c a g c t a c a t g c a c t g g t a t c a a c a g a a a c c a g g a c a a c c c c c c a a a c t g t g a t t
t a t c t c g c t t c a a a c t t g g a g t c c g g c g t g c c t g c g c g c t t t t c a g g g a g t g g g a g c g g c a c a g a t t t t a c g c t g a c t a t
c a a c c c c g t a g a a g c a a a c g a t a c a g c g a a t t a t t a t t g t c a a c a t t c c c g g g a a c t c c c c t t t a c g t t c g g c g g g g g c a
c a a a g g t c g a a a t t a a g a g a a c c a c g a c a a c c c c g g c c c c a g a c c a c c a a c g c c a g c c c c a c c a t c g c c a g c c a a c c c
c t g t c t c t g a g a c c a g a a g c c t g t a g g c c t g c c g c c g g t g g a g c t g t g c a c a c a a g a g g a c t g g a t t t c g c c t g t g a t a t
c t a c a t t t g g g c c c c g c t c g c a g g c a c a t g t g g a g t g c (配列番号: 309)

CAR、E6 Fc/8/4- IBB/CD3z配列:

(DNA)

a t g g c c c t g c c c g t g a c c g c t t t g c t g c t c c c c c t g g c g c t g c t g c t g c a c g c c g c c a g g c c a g a g g t c c a g c t g g t t g a
g a g t g g c g g t g g g c t g g t t a a g c c t g g c g g c t c c c t g c g g c t g a g c t g c g c c g c g a g t g g a t t t a c t t t c a g c c g a t a t g
g g a t g a g t t g g g t g c g g c a a g c t c c c g g g a a g a g g c t g g a a t g g g t c t c a a c a a t c t c c g g g g g g g g c a c t t a c a t c t a
t t a c c c c g a c t c a g t c a a g g g a g a t t t a c c a t t t c a c g a g a c a a c g c t a a g a a t a c c c t g t a t t t g c a g a t g a a t t c t c
t g a g a g c a g a g g a c a c a g c t g t t a c t a t t g t a c c c g c g a c a a c t a t g g c a g g a a c t a c g a c t a c g g t a t g g a c t a t t g g

ggacaagggacattgggttacagtgagcagtgccggcgggggcagcggaggaggaggcagcgggtggcggaggcagcgagat
 agtgcacgcagtcacccgcgactctcagtcctcaccctggggaacgagctaccctgacgtgctctgctacctcctcag
 tgcataatactcactgggtacagcaacggcccgggcagtcacctagattgctcattatagtagctcctaatctggcctca
 ggtatccctgcacgatttctggatctgggtcaggttctgattacaccctcactatctctagcctggagcctgaagactt
 tggcgttatactgccagcagaggtctagctcccatcaccttggggagtgggaccaaggttgaaataaagagccca
 aatcttggacaaaactcacacatgccaccctgccagcaccctgaactcctggggggaccctcagctcttctcttcccc
 caaaacccaaggacacctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgctgggtgggggagcgtgagccacgaagacc
 tgaggtcaagtcaactggtagctggcggcgctggaggtgcaataagccaagacaaaagccgaggaggagcagtaaca
 gcagctaccgttgggtcagcgtctcaccgtctgcaccaggactggctgaaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctcc
 aaaaagcccctccagcccccatcgagaaaacctctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacct
 gccccca tcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatc
 gccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgctcccgtgctggactccgacggctcctt
 ctctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtctctctcagctccgtgatgcatgagg
 ctctgcacaaccctacacgcagaagagctctcctgtctccgggtaaaatctacatttgggccccgctcgaggcaca
 tggtagctcctcctctccttgggtgattacctgtactgcaaaaagggccgcaaaaaactcctttacatttttaagca
 gccctttatgaggccagtacagacgactcaagaggaagacgggtgctcagctccttctgaggaggaggaaggagggt
 gcgaactgctgcttaagtctcccgatcagccgacgctgcttacaagcagggccagaaccaactgtacaacgagctg
 aatctcggtagacgggaagagtagcagctgttggacaaaacggagagggccgagaccagaaaatgggaggcaagccctcgag
 gaaaaacccccaggagggtgtacaatgagttgcagaaagataagatggcagaagcttataagcgagatcggaatgaagg
 gggaaaggagacgagggaaaggacacgacggcctttatcagggcctgtccacagcaacaaaagatacgtatgacgacctc
 catatgaggcacttccaccacggtgataa (配列番号: 310)

(アミノ酸)

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKGPSLRRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEWVSTISGGGTIY
 YPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRRAEDTAVYYCTRDNVGRNYDYGMDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEI
 VLTQSPATLSLSPGERATLTCSATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGSDYTLTISSELEP
 AVYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIKEPKSCDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP
 EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
 PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEA
 LHNHYTQKSLSLSPGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEEGGC
 ELRVKFSRSADAPAYKQQNQLYNELNLRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKG
 ERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR** (配列番号: 311)

E6 CAR pCDH gBLOCK配列:

(DNA)

acgctgttttgacctccatagaagattctagagctagctgttagagcttggtagcggggccaccatggccccgcccgtga
 ccgctttgctgctccccctggcgtgctgctgcacgcccgccaggccagaggtcc agctggttgagagtgccgggtgggct
 ggttaagcctggcggctcccctgcggctgagctgcgcccgcgagtggtattactttcagccgatatgggatgagttgggtgc
 ggcaagctcccgggaagaggtggaaatgggtctcaacaatctccggggggggcacttacatctattaccccgactcagtc
 aaggggagatttaccatttcacgagacaacgctaagaaatacctgtatttgcagatgaattctctgagagcagaggacac
 agctgtttactattgtaccgcgacaactatggcaggaactacgactacggtatggactatggggacaaggacatgg
 ttacagtgagcagtgccggcgggggcagcggaggaggaggcagcgggtggcggaggcagcgagatagtgctcacgcagta
 cccgcgactctcagctctcaccctggggaacgagctaccctgacgtgctctgctacctcctcagtgctcatatattcactg
 gtacagcaacggcccgggcagtcacctagattgctcattatagtagctcctaatctggcctcaggtatccctgc (配列
 番号: 312)

E6 CAR Fc pCDH gBLOCK配列:

(DNA)

agtacctcctaatctggcctcaggtatccctgcacgatttctctggatctgggtcaggttctgattacaccctcactatctc
 tagcctggagcctgaagacttggcgttatactgccagcagaggtctagctccccattcaccttggggagtgaggacca
 aggttgaaataaagagcccaaatcttggacaaaactcacacatgccaccctgccagcaccctgaactcctgggggga

10

20

30

40

50

ccgtcagtccttctctcccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgctggggg
 ggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtagctggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagc
 cgcgggaggagcagtaaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaag
 gagtacaagtgaaggtctccaacaaagcccccccagccccatcgagaaaaccaatctccaagccaaaggcagccccg
 agaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgggcaaag
 gcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgctcccgtg
 ctg(配列番号: 313)

E6 CAR 8BB3 pCDH gBLOCK配列:
 (DNA)

agaacaactacaagaccacgctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaag
 agcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcct
 ctcccgtctccgggtaaaaatctacatttgggccccgctcgcaggcacaatgtggagtgctcctcctctcccgtggtgat
 taccctgtactgcaaaagggccgcaaaaactcctttacatttttaagcagccttttatgaggccagtagacagcactcaa
 gaggaagacgggtgctcatgcccgttctctgaggaggaggaaggagggtgcgaactgctgcttaagtctcccgatcagc
 cgacgctgcttacaagcagggccagaaccaactgtacaacgagctgaatctcggtagacgggaagagtacgacgtgt
 tggacaaacggagaggccgacccagaaaaggcggcaagcctcgacaggaaaaacccccaggaggagctgtacaatgag
 ttgcagaaagataagatggcagaagcttataagcgagatcggaatgaagggggaaaggagacgagggaaaggacacgacgg
 cctttatcagggcctgtccacagcaacaaaagatagctatgacgcccctccatagcaggcacttccaccaggtgataag
 ttaaacccgctgatcaggcggccgcaaggatctgcgatcgctccggtgccccgtcag(配列番号: 314)

CAR E6 FcH/8/4-1BB/CD3z配列:
 (DNA)

atggcccggccgtgaccgcttctgctgctccccctggcgtgctgctgcacgcccaggccagaggtccagctgggtga
 gagtggcgtgggtgggttaagcctggcggctcccctgctgctgagctgctgcccggcaggtggatttacttctcagccgatatg
 ggaatgagttgggtgctggcaagctcccgggaagaggctggaaatgggtctcaacaatctccggggggggcacttacaatctat
 taccctgactcagtaaggggagatttaccatttccagagacaacgctaagaaataccctgatattgcagatgaattctct
 gagagcagaggacacagctgtttactatgtaccctgcaacaactatggcaggaactacgactacgggtatggactatggg
 gacaagggacattgggttacagtgagcagtgccggcgggggagcggaggaggaggcagcgggtggcggaggcagcgagata
 gtgctcacgcagtcaccctgacgtctcagctctcaccctggggaacgagctaccctgacgtgctctgctacctcctcag
 gtcatatattcactggatcagcaacggccccggcagctcccctagattgctcatttatagctacctctaattctggcctcag
 gttaccctgacgatattctggatctgggttcaggctctgatfacacctcactatctctagcctggagcctgaagacttt
 gccgtttatctacgagcagaggtctagctccccatcacccttgggagtgaggaccaaggttgaaataaagcactga
 actcctggggggaccgtcagctctcctctcccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccggacccctgaggtca
 catgctgggtggtagctgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtagctggacggcgtggaggtgcataat
 gccaaagacaaagccgcccgggaggagcagtaaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactg
 gctgaatggcaaggagtacaagtgaaggctctccaacaaagcccccccagccccatcgagaaaaccaatctccaagcca
 aaggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacc
 tgcctggtcaaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactacaaga
 ccacgctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcag
 gggaaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcccgtctccggg
 taaaatctacatttgggccccgctcgcaggcacaatgtggagtgctcctcctctcccgtggtgatfaccctgtactgcaaaa
 gggccgcaaaaaactcctttacatttttaagcagccttttatgaggccagtagacagcactcaagaggaagacgggtgc
 tcatgcccgttctctgaggaggaggaaggagggtgcgaactgctgcttaagtctcccgatcagccgacgctgctta
 caagcagggccagaaccaactgtacaacgagctgaatctcggtagacgggaagagtacgacgtgtggacaaacgggagag
 gccgcgaccagaaaaaggcggcaagcctcgacaggaaaaacccccaggaggagctgtacaatgagttgcagaaagataag
 atggcagaagcttataagcgagatcggaatgaagggggaaaggagacgagggaaaggacacgacggcctttatcagggcct
 gtccacagcaacaaaagatagctatgacgcccctccatagcaggcacttccaccacggtgataa(配列番号: 315)
 (アミノ酸)

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLIEWSTISGGGTYY

10

20

30

40

50

YPDSVKGRFTI SRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDNVGRNYDYGMDYWQGGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEI
 VLTQSPATLSLSPGERATLTCSATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGSDYTLTISSLEPEDF
 AVYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIKAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
 AKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
 CLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
 KIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY
 KQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDGLYQGL
 STATKDTYDALHMQALPPR* * (配列番号: 316)

E6 CAR FcH pCDH gBLOCK配列:
 (DNA)

10

agtaccttaactctggcctcaggatccctgcacgatttctcggatctggttcaggctctgat tacacctcactatctc
 tagcctggagcctgaagactttgccgtttattactgccagcagaggcttagctccccattcacctttgggagtgaggacca
 aggttgaattaaagcactgaactcctggggggaccgtcagctcttctcttcccccaaaacccaaggacacctcatg
 atctcccggacccccgaggtcacaatgctgggggggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagtccaactggtacgt
 ggacggcgtggaggtgcaataagcacaagcgcggggaggagcagtaaacagcagctaccgtgtggtcagcgtcc
 taccgtctcgcaccaggactggctgaaaggcaaggagtacaagtgaaggctccaacaagccctcccagccccatc
 gagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacagggtgtacacctgcccccatcccgggaggagatgac
 caagaaccaggtcagctgacctgctggtaaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagagcaatgggc
 agccggagaacaactacaagaccacgctcccgtgctg (配列番号: 317)

20

CAR E6 Fc/4/4-IBB/CD3z配列:
 (DNA)

atggccctgcccgtgaccgctttgctgctccccctggcgtgctgctgcacgccagccagggccagaggtccagctggttga
 gagtgccggtgggtgggttaagcctggcggctcccctgcggctgagctgcccggcgagtggtttactttcagccgatatg
 ggaatgagttgggtgcccgaagctcccgggaagaggctggaaatgggtctcaacaatctccggggggggcacttacatctat
 taccctgactcagtaagggggagatttaccatttccagagacaacgctaagaaatacctgtatttgcagatgaattctct
 gagagcagaggacacagctgtttactatgtaccctgcgacaactatggcaggaactacgactacgggtatggactatggg
 gacaaggggacattgggttacagtgagcagtgccggcggggggcagcggaggaggaggcagcgggtggcggaggcagcgagata
 gtgctcacgcagtcaccctgcgactctcagctctcaccctggggaacgagctaccctgacgtgctctgctacctcctcag
 gtgcatatattcactgggtatcagcaacggccggcagctcccctagattgctcatttatagtagcttaactctggcctca
 ggtatcccctgcacgattttctggatctgggttcaggctctgat tacacctcactatctctagcctggagcctgaagactt
 tggcgtttattactgccagcagaggcttagctccccattcacctttgggagtgaggaccaaggttgaaataaagagccca
 aatctgtgacaaaactcacacatgccaccctgcccagcactgaactcctgggggggaccgtcagctcttctcttcccc
 caaaacccaaggacacctcatgatctcccggacccccgaggtcacaatgctgggggggacgtgagccacgaagacct
 tgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcaataagcacaagcgcggggaggagcagtaaca
 gcagctaccgtgtggtcagcgtctcaccgtctcgcaccaggactggctgaaaggcaaggagtacaagtgaaggctctcc
 aacaagcccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacagggtgtacacct
 gcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggctcagcctgacctgctggtaaaaggcttctatcccagcgacatcg
 ccgtggagtgaggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgctcccgtgctggactccgacggctccttc
 tctcttacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggc
 tctgcacaaccctacacgcagaagagcctctcccctgctcggggtaaaaatggccctgatgtgctggggggcgctcgccg
 gctcctgcttttcatgggctaggcatctcttcaaaagggggccgaaaaaactcctttacatttttaagcagcctttt
 atgaggccagtacagacgactcaagaggaagacgggtgctcatgcccgtttcttgaggaggaggaaggagggtgccaact
 gcgcttaagttctcccgtacagccagcgcctgcttacaagcagggccagaaccaactgtacaacgagctgaatctcg
 gtacagcgggaagagtacgacgtgtggacaaacggagaggccgcgaccca gaaatgggcccgaagcctcgaggaaaaa
 ccccaggagggtgtacaaatgagttgcagaaagataagatggcagaagcttatagcgagatcggaatgaagggggaaa
 ggagacgagggaaaggacacgacggcctttatcagggcctgtccacagcaacaaaagatacgtatgacgcccccatatg
 caggcacttccaccacggtgataa (配列番号: 318)

30

40

(アミノ酸)

50

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEWVSTISGGGTYIY
 YPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDNYGRNYDYGMDYWGQGLVTVVSSGGGGSGGGGSGGGGSEI
 VLTQSPATLSLSPGERATLTCSATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGSDYTLTISSELPEDF
 AVYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIKEPKSCDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDP
 EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTL
 PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA
 LHNHYTQKSLSLSPGKMALIVLGGVAGLLLFILGLIFFKRGRKLLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPPEEEEGGCEL
 RVKFSRSADAPAYKQGQNLNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER
 RRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR** (配列番号: 319)

10

E6 CAR 44BB3 pCDH gBLOCK配列:

(DNA)

agaacaactacaagaccacgacctcccgctgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaag
 agcaggtaggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcct
 ctccctgtctccgggtaaaaaggccctgattgtgctggggggcgctcgccggcctcctgcttttcatgggctaggcatct
 tcttcaaaagggcgcaaaaaactcctttacattttaagcagccttttatgaggccagtagacagcactcaagaggaa
 gacgggtgctcatgcccgtttcctgaggaggaggaaggagggtgcgaactgcgcgtaagtctcccgatcagccgacgc
 gctgcttacaagcagggccagaaccaactgtacaacgagctgaatctcggtagacgggaagagtagcagcgtgtggaca
 aacggagagccgacccagaaaaggcggaagcctcgcaggaaaaaccccgaggaggactgtacaatgagttgcag
 aaagataagatggcagaagcttatagcgagatcggaatgaagggggaaaggagacgaggaaaggacacgacggccttta
 tcagggctgtccacagcaacaaaagatagctatgacgcccctcatatgcaggcacttccaccacggtgataagtttaa
 cccgctgatcaggcggccgcaaggaatctgcgatcgctccgggtgcccgtcag (配列番号: 320)

20

CAR E6 FcH/4/4-1BB/CD3z配列:

(DNA)

atggcccggccgtgaccgctttgctgctccccctggcgtgctgctgcacgcccagggccagaggtccagctggttga
 gagtggcggtagggctgggttaagcctggcggcctcccctgcggctgagctgcgcccgcgagtggaatttactttcagccgatatg
 gtagtagttgggtgctggcaagctcccgggaagaggctggaaagggtctcaacaatctccggggggggcacttacatctat
 taccggcactcagtaaggggagatttaccatttcacgagacaacgctaagaataccctgatattgcagatgaattctct
 gagagcagaggacacagctgtttactatgtaccgagcaactatggcaggaactacgactacggtatggactatggg
 gacaagggacattgggtacagtagcagtagcggcggggcagcggaggaggaggcagcggtagcggaggcagcgagata
 gtgctcacgcagtcaccgagcactcagctctcaccctggggaacgagctaccctgacgtgctctgctacctcctcag
 gtcatatattcactggtagcagcaacggcccggcagctcccctagattgctcatttatagtagctctaatctggcctcag
 gtagtcccctgcagattttctggatctgggtcagggtctgatctacacctcactatctctagcctggagcctgaagacttt
 gccgtttattactgccagcagaggtctagctccccattcacctttgggagtaggaccaagggtgaaataaagcacctg
 aactcctggggggaccgtcagctctcctctccccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccggacccccgaggtc
 acatgctggtaggtagcgtgagccacgaagacccctgaggctcaagttcaactggtagctggacggcgtggaggtagataa
 tgccaagacaaagccgaggaggagcagtaaacagcagctaccgtgtggtagcgtctcaccgtcctgcaccaggact
 ggcgtgaatggcaaggagtaaaagtgaaggtctccaacaaaagccctcccagccccatcgagaaaaacctccaagacc
 aaaggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgac
 ctgctgggtcaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtaggagagcaatgggcagccggagaacaactacaaga
 ccacgctcccgtgctggactccgacggcctccttctcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcag
 gggaaagctctctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccggg
 taaaaaggccctgattgtgctggggggcgctcgccggcctcctgcttttcatgggctaggcatctcttcaaaagggcc
 gcaaaaaactcctttacatttttaagcagccttttatgaggccagtagacagcactcaagaggaagacgggtgctcatgc
 cgctttcctgaggaggaggaaggagggtgcgaactgcgcgtaagttctcccgatcagccgacgcgctgcttacaagca
 gggccagaaccaactgtacaacgagctgaatctcggtagacgggaagagtagcagcgtgtggacaaacgggagaggccg
 acccagaaaaggcggaagcctcgcaggaaaaaccccgaggaggactgtacaatgagttgcagaaagataagatggca
 gaagcttatagcgagatcggaatgaagggggaaagga gacgaggaaaggacacgacggcctttatcagggctgtcca
 cagcaacaaaagatagctatgacgcccctcatatgcaggcacttccaccacggtgataa (配列番号: 321)

30

40

50

(アミノ酸)

MALPVTALLLPLALLLHARPEVQLVESGGGLVKGPGSLRRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEWVSTISGGGTIY
 YPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDNVGRNYDYGMDYWGGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEI
 VLTQSPATLSLSPGERATLTCASATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGSDYTLTISSELEPDF
 AVYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIKAPPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
 AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
 KMALIVLGGVAGLLLFVGLGIFFKRGRKLLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQ
 GQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDLGQGLST
 ATKDITYDALHMQALPPR* * (配列番号: 322)

10

CAR E6 IgD/8/4-IBB/CD3z 配列:
 (DNA)

atggccctgcccgtgaccgctttgctgctccccctggcgcctgctgctgcacgcccagccagaggccagaggtccagctggttga
 gagtggcgggtggcctggttaagcctggcggctcccctgcggtgagctgcccgcgagtggtttactttcagccgatatg
 gtagtgggtgctggcaagctcccgggaagaggctggaaagggtctcaacaatctccggggggggcacttacatctat
 taccctgactcagtaaggggagattaccattcacgagacaacgctaagaataccctgatitgagatgaattctct
 gagagcagaggacacagctgtttactatgtaccgagcaaacatggcaggaactacgactacggtatggactatggg
 gacaagggacatgggtacagtgagcagtgccggcggggcagcggaggaggaggcagcgggtggcggaggcagcgagata
 gtgctcacgcagtcaccgagctctcagctctcaccctggggaacgagctaccctgacgtgctctgctacctcctcag
 gtcatatattcactgggtacagcaacggcccggcagctcccctagattgctcatattatagctacctctaatctggcctcag
 gtatcccctgacgatitctggatctgggtcaggctctgat tacacctcactatctctagcctggagcctgaagacttt
 gccgtttattactgccagcagaggcttagctccccattcacctttgggagtgaggaccaagggtgaaataaagagctcc
 aaaggcacaggcctcctcagtgccactgcacaaccccaagcagaggcagcctcgccaaggcaaccacagcccagcca
 ccaccctaacacaggaagaggcggcgaagagaagaaaaaggagaaggagaaggaacaagaagagagagagacaaag
 acaccaatctacatitgggccccctcgcaggcacaatgtggagtgcctcctctcctggtgattaccctgtactgcaa
 aagggccgcaaaaaactcctttacatittttaagcagccttttatgaggccagtacagacgactcaagaggaagacgggt
 gctcatgcccgtttcttgaggaggaggaaggagggtgcgaactgcgcgttaagttctcccgatcagccgacgcgctgct
 tacaagcaggggccagaaccaactgtacaacgagctgaatctcggtagacgggaagagtagcagctgtggacaacggag
 aggccgagaccagaaaaggcggcaagcctcgcaggaaaaacccccaggaggagctgtacaaatgagttgcagaaagata
 agatggcagaagcttatagcgagatcggaaatgaaggggaaaggagacgagggaaaggacacgagcggcctttatcagggc
 ctgtccacagcaacaaaaga、tacgtatgacgcccccatatgcaggcacttccaccacgggtgataa(配列番号: 3
 23)

20

30

(アミノ酸)

MALPVTALLLPLALLLHARPEVQLVESGGGLVKGPGSLRRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEWVSTISGGGTIY
 YPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDNVGRNYDYGMDYWGGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEI
 VLTQSPATLSLSPGERATLTCASATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGSDYTLTISSELEPDF
 AVYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIKESPKAQASSVPTAQPAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEEKEEERETK
 TPIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPA
 YKQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDLGQGL
 LSTATKDITYDALHMQALPPR* * (配列番号: 324)

40

E6 CAR IgD8 pcDH gBLOCK 配列:
 (DNA)

agtaccttaacttgccctcaggtatcccctgacgatitcttggatctgggtcaggttctgat tacacctcactatctc
 tagcctggagcctgaagactttgccgtttattactgccagcagaggcttagctccccattcacctttgggagtgaggacca
 aggttgaataaagagctccaaaggcacaggcctcctcagtgccactgcacaaccccaagcagaggcagcctcgcc
 aaggcaaccacagccccagccaccaccctaacacaggaagaggcggcgaagagaagaaaaaggagaaggagaagagga
 acaagaagagagagagacaaagacaccaatctacatitgggccccctcgcaggcacaatgtggagtgcctcctctccc
 tggtgattacctgtactgcaaaagggccgcaaaaaactcctttacatittttaagcagccttttatga ggccag(配

50

列番号：325)

E6 CAR BB 3 pCDH gBLOCK配列：

(DNA)

acat t t t taagcagcct t t t atgaggccagtacagacgactcaagaggaagacgggtgctcatgccgct t t cctgaggag
gaggaaggagggtgcgaactgcgcgttaagt t t cccgatcagccgacgcgctgct tacaagcagggccagaaccaact
gtacaacgagctgaa t c t c g g t a g a c g g g a a g a g t a c g a c g t g t t g g a c a a a c g g a g a g g c c g c g a c c c a g a a a t g g g c g
gcaagcctcgaggaaaaacccccaggaggac t g t a c a a t g a g t t g c a g a a a g a t a a g a t g g c a g a a g c t t a t a g c g a g
a t c g g a a t g a a g g g g a a a g g a g a c g a g g g a a a g g a c a c g a c g g c c t t t a t c a g g g c c t g t c c a c a g c a a c a a a a g a t a c
g t a t g a c g c c c t c c a t a t g c a g g c a c t t c c a c c a c g g t g a t a a g t t t a a a c c c g c t g a t c a g g c g g c c g c g a a g g a t c t g
c g a t c g c t c c g g t g c c c g t c a g (配列番号：326)

10

CAR E6 IgD/4/4- IBB/CD3z配列：

(DNA)

a t g g c c c t g c c c g t g a c c g c t t t g c t g c t c c c c t g g c g c t g c t g c t g c a c g c c g c c a g g c c a g a g g t c c a g c t g g t t g a
g a g t g g c g t g g g c t g g t t a a g c c t g g c g g c t c c c t g c g g c t g a g c t g c g c c g c g a g t g g a t t t a c t t t c a g c c g a t a t g
g g a t g a g t t g g g t g c g g c a a g c t c c c g g g a a g a g g c t g g a a t g g g t c t c a c a a t c t c c g g g g g g g c a c t t a c a t c t a t
t a c c c g a c t c a g t c a a g g g a g a t t t a c c a t t t c a c g a g a c a a c g c t a a g a a t a c c c t g t a t t t g c a g a t g a a t t c t c t
g a g a g c a g a g g a c a c a g c t g t t t a c t a t t g t a c c c g c g a c a a c t a t g g c a g g a a c t a c g a c t a c g g t a t g g a c t a t t g g g
g a c a a g g g a c a t t g g t t a c a g t g a g c a g t g g c g g c g g g g c a g c g g a g g a g g a g g c a g c g g t g g c g g a g g c a g c g a g a t a
g t g c t a c g c a g t c a c c c g c g a c t c t c a g t c t c t c a c c t g g g g a a c g a g c t a c c c t g a c g t g c t c t g c t a c c t c c t c a g t
g t c a t a t a t t c a c t g g t a t c a g c a a c g g c c c g g g c a g t c c c c t a g a t t g c t c a t t t a t a g t a c c t c t a a t c t g g c c t c a g
g t a t c c c t g c a c g a t t t t c t g g a t c t g g t t c a g g t t c t g a t t a c a c c c t c a c t a t c t c t a g c c t g g a g c c t g a a g a c t t t
g c c g t t t a t t a c t g c c a g c a g a g g t c t a g c t c c c c a t t c a c c t t t g g g a g t g g g a c c a a g g t t g a a a t t a a a g a g t c t c c
a a a g g c a c a g g c c t c c t c a g t g c c c a c t g c a c a a c c c c a a g c a g a g g g c a g c c t c g c c a a g g c a a c c a c a g c c c c a g c c a
c c a c c c g t a a c a c a g g a a g a g g c g g c g a a g a g a a g a a a a a g g a g a a g g a a a g a g g a a c a a g a a g a g a g a g a g a c a a a g
a c a c c a a t g g c c c t g a t t g t g c t g g g g g g c g t c g c c g g c c t c c t g c t t t c a t t g g g c t a g g c a t c t t c t t c a a a a g g g g
c c g c a a a a a c t c c t t t a c a t t t t a a g c a g c c t t t a t g a g g c c a g t a c a g a c g a c t c a a g a g g a a g a c g g g t g c t c a t
g c c g c t t c c t g a g g a g g a g g a g g g t g c g a a c t g c g c g t a a g t t c t c c c g a t c a g c c g a c g c g c c t g c t t a c a a g
c a g g g c c a g a a c c a a c t g t a c a a c g a g c t g a a t c t c g g t a g a c g g g a a g a g t a c g a c g t g t t g g a c a a a c g g a g a g g c c g
c g a c c c a g a a a t g g g c g g c a a g c c t c g c a g g a a a a c c c c c a g g a g g a c t g t a c a a t g a g t t g c a g a a a g a t a a g a t g g
c a g a a g c t t a t a g c g a g a t c g g a a t g a a g g g g g a a a g g a g a c g a g g g a a a g g a c a c g a c g g c c t t t a t c a g g g c c t g t c c
a c a g c a a c a a a a g a t a c g t a t g a c g c c t c c a t a t g c a g g c a c t t c c a c c a c g g t g a t a a (配列番号：327)

20

30

(アミノ酸)

MALPVTALLLLPLALLLHAAARPEVQLVESGGGLV KPGGSLRLS CAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEWVST I SGGGTY I Y
YPDSVKGRFT I SRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDNYGRNYDYGMDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSE I
VLTQSPATLSLSPGERATLTC SATSSVSY I HWYQQRPGQSPRL I YSTSNLASG I PARFSGSGSGSDYTLT I SSLEPEDF
AVYYCQQRSSSPFTFGSGTKVE I KESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEKKKEKEKEEQEERETK
TPMAL I VLGGVAGLLLF I GLG I FFKRGRKLLY I FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYK
QGQNQLYNELNLRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE I GMKGERRRRKGHDGLYQGLS
TATKDTYDALHMQALPPR* * (配列番号：328)

40

E6 CAR IgD4 pCDH gBLOCK配列：

(DNA)

a g t a c c t c t a a t c t g g c c t c a g g t a t c c c t g c a c g a t t t t c t g g a t c t g g t t c a g g t t c t g a t t a c a c c c t c a c t a t c t c
t a g c c t g g a g c c t g a a g a c t t t g c c g t t t a t t a c t g c c a g c a g a g g t c t a g c t c c c c a t t c a c c t t t g g g a g t g g g a c c a
a g g t t g a a a t t a a a g a g t c t c c a a a g g c a c a g g c c t c c t c a g t g c c c a c t g c a c a a c c c c a a g c a g a g g g c a g c c t c g c c
a a g g c a a c c a c a g c c c c a g c c a c c a c c c g t a a c a c a g g a a g a g g c g g c g a a g a g a a g a a a a a g g a g a a g g a a a g a g g a
a c a a g a a g a g a g a g a c a a a g a c a c c a a t g g c c c t g a t t g t g c t g g g g g g c g t c g c c g g c c t c c t g c t t t c a t t g g g c
t a g g c a t c t t c t t c a a a a g g g g c c g a a a a a a c t c c t t t a c a t t t t a a g c a g c c t t t a t g a g g c c a g (配列番号：

50

329)

CAR E6 X4/8/4-IBB/CD3z 配列:

(DNA)

atggccctgcccgtgaccgctttgctgctccccctggcgctgctgctgcacgccgccaggccagaggccagctgggtga
gagtggcggggggcgggttaagcctggcggcctcccctgcggtgagctgcgccgagtggaattactttcagccgatatg
ggaatgagttgggtgcggcaagctcccgggaagaggctggaaatgggtctcaacaatctccggggggggcacttacatctat
taccctgactcagtaaggggagattaccatttcacgagacaacgctaagaataacctgtatttgagatgaattctct
gagagcagaggacacagctgtttactattgtaccgcgacaactatggcaggaactacgactacggatggactatggg
gacaagggacattgggtacagtgagcagtgccggcggggggcagcggaggaggaggcagcggggcggaggcagcgagata
gtgctcacgcagtcaccgcgactctcagctctcaccctggggaacgagctacctgacgtgctctgctacctcctcag
gtcattatctactggatcagcaacggcccggcagctcccctagattgctcattatagctacctctaatctggcctcag
gtacctgacgattttctggatctgggttcaggctctgatfacacctcactatctctagcctggagcctgaagacttt
gccgtttatctactgcccagcagaggcttagctccccattcaccctttgggagtgaggaccaagggtgaaataaagacaagac
gcacaccaagccaccataaccagctccagaactgctcggaggctctggcaccggaaccggaggacctaccatcaaaccac
ctaagccacctaaagcctgctcctaaccctgctcggaggacctatctacattttgggccccgctcgcaggcacatgtggagt
ctcctcctctcccctgggtgattaccctgtactgcaaaaagggggccgaaaaaacctctttacatttttaagcagcctttat
gaggccagtaacagcagctcaagaggaagacgggtgctcatgccgctttctgaggaggagggaaggagggtgccaactgc
gcgttaagttctcccgatcagccgacgcgctgcttacaagcagggccagaaccaactgtacaacgagctgaatctcgg
agacgggaagagtaacagctgttgacaacggagaggccgcgaccagaaaatggcggcaagcctcgaggaaaaacc
ccaggaggacctgtacaaatgagttgcagaaagataagatggcagaagcttatagcgagatcggaatgaagggggaaagga
gacgagggaaaggacacgacggcctttatcaggccctgtccacagcaacaaaagatacgtatgacgcccccatatgca
gcacttccaccacggtgataa (配列番号: 330)

(アミノ酸)

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEWVSTISGGTYIY
YPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDNVGRNYDYGMDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEI
VLTQSPATLSLSPGERATLTCASSTSSVSIHWYQQRPGQSPRLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGSDYTLTISSELPEDF
AVYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIKDKHTHTKPPKPAPELLGGPGTGTGGPTIKPPKPPKPAPNLLGGPIYIWAPLAGTCGV
LLLSLVITLYCKRGRKLLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLG
RREEDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRKGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ
ALPPR* * (配列番号: 331)

E6 CAR X48 pCDH gBLOCK 配列:

(DNA)

agtacctctaatctggcctcaggatccccctgacgattttctggatctgggttcaggctctgatfacacctcactatctc
tagcctggagcctgaagactttgccgtttatctactgccagcagaggcttagctccccattcaccctttgggagtgaggacca
agggtgaaataaagacaagacgcacaccaagccaccataaccagctccagaactgctcggaggctctggcaccggaacc
ggaggacctaccatcaaaccacctaaagcaccctaaagcctgctcctaaccctgctcggaggacctatctacattttgggccc
cgctcgaggcacatgtggagtgcctcctcctcccctgggtgattaccctgtactgcaaaaagggggccgaaaaaacctctt
tacatttttaagcagcctttatgaggccag (配列番号: 332)

CAR E6 X4/4/4-IBB/CD3z 配列:

(DNA)

atggccctgcccgtgaccgctttgctgctccccctggcgctgctgctgcacgccgccaggccagaggccagctgggtga
gagtggcggggggcgggttaagcctggcggcctcccctgcggtgagctgcgccgagtggaattactttcagccgatatg
ggaatgagttgggtgcggcaagctcccgggaagaggctggaaatgggtctcaacaatctccggggggggcacttacatcta
ttaccctgactcagtaaggggagattaccatttcacgagacaacgctaagaataacctgtatttgagatgaattctc
tgagagcagaggacacagctgtttactattgtaccgcgacaactatggcaggaactacgactacggatggactatggg
ggacaagggacattgggtacagtgagcagtgccggcggggggcagcggaggaggaggcagcggggcggaggcagcgagata
agtgctcacgcagtcaccgcgactctcagctctcaccctggggaacgagctacctgacgtgctctgctacctcctcag

tgtcataatctcactgggtatcagcaacggcccggcagctccccctagattgctcatttatagtagctcctaactctggcctcaggatccccctgcacgatcttctggatctgggtcagggtctgat tacaccctcactatctctagcctggagcctgaagactttgccgtttatfactgccagcagaggcttagctccccattcacctttgggagtgaggaccaaggttgaaat taaagacaagacgcacaccaagccacctaaaccagctccagaactgctcggagggtccctggcaccggaaccggaggacctaccatcaaaccacctaaagccacctaaagcctgctcctaacctgctcggaggacctatggccctgat tggctggggggcgtcgccggcctcctgcttttcat tgggctaggcatcttcttcaaaaagggccgcaaaaaactcctttacat ttttaagcagccttttatgaggccagtacagacgactcaagaggaagacgggtgctcatgccgctttcctgaggaggaggaaggagggtgcgaactgcgcgttaagttctcccgatcagccgacgcgctgcttacaagcagggccagaaccaactgtacaacgagctgaatctcggtagacgggaagag tacgacgtgtggacaaacggagaggccgcgaccagaaaatgggaggcaagcctcgaggaaaaacccccagaggggactgtacaaatgagttgcagaaagataagatggcagaagcttatagcgagatcggaatgaagggggaaaggagacgaggaaaggacacgacggcctttatcaggccctgtccacagcaacaaaagatacgtatgacgcccccatatgcaggcacttccaccacggtgataa(配列番号: 333)

(アミノ酸)

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEWVSTISGGGTIYY
 YPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDNVGRNYDYGMDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEI
 VLTQSPATLSLSPGERATLTCSATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGSDYTLTISSELPEDF
 AVYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIKDKTHTKPPKPAPELLGGPGTGTGGPTIKPPKPPKPAPNLLGGPMALIVLGGVAGLL
 LFI GLGIFFKRGRKLLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNLYNELNLGRR
 EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDGLYQGLSTATKDYDALHMQUAL
 PPR* * (配列番号: 334)

E6 CAR X44 pCDH gBLOCK配列:

(DNA)

agtagctcctaactctggcctcagggtatccccctgcacgatcttctggatctgggtcagggtctgat tacaccctcactatctc
 tagcctggagcctgaagactttgccgtttatfactgccagcagaggcttagctccccattcacctttgggagtgaggacca
 aggttgaaat taaagacaagacgcacaccaagccacctaaaccagctccagaactgctcggagggtccctggcaccggaacc
 ggaggacctaccatcaaaccacctaaagccacctaaagcctgctcctaacctgctcggaggacctatggccctgat tggct
 gggggggcgtcgccggcctcctgcttttcat tgggctaggcatcttcttcaaaaagggccgcaaaaaactcctttacat ttt
 ttaagcagccttttatgaggccag(配列番号: 335)

CAR E6 8+4/4/4-1BB/CD3z配列:

(DNA)

atggccctgccgtgaccgctttgctgctccccctggcgtgctgctgcacgcccaggccagagggtccagctgggtga
 gagtggcgggtgggttaagcctggcggctccccctgaggctgagctgcgcccggagtggaattactttcagccgatatg
 ggaatgagttgggtgcggcaagctcccgggaagaggctggaaatgggtctcaacaatctccggggggggcacttacatctat
 taccctgactcagtaaggggagattta ccat ttcacgagacaacgctaagaataccctgattttgcagatgaattctc
 tgagagcagaggacacagctgtttactat tgaaccgagacaactatggcaggaactacgactacggatggactatgg
 ggacaagggacattgggtacagtgagcagtgccggcgggggacgaggaggaggcagcgggtggcggaggcagcgagat
 agtgcctcacgagctaccccgactctcagttctcaccctggggaacgagctaccct gacgtgctctgctacctcctca
 gtgtcataatctcactgggtatcagcaacggcccggcagctccccctagattgctcatttatagtagctcctaactctggcctc
 aggtatccccctgcacgatcttctggatctgggtcagggtctgat tacaccctcactatctctagcctggagcctgaagact
 ttgccgtttatfactgccagcagaggcttagctccccattcacctttgggagtgaggaccaaggttgaaat taaaacgaca
 accccg gccccagaccaccaacgccagccccaccatcgccagcaaccctgtctctgagaccagaagcctgtaggc
 ctgccgccggtggagctgtgcacacaagaggactggatttcgctgtgatatggccctgat tggctggggggcgtcgcc
 ggctcctgcttttcat tgggctaggcatcttcttcaaaaagggccgc aaaaaactcctttacat ttttaagcagcctt
 ttatgaggccagtacagacgactcaagaggaagacgggtgctcatgccgctttcctgaggaggaggaaggagggtgcga
 actgcgcgttaagttctcccgatcagccgacgcgctgcttacaagcagggccagaaccaactgtacaacgagctgaatct
 cggtagacgggaagagtacgacgtgtggacaaacggagaggccgcgaccagaaaatgggaggcaagcctcgaggaaaa
 acccccaggaggggactgtacaaatgagttgcagaaagataagatggcagaagcttatagcgagat cggaatgaaggggga
 aaggagacgaggggaaaggacacgacggcctttatcaggccctgtccacagcaacaaaagatacgtatgacgcccccata

10

20

30

40

50

tgaggcacttccaccacggtgataa(配列番号: 336)
(アミノ酸)

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKGSSLRRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEWVSTISGGGTYIY
YPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDNYGRNYDYGMDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEI
VLTQSPATLSLSPGERATLTCSATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGSDYTLTISSELEPDF
AVYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIKTTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDMALIVLGGVAG
LLLFIGLGIFFKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEEGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLG
RREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ
ALPPR* * (配列番号: 337)

10

E6 CAR CD844 pCDH gBLOCK配列:
(DNA)

agtacctctaatctggcctcaggatccctgcacgattttctggatctggttcaggttctgattacacctcactatctc
tagctggagcctgaagactttgccgtttattactgccagcagaggcttagctccccattcacctttgggagtgaggacca
aggftgaaataaaaagacaacccccggccccagaccaccaacgccagccccaccatcgccagccaacccctgtctctg
agaccagaagcctgtaggcctgccgcccgtggagctgtgcacacaagaggactggatttcgacctgtgatatggccctga
ttgtgctggggggcgctgccggcctcctgctttcatctgggctaggcatctcttcaaaaggggcccgaaaaaactcctt
tacattttaagcagccttttatgaggccag(配列番号: 338)

CARにおけるヒト化C2 scFV配列:
(DNA)

gagggccaccatggccttgccagtgacggccctgctgctgccattggctcttctgttgcacgctgccaggcctgaagtgc
agctcgtagagagtgccgggggactgggaagcccgggtgaagcctcagactcagttgcgccgctcaggtttactttt
tcaggttacgcaatgctcctgggtaagacaggcaccgggaaaggactcgagtggtgtctactatcagctcaggaggcac
ttatataatctctgactctgtaaaaggccgatttacgatttctcgcgacaatgcaaaagaactccctctacctccaa
atgaacagctttagggcagaagacactgctgtatactatgtgcacgctcggcggcgacaactactacgagtactttga
cgtgtgggggaaaggactaccgtgacagtttcaagcggaggagggtggctcagggtggaggcgggtcaggggggggaggaa
gtgatatgtgctcacacaatccccagcctcccggctgtgctccccggccaacgcgctacaattacatgtcgggctcc
aaaagcgtgagcaccagcggctaca gctacatgcactggatcaacagaaaccaggacaaccccccaactgttgattt
atctcgcttcaaaacttgagtcggcgctgctgctgcttttcaggaggaggagcggcacagattttacgctgactatc
aacccttagaagcaaacgatacagcgaattattatgtcaacatccccgggaactcccctttacgttcggcgggggac
aaagtcgaaat taagagaacc(配列番号: 339)

20

30

(アミノ酸)

EVQLVESGGGLVKGSSLRRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNANKSLY
LQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYEYFDVWGKGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPASLAVSPGQRATITCR
ASKSVSTSGYSYMHYQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYCQHSRELPTFTGG
GTKVEIKRT(配列番号: 340)

CARにおけるヒト化E6 scFV配列:
(DNA)

gaggtccagctggttgagagtgccgggtggcctggttaagcctggcggctccctgcccgtgagctgcgccgagtggtat
tactttcagccgatatgggatgagttgggtgcggcaagcctcccgggaagaggctggaaatgggtctcaacaatctccgggg
ggggcacttacaatctattaccccgactcagtcaaggggagattaccatttcacgagacaacgctaagaataacctgtat
ttgcagatgaattctctgagagcagaggacacagctgtttactatgtaccgagcacaactatggcaggaactacgact
acggtatggactatggggacaaggacattggttacagtgagcagtgccggcggggcagcggaggaggaggcagcgggt
ggggggggcagcgagatagtgctcacgcagtcacccgagctctcagctctcaccctggggaacgagctacctgacgtg
ctctgctacctcctcagtgctatatactcactgggtatcagcaacggcccggcagtc ccctagattgctcatttatagt
acctctaacttgccctcaggatccctgcacgattttctggatctggttcaggttctgattacacctcactatctctag
cctggagcctgaagactttgccgtttattact gccagcagaggcttagctccccattcacctttgggagtgaggaccaag
gttgaat taaa(配列番号: 341)

40

50

(アミノ酸)

EVQLVESGGGLVVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEWVSTISGGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCTRDNYGRNYDYGMDYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLTC
SATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGSDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSSPFTFGSGTKV
EIK (配列番号: 342)

CD8リーダー配列:

(DNA)

atggccctgcccgtgaccgctttgctgctccccctggcgctgctgctgcacgccgccaggcca(配列番号: 343)

(アミノ酸)

MALPVTALLLPLALLLHAARP(配列番号: 344)

10

CD8ヒンジ領域配列:

(DNA)

acgacaacccccggccccagaccaccaacgccagccccaccatcgccagccaacccctgtctctgagaccagaagcctg
taggctgcccgggtggagctgtgcacacaagaggactggatttcgacctgtgat(配列番号: 345)

(アミノ酸)

TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD(配列番号: 346)

CD4ヒンジ領域配列:

(DNA)

tcgggacaggtcctgctggaatccaacatcaaggttctgcccacatggtccacccccggtgcagcca(配列番号: 347
)

(アミノ酸)

SGQVLLESNIKVLPTWSTPVQP(配列番号: 348)

20

CD28ヒンジ領域配列:

(DNA)

aaacacctttgtccaagtcccctatttcccggaccttctaagccc(配列番号: 349)

(アミノ酸)

KHLCPSPLFPGPSKP(配列番号: 350)

30

CD8+CD4ヒンジ領域配列:

(DNA)

acgacaacccccggccccagaccaccaacgccagccccaccatcgccagccaacccctgtctctgagaccagaagcctg
taggctgcccgggtggagctgtgcacacaagaggactggatttcgacctgtgatcgggacaggtcctgctggaatcca
acatcaaggttctgcccacatggtccacccccggtgcagcca(配列番号: 351)

(アミノ酸)

TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDSGQVLLESNIKVLPTWSTPVQP(配列番号: 352
)

40

CD8+CD28ヒンジ領域配列:

(DNA)

acgacaacccccggccccagaccaccaacgccagccccaccatcgccagccaacccctgtctctgagaccagaagcctg
taggctgcccgggtggagctgtgcacacaagaggactggatttcgacctgtgataaacacctttgtccaagtcccctat
tcccggaccttctaagccc(配列番号: 353)

(アミノ酸)

TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDKHLCPSPLFPGPSKP(配列番号: 354)

CD28+CD4ヒンジ領域配列:

50

(DNA)

aaacacctttgtccaagtcccctatttcccggaccttctaagccctcgggacaggtcctgctggaatccaacatcaaggt
tctgcccacatggtccaccccggtgcagcca(配列番号: 355)

(アミノ酸)

KHLCPSPFLFPGPSKPSGQVLLLESNIKVLPTWSTPVQP(配列番号: 356)

ヒトIgDヒンジ領域配列:

(DNA)

gagtcctccaaaggcacaggcctcctcagtgcccactgcacaaccccaagcagagggcagcctcgccaaggcaaccacagc
cccagccaccaccgtaacacaggaagaggcggcgaagagaagaaaaaggagaaggagaaagaggaacaagaagagagag
agacaaagacacca(配列番号: 357)

(アミノ酸)

ESPKAQASSVPTAQQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTP(配列番号: 358)

X4リンカー(IgG1及びIgG2修飾ヒンジ部)配列:

(DNA)

gacaagacgcacaccaagccacctaaaccagctccagaactgctcggaggtcctggcaccggaaccggaggacctacat
caaaccacctaaagccacctaaagcctgctcctaacctgctcggaggacct(配列番号: 359)

(アミノ酸)

DKTHTKPPKPAPPELLGGPGTGTGGPTIKPPKPPKPAPNLLGGP(配列番号: 360)

CD3 ZETA膜貫通領域配列:

(DNA)

ctctgctacctgctggatggaatcctcttcatctatgggtgctatctcactgccttgttcctg(配列番号: 361)

(アミノ酸)

LCYLLDGIILFIYGVILTALFL(配列番号: 362)

CD8膜貫通領域配列:

(DNA)

atctacatttgggccccgctcgcaggcacatgtggagtgctcctcctctccctggtgattaccctgtactgc(配列番
号: 363)

(アミノ酸)

IYIWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYC(配列番号: 364)

CD4膜貫通領域配列:

(DNA)

atggccctgattgtgctggggggcgctcgccggcctcctgcttttcatctgggctaggcatcttcttc(配列番号: 365
)

(アミノ酸)

MALIVLGGVAGLLLLFIGLGIFF(配列番号: 366)

CD28膜貫通領域配列:

(DNA)

ttttgggtgctgggtgggtgggtgggtggagtcctggcctgctatagcttgctagtaaacagtgccctttattatfttctgggt
g(配列番号: 367)

(アミノ酸)

FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV(配列番号: 368)

4-1BB膜貫通領域配列:

(DNA)

50

atcatctccttcttcttcttgcgctgacgtcgactgctgttcttcttccctgctgttcttccctcacgctccgttctctgttgt
t(配列番号: 369)

(アミノ酸)

IISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVV (配列番号: 370)

OX40膜貫通領域配列:

(DNA)

gttgcggccatcctgggacctgggacctgggtgctggggctgctgggccccctggccatcctgctggccctgtacctgctc(
配列番号: 371)

(アミノ酸)

VAAI LGLGLV LGLLGPLA ILLALYLL (配列番号: 372)

CD3 ZETA領域配列:

(DNA)

cgcttaagtctcccgatcagccgacgctgcttacaagcagggccagaaccaactgtacaacgagctgaatctcgg
tagacgggaagagtacgactgttggacaaacggagaggccgcgaccagaaaatggcggaagccctcgaggaaaaacc
cccaggaggactgtacaaatgagttgcagaaagataagatggcagaagcttatagcgagatcggaatgaaggggaaagg
agacgagggaaaggacacgacggcctttatcagggcctgtccacagcaacaaaagatacgtatgacgcccccatatgc
aggcacttccaccacgg(配列番号: 373)

(アミノ酸)

RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER
RRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR (配列番号: 374)

CD3 ZETA領域変種配列:

(DNA)

agagtgaagtctcagcaggagcgcagacgcccccgctaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctagg
acgaagagaggagtacgatgttttggacaagagactggccgggacctgagatggggggaaagccgagaaggaagaacc
ctcaggaaggctgtacaaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagatgggatgaaaggcgagcgc
cggaggggcaaggggacgagtggcctttaccagggctcagtacagccaccaaggacacctacgacgccccctcacatgca
ggcctgccccctcgc(配列番号: 375)

(アミノ酸)

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER
RRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR (配列番号: 376)

CD28領域配列:

(DNA)

agaagcaagcgtctcggctcctgcatcttgattacatgaacatgacccaagaagaccaggccccaccaggaaacattta
ccagccctacgctccgcccagcgtctcgtgcctaccgggtcc(配列番号: 377)

(アミノ酸)

RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS(配列番号: 378)

4-1BB領域配列:

(DNA)

aaaaggggcccgaaaaaactcctttacattttaagcagccttttatgaggccagtacagacgactcaagaggaagacgg
gtgctcatgccgcttcttgaggaggaggaaggagggtgcgaactg(配列番号: 379)

(アミノ酸)

KRGRKLLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL(配列番号: 380)

OX40領域配列:

(DNA)

10

20

30

40

50

cggagggaccagaggctgcccccgatgccacaagccccctgggggaggcagtttccggacccccatccaagaggagcaggccgacgccactccaccctggccaagatc(配列番号: 381)

(アミノ酸)

RRDQRLPPDAHKKPPGGGSRTPIQEEQADAHSTLAKI(配列番号: 382)

ヒト化抗CD3 scFVクローン12F6(VH-VL)配列:

(DNA)

caggtgcagctggcagagcggaggcggagtggtccaacctggaagatctctgagactgagctgtaaggctagcgggta
cacgttcacatcttacacgatgcactgggtgaggcaagccccggtaagggcctggaatggatcggaatataaacccca
gctcagggataaccaataataacagaagttcaagatcggttcacgatctctgctgataaaagtaagtcaccgcttct
ctgcagatggactcactcaggccagaagatactgggtgtttatctctgcaaggcggcaggactacgacgtgtactttga
ctatgggggacggggacgctgtaacagatcaagcggcggcggcggatccggcggcggcggatccggcggcggcggat
ccgatatcagatgaccagagccccgagcagcctgagcgcgagcgtgggcgatcgcgtagccatgacctgccgcgcgagc
agcagcgtgagctataatgcatgggtatcagcagacccccgggcaagcgcgcaaacctggatttatgagaccagcaacct
ggcagcggcgtgccgagccgcttagcggcagcggcagcggcaccgatataacctgaccatagcagcctgcagccgg
aagatattgagacctatattgccagcagtgagcagcaacccgcccaccctttggccagggcaccaaacgcagattacc
cgc(配列番号: 383)

10

(アミノ酸)

QVQLVQSGGTVVQPRSLRLSCKASGYTFSTYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSSGYTKYNQKFKDRFTISADKSKSTAF
LQMDSLRPEDTGVYFCARWQDYDVFYDWGQGTPTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVMTCRAS
SSVSYMHWYQQTPGKAPKPIYATSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPPTFGQGTKLQIT
R(配列番号: 384)

20

ヒト化抗CD3 scFVクローン12F6(VL-VH)配列:

(DNA)

gatatcagatgaccagagccccgagcagcctgagcgcgagcgtgggcgatcgcgtagccatgacctgccgcgcgagcag
cagcgtgagctataatgcatgggtatcagcagacccccgggcaagcgcgcaaacctggatttatgagaccagcaacctgg
cgagcggcgtgccgagccgcttagcggcagcggcagcggcaccgatataacctgaccatagcagcctgcagccggaa
gatatgagacctatattgccagcagtgagcagcaacccgcccaccctttggccagggcaccaaacgcagattaccgg
cggcggcggcggatccggcggcggcggatccggcggcggcggatcccaggcgcagcctggcgcagagcggaggcggagtg
tccaacctggaagatctctgagactgagctgtaaggctagcgggtacacgttcacatcttacacgatgcactgggtgagg
caagccccggtaagggcctggaatggatcggaatataaaccaccagcctcagggtataaccaataataacagaagttca
agatcggttcacgatctctgctgataaaagtaagtcaccgcttctctgcagatggactcactcaggccagaagatactg
gtgtttatctctgcaaggcggcaggactacgacgtgtactttgactattgggggacggggacgctgtaacagatca
agc(配列番号: 385)

30

(アミノ酸)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVMTCRASSSVSYMHWYQQTPGKAPKPIYATSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPE
DIATYYCQQWSSNPPTFGQGTKLQITRGGGGSGGGGSGGGGSQLVQSGGGTVVQPRSLRLSCKASGYTFSTYTMHWVR
QAPGKGLEWIGYINPSSGYTKYNQKFKDRFTISADKSKSTAFSLQMDSLRPEDTGVYFCARWQDYDVFYDWGQGTPTVTVS
S(配列番号: 386)

40

ヒト化抗CD3 scFVクローンOKT3(VH-VL)配列:

(DNA)

caggtgcagctggcagagcggaggcggagtggtgcagcctggaagaagcctgagcctgagctgcaaaagcagcggccta
taccttaccgctataccatgcatgggtgcgcccaggcgcgggcaaggcctggaatggatggctataataaccgga
gccgcggctataccaactataaccagaaaagtgaagatcgctttaccatagcaccgataaaagcaaaagcaccgcttt
ctgcagatggatagcctgcgcccgaagataaccgctgtatattatgagcgcgctattatgatgatcattatggcctgga
ttatggggccagggcaccacctgaccgtgagcagcggcggcggcggatccggcggcggcggatccggcggcggcggat
ccgatatcagatgaccagagccccgagcagcctgagcgcgagcgtgggcgatcgcgtagccatgacctgcagcgcgagc
agcagcgtgagctataatgaactgggtatcagcagacccccgggcaagcgcgcaaacgctggatttatgataccagcaaac

50

tggcgagcggcgtagccagccgcttagcggcagcggcagcggcaccgatataacctttaccatttagcagcctgcagccggaagataatgcgacctatattgccagcagtgagcagcaaccgctttacctttggccagggcaccaaaactgcagattaccg(配列番号: 387)

(アミノ酸)

QVQLVQSGGAVVQPRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISTDKSKSTAF LQMDSLRLPEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKSLASGVPSRFSGSGSGTDYTFITSSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITR(配列番号: 388)

ヒト化抗 CD3 scFVクローンOKT3(VH-VL)配列:

(DNA)

gataatcagatgaccagagcccagcagcctgagcgcgagcgtggcgatcgcgtagccattacctgcagcgcgagcagcagcgtgagctataatgaactggatcagcagaccccgggcaaaagcggcgaacgctggattatgataaccagcaaaactggcgagcggcgtgccgagccgcttagcggcagcggcagcggcaccgatataacctttaccattagcagcctgcagccggaa gataatgcgacctatattgccagcagtgagcagcaaccgctttacctttggccagggcaccaaaactgcagattaccg cggcggtagcggaatccggcggtagcggaatccggcggtagcggaatcccaggtagcagctggtagcagagcggaggcggagtagg tgtagcctggaagaagcctgcgctgagcgtgcaaagcagcggctataacctttaccgctataccatgcatgggtgcg ccaggcggcgggcaaaagcctggaaatggattggctataataaaccgagccgcgctataccaactataaccagaaaagtaga aagatcgctttaccattagcaccgataaaagcaaaagcaccgctttctgcagatggatagcctgcgcccgaagatacc gcggtgatattgcgcgcgctatattgatgatcattatgccggattatggggccagggcaccaccctgaccgtgag cagc(配列番号: 389)

(アミノ酸)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKSLASGVPSRFSGSGSGTDYTFITSSLQPE DIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITRGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGGAVVQPRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVR QAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISTDKSKSTAF LQMDSLRLPEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVS S(配列番号: 390)

ヒト化E6 scFV(VH-VL)配列:

(DNA)

gaggtagcagctggtaggagctgggggaggcctggtagcagcctgggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggatt caccctcagtaggtaggcatgagcctgggtagcagcctccaggggaagaggctggagtaggctctcaaccattagtaggag gaggcaccctacataactaccagagactcagtagaagggccgatcaccatctccagagacaacgccaagaacaccctgtat ctgcaaaagaacagcctgagagcggaggacagcctgtgtatctactgtaccagagataactatggccgcaactatgattat ggcatggattatggggccagggcaccctggtagcctgagcagcggcggtagcggaatccggcggtagcggaatccggcg gtagcggaatccgaaatgtgtgacacagctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctcaccctgc agcggcaccagcagctgttagctacatccactggtagcaacagaggcctggccagagccccaggctcctcatctatagcac ctccaacctggccagcggcatcccagccaggctcagtaggtagggctctgggagcgactacactctcaccatcagcagcc tagagcctgaagattttgcagttattactgtcagcagcgtagcagctcccctttacctttggcagcggcaccaaaagt gaaattaaa(配列番号: 391)

(アミノ酸)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEWVSTISGGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCTRDNRYGRNYDYGMDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATL CSATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGSDYTLTISSELPEDFAVYYCQQRSSSPFTFGSGT KVEIK(配列番号: 392)

ヒト化E6 scFV(VL-VH)配列:

(DNA)

gaaatgtgtgacacagctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctcaccctgcagcggcaccag cagcttagctacatccactggtagcaacagaggcctggccagagccccaggctcctcatctatagcaccctccaacctgg ccagcggcatcccagccaggctcagtaggtagggctctgggagcgactacactctcaccatcagcagcctagagcctgaa

10

20

30

40

50

gattttgacagtttattactgtcagcagcgtagcagctcccccttccaccttggcagcggcaccaaagtggaaattaaagg
 cggtagcggatccggcggtagcggatccggcggtagcggatccgaggtgcagctggtaggtctgggggaggcctggtca
 agcctggggggctcctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtaggtatggcatgagctgggtccgccag
 gctccaggaagaggctggagtaggtctcaacattagtaggtagggcagcctacataactaccagactcagtgaaggg
 ccgattcacctctccagagacaacgccaagaacacctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctg
 tgtattactgtaccagagataactatggccgcaactatgatattggcatggattattggggccagggcacccctggtgacc
 gtgagcagc(配列番号: 393)

(アミノ酸)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLTCATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGSDYTLTISSLEPE
 DFAVYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVR
 QAPGKRLEWVSTISGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDNYGRNYDYGM DYWGQGT
 LVTVSS(配列番号: 394)

10

ヒト化C2 scFV(VH-VL)配列:

(DNA)

gaggtgcagctggtaggtctgggggaggcctgggtcaagcctggggggctcctgagactctcctgtgcagcctctggatt
 caccttcagtaggtatgccatgagctgggtccgccaggctccaggggaagggctggagtaggtctcaacattagtagtg
 gcggaacctacataactaccgactcagtagaaggccgattcacctctccagagacaacgccaagaactcactgtat
 ctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggcctgtattactgtgcgagacttgggggggataaatactacgaat
 acttcgatgtctggggcaagggaccacggctcctccggcggtagcggatccggcggtagcggatccggcggtagcggg
 ggtagcagctgtgtctgaccagctccagcctcctggccgtgtctccaggacagagggccaccatcacctgcag
 agccagtaagagtgtcagtagcagcggatctctacatgcactggtagcagcagaaaccaggacaacctcctaaactc
 ctgatttacctggcatccaatctggagagcggggtcccagccaggctcagcggcagtaggtctgggaccgatttcccc
 cacaataatcctgtggaagcgaatgatactgcaaatattactgtcagcacagtagggagctgccttccacattcggcg
 gagggaccaaggtggagatcaaacgaact(配列番号: 395)

20

(アミノ酸)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLY
 LQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYEYFDVWGKGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPASLAVSPGQRATITCR
 ASKSVSTSGYSYMHYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTI NPVEANDTANYYCQHSRELPFTFGG
 GTKVEIKRT(配列番号: 396)

30

ヒト化E6 scFV(VL-VH)配列:

(DNA)

gacattgtgtctgaccagctctccagcctccttggccgtgtctccaggacagagggccaccatcacctgcagagccagtaa
 gtagtgcagtagcagcggatctctacatgcactggtagcagcagaaaccaggacaacctcctaaactcctgatttacc
 tggcatccaatctggagagcggggtcccagccaggctcagcggcagtaggtctgggaccgatttccccccacaataat
 cctgtggaagcgaatgatactgcaaatattactgtcagcacagtagggagctgccttccacattcggcggaggggacca
 agtaggagatcaaacgaactggcggtagcggatccggcggtagcggatccggcggtagcggatccgaggtgcagctggtag
 agtctgggggaggcctggtagcggtagcggatccggcggtagcggatccggcggtagcggatccgaggtgcagctggtag
 gcatgagctgggtccgccaggctccaggggaagggctggagtaggtctcaacattagtagtagcgggaacctacataa
 ctaccgactcagtagaaggccgattcacctctccagagacaacgccaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcc
 tgagagccgaggacacggcctgtattactgtgcgagacttgggggggataaatactacgaatacttcgatgtctggggc
 aaagggaccacggtcacgctcctcc(配列番号: 397)

40

(アミノ酸)

DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASKSVSTSGYSYMHYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTI N
 PVEANDTANYYCQHSRELPFTFGGGTKVEIKRTGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGY
 AMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYEYFDVWG
 KGTTTVTVSS(配列番号: 398)

50

G₄S₁ リンカー 配列:

(DNA)

ggcggtaggcggatcc(配列番号: 399)

(アミノ酸)

GGGGS(配列番号: 400)

[G₄S₁] x3リンカー配列:

(DNA)

ggcggtaggcggatccggcggtaggcggatccggcggtaggcggatcc(配列番号: 401)

(アミノ酸)

GGGSGGGSGGGGS(配列番号: 402)

10

8 aa GSリンカー配列:

(DNA)

ggcggtaggcggtaggcggatccgga(配列番号: 403)

(アミノ酸)

GGSGGSG(配列番号: 404)

12 aa GSリンカー配列:

(DNA)

ggcggtaggcggtaggcggatccggcggtaggcggatccgga(配列番号: 405)

(アミノ酸)

GGSGGSGGGSG(配列番号: 406)

20

13 aa GSリンカー配列:

(DNA)

ggcggtaggcggtaggcggatccggcggtaggcggatcc(配列番号: 407)

(アミノ酸)

GGGSGGGSGGGGS(配列番号: 408)

22 aa GSリンカー配列:

(DNA)

ggcggtaggaagcggcggtaggcggatccggcagcggcgggaagcggcggtaggcggatccggcggtagga(配列番号: 409)

(アミノ酸)

GGGSGGGSGGGSGGGSGGG(配列番号: 410)

30

24 aa GSリンカー配列:

(DNA)

ggcggtaggcggtaggcggatccggcggtaggcggatccggaggcggtaggcggtaggcggatccggatccgga(配列番号: 411)

(アミノ酸)

GGSGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG(配列番号: 412)

40

マウスC3重鎖可変領域配列:

(DNA)

caggtagcagctgcagcagctctgggacctgagctggtagggacctggggctctcagtagaagatttctctgcaaggggtccggctacagattcactgatattgctatgaactgggtgaagcagagtcagcaagagcttagagtaggattggagttatttagtactttctctggtaatacaaacctcaaccagaagtttaagggcaaggccacaatgactgtagacaaatctccagcacagcctat atggaacttgccagattgacatctgaggattctgccatgtattactgtgcaagatcggattactacggccccatactttgactactggggccaaggcaccactctcacagctctcctca(配列番号: 413)

50

(アミノ酸)

QVQLQQSGPELVRPGVSVKI SCKGSGYRFTDYAMNWKQSHAKSLEWIGVISTFSGNTNFNQKFKGKATMTVDKSSSTAY
MELARLTSEDSAMYYCARSDYYGPYFDYWGGQTTLTVSS(配列番号: 414)

マウスC3重鎖可変フレームワーク領域1(FWR1)配列:

(DNA)

caggtccagctgcagcagctctgggacctgagctggtagggcctggggctctcagtgaagatttctctgcaaggggtccggcta
cagattcact(配列番号: 415)

(アミノ酸)

QVQLQQSGPELVRPGVSVKI SCKGSGYRFT(配列番号: 416)

10

マウスC3重鎖可変相補性決定領域1(CDR1)配列:

(DNA)

gattatgctatgaac(配列番号: 417)

(アミノ酸)

DYAMN(配列番号: 418)

マウスC3重鎖可変フレームワーク領域2(FWR2)配列:

(DNA)

tgggtgaagcagagtcattgcaaagagcttagagtggaattgga(配列番号: 419)

(アミノ酸)

WVKQSHAKSLEWIG(配列番号: 420)

20

マウスC3重鎖可変相補性決定領域2(CDR2)配列:

(DNA)

gttattagtagtactttctctggtaatacaaaacttcaaccagaagtttaagggc(配列番号: 421)

(アミノ酸)

VISTFSGNTNFNQKFKG(配列番号: 422)

マウスC3重鎖可変フレームワーク領域3(FWR3)配列:

(DNA)

aaggccacaatgactgttagacaaaatcctccagcacagcctatatggaacttgccagattgacatctgaggattctgccaat
gtattactgtgcaaga(配列番号: 423)

(アミノ酸)

KATMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSAMYYCAR(配列番号: 424)

30

マウスC3重鎖可変相補性決定領域3(CDR3)配列:

(DNA)

tcggattactacggcccatactttgactac(配列番号: 425)

(アミノ酸)

SDYYGPYFDY(配列番号: 426)

40

IGHV1-18*04重鎖可変領域配列:

(DNA)

caggttcagctgggtgcagctctggagctgaggtagagaagcctggggcctcagtgaaggtctctctgcaagggcttctggttta
cacctttaccagctacgggtatcagctgggtgacagggccctggacaagggcttgagtggaatggatggatcagcgctt
acaatggtaacacaaactatgacacagaagctccagggcagagtcacatgaccacagacacatccacgagcacagccttac
atggagctgaggagcctgagatctgacg acacggccgtgtattactgtgagagaga(配列番号: 427)

(アミノ酸)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWI SAYNGNTNYAQKLGGRVTMTTDTSTSTAY

50

MELRSLRSDDTAVYYCAR (配列番号: 428)

IGHV1-18*04重鎖可変フレームワーク領域1(FWR1)配列:

(DNA)

cagg ttcagctgg tgcag tctggagctgagg tgaagaagcctggggcctcag tgaagg tctcctgcaaggct tctgg tta
cacctttacc (配列番号: 429)

(アミノ酸)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT (配列番号: 430)

IGHV1-18*04重鎖可変相補性決定領域1(CDR1)配列:

(DNA)

agctacgggtatcagc (配列番号: 431)

(アミノ酸)

SYGIS (配列番号: 432)

10

IGHV1-18*04重鎖可変フレームワーク領域2(FWR2)配列:

(DNA)

tgggtg cgcacaggcccc tggacaagggcttgag tggatggga (配列番号: 433)

(アミノ酸)

WVRQAPGQGLEWMG (配列番号: 434)

20

IGHV1-18*04重鎖可変相補性決定領域2(CDR2)配列:

(DNA)

tggatcagcgcttacaatggtaacacaaactatgcacagaagctccagggc (配列番号: 435)

(アミノ酸)

WISAYNGNTNYAQLQG (配列番号: 436)

IGHV1-18*04重鎖可変フレームワーク領域3(FWR3)配列:

(DNA)

agagtcacatgaccacagacacatccacgagcacagcctacatggagctgaggagcctgagatctgacgacacggccgt
gtattactgtgcgaga (配列番号: 437)

(アミノ酸)

RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR (配列番号: 438)

30

ヒト化C3重鎖可変領域配列:

(DNA)

cagg ttcagctgg tgcag tctggagctgagg tgaagaagcctggggcctcag tgaagg tctcctgcaaggct tctgg tta
cacctttaccgactacgcca tgaactgggtg cgcacaggcccc tggacaagggcttgag tggatgggagtgatcagcacct
tcagcggtaacacaaacttcaaccagaagttcaagggcagagtcacatgaccacagacacatccacgagcacagcctac
atggagctgaggagcctgagatctgacgacacggccgtgtattactgtg c gagaagcgactactacggcccatactt cga
ctactggggccagggcaccaccc t gaccgtgtccagc (配列番号: 439)

(アミノ酸)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYAMNWRQAPGQGLEWMGVI STFSGNTNFNQKFKGRVTMTTDTSTSTAY
MELRSLRSDDTAVYYCARSDYYGPFYDWGQGTTLTVSS (配列番号: 440)

40

ヒト化C3重鎖可変フレームワーク領域1(FWR1)酸配列:

(DNA)

cagg ttcagctgg tgcag tctggagctgagg tgaagaagcctggggcctcag tgaagg tctcctgcaaggct tctgg tta
cacctttacc (配列番号: 441)

(アミノ酸)

50

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT(配列番号: 442)

ヒト化C3重鎖可変相補性決定領域1(CDR1)配列:

(DNA)

gactacgccatgaac(配列番号: 443)

(アミノ酸)

DYAMN(配列番号: 444)

ヒト化C3重鎖可変フレームワーク領域2(FWR2)配列:

(DNA)

tgggtgcgacaggccccctggacaagggcttgagtggaatggga(配列番号: 445)

(アミノ酸)

WVRQAPGQGLEWMG(配列番号: 446)

10

ヒト化C3重鎖可変相補性決定領域2(CDR2)配列:

(DNA)

gtgatcagcaccttcagcggtaacacaaacttcaaccagaagttcaagggc(配列番号: 447)

(アミノ酸)

VISTFSGNTNFNQKFKG(配列番号: 448)

20

ヒト化C3重鎖可変フレームワーク領域3(FWR3)配列:

(DNA)

agagtacccatgaccacagacacatccacgagcacagcctacatggagctgaggagcctgagatctgacgacacggccgtgtattactgtgcgaga(配列番号: 449)

(アミノ酸)

RVTMTTDTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR(配列番号: 450)

ヒト化C3重鎖可変相補性決定領域3(CDR3)配列:

(DNA)

agcgactactacggccatacttcgactac(配列番号: 451)

(アミノ酸)

SDYYGPYFDY(配列番号: 452)

30

ヒト化C3 IgG1重鎖配列

(DNA)

caggttcagctggcagctctggagctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaggctctcctgcaaggcttctggttacaccttaccgactacgccatgaactgggtgcgacaggccccctggacaagggcttgagtggaatgggagtgatcagcaccttcagcggtaacacaaacttcaaccagaagttcaagggcagagtcacatgaccacagacacatccacgagcacagcctacatggagctgaggagcctgagatctgacgacacggccgtgtattactgtgcgagaagcgactactacggccatacttcgactactggggccaggcaccacctgaccgtgtccagcgtagcaccaagggcccatcggctcttccccctggcaccctctccaagagcaccctctgggggcacagcggccccctgggctgacctggtaaggactacttccccgaaccggtgacgggtgctggaactcaggcgccccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggcgtgctctacagctcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacagtgccccctcagcagcttgggcaccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagccagcaacaccaagggtggacaagaaagttagcccaaatctgtgacaaaactcacacatgccaccctgcccagcaccctgaactcctggggggacgctcagctctcctcttcccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgctgggtgggtgacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagcaaaagccgctgggagcagtaacaacagcagctaccgtgtggcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtaaaagtgaaggctccaacaaagccccccagcccccatcgagaaaacctccaagccaaagggcagccccgaaccacaggtgtacacctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggctcagcctgacctgacctgggtcaaaagcctctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagagcaatgggcagccggaagaactacaagaccacgcctcccgtg

40

50

ctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggaggcagcagggaacgtcttctc
atgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatgataa(配
列番号: 453)

(アミノ酸)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYAMNWRQAPGQGLEWMGVISTFSGNTNFNQKFKGRVTMTTDTSTSTAY
MELRSLRSDDTAVYYCARSDYYGPYFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDL
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* *(配列番号: 454)

10

ヒト化C3 IgG2重鎖配列

(DNA)

caggctcagctgggtgcagctcggagctgagggaagaagcctggggcctcagtgaggctcctgcaaggcttctggtta
caccttaccgactacgccaagaactgggtgcgacaggccccggacaaggcttgagtggaaggagtgatcagcacct
tcagcggtaacacaaactcaaccagaagttcaagggcagagtcacatgaccacagacacatccacgagcacagcctac
atggagctgaggagcctgagatctgacgacacggcctgtatctactgtgcgagaagcgcactactacggccatacttca
ctactggggccaggccaccacctgaccgtgtccagcgctccaccaaggggcccatcggtcttccccctggcgccctgct
ccaggagcactccgagagcacagccgctgggctgctggcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgctggtg
aactcaggcgtctgaccagcggcgtgcacaccttcccagctgtcctacagtcctcaggactctactcctcagcagcgt
ggtgaccgtgcccctccagcaacttcggcaccagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaagggtg
gacaagacagctgagcgcgaatgtgtgtcgagtgcccaccgtgcccagcaccacctgtggcaggaccgtcagcttctc
cttcccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccggacccccgaggtcacgtgctggtgggggagctgagccacg
aagacccccgaggtccagttcaactggtagctggacggcgtggaggtgcaataatgccaagacaagccacgggaggagcag
ttcaacagcacgttccgtgtggtcagcgtcctcaccgtgtgtgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgcaa
ggtctccaacaaaggctcccagccccatcgagaaaaccttccaaaaccaaagggcagccccgagaaccacaggtgt
acacctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgggtcaaaggcttctaccccagc
gacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacacctcccatgctggactccgacgg
ctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggaggcagcagggaacgtcttctcatgctccgtgatgc
atgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatagtaa(配列番号: 455)

20

30

(アミノ酸)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYAMNWRQAPGQGLEWMGVISTFSGNTNFNQKFKGRVTMTTDTSTSTAY
MELRSLRSDDTAVYYCARSDYYGPYFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPSSNFGTQTYTCNVNKHPSNTKVDKTKVERKCCVECPAPPVAGPSVFLF
PPKPKDTLMI SRTPEVTCWVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKV
NKGLPAPI EKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK** (配列番号: 456)

ヒト化C3重鎖IgG1 gBLOCK配列:

(DNA)

tgetctgggttccaggctccactggtgacgcggcccagccggcccaggctcagctggtgcagctcggagctgagggaag
aagcctggggcctcagtgaggctcctgcaaggcttctggttacaccttaccgactacgccaagaactgggtgcgaca
ggccccggacaaggcttgagtggaaggagtgatcagcaccttcagcggtaacacaaactcaaccagaagttcaagg
gcagagtcacatgaccacagacacatccacgagcacagcctacatggagctgaggagcctgagatctgacgacacggcc
gtgtatctactgtgcgagaagcgcactactacggccatacttgcactactggggccaggccaccacctgaccgtgtccag
cgctagcaccaaggcccatcggtcttccccctggcaccctctccaagagcacccttgggggacagcggccctgggct
gctggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgctggtggaactcaggcggcctgaccagc(配列番号: 457)

40

マウス C3軽鎖可変領域配列:

(DNA)

50

gatgttttgatgacccaaactccactctccctgcctgtcagtcctggagatcaagcctccatctcttgcagatctagtca
gaccattgtacatagtaatggaaacacctatttagaatggtagctgcagaaaccaggccagtcctcaaagctcctgatct
acaagtttccaaccgatttctggggcccagacaggttcagtgccagtggtcagggacagatttcacactcaagatc
aacagagtggaggctgaggatctgggagtttattactgctttcaaggttcacatgttccattcacgttcggctcggggac
aaagtggaaataaaa(配列番号: 458)

(アミノ酸)

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQTI VHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLK I
NRVEAEDLGVYYCFQGSHPVPTFGSGTKLEIK(配列番号: 459)

マウスC3軽鎖可変フレームワーク領域1(FWR1)配列:

(DNA)

gatgttttgatgacccaaactccactctccctgcctgtcagtcctggagatcaagcctccatctcttgc(配列番号:
460)

(アミノ酸)

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISC(配列番号: 461)

マウスC3軽鎖可変相補性決定領域1(CDR1)配列:

(DNA)

agatctagtcagaccattgtacatagtaatggaaacacctatttagaa(配列番号: 462)

(アミノ酸)

RSSQTI VHSNGNTYLE(配列番号: 463)

マウスC3軽鎖可変フレームワーク領域2(FWR2)配列:

(DNA)

tggtacctgcagaaaccaggccagtcctcaaagctcctgatctac(配列番号: 464)

(アミノ酸)

WYLQKPGQSPKLLIY(配列番号: 465)

マウスC3軽鎖可変相補性決定領域2(CDR2)配列:

(DNA)

aaagtttccaaccgatttct(配列番号: 466)

(アミノ酸)

KVSNRFS(配列番号: 467)

マウスC3軽鎖可変フレームワーク領域3(FWR3)配列:

(DNA)

ggggtcccagacaggttcagtgccagtggtcagggacagatttcacactcaagatcaacagagtggaggctgaggatct
gggagtttattactgc(配列番号: 468)

(アミノ酸)

GVPDRFSGSGSGTDFTLKINRVEAEDLGVYYC(配列番号: 469)

マウスC3軽鎖可変相補性決定領域3(CDR3)配列:

(DNA)

tttcaaggttcacatgttccattcacg(配列番号: 470)

(アミノ酸)

FQGSHPVPT(配列番号: 471)

IGKV2-29*03軽鎖可変領域配列:

(DNA)

gatatgtgatgaccagactccactctctctgtccgtcaccctggacagccggcctccatctcctgcaagtctagtca

10

20

30

40

50

gagcctcctgcatagtgatggaaagacctat t t g t a t t g g t a c c t g c a g a a g c c a g g c c a g t c t c c a c a g c t c c t g a t c t
 atgaagttccagccggttctctggagtgccagataggttcagtgccagcgggtcagggacagatttcacactgaaaatc
 agccgggtggaggctgaggatgttggggttattactgcatgcaaggatatacaccttctt(配列番号: 472)

(アミノ酸)

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLHSDGKTYLYWYLQKPGQSPQLLIYEVSSRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI
 SRVEAEDVGVYYCMQGIHLP(配列番号: 473)

IGKV2-29*03軽鎖可変フレームワーク領域1(FWR1)配列:

(DNA)

gatattgtgatgaccagactccactctctctgtccgtcaccctggacagccggcctccatctcctgc(配列番号: 474)

(アミノ酸)

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC(配列番号: 475)

IGKV2-29*03軽鎖可変相補性決定領域1(CDR1)配列:

(DNA)

aagcttagtcagagcctcctgcatagtgatggaaagacctat t t g t a t(配列番号: 476)

(アミノ酸)

KSSQSLLHSDGKTYLY(配列番号: 477)

IGKV2-29*03軽鎖可変フレームワーク領域2(FWR2)配列:

(DNA)

tggtacctgcagaagccagccagctctccacagctcctgatctat(配列番号: 478)

(アミノ酸)

WYLQKPGQSPQLLIY(配列番号: 479)

IGKV2-29*03軽鎖可変相補性決定領域2(CDR2)配列:

(DNA)

gaagttccagccggttc(配列番号: 480)

(アミノ酸)

EVSSRFS(配列番号: 481)

IGKV2-29*03軽鎖可変フレームワーク領域3(FWR3)配列:

(DNA)

ggagtgccagataggttcagtgccagcgggtcagggacagatttcacactgaaaatcagccgggtggaggctgaggatgt
 tggggtttattactgc(配列番号: 482)

(アミノ酸)

GVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYC(配列番号: 483)

IGKV2-29*03軽鎖可変相補性決定領域3(CDR3)配列:

(DNA)

atgcaaggatatacaccttctt(配列番号: 484)

(アミノ酸)

MQGIHLP(配列番号: 485)

ヒト化C3軽鎖可変領域配列:

(DNA)

gatattgtgatgaccagactccactctctctgtccgtcaccctggacagccggcctccatctcctgcaggcttagtca
 gaccattgtccatagtaatggaaacacctat t t g g a g t g g t a c c t g c a g a a g c c a g g c c a g t c t c c a c a g c t c c t g a t c t
 ataaggtttccaaccggttctctggagtgccagataggttcagtgccagcgggtcagggacagatttcacactgaaaatc

10

20

30

40

50

agccgggtggaggctgaggatgttgggg ttattactgcttccaaggtagccacgtgcctttcaccttcggcggaggga
ccaaggtggagatcaaacgaact(配列番号: 486)

(アミノ酸)

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQTI VHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLI YKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI
SRVEAEDVGVYYCFQGSHPVPTFGGGTKVEIKRT (配列番号: 487)

ヒト化C3軽鎖可変フレームワーク領域1(FWR1)配列:

(DNA)

gatattgtgatgaccagactccactctctctgtccgtcaccctggacagccggcctccatctcctgc(配列番号:
488)

(アミノ酸)

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC(配列番号: 489)

ヒト化C3軽鎖可変相補性決定領域1(CDR1)配列:

(DNA)

ggctagtcagaccattgtccatagtaatggaaacacctatttgag(配列番号: 490)

(アミノ酸)

RSSQTI VHSNGNTYLE(配列番号: 491)

ヒト化C3軽鎖可変フレームワーク領域2(FWR2)配列:

(DNA)

tggfacctgcagaagccaggccagctccacagctcctgatctat(配列番号: 492)

(アミノ酸)

WYLQKPGQSPQLLIY(配列番号: 493)

ヒト化C3軽鎖可変相補性決定領域2(CDR2)配列:

(DNA)

aaggtttccaaccggttctct(配列番号: 494)

(アミノ酸)

KVSNRFS(配列番号: 495)

ヒト化C3軽鎖可変フレームワーク領域3(FWR3)配列:

(DNA)

ggagtgccagataggttcagtgccagcgggtcaggacagattcacactgaaaatcagccgggtggaggctgaggatgt
tggggtttattactgc(配列番号: 496)

(アミノ酸)

GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC(配列番号: 497)

ヒト化C3軽鎖可変相補性決定領域3(CDR3)配列:

(DNA)

ttccaaggtagccacgtgcctttcacc(配列番号: 498)

(アミノ酸)

FQGSHPVPT(配列番号: 499)

ヒト化C3 軽鎖配列

(DNA)

gatattgtgatgaccagactccactctctctgtccgtcaccctggacagccggcctccatctcctgcaggctctagtca
gacctgttccatagtaatggaaacacctatttgagtggtacctgcagaagccaggccagctccacagctcctgatct
ataaggtttccaaccggttctctggagtgcagataggttcagtgccagcgggtcaggacagattcacactgaaaatc
agccgggtggaggctgaggatgttggggtttattactgcttccaaggtagccacgtgcctttcaccttcggcggaggga

50

10

20

30

40

caagg tggagat caaacgaac tgg t cagcccaaggct gccccct cgg t cact c t g t t cccgccct cct c t gaggagct t c
 aagccaacaaggccacac tgg t g t g t c t c a t a a g t g a c t t c t a c c c g g g a g c c g t g a c a g t g g c c t g g a a g g c a g a t a g c
 agccccg t caaggcgggag t ggagaccaecacaccc t ccaaaacaaagcaacaacaag t acg c g g c c a g c a g c t a t c t g a g
 c c t g a c g c c t g a g c a g t g g a a g t c c c a c a g a a g c t a c a g c t g c c a g g t c a c g c a t g a a g g g a g c a c c g t g g a g a a g a c a g
 tggcccc tacagaat g t t c a t a g t a a (配列番号: 500)

(アミノ酸)

D I V M T Q T P L S L S V T P G Q P A S | S C R S S Q T | V H S N G N T Y L E W Y L Q K P G Q S P Q L L | Y K V S N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K |
 S R V E A E D V G V Y Y C F Q G S H V P F T F G G G T K V E | K R T G Q P K A A P S V T L F P P S S E E L Q A N K A T L V C L | S D F Y P G A V T V A W K A D S
 S P V K A G V E T T T P S K Q S N N K Y A A S S Y L S L T P E Q W K S H R S Y S C Q V T H E G S T V E K T V A P T E C S * * (配列番号: 501)

10

ヒト化C3 軽鎖

(DNA)

g a t a t t g t g a t g a c c c a g a c t c c a c t c t c t c t g t c c g t c a c c c c t g g a c a g c c g g c c t c c a t c t c c t g c a g g t c t a g t c a
 g a c c a t t g t c c a t a g t a a t g g a a c a c c t a t t t g g a g t g g t a c c t g c a g a a g c c a g g c c a g t c t c c a c a g c t c c t g a t c t
 a t a a g g t t t c c a a c c g g t t c t c t g g a g t g c c a g a t a g g t t c a g t g g c a g c g g g t c a g g g a c a g a t t t c a c a c t g a a a t c
 a g c c g g g t g g a g g c t g a g g a t g t t g g g g t t t a t t a c t g c t t c c a a g g t a g c c a c g t g c c t t t c a c c t t c g g c g g a g g g a c
 c a a g g t g g a g a t c a a a c g a a c t a c g g t g g c t g c a c c a t c t g t c t t c a t c t t c c c g c c a t c t g a t g a g c a g t t g a a t c t g
 g a a c t g c c t c t g t t g t g t g c c t g c t g a a t a a c t t c t a t c c c a g a g a g g c c a a a g t a c a g t g g a a g g t g g a t a a c g c c c t c
 c a a t c g g g t a a c t c c c a g g a g a g t g t c a c a g a g c a g g a c a g c a a g g a c a g c a c c t a c a g c c t c a g c a g c a c c c t g a c g c t
 g a g c a a a g c a g a c t a c g a g a a a c a c a a g t c t a c g c c t g c g a a g t c a c c c a t c a g g g c c t g a g c t c g c c c g t c a c a a a g
 a g c t t c a a c a g g g g a g a g t g t t a g t a a (配列番号: 502)

20

(アミノ酸)

D I V M T Q T P L S L S V T P G Q P A S | S C R S S Q T | V H S N G N T Y L E W Y L Q K P G Q S P Q L L | Y K V S N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K |
 S R V E A E D V G V Y Y C F Q G S H V P F T F G G G T K V E | K R T T V A A P S V F | F P P S D E Q L K S G T A S W C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q
 S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q L S S P V T K S F N R G E C * * (配列番号: 503)

ヒト化C3カップー軽gBLOCK配列:

(DNA)

a g c t g g c t a g g t a a g c t t g g t a c c g a g c t c g g a t c c a c g c c a c c a t g g a g a c a g a c a c a c t c c t g c t a t g g g t a c t g c t g
 c t c t g g g t t c c a g g t t c c a c t g g t g a c g a t a t t g t g a t g a c c c a g a c t c c a c t c t c t c t g t c c g t c a c c c c t g g a c a g c c
 g g c t c c a t c t c c t g c a g g t c t a g t c a g a c c a t t g t c c a t a g t a a t g g a a c a c c t a t t t g g a g t g g t a c c t g c a g a a g c
 c a g g c c a g t c t c c a c a g c t c c t g a t c t a t a a g g t t t c c a a c c g g t t c t c t g g a g t g c c a g a t a g g t t c a g t g g c a g c g g g
 t c a g g g a c a g a t t t c a c a c t g a a a a t c a g c c g g g t g g a g g c t g a g g a t g t t g g g g t t t a t t a c t g e t t c c a a g g t a g c c a
 c g t g c c t t t c a c c t t c g g c g g a g g g a c c a a g g t g g a g a t c a a a c g a a c t a c g g t g g c t g c a c c a t c t g t c t t c a t c t t c c
 c g c c a t c t g a t g a g c a g t t g a a a t c t g g a a c t g c c t c t g t t g t g t g c c t g c t g a a t a a c t t c t a t c c c a g a g a g g c c a a a
 g t a c a g t g g a a g g t g g a t a a c g c c c t c c a a t c g g g t a a c t c c c a g g a g a g t g t c a c a g a g c a g g a c a g c a a g g a c a g c a c
 c t a c a g c c t c a g c a g c a c c c t g a c g c t g a g c a a a g c a g a c t a c g a g a a a c a c a a a g t c t a c g c c t g c g a a g t c a c c c a t c
 a g g g c c t g a g c t c g c c c g t c a c a a a g a g c t t c a a c a g g g g a g a g t g t t a g t a a g t t t a a a c c c g c t g a t c a g c c t c g a c t
 g t g c c t t c t a g t t g c (配列番号: 504)

30

40

マウスC8重鎖可変領域配列:

(DNA)

g a a g t g a t g g t c g t g g a a a g c g g c g g t g g t c t g g t a a a g c c g g g g g a t c c c t t a a g c t t t c t t g c g c c g c a t c c g g g t t
 c a c g t t c t c g g c t a t g c c a t g t c c t g g g t c c g a c a g a c t c c c g a a a a g c g c t t g g a a t g g g t g g c c a c t a t c t c c t c c g
 g g g g a c g t a c a t c t a c t a c c c c g a c a g t g t g a a g g a a g a t t t a c a a t a t c t c g c g a c a a c g c a a a a a a t a c c t t g t a t
 c t t c a a a t g a g c t c c c t g c g g t c a g a g g a c a c t g c c a t g t a c t a t t g c g c c c g c c t g g g c g g c g a c a a t t a c t a t g a g t
 a t (配列番号: 505)

(アミノ酸)

E V M V V E S G G L V K P G G S L K L S C A A S G F T F S G Y A M S W R Q T P E K R L E W V A T | S S G G T Y | Y P D S V K G R F T | S R D N A K N T L Y
 L Q M S S L R S E D T A M Y Y C A R L G G D N Y Y E Y (配列番号: 506)

50

マウスC8重鎖可変相補性決定領域1(CDR1)配列:

(DNA)

ggctatgccatgtcc(配列番号: 507)

(アミノ酸)

GYAMS(配列番号: 508)

マウスC8重鎖可変相補性決定領域2(CDR2)配列:

(DNA)

actatctcctccggggggacgtacatctactacccccacagtgtgaaagga(配列番号: 509)

(アミノ酸)

TISSGGTYIYYPDSVKG(配列番号: 510)

マウスC8重鎖可変相補性決定領域3(CD3:

(DNA)

ctggcgggcgacaattactatgagtat(配列番号: 511)

(アミノ酸)

LGGDNYEY(配列番号: 512)

IGHV3-21*04重鎖可変領域配列:

(DNA)

gagggtgcagctggaggagtctgggggaggcctgggtcaagcctgggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggatt
caccttcagtagctatagcatgaactgggtccgccaggctccaggggaaggggctggagtggggtctcatccattagtagta
gtagtagttacataactacgcagactcagtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcactgtat
ctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcca(配列番号: 513)

(アミノ酸)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAR(配列番号: 514)

IGHV3-21*04重鎖可変フレームワーク領域1(FWR1)配列:

(DNA)

gagggtgcagctggaggagtctgggggaggcctgggtcaagcctgggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggatt
caccttcagt(配列番号: 515)

(アミノ酸)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS(配列番号: 516)

IGHV3-21*04重鎖可変相補性決定領域1(CDR1)配列:

(DNA)

agctatagcatgaac(配列番号: 517)

(アミノ酸)

YSYMN(配列番号: 518)

IGHV3-21*04重鎖可変フレームワーク領域2(FWR2)配列:

(DNA)

tgggtccgccaggctccaggggaaggggctggagtgggct(配列番号: 519)

(アミノ酸)

WVRQAPGKGLEWV(配列番号: 520)

IGHV3-21*04重鎖可変相補性決定領域2(CDR2)配列:

(DNA)

10

20

30

40

50

tcatccattagtagtagtagttacatatactacgcagactcagtgaagggc(配列番号: 521)

(アミノ酸)

SSISSSSSYIYYADSVKG(配列番号: 522)

IGHV3-21*04重鎖可変フレームワーク領域3(FWR3)配列:

(DNA)

cgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcga(配列番号: 523)

(アミノ酸)

RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR(配列番号: 524)

10

ヒト化C8重鎖可変領域配列:

(DNA)

gaggtcagctgggtggagctctgggggaggcctgggtcaagcctgggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagttggctatgccatgagctgggtccgcccaggctccaggggaaggggctggagtggtctcaaccattagtagtgcggaacctacatatactacctgactcagtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagactgggcggcgataactattatgaata ttggggcaaagggaccacgggtcaccgtctcctcc(配列番号: 525)

(アミノ酸)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYEYWGKGTITVTVSS(配列番号: 526)

20

ヒト化C8重鎖可変フレームワーク領域1(FWR1)配列:

(DNA)

gaggtcagctgggtggagctctgggggaggcctgggtcaagcctgggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagt(配列番号: 527)

(アミノ酸)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS(配列番号: 528)

ヒト化C8重鎖可変相補性決定領域1(CDR1)配列:

(DNA)

ggctatgccatgagc(配列番号: 529)

(アミノ酸)

GYAMS(配列番号: 530)

30

ヒト化C8重鎖可変フレームワーク領域2(FWR2)配列:

(DNA)

tgggtccgcccaggctccaggaaggggctggagtggtctca(配列番号: 531)

(アミノ酸)

WVRQAPGKGLEWVS(配列番号: 532)

40

ヒト化C8重鎖可変相補性決定領域2(CDR2)配列:

(DNA)

accattagtagtggcggaacctacatatactacctgactcagtgaagggc(配列番号: 533)

(アミノ酸)

TISSGGTYIYYPDSVKG(配列番号: 534)

ヒト化C8重鎖可変フレームワーク領域3(FWR3)配列:

(DNA)

cgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgt

50

gtattactgtgcgaga(配列番号: 535)
(アミノ酸)

RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR(配列番号: 536)

ヒト化C8重鎖可変相補性決定領域3(CDR3)配列:
(DNA)

ctgggcggcgataactattatgaatat(配列番号: 537)
(アミノ酸)

LGGDNYEY(配列番号: 538)

10

ヒト化C8 IgG1重鎖配列
(DNA)

gaggTgcagctggTggagtctgggggaggccTggtcaagccTggggggTccctgagactctcctgtgcagcctctggatt
caccTtcagtggctatgccatgagctgggtccgccaggctccagggaaagggcTggagtgggtctcaaccattagtagtg
gcggaacctacataatactacctgactcagtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcactgtat
ctgcaaaTgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgCGagactgggcggcgataactattatgaata
TggggcaaaagggaccacggTcaccgtctcctccgctagcaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctctcca
agagcaccTctgggggcacagcggccctgggctgccTggTcaaggactacttccccgaaccggTgacggTgtcgTggaac
TcaggcggcctgaccagcggcTgcacaccttcccgctgtctacagtctcaggactctactcctcagcagcgtggT
gacagtGCCctccagcagctTgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggTggaca
agaaagTtgagccaaaTctTgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcaccTgaactcctggggggaccgtca
gtcttctcttccccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccggacccctgaggTcacatgCGTggTggTggacgt
gagccacgaagacctgaggTcaagtTcaactggTactTggacggcgtggaggTgcataatgccaagacaaagccgcggg
aggagcagTacaacagcagTaccgtTggTcagcgtctcaccgtctgcaccaggactggctgaatggcaaggagTac
aagTgcaaggTctccaacaaaagccctcccagccccatcgagaaaaacctctccaagccaaagggcagccccgagaacc
acaggTgtacacctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggTcagcctgacctgctggTcaaaggctct
atcccagcgacatcgccgtggagTgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctgga
ctccgacggctcttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggTggcagcaggggaacgtcttctcatgct
ccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcctgtctccgggtaaatgataa(配列番号
: 539)

20

30

(アミノ酸)

EVQLVESGGGLVFKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNKNSLY
LQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYEYWGKGTITVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK** (配列番号: 540)

ヒト化C8 IgG2重鎖配列
(DNA)

gaggTgcagctggTggagtctgggggaggccTggtcaagccTggggggTccctgagactctcctgtgcagcctctggatt
caccTtcagtggctatgccatgagctgggtccgccaggctccagggaaagggcTggagtgggtctcaaccattagtagtg
gcggaacctacataatactacctgactcagtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcactgtat
ctgcaaaTgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgCGa gactgggcggcgataactattatgaat
atTggggcaaaagggaccacggTcaccgtctcctccgctccaccaagggcccatcggtcttccccctggcggcctgctcc
aggagcaccTccgagagcacagccgccccTgggctgccTggTcaaggactacttccccgaaccggTgacggTgtcgTgga
ctcaggcgtctgaccagcggcTgcacaccttccagctgtctacagtctcaggactctactcctcagcagcgtgg
TgaccgtGCCctccagcaactcggc caccagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaaggTgga
caagacagTtgagcgcaaaTgtTgtTcgagTgccaccctgcccagcaccaccTgtggcagggaccgtcagTcttctct
tccccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccggacccctgaggTcacgtgCGTggTggTggacgtgagccacgaa

40

50

gacccccgaggtccagttcaactggtagctggacggcgtggaggtgcatataatgccaaagacaaagccacgggaggagcag t
tcaacagcacgttccgtgtggtcagcgtcctcaccgttgtgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgaag
gtctccaacaaaggccctcccagcccccatcgagaaaacctctccaaaaccaaagggcagccccgagaaccacaggtgta
cacctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggctcagcctgacctgccctgggtcaaaggcttctaccccagcg
acatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaaga ccacacctcccatgctggactccgacgg
ctcttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgc
atgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatagtaa(配列番号: 541)

(アミノ酸)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLY
LQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYEYWGKGTITVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVIVTSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPAPPVAGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRWSVLTWHQDWLNGKEYKCKVSNK
GLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK** (配列番号: 542)

10

マウスC8軽鎖可変領域配列

(DNA)

gacatcgatcat tacgcagacccccgccagttctgccgttctctctgggccagagggccactatcagttacagggcgagtaa
gtctgtgagtagaccagcggctatagttacatgcat tggaccagcagaaaccgggacagccaccacgcctgcttat t t at c
tgggtctaa tcttgagtcgggggtgcccgccaggttcagcggcagcggctctgggaccgacttcacactcaacattcat
ccagtggaagaagaggacgctgctacatactactgtcaacacattcggaactgaccaggagtgaa(配列番号: 543)

20

(アミノ酸)

DIVITQTPASLAVSLGQRATISYRASKSVSTSGYSYMHWNQQKPGQPRLLIYLVSNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIH
PVEEEDAATYYCQHIRELTRSE(配列番号: 544)

マウスC8軽鎖可変相補性決定領域1(CD1:

(DNA)

agggcgagtaagttctgtgagtagaccagcggctatagttacatgcat(配列番号: 545)

(アミノ酸)

RASKSVSTSGYSYMH(配列番号: 546)

30

マウスC8軽鎖可変相補性決定領域2(CD2:

(DNA)

ctgggtgtctaatcttgagtcc(配列番号: 547)

(アミノ酸)

LVSNNLES(配列番号: 548)

マウスC8軽鎖可変相補性決定領域3(CD3):

(DNA)

caacacattcggaactgaccaggagtgaa(配列番号: 549)

40

(アミノ酸)

QHIRELTRSE(配列番号: 550)

NCBI生殖細胞系列z00023軽鎖可変領域配列:

(DNA)

gacatcgatgtagaccagttctccagactccctggctgtgtctctgggcgagagggccaccatcaactgcaagtccagcca
gagtgttttatacagctccaacaataagaactacttagcttggtagaccagcagaaaccaggacagcctcctaagctgctca
tttactgggcatctaccggggaatccgggggtccctgaccgatcagtgccagcgggtctgggacagatttactctcacc
atcagcagcctgcaggctgaagatgtggcagtttattactgtcagcaatattatagttactcct(配列番号: 551)

50

(アミノ酸)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLT
ISSLQAEDVAVYYCQQYYSTP(配列番号: 552)

NCBI生殖細胞系列z00023軽鎖可変フレームワーク領域1(FWR1)配列:
(DNA)

gacatcgtgatgaccagctctccagactccctggctgtgtctctgggcgagagggccaccatcaactgc(配列番号:
553)

(アミノ酸)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC(配列番号: 554)

10

NCBI生殖細胞系列z00023軽鎖可変相補性決定領域1(CDR1)配列:
(DNA)

aagtcagccagagtgttttatacagctccaacaataagaactacttagct(配列番号: 555)

(アミノ酸)

KSSQSVLYSSNNKNYLA(配列番号: 556)

NCBI生殖細胞系列z00023軽鎖可変フレームワーク領域2(FWR2)配列:
(DNA)

tggtagcagcagaaaccaggacagcctcctaagctgctcatttac(配列番号: 557)

(アミノ酸)

WYQQKPGQPPKLLIY(配列番号: 558)

20

NCBI生殖細胞系列z00023軽鎖可変相補性決定領域2(CDR2)配列:
(DNA)

tggcatctacccgggaatcc(配列番号: 559)

(アミノ酸)

WASTRES(配列番号: 560)

NCBI生殖細胞系列z00023軽鎖可変フレームワーク領域3(FWR3)配列:
(DNA)

ggggtccctgaccgatcagtaggcagcgggtctgggacagattcactctcaccatcagcagcctgcaggctgaagatgt
ggcagtttattactgt(配列番号: 561)

(アミノ酸)

GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC(配列番号: 562)

30

NCBI生殖細胞系列z00023軽鎖可変相補性決定領域3(CD3)配列:
(DNA)

cagcaatattatagtactcct(配列番号: 563)

(アミノ酸)

QQYYSTP(配列番号: 564)

40

ヒト化C8軽鎖可変領域配列

(DNA)

gacatcgtgatgaccagctctccagactccctggctgtgtctctgggcgagagggccaccatcaactgcagggccagcaa
gagtgttagcaccagcggctacagctacatgcactggtagcagcagaaaccaggacagcctcctaagctgctcatttacc
tgggtgtctaacctggaaatccgggggtccctgaccgatcagtaggcagcgggtctgggacagattcactctcaccatcagc
agctgcaggctgaagatgtggcagtttattactgtcaacacattcggaactgaccaggagtgaaatcgggcggagggac
caagtgagatcaaacgaact(配列番号: 565)

(アミノ酸)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYMHYQQKPGQPPKLLIYLVSNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLT I

50

SSLQAEDVAVYYCQHIRELTRSEFGGGTKVEIKRT(配列番号: 566)

ヒト化C8軽鎖可変フレームワーク領域1(FWR1)配列:

(DNA)

gacatcgtgatgaccagctctccagactccctggctgtgtctctgggagagagggccaccatcaactgc(配列番号: 567)

(アミノ酸)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC(配列番号: 568)

ヒト化C8軽鎖可変相補性決定領域1(CDR1)配列:

(DNA)

aggccagcaagagtgttagcaccagcggctacagctacatg(配列番号: 569)

(アミノ酸)

RASKSVSTSGYSYM(配列番号: 570)

10

ヒト化C8軽鎖可変フレームワーク領域2(FWR2)配列:

(DNA)

cactggtaccagcagaaaccaggacagcctcctaagctgctcatttac(配列番号: 571)

(アミノ酸)

HWYQQKPGQPPLLIY(配列番号: 572)

20

ヒト化C8軽鎖可変相補性決定領域2(CDR2)配列:

(DNA)

ctgggtgctaacctggaatcc(配列番号: 573)

(アミノ酸)

LVSNLES(配列番号: 574)

ヒト化C8軽鎖可変フレームワーク領域3(FWR3)配列:

(DNA)

ggggtccctgaccgattcagtgccagcgggtctgggacagatttcactctcaccatcagcagcctgcaggctgaagatgt

ggcagtttattactgt(配列番号: 575)

(アミノ酸)

GVPDRFSGSGSFTDFTLTISSLQAEDVAVYYC(配列番号: 576)

30

ヒト化C8軽鎖可変相補性決定領域3(CDR3)配列:

(DNA)

caacacattcggaactgaccaggagtga(配列番号: 577)

(アミノ酸)

QHIRELTRSE(配列番号: 578)

40

ヒト化C8 軽鎖配列

(DNA)

gacatcgtgatgaccagctctccagactccctggctgtgtctctgggagagagggccaccatcaactgcaggggccagcaa
gagtgttagcaccagcggctacagctacatgcactggtagcagcagaaaccaggacagcctcctaagctgctcatttacc
tgggtctaacctggaatccgggtccctgaccgattcagtgccagcgggtctgggacagatttcactctcaccatcagc
agcctgcaggctgaagatgtggcagtttattactgtcaacacattcggaactgaccaggagtgaattcggcggagggagc
caaggtgagatcaaacgaactggtagcccaaggctgccccctcggctcactctgttcccggcctcctctgaggagcttc
aagccaacaaggccacactgggtgtctcataagtgactctaccgggagccgtgacagtggcctggaaggcagatagc
agccccgtcaaggcgggagtgagaccaecacaccctccaaacaagcaacaacaagtacgcgccagcagctatctgag
cctgacgctgagcagtggaagtc ccacagaagctacagctgccaggtcacgcatgaagggagcaccgtggagaagaca

50

gtggccccacagaatgttcatagtaa(配列番号: 579)

(アミノ酸)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLVSNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS
SSLQAEDVAVYYCQHIRLSTRSEFGGGTKVEIKRTGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKAD
SSPVKAGVETTTSPKQSNKYAASSYLSLTPEQWQKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS** (配列番号: 580)

ヒト化C8 軽鎖配列

(DNA)

gacatcgtgatgaccagctctccagactccctggctgtgtctctgggcgagagggccaccatcaactgcagggccagcaa
gagtgttagcaccagcggctacagctacatgcactggtagcagcagaaaccaggacagcctcctaagctgctcatftacc
tgggtgtctaacctggaaatccgggggtccctgaccgatcagtgccagcgggtctgggacagattcactctcaccatcagc
agcctgcaggctgaagatgtggcagtttattactgtcaacacattcggaactgaccaggagtgaattcggcggaggggac
caaggtaggagataaacgaactacggtagcctctgtcttcatcttcccgcattctgatgagcagttgaaatctg
gaactgcctctgttgtgtgacctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtaggataacgccctc
caatcgggtaactcccaggagagtgtagcagagcaggacagcaaggacagcaccacagcctcagcagcaccctgacgct
gagcaaacgagactacgagaaacacaaaagctacgcttgcgaagtacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaaga
gcttcaacaggggagagtgtagtaa(配列番号: 581)

10

(アミノ酸)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLVSNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS
SSLQAEDVAVYYCQHIRLSTRSEFGGGTKVEIKRTTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC** (配列番号: 582)

20

ヒト化C8 軽鎖gBLOCK配列:

(DNA)

agctggcaggtaagcttggtagcagctcggatccacgccaccatggagacagacacactcctgctatgggtactgctg
ctctgggttccaggttccactggtagcagacatcgtgatgaccagctctccagactccctggctgtgtctctgggcgagag
ggccaccatcaactgcagggccagcaagagtgtagcaccagcggctacagctacatgcactggtagcagcagaaaccag
gacagcctcctaagctgctcatftaccgggtgtctaacctggaaatccgggggtccctgaccgatcagtgccagcgggtct
gggacagattcactctcaccatcagcagcctgcaggctgaagatgtggcagtttattactgtcaacacattcggaact
gaccaggagtgaattcggcggaggggaccaagtgtagatcaaacgaactacggtagcctctgtcttcatcttcc
cgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgacctgctgaataacttctatcccagagaggccaaa
gtacagtggaaggtaggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtagcagagcaggacagcaaggacagca
cctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaacgagactacgagaaacacaaaagctacgcttgcgaagtacccat
cagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgtagtaagtttaaacccgctgatcagcctcgac
tgtgccttctagttgc(配列番号: 583)

30

CAR-T E6 CD8配列:

(DNA)

gaggccagctgggtgagagtgccggtaggctgggttaagcctggcggctccctgcggctgagctgcgcccgcagtggaatt
tactttcagccgataatgggatgagttgggtgcggcaagctcccgggaagaggctggaaatgggtctcaacaattccgggg
ggggcacttacaatctatccccgactcagtaaggggagattaccatttcacgagacaacgctaagaataccctgtat
ttgcagatgaattctctgagagcagaggacacagctgtttactattgtaccgcgacaactatggcaggaactacgacta
cggtagtgactatggggacaagggacattgggttacagtgagcagtgccggcgggggagcggaggaggaggcagcgggtg
gggggggagcagagatagctcacgagctacccgcgactctcagctctcaccctggggaacgagctaccctgacgtgc
tctgctacctcctcagtgctataatctactgggtatcagcaacggccggcagctcccttagattgctcatftatagtac
ctcctaactggcctcaggtatccctgcacgatcttctggatctgggtcaggtctctgatfacacctcactatctctagcc
tgagacctgaagactttgccgtttattactgccagcagaggtctagctcccatcaccctttgggagtgaggaccaaggtt
gaaatataaaacgacaacccccggccccagaccaccaacgcagccccaccatcgccagccaacccctgtctctgagac
cagaagcctgtaggcctgccgcccgtggagctgtgcacacaagaggactggatttcgctctgatattacatttgggcc
ccgctcgaggcacaatgtggagtgcctcctctccctgggtgatcaccctgtactgctgataa(配列番号: 584)

40

(アミノ酸)

50

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEWVSTISGGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLY
 LQMNSLRAEDTAVYYCTRDNYGRNYDYGMDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLTC
 SATSSVSYIHWHYQQRPGQSPRLLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGSDYTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSSSPFTFGSGTKV
 EIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYC* *(配列
 番号: 585)

CAR-T C2 CD8配列:

(DNA)

gaagtgcagctcgtagagagtggcgggggactgggtgaagcccgggtggaagcctcagactcagttgcgccgcctcaggttt
 cactttttcaggttacgccaatgctcctgggtaagacaggcaccggggaaaggactcgagtggtgtctactatcagctcag
 gaggcacttataataatctcctgactcgtgtaaaaggccgatctacgatctctcgcgacaatgcaaagaactccctctac
 ctccaaatgaacagctctagggcagaagacactgctgtatactatgtgcaacgctcggcggcgacaactactacgagta
 ctttgacgtgtgggggaaaggactaccgtgacagtttcaagcggaggagggtggctcaggtggaggcgggtcaggggggg
 gaggaagtgaatatgtgctcacacaatccccagcctccctggctgtgtctcccggccaacgcgctacaattacatgtcgg
 gcctccaaaagcgtgagcaccagcggctacagctacatgcaactggatcaacagaaaccaggacaaccccccaactgt
 tgatttatctcgcttcaaacttgaggtccggcgtgcttgcgcgcttttcagggagtgaggcggcacagattttacgctg
 actatcaaccccgtagaagcaaacgatacagcgaattatattgtcaacatcccgggaactcccctttacgttcggcgg
 gggcacaaggtcgaaatgaagagaaccacgacaacccccggccccagaccaccaacgccagccccaccatcgccagcc
 aaccctgtctctgagaccagaagcctgtaggctgccgcgggtggagctgtgacacaagaggactggatttcgctg
 tgatactacattggggccccgctcgcaggcacaatgtggagtgctcctcctcctcctggtgattaccctgtactgctgat
 aa(配列番号: 586)

10

20

(アミノ酸)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKLEWVSTISGGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLY
 LQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYEYFDVWGKGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPASLAVSPGQRATITCR
 ASKSVSTSGYSYMHWHYQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYCQHSRELPFTFG
 GGTKVEIKRTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYC*
 *(配列番号: 587)

CD8/4-1BB配列

(DNA)

acgacaacccccggccccagaccaccaacgccagccccaccatcgccagccaacccctgtctctgagaccagaagcctg
 taggctgccgcccgggtggagctgtgacacaagaggactggatttcgctctgatactacatttgggccccgctcgcag
 gcacatgtggagtgctcctcctcctcctgggtgattaccctgtactgcaaaagggggccgcaaaaaactcctttacatttt
 aagcagccttttatgaggccagtacagacgactcaagaggaagacgggtgctcatgccgctttcctgaggaggaggaagg
 aggtgcaactgtgataa(配列番号: 588)

30

(アミノ酸)

TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYCKRGRKLLYIF
 KQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPPEEEEGGCEL* *(配列番号: 589)

CD8/CD28配列

(DNA)

acgacaacccccggccccagaccaccaacgccagccccaccatcgccagccaacccctgtctctgagaccagaagcctg
 taggctgccgcccgggtggagctgtgacacaagaggactggatttcgctctgatactacatttgggccccgctcgcag
 gcacatgtggagtgctcctcctcctcctgggtgattaccctgtactgcagaagcaagcggctcggcctcctgcatctgat
 tacaatgaacatgacccaagaagaccaggccccaccaggaaacattaccagcctacgctccgccacgcgacttcgctgc
 ctaccggtcctgataa(配列番号: 590)

40

(アミノ酸)

TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYCRSKRSRLLHSD
 YNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS* *(配列番号: 591)

CD8/CD3z配列:

50

(DNA)

acgacaacccccggccccagaccaccaacgccagccccacccatcgccagccaacccccgtctctgagaccagaagcctg
 taggctgcccggcggggagcgtgacacacaagaggactggatttcgacctgtgatatctacatttgggccccgctcgag
 gcacatgtggagtgcctcctcctcctcctgggtgattacctgtactgccgcgttaagtctcccgatcagccgacgcgct
 gcttacaagcagggccagaaccaactgtacaacgagctgaatctcggtagacgggaagagtagcagcgtgtggacaaacg
 gagaggccgcgacccagaaaatgggcggaagcctcgaggaacccccaggaggagcgtacaatgagttgcagaaag
 ataagatggcagaagcttataagcgagatcggaatgaaggggaaaggagacgagggaaaggacacgacggcctttatcag
 ggctgtccacagcaacaaaagatacgtatgacgcccccatatgacggcacttccaccacggtgataa(配列番号:
 592)

(アミノ酸)

TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYCRVKFSRSADAP
 AYKQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQ
 GLSTATKDTYDALHMQUALPPR* * (配列番号: 593)

10

CD8/CD28/CD3z 配列:

(DNA)

acgacaacccccggccccagaccaccaacgccagccccacccatcgccagccaacccccgtctctgagaccagaagcctg
 taggctgcccggcggggagcgtgacacacaagaggactggatttcgacctgtgatatctacatttgggccccgctcgag
 gcacatgtggagtgcctcctcctcctcctgggtgattacctgtactgcagaagcaagcggctcggctcctgcatctgat
 tacatgaacatgacccaagaagaccag gccccaccaggaaacattaccagccccacgctccgccacgcgacttcgctg
 cctaccggtcccgcgttaagtctcccgatcagccgacgcgctgcttacaagcagggccagaaccaactgtacaacgag
 ctgaatctcggtagacgggaagagtagcagcgtgtggacaaacggagaggccgcgacccagaaaatgggcggaagcctcg
 caggaaaaacccccaggaggagcgtacaatgagttgcagaaagataagatggcagaagcttataagcgagatcggaatga
 agggggaaaggagacgagggaaaggacacgacggcctttatcagggcctgtccacagcaacaaaagatacgtatgacgccc
 tccatatagacggcacttccaccacggtgataa(配列番号: 594)

(アミノ酸)

TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYCRSKRSRLLHSD
 YMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR
 RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR* * (配列番号: 595
)

20

30

CD8/4-1BB/CD3z 配列:

(DNA)

acgacaacccccggccccagaccaccaacgccagccccacccatcgccagccaacccccgtctctgagaccagaagcctg
 taggctgcccggcggggagcgtgacacacaagaggactggatttcgacctgtgatatctacatttgggccccgctcgag
 gcacatgtggagtgcctcctcctcctcctgggtgattacctgtactgcaaaagggggccgaaaaaacctctttacatttt
 aagcagccttttatgaggccagtacagacgactcaagaggaagacgggtgctcatgccgctttctgaggaggaggaagg
 aggtgcgaactgcgcttaagtctcccgatcagccgacgcgctgcttacaagcagggccagaaccaactgtacaacg
 agctgaatctcggtagacgggaagagtagcagcgtgtggacaaacggagaggccgcgacccagaaaatgggcggaagcct
 cgaggaacccccaggaggagcgtacaatgagttgcagaaagataagatggcagaagcttataagcgagatcggaat
 gaagggggaaaggagacgagggaaaggacacgacggcctttatcagggcctgtccacagcaacaaaagatacgtatgacg
 ccctccatatagacggcacttccaccacggtgataa(配列番号: 596)

(アミノ酸)

TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYCKRGRKLLLYIF
 KQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR
 RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR* * (配列番号: 5
 97)

40

CD8/CD28/4-1BB/CD3z 配列:

(DNA)

50

acgacaacccccggccccagaccaccaacgccagccccaccatcgccagccaacccctgtctctgagaccagaagcctg
 taggccgcccgggtggagctgtgcacacaagaggactggatttcgacctgtgatatctacatttgggccccgctcgag
 gcacatgtggagtgtcctcctcctcctcctgggtgattaccctgtactgcagaagcaagcgggtctcggtcctgcatctgat
 tacatgaacatgacccaagaagaccaggccccaccaggaaacattaccagccctacgctccgcccacgcgacttcgctgc
 ctaccggtccaaaaggggcccgaaaaaactcctttacatttttaagcagccttttatgaggccagtacagacgactcaag
 aggaagacgggtgctcatgccgctttcctgaggaggaggaaggagggtgcgaactgcgcttaagttctcccgatcagcc
 gacgcgctgtctacaagcagggccagaaccaactgtacaacgagctgaatctcggtagacgggaagagtacgacgtgtt
 ggacaaaaggagggccgcgacccagaaaagggcggaagcctcgaggaaaaacccccaggaggactgtacaatgagt
 tgcagaaagataagatggcagaagcttataagcgagatcggaatgaaggggaaaggagacgagggaaaggacacgacggc
 ctttatcagggcctgtccacagcaaaaaagatacgtatgacgcccctccatatagcaggcacttccaccacgggtgataa(

配列番号：598)

(アミノ酸)

TTTTAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD IY I WAPLAGTCGVLLLLSLV I TLYCRSKRSRLLHSD
 YMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSKRGRKLLY I FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSA
 DAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE I GMKGERRRGKGHGD
 LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR* * (配列番号：599)

CAR-T C3 4- IBB/CD3z 配列:

(DNA)

atggccctgcccgtgaccgctttgctgctccccctggcgctgctgctgcacgccgcccaggccacaggttcagctggtgca
 gctcggagctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaggctcctgcaagccttctggttacacctttaccgactacg
 ccatgaactgggtgcgacagggccccggacaagggcttgagtggaaggagtgatcagcaccttcagcggtaacacaaac
 tccaaccagaagtccaagggcagagtcacatgaccacagacacatccacgagcacagcctacatggagctgaggagcct
 gagaatgcgacacagggcctgtatctgctgagagaagcagctactacggccatacttcgactactggggccagggca
 ccacctgaccgtgtccagcggcgggtggcggaatccggcgggtggcggaatccggcgggtggcggaatccgatattgtgatgacc
 cagactccactctctctgctccgtcaccctggacagccggcctccatctcctgcaggtctagttagacatgtccatag
 taatggaaaacacctatttggagtggaccgcaagaagccaggccagcttccacagctcctgatctataagggtttccaacc
 gggtctctggagtgcagataaggttcagtgccagcgggtcagggacagattcacactgaaaaatcagccgggtggaggct
 gaggatgttgggggtttatctactgetccaaggtagccacgtgcctttcaccttcggcggaggggaccaaggtggagatcaa
 acgaactacgacaacccccggccccagaccaccaacgccagccccaccatcgccagccaacccctgtctctgagaccag
 aagcctgtaggccgcccgggtggagctgtgcacacaagaggactggatttcgacctgtgatatctacatttgggccccg
 ctcgaggcacaatgtggagtgtcctcctcctcctgggtgattaccctgtactgcaaaaaggggcccgaaaaaactccttta
 catttttaagcagccttttatgaggccagtac agacgactcaagaggaagacgggtgctcatgccgctttcctgaggag
 gaggaaggagggtgcgaactgcgcttaagttctcccgatcagccgacgcgctgcttacaagcagggccagaaccaact
 gtacaacgagctgaatctcggtagacgggaagagtacgacgtgttggacaaacggagaggccgcgacccagaaaatgggcg
 gcaagcctcgaggaaaaacccccaggaggactgtacaatgagttgcagaaagataagatggcagaagcttatagcgag
 atcggaaatgaaggggaaaggagacgagggaaaggacacgacggcctttatcagggcctgtccacagcaaaaaagatac
 gtatgacgcccctccatatagcaggcacttccaccac ggtgataa(配列番号：600)

(アミノ酸)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYAMNWRQAPGQGLEWVMGVI STFSGNTNFNQKFKGRVTMTTDTSTSTAY
 MELRSLRSDDTAVYYCARSDYYGPFYDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSD I VMTQTPLSLSVTPGQPAS I SCRSS
 QT I VHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLL I YKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLK I SRVEAEDVGVYYCFQGSHPVPTFGGG
 TKVE I KRTTTTAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD IY I WAPLAGTCGVLLLLSLV I TLYCKRG
 RKKLLY I FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR
 DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE I GMKGERRRGKGHGDLYQGLSTATKDTYDALHMQALP PR** (配列
 番号：601)

C3 CAR gBLOCK 1 配列:

(DNA)

atccacgctgttttgacctccatagaagattctagagctagctgtagagcttggtagcagggccaccatggccctgccc

gtgaccgctttgctgctccccctggcgctgctgctgcacgccgccaggccacaggttcagctggtagctctggagctga
 ggtagaagaagcctggggcctcagtagaaggtctcctgcaaggcttctggttacacctttaccgactacgcatgaactggg
 tgcgacaggccccggacaagggcttgagtggatgggagtgatcagcaccttcagcggtaacacaaacttcaaccagaag
 tcaagggcagagtaccatgaccacagacacatccacgagcacagcctacatggagctgaggagcctgagatctgacga
 cacggcctgtatctactgtgcgagaagcgactactacggccatacttcgactactggggccagggcaccaccctgaccg
 tgtccagcggcggtagcggatccggcggtagcggatccggatccgatattgtgatgaccagactccact
 ctctctgt (配列番号: 602)

C3 CAR gBLOCK 2配列:

(DNA)

10

tattgtgatgaccagactccactctctctgtccgtcacccccggacagccggcctccatctcctgcaggtctagtcaga
 ccatgtccatagtaatggaaacacctatttggagtggtagctgcagaagccaggcagctccacagctcctgatctat
 aaggtttccaaccggttctctggagtgccagataggttcagtagcagcgggtcagggacagatttcacactgaaaaatcag
 ccgggtggaggctgaggatgttggggtttattactgetccaaggtagccacgtgccctttcaccttcggcggaggggacca
 aggtggagatcaaacgaactacgacaacccccggccccagaccaccaacgccagccccaccatcgccagccaacccctg
 tctctgagaccagaagcctgtaggcctgccgcccgtggagctgtgcacacaagaggactggatttcgctgtgatatcta
 catttgggccccgctcgcaggcacatgtg (配列番号: 603)

E6 scFV gBLOCK 1配列:

(DNA)

20

tgctctgggttccaggttccactggtagcgcggcccagccggccgaggtgcagctggtaggtctgggggaggcctggtc
 aagcctgggggggtcccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtaggtatggcatgagctgggtccgcca
 ggctccaggaagaggctggagtgggtctcaaccttagtggcggaggccacctacataactaccagactcagtagaagg
 gccgatcaccatctccagagacaacgccaagaacacctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggct
 gtgtattactgtaccagagataactatggcccgaactatgatattggcatggattattggggccagggcacccctggtgac
 cgtgagcagcggcggtagcggatccggcggtagcggatccggcggtagcggatcc (配列番号: 604)

E6 scFV gBLOCK 2配列:

(DNA)

30

ggcggtagcggatccggcggtagcggatccgaaattgtgtgacacagctccagccaccctgtc
 tttgtctccaggggaaagagccaccctcacctgcagcgcaccagcagtgtagctacatccactggtaccaacagaggc
 ctggccagagccccaggctcctcatctatagcaccccaacctggccagcggcatcccagccaggttcagtaggcagtagg
 tctgggagcgactacactctcacatcagcagcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagcgtagcag
 ctccccctttcacctttggcagcggcaccaaaagggaaattaaaaccggctcatcatcaecatcaccactgataagtttaa
 cccgctgatcagcctcgactgtgccttctagt (配列番号: 605)

CAR-T C2 CD3z配列:

(DNA)

40

atggccttgccagtgacggccccctgctgctgccattggctctctgttgcacgctgccaggcctgaagtgacgctcgtaga
 gagtagcgggggacaggtagaagcccgtggaagcctcagactcagttgcgcccctcaggtttcactttttcaggttacg
 ccatgtcctgggtaagacagggcaccggggaaaggactcgagtgggtgtctactatcagctcaggaggcacttatatatat
 tatcctgactctgtaaaaggccgatttacgatttctcgcgacaatgcaaagaactcccctctacctccaaatgaacagctct
 tagggcagaagacactgctgtatactattgtgcacgctcggcggcgacaactactacgagtagctttgacgtgtggggga
 aagggtaccgtgacagtttcaagcggaggaggtaggctcaggtaggaggcgggtcagggggggagggaagtgtatattgtg
 ctcacacaaatccccagcctcccggctgtgtctcccggccaacgcgtacaattacatgtcgggcctccaaaagcgtgag
 caccagcggctacagctacatgcactggtagcaacagaaaaccaggacaaccccccaaacgttgatttatctcgcttcaa
 acttggagtagcggctgcttgcgctctttcagggagtaggagcggcacagattttacgctgactatcaaccccgtagaa
 gcaaacgatacagcgaattatattgtcaacatccccgggaactcccctttacgttcggcggggggcacaaggctgaaat
 taagagaaccacgacaacccccggccccagaccaccaacgccagccccaccatcgccagccaacccctgtctctgagac
 cagaagcctgtaggcctgccgcccgtggagctgtgcacacaagaggactggatttcgctgtgatatctacatttgggcc

50

ccgctcgcaggcaca t g t g g a g t g c t c c t c c t c t c c c t g g t g a t t a c c c t g t a c t g c c g c g t t a a g t t c t c c c g a t c a g c
 cgacgcgcc t g c t t a c a a g c a g g g c c a g a a c c a a c t g t a c a a c g a g c t g a a t e t c g g t a g a c g g g a a g a g t a c g a c g t g t
 t g g a c a a a c g g a g a g g c c g c g a c c c a g a a a t g g g c g g c a a g c c t c g c a g g a a a a c c c c c a g g a g g g a c t g t a c a a t g a
 g t t g c a g a a a g a t a a g a t g g c a g a a g c t t a t a g c g a g a t c g g a a t g a a g g g g g a a a g g a g a c g a g g g a a a g g a c a c g a c g
 g c c t t t a t c a g g g c c t g t c c a c a g a c a a a a a g a t a c g t a t g a c g c c c t c c a t a t g c a g g c a c t t c c a c c a c g g t g a t a a
 (配列番号：606)

(アミノ酸)

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIY
 YPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYEYFDVWVGKTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIV
 LTQSPASLAVSPGQRATITCRASKSVSTSGYSYMHYQQKPGQPPKLLIYLASNLESVGPARGSGSGTDFTLTINPVE
 ANDTANYYCQHSRELPFTFGGGTKVEIKRTTTTTAPRPPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA
 PLAGTCGVLLLLSLVITLYCRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE
 LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR* * (配列番号：607)

10

CAR-T C2 CD28/CD3z 配列:

(DNA)

a t g g c c t t g c c a g t g a c g g c c c t g c t g c t g c c a t t g g c t c t t c t g t t g c a c g c t g c c a g g c c t g a a g t g c a g c t c g t a g a
 g a g t g g c g g g g g a c t g g t g a a g c c c g g t g g a a g c c t c a g a c t c a g t t g c g c c g c c t c a g g t t t c a c t t t t c a g g t t a c g
 c c a t g t c c t g g g t a a g a c a g g c a c c g g g g a a a g g a c t c g a g t g g g t g t c t a c t a t c a g c t c a g g a g g c a c t t a t a t a t a t
 t a t c c t g a c t c t g t a a a a g g c c g a t t t a c g a t t t c t c g c g a c a a t g c a a a g a a c t c c c t c t a c c t c c a a a t g a a c a g t c t
 t a g g g c a g a a g a c a c t g c t g t a t a c t a t t g t g c a c g c c t c g g c g g c g a c a a c t a c t a c g a g t a c t t t g a c g t g t g g g g g a
 a a g g g a c t a c c g t g a c a g t t t c a a g c g g a g g a g g t g g c t c a g g t g g a g g c g g g t c a g g g g g g g g a g g a a g t g a t a t t g t g
 c t c a c a c a a t c c c c a g c c t c c c t g g c t g t g t c t c c c g g c c a a c g c g c t a c a a t t a c a t g t c g g g c c t c c a a a a g c g t g a g
 c a c c a g c g g c t a c a g c t a c a t g c a c t g g t a t c a a c a g a a a c c a g g a c a a c c c c c c a a a c t g t t g a t t t a t c t c g c t t c a
 a a c t t g g a g t c c g g c g t g c c t g c g c g c t t t t c a g g g a g t g g g a g c g g c a c a g a t t t t a c g c t g a c t a t c a a c c c c g t a g a
 a g c a a a c g a t a c a g c g a a t t a t a t t g t c a a c a t t c c c g g g a a c t c c c c t t t a c g t t c g g c g g g g c a c a a a g g t c g a a a
 t t a a g a g a a c c a c g a c a a c c c c g g c c c c a g a c c a c c a a c g c c a g c c c c a c c a t c g c c a g c c a a c c c c t g t c t c t g a g
 a c c a g a a g c c t g t a g g c t g c c g c c g g t g g a g c t g t g c a c a c a a g a g g a c t g g a t t t c g c c t g t g a t a t c t a c a t t t g g g
 c c c c g c t c g c a g g c a c a t g t g g a g t g c t c c t c c t c c c t g g t g a t t a c c c t g t a c t g c a g a a g c a a g c g g t c t c g g c t c
 c t g c a t t c t g a t t a c a t g a a c a t g a c c c c a a g a a g a c c a g g c c c c a c c a g g a a a c a t t a c c a g c c c t a c g c t c c g c c a c g
 c g a c t t c g c t g c c t a c c g g t c c c g c g t t a a g t t c t c c c g a t c a g c c g a c g c g c c t g c t t a c a a g c a g g g c c a g a a c c a a c
 t g t a c a a c g a g c t g a a t c t c g g t a g a c g g g a a g a g t a c g a c g t g t t g g a c a a a c g g a g a g g c c g c g a c c c a g a a a t g g g c
 g g c a a g c c t c g c a g g a a a a c c c c c a g g a g g g a c t g t a c a a t g a g t t g c a g a a a g a t a a g a t g g c a g a a g c t t a t a g c g a
 g a t c g g a a t g a a g g g g g a a a g g a g a c g a g g g a a a g g a c a c g a c g g c c t t a t c a g g g c c t g t c c a c a g a c a a a a g a t a
 c g t a t g a c g c c t c c a t a t g c a g g c a c t t c c a c c a c g g t g a t a a (配列番号：608)

20

30

(アミノ酸)

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIY
 YPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYEYFDVWVGKTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIV
 LTQSPASLAVSPGQRATITCRASKSVSTSGYSYMHYQQKPGQPPKLLIYLASNLESVGPARGSGSGTDFTLTINPVE
 ANDTANYYCQHSRELPFTFGGGTKVEIKRTTTTTAPRPPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA
 PLAGTCGVLLLLSLVITLYCRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYKQGQNQL
 YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDT
 YDALHMQUALPPR* * (配列番号：609)

40

CAR-T C2 4-1BB/CD3z 配列:

(DNA)

a t g g c c t t g c c a g t g a c g g c c c t g c t g c t g c c a t t g g c t c t t c t g t t g c a c g c t g c c a g g c c t g a a g t g c a g c t c g t a g a
 g a g t g g c g g g g g a c t g g t g a a g c c c g g t g g a a g c c t c a g a c t c a g t t g c g c c g c c t c a g g t t t c a c t t t t c a g g t t a c g
 c c a t g t c c t g g g t a a g a c a g g c a c c g g g g a a a g g a c t c g a g t g g g t g t c t a c t a t c a g c t c a g g a g g c a c t t a t a t a t a t
 t a t c c t g a c t c t g t a a a a g g c c g a t t t a c g a t t t c t c g c g a c a a t g c a a a g a a c t c c c t c t a c c t c c a a a t g a a c a g t c

50

t tagggcagaagacactgctgtatactat t t g t g c a c g c c t c g g c g g c g a c a a c t a c t a c g a g t a c t t t g a c g t g t g g g g g
 aaaggac t accg t g a c a g t t t c a a g c g g a g g a g g t g g c t c a g g t g g a g g c g g g t c a g g g g g g g a g g a a g t g a t a t t g t
 g c t c a c a c a a t c c c c a g c c t c c c t g g c t g t g t c t c c c g g c c a a c g c g c t a c a a t t a c a t g t c g g g c c t c c a a a a g c g t g a
 g c a c c a g c g g c t a c a g t a c a t g c a c t g g t a t c a a c a g a a a c c a g g a c a a c c c c c c a a a c t g t t g a t t t a t c t c g c t t c a
 a a c t g g a g t c c g g c g t g c c t g c g c g c t t t t c a g g a g t g g g a g c g g c a c a g a t t t t a c g t g a c t a t c a a c c c c g t a g a
 a g c a a a c g a t a c a g c g a a t t a t t a t t g t c a a c a t t c c c g g g a a c t c c c c t t t a c g t t c g g c g g g g c a c a a a g g t c g a a a
 t t a a g a g a a c c a c g a c a a c c c c g g c c c c a g a c c a c c a a c g c c a g c c c c a c c a t c g c c a g c c a a c c c c t g t c t c t g a g
 a c c a g a a g c c t g t a g g c c t g c c g c c g g t g g a g c t g t g c a c a c a a g a g g a c t g g a t t t c g c c t g t g a t a t c t a c a t t t g g g
 c c c c g c t c g c a g g c a c a t g t g g a g t g c t c c t c c t c c c t g g t g a t t a c c c t g t a c t g c a a a a g g g g c c g c a a a a a a c t c
 c t t t a c a t t t t t a a g c a g c c t t t t a t g a g g c c a g t a c a g a c g a c t c a a g a g g a a g a c g g g t g c t c a t g c c g c t t t c c t g a
 g g a g g a g g a a g g a g g t g c g a a c t g c g c g t t a a g t t c t c c c g a t c a g c c g a c g c g c c t g c t t a c a a g c a g g g c c a g a a c
 c a a c t g t a c a a c g a g c t g a a t c t c g g t a g a c g g g a a g a g t a c g a c g t g t t g g a c a a a c g g a g a g g c c g c g a c c c a g a a a t
 g g g c g g c a a g c c t c g c a g g a a a a c c c c c a g g a g g g a c t g t a c a a t g a g t t g c a g a a a g a t a a g a t g g c a g a a g c t t a t a
 g c g a g a t c g g a a t g a a g g g g g a a g g a g a c g a g g g a a g g a c a c g a c g c c t t t a t c a g g g c c t g t c c a c a g c a a c a a a a
 g a t a c g t a t g a c g c c c t c c a t a t g c a g g c a c t t c c a c c a c g g t g a t a a (配列番号: 610)

(アミノ酸)

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIY
 YPDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYEYFDVWGKGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIV
 LTQSPASLAVSPGQRATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESVGPVRFSGSGSGTDFTLTINPVE
 ANDTANYYCQHSRELPFTFGGGTKVEIKRTTTTPAPRPPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA
 PLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNK
 LYNELNLGRREEYDVLDRRRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRKGKHDGLYQGLSTATKD
 TYDALHMQALPPR* * (配列番号: 611)

CAR-T C2 OX40/CD3z 配列:

(DNA)

a t g g c c t t g c c a g t g a c g g c c c t g c t g c t g c c a t t g g c t c t t c t g t t g c a c g c t g c c a g g c c t g a a g t g c a g c t c g t a g a
 g a g t g g c g g g g g a c t g g t g a a g c c c g g t g g a a g c c t c a g a c t c a g t t g c g c c g c c t c a g g t t t c a c t t t t t c a g g t t a c g
 c c a t g t c c t g g g t a a g a c a g g c a c c g g g g a a a g g a c t c g a g t g g g t g t c t a c t a t c a g c t c a g g a g g c a c t t a t a t a t a t
 t a t c c t g a c t c t g t a a a a g g c c g a t t t a c g a t t t c t c g c g a c a a t g c a a a g a a c t c c c t c t a c c t c c a a a t g a a c a g t c t
 t a g g g c a g a a g a c a c t g c t g t a t a c t a t t g t g c a c g c c t c g g c g g c g a c a a c t a c t a c g a g t a c t t t g a c g t g t g g g g g a
 a a g g g a c t a c c g t g a c a g t t t c a a g c g g a g g a g g t g g c t c a g g t g g a g g c g g g t c a g g g g g g g a g g a a g t g a t a t t g t g
 c t c a c a c a a t c c c c a g c c t c c c t g g c t g t g t c t c c c g g c c a a c g c g c t a c a a t t a c a t g t c g g g c c t c c a a a a g c g t g a g
 c a c c a g c g g c t a c a g c t a c a t g c a c t g g t a t c a a c a g a a a c c a g g a c a a c c c c c c a a a c t g t t g a t t t a t c t c g c t t c a a
 a c t t g g a g t c c g g c g t g c c t g c g c g c t t t t c a g g a g t g g g a g c g g c a c a g a t t t t a c g t g a c t a t c a a c c c c g t a g a a
 g c a a a c g a t a c a g c g a a t t a t t a t t g t c a a c a t t c c c g g g a a c t c c c c t t t a c g t t c g g c g g g g g c a c a a a g g t c g a a a t
 t a a g a g a a c c a c g a c a a c c c c g g c c c c a g a c c a c c a a c g c c a g c c c c a c c a t c g c c a g c c a a c c c c t g t c t c t g a g a
 c c a g a a g c c t g t a g g c c t g c c g c c g g t g g a g c t g t g c a c a c a a g a g g a c t g g a t t t c g c c t g t g a t a t c t a c a t t t g g g c
 c c c g c t c g c a g g c a c a t g t g g a g t g c t c c t c c t c c c t g g t g a t t a c c c t g t a c t g c c g g a g g g a c c a g a g g c t g c c c c
 c c g a t g c c c a c a a g c c c c t g g g g g a g g c a g t t t c c g g a c c c c a t c c a a g a g g a c a g g c c g a c g c c c a c t c c a c c c t g
 g c c a a g a t c c g c g t t a a g t t c t c c c g a t c a g c c g a c g c g c c t g c t t a c a a g c a g g g c c a g a a c c a a c t g t a c a a c g a g c t
 g a a t c t c g g t a g a c g g g a a g a g t a c g a c g t g t t g g a c a a a c g g a g a g g c c g c g a c c c a g a a a t g g g c g g c a a g c c t c g c a
 g g a a a a a c c c c a g g a g g g a c t g t a c a a t g a g t t g c a g a a a g a t a a g a t g g c a g a a g c t t a t a g c g a g a t c g g a a t g a a g
 g g g g a a a g g a g a c a g a g g g a a a g g a c a c g a c g c c t t t a t c a g g g c c t g t c c a c a g c a a c a a a a g a t a c g t a t g a c g c c c t
 c c a t a t g c a g g c a c t t c c a c c a c g g t g a t a a (配列番号: 612)

(アミノ酸)

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIY
 YPDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYEYFDVWGKGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIV
 LTQSPASLAVSPGQRATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESVGPVRFSGSGSGTDFTLTINPVE
 ANDTANYYCQHSRELPFTFGGGTKVEIKRTTTTPAPRPPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA

10

20

30

40

50

PLAGTCGVLLLLSLVITLYCRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNEL
NLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDAL
HMQUALPPR* * (配列番号: 613)

CAR-T C2 CD28/OX40/CD3z 配列:
(DNA)

atggccttgccagtgacggccctgctgctgccattggctcttctgttgcacgctgccaggcctgaagtgacgctcgtaga
gagtgccgggggactggtagagcccggtggaagcctcagactcagttgcgccgctcaggtttctacttttcaggttacg
cctgtcttgggtaagacaggcaccgggaaaggactcgagtggtgtctactatcagctcaggaggcacttatatatat
tatcttgactctgtaaaaggccgatttacgatttctcgcgacaatgcaaagaactccctctacctccaaatgaacagctc
tagggcagaagacactgctgtatactattgtgcacgctcgccggcgacaactactacgagactttgacgtgtggggga
aagggactaccgtgacagtttcaagcggaggagggtggctcaggtaggaggcgggtcagggggggagggaagtgatattgtg
ctcacacaaatccccagcctcccggctgtgtctcccggccaacgcgctacaattacatgtcgggctccaaaagcgtgag
caccagcggctacagctacatgcactggatcaacagaaaccaggacaaccccccaactgttgatttatctcgcttcaa
acttgagtgccggcgtgctgctgcttttcagggagtgaggcggcacagatttacgctgactatcaacccgtagaa
gcaaagctacagcgaattatattgtcaacatccccgggaactcccccttacgttcggcgggggacaaaaggtcgaaat
taagagaaccacgacaacccccggccccagaccaccaacgccacccccaccatcgccaccaacccctgtctctgaga
ccagaagcctgtaggcctgccgcccgtggagctgtgcacacaagaggactggatttcgctgtgatattacatttgggc
cccgtcgcaggcacaatggagtgctctctctctcctgggtgattaccctgtactgcagaagcaagcggctcctggctcc
tgcatctgatatacagaacatgacccaagaagaccaggccccaccaggaaacattaccagccctacgctccgccacgc
gactcgcctgctaccggctcccggaggaccagaggctgccccccgatgccacaagccccctgggggaggcagtttccg
gacccccatccaagaggagcaggccgacgcccactccacctggccaagatccgcttaagttctccgatcagccgacg
cgctgcttacaagcaggccagaaccaactgtacaacgagctgaaatctcggtagacgggaagagtagcagctgttggac
aaacggagaggccgacaccagaaaaggcggaagcctcgcaggaaaaacccccaggaggactgtacaatgagttgca
gaaagataagatggcagaagcttataagcgagatcggaatgaaggggaaaggagacgagggaaaggacacgacggccttt
atcagggcctgtccacagcaacaaaagatagctatgacgcccctccatatagcaggcacttccaccacggtgataa(配列
番号: 614)

(アミノ酸)

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIY
YPSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYEYFDVWGKTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGSDIV
LTQSPASLAVSPGQRATITCRASKSVSTSGYSYMHYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVE
ANDTANYYCQHSRELPFTFGGGTKVEIKRTTTTPAPRPPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA
PLAGTCGVLLLLSLVITLYCRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRRDQRLPPDAHKPPGGGSFR
TPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ
KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR* * (配列番号: 615)

CAR-T E6 OX40/CD3z 配列:
(DNA)

atggcccctgcccgtgaccgctttgctgctccccctggcgtgctgctgcacgccgcccaggccagaggctccagctggttga
gagtgccggggggctgggttaagcctggcggctcccctgcggctgagctgcgcccgcagtggaattactttcagccgatatg
ggaatgagttgggtgcccgaagctcccgggaagaggctggaaatgggtctcaacaatctccggggggggcacttacatctat
taccctgactcagtaaggggagatttaccatttcacgagacaacgctaagaataacctgtatttgcagatgaattctct
gagagcagaggacacagctgtttactattgtaccctgcgacaactatggcaggaactacgactacggataggactattggg
gacaagggacattggttacagtgagcagtgccggcgggggagcggaggaggaggcagcgggtggggggggcagcgagata
gtgctcacgcagctaccctgcgactctcagctctcaccctggggaacgagctaccctgacgtgctctgctacctcctcag
tgtcattatctactgggtacagcaacggccccggcagctccccctagattgctcatttatagtagcttaattctggcctca
ggtaacctgcacgattttctggatctgggtcagggtcttgattacacctcactatctctagcctggagcctgaagactt
tgccgtttattactgccagcagaggctagctccccattaccctttgggagtgggaccaaggttgaaatataaacgacaa
ccccggccccagaccaccaacgccagccccaccatcgccagccaacccctgtctctgagaccagaagcctgtaggcc
tgccgcccgtggagctgtgcacacaagaggactggatttcgctgtgatattacatttgggccccgctcgcaggcacaat

gtggagtgetcctcctctccctggtgattacctgtactgccggaggaccagaggctgcccccgatgccacaagccc
 cctgggggaggcagtttccggacccccatccaagaggagcaggccgacgcccactccacctggccaagatccgcgttaa
 gttctcccgatcagccgacgcgctgcttacaagcagggccagaaccaactgtacaacgagctgaatctcggtagacggg
 aagagtacgacgtgtggacaaaacggagagggccgcgacccagaaaaaggcggaagccctcgaggaaaaacccccaggag
 ggactgtacaaagagtgcagaaagataagatggcagaagcttatagcgagatcggaatgaa gggggaaaggagacgag
 ggaaggacacgacggcctttatcaggccctgtccacagcaacaaaagatacgtatgacgcccccatatgcaggcactt
 ccaccacggtgataa(配列番号: 616)

(アミノ酸)

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEWVSTISGGGTYIY
 YPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDNVGRNYDYGMDYWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSEI
 VLTQSPATLSLSPGERATLTCSATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGSDYTLTISSELEPDF
 AVYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTC
 GVLLLSLVITLYCRRDQRLPPDAHKPPGGGSRFTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLRRE
 EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP
 PR** (配列番号: 617)

10

CAR-T E6 CD28/OX40/CD3z 配列:

(DNA)

atggccctgcccgtgaccgctttgctgctccccctggcgtgctgctgcacgccgcccaggccagaggctccagctggttga
 gagtggcgggtggctggttaagcctggcggctccccgcgctgagctgcccgcgagtggaattactttcagccgatatg
 ggaagagtgggtgcggcaagctcccgggaagaggctggaaagggtctcaacaatctccggggggggcacttacatctat
 taccctgactcagtaaggggagattaccattcacgagacaacgctaagaataacctgatttgcagatgaattctct
 gagagcagaggacacagctgttactatgtaccgcgacaactatggcaggaactacgactacggtatggactatggg
 gacaagggacattggttacagtgagcagtgccggcggggcagcggaggaggaggcagcgggtggggggggcagcgagata
 gtgctcacgagctaccgcgactctcagctctcaccctggggaacgagctacctgacgtgctctgctacctcctcag
 gtcatatattcactggtatcagcaacggcccggcagctcccctagattgctcatattatagctacctctaatctggcctcag
 gtaacctgacgatattctggatctggttcaggctctgat tacacctcactatctctagcctggagcctgaagacttt
 gccgtttattactgccagcagaggcttagctccccattcacccttgggagtgaggaccaagggttgaattaaaacgacaac
 cccg gccccagaccaccaacgccagccccaccatcgccagccaacccccgtctctgagaccagaagcctgtaggcct
 gccgcccgtggagctgtgcacacaagaggactggatttcgctgtgatattacattgggccccgctcgaggcacaatg
 tggagtgcctcctctcccgggtgat taccctgtactgcagaagcaagcggctctcggtcctgcatctgat tacatga
 acatgacccccagaagaccaggccccaccaggaaaacattaccagccccacgctccgcccacgagcactctgctgacctaccg
 tcccggagggaccagaggctgccccccgatgccacaagccccctgggggaggcagtttccggacccccatccaagagga
 gcaggccgacgcccactccacctggccaagatccgcgttaagttctcccgatcagccgacgcgctgcttacaagcagg
 gccagaaccaactgtacaacgagctgaatctcggtagacgggaagagtacgacgtgtggacaaaacggagagggccgcgac
 ccagaaaaggcggaagccctcgaggaaaaacccccaggaggactgtacaatgagttgcagaaagataagatggcaga
 agcttatagcgagatcggaatgaaggggaaaggagacgagggaaaggacacgacggcctttatcaggccctgtccacag
 caacaaaagatacgtatgacgcccccatatgcaggcacttccaccacggtgataa(配列番号: 618)

20

30

(アミノ酸)

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEWVSTISGGGTYIY
 YPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDNVGRNYDYGMDYWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSEI
 VLTQSPATLSLSPGERATLTCSATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGSDYTLTISSELEPDF
 AVYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTC
 GVLLLSLVITLYCRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRRDQRLPPDAHKPPGGGSRFTPIQEE
 QADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE
 AYSEIGMKGERRRKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR** (配列番号: 619)

40

MUC1 欠失細胞質配列

(アミノ酸)

SNIKFRPGSVVQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQYKTEAASRY(配列番号: 620)

50

MUC1欠失細胞質配列

(アミノ酸)

SVVVQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQYKTEAASRY(配列番号: 621)

MUC1欠失細胞質配列

(アミノ酸)

VQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQY(配列番号: 622)

MUC1欠失細胞質配列

(アミノ酸)

SNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTIN(配列番号: 623)

10

プライマー

attctaagcttgggccaccatggaactg(配列番号: 624)

tctagagtttaaacttactatttaccggagacagggagag(配列番号:625)

agtatggcccagccggccgaggtgcagctggtggagtctgg(配列番号:626)

tagaaggcacagtcgaggctgatcag(配列番号:627)

attctaagcttgggccaccatggaagc(配列番号:628)

tctagagtttaaacttactaacactctccccctgttgaagc(配列番号:629)

20

agtatggcccagccggccgaaattgtgttgacacagctctccag(配列番号: 630)

tagaaggcacagtcgaggctgatcag(配列番号: 631)

actgtcatatggagggtgcagctggtggagtctg(配列番号: 632)

actgtctcgagtttaatttccactttggtgccgctgc(配列番号: 633)

actgtcatatggagggtgcagctggtggagtctg(配列番号: 634)

actgtaccggttttaatttccactttggtgccgctgc(配列番号: 635)

cttcttccctcaggagcaagctcaccgtgg(配列番号: 636)

gagccgtcggagtccagc(配列番号: 637)

gcacctgaactcctgggg(配列番号: 638)

tttaatttccactttggtgccg(配列番号: 639)

30

cgcggttagcttaagcttggtagcgaggcca(配列番号: 640)

cgcggtggccgctgatcagcggttttaaacttatc(配列番号: 641)

【0257】

本発明は、ここに記述された、特定の実施態様による範囲に制限されるものではない。実際、ここに記述されたものに加えて、本発明の様々な変異は、上記詳細な説明、実施例及び図面から、当業者には明白である。そのような変異は、本願発明の請求項の範囲内にあることが意図されている。以下の実施例は、制限的なものではなく、本発明の実例として提供されている。

【実施例】

【0258】

40

実施例1 - NME1及びNME7とのELISA競合

【0259】

PSMGFRペプチドは、ImjectMaleimide活性化BSAキット(Thermo Fisher)を使用して、BSAに共有結合でつながれた。PSMGFRペプチド結合BSAは、0.1M炭酸塩/重炭酸塩バッファpH 9.6によって7.5 µg/mLに希釈し、そして、50 µLが、96ウェルプレートの各ウェルに加えられた。4日の一夜のインキュベーションの後、プレートは、PBS-Tで2度洗浄した。そして、3%BSA溶液が、ウェル上での残る結合部位をブロックするために添加された。室温(RT)で1hの後、プレートは、PBS-Tで、2度洗浄され、そして、PBS-T+1%BSAで希釈したNME1若しくはNME7が、飽和濃度に加えられた。室温での1hの後、プレートは、PBS-Tで3X洗浄され、PBS-T+1%BSAで希釈した抗MUC1*抗体(若しくは抗体断片)が加えられた(NME1

50

/NME7にくらべ5Xモル過剰)。室温での1hの後、プレートはPBS-Tで3X洗浄され、そして、PBS-T+1%BSAで希釈したヤギ抗 HisTag-HRPが、1/10000の希釈で加えられた。室温での1h後、プレートは、PBS-Tで3x洗浄され、そしてPSMGFRペプチドに結合した残るNME1若しくはNME7が、ABTS溶液(Thermo Fisher)を使い、415nmで測定された。

【0260】

実施例2 - 抗MUC1*細胞外ドメイン単クローン抗体のヒト化

【0261】

本発明者は、相補性決定領域、「CDR」、移植術と呼ばれるプロセスによって、MUC1*の細胞外ドメインへ結合する、ヒト化抗体を生成した。最初に、相同探索が、ヒト化抗体配列(IMG2、国際的ImMunoGeneTics情報システム)のレパトリーに対して、マウス単クローン抗MUC1*抗体(E6 HC 配列番号: 12-13; LC 配列番号: 65-66及びMN-C2 HC配列番号: 118-119; LC配列番号: 168-169)の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域ヌクレオチド配列を、独立して、アラインするために行なわれた。最も高い相同性をもった配列が選択された。IGHV3-21*01は、マウスMN-E6重鎖可変領域への、82.9%(DNA)及び74.5%(アミノ酸)の同一性をもったヒトIgG重鎖可変領域配列である。IGKV3-11*02は、マウスMN-E6軽鎖可変領域への、68.8%(DNA)及び61.1%(アミノ酸)の同一性をもったヒトIgG軽鎖可変領域配列である。IGHV3-21*04は、マウスMN-C2重鎖可変領域への、85%(DNA)及び81.6%(アミノ酸)の同一性をもったヒトIgG重鎖可変領域配列である。IGKV7-3*01は、マウスMN-C2軽鎖可変領域への、76.9%(DNA)及び71.3%(アミノ酸)の同一性をもったヒトIgG軽鎖可変領域配列である。次に、マウスscFvのモデルが、CDRとフレームワークの安定性にとって重要な、マウス残基を選択し維持するために生成された。最後に、ヒト生殖細胞系列からのCDRが、対応するマウスCDRと取り替えられた。

【0262】

ヒト化MN-E6 IgG2重鎖クローニング

【0263】

IGHV3-21*03リーダー配列、ヒト化MN-E6重鎖可変領域及びヒトIgG2の定常領域が後続するKozak共通配列は、GenScript、NJにより本発明者のリクエストによって合成された(配列番号:52-53)。cDNAは次のプライマーを使用して、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅された:

5'-ATTCTAAGCTTGGGCCACCATGGAAGT -3'(配列番号: 624)及び

5'-TCTAGAGTTTAACTTACTATTTACCCGAGACAGGGAGAG-3'(配列番号: 625)。

HindIIIとPmeIの制限酵素(NewEnglandBiolabs)で消化の後、精製された断片は、同じ制限酵素で消化され、pCDNA 3.1V5ベクター(LifeTrchnologies)へクローニングされた。

【0264】

ヒト化MN-E6重鎖cDNAが、次のプライマーを使用して、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅された:

5'-AGTATGGCCCAGCCGCGCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG-3'(配列番号: 626)及び

5'-TAGAAGGC ACAGTCGAGGCTGATC AG-3'(配列番号: 627)。

SfiIとPmeIの制限酵素(NewEnglandBiolabs)で消化の後、精製された断片は、同じ制限酵素で消化され、pSECTag2ベクター(LifeTrchnologies)へクローニングされた。

【0265】

ヒト化MN-E6 軽鎖クローニング

【0266】

IGHV3-11*02リーダー配列、ヒト化MN-E6軽鎖可変領域及びヒト 軽鎖の定常領域が後続するKozak共通配列が、GenScript、NJにより本発明者のリクエストによって合成された(配列番号:107-108)。cDNAは、次のプライマーを使用して、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅された:

5'-ATTCTAAGCTTGGGCC ACC ATGGAAGC-3'(配列番号: 628)及び

5'-TCTAGAGTTTAACTTACTAACACTCTCCCCTGTTGAAGC-3'(配列番号: 629)。

HindIIIとPmeIの制限酵素(NewEnglandBiolabs)で消化の後、精製された断片は、同じ制

10

20

30

40

50

限酵素で消化された、pCDNA 3.1V5ベクター(LifeTrchnologies)へクローン化された。

【0267】

ヒト化MN-E6軽鎖cDNAは次のプライマーを使用して、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅された:

5'-AGTATGGCCAGCCGCGCGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAG-3' (配列番号: 630) 及び

5'-TAGAAGGCAC AGTCGAGGCTGATCAG-3 - ' (配列番号: 631)。

SfiIとPmeIの制限酵素(NewEnglandBiolabs)で消化の後、精製された断片は、同じ制限酵素で消化された、pSECTag2ベクター(LifeTechnologies)へクローン化された。

【0268】

ヒト化MN-E6 IgG1重鎖クローニング

10

【0269】

IgG2重鎖定常領域を除去するために、ヒト化MN-E6 IgG2構築物(pCDNA 3.1 V5及びpSECTag 2)が、BstEII及びPmeI(NewEnglandBiolabs)で消化された。ヒト化MN-E6重鎖可変領域をもったベクターが精製された。ヒトIgG1重鎖定常領域は、IDT, IAにより本発明者のリクエストによって合成された(配列番号: 60-61))。gBLOCKS及びヒト化MN-E6可変領域をもった精製ベクターの両方が、ギブソンアッセムブリクローニングキット(NewEnglandBiolabs)を使用して結合された。

【0270】

ヒト化MN-E6 軽鎖クローニング

20

【0271】

ヒト化MN-E6 軽鎖構築物(pCDNA 3.1 V5ベクター及びpSECTag2ベクター)が、 軽鎖定常領域を除去するためにKpnI及びPmeI(NewEnglandBiolabs)で消化された。ヒト化MN-E6軽鎖可変領域をもったベクターが精製された。ヒト 軽鎖定常領域は、IDT, IAにより本発明者のリクエストによって合成された(配列番号: 115))。ヒト化MN-E6軽鎖可変領域をもった、両、gBLOCK及び精製されたベクターは、ギブソンアッセムブリ クローニング・キット(NewEngland・Biolabs)を使用して結合された。

【0272】

ヒト化MN-C2 IgG1及びIgG2重鎖クローニング

30

【0273】

pSECTag2でのヒト化MN-E6 IgG1及びIgG2重鎖が、該MN-E6可変領域を除去するためにSfiIとAgeIで消化された。pCDNA 3.1 V5でのヒト化MN-E6 IgG1及びIgG2重鎖は、該MN-E6可変領域を除去するためにHindIIIとAgeIで消化され、ヒトIgG1若しくはIgG2定常領域をもったベクターが精製された。ヒト化MN-C2重鎖は、IDT, IAにより本発明者のリクエストによって合成された(配列番号: 160と165)。pCDNA 3.1 V5へクローン化される配列は、5'にネズミ科Ig 鎖リーダー配列(配列番号160)を含んでいる。ヒトIgG1かIgG2定常領域をもった、両、gBLOCK及び精製されたベクターがギブソンアッセムブリ クローニング・キット(NewEngland・Biolabs)を使用して結合された。

【0274】

ヒト化MN-C2 / 軽鎖クローニング

40

【0275】

軽鎖定常領域へ結合された、2つのヒト化MN-C2可変領域、及び 軽鎖定常領域へ結合された、2つのヒト化MN-C2可変領域が、IDT, IA)により本発明者のリクエストによって合成された(それぞれ配列番号:210及び213、ならびに配列番号:216及び219)。pCDNA 3.1 V5が、HindIIIとPmeIの制限酵素(NewEnglandBiolabs)で消化され、また、pSEC Tag2が、SfiIとPmeIの制限酵素(NewEngland・Biolabs)で消化された。その後、両方のプラスミドは精製された。配列番号:210と216が、消化されたpCDNA 3.1 V5へ、配列番号:213と219が、消化されたpSEC Tag2へ、ギブソンアッセムブリークローニング・キット(NewEngland・Biolabs)を使用して、結合された。

【0276】

ヒト化C3 IgG1重鎖クローニング

50

【 0 2 7 7 】

ヒト化E6 IgG1構築物(pSECTag2)が、E6重鎖可変領域を除去するためにSfiI及びAgeI(NewEnglandBiolabs)で消化された。ヒト化E6重鎖可変領域のないベクターが精製された。ヒト化C3重鎖可変領域は、IDT, IAにより本発明者のリクエストによって合成された(配列番号: 457)。gBLOCK及び精製されたベクターがギブソンアッセブリークローニング・キット(NewEngland・Biolabs)を使用して結合された。

【 0 2 7 8 】

ヒト化C3 軽鎖クローニング

【 0 2 7 9 】

pEF V5-HisがBamHI及びPmeI(NewEnglandBiolabs)で消化され及び精製された。ヒト化C3軽鎖は、IDT, IA)により本発明者のリクエストによって合成された(配列番号: 504)。両、gBLOCK及び精製されたベクターは、ギブソンアッセブリークローニング・キット(NewEngland・Biolabs)を使用して結合された。

10

【 0 2 8 0 】

ヒト化C8 軽鎖クローニング

【 0 2 8 1 】

pEF V5-HisがBamHI及びPmeI(NewEnglandBiolabs)で消化され及び精製された。ヒト化C8軽鎖は、IDT, IA)により本発明者のリクエストによって合成された(配列番号: 583)。両、gBLOCK及び精製されたベクターがギブソンアッセブリークローニング・キット(NewEngland・Biolabs)を使用して結合された。

20

【 0 2 8 2 】

実施例 3 - 抗MUC1*細胞外ドメイン抗体のヒト化scFVのクローニング

【 0 2 8 3 】

ヒト化E6 scFVクローニング:

【 0 2 8 4 】

pSEC Tag2が、SfiI及びPmeI(NewEnglandBiolabs)で消化され精製された。ヒト化E6 scFV gBLOCKSは、IDT, IA)により本発明者のリクエストによって合成された(配列番号: 604-605)。両、gBLOCKs及び精製されたベクターは、ギブソンアッセブリークローニング・キット(NewEngland・Biolabs)を使用して結合された。

30

【 0 2 8 5 】

ヒト化E6 scFV cDNAは、次のプライマーを使用して、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅された:

5'-ACTGTCATATGGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTG-3' (配列番号: 632)及び

5'-ACTGTCTCGAGTTTAAATTTCCACTTTGGTGCCGCTGC-3' (配列番号:633)。

NdeIとXhoIの制限酵素(NewEnglandBiolabs)で消化の後、精製された断片は、同じ制限酵素で消化された、pET21bベクター(Novagen)へクローン化された。ヒト化E6 scFV cDNAが、タンパク質精製のためにヒスチジン・タグの5'クローン化された。

【 0 2 8 6 】

ヒト化E6 scFV cDNAは、次のプライマーを使用して、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅された:

40

5'-ACTGTCATATGGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTG-3' (配列番号: 634)及び

5'-ACTGTACCGGTTTAAATTTCCACTTTGGTGCCGCTGC-3' (配列番号:635)。

NdeIとAgeIの制限酵素(NewEnglandBiolabs)で消化の後、精製された断片は、同じ制限酵素で消化された、修飾pET21bベクター(Novagen)へクローン化された。ベクターは、ヒスチジン・タグの2つの停止コードン'5が後続するStrepTag2配列を含めるために修飾された。ヒト化E6 scFV cDNAが、タンパク質精製用のStrepTag2の5'クローン化された。

【 0 2 8 7 】

ヒト化E6、C2、C3及びC8 scFV-Fcクローニング

【 0 2 8 8 】

IgG1重鎖定常領域の部分とE6重鎖可変領域を除去するために、ヒト化E6 IgG1構築物(pSEC

50

Tag2)は、SfiI及びSacII(NewEnglandBiolabs)で消化された。ヒト化E6重鎖可変領域のないベクターが精製された。ヒト化E6、C2、C3及びC8 scFV gBLOCKSは、IDT,IAにより本発明者のリクエストによって合成された(配列番号: 258-259、262-263、266-267及び270-271)。E6、C2、C3及びC8 gBLOCKS及び精製されたベクターは、ヒトIgG1 Fc部位のフレーム中の相応するscFVをアッセンブルするためにギブソンアッセブリークローニング・キット(NewEnglandBiolabs)を使用して結合された。

【0289】

ヒト化E6 scFV-Fc Y407Rクローニング

【0290】

ヒト化E6 scFV-Fcチロシン407が、部位特異的突然変異誘発によってアルギニン(Y407R)に変化させられた。Q5部位特異的突然変異誘発キット(NEB)が、次のプライマーと共に使用された:

5'-CTTCTTCCTCAGGAGCAAGCTCACCGTGG-3'(配列番号: 636)及び

5'-GAGCCGTCGGAGTCC AGC-3'(配列番号: 637)

【0291】

ヒト化E6 scFV-Fcヒンジレスクローニング

【0292】

ヒト化E6 scFV-Fcのヒンジ部は部位特異的突然変異誘発によって除去された。Q5部位特異的突然変異誘発キット(NEB)が、次のプライマーと共に使用された:

5'-GCACCTGAACTCCTGGGG-3'(配列番号: 638)及び

5'-TTTAATTTCCACTTTGGTGCCG3'(配列番号: 639)

【0293】

実施例4 - 抗MUC1*細胞外ドメイン抗体のCAR-Tのクローニング

【0294】

CAR E6 CD28/4 1BB/CD3zクローニング:

【0295】

pCDNA 3.1 V5が、KpnI及びPmeI(NewEnglandBiolabs)で消化され精製された。完全なCAR-T E6(CD8/CD28/4-1BB/CD3z)gBLOCKは、IDT,IA(配列番号: 305))により本発明者のリクエストによって合成された。両、gBLOCK及び精製されたベクターが、ギブソンアッセブリークローニング・キット(NewEngland・Biolabs)を使用して結合された。

【0296】

CAR E6 CD3zクローニング:

【0297】

pCDNA 3.1 V5 CAR-T E6CD8/CD28/4-1BB/CD3zが、細胞質領域を除去するためにEcoRV及びPmeI(NewEnglandBiolabs)で消化された。細胞質領域のないベクターが精製された。CAR-T E6 CD8/CD3z gBLOCKが、IDT,IAにより本発明者のリクエストによって合成された(配列番号: 296)。両、gBLOCK及び精製されたベクターがギブソンアッセブリークローニング・キット(NewEngland・Biolabs)を使用して結合された。

【0298】

CAR E6 CD28/CD3zクローニング:

【0299】

pCDNA 3.1 V5 CAR-T E6CD8/CD28/4-1BB/CD3zは、細胞質領域を除去するためにEcoRV及びPmeI(NewEnglandBiolabs)で消化された。細胞質領域のないベクターが精製された。CAR-T E6 CD8/CD28/CD3z gBLOCKはIDT,IAにより本発明者のリクエストによって合成された(配列番号: 299)。両、gBLOCK及び精製されたベクターがギブソンアッセブリークローニング・キット(NewEngland・Biolabs)を使用して結合された。

【0300】

CAR E6 4-1BB/CD3zクローニング:

【0301】

pCDNA 3.1 V5 CAR-T E6CD8/CD28/4-1BB/CD3zは、細胞質領域を除去するためにEcoRV及びP

10

20

30

40

50

mel(NewEnglandBiolabs)で消化された。細胞質領域のないベクターが精製された。CAR-T E6 CD8/4-1BB/CD3z gBLOCKはIDT,IAにより本発明者のリクエストによって合成された(配列番号: 302)。両、gBLOCK及び精製されたベクターが、ギブソンアッセブリークローニング・キット(NewEngland・Biolabs)を使用して結合された。

【 0 3 0 2 】

CAR C2 CD28/4 1BB/CD3zクローニング:

【 0 3 0 3 】

pCDNA 3.1 V5 CAR-T E6CD8/CD28/4-1BB/CD3zが、KpnI及びEcoRV(NewEngland・Biolabs)でE6 scFVを除去するために消化された。E6 scFVのないベクターが精製された。CAR-T C2 gBLOCKsはIDT,IAにより本発明者のリクエストによって合成された(配列番号: 308-309))。両、gBLOCKs及び精製されたベクターが、ギブソンアッセブリークローニング・キット(NewEngland・Biolabs)を使用して結合された。

10

【 0 3 0 4 】

レンチウイルスベクターへのCARサブクローニング:

【 0 3 0 5 】

全pCDNA 3.1 V5 CAR cDNAが、次のプライマーを使用して、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅された:

5'-CGCGGCTAGCTTAAGCTTGGTACCGAGGGCCA-3'(配列番号: 640)及び

5'-CGCGGCGGCCGCTGATCAGCGGGTTAAACTTATC-3'(配列番号: 641)。

NheIとNotIの制限酵素(NewEnglandBiolabs)で消化の後、精製された断片は、同じ制限酵素で消化された、レンチウイルスベクター(pCDH-EF1-MCS-IRESGFP及びpCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP+puro、SBI)へクローン化された。

20

【 0 3 0 6 】

CAR-E6-Fc/8/41BB/CD3zクローニング:

【 0 3 0 7 】

pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP+puro(SBI)が、NheI及びNotI(NewEnglandBiolabs)で消化され、そして、ベクターが精製された。gBLOCKsは、IDT,IAにより本発明者のリクエストによって合成された(配列番号: 312、313及び314)。gBLOCKs及び精製されたベクターがギブソンアッセブリークローニング・キット(NewEngland・Biolabs)を使用して結合された。

【 0 3 0 8 】

30

CAR-E6-FcH/8/41BB/CD3zクローニング:

【 0 3 0 9 】

pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP+puro(SBI)が、NheI及びNotI(NewEnglandBiolabs)で消化され、そして、ベクターが精製された。gBLOCKsは、IDT,IAにより本発明者のリクエストによって合成された(配列番号: 312、317及び314)。gBLOCKs及び精製されたベクターが、ギブソンアッセブリークローニング・キット(NewEngland・Biolabs)を使用して結合された。

【 0 3 1 0 】

CAR-E6-Fc-4-41BB-CD3zクローニング:

【 0 3 1 1 】

pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP+puro(SBI)が、NheI及びNotI(NewEnglandBiolabs)で消化され、そして、ベクターが精製された。gBLOCKsは、IDT,IAにより本発明者のリクエストによって合成された(配列番号: 312、313及び320)。gBLOCKs及び精製されたベクターが、ギブソンアッセブリークローニング・キット(NewEngland・Biolabs)を使用して結合された。

40

【 0 3 1 2 】

CAR-E6 FcH/4/41BB/CD3zクローニング:

【 0 3 1 3 】

pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP+puro(SBI)が、NheI及びNotI(NewEnglandBiolabs)で消化され、そしてベクターが精製された。gBLOCKsは、IDT,IAにより本発明者のリクエストによって合成された(配列番号: 312、317及び320)。gBLOCKs及び精製されたベクターがギブソンアッセブリークローニング・キット(NewEngland・Biolabs)を使用して結合された。

50

【 0 3 1 4 】

CAR-E6 IgD/8/41BB/CD3zクローニング:

【 0 3 1 5 】

pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP+puro(SBI)が、NheI及びNotI(NewEnglandBiolabs)で消化され、そしてベクターが精製された。gBLOCKsは、IDT,IAにより本発明者のリクエストによって合成された(配列番号: 312、325及び326)。gBLOCKs及び精製されたベクターがギブソニアッセブリークローニング・キット(NewEngland・Biolabs)を使用して結合された。

【 0 3 1 6 】

CAR-E6 IgD/4/41BB/CD3zクローニング:

【 0 3 1 7 】

pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP+puro(SBI)が、NheI及びNotI(NewEnglandBiolabs)で消化され、そしてベクターが精製された。gBLOCKsは、IDT,IAにより本発明者のリクエストによって合成された(配列番号: 312、329及び326)。gBLOCKs及び精製されたベクターがギブソニアッセブリークローニング・キット(NewEngland・Biolabs)を使用して結合された。

【 0 3 1 8 】

CAR-E6 X4/8/41BB/CD3zクローニング:

【 0 3 1 9 】

pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP+puro(SBI)が、NheI及びNotI(NewEnglandBiolabs)で消化され、そしてベクターが精製された。gBLOCKsは、IDT,IAにより本発明者のリクエストによって合成された(配列番号: 312、332及び326)。gBLOCKs及び精製されたベクターがギブソニアッセブリークローニング・キット(NewEngland・Biolabs)を使用して結合された。

【 0 3 2 0 】

CAR-E6 X4/4/41BB/CD3zクローニング:

【 0 3 2 1 】

pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP+puro(SBI)が、NheI及びNotI(NewEnglandBiolabs)で消化され、そしてベクターが精製された。gBLOCKsは、IDT,IAにより本発明者のリクエストによって合成された(配列番号: 312、335及び326)。gBLOCKs及び精製されたベクターがギブソニアッセブリークローニング・キット(NewEngland・Biolabs)を使用して結合された。

【 0 3 2 2 】

CAR E6-8+4-4-41BB-CD3Zクローニング:

【 0 3 2 3 】

pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP+puro(SBI)が、NheI及びNotI(NewEnglandBiolabs)で消化され、そしてベクターが精製された。gBLOCKsは、IDT,IAにより本発明者のリクエストによって合成された(配列番号: 312、338及び326)。gBLOCKs及び精製されたベクターがギブソニアッセブリークローニング・キット(NewEngland・Biolabs)を使用して結合された。

【 0 3 2 4 】

実施例 5 - レンチウイルス生産

【 0 3 2 5 】

HEK 293T細胞(ATCC)が、レンチウイルスを生産するために使用された。トランスフェクション前日、プレート(6ウェルプレート)が、ポリ-D-リジンでコートされ、細胞は、トランスフェクション時、細胞密度が90-95%に達するように植え付けられ、5%CO₂雰囲気下で培養された。次の日、細胞は、メーカー指示書(lentiviral発現vecotrの0.75 µg及びpPACKHIパッケージングMIXの2.25 µgが、使用された)によって、Lipofectamine 3000(LifeTechnologies)及びOpti-MEM^Rでトランスフェクトされた。6hのインキュベーションの後、培地は変更され、そして、レンチウイルスを含んでいる培地が、24及び48時間後に収穫された。レンチウイルスはLenti-Xコンセントレータ(Clontech)で濃縮され、そして、タイターは、Lenti-Xp@4ラピッドタイター・キット(Clontech)を使用して計算された。レンチウイルスは、シングル-使用アリコットsに-80 で保存した。

【 0 3 2 6 】

実施例 6 - Lipofectamine一時的発現

【0327】

HEK 293T細胞(ATCC)が、ヒト化IgGの発現をテストするために使用された。トランスフェクション前の夜、細胞は、1/3希釈(6ウェルプレート)で通過され、そして5%CO₂雰囲気下で培養された。翌日、トランスフェクションの1時間前に、抗生物質のない完全培地(10%のウシ胎仔血清を含むATCCからのDMEM高グルコース)へ変更した。トランスフェクションについて、本発明者は、メーカー指示によってLipofectamine3000(Life Technologies)及びOpti-MEM^R I還元血清培地を使用した。重鎖構築物の1.25 μg及び軽鎖構築物の1.25 μg若しくはFc融合構築物の2及び5 μgが、使用された。48hのインキュベーションの後、培地は集められ、遠心分離によって明澄化され、ヒト化IgG発現のレベルとPSMGFRペプチドへの結合を定量するためにELISA分析を実施した。

10

【0328】

実施例7 - ポリエチレンイミン(PEI)大規模一時的発現

【0329】

HEK 293T細胞(ATCC)が、Fc融合蛋白質の大規模発現に使用された。トランスフェクション前の夜、細胞は通過され(150mmの皿で6.5x10⁶細胞)、5%CO₂雰囲気下で培養する。翌日、トランスフェクションの1時間前に、細胞は、一度 PBS pH 7.4で洗浄され、そして、培地が抗生物質のない完全培地(10%の極めて低いIgGウシ胎仔血清を含んでいるATCCからのDMEM高グルコース)に変更された。トランスフェクションについて、本発明者はポリエチレンイミン「MAX」(PEI「MAX」, Polysciences)及びOpti-MEM^R I還元血清培地(Fc融合構築物の25 μgとPEIの250 μg)を使用した。72hのインキュベーション後、培地は集められ-20

20

で保存、若しくは精製のための遠心分離/濾過によって清澄化された。

【0330】

実施例8 - Jurkat細胞レンチウイルス形質導入:

【0331】

プロトコル#1:

レンチウイルスの50/50溶液(2mL)が、新鮮な培地の中で準備され、ポリブレンの8 μg/mLで補填され、そして、6ウェルプレートのウェルに加えた。Jurkat E6-1細胞(ATCC(TIB)-152)が、室温5分で1200rpmでペレット化され、新鮮な培地(10%のウシ胎仔血清及び1%のペニシリン/ストレプトマイシン/アンフォテリシンbを含んでいるRPMI)で再懸濁された。細胞は数えられ、2x10⁵細胞を、ウイルス+ポリブレン溶液を含んでいるウェルに加えた。24

30

-48hインキュベートし、新鮮な培地を加え、及び/又は細胞を分割した。72hの後、抗生物質(ピューロマイシン)選択で細胞の生育を始めた。

【0332】

プロトコル#2:

Jurkat E6-1細胞(ATCC、TIB-152)は室温5分で1200rpmでペレット化され、2.5x10⁵細胞/mL濃度で新鮮な培地(10%のウシ胎仔血清及び1%のペニシリン/ストレプトマイシン/アンフォテリシンbを含んでいるRPMI)中で再懸濁された。細胞の2mLを15mLの無菌の円錐管に加え、レンチウイルス及びTransdux感染試薬(IX、SBI)のIXを加える。優しく混合し、20分間室温でインキュベートした。32 で30分の1900rpmの遠心分離に細胞をかけ、上澄みを除き、新鮮な培地の2 mLに細胞を再懸濁し、そして、細胞を6ウェルプレートのウェルに移した。48hの後に、GFP発現について細胞を検討した。

40

【0333】

実施例9 - T細胞レンチウイルス形質導入:

【0334】

高度に精製されたT細胞(AllCells)が、室温で5分の200xgでペレット化され、新鮮な培地(10%のウシ胎仔血清及び1%のペニシリン/ストレプトマイシンを含んでいるRPMI1640)に1x10⁶細胞/mLで再懸濁された。CD3/CD28活性化剤Dynabeads(ThermoFisher, 1x10⁶細胞のために25uL)を加え、24ウェルプレートに細胞の1mLを植え付け、そして、IL2(ThermoFisher)を加える。毎日、細胞をモニターし、そして、必要ならば細胞を分ける。形質導入の前日、Retronectin(タカラ)でプレートをコートし、4 でそれを夜通し保存する。次、Retr

50

onectin溶液を除去し、そして、停止液(PBSの2%BSA)を加え、室温で3分インキュベートする。BSA溶液を除去し、そして、細胞がレディーになるまで、PBSを加える。活性化T細胞を集め、新鮮な培地中に 0.5×10^6 細胞/mLで再懸濁をした。retronectin処理プレートへ細胞の1mLを加え、IL2及びレンチウイルス溶液の1mLを加えた。細胞は、室温で90分の100Oxgでのプレートの遠心分離によって注入された。プレートは、一昼夜でインキュベータへもどした。次に、培地の1mLを除去し、ウイルスの1mLを加え、注入を繰り返した。細胞をモニターし、そして、必要な場合、 $0.5 \sim 1 \times 10^6$ 細胞/mLの密度でそれらを分けた。T細胞は、48hポスト形質導入で、サイトカイン・リリース分析若しくは細胞毒性分析に使用した。

【0335】

10

実施例10 - IL2検出

【0336】

培地中でのIL-2分泌は、ヒトIL-2 ELISAキット(Thermo Fisher)を使用して測定された。プレートは、抗-IL-2抗体(コーティング抗体、PBS中1/100)でコートされた。4での一夜のインキュベーションの後、プレートは、PBS-Tで3度洗浄され、そして、4%BSA溶液でウェル上の残りの結合部位をブロックするために添加された。室温1hの後に、プレートは、PBS-Tで一度洗浄され、そして調整培地(CM)及びPBS+4%BSAに希釈された標準化されたIL-2が加えられた。室温2hの後、プレートは、PBS-Tで3X洗浄され、PBS+4%BSA(1/100)で希釈した、抗ヒトIL-2(検出抗体)が加えられた。室温2hの後、プレートはPBS-Tで5X洗浄され、そして、Streptavidin-HRP(1/400)が加えられた。室温30分の後、プレートは、PBS-Tで7X洗浄され(1分浸し、各洗浄)、そして基質溶液が、加えられた。反応は、20分後に、停止液を加え止められ、吸光度が停止30分以内に450nm(550nmでマイナス吸光度)で読まれた。

20

【0337】

実施例11 - IFN- 検出

【0338】

培地中のIFN- 分泌は、ヒトIFN- ELISAキット(Biolegend)を使用して測定された。プレートは、抗-IFN- 抗体(捕獲抗体、コーティングバッファ-中で、1X)でコートされた。4で一夜インキュベーションの後、プレートは、PBS-Tで4回洗浄され、そして、ブロッキング液が、ウェル上の残りの結合部位をブロックするために添加された。室温(500rpmで震動)1hの後、プレートは、PBS-Tで4回洗浄され、そして、調整培地(CM)及びIFN- 標準が加えられた。振盪をしながら室温2hの後、プレートは、PBS-Tで4回洗浄され、そして検出抗体(1x)が、加えられた。振盪をしながら室温1hの後、プレートは、PBS-Tで4回洗浄され、そして、アビジンHRP(1x)が、加えられた。振盪をしながら室温30分の後、プレートは、PBS-Tで5回洗浄され(1分浸し、各洗浄)、そしてTMB基質溶液が、加えられた。反応は、20分後に、停止液を加え停止され、吸光度が停止15分以内に450nm(570nmでマイナス吸光度)で読まれた。

30

【0339】

実施例12 - CAR T細胞毒性分析

【0340】

40

ヒトT細胞は、標準プロトコルによって全血から分離された。その後、T細胞は、GFPタグをもつCAR構築物を担持するレンチウイルスで、別々に2度形質導入された。RPMI 10%FBS及びIL-2中で2-3日間の培養に続いて、細胞は、MN-E6、MN-C2、MN-C3及びMN-C8の表面発現をラベルするために、F(ab')₂で染色された。その後、細胞は、Fab陽性、GFP陽性細胞のための流動細胞計測法によってソートされた。それは、2重陽性の個体群が、挿入されたCARを持ち、CARが正確な抗体断片を露出したことを意味する。CAR T細胞は、そのとき、MUC1*陰性コントロール細胞若しくは標的MUC1*陽性癌細胞と混合される準備ができる。

【0341】

標的細胞は以下のように準備された:

標的細胞を得、そして $1 \sim 1.5 \times 10^6$ 細胞/mLで、CMTMr染料(Cell Tracker Orange、5-and-6-

50

4-クロロメチル・ベンゾイル・アミノテトラメチルローダミン、Thermo Fisher)の15 μ Mを含んでいる無血清培地に細胞を再懸濁する。特別の細胞型に適切な増殖条件の下で30分インキュベーション。培地中で洗浄し、新しいチューブに染色された細胞を移し、培地中で細胞を60分インキュベートする。過剰の染料をすべて取り除くために培地中でさらに2回洗浄する。0.5mlの培地全容積をもった24ウェルプレートで、分析をセット・アップした。標的細胞(及びコントロール標的細胞)を再懸濁し、その結果、1つのウェルあたり20,000個の細胞が常にある(20,000細胞/250 μ l)。各々のウェルに250 μ lを置く。T細胞の250 μ lを加え、その結果、T細胞:標的細胞の比率は、20:1、10:1、5:1、若しくは1:1となる。24h及び72hの後に細胞を分析する。懸濁標的細胞については、ウェルから0.5mlの培地を取り、チューブに置き、0.5mlの培地若しくはPBSでウェルを洗浄する。付着標的細胞については、ウェルから0.5mlの培地を取り、チューブに置き、0.5mlのPBSでウェルを洗浄する。PBSを同じチューブに加え、120 μ lトリプシンをウェルに加える。4分間インキュベートし、次いで、トリプシンを中和するために0.5mlの培地を加え、そして同様にチューブにそれを置く。細胞を回転させ、100 μ l FACSバッファー中にペレットを再懸濁する。再び細胞を回転させる。氷で30分間、100 μ l バッファー+ 5 μ l 抗CD3抗体に、細胞を再懸濁する(T細胞を染色するため)。30分後、FACSバッファーで染色された細胞を2x洗浄し、そして250 μ l バッファーに再懸濁された。FACSチューブのフィルタ・キャップを通過して細胞を走らせる。分析に先立って10分、10 μ l 7AAD染料を各チューブに加え、細胞毒性銻型によりFortessaで分析した。

10

【0342】

20

実施例13 - ヒト化IgGのELISA発現レベル

【0343】

ヤギ抗ヒトFc特異抗体を0.1M炭酸塩/重炭酸塩バッファーpH 9.6で5 μ g/mLに希釈し、そして、50 μ Lが、96ウェルプレートの各々のウェルに加えられた。4 での一夜インキュベーションの後、プレートは、PBS-Tで2度洗浄し、そして、3%BSA溶液がウェル上の残りの結合部位をブロックするために添加された。室温1hの後、プレートは、PBS-Tで2度洗浄され、PBS-T+1%BSAで希釈された調整培地(CM)が異なる濃度で加えられた。さらに、PBS-T+1%BSAで希釈された、精製ヒトIgG(Life Technologies)が、ヒト化IgG若しくはFc融合蛋白質の発現レベルの決定のための、標準曲線を作るために、異なる濃度で加えられた。室温1hの後、プレートは、PBS-Tで3x洗浄され、PBS-T+1%BSAで希釈した、抗ヒト(H+L)HRP(Life Technologies)が、1/2500で加えられた。室温1hの後、プレートは、PBS-Tで3x洗浄され、ヒトIgG及びヒト化IgGの結合が、ABTS溶液(ThermoFisher)を使い、415nmで測定された(図9(MN-E6)及び図11(MN-C2))。

30

【0344】

実施例14 -MUC1*細胞外ドメインのPSMGFRペプチドへのELISAヒト化IgG結合

【0345】

配列PSMGFRの合成ペプチドは、Imjectマレイミド活性化BSAキット(Thermo Fisher)を使用して、BSAに共有結合でつないだ。BSA結合PSMGFRは、0.1M炭酸塩/重炭酸塩バッファーpH 9.6で、7.5 μ g/mLに希釈し、そして、50 μ Lが、96ウェルプレートの各ウェルに加えられた。4 での一夜インキュベーションの後、プレートは、PBS-Tで2度洗浄し、そして、3%BSA溶液が、ウェル上の残りの結合部位をブロックするために添加された。室温1h後、プレートは、PBS-Tで2度洗浄し、PBS-T+1%BSAで希釈された、調整培地(CM)が、異なる濃度で加えられた。同時に、相応するマウスIgGが、PBS-T+1%BSAで希釈され、結合コントロールとして異なる濃度で加えた。室温1h後に、プレートは、PBS-Tで3度洗浄し、そして、PBS-T+1%BSAで希釈した、抗ヒト(H+L)HRP(Life Technologies)が、ヒト化IgGの結合を検出するために1/5000で加えた。PBS-T+1%BSAで希釈した、抗マウスHRP(Life Technologies)が、マウスIgGの結合を検出するために1/2500で加えた。室温1h後、プレートは、PBS-Tで3x洗浄され、そして、結合は、ABTS溶液(ThermoFisher)を使用して、415nmで測定された(図8(MN-E6)及び図10(MN-C2))。

40

【0346】

50

実施例 15 - 安定細胞株の生成

【0347】

CHO-K1細胞(ATCC)が、ハイ・レベルのヒト化IgGを発現する安定した細胞株を調製するために使用された。HEK293細胞(ATCC)が、ハイ・レベルのFc融合蛋白質を発現する安定した細胞株を調製するために使用された。トランスフェクション前夜、細胞は、1/3希釈(6wellプレート)そして5%CO₂雰囲気下での培養におかれた。翌日トランスフェクションの1時間前に、培地は、抗生物質のない完全培地(10%ウシ胎仔血清を含むF12KまたはDMEM)へ変更した。トランスフェクションについては、本発明者はメーカー指示によってLipofectamine 3000(Life Technologies)及びOpti-MEMR1還元血清培地を使用した。重鎖構築物1.25 μg及び軽鎖構築物1.25 μg構築物若しくはFc融合構築物2.5 μgが使用された。24h後、細胞は、トリプシン処理され、そしてT75フラスコ(10%ウシ胎仔血清を含んでいるF12KまたはDMEM中で)中に置かれた。24h後、細胞は、トリプシン処理され、10%FCS及び選択剤(pSECTag2のためのZeocin若しくはpCDNA 3.1 V5のためのG418)を含んでいるF12KまたはDMEM中で100個細胞/mL及び1000個細胞/mLに希釈され、そして96ウェルプレートに置かれ(ウェルあたり100 μL)、そして5%CO₂雰囲気下で培養する。2-3週後に、単一のクローンからの培地は集められ、遠心分離によって澄清化され、PSMGFRペプチドへの結合及びヒト化IgG発現のレベルの定量のためにELISA分析した。最も高い発現及びPSMGFR結合をもったクローンは、大規模発現のために拡張した。

10

【0348】

実施例 16 - scFV発現:

20

【0349】

pET21b E6 scFVプラスミド(HisTagまたはStrepTagIIをもつ)が、Shuffle T7 発現適応性細胞(NEB)に、形質転換された。TBプロス(テリフィックプロス)は、一夜培養(LBプロス30-200rpm)の1/100で植え付けられ、30 /200rpmで培養された。OD600が~1に達した時、温度は、20 に下げられ、そして、増殖が継続された。2h後に、組換え型タンパク質発現が、0.2mMイソプロピル-D-チオ-ガラクトシド(IPTG、GoldBiotechnology)で引き起こされ、そして、培養は22h後に止められた。遠心分離(4 で10分間6000rpm)によって細胞を収穫した後に、細胞ペレットは、ランニングバッファーで再懸濁された。Histagについては、タンパク質バッファーは次のとおり:50mMトリスpH8.0、300mM NaCl及び5mMイミダゾール。StrepTagIIについては、タンパク質バッファーは、100mMトリスpH 8.0及び150mM NaClであった。

30

【0350】

実施例 17 - HisTag EscFV精製:

【0351】

MgCl₂(0.5mM)、DNAse(0.5 μg/mL、シグマ)、PMSF(1mM、GoldBitotechnology)及びBugBuster(IX、Novagen)が、加えられた。細胞懸濁液は、室温で、回転platform上で20分間インキュベーションされた。不溶性の細胞デブリsが、遠心分離(4、30分間20000rpm)によって除去された。その後、透明溶解液は、ランニングバッファーで平衡化されたNi-NTAカラム(Qiagen)に適用された。カラムは、495mMイミダゾールで補充されたランニングバッファーで、カラムからタンパク質を溶出する前に、洗浄された。タンパク質は、サイズ排除クロマトグラフィー(Superdex 200)によってさらに精製された。タンパク質を含んでいる分画は、プールされ、分割され、-80 で保存された。

40

【0352】

実施例 18 - StrepTagII EscFV精製:

【0353】

MgCl₂(0.5mM)、DNAse(0.5 μg/mL、シグマ)、PMSF(1mM、GoldBitotechnology)及びBugBuster(IX、Novagen)が、加えられた。細胞懸濁液は、室温で、回転platform上で20分間インキュベーションされた。不溶性の細胞デブリsが、遠心分離(4、30分間20000rpm)によって除去された。その後、透明溶解液は、ランニングバッファーで平衡化されたStrep-Tactinカラム(IBA)に適用された。カラムは、5mM d-Desthiobiotinで補充されたランニング

50

バッファーで、カラムからタンパク質を溶出する前に、洗浄された。タンパク質は、サイズ排除クロマトグラフィー(Superdex 200)によってさらに精製された。タンパク質を含んでいる分画は、プールされ、分割され、-80 で保存された。

【0354】

実施例19 - ヒト化IgG/Fc融合物精製:

【0355】

条件培地(一時的なトランスフェクション若しくは安定した細胞株からの)が集められ、遠心分離と濾過によって明澄化された(0.2 μm)。その後、培地は、プロテインAまたはCaptureSelectのFcXL(Genscript)(Thermo Fisher)に充填され、該蛋白質は、溶出のための酸性条件を使用して、メーカー指示法によって、精製した。その後、溶出されたタンパク質は、PBS pH 7.4に対して透析され、サイズ排除クロマトグラフィー(Superdex 200)によってさらに精製された。タンパク質を含んでいる分画は、集められ、分離されそして-80で保存された。

10

【0356】

実施例20 - 免疫組織化学

【0357】

ヒト組織標本はBiomaxから購入された。組織は、委員会認証病理学者によって決定された、正常若しくは癌であった。組織は、匿名化されたが、数字、組織タイプ、癌の病期、また利用可能な場合、TNM腫瘍等級指定でラベル化された。TNM等級は以下のとおりである:

20

Tは、原発腫瘍である。Txは、評価できない、原発腫瘍である。T0は、腫瘍の証拠はない。これは、元々の位置、上皮内、又は固有層侵入の癌腫である。T1は、粘膜下組織に侵入する腫瘍である。T2は、筋固有層に侵入する腫瘍である。T3は、筋固有層を経て、漿膜下組織へ、又は非腹膜被覆化結腸周囲組織若しくは直腸周囲組織に侵入する腫瘍である。T4は、直接、他の器官若しくは構造及び/又は貫通内臓腹膜へ侵入する腫瘍である。Nは、所属リンパ節である。NOは、非所属リンパ節転移である。N1は、1~3つの所属リンパ節での転移である。N2は、4つ以上の所属リンパ節での転移である。Mは、遠隔転移である。M0は、非遠隔転移である。M1は、遠隔転移である。

【0358】

組織は、一次抗MUC1*抗体マウス単クローンMN-C2、MN-E6、ヒト化MN-E6 scFv-Fc、若しくはヒト化MN-E6 scFv-Fcビオチンで染色された。もし、一次がマウス単クローン抗体だった場合、使用された二次抗体は、ウサギ抗マウスHRP結合抗体であった。一次が、ヒト化抗体だった場合、二次はヤギ抗ヒトHRP結合抗体であった。一次が、ビオチン化された抗体だった場合、二次は、streptavidin HRP結合抗体であった。

30

【0359】

組織標本は、標準プロトコルによって、キシレン及びエタノールを使い脱パラフィン化された。抗原検索手法は、10mMクエン酸ナトリウム-0.05%トゥイーンpH 6緩衝液(予め緩衝液はボイルされ暖かく維持)を含むいくつかの組織に使用され、10'沸騰、炊飯器中で20'冷却、その後、そのとき冷生水を5分間すすぎ、TBSで5分間2度の洗浄する。組織は、TBS中に10%NGS+5%BSAで、室温で1時間ブロックされた。もし使用された一次抗体が、ヒト化MN-E6scFv、それは2次抗体によって視覚化することができるようにそれはビオチンに結合する、であった場合、組織は、アビジン溶液で、そしてビオチン溶液で、予備ブロックされた。一次抗体は、温和な軌道の回転で、1%BSA-TBSで4 で組織と夜通しインキュベートされた。組織は、温和な振動で、5分間TBS-Tでリンスされた。HRP結合検出のみについては、マウントされた組織が、室温で15分間、TBS中3% H_2O_2 でインキュベートされた。ビオチン化一次抗体でインキュベートされた組織のためには、それらはStreptavidinHRPラベル(Biocare Cat#: HP604 G、H、L)で10分間StreptAvidin中でつけられ、次に、温和な振動で、TBS-Tで、室温5分間3回洗浄された。その後、それらは室温で5分間クロモゲン(DAB-1mL希釈剤; 1ドロップDAB基質)で展開され、次に、5分間ランニングタップ水でリンスされた。その後、それらは、1秒間、ヘマトキシリン、ついで0.08% NH_4OH Bluing Reage

40

50

nt"に短時間浸し、ついでランニング水(流水)で5分処理し、カウンター染色された。その後、組織は脱水され、Cytoseal XYL(1ドロップ/秒)でマウントされカバーガラスをかけた。

【0360】

ここに引用された参照のすべて内容は、参照によって本発明の開示に挿入されている。

【0361】

当業者は、ここに具体的に記述された発明の特異的な実施態様への多くの均等物を、ルーチンの実験より以上をすることなく、認識し、確認することができる。

【図1】

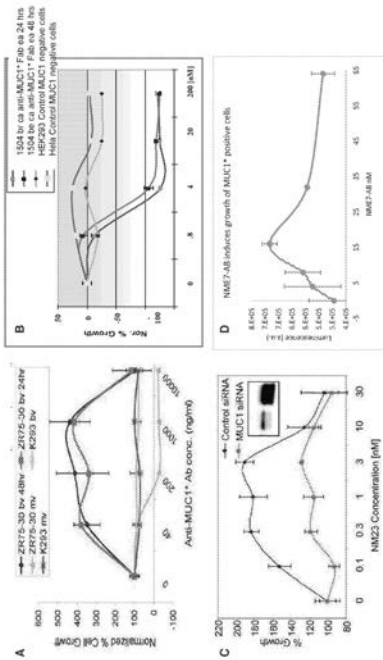


Figure 1

【図2】

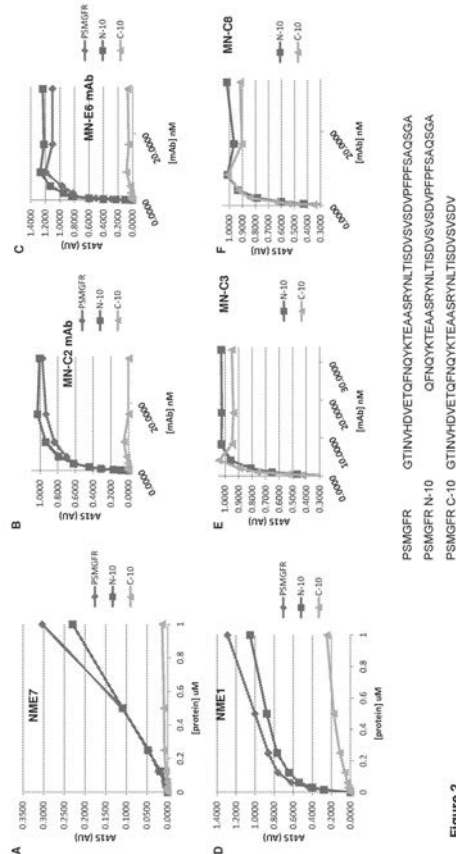


Figure 2

【 3 】

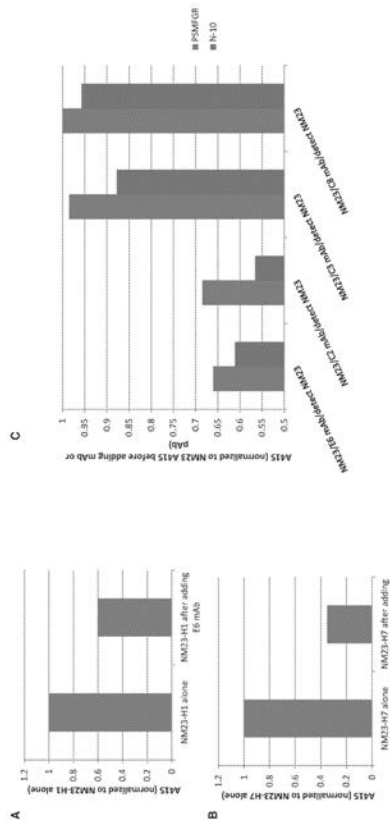


Figure 3

【 5 】

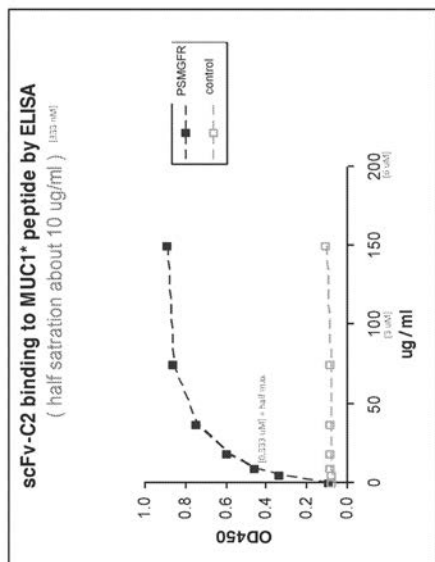


Figure 5

【 4 】

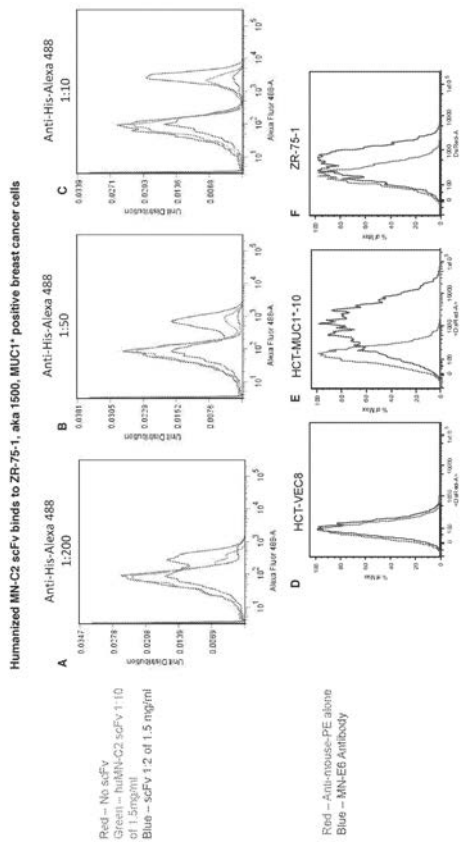


Figure 4

【 6 】

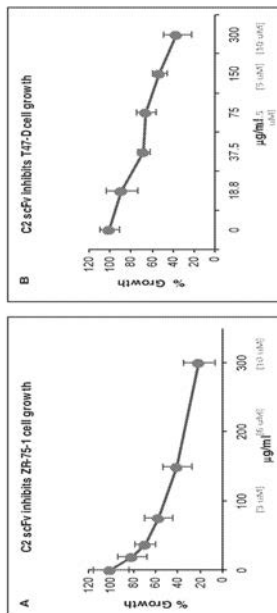


Figure 6

【 7 】

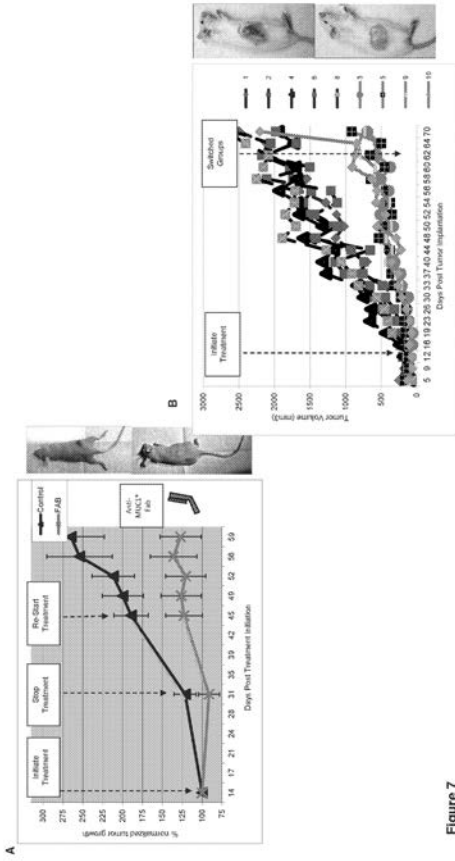


Figure 7

【 8 】

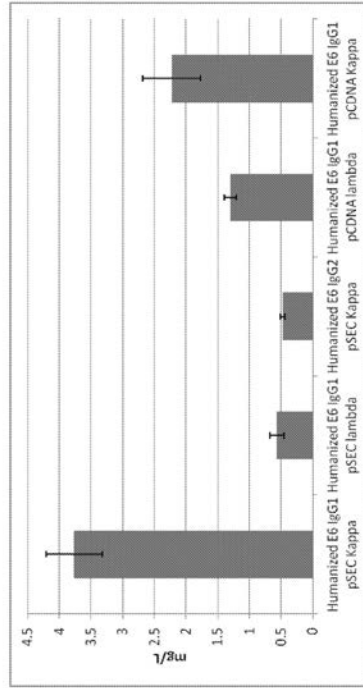


Figure 8

【 9 】

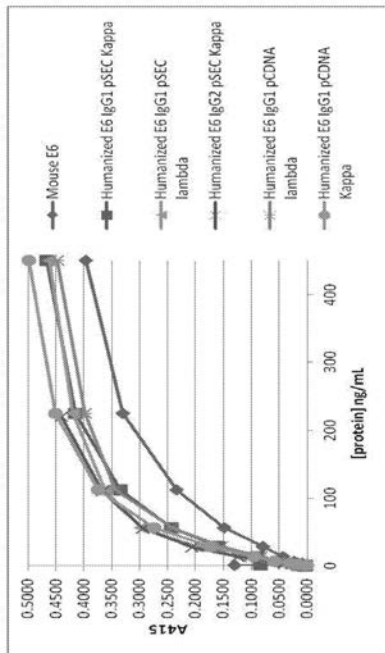


Figure 9

【 10 】

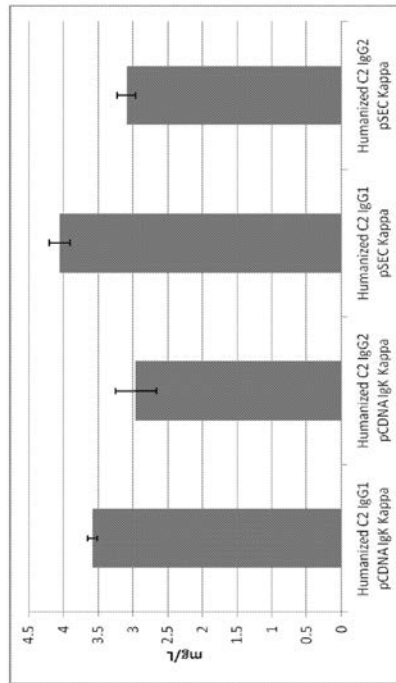


Figure 10

【 1 1 】

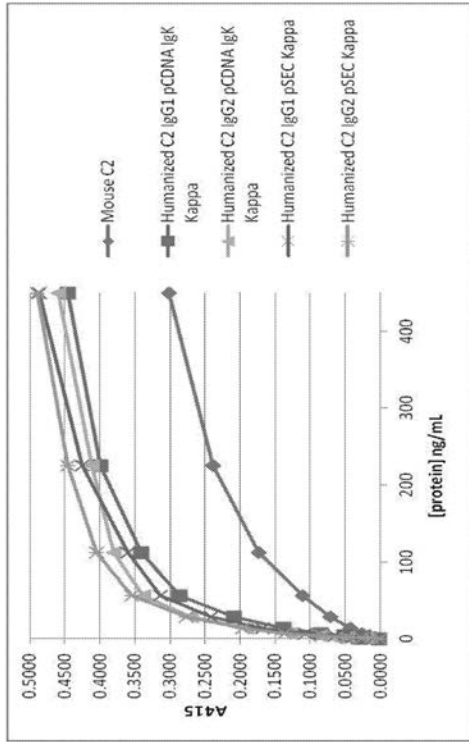


Figure 11

【 1 2 】

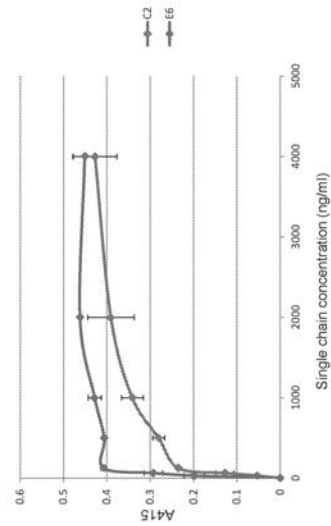


Figure 12

【 1 3 】

E6 scFv Fc-Fusion Protein A purification – Ultra low IgG FBS

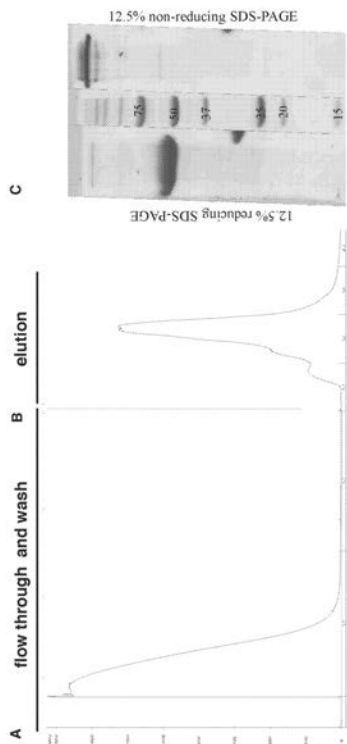


Figure 13

【 1 4 】

Purified E6 scFv-Fc with mutations in CH3 domain of Fc

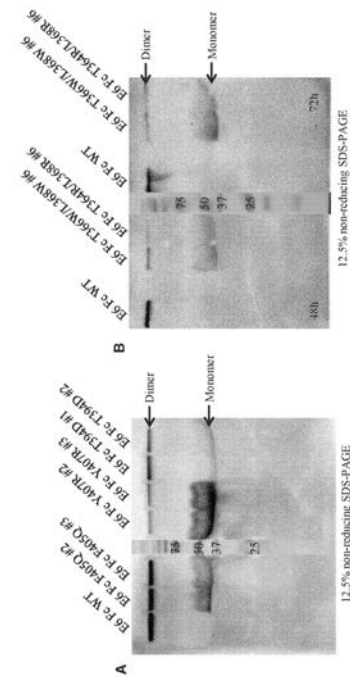


Figure 14

【 15 】

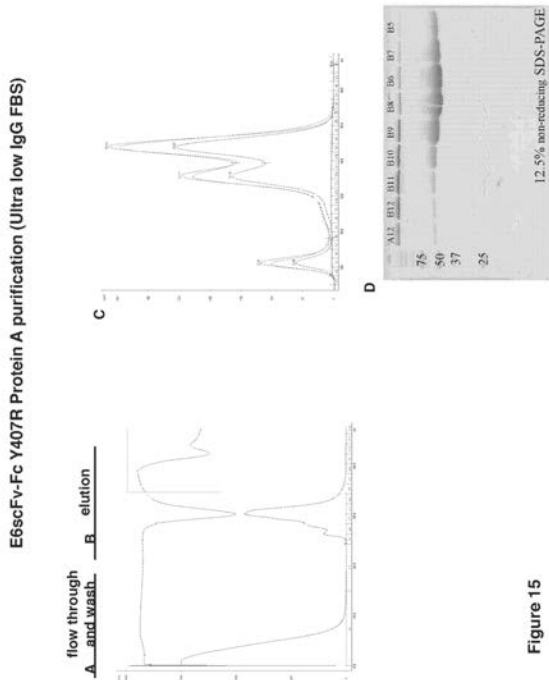


Figure 15

【 16 】

Western Blot of E6 scFv Fc-mutant (hingeless) transfection in HEK 293 T cells (48 hrs)

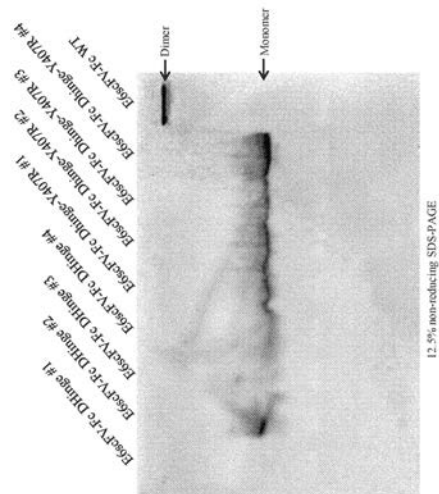


Figure 16

【 17 】

E6scFv-Fc Hingeless Capture Select FcXL purification

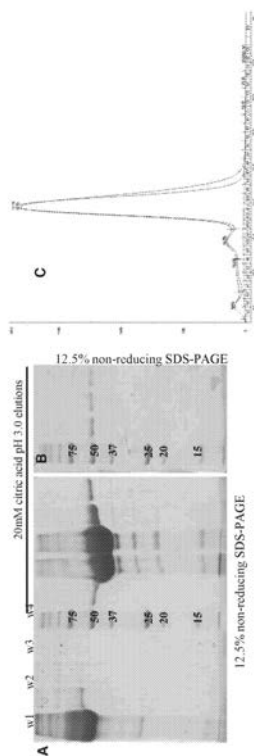


Figure 17

【 18 】

C3scFv-Fc Capture Select FcXL purification

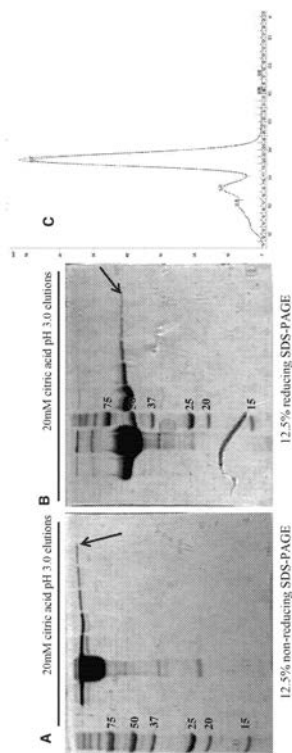


Figure 18

【 19 】

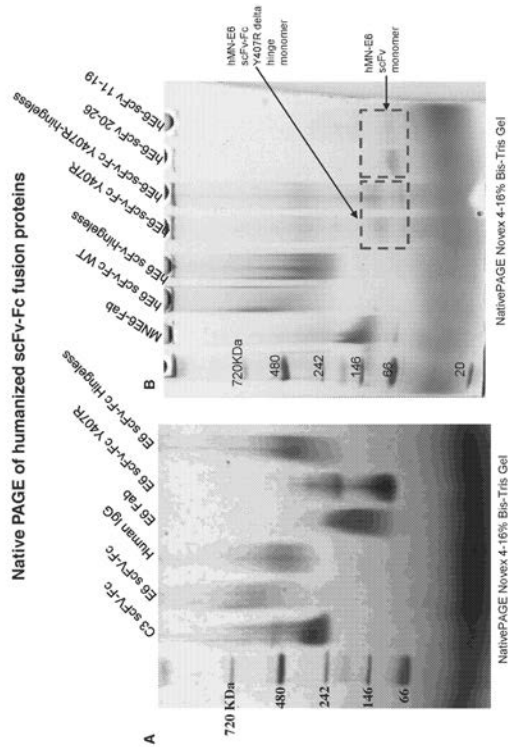


Figure 19

【 20 】

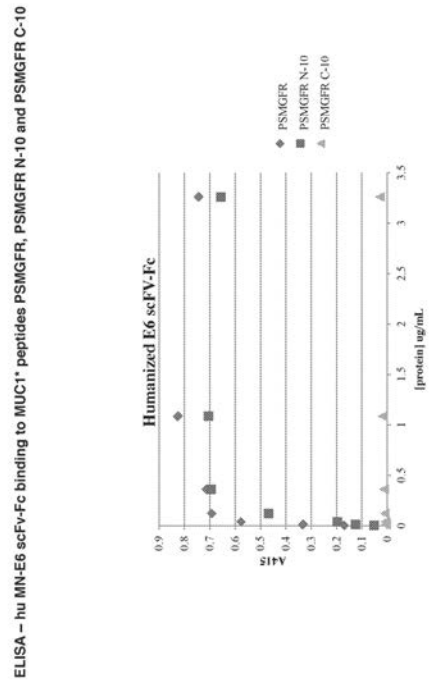


Figure 20

【 21 】

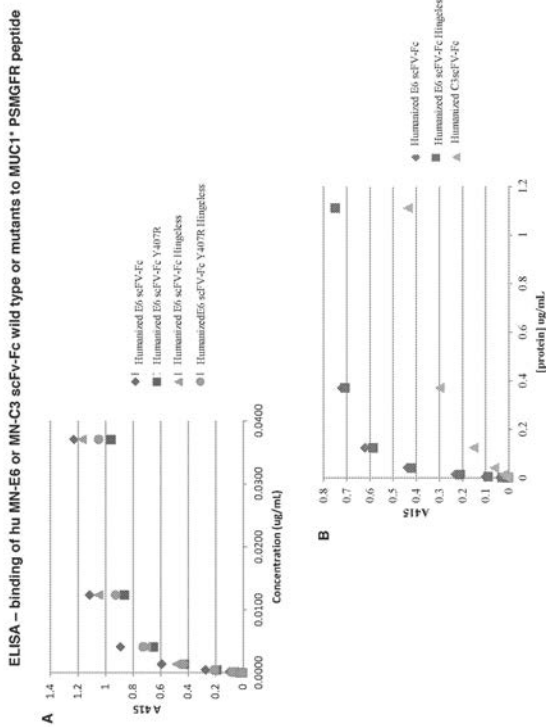


Figure 21

【 22 】

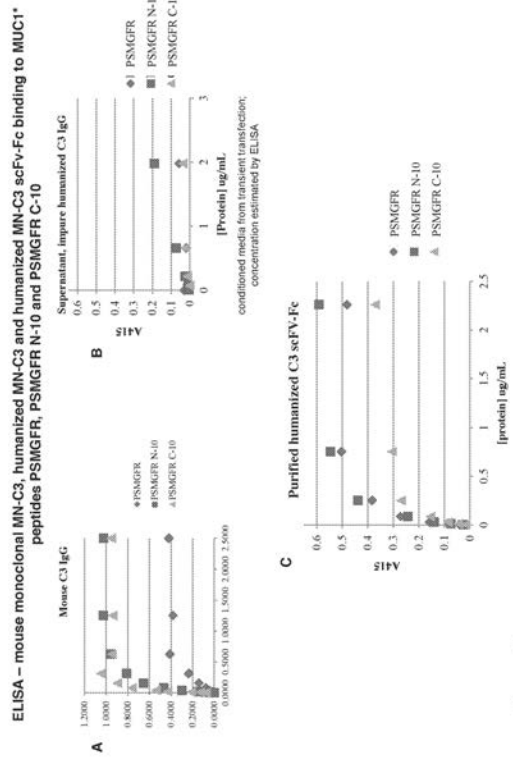


Figure 22

【 2 3 】

ELISA assay quantifies binding of humanized MN-E6 scFv-Fc-delta hinge, aka hingeless, and humanized MN-E6 scFv to the MUC1* peptide PSMGFR

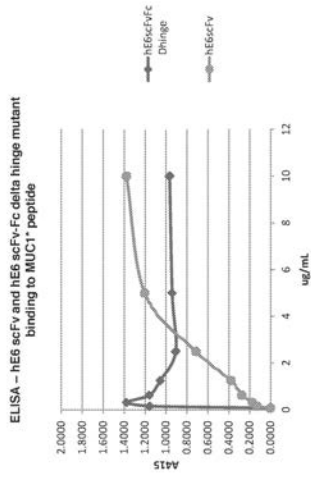


Figure 23

【 2 4 】

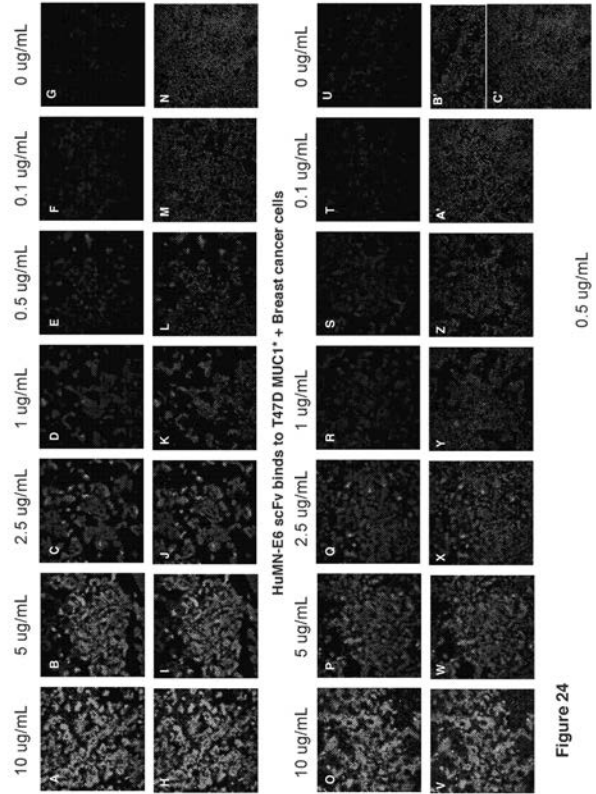


Figure 24

【 2 5 】

Humanized MN-E6 scFv inhibits growth of MUC1* positive cancer cells in a concentration dependent manner; shown are 1500 MUC1* + breast cancer cells

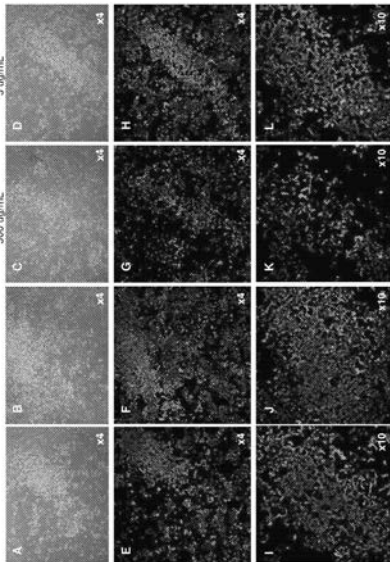


Figure 25

【 2 6 】

Humanized MN-E6 scFv mutants inhibit growth of MUC1* positive breast cancer cells in a concentration dependent manner; shown are 1500 MUC1* + breast cancer cells

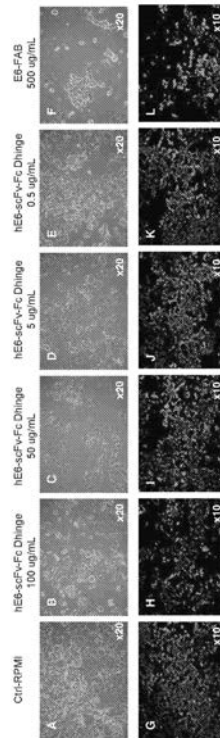


Figure 26

【 2 7 】

Image analysis that uses pixel counting/pixel fluorescence intensity quantifies growth inhibition of MUC1⁺ positive cancers by MN-E6, humanized MN-E6 scFv-Fc-delta hinge, aka hingeless, and humanized MN-E6 scFv

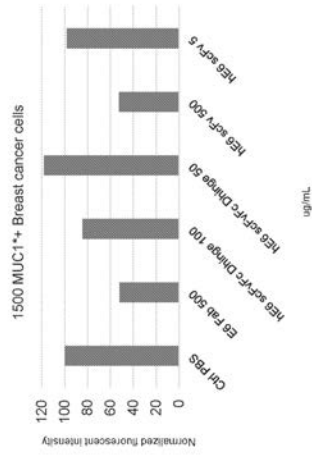


Figure 27

【 2 8 】

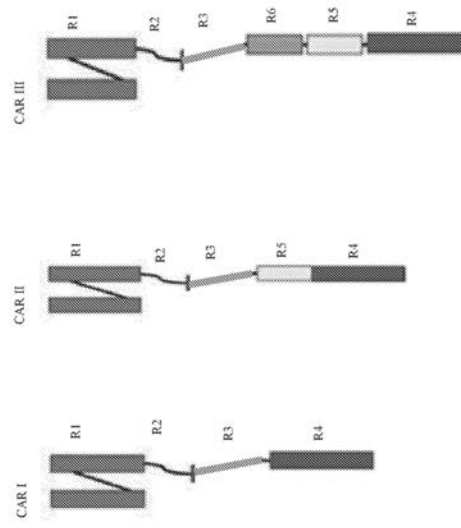


Figure 28

【 2 9 】

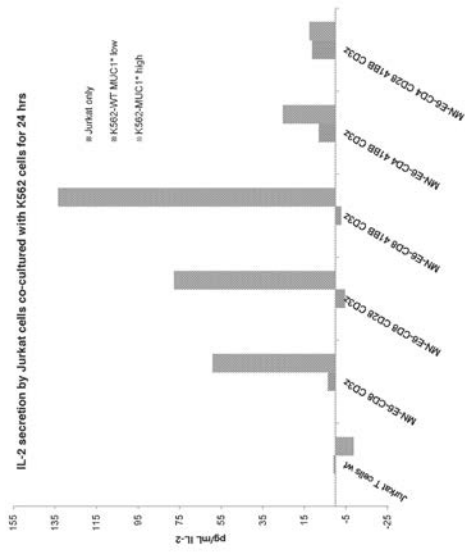


Figure 29

【 3 0 】

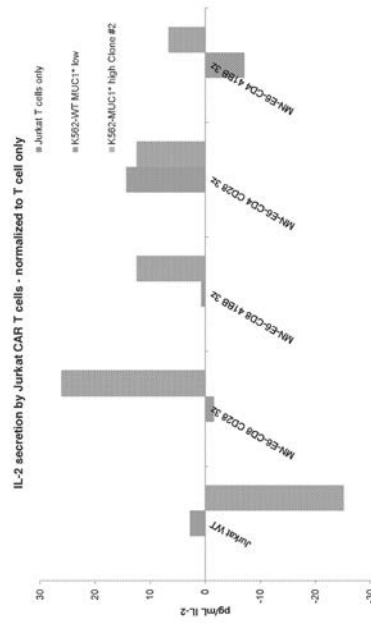
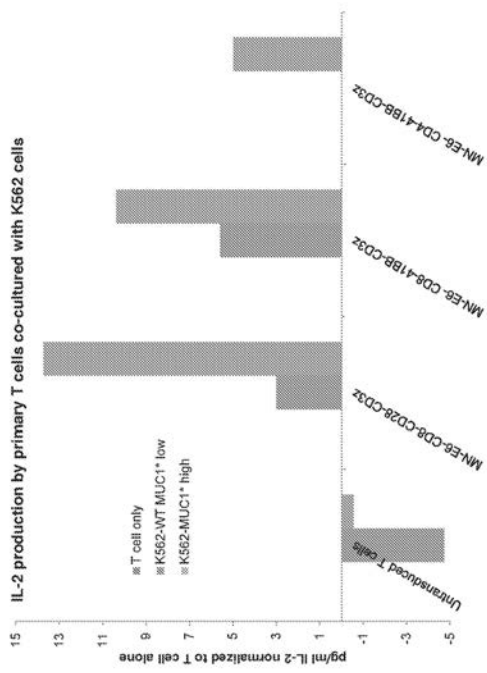


Figure 30

【 3 1 】



【 3 2 】

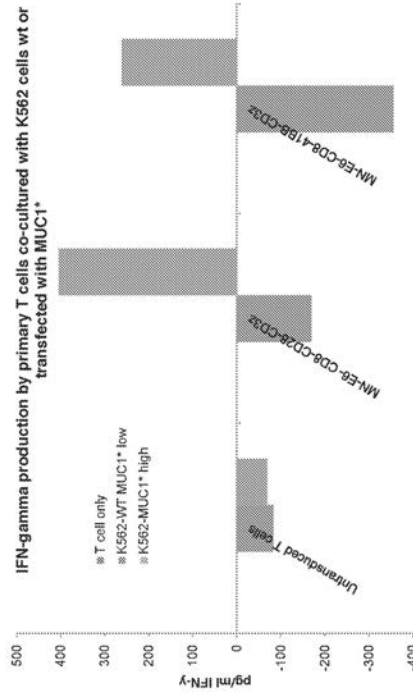


Figure 31

Figure 32

【 3 3 】

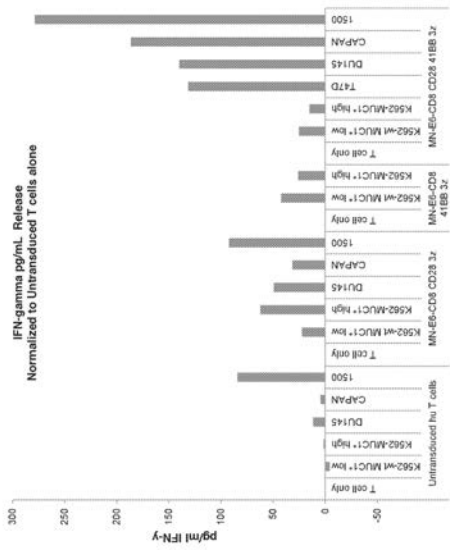


Figure 33

【 3 4 】

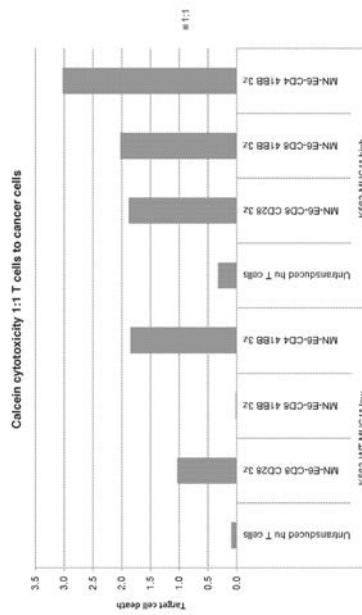


Figure 34

【 3 5 】

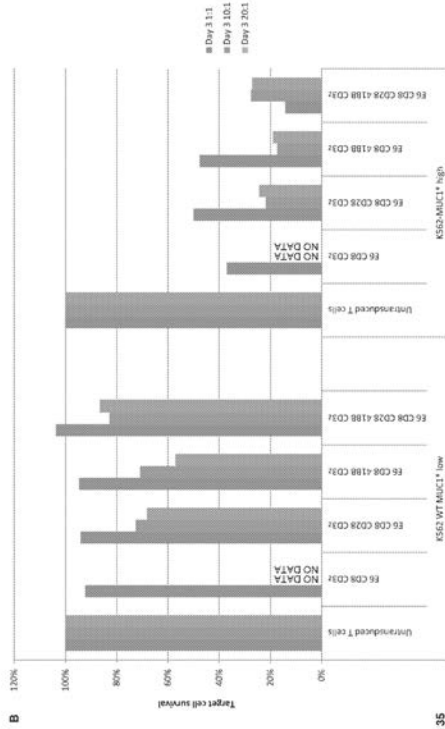


Figure 35

【 3 6 】

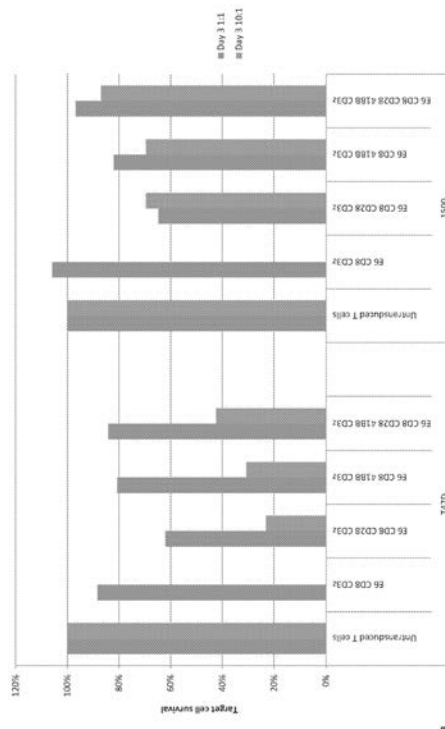


Figure 36

【 3 7 】

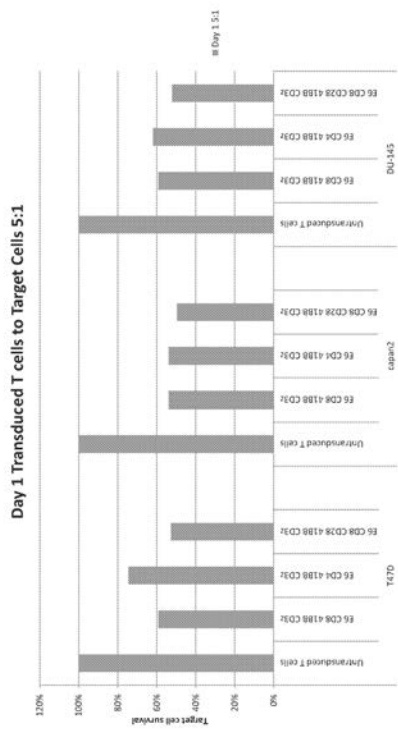


Figure 37

【 3 8 】

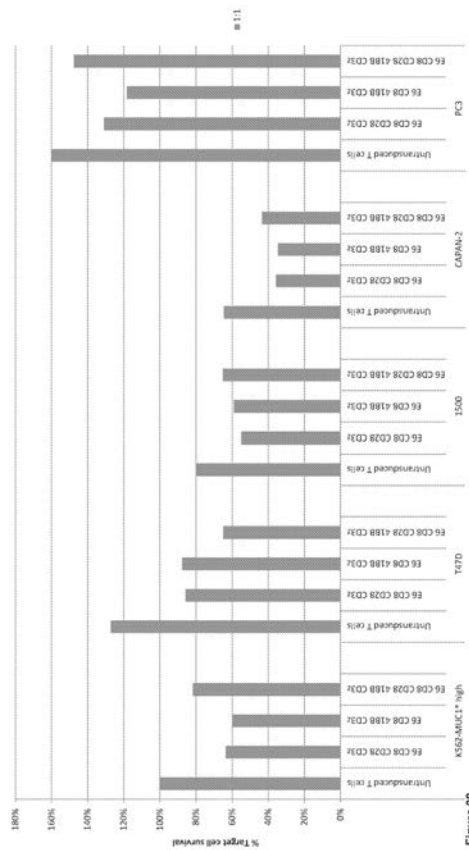


Figure 38

【 3 9 】

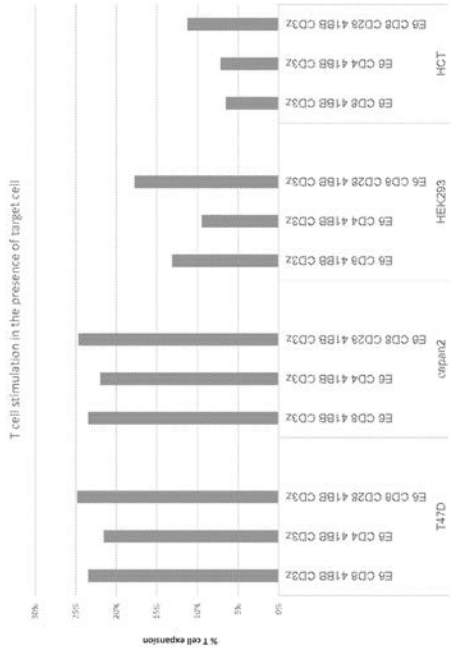


Figure 39

【 4 0 】

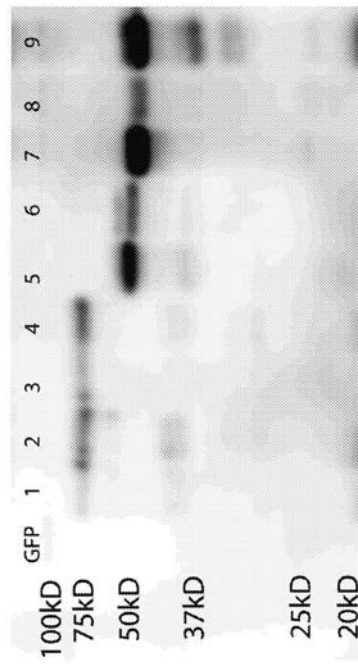


Figure 40

【 4 1 】

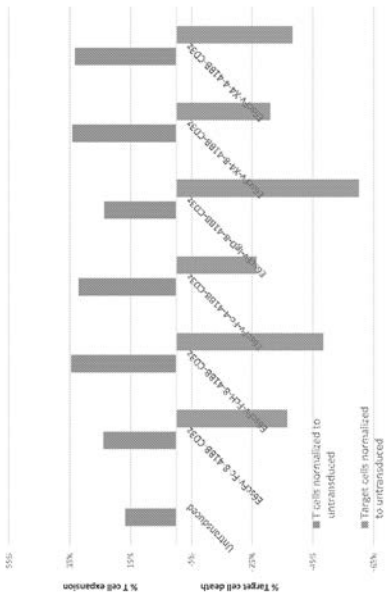


Figure 41

【 4 2 】

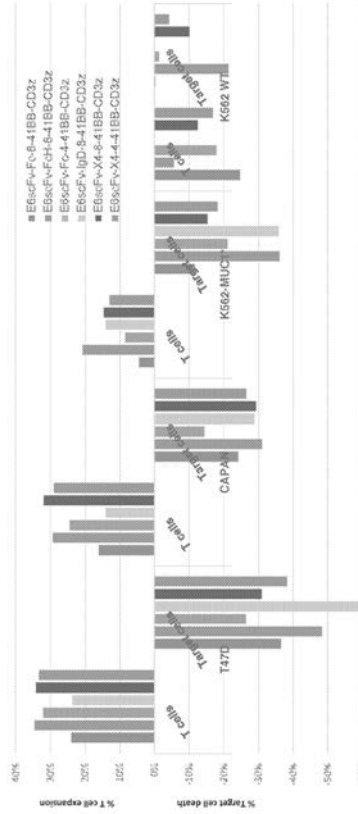


Figure 42

【 4 3 】

Tissue arrays comprising specimens from 240 breast cancer patients were stained with an antibody (VU4H5) that recognizes full-length MUC1 (left) or stained with an antibody that recognizes MUC1* (MN-C2). The data show that most or all (green boxes) of the MUC1 on cancerous tissue is MUC1* and not MUC1 full-length (MUC1-FL). The data further show that MN-C2 monoclonal antibody binds to cancerous tissue but not the healthy control tissue.

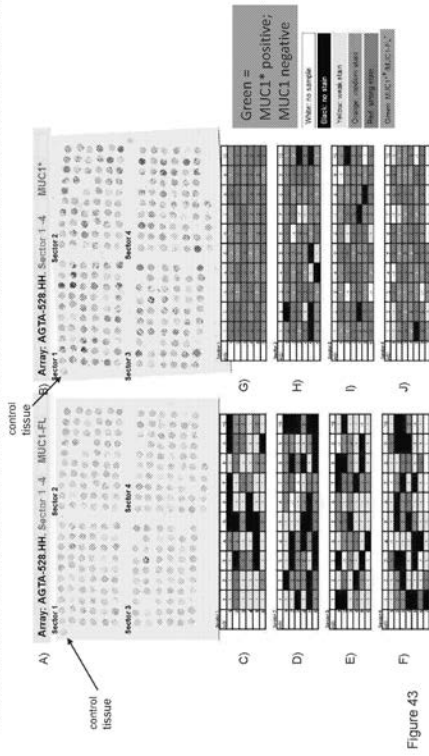


Figure 43

【 4 4 】

Tissue arrays comprising specimens from 240 breast cancer patients were stained with an antibody (VU4H5) that recognizes full-length MUC1 (left) or stained with an antibody that recognizes MUC1* (MN-C2). The data show that most or all (green boxes) of the MUC1 on cancerous tissue is MUC1* and not MUC1 full-length (MUC1-FL). The data further show that MN-C2 monoclonal antibody binds to cancerous tissue but not the healthy control tissue.

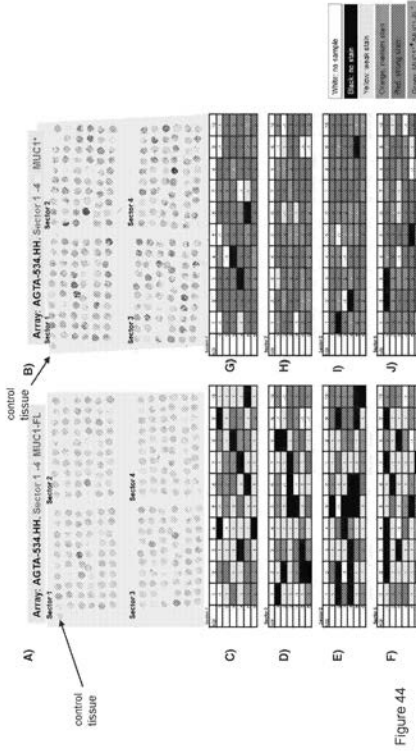


Figure 44

【 4 5 】

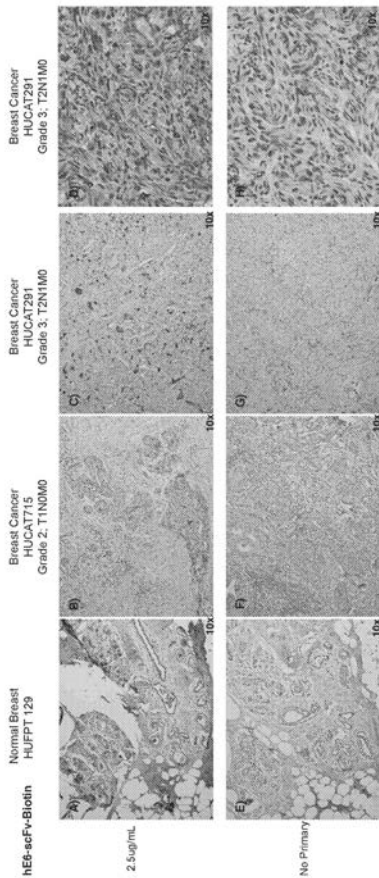


Figure 45

【 4 6 】

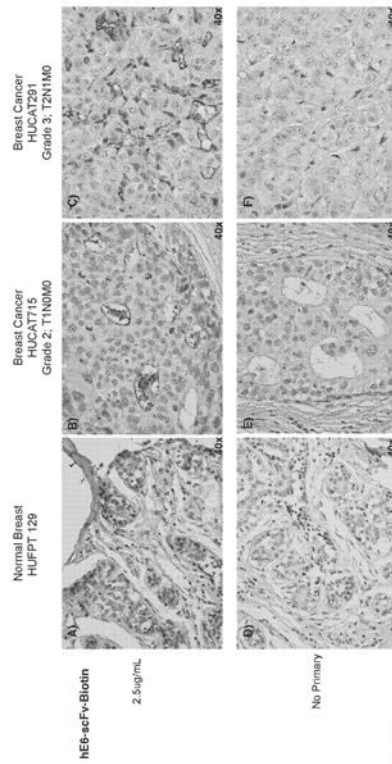


Figure 46

【 47 】

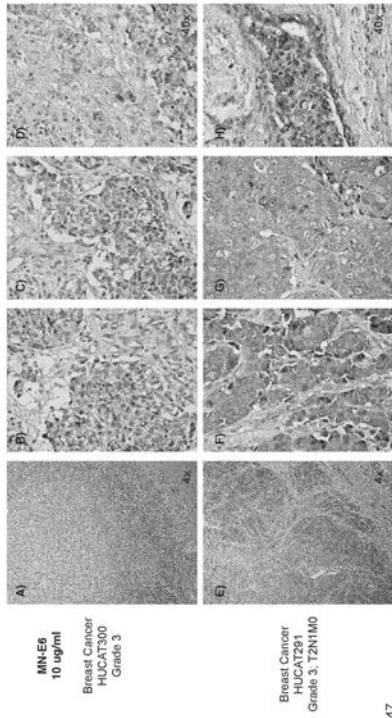


Figure 47

【 48 】

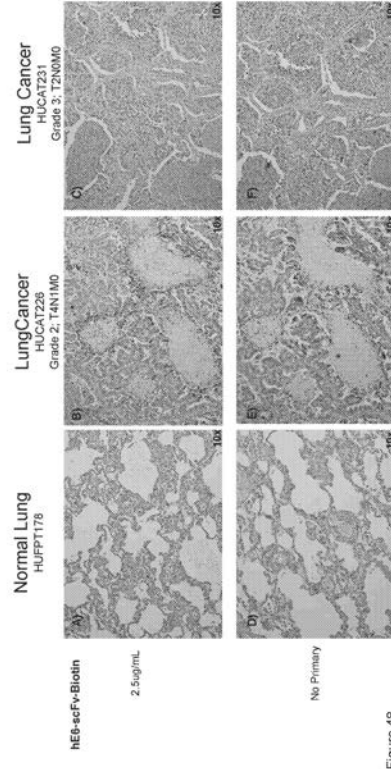


Figure 48

【 49 】

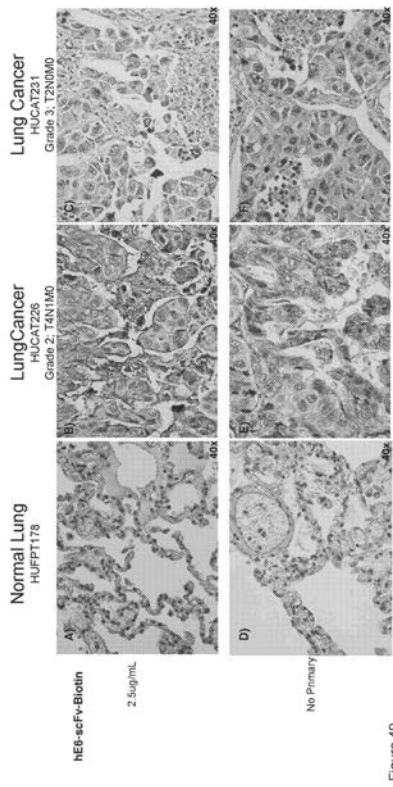


Figure 49

【 50 】

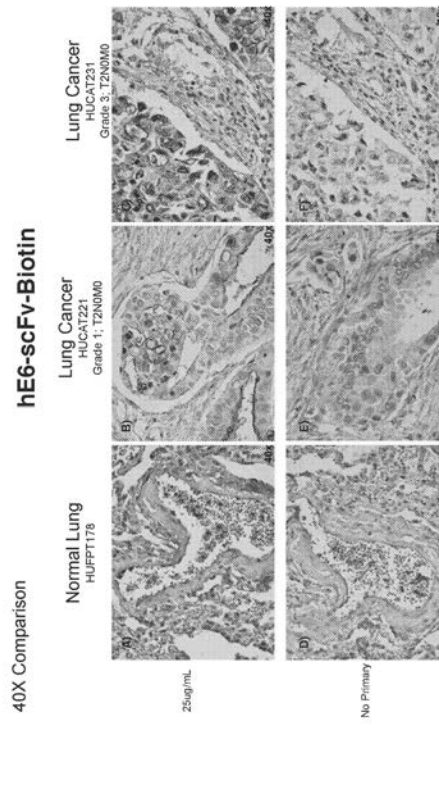


Figure 50

【 5 1 】

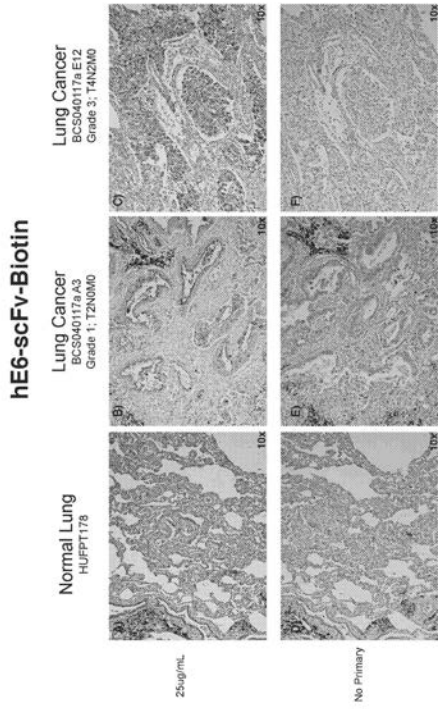


Figure 51

【 5 2 】

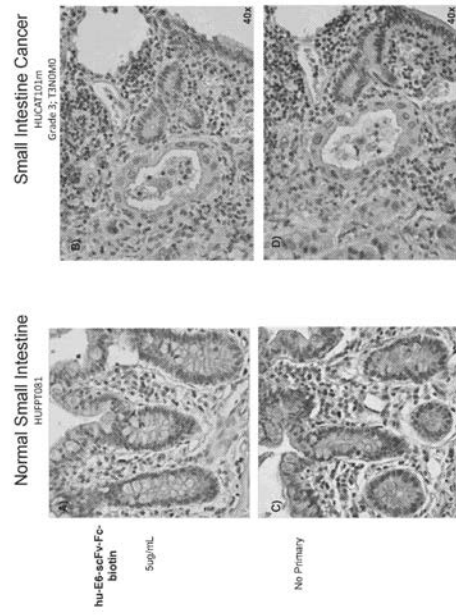


Figure 52

【 5 3 】

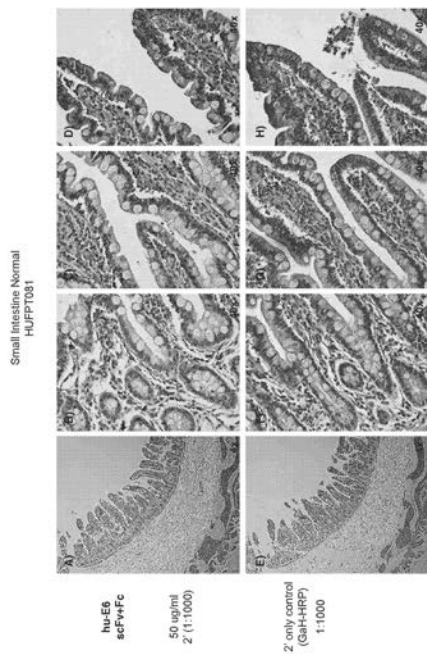


Figure 53

【 5 4 】

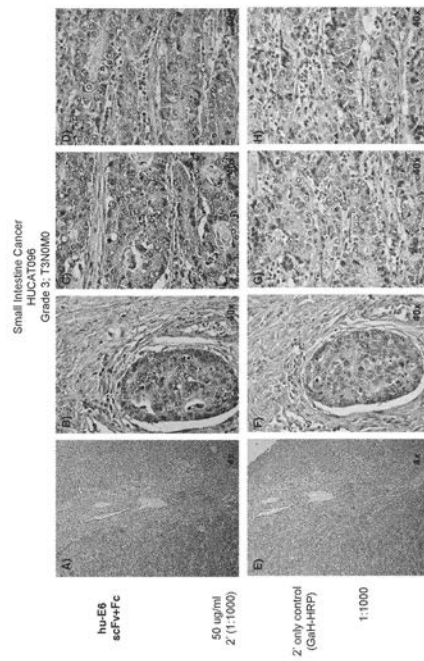


Figure 54

【 5 5 】

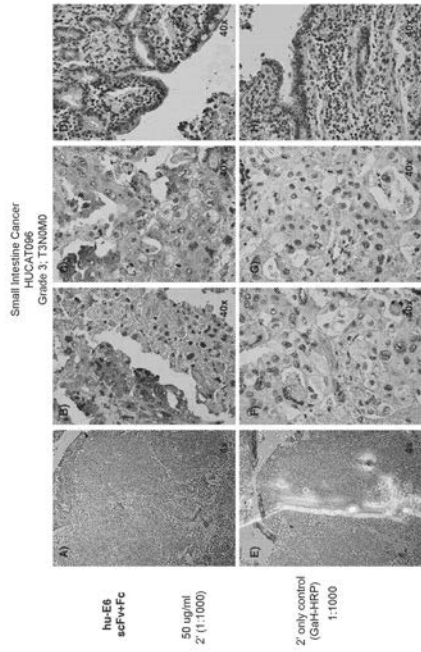


Figure 55

【 5 6 】

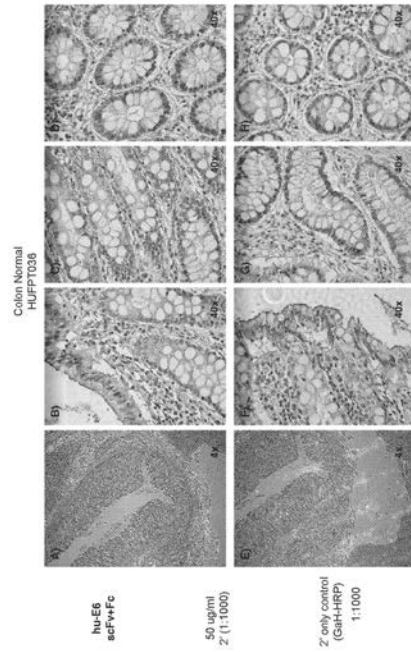


Figure 56

【 5 7 】

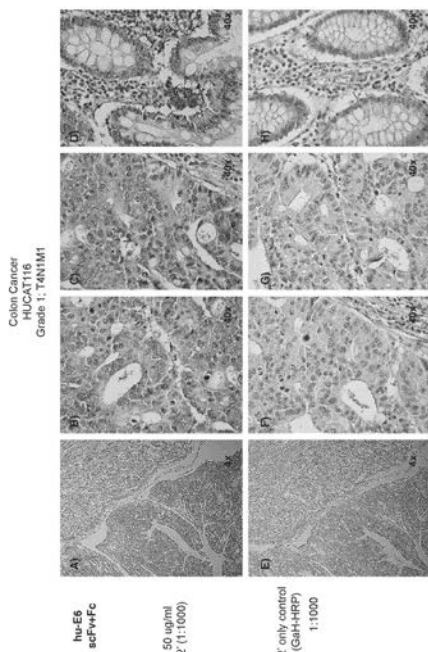


Figure 57

【 5 8 】

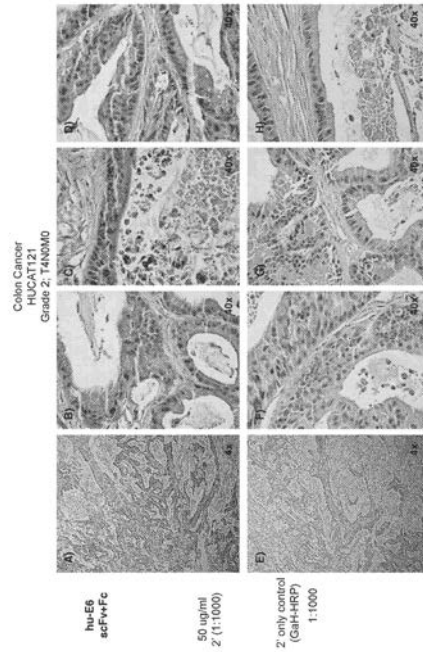


Figure 58

【 5 9 】

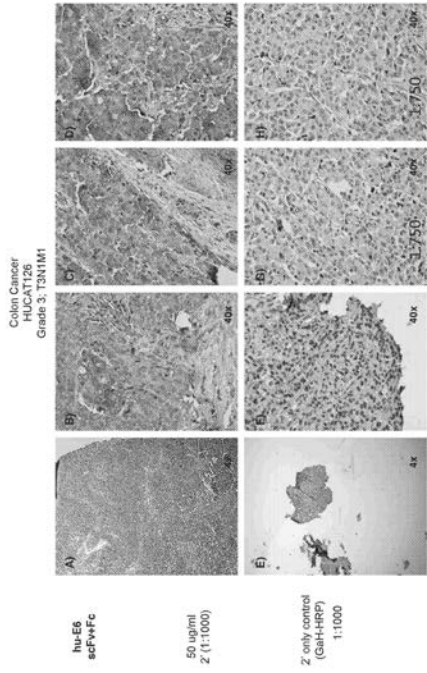


Figure 59

【 6 0 】

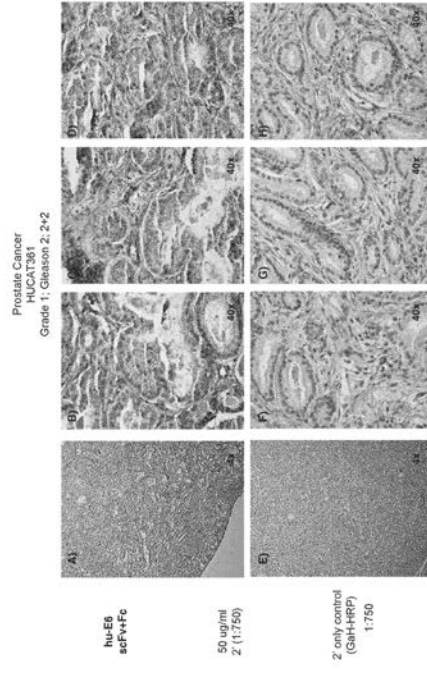


Figure 60

【 6 1 】

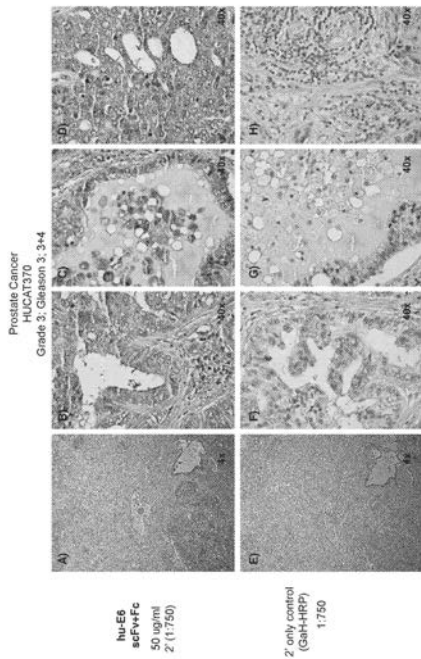


Figure 61

【 6 2 】

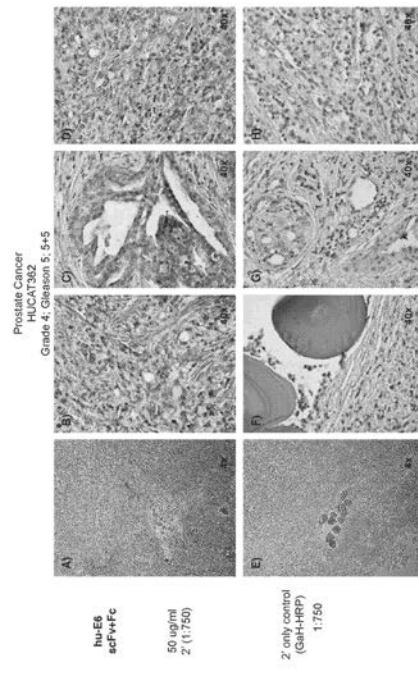


Figure 62

【配列表】

2018512379000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 16/17422
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07K 16/30, C07K 16/28 (2016.01) CPC - C07K 16/3092, C07K 16/28, C07K 16/30 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8)- C07K 16/30, C07K 16/28 (2016.01) CPC- C07K 16/3092, C07K 16/28, C07K 16/30 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched (keyword search, terms below) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST (USPT, PGPB, EPAB, JPAB), Google Patents/Scholar Search Terms Used: MUC1, antibody, extracellular, epitope, PSMGFR, NEM7, NEM6, human, humanized, MN-E6		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X -- Y -- A	US 2004/0057952 A1 (PAYNE et al.) 25 March 2004 (25.03.2004) Claim 1, 4, 10, para [0073], [0074], [0112], SEQ 1	1-4, 33-37, 67 ----- 5-9, 25, 40 ----- 26, 41
X -- Y -- A	WO 2014/028668 A2 (MINERVA BIOTECHNOLOGIES CORPORATION) 20 February 2014 (20.02.2014) para [0012], [0049], [0057], [0059], [0060], [0078], [0080], Fig. 27, SEQ ID NOs: 19, 21	38, 39, 76 ----- 5-9, 25, 40, (82-85)/76 ----- 26, 41, 77, (82-85)/77
Y	US 2011/0318757 A1 (Behrens et al.) 29 December 2011 (29.12.2011) abstract, para [0003]	(82-85)/76
Y	US 2013/0177555 A1 (Wilkinson et al.) 11 July 2013 (11.07.2013) para [0005], [0010]	(83-85)/76
Y	US 7,538,088 B2 to (Anderson et al.) 26 May 2009 (26.05.2009) SEQ ID NO: 26	85/76
A	US 2011/0165167 A1 (Pullen) 07 July 2011 (07.07.2011) abstract, para [0027], SEQ ID NO: 22	26
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 June 2016 (25.06.2016)		Date of mailing of the international search report 26 JUL 2016
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 16/17422

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2009/0299039 A1 (Kataoka et al.) 03 December 2009 (03.12.2009) abstract, para [0017], SEQ ID NO: 89	26
A	US 2010/0150918 A1 (Kufner et al.) 17 June 2010 (17.06.2010) SEQ ID NO: 1582	41

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/17422

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

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: 47, 69, 70, 72
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I+: Claims 1-44, 67, 76-80, 82-85, directed to a human or humanized anti-MUC1* antibody or scFv, that binds to a region on extracellular domain of MUC1 isoform or cleavage product that is devoid of the tandem repeat domains. The anti-MUC1* antibody will be searched to the extent that the humanized antibody is derived from the first named mouse monoclonal MN-E6 antibody (claims 5-7, 77) comprising humanized IgG2 heavy chain SEQ ID NO: 53 and Kappa light chain SEQ ID NO: 108 (claim 25); and scFv of SEQ ID NO: 233 (claim 41). It is believed that claims 1-9, 25, 26, 33-41, 67, 76-77, (82-85)(in part) encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NOs: 53, 108, 233. Additional human or humanized anti-MUC1* antibodies will be searched upon the payment of additional fees.

--See extra sheet--

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims: it is covered by claims Nos.: 1-9, 25, 26, 33-41, 67, 76-77, (82-85)(in part) limited to SEQ ID NOs: 53, 108, 233.

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/17422

Continuation of:

Box NO III. Observations where unity of invention is lacking

Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be human or humanized anti-MUC1* antibody derived from mouse monoclonal MN-C2 antibody (claims 10-12, 78) comprising humanized IgG1 heavy chain SEQ ID NO: 159 and Lambda light chain SEQ ID NO: 219 (claim 25); and scFv of SEQ ID NO: 239 (claim 42) (claims 1-4, 10-14, 27, 28, 33-40, 42, 67, 76, 78, (82-85)/(in part)).

Group II+: Claims 45-46, 48-60, directed to a chimeric antigen receptor (CAR) comprising a scFv that binds to the extracellular domain of a MUC1 that is devoid of tandem repeats. Group II+ will be searched upon payment of additional fees. The CAR may be searched, for example, to the extent that the CAR encompasses MN-E6 scFv SEQ ID NO: 233 (claim 49); CARMN-E6 CD3z SEQ ID NO: 295 (claim 51); and wherein the extracellular domain unit recognizes peptide of SEQ ID NO: 2 (claim 58); for an additional fee and election as such. It is believed that claims 45-46, 48-58 read on this exemplary invention. Additional scFv, CAR, and peptide will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected CAR. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. Another exemplary election would be MN-C2 scFv SEQ ID NO: 239; CARMN-C2 CD3z SEQ ID NO: 607; and the peptide is SEQ ID NO: 7 (claims 45-46, 48-57, 59-60).

Group III: claims 61-66, drawn to a composition comprising at least two CARs with different extracellular domain units transfected into the same cell.

Group IV: claim 68, drawn to a method of screening a library of antibodies.

Group V: claims 71, 81, 93-97, drawn to a method for treating a disease in a subject.

Group VI: claims 73-75, drawn to a method of isolating stem cell.

Group VII: claims 86-90, drawn to a fusion polypeptide comprising at least two different scFv sequences.

Group VIII: claims 91-92, drawn to a method of detecting presence of a cell that expresses MUC1* aberrantly.

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

Special Technical Features

Group I+ includes the special technical feature of a composition comprising a human or a humanized antibody or scFv, not required by Groups II+, III-VIII.

Group II+ includes the special technical feature of a composition comprising a chimeric antigen receptor, not required by Groups I+ and III-VIII.

Group III includes the special technical feature of a composition comprising a cell with at least two CARs, not required by Groups I+, II+, IV-VIII.

Group IV includes the special technical feature of a method of screening a library of antibodies, not required by Groups I+, II+, III, V-VIII.

Group V includes the special technical feature of a method for treating a disease, not required by Groups I+, II+, III, IV, VI-VIII.

Group VI includes the special technical feature of a method of isolating stem cell, not required by Groups I+, II+, III-V, VII, VIII.

Group VII includes the special technical feature of a composition comprising a fusion polypeptide comprising at least two different scFv sequences, not required by Groups I+, II+, III-VI, VIII.

Group VIII includes the special technical feature of a method of detecting presence of a cell that expresses MUC1* aberrantly, not required by Groups I+, II+, III-VII.

Another special technical feature of the inventions listed as Group I+ is the specific human or humanized antibody or scFv amino acid sequences, recited therein. Each of the inventions of Group I+ requires a unique set of sequences comprising IgG heavy chain, light chain and scFv, not required by the other inventions.

- Please see extra sheet for continuation -

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/17422

Continuation of:

Box NO III. Observations where unity of invention is lacking

Another special technical feature of the inventions listed as Group II+ is the specific scFv, CAR and peptide sequences, recited therein. Each of the inventions of Group II+ requires a unique set of sequences comprising scFv, CAR and peptide, not required by the other inventions.

Common Technical Features

The inventions of Groups I+, II+, III-VIII share the technical feature of MUC1* and anti-MUC1* antibody or scFv.

The inventions of Groups I+, II+, IV, V, VII-VIII share the technical feature of anti-MUC1* that binds to a region on extracellular domain of MUC1 isoform or cleavage product that is devoid of the tandem repeat domains

The inventions of Groups II+, III, V share the technical feature of a chimeric antigen receptor. Groups II+ and V further share MUC1* targeting CAR.

The inventions of Groups I+, V share the technical feature of claim 76.

The inventions of Groups I+, VIII share the technical feature of claim 82.

The inventions of Groups I+ share the technical feature of claims 1, 2, 38, 76, 82, IgG heavy chain and kappa or lambda light chain.

The inventions of Groups II+ share the technical feature of claims 45, 52, 57.

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art in view of US 2004/0057952 A1 to PAYNE et al. (hereinafter 'Payne'). Payne teaches (instant claims 1-2) a human or humanized anti-MUC1* antibody or antibody fragment or antibody-like protein that binds to a region on extracellular domain of MUC1 isoform or cleavage product that is devoid of the tandem repeat domains (Claim 1, An isolated monoclonal antibody that specifically binds to an epitope of a non-shed extracellular portion of a shed antigen; para [0073]. Humanized forms of the antibodies are made by substituting the complementarity determining regions of, for example, a mouse antibody, into a human framework domain.), which specifically binds to (iii) a peptide having amino acid sequence of SNIKFRPGSVVYQLTLAFREGTINVHDVETOFNQYKTEAASRY (SEQ ID NO: 620) (Claim 11, wherein said antibody binds to at least one peptide selected from the group consisting of: a) QLTLAFREGTINVHDVETQFN (SEQ ID NO: 6), NOTE, SEQ ID NO: 6 is 100% match to amino acid residues 13-33 of SEQ ID N: 620 of instant claim).

Payne teaches (instant claim 38) a single chain variable fragment (scFv) comprising a heavy and light chain variable regions connected via a linker (para [0074]. These fragments contain at least one fragment of an antibody variable heavy-chain amino acid sequence (VH) tethered to at least one fragment of an antibody variable light-chain sequence (VL) with or without one or more interconnecting linkers.), further comprising CDRs of antibodies (para [0075]. Single-chain antibody fragments contain amino acid sequences having at least one of the variable or complementarity determining regions (CDR's) of the whole antibodies.) that bind to MUC1* extracellular domain (Claims 1, 11).

Payne teaches (instant claim 76) a scFv comprising variable domain fragments derived from an antibody that binds to an extracellular domain of MUC1 isoform or cleavage product that is devoid of the tandem repeat domains (Claims 1, 11, para [0074], [0075]).

Payne teaches (instant claim 45) a scFv or a humanized variable region that binds to the extracellular domain of a MUC1 that is devoid of tandem repeats, a linker molecule (Claims 1, 11, para [0074], [0075]), but does not specifically teach a chimeric antigen receptor (CAR) comprising said MUC1 targeting scFv. WO 2015/009740 A2 (CELL SIGNALING TECHNOLOGY, INC. et al.) (hereinafter 'CST') teaches a chimeric antigen receptor (CAR) comprising a MUC1 targeting scFv (abstract, anti-MUC1 binding agents (e.g., antibodies and chimeric antigen receptors); pg 35, in 12-32, Examples of chimeric antigen receptors include one or more antibody binding domains (e.g., an scFv that includes one or more sequences disclosed herein) linked by a transmembrane domain to at least one T cell receptor (TCR) signaling domain (e.g., a TCR zeta domain) and, optionally, one or more costimulatory signaling domains (e.g., a CD28, CD37 (4-1BB), or CD134 (OX40) signaling domain).). One of ordinary skill in the art would have prepared a chimeric antigen receptor of CST comprising the scFv as taught by Payne, which would have directed T cell to cancer cell expressing MUC1*.

Payne, in view of CST, teaches (instant claim 52) a cell comprising a CAR with an extracellular domain that binds to MUC1* transfected or transduced cell (Payne, Claims 1, 11, para [0074], [0075]; CST, abstract, pg 35, in 12-32, in some embodiments, T cells expressing such a chimeric antigen receptor can be produced and used for treatment of a tumor that expresses MUC1*).

Payne, in view of CST, teaches (instant claim 57) a CAR molecule in which the extracellular domain unit recognizes a peptide (Payne, Claims 1, 11, para [0074], [0075]; CST, abstract, pg 35, in 12-32).

CST further teaches that anti-MUC1 antibody comprising IgG (pg 26, in 6-13). In addition, it is well known to one of ordinary skill in the art that antibody comprises a heavy chain and a light chain (kappa or lambda).

Payne does not specifically teach (instant claim 82) a scFv-Fc construct. US 2011/0318757 A1 to Behrens et al. (hereinafter 'Behrens') teaches anti-MUC1 scFv-Fc construct (abstract, para [0003], one or more natural or synthetic antibody domains, e.g. CH1, CH2, CH3, scFv-Fc and other synthetic antibody fusion proteins.).

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

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

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
C 4 0 B 40/10 (2006.01)	C 4 0 B 40/10	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
	C 1 2 P 21/08	

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

(72)発明者 バンダッド, シンシア

米国, エムエー 0 2 4 5 1, ウォルサム, 4 0 ベアー ヒル アールディー.

(72)発明者 スマッジ, ブノワ

米国, エムエー 0 2 4 5 1, ウォルサム, 4 0 ベアー ヒル アールディー.

Fターム(参考) 4B063 QA18 QQ02 QQ08 QQ79 QR48 QR72 QR77 QS36 QX01
 4B064 AG01 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13
 4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA01 CA24 CA25 CA44 CA46
 4C085 AA13 AA14 BB01 EE01
 4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA76 EA20 EA50 FA74
 GA15 GA22

专利名称(译)	人源化抗MUC1 *抗体		
公开(公告)号	JP2018512379A	公开(公告)日	2018-05-17
申请号	JP2017542004	申请日	2016-02-10
[标]申请(专利权)人(译)	米纳瓦生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	密涅瓦生物技术公司		
[标]发明人	バンダッドシンシア スマッジブノワ		
发明人	バンダッド,シンシア スマッジ,ブノワ		
IPC分类号	C07K16/28 C12N15/09 C07K19/00 C07K14/705 C12N5/10 C12Q1/04 C07K16/46 C07K16/18 C40B40/10 A61K39/395 A61P35/00 G01N33/53 C12P21/08		
CPC分类号	C07K16/28 C07K16/3092 C07K2317/24 C07K2317/34 C07K2317/52 C07K2317/622 C07K2319/30 A61P35/00 A61K39/0011 A61K39/00117 A61K2039/5156 A61K2039/5158 C07K2319/02		
FI分类号	C07K16/28.ZNA C12N15/00.A C07K19/00 C07K14/705 C12N5/10 C12Q1/04 C07K16/46 C07K16/18 C40B40/10 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P35/00 G01N33/53.D C12P21/08		
F-TERM分类号	4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS36 4B063/QX01 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB01 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA15 4H045/GA22		
代理人(译)	庄司隆 Shinobe百合子		
优先权	62/114526 2015-02-10 US		
其他公开文献	JP2018512379A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)
人源化抗MUC1 *抗体，抗体样蛋白质及其片段，其制备方法及其用途技术领域本发明涉及人源化抗-MUC1 *抗体，抗体样蛋白质及其片段，其制备方法及其用途。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 公表特許公報(A)	(11) 特許出願公表番号 特表2018-512379 (P2018-512379A) (43) 公表日 平成30年5月17日(2018.5.17)
(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01) C07K 14/705 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)	FI C07K 16/28 ZNA C12N 15/00 A C07K 19/00 C07K 14/705 C12N 5/10	テーマコード(参考) 4B063 4B064 4B065 4C085 4H045 (全161頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号 特願2017-542004 (P2017-542004) (22) 出願日 平成28年2月10日(2016.2.10) (85) 翻訳文提出日 平成29年9月25日(2017.9.25) (86) 国際出願番号 PCT/US2016/017422 (87) 国際公開番号 W02016/130726 (87) 国際公開日 平成28年8月18日(2016.8.18) (31) 優先権主張番号 62/114,526 (32) 優先日 平成27年2月10日(2015.2.10) (33) 優先権主張国 米国(US)	(71) 出願人 507081094 ミネルバ バイオテクノロジーズ コーポ レーション 米国, エムエー O2451, ウォルサム , 40 ベアー ヒル ロード (74) 代理人 100089904 弁理士 庄司 隆 (74) 代理人 100124453 弁理士 寛延 由利子 (74) 代理人 100135208 弁理士 大杉 卓也 (74) 代理人 100163544 弁理士 平田 緑	最終頁に続く
(54) 【発明の名称】 ヒト化抗MUC1 * 抗体		