

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-503163

(P2023-503163A)

(43)公表日 令和5年1月26日(2023.1.26)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード(参考)	
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 B 0 6 5
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	Z N A	4 C 0 8 4
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00		4 C 0 8 5
C 0 7 K	16/30 (2006.01)	C 0 7 K	16/30		4 C 0 8 6
C 0 7 K	14/705 (2006.01)	C 0 7 K	14/705		4 C 0 8 7
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全378頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2022-530723(P2022-530723)	(71)出願人	504389991 ノバルティス アーゲー
(86)(22)出願日	令和2年11月25日(2020.11.25)		スイス国 バーゼル リヒトシュトラーセ 3 5
(85)翻訳文提出日	令和4年7月15日(2022.7.15)	(74)代理人	100106518 弁理士 松谷 道子
(86)国際出願番号	PCT/US2020/062357	(74)代理人	100122301 弁理士 富田 憲史
(87)国際公開番号	WO2021/108661	(72)発明者	アブジュブ, アイダー アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセ ッツ州ケンブリッジ、マサチューセツ ・アベニュー 2 5 0
(87)国際公開日	令和3年6月3日(2021.6.3)	(72)発明者	ブランケンシップ, ジョン アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセ ッツ州ケンブリッジ、マサチューセツ
(31)優先権主張番号	62/940,509		
(32)優先日	令和1年11月26日(2019.11.26)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 キメラ抗原受容体及びその使用

(57)【要約】

本発明は、キメラ抗原受容体(CAR)を発現する免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)並びにその組成物及び方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離細胞であって、

(a) 抗 B C M A 結合ドメインである第 1 抗原結合ドメインであって、前記抗 B C M A 結合ドメインは、重鎖相補性決定領域 1 (H C C D R 1)、重鎖相補性決定領域 2 (H C C D R 2) 及び重鎖相補性決定領域 3 (H C C D R 3) を含む重鎖可変領域 (V H) と、軽鎖相補性決定領域 1 (L C C D R 1)、軽鎖相補性決定領域 2 (L C C D R 2) 及び軽鎖相補性決定領域 3 (L C C D R 3) を含む軽鎖可変領域 (V L) とを含み、前記 H C C D R 1、H C C D R 2、H C C D R 3、L C C D R 1、L C C D R 2 及び L C C D R 3 は、

10

(i) それぞれ配列番号 8 6、1 3 0、8 8、9 5、1 3 1 及び 1 3 2 ;

(i i) それぞれ配列番号 4 4、4 5、8 4、5 4、5 5 及び 5 6 ; 又は

(i i i) それぞれ配列番号 1 7 9、1 8 0、1 8 1、1 4 7、1 8 2 及び 1 8 3 のアミノ酸配列を含む、第 1 抗原結合ドメインと ;

(b) 第 2 抗原結合ドメインとを含む単離細胞。

【請求項 2】

前記第 1 抗原結合ドメインと前記第 2 抗原結合ドメインとは、2 つのキメラ抗原受容体 (C A R) に配置されるか、又は前記第 1 抗原結合ドメインと前記第 2 抗原結合ドメインとは、1 つの C A R に配置される、請求項 1 に記載の単離細胞。

20

【請求項 3】

前記 H C C D R 1、H C C D R 2、H C C D R 3、L C C D R 1、L C C D R 2 及び L C C D R 3 は、それぞれ配列番号 8 6、1 3 0、8 8、9 5、1 3 1 及び 1 3 2 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の単離細胞。

【請求項 4】

前記 H C C D R 1、H C C D R 2、H C C D R 3、L C C D R 1、L C C D R 2 及び L C C D R 3 は、

(i) それぞれ配列番号 8 6、8 7、8 8、9 5、9 6 及び 9 7 ;

(i i) それぞれ配列番号 8 6、1 0 9、8 8、9 5、1 1 4 及び 1 1 5 ; 又は

(i i i) それぞれ配列番号 8 6、1 0 9、8 8、9 5、1 1 4 及び 9 7

のアミノ酸配列を含む、請求項 3 に記載の単離細胞。

30

【請求項 5】

(i) 前記 V H は、配列番号 9 3 若しくは 1 1 2 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み ; 及び / 又は

(i i) 前記 V H は、配列番号 2 6 0、9 4 若しくは 1 1 3 の核酸配列又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる、請求項 3 又は 4 に記載の単離細胞。

【請求項 6】

(i) 前記 V L は、配列番号 1 0 2、1 1 8 若しくは 1 2 4 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み ; 及び / 又は

(i i) 前記 V L は、配列番号 2 6 1、1 0 3、1 1 9 若しくは 1 2 5 の核酸配列又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる、請求項 3 ~ 5 のいずれか一項に記載の単離細胞。

40

【請求項 7】

前記 V H 及び V L は、

(i) それぞれ配列番号 9 3 及び 1 0 2 ;

(i i) それぞれ配列番号 1 1 2 及び 1 1 8 ; 又は

50

(i i i) それぞれ配列番号 1 1 2 及び 1 2 4
 のアミノ酸配列を含む、請求項 3 ~ 6 のいずれか一項に記載の単離細胞。

【請求項 8】

(i) 前記第 1 抗原結合ドメインは、配列番号 1 0 5、1 2 0 若しくは 1 2 6 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単鎖可変領域フラグメント (s c F v) を含み；及び / 又は

(i i) 前記第 1 抗原結合ドメインは、配列番号 2 5 3、1 0 6、1 2 1 若しくは 1 2 7 の核酸配列又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる、請求項 3 ~ 7 のいずれか一項に記載の単離細胞。

10

【請求項 9】

前記第 1 抗原結合ドメインは、第 1 C A R に配置され、

(i) 前記第 1 C A R は、配列番号 1 0 7、2 2 6、1 2 2 若しくは 1 2 8 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み；及び / 又は

(i i) 前記第 1 C A R は、配列番号 2 5 9、2 5 8、1 0 8、1 2 3 若しくは 1 2 9 の核酸配列又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる、請求項 3 ~ 8 のいずれか一項に記載の単離細胞。

【請求項 1 0】

前記 H C C D R 1、H C C D R 2、H C C D R 3、L C C D R 1、L C C D R 2 及び L C C D R 3 は、それぞれ配列番号 4 4、4 5、8 4、5 4、5 5 及び 5 6 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の単離細胞。

20

【請求項 1 1】

前記 H C C D R 1、H C C D R 2、H C C D R 3、L C C D R 1、L C C D R 2 及び L C C D R 3 は、

(i) それぞれ配列番号 4 4、4 5、7 6、5 4、5 5 及び 5 6；

(i i) それぞれ配列番号 4 4、4 5、4 6、5 4、5 5 及び 5 6；又は

(i i i) それぞれ配列番号 4 4、4 5、6 8、5 4、5 5 及び 5 6

のアミノ酸配列を含む、請求項 1 0 に記載の単離細胞。

【請求項 1 2】

(i) 前記 V H は、配列番号 7 8、5 2 若しくは 7 0 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み；及び / 又は

(i i) 前記 V H は、配列番号 7 9、5 3 若しくは 7 1 の核酸配列又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる、請求項 1 0 又は 1 1 に記載の単離細胞。

30

【請求項 1 3】

(i) 前記 V L は、配列番号 6 1 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み；及び / 又は

(i i) 前記 V L は、配列番号 6 2 の核酸配列又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる、請求項 1 0 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の単離細胞。

40

【請求項 1 4】

前記 V H 及び V L は、

(i) それぞれ配列番号 7 8 及び 6 1；

(i i) それぞれ配列番号 5 2 及び 6 1；又は

(i i i) それぞれ配列番号 7 0 及び 6 1

のアミノ酸配列を含む、請求項 1 0 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の単離細胞。

【請求項 1 5】

(i) 前記第 1 抗原結合ドメインは、配列番号 8 0、6 4 若しくは 7 2 のアミノ酸配列

50

又はそれと少なくとも約 85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単鎖可変領域フラグメント (s c F v) を含み；及び/又は
 (i i) 前記第1抗原結合ドメインは、配列番号81、65若しくは73の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる、請求項10~14のいずれか一項に記載の単離細胞。

【請求項16】

前記第1抗原結合ドメインは、第1CARに配置され、
 (i) 前記第1CARは、配列番号224、82、66若しくは74のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み；及び/又は

10

(i i) 前記第1CARは、配列番号83、67若しくは75の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる、請求項10~15のいずれか一項に記載の単離細胞。

【請求項17】

前記HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、それぞれ配列番号179、180、181、147、182及び183のアミノ酸配列を含む、請求項1又は2に記載の単離細胞。

【請求項18】

前記HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、

20

(i) それぞれ配列番号137、138、139、147、148及び149；又は

(i i) それぞれ配列番号160、161、162、147、170及び171

のアミノ酸配列を含む、請求項17に記載の単離細胞。

【請求項19】

(i) 前記VHは、配列番号145若しくは168のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み；及び/又は

(i i) 前記VHは、配列番号146若しくは169の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる、請求項17又は18に記載の単離細胞。

30

【請求項20】

(i) 前記VLは、配列番号154若しくは173のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み；及び/又は

(i i) 前記VLは、配列番号155若しくは174の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる、請求項17~19のいずれか一項に記載の単離細胞。

【請求項21】

前記VH及びVLは、

(i) それぞれ配列番号145及び154、又は

40

(i i) それぞれ配列番号168及び173

のアミノ酸配列を含む、請求項17~20のいずれか一項に記載の単離細胞。

【請求項22】

(i) 前記第1抗原結合ドメインは、配列番号156若しくは175のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単鎖可変領域フラグメント (s c F v) を含み；

(i i) 前記第1抗原結合ドメインは、配列番号157若しくは176の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる、請求項17~21のいずれか一項に記載の単離細胞。

【請求項23】

50

前記抗原結合ドメインは、第1CARに配置され、

(i) 前記第1CARは、配列番号158若しくは177のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み；及び/又は

(iii) 前記第1CARは、配列番号159若しくは178の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる、請求項17~22のいずれか一項に記載の単離細胞。

【請求項24】

単離細胞であって、

(a) 抗BCMA結合ドメインである第1抗原結合ドメインであって、前記抗BCMA結合ドメインは、

(i) 表20又は26に列挙される抗BCMA配列のHC CDR1、HC CDR2及びHC CDR3を含むVHと、表20又は26に列挙される抗BCMA配列のLC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3を含むVLとであって、配列番号243のアミノ酸配列を含むリンカーによって連結される、VH及びVL；

(ii) それぞれ配列番号239及び242のアミノ酸配列を含むVH及びVLであって、配列番号243のアミノ酸配列を含むリンカーによって連結される、VH及びVL；又は

(iii) 配列番号200のアミノ酸配列を含むscFvを含む、第1抗原結合ドメインと；

(b) 第2抗原結合ドメインとを含む単離細胞。

【請求項25】

前記第1抗原結合ドメインと前記第2抗原結合ドメインとは、2つのキメラ抗原受容体(CAR)に配置されるか、又は前記第1抗原結合ドメインと前記第2抗原結合ドメインとは、1つのCARに配置される、請求項24に記載の単離細胞。

【請求項26】

前記第2抗原結合ドメインは、CD19、CD5、CD10、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD27、CD30、CD34、CD37、CD38、CD40、CD53、CD69、CD72、CD73、CD74、CD75、CD77、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85、CD86、CD123、CD135、CD138、CD179、CD269、Flt3、ROR1、FcRn5、FcRn2、CS-1、CXCR4、5、7、IL-7/3R、IL7/4/3R又はIL4Rから選択される抗原に結合し、任意選択で、前記B細胞抗原は、CD19、CD20、CD22、FcRn5、FcRn2、CS-1、CD138、CD123、CD33、CD34、CLL-1、葉酸受容体又はFLT3から選択され、任意選択で、前記第2抗原結合ドメインは、CD19に結合する、請求項1~25のいずれか一項に記載の単離細胞。

【請求項27】

前記第2抗原結合ドメインは、EGFRvIII、メソテリン、GD2、Tn抗原、sTn抗原、Tn-O-糖ペプチド、sTn-O-糖ペプチド、PSMA、CD97、TAG72、CD44v6、CEA、EPCAM、KIT、IL-13Ra2、レグマン、GD3、CD171、IL-11Ra、PSCA、MAD-CT-1、MAD-CT-2、VEGFR2、ルイスY、CD24、PDGFR、SSEA-4、葉酸受容体、ERBB(例えば、ERBB2)、Her2/neu、MUC1、EGFR、NCAM、エフリンB2、CAIX、LMP2、sLe、HMWMAA、o-アセチル-GD2、葉酸受容体、TEM1/CD248、TEM7R、FAP、レグマイン、HPV E6若しくはE7、ML-IAP、CLDN6、TSHR、GPRC5D、ALK、ポリシアル酸、Fos関連抗原、好中球エラスターゼ、TRP-2、CYP1B1、精子タンパク質1

7、 ヒト絨毛性ゴナドトロピン、AFP、チログロブリン、PLAC1、グロボH、RAGE1、MN-CAIX、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、腸カルボキシエステラーゼ、mut hsp 70-2、NA-17、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、NY-ESO-1、GPR20、Ly6k、OR51E2、TARP、GFR 4又はMHCに提示される前記抗原のいずれかのペプチドから選択される抗原に結合する、請求項1～25のいずれか一項に記載の単離細胞。

【請求項28】

前記第2抗原結合ドメインは、CD19に結合し、任意選択で、

(i) 前記第2抗原結合ドメインは、表19又は表22に列挙される抗CD19配列のHC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及び
/又はLC CDR3、例えばそれぞれ配列番号295及び245～249の配列を含む
HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及
びLC CDR3を含み；

10

(ii) 前記第2抗原結合ドメインは、表19又は表22に列挙される抗CD19配列のVH及び/又はVL、例えばそれぞれ配列番号250及び251のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むVH及びVLを含み；

(iii) 前記第2抗原結合ドメインは、表19又は表22に列挙される抗CD19配列のscFv、例えば配列番号211のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むscFvを含み；及
び/又は

20

(iv) 前記第2抗原結合ドメインは、第2CARに配置され、前記CARは、表19又は表22に列挙される抗CD19配列のCAR、例えば配列番号225若しくは229のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むCARを含む、請求項1～25のいずれか一項に記載の単離細胞。

【請求項29】

(i) 前記第1抗原結合ドメインは、

(a) それぞれ配列番号86、87、88、95、96及び97；

(b) それぞれ配列番号44、45、76、54、55及び56；又は

(c) それぞれ配列番号44、45、46、54、55及び56

のアミノ酸配列を含むHC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3を含み、及び前記第2抗原結合ドメインは、それぞれ配列番号295及び245～249のアミノ酸配列を含むHC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3を含むか；

30

(ii) 前記第1抗原結合ドメインは、

(a) それぞれ配列番号93及び102；

(b) それぞれ配列番号78及び61；又は

(c) それぞれ配列番号52及び61

のアミノ酸配列を含むVH及びVLを含み、及び前記第2抗原結合ドメインは、それぞれ配列番号250及び251のアミノ酸配列を含むVH及びVLを含むか；

40

(iii) 前記第1抗原結合ドメインは、配列番号105、80又は64のアミノ酸配列を含むscFvを含み、及び前記第2抗原結合ドメインは、配列番号211のアミノ酸配列を含むscFvを含むか；又は

(iv) 前記第1抗原結合ドメインは、配列番号253、106、81又は65の核酸配列によってコードされ、及び前記第2抗原結合ドメインは、配列番号212の核酸配列によってコードされる、請求項1～25又は28のいずれか一項に記載の単離細胞。

【請求項30】

前記第1抗原結合ドメインは、第1CARに配置され、及び前記第2抗原結合ドメインは、第2CARに配置され、前記第1CARは、第1膜貫通ドメインと、第1細胞内シグ

50

ナル伝達ドメインとをさらに含み、及び/又は前記第2CARは、第2膜貫通ドメインと、第2細胞内シグナル伝達ドメインとをさらに含む、請求項1～29のいずれか一項に記載の単離細胞。

【請求項31】

前記第1CARは、第1核酸配列によってコードされ、及び前記第2CARは、第2核酸配列によってコードされ、前記第1及び第2核酸配列は、個別の核酸分子上に配置される、請求項30に記載の単離細胞。

【請求項32】

前記第1CARは、第1核酸配列によってコードされ、及び前記第2CARは、第2核酸配列によってコードされ、前記第1及び第2核酸配列は、単一の核酸分子上に配置される、請求項30に記載の単離細胞。

10

【請求項33】

前記単一の核酸分子は、5'から3'の方向に、以下の構成：

(i) 前記第1抗原結合ドメインをコードする核酸配列 - 第1膜貫通ドメインをコードする核酸配列 - 第1細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列 - リンカーをコードする核酸配列 - 前記第2抗原結合ドメインをコードする核酸配列 - 第2膜貫通ドメインをコードする核酸配列 - 第2細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列；又は

(ii) 前記第2抗原結合ドメインをコードする核酸配列 - 第2膜貫通ドメインをコードする核酸配列 - 第2細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列 - リンカーをコードする核酸配列 - 前記第1抗原結合ドメインをコードする核酸配列 - 第1膜貫通ドメインをコードする核酸配列 - 第1細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列

20

を含み、

任意選択で、前記リンカーは、自己切断部位を含み、任意選択で、前記リンカーは、P2A部位、T2A部位、E2A部位又はF2A部位を含み、任意選択で、前記リンカーは、P2A部位を含み、任意選択で、

前記リンカーは、配列番号209の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされるか、又は

前記リンカーは、配列番号208のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項32に記載の単離細胞。

30

【請求項34】

(i) 前記単一の核酸分子は、配列番号215、217、219、221若しくは223の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列を含むか；又は

(ii) 前記単一の核酸分子は、配列番号214、216、218、220若しくは222のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする、請求項32又は33に記載の単離細胞。

【請求項35】

前記第1抗原結合ドメイン及び前記第2抗原結合ドメインは、1つのCARに配置され、前記CARは、膜貫通ドメインと細胞内シグナル伝達ドメインとをさらに含む、請求項1～29のいずれか一項に記載の単離細胞。

40

【請求項36】

前記第1抗原結合ドメインは、第1VH(VH1)と第1VL(VL1)とを含み、及び第2抗原結合ドメインは、第2VH(VH2)と第2VL(VL2)とを含み、前記VH1、VL1、VH2及びVL2は、N末端からC末端まで、以下の構成：

(i) VH2 - 任意選択でリンカー1(「L1」) - VL1 - 任意選択でリンカー2(「L2」) - VH1 - 任意選択でリンカー3(「L3」) - VL2；

(ii) VH1 - 任意選択でL1 - VH2 - 任意選択でL2 - VL2 - 任意選択でL3 - VL1；

(iii) VL2 - 任意選択でL1 - VL1 - 任意選択でL2 - VH1 - 任意選択でL3

50

- V H 2 ;
- (i v) V L 2 - 任意選択で L 1 - V H 1 - 任意選択で L 2 - V L 1 - 任意選択で L 3 - V H 2 ;
- (v) V H 2 - 任意選択で L 1 - V H 1 - 任意選択で L 2 - V L 1 - 任意選択で L 3 - V L 2 ;
- (v i) V L 1 - 任意選択で L 1 - V H 2 - 任意選択で L 2 - V L 2 - 任意選択で L 3 - V H 1 ;
- (v i i) V L 1 - 任意選択で L 1 - V L 2 - 任意選択で L 2 - V H 2 - 任意選択で L 3 - V H 1 ; 又は
- (v i i i) V H 1 - 任意選択で L 1 - V L 2 - 任意選択で L 2 - V H 2 - 任意選択で L 3 - V L 1

で配列される、請求項 3 5 に記載の単離細胞。

【請求項 3 7】

- (i) 前記 V H 1 及び V L 1 は、
 - (a) それぞれ配列番号 9 3 及び 1 0 2 のアミノ酸配列（又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列）；
 - (b) それぞれ配列番号 3 3 3 及び 3 3 4 のアミノ酸配列（又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列）；
 - (c) それぞれ配列番号 7 8 及び 6 1 のアミノ酸配列（又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列）； 又は
 - (d) それぞれ配列番号 3 3 5 及び 3 3 6 のアミノ酸配列（又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列）
- を含み、及び / 又は

- (i i) 前記 V H 2 及び V L 2 は、
 - (a) それぞれ配列番号 2 5 0 及び 2 5 1 のアミノ酸配列（又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列）； 又は
 - (b) それぞれ配列番号 3 3 1 及び 3 3 2 のアミノ酸配列（又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列）
- を含む、請求項 3 6 に記載の単離細胞。

【請求項 3 8】

L 1 又は L 3 は、配列番号 5 のアミノ酸配列を含み、及び / 又は L 2 は、配列番号 6 3 のアミノ酸配列を含む、請求項 3 6 又は 3 7 に記載の単離細胞。

【請求項 3 9】

- (i) 前記 C A R は、配列番号 3 2 1 ~ 3 3 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列又はそれと少なくとも 8 0、8 5、9 0、9 5 若しくは 9 9 % の同一性を有するアミノ酸配列を含むか； 又は
- (i i) 前記 C A R は、配列番号 3 3 9 ~ 3 4 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列又はそれと少なくとも 8 0、8 5、9 0、9 5 若しくは 9 9 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 3 5 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の単離細胞。

【請求項 4 0】

- 前記 C A R は、5' から 3' の方向に、以下の構成：
- (i) 前記第 1 抗原結合ドメインをコードする核酸配列 - 任意選択でリンカーをコードする核酸配列 - 前記第 2 抗原結合ドメインをコードする核酸配列 - 膜貫通ドメインをコードする核酸配列 - 細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列； 又は
 - (i i) 前記第 2 抗原結合ドメインをコードする核酸配列 - 任意選択でリンカーをコードする核酸配列 - 前記第 1 抗原結合ドメインをコードする核酸配列 - 膜貫通ドメインをコードする核酸配列 - 細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列
- を含む核酸分子によってコードされる、請求項 3 5 ~ 3 9 のいずれか一項に記載の単離細胞。

【請求項 4 1】

10

20

30

40

50

前記 C A R は、N から C の方向に、以下の構成：

(i) 前記第 1 抗原結合ドメイン - 任意選択でリンカー - 前記第 2 抗原結合ドメイン - 膜貫通ドメイン - 細胞内シグナル伝達ドメイン；又は

(i i) 前記第 2 抗原結合ドメイン - 任意選択でリンカー - 前記第 1 抗原結合ドメイン - 膜貫通ドメイン - 細胞内シグナル伝達ドメイン

を含む、請求項 35 ~ 40 のいずれか一項に記載の単離細胞。

【請求項 42】

前記第 1 抗原結合ドメイン又は第 2 抗原結合ドメインは、V H 及び V L を含み、前記 V H 及び V L は、リンカーによって連結され、任意選択で、前記リンカーは、配列番号 5、63、104 若しくは 243 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約 85%、90%、95% 若しくは 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 41 のいずれか一項に記載の単離細胞。

10

【請求項 43】

(i) 前記膜貫通ドメイン、第 1 膜貫通ドメイン又は第 2 膜貫通ドメインは、T 細胞受容体の、若しくは鎖、C D 28、C D 3、C D 45、C D 4、C D 5、C D 8、C D 9、C D 16、C D 22、C D 33、C D 37、C D 64、C D 80、C D 86、C D 134、C D 137 又は C D 154 から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含むか；

(i i) 前記膜貫通ドメイン、第 1 膜貫通ドメイン又は第 2 膜貫通ドメインは、配列番号 6 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約 85%、90%、95% 若しくは 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか；又は

20

(i i i) 前記膜貫通ドメイン、第 1 膜貫通ドメイン又は第 2 膜貫通ドメインは、配列番号 17 の核酸配列又はそれと少なくとも約 85%、90%、95% 若しくは 99% の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる、請求項 30 ~ 42 のいずれか一項に記載の単離細胞。

【請求項 44】

前記第 1 抗原結合ドメイン又は第 2 抗原結合ドメインは、ヒンジ領域（例えば、第 1 又は第 2 ヒンジ領域）により、前記膜貫通ドメイン、第 1 膜貫通ドメイン又は第 2 膜貫通ドメインに連結され、任意選択で、

(i) 前記ヒンジ領域は、配列番号 2、3 若しくは 4 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約 85%、90%、95% 若しくは 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか；

30

(i i) 前記ヒンジ領域は、配列番号 13、14 若しくは 15 の核酸配列又はそれと少なくとも約 85%、90%、95% 若しくは 99% の配列同一性を有する核酸配列によってコードされるか；

(i i i) 前記ヒンジ領域及び前記膜貫通ドメインは、配列番号 202 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約 85%、90%、95% 若しくは 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか；又は

(i v) 前記ヒンジ領域及び前記膜貫通ドメインは、配列番号 203 若しくは 213 の核酸配列又はそれと少なくとも約 85%、90%、95% 若しくは 99% の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる、請求項 30 ~ 43 のいずれか一項に記載の単離細胞。

40

【請求項 45】

前記細胞内シグナル伝達ドメイン、第 1 細胞内シグナル伝達ドメイン又は第 2 細胞内シグナル伝達ドメインは、一次シグナル伝達ドメイン（例えば、第 1 又は第 2 一次シグナル伝達ドメイン）を含み、任意選択で、

(i) 前記一次シグナル伝達ドメインは、C D 3、T C R、F c R、F c R、C D 3、C D 3、C D 3、C D 5、C D 22、C D 79 a、C D 79 b、C D 278 (I C O S)、F c R I、D A P 10、D A P 12 又は C D 66 d に由来する機能性シグナル伝達ドメインを含むか；

50

(i i) 前記一次シグナル伝達ドメインは、配列番号 9 若しくは 10 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約 85%、90%、95% 若しくは 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか；又は

(i i i) 前記一次シグナル伝達ドメインは、配列番号 20、21 若しくは 205 の核酸配列又はそれと少なくとも約 85%、90%、95% 若しくは 99% の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる、請求項 30 ~ 44 のいずれか一項に記載の単離細胞。

【請求項 46】

前記細胞内シグナル伝達ドメイン、第 1 細胞内シグナル伝達ドメイン又は第 2 細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激シグナル伝達ドメイン（例えば、第 1 又は第 2 共刺激シグナル伝達ドメイン）を含み、任意選択で、

(i) 前記共刺激シグナル伝達ドメインは、MHC クラス I 分子、TNF 受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ球活性化分子（SLAM タンパク質）、活性化 NK 細胞受容体、BTLA、Toll リガンド受容体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、4-1BB（CD137）、B7-H3、ICOS（CD278）、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM（LIGHTR）、KIRDS2、SLAMF7、NKp80（KLRF1）、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8、CD8、IL2R、IL2R、IL7R、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANSCENDANCE/RANKL、DNAM1（CD226）、SLAMF4（CD244、2B4）、CD84、CD96（Tactile）、CEACAM1、CRTAM、Ly9（CD229）、CD160（BY55）、PSGL1、CD100（SEMA4D）、CD69、SLAMF6（NTB-A、Ly108）、SLAM（SLAMF1、CD150、IPO-3）、BLAME（SLAMF8）、SELPLG（CD162）、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、CD28-OX40、CD28-4-1BB 又は CD83 と特異的に結合するリガンドに由来する機能性シグナル伝達ドメインを含むか；

(i i) 前記共刺激シグナル伝達ドメインは、配列番号 7 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約 85%、90%、95% 若しくは 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか；又は

(i i i) 前記共刺激シグナル伝達ドメインは、配列番号 18 若しくは 204 の核酸配列又はそれと少なくとも約 85%、90%、95% 若しくは 99% の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる、請求項 30 ~ 45 のいずれか一項に記載の単離細胞。

【請求項 47】

前記細胞内シグナル伝達ドメイン、第 1 細胞内シグナル伝達ドメイン又は第 2 細胞内シグナル伝達ドメインは、4-1BB に由来する機能性シグナル伝達ドメインと、CD3 に由来する機能性シグナル伝達ドメインとを含み、任意選択で、前記細胞内シグナル伝達ドメイン、第 1 細胞内シグナル伝達ドメイン又は第 2 細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号 7 のアミノ酸配列（又はそれと少なくとも約 85%、90%、95% 若しくは 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列）と、配列番号 9 若しくは 10 のアミノ酸配列（又はそれと少なくとも約 85%、90%、95% 若しくは 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列）とを含み、任意選択で、前記細胞内シグナル伝達ドメイン、第 1 細胞内シグナル伝達ドメイン又は第 2 細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号 7 のアミノ酸配列と、配列番号 9 又は 10 のアミノ酸配列とを含む、請求項 30 ~ 46 のいずれか一項に記載の単離細胞。

【請求項 48】

前記 CAR、第 1 CAR 又は第 2 CAR は、リーダー配列（例えば、第 1 又は第 2 リー

10

20

30

40

50

ダ配列)をさらに含み、

(i) 前記リーダー配列は、配列番号1のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか；又は

(ii) 前記リーダー配列は、配列番号199若しくは210の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる、請求項30~47のいずれか一項に記載の単離細胞。

【請求項49】

(i) 前記第1リーダー配列及び前記第2リーダー配列は、異なる(例えば、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%又は100%異なる)核酸配列によってコードされ；

10

(ii) 前記第1ヒンジ領域及び前記第2ヒンジ領域は、異なる(例えば、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%又は100%異なる)核酸配列によってコードされ；

(iii) 前記第1膜貫通ドメイン及び前記第2膜貫通ドメインは、異なる(例えば、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%又は100%異なる)核酸配列によってコードされ；及び/又は

(iv) 前記第1細胞内シグナル伝達ドメイン及び前記第2細胞内シグナル伝達ドメインは、異なる(例えば、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%又は100%異なる)核酸配列によってコードされ、任意選択で、前記第1一次シグナル伝達ドメイン及び前記第2一次シグナル伝

20

達ドメインは、異なる(例えば、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%又は100%異なる)核酸配列によってコードされ、及び/又は前記第1共刺激シグナル伝達ドメイン及び前記第2共刺激シグナル伝達ドメインは、異なる(例えば、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%又は100%異なる)核酸配列によってコードされる、請求項30~34又は42~48のいずれか一項に記載の単離細胞。

【請求項50】

(i) 前記第1リーダー配列及び前記第2リーダー配列は、同じアミノ酸配列を含む(例えば、前記第1リーダー配列及び前記第2リーダー配列は、配列番号1のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む)か、又は異なるアミノ酸配列を含み；

30

(ii) 前記第1ヒンジ領域及び前記第2ヒンジ領域は、同じアミノ酸配列を含む(例えば、前記第1ヒンジ領域及び前記第2ヒンジ領域は、配列番号2のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む)か、又は異なるアミノ酸配列を含み；

(iii) 前記第1膜貫通ドメイン及び前記第2膜貫通ドメインは、同じアミノ酸配列を含む(例えば、前記第1膜貫通ドメイン及び前記第2膜貫通ドメインは、配列番号6のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む)か、又は異なるアミノ酸配列を含み；及び/又は

40

(iv) 前記第1細胞内シグナル伝達ドメイン及び前記第2細胞内シグナル伝達ドメインは、同じアミノ酸配列を含むか、又は異なるアミノ酸配列を含み、

任意選択で、前記第1一次シグナル伝達ドメイン及び前記第2一次シグナル伝達ドメインは、同じアミノ酸配列を含む(例えば、前記第1一次シグナル伝達ドメイン及び前記第2一次シグナル伝達ドメインは、配列番号10のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む)か、又は異なるアミノ酸配列を含み、及び/又は

前記第1共刺激シグナル伝達ドメイン及び前記第2共刺激シグナル伝達ドメインは、同じアミノ酸配列を含む(例えば、前記第1共刺激シグナル伝達ドメイン及び前記第2共刺激シグナル伝達ドメインは、配列番号7のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、9

50

0%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む)か、又は異なるアミノ酸配列を含む(例えば、前記第1及び第2共刺激シグナル伝達ドメインは、それぞれ4-1BB共刺激ドメイン配列及びCD28共刺激ドメイン配列を含むか;又はそれぞれCD28共刺激ドメイン配列及び4-1BB共刺激ドメイン配列を含む)、請求項49に記載の単離細胞。

【請求項51】

(i)前記第1リーダー配列及び前記第2リーダー配列は、それぞれ配列番号199及び210を含む核酸配列(又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列)又はそれぞれ配列番号210及び199を含む核酸配列(又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列)によってコードされ;

10

(ii)前記第1ヒンジ領域及び前記第2ヒンジ領域は、それぞれ配列番号337及び13を含む核酸配列(又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列)又はそれぞれ配列番号13及び337を含む核酸配列(又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列)によってコードされ;

(iii)前記第1膜貫通ドメイン及び前記第2膜貫通ドメインは、それぞれ配列番号338及び17を含む核酸配列(又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列);又はそれぞれ配列番号17及び338を含む核酸配列(又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列)によってコードされ;

20

(iv)前記第1共刺激シグナル伝達ドメイン及び前記第2共刺激シグナル伝達ドメインは、それぞれ配列番号204及び18を含む核酸配列(又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列);又はそれぞれ配列番号18及び204を含む核酸配列(又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列)によってコードされ;及び/又は

(v)前記第1一次シグナル伝達ドメイン及び前記第2一次シグナル伝達ドメインは、それぞれ配列番号205及び21を含む核酸配列(又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列);又はそれぞれ配列番号21及び205を含む核酸配列(又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列)によってコードされる、請求項49又は50に記載の単離細胞。

30

【請求項52】

前記CAR、第1CAR又は第2CARは、ウッドチャック肝炎転写後調節エレメント(WPRE)を含む核酸配列によってコードされる、請求項30~51のいずれか一項に記載の単離細胞。

【請求項53】

単離核酸分子であって、

(a)抗BCMA結合ドメインである第1抗原結合ドメインをコードする第1核酸配列であって、前記抗BCMA結合ドメインは、重鎖相補性決定領域1(HC CDR1)、重鎖相補性決定領域2(HC CDR2)及び重鎖相補性決定領域3(HC CDR3)を含む重鎖可変領域(VH)と、軽鎖相補性決定領域1(LC CDR1)、軽鎖相補性決定領域2(LC CDR2)及び軽鎖相補性決定領域3(LC CDR3)を含む軽鎖可変領域(VL)とを含み、前記HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、

40

(i)それぞれ配列番号86、130、88、95、131及び132;

(ii)それぞれ配列番号44、45、84、54、55及び56;又は

(iii)それぞれ配列番号179、180、181、147、182及び183

のアミノ酸配列を含む、第1核酸配列と;

(b)第2抗原結合ドメインをコードする第2核酸配列と

50

を含む単離核酸分子。

【請求項 5 4】

個別の核酸分子である第 1 核酸分子及び第 2 核酸分子を含み、前記第 1 核酸配列は、前記第 1 核酸分子上に配置され、及び前記第 2 核酸配列は、前記第 2 核酸分子上に配置される、請求項 5 3 に記載の単離核酸分子。

【請求項 5 5】

単離核酸分子であって、

(a) 抗 B C M A 結合ドメインである第 1 抗原結合ドメインをコードする第 1 核酸配列であって、前記抗 B C M A 結合ドメインは、

(i) 表 2 0 又は 2 6 に列挙される抗 B C M A 配列の H C C D R 1、H C C D R 2 及び H C C D R 3 を含む V H と、表 2 0 又は 2 6 に列挙される抗 B C M A 配列の L C C D R 1、L C C D R 2 及び L C C D R 3 を含む V L とであって、配列番号 2 4 3 のアミノ酸配列を含むリンカーによって連結される、V H 及び V L ;

(i i) それぞれ配列番号 2 3 9 及び 2 4 2 のアミノ酸配列を含む V H 及び V L であって、配列番号 2 4 3 のアミノ酸配列を含むリンカーによって連結される、V H 及び V L ; 又は

(i i i) 配列番号 2 0 0 のアミノ酸配列を含む s c F v を含む、第 1 核酸配列と ;

(b) 第 2 抗原結合ドメインをコードする第 2 核酸配列とを含む単離核酸分子。

【請求項 5 6】

第 1 C A R をコードする第 1 核酸配列と、第 2 C A R をコードする第 2 核酸配列とを含む単離核酸分子であって、前記第 1 C A R は、抗 B C M A 結合ドメインである第 1 抗原結合ドメイン、第 1 膜貫通ドメイン及び第 1 細胞内シグナル伝達ドメインを含み、前記第 2 C A R は、抗 C D 1 9 結合ドメインである第 2 抗原結合ドメイン、第 2 膜貫通ドメイン及び第 2 細胞内シグナル伝達ドメインを含み、

(i) 前記第 1 抗原結合ドメインは、それぞれ配列番号 8 6、8 7、8 8、9 5、9 6 及び 9 7 のアミノ酸配列を含む H C C D R 1、H C C D R 2、H C C D R 3、L C C D R 1、L C C D R 2 及び L C C D R を含み、及び前記第 2 抗原結合ドメインは、それぞれ配列番号 2 9 5 及び 2 4 5 ~ 2 4 9 のアミノ酸配列を含む H C C D R 1、H C C D R 2、H C C D R 3、L C C D R 1、L C C D R 2 及び L C C D R を含むか ;

(i i) 前記第 1 抗原結合ドメインは、それぞれ配列番号 9 3 及び 1 0 2 のアミノ酸配列を含む V H 及び V L を含み、及び前記第 2 抗原結合ドメインは、それぞれ配列番号 2 5 0 及び 2 5 1 のアミノ酸配列を含む V H 及び V L を含むか ;

(i i i) 前記第 1 抗原結合ドメインは、配列番号 1 0 5 のアミノ酸配列を含む s c F v を含み、及び前記第 2 抗原結合ドメインは、配列番号 2 1 1 のアミノ酸配列を含む s c F v を含むか ;

(i v) 前記第 1 C A R は、配列番号 1 0 7 又は 2 2 6 のアミノ酸配列を含み、及び前記第 2 C A R は、配列番号 2 2 5 又は 2 2 9 のアミノ酸配列を含むか ; 又は

(v) 前記単離核酸分子は、配列番号 2 7 1 の核酸配列を含む、単離核酸分子。

【請求項 5 7】

第 1 C A R をコードする第 1 核酸配列と、第 2 C A R をコードする第 2 核酸配列とを含む核酸分子であって、前記第 1 C A R は、抗 B C M A 結合ドメインである第 1 抗原結合ドメイン、第 1 膜貫通ドメイン及び第 1 細胞内シグナル伝達ドメインを含み、前記第 2 C A R は、抗 C D 1 9 結合ドメインである第 2 抗原結合ドメイン、第 2 膜貫通ドメイン及び第 2 細胞内シグナル伝達ドメインを含み、

(i) 前記第 1 抗原結合ドメインは、それぞれ配列番号 4 4、4 5、7 6、5 4、5 5 及び 5 6 のアミノ酸配列を含む H C C D R 1、H C C D R 2、H C C D R 3、L C C D R 1、L C C D R 2 及び L C C D R を含み、前記第 2 抗原結合ドメインは、それぞれ配列番号 2 9 5 及び 2 4 5 ~ 2 4 9 のアミノ酸配列を含む H C C D R 1、H C C

D R 2、H C C D R 3、L C C D R 1、L C C D R 2 及び L C C D R 3 を含むか；
 (i i) 前記第 1 抗原結合ドメインは、それぞれ配列番号 7 8 及び 6 1 のアミノ酸配列を含む V H 及び V L を含み、及び前記第 2 抗原結合ドメインは、それぞれ配列番号 2 5 0 及び 2 5 1 のアミノ酸配列を含む V H 及び V L を含むか；

(i i i) 前記第 1 抗原結合ドメインは、配列番号 8 0 のアミノ酸配列を含む s c F v を含み、及び前記第 2 抗原結合ドメインは、配列番号 2 1 1 のアミノ酸配列を含む s c F v を含むか；

(i v) 前記第 1 C A R は、配列番号 8 2 又は 2 2 4 のアミノ酸配列を含み、及び前記第 2 C A R は、配列番号 2 2 5 又は 2 2 9 のアミノ酸配列を含むか；又は

(v) 前記単離核酸分子は、配列番号 2 1 5 の核酸配列を含む、単離核酸分子。

10

【請求項 5 8】

請求項 5 3 ~ 5 7 のいずれか一項に記載の核酸分子によってコードされる単離ポリペプチド分子。

【請求項 5 9】

単離 C A R であって、

(a) 抗 B C M A 結合ドメインである第 1 抗原結合ドメインであって、前記抗 B C M A 結合ドメインは、重鎖相補性決定領域 1 (H C C D R 1)、重鎖相補性決定領域 2 (H C C D R 2) 及び重鎖相補性決定領域 3 (H C C D R 3) を含む重鎖可変領域 (V H) と、軽鎖相補性決定領域 1 (L C C D R 1)、軽鎖相補性決定領域 2 (L C C D R 2) 及び軽鎖相補性決定領域 3 (L C C D R 3) を含む軽鎖可変領域 (V L) とを含み、前記 H C C D R 1、H C C D R 2、H C C D R 3、L C C D R 1、L C C D R 2 及び L C C D R 3 は、

20

(i) それぞれ配列番号 8 6、1 3 0、8 8、9 5、1 3 1 及び 1 3 2；

(i i) それぞれ配列番号 4 4、4 5、8 4、5 4、5 5 及び 5 6；又は

(i i i) それぞれ配列番号 1 7 9、1 8 0、1 8 1、1 4 7、1 8 2 及び 1 8 3 のアミノ酸配列を含む、第 1 抗原結合ドメインと；

(b) 第 2 抗原結合ドメインとを含む単離 C A R。

【請求項 6 0】

単離 C A R であって、

(a) 抗 B C M A 結合ドメインである第 1 抗原結合ドメインであって、前記抗 B C M A 結合ドメインは、

(i) 表 2 0 又は 2 6 に列挙される抗 B C M A 配列の H C C D R 1、H C C D R 2 及び H C C D R 3 を含む V H と、表 2 0 又は 2 6 に列挙される抗 B C M A 配列の L C C D R 1、L C C D R 2 及び L C C D R 3 を含む V L とであって、配列番号 2 4 3 のアミノ酸配列を含むリンカーによって連結される、V H 及び V L；

(i i) それぞれ配列番号 2 3 9 及び 2 4 2 のアミノ酸配列を含む V H 及び V L であって、配列番号 2 4 3 のアミノ酸配列を含むリンカーによって連結される、V H 及び V L；又は

(i i i) 配列番号 2 0 0 のアミノ酸配列を含む s c F v を含む、第 1 抗原結合ドメインと；

(b) 第 2 抗原結合ドメインとを含む単離 C A R。

30

40

【請求項 6 1】

請求項 5 3 ~ 5 7 のいずれか一項に記載の核酸分子又は請求項 5 9 若しくは 6 0 に記載の C A R をコードする核酸分子を含むベクターであって、任意選択で、D N A ベクター、R N A ベクター、プラスミド、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター又はレトロウイルスベクターから選択されるベクター。

【請求項 6 2】

配列番号 1 1 の核酸配列を含む E F - 1 プロモーターをさらに含む、請求項 6 1 に記載

50

のベクター。

【請求項 6 3】

請求項 5 3 ~ 5 7 のいずれか一項に記載の核酸分子、請求項 5 8 に記載のポリペプチド分子、請求項 5 9 若しくは 6 0 に記載の C A R 又は請求項 6 1 若しくは 6 2 に記載のベクターを含む単離細胞。

【請求項 6 4】

T 細胞又は N K 細胞である、請求項 1 ~ 5 2 又は 6 3 のいずれか一項に記載の単離細胞。

【請求項 6 5】

細胞を作製する方法であって、請求項 6 2 又は 6 3 に記載のベクターで細胞を形質導入するステップを含み、任意選択で、前記細胞は、T 細胞又は N K 細胞である、方法。 10

【請求項 6 6】

R N A 操作細胞を作製する方法であって、インビトロで転写された R N A 又は合成 R N A を細胞に導入するステップを含み、前記 R N A は、請求項 5 3 ~ 5 7 のいずれか一項に記載の核酸分子又は請求項 5 9 若しくは 6 0 に記載の C A R をコードする核酸分子を含み、任意選択で、前記細胞は、T 細胞又は N K 細胞である、方法。

【請求項 6 7】

キメラ抗原受容体 (C A R) を発現する細胞 (例えば、T 細胞) の集団を作製する方法であって、

(i) 細胞 (例えば、T 細胞、例えば凍結された又は新鮮な白血球アフェレーシス産物から単離された T 細胞) の集団を、C D 3 / T C R 複合体を刺激する薬剤及び / 又は前記細胞の表面上の共刺激分子を刺激する薬剤と接触させる (例えば、結合させる) ステップ； 20

(i i) 前記細胞 (例えば、T 細胞) の集団を、請求項 5 3 ~ 5 7 のいずれか一項に記載の核酸分子又は請求項 5 9 若しくは 6 0 に記載の C A R をコードする核酸分子と接触させ、それにより前記核酸分子を含む細胞 (例えば、T 細胞) の集団を提供するステップ、及び

(i i i) 保存 (例えば、凍結保存培地中の前記細胞の集団の再製剤化) 又は投与のために前記細胞 (例えば、T 細胞) の集団を採取するステップ

を含み、

(a) ステップ (i i) は、ステップ (i) と一緒に、又はステップ (i) の開始後の 2 0 時間以内、例えばステップ (i) の開始後の 1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7 若しくは 1 8 時間以内、例えばステップ (i) の開始後の 1 8 時間以内実施され、及び 30
ステップ (i i i) は、ステップ (i) の開始後の 3 0 (例えば、2 6) 時間以内、例えばステップ (i) の開始後の 2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9 又は 3 0 時間以内、例えばステップ (i) の開始後の 2 4 時間以内実施されるか、

(b) ステップ (i i) は、ステップ (i) と一緒に、又はステップ (i) の開始後の 2 0 時間以内、例えばステップ (i) の開始後の 1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7 若しくは 1 8 時間以内、例えばステップ (i) の開始後の 1 8 時間以内実施され、及び
ステップ (i i i) は、ステップ (i i) の開始後の 3 0 時間以内、例えばステップ (i i) の開始後の 2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9 又は 3 0 時間以内に実 40
施されるか、又は

(c) ステップ (i i i) からの前記細胞の集団は、増殖されないか、又は例えばステップ (i) の開始時の前記細胞の集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて 5、1 0、1 5、2 0、2 5、3 0、3 5 若しくは 4 0 % 以下、例えば 1 0 % 以下だけ増殖され、任意選択で、ステップ (i i) の前記核酸分子は、ウイルスベクター上にあり、任意選択で、ステップ (i i) の前記核酸分子は、ウイルスベクター上の R N A 分子であり、任意選択で、ステップ (i i) は、前記 C A R をコードする核酸分子を含むウイルスベクターで前記細胞 (例えば、T 細胞) の集団を形質導入することを含む、方法。

【請求項 6 8】

C D 3 / T C R 複合体を刺激する前記薬剤は、C D 3 を刺激する薬剤 (例えば、抗 C D 50

3抗体)であり、共刺激分子を刺激する前記薬剤は、CD28、ICOS、CD27、HVEM、LIGHT、CD40、4-1BB、OX40、DR3、GITR、CD30、TIM1、CD2、CD226又はそれらの任意の組み合わせを刺激する薬剤であり、任意選択で、CD3/TCR複合体を刺激する前記薬剤又は共刺激分子を刺激する前記薬剤は、抗体(例えば、単ドメイン抗体(例えば、重鎖可変ドメイン抗体)、ペプチボディ、Fabフラグメント又はscFv)、小分子又はリガンド(例えば、天然に存在する、組換え又はキメラリガンド)から選択され、任意選択で、CD3/TCR複合体を刺激する前記薬剤又は共刺激分子を刺激する前記薬剤は、ビーズを含まず、任意選択で、CD3/TCR複合体を刺激する前記薬剤は、抗CD3抗体を含み、及び共刺激分子を刺激する前記薬剤は、抗CD28抗体を含み、任意選択で、CD3/TCR複合体を刺激する前記薬剤は、コロイドポリマーナノマトリックスに共有結合された抗CD3抗体を含み、及び共刺激分子を刺激する前記薬剤は、コロイドポリマーナノマトリックスに共有結合された抗CD28抗体を含み、任意選択で、CD3/TCR複合体を刺激する前記薬剤及び共刺激分子を刺激する前記薬剤は、T Cell Trans Act(商標)を含む、請求項67に記載の方法。

10

【請求項69】

ステップ(i)及び/又は(ii)は、IL-2、IL-15(例えば、hetIL-15(IL15/sIL-15Ra))、IL-7、IL-21、IL-6(例えば、IL-6/sIL-6Ra)、LSD1阻害剤、MALT1阻害剤又はそれらの組み合わせを含む細胞培地(例えば、無血清培地)中で実施される、請求項67又は68に記載の方法。

20

【請求項70】

ステップ(i)及び/又は(ii)は、血清代替品を含む無血清細胞培地中で実施され、任意選択で、前記血清代替品は、CTS(商標)Immune Cell Serum Replacement(ICSER)である、請求項67~69のいずれか一項に記載の方法。

【請求項71】

ステップ(i)前に、
(iv)(任意選択で)実体、例えば研究室、病院又は医療提供者から、新鮮な白血球アフエーシス産物(或いは新鮮な全血液産物、新鮮な骨髄産物又は新鮮な腫瘍若しくは臓器生検若しくは切除(例えば、胸腺除去からの新鮮な産物)などの造血組織の代替供給源)を受け取るステップ、及び
(v)新鮮な白血球アフエーシス産物(或いは新鮮な全血液産物、新鮮な骨髄産物又は新鮮な腫瘍若しくは臓器生検若しくは切除(例えば、胸腺除去からの新鮮な産物)などの造血組織の代替供給源)から、ステップ(i)で接触される前記細胞(例えば、T細胞、例えばCD8+及び/又はCD4+T細胞)の集団を単離するステップをさらに含み、任意選択で、
ステップ(iii)は、ステップ(v)の開始後の35時間以内、例えばステップ(v)の開始後の27、28、29、30、31、32、33、34又は35時間以内、例えばステップ(v)の開始後の30時間以内実施されるか、又は
ステップ(iii)からの前記細胞の集団は、ステップ(v)の終了時の前記細胞の集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて、増殖されないか、又は5、10、15、20、25、30、35若しくは40%以下、例えば10%以下だけ増殖される、請求項67~70のいずれか一項に記載の方法。

30

40

【請求項72】

ステップ(i)前に、実体、例えば研究室、病院又は医療提供者から、白血球アフエーシス産物(或いは全血液、骨髄又は腫瘍若しくは臓器生検若しくは切除(例えば、胸腺除去)から単離された凍結保存T細胞などの造血組織の代替供給源)から単離された凍結保存T細胞を受け取るステップをさらに含む、請求項67~70のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 73】

ステップ (i) 前に、

(i v) (任意選択で) 実体、例えば研究室、病院又は医療提供者から、凍結保存白血球アフェレーシス産物 (或いは凍結保存全血液産物、凍結保存骨髄産物又は凍結保存腫瘍若しくは臓器生検若しくは切除 (例えば、胸腺除去からの凍結保存産物) などの造血組織の代替供給源) を受け取るステップ、及び

(v) 凍結保存白血球アフェレーシス産物 (或いは凍結保存全血液産物、凍結保存骨髄産物又は凍結保存腫瘍若しくは臓器生検若しくは切除 (例えば、胸腺除去からの凍結保存産物) などの造血組織の代替供給源) から、ステップ (i) で接触される前記細胞 (例えば、T細胞、例えば CD 8 + 及び / 又は CD 4 + T細胞) の集団を単離するステップ

10

をさらに含み、任意選択で、

ステップ (i i i) は、ステップ (v) の開始後の 3 5 時間以内、例えばステップ (v) の開始後の 2 7、2 8、2 9、3 0、3 1、3 2、3 3、3 4 又は 3 5 時間以内、例えばステップ (v) の開始後の 3 0 時間以内に実施されるか、又は

ステップ (i i i) からの前記細胞の集団は、ステップ (v) の終了時の前記細胞の集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて、増殖されないか、又は 5、1 0、1 5、2 0、2 5、3 0、3 5 若しくは 4 0 % 以下、例えば 1 0 % 以下だけ増殖される、請求項 6 7 ~ 7 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 74】

ステップ (v i) :

20

ステップ (i i i) からの前記細胞の集団の一部を少なくとも 2、2 . 5、3、3 . 5、4、4 . 5、5、5 . 5、6、6 . 5 又は 7 日、例えば少なくとも 2 日且つ 7 日以下にわたって培養し、及び前記一部における C A R 発現レベルを測定する (例えば、前記一部における生存 C A R 発現細胞のパーセンテージを測定する) ステップ

をさらに含み、任意選択で、

ステップ (i i i) は、前記細胞 (例えば、T細胞) の集団を採取及び凍結することを含み、且つステップ (v i) は、ステップ (i i i) からの前記細胞の集団の一部を解凍し、前記一部を少なくとも 2、2 . 5、3、3 . 5、4、4 . 5、5、5 . 5、6、6 . 5 又は 7 日、例えば少なくとも 2 日且つ 7 日以下にわたって培養し、及び前記一部における C A R 発現レベルを測定する (例えば、前記一部における生存 C A R 発現細胞のパーセンテージを測定する) ことを含む、請求項 6 7 ~ 7 3 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 75】

キメラ抗原受容体 (C A R) を発現する細胞 (例えば、T細胞) の集団を作製する方法であって、

(1) 細胞 (例えば、T細胞、例えば凍結白血球アフェレーシス産物から単離された T細胞) の集団を、I L - 2、I L - 7、I L - 1 5 (例えば、h e t I L - 1 5 (I L 1 5 / s I L - 1 5 R a)、I L - 2 1、I L - 6 (例えば、I L - 6 / s I L - 6 R a) 又はそれらの組み合わせから選択されるサイトカインと接触させるステップ、

(2) 前記細胞 (例えば、T細胞) の集団を、請求項 5 3 ~ 5 7 のいずれか一項に記載の核酸分子又は請求項 5 9 若しくは 6 0 に記載の C A R をコードする核酸分子と接触させ、それにより前記核酸分子を含む細胞 (例えば、T細胞) の集団を提供するステップ、及び

40

(3) 保存 (例えば、凍結保存培地中の前記細胞の集団の再製剤化) 又は投与のために前記細胞 (例えば、T細胞) の集団を採取するステップ

を含み、

(a) ステップ (2) は、ステップ (1) と一緒に、又はステップ (1) の開始後の 5 時間以内、例えばステップ (1) の開始後の 1、2、3、4 又は 5 時間以内実施され、及び

ステップ (3) は、ステップ (1) の開始後の 2 6 時間以内、例えばステップ (1) の開始後の 2 2、2 3 又は 2 4 時間以内、例えばステップ (1) の開始後の 2 4 時間以内実施されるか、又は

50

(b) ステップ(3)からの前記細胞の集団は、例えば、ステップ(1)の開始時の前記細胞の集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて、増殖されないか、又は5、10、15、20、25、30、35若しくは40%以下、例えば10%以下だけ増殖され、任意選択で、ステップ(2)の前記核酸分子は、ウイルスベクター上にあり、任意選択で、ステップ(ii)の前記核酸分子は、ウイルスベクター上のRNA分子であり、任意選択で、ステップ(ii)は、前記細胞(例えば、T細胞)の集団を、前記CARをコードする核酸分子を含むウイルスベクターで形質導入することを含む、方法。

【請求項76】

前記細胞の集団は、CD3/TCR複合体を刺激する薬剤及び/若しくは前記細胞の表面上の共刺激分子を刺激する薬剤とインビトロで接触されないか、又は接触される場合、前記接触させるステップは、2時間未満、例えば1若しくは1.5時間以下である、請求項75に記載の方法。

10

【請求項77】

CD3/TCR複合体を刺激する前記薬剤は、CD3を刺激する薬剤(例えば、抗CD3抗体)であり、共刺激分子を刺激する前記薬剤は、CD28、ICOS、CD27、HVEM、LIGHT、CD40、4-1BB、OX40、DR3、GITR、CD30、TIM1、CD2、CD226又はそれらの任意の組み合わせを刺激する薬剤であり、任意選択で、CD3/TCR複合体を刺激する前記薬剤又は共刺激分子を刺激する前記薬剤は、抗体(例えば、単ドメイン抗体(例えば、重鎖可変ドメイン抗体)、ペプチボディ、Fabフラグメント又はscFv)、小分子又はリガンド(例えば、天然に存在する、組換え又はキメラリガンド)から選択される、請求項76に記載の方法。

20

【請求項78】

ステップ(1)及び/又は(2)は、5、4、3、2、1又は0%以下の血清を含む細胞培地中で実施され、任意選択で、ステップ(1)及び/又は(2)は、約2%の血清を含む細胞培地中で実施されるか、又はLSD1阻害剤又はMALT1阻害剤を含む細胞培地中で実施される、請求項75~77のいずれか一項に記載の方法。

【請求項79】

実体、例えば研究室、病院又は医療提供者から、凍結保存白血球アフェレーシス産物(或いは凍結保存全血液産物、凍結保存骨髄産物又は凍結保存腫瘍若しくは臓器生検若しくは切除(例えば、胸腺除去からの凍結保存産物)などの造血組織の代替供給源)を受け取るステップをさらに含む、請求項75~78のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項80】

ステップ(i)又はステップ(1)の開始時の前記細胞の集団は、IL6R発現細胞(例えば、IL6R及び/又はIL6Rについて陽性の細胞)について濃縮されているか;又は

ステップ(i)又はステップ(1)の開始時の前記細胞の集団は、50、60又は70%以上のIL6R発現細胞(例えば、IL6R及び/又はIL6Rについて陽性の細胞)を含む、請求項67~79のいずれか一項に記載の方法。

【請求項81】

ステップ(i)及び(ii)又はステップ(1)及び(2)は、IL-15(例えば、hetIL-15(IL15/sIL-15Ra))を含む細胞培地中で実施される、請求項67~80のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項82】

請求項67~81のいずれか一項に記載の方法によって作製される細胞の集団。

【請求項83】

CARを発現するように操作された細胞の集団(「CAR発現細胞の集団」)であって、
(a) 前記CARを発現するように操作される前の同じ細胞の集団中のナイーブ細胞、例えばナイーブT細胞、例えばCD45RO-CCR7+T細胞のパーセンテージと比べて

50

- 、ほぼ同じパーセンテージのナイーブ細胞、例えばナイーブT細胞、例えばCD45RO - CCR7 + T細胞；
- (b) 前記CARを発現するように操作される前の同じ細胞の集団中のナイーブ細胞、例えばナイーブT細胞、例えばCD45RO - CCR7 + T細胞のパーセンテージと比べて、ナイーブ細胞、例えばナイーブT細胞、例えばCD45RO - CCR7 + T細胞の約5% ~ 約10%以内の変化；
- (c) 前記CARを発現するように操作される前の同じ細胞の集団中のナイーブ細胞、例えばナイーブT細胞、例えばCD45RO - CCR7 + T細胞のパーセンテージと比べて、増加したパーセンテージの、例えば少なくとも1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、2.2、2.4、2.6、2.8又は3倍増加したナイーブ細胞、例えばナイーブT細胞、例えばCD45RO - CCR7 + T細胞；
- (d) 前記CARを発現するように操作される前の同じ細胞の集団中のセントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリーT細胞、例えばCCR7 + CD45RO + T細胞のパーセンテージと比べて、ほぼ同じパーセンテージのセントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリーT細胞、例えばCCR7 + CD45RO + T細胞；
- (e) 前記CARを発現するように操作される前の同じ細胞の集団中のセントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリーT細胞、例えばCCR7 + CD45RO + T細胞のパーセンテージと比べて、セントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリーT細胞、例えばCCR7 + CD45RO + T細胞の約5% ~ 約10%以内の変化；
- (f) 前記CARを発現するように操作される前の同じ細胞の集団中のセントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリーT細胞、例えばCCR7 + CD45RO + T細胞のパーセンテージと比べて、減少したパーセンテージの、例えば少なくとも20、25、30、35、40、45又は50%減少したセントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリーT細胞、例えばCCR7 + CD45RO + T細胞；
- (g) 前記CARを発現するように操作される前の同じ細胞の集団中の幹メモリーT細胞、例えばCD45RA + CD95 + IL-2受容体 + CCR7 + CD62L + T細胞のパーセンテージと比べて、ほぼ同じパーセンテージの幹メモリーT細胞、例えばCD45RA + CD95 + IL-2受容体 + CCR7 + CD62L + T細胞；
- (h) 前記CARを発現するように操作される前の同じ細胞の集団中の幹メモリーT細胞、例えばCD45RA + CD95 + IL-2受容体 + CCR7 + CD62L + T細胞のパーセンテージと比べて、幹メモリーT細胞、例えばCD45RA + CD95 + IL-2受容体 + CCR7 + CD62L + T細胞の約5% ~ 約10%以内の変化；又は
- (i) 前記CARを発現するように操作される前の同じ細胞の集団中の幹メモリーT細胞、例えばCD45RA + CD95 + IL-2受容体 + CCR7 + CD62L + T細胞のパーセンテージと比べて、増加したパーセンテージの幹メモリーT細胞、例えばCD45RA + CD95 + IL-2受容体 + CCR7 + CD62L + T細胞を含み、
- (a) 抗BCMA結合ドメインである第1抗原結合ドメインであって、前記抗BCMA結合ドメインは、重鎖相補性決定領域1 (HC CDR1)、重鎖相補性決定領域2 (HC CDR2) 及び重鎖相補性決定領域3 (HC CDR3) を含む重鎖可変領域 (VH) と、軽鎖相補性決定領域1 (LC CDR1)、軽鎖相補性決定領域2 (LC CDR2) 及び軽鎖相補性決定領域3 (LC CDR3) を含む軽鎖可変領域 (VL) とを含み、前記HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2 及びLC CDR3は、
- (i) それぞれ配列番号86、130、88、95、131及び132；
- (ii) それぞれ配列番号44、45、84、54、55及び56；又は
- (iii) それぞれ配列番号179、180、181、147、182及び183の amino acid 配列を含む、第1抗原結合ドメインと；
- (b) 第2抗原結合ドメインとを含む細胞の集団 (「CAR発現細胞の集団」)。

10

20

30

40

50

【請求項 8 4】

請求項 1 ~ 5 2、6 3 若しくは 6 4 のいずれか一項に記載の細胞又は請求項 8 2 若しくは 8 3 に記載の細胞の集団及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 8 5】

対象において抗腫瘍免疫を提供する方法であって、有効量の、請求項 1 ~ 5 2、6 3 若しくは 6 4 のいずれか一項に記載の細胞、請求項 8 2 若しくは 8 3 に記載の細胞の集団又は請求項 8 4 に記載の医薬組成物を前記対象に投与するステップを含む方法。

【請求項 8 6】

B C M A の発現に関連する疾患を有する対象を処置する方法であって、有効量の、請求項 1 ~ 5 2、6 3 若しくは 6 4 のいずれか一項に記載の細胞、請求項 8 2 若しくは 8 3 に記載の細胞の集団又は請求項 8 4 に記載の医薬組成物を前記対象に投与するステップを含む方法。

10

【請求項 8 7】

B C M A の発現に関連する前記疾患は、
 (i) 骨髄形成異常、骨髄異形成症候群又は前白血病の 1 つ以上から選択される癌若しくは悪性疾患又は前癌状態、又は
 (i i) B C M A の発現に関連する非癌関連適応症
 である、請求項 8 6 に記載の方法。

【請求項 8 8】

前記疾患は、血液癌又は固形癌である、請求項 8 6 又は 8 7 に記載の方法。

20

【請求項 8 9】

前記疾患は、急性白血病、B 細胞急性リンパ性白血病（「BALL」）、T 細胞急性リンパ性白血病（「TALL」）、急性リンパ性白血病（ALL）、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、B 細胞前リンパ球性白血病、芽球性形質細胞様樹状細胞新生物、パーキットリンパ腫、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、ヘアリー細胞白血病、小細胞型若しくは大細胞型濾胞性リンパ腫、悪性リンパ球増殖性病態、MALT リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、多発性骨髄腫、骨髄形成異常及び骨髄異形成症候群、非ホジキンリンパ腫、形質芽球性リンパ腫、形質細胞様樹状細胞新生物、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、前立腺癌（例えば、去勢抵抗性若しくは治療抵抗性前立腺癌又は転移性前立腺癌）、膵臓癌、肺癌、形質細胞増殖異常症（例えば、無症候性骨髄腫（くすぶり型多発性骨髄腫又は無症候性骨髄腫）、意義不明の単クローン性 グロブリン血症（MGUS）、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、形質細胞腫（例えば、形質細胞異常増殖症、孤立性骨髄腫、孤立性形質細胞腫、髄外性形質細胞腫及び多発性形質細胞腫）、全身性アミロイド軽鎖アミロイドーシス若しくは POEMS 症候群（クロウ・深瀬症候群、高月病及び PEP 症候群としても知られる））又はそれらの組み合わせから選択される、請求項 8 6 ~ 8 8 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 9 0】

前記疾患は、多発性骨髄腫である、請求項 8 6 ~ 8 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 1】

前記細胞の集団又は医薬組成物は、約 1×10^6 ~ 約 1×10^8 （例えば、約 2×10^6 ~ 約 5×10^7 、約 5×10^6 ~ 約 2×10^7 、約 1×10^6 ~ 約 1×10^7 、約 1×10^7 ~ 約 1×10^8 、約 1×10^6 ~ 約 3×10^6 、約 2×10^6 ~ 約 4×10^6 、約 3×10^6 ~ 約 5×10^6 、約 4×10^6 ~ 約 6×10^6 、約 5×10^6 ~ 約 7×10^6 、約 6×10^6 ~ 約 8×10^6 、約 7×10^6 ~ 約 9×10^6 、約 8×10^6 ~ 約 1×10^7 、約 9×10^6 ~ 約 2×10^7 、約 1×10^7 ~ 約 3×10^7 、約 2×10^7 ~ 約 4×10^7 、約 3×10^7 ~ 約 5×10^7 、約 4×10^7 ~ 約 6×10^7 、約 5×10^7 ~ 約 7×10^7 、約 6×10^7 ~ 約 8×10^7 、約 7×10^7 ~ 約 9×10^7 、約 8×10^7 ~ 約 1×10^8 、約 1×10^6 、約 2×10^6 、約 3×10^6 、約 4×10^6 、約 5×10^6 、約 6×10^6 、約 7×10^6 、約 8×10^6 、約 9×10^6 、約 1×10^7 、約

40

50

2×10^7 、約 3×10^7 、約 4×10^7 、約 5×10^7 、約 6×10^7 、約 7×10^7 、約 8×10^7 、約 9×10^7 又は約 1×10^8) 個の CAR 陽性生存細胞 (例えば、BCMA CAR + T 細胞) の用量で前記対象に投与され、任意選択で、前記細胞の集団又は医薬組成物は、約 5×10^6 ~ 約 2×10^7 個の CAR 陽性生存細胞 (例えば、BCMA CAR + T 細胞) の用量で前記対象に投与される、請求項 85 ~ 90 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 92】

前記対象に第 2 治療薬を投与するステップをさらに含み、任意選択で、前記第 2 治療薬は、

(i) PD - 1 阻害剤であって、任意選択で、PDR001、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、ピジリズマブ、MED10680、REGN2810、TSR - 042、PF - 06801591 及び AMP - 224 からなる群から選択される PD - 1 阻害剤； 10

(ii) PD - L1 阻害剤であって、任意選択で、FAZ053、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ及び BMS - 936559 からなる群から選択される PD - L1 阻害剤；

(iii) LAG - 3 阻害剤であって、任意選択で、LAG525、BMS - 986016、TSR - 033、MK - 4280 及び REGN3767 からなる群から選択される LAG - 3 阻害剤；

(iv) TIM - 3 阻害剤であって、任意選択で、MBG453、TSR - 022 及び LY3321367 からなる群から選択される TIM - 3 阻害剤； 20

(v) CTLA - 4 阻害剤であって、任意選択で、イピリムマブ又はトレメリムマブである CTLA - 4 阻害剤；

(vi) インターロイキン - 15 (IL - 15) ポリペプチド、インターロイキン - 15 受容体 (IL - 15 Ra) ポリペプチド又は IL - 15 ポリペプチドと IL - 15 Ra ポリペプチドとの両方の組み合わせ、例えば hetIL - 15；

(vii) インターロイキン - 12 (IL - 12) ポリペプチド；又は

(viii) mTOR 阻害剤であって、任意選択で、RAD001 又はラパマイシンである mTOR 阻害剤

から選択される、請求項 85 ~ 91 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 93】 30

単離細胞であって、

(a) 第 1 抗原に結合する第 1 抗原結合ドメイン、第 1 膜貫通ドメイン及び第 1 細胞内シグナル伝達ドメイン (例えば、第 1 一次シグナル伝達ドメイン及び / 又は第 1 共刺激シグナル伝達ドメイン) を含む第 1 CAR であって、任意選択で、第 1 リーダー配列及び / 又は第 1 ヒンジ領域を含む、第 1 CAR と；

(b) 第 2 抗原に結合する第 2 抗原結合ドメイン、第 2 膜貫通ドメイン及び第 2 細胞内シグナル伝達ドメイン (例えば、第 2 一次シグナル伝達ドメイン及び / 又は第 2 共刺激シグナル伝達ドメイン) を含む第 2 CAR であって、任意選択で、第 2 リーダー配列及び / 又は第 2 ヒンジ領域を含む、第 2 CAR と

を含み、 40

(i) 前記第 1 リーダー配列及び前記第 2 リーダー配列は、異なる (例えば、少なくとも 5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95% 又は 100% 異なる) 核酸配列によってコードされ、任意選択で、前記第 1 及び第 2 リーダー配列は、同じアミノ酸配列を含み；

(ii) 前記第 1 ヒンジ領域及び前記第 2 ヒンジ領域は、異なる (例えば、少なくとも 5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95% 又は 100% 異なる) 核酸配列によってコードされ、任意選択で、前記第 1 及び第 2 ヒンジ領域は、同じアミノ酸配列を含み；

(iii) 前記第 1 膜貫通ドメイン及び前記第 2 膜貫通ドメインは、異なる (例えば、少なくとも 5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、8 50

5%、90%、95%又は100%異なる)核酸配列によってコードされ、任意選択で、前記第1及び第2膜貫通ドメインは、同じアミノ酸配列を含み;及び/又は

(iv)前記第1細胞内シグナル伝達ドメイン及び前記第2細胞内シグナル伝達ドメインは、異なる(例えば、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%又は100%異なる)核酸配列によってコードされ、

任意選択で、前記第1一次シグナル伝達ドメイン及び前記第2一次シグナル伝達ドメインは、異なる(例えば、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%又は100%異なる)核酸配列によってコードされ、及び/又は

前記第1共刺激シグナル伝達ドメイン及び前記第2共刺激シグナル伝達ドメインは、異なる(例えば、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%又は100%異なる)核酸配列によってコードされる、単離細胞。

【請求項94】

単離核酸分子であって、

(a)第1CARをコードする第1核酸配列であって、前記第1CARは、第1抗原に結合する第1抗原結合ドメイン、第1膜貫通ドメイン及び第1細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、第1一次シグナル伝達ドメイン及び/又は第1共刺激シグナル伝達ドメイン)を含み、任意選択で、前記第1CARは、第1リーダー配列及び/又は第1ヒンジ領域を含む、第1核酸配列と;

(b)第2CARをコードする第2核酸配列であって、前記第2CARは、第2抗原に結合する第2抗原結合ドメイン、第2膜貫通ドメイン及び第2細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、第2一次シグナル伝達ドメイン及び/又は第2共刺激シグナル伝達ドメイン)を含み、任意選択で、前記第2CARは、第2リーダー配列及び/又は第2ヒンジ領域を含む、第2核酸配列と

を含み、

(i)前記第1リーダー配列及び前記第2リーダー配列は、異なる(例えば、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%又は100%異なる)核酸配列によってコードされ、任意選択で、前記第1及び第2リーダー配列は、同じアミノ酸配列を含み;

(ii)前記第1ヒンジ領域及び前記第2ヒンジ領域は、異なる(例えば、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%又は100%異なる)核酸配列によってコードされ、任意選択で、前記第1及び第2ヒンジ領域は、同じアミノ酸配列を含み;

(iii)前記第1膜貫通ドメイン及び前記第2膜貫通ドメインは、異なる(例えば、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%又は100%異なる)核酸配列によってコードされ、任意選択で、前記第1及び第2膜貫通ドメインは、同じアミノ酸配列を含み;及び/又は

(iv)前記第1細胞内シグナル伝達ドメイン及び前記第2細胞内シグナル伝達ドメインは、異なる(例えば、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%又は100%異なる)核酸配列によってコードされ、

任意選択で、前記第1一次シグナル伝達ドメイン及び前記第2一次シグナル伝達ドメインは、異なる(例えば、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%又は100%異なる)核酸配列によってコードされ、及び/又は

前記第1共刺激シグナル伝達ドメイン及び前記第2共刺激シグナル伝達ドメインは、異なる(例えば、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%又は100%異なる)核酸配列によってコードされ

10

20

30

40

50

る、単離核酸分子。

【請求項 9 5】

前記第 1 一次シグナル伝達ドメイン及び前記第 2 一次シグナル伝達ドメインは、同じアミノ酸配列を含むか、若しくは異なるアミノ酸配列を含み、及び/又は前記第 1 共刺激シグナル伝達ドメイン及び前記第 2 共刺激シグナル伝達ドメインは、同じアミノ酸配列を含むか、若しくは異なるアミノ酸配列を含む(例えば、前記第 1 及び第 2 共刺激シグナル伝達ドメインは、それぞれ 4 - 1 B B 共刺激ドメイン配列及び C D 2 8 共刺激ドメイン配列を含むか; 又はそれぞれ C D 2 8 共刺激ドメイン配列及び 4 - 1 B B 共刺激ドメイン配列を含む)、請求項 9 3 に記載の単離細胞又は請求項 9 4 に記載の単離核酸分子。

【請求項 9 6】

(i) 前記第 1 リーダー配列及び前記第 2 リーダー配列は、配列番号 1 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み;

(i i) 前記第 1 ヒンジ領域及び前記第 2 ヒンジ領域は、配列番号 2 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み;

(i i i) 前記第 1 膜貫通ドメイン及び前記第 2 膜貫通ドメインは、配列番号 6 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み;

(i v) 前記第 1 共刺激シグナル伝達ドメイン及び前記第 2 共刺激シグナル伝達ドメインは、配列番号 7 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み; 及び/又は

(v) 前記第 1 一次シグナル伝達ドメイン及び前記第 2 一次シグナル伝達ドメインは、配列番号 1 0 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 9 3 若しくは 9 5 に記載の単離細胞又は請求項 9 4 若しくは 9 5 に記載の単離核酸分子。

【請求項 9 7】

(i) 前記第 1 リーダー配列及び前記第 2 リーダー配列は、それぞれ配列番号 1 9 9 及び 2 1 0 を含む核酸配列(又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有する核酸配列)又はそれぞれ配列番号 2 1 0 及び 1 9 9 を含む核酸配列(又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有する核酸配列)によってコードされ;

(i i) 前記第 1 ヒンジ領域及び前記第 2 ヒンジ領域は、それぞれ配列番号 3 3 7 及び 1 3 を含む核酸配列(又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有する核酸配列)又はそれぞれ配列番号 1 3 及び 3 3 7 を含む核酸配列(又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有する核酸配列)によってコードされ;

(i i i) 前記第 1 膜貫通ドメイン及び前記第 2 膜貫通ドメインは、それぞれ配列番号 3 3 8 及び 1 7 を含む核酸配列(又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有する核酸配列); 又はそれぞれ配列番号 1 7 及び 3 3 8 を含む核酸配列(又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有する核酸配列)によってコードされ;

(i v) 前記第 1 共刺激シグナル伝達ドメイン及び前記第 2 共刺激シグナル伝達ドメインは、それぞれ配列番号 2 0 4 及び 1 8 を含む核酸配列(又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有する核酸配列); 又はそれぞれ配列番号 1 8 及び 2 0 4 を含む核酸配列(又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有する核酸配列)によってコードされ; 及び/又は

(i v) 前記第 1 一次シグナル伝達ドメイン及び前記第 2 一次シグナル伝達ドメインは、それぞれ配列番号 2 0 5 及び 2 1 を含む核酸配列(又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有する核酸配列); 又はそれぞれ配列番号 2 1

10

20

30

40

50

及び205を含む核酸配列（又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列）によってコードされる、請求項93、95若しくは96のいずれか一項に記載の単離細胞又は請求項94～96のいずれか一項に記載の単離核酸分子。

【請求項98】

前記第1又は第2抗原は、BCMA、CD19、CD5、CD10、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD27、CD30、CD34、CD37、CD38、CD40、CD53、CD69、CD72、CD73、CD74、CD75、CD77、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85、CD86、CD123、CD135、CD138、CD179、CD269、Flt3、ROR1、FcRn5、FcRn2、CS-1、CXCR4、5、7、IL-7/3R、IL7/4/3R又はIL4Rから選択され、任意選択で、前記B細胞抗原は、CD19、CD20、CD22、FcRn5、FcRn2、CS-1、CD138、CD123、CD33、CD34、CLL-1、葉酸受容体、FLT3、EGFRvIII、メソテリン、GD2、Tn抗原、sTn抗原、Tn-O-糖ペプチド、sTn-O-糖ペプチド、PSMA、CD97、TAG72、CD44v6、CEA、EPCAM、KIT、IL-13Ra2、レグマン、GD3、CD171、IL-11Ra、PSCA、MAD-CT-1、MAD-CT-2、VEGFR2、ルイスY、CD24、PDGFR、SSEA-4、葉酸受容体、ERBB（例えば、ERBB2）、Her2/neu、MUC1、EGFR、NCAM、エフリンB2、CAIX、LMP2、sLe、HMWMAA、o-アセチル-GD2、葉酸受容体、TEM1/CD248、TEM7R、FAP、レグマイン、HPV E6若しくはE7、ML-IAP、CLDN6、TSHR、GPRC5D、ALK、ポリシアル酸、Fos関連抗原、好中球エラスターゼ、TRP-2、CYP1B1、精子タンパク質17、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、AFP、チログロブリン、PLAC1、グロボH、RAGE1、MN-CAIX、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、腸カルボキシエステラーゼ、mut hsp 70-2、NA-17、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、NY-ESO-1、GPR20、Ly6k、OR51E2、TARP、GFR4又はMHCに提示される前記抗原のいずれかのペプチドから選択される、請求項93若しくは95～97のいずれか一項に記載の単離細胞又は請求項94～97のいずれか一項に記載の単離核酸分子。

【請求項99】

前記第1又は第2抗原結合ドメインは、本明細書に開示されるCDR、VH、VL若しくはscFv又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項93若しくは95～98のいずれか一項に記載の単離細胞又は請求項94～98のいずれか一項に記載の単離核酸分子。

【請求項100】

単離CARであって、第1VH（VH1）、第1VL（VL1）、第2VH（VH2）、第2VL（VL2）、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを含み、前記VH1及びVL1は、第1抗原に結合し、且つ前記VH2及びVL2は、第2抗原に結合し、前記VH1、VL1、VH2及びVL2は、N末端からC末端まで、以下の構成：

(i) VH1 - 任意選択でリンカー1（「L1」） - VH2 - 任意選択でリンカー2（「L2」） - VL2 - 任意選択でリンカー3（「L3」） - VL1；

(ii) VH1 - 任意選択でL1 - VL2 - 任意選択でL2 - VH2 - 任意選択でL3 - VL1；

(iii) VL1 - 任意選択でL1 - VH2 - 任意選択でL2 - VL2 - 任意選択でL3 - VH1；

(iv) VL1 - 任意選択でL1 - VL2 - 任意選択でL2 - VH2 - 任意選択でL3 - VH1；

(v) VH2 - 任意選択でL1 - VH1 - 任意選択でL2 - VL1 - 任意選択でL3 - V

L 2 ;

(v i) V H 2 - 任意選択で L 1 - V L 1 - 任意選択で L 2 - V H 1 - 任意選択で L 3 - V L 2 ;

(v i i) V L 2 - 任意選択で L 1 - V H 1 - 任意選択で L 2 - V L 1 - 任意選択で L 3 - V H 2 ; 又は

(v i i i) V L 2 - 任意選択で L 1 - V L 1 - 任意選択で L 2 - V H 1 - 任意選択で L 3 - V H 2

で配列される、単離 C A R。

【請求項 1 0 1】

前記 V H 1、V L 1、V H 2 及び V L 2 は、N 末端から C 末端まで、以下の構成：

(i) V H 1 - リンカー 1 (「 L 1 」) - V H 2 - リンカー 2 (「 L 2 」) - V L 2 - リンカー 3 (「 L 3 」) - V L 1 ;

(i i) V H 1 - L 1 - V L 2 - L 2 - V H 2 - L 3 - V L 1 ;

(i i i) V L 1 - L 1 - V H 2 - L 2 - V L 2 - L 3 - V H 1 ;

(i v) V L 1 - L 1 - V L 2 - L 2 - V H 2 - L 3 - V H 1 ;

(v) V H 2 - L 1 - V H 1 - L 2 - V L 1 - L 3 - V L 2 ;

(v i) V H 2 - L 1 - V L 1 - L 2 - V H 1 - L 3 - V L 2 ;

(v i i) V L 2 - L 1 - V H 1 - L 2 - V L 1 - L 3 - V H 2 ; 又は

(v i i i) V L 2 - L 1 - V L 1 - L 2 - V H 1 - L 3 - V H 2

で配列される、請求項 1 0 0 に記載の単離 C A R。

【請求項 1 0 2】

L 1 又は L 3 は、配列番号 5 のアミノ酸配列を含み、及び / 又は L 2 は、配列番号 6 3 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 0 0 又は 1 0 1 に記載の単離 C A R。

【請求項 1 0 3】

N 末端から C 末端まで、以下の構成：

(i) V H 1 - 任意選択でリンカー 1 (「 L 1 」) - V H 2 - 任意選択でリンカー 2 (「 L 2 」) - V L 2 - 任意選択でリンカー 3 (「 L 3 」) - V L 1 - 任意選択でヒンジ領域 - 膜貫通ドメイン - 細胞内シグナル伝達ドメイン；

(i i) V H 1 - 任意選択で L 1 - V L 2 - 任意選択で L 2 - V H 2 - 任意選択で L 3 - V L 1 - 任意選択でヒンジ領域 - 膜貫通ドメイン - 細胞内シグナル伝達ドメイン；

(i i i) V L 1 - 任意選択で L 1 - V H 2 - 任意選択で L 2 - V L 2 - 任意選択で L 3 - V H 1 - 任意選択でヒンジ領域 - 膜貫通ドメイン - 細胞内シグナル伝達ドメイン；

(i v) V L 1 - 任意選択で L 1 - V L 2 - 任意選択で L 2 - V H 2 - 任意選択で L 3 - V H 1 - 任意選択でヒンジ領域 - 膜貫通ドメイン - 細胞内シグナル伝達ドメイン；

(v) V H 2 - 任意選択で L 1 - V H 1 - 任意選択で L 2 - V L 1 - 任意選択で L 3 - V L 2 - 任意選択でヒンジ領域 - 膜貫通ドメイン - 細胞内シグナル伝達ドメイン；

(v i) V H 2 - 任意選択で L 1 - V L 1 - 任意選択で L 2 - V H 1 - 任意選択で L 3 - V L 2 - 任意選択でヒンジ領域 - 膜貫通ドメイン - 細胞内シグナル伝達ドメイン；

(v i i) V L 2 - 任意選択で L 1 - V H 1 - 任意選択で L 2 - V L 1 - 任意選択で L 3 - V H 2 - 任意選択でヒンジ領域 - 膜貫通ドメイン - 細胞内シグナル伝達ドメイン；又は

(v i i i) V L 2 - 任意選択で L 1 - V L 1 - 任意選択で L 2 - V H 1 - 任意選択で L 3 - V H 2 - 任意選択でヒンジ領域 - 膜貫通ドメイン - 細胞内シグナル伝達ドメイン

を含む、請求項 1 0 0 ~ 1 0 2 のいずれか一項に記載の単離 C A R。

【請求項 1 0 4】

前記第 1 又は第 2 抗原は、異なり、且つ前記第 1 又は第 2 抗原は、B C M A、C D 1 9、C D 5、C D 1 0、C D 2 0、C D 2 1、C D 2 2、C D 2 3、C D 2 4、C D 2 5、C D 2 7、C D 3 0、C D 3 4、C D 3 7、C D 3 8、C D 4 0、C D 5 3、C D 6 9、C D 7 2、C D 7 3、C D 7 4、C D 7 5、C D 7 7、C D 7 9 a、C D 7 9 b、C D 8 0、C D 8 1、C D 8 2、C D 8 3、C D 8 4、C D 8 5、C D 8 6、C D 1 2 3、C D 1 3 5、C D 1 3 8、C D 1 7 9、C D 2 6 9、F l t 3、R O R 1、F c R n 5、F c

50

R n 2、C S - 1、C X C R 4、5、7、I L - 7 / 3 R、I L 7 / 4 / 3 R又はI L 4 Rから選択され、任意選択で、前記B細胞抗原は、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 2、F c R n 5、F c R n 2、C S - 1、C D 1 3 8、C D 1 2 3、C D 3 3、C D 3 4、C L L - 1、葉酸受容体、F L T 3、E G F R v I I I、メソテリン、G D 2、T n 抗原、s T n 抗原、T n - O - 糖ペプチド、s T n - O - 糖ペプチド、P S M A、C D 9 7、T A G 7 2、C D 4 4 v 6、C E A、E P C A M、K I T、I L - 1 3 R a 2、レグマン、G D 3、C D 1 7 1、I L - 1 1 R a、P S C A、M A D - C T - 1、M A D - C T - 2、V E G F R 2、ルイスY、C D 2 4、P D G F R -、S S E A - 4、葉酸受容体、E R B B (例えば、E R B B 2)、H e r 2 / n e u、M U C 1、E G F R、N C A M、エフリンB 2、C A I X、L M P 2、s L e、H M W M A A、o - アセチル - G D 2、葉酸受容体、T E M 1 / C D 2 4 8、T E M 7 R、F A P、レグマイン、H P V E 6若しくはE 7、M L - I A P、C L D N 6、T S H R、G P R C 5 D、A L K、ポリシアル酸、F o s 関連抗原、好中球エラスターゼ、T R P - 2、C Y P 1 B 1、精子タンパク質 1 7、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、A F P、チログロブリン、P L A C 1、グロボH、R A G E 1、M N - C A I X、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、腸カルボキシエステラーゼ、m u t h s p 7 0 - 2、N A - 1 7、N Y - B R - 1、U P K 2、H A V C R 1、A D R B 3、P A N X 3、N Y - E S O - 1、G P R 2 0、L y 6 k、O R 5 1 E 2、T A R P、G F R 4又はM H Cに提示される前記抗原のいずれかのペプチドから選択される、請求項100~103のいずれか一項に記載の単離C A R。

10

【請求項105】

20

(i) 前記V H 1、V L 1、V H 2又はV L 2は、本明細書に開示されるC D R、V H若しくはV L配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み；及び/又は

(ii) 前記ヒンジ領域、膜貫通ドメイン又は細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、一次シグナル伝達ドメイン及び/又は共刺激シグナル伝達ドメイン)は、本明細書に開示されるヒンジ領域配列、膜貫通ドメイン配列若しくは細胞内シグナル伝達ドメイン配列(例えば、一次シグナル伝達ドメイン配列及び/若しくは共刺激シグナル伝達ドメイン配列)又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項100~104のいずれか一項に記載の単離C A R。

【請求項106】

30

請求項100~105のいずれか一項に記載のC A Rをコードする単離核酸分子。

【請求項107】

請求項106に記載の核酸分子を含む単離ベクター。

【請求項108】

請求項100~105のいずれか一項に記載のC A R、請求項106に記載の核酸分子又は請求項107に記載のベクターを含む単離細胞。

【請求項109】

キメラ抗原受容体(C A R)を発現する細胞(例えば、T細胞)の集団を作製する方法であって、

(i) 細胞(例えば、T細胞、例えば凍結された又は新鮮な白血球アフェレーシス産物から単離されたT細胞)の集団を、C D 3 / T C R複合体を刺激する薬剤及び/又は前記細胞の表面上の共刺激分子を刺激する薬剤と接触させる(例えば、結合させる)ステップ；

40

(ii) 前記細胞(例えば、T細胞)の集団を、前記C A Rをコードする核酸分子(例えば、D N A又はR N A分子)と接触させ、それにより前記核酸分子を含む細胞(例えば、T細胞)の集団を提供するステップ、及び

(iii) 保存(例えば、凍結保存培地中の前記細胞の集団の再製剤化)又は投与のために前記細胞(例えば、T細胞)の集団を採取するステップを含み、

(a) ステップ(ii)は、ステップ(i)と一緒に、又はステップ(i)の開始後の20時間以内、例えばステップ(i)の開始後の12、13、14、15、16、17若し

50

くは 18 時間以内、例えばステップ (i) の開始後の 18 時間以内実施され、及び
ステップ (i i i) は、ステップ (i) の開始後の 30 (例えば、26) 時間以内、例
えばステップ (i) の開始後の 22、23、24、25、26、27、28、29 又は 30
時間以内、例えばステップ (i) の開始後の 24 時間以内実施されるか、

(b) ステップ (i i) は、ステップ (i) と一緒に、又はステップ (i) の開始後の 20
時間以内、例えばステップ (i) の開始後の 12、13、14、15、16、17 若し
くは 18 時間以内、例えばステップ (i) の開始後の 18 時間以内実施され、及び
ステップ (i i i) は、ステップ (i i) の開始後の 30 時間以内、例えばステップ (i
i) の開始後の 22、23、24、25、26、27、28、29 又は 30 時間以内実施
されるか、又は

(c) ステップ (i i i) からの前記細胞の集団は、例えば、ステップ (i) の開始時の
前記細胞の集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて、増殖されないか、又は 5、
10、15、20、25、30、35 若しくは 40% 以下、例えば 10% 以下だけ増殖さ
れ、

任意選択で、ステップ (i i) の前記核酸分子は、ウイルスベクター上にあり、任意選択
で、ステップ (i i) の前記核酸分子は、ウイルスベクター上の RNA 分子であり、任意
選択で、ステップ (i i) は、前記細胞 (例えば、T 細胞) の集団を、前記 CAR をコー
ドする核酸分子を含むウイルスベクターで形質導入することを含み、

(I) 前記核酸分子は、第 1 CAR をコードする第 1 核酸配列と、第 2 CAR をコードす
る第 2 核酸配列とを含み、

前記第 1 及び第 2 核酸配列は、単一の核酸分子上に配置され、例えば、前記第 1 核酸配列
及び前記第 2 核酸配列は、自己切断部位 (例えば、P2A 部位、T2A 部位、E2A 部位
又は F2A 部位) をコードする第 3 核酸配列によって隔てられるか、又は

前記第 1 及び第 2 核酸配列は、個別の核酸分子上に配置されるか；又は

(I I) 前記核酸分子は、CAR をコードする核酸配列を含み、前記 CAR は、第 1 V H
(V H 1)、第 1 V L (V L 1)、第 2 V H (V H 2)、第 2 V L (V L 2)、膜貫通ド
メイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを含み、前記 V H 1 及び V L 1 は、第 1 抗原に結
合し、且つ前記 V H 2 及び V L 2 は、第 2 抗原に結合し、前記 V H 1、V L 1、V H 2 及
び V L 2 は、N 末端から C 末端まで、以下の構成：V H 1 - 任意選択でリンカー 1 (「L
1」) - V H 2 - 任意選択でリンカー 2 (「L 2」) - V L 2 - 任意選択でリンカー 3 (30
「L 3」) - V L 1、V H 1 - 任意選択で L 1 - V L 2 - 任意選択で L 2 - V H 2 - 任意
選択で L 3 - V L 1、V L 1 - 任意選択で L 1 - V H 2 - 任意選択で L 2 - V L 2 - 任意
選択で L 3 - V H 1、V L 1 - 任意選択で L 1 - V L 2 - 任意選択で L 2 - V H 2 - 任意
選択で L 3 - V H 1、V H 2 - 任意選択で L 1 - V H 1 - 任意選択で L 2 - V L 1 - 任意
選択で L 3 - V L 2、V H 2 - 任意選択で L 1 - V L 1 - 任意選択で L 2 - V H 1 - 任意
選択で L 3 - V L 2、V L 2 - 任意選択で L 1 - V H 1 - 任意選択で L 2 - V L 1 - 任意
選択で L 3 - V H 2；又は V L 2 - 任意選択で L 1 - V L 1 - 任意選択で L 2 - V H 1 -
任意選択で L 3 - V H 2 で配列される、方法。

【請求項 110】

前記核酸分子は、第 1 CAR をコードする第 1 核酸配列と、第 2 CAR をコードする第
2 核酸配列とを含み、前記第 1 及び第 2 核酸配列は、個別の核酸分子上に配置される、請
求項 109 に記載の方法。

【請求項 111】

前記第 1 及び第 2 核酸分子は、個別のウイルスベクター上にあり、ステップ (i i) は
、前記第 1 CAR をコードする前記核酸分子を含む第 1 ウイルスベクターと、前記第 2 C
AR をコードする前記第 2 核酸分子を含む第 2 ウイルスベクターとで前記細胞 (例えば、
T 細胞) の集団を形質導入することを含む、請求項 110 に記載の方法。

【請求項 112】

前記第 1 CAR は、抗 BCMA 結合ドメイン (例えば、抗 BCMA CAR) を含み、
及び前記第 2 CAR は、抗 CD19 結合ドメイン (例えば、抗 CD19 CAR) を含む

10

20

30

40

50

、請求項 1 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 1 3】

ステップ (i i) において、前記細胞の集団は、前記細胞の集団が前記第 2 ウイルスベクターと接触される感染多重度 (M O I) より高いか、それと等しいか又はそれより低い M O I で前記第 1 ウイルスベクターと接触され、

任意選択で、ステップ (i i) において、前記細胞の集団は、前記細胞の集団が前記第 2 ウイルスベクターと接触される感染多重度 (M O I) より高い M O I で前記第 1 ウイルスベクターと接触される、請求項 1 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 1 4】

ステップ (i i) において、前記細胞の集団は、得られる細胞の集団が、前記抗 B C M A C A R を含むが、前記抗 C D 1 9 C A R を含まない第 1 の細胞の集団、前記抗 C D 1 9 C A R を含むが、前記抗 B C M A C A R を含まない第 2 の細胞の集団及び前記抗 B C M A C A R と前記抗 C D 1 9 C A R との両方を含む第 3 の細胞の集団を含むように、第 1 M O I で前記第 1 ウイルスベクターと、且つ第 2 M O I で前記第 2 ウイルスベクターと接触され、例えば実施例 1 0 に記載の方法によって決定されて、

(i) 前記第 2 及び第 3 集団を合わせた生存細胞の総数は、前記第 1 及び第 3 集団を合わせた生存細胞の総数の約 1 1 0 % 以下 (例えば、約 1 0 5 %、1 0 0 %、9 0 %、8 0 %、7 0 %、6 0 %、5 0 %、4 0 %、3 0 %、2 0 %、1 0 %、5 %、1 % 又はそれ未満以下) であり；

(i i) 前記第 1 及び第 3 集団を合わせた生存細胞の総数は、前記第 2 及び第 3 集団を合わせた生存細胞の総数の約 9 0 % 以上 (例えば、約 1 0 0 %、1 2 5 %、1 5 0 %、1 7 5 %、2 0 0 %、2 5 0 %、3 0 0 %、4 0 0 %、5 0 0 %、7 5 0 %、1 0 0 0 %、2 0 0 0 %、5 0 0 0、1 0 0 0 0 % 又はそれを超えるもの以上) であり；及び / 又は

(i i i) 前記第 1 及び第 3 集団を合わせた生存細胞の総数は、前記得られる集団の生存細胞の総数の約 5 % 以上 (例えば、約 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 % 又は 9 0 % 以上) である、請求項 1 1 2 又は 1 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 1 5】

ステップ (i i) において、前記細胞の集団は、

(a) 約 1 ~ 約 1 0 (例えば、約 2 ~ 約 9、約 3 ~ 約 8、約 4 ~ 約 7、約 5 ~ 約 6、約 1 ~ 約 8、約 1 ~ 約 6、約 1 ~ 約 4、約 8 ~ 約 1 0、約 6 ~ 約 1 0、約 4 ~ 約 1 0、約 1 ~ 約 3、約 2 ~ 約 4、約 3 ~ 約 5、約 4 ~ 約 6、約 5 ~ 約 7、約 6 ~ 約 8、約 7 ~ 約 9、約 8 ~ 約 1 0、約 2 . 5 ~ 約 5、約 1、約 2、約 3、約 4、約 5、約 6、約 7、約 8、約 9 又は約 1 0) の M O I で前記第 1 ウイルスベクターと接触され、

任意選択で、前記細胞の集団は、約 2 . 5 ~ 約 5 の M O I で前記第 1 ウイルスベクターと接触され；

(b) 約 0 . 1 ~ 約 5 (例えば、約 0 . 2 ~ 約 4、約 0 . 3 ~ 約 3、約 0 . 4 ~ 約 2、約 0 . 5 ~ 約 1、約 0 . 6 ~ 約 0 . 9、約 0 . 7 ~ 約 0 . 8、約 0 . 1 ~ 約 4、約 0 . 1 ~ 約 3、約 0 . 1 ~ 約 2、約 0 . 1 ~ 約 1、約 0 . 1 ~ 約 0 . 5、約 4 ~ 約 5、約 3 ~ 約 5、約 2 ~ 約 5、約 1 ~ 約 5、約 0 . 5 ~ 約 5、約 0 . 2 ~ 約 5、約 0 . 1 ~ 約 0 . 5、約 0 . 2 ~ 約 1、約 0 . 5 ~ 約 2、約 1 ~ 約 3、約 2 ~ 約 4、約 3 ~ 約 5、約 0 . 5 ~ 約 1、約 0 . 1、約 0 . 2、約 0 . 3、約 0 . 4、約 0 . 5、約 0 . 6、約 0 . 7、約 0 . 8、約 0 . 9、約 1、約 2、約 3、約 4 又は約 5) の M O I で前記第 2 ウイルスベクターと接触され、

任意選択で、前記細胞の集団は、約 0 . 5 ~ 約 1 . 0 の M O I で前記第 2 ウイルスベクターと接触され；

(c) 前記細胞の集団が前記第 2 ウイルスベクターと接触される M O I より少なくとも 1 0 % (例えば、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 % 若しくは 9 0 %) 高いか、又は少なくとも約 1 倍 (例えば、少なくとも約 2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 5、2 0、2 5、3 0、3 5、4 0、5 0、6 0、7 0、8 0、9 0 若しくは 1 0 0 倍、例えば約 2 ~ 約 5 0 倍、約 3 ~ 2 0 倍、約 5 ~ 約 1 5 倍若しくは約 8 ~ 約

10

20

30

40

50

10倍)のMOIで前記第1ウイルスベクターと接触され、
任意選択で、前記細胞の集団が前記第2ウイルスベクターと接触されるMOIの約8~約10倍のMOIで前記第1ウイルスベクターと接触され；及び/又は

(d)前記細胞の集団が前記第1ウイルスベクターと接触されるMOIの1/X(ここで、Xは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、30、40、50、60、70、80、90又は100である)以下のMOIで前記第2ウイルスベクターと接触され、

任意選択で、前記細胞の集団が前記第1ウイルスベクターと接触されるMOIの1/X(ここで、Xは、6、8、10又は12である)以下のMOIで前記第2ウイルスベクターと接触される、請求項112又は113に記載の方法。

10

【請求項116】

ステップ(i i)において、前記細胞の集団は、

(a)約4~約5(例えば、約4.75)のMOIで前記第1ウイルスベクターと；及び/又は

(b)約0.2~約1(例えば、約0.5)のMOIで前記第2ウイルスベクターと接触される、請求項113~115のいずれか一項に記載の方法。

【請求項117】

ステップ(i i)において、前記細胞の集団は、約 1×10^8 ~約 5×10^9 (例えば、約 2×10^8 ~約 2×10^9 又は約 4×10^8 ~約 1×10^9 個の総生存細胞を含み、任意選択で、前記細胞は、約 1×10^6 ~約 1×10^7 (例えば、約 2×10^6 ~約 5×10^6 又は約 3×10^6 ~約 4×10^6)個の生存細胞/mLの濃度で培養物中に懸濁される、請求項109~116のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項118】

CD3/TCR複合体を刺激する前記薬剤は、CD3を刺激する薬剤(例えば、抗CD3抗体)であり、共刺激分子を刺激する前記薬剤は、CD28、ICOS、CD27、HVEM、LIGHT、CD40、4-1BB、OX40、DR3、GITR、CD30、TIM1、CD2、CD226又はそれらの任意の組み合わせを刺激する薬剤であり、任意選択で、CD3/TCR複合体を刺激する前記薬剤又は共刺激分子を刺激する前記薬剤は、抗体(例えば、単ドメイン抗体(例えば、重鎖可変ドメイン抗体)、ペプチボディ、Fabフラグメント又はscFv)、小分子又はリガンド(例えば、天然に存在する、組換え又はキメラリガンド)から選択され、任意選択で、CD3/TCR複合体を刺激する前記薬剤又は共刺激分子を刺激する前記薬剤は、ビーズを含まず、任意選択で、CD3/TCR複合体を刺激する前記薬剤は、抗CD3抗体を含み、及び共刺激分子を刺激する前記薬剤は、抗CD28抗体を含み、任意選択で、CD3/TCR複合体を刺激する前記薬剤は、コロイドポリマーナノマトリックスに共有結合された抗CD3抗体を含み、及び共刺激分子を刺激する前記薬剤は、コロイドポリマーナノマトリックスに共有結合された抗CD28抗体を含み、任意選択で、CD3/TCR複合体を刺激する前記薬剤及び共刺激分子を刺激する前記薬剤は、T Cell Trans Act(商標)を含む、請求項109~117のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項119】

ステップ(i)及び/又は(ii)は、IL-2、IL-15(例えば、hetIL-15(IL15/sIL-15Ra))、IL-7、IL-21、IL-6(例えば、IL-6/sIL-6Ra)、LSD1阻害剤、MALT1阻害剤又はそれらの組み合わせを含む細胞培地(例えば、無血清培地)中で実施される、請求項109~118のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項120】

ステップ(i)及び/又は(ii)は、血清代替品を含む無血清細胞培地中で実施され、任意選択で、前記血清代替品は、CTS(商標)Immune Cell Serum Replacement(ICSR)である、請求項109~119のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 1 2 1】

ステップ (i) 前に、

(i v) (任意選択で) 実体、例えば研究室、病院又は医療提供者から、新鮮な白血球アフレーシス産物 (或いは新鮮な全血液産物、新鮮な骨髄産物又は新鮮な腫瘍若しくは臓器生検若しくは切除 (例えば、胸腺除去からの新鮮な産物) などの造血組織の代替供給源) を受け取るステップ、及び

(v) 新鮮な白血球アフレーシス産物 (或いは新鮮な全血液産物、新鮮な骨髄産物又は新鮮な腫瘍若しくは臓器生検若しくは切除 (例えば、胸腺除去からの新鮮な産物) などの造血組織の代替供給源) から、ステップ (i) で接触される前記細胞 (例えば、T細胞、例えば CD 8 + 及び / 又は CD 4 + T細胞) の集団を単離するステップ

10

をさらに含み、任意選択で、

ステップ (i i i) は、ステップ (v) の開始後の 3 5 時間以内、例えばステップ (v) の開始後の 2 7、2 8、2 9、3 0、3 1、3 2、3 3、3 4 又は 3 5 時間以内、例えばステップ (v) の開始後の 3 0 時間以内実施されるか、又は

ステップ (i i i) からの前記細胞の集団は、ステップ (v) の終了時の前記細胞の集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて、増殖されないか、又は 5、1 0、1 5、2 0、2 5、3 0、3 5 若しくは 4 0 % 以下、例えば 1 0 % 以下だけ増殖される、請求項 1 0 9 ~ 1 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2 2】

ステップ (i) 前に、実体、例えば研究室、病院又は医療提供者から、白血球アフレーシス産物 (或いは全血液、骨髄又は腫瘍若しくは臓器生検若しくは切除 (例えば、胸腺除去) から単離された凍結保存 T細胞などの造血組織の代替供給源) から単離された凍結保存 T細胞を受け取るステップをさらに含む、請求項 1 0 9 ~ 1 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 1 2 3】

ステップ (i) 前に、

(i v) (任意選択で) 実体、例えば研究室、病院又は医療提供者から、凍結保存白血球アフレーシス産物 (或いは凍結保存全血液産物、凍結保存骨髄産物又は凍結保存腫瘍若しくは臓器生検若しくは切除 (例えば、胸腺除去からの凍結保存産物) などの造血組織の代替供給源) を受け取るステップ、及び

30

(v) 凍結保存白血球アフレーシス産物 (或いは凍結保存全血液産物、凍結保存骨髄産物又は凍結保存腫瘍若しくは臓器生検若しくは切除 (例えば、胸腺除去からの凍結保存産物) などの造血組織の代替供給源) から、ステップ (i) で接触される前記細胞 (例えば、T細胞、例えば CD 8 + 及び / 又は CD 4 + T細胞) の集団を単離するステップ

をさらに含み、任意選択で、

ステップ (i i i) は、ステップ (v) の開始後の 3 5 時間以内、例えばステップ (v) の開始後の 2 7、2 8、2 9、3 0、3 1、3 2、3 3、3 4 又は 3 5 時間以内、例えばステップ (v) の開始後の 3 0 時間以内実施されるか、又は

ステップ (i i i) からの前記細胞の集団は、ステップ (v) の終了時の前記細胞の集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて、増殖されないか、又は 5、1 0、1 5、2 0、2 5、3 0、3 5 若しくは 4 0 % 以下、例えば 1 0 % 以下だけ増殖される、請求項 1 0 9 ~ 1 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 1 2 4】

ステップ (v i) :

ステップ (i i i) からの前記細胞の集団の一部を少なくとも 2、2 . 5、3、3 . 5、4、4 . 5、5、5 . 5、6、6 . 5 又は 7 日、例えば少なくとも 2 日且つ 7 日以下にわたって培養し、及び前記一部における C A R 発現レベルを測定する (例えば、前記一部における生存 C A R 発現細胞のパーセンテージを測定する) ステップ

をさらに含み、任意選択で、

ステップ (i i i) は、前記細胞 (例えば、T細胞) の集団を採取及び凍結することを含

50

み、且つステップ(v i)は、ステップ(i i i)からの前記細胞の集団の一部を解凍し、前記一部を少なくとも2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5又は7日、例えば少なくとも2日且つ7日以下にわたって培養し、及び前記一部におけるC A R発現レベルを測定する(例えば、前記一部における生存C A R発現細胞のパーセンテージを測定する、例えば前記一部における生存抗B C M A C A R発現細胞のパーセンテージを測定する)ことを含む、請求項109~123のいずれか一項に記載の方法。

【請求項125】

ステップ(i i i)からの前記細胞は、前記一部におけるC A R発現レベルを測定する(例えば、前記一部における生存C A R発現細胞のパーセンテージを測定する、例えば前記一部における生存抗B C M A C A R発現細胞のパーセンテージを測定する)前に、約2~約4日、例えば約3日(例えば、採取後約72時間)にわたって培養される、請求項124に記載の方法。

10

【請求項126】

C A R発現の前記測定は、ステップ(i i)から約4日(例えば、96時間)後に行われる、請求項125に記載の方法。

【請求項127】

前記C A R発現レベルは、フローサイトメトリーによって測定される、請求項124~126のいずれか一項に記載の方法。

【請求項128】

キメラ抗原受容体(C A R)を発現する細胞(例えば、T細胞)の集団を作製する方法であって、

20

(1)細胞(例えば、T細胞、例えば凍結された白血球アフェレーシス産物から単離されたT細胞)の集団を、I L - 2、I L - 7、I L - 15(例えば、h e t I L - 15(I L 15 / s I L - 15 R a))、I L - 21、I L - 6(例えば、I L - 6 / s I L - 6 R a)又はそれらの組み合わせから選択されるサイトカインと接触させるステップ、

(2)前記細胞(例えば、T細胞)の集団を、前記C A Rをコードする核酸分子(例えば、D N A又はR N A分子)と接触させ、それにより前記核酸分子を含む細胞(例えば、T細胞)の集団を提供するステップ、及び

(3)保存(例えば、凍結保存培地中の前記細胞の集団の再製剤化)又は投与のために前記細胞(例えば、T細胞)の集団を採取するステップ

30

を含み、

(a)ステップ(2)は、ステップ(1)と一緒に、又はステップ(1)の開始後の5時間以内、例えばステップ(i)の開始後の1、2、3、4若しくは5時間以内に実施され、及び

ステップ(3)は、ステップ(1)の開始後の26時間以内、例えばステップ(i)の開始後の22、23若しくは24時間以内、例えばステップ(i)の開始後の24時間以内に実施されるか、又は

(b)ステップ(3)からの前記細胞の集団は、例えば、ステップ(1)の開始時の前記細胞の集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて、増殖されないか、又は5、10、15、20、25、30、35若しくは40%以下、例えば10%以下だけ増殖され、任意選択で、ステップ(2)の前記核酸分子は、ウイルスベクター上にあり、任意選択で、ステップ(i i)の前記核酸分子は、ウイルスベクター上のR N A分子であり、任意選択で、ステップ(i i)は、前記細胞(例えば、T細胞)の集団を、前記C A Rをコードする核酸分子を含むウイルスベクターで形質導入することを含み、

40

(I)前記核酸分子は、第1C A Rをコードする第1核酸配列と、第2C A Rをコードする第2核酸配列とを含み、

前記第1及び第2核酸配列は、単一の核酸分子上に配置され、例えば、前記第1核酸配列及び前記第2核酸配列は、自己切断部位(例えば、P 2 A部位、T 2 A部位、E 2 A部位又はF 2 A部位)をコードする第3核酸配列によって隔てられるか、又は

前記第1及び第2核酸配列は、個別の核酸分子上に配置されるか；又は

50

(I I) 前記核酸分子は、 C A R をコードする核酸配列を含み、前記 C A R は、第 1 V H (V H 1)、第 1 V L (V L 1)、第 2 V H (V H 2)、第 2 V L (V L 2)、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを含み、前記 V H 1 及び V L 1 は、第 1 抗原に結合し、且つ前記 V H 2 及び V L 2 は、第 2 抗原に結合し、前記 V H 1、V L 1、V H 2 及び V L 2 は、N 末端から C 末端まで、以下の構成：V H 1 - 任意選択でリンカー 1 (「L 1」) - V H 2 - 任意選択でリンカー 2 (「L 2」) - V L 2 - 任意選択でリンカー 3 (「L 3」) - V L 1、V H 1 - 任意選択で L 1 - V L 2 - 任意選択で L 2 - V H 2 - 任意選択で L 3 - V L 1、V L 1 - 任意選択で L 1 - V H 2 - 任意選択で L 2 - V L 2 - 任意選択で L 3 - V H 1、V L 1 - 任意選択で L 1 - V L 2 - 任意選択で L 2 - V H 2 - 任意選択で L 3 - V H 1、V H 2 - 任意選択で L 1 - V H 1 - 任意選択で L 2 - V L 1 - 任意選択で L 3 - V L 2、V H 2 - 任意選択で L 1 - V L 1 - 任意選択で L 2 - V H 1 - 任意選択で L 3 - V L 2、V L 2 - 任意選択で L 1 - V H 1 - 任意選択で L 2 - V L 1 - 任意選択で L 3 - V H 2 ; 又は V L 2 - 任意選択で L 1 - V L 1 - 任意選択で L 2 - V H 1 - 任意選択で L 3 - V H 2 で配列される、方法。

10

【請求項 1 2 9】

前記細胞の集団は、C D 3 / T C R 複合体を刺激する薬剤及び / 若しくは前記細胞の表面上の共刺激分子を刺激する薬剤とインビトロで接触されないか、又は接触される場合、前記接触させるステップは、2 時間未満、例えば 1 若しくは 1 . 5 時間以下である、請求項 1 2 8 に記載の方法。

20

【請求項 1 3 0】

C D 3 / T C R 複合体を刺激する前記薬剤は、C D 3 を刺激する薬剤 (例えば、抗 C D 3 抗体) であり、共刺激分子を刺激する前記薬剤は、C D 2 8、I C O S、C D 2 7、H V E M、L I G H T、C D 4 0、4 - 1 B B、O X 4 0、D R 3、G I T R、C D 3 0、T I M 1、C D 2、C D 2 2 6 又はそれらの任意の組み合わせを刺激する薬剤であり、任意選択で、C D 3 / T C R 複合体を刺激する前記薬剤又は共刺激分子を刺激する前記薬剤は、抗体 (例えば、単ドメイン抗体 (例えば、重鎖可変ドメイン抗体)、ペプチボディ、F a b フラグメント又は s c F v)、小分子又はリガンド (例えば、天然に存在する、組換え又はキメラリガンド) から選択される、請求項 1 2 9 に記載の方法。

【請求項 1 3 1】

ステップ (1) 及び / 又は (2) は、5、4、3、2、1 又は 0 % 以下の血清を含む細胞培地中で実施され、任意選択で、ステップ (1) 及び / 又は (2) は、約 2 % の血清を含む細胞培地中で実施されるか、又は L S D 1 阻害剤又は M A L T 1 阻害剤を含む細胞培地中で実施される、請求項 1 2 8 ~ 1 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 1 3 2】

実体、例えば研究室、病院又は医療提供者から、凍結保存白血球アフェレーシス産物 (或いは凍結保存全血液産物、凍結保存骨髓産物又は凍結保存腫瘍若しくは臓器生検若しくは切除 (例えば、胸腺除去からの凍結保存産物) などの造血組織の代替供給源) を受け取るステップをさらに含む、請求項 1 2 8 ~ 1 3 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3 3】

ステップ (i) 又はステップ (1) の開始時の前記細胞の集団は、I L 6 R 発現細胞 (例えば、I L 6 R 及び / 又は I L 6 R について陽性の細胞) について濃縮されているか ; 又はステップ (i) 又はステップ (1) の開始時の前記細胞の集団は、5 0、6 0 又は 7 0 % 以上の I L 6 R 発現細胞 (例えば、I L 6 R 及び / 又は I L 6 R について陽性の細胞) を含む、請求項 1 0 9 ~ 1 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 1 3 4】

ステップ (i) 及び (i i) 又はステップ (1) 及び (2) は、I L - 1 5 (例えば、h e t I L - 1 5 (I L 1 5 / s I L - 1 5 R a)) を含む細胞培地中で実施される、請求項 1 0 9 ~ 1 3 3 のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 135】

請求項 109 ~ 134 のいずれか一項に記載の方法によって作製される細胞の集団。

【請求項 136】

請求項 112 ~ 114 のいずれか一項に記載の方法によって作製される細胞の集団。

【請求項 137】

前記細胞の集団は、

抗 B C M A C A R を含むが、抗 C D 1 9 C A R を含まない第 1 の細胞の集団；
 抗 C D 1 9 C A R を含むが、抗 B C M A C A R を含まない第 2 の細胞の集団；及び
 抗 B C M A C A R と抗 C D 1 9 C A R との両方を含む第 3 の細胞の集団
 を含む、請求項 136 に記載の細胞の集団。

10

【請求項 138】

(i) 前記第 2 及び第 3 集団を合わせた生存細胞の総数は、前記第 1 及び第 3 集団を合わせた生存細胞の総数の約 110% 以下 (例えば、約 105%、100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、1% 又はそれ未満以下) であり；

(i i) 前記第 1 及び第 3 集団を合わせた生存細胞の総数は、前記第 2 及び第 3 集団を合わせた生存細胞の総数の約 90% 以上 (例えば、約 100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、400%、500%、750%、1000%、2000%、5000%、10000% 又はそれを超えるもの以上) であり；及び / 又は

(i i i) 前記第 1 及び第 3 集団を合わせた生存細胞の総数は、前記集団の生存細胞の総数の約 5% 以上 (例えば、約 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80% 又は 90% 以上) である、請求項 137 に記載の細胞の集団。

20

【請求項 139】

C A R を含まない第 4 の細胞の集団をさらに含む、請求項 137 又は 138 に記載の細胞の集団。

【請求項 140】

C A R を発現するように操作された細胞の集団 (「C A R 発現細胞の集団」) であって、

(a) 前記 C A R を発現するように操作される前の同じ細胞の集団中のナイーブ細胞、例えばナイーブ T 細胞、例えば C D 4 5 R O - C C R 7 + T 細胞のパーセンテージと比べて、ほぼ同じパーセンテージのナイーブ細胞、例えばナイーブ T 細胞、例えば C D 4 5 R O - C C R 7 + T 細胞；

30

(b) 前記 C A R を発現するように操作される前の同じ細胞の集団中のナイーブ細胞、例えばナイーブ T 細胞、例えば C D 4 5 R O - C C R 7 + T 細胞のパーセンテージと比べて、ナイーブ細胞、例えばナイーブ T 細胞、例えば C D 4 5 R O - C C R 7 + T 細胞の約 5% ~ 約 10% 以内の変化；

(c) 前記 C A R を発現するように操作される前の同じ細胞の集団中のナイーブ細胞、例えばナイーブ T 細胞、例えば C D 4 5 R O - C C R 7 + T 細胞のパーセンテージと比べて、増加したパーセンテージの、例えば少なくとも 1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、2.2、2.4、2.6、2.8 又は 3 倍増加したナイーブ細胞、例えばナイーブ T 細胞、例えば C D 4 5 R O - C C R 7 + T 細胞；

40

(d) 前記 C A R を発現するように操作される前の同じ細胞の集団中のセントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリー T 細胞、例えば C C R 7 + C D 4 5 R O + T 細胞のパーセンテージと比べて、ほぼ同じパーセンテージのセントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリー T 細胞、例えば C C R 7 + C D 4 5 R O + T 細胞；

(e) 前記 C A R を発現するように操作される前の同じ細胞の集団中のセントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリー T 細胞、例えば C C R 7 + C D 4 5 R O + T 細胞のパーセンテージと比べて、セントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリー T 細胞、例えば C C R 7 + C D 4 5 R O + T 細胞の約 5% ~ 約 10% 以内の変化；

(f) 前記 C A R を発現するように操作される前の同じ細胞の集団中のセントラルメモリー

50

ー細胞、例えばセントラルメモリーT細胞、例えばCCR7 + CD45RO + T細胞のパーセンテージと比べて、減少したパーセンテージの、例えば少なくとも20、25、30、35、40、45又は50%減少したセントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリーT細胞、例えばCCR7 + CD45RO + T細胞；

(g) 前記CARを発現するように操作される前の同じ細胞の集団中の幹メモリーT細胞、例えばCD45RA + CD95 + IL-2受容体 + CCR7 + CD62L + T細胞のパーセンテージと比べて、ほぼ同じパーセンテージの幹メモリーT細胞、例えばCD45RA + CD95 + IL-2受容体 + CCR7 + CD62L + T細胞；

(h) 前記CARを発現するように操作される前の同じ細胞の集団中の幹メモリーT細胞、例えばCD45RA + CD95 + IL-2受容体 + CCR7 + CD62L + T細胞のパーセンテージと比べて、幹メモリーT細胞、例えばCD45RA + CD95 + IL-2受容体 + CCR7 + CD62L + T細胞の約5%～約10%以内の変化；又は

(i) 前記CARを発現するように操作される前の同じ細胞の集団中の幹メモリーT細胞、例えばCD45RA + CD95 + IL-2受容体 + CCR7 + CD62L + T細胞のパーセンテージと比べて、増加したパーセンテージの幹メモリーT細胞、例えばCD45RA + CD95 + IL-2受容体 + CCR7 + CD62L + T細胞

を含み、

前記CARをコードする核酸配列(例えば、DNA又はRNA分子)を含む細胞を含み、

(I) 前記核酸分子は、第1CARをコードする第1核酸配列と、第2CARをコードする第2核酸配列とを含み、

前記第1及び第2核酸配列は、単一の核酸分子上に配置され、例えば、前記第1核酸配列及び前記第2核酸配列は、自己切断部位(例えば、P2A部位、T2A部位、E2A部位又はF2A部位)をコードする第3核酸配列によって隔てられるか、又は

前記第1及び第2核酸配列は、個別の核酸分子上に配置されるか；又は

(II) 前記核酸分子は、CARをコードする核酸配列を含み、前記CARは、第1VH(VH1)、第1VL(VL1)、第2VH(VH2)、第2VL(VL2)、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを含み、前記VH1及びVL1は、第1抗原に結合し、且つ前記VH2及びVL2は、第2抗原に結合し、前記VH1、VL1、VH2及びVL2は、N末端からC末端まで、以下の構成：VH1 - 任意選択でリンカー1(「L1」) - VH2 - 任意選択でリンカー2(「L2」) - VL2 - 任意選択でリンカー3(「L3」) - VL1、VH1 - 任意選択でL1 - VL2 - 任意選択でL2 - VH2 - 任意選択でL3 - VL1、VL1 - 任意選択でL1 - VH2 - 任意選択でL2 - VL2 - 任意選択でL3 - VH1、VL1 - 任意選択でL1 - VL2 - 任意選択でL2 - VH2 - 任意選択でL3 - VH1、VH2 - 任意選択でL1 - VH1 - 任意選択でL2 - VL1 - 任意選択でL3 - VL2、VH2 - 任意選択でL1 - VL1 - 任意選択でL2 - VH1 - 任意選択でL3 - VL2、VL2 - 任意選択でL1 - VH1 - 任意選択でL2 - VL1 - 任意選択でL3 - VH2で配列される、細胞の集団(「CAR発現細胞の集団」)。

【請求項141】

請求項112～114のいずれか一項に記載の方法によって作製される単離細胞又は細胞の集団であって、

(a) 抗BCMA結合ドメイン、第1膜貫通ドメイン及び第1細胞内シグナル伝達ドメインを含む第1CARをコードする第1核酸分子であって、前記抗BCMA結合ドメインは、重鎖相補性決定領域1(HCCDR1)、重鎖相補性決定領域2(HCCDR2)及び重鎖相補性決定領域3(HCCDR3)を含む重鎖可変領域(VH)と、軽鎖相補性決定領域1(LCCDR1)、軽鎖相補性決定領域2(LCCDR2)及び軽鎖相補性決定領域3(LCCDR3)を含む軽鎖可変領域(VL)とを含み、前記HCCDR1、HCCDR2、HCCDR3、LCCDR1、LCCDR2及びLCCDR3は、それぞれ配列番号86、87、88、95、96及び97のアミノ酸配列を含む、第1核酸分子と；

10

20

30

40

50

(b) 抗CD19結合ドメイン、第2膜貫通ドメイン及び第2細胞内シグナル伝達ドメインを含む第2CARをコードする第2核酸分子であって、前記抗CD19結合ドメインは、HC CDR1、HC CDR2及びHC CDR3を含むVHと、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3を含むVLとを含み、前記HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、それぞれ配列番号295、304及び297~300のアミノ酸配列を含む、第2核酸分子とを含む単離細胞又は細胞の集団。

【請求項142】

単離細胞であって、

(a) 抗BCMA結合ドメイン、第1膜貫通ドメイン及び第1細胞内シグナル伝達ドメインを含む第1CARをコードする第1核酸分子であって、前記抗BCMA結合ドメインは、重鎖相補性決定領域1(HC CDR1)、重鎖相補性決定領域2(HC CDR2)及び重鎖相補性決定領域3(HC CDR3)を含む重鎖可変領域(VH)と、軽鎖相補性決定領域1(LC CDR1)、軽鎖相補性決定領域2(LC CDR2)及び軽鎖相補性決定領域3(LC CDR3)を含む軽鎖可変領域(VL)とを含み、前記HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、それぞれ配列番号86、87、88、95、96及び97のアミノ酸配列を含む、第1核酸分子と；

(b) 抗CD19結合ドメイン、第2膜貫通ドメイン及び第2細胞内シグナル伝達ドメインを含む第2CARをコードする第2核酸分子であって、前記抗CD19結合ドメインは、HC CDR1、HC CDR2及びHC CDR3を含むVHと、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3を含むVLとを含み、前記HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、それぞれ配列番号295、304及び297~300のアミノ酸配列を含む、第2核酸分子とを含む単離細胞。

【請求項143】

(i) 前記抗BCMA結合ドメインの前記VH及びVLは、それぞれ配列番号93及び102のアミノ酸配列を含み；

(ii) 前記抗CD19結合ドメインの前記VH及びVLは、それぞれ配列番号250及び251のアミノ酸配列を含み；

(iii) 前記抗BCMA結合ドメインは、配列番号105のアミノ酸配列を含み；

(iv) 前記抗CD19結合ドメインは、配列番号293のアミノ酸配列を含み；

(v) 前記第1CARは、配列番号107のアミノ酸配列を含み；及び/又は

(vi) 前記第2CARは、配列番号225のアミノ酸配列を含む、請求項141又は142に記載の単離細胞又は細胞の集団。

【請求項144】

請求項141~143のいずれか一項に記載の細胞又は細胞の集団を含む医薬組成物。

【請求項145】

BCMAの発現に関連する疾患を有する対象において抗腫瘍免疫を提供するか、又は対象を処置する方法であって、有効量の、請求項141~143のいずれか一項に記載の細胞若しくは細胞の集団又は請求項144に記載の医薬組成物を前記対象に投与するステップを含む方法。

【請求項146】

BCMAの発現に関連する前記疾患は、血液癌又は固形癌である、請求項145に記載の方法。

【請求項147】

前記疾患は、急性白血病、B細胞急性リンパ性白血病(「BALL」)、T細胞急性リンパ性白血病(「TALL」)、急性リンパ性白血病(ALL)、慢性骨髄性白血病(CML)、慢性リンパ球性白血病(CLL)、B細胞前リンパ球性白血病、芽球性形質細胞様樹状細胞新生物、パーキットリンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リン

10

20

30

40

50

パ腫、ヘアリー細胞白血病、小細胞型若しくは大細胞型濾胞性リンパ腫、悪性リンパ球増殖性病態、MALTリンパ腫、マンテル細胞リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、多発性骨髄腫、骨髄形成異常及び骨髄異形成症候群、非ホジキンリンパ腫、形質芽球性リンパ腫、形質細胞様樹状細胞新生物、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、前立腺癌（例えば、去勢抵抗性若しくは治療抵抗性前立腺癌又は転移性前立腺癌）、膵臓癌、肺癌、形質細胞増殖異常症（例えば、無症候性骨髄腫（くすぶり型多発性骨髄腫又は無症候性骨髄腫）、意義不明の単クローン性 グロブリン血症（MGUS）、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、形質細胞腫（例えば、形質細胞異常増殖症、孤立性骨髄腫、孤立性形質細胞腫、髄外性形質細胞腫及び多発性形質細胞腫）、全身性アミロイド軽鎖アミロイドーシス若しくはPOEMS症候群（クロウ・深瀬症候群、高月病及びPEP症候群としても知られる））又はそれらの組み合わせから選択される、請求項145又は146に記載の方法。

10

【請求項148】

前記疾患は、多発性骨髄腫である、請求項145～147のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2019年11月26日に提出された米国特許出願第62/940509号明細書（この内容全体が参照により本明細書に組み込まれる）に対する優先権を主張する。

20

【0002】

配列表

本願は、ASCIIフォーマットで電子出願されており、その全体が参照により本明細書に組み込まれる配列表を含む。前記ASCIIコピーは、2020年11月24日に作成され、名称がN2067-7166WO__SL.txtであり、サイズが598,194バイトである。

【0003】

本発明は、概して、キメラ抗原受容体（CAR）を発現するように操作された免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）並びにその組成物及び使用に関する。

30

【背景技術】

【0004】

T細胞、特にキメラ抗原受容体（CAR）を形質導入したT細胞での養子細胞移入（ACT）療法は、いくつかの血液癌の試験で有望性が示されている。CAR発現細胞療法製品の生産を改善し、製品の品質を高めると共に製品の治療効果を最大化する方法及びプロセスが必要とされている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

一態様では、本発明は、第1抗原結合ドメインと第2抗原結合ドメインとを含む細胞、例えば免疫細胞、例えばT細胞又はNK細胞を特徴とする。一部の実施形態では、第1抗原結合ドメインは、抗BCMA結合ドメインである。一部の実施形態では、抗BCMA結合ドメインは、本明細書に開示される抗BCMA結合配列、例えば、CDR、VH、VL又は表3～15、19、20、26及び31に開示されるscFv配列を含む。一部の実施形態では、第2抗原結合ドメインは、抗CD19結合ドメインである。一部の実施形態では、抗CD19結合ドメインは、本明細書に開示される抗CD19結合配列、例えば、CDR、VH、VL又は表2、19、22及び31に開示されるscFv配列を含む。

40

【0006】

一部の実施形態では、本発明は、(a)抗BCMA結合ドメインである第1抗原結合ド

50

メインであって、抗BCMA結合ドメインは、重鎖相補性決定領域1(HC CDR1)、重鎖相補性決定領域2(HC CDR2)及び重鎖相補性決定領域3(HC CDR3)を含む重鎖可変領域(VH)と、軽鎖相補性決定領域1(LC CDR1)、軽鎖相補性決定領域2(LC CDR2)及び軽鎖相補性決定領域3(LC CDR3)を含む軽鎖可変領域(VL)とを含み、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、(i)それぞれ配列番号86、130、88、95、131及び132；(ii)それぞれ配列番号44、45、84、54、55及び56；又は(iii)それぞれ配列番号179、180、181、147、182及び183のアミノ酸配列を含む、第1抗原結合ドメインと；(b)第2抗原結合ドメインとを含む細胞を提供する。一部の実施形態では、第1抗原結合ドメインと第2抗原結合ドメインとは、2つのキメラ抗原受容体(CAR)に配置される。一部の実施形態では、第1抗原結合ドメインと第2抗原結合ドメインとは、1つのCARに配置される。

【0007】

一部の実施形態では、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、それぞれ配列番号86、130、88、95、131及び132のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、それぞれ配列番号86、87、88、95、96及び97のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、それぞれ配列番号86、109、88、95、114及び115のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、それぞれ配列番号86、109、88、95、114及び97のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VHは、配列番号93若しくは112のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VHは、配列番号260、94若しくは113の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる。一部の実施形態では、VLは、配列番号102、118若しくは124のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VLは、配列番号261、103、119若しくは125の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる。一部の実施形態では、VH及びVLは、それぞれ配列番号93及び102のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VH及びVLは、それぞれ配列番号112及び118のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VH及びVLは、それぞれ配列番号112及び124のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第1抗原結合ドメインは、配列番号105、120若しくは126のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単鎖可変領域フラグメント(scFv)を含む。一部の実施形態では、第1抗原結合ドメインは、配列番号253、106、121若しくは127の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる。一部の実施形態では、第1抗原結合ドメインは、第1CARに配置される。一部の実施形態では、第1CARは、配列番号107、226、122若しくは128のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第1CARは、配列番号259、258、108、123若しくは129の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる。

【0008】

一部の実施形態では、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、それぞれ配列番号44、45、84、54

、 55 及び 56 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2 及び LC CDR3 は、それぞれ配列番号 44、45、76、54、55 及び 56 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2 及び LC CDR3 は、それぞれ配列番号 44、45、46、54、55 及び 56 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2 及び LC CDR3 は、それぞれ配列番号 44、45、68、54、55 及び 56 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VH は、配列番号 78、52 若しくは 70 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約 85%、90%、95% 若しくは 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VH は、配列番号 79、53 若しくは 71 の核酸配列又はそれと少なくとも約 85%、90%、95% 若しくは 99% の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる。一部の実施形態では、VL は、配列番号 61 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約 85%、90%、95% 若しくは 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VL は、配列番号 62 の核酸配列又はそれと少なくとも約 85%、90%、95% 若しくは 99% の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる。一部の実施形態では、VH 及び VL は、それぞれ配列番号 78 及び 61 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VH 及び VL は、それぞれ配列番号 52 及び 61 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VH 及び VL は、それぞれ配列番号 70 及び 61 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第 1 抗原結合ドメインは、配列番号 80、64 若しくは 72 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約 85%、90%、95% 若しくは 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単鎖可変領域フラグメント (scFv) を含む。一部の実施形態では、第 1 抗原結合ドメインは、配列番号 81、65 若しくは 73 の核酸配列又はそれと少なくとも約 85%、90%、95% 若しくは 99% の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる。一部の実施形態では、第 1 抗原結合ドメインは、第 1 CAR に配置される。一部の実施形態では、第 1 CAR は、配列番号 224、82、66 若しくは 74 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約 85%、90%、95% 若しくは 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第 1 CAR は、配列番号 83、67 若しくは 75 の核酸配列又はそれと少なくとも約 85%、90%、95% 若しくは 99% の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる。

【0009】

一部の実施形態では、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2 及び LC CDR3 は、それぞれ配列番号 179、180、181、147、182 及び 183 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2 及び LC CDR3 は、それぞれ配列番号 137、138、139、147、148 及び 149 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2 及び LC CDR3 は、それぞれ配列番号 160、161、162、147、170 及び 171 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VH は、配列番号 145 若しくは 168 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約 85%、90%、95% 若しくは 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VH は、配列番号 146 若しくは 169 の核酸配列又はそれと少なくとも約 85%、90%、95% 若しくは 99% の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる。一部の実施形態では、VL は、配列番号 154 若しくは 173 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約 85%、90%、95% 若しくは 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VL は、配列番号 155 若しくは 174 の核酸配列又はそれと少なくとも約 85%、90%、95% 若しくは 99% の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる。一部の実施形態では、VH 及び VL は、それぞれ配列番号 145 及び 154 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VH 及び VL は、それぞれ配列番号 168 及び 173 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第 1 抗原結合ドメ

インは、配列番号156若しくは175のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単鎖可変領域フラグメント(s c F v)を含む。一部の実施形態では、第1抗原結合ドメインは、配列番号157若しくは176の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる。一部の実施形態では、第1抗原結合ドメインは、第1CARに配置される。一部の実施形態では、第1CARは、配列番号158若しくは177のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第1CARは、配列番号159若しくは178の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる。

10

【0010】

一部の実施形態では、本発明は、(a)抗BCMA結合ドメインである第1抗原結合ドメインであって、抗BCMA結合ドメインは、(i)表20又は26に列挙される抗BCMA配列のHC CDR1、HC CDR2及びHC CDR3を含むVHと、表20又は26に列挙される抗BCMA配列のLC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3を含むVLとであって、配列番号243のアミノ酸配列を含むリンカーによって連結される、VH及びVL；(ii)それぞれ配列番号239及び242のアミノ酸配列を含むVH及びVLであって、配列番号243のアミノ酸配列を含むリンカーによって連結される、VH及びVL；又は(iii)配列番号200のアミノ酸配列を含むs c F vを含む、第1抗原結合ドメインと；(b)第2抗原結合ドメインとを含む細胞を提供する。一部の実施形態では、第1抗原結合ドメインと第2抗原結合ドメインとは、2つのキメラ抗原受容体(CAR)に配置される。一部の実施形態では、一部の実施形態では、第1抗原結合ドメインと第2抗原結合ドメインとは、1つのCARに配置される。一部の実施形態では、第2抗原結合ドメインは、CD19、CD5、CD10、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD27、CD30、CD34、CD37、CD38、CD40、CD53、CD69、CD72、CD73、CD74、CD75、CD77、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85、CD86、CD123、CD135、CD138、CD179、CD269、Flt3、ROR1、FcRn5、FcRn2、CS-1、CXCR4、5、7、IL-7/3R、IL7/4/3R又はIL4Rから選択される抗原に結合し、任意選択で、B細胞抗原は、CD19、CD20、CD22、FcRn5、FcRn2、CS-1、CD138、CD123、CD33、CD34、CLL-1、葉酸受容体又はFLT3から選択される。一部の実施形態では、第2抗原結合ドメインは、CD19に結合する。一部の実施形態では、第2抗原結合ドメインは、EGFRvIII、メソテリン、GD2、Tn抗原、sTn抗原、Tn-O-糖ペプチド、sTn-O-糖ペプチド、PSMA、CD97、TAG72、CD44v6、CEA、EPCAM、KIT、IL-13Ra2、レグマン、GD3、CD171、IL-11Ra、PSCA、MAD-CT-1、MAD-CT-2、VEGFR2、ルイスY、CD24、PDGFR、SSEA-4、葉酸受容体、ERBB(例えば、ERBB2)、Her2/neu、MUC1、EGFR、NCAM、エフリンB2、CAIX、LMP2、sLe、HMWMAA、o-アセチル-GD2、葉酸受容体、TEM1/CD248、TEM7R、FAP、レグマイン、HPV E6若しくはE7、ML-IAP、CLDN6、TSHR、GPRC5D、ALK、ポリシアル酸、Fos関連抗原、好中球エラスターゼ、TRP-2、CYP1B1、精子タンパク質17、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、AFP、チログロブリン、PLAC1、グロボH、RAGE1、MN-CAIX、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、腸カルボキシルエステラーゼ、mut hsp 70-2、NA-17、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、NY-ESO-1、GPR20、Ly6k、OR51E2、TARP、GFR4又はMHCに提示されるこれらの抗原のいずれかのペプチドから選択される抗原に結合する。

20

30

40

50

【 0 0 1 1 】

一部の実施形態では、第2抗原結合ドメインは、CD19に結合する。一部の実施形態では、第2抗原結合ドメインは、表19又は表22に列挙される抗CD19配列のHC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及び/又はLC CDR3、例えばそれぞれ配列番号295及び245～249の配列を含むHC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3を含む。一部の実施形態では、第2抗原結合ドメインは、表19又は表22に列挙される抗CD19配列のVH及び/又はVL、例えばそれぞれ配列番号250及び251のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むVH及びVLを含む。一部の実施形態では、第2抗原結合ドメインは、表19又は表22に列挙される抗CD19配列のscFv、例えば配列番号211のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むscFvを含む。一部の実施形態では、第2抗原結合ドメインは、第2CARに配置され、CARは、表19又は表22に列挙される抗CD19配列のCAR、例えば配列番号225若しくは229のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むCARを含む。

10

【 0 0 1 2 】

一部の実施形態では、第1抗原結合ドメインは、(a)それぞれ配列番号86、87、88、95、96及び97；(b)それぞれ配列番号44、45、76、54、55及び56；又は(c)それぞれ配列番号44、45、46、54、55及び56のアミノ酸配列を含むHC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3を含む。一部の実施形態では、第2抗原結合ドメインは、それぞれ配列番号295及び245～249のアミノ酸配列を含むHC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3を含む。一部の実施形態では、第1抗原結合ドメインは、(a)それぞれ配列番号93及び102；(b)それぞれ配列番号78及び61；又は(c)それぞれ配列番号52及び61のアミノ酸配列を含むVH及びVLを含む。一部の実施形態では、第2抗原結合ドメインは、それぞれ配列番号250及び251のアミノ酸配列を含むVH及びVLを含む。一部の実施形態では、第1抗原結合ドメインは、配列番号105、80又は64のアミノ酸配列を含むscFvを含む。一部の実施形態では、第2抗原結合ドメインは、配列番号211のアミノ酸配列を含むscFvを含む。一部の実施形態では、第1抗原結合ドメインは、配列番号253、106、81又は65の核酸配列によってコードされる。一部の実施形態では、第2抗原結合ドメインは、配列番号212の核酸配列によってコードされる。

20

30

【 0 0 1 3 】

一部の実施形態では、第1抗原結合ドメインは、第1CARに配置され、及び第2抗原結合ドメインは、第2CARに配置される。一部の実施形態では、第1CARは、第1膜貫通ドメインと、第1細胞内シグナル伝達ドメインとをさらに含む。一部の実施形態では、第2CARは、第2膜貫通ドメインと、第2細胞内シグナル伝達ドメインとをさらに含む。

40

【 0 0 1 4 】

一部の実施形態では、第1CARは、第1核酸配列によってコードされ、及び第2CARは、第2核酸配列によってコードされ、第1及び第2核酸配列は、個別の核酸分子上に配置される。

【 0 0 1 5 】

一部の実施形態では、第1CARは、第1核酸配列によってコードされ、及び第2CARは、第2核酸配列によってコードされ、第1及び第2核酸配列は、単一の核酸分子上に配置される。一部の実施形態では、単一の核酸分子は、5'から3'の方向に、以下の構成を含む：第1抗原結合ドメインをコードする核酸配列 - 第1膜貫通ドメインをコードする核酸配列 - 第1細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列 - リンカーをコードす

50

る核酸配列 - 第2抗原結合ドメインをコードする核酸配列 - 第2膜貫通ドメインをコードする核酸配列 - 第2細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列。一部の実施形態では、単一の核酸分子は、5'から3'の方向に、以下の構成を含む：第2抗原結合ドメインをコードする核酸配列 - 第2膜貫通ドメインをコードする核酸配列 - 第2細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列 - リンカーをコードする核酸配列 - 第1抗原結合ドメインをコードする核酸配列 - 第1膜貫通ドメインをコードする核酸配列 - 第1細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列。一部の実施形態では、リンカーは、自己切断部位を含む。一部の実施形態では、リンカーは、P2A部位、T2A部位、E2A部位又はF2A部位を含む。一部の実施形態では、リンカーは、P2A部位を含む。一部の実施形態では、リンカーは、配列番号209の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる。一部の実施形態では、リンカーは、配列番号208のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、単一の核酸分子は、配列番号215、217、219、221若しくは223の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列を含む。一部の実施形態では、単一の核酸分子は、配列番号214、216、218、220若しくは222のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする。

【0016】

一部の実施形態では、第1抗原結合ドメイン及び第2抗原結合ドメインは、1つのCARに配置され、CARは、膜貫通ドメインと細胞内シグナル伝達ドメインとをさらに含む。一部の実施形態では、第1抗原結合ドメインは、第1VH(VH1)と第1VL(VL1)とを含み、及び第2抗原結合ドメインは、第2VH(VH2)と第2VL(VL2)とを含む。一部の実施形態では、VH1、VL1、VH2及びVL2は、N末端からC末端まで、以下の構成で配列される：VH2 - 任意選択でリンカー1(「L1」) - VL1 - 任意選択でリンカー2(「L2」) - VH1 - 任意選択でリンカー3(「L3」) - VL2。一部の実施形態では、VH1、VL1、VH2及びVL2は、N末端からC末端まで、以下の構成で配列される：VH1 - 任意選択でL1 - VH2 - 任意選択でL2 - VL2 - 任意選択でL3 - VL1。一部の実施形態では、VH1、VL1、VH2及びVL2は、N末端からC末端まで、以下の構成で配列される：VL2 - 任意選択でL1 - VL1 - 任意選択でL2 - VH1 - 任意選択でL3 - VH2。一部の実施形態では、VH1、VL1、VH2及びVL2は、N末端からC末端まで、以下の構成で配列される：VL2 - 任意選択でL1 - VH1 - 任意選択でL2 - VL1 - 任意選択でL3 - VH2。一部の実施形態では、VH1、VL1、VH2及びVL2は、N末端からC末端まで、以下の構成で配列される：VH2 - 任意選択でL1 - VH1 - 任意選択でL2 - VL1 - 任意選択でL3 - VL2。一部の実施形態では、VH1、VL1、VH2及びVL2は、N末端からC末端まで、以下の構成で配列される：VL1 - 任意選択でL1 - VH2 - 任意選択でL2 - VL2 - 任意選択でL3 - VH1。一部の実施形態では、VH1、VL1、VH2及びVL2は、N末端からC末端まで、以下の構成で配列される：VL1 - 任意選択でL1 - VL2 - 任意選択でL2 - VH2 - 任意選択でL3 - VL1。一部の実施形態では、VH1及びVL1は、それぞれ配列番号93及び102のアミノ酸配列(又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列)を含む。一部の実施形態では、VH1及びVL1は、それぞれ配列番号333及び334のアミノ酸配列(又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列)を含む。一部の実施形態では、VH1及びVL1は、それぞれ配列番号78及び61のアミノ酸配列(又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列)を含む。一部の実施形態では、VH1及びVL1は、それぞれ配列番号335及び336のアミノ酸

10

20

30

40

50

配列（又はそれと少なくとも約 85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列）を含む。一部の実施形態では、VH2及びVL2は、それぞれ配列番号250及び251のアミノ酸配列（又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列）を含む。一部の実施形態では、VH2及びVL2は、それぞれ配列番号331及び332のアミノ酸配列（又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列）を含む。一部の実施形態では、L1又はL3は、配列番号5のアミノ酸配列（又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列）を含む。一部の実施形態では、L2は、配列番号63のアミノ酸配列（又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列）を含む。一部の実施形態では、CARは、配列番号321～330からなる群から選択されるアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95若しくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CARは、配列番号339～348からなる群から選択されるアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95若しくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

【0017】

一部の実施形態では、CARは、5'から3'の方向に、以下の構成：第1抗原結合ドメインをコードする核酸配列 - 任意選択でリンカーをコードする核酸配列 - 第2抗原結合ドメインをコードする核酸配列 - 膜貫通ドメインをコードする核酸配列 - 細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列を含む核酸分子によってコードされる。一部の実施形態では、CARは、5'から3'の方向に、以下の構成：第2抗原結合ドメインをコードする核酸配列 - 任意選択でリンカーをコードする核酸配列 - 第1抗原結合ドメインをコードする核酸配列 - 膜貫通ドメインをコードする核酸配列 - 細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列を含む核酸分子によってコードされる。

20

【0018】

一部の実施形態では、CARは、NからCの方向に、以下の構成：第1抗原結合ドメイン - 任意選択でリンカー - 第2抗原結合ドメイン - 膜貫通ドメイン - 細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態では、CARは、NからCの方向に、以下の構成：第2抗原結合ドメイン - 任意選択でリンカー - 第1抗原結合ドメイン - 膜貫通ドメイン - 細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

30

【0019】

一部の実施形態では、第1抗原結合ドメイン又は第2抗原結合ドメインは、VH及びVLを含む。一部の実施形態では、VH及びVLは、リンカーによって連結される。一部の実施形態では、リンカーは、配列番号5、63、104若しくは243のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0020】

一部の実施形態では、膜貫通ドメイン、第1膜貫通ドメイン又は第2膜貫通ドメインは、T細胞受容体の、若しくは鎖、CD28、CD3、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137又はCD154から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含む。一部の実施形態では、膜貫通ドメイン、第1膜貫通ドメイン又は第2膜貫通ドメインは、配列番号6のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、膜貫通ドメイン、第1膜貫通ドメイン又は第2膜貫通ドメインは、配列番号17の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる。

40

【0021】

一部の実施形態では、第1抗原結合ドメイン又は第2抗原結合ドメインは、ヒンジ領域（例えば、第1又は第2ヒンジ領域）により、膜貫通ドメイン、第1膜貫通ドメイン又は

50

第2膜貫通ドメインに連結される。一部の実施形態では、ヒンジ領域は、配列番号2、3若しくは4のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ヒンジ領域は、配列番号13、14若しくは15の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる。一部の実施形態では、ヒンジ領域及び膜貫通ドメインは、配列番号202のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ヒンジ領域及び膜貫通ドメインは、配列番号203若しくは213の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる。

10

【0022】

一部の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメイン、第1細胞内シグナル伝達ドメイン又は第2細胞内シグナル伝達ドメインは、一次シグナル伝達ドメイン(例えば、第1又は第2一次シグナル伝達ドメイン)を含む。一部の実施形態では、一次シグナル伝達ドメインは、CD3、TCR、FcR、FcR、CD3、CD3、CD3、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278(ICOS)、FcRI、DAP10、DAP12又はCD66dに由来する機能性シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態では、一次シグナル伝達ドメインは、配列番号9若しくは10のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、一次シグナル伝達ドメインは、配列番号20、21若しくは205の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる。一部の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメイン、第1細胞内シグナル伝達ドメイン又は第2細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激シグナル伝達ドメイン(例えば、第1又は第2共刺激シグナル伝達ドメイン)を含む。一部の実施形態では、共刺激シグナル伝達ドメインは、以下に由来する機能性シグナル伝達ドメインを含む: MHCクラスI分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ球活性化分子(SLAMタンパク質)、活性化NK細胞受容体、BTLA、Tollリガンド受容体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、4-1BB(CD137)、B7-H3、ICOS(CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8、CD8、IL2R、IL2R、IL7R、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELP(LG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、CD28-OX40、CD28-4-1BB又はCD83と特異的に結合するリガンド。一部の実施形態では、共刺激シグナル伝達ドメインは、配列番号7のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、共刺激シグナル伝達ドメインは、配列番号18若しくは204の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる。一部の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメイン、第1細胞内シグナル伝達ドメイン又は第2細胞内シグナル伝達ドメインは、4-1BBに由来する機能

20

30

40

50

性シグナル伝達ドメインと、CD3 に由来する機能性シグナル伝達ドメインとを含む。一部の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメイン、第1細胞内シグナル伝達ドメイン又は第2細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号7のアミノ酸配列（又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列）と、配列番号9若しくは10のアミノ酸配列（又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列）とを含む。一部の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメイン、第1細胞内シグナル伝達ドメイン又は第2細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号7のアミノ酸配列と、配列番号9又は10のアミノ酸配列とを含む。

【0023】

一部の実施形態では、CAR、第1CAR又は第2CARは、リーダー配列（例えば、第1又は第2リーダ配列）をさらに含む。一部の実施形態では、リーダー配列は、配列番号1のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、リーダー配列は、配列番号199若しくは210の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる。

【0024】

一部の実施形態では、第1リーダー配列及び第2リーダー配列は、異なる（例えば、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%又は100%異なる）核酸配列によってコードされる。一部の実施形態では、第1ヒンジ領域及び第2ヒンジ領域は、異なる（例えば、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%又は100%異なる）核酸配列によってコードされる。一部の実施形態では、第1膜貫通ドメイン及び第2膜貫通ドメインは、異なる（例えば、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%又は100%異なる）核酸配列によってコードされる。一部の実施形態では、第1細胞内シグナル伝達ドメイン及び第2細胞内シグナル伝達ドメインは、異なる（例えば、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%又は100%異なる）核酸配列によってコードされる。一部の実施形態では、第1一次シグナル伝達ドメイン及び第2一次シグナル伝達ドメインは、異なる（例えば、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%又は100%異なる）核酸配列によってコードされる。一部の実施形態では、第1共刺激シグナル伝達ドメイン及び第2共刺激シグナル伝達ドメインは、異なる（例えば、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%又は100%異なる）核酸配列によってコードされる。一部の実施形態では、第1リーダー配列及び第2リーダー配列は、同じアミノ酸配列（例えば、配列番号1のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列）を含む。一部の実施形態では、第1リーダー配列及び第2リーダー配列は、異なるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第1ヒンジ領域及び第2ヒンジ領域は、同じアミノ酸配列を含む（例えば、第1ヒンジ領域及び第2ヒンジ領域は、配列番号2のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む）。一部の実施形態では、第1ヒンジ領域及び第2ヒンジ領域配列は、異なるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第1膜貫通ドメイン及び第2膜貫通ドメインは、同じアミノ酸配列を含む（例えば、第1膜貫通ドメイン及び第2膜貫通ドメインは、配列番号6のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む）。一部の実施形態では、第1膜貫通ドメイン及び第2膜貫通ドメインは、異なるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第1細胞内シグナル伝達ドメイン及び第2細胞内シグナル伝達ドメインは、同じアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第1細胞内シグナル伝達ドメイン及び第2細胞内シグナル伝達ドメインは、異なる

10

20

30

40

50

アミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第1一次シグナル伝達ドメイン及び第2一次シグナル伝達ドメインは、同じアミノ酸配列を含む（例えば、第1一次シグナル伝達ドメイン及び第2一次シグナル伝達ドメインは、配列番号10のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む）。一部の実施形態では、第1一次シグナル伝達ドメイン及び第2一次シグナル伝達ドメインは、異なるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第1共刺激シグナル伝達ドメイン及び第2共刺激シグナル伝達ドメインは、同じアミノ酸配列を含む（例えば、第1共刺激シグナル伝達ドメイン及び第2共刺激シグナル伝達ドメインは、配列番号7のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む）。一部の実施形態では、第1共刺激シグナル伝達ドメイン及び第2共刺激シグナル伝達ドメインは、異なるアミノ酸配列を含む（例えば、第1及び第2共刺激シグナル伝達ドメインは、それぞれ4-1BB共刺激ドメイン配列及びCD28共刺激ドメイン配列を含むか；又はそれぞれCD28共刺激ドメイン配列及び4-1BB共刺激ドメイン配列を含む）。一部の実施形態では、第1リーダー配列及び第2リーダー配列は、配列番号199及び210を含む核酸配列（又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列）によりそれぞれコードされる。一部の実施形態では、第1リーダー配列及び第2リーダー配列は、配列番号210及び199を含む核酸配列（又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列）によりそれぞれコードされる。一部の実施形態では、第1ヒンジ領域及び第2ヒンジ領域は、配列番号337及び13を含む核酸配列（又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列）によりそれぞれコードされる。一部の実施形態では、第1ヒンジ領域及び第2ヒンジ領域配列は、配列番号13及び337を含む核酸配列（又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列）によりそれぞれコードされる。一部の実施形態では、第1膜貫通ドメイン及び第2膜貫通ドメインは、配列番号338及び17を含む核酸配列（又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列）によりそれぞれコードされる。一部の実施形態では、第1膜貫通ドメイン及び第2膜貫通配列は、配列番号17及び338を含む核酸配列（又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列）によりそれぞれコードされる。一部の実施形態では、第1共刺激シグナル伝達ドメイン及び第2共刺激シグナル伝達ドメインは、配列番号204及び18を含む核酸配列（又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列）によりそれぞれコードされる。一部の実施形態では、第1共刺激シグナル伝達ドメイン及び第2共刺激配列は、配列番号18及び204を含む核酸配列（又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列）によりそれぞれコードされる。一部の実施形態では、第1一次シグナル伝達ドメイン及び第2一次シグナル伝達ドメインは、配列番号205及び21を含む核酸配列（又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列）によりそれぞれコードされる。一部の実施形態では、第1共刺激シグナル伝達ドメイン及び第2共刺激配列は、配列番号21及び205を含む核酸配列（又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列）によりそれぞれコードされる。

【0025】

一部の実施形態では、CAR、第1CAR又は第2CARは、ウッドチャック肝炎転写後調節エレメント（WPRE）を含む核酸配列によってコードされる。

【0026】

一部の実施形態では、核酸分子であって、(a)抗BCMA結合ドメインである第1抗原結合ドメインをコードする第1核酸配列であって、抗BCMA結合ドメインは、重鎖相補性決定領域1（HC CDR1）、重鎖相補性決定領域2（HC CDR2）及び重鎖相補性決定領域3（HC CDR3）を含む重鎖可変領域（VH）と、軽鎖相補性決定領

10

20

30

40

50

域 1 (L C C D R 1)、軽鎖相補性決定領域 2 (L C C D R 2) 及び軽鎖相補性決定領域 3 (L C C D R 3) を含む軽鎖可変領域 (V L) とを含み、H C C D R 1、H C C D R 2、H C C D R 3、L C C D R 1、L C C D R 2 及び L C C D R 3 は、(i) それぞれ配列番号 8 6、1 3 0、8 8、9 5、1 3 1 及び 1 3 2 ; (i i) それぞれ配列番号 4 4、4 5、8 4、5 4、5 5 及び 5 6 ; 又は (i i i) それぞれ配列番号 1 7 9、1 8 0、1 8 1、1 4 7、1 8 2 及び 1 8 3 のアミノ酸配列を含む、第 1 核酸配列と ; (b) 第 2 抗原結合ドメインをコードする第 2 核酸配列とを含む核酸分子が本明細書に提供される。

【 0 0 2 7 】

一部の実施形態では、単離核酸分子は、個別の核酸分子である第 1 核酸分子及び第 2 核酸分子を含み、第 1 核酸配列は、第 1 核酸分子上に配置され、第 2 核酸配列は、第 2 核酸分子上に配置される。

【 0 0 2 8 】

一部の実施形態では、核酸分子であって、(a) 抗 B C M A 結合ドメインである第 1 抗原結合ドメインをコードする第 1 核酸配列であって、抗 B C M A 結合ドメインは、(i) 表 2 0 又は 2 6 に列挙される抗 B C M A 配列の H C C D R 1、H C C D R 2 及び H C C D R 3 を含む V H と、表 2 0 又は 2 6 に列挙される抗 B C M A 配列の L C C D R 1、L C C D R 2 及び L C C D R 3 を含む V L とであって、配列番号 2 4 3 のアミノ酸配列を含むリンカーによって連結される、V H 及び V L ; (i i) それぞれ配列番号 2 3 9 及び 2 4 2 のアミノ酸配列を含む V H 及び V L であって、配列番号 2 4 3 のアミノ酸配列を含むリンカーによって連結される、V H 及び V L ; 又は (i i i) 配列番号 2 0 0 のアミノ酸配列を含む s c F v を含む、第 1 核酸配列と ; (b) 第 2 抗原結合ドメインをコードする第 2 核酸配列とを含む核酸分子が本明細書に提供される。

【 0 0 2 9 】

一部の実施形態では、第 1 C A R をコードする第 1 核酸配列と、第 2 C A R をコードする第 2 核酸配列とを含む核酸分子が本明細書に提供され、第 1 C A R は、抗 B C M A 結合ドメインである第 1 抗原結合ドメイン、第 1 膜貫通ドメイン及び第 1 細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第 2 C A R は、抗 C D 1 9 結合ドメインである第 2 抗原結合ドメイン、第 2 膜貫通ドメイン及び第 2 細胞内シグナル伝達ドメインを含み、(i) 第 1 抗原結合ドメインは、それぞれ配列番号 8 6、8 7、8 8、9 5、9 6 及び 9 7 のアミノ酸配列を含む H C C D R 1、H C C D R 2、H C C D R 3、L C C D R 1、L C C D R 2 及び L C C D R を含み、及び第 2 抗原結合ドメインは、それぞれ配列番号 2 9 5 及び 2 4 5 ~ 2 4 9 のアミノ酸配列を含む H C C D R 1、H C C D R 2、H C C D R 3、L C C D R 1、L C C D R 2 及び L C C D R を含むか ; (i i) 第 1 抗原結合ドメインは、それぞれ配列番号 9 3 及び 1 0 2 のアミノ酸配列を含む V H 及び V L を含み、及び第 2 抗原結合ドメインは、それぞれ配列番号 2 5 0 及び 2 5 1 のアミノ酸配列を含む V H 及び V L を含むか ; (i i i) 第 1 抗原結合ドメインは、配列番号 1 0 5 のアミノ酸配列を含む s c F v を含み、及び第 2 抗原結合ドメインは、配列番号 2 1 1 のアミノ酸配列を含む s c F v を含むか ; (i v) 第 1 C A R は、配列番号 1 0 7 又は 2 2 6 のアミノ酸配列を含み、及び第 2 C A R は、配列番号 2 2 5 又は 2 2 9 のアミノ酸配列を含むか ; 又は (v) 単離核酸分子は、配列番号 2 7 1 の核酸配列を含む。

【 0 0 3 0 】

一部の実施形態では、第 1 C A R をコードする第 1 核酸配列と、第 2 C A R をコードする第 2 核酸配列とを含む核酸分子が本明細書に提供され、第 1 C A R は、抗 B C M A 結合ドメインである第 1 抗原結合ドメイン、第 1 膜貫通ドメイン及び第 1 細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第 2 C A R は、抗 C D 1 9 結合ドメインである第 2 抗原結合ドメイン、第 2 膜貫通ドメイン及び第 2 細胞内シグナル伝達ドメインを含み、(i) 第 1 抗原結合ドメインは、それぞれ配列番号 4 4、4 5、7 6、5 4、5 5 及び 5 6 のアミノ酸配列を含む H C C D R 1、H C C D R 2、H C C D R 3、L C C D R 1、L C C D R 2 及び L C C D R を含み、第 2 抗原結合ドメインは、それぞれ配列番号 2 9 5 及び 2 4 5

10

20

30

40

50

~ 249のアミノ酸配列を含むHC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3を含むか；(ii)第1抗原結合ドメインは、それぞれ配列番号78及び61のアミノ酸配列を含むVH及びVLを含み、及び第2抗原結合ドメインは、それぞれ配列番号250及び251のアミノ酸配列を含むVH及びVLを含むか；(iii)第1抗原結合ドメインは、配列番号80のアミノ酸配列を含むscFvを含み、及び第2抗原結合ドメインは、配列番号211のアミノ酸配列を含むscFvを含むか；(iv)第1CARは、配列番号82又は224のアミノ酸配列を含み、及び第2CARは、配列番号225又は229のアミノ酸配列を含むか；又は(v)単離核酸分子は、配列番号215の核酸配列を含む。

【0031】

10

一部の実施形態では、本明細書に開示される核酸分子によってコードされるポリペプチド分子が本明細書に提供される。

【0032】

一部の実施形態では、CARが本明細書に提供され、CARは、(a)抗BCMA結合ドメインである第1抗原結合ドメインであって、抗BCMA結合ドメインは、重鎖相補性決定領域1(HC CDR1)、重鎖相補性決定領域2(HC CDR2)及び重鎖相補性決定領域3(HC CDR3)を含む重鎖可変領域(VH)と、軽鎖相補性決定領域1(LC CDR1)、軽鎖相補性決定領域2(LC CDR2)及び軽鎖相補性決定領域3(LC CDR3)を含む軽鎖可変領域(VL)とを含み、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、(i)それぞれ配列番号86、130、88、95、131及び132；(ii)それぞれ配列番号44、45、84、54、55及び56；又は(iii)それぞれ配列番号179、180、181、147、182及び183のアミノ酸配列を含む、第1抗原結合ドメインと；(b)第2抗原結合ドメインとを含む。

20

【0033】

一部の実施形態では、CARが本明細書に提供され、CARは、(a)抗BCMA結合ドメインである第1抗原結合ドメインであって、抗BCMA結合ドメインは、(i)表20又は26に列挙される抗BCMA配列のHC CDR1、HC CDR2及びHC CDR3を含むVHと、表20又は26に列挙される抗BCMA配列のLC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3を含むVLとであって、配列番号243のアミノ酸配列を含むリンカーによって連結される、VH及びVL；(ii)それぞれ配列番号239及び242のアミノ酸配列を含むVH及びVLであって、配列番号243のアミノ酸配列を含むリンカーによって連結される、VH及びVL；又は(iii)配列番号200のアミノ酸配列を含むscFvを含む、第1抗原結合ドメインと；(b)第2抗原結合ドメインとを含む。

30

【0034】

一部の実施形態では、本明細書に開示される核酸分子又は本明細書に開示されるCARをコードする核酸分子を含むベクターが本明細書に提供される。一部の実施形態では、ベクターは、DNAベクター、RNAベクター、プラスミド、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター又はレトロウイルスベクターから選択される。一部の実施形態では、ベクターは、配列番号11の核酸配列を含むEF-1プロモーターを含む。

40

【0035】

一部の実施形態では、本明細書に開示される核酸分子、本明細書に開示されるCARをコードする核酸分子、本明細書に開示されるポリペプチド、本明細書に開示されるCAR又は本明細書に開示されるベクターを含む細胞が本明細書に提供される。一部の実施形態では、細胞は、T細胞又はNK細胞である。

【0036】

一部の実施形態では、細胞を作製する方法であって、本明細書に開示されるベクターで細胞を形質導入するステップを含む方法が本明細書に提供され、任意選択で、細胞は、T細胞又はNK細胞である。一部の実施形態では、RNA操作細胞を作製する方法であって

50

、インビトロで転写されたRNA又は合成RNAを細胞に導入するステップを含む方法が本明細書に提供され、ここで、RNAは、本明細書に開示の核酸分子、本明細書に開示のCARをコードする核酸分子を含む。一部の実施形態では、細胞は、T細胞又はNK細胞である。

【0037】

一部の実施形態では、キメラ抗原受容体(CAR)を発現する細胞(例えば、T細胞)の集団を作製する方法が本明細書に提供され、この方法は、(i)細胞(例えば、T細胞、例えば凍結された又は新鮮な白血球アフェレーシス産物から単離されたT細胞)の集団を、CD3/TCR複合体を刺激する薬剤及び/又は細胞の表面上の共刺激分子を刺激する薬剤と接触させる(例えば、結合させる)ステップ; (ii)上記細胞(例えば、T細胞)の集団を、本明細書に開示の核酸分子又は本明細書に開示のCARをコードする核酸分子と接触させ、それにより上記核酸分子を含む細胞(例えば、T細胞)の集団を提供するステップ、並びに(iii)保存(例えば、凍結保存培地中の細胞の集団の再製剤化)又は投与のために、上記細胞(例えば、T細胞)の集団を採取するステップを含み、

(a)ステップ(ii)は、ステップ(i)と一緒に、又はステップ(i)の開始後の20時間以内、例えばステップ(i)の開始後の12、13、14、15、16、17若しくは18時間以内、例えばステップ(i)の開始後の18時間以内実施され、及びステップ(iii)は、ステップ(i)の開始後の30(例えば、26)時間以内、例えばステップ(i)の開始後の22、23、24、25、26、27、28、29又は30時間以内、例えばステップ(i)の開始後の24時間以内実施され、

(b)ステップ(ii)は、ステップ(i)と一緒に、又はステップ(i)の開始後の20時間以内、例えばステップ(i)の開始後の12、13、14、15、16、17若しくは18時間以内、例えばステップ(i)の開始後の18時間以内実施され、及びステップ(iii)は、ステップ(ii)の開始後の30時間以内、例えばステップ(ii)の開始後の22、23、24、25、26、27、28、29又は30時間以内実施されるか、又は

(c)ステップ(iii)からの細胞の集団は、増殖されないか、又は例えばステップ(i)の開始時の細胞の集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて5、10、15、20、25、30、35若しくは40%以下、例えば10%以下だけ増殖され、

任意選択で、ステップ(ii)の核酸分子は、ウイルスベクター上にあり、任意選択で、ステップ(ii)の核酸分子は、ウイルスベクター上のRNA分子であり、任意選択で、ステップ(ii)は、CARをコードする核酸分子を含むウイルスベクターで細胞(例えば、T細胞)の集団を形質導入することを含む。

【0038】

一部の実施形態では、キメラ抗原受容体(CAR)を発現する細胞(例えば、T細胞)の集団を作製する方法が本明細書に提供され、この方法は、(1)細胞(例えば、T細胞、例えば凍結された又は新鮮な白血球アフェレーシス産物から単離されたT細胞)の集団を、IL-2、IL-7、IL-15(例えば、hetIL-15(IL-15/sIL-15Ra))、IL-21、IL-6(例えば、IL-6/sIL-6Ra)又はそれらの組み合わせから選択されるサイトカインと接触させるステップ、(2)細胞(例えば、T細胞)の集団を、本明細書に開示される核酸分子又は本明細書に開示されるCARをコードする核酸分子と接触させ、それにより核酸分子を含む細胞(例えば、T細胞)の集団を提供するステップ、並びに(3)保存(例えば、凍結保存培地中の細胞の集団の再製剤化)又は投与のために、上記細胞(例えば、T細胞)の集団を採取するステップを含み、

(a)ステップ(2)は、ステップ(1)と一緒に、又はステップ(1)の開始後の5時間以内、例えばステップ(1)の開始後の1、2、3、4若しくは5時間以内実施され、及び

ステップ(3)は、ステップ(1)の開始後の26時間以内、例えばステップ(1)の開始後の22、23若しくは24時間以内、例えばステップ(1)の開始後の24時間以内

に実施されるか、又は

(b) ステップ(3)からの細胞の集団は、増殖されないか、又は例えばステップ(1)の開始時の細胞の集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて5、10、15、20、25、30、35若しくは40%以下、例えば10%以下だけ増殖され、

任意選択で、ステップ(2)の核酸分子は、ウイルスベクター上にあり、任意選択で、ステップ(ii)の核酸分子は、ウイルスベクター上のRNA分子であり、任意選択で、ステップ(ii)は、CARをコードする核酸分子を含むウイルスベクターで細胞(例えば、T細胞)の集団を形質導入することを含む。

【0039】

一部の実施形態では、CARを発現するように操作された細胞の集団(「CAR発現細胞の集団」)が本明細書に開示され、前記集団は、以下を含む:(a) CARを発現するように操作される前の同じ細胞の集団中のナイーブ細胞、例えばナイーブT細胞、例えばCD45RO-CCR7+T細胞のパーセンテージと比べて、ほぼ同じパーセンテージのナイーブ細胞、例えばナイーブT細胞、例えばCD45RO-CCR7+T細胞;(b) CARを発現するように操作される前の同じ細胞の集団中のナイーブ細胞、例えばナイーブT細胞、例えばCD45RO-CCR7+T細胞のパーセンテージと比べて、ナイーブ細胞、例えばナイーブT細胞、例えばCD45RO-CCR7+T細胞の約5%~約10%以内の変化;(c) CARを発現するように操作される前の同じ細胞の集団中のナイーブ細胞、例えばナイーブT細胞、例えばCD45RO-CCR7+T細胞のパーセンテージと比べて、増加したパーセンテージの、例えば少なくとも1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、2.2、2.4、2.6、2.8又は3倍増加したナイーブ細胞、例えばナイーブT細胞、例えばCD45RO-CCR7+T細胞;(d) CARを発現するように操作される前の同じ細胞の集団中のセントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリーT細胞、例えばCCR7+CD45RO+T細胞のパーセンテージと比べて、ほぼ同じパーセンテージのセントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリーT細胞、例えばCCR7+CD45RO+T細胞;(e) CARを発現するように操作される前の同じ細胞の集団中のセントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリーT細胞、例えばCCR7+CD45RO+T細胞のパーセンテージと比べて、セントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリーT細胞、例えばCCR7+CD45RO+T細胞の約5%~約10%以内の変化;(f) CARを発現するように操作される前の同じ細胞の集団中のセントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリーT細胞、例えばCCR7+CD45RO+T細胞のパーセンテージと比べて、減少したパーセンテージの、例えば少なくとも20、25、30、35、40、45又は50%減少したセントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリーT細胞、例えばCCR7+CD45RO+T細胞;(g) CARを発現するように操作される前の同じ細胞の集団中の幹メモリーT細胞、例えばCD45RA+CD95+IL-2受容体+CCR7+CD62L+T細胞のパーセンテージと比べて、ほぼ同じパーセンテージの幹メモリーT細胞、例えばCD45RA+CD95+IL-2受容体+CCR7+CD62L+T細胞;(h) CARを発現するように操作される前の同じ細胞の集団中の幹メモリーT細胞、例えばCD45RA+CD95+IL-2受容体+CCR7+CD62L+T細胞のパーセンテージと比べて、幹メモリーT細胞、例えばCD45RA+CD95+IL-2受容体+CCR7+CD62L+T細胞の約5%~約10%以内の変化;又は(i) CARを発現するように操作される前の同じ細胞の集団中の幹メモリーT細胞、例えばCD45RA+CD95+IL-2受容体+CCR7+CD62L+T細胞のパーセンテージと比べて、増加したパーセンテージの幹メモリーT細胞、例えばCD45RA+CD95+IL-2受容体+CCR7+CD62L+T細胞。一部の実施形態では、集団は、本明細書に開示される細胞を含む。一部の実施形態では、集団は、本明細書に開示される二重CAR又はダイアポディCARを含む細胞を含む。一部の実施形態では、集団は、(a) 抗BCMA結合ドメインである第1抗原結合ドメインであって、抗BCMA結合ドメインは、重鎖相補性決定領域1(HC CDR1)、重鎖相補性決定領域2(HC CDR2)及び重鎖相補性決定領域3(HC CDR3)

10

20

30

40

50

を含む重鎖可変領域 (VH) と、軽鎖相補性決定領域 1 (LC CDR1)、軽鎖相補性決定領域 2 (LC CDR2) 及び軽鎖相補性決定領域 3 (LC CDR3) を含む軽鎖可変領域 (VL) とを含み、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2 及び LC CDR3 は、(i) それぞれ配列番号 86、130、88、95、131 及び 132；(ii) それぞれ配列番号 44、45、84、54、55 及び 56；又は (iii) それぞれ配列番号 179、180、181、147、182 及び 183 のアミノ酸配列を含む、第 1 抗原結合ドメインと；(b) 第 2 抗原結合ドメインとを含む細胞を含む。

【0040】

一部の実施形態では、本明細書に開示される細胞又は本明細書に開示される細胞の集団と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物が本明細書に提供される。 10

【0041】

一部の実施形態では、細胞の集団は、本明細書に開示される方法によって作製される。

一部の実施形態では、集団は、

- (a) 抗 BCMA CAR を含むが、抗 CD19 CAR を含まない第 1 細胞集団；
 - (b) 抗 CD19 CAR を含むが、抗 BCMA CAR を含まない第 2 細胞集団；及び
 - (c) 抗 BCMA CAR と抗 CD19 CAR との両方を含む第 3 細胞集団
- を含む。

【0042】

一部の実施形態では、

(i) 第 2 及び第 3 集団を合わせた生存細胞の総数は、第 1 及び第 3 集団を合わせた生存細胞の総数の約 110% 以下 (例えば、約 105%、100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、1% 又はそれ未満以下) であり；

(ii) 第 1 及び第 3 集団を合わせた生存細胞の総数は、第 2 及び第 3 集団を合わせた生存細胞の総数の約 90% 以上 (例えば、約 100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、400%、500%、750%、1000%、2000%、5000、10000% 又はそれを超えるもの以上) であり；

(iii) 第 1 及び第 3 集団を合わせた生存細胞の総数は、生存細胞の総数の約 5% 以上 (例えば、約 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80% 又は 90% 以上) である。 30

【0043】

一部の実施形態では、集団は、CAR を含まない第 4 細胞集団をさらに含む。

【0044】

一部の実施形態では、

(i) 第 2 集団の生存細胞の総数は、第 1 及び第 3 集団を合わせた生存細胞の総数の約 110% 以下 (例えば、約 105%、100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、1% 又はそれ未満以下) であり；

(ii) 第 2 集団の生存細胞の総数は、第 1 及び第 3 集団を合わせた生存細胞の総数の約 45% ~ 約 50% (例えば、約 47%) 以下；約 50 ~ 約 55% (例えば、約 53%) 以下；約 60% ~ 約 65% (例えば、約 63%) 以下；又は約 80 ~ 約 85% (例えば、約 82%) 以下である。 40

【0045】

一部の実施形態では、対象において抗腫瘍免疫を提供する方法が本明細書に開示され、これは、有効量の、本明細書に開示される細胞、本明細書に開示される細胞の集団又は本明細書に開示される医薬組成物を対象に投与することを含む。一部の実施形態では、BCMA の発現に関連する疾患を有する対象を処置する方法が本明細書に開示され、これは、有効量の、本明細書に開示される細胞、本明細書に開示される細胞の集団又は本明細書に開示される医薬組成物を対象に投与することを含む。一部の実施形態では、BCMA の発現に関連する疾患は、(i) 骨髄形成異常、骨髄異形成症候群若しくは前白血病の 1 つ以 50

上から選択される癌若しくは悪性疾患又は前癌状態、或いは (i i) B C M A の発現に関連する非癌関連適応症である。一部の実施形態では、癌は、血液癌又は固形癌である。一部の実施形態では、疾患は、急性白血病、B細胞急性リンパ性白血病(「BALL」)、T細胞急性リンパ性白血病(「TALL」)、急性リンパ性白血病(ALL)、慢性骨髄性白血病(CML)、慢性リンパ球性白血病(CLL)、B細胞前リンパ球性白血病、芽球性形質細胞様樹状細胞新生物、パーキットリンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、ヘアリー細胞白血病、小細胞型若しくは大細胞型濾胞性リンパ腫、悪性リンパ球増殖性病態、MALTリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、多発性骨髄腫、骨髄形成異常及び骨髄異形成症候群、非ホジキンリンパ腫、形質芽球性リンパ腫、形質細胞様樹状細胞新生物、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、前立腺癌(例えば、去勢抵抗性若しくは治療抵抗性前立腺癌又は転移性前立腺癌)、膵臓癌、肺癌、形質細胞増殖異常症(例えば、無症候性骨髄腫(くすぶり型多発性骨髄腫又は無症候性骨髄腫)、意義不明の単クローン性 グロブリン血症(MGUS)、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、形質細胞腫(例えば、形質細胞異常増殖症、孤立性骨髄腫、孤立性形質細胞腫、髓外性形質細胞腫及び多発性形質細胞腫)、全身性アミロイド軽鎖アミロイドーシス若しくはPOEMS症候群(クロウ・深瀬症候群、高月病及びPEP症候群としても知られる))又はそれらの組み合わせである。一部の実施形態では、疾患は、多発性骨髄腫である。

10

【0046】

一部の実施形態では、細胞の集団又は医薬組成物を約 1×10^6 ~ 約 1×10^8 (例えば、約 2×10^6 ~ 約 5×10^7 、約 5×10^6 ~ 約 2×10^7 、約 1×10^6 ~ 約 1×10^7 、約 1×10^7 ~ 約 1×10^8 、約 1×10^6 ~ 約 3×10^6 、約 2×10^6 ~ 約 4×10^6 、約 3×10^6 ~ 約 5×10^6 、約 4×10^6 ~ 約 6×10^6 、約 5×10^6 ~ 約 7×10^6 、約 6×10^6 ~ 約 8×10^6 、約 7×10^6 ~ 約 9×10^6 、約 8×10^6 ~ 約 1×10^7 、約 9×10^6 ~ 約 2×10^7 、約 1×10^7 ~ 約 3×10^7 、約 2×10^7 ~ 約 4×10^7 、約 3×10^7 ~ 約 5×10^7 、約 4×10^7 ~ 約 6×10^7 、約 5×10^7 ~ 約 7×10^7 、約 6×10^7 ~ 約 8×10^7 、約 7×10^7 ~ 約 9×10^7 、約 8×10^7 ~ 約 1×10^8 、約 1×10^6 、約 2×10^6 、約 3×10^6 、約 4×10^6 、約 5×10^6 、約 6×10^6 、約 7×10^6 、約 8×10^6 、約 9×10^6 、約 1×10^7 、約 2×10^7 、約 3×10^7 、約 4×10^7 、約 5×10^7 、約 6×10^7 、約 7×10^7 、約 8×10^7 、約 9×10^7 又は約 1×10^8) 個のCAR陽性生存細胞(例えば、BCMA CAR+T細胞)の用量で対象に投与する。一部の実施形態では、細胞の集団又は医薬組成物を約 5×10^6 ~ 約 2×10^7 個のCAR陽性生存細胞(例えば、BCMA CAR+T細胞)の用量で対象に投与する。

20

30

【0047】

一部の実施形態では、細胞の集団又は医薬組成物を1又は複数回(例えば、2、3、4若しくはそれを超える)用量で対象に投与する。一部の実施形態では、細胞の集団又は医薬組成物を2回用量で対象に投与する。一部の実施形態では、1又は複数回用量は、1回目用量及び2回目用量を含み、1回目用量中のCAR陽性生存細胞(例えば、BCMA CAR+T細胞)の数は、2回目用量中のCAR陽性生存細胞(例えば、BCMA CAR+T細胞)の数より多いか、等しいか又はそれより少ない。

40

【0048】

一部の実施形態において、1又は複数回用量は、1回目用量と2回目用量を含み、(a) 1回目用量は、約 1×10^6 ~ 約 1×10^7 (例えば、約 2×10^6 ~ 約 8×10^6 、約 4×10^6 ~ 約 6×10^6 、約 1×10^6 ~ 約 5×10^6 、約 5×10^6 ~ 約 1×10^7 、約 1×10^6 ~ 約 3×10^6 、約 2×10^6 ~ 約 4×10^6 、約 3×10^6 ~ 約 5×10^6 、約 4×10^6 ~ 約 6×10^6 、約 5×10^6 ~ 約 7×10^6 、約 6×10^6 ~ 約 8×10^6 、約 7×10^6 ~ 約 9×10^6 、約 8×10^6 ~ 約 1×10^7 、約 1×10^6 、約 2×10^6 、約 3×10^6 、約 4×10^6 、約 5×10^6 、約 6×10^6 、約 7×10^6 、約 8×10^6 、約 9×10^6 若しくは約 1×10^7) 個のCAR陽性生存細胞

50

(例えば、BCMA CAR + T細胞)を含み；

(b) 2回目用量は、約 1×10^7 ~ 約 1×10^8 (例えば、約 2×10^7 ~ 約 8×10^7 、約 4×10^7 ~ 約 6×10^7 、約 1×10^7 ~ 約 5×10^7 、約 5×10^7 ~ 約 1×10^8 、約 1×10^7 ~ 約 3×10^7 、約 2×10^7 ~ 約 4×10^7 、約 3×10^7 ~ 約 5×10^7 、約 4×10^7 ~ 約 6×10^7 、約 5×10^7 ~ 約 7×10^7 、約 6×10^7 ~ 約 8×10^7 、約 7×10^7 ~ 約 9×10^7 、約 8×10^7 ~ 約 1×10^8 、約 1×10^7 、約 2×10^7 、約 3×10^7 、約 4×10^7 、約 5×10^7 、約 6×10^7 、約 7×10^7 、約 8×10^7 、約 9×10^7 若しくは約 1×10^8)個のCAR陽性生存細胞(例えば、BCMA CAR + T細胞)を含み；

(c) 1回目用量中のCAR陽性生存細胞(例えば、BCMA CAR + T細胞)の数は、2回目用量中のCAR陽性生存細胞(例えば、BCMA CAR + T細胞)の数の $1/X$ (ここで、 X は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90又は100である)以下であり；及び/又は

(d) 1回目用量中のCAR陽性生存細胞(例えば、BCMA CAR + T細胞)の数は、2回目用量中のCAR陽性生存細胞(例えば、BCMA CAR + T細胞)の数の約1% ~ 約100%(例えば、約10% ~ 約90%、約20% ~ 約80%、約30% ~ 約70%、約40% ~ 約60%、約10% ~ 約50%、約50% ~ 約90%、約10% ~ 約30%、約20% ~ 約40%、約30% ~ 約50%、約50% ~ 約70%、約60% ~ 約80%若しくは約70% ~ 約90%)である。

【0049】

一部の実施形態において、1回目用量は、約 5×10^6 個のCAR陽性生存細胞(例えば、BCMA CAR + T細胞)を含む。一部の実施形態において、2回目用量は、約 1×10^7 ~ 約 2×10^7 個のCAR陽性生存細胞(例えば、BCMA CAR + T細胞)を含む。

【0050】

一部の実施形態において、本方法は、第2治療薬を対象に投与するステップをさらに含む。一部の実施形態では、第2治療薬は、以下から選択される：(i) PD-1阻害剤であって、任意選択で、PDR001、ニボルマブ、ペムプロリズマブ、ピジリズマブ、MED10680、REGN2810、TSR-042、PF-06801591及びAMP-224からなる群から選択されるPD-1阻害剤；(ii) PD-L1阻害剤であって、任意選択で、FAZ053、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ及びBMS-936559からなる群から選択されるPD-L1阻害剤；(iii) LAG-3阻害剤であって、任意選択で、LAG525、BMS-986016、TSR-033、MK-4280及びREGN3767からなる群から選択されるLAG-3阻害剤；(iv) TIM-3阻害剤であって、任意選択で、MBG453、TSR-022及びLY3321367からなる群から選択されるTIM-3阻害剤；(v) CTLA-4阻害剤であって、任意選択で、イピリムマブ又はトレメリムマブであるCTLA-4阻害剤；(vi) インターロイキン-15(IL-15)ポリペプチド、インターロイキン-15受容体(IL-15Ra)ポリペプチド又はIL-15ポリペプチドとIL-15Raポリペプチドとの両方の組み合わせ、例えばhetIL-15；(vii) インターロイキン-12(IL-12)ポリペプチド；又は(viii) mTOR阻害剤であって、任意選択で、RAD001又はラパマイシンであるmTOR阻害剤。

【0051】

一部の実施形態では、細胞であって、(a) 第1抗原に結合する第1抗原結合ドメイン、第1膜貫通ドメイン及び第1細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、第1一次シグナル伝達ドメイン及び/又は第1共刺激シグナル伝達ドメイン)を含む第1CARであって、任意選択で、第1リーダー配列及び/又は第1ヒンジ領域を含む第1CARと；(b) 第2抗原に結合する第2抗原結合ドメイン、第2膜貫通ドメイン及び第2細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、第2一次シグナル伝達ドメイン及び/又は第2共刺激シグナル伝達ドメイン)を含む第2CARであって、任意選択で、第2リーダー配列及び/又は第2ヒ

10

20

30

40

50

ンジ領域を含む第2 CARとを含む細胞が本明細書に提供され、ここで、(i)第1リーダー配列及び第2リーダー配列は、異なる(例えば、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%又は100%異なる)核酸配列によってコードされ、任意選択で、第1及び第2リーダー配列は、同じアミノ酸配列を含み；(ii)第1ヒンジ領域及び第2ヒンジ領域は、異なる(例えば、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%又は100%異なる)核酸配列によってコードされ、任意選択で、第1及び第2ヒンジ領域は、同じアミノ酸配列を含み；(iii)第1膜貫通ドメイン及び第2膜貫通ドメインは、異なる(例えば、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%又は100%異なる)核酸配列によってコードされ、任意選択で、第1及び第2膜貫通ドメインは、同じアミノ酸配列を含み；及び/又は(iv)第1細胞内シグナル伝達ドメイン及び第2細胞内シグナル伝達ドメインは、異なる(例えば、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%又は100%異なる)核酸配列によってコードされ、任意選択で、第1一次シグナル伝達ドメイン及び第2一次シグナル伝達ドメインは、異なる(例えば、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%又は100%異なる)核酸配列によってコードされ、及び/又は第1共刺激シグナル伝達ドメイン及び第2共刺激シグナル伝達ドメインは、異なる(例えば、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%又は100%異なる)核酸配列によってコードされる。

【0052】

一部の実施形態では、核酸分子であって、(a)第1 CARをコードする第1核酸配列であって、第1 CARが、第1抗原に結合する第1抗原結合ドメイン、第1膜貫通ドメイン及び第1細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、第1一次シグナル伝達ドメイン及び/又は第1共刺激シグナル伝達ドメイン)を含み、任意選択で、第1 CARは、第1リーダー配列及び/又は第1ヒンジ領域を含む、第1核酸配列と；(b)第2 CARをコードする第2核酸配列であって、第2 CARが、第2抗原に結合する第2抗原結合ドメイン、第2膜貫通ドメイン及び第2細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、第2一次シグナル伝達ドメイン及び/又は第2共刺激シグナル伝達ドメイン)を含み、任意選択で、第2 CARは、第2リーダー配列及び/又は第2ヒンジ領域を含む、第2核酸配列とを含む核酸分子が本明細書に提供され、ここで、(i)第1リーダー配列及び第2リーダー配列は、異なる(例えば、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%又は100%異なる)核酸配列によってコードされ、任意選択で、第1及び第2リーダー配列は、同じアミノ酸配列を含み；(ii)第1ヒンジ領域及び第2ヒンジ領域は、異なる(例えば、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%又は100%異なる)核酸配列によってコードされ、任意選択で、第1及び第2ヒンジ領域は、同じアミノ酸配列を含み；(iii)第1膜貫通ドメイン及び第2膜貫通ドメインは、異なる(例えば、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%又は100%異なる)核酸配列によってコードされ、任意選択で、第1及び第2膜貫通ドメインは、同じアミノ酸配列を含み；及び/又は(iv)第1細胞内シグナル伝達ドメイン及び第2細胞内シグナル伝達ドメインは、異なる(例えば、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%又は100%異なる)核酸配列によってコードされ、任意選択で、第1細胞内シグナル伝達ドメイン及び第2細胞内シグナル伝達ドメインは、同じアミノ酸配列を含む。

【0053】

一部の実施形態において、第1及び第2リーダー配列は、同じアミノ酸配列を含む。理論に縛られることは意図しないが、こうした核酸分子は、第1リーダー配列及び第2リー

ダー配列が同じ核酸配列によってコードされる以外は同様の核酸分子よりも低い組換えを呈示する。

【 0 0 5 4 】

一部の実施形態において、第 1 及び第 2 ヒンジ領域は、同じアミノ酸配列を含む。理論に縛られることは意図しないが、こうした核酸分子は、第 1 ヒンジ領域及び第 2 ヒンジ領域が同じ核酸配列によってコードされる以外は同様の核酸分子よりも低い組換えを呈示する。

【 0 0 5 5 】

一部の実施形態において、第 1 及び第 2 膜貫通ドメインは、同じアミノ酸配列を含む。理論に縛られることは意図しないが、こうした核酸分子は、第 1 膜貫通ドメイン及び第 2 膜貫通ドメインが同じ核酸配列によってコードされる以外は同様の核酸分子よりも低い組換えを呈示する。

10

【 0 0 5 6 】

一部の実施形態において、第 1 細胞内シグナル伝達ドメイン及び第 2 細胞内シグナル伝達ドメインは、同じアミノ酸配列を含む。理論に縛られることは意図しないが、こうした核酸分子は、第 1 細胞内シグナル伝達ドメイン及び第 2 細胞内シグナル伝達ドメインが同じ核酸配列によってコードされる以外は同様の核酸分子よりも低い組換えを呈示する。

【 0 0 5 7 】

一部の実施形態において、第 1 一次シグナル伝達ドメイン及び第 2 一次シグナル伝達ドメインは、同じアミノ酸配列を含む。理論に縛られることは意図しないが、こうした核酸分子は、第 1 一次シグナル伝達ドメイン及び第 2 一次シグナル伝達ドメインが同じ核酸配列によってコードされる以外は同様の核酸分子よりも低い組換えを呈示する。

20

【 0 0 5 8 】

一部の実施形態において、第 1 一次シグナル伝達ドメイン及び第 2 一次シグナル伝達ドメインは、異なるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 5 9 】

一部の実施形態において、第 1 共刺激シグナル伝達ドメイン及び第 2 共刺激シグナル伝達ドメインは、同じアミノ酸配列を含む。理論に縛られることは意図しないが、こうした核酸分子は、第 1 共刺激シグナル伝達ドメイン及び第 2 共刺激シグナル伝達ドメインが同じ核酸配列によってコードされる以外は同様の核酸分子よりも低い組換えを呈示する。

30

【 0 0 6 0 】

一部の実施形態において、第 1 共刺激シグナル伝達ドメイン及び第 2 共刺激シグナル伝達ドメインは、異なるアミノ酸配列を含む（例えば、第 1 及び第 2 共刺激シグナル伝達ドメインは、それぞれ 4 - 1 B B 共刺激ドメイン配列及び C D 2 8 共刺激ドメイン配列を含むか；又はそれぞれ C D 2 8 共刺激ドメイン配列及び 4 - 1 B B 共刺激ドメイン配列を含む）。

【 0 0 6 1 】

一部の実施形態において、第 1 リーダー配列及び第 2 リーダー配列は、配列番号 1 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第 1 リーダー配列及び第 2 リーダー配列は、それぞれ配列番号 1 9 9 及び 2 1 0 を含む核酸配列（又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有する核酸配列）或いはそれぞれ配列番号 2 1 0 及び 1 9 9 を含む核酸配列（又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有する核酸配列）によってコードされる。

40

【 0 0 6 2 】

一部の実施形態において、第 1 ヒンジ領域及び第 2 ヒンジ領域は、配列番号 2 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第 1 ヒンジ領域及び第 2 ヒンジ領域は、それぞれ配列番号 3 3 7 及び 1 3 を含む核酸配列（又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有する核酸配列）；或いはそれぞれ配列番号 1

50

3 及び 3 3 7 を含む核酸配列（又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有する核酸配列）によってコードされる。

【 0 0 6 3 】

一部の実施形態において、第 1 膜貫通ドメイン及び第 2 膜貫通ドメインは、配列番号 6 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第 1 膜貫通ドメイン及び第 2 膜貫通ドメインは、それぞれ配列番号 3 3 8 及び 1 7 を含む核酸配列（又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有する核酸配列）；或いはそれぞれ配列番号 1 7 及び 3 3 8 を含む核酸配列（又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有する核酸配列）によってコードされる。

10

【 0 0 6 4 】

一部の実施形態において、第 1 共刺激シグナル伝達ドメイン及び第 2 共刺激シグナル伝達ドメインは、配列番号 7 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第 1 共刺激シグナル伝達ドメイン及び第 2 共刺激シグナル伝達ドメインは、それぞれ配列番号 2 0 4 及び 1 8 を含む核酸配列（又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有する核酸配列）；或いはそれぞれ配列番号 1 8 及び 2 0 4 を含む核酸配列（又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有する核酸配列）によってコードされる。

20

【 0 0 6 5 】

一部の実施形態において、第 1 一次シグナル伝達ドメイン及び第 2 一次シグナル伝達ドメインは、配列番号 1 0 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第 1 一次シグナル伝達ドメイン及び第 2 一次シグナル伝達ドメインは、それぞれ配列番号 2 0 5 及び 2 1 を含む核酸配列（又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有する核酸配列）；或いはそれぞれ配列番号 2 1 及び 2 0 5 を含む核酸配列（又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有する核酸配列）によってコードされる。

【 0 0 6 6 】

一部の実施形態において、第 1 及び第 2 抗原は異なる。第 1 又は第 2 抗原は、BCMA、CD 1 9、CD 5、CD 1 0、CD 2 0、CD 2 1、CD 2 2、CD 2 3、CD 2 4、CD 2 5、CD 2 7、CD 3 0、CD 3 4、CD 3 7、CD 3 8、CD 4 0、CD 5 3、CD 6 9、CD 7 2、CD 7 3、CD 7 4、CD 7 5、CD 7 7、CD 7 9 a、CD 7 9 b、CD 8 0、CD 8 1、CD 8 2、CD 8 3、CD 8 4、CD 8 5、CD 8 6、CD 1 2 3、CD 1 3 5、CD 1 3 8、CD 1 7 9、CD 2 6 9、Flt 3、ROR 1、FcRn 5、FcRn 2、CS - 1、CXCR 4、5、7、IL - 7 / 3 R、IL 7 / 4 / 3 R 又は IL 4 R から選択され、任意選択で、B 細胞抗原は、CD 1 9、CD 2 0、CD 2 2、FcRn 5、FcRn 2、CS - 1、CD 1 3 8、CD 1 2 3、CD 3 3、CD 3 4、CLL - 1、葉酸受容体、FLT 3、EGFRvIII、メソテリン、GD 2、Tn 抗原、sTn 抗原、Tn - O - 糖ペプチド、sTn - O - 糖ペプチド、PSMA、CD 9 7、TAG 7 2、CD 4 4 v 6、CEA、EPCAM、KIT、IL - 1 3 Ra 2、レグマン、GD 3、CD 1 7 1、IL - 1 1 Ra、PSCA、MAD - CT - 1、MAD - CT - 2、VEGFR 2、ルイス Y、CD 2 4、PDGFR、SSEA - 4、葉酸受容体、ERBB（例えば、ERBB 2）、Her 2 / neu、MUC 1、EGFR、NCAM、エフリン B 2、CAIX、LMP 2、sLe、HMWMAA、o - アセチル - GD 2、葉酸受容体、TEM 1 / CD 2 4 8、TEM 7 R、FAP、レグマイン、HPV E 6 若しくは E 7、ML - IAP、CLDN 6、TSHR、GPRC 5 D、ALK、ポリシアル酸、Fos 関連抗原、好中球エラストラーゼ、TRP - 2、CYP 1 B 1、精子タンパク質 1 7、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、AFP、チログロブリン、PLAC 1、グロボ H、RAGE 1、MN - CAIX、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、腸カルボキシルエス

30

40

50

テラーゼ、mut h s p 70 - 2、NA - 17、NY - BR - 1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、NY - ESO - 1、GPR20、Ly6k、OR51E2、TARP、GFR 4又はMHCに提示されるこれらの抗原のいずれかのペプチドから選択される。一部の実施形態では、第1又は第2抗原結合ドメインは、本明細書に開示されるCDR、VH、VL若しくはscFv又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0067】

一部の実施形態では、第1VH(VH1)、第1VL(VL1)、第2VH(VH2)、第2VL(VL2)、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを含むCARが本明細書に提供され、ここで、VH1及びVL1は、第1抗原に結合し、且つVH2及びVL2は、第2抗原に結合する。一部の実施形態では、VH1、VL1、VH2及びVL2は、N末端からC末端まで、以下の構成：VH1 - 任意選択でリンカー1(「L1」) - VH2 - 任意選択でリンカー2(「L2」) - VL2 - 任意選択でリンカー3(「L3」) - VL1で配列される。一部の実施形態では、VH1、VL1、VH2及びVL2は、N末端からC末端まで、以下の構成：VH1 - リンカー1 - VL2 - リンカー2 - VH2 - リンカー3 - VL1で配列される。一部の実施形態では、VH1、VL1、VH2及びVL2は、N末端からC末端まで、以下の構成：VL1 - リンカー1 - VH2 - リンカー2 - VL2 - リンカー3 - VH1で配列される。一部の実施形態では、VH1、VL1、VH2及びVL2は、N末端からC末端まで、以下の構成：VL1 - リンカー1 - VL2 - リンカー2 - VH2 - リンカー3 - VH1で配列される。一部の実施形態では、VH1、VL1、VH2及びVL2は、N末端からC末端まで、以下の構成：VH2 - 任意選択でL1 - VH1 - 任意選択でL2 - VL1 - 任意選択でL3 - VL2で配列される。一部の実施形態では、VH1、VL1、VH2及びVL2は、N末端からC末端まで、以下の構成：VH2 - 任意選択でL1 - VL1 - 任意選択でL2 - VH1 - 任意選択でL3 - VL2で配列される。一部の実施形態では、VH1、VL1、VH2及びVL2は、N末端からC末端まで、以下の構成：VL2 - リンカー1 - VH1 - リンカー2 - VL1 - リンカー3 - VH2で配列される。一部の実施形態では、VH1、VL1、VH2及びVL2は、N末端からC末端まで、以下の構成：VL2 - リンカー1 - VL1 - リンカー2 - VH1 - リンカー3 - VH2で配列される。一部の実施形態では、VH1、VL1、VH2及びVL2は、N末端からC末端まで、以下の構成：VH1 - リンカー1(「L1」) - VH2 - リンカー2(「L2」) - VL2 - リンカー3(「L3」) - VL1で配列される。一部の実施形態では、VH1、VL1、VH2及びVL2は、N末端からC末端まで、以下の構成：VH1 - L1 - VL2 - L2 - VH2 - L3 - VL1で配列される。一部の実施形態では、VH1、VL1、VH2及びVL2は、N末端からC末端まで、以下の構成：VL1 - L1 - VH2 - L2 - VL2 - L3 - VH1で配列される。一部の実施形態では、VH1、VL1、VH2及びVL2は、N末端からC末端まで、以下の構成：VL1 - L1 - VL2 - L2 - VH2 - L3 - VH1で配列される。一部の実施形態では、VH1、VL1、VH2及びVL2は、N末端からC末端まで、以下の構成：VH2 - L1 - VH1 - L2 - VL1 - L3 - VL2で配列される。一部の実施形態では、VH1、VL1、VH2及びVL2は、N末端からC末端まで、以下の構成：VH2 - L1 - VL1 - L2 - VH1 - L3 - VL2で配列される。一部の実施形態では、VH1、VL1、VH2及びVL2は、N末端からC末端まで、以下の構成：VL2 - L1 - VH1 - L2 - VL1 - L3 - VH2で配列される。一部の実施形態では、VH1、VL1、VH2及びVL2は、N末端からC末端まで、以下の構成：VL2 - L1 - VH1 - L2 - VL1 - L3 - VH2で配列される。一部の実施形態では、L1又はL3は、配列番号5のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、L2は、配列番号63のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CARは、N末端からC末端まで、以下の構成を含む：(i) VH1 - 任意選択でリンカー1(「L1」) - VH2 - 任意選択でリン

カー 2 (「L 2」) - VL 2 - 任意選択でリンカー 3 (「L 3」) - VL 1 - 任意選択でヒンジ領域 - 膜貫通ドメイン - 細胞内シグナル伝達ドメイン; (ii) VH 1 - 任意選択で L 1 - VL 2 - 任意選択で L 2 - VH 2 - 任意選択で L 3 - VL 1 - 任意選択でヒンジ領域 - 膜貫通ドメイン - 細胞内シグナル伝達ドメイン; (iii) VL 1 - 任意選択で L 1 - VH 2 - 任意選択で L 2 - VL 2 - 任意選択で L 3 - VH 1 - 任意選択でヒンジ領域 - 膜貫通ドメイン - 細胞内シグナル伝達ドメイン; (iv) VL 1 - 任意選択で L 1 - VL 2 - 任意選択で L 2 - VH 2 - 任意選択で L 3 - VH 1 - 任意選択でヒンジ領域 - 膜貫通ドメイン - 細胞内シグナル伝達ドメイン; (v) VH 2 - 任意選択で L 1 - VH 1 - 任意選択で L 2 - VL 1 - 任意選択で L 3 - VL 2 - 任意選択でヒンジ領域 - 膜貫通ドメイン - 細胞内シグナル伝達ドメイン; (vi) VH 2 - 任意選択で L 1 - VL 1 - 任意選択で L 2 - VH 1 - 任意選択で L 3 - VL 2 - 任意選択でヒンジ領域 - 膜貫通ドメイン - 細胞内シグナル伝達ドメイン; (vii) VL 2 - 任意選択で L 1 - VH 1 - 任意選択で L 2 - VL 1 - 任意選択で L 3 - VH 2 - 任意選択でヒンジ領域 - 膜貫通ドメイン - 細胞内シグナル伝達ドメイン; 又は (viii) VL 2 - 任意選択で L 1 - VL 1 - 任意選択で L 2 - VH 1 - 任意選択で L 3 - VH 2 - 任意選択でヒンジ領域 - 膜貫通ドメイン - 細胞内シグナル伝達ドメイン。一部の実施形態では、第 1 及び第 2 抗原は異なる。一部の実施形態では、第 1 又は第 2 抗原は、BCMA、CD 19、CD 5、CD 10、CD 20、CD 21、CD 22、CD 23、CD 24、CD 25、CD 27、CD 30、CD 34、CD 37、CD 38、CD 40、CD 53、CD 69、CD 72、CD 73、CD 74、CD 75、CD 77、CD 79a、CD 79b、CD 80、CD 81、CD 82、CD 83、CD 84、CD 85、CD 86、CD 123、CD 135、CD 138、CD 179、CD 269、Flt 3、ROR 1、FcRn 5、FcRn 2、CS - 1、CXCR 4、5、7、IL - 7 / 3R、IL 7 / 4 / 3R 又は IL 4R から選択され、任意選択で、B 細胞抗原は、CD 19、CD 20、CD 22、FcRn 5、FcRn 2、CS - 1、CD 138、CD 123、CD 33、CD 34、CLL - 1、葉酸受容体、FLT 3、EGFR v III、メソテリン、GD 2、Tn 抗原、s Tn 抗原、Tn - O - 糖ペプチド、s Tn - O - 糖ペプチド、PSMA、CD 97、TAG 72、CD 44 v 6、CEA、EPCAM、KIT、IL - 13Ra 2、レグマン、GD 3、CD 171、IL - 11Ra、PSCA、MAD - CT - 1、MAD - CT - 2、VEGFR 2、ルイス Y、CD 24、PDGFR、SSEA - 4、葉酸受容体、ERBB (例えば、ERBB 2)、Her 2 / neu、MUC 1、EGFR、NCAM、エフリン B 2、CAIX、LMP 2、sLe、HMWMAA、o - アセチル - GD 2、葉酸受容体、TEM 1 / CD 248、TEM 7R、FAP、レグマイン、HPV E 6 若しくは E 7、ML - IAP、CLDN 6、TSHR、GPCR 5D、ALK、ポリシアル酸、Fos 関連抗原、好中球エラストラーゼ、TRP - 2、CYP 1B 1、精子タンパク質 17、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、AFP、チログロブリン、PLAC 1、グロボ H、RAGE 1、MN - CAIX、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、腸カルボキシルエステラーゼ、mut hsp 70 - 2、NA - 17、NY - BR - 1、UPK 2、HAVCR 1、ADRB 3、PANX 3、NY - ES - 1、GPR 20、Ly 6k、OR 51E 2、TARP、GFR 4 又は MHC に提示されるこれらの抗原のいずれかのペプチドから選択される。一部の実施形態では、VH 1、VL 1、VH 2 又は VL 2 は、本明細書に開示される CDR、VH 若しくは VL 配列又はそれと少なくとも約 85%、90%、95% 若しくは 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ヒンジ領域、膜貫通ドメイン又は細胞内シグナル伝達ドメイン (例えば、一次シグナル伝達ドメイン及び / 又は共刺激シグナル伝達ドメイン) は、本明細書に開示されるヒンジ領域配列、膜貫通ドメイン配列若しくは細胞内シグナル伝達ドメイン配列 (例えば、一次シグナル伝達ドメイン配列及び / 若しくは共刺激シグナル伝達ドメイン配列) 又はそれと少なくとも約 85%、90%、95% 若しくは 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0068】

一部の実施形態では、本明細書に開示されるダイアボディ CAR をコードする核酸分子

10

20

30

40

50

が本明細書に提供される。一部の実施形態では、本明細書に開示されるダイアボディCARをコードする核酸分子を含むベクターが本明細書に提供される。一部の実施形態では、本明細書に開示されるCAR、本明細書に開示されるダイアボディCAR又は本明細書に開示されるダイアボディCARをコードする核酸分子を含むベクターを含む細胞が本明細書に提供される。一部の実施形態では、本明細書に開示されるダイアボディCARと、薬学的に許容される担体を含む医薬組成物が本明細書に提供される。一部の実施形態では、本明細書に開示されるダイアボディCARを含む細胞を作製する方法が本明細書に開示される。一部の実施形態では、本明細書に開示されるダイアボディCARを含む細胞を用いて、対象、例えば、癌を有する対象を処置する方法が本明細書に開示される。

【0069】

一部の実施形態では、本開示は、CARを発現するように操作された免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）を作製する方法及びそうした方法を用いて作製された組成物に関する。本明細書に開示される方法（例えば、本明細書に開示されるARMプロセス又はサイトカインプロセス）を使用して、本明細書に開示される二重CAR若しくはダイアボディCARを発現する細胞を作製することができる。また、対象の疾患、例えば、癌を処置するためにそうした組成物を使用する方法も開示される。

【0070】

一部の実施形態では、本発明は、キメラ抗原受容体（CAR）を発現する細胞（例えば、T細胞）の集団を作製する方法を特徴とし、本方法は、（i）細胞（例えば、T細胞、例えば凍結された又は新鮮な白血球アフェレーシス産物から単離されたT細胞）の集団を、CD3/TCR複合体を刺激する薬剤及び/又は細胞の表面上の共刺激分子を刺激する薬剤と接触（例えば、結合）させるステップ；（ii）細胞（例えば、T細胞）の集団を、CARをコードする核酸分子（例えば、DNA又はRNA分子）と接触させ、それにより核酸分子を含む細胞（例えば、T細胞）の集団を提供するステップ、及び（iii）保存（例えば、凍結保存培地中の細胞の集団の再製剤化）又は投与のために細胞（例えば、T細胞）の集団を採取するステップを含み、（a）ステップ（ii）は、ステップ（i）と一緒に、又はステップ（i）の開始後の20時間以内、例えばステップ（i）の開始後の12、13、14、15、16、17若しくは18時間以内、例えばステップ（i）の開始後の18時間以内に実施され、及びステップ（iii）は、ステップ（i）の開始後の26時間以内、例えばステップ（i）の開始後の22、23、24又は25時間以内、例えばステップ（i）の開始後の24時間以内に実施されるか；（b）ステップ（ii）は、ステップ（i）と一緒に、又はステップ（i）の開始後の20時間以内、例えばステップ（i）の開始後の12、13、14、15、16、17若しくは18時間以内、例えばステップ（i）の開始後の18時間以内に実施され、及びステップ（iii）は、ステップ（ii）の開始後の30時間以内、例えばステップ（ii）の開始後の22、23、24、25、26、27、28、29又は30時間以内に実施されるか；又は（c）ステップ（iii）からの細胞の集団は、例えば、ステップ（i）の開始時の細胞の集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて、増殖されないか、又は5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35若しくは40%以下、例えば10%以下だけ増殖される。一部の実施形態では、ステップ（ii）における核酸分子は、DNA分子である。一部の実施形態では、ステップ（ii）における核酸分子は、RNA分子である。一部の実施形態では、ステップ（ii）における核酸分子は、ウイルスベクター、例えばレンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター又はレトロウイルスベクターから選択されるウイルスベクター上にある。一部の実施形態では、ステップ（ii）における核酸分子は、非ウイルスベクター上にある。一部の実施形態では、ステップ（ii）における核酸分子は、プラスミド上にある。一部の実施形態では、ステップ（ii）における核酸分子は、いずれのベクター上にもない。一部の実施形態では、ステップ（ii）は、細胞（例えば、T細胞）の集団を、CARをコードする核酸分子を含むウイルスベクターで形質導入することを含む。一部の実施形態では、ステップ（ii）は、ステップ（i）と一緒に実施される。一部の実施形態では、ステ

10

20

30

40

50

ップ (i i) は、ステップ (i) の開始後の 20 時間以内に実施される。一部の実施形態では、ステップ (i i) は、ステップ (i) の開始後の 12、13、14、15、16、17 又は 18 時間以内に実施される。一部の実施形態では、ステップ (i i) は、ステップ (i) の開始後の 18 時間以内に実施される。一部の実施形態では、ステップ (i i i) は、ステップ (i) の開始後の 26 時間以内に実施される。一部の実施形態では、ステップ (i i i) は、ステップ (i) の開始後の 22、23、24 又は 25 時間以内に実施される。一部の実施形態では、ステップ (i i i) は、ステップ (i) の開始後の 24 時間以内に実施される。一部の実施形態では、ステップ (i i i) は、ステップ (i i) の開始後の 30 時間以内に実施される。一部の実施形態において、ステップ (i i i) は、ステップ (i i) の開始後の 22、23、24、25、26、27、28、29 又は 30 時間以内に実施する。一部の実施形態では、C A R をコードする核酸分子は、本明細書に開示される核酸分子である。一部の実施形態では、核酸分子は、第 1 C A R をコードする第 1 核酸配列と、第 2 C A R をコードする第 2 核酸配列とを含む。一部の実施形態では、第 1 及び第 2 核酸配列は、単一の核酸分子上に配置され、例えば、第 1 核酸配列及び第 2 核酸配列は、自己切断部位 (例えば、P 2 A 部位、T 2 A 部位、E 2 A 部位又は F 2 A 部位) をコードする第 3 核酸配列によって隔てられる。一部の実施形態では、第 1 及び第 2 核酸配列は、個別の核酸分子上に配置される。一部の実施形態では、核酸分子は、C A R をコードする核酸配列を含み、C A R は、第 1 V H (V H 1)、第 1 V L (V L 1)、第 2 V H (V H 2)、第 2 V L (V L 2)、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを含み、V H 1 及び V L 1 は、第 1 抗原に結合し、且つ V H 2 及び V L 2 は、第 2 抗原に結合し、V H 1、V L 1、V H 2 及び V L 2 は、N 末端から C 末端まで、以下の構成：V H 1 - 任意選択でリンカー 1 (「L 1」) - V H 2 - 任意選択でリンカー 2 (「L 2」) - V L 2 - 任意選択でリンカー 3 (「L 3」) - V L 1、V H 1 - 任意選択で L 1 - V L 2 - 任意選択で L 2 - V H 2 - 任意選択で L 3 - V L 1、V L 1 - 任意選択で L 1 - V H 2 - 任意選択で L 2 - V L 2 - 任意選択で L 3 - V H 1、V L 1 - 任意選択で L 1 - V L 2 - 任意選択で L 2 - V H 2 - 任意選択で L 3 - V H 1、V H 2 - 任意選択で L 1 - V H 1 - 任意選択で L 2 - V L 1 - 任意選択で L 3 - V L 2、V H 2 - 任意選択で L 1 - V L 1 - 任意選択で L 2 - V H 1 - 任意選択で L 3 - V L 2、V L 2 - 任意選択で L 1 - V H 1 - 任意選択で L 2 - V L 1 - 任意選択で L 3 - V H 2 ; 又は V L 2 - 任意選択で L 1 - V L 1 - 任意選択で L 2 - V H 1 - 任意選択で L 3 - V H 2 で配列される。

【0071】

一部の実施形態では、ステップ (i i i) からの細胞の集団は、増殖されない。一部の実施形態では、ステップ (i i i) からの細胞の集団は、例えば、ステップ (i) の開始時の細胞の集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35 又は 40 % 以下だけ増殖される。一部の実施形態では、ステップ (i i i) からの細胞の集団は、例えば、ステップ (i) の開始時の細胞の集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて 10 % 以下だけ増殖される。

【0072】

一部の実施形態では、核酸分子は、第 1 C A R をコードする第 1 核酸配列と、第 2 C A R をコードする第 2 核酸配列とを含み、第 1 及び第 2 核酸配列は、個別の核酸分子上に配置される。

【0073】

一部の実施形態では、第 1 及び第 2 核酸分子は、個別のウイルスペクター上にあり、ステップ (i i) は、第 1 C A R をコードする核酸分子を含む第 1 ウイルスペクターと、第 2 C A R をコードする第 2 核酸分子を含む第 2 ウイルスペクターとで細胞 (例えば、T 細胞) の集団を形質導入することを含む。

【0074】

一部の実施形態では、第 1 C A R は、抗 B C M A 結合ドメイン (例えば、抗 B C M A C A R) を含み、及び第 2 C A R は、抗 C D 19 結合ドメイン (例えば、抗 C D 19 C

A R) を含む。

【 0 0 7 5 】

一部の実施形態では、ステップ (i i) において、第 2 ウイルスペクターと細胞集団を接触させる場合の M O I より高いか、それと等しいか又はそれより低い感染多重度 (M O I) で第 1 ウイルスペクターと細胞集団を接触させる。一部の実施形態において、ステップ (i i) では、第 2 ウイルスペクターと細胞集団を接触させる場合の M O I より高い感染多重度 (M O I) で第 1 ウイルスペクターと細胞集団を接触させる。

【 0 0 7 6 】

一部の実施形態では、ステップ (i i) において、得られる細胞集団が、抗 B C M A C A R を含むが、抗 C D 1 9 C A R を含まない第 1 細胞集団、抗 C D 1 9 C A R を含むが、抗 B C M A C A R を含まない第 2 細胞集団、抗 B C M A C A R と抗 C D 1 9 C A R との両方を含む第 3 細胞集団を含むように、第 1 M O I で第 1 ウイルスペクターと、且つ第 2 M O I で第 2 ウイルスペクターと細胞集団を接触させ、

(a) 例えば、実施例 1 0 に記載の方法によって決定されて、第 2 及び第 3 集団を合わせた生存細胞の総数は、第 1 及び第 3 集団を合わせた生存細胞の総数の約 1 1 0 % 以下 (例えば、約 1 0 5 % 、 1 0 0 % 、 9 0 % 、 8 0 % 、 7 0 % 、 6 0 % 、 5 0 % 、 4 0 % 、 3 0 % 、 2 0 % 、 1 0 % 、 5 % 、 1 % 又はそれ未満以下) であり ;

(b) 例えば、実施例 1 0 に記載の方法によって決定されて、第 1 及び第 3 集団を合わせた生存細胞の総数は、第 2 及び第 3 集団を合わせた生存細胞の総数の約 9 0 % 以上 (例えば、約 1 0 0 % 、 1 2 5 % 、 1 5 0 % 、 1 7 5 % 、 2 0 0 % 、 2 5 0 % 、 3 0 0 % 、 4 0 0 % 、 5 0 0 % 、 7 5 0 % 、 1 0 0 0 % 、 2 0 0 0 % 、 5 0 0 0 、 1 0 0 0 0 % 又はそれを超えるもの以上) であり ;

(c) 例えば、実施例 1 0 に記載の方法によって決定されて、第 1 及び第 3 集団を合わせた生存細胞の総数は、得られる集団の生存細胞の総数の約 5 % 以上 (例えば、約 1 0 % 、 2 0 % 、 3 0 % 、 4 0 % 、 5 0 % 、 6 0 % 、 7 0 % 、 8 0 % 又は 9 0 % 以上) であり ;

(d) 例えば、実施例 1 0 に記載の方法によって決定されて、第 2 集団の生存細胞の総数は、第 1 及び第 3 集団を合わせた生存細胞の総数の約 1 1 0 % 以下 (例えば、約 1 0 5 % 、 1 0 0 % 、 9 0 % 、 8 0 % 、 7 0 % 、 6 0 % 、 5 0 % 、 4 0 % 、 3 0 % 、 2 0 % 、 1 0 % 、 5 % 、 1 % 又はそれ未満以下) であるか ; 又は

(e) 例えば、実施例 1 0 に記載の方法によって決定されて、第 1 及び第 3 集団を合わせた生存細胞の総数は、第 2 集団の生存細胞の総数の約 9 0 % 以上 (例えば、約 1 0 0 % 、 1 2 5 % 、 1 5 0 % 、 1 7 5 % 、 2 0 0 % 、 2 5 0 % 、 3 0 0 % 、 4 0 0 % 、 5 0 0 % 、 7 5 0 % 、 1 0 0 0 % 、 2 0 0 0 % 、 5 0 0 0 、 1 0 0 0 0 % 又はそれを超えるもの以上) である。一部の実施形態では、ステップ (i i) において、第 2 ウイルスペクターと細胞の集団を特定の M O I で接触させる (例えば、第 1 ウイルスペクターと細胞集団を接触させる際の M O I より十分に低い M O I で、それにより、得られる細胞集団中で、以下が達成される M O I :

(a) 例えば、実施例 1 0 に記載の方法によって決定されて、第 2 及び第 3 集団を合わせた生存細胞の総数が、第 1 及び第 3 集団を合わせた生存細胞の総数の約 1 1 0 % 以下 (例えば、約 1 0 5 % 、 1 0 0 % 、 9 0 % 、 8 0 % 、 7 0 % 、 6 0 % 、 5 0 % 、 4 0 % 、 3 0 % 、 2 0 % 、 1 0 % 、 5 % 、 1 % 又はそれ未満以下) であり ;

(b) 例えば、実施例 1 0 に記載の方法によって決定されて、第 1 及び第 3 集団を合わせた生存細胞の総数が、第 2 及び第 3 集団を合わせた生存細胞の総数の約 9 0 % 以上 (例えば、約 1 0 0 % 、 1 2 5 % 、 1 5 0 % 、 1 7 5 % 、 2 0 0 % 、 2 5 0 % 、 3 0 0 % 、 4 0 0 % 、 5 0 0 % 、 7 5 0 % 、 1 0 0 0 % 、 2 0 0 0 % 、 5 0 0 0 、 1 0 0 0 0 % 又はそれを超えるもの以上) であり ;

(c) 例えば、実施例 1 0 に記載の方法によって決定されて、第 1 及び第 3 集団を合わせた生存細胞の総数が、得られる集団の生存細胞の総数の約 5 % 以上 (例えば、約 1 0 % 、 2 0 % 、 3 0 % 、 4 0 % 、 5 0 % 、 6 0 % 、 7 0 % 、 8 0 % 又は 9 0 % 以上) であり ;

(d) 例えば、実施例 1 0 に記載の方法によって決定されて、第 2 集団の生存細胞の総数

10

20

30

40

50

が、第1及び第3集団を合わせた生存細胞の総数の約110%以下（例えば、約105%、100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、1%又はそれ未満以下）であるか；又は

(e) 例えば、実施例10に記載の方法によって決定されて、第1及び第3集団を合わせた生存細胞の総数が、第2集団の生存細胞の総数の約90%以上（例えば、約100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、400%、500%、750%、1000%、2000%、5000、10000%又はそれを超えるもの以上）である。

【0077】

一部の実施形態では、ステップ(ii)において、第1ウイルスベクターと第1MOI 10
で、細胞集団を接触させ、第2ウイルスベクターと第2MOIで、細胞集団を接触させ、
それにより、得られる細胞集団が、以下を含むようにする：

(a) 例えば、実施例10に記載の方法によって決定されて、第2及び第3集団を合わせた生存細胞の総数が、第1及び第3集団を合わせた生存細胞の総数の約110%以下（例えば、約105%、100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、1%又はそれ未満以下）であり；

(b) 例えば、実施例10に記載の方法によって決定されて、第1及び第3集団を合わせた生存細胞の総数が、第2及び第3集団を合わせた生存細胞の総数の約90%以上（例えば、約100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、400%、500%、750%、1000%、2000%、5000、10000%又はそれを超えるもの以上）であり； 20

(c) 例えば、実施例10に記載の方法によって決定されて、第1及び第3集団を合わせた生存細胞の総数が、得られる集団の生存細胞の総数の約5%以上（例えば、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%又は90%以上）であり；

(d) 例えば、実施例10に記載の方法によって決定されて、第2集団の生存細胞の総数は、第1及び第3集団を合わせた生存細胞の総数の約110%以下（例えば、約105%、100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、1%又はそれ未満以下）であるか；又は

(e) 例えば、実施例10に記載の方法によって決定されて、第1及び第3集団を合わせた生存細胞の総数は、第2集団の生存細胞の総数の約90%以上（例えば、約100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、400%、500%、750%、1000%、2000%、5000、10000%又はそれを超えるもの以上）である。 30

【0078】

一部の実施形態では、ステップ(ii)において、細胞集団を、

(a) 約1～約10（例えば、約2～約9、約3～約8、約4～約7、約5～約6、約1～約8、約1～約6、約1～約4、約8～約10、約6～約10、約4～約10、約1～3、約2～約4、約3～約5、約4～約6、約5～約7、約6～約8、約7～約9、約8～約10、約2.5～約5、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9又は約10）のMOIで第1ウイルスベクター； 40

(b) 約0.1～約5（例えば、約0.2～約4、約0.3～約3、約0.4～約2、約0.5～約1、約0.6～約0.9、約0.7～約0.8、約0.1～約4、約0.1～約3、約0.1～約2、約0.1～約1、約0.1～約0.5、約4～約5、約3～約5、約2～約5、約1～約5、約0.5～約5、約0.2～約5、約0.1～約0.5、約0.2～約1、約0.5～約2、約1～約3、約2～約4、約3～約5、約0.5～約1、約0.1、約0.2、約0.3、約0.4、約0.5、約0.6、約0.7、約0.8、約0.9、約1、約2、約3、約4又は約5）のMOIで第2ウイルスベクター；

(c) 第2ウイルスベクターと細胞集団を接触させる際のMOIより少なくとも10%（例えば、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%若しくは90%）高いか、又は少なくとも約1倍（例えば、少なくとも約2、3、4、5、6、7、8、9、 50

10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90若しくは100倍、例えば約2～約50倍、約3～20倍、約5～約15倍若しくは約8～約10倍)のMOIで第1ウイルスベクター；及び/又は

(d)第1ウイルスベクターと細胞集団を接触させる際のMOIの $1/X$ (ここで、 X は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、30、40、50、60、70、80、90又は100である)以下のMOIで第2ウイルスベクターと接触させる。

【0079】

一部の実施形態では、約2.5～約5のMOIで第1ウイルスベクターと細胞集団を接触させる。一部の実施形態では、約0.5～約1.0のMOIで第2ウイルスベクターと細胞集団を接触させる。一部の実施形態では、第2ウイルスベクターと細胞集団を接触させる際のMOIより約8倍～約10倍高いMOIの第1ウイルスベクターである。一部の実施形態では、第1ウイルスベクターと細胞集団を接触させる際のMOIの $1/X$ (ここで、 X は、6、8、10又は12)以下のMOIの第2ウイルスベクターである。

10

【0080】

一部の実施形態では、ステップ(ii)において、細胞集団を、
(a)約4～約5(例えば、約4.75)のMOIで第1ウイルスベクター；及び/又は
(b)約0.2～約1(例えば、約0.5)のMOIで第2ウイルスベクターと接触させる。

【0081】

一部の実施形態では、ステップ(ii)において、細胞集団は、約 1×10^8 ～約 5×10^9 (例えば、約 2×10^8 ～約 2×10^9 又は約 4×10^8 ～約 1×10^9 個の総生存細胞を含む。一部の実施形態では、細胞を、約 1×10^6 ～約 1×10^7 (例えば、約 2×10^6 ～約 5×10^6 又は約 3×10^6 ～約 4×10^6)個の生存細胞/mLの濃度で培養物中に懸濁させる。

20

【0082】

一部の実施形態では、CD3/TCR複合体を刺激する薬剤は、CD3を刺激する薬剤である。一部の実施形態では、共刺激分子を刺激する薬剤は、CD28、ICOS、CD27、HVEM、LIGHT、CD40、4-1BB、OX40、DR3、GITR、CD30、TIM1、CD2、CD226又はそれらの任意の組み合わせを刺激する薬剤である。一部の実施形態では、共刺激分子を刺激する薬剤は、CD28を刺激する薬剤である。一部の実施形態では、CD3/TCR複合体を刺激する薬剤は、抗体(例えば、単ドメイン抗体(例えば、重鎖可変ドメイン抗体)、ペプチポディ、Fabフラグメント若しくはscFv)、小分子又はリガンド(例えば、天然に存在するリガンド、組換えリガンド若しくはキメラリガンド)から選択される。一部の実施形態では、共刺激分子を刺激する薬剤は、抗体(例えば、単ドメイン抗体(例えば、重鎖可変ドメイン抗体)、ペプチポディ、Fabフラグメント若しくはscFv)、小分子又はリガンド(例えば、天然に存在するリガンド、組換えリガンド若しくはキメラリガンド)から選択される。一部の実施形態では、CD3/TCR複合体を刺激する薬剤は、ビーズを含まない。一部の実施形態では、共刺激分子を刺激する薬剤は、ビーズを含まない。一部の実施形態では、CD3/TCR複合体を刺激する薬剤は、抗CD3抗体を含む。一部の実施形態では、共刺激分子を刺激する薬剤は、抗CD28抗体を含む。一部の実施形態では、CD3/TCR複合体を刺激する薬剤は、コロイドポリマーナノマトリックスに共有結合された抗CD3抗体を含む。一部の実施形態では、共刺激分子を刺激する薬剤は、コロイドポリマーナノマトリックスに共有結合された抗CD28抗体を含む。一部の実施形態では、CD3/TCR複合体を刺激する薬剤及び共刺激分子を刺激する薬剤は、T Cell TransAct(商標)を含む。

30

40

【0083】

一部の実施形態では、CD3/TCR複合体を刺激する薬剤は、ハイドロゲルを含まない。一部の実施形態では、共刺激分子を刺激する薬剤は、ハイドロゲルを含まない。一部

50

の実施形態では、CD3 / TCR複合体を刺激する薬剤は、アルギン酸塩を含まない。一部の実施形態では、共刺激分子を刺激する薬剤は、アルギン酸塩を含まない。

【0084】

一部の実施形態では、CD3 / TCR複合体を刺激する薬剤は、ハイドロゲルを含む。一部の実施形態では、共刺激分子を刺激する薬剤は、ハイドロゲルを含む。一部の実施形態では、CD3 / TCR複合体を刺激する薬剤は、アルギン酸塩を含む。一部の実施形態では、共刺激分子を刺激する薬剤は、アルギン酸塩を含む。一部の実施形態では、CD3 / TCR複合体を刺激する薬剤又は共刺激分子を刺激する薬剤は、Quad Technologies製のMagCloudz (商標)を含む。

【0085】

一部の実施形態では、ステップ(i)は、ステップ(iii)からの細胞の集団中のCAR発現細胞のパーセンテージを増加させ、例えば、ステップ(iii)からの細胞の集団は、ステップ(i)なしである以外には同様の方法によって作製された細胞と比べて、CAR発現細胞のより高いパーセンテージ(例えば、少なくとも10、20、30、40、50又は60%高い)を示す。

【0086】

一部の実施形態では、ステップ(iii)からの細胞の集団中のナイーブ細胞、例えばナイーブT細胞、例えばCD45RA + CD45RO - CCR7 + T細胞のパーセンテージは、ステップ(i)の開始時の細胞の集団中のナイーブ細胞、例えばナイーブT細胞、例えばCD45RA + CD45RO - CCR7 + 細胞のパーセンテージと同じである。一部の実施形態では、ステップ(iii)からの細胞の集団中のナイーブ細胞、例えばナイーブT細胞、例えばCD45RA + CD45RO - CCR7 + T細胞のパーセンテージは、ステップ(i)の開始時の細胞の集団中のナイーブ細胞、例えばナイーブT細胞、例えばCD45RA + CD45RO - CCR7 + 細胞のパーセンテージと3、4、5、6、7、8、9、10、11又は12%以下だけ異なる。一部の実施形態では、ステップ(iii)からの細胞の集団中のナイーブ細胞、例えばナイーブT細胞、例えばCD45RA + CD45RO - CCR7 + T細胞のパーセンテージは、ステップ(i)の開始時の細胞の集団中のナイーブ細胞、例えばナイーブT細胞、例えばCD45RA + CD45RO - CCR7 + 細胞のパーセンテージと5又は10%以下だけ異なる。

【0087】

一部の実施形態では、ステップ(iii)からの細胞の集団は、ステップ(iii)が、ステップ(i)の開始後、26時間を超えて、例えばステップ(i)の開始後、5、6、7、8、9、10、11又は12日を超えてから実施される以外には同様の方法によって作製された細胞と比べて、ナイーブ細胞、例えばナイーブT細胞、例えばCD45RA + CD45RO - CCR7 + T細胞のより高いパーセンテージ(例えば、少なくとも10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35又は40%高い)を示す。一部の実施形態では、ステップ(iii)からの細胞の集団は、ステップ(ii)後且つステップ(iii)前に細胞(例えば、T細胞)の集団をインビトロで3日超、例えば5、6、7、8又は9日にわたって増殖させるステップをさらに含む以外には同様の方法によって作製された細胞と比べて、ナイーブ細胞、例えばナイーブT細胞、例えばCD45RA + CD45RO - CCR7 + T細胞のより高いパーセンテージ(例えば、少なくとも10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35又は40%高い)を示す。

【0088】

一部の実施形態では、ステップ(iii)からの細胞の集団中のセントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリーT細胞、例えばCD95 + セントラルメモリーT細胞のパーセンテージは、ステップ(i)の開始時の細胞の集団中のセントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリーT細胞、例えばCD95 + セントラルメモリーT細胞のパーセンテージと同じである。一部の実施形態では、ステップ(iii)からの細胞の集団中のセントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリーT細胞、例えばCD95 + セントラル

10

20

30

40

50

メモリーT細胞のパーセンテージは、ステップ(i)の開始時の細胞の集団中のセントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリーT細胞、例えばCD95+セントラルメモリーT細胞のパーセンテージと3、4、5、6、7、8、9、10、11又は12%以下だけ異なる。一部の実施形態では、ステップ(iii)からの細胞の集団中のセントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリーT細胞、例えばCD95+セントラルメモリーT細胞のパーセンテージは、ステップ(i)の開始時の細胞の集団中のセントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリーT細胞、例えばCD95+セントラルメモリーT細胞のパーセンテージと5又は10%以下だけ異なる。

【0089】

一部の実施形態では、ステップ(iii)からの細胞の集団は、ステップ(iii)が、ステップ(i)の開始後、26時間を超えて、例えばステップ(i)の開始後、5、6、7、8、9、10、11又は12日を超えてから実施される以外には同様の方法によって作製された細胞と比べて、セントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリーT細胞、例えばCD95+セントラルメモリーT細胞のより低いパーセンテージ(例えば、少なくとも10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35又は40%低い)を示す。一部の実施形態では、ステップ(iii)からの細胞の集団は、ステップ(ii)後且つステップ(iii)前に細胞(例えば、T細胞)の集団をインビトロで3日超、例えば5、6、7、8又は9日にわたって増殖させるステップをさらに含む以外には同様の方法によって作製された細胞と比べて、セントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリーT細胞、例えばCD95+セントラルメモリーT細胞のより低いパーセンテージ(例えば、少なくとも10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35又は40%低い)を示す。

【0090】

一部の実施形態では、ステップ(iii)からの細胞の集団中のステムメモリーT細胞、例えばCD45RA+CD95+IL-2受容体+CCR7+CD62L+T細胞のパーセンテージは、ステップ(i)の開始時の細胞の集団中のステムメモリーT細胞、例えばCD45RA+CD95+IL-2受容体+CCR7+CD62L+T細胞のパーセンテージと比べて増加される。一部の実施形態では、ステップ(iii)からの細胞の集団中のCAR発現ステムメモリーT細胞、例えばCAR発現CD45RA+CD95+IL-2受容体+CCR7+CD62L+T細胞のパーセンテージは、ステップ(i)の開始時の細胞の集団中のCAR発現ステムメモリーT細胞、例えばCAR発現CD45RA+CD95+IL-2受容体+CCR7+CD62L+T細胞のパーセンテージと比べて増加される。一部の実施形態では、ステップ(iii)からの細胞の集団中のステムメモリーT細胞、例えばCD45RA+CD95+IL-2受容体+CCR7+CD62L+T細胞のパーセンテージは、ステップ(iii)が、ステップ(i)の開始後、26時間を超えて、例えばステップ(i)の開始後、5、6、7、8、9、10、11又は12日を超えてから実施される以外には同様の方法によって作製された細胞の集団中のステムメモリーT細胞、例えばCD45RA+CD95+IL-2受容体+CCR7+CD62L+T細胞のパーセンテージより高い。一部の実施形態では、ステップ(iii)からの細胞の集団中のCAR発現ステムメモリーT細胞、例えばCAR発現CD45RA+CD95+IL-2受容体+CCR7+CD62L+T細胞のパーセンテージは、ステップ(iii)が、ステップ(i)の開始後、26時間を超えて、例えばステップ(i)の開始後、5、6、7、8、9、10、11又は12日を超えてから実施される以外には同様の方法によって作製された細胞中のCAR発現ステムメモリーT細胞、例えばCAR発現CD45RA+CD95+IL-2受容体+CCR7+CD62L+T細胞のパーセンテージより高い。一部の実施形態では、ステップ(iii)からの細胞の集団中のステムメモリーT細胞、例えばCD45RA+CD95+IL-2受容体+CCR7+CD62L+T細胞のパーセンテージは、ステップ(ii)後且つステップ(iii)前に細胞(例えば、T細胞)の集団をインビトロで3日超、例えば5、6、7、8又は9日にわたって増殖させるステップをさらに含む以外には同様の方法によって作製された細胞

胞の集団中のステムメモリーT細胞、例えばCD45RA+CD95+IL-2受容体+CCR7+CD62L+T細胞のパーセンテージより高い。一部の実施形態では、ステップ(iii)からの細胞の集団中のCAR発現ステムメモリーT細胞、例えばCAR発現CD45RA+CD95+IL-2受容体+CCR7+CD62L+T細胞のパーセンテージは、ステップ(ii)後且つステップ(iii)前に細胞(例えば、T細胞)の集団をインビトロで3日超、例えば5、6、7、8又は9日にわたって増殖させるステップをさらに含む以外には同様の方法によって作製された細胞の集団中のCAR発現ステムメモリーT細胞、例えばCAR発現CD45RA+CD95+IL-2受容体+CCR7+CD62L+T細胞のパーセンテージより高い。

【0091】

一部の実施形態では、ステップ(iii)からの細胞の集団のGeneSetScore中央値(Up TEM vs. Down TSCM)は、ステップ(i)の開始時の細胞の集団のGeneSetScore中央値(Up TEM vs. Down TSCM)とほぼ同じであるか又は約25、50、75、100若しくは125%以下だけ異なる(例えば、それ以下だけ増加される)。一部の実施形態では、ステップ(iii)からの細胞の集団のGeneSetScore中央値(Up TEM vs. Down TSCM)は、ステップ(iii)が、ステップ(i)の開始後、26時間を超えて、例えばステップ(i)の開始後、5、6、7、8、9、10、11又は12日を超えてから実施される以外には同様の方法によって作製された細胞の集団のGeneSetScore中央値(Up TEM vs. Down TSCM)より低い(例えば、少なくとも約100、150、200、250又は300%低い)。一部の実施形態では、ステップ(iii)からの細胞の集団のGeneSetScore中央値(Up TEM vs. Down TSCM)は、ステップ(ii)後且つステップ(iii)前に細胞(例えば、T細胞)の集団をインビトロで3日超、例えば5、6、7、8又は9日にわたって増殖させるステップをさらに含む以外には同様の方法によって作製された細胞の集団のGeneSetScore中央値(Up TEM vs. Down TSCM)より低い(例えば、少なくとも約100、150、200、250又は300%低い)。一部の実施形態では、ステップ(iii)からの細胞の集団のGeneSetScore中央値(Up Treg vs. Down Teff)は、ステップ(i)の開始時の細胞の集団のGeneSetScore中央値(Up Treg vs. Down Teff)とほぼ同じであるか又は約25、50、100、150若しくは200%以下だけ異なる(例えば、それ以下だけ増加される)。一部の実施形態では、ステップ(iii)からの細胞の集団のGeneSetScore中央値(Up Treg vs. Down Teff)は、ステップ(iii)が、ステップ(i)の開始後、26時間を超えて、例えばステップ(i)の開始後、5、6、7、8、9、10、11又は12日を超えてから実施される以外には同様の方法によって作製された細胞の集団のGeneSetScore中央値(Up Treg vs. Down Teff)より低い(例えば、少なくとも約50、100、125、150又は175%低い)。一部の実施形態では、ステップ(iii)からの細胞の集団のGeneSetScore中央値(Up Treg vs. Down Teff)は、ステップ(ii)後且つステップ(iii)前に細胞(例えば、T細胞)の集団をインビトロで3日超、例えば5、6、7、8又は9日にわたって増殖させるステップをさらに含む以外には同様の方法によって作製された細胞の集団のGeneSetScore中央値(Up Treg vs. Down Teff)より低い(例えば、少なくとも約50、100、150又は175%低い)。一部の実施形態では、ステップ(iii)からの細胞の集団のGeneSetScore中央値(Down stemness)は、ステップ(i)の開始時の細胞の集団のGeneSetScore中央値(Down stemness)とほぼ同じであるか又は約25、50、100、150、200若しくは250%以下だけ異なる(例えば、それ以下だけ増加される)。一部の実施形態では、ステップ(iii)からの細胞の集団のGeneSetScore中央値(Down stemness)は、ステップ(iii)が、ステップ(i)の開始後、26時間を超えて、例え

10

20

30

40

50

ばステップ (i) の開始後、5、6、7、8、9、10、11又は12日を超えてから実施される以外には同様の方法によって作製された細胞の集団の Gene Set Score 中央値 (Down stemness) より低い (例えば、少なくとも約50、100又は125%低い)。一部の実施形態では、ステップ (iii) からの細胞の集団の Gene Set Score 中央値 (Down stemness) は、ステップ (ii) 後且つステップ (iii) 前に細胞 (例えば、T細胞) の集団をインビトロで3日超、例えば5、6、7、8又は9日にわたって増殖させるステップをさらに含む以外には同様の方法によって作製された細胞の集団の Gene Set Score 中央値 (Down stemness) より低い (例えば、少なくとも約50、100又は125%低い)。一部の実施形態では、ステップ (iii) からの細胞の集団の Gene Set Score 中央値 (Up hypoxia) は、ステップ (i) の開始時の細胞の集団の Gene Set Score 中央値 (Up hypoxia) とほぼ同じであるか又は約125、150、175若しくは200%以下だけ異なる (例えば、それ以下だけ増加される)。一部の実施形態では、ステップ (iii) からの細胞の集団の Gene Set Score 中央値 (Up hypoxia) は、ステップ (iii) が、ステップ (i) の開始後、26時間を超えて、例えばステップ (i) の開始後、5、6、7、8、9、10、11又は12日を超えてから実施される以外には同様の方法によって作製された細胞の集団の Gene Set Score 中央値 (Up hypoxia) より低い (例えば、少なくとも約40、50、60、70又は80%低い)。一部の実施形態では、ステップ (iii) からの細胞の集団の Gene Set Score 中央値 (Up hypoxia) は、ステップ (ii) 後且つステップ (iii) 前に細胞 (例えば、T細胞) の集団をインビトロで3日超、例えば5、6、7、8又は9日にわたって増殖させるステップをさらに含む以外には同様の方法によって作製された細胞の集団の Gene Set Score 中央値 (Up hypoxia) より低い (例えば、少なくとも約40、50、60、70又は80%低い)。一部の実施形態では、ステップ (iii) からの細胞の集団の Gene Set Score 中央値 (Up autophagy) は、ステップ (i) の開始時の細胞の集団の Gene Set Score 中央値 (Up autophagy) とほぼ同じであるか又は約180、190、200若しくは210%以下だけ異なる (例えば、それ以下だけ増加される)。一部の実施形態では、ステップ (iii) からの細胞の集団の Gene Set Score 中央値 (Up autophagy) は、ステップ (iii) が、ステップ (i) の開始後、26時間を超えて、例えばステップ (i) の開始後、5、6、7、8、9、10、11又は12日を超えてから実施される以外には同様の方法によって作製された細胞の集団の Gene Set Score 中央値 (Up autophagy) より低い (例えば、少なくとも約20、30又は40%低い)。一部の実施形態では、ステップ (iii) からの細胞の集団の Gene Set Score 中央値 (Up autophagy) は、ステップ (ii) 後且つステップ (iii) 前に細胞 (例えば、T細胞) の集団をインビトロで3日超、例えば5、6、7、8又は9日にわたって増殖させるステップをさらに含む以外には同様の方法によって作製された細胞の集団の Gene Set Score 中央値 (Up autophagy) より低い (例えば、少なくとも約20、30又は40%低い)。

10

20

30

40

【0092】

一部の実施形態では、ステップ (iii) からの細胞の集団は、CARによって認識される抗原を発現する細胞と一緒にインキュベートされた後、ステップ (iii) が、ステップ (i) の開始後、26時間を超えて、例えばステップ (i) の開始後、5、6、7、8、9、10、11若しくは12日を超えてから実施される以外には同様の方法によって作製された細胞又はステップ (ii) 後且つステップ (iii) 前に細胞 (例えば、T細胞) の集団をインビトロで3日超、例えば5、6、7、8若しくは9日にわたって増殖させるステップをさらに含む以外には同様の方法によって作製された細胞よりも高いレベル (例えば、少なくとも2、4、6、8、10、12又は14倍高い) でIL-2を分泌する。

【0093】

50

一部の実施形態では、ステップ (i i i) からの細胞の集団は、インビボで投与された後、ステップ (i i i) が、ステップ (i) の開始後、26時間を超えて、例えばステップ (i) の開始後、5、6、7、8、9、10、11又は12日を超えてから実施される以外には同様の方法によって作製された細胞と比べてより長く持続するか又はより高い (例えば、少なくとも20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85若しくは90%高い) レベルで増殖する。一部の実施形態では、ステップ (i i i) からの細胞の集団は、インビボで投与された後、ステップ (i i) 後且つステップ (i i i) 前に細胞 (例えば、T細胞) の集団をインビトロで3日超、例えば5、6、7、8又は9日にわたって増殖させるステップをさらに含む以外には同様の方法によって作製された細胞と比べてより長く持続するか又はより高い (例えば、少なくとも

10

【0094】

一部の実施形態では、ステップ (i i i) からの細胞の集団は、インビボで投与された後、ステップ (i i i) が、ステップ (i) の開始後、26時間を超えて、例えばステップ (i) の開始後、5、6、7、8、9、10、11若しくは12日を超えてから実施される以外には同様の方法によって作製された細胞又はステップ (i i) 後且つステップ (i i i) 前に細胞 (例えば、T細胞) の集団をインビトロで3日超、例えば5、6、7、8若しくは9日にわたって増殖させるステップをさらに含む以外には同様の方法によって作製された細胞よりも強力な抗腫瘍活性 (例えば、低用量、例えば 0.15×10^6 、 0.2×10^6 、 0.25×10^6 又は 0.3×10^6 個の生存CAR発現細胞でより強力な抗腫瘍活性) を示す。

20

【0095】

一部の実施形態では、ステップ (i i i) からの細胞の集団は、ステップ (i) の開始時の細胞の集団と比べて、例えば生存細胞の数によって評価されて増殖されない。一部の実施形態では、ステップ (i i i) からの細胞の集団は、例えば、生存細胞の数によって評価されて、ステップ (i) の開始時の細胞の集団中の生存細胞の数から減少する。一部の実施形態では、ステップ (i i i) からの細胞の集団は、ステップ (i) の開始時の細胞の集団と比べて、例えば生存細胞の数によって評価されて5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35又は

30

【0096】

一部の実施形態では、ステップ (i) 及び (i i) は、IL-2、IL-15 (例えば、hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra))、IL-6 (例えば、IL-6/sIL-6Ra)、LSD1阻害剤又はMALT1阻害剤を含む細胞培地中で実施される。一部の実施形態では、ステップ (i) 及び (i i) は、IL-7、IL-21又はそれらの組み合わせを含む細胞培地 (例えば、無血清培地) 中で実施される。一部の実施形態では、ステップ (i) 及び (i i) は、IL-2、IL-15 (例えば、hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra))、IL-21、IL-7、IL-6 (例えば、IL-6/sIL-6Ra)、LSD1阻害剤、MALT1阻害剤又はそれらの組み合わせを含む細胞培地中で実施される。一部の実施形態では、ステップ (i) は、IL-2、IL-15 (例えば、hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra))、IL-6 (例えば、IL-6/sIL-6Ra)、LSD1阻害剤又はMALT1阻害剤を含む細胞培地中で実施される。一部の実施形態では、ステップ (i i) は、IL-2、IL-15 (例えば、hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra))、IL-6 (例えば、IL-6/sIL-6Ra)、LSD1阻害剤又はMALT1阻害剤を含む細胞培地中で実施される。一部の実施形態では、ステップ (i) は、IL-7、IL-21又はそれらの組み合わせを含む細胞培地 (例えば、無血清培地) 中で実施される。一部の実施形態では、

40

50

ステップ (i i) は、 I L - 7、 I L - 2 1 又はそれらの組み合わせを含む細胞培地 (例えば、無血清培地) 中で実施される。一部の実施形態では、ステップ (i) は、 I L - 2、 I L - 1 5 (例えば、 h e t I L - 1 5 (I L 1 5 / s I L - 1 5 R a))、 I L - 2 1、 I L - 7、 I L - 6 (例えば、 I L - 6 / s I L - 6 R a)、 L S D 1 阻害剤、 M A L T 1 阻害剤又はそれらの組み合わせを含む細胞培地中で実施される。一部の実施形態では、ステップ (i i) は、 I L - 2、 I L - 1 5 (例えば、 h e t I L - 1 5 (I L 1 5 / s I L - 1 5 R a))、 I L - 2 1、 I L - 7、 I L - 6 (例えば、 I L - 6 / s I L - 6 R a)、 L S D 1 阻害剤、 M A L T 1 阻害剤又はそれらの組み合わせを含む細胞培地中で実施される。一部の実施形態では、細胞培地は、血清代替品を含む無血清培地である。一部の実施形態では、血清代替品は、 C T S (商標) I m m u n e C e l l S e r u m R e p l a c e m e n t (I C S R) である。

10

【 0 0 9 7 】

一部の実施形態では、前述の方法は、ステップ (i) 前に、 (i v) 実体、例えば研究室、病院又は医療提供者から、新鮮な白血球アフェレーシス産物 (或いは新鮮な全血液産物、新鮮な骨髓産物又は新鮮な腫瘍若しくは臓器生検若しくは切除 (例えば、胸腺除去からの新鮮な産物) などの造血組織の代替供給源) を受け取るステップをさらに含む。

【 0 0 9 8 】

一部の実施形態では、前述の方法は、ステップ (i) 前に、 (v) 新鮮な白血球アフェレーシス産物 (或いは新鮮な全血液産物、新鮮な骨髓産物又は新鮮な腫瘍若しくは臓器生検若しくは切除 (例えば、胸腺除去からの新鮮な産物) などの代替供給源) から、ステップ (i) で接触される細胞 (例えば、 T 細胞、例えば C D 8 + 及び / 又は C D 4 + T 細胞) の集団を単離するステップをさらに含む。一部の実施形態では、ステップ (i i i) は、ステップ (v) の開始後の 3 5 時間以内、例えばステップ (v) の開始後の 2 7、 2 8、 2 9、 3 0、 3 1、 3 2、 3 3、 3 4 又は 3 5 時間以内、例えばステップ (v) の開始後の 3 0 時間以内に実施される。一部の実施形態では、ステップ (i i i) からの細胞の集団は、ステップ (v) の終了時の細胞の集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて、増殖されないか、又は 5、 1 0、 1 5、 2 0、 2 5、 3 0、 3 5 若しくは 4 0 % 以下、例えば 1 0 % 以下だけ増殖される。

20

【 0 0 9 9 】

一部の実施形態では、前述の方法は、ステップ (i) 前に、実体、例えば研究室、病院又は医療提供者から、白血球アフェレーシス産物 (或いは全血液、骨髓又は腫瘍若しくは臓器生検若しくは切除 (例えば、胸腺除去) から単離された凍結保存 T 細胞などの造血組織の代替供給源) から単離された凍結保存 T 細胞を受け取るステップをさらに含む。

30

【 0 1 0 0 】

一部の実施形態では、前述の方法は、ステップ (i) 前に、 (i v) 実体、例えば研究室、病院又は医療提供者から、凍結保存白血球アフェレーシス産物 (或いは凍結保存全血液産物、凍結保存骨髓産物又は凍結保存腫瘍若しくは臓器生検若しくは切除 (例えば、胸腺除去からの凍結保存産物) などの造血組織の代替供給源) を受け取るステップをさらに含む。

【 0 1 0 1 】

一部の実施形態では、前述の方法は、ステップ (i) 前に、 (v) 凍結保存白血球アフェレーシス産物 (或いは凍結保存全血液産物、凍結保存骨髓産物又は凍結保存腫瘍若しくは臓器生検若しくは切除 (例えば、胸腺除去からの凍結保存産物) などの造血組織の代替供給源) から、ステップ (i) で接触される細胞 (例えば、 T 細胞、例えば C D 8 + 及び / 又は C D 4 + T 細胞) の集団を単離するステップをさらに含む。一部の実施形態では、ステップ (i i i) は、ステップ (v) の開始後の 3 5 時間以内、例えばステップ (v) の開始後の 2 7、 2 8、 2 9、 3 0、 3 1、 3 2、 3 3、 3 4 又は 3 5 時間以内、例えばステップ (v) の開始後の 3 0 時間以内に実施される。一部の実施形態では、ステップ (i i i) からの細胞の集団は、ステップ (v) の終了時の細胞の集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて、増殖されないか、又は 5、 1 0、 1 5、 2 0、 2 5、 3 0、 3

40

50

5 若しくは40%以下、例えば10%以下だけ増殖される。

【0102】

一部の実施形態では、ステップ(iii)からの細胞は、その一部中のCAR発現レベルを測定する(例えば、その一部中の生存CAR発現細胞のパーセンテージを測定する、例えばその一部中の生存抗BCMA CAR発現細胞のパーセンテージを測定する)前に、約2~約4日、例えば約3日(例えば、採取後約72時間)にわたって培養される。一部の実施形態では、CAR発現の測定は、ステップ(ii)から約4日(例えば、96時間)後に行われる。一部の実施形態では、CAR発現レベルは、フローサイトメトリーによって測定される。

【0103】

一部の実施形態では、本発明は、キメラ抗原受容体(CAR)を発現する細胞(例えば、T細胞)の集団を作製する方法を特徴とし、本方法は、(1)細胞(例えば、T細胞、例えば凍結白血球アフェレーシス産物から単離されたT細胞)の集団を、IL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-6又はそれらの組み合わせから選択されるサイトカインと接触させるステップ、(2)細胞(例えば、T細胞)の集団を、CARをコードする核酸分子(例えば、DNA又はRNA分子)と接触させ、それにより核酸分子を含む細胞(例えば、T細胞)の集団を提供するステップ、及び(3)保存(例えば、凍結保存培地中の細胞の集団の再製剤化)又は投与のために細胞(例えば、T細胞)の集団を採取するステップを含み、(a)ステップ(2)は、ステップ(1)と一緒に、又はステップ(1)の開始後の5時間以内、例えばステップ(1)の開始後の1、2、3、4又は5時間以内に実施され;及びステップ(3)は、ステップ(1)の開始後の26時間以内、例えばステップ(1)の開始後の22、23、24又は25時間以内、例えばステップ(1)の開始後の24時間以内に実施されるか;又は(b)ステップ(3)からの細胞の集団は、例えば、ステップ(1)の開始時の細胞の集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて、増殖されないか、又は5、10、15、20、25、30、35若しくは40%以下、例えば10%以下だけ増殖される。一部の実施形態では、ステップ(2)における核酸分子は、DNA分子である。一部の実施形態では、ステップ(2)における核酸分子は、RNA分子である。一部の実施形態では、ステップ(2)における核酸分子は、ウイルスベクター、例えばレンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター又はレトロウイルスベクターから選択されるウイルスベクター上にある。一部の実施形態では、ステップ(2)における核酸分子は、非ウイルスベクター上にある。一部の実施形態では、ステップ(2)における核酸分子は、プラスミド上にある。一部の実施形態では、ステップ(2)における核酸分子は、いずれのベクター上にもない。一部の実施形態では、ステップ(2)は、細胞(例えば、T細胞)の集団を、CARをコードする核酸分子を含むウイルスベクターで形質導入することを含む。一部の実施形態では、CARをコードする核酸分子は、本明細書に開示される核酸分子である。一部の実施形態では、核酸分子は、第1CARをコードする第1核酸配列と、第2CARをコードする第2核酸配列とを含む。一部の実施形態では、第1及び第2核酸配列は、単一の核酸分子上に配置され、例えば、第1核酸配列及び第2核酸配列は、自己切断部位(例えば、P2A部位、T2A部位、E2A部位又はF2A部位)をコードする第3核酸配列によって隔てられる。一部の実施形態では、第1及び第2核酸配列は、個別の核酸分子上に配置される。一部の実施形態では、核酸分子は、CARをコードする核酸配列を含み、CARは、第1VH(VH1)、第1VL(VL1)、第2VH(VH2)、第2VL(VL2)、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを含み、VH1及びVL1は、第1抗原に結合し、且つVH2及びVL2は、第2抗原に結合し、VH1、VL1、VH2及びVL2は、N末端からC末端まで、以下の構成: VH1 - 任意選択でリンカー1(「L1」) - VH2 - 任意選択でリンカー2(「L2」) - VL2 - 任意選択でリンカー3(「L3」) - VL1、VH1 - 任意選択でL1 - VL2 - 任意選択でL2 - VH2 - 任意選択でL3 - VL1、VL1 - 任意選択でL1 - VH2 - 任意選択でL2 - VL2 - 任意選択でL3 - VH1、VL1 - 任意選択でL1 - VL2 - 任意選択でL2 - VH2 - 任意選択でL3 - VH1、VH2 - 任意

10

20

30

40

50

選択で L 1 - V H 1 - 任意選択で L 2 - V L 1 - 任意選択で L 3 - V L 2、V H 2 - 任意選択で L 1 - V L 1 - 任意選択で L 2 - V H 1 - 任意選択で L 3 - V L 2、V L 2 - 任意選択で L 1 - V H 1 - 任意選択で L 2 - V L 1 - 任意選択で L 3 - V H 2；又は V L 2 - 任意選択で L 1 - V L 1 - 任意選択で L 2 - V H 1 - 任意選択で L 3 - V H 2 で配列される。

【 0 1 0 4 】

一部の実施形態では、ステップ (2) は、ステップ (1) と一緒に実施される。一部の実施形態では、ステップ (2) は、ステップ (1) の開始後の 5 時間以内に実施される。一部の実施形態では、ステップ (2) は、ステップ (1) の開始後の 1、2、3、4 又は 5 時間以内に実施される。一部の実施形態では、ステップ (3) は、ステップ (1) の開始後の 2 6 時間以内に実施される。一部の実施形態では、ステップ (3) は、ステップ (1) の開始後の 2 2、2 3、2 4 又は 2 5 時間以内に実施される。一部の実施形態では、ステップ (3) は、ステップ (1) の開始後の 2 4 時間以内に実施される。

10

【 0 1 0 5 】

一部の実施形態では、ステップ (3) からの細胞の集団は、例えば、ステップ (1) の開始時の細胞の集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて増殖されない。一部の実施形態では、ステップ (3) からの細胞の集団は、例えば、ステップ (1) の開始時の細胞の集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて 5、6、7、8、9、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 5、3 0、3 5 又は 4 0 % 以下だけ増殖される。一部の実施形態では、ステップ (3) からの細胞の集団は、例えば、ステップ (1) の開始時の細胞の集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて 1 0 % 以下だけ増殖される。

20

【 0 1 0 6 】

一部の実施形態では、ステップ (1) は、細胞 (例えば、T 細胞) の集団を I L - 2 と接触させることを含む。一部の実施形態では、ステップ (1) は、細胞 (例えば、T 細胞) の集団を I L - 7 と接触させることを含む。一部の実施形態では、ステップ (1) は、細胞 (例えば、T 細胞) の集団を I L - 1 5 (例えば、h e t I L - 1 5 (I L 1 5 / s I L - 1 5 R a)) と接触させることを含む。一部の実施形態では、ステップ (1) は、細胞 (例えば、T 細胞) の集団を I L - 2 1 と接触させることを含む。一部の実施形態では、ステップ (1) は、細胞 (例えば、T 細胞) の集団を I L - 6 (例えば、I L - 6 / s I L - 6 R a) と接触させることを含む。一部の実施形態では、ステップ (1) は、細胞 (例えば、T 細胞) の集団を I L - 2 及び I L - 7 と接触させることを含む。一部の実施形態では、ステップ (1) は、細胞 (例えば、T 細胞) の集団を I L - 2 及び I L 1 5 (例えば、h e t I L - 1 5 (I L 1 5 / s I L - 1 5 R a)) と接触させることを含む。一部の実施形態では、ステップ (1) は、細胞 (例えば、T 細胞) の集団を I L - 2 及び I L - 2 1 と接触させることを含む。一部の実施形態では、ステップ (1) は、細胞 (例えば、T 細胞) の集団を I L - 2 及び I L - 6 (例えば、I L - 6 / s I L - 6 R a) と接触させることを含む。一部の実施形態では、ステップ (1) は、細胞 (例えば、T 細胞) の集団を I L - 7 及び I L - 1 5 (例えば、h e t I L - 1 5 (I L 1 5 / s I L - 1 5 R a)) と接触させることを含む。一部の実施形態では、ステップ (1) は、細胞 (例えば、T 細胞) の集団を I L - 7 及び I L - 2 1 と接触させることを含む。一部の実施形態では、ステップ (1) は、細胞 (例えば、T 細胞) の集団を I L - 7 及び I L - 6 (例えば、I L - 6 / s I L - 6 R a) と接触させることを含む。一部の実施形態では、ステップ (1) は、細胞 (例えば、T 細胞) の集団を I L - 1 5 (例えば、h e t I L - 1 5 (I L 1 5 / s I L - 1 5 R a)) 及び I L - 2 1 と接触させることを含む。一部の実施形態では、ステップ (1) は、細胞 (例えば、T 細胞) の集団を I L - 1 5 (例えば、h e t I L - 1 5 (I L 1 5 / s I L - 1 5 R a)) 及び I L - 6 (例えば、I L - 6 / s I L - 6 R a) と接触させることを含む。一部の実施形態では、ステップ (1) は、細胞 (例えば、T 細胞) の集団を I L - 2 1 及び I L - 6 (例えば、I L - 6 / s I L - 6 R a) と接触させることを含む。一部の実施形態では、ステップ (1) は、細胞 (例えば、T 細胞) の集団を I L - 7 及び I L - 6 (例えば、I L - 6 / s I L - 6 R a) と接触させることを含む。一部の実施形態では、ステップ (1) は、細胞 (例えば、T 細胞) の集団を I L - 7 及び I L - 2 1 と接触させることを含む。一部の実施形態では、ステップ (1) は、細胞 (例えば、T 細胞) の集団を I L - 7 及び I L - 6 (例えば、I L - 6 / s I L - 6 R a) と接触させることを含む。一部の実施形態では、ステップ (1) は、細胞 (例えば、T 細胞) の集団を I L - 1 5 (例えば、h e t I L - 1 5 (I L 1 5 / s I L - 1 5 R a)) 及び I L - 6 (例えば、I L - 6 / s I L - 6 R a) と接触させることを含む。一部の実施形態では、ステップ (1) は、細胞 (例えば、T 細胞) の集団を I L - 2 1 及び I L - 6 (例えば、I L - 6 / s I L - 6 R a) と接触させることを含む。一部の実施形態では、ステップ (1) は、細胞 (例えば、T 細胞) の集団を I L - 2 1 及び I L - 6 (例えば、I L - 6 / s I L - 6 R a) と接触させることを含む。

30

40

50

、T細胞)の集団をIL-7、IL15(例えば、hetIL-15(IL15/sIL-15Ra))及びIL-21と接触させることを含む。

【0107】

一部の実施形態では、ステップ(3)からの細胞の集団は、細胞の集団を例えば抗CD3抗体と接触させるステップをさらに含む以外には同様の方法によって作製された細胞と比べて、CAR発現細胞の中でナイーブ細胞のより高いパーセンテージ(例えば、少なくとも10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35又は40%高い)を示す。

【0108】

一部の実施形態では、ステップ(3)からの細胞の集団中のナイーブ細胞、例えばナイーブT細胞、例えばCD45RA+CD45RO-CCR7+T細胞のパーセンテージは、ステップ(1)の開始時の細胞の集団中のナイーブ細胞、例えばナイーブT細胞、例えばCD45RA+CD45RO-CCR7+細胞のパーセンテージと同じである。一部の実施形態では、ステップ(3)からの細胞の集団中のナイーブ細胞、例えばナイーブT細胞、例えばCD45RA+CD45RO-CCR7+T細胞のパーセンテージは、ステップ(1)の開始時の細胞の集団中のナイーブ細胞、例えばナイーブT細胞、例えばCD45RA+CD45RO-CCR7+細胞のパーセンテージと3、4、5、6、7、8、9、10、11又は12%以下だけ異なる。一部の実施形態では、ステップ(3)からの細胞の集団中のナイーブ細胞、例えばナイーブT細胞、例えばCD45RA+CD45RO-CCR7+T細胞のパーセンテージは、ステップ(1)の開始時の細胞の集団中のナイーブ細胞、例えばナイーブT細胞、例えばCD45RA+CD45RO-CCR7+細胞のパーセンテージと5又は10%以下だけ異なる。一部の実施形態では、ステップ(3)からの細胞の集団中のナイーブ細胞、例えばナイーブT細胞、例えばCD45RA+CD45RO-CCR7+T細胞のパーセンテージは、ステップ(1)の開始時の細胞の集団中のナイーブ細胞、例えばナイーブT細胞、例えばCD45RA+CD45RO-CCR7+細胞のパーセンテージと比べて増加される。一部の実施形態では、ステップ(3)からの細胞の集団中のナイーブ細胞、例えばナイーブT細胞、例えばCD45RA+CD45RO-CCR7+T細胞のパーセンテージは、ステップ(1)の開始時の細胞の集団中のナイーブ細胞、例えばナイーブT細胞、例えばCD45RA+CD45RO-CCR7+細胞のパーセンテージと比べて少なくとも10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20%だけ増加される。一部の実施形態では、ステップ(3)からの細胞の集団中のナイーブ細胞、例えばナイーブT細胞、例えばCD45RA+CD45RO-CCR7+細胞のパーセンテージは、ステップ(1)の開始時の細胞の集団中のナイーブ細胞、例えばナイーブT細胞、例えばCD45RA+CD45RO-CCR7+細胞のパーセンテージと比べて少なくとも10又は20%だけ増加される。

【0109】

一部の実施形態では、ステップ(3)からの細胞の集団は、ステップ(3)が、ステップ(1)の開始後、26時間を超えて、例えばステップ(1)の開始後、5、6、7、8、9、10、11又は12日を超えてから実施される以外には同様の方法によって作製された細胞と比べて、ナイーブ細胞、例えばナイーブT細胞、例えばCD45RA+CD45RO-CCR7+T細胞のより高いパーセンテージ(例えば、少なくとも10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35又は40%高い)を示す。一部の実施形態では、ステップ(3)からの細胞の集団は、ステップ(2)後且つステップ(3)前に細胞(例えば、T細胞)の集団をインビトロで3日超、例えば5、6、7、8又は9日にわたって増殖させるステップをさらに含む以外には同様の方法によって作製された細胞と比べて、ナイーブ細胞、例えばナイーブT細胞、例えばCD45RA+CD45RO-CCR7+T細胞のより高いパーセンテージ(例えば、少なくとも10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35又は40%高い)を示す。

【0110】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、ステップ(3)からの細胞の集団中のセントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリーT細胞、例えばCD95+セントラルメモリーT細胞のパーセンテージは、ステップ(i)の開始時の細胞の集団中のセントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリーT細胞、例えばCD95+セントラルメモリーT細胞のパーセンテージと同じである。一部の実施形態では、ステップ(3)からの細胞の集団中のセントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリーT細胞、例えばCD95+セントラルメモリーT細胞のパーセンテージは、ステップ(i)の開始時の細胞の集団中のセントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリーT細胞、例えばCD95+セントラルメモリーT細胞のパーセンテージと3、4、5、6、7、8、9、10、11又は12%以下だけ異なる。一部の実施形態では、ステップ(3)からの細胞の集団中のセントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリーT細胞、例えばCD95+セントラルメモリーT細胞のパーセンテージは、ステップ(i)の開始時の細胞の集団中のセントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリーT細胞、例えばCD95+セントラルメモリーT細胞のパーセンテージと5又は10%以下だけ異なる。一部の実施形態では、ステップ(3)からの細胞の集団中のセントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリーT細胞、例えばCD95+セントラルメモリーT細胞のパーセンテージは、ステップ(1)の開始時の細胞の集団中のセントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリーT細胞、例えばCD95+セントラルメモリーT細胞のパーセンテージと比べて減少される。一部の実施形態では、ステップ(3)からの細胞の集団中のセントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリーT細胞、例えばCD95+セントラルメモリーT細胞のパーセンテージは、ステップ(1)の開始時の細胞の集団中のセントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリーT細胞、例えばCD95+セントラルメモリーT細胞のパーセンテージと比べて少なくとも10又は20%だけ減少される。一部の実施形態では、ステップ(3)からの細胞の集団中のセントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリーT細胞、例えばCD95+セントラルメモリーT細胞のパーセンテージは、ステップ(1)の開始時の細胞の集団中のセントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリーT細胞、例えばCD95+セントラルメモリーT細胞のパーセンテージと比べて少なくとも10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20%だけ減少される。

【0111】

一部の実施形態では、ステップ(3)からの細胞の集団は、ステップ(3)が、ステップ(1)の開始後、26時間を超えて、例えばステップ(1)の開始後、5、6、7、8、9、10、11又は12日を超えてから実施される以外には同様の方法によって作製された細胞と比べて、セントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリーT細胞、例えばCD95+セントラルメモリーT細胞のより低いパーセンテージ(例えば、少なくとも10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35又は40%低い)を示す。一部の実施形態では、ステップ(3)からの細胞の集団は、ステップ(2)後且つステップ(3)前に細胞(例えば、T細胞)の集団をインビトロで3日超、例えば5、6、7、8又は9日にわたって増殖させるステップをさらに含む以外には同様の方法によって作製された細胞と比べて、セントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリーT細胞、例えばCD95+セントラルメモリーT細胞のより低いパーセンテージ(例えば、少なくとも10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35又は40%低い)を示す。

【0112】

一部の実施形態では、ステップ(3)からの細胞の集団は、インビボで投与された後、ステップ(3)が、ステップ(1)の開始後、26時間を超えて、例えばステップ(1)の開始後、5、6、7、8、9、10、11又は12日を超えてから実施される以外には同様の方法によって作製された細胞と比べて、より長く持続するか又はより高い(例えば、少なくとも20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85若しくは90%高い)レベルで増殖する。一部の実施形態では、ステップ(3)からの細胞の集団は、インビボで投与された後、ステップ(2)後且つステップ(

3) 前に細胞 (例えば、T細胞) の集団をインビトロで3日超、例えば5、6、7、8又は9日にわたって増殖させるステップをさらに含む以外には同様の方法によって作製された細胞と比べて、より長く持続するか又はより高い (例えば、少なくとも20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85若しくは90%高い) レベルで増殖する。

【0113】

一部の実施形態では、ステップ(3)からの細胞の集団は、ステップ(1)の開始時の細胞の集団と比べて、例えば生存細胞の数によって評価されて増殖されない。一部の実施形態では、ステップ(3)からの細胞の集団は、ステップ(1)の開始時の細胞の集団と比べて、例えば生存細胞の数によって評価されて5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35又は40%以下だけ増殖される。一部の実施形態では、ステップ(3)からの細胞の集団は、ステップ(1)の開始時の細胞の集団と比べて、例えば生存細胞の数によって評価されて10%以下だけ増殖される。一部の実施形態では、ステップ(3)からの細胞の集団中の生存細胞の数は、例えば、生存細胞の数によって評価されて、ステップ(1)の開始時の細胞中の生存細胞の数から減少する。

10

【0114】

一部の実施形態では、ステップ(3)からの細胞の集団は、ステップ(1)の開始時の細胞の集団と比べて、例えば生存細胞の数によって評価されて増殖されない。一部の実施形態では、ステップ(3)からの細胞の集団は、ステップ(1)の開始時の細胞の集団と比べて、0.5、1、1.5又は2時間未満、例えば1又は1.5時間未満だけ増殖される。

20

【0115】

一部の実施形態では、細胞の集団は、CD3/TCR複合体を刺激する薬剤及び/又はそれらの細胞の表面上の共刺激分子を刺激する薬剤とインビトロで接触されないか、又は接触される場合、接触させるステップは、2時間未満、例えば1若しくは1.5時間以下である。一部の実施形態では、CD3/TCR複合体を刺激する薬剤は、CD3 (例えば、抗CD3抗体) を刺激する薬剤である。一部の実施形態では、共刺激分子を刺激する薬剤は、CD28、ICOS、CD27、HVEM、LIGHT、CD40、4-1BB、OX40、DR3、GITR、CD30、TIM1、CD2、CD226又はそれらの任意の組み合わせを刺激する薬剤である。一部の実施形態では、共刺激分子を刺激する薬剤は、CD28を刺激する薬剤である。一部の実施形態では、CD3/TCR複合体を刺激する薬剤は、抗体 (例えば、単ドメイン抗体 (例えば、重鎖可変ドメイン抗体)、ペプチボディ、Fabフラグメント若しくはscFv)、小分子又はリガンド (例えば、天然に存在するリガンド、組換えリガンド若しくはキメラリガンド) から選択される。

30

【0116】

一部の実施形態では、ステップ(1)及び/又は(2)は、5、4、3、2、1又は0%以下の血清を含む細胞培地中で実施される。一部の実施形態では、ステップ(1)及び/又は(2)は、2%以下の血清を含む細胞培地中で実施される。一部の実施形態では、ステップ(1)及び/又は(2)は、約2%の血清を含む細胞培地中で実施される。一部の実施形態では、ステップ(1)及び/又は(2)は、LSD1阻害剤又はMALT1阻害剤を含む細胞培地中で実施される。一部の実施形態では、ステップ(1)は、5、4、3、2、1又は0%以下の血清を含む細胞培地中で実施される。一部の実施形態では、ステップ(1)は、2%以下の血清を含む細胞培地中で実施される。一部の実施形態では、ステップ(1)は、約2%の血清を含む細胞培地中で実施される。一部の実施形態では、ステップ(2)は、5、4、3、2、1又は0%以下の血清を含む細胞培地中で実施される。一部の実施形態では、ステップ(2)は、2%以下の血清を含む細胞培地中で実施される。一部の実施形態では、ステップ(2)は、約2%の血清を含む細胞培地中で実施される。一部の実施形態では、ステップ(1)は、LSD1阻害剤又はMALT1阻害剤を含む細胞培地中で実施される。一部の実施形態では、ステップ(2)は、LSD1阻害剤

40

50

又はM A L T 1 阻害剤を含む細胞培地中で実施される。

【 0 1 1 7 】

一部の実施形態では、前述の方法は、ステップ (i) 前に、(i v) 実体、例えば研究室、病院又は医療提供者から、新鮮な白血球アフェレーシス産物 (或いは新鮮な全血液産物、新鮮な骨髓産物又は新鮮な腫瘍若しくは臓器生検若しくは切除 (例えば、胸腺除去からの新鮮な産物) などの造血組織の代替供給源) を受け取るステップをさらに含む。

【 0 1 1 8 】

一部の実施形態では、前述の方法は、ステップ (i) 前に、(v) 新鮮な白血球アフェレーシス産物 (或いは新鮮な全血液産物、新鮮な骨髓産物又は新鮮な腫瘍若しくは臓器生検若しくは切除 (例えば、胸腺除去からの新鮮な産物) などの造血組織の代替供給源) から、ステップ (i) で接触される細胞 (例えば、T細胞、例えばC D 8 + 及び / 又はC D 4 + T細胞) の集団を単離するステップをさらに含む。一部の実施形態では、ステップ (i i i) は、ステップ (v) の開始後の35時間以内、例えばステップ (v) の開始後の27、28、29、30、31、32、33、34又は35時間以内、例えばステップ (v) の開始後の30時間以内に実施される。一部の実施形態では、ステップ (i i i) からの細胞の集団は、ステップ (v) の終了時の細胞の集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて、増殖されないか、又は5、10、15、20、25、30、35若しくは40%以下、例えば10%以下だけ増殖される。

10

【 0 1 1 9 】

一部の実施形態では、前述の方法は、ステップ (i) 前に、実体、例えば研究室、病院又は医療提供者から、白血球アフェレーシス産物 (或いは全血液、骨髓又は腫瘍若しくは臓器生検若しくは切除 (例えば、胸腺除去) から単離された凍結保存T細胞などの代替供給源) から単離された凍結保存T細胞を受け取るステップをさらに含む。

20

【 0 1 2 0 】

一部の実施形態では、前述の方法は、ステップ (i) 前に、(i v) 実体、例えば研究室、病院又は医療提供者から、凍結保存白血球アフェレーシス産物 (或いは凍結保存全血液産物、凍結保存骨髓産物又は凍結保存腫瘍若しくは臓器生検若しくは切除 (例えば、胸腺除去からの凍結保存産物) などの造血組織の代替供給源) を受け取るステップをさらに含む。

【 0 1 2 1 】

一部の実施形態では、前述の方法は、ステップ (i) 前に、(v) 凍結保存白血球アフェレーシス産物 (或いは凍結保存全血液産物、凍結保存骨髓産物又は凍結保存腫瘍若しくは臓器生検若しくは切除 (例えば、胸腺除去からの凍結保存産物) などの造血組織の代替供給源) から、ステップ (i) で接触される細胞 (例えば、T細胞、例えばC D 8 + 及び / 又はC D 4 + T細胞) の集団を単離するステップをさらに含む。一部の実施形態では、ステップ (i i i) は、ステップ (v) の開始後の35時間以内、例えばステップ (v) の開始後の27、28、29、30、31、32、33、34又は35時間以内、例えばステップ (v) の開始後の30時間以内に実施される。一部の実施形態では、ステップ (i i i) からの細胞の集団は、ステップ (v) の終了時の細胞の集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて、増殖されないか、又は5、10、15、20、25、30、35若しくは40%以下、例えば10%以下だけ増殖される。

30

40

【 0 1 2 2 】

一部の実施形態では、ステップ (i) 又はステップ (1) の開始時の細胞の集団は、I L 6 R 発現細胞 (例えば、I L 6 R 及び / 又はI L 6 R について陽性の細胞) について濃縮されている。一部の実施形態では、ステップ (i) 又はステップ (1) の開始時の細胞の集団は、40、45、50、55、60、65若しくは70%以上のI L 6 R 発現細胞 (例えば、I L 6 R 及び / 又はI L 6 R について陽性の細胞) を含む。

【 0 1 2 3 】

一部の実施形態では、ステップ (i) 及び (i i) 又はステップ (1) 及び (2) は、I L - 1 5 (例えば、h e t I L - 1 5 (I L 1 5 / s I L - 1 5 R a)) を含む細胞培

50

地中で実施される。一部の実施形態では、IL-15は、細胞の集団が例えば10、15、20又は25日後に増殖する能力を増加させる。一部の実施形態では、IL-15は、細胞の集団中のIL6R 発現細胞のパーセンテージを増加させる。

【0124】

前述した方法の一部の実施形態では、本方法は、閉鎖系において実施される。一部の実施形態では、T細胞分離、活性化、形質導入、インキュベーション及び洗浄は、全て閉鎖系において実施される。前述した方法の一部の実施形態では、本方法は、個別の装置内で実施される。一部の実施形態では、T細胞分離、活性化及び形質導入、インキュベーション及び洗浄は、個別の装置内で実施される。

【0125】

前述した方法の一部の実施形態では、本方法は、形質導入効率を高めるためにアジュバント又は形質導入促進試薬を細胞培地に添加するステップをさらに含む。一部の実施形態では、アジュバント又は形質導入試薬は、カチオン性ポリマーを含む。一部の実施形態では、アジュバント又は形質導入促進試薬は、LentiBOOST (商標) (Sirion Biotech)、ベクトフシン (vectofusin) - 1、F108、臭化ヘキサジメトリン (Polybrene)、PEA、Pluronic F68、Pluronic F127、Synperonic 又はLentiTrans (商標) から選択される。一部の実施形態では、アジュバントは、LentiBOOST (商標) (Sirion Biotech) である。

【0126】

前述した方法の一部の実施形態では、細胞 (例えば、T細胞) の集団をウイルスベクターで形質導入するステップは、形質導入効率が高められるような条件下で細胞の集団及びウイルスベクターを遠心力に付すことを含む。一実施形態では、細胞は、スピノキュレーションによって形質導入される。

【0127】

前述した方法の一部の実施形態では、細胞 (例えば、T細胞) は、底部にガス透過膜を含む細胞培養フラスコ内で活性化され、形質導入され、このガス透過膜は、ガス交換を実質的に損なうことなく大きい培地量を支持する。一部の実施形態では、細胞増殖は、対流による栄養素へのアクセス、例えば中断しないアクセスによって達成される。

【0128】

前述した方法の一部の実施形態では、CARは、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【0129】

一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、CD19、CD20、CD22、BCMA、メソテリン、EGFRvIII、GD2、Tn抗原、sTn抗原、Tn-O-グリコペプチド、sTn-O-グリコペプチド、PSMA、CD97、TAG72、CD44v6、CEA、EPCAM、KIT、IL-13Ra2、レグマン、GD3、CD171、IL-11Ra、PSCA、MAD-CT-1、MAD-CT-2、VEGFR2、ルイスY、CD24、PDGFR、SSEA-4、葉酸受容体、ERBB (例えば、ERBB2)、Her2/neu、MUC1、EGFR、NCAM、エフリンB2、CAIX、LMP2、sLe、HMWMAA、o-アセチル-GD2、葉酸受容体、TEM1/CD248、TEM7R、FAP、レグマイン、HPV E6若しくはE7、ML-IA P、CLDN6、TSHR、GPRC5D、ALK、ポリシアル酸、Fos関連抗原、好中球エラストラーゼ、TRP-2、CYP1B1、精子タンパク質17、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、AFP、チログロブリン、PLAC1、グロボH、RAGE1、MN-CAIX、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、腸カルボキシエステラーゼ、mut hsp 70-2、NA-17、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、NY-ESO-1、GPR20、Ly6k、OR51E2、TARP、GFR4又はMHCに提示されるこれらの抗原のいずれかのペプチドから選択される抗原に結合する。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、本明細書に開示されるCDR、VH、VL、

10

20

30

40

50

s c F v又はC A R配列を含む。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、V H及びV Lを含み、V H及びV Lは、リンカーによって連結され、任意選択で、リンカーは、配列番号63又は104のアミノ酸配列を含む。

【0130】

一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、T細胞受容体の、又は鎖、C D 2 8、C D 3、C D 4 5、C D 4、C D 5、C D 8、C D 9、C D 1 6、C D 2 2、C D 3 3、C D 3 7、C D 6 4、C D 8 0、C D 8 6、C D 1 3 4、C D 1 3 7及びC D 1 5 4から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含む。一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、C D 8の膜貫通ドメインを含む。一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、配列番号6のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、膜貫通ドメインをコードする核酸配列を含み、核酸配列は、配列番号17の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列を含む。

10

【0131】

一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、ヒンジ領域によって膜貫通ドメインに連結される。一部の実施形態では、ヒンジ領域は、配列番号2、3若しくは4のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、ヒンジ領域をコードする核酸配列を含み、核酸配列は、配列番号13、14若しくは15の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列を含む。

20

【0132】

一部の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、一次シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態では、一次シグナル伝達ドメインは、C D 3、T C R、F c R、F c R、C D 3、C D 3、C D 3、C D 5、C D 2 2、C D 7 9 a、C D 7 9 b、C D 2 7 8 (I C O S)、F c R I、D A P 1 0、D A P 1 2又はC D 6 6 dに由来する機能性シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態では、一次シグナル伝達ドメインは、C D 3に由来する機能性シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態では、一次シグナル伝達ドメインは、配列番号9又は10のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、一次シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列を含み、核酸配列は、配列番号20若しくは21の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列を含む。

30

【0133】

一部の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態では、共刺激シグナル伝達ドメインは、M H CクラスI分子、T N F受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ球活性化分子 (S L A Mタンパク質)、活性化N K細胞受容体、B T L A、T o l lリガンド受容体、O X 4 0、C D 2、C D 7、C D 2 7、C D 2 8、C D 3 0、C D 4 0、C D 5、I C A M - 1、4 - 1 B B (C D 1 3 7)、B 7 - H 3、I C O S (C D 2 7 8)、G I T R、B A F F R、L I G H T、H V E M (L I G H T R)、K I R D S 2、S L A M F 7、N K p 8 0 (K L R F 1)、N K p 4 4、N K p 3 0、N K p 4 6、C D 1 9、C D 4、C D 8、C D 8、I L 2 R、I L 2 R、I L 7 R、I T G A 4、V L A 1、C D 4 9 a、I T G A 4、I A 4、C D 4 9 D、I T G A 6、V L A - 6、C D 4 9 f、I T G A D、C D 1 1 d、I T G A E、C D 1 0 3、I T G A L、C D 1 1 a、L F A - 1、I T G A M、C D 1 1 b、I T G A X、C D 1 1 c、I T G B 1、C D 2 9、I T G B 2、C D 1 8、I T G B 7、N K G 2 D、N K G 2 C、T N F R 2、T R A N C E / R A N K L、D N A M 1 (C D 2 2 6)、S L A M F 4 (C D 2 4 4、2 B 4)、C D 8 4、C D 9 6 (T a c t i l e)、C E A C A M 1、C R T A M、L y 9 (C D 2 2 9)、C D 1 6 0 (B Y 5 5)、P S G L 1、C D 1 0 0 (S E M A 4 D)、C D 6 9、S L A M F 6 (N T B - A、L y 1 0 8)、S L A M (S L A M

40

50

F 1、C D 1 5 0、I P O - 3)、B L A M E (S L A M F 8)、S E L P L G (C D 1 6 2)、L T B R、L A T、G A D S、S L P - 7 6、P A G / C b p、C D 1 9 a、C D 2 8 - O X 4 0、C D 2 8 - 4 - 1 B B 又は C D 8 3 と特異的に結合するリガンドを含む。一部の実施形態では、共刺激シグナル伝達ドメインは、4 - 1 B B に由来する機能性シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態では、共刺激シグナル伝達ドメインは、配列番号 7 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、共刺激シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列を含み、核酸配列は、配列番号 1 8 の核酸配列又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有する核酸配列を含む。

10

【 0 1 3 4 】

一部の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、4 - 1 B B に由来する機能性シグナル伝達ドメインと、C D 3 に由来する機能性シグナル伝達ドメインとを含む。一部の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号 7 のアミノ酸配列（又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列）と、配列番号 9 若しくは 1 0 のアミノ酸配列（又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列）とを含む。一部の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号 7 のアミノ酸配列と、配列番号 9 又は 1 0 のアミノ酸配列とを含む。

【 0 1 3 5 】

一部の実施形態では、C A R は、配列番号 1 のアミノ酸配列を含むリーダー配列をさらに含む。

20

【 0 1 3 6 】

一部の実施形態では、本発明は、前述した方法のいずれか又は本明細書に開示されるいずれか他の方法によって作製される C A R 発現細胞（例えば、自家又は同種異系 C A R 発現 T 細胞又は N K 細胞）の集団を特徴とする。一部の実施形態では、本明細書に開示の C A R 発現細胞の集団と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物が本明細書において提供される。

【 0 1 3 7 】

一部の実施形態では、集団は、
 (a) 抗 B C M A C A R を含むが、抗 C D 1 9 C A R を含まない第 1 細胞集団；
 (b) 抗 C D 1 9 C A R を含むが、抗 B C M A C A R を含まない第 2 細胞集団；及び
 (c) 抗 B C M A C A R と抗 C D 1 9 C A R との両方を含む第 3 細胞集団
 を含む。

30

【 0 1 3 8 】

一部の実施形態では、
 (i) 第 2 及び第 3 集団を合わせた生存細胞の総数は、第 1 及び第 3 集団を合わせた生存細胞の総数の約 1 1 0 % 以下（例えば、約 1 0 5 %、1 0 0 %、9 0 %、8 0 %、7 0 %、6 0 %、5 0 %、4 0 %、3 0 %、2 0 %、1 0 %、5 %、1 % 又はそれ未満以下）であり；
 (i i) 第 1 及び第 3 集団を合わせた生存細胞の総数は、第 2 及び第 3 集団を合わせた生存細胞の総数の約 9 0 % 以上（例えば、約 1 0 0 %、1 2 5 %、1 5 0 %、1 7 5 %、2 0 0 %、2 5 0 %、3 0 0 %、4 0 0 %、5 0 0 %、7 5 0 %、1 0 0 0 %、2 0 0 0 %、5 0 0 0、1 0 0 0 0 % 又はそれを超えるもの以上）であり；及び / 又は
 (i i i) 第 1 及び第 3 集団を合わせた生存細胞の総数は、集団中の生存細胞の総数の約 5 % 以上（例えば、約 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 % 又は 9 0 % 以上）である。

40

【 0 1 3 9 】

一部の実施形態では、集団は、C A R を含まない細胞の第 4 集団をさらに含む。

【 0 1 4 0 】

50

一部の実施形態では、

(i) 第 2 集団の生存細胞の総数は、第 1 及び第 3 集団を合わせた生存細胞の総数の約 10 % 以下 (例えば、約 105 %、100 %、90 %、80 %、70 %、60 %、50 %、40 %、30 %、20 %、10 %、5 %、1 % 又はそれ未満以下) であり；

(i i) 第 2 集団の生存細胞の総数は、第 1 及び第 3 集団を合わせた生存細胞の総数の約 45 % ~ 約 50 % (例えば、約 47 %) 以下；約 50 % ~ 約 55 % (例えば、約 53 %) 以下；約 60 % ~ 約 65 % (例えば、約 63 %) 以下；又は約 80 % ~ 約 85 % (例えば、約 82 %) 以下である。

【 0 1 4 1 】

一部の実施形態では、本明細書記載の方法を用いて製造される最終 CAR 細胞産物において、ビーズ (例えば、CD4 ビーズ、CD8 ビーズ及び / 又は TransACT ビーズ) の総量は、製造プロセス中に添加されるビーズの総量の 0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4 又は 0.5 % 以下である。

【 0 1 4 2 】

一部の実施形態では、本発明は、以下の特徴の 1 つ以上を含む CAR 発現細胞 (例えば、自家又は同種異系 CAR 発現 T 細胞又は NK 細胞) の集団を特徴とする：(a) CAR を発現するように操作される前の同じ細胞の集団中のナイーブ細胞、例えばナイーブ T 細胞、例えば CD45RO - CCR7 + 細胞のパーセンテージと比べて、ほぼ同じパーセンテージのナイーブ細胞、例えばナイーブ T 細胞、例えば CD45RO - CCR7 + 細胞；

(b) CAR を発現するように操作される前の同じ細胞の集団中のナイーブ細胞、例えばナイーブ T 細胞、例えば CD45RO - CCR7 + 細胞のパーセンテージと比べて、ナイーブ細胞、例えばナイーブ T 細胞、例えば CD45RO - CCR7 + 細胞の約 5 % ~ 約 10 % 以内の変化；(c) CAR を発現するように操作される前の同じ細胞の集団中のナイーブ細胞、例えばナイーブ T 細胞、例えば CD45RO - CCR7 + 細胞のパーセンテージと比べて、増加された、例えば少なくとも 1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、2.2、2.4、2.6、2.8 又は 3 倍増加されたパーセンテージのナイーブ細胞、例えばナイーブ T 細胞、例えば CD45RO - CCR7 + 細胞；

(d) CAR を発現するように操作される前の同じ細胞の集団中のセントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリー T 細胞、例えば CCR7 + CD45RO + T 細胞のパーセンテージと比べて、ほぼ同じパーセンテージのセントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリー T 細胞、例えば CCR7 + CD45RO + T 細胞；

(e) CAR を発現するように操作される前の同じ細胞の集団中のセントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリー T 細胞、例えば CCR7 + CD45RO + T 細胞のパーセンテージと比べて、セントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリー T 細胞、例えば CCR7 + CD45RO + T 細胞の約 5 % ~ 約 10 % 以内の変化；(f) CAR を発現するように操作される前の同じ細胞の集団中のセントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリー T 細胞、例えば CCR7 + CD45RO + T 細胞のパーセンテージと比べて、減少された、例えば少なくとも 20、25、30、35、40、45 又は 50 % 減少されたパーセンテージのセントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリー T 細胞、例えば CCR7 + CD45RO + T 細胞；

(g) CAR を発現するように操作される前の同じ細胞の集団中のステムメモリー T 細胞、例えば CD45RA + CD95 + IL - 2 受容体 + CCR7 + CD62L + T 細胞のパーセンテージと比べて、ほぼ同じパーセンテージのステムメモリー T 細胞、例えば CD45RA + CD95 + IL - 2 受容体 + CCR7 + CD62L + T 細胞；

(h) CAR を発現するように操作される前の同じ細胞の集団中のステムメモリー T 細胞、例えば CD45RA + CD95 + IL - 2 受容体 + CCR7 + CD62L + T 細胞のパーセンテージと比べて、ステムメモリー T 細胞、例えば CD45RA + CD95 + IL - 2 受容体 + CCR7 + CD62L + T 細胞の約 5 % ~ 約 10 % 以内の変化；又は (i) CAR を発現するように操作される前の同じ細胞の集団中のステムメモリー T 細胞、例えば CD45RA + CD95 + IL - 2 受容体 + CCR7 + CD62L + T 細胞のパーセンテージと比べて、増加された

10

20

30

40

50

パーセンテージのステムメモリーT細胞、例えばCD45RA+CD95+IL-2受容体+CCR7+CD62L+T細胞。

【0143】

一部の実施形態では、本発明は、CAR発現細胞（例えば、自家又は同種異系CAR発現T細胞又はNK細胞）の集団を特徴とし、ここで、（a）細胞の集団のGeneSetScore中央値（Up TEM vs. Down TSCM）は、CARを発現するように操作される前の同じ細胞の集団のGeneSetScore中央値（Up TEM vs. Down TSCM）とほぼ同じであるか又は約25、50、75、100若しくは125%以下だけ異なる（例えば、それ以下だけ増加される）か；（b）細胞の集団のGeneSetScore中央値（Up Treg vs. Down Tef f）は、CARを発現するように操作される前の細胞の集団のGeneSetScore中央値（Up Treg vs. Down Tef f）とほぼ同じであるか又は約25、50、100、150若しくは200%以下だけ異なる（例えば、それ以下だけ増加される）か；（c）細胞の集団のGeneSetScore中央値（Down stemness）は、CARを発現するように操作される前の細胞の集団のGeneSetScore中央値（Down stemness）とほぼ同じであるか又は約25、50、100、150、200若しくは250%以下だけ異なる（例えば、それ以下だけ増加される）か；（d）細胞の集団のGeneSetScore中央値（Up hypoxia）は、CARを発現するように操作される前の細胞の集団のGeneSetScore中央値（Up hypoxia）とほぼ同じであるか又は約125、150、175若しくは200%以下だけ異なる（例えば、それ以下だけ増加される）か；又は（e）細胞の集団のGeneSetScore中央値（Up autophagy）は、CARを発現するように操作される前の細胞の集団のGeneSetScore中央値（Up autophagy）とほぼ同じであるか又は約180、190、200若しくは210%以下だけ異なる（例えば、それ以下だけ増加される）。

10

20

【0144】

一部の実施形態では、本発明は、対象の免疫応答を増加させる方法を特徴とし、これは、本明細書に開示されるCAR発現細胞の集団又は本明細書に開示される医薬組成物を対象に投与し、それにより対象の免疫応答を増加させるステップを含む。

【0145】

一部の実施形態では、対象の癌を処置する方法が開示され、これは、本明細書に開示されるCAR発現細胞の集団又は本明細書に開示される医薬組成物を対象に投与し、それにより対象の癌を処置するステップを含む。一部の実施形態では、癌は、例えば、中皮腫、悪性胸膜中皮腫、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、扁平上皮癌、大細胞肺癌、膀胱癌、膵臓癌、膵管腺癌、食道腺癌、乳癌、膠芽腫、卵巣癌、大腸癌、前立腺癌、子宮頸癌、皮膚癌、黒色腫、腎癌、肝臓癌、脳腫瘍、胸腺腫、肉腫、癌腫、子宮癌、腎臓癌、消化管癌、尿路上皮癌、咽頭癌、頭部及び頸部癌、直腸癌、食道癌若しくは膀胱癌の1つ以上から選択される固形癌又はその転移である。一部の実施形態では、癌は、例えば、慢性リンパ性白血病（CLL）、マンツル細胞リンパ腫（MCL）、多発性骨髄腫、急性リンパ性白血病（ALL）、ホジキンリンパ腫、B細胞急性リンパ性白血病（BALL）、T細胞急性リンパ性白血病（TALL）、小リンパ球性白血病（SLL）、B細胞前リンパ球性白血病、芽球性形質細胞様樹状細胞新生物、パーキットリンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）、慢性炎症を伴うDLBCL、慢性骨髄性白血病、骨髄増殖性腫瘍、濾胞性リンパ腫、小児性濾胞性リンパ腫、ヘアリー細胞白血病、小細胞型若しくは大細胞型濾胞性リンパ腫、悪性リンパ球増殖性病態、MALTリンパ腫（粘膜関連リンパ組織型節外性濾胞辺縁帯リンパ腫）、辺縁帯リンパ腫、骨髄形成異常、骨髄異形成症候群、非ホジキンリンパ腫、形質芽球性リンパ腫、形質細胞様樹状細胞新生物、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、脾辺縁帯リンパ腫、脾リンパ腫/白血病、脾臓びまん性赤脾髄小細胞型B細胞リンパ腫、ヘアリー細胞白血病-変異型、リンパ形質細胞性リンパ腫、H鎖病、プラズマ細胞骨髄腫、孤立性骨形質細胞腫、骨外性形質細胞腫、節性辺縁帯リンパ腫、小児性

30

40

50

節性辺縁帯リンパ腫、原発性皮膚濾胞中心リンパ腫、リンパ腫様肉芽腫症、原発性縦隔（胸腺）大細胞型B細胞リンパ腫、血管内大細胞型B細胞リンパ腫、ALK+大細胞型B細胞リンパ腫、HHV8関連多中心性キャスルマン病に発生する大細胞型B細胞リンパ腫、原発性滲出性リンパ腫、B細胞リンパ腫、急性骨髄性白血病（AML）又は分類不能なリンパ腫から選択される液性癌である。

【0146】

一部の実施形態では、本方法は、第2の治療薬を対象に投与するステップをさらに含む。一部の実施形態では、第2の治療薬は、抗癌治療薬、例えば化学療法薬、放射線療法又は免疫調節療法である。一部の実施形態では、第2の治療薬は、IL-15（例えば、hetIL-15（IL15/sIL-15Ra））である。

10

【0147】

一部の実施形態では、本明細書に開示される方法によって作製される単離細胞又は細胞の集団であって、

(a) 抗BCMA結合ドメイン、第1膜貫通ドメイン及び第1細胞内シグナル伝達ドメインを含む第1CARをコードする第1核酸分子であって、抗BCMA結合ドメインは、重鎖相補性決定領域1（HC CDR1）、重鎖相補性決定領域2（HC CDR2）及び重鎖相補性決定領域3（HC CDR3）を含む重鎖可変領域（VH）と、軽鎖相補性決定領域1（LC CDR1）、軽鎖相補性決定領域2（LC CDR2）及び軽鎖相補性決定領域3（LC CDR3）を含む軽鎖可変領域（VL）とを含み、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、それぞれ配列番号86、87、88、95、96及び97のアミノ酸配列を含む、第1核酸分子と；

20

(b) 抗CD19結合ドメイン、第2膜貫通ドメイン及び第2細胞内シグナル伝達ドメインを含む第2CARをコードする第2核酸分子であって、抗CD19結合ドメインは、HC CDR1、HC CDR2及びHC CDR3を含むVHと、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3を含むVLとを含み、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、それぞれ配列番号295、304及び297～300のアミノ酸配列を含む、第2核酸分子とを含む単離細胞又は細胞の集団が本明細書に提供される。

30

【0148】

一部の実施形態では、単離細胞であって、

(a) 抗BCMA結合ドメイン、第1膜貫通ドメイン及び第1細胞内シグナル伝達ドメインを含む第1CARをコードする第1核酸分子であって、抗BCMA結合ドメインは、重鎖相補性決定領域1（HC CDR1）、重鎖相補性決定領域2（HC CDR2）及び重鎖相補性決定領域3（HC CDR3）を含む重鎖可変領域（VH）と、軽鎖相補性決定領域1（LC CDR1）、軽鎖相補性決定領域2（LC CDR2）及び軽鎖相補性決定領域3（LC CDR3）を含む軽鎖可変領域（VL）とを含み、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、それぞれ配列番号86、87、88、95、96及び97のアミノ酸配列を含む、第1核酸分子と；

40

(b) 抗CD19結合ドメイン、第2膜貫通ドメイン及び第2細胞内シグナル伝達ドメインを含む第2CARをコードする第2核酸分子であって、抗CD19結合ドメインは、HC CDR1、HC CDR2及びHC CDR3を含むVHと、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3を含むVLとを含み、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、それぞれ配列番号295、304及び297～300のアミノ酸配列を含む、第2核酸分子とを含む単離細胞が本明細書に提供される。

【0149】

一部の実施形態では、抗BCMA結合ドメインのVH及びVLは、それぞれ配列番号93及び102のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、抗CD19結合ドメインのV

50

H及びV Lは、それぞれ配列番号250及び251のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、抗BCMA結合ドメインのV H及びV Lは、それぞれ配列番号93及び102のアミノ酸配列を含み、抗CD19結合ドメインのV H及びV Lは、それぞれ配列番号250及び251のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、抗BCMA結合ドメインは、配列番号105のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、抗CD19結合ドメインは、配列番号293のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、抗BCMA結合ドメインは、配列番号105のアミノ酸配列を含み、抗CD19結合ドメインは、配列番号293のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第1CARは、配列番号107のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第2CARは、配列番号225のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第1CARは、配列番号107のアミノ酸配列を含み；第2CARは、配列番号225のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第1CARは、配列番号259、258又は416の核酸配列によってコードされる。一部の実施形態では、第2CARは、配列番号417、355、356又は354の核酸配列によってコードされる。一部の実施形態では、第1CARは、配列番号259、258又は416の核酸配列によってコードされ、及び第2CARは、配列番号417、355、356又は354の核酸配列によってコードされる。

10

【0150】

一部の実施形態では、本明細書に記載される細胞又は細胞の集団を含む医薬組成物が本明細書に提供される。

【0151】

一部の実施形態では、対象において抗腫瘍免疫を提供するか、又はBCMAの発現に関連する疾患を有する対象を処置する方法が本明細書に提供され、これは、有効量の、本明細書に記載される細胞若しくは細胞集団又は医薬組成物を対象に投与することを含む。

20

【0152】

一部の実施形態では、BCMA発現に関連する疾患は、血液癌又は固形癌、例えば、本明細書に記載される血液癌又は固形癌である。

【0153】

一部の実施形態では、疾患は、急性白血病、B細胞急性リンパ性白血病（「BALL」）、T細胞急性リンパ性白血病（「TALL」）、急性リンパ性白血病（ALL）、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、B細胞前リンパ球性白血病、芽球性形質細胞様樹状細胞新生物、パーキットリンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、ヘアリー細胞白血病、小細胞型若しくは大細胞型濾胞性リンパ腫、悪性リンパ球増殖性病態、MALTリンパ腫、マンツル細胞リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、多発性骨髄腫、骨髄形成異常及び骨髄異形成症候群、非ホジキンリンパ腫、形質芽球性リンパ腫、形質細胞様樹状細胞新生物、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、前立腺癌（例えば、去勢抵抗性若しくは治療抵抗性前立腺癌又は転移性前立腺癌）、膵臓癌、肺癌、形質細胞増殖異常症（例えば、無症候性骨髄腫（くすぶり型多発性骨髄腫又は無症候性骨髄腫）、意義不明の単クローン性 グロブリン血症（MGUS）、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、形質細胞腫（例えば、形質細胞異常増殖症、孤立性骨髄腫、孤立性形質細胞腫、髄外性形質細胞腫及び多発性形質細胞腫）、全身性アミロイド軽鎖アミロイドーシス若しくはPOEMS症候群（また、クロウ・深瀬症候群、高月病及びPEP症候群としても知られている）又はそれらの組み合わせから選択される。

30

40

【0154】

一部の実施形態では、疾患は、多発性骨髄腫である。

【0155】

本明細書に記載のものと同様の又は均等な方法及び材料を本発明の実施又は試験に使用することができるが、適切な方法及び材料を以下に記載する。本明細書に記載の全ての刊行物、特許出願、特許及び他の参照文献（例えば、配列データベース参照番号）は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。例えば、本明細書で（例えば、本明細書の任意の表において）言及される全てのGenBank、UniGene及びEntrez配

50

列は、参照により組み込まれる。1つの遺伝子又はタンパク質が複数の配列受託番号を参照する場合、全ての配列変異体が包含される。

【0156】

さらに、材料、方法及び例は、単なる例示であり、限定を意図するものではない。見出し、副見出し又は番号若しくは文字が振られた要素、例えば(a)、(b)、(i)等は、単に読み易いように提供される。本明細書で見出し又は番号若しくは文字が振られた要素を使用しても、ステップ若しくは要素がアルファベット順に実施される必要はないか、又はステップ若しくは要素が必ず互いに別個のものである必要はない。本発明の他の特徴、目的及び利点は、説明及び図面並びに特許請求の範囲から明らかとなるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0157】

【図1-1】自動化システムを用いたJurkat NFATルシフェラーゼ(JNL)リポーターアッセイを用いて、BCMA CARの機能を試験した。JNLリポーターアッセイでCARクローンを抗原依存性活性について評価した。表示したCARクローンを含有するJNL細胞又は非形質導入JNL細胞(UTD)を培地のみと一緒に(図1G及び1H)又は標的細胞株(BCMA陽性細胞株としてのKMS11(図1A及び1C)並びにBCMA陰性細胞株としてのNALM6(図1E及び1F))と一緒に、様々な比で共培養し、ルシフェラーゼ活性をルミネセンス強度として測定した。ルミネセンス強度が、抗原発現細胞の存在下のUTD細胞のレベルの2倍を超えれば、クローンを活性とみなした。ルミネセンス読出しは、CAR刺激の直接の測定値である。図1B及び図1Dは、ヒト組換え(r)BCMA__Fc-AF647を用いたフローサイトメトリーにより検出されたJNL細胞でのBCMA CARの発現レベルを示すグラフである。1×又は2×プラットフォームは、ウイルス産生のために接種された40,000個のH293細胞又は80,000個のH293を示した。

【図1-2】同上。

【図1-3】同上。

【図1-4】同上。

【図2】初代ヒトT細胞上のBCMA CARの発現レベル。ヒトrBCMA__Fc-AF647試薬で細胞を染色した後、フローサイトメトリーによりアッセイした。細胞培養の第5日及び第9日についてCAR+細胞及びMFIのパーセンテージをグラフに示す。データを表27にまとめるが、これは、それぞれのCARについて達成されたウイルス力価を含む。

【図3-1】表示されるCARを発現するT細胞が細胞溶解及びサイトカイン産生を媒介する能力を、ホタルルシフェラーゼ(KMS11-luc)を発現するKMS11標的細胞株に対して評価した。図3A：表示のE:T比で、CART細胞をKMS11-luc標的細胞と共培養した。細胞殺傷率(%)は、エフェクターT細胞を含まない標的細胞(対照)と、エフェクターT細胞を含む標的細胞(実験)との間のルシフェラーゼの差によって決定し、対照のパーセントとして表した。UTDは、非形質導入T細胞を示す。図3B：BCMA陰性株NALM6についてバックグラウンド殺傷を観察した。図3C：2.5のE:T比で、これらの共培養系から24h時点で収集した上清中のMSDによりIFNを測定した。データは全て、平均+/-標準偏差として表される。

【図3-2】同上。

【図3-3】同上。

【図4-1】MOI=5で形質導入したT細胞におけるCAR発現(ウイルス力価は、SupT1細胞に発現された第1CARにより決定される)。図4Aは、様々な構築物のCAR19(%), BCMA CAR(%), 二重陽性(%), CAR19のみ(%), 及びBCMA-CARのみ(%)をまとめた表である。図4Bは、表面BCMA CAR発現(x軸)及び表面CD19 CAR発現(y軸)についての細胞の染色を示す一連のフローサイトメトリープロットである。図4Cは、BCMA CAR MFI(上のパネル)及びCD19 CAR MFI(下のパネル)を示す一対の棒グラフである。

10

20

30

40

50

【図 4 - 2】同上。

【図 4 - 3】同上。

【図 5】第 8 日の CAR T 細胞を用いたインビトロ殺傷アッセイ。図 5 A ~ 5 C は、表示の E : T 比でそれぞれ BCMA 陽性 KMS 1 1 細胞、CD 1 9 陽性 Na 1 m 6 細胞又は BCMA / CD 1 9 陰性細胞に対する殺傷率 (%) を示す一連のグラフである。

【図 6】第 8 日の CAR T 細胞を用いたインビトロサイトカイン産生。図 6 A ~ 6 D は、BCMA 陽性 KMS 1 1 細胞又は CD 1 9 陽性 Na 1 m 6 細胞と共培養したとき、CAR T 細胞の IFN 産生を示す一連の棒グラフである。

【図 7 - 1】ARM プロセスを用いて製造された細胞の個別の CAR 発現。図 7 A ~ 7 B は、ARM プロセスを用いて製造されたヒト初代 T 細胞の形質導入から 2 4 h 又は 7 2 h 後の抗 BCMA 及び抗 CD 1 9 CAR 両方の発現パターンを示すヒストグラムである。これらの試験は、上流 CAR の発現により決定された Sup T 1 力価に基づき、1 の MOI を使用した。図 7 A 及び 7 B の各々において、左側部分は、r BCMA - Fc を用いた染色を示すヒストグラムのパネルであり、右側部分は、CD 1 9 CAR に結合する抗イディオタイプ抗体を用いた染色を示すヒストグラムのパネルである。構築物 # 2 4 4 (「c 2 4 4」) 及び # 2 4 5 (「c 2 4 5」) は、それぞれモノ抗 CD 1 9 CAR 及び抗 BCMA CAR である。図 7 C は、上流 CAR 力価に基づいて 1 の MOI を用いた、ヒト初代 T 細胞の形質導入から 7 2 h 後の抗 BCMA 及び抗 CD 1 9 CAR を示すフローサイトメトリープロットのパネルである。

10

【図 7 - 2】同上。

20

【図 7 - 3】同上。

【図 8】3 つのマウスモデル：ルシフェラーゼリポーター遺伝子 (KMS 1 1 - Luc) を発現する播種性 KMS - 1 1 (BCMA + CD 1 9 -) 多発性骨髄腫モデル (図 8 A)、Na 1 m 6 - Luc (CD 1 9 + BCMA -) 異種移植マウスモデル (図 8 B) 及び 5 % Na 1 m 6 - Luc 細胞を含む 9 5 % KMS - 1 1 Luc の混合モデルを用いた構築物 # 2 3 6 (「c 2 3 6」) 及び構築物 # 2 3 8 (「c 2 3 8」) のインビボ抗腫瘍活性。腫瘍負荷は、全身体発光 (p / s) として表し、平均腫瘍負荷 + SEM として示す。腫瘍接種後の第 7 日又は第 8 日に、表 3 0 に示すように、指定量の BCMA CAR + 又は CD 1 9 CAR + T 細胞 (生存 CAR + T 細胞の概数) の c 2 3 6 及び c 2 3 8 で処理した。ビヒクル (PBS) 及び非形質導入 T 細胞 (UTD) を陰性対照として使用した。モノ抗 BCMA CAR PI 6 1 及びモノ抗 CD 1 9 CAR CTL 1 1 9 も対照として使用した。

30

【図 9】移植片対宿主反応により誘発された体重減少。体重を経時的に測定することにより、X - GvHD についての読出しとして、全てのマウスを体重減少について個別にモニターした。体重 (BWT) は、ベースラインからの変化率 (%) としてプロットする。

【図 1 0】注入から 4 週間後まで、末梢血 CD 3 + T 細胞のインビボ拡大をフローサイトメトリーにより分析した。

【図 1 1】注入から 4 週間後まで、CAR + T 細胞 (BCMA CAR + パーセンテージ) のインビボ拡大をフローサイトメトリーにより分析した。

【図 1 2】注入から 4 週間後まで、CAR + T 細胞 (二重 CAR + 細胞数) のインビボ拡大をフローサイトメトリーにより分析した。

40

【図 1 3】インビボ血漿 IFN 動態。c 2 3 6 及び c 2 3 8 で処理した全 3 つのマウスモデル並びにそれぞれの CAR - T 用量のモノ CAR 対照からの血漿 IFN レベルをグラフにプロットした。マウスを採血し、MSD アッセイにより血漿サイトカインを測定した。

【図 1 4】多発性骨髄腫異種移植マウスモデルにおいて 2 3 6 及び c 2 3 8 を用いて作製した細胞のインビボ有効性及び細胞拡大。図 1 4 A : NSG マウスに、ルシフェラーゼリポーター遺伝子を発現した多発性骨髄腫株 KMS 1 1 を注射した。腫瘍負荷は、全身体発光 (p / c) として表し、平均腫瘍負荷 + SEM として示す。腫瘍接種後の第 8 日に、マウスを、9 e 4 BCMA - CD 1 9 二重 CAR + T 細胞用量 (生存 CAR + T 細胞の概数

50

)のc236及びc238で処理した。ピヒクル(PBS)及び非形質導入T細胞(UTD)を陰性対照として使用した。図14B:注入から4週間後まで、末梢血CAR+T細胞の拡大をフローサイトメトリーにより分析した。c236及びc238CAR-T R_x群において二重抗BCMA及びCD19 CAR+T細胞拡大を観察した。

【図15-1】ARMプロセスを用いて製造された細胞のCAR発現。ARMプロセスを用いて製造されたヒト初代T細胞へのウイルス添加から96h後(図15A)及び7日後(図15B)の二重陽性抗BCMA及び抗CD19 CARの発現を示すフローサイトメトリープロット。これらの試験では、CD19CARに結合する抗イディオタイプ抗体及びPI61又はR1G5に結合する組換えBCMA_{-Fc}(AF647)により検出される二重CAR(PI61又はR1G5クローン及びCTL119について陽性)の発現により決定されたSupT1力価に基づき、2のMOIを使用した。モノ抗BCMA CAR T PI61及びR1G5並びにモノ抗CD19 CAR CTL119も対照として使用した。

【図15-2】同上。

【図16】5のMOIを用いるTMプロセスによる第7日のCAR発現。TMプロセスを用いて製造されたヒト初代T細胞へのウイルス添加後第7日の二重陽性抗BCMA及び抗CD19 CARの発現を示すフローサイトメトリープロット。これらの試験では、CD19 CARに結合する抗イディオタイプ抗体及びPI61又はR1G5に結合する組換えBCMA_{-Fc}(AF647)により検出される二重CAR(PI61又はR1G5クローン及びCTL119について陽性)の発現により決定されたSupT1力価に基づき、5のMOIを使用した。

【図17】抗BCMACAR及びCD19CARダイアボディ構築物で操作されたT細胞によるBCMA-又はCD19発現腫瘍細胞のインビトロでの特異的殺傷。PI61/CTL119クローンを発現するT細胞が細胞溶解を媒介する能力を、KMS11-Luc又はNALM6-Luc標的細胞株に対して評価した。CAR T細胞をBCMA+KMS11-Luc又はBCMA-NALM6-Luc標的細胞と表示のE:T比で20時間共培養し、細胞殺傷率(%) (エフェクターT細胞を含まない標的細胞(対照)と、エフェクターT細胞を含む標的細胞(実験)との間のルシフェラーゼシグナルの差によって決定される)を標的細胞溶解の代わりとして測定し、対照のパーセントとして表した。UTDは、非形質導入T細胞を示す。モノPI61又はCTL119も対照として使用した。

【図18】BCMA-又はCD19発現腫瘍細胞に应答する、抗BCMACAR及びCD19CARダイアボディ構築物で操作されたT細胞のサイトカイン産生。1.25:1の比での殺傷アッセイ共培養からの上清中のMSDによりIFN γ (図18A)及びIL-2(図18B)を測定した。

【図19】第4日の二重CAR陽性集団、BCMA CAR陽性集団及びCD19 CARのパーセンテージ。

【図20】CD19 CARに結合するrBCMA-Fc及び抗イディオタイプ抗体による細胞の染色を示すフローサイトメトリープロット。

【図21】表示される条件下での第4日及び第7日の総CAR陽性集団のパーセンテージ。

【図22】表示される条件下での第0、1、3及び7日の細胞数(左側パネル)及び生存細胞のパーセンテージ(右側パネル)。

【図23】インプット細胞(図23A)、第1日細胞(図23B)及び第9日細胞(図23C)についての単一細胞RNA-seqデータ。「nGene」グラフは、1細胞当たりの発現細胞の数を示す。「nUMI」グラフは、1細胞当たりのユニークな分子識別子(UMI)の数を示す。

【図24-1】インプット細胞(図24A)、第1日細胞(図24B)及び第9日細胞(図24C)を増殖シグネチャーについて比較するT-分布型確率的近傍埋め込み法(TSNE)プロットであり、増殖シグネチャーは、遺伝子CCNB1、CCND1、CCNE1、PLK1及びMKI67の発現に基づいて決定した。各点は、そのサンプル中の細胞

10

20

30

40

50

を表す。薄いグレーとして示される細胞は、増殖遺伝子を発現しないが、濃い影付きの細胞は、1つ以上の増殖遺伝子を発現する。図24Dは、第1日細胞、第9日細胞及びインプット細胞についての活性化T細胞状態に対する休止T細胞状態を特徴とする遺伝子を含む遺伝子セットの遺伝子セットスコアの分布を示すバイオリンプロットである。図24Dでは、遺伝子セットスコア (Up resting vs. Down activated) が高いほど、休止T細胞表現型の増加を示すのに対し、遺伝子セットスコア (Up resting vs. Down activated) が低いほど、活性化T細胞表現型の増加を示す。インプット細胞は、第9日及び第1日細胞と比べて、全体的に休止状態の方が多かった。第1日細胞は、最も高い活性化遺伝子セットスコアを示す。

【図24-2】同上。

10

【図25-1】インプット細胞、第1日細胞及び第9日細胞についての遺伝子セット解析。図25Aにおいて、遺伝子セットの遺伝子セットスコア「Up TEM vs. Down TSCM」が高いほど、そのサンプル中の細胞のエフェクターメモリーT細胞 (TEM) 表現型の増加を示し、遺伝子セットスコアが低いほど、幹細胞メモリーT細胞 (TSCM) 表現型の増加を示す。図25Bでは、遺伝子セットの遺伝子セットスコア「Up Treg vs. Down Tef f」が高いほど、調節T細胞 (Treg) 表現型の増加を示し、遺伝子セットスコアが低いほど、エフェクターT細胞 (Tef f) 表現型の増加を示す。図25Cでは、遺伝子セットの遺伝子セットスコア「Down stemness」が低いほど、幹細胞性表現型の増加を示す。図25Dでは、遺伝子セットの遺伝子セットスコア「Up hypoxia」が高いほど、低酸素表現型の増加を示す。図25Eでは、遺伝子セットの遺伝子セットスコア「Up autophagy」が高いほど、オートファジー表現型の増加を示す。第1日細胞は、メモリー、ステム様及び分化シグネチャーに関してインプット細胞と同様と思われた。これに対し、第9日細胞は、代謝ストレスについて高い濃縮を示す。

20

【図25-2】同上。

【図25-3】同上。

【図25-4】同上。

【図25-5】同上。

【図26】インプット細胞についての遺伝子クラスター解析。図26A~26Cは、インプット細胞の4つのクラスターの遺伝子セット解析からの遺伝子セットスコアを示すバイオリンプロットである。図26A~26C中でバイオリンプロットに重なる各ドットは、細胞の遺伝子セットスコアを表す。図26Aでは、遺伝子セットの遺伝子セットスコア「Up Treg vs. Down Tef f」が高いほど、Treg細胞表現型の増加を示し、遺伝子セットの遺伝子セットスコア「Up Treg vs. Down Tef f」が低いほど、Tef f細胞表現型の増加を示す。図26Bでは、遺伝子セットの遺伝子セットスコア「Progressively up in memory differentiation」が高いほど、後期メモリーT細胞表現型の増加を示し、遺伝子セットの遺伝子セットスコア「Progressively up in memory differentiation」が低いほど、早期メモリーT細胞表現型の増加を示す。図26Cでは、遺伝子セットの遺伝子セットスコア「Up TEM vs. Down TN」が高いほど、エフェクターメモリーT細胞表現型の増加を示し、遺伝子セットの遺伝子セットスコア「Up TEM vs. Down TN」が低いほど、ナイーブT細胞表現型の増加を示す。早期メモリー、低分化T細胞状態にあるクラスター1及びクラスター2の細胞と比べて、クラスター3の細胞は、後期メモリー、より分化したT細胞状態にあることがわかる。クラスター0は、中間T細胞状態にあると考えられる。総合すると、このデータは、インプット細胞に相当レベルの不均質性があることを示している。

30

40

【図27】TCRシーケンシング及びクロナタイプ多様性の測定。第9日細胞は、クロナタイプ頻度のより平坦な分布 (高い多様性) を有する。

【図28-1】形質導入から4及び7日後のCAR発現のフローサイトメトリー解析。24ウェルプレート内のARMプロセスを用いて、様々な組み合わせのMOIのBCMA

50

及びCD19CARで細胞を共形質導入することによって作製したCAR-T細胞のフローサイトメトリー解析。図28A：フローサイトメトリープロットは、対照（UTD及び単一ベクター）に加えて、4つの異なるMOI条件下での形質導入から4及び7日後のモノ抗BCMA CAR、モノ抗CD19 CAR及び二重+CAR発現を示した。図28B：図28Aに記載される各条件下での総抗BCMA CAR+T細胞、総抗CD19 CAR+T細胞並びに総CAR+T細胞（2つのモノCAR+T細胞及び二重+CAR T細胞の合計）を含むCAR+集団のサブセットの定量。示されるデータは、一貫した結果を有する3つのドナーT細胞からの代表的なものである。CAR+細胞パーセンテージは、生存CD3+T細胞集団についてゲーティングする。

【図28-2】同上。

10

【図28-3】同上。

【図29】形質導入後の第4日のCAR発現についてのフローサイトメトリー解析。形質導入後の第4日のCAR発現についての二重ターゲティングカクテルCART、モノBCMACART及びモノCD19CARTの最終生成物のフローサイトメトリー解析。24h時点の採取時の各生成物の小アリコートを経過培養した後、フローサイトメトリー染色を実施した。

【図30-1】異種移植モデルにおけるモノBCMACART、モノCD19CARTと比べた二重CARTのインビボ有効性。ルシフェラーゼリポーター遺伝子を発現する細胞株（KMS-11若しくはNALM-6又は5%NALM-6-luc及び両方の混合物）をNSGマウスに注射した。腫瘍負荷を平均腫瘍負荷+SEMとして示される、全身体発光（p/s）として表す。腫瘍接種後の第7又は8日に、それぞれの用量（生存CAR+T細胞の概数）の二重ターゲティングカクテルCART、BCMACART又はCD19CARTで処置した。ピヒクル（PBS）及び非形質導入T細胞（UTD）を陰性対照として使用した。全ての群についてN=5。BCMACART及びCD19CARTを、最大用量レベルを用いるそれぞれの対照として使用した。CAR-T投与後の第23日に全ての実験を終了した。

20

【図30-2】同上。

【図30-3】同上。

【図30-4】同上。

【図30-5】同上。

30

【図31】図31は、形質導入後の第4日（採取後の第3日）のモノCD19 CAR+細胞（%）、モノBCMA CAR+細胞（%）及び二重BCMA/CD19 CAR+細胞を示す棒グラフである。

【図32】T細胞サブセットの特性決定。図32は、インプット材料中、濃縮後材料中及び採取後第1日の材料中のCD4+T細胞、CD8+T細胞、ナイーブT細胞（Tn）、セントラルメモリーT細胞（Tcm）、エフェクターメモリーT細胞（Tem）及びCD45RAを再発現するエフェクターメモリーT細胞（Temra）の%を示すグラフである。

【図33-1】BCMA/CD19二重CART細胞産物、BCMA CART及びCD19 CART処置マウスの血漿IFN動態。それぞれのCAR-T用量のPBS、UTD、BCMA/CD19二重CART細胞産物、BCMA CART又はCD19 CARTで動物を処理した。マウスを採血し、MSDアッセイにより血漿サイトカインを測定した。

40

【図33-2】同上。

【発明を実施するための形態】

【0158】

定義

特に定義されない限り、本明細書で使用される全ての科学技術用語は、本発明が関係する技術分野の当業者が一般に理解するのと同じ意味を有する。

【0159】

50

用語「1つの(a)」及び「1つの(an)」は、その冠詞の文法上の指示対象の1つ又は1つより多い(すなわち少なくとも1つ)を指す。例として、「要素」は、1つの要素又は1つより多い要素を意味する。

【0160】

用語「約」は、量、時間的な継続期間などの計測可能な値を参照するとき、指定される値から±20%又は一部の例では±10%、又は一部の例では±5%、又は一部の例では±1%、又は一部の例では±0.1%の変動が、かかる変動が本開示の方法の実施に適切であるものとして包含されることを意味する。

【0161】

本発明の組成物及び方法は、指定された配列を有するポリペプチド及び核酸又はそれと実質的に同一若しくは類似の配列、例えば指定された配列と少なくとも85%、90%若しくは95%以上同一の配列を包含する。アミノ酸配列に関連して、用語「実質的に同一の」は、本明細書において、第1及び第2アミノ酸配列が共通の構造ドメイン及び/若しくは共通の機能活性を有し得るように、第2アミノ酸配列内のアラインメントされたアミノ酸残基とi)同一であるか、又はii)その保存的置換である十分な若しくは最小数のアミノ酸残基を含有する第1アミノ酸配列、例えば参照配列、例えば本明細書に記載の配列に対して少なくとも約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の同一性を有する共通の構造ドメインを含有するアミノ酸配列を指すために使用される。

10

【0162】

ヌクレオチド配列に関連して、用語「実質的に同一の」は、本明細書において、第1及び第2ヌクレオチド配列が共通の機能活性を有するポリペプチドをコードするか、又は共通の構造ポリペプチドドメイン若しくは共通の機能性ポリペプチド活性をコードするように、第2核酸配列内のアラインメントされたヌクレオチドと同一である十分な若しくは最小数のヌクレオチドを含有する第1核酸配列、例えば参照配列、例えば本明細書に記載の配列に対して少なくとも約75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の同一性を有するヌクレオチド配列を指すために使用される。

20

【0163】

用語「変異体」は、参照アミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するか、又は実質的に同一のヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドを指す。一部の実施形態では、変異体は、機能性変異体である。

30

【0164】

用語「機能性変異体」は、参照アミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するか、又は実質的に同一のヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドで、参照アミノ酸配列の1つ以上の活性を有し得るポリペプチドを指す。

【0165】

用語サイトカイン(例えば、IL-2、IL-7、IL-15、IL-21又はIL-6)は、完全長の天然に存在するサイトカイン、断片又は変異体、例えば機能性変異体(天然に存在するサイトカインの活性、例えば免疫調節活性の少なくとも10%、30%、50%若しくは80%を有するその断片及び機能性変異体を含む)を包含する。一部の実施形態では、サイトカインは、天然に存在するサイトカインと実質的に同一(例えば、少なくとも約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の同一性)であるか、又はサイトカインをコードする天然に存在するヌクレオチド配列と実質的に同一(例えば、少なくとも約75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の同一性)であるヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、文脈から理解される通り、サイトカインは、受容体ドメイン、例えばサイトカイン受容体ドメイン(例えば、IL-15/IL-15R)をさらに含む。

40

【0166】

50

本明細書で使用される場合、用語「BCMA」は、B細胞成熟抗原を指す。BCMA (TNFRSF17、BCM又はCD269としても知られる)は、腫瘍壊死因子受容体(TNFR)ファミリーのメンバーであり、主として、最終分化B細胞、例えば、メモリーB細胞及びプラズマ細胞上に発現される。そのリガンドは、TNFファミリーのB細胞活性化因子(BAFF)及び増殖誘発リガンド(APRIL)と呼ばれる。BCMAは、長期液性免疫を維持するための形質細胞の生存の媒介に関与する。BCMAの遺伝子は、染色体16上でコードされて、994ヌクレオチド長の一次mRNA転写物(NCBIアクセッション番号NM_001192.2)を産生し、これが、184アミノ酸のタンパク質(NP_001183.2)をコードする。BCMA遺伝子座に由来する第2アンチセンス転写物が記載されており、これは、BCMA発現の調節に特定の役割を果たし得る。(Laabi Y. et al., *Nucleic Acids Res.*, 1994, 22: 1147-1154)。別の転写物変異体が記載されているが、有意性は不明である(Smirnova AS et al., *Mol Immunol.*, 2008, 45(4): 1179-1183。TV4としても知られる第2アイソフォームが同定されている(Uniprot 識別子Q02223-2)。本明細書で使用される場合、「BCMA」は、完全長野生型BCMAの突然変異、例えば、点突然変異、断片、挿入、欠失及びスプライス変異体を含むタンパク質を包含する。

10

【0167】

「BCMAの発現に関連する疾患」という語句は、限定はされないが、BCMA (例えば、野生型若しくは変異型BCMA)を発現する細胞に関連する疾患又はBCMA (例えば、野生型若しくは変異型BCMA)を発現する細胞に関連する状態を含み、例えば、癌若しくは悪性疾患又は骨髄形成異常、骨髄異形成症候群若しくは前白血病のような前癌状態などの増殖性疾患；又はBCMA (例えば、野生型若しくは変異型BCMA)を発現する細胞に関連する非癌関連適応症が挙げられる。誤解を避けるために、BCMAの発現に関連する疾患は、例えば、BCMAをターゲティングする分子(例えば、本明細書に記載のBCMA阻害剤)を用いた処置により、例えばBCMA発現が下方制御されたため、BCMAを現在発現していないが、以前にBCMAを発現した細胞に関連する病態を含み得る。一態様では、BCMA (例えば、野生型又は変異型BCMA)の発現に関連する癌は、血液癌である。一態様では、血液癌は、白血病又はリンパ腫である。一態様では、BCMA (例えば、野生型又は変異型BCMA)の発現に関連する癌は、分化プラズマB細胞の悪性疾患である。一態様では、BCMA (例えば、野生型又は変異型BCMA)の発現に関連する癌は、限定されないが、例えば、B細胞急性リンパ性白血病(「BALL」)、T細胞急性リンパ性白血病(「TALL」)、急性リンパ性白血病(ALL)などの急性白血病；限定されないが、例えば、慢性骨髄性白血病(CML)、慢性リンパ球性白血病(CLL)などの慢性白血病を含む癌及び悪性疾患が挙げられるが、それらに限定されない。BCMA (例えば、野生型若しくは変異型BCMA)の発現に関連する別の癌又は血液癌は、限定されないが、例えば、B細胞前リンパ球性白血病、芽球性形質細胞様樹状細胞新生物、パーキットリンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、ヘアリー細胞白血病、小細胞型若しくは大細胞型濾胞性リンパ腫、悪性リンパ球増殖性病態、MALTリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、多発性骨髄腫、骨髄形成異常及び骨髄異形成症候群、非ホジキンリンパ腫、形質芽球性リンパ腫、形質細胞様樹状細胞新生物、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症を含み、さらには骨髄性血液細胞の不十分な生産(又は異形成)で一致する血液病態の多様な集合体である「前白血病」、なども含まれる。一部の実施形態では、癌は、多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫又は膠芽腫である。いくつかの実施形態では、BCMAの発現に関連する疾患は、形質細胞増殖異常症、例えば、無症候性骨髄腫(くすぶり型多発性骨髄腫又は無症候性骨髄腫)、意義不明の単クローン性グロブリン血症(MGUS)、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、形質細胞腫(例えば、形質細胞異常増殖症、孤立性骨髄腫、孤立性形質細胞腫、髄外性形質細胞腫及び多発性形質細胞腫)、全身性アミロイド軽鎖アミロイドーシス並びにPOEMS症候群(クロウ・深瀬症候群、高月病及びPEP

20

30

40

50

症候群としても知られている)を含む。BCMA(例えば、野生型若しくは変異型BCMA)の発現に関連するさらに別の疾患としては、限定されないが、例えば、BCMA(例えば、野生型若しくは変異型BCMA)の発現に関連する非定型及び/若しくは非古典的癌、悪性疾患、前癌状態又は増殖性疾患、例えば、本明細書に記載される癌、例えば、前立腺癌(例えば、去勢抵抗性若しくは治療抵抗性前立腺癌又は転移性前立腺癌)、膵臓癌又は肺癌が挙げられる。

【0168】

BCMA(例えば、野生型若しくは変異型BCMA)の発現に関連する非癌関連病態としては、ウイルス感染症;例えば、HIV、真菌感染症、例えば、C.ネオフォルマンズ(C. neoformans);自己免疫疾患;例えば、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス(SLE若しくは狼瘡)、尋常性天疱瘡及びシェーグレン症候群;炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎;粘膜免疫に関する移植関連アトピー的免疫障害;体液性免疫が重要である場合の生物製剤(例えば、第VII因子)に対する不要な免疫反応が挙げられる。いくつかの実施形態では、BCMAの発現に関連する非癌関連適応症として、限定されないが、例えば、自己免疫疾患(例えば、狼瘡)、炎症性疾患(アレルギー及び喘息)並びに移植が挙げられる。一部の実施形態では、腫瘍抗原発現細胞は、腫瘍抗原をコードするmRNAを発現するか又はいつでも発現した。一実施形態では、腫瘍抗原発現細胞は、腫瘍抗原タンパク質(例えば、野生型若しくは変異型)を産生し、腫瘍抗原タンパク質は、正常レベル又は低いレベルで存在し得る。一実施形態では、腫瘍抗原発現細胞は、ある時点で検出可能なレベルの腫瘍抗原タンパク質を産生したが、その後、検出可能な腫瘍抗原タンパク質を実質的に産生しなかった。

10

20

【0169】

用語「キメラ抗原受容体」若しくは代替的に「CAR」又は「CAR分子」は、下に定義されるような、少なくとも細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン及び刺激性分子由来の機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞質シグナル伝達ドメイン(本明細書では「細胞内シグナル伝達ドメイン」とも称する)を含む組換えポリペプチド構築物を指す。一部の実施形態では、CARポリペプチド構築物中のドメインは、同じポリペプチド鎖内に例えばキメラ融合タンパク質を含む。一部の実施形態では、CARポリペプチド構築物内のドメインは、互いに隣接しておらず、例えば異なるポリペプチド鎖内、例えば本明細書に記載される通りRCAR内に提供される。

30

【0170】

一部の実施形態において、細胞質シグナル伝達ドメインは、一次シグナル伝達ドメイン(例えば、CD3の一次シグナル伝達ドメイン)を含む。一部の実施形態では、細胞質シグナル伝達ドメインは、下に定義するような少なくとも1つの共刺激分子由来の1つ以上の機能的シグナル伝達ドメインをさらに含む。一部の実施形態では、共刺激分子は、41BB(すなわちCD137)、CD27、ICOS及び/又はCD28から選択される。一部の実施形態では、CARは、細胞外抗原認識ドメインを含むキメラ融合タンパク質、膜貫通ドメイン及び刺激性分子由来の機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態では、CARは、細胞外抗原認識ドメインを含むキメラ融合タンパク質、膜貫通ドメイン並びに共刺激分子由来の機能的シグナル伝達ドメイン及び刺激性分子由来の機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態では、CARは、細胞外抗原認識ドメインを含むキメラ融合タンパク質、膜貫通ドメイン並びに1つ以上の共刺激分子由来の2つの機能的シグナル伝達ドメイン及び刺激性分子由来の機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態では、CARは、CAR融合タンパク質のアミノ末端(N末端)に任意選択のリーダー配列を含む。一部の実施形態では、CARは、細胞外抗原認識ドメインのN末端のリーダー配列をさらに含み、このリーダー配列は、細胞プロ

40

50

セシング及びCARの細胞膜への局在化中に抗原認識ドメイン（例えば、scFv）から任意選択で切断される。

【0171】

本明細書に記載のものなどの特定の腫瘍抗原X（ここで、Xは、本明細書に記載されるような腫瘍マーカーであり得る）を標的とする抗原結合ドメイン（例えば、scFv、単一ドメイン抗体又はTCR（例えば、TCR結合ドメイン若しくはTCR結合ドメイン））を含むCARは、XCARとも称される。例えば、BCMAを標的とする抗原結合ドメインを含むCARは、BCMA CARと称される。CARは、任意の細胞、例えば本明細書に記載される免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞若しくはNK細胞）に発現され得る。

10

【0172】

「シグナル伝達ドメイン」という用語は、セカンドメッセンジャーを生成することにより、又はそのようなメッセンジャーに応答することによりエフェクターとして機能することにより、特定されたシグナル伝達経路を介して細胞活性を調節するために細胞内で情報を伝達することにより作用するタンパク質の機能的部分を指す。

【0173】

用語「抗体」は、本明細書で使用されるとき、抗原と特異的に結合する免疫グロブリン分子に由来するタンパク質又はポリペプチド配列を指す。抗体は、ポリクローナル又はモノクローナル、多重鎖又は単鎖又はインタクトな免疫グロブリンであり得、及び天然の供給源又は組換え供給源に由来し得る。抗体は、免疫グロブリン分子の四量体であり得る。

20

【0174】

用語「抗体フラグメント」は、インタクトな抗体の少なくとも一部又はその組換え変異体を指し、また標的、例えば抗原に対し、抗体フラグメントの認識及び特異的結合を付与する上で十分な抗原結合ドメイン、例えばインタクトな抗体の抗原決定可変領域を指す。抗体フラグメントの例は、Fab、Fab'、F(ab')₂及びFvフラグメント、scFv抗体フラグメント、線形抗体、sdAbなどの単一ドメイン抗体（VL又はVHのいずれか）、ラクダ科VHHドメイン並びにヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つ以上、例えば2つのFabフラグメント又は連結された抗体の2つ以上、例えば2つの単離CDR若しくは他のエピトープフラグメントを含む二価フラグメントなどの抗体フラグメントから形成される多特異性抗体を含むが、これらに限定されない。抗体フラグメントは、シングルドメイン抗体、マキシボディ、ミニボディ、ナノボディ、イントラボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、v-NAR及びビス-scFvにも取り込まれ得る（例えば、Hollinger and Hudson, Nature Biotechnology 23: 1126-1136, 2005を参照されたい）。抗体フラグメントは、フィブロネクチンIII型（Fn3）などのポリペプチドをベースとする足場にもグラフトされ得る（フィブロネクチンポリペプチドミニボディについて記載している米国特許第6,703,199号明細書を参照されたい）。用語「scFv」は、軽鎖の可変領域を含む少なくとも1つの抗体フラグメントと、重鎖の可変領域を含む少なくとも1つの抗体フラグメントとを含む融合タンパク質を指し、軽鎖及び重鎖可変領域は、短い可動性ポリペプチドリンカーによって近接して連結され、単鎖ポリペプチドとして発現することが可能であり、及びscFvは、その由来であるインタクトな抗体の特異性を保持している。指定されない限り、本明細書で使用されるとき、scFvは、VL及びVH可変領域を例えばポリペプチドのN端側及びC端側末端に対していずれの順序でも有し得、scFvは、VL-リンカー-VHを含み得るか又はVH-リンカー-VLを含み得る。

30

40

【0175】

一部の実施形態では、scFvは、NH₂-VL-リンカー-VH-COOH又はNH₂-VH-リンカー-VL-COOHの構造を含み得る。

【0176】

本明細書で使用される「相補性決定領域」又は「CDR」という用語は、抗原特異性及

50

び結合親和性を与える抗体可変領域内のアミノ酸の配列を指す。例えば、一般に、各重鎖可変領域（例えば、HCDR1、HCDR2及びHCDR3）には3つのCDRがあり、各軽鎖可変領域（LCDR1、LCDR2及びLCDR3）には3つのCDRがある。ある所与のCDRの厳密なアミノ酸配列境界は、Kabata et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (「Kabata」番号付けスキーム)、Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273, 927-948 (「Chothia」番号付けスキーム)により記載のもの又はその組み合わせを含む、多くの周知のスキームのいずれかを使用して決定できる。KabataとChothiaを組み合わせた番号付けスキームでは、一部の実施形態において、CDRは、Kabata CDRの一部、Chothia CDRの一部又はその両方であるアミノ酸残基に対応する。

10

【0177】

抗体又はその抗体フラグメントを含む本発明のCAR組成物の部分は、種々の形態で存在し得、例えば、ここで、抗原結合ドメインは、例えば、単ドメイン抗体フラグメント(sdAb)、単鎖抗体(scFv)又は例えばヒト型若しくはヒト化抗体を含め、ポリペプチド鎖の一部として発現する(Harlow et al., 1999, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242: 423-426)。一部の実施形態では、本発明のCARの抗原結合ドメインは、抗体フラグメントを含む。一部の実施形態では、CARは、scFvを含む抗体フラグメントを含む。

20

【0178】

本明細書で使用されるとき、用語「結合ドメイン」又は「抗体分子」（本明細書では「抗標的結合ドメイン」とも称される）は、少なくとも1つの免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むタンパク質、例えば免疫グロブリン鎖又はそのフラグメントを指す。用語「結合ドメイン」又は「抗体分子」は、抗体及び抗体フラグメントを包含する。一部の実施形態では、抗体分子は、多重特異性抗体分子であり、例えば、これは、複数個の免疫グロブリン可変ドメイン配列を含み、ここで、複数のうちの第1の免疫グロブリン可変ドメイン配列が第1のエピトープに対する結合特異性を有し、複数のうちの第2の免疫グロブリン可変ドメイン配列が第2のエピトープに対する結合特異性を有する。ある実施形態において、多重特異性抗体分子は、二重特異性抗体分子である。二重特異性抗体は、2つ以下の抗原に対して特異性を有する。二重特異性抗体分子は、第1のエピトープに対して結合特異性を有する第1の免疫グロブリン可変ドメイン配列と、第2のエピトープに対して結合特異性を有する第2の免疫グロブリン可変ドメイン配列を特徴とする。

30

【0179】

用語「二重特異性抗体」及び「複数の二重特異性抗体」は、単一分子内の2つの抗体の抗原結合部位を結合させる分子を指す。従って、二重特異性抗体は、同時又は順次2つの異なる抗体に結合することができる。二重特異性抗体を作製する方法は、当技術分野で公知である。2つの抗体を結合させる様々なフォーマットも当技術分野で公知である。本発明の二重特異性抗体の形態としては、当業者には周知のように、ダイアボディ、単鎖抗体、Fab二量体化(Fab-Fab)、Fab-scFv及びタンデム抗体が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0180】

用語「抗体重鎖」は、その天然に存在するコンホメーションで抗体分子に存在する2種類のポリペプチド鎖の大きい方を指し、通常、これが抗体の属するクラスを決定する。

50

【0181】

用語「抗体軽鎖」は、その天然に存在するコンホメーションで抗体分子に存在する2種類のポリペプチド鎖の小さい方を指す。カップ()及びラムダ()軽鎖が2つの主要な抗体軽鎖アイソタイプを指す。

【0182】

用語「組換え抗体」は、例えば、バクテリオファージ又は酵母発現システムによって発現される抗体など、組換えDNA技術を用いて作成される抗体を指す。この用語は、抗体をコードするDNA分子であって、抗体タンパク質を発現するDNA分子又はその抗体を指定するアミノ酸配列の合成によって作成された抗体を意味するとも解釈されるべきであり、DNA又はアミノ酸配列は、当技術分野において利用可能な周知の組換えDNA又はアミノ酸配列技術を用いて得られたものである。

10

【0183】

用語「抗原」又は「Ag」は、免疫応答を引き起こす分子を指す。この免疫応答には、抗体産生又は特異的免疫適格細胞の活性化のいずれか又は両方が含まれ得る。当業者は、任意の巨大分子が、事実上あらゆるタンパク質又はペプチドを含め、抗原となり得ることを理解するであろう。さらに、抗原は、組換えDNA又はゲノムDNAに由来し得る。当業者は、従って、免疫応答を生じさせるタンパク質をコードするヌクレオチド配列又は部分的ヌクレオチド配列を含む任意のDNAが、その用語が本明細書において使用される通りの「抗原」をコードすることを理解するであろう。さらに、当業者は、抗原がある遺伝子の完全長ヌクレオチド配列によってのみコードされる必要はないことを理解するであろう。本発明には、限定されないが、2つ以上の遺伝子の部分的ヌクレオチド配列の使用が含まれること、及びそれらのヌクレオチド配列が所望の免疫応答を生じさせるポリペプチドをコードするように様々な組み合わせで配列されることが容易に明らかである。さらに、当業者は、抗原が「遺伝子」によってコードされる必要は全くないことを理解するであろう。抗原は、合成して作成され得るか、又は生体試料から得られ得るか、又はポリペプチド以外の巨大分子である可能性もあることが容易に明らかである。かかる生体試料には、限定されないが、組織試料、腫瘍試料、細胞又は体液が他の生物学的成分と共に含まれ得る。

20

【0184】

用語「抗腫瘍効果」及び「抗癌効果」は、互換的に使用され、限定されないが、例えば腫瘍体積若しくは癌体積の減少、腫瘍細胞若しくは癌細胞の数の減少、転移の数の減少、平均余命の増加、腫瘍細胞増殖若しくは癌細胞増殖の低減、腫瘍細胞生存若しくは癌細胞生存の低減又は癌性病態に関連する多様な生理学的症状の改善を含む様々な手段によって現れ得る生物学的効果を指す。「抗腫瘍効果」又は「抗癌効果」は、本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、細胞及び抗体が腫瘍又は癌の発生を予防する能力によってもまず現れ得る。

30

【0185】

用語「自己」は、同じ個体に由来する任意の材料であって、後にその個体に再導入されることになる材料を指す。

【0186】

用語「同種異系」は、材料が導入される個体と同じ種の異なる動物に由来する任意の材料を指す。2つ以上の個体は、1つ以上の遺伝子座の遺伝子が同一でないとき、互いに同種異系であると言われる。一部の実施形態において、同じ種の個体からの同種異系材料は、抗原的に相互作用するのに十分に遺伝的に異なり得る。

40

【0187】

用語「異種」は、異なる種の動物に由来するグラフトを指す。

【0188】

本明細書で使用される用語「アフエレーシス」は、ドナー又は患者の血液をドナー又は患者から採取して、選択した特定の成分を分離する装置に通過させた後、例えば再輸血によって残りをドナー又は患者に戻すという、当技術分野で承認されている体外処置を指す

50

。従って、「アフエレーシスサンプル」に関連して、アフエレーシスを用いて得られたサンプルを指す。

【0189】

用語「癌」は、異常細胞の急速且つ無制御の成長によって特徴付けられる疾患を指す。癌細胞は、局所的に又は血流及びリンパ系を通じて体の他の部位に広がり得る。様々な癌の例が本明細書に記載され、限定されないが、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、皮膚癌、膵癌、結腸直腸癌、腎癌、肝癌、脳癌、リンパ腫、白血病、肺癌などが挙げられる。一部の実施形態では、本明細書に記載の方法で処置される癌は、多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫又は非ホジキンリンパ腫を含む。

【0190】

用語「腫瘍」及び「癌」は、本明細書では同義的に使用され、例えば、両方の用語とも固形及び液性、例えばびまん性又は循環性腫瘍を包含する。本明細書で使用されるとき、用語「癌」又は「腫瘍」は、前癌性並びに悪性の癌及び腫瘍を含む。

【0191】

「由来する」は、この用語が本明細書で使用される場合、第1の分子と第2の分子との間の関係を指す。これは、概して、第1の分子と第2の分子との間の構造的類似性に言及するものであり、第2の分子に由来する第1の分子に関する方法又は供給源を限定することを含意又は包含しない。例えば、CD3分子に由来する細胞内シグナル伝達ドメインの場合、細胞内シグナル伝達ドメインは、求められる機能、すなわち適切な条件下でシグナルを生成する能力を有するような十分なCD3構造を保持している。これは、細胞内シグナル伝達ドメインの特定の作製方法に限定することを含意又は包含せず、例えば細胞内シグナル伝達ドメインを提供するためにCD3配列で開始して不要な配列を欠失させるか、又は変異を付与して細胞内シグナル伝達ドメインに至らせなければならないことを意味しない。

【0192】

用語「保存的配列改変」は、そのアミノ酸配列を含む抗体又は抗体フラグメントの結合特性が大きい影響又は変化を被ることのないアミノ酸改変を指す。かかる保存的改変には、アミノ酸置換、付加及び欠失が含まれる。改変は、部位特異的突然変異誘発及びPCR媒介性突然変異誘発など、当技術分野において公知の標準技法によって本発明の抗体又は抗体フラグメントに導入することができる。保存的置換は、アミノ酸残基が同様の側鎖を有するアミノ酸残基に置き換えられるものである。同様の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野において定義されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、分枝側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸が含まれる。従って、本発明のCAR内の1つ以上のアミノ酸残基は、同じ側鎖ファミリーからの他のアミノ酸残基に置き換えることができ、及び変化したCARは、本明細書に記載される機能アッセイを用いて試験することができる。

【0193】

刺激及び/又は共刺激分子による刺激に関連して、用語「刺激」は、刺激性分子（例えば、TCR/CD3複合体）及び/又は共刺激分子（例えば、C28若しくは4-1BB）とその同族のリガンドとの結合によって誘導される応答、例えば一次若しくは二次応答を指し、それにより、限定されないが、TCR/CD3複合体を介したシグナル伝達などのシグナル伝達事象を媒介する。刺激は、特定の分子の発現変化及び/又は細胞骨格構造の再組織化などを媒介することができる。

【0194】

用語「刺激性分子」は、T細胞によって発現され、T細胞シグナル伝達経路の少なくとも

10

20

30

40

50

もいくつかの態様について、TCR複合体の一次活性化を調節する一次細胞質シグナル伝達配列を提供する分子を指す。一部の実施形態では、CAR内のITAM含有ドメインは、内因性TCR複合体とは独立に一次TCRのシグナル伝達を反復する。一部の実施形態では、一次シグナルは、例えば、TCR/CD3複合体と、ペプチドを載せたMHC分子との結合により開始される一次シグナルであり、これは、限定されないが、増殖、活性化、分化などを含むT細胞応答の媒介をもたらす。刺激性様式で作用する初代細胞質シグナル伝達配列（「一次シグナル伝達ドメイン」とも称される）は、免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ又はITAMとして知られるシグナル伝達モチーフを含み得る。本発明において特に有用であるITAM含有初代細胞質シグナル伝達配列の例としては、TCR、FcR、FcR、CD3、CD3、CD3、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278（「ICOS」としても知られる）、FcRI及びCD66d、DAP10及びDAP12由来のものが挙げられるが、これらに限定されるわけではない。本発明の具体的なCARにおいて、本発明の任意の1つ以上のCARの細胞内シグナル伝達ドメインは、細胞内シグナル伝達配列、例えばCD3-の一次シグナル伝達配列を含む。用語「抗原提示細胞」又は「APC」は、その表面上に主要組織適合遺伝子複合体（MHC）と複合体化した外来抗原を提示するアクセサリ細胞などの免疫系細胞（例えば、B細胞、樹状細胞など）を指す。T細胞は、そのT細胞受容体（TCR）を用いてこうした複合体を認識し得る。APCは、抗原をプロセッシングしてそれをT細胞に提示する。

10

【0195】

20

「細胞内シグナル伝達ドメイン」は、この用語が本明細書で使用されるとき、分子の細胞内部分を指す。実施形態において、細胞内シグナルドメインは、エフェクター機能シグナルを形質導入し、細胞に特殊な機能を果たすよう指示する。細胞内シグナル伝達ドメイン全体を用いることができるが、多くの場合、鎖全体を使用する必要はない。細胞内シグナル伝達ドメインの切断された一部を使用する範囲内で、このような切断された一部を、それがエフェクター機能シグナルを伝達する限り、完全鎖の代わりに使用し得る。用語細胞内シグナル伝達ドメインは、そのため、エフェクター機能シグナルの伝達に十分な細胞内シグナル伝達ドメインのあらゆる切断された一部を含むことを意図する。

【0196】

細胞内シグナル伝達ドメインは、CAR含有細胞、例えばCAR-T細胞の免疫エフェクター機能を促進するシグナルを生成する。例えば、CAR-T細胞の免疫エフェクター機能の例として、細胞溶解活性及びサイトカインの分泌を含めたヘルパー活性が挙げられる。

30

【0197】

一部の実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインは、一次細胞内シグナル伝達ドメインを含み得る。例示的一次細胞内シグナル伝達ドメインには、一次刺激又は抗原依存性刺激に関する分子に由来するものが含まれる。一部の実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激細胞内ドメインを含み得る。例示的共刺激細胞内シグナル伝達ドメインには、共刺激シグナル又は抗原非依存性刺激に関する分子に由来するものが含まれる。例えば、CAR-Tの場合、一次細胞内シグナル伝達ドメインがT細胞受容体の細胞質配列を含むことができ、及び共刺激細胞内シグナル伝達ドメインが共受容体又は共刺激分子からの細胞質配列を含むことができる。

40

【0198】

一次細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫受容体活性化チロシンモチーフ又はITAMとして知られるシグナル伝達モチーフを含むことができる。ITAMを含む一次細胞質シグナル伝達配列の例には、限定されないが、CD3、FcR、FcR、CD3、CD3、CD3、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278（「ICOS」としても知られる）、FcRI、CD66d、DAP10及びDAP12に由来するものが含まれる。

【0199】

用語「」若しくは代替的に「鎖」、「CD3-」又は「TCR-」は、CD2

50

47を指す。Swiss-Prot受託番号P20963は、例示的なヒトCD3 アミノ酸配列を提供する。「刺激ドメイン」若しくは代替的に「CD3 - 刺激ドメイン」又は「TCR - 刺激ドメイン」は、CD3 又はその変異体（例えば、突然変異、例えば点突然変異、フラグメント、挿入若しくは欠失を有する分子）の刺激ドメインを指す。一部の実施形態では、の細胞質ドメインは、GenBank受託番号BAG36664 . 1の残基52～164又はその変異体（例えば、突然変異、例えば点突然変異、フラグメント、挿入若しくは欠失を有する分子）を含む。一部の実施形態では、「刺激ドメイン」又は「CD3 - 刺激ドメイン」は、配列番号9若しくは10として提供される配列又はその変異体（例えば、突然変異、例えば点突然変異、フラグメント、挿入若しくは欠失を有する分子）である。

10

【0200】

「共刺激分子」という用語は、共刺激リガンドと特異的に結合し、それにより、T細胞の、限定されないが、増殖などによる共刺激応答を媒介する、T細胞上の同族結合パートナーを指す。共刺激分子は、効率的な免疫応答に必要な抗原受容体又はそのリガンド以外の細胞表面分子である。共刺激分子は、MHCクラスI分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ性活性化分子（SLAMタンパク質）、活性化NK細胞受容体、BTLA、Tollリガンド受容体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、LFA-1（CD11a/CD18）、4-1BB（CD137）、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS（CD278）、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM（LIGHTR）、KIRDS2、SLAMF7、NKp80（KLRF1）、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8、CD8、IL2R、IL2R、IL7R、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1（CD226）、SLAMF4（CD244、2B4）、CD84、CD96（Tactile）、CEACAM1、CRTAM、Ly9（CD229）、CD160（BY55）、PSGL1、CD100（SEMA4D）、CD69、SLAMF6（NTB-A、Ly108）、SLAM（SLAMF1、CD150、IPO-3）、BLAME（SLAMF8）、SELP LG（CD162）、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、CD28-OX40、CD28-4-1BB及びCD83と特異的に結合するリガンドを含むが、これらに限定されるものではない。

20

30

【0201】

共刺激細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激分子の細胞内部分を指す。

【0202】

細胞内シグナル伝達ドメインは、それが由来する分子の細胞内部分全体若しくは天然の細胞内シグナル伝達ドメイン全体又はその機能的フラグメントを含み得る。

40

【0203】

用語「4-1BB」は、CDR137又は腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー9を指す。Swiss-Prot受託番号P20963は、例示的なヒト4-1BBアミノ酸配列を提供する。「4-1BB共刺激ドメイン」は、4-1BBの共刺激ドメイン又はその変異体（例えば、突然変異、例えば点突然変異、フラグメント、挿入若しくは欠失を有する分子）を指す。一部の実施形態では、「4-1BB共刺激ドメイン」は、配列番号7として提供される配列又はその変異体（例えば、突然変異、例えば点突然変異、フラグメント、挿入若しくは欠失を有する分子）である。

【0204】

「免疫エフェクター細胞」は、その用語が本明細書で使用される場合、免疫応答、例え

50

ば、免疫エフェクター応答の促進に関与する細胞を指す。免疫エフェクター細胞の例には、T細胞、例えば / T細胞及び / T細胞、B細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、ナチュラルキラーT（NK T）細胞、肥満細胞及び骨髄球由来食細胞が含まれる。

【0205】

「免疫エフェクター機能又は免疫エフェクター応答」は、この用語が本明細書で使用されるとき、標的細胞の免疫攻撃を亢進させる又は促進する例えば免疫エフェクター細胞の機能又は応答を指す。例えば、免疫エフェクター機能又は応答は、標的細胞の死滅又は成長若しくは増殖阻害を促進するT細胞又はNK細胞の特性を指す。T細胞の場合、一次刺激及び共刺激が免疫エフェクター機能又は応答の例である。

【0206】

用語「エフェクター機能」は、細胞の特殊化された機能を指す。T細胞のエフェクター機能は、例えば、細胞溶解活性又はサイトカインの分泌を含むヘルパー活性であり得る。

【0207】

用語「コードする」は、定義付けられたヌクレオチド配列（例えば、rRNA、tRNA及びmRNA）又は定義付けられたアミノ酸配列のいずれかを有する生物学的過程における他のポリマー及び巨大分子の合成の鋳型としての役割を果たす、遺伝子、cDNA又はmRNAなど、ポリヌクレオチド内の特異的ヌクレオチド配列の固有の特性及びそれによってもたらされる生物学的特性を指す。従って、遺伝子、cDNA又はRNAは、その遺伝子に対応するmRNAの転写及び翻訳によって細胞又は他の生体系のタンパク質が産生される場合にタンパク質をコードする。そのヌクレオチド配列がmRNA配列と同一の且つ通常配列表に提供されるものであるコード鎖及び遺伝子又はcDNAの転写鋳型として使用される非コード鎖の両方は、その遺伝子のcDNAのタンパク質又は他の産物をコードすると称することができる。

【0208】

特記されない限り、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」は、互いの縮重バージョンであり、同じアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の全てを含む。タンパク質又はRNAをコードするヌクレオチド配列という語句には、そのタンパク質をコードするヌクレオチド配列が何らかのバージョンで1つ又は複数のイントロンを含み得る限りにおいて、イントロンも含まれ得る。

【0209】

用語「有効量」又は「治療有効量」は、本明細書において互換的に使用され、特定の生物学的結果を達成する上で有効である、本明細書に記載の化合物、製剤、材料若しくは組成物の量を指す。

【0210】

「内因性」という用語は、生物体、細胞、組織若しくは系からの又はその内部で生成された任意の物質を指す。

【0211】

用語「外因性」は、生物、細胞、組織又は系の外側から導入されるか又はその外側で産生される任意の材料を指す。

【0212】

用語「発現」は、特定のヌクレオチド配列の転写及び / 又は翻訳を指す。一部の実施形態では、発現は、細胞に導入されたmRNAの翻訳を含む。

【0213】

用語「トランスファーベクター」は、単離核酸を含む組成物であって、細胞内部への単離核酸の送達に使用し得る組成物を指す。当技術分野では、限定されないが、線状ポリヌクレオチド、イオン性又は両親媒性化合物に関連するポリヌクレオチド、プラスミド及びウイルスを含め、多くのベクターが公知である。従って、用語「トランスファーベクター」には自己複製プラスミド又はウイルスが含まれる。この用語は、例えば、ポリリジン化合物、リボソームなど、細胞への核酸のトランスファーを促進する非プラスミド及び非ウイルス化合物もさらに含むものと解釈されなければならない。ウイルストランスファーベ

10

20

30

40

50

クターの例としては、限定されないが、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターなどが挙げられる。

【0214】

用語「発現ベクター」は、発現させるヌクレオチド配列に作動可能に連結した発現制御配列を含む組換えポリヌクレオチドを含むベクターを指す。発現ベクターは、発現に十分なシス作用エレメントを含み、他の発現用エレメントは、宿主細胞によって供給されるか、又はインビトロ発現系に供給され得る。発現ベクターには、組換えポリヌクレオチドを組み込むコスミド、プラスミド（例えば、ネイキッド又はリポソームに含まれる）及びウイルス（例えば、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス及びアデノ随伴ウイルス）を含め、当技術分野において公知のもの全てが含まれる。

10

【0215】

用語「レンチウイルス」は、レトロウイルス科（*Retroviridae*）の属を指す。レンチウイルスは、非分裂細胞を感染させることができる点でレトロウイルスの中でユニークであり、レンチウイルスは、宿主細胞のDNAに多量の遺伝情報を送達することができ、そのため、遺伝子デリバリーベクターの最も効率的な方法の1つである。HIV、SIV及びFIVは、全てレンチウイルスの例である。

【0216】

用語「レンチウイルスベクター」は、特に、Milone et al., *Mol. Ther.* 17 (8) : 1453 - 1464 (2009) に提供される通りの自己不活性化レンチウイルスベクターを含め、レンチウイルスゲノムの少なくとも一部分に由来するベクターを指す。臨床で使用し得るレンチウイルスベクターの他の例としては、限定されないが、例えばOxford BiomedicaからのLENTIVECTOR（登録商標）遺伝子デリバリー技術、LentigenからのLENTIMAX（商標）ベクターシステムなどが挙げられる。非臨床タイプのレンチウイルスベクターも利用可能であり、当業者に公知であろう。

20

【0217】

用語「相同」又は「同一性」は、2つのポリマー分子間、例えば2つのDNA分子又は2つのRNA分子など、2つの核酸分子間又は2つのポリペプチド分子間におけるサブユニット配列同一性を指す。2つの分子の両方におけるサブユニット位置が同じ単量体サブユニットによって占有されるとき、例えば、2つのDNA分子の各々の位置がアデニンによって占有される場合、それらは、その位置で相同又は同一である。2つの配列間の相同性は、一致する位置又は相同な位置の数の直接の関数である。例えば、2つの配列における位置の半分（例えば、10サブユニット長のポリマーにおける5個の位置）が相同である場合、それらの2つの配列は、50%相同である。位置の90%（例えば、10個中9個）が一致するか又は相同である場合、それらの2つの配列は、90%相同である。

30

【0218】

「ヒト化」形態の非ヒト（例えば、マウス）抗体は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖又はそのフラグメント（抗体のFv、Fab、Fab'、F(ab')₂又は他の抗原結合部分配列など）である。ほとんどの場合、ヒト化抗体及びその抗体フラグメントは、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体又は抗体フラグメント）においてレシピエントの相補決定領域（CDR）からの残基が所望の特異性、親和性及び能力を有するマウス、ラット又はウサギなどの非ヒト種（ドナー抗体）のCDRからの残基に置き換えられているものである。一部の例では、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域（FR）残基が対応する非ヒト残基に置き換えられる。さらに、ヒト化抗体/抗体フラグメントは、レシピエント抗体にも、移入されるCDR又はフレームワーク配列にも見られない残基を含むことができる。これらの改変は抗体又は抗体フラグメントの性能をさらに精緻化及び最適化し得る。一般に、ヒト化抗体又はその抗体フラグメントは、少なくとも1つ及び典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含むことになり、CDR領域の全て又は実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、及びFR領域の全て又は大部分がヒト免疫グロブリン配列のものである。

40

50

ヒト化抗体又は抗体フラグメントは、免疫グロブリン定常領域 (Fc)、典型的にはヒト免疫グロブリンのFcの少なくとも一部分も含むことができる。さらなる詳細については、Jones et al., Nature, 321: 522 - 525, 1986; Reichmann et al., Nature, 332: 323 - 329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593 - 596, 1992を参照されたい。

【0219】

「完全にヒト」は、分子全体がヒト起源であるか、又はヒト形態の抗体又は免疫グロブリンと同一のアミノ酸配列からなる抗体又は抗体フラグメントなどの免疫グロブリンを指す。

10

【0220】

用語「単離されている」は、自然状態から改変されているか又は取り出されていることを意味する。例えば、生きている動物に天然に存在する核酸又はペプチドは、「単離されている」のではないが、その自然状態の共存する材料から部分的又は完全に分離された同じ核酸又はペプチドは、「単離されている」。単離核酸又はタンパク質は、実質的に精製された形態で存在することができるか、又は例えば宿主細胞など、非天然環境中に存在することができる。

【0221】

本発明との関連において、一般的に存在する核酸塩基に関して以下の略称が使用される。「A」は、アデノシンを指し、「C」は、シトシンを指し、「G」は、グアノシンを指し、「T」は、チミジンを指し、及び「U」は、ウリジンを指す。

20

【0222】

用語「作動可能に連結された」又は「転写制御」は、調節配列と異種核酸配列との間における後者の発現をもたらす機能的な連結を指す。例えば、第1の核酸配列が第2の核酸配列と機能的に関係した状態に置かれているとき、第1の核酸配列は、第2の核酸配列と作動可能に連結される。例えば、プロモーターがコード配列の転写又は発現に影響を及ぼす場合、プロモーターは、コード配列に作動可能に連結される。作動可能に連結されるDNA配列は、互いに連続し得、例えば2つのタンパク質コード領域をつなぎ合わせる必要がある場合、同じリーディングフレーム内にある。

【0223】

免疫原性組成物の「非経口」投与という用語は、例えば、皮下 (s.c.)、静脈内 (i.v.)、筋肉内 (i.m.)、又は胸骨内注射、腫瘍内、又は輸注技法を含む。

30

【0224】

用語「核酸」、「核酸分子」、「ポリペプチド」又は「ポリヌクレオチド分子」は、一本鎖又は二本鎖のいずれかの形態のデオキシリボ核酸 (DNA) 又はリボ核酸 (RNA) 及びそれらのポリマーを指す。具体的に限定しない限り、この用語には、参照核酸と同様の結合特性を有し、且つ天然に存在するヌクレオチドと同じように代謝される、天然ヌクレオチドの公知の類似体を含む核酸が包含される。一部の実施形態では、「核酸」、「核酸分子」、「ポリペプチド」又は「ポリヌクレオチド分子」は、ヌクレオチド/ヌクレオシド誘導体又は類似体を含む。別に指示のない限り、特定の核酸配列は、黙示的に、その保存的に改変された変異体 (例えば、縮重コドン置換、例えば保存的置換)、アレル、オルソログ、SNP及び相補配列並びに明示的に指示される配列も包含する。具体的には、縮重コドン置換、例えば保存的置換は、1つ以上の選択された (又は全ての) コドンの3番目の位置が、混合塩基及び/又はデオキシイノシン残基で置換されている配列を作製することによって達成し得る (Batzner et al., Nucleic Acid Res. 19: 5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260: 2605 - 2608 (1985); 及びRossolini et al., Mol. Cell. Probes 8: 91 - 98 (1994))。

40

【0225】

用語「ペプチド」、「ポリペプチド」及び「タンパク質」は、同義的に使用され、ペプ

50

チド結合によって共有結合的に連結したアミノ酸残基で構成される化合物を指す。タンパク質又はペプチドは、少なくとも2つのアミノ酸を含有しなければならず、タンパク質の配列又はペプチドの配列を含むことのできるアミノ酸の最大数に制限はない。ポリペプチドは、互いにペプチド結合によってつなぎ合わされた2つ以上のアミノ酸を含む任意のペプチド又はタンパク質を含む。本明細書で使用されるとき、この用語は、当技術分野では一般に例えばペプチド、オリゴペプチド及びオリゴマーとも称される短鎖と、当技術分野では概してタンパク質と称される、多数の種類があるより長い鎖との両方を指す。「ポリペプチド」には、例えば、生物学的に活性なフラグメント、実質的に相同なポリペプチド、オリゴペプチド、ホモ二量体、ヘテロ二量体、ポリペプチドの変異体、修飾ポリペプチド、誘導體、類似体、融合タンパク質が特に含まれる。ポリペプチドには、天然ペプチド、組換えペプチド又はこれらの組み合わせが含まれる。

10

【0226】

用語「プロモーター」は、ポリヌクレオチド配列の特異的転写を開始させるのに必要である、細胞の合成機構又は導入された合成機構によって認識されるDNA配列を指す。

【0227】

用語「プロモーター/調節配列」は、そのプロモーター/調節配列に作動可能に連結された遺伝子産物の発現に必要な核酸配列を指す。一部の例では、この配列は、コアプロモーター配列であり得、他の例では、この配列は、エンハンサー配列及び遺伝子産物の発現に必要な他の調節エレメントも含み得る。プロモーター/調節配列は、例えば、遺伝子産物を組織特異的に発現するものであり得る。

20

【0228】

用語「構成的」プロモーターは、遺伝子産物をコードするか又はそれを指定するポリヌクレオチドと作動可能に連結されるとき、細胞のほとんど又は全ての生理条件下で細胞において遺伝子産物の産生を生じさせるヌクレオチド配列を指す。

【0229】

用語「誘導性」プロモーターは、遺伝子産物をコードするか又はそれを指定するポリヌクレオチドと作動可能に連結されるとき、実質的にプロモーターに対応する誘発物質が細胞に存在する場合に限り細胞において遺伝子産物の産生を生じさせるヌクレオチド配列を指す。

【0230】

用語「組織特異的」プロモーターは、遺伝子をコードするか又はそれによって指定されるポリヌクレオチドと作動可能に連結されるとき、実質的に細胞がプロモーターに対応する組織型の細胞である場合に限り細胞において遺伝子産物の産生を生じさせるヌクレオチド配列を指す。

30

【0231】

用語「癌関連抗原」、「腫瘍抗原」、「過剰増殖性障害抗原」及び「過剰増殖性障害に関連する抗原」は、互換的に、特定の過剰増殖性障害に共通の抗原を指す。一部の実施形態では、これらの用語は、癌細胞の表面上に、完全に又はフラグメント（例えば、MHC/ペプチド）として、発現する分子（典型的にはタンパク質、炭水化物若しくは脂質）であって、癌細胞に対する薬理学的薬剤の優先的な標的化に有用な分子を指す。一部の実施形態において、腫瘍抗原は、正常細胞及び癌細胞の両方が発現するマーカー、例えば系列マーカー、例えばB細胞上のCD19である。一部の実施形態では、腫瘍抗原は、正常細胞と比べて癌細胞で過剰発現（例えば、正常細胞と比べて1倍の過剰発現、2倍の過剰発現、3倍以上の過剰発現）する細胞表面分子である。一部の実施形態では、腫瘍抗原は、癌細胞で不適切に合成される細胞表面分子、例えば正常細胞に発現する分子と比べて欠失、付加又は変異を含む分子である。一部の実施形態では、腫瘍抗原は、癌細胞の細胞表面にのみ、完全に又はフラグメント（例えば、MHC/ペプチド）として発現することになり、正常細胞の表面には合成されないか又は発現しない。一部の実施形態では、本発明の過剰増殖性障害抗原は、原発性若しくは転移性黒色腫、胸腺腫、リンパ腫、肉腫、肺癌、肝臓癌、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、白血病、子宮癌、子宮頸癌、膀胱癌、

40

50

腎臓癌並びに乳癌、前立腺癌（例えば、去勢抵抗性若しくは治療抵抗性前立腺癌又は転移性前立腺癌）、卵巣癌、膵臓癌など、又は形質細胞増殖性障害、例えば無症候性骨髄腫（くすぶり型多発性骨髄腫又は無症候性骨髄腫）、意義不明の単クローン性ガンマグロブリン血症（MGUS）、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、形質細胞腫（例えば、プラズマ細胞増殖症、孤立性骨髄腫、孤立性形質細胞腫、髄外性形質細胞腫及び多発性形質細胞腫）、全身性軽鎖アミロイドーシス及びPOEMS症候群（また、クロウ・深瀬症候群、高月病（Takatsuki disease）及びPEP症候群としても知られる）に由来する。一部の実施形態では、本発明のCARは、MHC提示ペプチドに結合する抗原結合ドメイン（例えば、抗体又は抗体フラグメント）を含むCARを含む。通常、内因性タンパク質に由来するペプチドは、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）クラスI分子のポケットに嵌まり、CD8+Tリンパ球上のT細胞受容体（TCR）によって認識される。MHCクラスI複合体は、あらゆる有核細胞によって構成的に発現される。癌では、ウイルス特異的及び/又は腫瘍特異的ペプチド/MHC複合体が免疫療法用のユニークなクラスの細胞表面標的となる。ヒト白血球抗原（HLA）-A1又はHLA-A2のコンテクストでウイルス又は腫瘍抗原由来のペプチドを標的とするTCR様抗体が記載されている（例えば、Sastrey et al., J Virol. 2011 85(5): 1935-1942; Sergeeva et al., Blood, 2011 117(16): 4262-4272; Verma et al., J Immunol 2010 184(4): 2156-2165; Willemsen et al., Gene Ther 2001 8(21): 1601-1608; Dao et al., Sci Transl Med 2013 5(176): 176ra33; Tassev et al., Cancer Gene Ther 2012 19(2): 84-100を参照されたい）。例えば、TCR様抗体は、ヒトscFvファージディスプレイライブラリなど、ライブラリーのスクリーニングによって同定することができる。

10

20

30

40

50

【0232】

用語「腫瘍支持抗原」又は「癌支持抗原」は、互換的に、それ自体癌性ではない細胞の表面に発現するが、例えばそれらの増殖若しくは生存、例えば免疫細胞に対する抵抗性を促進することによって癌細胞を支持する分子（典型的にはタンパク質、炭水化物若しくは脂質）を指す。このタイプの例示的な細胞として、間質細胞及び骨髄由来免疫抑制細胞（MDSC）が挙げられる。腫瘍支持抗原自体は、癌細胞を支持する細胞に抗原が存在する限り、腫瘍細胞を支持する役割を果たす必要はない。

【0233】

用語「可動性ポリペプチドリンカー」又は「リンカー」は、scFvとの関連で使用されるとき、可変重鎖領域と可変軽鎖領域とを共に連結するために単独又は組み合わせで使用されるグリシン及び/又はセリン残基などのアミノ酸からなるペプチドリンカーを指す。一部の実施形態において、可動性ポリペプチドリンカーは、Gly/Serリンカーであり、アミノ酸配列（Gly-Gly-Gly-Ser）_n（式中、*n*は、1以上の正の整数、例えば*n* = 1、*n* = 2、*n* = 3、*n* = 4、*n* = 5及び*n* = 6、*n* = 7、*n* = 8、*n* = 9及び*n* = 10である）（配列番号41）を含む。一部の実施形態において、可動性ポリペプチドリンカーには、限定されないが、（Gly₄ Ser）₄（配列番号27）又は（Gly₄ Ser）₃（配列番号28）が含まれる。一部の実施形態において、リンカーは、（Gly₂ Ser）、（Gly Ser）又は（Gly₃ Ser）（配列番号29）の複数の繰り返しを含む。また、国際公開第2012/138475号パンフレット（参照により本明細書に援用される）に記載されるリンカーも本発明の範囲内に含まれる。

【0234】

本明細書で使用されるとき、5'キャップ（RNAキャップ、RNA 7-メチルグアノシンキャップ又はRNA m⁷Gキャップとも称される）は、転写開始直後に真核生物メッセンジャーRNAの「前」又は5'末端に付加された修飾グアニンヌクレオチドである。5'キャップは、1番目の転写ヌクレオチドに連結される末端基からなる。その存在は、リボソームによる認識及びRNアーゼからの保護に重要である。キャップ付加は転写と

結び付いており、それぞれが他方に影響を与えるようにして同時転写的に起こる。転写開始直後、合成されている mRNA の 5' 末端に、RNA ポリメラーゼに関連するキャップ合成複合体が結合する。この酵素複合体は、mRNA キャッピングに必要な化学反応を触媒する。合成は、多段階生化学反応として進行する。キャッピング部分は、mRNA のその安定性又は翻訳効率などの機能を調整するために改変することができる。

【0235】

本明細書で使用されるとき、「インビトロ転写 RNA」は、インビトロ合成された RNA を指す。一部の実施形態では、RNA は、mRNA である。概して、インビトロ転写 RNA は、インビトロ転写ベクターから作成される。インビトロ転写ベクターは、インビトロ転写 RNA の作成に使用される鋳型を含む。

10

【0236】

本明細書で使用されるとき、「ポリ(A)」は、ポリアデニル化によって mRNA に結合される一連のアデノシンである。一過性発現用の構築物の一部の実施形態において、ポリ(A)は、50~5000である(配列番号30)。一部の実施形態では、ポリ(A)は、64より多い。一部の実施形態では、ポリ(A)は、100より多い。一部の実施形態では、ポリ(A)は、300より多い。一部の実施形態では、ポリ(A)は、400より多い。ポリ(A)配列は、局在性、安定性又は翻訳効率などの mRNA 機能を調整するために化学的又は酵素的に改変することができる。

【0237】

本明細書で使用されるとき、「ポリアデニル化」は、メッセンジャー RNA 分子へのポリアデニル部分又はその改変変異体の共有結合を指す。真核生物では、ほとんどのメッセンジャー RNA (mRNA) 分子が 3' 末端でポリアデニル化される。3' ポリ(A)テールは、酵素、ポリアデニル酸ポリメラーゼの作用によって mRNA 前駆体に付加されるアデニンヌクレオチドの長い配列(多くの場合に数百個)である。高等真核生物では、ポリ(A)テールは、特異的配列、ポリアデニル化シグナルを含む転写物に付加される。ポリ(A)テール及びそれに結合したタンパク質は、mRNA をエキソヌクラーゼによる分解から保護するのに役立つ。ポリアデニル化は、転写終結、mRNA の核外移行及び翻訳にも重要である。ポリアデニル化は、DNA から RNA への転写直後に核内で起こるが、さらに後に細胞質でも起こり得る。転写が終結した後、RNA ポリメラーゼに関連するエンドヌクラーゼ複合体の作用によって mRNA 鎖が切断される。切断部位は、通常、切断部位近傍の塩基配列 AAUAAA の存在によって特徴付けられる。mRNA が切断された後、切断部位の遊離 3' 末端にアデノシン残基が付加される。

20

30

【0238】

本明細書で使用されるとき、「一過性」は、数時間、数日間又は数週間の期間にわたる組み込まれないトランス遺伝子の発現を指し、この発現期間は、宿主細胞においてゲノムに組み込まれた場合又は安定プラスミドレプリコン中に含まれている場合の遺伝子の発現期間よりも短い。

【0239】

本明細書で使用される場合、用語「処置する」、「処置」及び「処置している」は、1つ以上の療法(例えば、本発明の CAR などの1つ以上の療法剤)の投与によってもたらされる増殖性障害の進行、重症度及び/若しくは持続期間の低減若しくは改善又は増殖性障害の1つ以上の症状(好ましくは1つ以上の認識し得る症状)の改善を指す。具体的な実施形態において、用語「処置する」、「処置」及び「処置している」は、患者には必ずしも認識できない、腫瘍の増殖などの増殖性障害の少なくとも1つの計測可能な理学的パラメーターの改善を指す。他の実施形態において、用語「処置する」、「処置」及び「処置している」は、増殖性障害の進行の物理的な、例えば認識し得る症状の安定化による阻害、生理学的な、例えば理学的パラメーターの安定化による阻害のいずれか又は両方を指す。他の実施形態において、用語「処置する」、「処置」及び「処置している」は、腫瘍サイズ又は癌性細胞数の低減又は安定化を指す。

40

【0240】

50

用語「シグナル伝達経路」は、細胞のある部分から細胞の別の部分へのシグナルの伝達において役割を果たす種々のシグナル伝達分子間の生化学的関係を指す。語句「細胞表面受容体」は、シグナルを受け取り、且つ細胞の膜を越えてシグナルを伝える能力を有する分子及び分子複合体を含む。

【0241】

用語「対象」は、免疫応答を生じさせることのできる生きている生物（例えば、哺乳類、例えばヒト）を含むことが意図される。

【0242】

用語の「実質的に精製された」細胞は、他の細胞型を本質的に含まない細胞を指す。実質的に精製された細胞とは、その天然に存在する状態でそれが通常結び付いている他の細胞型と分離されている細胞も指す。一部の例では、実質的に精製された細胞集団とは、均質な細胞集団を指す。他の例では、この用語は、単に、その自然状態でそれが天然に結び付いている細胞から分離されている細胞を指す。一部の実施形態において、これらの細胞は、インビトロで培養される。一部の実施形態において、これら細胞は、インビトロで培養されない。

10

【0243】

本明細書で使用される用語「治療的」とは、処置を意味する。治療効果は、病態の低減、抑制、寛解又は根絶によって達成される。

【0244】

本明細書で使用される用語「予防」とは、疾患若しくは病態の予防又は予防的処置を意味する。

20

【0245】

用語「トランスフェクトされた」、又は「形質転換された」、又は「形質導入された」は、外因性核酸を宿主細胞に移入させるか又は導入するプロセスを指す。「トランスフェクトされた」、又は「形質転換された」、又は「形質導入された」細胞は、外因性核酸をトランスフェクト、形質転換又は形質導入されたものである。細胞には初代対象細胞及びその子孫が含まれる。

【0246】

用語「特異的に結合する」は、試料中に存在するコグネイト結合パートナー（例えば、T細胞に存在する刺激及び/若しくは共刺激分子）タンパク質を認識して、それと結合するが、試料中の他の分子は実質的に認識しないか又はそれらに結合しない抗体又はリガンドを指す。

30

【0247】

本明細書で使用される「調節可能なキメラ抗原受容体（RCAR）」という用語は、免疫エフェクター細胞中にあるとき、標的細胞、典型的には癌細胞に対する特異性及び細胞内シグナル生成を細胞に付与する一連のポリペプチド、典型的には最も単純な実施形態では2つのポリペプチドを指す。一部の実施形態では、RCARは、少なくとも1つの細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン並びにCAR分子に関連して本明細書で定義されるような刺激分子及び/又は共刺激分子由来の機能性シグナル伝達ドメインを含む細胞腫シグナル伝達ドメイン（また、本明細書では「細胞内シグナル伝達ドメイン」とも称される）を含む。一部の実施形態では、RCAR中のこれら一連のポリペプチドは、互いに隣接しておらず、例えば異なるポリペプチド鎖内にある。一部の実施形態では、RCARは、二量体化スイッチを含み、これは、二量体化分子が存在すると、ポリペプチドを互いに結合させることができ、例えば細胞内シグナル伝達ドメインに抗原結合ドメインを結合させることができる。一部の実施形態では、RCARは、本明細書に記載される細胞（例えば、免疫エフェクター細胞）、例えばRCAR発現細胞（また、「RCARX細胞」とも称される）に発現される。一部の実施形態では、RCARX細胞は、T細胞であり、RCARNT細胞と称される。一部の実施形態では、RCARXは、NK細胞であり、RCARN細胞と称される。RCARは、RCAR発現細胞に、標的細胞、典型的には癌細胞に対する特異性及び調節可能な細胞内シグナル生成若しくは増殖を付与することができ、これら

40

50

は、RCAR発現細胞の免疫エフェクター特性を最適化し得る。複数の実施形態では、RCAR細胞は、抗原結合ドメインに結合した抗原を含む標的細胞に対する特異性を取得するために、少なくとも部分的に、抗原結合ドメインに依存する。

【0248】

「膜アンカー」又は「膜テザリングドメイン」は、この用語が本明細書で使用されるとき、細胞外若しくは細胞内ドメインを原形質膜に結合させる上で十分なポリペプチド若しくは部分、例えばミリストイル基を指す。

【0249】

「スイッチドメイン」は、この用語が本明細書で例えばRCARを指す場合に使用されるとき、二量体化分子の存在下で別のスイッチドメインと結合する実体、典型的には、ポリペプチドベースの実体を指す。この結合により、第1のスイッチドメインに連結、例えば融合した第1の実体と、第2のスイッチドメインに連結、例えば融合した第2の実体との機能性カップリングが起こる。第1及び第2のスイッチドメインは、集合的に二量体化スイッチと呼ばれる。複数の実施形態において、第1及び第2のスイッチドメインは、互いに同じであり、例えば、両者は、同じ一次アミノ酸配列を有するポリペプチドであり、集合的にホモ二量体化スイッチと呼ばれる。複数の実施形態において、第1及び第2のスイッチドメインは、互いに異なり、例えば、それらは、異なる一次アミノ酸配列を有するポリペプチドであり、集合的にヘテロ二量体化スイッチと呼ばれる。複数の実施形態において、スイッチは、細胞内である。複数の実施形態では、スイッチは、細胞外である。複数の実施形態において、スイッチドメインは、ポリペプチドベースの実体、例えばFKBP又はFRBベースであり、二量体化分子は、小分子、例えばラパログである。複数の実施形態において、スイッチドメインは、ポリペプチドベースの実体、例えばmycペプチドに結合するscFvであり、二量体化分子は、ポリペプチド、その断片又はポリペプチドの多量体、例えばmycリガンド若しくは1つ以上のmyc scFvに結合するmycリガンドの多量体である。複数の実施形態において、スイッチドメインは、ポリペプチドベースの実体、例えばmyc受容体であり、二量体化分子は、抗体又はその断片、例えばmyc抗体である。

【0250】

「二量体化分子」という用語は、この用語が本明細書で例えばRCARを指す場合に使用されるとき、第1のスイッチドメインと第2のスイッチドメインの結合を促進する分子を指す。複数の実施形態において、二量体化分子は、対象に天然に存在しないか、又は有意な二量体化を起こす濃度では存在しない。複数の実施形態では、二量体化分子は、小分子、例えばラパマイシン若しくはラパログ、例えばRAD001である。

【0251】

用量「低い免疫増強用量」は、mTOR阻害剤、例えばアロステリックmTOR阻害剤、例えばRAD001若しくはラパマイシン又は触媒mTOR阻害剤と一緒に使用されるとき、例えばP70 S6キナーゼ活性の阻害により測定される通り、mTOR活性を部分的に、しかし完全にではなく、阻害するmTOR阻害剤の用量を指す。例えば、P70 S6キナーゼ活性の阻害によりmTOR活性を評価する方法は、本明細書に詳述される。この用量は、完全な免疫抑制をもたらすのに不十分であるが、免疫応答を増強するには十分である。一部の実施形態では、mTOR阻害剤の低い免疫増強用量は、PD-1陽性T細胞の数の減少及び/若しくはPD-1陰性T細胞の数の増加又はPD-1陰性T細胞/PD-1陽性T細胞の比の増加をもたらす。一部の実施形態では、mTOR阻害剤の低い免疫増強用量は、ナイーブT細胞の数の増加をもたらす。一部の実施形態では、mTOR阻害剤の低い免疫増強用量は、

例えば、メモリーT細胞、例えばメモリーT細胞前駆体での下記マーカー：CD62L^{high}、CD127^{high}、CD27⁺及びBCL2の1つ以上の発現の増大；

例えば、メモリーT細胞、例えばメモリーT細胞前駆体でのKLRG1の発現の減少；及び

例えば、下記の特徴：CD62L^{high}の増加、CD127^{high}の増加、CD27

10

20

30

40

50

+ の増加、K L R G 1 の減少及び B C L 2 の増加のいずれか 1 つ又はそれらの組み合わせを備えるメモリー T 細胞前駆体の数の増加の 1 つ以上をもたらし、ここで、前述した変化のいずれかは、例えば、非処置対象と比べて、少なくとも一時的に起こる。

【0252】

「難治性」は、本明細書で使用される場合、処置に応答しない疾患、例えば癌を指す。複数の実施形態において、難治性癌は、処置の開始前又は開始時点で処置に抵抗性であり得る。他の実施形態において、難治性癌は、処置中に抵抗性になり得る。難治性癌は、抵抗性癌とも称される。

【0253】

本明細書で使用される「再発した」又は「再発」は、改善若しくは応答性期間後、例えばある治療（例えば、癌治療）による以前の処置後の疾患（例えば、癌）の又は癌などの疾患の兆候及び症状の再発又は再出現を指す。初期の応答性期間は、癌細胞のレベルの、ある閾値未満、例えば 20%、1%、10%、5%、4%、3%、2% 又は 1% 未満への低下を含み得る。再出現は、癌細胞のレベルの、ある閾値を越える、例えば 20%、1%、10%、5%、4%、3%、2% 又は 1% を超える増加を含み得る。例えば、再出現は、例えば、B - A L L に関連して、完全応答後の、例えば血液、骨髓 (> 5%) 又は任意の髓外部位における芽球の再出現を含み得る。これに関連して、完全応答は、< 5% の B M 芽球を含み得る。より一般的には、一部の実施形態において、応答（例えば、完全応答又は部分応答）は、検出可能な M R D（微小残存病変）の非存在を含み得る。一実施形態において、応答性の初期期間は、少なくとも 1、2、3、4、5 又は 6 日間；少なくとも 1、2、3 又は 4 週間；少なくとも 1、2、3、4、6、8、10 又は 12 ヶ月間；又は少なくとも 1、2、3、4 又は 5 年間続く。

【0254】

範囲：本開示全体を通じて、本発明の様々な実施形態が範囲の形式で提示され得る。範囲の形式での記載は、単に便宜上及び簡潔にするためのものであり、本発明の範囲に対する確固たる限定と解釈されてはならないことが理解されるべきである。従って、範囲の記載は、具体的に開示される全ての可能な部分範囲並びにその範囲内にある個々の数値を有すると考えられなければならない。例えば、1 ~ 6 などの範囲の記載は、1 ~ 3、1 ~ 4、1 ~ 5、2 ~ 4、2 ~ 6、3 ~ 6 などの具体的に開示される部分範囲並びにその範囲内にある個々の数値、例えば 1、2、2.7、3、4、5、5.3 及び 6 を有すると考えられなければならない。別の例として、95 ~ 99% の同一性などの範囲は、95%、96%、97%、98% 又は 99% の同一性を有するものを含み、及び 96 ~ 99%、96 ~ 98%、96 ~ 97%、97 ~ 99%、97 ~ 98% 及び 98 ~ 99% の同一性などの部分範囲を含む。これは、範囲の幅に関わらず適用される。

【0255】

「遺伝子編集システム」は、この用語が本明細書で使用されるとき、前記システムにより標的化されるゲノム D N A の部位若しくはその付近の 1 つ以上の核酸の改変、例えば欠失を指令し、実行するシステム、例えば 1 つ以上の分子を指す。遺伝子編集システムは、当技術分野では公知であり、以下により詳しく記載する。

【0256】

「組み合わせて」投与されるは、本明細書で使用される場合、疾患による対象の苦痛が継続する過程において 2 種（以上の）異なる処置が対象に送達されることを意味し、例えば対象が疾患を有すると診断された後且つ疾患が治癒若しくは排除されるか、又は処置が他の理由で中止される前に、2 種以上の処置が送達される。一部の実施形態では、1 つの処置の送達は、第 2 の処置の送達が始まる時依然として続いており、これにより、投与に関して重複が存在する。これは、本明細書において、「同時」又は「同時送達」と呼ばれる場合がある。他の実施形態では、1 つの処置の送達は、他の処置の送達が始まる前に終了する。いずれかの場合の一部の実施形態において、処置は、併用投与によってより有効である。例えば、第 2 の処置の方が有効であり、例えばより少ない第 2 の処置で同

10

20

30

40

50

等の効果がみられるか、又は第2の処置は、第1の処置を行わずに第2の処置が投与される場合にみられるものより優れた程度まで症状を軽減するか若しくは第1の処置と類似の状況がみられる。一部の実施形態では、送達は、症状の軽減又は障害に関する他のパラメーターが、一方が他方なしで送達された場合に認められるものより高くなるようにする。2つの処置の効果は、部分的に相加的、完全に相加的であるか又は相加的を上回り得る。送達は、送達される第1の処置の効果が、第2の処置が送達されるときにも依然として検出可能であるようにすることができる。

【0257】

本明細書で互換的に使用される「枯渇（欠失）」又は「枯渇する（欠失させる）こと」という用語は、プロセス、例えば選択ステップ、例えばネガティブ選択が実施された後の、サンプル中の細胞、タンパク質若しくは高分子のレベル又は量の減少又は低下を指す。枯渇は、細胞、タンパク質若しくは高分子の完全又は部分的な枯渇であり得る。一部の実施形態において、枯渇は、プロセスが実施される前のサンプル中の細胞、タンパク質若しくは高分子のレベル又は量と比べて、細胞、タンパク質若しくは高分子のレベル又は量の少なくとも1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%若しくは99%の減少又は低下である。

【0258】

本明細書で使用される場合、「ナイーブT細胞」は、抗原未経験のT細胞を指す。一部の実施形態では、抗原未経験T細胞は、胸腺中でそのコグネイト抗原に遭遇しているが、末梢では遭遇していない。一部の実施形態では、ナイーブT細胞は、メモリーT細胞の前駆体である。一部の実施形態では、ナイーブT細胞は、CD45RA及びCCR7の両方を発現するが、CD45ROを発現しない。一部の実施形態では、ナイーブT細胞は、CD62L、CD27、CCR7、CD45RA、CD28及びCD127の発現並びにCD95又はCD45ROアイソフォームの非存在を特徴とし得る。一部の実施形態では、ナイーブT細胞は、CD62L、IL-7受容体、IL-6受容体及びCD132を発現するが、CD25、CD44、CD69又はCD45ROを発現しない。一部の実施形態では、ナイーブT細胞は、CD45RA、CCR7及びCD62Lを発現するが、CD95又はIL-2受容体を発現しない。一部の実施形態では、マーカーの表面発現レベルは、フローサイトメトリーを用いて評価される。

【0259】

用語「セントラルメモリーT細胞」は、ヒトにおいてCD45RO陽性であり、CCR7を発現するT細胞のサブセットを指す。一部の実施形態では、セントラルメモリーT細胞は、CD95を発現する。一部の実施形態では、セントラルメモリーT細胞は、IL-2R、IL-7R及び/又はIL-15Rを発現する。一部の実施形態では、セントラルメモリーT細胞は、CD45RO、CD95、IL-2受容体、CCR7及びCD62Lを発現する。一部の実施形態では、マーカーの表面発現レベルは、フローサイトメトリーを用いて評価される。

【0260】

用語「ステムメモリーT細胞」、「幹細胞メモリーT細胞」、「幹細胞様メモリーT細胞」、「メモリーステムT細胞」、「Tメモリー幹細胞」、「Tステムセルメモリー細胞」又は「TSCM細胞」は、幹細胞様能力、例えば自己再生する能力並びに/又はメモリー及び/若しくはエフェクターT細胞サブセットを再構成する多分化能を備えたメモリーT細胞のサブセットを指す。一部の実施形態では、ステムメモリーT細胞は、CD45RA、CD95、IL-2受容体、CCR7及びCD62Lを発現する。一部の実施形態では、マーカーの表面発現レベルは、フローサイトメトリーを用いて評価される。一部の実施形態では、例示的なステムメモリーT細胞は、Gattinoni et al., Nat Med. 2017 January 06; 23(1): 18-27に開示されており、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0261】

10

20

30

40

50

明瞭化の目的で、別に注記されない限り、特定のマーカーを「発現しない」又は「それが存在しない」又は「それについて陰性である」ものとして細胞若しくは細胞の集団を分類するのは、必ずしもマーカーの非存在を意味するわけではない。当業者は、容易に、陽性及び/若しくは陰性対照に対して細胞を比較し、及び/又は所定の閾値を設定し、且つ従来の検出方法を用いて、例えばフローサイトメトリーを用いて、例えば本明細書の実施例に記載されるように、細胞が、所定の閾値に満たない発現レベルを有するか、又は細胞の集団が、所定の閾値に満たない過剰発現レベルを有するとき、マーカーを発現しないか、若しくはマーカーについて陰性であるものとして細胞若しくは細胞の集団を分類することができる。

【0262】

本明細書で使用される場合、細胞の「GeneSetScore (Up TEM vs . Down TSCM)」という用語は、細胞が、幹細胞メモリーT細胞 (TSCM) 表現型に対してエフェクターメモリーT細胞 (TEM) 表現型を示す程度を表すスコアを指す。より高いGeneSetScore (Up TEM vs . Down TSCM) は、TEM表現型の増加を示すのに対し、より低いGeneSetScore (Up TEM vs . Down TSCM) は、TSCM表現型の増加を示す。一部の実施形態では、GeneSetScore (Up TEM vs . Down TSCM) は、TEM細胞で上方制御される及び/又はTSCMで下方制御される1つ以上の遺伝子、例えばMXRA7、CLIC1、NAT13、TBC1D2B、GLCCI1、DUSP10、APOBEC3D、CACNB3、ANXA2P2、TPRG1、EOMES、MATK、ARRHGAP10、ADAM8、MAN1A1、SLFN12L、SH2D2A、EIF2C4、CD58、MYO1F、RAB27B、ERN1、NPC1、NBEAL2、APOBEC3G、SYTL2、SLC4A4、PIK3AP1、PTGDR、MAF、PLEKHA5、ADRB2、PLXND1、GNAO1、THBS1、PPP2R2B、CYTH3、KLRF1、FLJ16686、AUTS2、PTPRM、GNLY及びGFPT2からなる群から選択される1つ以上の遺伝子の発現を測定することによって決定される。一部の実施形態では、GeneSetScore (Up TEM vs . Down TSCM) は、例えば、図25Aを参照にして実施例7に例示される通り、RNA-seq、例えば単一細胞RNA-seq (scRNA-seq) を用いて、各細胞について決定される。一部の実施形態では、GeneSetScore (Up TEM vs . Do

10

20

30

【0263】

本明細書で使用されるとき、細胞の「GeneSetScore (Up Treg vs . Down Teff)」という用語は、細胞が、エフェクターT細胞 (Teff) 表現型に対して調節T細胞 (Treg) を示す程度を表すスコアを指す。より高いGeneSetScore (Up Treg vs . Down Teff) は、Treg表現型の増加を示すのに対し、より低いGeneSetScore (Up Treg vs . Down Teff) は、Teff表現型の増加を示す。一部の実施形態では、GeneSetScore (Up Treg vs . Down Teff) は、Treg細胞で上方制御される及び/又はTeff細胞で下方制御される1つ以上の遺伝子、例えばC12orf75、SELPLG、SWAP70、RGS1、PRR11、SPATS2L、SPATS2L、TSHR、C14orf145、CASP8、SYT11、ACTN4、ANXA5、GLRX、HLA-DMB、PMCH、RAB11FIP1、IL32、FAM160B1、SHMT2、FRMD4B、CCR3、TNFRSF13B、NTNG2、CLDND1、BARD1、FCER1G、TYMS、ATP1B1、GJB6、FGL2、TK1、SLC2A8、CDKN2A、SKAP2、GPR55、CDCA7、S100A4、GDPD5、PMAIP1、ACOT9、CEP55、SGMS1、ADPRH、AKAP2、HDAC9、IKZF4、CARD17、VAV3、OBFC2A、ITGB1、CIITA、SETD7、HLA-DMA、CCR10、KIAA0101、

40

50

SLC14A1、PTTG3P、DUSP10、FAM164A、PYHIN1、MYO1F、SLC1A4、MYBL2、PTTG1、RRM2、TP53INP1、CCR5、ST8SIA6、TOX、BFSP2、ITPRIPL1、NCAPH、HLA-DPB2、SYT4、NINJ2、FAM46C、CCR4、GBP5、C15orf53、LMCD1、MKI67、NUSAP1、PDE4A、E2F2、CD58、ARHGFE12、LOC100188949、FAS、HLA-DPB1、SELP、WEE1、HLA-DPA1、FCRL1、ICA1、CNTNAP1、OAS1、METTL7A、CCR6、HLA-DRB4、ANXA2P3、STAM、HLA-DQB2、LGALS1、ANXA2、PI16、DUSP4、LAYN、ANXA2P2、PTPLA、ANXA2P1、ZNF365、LAIR2、LOC541471、RASGRP4、BCAS1、UTS2、MIAT、PRDM1、SEMA3G、FAM129A、HPGD、NCF4、LGALS3、CEACAM4、JAKMIP1、TIGIT、HLA-DRA、IKZF2、HLA-DRB1、FANK1、RTKN2、TRIB1、FCRL3及びFOXP3からなる群から選択される1つ以上の遺伝子の発現を測定することによって決定される。一部の実施形態において、GeneSetScore(Up Treg vs. Down Treg)は、例えば、図25Bを参照にして実施例7に例示される通り、RNA-seq、例えば単一細胞RNA-seq(scRNA-seq)を用いて決定される。一部の実施形態では、GeneSetScore(Up Treg vs. Down Treg)は、遺伝子セット中の遺伝子全ての平均log正規化遺伝子発現値を取得することにより計算される。

【0264】

本明細書で使用されるとき、細胞の「GeneSetScore(Down stemness)」という用語は、細胞が、幹細胞性表現型を示す程度を表すスコアを指す。より低いGeneSetScore(Down stemness)は、幹細胞性表現型の増加を示す。一部の実施形態では、GeneSetScore(Down stemness)は、造血幹細胞中で下方制御されるのに対して、分化幹細胞中で上方制御される1つ以上の遺伝子、例えばACE、BATF、CDK6、CHD2、ERCC2、HOXB4、MEOX1、SFRP1、SP7、SRF、TAL1及びXRCC5からなる群から選択される1つ以上の遺伝子の発現を測定することにより測定される。一部の実施形態では、GeneSetScore(Down stemness)は、例えば、図25Cを参照にして実施例7に例示される通り、RNA-seq、例えば単一細胞RNA-seq(scRNA-seq)を用いて決定される。一部の実施形態では、GeneSetScore(Down stemness)は、遺伝子セット中の遺伝子全ての平均log正規化遺伝子発現値を取得することにより計算される。

【0265】

本明細書で使用されるとき、細胞の「GeneSetScore(UP hypoxia)」という用語は、細胞が低酸素表現型を示す程度を表すスコアを示す。より高いGeneSetScore(UP hypoxia)は、低酸素表現型の増加を示す。一部の実施形態では、GeneSetScore(UP hypoxia)は、低酸素を被っている細胞において上方制御される1つ以上の遺伝子、例えばABCB1、ACAT1、ADM、ADORA2B、AK2、AK3、ALDH1A1、ALDH1A3、ALDOA、ALDOC、ANGPT2、ANGPTL4、ANXA1、ANXA2、ANXA5、ARHGAP5、ARSE、ART1、BACE2、BATF3、BCL2L1、BCL2L2、BHLHE40、BHLHE41、BIK、BIRC2、BNIP3、BNIP3L、BPI、BTG1、C11orf2、C7orf68、CA12、CA9、CALD1、CCNG2、CCT6A、CD99、CDK1、CDKN1A、CDKN1B、CITED2、CLK1、CNOT7、COL4A5、COL5A1、COL5A2、COL5A3、CP、CTSD、CXCR4、D4S234E、DDIT3、DDIT4、1-Dec、DKC1、DR1、EDN1、EDN2、EFNA1、EGF、EGR1、EIF4A3、ELF3、ELL2、ENG、ENO1、ENO3、ENPEP、EPO、

ERRFI1、ETS1、F3、FABP5、FGF3、FKBP4、FLT1、FN1、FOS、FTL、GAPDH、GBE1、GLRX、GPI、GPRC5A、HAP1、HBP1、HDAC1、HDAC9、HERC3、HERPUD1、HGF、HIF1A、HK1、HK2、HLA-DQB1、HMOX1、HMOX2、HSPA5、HSPD1、HSPH1、HYOU1、ICAM1、ID2、IFI27、IGF2、IGFBP1、IGFBP2、IGFBP3、IGFBP5、IL6、IL8、INSIG1、IRF6、ITGA5、JUN、KDR、KRT14、KRT18、KRT19、LDHA、LDHB、LEP、LGALS1、LONP1、LOX、LRP1、MAP4、MET、MIF、MMP13、MMP2、MMP7、MPI、MT1L、MTL3P、MUC1、MXI1、NDRG1、NFIL3、NFKB1、NFKB2、NOS1、NOS2、NOS2P1、NOS2P2、NOS3、NR3C1、NR4A1、NT5E、ODC1、P4HA1、P4HA2、PAICS、PDGFB、PDK3、PFKFB1、PFKFB3、PFKFB4、PFKL、PGAM1、PGF、PGK1、PGK2、PGM1、PIM1、PIM2、PKM2、PLAU、PLAUR、PLIN2、PLOD2、PNN、PNP、POLM、PPARA、PPAT、PROK1、PSMA3、PSMD9、PTGS1、PTGS2、QSOX1、RBPJ、RELA、RIOK3、RNASEL、RPL36A、RRP9、SAT1、SERPINB2、SERPINE1、SGSM2、SIAH2、SIN3A、SIRPA、SLC16A1、SLC16A2、SLC20A1、SLC2A1、SLC2A3、SLC3A2、SLC6A10P、SLC6A16、SLC6A6、SLC6A8、SORL1、SPP1、SRSF6、SSSCA1、STC2、STRA13、SYT7、TBPL1、TCEAL1、TEK、TF、TF3、TFRC、TGFA、TGFB1、TGFB3、TGFB1、TGM2、TH、THBS1、THBS2、TIMM17A、TNFAIP3、TP53、TPBG、TPD52、TPI1、TXN、TXNIP、UMPS、VEGFA、VEGFB、VEGFC、VIM、VPS11及びXRCC6からなる群から選択される1つ以上の遺伝子の発現を測定することにより決定される。一部の実施形態では、GeneSetScore(UP hypoxia)は、例えば、図25Dを参照にして実施例7に例示される通り、RNA-seq、例えば単一細胞RNA-seq(scRNA-seq)を用いて決定される。一部の実施形態では、GeneSetScore(UP hypoxia)は、遺伝子セット中の遺伝子全ての平均log正規化遺伝子発現値を取得することにより計算される。

【0266】

本明細書で使用されるとき、細胞の「GeneSetScore(UP autophagy)」という用語は、細胞がオートファジー表現型を示す程度を表すスコアを示す。より高いGeneSetScore(UP autophagy)は、オートファジー表現型の増加を示す。一部の実施形態では、GeneSetScore(UP autophagy)は、オートファジーを被っている細胞において上方制御される1つ以上の遺伝子、例えばABL1、ACBD5、ACIN1、ACTRT1、ADAMTS7、AKR1E2、ALKBH5、ALPK1、AMBRA1、ANXA5、ANXA7、ARSB、ASB2、ATG10、ATG12、ATG13、ATG14、ATG16L1、ATG16L2、ATG2A、ATG2B、ATG3、ATG4A、ATG4B、ATG4C、ATG4D、ATG5、ATG7、ATG9A、ATG9B、ATP13A2、ATP1B1、ATPAF1-AS1、ATPIF1、BECN1、BECN1P1、BLOC1S1、BMP2KL、BNIP1、BNIP3、BOC、C11orf2、C11orf41、C12orf44、C12orf5、C14orf133、C1orf210、C5、C6orf106、C7orf59、C7orf68、C8orf59、C9orf72、CA7、CALCB、CALCOCO2、CAPS、CCDC36、CD163L1、CD93、CDC37、CDKN2A、CHAF1B、CHMP2A、CHMP2B、CHMP3、CHMP4A、CHMP4B、CHMP4C、CHMP6、CHST3、CISD2、CLDN7、CLEC16A、CLN3、CLVS1、COX8A、CP

A 3、CRNKL1、CSPG5、CTSA、CTSB、CTSD、CXCR7、DAP
、DKKL1、DNAAF2、DPF3、DRAM1、DRAM2、DYNLL1、DY
NLL2、DZANK1、EI24、EIF2S1、EPG5、EPM2A、FABP1
、FAM125A、FAM131B、FAM134B、FAM13B、FAM176A、
FAM176B、FAM48A、FANCC、FANCF、FANCL、FBXO7、F
CGR3B、FGF14、FGF7、FGFBP1、FIS1、FNBP1L、FOXO
1、FUNDC1、FUNDC2、FXR2、GABARAP、GABARAPL1、G
ABARAPL2、GABARAPL3、GABRA5、GDF5、GMIP、HAP1
、HAPLN1、HBXIP、HCAR1、HDAC6、HGS、HIST1H3A、H
IST1H3B、HIST1H3C、HIST1H3D、HIST1H3E、HIST1 10
H3F、HIST1H3G、HIST1H3H、HIST1H3I、HIST1H3J、
HK2、HMGB1、HPR、HSF2BP、HSP90AA1、HSPA8、IFI1
6、IPPK、IRGM、IST1、ITGB4、ITPKC、KCNK3、KCNQ1
、KIAA0226、KIAA1324、KRCC1、KRT15、KRT73、LAM
P1、LAMP2、LAMTOR1、LAMTOR2、LAMTOR3、LARP1B、
LENG9、LGALS8、LIX1、LIX1L、LMCD1、LRRK2、LRSA
M1、LSM4、MAP1A、MAP1LC3A、MAP1LC3B、MAP1LC3B
2、MAP1LC3C、MAP1S、MAP2K1、MAP3K12、MARK2、MB
D5、MDH1、MEX3C、MFN1、MFN2、MLST8、MRPS10、MRP
S2、MSTN、MTERFD1、MTMR14、MTMR3、MTOR、MTSS1、 20
MYH11、MYLK、MYOM1、NBR1、NDUFB9、NEFM、NHLRC1
、NME2、NPC1、NR2C2、NRBF2、NTHL1、NUP93、OBSCN
、OPTN、P2RX5、PACS2、PARK2、PARK7、PDK1、PDK4、
PEX13、PEX3、PFKP、PGK2、PHF23、PHYHIP、PI4K2A
、PIK3C3、PIK3CA、PIK3CB、PIK3R4、PINK1、PLEKH
M1、PLOD2、PNPO、PPARGC1A、PPY、PRKAA1、PRKAA2
、PRKAB1、PRKAB2、PRKAG1、PRKAG2、PRKAG3、PRKD
2、PRKG1、PSEN1、PTPN22、RAB12、RAB1A、RAB1B、R
AB23、RAB24、RAB33B、RAB39、RAB7A、RB1CC1、RBM
18、REEP2、REP15、RFWD3、RGS19、RHEB、RIMS3、RN 30
F185、RNF41、RPS27A、RPTOR、RRAGA、RRAGB、RRAG
C、RRAGD、S100A8、S100A9、SCN1A、SERPINB10、SE
SN2、SFRP4、SH3GLB1、SIRT2、SLC1A3、SLC1A4、SL
C22A3、SLC25A19、SLC35B3、SLC35C1、SLC37A4、S
LC6A1、SLCO1A2、SMURF1、SNAP29、SNAPIN、SNF8、
SNRPB、SNRPB2、SNRPD1、SNRPF、SNTG1、SNX14、SP
ATA18、SQSTM1、SRPX、STAM、STAM2、STAT2、STBD1
、STK11、STK32A、STOM、STX12、STX17、SUPT3H、TB
C1D17、TBC1D25、TBC1D5、TCIRG1、TEAD4、TECPR1
、TECPR2、TFEB、TM9SF1、TMBIM6、TMEM203、TMEM2 40
08、TMEM39A、TMEM39B、TMEM59、TMEM74、TMEM93、
TNIK、TOLLIP、TOMM20、TOMM22、TOMM40、TOMM5、T
OMM6、TOMM7、TOMM70A、TP53INP1、TP53INP2、TRA
PPC8、TREM1、TRIM17、TRIM5、TSG101、TXLNA、UBA
52、UBB、UBC、UBQLN1、UBQLN2、UBQLN4、ULK1、ULK
2、ULK3、USP10、USP13、USP30、UVRAG、VAMP7、VAM
P8、VDAC1、VMP1、VPS11、VPS16、VPS18、VPS25、VP
S28、VPS33A、VPS33B、VPS36、VPS37A、VPS37B、VP
S37C、VPS37D、VPS39、VPS41、VPS4A、VPS4B、VTA1
、VTI1A、VTI1B、WDFY3、WDR45、WDR45L、WIPI1、WI 50

PI2、XBP1、YIPF1、ZCCHC17、ZFYVE1、ZKSCAN3、ZNF189、ZNF593及びZNF681からなる群から選択される1つ以上の遺伝子の発現を測定することにより決定される。一部の実施形態では、GeneSetScore (UP autophagy) は、例えば、図25Eを参照にして実施例7に例示される通り、RNA-seq、例えば単一細胞RNA-seq (scRNA-seq) を用いて決定される。一部の実施形態では、GeneSetScore (UP autophagy) は、遺伝子セット中の遺伝子全ての平均log正規化遺伝子発現値を取得することにより計算される。

【0267】

本明細書で使用されるとき、細胞の「GeneSetScore (Up resting vs. Down activated)」という用語は、細胞が、活性化T細胞表現型に対して休止T細胞表現型を示す程度を表すスコアを指す。より高いGeneSetScore (Up resting vs. Down activated) は、休止T細胞表現型の増加を示すのに対し、より低いGeneSetScore (Up resting vs. Down activated) は、活性化T細胞表現型の増加を示す。一部の実施形態では、GeneSetScore (Up resting vs. Down activated) は、休止T細胞で上方制御され、且つ/又は活性化T細胞で下方制御される1つ以上の遺伝子、例えばABCA7、ABCF3、ACAP2、AMT、ANKH、ATF7IP2、ATG14、ATP1A1、ATXN7、ATXN7L3B、BCL7A、BEX4、BSDC1、BTG1、BTG2、BTN3A1、C11orf21、C19orf22、C21orf2、CAMK2G、CARS2、CCNL2、CD248、CD5、CD55、CEP164、CHKB、CLK1、CLK4、CTSL1、DBP、DCUN1D2、DENND1C、DGKD、DLG1、DUSP1、EAPP、ECE1、ECHDC2、ERBB2IP、FAM117A、FAM134B、FAM134C、FAM169A、FAM190B、FAU、FLJ10038、FOXJ2、FOXJ3、FOXL1、FOXO1、FXVD5、FYB、HLA-E、HSPA1L、HYAL2、ICAM2、IFIT5、IFITM1、IKBKB、IQSEC1、IRS4、KIAA0664L3、KIAA0748、KLF3、KLF9、KRT18、LEF1、LINC00342、LIPA、LIPT1、LLGL2、LMBR1L、LPAR2、LTBP3、LYPD3、LZTFL1、MANBA、MAP2K6、MAP3K1、MARCH8、MAU2、MGEA5、MMP8、MPO、MSL1、MSL3、MYH3、MYLIP、NAGPA、NDST2、NISCH、NKTR、NLRP1、NOSIP、NPIP、NUMA1、PAIP2B、PAPD7、PBXIP1、PCIF1、PI4KA、PLCL2、PLEKHA1、PLEKHF2、PNISR、PPFIBP2、PRKCA、PRKCZ、PRKD3、PRMT2、PTP4A3、PXN、RASA2、RASA3、RASGRP2、RBM38、REPIN1、RNF38、RNF44、ROR1、RPL30、RPL32、RPLP1、RPS20、RPS24、RPS27、RPS6、RPS9、RXRA、RYK、SCAND2、SEMA4C、SETD1B、SETD6、SETX、SF3B1、SH2B1、SLC2A4RG、SLC35E2B、SLC46A3、SMAGP、SMARCE1、SMPD1、SNPH、SP140L、SPATA6、SPG7、SREK1IP1、SRSF5、STAT5B、SVIL、SYF2、SYNJ2BP、TAF1C、TBC1D4、TCF20、TECTA、TES、TMEM127、TMEM159、TMEM30B、TMEM66、TMEM8B、TP53TG1、TPCN1、TRIM22、TRIM44、TSC1、TSC22D1、TSC22D3、TSPYL2、TTC9、TTN、UBE2G2、USP33、USP34、VAMP1、VILL、VIPR1、VPS13C、ZBED5、ZBTB25、ZBTB40、ZC3H3、ZFP161、ZFP36L1、ZFP36L2、ZHX2、ZMYM5、ZNF136、ZNF148、ZNF318、ZNF350、ZNF512B、ZNF609、ZNF652、ZNF83、ZNF862及びZNF91からなる群から選択される1つ以上の遺伝子の発現を測定することにより決定

される。一部の実施形態では、GeneSetScore (Up resting vs . Down activated) は、例えば、図 24D を参照にして実施例 7 に例示される通り、RNA-seq、例えば単一細胞 RNA-seq (scRNA-seq) を用いて決定される。一部の実施形態では、GeneSetScore (Up resting vs . Down activated) は、遺伝子セット中の遺伝子全ての平均 log 正規化遺伝子発現値を取得することにより計算される。

【0268】

本明細書で使用されるとき、細胞の「GeneSetScore (Progressively up in memory differentiation)」は、メモリー分化における細胞の段階を表すスコアを指す。より高い GeneSetScore (Progressively up in memory differentiation) は、後期メモリー T 細胞表現型の増加を示すのに対し、より低い GeneSetScore (Progressively up in memory differentiation) は、早期メモリー T 細胞表現型の増加を示す。一部の実施形態では、GeneSetScore (UP autophagy) は、メモリー分化中に上方制御される 1 つ以上の遺伝子、例えば MTCH2、RAB6C、KIAA0195、SETD2、C2orf24、NRD1、GNA13、COPA、SELT、TNIP1、CBFA2T2、LRP10、PRKCI、BRE、ANKS1A、PNPLA6、ARL6IP1、WDFY1、MAPK1、GPR153、SHKBP1、MAP1LC3B2、PIP4K2A、HCN3、GTPBP1、TLN1、C4orf34、KIF3B、TCIRG1、PPP3CA、ATG4D、TYMP、TRAF6、C17orf76、WIPF1、FAM108A1、MYL6、NRM、SPCS2、GGT3P、GALK1、CLIP4、ARL4C、YWHAQ、LPCAT4、ATG2A、IDS、TBC1D5、DMPK、ST6GALNAC6、REEP5、ABHD6、KIAA0247、EMB、TSEN54、SPIRE2、PIWIL4、ZSCAN22、ICAM1、CHD9、LPIN2、SETD8、ZC3H12A、ULBP3、IL15RA、HLA-DQB2、LCP1、CHP、RUNX3、TMEM43、REEP4、MEF2D、ABL1、TMEM39A、PCBP4、PLCD1、CHST12、RASGRP1、C1orf58、C11orf63、C6orf129、FHOD1、DKFZp434F142、PIK3CG、ITPR3、BTG3、C4orf50、CNNM3、IFI16、AK1、CDK2AP1、REL、BCL2L1、MVD、TTC39C、PLEKHA2、FKBP11、EML4、FANCA、CDCA4、FUCA2、MFS D10、TBCD、CAPN2、IQGAP1、CHST11、PIK3R1、MYO5A、KIR2DL3、DLG3、MXD4、RALGDS、S1PR5、WSB2、CCR3、TIPARP、SP140、CD151、SOX13、KRTAP5-2、NF1、PEA15、PARP8、RNF166、UEVLD、LIMK1、CACNB1、TMX4、SLC6A6、LBA1、SV2A、LLGL2、IRF1、PPP2R5C、CD99、RAPGEF1、PPP4R1、OSBPL7、FOXP4、SLA2、TBC1D2B、ST7、JAZF1、GGA2、PI4K2A、CD68、LPGAT1、STX11、ZAK、FAM160B1、RORA、C8orf80、APOBEC3F、TGFB I、DNAJC1、GPR114、LRP8、CD69、CMIP、NAT13、TGFB1、FLJ00049、ANTXR2、NR4A3、IL12RB1、NTNG2、RDX、MLLT4、GPRIN3、ADCY9、CD300A、SCD5、ABI3、PTPN22、LGALS1、SYTL3、BMPR1A、TBK1、PMAIP1、RASGEF1A、GCNT1、GABARAPL1、STOM、CALHM2、ABCA2、PPP1R16B、SYNE2、PAM、C12orf75、CLCF1、MXRA7、APOBEC3C、CLSTN3、ACOT9、HIP1、LAG3、TNFAIP3、DCBLD1、KLF6、CACNB3、RNF19A、RAB27A、FADS3、DLG5、APOBEC3D、TNFRSF1B、ACTN4、TBKBP1、ATXN1、ARAP2、ARHGEF12、FAM53B、MAN1A1、FAM38A、PL

XNC1、GRLF1、SRGN、HLA-DRB5、B4GALT5、WIPI1、PTPRJ、SLFN11、DUSP2、ANXA5、AHNAK、NEO1、CLIC1、EIF2C4、MAP3K5、IL2RB、PLEKHG1、MYO6、GTDC1、EDARADD、GALM、TARP、ADAM8、MSC、HNRPLL、SYT11、ATP2B4、NHSL2、MATK、ARHGAP18、SLFN12L、SPATS2L、RAB27B、PIK3R3、TP53INP1、MBOAT1、GYG1、KATNAL1、FAM46C、ZC3HAV1L、ANXA2P2、CTNNA1、NPC1、C3AR1、CRIM1、SH2D2A、ERN1、YPEL1、TBX21、SLC1A4、FASLG、PHACTR2、GALNT3、ADRB2、PIK3AP1、TLR3、PLEKHA5、DUSP10、GNAO1、PTGDR、FRMD4B、ANXA2、EOMES、CADM1、MAF、TPRG1、NBEAL2、PPP2R2B、PELO、SLC4A4、KLRF1、FOSL2、RGS2、TGFB3、PRF1、MYO1F、GAB3、C17orf66、MICAL2、CYTH3、TOX、HLA-DRA、SYNE1、WEE1、PYHIN1、F2R、PLD1、THBS1、CD58、FAS、NETO2、CXCR6、ST6GALNAC2、DUSP4、AUTS2、C1orf21、KLRG1、TNIP3、GZMA、PRR5L、PRDM1、ST8SIA6、PLXND1、PTPRM、GFPT2、MYBL1、SLAMF7、FLJ16686、GNLY、ZEB2、CST7、IL18RAP、CCL5、KLRD1及びKLRB1からなる群から選択される1つ以上の遺伝子の発現を測定することにより決定される。一部の実施形態では、GeneSetScore(Progressively up in memory differentiation)は、例えば、図26Bを参照にして実施例7に例示される通り、RNA-seq、例えば単一細胞RNA-seq(scRNA-seq)を用いて決定される。一部の実施形態では、GeneSetScore(Progressively up in memory differentiation)は、遺伝子セット中の遺伝子全ての平均log正規化遺伝子発現値を取得することにより計算される。

【0269】

本明細書で使用されるとき、細胞の「GeneSetScore(Up TEM vs . Down TN)」という用語は、細胞が、ナイーブT細胞(TN)表現型に対してエフェクターメモリーT細胞(TEM)表現型を示す程度を表すスコアを指す。より高いGeneSetScore(Up TEM vs . Down TN)は、TEM表現型の増加を示すのに対し、より低いGeneSetScore(Up TEM vs . Down TN)は、TN表現型の増加を示す。一部の実施形態では、GeneSetScore(Up TEM vs . Down TN)は、TEM細胞で上方制御され、且つ/又はTN細胞で下方制御される1つ以上の遺伝子、例えばMYO5A、MXD4、STK3、S1PR5、GLCCI1、CCR3、SOX13、KRTAP5-2、PEA15、PARP8、RNF166、UEVLD、LIMK1、SLC6A6、SV2A、KPNA2、OSBPL7、ST7、GGA2、PI4K2A、CD68、ZAK、RORA、TGFB1、DNAJC1、JOSD1、ZFYVE28、LRP8、OSBPL3、CMIP、NAT13、TGFB1、ANTXR2、NR4A3、RDX、ADCY9、CHN1、CD300A、SCD5、PTPN22、LGALS1、RASGEF1A、GCNT1、GLUL、ABCA2、CLDND1、PAM、CLCF1、MXRA7、CLSTN3、ACOT9、METRNL、BMPR1A、LRIG1、APOBEC3G、CACNB3、RNF19A、RAB27A、FADS3、ACTN4、TBKBP1、FAM53B、MAN1A1、FAM38A、GRLF1、B4GALT5、WIPI1、DUSP2、ANXA5、AHNAK、CLIC1、MAP3K5、ST8SIA1、TARP、ADAM8、MATK、SLFN12L、PIK3R3、FAM46C、ANXA2P2、CTNNA1、NPC1、SH2D2A、ERN1、YPEL1、TBX21、STOM、PHACTR2、GBP5、ADRB2、PIK3AP1、DUSP10、PTGDR、EOMES、MAF、TPRG1、NBEAL2、NCAPH、SLC4A4

、FOSL2、RGS2、TGFB3、MYO1F、C17orf66、CYTH3、WEE1、PYHIN1、F2R、THBS1、CD58、AUTS2、FAM129A、TNIP3、GZMA、PRR5L、PRDM1、PLXND1、PTPRM、GFP T2、MYBL1、SLAMF7、ZEB2、CST7、CCL5、GZMK及びKLR B1からなる群から選択される1つ以上の遺伝子の発現を測定することにより決定される。一部の実施形態では、GeneSetScore (Up TEM vs. Down TN) は、例えば、図26Cを参照にして実施例7に例示される通り、RNA-seq、例えば単一細胞RNA-seq (scRNA-seq) を用いて決定される。一部の実施形態では、GeneSetScore (Up TEM vs. Down TN) は、遺伝子セット中の遺伝子全ての平均log正規化遺伝子発現値を取得することにより計算される。

【0270】

GeneSetScore値(例えば、GeneSetScore中央値)に関連して、正のGeneSetScoreが100%減少するとき、この値は0になる。負のGeneSetScoreが100%増加するとき、この値は0になる。例えば、図25Aにおいて、第1日サンプルのGeneSetScore中央値は、-0.084であり；第9日サンプルのGeneSetScore中央値は、0.035であり；入力サンプルのGeneSetScore中央値は、-0.1である。図25Aにおいて、入力サンプルのGeneSetScore中央値の100%の増加により、0のGeneSetScore値が得られ；入力サンプルのGeneSetScore中央値の200%の増加により、0.1のGeneSetScore値が得られる。図25Aにおいて、第9日サンプルのGeneSetScore中央値の100%の減少により、0のGeneSetScore値が得られ；第9日サンプルのGeneSetScore中央値の200%の減少により、-0.035のGeneSetScore値が得られる。

【0271】

本明細書で使用されるとき、用語「ビーズ」は、直径約0.1 μ m~数ミリメートルのサイズの固体表面を備える個別の粒子を指す。ビーズは、球形(例えば、マイクロスフィア)であり得るか、又は不規則な形状を有し得る。ビーズは、限定されないが、常磁性材料、セラミック、プラスチック、ガラス、ポリスチレン、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテックス、Sephadex (商標)、セルロース、ナイロンなどを含め、多様な材料を含み得る。一部の実施形態では、ビーズは、比較的均一で、直径約4.5 μ mの、球形、超常磁性ポリスチレンビーズであり、例えばCD3(例えば、CD3)及びCD28に対する抗体の混合物でコーティングされている、例えばそれと結合している。一部の実施形態では、ビーズは、Dynabeads (登録商標)である。一部の実施形態では、抗CD3及び抗CD28抗体の双方が同じビーズに結合されて、抗原提示細胞によるT細胞の刺激を模倣する。Dynabeads (登録商標)の特性並びに細胞単離及び増殖のためのDynabeads (登録商標)の使用は当技術分野で公知であり、例えばNeurauter et al., Cell isolation and expansion using Dynabeads, Adv Biochem Eng Biotechnol 2007; 106: 41-73を参照されたく、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0272】

本明細書で使用されるとき、用語「ナノマトリックス」は、可動性ポリマー鎖のマトリックスを含むナノ構造を指す。ナノマトリックスは、1~500nm、例えば10~200nmのサイズである。一部の実施形態では、可動性ポリマー鎖のマトリックスは、T細胞に活性化シグナルを提供する1つ以上のアゴニスト、例えばアゴニスト抗CD3及び/又は抗CD28抗体に結合される。一部の実施形態では、ナノマトリックスは、1つ以上の刺激分子のアゴニスト及び/又は1つ以上の共刺激分子のアゴニストに結合、例えば共有結合したコロイドポリマーナノマトリックスを含む。一部の実施形態では、1つ以上の刺激分子のアゴニストは、CD3アゴニスト(例えば、抗CD3アゴニスト抗体)である

。一部の実施形態では、1つ以上の刺激分子のアゴニストは、CD28アゴニスト（例えば、抗CD28アゴニスト抗体）である。一部の実施形態では、ナノマトリックスは、例えば、抗CD3及び/又は抗CD28抗体などのアゴニストの結合点として、固体表面の非存在を特徴とする。一部の実施形態では、ナノマトリックスは、国際公開第2014/048920A1号パンフレットに開示されるナノマトリックス又はMiltenyi Biotec GmbH製のMACS（登録商標）GMP T Cell Trans Act（商標）キットに提供されるようなナノマトリックスであり、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。MACS（登録商標）GMP T Cell Trans Act（商標）は、ヒトCD3及びCD28に対するヒト化組換えアゴニスト抗体に共有結合されたコロイドポリマーナノマトリックスから構成される。

10

【0273】

本明細書に記載の組成物及び方法の様々な実施形態について以下でさらに詳細に説明する。追加的定義は、本明細書全体を通して記載される。

【0274】

本明細書には、1つ以上のキメラ抗原受容体（CAR）を発現する細胞を用いる、癌などの疾患の処置のための物質の組成物及び使用方法が提供される。一部の実施形態では、本発明は、1つ以上のCARを発現するように操作された細胞（例えば、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞若しくはNK細胞）を提供し、ここで、CAR T細胞（「CAR T」）又はCAR NK細胞は、抗腫瘍特性を呈示する。

【0275】

一部の実施形態では、細胞は、少なくとも2つのCARを発現する。一部の実施形態では、細胞は、第1抗原に結合する第1CARと、第2抗原に結合する第2CARを発現する。一部の実施形態では、第1抗原と第2抗原は異なる。一部の実施形態では、第1抗原は、BCMAである。一部の実施形態では、第1CARは、本明細書に開示されるCDR、VH、VL、scFv若しくはCAR配列、例えば、表3～15、19、20、22及び26に開示される配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む抗BCMA CAR、例えば、本明細書に開示される抗BCMA CARである。一部の実施形態では、第2抗原は、CD19である。一部の実施形態では、第2抗原は、本明細書に開示されるCDR、VH、VL、scFv若しくはCAR配列、例えば、表2、19及び22に開示される配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む抗CD19 CAR、例えば、本明細書に開示される抗CD19 CARである。一部の実施形態では、第1CAR及び第2CARは、単一の核酸分子に配置される核酸配列により発現される。一部の実施形態では、第1CARをコードする核酸配列と第2CARをコードする核酸配列は、自己切断部位をコードする核酸、例えば、P2A部位、T2A部位、E2A部位又はF2A部位によって隔てられる。一部の実施形態では、細胞は、本明細書に開示される二重CARを発現する細胞である。一部の実施形態では、第1CAR及び第2CARは、個別の核酸分子に配置される核酸配列により発現される。一部の実施形態では、本明細書に開示される共形質導入システムを用いて、細胞を操作する。

20

30

【0276】

一部の実施形態では、細胞は、第1抗原及び第2抗原に結合するCARを発現する。一部の実施形態では、CARは、本明細書に開示されるダイアボディCARである。一部の実施形態では、CARは、第1VH（VH1）、第1VL（VL1）、第2VH（VH2）及び第2VL（VL2）を有する結合ドメインを含む。一部の実施形態では、VH1及びVL1は、第1抗原に結合し、且つVH2及びVL2は、第2抗原に結合する。一部の実施形態では、VH1、VL1、VH2及びVL2は、N末端からC末端まで、以下の構成：VH1 - 任意選択でリンカー1（「L1」） - VH2 - 任意選択でリンカー2（「L2」） - VL2 - 任意選択でリンカー3（「L3」） - VL1、VH1 - 任意選択でL1 - VL2 - 任意選択でL2 - VH2 - 任意選択でL3 - VL1、VL1 - 任意選択でL1 - VH2 - 任意選択でL2 - VL2 - 任意選択でL3 - VH1、VL1 - 任意選択でL1

40

50

- V L 2 - 任意選択で L 2 - V H 2 - 任意選択で L 3 - V H 1、V H 2 - 任意選択で L 1
 - V H 1 - 任意選択で L 2 - V L 1 - 任意選択で L 3 - V L 2、V H 2 - 任意選択で L 1
 - V L 1 - 任意選択で L 2 - V H 1 - 任意選択で L 3 - V L 2、V L 2 - 任意選択で L 1
 - V H 1 - 任意選択で L 2 - V L 1 - 任意選択で L 3 - V H 2 ; 又は V L 2 - 任意選択で
 L 1 - V L 1 - 任意選択で L 2 - V H 1 - 任意選択で L 3 - V H 2 で配列される。

【 0 2 7 7 】

一部の実施形態では、本発明の C A R は、抗原結合ドメインを細胞内シグナル伝達分子と結合させる。例えば、一部の実施形態では、細胞内シグナル伝達分子として、限定されないが、C D 3 鎖、4 - 1 B B 及び C D 2 8 シグナル伝達モジュール及びそれらの組み合わせが挙げられる。

【 0 2 7 8 】

さらには、本発明は、疾患の中でも、癌又はいずれかの悪性疾患若しくは自己免疫疾患を治療するための C A R 組成物及び薬剤におけるそれらの使用又は方法も提供する。

【 0 2 7 9 】

キメラ抗原受容体 (C A R)

本発明は、免疫エフェクター細胞を、癌に指向させる、1つ以上の C A R を含有するように操作された免疫エフェクター細胞 (例えば、T細胞又はNK細胞) を提供する。これは、癌関連抗原に対して特異的である C A R 上の抗原結合ドメインを通して達成される。本明細書に記載の C A R により標的化され得る2つのクラスの癌関連抗原 (腫瘍抗原) が存在する: (1) 癌細胞の表面に発現される癌関連抗原; 及び (2) それ自体は細胞内であるが、そのような抗原のフラグメント (ペプチド) が M H C (主要組織適合複合体) により癌細胞の表面に提示される、癌関連抗原。

【 0 2 8 0 】

従って、免疫エフェクター細胞 (例えば、本明細書に記載の方法によって得られるもの) は、以下の癌関連抗原 (腫瘍抗原) の1つを標的とする C A R を含有するように操作することができる: C D 1 9、C D 1 2 3、C D 2 2、C D 3 0、C D 1 7 1、C S - 1、C L L - 1、C D 3 3、E G F R v I I I、G D 2、G D 3、B C M A、T n A g、P S M A、R O R 1、F L T 3、F A P、T A G 7 2、C D 3 8、C D 4 4 v 6、C E A、E P C A M、B 7 H 3、K I T、I L - 1 3 R a 2、メソテリン、I L - 1 1 R a、P S C A、V E G F R 2、ルイス Y、C D 2 4、P D G F R - 、P R S S 2 1、S S E A - 4、C D 2 0、葉酸受容体、E R B B 2 (H e r 2 / n e u)、M U C 1、E G F R、N C A M、P r o s t a s e、P A P、E L F 2 M、エフリン B 2、I G F - I 受容体、C A I X、L M P 2、g p 1 0 0、b c r - a b 1、チロシナーゼ、E p h A 2、フコシル G M 1、s L e、G M 3、T G S 5、H M W M A A、o - アセチル - G D 2、葉酸受容体、T E M 1 / C D 2 4 8、T E M 7 R、C L D N 6、T S H R、G P R C 5 D、C X O R F 6 1、C D 9 7、C D 1 7 9 a、A L K、ポリシアル酸、P L A C 1、G l o b o H、N Y - B R - 1、U P K 2、H A V C R 1、A D R B 3、P A N X 3、G P R 2 0、L Y 6 K、O R 5 1 E 2、T A R P、W T 1、N Y - E S O - 1、L A G E - 1 a、レグマイン、H P V E 6、E 7、M A G E - A 1、M A G E A 1、E T V 6 - A M L、精子タンパク質 1 7、X A G E 1、T i e 2、M A D - C T - 1、M A D - C T - 2、F o s 関連抗原 1、p 5 3、p 5 3 変異体、プロステイン、サバイピン及びテロメラーゼ、P C T A - 1 / ガレクチン 8、M e l a n A / M A R T 1、R a s 変異体、h T E R T、肉腫転座切断点、M L - I A P、E R G (T M P R S S 2 E T S 融合遺伝子)、N A 1 7、P A X 3、アンドロゲン受容体、サイクリン B 1、M Y C N、R h o C、T R P - 2、C Y P 1 B 1、B O R I S、S A R T 3、P A X 5、O Y - T E S 1、L C K、A K A P - 4、S S X 2、R A G E - 1、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、R U 1、R U 2、腸カルボキシルエステラーゼ及び m u t h s p 7 0 - 2。

【 0 2 8 1 】

本明細書に記載される C A R 分子の一部となり得る様々な成分の非限定的な例の配列を表 1 に列挙し、ここで、「a a」は、アミノ酸を表し、「n a」は、対応するペプチドを

10

20

30

40

50

コードする核酸を表す。

【 0 2 8 2 】

【 表 1 】

表 1. CAR の様々な成分の配列

配列番号	説明	配列
配列番号 11	EF-1 α プロモーター (na)	CGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAAGTGGGCAGAGCGCACATCGCC CACAGTCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTTCGGCAATTGAACC GGTGCC TAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGAT GTCGTGTA CTGGCTCCGCCTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACC GTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTCGCAACG GGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCG CGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCCTGCCCTGAA TTA CTTCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTT CGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCCTTAAG GAGCCCTTCGCCTCGTGTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGGCG TGGGGCCGCCGCTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCCTGTCT CGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTGTATGAC CTGCTGCGACGCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTGTAAATGCG GGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGG CGGGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTCCGGCGAGG CGGGCC TGCAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGT CTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCCGG TGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCCGGTTCGGCAC CAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGCCCTGCTGC AGGGAGCTCAAATGGAGGACCGCGGCTCGGGAGAGCGGGC GGGTGAGTACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCTCA GCCGTCGTTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCA GGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTGCTTTA GGTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCACACTG AGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTGATGTA ATTCTCCTTGGAAATTTGCCCTTTTGTAGTTTGGATCTTGGTTCA TCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTCA GGTGTCGTGA

10

20

30

40

50

【 0 2 8 3 】

【表 2】

配列番号 1	リーダー (aa)	MALPVTALLLPLALLLHAARP	
配列番号 12	リーダー (na)	ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCT GCTGCATGCCGCTAGACCC	
配列番号 199	リーダー (na)	ATGGCCCTCCCTGTACCCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTG CTCCACGCCGCTCGGCC	
配列番号 351	リーダー (aa)	MLLVTSLLLCELPHPAFLIP	
配列番号 352	リーダー (na)	ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACA CCCAGCATTCCTCCTGATCCCA	
配列番号 353	リーダー (na)	ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCCA CCCCGCCTTCTGCTGATCCCC	
配列番号 2	CD 8 ヒンジ (aa)	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD	10
配列番号 13	CD8 ヒンジ (na)	ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCA TCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCC AGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCC TGTGAT	
配列番号 3	Ig4 ヒンジ (aa)	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL LGKM	
配列番号 14	Ig4 ヒンジ (na)	GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGCCCTGCCCCCGA GTTCTGGGCGGACCCAGCGTGTCTGTTCCCCCAAGCCCA AGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCGAGGTGACCTGTGT GGTGGTGGACGTGTCCAGGAGGACCCCGAGGTCCAGTTC AAC TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGC CCCGGGAGGAGCAGTTCAATAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGT GCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATAC AAGTGTAAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCAGCAGCATCGAGA AAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGGT GTACACCCTGCCCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAG GTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCAGAACTA CAAGACCACCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCC TGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAGGG CAACGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACC ACTACACCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATG	20
配列番号 4	IgD ヒンジ (aa)	RWPESPKAQASSVPTAQQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKK KEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATF TCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSHS RLTLPRSLWNAGTSVTCNLNHPQLPQRLMALREPAAQAPVKLSL NLLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPNILLMWLEDQREVNTSGFAPA RPPQPSTTFWAWSVLRVPAPPSPQATYTCVVSHEDSRTLLNAS RSLEVSIVTDH	30

【 0 2 8 4 】

40

50

【表 3】

配列番号 15	IgD ヒンジ (na)	AGGTGGCCCCGAAAGTCCCAAGGCCAGGCATCTAGTGTTCCTA CTGCACAGCCCCAGGCAGAAGGCAGCCTAGCCAAAGCTACTAC TGCACCTGCCACTACGCACAATACTGGCCGTGGCCGGGGAGGAG AAGAAAAAGGAGAAAAGAGAAAGAAGAACAGGAAAGAGAGGGA GACCAAGACCCCTGAATGTCCATCCCATAACCCAGCCGCTGGGC GTCTATCTCTTGACTCCCGCAGTACAGGACTTGTGGCTTAGAGA TAAGGCCACCTTTACATGTTTCGTCGTGGGCTCTGACCTGAAGG ATGCCCATTTGACTTGGGAGGTTGCCGGAAAGGTACCCACAGG GGGGGTTGAGGAAGGGTTGCTGGAGCGCCATTCCAATGGCTCT CAGAGCCAGCACTCAAGACTCACCCCTCCGAGATCCCTGTGGA ACGCCGGGACCTCTGTCACATGTAATCAATCATCCTAGCCCTG CCCCACAGCGTCTGATGGCCCTTAGAGAGCCAGCCGCCCAGG CACCAGTTAAGCTTAGCCTGAATCTGCTCGCCAGTAGTGATCCC CCAGAGGCCGCCAGCTGGCTCTTATGCGAAGTGTCCGGCTTTAG CCCGCCCAACATCTTGCTCATGTGGCTGGAGGACCAGCGAGAA GTGAACACCAGCGGCTTCGCTCCAGCCCGGCCCCACCCACAGC CGGGTTCTACCACATTCTGGGCCTGGAGTGTCTTAAGGGTCCCA GCACCACCTAGCCCCAGCCAGCCACATAACCTGTGTGTGTGTC CCATGAAGATAGCAGGACCCTGCTAAATGCTTCTAGGAGTCTG GAGGTTTCTACGTGACTGACCAATT
配列番号 6	CD8 膜貫通 (aa)	IYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYC
配列番号 17	CD8 膜貫通 (na)	ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCT CCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACTGC
配列番号 7	4-1BB 細胞内 ドメイン (aa)	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCEL
配列番号 18	4-1BB 細胞内 ドメイン (na)	AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCAT TTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAG CTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG
配列番号 8	CD27 (aa)	QRRKYRSNKGESVPEAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACS P
配列番号 19	CD27 (na)	AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTACTACATGAACA TGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCAATTACCAGCC CTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC
配列番号 9	CD3- ζ (aa) (Q/K 突然変異体)	RVKFSRSADAPAYKQGGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKQHD GLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
配列番号 20	CD3- ζ (na) (Q/K 突然変異体)	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACAAGC AGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAG AGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCT GAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGC CTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCCTACA GTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGC ACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACAC CTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC
配列番号 10	CD3- ζ (aa) (NCBI 参照配列 NM 000734.3)	RVKFSRSADAPAYQGGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKQHD GLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

10

20

30

【 0 2 8 5 】

40

50

【表 4】

配列番号 21	CD3- ζ (na) (NCBI 参照配列 NM_000734.3)	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAG CAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGA AGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGAC CCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAA GGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCC TACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGCAAG GGGCACGATGGCCTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGG ACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC
配列番号 36	CD28 細胞内 ドメイン (アミノ酸 配列)	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAAYRS
配列番号 37	CD28 細胞内 ドメイン (ヌクレオチド 配列)	AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTACTACATGAACA TGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCC CTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC
配列番号 38	ICOS 細胞内 ドメイン (アミノ酸 配列)	T K K K Y S S S V H D P N G E Y M F M R A V N T A K K S R L T D V T L
配列番号 39	ICOS 細胞内 ドメイン (ヌクレオチド 配列)	ACAAAAAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAACGGTG AATACATGFTCATGAGAGCAGTGAACACAGCCAAAAAATCCAG ACTCACAGATGTGACCCTA
配列番号 5	GS ヒンジ/リンカー (aa)	GGGSGGGGS
配列番号 16	GS ヒンジ/リンカー (na)	GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC
配列番号 40	GS ヒンジ/リンカー (na)	GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGGGGTTCC
配列番号 25	リンカー	GGGGS
配列番号 26	リンカー	(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser) _n , (n = 1~6), 例えば、GGGSGGGGS GGGSGGGGS GGGSGGGGS
配列番号 27	リンカー	GGGSGGGGS GGGSGGGGS
配列番号 28	リンカー	GGGSGGGGS GGGGS
配列番号 29	リンカー	GGGS
配列番号 41	リンカー	(Gly-Gly-Gly-Ser) _n (n は、1 以上の整数である)
配列番号 42	リンカー	(Gly-Gly-Gly-Ser) _n , (n = 1~10), 例えば、GGGSGGGSGG GSGGGSGGGS GGGSGGGSGG GSGGGSGGGS
配列番号 43	リンカー	GSTSGSGKPGSGEGSTKG
配列番号 30	poly(A)	(A) ₅₀₀₀ この配列は、50~5000 のアデニンを含み得る。
配列番号 31	polyT	(T) ₁₀₀
配列番号 32	polyT	(T) ₅₀₀₀ この配列は、50~5000 のチミンを含み得る。

10

20

30

【 0 2 8 6 】

40

50

【表 5】

配列番号 33	poly(A)	(A) ₅₀₀₀ この配列は、100~5000 のアデニンを含み得る。
配列番号 34	poly(A)	(A) ₄₀₀ この配列は、100~400 のアデニンを含み得る。
配列番号 35	poly(A)	(A) ₂₀₀₀ この配列は、50~2000 のアデニンを含み得る。
配列番号 22	PD1 CAR (aa)	<u>pgwfldspdrpwnppfspallvvttegdnatficsfsntsesfvlnwyrmspsnqtdklaafpedrsq</u> <u>pgqdcfrfvqlpngrdfhmsvvrarrndsgtlylcgaislapkqikeslraelrvterraevptahpsp</u> <u>sprpaagfqlvttppaprpptpaptiasqplsrlpeacrpaaggavhtrglfacdiyiwaplagtcgvl</u> <u>llslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrpfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqn</u> <u>qlynelnlgrrreydvlkrrgrdpemggkprknppqeglynelqkdkmaeayseigmkgerr</u> <u>gkghdglyqglistatkdtaldalhmqlppr</u>
配列番号 23	PD-1 CAR (na) (PD1 ECD は 下線部)	<u>aifggccctcctgtcactgcctctcttccccctgcactcctcctccacgcccgtagaccaccggat</u> <u>ggttctcgaactcctccgafccgcccgtgaaatccccaacctctcaccggcactctgtgactgag</u> <u>ggcgataatgcgactcctcactgctcgtcttcccaaacctccgaaatcattcgtctgaactgtagccat</u> <u>gagcccgtaaacacagaccgacaagctcggcggcttccggaaagatcggcgaaccgggacagat</u> <u>fgtgcgtcccgtagactcaactccgaatggcagagactccacatgagcgtgctcccgctagggca</u> <u>aacgactccgggactactctgctggagccatctcgtcgcctaaaggccccaaatcaagaagagctt</u> <u>gagggccgaactgagagtaccgagcgcaagctgaggtgccactgcacatccatcccatccct</u> <u>ccgctcggggcagttcagaccctgctcagaccactccggcggcggcccaccgactccggccc</u> <u>caactatcgcgagccagcccctgctgtagggcggaaagcatgccgccctgccggcggaggtgctgt</u> <u>gcataccggggattgactcgcagatctacatitggctctctcgcggaaactgtggcgtgct</u> <u>cctctgtccctggtcactaccctgtactgcaagcggggtcggaaaagcttctgtacatitcaagcagcc</u> <u>cttcagaggccggtgcaaacaccagaggagggagcgttctcctcgcgggtcccccgaagaggaag</u> <u>aaggaggtgagcagctgctgaggttctccggagcggcagccccctataagcagggcca</u> <u>gaaccagctgtacaacgaactgaacctgggacggcgggaagagtacgatgtgctggacaagcggcgc</u> <u>ggccgggaccggaaatggggcgggaagcctagaagaagaacccctcaggaaggcctgtataacgag</u> <u>ctgcagaaggacaagatggcggagcctactccgaaattgggatgaaggagagcggcggaggggga</u> <u>aaggggcagcagggcctgtaccaaggactgtccaccgccaccaaggaacacatagatgcctgcacat</u> <u>gcaggccctcccccctcgc</u>
配列番号 24	PD-1 CAR (aa) シグナル付き (PD1 ECD は 下線部)	<u>malpvttallplallhaarppgwfldspdrpwnppfspallvvttegdnatficsfsntsesfvlnwyr</u> <u>mspsnqtdklaafpedrsqpgqdcfrfvqlpngrdfhmsvvrarrndsgtlylcgaislapkqikesl</u> <u>raelrvterraevptahpspsprpaagfqlvttppaprpptpaptiasqplsrlpeacrpaaggavhtrgl</u> <u>dfacdiyiwaplagtcgvl</u> <u>llslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrpfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqn</u> <u>qlynelnlgrrreydvlkrrgrdpemggkprknppqeglynelqkdkmaeayseigmkgerr</u> <u>gkghdglyqglistatkdtaldalhmqlppr</u>

10

20

【0287】

30

一部の実施形態において、抗原結合ドメインは、標的細胞の表面上の対リガンドに結合する分子の細胞外ドメイン又はその対リガンド結合フラグメントを含む。

【0288】

免疫エフェクター細胞は、CARをコードする配列を含む組換えDNA構築物を含むことができ、CARは、腫瘍抗原、例えば本明細書に記載の腫瘍抗原及び細胞内シグナル伝達ドメインに特異的に結合する抗原結合ドメイン（例えば、抗体又は抗体フラグメント、TCR又はTCRフラグメント）を含む。細胞内シグナル伝達ドメインは共刺激シグナル伝達ドメイン及び/又は一次シグナル伝達ドメイン、例えば、鎖を含み得る。他の箇所に記載されるように、本明細書に記載される方法は、細胞（例えば、T制御性枯渇細胞の集団からのもの）を、CAR、例えば、本明細書に記載されるCARをコードする核酸で形質導入することを含み得る。

40

【0289】

一部の実施形態において、CARはscFvドメインを含み、scFvの前には、配列番号1に提供されるような任意選択のリーダー配列があり得、後ろには、配列番号2又は配列番号36又は配列番号38に提供されるような任意選択のヒンジ配列、配列番号6に提供されるような膜貫通領域、配列番号7又は配列番号16を含む細胞内シグナル伝達ドメイン及び配列番号9又は配列番号10を含むCD3配列があり得、例えば、これらのドメインは、連続しており、同じリーディングフレーム内にあり、単一の融合タンパク質を形成する。

【0290】

50

一部の実施形態において、例示的 C A R 構築物は、任意選択のリーダー配列（例えば、本明細書に記載されるリーダー配列）、細胞外抗原結合ドメイン（例えば、本明細書に記載される抗原結合ドメイン）、ヒンジ（例えば、本明細書に記載されるヒンジ領域）、膜貫通ドメイン（例えば、本明細書に記載される膜貫通ドメイン）及び細胞内刺激ドメイン（例えば、本明細書に記載される細胞内刺激ドメイン）を含む。一部の実施形態において、例示的 C A R 構築物は、任意選択のリーダー配列（例えば、本明細書に記載されるリーダー配列）、細胞外抗原結合ドメイン（例えば、本明細書に記載される抗原結合ドメイン）、ヒンジ（例えば、本明細書に記載されるヒンジ領域）、膜貫通ドメイン（例えば、本明細書に記載される膜貫通ドメイン）、細胞内共刺激シグナル伝達ドメイン（例えば、本明細書に記載される共刺激シグナル伝達ドメイン）及び / 又は細胞内一次シグナル伝達ドメイン（例えば、本明細書に記載される一次シグナル伝達ドメイン）を含む。

10

【0291】

例示的なリーダー配列は、配列番号 1 として提供される。別の例示的なリーダーは、配列番号 351 に提供されるか、又は配列番号 352 若しくは 353 によってコードされるものを含む。例示的なヒンジ / スペーサー配列は、配列番号 2、又は配列番号 36、又は配列番号 38 として提供される。例示的な膜貫通ドメイン配列は、配列番号 6 として提供される。例示的な 4 - 1 B B タンパク質の細胞内シグナル伝達ドメインの配列は、配列番号 7 として提供される。例示的な C D 27 の細胞内シグナル伝達ドメインの配列の例は、配列番号 16 として提供される。例示的な C D 3 ドメイン配列は、配列番号 9 又は配列番号 10 として提供される。

20

【0292】

一部の実施形態において、免疫エフェクター細胞は、C A R をコードする核酸分子を含む組換え核酸構築物を含み、核酸分子は、抗原結合ドメインをコードする核酸配列を含み、この配列は、細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列に連続しており、それと同じリーディングフレーム内にある。C A R に使用し得る例示的細胞内シグナル伝達ドメインには、限定されないが、例えば C D 3 - 、C D 28、4 - 1 B B などの 1 つ以上の細胞内シグナル伝達ドメインが含まれる。一部の例では、C A R は、C D 3 - 、C D 28、C D 27、4 - 1 B B などの任意の組み合わせを含み得る。

【0293】

所望の分子をコードする核酸配列は、標準的な技法を用いて、例えば核酸分子を発現する細胞からのライブラリーをスクリーニングすることによるか、それを含むことが知られるベクターから核酸分子を誘導することによるか、又はそれを含む細胞及び組織から直接単離することによるなど、当技術分野において公知の組換え方法を用いて得ることができる。代わりに、目的の核酸はクローニングでなく、むしろ合成的に作製することができる。

30

【0294】

C A R をコードする核酸は、例えばレトロウイルス又はレンチウイルスベクター構築物を使用して、免疫エフェクター細胞に導入することができる。

【0295】

C A R をコードする核酸は、例えば、細胞に直接トランスフェクトされ得る R N A 構築物を使用しても免疫エフェクター細胞に導入され得る。トランスフェクションに使用するための m R N A の作成方法には、特別に設計したプライマーによるテンプレートのインビトロ転写 (I V T) と、続くポリ (A) 付加が含まれ、それにより、3' 及び 5' 非翻訳配列 (「U T R」) (例えば、本明細書に記載の 3' 及び / 又は 5' U T R)、5' キャップ (例えば、本明細書に記載の 5' キャップ) 及び / 又は配列内リボソーム進入部位 (I R E S) (例えば、本明細書に記載の I R E S)、発現させようとする核酸及びポリ (A) テールを含む構築物、典型的には 50 ~ 2000 塩基長 (例えば、実施例に記載されるもの、例えば、配列番号 35) が産生される。このように産生された R N A は、異なる種の細胞において効率的にトランスフェクトされ得る。一部の実施形態において、テンプレートは、C A R の配列を含む。一部の実施形態において、R N A C A R ベクターは、電気

40

50

穿孔によって細胞、例えばT細胞に、形質導入される。

【0296】

抗原結合ドメイン

一部の実施形態において、複数の免疫エフェクター細胞、例えばT制御性枯渴細胞の集団は、抗原結合ドメインとも称される標的特異的結合要素を含むCARをコードする核酸を含む。結合要素の選択は、標的細胞の表面を定義するリガンドのタイプ及び数に依存する。例えば、抗原結合ドメインは、特定の病状に関連する標的細胞上の細胞表面マーカーとして作用するリガンドを認識するように選択され得る。従って、本明細書に記載のCARにおいて抗原結合ドメインのリガンドとして作用し得る細胞表面マーカーの例には、ウイルス、細菌及び寄生虫感染、自己免疫疾患並びに癌細胞に関連するものが含まれる。

10

【0297】

一部の実施形態において、抗原結合ドメインを含むCARの一部は、腫瘍抗原、例えば本明細書に記載される腫瘍抗原を標的とする抗原結合ドメインを含む。

【0298】

抗原結合ドメインは、限定されないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、組換え抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体及びその機能性フラグメント、例えば、限定されないが、重鎖可変ドメイン(VH)、軽鎖可変ドメイン(VL)及びラクダ科動物由来ナノボディの可変ドメイン(VHH)などのシングルドメイン抗体及び組換えフィブロネクチンドメイン、T細胞受容体(TCR)又はそのフラグメント、例えば、単鎖TCRなど、抗原結合ドメインとして機能することが当技術分野において公知の代替的足場を含め、抗原に結合する任意のドメインであり得る。一部の例において、抗原結合ドメインは、CARが最終的に使用されることになる同じ種に由来することが有益である。例えば、ヒトでの使用には、CARの抗原結合ドメインが抗体又は抗体フラグメントの抗原結合ドメインにヒト又はヒト化残基を含むことが有益であり得る。

20

【0299】

CD19CAR

一部の実施形態において、本明細書に記載されるCAR発現細胞は、CD19CAR発現細胞(例えば、ヒトCD19に結合するCARを発現する細胞)である。

【0300】

一部の実施形態において、CD19CARの抗原結合ドメインは、Nicholson et al. Mol. Immun. 34(16-17): 1157-1165(1997)に記載されるFMC63 scFvフラグメントと同じであるか又は類似の結合特異性を有する。一部の実施形態において、CD19CARの抗原結合ドメインは、Nicholson et al. Mol. Immun. 34(16-17): 1157-1165(1997)に記載されるscFvフラグメントを含む。

30

【0301】

一部の実施形態において、CD19CARは、国際公開第2014/153270号パンフレット(参照により本明細書に組み込まれる)の表3に従う抗原結合ドメイン(例えば、ヒト化抗原結合ドメイン)を含む。国際公開第2014/153270号パンフレットは、様々なCAR構築物の結合及び有効性をアッセイする方法も記載する。

40

【0302】

一部の実施形態において、親マウスscFv配列は、国際公開第2012/079000号パンフレット(参照により本明細書に組み込まれる)に記載されるCAR19構築物である。一部の実施形態において、抗CD19結合ドメインは、国際公開第2012/079000号パンフレットに記載されるscFvである。

【0303】

一部の実施形態において、CAR分子は、国際公開第2012/079000号パンフレットの配列番号12に記載される融合ポリペプチド配列を含み、これは、ヒトCD19に特異的に結合するマウス由来のscFvフラグメントを提供する。

【0304】

50

一部の実施形態において、CD19CARは、国際公開第2012/079000号パンフレットの配列番号12に記載されるアミノ酸配列を含む。

【0305】

一部の実施形態において、アミノ酸配列は、

【化1】

Diqmtqtsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnwyqqkpdgtvkliiyhtsrllhsgvpsrfsfgsgsgtdytlisnleqediayfcqqgn
tlpytfgggtkleitggggsgggsggggsevkqesgpglvapsqslsvctvsgvslpdygvswirpprkglewlgviwgsettyynsalksr
ltiikdnksqvflkmnslqtddtaiyycahyyyggsyamdywgqgtsvtvssttpprppptaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfa
cdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqtteedgescrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgnqlynelnlgrr
eydvldkrrrdpempgkprknpqeglynelqkdkmacayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr (配列番号
292)

10

又はそれに対して実質的に相動性の配列である。

【0306】

一部の実施形態において、CD19CARは、USAN名TISAGENLECLEUC
CELL-Tを有する。実施形態において、CTL019は、T細胞の遺伝子改変によって
作製され、この改変は、EF-1プロモーターの制御下のCTL019導入遺伝子を含
有する自己不活性化、複製欠損レンチウイルス(LV)ベクターでの形質導入による安定
的挿入によって媒介される。CTL019は、パーセント導入遺伝子陽性T細胞に基づい
て対象に送達される導入遺伝子陽性T細胞と導入遺伝子陰性T細胞の混合物であり得る。

20

【0307】

他の実施形態において、CD19CARは、参照により本明細書に組み込まれる国際公
開第2014/153270号パンフレットの表3に記載の抗原結合ドメイン(例えば、
ヒト化抗原結合ドメイン)を含む。

【0308】

マウスCD19抗体のヒト化は、マウス特異的残基が、CART19処置、すなわちC
AR19構築物で形質導入されたT細胞による処置を受ける患者にヒト-抗-マウス抗原
(HAMA)応答を誘導し得る臨床現場において望ましい。ヒト化CD19CAR配列の
生成、特性決定及び有効性について、国際公開第2014/153270号パンフレット
(その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる)に、実施例1~5(p.115~
159)を含め、記載されている。

30

【0309】

一部の実施形態において、CAR分子は、

【化2】

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWyQQKPGQAPRLLIYHTSRLLHSGIPARFSGS
GSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQES
GPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETYYQSSLKSRVTISKD
NSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLVTVSS (配列番号293)

40

のアミノ酸配列を含むヒト化CD19CARである。

【0310】

一部の実施形態において、CAR分子は、

50

【化 3】

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGS
 GSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQES
 GPLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYQSSSLKSRVTISKD
 NSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLTVTVSSTTTPAPRPPTPAPT
 IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYI
 FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREE
 YDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQ
 GLSTATKDTYDALHMQUALPPR (配列番号294)

10

のアミノ酸配列を含むヒト化CD19CARである。

【0311】

一部の実施形態では、CAR分子は、

【化 4】

MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLWYQQKPGQA
 PRLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGG
 GSGGGGSGGGGSQVQLQESGPLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVI
 WGSETTYQSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQ
 GTLVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCG
 VLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAP
 AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS
 EIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR (配列番号349)

20

のアミノ酸配列を含むヒト化CD19CARである。

【0312】

一部の実施形態では、CAR分子は、

【化 5】

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGS
 GSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQES
 GPLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYQSSSLKSRVTISKD
 NSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLTVTVSSTTTPAPRPPTPAPT
 IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYI
 FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE
 YDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQ
 GLSTATKDTYDALHMQUALPPR (配列番号350)

40

のアミノ酸配列を含むヒト化CD19CARである。

【0313】

いずれか既知のCD19CAR、例えばいずれか既知のCD19CARのCD19抗原結合ドメインを当技術分野において本開示に従って使用することができる。例えば、LG-740；米国特許第8,399,645号明細書；米国特許第7,446,190号明細書；Xu et al., Leuk Lymphoma. 2013 54(2): 255-260(2012)；Cruz et al., Blood 122(17): 2965-2973(2013)；Brentjens et al., Blood, 118

50

(18) : 4817 - 4828 (2011) ; Kochenderfer et al . , Blood 116 (20) : 4099 - 102 (2010) ; Kochenderfer et al . , Blood 122 (25) : 4129 - 39 (2013) ; 及び 16th Annu Meet Am Soc Gen Cell Ther (ASGCT) (May 15 - 18 , Salt Lake City) 2013 , Abst 10 に記載の CD19CAR である。

【0314】

例示的な CD19CAR は、本明細書に記載される CD19CAR 又は Xu et al . Blood 123 . 24 (2014) : 3750 - 9 ; Kochenderfer et al . Blood 122 . 25 (2013) : 4129 - 39 , Cruz et al . Blood 122 . 17 (2013) : 2965 - 73、NCT00586391、NCT01087294、NCT02456350、NCT00840853、NCT02659943、NCT02650999、NCT02640209、NCT01747486、NCT02546739、NCT02656147、NCT02772198、NCT00709033、NCT02081937、NCT00924326、NCT02735083、NCT02794246、NCT02746952、NCT01593696、NCT02134262、NCT01853631、NCT02443831、NCT02277522、NCT02348216、NCT02614066、NCT02030834、NCT02624258、NCT02625480、NCT02030847、NCT02644655、NCT02349698、NCT02813837、NCT02050347、NCT01683279、NCT02529813、NCT02537977、NCT02799550、NCT02672501、NCT02819583、NCT02028455、NCT01840566、NCT01318317、NCT01864889、NCT02706405、NCT01475058、NCT01430390、NCT02146924、NCT02051257、NCT02431988、NCT01815749、NCT02153580、NCT01865617、NCT02208362、NCT02685670、NCT02535364、NCT02631044、NCT02728882、NCT02735291、NCT01860937、NCT02822326、NCT02737085、NCT02465983、NCT02132624、NCT02782351、NCT01493453、NCT02652910、NCT02247609、NCT01029366、NCT01626495、NCT02721407、NCT01044069、NCT00422383、NCT01680991、NCT02794961 又は NCT02456207 に記載される抗 CD19CAR を含み、それぞれその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0315】

一部の実施形態において、CD19CAR は、例えば、表 2 に開示される CDR、VH、VL、scFv 若しくは完全 CAR 配列又はそれと少なくとも 80%、85%、90%、95% 若しくは 99% の同一性を有する配列を含む。

【0316】

10

20

30

40

50

【表 6】

表 2. 例示的な抗 CD19 分子のアミノ酸配列

配列番号	領域	配列
CTL019		
295	HCDR1 (Kabat)	DYGVS
296	HCDR2 (Kabat)	VIWGSETTYNSALKS
297	HCDR3 (Kabat)	HYYYGGSYAMDY
298	LCDR1 (Kabat)	RASQDISKYLN
299	LCDR2 (Kabat)	HTSRLHS
300	LCDR3 (Kabat)	QQGNTLPYT
301	CTL019完全 アミノ酸配列	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISK YLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFGSGSGTDYSLTISNLEQED IATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGSGGGSGGGSEVKLQESGPG LVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYN SALKSRLTIKDNSKSVFLKMNSLQDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDY WGQGSVTVSSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL DFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

20

【 0 3 1 7 】

30

40

50

【表 7】

302	CTL019完全ヌクレオチド配列	<p>ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTC CACGCCGCCAGGCCGGACATCCAGATGACACAGACTACATCCCTCCCT GTCGCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTC AGGACATTAGTAAATATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGA ACTGTAAACTCCTGATCTACCATAACATCAAGATTACACTCAGGAGTC CCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTTCTCTACC ATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACA GGGTAATACGCTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGGACCAAGCTGGAGA TCACAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGGCGGCCGA TCTGAGGTGAAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTC ACAGAGCCTGTCCGTACATGCACCTGCTCAGGGGTCTCATTACCCG ACTATGGTGTAAAGCTGGATTCCGCCAGCTCCACGAAAGGGTCTGGAG TGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAAACCACATACTATAATTCAGC TCTCAAATCCAGACTGACCATCATCAAGGACAACCTCAAGAGCCAAAG TTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGACACAGCCATTACT ACTGTGCCAAAACATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACT GGGGCCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAACCACGACGCCAGCG CCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCCGAGCCCTGTC CCTGCGCCAGAGGCGTGGCCGGCCAGCGGGGGGGGGCGCAGTGCAC ACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGGCGCCCTT GGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTACTGGTTATCACCTTTA CTGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATAATCAAACAACCAT TTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGC CGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGT TCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACAAGCAGGGCCAGAACCA GCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTT TGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAG AAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGAT AAGATGGCGGAGGCCACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCC GGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTACCAGGGTCTCAGTACAGCC ACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCG C</p>	10
303	CTL019 scFv ドメイン	<p>DIQMTQTSSLSASLGRVITISCRASQDISKYLWYQQKPDGTVKLLIYH TSRLHSGVPSRFSGSGSDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGG TKLEITGGGGSGGGSGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSL PDYGVSWIRQPPRKGLEWLVIGWSETTYNSALKSRLTIKDNSKSNQVF LKMNSLQTDATAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSS</p>	20
ヒト化CAR2			30
295	HCDR1 (Kabat)	DYGVS	30
304	HCDR2 (Kabat)	VIWGSETTYQSSLKS	30
297	HCDR3 (Kabat)	HYYYGGSYAMDY	30
298	LCDR1 (Kabat)	RASQDISKYLN	30
299	LCDR2 (Kabat)	HTSRLHS	30
300	LCDR3 (Kabat)	QQGNTLPYT	30
293	CAR2 scFv ドメイン - aa (リンカーは下線部)	<p>EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLWYQQKPGQAPRLLIYH TSRLHSGIPARFSGSGSDYSLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGGG TKLEIKGGGGSGGGSGGGGQVQLQESGPGLVKPSITLSLCTVSGVSL LPDYGVSWIRQPPGKLEWLVIGWSETTYQSSLKSRVTISKDNSKNQ VSLKLSVTAADTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLTVTVSS</p>	40

【 0 3 1 8 】

【表 8】

305	CAR2 scFv ドメイン - nt	GAAATTGTGATGACCCAGTCACCCGCCACTCTTAGCCTTTCACCCGGT GAGCGCGCAACCCTGTCTTGCAGAGCCTCCCAAGACATCTCAAATA CCTTAATTGGTATCAACAGAAGCCCGGACAGGCTCCTCGCCTTCTGAT CTACCACACCAGCCGGCTCCATTCTGGAAATCCCIGCCAGGTTTCAGCG GTAGCGGATCTGGGACCGACTACACCCTCACTATCAGCTCACTGCAG CCAGAGGACTTCGCTGTCTATTTCTGTGAGCAAGGGAACACCCTGCC TACACCTTTGGACAGGGCACCAAGCTCGAGATTAAGGTGGAGGTG GCAGCGGAGGAGGTGGGTCCGGCGGTGGAGGAAGCCAGGTCCAAC CCAAGAAAGCGGACCCGGTCTTGTGAAGCCATCAGAAACTCTTTAC TGACTTGTACTGTGAGCGGAGTGTCTCTCCCCGATTACGGGGTGTCTT GGATCAGACAGCCACCGGGGAAGGGTCTGGAAATGGATTGGAGTGATT TGGGGCTCTGAGACTACTACTACCAATCATCCCTCAAGTCACGCGTC ACCATCTCAAAGGACAACCTAAGAATCAGGTGTCACTGAAACTGTC ATCTGTGACCGCAGCCGACACCGCCGTGTACTATTGCGCTAAGCATT ACTATTA TGGCGGGAGCTACGCAATGGATTACTGGGGACAGGGTACT CTGGTCACCCGTGCCAGC
306	CAR 2 - 完全- aa	MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISK YLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLPEDF AVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPG LVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETYYQS SLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDY WGQGLVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGGAVHTRGL DFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGHDLGYQLSTATKDTYDALHMQLPPR
307	CAR 2 - 完全 - nt	atggcctccctgtaccgacctgctcttccgctgctcttctgctccaccgctcggccgcaaatgtgatgacc cagteaccgcccactcttagccttccaccggtagcgcgcaacctgcttgcagagcctcccaagacatcctcaaaa taccttaaftggatcaacagaagcccgacaggctcctgctctgafctaccacaccgcccgtccaitctggaa tccctgccaggtcagcggtagcggatctgggaccgactacacctcactatcagctcactgcagccagaggacttc gctgtctatftctctcagcaagggaaacacctgcccctacaccttggacagggcaccacagctcagattaaaggagg ggtagcagcggagagagtggtgctcggcggtaggaggaagcagctcactccaagaagcggagcgggcttctgt gaagccatcagaactcttctcactgactgtactgtgagcggagtgtctctccgattacggggctctgtgtagac agccaccggggaagggctcgaatggatggagtgattggggctctgagactactactccaatcaccctcaagt caccgctcaccatcctcaaggacaactctaaagaatcagggtgctcactgaaactgfcactctgaccgcagccgaca gcccgtgactattgctgaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactgggacaggggactctgtgca ccgtgtccagcaccactacccagcaccgaggccaccaccgctcctaccatgctcctccagcctctgtccctg cgtccggaggcatgtagaccgcagctggggcggcgtgcataccgggcttctgacttgcctcgatattctacatt tgggcccctctgctgtagtctgagggtcctgctgcttctcactgtagcactcttactgtaagcgcggtcggaaaga gctgctgtacatcttaagcaacctctatgaggcctgctgagactactcaagaggagggagcctgttcagccggctc ccagaggaggaggaaaggcggctcgaactgcgctgaaattcagccgagcagatgctccagctcacaagca ggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttgctggagagaggagtacagctgctgacaagcggagagg acgggaccgagaatggcgggaagccgcgagaagaatcccagaggcctgtacaacgagctccaaaag gataagatggcagaagcctatagcagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaagggccacgacggact gtaccagggactcagcaccgccaagacacctatgacgcttctcactgagcctcctgcccctcgg
349	CAR 2A- 完全アミノ酸 配列; シグナル ペプチドは 下線部	<u>MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISK</u> YLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLPEDF AVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPG LVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETYYQS SLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDY WGQGLVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGGAVHTRGL DFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQGGNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGHDLGYQLSTATKDTYDALHMQLPPR

10

20

30

40

【 0 3 1 9 】

【表 9】

225	CAR 2A – アミノ酸配 列; シグナル ペプチドなし	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYH TSRLHSGIPARFSGSGSGETDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQG TKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSV LPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYQSSLSKSRVTISKDNSKNQ VSLKLSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLVTVSSTTTP APRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAFLAG TCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEE EEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVI.DKRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGK.GHDG LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
354	CAR 2A 完全核酸 配列; シグナ ルペプチド 及び終止 コドンは 下線部	<u>atggccctccctgtcaccgccctgctgctccgctggcctctctctccacgccgctcgcccgaaattgtagacc</u> <u>agtcaccgccactcttagcctttaccgggtgagcgcaacctgcttgcagagcctcccaagacatctcaaat</u> <u>accttaattggtatcaacagaagcccgacaggtcctcctctctgctaccacaccagccgctccattctggaat</u> <u>ccctgccaggttcagcggtagcggatctgggacgactacacctactatcagctcactgcagccagggacttcg</u> <u>ctgtctattctgtagcaagggaacacctgaccttggacagggcaccagctcagatcaaggtggag</u> <u>gtggcagcggaggagggtgggtccggcggtggaggaaagccaggtccaactccaagaaagcggaccggtctgtg</u> <u>aagccatcagaaactttcactgactgtactgtgagcggagtgtctctcccattacggggtctgtgatcagaca</u> <u>gccaccggggaagggtctggaatggattggagtgattggggctctgagactactactaccaatcatcctcaagtc</u> <u>acggctcaacatctcaaggaacacttaagaatcagggtgtcactgaaactgtcaactgtgaccgcagccgacacc</u> <u>ccgtgtactattcgctaagcattactatfatggcgggagctacgcaatggattactggggacaggggtactctgtcac</u> <u>cggtccagcaccactaccaccagcaccgagccaccaccgccctctaccatcgctccaccgctctgtccctgc</u> <u>gtccggaggcatgtagaccgcagctggtgggcccgtgcataccggggtctgactcgcctgcgatatctacatt</u> <u>gggcccctctgctgtacttgggggtctgtcttactctgtgactacttactgtaagcggctcggaaagaa</u> <u>gctgtgtacatcttaagcaacctctatgagcctgtgcagactactcaagaggagcggctgttcatgccggttc</u> <u>ccagaggaggaggaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagctaccagca</u> <u>ggggcagaaccagctcaaacgaactcaatctgtcggagagaggtagacgtgctgacaacggcggagagg</u> <u>acgggaccagaatggcgggaggcgcgagaagaatcccaagaggcctgtacaacgagctccaaaag</u> <u>gataagatggcagaagcctatagcagattggtatgaaagggaacgcagaagaggcaaaaggccacgacggact</u> <u>gtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcaatgtagggccttccgctcgggtaa</u>
355	CAR 2A 核酸配列; シグナル ペプチドは 下線部; 終止コドン なし	<u>atggccctccctgtcaccgccctgctgctccgctggcctctctctccacgccgctcgcccgaaattgtagacc</u> <u>agtcaccgccactcttagcctttaccgggtgagcgcaacctgcttgcagagcctcccaagacatctcaaat</u> <u>accttaattggtatcaacagaagcccgacaggtcctcctctctgctaccacaccagccgctccattctggaat</u> <u>ccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacacctactatcagctcactgcagccagaggacttcg</u> <u>ctgtctattctgtagcaagggaacacctgaccttggacagggcaccagctcagatcaaggtggag</u> <u>gtggcagcggaggagggtgggtccggcggtggaggaaagccaggtccaactccaagaaagcggaccggtctgtg</u> <u>aagccatcagaaactttcactgactgtactgtgagcggagtgtctctcccattacggggtctgtgatcagaca</u> <u>gccaccggggaagggtctggaatggattggagtgattggggctctgagactactactaccaatcatcctcaagtc</u> <u>acggctcaacatctcaaggaacacttaagaatcagggtgtcactgaaactgtactgtgaccgcagccgacacc</u> <u>ccgtgtactattgcgctaagcattactatfatggcgggagctacgcaatggattactgggacaggggtactctgtg</u> <u>cggtccagcaccactaccaccagcaccgagccaccaccgccctctaccatcgctccaccgctctgtccctgc</u> <u>gtccggaggcatgtagaccgcagctggtgggcccgtgcataccggggtctgactcgcctgcgatatctacatt</u> <u>gggcccctctgctgtacttgggggtctgtcttactctgtgactacttactgtaagcggctcggaaagaa</u> <u>gctgtgtacatcttaagcaacctctatgagcctgtgcagactactcaagaggagcggctgttcatgccggttc</u> <u>ccagaggaggaggaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagctaccagca</u> <u>ggggcagaaccagctcaaacgaactcaatctgtcggagagaggtagacgtgctggacaagcggagagg</u> <u>acgggaccagaatggcgggaggcgcgagaagaatcccaagaggcctgtacaacgagctccaaaag</u> <u>gataagatggcagaagcctatagcagattggtatgaaagggaacgcagaagaggcaaaaggccacgacggact</u> <u>gtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcaatgtagggccttccgctcggg</u>

10

20

30

40

50

【 0 3 2 0 】

【表 1 0】

356	CAR 2A 核酸配列; シグナルペプチドなし; 終止コドンは下線部	<p>gaaattgtgatgaccagtcaccggccactcttagcctttcaccgggtgagcgcgcaaccctgtcttgagagcctcc caagacatctcaaaafacctaattggtatcaacagaagcccgacaggtctctcgcctctgactaccacaccagcc ggctccattctggaatccctgcccaggtcagcggtagcggatctggaccgactacaccctcactatcagctcactgc agccagaggacttcgctgtctatctgtcagcaagggaaacccctgccctacacclttggacagggcaccagaactcg agaltaaagggtggaggtggcagcggagggaggtgggfcggcgggtggaggaagccaggtccaactccaagaagc ggaccgggtctgtgaaagccatcagaactcttcaactgactgactgtgagcggaggtctctcccgattacggggt gtcttgatcagacagccaccggggaagggtctggaatggattggagtgattggggctctgagactactactacca atcatccctcaagtcacgctcaccatctcaaggaacaacttaagaatcagggtgctcactgaaactgctactgtgacc gcagccgacaccgccgtgactattgcgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactgggacag ggactctggtcaccgtgtccagcaccactaccaccagcaccgagggccaccaccggctctcctacatcgcctcca gcctctgtccctgctgcccagggcatgtagaccggcagctggggggcctgcataccgggggttggacttgcct gcgatactacattggcccctctgctgctgacttgcggggctctgctgtcttactctgtgactacttactgtaagcg cggctcggaaaggctgctgtacatcttaagcaaccctcatgagcctgtgacagactactcaagaggagggcct gtcatccgggttcccagaggaggaggcggctgcgaactcgcgtaaatcagccgcagcgcagatgctc cagcctaccagcaggggcagaaacagctctacacgaactcaatctgctcggagagaggagtagcagctgctgg acaagcggagaggacggaccagaanaatggggggagccgcagaaagaatcccaagaggcctgtaca acgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcmaa ggccacgacggactgtaccagggactcagaccgccaccaaggacaccltagcgtcttccatcagaggcctg cgctcggtaa</p>	10
417	CAR 2A 核酸配列; シグナルペプチドなし; 終止コドンなし	<p>gaaattgtgatgaccagtcaccggccactcttagcctttcaccgggtgagcgcgcaaccctgtcttgagagcctcc caagacatctcaaaafacctaattggtatcaacagaagcccgacaggtctctcgcctctgactaccacaccagcc ggctccattctggaatccctgcccaggtcagcggtagcggatctggaccgactacaccctcactatcagctcactgc agccagaggacttcgctgtctatctgtcagcaagggaaacccctgccctacacclttggacagggcaccagaactcg agaltaaagggtggaggtggcagcggagggaggtgggfcggcgggtggaggaagccaggtccaactccaagaagc ggaccgggtctgtgaaagccatcagaactcttcaactgactgactgtgagcggaggtctctcccgattacggggt gtcttgatcagacagccaccggggaagggtctggaatggattggagtgattggggctctgagactactactacca atcatccctcaagtcacgctcaccatctcaaggaacaacttaagaatcagggtgctcactgaaactgctactgtgacc gcagccgacaccgccgtgactattgcgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactgggacag ggactctggtcaccgtgtccagcaccactaccaccagcaccgagggccaccaccggctctcctacatcgcctcca gcctctgtccctgctgcccagggcatgtagaccggcagctggggggcctgcataccgggggttggacttgcct gcgatactacattggcccctctgctgctgacttgcggggctctgctgtcttactctgtgactacttactgtaagcg cggctcggaaaggctgctgtacatcttaagcaaccctcatgagcctgtgacagactactcaagaggagggcct gtcatccgggttcccagaggaggaggcggctgcgaactcgcgtaaatcagccgcagcgcagatgctc cagcctaccagcaggggcagaaacagctctacacgaactcaatctgctcggagagaggagtagcagctgctgg acaagcggagaggacggaccagaanaatggggggagccgcagaaagaatcccaagaggcctgtaca acgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcmaa ggccacgacggactgtaccagggactcagaccgccaccaaggacaccltagcgtcttccatcagaggcctg cgctcgg</p>	20
357	VH	<p>CAGGTCCAGCTGCAGGAATCAGGACCAGGGCTGGTGA AACCTAGCGA AACTCTGAGTCTGACTTGTACCGTCTCCGGGGTGTCTCGCCAGACTAC GGCGTGAGCTGGATCAGACAGCCCCCTGGCAAGTGCCTGGAGTGGATC GGCGTGATCTGGGGCTCCGAGACCACATACTATCAGAGCTCCCTGAAG TCTCGGGTGACCATCTCCAAGGACAACCTAAGAA TCAGGTGAGCCTG AAGCTGCTAGCGTGACCCGCCGCGATACAGCCGTGACTATTGTGCC AAGCACTACTATTACGGCGGCTCCTATGCCATGGATTACTGGGGCCAG GGCACCCCTGGTGACAGTGTCTCT</p>	30

【 0 3 2 1】

40

50

【表 1 1】

358	VH	CAGGTCCAGCTGCAGGAATCCGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTAGCGA GACCTGTCCCTGACCTGCACAGTGAGCGGCGTGTCCCTGCCCGATT ACGGCGTGAGCTGGATCAGACAGCCCCCTGGCAAGTGTCTGGAGTGG ATCGGCGTGATCTGGGGCTCTGAGACCACATACTATCAGTCCCTCTG AAGAGCAGGGTGACCATCTCTAAGGACAACAGCAAGAATCAGGTGT CCCTGAAGCTGAGCTCCGTGACCGCAGCAGATACAGCCGTGTACTAT TGCGCCAAGCACTACTATTACGGCGGCTCCTATGCTATGGATTATTGG GGCAGGGCACTCTGGTCACTGTCTCATCA
359	VH	CAGGTGCAGCTGCAGGAATCTGGACCCGGACTGGTGAACCTAGTGA AACTCTGTCTCTGACTTGTACCGTCTCAGGGGTCTCACTGCCAGACTA CGGCGTGTCTGGATCAGACAGCCCCCTGGCAAGTGCCCTGGAGTGG TCGGCGTGATCTGGGGCTCTGAGACCACATACTATCAGAGCTCCCTG AAGAGCCGGGTGACCATCTCCAAGGACAACCTAAGAATCAGGTGT CCTGAAGCTGTCTAGCGTGACCGCCGCCGATACAGCCGTGTACTATT GTGCCAAGCACTACTATTACGGCGGCAGCTATGCCATGGATTACTGG GGCCAGGGCACCTGGTGACAGTGTCTCT
360	VH	CAGGTCCAGCTGCAGGAAAGCGGCCAGGACTGGTGAAGCCTAGCG AGACCTGTCCCTGACCTGCACAGTGAGCGGCGTGTCCCTGCCTGATT ACGGCGTGTCTGGATCAGACAGCCCCCTGGCAAGTGTCTGGAGTGG ATCGGCGTGATCTGGGGCTCCGAGACCACATACTATCAGTCCCTCTG AAGTCTAGGGTGACAATCTCTAAGGACAACAGCAAGAATCAGGTGA GCCTGAAGCTGAGCTCCGTGACCGCAGCAGATACAGCCGTGTACTAT TGTGCCAAGCACTACTATTACGGCGGCTCTATGCTATGGATTATTGG GGCAGGGCACTCTGGTCACTGTCTCAAGC
361	VH	CAGGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCCG AGACACTGTCTCTGACCTGTACAGTGAGCGGCGTGTCCCTGCCCGAC TACGGCGTGTCTGGATCAGACAGCCACCTGGCAAGGGACTGGAGTGG GATCGGCGTGATCTGGGGCAGCGAGACCACATACTATCAGAGCTCCC TGAAGTCCAGGGTGACCATCAGCAAGGACAACCTCAAGAATCAGGT GAGCCTGAAGCTGTCTAGCGTGACCGCCGCCGATACAGCCGTGTACT ATTGCGCCAAGCACTACTATTACGGCGGCTCCTATGCCATGGATTACT GGGGCCAGGGCACCTGGTGACAGTGTCTCT
362	VH	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCTGA GACCTGAGCCTGACCTGCACAGTGTCCGGCGTGTCTCTGCCCGATTA CGGCGTGTCTGGATCAGACAGCCACCTGGCAAGGGACTGGAGTGG TCGGCGTGATCTGGGGCTCTGAGACCACATACTATCAGTCTAGCCTG AAGAGCCGGGTGACAATCTCCAAGGACAACCTCAAGAATCAGGTGT CCTGAAGCTGTCTCTGTGACCGCCGCCGATACAGCCGTGTACTATTG TGCCAAGCACTACTATTACGGCGGCAGCTATGCCATGGACTACTGGG GCCAGGGCACCTGGTGACAGTGAGCTCC
363	VH	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCTGA GACCTGAGCCTGACCTGCACAGTGAGCGGCGTGTCCCTGCCCGATT ACGGCGTGTCTGGATCAGACAGCCACCTGGCAAGGGACTGGAGTGG ATCGGCGTGATCTGGGGCAGCGAGACCACATACTATCAGTCCCTCTCT GAAGTCCAGGGTGACAATCTCCAAGGACAACCTCAAGAATCAGGTGA GCCTGAAGCTGAGCTCCGTGACCGCAGCAGATACAGCCGTGTACTAT TGCGCCAAGCACTACTATTACGGCGGCTCCTATGCCATGGACTACTG GGCCAGGGCACCTGGTGACAGTGTCTAGC
364	VH	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCCGA GACACTGTCTCTGACCTGTACAGTGTCCGGCGTGTCTCTGCCCGACTA CGGCGTGAGCTGGATCAGACAGCCACCTGGCAAGGGACTGGAGTGG ATCGGCGTGATCTGGGGCTCTGAGACCACATACTATCAGTCCCTCTCTG AAGAGCCGGGTGACCATCAGCAAGGACAACCTCAAGAATCAGGTGT CCCTGAAGCTGAGCTCCGTGACCGCAGCAGATACAGCCGTGTACTAT TGCGCCAAGCACTACTATTACGGCGGCAGCTATGCCATGGATTACTG GGCCAGGGCACCTGGTGACAGTGTCTAGC

10

20

30

40

【 0 3 2 2 】

【表 1 2】

365	VL	GAGATCGTGATGACCCAGAGCCCAGCCACACTGAGCCTGTCCCCAGG AGAGAGGGGCCACACTGTCTTGTAGAGCCAGCCAGGATATCTCCAAGT ATCTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCTGGACAGGCACCAAGGCTGCTG ATCTACCACACCTCTAGACTGCACAGCGGCATCCCTGCCAGGTTTTCT GGCAGCGGCTCCGGCACAGACTATAACCCTGACAATCTCTAGCCTGCA GCCAGAGGATTTCCGCGTGTACTTTTGTGTCAGCAGGGCAATACTCTGCC ATACACCTTTGGATGCGGAACATAAAGCTGGAAATCAAG
366	VL	GAAATTGTGATGACCCAGTCCCCGCTACTCTGTCTCTGTCCCCGGA GAACGGGCTACTCTGTCTTGTTCGCGCTTCCCAGGATATTAGCAAGTAC CTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCAGGACAGGCACCAAGGCTGCTGAT CTACCACACCTCTCGCCTGCACAGCGGCATCCCTGCACGGTTCTCTGG CAGCGGCTCCGGCACAGACTACACCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGC CTGAGGATTTCCGCGTGTACTTTTGGCAGCAGGGCAATAACCCTGCCAT ATACATTTGGCTGTGGCACCACCAAGCTGGAGATCAAG
367	VL	GAGATCGTGATGACCCAGTCCCCAGCCACACTGAGCCTGTCCCCAGG AGAGAGGGGCCACCCTGTCTTGTAGAGCCAGCCAGGATATCTCCAAGT ATCTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCTGGACAGGCACCAAGGCTGCTG ATCTACCACACCTCTAGACTGCACAGCGGCATCCCTGCCAGGTTTTCT GGCAGCGGCTCCGGCACAGACTATAACCCTGACAATCTCTAGCCTGCA GCCAGAGGATTTCCGCGTGTACTTTTGTGTCAGCAGGGAAATACTCTGCC ATACACCTTTGGATGCGGAACATAAAGCTGGAAATCAAG
368	VL	GAGATTGTGATGACCCAGTCCCCGCCACCCTGAGTCTGAGCCCCGG AGAACGAGCTACCCTGAGTTGCCGAGCTTCCCAGGACATTTCCAAGT ACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCAGGACAGGCACCAAGGCTGTCT GATCTACCACACCTCTCGCCTGCACAGCGGCATCCCAGCACGGTTCTC TGGCAGCGGCTCCGGCACAGACTACACCCTGACAATCAGCTCCCTGC AGCCTGAGGATTTCCGCGTGTACTTTTGGCAGCAGGGCAATAACCCTG CCATATACATTTGGCTGTGGCACCACCAAGCTGGAGATCAAG
369	VL	GAGATCGTGATGACCCAGTCTCCAGCCACACTGTCTCTGAGCCCAGG AGAGAGGGGCCACCCTGTCTTGGCCGCGCCAGCCAGGATATCTCCAAGT ATCTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCACCAAGGCTGCTG GATCTACCACACCTCTCGCCTGCACAGCGGCATCCCAGCACGGTTCTC CGGCTCTGGCAGCGGCACAGACTACACCCTGACAATCTCTCTCTGC AGCCCCGAGGATTTCCGCGTGTATTTTGGCAGCAGGGCAATAACCCTG CCTTACACATTTGGCCAGGGCACCACCAAGCTGGAGATCAAG
370	VL	GAGATCGTGATGACCCAGAGCCCAGCCACACTGAGCCTGTCCCCAGG AGAGAGGGGCCACCCTGAGCTGCAGAGCCTCCCAGGATATCTCTAAGT ATCTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCTGGACAGGCACCAAGGCTGCTG ATCTACCACACCAGCAGACTGCACCTCCGGCATCCCTGCAAGGTTCTCT GGCAGCGGCTCCGGCACAGACTACACCCTGACAATCTCTAGCCTGCA GCCTGAGGATTTCCGCGTGTATTTTGTGTCAGCAGGGCAATAACCCTGCC ATACACATTTGGCCAGGGCACCACCAAGCTGGAGATCAAG
371	VL	GAGATCGTGATGACCCAGAGCCCAGCCACACTGTCTCTGAGCCCAGG AGAGAGGGGCCACCCTGAGCTGTTCGCGCCTCCCAGGATATCTCTAAGT ATCTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCACCAAGGCTGCTG GATCTACCACACCAGCGCCTGCACCTCCGGCATCCCAGCACGGTTCTC CCGGCTCTGGCAGCGGCACAGACTACACCCTGACAATCTCTCTCTG CAGCCCAGGATTTCCGCGTGTATTTTGGCAGCAGGGCAATAACCCT GCCTTACACATTTGGCCAGGGCACCACCAAGCTGGAGATCAAG
372	VL	GAGATCGTGATGACCCAGTCTCCAGCCACACTGAGCCTGTCCCCAGG AGAGAGGGGCCACCCTGTCTTGCAGAGCCAGCCAGGATATCTCCAAGT ATCTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCTGGACAGGCACCAAGGCTGCTG ATCTACCACACCTCTAGACTGCACAGCGGCATCCCAGCAAGGTTCTC TGGCAGCGGCTCCGGCACAGACTACACCCTGACAATCTCTAGCCTGC AGCCTGAGGATTTCCGCGTGTATTTTGGCAGCAGGGCAATAACCCTGC CATAACATTTGGCCAGGGCACCACCAAGCTGGAGATCAAG

10

20

30

40

【 0 3 2 3 】

50

【表 1 3】

配列番号250	抗CD19 VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKLEWIGV IWGSETTYQSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHY YYGGSYAMDYWGQGLVTVSS
配列番号251	抗CD19 VL	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYH TSRLHSGIPARFSGSGSDYTLTISLQPEDFAVYFCQQGNLTPYTFGGG TKLEIK
配列番号331	VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKLEWIGV IWGSETTYQSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHY YYGGSYAMDYWGQGLVTVSS
配列番号332	VL	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYH TSRLHSGIPARFSGSGSDYTLTISLQPEDFAVYFCQQGNLTPYTFGGG TKLEIK
373	CAR 1 scFv	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYH HSGIPARFSGSGSDYTLTISLQPEDFAVYFCQQGNLTPYTFGGGKLEIKG GGSGGGSGGGGQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQ PPGKLEWIGVWIGSETTYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYY CAKHYGGSYAMDYWGQGLVTVSS
374	CAR 3 scFv	qvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirppgkglewivg ettyyssslksrvtiskdsknqvslklssttaadtavyycahyyyggsyamd ywgqglvtvssgggsgggsgggsgggseivmtqspatlsispgeratls crasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsdtyltis slqpedfavyfcqqgnltpytfgggkkleik
375	CAR 4 scFv	qvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirppgkglewivg ettyyqssslksrvtiskdsknqvslklssttaadtavyycahyyyggsyamd ywgqglvtvssgggsgggsgggsgggseivmtqspatlsispgeratls crasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsdtyltis slqpedfavyfcqqgnltpytfgggkkleik
376	CAR 5 scFv	eivmtqspatlsispgeratlsrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsr hsgiparfsgsgsdtyltisllqpedfavyfcqqgnltpytfgggkkleikg ggsgggsgggsgggsgggsgggsgggseivmtqspatlsispgeratls wirppgkglewivgsettyyssslksrvtiskdsknqvslklssttaad tavyycahyyyggsyamywgqglvtvss
377	CAR 6 scFv	eivmtqspatlsispgeratlsrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsr hsgiparfsgsgsdtyltisllqpedfavyfcqqgnltpytfgggkkleikg ggsgggsgggsgggsgggsgggsgggseivmtqspatlsispgeratls wirppgkglewivgsettyyqssslksrvtiskdsknqvslklssttaad tavyycahyyyggsyamywgqglvtvss
378	CAR 7 scFv	qvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirppgkglewivg ettyyssslksrvtiskdsknqvslklssttaadtavyycahyyyggsyamd ywgqglvtvssgggsgggsgggsgggsgggseivmtqspatlsispgeratls crasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsdtyltis slqpedfavyfcqqgnltpytfgggkkleik
379	CAR 8 scFv	qvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirppgkglewivg ettyyqssslksrvtiskdsknqvslklssttaadtavyycahyyyggsyamd ywgqglvtvssgggsgggsgggsgggsgggseivmtqspatlsispgeratls crasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsdtyltis slqpedfavyfcqqgnltpytfgggkkleik
380	CAR 9 scFv	eivmtqspatlsispgeratlsrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsr hsgiparfsgsgsdtyltisllqpedfavyfcqqgnltpytfgggkkleikg ggsgggsgggsgggsgggsgggsgggseivmtqspatlsispgeratls wirppgkglewivgsettyynssslksrvtiskdsknqvslklssttaad tavyycahyyyggsyamywgqglvtvss
381	CAR 10 scFv	qvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirppgkglewivg ettyynssslksrvtiskdsknqvslklssttaadtavyycahyyyggsyamd ywgqglvtvssgggsgggsgggsgggsgggseivmtqspatlsispgeratls crasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsdtyltis slqpedfavyfcqqgnltpytfgggkkleik

10

20

30

40

【 0 3 2 4】

50

【表 1 4】

382	CAR 11 scFv	eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrl hsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqqgntlpytfgggtkleikg ggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpselstctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgs ettynsslksrvtiskdsknqvsiklssvtaadtavyycahyyyggsyamd ywggtlvtvssggsgggsgggsgggseivmtqspatlslspgeratlscrasq diskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpe dfavyfcqqgntlpytfgggtkleik
383	CAR 12 scFv	qvqlqesgpglvkpselstctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgs ettynsslksrvtiskdsknqvsiklssvtaadtavyycahyyyggsyamd ywggtlvtvssggsgggsgggsgggseivmtqspatlslspgeratlscrasq diskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpe dfavyfcqqgntlpytfgggtkleik
384	CAR A 完全 ヌクレオチド 配列; リーダー を含む	atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacaccagcattc ctcctgatcccagacatccagatgacacagactacatcctccctgtctgcctct ctggagacagagtcaccatcagttgcagggcaagtccaggacattagtaaatat ttaaattggtatcagcagaaccagatggaactgttaaactcctgatctaccat acatcaagattacactcaggagtcaccatcaaggttcagtgccagtgggctcggga acagattattctctcaccattagcaacctggagcaagaagatattgccacttac ttttgccaacagggtaatacgcttccgtacacgcttcggaggggggactaagtgtg gaaataacaggctccacctctggatccggcaagcccgatctggcgaggatcc accaagggcgaggtgaaactgcaggagtcaggacctggcctggtggcgccctca cagagcctgtccgtcacatgcactgtctcaggggtctcattaccgactatggt gtaagctggattcggcagcctccacgaaaggtctggagtggtgggagtaata tgggtagtgaaaccacatactataattcagctctcaaatccagactgaccatc atcaaggacaactccaagagccaagtttcttaaaaatgaacagctctgcaaac gatgacacagccatttactactgtgccaacattattactacggtggttagctat gctatggactactggggtcaaggaacctcagtcaccgtctcctcagcggccgca attgaagttatgtatcctcctcctacctagacaatgagaagagcaatggaacc attatccatgtgaaagggaaacacctttgtccaagtcacctatttcccgacct tctaagcccttttgggtgctgggtgggtgggtgggggagtcctggcttgetatagc ttgctagtaacagtgccctttatttttctgggtgaggagtaagaggagcagg ctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgccgccccgggcccaccgcg aagcattaccagccctatgccccaccacgcgacttcgcagcctatcgtccaga gtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtaccagcagggccagaaaccag ctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtagcatgttttggacaag agacgtggccggaccctgagatgggggaaagccgagaaggaagaaccctcag gaagccctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgag attgggatgaaagggcagcgcggaggggcaaggggcacgatggcctttaccag ggtctcagtaacagccaccaaggacacctacgacgccttcacatgcaggccctg ccccctcgc
385	CAR A- 完全 アミノ酸 トランスジーン 配列; リーダー を含む	MLLVTSLLLCELPFPFALLIPDIQMTQTSSLSASLGRVITISCRASQDISKY LNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATY FCQQGNTLPHYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVQLQESGPGLVAPS QSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLVWGSSETTYNSALKSRLTI IKDNSKQVFLKMNSLQTDITAIYYCAKHYGGYAMDYWGQGSVTVSSAAA IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVWLVVVGGLACYS LLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSR VKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQ EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHIDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL PPR

10

20

30

【 0 3 2 5 】

40

50

【表 15】

386	リーダーを含むCAR A-CD19 scFvヌクレオチド配列	atgcttctcctggtgacaagccitctgctctgtgagttaccacaccagcattc ctcctgatcccagacatccagatgacacagactacatcctccctgtctgcctct ctgggagacagagtcaccatcagttgacagggcaagtccaggacattagtaaat ttaaatgggtatcagcagaaaccagatggaactgltaaactcctgatctaccat acatcaagattacactcaggagtcaccatcaagggtcagtgccagtggtctgga acagattattctctcaccattagcaacctggagcaagaagatattgccacttac ttttgccaacagggtaatacgtctccgtacacgcttcggaggggggactaagttg gaaataacagggtccacctctggatccggcaagcccgatctggcgagggatcc accaagggcgaggtgaaactgcaggagtcaggacctggcctggtggcgccctca cagagcctgtcctgacatgcaactgtctcaggggtctcattaccggactatggt gtaagctggattcgccagcctccacgaaagggctcggagtgctgggagtaata tggggtagtgaaccacataactataattcagctctcaaateccagactgaccate atcaaggacaactccaagagccaagttttcttaaaaatgaacagctcgcgaaact gatgacacagccatttactactgtgccaacatttactacgggtggtagctat gctatggactactgggtcaaggaacctcagtcaccgtctcctca
387	CAR A- CD19 scFv アミノ酸配列; リーダーを含む	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKY LNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFRSGSGSDYSLTISNLEQEDIATY FCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPS QSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTI IKDNSKSQVFLKMNSLQTDITAIYYCAKHYHYGGSYAMDYWGQGSVTVS
388	CAR A- 完全ヌクレオチド配列; リーダーなし	gacatccagatgacacagactacatcctccctgtctgcctctctgggagacaga gtcaccatcagttgacagggcaagtccaggacattagtaaatattttaaattggtat cagcagaaaccagatggaactgttaaactcctgatctaccatacatcaagatta cactcaggagtcaccatcaaggttcagtgccagtggtctggaacagattattct ctcaccattagcaacctggagcaagaagatattgccacttacttttgccaacag ggtaatacgtctccgtacacgcttcggaggggggactaagttgaaataacaggc tccacctctggatccggcaagcccgatclggcgagggatccaccaagggcgag gtgaaactgcaggagtcaggacctggcctggtggcgccctcacagagcctgtcc gtcacatgcaactgtctcaggggtctcattaccggactatggtgtaagctggatt cgccagcctccacgaaagggctcggagtggtgggagtaaatggggtagtga accacatactataattcagctctcaaateccagactgaccatcatcaaggacaac tccaagagccaagttttcttaaaaatgaacagctcgcgaaactgatgacacagcc atttactactgtgccaacatttactacgggtggtagctatggtactacagactac tggggtcaaggaacctcagtcaccgtctcctcagcggccgcaattgaagttatg tatcctcctccttacctagacaatgagaagagcaatggaaccattatccatgtg aaagggaacacocctttgtccaagtcccctatttccggacctctcaagccctt tgggtgctggtggtggttgggggagtcctggcttgctatagcttqctagtaaca gtggcctttattattttctgggtgaggagtaagaagagcaggctcctgcacagt gactacatgaacatgactcccgcgcgcccgggcccaccgcaagcattaccag ccctatgccccaccagcgcacttcgcagcctatcgtccagagtgaaagttcagc aggagcgcagacgccccgcgtaccagcagggccagaaaccagctctataacgag ctcaatctaggacgaagagagagtagatggttttgacaagagacgtggccgg gaccctgagatgggggaaagccgagaaaggaagaacctcaggaagggcctgtac aatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaa ggcgagcgcggaggggcaaggggcagatggcctttaccaggtctcagta gccaccaaggacacctacgacgccccttcacatgcaggccctgccccctcgc
389	CAR A- 完全アミノ酸トランスジーン配列; リーダーなし	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRL HSGVPSRFRSGSGSDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITG STSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWI RQPPRKLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNKSQVFLKMNSLQTDITAI IYYCAKHYHYGGSYAMDYWGQGSVTVSSAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHV KKGKHLCPSPFPGPSKPFVWLVVGGVIACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLS DYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPRDFAAYSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGHDLGYQLSTATKDTYDALHMQLPPR

10

20

30

40

【 0 3 2 6 】

50

【表 1 6】

390	CAR A- CD19 scFv スクレオチド; リーダーなし	gacatccagatgacacagactacatcctcctctgctcctctctgggagacaga gtcaccatcagttgcaggggcaagtccaggacattagtaaatatttaaatggat cagcagaaaccagatggaactgttaaacctcctgatcaccatacatcaagatta cactcaggagtcccacatcaagggttcagtgccagtggtctggaaacagattattct ctcaccattagcaacctggagcaagaagatattgccacttacttttgccaacag ggtaatacgcctccgtacacgcttcggaggggggactaagttggaataacaggc tccacctctggatccggcaagcccgatctggcgagggatccaccaaggggcag gtgaaactgcaggagtccaggacctggcctggtggcgccctcacagagcctgtcc gtcacatgcaactgtctcagggtctcattaccgactatggtgtagctggatt cgccagcctccacgaaagggtctggagtggctgggagtaatatgggtagtgaa accacatactataattcagctctcaaaccagactgaccatcatcaaggacaac tccaagagccaagttttcttaaaaatgaacagctctgcaactgatgacacagcc atctactactgtgccaacattattactacgggtggttagctatgctatggactac tggggtcaaggaacctcagtcaccgtctcctca
391	CAR A- CD19 scFv アミノ酸配列; リーダーなし	DIQMTQTSSLSASLGDVRTISCRASQDISKYLWNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRL HSGVPSRFRSGSGSDYSLTISNLEQEDIATYFCQQNTLPYTFGGGKLEITG STSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQLSVTCTVSGVSLPDYGVSWI RQPPRKGLEWLVGWSETTYNSALKSRLTIKDNSKSVFLKMNLSQTDDTA IYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSS
392	CAR B- 完全スクレオチド配列; リーダーを含む	ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGCTGCGAGCTGCCCCACCCGCTTT CTGCTGATCCCGACATCCAGATGACCCAGACCCTCCAGCCTGAGCGCCAGC CTGGGCGACCGGGTGACCATCAGCTGCCGGGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTAC CTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGACCGCACCGTCAAGCTGCTGATCTACCAC ACCAGCCGGCTGCACAGCGCGTGCCAGCCGGTTTAGCGGCAGCGGCTCCGGC ACCGACTACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAACAGGAAGATATCGCCACCTAC TTTTGCCAGCAGGGCAACACACTGCCCTACACCTTTGGCGCGGAACAAAGCTG GAAATCACCGGCAGCACCTCCGGCAGCGCAAGCCTGGCAGCGCGAGGGCAGC ACCAAGGGCGAGGTGAAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGGTGGCCCCCAGC CAGAGCCTGAGCGTGACCTGCACCGTGAGCGGCGTGAGCCTGCCGACTACGGC GTGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGAAGGGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATC TGGGGCAGCGAGACCCTACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATC ATCAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGTGTTCTGAAAGATGAACAGCCTGCAGACC GACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAAGCACTACTACTACGGCGGCAGCTAC GCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACCGTGAGCAGCGAATCTAAG TACGGACCGCCCTGCCCCCTTGCCCTATGTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTCCGA GGCGTGCTGGCCTGCTACAGCCTGCTGGTACCCTGGCCTTCATCATCTTTTGG GTGAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTTCAAACAACCATTTATGAGA CCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAA GAAGAGGAGGATGTGAAGTGCAGGTTGAGTTTCCAGCAGAAGCGCCGACGCCCT GCCTACCAGCAGGGCCAGAAATCAGCTGTACAACAGCTGAACCTGGGCAGAAAG GAAGAGTACGACGCTCCTGGATAAGCGGAGAGGCCGGACCCCTGAGATGGCGGC AAGCCTCGGGCGAAGAACCCCGAGGAAGCCTGTATAACGAACCTGCAGAAAGAC AAGATGGCCGAGGCCACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCAGCGGAGCGGGGC AAGGGCCACGACGGCCTGTATCAGGGCCTGTCCACCGCCACCAAGGATACCTAC GACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCAAGG
393	CAR B- 完全トランスジーンアミノ酸配列; リーダーを含む	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPIQMTQTSSLSASLGDVRTISCRASQDISKY LNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFRSGSGSDYSLTISNLEQEDIATY FCQQNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPS QSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLVGWSETTYNSALKSRLTI IKDNSKSVFLKMNLSQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSESK YGPFCPCPFMFWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEEDGCSFRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLGRR EEYDVLDRRRDRPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

10

20

30

40

【 0 3 2 7 】

50

【表 17】

394	CAR B- CD19 scFv ヌクレオチド配列; リーダーを含む	ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCCACCCCGCCTTTCTGCTGATCCCCGACATCCAGATGACCCAGACCACCTCCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGCGGACCCGGTGACCATCAGCTGCCGGGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGACGGCACCGTCAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCCGGCTGCACAGCGGGTGCAGCCAGCCGGTTTAGCGGCAGCGGCTCCGGCCACCGACTACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAACAGGAAGATATCGCCACCTACTTTTGGCAGCAGGGCAACACACTGCCCTACACCTTTGGCGGGGAAACAAAGCTGGAAATCACCAGCAGCACCTCCGGCAGCGCAAGCCTGGCAGCGGGCAGGGCCAGCACCAGGGCGAGGTGAAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGGTGGCCCCCAGCAGAGCCTGAGCGTGACCTGCACCGTGAGCGGGCTGAGCCTGCCCGACTACGGCGTGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGAAGGGCCTGGAAATGGCTGGCGGTGATCTGGGGCAGCGAGACCACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGTGTCTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCAGCAGACCCGCATCTACTACTGCGCCAAGCACTACTACTACGGCCGAGCAGTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACCCTGAGCAGC
395	CAR B- CD19 scFv アミノ酸配列; リーダーを含む	MLLLVTSLLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTSSLSASLGRVTTISCRASQDISKYLINWYQQKPDGTVKLLIYHSTRLSHSGVPSRFSGSGSDYSLTISNLEQEDIATYFCQQENTLPHYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSKQVFLKMNLSQTDDTAIYYCAKHYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS
396	CAR B- 完全ヌクレオチド配列; リーダーなし	GACATCCAGATGACCCAGACCACCTCCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGACCCGGTGACCATCAGCTGCCGGGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGACGGCACCGTCAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCCGGCTGCACAGCGGGCTGCCAGCCGGTTTAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCCGACTACAGCTGACCATCTCCAACCTGGAACAGGAAGATATCGCCACCTACTTTTGGCAGCAGGGCAACACACTGCCCTACACCTTTGGCGGGCAACAAAGCTGGAAATCACCGGCAGCACCTCCGGCAGCGGCAAGCCTGGCAGCGGGCAGGGCAGCACCAGGGCGAGGTGAAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGGTGGCCCCCAGCCAGAGCCTGAGCGTGACCTGCACCGTGAGCGGGCTGAGCCTGCCCGACTACGGCGTGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGAAGGGCCTGGAAATGGCTGGCGGTGATCTGGGGCAGCGAGACCACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACACAGCAAGAGCCAGGTGTCTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCAGCAGACCAGCCATCTACTACTGCGCCAAGCACTACTACTACGGCGGGCAGCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACCGTGAGCAGCGAATCTAAGTACGGACCCGCCCTGGCCCCCTTGCCCTATGTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTTCGGAGGCGTCTGGCCCTGCTACAGCCTGCTGGTCCCGTGGCCTTCATCATCTTTGGGTGAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAGGAGGATGTGAACTGCGGGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGACGCCCTGCCACCAGCAGGGCCAGAATCAGCTGTACAACAGCTGAACTGGGCAGAAAGGAGAGTACGACGTCTGGATAAGCGGAGAGGCCGGGACCCTGAGATGGCGGCAAGCCTCGGCCGGAAGAACCCCAAGGAGCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGCGGGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTATCAGGGCCTGTCCACCGCCACCAAGGATACCTACGAGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCAAGG
397	CAR B- 完全アミノ酸トランスジーン配列; リーダーなし	DIQMTQTSSLSASLGRVTTISCRASQDISKYLINWYQQKPDGTVKLLIYHSTRLSHSGVPSRFSGSGSDYSLTISNLEQEDIATYFCQQENTLPHYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGI.VAPQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKLEWLGVIWSETTYNSALKSRLTIKDNSKSKQVFLKMNLSQTDDTAIYYCAKHYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSSESKYGPCCPPCFMFWLVVVGGVLA CYSLLVTVAFIIFWVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGG CELRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLRREEYDVLDRRRGRDPFMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

20

30

40

50

【表 1 8】

398	CAR B- CD19 scFv 配列; リーダーなし	GACATCCAGATGACCCAGACCACCTCCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGACCGG GTGACCATCAGCTGCCGGGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTGGTAT CAGCAGAAGCCCAGCGGCACCGTCAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCCGGCTG CACAGCGGCGTGCCAGCCGGTTTAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCCTACTACAGC CTGACCATCTCCAACCTGGAACAGGAAGATATCGCCACCTACTTTTGCCAGCAG GGCAACACACTGCCCTACACCTTTGGCGGCGGAACAAAGCTGGAAATCACCGGC AGCACCTCCGGCAGCGGCAAGCCTGGCAGCGGCGAGGGCAGCACCAGGGCGAG GTGAAGCTGCAGGAAAGCGGCCTGGCCTGGTGGCCCCAGCCAGAGCCTGAGC GTGACCTGCACCGTGAGCGGCGTGAGCCTGCCCGACTACGGCGTGAGCTGGATC CGGCAGCCCCCAGGAAGGGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGCGAG ACCACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACAAC AGCAAGAGCCAGGTGTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCC ATCTACTACTGCGCAAGCACTACTACTACGGCGGCGAGCTACGCCATGGACTAC TGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACCGTGAGCAGC
399	CAR B- CD19 scFv 配列; リーダーなし	DIQMTQTTSSLSASLGDVRTTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRL HSGVPSRFSGSGSSTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITG STSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWI RQPPRKGLEWLVIVGSETTYNSALKSRLLTIKDNSKQVFLKMNSLQTDDTA IYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSS

10

【 0 3 2 9】

BCMA CAR

一部の実施形態において、本明細書に記載されるCAR発現細胞は、BCMA CAR発現細胞（例えば、ヒトBCMAに結合するCARを発現する細胞）である。例示的なBCMA CARは、国際公開第2016/014565号パンフレット（参照により本明細書に組み込まれる）の表1又は16に開示される配列を含み得る。BCMA CAR構築物は、任意選択のリーダー配列；任意選択ヒンジドメイン、例えばCD8ヒンジドメイン；膜貫通ドメイン、例えばCD8膜貫通ドメイン；細胞内ドメイン、例えば4-1BB細胞内ドメイン；及び機能的シグナル伝達ドメイン、例えばCD3ドメインを含み得る。特定の実施形態において、ドメインは、隣接しており、同じリーディングフレーム内で単一の融合タンパク質を形成する。他の実施形態において、ドメインは、例えば、本明細書に記載されるRCAR分子と同様に、個別のポリペプチド内に存在する。

20

【 0 3 3 0】

一部の実施形態において、BCMA CAR分子は、1つ以上のCDR、VH、VL、scFv又は国際公開第2016/014565号パンフレットに開示されるBCMA-1、BCMA-2、BCMA-3、BCMA-4、BCMA-5、BCMA-6、BCMA-7、BCMA-8、BCMA-9、BCMA-10、BCMA-11、BCMA-12、BCMA-13、BCMA-14、BCMA-15、149362、149363、149364、149365、149366、149367、149368、149369、BCMA__EBB-C1978-A4、BCMA__EBB-C1978-G1、BCMA__EBB-C1979-C1、BCMA__EBB-C1978-C7、BCMA__EBB-C1978-D10、BCMA__EBB-C1979-C12、BCMA__EBB-C1980-G4、BCMA__EBB-C1980-D2、BCMA__EBB-C1978-A10、BCMA__EBB-C1978-D4、BCMA__EBB-C1980-A2、BCMA__EBB-C1981-C3、BCMA__EBB-C1978-G4、A7D12.2、C11D5.3、C12A3.2若しくはC13F12.1の完全長配列又はそれと実質的に（例えば、95～99%）同一の配列を含む。

30

40

【 0 3 3 1】

抗BCMA CAR構築物に使用することができる別の例示的なBCMA標的化配列は、国際公開第2017/021450号、同第2017/011804号、同第2017/025038号、同第2016/090327号、同第2016/130598号、同第2016/210293号、同第2016/090320号、同第2016/014789号、同第2016/094304号、同第2016/154055号、同第2015

50

／ 166073号、同第2015/188119号、同第2015/158671号パンフレット、米国特許第9,243,058号、同第8,920,776号、同第9,273,141号、同第7,083,785号、同第9,034,324号明細書、米国特許出願第2007/0049735号、同第2015/0284467号、同第2015/0051266号、同第2015/0344844号、同第2016/0131655号、同第2016/0297884号、同第2016/0297885号、同第2017/0051308号、同第2017/0051252号、同第2017/0051252号、同第2016/020332号、同第2016/087531号明細書、国際公開第2016/079177号、同第2015/172800号、同第2017/008169号パンフレット、米国特許第9,340,621号、米国特許出願第2013/0273055号、同第2016/0176973号、同第2015/0368351号、同第2017/0051068号、同第2016/0368988号及び同第2015/0232557号明細書に開示されており、これらは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。一部の実施形態において、別の例示的なBCMA CAR構築物は、国際公開第2012/0163805号パンフレット（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）からのVH及びVL配列を用いて作製される。

10

【0332】

一部の実施形態において、BCMA CARは、配列、例えば表3～15に開示されるCDR、VH、VL、scFv若しくは完全CAR配列又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%若しくは99%の同一性を有する配列を含む。一部の実施形態において、抗原結合ドメインは、ヒト抗体又はヒト抗体フラグメントを含む。一部の実施形態において、ヒト抗BCMA結合ドメインは、本明細書に（例えば、表3～15に）記載されるヒト抗BCMA結合ドメインの1つ以上（例えば、全3つ）のLC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3並びに／又は本明細書に（例えば、表3～15に）記載されるヒト抗BCMA結合ドメインの1つ以上（例えば、全3つ）のHC CDR1、HC CDR2及びHC CDR3を含む。一部の実施形態において、ヒト抗BCMA結合ドメインは、本明細書に（例えば、表3、7、11、11a及び12）に記載のヒトVL並びに／又は本明細書に（例えば、表3、7、11、11a及び12）に記載のヒトVHを含む。一部の実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、表3、7、11、11a及び12のアミノ酸配列のVL及びVHを含むscFvである。一部の実施形態において、抗BCMA結合ドメイン（例えば、scFv）は、以下を含む：表3、7、11、11a及び12に記載のアミノ酸配列の少なくとも1つ、2つ若しくは3つの修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）、しかし30、20若しくは10以下の修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列又は表3、7、11、11a及び12のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列を含むVL並びに／或いは表3、7、11、11a及び12に記載のアミノ酸配列の少なくとも1つ、2つ若しくは3つの修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）、しかし30、20若しくは10以下の修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列又は表3、7、11、11a及び12のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列を含むVH。

20

30

【0333】

40

50

【表 1 9】

表 3: 例示的な PALLAS 由来抗 BCMA 分子のアミノ酸及び核酸配列

配列番号	名称/説明	配列
R1B6		
配列番号 44	HCDR1 (Kabat)	SYAMS
配列番号 45	HCDR2 (Kabat)	AISGSGGSTYYADSVKG
配列番号 46	HCDR3 (Kabat)	REWVPYDVSIFYDY
配列番号 47	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSY
配列番号 48	HCDR2 (Chothia)	SGSGGS
配列番号 46	HCDR3 (Chothia)	REWVPYDVSIFYDY
配列番号 49	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSYA
配列番号 50	HCDR2 (IMGT)	ISGSGGST
配列番号 51	HCDR3 (IMGT)	ARREWVPYDVSIFYDY
配列番号 52	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR REWVPYDVSIFYDYWGQGTLLTVSS

10

20

【 0 3 3 4】

30

40

50

【表 2 0】

配列番号 53	DNA VH	GAAGTGCAGTTGCTGGAGTCAGGCGGAGGACTGGTGCAGCCCCGGAGG ATCGCTTCGCTTGAGCTGCGCAGCCTCAGGCTTTACCTTCTCCTCCTAC GCCATGTCTGGGTGACACAGGCTCCCGGGAAGGGACTGGAATGGGT GTCCGCCATTAGCGGTTCCGGCGGAAGCACTTACTATGCCGACTCTGT GAAGGGCCGCTTCACTATCTCCCGGACAACCTCCAAGAACACCCTGTA TCTCCAAATGAATTCCCTGAGGGCCGAAGATACCGCGGTGTACTACTG CGCTAGACGGGAGTGGGTGCCCTACGATGTCAGCTGGTACTTCGACTA CTGGGGACAGGGCACTCTCGTACTGTGTCCTCC
配列番号 54	LCDR1 (Kabat)	RASQSISSYLN
配列番号 55	LCDR2 (Kabat)	AASSLQS
配列番号 56	LCDR3 (Kabat)	QQSYSTPLT
配列番号 57	LCDR1 (Chothia)	SQSISSY
配列番号 58	LCDR2 (Chothia)	AAS
配列番号 59	LCDR3 (Chothia)	SYSTPL
配列番号 60	LCDR1 (IMGT)	QSISSY
配列番号 58	LCDR2 (IMGT)	AAS
配列番号 56	LCDR3 (IMGT)	QQSYSTPLT
配列番号 61	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTK VEIK
配列番号 62	DNA VL	GACATTCAAATGACTCAGTCCCCGTCCTCCCTCTCCGCCTCCGTGGGA GATCGCGTCACGATCACGTGCAGGGCCAGCCAGAGCATCTCCAGCTA CCTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAGGCACCGAAGCTCCTGA TCTACGCCGCTAGCTCGCTGCAGTCCGGCGTCCCTTACGGTTCTCGG GATCGGGCTCAGGCACCGACTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAGC CGGAGGACTTCGCGACATACTACTGTGAGCAGTCATACTCCACCCCTC TGACCTTCGGCCAAGGGACCAAGTGGAGATCAAG
配列番号 63	リンカー	GGGGSGGGSGGGSGGGGS
配列番号 64	scFv (VH- リンカー-VL)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVS AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR REWVPPYDVSWYFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGGSDI QMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASS LQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKV EIK

10

20

30

40

50

【 0 3 3 5 】

【表 2 1】

配列番号 65	DNA scFv	GAAGTGCAGTTGCTGGAGTCAGGCGGAGGACTGGTGCAGCCCGGAGG ATCGCTTCGCTTGAGCTGCGCAGCCTCAGGCTTTACCTTCTCCTCTAC GCCATGTCCTGGGTGAGACAGGCTCCCGGGAAGGGACTGGAATGGGT GTCCGCCATTAGCGGTTCCGGCGGAAGCACTTACTATGCCGACTCTGT GAAGGGCCGCTTCACTATCTCCCGGACAACCTCAAGAACACCCTGTA TCTCAAATGAATCCCTGAGGGCCGAAGATACCGCGGTGTACTIONG CGCTAGACGGGAGTGGGTGCCCTACGATGTCAGCTGGTACTTCGACTA CTGGGGACAGGGCACTCTCGTGACTGTGTCTCCGGTGGTGGTGGATC GGGGGGTGGTGGTTCGGGCGGAGGAGGATCTGGAGGAGGAGGGTTCG GACATTCAAATGACTCAGTCCCGTCTCCCTCTCCGCCTCCGTGGGA GATCGCGTCACGATCACGTGCAGGGCCAGCCAGAGCATCTCCAGCTA CCTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAGGCACCGAAGCTCCTGA TCTACGCCGCTAGCTCGCTGCAGTCCGGCGTCCCTTACGGTTCTCGG GATCGGGCTCAGGCACCGACTTCACCTGACCATTAGCAGCCTGCAGC CGGAGGACTTCGCGACATACTACTGTCAGCAGTCATACTCCACCCCTC TGACCTTCGGCCAAGGGACCAAAGTGGAGATCAAG
配列番号 66	完全 CAR アミノ酸配列	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR REWVPYDVSWYFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSDI QMTQSPSSLSASVGDREVITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASS LQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQSYSTPLTFGQGTKV EIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYW APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC RFPEEEEGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNLYNELNLGRREYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
配列番号 67	完全 CAR DNA 配列	GAAGTGCAGTTGCTGGAGTCAGGCGGAGGACTGGTGCAGCCCGGAGG ATCGCTTCGCTTGAGCTGCGCAGCCTCAGGCTTTACCTTCTCCTCTAC GCCATGTCCTGGGTGAGACAGGCTCCCGGGAAGGGACTGGAATGGGT GTCCGCCATTAGCGGTTCCGGCGGAAGCACTTACTATGCCGACTCTGT GAAGGGCCGCTTCACTATCTCCCGGACAACCTCAAGAACACCCTGTA TCTCAAATGAATCCCTGAGGGCCGAAGATACCGCGGTGTACTIONG CGCTAGACGGGAGTGGGTGCCCTACGATGTCAGCTGGTACTTCGACTA CTGGGGACAGGGCACTCTCGTGACTGTGTCTCCGGTGGTGGTGGATC GGGGGGTGGTGGTTCGGGCGGAGGAGGATCTGGAGGAGGAGGGTTCG GACATTCAAATGACTCAGTCCCGTCTCCCTCTCCGCCTCCGTGGGA GATCGCGTCACGATCACGTGCAGGGCCAGCCAGAGCATCTCCAGCTA CCTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAGGCACCGAAGCTCCTGA TCTACGCCGCTAGCTCGCTGCAGTCCGGCGTCCCTTACGGTTCTCGG GATCGGGCTCAGGCACCGACTTCACCTGACCATTAGCAGCCTGCAGC CGGAGGACTTCGCGACATACTACTGTCAGCAGTCATACTCCACCCCTC TGACCTTCGGCCAAGGGACCAAAGTGGAGATCAAGACCACTACCCCA GCACCGAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTG TCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGCAGCTGGTGGGGCCGTGCAT ACCCGGGGTCTTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTG GCTGGTACTTGCGGGGTCTGCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTACT GTAAGCGCGGTTCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTAAGCAACCCTTCA TGAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGG TTCCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAAATTCAG CCGACGCGCAGATGCTCCAGCCTACCAGCAGGGGCAGAACCAGCTCT ACAACGAACTCAATCTTGGTTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGAC AAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAA AGAATCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATG GCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAG GCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACCGCCACCAAG GACACCTATGACGCTTTCACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG

10

20

30

40

【 0 3 3 6 】

【表 2 2】

R1F2		
配列番号 44	HCDR1 (Kabat)	SYAMS
配列番号 45	HCDR2 (Kabat)	AISGSGGSTYYADSVKG
配列番号 68	HCDR3 (Kabat)	REWWYDDWYLDY
配列番号 47	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSY
配列番号 48	HCDR2 (Chothia)	SGSGGS
配列番号 68	HCDR3 (Chothia)	REWWYDDWYLDY
配列番号 49	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSYA
配列番号 50	HCDR2 (IMGT)	ISGSGGST
配列番号 69	HCDR3 (IMGT)	ARREWWYDDWYLDY
配列番号 70	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR REWWYDDWYLDYWGQGLVTVSS
配列番号 71	DNA VH	GAAGTGCAGTTGCTGGAGTCAGGCGGAGGACTGGTGCAGCCCGGAGG ATCGCTTCGCTTGAGCTGCGCAGCCTCAGGCTTTACCTTCTCCTCCTAC GCCATGTCCTGGGTCAGACAGGCTCCCGGAAGGGACTGGAATGGGT GTCCGCCATTAGCGGTTCCGGCGGAAGCACTTACTATGCCGACTCTGT GAAGGGCCGCTTCACTATCTCCCGGACAACTCCAAGAACACCCTGTA TCTCAAATGAATTCCTGAGGGCCGAAGATACCGCGGTGTACTACTG CGTAGACGGGAGTGGTGGTACGACGATGGTACCTGGACTACTGGG GACAGGGCACTCTCGTGACTGTGTCTCTCC
配列番号 54	LCDR1 (Kabat)	RASQSISSYLN
配列番号 55	LCDR2 (Kabat)	AASSLQS
配列番号 56	LCDR3 (Kabat)	QQSYSTPLT
配列番号 57	LCDR1 (Chothia)	SQSISSY
配列番号 58	LCDR2 (Chothia)	AAS
配列番号 59	LCDR3 (Chothia)	SYSTPL
配列番号 60	LCDR1 (IMGT)	QSISSY
配列番号 58	LCDR2 (IMGT)	AAS
配列番号 56	LCDR3 (IMGT)	QQSYSTPLT

【 0 3 3 7 】

10

20

30

40

50

【表 2 3】

配列番号 61	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTK VEIK	
配列番号 62	DNA VL	GACATTCAAATGACTCAGTCCCCGTCTCCCTCTCCGCCTCCGTGGGA GATCGCGTCACGATCACGTGCAGGGCCAGCCAGAGCATCTCCAGCTA CCTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAGGCACCGAAGCTCCTGA TCTACGCCGCTAGCTCGCTGCAGTCCGGCGTCCCITCACGGTTCTCGG GATCGGGCTCAGGCACCGACTTCACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAGC CGGAGGACTTCGCGACATACTACTGTGAGCAGTCATACTCCACCCCTC TGACCTTCGGCCAAGGGACCAAAGTGGAGATCAAG	
配列番号 63	リンカー	GGGGSGGGSGGGSGGGGS	10
配列番号 72	scFv (VH- リンカー-VL)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR REWWYDDWYLDYWGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEI K	
配列番号 73	DNA scFv	GAAGTGCAGTTGCTGGAGTCAGGCGGAGGACTGGTGCAGCCCCGAGG ATCGCTTCGTTGAGCTGCGCAGCCTCAGGCTTACCTTCTCCTCCTAC GCCATGTCTGGGTCAGACAGGCTCCCGGGAAGGACTGGAATGGGT GTCCGCCATTAGCGGTTCCGGCGGAAGCACTTACTATGCCGACTCTGT GAAGGGCCGCTTCACTATCTCCCGGACAACTCCAAGAACCCTGTA TCTCCAAATGAATTCCTGAGGGCCGAAGATACCGCGGTGTACTACTG CGCTAGACGGGAGTGGTGGTACGACGATTGGTACCTGGACTACTGGG GACAGGGCACTCTCGTACTGTGTCCTCCGGTGGTGGATCGGGGG GTGGTGGTTCGGGCGGAGGAGGATCTGGAGGAGGAGGTCGGACATT CAAATGACTCAGTCCCGTCTCCTCCTCCTCCGCCTCCGTGGGAGATCGC GTCACGATCACGTGCAGGGCCAGCCAGAGCATCTCCAGCTACCTGAA CTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAGGCACCGAAGCTCCTGATCTACG CCGCTAGCTCGCTGCAGTCCGGCGTCCCTTACGGTTCTCGGGATCGG GCTCAGGCACCGACTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAGG ACTTCGCGACATACTACTGTGAGCAGTCATACTCCACCCCTCTGACCTT CGGCCAAGGGACCAAAGTGGAGATCAAG	20
配列番号 74	完全 CAR アミノ酸配列	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR REWWYDDWYLDYWGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEI KTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA PLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF PEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	30

【 0 3 3 8 】

40

50

【表 2 4】

配列番号 75	完全 CAR DNA 配列	GAAGTGCAGTTGCTGGAGTCAGGCGGAGGACTGGTGCAGCCCCGAGG ATCGCTTCGCTTGAGCTGCGCAGCCTCAGGCTTTACCTTCTCCTCCTAC GCCATGTCCTGGGTCAGACAGGCTCCCAGGGAAGGGACTGGAATGGGT GTCCGCCATTAGCGGTTCCGGCGGAAGCACTTACTATGCCGACTCTGT GAAGGGCCGCTTCACTATCTCCCAGGACAACCTCCAAGAACCCTGTA TCTCCAAATGAATTCCCTGAGGGCCGAAGATAACCGCGGTGTACTACTG CGCTAGACGGGAGTGGTGGTACGACGATTGGTACCTGGACTACTGGG GACAGGGCACTCTCGTACTGTGTCCTCCGGTGGTGGTATCGGGGG GTGGTGGTTCCGGCGGAGGAGGATCTGGAGGAGGAGGGTCGGACATT CAAATGACTCAGTCCCCTCCTCCCTCCTCCGCTCCGTGGGAGATCGC GTCACGATCAGTGCAGGGCCAGCCAGAGCATCTCCAGCTACCTGAA CTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAGGCACCGAAGCTCCTGATCTACG CCGCTAGCTCGCTGCAGTCCGGCGTCCCTTACGGTCTCCGGGATCGG GCTCAGGCACCGACTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAGG ACTTCGCGACATACTACTGTCAGCAGTCATACTCCACCCCTCTGACCTT CGGCCAAGGGACCAAAGTGGAGATCAAGACCACTACCCAGCACCGA GGCCACCCACCCGGTCTCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGC GTCCGGAGGCATGTAGACCCCGAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGG GGTCTTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGGCCCTCTGGCTGGTA CTTGCGGGTCTGCTGCTTTCCTACTCGTGATCACTCTTTACTGTAAGCG CGGTTCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCTTCATGAGGCC TGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGGTCCAGAG GGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAAATTCAGCCGCAGCG CAGATGCTCCAGCCTACCAGCAGGGGCAGAACCCAGCTCTACAACGAA CTCAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAG AGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCC CAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGC CTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAAGGCC ACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTAT GACGCTCTTACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG
RIG5		
配列番号 44	HCDR1 (Kabat)	SYAMS
配列番号 45	HCDR2 (Kabat)	AISGSGGSTYYADSVKG
配列番号 76	HCDR3 (Kabat)	REWWGESWLFDY
配列番号 47	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSY
配列番号 48	HCDR2 (Chothia)	SGSGGS
配列番号 76	HCDR3 (Chothia)	REWWGESWLFDY
配列番号 49	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSYA
配列番号 50	HCDR2 (IMGT)	ISGSGGST
配列番号 77	HCDR3 (IMGT)	ARREWWGESWLFDY

10

20

30

40

【 0 3 3 9 】

50

【表 2 5】

配列番号 78	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR REWWGESWLFQDYWGQGLVTVSS	
配列番号 79	DNA VH	GAAGTGCAGTTGCTGGAGTCAGGCGGAGGACTGGTGCAGCCCGGAGG ATCGCTTCGCTTGAGCTGCGCAGCCTCAGGCTTTACCTTCTCCTCCTAC GCCATGTCTTGGGTGAGACAGGCTCCCGGAAGGGACTGGAATGGGT GTCCGCCATTAGCGGTTCCGGCGGAAGCACTTACTATGCCGACTCTGT GAAGGGCCGCTTCACTATCTCCCGGACAACTCCAAGAACCCTGTGTA TCTCAAATGAATTCCTGAGGGCCGAAGATACCGCGGTGTACTACTG CGCTAGACGGGAGTGGTGGGGAGAAAGCTGGCTGTTTCGACTACTGGG GACAGGGCACTCTCGTGACTGTGTCTCC	
配列番号 54	LCDR1 (Kabat)	RASQSISSYLN	10
配列番号 55	LCDR2 (Kabat)	AASSLQS	
配列番号 56	LCDR3 (Kabat)	QQSYSTPLT	
配列番号 57	LCDR1 (Chothia)	SQSISSY	
配列番号 58	LCDR2 (Chothia)	AAS	
配列番号 59	LCDR3 (Chothia)	SYSTPL	
配列番号 60	LCDR1 (IMGT)	QSISSY	20
配列番号 58	LCDR2 (IMGT)	AAS	
配列番号 56	LCDR3 (IMGT)	QQSYSTPLT	
配列番号 61	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTK VEIK	
配列番号 62	DNA VL	GACATTCAAATGACTCAGTCCCGTCCTCCCTCCTCCGCTCCGTGGGA GATCGCGTCACGATCACGTGCAGGGCCAGCCAGAGCATCTCCAGCTA CCTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAGGCACCGAAGCTCCTGA TCTACGCCGCTAGCTCGCTGCAGTCCGGCGTCCCTTACGGTTCTCGG GATCGGGCTCAGGCACCGACTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAGC CGGAGGACTTCGCGACATACTACTGTCAGCAGTCATACTCCACCCCTC TGACCTTCGGCCAAGGGACCAAAGTGGAGATCAAG	30
配列番号 63	リンカー	GGGSGGGGSGGGGSGGGGS	
配列番号 80	scFv (VH- リンカー-VL)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR REWWGESWLFQDYWGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQM TQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEIK	

【 0 3 4 0 】

40

50

【表 2 6】

配列番号 81	DNA scFv	<p>GAAGTGCAGTTGCTGGAGTCAGGCGGAGGACTGGTGCAGCCCGGAGG ATCGCTTCGCTTGAGCTGCGCAGCCTCAGGCTTTACCTTCTCCTCCTAC GCCATGTCTGGGTACAGACAGGCTCCCGGGAAGGGACTGGAATGGGT GTCCGCCATTAGCGGTTCCGGCGGAAGCACTTACTATGCCGACTCTGT GAAGGGCCGTTCACTATCTCCCGGACAACCTCCAAGAACACCCTGTA TCTCAAATGAATTCCCTGAGGGCCGAAGATACCGCGGTGTACTACTG CGCTAGACGGGAGTGGTGGGGAGAAAGCTGGCTGTTGACTACTGGG GACAGGGCACTCTCGTGACTGTGTCTCCGGTGGTGGTGGATCGGGGG GTGGTGGTTCGGGCGGAGGAGGATCTGGAGGAGGAGGGTCCGACATT CAAATGACTCAGTCCCCGTCTCCCTCTCCGCTCCGTGGGAGATCGC GTCACGATCACGTGCAGGGCCAGCCAGAGCATCTCCAGCTACCTGAA CTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAGGCACCGAAGCTCCTGATCTACG CCGCTAGCTCGCTGCAGTCCGGCGTCCCTTACGGTCTCTCGGGATCGG GCTCAGGCACCGACTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAGG ACTTCGCGACATACTACTGTCAGCAGTCATACTCCACCCCTCTGACCTT CGGCCAAGGGACCAAAGTGGAGATCAAG</p>	10
配列番号 82	完全 CAR ア ミノ酸配列	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVS AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRaedTAVYYCAR REWWGESWLFdywQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQM TQSPSSLSASVgDRYtITCRASQSISSYLNWYQKPKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTkVEIK TTPAPRPPTPAPIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPL AGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGcSCRfPE EEEGGcELRVKfRSADAPAYQGGQNLyNELNLGRREEYdVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQeGLyNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGkGHdG LYQGLSTATKDYDALHMqALPPR</p>	20
配列番号 83	完全 CAR DNA 配列	<p>GAAGTGCAGTTGCTGGAGTCAGGCGGAGGACTGGTGCAGCCCGGAGG ATCGCTTCGCTTGAGCTGCGCAGCCTCAGGCTTTACCTTCTCCTCCTAC GCCATGTCTGGGTACAGACAGGCTCCCGGGAAGGGACTGGAATGGGT GTCCGCCATTAGCGGTTCCGGCGGAAGCACTTACTATGCCGACTCTGT GAAGGGCCGTTCACTATCTCCCGGACAACCTCCAAGAACACCCTGTA TCTCAAATGAATTCCCTGAGGGCCGAAGATACCGCGGTGTACTACTG CGCTAGACGGGAGTGGTGGGGAGAAAGCTGGCTGTTGACTACTGGG GACAGGGCACTCTCGTGACTGTGTCTCCGGTGGTGGTGGATCGGGGG GTGGTGGTTCGGGCGGAGGAGGATCTGGAGGAGGAGGGTCCGACATT CAAATGACTCAGTCCCCGTCTCCCTCTCCGCTCCGTGGGAGATCGC GTCACGATCACGTGCAGGGCCAGCCAGAGCATCTCCAGCTACCTGAA CTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAGGCACCGAAGCTCCTGATCTACG CCGCTAGCTCGCTGCAGTCCGGCGTCCCTTACGGTCTCTCGGGATCGG GCTCAGGCACCGACTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAGG ACTTCGCGACATACTACTGTCAGCAGTCATACTCCACCCCTCTGACCTT CGGCCAAGGGACCAAAGTGGAGATCAAGACCACTACCCACGACCCGA GGCCACCCACCCCGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGC GTCCGGAGGCATGTAGACCCGAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGG GTCTTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTA CTTGCGGGTCTGCTGCTTCACTCGTGATCACTTTTACTGTAAAGCG CGGTCCGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCTTCATGAGGCC TGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGTTCCAGAG GGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAAATTCAGCCGCAGCG CAGATGCTCCAGCCTACCAGCAGGGGCAGAACCAGCTCTACAACGAA CTCAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAG AGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCC CAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAAGC CTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAAGAGGCAAAGGCC ACGACGACTGTACCAGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTAT GACGCTTTCACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG</p>	30

【 0 3 4 1 】

【表 2 7】

表 4: 例示的な PALLAS 由来抗 BCMA 分子の Kabat CDR

Kabat	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
R1B6	SYAMS (配列番号 44)	AISGSGGSTY YADSVKG (配列番号 45)	REWVPYDVS WYFDY (配列 番号 46)	RASQSISS YLN (配列 番号 54)	AASSL QS (配 列番号 55)	QQSYSTP LT (配列 番号 56)
R1F2	SYAMS (配列番号 44)	AISGSGGSTY YADSVKG (配列番号 45)	REWWYDD WYLDY (配列番号 68)	RASQSISS YLN (配列 番号 54)	AASSL QS (配 列番号 55)	QQSYSTP LT (配列 番号 56)
R1G5	SYAMS (配列番号 44)	AISGSGGSTY YADSVKG (配列番号 45)	REWWGESW LFDY (配列 番号 76)	RASQSISS YLN (配列 番号 54)	AASSL QS (配 列番号 55)	QQSYSTP LT (配列 番号 56)
コンセン サス	SYAMS (配列番号 44)	AISGSGGSTY YADSVKG (配列番号 45)	REWX ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ WX ₇ X ₈ D Y (X ₁ は存在 しないか、又は Vであり; X ₂ は、存在しな いか、又はP であり; X ₃ は、 W又はYで あり; X ₄ は、G, Y, 又はDで あり; X ₅ は、E, D, 又はVで あり; X ₆ は、S 又はDであり; X ₇ は、L又は Yであり; X ₈ は、F又は Lである) (配列番号 84)	RASQSISS YLN (配列 番号 54)	AASSL QS (配 列番号 55)	QQSYSTP LT (配列 番号 56)

10

20

30

【 0 3 4 2 】

40

50

【表 2 8】

表 5: 例示的な PALLAS 由来抗 BCMA 分子の Chothia CDR

Chothia	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
R1B6	GFTFSSY (配列番号 47)	SGSGGS (配列 番号 48)	REWVPYDVS WYFDY (配列 番号 46)	SQSISSY (配列番号 57)	AAS (配列番 号 58)	SYSTPL (配列番号 59)
R1F2	GFTFSSY (配列番号 47)	SGSGGS (配列 番号 48)	REWWYDD WYLDY (配 列番号 68)	SQSISSY (配列番号 57)	AAS (配列番 号 58)	SYSTPL (配列番号 59)
R1G5	GFTFSSY (配列番号 47)	SGSGGS (配列 番号 48)	REWWGESW LFDY (配列番 号 76)	SQSISSY (配列番号 57)	AAS (配列番 号 58)	SYSTPL (配列番号 59)
コンセンサ ス	GFTFSSY (配列番号 47)	SGSGGS (配列 番号 48)	REWX ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ WX ₇ X ₈ D Y (X ₁ は存在し ないか、又は Vであり; X ₂ は、存在しな いか、又は P であり; X ₃ は、 W 又は Y であ り; X ₄ は、G, Y, 又は D であ り; X ₅ は、E, D, 又は V であり; X ₆ は、S 又は D であり; X ₇ は、L 又は Y であり; X ₈ は、 F 又は L であ る) (配列番号 84)	SQSISSY (配列番号 57)	AAS (配列番 号 58)	SYSTPL (配列番号 59)

10

20

30

【 0 3 4 3 】

40

50

【表 2 9】

表 6: 例示的な PALLAS 由来抗 BCMA 分子の IMGT CDR

IMGT	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
R1B6	GFTFSSYA (配列番号 49)	ISGSGGST (配 列番号 50)	ARREWVPY DVSIFYDY (配列番号 51)	QSISSY (配 列番号 60)	AAS (配列番 号 58)	QQSYSTP LT (配列 番号 56)
R1F2	GFTFSSYA (配列番号 49)	ISGSGGST (配 列番号 50)	ARREWWYD DWYLDY (配 列番号 69)	QSISSY (配 列番号 60)	AAS (配列番 号 58)	QQSYSTP LT (配列 番号 56)
R1G5	GFTFSSYA (配列番号 49)	ISGSGGST (配 列番号 50)	ARREWWGE SWLFDY (配 列番号 77)	QSISSY (配 列番号 60)	AAS (配列番 号 58)	QQSYSTP LT (配列 番号 56)
コンセン サ ス	GFTFSSYA (配列番号 49)	ISGSGGST (配 列番号 50)	ARREWX ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ WX ₇ X ₈ DY (X ₁ は存 在しないか、 又は V であり; X ₂ は、存在し ないか、又は P であり; X ₃ は、W 又は Y であり; X ₄ は、 G, Y, 又は D であり; X ₅ は、 E, D, 又は V であり; X ₆ は、 S 又は D であ り; X ₇ は、L 又 は Y であり; X ₈ は、F 又は L である) (配 列番号 85)	QSISSY (配 列番号 60)	AAS (配列番 号 58)	QQSYSTP LT (配列 番号 56)

10

20

30

【 0 3 4 4 】

40

50

【表 3 0】

表 7: 例示的な B 細胞由来抗 BCMA 分子のアミノ酸及び核酸配列

配列番号	名称/説明	配列
PI61		
配列番号 86	HCDR1 (Kabat)	SYGMH
配列番号 87	HCDR2 (Kabat)	VISYDGSNKYYADSVKG
配列番号 88	HCDR3 (Kabat)	SGYALHDDYYGLDV
配列番号 47	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSY
配列番号 89	HCDR2 (Chothia)	SYDGSN
配列番号 88	HCDR3 (Chothia)	SGYALHDDYYGLDV
配列番号 90	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSYG
配列番号 91	HCDR2 (IMGT)	ISYDGSNK
配列番号 92	HCDR3 (IMGT)	GGSGYALHDDYYGLDV
配列番号 93	VH	QVQLQESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA VISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGGS GYALHDDYYGLDVWGQGLVTVSS
配列番号 94	DNA VH	CAAGTGCAGCTGCAGGAATCCGGTGGCGGAGTCGTGCAGCCTGGAAGG AGCCTGAGACTCTCATGCGCCGCGTCAGGGTTACCTTTTCCTCTACG GGATGCATTGGGTCAGACAGGCCCGGAAAAGGACTCGAATGGGTGG CTGTGATCAGCTACGACGGCTCCAACAAGTACTACGCCGACTCCGTGA AAGGCCGGTTCACTATCTCCCGGACAACCTCCAAGAACACGCTGTATCT GCAAATGAATTCAGTGCAGCGGAGGATACCGCTGTGTACTACTGCGG TGGCTCCGGTTACGCCCTGCACGATGACTATTACGGCCTTGACGTCTGG GGCCAGGGAACCCTCGTGACTGTGTCCAGC
配列番号 95	LCDR1 (Kabat)	TGTSSDVGGYNYVS
配列番号 96	LCDR2 (Kabat)	DVSNRPS
配列番号 97	LCDR3 (Kabat)	SSYTSSSTLYV
配列番号 98	LCDR1 (Chothia)	TSSDVGGYNY

10

20

30

40

50

【 0 3 4 5】

【表 3 1】

配列番号 99	LCDR2 (Chothia)	DVS	
配列番号 100	LCDR3 (Chothia)	YTSSSTLY	
配列番号 101	LCDR1 (IMGT)	SSDVGGYNY	
配列番号 99	LCDR2 (IMGT)	DVS	
配列番号 97	LCDR3 (IMGT)	SSYTSSSTLYV	
配列番号 102	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMY DVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFG SGTKVTVL	10
配列番号 103	DNA VL	CAGAGCGCACTGACTCAGCCGGCATCCGTGTCCGGTAGCCCCGGACAG TCGATTACCATCTCCTGTACCGGCACCTCCTCCGACGTGGGAGGGTACA ACTACGTGTCTGGTACCAGCAGCACCAGGAAAGGCCCTAAGTTGA TGATCTACGATGTGTCAAACCGCCCGTCTGGAGTCTCCAACCGTTCTC CGGCTCCAAGTCCGGCAACACCGCCAGCCTGACCATTAGCGGGCTGCA AGCCGAGGATGAGGCCGACTACTACTGCTCGAGCTACACATCTCGAG CACCTCTACGTGTCCGGCTCGGGGACTAAGGTCACCGTGCTG	
配列番号 104	リンカー	GGGGSGGGGSGGGGS	
配列番号 105	scFv (VH-リ ンカー-VL)	QVQLQESGGGVVQPRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA VISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGGS GYALHDDYYGLDVWGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSQSALTQPAS VSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGSGTKVTVL	20
配列番号 106	DNA scFv	CAAGTGCAGCTGCAGGAATCCGGTGGCGGAGTCTGTCAGCCTGGAAGG AGCCTGAGACTCTCATGCGCCCGCTCAGGGTTACCTTTTCTCCTACG GGATGCATTGGGTACAGACAGGCCCGGAAAGGGACTCGAATGGGTGG CTGTGATCAGCTACGACGGCTCCAACAAGTACTACGCCGACTCCGTGA AAGGCCGGTTCACTATCTCCCGGGACAACCTCCAAGAACACGCTGTATCT GCAAATGAATTCAGTGCAGCGGGAGGATACCGCTGTGTACTACTGCGG TGGCTCCGGTACGCCCTGCACGATGACTATTACGGCCTTGACGTCTGG GGCCAGGGAACCTCGTACTGTGTCCAGCGGTGGAGGAGTTCCGGC GGAGGAGGATCAGGAGGGGTGGATCGCAGAGCGCACTGACTCAGCC GGCATCCGTGTCCGGTAGCCCCGGACAGTCGATTACCATCTCCTGTACC GGCACCTCCTCCGACGTGGGAGGGTACAACCTACGTGTCTGGTACCAG CAGCACCCAGGAAAGGCCCTAAGTTGATGATCTACGATGTGTCAAAC CGCCCGTCTGGAGTCTCAAACCGGTTCTCCGGCTCAAAGTCCGGCAACA CCGCCAGCCTGACCATTAGCGGGCTGCAAGCCGAGGATGAGGCCGACT ACTACTGCTCGAGCTACACATCCTCGAGCACCTCTACGTGTCCGGCTC GGGACTAAGGTCACCGTGCTG	30
配列番号 107	完全 CAR アミノ酸配列	QVQLQESGGGVVQPRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA VISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGGS GYALHDDYYGLDVWGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSQSALTQPAS VSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGSGTKVTVLT TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLA GTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE EGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQUALPPR	40

【 0 3 4 6 】

【表 3 2】

配列番号 108	完全 CAR DNA 配列	CAAGTGCAGCTGCAGGAATCCGGTGGCGGAGTCGTGCAGCCTGGAAGG AGCCTGAGACTTTCATGCGCCGCGTCAGGGTTCACCTTTTCCTCCTACG GGATGCATTGGGTCAGACAGGCCCGGAAAGGGACTCGAATGGGTGG CTGTGATCAGCTACGACGGCTCCAACAAGTACTACGCCGACTCCGTGA AAGGCCGGTTCACTATCTCCCGGACAACCTCCAAGAACACGCTGTATCT GCAAATGAATTCAGTGCAGCGGAGGATAACCGCTGTGTACTACTGCGG TGGCTCCGGTACGCCCTGCACGATGACTATTACGGCCTTGACGTCTGG GGCCAGGGAACCCCTCGTACTGTGTCCAGCGGTGGAGGAGGTTCCGGC GGAGGAGGATCAGGAGGGGGTGGATCGCAGAGCGCACTGACTCAGCC GGCATCCGTGTCCGGTAGCCCCGGACAGTCGATTACCATCTCCTGTACC GGCACCTCCTCCGACGTGGGAGGGTACAACCTACGTGTCTGGTACCAG CAGCACCCAGGAAAGGCCCTAAGTTGATGATCTACGATGTGTCAAAC CGCCCGTCTGGAGTCTCCAACCGGTTCTCCGGCTCCAAGTCCGGCAACA CCGCCAGCCTGACCATAGCGGGCTGCAAGCCGAGGATGAGGCCGACT ACTACTGCTCGAGCTACACATCTCGAGCACCTCTACGTGTTCCGGCTC GGGACTAAGGTCACCGTGTGACTACTACCCAGCACCGAGGCCACC CACCCCGGCTCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAG GCATGTAGACCCGACGTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGAC TTCGCTGCGATACTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGG TCCTGCTGCTTTCAGTGTGATCACTCTTACTGTAAGCGCGGTCCGAA GAAGCTGCTGTACATCTTAAGCAACCTTCATGAGGCCCTGTCAGACT ACTCAAGAGGAGGACCGGTGTTATGCCGGTCCAGAGGAGGAGGAA GGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAATTCAGCCGCAGCGCAGATGCTCCA GCCTACCAGCAGGGCAGAACCAGCTCTACAACGAACCTCAATCTTGGT CGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCC AGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCAAGAGGGCCTGT ACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTG GTATGAAAAGGGAAACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTAC CAGGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCACATG CAGGCCCTGCCGCTCGG
B61-02		
配列番号 86	HCDR1 (Kabat)	SYGMH
配列番号 109	HCDR2 (Kabat)	VISYKGSNKYYADSVKG
配列番号 88	HCDR3 (Kabat)	SGYALHDDYYGLDV
配列番号 47	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSY
配列番号 110	HCDR2 (Chothia)	SYKGSN
配列番号 88	HCDR3 (Chothia)	SGYALHDDYYGLDV
配列番号 90	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSYG
配列番号 111	HCDR2 (IMGT)	ISYKGSNK
配列番号 92	HCDR3 (IMGT)	GGSGYALHDDYYGLDV
配列番号 112	VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVA VISYKGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGGS GYALHDDYYGLDVWVGQGLTVTVSS

10

20

30

40

【 0 3 4 7 】

50

【表 3 3】

配列番号 113	DNA VH	CAAGTGCAGCTTGTCTGAATCGGGAGGCGGAGTGGTGCAGCCTGGACGA TCGCTCCGGCTCTCATGTGCCGCGAGCGGATTCACCTTCTCGAGCTACG GCATGCACTGGGTACAGACAAGCCCCAGGAAAGGGCCTGGAATGGGTGG CTGTCATCTCGTACAAGGGCTCAAACAAGTACTACGCCGACTCCGTGAA GGCCCGGTTACCATCTCCCGCGATAACTCCAAGAATACCCCTCTATCTG CAAATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGATACTGCAGTGTACTACTGCGGG GGTTCAGGCTACGCGCTGCACGACGACTACTACGGATTGGACGTCTGG GGCCAAGGAACTCTGTGACCGTGTCTCT	
配列番号 95	LCDR1 (Kabat)	TGTSSDVGGYNYVS	
配列番号 114	LCDR2 (Kabat)	EVSNRLR	10
配列番号 115	LCDR3 (Kabat)	SSYTSSSALYV	
配列番号 98	LCDR1 (Chothia)	TSSDVGGYNY	
配列番号 116	LCDR2 (Chothia)	EVS	
配列番号 117	LCDR3 (Chothia)	YTSSSALY	
配列番号 101	LCDR1 (IMGT)	SSDVGGYNY	
配列番号 116	LCDR2 (IMGT)	EVS	20
配列番号 115	LCDR3 (IMGT)	SSYTSSSALYV	
配列番号 118	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQHPGKAPKLMY EVSNRLRGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSALYVF GSGTKVTVL	
配列番号 119	DNA VL	CAGAGCGCGCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGAGCGGTTCCGCCGGACAG TCCATTACCATTTCGTGCACCGGGACCTCCTCCGACGTGGGAGGCTACA ACTACGTGTCTGGTACCAGCAGCATCCCGGAAAGGCCCGAAGCTGA TGATCTACGAAGTGTGGAACAGACTGCGGGGAGTCTCCAACCGCTTTC CGGGTCCAAGTCCGGCAACACCGCCAGCCTGACCATCAGCGGGCTCCA GGCAGAAGATGAGGCTGACTATTACTGCTCCTCCTACACGTCAAGCTCC GCCCTCTACGTGTTCCGGTCCGGGACCAAAGTCACTGTGCTG	
配列番号 63	リンカー	GGGGSGGGSGGGSGGGGS	30
配列番号 120	scFv (VH- リンカー-VL)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVA VISYKGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGGS GYALHDDYYGLDVWGQTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGGSQSAL TQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQHPGKAPKLMYEVSN RLRGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSALYVFGST KVTVL	

【0 3 4 8】

10

20

30

40

50

【表 3 4】

配列番号 121	DNA scFv	CAAGTGCAGCTTGTGCGAATCGGGAGGCGGAGTGGTGCAGCCTGGACGA TCGCTCCGGCTCTCATGTGCCGCGAGCGGATTACCTTCTCGAGCTACG GCATGCACTGGGTCAGACAAGCCCCAGGAAAGGGCCTGGAATGGGTGG CTGTATCTCGTACAAGGGCTCAAACAAGTACTACGCCGACTCCGTGAA GGGCCGGTTCACCATCTCCCGGATAACTCCAAGAATACCCTCTATCTG CAAATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGATACTGCAGTGTACTACTGCGGG GGTTCAGGCTACGCGCTGCACGACGACTACTACGGATTGGACGTCTGG GGCCAAGGAACCTTGTGACCGTGTCTCTGGTGGAGGGCGGATCAGGG GGTGGCGGATCTGGGGGTGGTGGTTCCGGGGGAGGAGGATCGCAGAGC GCGCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGAGCGGTTCCGCCGGGACAGTCCATTA CCATTTCTGTCACCGGGACCTCTCCGACGTGGGAGGCTACAACCTACGT GTCCTGGTACCAGCAGCATCCCGGAAAGGCCCGAAGCTGATGATCTA CGAAGTGTGCAACAGACTGCGGGGAGTCTCCAACCGCTTTTCCGGGTCC AAGTCCGGCAACACCGCCAGCCTGACCATCAGCGGGCTCCAGGCAGAA GATGAGGCTGACTATTACTGCTCCTCCTACACGTCAAGCTCCGCCCTCT ACGTGTTCCGGTCCGGGACCAAAGTCACTGTGCTG
配列番号 122	完全 CAR アミノ酸配列	QVQLVESGGGVVQPRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVA VISYKGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGGS GYALHDDYYGLDVWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGSALS TQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQHPGKAPKLMIEVSN RLRGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYSSSALYVFGSGT KVTVLTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC RFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDYDALHMQALPPR
配列番号 123	完全 CAR DNA 配列	CAAGTGCAGCTTGTGCGAATCGGGAGGCGGAGTGGTGCAGCCTGGACGA TCGCTCCGGCTCTCATGTGCCGCGAGCGGATTACCTTCTCGAGCTACG GCATGCACTGGGTCAGACAAGCCCCAGGAAAGGGCCTGGAATGGGTGG CTGTATCTCGTACAAGGGCTCAAACAAGTACTACGCCGACTCCGTGAA GGGCCGGTTCACCATCTCCCGGATAACTCCAAGAATACCCTCTATCTG CAAATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGATACTGCAGTGTACTACTGCGGG GGTTCAGGCTACGCGCTGCACGACGACTACTACGGATTGGACGTCTGG GGCCAAGGAACCTTGTGACCGTGTCTCTGGTGGAGGGCGGATCAGGG GGTGGCGGATCTGGGGGTGGTGGTTCCGGGGGAGGAGGATCGCAGAGC GCGCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGAGCGGTTCCGCCGGGACAGTCCATTA CCATTTCTGTCACCGGGACCTCTCCGACGTGGGAGGCTACAACCTACGT GTCCTGGTACCAGCAGCATCCCGGAAAGGCCCGAAGCTGATGATCTA CGAAGTGTGCAACAGACTGCGGGGAGTCTCCAACCGCTTTTCCGGGTCC AAGTCCGGCAACACCGCCAGCCTGACCATCAGCGGGCTCCAGGCAGAA GATGAGGCTGACTATTACTGCTCCTCCTACACGTCAAGCTCCGCCCTCT ACGTGTTCCGGTCCGGGACCAAAGTCACTGTGCTGACCCTACCCAGC ACCGAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCTCCAGCCTCTGTCC CTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGCAGCTGGTGGGGCCGTGCATACC CGGGGTCTTACTTCCGCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTG GTAATGCGGGGTCTGCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTACTGTAAG CGCGGTGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCTTCATGAGGC CTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACCGGCTGTTTCATGCCGGTCCAG AGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAATTCAGCCGCAGC GCAGATGCTCCAGCCTACCAGCAGGGGCAGAACAGCTCTACAACGAA CTCAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGA GGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCA AGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAAGCCTA TAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAAGAGGCAAAAGGCCACG ACGGACTGTACCAGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACG CTCTTACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG

10

20

30

40

【 0 3 4 9 】

【表 3 5】

B61-10		
配列番号 86	HCDR1 (Kabat)	SYGMH
配列番号 109	HCDR2 (Kabat)	VISYKGSNKYYADSVKG
配列番号 88	HCDR3 (Kabat)	SGYALHDDYYGLDV
配列番号 47	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSY
配列番号 110	HCDR2 (Chothia)	SYKGSN
配列番号 88	HCDR3 (Chothia)	SGYALHDDYYGLDV
配列番号 90	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSYG
配列番号 111	HCDR2 (IMGT)	ISYKGSNK
配列番号 92	HCDR3 (IMGT)	GGSGYALHDDYYGLDV
配列番号 112	VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA VISYKGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGGS GYALHDDYYGLDVWGQGLVTVSS
配列番号 113	DNA VH	CAAGTGCAGCTTGTGCAATCGGGAGGCGGAGTGGTGCAGCCTGGACGA TCGCTCCGGCTCTCATGTGCCGCGAGCGGATTCACCTTCTCGAGCTACG GCATGCACTGGGTCAGACAAGCCCCAGGAAAGGGCCTGGAATGGGTGG CTGTCATCTCGTACAAGGGCTCAAACAAGTACTACGCCGACTCCGTGAA GGCCCGTTACCATCTCCCGGATAACTCCAAGAATACCCTCTATCTG CAAATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGATACTGCAGTGTACTACTGCGGG GGTTCAGGCTACGCGCTGCACGACGACTACTACGGATTGGACGTCTGG GGCCAAGGA ACTCTTGTGACCGTGTCTCT
配列番号 95	LCDR1 (Kabat)	TGTSSDVGGYNYVS
配列番号 114	LCDR2 (Kabat)	EVSNRLR
配列番号 97	LCDR3 (Kabat)	SSYTSSSTLYV
配列番号 98	LCDR1 (Chothia)	TSSDVGGYNY
配列番号 116	LCDR2 (Chothia)	EVS
配列番号 100	LCDR3 (Chothia)	YTSSSTLY
配列番号 101	LCDR1 (IMGT)	SSDVGGYNY
配列番号 116	LCDR2 (IMGT)	EVS
配列番号 97	LCDR3 (IMGT)	SSYTSSSTLYV
配列番号 124	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMY EVSNRLRGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFG SGTKVTVL

10

20

30

40

【 0 3 5 0 】

50

【表 3 6】

配列番号 125	DNA VL	CAGAGCGCGCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGAGCGGTTCCGCCGGGACAG TCCATTACCATTTTCGTGCACCCGGGACCTCCTCCGACGTGGGAGGCTACA ACTACGTGTCCTGGTACCAGCAGCATCCCGGAAAGGCCCCGAAGCTGA TGATCTACGAAGTGTGGAACAGACTGCGGGGAGTCTCCAACCGCTTTTC CGGGTCCAAGTCCGGCAACACCGCCAGCCTGACCATCAGCGGGCTCCA GGCAGAAGATGAGGCTGACTATTACTGCTCCTCCTACACGTCAAGCTCC ACCCTTACGTGTTCCGGTCCGGGACCAAAGTCACTGTGCTG	
配列番号 63	リンカー	GGGGSGGGSGGGSGGGGS	
配列番号 126	scFv (VH- リンカー-VL)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA VISYKGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGGS GYALHDDYYGLDVWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGGSQSAL TQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQHPGKAPKLMIEVSN RLRGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYSSSTLYVFGSGTK VTVL	10
配列番号 127	DNA scFv	CAAGTGCAGCTTGTGCAATCGGGAGGCGGAGTGGTGCAGCCTGGACGA TCGCTCCGGCTCTCATGTGCCGCGAGCGGATCACCTTCTCGAGCTACG GCATGCACTGGGTACAGACAAGCCCCAGGAAAGGGCCTGGAATGGGTGG CTGTCATCTCGTACAAGGGCTCAAACAAGTACTACGCCGACTCCGTGAA GGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGATAACTCCAAGAATACCTCTATCTG CAAATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGATACTGCAGTGTACTACTCGGG GGTTCAGGCTACGCGCTGCACGACGACTACTACGGATTGGACGTCTGG GGCCAAGGAACTCTGTGACCGTGTCTCTGGTGGAGGCGGATCAGGG GGTGGCGGATCTGGGGTGGTGGTTCGGGGGAGGAGGATCGCAGAGC GCGCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGAGCGGTTCCGCCGGGACAGTCCATTA CCATTCGTGCACCGGGACCTCCTCCGACGTGGGAGGCTACAACCTACGT GTCCTGGTACCAGCAGCATCCCGGAAAGGCCCCGAAGCTGATGATCTA CGAAGTGTGCAACAGACTGCGGGGAGTCTCCAACCGCTTTTCCGGGTCC AAGTCCGGCAACACCGCCAGCCTGACCATCAGCGGGCTCCAGGCAGAA GATGAGGCTGACTATTACTGCTCCTCCTACACGTCAAGCTCCACCCTCT ACGTGTTCCGGTCCGGGACCAAAGTCACTGTGCTG	20
配列番号 128	完全 CAR アミノ酸配列	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA VISYKGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGGS GYALHDDYYGLDVWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGGSQSAL TQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQHPGKAPKLMIEVSN RLRGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYSSSTLYVFGSGTK VTVLTTTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC RFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	30

【 0 3 5 1 】

【表 3 7】

配列番号 129	完全 CAR DNA 配列	CAAGTGCAGCTTGTCTGAATCGGGAGGCGGAGTGGTGCAGCCTGGACGA TCGCTCCGGCTCTCATGTGCCGCGAGCGGATTCACCTTCTCGAGCTACG GCATGCACTGGGTACAGCAAGCCCCAGGAAAGGGCCCTGGAATGGGTGG CTGTCATCTCGTACAAGGGCTCAAACAAGTACTACGCCGACTCCGTGAA GGGCCGGTTACCATCTCCC GCGATAACTCCAAGAATACCCTCTATCTG CAAATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGATACTGCAGTGTACTACTGCGGG GGTTCAGGCTACGCGCTGCACGACGACTACTACGGATTGGACGTCTGG GGCCAAGGA ACTCTTGTGACCGTGTCTCTGGTGGAGGCGGATCAGGG GGTGGCGGATCTGGGGGTGGTGGTTCGGGGGGAGGAGGATCGCAGAGC GCGCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGAGCGGTTCGCCGGGACAGTCCATTA CCATTTTCGTGCACCGGGACCTCCTCCGACGTGGGAGGCTACAACACTACGT GTCTGGTACCAGCAGCATCCCGGAAAGGCCCGAAGCTGATGATCTA CGAAGTGTCTGAACAGACTGCGGGGAGTCTCCAACCGCTTTTCCGGGTCC AAGTCCGGCAACACCGCCAGCCTGACCATCAGCGGGCTCCAGGCAGAA GATGAGGCTGACTATTACTGCTCCTCCTACACGTCAAGCTCCACCCTCT ACGTGTTCCGGTCCGGGACCAAAGTCACTGTGCTGACCACTACCCAGC ACCGAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCC CTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGCAGCTGGTGGGGCCCTGCATACC CGGGGTCTTGACTTCGCTGCGATATCTACATTGGGCCCTCTGGCTG GTAATTGCGGGTCTGCTGCTTTACTCGTGATCACTTTACTGTAAAG CGCGGTCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCCTCATGAGGC CTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGGTCCCAG AGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCGCGTCAAATTCAGCCGCAGC GCAGATGCTCCAGCCTACCAGCAGGGGCAGAACAGCTCTACAACGAA CTCAATCTTGGTTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGA GGACGGGACCCAGAAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAAGAATCCCCA AGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAAGCCTA TAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAAGAGGCAAAGGCCACG ACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACG CTCTTACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG
-------------	------------------	--

10

20

【 0 3 5 2】

【表 3 8】

表 8: 例示的な B 細胞由来抗 BCMA 分子の Kabat CDR

Kabat	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
PI61	SYGMH (配列番号 86)	VISYDGSN KYYADSV KG (配列番 号 87)	SGYALHDD YYGLDV (配列番号 88)	TGTSSDV GGYNYV S (配列番 号 95)	DVSNRPS (配列番号 96)	SSYTSSS TLYV (配列番号 97)
B61-02	SYGMH (配列番号 86)	VISYKGSN KYYADSV KG (配列番 号 109)	SGYALHDD YYGLDV (配列番号 88)	TGTSSDV GGYNYV S (配列番 号 95)	EVS NRLR (配列番号 114)	SSYTSSS ALYV (配列番号 115)
B61-10	SYGMH (配列番号 86)	VISYKGSN KYYADSV KG (配列番 号 109)	SGYALHDD YYGLDV (配列番号 88)	TGTSSDV GGYNYV S (配列番 号 95)	EVS NRLR (配列番号 114)	SSYTSSS TLYV (配列番号 97)
コンセンサ ス	SYGMH (配列番号 86)	VISYXGSN KYYADSV KG (Xは、 D又はKで ある) (配列 番号 130)	SGYALHDD YYGLDV (配列番号 88)	TGTSSDV GGYNYV S (配列番 号 95)	X ₁ VSNRX ₂ X ₃ , (X ₁ は、D又 はEであり; X ₂ は、P又は Lであり; X ₃ は、S又はR である) (配列 番号 131)	SSYTSSS XLYV (X は、T又は Aである) (配列番号 132)

30

40

【 0 3 5 3】

50

【表 3 9】

表 9: 例示的な B 細胞由来抗 BCMA 分子の Chothia CDR

Chothia	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
PI61	GFTFSSY (配列番号 47)	SYDGSN (配列番号 89)	SGYALHDDY YGLDV (配列 番号 88)	TSSDVGG YNY (配列 番号 98)	DVS (配列 番号 99)	YTSSSTLY (配列番号 100)
B61-02	GFTFSSY (配列番号 47)	SYKGSN (配列番号 110)	SGYALHDDY YGLDV (配列 番号 88)	TSSDVGG YNY (配列 番号 98)	EVS (配列 番号 116)	YTSSSAL Y (配列番 号 117)
B61-10	GFTFSSY (配列番号 47)	SYKGSN (配列番号 110)	SGYALHDDY YGLDV (配列 番号 88)	TSSDVGG YNY (配列 番号 98)	EVS (配列 番号 116)	YTSSSTLY (配列番号 100)
コンセンサ ス	GFTFSSY (配列番号 47)	SYXGSN (X は、D 又は K である) (配 列番号 133)	SGYALHDDY YGLDV (配列 番号 88)	TSSDVGG YNY (配列 番号 98)	XVS (X は、D 又は E である) (配列番号 134)	YTSSSXL Y (X は、T 又は A で ある) (配列 番号 135)

10

【 0 3 5 4】

【表 4 0】

20

表 10: 例示的な B 細胞由来抗 BCMA 分子の IMGT CDR

IMGT	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
PI61	GFTFSSYG (配列番号 90)	ISYDGSN K (配列番 号 91)	GGSGYALHDD YYGLDV (配列 番号 92)	SSDVGGY NY (配列番 号 101)	DVS (配 列番号 99)	SSYTSSSTL YV (配列番 号 97)
B61-02	GFTFSSYG (配列番号 90)	ISYKGSN K (配列番 号 111)	GGSGYALHDD YYGLDV (配列 番号 92)	SSDVGGY NY (配列番 号 101)	EVS (配 列番号 116)	SSYTSSSA LYV (配列 番号 115)
B61-10	GFTFSSYG (配列番号 90)	ISYKGSN K (配列番 号 111)	GGSGYALHDD YYGLDV (配列 番号 92)	SSDVGGY NY (配列番 号 101)	EVS (配 列番号 116)	SSYTSSSTL YV (配列番 号 97)
コンセンサ ス	GFTFSSYG (配列番号 90)	ISYXGSN K (X は、D 又は K で ある) (配 列番号 136)	GGSGYALHDD YYGLDV (配列 番号 92)	SSDVGGY NY (配列番 号 101)	XVS (X は、D 又 は E であ る) (配列 番号 134)	SSYTSSSX LYV (X は、 T 又は A で ある) (配列 番号 132)

30

【 0 3 5 5】

40

50

【表 4 1】

表 11: PI61 に基づく例示的な抗 BCMA 分子のアミノ酸及び核酸配列

同定	タンパク質配列	DNA 配列(5'-3')
シグナルペプチド	MALPVTALLLPLALLLHAARP (配列番号 1)	Atggccctccctgtcaccgctctgttgcctgcccgttgcctctgctgetcc acgcagcgcgaccg (配列番号 252)
PI61 VH	QVQLQESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMHWVRQAP GKGLEWVAVISYDGSNKYYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCGSGYA LHDDYYGLDVWGQTLVTVS S (配列番号 93)	CAGGTACAATTGCAGGAGTCTGGAGGCGG TGTGGTGC AACCCGGTCCGAGCTTGCGCCT GAGTTGTGCTGCGTCTGGATTTACATTTTC ATCTTACGGAATGCATTGGGTACGCCAGG CACCGGGGAAAGGCCCTTGAATGGGTGGCT GTAATTTTCATACGATGGTTCCAACAAATAC TATGCTGACTCAGTCAAGGGTTCGATTTACA ATTAGTCGGGACAACCTCCAAGAACACCCT TTATCTTCAAATGAATTCCTTAGAGCAGA GGATACGGCGGTCTATTA CTGTGGTGGCA GTGGTTATGCACTTCATGATGACTACTATG GCTTGGATGTCTGGGGCAAGGGACGCTT GTAACTGTATCCTCT (配列番号 260)
PI61 VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCT GTSSDVGGYNYVSWYQQHPG KAPKLMYDVSNRPSGVSNRFS GSKSGNTASLTISGLQAEDEAD YYCSSYTSSSTLYVFGSGTKVT VL (配列番号 102)	CAATCTGCTCTGACTCAACCAGCAAGCGT ATCAGGGTCACCGGGACAGAGTATTACCA TAAGTTGCACGGGGACCTCTAGCGATGTA GGGGGGTATAATTATGTATCTTGGTATCAA CAACACCCCGGAAAGCCCTAAATTGAT GATCTACGACGTGACAAATCGACCTAGTG GCGTATCAAATCGCTTCTCTGGTAGCAAGA GTGGGAATACGGCGTCCCTTACTATTAGCG GATTGCAAGCAGAAGATGAGGCCGATTAC TACTGCAGCTCCTATACTAGCTCTTCTACA TTGTACGTCTTTGGGAGCGGAACAAAAGT AACAGTACTC (配列番号 261)
リンカー	GGGGSGGGSGGGGS (配列番 号 104)	
ScFv PI61	QVQLQESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMHWVRQAP GKGLEWVAVISYDGSNKYYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCGSGYA LHDDYYGLDVWGQTLVTVS SGGGSGGGSGGGGSQSALT QPASVSGSPGQSITISCTGTSSD VGGYNYVSWYQQHPGKAPKL MIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSG NTASLTISGLQAEDEADYYCSS YTSSSTLYVFGSGTKVTVL (配 列番号 105)	CaggtaacaattgcaggagctggaggcgggtgtgGtgaaccgggtc gcagcttgcgctgagttgtGctgcgtctgattacatttcatcttac ggaAtgcattgggtacgccaggcaccggggaaggcCtgaatgg gtggctgaatttcatacgtggfTccaacaatactatgctgactcag tcaagggtCgattacaattagtcgggacaactccaagaacAccctt atctcaaatgaattcccttagagcaGaggatacggcggctctactg tgggtggcagtGgttatgcactcatgatgattactatggcttgGatgct gggggcaaggacgcttgaactgtaTcctctggtggtggfagt ggtggggaggcTccggcgggtgcccctctcaatctgctctgactC aaccagcaagcgtatcagggtcaccgggacagAgtattaccataag ttgcacgggacctctagcGatgtaggggggtataaattatgtatcttg gtatCaacaacaccggggaagcccctaattgatAtctacgac gtgagcaatcgacctagtggcgtTcaaatcgtctctgtagcaag agtgggaatAcggcgtccttactattagcggattgcaagcaGaa atgaggccgattactactgagctctatActagctctctacattgtac gtcttgggagcggaaacaaaagtaacagtactc (配列番号 253)

10

20

30

【 0 3 5 6】

40

50

【表 4 2】

膜貫通ドメイン 及びヒンジ	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR PEACRPAAGGAVHTRGLDFAC DIYWAPLAGTCGVLLSLVIT LYC (配列番号 202)	AcaacaacacctgccccgagaccgacctacaccaGccccactatt gccagccagcctctgagcctcAggcctgagcctctagggccgca gcgggcggcGcagttcatacacgggcttgatctgctgtGatatt tatattgggctcctttgcggggacaTgtggcgctgctctctgtcac ttgtattacctgtactgt (配列番号 254)
4-1BB	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQT TQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (配列番号 7)	AaacgcgggcgaaaaaattgctgtatatatttAagcagccattatg aggccccgtcagacgacgCaggaggagacgggtgctcttgcaggt teccagaagaggaagaagggggctgtgaattg (配列番号 255)
CD3ζ	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLY NELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGHDGLYQGLSTATKDTYDA LHMQUALPPR (配列番号 10)	CgggttaatttcaagatccgcagacgctccaGcataccaacaggg acaaaaccaactctataacGagctgaatcttgaagaagggaggat atgatGtgctggataaacggcgcttagagatccggagAtggcg gaaaaccaagcgaaaaaacctcagGaggactctacaacgaac tcagaaagacaaaAtggcgagccttattccgaatagcatgaa gGcgagcgggagggcagggaaagggcagcagcgaCtgatcaa ggcctctcaaccgactaaggatAcgtacgagccctgcacatgc aggccctgectcggaga (配列番号 256)
PI61 完全 CAR 構築物	MALPVTALLLPLALLLHAARP QVQLQESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMHWVRQAP GKGLEWVAVISYDGSNKYYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCGSGYA LHDDYYGLDVWGQGLTVTS SGGGSGGGSGGGGSQSALT QPASVSGSPGQSITISCTGTSSD VGGYNYVSWYQQHPGKAPKL MIYDVSNRPSGVSNRFSKSG NTASLTISGLQAEDEADYYCSS YTSSSTLYVFGSGTKVTVLTTT PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA CRPAAGGAVHTRGLDFACDIY IWAPLAGTCGVLLSLVITLYC KRGRKLLYIFKQPFMRPVQT TQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLY NELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGHDGLYQGLSTATKDTYDA LHMQUALPPR (配列番号 257)	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCTCTGTTGCTG CCGCITGCTCTGCTGCTCCACGCAGCGCGA CCGCAGGTACAATTGCAGGAGTCTGGAGG CGGTGTGGTGCAACCCGGTCCGAGCTTGC GCCTGAGTTGTGCTGCGTCTGGATTTACAT TTTCATCTTACGGAATGCATTGGGTACGCC AGGCACCGGGAAAGGCCTTGAATGGGTG GCTGTAATTTACATACGATGGTTCCAACAAA TACTATGCTGACTCAGTCAAGGTCGATTT ACAATTAGTCGGGACAACCTCAAGAACAC CCTTTATCTCAAATGAATCCCTTAGAGC AGAGGATACGGCGGTCTATTACTGTGGTG GCAGTGGTTATGCACCTCATGATGATTA ATGGCTTGATGTCTGGGGGCAAGGGACG CTTGTAAGTGTATCCTCTGGTGGTGGTGGT AGTGGTGGGGGAGGCTCCGGCGGTGGCGG CTCTCAATCTGCTCTGACTCAACCAGCAAG CGTATCAGGGTCACCGGGACAGAGTATTA CCATAAGTTGCACGGGGACCTCTAGCGAT GTAGGGGGGTATAATTATGTATCTTGGTAT CAACAACACCCCGGAAAGCCCTAAATT GATGATCTACGACGTGAGCAATCGACCTA GTGGCGTATCAAATCGCTTCTCTGGTAGCA AGAGTGGGAATACGGCGTCCCTTACTATT AGCGGATTGCAAGCAGAAGATGAGGCCGA TTACTACTGCAGCTCCTATACTAGCTCTTC TACATTGTACGTCTTTGGGAGCGGAACAA AAGTAACAGTACTCACACAACACCTGCC CCGAGACCGCTACACCAGCCCCGACTAT TGCCAGCCAGCCTCTGAGCCTCAGGCCTG AGGCCTGTAGGCCCGCAGCGGGCGCGCA

10

20

30

【 0 3 5 7 】

40

50

【表 4 3】

	<p>G TTCATACACGGGGCTTGGATTTCGCTTGT GATATTTATATTTGGGCTCCTTTGGCGGGG ACATGTGGCGTGCTGCTTCTGTCACTTGT ATTACACTGFACTGTAAACGCGGGCGAAA AAAATTGCTGTATATTTTTAAGCAGCCATT TATGAGGCCCGTTCAGACGACGCAGGAGG AGGACGGTTGCTCTTGCAGGTTCCAGAA GAGGAAGAAGGGGGCTGTGAATTGCGGGT TAAATTTTCAAGATCCGCAGACGCTCCAGC ATACCAACAGGGACAAAACCAACTCTATA ACGAGCTGAATCTTGGAAGAAGGGAGGAA TATGATGTGCTGGATAAACGCGCGGTAG AGATCCGGAGATGGGCGGAAAACCAAGGC GAAAAAACCTCAGGAGGGACTCTACAAC GAACTGCAGAAAGACAAAATGGCGGAGG CTTATTCCGAAATAGGCATGAAGGGCGAG CGGAGGCGAGGGAAAGGGCACGACGGAC TGTATCAAGGCCTCTCAACCGGACTAAG GATACGTACGACGCCCTGCACATGCAGGC CCTGCCTCCGAGA (配列番号 258)</p>
--	---

10

【 0 3 5 8 】

20

30

40

50

【表 4 4】

<p>PI61 完全 CAR 構築物(シグナル ペプチド及び終止 コドンを含む核酸)</p>		<p>ATGGCCCTCCCTGTACCCGCTCTGTTGCTGCCGC TTGCTCTGCTGCTCCACGCAGCGCGACCCGAGGT ACAATTGCAGGAGTCTGGAGGCGGTGTGGTGCAA CCCGGTCGCAGCTTGCGCCTGAGTTGTGCTGCCG CTGGATTTACATTTTCATCTTACGGAATGCATTG GGTACGCCAGGCACCCGGGAAAGGCCTTGAATGG GTGGCTGTAATTTTCATACGATGGTTCCAACAAAT ACTATGCTGACTCAGTCAAGGGTTCGATTTACAAT TAGTCGGGACAACCTCAAGAACACCCCTTTATCTT CAAATGAATTTCCCTTAGAGCAGAGGATACGGCGG TCTATTACTGTGGTGGCAGTGGTTATGCACTTCA TGATGATTACTATGGCTTGGATGTCTGGGGGCAA GGGACGCTTGTAACGTATCCTCTGTTGGTGGTG GTAGTGGTGGGGGAGGCTCCGGCGGTGGCGGCTC TCAATCTGCTCTGACTCAACCAGCAAGCGTATCA GGTCACCCGGGACAGAGTATTACCATAGTTGCA CGGGGACCTCTAGCGATGTAGGGGGGTATAATTA TGTATCTTGGTATCAACAACACCCCGGGAAAGCC CCTAAATTGATGATCTACGACGTGAGCAATCGAC CTAGTGGCGTATCAAATCGCTTCTCTGGTAGCAA GAGTGGGAATACGGCGTCCCTTACTATTAGCGGA TTGCAAGCAGAAGATGAGGCCGATTACTACTGCA GCTCCTATACTAGCTCTTCTACATTGTACGCTCTT TGGGAGCGGAACAAAAGTAACAGTACTCACAACA ACACCTGCCCGGAGACCGCTACACCAGCCCGGA CTATTGCCAGCCAGCTCTGAGCCTCAGGCCTGA GGCTGTAGGCCCGCAGCGGGCGGCGCAGTTTAT ACACGGGGCTTGGATTTTCGCTTGTGATATTTATA TTTGGGCTCCTTTGGCGGGACATGTGGCGTCT GCTTCTGTCACTTGTATTACACTGTACTGTAAA CGCGGGCGAAAAAATTGCTGTATATTTTAAAGC AGCCATTTATGAGGCCCGTTCAGACGACGCAGGA GGAGGACGGTTGCTCTTGCAGGTTCCAGAAGAG GAAGAAGGGGGCTGTGAATTGCGGGTTAAATTTT CAAGATCCGCAGACGCTCCAGCATACCAACAGGG AAAAAACCAACTCTATAACGAGCTGAATCTTGGA AGAAGGGAGGAATATGATGTGCTGGATAAACGGC GCGGTAGAGATCCGGAGATGGGCGGAAAACCAAG GCGAAAAACCCCTCAGGAGGGACTCTACAACGAA CTGCAGAAAGACAAAATGGCGGAGGCTTATTCCG AAATAGGCATGAAGGGCGAGCGGAGGCGAGGGAA AGGGCACGACGGACTGTATCAAGGCCTCTCAACC GCGACTAAGGATACGTACGACGCCCTGCACATGC AGGCCCTGCCTCCGAGATGATAA (配列番号 416)</p>
--	--	--

10

20

30

40

50

【 0 3 5 9 】

【表 4 5】

<p>PI61 成熟 CAR タンパク質</p>	<p>QVQLQESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMHWVRQAP GKGLEWVAVISYDGSNKYYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCGGSGYA LHDDYYGLDVWGQGLVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSQSALT QPASVSGSPGQSITISCTGTSSD VGGYNYVSWYQQHPGKAPKL MIYDVSNRPSGVSNRFSKSG NTASLTISGLQAEDEADYYCSS YTSSSTLYVFGSGTKVTVLTTT PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA CRPAAGGAVHTRGLDFACDIY IWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYC KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT TQEEDGCSCRFPEEEEGGCELR VKFSRSADAPAYQQGQNQLY NELNLGRREEYDVLDRRGRD PEMGGKPRRKNPQGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGHDGLYQGLSTATKDTYDA LHMQUALPPR (配列番号 107)</p>	<p>caggacaattgcaggagtctggaggcgggtggtgcaaccggc gcagctgcgccctgagttgtgctgctgctgattfacatttcatctacg gaaatgcatgggtacgccaggcaccgggaaaggccttgaaatgggt ggctgtaatttcatacagatgggtccaacaatactatgctgactcagica agggtcgattfacaattagtcgggacaactccaagaacaccctttatctt caaatgaattcccttagagcagaggatacggcggtctattactgtggtg gcagtggtatgcactcatgatgattactatgctgctgctgctggggg caaggacgctgttaactgtatcctctggtggtggtggtggtggtggtg ggaggctcggcggtggtgctcctcaatctgctgctgactcaaccagc aagcgtatcagggtcacgggacagagatattaccataagttgcacgg ggacctctagcagatgtaggggggtataattatgctctggtatcaaca acccccgggaaagcccctaaattgatgactacgacgtgagcaatc gacctagtggtgctatcaaatcgtctctggtagcaagagtggaata cggcgtcccttactattagcggattgcaagcagaagatgagccgatt actactgcagctctatactagctctctacattgtactgtcttgggagcg gaacaaaagtaacagtactcacaacaacacctgccccgagaccgct acaccagccccgactattgccagccagcctctgagccctcagccctga ggcctgtagcccgacggggcgcgcgagttcatacaggggctg gatttcgctgtgatattatattgggtcctcttggcggggacatgtggc gtgctgctctgtcactgttattacactgactgtaaacggcgggcga aaaattgctgtatattttaagcagccatttatgagcccggttcagacga cgcaggaggaggacggtgctctgtaggttccagaagaggaaga agggggctgtgaattgcgggttaatttcaagatccgcagacgctcc agcataccaacagggacaaaaccaactctatacagagctgaatcttg gaagaaggagggaatfatggtgctgataaacggcgctgtagaga tccggagatggcggaacaaaggcgaacaaacccctcaggagg actctacaacgaactgcagaagacaaaatggcggaggcttattccg aaataggcatgaaggcgagcggaggcgaagggaaggcagcagc ggactgtatcaaggcctctcaaccgcgactaaggatagctacgacgc cctgcacatgcaggccctgctcctcgaga (配列番号 259)</p>
------------------------------	--	--

10

20

30

40

50

【 0 3 6 0 】

【表 4 6】

表 11A: PI161 に基づく別の例示的な抗 BCMA バインダー配列

配列番号	領域	配列
400	VH	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGCGGCGGCGTGGTGCAGCCAGGCC GGTCCCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTTCCTCTT ATGGCATGCACTGGGTGAGACAGGCACCTGGCAAGGGACTGGAGTG GGTGGCCGTGATCTCCTACGACGGCTCTAACAAGTATTACGCCGATA GCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCCGCGACAACCTCCAAGAATACA CTGTATCTGCAGATGAATAGCCTGCGGGCCGAGGATACCGCCGTGTA TACTGCGGAGGCTCCGGCTACGCACTGCACGACGATTATTACGGAC TGGACGTGTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGACAGTGAGCTCC
401	VH	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCGGAGGAGTGGTGCAGCCAGGCC GGTCCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTCACATTTTCTAGCT ACGGAATGCACTGGGTGCGCCAGGCACCTGGCAAGGGACTGGAGTG GGTGGCCGTGATCTCCTATGACGGCTCTAACAAGTACTATGCCGATTC CGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCCGCGACAACCTCCAAGAATACAC TGTACCTGCAGATGAATTCCCTGCGGGCCGAGGATACCGCCGTGTAC TATTGTGGCGGCTCTGGCTATGCCCTGCACGACGATTACTATGGACTG GACGTGTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCCTCT
402	VH	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCGGAGGAGTGGTGCAGCCAGGCC GGAGCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCTCTGGCTTCACCTTTAGCTCCT ATGGCATGCACTGGGTGAGACAGGCACCTGGCAAGGGACTGGAGTG GGTGGCCGTGATCAGCTACGACGGCTCCAACAAGTATTACGCCGATA GCGTGAAGGGCAGGTTACCATCTCTCGCGACAACAGCAAGAATACA CTGTATCTGCAGATGAATTCCCTGCGGGCCGAGGATACAGCCGTGTA TACTGCGGAGGCAGCGGCTACGCACTGCACGACGATTATTACGGAC TGGACGTGTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCCTAGC
403	VH	CAGGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCGGCGGCGTGGTGCAGCCCGGCC GGTCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCTCCGGCTTCACCTTTAGCTCCT ACGGAATGCACTGGGTGCGCCAGGCACCTGGCAAGGGACTGGAGTG GGTGGCCGTGATCTTTATGACGGCAGCAACAAGTACTATGCCGATA GCGTGAAGGGCAGGTTACCATCTCCCGCGACAACCTAAGAATACA CTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGCGGGCCGAGGATACCGCCGTGTA CTATTGCGGAGGCTCCGGCTATGCACTGCACGACGATTACTATGGAC TGGACGTGTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCCTAGC
404	VH	CAGGTCCAGCTGCAGGAGAGTGGGGGGGGTCCGTCCAGCCCGGAA GAAGCCTGAGACTGTCATGTGCCGCATCTGGGTTTACTTTTAGCTCCT ATGGAATGCACTGGGTGCGCCAGGCACCTGGCAAGTGCCTGGAGTGG GTGGCCGTGATCTCCTACGACGGCTCTAACAAGTACTATGCCGATAG CGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCAGAGACAACCTCCAAGAATACAC TGTATCTGCAGATGAATTCTCTGCGGGCCGAGGATACCGCCGTGACT ATTGTGGAGGCTCCGGCTACGCACTGCACGACGATTACTATGGACTG GACGTGTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCCTAGC

10

20

30

【 0 3 6 1 】

40

50

【表 4 7】

405	VH	CAGGTCCAGCTGCAGGAATCCGGCGGAGGAGTGGTGCAGCCAGGCC GGTCTCTGAGACTGAGCTGCGCCGCCTCCGGCTTACATTTTCCTCTT ATGGCATGCACTGGGTGAGACAGGCCCTGGCAAGTGTCTGGAGTGG GTGGCCGTGATCTCTTACGACGGCAGCAACAAGTATTACGCCGATAG CGTGAAGGGCAGGTTACCATCTCCCGCGACAACCTCTAAGAATACAC TGTATCTGCAGATGAATTCCTGCGGGCCGAGGATACCGCGTGTATT ACTGCGGGCTCTGGCTACGCCCTGCACGACGACTACTATGGACTG GATGTCTGGGGGCAGGGCACACTGGTCACTGTCTCTTCA
406	VH	CAGGTCCAGCTGCAGGAATCAGGGGGGGGGTTCGTCCAGCCCCGAA GAAGTCTGAGACTGTCATGTGCCGCATCAGGGTTTACCTTTAGCTCCT ATGGAATGCACTGGGTGCGCCAGGCACCTGGCAAGTGCCTGGAGTGG GTGGCCGTGATCTCCTACGACGGCTCTAACAAGTACTATGCCGATAG CGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCAGAGACAACCTCAAGAATACAC TGTATCTGCAGATGAATTCCTGCGGGCCGAGGATACCGCGTGTACT ATTGTGGAGGCTCCGGCTACGCACTGCACGACGATTACTATGGACTG GACGTGTGGGGACAGGGCACCTGGTGACAGTGTCTAGC
407	VH	CAGGTCCAGCTGCAGGAATCCGGCGGAGGAGTGGTGCAGCCAGGCC GGTCTCTGAGACTGAGCTGCGCCGCCTCCGGCTTACCTTTTCCTCTT ATGGCATGCACTGGGTGAGACAGGCCCTGGCAAGTGTCTGGAGTGG GTGGCCGTGATCTCTTACGACGGCAGCAACAAGTATTACGCCGATAG CGTGAAGGGCAGGTTACCATCTCCCGCGACAACCTCAAGAATACAC TGTATCTGCAGATGAATTCCTGCGGGCCGAGGATACAGCCGTGTAT TACTGTGGCGGCTCTGGCTACGCCCTGCATGATGATTATTATGGACTG GATGTCTGGGGGCAGGGCACACTGGTCACTGTCTCTTCC
408	VL	CAGTCTGCCCTGACCCAGCCAGCAAGCGTGTCCGGCTCTCCTGGCCA GAGCATCAAACTCTCCTGCACCGGCACAAGCTCCGACGTGGGAGGCT ATAACTACGTGAGCTGGTATCAGCAGCACCCAGGCAAGGCCCCCAAG CTGATGATCTACGACGTGAGCAACAGGCCTTCTGGCGTGAGCAATCG CTCAGCGGCTCCAAGTCTGGCAATACCGCCTCTCTGACAATCAGCG GCCTGCAGGCAGAGGACGAGGCAGATTATTAAGTCTAGCTATAACC TCCTTAGCACACTGTACGTGTTTGGCAGCGGCACCAAGGTGACAGT GCTG
409	VL	CAGAGCGCCCTGACCCAGCCAGCATCCGTGTCTGGCAGCCCAGGCCA GTCTATCACAATCAGCTGCACCGGCACAAGCTCCGACGTGGGAGGCT ACAACATATGTGAGCTGGTACCAGCAGCACCCAGGCAAGGCCCCCAAG CTGATGATCTATGACGTGAGCAACCGGCCATCCGGCGTGTCTAATAG ATTCTCCGGCTTAAGAGCGGCAATACCGCCTCCCTGACAATCTCTGG CCTGCAGGCAGAGGACGAGGCAGATTACTATTGTTCTAGCTACACCT CCTCTAGCACACTGTACGTGTTTGGCAGCGGCACCAAGGTGACAGTG CTG
410	VL	CAGTCTGCCCTGACCCAGCCAGCAAGCGTGTCCGGCTCTCCTGGCCA GTCCATCACAATCTCTTGTACCGGCACATCCTCTGACGTGGGCGGCTA TAACTACGTGTCTGGTATCAGCAGCACCCAGGCAAGGCCCCCAAGC TGATGATCTACGATGTGAGCAACAGGCCTTCTGGCGTGAGCAATCGC TTCAGCGGCTCCAAGTCTGGCAATACCGCCAGCCTGACAATCTCCGG CCTGCAGGCAGAGGACGAGGCAGATTACTGACAGTCTCTATACCT CTAGCTCCACACTGTACGTGTTTGGCAGCGGCACCAAGGTGACAGTG CTG

10

20

30

【 0 3 6 2 】

40

50

【表 4 8】

411	VL	CAGAGCGCCCTGACCCAGCCAGCATCCGTGTCTGGCAGCCAGGCCA GTCCATCACAATCTCTTGCACCGGCACATCTAGCGACGTGGGCGGCT ACAACTACGTGAGCTGGTACCAGCAGCACCTGGCAAGGCCCAAG CTGATGATCTATGATGTGAGCAACCGGCCCTCCGGCGTGTCTAATAG ATTCTCCGGCTCTAAGAGCGCAATACCGCCAGCCTGACAATCTCCG GCCTGCAGGCAGAGGACGAGGCAGATTACTATTGCTCCTCTTACACC AGCTCCTTACACTGTACGTGTTCCGGCTCCGGCACCAAGGTGACAGT GCTG
412	VL	CAGTCTGCCCTGACCCAGCCTGCAAGCGTGTCCGGCTCTCCAGGCCA GTCTATCACAATCAGCTGTACCGGCACAAGCTCCGACGTGGGCGGCT ATAACTACGTGAGCTGGTATCAGCAGCACCTGGCAAGGCCCAAG CTGATGATCTACGACGTGAGCAACCGGCCCTCTGGCGTGAGCAATCG GTTTCAGCGGCAGCAAGTCTGGCAATACCGCCTCCCTGACAATCTCTG GCCTGCAGGCAGAGGACGAGGCAGATTACTGTAGCAGTTATACT TCAAGCTCAACCCTGTACGTGTTTGGATGCGGCACTAAGGTACCCGT CCTG
413	VL	CAGTCTGCTCTGACCCAGCCGCTTCCGTCTCAGGGTCTCCAGGACAG TCAATTACCATTAGTTGCACAGGCACCTCATCCGATGTGGGCGGCTAT AACTACGTGTCTGGTATCAGCAGCACCCAGGCAAGGCCCAAGCT GATGATCTACGACGTGAGCAACAGGCCATCTGGCGTGAGCAATCGCT TCAGCGGCTCCAAGTCTGGCAATACCGCCAGCCTGACAATCTCCGGC CTGCAGGCAGAGGACGAGGCAGATTACTATTGCAGCTCCTATACCTC TAGCTCCACACTGTACGTGTTTGGCTGTGGCACCAAGGTGACAGTGT G
414	VL	CAGTCTGCCCTGACCCAGCCTGCAAGCGTGTCCGGCTCTCCAGGCCA GTCTATCACAATCAGCTGTACCGGCACAAGCTCCGACGTGGGCGGCT ATAACTACGTGAGCTGGTATCAGCAGCACCTGGCAAGGCCCAAG CTGATGATCTACGACGTGAGCAACCGGCCCTCTGGCGTGAGCAATCG GTTTCAGCGGCAGCAAGTCTGGCAATACCGCCTCCCTGACAATCTCTG GCCTGCAGGCAGAGGACGAGGCAGATTACTGTAGCTCCTACACT TCTTCAAGCACACTGTATGTCTTTGGATGCGGAACTAAGGTCACTGTC CTG
415	VL	CAGTCTGCTCTGACCCAGCCGCTTCCGTCTCAGGATCTCCAGGACAG TCTATTACAATTAGTTGCACAGGAACCTCTTCCGATGTGGGCGGCTAT AACTACGTGTCTGGTATCAGCAGCACCCAGGCAAGGCCCAAGCT GATGATCTACGACGTGAGCAACAGGCCCTTCTGGCGTGAGCAATCGCT TCAGCGGCTCCAAGTCTGGCAATACCGCCAGCCTGACAATCTCCGGC CTGCAGGCAGAGGACGAGGCAGATTACTATTGCAGCTCCTATACCTC TAGCTCCACACTGTACGTGTTTGGCTGTGGCACCAAGGTGACAGTGT G
配列番号93	抗BCMA VH (PI61)	QVQLQESGGGVVQPRSLRSLCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEW VAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CGSGYALHDDYYGLDVWGQGLVTVSS
配列番号 102	抗BCMA VL (PI61)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLM YDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLY VFGSGTKVTVL
配列番号 333	抗BCMA VH (PI61) 変異体	QVQLQESGGGVVQPRSLRSLCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKCLEW VAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CGSGYALHDDYYGLDVWGQGLVTVSS
配列番号 334	抗BCMA VL (PI61) 変異体	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLM YDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLY VFGCGTKVTVL

10

20

30

40

【 0 3 6 3 】

50

【表 4 9】

表 12: 例示的なハイブリドーマ由来抗 BCMA 分子のアミノ酸及び核酸配列

配列番号	名称/説明	配列
Hy03		
配列番号 137	HCDR1 (Kabat)	GFWMMS
配列番号 138	HCDR2 (Kabat)	NIKQDGSEKYYVDSVRG
配列番号 139	HCDR3 (Kabat)	ALDYYGMDV
配列番号 140	HCDR1 (Chothia)	GFTFSGF
配列番号 141	HCDR2 (Chothia)	KQDGSE
配列番号 139	HCDR3 (Chothia)	ALDYYGMDV
配列番号 142	HCDR1 (IMGT)	GFTFSGFW
配列番号 143	HCDR2 (IMGT)	IKQDGSEK
配列番号 144	HCDR3 (IMGT)	ARALDYYGMDV
配列番号 145	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGFWMSWVRQAPGKGLEWV ANIKQDGSEKYYVDSVRGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RALDYYGMDVWGQGTITVTVSS
配列番号 146	DNA VH	GAAGTGCAACTGGTGGAGAGCGGTGGAGGGCTTGTCCAGCCCGGAGG ATCGCTGCGGCTGTCTGTGCTGCGTCCGGGTTACCTTCTCCGGCTTC TGGATGTCCTGGGTGAGACAGGCACCGGAAAGGGCCTCGAATGGGT GGCCAACATCAAGCAGGATGGCTCCGAGAAGTACTACGTCGACTCCGT GAGAGGCCGCTTACCATCTCCCGGACAACGCCAAGAACTCGCTGTA CCTCCAAATGAATAGCCTCAGGGCGGAAGATACTGCTGTGTATTACTG CGCACGCGCCCTTGACTACTACGGCATGGACGTCTGGGGCCAAGGGAC CACTGTGACCGTGTCTAGC
配列番号 147	LCDR1 (Kabat)	RSSQSLLDSDDGNTYLD

10

20

30

【 0 3 6 4 】

40

50

【表 5 0】

配列番号 148	LCDR2 (Kabat)	TLSYRAS	
配列番号 149	LCDR3 (Kabat)	TQRLEFPSIT	
配列番号 150	LCDR1 (Chothia)	SQSLDSDDGNTY	
配列番号 151	LCDR2 (Chothia)	TLS	
配列番号 152	LCDR3 (Chothia)	RLEFPSI	
配列番号 153	LCDR1 (IMGT)	QSLDSDDGNTY	10
配列番号: 151	LCDR2 (IMGT)	TLS	
配列番号 149	LCDR3 (IMGT)	TQRLEFPSIT	
配列番号 154	VL	DIVMTQTPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLDSDDGNTYLDWYLQKPGQSPRLLIYTLRYASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGLYYCTQRLEFPSITFGQGT	
配列番号 155	DNA VL	GATATCGTGTGATGACCCAGACTCCCCTGTCCCTGCCTGTGACTCCCGGA GAACCAGCCTCCATTTCCCTGCCGGTCCCTCCAGTCCCTGCTGGACAGC GACGACGGCAACACTTACCTGGACTGGTACTTGCAGAAGCCGGGCCA ATCGCCTCGCCTGCTGATCTATAACCCTGTCATACCGGGCCTCAGGAGT GCCTGACCGCTTCTCGGGATCAGGGAGCGGGACCGATTTCACCCTGAA AATTTCCCGAGTGGAAGCCGAGGACGTCGGACTGTACTACTGCACCCA GCGCCTCGAATTCCTCGTACGATTGACGTTTGGACAGGGTACCCGGCTTGA GATCAAG	20
配列番号 63	リンカー	GGGSGGGGSGGGGSGGGGS	
配列番号 156	scFv (VH- リンカー-VL)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGFWMSWVRQAPGKGLEWV ANIKQDGSEKYYVDSVRGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RALDYGMVDVWGQGTITVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQ TPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLDSDDGNTYLDWYLQKPGQSPRLLIYTL YRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGLYYCTQRLEFPSITFGQGT RLEIK	
配列番号 157	DNA scFv	GAAGTGCAACTGGTGGAGAGCGGTGGAGGGCTTGTCCAGCCCGGAGG ATCGCTGCGGCTGTCCCTGTGCTGCGTCCGGGTTACCTTCTCCGGCTTC TGGATGTCCTGGGTGAGACAGGACCCGGGAAAGGGCCTCGAATGGGT GGCCAACATCAAGCAGGATGGCTCCGAGAAGTACTACGTCGACTCCGT GAGAGGCCGCTTACCATCTCCCGGACAACGCCAAGAAGTCTGCTGTA CCTCCAAATGAATAGCCTCAGGGCGGAAGATACTGCTGTGTATTACTG CGACGCGCCCTTACTACTACGGCATGGACGCTTGGGGCCAAGGGAC CACTGTGACCGTGTCTAGCGGAGGCGGAGGTTACGGGGGCGGTGGAT CAGGCGGAGGAGGATCGGGGGGTGGTGGATCGGATATCGTGATGACC CAGACTCCCCTGTCCCTGCCTGTGACTCCCGGAGAACCAGCCTCCATTT CCTGCCGGTCCCTCCAGTCCCTGTGACAGCGACGACGGCAACACTT ACCTGGACTGGTACTTGCAGAAGCCGGGCCAATCGCCTCGCCTGCTGA TCTATAACCCTGTCATACCGGGCCTCAGGAGTGCCTGACCGCTTCTCGG GATCAGGGAGCGGGACCGATTTCACCCTGAAAATTTCCCGAGTGGAA GCCGAGGACGTCGGACTGTACTACTGCACCCAGCGCCTCGAATTCCTCG TCGATTACGTTTGGACAGGGTACCCGGCTTGGATCAAG	30

【 0 3 6 5】

10

20

30

40

50

【表 5 1】

配列番号 158	完全 CAR アミノ酸配列	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGFWMWVWRQAPGKGLEWV ANIKQDGSEKYYVDSVVRGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RALDYYGMDVWVGQGTITVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQ TPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLDSDDGNTYLDWYLYLQKPGQSPRLIYTL YRASGVPDFRFGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGLYYCTQRLEFPSITFGQGT RLEIKTTTPAPRPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS CRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVL KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
配列番号 159	完全 CAR DNA 配列	GAAGTGCAACTGGTGGAGAGCGGTGGAGGGCTTGTCCAGCCCAGGAGG ATCGCTGCGGCTGTCTGTGCTGCGTCCGGGTTACCTTCTCCGGCTTC TGGATGTCTTGGGTGACAGCGCACCGGAAAGGGCCTCGAATGGGT GGCCAAACATCAAGCAGGATGGCTCCGAGAAGTACTACGTCGACTCCGT GAGAGGCCGCTTACCATCTCCCGGACAACGCCAAGAACTCGCTGTA CCTCCAAATGAATAGCCTCAGGGCGGAAGATACTGCTGTGTATTACTG CGCACGCGCCTTGACTACTACGGCATGGACGTCTGGGGCCAAGGGAC CACTGTGACCGTGTCTAGCGGAGGCGGAGGTTTCAAGGGGCGGTGGAT CAGGCGGAGGAGGATCGGGGGGTGGTGGATCGGATATCGTGATGACC CAGACTCCCCTGTCCCTGCCTGTGACTCCCGGAGAACCAGCCTCCATTT CCTGCCGGTCTCCAGTCCCTGCTGGACAGCGACGACGGCAACACTT ACCTGGACTGGTACTTGCAGAAGCCGGGCCAATCGCCTCGCCTGCTGA TCTATACCCTGTCATACCGGGCCTCAGGAGTGCCTGACCGCTTCTCGG GATCAGGGAGCGGGACCGATTTACCCTGAAAATTTCCCGAGTGGAA GCCGAGGACGTGCGACTGTACTACTGCACCCAGCGCTCGAATTCCTCG TCGATTACGTTTGGACAGGGTACCCGGCTTGAGATCAAGACCACTACC CCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCTCCAGCCT CTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGCAGCTGGTGGGCGGTG CATACCCGGGTCTTGACTTCGCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTC TGGCTGGTACTTGCGGGTCTGCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTA CTGTAAGCGCGGTGCGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCTT CATGAGGCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCG GTTCCCAGAGGAGGAGGAAGGCGCTGCGAACTGCGCGTGAAATTCAG GCCGACGCGCAGATGCTCCAGCCTACCAGCAGGGGCAGAACCACTC TACAACGAACTCAATCTTGGTTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGA CAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGA AGAATCCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGAT GGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAG GCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGACTCAGCACCGCCACCAAG GACACCTATGACGCTCTTACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG
Hy52		
配列番号 160	HCDR1 (Kabat)	SFRMN
配列番号 161	HCDR2 (Kabat)	SISSSSYIYYADSVKG
配列番号 162	HCDR3 (Kabat)	WLSYYGMDV
配列番号 163	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSF
配列番号 164	HCDR2 (Chothia)	SSSSSY

10

20

30

40

【 0 3 6 6 】

50

【表 5 2】

配列番号 162	HCDR3 (Chothia)	WLSYYGMDV	
配列番号 165	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSFR	
配列番号 166	HCDR2 (IMGT)	ISSSSSYI	
配列番号 167	HCDR3 (IMGT)	ARWLSYYGMDV	
配列番号 168	VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSFRMNWVRQAPGKGLEWVS SISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARW LSYYGMDVWGQGTITVTVSS	10
配列番号 169	DNA VH	GAAGTGCAACTGGTGGAGAGCGGTGGAGGGCCTTGCAAGCCCGGAGG ATCGCTGCGGCTGTCTGTGCTGCGTCCGGGTTACCTTCTCCTCGTTC CGCATGAACTGGGTGACACAGGCACCGGAAAGGGCCTCGAATGGGT GTCCTCAATCTCATCGTCTCGTCTACATCTACTACGCCGACTCCGTG AAAGGCCGCTTACCATCTCCCGGACAACGCCAAGAAGACTCGTGTAC CTCCAAATGAATAGCCTCAGGGCGGAAGATACTGCTGTGTATTACTGC GCACGCTGGCTTTCCTACTACGGCATGGACGCTGCGGGCCAAGGGACC ACTGTGACCGTGTCTAGC	
配列番号 147	LCDR1 (Kabat)	RSSQSLLDSDDGNTYLD	
配列番号 170	LCDR2 (Kabat)	TLSFRAS	
配列番号 171	LCDR3 (Kabat)	MQRIGFPIT	20
配列番号 150	LCDR1 (Chothia)	SQSLLDSDDGNTY	
配列番号 151	LCDR2 (Chothia)	TLS	
配列番号 172	LCDR3 (Chothia)	RIGFPI	
配列番号 153	LCDR1 (IMGT)	QSLLDSDDGNTY	
配列番号 151	LCDR2 (IMGT)	TLS	
配列番号 171	LCDR3 (IMGT)	MQRIGFPIT	30
配列番号 173	VL	DIVMTQTPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLDSDDGNTYLDWYLQKPGQSPQ LLIYTLSFRASGVPDRFSGSGSDFTLTKIRRVEAEDVGVYYCMQRIGFPIT FGQGRLEIK	
配列番号 174	DNA VL	GATATCGTGATGACCCAGACTCCCCTGTCCCTGCCTGTGACTCCCGGA GAACCAGCCTCCATTTCTGCCGTCCTCCAGTCCCTGCTGGACAGC GACGACGGCAACACTTACCTGGACTGGTACTTGCAGAAGCCGGGCA ATCGCCTCAGCTGCTGATCTATAACCCTGTCATTCCGGCCCTCAGGAGT GCCTGACCGCTTCTCGGGATCAGGGAGCGGGACCGATTTACCCTGAA AATTAGGCGAGTGGAAGCCGAGGACGTCGGAGTGTACTACTGCATGC AGCGCATCGGCTTCCGATTACGTTTGGACAGGGTACCCGGCTTGAGA TCAAG	
配列番号 63	リンカー	GGGGSGGGSGGGSGGGGS	40

【 0 3 6 7 】

【表 5 3】

配列番号 175	scFv (VH- リンカー-VL)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSFRMNWVRQAPGKGLEWVS SISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARW LSYYGMDVWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQTPL SLPVTPEPASISCRSSQSLLDSDDGNTYLDWYLQKPGQSPQLLIYTLFRA SGVPDRFSGSGSGTDFTLKIRRVEAEDVGVVYCMQRIGFPITFGQGRLEI K	
配列番号 176	DNA scFv	GAAGTGCAACTGGTGGAGAGCGGTGGAGGGCTTGTCAGCCCGGAGG ATCGCTGCGGCTGTCTGTGCTGCGTCCGGGTTACCTTCTCCTCGTTC CGCATGAACTGGGTCAGACAGGCACCGGAAAGGGCCTCGAATGGGT GTCCTCAATCTCATCGTCCTCGTCCTACATCTACTACGCCACTCCGTG AAAGGCCGCTTACCATCTCCCGGACAACGCCAAGAAGCTCGCTGTAC CTCCAAATGAATAGCCTCAGGGCGGAAGATACTGCTGTGTATTACTGC GCACGCTGGCTTTCCTACTACGGCATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACC ACTGTGACCGTGTCTAGCGGAGGCGGAGGTTACAGGGGCGGTGGATC AGGCGGAGGAGGATCGGGGGTGGTGGATCGGATATCGTGATGACCC AGACTCCCCTGTCCCTGCCTGTGACTCCCGGAGAACCAGCCTCCATTC CTGCCGGTCCCTCCAGTCCCTGCTGGACAGCGACGACGGCAACACTTA CCTGGACTGGTACTTGAGAAGCCGGGCAATCGCCTCAGCTGCTGAT CTATACCCTGTCAATCCGGGCTCAGGAGTGCCTGACCGCTTCTCGGG ATCAGGGAGCGGGACCGATTTACCCTGAAAATTAGGCGAGTGGAAG CCGAGGACGTCGGAGTGTACTACTGCATGCAGCGCATCGGCTCCCGA TTACGTTTGGACAGGGTACCCGGCTTGAGATCAAG	10
配列番号 177	完全 CAR アミノ酸配列	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSFRMNWVRQAPGKGLEWVS SISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARW LSYYGMDVWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQTPL SLPVTPEPASISCRSSQSLLDSDDGNTYLDWYLQKPGQSPQLLIYTLFRA SGVPDRFSGSGSGTDFTLKIRRVEAEDVGVVYCMQRIGFPITFGQGRLEI KTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWP LAGTCGVLLLSLITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHG LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	20

【 0 3 6 8 】

10

20

30

40

50

【表 5 4】

配列番号 178	完全 CAR DNA 配列	GAAGTGCAACTGGTGGAGAGCGGTGGAGGGCTTGTCAAGCCCCGGAGG ATCGCTGCGGCTGTCTGTGCTGCGTCCGGGTTACCTTCTCCTCGTTC CGCATGAACTGGGTCAGACAGGCACCGGAAAGGGCCTCGAATGGGT GTCCTCAATCTCATCGTCCTCGTCCTACATCTACTACGCCGACTCCGTG AAAGGCCGCTTACCATCTCCCAGGACAACGCCAAGAAGCTCGCTGTAC CTCCAAATGAATAGCCTCAGGGCGGAAGATACTGCTGTGTATTACTGC GCACGCTGGCTTTCCTACTACGGCATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACC ACTGTGACCGTGTCTAGCGGAGGCGGAGGTTAGAGGGGCGGTGGATC AGGCGGAGGAGGATCGGGGGGTGGTGGATCGGATATCGTGATGACCC AGACTCCCCTGTCCCTGCCTGTGACTCCCGGAGAACCAGCCTCCATTT CTGCCGGTCCCTCCAGTCCCTGCTGGACAGCGACGACGGCAACACTTA CCTGGACTGGTACTTGCAGAAGCCGGGCAATCGCCTCAGCTGCTGAT CTATACCCTGTCAATCCGGGCTCAGGAGTGCCTGACCGCTTCTCGGG ATCAGGGAGCGGGACCGATTTACCCTGAAAATTAGGCGAGTGGAAAG CCGAGGACGTGGAGTGTACTACTGCATGCAGCGCATCGGCTTCCCGA TTACGTTTGGACAGGGTACCCGGCTTGAGATCAAGACCACTACCCAG CACCGAGGCCACCCACCCGGCTCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGT CCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGCAGCTGGTGGGGCCGTGCATA CCCGGGGTCTTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGC TGGTACTTGGCGGGTCTGCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTACTGT AAGCGCGGTCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCTTCATG AGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGGTTC CCAGAGGAGGAGGAAGGCGCTGCGAACTGCGCGTGAAATTCAGCCG CAGCGCAGATGCTCCAGCCTACCAGCAGGGGCAGAACCAGCTCTACA ACGAACTCAATCTTGGTCCGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAG CGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGA ATCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCA GAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAAGAGGCAA AGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACA CCTATGACGCTTTCACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG
-------------	------------------	---

10

20

30

40

50

【 0 3 6 9 】

【表 5 5】

表 13: 例示的なハイブリドーマ由来抗 BCMA 分子の Kabat CDR

Kabat	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
Hy03	GFWMSS (配列番号 137)	NIKQDGSEK YYVDSVRG (配列番号 138)	ALDYYGMD V (配列番号 139)	RSSQSLDSD DDGNTYLD (配列番号 147)	TLSYRAS (配列番号 148)	TQRLEFP SIT (配列番号 149)
Hy52	SFRMNS (配列番号 160)	SISSSSYIYY ADSVKGG (配列番号 161)	WLSYYGMD V (配列番号 162)	RSSQSLDSD DDGNTYLD (配列番号 147)	TLSFRAS (配列番号 170)	MQRIGFP IT (配列番号 171)
コンセンサス	X ₁ FX ₂ MX ₃ (X ₁ は、G 又はSで あり; X ₂ は、W又 はRであ り; X ₃ は、S 又はNで ある) (配列 番号179)	X ₁ IX ₂ X ₃ X ₄ X ₅ S X ₆ X ₇ YYX ₈ DS VX ₉ G (X ₁ は、 N又はSで あり; X ₂ は、K 又はSで あり; X ₃ は、Q又 はSで あり; X ₄ は、D 又はS であり; X ₅ は、G 又はS であり; X ₆ は、E 又はY であり; X ₇ は、 K又はI であり; X ₈ は、V 又はA であり; X ₉ は、R 又はK である) (配 列番号 180)	X ₁ LX ₂ YYGM DV (X ₁ は、A 又はW であり; X ₂ は、D 又はS である) (配 列番号 181)	RSSQSLDSD DDGNTYLD (配列番号 47)	TLSXRAS (Xは、 YはFで ある) (配 列番号 182)	X ₁ QRX ₂ X ₃ FPX ₄ IT (X ₁ は、T 又はM であり; X ₂ は、L 又はI であり; X ₃ は、E 又はG であり; X ₄ は、S 又は 存在し ない) (配 列番号 183)

10

20

【0370】

30

【表 5 6】

表 14: 例示的なハイブリドーマ由来抗 BCMA 分子の Chothia CDR

Chothia	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
Hy03	GFTFSGF (配列番号 140)	KQDGSE (配列番号 141)	ALDYYGMD V (配列番号 139)	SQSLDSD DGNTY (配列番号 150)	TLS (配列番号 151)	RLEFPSI (配列番号 152)
Hy52	GFTFSSF (配列番号 163)	SSSSSY (配列番号 164)	WLSYYGMD V (配列番号 162)	SQSLDSD DGNTY (配列番号 150)	TLS (配列番号 151)	RIGFPI (配列番号 172)
コンセンサス	GFTFSXF (Xは、G 又はS である) (配 列番号 184)	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ SX ₅ (X ₁ は、K 又はS であり; X ₂ は、 Q又はS であり; X ₃ は、D 又はS であり; X ₄ は、G 又はS であり; X ₅ は、E 又はY である) (配 列番号 185)	X ₁ LX ₂ YYGM DV (X ₁ は、A 又はW であり; X ₂ は、D 又はS である) (配 列番号 181)	SQSLDSD DGNTY (配 列番号 150)	TLS (配 列番号 151)	RX ₁ X ₂ FP X ₃ I (X ₁ は、L 又はI であり; X ₂ は、E 又はG であり; X ₃ は、S 又は 存在し ない) (配 列番号 186)

40

50

【 0 3 7 1 】

【 表 5 7 】

表 15: 例示的なハイブリドーマ由来抗 BCMA 分子の IMGT CDR

IMGT	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
Hy03	GFTFSGF W (配列番号 142)	IKQDGSEK (配列番号 143)	ARALDYYG MDV (配列番号 144)	QSLDSD GNTY (配列番号 153)	TLS (配列番号 151)	TQRLEFPS IT (配列番号 149)
Hy52	GFTFSFR (配列番号 165)	ISSSSYI (配列番号 166)	ARWLSYYG MDV (配列番号 167)	QSLDSD GNTY (配列番号 153)	TLS (配列番号 151)	MQRIGFPI T (配列番号 171)
コンセンサス	GFTFSX ₁ F X ₂ (X ₁ は、G 又は S であり; X ₂ は、W 又は R である) (配列番号 187)	IX ₁ X ₂ X ₃ X ₄ SX ₅ X ₆ (X ₁ は、K 又は S であり; X ₂ は、Q 又は S であり; X ₃ は、D 又は S であり; X ₄ は、G 又は S であり; X ₅ は、E 又は Y であり; X ₆ は、K 又は I である) (配列番号 188)	ARX ₁ LX ₂ YY GMDV (X ₁ は、A 又は W であり; X ₂ は、D 又は S である) (配列番号 189)	QSLDSD GNTY (配列番号 153)	TLS (配列番号 151)	X ₁ QRX ₂ X ₃ FPX ₄ IT, (X ₁ は、T 又は M であり; X ₂ は、L 又は I であり; X ₃ は、E 又は G であり; X ₄ は、S 又は存在しない) (配列番号 183)

10

20

【 0 3 7 2 】

30

40

50

【表 5 8】

表 20. 例示的な抗 BCMA 分子のアミノ酸及び核酸配列

配列番号	名称/説明	配列
duBCMA.4		
配列番号 231	HCDR1 (Kabat)	NHGMS
配列番号 232	HCDR2 (Kabat)	GIVYSGSTYYAASVKG
配列番号 233	HCDR3 (Kabat)	HGGESDV
配列番号 234	HCDR1 (Chothia)	GFALSNH
配列番号 235	HCDR2 (Chothia)	VYSGS
配列番号 233	HCDR3 (Chothia)	HGGESDV
配列番号 236	HCDR1 (IMGT)	GFALSNHG
配列番号 237	HCDR2 (IMGT)	IVYSGST
配列番号 238	HCDR3 (IMGT)	SAHGGESDV
配列番号 239	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGKGLEWVS GIVYSGSTYYAASVKGRFTISRDNRSRNTLYLQMNSLRPEDTAIYYCSAHGG ESDVWGQGTTVTVSS
配列番号 262	DNA VH	GAAGTGCAATTGGTGAATCAGGGGGAGGACTTGTGCAGCCTGGAGGA TCGCTGAGACTGTCATGTGCCGTGTCCGGCTTTGCCCTGTCCAACACG GGATGTCCTGGGTCCGCCGCGCCTGGAAAGGGCCTCGAATGGGTGT CGGGTATTGTGTACAGCGGTAGCACCTACTATGCCGCATCCGTGAAGGG GAGATTCACCATCAGCCGGGACAACCTCCAGGAACACTCTGTACCTCAA ATGAATTCGCTGAGGCCAGAGGACACTGCCATCTACTACTGCTCCGCGC ATGGCGGAGAGTCCGACGTCTGGGGACAGGGGACCACCGTGACCGTGT CTAGC

10

20

【0373】

30

40

50

【表 5 9】

配列番号 54	LCDR1 (Kabat)	RASQSISSYLN	
配列番号 55	LCDR2 (Kabat)	AASSLQS	
配列番号 240	LCDR3 (Kabat)	QQSYSTPYT	
配列番号 57	LCDR1 (Chothia)	SQSISSY	
配列番号 58	LCDR2 (Chothia)	AAS	
配列番号 241	LCDR3 (Chothia)	SYSTPY	10
配列番号 60	LCDR1 (IMGT)	QSISSY	
配列番号 58	LCDR2 (IMGT)	AAS	
配列番号 240	LCDR3 (IMGT)	QQSYSTPYT	
配列番号 242	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASS LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKVEI K	
配列番号 263	DNA VL	GACATCCAGCTCACCCAGTCCCCGAGCTCGCTGTCCGCCTCCGTGGGAG ATCGGGTCACCATCACGTGCCGCGCCAGCCAGTCGATTCCTCCTACCT GAACTGGTACCAACAGAACCCCGGAAAAGCCCCGAAGCTTCTCATCTA CGCCGCCTCGAGCCTGCAGTCAGGAGTGCCCTCACGGTTCTCCGGCTCC GGTTCGGTACTGATTTACCCTGACCATTTCTCCCTGCAACCGGAGG ACTTCGCTACTTACTACTGCCAGCAGTCGTAATCCACCCCTACACTTC GGACAAGGCACCAAGGTCGAAATCAAG	20
配列番号 243	リンカー	ASGGGGSGGGSGGGGS	
配列番号 200	scFv (VH- リンカー-VL)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGKGLEWVS GIVYSGSTYYAASVKGRFTISRDNRSRNTLYLQMNSLRPEDTAIYYCSAHGG ESDVWGQGTITVTVSSASGGGGSGGGSGGGSDIQLTQSPSSLSASVGDRT ITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKVEIK	
配列番号 201	DNA scFv	GAAGTGCAATTGGTGAATCAGGGGGAGGACTTGTGCAGCCTGGAGGA TCGCTGAGACTGTCATGTGCCGTGTCCGGCTTTGCCCTGTCCAACCACG GGATGTCTGGGTCCGCCGCGCCTGGAAAGGGCCTCGAATGGGTGT CGGGTATTGTGTACAGCGGTAGCACCTACTATGCCGCATCCGTGAAGGG GAGATTCACCATCAGCCGGGACAACCTCCAGGAACACTCTGTACCTCAA ATGAATTCGCTGAGGCCAGAGGACACTGCCATCTACTACTGCTCCGCGC ATGGCGGAGAGTCCGACGTCCTGGGGACAGGGGACCACCGTGACCGTGT CTAGCGCTCCGGCGGAGGCGGCAGCGGGGTGGTGGTTACGGGGGCG GCGGATCGGACATCCAGCTCACCCAGTCCCCGAGCTCGCTGTCCGCCTC CGTGGGAGATCGGGTCACCATCACGTGCCGCGCCAGCCAGTCGATTTCC TCCTACCTGAAGTGGTACCAACAGAAGCCCGGAAAAGCCCCGAAGCTT CTCATCTACGCCGCTCGAGCCTGCAGTCAGGAGTGCCCTCACGGTTCT CCGGTCCGGTCCGGTACTGATTTACCCTGACCATTTCTCCCTGCAA CCGGAGGACTTCGCTACTTACTACTGCCAGCAGTCGTAATCCACCCCT ACACTTCGGACAAGGCACCAAGGTCGAAATCAAG	30

【 0 3 7 4 】

40

50

【表 6 0】

配列番号 230	完全 CAR アミノ酸配列	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVS GIVYSGSTYYAASVKGRFTISRDN ESDVWGQGTITVTVSSASGGGGSG VTITCRASQSISSYLNWYQKPKAP FTLTISLQPEDFATYYCQSYSTPY QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD CKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQE DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR MQALPPR
-------------	------------------	--

10

【 0 3 7 5】

【表 6 1】

表 26. 例示的な抗 BCMA 分子の CDR

duBCMA. 4	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
Kabat	配列番号 231	配列番号 232	配列番号 233	配列番号 54	配列番号 55	配列番号 240
Chothia	配列番号 234	配列番号 235	配列番号 233	配列番号 57	配列番号 58	配列番号 241
IMGT	配列番号 236	配列番号 237	配列番号 238	配列番号 60	配列番号 58	配列番号 240

20

【 0 3 7 6】

一部の実施形態において、ヒト抗 BCMA 結合ドメインは、HC CDR 1、HC CDR 2、HC CDR 3、LC CDR 1、LC CDR 2 及び LC CDR 3 を含む。

【 0 3 7 7】

特定の実施形態において、本明細書に記載の CAR 分子又は本明細書に記載の抗 BCMA 結合ドメインは、以下を含む：

- (1) 以下から選択される 1 つ、2 つ若しくは 3 つの軽鎖 (LC) CDR :
 - (i) 配列番号 54 の LC CDR 1、配列番号 55 の LC CDR 2 及び配列番号 56 の LC CDR 3 ; 及び / 又は
- (2) 以下の 1 つからの 1 つ、2 つ若しくは 3 つの重鎖 (HC) CDR :
 - (i) 配列番号 44 の HC CDR 1、配列番号 45 の HC CDR 2 及び配列番号 84 の HC CDR 3 ; (ii) 配列番号 44 の HC CDR 1、配列番号 45 の HC CDR 2 及び配列番号 46 の HC CDR 3 ; (iii) 配列番号 44 の HC CDR 1、配列番号 45 の HC CDR 2 及び配列番号 68 の HC CDR 3 ; 又は (iv) 配列番号 44 の HC CDR 1、配列番号 45 の HC CDR 2 及び配列番号 76 の HC CDR 3 。

30

【 0 3 7 8】

特定の実施形態において、本明細書に記載の CAR 分子又は本明細書に記載の抗 BCMA 結合ドメインは、以下を含む：

- (1) 以下の 1 つからの 1 つ、2 つ若しくは 3 つの軽鎖 (LC) CDR :
 - (i) 配列番号 95 の LC CDR 1、配列番号 131 の LC CDR 2 及び配列番号 132 の LC CDR 3 ; (ii) 配列番号 95 の LC CDR 1、配列番号 96 の LC CDR 2 及び配列番号 97 の LC CDR 3 ; (iii) 配列番号 95 の LC CDR 1、配列番号 114 の LC CDR 2 及び配列番号 115 の LC CDR 3 ; 又は (iv) 配列番号 95 の LC CDR 1、配列番号 114 の LC CDR 2 及び配列番号 97 の LC CDR 3 ; 及び / 又は
- (2) 以下の 1 つからの 1 つ、2 つ若しくは 3 つの重鎖 (HC) CDR :
 - (i) 配列番号 86 の HC CDR 1、配列番号 130 の HC CDR 2 及び配列番号 8

40

50

8のHC CDR3；(i i)配列番号86のHC CDR1、配列番号87のHC CDR2及び配列番号88のHC CDR3；又は(i i i)配列番号86のHC CDR1、配列番号109のHC CDR2及び配列番号88のHC CDR3。

【0379】

特定の実施形態において、本明細書に記載のCAR分子又は本明細書に記載の抗BCMA結合ドメインは、以下を含む：

(1)以下の1つからの1つ、2つ若しくは3つの軽鎖(LC)CDR：

(i)配列番号147のLC CDR1、配列番号182のLC CDR2及び配列番号183のLC CDR3；(i i)配列番号147のLC CDR1、配列番号148のLC CDR2及び配列番号149のLC CDR3；又は(i i i)配列番号147のLC CDR1、配列番号170のLC CDR2及び配列番号171のLC CDR3；及び/又は

(2)以下の1つからの1つ、2つ若しくは3つの重鎖(HC)CDR：

(i)配列番号179のHC CDR1、配列番号180のHC CDR2及び配列番号181のHC CDR3；(i i)配列番号137のHC CDR1、配列番号138のHC CDR2及び配列番号139のHC CDR3；又は(i i i)配列番号160のHC CDR1、配列番号161のHC CDR2及び配列番号162のHC CDR3。

【0380】

一部の実施形態において、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、それぞれ、配列番号44、45、84、54、55及び56のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、それぞれ、配列番号44、45、46、54、55及び56のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、それぞれ、配列番号44、45、68、54、55及び56のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、それぞれ、配列番号44、45、76、54、55及び56のアミノ酸配列を含む。

【0381】

一部の実施形態において、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、それぞれ、配列番号47、48、84、57、58及び59のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、それぞれ、配列番号47、48、46、57、58及び59のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、それぞれ、配列番号47、48、68、57、58及び59のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、それぞれ、配列番号47、48、76、57、58及び59のアミノ酸配列を含む。

【0382】

一部の実施形態において、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、それぞれ、配列番号49、50、85、60、58及び56のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、それぞれ、配列番号49、50、51、60、58及び56のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、それぞれ、配列番号49、50、69、60、58及び56のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、HC CDR1

、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、それぞれ、配列番号49、50、77、60、58及び56のアミノ酸配列を含む。

【0383】

一部の実施形態において、ヒト抗BCMA結合ドメインは、VH（例えば、本明細書に記載のVH）及びVL（例えば、本明細書に記載のVL）を含むscFvを含む。一部の実施形態では、VHは、リンカー、例えば本明細書に記載されるリンカー、例えば表1に記載のリンカーを介してVLに結合される。一部の実施形態において、ヒト抗BCMA結合ドメインは、(Gly4-Ser)_nリンカーを含み、ここで、nは、1、2、3、4、5若しくは6、好ましくは3又は4である（配列番号26）。scFvの軽鎖可変領域及び重鎖可変領域は、例えば、以下の配向：軽鎖可変領域-リンカー-重鎖可変領域又は重鎖可変領域-リンカー-軽鎖可変領域のいずれでもあり得る。

10

【0384】

一部の実施形態では、抗BCMA結合ドメインは、断片、例えば単鎖可変フラグメント(scFv)である。一部の実施形態では、抗BCMA結合ドメインは、Fv、Fab、(Fab')₂又は二機能性（例えば、二重特異性）ハイブリッドである（例えば、Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)）。一部の実施形態では、本発明の抗体及びその断片は、野生型又は増大した親和性でBCMAタンパク質と結合する。

【0385】

一部の実施形態では、scFvは、当技術分野で公知の方法に従って調製することができる（例えば、Bird et al., (1988) Science 242: 423-426及びHouston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883を参照）。scFv分子は、柔軟なポリペプチドリンカーを用いてVH及びVL領域を互いに連結することによって生成することができる。scFv分子は、最適化された長さ及び/又はアミノ酸組成物を備えるリンカー（例えば、Ser-Glyリンカー）を含む。リンカー長さは、どのようにscFv分子の可変領域がフォールドし、相互作用するかにより大きく影響し得る。実際、短いポリペプチドリンカー（例えば、5~10アミノ酸）を使用すると、鎖内フォールディングが妨げられる。また、鎖間フォールディングも、2つの可変領域を一緒にして、機能性エピトープ結合部位を形成するために必要である。例えば、リンカー配向及びサイズについて、例えばHollinger et al. 1993 Proc Natl Acad. Sci. U.S.A. 90: 6444-6448、米国特許出願第2005/0100543号、同第2005/0175606号、同第2007/0014794号明細書並びに国際公開第2006/020258号パンフレット及び同第2007/024715号パンフレット（参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

20

30

【0386】

scFvは、そのVL及びVH領域間に少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50若しくはそれを超えるアミノ酸残基のリンカーを含み得る。リンカー配列は、いずれの天然に存在するアミノ酸を含み得る。一部の実施形態では、リンカー配列は、アミノ酸グリシン及びセリンを含む。一部の実施形態では、リンカー配列は、一連のグリシン及びセリン反復、例えば(Gly4Ser)_n（ここで、nは、1以上の正の整数である）（配列番号25）を含む。一部の実施形態では、リンカーは、(Gly4Ser)₄（配列番号27）又は(Gly4Ser)₃（配列番号28）であり得る。リンカー長さの変化は、活性を保持又は増大して、活性試験で優れた有効性をもたらす得る。

40

【0387】

CD20 CAR

一部の実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞は、CD20 CAR発現

50

細胞（例えば、ヒトCD20に結合するCARを発現する細胞）である。一部の実施形態では、CD20 CAR発現細胞は、本明細書に参照により組み込まれる国際公開第2016164731号パンフレット及び同第2018067992号パンフレットに従う抗原結合ドメインを含む。例示的なCD20結合配列又はCD20 CAR配列は、例えば、国際公開第2018067992号パンフレットの表1～5に開示されている。一部の実施形態では、CD20 CARは、国際公開第2018067992号パンフレット又は同第2016164731号パンフレットに開示されるCDR、可変領域、scFv又は完全長配列を含む。

【0388】

CD22 CAR

10

一部の実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞は、CD22 CAR発現細胞（例えば、ヒトCD20に結合するCARを発現する細胞）である。一部の実施形態では、CD22 CAR発現細胞は、本明細書に参照により組み込まれる国際公開第2016164731号パンフレット及び同第2018067992号パンフレットに従う抗原結合ドメインを含む。例示的なCD22結合配列又はCD22 CAR配列は、例えば、国際公開第2016164731号パンフレットの表6A、6B、7A、7B、7C、8A、8B、9A、9B、10A及び10B並びに国際公開第2018067992号パンフレットの表6～10に開示されている。一部の実施形態では、国際公開第2018067992号パンフレット又は同第2016164731号パンフレットに開示されるCD22 CARは、CDR、可変領域、scFv又は完全長配列を含む。

20

【0389】

一部の実施形態において、CAR分子は、CD22に結合する抗原を含む（CD22 CAR）。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、ヒトCD22を標的にする。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、本明細書に記載の単鎖Fv配列を含む。

【0390】

ヒトCD CARの配列を以下に記載する。一部の実施形態では、ヒトCD22 CARは、CAR22-65である。

【0391】

ヒトCD22 CAR scFv配列

【化6】

30

EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDY
 ASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARVRLQDGNWSDAFDVWGQTMVT
 VSSGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGK
 APKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSTLYVFGTGTQLT
 VL (配列番号285)

【0392】

ヒトCD22 CAR重鎖可変領域

40

【化7】

EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDY
 ASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARVRLQDGNWSDAFDVWGQTMVT
 VSS (配列番号286)

【0393】

ヒトCD22 CAR軽鎖可変領域

QSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQ
 HPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGL

50

Q A E D E A D Y Y C S S Y T S S S T L Y V F G T G T Q L T V L (配列番号 2 8 7)
 【 0 3 9 4 】
 【 表 6 2 】

表 16 CD22 CAR の重鎖可変ドメイン CDR (CAR22-65)

候補	HCDR1	配列番号	HCDR2	配列番号	HCDR3	配列番号
CAR22-65 組み合わせ	GDSML SNSDT WN	288	RTYHRSTWYDDYA SSVRG	290	VRLQDGNSWSD AFDV	291
CAR22-65 Kabat	SNSDT WN	289	RTYHRSTWYDDYA SSVRG	290	VRLQDGNSWSD AFDV	291

10

【 0 3 9 5 】
 【 表 6 3 】

表 17 CD22 CAR の軽鎖可変ドメイン CDR (CAR22-65)。この表の LC CDR 配列は、Kabat 又は
 組み合わせた定義に従って同じ配列を有する。

候補	LCDR1	配列番号	LCDR2	配列番号	LCDR3	配列番号
CAR22-65 組み合わせ	TGTSSDVGGYNYVS	95	DVSNRPS	96	SSYTSSSTLYV	97

20

【 0 3 9 6 】

一部の実施形態において、抗原結合ドメインは、表 16 に挙げる任意の重鎖結合ドメインアミノ酸配列の HC CDR 1、HC CDR 2 及び HC CDR 3 を含む。複数の実施形態では、抗原結合ドメインは、LC CDR 1、LC CDR 2 及び LC CDR 3 をさらに含む。一部の実施形態において、抗原結合ドメインは、表 17 に挙げる LC CDR 1、LC CDR 2 及び LC CDR 3 アミノ酸配列を含む。

30

【 0 3 9 7 】

一部の実施形態において、抗原結合ドメインは、表 17 に挙げる任意の重鎖結合ドメインアミノ酸配列の LC CDR 1、LC CDR 2 及び LC CDR 3 の 1 つ、2 つ若しくは全部と、表 16 に挙げる任意の重鎖結合ドメインアミノ酸配列の HC CDR 1、HC CDR 2 及び HC CDR 3 の 1 つ、2 つ若しくは全部を含む。

【 0 3 9 8 】

一部の実施形態において、CDR は、Kabat ナンバーリングスキーム、Chothia ナンバーリングスキーム又はそれらの組み合わせに従って定義される。

【 0 3 9 9 】

VL 及び VH ドメインが scFv 内に出現する順序は変動する可能性があり (すなわち VL - VH 若しくは VH - VL 配向)、また各サブユニットが配列 GGGGS (配列番号 25) (例えば、(G4S)₃ (配列番号 28) 又は (G4S)₄ (配列番号 27) を含む「G4S」サブユニット (配列番号 25) の 1 つ、2 つ、3 つ若しくは 4 つのコピーのいずれかは、可変ドメインを連結して、完全な scFv ドメインを形成することができる。代わりに、CAR 構築物は、例えば、配列 GSTSGSGKPGSGEGSTKG (配列番号 43) を含むリンカーを含み得る。代わりに、CAR 構築物は、例えば、配列 LAEAAAK (配列番号 308) を含むリンカーを含み得る。一部の実施形態では、CAR 構築物は、VL 及び VH ドメイン間にリンカーを含まない。

40

【 0 4 0 0 】

これらのクローン、全て CD3 鎖由来の共刺激ドメインのシグナルドメインに Q / K

50

残基変化を含んだ。

【0401】

E G F R C A R

一部の実施形態では、本明細書に記載されるC A R発現細胞は、E G F R C A R発現細胞（例えば、ヒトE G F Rに結合するC A Rを発現する細胞）である。一部の実施形態では、本明細書に記載のC A R発現細胞は、E G F R v I I I C A R発現細胞（例えば、ヒトE G F R v I I Iに結合するC A Rを発現する細胞）である。例示的なE G F R v I I I C A Rは、本明細書に参照により組み込まれる国際公開第2014/130657号パンフレット、例えば国際公開第2014/130657号パンフレットの表2に開示される配列を含む。

10

【0402】

例示的なE G F R v I I I結合配列又はE G F R C A R配列は、国際公開第2014/130657号パンフレットに開示されるE G F R C A RのC D R、可変領域、s c F v又は完全長C A R配列を含み得る。

【0403】

メソテリンC A R

一部の実施形態では、本明細書に記載されるC A R発現細胞は、メソテリンC A R発現細胞（例えば、ヒトメソテリンに結合するC A Rを発現する細胞）である。例示的なメソテリンC A Rは、本明細書に参照により組み込まれる国際公開第2015090230号パンフレット及び同第2017112741号パンフレット、例えば国際公開第2017112741号パンフレットの表2、3、4及び5に開示される配列を含み得る。

20

【0404】

他の例示的なC A R

他の実施形態では、C A R発現細胞は、C D 1 2 3に特異的に結合することができ、例えば本明細書に参照により組み込まれる国際公開第2014/130635号パンフレットの表1～2のC A R分子（例えば、C A R 1～C A R 8）又は抗原結合ドメインを含み得る。C D 1 2 3 C A R分子及び抗原結合ドメイン（例えば、K a b a t若しくはC h o t h i aに従う1つ、2つ、3つのV H C D R；及び1つ、2つ、3つのV L C D R）をコードするアミノ酸及びヌクレオチド配列は、国際公開第2014/130635号パンフレットに明示されている。他の実施形態では、C A R発現細胞は、C D 1 2 3に特異的に結合することができ、例えば本明細書に参照により組み込まれる国際公開第2016/028896号パンフレットの表2、6及び9に従うC A R分子（例えば、C A R 1 2 3 - 1～C A R 1 2 3 - 4及びh z C A R 1 2 3 - 1～h z C A R 1 2 3 - 32のいずれか）又は抗原結合ドメインを含み得る。C D 1 2 3 C A R分子及び抗原結合ドメイン（例えば、K a b a t若しくはC h o t h i aに従う1つ、2つ、3つのV H C D R；及び1つ、2つ、3つのV L C D R）をコードするアミノ酸及びヌクレオチド配列は、国際公開第2016/028896号パンフレットに明示されている。

30

【0405】

一部の実施形態において、C A R分子は、本明細書に記載のC L L 1 C A R、例えば本明細書に参照により組み込まれる米国特許出願第2016/0051651A1号明細書に記載されるC L L 1 C A Rを含む。複数の実施形態では、C L L 1 C A Rは、アミノ酸を含むか、又は本明細書に参照により組み込まれる米国特許出願第2016/0051651A1号明細書に表示されるヌクレオチド配列を有する。他の実施形態では、C A R発現細胞は、C L L - 1に特異的に結合し、例えば本明細書に参照により組み込まれる国際公開第2016/014535号パンフレットの表2に従うC A R分子又は抗原結合ドメインを含み得る。C L L - 1 C A R分子及び抗原結合ドメイン（例えば、K a b a t若しくはC h o t h i aに従う1つ、2つ、3つのV H C D R；及び1つ、2つ、3つのV L C D R）をコードするアミノ酸及びヌクレオチド配列は、国際公開第2016/014535号パンフレットに明示されている。

40

【0406】

50

一部の実施形態において、CAR分子は、本明細書に記載のCD33 CAR、例えば本明細書に参照により組み込まれる米国特許出願第2016/0096892A1号明細書に記載されるCD33 CARを含む。複数の実施形態では、CD33 CARは、アミノ酸を含むか、又は本明細書に参照により組み込まれる米国特許出願第2016/0096892A1号明細書に表示されるヌクレオチド配列を有する。他の実施形態では、CAR発現細胞は、CD33に特異的に結合し、例えば本明細書に参照により組み込まれる国際公開第2016/014576号パンフレットの表2若しくは9に従うCAR分子(例えば、CAR33-1~CD33-9のいずれか)又は抗原結合ドメインを含み得る。CD33 CAR分子及び抗原結合ドメイン(例えば、Kabab若しくはChothiaに従う1つ、2つ、3つのVH CDR;及び1つ、2つ、3つのVL CDR)をコードするアミノ酸及びヌクレオチド配列は、国際公開第2016/014576号パンフレットに明示されている。

10

【0407】

一部の実施形態において、抗原結合ドメインは、本明細書に記載の抗体からの1つ、2つ、3つ(例えば、3つ全て)の重鎖CDR、HC CDR1、HC CDR2及びHC CDR3(例えば、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2015/142675号パンフレット、米国特許出願公開第2015-0283178-A1号明細書、2016-0046724-A1号明細書、米国特許出願公開第2014/0322212A1号明細書、米国特許出願公開第2016/0068601A1号明細書、米国特許出願公開第2016/0051651A1号明細書、米国特許出願公開第2016/0096892A1号明細書、米国特許出願公開第2014/0322275A1号明細書又は国際公開第2015/090230号パンフレットに記載の抗体)及び/又は本明細書に記載の抗体からの1つ、2つ、3つ(例えば、3つ全て)の軽鎖CDR、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3(例えば、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2015/142675号パンフレット、米国特許出願公開第2015-0283178-A1号明細書、2016-0046724-A1号明細書、米国特許出願公開第2014/0322212A1号明細書、米国特許出願公開第2016/0068601A1号明細書、米国特許出願公開第2016/0051651A1号明細書、米国特許出願公開第2016/0096892A1号明細書、米国特許出願公開第2014/0322275A1号明細書又は国際公開第2015/090230号パンフレットに記載の抗体)を含む。一部の実施形態において、抗原結合ドメインは、上に列挙した抗体の重鎖可変領域及び/又は軽鎖可変領域を含む。

20

30

【0408】

実施形態において、抗原結合ドメインは、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2015/142675号パンフレット、米国特許出願公開第2015-0283178-A1号明細書、2016-0046724-A1号明細書、米国特許出願公開第2014/0322212A1号明細書、米国特許出願公開第2016/0068601A1号明細書、米国特許出願公開第2016/0051651A1号明細書、米国特許出願公開第2016/0096892A1号明細書、米国特許出願公開第2014/0322275A1号明細書又は国際公開第2015/090230号パンフレットに記載の抗原結合ドメインである。

40

【0409】

実施形態において、抗原結合ドメインはBCMAを標的とし、米国特許出願公開第2016-0046724-A1号明細書に記載されている。実施形態において、抗原結合ドメインはCD19を標的とし、米国特許出願公開第2015-0283178-A1号明細書に記載されている。実施形態において、抗原結合ドメインはCD123を標的とし、米国特許出願公開第2014/0322212A1号明細書、米国特許出願公開第2016/0068601A1号明細書に記載されている。実施形態において、抗原結合ドメインはCLL1を標的とし、米国特許出願公開第2016/0051651A1号明細書に記載されている。実施形態において、抗原結合ドメインはCD33を標的とし、米国特許

50

出願公開第2016/0096892A1号明細書に記載されている。

【0410】

CAR発現細胞を使用して標的とすることができる例示的な標的抗原には、例えば、それぞれ参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第2014/153270号パンフレット、国際公開第2014/130635号パンフレット、国際公開第2016/028896号パンフレット、国際公開第2014/130657号パンフレット、国際公開第2016/014576号パンフレット、国際公開第2015/090230号パンフレット、国際公開第2016/014565号パンフレット、国際公開第2016/014535号パンフレット及び国際公開第2016/025880号パンフレットに記載されるように、とりわけ、CD19、CD123、EGFRvIII、CD33、メソテリン、BCMA及びGFR ALPHA-4が含まれるが、これらに限定されるものではない。

10

【0411】

他の実施形態において、CAR発現細胞は、GFR ALPHA-4に特異的に結合することができるが、例えば、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2016/025880号パンフレットの表2に記載のCAR分子又は抗原結合ドメインを含み得る。GFR ALPHA-4 CAR分子及び抗原結合ドメインをコードするアミノ酸及びヌクレオチド配列（例えば、1つ、2つ、3つのVH CDR及びKabata又はChothiaによる1つ、2つ、3つのVL CDRを含む）は、国際公開第2016/025880号パンフレットで特定されている。

20

【0412】

一部の実施形態において、本明細書に記載されるCAR分子のいずれかの抗原結合ドメイン（例えば、CD19、CD123、EGFRvIII、CD33、メソテリン、BCMA及びGFR ALPHA-4）は、上に挙げた抗体由来の1つ、2つ、3つ（例えば、全3つの）重鎖CDR、HC CDR1、HC CDR2及びHC CDR3及び/又は上に挙げた抗原結合ドメイン由来の1つ、2つ、3つ（例えば、全3つの）軽鎖CDR、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3を含む。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、上に列挙若しくは記載した抗体の重鎖可変領域及び/又は可変軽鎖領域を含む。

30

【0413】

一部の実施形態において、抗原結合ドメインは、上に挙げた抗体由来の1つ、2つ、3つ（例えば、全3つの）重鎖CDR、HC CDR1、HC CDR2及びHC CDR3及び/又は上に挙げた抗原結合ドメイン由来の1つ、2つ、3つ（例えば、全3つの）軽鎖CDR、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3を含む。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、上に列挙若しくは記載した抗体の重鎖可変領域及び/又は可変軽鎖領域を含む。

【0414】

一部の実施形態において、腫瘍抗原は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる2015年3月13日出願の国際公開第2015/142675号パンフレットに記載の腫瘍抗原である。一部の実施形態において、腫瘍抗原は、CD19；CD123；CD22；CD30；CD171；CS-1（CD2サブセット1、CRACC、SLAMF7、CD319、19A24とも称される）；C型レクチン様分子1（CLL-1又はCLECL1）；CD33；上皮増殖因子受容体変異体III（EGFRvIII）；ガングリオシドG2（GD2）；ガングリオシドGD3（aNeu5Ac（2-8）aNeu5Ac（2-3）bDGalp（1-4）bDGlcp（1-1）Cer）；TNF受容体ファミリーメンバーB細胞成熟（BCMA）；Tn抗原（（Tn Ag）又は（GalNAc-Ser/Thr））；前立腺特異的膜抗原（PSMA）；受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体1（ROR1）；Fms様チロシンキナーゼ3（FLT3）；腫瘍関連糖タンパク質72（TAG72）；CD38；CD44v6；癌胎児性抗原（CEA）；上皮細胞接着分子（EPCAM）；B7H3（CD276）；KIT（CD117）

40

50

; インターロイキン13受容体サブユニット 2 (I L - 1 3 R a 2 又は C D 2 1 3 A 2) ; メソテリン ; インターロイキン11受容体 (I L - 1 1 R a) ; 前立腺幹細胞抗原 (P S C A) ; プロテアーゼセリン21 (テスティシン又は P R S S 2 1) ; 血管内皮増殖因子受容体2 (V E G F R 2) ; ルイス (Y) 抗原 ; C D 2 4 ; 血小板由来増殖因子受容体 (P D G F R -) ; ステージ特異的胚性抗原 - 4 (S S E A - 4) ; C D 2 0 ; 葉酸受容体 ; 受容体チロシントキナーゼ E R B B 2 (H e r 2 / n e u) ; ムチン1、細胞表面関連 (M U C 1) ; 上皮増殖因子受容体 (E G F R) ; 神経細胞接着分子 (N C A M) ; プロテアーゼ ; 前立腺酸性ホスファターゼ (P A P) ; 伸長因子2変異体 (E L F 2 M) ; エフリンB2 ; 線維芽細胞活性化タンパク質 (F A P) ; インスリン様増殖因子1受容体 (I G F - I 受容体) 、炭酸脱水酵素 I X (C A I X) ; プロテアソーム (プロソーム、マクロペイン) サブユニット、タイプ、9 (L M P 2) ; 糖タンパク質100 (g p 1 0 0) ; 切断点クラスター領域 (B C R) 及びアベルソンマウス白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ1 (A b l) (b c r - a b l) ; チロシナーゼ ; エフリンA型受容体2 (E p h A 2) ; フコシルGM1 ; シアリルルイス接着分子 (s L e) ; ガングリオシドGM3 (a N e u 5 A c (2 - 3) b D G a l p (1 - 4) b D G l c p (1 - 1) C e r) ; トランスグルタミナーゼ5 (T G S 5) ; 高分子量黒色腫関連抗原 (H M W M A A) ; o - アセチル - G D 2 ガングリオシド (O A c G D 2) ; 葉酸受容体 ; 腫瘍内皮マーカー1 (T E M 1 / C D 2 4 8) ; 腫瘍内皮マーカー7関連 (T E M 7 R) ; クロロイン6 (C L D N 6) ; 甲状腺刺激ホルモン受容体 (T S H R) ; Gタンパク質共役受容体クラスCグループ5、メンバーD (G P R C 5 D) ; 染色体Xオープンリーディングフレーム61 (C X O R F 6 1) ; C D 9 7 ; C D 1 7 9 a ; 未分化リンパ腫キナーゼ (A L K) ; ポリシアル酸 ; 胎盤特異的1 (P L A C 1) ; g l o b o H グリコセラミド (G l o b o H) の六糖部分 ; 乳腺分化抗原 (N Y - B R - 1) ; ウロプラキニン2 (U P K 2) ; A型肝炎ウイルス細胞受容体1 (H A V C R 1) ; アドレナリン受容体 3 (A D R B 3) ; パネキシン3 (P A N X 3) ; Gタンパク質共役受容体20 (G P R 2 0) ; リンパ球抗原6複合体、遺伝子座K9 (L Y 6 K) ; 嗅覚受容体51E2 (O R 5 1 E 2) ; T C R 代替オープンリーディングフレームタンパク質 (T A R P) ; ウィルムス腫瘍タンパク質 (W T 1) ; 癌 / 精巢抗原1 (N Y - E S O - 1) ; 癌 / 精巢抗原2 (L A G E - 1 a) ; 黒色腫関連抗原1 (M A G E - A 1) ; 染色体12p上に位置するETS転座変異体遺伝子6 (E T V 6 - A M L) ; 精子タンパク質17 (S P A 1 7) ; X抗原ファミリー、メンバー1A (X A G E 1) ; アンジオポエチン結合細胞表面受容体2 (T i e 2) ; 黒色腫癌精巢抗原 - 1 (M A D - C T - 1) ; 黒色腫癌精巢抗原 - 2 (M A D - C T - 2) ; F o s 関連抗原1 ; 腫瘍タンパク質 p 5 3 (p 5 3) ; p 5 3 変異体 ; プロステイン (p r o s t e i n) ; 生存 ; テロメラーゼ ; 前立腺癌腫瘍抗原 - 1 (P C T A - 1 又は ガレクチン 8) 、 T 細胞によって認識される黒色腫抗原1 (M e l a n A 又は M A R T 1) ; ラット肉腫 (R a s) 変異体 ; ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (h T E R T) ; 肉腫転座切断点 ; 黒色腫由来アポトーシス阻害剤 (M L - I A P) ; E R G (膜貫通型プロテアーゼ、セリン2 (T M P R S S 2) E T S 融合遺伝子) ; N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼV (N A 1 7) ; ペアードボックスタンパク質 P a x - 3 (P A X 3) ; アンドロゲン受容体 ; サイクリンB1 ; v - m y c トリ骨髄球症ウイルス癌遺伝子神経芽腫由来ホモログ (M Y C N) ; R a s ホモログファミリーメンバーC (R h o C) ; チロシナーゼ関連タンパク質2 (T R P - 2) ; チトクロム P 4 5 0 1 B 1 (C Y P 1 B 1) ; C C C T C 結合因子 (ジンクフィンガータンパク質) 様 (B O R I S 、 すなわち B r o t h e r o f t h e R e g u l a t o r o f I m p r i n t e d S i t e s) ; T細胞により認識される扁平上皮癌抗原3 (S A R T 3) ; ペアードボックスタンパク質 P a x - 5 (P A X 5) ; プロアクロシン結合タンパク質 s p 3 2 (O Y - T E S 1) ; リンパ球特異的プロテインチロシントキナーゼ (L C K) ; Aキナーゼアンカータンパク質4 (A K A P - 4) ; 滑膜肉腫、X染色体切断点2 (S S X 2) ; 終末糖化産物受容体 (R A G E - 1) ; 腎ユビキタス1 (R U 1) ; 腎ユビキタス2 (R U 2) ; レグマイン ; ヒトパピローマウイルスE6 (H P V E 6) ; ヒトパピロ

10

20

30

40

50

ーマウイルスE7 (HPV E7); 腸カルボキシエステラーゼ; 熱ショックタンパク質70-2変異体 (mut hsp70-2); CD79a; CD79b; CD72; 白血球関連免疫グロブリン様受容体1 (LAIR1); IgA受容体のFcフラグメント (FCAR又はCD89); 白血球関連免疫グロブリン様受容体サブファミリーAメンバー2 (LILRA2); CD300分子様ファミリーメンバーf (CD300LF); C型レクチンドメインファミリー12メンバーA (CLEC12A); 骨髄間質細胞抗原2 (BST2); EGF様モジュール含有ムチン様ホルモン受容体様2 (EMR2); リンパ球抗原75 (LY75); グリピカン3 (GPC3); Fc受容体様5 (FCRL5); 及び免疫グロブリンラムダ様ポリペプチド1 (IGLL1)の1つ以上から選択される。

【0415】

10

一部の実施形態において、抗原結合ドメインは、上に列挙した抗体からの1つ、2つ、3つ(例えば、3つ全て)の重鎖CDR、HC CDR1、HC CDR2及びHC CDR3並びに/又は上に列挙した抗体からの1つ、2つ、3つ(例えば、3つ全て)の軽鎖CDR、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3を含む。一部の実施形態において、抗原結合ドメインは、上に列挙又は記載した抗体の重鎖可変領域及び/又は軽鎖可変領域を含む。

【0416】

一部の実施形態において、抗腫瘍抗原結合ドメインは、フラグメント、例えば、単鎖可変フラグメント(scFv)である。一部の実施形態において、本明細書に記載されるような抗癌関連抗原結合ドメインは、Fv、Fab、(Fab')₂又は二機能性(例えば、二特異性)ハイブリッド抗体(例えば、Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987))である。一部の実施形態において、本発明の抗体及びそのフラグメントは、野生型又は増強した親和性で本明細書に記載されるような癌関連抗原に結合する。

20

【0417】

ある例において、scFvsは、当技術分野で公知の方法により製造できる(例えば、Bird et al., (1988) Science 242: 423-426及びHuston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 5879-5883を参照されたい)。ScFv分子は、可動性ポリペプチドリンカーを使用して、VH領域とVL領域を一緒に連結することにより産生できる。scFv分子は、最適長及び/又はアミノ酸組成を有するリンカー(例えば、Ser-Glyリンカー)を含む。リンカー長は、scFvの可変領域がどのように折りたたまれ、相互作用するかにより大きく影響し得る。実際、短ポリペプチドリンカーを用いる場合、(例えば、5~10アミノ酸)、鎖内折りたたみは阻止される。鎖内折りたたみは、2可変領域が一体となって機能的エピトープ結合部位を形成させるためにも必要である。リンカー方向及びサイズの例は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Hollinger et al. 1993 Proc Natl Acad. Sci. U.S.A. 90: 6444-6448、米国特許出願公開第2005/0100543号、同第2005/0175606号、同第2007/0014794号明細書及び国際公開第2006/020258号パンフレット及び国際公開第2007/024715号パンフレットを参照されたい。

30

40

【0418】

scFvは、そのVL領域とVH領域との間に少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50又はそれを超えるアミノ酸残基のリンカーを含み得る。リンカー配列は、あらゆる天然に存在するアミノ酸を含み得る。一実施形態において、リンカー配列は、アミノ酸グリシン及びセリンを含む。一部の実施形態において、リンカー配列は、(Gly4Ser)_n(ここで、nは、1以上の正の整数である)など、一連のグリシン及びセリン反復を含む(配列番号25)。一部の実施形態において、リンカーは(Gly4Ser)₄(配列番号27)又は(Gly4Ser)₃(配列番号28)であ

50

り得る。リンカー長の変動は、活性を維持又は増強し、活性試験において優れた有効性を生じ得る。

【0419】

一部の実施形態において、抗原結合ドメインは、T細胞受容体(「TCR」)又はそのフラグメント、例えば単鎖TCR(scTCR)である。そのようなTCRを作製する方法は当技術分野で公知である。例えば、illemesen RA et al, Gene Therapy 7:1369-1377(2000); Zhang T et al, Cancer Gene Ther 11:487-496(2004); Aggen et al, Gene Ther. 19(4):365-74(2012)(参考文献はその全体が本明細書に組み込まれる)を参照されたい。例えば、リンカー(例えば、柔軟なペプチド)によって連結されたT細胞クローン由来のV_H及びV_L遺伝子を含むscTCRを操作することができる。このアプローチは、それ自体が細胞内にある癌関連標的にとって非常に有用であるが、そのような抗原(ペプチド)のフラグメントは、MHCによって癌細胞の表面に提示される。

10

【0420】

膜貫通ドメイン

膜貫通ドメインに関して、種々の実施形態において、CARは、CARの細胞外ドメインに結合する膜貫通ドメインを含むように設計できる。膜貫通ドメインは、膜貫通領域に隣接した1つ以上のさらなるアミノ酸、例えば膜貫通が由来するタンパク質の細胞外領域と関係する1つ以上のアミノ酸(例えば、細胞外領域の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10~最大で15のアミノ酸)及び/又は膜貫通タンパク質が由来するタンパク質の細胞内領域と関係する1つ以上のアミノ酸(例えば、細胞内領域の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10~最大で15のアミノ酸)を含み得る。一部の実施形態において、膜貫通ドメインは、CARの他のドメインの1つに関連して使用されるものである。ある例において、膜貫通ドメインは、このようなドメインが、同一又は異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインと結合するのを避けるように、例えば受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小化するように選択され又はアミノ酸置換による改変ができる。一部の実施形態において、膜貫通ドメインは、CAR発現細胞、例えばCAR⁺T細胞表面上の別のCARとホモ二量体化できる。一部の実施形態において、膜貫通ドメインのアミノ酸配列は、同じCAR発現細胞、例えばCAR⁺Tに存在する天然結合パートナーの結合ドメインとの相互作用を最小化するように改変又は置換され得る。

20

30

【0421】

膜貫通ドメインは、天然由来又は組換え源由来であり得る。源が天然であるとき、ドメインは、あらゆる膜結合又は膜貫通タンパク質由来であり得る。一部の実施形態において、膜貫通ドメインは、CARが標的に結合したときは常に細胞内ドメインにシグナル伝達できる。本発明において特に有用な膜貫通ドメインは、例えば、T細胞受容体の、又は鎖、CD28、CD3、CD45、CD4、CD5、CD8(例えば、CD8、CD8)、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154の少なくとも膜貫通領域を含み得る。一部の実施形態において、膜貫通ドメインは、少なくとも、共刺激分子、例えばMHCクラスI分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ球活性化分子(SLAMタンパク質)、活性化NK細胞受容体、BTLA、Tollリガンド受容体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD5、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、4-1BB(CD137)、B7-H3、CD5、ICAM-1、ICOS(CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、Nkp80(KLRF1)、Nkp44、Nkp30、Nkp46、CD19、CD4、CD8、CD8、IL2R、IL2R、IL7R、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、

40

50

CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANSCENDANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a及びCD83と特異的に結合するリガンドの膜貫通領域を含み得る。

【0422】

一部の事例において、膜貫通ドメインは、ヒンジ、例えばヒトタンパク質からのヒンジを介して、CARの細胞外領域、例えばCARの抗原結合ドメインに結合することができる。例えば、一部の実施形態において、ヒンジは、ヒトIg(免疫グロブリン)ヒンジ、例えばIgG4ヒンジ又はCD8aヒンジであり得る。一部の実施形態において、ヒンジ又はスペーサーは、配列番号2のアミノ酸配列を含む(例えば、これから構成される)。一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、配列番号6の膜貫通ドメインを含む(例えば、これから構成される)。

【0423】

一部の実施形態において、ヒンジ又はスペーサーは、IgG4ヒンジを含む。例えば、一部の実施形態において、ヒンジ又はスペーサーは、配列番号3のヒンジを含む。一部の実施形態において、ヒンジ又はスペーサーは、配列番号14のヌクレオチド配列によってコードされるヒンジを含む。

【0424】

一部の実施形態において、ヒンジ又はスペーサーは、IgDヒンジを含む。例えば、一部の実施形態において、ヒンジ又はスペーサーは、配列番号4のアミノ酸配列のヒンジを含む。一部の実施形態において、ヒンジ又はスペーサーは、配列番号15のヌクレオチド配列によってコードされるヒンジを含む。

【0425】

一部の実施形態において、膜貫通ドメインは組換えであり得、その場合、ロイシン及びバリンなどの疎水性残基を優勢に含む。一部の実施形態において、フェニルアラニン、トリプトファン及びバリンのトリプレットを、組換え膜貫通ドメインの各末端に見ることができる。

【0426】

任意選択で、2~10アミノ酸長の短オリゴ又はポリペプチドリンカーが、CARの膜貫通ドメインと細胞質領域との間に結合を形成し得る。グリシン-セリンダブレットは特に適当なリンカーを提供する。例えば、一部の実施形態において、リンカーは、配列番号5のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、リンカーは、配列番号16のヌクレオチド配列によってコードされる。

【0427】

一部の実施形態において、ヒンジ又はスペーサーは、KIR2DS2ヒンジを含む。

【0428】

細胞質ドメイン

本発明のCARの細胞質ドメイン又は領域は、細胞内シグナル伝達ドメインを含む。細胞内シグナル伝達ドメインは、一般的に、CARが導入されている免疫細胞の正常エフェクター機能の少なくとも1つの活性化を担う。

【0429】

本発明のCARにおいて使用する細胞内シグナル伝達ドメインの例は、T細胞受容体(TCR)及び抗原受容体結合後にシグナル伝達を開始するために協調して機能する共受容体の細胞質配列並びにこれらのあらゆる誘導體又はバリエーション及び同じ機能的能力を有するあらゆる組換え配列を含む。

10

20

30

40

50

【0430】

T C R単独により産生されたシグナルはT細胞の完全活性化には不十分であり、二次及び/又は共刺激シグナルも必要であることが知られている。そのため、T細胞活性化は、2つの異なるクラスの細胞質シグナル伝達配列が介在するということができる：T C R（初代細胞内シグナル伝達ドメイン）を介して抗原依存性一次活性化を開始するもの及び二次又は共刺激シグナル（二次細胞質ドメイン、例えば共刺激ドメイン）を提供するように抗原非依存的な方法で作用するもの。

【0431】

一次シグナル伝達ドメインは、T C R複合体の一次活性化を刺激性方向又は阻害性方向のいずれかで制御する。刺激性方向で作用する初代細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ又はI T A Mとして知られるシグナル伝達モチーフを含み得る。

【0432】

本発明において特に有用であるI T A M含有初代細胞内シグナル伝達ドメインの例は、T C R、F c R、F c R、C D 3、C D 3、C D 3、C D 5、C D 2 2、C D 7 9 a、C D 7 9 b、C D 2 7 8（「I C O S」としても知られる）、F c R I、D A P 1 0、D A P 1 2及びC D 6 6 dのものを含む。一部の実施形態において、本発明のC A Rは、細胞内シグナル伝達ドメイン、例えばC D 3の一次シグナル伝達ドメインを含む。

【0433】

一部の実施形態において、一次シグナル伝達ドメインは、天然I T A Mドメインと比べて改変された（例えば、増加又は減少した）活性を有する、修飾I T A Mドメイン、例えば変異I T A Mドメインを含む。一部の実施形態において、一次シグナル伝達ドメインは、修飾I T A M含有初代細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば最適化及び/又は切断されたI T A M含有初代細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態において、一次シグナル伝達ドメインは、1つ、2つ、3つ、4つ又はそれを超えるI T A Mモチーフを含む。

【0434】

本発明で特に有用な一次細胞内シグナル伝達ドメインを含む分子のさらに別の例としては、D A P 1 0、D A P 1 2及びC D 3 2の分子が挙げられる。

【0435】

C A Rの細胞内シグナル伝達ドメインは、一次シグナル伝達ドメイン、例えばC D 3 - シグナル伝達ドメインをそれ自体で含み得るか、又は本発明のC A Rに関連して有用ないずれか他の所望の細胞内シグナル伝達ドメインと組み合わせられ得る。例えば、C A Rの細胞内シグナル伝達ドメインは、一次シグナル伝達ドメイン、例えばC D 3鎖部分並びに共刺激分子伝達ドメインを含み得る。共刺激分子シグナル伝達ドメインは、共刺激分子の細胞内シグナル伝達ドメインを含むC A Rの一部を指す。共刺激分子は、抗原に対するリンパ球の効率的な応答に必要な抗原受容体又はそのリガンド以外の細胞表面分子である。こうした分子の例として、M H CクラスI分子、T N F受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ球活性化分子（S L A Mタンパク質）、活性化N K細胞受容体、B T L A、T o l lリガンド受容体、O X 4 0、C D 2、C D 7、C D 2 7、C D 2 8、C D 3 0、C D 4 0、C D 5、I C A M - 1、I C O S（C D 2 7 8）、G I T R、B A F F R、L I G H T、H V E M（L I G H T R）、K I R D S 2、S L A M F 7、N K p 8 0（K L R F 1）、N K p 4 4、N K p 3 0、N K p 4 6、C D 1 9、C D 4、C D 8、C D 8、I L 2 R、I L 2 R、I L 7 R、I T G A 4、V L A 1、C D 4 9 a、I T G A 4、I A 4、C D 4 9 D、I T G A 6、V L A - 6、C D 4 9 f、I T G A D、C D 1 1 d、I T G A E、C D 1 0 3、I T G A L、C D 1 1 a、L F A - 1、I T G A M、C D 1 1 b、I T G A X、C D 1 1 c、I T G B 1、C D 2 9、I T G B 2、C D 1 8、L F A - 1、I T G B 7、N K G 2 D、N K G 2 C、T N F R 2、T R A N C E / R A N K L、D N A M 1（C D 2

10

20

30

40

50

26)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELP(LG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a及びCD83と特異的に結合するリガンドなどを含む。例えば、CD27共刺激は、インビトロでヒトCART細胞の拡大、エフェクター機能及び生存を増大し、ヒトT細胞持続性及び抗腫瘍活性をインビボで高めることが実証されている(Song et al. Blood. 2012; 119(3): 696-706)。本発明のCARの細胞質部分内の細胞内シグナル伝達配列を、ランダムに又は指定された順序で互いに連結させることもできる。任意選択で、2~10アミノ酸(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9若しくは10アミノ酸)長の短いオリゴ又はポリペプチドリンカーは、細胞内シグナル伝達配列同士の連結を形成し得る。一部の実施形態では、グリシン-セリンダブレットを好適なリンカーとして使用することができる。一部の実施形態では、単一アミノ酸、例えばアラニン、グリシンを好適なリンカーとして使用することができる。

10

【0436】

一部の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、2つ以上、例えば2、3、4、5つ又はそれを超える共刺激シグナル伝達ドメインを含むように設計される。一部の実施形態では、2つ以上、例えば2、3、4、5つ又はそれを超える共刺激シグナル伝達ドメインは、リンカー分子、例えば本明細書に記載のリンカー分子によって隔てられている。一部の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、2つの共刺激シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態では、リンカー分子は、グリシン残基である。一部の実施形態では、リンカーは、アラニン残基である。

20

【0437】

一部の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3のシグナル伝達ドメインとCD28のシグナル伝達ドメインを含むように設計される。一部の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3のシグナル伝達ドメインと4-1BBのシグナル伝達ドメインを含むように設計される。一部の実施形態では、4-1BBのシグナル伝達ドメインは、配列番号7のシグナル伝達ドメインである。一部の実施形態では、CD3のシグナル伝達ドメインは、配列番号9(突然変異型CD3)又は配列番号10(野生型ヒトCD3)のシグナル伝達ドメインである。

30

【0438】

一部の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3のシグナル伝達ドメインとCD27のシグナル伝達ドメインを含むように設計される。一部の実施形態では、CD27のシグナル伝達ドメインは、配列番号8のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD27のシグナル伝達ドメインは、配列番号19の核酸配列によってコードされる。

【0439】

一部の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3のシグナル伝達ドメインとCD28のシグナル伝達ドメインを含むように設計される。一部の実施形態では、CD28のシグナル伝達ドメインは、配列番号36のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD28のシグナル伝達ドメインは、配列番号37の核酸配列によってコードされる。一部の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3のシグナル伝達ドメインとICOSのシグナル伝達ドメインを含むように設計される。一部の実施形態では、ICOSのシグナル伝達ドメインは、配列番号38のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ICOSのシグナル伝達ドメインは、配列番号39の核酸配列によってコードされる。

40

【0440】

CAR構成
二重CAR

50

一実施形態では、免疫細胞（例えば、T細胞若しくはNK細胞）は、2つのCAR、例えば、第1抗原に結合する第1CARと、第2抗原に結合する第2CARを発現する。一実施形態では、第1抗原及び第2抗原は異なる。一実施形態では、第1若しくは第2抗原は、B細胞に発現される抗原、急性骨髄性白血病細胞に発現される抗原又は固形腫瘍細胞上の抗原から選択される。一実施形態では、第1若しくは第2抗原は、CD10、CD19、CD20、CD22、CD34、CD123、BCMA、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179b、CD79a、CD34、CLL-1、葉酸受容体、FLT3、EGFRvIII、メソテリン、GD2、Tn抗原、sTn抗原、Tn-O-糖ペプチド、sTn-O-糖ペプチド、PSMA、CD97、TAG72、CD44v6、CEA、EPCAM、KIT、IL-13Ra2、レグマン、GD3、CD171、IL-11Ra、PSCA、MAD-CT-1、MAD-CT-2、VEGFR2、ルイスY、CD24、PDGFR、SSEA-4、葉酸受容体、ERBB（例えば、ERBB2）、Her2/neu、MUC1、EGFR、NCAM、エフリンB2、CAIX、LMP2、sLe、HMWMAA、o-アセチル-GD2、葉酸受容体、TEM1/CD248、TEM7R、FAP、レグマイン、HPV E6若しくはE7、ML-IAP、CLDN6、TSHR、GPRC5D、ALK、ポリシアル酸、Fos関連抗原、好中球エラストラーゼ、TRP-2、CYP1B1、精子タンパク質17、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、AFP、チログロブリン、PLAC1、グロボH、RAGE1、MN-CAIX、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、腸カルボキシルエステラーゼ、mut hsp 70-2、NA-17、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、NY-ESO-1、GPR20、Ly6k、OR51E2、TARP、GFR4又はMHCに提示されるこれらの抗原のいずれかのペプチドから選択される。

10

20

【0441】

一実施形態では、第1抗原は、CD19である。一実施形態では、第2抗原は、CD19ではない。一実施形態では、第2抗原は、CD19ではない、本明細書に開示される抗原である。

【0442】

一実施形態では、第1抗原は、BCMAである。一実施形態では、第2抗原は、BCMAではない。一実施形態では、第2抗原は、BCMAではない、本明細書に開示の抗原である。一実施形態では、第2抗原は、B細胞に発現される抗原、急性骨髄性白血病細胞に発現される抗原又は固形腫瘍細胞上の抗原から選択される。一実施形態では、第2抗原は、CD10、CD19、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179b、CD79a、CD34、CLL-1、葉酸受容体、FLT3、EGFRvIII、メソテリン、GD2、Tn抗原、sTn抗原、Tn-O-糖ペプチド、sTn-O-糖ペプチド、PSMA、CD97、TAG72、CD44v6、CEA、EPCAM、KIT、IL-13Ra2、レグマン、GD3、CD171、IL-11Ra、PSCA、MAD-CT-1、MAD-CT-2、VEGFR2、ルイスY、CD24、PDGFR、SSEA-4、葉酸受容体、ERBB（例えば、ERBB2）、Her2/neu、MUC1、EGFR、NCAM、エフリンB2、CAIX、LMP2、sLe、HMWMAA、o-アセチル-GD2、葉酸受容体、TEM1/CD248、TEM7R、FAP、レグマイン、HPV E6若しくはE7、ML-IAP、CLDN6、TSHR、GPRC5D、ALK、ポリシアル酸、Fos関連抗原、好中球エラストラーゼ、TRP-2、CYP1B1、精子タンパク質17、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、AFP、チログロブリン、PLAC1、グロボH、RAGE1、MN-CAIX、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、腸カルボキシルエステラーゼ、mut hsp 70-2、NA-17、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、NY-ESO-1、GPR20、Ly6k、OR51E2、TARP、GFR4又はMHCに提示されるこれらの抗原のいずれかのペプチドから選択される。一実施形態では、第1抗原は、BCMAであり、第2抗原は、CD19である。

30

40

【0443】

50

一実施形態では、第1 CARは、第1核酸配列によってコードされる。一実施形態では、第2 CARは、第2核酸配列によってコードされる。一実施形態では、第1及び第2核酸配列は、単一の核酸分子上に配置される。一実施形態では、第1及び第2核酸配列は、個別の核酸分子上に配置される。一実施形態では、1つ以上の核酸分子は、DNA又はRNA分子である。いくつかの実施形態では、第1及び第2核酸配列は、同じ配向に位置し、例えば、第1及び第2核酸配列の転写は、同じ方向に進行する。いくつかの実施形態では、第1及び第2核酸配列は、異なる配向に位置する。いくつかの実施形態では、単一プロモーターが、第1及び第2核酸配列の発現を制御する。いくつかの実施形態では、プロテアーゼ切断部位をコードする核酸（例えば、T2A、P2A、E2A又はF2A切断部位）をコードする核酸が、第1及び第2核酸配列の間に位置する。一実施形態では、プロテアーゼ切断部位は、細胞が第1 CAR及び第2 CARを含む融合タンパク質を発現することができるように配置され、後に、この融合タンパク質は、タンパク質分解切断によって2つのペプチドにプロセッシングされる。一部の実施形態では、第1核酸配列は、第2核酸配列の上流にあるか、又は第2核酸配列が、第1核酸配列の上流にある。いくつかの実施形態では、第1プロモーターが第1核酸配列の発現を制御し、第2プロモーターが第2核酸配列の発現を制御する。いくつかの実施形態では、核酸分子は、プラスミドである。いくつかの実施形態では、核酸分子は、ウイルスパッケージングエレメントを含む。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、T2A、P2A、E2A又はF2A切断部位を切断するプロテアーゼ（例えば、内因性若しくは外因性プロテアーゼ）を含み得る。

10

【0444】

20

一実施形態では、第1 CARは、第1抗原結合ドメインを含み、第2 CARは、第2抗原結合ドメインを含む。一実施形態では、第1又は第2抗原結合ドメインは、本明細書に開示されるCDR、VH、VL若しくはscFv又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、第1又は第2抗原結合ドメインは、本明細書に開示される抗BCMA抗原結合ドメインのCDR、VH、VL若しくはscFv（例えば、表3～15、19、20、22及び26に開示されるアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列）を含む。一実施形態では、第1又は第2抗原結合ドメインは、本明細書に開示される抗CD19抗原結合ドメインのCDR、VH、VL若しくはscFv（例えば、表2、19及び22に開示されるアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列）を含む。

30

【0445】

一実施形態では、第1抗原は、BCMAであり、第2抗原は、CD19である。一実施形態では、免疫細胞（例えば、T細胞若しくはNK細胞）は、抗BCMA CAR、例えば、本明細書に開示される抗BCMA CARと、抗CD19 CAR、例えば、本明細書に開示される抗CD19 CARを発現する。一実施形態では、免疫細胞（例えば、T細胞若しくはNK細胞）は、抗BCMA CAR、例えば、本明細書に開示される抗BCMA CARをコードする第1核酸配列と、抗CD19 CAR、例えば、本明細書に開示される抗CD19 CARをコードする第2核酸配列とを含む。表19は、二重CAR構築物の例示的なアミノ酸及び核酸配列を示す。

40

【0446】

50

【表 6 4】

表 19. 例示的な BCMA/CD19 二重 CAR 構築物及びその成分

二重 BCMA/CD19 構築物		
同定	タンパク質配列	DNA 配列(5'-3')
シグナル ペプチド (抗 BCMA CAR アーム 内)	MALPVTALLLPLALLLHAARP (配列 番号 1)	Atggccctccctgtcaccgcectgctgcttccgct ggctottctgctccacgcgctcggccc (配列番 号 199)
ScFv R1G5	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARREWWGE SWLFDYWGGTLVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASV GDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYS TPLTFGQGTKVEIK (配列番号 80)	Gaagtgcagttgctggagtcaggcggaggactggt gcagcccggaggatcgcttccgcttgagctgcgcag ctcaggctttacctctcctcctaagccatgtcc tgggtcagacaggctcccgggaaggactggaatg ggtgtccgccattagcggttccggcgaagcactt actatgccgactctgtgaagggccgcttcaactatc tcccgggacaactccaagaacaccctgtatctcca aatgaattccctgagggccgaagataaccgcggtgt actactgcgctagacgggagtggtgggagaaagc tggetgttcgactactggggacaggcactctcgt gactgtgtcctccggtggtggatcggggggtg gtggttcgggcggaggaggatctggaggaggagg tcggacattcaaatgactcagtcaccgctcctccct ctccgcctccgtgggagatcgcgtcacgatcacgt gcagggccagccagagcatctccagctacctgaac tggtaccagcagaagccagggaggcaaccgaagct cctgatctacgcccgtagctcgctgcagtcggcg tccttcacggttctcgggatcgggctcaggcacc gacttcacctgaccattagcagcctgcagccgga ggacttcgcgacatactactgtcagcagtcatact ccaaccctctgacctcggccaagggaaccaaaagt gagatcaag (配列番号 81)

10

20

30

40

50

【 0 4 4 7】

【表 6 5】

ScFv PI61	<p>QVQLQESGGGVVQPGRSRLRLSCAASG FTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIS YDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCGGSGYALH DDYYGLDVWGQGLVTVSSGGGGSGG GSGGGGSQSALTQFASVSGSPGQSI TISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGK APKLMYDVSNRPSGVSNRFGSKSG NTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSS STLYVFGSGTKVTVL (配列番号 105)</p>	<p>Caagtgcagctgcaggaatccggtggcggagtcgt gcagcctggaaggagcctgagactctcatgcgccg cgtcagggttcaccttttctcctacgggatgcat tgggtcagacaggcccccgaaaggactcgaatg ggtggctgtgatcagctacgacggctccaacaagt actacgccgactccgtgaaaggccggttactatc tccgggacaactccaagaacacgctgtatctgca aatgaattcactgcgcgaggagataccgctgtgt actactgoggtggctccggttacgccctgcaagat gactattacggccttgacgtctggggccagggaac cctcgtgactglgtccagcgggtggaggaggttcgg gcgaggaggatcaggaggggtggatcgcagagc gcactgactcagccggcatccgtgtccggtagccc cggacagtcgattaccatctcctgtaccggcacct cctccgacgtgggaggggtacaactacgtgtcgtgg taccagcagcaccaggaaaggccctaagttgat gatctacgatgtgtcaaaccgcccgtctggagtc ccaaccggttctccggctccaagtcgggaacacc gccagcctgaccattagcgggtgcaagccgagga tgaggccgactactactgctcagctacacatcct cgagcaccctctacgtgttcggctcggggactaag gtcaccgtgetg (配列番号 106)</p>
ScFv RIB6	<p>EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASG FTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARREWVPY DVSWYFDYWGQGLVTVSSGGGGSGG GSGGGGSQSDIQMTQSPSSLSA SVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQK PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQS YSTPLTFGQGTKVEIK (配列番号 64)</p>	<p>Gaagtgcagtgtctggagtcaggcggaggactggt gcagcccggaggatcgtcttcgcttgagctgcgcag cctcaggtttaccttctcctcctacgccatgtcc tgggtcagacaggctcccgggaaggactggaatg ggtgtccgccattagcgggtccggcggaaagcact actatgccgactctgtgaaggccgcttactatc tccgggacaactccaagaacacccctgtatctcca aatgaattccctgagggccgaagataccgcggtgt actactgcctagaacgggagtggtgcctacgat gtcagctggtacttcgactactggggacagggcac tctcgtgactgtgtcctccgggtggtggatcgg ggggtggtggtccggcggaggaggatctggagga ggagggtcggacattcaaatgactcagtcgccgctc ctccctctccgctccgtgggagatcgcgtcacga tcacgtgcagggccagccagagcatctccagctac ctgaactggtaccagcagaagccagggaaggcacc gaagctcctgatctacgccgctagctcgtgcagt ccggcgtcccttcaagggttctcgggatcgggctca ggcaccgacttccctgaccattagcagcctgca gccggaggacttcgcgacatactactgtcagcagt catactccaccctctgacctcggccaagggacc aaagtggagatcaag (配列番号 65)</p>

10

20

30

40

50

【 0 4 4 8 】

【表 6 6】

<p>ScFv duBCMA.4</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSG FALSNGTHMSWVRRAPGKGLEWVSGIV YSGSTYYAASVKGRFTISRDNRNRL YLQMNLSLRPEDTAIYYCSAHGGESDV WQGTTTVTVSSASGGGSGGGGSGGG GSDIQLTQSPSSLSASVGDRTVITCR ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYA ASLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGT KVEIK (配列番号 200)</p>	<p>Gaagtgcaattggtggaatcagggggaggacttgt gcagcctggaggatcgctgagactgtcatgtgccg tgtccggctttgccctgtccaaccacgggatgtcc tgggtccgcccgcgcctggaaagggcctcgaatg ggtgtcgggtattgtgtacagcggtagcacctact atgcgcgatccgtgaaggggagaltcaccatcagc cgggacaactccaggaacactctgtacctccaaat gaattcgcctgaggccagaggacactgccatctact actgotccgcgcgatggcggagagtccgacgtctgg ggacaggggaccaccgtgaccgtgtctagcgcgtc cggcggaggcggcagcgggggtggtggttcagggg gcccgggatcggacatccagctcaccagtcctccg agctcgtctgtccgcctccgtgggagatcgggtcac catcagctgccgcgcagccagtcgatttccctect acctgaactggtaccaacagaagcccgaaaagcc ccgaagcttctcatctacgcgcctcgagcctgca gtcaggagtgcctcaccggttctccggctccgggtt ccggtaactgattcaccctgaccatttccctccctg caaccggaggacttcgctacttactactgccagca gtcgtactccacccctacactttcggacaaggca ccaaggctcgaatcaag (配列番号 201)</p>	<p>10</p>
<p>ヒンジ及び 膜貫通 ドメイン (抗 BCMA CAR アーム 内)</p>	<p>TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA CRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPL AGTCGVLLLLSLVITLYC (配列番号 202)</p>	<p>Accactaccccagcaccgaggccacccaccccggc tctaccatcgctcccagcctctgtccctgcgtc cggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtg catacccggggtcttgacttcgcctgcgatatcta catttgggcccctctggctggtacttgcggggctc tgetgcttcaactcgtgatcactcttactgt (配列番号 203)</p>	<p>20</p>
<p>ヒンジ (抗 BCMA CAR アーム 内)</p>	<p>TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA CRPAAGGAVHTRGLDFACD (配列番 号 2)</p>	<p>Accactaccccagcaccgaggccacccaccccggc tctaccatcgctcccagcctctgtccctgcgtc cggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtg catacccggggtcttgacttcgcctgcgat (配 列番号 337)</p>	<p>30</p>
<p>膜貫通 ドメイン (抗 BCMA CAR アーム 内)</p>	<p>IYIWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYC (配列番号 6)</p>	<p>Atctacatttgggcccctctggctggtacttgcgg ggtcctgctgctttcaactcgtgatcactcttact gt (配列番号 338)</p>	<p>40</p>
<p>4-1BB (抗 BCMA CAR アーム 内)</p>	<p>KRGRKLLLYIFKQPFMRPVQTTQEED GCSCRFPPEEEFGGCEL (配列番号 7)</p>	<p>Aagcgcggtcggagaagctgctgtacatctttaa gcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaag aggaggacggctgttcatgcccgttccagaggag gaggaaggcggctgcgaactg (配列番号 204)</p>	<p>50</p>

【 0 4 4 9 】

【表 6 7】

CD3 ζ (抗 BCMA CAR アーム 内)	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEINL GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGHGDLYQGLSTATKDTYDAL HMQUALPPR (配列番号 10)	Cgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagc ctaccagcaggggcagaaccagctctacaacgaac tcaatcttggtcggagagaggagtaccgacgtgctg gacaagcggagaggacgggacccagaaatggggcgg gaagccgcgcagaaagaatccccagagggcctgt acaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcc tatagcgagattggtatgaaaggggaaacgcagaag aggcaaaggccaagcagcggactgtaccagggactca gcaccgccaccaagcacctatgacgctcttcac atgcagggcctgcccgcctcgg (配列番号 205)
リンカー	GSG (配列番号 206)	Ggaagcggga (配列番号 207)
P2A 配列	ATNFSLLKQAGDVEENPGP (配列番 号 208)	Gctactaacttcagcctgctgaagcaggtggaga cgtggaggagaaccctggacct (配列番号 209)
シグナルペプ チド (抗 CD19 CAR アーム 内)	MALPVTALLLPLALLLHAARP (配列 番号 1)	Atggccttaccagtgaaccgcttgcctcctgccgct ggccttgcctgctccacgcggccaggccg (配列番 号 210)
ScFv duCD19.1	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QDISKYLINWYQQKPGQAPRLLIYHTS RLHSGIPARFSGSGGTDTYTLTISSL QPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKL EIKGGGSGGGGSGGGGSSQVQLQESG PGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGV SWIRQPPGKLEWIGVIWGSETTYIQ SSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVT AADTAVYYCAKHYYGGSYAMDYWGQ GTLVTVSS (配列番号 211)	Gaaattgtgatgaccagtcaccgccactcttag cctttcaccgggtgagcgcgcaaccctgtcttgca gagcctcccaagacatctcaaaataaccttaattgg tatcaacagaagcccggacaggtcctcgccttct gatctaccacaccagcggctccattctggaatcc ctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgac tacaccctcactatcagctcactgcagccagagga cttcgctgtctattctgtcagcaagggaacacc tgccctacaccttggacagggcaccgaagctcgag attaaaggtggaggtggcagcggaggaqgtgggtc cggcgggtggaggaagccaggtccaactccaagaaa gcggaccgggtctgtgaagccatcagaaactctt tcactgacttgtactgtgagcggagtgtctctccc cgattacggggtgtctggatcagacagccaccgg ggaaggtctggaatggattggagtgattggggc tctgagactactactaccaatcatccctcaagtc acgcgtcaccatctcaaggacaactctagaatc aggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagcc gacaaccgcggtgactattgcgctaagcattacta ttatggcgggagctacgcgaatggattactggggac agggactctggtcaccggtgtccagc (配列番号 212)
ヒンジ及び膜 貫通ドメイン (抗 CD19 CAR アーム 内)	TTTPAPRPPTPAPFIIASQPLSLRPEA CRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPL AGTCGVLLLSLVITLYC (配列番号 202)	Accaogacgccagcgcggcagaccaccaacaccggc gccaccatcgcgtcgcagcccctgtccctgcgcc cagagggcgtgccggccagcggcggggggcgcagtg cacaogagggggctggacttcgcctgtgatata catctgggcgcccttggccgggacttgtggggctcc ttctcctgtcactggttatcacccttactgc (配列番号 213)

10

20

30

【 0 4 5 0 】

40

50

【表 6 8】

ヒンジ (抗 CD19 CAR アーム 内)	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA CRPAAGGAVHTRGLDFACD (配列番 号 2)	Accacgacgccagcgccgaccaccaacaccggc gcccaccatcgcgtegcagcccctgtccctgcgcc cagagggcgtgccggccagcggcggggggcgagtg cacacgagggggctggacttcgcctgtgat (配 列番号 13)
膜貫通 ドメイン (抗 CD19 CAR アーム 内)	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (配列番号 6)	Atctacatctgggcgcccttggccgggacttgtgg ggtccttctcctgtcaactggttatcaccccttact gc (配列番号 17)
4-1BB (抗 CD19 CAR アーム 内)	KRGRKLLLYIFKQPFMRPVQTTQEED GCSCRFPPEEEGGCEL (配列番号 7)	Aaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaa acaaccatttatgagaccagtacaaactactcaag aggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaa gaagaaggaggatgtgaactg (配列番号 18)
CD3ζ (抗 CD19 CAR アーム 内)	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQUALPPR (配列番号 10)	Agagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgc gtaccagcagggccagaaccagctctataacgagc tcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttg gacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggg aaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgt acaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcc tacagtgagattgggatgaaaggcgagcgggag gggcaaggggcacgatggcctttaccaggggtctca gtacagccaccaaggacacctaagcgccttcac atgcaggccctgccccctcgc (配列番号 21)

10

20

【 0 4 5 1】

30

40

50

【表 6 9】

<p>RIG5-P2A- duCD19.1</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLL ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARREWGWESWLF YWGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGG SGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSISSYLNWYQKPKAPKL LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF TITISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTF GQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD FACDIYIWAPLAGTFCGVLLLSLVIT LYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQ EEDGCSCRFP EEEEGGCEL RVKFS RSADAPAYQQGQNQLYNELNLRRE EYDVLDKRRGRDP EGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGHDLGQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR (配列番号 214)</p>	<p>atggccctccctgtcaaccgcccctgctgcttccgct ggctcttctgctccaacgcccctcgcccgaagtgc agttgctggagtcaggcggaggactgggacagccc ggaggatcgcttcgcttgagctgctgcagcctcagg ctttaccttctcctcctacgccatgtcctgggtca gacaggctcccgggaagggaactggaatgggtgtcc gccattagcgggtccggcgggaagcacttactatgc cgactctgtgaaggccgcttcactatctcccggg acaactccaagaaaccctgtatctccaaatgaat tcocctgagggccgaagataaccgctgtactactg cgctagacgggagtggtggggagaaagctggctgt tcgactactgggacagggaactctcgtgactgtg tcctccggtggtggatcggggggtgggttc ggcggaggaggatctggaggagggtcggaca ttcaaatgactcagtcctccctcctcctccgccc tcogtgggagatcgctcagatcagctgcagggc cagccagagcatctccagctaccgaaactggtacc agcagaagccagggaaggcaccgaagctcctgatc taagcctgtagctcgtgcagtcgggctcccttc acggttctcgggatcgggctcaggcaaccgacttca ccctgaccattagcagcctgcagcgggaggacttc ggacatactactgtcagcagtcatactccacccc cttgaccttcggccaagggaaccaagtggagatca agaccactaccagcaccgaggccaaccacccc gctcctaccatcgctcccagcctctgtccctgct tcggaggcaatgtagaccgcagctgggtggggccg tgataaccgggtcttgacttcgctgcgatatc tacatttggcccctctgctggtacttgggggt cctgctgcttcaactcgtgatcactcttactgta agcgggtcggagaagctgctgtacatctttaag caacccttcatgagcctgtgcagactactcaaga ggaggacggctgttcattgcgggttcccagaggagg aggaaggcggctgcgaactgcgctgaaattcagc cgcagcgcagatgctccagcctaccagcggggca gaaccagcttacaacgaactcaatcttggctgga gagaggagtacgactgctggacaagcgggagagga cgggaccagaaatgggcccgaagcgcgagaaa gaatcccaagaggcctgtacaacgagctccaaa aggataagatggcagaagcctatagcgagattggt atgaaaggggaacgcagaagaggcaaggccacga</p>
-------------------------------	---	--

10

20

30

【 0 4 5 2 】

40

50

【表 7 0】

	<p> cggactgtaccagggactcagcaccgccaccaagg acacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccc cctcggggaagcggagctactaacttcagcctgct <u>gaagcaggctggagacgtggaggagaacccctggac</u> <u>ctatggccttaccagtgaccgccttgcctcctgccc</u> ctggccttgcctcaccgcgccaggccggaaat tgtgatgaccagtcacccgccactcttagccttt caccgggtgagcgcgaaccctgtcttgcagagcc tcccagacatctcaaaataccttaattggtatca acagaagcccggacaggetcctgccttctgatct accacaccagccggctocattctggaatccctgccc aggttcagcggtagcggatctgggaccgactacac cctcactatcagctcactgcagccagaggacttgc ctgtctatcttctgtcagcaagggaaacccctgccc tacacctttggacagggcaccagctcgagattaa aggtggaggtggcagcggaggaggtgggtccggcg gtggaggaagccaggctccaactccaagaaagcggg ccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcact gacttctaactgtgagcggagtgtctctcccatt acggggtgtcttggatcagacagccaccggggaag ggtctggaatggattggagtgtttgggctctga gactacttactaccaatcatccctcaagtcacggc tcacctctcaaggacaactctaaagaatcagggtg tcaactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacac cgccgtgtaactattgcgctaagcattactattatg gcccggactacgcaatggattactggggacaggggt actctggtcaccgtgtccagcaccacgaagccagc gccggaaccaacaaccggcgccaccatcgcgt cgcagccctgtccctgcgccagaggcgtgcccg ccagcggcggggggcgcagtgcaacaggggggct ggacttcgcctgtgatctacatctggggccct tggccgggacttgtgggtccttctcctgtcactg gttatcacccttactgcaaaccgggcagaaagaa actcctgtatataatcaaacaccatttatgagac cagtacaaactactcaagaggaagatggctgtgac tgccgatttccagaagaagaagaaggaggatgtga actgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgcc ccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataac gagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgt tttggacaagagacgtggccgggaccctgagatgg gggaaagccgagaaggaagaacccctcaggaagcc ctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggg ggcctacagt.gagattgggatgaaaggcagagcgc ggagggggcaaggggacagatggcctttaccaggggt ctcagtaagccaccaaggacacctacgacgcct tcacatgcaggccctgcccctcgc (配列番号 215) </p>
--	---

10

20

30

【 0 4 5 3】

40

50

【表 7 1】

<p>PI61-P2A- duCD19.1</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQ ESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS YGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSN KYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCGSGYALHDDYYG LDVWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSGG GGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCT GTSSDVGGINYSWYQQHPGKAPKLM IYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASL TISGLQAEDEADYYCSSYTSSTLYV FGSGTKVTVLTTTPAPRPPTPAPTIA SQPLSLRPEACRPAAGAVHTRGLDF ACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY CKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE DGCSCRFPEEEEGCELRVKFSRSAD APAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE LQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGD GLYQGLSTATKDYDALHMQALPPRG SGATNFSLLKQAGDVEENPGPMALPV TALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPAT LSLSPGERATLSCRASQDISKYLWY QQKPGQAPRLLIYHTRSLHSGIPARF SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFC QQGNTLPHYTFGQTKLEIKGGGSGG GGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETL SLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKG LEWIGVIWGSETTYQSSLSKSRVTIS KDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCA KHYYYGGSYAMDYWGQGTLLVTVSST TPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACR PAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAG TCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIF KQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE GGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLY NELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGG KPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSE IGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKD TYDALHMQALPPR (配列番号 216)</p>	<p>atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgct ggctcttctgctccaagccgctcggcccaagtgc agctgcaggaatccggtggcggagtcgtgcagcct ggaaggagcctgagactctcatgocccgctcagg gttoaccttttctctactacgggatgcatgggtca gacaggcccccgaaaggactcgaatgggtggct gtgatcagctacgacggctccaacaagtaactcgc cgactccgtgaaaggccggttcaactatctcccggg acaactccaagaacacgctgtatctgcaaatgaat tcactgcgcgcgaggataaccgctgtgtaactactg cgggtggctccggttacgccctgcaagatgactatt acggccttgacgtctggggccagggaacctcgtg actgtgtccagcgggtggaggaggtcggggcggagg aggatcaggaggggggtggatcgcagagcgcactga ctcagccggcatccgtgtccggtagccccggacag tcgattaccatctcctgtaccggcaccctcccca cgtgggagggtacaactacgtgtcgtgggtaccagc agcaccaggaaaggcccctaagttgatgatctac gatgtgtcaaaccgcccgtctggagtctccaaccg gttctccggctccaagtccggcaaccaccgcccagcc tgaccattagcgggctgcaagccgaggatgaggcc gactactactgctcgagctacacatcctcgagcac cctctacgtgtcggctcggggactaagggtcaccg tgtgaccactaccaccagcaccgagggcaccacc ccggctcctaccatcgccctcccagcctctgtccct gogtccggagcagctgtagaccgcagctgggtgggg ccgtgcatacccggggtcttgactcgcctgcgat atctacatttgggcccctctggctggtaacttgcgg ggctcctgctgcttcaactcgtgatcaactcttact gtaagcgcggtcggagaagctgctgtacatcttt aagcaaccttcatgaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttcatgcccgttcccagagg aggaggaaggcggctgccaactgocgtgaaattc agcgcagcgcagatgctccagcctaccagcaggg gcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtc ggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggaga ggacgggaccagaaaatgggcgggaagccgcgag aaagaatccccagaggccctgtacaacgagctcc aaaaggataagatggcagaagcctatagcagatt ggatgaaaggggaacgcagaagaggcaaggcca</p>
-------------------------------	---	--

10

20

30

40

50

【 0 4 5 4 】

【表 7 2】

	<p> ogaaggactgtaccagggactcagcaaccgccacca aggacacctatgacgctcttccatgcaggccctg ccgctcggggaaggagctactaacttcagcct <u>gctgaagcaggctggagacgtggaggagaaccctg</u> <u>gaacctatggccttaaccagtgaccgcttgcctctg</u> ccgctggccttgcctgctccaagccagggccgga aattgtgatgaccagtcaccgccaactcttagcc tttcaccgggtgagcgcgcaaccctgtcttgcaga gcctcccaagacatctcaaaataccttaattggta tcaacagaagcccggaaggctcctcgcttctga tctaccacaccagccggctccattctggaatccct gccaggttcagcggtagcggatctgggaccgacta caccctcactatcagctcactgcagccagaggact tcgctgtctatctctgtcagcaagggaacaccctg ccctacaccttggacagggcaccagctcgagat taaaggtggaggtggcagcggaggaggtgggtccg gcggtggaggaaagccaggtccaactccaagaaagc ggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttc actgacttgtactgtgagcggagtgtctctccccg attacggggtgtcttggatcagacagccaccgggg aagggtctggaatggattggagtgatttggggctc tgagactacttactaccaatcatccctcaagtcac gcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcag gtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccga caaccgggtgactattgcgctaagcattactatt atggcgggagctacgcaatggattactggggacag ggtaactctgggtcaaccgtgtccagcaccacgacgc agcgcgcgaccaccaacaccggcgcaccatcg cgtcgcagccctgtccctgcgcccagaggcgtgc cggccagcggcggggggcgcagtgcaacgagggg gctggacttcgctgtgatctacatctggggcgc ccttggccgggacttgtgggtccttctctgtca ctggttatcacctttactgcaaacggggcagaaa gaaactcctgtatataattcaacaaccatttatga gaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgt agctgccgatttccagaagaagaagaaggaggatg tgaactgagagtgaagttcagcaggagcgcagacg cccccggtaccagcagggccagaaccagctctat aacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacga tgttttggacaagagacgtggccgggaccctgaga tgggggaaagccgagaaggaaagaaaccctcaggaa ggctgtacaatgaactgcagaaagataagatggc ggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcagc gccggaggggcaaggggcacgatggcctttaccag ggtctcagtcagccaccaaggacacctacgacgc ccttcacatgcaggccctgccccctcgc (配列番 号 217) </p>
--	--

10

20

30

【 0 4 5 5 】

40

50

【表 7 3】

<p>R1B6-P2A- duCD19.1</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLL ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS TYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARREWVPYDVS FDYWGQCTLVTVSSGGGGSGGGSGG GGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVDR VTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSDT FTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPL TFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPT ASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD FACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITL YCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQE EDGCSCRFPSEEEEGCELRVKFSRSA DAPAYQQGNQLYNELNLRREEYDV LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPP GSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMALP VTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPA TSLSPGERATLSCRASQDISKYLNW YQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPAR FSGSGSGTDYTLTISLQPEDFAVYF CQQGNTLTPYTFGQGTKLEIKGGGSG GGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSET LSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGK GLEWIGVIWGSETTYQSSSLKSRVTI SKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYC AKHYYYGGSYAMDYWGQCTLVTVSST TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC RPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLA GTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYI FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPSE EGGCELRVKFSRSADAPAYQQGNQL YNELNLRREEYDVLDRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS EIGMKGERRRGKHGGLYQGLSTATK DTYDALHMQUALPP (配列番号 218)</p>	<p>atggcctccctgtcaccgcctgtgcttccgct ggctcttctgctccacgcctcggccggaagtgc agttgctggagtcaggcggaggactggcagccc ggaggatcgcttcgcttgagctgcccagcctcagg ctttaccttctcctcctacgccatgtcctgggtca gacaggctcccgggaagggaactggaatgggtgtcc gccattagcggttccggcgggaagcacttactatgc cgactctgtgaaggccgcttccactatctcccggg acaactccaagaacaccctgtatctccaaatgaat tccttgagggcogaagataccgcggtgtactactg cgctagacgggagtggtgcccactacgatgtcagct ggtaactcgcactactggggacagggcactctcgtg actgtgtcctccggtgggtggatcgggggggtg tggttcggggcggaggaggatctggaggaggagggt cggacattcaaatgactcagtcctccctcctcctc tccgcctccgtgggagatcgcgtcagatcagctg cagggccagccagagcatctccagctacctgaact ggtaaccagcagaagccagggaaggcaccgaagctc ctgatctacgcctcagctcagctcagctccggcgt ccttcacgggttcctgggatcgggctcaggcaccg acttaccctgaccattagcagcctgcagccggag gacttcgcgacatactactgtcagcagtcatactc caccctctgacctcggccaagggacaaagtgg agatcaagaccactacccagcaccgaggccacc accccggtcctaccatcgcctcccagcctctgtc cctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctgggtg gggcggtgcatacccggggtcttgacttcgectgc gatatactacatttgggcccctctggctggtaactg cggggtcctgctgcttccactcgtgatcactctt actgtaagcgcggtcggagaagctgctgtacatc ttaaagcaaccctcatgaggcctgtgcagactac tcaagaggaggacgctgttcatgccggttcccag aggaggaggaaaggcgtgcgaactgcgctgaaa tccagccgagcgcagatgctccagcctaaccagca ggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttg gtcggagagaggagtagcagcgtgctggacaagcgg agaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcg cagaaagaatcccaaggggcctgtacaacgagc tccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgag attggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaagg</p>
-------------------------------	---	--

10

20

30

40

50

【 0 4 5 6】

【表 7 4】

	<p>ccaagacggactgtaccagggactcagcaaccgcca ccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggcc ctgcccctcgggaagcggagctactaacttcag <u>cctgctgaagcaggctggagacgtggaggagaacc</u> <u>ctggacctatggccttaccagtgaccgcttggctc</u> ctgcccctggccttggctgctccacgcgcagcc ggaaattgtgatgaccagtcacccgccactctta gcctttcaccggtgagcgcgcaaccctgtcttgc agagcctccaagacatctcaaaataccttaattg gtatcaacagaagccggacaggctcctcgccttc tgatctaccacaccagccgctccattctggaatc cctgccaggltcagcggtagcggatctgggaccga ctacaccctcactatcagctcactgcagccagagg acttcgctgtctatttctgtcagcaagggaacc ctgcctacaccttggacagggcaaccaagctcga gattaaaggtggaggtggcagcggaggaggtgggt ccggcggtagggaagccaggctccaactccaagaa agcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactct ttcactgacttgtactgtgagcggagtgctctcc cggattacgggtgtcttggatcagacagccaccg gggaaggtctggaatggattggagtgatttgggg ctctgagactacttactaccaatcatccctcaagt cacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaat caggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagc cgacaccgcctgtactattgcgctaagcattact attatggcgggagctacgcaatggattactgggga cagggtagctctggtcaccgtgtccagcaccacgac gccagcgcgcgcgaccaccaacaccggcgcaccaca tcgctgcagcccctgtccctgcgcccagaggcg tgccggccagcggcggggggcgagtgccacacgag ggggctggacttcgctgtgatctacatctggg cgcccttggcgggacttgtggggctctctcctg tcactggttatcaccccttactgcaaacggggcag aaagaaactcctgtatatattcaaacaccattta tgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggc tgtagctgcgatttccagaagaagaaggagg atgtgaactgagagtgaagttcagcaggagcgcag acgccccgcgtaccagcagggccagaaccagctc tataacgagctcaatctaggacgaagagaggagta cgatgttttggacaagagacgtggccgggaccctg agatggggggaagccgagaaggaagaaccctcag gaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagat ggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcg agcgcggaggggcaaggggacgatggcctttac cagggctctcagtcagccaccaaggacacctacga cgcccttcacatgcaggccctgccccctcgc (配 列番号 219)</p>
--	---

10

20

30

40

50

【 0 4 5 7 】

【表 7 5】

<p>duBCMA.4- P2A- duCD19.1</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLV ESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSN HGMSWVRRAPGKGLEWVSGIVYSGST YYAASVKGRFTISRDNSENRLYLQMN SLRPEDTAIYYCSAHGGESDVWQGT TVTSSASGGGGGGGGGGGGSDIQ LTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSI SSYLNWYQQKPKGAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGGTDFLTISSLQPE DFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKVEIK TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA CRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPL AGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLY IFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE EEGCCELRVKFSRSADAPAYQQGNQ LYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY SEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTAT KDYDALHMQUALPPRGSGATNFSLLK QAGDVEENPGPMALPVTALLLPLALL LHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQDISKYLWYQQKPGQAPRL LIYHTSRLHSGIPARFSGSGGTDTYT LTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTF GQGTKLEIKGGGGGGGGGGGGQV QLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVS LPDYGVSWIRQPPGKLEWIGVIWGS ETYYQSSSLKSRVTISKDNSKNQVSL KLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYA MDYWCQGTTLTVSSTTPAPRPPTPA PTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLV ITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCCELRVKFS RSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGDGLYQGLSTATKDYDALHMQUAL PPR (配列番号 220)</p>	<p>atggcctccctgtcaaccgacctgtgcttccgct ggctcttctgctccacgacctcgccccaagtgc aattgggtggaatcagggggaggacttctgagacct ggaggatcgctgagactgtcatgtgccgtgtccgg ctttgccclgtccaaccacgggatgtcctgggtcc gcgcgcgcctggaaagggcctcgaatgggtgtcg ggattgtgtacagcggtagcacctactatgccgc atccgtgaaggggagattcaccatcagccgggaca actccaggaacactctgtacctccaaatgaattcg ctgaggccagaggacctgccatctactactgtc cgcgcatggcggagagtccgacctctggggacagg ggaccaacctgacctgtctagcgcgtccggcgga ggcgcagcgggtgggtggttcagggggggcg atcggacatccagctcaccagctcccagctcgc tgtccgcctcctgggagatcgggtcaccatcag tgccgcgcagccagctcgatttccctcctacctgaa ctggtaaccaacagaagcccgaaaagccccgaagc ttctcatctacgcccctcgagcctgcagtcagga gtgccctcacggttctccggctccggttccggta tgatttcacctgaccttctcctcctgcaaccgg aggacttcgctacttactactgcccagctcgtac tccccccctacactttcggacaaggcaccagggt cgaaatcaagaccactaaccagcaccagggccac cccccccgctcctaccatcgccctcccagcctctg tccttgcgtccggaggcatgtagaccgcagctgg tggggcgtgcatacccggggtcttgacttgcct gcgatctctacatttgggcccctctggctggctact tgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactct ttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtaca tctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagact actcaagaggaggacggctgttcatgcccgttccc agaggaggaggaaaggcgtgcaactgcgcgtga aattcagcgcagcgcagatgtccagcctaccag caggggcagaaccagctctacaacgaactcaatct tggtcggagagaggagtaagcgtgtggacaagc ggagaggacgggaccagaaatggcggggaagccg cgcagaaagaatcccaagagggctgtacaacga gctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcg agattggatgaaaggggaacgcagaagaggcaaa ggccaacgacggactgtaccagggactcagcaccgc</p>
--	---	--

10

20

30

40

50

【 0 4 5 8 】

【表 7 6】

	<p>caccaaggacacclatgacgctcctcacatgcagg cctgcccgcctcgggaagcggagctactaacttc agcctgctgaagcaggctggagacgtggaggagaa cctggacclatggccttaccagtgaccgccttgc tctgcccgcctggccttgcctgctccacgcgccagg ccggaaattgtgatgaccagtcacccgccactct tagcctttcacccggtgagcgcgcaaccctgtctt gcagagcctcccaagacatctcaaaataccttaat tggatcaacagaagcccggacaggctcctcgcct tctgatctaccacaccagccggctccattctggaa tcctgcccaggttcagcggtagcggatctgggacc gactacaccctcactatcagctcactgcagccaga ggacttcgctgtctatctgtcagcaagggaaca ccctgcctacaccttggacagggcaccaagctc gagattaaaggtggaggtggcagcggaggaggtgg gtccggcgggtggaggaagccaggtccaactccaag aaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaact ctttcactgacttgaactgtgagcggagtgctct ccccgattacggggtgtcttggatcagacagccac cggggaagggtctggaatggattggagtgatttgg ggctctgagactacttactaccaatcatccctcaa gtcacgcgtcacclatctcaaaggacaactotaaga atcaggtgtcactgaaactgtcactctgtgaccgca gccgacaccgcctgtactattggcctaagcatta ctattatggcgggagctacgcaatggattactggg gacaggttactctggtcaccgtgtccagcaccacg accgccagcgcgcgcaaccaccaaccggcgcacc catcgcctgcagcccctgtccctgcgcccagagg cgtgcccggccagcggcggggggcgcagtgccacacg agggggctggacttcgcctgtgatctacatctg ggcgccttggccgggacttgtggggtccttctcc tgtcactggttatcaccccttactgcaaacggggc agaaagaactcctgtatatattcaaacaccatt tatgagaccagtaaaaactactcaagaggaagatg gctgtagctgccgatttcagaagaagaagaagga ggatgtgaactgagagtgaagttcagcaggagcgc agacgccccgcgtaccagcagggccagaaccagc tctataacgagctcaatctaggacgaagagaggag tacgatgttttggacaagagacgtggccgggacc tgagatggggggaaagccgagagaaggaaccctc aggaaggcctgtcaatgaactgcagaaagataag atggcggaggcctacagtgagattgggatgaaagg cgagcgcggaggggcaaggggcaagatggcctt accaggtctcagtcagccaccaaggacacclac gacgccttccatgcagccctgccccctcgc (配列番号 221)</p>
--	---

10

20

30

40

50

【 0 4 5 9 】

【表 7 7】

<p>duCD19.1- P2A- duBCMA.4</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMT QSPATLSLSLSPGERATLSCRASQDISK YLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSG IPARFSGSGSSTDYTLTISSLQPEDF AVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGG GSGGGGGSGGGCSQVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQ PPGKGLEWIGVIWGSETTYQSSSLKS RVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTA VYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLVF VSTTTTPAPRPPTPAFTIASQPLSLR PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIW APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKK LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF PEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQG QNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMA EAYSEIGMKGERRRGKGHGDLGQGLS TATKDTYDALHMQALPPRGSGATNFS LLKQAGDVEENPGPMALPVTALLLPL ALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGK GLEWVSGIVYSGSTYYAASVKGRFTI SRDNSRNTLYLQMNSLRPEDTAIYYC SAHGGESDVWGQGTVTVTVSSASGGGG SGGGSGGGGSDIQLTQSPSSLSASV GDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYS TPYTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPA FTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLV ITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT TQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFS RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGHGDLGQGLSTATKDTYDALHMQAL PPR (配列番号 222)</p>	<p>atggcettaccagtgaccgccttgctcctgcccgt ggccttgctgctccacgccgccaggccggaattg tgatgaccagtcacccgccactcttagcctttca ccoggtgagcgcgcaacctgtcttgagagcctc coaagacatctcaaaataccttaattggatcaac agaagcccggacaggctcctcgcctctgatctac cacaccagccggctccattctggaatccctgccag gttcagcggtagcggatctgggaccgactacacc tactatcagctcactgcagccagaggacttcgct gtctatctctgtcagcaaggggaacacctgacct cacctttggacagggaaccaagctcgagattaag gtggagggtggcagcggagggtgggtccggcggt ggaggaagccagggtccaactccaagaaagcggacc gggtcttgtagaacatcagaaactcttctactga ctgtactgtgagcggagtgctctccccgattac gggggtgtcttggatcagacagccaccggggaagg tctggaatggattggagtgatttggggctctgaga ctaactactaccaatcatccctcaagtcacgcgtc accatctcaaaggacaactcaagaatcagggtgc actgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccg ccgtgtactattgcgctaagcattaactattatggc gggagctacgcaatggattactgggacaggggtac tctggtcaccgtgtccagcaccacgacccagcgc cgcgaccaccaacaccggcgcccaccatcgcgtg cagcccctgtccctgcgccagaggcgtgccggcc agcggcggggggcgcagtgccacagagggggctgg acttcgctgtgatctacatctggcgcccttg gcgggacttgggggtccttctcctgtcaotggt tatcaccctttactgcaaaccggggcagaaagaaac tctgtatatattcaaacaccatttatgagacca gtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctg ccgatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaac tgagagtgagttcagcaggagcgcagacgcccc ggtaccagcaggccagaaccagctctataacga gctcaatctaggacgaagagaggatcagatgttt tgacaagagacgtggcgggaccctgagatgggg ggaaagccgagaaggagaaccctcaggaaggcct gtacaatgaactgcagaaagataagatggcgagg cctacagtgagattgggatgaaaggcagcgcgg aggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtct</p>
--	--	--

10

20

30

40

50

【 0 4 6 0 】

【表 7 8】

	<p>cagtacagccaccaaggacacctaagcagccctc acatgcaggccctgccccctcgcggaagcggagct <u>actaacttcagcctgctgaagcaggctggagacgt</u> <u>ggaggagaaccctggacctatggccctccctgtca</u> ccgccctgctgcttcgctggctcttctgctccac gocgctcggcccgaagtgcaattggtggaatcagg gggaggacttgtcagcctggaggatcgctgagac tgtcatgtgocgtgtccgctttgcccctgtccaac caocgggatgtcctgggtccgcccgcgcctggaaa ggccctcgaatgggtgtcgggtattgtgtacagcg gtagcacctactatgccgcacccgtgaaggggaga ttaccatcagccgggacaactccaggaacactct gtacctccaaatgaattcgctgaggccagaggaca ctgccatctactactgctccgcgcacggcgagag tccgacgtctggggacaggggaccaccgtgaccgt gtctagcgcgtccggcggaggcgcagcgggggtg gtggttcaggggcggcggtatggacatccagctc accagtcccagcctcgtgtccgctccgtggg agatcgggtcaccatcacgtgcgcgcagccagt cgatttctcctacctgaactggtaccaacagaag cccggaaaagcccgaagcttctcatctacgcgc ctcagaccctgcagtcaggagtgcctccaggttct ccggctccggtccggctactgatllcaccctgacc atctcctccctgcaaccggaggacttcgctactta ctactgccagcagtcgtactccaccccctacactt tcggacaaggcaccaggctcgaatcaagaccact accccagcaccgaggccaccccacccggctcctac catcgcctcccagcctctgtccctcgtccggagg catgtagaccgcagctggtggggcogtgcatacc cggggtcttgacttcgctcgcgatatctacattg ggccctctggtcgtacttcggggctcctgctgc tttactcgtgatcactctttactgtaagcgcggt cggagaagctgctgtacatctttaagcaaccctt catgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacg gctgttcatgcgggttcccagaggaggaggaaggc ggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgc agatgctccagcctaccagcaggggcagaaccagc tctacaacgaactcaatcttggctcggagagaggag taogacgtgctggacaagcggagaggacgggaacc agaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccc aagaggcctgtacaacgagctccaaaaggataag atggcagaagcctatagcagattggtatgaaagg ggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgt accagggaactcagcaccgccaccaaggacacctat gacgctcttcacatgcaggccctgcgcgcctcgg (配列番号 223)</p>
--	--

10

20

30

【 0 4 6 1】

40

50

【表 7 9】

RIG5-P2A- duCD19.1 から 得られる予測 タンパク質	<p>抗 BCMA CAR アーム: EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG ETFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARREWWGE SWLFDYWGGTLVTVSSGGGGSGGGG SGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASV GDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYS TPLTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPA PTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLV ITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQT TQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFS RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL PFRGSGATNFSLLKQAGDVEENPG (配列番号 224)</p>		10
	<p>抗 CD19 CAR アーム: EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QDISKYNWYQQKPGQAPRLLIYHTS RLHSGIPARFSGSGGTDTYTLTISL QPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKL EIKGGGSGGGSGGGGSQVQLQESG PGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGV SWIRQPPGKLEWIGVIWGSETYYQ SSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVT AADTAVYYCAKHYYGGSYAMDYWGQ GTLVTVSSTTPAPRPPTPAPTIASQ PLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCK RGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAP AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGL YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (配列番号 225)</p>		20
			30
			40
			50

【 0 4 6 2 】

【表 8 0】

PI61-P2A- duCD19.1 から 得られる予測 タンパク質	抗 BCMA CAR アーム: QVQLQESGGGVVQPGRSLRLSCAASG FTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIS YDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLR AEDTAVYYCGGSGYALH DDYYGLDVWGQGLVTVSSGGGGSGG GSGGGGSQSALTQPASVSGSPGQSI TISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGK APKLMIDVSNRPSGVSNRFGSKSG NTASLTISGLQAEDEADYICSSYTSS STLYVFGSGTKVTVLTTTPAPRPPTP APTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSL VITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQ TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKF SRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA LPPRSGATNFSLLKQAGDVEENPG (配列番号 226)		10
	抗 CD19 CAR アーム: EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTS RLHSGIPARFSGSGSDYTLTISSL QPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKL EIKGGGGSGGGSGGGGSQVQLQESG PGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGV SWIRQPPGKLEWIGVIWGSETTYIQ SSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVT AADTAVYYCAKHYYGGSYAMDYWGQ GTLTVSSTTTTPAPRPPTPAPTIASQ PLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCK RGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAP AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLK RRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGL YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (配列番号 225)		20
			30

【 0 4 6 3】

40

50

【表 8 1】

R1B6-P2A- duCD19.1 から 得られる予測 タンパク質	抗 BCMA CAR アーム: EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARREWVPY DVSWYFDYWGQGLVTVSSGGGGSGG GSGGGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSA SVGDRVTTICRASQSISSYLNWYQQK PGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQS YSTPLTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPT PAFTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH TRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLS LVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPV QTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVK FSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPRSGGATNFSLLKQAGDVEENPG (配列番号 227)		10
	抗 CD19 CAR アーム: EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QDISKYLWYQQKPGQAPRLLIYHTS RLHSGIPARFSGSGGTDTLTISSL QPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKL EIKGGGGSGGGSGGGGSQVQLQESG PGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGV SWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYQ SSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVT AADTAVYYCAKHYYGGSYAMDYWGQ GTLVTVSSTTTTPAPRPPTPAFTIASQ PLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC DIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCK RGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAP AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGL YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (配列番号 225)		20
			30

【 0 4 6 4 】

40

50

【表 8 2】

<p>duBCMA.4-P2A- duCD19.1 から 得られる予測 タンパク質</p>	<p>抗 BCMA CAR アーム: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSG FALSNHGMSWVRRAPGKGLEWVSGIV YSGSTYYAASVKGRFTISRDNSTL YLMNSLRPEDTAIYYCSAHGGESDV WGQGTTVTVSSASGGGGSGGGSGGG GSDIQLTQSPSSLSASVGDRTITCR ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGT KVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY IWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGR KLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC RFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQ QQQNQLYNELNLRREEYDVLDRRG RDPFEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGYQG LSTATKDTYDALHMQALPPRSGATN FSLLKQAGDVEENPG (配列番号 228)</p>	10
	<p>抗 CD19 CAR アーム: EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QDISKYLWYQQKPGQAPRLLIYHTS RLHSGIPARFSGSGSDYTLTISSL QPEDFAVYFCQQNTLPYTFGQGTKL EIKGGGSGGGSGGGGQVQLQESG PGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGV SWIRQPPGKLEWIGVIWGSETTYQ SSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVT AADTAVYYCAKHYYGGSYAMDYWGQ GTLVTVSSTTPAPRPPTPAPTIASQ PLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCK RGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAP AYQQQNQLYNELNLRREEYDVLDR RRGRDPFEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDL YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (配列番号 225)</p>	20
		30

【 0 4 6 5 】

40

50

【表 8 3】

duCD19.1-P2A-duBCMA.4から得られる予測タンパク質	抗 CD19 CAR アーム: EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTS RLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSL QPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKL EIKGGGSGGGGSGGGGSSQVQLQESG PGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGV SWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETYYQ SSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVT AADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQ GTLVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQ PLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCK RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAP AYQQGNQLYNELNLRREEYDVLDK RRGRDPFMGGKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGDL YQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSG ATNFSLLKQAGDVEENPG (配列番 号 229)		10
	抗 BCMA CAR アーム: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSG FALSNHGMSWVRRAPGKGLEWVSGIV YSGSTYYAASVKGRFTISRDNRNLT YLQMNSLRPEDTAIYYCSAHGGESDV WGQGTITVTVSSASGGGGSGGGGSGGG GSDIQLTQSPSSLSASVGDRTITCR ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGT KVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY IWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGR KLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC RFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQ QGNQLYNELNLRREEYDVLDRRG RDPFMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHGDL YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (配列 番号 230)		20
			30
			40
			50

【 0 4 6 6 】

【表 8 4】

表 22. 二重 CAR の例示的な成分のアミノ酸配列

配列番号	名称/説明	配列
PI61		
配列番号 86	HCDR1 (Kabat)	SYGMH
配列番号 87	HCDR2 (Kabat)	VISYDGSNKYYADSVKG
配列番号 88	HCDR3 (Kabat)	SGYALHDDYYGLDV
配列番号 47	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSY
配列番号 89	HCDR2 (Chothia)	SYDGSN
配列番号 88	HCDR3 (Chothia)	SGYALHDDYYGLDV
配列番号 90	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSYG
配列番号 91	HCDR2 (IMGT)	ISYDGSNK
配列番号 92	HCDR3 (IMGT)	GGSGYALHDDYYGLDV
配列番号 93	VH	QVQLQESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWV AVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCG GSGYALHDDYYGLDVWGQGLVTVSS
配列番号 94	DNA VH	CAAGTGCAGCTGCAGGAATCCGGTGGCGGAGTCGTCAGCCTGGAAG GAGCCTGAGACTCTCATGCGCCGCGTCAGGGTTCACCTTTTCCTCCTAC GGGATGCATTGGGTCAGACAGGCCCGGAAAGGGACTCGAATGGGT GGCTGTGATCAGCTACGACGGCTCCAACAAGTACTACGCCGACTCCGT GAAAGGCCGGTTCATCTCCCGGACAACCTCCAAGAACACGCTGTA TCTGCAAATGAATTCAGTGCAGCGGAGGATACCGCTGTGTACTACTG CGGTGGCTCCGGTTACGCCCTGCACGATGACTATTACGGCCTTGACGT CTGGGGCCAGGGAACCCTCGTACTGTGTCCAGC
配列番号 95	LCDR1 (Kabat)	TGTSSDVGGYNYVS
配列番号 96	LCDR2 (Kabat)	DVSNRPS
配列番号 97	LCDR3 (Kabat)	SSYTSSSTLYV

10

20

30

40

50

【 0 4 6 7 】

【表 8 5】

配列番号 98	LCDR1 (Chothia)	TSSDVGGYNY	
配列番号 99	LCDR2 (Chothia)	DVS	
配列番号 100	LCDR3 (Chothia)	YTSSSTLY	
配列番号 101	LCDR1 (IMGT)	SSDVGGYNY	
配列番号 99	LCDR2 (IMGT)	DVS	
配列番号 97	LCDR3 (IMGT)	SSYTSSSTLYV	10
配列番号 102	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLM YDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYV FGSGTKVTVL	
配列番号 103	DNA VL	CAGAGCGCACTGACTCAGCCGGCATCCGTGTCCGGTAGCCCCGGACAG TCGATTACCATCTCCTGTACCGGCACCTCCTCCGACGTGGGAGGGTAC AACTACGTGTCGTGGTACCAGCAGCACCCAGGAAAGGCCCTAAGTTG ATGATCTACGATGTGTCAAACCGCCCGTCTGGAGTCTCCAACCGGTT TCCGGCTCAAAGTCCGGCAACACCGCCAGCCTGACCATTAGCGGGCTG CAAGCCGAGGATGAGGCCGACTACTACTGCTCGAGCTACACATCCTCG AGCACCTCTACGTGTTCCGGCTCGGGGACTAAGGTCACCGTGCTG	
配列番号 104	リンカー	GGGSGGGSGGGGS	
配列番号 105	scFv (VH- リンカー-VL)	QVQLQESGGGVVQGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWV AVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCG GSGYALHDDYYGLDVWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQP ASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRP SGVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYV VFGSGTKVTVL	20
配列番号 106	DNA scFv	CAAGTGCAGCTGCAGGAATCCGGTGGCGGAGTCGTCAGCCTGGAAG GAGCCTGAGACTCTCATGCGCCGCGTCAGGGTTACCTTTTCCTCCTAC GGGATGCATTGGGTCAGACAGGCCCCCGGAAAGGGACTCGAATGGGT GGCTGTGATCAGCTACGACGGCTCCAACAAGTACTACGCCGACTCCGT GAAAGGCCGGTTCATCTCCTCCGGGACAACCTCCAAGAACACGCTGTA TCTGCAAATGAATTCAGTGCAGCGGAGGATACCGCTGTGTACTACTG CGGTGGCTCCGGTTACGCCCTGCACGATGACTATTACGGCCTTGACGT CTGGGGCCAGGGAACCCTCGTACTGTGTCCAGCGGTGGAGGAGGTT GGGCGGAGGAGGATCAGGAGGGGGTGGATCGCAGAGCGCACTGACTC AGCCGGCATCCGTGTCCGGTAGCCCCGGACAGTCGATTACCATCTCCT GTACCGGCACCTCCTCCGACGTGGGAGGGTACAACACTACGTGTGCTGGT ACCAGCAGCACCCAGGAAAGGCCCTAAGTTGATGATCTACGATGTGT CAAACCGCCGTCTGGAGTCTCCAACCGGTTCTCCGGCTCCAAGTCCG GCAACACCGCCAGCCTGACCATTAGCGGGCTGCAAGCCGAGGATGAG GCCGACTACTACTGCTCGAGCTACACATCCTCGAGCACCTCTACGTG TTCGGCTCGGGGACTAAGGTCACCGTGCTG	30
R1B6			
配列番号 44	HCDR1 (Kabat)	SYAMS	
配列番号 45	HCDR2 (Kabat)	AISGSGGSTYYADSVKG	
配列番号 46	HCDR3 (Kabat)	REWVPYDVSIFYDY	40

【 0 4 6 8 】

【表 8 6】

配列番号 47	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSY	
配列番号 48	HCDR2 (Chothia)	SGSGGS	
配列番号 46	HCDR3 (Chothia)	REWVPYDVSWYFDY	
配列番号 49	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSYA	
配列番号 50	HCDR2 (IMGT)	ISGSGGST	
配列番号 51	HCDR3 (IMGT)	ARREWVPYDVSWYFDY	10
配列番号 52	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARR EWVPYDVSWYFDYWGQGLVTVSS	
配列番号 53	DNA VH	GAAGTGCAGTTGCTGGAGTCAGGCGGAGGACTGGTGCAGCCCGGAGG ATCGCTTCGCTTGAGCTGCGCAGCCTCAGGCTTTACCTTCTCCTCCTAC GCCATGTCCTGGGTGAGACAGGCTCCCGGAAGGGACTGGAAFGGGT GTCCGCCATTAGCGGTTCCGGCGGAAGCACTACTATGCCGACTCTGT GAAGGGCCGCTTCACTATCTCCCGGACAACCTCCAAGAACACCCTGTA TCTCAAATGAATTCCTGAGGGCCGAAGATACCGCGGTGTACTACTG CGCTAGACGGGAGTGGGTGCCCTACGATGTCAGCTGGTACTTCGACTA CTGGGGACAGGGCACTCTCGTGACTGTGTCCTCC	
配列番号 54	LCDR1 (Kabat)	RASQSISSYLN	20
配列番号 55	LCDR2 (Kabat)	AASSLQS	
配列番号 56	LCDR3 (Kabat)	QSYSTPLT	
配列番号 57	LCDR1 (Chothia)	SQSISSY	
配列番号 58	LCDR2 (Chothia)	AAS	
配列番号 59	LCDR3 (Chothia)	SYSTPL	
配列番号 60	LCDR1 (IMGT)	QSISSY	
配列番号 58	LCDR2 (IMGT)	AAS	30
配列番号 56	LCDR3 (IMGT)	QSYSTPLT	
配列番号 61	VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTITSSLPEDFATYYCQSYSTPLTFGQGTK VEIK	
配列番号 62	DNA VL	GACATTCAAATGACTCAGTCCCCGTCCTCCCTCCTCCGCTCCGTGGGA GATCGCGTCACGATCACGTGCAGGGCCAGCCAGAGCATCTCCAGCTAC CTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGGAAGGCACCGAAGCTCCTGAT CTACGCCGCTAGCTCGCTGCAGTCCGGCGTCCCTTCACGGTTCTCGGG ATCGGGCTCAGGCACCGACTTCACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCC GGAGGACTTCGCGACATACTACTGTGACGAGTCATACTCCACCCCTCT GACCTTCGGCCAAGGGACCAAAGTGGAGATCAAG	40

【 0 4 6 9 】

【表 8 7】

配列番号 63	リンカー	GGGSGGGGSGGGGSGGGGS	
配列番号 64	scFv (VH- リンカー-VL)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARR EWVVPYDVSWYFDYWGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTTCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYYCQSYSTPLTFGQGTKVEI K	
配列番号 65	DNA scFv	GAAGTGCAGTTGCTGGAGTCAGGCGGAGGACTGGTGCAGCCCGGAGG ATCGCTTCGCTTGAGCTGCGCAGCCTCAGGCTTACCTTCTCCTCTAC GCCATGTCCTGGGTGAGACAGGCTCCCGGAAGGGACTGGAATGGGT GTCCGCCATTAGCGGTTCCGGCGGAAGCACTTACTATGCCGACTCTGT GAAGGGCCGCTTCACTATCTCCCGGACAACCTCAAGAACCCTGTA TCTCCAAATGAATCCCTGAGGGCCGAAGATACCGCGGTGTACTACTG CGCTAGACGGGAGTGGGTGCCCTACGATGTCAGCTGGTACTTTCGACTA CTGGGGACAGGGCACTCTCGTACTGTGTCTCCGGTGGTGGATC GGGGGGTGGTGGTTCGGGCGGAGGAGGATCTGGAGGAGGAGGGTTCGG ACATTCAAATGACTCAGTCCCCGTCTCCTCTCCGCCTCCGTGGGAG ATCGCGTCACGATCACGTGCAGGGCCAGCCAGAGCATCTCCAGTACC TGAAGTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAGGCACCGAAGCTCCTGATC TACGCCGCTAGCTCGTGCAGTCCGGCGTCCCTTACGGTTCTCGGGA TCGGGCTCAGGCACCGACTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCCG GAGGACTTCGCGACATACTACTGTCAGCAGTCATACTCCACCCTCTG ACCTTCGGCCAAGGGACCAAAGTGGAGATCAAG	10
RIG5			
配列番号 44	HCDR1 (Kabat)	SYAMS	20
配列番号 45	HCDR2 (Kabat)	AISGSGGSTYYADSVKGR	
配列番号 76	HCDR3 (Kabat)	REWWGESWLFDY	
配列番号 47	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSY	
配列番号 48	HCDR2 (Chothia)	SGSGGS	
配列番号 76	HCDR3 (Chothia)	REWWGESWLFDY	
配列番号 49	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSYA	
配列番号 50	HCDR2 (IMGT)	ISGSGGST	30
配列番号 77	HCDR3 (IMGT)	ARREWWGESWLFDY	
配列番号 78	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARR EWWGESWLFDYWGQGLVTVSS	
配列番号 79	DNA VH	GAAGTGCAGTTGCTGGAGTCAGGCGGAGGACTGGTGCAGCCCGGAGG ATCGCTTCGCTTGAGCTGCGCAGCCTCAGGCTTACCTTCTCCTCTAC GCCATGTCCTGGGTGAGACAGGCTCCCGGAAGGGACTGGAATGGGT GTCCGCCATTAGCGGTTCCGGCGGAAGCACTTACTATGCCGACTCTGT GAAGGGCCGCTTCACTATCTCCCGGACAACCTCAAGAACCCTGTA TCTCCAAATGAATCCCTGAGGGCCGAAGATACCGCGGTGTACTACTG CGCTAGACGGGAGTGGTGGGGAGAAAGCTGGCTGTTTCGACTACTGGG GACAGGGCACTCTCGTACTGTGTCTCC	40

【 0 4 7 0 】

【表 8 8】

配列番号 54	LCDR1 (Kabat)	RASQSISSYLN	
配列番号 55	LCDR2 (Kabat)	AASSLQS	
配列番号 56	LCDR3 (Kabat)	QQSYSTPLT	
配列番号 57	LCDR1 (Chothia)	SQSISSY	
配列番号 58	LCDR2 (Chothia)	AAS	
配列番号 59	LCDR3 (Chothia)	SYSTPL	10
配列番号 60	LCDR1 (IMGT)	QSISSY	
配列番号 58	LCDR2 (IMGT)	AAS	
配列番号 56	LCDR3 (IMGT)	QQSYSTPLT	
配列番号 61	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTK VEIK	
配列番号 62	DNA VL	GACATTCAAATGACTCAGTCCCCGTCCCTCCTCCGCCTCCGTGGGA GATCGCGTCACGATCACGTGCAGGGCCAGCCAGAGCATCTCCAGCTAC CTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAGGCACCGAAGCTCCTGAT CTACGCCGCTAGCTCGCTGCAGTCCGGCGTCCCTTCACGGTTCTCGGG ATCGGGCTCAGGCACCGACTTCACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCC GGAGGACTTCGCGACATACTACTGTCAGCAGTCATACTCCACCCCTCT GACCTTCGGCCAAGGGACCAAAGTGGAGATCAAG	20
配列番号 63	リンカー	GGGGSGGGSGGGSGGGGS	
配列番号 80	scFv (VH- リンカー-VL)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARR EWWGESWLFYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAASSLQS GVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEIK	
配列番号 81	DNA scFv	GAAGTGCAGTTGCTGGAGTCAGGCGGAGGACTGGTGCAGCCCGGAGG ATCGCTTCGCTTGAGCTGCGCAGCCTCAGGCTTACCTTCTCCTCTAC GCCATGTCCTGGGTCAGACAGGCTCCCGGGAAGGGACTGGAATGGGT GTCCGCCATTAGCGGTTCCGGCGGAAGCACTTACTATGCCGACTCTGT GAAGGGCCGCTTACTATCTCCCGGGAAGGACTCCAAGAACACCCTGTA TCTCCAAATGAATCCCTGAGGGCCGAAGATACCGCGGTGTACTACTG CGCTAGACGGGAGTGGTGGGGAGAAAGCTGGCTGTTCGACTACTGGG GACAGGGCACTCTCGTACTGTGTCCTCCGGTGGTGGTGGATCGGGGG GTGGTGGTTCGGGCGGAGGAGGATCTGGAGGAGGAGGGTCCGACATT CAAATGACTCAGTCCCCGTCCCTCCTCCTCCGCCTCCGTGGGAGATCGC GTCACGATCACGTGCAGGGCCAGCCAGAGCATCTCCAGCTACCTGAAC TGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAGGCACCGAAGCTCCTGATCTACGC CGCTAGCTCGCTGCAGTCCGGCGTCCCTTCACGGTTCTCGGGATCGGG CTCAGGCACCGACTTCACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAGGA CTTCGCGACATACTACTGTCAGCAGTCATACTCCACCCCTCTGACCTTC GGCCAAGGGACCAAAGTGGAGATCAAG	30
duBCMA. 4			40

【 0 4 7 1 】

【表 8 9】

配列番号 231	HCDR1 (Kabat)	NHGMS
配列番号 232	HCDR2 (Kabat)	GIVYSGSTYYAASVKG
配列番号 233	HCDR3 (Kabat)	HGGESDV
配列番号 234	HCDR1 (Chothia)	GFALSNIH
配列番号 235	HCDR2 (Chothia)	VYSGS
配列番号 233	HCDR3 (Chothia)	HGGESDV
配列番号 236	HCDR1 (IMGT)	GFALSNIHG
配列番号 237	HCDR2 (IMGT)	IVYSGST
配列番号 238	HCDR3 (IMGT)	SAHGGESDV
配列番号 239	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAIVSGFALSNIHGMSWVRRAPGKGLEWV SGIVYSGSTYYAASVKGFRFTISRDNRSRNTLYLQMNLSLRPEDTAIYYCSAHG GESDVWGGQTTVTVSS
配列番号 262	DNA VH	GAAGTGCAATTGGTGGAAATCAGGGGGAGGACTTGTGCAGCCTGGGAGG ATCGCTGAGACTGTCATGTGCCGTGTCCGGCTTTGCCCTGTCCAACCAC GGGATGTCTGGGTCCGCCGCGCCTGGAAAGGGCCTCGAATGGGT GTCGGGTATTGTGTACAGCGGTAGCACCTACTATGCCGCATCCGTGAA GGGGAGATTCACCATCAGCCGGGACAACCTCCAGGAACACTCTGTACCT CCAAATGAATTCGCTGAGGCCAGAGGACACTGCCATCTACTACTGCTC CGCGCATGGCGGAGAGTCCGACGTCTGGGGACAGGGGACCACCGTGA CCGTGTCTAGC
配列番号 54	LCDR1 (Kabat)	RASQSISSYLN
配列番号 55	LCDR2 (Kabat)	AASSLQS
配列番号 240	LCDR3 (Kabat)	QQSYSTPYT
配列番号 57	LCDR1 (Chothia)	SQSISSY
配列番号 58	LCDR2 (Chothia)	AAS
配列番号 241	LCDR3 (Chothia)	SYSTPY
配列番号 60	LCDR1 (IMGT)	QSISSY
配列番号 58	LCDR2 (IMGT)	AAS
配列番号 240	LCDR3 (IMGT)	QQSYSTPYT
配列番号 242	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDVVTITCRASQSISSYLNWYQKPKGKAPKLLIYAAS SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTK VEIK

10

20

30

40

【 0 4 7 2 】

50

【表 9 0】

配列番号 263	DNA VL	GACATCCAGCTCACCCAGTCCCCGAGCTCGCTGTCCGCTCCGTGGGA GATCGGGTCACCATCACGTGCCGCGCCAGCCAGTCGATTTCTCTCTAC CTGAACTGGTACCAACAGAAGCCCGAAAAGCCCCGAAGCTTCTCATC TACGCCGCCTCGAGCCTGCAGTCAGGAGTGCCTCACGGTTCTCCGGC TCCGGTTCCGGTACTGATTTACCCTGACCAITTTCTCCCTGCAACCGG AGGACTTCGCTACTTACTACTGCCAGCAGTCGTACTCCACCCCTACA CTTTCGGACAAGGCACCAAGGTCGAAATCAAG
配列番号 243	リンカー	ASGGGSGGGGSGGGGS
配列番号 200	scFv (VH- リンカー-VL)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGKGLEWV SGIVYSGSTYYAASVKGRFTISRDNRSNTLYLQMNSLRPEDTAIYYCSAHG GESDVGWQGTTVTVSSASGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPSSLSASVGD RVTTTCRASQSISSYLNWYQQKPKGAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQSYSTPYTFGGQGTKVEIK
配列番号 201	DNA scFv	GAAGTGCAATTGGTGGAAATCAGGGGGAGGACTTGTGCAGCCTGGAGG ATCGCTGAGACTGTCATGTGCCGTGTCCGGCTTTGCCCTGTCCAACCAC GGGATGTCTGGGTCCGCCGCGCCTGGAAGGGCCTCGAATGGGT GTCGGGTATTGTGTACAGCGGTAGCACCTACTATGCCGCATCCGTGAA GGGGAGATTACCATCAGCCGGGACAACCTCCAGGAACACTCTGTACCT CCAAATGAATTCGCTGAGGCCAGAGGACACTGCCATCTACTACTGCTC CGCGCATGGCGGAGAGTCCGACGTCTGGGGACAGGGGACCACCGTGA CCGTGTCTAGCGCGTCCGGCGGAGGCGGCAGCGGGGGTGGTGGTTCA GGGGGCGGCGGATCGGACATCCAGCTCACCCAGTCCCCGAGCTCGCTG TCCGCTCCGTGGGAGATCGGGTACCATCAGTGCCTGCCGCGCCAGCCAG TCGATTTCTCTACTGAACTGGTACCAACAGAAGCCCCGAAAAGCC CCGAAGCTTCTCATCTACGCCCTCGAGCCTGCAGTCAGGAGTGCC TCACGGTTCCTCCGCTCCGGTTCGGTACTGATTTACCCTGACCATTT CCTCCCTGCAACCGGAGGACTTCGCTACTTACTACTGCCAGCAGTCGT ACTCCACCCCTACACTTTCGGACAAGGCACCAAGGTCGAAATCAAG
duCD19.1		
配列番号 244	HCDR1	GVSLPDYGV
配列番号 245	HCDR2	VIWGSETTYQSSLKS
配列番号 246	HCDR3	HYYYGGSYAMDY
配列番号 295	HCDR1 (Kabat)	DYGV
配列番号 245	HCDR2 (Kabat)	VIWGSETTYQSSLKS
配列番号 246	HCDR3 (Kabat)	HYYYGGSYAMDY
配列番号 310	HCDR1 (Chothia)	GVSLPDY
配列番号 311	HCDR2 (Chothia)	WGSET
配列番号 246	HCDR3 (Chothia)	HYYYGGSYAMDY
配列番号 312	HCDR1 (IMGT)	GVSLPDY
配列番号 313	HCDR2 (IMGT)	IWGSET
配列番号 314	HCDR3 (IMGT)	AKHYYYGGSYAMDY

10

20

30

40

【 0 4 7 3】

50

【表 9 1】

配列番号 250	VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVI WGSETYYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYY YGGSYAMDYWGQGLVTVSS	
配列番号 315	DNA VH	CAGGTCCTCAACTCCAAGAAAGCGGACCGGGTCTTGTGAAGCCATCAGA AACTCTTCACTGACTTGTACTGTGAGCGGAGTGTCTCTCCCGATTAC GGGGTGTCTTGGATCAGACAGCCACCGGGGAAGGGTCTGGAATGGAT TGGAGTGATTTGGGGCTCTGAGACTACTTACTACCAATCATCCCTCAA GTCACGCGTCACCATCTCAAAGGACAACCTAAGAATCAGGTGTCCT GAAACTGTCATCTGTGACCGCAGCCGACACCGCCGTACTATTGCGC TAAGCATTACTATTATGGCGGGAGCTACGCAATGGATTACTGGGGACA GGGTACTCTGGTCACCGTGTCCAGC	
配列番号 247	LCDR1	RASQDISKYLN	10
配列番号 248	LCDR2	HTSRLHS	
配列番号 249	LCDR3	QQGNTLPYT	
配列番号 247	LCDR1 (Kabat)	RASQDISKYLN	
配列番号 248	LCDR2 (Kabat)	HTSRLHS	
配列番号 249	LCDR3 (Kabat)	QQGNTLPYT	
配列番号 316	LCDR1 (Chothia)	SQDISKY	20
配列番号 317	LCDR2 (Chothia)	HTS	
配列番号 318	LCDR3 (Chothia)	GNTLPY	
配列番号 319	LCDR1 (IMGT)	QDISKY	
配列番号 317	LCDR2 (IMGT)	HTS	
配列番号 300	LCDR3 (IMGT)	QQGNTLPYT	
配列番号 251	VL	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHT SRLHSGIPARFSGSGSDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGT KLEIK	30
配列番号 320	DNA VL	GAAATTGTGATGACCCAGTCACCCGCCACTCTTAGCCTTTCACCCGGT GAGCGCGCAACCCTGTCTTGCAGAGCCTCCCAAGACATCTCAAATAAC CTTAATTGGTATCAACAGAAGCCCGGACAGGCTCCTCGCCTTCTGATC TACCACACCAGCCGGCTCCATTCTGGAATCCCTGCCAGGTTCAAGCGGT AGCGGATCTGGGACCGACTACACCCTCACTATCAGCTCACTGCAGCCA GAGGACTTCGCTGTCTATTTCTGTGAGCAAGGGAACACCCTGCCCTAC ACCTTTGGACAGGGCACCAAGCTCGAGATTA	
配列番号 104	リンカー	GGGSGGGSGGGGS	
配列番号 211	CAR2 scFv ドメイン - aa (リンカーは、 下線部)	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHT SRLHSGIPARFSGSGSDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGT KLEIKGGGSGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLP DYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETYYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSL KLSVTAADTAVYYCAKHYYGGSYAMDYWGQGLVTVSS	40

【 0 4 7 4 】

【表 9 2】

配列番号 305	CAR2 scFv ドメイン-nt	GAAATTGTGATGACCCAGTCACCCGCCACTCTTAGCCTTTCACCCGGT GAGCGCGCAACCCTGTCTTGCAGAGCCTCCCAAGACATCTCAAATAC CTTAATTGGTATCAACAGAAGCCCGGACAGGCTCCTCGCCTTCTGATC TACCACACCAGCCGGCTCCATTCTGGAATCCCTGCCAGGTTTCAGCGGT AGCGGATCTGGGACCGACTACACCCTCACTATCAGCTCACTGCAGCCA GAGGACTTCGCTGTCTATTTCTGTGAGCAAGGGAACACCCTGCCCTAC ACCTTTGGACAGGGCACCAAGCTCGAGATTAAGGTGGAGGTGGCAG CGGAGGAGGTGGGTCCGGCGGTGGAGGAAGCCAGGTCCAACCTCCAAG AAAGCGGACCGGGTCTTGTGAAGCCATCAGAACTCTTTCCTGACTT GTACTGTGAGCGGAGTGTCTCTCCCGATTACGGGGTGTCTTGGATCA GACAGCCACCGGGGAAGGGTCTGGAATGGATTGGAGTGATTTGGGGC TCTGAGACTACTTACTACCAATCATCCCTCAAGTCACGCGTCACCATCT CAAAGGACAACCTAAGAATCAGGTGTCACTGAAACTGTCACTGTGA CCGCAGCCGACACCGCGTGTACTATTGCGCTAAGCATTACTATTATG GCGGGAGCTACGCAATGGATTACTGGGGACAGGGTACTCTGGTCACC GTGTCCAGC
配列番号 225	完全 CAR	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLWYQQKPGQAPRLLIYHT SRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFVYFCQQGNTLPYTFGQGT KLEIKGGGSGGGGSGGGGSGVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLP DYGVSWIRQPPGKLEWIGVIWGSETTYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSL KLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLTVTVSSTTTPAPRP PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAFLAGTCGVL LLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCE LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGG KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLST ATKDTYDALHMQALPPR

10

20

【 0 4 7 5 】

一部の実施形態では、第 1 CAR ポリペプチドをコードする第 1 核酸配列と、第 2 CAR ポリペプチドをコードする第 2 核酸配列とを含む単離核酸分子が本明細書に提供され、ここで、第 1 CAR ポリペプチドは、抗 B C M A 結合ドメイン（例えば、ヒト抗 B C M A 結合ドメイン）である第 1 抗原結合ドメイン、第 1 膜貫通ドメイン及び第 1 細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第 2 CAR ポリペプチドは、抗 C D 1 9 結合ドメインである第 2 抗原結合ドメイン、第 2 膜貫通ドメイン及び第 2 細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態では、第 1 CAR ポリペプチドは、表 2 0 又は 2 6 に列挙される抗 B C M A 配列の H C C D R 1、H C C D R 2 及び H C C D R 3 を含む V H と、表 2 0 又は 2 6 に列挙される抗 B C M A 配列の L C C D R 1、L C C D R 2 及び L C C D R 3 を含む V L とを含み、V H 及び V L は、配列番号 2 4 3 のアミノ酸配列を含むリンカーによって連結される。一部の実施形態では、第 1 CAR ポリペプチドは、それぞれ配列番号 2 3 9 及び 2 4 2 のアミノ酸配列を含む V H 及び V L を含み、V H 及び V L は、配列番号 2 4 3 のアミノ酸配列を含むリンカーによって連結される。一部の実施形態では、第 1 CAR ポリペプチドは、配列番号 2 0 0 のアミノ酸配列を含む s c F v を含む。一部の実施形態では、第 1 CAR ポリペプチドは、配列番号 2 3 0 又は 2 2 8 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第 2 CAR ポリペプチドは、表 1 9 又は表 2 2 に列挙される抗 C D 1 9 配列の H C C D R 1、H C C D R 2、H C C D R 3、L C C D R 1、L C C D R 2 及び / 又は L C C D R 3（例えば、それぞれ配列番号 2 9 5 及び 2 4 5 ~ 2 4 9 のアミノ酸配列を含む H C C D R 1、H C C D R 2、H C C D R 3、L C C D R 1、L C C D R 2 及び L C C D R 3）を含む。一部の実施形態では、第 2 CAR ポリペプチドは、表 1 9 又は表 2 2 に列挙される抗 C D 1 9 配列の V H 及び / 又は V L（例えば、それぞれ配列番号 2 5 0 及び 2 5 1 のアミノ酸配列を含む V H 及び V L）又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第 2 CAR ポリペプチドは、表 1 9 又は表 2 2 に列挙される抗 C D 1 9 配列の s c F v（例えば、配列番号 2 1 1 のアミノ酸配列を含む s c F v）又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第 2 CAR ポリペプチドは、表 1 9 又は表 2

30

40

50

2 に列挙される抗 C D 1 9 配列の C A R ポリペプチド（例えば、配列番号 2 2 5 若しくは 2 2 9 のアミノ酸配列を含む C A R ポリペプチド）又はそれと少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号 2 2 1 又は 2 2 3 の核酸配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号 1 のシグナルペプチドを含む若しくは含まない配列番号 2 2 0 又は 2 2 2 のアミノ酸配列をコードする。

【 0 4 7 6 】

多重特異性 C A R

一実施形態では、本発明の C A R は、多重特異性 C A R である。一実施形態では、多重特異性 C A R は、二重特異性 C A R である。一実施形態では、二重特異性 C A R は、二重特異性抗体分子である抗原結合ドメインを含む。二重特異性抗体は、2 つ以下の抗原に対する特異性を有する。二重特異性抗体分子は、第 1 エピトープに対する結合特異性を有する第 1 免疫グロブリン可変ドメイン配列と、第 2 エピトープに対する結合特異性を有する第 2 免疫グロブリン可変ドメイン配列を特徴とする。一実施形態では、第 1 及び第 2 エピトープは、同じ抗原、例えば、同じタンパク質（又は多量体タンパク質のサブユニット）上にある。一実施形態では、第 1 及び第 2 エピトープは、重複する。一実施形態では、第 1 及び第 2 エピトープは、重複しない。一実施形態では、第 1 及び第 2 エピトープは、異なる抗原、例えば、異なるタンパク質（又は多量体タンパク質の異なるサブユニット）上にある。一実施形態では、二重特異性抗体分子は、第 1 エピトープに対する結合特異性を含む重鎖可変ドメイン配列及び軽鎖可変ドメイン配列と、第 2 エピトープに対する結合特異性を含む重鎖可変ドメイン配列及び軽鎖可変ドメイン配列とを含む。一実施形態では、二重特異性抗体分子は、第 1 エピトープに対する結合特異性を有する半抗体と、第 2 エピトープに対する結合特異性を有する半抗体とを含む。一実施形態では、二重特異性抗体分子は、第 1 エピトープに対する結合特異性を有する半抗体又はその断片と、第 2 エピトープに対する結合特異性を有する半抗体又はその断片とを含む。一実施形態では、二重特異性抗体分子は、第 1 エピトープに対する結合特異性を有する s c F v 又はその断片と、第 2 エピトープに対する結合特異性を有する s c F v 又はその断片とを含む。

【 0 4 7 7 】

一部の実施形態では、本発明の C A R は、多重特異性（例えば、二重特異性又は三重特異性）抗体分子である抗原結合ドメインを含む。二重特異性又はヘテロ二量体抗体分子を作製するためのプロトコルは、当技術分野で公知であり；限定されないが、例えば、以下のものが挙げられる：例えば、米国特許第 5 7 3 1 1 6 8 号明細書に記載されている「ノブ・イン・ア・ホール」アプローチ；例えば、国際公開第 0 9 / 0 8 9 0 0 4 号パンフレット、同第 0 6 / 1 0 6 9 0 5 号パンフレット及び同第 2 0 1 0 / 1 2 9 3 0 4 号パンフレットに記載のような静電ステアリング F c ペアリング；例えば、国際公開第 0 7 / 1 1 0 2 0 5 号パンフレットに記載のような鎖交換操作ドメイン（S E E D）ヘテロ二量体形成；例えば、国際公開第 0 8 / 1 1 9 3 5 3 号パンフレット、同第 2 0 1 1 / 1 3 1 7 4 6 号パンフレット及び同第 2 0 1 3 / 0 6 0 8 6 7 号パンフレットに記載のような F a b アーム交換；例えば、米国特許第 4 4 3 3 0 5 9 号明細書に記載のような、例えば、アミン反応基及びスルフヒドリル反応基を有するヘテロ二官能性試薬を用いて二重特異性構造を作製する抗体架橋による二重抗体コンジュゲート；例えば、米国特許第 4 4 4 4 8 7 8 号明細書に記載のような、2 つの重鎖間のジスルフィド結合の還元及び酸化のサイクルを介した異なる抗体に由来する半抗体（重 - 軽鎖対若しくは F a b）の組換えによって作製される二重特異性抗体決定基；例えば、米国特許第 5 2 7 3 7 4 3 号明細書に記載のような三官能性抗体、例えば、スルフヒドリル反応基を介して架橋された 3 つの F a b ' フラグメント；例えば、米国特許第 5 5 3 4 2 5 4 号明細書に記載のような生合成結合タンパク質、例えば、好ましくはジスルフィド若しくはアミン反応性化学架橋により、C 末端テールを介して架橋された s c F v のペア；例えば、米国特許第 5 5 8 2 9 9 6 号明細書に記載のような二官能性抗体、例えば、定常ドメインが置換されたロイシンジッパー（例えば、c - f o s 及び c - j u n）を介して二量体化された、異なる結合特異性を有する F

10

20

30

40

50

a bフラグメント；例えば、米国特許第5591828号明細書に記載のような二重特異性及びオリゴ特異性一価 - 及びオリゴバレント受容体、例えば、1つの抗体のCH1領域と、典型的に関連軽鎖を有する他の抗体のVH領域との間のポリペプチドスパーサーを介して連結された2つの抗体（2つのFab断片）のVH-CH1領域；例えば、米国特許第5635602号明細書に記載のような二重特異性DNA-抗体コンジュゲート、例えば、DNAの二本鎖部分を介した抗体若しくはFabフラグメントの架橋；例えば、米国特許第5637481号明細書に記載のような二重特異性融合タンパク質、例えば、互いの間に親水性ヘリカルペプチドリッカーを有する2つのscFvと完全定常領域とを含む発現構築物；例えば、米国特許第5837242号明細書に記載のような多価及び多重特異性結合タンパク質、例えば、Ig重鎖可変領域の結合領域を含む第1ドメインと、Ig軽鎖可変領域の結合領域を含む第2ドメインとを有するポリペプチドの二量体（一般に、ダイアボディと呼ばれる）（二重特異性、三重特異性若しくは四重特異性分子を形成する、より高次の構造も包含される；米国特許第5837821号明細書に記載のような、ペプチドスパーサーにより抗体ヒンジ領域及びCH3領域とさらにつながった連結VL及びVHを含むミニボディ構築物（これは、二量体化されて、二重特異性/多重特異性分子を形成することができる）；短いペプチドリッカー（例えば、5若しくは10アミノ酸）と連結しているか、又はいずれの配向にもリンカーを一切含まないVH及びVLドメイン（これは、二量体を形成して、二重特異性ダイアボディを形成することができる）；例えば、米国特許第5844094号明細書に記載のような三量体及び四量体；例えば、米国特許第5864019号明細書に記載のような、C末端に架橋可能基を有するペプチド結合によって連結されたVHドメイン（若しくはファミリーメンバーのVLドメイン）の鎖（VLドメインと結合して、一連のFV（若しくはscFv）を形成する）；及び例えば米国特許第5869620号明細書に記載のように、ペプチドリッカーを介して連結されたVH及びVLドメインの両方を有する単鎖結合ポリペプチドを、非共有若しくは化学架橋により組み合わせて多価構造にし、scFv若しくはダイアボディ型フォーマットの両方を用いて、例えば、ホモ二価、ヘテロ二価、三価及び四価構造を形成する。別の例示的な多重特異性及び二重特異性分子並びにそれらを作製する方法は、例えば、以下に見出される：米国特許第5910573号明細書、同第5932448号明細書、同第5959083号明細書、同第5989830号明細書、同第6005079号明細書、同第6239259号明細書、同第6294353号明細書、同第6333396号明細書、同第6476198号明細書、同第6511663号明細書、同第6670453号明細書、同第6743896号明細書、同第6809185号明細書、同第6833441号明細書、同第7129330号明細書、同第7183076号明細書、同第7521056号明細書、同第7527787号明細書、同第7534866号明細書、同第7612181号明細書、同第2002004587A1号明細書、同第2002076406A1号明細書、同第2002103345A1号明細書、同第2003207346A1号明細書、同第2003211078A1号明細書、同第2004219643A1号明細書、同第2004220388A1号明細書、同第2004242847A1号明細書、同第2005003403A1号明細書、同第2005004352A1号明細書、同第2005069552A1号明細書、同第2005079170A1号明細書、同第2005100543A1号明細書、同第2005136049A1号明細書、同第2005136051A1号明細書、同第2005163782A1号明細書、同第2005266425A1号明細書、同第2006083747A1号明細書、同第2006120960A1号明細書、同第2006204493A1号明細書、同第2006263367A1号明細書、同第2007004909A1号明細書、同第2007087381A1号明細書、同第2007128150A1号明細書、同第2007141049A1号明細書、同第2007154901A1号明細書、同第2007274985A1号明細書、同第2008050370A1号明細書、同第2008069820A1号明細書、同第2008152645A1号明細書、同第2008171855A1号明細書、同第2008241884A1号明細書、同第2008254512A1号明細書、同第200826

10

20

30

40

50

0738A1号明細書、同第2009130106A1号明細書、同第2009148905A1号明細書、同第2009155275A1号明細書、同第2009162359A1号明細書、同第2009162360A1号明細書、同第2009175851A1号明細書、同第2009175867A1号明細書、同第2009232811A1号明細書、同第2009234105A1号明細書、同第2009263392A1号明細書、同第2009274649A1号明細書、欧州特許第346087A2号明細書、国際公開第0006605A2号パンフレット、同第02072635A2号パンフレット、同第04081051A1号パンフレット、同第06020258A2号パンフレット、同第2007044887A2号パンフレット、同第2007095338A2号パンフレット、同第2007137760A2号パンフレット、同第2008119353A1号パンフレット、同第2009021754A2号パンフレット、同第2009068630A1号パンフレット、同第9103493A1号パンフレット、同第9323537A1号パンフレット、同第9409131A1号パンフレット、同第9412625A2号パンフレット、同第9509917A1号パンフレット、同第9637621A2号パンフレット、同第9964460A1号パンフレット。上に挙げた参照出願の内容は、参照によりその全体を本明細書に組み込むものとする。

10

【0478】

二重特異性抗体分子の各抗体又は抗体断片（例えば、 $s c F v$ ）において、 $V H$ は、 $V L$ の上流又は下流のいずれでもあり得る。一部の実施形態では、上流の抗体又は抗体断片（例えば、 $s c F v$ ）は、その $V H$ （ $V H_1$ ）がその $V L$ （ $V L_1$ ）の上流に位置するように配列され、下流の抗体又は抗体断片（例えば、 $s c F v$ ）は、その $V L$ （ $V L_2$ ）がその $V H$ （ $V H_2$ ）の上流に位置するように配列され、その結果、二重特異性抗体分子全体は、構成： $V H_1 - V L_1 - V L_2 - V H_2$ を有する。他の実施形態では、上流の抗体又は抗体断片（例えば、 $s c F v$ ）は、その $V L$ （ $V L_1$ ）がその $V H$ （ $V H_1$ ）の上流に位置するように配列され、下流の抗体又は抗体断片（例えば、 $s c F v$ ）は、その $V H$ （ $V H_2$ ）がその $V L$ （ $V L_2$ ）の上流に位置するように配列され、その結果、二重特異性抗体分子全体は、構成： $V L_1 - V H_1 - V H_2 - V L_2$ を有する。任意選択で、2つの抗体又は抗体断片（例えば、 $s c F v$ ）の間に、例えば、構築物が $V H_1 - V L_1 - V L_2 - V H_2$ として構成される場合には $V L_1$ と $V L_2$ との間及び構築物が $V L_1 - V H_1 - V H_2 - V L_2$ として構成される場合には $V H_1$ と $V H_2$ との間にリンカーが配置される。リンカーは、本明細書に記載されるリンカー、例えば（ $G l y_4 - S e r$ ） n リンカー（ n は、1、2、3、4、5又は6、好ましくは4である）（配列番号26）であり得る。概して、2つの $s c F v$ 間のリンカーは、2つの $s c F v$ のドメインの間の誤対合を回避するのに十分長くなければならない。任意選択で、第1 $s c F v$ の $V L$ と $V H$ の間にリンカーが配置される。任意選択で、第2 $s c F v$ の $V L$ と $V H$ の間にリンカーが配置される。複数のリンカーを有する構築物において、リンカーのいずれか2つ以上は、同じであるか又は異なり得る。従って、一部の実施形態では、二重特異性CARは、本明細書に記載の構成に、 $V L$ 、 $V H$ 及び任意選択で1つ以上のリンカーを含む。

20

30

【0479】

一態様では、二重特異性抗体は、BCMAに対する結合特異性を有し、例えば、本明細書に記載の $s c F v$ を含むか、又は本明細書に記載のBCMA $s c F v$ 由来の軽鎖CDR及び/若しくは重鎖CDRを含む第1免疫グロブリン可変ドメイン配列、例えば、 $s c F v$ 並びに異なる抗原上の第2エピトープに対する結合特異性を有する第2免疫グロブリン可変ドメイン配列を特徴とする。一態様では、第2免疫グロブリン可変ドメイン配列は、AML細胞に発現される抗原、例えば、BCMA以外の抗原に対する結合特異性を有する。例えば、第2免疫グロブリン可変ドメイン配列は、CD123に対する結合特異性を有する。別の例として、第2免疫グロブリン可変ドメイン配列は、CLL-1に対する結合特異性を有する。別の例として、第2免疫グロブリン可変ドメイン配列は、CD34に対する結合特異性を有する。別の例として、第2免疫グロブリン可変ドメイン配列は、FLT3に対する結合特異性を有する。例えば、第2免疫グロブリン可変ドメイン配列は、

40

50

葉酸受容体 に対する結合特異性を有する。いくつかの態様では、第2免疫グロブリン可変ドメイン配列は、B細胞に発現される抗原、例えば、CD10、CD19、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3、CD79b、CD179b又はCD79aに対する結合特異性を有する。

【0480】

ダイアボディCAR

一部の実施形態では、本発明のCARは、二重特異性CARである。一部の実施形態では、本発明のCARは、ダイアボディCARである。一部の実施形態では、ダイアボディCARは、第1抗原及び第2抗原に結合する抗原結合ドメインを含む。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、VH1、VL1、VH2及びVL2を含み、VH1とVL1は、第1抗原に結合し、且つVH2とVL2は、第2抗原に結合する。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、N末端からC末端まで、以下の構成：VH1 - 任意選択でリンカー1（「L1」） - VH2 - 任意選択でリンカー2（「L2」） - VL2 - 任意選択でリンカー3（「L3」） - VL1を有する。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、N末端からC末端まで、以下の構成：VH1 - 任意選択でL1 - VL2 - 任意選択でL2 - VH2 - 任意選択でL3 - VL1を有する。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、N末端からC末端まで、以下の構成：VL1 - 任意選択でL1 - VH2 - 任意選択でL2 - VL2 - 任意選択でL3 - VH1を有する。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、N末端からC末端まで、以下の構成：VH2 - 任意選択でL1 - VH1 - 任意選択でL2 - VL1 - 任意選択でL3 - VL2を有する。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、N末端からC末端まで、以下の構成：VH2 - 任意選択でL1 - VL1 - 任意選択でL2 - VH1 - 任意選択でL3 - VL2を有する。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、N末端からC末端まで、以下の構成：VL2 - 任意選択でL1 - VH1 - 任意選択でL2 - VL1 - 任意選択でL3 - VH2を有する。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、N末端からC末端まで、以下の構成：VL2 - 任意選択でL1 - VL1 - 任意選択でL2 - VH1 - 任意選択でL3 - VH2を有する。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、N末端からC末端まで、以下の構成：VH1 - リンカー1（「L1」） - VH2 - リンカー2（「L2」） - VL2 - リンカー3（「L3」） - VL1を有する。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、N末端からC末端まで、以下の構成：VH1 - L1 - VL2 - L2 - VH2 - L3 - VL1を有する。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、N末端からC末端まで、以下の構成：VL1 - L1 - VH2 - L2 - VL2 - L3 - VH1を有する。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、N末端からC末端まで、以下の構成：VL1 - L1 - VL2 - L2 - VH2 - L3 - VH1を有する。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、N末端からC末端まで、以下の構成：VH2 - L1 - VH1 - L2 - VL1 - L3 - VL2を有する。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、N末端からC末端まで、以下の構成：VH2 - L1 - VL1 - L2 - VH1 - L3 - VL2を有する。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、N末端からC末端まで、以下の構成：VL2 - L1 - VH1 - L2 - VL1 - L3 - VH2を有する。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、N末端からC末端まで、以下の構成：VL2 - L1 - VL1 - L2 - VH1 - L3 - VH2を有する。一部の実施形態では、可変領域は、GGGGSGGGGS（配列番号5）のアミノ酸配列を含むリンカーにより融合される。一部の実施形態では、可変領域は、GGGGSGGGGS（配列番号63）のアミノ酸配列を含むリンカーにより融合される。一部の実施形態では、L1は、配列番号5のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、L2は、配列番号63のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、L3は、配列番号5のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VH1、VL1、VH2若しくはVL2は、本明細書に開示されるCDR、VH若しくはVL配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、本明細書に開示されるダイ

10

20

30

40

50

アボディは、例えば、抗体を安定化し、且つ/又はVH及びVLの正しい対合を促進するために、操作されたジスルフィド架橋を含む。一部の実施形態では、操作されたジスルフィド架橋は、ヒンジ領域に最も近位の可変領域（例えば、ヒンジ領域に最も近位のVH又はVL領域）と、その対応する対合パートナー（例えば、対応するVL又は対応するVH）の間にある。

【0481】

一部の実施形態では、第1抗原及び第2抗原は異なる。一実施形態では、第1若しくは第2抗原は、B細胞に発現される抗原、急性骨髄性白血病細胞に発現される抗原又は固形腫瘍細胞に発現される抗原から選択される。一実施形態では、第1若しくは第2抗原は、CD10、CD19、CD20、CD22、CD34、CD123、BCMA、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179b、CD79a、CD34、CLL-1、葉酸受容体、FLT3、EGFRvIII、メソテリン、GD2、Tn抗原、sTn抗原、Tn-O-糖ペプチド、sTn-O-糖ペプチド、PSMA、CD97、TAG72、CD44v6、CEA、EPCAM、KIT、IL-13Ra2、レグマン、GD3、CD171、IL-11Ra、PSCA、MAD-CT-1、MAD-CT-2、VEGFR2、ルイスY、CD24、PDGFR、SSEA-4、葉酸受容体、ERBB（例えば、ERBB2）、Her2/neu、MUC1、EGFR、NCAM、エフリンB2、CAIX、LMP2、sLe、HMWMAA、o-アセチル-GD2、葉酸受容体、TEM1/CD248、TEM7R、FAP、レグマイン、HPV E6若しくはE7、ML-IAP、CLDN6、TSHR、GPRC5D、ALK、ポリシアル酸、Fos関連抗原、好中球エラスターゼ、TRP-2、CYP1B1、精子タンパク質17、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、AFP、チログロブリン、PLAC1、グロボH、RAGE1、MN-CAIX、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、腸カルボキシエステラーゼ、mut hsp 70-2、NA-17、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、NY-ESO-1、GPR20、Ly6k、OR51E2、TARP、GFR4又はMHCに提示されるこれらの抗原のいずれかのペプチドから選択される。

【0482】

一部の実施形態では、第1抗原は、BCMAであり、第2抗原は、CD19である。一部の実施形態では、CARは、BCMA及びCD19に結合する抗原結合ドメインを含む。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、BCMAに結合するVH₁及びVL₁（「BCMA VH」及び「BCMA VL」）と、CD19に結合するVH₂及びVL₂（「CD19 VH」及び「CD19 VL」）を含む。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、N末端からC末端まで、以下の構成：BCMA VH - 任意選択でリンカー1（「L1」） - CD19 VH - 任意選択でリンカー2（「L2」） - CD19 VL - 任意選択でリンカー3（「L3」） - BCMA VLを有する。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、N末端からC末端まで、以下の構成：BCMA VH - 任意選択でL1 - CD19 VL - 任意選択でL2 - CD19 VH - 任意選択でL3 - BCMA VLを有する。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、N末端からC末端まで、以下の構成：BCMA VL - 任意選択でL1 - CD19 VH - 任意選択でL2 - CD19 VL - 任意選択でL3 - BCMA VHを有する。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、N末端からC末端まで、以下の構成：CD19 VH - 任意選択でL1 - BCMA VH - 任意選択でL2 - BCMA VL - 任意選択でL3 - CD19 VLを有する。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、N末端からC末端まで、以下の構成：CD19 VH - 任意選択でL1 - BCMA VL - 任意選択でL2 - BCMA VH - 任意選択でL3 - CD19 VLを有する。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、N末端からC末端まで、以下の構成：CD19 VL - 任意選択でL1 - BCMA VH - 任意選択でL2 - BCMA VL - 任意選択でL3 - CD19 VHを有する。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、N末端からC末端まで、

以下の構成：CD19 VL - 任意選択でL1 - BCMA VH - 任意選択でL2 - BCMA VH - 任意選択でL3 - CD19 VHを有する。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、N末端からC末端まで、以下の構成：BCMA VH - リンカー1（「L1」） - CD19 VH - リンカー2（「L2」） - CD19 VL - リンカー3（「L3」） - BCMA VLを有する。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、N末端からC末端まで、以下の構成：BCMA VH - L1 - CD19 VL - L2 - CD19 VH - L3 - BCMA VLを有する。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、N末端からC末端まで、以下の構成：BCMA VL - L1 - CD19 VH - L2 - CD19 VL - L3 - BCMA VHを有する。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、N末端からC末端まで、以下の構成：CD19 VH - L1 - BCMA VH - L2 - BCMA VL - L3 - CD19 VLを有する。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、N末端からC末端まで、以下の構成：CD19 VL - L1 - BCMA VH - L2 - BCMA VL - L3 - CD19 VHを有する。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、N末端からC末端まで、以下の構成：CD19 VL - L1 - BCMA VL - L2 - BCMA VH - L3 - CD19 VHを有する。一部の実施形態では、可変領域は、配列番号5若しくは63のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95若しくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むリンカーにより融合される。一部の実施形態では、L1は、配列番号5のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、L2は、配列番号63のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、L3は、配列番号5のアミノ酸配列を含む。

【0483】

一部の実施形態では、BCMA VHは、本明細書に開示されるCDR若しくはVH配列、例えば、表3～15、19、20、22、26及び31に開示されるCDR若しくはVH配列又はそれと少なくとも80、85、90、95若しくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、BCMA VLは、本明細書に開示されるCDR若しくはVL配列、例えば、表3～15、19、20、22、26及び31に開示されるCDR若しくはVL配列又はそれと少なくとも80、85、90、95若しくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD19 VHは、本明細書に開示されるCDR若しくはVH配列、例えば、表2、19、22及び31に開示されるCDR若しくはVH配列又はそれと少なくとも80、85、90、95若しくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD19 VLは、本明細書に開示されるCDR若しくはVL配列、例えば、表2、19、22及び31に開示されるCDR若しくはVL配列又はそれと少なくとも80、85、90、95若しくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0484】

一部の実施形態では、CAR、例えば、ダイアポディCARは、ヒンジ領域、膜貫通ドメイン及び/又は細胞内シグナル伝達ドメインをさらに含む。一部の実施形態では、ヒンジ領域は、CD8ヒンジ領域を含む。一部の実施形態では、ヒンジ領域は、本明細書に開示されるヒンジ領域配列、例えば、配列番号2のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95若しくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、CD8膜貫通ドメインを含む。一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、本明細書に開示される膜貫通ドメイン配列、例えば、配列番号6のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95若しくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、4-1BB細胞内ドメインを含む。一部の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、本明細書に開示される共刺激シグナル伝達ドメイン配列、例えば、配列番号7のアミノ酸配列又はそれ

と少なくとも 80、85、90、95 若しくは 99% の同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3 細胞内ドメインを含む。一部の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、本明細書に開示される一次シグナル伝達ドメイン配列、例えば、配列番号 9 若しくは 10 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも 80、85、90、95 若しくは 99% の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0485】

例示的なダイアボディ配列を表 31 に開示する。一部の実施形態では、CAR は、配列番号 321 ~ 330 からなる群から選択されるアミノ酸配列又はそれと少なくとも 80、85、90、95 若しくは 99% の同一性を有するアミノ酸配列を含む抗原結合ドメインを含む。一部の実施形態では、CAR は、配列番号 339 ~ 348 からなる群から選択されるアミノ酸配列又はそれと少なくとも 80、85、90、95 若しくは 99% の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0486】

【表 93】

表 31. ダイアボディ CAR の例示的な成分

配列番号	説明	アミノ酸配列*
配列番号 321	JL1 抗原結合 ドメイン	<u>QVQLQESGPGLVKPSITLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIROPPGKCLEWIGVIWGS</u> <u>ETYYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDY</u> <u>WGQGLVTVSSGGGGSQSALTOPASVSGSPGOSITISCTGTSSDVGGINYVS</u> <u>WYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEAD</u> <u>YYCSSYTSSTLYVEFGSGTKVTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSQVQLQE</u> <u>SGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVROAPGKGLEWVAVISYDGS</u> <u>NKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGGSGYALHD</u> <u>DYYGLDVWGQGLVTVSSGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDIS</u> <u>KYLNWYQQKPGQAPRLLIYHISRLHSGIPARESGSGSGTDYTLTISSLOPEDEFAV</u> <u>YFCQQGNTLPYTFGCGTKLEIK</u>

【0487】

10

20

30

40

50

【表 9 4】

配列番号 339	JL1完全長 ダイアボディ CAR	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKCLEWIGVI WGSETTYQSSLSKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYYY GGSYAMDYWGQGLTVVSSGGGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSS DVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTI SGLQAEDEADYCYSSYTSSTLYVFGSGTKVTVLGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSQVQLQESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGL EWWAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYY CGSGYALHDDYYGLDVWGQGLTVVSSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGE RATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGT DYTLTISSLOPEDFAVYFCQQGNLTPYTFGCGTKLEIKTTTPAPRPPPTPAPTI ASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVTIL YCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFRS ADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALH MQALPPR
配列番号 322	JL2抗原結合 ドメイン	<u>EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHS</u> <u>GIPARFSGSGSGTDYTLTISSLOPEDFAVYFCQQGNLTPYTFGCGTKLEIKGGGG</u> <u>SQVQLQESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWV</u> <u>AVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCGG</u> <u>SGYALHDDYYGLDVWGQGLTVVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSQA</u> <u>LTOPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVS</u> <u>NRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYCYSSYTSSTLYVFGSGT</u> <u>KVTVLGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGK</u> <u>CLEWIGVIWGSETTYQSSLSKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKH</u> <u>YGGSYAMDYWGQGLTVVSS</u>
配列番号 340	JL2完全長 ダイアボディ CAR	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTS RLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLOPEDFAVYFCQQGNLTPYTFGCGTKL EIKGGGGSQVQLQESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTA VYYCGGSGYALHDDYYGLDVWGQGLTVVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKL MIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYCYSSYTSSTLY VFGSGTKVTVLGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGV WIRQPPGKCLEWIGVIWGSETTYQSSLSKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTA ADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLTVVSSTTTPAPRPPPTPAPTIAS QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVTILY CKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFRSA DAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALH MQALPPR
配列番号 323	JL3抗原結合 ドメイン	<u>QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKCLEWIGVIWGS</u> <u>ETTYQSSLSKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDY</u> <u>WGQGLTVVSSGGGGSQVQLQESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH</u> <u>WVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN</u> <u>LSRAEDTAVYYCGGSGYALHDDYYGLDVWGQGLTVVSSGGGGSGGGG</u> <u>SGGGGSGGGGSSQSALTOPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQ</u> <u>HPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYCY</u> <u>SYTSSSTLYVFGSGTKVTVLGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDI</u> <u>SKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLOPEDFAV</u> <u>YFCQQGNLTPYTFGCGTKLEIK</u>

10

20

30

40

【 0 4 8 8 】

50

【表 9 5】

配列番号 341	JL3完全長 ダイアボディ CAR	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKCLEWIGVI WGSETTYQSSLSKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYYY GGSYAMDYWGQGLTVTVSSGGGGGSQVQLQESGGGVVQGRSLRLSCAAS GFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGGSGYALHDDYYGLDVWGQGLTVTVSS GGGGSGGGSGGGSGGGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGG YNYVSWYQHPGKAPKLMIDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQ AEDEADYYCSSYTSSTLYVFGSGTKVTVLGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGE RATLSCRASQDISKYLNWYQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGT DYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGCGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTI ASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITL YCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRS ADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALH MQALPPR
配列番号 324	JL4抗原結合 ドメイン	<u>EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQKPGQAPRLLIYHTSRLHS</u> <u>GIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGCGTKLEIKGGG</u> <u>SQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQHPGKAPKLM</u> <u>IDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSTLYV</u> <u>FSGTKVTVLGGGGSGGGSGGGGSQVQLQESGGGVVQGRSLRL</u> <u>SCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTI</u> <u>SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGGSGYALHDDYYGLDVWGQGL</u> <u>TVTVSSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVS</u> <u>WIRQPPGKCLEWIGVIWGSETTYQSSLSKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKH</u> <u>YGGSYAMDYWGQGLTVTVSS</u>
配列番号 342	JL4完全長 ダイアボディ CAR	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQKPGQAPRLLIYHTS RLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGCGTKL EIKGGGGQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQHPG KAPKLMIDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTS SSTLYVFGSGTKVTVLGGGGSGGGSGGGSGGGGSQVQLQESGGGVVQ PGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVAVISYDGSNKYYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGGSGYALHDDYYGLDV WGQGLTVTVSSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVS WIRQPPGKCLEWIGVIWGSETTYQSSLSKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTA ADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLTVTVSSTTPAPRPPTPAPTIAS QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLY CKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSA DAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALH MQALPPR
配列番号 325	JL5 抗原 結合ドメイン	<u>QVQLQESGGGVVQGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVA</u> <u>VISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGGS</u> <u>GYALHDDYYGLDVWGQGLTVTVSSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLS</u> <u>CRASQDISKYLNWYQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARISGSGSGTDYTLTISSL</u> <u>QPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGCGTKLEIKGGGGSGGGSGGGGSQV</u> <u>QLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKLEWIGVIWGSET</u> <u>TYQSSLSKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQ</u> <u>GTLTVTVSSGGGGQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQ</u> <u>HPGKAPKLMIDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC</u> <u>SSYTSSTLYVFGCGTKVTVL</u>

10

20

30

40

【 0 4 8 9 】

50

【表 9 6】

配列番号 343	JL5完全長 ダイアボディ CAR	QVQLQESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKCLEWVA VISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGGS GYALHDDYYGLDVWGQGLTVTVSSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATL SCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTL TISSLOPEDFAVYFCQQGNTLPLYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGSGGGSGG GGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWI GVIWGSETTYQSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKH YYYGGSYAMDYWGQGLTVTVSSGGGGQSALTQPASVSGSPGQSITISCT GTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTA SLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSTLYVFGCGTKVTVLTTPAPRPPTPAPTI ASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVTIL YCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRS ADAPAYKQGGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPMEGKPRRKNPQEG GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDHGLYQGLSTATKDTYDALH MQALPPR
配列番号 326	JL6 抗原 結合ドメイン	<u>QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMY</u> <u>DVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSTLYVFG</u> <u>CGTKYTVLGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQ</u> <u>PPGKGLEWIGVIWGSETTYQSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCA</u> <u>KHYYYGGSYAMDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEIIVMTQS</u> <u>PATLSLSPGERATLSRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARE</u> <u>SGSGTDYTLTISSLOPEDFAVYFCQQGNTLPLYTFGQGTKLEIKGGGGSQVQL</u> <u>QESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKCLEWVAVISYD</u> <u>GSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGGSGYAL</u> <u>HDDYYGLDVWGQGLTVTVSS</u>
配列番号 344	JL6 完全長 ダイアボディ CAR	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMY DVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSTLYVFG CGTKYTVLGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIR PPGKGLEWIGVIWGSETTYQSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAAD TAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGG GGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIY HTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLOPEDFAVYFCQQGNTLPLYTFGQ TKLEIKGGGGSQVQLQESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQ APGKCLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCGGSGYALHDDYYGLDVWGQGLTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIA SQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVTILY CKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSA DAPAYKQGGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPMEGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDHGLYQGLSTATKDTYDALH MQALPPR
配列番号 327	JL7 抗原 結合ドメイン	<u>QVQLQESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKCLEWVA</u> <u>VISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGGS</u> <u>GYALHDDYYGLDVWGQGLTVTVSSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCT</u> <u>TVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYQSSSLKSRVTISKDNSKNQ</u> <u>VSLKLSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGS</u> <u>GGGGSGGGSEIIVMTQSPATLSLSPGERATLSRASQDISKYLNWYQQKPGQA</u> <u>PRLLIYHTSRLHSGIPARESGSGSGTDYTLTISSLOPEDFAVYFCQQGNTLPLYTFG</u> <u>QGTKLEIKGGGGQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQ</u> <u>QHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC</u> <u>SSYTSSTLYVFGCGTKVTIL</u>

10

20

30

40

【 0 4 9 0 】

50

【表 9 7】

配列番号 345	JL7完全長 ダイアボディ CAR	QVQLQESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKCLEWVA VISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGGS GYALHDDYYGLDVWGQGLTVTVSSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLT CTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYQSSLSKSRVTISKD NSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLTVTVSS GGGGSGGGSGGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISK YLNWYQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLPEDF AVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGQSALTQPASVSGSPQSITISCT GTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTA SLTISGLQAEDEADYCYSSYTSSTLYVFGCGTKVTVLTTTPAPRPPTPAPTI ASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVTIL YCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRS ADAPAYKQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALH MQALPPR
配列番号 328	JL8 抗原結 合ドメイン	<u>QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMY</u> <u>DVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYCYSSYTSSTLYVFG</u> <u>CGTKVTVLGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLWYQQK</u> <u>PGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFAVYFCQQGNTLPY</u> <u>TFGQGTKLEIKGGGGSGGGSGGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLT</u> <u>CTVSGVSLPDYGVSWIROPPGKGLEWIGVIWGSETTYQSSLSKSRVTISKD</u> <u>NSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLTVTVSSGGGGSQVQL</u> <u>QESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKCLEWVAVISYD</u> <u>GSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGGSGYAL</u> <u>HDDYYGLDVWGQGLTVTVSS</u>
配列番号 346	JL8 完全長 ダイアボディ CAR	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMY DVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYCYSSYTSSTLYVFG CGTKVTVLGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLWYQQ KPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFAVYFCQQG NTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGSGGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIROPPGKGLEWIGVIWGSETTYQSSLSK SRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGL TVTVSSGGGGSQVQLQESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQ APGKCLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCGGSGYALHDDYYGLDVWGQGLTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTI ASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVTIL YCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRS ADAPAYKQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALH MQALPPR
配列番号 329	JL9 抗原 結合ドメイン	<u>QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIROPPGKCLEWIGVIWGS</u> <u>ETTYQSSLSKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDY</u> <u>WGQGLTVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWY</u> <u>QQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYC</u> <u>QOSYSTPLTFGQGTKVEIKGGGGSGGGSGGGGGSGGGGSEVQLLESGGGL</u> <u>YQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYA</u> <u>DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARREWWGESWLFDY</u> <u>WGQGLTVTVSSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLWYQ</u> <u>QKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFAVYFCQQGN</u> <u>TLPYTFGCGTKLEIK</u>

10

20

30

40

【 0 4 9 1 】

50

【表 9 8】

配列番号 347	JL9 完全長 ダイアボディ CAR	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKCLEWIGVI WGSETTYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYYY GGSYAMDYWGQGLTVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTTICRAS QSISYLNWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCQQSYSTPLTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARREW WGESWLFDYWGQGLTVTVSSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRA SQDISKYLWYQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSL QPEDFAVYFCQGGNTLPYTFGCGTKLEIKTTTPAPRPPTAPTIASQPLSLRP EACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVTLYCKRGRKK LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQ GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
配列番号 330	JL10 抗原 結合ドメイン	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKCLEWVSA</u> <u>ISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRE</u> <u>WWGESWLFDYWGQGLTVTVSSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRA</u> <u>QDISKYLWYQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPED</u> <u>FAVYFCQGGNTLPYTFGCGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSOVQLOE</u> <u>SGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYQ</u> <u>SSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGL</u> <u>TVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTTICRASQSISYLNWYQKPGK</u> <u>APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSYSTP</u> <u>LTFGCGTKVEIK</u>
配列番号 348	JL10 完全長 ダイアボディ CAR	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKCLEWVSA ISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRE WWGESWLFDYWGQGLTVTVSSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCR ASQDISKYLWYQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFAVYFCQGGNTLPYTFGCGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKLEWIGVI WGSETTYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYYY GGSYAMDYWGQGLTVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTTICRAS QSISYLNWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCQQSYSTPLTFGCGTKVEIKTTTPAPRPPTAPTIASQPLSLRPE ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVTLYCKRGRKKL LYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQ QNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
配列番号 250	抗CD19 VH (CTL119)	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKLEWIGVI WGSETTYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYYY GGSYAMDYWGQGLTVTVSS
配列番号 251	抗CD19 VL (CTL119)	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLWYQKPGQAPRLLIYHTS RLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQGGNTLPYTFGCGTKL EIK
配列番号 331	抗CD19 VH (CTL119) 変異体	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKCLEWIGVI WGSETTYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYYY GGSYAMDYWGQGLTVTVSS
配列番号 332	抗CD19 VL (CTL119) 変異体	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLWYQKPGQAPRLLIYHTS RLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQGGNTLPYTFGCGTKL EIK

10

20

30

40

【 0 4 9 2 】

50

【表 9 9】

配列番号 93	抗BCMA VH (PI61)	QVQLQESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA VISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGGS GYALHDDYYGLDVWGQGLTVTVSS
配列番号 102	抗BCMA VL (PI61)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMY DVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFG SGTKVTVL
配列番号 333	抗BCMA VH (PI61) 変異体	QVQLQESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKCLEWVA VISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGGS GYALHDDYYGLDVWGQGLTVTVSS
配列番号 334	抗BCMA VL (PI61) 変異体	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMY DVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFG CGTKVTVL
配列番号 78	抗BCMA VH (R1G5)	EVQLLES GGGLVQP GGSRLRLS CAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSA ISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRE WWGESWLFDYWGQGLTVTVSS
配列番号 61	抗BCMA VL (R1G5)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS SLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQSYSTPLTFGGQGTKVE IK
配列番号 335	抗BCMA VH (R1G5) 変異体	EVQLLES GGGLVQP GGSRLRLS CAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKCLEWVSA ISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRE WWGESWLFDYWGQGLTVTVSS
配列番号 336	抗BCMA VL (R1G5) 変異体	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS SLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQSYSTPLTFGGQGTKVE IK
配列番号 5	リンカー	GGGSGGGGS
配列番号 63	リンカー	GGGSGGGSGGGSGGGGS

10

20

*: VH配列は下線部であり、VL配列は、二重下線部である。CD19-結合配列 (VH及びVL)は、イタリック体で示される。

【 0 4 9 3】

キメラTCR

一態様では、本発明の抗体及び抗体断片を、T細胞受容体(「TCR」)鎖、例えば、TCR又はTCR鎖の1つ以上の定常ドメインに移植して、キメラTCRを作製することができる。理論に束縛されるものではないが、キメラTCRは、抗原結合時にTCR複合体を介してシグナル伝達すると考えられる。例えば、本明細書に開示されるscFvは、TCR鎖、例えば、TCR鎖及び/又はTCR鎖の定常ドメイン、例えば、細胞外定常ドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインの少なくとも一部に移植することができる。別の例として、抗体断片、例えば本明細書に記載されるVLドメインをTCR鎖の定常ドメインに移植することができ、抗体断片、例えば本明細書に記載のVHドメインをTCR鎖の定常ドメインに移植することができる(又はVLドメインをTCR鎖の定常ドメインに移植することができ、VHドメインをTCR鎖に移植することができる)。別の例として、抗体若しくは抗体断片のCDR、例えば本明細書に記載の抗体若しくは抗体断片のCDRをTCR及び/又は鎖に移植して、キメラTCRを作製することもできる。例えば、本明細書に開示されるLCDRをTCR鎖の可変ドメインに移植し、本明細書に開示されるHCDRをTCR鎖の可変ドメインに移植し得るか、又はその逆も可能である。こうしたキメラTCRは、当技術分野で公知の方法により生産することができる(例えば、Willemsen RA et al, Gene Therapy 2000; 7: 1369-1377; Zhang T et al, Cancer Gene Ther 2004; 11: 487-496; Aggen et al, Gene Ther. 2012 Apr; 19(4): 365-74)。

30

40

【 0 4 9 4】

別の実施形態

50

一態様では、本明細書に記載のCAR発現細胞は、第2CAR、例えば、同じ標的（BCMA）若しくは異なる標的（例えば、CD19、CD20若しくはCS-1又は他の多発性骨髄腫標的、例えば、軽鎖、CD138、ルイスY抗原若しくはCD38（Garfall et al., *Discovery Medicine*, 2014, 17(91): 37-46））に対して、異なる抗原結合ドメインを有する第2CARをさらに含み得る。一実施形態では、CAR発現細胞は、第1抗原をターゲティングし、且つ共刺激シグナル伝達ドメインを有するが、一次シグナル伝達ドメインはない細胞内シグナル伝達ドメインを含む第1CARと、第2の異なる抗原をターゲティングし、且つ一次シグナル伝達ドメインを有するが、共刺激シグナル伝達ドメインはない細胞内シグナル伝達ドメインを含む第2CARとを含む。理論に縛られることは意図しないが、共刺激シグナル伝達ドメイン、例えば、4-1BB、CD28、CD27 ICOS若しくはOX-40の第1CAR上の配置並びに一次シグナル伝達ドメイン、例えば、CD3の第2CAR上の配置は、両標的が発現される細胞に対するCAR活性を制限し得る。一実施形態では、CAR発現細胞は、BCMA結合ドメイン、膜貫通ドメイン及び共刺激シグナル伝達ドメインを含む第1BCMA CARと、BCMA以外の抗原（例えば、白血病若しくはリンパ腫細胞に発現される抗原、例えば、CD19、CD20、CS-1、軽鎖、CD139、ルイスY抗原若しくはCD38）をターゲティングし、且つ抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン及び一次シグナル伝達ドメインを含む第2CARとを含む。別の実施形態では、CAR発現細胞は、BCMA結合ドメイン、膜貫通ドメイン及び一次シグナル伝達ドメインを含む第1BCMA CARと、BCMA以外の抗原（例えば、白血病若しくはリンパ腫細胞に発現される抗原、例えば、CD19、CD20、CS-1、軽鎖、CD139、ルイスY抗原若しくはCD38）をターゲティングし、且つ抗原に対する抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン及び共刺激シグナル伝達ドメインを含む第2CARとを含む。一実施形態では、CAR発現細胞は、本明細書に記載のBCMA CARと、CD19をターゲティングするCAR（CD19 CAR）とを含む。

10

20

【0495】

一実施形態では、CAR発現細胞は、本明細書に記載のBCMA CARと、阻害性CARを含む。一実施形態では、阻害性CARは、正常細胞に存在するが、癌細胞には存在しない抗原に結合する抗原結合ドメインを含む。一実施形態では、阻害性CARは、阻害分子の抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞内ドメインを含む。例えば、阻害性CARの細胞内ドメインは、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM（例えば、CEACAM-1、CEACAM-3及び/又はCEACAM-5）、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3（CD276）、B7-H4（VTCN1）、HVEM（TNFRSF14若しくはCD270）、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシン及びTGFRの細胞内ドメインであり得る。

30

【0496】

一実施形態では、CAR発現細胞が2つ以上の異なるCARを含むとき、異なるCARの抗原結合ドメインは、抗原結合ドメインが互いに相互作用しないようなものであり得る。例えば、第1及び第2CARを発現する細胞は、第2CARの抗原結合ドメインとの結合を形成しない第1CARの抗原結合ドメイン、例えば断片として例えばscFvを有し得、例えば、第2CARの抗原結合ドメインは、VHHである。

40

【0497】

一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、その相補性決定領域が単一ドメインポリペプチドの一部である分子を含め、単一ドメイン抗原結合ドメイン（SDAB）分子を含む。例として、限定されないが、重鎖可変ドメイン、天然に軽鎖を欠失した結合分子、一般的な4鎖抗体に由来する単一ドメイン、操作ドメイン並びに抗体由来のもの以外の単一ドメインスカフォールドが挙げられる。SDAB分子は、当技術分野の任意のもの又は任意の将来の単一ドメイン分子であり得る。SDAB分子は、限定されないが、マウス、ヒト、ラクダ、ラマ、ヤツメウナギ、魚類、サメ、ヤギ、ウサギ及びウシなどの任意の種に由

50

来するものであり得る。この用語は、ラクダ科 (Camelidae) 及びサメ以外の種由来の天然に存在する単一ドメイン抗体も含む。

【0498】

一態様では、SDAB分子は、魚類に見出される免疫グロブリンの可変領域に由来するもの、例えば、サメの血清に見出される新規な抗原受容体 (Novel Antigen Receptor) (NAR) として知られる免疫グロブリンアイソタイプに由来するものであり得る。NARの可変領域由来の単一ドメイン分子 (「IgNAR」) を生成する方法は、国際公開第03/014161号パンフレット及びStreletssov (2005) Protein Sci. 14: 2901-2909に記載されている。

【0499】

別の態様では、SDAB分子は、軽鎖を欠失した重鎖として知られる、天然に存在する単一ドメイン分子である。このような単一ドメイン分子は、例えば、国際公開第9404678号パンフレット及びHamers-Casterman, C. et al. (1993) Nature 363: 446-448に記載されている。明瞭化の理由で、天然に軽鎖を欠失した重鎖分子に由来するこの可変ドメインは、4鎖免疫グロブリンの一般的なVHから区別するために、VHH又はナノボディとして本明細書では知られる。このようなVHH分子は、ラクダ科 (Camelidae)、例えば、ラクダ、ラマ、ヒトコブラクダ、アルパカ及びグアナコに由来し得る。ラクダ科 (Camelidae) 以外の他の種も、天然に軽鎖を欠失した重鎖分子を産生することができ；こうしたVHHは、本発明の範囲内である。

【0500】

SDAB分子は、組換え、CDR移植、ヒト化、ラクダ化、脱免疫化された及び/又はインビトロで産生された (例えば、ファージディスプレイにより選択された) ものであり得る。

【0501】

また、受容体の抗原結合ドメイン同士で相互作用する、抗原結合ドメインを含むキメラ膜埋込み型受容体を複数備える細胞は、抗原結合ドメインの1つ以上がそのコグネイト抗原結合ドメインと結合する能力を阻害することから、望ましくない可能性があることも見出されている。従って、こうした相互作用を最小限にする抗原結合ドメインを含む第1及び第2非天然キメラ膜埋込み受容体を有する細胞が本明細書に開示される。また、こうした相互作用を最小限にする抗原結合ドメインを含む第1及び第2の天然に存在するキメラ膜埋込み受容体をコードする核酸並びにそのような細胞及び核酸を作製し、使用方法も本明細書に開示される。一実施形態では、前記第1及び第2非天然キメラ膜埋込み受容体の一方の抗原結合ドメインは、scFvを含み、他方は、単一VHドメイン、例えば、ラクダ科、サメ若しくはヤツメウナギ単一VHドメイン又はヒト若しくはマウス配列由来の単一VHドメインを含む。

【0502】

一部の実施形態では、請求される本発明は、第1及び第2CARを含み、前記第1CAR及び前記第2CARの一方の抗原結合ドメインは、可変軽鎖ドメイン及び可変重鎖ドメインを含まない。一部の実施形態では、前記第1CAR及び前記第2CARの一方の抗原結合ドメインは、scFvであり、他方は、scFvではない。一部の実施形態では、前記第1CAR及び前記第2CARの一方の抗原結合ドメインは、単一VHドメイン、例えば、ラクダ科、サメ若しくはヤツメウナギ単一VHドメイン又はヒト若しくはマウス配列由来の単一VHドメインを含む。一部の実施形態では、前記第1CAR及び第2CARの一方の抗原結合ドメインは、ナノボディを含む。一部の実施形態では、前記第1CAR及び前記第2CARの一方の抗原結合ドメインは、ラクダ科VHHドメインを含む。

【0503】

一部の実施形態では、前記第1CAR及び前記第2CARの一方の抗原結合ドメインは、scFvを含み、他方は、単一VHドメイン、例えば、ラクダ科、サメ若しくはヤツメウナギ単一VHドメイン又はヒト若しくはマウス配列由来の単一VHドメインを含む。一

10

20

30

40

50

部の実施形態では、前記第1CAR及び前記第2CARの一方の抗原結合ドメインは、scFvを含み、他方は、ナノボディを含む。一部の実施形態では、前記第1CAR及び前記第2CARの一方の抗原結合ドメインは、scFvを含み、他方は、ラクダ科VHHドメインを含む。

【0504】

一部の実施形態では、細胞の表面上に存在するとき、前記第1CARの抗原結合ドメインとそのコグネイト抗原の結合は、前記第2CARの存在によって実質的に低減されない。一部の実施形態では、前記第2CARの存在下での前記第1CARの抗原結合ドメインとそのコグネイト抗原の結合は、前記第2CARの非存在下での前記第1CARの抗原結合ドメインとそのコグネイト抗原の結合の85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%である。

10

【0505】

一部の実施形態では、細胞の表面上に存在するとき、前記第1CAR及び前記第2CARの抗原結合ドメインは、両方がscFv抗原結合ドメインである場合よりも低い程度で互いに結合する。一部の実施形態では、前記第1CAR及び前記第2CARの抗原結合ドメインは、両方がscFv抗原結合ドメインである場合よりも85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%低い程度で互いに結合する。

【0506】

一態様において、本明細書に記載されるCAR発現細胞は、別の薬剤、例えばCAR発現細胞の活性を増大する薬剤をさらに発現することができる。例えば、一実施形態では、薬剤は、阻害分子を阻害する薬剤、例えば本明細書に記載される薬剤であり得る。阻害分子、例えばPD1は、一部の実施形態において、CAR発現細胞が免疫エフェクター応答を開始する能力を低減させる。阻害分子の例としては、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM（例えば、CEACAM-1、CEACAM-3及び/又はCEACAM-5）、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3（CD276）、B7-H4（VTCN1）、HVEM（TNFRSF14若しくはCD270）、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシン及びTGFRが挙げられる。一部の実施形態では、阻害分子を阻害する薬剤は、細胞に正のシグナルを付与する第2ポリペプチド（例えば、細胞内シグナル伝達ドメイン）と結合した第1ポリペプチド、例えば、阻害分子を含む。一実施形態では、薬剤は、例えば、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM（例えば、CEACAM-1、CEACAM-3及び/又はCEACAM-5）、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3（CD276）、B7-H4（VTCN1）、HVEM（TNFRSF14若しくはCD270）、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシン及びTGFR又はこれらのいずれかの断片（例えば、これらのいずれかの細胞外ドメインの少なくとも1部分）などの阻害分子の第1ポリペプチドと、本明細書に記載の細胞内シグナル伝達ドメイン（例えば、本明細書に記載されるように、例えば、41BB、CD27ICOS若しくはCD28を含む）及び/又は一次シグナル伝達ドメイン（例えば、本明細書に記載されるCD3シグナル伝達ドメイン）である第2ポリペプチドとを含む。一実施形態では、薬剤は、PD1の第1ポリペプチド又はその断片（例えば、少なくとも、PD1の細胞外ドメインの少なくとも1部分）と、本明細書に記載の細胞内シグナル伝達ドメイン（例えば、本明細書に記載のCD28シグナル伝達ドメイン及び/又は本明細書に記載のCD3シグナル伝達ドメイン）の第2ポリペプチドとを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載CAR発現細胞は、国際公開第2013/019615号パンフレット（その全体が、参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように、スイッチ共刺激受容体を含む。PD1は、CD28、CTLA-4、ICOS及びBTLAも含む受容体のCD28ファミリーの抑制メンバーである。PD-1は、活性化B細胞、T細胞及び骨髄細胞に発現される（Agata et al. 1996 Int. Immunol

20

30

40

50

8 : 7 6 5 - 7 5)。PD 1、PD - L 1 及び PD - L 2 に対する 2 つのリガンドが、PD 1 との結合時に T 細胞の活性化を下方制御することが証明されている (Freeman et al . 2 0 0 0 J Exp Med 1 9 2 : 1 0 2 7 - 3 4 ; Latchman et al . 2 0 0 1 Nat Immunol 2 : 2 6 1 - 8 ; Carter et al . 2 0 0 2 Eur J Immunol 3 2 : 6 3 4 - 4 3)。PD - L 1 は、ヒト癌に豊富に存在する (Dong et al . 2 0 0 3 J Mol Med 8 1 : 2 8 1 - 7 ; Blank et al . 2 0 0 5 Cancer Immunol . Immunother 5 4 : 3 0 7 - 3 1 4 ; Konishi et al . 2 0 0 4 Clin Cancer Res 1 0 : 5 0 9 4)。PD 1 と PD - L 1 の局所相互作用を阻害することにより、免疫抑制を逆転することができる。

10

【 0 5 0 7 】

一実施形態では、薬剤は、阻害分子、例えば、プログラム細胞死 (PD 1) の細胞外ドメイン (ECD) を含み、膜貫通ドメイン並びに 4 1 B B 及び CD 3 などの細胞内シグナル伝達ドメインに融合することができる (PD 1 CAR としても知られる)。一実施形態では、PD 1 CAR は、本明細書に記載の BCMA CAR と組み合わせて使用すると、CAR 発現細胞、例えば、T 細胞若しくは NK 細胞の持続を改善する。一実施形態では、CAR は、配列番号 2 4 において下線部として示される PD 1 の細胞外ドメインを含む PD 1 CAR である。一実施形態では、PD 1 CAR は、配列番号 2 4 のアミノ酸配列を含む。

【 0 5 0 8 】

一実施形態では、PD 1 CAR は、以下に提供されるアミノ酸配列 (配列番号 2 2) を含む。

20

【 0 5 0 9 】

一実施形態では、薬剤は、PD 1 CAR をコードする核酸配列、例えば、本明細書に記載される PD 1 CAR を含む。一実施形態では、PD 1 CAR に対する核酸配列は、配列番号 2 3 として提供され、下線部の PD 1 ECD を含む。

【 0 5 1 0 】

別の態様において、本発明は、CAR 発現細胞、例えば、CAR T 細胞若しくは CAR 発現 NK 細胞の集団を提供する。一部の実施形態では、CAR 発現細胞の集団は、異なる CAR を発現する細胞の混合物を含む。例えば、一実施形態において、CAR 発現細胞 (例えば、CAR T 細胞若しくは CAR 発現 NK 細胞) の集団は、本明細書に記載の抗 BCMA 結合ドメインを有する CAR を発現する第 1 細胞と、異なる抗 BCMA 結合ドメイン、例えば、第 1 細胞により発現される CAR 中の抗 BCMA 結合ドメインと異なる本明細書に記載の抗 BCMA 結合ドメインを有する CAR を発現する第 2 細胞とを含み得る。別の例として、CAR 発現細胞の集団は、例えば、本明細書に記載されるような抗 BCMA 結合ドメインを含む CAR を発現する第 1 細胞と、BCMA 以外の標的 (例えば、CD 1 9、CD 2 0、CS - 1、軽鎖、CD 1 3 9、ルイス Y 抗原又は CD 3 8) に対する抗原結合ドメインを含む CAR を発現する第 2 細胞とを含み得る。一実施形態では、CAR 発現細胞の集団は、例えば、本明細書に記載されるような抗 BCMA 結合ドメインを含む CAR を発現する第 1 細胞と、CD 1 9 をターゲティングする抗原結合ドメインを含む CAR (CD 1 9 CAR) を発現する第 2 細胞とを含む。一実施形態では、CAR 発現細胞の集団は、例えば、一次細胞内シグナル伝達ドメインを含む CAR を発現する第 1 細胞と、二次シグナル伝達ドメインを含む CAR を発現する第 2 細胞とを含む。

30

40

【 0 5 1 1 】

別の態様において、本発明は、細胞の集団を提供し、ここで、集団中の少なくとも 1 つの細胞は、本明細書に記載の抗 BCMA ドメインを有する CAR を発現し、第 2 細胞は、別の薬剤、例えば CAR 発現細胞の活性を増大する薬剤を発現する。例えば、一実施形態では、薬剤は、阻害分子を阻害する薬剤であり得る。阻害分子は、例えば、一部の実施形態において、CAR 発現細胞が免疫エフェクター応答を開始する能力を減少させ得る。阻害分子の例としては、PD 1、PD - L 1、PD - L 2、CTLA 4、TIM 3、CEA

50

C A M (例えば、C E A C A M - 1、C E A C A M - 3 及び / 又は C E A C A M - 5)、L A G 3、V I S T A、B T L A、T I G I T、L A I R 1、C D 1 6 0、2 B 4、C D 8 0、C D 8 6、B 7 - H 3 (C D 2 7 6)、B 7 - H 4 (V T C N 1)、H V E M (T N F R S F 1 4 若しくは C D 2 7 0)、K I R、A 2 a R、M H C クラス I、M H C クラス II、G A L 9、アデノシン及び T G F R が挙げられる。一部の実施形態では、阻害分子を阻害する薬剤は、細胞に正のシグナルを付与する第 2 ポリペプチド (例えば、本明細書に記載の細胞内シグナル伝達ドメイン) と結合した第 1 ポリペプチド、例えば、阻害分子を含む。一実施形態では、薬剤は、例えば、P D 1、P D - L 1、P D - L 2、C T L A 4、T I M 3、C E A C A M (例えば、C E A C A M - 1、C E A C A M - 3 及び / 又は C E A C A M - 5)、L A G 3、V I S T A、B T L A、T I G I T、L A I R 1、C D 1 6 0、2 B 4、C D 8 0、C D 8 6、B 7 - H 3 (C D 2 7 6)、B 7 - H 4 (V T C N 1)、H V E M (T N F R S F 1 4 若しくは C D 2 7 0)、K I R、A 2 a R、M H C クラス I、M H C クラス II、G A L 9、アデノシン及び T G F R 又はこれらのいずれかの断片 (例えば、これらのいずれかの細胞外ドメインの少なくとも 1 部分) などの阻害分子の第 1 ポリペプチドと、本明細書に記載の細胞内シグナル伝達ドメイン (例えば、本明細書に記載されるように、例えば、4 1 B B、C D 2 7、I C O S 若しくは C D 2 8 を含む) 及び / 又は一次シグナル伝達ドメイン (例えば、本明細書に記載される C D 3 シグナル伝達ドメイン) である第 2 ポリペプチドとを含む。一実施形態では、薬剤は、P D 1 の第 1 ポリペプチド又はその断片 (例えば、P D 1 の細胞外ドメインの少なくとも 1 部分) と、本明細書に記載の細胞内シグナル伝達ドメイン (例えば、本明細書に記載の C D 2 8 シグナル伝達ドメイン及び / 又は本明細書に記載の C D 3 シグナル伝達ドメイン) の第 2 ポリペプチドとを含む。

10

20

30

40

50

【 0 5 1 2 】

一態様において、本発明は、C A R 発現細胞 (例えば、C A R T 細胞若しくは C A R 発現 N K 細胞) の集団、例えば、別の薬剤、例えば、キナーゼ阻害剤 (例えば、本明細書に記載のキナーゼ阻害剤) と組み合わせた、異なる C A R を発現する細胞の混合物を投与することを含む方法を提供する。別の態様において、本発明は、別の薬剤、例えば、キナーゼ阻害剤 (例えば、本明細書に記載のキナーゼ阻害剤) と組み合わせた細胞の集団であって、集団中の少なくとも 1 つの細胞が、本明細書に記載の抗癌関連抗原結合ドメインを有する C A R を発現し、第 2 細胞が、別の薬剤、例えば C A R 発現細胞の活性を増大する薬剤を発現する、細胞の集団を投与することを含む方法を提供する。

【 0 5 1 3 】

ナチュラルキラー細胞受容体 (N K R) C A R

一実施形態において、本明細書に記載の C A R 分子は、ナチュラルキラー細胞受容体 (N K R) の 1 つ以上の成分を含み、それにより、N K R - C A R を形成する。N K R 成分は、以下のナチュラルキラー細胞受容体のいずれか由来の膜貫通ドメイン、ヒンジドメイン又は細胞質ドメインであり得る：キラー細胞免疫グロブリン様受容体 (K I R)、例えば、K I R 2 D L 1、K I R 2 D L 2 / L 3、K I R 2 D L 4、K I R 2 D L 5 A、K I R 2 D L 5 B、K I R 2 D S 1、K I R 2 D S 2、K I R 2 D S 3、K I R 2 D S 4、D I R 2 D S 5、K I R 3 D L 1 / S 1、K I R 3 D L 2、K I R 3 D L 3、K I R 2 D P 1 及び K I R 3 D P 1；天然細胞傷害性受容体 (N C R)、例えば、N K p 3 0、N K p 4 4、N K p 4 6；免疫細胞受容体のシグナル伝達リンパ球活性化分子 (S L A M) ファミリー、例えば、C D 4 8、C D 2 2 9、2 B 4、C D 8 4、N T B - A、C R A C C、B L A M E 及び C D 2 F - 1 0；F c 受容体 (F c R)、例えば C D 1 6 及び C D 6 4；並びに L y 4 9 受容体、例えば L Y 4 9 A、L Y 4 9 C。本明細書に記載の N K R - C A R 分子は、アダプター分子又は細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、D A P 1 2 と相互作用し得る。N K R 要素を含む C A R 分子の例示的な配置及び配列は、国際公開第 2 0 1 4 / 1 4 5 2 5 2 号パンフレットに記載され、その内容は参照により本明細書に援用される。

【 0 5 1 4 】

非抗体足場

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、非抗体足場、例えば、フィブロネクチン、アンキリン、ドメイン抗体、リポカリン、小モジュラー免疫医薬品、マキシボディ、プロテインA又はアフィリンを含む。非抗体足場は、細胞上の標的抗原に結合する能力を有する。いくつかの実施形態において、抗原結合ドメインは、細胞上で発現される天然に存在するタンパク質のポリペプチド又はその断片である。一部の実施形態において、抗原結合ドメインは、非抗体足場を含む。得られるポリペプチドが、標的細胞上の標的抗原に特異的に結合する少なくとも1つの結合領域を含む限り、多様な非抗体足場を使用することができる。

【0515】

非抗体足場としては、フィブロネクチン (Novartis, MA)、アンキリン (Molecular Partners AG, Zurich, スイス)、ドメイン抗体 (Domantis, Ltd., Cambridge, MA 及び Ablynx nv, Zwijnaarde, ベルギー)、リポカリン (Pieris Proteolab AG, Freising, ドイツ)、小モジュラー免疫医薬品 (Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA)、マキシボディ (Avidia, Inc., Mountain View, CA)、プロテインA (Affibody AG, スウェーデン) 並びにアフィリン (クリスタリン又はユビキチン) (Scil Proteins GmbH, Halle, ドイツ) が挙げられる。

【0516】

キメラ抗原受容体を制御するための戦略

CAR活性を制御することができる多くの方法がある。一部の実施形態において、CAR活性を制御することができる制御可能CAR (RCAR) は、CAR療法の安全性及び有効性を最適化するために望ましい。例えば、二量体化ドメインに融合したカスパーゼを用いた、例えば、アポトーシスの誘導 (例えば、Dietal., N Engl. J. Med. 2011 Nov. 3; 365 (18): 1673 - 1683 を参照されたい) を本発明のCAR療法の安全スイッチとして使用することができる。別の例において、CAR発現細胞は、誘導性カスパーゼ-9 (iCaspase-9) 分子も発現することができる。これは、二量体化因子薬物 (例えば、リミズシド (rimiducid) (AP1903 (Bellicum Pharmaceuticals) 又は AP20187 (Ariad) と呼ばれる) の投与により、細胞のカスパーゼ-9の活性化及びアポトーシスを起こす。iCaspase-9分子は、二量体化 (CID) 結合ドメインの化学誘導因子を含み、これは、CIDの存在下で二量体化を媒介する。これは、CAR発現細胞の誘導的及び選択的枯渇を引き起こす。いくつかの事例では、iCaspase-9分子は、CARコードベクターとは別の核酸分子によってコードされる。いくつかの事例では、iCaspase-9分子は、CARコードベクターと同じ核酸分子によってコードされる。iCaspase-9は、CAR発現細胞のあらゆる毒性を回避するための安全スイッチを提供することができる。例えば、Song et al. Cancer Gene Ther. 2008; 15 (10): 667 - 75; Clinical Trial Id. No. NCT02107963; 及び Di Stasi et al. N. Engl. J. Med. 2011; 365: 1673 - 83 を参照されたい。

【0517】

本発明のCAR療法を制御するための代替的戦略は、例えば、抗体依存性細胞傷害 (ADCC) の誘発により、例えばCAR発現細胞を消失させることにより、CAR活性を脱活性化若しくは遮断する小分子又は抗体の利用を含む。例えば、本明細書に記載のCAR発現細胞は、細胞死、例えば、ADCC又は補体誘導性細胞死を誘発することができる分子により認識される抗原も発現し得る。例えば、本明細書に記載のCAR発現細胞は、抗体又は抗体フラグメントにより標的化され得る受容体も発現し得る。このような受容体の例としては、EPCAM、VEGFR、インテグリン (例えば、インテグリン 3、4、3/4 3、4 7、5 1、3、)、TNF受容体スーパー

10

20

30

40

50

ファミリーのメンバー（例えば、TRAIL-R1、TRAIL-R2）、PDGF受容体、インターフェロン受容体、葉酸受容体、GPNMB、ICAM-1、HLA-DR、CEA、CA-125、MUC1、TAG-72、IL-6受容体、5T4、GD2、GD3、CD2、CD3、CD4、CD5、CD11、CD11a/LFA-1、CD15、CD18/ITGB2、CD19、CD20、CD22、CD23/IgE受容体、CD25、CD28、CD30、CD33、CD38、CD40、CD41、CD44、CD51、CD52、CD62L、CD74、CD80、CD125、CD147/ペイシジン、CD152/CTLA-4、CD154/CD40L、CD195/CCR5、CD319/SLAMF7及びEGFR並びにその切断バージョン（例えば、1つ以上の細胞外エピトープを保持するが、細胞質ドメイン内の1つ以上の領域を欠くバージョン）を含む。例えば、本明細書に記載のCAR発現細胞は、シグナル伝達能力を欠くが、ADCCを誘発できる分子、例えばセツキシマブ（アービタックス（登録商標））により認識されるエピトープを保持する切断型上皮細胞増殖因子受容体（EGFR）も発現し得、その結果、セツキシマブの投与が、ADCC及び続くCAR発現細胞の枯渇を誘発する（例えば、国際公開第2011/056894号パンフレット及びJonnalagadda et al., Gene Ther., 2013; 20(8)853-860を参照されたい）。別の戦略は、例えば、ADCCによりCAR発現細胞の選択的枯渇をもたらす、リツキシマブに結合する、本明細書に記載のCAR発現細胞におけるCD32及びCD20抗原の両方からの標的エピトープを合わせる、高度に小型のマーカ-自殺遺伝子の発現を含む（例えば、Philip et al., Blood, 2014; 124(8)1277-1287を参照されたい）。本明細書に記載のCAR発現細胞を枯渇させる他の方法は、例えば、ADCCを誘発することにより、破壊の目的で成熟リンパ球、例えばCAR発現細胞に選択的に結合して、これをターゲティングするモノクローナル抗CD52抗体であるCAMPATH（登録商標）の投与を含む。他の実施形態において、CAR発現細胞は、CARリガンド、例えば抗イディオタイプ抗体を使用して選択的にターゲティングされ得る。一部の実施形態において、抗イディオタイプ抗体は、エフェクター細胞活性、例えばADCC又はADC活性を引き起こし、それによりCAR発現細胞数を減らすことができる。他の実施形態において、CARリガンド、例えば抗イディオタイプ抗体は、細胞殺傷を誘発する薬剤、例えばトキシンに結合させ、それによりCAR発現細胞数を減らすことができる。これに代わり、CAR分子自体を、下記のように、活性を制御する、例えばオン及びオフ状態にすることができるように配置できる。

【0518】

一部の実施形態において、RCARは、本明細書に記載の標準的CARの要素、例えば抗原結合ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインが個別のポリペプチド又はメンバーに配置された、一連のポリペプチド、典型的には最も単純な実施形態において2つのポリペプチドを含む。一部の実施形態において、一連のポリペプチドは、二量体化分子の存在下で互いにポリペプチドと結合することができる、例えば、抗原結合ドメインを細胞内シグナル伝達ドメインに結合することができる二量体化スイッチを含む。このような制御可能なCARのさらなる説明及び例示的な配置は、本明細書及び国際公開第2015/090229号パンフレットに提供され、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0519】

一実施形態において、RCARは、2つのポリペプチド又はメンバー：1)細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、本明細書に記載の初代細胞内シグナル伝達ドメインと、第1スイッチドメインを含む細胞内シグナル伝達メンバー；2)例えば、本明細書に記載されるように、本明細書に記載の腫瘍抗原をターゲティングする抗原結合ドメインと、第2スイッチドメインを含む抗原結合メンバーを含む。任意選択で、RCARは、本明細書に記載の膜貫通ドメインを含む。一実施形態では、膜貫通ドメインは、細胞内シグナル伝達メンバー、抗原結合メンバー又はその両方に配置され得る。（別に指示のない限り、RCARのメンバー若しくはエレメントが本明細書に記載される場合、順序は提供される通りであり得るが、他の順序も同様に含まれる。言い換えれば、一実施形態では、本文中に順序

が記載されるが、他の実施形態では、順序は異なっている可能性がある。例えば、膜貫通領域の片側のエレメントの順序は、実施例と異なり得、例えば、細胞内シグナル伝達ドメインに対するスイッチドメインの配置は、相違し得る、例えば逆転される可能性がある）。

【0520】

一実施形態において、第1及び第2スイッチドメインは、細胞内又は細胞外二量体化スイッチを形成することができる。一実施形態では、二量体化スイッチは、ホモ二量体化スイッチであり得、例えば、第1及び第2スイッチドメインは、同じであるか又はヘテロ二量体化スイッチであり、例えば、第1及び第2スイッチドメインは、互いに異なる。

【0521】

一実施形態において、RCARは、「マルチスイッチ」を含み得る。マルチスイッチは、ヘテロ二量体化スイッチドメイン又はホモ二量体化スイッチドメインを含み得る。マルチスイッチは、第1メンバー、例えば、抗原結合メンバー及び第2メンバー、例えば、細胞内シグナル伝達メンバー上に、独立して、複数、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個のスイッチドメインを含む。一実施形態では、第1メンバーは、複数の第1スイッチドメイン、例えば、FKBPベースのスイッチドメインを含み、第2メンバーは、複数の第2スイッチドメイン、例えば、FRBベースのスイッチドメインを含む。一実施形態では、第1メンバーは、第1及び第2スイッチドメイン、例えば、FKBPベースのスイッチドメインとFRBベースのスイッチドメインを含み、第2メンバーは、第1及び第2スイッチドメイン、例えば、FKBPベースのスイッチドメインとFRBベースのスイッチドメインを含み得る。

【0522】

一実施形態において、細胞内シグナル伝達メンバーは、1つ以上の細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、一次シグナル伝達ドメインと、1つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインを含む。

【0523】

一実施形態において、抗原結合メンバーは、1つ以上の細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、1つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインを含み得る。一実施形態では、抗原結合メンバーは、複数、例えば、2又は3つの本明細書に記載される共刺激シグナル伝達ドメイン、例えば、4-1BB、CD28、CD27、ICOS及びOX-40から選択される共刺激シグナル伝達ドメインを含み、いくつかの実施形態では、一次シグナル伝達ドメインを含まない。一実施形態では、抗原結合メンバーは、細胞外から細胞内の方向に、以下の共刺激シグナル伝達ドメイン：4-1BB-CD27；4-1BB-CD27；CD27-4-1BB；4-1BB-CD28；CD28-4-1BB；OX40-CD28；CD28-OX40；CD28-4-1BB；又は4-1BB-CD28を含む。こうした実施形態では、細胞内結合メンバーは、CD3ドメインを含む。1つのこうした実施形態では、RCARは、(1)抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインと、2つの共刺激シグナル伝達ドメイン及び第1スイッチドメインを含む抗原結合メンバー；並びに(2)膜貫通ドメイン又は膜テザリングドメインと、少なくとも1つの一次シグナル伝達ドメイン及び第2スイッチドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【0524】

一実施形態は、抗原結合メンバーが、CAR細胞の表面にテザリングされていないRCARを提供する。これにより、抗原結合メンバーをコードする配列で細胞を形質変換することなく、細胞内シグナル伝達メンバーを有する細胞を1つ以上の抗原結合ドメインと好適に対合させることが可能になる。こうした実施形態では、RCARは、1)第1スイッチドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、一次シグナル伝達ドメイン及び第1スイッチドメインを含む細胞内シグナル伝達メンバー；並びに2)抗原結合ドメイン及び第2スイッチドメインを含む抗原結合メンバーを含み、抗原結合メンバーは、膜貫通ドメイン又は膜テザリングドメインを含まず、任意選択で、細胞内シグナル伝達ドメインを含まない。一部の実施形態では、RCARは、3)第2抗原結合ドメイン

10

20

30

40

50

、例えば、抗原結合ドメインにより結合された異なる抗原に結合する第2抗原結合ドメイン；及び第2スイッチドメインを含む第2抗原結合メンバーをさらに含む得る。

【0525】

また、抗原結合メンバーが、二重特異性活性化及びターゲティング能力を含むRCARも本明細書に提供される。この実施形態では、抗原結合メンバーは、複数、例えば、2、3、4若しくは5つの抗原結合ドメイン、例えば、scFvを含むことができ、各抗原結合ドメインは、標的抗原、例えば、異なる抗原又は同じ抗原、例えば、同じ抗原上の同じ若しくは異なるエピトープに結合する。一実施形態では、複数の抗原結合ドメインは、タンデムであり、任意選択で、リンカー又はヒンジ領域は、抗原結合ドメインの各々の間に配置される。好適なリンカー及びヒンジ領域は本明細書に記載される。

10

【0526】

一実施形態は、増殖のスイッチングを可能にする構成を有するRCARを提供する。この実施形態では、RCARは、1)任意選択で、膜貫通ドメイン又は膜テザリングドメイン；4-1BB、CD28、CD27、ICOS及びOX-40から選択される1つ以上の共刺激シグナル伝達ドメイン及びスイッチドメインを含む細胞内シグナル伝達メンバー；並びに2)抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン及び一次シグナル伝達ドメイン、例えば、CD3ドメインを含む抗原結合メンバーを含み、抗原結合メンバーは、スイッチドメインを含まないか、又は細胞内シグナル伝達メンバー上でスイッチドメインと二量体化するスイッチドメインを含まない。一実施形態では、抗原結合メンバーは、共刺激シグナル伝達ドメインを含まない。一実施形態では、細胞内シグナル伝達メンバーは、ホモ二量体化スイッチからのスイッチドメインを含む。一実施形態では、細胞内シグナル伝達メンバーは、ヘテロ二量体化スイッチの第1スイッチドメインを含み、RCARは、ヘテロ二量体化スイッチの第2スイッチドメインを含む第2細胞内シグナル伝達ドメインを含む。こうした実施形態では、第2細胞内シグナル伝達メンバーは、細胞内シグナル伝達メンバーと同じ細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一実施形態では、二量体化スイッチは、細胞内である。一実施形態では、二量体化スイッチは、細胞外である。

20

【0527】

本明細書に記載されるRCAR構成のいずれかにおいて、第1及び第2スイッチドメインは、本明細書に記載されるようなFKBP-FRBベースのスイッチを含む。

【0528】

また、本明細書に記載のRCARを含む細胞も本明細書に提供される。RCARを発現するように操作された任意の細胞をRCARX細胞として用いることができる。一実施形態では、RCARX細胞は、T細胞であり、RCART細胞と呼ばれる。一実施形態では、RCARX細胞は、NK細胞であり、RCARN細胞と呼ばれる。

30

【0529】

さらに、RCARコード配列を含む核酸及びベクターも本明細書に提供される。RCARの様々なエレメントをコードする配列を同じ核酸分子、例えば、同じプラスミド又はベクター、例えば、ウイルスベクター、例えば、レンチウイルスベクターに配置することができる。一実施形態では、(i)抗原結合メンバーをコードする配列及び(ii)細胞内シグナル伝達メンバーをコードする配列が、同じ核酸分子、例えば、ベクター上に存在し得る。対応するタンパク質の生産は、例えば、個別のプロモーターの使用又は2シストロン性転写産物(これは、単一翻訳産物の切断又は2つの個別のタンパク質産物の翻訳により2つのタンパク質の生産をもたらし得る)に使用によって達成され得る。一実施形態では、切断可能なペプチド、例えば、P2A又はF2A配列をコードする配列は、(i)と(ii)の間に配置される。一実施形態では、IRESをコードする配列、例えば、EMCV又はEV71IRESをコードする配列は、(i)と(ii)の間に配置される。これらの実施形態では、(i)及び(ii)は、単一RNAとして転写される。一実施形態では、(i)及び(ii)が個別のmRNAとして転写されるように、第1プロモーターが(i)と作動可能に連結され、第2プロモーターが(ii)と作動可能に連結される。

40

50

【0530】

代わりに、RCARの様々なエレメントをコードする配列は、異なる核酸分子、例えば、異なるプラスミド又はベクター、例えばウイルスペクター、例えばレンチウイルスペクター上に配置される。例えば、(i)抗原結合メンバーをコードする配列は、第1核酸、例えば第1ベクター上に存在し得、(ii)細胞内シグナル伝達メンバーをコードする配列は、第2核酸、例えば第2ベクター上に存在し得る。

【0531】

二量体化スイッチ

二量体化スイッチは、非共有結合又は共有結合であり得る。非共有結合二量体化スイッチの場合、二量体化分子は、スイッチドメイン同士の非共有結合相互作用を促進する。共有結合二量体化スイッチの場合、二量体化分子は、スイッチドメイン同士の共有結合相互作用を促進する。

10

【0532】

一実施形態では、RCARは、FKBP/FRAP又はFKBP/FRBベースの二量体化スイッチを含む。FKBP12(FKBP又はFK506結合タンパク質)は、天然産物の免疫抑制薬、ラパマイシンの初期細胞内標的として役立つ豊富な細胞質タンパク質である。ラパマイシンは、FKBP及び大型PI3KホモログFRAP(RAFT、mTOR)に結合する。FRBは、FRAPの93アミノ酸部分であり、これは、FKBP-ラパマイシン複合体に結合するのに十分である(Chen, J., Zheng, X.F., Brown, E.J. & Schreiber, S.L. (1995) Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. Proc Natl Acad Sci U S A 92:4947-51)。

20

【0533】

一実施形態では、FKBP/FRAP、例えば、FKBP/FRBベースのスイッチは、二量体化分子、例えば、ラパマイシン又はラパマイシンアナログを使用することができる。

【0534】

FKBPの例示的なアミノ酸配列は、以下の通りである。

30

【化8】

DVPDYASLGGPSSPKKKRKRKVS RGVQVETISPGDGRTFPKRGQT
CVVHYTGMLLEDGKKFDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQM
SVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLETSY

(配列番号275)

【0535】

いくつかの実施形態では、FKBPスイッチドメインは、ラパマイシン又はラパログの存在下で、FRB又はそのフラグメント若しくはアナログと結合する能力を有するFKBPのフラグメントを含み得る。一実施形態では、FKBPスイッチドメインは、以下のアミノ酸配列を含む。

40

【化9】

VQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKFDSSRDRN
KPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHP
GIIPPHATLVFDVELLKLETS (配列番号276)

【0536】

50

FRBのアミノ酸配列は、以下の通りである。

ILWHEMWHEG LEEASRLYFG ERNVKGMFEV LEPLHAM
MER GPQTLKETSF NQAYGRDLME AQEWCRKYMK SGN
VKDLTQA WDLYYHVFRR ISK (配列番号277)

【0537】

「FKBP / FRAP、例えば、FKBP / FRBベースのスイッチ」は、この用語が本明細書で使用されるとき、以下を含む二量体化スイッチを指す：ラパマイシン又はラパログ、例えば、RAD001の存在下で、FRB又はそのフラグメント若しくはアナログと結合する能力を有するFKBPフラグメント若しくはそのアナログを含み、且つ配列番号275又は276のFKBP配列と少なくとも70、75、80、85、90、95、96、97、98若しくは99%の配列同一性を有するか、又はそれと30、25、20、15、10、5、4、3、2若しくは1アミノ酸残基のみが相違しない第1スイッチドメイン；並びにラパマイシン又はラパログの存在下で、FRB又はそのフラグメント若しくはアナログと結合する能力を有するFRBフラグメント若しくはそのアナログを含み、且つ配列番号277のFRB配列と少なくとも70、75、80、85、90、95、96、97、98若しくは99%の配列同一性を有するか、又はそれと30、25、20、15、10、5、4、3、2若しくは1アミノ酸残基のみが相違しない第2スイッチドメイン。一実施形態では、本明細書に記載されるRCARは、配列番号275（又は配列番号276）に開示されるアミノ酸残基を含む1つのスイッチドメインと、配列番号277に開示されるアミノ酸残基を含む1つのスイッチドメインを含む。

10

20

【0538】

いくつかの実施形態では、FKBP / FRB二量体化スイッチは、FRBベースのスイッチドメイン、例えば、修飾FRBスイッチドメイン、FKBPベースのスイッチドメインと、二量体化分子、例えば、ラパマイシン又はラパログ、例えば、RAD001の間に、改変された、例えば、増強された複合体形成を呈示する修飾FRBスイッチドメインを含む。一実施形態では、修飾FRBスイッチドメインは、アミノ酸位置：L2031、E2032、S2035、R2036、F2039、G2040、T2098、W2101、D2102、Y2105及びF2108における突然変異から選択される、1つ以上、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10若しくはそれを超える突然変異を含み、野生型アミノ酸は、いずれか他の天然に存在するアミノ酸に変異している。一実施形態では、突然変異型FRBは、E2032に突然変異を含み、E2032は、フェニルアラニン（E2032F）、メチオニン（E2032M）、アルギン（E2032R）、バリン（E2032V）、チロシン（E2032Y）、イソロイシン（E2032I）、例えば、配列番号278又はロイシン（E2032L）、例えば、配列番号279に変異している。一実施形態では、突然変異FRBは、T2098に突然変異を含み、T2098は、フェニルアラニン（T2098F）又はロイシン（T2098L）、例えば、配列番号280に変異している。一実施形態では、突然変異型FRBは、E2032及びT2098に突然変異を含み、E2032は、任意のアミノ酸に変異し、T2098は、任意のアミノ酸、例えば、配列番号281に変異している。一実施形態では、突然変異型FRBは、E2032I及びT2098L突然変異、例えば、配列番号282を含む。一実施形態では、突然変異型FRBは、E2032L及びT2098突然変異、例えば、配列番号283を含む。

30

40

【0539】

50

【表 1 0 0】

表 18. 二量体化分子に対して増大した親和性を有する例示的な突然変異体 FRB。

FRB 突然変異体	アミノ酸配列	配列番号
E2032I 突然変異体	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKGMFVLEPLHAMMERGPQTLKE TSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRI SKTS	278
E2032L 突然変異体	ILWHEMWHEGLLEASRLYFGERNVKGMFVLEPLHAMMERGPQTLKE TSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRI SKTS	279
T2098L 突然変異体	ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFVLEPLHAMMERGPQTLKE TSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRI SKTS	280
E2032, T2098 突然変異体	ILWHEMWHEGL X EASRLYFGERNVKGMFVLEPLHAMMERGPQTLKE TSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDL X QAWDLYYHVFRRI SKTS (X は、任意のアミノ酸残基である)	281
E2032I, T2098L 突然変異体	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKGMFVLEPLHAMMERGPQTLKE TSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRI SKTS	282
E2032L, T2098L 突然変異体	ILWHEMWHEGLLEASRLYFGERNVKGMFVLEPLHAMMERGPQTLKE TSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRI SKTS	283

10

【0 5 4 0】

他の好適な二量体化スイッチとしては、GyrB - GyrB ベースの二量体化スイッチ、ジベレリン (Gibberellin) ベースの二量体化スイッチ、タグ/バインダー二量体化スイッチ及びハロ-タグ/スナップ-タグ二量体化スイッチが挙げられる。本明細書に提供されるガイドラインに従って、こうしたスイッチ及び関連二量体化分子は、当業者には明らかであろう。

20

【0 5 4 1】

二量体化分子

二量体化分子によってスイッチドメイン同士の結合が促進される。二量体化分子の存在下で、スイッチドメイン同士の相互作用又は結合は、第1スイッチドメインと結合した、例えば、それと融合したポリペプチドと、第2スイッチドメインと結合した、例えば、それと融合したポリペプチドとの間のシグナル伝達を可能にする。非限定的なレベルの二量体化分子の存在下で、シグナル伝達は、例えば、本明細書に記載のシステムで測定して、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、5、10、50、100倍増大する。

30

【0 5 4 2】

本明細書に記載されるFKBP / FRB ベースの二量体化スイッチにおける二量体化分子として、ラパマイシン及びラパマイシンアナログ(場合によっては、ラパログと呼ばれる)、例えば、RAD001を使用することができる。一実施形態では、二量体化分子は、ラパマイシン(シロリムス)、RAD001(エベロリムス)、ゾタロリムス、テムシロリムス、AP-23573(リダホロリムス)、ピオリムス及びAP21967から選択することができる。FKBP / FRB ベースの二量体化スイッチに使用するのに好適な別のラパマイシンアナログは、「併用療法」と題するセクション又は「低、免疫増強、用量のmTOR阻害剤との併用」と題するサブセクションにさらに詳しく記載される。

40

【0 5 4 3】

スプリットCAR

一部の実施形態において、CAR発現細胞は、スプリットCARを使用する。スプリットCARアプローチは、本明細書に参照により組み込まれる国際公開第2014/055442号パンフレット及び同第2014/055657号パンフレットに、より詳細に記載されている。簡潔には、スプリットCAR系は、第1抗原結合ドメイン及び共刺激ドメイン(例えば、41BB)を有する第1CARを発現する細胞を含み、細胞は、第2抗原結合ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、CD3)を有する第2CARも発現する。細胞が第1抗原に遭遇すると、共刺激ドメインが活性化され、細胞が増殖する。細胞が第2抗原に遭遇すると、細胞内シグナル伝達ドメインが活性化され、細胞殺傷活性が開始される。そのため、CAR発現細胞は、両方の抗原の存在下でのみ完全活性化

50

される。いくつかの実施形態では、第1抗原結合ドメインは、BCMAを認識し、例えば、本明細書に記載の抗原結合ドメインを含み、第2抗原結合ドメインは、急性骨髄性白血病細胞に発現される抗原、例えば、CD123、CLL-1、CD34、FLT3若しくは葉酸受容体を認識する。いくつかの実施形態では、第1抗原結合ドメインは、BCMAを認識し、例えば、本明細書に記載の抗原結合ドメインを含み、第2抗原結合ドメインは、B細胞に発現される抗原、例えば、CD10、CD19、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179b又はCD79aを認識する。

【0544】

CARと他の分子又は薬剤との共発現

10

第2のCARの共発現

一部の実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞は、第2のCAR、例えば同じ標的（例えば、CD19）又は異なる標的（例えば、CD19以外の標的、例えば、本明細書に記載の標的）に対する、例えば第2のCARの異なる抗原結合ドメインをさらに含み得る。一部の実施形態において、CAR発現細胞は、第1の抗原を標的とし、共刺激シグナル伝達ドメインを有するが、一次シグナル伝達ドメインを有しない細胞内シグナル伝達ドメインを含む第1のCAR及び第2の、異なる、抗原を標的とし、一次シグナル伝達ドメインを有するが、共刺激シグナル伝達ドメインを有しない細胞内シグナル伝達ドメインを含む第2のCARを含む。第1のCARへの共刺激シグナル伝達ドメイン、例えば4-1BB、CD28、CD27、OX-40又はICOS及び一次シグナル伝達ドメイン、例えばCD3の第2のCARへの配置は、両標的が発現される細胞に対してCAR活性を制限する。一部の実施形態において、CAR発現細胞は、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン及び共刺激ドメインを含む第1のCAR及び他の抗原を標的とし、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン及び一次シグナル伝達ドメインを含む第2のCARを含む。一部の実施形態において、CAR発現細胞は、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン及び一次シグナル伝達ドメインを含む第1のCAR及び他の抗原を標的とし、抗原に対する抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン及び共刺激シグナル伝達ドメインを含む第2のCARを含む。

20

【0545】

一部の実施形態において、CAR発現細胞は、本明細書に記載のXCAR及び阻害性CARを含む。一部の実施形態において、阻害性CARは、正常細胞、例えばXも発現する正常細胞で見られるが、癌細胞で見られない抗原と結合する抗原結合ドメインを含む。一部の実施形態において、阻害性CARは、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン及び阻害分子の細胞内ドメインを含む。例えば、阻害性CARの細胞内ドメインは、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM（CEACAM-1、CEACAM-3及び/又はCEACAM-5）、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3（CD276）、B7-H4（VTCN1）、HVEM（TNFRSF14又はCD270）、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシン及びTGF（例えば、TGF）の細胞内ドメインであり得る。

30

40

【0546】

一部の実施形態において、CAR発現細胞が2以上の異なるCARを含むとき、異なるCARの抗原結合ドメインは、抗原結合ドメインが互いに相互作用しないようなものである。例えば、第1及び第2のCARを発現する細胞は、第2のCARの抗原結合ドメイン、例えばVHHである第2のCARの抗原結合ドメインと結合を形成しない、例えばフラグメント、例えばscFvとしての第1のCARの抗原結合ドメインを有し得る。

【0547】

一部の実施形態において、抗原結合ドメインは、単ドメイン抗原結合（SDAB）分子を含み、相補的決定領域が単ドメインポリペプチドの一部である分子を含む。例は、重鎖可変ドメイン、軽鎖を天然に欠く結合分子、慣用の4鎖抗体由来の単ドメイン、操

50

作されたドメイン及び抗体由来のもの以外の単一ドメインスキフォールドを含むが、これらに限定されない。S D A B分子は、当技術分野の又は将来的な単一ドメイン分子であり得る。S D A B分子は、マウス、ヒト、ラクダ、ラマ、ヤツメウナギ、魚類、サメ、ヤギ、ウサギ及びウシを含むが、これらに限定されない任意の種由来であり得る。この用語は、ラクダ科 (C a m e l i d a e) 及びサメ以外の種由来の天然に存在する単一ドメイン抗体分子も含む。

【0548】

一部の実施形態において、S D A B分子は、例えば、サメの血清に見られる新規抗原受容体 (N A R) として知られる免疫グロブリンアイソタイプ由来であるような、魚類で見られる免疫グロブリンの可変領域に由来し得る。N A R (「I g N A R」) の可変領域由来の単一ドメイン分子を製造する方法は、国際公開第03/014161号パンフレット及びS t r e l t s o v (2005) P r o t e i n S c i . 14 : 2901 - 2909に記載されている。

10

【0549】

一部の実施形態において、S D A B分子は、軽鎖を欠く重鎖として知られる天然に存在する単一ドメイン抗原結合分子である。このような単一ドメイン分子は、例えば、国際公開第9404678号パンフレット及びH a m e r s - C a s t e r m a n , C . e t a l . (1993) N a t u r e 363 : 446 - 448に記載されている。明確化するために、天然に軽鎖を欠く重鎖分子由来のこの可変ドメインは、ここでは、4鎖免疫グロブリンの慣用のV Hと区別するためにV H H又はナノボディとして知られている。このようなV H H分子は、ラクダ科 (C a m e l i d a e) 種、例えばラクダ、ラマ、ヒトコブラクダ、アルパカ及びグアナコ由来であり得る。ラクダ科 (C a m e l i d a e) 以外の他の種は、天然に軽鎖を欠く重鎖分子を産生し得、このようなV H Hは、本発明の範囲内である。

20

【0550】

S D A B分子は、組換え、C D R移植、ヒト化、ラクダ化、脱免疫化及び/又はインビトロ産生され得る (例えば、ファージディスプレイにより選択)。

【0551】

受容体の抗原結合ドメイン間を相互作用する抗原結合ドメインを含む複数のキメラ膜包埋受容体を有する細胞は、例えば、抗原結合ドメインの1つ以上がその同族抗原に結合することを阻止するため、望ましくない可能性があることも判明した。従って、本明細書に開示されるのは、このような相互作用を最小化する、抗原結合ドメインを含む第1及び第2の天然に存在しないキメラ膜包埋受容体を有する細胞である。また、本明細書に開示されるのは、このような相互作用を最小化する抗原結合ドメインを含む第1及び第2の天然に存在しないキメラ膜包埋受容体をコードする核酸並びにこのような細胞及び核酸を製造及び使用方法である。一部の実施形態において、第1及び第2の天然に存在しないキメラ膜包埋受容体の抗原結合ドメインの一方は、s c F vを含み、他方は、単一V Hドメイン、例えばラクダ科、サメ若しくはヤツメウナギ単一V Hドメイン又はヒト若しくはマウス配列由来の単一V Hドメインを含む。

30

【0552】

一部の実施形態において、本明細書における組成物は、第1及び第2のC A Rを含み、ここで、第1及び第2のC A Rの一方の抗原結合ドメインは、可変軽ドメイン及び可変重ドメインを含まない。一実施形態において、第1及び第2のC A Rの一方の抗原結合ドメインは、s c F vであり、他方は、s c F vではない。一実施形態において、第1及び第2のC A Rの一方の抗原結合ドメインは、単一V Hドメイン、例えばラクダ科、サメ若しくはヤツメウナギ単一V Hドメイン又はヒト若しくはマウス配列由来の単一V Hドメインを含む。一実施形態において、第1及び第2のC A Rの一方の抗原結合ドメインは、ナノボディを含む。一実施形態において、第1及び第2のC A Rの一方の抗原結合ドメインは、ラクダ科V H Hドメインを含む。

40

【0553】

50

一実施形態において、第1及び第2のCARの一方の抗原結合ドメインは、scFvを含み、他方は、単一VHドメイン、例えばラクダ科、サメ若しくはヤツメウナギ単一VHドメイン又はヒト若しくはマウス配列由来の単一VHドメインを含む。一実施形態において、第1及び第2のCARの一方の抗原結合ドメインは、scFvを含み、他方は、ナノボディを含む。一実施形態において、第1及び第2のCARの一方の抗原結合ドメインは、scFvを含み、他方は、ラクダ科VHHドメインを含む。

【0554】

一実施形態において、細胞の表面上に存在するとき、第1のCARの抗原結合ドメインのその同族抗原への結合は、第2のCARの存在により実質的に低減されない。一実施形態において、第2のCARの存在下の第1のCARの抗原結合ドメインのその同族抗原への結合は、第2のCARの非存在下の第1のCARの抗原結合ドメインのその同族抗原への結合の少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%、例えば85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%である。

10

【0555】

一実施形態において、細胞の表面上に存在するとき、第1及び第2のCARの抗原結合ドメインは、両方がscFv抗原結合ドメインである場合より少なく互いに結合する。一実施形態において、第1及び第2のCARの抗原結合ドメインは、両方がscFv抗原結合ドメインである場合より少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%少なく、例えば85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%少なく互いに結合する。

20

【0556】

CAR活性を強化する薬剤の共発現

一部の実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞は、別の薬剤、例えば、CAR発現細胞の活性又は適応度を増強する薬剤をさらに発現できる。

【0557】

例えば、一部の実施形態において、薬剤は、T細胞機能を調節又は制御する、例えば阻害する分子を阻害する薬剤であり得る。一部の実施形態において、T細胞機能を調節又は制御する分子は、阻害分子である。阻害分子、例えば、PD1は、一部の実施形態において、CAR発現細胞が免疫エフェクター応答を開始する能力を減少させ得る。阻害分子の例は、PD1、PD-L1、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14又はCD270)、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシン又はTGFを含む。

30

【0558】

一部の実施形態において、例えば、本明細書に記載されるような、薬剤、例えば阻害性核酸、例えばdsRNA、例えばsiRNA若しくはshRNA；又は例えば阻害性タンパク質若しくはシステム、例えば群生性等間隔短回文反復配列(CRISPR)、転写-アクティベーター様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)又は亜鉛フィンガーエンドヌクレアーゼ(ZFN)を使用して、CAR発現細胞においてT細胞の機能を調節又は制御する、例えば阻害する、分子の発現を阻害することができる。一部の実施形態において、薬剤は、shRNA、例えば本明細書に記載のshRNAである。一部の実施形態において、T細胞機能を調節又は制御する、例えば阻害する薬剤は、CAR発現細胞内で阻害される。例えば、T細胞機能を調節又は制御する、例えば阻害する分子の発現を阻害するdsRNA分子は、CARの成分、例えば全ての成分をコードする核酸に連結される。

40

【0559】

一部の実施形態において、薬剤は、例えば、PD1、PD-L1、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14又はCD270)、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラ

50

スII、GAL9、アデノシン若しくはTGF 又はこれらのいずれかのフラグメント（例えば、これらのいずれかの少なくとも細胞外ドメインの部分）などの阻害分子の第1のポリペプチド及び本明細書に記載の細胞内シグナル伝達ドメインである第2のポリペプチド（例えば、共刺激ドメイン（例えば、本明細書に記載のような例えば41BB、CD27又はCD28）及び/又は一次シグナル伝達ドメイン（例えば、本明細書に記載のCD3シグナル伝達ドメインを含む）である第2のポリペプチドを含む。一部の実施形態において、薬剤は、PD1又はそのフラグメント（例えば、PD1の少なくとも細胞外ドメインの部分）の第1のポリペプチド並びに本明細書に記載の細胞内シグナル伝達ドメイン（例えば、本明細書に記載のCD28シグナル伝達ドメイン及び/又は本明細書に記載のCD3シグナル伝達ドメイン）の第2のポリペプチドを含む。PD1は、CD28、CTLA-4、ICOS及びBTLAも含む受容体のCD28ファミリーの阻害性メンバーである。PD-1は、活性化B細胞、T細胞及び骨髄細胞に発現される（Agata et al. 1996 Int. Immunol 8:765-75）。PD1に対する2リガンド、PD-L1及びPD-L2は、PD1への結合によりT細胞活性化を下方制御することが示されている（Freeman et al. 2000 J Exp Med 192:1027-34; Latchman et al. 2001 Nat Immunol 2:261-8; Carter et al. 2002 Eur J Immunol 32:634-43）。PD-L1は、ヒト癌において豊富である（Dong et al. 2003 J Mol Med 81:281-7; Blank et al. 2005 Cancer Immunol. Immunother 54:307-314; Konishi et al. 2004 Clin Cancer Res 10:5094）。免疫抑制は、PD1とPD-L1との局所相互作用の阻害により逆転できる。

【0560】

一部の実施形態において、薬剤は、阻害分子、例えばプログラム細胞死1（PD1）（本明細書ではPD1 CARと称する）の細胞外ドメイン（ECD）を含み、膜貫通ドメイン及び41BB及びCD3などの細胞内シグナル伝達ドメインに融合され得る。一部の実施形態において、PD1 CARは、本明細書に記載のXCARと組み合わせで使用したとき、T細胞の残留性を改善する。一部の実施形態において、CARは、配列番号24において下線で示すPD1の細胞外ドメインを含むPD1 CARである。一部の実施形態において、PD1 CARは、配列番号24のアミノ酸配列を含む。

【0561】

一部の実施形態において、PD1 CARは、配列番号22のアミノ酸配列を含む。

【0562】

一部の実施形態において、薬剤は、PD1 CAR、例えば本明細書に記載のPD1 CARをコードする核酸配列を含む。一部の実施形態において、PD1 CARの核酸配列は、PD1 ECDに下線を施した配列番号23として提示される。

【0563】

別の例において、一部の実施形態において、CAR発現細胞の活性を増強する薬剤は、共刺激分子又は共刺激分子リガンドであり得る。共刺激分子の例には、MHCクラスI分子、BTLA及びTollリガンド受容体並びにOX40、CD27、CD28、CD5、ICAM-1、LFA-1（CD11a/CD18）、ICOS（CD278）及び4-1BB（CD137）が含まれる。そのような共刺激分子のさらなる例は、CD5、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM（LIGHTR）、SLAMF7、Nkp80（KLRP1）、Nkp44、Nkp30、Nkp46、CD160、CD19、CD4、CD8、CD8、IL2R、IL2R、IL7R、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、

TRANCE / RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a及びCD83と特異的に結合するリガンド、例えば本明細書に記載されるようなものを含む。共刺激分子リガンドの例には、CD80、CD86、CD40L、ICOSL、CD70、OX40L、4-1BBL、GITRL及びLIGHTが含まれる。実施形態において、共刺激分子リガンドは、CARの共刺激分子ドメインと異なる共刺激分子のリガンドである。実施形態において、共刺激分子リガンドは、CARの共刺激分子ドメインと同一の共刺激分子のリガンドである。一部の実施形態において、共刺激分子リガンドは4-1BBLである。一部の実施形態において、共刺激リガンドは、CD80又はCD86である。一部の実施形態において、共刺激分子リガンドはCD70である。実施形態において、本明細書に記載されるCAR発現免疫エフェクター細胞は、1つ以上の追加の共刺激分子又は共刺激分子リガンドを発現するようにさらに操作され得る。

10

【0564】

CARとケモカイン受容体の共発現

実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞、例えばCD19CAR発現細胞は、さらに、ケモカイン受容体分子を含む。T細胞におけるケモカイン受容体CCR2b又はCXCR2のトランスジェニック発現は、黒色腫及び神経芽腫を含むCCL2-又はCXCL1分泌固形腫瘍への輸送を促進する (Craddock et al., J Immunother. 2010 Oct; 33(8): 780-8及びKershaw et al., Hum Gene Ther. 2002 Nov 1; 13(16): 1971-80)。そのため、理論に拘束されることを望むものではないが、腫瘍、例えば、固形腫瘍により分泌されるケモカインを認識するCAR発現細胞で発現されるケモカイン受容体は、CAR発現細胞の腫瘍への帰巢を改善し、CAR発現細胞の腫瘍への浸潤を促進し、及びCAR発現細胞の抗腫瘍効果を増強すると考えられる。ケモカイン受容体分子は、天然に存在する又は組換えケモカイン受容体又はそのケモカイン結合フラグメントを含み得る。本明細書に記載のCAR発現細胞 (例えば、CAR-Tx) における発現に適するケモカイン受容体分子は、CXCKケモカイン受容体 (例えば、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6又はCXCR7)、CCケモカイン受容体 (例えば、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10又はCCR11)、CX3CKケモカイン受容体 (例えば、CX3CR1)、XCケモカイン受容体 (例えば、XCR1) 又はそのケモカイン結合フラグメントを含む。一部の実施形態において、本明細書に記載のCARと共に発現するケモカイン受容体分子は、腫瘍により分泌されるケモカインに基づき選択する。一部の実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞は、さらに、CCR2b受容体又はCXCR2受容体を含む、例えば、発現する。一部の実施形態において、本明細書に記載のCAR及びケモカイン受容体分子は、同じベクターにある又は2つの異なるベクターにある。本明細書に記載のCAR及びケモカイン受容体分子が同じベクターに実施形態において、CAR及びケモカイン受容体分子は、各々、2つの異なるプロモーターの制御下にあるか又は同じプロモーターの制御下にある。

20

30

40

【0565】

CARをコードする核酸構築物

本発明は、本明細書に記載される1つ以上のCAR構築物をコードする核酸分子を含む免疫エフェクター細胞、例えば本明細書に記載の方法によって作製されたものも提供する。一部の実施形態において、核酸分子は、メッセンジャーRNA転写物として提供される。一部の実施形態において、核酸分子は、DNA構築物として提供される。

【0566】

50

本明細書に記載される核酸分子は、DNA分子、RNA分子又はそれらの組み合わせであり得る。一部の実施形態において、核酸分子は、本明細書に記載されるようなCARポリペプチドをコードするmRNAである。他の実施形態において、核酸分子は、前述の核酸分子のいずれかを含むベクターである。

【0567】

一部の実施形態において、本発明のCARの抗原結合ドメイン（例えば、scFv）は、その配列が哺乳動物細胞における発現のためにコドン最適化されている核酸分子によってコードされる。一部の実施形態において、本発明のCAR構築物全体は、その配列全体が哺乳動物細胞での発現のためにコドン最適化されている核酸分子によってコードされる。コドン最適化とは、コーディングDNAにおける同義コドン（すなわち同じアミノ酸をコードするコドン）の出現頻度が異なる種に偏っているという発見を指す。そのようなコドン縮重は、同一のポリペプチドが様々なヌクレオチド配列によってコードされることを可能にする。様々なコドン最適化方法が当技術分野で知られており、例えば、少なくとも米国特許第5,786,464号明細書及び同第6,114,148号明細書に開示される方法が含まれる。

10

【0568】

従って、一部の実施形態において、免疫エフェクター細胞、例えば本発明の方法によって作製されたものは、キメラ抗原受容体（CAR）をコードする核酸分子を含み、CARは、本明細書に記載の腫瘍抗原に結合する抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン（例えば、本明細書に記載の膜貫通ドメイン）並びに刺激ドメイン、例えば、共刺激シグナル伝達ドメイン（例えば、本明細書に記載の共刺激シグナル伝達ドメイン）及び/又は一次シグナル伝達ドメイン（例えば、本明細書に記載の一次シグナル伝達ドメイン、例えば、本明細書に記載の鎖）を含む細胞内シグナル伝達ドメイン（例えば、本明細書に記載の細胞内シグナル伝達ドメイン）を含む。

20

【0569】

本発明は、CARをコードする核酸分子、例えば、本明細書に記載の核酸分子が挿入されているベクターも提供する。レンチウイルスなどのレトロウイルス由来のベクターは、それらが導入遺伝子の長期の安定した組み込み及び娘細胞への伝播を可能にするため、長期遺伝子導入を達成するのに適するツールである。レンチウイルスベクターは、肝細胞などの非増殖細胞を形質導入できる点で、マウス白血病ウイルスなどのオンコ-レトロウイルス由来のベクターを超えるさらなる利点を有する。さらに、それらは、低免疫原性であるという付加的利点も有する。レトロウイルスベクターは、例えば、レトロウイルスベクターでもあり得る。レトロウイルスベクターは、例えば、プロモーター、パッケージングシグナル（ Ψ ）、プライマー結合部位（PBS）、1つ以上の（例えば、2）末端反復配列（LTR）及び目的の導入遺伝子、例えば、CARをコードする遺伝子を含み得る。レトロウイルスベクターは、gag、pol及びenvなどのウイルス構造的遺伝子を欠き得る。例示的なレトロウイルスベクターは、マウス白血病ウイルス（MLV）、脾フォーカス形成ウイルス（SFFV）及び骨髄増殖性肉腫ウイルス（MPSV）及びそれら由来のベクターを含む。他のレトロウイルスベクターは、例えば、Tobias Maetzig et al., "Gammaretroviral Vectors: Biology, Technology and Application" *Viruses*, 2011 Jun; 3(6): 677-713に記載される。

30

40

【0570】

一部の実施形態において、所望のCARをコードする核酸を含むベクターは、アデノウイルスベクター（A5/35）である。一部の実施形態において、CARをコードする核酸の発現は、sleeping beauty、crisper、CAS9及び亜鉛フィンガーヌクレアーゼなどのトランスポゾンを使用して達成できる。参照により本明細書に包含される下記のJune et al., 2009 *Nature Reviews Immunology* 9.10: 704-716を参照されたい。

【0571】

50

概説すると、CARをコードする天然又は合成核酸の発現は、典型的には、CARポリペプチドをコードする核酸又はその一部をプロモーターに操作可能に連結させ、その構築物を発現ベクターに取り込むことにより達成される。ベクターは、真核生物での複製及び組込みに適し得る。典型的クローニングベクターは、所望の核酸配列の発現の制御に有用な転写及び翻訳ターミネーター、開始配列及びプロモーターを含む。

【0572】

核酸は、多数のタイプのベクターにクローン化できる。例えば、核酸は、プラスミド、ファージミド、ファージ誘導体、動物ウイルス及びコスミドを含むが、これらに限定されないベクターにクローン化できる。特に興味深いベクターは、発現ベクター、複製ベクター、プロブ産生ベクター及びシークエンシングベクターを含む。

10

【0573】

さらに、発現ベクターは、ウイルスベクターの形で細胞に提供され得る。ウイルスベクターテクノロジーは当分野で周知であり、例えば、Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1 - 4, Cold Spring Harbor Press, NY及び他のウイルス学及び分子生物学マニュアルに記載されている。ベクターとして有用なウイルスは、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス及びレンチウイルスを含むが、これらに限定されない。一般に、適当なベクターは、少なくとも1生物で機能的な複製起点、プロモーター配列、便利な制限エンドヌクレアーゼ部位及び1つ以上の選択可能マーカを含む(例えば、国際公開第01/96584号パンフレット; 国際公開第01/29058号パンフレット; 及び米国特許第6,326,193号明細書)。

20

【0574】

多数のウイルスベースの系が、哺乳動物細胞への遺伝子移入のために開発されている。例えば、レトロウイルスは、遺伝子送達系のための簡便なプラットフォームを提供する。選択した遺伝子を、当分野で知られる技術を使用して、ベクターに挿入し、レトロウイルス粒子に包装できる。次いで、組換えウイルスが単離され、対象の細胞にインビボ又はエクスピボで送達され得る。多数のレトロウイルス系が当分野で知られる。一実施形態において、アデノウイルスベクターを使用する。多数のアデノウイルスベクターが当分野で知られる。一部の実施形態において、レンチウイルスベクターを使用する。

30

【0575】

さらなるプロモーター要素、例えば、エンハンサーは、転写開始の頻度を制御する。典型的には、これらは、開始部位の上流30~110bpの領域に位置するが、多数のプロモーターが、同様に開始部位の下流に機能的要素を含むことが示されている。プロモーター要素間の空間はしばしば可動性であり、そのため、要素が互いに逆になったとき又は移動したときにプロモーター機能が保持される。チミジンキナーゼ(tk)プロモーターにおいて、プロモーター要素間の空間は、活性が落ち始める前、50bp離れるまで増加し得る。プロモーターにより、個々の要素は、転写を活性化するために協調的又は独立的に機能できるように見える。代表的プロモーターは、CMV IE遺伝子、EF-1、ユビキチンC又はホスホグリセロキナーゼ(PGK)プロモーターを含む。

40

【0576】

哺乳動物T細胞においてCARコード核酸分子を発現することができるプロモーターの例は、EF1aプロモーターである。天然EF1aプロモーターは、アミノアシルtRNAのリボソームへの酵素送達を担う伸長因子-1複合体のサブユニットの発現を駆動する。EF1aプロモーターは、哺乳動物発現プラスミドで広く使用されており、レンチウイルスベクターにクローン化された核酸分子からCAR発現を駆動するのに有効であることが示されている。例えば、Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464(2009)を参照されたい。一部の実施形態において、EF1aプロモーターは、実施例で提供される配列を含む。

【0577】

50

プロモーターの別の例は、最初期サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター配列である。このプロモーター配列は、それに操作可能に連結したあらゆるポリヌクレオチド配列の高レベルの発現を駆動できる、強い構成的プロモーター配列である。しかしながら、サルウイルス 40 (SV40) 初期プロモーター、マウス乳房腫瘍ウイルス (MMTV)、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 末端反復配列 (LTR) プロモーター、MoMuLV プロモーター、トリ白血球ウイルスプロモーター、エプスタイン-バーウイルス最初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーターを含むが、これらに限定されない他の構成的プロモーター配列並びにアクチンプロモーター、ミオシンプロモーター、伸長因子-1 プロモーター、ヘモグロビンプロモーター及びクレアチンキナーゼプロモーターなど、しかし、これらに限定されないヒト遺伝子プロモーターも使用し得る。さらに、本発明は、構成的プロモーターの使用に限定すべきではない。誘導性プロモーターも本発明の一部であるとして意図される。誘導性プロモーターの使用は、操作可能に連結したポリヌクレオチド配列の発現を、発現が望まれるときに発現を活性化し、発現が望まれないときに発現を遮断することができる分子スイッチを提供する。誘導性プロモーターの例は、メタロチオネインプロモーター、グルココルチコイドプロモーター、プロゲステロンプロモーター及びテトラサイクリンプロモーターを含むが、これらに限定されない。

10

【0578】

プロモーターの別の例は、ホスホグリセラートキナーゼ (PGK) プロモーターである。実施形態において、切断 PGK プロモーター (例えば、野生型 PGK プロモーター配列と比べたとき、1つ以上の、例えば、1、2、5、10、100、200、300 又は 4000 ヌクレオチド欠失を有する PGK プロモーター) が望ましいことがある。

20

【0579】

PGK プロモーター例のヌクレオチド配列を下に提供する。

WT PGK プロモーター：

【化10】

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAG
GCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCTTGTCCCAGGTGTGATGGCGGGGT
GTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCCGCGCGGGACGACTCGT
CGGCGATAACCGGTGTCTGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACGAGGGACCGCGACAGG
CAGACGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAAGGCAAATAGTGCAGGCCGTGCGGCGCTTG
GCGTTCCTTGGAAGGGCTGAATCCCCGCCTCGTCTTCGCAGCGGCCCGGGTGTTCCTCC
ATCGCCGCTTCTAGGCCACTGCGACGCTTGCCTGCACTTCTTACACGCTCTGGGTCCCAGC
CGCGGCGACGCAAAGGGCCTTGGTGCGGGTCTCGTTCGGCGCAGGGACGCGTTTTGGGTCCC
GACGGAACCTTTTCCGCGTTGGGGTTGGGGCACCATAAGCT (配列番号190)

30

例示的な切断型 PGK プロモーター：

PGK 100：

40

【化11】

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAG
GCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCTTGTCCCAGGTGTGATGGCGGGGT
G (配列番号198)

PGK 200：

50

【化 1 2】

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAG
GCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGATGGCGGGGT
GTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCCGCGCGGGACGACTCGT
CGGCGATAACCGGTGTCTGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACG (配列番号191)

P G K 3 0 0 :

【化 1 3】

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAG
GCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGATGGCGGGGT
GTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCCGCGCGGGACGACTCGT
CGGCGATAACCGGTGTCTGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACGAGGGACCGCGACAGG
CAGACGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCAAGGCAAATAGTGCAGGCCGTGCGGGCGTTG
GCGTTCCTTGAAGGGCTGAATCCCCG (配列番号192)

10

P G K 4 0 0 :

【化 1 4】

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAG
GCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGATGGCGGGGT
GTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCCGCGCGGGACGACTCGT
CGGCGATAACCGGTGTCTGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACGAGGGACCGCGACAGG
CAGACGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCAAGGCAAATAGTGCAGGCCGTGCGGGCGTTG
GCGTTCCTTGAAGGGCTGAATCCCCGCTCGTCCTTCGCAGCGGCCCGGGTGTTC
ATCGCCGCTTCTAGGCCACTGCGACGCTTGCTGCACTTCTTACACGCTCTGGGTCCCAGC
CG (配列番号193)

20

30

【0 5 8 0】

ベクターは、例えば、分泌を促進するためのシグナル配列、ポリアデニル化シグナル及び転写ターミネーター（例えば、ウシ成長ホルモン（B G H）遺伝子から）、エピソーム複製及び原核生物における複製を可能にする要素（例えばS V 4 0 起源及びC o l E 1又は当分野で知られるその他）及び/又は選択を可能にする要素（例えば、アンピシリン耐性遺伝子及び/又はゼオシンマーカー）も含み得る。

【0 5 8 1】

C A R ポリペプチド又はその一部の発現を評価するために、細胞に導入する発現ベクター遺伝子導入又はウイルスベクターによる感染が探求される細胞の集団から発現細胞から発現細胞の同定及び選択を容易にするために、選択可能マーカー遺伝子又はレポーター遺伝子又は両者も含み得る。一部の実施形態において、選択可能マーカーは、D N A の別の断面に担持され、共トランスフェクション法において使用される。選択可能マーカー及びレポーター遺伝子のいずれも、宿主細胞における発現が可能であるように、適切な制御配列が隣接し得る。有用な選択可能マーカーは、例えば、n e o などの抗生物質耐性遺伝子を含む。

40

【0 5 8 2】

レポーター遺伝子は、恐らく遺伝子導入されている細胞を同定し、制御配列の機能性を評価するために使用される。一般に、レポーター遺伝子は、レシピエント生物又は組織に存在又は発現されず、発現がある容易に検出可能な特性、例えば、酵素活性により顕在化

50

されるポリペプチドをコードする、遺伝子である。レポーター遺伝子の発現を、DNAがレシピエント細胞に導入されてから適当な時間後にアッセイする。適当なレポーター遺伝子は、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、分泌型アルカリホスファターゼ又は緑色蛍光タンパク質遺伝子をコードする遺伝子を含み得る（例えば、U i - T e i e t a l . , 2 0 0 0 F E B S L e t t e r s 4 7 9 : 7 9 - 8 2 ）。適当な発現系は周知であり、既知技術により製造でき又は商業的に入手できる。一般に、レポーター遺伝子の最高レベルの発現を示す最小5'フランキング領域を有する構築物をプロモーターとして同定する。このようなプロモーター領域は、レポーター遺伝子に連結し、プロモーター駆動転写を調節する能力について薬剤を評価するのに使用し得る。

10

【0583】

実施形態において、ベクターは、CAR、例えば本明細書に記載のCAR、例えばCD19CAR及び第2のCAR、例えば阻害性CAR又はCD19以外の抗原に特異的に結合するCARをコードする2つ以上の核酸配列を含み得る。このような実施形態において、2以上のCARをコードする核酸配列は、同じフレームにおいて単一核分子により且つ単一ポリペプチド鎖としてコード化される。一部の実施形態において、2以上のCARは、例えば、1つ以上のペプチド開裂部位により分けられ得る（例えば、自己開裂部位又は細胞内プロテアーゼのための基質）。ペプチド切断部位の例には、T2A、P2A、E2A又はF2A部位が含まれる。

【0584】

細胞に遺伝子を導入し、発現させる方法は当分野で知られる。発現ベクターに関連して、ベクターは、任意の方法、例えば当技術分野で知られたものにより、宿主細胞、例えば、哺乳動物、細菌、酵母又は昆虫細胞に容易に導入できる。例えば、発現ベクターは、物理的、化学的又は生物学的手段により、宿主細胞に移入される。

20

【0585】

宿主細胞にポリヌクレオチドを導入するための物理的方法は、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、微粒子銃、微量注入、エレクトロポレーションなどを含む。ベクター及び/又は外来性核酸を含む細胞を産生する方法は、当分野で周知である。例えば、S a m b r o o k e t a l . , 2 0 1 2 , M O L E C U L A R C L O N I N G : A L L A B O R A T O R Y M A N U A L , v o l u m e s 1 - 4 , C o l d S p r i n g H a r b o r P r e s s , N Y を参照されたい）。宿主細胞へのポリヌクレオチドの導入するための適切な方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションである。

30

【0586】

宿主細胞に目的のポリヌクレオチドを導入するための生物学的方法は、DNA及びRNAベクターの使用を含む。ウイルスベクター、特にレトロウイルスベクターは、哺乳動物、例えば、ヒト細胞への遺伝子挿入に最も広く使用される方法となってきた。他のウイルスベクターは、レンチウイルス、ポックスウイルス、単純ヘルペスウイルスI、アデノウイルス及びアデノ関連ウイルスなどに由来し得る。例えば、米国特許第5,350,674号明細書及び同第5,585,362号明細書を参照されたい。

【0587】

宿主細胞にポリヌクレオチドを導入するための化学的手段は、巨大分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズ及び水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセル及びリポソームを含む脂質ベースの系などのコロイド分散体系を含む。インビトロ及びインビボで送達媒体として使用するための代表的コロイド系は、リポソーム（例えば、人工膜小胞）である。標的化ナノ粒子又は他の適当なサブミクロンサイズの送達系を用いるポリヌクレオチドの送達など、最新式の核酸の標的化送達の他の方法が利用可能である。

40

【0588】

非ウイルス送達系を利用する場合、代表的送達媒体はリポソームである。脂質製剤の使用は、宿主細胞への核酸の導入のために意図される（インビトロ、エクスピボ又はインビボ）。一部の実施形態において、核酸は、脂質と結合され得る。脂質と結合した核酸は、

50

リポソームの水性内部への被包、リポソームの脂質二重層内への分散、リポソームとオリゴヌクレオチドの両者と結合する連結分子を介するリポソームへの結合、リポソームへの封入、リポソームとの複合体化、脂質含有溶液への分散、脂質との混合、脂質との組み合わせ、脂質中の懸濁液としての包含、ミセル内への包含又は複合体化又は他の方法で脂質と結合する。脂質、脂質/DNA又は脂質/発現ベクター結合組成物は、溶液中の何らかの特定の構造に限定されない。例えば、それらは、二重層構造において、ミセルとして又は「崩壊」構造を有して存在し得る。それらは、単に溶液に分散され、恐らくサイズ又は形が均一ではない凝集体も形成し得る。脂質は、天然に存在する又は合成脂質であり得る脂肪物質である。例えば、脂質は、細胞質に天然に生じる脂肪滴並びに脂肪酸、アルコール、アミン、アミノアルコール及びアルデヒドなどの長鎖脂肪族炭化水素を含む化合物群及びその誘導体を含む。

10

【0589】

使用に適する脂質は、商業的供給源から得ることができる。例えば、ジミリスチルホスファチジルコリン(「DMPC」)は、Sigma, St. Louis, MOから得ることができ、リン酸ジセチル(「DCP」)はK&K Laboratories (Plainview, NY)から得ることができ;コレステロール(「Choi」)はCalbiochem - Behringから得ることができ、ジミリスチルホスファチジルグリセロール(「DMPG」)及び他の脂質は、Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL)から得ることができる。クロロホルム又はクロロホルム/メタノール中の脂質の原液を、約 - 20 で保存できる。クロロホルムを、メ
封入された脂質二重層又は凝集体の産生により形成される多様な単及び多層状脂質媒体を包含する一般的用語である。リポソームは、リン脂質二重層膜及び内部水性媒体を伴う小胞構造を有することにより特徴付けられる。多層状リポソームは、水性媒体により分離された、複数の脂質層を有する。それらは、リン脂質が過剰の水溶液に懸濁されたときに自然に形成される。脂質要素は、閉構造形成前に自己凝集し、水及び溶解した溶質を脂質二重層間に封入する (Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5: 505 - 10)。しかしながら、通常の小胞構造と異なる構造を溶液で有する組成物も包含される。例えば、脂質は、ミセル構造であるか又は単に脂質分子の不均一凝集体として存在すると考えられ得る。リポフェクタミン - 核酸複合体も考慮される。

20

30

【0590】

外来性核酸を宿主細胞に導入する又はそうでなければ細胞を本発明の阻害剤に曝す方法に関係なく、宿主細胞における組換え核酸配列の存在を確認するために、多様なアッセイを行い得る。このようなアッセイは、例えば、サザン及びノーザンブロッティング、RT-PCR及びPCRなどの当業者に周知の「分子生物学的」アッセイ、薬剤の同定に使用するための、例えば、免疫学的手段(ELISA及びウェスタンブロット)により、特定のペプチドの存在又は不在を検出するような「生化学的」アッセイ又は本発明の範囲内に入る本明細書に記載のアッセイを含む。

【0591】

RNAトランスフェクション

インビトロで転写されたRNA CARを産生する方法が本明細書に開示される。RNA CAR及びそれを使用する方法は、例えば、2015年3月13日に出版された国際公開第2015/142675号パンフレットの段落553~570に記載され、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0592】

免疫エフェクター細胞は、メッセンジャーRNA(mRNA)によってコードされたCARを含み得る。一部の実施形態において、本明細書に記載のCARをコードするmRNAは、CAR発現細胞の産生のために、例えば本明細書に記載される方法によって作製される、免疫エフェクター細胞に導入される。

【0593】

50

一部の実施形態において、インビトロ転写RNA CARを一過性トランスフェクションの形態として細胞に導入できる。RNAは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)産生鑄型を使用するインビトロ転写により産生される。任意の供給源からの目的のDNAを、適切なプライマー及びRNAポリメラーゼを使用してインビトロmRNA合成のための鑄型にPCRにより直接変換できる。DNAの供給源は、例えば、ゲノムDNA、プラスミドDNA、ファージDNA、cDNA、合成DNA配列又はDNAのあらゆる他の適切な供給源であり得る。インビトロ転写のための所望の鑄型は本明細書中に記載されるCARである。例えば、RNA CARの鑄型は、本明細書に記載の腫瘍関連抗原に対する抗体の単鎖可変ドメインを含む細胞外領域；ヒンジ領域(例えば、本明細書に記載のヒンジ領域)；膜貫通ドメイン(例えば、CD8aの膜貫通ドメインなどの本明細書に記載の膜貫通ドメイン)；及び細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば本明細書に記載の細胞内シグナル伝達ドメイン、例えばCD3- のシグナル伝達ドメイン及び4-1BBのシグナル伝達ドメインを含むものを含む細胞質領域を含む。

10

【0594】

一部の実施形態において、PCRに使用するDNAは、オープンリーディングフレームを含む。DNAは、生物のゲノムからの天然に存在するDNA配列由来であり得る。一部の実施形態において、核酸は、5'及び/又は3'非翻訳領域(UTR)のいくらか又は全てを含み得る。核酸は、エクソン及びイントロンを含み得る。一部の実施形態において、PCRに使用するDNAは、ヒト核酸配列である。一部の実施形態において、PCRに使用するDNAは、5'及び3'UTRを含むヒト核酸配列である。DNAは、代わりに、天然に存在する生物で通常発現されない人工DNA配列であり得る。例示的な人工DNA配列は、融合タンパク質をコードするオープンリーディングフレームを形成するようにライゲートされた遺伝子の部分を含むものである。ライゲートされたDNAの部分は、単一生物由来又は1つを超える生物由来であり得る。

20

【0595】

PCRを使用して、トランスフェクションに使用するmRNAのインビトロ転写のための鑄型を産生する。PCRを実施する方法は、当技術分野で周知である。PCRにおいて使用するプライマーは、PCRのための鑄型として使用するDNAの領域に実質的に相補的である領域を有するように設計する。本明細書で使用する「実質的に相補的」は、プライマー配列の残基の大部分又は全てが相補的であるか又は1つ以上の塩基が非相補的又は mismatchesである、ヌクレオチドの配列を指す。実質的に相補的な配列は、PCRに使用するアニーリング条件下においてDNA標的とアニール又はハイブリダイズできる。プライマーは、DNA鑄型の任意の部分と実質的に相補的であるように設計できる。例えば、プライマーは、5'及び3'UTRを含む、細胞において通常転写される(オープンリーディングフレーム)核酸の部分を増幅するように設計できる。プライマーは、目的の特定のドメインをコードする核酸の部分を増幅するようにも設計できる。一部の実施形態において、プライマーは、5'及び3'UTRの全て又は一部を含む、ヒトcDNAのコーディング領域を増幅するように設計される。PCRに有用なプライマーは、当技術分野で周知の合成法により産生できる。「順方向プライマー」は、増幅するDNA配列の上流であるDNA鑄型上にヌクレオチドに対して実質的に相補的であるヌクレオチドの領域を含むプライマーである。「上流」は、コード鎖に対して、増幅するDNA配列に対する5'位を指すために本明細書で使用する。「逆方向プライマー」は、増幅するDNA配列の下流である、二本鎖DNA鑄型に対して実質的に相補的なヌクレオチドの領域を含むプライマーである。「下流」は、コード鎖に対して、増幅するDNA配列に対する3'位を指すために本明細書で使用する。

30

40

【0596】

PCRに有用なあらゆるDNAポリメラーゼを本明細書に開示する方法で使用できる。試薬及びポリメラーゼは、多数の供給元から市販されている。

【0597】

安定性及び/又は翻訳効率を促進する能力を有する化学構造も使用し得る。実施形態に

50

において、RNAは、5'及び3'UTRを有する。一部の実施形態において、5'UTRは、1~3000ヌクレオチド長である。コーディング領域に付加する5'及び3'UTR配列の長さは、UTRの異なる領域をアニールするPCRのためのプライマーの設計を含むが、これに限定されない異なる方法により変わり得る。このアプローチを使用して、当業者は、転写RNAのトランスフェクション後、最適翻訳効率を達成するのに必要な5'及び3'UTR長を修飾できる。

【0598】

5'及び3'UTRは、目的の核酸のための天然に存在する内在性5'及び3'UTRであり得る。代わりに、目的の核酸に対して内在性ではないUTR配列を順方向及び逆方向プライマーへのUTR配列の取り込みにより又は鑄型の任意の他の修飾により付加できる。10
目的の核酸に対して内在性ではないUTR配列の使用は、RNAの安定性及び/又は翻訳効率の修飾のために有用であり得る。例えば、3'UTR配列のAUリッチ要素は、mRNAの安定性を低下させ得ることが知られる。従って、3'UTRを、当技術分野で周知であるUTRの特性に基づき、転写されたRNAの安定性を増加するように選択及び設計できる。

【0599】

一部の実施形態において、5'UTRは、内在性核酸のKozak配列を含み得る。代わりに、目的の核酸に対して内在性ではない5'UTRを上記のようにPCRにより付加するとき、コンセンサスKozak配列を5'UTR配列の付加により再設計できる。Kozak配列は、あるRNA転写物の翻訳効率を上げることができるが、効率的翻訳を可能とするために全RNAで必要であるように見えない。多くのmRNAについてのKozak配列に対する必要性は、当技術分野で公知である。他の実施形態において、5'UTRは、RNAゲノムが細胞で安定であるRNAウイルスの5'UTRであり得る。他の実施形態において、種々のヌクレオチドアナログを、mRNAのエキソヌクレアーゼ分解を妨害するために3'又は5'UTRにおいて使用できる。20

【0600】

遺伝子クローニングの必要性なしにDNA鑄型からのRNAの合成を可能にするために、転写のプロモーターは、転写する配列の上流のDNA鑄型に結合すべきである。RNAポリメラーゼのプロモーターとして機能する配列が順方向プライマーの5'末端に追加されるとき、RNAポリメラーゼプロモーターは、転写されるオープンリーディングフレームの上流のPCR産物に取り込まれる。一部の実施形態において、プロモーターは、本明細書の他の箇所に記載するような、T7ポリメラーゼプロモーターである。他の有用なプロモーターは、T3及びSP6 RNAポリメラーゼプロモーターを含むが、これらに限定されない。T7、T3及びSP6プロモーターのコンセンサスヌクレオチド配列が当技術分野で公知である。30

【0601】

一部の実施形態において、mRNAは、リボソーム結合、翻訳開始及び細胞におけるmRNAの安定性を決定する、5'末端及び3'ポリ(A)テールの両者にキャップを有する。環状DNA鑄型、例えばプラスミドDNA上において、RNAポリメラーゼは、真核細胞における発現に適しない長いコンカテマー産物を産生する。3'UTRの末端で直線化されたプラスミドDNAの転写は、転写後ポリアデニル化されても、真核トランスフェクションに有効ではない正常サイズのmRNAを生じる。40

【0602】

直鎖状DNA鑄型で、ファージT7 RNAポリメラーゼは、鑄型の最後の塩基を越えて転写物の3'末端を伸長できる(Schenborn and Mierendorf, Nuc Acids Res., 13:6223-36(1985); Nacheva and Berzal-Herranz, Eur. J. Biochem., 270:1485-65(2003))。

【0603】

DNA鑄型に伸びるポリ(A)/Tの組込みの慣用法は、分子クローニングである。し 50

かしながら、プラスミドDNAに統合されたポリ(A)/T配列は、プラスミド不安定性を生じ得、これは、細菌細胞から得たプラスミドDNA鑄型が多くの場合に欠失及び他の異常で高度に汚染されている理由である。これにより、クローニング工程は、困難で時間がかかるだけでなく、多くの場合に信頼できないものとなる。これが、クローニングを伴わないポリ(A)/T 3'ストレッチを有するDNA鑄型の産生を可能にする方法が非常に望ましい理由である。

【0604】

転写DNA鑄型のポリ(A)/Tセグメントは、100Tテール(配列番号31)などのポリTテールを含む逆方向プライマーを使用するPCR中(サイズは、50~5000Tであり得る(配列番号32))又はDNAライゲーション若しくはインビトロ組換えを含むが、これらに限定されない任意の他の方法によりPCR後に産生できる。ポリ(A)テールは、RNAに安定性も提供し、その分解を減らす。一般に、ポリ(A)テールの長さは、転写されたRNAの安定性と正に相関する。一部の実施形態において、ポリ(A)テールは、100~5000アデノシンである(例えば、配列番号33)。

10

【0605】

RNAのポリ(A)テールは、大腸菌(*E. coli*)ポリ(A)ポリメラーゼ(E-PAP)のなどのポリ(A)ポリメラーゼの使用により、インビトロ転写後にさらに伸長できる。一部の実施形態において、ポリ(A)テールの100ヌクレオチドから300~400ヌクレオチドへの長さの延長(配列番号34)は、RNAの翻訳効率の約2倍増加を生じる。さらに、3'末端への異なる化学基の付加は、mRNA安定性を増加させ得る。このような結合は、修飾/人工ヌクレオチド、アダプター及び他の化合物を含み得る。例えば、ATPアナログは、ポリ(A)ポリメラーゼを使用してポリ(A)テールに取り込まれ得る。ATPアナログは、RNAの安定性をさらに高め得る。

20

【0606】

5'キャップもRNA分子に安定性を提供する。一部の実施形態において、本明細書に開示する方法により産生されたRNAは、5'キャップを含む。5'キャップは、当技術分野で公知であり、本明細書に記載の技術を使用して提供される(Cougot, et al., *Trends in Biochem. Sci.*, 29: 436-444 (2001); Stepinski, et al., *RNA*, 7: 1468-95 (2001); Elango, et al., *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 330: 958-966 (2005))。

30

【0607】

本明細書に開示する方法により産生されたRNAは、配列内リボソーム進入部位(IRES)配列も含み得る。IRES配列は、mRNAへのキャップ非依存的リボソーム結合を開始し、翻訳開始を促進するあらゆるイルス、染色体又は人工設計配列であり得る。糖、ペプチド、脂質、タンパク質、抗酸化剤及び界面活性剤などの細胞透過性及び生存能を促進する因子を含有し得る、細胞電気穿孔に適した任意の溶質が含まれ得る。

【0608】

RNAを、多数の異なる方法、例えば商業的に利用可能な方法のいずれかを使用して標的細胞に導入でき、これは、電気穿孔(Amaxa Nucleofector-II (Amaxa Biosystems, Cologne, Germany))、(ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.))又はGene Pulser II (BioRad, Denver, Colo.)、Multiporator (Eppendorf, Hamburg Germany)、リポフェクションを使用するカチオン性リボソーム介在トランスフェクション、ポリマー封入、ペプチド介在トランスフェクション又は「遺伝子銃」などの微粒子銃粒子送達系(例えば、Nishikawa, et al. *Hum Gene Ther.*, 12(8): 861-70 (2001)を参照されたい)を含むが、これらに限定されない。

40

【0609】

非ウイルス送達方法

50

一部の実施形態において、非ウイルス方法を使用して、本明細書に記載のCARをコードする核酸を細胞又は組織又は対象に送達できる。

【0610】

一部の実施形態において、非ウイルス方法は、トランスポゾン（転位因子とも呼ばれる）の使用を含む。一部の実施形態において、トランスポゾンは、ゲノムの位置にそれ自体挿入できるDNAのフラグメント、例えば自己複製性であり、そのコピーをゲノムに挿入することができるDNAのフラグメント又は長い核酸の外にスプライシングされ、ゲノムの別の場所に挿入されることができるDNAのフラグメントである。例えば、トランスポゾンは、転位のための逆位反復フランキング遺伝子からなるDNA配列を含む。

【0611】

例示的なトランスポゾンを使用する核酸送達法は、Sleeping Beautyトランスポゾン系（SBTS）及びpiggyBac（商標）（PB）トランスポゾン系を含む。例えば、Aronovich et al. Hum. Mol. Genet. 20. R1 (2011) : R14 - 20 ; Singh et al. Cancer Res. 15 (2008) : 2961 - 2971 ; Huang et al. Mol. Ther. 16 (2008) : 580 - 589 ; Grabundzija et al. Mol. Ther. 18 (2010) : 1200 - 1209 ; Kebriaei et al. Blood. 122. 21 (2013) : 166 ; Williams. Molecular Therapy 16. 9 (2008) : 1515 - 16 ; Bell et al. Nat. Protoc. 2. 12 (2007) : 3153 - 65 ; 及び Ding et al. Cell. 122. 3 (2005) : 473 - 83（これらの全ては、参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【0612】

SBTSは2つの成分：1）導入遺伝子を含むトランスポゾン、及び2）トランスポサージ酵素の供給源を含む。トランスポサージは、担体プラスミド（又は他のドナーDNA）から、宿主細胞染色体/ゲノムなどの標的DNAにトランスポゾンを転位できる。例えば、トランスポサージは、担体プラスミド/ドナーDNAに結合し、トランスポゾン（導入遺伝子含有）をプラスミドの外に切り出し、宿主細胞のゲノムに入れる。例えば、Aronovich et al. 上掲を参照されたい。

【0613】

例示的なトランスポゾンは、pT2ベースのトランスポゾンを含む。例えば、全て参照により本明細書に組み込まれるGrabundzija et al. Nucleic Acids Res. 41. 3 (2013) : 1829 - 47 ; 及びSingh et al. Cancer Res. 68. 8 (2008) : 2961 - 2971を参照されたい。例示的なトランスポサージは、Tc1/mariner型トランスポサージ、例えばSB10トランスポサージ又はSB11トランスポサージを含む（例えば、サイトメガロウイルスプロモーターから発現できる機能亢進トランスポサージ）。例えば、全て参照により本明細書に組み込まれるAronovich et al. ; Kebriaei et al. ; 及びGrabundzija et al. を参照されたい。

【0614】

SBTSの使用は、導入遺伝子、例えば本明細書に記載のCARをコードする核酸の効率的組込み及び発現を可能にする。例えば、SBTSなどのトランスポゾン系を使用する、本明細書に記載のCARを安定に発現する細胞、例えばT細胞又はNK細胞を産生する方法が本明細書に提供される。

【0615】

本明細書に記載の方法により、一部の実施形態において、SBTS成分を含む1つ以上の核酸、例えばプラスミドが細胞に送達される（例えば、T細胞又はNK細胞）。例えば、核酸は、核酸（例えば、プラスミドDNA）送達の標準法、例えば本明細書に記載の方法、例えば電気穿孔、トランスフェクション又はリポフェクションにより送達される。一部の実施形態において、核酸は、導入遺伝子、例えば本明細書に記載のCARをコードす

10

20

30

40

50

る核酸を含むトランスポゾンを含む。一部の実施形態において、核酸は、導入遺伝子（例えば、本明細書に記載のCARをコードする核酸）を含むトランスポゾン並びにトランスポサゼ酵素をコードする核酸配列を含む。他の実施形態において、例えば、デュアルプラスミド系、例えば第1のプラスミドが導入遺伝子を含むトランスポゾンを含み、第2のプラスミドがトランスポサゼ酵素をコードする核酸配列を含む、2核酸の系が提供される。例えば、第1及び第2の核酸は、宿主細胞に共送達される。

【0616】

一部の実施形態において、本明細書に記載のCARを発現する細胞、例えば、T細胞又はNK細胞は、ヌクレアーゼ（例えば、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写アクティベーター様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、CRISPR/Cas系又は操作されたメガヌクレアーゼ再操作ホーミングエンドヌクレアーゼ）を使用するSBTS及び遺伝子編集の遺伝子挿入の組み合わせを使用して産生される。

【0617】

一部の実施形態において、非ウイルス送達方法の使用は、細胞、例えばT細胞又はNK細胞の再プログラミング及び対照への細胞の直接注入を可能にする。非ウイルスベクターの利点は、患者集団に見合うために必要な十分量の産生が容易且つ比較的安価であること、保存中の安定性及び免疫原性の欠如を含むが、これらに限定されない。

【0618】

製造 / 生産の方法

本発明は、本明細書に開示される細胞を作製する方法、例えば、本明細書に記載される1つ以上のCAR構築物をコードする核酸分子を発現するように、T細胞又はNK細胞を操作する方法も提供する。一部の実施形態では、本明細書に記載される製造方法を用いて、本明細書に開示される2つのCAR（例えば、本明細書に開示される抗BCMA CAR及び抗CD19 CAR）をコードする核酸分子を含む細胞を製造する。一部の実施形態では、本明細書に開示される製造方法を用いて、本明細書に開示のダイアボディCAR（例えば、本明細書に開示の抗BCMA / 抗CD19ダイアボディCAR）をコードする核酸分子を含む細胞を製造する。一部の実施形態では、本明細書に記載される製造方法を用いて、各々が本明細書に開示のCARをコードする2つの核酸分子（例えば、抗BCMA CARをコードする1つの核酸分子と、抗CD19 CARをコードする1つの核酸分子）を含む細胞を製造する。一部の実施形態では、本明細書に記載される製造プロセスのいずれかによって作製された細胞（例えば、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞又はNK細胞）の集団が本明細書に提供される。

【0619】

活性化プロセス

一部の実施形態において、本明細書に開示される方法は、1つ以上のCARを24時間以内に発現するように操作された免疫エフェクター細胞を製造することができる。理論に縛られることは意図しないが、本明細書に提供される方法は、製造工程中、T細胞、例えば、ナイーブT細胞の未分化表現型を保存する。未分化表現型を有するこれらのCAR発現細胞は、注入後インビボで、より長期に持続し、且つ / 又は良好に拡大し得る。一部の実施形態では、本明細書に提供される製造方法により生産されるCART細胞は、例えば、scRNA-seqを用いて測定した場合（例えば、図25Aに関して、実施例7に記載の方法を用いて測定した場合）、伝統的製造方法により生産されるCART細胞と比べて、増加したパーセンテージの幹細胞メモリーT細胞を含む。一部の実施形態では、本明細書に提供される製造方法により生産されるCART細胞は、例えば、scRNA-seqを用いて測定した場合（例えば、図25Bに関して、実施例7に記載の方法を用いて測定した場合）、伝統的製造方法により生産されるCART細胞と比べて、増加したパーセンテージのエフェクターT細胞を含む。一部の実施形態では、本明細書に提供される製造方法により生産されるCART細胞は、例えば、scRNA-seqを用いて測定した場合（例えば、図25Cに関しては、実施例7に記載の方法を用いて測定した場合）、伝統的製造方法により生産されるCART細胞と比べて、T細胞の幹細胞的形質をより良好に

10

20

30

40

50

維持する。一部の実施形態では、本明細書に提供される製造方法により生産されるCART細胞は、例えば、scRNA-seqを用いて測定した場合（例えば、図25Dに関しては、実施例7に記載の方法を用いて測定した場合）、伝統的製造方法により生産されるCART細胞と比べて、より低レベルの低酸素症を示す。一部の実施形態では、本明細書に提供される製造方法により生産されるCART細胞は、例えば、scRNA-seqを用いて測定した場合（例えば、図25Eに関しては、実施例7に記載の方法を用いて測定した場合）、伝統的製造方法により生産されるCART細胞と比べて、より低レベルのオートファジーを示す。一部の実施形態では、免疫エフェクター細胞は、本明細書に開示される2つのCAR（例えば、本明細書に開示される抗BCMA CARと抗CD19 CAR）をコードする核酸分子を含むように、操作される。一部の実施形態では、免疫エフェクター細胞は、本明細書に開示されるダイアポディCAR、例えば、本明細書に開示される抗BCMA及び/又は抗CD19ダイアポディCARをコードする核酸分子を含むように、操作される。一部の実施形態では、免疫エフェクター細胞は、各々が本明細書に記載のCARをコードする2つの核酸分子（例えば、抗BCMA CARをコードする1つの核酸分子と、抗CD19 CARをコードする1つの核酸分子）を含むように、操作される。

10

【0620】

一部の実施形態において、本明細書に開示される方法は、ビーズ、例えば、Dynabeads（登録商標）（例えば、CD3/CD28 Dynabeads（登録商標））の使用を含まず、従って、脱ビーズステップを含まない。一部の実施形態において、本明細書に開示の方法により製造されるCART細胞は、最小のエクスピボ拡大、例えば、1日未満、12時間未満、8時間未満、6時間未満、4時間未満、3時間未満、2時間未満、1時間未満で又はエクスピボ拡大なしで対象に投与され得る。従って、本明細書に記載される方法は、対象の疾患の処置に使用するための改善されたCAR発現細胞産物を作製する高速製造プロセスを提供する。

20

【0621】

一部の実施形態において、本開示は、キメラ抗原受容体（CAR）（例えば、1つ以上のCAR、例えば、2つのCAR）を発現する細胞（例えば、T細胞）の集団を作製する方法を提供し、これは、(i)細胞（例えば、T細胞、例えば凍結された又は新鮮な白血球アフェレーシス産物から単離されたT細胞）の集団を、CD3/TCR複合体を刺激する薬剤及び/又は細胞の表面上の共刺激分子を刺激する薬剤と接触させるステップ；(ii)細胞（例えば、T細胞）の集団を、CARをコードする核酸分子（例えば、DNA又はRNA分子）と接触させ、それにより核酸分子を含む細胞（例えば、T細胞）の集団を提供するステップ、並びに(iii)保存（例えば、凍結保存培地中の細胞の集団の再製剤化）又は投与のために細胞（例えば、T細胞）の集団を採取するステップを含み、(a)ステップ(ii)は、ステップ(i)と一緒に、又はステップ(i)の開始後の20時間以内、例えばステップ(i)の開始後の12、13、14、15、16、17若しくは18時間以内、例えばステップ(i)の開始後の18時間以内に実施され、及びステップ(iii)は、ステップ(i)の開始後の26時間以内、例えばステップ(i)の開始後の22、23若しくは24時間以内、例えばステップ(i)の開始後の24時間以内に実施されるか；(b)ステップ(ii)は、ステップ(i)と一緒に、又はステップ(i)の開始後の20時間以内、例えばステップ(i)の開始後の12、13、14、15、16、17若しくは18時間以内、例えばステップ(i)の開始後の18時間以内に実施され、及びステップ(iii)は、ステップ(ii)の開始後の30時間以内、例えばステップ(ii)の開始後の22、23、24、25、26、27、28、29又は30時間以内に実施されるか；又は(c)ステップ(iii)からの細胞の集団は、例えば、ステップ(i)の開始時の細胞の集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて、増殖されないか、又は5、10、15、20、25、30、35若しくは40%以下、例えば10%以下だけ増殖される。一部の実施形態では、ステップ(ii)における核酸分子は、DNA分子である。一部の実施形態では、ステップ(ii)における核酸分子は、RNA分

30

40

50

子である。一部の実施形態では、ステップ (i i) における核酸分子は、ウイルスベクター、例えば、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター又はレトロウイルスベクターから選択されるウイルスベクター上にある。一部の実施形態では、ステップ (i i) における核酸分子は、非ウイルスベクター上にある。一部の実施形態では、ステップ (i i) における核酸分子は、プラスミド上にある。一部の実施形態では、ステップ (i i) における核酸分子は、いずれのベクター上にもない。一部の実施形態では、ステップ (i i) は、細胞 (例えば、T細胞) の集団を、CARをコードする核酸分子を含むウイルスベクターで形質導入することを含む。

【 0 6 2 2 】

一部の実施形態では、細胞 (例えば、T細胞) の集団は、対象からのアフェレーシスサンプル (例えば、白血球アフェレーシスサンプル) から採取される。 10

【 0 6 2 3 】

一部の実施形態では、アフェレーシスサンプル (例えば、白血球アフェレーシスサンプル) を対象から採取し、凍結サンプル (例えば、凍結保存サンプル) として細胞製造施設に輸送する。次に、凍結アフェレーシスサンプルを解凍した後、例えば、セルソーティング機 (例えば、CliniMACS (登録商標) Prodigy (登録商標) 装置) を用いて、アフェレーシスサンプルからT細胞 (例えば、CD4 + T細胞及び / 又はCD8 + T細胞) を選択する。続いて、選択されたT細胞 (例えば、CD4 + T細胞及び / 又はCD8 + T細胞) を、本明細書に記載の活性化プロセスを用いるCAR T製造のために接種する。一部の実施形態では、選択されたT細胞 (例えば、CD4 + T細胞及び / 又はCD8 + T細胞) は、CAR T製造のために接種する前に、1ラウンド以上の凍結 - 解凍工程に付す。 20

【 0 6 2 4 】

一部の実施形態では、アフェレーシスサンプル (例えば、白血球アフェレーシスサンプル) を対象から採取し、新鮮な産物 (例えば、凍結していない産物) として細胞製造施設に輸送する。例えば、セルソーティング機 (例えば、CliniMACS (登録商標) Prodigy (登録商標) 装置) を用いて、アフェレーシスサンプルからT細胞 (例えば、CD4 + T細胞及び / 又はCD8 + T細胞) を選択する。続いて、選択されたT細胞 (例えば、CD4 + T細胞及び / 又はCD8 + T細胞) を、本明細書に記載の活性化プロセスを用いるCAR T製造のために接種する。一部の実施形態では、選択されたT細胞 (例えば、CD4 + T細胞及び / 又はCD8 + T細胞) は、CAR T製造のために接種する前に、1ラウンド以上の凍結 - 解凍工程に付す。 30

【 0 6 2 5 】

一部の実施形態では、アフェレーシスサンプル (例えば、白血球アフェレーシスサンプル) を対象から採取する。例えば、セルソーティング機 (例えば、CliniMACS (登録商標) Prodigy (登録商標) 装置) を用いて、アフェレーシスサンプルからT細胞 (例えば、CD4 + T細胞及び / 又はCD8 + T細胞) を選択する。続いて、選択されたT細胞 (例えば、CD4 + T細胞及び / 又はCD8 + T細胞) を凍結サンプル (例えば、凍結保存サンプル) として細胞製造施設に輸送する。選択されたT細胞 (例えば、CD4 + T細胞及び / 又はCD8 + T細胞) を後に解凍し、本明細書に記載の活性化プロセスを用いるCAR T製造のために接種する。 40

【 0 6 2 6 】

一部の実施形態では、細胞 (例えば、T細胞) の集団を抗CD3及び抗CD28抗体と、例えば、12時間接触させた後、CAR (例えば、1つ以上のCAR) をコードするベクター (例えば、レンチウイルスベクター) (例えば、1つ以上のベクター) で形質導入する。培養開始から24時間後に細胞を洗浄し、保存又は投与のために製剤化する。

【 0 6 2 7 】

理論に縛られることは意図しないが、短時間のCD3及びCD28刺激が、自己再生T細胞の効率的な形質導入を促進し得る。伝統的なCAR T製造アプローチと比べて、本明細書に開示される活性化プロセスは、長時間にわたるエクスピボ拡大を伴わない。サイト 50

カインプロセスと同様に、本明細書に提供される活性化プロセスも、CART製造中に未分化T細胞を維持する。

【0628】

一部の実施形態では、CD3/TCR複合体を刺激する薬剤及び/又は細胞の表面上の共刺激分子を刺激する薬剤と細胞集団を接触させる。

【0629】

一部の実施形態では、CD3/TCR複合体を刺激する薬剤は、CD3を刺激する薬剤である。一部の実施形態では、共刺激分子を刺激する薬剤は、CD28、ICOS、CD27、HVEM、LIGHT、CD40、4-1BB、OX40、DR3、GITR、CD30、TIM1、CD2、CD226又はそれらの組み合わせを刺激する薬剤である。一部の実施形態では、共刺激分子を刺激する薬剤は、CD28を刺激する薬剤である。一部の実施形態では、CD3/TCR複合体を刺激する薬剤は、抗体（例えば、単ドメイン抗体（例えば、重鎖可変ドメイン抗体）、ペプチボディ、Fabフラグメント又はscFv）、小分子又はリガンド（例えば、天然に存在する、組換え又はキメラリガンド）から選択される。一部の実施形態では、CD3/TCR複合体を刺激する薬剤は、抗体である。一部の実施形態では、CD3/TCR複合体を刺激する薬剤は、抗CD3抗体である。一部の実施形態では、共刺激分子を刺激する薬剤は、抗体（例えば、単ドメイン抗体（例えば、重鎖可変ドメイン抗体）、ペプチボディ、Fabフラグメント又はscFv）、小分子又はリガンド（例えば、天然に存在する、組換え又はキメラリガンド）から選択される。一部の実施形態では、共刺激分子を刺激する薬剤は、抗体である。一部の実施形態では、共刺激分子を刺激する薬剤は、抗CD28抗体である。一部の実施形態では、CD3/TCR複合体を刺激する薬剤又は共刺激分子を刺激する薬剤は、ビーズを含まない。一部の実施形態では、CD3/TCR複合体を刺激する薬剤は、コロイドポリマーナノマトリックスに共有結合された抗CD3抗体を含む。一部の実施形態では、共刺激分子を刺激する薬剤は、コロイドポリマーナノマトリックスに共有結合された抗CD28抗体を含む。一部の実施形態では、CD3/TCR複合体を刺激する薬剤及び共刺激分子を刺激する薬剤は、T Cell Trans Act（商標）を含む。

10

20

【0630】

一部の実施形態において、マトリックスは、例えば、細胞に対して非毒性であるポリマー、例えば、生分解性若しくは生体適合性の不活性材料を含むか又はそれから構成される。一部の実施形態では、マトリックスは、親水性ポリマー鎖から構成され、これは、鎖の水和によって水溶液中で最大可動性を取得する。一部の実施形態において、可動性マトリックスは、コラーゲン、精製タンパク質、精製ペプチド、多糖、グリコサミノグリカン又は細胞外マトリックス組成物からなるものであり得る。多糖としては、例えば、セルロースエーテル、デンプン、アラビアガム、アガロース、デキストラン、キトサン、ヒアルロン酸、ペクチン、キサンタン、グアーガム又はアルギン酸塩を挙げることができる。他のポリマーとしては、ポリエステル、ポリエーテル、ポリアクリレート、ポリアクリルアミド、ポリアミン、ポリエチレンイミン、ポリクオタニウムポリマー、ポリホスファゼン、ポリビニルアルコール、ポリ酢酸ビニル、ポリビニルピロリドン、ブロックコポリマー又はポリウレタンが挙げられる。一部の実施形態において、可動性マトリックスは、デキストランのポリマーである。

30

40

【0631】

一部の実施形態では、細胞の集団を、CAR（例えば、1つ以上のCAR）をコードする核酸分子（例えば、1つ以上の核酸分子）と接触させる。一部の実施形態では、細胞の集団を、CAR（例えば、1つ以上のCAR）をコードするDNA分子（例えば、1つ以上のDNA分子）で形質導入する。

【0632】

一部の実施形態において、2つの核酸分子（例えば、レンチウイルスベクター）の共形質導入の場合、その各々が、本明細書に開示されるCARをコードし（例えば、本明細書に開示されるように、1つの核酸分子が、抗BCMA CARをコードし、1つの核酸分

50

子が、抗CD19 CARをコードする)、CARをコードする核酸分子を含むベクターの各々は、異なる感染多重度(MOI)で反応混合物(例えば、細胞集団を含有する)に添加することができる。

【0633】

理論に縛られることは意図しないが、一部の実施形態では、異なるCAR分子をコードする核酸分子を含有するベクターについて異なるMOIを使用すると、細胞集団の最終組成に影響を及ぼし得ると考えられる。例えば、抗BCMA CARをコードするレンチウイルスベクターと、抗CD19 CARをコードするレンチウイルスベクターの共形質導入の場合、異なるMOIを使用して、得られるモノCD19 CART細胞及び未形質導入細胞をより少数にすると同時に、モノBCMA CART細胞及びBCMA/CD19二重CART細胞のパーセントを最大化することができる。

10

【0634】

一部の実施形態において、BCMA CARをコードするレンチウイルスベクターと、抗CD19 CARをコードするレンチウイルスベクターの共形質導入の場合、第2ウイルスベクターと細胞集団を接触させる場合のMOIより高いか、それと等しいか又はそれより低い感染多重度(MOI)で第1ウイルスベクターと細胞集団を接触させる。一部の実施形態において、第2ウイルスベクターと細胞集団を接触させる場合のMOIより高い感染多重度(MOI)で第1ウイルスベクターと細胞集団を接触させる。

【0635】

一部の実施形態では、細胞の集団を、第1MOIで第1ウイルスベクターと、且つ第2MOIで第2ウイルスベクターと接触され、それにより、得られる細胞の集団が、抗BCMA CARを含むが、抗CD19 CARを含まない第1細胞集団、抗CD19 CARを含むが、抗BCMA CARを含まない第2細胞集団、抗BCMA CARと抗CD19 CARとの両方を含む第3細胞集団を含むようにし、

20

(a) 例えば、実施例10に記載の方法によって決定されて、第2及び第3集団を合わせた生存細胞の総数は、第1及び第3集団を合わせた生存細胞の総数の約110%以下(例えば、約105%、100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、1%又はそれ未満以下)であり；

(b) 例えば、実施例10に記載の方法によって決定されて、第1及び第3集団を合わせた生存細胞の総数は、第2及び第3集団を合わせた生存細胞の総数の約90%以上(例えば、約100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、400%、500%、750%、1000%、2000%、5000、10000%又はそれを超えるもの以上)であり；

30

(c) 例えば、実施例10に記載の方法によって決定されて、第1及び第3集団を合わせた生存細胞の総数は、得られる集団の生存細胞の総数の約5%以上(例えば、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%又は90%以上)であり；

(d) 例えば、実施例10に記載の方法によって決定されて、第2集団の生存細胞の総数は、第1及び第3集団を合わせた生存細胞の総数の約110%以下(例えば、約105%、100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、1%又はそれ未満以下)であるか；又は

40

(e) 例えば、実施例10に記載の方法によって決定されて、第1及び第3集団を合わせた生存細胞の総数は、第2集団の生存細胞の総数の約90%以上(例えば、約100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、400%、500%、750%、1000%、2000%、5000、10000%又はそれを超えるもの以上)である。

【0636】

一部の実施形態では、細胞の集団を第2ウイルスベクターと特定のMOIで接触させる(例えば、第1ウイルスベクターと細胞の集団を接触させる場合のMOIより十分に低いMOIであって、それにより、得られる細胞集団において、以下が達成されるMOI：

(a) 例えば、実施例10に記載の方法によって決定されて、第2及び第3集団を合わせ

50

た生存細胞の総数が、第1及び第3集団を合わせた生存細胞の総数の約110%以下（例えば、約105%、100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、1%又はそれ未満以下）であり；

（b）例えば、実施例10に記載の方法によって決定されて、第1及び第3集団を合わせた生存細胞の総数が、第2及び第3集団を合わせた生存細胞の総数の約90%以上（例えば、約100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、400%、500%、750%、1000%、2000%、5000、10000%又はそれを超えるもの以上）であり；

（c）例えば、実施例10に記載の方法によって決定されて、第1及び第3集団を合わせた生存細胞の総数が、得られる集団の生存細胞の総数の約5%以上（例えば、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%又は90%以上）であり；

（d）例えば、実施例10に記載の方法によって決定されて、第2集団の生存細胞の総数が、第1及び第3集団を合わせた生存細胞の総数の約110%以下（例えば、約105%、100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、1%又はそれ未満以下）であるか；又は

（e）例えば、実施例10に記載の方法によって決定されて、第1及び第3集団を合わせた生存細胞の総数が、第2集団の生存細胞の総数の約90%以上（例えば、約100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、400%、500%、750%、1000%、2000%、5000、10000%又はそれを超えるもの以上）である。

【0637】

一部の実施形態では、細胞の集団を、第1ウイルスベクターと第1MOIで接触させ、細胞の集団を、第2ウイルスベクターと第2MOIで接触させ、それにより、得られる細胞集団が、以下を含むようにする：

（a）例えば、実施例10に記載の方法によって決定されて、第2及び第3集団を合わせた生存細胞の総数が、第1及び第3集団を合わせた生存細胞の総数の約110%以下（例えば、約105%、100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、1%又はそれ未満以下）であり；

（b）例えば、実施例10に記載の方法によって決定されて、第1及び第3集団を合わせた生存細胞の総数が、第2及び第3集団を合わせた生存細胞の総数の約90%以上（例えば、約100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、400%、500%、750%、1000%、2000%、5000、10000%又はそれを超えるもの以上）であり；

（c）例えば、実施例10に記載の方法によって決定されて、第1及び第3集団を合わせた生存細胞の総数が、得られる集団の生存細胞の総数の約5%以上（例えば、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%又は90%以上）であり；

（d）例えば、実施例10に記載の方法によって決定されて、第2集団の生存細胞の総数が、第1及び第3集団を合わせた生存細胞の総数の約110%以下（例えば、約105%、100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、1%又はそれ未満以下）であるか；又は

（e）例えば、実施例10に記載の方法によって決定されて、第1及び第3集団を合わせた生存細胞の総数が、第2集団の生存細胞の総数の約90%以上（例えば、約100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、400%、500%、750%、1000%、2000%、5000、10000%又はそれを超えるもの以上）である。

【0638】

一部の実施形態では、細胞の集団を、

（a）約1～約10（例えば、約2～約9、約3～約8、約4～約7、約5～約6、約1～約8、約1～約6、約1～約4、約8～約10、約6～約10、約4～約10、約1～3、約2～約4、約3～約5、約4～約6、約5～約7、約6～約8、約7～約9、約8

～約10、約2.5～約5、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9又は約10)のMOIで第1ウイルスベクターと；

(b) 約0.1～約5(例えば、約0.2～約4、約0.3～約3、約0.4～約2、約0.5～約1、約0.6～約0.9、約0.7～約0.8、約0.1～約4、約0.1～約3、約0.1～約2、約0.1～約1、約0.1～約0.5、約4～約5、約3～約5、約2～約5、約1～約5、約0.5～約5、約0.2～約5、約0.1～約0.5、約0.2～約1、約0.5～約2、約1～約3、約2～約4、約3～約5、約0.5～約1、約0.1、約0.2、約0.3、約0.4、約0.5、約0.6、約0.7、約0.8、約0.9、約1、約2、約3、約4又は約5)のMOIで第2ウイルスベクターと；

(c) 細胞の集団を第2ウイルスベクターと接触させる際のMOIより少なくとも約10% (例えば、少なくとも約20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%若しくは90%) 高いか、若しくは少なくとも約1倍(例えば、少なくとも約2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90若しくは100倍、例えば約2～約50倍、約3～20倍、約5～約15倍若しくは約8～約10倍)のMOIで第1ウイルスベクターと；及び/又は

(d) 細胞の集団を第1ウイルスベクターと接触させる際のMOIの1/X(ここで、Xは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、30、40、50、60、70、80、90又は100である)以下のMOIで第2ウイルスベクターと接触させる。

【0639】

一部の実施形態では、細胞の集団を約2.5～約5のMOIで第1ウイルスベクターと接触させる。一部の実施形態では、細胞の集団を約0.5～約1.0のMOIで第2ウイルスベクターと接触させる。一部の実施形態では、細胞の集団を第2ウイルスベクターと接触させる際のMOIより約8～約10倍高いMOIの第1ウイルスベクターである。一部の実施形態では、細胞集団を第1ウイルスベクターと接触させる際のMOIの1/X(ここで、Xは、6、8、10又は12)以下のMOIの第2ウイルスベクターである。

【0640】

一部の実施形態では、ステップ(ii)において、細胞の集団を、

(a) 約4～約5(例えば、約4.75)のMOIで第1ウイルスベクターと；及び/又は

(b) 約0.2～約1(例えば、約0.5)のMOIで第2ウイルスベクターと接触させる。

【0641】

一部の実施形態では、ステップ(ii)において、細胞の集団は、約 1×10^8 ～約 5×10^9 (例えば、約 2×10^8 ～約 2×10^9 又は約 4×10^8 ～約 1×10^9 個の総生存細胞を含む。一部の実施形態では、細胞は、約 1×10^6 ～約 1×10^7 (例えば、約 2×10^6 ～約 5×10^6 又は約 3×10^6 ～約 4×10^6)個の生存細胞/mLの濃度で培養物中に懸濁させる。

【0642】

各ベクターに用いられる正確なMOIは、いくつかの要因に基づいて調節又は決定することができ、そうした要因として、限定されないが、ウイルスベクターのバッチの特性、形質導入しようとする細胞の特性及び形質導入効率が挙げられる。一部の実施形態では、CARをコードする核酸分子と細胞集団を接触させるステップは、CD3/TCR複合体を刺激する薬剤及び/又は前述した細胞の表面上の共刺激分子を刺激する薬剤と細胞集団を接触させるステップと同時に行う。一部の実施形態では、CARをコードする核酸分子と細胞集団を接触させるステップは、CD3/TCR複合体を刺激する薬剤及び/又は前述した細胞の表面上の共刺激分子を刺激する薬剤と細胞集団を接触させるステップの開始後の30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1又は0.5時間以内に実施する。一部の実施形態では、CARをコードする核酸分子

10

20

30

40

50

、CD3 / TCR複合体を刺激する薬剤及び / 又は前述した細胞の表面上の共刺激分子を刺激する薬剤と細胞集団を接触させるステップの開始後の4時間以内実施する。一部の実施形態では、CARをコードする核酸分子と細胞集団を接触させるステップは、CD3 / TCR複合体を刺激する薬剤及び / 又は前述した細胞の表面上の共刺激分子を刺激する薬剤と細胞集団を接触させるステップの開始後の3時間以内実施する。一部の実施形態では、CARをコードする核酸分子と細胞集団を接触させるステップは、CD3 / TCR複合体を刺激する薬剤及び / 又は前述した細胞の表面上の共刺激分子を刺激する薬剤と細胞集団を接触させるステップの開始後の2時間以内実施する。一部の実施形態では、CARをコードする核酸分子と細胞集団を接触させるステップは、CD3 / TCR複合体を刺激する薬剤及び / 又は前述した細胞の表面上の共刺激分子を刺激する薬剤と細胞集団を接触させるステップの開始後の1時間以内実施する。一部の実施形態では、CARをコードする核酸分子と細胞集団を接触させるステップは、CD3 / TCR複合体を刺激する薬剤及び / 又は前述した細胞の表面上の共刺激分子を刺激する薬剤と細胞集団を接触させるステップの開始後の30分以内実施する。

【0643】

一部の実施形態では、保存又は投与のために細胞の集団を採取する。

【0644】

一部の実施形態では、CD3 / TCR複合体を刺激する薬剤及び / 又は前述した細胞の表面上の共刺激分子を刺激する薬剤と細胞集団を接触させるステップの開始後の72、60、48、36、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19又は18時間以内に、保存又は投与の目的で細胞集団を採取する。一部の実施形態では、CD3 / TCR複合体を刺激する薬剤及び / 又は前述した細胞の表面上の共刺激分子を刺激する薬剤と細胞集団を接触させるステップの開始後の26時間以内に、保存又は投与の目的で細胞集団を採取する。一部の実施形態では、CD3 / TCR複合体を刺激する薬剤及び / 又は前述した細胞の表面上の共刺激分子を刺激する薬剤と細胞集団を接触させるステップの開始後の25時間以内に、保存又は投与の目的で細胞集団を採取する。一部の実施形態では、CD3 / TCR複合体を刺激する薬剤及び / 又は前述した細胞の表面上の共刺激分子を刺激する薬剤と細胞集団を接触させるステップの開始後の24時間以内に、保存又は投与の目的で細胞集団を採取する。一部の実施形態では、CD3 / TCR複合体を刺激する薬剤及び / 又は前述した細胞の表面上の共刺激分子を刺激する薬剤と細胞集団を接触させるステップの開始後の23時間以内に、保存又は投与の目的で細胞集団を採取する。一部の実施形態では、CD3 / TCR複合体を刺激する薬剤及び / 又は前述した細胞の表面上の共刺激分子を刺激する薬剤と細胞集団を接触させるステップの開始後の22時間以内に、保存又は投与の目的で細胞集団を採取する。

【0645】

一部の実施形態において、細胞の集団はエクスピボで増殖されない。

【0646】

一部の実施形態において、細胞集団は、例えば、CD3 / TCR複合体を刺激する薬剤及び / 又は前述した細胞の表面上の共刺激分子を刺激する薬剤と接触させる前の細胞集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55若しくは60%以下だけ増殖される。一部の実施形態では、細胞集団は、例えば、CD3 / TCR複合体を刺激する薬剤及び / 又は前述した細胞の表面上の共刺激分子を刺激する薬剤と接触させる前の細胞集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて5%以下だけ増殖される。一部の実施形態では、細胞集団は、例えば、CD3 / TCR複合体を刺激する薬剤及び / 又は前述した細胞の表面上の共刺激分子を刺激する薬剤と接触させる前の細胞集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて10%以下だけ増殖される。一部の実施形態では、細胞集団は、例えば、CD3 / TCR複合体を刺激する薬剤及び / 又は前述した細胞の表面上の共刺激分子を刺激する薬剤と接触させる前の細胞集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて15%以下だけ増殖される。一部の実施形態では、細胞

胞集団は、例えば、CD3 / TCR複合体を刺激する薬剤及び/又は前述した細胞の表面上の共刺激分子を刺激する薬剤と接触させる前の細胞集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて20%以下だけ増殖される。一部の実施形態では、細胞集団は、例えば、CD3 / TCR複合体を刺激する薬剤及び/又は前述した細胞の表面上の共刺激分子を刺激する薬剤と接触させる前の細胞集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて25%以下だけ増殖される。一部の実施形態では、細胞集団は、例えば、CD3 / TCR複合体を刺激する薬剤及び/又は前述した細胞の表面上の共刺激分子を刺激する薬剤と接触させる前の細胞集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて30%以下だけ増殖される。一部の実施形態では、細胞集団は、例えば、CD3 / TCR複合体を刺激する薬剤及び/又は前述した細胞の表面上の共刺激分子を刺激する薬剤と接触させる前の細胞集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて35%以下だけ増殖される。一部の実施形態では、細胞集団は、例えば、CD3 / TCR複合体を刺激する薬剤及び/又は前述した細胞の表面上の共刺激分子を刺激する薬剤と接触させる前の細胞集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて40%以下だけ増殖される。

10

【0647】

一部の実施形態において、細胞集団は、例えば、前述した1つ以上のサイトカインと接触させる前の細胞集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、6、7、8、9、10、11、12、16、20、24、36又は48時間以下だけ増殖される。

【0648】

一部の実施形態において、活性化プロセスは、無血清細胞培地中で実施される。一部の実施形態において、活性化プロセスは、IL-2、IL-15（例えば、hetIL-15（IL15 / sIL-15Ra））又はIL-6（例えば、IL-6 / sIL-6Ra）から選択される1つ以上のサイトカインを含む細胞培地中で実施される。一部の実施形態において、hetIL-15は、

20

【化15】

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVEN
LILANNSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSITCPPPMSVEHADIWVK
SYLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPLKCIKIRDPALVHQRPPSTVTVT
TAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESHGTPSQT
TAKNWELTASASHQPPGVYPQG (配列番号309)

30

のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、hetIL-15は、配列番号309と少なくとも約70、75、80、85、90、95又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、活性化プロセスは、LSD1阻害剤を含む細胞培地中で実施される。一部の実施形態において、活性化プロセスは、MALT1阻害剤を含む細胞培地中で実施される。一部の実施形態において、無血清細胞培地は、血性代替品を含む。一部の実施形態において、血清代替品は、CTS（商標）Immune Cell Serum Replacement（ICSR）である。一部の実施形態において、ICSRのレベルは、例えば、最大5%、例えば約1%、2%、3%、4%又は5%であり得る。理論に縛られることは意図しないが、ICSR、例えば、2% ICSRを含む細胞培地、例えば、表21若しくは表25に示すラピッドメディア（Rapid Media）を使用すれば、本明細書に記載の製造プロセス中の細胞生存能力を向上させることができる。

40

【0649】

一部の実施形態において、本開示は、キメラ抗原受容体（CAR）を発現する細胞（例えば、T細胞）の集団を作製する方法を提供し、これは、（a）対象から採取したアフェレーシスサンプル（例えば、新鮮な又は凍結保存された白血球アフェレーシスサンプル）を用意するステップ；（b）アフェレーシスサンプルからT細胞を選択する（例えば、ネ

50

ガティブ選択、ポジティブ選択又はビーズなしの選択を用いて)ステップ; (c) 単離したT細胞を例えば $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 細胞/mLで接種するステップ; (d) T細胞を、T細胞を刺激する薬剤、例えばCD3/TCR複合体を刺激する薬剤及び/又は細胞の表面上の共刺激分子を刺激する薬剤と接触させる(例えば、T細胞を抗CD3及び/又は抗CD28抗体と接触させる、例えば、T細胞をTransActと接触させる)ステップ; (e) T細胞を、CARをコードする核酸分子(例えば、DNA又はRNA分子)と、例えば6~48時間、例えば20~28時間接触させる(例えば、T細胞を、CARをコードする核酸分子を含むウイルスと接触させる)ステップ; 並びに(f) 保存(例えば、凍結保存培地中のT細胞の製剤化)又は投与のためにT細胞を洗浄及び採取するステップを含む。一部の実施形態において、ステップ(f)は、ステップ(d)又は(e)の開始後の30時間以内、例えばステップ(d)又は(e)の開始後の22、23、24、25、26、27、28、29又は30時間以内に実施される。

【0650】

一部の実施形態では、本明細書に記載される製造プロセス(例えば、本明細書に記載の活性化プロセス)のいずれかによって作製された細胞(例えば、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞若しくはNK細胞)の集団が本明細書に提供される。

【0651】

一部の実施形態において、製造プロセスの終了時(例えば、本明細書に記載のサイトカインプロセス又は活性化プロセスの終了時)の細胞集団中のナイーブ細胞、例えばナイーブT細胞、例えばCD45RA+CD45RO-CCR7+T細胞のパーセンテージは、製造プロセスの開始時(例えば、本明細書に記載のサイトカインプロセス又は活性化プロセスの開始時)の細胞集団中のナイーブ細胞、例えばナイーブT細胞、例えばCD45RA+CD45RO-CCR7+T細胞のパーセンテージと比べて、(1)同じであるか、(2)例えば、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14若しくは15%以下だけ異なるか、又は(3)少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24若しくは25%だけ増加される。一部の実施形態において、製造プロセスの終了時(例えば、本明細書に記載のサイトカインプロセス又は活性化プロセスの終了時)の細胞集団は、26時間超継続する(例えば、5、6、7、8、9、10、11若しくは12日超継続する)か、又は3日超(例えば、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14若しくは15日)にわたりインビトロで細胞集団を増殖させるステップを含む以外は類似の方法によって作製された細胞と比べて、より高いパーセンテージ(例えば、少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45又は50%高い)のナイーブ細胞、例えばナイーブT細胞、例えばCD45RA+CD45RO-CCR7+T細胞を示す。

【0652】

一部の実施形態において、製造プロセスの終了時(例えば、本明細書に記載のサイトカインプロセス又は活性化プロセスの終了時)の細胞集団中のナイーブ細胞、例えばナイーブT細胞、例えばCD45RA+CD45RO-CCR7+T細胞のパーセンテージは、20、25、30、35、40、45、50、55若しくは60%以上である。

【0653】

一部の実施形態において、製造プロセスの終了時(例えば、本明細書に記載のサイトカインプロセス又は活性化プロセスの終了時)の細胞集団中のセントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリーT細胞、例えばCD95+セントラルメモリーT細胞のパーセンテージは、製造プロセスの開始時(例えば、本明細書に記載のサイトカインプロセス又は活性化プロセスの開始時)の細胞集団中のセントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリーT細胞、例えばCD95+セントラルメモリーT細胞のパーセンテージと比べて、(1)同じであるか、(2)例えば、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14若しくは15%以下だけ異なるか、又は(3)少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23

、24若しくは25%だけ減少される。一部の実施形態において、製造プロセスの終了時（例えば、本明細書に記載のサイトカインプロセス又は活性化プロセスの終了時）の細胞集団は、例えば26時間超持続する（例えば、5、6、7、8、9、10、11若しくは12日超持続する）か、又は例えば3日超にわたりインビトロで細胞集団を増殖させる（例えば、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14若しくは15日にわたりインビトロで細胞集団を増殖させる）ステップを含む以外は類似の方法によって作製された細胞と比べて、減少した低いパーセンテージ（例えば、少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45又は50%低い）のナイーブ細胞、例えばセントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリーT細胞、例えばCD95+セントラルメモリーT細胞を示す。

10

【0654】

一部の実施形態において、製造プロセスの終了時（例えば、本明細書に記載のサイトカインプロセス又は活性化プロセスの終了時）の細胞集団中のセントラルメモリー細胞、例えばセントラルメモリーT細胞、例えばCD95+セントラルメモリーT細胞のパーセンテージは、40、45、50、55、60、65、70、75又は80%以下である。

【0655】

一部の実施形態において、製造プロセスの終了時（例えば、本明細書に記載のサイトカインプロセス又は活性化プロセスの終了時）の細胞集団は、インビボで投与された後、例えば26時間超持続する（例えば、5、6、7、8、9、10、11若しくは12日超持続する）か、又は例えば3日超にわたりインビトロで細胞集団を増殖させる（例えば、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14若しくは15日にわたりインビトロで細胞集団を増殖させる）ステップを含む以外は類似の方法によって作製された細胞と比べて、長時間持続するか又は高い（例えば、少なくとも20、25、30、35、40、45、50、55、60、70、75、80、85若しくは90%高い）レベルで増殖する。

20

【0656】

一部の実施形態において、細胞の集団は、製造プロセスの開始前（例えば、本明細書に記載のサイトカインプロセス又は活性化プロセスの開始前）にIL6R発現細胞（例えば、IL6R及び/又はIL6R）について濃縮されている。一部の実施形態において、細胞の集団は、例えば、製造プロセスの開始時（例えば、本明細書に記載のサイトカインプロセス又は活性化プロセスの開始時）に、例えば、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75若しくは80%以下のIL6R発現細胞（例えば、IL6R及び/又はIL6R）について陽性の細胞を含む。

30

【0657】

サイトカインプロセス

一部の実施形態では、本開示は、キメラ抗原受容体（CAR）（例えば、1つ以上のCAR、例えば、2つのCAR）を発現する細胞（例えば、T細胞）の集団を作製する方法を提供し、これは、（1）細胞の集団を、IL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-6又はそれらの組み合わせから選択されるサイトカインと接触させるステップ、（2）細胞（例えば、T細胞）の集団を、CARをコードする核酸分子（例えば、DNA又はRNA分子）と接触させ、それにより核酸分子を含む細胞（例えば、T細胞）の集団を提供するステップ、及び（3）保存（例えば、凍結保存培地中の細胞集団の再製剤化）又は投与のために細胞（例えば、T細胞）の集団を採取するステップを含み、（a）ステップ（2）は、ステップ（1）と一緒に、又はステップ（1）の開始後の5時間以内、例えばステップ（1）の開始後の1、2、3、4若しくは5時間以内に実施され、ステップ（3）は、ステップ（1）の開始後の26時間以内、例えばステップ（1）の開始後の22、23若しくは24時間以内、例えばステップ（1）の開始後の24時間以内に実施されるか、又は（b）ステップ（3）からの細胞の集団は、増殖されないか、又は例えばステップ（1）の開始時の細胞の集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて5、10

40

50

、 15、20、25、30、35若しくは40%以下、例えば10%以下だけ増殖される。一部の実施形態では、ステップ(2)における核酸分子は、DNA分子である。一部の実施形態では、ステップ(2)における核酸分子は、RNA分子である。一部の実施形態では、ステップ(2)における核酸分子は、ウイルスベクター、例えば、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター又はレトロウイルスベクターから選択されるウイルスベクター上にある。一部の実施形態では、ステップ(2)における核酸分子は、非ウイルスベクター上にある。一部の実施形態では、ステップ(2)における核酸分子は、プラスミド上にある。一部の実施形態では、ステップ(2)における核酸分子は、いずれのベクター上にもない。一部の実施形態では、ステップ(2)は、CARをコードする核酸分子を含むウイルスベクターで、細胞(例えば、T細胞)の集団を形質導入することを含む。一部の実施形態では、本明細書に開示される2つのCAR(例えば、本明細書に開示される抗BCMA CAR及び抗CD19 CAR)をコードする核酸分子を含むように細胞を操作する。一部の実施形態では、本明細書に開示されるダイアボディCAR(例えば、本明細書に開示される抗BCMA/抗CD19ダイアボディCAR)をコードする核酸分子を含むように細胞を操作する。一部の実施形態では、各々が本明細書に開示のCARをコードする2つの核酸分子(例えば、抗BCMA CARをコードする1つの核酸分子と、抗CD19 CARをコードする1つの核酸分子)を含むように細胞を操作する。

10

【0658】

一部の実施形態では、細胞(例えば、T細胞)の集団は、対象からのアフエーシスサンプル(例えば、白血球アフエーシスサンプル)から収集される。

20

【0659】

一部の実施形態では、アフエーシスサンプル(例えば、白血球アフエーシスサンプル)を対象から採取し、凍結サンプル(例えば、凍結保存サンプル)として細胞製造施設に輸送する。次に、凍結アフエーシスサンプルを解凍した後、例えばセルソーティング機(例えば、CliniMACS(登録商標)Prodigy(登録商標)装置)を用いて、アフエーシスサンプルからT細胞(例えば、CD4+T細胞及び/又はCD8+T細胞)を選択する。続いて、選択されたT細胞(例えば、CD4+T細胞及び/又はCD8+T細胞)を、本明細書に記載のサイトカインプロセスを用いるCAR T製造のために接種する。一部の実施形態では、サイトカインプロセスの終了時、CAR T細胞を凍結保存し、後に解凍して、対象に投与する。一部の実施形態では、選択されたT細胞(例えば、CD4+T細胞及び/又はCD8+T細胞)は、CAR T製造のために接種する前に、1ラウンド以上の凍結-解凍工程に付す。

30

【0660】

一部の実施形態では、アフエーシスサンプル(例えば、白血球アフエーシスサンプル)を対象から採取し、新鮮な産物(例えば、凍結していない産物)として細胞製造施設に輸送する。例えば、セルソーティング機(例えば、CliniMACS(登録商標)Prodigy(登録商標)装置)を用いて、アフエーシスサンプルからT細胞(例えば、CD4+T細胞及び/又はCD8+T細胞)を選択する。続いて、選択されたT細胞(例えば、CD4+T細胞及び/又はCD8+T細胞)を、本明細書に記載のサイトカインプロセスを用いるCAR T製造のために接種する。一部の実施形態では、選択されたT細胞(例えば、CD4+T細胞及び/又はCD8+T細胞)は、CAR T製造のために接種する前に、1ラウンド以上の凍結-解凍工程に付す。

40

【0661】

一部の実施形態では、アフエーシスサンプル(例えば、白血球アフエーシスサンプル)を対象から採取する。例えば、セルソーティング機(例えば、CliniMACS(登録商標)Prodigy(登録商標)装置)を用いて、アフエーシスサンプルからT細胞(例えば、CD4+T細胞及び/又はCD8+T細胞)を選択する。続いて、選択されたT細胞(例えば、CD4+T細胞及び/又はCD8+T細胞)を凍結サンプル(例えば、凍結保存サンプル)として細胞製造施設に輸送する。選択されたT細胞(例えば、CD4+T細胞及び/又はCD8+T細胞)を後に解凍し、本明細書に記載のサイトカイン

50

プロセスを用いるCART製造のために接種する。

【0662】

一部の実施形態では、細胞（例えば、T細胞）を接種した後、1つ以上のサイトカイン（例えば、IL-2、IL-7、IL-15（例えば、hetIL-15（IL15/sIL-15Ra））、IL-21若しくはIL-6（例えば、IL-6/sIL-6R）から選択される1つ以上のサイトカイン）並びにCAR（例えば、1つ以上のCAR）をコードするベクター（例えば、レンチウイルスベクター）（又は1つ以上のベクター）を細胞に添加する。20～24時間のインキュベーション後、細胞を洗浄してから、保存又は投与のために製剤化する。

【0663】

伝統的なCART製造アプローチと異なり、本明細書に提供されるサイトカインプロセスは、CD3及び/若しくはCD28刺激又はエキスピボT細胞拡大を伴わない。抗CD3及び抗CD28抗体と接触させて、エキスピボで広範囲に増殖するT細胞は、セントラルメモリー表現型に向かう分化を示す傾向がある。理論に縛られることは意図しないが、本明細書に提供されるサイトカインプロセスは、CART製造中に、T細胞の未分化表現型を保存するか又は増加させて、対象に注入された後、より長期に持続し得るCART産物を生成する。

【0664】

一部の実施形態では、細胞の集団を1つ以上のサイトカイン（例えば、IL-2、IL-7、IL-15（例えば、hetIL-15（IL15/sIL-15Ra））、IL-21又はIL-6（例えば、IL-6/sIL-6Ra）から選択される1つ以上のサイトカインと接触させる。

【0665】

一部の実施形態では、細胞の集団をIL-2と接触させる。一部の実施形態では、細胞の集団をIL-7と接触させる。一部の実施形態では、細胞の集団をIL-15（例えば、hetIL-15（IL15/sIL-15Ra））と接触させる。一部の実施形態では、細胞の集団をIL-21と接触させる。一部の実施形態では、細胞の集団をIL-6（例えば、IL-6/sIL-6Ra）と接触させる。一部の実施形態では、細胞の集団をIL-2及びIL-7と接触させる。一部の実施形態では、細胞の集団をIL-2及びIL-15（例えば、hetIL-15（IL15/sIL-15Ra））と接触させる。一部の実施形態では、細胞の集団をIL-2及びIL-21と接触させる。一部の実施形態では、細胞の集団をIL-2及びIL-6（例えば、IL-6/sIL-6Ra）と接触させる。一部の実施形態では、細胞の集団をIL-7及びIL-15（例えば、hetIL-15（IL15/sIL-15Ra））と接触させる。一部の実施形態では、細胞の集団をIL-7及びIL-21と接触させる。一部の実施形態では、細胞の集団をIL-7及びIL-6（例えば、IL-6/sIL-6Ra）と接触させる。一部の実施形態では、細胞の集団をIL-15（例えば、hetIL-15（IL15/sIL-15Ra））及びIL-21と接触させる。一部の実施形態では、細胞の集団をIL-15（例えば、hetIL-15（IL15/sIL-15Ra））及びIL-6（例えば、IL-6/sIL-6Ra）と接触させる。一部の実施形態では、細胞の集団をIL-21及びIL-6（例えば、IL-6/sIL-6Ra）と接触させる。一部の実施形態では、細胞の集団をIL-7、IL-15（例えば、hetIL-15（IL15/sIL-15Ra））及びIL-21と接触させる。一部の実施形態では、細胞の集団をLSD1阻害剤とさらに接触させる。一部の実施形態では、細胞の集団をMALT1阻害剤とさらに接触させる。

【0666】

一部の実施形態では、細胞の集団を20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290又は300U/mlのIL-2と接触させる。一部の実施形態では、細胞の集団を1、2

10

20

30

40

50

、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20 ng/mlのIL-7と接触させる。一部の実施形態では、細胞の集団を1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20 ng/mlのIL-15と接触させる。

【0667】

一部の実施形態では、細胞の集団を、CAR（例えば、1つ以上のCAR）をコードする核酸分子（例えば、1つ以上の核酸分子）と接触させる。一部の実施形態では、細胞の集団を、CAR（例えば、1つ以上のCAR）をコードするDNA分子（例えば、1つ以上のDNA分子）で形質導入する。

【0668】

一部の実施形態において、CARをコードする核酸分子と、細胞の集団を接触させるステップは、細胞の集団を前述した1つ以上のサイトカインと接触させるステップと同時に進行。一部の実施形態では、CARをコードする核酸分子と、細胞の集団を接触させるステップは、細胞の集団を前述した1つ以上のサイトカインと接触させるステップの開始後の1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5又は10時間以内に行う。一部の実施形態では、CARをコードする核酸分子と、細胞の集団を接触させるステップは、細胞の集団を前述した1つ以上のサイトカインと接触させるステップの開始後の5時間以内に行う。一部の実施形態では、CARをコードする核酸分子と、細胞の集団を接触させるステップは、細胞の集団を前述した1つ以上のサイトカインと接触させるステップの開始後の4時間以内に行う。一部の実施形態では、CARをコードする核酸分子と、細胞の集団を接触させるステップは、細胞の集団を前述した1つ以上のサイトカインと接触させるステップの開始後の3時間以内に行う。一部の実施形態では、細胞の集団を、CARをコードする核酸分子と接触させるステップは、前述した1つ以上のサイトカインと細胞の集団を接触させるステップの開始後の2時間以内に行う。一部の実施形態では、CARをコードする核酸分子と、細胞の集団を接触させるステップは、前述した1つ以上のサイトカインと細胞の集団を接触させるステップの開始後の1時間以内に行う。

【0669】

一部の実施形態では、保存又は投与のために細胞の集団を採取する。

【0670】

一部の実施形態では、細胞の集団を前述した1つ以上のサイトカインと接触させるステップの開始後の72、60、48、36、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19若しくは18時間以内に細胞の集団を保存又は投与のために採取する。一部の実施形態では、細胞の集団を前述した1つ以上のサイトカインと接触させるステップの開始後の26時間以内に細胞の集団を保存又は投与のために採取する。一部の実施形態では、細胞の集団を前述した1つ以上のサイトカインと接触させるステップの開始後の25時間以内に細胞の集団を保存又は投与のために採取する。一部の実施形態では、細胞の集団を前述した1つ以上のサイトカインと接触させるステップの開始後の24時間以内に細胞の集団を保存又は投与のために採取する。一部の実施形態では、細胞の集団を前述した1つ以上のサイトカインと接触させるステップの開始後の23時間以内に細胞の集団を保存又は投与のために採取する。一部の実施形態では、細胞の集団を前述した1つ以上のサイトカインと接触させるステップの開始後の22時間以内に細胞の集団を保存又は投与のために採取する。

【0671】

一部の実施形態では、細胞の集団は、エクスピボで増殖されない。

【0672】

一部の実施形態では、細胞の集団は、例えば、前述した1つ以上のサイトカインと接触させる前の細胞の集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55又は60%以下だけ増殖される。一部の実施形態では、細胞

10

20

30

40

50

の集団は、例えば、前述した1つ以上のサイトカインと接触させる前の細胞の集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて5%以下だけ増殖される。一部の実施形態では、細胞の集団は、例えば、前述した1つ以上のサイトカインと接触させる前の細胞の集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて10%以下だけ増殖される。一部の実施形態では、細胞の集団は、例えば、前述した1つ以上のサイトカインと接触させる前の細胞の集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて15%以下だけ増殖される。一部の実施形態では、細胞の集団は、例えば、前述した1つ以上のサイトカインと接触させる前の細胞の集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて20%以下だけ増殖される。一部の実施形態では、細胞の集団は、例えば、前述した1つ以上のサイトカインと接触させる前の細胞の集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて25%以下だけ増殖される。一部の
10
実施形態では、細胞の集団は、例えば、前述した1つ以上のサイトカインと接触させる前の細胞の集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて30%以下だけ増殖される。一部の実施形態では、細胞の集団は、例えば、前述した1つ以上のサイトカインと接触させる前の細胞の集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて35%以下だけ増殖される。一部の実施形態では、細胞の集団は、例えば、前述した1つ以上のサイトカインと接触させる前の細胞の集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて40%以下だけ増殖される。

【0673】

一部の実施形態において、細胞の集団は、例えば、前述した1つ以上のサイトカインと接触させる前の細胞の集団と比べて、生存細胞の数によって評価されて1、1.5、2、
20
2.5、3、3.5、4、4.5、5、6、7、8、9、10、11、12、16、20、24、36又は48時間以下だけ増殖される。

【0674】

一部の実施形態において、細胞の集団は、CD3/TCR複合体を刺激する薬剤（例えば、抗CD3抗体）及び/又は細胞の表面上の共刺激分子を刺激する薬剤（例えば、抗CD28抗体）とインビトロで接触されないか、又は接触される場合、接触させるステップは、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5若しくは5時間未満である。

【0675】

一部の実施形態において、細胞の集団は、CD3/TCR複合体を刺激する薬剤（例えば、抗CD3抗体）及び/又は細胞の表面上の共刺激分子を刺激する薬剤（例えば、抗CD28抗体）と20、21、22、23、24、25、26、27若しくは28時間イン
30
ビトロで接触させる。

【0676】

一部の実施形態において、本明細書に記載のサイトカインプロセスを用いて製造される細胞の集団は、例えば、CD3/TCR複合体と結合する薬剤（例えば、抗CD3抗体）及び/又は細胞の表面上の共刺激分子と結合する薬剤（例えば、抗CD28抗体）と、細胞の集団を接触させるステップをさらに含む以外には類似の方法によって作製された細胞と比べて、CAR発現細胞の中でナイーブ細胞のより高いパーセンテージ（例えば、少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、
40
19、20、25、30、35、40、45、50、55又は60%高い）を示す。

【0677】

一部の実施形態において、本明細書に記載のサイトカインプロセスは、0、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5
又は8%以下の血清を含む細胞培地中で実施される。一部の実施形態において、本明細書に記載のサイトカインプロセスは、LSD1阻害剤、MALT1阻害剤又はそれらの組み合わせを含む細胞培地中で実施される。

【0678】

別の例示的な製造方法

一部の実施形態では、細胞、例えば、T細胞若しくはNK細胞を、例えば、抗CD3/
抗CD28抗体コーティングDyna beads（登録商標）を用いて活性化させ、CA
50

R (例えば、1つ以上のCAR)をコードする1つ以上の核酸分子と接触させた後、例えば、7、8、9、10若しくは11日にわたってインビトロで増殖させる。一部の実施形態では、細胞、例えば、T細胞若しくはNK細胞は、ポジティブ又はネガティブ選択を用いて、新鮮若しくは凍結保存白血球アフェレーシスサンプルから選択される。一部の実施形態では、CAR (例えば、1つ以上のCAR)をコードする核酸分子 (例えば、1つ以上の核酸分子)と、細胞を接触させる。一部の実施形態では、本明細書に開示される2つのCAR (例えば、抗BCMA CAR及び抗CD19 CAR)をコードする核酸分子と、細胞を接触させる。一部の実施形態では、2つの核酸分子 (1つは、第1CAR (例えば、抗BCMA CAR)を発現し、他方は、第2CAR (例えば、抗CD19 CAR)を発現する)と、細胞を接触させる。一部の実施形態では、ダイアポディCAR (例えば、本明細書に開示される抗BCMA/抗CD19ダイアポディCAR)をコードする核酸分子と、細胞を接触させる。

10

【0679】

水簸

一部の実施形態において、本明細書に記載の方法は、不要な細胞、例えば単球及び芽細胞を除去し、これにより、CAR発現に好適な所望の免疫エフェクター細胞の濃縮改善を達成する水簸法を特徴とする。一部の実施形態では、本明細書に記載の水簸法は、事前に凍結したサンプル、例えば解凍サンプルからのCAR発現に好適な所望の免疫エフェクター細胞の濃縮のために最適化される。一部の実施形態では、本明細書に記載の水簸法は、当技術分野で公知の水簸プロトコルから収集される細胞の調製物と比べて、純度が向上した細胞の調製物を提供する。一部の実施形態では、本明細書に記載の水簸法は、特定の等張液 (例えば、PBS)を用いた希釈による出発サンプル、例えば細胞サンプル、例えば解凍した細胞サンプルの最適化された粘度の使用並びに水簸装置により収集される各画分の流量及び収集量の最適化された組み合わせの使用を含む。本発明に適用することができる例示的な水簸法は、国際公開第2017/117112号パンフレット (その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる)の48~51ページに記載されている。

20

【0680】

密度勾配遠心分離

養子細胞治療製品の製造は、末梢血アフェレーシス出発材料中に存在する血液細胞及び血液成分の複合混合物から離れて、所望の細胞、例えば免疫エフェクター細胞をプロセッシングすることを必要とする。末梢血由来のリンパ球サンプルは、フィコール溶液による密度勾配遠心分離を用いた分離に成功している。しかし、フィコールは、臨床使用に適格ではないため、フィコールは、治療用途で細胞を分離するのに好ましい試薬ではない。さらに、フィコールは、グリコールを含有し、これは、細胞に対して毒性を有する可能性がある。さらに、凍結保存後の解凍アフェレーシス産物のフィコール密度勾配遠心分離は、例えば、本明細書の実施例に記載されるように、準最適なT細胞産物をもたらす。例えば、フィコール溶液による密度勾配遠心分離によって分離された細胞調製物では、非T細胞、特に望ましくないB細胞、芽細胞及び単球の相対的な増加と共に、最終産物でのT細胞の喪失が観察された。

30

【0681】

理論に縛られることを意図しないが、免疫エフェクター細胞、例えばT細胞は、凍結保存中に脱水して、新鮮な細胞よりも密度が高くなると考えられる。理論に縛られることを意図しないが、免疫エフェクター細胞、例えばT細胞は、他の血液細胞よりも長い間密度が高いままであるため、他の細胞よりも容易にフィコール密度勾配分離中に失われることも考えられる。従って、理論に縛られることを意図しないが、フィコールより大きい密度の培地は、フィコール又はフィコールと同じ密度、例えば1.077g/mLを有する他の培地と比べて、所望の免疫エフェクター細胞の分離の改善を提供すると考えられる。

40

【0682】

一部の実施形態において、本明細書に記載の密度勾配遠心分離法は、イオジキサノールを含む密度勾配媒体の使用を含む。一部の実施形態において、密度勾配媒体は、水中に約

50

60%のイオジキサノールを含む。

【0683】

一部の実施形態において、本明細書に記載の密度勾配遠心分離法は、フィコールより大きい密度を有する密度勾配媒体の使用を含む。一部の実施形態において、本明細書に記載の密度勾配遠心分離法は、1.077 g/mL超、例えば1.077 g/mL超、1.1 g/mL超、1.15 g/mL超、1.2 g/mL超、1.25 g/mL超、1.3 g/mL超、1.31 g/mL超の密度を有する密度勾配媒体の使用を含む。一部の実施形態では、密度勾配媒体は、約1.32 g/mLの密度を有する。

【0684】

密度勾配遠心分離の別の実施形態は、国際公開第2017/117112号パンフレット（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）の51～53ページに記載されている。

10

【0685】

選択による濃縮

CAR発現に適した所望の免疫エフェクター細胞の濃縮を改善するための特定の細胞の選択方法が本明細書に提供される。一部の実施形態において、選択は、ポジティブ選択、例えば所望の免疫エフェクター細胞の選択を含む。一部の実施形態では、選択は、ネガティブ選択、例えば望ましくない細胞の選択、例えば望ましくない細胞の除去を含む。複数の実施形態において、本明細書に記載されるポジティブ又はネガティブ選択方法は、例えば、フロースルー装置、例えば本明細書に記載のフロースルー装置の使用により、流動条件下で実施される。例示的なポジティブ及びネガティブ選択は、国際公開第2017/117112号パンフレット（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）の53～57ページに記載されている。選択方法は、細胞プロセッシングシステムとも呼ばれるフロースルー装置を使用することにより流動条件下で実施して、CAR発現に好適な所望の免疫エフェクター細胞、例えばT細胞の細胞調製物をさらに濃縮することができる。例示的なフロースルー装置は、国際公開第2017/117112号パンフレット（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）の57～70ページに記載されている。例示的な細胞分離及び脱ビーズ（debeading）方法は、国際公開第2017/117112号パンフレット（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）の70～78ページに記載されている。

20

30

【0686】

選択手順は、国際公開第2017/117112号パンフレットの57～70ページに記載されているものに限定されない。カラム技術（CliniMACS（登録商標）Plus又はCliniMACS（登録商標）Prodigy（登録商標））と組み合わせてCD19、CD14及びCD26 Miltenyiビーズを用いる不要な細胞の除去によるネガティブT細胞選択又はCD4及びCD8 Miltenyiビーズ及びカラム技術（CliniMACS（登録商標）Plus又はCliniMACS（登録商標）Prodigy（登録商標））の組み合わせを用いたポジティブT細胞選択を使用することができる。代わりに、放出可能なCD3ビーズ（GE Healthcare）を用いたカラムフリー技術を使用することもできる。

40

【0687】

加えて、ThermoGenesis X-シリーズ装置などのビーズフリー技術も使用することができる。

【0688】

臨床用途

本明細書に記載のプロセス、全て臨床医薬品製造（cGMP）基準に従って実施することができる。

【0689】

これらのプロセスは、特に製造プロセス開始時の未処理の出発材料（特に細胞）の収集並びに細胞療法用の細胞の選択若しくは拡大のための製造プロセス中の細胞精製、富化、

50

採取、洗浄、濃縮又は細胞培地交換のために使用され得る。

【0690】

細胞は、任意の複数の細胞を含み得る。細胞は、同じ細胞型又は混合された細胞型のものであり得る。加えて、細胞は、一人のドナー、例えば細胞療法のための自己ドナー又は単一同種異系ドナーに由来するものであり得る。細胞は、患者から、例えば白血球アフェレーシス又はアフェレーシスから取得され得る。細胞は、T細胞を含み得、例えば50%超のT細胞、60%超のT細胞、70%超のT細胞、80%超のT細胞又は90%超のT細胞を有する集団を含み得る。

【0691】

選択プロセスは、培養及び拡大前に、細胞を選択する上で特に有用となり得る。例えば、抗CD3及び/又は抗CD28でコーティングされた常磁性粒子を使用して、キメラ抗原受容体(CAR)若しくは他のタンパク質をコードする核酸の伸長又は導入のためにT細胞を選択することができる。こうしたプロセスを使用して、急性リンパ性白血病(ALL)の治療のためにCTL019 T細胞を生産する。

【0692】

本明細書に開示される脱ビーズプロセス及びモジュールは、特に、細胞療法用の細胞の製造、例えば培養及び増殖前又は後の細胞の精製に有用であり得る。例えば、抗CD3及び/又は抗CD28抗体でコーティングされた常磁性粒子を使用して、T細胞、例えばキメラ抗原受容体(CAR)又は他のタンパク質をコードする核酸の導入によって修飾された若しくは修飾されるであろうT細胞を、CARがT細胞により発現されるように、選択的に増殖させることができる。こうしたT細胞の製造中、脱ビーズプロセス又はモジュールを用いて、T細胞を常磁性粒子から分離することができる。このような脱ビーズプロセス又はモジュールを用いて、例えば急性リンパ芽球性白血病(ALL)の処置のためのCTL019 T細胞を生産する。

【0693】

例として示される1つのこうしたプロセスでは、細胞、例えばT細胞をドナー(例えば、自己キメラ抗原受容体T細胞産物で処置しようとする患者)からアフェレーシス(例えば、白血球アフェレーシス)により収集する。続いて、収集した細胞を任意選択で例えば水簸ステップ又は標的細胞(例えば、T細胞)のポジティブ若しくはネガティブ選択によって精製し得る。次に、常磁性粒子、例えば抗CD3/抗CD28コーティング常磁性粒子を細胞集団に添加して、T細胞を増殖させることができる。このプロセスは、形質導入ステップも含み得、このステップにおいて、1つ以上の所望のタンパク質、例えばCAR、例えばCD19を標的化するCARをコードする核酸が細胞に導入される。核酸は、レンチウイルスベクター中に導入され得る。細胞、例えばレンチウイルスにより形質導入された細胞を例えば好適な培地の存在下で例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10若しくはそれを超える日数の期間にわたって増殖することができる。増殖の後、本明細書に開示される脱ビーズプロセス/モジュールを用いて、常磁性粒子から所望のT細胞を分離することができる。このプロセスは、本開示のプロセスに従う1つ以上の脱ビーズステップを含み得る。次に、脱ビーズした細胞を、患者への投与のために製剤化することができる。CAR T細胞及びそれらの製造の例は、例えば、国際公開第2012/079000号パンフレット(その全体が参照により本明細書に組み込まれる)にさらに記載されている。本開示のシステム及び方法は、国際公開第2012/079000号パンフレットに記載されるか又はそれに関連する任意の細胞分離/精製/脱ビーズプロセスに使用され得る。別のCAR T製造プロセスは、例えば、国際公開第2016109410号パンフレット及び同第2017117112号パンフレット(それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる)に記載されている。

【0694】

本明細書に記載のシステム及び方法は、従来 of システム及び方法と比べて、化学物質との曝露が少ないか又は曝露せずに、望ましい細胞の無駄を少なくし、細胞外傷を低減すると共に、細胞からの磁気及びあらゆる非常磁性粒子をより確実に除去することにより、他

10

20

30

40

50

の細胞療法製品にも同様に利益をもたらす得る。

【0695】

上には本開示の例示的な実施形態のみが具体的に記載されているが、これらの例の修正及び変更は、本開示の趣旨及び意図される範囲から逸脱することなく、可能であることは理解されよう。例えば、磁気モジュール及びそれらを含むシステムは、記載されるものに加えて様々な配置に構成及び使用され得る。それ以外にも、非磁気モジュールを同様に使用することができる。加えて、システム及び方法は、本明細書に具体的に記載されていない別の成分及びステップを含み得る。例えば、方法は、プライミングを含み得、この場合、流体をまず1成分に導入して、気泡を除去し、細胞懸濁液又はバッファ運動に対する抵抗を低減する。さらに、複数の実施形態は、本明細書に記載の方法で使用するための本明細書に記載のシステムの一部のみを含む場合もある。例えば、複数の実施形態は、細胞を分離若しくは脱ビーズして細胞産物を生産することができる完全なシステムを形成するために、非使い捨て装置内で使用可能な使い捨てモジュール、ホースなどに関連し得る。

10

【0696】

本発明と組み合わせることができる追加の製造方法及びプロセスは、当技術分野で記載されている。例えば、国際公開第2017/117112号パンフレットの86~91ページには、改善された洗浄ステップ及び改善された製造プロセスが記載されている。

【0697】

免疫エフェクター細胞の供給源

この項では、所望の免疫エフェクター細胞を含むインプットサンプルを取得し、所望の免疫エフェクター細胞、例えばT細胞を分離及びプロセッシングし、且つ不要な物質、例えば不要な細胞を除去するための追加の方法又はステップを提供する。この項に記載される追加の方法又はステップは、先行項に記載される水簸、密度勾配遠心分離、流動条件下での選択又は改善された洗浄ステップのいずれかと組み合わせ使用することができる。

20

【0698】

細胞の供給源、例えばT細胞若しくはナチュラルキラー(NK)細胞は、対象から取得することができる。対象の例として、ヒト、サル、チンパンジー、イヌ、ネコ、マウス、ラット及びそれらのトランスジェニック種が挙げられる。T細胞は、末梢血単核細胞、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位からの組織、腹水、胸水、脾臓組織及び腫瘍を含む、多数の供給源から得ることができる。

30

【0699】

本開示の一部の実施形態において、免疫エフェクター細胞、例えばT細胞は、当業者に周知の任意の数の技術及び本明細書に開示される方法のいずれかを使用して、それらのステップの任意の組み合わせで、対象から収集した血液の単位から得ることができる。一部の実施形態では、個体の循環血液からの細胞をアフエレーシスにより取得する。アフエレーシス産物は、典型的にはT細胞、単球、顆粒球、B細胞、他の有核白血球を含めたリンパ球、赤血球及び血小板を含む。一部の実施形態では、アフエレーシスにより収集された細胞は、血漿画分を除去するために洗浄し、任意選択で、続くプロセッシングステップのために細胞を適切なバッファ又は培地に入れ得る。一部の実施形態では、細胞をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄する。一部の実施形態では、洗浄溶液はカルシウムを欠き、マグネシウムを欠き得るか、又は全てではないとしても多くの二価カチオンを欠き得る。一部の実施形態において、細胞は、本明細書に記載の改善された洗浄ステップを使用して洗浄される。

40

【0700】

カルシウム非存在下での初期活性化ステップは、活性化の増強をもたらすことができる。当業者には容易に認識されるように、洗浄ステップは、当業者に公知の方法により、例えば製造業者の指示に従う半自動化「フロースルー」遠心分離(例えば、Cobe 2991細胞処理装置、Baxter Cytomate(商標)又はHaemonetics Cell Saver 5)、Haemonetics Cell Saver Elite(GE Healthcare Sepax若しくはSefia)又はスピニン

50

グメンブレンろ過技術を利用する装置 (Fresenius Kabi LOVO) を使用することにより達成され得る。洗浄後、細胞を、例えば無Ca、無Mg PBS、PlasmaLyte A、ヒト血清アルブミン (HSA) を補充したPBS - EDTA又はバッファーを含む又は含まない他の食塩水溶液など、多様な生体適合性バッファーに再懸濁し得る。代わりに、アフレーシスサンプルの望ましくない成分を除去した後、細胞を培養培地に直接再懸濁し得る。

【0701】

一部の実施形態において、所望の免疫エフェクター細胞、例えばT細胞は、赤血球を溶解し、例えばPERCOLL (商標) 勾配による遠心分離又は向流遠心水簸により単球を枯渇させることにより、末梢血リンパ球から単離する。

10

【0702】

本明細書に記載の方法は、例えば、本明細書に記載の、例えばネガティブ選択技術を使用する、例えばT制御性細胞枯渇集団、例えばCD25 + 枯渇細胞又はCD25^{high} 枯渇細胞である、免疫エフェクター細胞、例えばT細胞の、例えば特定の亜集団の選択を含み得る。一部の実施形態において、T制御性枯渇細胞の集団は、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%未満のCD25 + 細胞又はCD25^{high} 細胞を含む。

【0703】

一部の実施形態において、T制御性細胞、例えばCD25 + T細胞又はCD25^{high} T細胞を、抗CD25抗体若しくはそのフラグメント又はCD25結合リガンド、例えばIL-2を使用して集団から除去する。一部の実施形態では、抗CD25抗体若しくはそのフラグメント又はCD25結合リガンドを基質、例えばビーズにコンジュゲートするか、或いはそうでなければ基質、例えばビーズ上に被覆する。一部の実施形態では、抗CD25抗体又はそのフラグメントを、本明細書に記載されるような基質にコンジュゲートさせる。

20

【0704】

一部の実施形態において、T制御性細胞、例えばCD25 + T細胞又はCD25^{high} T細胞は、Miltenyi (商標) からのCD25枯渇剤を使用して集団から除去する。一部の実施形態では、細胞対CD25枯渇剤の比は1e7細胞対20µL、又は1e7細胞対15µL、又は1e7細胞対10µL、又は1e7細胞対5µL、又は1e7細胞対2.5µL、又は1e7細胞対1.25µLである。一部の実施形態では、例えばT制御性細胞の場合、5億細胞/ml超を使用する。一部の実施形態では、6億、7億、8億又は9億細胞/mlの細胞濃度を使用する。

30

【0705】

一部の実施形態において、枯渇させようとする免疫エフェクター細胞の集団は、約 6×10^9 のCD25 + T細胞を含む。一部の実施形態では、枯渇させようとする免疫エフェクター細胞の集団は、約 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ (及びその間の任意の整数値) のCD25 + T細胞を含む。一部の実施形態では、得られるT制御性枯渇細胞集団は、 2×10^9 のT制御性細胞、例えばCD25 + 細胞若しくはCD25^{high}細胞以下 (例えば、 1×10^9 、 5×10^8 、 1×10^8 、 5×10^7 、 1×10^7 以下のT制御性細胞) を有する。

40

【0706】

一部の実施形態において、T制御性細胞、例えばCD25 + 細胞又はCD25^{high}細胞を、例えばチューピング162 - 01など、枯渇チューピングセットと共にCliniMAC系を使用して集団から除去する。一部の実施形態では、CliniMAC系を例えばDEPLETION2.1などの枯渇設定で作動させる。

【0707】

特定の理論に縛られることを意図しないが、アフレーシス前又はCAR発現細胞産物の製造工程中の対象における免疫細胞の負のレギュレーターレベルの減少 (例えば、不要な免疫細胞、例えばTreg細胞の数の減少) は、対象の再発リスクを有意に低下させ

50

る。例えば、T r e g細胞を枯渇させる方法は当技術分野で知られている。T r e g細胞を減少させる方法は、シクロホスファミド、抗G I T R抗体（本明細書に記載の抗G I T R抗体）、C D 2 5枯渇及びそれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない。

【0708】

一部の実施形態において、製造方法は、C A R発現細胞の製造前のT r e g細胞の数の減少（例えば、枯渇）を含む。例えば、製造方法は、例えば、サンプル、例えばアフエレーシスサンプルと、抗G I T R抗体及び/又は抗C D 2 5抗体（若しくはそのフラグメント又はC D 2 5結合リガンド）を接触させ、C A R発現細胞（例えば、T細胞、N K細胞）産物の製造前にT r e g細胞を枯渇させることを含む。

【0709】

理論に縛られることを意図しないが、アフエレーシス前又はC A R発現細胞産物の製造工程中の対象における免疫細胞の負のレギュレーターのレベルの減少（例えば、不要な免疫細胞、例えばT r e g細胞の数の減少）は、対象の再発リスクを低下させることができる。一部の実施形態において、対象は、C A R発現細胞産物製造のための細胞採取前にT r e g細胞を減らす1つ以上の治療で前処置されており、それにより対象がC A R発現細胞処置を再び必要とするリスクを低減する。一部の実施形態では、T r e g細胞を減少させる方法は、シクロホスファミド、抗G I T R抗体、C D 2 5枯渇又はそれらの組み合わせの1つ以上の対象への投与を含むが、これに限定されない。一部の実施形態では、T r e g細胞を減少させる方法は、シクロホスファミド、抗G I T R抗体、C D 2 5枯渇又はそれらの組み合わせの1つ以上の対象への投与を含むが、これに限定されない。シクロホスファミド、抗G I T R抗体、C D 2 5枯渇又はそれらの組み合わせの1つ以上の投与は、C A R発現細胞産物注入前、注入中又は注入後に行うことができる。シクロホスファミド、抗G I T R抗体、C D 2 5枯渇又はそれらの組み合わせの1つ以上の投与は、C A R発現細胞産物注入前、注入中又は注入後に行うことができる。

【0710】

一部の実施形態において、製造方法は、C A R発現細胞製造前のT r e g細胞の数の減少（例えば、枯渇）を含む。例えば、製造方法は、例えば、サンプル、例えばアフエレーシスサンプルと抗G I T R抗体及び/又は抗C D 2 5抗体（若しくはそのフラグメント又はC D 2 5結合リガンド）を接触させ、C A R発現細胞（例えば、T細胞、N K細胞）産物の製造前にT r e g細胞を枯渇させることを含む。

【0711】

一部の実施形態において、対象は、C A R発現細胞産物製造のための細胞の採取前にシクロホスファミドで前処置され、それにより対象がC A R発現細胞処置（例えば、C T L 0 1 9処置）を再び必要とするリスクを低減する。一部の実施形態では、対象は、C A R発現細胞（例えば、T細胞又はN K細胞）産物製造のための細胞の採取前に抗G I T R抗体で前処置され、それにより対象がC A R発現細胞処置を再び必要とするリスクを低減する。

【0712】

一部の実施形態において、C A R発現細胞（例えば、T細胞、N K細胞）製造プロセスは、C A R発現細胞（例えば、T細胞、N K細胞）産物（例えば、C T L 0 1 9産物）の製造前にT r e g細胞を枯渇させるように修飾される。一部の実施形態では、C D 2 5枯渇を使用して、C A R発現細胞（例えば、T細胞、N K細胞）産物（例えば、C T L 0 1 9産物）の製造前に、T r e g細胞を枯渇させる。

【0713】

一部の実施形態において、除去すべき細胞の集団は、制御性T細胞又は腫瘍細胞ではなく、C A R T細胞の増殖及び/又は機能に他にマイナスに影響する細胞、例えばC D 1 4、C D 1 1 b、C D 3 3、C D 1 5又は潜在的免疫抑制性細胞により発現される他のマーカーを発現する細胞である。一部の実施形態では、このような細胞は、制御性T細胞及び/若しくは腫瘍細胞と同時に、又は前記枯渇後、又は別の順番で除去することが意図される。

10

20

30

40

50

【 0 7 1 4 】

本明細書に記載の方法は、2つ以上の選択ステップ、例えば2つ以上の枯渇ステップを含み得る。ネガティブ選択によるT細胞集団の濃縮は、例えば、ネガティブ選択される細胞に独特な表面マーカーを指向する抗体の組み合わせにより達成することができる。1つの方法は、ネガティブ選択される細胞に存在する細胞表面マーカーを指向するモノクローナル抗体のカクテルを使用する陰性磁気免疫粘着又はフローサイトメトリーによる細胞選別及び/又は選択である。例えば、ネガティブ選択によりCD4+細胞を富化するために、モノクローナル抗体カクテルは、CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR及びCD8に対する抗体を含み得る。

【 0 7 1 5 】

本明細書に記載の方法は、腫瘍抗原、例えばCD25を含まない腫瘍抗原、例えばCD19、CD30、CD38、CD123、CD20、CD14又はCD11bを発現する細胞の集団からの除去をさらに含み、それによりCAR、例えば本明細書に記載のCARの発現に好適なT制御性枯渇、例えばCD25+枯渇又はCD25^{high}枯渇及び腫瘍抗原枯渇細胞の集団を提供する。一部の実施形態では、腫瘍抗原発現細胞は、T制御性、例えばCD25+細胞又はCD25^{high}細胞と同時に除去される。例えば、抗CD25抗体又はそのフラグメント及び抗腫瘍抗原抗体又はそのフラグメントを同じ基質、例えばビーズに結合することができ、これを細胞の除去に使用することができるか、或いは抗CD25抗体若しくはそのフラグメント又は抗腫瘍抗原抗体若しくはそのフラグメントを別のビーズに結合することができ、その混合物を細胞の除去に使用することができる。他の実施形態では、T制御性細胞、例えばCD25+細胞又はCD25^{high}細胞の除去及び腫瘍抗原発現細胞の除去は逐次的であり、例えばいずれの順番でも起こり得る。

【 0 7 1 6 】

チェックポイント阻害剤、例えば本明細書に記載のチェックポイント阻害剤を発現する細胞、例えばPD1+細胞、LAG3+細胞及びTIM3+細胞の1つ以上の集団からの除去を含み、それによりT制御性枯渇、例えばCD25+枯渇細胞及びチェックポイント阻害剤枯渇細胞、例えばPD1+、LAG3+及び/又はTIM3+枯渇細胞の集団を提供する方法も提供される。例示的なチェックポイント阻害剤としては、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例えば、CEACAM-1、CEACAM-3及び/又はCEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14又はCD270)、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシン及びTGF(例えば、TGF)、例えば本明細書に記載されるようなものが挙げられる。一実施形態において、チェックポイント阻害剤発現細胞は、T制御性、例えばCD25+細胞又はCD25^{high}細胞と同時に除去される。例えば、抗CD25抗体又はそのフラグメント及び抗チェックポイント阻害剤抗体又はそのフラグメントを同じビーズに結合することができ、それを細胞の除去に使用することができるか、又は抗CD25抗体若しくはそのフラグメント及び抗チェックポイント阻害剤抗体若しくはそのフラグメントを別のビーズに結合することができ、その混合物を細胞の除去に使用することができる。他の実施形態では、T制御性細胞、例えばCD25+細胞又はCD25^{high}細胞の除去及びチェックポイント阻害剤発現細胞の除去は逐次的であり、例えばいずれの順番でも起こり得る。

【 0 7 1 7 】

本明細書に記載の方法は、ポジティブ選択ステップを含み得る。例えば、T細胞を、所望のT細胞のポジティブ選択に十分な時間、Dynabeads(登録商標)M-450CD3/CD28-Tなどの抗CD3/抗CD28(例えば、3x28)コンジュゲートビーズと一緒にインキュベーションすることにより単離することができる。一部の実施形態では、時間は、約30分である。一部の実施形態では、時間は、30分~36時間又はそれより長い範囲及びその間の全部の整数値である。一部の実施形態では、時間は、少なくとも1時間、2時間、3時間、4時間、5時間又は6時間である。一部の実施形態では

10

20

30

40

50

、時間は、10～24時間、例えば24時間である。腫瘍組織又は免疫不全状態の個体から腫瘍浸潤性リンパ球（TIL）を単離する場合のように、他の細胞型と比べてT細胞が少ないあらゆる状況において、T細胞を単離するために長いインキュベーション時間が使用され得る。さらに、長いインキュベーション時間の使用は、CD8+T細胞の捕獲効率を高め得る。そのため、単にT細胞をCD3/CD28ビーズと結合させる時間を短縮若しくは延長し、且つ/又はビーズ対T細胞比を増加又は減少させる（本明細書に詳しく記載される通り）ことにより、培養開始時又はプロセス中の他の時点でT細胞の亜集団を優先的に又はその反対に選択することができる。加えて、ビーズ若しくは他の表面上の抗CD3及び/又は抗CD28抗体比を増加又は減少させることにより、培養開始時又は他の所望の時点でT細胞の亜集団を優先的に又はその反対に選択することができる。

10

【0718】

一実施形態において、IFN- γ 、TNF- α 、IL-17A、IL-2、IL-3、IL-4、GM-CSF、IL-10、IL-13、グランザイムB及びパーフォリン又は他の適切な分子、例えば他のサイトカインの1つ以上を発現するT細胞集団を選択することができる。細胞発現についてスクリーニングする方法は、例えば、国際公開第2013/126712号パンフレットに記載される方法により決定することができる。

【0719】

ポジティブ又はネガティブ選択により所望の細胞の集団を単離するために、細胞及び表面（例えば、ビーズなどの粒子）の濃度は変わり得る。一部の実施形態において、細胞とビーズの最大接触を確実にするために、ビーズと細胞と一緒に混合する体積を有意に低下させる（例えば、細胞の濃度を増加させる）ことが望ましい場合もある。例えば、一部の実施形態では、100億細胞/ml、90億/ml、80億/ml、70億/ml、60億/ml又は50億/mlの濃度が使用される。一部の実施形態では、10億細胞/mlの濃度が使用される。一部の実施形態では、7500万、8000万、8500万、9000万、9500万又は1億細胞/mlの細胞濃度が使用される。一部の実施形態では、1億2500万又は1億5000万細胞/mlの濃度が使用され得る。

20

【0720】

高濃度を使用して、細胞収率、細胞活性化及び細胞増殖を増加することができる。さらに、高細胞濃度の使用は、CD28陰性T細胞などの目的の標的抗原を弱く発現し得る細胞の又は多くの腫瘍細胞が存在するサンプル（例えば、白血病性血液、腫瘍組織など）からのより効率的な捕獲を可能にする。このような細胞集団は、治療価値を有し得るため、取得することが望ましい。例えば、高濃度細胞の使用は、通常CD28発現が弱いCD8+T細胞のより効率的な選択を可能にする。

30

【0721】

一部の実施形態において、低濃度の細胞を使用することが望ましい場合がある。T細胞と表面（例えば、ビーズなどの粒子）の混合物を有意に希釈することにより、粒子と細胞の相互作用が最小化される。これは、粒子に結合する所望の抗原を高量で発現する細胞について選択する。例えば、CD4+T細胞は、高レベルのCD28を発現し、希釈濃度でCD8+T細胞より効率的に捕獲される。一部の実施形態では、使用する細胞の濃度は、 5×10^6 / mlである。一部の実施形態では、使用する濃度は、約 1×10^5 / ml ~ 1×10^6 / ml及びその間の任意の整数値であり得る。

40

【0722】

一部の実施形態において、2～10分又は室温のいずれかにおいて様々な長さの時間にわたり様々な速度のローテータ上で細胞をインキュベートし得る。

【0723】

一部の実施形態において、集団の複数の免疫エフェクター細胞は、ジアグリセロールキナーゼ（DGK）を発現せず、例えばDGK欠損性である。一部の実施形態では、集団の複数の免疫エフェクター細胞は、Ikarosを発現せず、例えばIkaros欠損性である。一部の実施形態では、集団の複数の免疫エフェクター細胞は、DGK及びIkarosを発現せず、例えばDGK及びIkaros両方の欠損性である。

50

【0724】

刺激のためのT細胞は、洗浄ステップ後に凍結させることもできる。理論に縛られることを意図しないが、凍結及びそれに続く解凍ステップは、細胞集団から顆粒球を、またある程度まで単球を除去することにより、より均一な産物を取得する。血漿及び血小板を除去する洗浄ステップ後、細胞を凍結溶液に懸濁することができる。多くの凍結溶液及びパラメーターが当技術分野で知られ、これに関連して有用であり、ある方法は、20% DMSO及び8% ヒト血清アルブミンを含むPBS又は10% Dextran 40及び5% デキストロース、20% ヒト血清アルブミン及び7.5% DMSO又は31.25% Plasmalyte-A、31.25% デキストロース5%、0.45% NaCl、10% Dextran 40及び5% デキストロース、20% ヒト血清アルブミン及び7.5% DMSOを含む培養培地又は例えばHespan及びPlasmalyte Aを含む他の適当な細胞凍結培地を使用することを伴い、次いで細胞を1°/分の速度で-80に凍結し、液体窒素貯蔵タンクの気相に保存する。制御凍結の他の方法も、直ちに-20又は液体窒素の非制御凍結と同様に使用することができる。

10

【0725】

一部の実施形態において、凍結保存細胞を本明細書に記載されるように解凍し、洗浄し、本発明の方法を使用する活性化前に室温で1時間休息させる。

【0726】

本発明に関連して、本明細書に記載されるような増殖細胞が必要となり得る時点前の期間における、対象からの血液サンプル又はアフレーシス産物の採取も企図されている。従って、増殖させようとする細胞の供給源は、必要な任意の時点で採取することができ、T細胞などの所望の細胞は、本明細書に記載のものなど、免疫エフェクター細胞治療からの利益があるであろう任意の数の疾患又は状態について、免疫エフェクター細胞治療におけるその後の使用のために単離及び凍結することができる。一部の実施形態では、血液サンプル又はアフレーシスは、概して健常な対象から採取する。一部の実施形態では、血液サンプル又はアフレーシスは、疾患を発症するリスクにあるが、依然として疾患を発症していない、概して健常な対象から採取し、目的の細胞をその後の使用のために単離及び凍結する。一部の実施形態では、T細胞を増殖、凍結し、後の時点で使用することができる。一部の実施形態では、サンプルは、本明細書に記載されるような特定の疾患の診断の直後且つ何らかの処置前に患者から採取する。一部の実施形態では、任意の数の関連する処置モダリティ前に対象からの血液サンプル又はアフレーシスから細胞を単離し、こうした処置モダリティとして、限定されないが、ナタリズマブ、エファリズマブ、抗ウイルス剤、化学療法剤、放射線、シクロスポリン、アザチオプリン、メトトレキサート、ミコフェノレート及びFK506などの免疫抑制剤、抗体又は他の免疫除去剤、例えばCAMPATH、抗CD3抗体、シトキサン、フルダラビン、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノール酸、ステロイド、FR901228及び照射などの薬剤による処置が挙げられる。

20

30

【0727】

本発明の一部の実施形態において、T細胞は、対象に機能的T細胞を残す処置後、患者から直接取得する。この点について、特定の癌処置、特に免疫系を損傷させる薬物での処置後、処置後間もなく、患者が通常その処置から回復するまでの間、得られるT細胞の品質がエクスピボで増殖する能力について最適であるか又は改善され得ることが観察されている。同様に、本明細書に記載の方法を使用するエクスピボ操作後、これらの細胞は、生着及びインピボ増殖増強について好ましい状態であり得る。このように、本発明に関連して、T細胞、樹状細胞又は造血細胞系統の他の細胞を含む血液細胞をこの回復期に採取することが企図される。さらに、一部の実施形態では、可動化(例えば、GM-CSFでの可動化)及びコンディショニングレジメンを使用して、特定の細胞型の再増殖、再循環、再生及び/又は増殖に好都合である条件を、特に、治療後の定められた時間枠中に対象において形成することができる。細胞型の例としては、T細胞、B細胞、樹状細胞及び免疫系の他の細胞が挙げられる。

40

50

【0728】

一部の実施形態において、CAR分子、例えば本明細書に記載のCAR分子を発現する免疫エフェクター細胞は、低い、免疫増強用量のmTOR阻害剤を受けた対象から取得する。一部の実施形態において、CARを発現するように操作しようとする免疫エフェクター細胞の集団、例えばT細胞は、対象中の又は対象から採取したPD1陰性免疫エフェクター細胞、例えばT細胞のレベル又はPD1陰性免疫エフェクター細胞、例えばT細胞/PD1陽性免疫エフェクター細胞、例えばT細胞の比が少なくとも一過性に増加するように、低い、免疫増強用量のmTOR阻害剤の投薬から十分な時間後又は十分な投薬後に採取する。

【0729】

他の実施形態では、CARを発現するように操作されているか又は操作される免疫エフェクター細胞、例えばT細胞の集団を、PD1陰性免疫エフェクター細胞、例えばT細胞の数を増加させるか、又はPD1陰性免疫エフェクター細胞、例えばT細胞/PD1陽性免疫エフェクター細胞、例えばT細胞の比を増大する量のmTOR阻害剤と接触させることにより、エクスピボで処理することができる。

【0730】

本願の方法は、5%以下、例えば2%の、ヒトAB血清を含む培養培地条件を利用することができる。既知培養培地条件及び組成物、例えばSmith et al., "Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement" Clinical & Translational Immunology (2015) 4, e31; doi: 10.1038/cti.2014.31に記載のものをを用いることができることは認識される。

【0731】

一部の実施形態において、本願の方法は、少なくとも約0.1%、0.5%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、6%、7%、8%、9%又は10%の血清を含む培地条件を利用することができる。一部の実施形態では、培地は、約0.5%~5%、約0.5%~4.5%、約0.5%~4%、約0.5%~3.5%、約0.5%~3%、約0.5%~2.5%、約0.5%~2%、約0.5%~1.5%、約0.5%~1.0%、約1.0%~5%、約1.5%~5%、約2%~5%、約2.5%~5%、約3%~5%、約3.5%~5%、約4%~5%又は約4.5%~5%の血清を含む。一部の実施形態では、培地は、約0.5%の血清を含む。一部の実施形態では、培地は、約0.5%の血清を含む。一部の実施形態では、培地は、約1%の血清を含む。一部の実施形態では、培地は、約1.5%の血清を含む。一部の実施形態では、培地は、約2%の血清を含む。一部の実施形態では、培地は、約2.5%の血清を含む。一部の実施形態では、培地は、約3%の血清を含む。一部の実施形態では、培地は、約3.5%の血清を含む。一部の実施形態では、培地は、約4%の血清を含む。一部の実施形態では、培地は、約4.5%の血清を含む。一部の実施形態では、培地は、約5%の血清を含む。一部の実施形態では、血清は、ヒト血清、例えばヒトAB血清を含む。一部の実施形態では、血清は、採取後に自然凝固させたヒト血清、例えばoff-the-clot (OTC) 血清である。一部の実施形態では、血清は、血漿由来血清ヒト血清である。血漿由来血清は、抗凝固剤、例えばクエン酸ナトリウムの存在下で採取されて、プールされたヒト血漿の脱線維によって生成することができる。

【0732】

一部の実施形態において、本願の方法は、無血清培地を含む培地条件を利用することができる。一部の実施形態において、無血清培地は、Optimizer (商標) CTS (商標) (Life Tech)、Immunocult (商標) XF (Stemcell technologies)、CellGro (商標) (Cell Genix)、TexMac (商標) (Miltényi)、Stemline (商標) (Sigma)、Xv

10

20

30

40

50

i v o 1 5 (商 標) (L o n z a) 、 P r i m e X V (商 標 登 録) (I r v i n e S c i e n t i f i c) 又 は S t e m X V i v o (商 標 登 録) (R a n d D s y s t e m s) である。無血清培地には、L i f e T e c h の I C S R (免 疫 細 胞 血 清 代 替 品) な の の 血 清 代 替 品 を 添 加 す る こ と が で き る 。 血 清 代 替 品 (例 え ば 、 I C S R) の レ ベ ル は 、 例 え ば 、 最 大 5 % 、 例 え ば 約 1 % 、 2 % 、 3 % 、 4 % 又 は 5 % で あ り 得 る 。 一 部 の 実 施 形 態 に お い て 、 無 血 清 培 地 は 、 血 清 、 例 え ば ヒ ト 血 清 、 例 え ば ヒ ト A B 血 清 を 添 加 し 得 る 。 一 部 の 実 施 形 態 で は 、 血 清 は 、 採 取 後 に 自 然 凝 固 さ せ た ヒ ト 血 清 、 例 え ば o f f - t h e - c l o t (O T C) 血 清 で あ る 。 一 部 の 実 施 形 態 で は 、 血 清 は 、 血 漿 由 来 ヒ ト 血 清 で あ る 。 血 漿 由 来 血 清 は 、 抗 凝 固 剤 、 例 え ば ク エ ン 酸 ナ ト リ ウ ム の 存 在 下 で 採 取 さ れ て 、 プ ー ル さ れ た ヒ ト 血 漿 の 脱 線 維 に よ っ て 生 成 す る こ と が で き る 。

10

【0733】

一 部 の 実 施 形 態 に お い て 、 T 細 胞 集 団 は 、 ジ ア グ リ セ ロ ー ル キ ナ ー ゼ (D G K) 欠 損 で あ る 。 D G K 欠 損 細 胞 は 、 D G K R N A 又 は タ ン パ ク 質 を 発 現 し な い か 、 又 は D G K 活 性 が 低 減 若 し く は 阻 害 さ れ た 細 胞 を 含 む 。 D G K 欠 損 細 胞 は 、 D G K 発 現 を 低 減 又 は 阻 止 す る た め の 遺 伝 的 手 法 、 例 え ば R N A 干 渉 剤 、 例 え ば s i R N A 、 s h R N A 、 m i R N A の 投 与 に よ っ て 作 製 す る こ と が で き る 。 代 わ り に 、 D G K 欠 損 細 胞 は 、 本 明 細 書 に 記 載 の D G K 阻 害 剤 で の 処 理 に よ っ て 作 製 す る こ と も で き る 。

【0734】

一 部 の 実 施 形 態 に お い て 、 T 細 胞 集 団 は 、 イ カ ロ ス 欠 損 で あ る 。 イ カ ロ ス 欠 損 細 胞 は 、 イ カ ロ ス R N A 又 は タ ン パ ク 質 を 発 現 し な い か 、 又 は イ カ ロ ス 活 性 が 低 下 し た 又 は 阻 害 さ れ た 細 胞 を 含 む 、 イ カ ロ ス 欠 損 細 胞 は 、 イ カ ロ ス 発 現 を 低 減 又 は 阻 止 す る た め の 遺 伝 的 手 法 、 例 え ば R N A 干 渉 剤 、 例 え ば s i R N A 、 s h R N A 、 m i R N A の 投 与 に よ っ て 作 製 す る こ と が で き る 。 代 わ り に 、 イ カ ロ ス 欠 損 細 胞 は 、 イ カ ロ ス 阻 害 剤 、 例 え ば レ ナ リ ド マ イ ド で の 処 理 に よ っ て 作 製 す る こ と が で き る 。

20

【0735】

複 数 の 実 施 形 態 に お い て 、 T 細 胞 集 団 は 、 D G K 欠 損 及 び イ カ ロ ス 欠 損 で あ り 、 例 え ば D G K 及 び イ カ ロ ス を 発 現 し な い か 、 又 は D G K 及 び イ カ ロ ス 活 性 が 低 減 若 し く は 阻 害 さ れ て い る 。 こ の よ う な D G K 及 び イ カ ロ ス 欠 損 細 胞 は 、 本 明 細 書 に 記 載 の 方 法 の い ず れ か に よ っ て 作 製 す る こ と が で き る 。

【0736】

一 部 の 実 施 形 態 で は 、 N K 細 胞 を 対 象 か ら 取 得 す る 。 一 部 の 実 施 形 態 で は 、 N K 細 胞 は 、 N K 細 胞 株 、 例 え ば N K - 9 2 細 胞 株 (C o n k w e s t) で あ る 。

30

【0737】

同 種 C A R 発 現 細 胞

本 明 細 書 に 記 載 の 複 数 の 実 施 形 態 に お い て 、 免 疫 エ フ ェ ク タ ー 細 胞 は 、 同 種 免 疫 エ フ ェ ク タ ー 細 胞 、 例 え ば T 細 胞 又 は N K 細 胞 で あ り 得 る 。 例 え ば 、 細 胞 は 、 同 種 T 細 胞 、 例 え ば 機 能 的 T 細 胞 受 容 体 (T C R) 及 び / 又 は ヒ ト 白 血 球 抗 原 (H L A) 、 例 え ば H L A ク ラ ス I 及 び / 又 は H L A ク ラ ス I I の 発 現 を 欠 く 同 種 T 細 胞 で あ り 得 る 。

【0738】

機 能 的 T C R を 欠 く T 細 胞 は 、 例 え ば 、 そ の 表 面 に 何 ら 機 能 的 T C R を 発 現 し な い よ う に 操 作 さ れ 、 機 能 的 T C R を 含 む 1 つ 以 上 の サ ブ ユ ニ ッ ト を 発 現 し な い よ う に 操 作 さ れ る (例 え ば 、 T C R 、 T C R 、 T C R 、 T C R 、 T C R 及 び / 又 は T C R の 発 現 が な い (又 は 発 現 の 減 少 を 示 す) よ う に 操 作 さ れ る) か 、 又 は そ の 表 面 に ご く わ ず か な 機 能 的 T C R を 産 生 す る よ う に 操 作 さ れ 得 る 。 代 わ り に 、 T 細 胞 は 、 例 え ば 、 T C R の サ ブ ユ ニ ッ ト の 1 つ 以 上 の 変 異 型 又 は 切 断 型 の 発 現 に よ り 、 実 質 的 に 障 害 さ れ た T C R を 発 現 し 得 る 。 用 語 「 実 質 的 に 障 害 さ れ た T C R 」 と は 、 こ の T C R が 、 宿 主 で 有 害 な 免 疫 反 応 を 惹 起 し な い こ と を 意 味 す る 。

40

【0739】

本 明 細 書 に 記 載 の T 細 胞 は 、 例 え ば 、 そ の 表 面 に 機 能 的 H L A を 発 現 し な い よ う に 操 作 さ れ 得 る 。 例 え ば 、 本 明 細 書 に 記 載 の T 細 胞 は 、 細 胞 表 面 発 現 H L A 、 例 え ば H L A クラ

50

ス1及び/又はHLAクラスIIが下方制御されるように操作され得る。一部の実施形態において、HLAの下方制御は、 β -2ミクログロブリン(B2M)の発現の減少又は排除を伴い得る。

【0740】

一部の実施形態において、T細胞は、機能的TCR及び機能的HLA、例えばHLAクラスI及び/又はHLAクラスIIを欠き得る。

【0741】

機能的TCR及び/又はHLAの発現を欠く修飾T細胞は、TCR又はHLAの1つ以上のサブユニットのノックアウト又はノックダウンを含む、任意の適当な手段により得ることができる。例えば、T細胞は、siRNA、shRNA、群生性等間隔短回文反復配列(CRISPR)、転写アクティベーター様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)又は亜鉛フィンガーエンドヌクレアーゼ(ZFN)を使用して、TCR及び/又はHLAのノックダウンを含み得る。

【0742】

一部の実施形態において、同種細胞は、例えば、本明細書に記載の方法のいずれかにより、阻害性分子を発現しないか、又は低レベルで発現する細胞であり得る。例えば、細胞は、例えば、CAR発現細胞が免疫エフェクター応答を開始する能力を低下し得る、阻害分子を発現しないか、又は低レベルで発現する細胞であり得る。阻害分子の例は、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例えば、CEACAM-1、CEACAM-3及び/又はCEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14又はCD270)、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシン及びTGF(例えば、TGF β)を含む。例えば、DNA、RNA又はタンパク質レベルでの阻害による、阻害分子の阻害は、CAR発現細胞性能を最適化できる。複数の実施形態において、例えば本明細書に記載されるような、阻害性核酸、例えば阻害性核酸、例えばdsRNA、例えばsiRNA若しくはshRNA、群生性等間隔短回文反復配列(CRISPR)、転写アクティベーター様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)又は亜鉛フィンガーエンドヌクレアーゼ(ZFN)を使用することができる。

【0743】

TCR又はHLAを阻害するためのsiRNA及びshRNA

一部の実施形態において、TCR発現及び/又はHLA発現を、細胞、例えばT細胞における、TCR及び/若しくはHLA並びに/又は本明細書に記載の阻害分子(例えば、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例えば、CEACAM-1、CEACAM-3及び/又はCEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14又はCD270)、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシン及びTGF β)をコードする核酸を標的とするsiRNA又はshRNAを使用して、阻害することができる。

【0744】

siRNA及びshRNAの発現系及び例示的なshRNAのための発現系は、例えば、2015年3月13日に出版された国際公開第2015/142675号パンフレットの段落649及び650に記載され、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0745】

TCR又はHLAを阻害するためのCRISPR

本明細書で使用する「CRISPR」又は「TCR及び/又はHLAに対するCRISPR」又は「TCR及び/又はHLAを阻害するためのCRISPR」は、一連の群生性等間隔短回文反復配列又はこのような一連の反復を含む系を指す。本明細書で使用する「Cas」は、CRISPR関連タンパク質を指す。「CRISPR/Cas」系は、細胞

10

20

30

40

50

、例えばT細胞における、TCR及び/若しくはHLA遺伝子並びに/又は本明細書に記載の阻害分子(例えば、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例えば、CEACAM-1、CEACAM-3及び/又はCEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14又はCD270)、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシン及びTGF)の発現抑制又は変異に使用することができる、CRISPR及びCas由来の系を指す。

【0746】

CRISPR/Casシステム及びその使用は、例えば、2015年3月13日に出願された国際公開第2015/142675号パンフレットの段落651~658に記載され、その全体は参照により本明細書に組み込まれる。

【0747】

TCR及び/又はHLAを阻害するためのTALEN

「TALEN」又は「HLA及び/又はTCRに対するTALEN」又は「HLA及び/又はTCRを阻害するためのTALEN」は、細胞、例えばT細胞における、HLA及び/若しくはTCR遺伝子並びに/又は本明細書に記載の阻害分子(例えば、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例えば、CEACAM-1、CEACAM-3及び/又はCEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14又はCD270)、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシン及びTGF)の編集に使用することができる人工ヌクレアーゼである、転写アクティベーター様エフェクターヌクレアーゼを指す。

【0748】

TALEN及びその使用は、例えば、2015年3月13日に出願された国際公開第2015/142675号パンフレットの段落659~665に記載されており、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0749】

HLA及び/又はTCRを阻害するための亜鉛フィンガーヌクレアーゼ

「ZFN」又は「亜鉛フィンガーヌクレアーゼ」又は「HLA及び/又はTCRに対するZFN」又は「HLA及び/又はTCRを阻害するためのZFN」は、細胞、例えばT細胞における、HLA及び/若しくはTCR遺伝子並びに/又は本明細書に記載の阻害分子(例えば、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例えば、CEACAM-1、CEACAM-3及び/又はCEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14又はCD270)、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシン及びTGF)の編集に使用することができる人工ヌクレアーゼである、亜鉛フィンガーヌクレアーゼを指す。

【0750】

ZFN及びその使用は、例えば、2015年3月13日に出願された国際公開第2015/142675号パンフレットの段落666~671に記載されており、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0751】

テロメラーゼ発現

テロメアは、体細胞の持続に重要な役割を果たし、その長さはテロメラーゼ(TERT)によって維持される。CLL細胞のテロメア長は非常に短い可能性があり(Roth et al., "Significantly shorter telomeres in T-cells of patients with ZAP-70+/CD38

10

20

30

40

50

chronic lymphocytic leukaemia” British Journal of Haematology, 143, 383 - 386., August 28 2008)、製造されたCAR発現細胞、例えばCAR T19細胞ではさらに短くなる可能性があるため、患者への養子移入後にそれが増殖する可能性が制限される。テロメラーゼの発現は、CAR発現細胞を複製疲弊から救済することができる。

【0752】

いずれか特定の理論に縛られることを意図しないが、一部の実施形態において、治療用T細胞は、T細胞中の短縮されたテロメアのために、患者における持続性が短期であり；従って、テロメラーゼ遺伝子を用いたトランスフェクションにより、T細胞のテロメアを延長し、患者におけるT細胞の持続性を改善することができる。Carl June, “Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic”, Journal of Clinical Investigation, 117: 1466 - 1476 (2007)を参照されたい。そのため、一部の実施形態では、免疫エフェクター細胞、例えばT細胞は、異所性にテロメラーゼサブユニットを、例えばテロメラーゼの触媒的サブユニット、例えばTERT、例えばhTERTを発現する。一部の実施形態では、本開示は、細胞と、テロメラーゼサブユニット、例えばテロメラーゼの触媒的サブユニット、例えばTERT、例えばhTERTをコードする核酸を接触させることを含む、CAR発現細胞を生産する方法を提供する。細胞は、CARをコードする構築物と接触させる前、それと同時に又はその後に核酸と接触させることができる。

10

20

【0753】

テロメラーゼの発現は安定しているか（例えば、核酸が細胞のゲノムに組み込まれ得る）又は一過性である（例えば、核酸が組み込まれず、一定の時間、例えば数日後に発現が低下する）可能性がある。安定した発現は、テロメラーゼサブユニット及び選択可能なマーカーをコードするDNAで細胞をトランスフェクト又は形質導入し、安定な組み込み体を選択することによって達成され得る。これに代わり又はこれと組み合わせ、安定した発現は、例えば、Cre/Lox又はFLP/FRTシステムを使用した、部位特異的組換えによって達成され得る。

【0754】

一過性の発現は、核酸、例えばDNA又はmRNAなどのRNAによるトランスフェクション又は形質導入を含み得る。一部の実施形態において、一過性のmRNAトランスフェクションは、TERTによる安定したトランスフェクションに関連する場合のある遺伝的不安定性を回避する。外因性テロメラーゼ活性の一過性発現は、例えば、国際公開第2014/130909号パンフレットに記載されており、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。複数の実施形態において、テロメラーゼサブユニットのmRNAベースのトランスフェクションは、Moderna Therapeuticsによって商品化されたメッセンジャーRNA Therapeutics（商標）プラットフォームに従って実施される。例えば、この方法は、米国特許第8710200号明細書、同第8822663号明細書、同第8680069号明細書、同第8754062号明細書、同第8664194号明細書又は同第8680069号明細書に記載の方法であり得る。

30

40

【0755】

一部の実施形態において、hTERTは、GenBankタンパク質ID AAC51724.1のアミノ酸配列を有する（Meyerson et al., “hEST2, the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization” Cell Volume 90, Issue 4, 22 August 1997, Pages 785 - 795）。

50

【化 1 6】

MPRAPRCRAVRSLLRSHYREVLPLATFVRRRLGPQGWRLVQRGDPAAFRALVAQCLVCPWDA
 RPPPAAPSRFRQVSKLKLVARVLQRLCERGAKNVLAFGFALLDGARGGPPEAFTTSVRSYLPNT
 VTDALRGSGAWGLLLRRVGGDDVLVHLLARCALFVLVAPSCAYQVCGPPLYQLGAATQARPPP
 HASGPRRRRLGCERAWNHSVREAGVPLGLPAPGARRRGGASRSLPLPKRPRRGAPEPERTPV
 GQGSWAHPGRTRGSPDRGFCVVSPARPAEEATSLEGALSGTRHSHPSVGRQHHAGPPSTSRPPR
 PWDTPCPPVYAETKHFLYSSGDKEQLRPSFLLSSLRPSLTGARRLVETIFLGSRPWMPGTPRRLP
 RLPQRYWQMRPLFLELLGNHAQCPYGVLLKTHCPLRAAVTPAAGVCAREKPQGSVAAPPEED
 TDPRLVQLLRQHSSPWQVYGFVRACLRRLVPPGLWGSRHNERFLRNTKKFISLKGKAKLSL
 QELTWKMSVRGCAWLRRSPGVGCVPAAEHRLREEILAKFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETT
 FQKNRLLFFYRKS VWSKLSIGIRQHLKR VQLRELSEAEVRQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRP
 IVNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVLNYERARRPGLLGASVLGLDDIHRAWRTFVL
 RVRAQDPPPELYFVKVDVTGAYDTIPQDRLEVIASIIKPQNTYCVRRYAVVQKAAHGHVRKA
 FKSHVSTLTDLQPYMRQFVAHLQETSPLRDAVVIEQSSSLNEASSGLFDVFLRFMCHHAVRIRG
 KSYVQCQGIPQGSILSTLLCSLCYGD MENKLFAGIRRDGLLRLVDDFLLVTPHLTHAKTFLRTL
 VRGVPEYGCVVNLRKTVVNFVVEDEALGGTAFVQMPAHGLFPWCGLLLDTRTLEVQSDYSSY
 ARTSIRASLTFNRGFKAGRNMRRKLFVLRRLKCHSLFLDLQVNSLQTVCTNIYKILLQAYRFH
 ACVLQLPFHQVWKNPTFFLRVISDTASLCYSILKAKNAGMSLGAAGAAGPLPSEAVQWLCH
 QAFLLKLTRHRVTYVPLLGSLRTAQTQLSRKLPGTTLTALEAAANPALPSDFKTILD (配列番号
 284)

10

20

【0756】

一部の実施形態において、h T E R T は、配列番号 2 8 4 の配列と少なくとも 8 0 %、
 8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % 又は 9 9 % 同一の配列を有する。一部
 の実施形態において、h T E R T は、配列番号 2 8 4 の配列を有する。一実施形態におい
 て、h T E R T は、N 末端、C 末端又は両方に欠失（例えば、5、10、15、20 又は
 30 アミノ酸以下）を含む。一部の実施形態において、h T E R T は、N 末端、C 末端又
 は両方にトランスジェニックアミノ酸配列（例えば、5、10、15、20 又は 30 アミ
 ノ酸以下）を含む。

30

【0757】

一部の実施形態において、h T E R T は、GenBank 受託番号 AF018167 の
 核酸配列によってコードされる (Meyerson et al., "hEST2, the
 Putative Human Telomerase Catalytic Subu
 nit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells
 and during Immortalization" Cell Volume 90
 , Issue 4, 22 August 1997, Pages 785 - 795)。

40

【0758】

免疫エフェクター細胞（例えば T 細胞）の活性化及び増殖

本明細書に記載の方法により生成又は濃縮された T 細胞などの免疫エフェクター細胞は
 、例えば、米国特許第 6,352,694 号明細書；同第 6,534,055 号明細書；
 同第 6,905,680 号明細書；同第 6,692,964 号明細書；同第 5,858,
 358 号明細書；同第 6,887,466 号明細書；同第 6,905,681 号明細書；
 同第 7,144,575 号明細書；同第 7,067,318 号明細書；同第 7,172,
 869 号明細書；同第 7,232,566 号明細書；同第 7,175,843 号明細書；
 同第 5,883,223 号明細書；同第 6,905,874 号明細書；同第 6,797,

50

514号明細書；同第6, 867, 041号明細書；及び米国特許出願公開第20060121005号明細書に記載する方法を使用して、一般的に活性化及び増殖され得る。

【0759】

一般に、免疫エフェクター細胞の集団を、CD3/TCR複合体結合シグナルを刺激する薬剤が結合したその表面と、T細胞の表面上の共刺激分子を刺激するリガンドを接触させることにより増殖できる。特に、T細胞集団は、表面上に固定された抗CD3抗体若しくはその抗原結合フラグメント又は抗CD2抗体との接触又はカルシウムイオノフォアと組み合わせたタンパク質キナーゼCアクティベーター（例えば、プリオスタチン）との接触により、本明細書に記載のように刺激し得る。T細胞表面上のアクセサリー分子の共刺激のために、アクセサリー分子と結合するリガンドである。例えば、T細胞集団を、T細胞の増殖刺激に適する条件下で抗CD3抗体及び抗CD28抗体と接触させ得る。CD4 + T細胞又はCD8 + T細胞の増殖を刺激するために、抗CD3抗体及び抗CD28抗体を使用できる。抗CD28抗体の例は、9.3、B-T3、XR-CD28を含み(Diacclone, Besancon, France)、当技術分野で一般に知られる他の方法のように使用できる(Berg et al., Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Haanen et al., J. Exp. Med. 190(9):1319-1328, 1999; Garland et al., J. Immunol. Meth. 227(1-2):53-63, 1999)。

10

【0760】

一部の実施形態において、T細胞のための一次刺激シグナル及び共刺激シグナルは、異なるプロトコルにより提供され得る。例えば、各シグナルを提供する薬剤は、溶液中でも表面と結合し得る。表面に結合しているとき、薬剤は、同じ表面（すなわち「シス」形態）又は別の表面（すなわち「トランス」形態）に結合し得る。代わりに、一方の薬剤が表面に結合し、他方が溶液にあり得る。一部の実施形態において、共刺激シグナルを提供する薬剤は、細胞表面に結合し、一次活性化シグナルを提供する薬剤は、溶液中であるか又は表面と結合する。一部の実施形態において、両剤は、溶液中にあり得る。一部の実施形態において、薬剤は、不溶性形態であり、Fc受容体又は抗体又は薬剤と結合する他の結合剤を発現する細胞などの表面に架橋され得る。この点に関して、例えば本発明におけるT細胞の活性化及び増殖のために意図される人工抗原提示細胞(aAPC)について、米国特許出願公開第20040101519号明細書及び同第20060034810号明細書を参照されたい。

20

30

【0761】

一部の実施形態において、2剤は、ビーズに、同じビーズ、すなわち「シス」又は別のビーズ、すなわち「トランス」で固定化される。例として、一次活性化シグナルを提供する薬剤は、抗CD3抗体又はその抗原結合フラグメントであり、共刺激シグナルを提供する薬剤は、抗CD28抗体又はその抗原結合フラグメントであり、両剤は、均等な分子量で同じビーズに共固定化される。一部の実施形態において、CD4 + T細胞増殖及びT細胞増殖のためのビーズに結合した1:1比の各抗体を使用する。本発明の一部の実施形態において、1:1比を使用して観察された増殖と比べて、T細胞増殖の増殖が観察されるように、ビーズに結合した抗CD3:CD28抗体の比を使用する。一部の実施形態において、1:1比を使用して観察された増殖と比べて約1~約3倍増加が観察される。一部の実施形態において、ビーズに結合したCD3:CD28抗体比は、100:1~1:100及びその間の全ての整数値の範囲である。一部の実施形態において、抗CD3抗体より多くの抗CD28抗体が粒子に結合しており、すなわちCD3:CD28比が1未満である。一部の実施形態において、ビーズに結合した抗CD28抗体対抗CD3抗体比は、2:1より大きい。一部の実施形態において、ビーズに結合した1:100 CD3:CD28比の抗体を使用する。一部の実施形態において、ビーズに結合した1:75 CD3:CD28比の抗体を使用する。一部の実施形態において、ビーズに結合した1:50 CD3:CD28比の抗体を使用する。一部の実施形態において、ビーズに結合し

40

50

た 1 : 1 0 C D 3 : C D 2 8 比の抗体を使用する。一部の実施形態において、ビーズに結合した 1 : 3 C D 3 : C D 2 8 比の抗体を使用する。一部の実施形態において、ビーズに結合した 3 : 1 C D 3 : C D 2 8 比の抗体を使用する。

【 0 7 6 2 】

1 : 5 0 0 ~ 5 0 0 : 1 及びその間の任意の整数値の粒子対細胞比を T 細胞又は他の標的細胞の刺激のために使用し得る。当業者に容易に認識され得るように、粒子対細胞比は、標的細胞に対する粒子径に依存し得る。例えば、小さいサイズのビーズは、少ない細胞にのみ結合でき、大きいビーズは、多く結合できる。一部の実施形態において、細胞対粒子比は、1 : 1 0 0 ~ 1 0 0 : 1 及びその間の任意の整数値の範囲であり、一部の実施形態において 1 : 9 ~ 9 : 1 及びその間の任意の整数値からなる比を T 細胞刺激に使用し得る。T 細胞刺激をもたらす抗 C D 3 及び抗 C D 2 8 結合粒子対 T 細胞の比は、上記のように変わり得るが、しかしながら、ある好適な値は、1 : 1 0 0、1 : 5 0、1 : 4 0、1 : 3 0、1 : 2 0、1 : 1 0、1 : 9、1 : 8、1 : 7、1 : 6、1 : 5、1 : 4、1 : 3、1 : 2、1 : 1、2 : 1、3 : 1、4 : 1、5 : 1、6 : 1、7 : 1、8 : 1、9 : 1、1 0 : 1 及び 1 5 : 1 を含み、1 つの好適な比は少なくとも 1 : 1 粒子対 T 細胞である。一部の実施形態において、1 : 1 以下の粒子対細胞比を使用する。一部の実施形態において、好適な粒子 : 細胞比は、1 : 5 である。一部の実施形態において、粒子対細胞比は、刺激の日により変わり得る。例えば、一部の実施形態において、粒子対細胞比は、1 日目は 1 : 1 ~ 1 0 : 1 であり、さらなる粒子をその後 1 0 日目まで連日又は隔日で細胞に添加し、最終比 1 : 1 ~ 1 : 1 0 である（添加の比の細胞数に基づく）。一部の実施形態において、粒子対細胞比は、刺激 1 日目に 1 : 1 であり、刺激 3 日目及び 5 日目に 1 : 5 に調節する。一部の実施形態において、粒子を、1 日目の 1 : 1 及び刺激 3 日目及び 5 日目の 1 : 5 の最終比に基づき、連日又は隔日で添加する。一部の実施形態において、粒子対細胞比は、刺激 1 日目は 2 : 1 であり、刺激 3 日目及び 5 日目に 1 : 1 0 に調節する。一部の実施形態において、粒子を、1 日目の 1 : 1 及び 3 日目及び 5 日目の 1 : 1 0 の最終比に基づき、連日又は隔日で添加する。当業者は、多様な他の比が本発明における使用に適し得ることを認識する。特に、比は、粒子径並びに細胞サイズ及びタイプによる。一部の実施形態において、使用するための最も典型的な比は、1 日目の 1 : 1、2 : 1 及び 3 : 1 付近である。

【 0 7 6 3 】

一部の実施形態において、T 細胞などの細胞を薬剤被覆ビーズと組み合わせ、ビーズ及び細胞をその後分離し、次いで細胞を培養する。一部の実施形態において、培養前に薬剤被覆ビーズ及び細胞を分離するが、一緒に培養する。一部の実施形態において、ビーズ及び細胞を磁気力などの力の適用によりまず濃縮し、細胞表面マーカーのライゲーシオンを増加させ、それにより細胞刺激を誘導する。

【 0 7 6 4 】

例として、細胞表面タンパク質を、抗 C D 3 及び抗 C D 2 8 が結合した常磁性ビーズ（3 x 2 8 ビーズ）と T 細胞を接触させることにより、ライゲートし得る。一部の実施形態において、細胞（例えば、1 0⁴ ~ 1 0⁹ T 細胞）及びビーズ（例えば、Dyna ビーズ S（登録商標）M - 4 5 0 C D 3 / C D 2 8 T 常磁性ビーズを 1 : 1 比）を緩衝液、例えば P B S（カルシウム及びマグネシウムなどの二価カチオンなし）中で合わせる。再び、任意の細胞濃度を使用し得ることが当業者に容易に認識され得る。例えば、標的細胞は、試料中で極めて稀であり、試料の 0 . 0 1 % のみが含まれるか又は試料全体（すなわち 1 0 0 %）が目的の標的細胞で構成され得る。従って、あらゆる細胞数が本発明に関連して一体となる。一部の実施形態において、細胞と粒子との最大接触を確実にするために、粒子及び細胞を混合する体積を有意に減少させる（すなわち細胞の濃度を高める）ことが望ましいことがある。例えば、一部の実施形態において、約 1 0 0 億細胞 / m l、9 0 億細胞 / m l、8 0 億細胞 / m l、7 0 億細胞 / m l、6 0 億細胞 / m l、5 0 億細胞 / m l 又は 2 0 億細胞 / m l の濃度を使用する。一部の実施形態において、1 億細胞 / m l 超を使用する。一部の実施形態において、1 0 0 0 万、1 5 0 0 万、2 0 0 0 万、2 5 0

0万、3000万、3500万、4000万、4500万又は5000万細胞/mlの細胞濃度を使用する。一部の実施形態において、細胞の7500万、8000万、8500万、9000万、9500万又は1億細胞/mlの濃度を使用する。一部の実施形態において、1億2500万又は1億5000万細胞/mlの濃度を使用できる。高濃度を使用して、細胞収率、細胞活性化及び細胞増殖を増加できる。さらに、高細胞濃度の使用は、CD28陰性T細胞などの目的の標的抗原を弱く発現し得る細胞のより効率的な捕獲を可能にする。このような細胞集団は、治療的価値を有し得、及び特定の態様では得ることが望ましいであろう。例えば、高濃度細胞の使用は、通常、CD28発現が弱いCD8+T細胞のより効率的な選択を可能にする。

【0765】

一部の実施形態において、CAR、例えば本明細書に記載のCAR、例えば本明細書に記載のCD19CARをコードする核酸が形質導入された細胞を例えば本明細書に記載の方法により増殖する。一部の実施形態において、細胞を数時間（例えば、約2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、15時間、18時間、21時間）～約14日（例えば、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日又は14日）の期間の培養により増殖する。一部の実施形態において、細胞は、4～9日の期間増殖される。一部の実施形態において、細胞は、8日以下、例えば7日、6日又は5日の期間増殖される。一部の実施形態において、細胞は、5日の培養により増殖され、得られた細胞は、同じ培養条件において9日間培養で増殖された同じ細胞よりも強力である。効力は、例えば、多様なT細胞機能、例えば増殖、標的細胞死、サイトカイン産生、活性化、遊走、表面CAR発現、CAR定量的PCR又はそれらの組み合わせにより規定され得る。一部の実施形態において、5日増殖された細胞、例えば本明細書に記載のCD19CAR細胞は、同じ培養条件下において9日間培養で増殖された同じ細胞と比べて、抗原刺激による細胞倍加の少なくとも1倍、2倍、3倍又は4倍増加を示す。一部の実施形態において、細胞、例えば本明細書に記載のCD19CAR発現細胞を発現する細胞は、5日の培養により増殖され、得られた細胞は、同じ培養条件下において9日間培養で増殖された同じ細胞と比べて、高い炎症誘発性サイトカイン産生、例えばIFN- γ 及び/又はGM-CSFレベルを示す。一部の実施形態において、5日増殖された細胞、例えば本明細書に記載のCD19CAR細胞は、同じ培養条件下において9日間培養で増殖された同じ細胞と比べて、炎症誘発性サイトカイン産生、例えばIFN- γ 及び/又はGM-CSFレベルのpg/mlで少なくとも1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍又はそれを超えて増加する。

【0766】

T細胞の培養期間が60日以上となり得るような数サイクルの刺激も望まれ得る。T細胞培養に適する条件は、血清（例えば、胎児ウシ又はヒト血清）、インターロイキン-2（IL-2）、インスリン、IFN- γ 、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF β 及びTNF- α 又は当業者に知られる細胞増殖のための任意の他の添加剤を含む、増殖及び生存能に必要な因子を含み得る、適切な培地（例えば、最小必須培地、 α -MEM、RPMI培地1640、AIM-V、DMEM、F-12又はX-vivo15（Lonza）、X-Vivo20、Optimizer及びIMDM）を含む。細胞の増殖のための他の添加剤は、界面活性剤、プラスマネート、及びN-アセチル-システイン、及び2-メルカプトエタノールなどの還元剤を含むが、これらに限定されない。培地は、限定されないが、無血清又は適切な量の血清（又は血漿）が添加されたか、又は規定されたセットのホルモン及び/又はT細胞の増殖及び拡大に十分な量のサイトカインが添加されたRPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-Vivo15、X-Vivo20、Optimizer及びIMDMを含み得る。抗生物質、例えばペニシリン及びストレプトマイシンは、実験的培養においてのみ包含され、対象に注入すべき細胞の培養に含まれない。標的細胞は、増殖を支持するのに必要な条件、例えば適切な温度（例えば、37 $^{\circ}$ C）及び雰囲気（例えば、空気+5%CO $_2$ ）で維持される。

10

20

30

40

50

【0767】

一部の実施形態において、細胞は、例えば、フローサイトメトリーなどの本明細書に記載の方法により測定して、14日の増殖期間にわたり、細胞の少なくとも200倍（例えば、200倍、250倍、300倍、350倍）増加をもたらす1つ以上のインターロイキンを含む適切な培地（例えば、本明細書に記載の培地）で増殖させる。一部の実施形態において、細胞は、IL-15及び/又はIL-7（例えば、IL-15及びIL-7）の存在下で増殖させる。

【0768】

実施形態において、本明細書に記載の方法、例えばCAR発現細胞製造法は、T制御性細胞、例えばCD25+T細胞又はCD25^{high}T細胞を、例えば抗CD25抗体又はそのフラグメント又はCD25結合リガンド、IL-2を使用して細胞集団から除去することを含む。細胞集団からT制御性細胞、例えばCD25+T細胞又はCD25^{high}T細胞を除去する方法は、本明細書に記載される。実施形態において、方法、例えば製造法は、細胞集団（例えば、CD25+T細胞又はCD25^{high}T細胞などのT制御性細胞が枯渇されている細胞集団；又は抗CD25抗体、そのフラグメント又はCD25結合リガンドと前に接触された細胞集団）とIL-15及び/又はIL-7との接触をさらに含む。例えば、細胞集団（例えば、抗CD25抗体、そのフラグメント又はCD25結合リガンドと先に接触されている）をIL-15及び/又はIL-7の存在下で増殖させる。

【0769】

一部の実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞を、インターロイキン-15（IL-15）ポリペプチド、インターロイキン-15受容体（IL-15Ra）ポリペプチド又はIL-15ポリペプチドとIL-15Raポリペプチドの組み合わせ、例えばhetIL-15を含む組成物とCAR発現細胞の製造中に例えばエキスピボで接触させることを含む。実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞をCAR発現細胞の製造中に例えばエキスピボで、IL-15ポリペプチドを含む組成物と接触させる。実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞をCAR発現細胞の製造中に例えばエキスピボで、IL-15ポリペプチド及びIL-15Raポリペプチドの両方の組み合わせを含む組成物と接触させる。実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞をCAR発現細胞の製造中に例えばエキスピボで、hetIL-15を含む組成物と接触させる。

【0770】

一部の実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞を、エキスピボ増殖中、hetIL-15を含む組成物と接触させる。一部の実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞を、エキスピボ増殖中、IL-15ポリペプチドを含む組成物と接触させる。一部の実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞を、エキスピボ増殖中、IL-15ポリペプチド及びIL-15Raポリペプチドの両方を含む組成物と接触させる。一部の実施形態において、接触は、リンパ球亜集団、例えばCD8+T細胞の生存及び増殖をもたらす。

【0771】

種々の刺激時間に曝されているT細胞は、異なる特徴を示し得る。例えば、典型的な血液又はアフレーシスした末梢血単核細胞産物は、細胞毒性又はサプレッサーT細胞集団（TC、CD8+）より大きいヘルパーT細胞集団（TH、CD4+）を有する。CD3及びCD28受容体での刺激によるT細胞のエキスピボ増殖は、約8~9日目まで主にTH細胞からなるT細胞集団を産生するが、約8~9日目後、T細胞集団は、徐々に大きくなるTC細胞集団を含む。従って、処置の目的により、主にTH細胞を含むT細胞集団を対象に注入することは有利であり得る。同様に、TC細胞の抗原特異的サブセットが単離されている場合、このサブセットを大きい程度まで増殖させることが有利であり得る。

【0772】

さらに、CD4及びCD8マーカーに加えて、他の表現型マーカーは、細胞増殖過程の

経過中、有意に、しかし、主に再現性よく変化する。そうして、このような再現性は、特定の目的のために活性化T細胞産物をもたらす能力を可能とする。

【0773】

本明細書に記載のCARが構築されると、適切なインビトロ及び動物モデルにおける抗原刺激後にT細胞を増殖させる能力、再刺激の非存在下でのT細胞増殖の持続及び抗癌活性など、しかし、これらに限定されない分子の活性を評価するために種々のアッセイが使用され得る。本発明のCARの効果の評価するためのアッセイは、以下にさらに詳細に記載される。

【0774】

初代T細胞におけるCAR発現のウェスタンブロット分析は、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる2015年3月13日に出願された国際公開第2015/142675号パンフレットの段落695に記載されるように、単量体及び二量体の存在を検出するために使用できる。

【0775】

抗原刺激後のCAR⁺T細胞のインビトロ増殖をフローサイトメトリーにより測定できる。例えば、CD4⁺及びCD8⁺T細胞の混合物をCD3/CD28 aAPCで刺激し、続いて分析すべきプロモーターの制御下において、GFPを発現するレンチウイルスベクターで形質導入する。代表的プロモーターは、CMV IE遺伝子、EF-1、ユビキチンC又はホスホグリセロキナーゼ(PGK)プロモーターを含む。GFP蛍光を、CD4⁺及び/又はCD8⁺T細胞サブセットの培養6日目にフローサイトメトリーにより評価する。例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)を参照されたい。代わりに、CD4⁺とCD8⁺T細胞の混合物を、0日目にCD3/CD28被覆磁気ビーズで刺激し、2ARIボソームスキッピング配列を使用するCARとeGFPを発現するパイシストロニックレンチウイルスベクターを使用して、1日目にCARを形質導入する。培養物を本明細書に記載されるような癌関連抗原⁺K562細胞(本明細書に記載されるような癌関連抗原を発現するK562)、野生型K562細胞(K562野生型)又は抗CD3及び抗CD28抗体存在下でhCD32及び4-1BBLを発現するK562細胞(K562-BBL-3/28)でのいずれかで再刺激する。外来性IL-2を、100IU/mlを隔日で培養物に添加する。GFP⁺T細胞を、ビーズベースの計数を使用するフローサイトメトリーにより数える。例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)を参照されたい。

【0776】

再刺激非存在下の持続するCAR⁺T細胞増殖も測定できる。例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)を参照されたい。簡潔には、平均T細胞体積(fl)を、0日目のCD3/CD28被覆磁気ビーズでの刺激及び1日目の記載するCARの形質導入後、培養8日目にCoulter Multisizer III粒子カウンター若しくはより高いバージョン、Nexcelom Cellometer Vision、Millipore Scepter又は他の細胞カウンターを使用して測定する。

【0777】

動物モデルも、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる2015年3月13日に出願された国際公開第2015/142675号パンフレットの段落698に記載されるように、CAR発現細胞活性の測定に使用できる。

【0778】

用量依存的CAR処置応答は、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる2015年3月13日に出願された国際公開第2015/142675号パンフレットの段落699に記載されるように、評価できる。

【0779】

細胞増殖及びサイトカイン産生の評価は、その全体が参照により本明細書に組み込まれ

10

20

30

40

50

る2015年3月13日に出願された国際公開第2015/142675号パンフレットの段落700に記載されるように、以前に説明されている。

【0780】

細胞毒性は、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる2015年3月13日に出願された国際公開第2015/142675号パンフレットの段落701に記載されるように、標準的51Cr放出アッセイにより評価できる。代替的な非放射性方法も利用することができる。

【0781】

細胞毒性は、例えば、xCeLLigenceリアルタイム細胞アナライザー(RTCA)を使用して、付着細胞の電気インピーダンスの変化を測定することによっても評価できる。一部の実施形態において、細胞毒性は複数の時点で測定される。

10

【0782】

造影テクノロジーは、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる2015年3月13日に出願された国際公開第2015/142675号パンフレットの段落702に記載されるように、腫瘍担持動物モデルにおけるCARの特異的輸送及び増殖を評価するために使用することができる。

【0783】

本明細書の実施例部分に記載のもの並びに当分野で知られるものを含む、他のアッセイも、本明細書に記載のCARの評価に使用できる。

【0784】

ここに開示する方法の代わりに又はこれと組み合わせ、CARリガンドの使用を含む、CAR発現細胞(例えば、インビトロ又はインビボ(例えば、臨床モニタリング))、免疫細胞増殖及び/又は活性化及び/又はCAR特異的選択の1つ以上の検出及び/又は定量のための方法及び組成物が開示される。一部の実施形態において、CARリガンドは、CAR分子に結合する、例えばCARの細胞外抗原結合ドメインに結合する抗体である(例えば、抗原結合ドメインに結合する抗体、例えば、抗イディオタイプ抗体;又は細胞外結合ドメインの定常領域に結合する抗体)。他の実施形態において、CARリガンドは、CAR抗原分子である(例えば、本明細書に記載されるようなCAR抗原分子)。

20

【0785】

一部の実施形態において、CAR発現細胞を検出及び/又は定量する方法が開示される。例えば、CARリガンドは、インビトロ又はインビボでCAR発現細胞の検出及び/又は定量に使用できる(例えば、患者におけるCAR発現細胞の臨床モニタリング又は患者への投薬)。方法は、

30

CARリガンド(任意選択で標識CARリガンド、例えばタグ、ビーズ、放射活性又は蛍光標識を含むCARリガンド)を提供し;

CAR発現細胞を獲得し(例えば、製造サンプル又は臨床サンプルなどのCAR発現細胞含有サンプルの獲得);

CAR発現細胞とCARリガンドを、結合が生じる条件下で接触させ、それにより存在するCAR発現細胞のレベル(例えば、量)を検出することを含む。CAR発現細胞とCARリガンドの結合は、FACS、ELISAなどのような標準技術を使用して検出できる。

40

【0786】

一部の実施形態において、増殖及び/又は活性化細胞(例えば、免疫エフェクター細胞)を増殖する方法が開示される。方法は、

CAR発現細胞(例えば、第1のCAR発現細胞又は一過性に発現されるCAR細胞)を提供し;

前記CAR発現細胞とCARリガンド、例えば、本明細書に記載されるようなCARリガンドを、免疫細胞増殖及び/又は増殖が生じる条件下で接触させ、それにより活性化及び/又は増殖集団を産生することを含む。

【0787】

50

特定の実施形態において、CARリガンドは基質上に存在する（例えば、基質、例えば、天然に存在しない基質に固定化又は結合される）。一部の実施形態において、基質は、非細胞基質である。非細胞基質は、例えば、プレート（例えば、マイクロタイタープレート）、膜（例えば、ニトロセルロース膜）、マトリックス、チップ又はビーズから選択される固体支持体であり得る。実施形態において、CARリガンドは、基質に存在する（例えば、基質表面上）。CARリガンドを、基質に共有又は非共有（例えば、架橋）により固定、結合又は会合させ得る。一部の実施形態において、CARリガンドは、ビーズに結合（例えば、共有結合）する。前記実施形態において、免疫細胞集団をインビトロ又はエクスピボで増殖できる。方法は、例えば、本明細書に記載の方法のいずれかを使用して、CAR分子のリガンド存在下、免疫細胞の集団を培養することをさらに含む。

10

【0788】

他の実施形態において、細胞を増殖及び/又は活性化する方法は、さらに第2の刺激性分子、例えば、CD28の添加を含む。例えば、CARリガンド及び第2の刺激性分子を基質、例えば、1つ以上のビーズに固定し、それにより細胞増殖及び/又は活性化を増加させ得る。

【0789】

一部の実施形態において、CAR発現細胞を選択又は富化する方法を提供する。方法は、CAR発現細胞と本明細書に記載されるようなCARリガンドを接触させ、CARリガンドの結合に基づき細胞を選択することを含む。

【0790】

さらに他の実施形態において、CAR発現細胞を枯渇、減少及び/又は死滅する方法が提供される。方法は、CAR発現細胞と本明細書に記載されるようなCARリガンドを接触させ；及び細胞を、CARリガンドの結合に基づき標的化し、それによりCAR発現細胞の数を減らす及び/又は殺傷することを含む。一部の実施形態において、CARリガンドは、毒性剤と結合する（例えば、トキシン又は細胞除去剤）。一部の実施形態において、抗イディオタイプ抗体は、エフェクター細胞活性、例えば、ADCC又はADC活性を生じ得る。

20

【0791】

本明細書に開示する方法において使用できる例示的な抗CAR抗体は、例えば、国際公開第2014/190273号パンフレット及びJena et al., "Chimeric Antigen Receptor (CAR) - Specific Monoclonal Antibody to Detect CD19 - Specific T cells in Clinical Trials", PLOS March 2013 8:3 e57838に記載され、その内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0792】

一部の実施形態において、本明細書における組成物及び方法は、例えば、その内容が全体として参照により本明細書に組み込まれる、2015年7月31日出願の米国特許出願PCT/米国特許出願公開第2015/043219号明細書に記載のような、T細胞の特定のサブセットのために最適化される。一部の実施形態において、T細胞の最適化サブセットは、対照T細胞、例えば、同じ構築物を発現する異なるタイプ（例えば、CD8+又はCD4+）のT細胞と比べて、残留性の増強を示す。

40

【0793】

一部の実施形態において、CD4+T細胞は、本明細書に記載のCARを含み、そのCARは、CD4+T細胞に適する（例えば、最適化、例えば、残留性の増強に至る）細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、ICOSドメインを含む。一部の実施形態において、CD8+T細胞は、本明細書に記載のCARを含み、そのCARは、CD8+T細胞に適する（例えば、最適化、例えば、残留性の増強に至る）細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、4-1BBドメイン、CD28ドメイン又はICOSドメイン以外の共刺激ドメインを含む。一部の実施形態において、本明細書に記載のCARは、本明細書に記載の抗原結合ドメイン、例えば、抗原結合ドメインを含むCARを含む。

50

【0794】

一部の実施形態において、本明細書に記載されるのは、対象、例えば、癌を有する対象を処置する方法である。方法は、前記対象に、有効量の、

1) 抗原結合ドメイン、例えば、本明細書に記載の抗原結合ドメイン；
膜貫通ドメイン；及び

細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば第1の共刺激ドメイン、例えばICOSドメインを含む、CARを含むCD4+T細胞(CARCD4+)；及び

2) CARを含むCD8+T細胞(CARCD8+)であって、
抗原結合ドメイン、例えば、本明細書に記載の抗原結合ドメイン；
膜貫通ドメイン；及び

細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば第2の共刺激ドメイン、例えば4-1BBドメイン、CD28ドメイン又はICOSドメイン以外の別の共刺激ドメインを含むもの

を投与することを含み、ここで、CARCD4+とCARCD8+は互いに異なる。任意選択で、方法は、さらに、

3) CARを含む第2のCD8+T細胞(第2のCARCD8+)であって、
抗原結合ドメイン、例えば、本明細書に記載の抗原結合ドメイン；
膜貫通ドメイン；及び

第2のCARCD8+が、CARCD8+上に存在しない細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば共刺激シグナル伝達ドメインを含み、任意選択でICOSシグナル伝達ドメインを含まない、細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【0795】

バイオポリマー送達方法

一部の実施形態において、本明細書に開示する1つ以上のCAR発現細胞を、バイオポリマー足場、例えば、バイオポリマーインプラントにより対象に投与又は送達し得る。バイオポリマー足場は、本明細書に記載のCAR発現細胞の送達、増殖及び/分散を支持又は強化することができる。バイオポリマー足場は、生体適合性(例えば、炎症性又は免疫応答を実質的に誘発しない)及び/又は天然に存在し得るか又は合成である生分解性ポリマーを含む。例示的なバイオポリマーは、例えば、2015年3月13日に出版された国際公開第2015/142675号パンフレットの段落1004~1006に記載され、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0796】

医薬組成物及び処置

一部の実施形態において、本開示は、本明細書に記載されるように産生されたCAR発現細胞を、任意選択で1つ以上の他の治療と組み合わせて、投与することを含む、患者を処置する方法を提供する。一部の実施形態において、本開示は、本明細書に記載されるようなCAR発現細胞を含む反応混合物を、任意選択で1つ以上の他の治療と組み合わせて、投与することを含む、患者を処置する方法を提供する。一部の実施形態において、本開示は、本明細書に記載されるようなCAR発現細胞を含む反応混合物を送達又は受領する方法を提供する。一部の実施形態において、本開示は、本明細書に記載されるように産生されたCAR発現細胞を受領することを含み、CAR発現細胞を、任意選択で1つ以上の他の治療と組み合わせて、患者に投与することをさらに含む、患者を処置する方法を提供する。一部の実施形態において、本開示は、本明細書に記載されるようなCAR発現細胞を産生することを含み、CAR発現細胞を、任意選択で1つ以上の他の治療と組み合わせて、患者に投与することをさらに含む、患者を処置する方法を提供する。他の療法は、例えば、化学療法などの癌療法であり得る。

【0797】

一部の実施形態において、本明細書に記載のCARを発現する細胞を、Treg細胞集団を減少させる分子と組み合わせて対象に投与する。Treg細胞数を減らす(例えば、

枯渇させる)方法は当分野で知られ、例えば、CD25枯渇、シクロホスファミド投与、GITR機能修飾を含む。理論に拘束されることを望むものではないが、アフエーシス前又は本明細書に記載のCAR発現細胞投与前に対象におけるTreg細胞数を減らすことは、腫瘍微小環境における望まない免疫細胞(例えば、Treg)の数を減らし、対象の再発のリスクを減らすと考えられる。

【0798】

一部の実施形態において、本明細書に記載の治療、例えば、CAR発現細胞は、制御性T細胞(Treg)を枯渇させるGITRアゴニスト及び/又はGITR抗体などのGITRを標的とする及び/又はGITR機能を調節する分子と組み合わせて対象に投与される。実施形態において、本明細書に記載のCARを発現する細胞を、対象にシクロホスファミドと組み合わせて投与する。一部の実施形態において、GITR結合分子及び/又はGITR機能を調節する分子(例えば、GITRアゴニスト及び/又はTreg枯渇GITR抗体)を、CAR発現細胞の前に投与する。例えば、一部の実施形態において、GITRアゴニストを細胞のアフエーシス前に投与できる。実施形態において、シクロホスファミドを、対象にCAR発現細胞の投与(例えば、注入又は再注入)前又は細胞のアフエーシス前に投与する。実施形態において、シクロホスファミド及び抗GITR抗体を、対象にCAR発現細胞の投与(例えば、注入又は再注入)前又は細胞のアフエーシス前に投与する。一部の実施形態において、対象は癌(例えば、固形癌又はALL又はCLLなどの血液癌)を有する。一部の実施形態において、対象は、CLLを有する。実施形態において、対象はALLを有する。実施形態において、対象は固形癌、例えば、本明細書に記載の固形癌を有する。例示的なGITRアゴニストは、例えば、米国特許第6,111,090号明細書、欧州特許第090505B1号明細書、米国特許第8,586,023号明細書、国際公開第2010/003118号パンフレット及び同2011/090754号パンフレットに記載のGITR融合タンパク質又は例えば米国特許第7,025,962号明細書、欧州特許第1947183B1号明細書、米国特許第7,812,135号明細書、米国特許第8,388,967号明細書、米国特許第8,591,886号明細書、欧州特許出願公開第EP1866339号明細書、国際公開第2011/028683号パンフレット、国際公開第2013/039954号パンフレット、国際公開第2005/007190号パンフレット、国際公開第2007/133822号パンフレット、国際公開第2005/055808号パンフレット、国際公開第99/40196号パンフレット、国際公開第2001/03720号パンフレット、国際公開第99/20758号パンフレット、国際公開第2006/083289号パンフレット、国際公開第2005/115451号パンフレット、米国特許第7,618,632号明細書及び国際公開第2011/051726号パンフレットに記載される抗GITR抗体など、例えば、GITR融合タンパク質及び抗GITR抗体(例えば、二価抗GITR抗体)を含む。

【0799】

一部の実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞を、GITRアゴニスト、例えば、本明細書に記載のGITRアゴニストと組み合わせて対象に投与する。一部の実施形態において、GITRアゴニストを、CAR発現細胞の前に投与する。例えば、一部の実施形態において、GITRアゴニストを細胞のアフエーシス前に投与できる。一部の実施形態において、対象は、CLLを有する。

【0800】

本明細書に記載の方法は、医薬組成物中にCAR発現細胞を製剤化することをさらに含み得る。医薬組成物は、本明細書に記載のように、CAR発現細胞、例えば複数のCAR発現細胞を1つ以上の薬学的に又は生理学的に許容される担体、希釈剤又は添加物と組み合わせて含む。このような組成物は、中性緩衝化食塩水、リン酸緩衝化食塩水などの緩衝液;グルコース、マンノース、スクロース又はデキストラン、マンニトールなどの炭水化物;タンパク質;グリシンなどのポリペプチド又はアミノ酸;抗酸化剤;EDTA又はグルタチオンなどのキレート剤;アジュバント(例えば、水酸化アルミニウム);及び防腐

10

20

30

40

50

剤を含み得る。組成物は、例えば静脈内投与のために、製剤化することができる。

【0801】

一部の実施形態において、医薬組成物は、例えば、エンドトキシン、マイコプラズマ、複製可能レンチウイルス(RCL)、p24、VSV-G核酸、HIV gag、残留抗CD3/抗CD28被覆ビーズ、マウス抗体、貯留ヒト血清、ウシ血清アルブミン、ウシ血清、培養培地要素、ベクターパッケージング細胞又はプラスミド成分、細菌及び真菌からなる群から選択される汚染物が実質的になく、例えば検出可能なレベルで存在しない。一部の実施形態において、細菌は、アルカリゲネス・フェカリス(*Alcaligenes faecalis*)、カンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)、エシェリキア・コリ(*Escherichia coli*)、ヘモフィルス・インフルエンザ(*Haemophilus influenza*)、ナイセリア・メニンギティディス(*Neisseria meningitidis*)、シュードモナス・エルジノーサ(*Pseudomonas aeruginosa*)、スタフィロコッカス・アウレウス(*Staphylococcus aureus*)、ストレプトコッカス・ニューモニエ(*Streptococcus pneumonia*)及びストレプトコッカス・ピオゲネス(*Streptococcus pyogenes*) A群からなる群から選択される少なくとも1つである。

10

【0802】

「免疫学的に有効量」、「抗癌有効量」、「癌阻害有効量」又は「治療量」が示される時、組成物の投与すべき正確な量は、年齢、体重、腫瘍サイズ、感染の程度又は転移及び患者(対象)の状態の個体差を考慮して医師が決定できる。本明細書に記載の免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を含む医薬組成物を、 $10^4 \sim 10^9$ 細胞/kg体重、いくつかの例において $10^5 \sim 10^6$ 細胞/kg体重の範囲の用量(これらの範囲内の全整数値を含む)で投与し得ると一般に述べることができる。T細胞組成物をまたこの用量で複数回投与し得る。細胞を、免疫療法において一般に知られる注入技術を使用して投与できる(例えば、Rosenberg et al., *New Eng. J. of Med.* 319:1676, 1988を参照されたい)。

20

【0803】

例示的なBCMA/CD19 CAR T医薬組成物

一部の実施形態において、BCMA/CD19二重CAR T細胞組成物は、2つのユニークなベクターを用いた共形質導入により生産される。従って、一部の実施形態では、細胞組成物は、異種細胞集団を含む。一部の実施形態では、異種細胞組成物は、未形質導入T細胞、モノBCMA特異的CAR T細胞、モノCD19特異的CAR T細胞並びにBCMA特異的CAR分子及びCD19特異的CAR分子の両方を発現する二重CAR T細胞を含む。これらの異なる細胞集団は、対象における疾患の処置に関して、異なる活性を呈示し得る。

30

【0804】

理論に縛られることは意図しないが、例えば、多発性骨髄腫の処置に関連して、BCMA特異的CAR T細胞の活性化は、患者の抗腫瘍応答における主な要因であり得るのに対し、CD19特異的活性は、優勢ではないCD19陽性腫瘍細胞の排除に特定の役割を果たし得る。

40

【0805】

一部の実施形態において、細胞組成物を評価して、4つの異なる細胞集団の相対パーセンテージを算定し、例えば、モノCD19特異的CAR細胞よりも高いパーセンテージのBCMA特異的CAR細胞(例えば、モノBCMA特異的CAR細胞及びBCMA/CD19二重CAR細胞)を含有する細胞組成物を選択することができる。

【0806】

一部の実施形態において、細胞は、

(a) 抗BCMA CARを含むが、抗CD19 CARを含まない細胞の第1集団；

(b) 抗CD19 CARを含むが、抗BCMA CARを含まない細胞の第2集団；及び

50

(c) 抗BCMA CARと抗CD19 CARとの両方を含む細胞の第3集団を含む。

【0807】

一部の実施形態では、

(i) 第2及び第3集団を合わせた生存細胞の総数は、第1及び第3集団を合わせた生存細胞の総数の約110%以下(例えば、約105%、100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、1%又はそれ未満以下)であり；

(ii) 第1及び第3集団を合わせた生存細胞の総数は、第2及び第3集団を合わせた生存細胞の総数の約90%以上(例えば、約100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、400%、500%、750%、1000%、2000%、5000%、10000%又はそれを超えるもの以上)であり；

(iii) 第1及び第3集団を合わせた生存細胞の総数は、生存細胞の総数の約5%以上(例えば、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%又は90%以上)である。

【0808】

一部の実施形態では、細胞組成物は、CARを含まない細胞の第4集団をさらに含む。

一部の実施形態では、細胞組成物は、BCMA特異的CAR細胞の数(例えば、モノBCMA特異的CAR細胞及びBCMA/CD19二重CAR細胞の総数)の110%以下(例えば、約105%、100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、1%又はそれ未満以下)のモノCD19特異的CAR細胞

の集団を含む。一部の実施形態では、細胞組成物は、BCMA特異的CAR T細胞の数の約45%~約50%(例えば、約47%)を含むモノCD19 CAR+細胞の集団を含む。一部の実施形態では、細胞組成物は、BCMA特異的CAR T細胞の数の約60%~約65%(例えば、約63%)を含むモノCD19 CAR+細胞の集団を含む。一部の実施形態では、細胞組成物は、BCMA特異的CAR T細胞の数の約50%~約55%(例えば、約53%)を含むモノCD19 CAR+細胞の集団を含む。一部の実施形態では、細胞組成物は、BCMA特異的CAR T細胞の数の約82%を含むモノCD19 CAR+細胞の集団を含む。

【0809】

一部の実施形態では、細胞組成物を評価して、十分な投与を可能にするCAR陽性生存細胞のパーセンテージを算定することができる。従って、一部の実施形態において、細胞組成物は、細胞組成物中の生存細胞の総数の5%以上(例えば、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%若しくは100%以上)であるBCMA特異的CAR細胞(例えば、モノBCMA特異的CAR細胞及びBCMA/CD19二重CAR細胞の総数)の集団を含む。

【0810】

一部の実施形態では、BCMA特異的CAR細胞は、BCMA特異的CAR T細胞である。一部の実施形態では、モノBCMA特異的CAR細胞は、モノBCMA特異的CAR T細胞である。一部の実施形態では、CD19特異的CAR細胞は、CD19特異的CAR T細胞である。一部の実施形態では、モノCD19特異的CAR細胞は、モノCD19特異的CAR T細胞である。一部の実施形態では、BCMA/CD19二重CAR細胞は、BCMA/CD19二重CAR T細胞である。

【0811】

用量設定

一部の実施形態において、CAR細胞(例えば、CD19 CAR細胞)の用量は、約 1×10^6 、 1.1×10^6 、 2×10^6 、 3.6×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 1.8×10^7 、 2×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 又は 5×10^8 細胞/kgを含む。一部の実施形態において、CAR細胞(例えば、CD19 CAR細胞)の用量は、少なくとも約 1×10^6 、 1.1×10^6 、 2×10^6 、 3.6×10^6 、 5×1

10

20

30

40

50

10^6 、 1×10^7 、 1.8×10^7 、 2×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8
 又は 5×10^8 細胞/kgを含む。一部の実施形態において、CAR細胞（例えば、CD
 19 CAR細胞）の用量は、最大約 1×10^6 、 1.1×10^6 、 2×10^6 、 $3.6 \times$
 10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 1.8×10^7 、 2×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8
 、 2×10^8 又は 5×10^8 細胞/kgを含む。一部の実施形態において、CAR細胞（
 例えば、CD19 CAR細胞）の用量は、約 $1.1 \times 10^6 \sim 1.8 \times 10^7$ 細胞/kg
 を含む。一部の実施形態において、CAR細胞（例えば、CD19 CAR細胞）の用量は
 、約 1×10^7 、 2×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 5×10^8 、 $1 \times$
 10^9 、 2×10^9 又は 5×10^9 細胞を含む。一部の実施形態において、CAR細胞（
 例えば、CD19 CAR細胞）の用量は、少なくとも約 1×10^7 、 2×10^7 、 5×10^7 、
 1×10^8 、 2×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 又は 5×10^9 細
 胞を含む。一部の実施形態において、CAR細胞（例えば、CD19 CAR細胞）の用量
 は、最大約 1×10^7 、 2×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 5×10^8
 、 1×10^9 、 2×10^9 又は 5×10^9 細胞を含む。

10

【0812】

一部の実施形態において、活性化された免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞、NK
 細胞）を対象に投与し、その後、血液を再採取し（又はアフエーシスを実施し）、そ
 から免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞、NK細胞）を活性化し、これらの活性化及
 び増殖した免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞、NK細胞）を患者に再注入するこ
 とが望ましい場合がある。この過程を数週間毎に複数回実施できる。一部の実施形態におい
 て、免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞、NK細胞）は、 $10 \text{ cc} \sim 400 \text{ cc}$ の採
 血した血液から活性化することができる。一部の実施形態において、免疫エフェクター細
 胞（例えば、T細胞、NK細胞）は、 20 cc 、 30 cc 、 40 cc 、 50 cc 、 60 cc
 70 cc 、 80 cc 、 90 cc 又は 100 cc の採血した血液から活性化される。

20

【0813】

対象組成物の投与は、任意の簡便な方法により実施し得る。本明細書に記載の組成物は
 、経動脈的に、皮下に、皮内に、腫瘍内に、節内に、髄内に、筋肉内に、静脈内（i.v.
 ）注射により又は腹腔内に、例えば、皮内又は皮下注射により患者に投与し得る。免疫
 エフェクター細胞（例えば、T細胞、NK細胞）の組成物を、腫瘍、リンパ節又は感染部
 位に直接注射し得る。

30

【0814】

T細胞枯渇

一部の実施形態において、本明細書に開示される方法は、細胞（例えば、本明細書に記
 載されるような免疫エフェクター細胞）での処置後にT細胞枯渇剤を投与すること、それ
 により、CAR発現細胞（例えば、CD19 CAR発現細胞）を減少させる（例えば、枯
 渇させる）ことをさらに含む。そのようなT細胞枯渇剤は、CAR発現細胞（例えば、C
 D19 CAR発現細胞）を効果的に枯渇させて、毒性を緩和するために使用することがで
 きる。一部の実施形態において、CAR発現細胞は、本明細書に記載の方法に従って製造
 され、例えば、本明細書に記載の方法に従ってアッセイされた（例えば、トランスフェク
 ション若しくは形質導入の前又は後）。

40

【0815】

一部の実施形態において、T細胞枯渇剤は、本明細書に記載の細胞、例えば免疫エフェ
 クター細胞の集団の投与から1、2、3、4又は5週間後に投与される。

【0816】

一部の実施形態において、T細胞枯渇剤は、例えば、抗体依存性細胞媒介性細胞毒性（
 ADCC）及び/又は補体誘導性細胞死を誘発することにより、CAR発現細胞を枯渇さ
 せる薬剤である。例えば、本明細書に記載のCAR発現細胞は、細胞死、例えば、ADCC
 又は補体誘導性細胞死を誘発することができる分子により認識される抗原（例えば、標
 的抗原）も発現し得る。例えば、本明細書に記載のCAR発現細胞は、抗体又は抗体フラ
 グメントによりターゲティングされ得る標的タンパク質（例えば、受容体）も発現し得る

50

。このような標的タンパク質の例として、限定されないが、E p C A M、V E G F R、インテグリン（例えば、インテグリン 3、4、3 / 4 3、4 7、5 1、3、）、T N F 受容体スーパーファミリーのメンバー（例えば、T R A I L - R 1、T R A I L - R 2）、P D G F 受容体、インターフェロン受容体、葉酸受容体、G P N M B、I C A M - 1、H L A - D R、C E A、C A - 1 2 5、M U C 1、T A G - 7 2、I L - 6 受容体、5 T 4、G D 2、G D 3、C D 2、C D 3、C D 4、C D 5、C D 1 1、C D 1 1 a / L F A - 1、C D 1 5、C D 1 8 / I T G B 2、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 2、C D 2 3 / I g E 受容体、C D 2 5、C D 2 8、C D 3 0、C D 3 3、C D 3 8、C D 4 0、C D 4 1、C D 4 4、C D 5 1、C D 5 2、C D 6 2 L、C D 7 4、C D 8 0、C D 1 2 5、C D 1 4 7 / ベイシジン、C D 1 5 2 / C T L A - 4、C D 1 5 4 / C D 4 0 L、C D 1 9 5 / C C R 5、C D 3 1 9 / S L A M F 7 及び E G F R 並びにそれらの切断バージョン（例えば、1つ以上の細胞外エピトープを保持するが、細胞質ドメイン内の1つ以上の領域を欠くバージョン）が挙げられる。

10

【0817】

一部の実施形態において、C A R 発現細胞は、C A R 及び標的タンパク質を共発現し、例えば、天然で標的タンパク質を発現するか、又は標的タンパク質を発現するように操作される。例えば、細胞、例えば、免疫エフェクター細胞の集団は、C A R 核酸（例えば、本明細書に記載されるようなC A R 核酸）及び標的タンパク質をコードする核酸を含有する核酸（例えば、ベクター）を含み得る。

【0818】

一部の実施形態において、T細胞枯渇剤は、C D 5 2 阻害剤、例えば、抗C D 5 2 抗体分子、例えば、アレムツズマブである。

20

【0819】

他の実施形態において、細胞、例えば、免疫エフェクター細胞の集団は、本明細書に記載されるようなC A R 分子（例えば、C D 1 9 C A R）及びT細胞枯渇剤によって認識される標的タンパク質を発現する。一部の実施形態において、標的タンパク質はC D 2 0 である。標的タンパク質がC D 2 0 である実施形態において、T細胞枯渇剤は抗C D 2 0 抗体、例えば、リツキシマブである。

【0820】

前述の方法のいずれかのさらに別の実施形態において、本方法は、細胞、例えば造血幹細胞又は骨髄を哺乳動物に移植することをさらに含む。

30

【0821】

一部の実施形態において、本発明は、細胞移植前に哺乳動物をコンディショニングする方法を特徴とする。この方法は、哺乳動物に、C A R 核酸又はポリペプチド、例えば、C D 1 9 C A R 核酸又はポリペプチドを含む、有効量の細胞を投与することを含む。一部の実施形態において、細胞移植は、幹細胞移植、例えば、造血幹細胞移植又は骨髄移植である。他の実施形態において、細胞移植前に対象をコンディショニングすることは、対象における標的発現細胞、例えば、C D 1 9 発現正常細胞又はC D 1 9 発現癌細胞の数を減少させることを含む。

【0822】

投薬レジメン

一部の実施形態では、1用量の生存C A R 発現細胞（例えば、生存C D 1 9、B C M A、C D 2 0 若しくはC D 2 2 C A R 発現細胞）又は前記細胞を含む医薬組成物は、約 1×10^6 ~ 約 1×10^8 個（例えば、約 2×10^6 ~ 約 5×10^7 、約 5×10^6 ~ 約 2×10^7 、約 1×10^6 ~ 約 1×10^7 、約 1×10^7 ~ 約 1×10^8 、約 1×10^6 ~ 約 3×10^6 、約 2×10^6 ~ 約 4×10^6 、約 3×10^6 ~ 約 5×10^6 、約 4×10^6 ~ 約 6×10^6 、約 5×10^6 ~ 約 7×10^6 、約 6×10^6 ~ 約 8×10^6 、約 7×10^6 ~ 約 9×10^6 、約 8×10^6 ~ 約 1×10^7 、約 9×10^6 ~ 約 2×10^7 、約 1×10^7 ~ 約 3×10^7 、約 2×10^7 ~ 約 4×10^7 、約 3×10^7 ~ 約 5×10^7 、約 4×10^7 ~ 約 6×10^7 、約 5×10^7 ~ 約 7×10^7 、約 6×10^7 ~ 約 8×10^7 、約 7×10^7 ~ 約 9×10^7 、約 8×10^7 ~ 約 1×10^8 ）を含む。

40

50

約 1×10^7 、約 $7 \times 10^7 \sim 約 9 \times 10^7$ 、約 $8 \times 10^7 \sim 約 1 \times 10^8$ 、約 1×10^6 、約 2×10^6 、約 3×10^6 、約 4×10^6 、約 5×10^6 、約 6×10^6 、約 7×10^6 、約 8×10^6 、約 9×10^6 、約 1×10^7 、約 2×10^7 、約 3×10^7 、約 4×10^7 、約 5×10^7 、約 6×10^7 、約 7×10^7 、約 8×10^7 、約 9×10^7 又は約 1×10^8 個)のCAR陽性生存細胞(例えば、BCMA CAR+T細胞)を含む。一部の実施形態では、1用量の生存CAR発現細胞(例えば、生存CD19、BCMA、CD20又はCD22 CAR発現細胞)は、約 0.5×10^6 個の生存CAR発現細胞～約 1.25×10^9 個の生存CAR発現細胞(例えば、 0.5×10^6 個の生存CAR発現細胞～ 1.25×10^9 個の生存CAR発現細胞)を含む。一部の実施形態では、1用量の生存CAR発現細胞(例えば、生存CD19、BCMA、CD20又はCD22 CAR発現細胞)は、約 1×10^6 、約 2.5×10^6 、約 5×10^6 、約 1.25×10^7 、約 2.5×10^7 、約 5×10^7 、約 5.75×10^7 又は約 8×10^7 個の生存CAR発現細胞を含む。

【0823】

一部の実施形態では、用量の計算は、本明細書に記載されるように、形質導入(第3日(72h))後の第4日(96h)にフローサイトメリーによって測定される、BCMA-CAR+生存T細胞(例えば、単一陽性BCMA CAR細胞及び二重陽性BCMA+/CD19+CAR細胞)の数に基づいて行う。一部の実施形態では、生存CAR発現細胞(例えば、BCMA/CD19二重CAR T細胞産物)の1用量は、約 $5 \times 10^6 \sim 約 2 \times 10^7$ 個のCAR陽性生存細胞(例えば、BCMA CAR+T細胞)を含む。

【0824】

一部の実施形態では、1用量の生存CAR発現細胞(例えば、生存CD19、BCMA、CD20若しくはCD22 CAR発現細胞)又は前記細胞を含む医薬組成物は、1回以上(例えば、2、3、4回以上)の用量で対象に投与される。一部の実施形態では、細胞又は医薬組成物は、2回用量で対象に投与される。一部の実施形態では、1回以上の用量は、1回目用量及び2回目用量を含み、1回目用量中のCAR陽性生存細胞(例えば、BCMA CAR+T細胞)の数は、2回目用量中のCAR陽性生存細胞(例えば、BCMA CAR+T細胞)の数を超えるか、それと同じであるか又はそれを下回る。

【0825】

一部の実施形態では、1回以上の用量は、1回目用量及び2回目用量を含み、その場合

(a) 1回目用量は、約 $1 \times 10^6 \sim 約 1 \times 10^7$ 個(例えば、約 $2 \times 10^6 \sim 約 8 \times 10^6$ 、約 $4 \times 10^6 \sim 約 6 \times 10^6$ 、約 $1 \times 10^6 \sim 約 5 \times 10^6$ 、約 $5 \times 10^6 \sim 約 1 \times 10^7$ 、約 $1 \times 10^6 \sim 約 3 \times 10^6$ 、約 $2 \times 10^6 \sim 約 4 \times 10^6$ 、約 $3 \times 10^6 \sim 約 5 \times 10^6$ 、約 $4 \times 10^6 \sim 約 6 \times 10^6$ 、約 $5 \times 10^6 \sim 約 7 \times 10^6$ 、約 $6 \times 10^6 \sim 約 8 \times 10^6$ 、約 $7 \times 10^6 \sim 約 9 \times 10^6$ 、約 $8 \times 10^6 \sim 約 1 \times 10^7$ 、約 1×10^6 、約 2×10^6 、約 3×10^6 、約 4×10^6 、約 5×10^6 、約 6×10^6 、約 7×10^6 、約 8×10^6 、約 9×10^6 若しくは約 1×10^7 個)の生存CAR陽性細胞(例えば、BCMA CAR+T細胞)を含み；

(b) 2回目用量は、約 $1 \times 10^7 \sim 約 1 \times 10^8$ 個(例えば、約 $2 \times 10^7 \sim 約 8 \times 10^7$ 、約 $4 \times 10^7 \sim 約 6 \times 10^7$ 、約 $1 \times 10^7 \sim 約 5 \times 10^7$ 、約 $5 \times 10^7 \sim 約 1 \times 10^8$ 、約 $1 \times 10^7 \sim 約 3 \times 10^7$ 、約 $2 \times 10^7 \sim 約 4 \times 10^7$ 、約 $3 \times 10^7 \sim 約 5 \times 10^7$ 、約 $4 \times 10^7 \sim 約 6 \times 10^7$ 、約 $5 \times 10^7 \sim 約 7 \times 10^7$ 、約 $6 \times 10^7 \sim 約 8 \times 10^7$ 、約 $7 \times 10^7 \sim 約 9 \times 10^7$ 、約 $8 \times 10^7 \sim 約 1 \times 10^8$ 、約 1×10^7 、約 2×10^7 、約 3×10^7 、約 4×10^7 、約 5×10^7 、約 6×10^7 、約 7×10^7 、約 8×10^7 、約 9×10^7 若しくは約 1×10^8 個)のCAR陽性生存細胞(例えば、BCMA CAR+T細胞)を含み；

(c) 1回目用量中のCAR陽性生存細胞(例えば、BCMA CAR+T細胞)の数は、2回目用量中のCAR陽性(例えば、BCMA CAR+T細胞)の数の $1/X$ (ここで、Xは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60

、 70、80、90又は100である)以下であり;及び/又は

(d) 1回目用量中のCAR陽性生存細胞(例えば、BCMA CAR+T細胞)の数は、2回目用量中のCAR陽性生存細胞(例えば、BCMA CAR+T細胞)の数の約1%~約100%(例えば、約10%~約90%、約20%~約80%、約30%~約70%、約40%~約60%、約10%~約50%、約50%~約90%、約10%~約30%、約20%~約40%、約30%~約50%、約50%~約70%、約60%~約80%若しくは約70%~約90%)である。

【0826】

一部の実施形態において、1回目用量は、約 5×10^6 個の生存CAR陽性細胞(例えば、BCMA CAR+T細胞)を含む。一部の実施形態において、2回目用量は、約 1×10^7 ~約 2×10^7 個の生存CAR陽性細胞(例えば、BCMA CAR+T細胞)を含む。

10

【0827】

一部の実施形態において、CAR陽性細胞の用量は、後の投与で出発用量から増加され得る。例えば、患者は、約 1×10^6 ~約 1×10^7 個(例えば、約 5×10^6 個)の生存CAR陽性細胞の出発用量を受けることができ、また、約 1×10^7 ~約 1×10^8 個(例えば、約 1×10^7 ~約 2×10^7 個)のCAR陽性生存細胞(例えば、BCMA CAR+T細胞)の2回目用量を受けすることができる。

【0828】

患者の選択

20

対象を処置する方法又は本明細書に開示される使用のための組成物のいずれかの一部の実施形態では、対象は、癌、例えば血液癌を有する。一部の実施形態では、癌は、リンパ性白血病(CLL)、マンツル細胞リンパ腫(MCL)、多発性骨髄腫、急性リンパ性白血病(ALL)、ホジキンリンパ腫、B細胞急性リンパ性白血病(BALL)、T細胞急性リンパ性白血病(TALL)、小リンパ球性白血病(SLL)、B細胞前リンパ球性白血病、芽球性形質細胞様樹状細胞新生物、パーキットリンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)、慢性炎症を伴うDLBCL、慢性骨髄性白血病、骨髄増殖性腫瘍、濾胞性リンパ腫、小児性濾胞性リンパ腫、ヘアリー細胞白血病、小細胞型若しくは大細胞型濾胞性リンパ腫、悪性リンパ球増殖性病態、MALTリンパ腫(粘膜関連リンパ組織型節外性濾胞辺縁帯リンパ腫)、辺縁帯リンパ腫、骨髄形成異常、骨髄異形成症候群、非ホジキンリンパ腫、形質芽球性リンパ腫、形質細胞様樹状細胞新生物、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、脾辺縁帯リンパ腫、脾リンパ腫/白血病、脾臓びまん性赤脾髄小細胞型B細胞リンパ腫、ヘアリー細胞白血病-変異型、リンパ形質細胞性リンパ腫、H鎖病、プラズマ細胞骨髄腫、孤立性骨形質細胞腫、骨外性形質細胞腫、節性辺縁帯リンパ腫、小児性節性辺縁帯リンパ腫、原発性皮膚濾胞中心リンパ腫、リンパ腫様肉芽腫症、原発性縦隔(胸腺)大細胞型B細胞リンパ腫、血管内大細胞型B細胞リンパ腫、ALK+大細胞型B細胞リンパ腫、HHV8関連多中心性キャスルマン病に発生する大細胞型B細胞リンパ腫、原発性滲出性リンパ腫、B細胞リンパ腫、急性骨髄性白血病(AML)又は分類不能なリンパ腫から選択される。一部の実施形態では、癌は、再発及び/又は難治性癌である。

30

40

【0829】

対象を処置する方法又は本明細書に開示される使用のための組成物のいずれかの一部の実施形態では、対象は、CLL又はSLLを有する。一部の実施形態では、CLL又はSLLを有する対象は、以前、BTK阻害剤療法、例えばイブルチニブを少なくとも1~12ヶ月、例えば6カ月にわたって投与されている。一部の実施形態では、BTK阻害剤療法、例えばイブルチニブ療法は、第二選択療法である。一部の実施形態では、対象は、部分的応答を有したか、又はBTK阻害剤療法に対する応答が安定した疾患を有した。一部の実施形態では、対象は、BTK阻害剤療法に対して応答しなかった。一部の実施形態では、対象は、耐性を発生し、例えばイブルチニブ耐性突然変異を発生した。一部の実施形態では、イブルチニブ耐性突然変異は、BTKをコードする遺伝子及び/又はPLCG2

50

をコードする遺伝子の突然変異を含む。一部の実施形態では、対象は、成人、例えば少なくとも18歳である。

【0830】

対象を処置する方法又は本明細書に開示される使用のための組成物のいずれかの一部の実施形態では、対象は、DLBCL、例えば再発及び/又は難治性DLBCLを有する。一部の実施形態では、DLBCL、例えば再発及び/又は難治性DLBCLを有する対象は、以前、少なくとも2つの選択化学療法、例えば抗CD20療法及び/又はアントラリンに基づく化学療法を実施されている。一部の実施形態では、対象は、以前、幹細胞療法、例えば自己幹細胞療法を受けており、前記幹細胞療法に対して応答しなかった。一部の実施形態では、対象は、幹細胞療法、例えば自己幹細胞療法に適格ではない。一部の実施形態では、対象は、成人、例えば少なくとも18歳である。

10

【0831】

治療への適用

BCMA関連疾患及び/又は障害

一態様において、本発明は、BCMA発現に関連する疾患を処置する方法を提供する。一態様において、本発明は、腫瘍の一部がBCMA陰性であり、且つ腫瘍の一部がBCMA陽性である疾患を処置する方法を提供する。例えば、本発明のCARは、BCMAの発現増大に関連する疾患の処置を受けたことがある対象を処置するのに有用であり、その場合、BCMAの発現増大に関連する疾患の処置を受けたことがある対象は、BCMAの発現増大に関連する疾患を呈示する。いくつかの実施形態において、本発明のCARは、BCMAの発現に関連する疾患を受けたことがある対象を処置するに有用であり、その場合、BCMAの発現に関連する疾患の処置を受けたことがある対象は、BCMAの発現に関連する疾患を呈示する。

20

【0832】

一実施形態では、本発明は、BCMAが正常細胞及び癌細胞の両方に発現されるが、正常細胞ではより低いレベルで発現される疾患を処置する方法を提供する。一実施形態では、本方法は、BCMA CARがBCMAを発現する癌細胞に結合して、それらを殺傷することを可能にする親和性で結合するが、その場合、例えば、本明細書に記載のアッセイにより決定して、BCMAを発現する正常細胞の30%、25%、20%、15%、10%、5%以下が殺傷されるCARを選択するステップをさらに含む。例えば、Cr51 CTLに基づくフローサイトメリーなどの殺傷アッセイを使用することができる。一実施形態では、BCMA CARは、標的抗原に対して、 $10^{-4} M \sim 10^{-8} M$ 、例えば、 $10^{-5} M \sim 10^{-7} M$ 、例えば、 $10^{-6} M \sim 10^{-7} M$ の結合親和性KDを有する抗原結合ドメインを有する。一実施形態では、BCMA抗原結合ドメインは、参照抗体、例えば、本明細書に記載の抗体よりも少なくとも5倍、10倍、20倍、30倍、50倍、100倍又は1,000倍低い結合親和性を有する。

30

【0833】

一態様において、本発明は、哺乳動物免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞又はNK細胞における発現用のプロモーターと作動可能に連結されたBCMA CARを含むベクターに関する。一態様において、本発明は、BCMA発現腫瘍の処置に使用するための、BCMA CARを発現する組換え免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞又はNK細胞を提供し、ここで、BCMA CARを発現する組換え免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）は、BCMA CAR発現細胞（例えば、BCMA CART細胞又はBCMA CAR発現NK細胞）と呼ばれる。一態様において、BCMA CAR発現細胞（例えば、BCMA CART細胞又はBCMA CAR発現NK細胞）は、腫瘍細胞を、その表面に発現された本発明の少なくとも1つのBCMA CARと接触させ、それにより、BCMA CAR発現細胞（例えば、BCMA CART細胞又はBCMA CAR発現NK細胞）が、腫瘍細胞をターゲティングして、腫瘍の増殖が阻害されるようにすることができる。

40

【0834】

50

一態様において、本発明は、BCMA発現腫瘍細胞の増殖を阻害する方法に関し、これは、BCMA CAR発現細胞（例えば、BCMA CART又はBCMA CAR発現NK細胞）が、抗原に应答して活性化されて、癌細胞をターゲティングするように、本発明のBCMA CAR発現細胞（例えば、BCMA CART又はBCMA CAR発現NK細胞）と腫瘍細胞を接触させるステップを含み、腫瘍の増殖が阻害される。

【0835】

一態様において、本発明は、対象の癌を処置する方法に関する。本方法は、本発明のBCMA CAR発現細胞（例えば、BCMA CART又はBCMA CAR発現NK細胞）を対象に投与し、それにより対象の癌を処置するステップを含む。本発明のBCMA CAR発現細胞（例えば、BCMA CART又はBCMA CAR発現NK細胞）により処置が可能な癌の一例は、BCMAの発現に関連する癌である。

10

【0836】

本発明は、キメラ抗原受容体（CAR）を発現するように、免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）が、遺伝的に修飾され、且つBCMA CAR発現細胞（例えば、BCMA CART又はBCMA CAR発現NK細胞）が、それを必要とするレシピエントに注入される、1タイプの細胞療法を含む。注入される細胞は、レシピエント中の腫瘍細胞を殺傷することができる。抗体療法とは違い、CAR修飾細胞、例えば、T細胞若しくはNK細胞は、インビボで複製することができ、それにより持続的な腫瘍制御を達成し得る長期持続を可能にする。様々な態様において、患者に投与された細胞（例えば、T細胞若しくはNK細胞）又はその子孫は、患者への細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）の投与後少なくとも4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月、12ヶ月、13ヶ月、14ヶ月、15ヶ月、16ヶ月、17ヶ月、18ヶ月、19ヶ月、20ヶ月、21ヶ月、22ヶ月、23ヶ月、2年、3年、4年若しくは5年にわたって持続する。

20

【0837】

本発明は、キメラ抗原受容体（CAR）を一過性発現するように、免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）が、例えば、インビトロ転写RNAにより修飾され、且つ免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）が、それを必要とするレシピエントに注入される、1タイプの細胞療法も含む。注入される細胞は、レシピエント中の腫瘍細胞を殺傷することができる。従って、様々な態様において、患者に投与された免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）は、患者への免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）の投与後1ヶ月未満、例えば3週間、2週間、1週間にわたって存在する。

30

【0838】

理論に縛られることは意図しないが、CAR修飾免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）により誘発される抗腫瘍免疫応答は、能動若しくは受動免疫であり得るか、又は代わりに直接対間接免疫応答によるものであり得ると考えられる。一態様において、CAR形質導入免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）は、BCMAを発現するヒト癌細胞に应答して特異的炎症性サイトカイン分泌及び強力な細胞溶解反応を呈示し、可溶性BCMA阻害に抵抗し、バスタンダー殺傷を媒介すると共に、定着したヒト腫瘍の退縮を媒介する。例えば、BCMA発現腫瘍の不均質領域内の低抗原腫瘍細胞は、隣接する抗原陽性癌細胞に対して以前反応したBCMA再指向免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）による間接的破壊を被りやすくなり得る。

40

【0839】

一態様において、本発明の完全ヒトCAR修飾免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）は、エキスピボ免疫化及び/又は哺乳動物におけるインビボ療法のためのワクチンの1タイプであり得る。一態様では、哺乳動物は、ヒトである。

【0840】

エキスピボ免疫化に関して、下記事項の少なくとも1つは、哺乳動物への細胞の投与前にインビトロで行われる：i)細胞の増殖、ii)CARをコードする核酸の細胞への導

50

入又はi i i)細胞の凍結保存。

【0841】

エクスピボ手順は、当技術分野で公知であり、以下により詳細に論じられる。手短には、哺乳動物(例えば、ヒト)から細胞を単離し、本明細書に開示されるCARを発現するベクターで遺伝子修飾(即ち、インビトロで形質導入又はトランスフェクト)する。治療利益を付与するために、CAR修飾細胞を哺乳動物レシピエントに投与することができる。哺乳動物レシピエントは、ヒトであり、CAR修飾細胞は、レシピエントに関して、自己由来であり得る。代わりに、細胞は、レシピエントに関して、同種異系、同種又は異種であり得る。

【0842】

造血幹細胞及び前駆細胞のエクスピボ増殖の手順は、本明細書に参照により組み込まれる米国特許第5,199,942号明細書に記載されており、これを本発明の細胞に適用することができる。他の好適な方法は、当技術分野で公知であり、本発明は、いずれか特定のエクスピボ細胞増殖に限定されない。手短には、T細胞のエクスピボ培養及び増殖は、以下を含む:(1)末梢血採取物又は骨髓外植片からの哺乳動物由来のCD34+造血幹細胞及び前駆細胞を収集するステップ;及び(2)こうした細胞をエクスピボで増殖するステップ。米国特許第5,199,942号明細書に記載されている細胞増殖因子に加えて、flt3-L、IL-1、IL-3及びc-kitリガンドなどの他の因子を細胞の培養及び増殖に使用することもできる。

【0843】

エクスピボ免疫に関して細胞ワクチンの使用に加えて、本発明は、患者の抗原に対する免疫応答を誘発する目的でのインビボ免疫化のための組成物及び方法も提供する。

【0844】

一般に、本明細書に記載されるように活性化及び増殖された細胞は、免疫無防備状態にある個体に発生する疾患の処置及び予防に使用することができる。例えば、本発明のCAR修飾免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞又はNK細胞)をBCMAの発現に関連する疾患、障害及び病態の処置に使用する。いくつかの態様では、本発明の細胞を、BCMAの発現に関連する疾患、障害及び病態を発生するリスクがある患者の処置に使用する。このように、本発明は、BCMAの発現に関連する疾患、障害及び病態の処置又は予防方法を提供し、これは、治療有効量の本発明のCAR修飾免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞又はNK細胞)を、それを必要とする対象に投与するステップを含む。

【0845】

一態様では、癌若しくは悪性疾患などの増殖性疾患又は骨髓形成異常、骨髓異形成症候群若しくは前白血病などの前癌状態を処置するために、本発明のCAR発現細胞(例えば、CAR-T細胞又はCAR発現NK細胞)を用いることができる。一態様では、癌は、血液癌である。血液癌病態は、白血病並びに血液、骨髓及びリンパ系を冒す悪性リンパ増殖性疾患などの癌のタイプである。一態様では、血液癌は、白血病又は血液学的癌である。BCMAに関連する疾患又は障害の1例は、多発性骨髓腫(MMとしても知られる)である(Claudio et al., Blood, 2002, 100(6):2175-86;及びNovak et al., Blood, 2004, 103(2):689-94を参照されたい)。プラズマ細胞骨髓腫又はケーラー病(Kahler's disease)としても知られる多発性骨髓腫は、骨髓中の異常又は悪性血漿B細胞の蓄積を特徴とする癌である。多くの場合、癌細胞は、隣接する骨に侵入し、骨格構造を破壊し、その結果、骨痛及び骨折を引き起こす。骨髓腫のほとんどのケースは、パラプロテイン(また、Mタンパク質又は骨髓腫タンパク質としても知られる)の産生も特徴とし、これは、悪性プラズマ細胞のクローン増殖により過剰に産生される異常な免疫グロブリンである。国際骨髓腫ワーキンググループ(International Myeloma Working Group)(IMWG)(Kyle et al.(2009), Leukemia, 23:3-9を参照)の診断基準によれば、30g/L超の血清中パラプロテイン濃度が多発性骨髓腫の徴候である。多発性骨髓腫の他の症状又は兆候としては、腎機能

10

20

30

40

50

低下又は腎不全、骨病変、貧血、高カルシウム血症及び神経学的症状が挙げられる。

【0846】

他のプラズマ細胞増殖障害から多発性骨髄腫を識別する基準は、国際骨髄腫ワーキンググループ (K y l e e t a l . (2 0 0 9) , L e u k e m i a . 2 3 : 3 - 9 を参照) により確立されている。下記基準の3つ全てを満たさなければならない：

- クローン骨髄腫プラズマ細胞 10%
- 血清及び/又は尿モノクローナルタンパク質の存在 (真性非分泌型多発性骨髄腫患者の場合を除く)
- 基礎的なプラズマ細胞増殖障害に起因する末端器官障害のエビデンス、具体的には、下記のもの：

- ・高カルシウム血症：血清カルシウム 11.5 mg / 100 ml
- ・腎不全：血清クレアチニン 1.73 mmol / l
- ・貧血：ヘモグロビン値が、正常の下限より > 2 g / 100 ml 低いか、又はヘモグロビン値 < 10 g / 100 ml である、正色素性、正赤血球性。
- ・骨病変：溶解性病変、重症骨粗鬆症又は病的骨折。

【0847】

本明細書に記載される組成物及び方法により処置することができる他のプラズマ細胞増殖障害として、限定されないが、無症候性骨髄腫 (くすぶり型多発性骨髄腫又は無症候性骨髄腫)、意義不明の単クローン性 グロブリン血症 (M G U S)、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、形質細胞腫 (例えば、形質細胞異常増殖症、孤立性骨髄腫、孤立性形質細胞腫、髄外性形質細胞腫及び多発性形質細胞腫)、全身性アミロイド軽鎖アミロイドーシス並びに P O E M S 症候群 (クロウ・深瀬症候群、高月病及び P E P 症候群としても知られている) が挙げられる。

【0848】

多発性骨髄腫の病期分類には2つの病期分類システムが使用される：国際病期分類システム (I n t e r n a t i o n a l S t a g i n g S y s t e m) (I S S) (G r e i p p e t a l . (2 0 0 5) , J . C l i n . O n c o l . 2 3 (1 5) : 3 4 1 2 - 3 4 2 0 を参照) 及び D u r i e - S a l m o n 病期分類システム (D S S) (D u r i e e t a l . (1 9 7 5) , C a n c e r 3 6 (3) : 8 4 2 - 8 5 4 を参照)。

【0849】

多発性骨髄腫の第3の病期分類システムは、改訂版国際病期分類システム (R e v i s e d I n t e r n a t i o n a l S t a g i n g S y s t e m) (R - I S S) (参照により本明細書に組み込まれる、P a l u m b o A , A v e t - L o i s e a u H , O l i v a S , e t a l . J o u r n a l o f c l i n i c a l o n c o l o g y : o f f i c i a l j o u r n a l o f t h e A m e r i c a n S o c i e t y o f C l i n i c a l O n c o l o g y 2 0 1 5 ; 3 3 : 2 8 6 3 - 9 を参照されたい)。R - I S S ステージ I は、I S S ステージ I (血清 2 - ミクログロブリン濃度 < 3.5 mg / L 及び血清アルブミン濃度 3.5 g / d L)、高リスク C A [d e l (1 7 p) 及び/又は t (4 ; 1 4) 及び/又は t (1 4 ; 1 6)] なし並びに正常 LDH レベル (正常範囲の上限を下回る) を含む。R - I S S ステージ I I I は、I S S ステージ I I I (血清 2 - ミクログロブリン濃度 > 5.5 mg / L) 及び高リスク C A 又は高 LDH レベルを含む。R - I S S ステージ I I は、考えられる他の組み合わせを含む。

【0850】

患者の応答は、K u m a r S , P a i v a B , A n d e r s o n K C , e t a l . I n t e r n a t i o n a l M y e l o m a W o r k i n g G r o u p c o n s e n s u s c r i t e r i a f o r r e s p o n s e a n d m i n i m a l r e s i d u a l d i s e a s e a s s e s s m e n t i n m u l t i p l e m y e l o m a . T h e L a n c e t O n c o l o g y ; 1 7 (8) : e 3 2 8

10

20

30

40

50

- e 3 4 6 (参照により本明細書に組み込まれる) に開示されているように、 I M W G 2 0 1 6 基準に基づいて決定することができる。

【 0 8 5 1 】

多発性骨髄腫及び関連疾患の標準的な処置は、化学療法、幹細胞移植 (自家又は同種異系)、放射線療法及び他の薬物療法が挙げられる。よく使用される抗骨髄腫薬としては、アルキル化剤 (例えば、ベンダムスチン、シクロホスファミド及びメルファラン)、プロテアソーム阻害剤 (例えば、ボルテゾミブ)、コルチコステロイド (例えば、デキサメタゾン及びプレドニゾン) 並びに免疫調節薬 (例えば、タリドミド及びレナリドミド若しくはレプリミド (登録商標)) 又はそれらの任意の組み合わせが挙げられる。また、バイホスホネート (b i p h o s p h o n a t e) 薬も、骨量減少を予防するために、標準的な抗 M M 治療薬と組み合わせて投与されることが多い。65 ~ 70 歳超の患者は、幹細胞移植の候補となる可能性が低い。いくつかの事例では、最初の移植片に対して応答が最適ではない 60 歳未満の患者の場合、二重自家幹細胞移植が選択肢となる。本発明の組成物及び方法は、多発性骨髄腫について現在処方される治療薬のいずれかと組み合わせて投与され得る。

10

【 0 8 5 2 】

B C M A に関連する疾患又は障害の別の例は、ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫である (C h i u e t a l . , B l o o d . 2 0 0 7 , 1 0 9 (2) : 7 2 9 - 3 9 ; H e e t a l . , J I m m u n o l . 2 0 0 4 , 1 7 2 (5) : 3 2 6 8 - 7 9 を参照されたい)。

20

【 0 8 5 3 】

ホジキン病としても知られるホジキンリンパ腫 (H L) は、白血球又はリンパ球に起因するリンパ系の癌である。リンパ腫を含む異常な細胞は、リード - スタンバーグ (R e e d - S t e r n b e r g) 細胞を含む。ホジキンリンパ腫では、癌は 1 リンパ節から別のリンパ節に伝播する。ホジキンリンパ腫は、リード - スタンバーグ細胞の形態及びリード - スタンバーグ細胞周辺の細胞組成 (リンパ節生検により決定して) に基づいて、4 つの病理学的サブタイプに細分することができる : 結節性硬化型 H L、混合細胞型サブタイプ、リンパ球豊富型又はリンパ球優位型、リンパ球減少型。いくつかのホジキンリンパ腫は、結節型リンパ球優位型ホジキンリンパ腫又は特定不能でもあり得る。ホジキンリンパ腫の症状及び兆候としては、頸部、脇の下若しくは股間のリンパ節の痛みのない腫大、発熱、寝汗、体重減少、疲労、痒み又は腹痛が挙げられる。

30

【 0 8 5 4 】

非ホジキンリンパ腫 (N H L) は、ホジキンリンパ腫以外のあらゆるタイプのリンパ腫を含む多様な血液癌の群を含む。非ホジキンリンパ腫のサブタイプは、主として、細胞形態、染色体異常及び表面マーカーにより分類される。NHL サブタイプ (又は NHL 関連癌) としては、B 細胞リンパ腫、例えば、限定されないが、パーキットリンパ腫、B 細胞慢性リンパ球性白血病 (B - C L L)、B 細胞前リンパ球性白血病 (B - P L L)、慢性リンパ球性白血病 (C L L)、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (D L B C L) (例えば、血管内大細胞型 B 細胞リンパ腫及び縦隔原発 B 細胞リンパ腫)、濾胞性リンパ腫 (例えば、濾胞中心リンパ腫、小切れ込み核細胞型濾胞性)、ヘアリー細胞白血病、高悪性度 B 細胞リンパ腫 (パーキットリンパ腫)、リンパ形質細胞性リンパ腫 (ワルデンストレームマクログロブリン血症)、マントル細胞リンパ腫、辺縁帯 B 細胞リンパ腫 (例えば、節外辺縁帯 B 細胞リンパ腫若しくは粘膜関連リンパ組織 (M A L T) リンパ腫、節性辺縁帯 B 細胞リンパ腫及び脾辺縁帯 B 細胞リンパ腫)、形質細胞腫 / 骨髄腫、前駆 B 細胞リンパ芽球性白血病 / リンパ腫 (P B - L B L / L)、原発性中枢神経系 (C N S) リンパ腫、原発性眼内リンパ腫、小リンパ球性リンパ腫 (S L L) ; 並びに T 細胞リンパ腫、例えば、限定されないが、未分化大細胞リンパ腫 (A L C L)、成人 T 細胞リンパ腫 / 白血病 (例えば、くすぶり型、慢性、急性及びリンパ腫性)、血管中心性リンパ腫、血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫、皮膚 T 細胞リンパ腫 (例えば、菌状息肉症、セザリー症候群など)、節外性ナチュラルキラー / T 細胞リンパ腫 (鼻型)、腸症型腸管 T 細胞リンパ腫、大顆粒リ

40

50

ンパ腫白血球、前駆T細胞リンパ芽球性リンパ腫/白血病(T-LBL/L)、T細胞慢性リンパ球性白血病/前リンパ球性白血病(T-CLL/PLL)及び特定不能な末梢性T細胞リンパ腫が挙げられる。ホジキンリンパ腫の症状及び兆候としては、頸部、脇の下若しくは股間のリンパ節の痛みのない腫大、発熱、寝汗、体重減少、疲労、痒み、腹痛、咳又は胸の痛みが挙げられる。

【0855】

病期分類は、ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫の両方について同じであり、身体内の癌細胞の伝播の程度を指す。ステージIでは、リンパ腫細胞は、1つのリンパ節群内にある。ステージIIでは、リンパ腫細胞は、少なくとも2つのリンパ節群内にあるが、両方の群は、横隔膜の同じ側にあるか、又は組織若しくは器官の1部分内にあり、その器官付近のリンパ節は、横隔膜の同じ側にある。ステージIIIでは、リンパ腫細胞は、横隔膜の両側のリンパ節内、又はこれらのリンパ節群付近の組織若しくは器官の1つの部分内、又は脾臓内にある。ステージIVでは、リンパ腫細胞は、少なくとも1つの器官若しくは組織の複数の部分内に見出されるか、又はリンパ腫細胞は、横隔膜の反対側の器官及びリンパ節内にある。ローマ数字の病期分類表示のほかに、A、B、E及びSの文字で病期を表すこともでき、ここで、Aは、症状のない患者を指し、Bは、症状を有する患者を指し、Eは、リンパ腫がリンパ系外部の組織に認められる患者を指し、Sは、リンパ腫が脾臓内に認められる患者を指す。

10

【0856】

ホジキンリンパ腫は、一般に、放射線療法、化学療法又は造血幹細胞移植によって処置される。非ホジキンリンパ腫の最も一般的な治療法は、R-CHOPであり、これは、4つの異なる化学療法薬(シクロホスファミド、ドキシソルピシン、ビンクリスチン及びプレドニゾロン)とリツキシマブ(Rituxan(登録商標))からなる。NHLを処置するために一般に使用される他の療法としては、他の化学療法薬、放射線療法、造血幹細胞移植(自家若しくは同種骨髄移植)又は生物学的療法、例えば、免疫療法が挙げられる。生物学的治療薬の他の例として、限定されないが、リツキシマブ(Rituxan(登録商標))、トシツモマブ(Bexxar(登録商標))、エプラツマブ(Lymphocide(登録商標))及びアレムツズマブ(MabCampath(登録商標))が挙げられる。本発明の組成物及び方法は、ホジキンリンパ腫又は非ホジキンリンパ腫について現在処方されている治療薬のいずれかと組み合わせ投与され得る。

20

30

【0857】

BCMA発現は、リンパ形質細胞性リンパ腫(LPL)としても知られるワルデンシュトレームマクログロブリン血症(WM)とも関連している。(Elsawa et al., Blood, 2006, 107(7): 2882-8を参照)。ワルデンシュトレームマクログロブリン血症は、以前多発性骨髄腫に関連すると考えられていたが、近年になって、非ホジキンリンパ腫のサブタイプとして分類された。WMは、制御されないB細胞リンパ腫増殖を特徴とし、その結果、貧血及び過剰量のパラプロテイン、即ち免疫グロブリンM(IgM)の産生が起こり、これは、血液の粘度を高くし、その結果、過粘稠度症候群を引き起こす。WMの他の症状及び兆候としては、熱、寝汗、疲労、貧血、体重減少、リンパ節腫脹又は脾腫、かすみ目、眩暈、鼻血、歯肉出血、異常な打撲傷、腎障害若しくは不全、アミロイドーシス又は末梢神経障害が挙げられる。

40

【0858】

WMの標準的な治療は、化学療法からなり、具体的にはリツキシマブ(Rituxan(登録商標))を用いる。他の化学療法薬を組み合わせ使用し得、例えばクロラムブシル(Leukeran(登録商標))、シクロホスファミド(Neosar(登録商標))、フルダラビン(Fludara(登録商標))、クラドリピン(Leustatin(登録商標))、ビンクリスチン及び/又はタリドミドが挙げられる。また、コルチコステロイド、例えばプレドニゾンを化学療法と組み合わせ投与し得る。プラスマフェレーシス、即ち血漿交換も、血液からパラプロテインを除去することによりいくつかの症状を改善するために、患者の処置全体を通して一般に使用される。いくつかの事例では、幹細胞

50

移植が一部の患者の選択肢となる。

【0859】

BCMAに関連する疾患又は障害の別の例は、脳腫瘍である。具体的には、BCMAの発現は、星細胞腫又は膠芽腫に関連している(Deshayes et al, Oncogene. 2004, 23(17):3005-12, Pelekanou et al., PLoS One. 2013, 8(12):e83250を参照)。星細胞腫は、脳のグリア細胞の1種である星細胞から発生する腫瘍である。膠芽腫(多発性膠芽腫又はGBMとしても知られる)は、星細胞腫の最も悪性形態であり、脳腫瘍の最も進行したステージ(ステージIV)と考えられる。膠芽腫には2つの変異型:巨細胞性膠芽腫と膠肉腫がある。他の星細胞腫としては、若年性毛様細胞性星細胞腫(JPA)、線維性星細胞腫、多形黄色星細胞腫(PXA)、胚芽異形成性神経上皮腫瘍(DNET)及び退形成性星細胞腫(AA)が挙げられる。

10

【0860】

膠芽腫又は星細胞腫に関連する症状若しくは兆候としては、脳圧の上昇、頭痛、てんかん発作、記憶喪失、挙動の変化、身体片側の運動又は感覚の消失、言語障害、認知障害、視覚障害、吐気、嘔吐及び腕又は脚の虚弱が挙げられる。

【0861】

腫瘍の外科的除去(又は切除)は、正常な周辺の脳を損傷せずに又は最小限の損傷で可能な限り多くの神経膠腫を除去するための標準的な処置である。手術後に、残留する癌細胞又は周囲病巣からの疾患再生を抑制し、且つ緩徐にするために、放射線療法及び/又は化学療法も往々にして使用される。放射線療法は、全脳放射線療法(従来 of 外部照射)、標的三次元原体照射及び標的放射線核種を含む。膠芽腫を処置するために一般に使用される化学療法薬としては、テモゾロミド、ゲフィチニブ又はエルロチニブ及びシスプラチンが挙げられる。また、ペバシズマブ(Avastin(登録商標))などの血管新生阻害剤も、一般的に放射線療法及び/又は化学療法と併用される。

20

【0862】

さらに、神経症状を軽減し、神経機能を改善するために、支持療法もよく使用され、本明細書に記載の癌療法のいずれかと組み合わせて投与される。主な支持療法薬としては、抗痙攣薬及びコルチコステロイドが挙げられる。従って、本発明の組成物及び方法は、膠芽腫又は星細胞腫を処置するための標準的若しくは支持療法のいずれかと組み合わせて使用され得る。

30

【0863】

BCMA発現に関連する非癌関連疾患及び障害も、本明細書に記載の組成物及び方法によって処置することができる。BCMA発現に関連する非癌関連疾患及び障害の例として、限定されないが、ウイルス感染症;例えば、HIV、真菌感染症、例えば、C.ネオフォルマンズ(C. neoformans);過敏性腸疾患;潰瘍性大腸炎;及び粘膜免疫に関連する障害が挙げられる。

【0864】

本発明のCAR修飾免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞又はNK細胞)は、単独で或いは希釈剤及び/又はIL-2若しくは他のサイトカインなどの他の成分若しくは細胞集団と組み合わせて投与され得る。

40

【0865】

本発明は、癌を処置するための組成物及び方法を提供する。一態様において、癌は、血液癌であり、そうしたものとして、白血病又はリンパ腫である血液癌が挙げられる。一態様では、本発明のCAR発現細胞(例えば、CAR-T細胞若しくはCAR発現NK細胞)は、癌及び悪性疾患を処置するために使用することができ、そうしたものとして、限定されないが、例えば、B細胞急性リンパ性白血病(「BALL」)、T細胞急性リンパ性白血病(「TALL」)、急性リンパ性白血病(ALL)などの急性白血病;限定されないが、例えば、慢性骨髄性白血病(CML)、慢性リンパ球性白血病(CLL)などの1つ以上の慢性白血病;限定されないが、例えば、B細胞前リンパ球性白血病、芽球性形質細

50

胞様樹状細胞新生物、パーキットリンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、ヘアリー細胞白血病、小細胞型又は大細胞型濾胞性リンパ腫、悪性リンパ球増殖性疾患、MALTリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、多発性骨髄腫、骨髄形成異常及び骨髄異形成症候群、非ホジキンリンパ腫、形質芽球性リンパ腫、形質細胞様樹状細胞新生物、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症などの別の血液癌又は血液病態並びに骨髄性血液細胞の不十分な生産（又は異形成）で一致する血液病態の多様な集合体である「前白血病」などが挙げられる。さらには、BCMA発現に関連する疾患として、限定されないが、例えば、BCMAを発現する、非定型及び/若しくは非古典的癌、悪性疾患、前癌状態又は増殖性疾患が挙げられる。

【0866】

10

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される組成物を用いて、限定されないが、形質細胞増殖異常症、例えば、無症候性骨髄腫（くすぶり型多発性骨髄腫又は無症候性骨髄腫）、意義不明の単クローン性グロブリン血症（MGUS）、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、形質細胞腫（例えば、形質細胞異常増殖症、孤立性骨髄腫、孤立性形質細胞腫、髄外性形質細胞腫及び多発性形質細胞腫）、全身性アミロイド軽鎖アミロイドーシス並びにPOEMS症候群（クロー・深瀬症候群、高月病及びPEP症候群としても知られる）を含む疾患を処置することができる。

【0867】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される組成物を用いて、限定されないが、癌、例えば、本明細書に記載の癌、例えば、前立腺癌（例えば、去勢抵抗性若しくは治療抵抗性前立腺癌又は転移性前立腺癌）、膵臓癌又は肺癌が挙げられる。

20

【0868】

本発明は、BCMA発現細胞集団の増殖を阻害又は低減する方法も提供し、本方法は、BCMA発現細胞を含む細胞の集団を、BCMA発現細胞に結合する本発明の抗BCMACAR発現細胞（例えば、BCMACART細胞若しくはBCMACAR発現NK細胞）と接触させるステップを含む。特定の態様において、本発明は、BCMAを発現する癌細胞の増殖を阻害するか、又はその集団を低減する方法を提供し、本方法は、BCMA発現癌細胞の集団を、BCMA発現細胞に結合する本発明の抗BCMACAR発現細胞（例えば、BCMACART細胞若しくはBCMACAR発現NK細胞）と接触させるステップを含む。一態様では、本発明は、BCMAを発現する癌細胞の増殖を阻害するか、又はその集団を低減する方法を提供し、本方法は、BCMA発現癌細胞の集団を、BCMA発現細胞に結合する本発明の抗BCMACAR発現細胞（例えば、BCMACART細胞若しくはBCMACAR発現NK細胞）と接触させるステップを含む。いくつかの態様では、本発明の抗BCMACAR発現細胞（例えば、BCMACART細胞若しくはBCMACAR発現NK細胞）は、骨髄性白血病若しくはBCMA発現細胞に関連する別の癌を有する対象又はそのための動物モデルにおける細胞及び/又は癌細胞の量、数、量若しくはパーセンテージを、陰性対照と比べて、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも65%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも95%若しくは少なくとも99%低減する。一態様では、対象は、ヒトである。

30

40

【0869】

本発明は、BCMA発現細胞に関連する疾患（例えば、BCMAを発現する血液癌又は非定型癌）を予防、処置及び/又は管理する方法も提供し、本方法は、BCMA発現細胞に結合する本発明の抗BCMACAR発現細胞（例えば、BCMACART細胞若しくはBCMACAR発現NK細胞）を、必要とする対象に投与するステップを含む。一態様では、対象はヒトである。BCMA発現細胞に関連する障害の非限定的な例として、ウイルス又は真菌感染症及び粘膜免疫に関連する障害が挙げられる。

【0870】

本発明は、BCMA発現細胞に関連する疾患を予防、処置及び/又は管理する方法も提供し、本方法は、BCMA発現細胞に結合する本発明の抗BCMACAR発現細胞（例

50

例えば、BCMA CAR T細胞若しくはBCMA CAR 発現NK細胞)を、必要とする対象に投与するステップを含む。一態様では、対象はヒトである。

【0871】

本発明は、BCMA 発現細胞に関連する癌の再発を予防する方法を提供し、本方法は、BCMA 発現細胞に結合する本発明の抗BCMA CAR 発現細胞(例えば、BCMA CAR T細胞若しくはBCMA CAR 発現NK細胞)を、必要とする対象に投与するステップを含む。一態様では、本方法は、有効量の別の治療薬と組み合わせて、BCMA 発現細胞に結合する本明細書に記載の抗BCMA CAR 発現細胞(例えば、BCMA CAR T細胞若しくはBCMA CAR 発現NK細胞)を有効量で、必要とする対象に投与するステップを含む。

10

【0872】

併用療法

本明細書に記載されるCAR 発現細胞は、他の公知の薬剤及び治療法と組み合わせて使用することができる。本明細書に記載されるCAR 発現細胞と、少なくとも1つの別の治療薬とを同じ又は個別の組成物中で同時に又は順次投与することができる。順次投与する場合、本明細書に記載のCAR 発現細胞を最初に投与し、別の薬剤を2番目に投与することができるか、又は投与の順序を逆にし得る。CAR 療法及び/若しくは他の治療薬、手順又はモダリティは、活動性疾患の期間中又は寛解若しくは低活動性疾患の期間中に投与することができる。CAR 療法は、他の処置前、それと同時、処置後又は疾患の寛解中に投与することができる。組み合わせて投与する場合、CAR 療法及び/又は追加の薬剤(例えば、第2若しくは第3薬剤)又は全部を、各薬剤が個別に、例えば、単剤療法として使用される量若しくは用量よりも高いか、低いか若しくはそれと同じ量で投与することができる。一部の実施形態では、CAR 療法、追加の薬剤(例えば、第2若しくは第3薬剤)又は全部の投与量若しくは用量は、各薬剤が個別に、例えば、単剤療法として使用される量若しくは用量よりも(例えば、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%若しくは少なくとも50%)低い。他の実施形態では、所望の効果(例えば、癌の治療)をもたらす、CAR 療法、追加の薬剤(例えば、第2若しくは第3薬剤)又は全部の投与量若しくは用量は、同じ治療効果を達成するのに必要な、各薬剤が個別に、例えば、単剤療法として使用される量若しくは用量よりも(例えば、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%若しくは少なくとも50%)低い。別の態様では、本明細書に記載のCAR 発現細胞は、手術、化学療法、放射線、免疫抑制剤と組み合わせた処置レジメンに使用され得る。本明細書に記載のCAR 発現細胞と併用することができる例示的な薬剤及び治療法は、国際公開第2016164731号パンフレット(その全体が、参照により本明細書に組み込まれる)の第266~313頁に開示されている。

20

30

【0873】

CAR 有効性を評価するためのバイオマーカー

一部の実施形態では、対象(例えば、癌、例えば血液癌を有する対象)において、CAR 発現細胞療法(例えば、CD19若しくはBCMA CAR 療法)の有効性を評価又はモニターする方法が本明細書に開示される。この方法は、CAR 療法に対する有効性の値を取得することを含み、ここで、前記値は、CAR 発現細胞療法の有効性又は適合性を示す。

40

【0874】

複数の実施形態では、CLL若しくはSLLを有する対象におけるCAR 療法に対する有効性の値は、下記パラメーターの1つ、2つ、3つ若しくは全部の尺度を含む：

(i) サンプル(例えば、アフレーシスサンプル若しくは製造されたCAR 発現細胞産物サンプル)中のBTKをコードする遺伝子の突然変異；

(ii) サンプル(例えば、アフレーシスサンプル若しくは製造されたCAR 発現細胞産物サンプル)中のPLCg2をコードする遺伝子の突然変異；

(iii) サンプル(例えば、対象からのアフレーシスサンプル若しくは腫瘍サンプル)中の；例えばCD8、CD4、CD3、CD5、CD19、CD20、CD22、CD

50

43、CD79b、CD27、CD45RO、CD45RA、CCR7、CD95、Lag3、PD-1、Tim-3及び/若しくはCD81のレベル及び/若しくは活性により評価される；又は免疫グロブリンディープシーケンシングにより評価されるような微小残存病変；又は

(iv) サンプル、例えば対象からのアフレーシスサンプル中の、IFN-g、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-15、TNF-a、IP-10、MCP1、MIP1aから選択される1、2、3、4、5、6、7、8、9、10若しくは全部のレベル又は活性。

【0875】

複数の実施形態では、DLBCL、例えば再発及び/又は難治性DLBCLを有する対象のCAR療法に対する有効性の値は、下記パラメーターの1つ又は両方の尺度を含む：

(i) サンプル（例えば、対象からのアフレーシスサンプル若しくは腫瘍サンプル）中の；例えばCD8、CD4、CAR19、CD3、CD27、CD45RO、CD45RA、CCR7、CD95、Lag3、PD-1及び/若しくはTim-3のレベル及び/若しくは活性により評価される；又は免疫グロブリンディープシーケンシングにより評価されるような微小残存病変；又は

(ii) サンプル（例えば、対象からアフレーシスサンプル）中の、IFN-g、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-15、TNF-a、IP-10、MCP1、MIP1aから選択される1、2、3、4、5、6、7、8、9、10若しくは全部のレベル又は活性。

【0876】

他の実施形態では、CAR療法に対する有効性の値は、下記パラメーターの1、2、3、4、5、6つ若しくはそれを超える（全部）の尺度をさらに含む：

(i) サンプル（例えば、アフレーシスサンプル若しくは製造されたCAR発現細胞産物サンプル）中の、休止TEFF細胞、休止TREG細胞、より若いT細胞（例えば、ナイーブT細胞（例えば、ナイーブCD4若しくはCD8 T細胞、ナイーブ / T細胞）、若しくはステムメモリーT細胞（例えば、ステムメモリーCD4若しくはCD8 T細胞若しくはステムメモリー / T細胞）、若しくは早期メモリーT細胞又はそれらの組み合わせの1、2、3つ若しくはそれを超えるもの（例えば、全部）のレベル又は活性；

(ii) サンプル（例えば、アフレーシスサンプル若しくは製造されたCAR発現細胞産物サンプル）中の、活性化TEFF細胞、活性化TREG細胞、より経時的なT細胞（例えば、より経時的なCD4若しくはCD8細胞）若しくは後期メモリーT細胞又はそれらの組み合わせの1、2、3つ若しくはそれを超えるもの（例えば、全部）のレベル又は活性；

(iii) サンプル（例えば、アフレーシスサンプル若しくは製造されたCAR発現細胞産物サンプル）中の、免疫細胞疲弊マーカー、例えば1、2つ若しくはそれを超えるものの免疫チェックポイント阻害因子（例えば、PD-1、PD-L1、TIM-3、TIGIT及び/又はLAG-3）のレベル又は活性。一部の実施形態において、免疫細胞は、疲弊表現型を有し、例えば少なくとも2つの疲弊マーカー、例えばPD-1及びTIM-3を同時発現する。他の実施形態では、免疫細胞は、疲弊表現型を有し、例えば少なくとも2つの疲弊マーカー、例えばPD-1及びLAG-3を同時発現する；

(iv) サンプル（例えば、アフレーシスサンプル若しくは製造されたCAR発現細胞産物サンプル）中の、例えばCD4+若しくはCD8+ T細胞集団における、CD27及び/又はCD45RO-（例えば、CD27+CD45RO-）免疫エフェクター細胞のレベル又は活性；

(v) CCL20、IL-17a、IL-6、PD-1、PD-L1、LAG-3、TIM-3、CD57、CD27、CD122、CD62L、KLRG1から選択されるバイオマーカーの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11若しくは全部のレベル又は活性；

10

20

30

40

50

(v i) C A R 発現細胞産物サンプル、例えば C L L - 1 発現細胞産物サンプル中のサイトカインレベル又は活性（例えば、サイトカインレパトアの品質）；又は

(v i i) 製造された C A R 発現細胞産物サンプル中の C A R 発現細胞の形質導入効率。

【 0 8 7 7 】

本明細書に開示される方法のいずれかの一部の実施形態において、C A R 発現細胞療法は、複数の C A R 発現免疫エフェクター細胞（例えば、その集団）、例えば複数の T 細胞若しくは N K 細胞（例えば、その集団）又はそれらの組み合わせを含む。一部の実施形態において、C A R 発現細胞療法は、C D 1 9 C A R 療法である。

【 0 8 7 8 】

本明細書に開示される方法のいずれかの一部の実施形態において、本明細書に開示される 1 つ以上のパラメーターの尺度は、対象から得たアフエーシスサンプルから取得される。アフエーシスサンプルは、注入又は再注入前に評価することができる。

【 0 8 7 9 】

本明細書に開示される方法のいずれかの一部の実施形態において、本明細書に開示される 1 つ以上のパラメーターの尺度は、対象から得た腫瘍サンプルから取得される。

【 0 8 8 0 】

本明細書に開示される方法のいずれかの一部の実施形態において、本明細書に開示される 1 つ以上のパラメーターの尺度は、製造された C A R 発現細胞産物サンプル、例えば C D 1 9 C A R 発現細胞産物サンプルから取得される。製造された C A R 発現細胞産物は、注入又は再注入前に評価することができる。

【 0 8 8 1 】

本明細書に開示される方法のいずれかの一部の実施形態において、対象は、C A R 発現細胞療法を受ける前、療法の過程で又はそれを受けた後に評価される。

【 0 8 8 2 】

本明細書に開示される方法のいずれかの一部の実施形態において、本明細書に開示される 1 つ以上のパラメーターの尺度により、1 つ以上の遺伝子発現、フローサイトメトリー又はタンパク質発現についてのプロフィールを評価する。

【 0 8 8 3 】

本明細書に開示される方法のいずれかの一部の実施形態において、本方法は、本明細書に開示される 1 つ以上のパラメーターの尺度に基づいて、対象を応答者、非応答者、再発者又は非再発者として識別することをさらに含む。

【 0 8 8 4 】

本明細書に開示される方法のいずれかの一部の実施形態において、応答者、例えば完全応答者は、参照値、例えば C D 8 + T 細胞の非応答者パーセンテージと比べて、高い、例えば統計的に有意に高いパーセンテージの C D 8 + T 細胞を有するか又は有する者として識別される。

【 0 8 8 5 】

本明細書に開示される方法のいずれかの一部の実施形態において、応答者、例えば完全応答者は、参照値、例えば C D 2 7 + C D 4 5 R O - 免疫エフェクター細胞の非応答者数と比べて、例えば C D 8 + 集団において、高いパーセンテージの C D 2 7 + C D 4 5 R O - 免疫エフェクター細胞を有するか又は有する者として識別される。

【 0 8 8 6 】

本明細書に開示される方法のいずれかの一部の実施形態において、応答者、例えば完全応答者若しくは部分応答者は、参照値、例えば C D 4 + T 細胞の非応答者パーセンテージと比べて、高い、例えば統計的に有意に高いパーセンテージの C D 4 + T 細胞を有するか又は有する者として識別される。

【 0 8 8 7 】

本明細書に開示される方法のいずれかの一部の実施形態において、応答者、例えば完全応答者は、参照値、例えば休止 T E F F 細胞、休止 T R E G 細胞、より若い T 細胞若しくは早期メモリー T 細胞の非応答者数と比べて、増加したパーセンテージで休止 T E F F 細

10

20

30

40

50

胞、休止 T_{REG} 細胞、より若い T 細胞若しくは早期メモリー T 細胞又はそれらの組み合わせの 1、2、3 つ若しくはそれを超えるもの（例えば、全部）を有するか又は有する者として識別される。

【0888】

本明細書に開示される方法のいずれかの一部の実施形態において、非応答者は、参照値、例えば活性化 T_{EFF} 細胞、活性化 T_{REG} 細胞、より経時的な T 細胞（例えば、より経時的な CD 4 若しくは CD 8 細胞）又は後期メモリー T 細胞の応答者数と比べて、増加したパーセンテージで、活性化 T_{EFF} 細胞、活性化 T_{REG} 細胞、より経時的な T 細胞（例えば、より経時的な CD 4 若しくは CD 8 細胞）若しくは後期メモリー T 細胞又はそれらの組み合わせの 1、2、3 つ若しくはそれを超えるもの（例えば、全部）を有するか又は有する者として識別される。

10

【0889】

本明細書に開示される方法のいずれかの一部の実施形態において、非応答者は、より高いパーセンテージの免疫細胞疲弊マーカー、例えば 1、2 つ又はそれを超える免疫チェックポイント阻害因子（例えば、PD - 1、PD - L 1、TIM - 3、TIGIT 及び / 若しくはLAG - 3）を有するか又は有する者として識別される。一部の実施形態では、非応答者は、応答者からの PD - 1 若しくはLAG - 3 発現免疫エフェクター細胞パーセンテージと比べて、増加したパーセンテージの PD - 1、PD - L 1 若しくはLAG - 3 発現免疫エフェクター細胞（例えば、CD 4 + T 細胞及び / 若しくはCD 8 + T 細胞）（例えば、CAR 発現 CD 4 + T 細胞及び / 若しくはCD 8 + T 細胞）を有するか又は有する者として識別される。

20

【0890】

一部の実施形態では、非応答者は、より高いパーセンテージで、疲弊表現型を有する免疫細胞、例えば少なくとも 2 つの疲弊マーカーを同時発現する、例えば PD - 1、PD - L 1 及び / 若しくはTIM - 3 を同時発現する免疫細胞を有するか又は有する者として識別される。他の実施形態では、非応答者は、より高いパーセンテージで、疲弊表現型を有する免疫細胞、例えば少なくとも 2 つの疲弊マーカーを同時発現する、例えば PD - 1 及びLAG - 3 を同時発現する免疫細胞を有するか又は有する者として識別される。

【0891】

本明細書に開示される方法のいずれかの一部の実施形態において、非応答者は、CAR 発現細胞療法に対する応答者（例えば、完全応答者）と比べて、増加したパーセンテージで、CAR 発現細胞集団（例えば、CLL - 1 CAR + 細胞集団）中に PD - 1 / PD - L 1 + / LAG - 3 + 細胞を有するか又は有する者として識別される。

30

【0892】

本明細書に開示される方法のいずれかの一部の実施形態において、応答者（例えば、完全又は部分応答者）は、下記プロフィールの 1、2、3 つ若しくはそれを超えるもの（又は全部）を有する：

(i) 参照値、例えば CD 27 + 免疫エフェクター細胞の非応答者数と比べて、高い数の CD 27 + 免疫エフェクター細胞を有する；

(ii) 参照値、例えば CD 8 + T 細胞の非応答者数と比べて、高い数の CD 8 + T 細胞を有する；

40

(iii) 参照値、例えば 1 つ以上のチェックポイント阻害因子を発現する細胞の非応答者数と比べて、少数の、1 つ以上のチェックポイント阻害因子、例えば PD - 1、PD - L 1、LAG - 3、TIM - 3 若しくはKLRG - 1 又はそれらの組み合わせから選択されるチェックポイント阻害因子を発現する免疫細胞を有する；又は

(iv) 参照値、例えば休止 T_{EFF} 細胞、休止 T_{REG} 細胞、ナイーブ CD 4 細胞、非刺激メモリー T 細胞若しくは早期メモリー T 細胞の非応答者数と比べて、高い数で、休止 T_{EFF} 細胞、休止 T_{REG} 細胞、ナイーブ CD 4 細胞、非刺激メモリー T 細胞若しくは早期メモリー T 細胞又はそれらの組み合わせの 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ若しくはそれを超えるもの（全部）を有する。

50

【0893】

複数の実施形態では、本明細書の方法によって特定された応答者、非応答者、再発者又は非再発者である対象は、臨床基準に従ってさらに評価することができる。例えば、完全応答者は、疾患、例えば癌を有するか又は有する者で、処置に対して完全応答、例えば完全寛解を呈示する対象として識別される。完全応答は、例えば、NCCN Guidelines (登録商標) 又はその全体が参照により本明細書に組み込まれる Hallek Met al., Blood (2018) 131: 2745 - 2760 "iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL," に開示される通りの International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (iwCLL) 2018 を用いて識別され得る。部分応答者は、疾患、例えば癌を有するか又は有する者で、処置に対して部分応答、例えば部分寛解を呈示する対象として識別される。部分応答は、例えば、NCCN Guidelines (登録商標) 又は本明細書に記載される通りの iwCLL 2018 基準を用いて識別され得る。非応答者は、疾患、例えば癌を有するか又は有する者として識別され、その対象は、処置に対して応答を呈示せず、例えば、患者は、安定又は進行性疾患を有する。非応答者は、例えば、NCCN Guidelines (登録商標) 又は本明細書に記載される通りの iwCLL 2018 基準を用いて識別され得る。

10

【0894】

上記に代わり又は本明細書に開示の方法と組み合わせ、前記の値に応答して、以下のステップの1つ、2つ、3つ、4つ若しくはそれを超えるものを実施する：

例えば、応答者又は非応答者に、CAR発現細胞療法を投与する；

変更された用量設定のCAR発現細胞療法を投与する；

CAR発現細胞療法のスケジュール又はタイムコースを変更する；

例えば、非応答者又は部分応答者に、CAR発現細胞療法と組み合わせ、追加薬剤、例えばチェックポイント阻害因子、例えば本明細書に記載のチェックポイント阻害因子を投与する；

非応答者又は部分応答者に、CAR発現細胞療法による処置前に対象中の若いT細胞の数を増加させる療法を実施する；

例えば、非応答者又は部分応答者として識別された対象の場合、CAR発現細胞療法の製造プロセスを改変する、例えばCARをコードする核酸の導入前に若いT細胞を濃縮するか又は形質導入効率を高める；

例えば、非応答者若しくは部分応答者又は再発者の場合、代替療法を実施する；又は

対象が、非応答者又は再発者であるか又はそれとして識別される場合、例えばCD25 枯渴、シクロホスファミド、抗GITR抗体の投与の1つ以上又はそれらの組み合わせにより、TREG細胞集団及び/又はTREG遺伝子シグネチャーを低減する。

【実施例】

【0895】

本発明を、次の実験的实施例を参照してさらに詳細に記載する。これらの実施例は、説明のみを目的として提供し、特に断らない限り限定を意図しない。従って、本発明は、決して次の実施例に限定されると解釈してはならず、むしろ本明細書に提供する教示の結果として明らかとなる任意且つ全ての変形形態を含むと解釈すべきである。

【0896】

実施例1：ヒトBCMA CARのインビトロ特性決定

1セットの完全ヒト一本鎖可変フラグメント(scFv)を、CD3 鎖及び4-1B B刺激分子：R1B6、R1F2、R1G5、PI61、B61-10、B61-02、Hy03及びHy52を含むレンチウイルスCAR発現ベクターにクローニングした。初めに、自動化細胞リポーターアッセイを用いて、これらの構築物をスクリーニングした後、初代T細胞での発現並びにBCMA発現(「BCMA+」又は「BCMA陽性」)標的

30

40

50

に应答するエフェクターT細胞应答(「BCMA CAR T」又は「BCMA CAR T細胞」)の量及び質に基づく最適クローンの選択を実施した。エフェクターT細胞应答として、限定されないが、細胞拡大、増殖、倍加、サイトカイン産生及び標的細胞殺傷又は細胞溶解活性(脱顆粒)が挙げられる。

【0897】

BCMA CARレンチウイルスの作製

前述したscFvコード化レンチウイルストランスファーベクターを全て使用して、VSVg偽型レンチウイルス粒子にパッケージングされたゲノム物質を生成した。CARをコードするレンチウイルストランスファーベクターDNAを、3つのパッケージング成分：VSVg、gag/pol及びrevをリポフェクタミン試薬と組み合わせて混合して、Lenti-X 293T細胞(Clontech)をトランスフェクトした後、12~18h後に培地を取り換えた。培地の交換から30時間後、培地を収集し、濾過し、-80で保存した。

【0898】

自動化システムを用いたBCMA CAR JNL及びJNLスクリーニングリポーターアッセイ

リポーターアッセイのために、96ウェルプレートにおいて、自動化された小規模様式で、2つの異なる細胞密度(40,000細胞(1xH293)又は80,000細胞(2xH293))のHEK293細胞中でBCMA CARをコードするレンチウイルスを作製し、この場合、トランスフェクションから48h後にウイルス含有上清を回収し、凍結せずに、Jurkat T細胞リポーター細胞株の形質導入のために新鮮な状態で使用した。Jurkat NFATルシフェラーゼ(JNL)リポーター細胞株は、急性T細胞白血病株Jurkatを基材とする。この細胞株を、活性化T細胞の核内因子(NFAT)应答エレメントの制御下でルシフェラーゼを発現するように修飾した。BCMA CARでの形質導入のために、96ウェルプレートの10,000JNL細胞/ウェルを50µlの新鮮な、45µmの濾過済ウイルス含有上清で形質導入した。プレートを5日間培養した後、標的細胞と共培養した。

【0899】

BCMA CARが、JNL細胞を活性化する機能的能力を評価するために、それらを標的癌細胞と、様々なエフェクター：標的細胞比(E:T比)で共培養して、ルシフェラーゼ発現を定量することにより、その活性化を読み出した。scFvベースのCAR R1B6、R1F2、R1G5、PI61、B61-10、B61-02、Hy03及びHy52を評価した。CD19 JNL CAR細胞を標的的特異的対照として使用し、標的細胞を含まない培地のみを陰性対照として使用した。

【0900】

前述した5日間形質導入JNL CAR細胞を、BCMA陽性多発性骨髄腫(MM)細胞株KMS11と一緒に、又はBCMA陰性対照として使用されるNALM6(急性リンパ性白血病細胞株)と一緒に共培養した。残ったJNL CART細胞を、BCMA CAR発現についてフローサイトメトリーにより評価した。共培養物を384ウェルプレート内に4:1、1:1及び0.5:1のエフェクター：標的(E:T)比でセットアップし、24hインキュベートした後、活性化JNL CART細胞によるルシフェラーゼの発現をBright-Glo(商標)Luciferase Assay System(Promega, Madison, WI)により定量した。各ウェルからの放射された光の量(ルミネセンス)は、それぞれのCARによるJNL活性化の直接読み出しである。ルミネセンスのレベルが、UTD細胞の2倍以上であれば、JNL細胞は活性化されているとみなした。BCMA+KMS11細胞株は、R1B6、R1F2、R1G5、PI61、B61-10、B61-02、Hy03及びHy52を発現するJNL細胞の活性化をもたらした(図1A及び1C)。BCMA CARのいずれも、BCMA陰性株NALM6による活性化を示さなかった(図1E及び1F)。標的細胞を含まない培地単独では、試験したCAR形質導入JNLのいずれも活性化しなかった(図1G及び1H)。F

10

20

30

40

50

A C S 解析により、形質導入 J N L 中の B C M A - C A R 発現が様々な程度まで検出されたことが実証された；C A R % は、ほとんどの活性 J N L C A R T において K M S 1 1 による J N L 活性化と概して正に相関する（図 1 B 及び 1 D）。

【 0 9 0 1 】

B C M A C A R T 細胞の作製

次の 8 つの C A R を初代 T 細胞における C A R 発現、安定性及び有効性の分析のために選択した：R 1 B 6、R 1 F 2、R 1 G 5、P I 6 1、B 6 1 - 1 0、B 6 1 - 0 2、H y 0 3 及び H y 5 2。健康なアフレーシス済ドナー（その T 細胞（C D 4 + 及び C D 8 + リンパ球）を C D 3 + T 細胞についてのネガティブ選択により取得した）からの血液で開始することにより、B C M A C A R T 細胞を作製した。これらの細胞を、T 細胞培地（R P M I 1 6 4 0、1 0 % 熱不活性化ウシ胎仔血清（F C S）、2 m M L - グルタミン、1 x ペニシリン/ストレプトマイシン、1 0 0 μ M 非必須アミノ酸、1 m M ピルビン酸ナトリウム、1 0 m M H e p e s 及び 5 5 μ M 2 - メルカプトエタノール）中に、C D 3 / C D 2 8 ビーズ（D y n a b e a d s（登録商標）H u m a n T - E x p a n d e r C D 3 / C D 2 8, T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c）を 1 : 3（T 細胞：ビーズ）の比で添加することにより活性化した。3 7 ° C、5 % C O 2 にて、2 4 ウェルプレートのウェル当たり 1 m L 培地中 0.5×10^6 T 細胞で T 細胞を培養した。2 4 時間後、T 細胞をプラスト処理し、T 細胞を 5 の感染多重度（M O I）で B C M A C A R ウイルスにより形質導入した。T 細胞は対数増殖パターンで分裂を開始し、これを、1 m L 当たりの細胞数を測定することによりモニターし、2 日毎に T 細胞を新鮮な培地で希釈し、脱ビーズした後、第 9 日にさらなる分析のために採取した。T 細胞のアリコート染色して、F A C S F o r t e s s a（B D）で第 5 及び 9 日にフローサイトメトリーにより C A R 発現を測定した。B C M A C A R T 細胞は全て、研究グレード（即ち、臨床グレードではない）製造条件下で生産した。

【 0 9 0 2 】

B C M A - C A R 表面発現及びその安定性は、r B C M A _ F c - A F 6 4 7 染色細胞のフローサイトメトリー解析を用いて、第 5 及び 9 日に C A R % 及び M F I（平均蛍光強度）を測定することにより評価した（図 2 及び表 2 7）。第 9 日の最終産物における B C M A C A R 発現は、1 8 % ~ 4 2 . 4 % の範囲で構築物毎に異なり、M F I は、6 7 2 ~ 5 2 3 8 であった。P A L L A S 由来のクローン R 1 F 2、R 1 B 6 及び R 1 G 5 並びにハイブリドマクローン、H y 0 3 からの構築物は、第 5 日 ~ 第 9 日までに約 3 0 % ~ 5 0 % の C A R 喪失を示したのに対し、P I 6 1、B 6 1 - 1 0 及び - 0 2 並びに H y 5 2 は、C A R 発現のパーセンテージに関して比較的安定していたが、全ての C A R 構築物が、第 5 日 ~ 第 9 日までに M F I の減少を示し、これは、恐らく、第 9 日にその休止期にある T 細胞のサイズが小さかったためであろう。C A R T 細胞培養物の細胞数は、非形質導入 T 細胞（「U T D」）と比べると、細胞が正常に増殖する能力に対して、B C M A C A R を担持するヒト s c F v の検出可能なマイナスの作用がないことを示した。

【 0 9 0 3 】

10

20

30

40

50

【表 101】

表 27. CAR 発現の分析

CAR 構築物	力価	T細胞上のCAR%		T細胞上のCAR MFI	
		第5日	第9日	第5日	第9日
R1B6	2.68E+08	40.0	27.4	24,420	2,367
R1F2	3.60E+08	48.8	22.7	4,716	672
R1G5	2.27E+08	52.0	30.7	29,113	5,238
PI61	1.71E+08	47.4	42.3	24,360	2,099
B61-10	7.06E+07	41.1	30.3	27,298	3,288
B61-02	8.16E+07	33.5	23.6	29,113	3,471
Hy03	4.96E+07	33.7	18.1	9,463	929
Hy52	7.03E+07	35.1	36.1	33,694	2,859

10

【0904】

BCMA CAR再指向T細胞の機能性の評価

20

BCMA CAR-T細胞の機能的能力を評価するために、BCMA-陽性及び-陰性癌細胞株と一緒に共培養物をセットアップした。CAR-T細胞を解凍し、計数した後、標的細胞と一緒に共培養して、それらの殺傷能力及びサイトカインの分泌の読み出しを行った。BCMA CAR-クローンR1B6、R1F2、R1G5、PI61、B61-10、B61-02、Hy03及びHy52を試験した。非形質導入T細胞(「UTD」)を非ターゲティングT細胞対照として使用した。

【0905】

CART細胞をKMS11-Luc及びNALM6-Luc標的細胞と、様々なE:T比で20時間共培養することにより、CART細胞殺傷を実施した。CART細胞集団を同等パーセンテージのCAR陽性細胞に対して正規化した後、平板培養した。Mesoscale Discovery(MSD;Gaithersburg,MD)を用いて、2.5:1のエフェクター:標的比でのCAR-T細胞の20時間共培養物からの上清中で、サイトカインIFN- γ を測定し、既知標準を用いて、各サイトカインについての結果を算出した。アッセイは全て、単一のドナー細胞源から2回繰り返して実施した。殺傷データは、BCMA CARクローンが、KMS11癌細胞を有効に殺傷することを示している(図3A)。対照標的細胞NALM6は、これらのBCMA特異的CARのいずれによっても殺傷されなかった(図3B)。KMS11と一緒に培養したとき、これらのCARがIFN- γ を産生する能力も試験した(図3C)。BCMA CAR R1F2、R1G5及びPI61は、産生された最高量のIFN- γ をもたらした。対照NALM6細胞に対する曝露後のBCMA CARTにより産生されたサイトカインのレベルは低かった(図3C)が、これは、BCMA CARによる非特異的な活性化がなかったことを示している。

30

40

【0906】

結論

CAR-T細胞に関して、新しいBCMA結合scFvを試験した。JNLリポーターアッセイ並びに初代T細胞において8つのCARをアッセイした:R1B6、R1F2、R1G5、B61-02、B61-10、PI61、Hy03及びHy52。8つのCAR-T細胞は全て、標的特異的殺傷を示した。R1F2、R1G5又はPI61を発現するT細胞は、標的細胞の存在下で最高量のIFN- γ を産生した。全体として、初代T細胞へのBCMA CARの移入は、抗BCMA CAR反応性を誘導したが、オフターゲ

50

ット機能は誘導しなかった。

【0907】

実施例2：二重CAR発現及び抗BCMA及び抗CD二重CARのインビトロ活性

2つの完全CAR（キメラ抗原受容体）鎖（一方はBCMAを、他方はCD19を指向する）を含む1セットのバイシストロン構築物をレンチウイルスベクター中で操作した（表28）。CAR発現は、EF1プロモーターにより駆動する。このようなCARは、BCMAをターゲティングする1セットのヒト一本鎖可変フラグメント（scFv）（duBCMA.4、PI61、R1G5及びR1B6）を含む。CD19をターゲティングする同じヒト化scFvを全ての構築物で操作した。各scFvのN末端で、CD8由来のシグナルペプチドは、CARを分泌経路にターゲティングさせる。このようなシグナルペプチドは、同時翻訳的に切断されるため、細胞表面に展示されるCARの成熟形態には存在しないと予想される。各scFvのC末端では、CD8のヒンジ及び膜貫通ドメインが4-1BBの細胞内ドメインに、続いてCD3の細胞内ドメインに融合される。2つのCARの間で、より正確には、第1CD3ドメインの最後のアミノ酸と、続くCARのシグナルペプチドの間で、リンカー（GS（配列番号206））、続いてブタテシオウイルス-1 2A由来の2A自己切断ペプチド（即ち、P2A配列）が操作される。他のリンカー及び/又は自己切断ペプチドも同様に使用することができる。この設計は、単一のmRNA転写物から、2つの独立したCARの発現を可能にする。2つのCARの間の重複領域（シグナルペプチド、ヒンジ、膜貫通ドメイン、4-1BB及びCD3）をコードするDNA配列は、組換えの可能性を最小限にするために、互いに異なっている。

10

20

【0908】

【表102】

表28. 構築物のまとめ。

構築物番号	説明
234	duCD19.1-duBCMA.4
235	duBCMA.4-duCD19.1
236	R1G5-duCD19.1
237	R1B6-duCD19.1
238	PI61-duCD19.1
244	モノ-duCD19.1
245	モノ-duBCMA.4

30

【0909】

構築物を用いて、ベクター物質を作製し、それを用いて、ヒト初代T細胞を感染させた。CAR発現をフローサイトメトリーにより評価した。BCMA発現（「BCMA+」又は「BCMA陽性」）及びCD19+腫瘍標的に応答するエフェクターT細胞応答（「BCMA-CD19二重CAR」又は「T細胞」）の量及び質も測定した。エフェクターT細胞応答として、限定されないが、細胞拡大、増殖、倍加、サイトカイン産生及び標的細胞殺傷又は細胞溶解活性（脱顆粒）が挙げられる。

40

【0910】

レンチウイルスの生産及び力価決定

前述した二重BCMA/CD19CARをコードする5つの構築物を使用して、VSVG偽型レンチウイルス粒子にパッケージングされたゲノム物質を生成した。2つの構築物を対照として使用した：一方は、BCMAに対するモノCARをコードし（duBCMA

50

．4)、また他方は、CD19に対するモノCARをコードする。7つの構築物は全て、同じプラスミドバックボーン中で操作した。これらDNAの各々を、リポフェクタミン試薬と組み合わせた3つのパッケージング成分VSVg、gag/pol及びrevと混合して、Lenti-X 293T細胞(Clonotech)をトランスフェクトした後、12～18h後に培地を取り換えた。培地の交換から30分後、培地を収集し、濾過してから、-80℃で保存した。

【0911】

組換えヒトAlexa-647-Fcタグ付けBCMAタンパク質(BCMA-Fc)及び抗ID-duCD19.1抗体(PE)を用いて、形質導入Sup-T1細胞上でのBCMA-CD19二重CARの表面発現を評価することにより、レンチウイルス力価を決定した。Sup-T1細胞は、1:3の出発希釈率を用いたウイルス上清の3段階希釈物で形質導入した。4日後、CAR(CAR+細胞)を発現する細胞のパーセンテージを評価した。下記の式：

10

$$(\% \text{CAR}+) \times (\# \text{接種された Sup-T1 細胞}) \times (\text{希釈率}) / (\text{ウイルスの量 (mL)})$$

に従って、上流CAR陽性又は二重陽性CAR集団のいずれかを用いて、ウイルス力価を算出した。

【0912】

ウイルス力価は、5～25%CAR+細胞をもたらす線形範囲内の最も中央の希釈点から計算した(表29)。

20

【0913】

【表103】

表29. supT1 力価。

構築物番号	上流CARのCAR+ (a) に基づく	二重+ CAR (b) に基づく
234	5.39E+07	1.91E+07
235	4.41E+08	1.15E+08
236	2.14E+08	1.17E+08
237	1.97E+08	8.51E+07
238	1.85E+08	5.66E+07

30

通常の10日生産プロセスを用いたBCMA-CD19 CAR T細胞の作製

【0914】

従来の10日生産プロセスを用いたBCMA-CD19 CART細胞の作製

健康なアフレーシス済ドナーからの血液の処理時に、Prodigyを用いたネガティブ選択又はポジティブ選択により取得したヒト初代T細胞(CD4+及びCD8+リンパ球)を用いて、BCMA-CD19二重又はモノBCMA若しくはモノCD19 CART細胞を作製した。形質導入前に、これらのT細胞を、T細胞培地(RPMI1640、10%熱不活性化ウシ胎仔血清(FCS)、2mM L-グルタミン、1xペニシリン/ストレプトマイシン、100µM非必須アミノ酸、1mMピルビン酸ナトリウム、10mM HEPES及び55µM 2-メルカプトエタノール)中に、CD3/CD28ビーズ(Dynabeads(登録商標)Human T-Expander CD3/CD28, Thermo Fisher Scientific)を1:3(T細胞:ビーズ)の比で添加することにより活性化した。37℃、5%CO₂にて、24ウェルプレート中ウェル当たり0.5x10⁶/mL培地の密度で細胞を培養した。24時間後、T細胞をプラスト処理し、それらを、上流CAR力価に基づく5の感染多重度(MOI)で、ウイルスにより形質導入した。T細胞は対数増殖パターンで分裂を開始し、これを、1mL

40

50

当たりの細胞数を測定することによりモニターし、2日毎にT細胞を新鮮な培地で希釈し、脱ビーズした後、細胞のサイズに応じて、第8日又はそれ以降にさらなる分析のために採取した。T細胞のアリコートを染色して、FACS Fortessa (BD)で第7又は8日にフローサイトメトリーによりCAR発現を測定した。

【0915】

BCMA-CAR及びCD19-CAR表面発現は、rBCMA₁-Fc-AF647及び抗ID-duCD19.1(PE)染色細胞のフローサイトメトリー解析を用いて、第8日にCAR%及びMFI(平均蛍光強度)を測定することにより評価した(図4A~4C)。R1G5、R1B6又はPI61は、類似するパーセンテージの二重陽性CAR(約10%)をもたらし、構築物236(R1G5/duCD19.1)は、BCMA及びCD19-CARについて最も高いMFIレベルを示した(図4A)。モノduCD19.1(構築物244)は、様々な構築物でCAR19について最も高いMFIレベルを示した(図4B)。

10

【0916】

インビトロ及びインビボでの二重BCMA-CD19-CAR再指向D8-T細胞産物の機能性の評価

二重BCMA-CD19-CART細胞内のCAR各々の抗腫瘍効力を評価するために、BCMA陽性(KMS11)、CD19陽性(NALM6)及びBCMA/CD19陰性癌細胞株(CD19KO;NALM6由来)と一緒に共培養物をセットアップした。CART細胞を解凍し、計数した後、標的細胞と一緒に共培養して、それらの殺傷能力及びサイトカインの分泌の読み出しを行った。非形質導入T細胞(UTD)を非ターゲティングT細胞対照として使用した。

20

【0917】

CART細胞を、ルシフェラーゼを発現する標的細胞と一緒に、様々なE:T比で20時間共培養することにより、インビトロ細胞毒性アッセイを実施した。CART細胞集団は、平板培養前に、それぞれの腫瘍に指向されたCARに応じて(即ち、CARTをKMS11細胞と共培養したときのBCMA-CARに基づく正規化;及びCARTをNALM6と共培養したときのCAR19に基づく正規化)、同等パーセンテージのCAR陽性細胞に対して正規化した。Meso Scale Discovery(MSD;Gaithersburg,MD)を用いて、1.25:1~2.5:1の標的比に対応する20時間共培養物からの上清中で、サイトカインIFN γ を測定した。既知標準を用いて、結果をpg/mL単位で算出した。アッセイは全て、ドナー細胞の単一供給源から2回繰り返して実施した。殺傷データは、全ての二重CARクローンが、BCMA-陽性KMS11細胞及びCD19陽性NALM6細胞に対して有効であることを示している(それぞれ図5A及び5B)。バックグラウンド殺傷は、BCMA/CD19陰性腫瘍細胞に対してのみ観察された(図5C)。KMS11又はNALM6と一緒に培養したとき、これらの二重CARがIFN γ を産生する能力は、2つの異なるE:T比を用いて評価して、同様であった(図6A~6D)。

30

【0918】

これらのD8-CARTのインビボ抗腫瘍活性を、NSGマウスにおける混合異種移植腫瘍モデル(5%NALM6及び95%KMS11)を用いて分析した。

40

【0919】

活性化高速製造(ARM)プロセスを用いた第1日抗BCMA-CD19二重CARTの生産及び測定

一部の実施形態において、このARMプロセスは、凍結された又は新鮮な白血球アフェレーシス産物から出発する。計数及びQCのためのサンプルを取得した後、産物をセルソーティング機(例えば、取り付けられたCliniMACS Prodig装置キット)に付着させて、プログラムを開始する。細胞を洗浄し、所望の表面マーカー、例えば、CD4及びCD8などに結合するマイクロビーズと一緒にインキュベートする。細胞を磁気カラムに通過させることにより、ビーズ標識した細胞を選択する。単離した細胞を再度洗

50

浄してから、分離バッファーを細胞培地と交換する。次に、単離したT細胞を培養するか、又は後の使用のために凍結保存する。単離したT細胞の純度は、フローサイトメトリー評価によるQCステップを通過するであろう。凍結保存した細胞を解凍し、予熱した細胞培地中で洗浄してから、細胞培地中に再懸濁させる。新鮮な細胞を培地に直接添加する。細胞を $0.4 \sim 1.2 \times 10^6$ 細胞/cm²膜で、膜バイオリアクターに接種し、活性化試薬、例えば、抗CD3/CD28ビーズ/ポリマー、ナノ粒子又はナノコロイドなどを添加し、細胞培地を $0.25 \sim 2$ ml/cm²膜の最終量まで添加する。インビトロCAR発現動態試験のために、24ウェルGrexxを使用する。Grexx100、フラスコ又はcentricultを用いて、この製造プロセスが、スケラブルであるか否かを検証すると共に、インビボ抗腫瘍効果を試験する。平板培養時に、1又は2の感染多重度(MOI)で、BCMA-CD19二重CARをコードするレンチウイルスベクターを用いて、細胞を形質導入する。MOIは、2A配列の上流で操作されるCARの力価に基づき、Sup-T1細胞で得られたウイルス力価に基づいて決定する。24時間で、細胞を洗浄し、不要な試薬を除去した後、染色して、フローサイトメトリーによりCAR発現を測定し、インビボ試験用の「第1日CAR T産物」として凍結保存培地中で再製剤化する。全てのケースにおいて、形質導入から72h後に、インビトロでのCAR発現動態を測定するために細胞のアリコートを採用する。第1日CAR T応答として、限定されないが、インビボ細胞溶解活性及び拡大が挙げられる。

10

【0920】

図7A~7Bは、上流CARの発現のみによって決定されたSup-T1力価に基づき、1のMOIを使用し、ARMプロセスを用いて製造されたヒト初代T細胞の形質導入から24h及び72h後の抗BCMA及び抗CD19 CAR両方の発現パターンを示す。形質導入から24時間後、フローサイトメトリーにおいて、生存CD3+T細胞の前集団が、異なる程度で右にシフトしたことが観察された(図7A)。この発現パターンは、CARを発現するように形質導入された細胞の典型的なフローサイトメトリーヒストグラム(CAR陽性集団が、陰性集団から明らかに分離される)と異なっていた。これらのデータは、「偽形質導入又は一過性発現」が、rBCMA_Fcフローサイトメトリー染色試薬により検出され得ることを示唆している。ベクター添加の時点からCD34+では24時間まで、また293細胞では72時間まで、レンチウイルス偽形質導入が観察されたことが以前報告されている(Haas DL, et al. Mol Ther. 2000. 291: 71-80)。インテグラーゼ欠損レンチウイルスベクターは、CD34+では最大10日間、また293細胞では14日間eGFP発現を引き起こした。T細胞形質導入後第1日に観察されたCAR発現は、恐らく偽形質導入に起因し得るが、第3日には、2つの明瞭な集団が出現し、1つはrBCMA_Fc陽性であり、他方は抗IDduCD19.1陽性であった(図7B及び図7C)。さらに、20~30%の細胞は、二重構築物c235、c236、c237及びc238を用いて操作された細胞中でモノBCMACAR陽性(CD19CAR陰性)であった(図7C)。全体的に見て、これらの結果は、R1G5、R1B6及びPI61がduCD19.1と組み合わせて使用されたとき、両方のCARが、二重CAR T系で十分に発現されたことを証明している。ウイルス形質導入から72h後を、インビボ用量設定戦略のためのCAR発現を測定する代替時点として使用することができた。

20

30

40

【0921】

第1日ARM処理BCMA CAR Tの機能性のインビボでの評価

Centricult又はフラスコシステムを用いて作製した第1日CAR Tを、3つのマウスモデル：播種性KMS-11-Luc (BCMA+CD19-)多発性骨髄腫モデル、NALM6-Luc (CD19+BCMA-)異種移植マウスモデル及び95%KMS-11-Lucと5%NALM6-Luc細胞の混合モデルを用いて、インビボでそれらの抗腫瘍活性について調べた。このインビボ試験の目標は、下記の3つからなる：(1)二重CAR TのBCMA及びCD19アーム両方の有効性を実証すること；(2)混合モデル(BCMA+腫瘍細胞とCD19+腫瘍細胞を含む)をKMS-11-Luc多発性骨

50

髄腫モデル (BCMA + CD19-) と比べて、CD19 標的を介した二重 CART の潜在的活性化を理解すること；並びに (3) Nalm6 単独モデル (CD19 + BCMA-) 中の二重 CART を試験して、CD19 アームの活性を調べること。BLI 測定は、毎週 2 回実施した。フローサイトメトリー解析のために、第 6、13、20 及び 27 日に、末梢血を採取した。サイトカイン解析のために、第 2 日に加えて、前述した日に血漿を収集した。試験設計及び用量の情報を表 30 にまとめる。

【0922】

【表104】

表30. インビボ試験設計及び用量計画

	KMS11 (BCMA)	Nalm6 (CD19)	Luc タグ付き KMS11 (BCMA) 及び Nalm6 (CD19) 両者の混合物
c236	1e4, 5e4	1.5e5	1e4, 5e4
c238	1e4, 5e4	1.5e5	1e4, 5e4
モノ PI61	1e4, 5e4		1e4, 5e4
モノ CTL119		1.5e5	1e4, 5e4

10

20

【0923】

二重 CART は、試験期間にわたって、5e4 の用量で混合腫瘍 (BCMA + CD19+) を排除し、1e4 の用量で腫瘍を阻害したが、完全には排除しなかった (図 8C)。PI61 又は CTL119 のいずれも、混合腫瘍を制御することができなかった (図 8C)。二重 c236 及び c238 は共に、KMS11 及び Nalm6 モデルにおけるモノ対応物と比べて、同等であるか又は優れた効果を示した (図 8A 及び 8B)。3 つ全てのモデルで、試験期間中体重が増加した (図 9A ~ 9C)。恐らく GVHD のために、KMS11 及び NALM6 試験の終了時に若干の減少があった。

【0924】

T 細胞増殖が、第 6 日 ~ 第 20 日に起こり、その後第 20 日 ~ 第 27 日まで平坦になった (図 10A ~ 10C)。増殖は、3 つ全てのモデルで、用量に関連していた (図 11A ~ 11C)。KMS11 モデルは、より高い用量での混合モデルと比べて、3 ~ 4 倍高い増殖を示した (図 10A 及び 10C)。二重 c236 及び c238 は、モノ CART より高い増殖を示した (図 10A ~ 10C)。

30

【0925】

総 BCMA CAR+ パーセンテージは、第 13 日にピークに達し、その後、減少し始め、これは第 27 日まで続いた (図 11A ~ 11C)。混合モデルでは、5e4 群が、第 13 日の後に 1e4 群と比べて低い BCMA CAR+ パーセンテージを示した (図 11C)。二重 CAR+ パーセンテージは、総 CD3+ の流入に関連したが、これは、GVHD の兆候の可能性と考えられた。3 つ全てのモデルにおいて、二重抗 BCMA 及び CD19 CAR+ T 細胞増殖が c236 及び c238 CART Rx 群に認められた (図 12A ~ 12C)。

40

【0926】

IFN の誘導は、全てのモデルを通して用量反応性であった (図 13A ~ 13C)。両用量の二重は、KMS11 単独モデルの約 3 ~ 4 倍の IFN を産生した (図 13A 及び 13C)。ピーク誘導は、全モデルのほとんどの群で 13 日以内に観察された (第 20 日及び第 27 日のピークは、GVHD による可能性が極めて高い) (図 13A ~ 13C)。

【0927】

50

個別の試験では、Gre x 1 0 0 及び 6 ウェル Gre x システムを用いて作製した第 1 日 C A R T を、播種性 K M S - 1 1 - 1 u c 多発性骨髄腫モデルを用い、インビボでの抗腫瘍活性について調べた。ルシフェラーゼリポーターにより、定量的生物発光イメージング (B L I) による疾患負荷のモニタリングが可能になる。手短には、前述のように製造した第 1 日 C A R T は、腫瘍担持マウスに投与した。毎週血液サンプルを採取して、末梢血 C A R T 増殖を測定し、フローサイトメトリーにより解析した。構築物 # 2 3 6 及び構築物 # 2 3 8 を用いて操作された T 細胞は、インビボで K M S 1 1 (B C M A + C D 1 9 -) モデルに対する強力な抗腫瘍活性 (図 1 4 A) 及び優れた C A R T 増殖 (図 1 4 B) を示した。

【 0 9 2 8 】

10

実施例 3 : ダイアボディ C A R T の特性決定

この実施例は、ダイアボディ C A R J L 1 ~ J L 1 0 の特性決定を説明する。J L 1 ~ J L 8 は、P I 6 1 / C T L 1 1 9 ダイアボディ構築物であり、J L 9 ~ J L 1 0 は、R 1 G 5 / C T L 1 1 9 ダイアボディ構築物である。J L 1 ~ J L 1 0 の配列情報は、表 3 1 に開示する。

【 0 9 2 9 】

活性化高速製造 (A R M) プロセスを用いた第 1 日抗 B C M A - C D 1 9 ダイアボディ C A R T の生産及び測定

一部の実施形態において、この A R M プロセスは、凍結された又は新鮮な白血球アフェレーシス産物から出発する。計数及び Q C のためのサンプルを取得した後、産物をセルソーティング機 (例えば、取り付けられた C l i n i M A C S P r o d i g 装置キット) に付着させて、プログラムを開始する。細胞を洗浄し、所望の表面マーカー、例えば、C D 4 及び C D 8 などに結合するマイクロビーズと一緒にインキュベートする。細胞を磁気カラムに通過させることにより、ビーズ標識した細胞を選択する。単離した T 細胞を再度洗浄してから、分離バッファーを細胞培地と交換する。次に、精製した T 細胞を培養するか、又は後の使用のために凍結保存する。単離 T 細胞の純度は、フローサイトメトリー評価による Q C ステップを通過するであろう。凍結保存した細胞を解凍し、予熱した細胞培地で洗浄してから、細胞培地中に再懸濁させる。新鮮な細胞を培地に直接添加する。凍結した P a n T 単離細胞のアリコート量を 3 7 の水浴中で解凍し、O p t i m i z e r C M (サプリメント + 1 0 0 U / m L のヒト I L 2 を含む G i b c o O p t i m i z e r M e d i a) 中に導入して、1 5 0 0 r p m で 5 分スピンドした。細胞を計数し、2 4 ウェルプレート中に、3 e 6 / m L 、 1 m L / ウェルで平板培養した。T r a n s A c t を各ウェルに 1 / 1 0 0 (1 0 μ L / ウェル) で添加した。

20

30

【 0 9 3 0 】

A R M プロセスを用いたインビトロ C A R 発現動態試験のために、2 4 ウェルプレートを使用した。平板培養時に、2 の感染多重度 (M O I) で、B C M A - C D 1 9 ダイアボディ C A R をコードするレンチウイルスベクターを用いて、細胞を形質導入した。M O I は、二重陽性 C A R 発現に基づき、S u p T 1 細胞で得られたウイルス力価に基づいて決定した。2 4 時間の培養後に、細胞を採取し、P B S + 1 % H S A で 3 回洗浄した。次に、細胞を計数し、2 4 ウェルプレート中、最終 1 e 6 / m L で再平板培養した。再平板培養から 7 2 時間後、細胞を採取し、計数した後、フローサイトメトリー解析のために、各サンプルから 5 e 5 細胞のアリコートを取得した。7 2 時間後に、この手順を 1 日 7 時点について繰り返した。

40

【 0 9 3 1 】

図 1 5 A 及び 1 5 B は、2 の M O I を用い、A R M プロセスを用いて製造されたヒト初代 T 細胞へのダイアボディウイルス添加から 9 6 h 後 (図 1 5 A) 又は 7 日後 (図 1 5 B) の抗 B C M A 及び抗 C D 1 9 C A R の両方の発現パターンを示す。全体的に見て、これらの結果は、ウイルス添加から 4 日後 (図 1 5 A) 又は 7 日後 (図 1 5 B) に R 1 G 5 又は P I 6 1 が d u C D 1 9 . 1 と組み合わせて使用されたとき、両方の C A R が、ダイアボディ C A R T 系で十分に発現されたことを証明している。J L 1 ~ J L 4 、 J L 9 及

50

び J L 1 0 は、二重陽性 C A R の線形発現を示したのに対し、J L 5 ~ J L 8 は、C D 1 9 + 集団に対する若干のシフトを示し、これは、それぞれの検出試薬に対する C A R 結合の差によるものと考えられる。ここでは、2つのドナーの1つからのデータを示す。

【0932】

伝統的製造プロセスを用いた C A R - T 細胞生産

伝統的製造 (T M) プロセスは、活性化及び形質導入後に T 細胞をエクスピボで 8 ~ 9 日間エクスピボで増殖した後に、回収するプロセスである。 P r o d i g y 処理 T 細胞を温かい R P M I 完全 T 細胞培地 (R P M I 、 1 0 % 熱不活性化 F B S 、 2 m M L - グルタミン、 1 0 0 U / m L の P e n / S t r e p 、 1 x N E A A 、 1 m M ピルビン酸ナトリウム、 1 0 m M H E P E S 及び 5 5 μ M -メルカプトエタノール) に再懸濁させてから、ウェル当たり 0.5×10^6 細胞 / m L で 2 4 ウェルプレートにおいて平板培養した。 3 : 1 のビーズ : 細胞比で、ヒト T - エクспанダー C D 3 / C D 2 8 ビーズと一緒に、T 細胞を 3 7 で一晩インキュベートした。

10

【0933】

第 1 日に、 S u p - T 1 力価に基づいて、5 の M O I でレンチウイルスを添加した。非形質導入対照 (U T D) にはウイルスを添加しなかった。 T 細胞を 3 7 で一晩インキュベートした後、ウェル当たり 1 m L の完全 T 細胞培地をさらに添加してから、3 7 で一晩インキュベートした。残る 6 日間の培養物増殖のために、 T 細胞を組織培養フラスコに移し、 0.5×10^6 細胞 / m L の濃度を目標にして 2 日毎に完全 T 細胞培地で希釈した。典型的なスプリット比は、増殖期の間、 1 : 2 ~ 1 : 4 の範囲であった。

20

【0934】

第 7 日に、 T 細胞を脱ビーズし、採取した後、 C r y o S t o r C S 1 0 凍結保存溶液中に凍結保存し、 C o o l C e l l C e l l F r e e z i n g C o n t a i n e r s (B i o c i s i o n) 内に - 8 0 で凍結し、翌日 L N ₂ に移した。 T 細胞の小アリコートで C A R 発現について染色した。補正のために単色対照を加えた。サンプルをフローサイトメーター (B D L S R F o r t e s s a) で測定し、データを F l o w J o ソフトウェアで解析した。

【0935】

図 1 6 は、5 の M O I を用いる T M プロセスによる第 7 日の C A R 発現を示す。 T M 産物は、 A R M 産物と類似の発現パターンを示した (図 1 5 A 、 1 5 B 及び 1 6) 。

30

【0936】

インビトロ殺傷アッセイ

様々なダイアポディ構築物で操作された T 細胞が、 B C M A 又は C D 1 9 発現標的細胞に応答して殺傷する能力を、 2 0 : 1 から出発する 2 倍 E : T 比の希釈で、 C A R T 細胞を標的細胞と一緒にインキュベートすることにより評価した。標的細胞の数を 2.5×10^5 細胞 / ウェルで固定し、細胞を 9 6 ウェル平底プレート内で培養した。エフェクター細胞は、 T 細胞をダイアポディで形質導入することによる伝統的製造を用いて作製した C A R T 細胞であった。標的細胞は、 B C M A 陽性 K M S 1 1 - l u c 細胞又は B C M A 陰性 N A L M 6 - l u c 細胞を含む。このアッセイのために、 B C M A C A R T への U T D の添加により、 C A R - T 細胞の % 形質導入を正規化した。これにより、各サンプル中の同じ数の C A R T と同じ総 T 細胞数の比較が可能になった。

40

【0937】

細胞接種から 1 6 h 後に B r i g h t - G l o 基質を用いて、細胞殺傷により生じたルシフェラーゼシグナルの消失を測定し、特異的な溶解を下記の式に従って計算した。

特異的溶解 (%) = $100 - (\text{サンプルルミネセンス} / \text{平均最大ルミネセンス}) * 100$

【0938】

図 1 7 A 及び 1 7 B は、 P I 6 1 / C T L 1 1 9 の様々なダイアポディが、特定の標的細胞株 N A L M - 6 (C D 1 9 + 、 B C M A -) (図 1 7 A) 又は K M S - 1 1 (C D 1 9 - 、 B C M A +) (図 1 7 B) を有効に殺傷する能力を実証するものである。データは、クローン J L 6 、 J L 5 、 J L 3 及び J L 8 が、両方の標的細胞を同等に殺傷すること

50

を示唆している。

【0939】

サイトカイン分泌アッセイ

MSD V-PLEX ヒトIFN- γ 及びIL-2分析に使用するために、20時間インキュベーション後の上記殺傷アッセイに使用した共培養物(1.25:1の比)から上清を収集した。KMS11又はNALM6細胞による刺激に応答して、ダイアボディ形質導入細胞によるIFN- γ 又はIL-2の様々な程度の標的・特異的誘導が観察された(図18A及び18B)。UTD細胞は、いずれの標的細胞に応答する非特異的IFN- γ 分泌も示さなかった(図18A)。殺傷アッセイからの結果と一致して、クローンJL6、JL5、JL3及びJL8は、標的細胞に応答して、より多くのサイトカインを産生した(図18A及び18B)。

10

【0940】

実施例4: BCMA CAR及びCD19CARの共形質導入

凍結されたPan T単離細胞のアリコート(37°Cの水浴中で解凍し、Optimzer CM(サプリメント+100U/mLのヒトIL2を含むGibco Optimizer Media)中に導入して、1500rpmで5分スピンドした。細胞を計数し、24ウェルプレート中に、 3×10^6 /mL、1mL/ウェルで平板培養した。TransActを各ウェルに1/100(10 μ L/ウェル)で添加した。PI61のSUP-T1力価又はCTL119のqPCR力価のいずれかに基づく様々な感染多重度(MOI)でウイルスを添加した。PI61は2のMOIで使用し、3つの異なるCTL119 MOI: 1、0.5及び0.25と組み合わせた。モノCARを、PI61には1又は2のMOIで、CTL119には1のMOIで添加し、UTD対照も平板培養した。24時間の培養後に、細胞を採取し、PBS+1%HSA中で3回洗浄した。次に、細胞を計数し、24ウェルプレートにおいて最終 1×10^6 /mLで再平板培養した。

20

【0941】

再平板培養から72時間後、細胞を採取し、計数してから、フローサイトメトリー解析のために、各サンプルから 5×10^5 細胞のアリコートを取得した。細胞を100 μ L/ウェルのLive/Dead Aqua(BV510)で15分染色した後、2回洗浄した。次に、抗体MM(表32)を50 μ L/ウェルで、4°Cで25分添加した。細胞を再度2回洗浄した後、PBS中1.6%PFA(100 μ L/ウェル)中で15分固定した。固定の後、前述のように細胞を洗浄し、フローサイトメトリーバッファ中150 μ L/サンプルの最終量で再懸濁させた。BD LSRFortessa(BD Biosciences, San Jose, CA)上の各サンプルの生存CD3陽性ゲートで、 5×10^4 細胞を取得し、FlowJo v.10ソフトウェア(Ashland, OR)を用いて、データを解析した。72時間後に、この手順を1日7時点について繰り返した。

30

【0942】

40

50

【表 1 0 5】

表 32. 抗体及び他の試薬。

マーカー	クローン	蛍光色素	ベンダー	カタログ No.	希釈度
生存/死滅		BV510	Biologend	423102	1/500
CD3	SK7	BUV395	BD	564001	1/200
CAR19	抗 ID	PE	社内試薬		1/160
CD4	SK3	PerCP 5.5	Biologend	344608	1/100
CAR	rBCMA FC	AF 647	社内試薬		1/380 (3ug/ml)
CD8	SK1	APC H7	BD	560179	1/200
FACS バッファー			Miltenyi Biotec	130-091-222	
BSA ストック溶液			Miltenyi Biotec	130-091-376	
リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)			Gibco	14190-144	
パラホルムアルデヒド (PFA)			Polysciences Inc.	18814-10	

10

20

【 0 9 4 3】

ウイルス添加後の第 4 日に、フローサイトメトリー解析は、BCMA CAR MOI 2 の条件で、CAR19 陽性集団及び二重 CAR 陽性集団と比べて、有意に高いパーセンテージのモノ BCMA CAR + 集団を示した (図 19 及び 20)。これは、両ドナーについて一致していた。PI 61 を 1 の MOI で添加したとき、全ての集団の優れた力価測定が観察された (図 19 及び 20)。CD19 CAR MOI が 1 から 0.25 に低下すると、CAR19 + 集団並びに二重 CAR + 集団も減少した (図 19)。CTL119 コード化ウイルスをより少量で添加すると、BCMA CAR + 集団は、増加した (図 19)。総 CAR + 集団のパーセンテージは、各ウェルに添加された総 MOI と相関した (図 21)。総 BCMA CAR 及び CAR19 パーセンテージも同様に相関した。全ての傾向は第 4 日～第 7 日まで安定していた (図 21)。生存率及び増殖速度は、添加した総 MOI から独立していた (図 22)。ここでは、4 つのドナーの 1 つからのデータを示す。

30

【 0 9 4 4】

実施例 5：活性化高速製造 (ARM) プロセスの説明

一部の実施形態では、連続的活性化高速製造 (ARM) プロセスを用いて、約 2 日かけて CART 細胞を製造するが、これにより恐らくより多数の低分化 T 細胞 (T ナイブ及び T_{SCM} (ステムセントラルメモリー T) 細胞) をインビボ細胞増殖のために患者に戻すことが可能になるであろう。短い製造期間により、早期分化 T 細胞プロファイルは、その所望の最終分化状態に向けて、エクスピボ培養容器内ではなく、体内で増殖することが可能になる。

40

【 0 9 4 5】

一部の実施形態では、CART 細胞は、凍結保存白血球アフェレーシス源材料、例えば非動員自己末梢血白血球アフェレーシス (LKPK) 材料を用いて製造される。凍結保存材料は、抗 CD4 / 抗 CD8 免疫磁気システムを用いて、生産の 1 日目 (第 0 日) に T 細胞濃縮のためのプロセッシングステップに付す。次に、陽性画分を G-rex 培養容器に接種し、抗 CD3 / CD28 系 (TransACT) で活性化し、同じ日に、CAR をコードするレンチウイルスベクター (LV) で形質導入する。翌日、形質導入の 20 ~ 28 時間後、T 細胞を採取し、4 回洗浄し、凍結培地に製剤化した後、コントロールレートフリ

50

ーザー (Controlled Rate Freezer) (CRF) により凍結する。第0日のプロセスの開始から翌日の採取の開始まで、第0日の接種後24時間を目標にして、細胞を20~28時間培養する。

【0946】

第0日の培地を表21に従って調製した。

【0947】

【表106】

表21: CART 製造における培地タイプ及び使用時点

培地/バッファータイプ	組成	使用時点
ラピッドバッファ- (Rapid Buffer) (RB)	CliniMACS [®] Buffer (+0.5% ヒト血清アルブミン(HSA))	第0日 細胞洗浄/分離機での処理
ラピッドメディア (Rapid Media) (RM)	OpTmizer [™] Media, CTS [™] , IL-2, Glutamax 及び ICSR	第0日 細胞洗浄/分離機での処理及び細胞接種
ハーベストバッファ- (Harvest Buffer) (HB) (ハーベストバッファ-溶液とも呼ばれる)	EDTA は含まず、2% HSA を含有する PBS	ハーベストウォッシュバッファ- (Harvest Wash Buffer) (第1日)
クライオメディア (Cryomedia)	Cryostor10 (CS10)	ハーベスト製剤化 (Harvest Formulation)

10

20

【0948】

凍結白血球アフェレーシス材料を解凍する。解凍した細胞をラピッドバッファ- (表21) で希釈し、CliniMACS (登録商標) Prodigy (登録商標) 装置で洗浄する。T細胞をCliniMACS (登録商標) CD4及びCD8マイクロビーズにより選択する。T細胞選択 (約3時間40分~4時間40分) のためのプログラムが終了したら、ラピッドメディア (表21) に懸濁させた細胞を含むリアプリケーションバッグをトランスファーパックに移す。生存率及び細胞カウントのためにサンプルを取得した。培養容器を活性化及びベクター形質導入に接種する際、陽性画分バッグからの細胞数及び生存率データを用いて、細胞濃度を決定する。

30

【0949】

CliniMACS (登録商標) マイクロビーズ (CD4及びCD8) を用いたT細胞のポジティブ選択後、細胞を培養容器、G-Rexに接種する。細胞を接種したら、活性化試薬 (TransACT) を培養容器に添加する。次に、1.0 (0.8~1.2) の目標MOIで、CARをコードするレンチウイルスベクターにより細胞を形質導入する。ベクター添加後、培養容器をインキュベーターに移し、そこで、公称5%CO₂ (作動範囲4.5~5.5%)、37℃の公称温度 (作動範囲36~38℃) で目標の24時間にわたり (作動範囲20~28時間) それをインキュベートする。インキュベーション後、細胞をハーベスト洗浄液 (Harvest Wash Solution) (表21) で4回洗浄して、非組込みベクター及び残留ウイルス粒子並びに他のプロセス関連不純物を全て除去する。次に、細胞を溶出し、細胞数及び生存率のためのサンプルを取得して試験し、それらの結果を用いて、Cryostor (登録商標) CS10を用いた最終製剤化のために、細胞を再懸濁させるのに必要な量を決定する。続いて、細胞を遠心分離して、ハーベスト洗浄液を除去し、凍結保存を実施する。

40

【0950】

一部の実施形態では、CART細胞中に発現したCARがCD19に結合する。一部の実施形態では、ラピッドメディア (RM) (表21) に使用したIL-2の代わりに、IL-15、hetIL-15 (IL-15/sIL-15Ra)、IL-6又はIL-6

50

/ s I L - 6 R aを使用することができる。

【0951】

一部の実施形態では、CART細胞中に発現したCARはBCMAに結合する。一部の実施形態では、ラピッドメディア(RM)(表21)に使用したIL-2の代わりに、IL-15、hetIL-15(IL-15/sIL-15Ra)、IL-6又はIL-6/sIL-6Raを使用することができる。

【0952】

一部の実施形態では、CART細胞は、本明細書に開示される二重CAR、例えば、本明細書に開示されるBCMA/抗CD19二重CARを発現する。一部の実施形態では、CART細胞は、本明細書に開示されるダイアボディCAR、例えば、本明細書に開示される抗BCMA/抗CD19ダイアボディCARを発現する。一部の実施形態では、CART細胞は、本明細書に開示の共形質導入を用いて、抗BCMA CAR及び抗CD19 CARを発現するように、操作される。

10

【0953】

実施例6：活性化高速製造(ARM)プロセスを用いるCART細胞の製造

CART細胞のARMプロセスは、表25に概略を示すように、培地の調製から開始する。

【0954】

凍結保存された白血球アフェレーシス産物を出発材料として使用し、T細胞濃縮のために処理した。利用可能であれば、アフェレーシスパーワークを利用して、T細胞パーセンテージを決定する。アフェレーシスパーワークに基づくT細胞パーセンテージデータがない場合、到着した凍結保存白血球アフェレーシス産物にセンチネルバイアル試験を実施して、アフェレーシスのT細胞パーセンテージ目標を取得する。T細胞パーセンテージについての結果により、ARMプロセスの第0日にどの程度の個数のバッグを解冻するかを決定する。

20

【0955】

【表107】

表 25: CART 製造における培地及びバッファータイプ及び使用時点

培地タイプ	供給源	使用時点
CliniMACS® Buffer/ ヒト血清アルブミン (HSA) (使用濃度 0.5%)	第0日にオペレーターにより調製	細胞洗浄/分離機での第0日処理
ラピッドメディア(Rapid Media)	第0日にオペレーターにより調製	細胞接種の目的で第0日
PBS/HSA (使用濃度 1%又は 2%)	第0日にオペレーターにより調製	ハーベスト及び培養物洗浄 (第0日)
Cryosstor10 (CS10)	市販品	ハーベスト製剤化

30

40

【0956】

凍結保存白血球アフェレーシスを解冻、洗浄した後、CliniMACS(登録商標)マイクロビーズ技術を用いて、T細胞選択及び濃縮を実施する。生存有核細胞(VNC)をTransACT(Miltenyi)で活性化し、CARをコードするレンチウイルスベクターで形質導入する。Miltenyiマイクロビーズで選択された生存細胞を、Prodigy(登録商標)上のcentricult(非加湿インキュベーションチャンバーである)に接種する。培養中、CTS(商標)サプリメント(ThermoFisher)、グルタマックス(Glutamax)、IL-2及び2%免疫細胞血清代替品

50

をその成分として含む OpTmizer (商標) CTS (商標) ベース培地であるラピッドメディア (Rapid media) に細胞を懸濁させて、T細胞活性化及び形質導入を促進する。レンチウイルス形質導入は、TransACTを培地中の希釈細胞に添加した後、接種の日に1回実施する。レンチウイルスベクターは、接種日の使用直前に、室温で最大30分かけて解凍する。

【0957】

第0日のプロセス開始から、培養物洗浄及び採取の開始まで、CART細胞を接種から20～28時間培養する。培養後、細胞懸濁液をcentricultチャンバー (Miltenyi Biotech) 内で2回の培地洗浄及び1回の採取物洗浄に付す。

【0958】

第1日のCliniMACS (登録商標) Prodigy (登録商標) での採取物洗浄後、細胞懸濁液をサンプリングして、生存細胞数及び生存率を決定する。次に、細胞懸濁液を遠心分離機に移し、手動でペレット化する。上清を除去し、細胞ペレットをCS10 (BioLife Solution) に再懸濁させることにより、約10.0%の最終DMSO濃度を有する産物製剤が得られる。生存細胞数は、用量設定のために採取後に公式化する。次に、用量を個別のクライオバッグに分配し、クライオバイアル中での分析サンプリングを行う。

【0959】

凍結保存産物は、安全な進入制限エリア内のモニター付きLN2保存タンク内に最終出荷及び発送まで保存する。

【0960】

一部の実施形態では、CART細胞は、本明細書に開示される二重CAR、例えば、本明細書に開示される抗BCMA / 抗CD19二重CARを発現する。一部の実施形態では、CART細胞は、本明細書に開示されるダイアポディCAR、例えば、本明細書に開示される抗BCMA / 抗CD19ダイアポディCARを発現する。一部の実施形態では、CART細胞は、本明細書に開示される共形質導入を用いて、抗BCMA CAR及び抗CD19CARを発現するように、操作される。

【0961】

実施例7：抗BCMA CAR及び抗CD19CARを発現するCART細胞の製造

CART細胞の高速製造プロセスは、表33に概略を示すように、培地の調製から開始する。

【0962】

【表108】

表33: CART製造における培地タイプ及び使用時点

培地/バッファータイプ	組成	処理ステップ
ラピッドメディア(RM)	OpTmizer CTS CTS サプリメント ICSR GlutaMAX 再構成 IL-2	細胞接種及び活性化
ラビットバッファー(RB)	CliniMACs バッファー(EDTA 含有の PBS) HSA	細胞洗浄及び T 細胞濃縮
培養物/ハーベスト洗浄液	PBS (Mg/Ca は含まず、EDTA を含有) HSA	ハーベスト洗浄工程
クライオメディア (Cryomedia)	DMSO 含有の CryoStor® (CS10)	ハーベスト製剤化

10

20

30

40

50

【0963】

凍結保存白血球アフェレーシスを解凍した。解凍した細胞をラピッドバッファー (Rapid Buffer) (表33) で希釈し、CliniMACS (登録商標) Prodigy (登録商標) 装置上で洗浄した。T細胞をCliniMACS (登録商標) CD4及びCD8マイクロビーズにより選択した。プログラムをT細胞について終了したら (約3時間40分~4時間40分)、リアプリケーションバッグは、ラピッドバッファー (Rapid Buffer) (表33) を含有している。生存率及び細胞計数のためにサンプルを取得する。この細胞数及び生存率データを用いて、活性化及びベクター形質導入用の培養容器に接種する際の細胞濃度を決定する。

【0964】

CliniMACS (登録商標) マイクロビーズ (CD4及びCD8) を用いたT細胞のポジティブ選択後、細胞を培養容器、Prodigy (登録商標) 中のCentriCultに、約 4.0×10^6 生存細胞/mLの目標濃度で、 $4.0 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^9$ 総生存細胞を目標に接種する。細胞を接種したら、活性化試薬 (TransACT) を培養容器に添加する。

【0965】

次に、抗BCMA CARをコードするレンチウイルスベクター及び抗CD19 CARをコードするレンチウイルスベクターにより細胞を形質導入する。ポジティブ選択後に、T細胞の形質導入のために使用されるベクター容量は、BCMA CARレンチウイルスベクターについては4.75の目標感染多重度 (MOI)、CD19 CARレンチウイルスベクターについては0.5の目標MOIに基づいて計算する。

【0966】

公称5%CO₂、37℃の温度で目標の24時間 (作動範囲20~28時間) のインキュベーション後、細胞をハーベスト洗浄のために処理する。

【0967】

インキュベーション後、細胞をハーベスト洗浄液 (Harvest Wash Solution) (表33) で3回洗浄して、非組込みベクター及び残留ウイルス粒子並びに他のプロセス関連不純物を全て除去する。次に、細胞を溶出し、細胞計数及び生存率のためのサンプルを取得して試験し、それらの結果を用いて、CryoStor (登録商標) CS10を用いた最終製剤化のために、細胞を再懸濁させるのに必要な量を決定する。続いて、細胞を遠心分離して、ハーベスト洗浄液を除去し、凍結保存を実施する。

【0968】

実施例8: ARMプロセスを用いて製造されるCAR T細胞の遺伝子シグネチャー分析方法

単一細胞RNAseq

10X Genomics Chromium Controller instrument及び支持ライブラリー構築キットを用いて、単一細胞RNAseqライブラリーを作製した。

【0969】

凍結保存細胞を解凍し、カウント及びフロー分別 (試験課題の必要に応じて) した後、10X Genomics Instrumentにロードした。個別の細胞を液滴にロードし、GemCodeビーズによって個別の液滴中のRNAにバーコードを付けた。バーコード付きRNAを液滴から放出させ、全トランスクリプトームIllumina適合性シーケンシングライブラリーに変換した。

【0970】

作製したライブラリーをIllumina HiSeq Instrumentで配列決定し、10X Genomics解析パイプライン及びLoupe Cell Browserソフトウェアを用いて解析した。

【0971】

単一細胞免疫細胞プロファイリング

10

20

30

40

50

全トランスクリプトーム10X Genomics単一細胞ライブラリーを鋳型材料として使用して、免疫細胞プロファイリング及びレパトア解析を作成した。T細胞受容体配列をChromium Single Cell 5' LibrariesからPCR増幅した後、Illuminaシーケンシング装置で解析した。

【0972】

解析パイプライン

単一細胞RNAseqデータを、FASTQファイルで開始するCell Ranger解析パイプラインで処理した。Cell Ranger解析パイプラインの詳細な説明は、support.10xgenomics.com/single-cell-gene-expression/software/pipelines/latest/what-is-cell-rangerに見出すことができる。一般的パイプラインは、アラインメント、フィルタリング、バーコードカウント及びUMIカウントを含んだ。細胞バーコードを用いて、遺伝子バーコードマトリックスを作成し、クラスターを決定して、遺伝子発現解析を実施した。遺伝子発現カウントデータは、Seurat Bioconductorパッケージを用いて正規化した。200未満の発現遺伝子を有する細胞を解析から廃棄した。2つ以下の細胞にのみ発現された遺伝子を解析から廃棄した。残ったデータを、10,000のスケール因子を用いてSeurat log正規化法により正規化した。1細胞当たりの検出分子の数に対する回帰によりデータをスケールした。遺伝子セット内の全遺伝子の平均log正規化遺伝子発現値を取得することにより、遺伝子セットスコア(GeneSetScore)を算出した。各遺伝子は、サンプル全体の遺伝子の平均発現が0であり、標準偏差が1であるように正規化されたz-スコアである。次に、遺伝子セットスコアを、遺伝子セット内の遺伝子の正規化値の平均として計算する。遺伝子セットスコア計算例を以下に説明する。

【0973】

本実施例の遺伝子セットスコア計算の場合、6つの遺伝子についての2つのサンプルの正規化遺伝子発現を表23に記載する。この計算例を目的として、遺伝子セットは、遺伝子1~4から構成される。従って、サンプル1及び2の両方が、0の遺伝子セットスコアを有する。

【0974】

【表109】

表 23: 遺伝子セットスコア計算のための例示的なデータセット

	サンプル 1	サンプル 2
遺伝子 1	-3	0
遺伝子 2	3	0
遺伝子 3	1	0
遺伝子 4	-1	0
遺伝子 5	10	4
遺伝子 6	-5	3

【0975】

遺伝子セット「Up TEM vs. Down TSCM」は、以下の遺伝子：MXRA7、CLIC1、NAT13、TBC1D2B、GLCCI1、DUSP10、APOBEC3D、CACNB3、ANXA2P2、TPRG1、EOMES、MATK、ARGAP10、ADAM8、MAN1A1、SLFN12L、SH2D2A、EIF2C4、CD58、MYO1F、RAB27B、ERN1、NPC1、NBEAL2、APO

10

20

30

40

50

BEC3G、SYTL2、SLC4A4、PIK3AP1、PTGDR、MAF、PLEKHA5、ADRB2、PLXND1、GNAO1、THBS1、PPP2R2B、CYTH3、KLRF1、FLJ16686、AUTS2、PTPRM、GNLY及びGFPT2を含む。

【0976】

遺伝子セット「Up Treg vs. Down Teff」は、以下の遺伝子：C12orf75、SELPLG、SWAP70、RGS1、PRR11、SPATS2L、SPATS2L、TSHR、C14orf145、CASP8、SYT11、ACTN4、ANXA5、GLRX、HLA-DMB、PMCH、RAB11FIP1、IL32、FAM160B1、SHMT2、FRMD4B、CCR3、TNFRSF13B、NTNG2、CLDND1、BARD1、FCER1G、TYMS、ATP1B1、GJB6、FGL2、TK1、SLC2A8、CDKN2A、SKAP2、GPR55、CDCA7、S100A4、GDPD5、PMAIP1、ACOT9、CEP55、SGMS1、ADPRH、AKAP2、HDAC9、IKZF4、CARD17、VAV3、OBFC2A、ITGB1、CIITA、SETD7、HLA-DMA、CCR10、KIAA0101、SLC14A1、PTTG3P、DUSP10、FAM164A、PYHIN1、MYO1F、SLC1A4、MYBL2、PTTG1、RRM2、TP53INP1、CCR5、ST8SIA6、TOX、BFSP2、ITPRIPL1、NCAPH、HLA-DPB2、SYT4、NINJ2、FAM46C、CCR4、GBP5、C15orf53、LMCD1、MKI67、NUSAP1、PDE4A、E2F2、CD58、ARHGEF12、LOC100188949、FAS、HLA-DPB1、SELP、WEE1、HLA-DPA1、FCRL1、ICA1、CNTNAP1、OAS1、METTL7A、CCR6、HLA-DRB4、ANXA2P3、STAM、HLA-DQB2、LGALS1、ANXA2、PI16、DUSP4、LAYN、ANXA2P2、PTPLA、ANXA2P1、ZNF365、LAIR2、LOC541471、RASGRP4、BCAS1、UTS2、MIAT、PRDM1、SEMA3G、FAM129A、HPGD、NCF4、LGALS3、CEACAM4、JAKMIP1、TIGIT、HLA-DRA、IKZF2、HLA-DRB1、FANK1、RTKN2、TRIB1、FCRL3及びFOXP3を含む。

【0977】

遺伝子セット「Down stemness」は、以下の遺伝子：ACE、BATF、CDK6、CHD2、ERCC2、HOXB4、MEOX1、SFRP1、SP7、SRF、TAL1及びXRCC5を含む。

【0978】

遺伝子セット「Up hypoxia」は、以下の遺伝子：ABCB1、ACAT1、ADM、ADORA2B、AK2、AK3、ALDH1A1、ALDH1A3、ALDOA、ALDOC、ANGPT2、ANGPTL4、ANXA1、ANXA2、ANXA5、ARHGAP5、ARSE、ART1、BACE2、BATF3、BCL2L1、BCL2L2、BHLHE40、BHLHE41、BIK、BIRC2、BNIP3、BNIP3L、BPI、BTG1、C11orf2、C7orf68、CA12、CA9、CALD1、CCNG2、CCT6A、CD99、CDK1、CDKN1A、CDKN1B、CITED2、CLK1、CNOT7、COL4A5、COL5A1、COL5A2、COL5A3、CP、CTSD、CXCR4、D4S234E、DDIT3、DDIT4、1-Dec、DKC1、DR1、EDN1、EDN2、EFNA1、EGF、EGR1、EIF4A3、ELF3、ELL2、ENG、ENO1、ENO3、ENPEP、EPO、ERRFI1、ETS1、F3、FABP5、FGF3、FKBP4、FLT1、FN1、FOS、FTL、GAPDH、GBE1、GLRX、GPI、GPRC5A、HAP1、HBP1、HDAC1、HDAC9、HERC3、HERPUD1、HGF、HIF1A、HK1、HK2、HLA-DQB1、HMOX1、HMOX2、HSPA5、HSPD1、HSPH1、HYOU1、ICAM1、ID2、IFI27、IGF2、IGF

BP1、IGFBP2、IGFBP3、IGFBP5、IL6、IL8、INSIG1、IRF6、ITGA5、JUN、KDR、KRT14、KRT18、KRT19、LDHA、LDHB、LEP、LGALS1、LONP1、LOX、LRP1、MAP4、MET、MIF、MMP13、MMP2、MMP7、MPI、MT1L、MTL3P、MUC1、MXI1、NDRG1、NFIL3、NFKB1、NFKB2、NOS1、NOS2、NOS2P1、NOS2P2、NOS3、NR3C1、NR4A1、NT5E、ODC1、P4HA1、P4HA2、PAICS、PDGFB、PDK3、PFKFB1、PFKFB3、PFKFB4、PFKL、PGAM1、PGF、PGK1、PGK2、PGM1、PIM1、PIM2、PKM2、PLAU、PLAUR、PLIN2、PLOD2、PNN、PNP、POLM、PPARA、PPAT、PROK1、PSMA3、PSMD9、PTGS1、PTGS2、QSOX1、RBPJ、RELA、RIOK3、RNASEL、RPL36A、RRP9、SAT1、SERPINB2、SERPINE1、SGSM2、SIAH2、SIN3A、SIRPA、SLC16A1、SLC16A2、SLC20A1、SLC2A1、SLC2A3、SLC3A2、SLC6A10P、SLC6A16、SLC6A6、SLC6A8、SORL1、SPP1、SRSF6、SSSCA1、STC2、STRA13、SYT7、TBPL1、TCEAL1、TEK、TF、TFF3、TFRC、TGFA、TGFB1、TGFB3、TGFB1、TGM2、TH、THBS1、THBS2、TIMM17A、TNFAIP3、TP53、TPBG、TPD52、TPI1、TXN、TXNIP、UMPS、VEGFA、VEGFB、VEGFC、VIM、VPS11及びXRCC6を含む。

【0979】

遺伝子セット「Up autophagy」は、以下の遺伝子：ABL1、ACBD5、ACIN1、ACTRT1、ADAMTS7、AKR1E2、ALKBH5、ALPK1、AMBRA1、ANXA5、ANXA7、ARSB、ASB2、ATG10、ATG12、ATG13、ATG14、ATG16L1、ATG16L2、ATG2A、ATG2B、ATG3、ATG4A、ATG4B、ATG4C、ATG4D、ATG5、ATG7、ATG9A、ATG9B、ATP13A2、ATP1B1、ATPAF1-AS1、ATPIF1、BECN1、BECN1P1、BLOC1S1、BMP2KL、BNIP1、BNIP3、BOC、C11orf2、C11orf41、C12orf44、C12orf5、C14orf133、C1orf210、C5、C6orf106、C7orf59、C7orf68、C8orf59、C9orf72、CA7、CALCB、CALCOCO2、CAPS、CCDC36、CD163L1、CD93、CDC37、CDKN2A、CHAF1B、CHMP2A、CHMP2B、CHMP3、CHMP4A、CHMP4B、CHMP4C、CHMP6、CHST3、CISD2、CLDN7、CLEC16A、CLN3、CLVS1、COX8A、CPA3、CRNKL1、CSPG5、CTSA、CTSB、CTSD、CXCR7、DAP、DKKL1、DNAAF2、DPPF3、DRAM1、DRAM2、DYNLL1、DYNLL2、DZANK1、EI24、EIF2S1、EPG5、EPM2A、FABP1、FAM125A、FAM131B、FAM134B、FAM13B、FAM176A、FAM176B、FAM48A、FANCC、FANCF、FANCL、FBXO7、FCGR3B、FGF14、FGF7、FGFBP1、FIS1、FNBP1L、FOXO1、FUND C1、FUND C2、FXR2、GABARAP、GABARAPL1、GABARAPL2、GABARAPL3、GABRA5、GDF5、GMIP、HAP1、HAPLN1、HBXIP、HCAR1、HDAC6、HGS、HIST1H3A、HIST1H3B、HIST1H3C、HIST1H3D、HIST1H3E、HIST1H3F、HIST1H3G、HIST1H3H、HIST1H3I、HIST1H3J、HK2、HMGB1、HPR、HSF2BP、HSP90AA1、HSPA8、IFI16、IPPK、IRGM、IST1、ITGB4、ITPKC、KCNK3、KCNQ1、KIAA0226、KIAA1324、KRCC1、KRT15、KRT73、LAMP1、LAMP2、LAMTOR1、LAMTOR2、LAMTOR3、LARP1B、LENG9、LGALS8、LI

X1、LIX1L、LMCD1、LRRK2、LRSAM1、LSM4、MAP1A、MAP1LC3A、MAP1LC3B、MAP1LC3B2、MAP1LC3C、MAP1S、MAP2K1、MAP3K12、MARK2、MBD5、MDH1、MEX3C、MFN1、MFN2、MLST8、MRPS10、MRPS2、MSTN、MTERFD1、MTMR14、MTMR3、MTOR、MTSS1、MYH11、MYLK、MYOM1、NBR1、NDUFB9、NEFM、NHLRC1、NME2、NPC1、NR2C2、NRBF2、NTHL1、NUP93、OBSCN、OPTN、P2RX5、PACS2、PARK2、PARK7、PDK1、PDK4、PEX13、PEX3、PFKP、PGK2、PHF23、PHYHIP、PI4K2A、PIK3C3、PIK3CA、PIK3CB、PIK3R4、PINK1、PLEKHM1、PLOD2、PNPO、PPARGC1A、PPY、PRKAA1、PRKAA2、PRKAB1、PRKAB2、PRKAG1、PRKAG2、PRKAG3、PRKD2、PRKG1、PSEN1、PTPN22、RAB12、RAB1A、RAB1B、RAB23、RAB24、RAB33B、RAB39、RAB7A、RB1CC1、RBM18、REEP2、REP15、RFWD3、RGS19、RHEB、RIMS3、RNF185、RNF41、RPS27A、RPTOR、RRAGA、RRAGB、RRAGC、RRAGD、S100A8、S100A9、SCN1A、SERPINB10、SESN2、SFRP4、SH3GLB1、SIRT2、SLC1A3、SLC1A4、SLC22A3、SLC25A19、SLC35B3、SLC35C1、SLC37A4、SLC6A1、SLCO1A2、SMURF1、SNAP29、SNAPIN、SNF8、SNRPB、SNRPB2、SNRPD1、SNRPF、SNTG1、SNX14、SPATA18、SQSTM1、SRPX、STAM、STAM2、STAT2、STBD1、STK11、STK32A、STOM、STX12、STX17、SUPT3H、TBC1D17、TBC1D25、TBC1D5、TCIRG1、TEAD4、TECPR1、TECPR2、TFEB、TM9SF1、TMBIM6、TMEM203、TMEM208、TMEM39A、TMEM39B、TMEM59、TMEM74、TMEM93、TNIK、TOLLIP、TOMM20、TOMM22、TOMM40、TOMM5、TOMM6、TOMM7、TOMM70A、TP53INP1、TP53INP2、TRAPPC8、TREM1、TRIM17、TRIM5、TSG101、TXLNA、UBA52、UBB、UBC、UBQLN1、UBQLN2、UBQLN4、ULK1、ULK2、ULK3、USP10、USP13、USP30、UVRAG、VAMP7、VAMP8、VDAC1、VMP1、VPS11、VPS16、VPS18、VPS25、VPS28、VPS33A、VPS33B、VPS36、VPS37A、VPS37B、VPS37C、VPS37D、VPS39、VPS41、VPS4A、VPS4B、VTA1、VTI1A、VTI1B、WDFY3、WDR45、WDR45L、WIPI1、WIPI2、XBP1、YIPF1、ZCCHC17、ZFYVE1、ZKSCAN3、ZNF189、ZNF593及びZNF681を含む。

【0980】

遺伝子セット「Up resting vs. Down activated」は、以下の遺伝子：ABCA7、ABCF3、ACAP2、AMT、ANKH、ATF7IP2、ATG14、ATP1A1、ATXN7、ATXN7L3B、BCL7A、BEX4、BSDC1、BTG1、BTG2、BTN3A1、C11orf21、C19orf22、C21orf2、CAMK2G、CARS2、CCNL2、CD248、CD5、CD55、CEP164、CHKB、CLK1、CLK4、CTSL1、DBP、DCUN1D2、DENND1C、DGKD、DLG1、DUSP1、EAPP、ECE1、ECHDC2、ERBB2IP、FAM117A、FAM134B、FAM134C、FAM169A、FAM190B、FAU、FLJ10038、FOXJ2、FOXJ3、FOXJ1、FOXO1、FXVD5、FYB、HLA-E、HSPA1L、HYAL2、ICAM2、IFIT5、IFITM1、IKBKB、IQSEC1、IRS4、KIAA0664L3、KIAA0748、KLF3、KLF9、KRT18、LEF1、LINC

00342、LIPA、LIPT1、LLGL2、LMBR1L、LPA2、LTBP3、LYPD3、LZTFL1、MANBA、MAP2K6、MAP3K1、MARCH8、MAU2、MGEA5、MMP8、MPO、MSL1、MSL3、MYH3、MYLIP、NAGPA、NDST2、NISCH、NKTR、NLRP1、NOSIP、NP1P、NUMA1、PAIP2B、PAPD7、PBXIP1、PCIF1、PI4KA、PLCL2、PLEKHA1、PLEKHF2、PNISR、PPFIBP2、PRKCA、PRKCZ、PRKD3、PRMT2、PTP4A3、PXN、RASA2、RASA3、RASGRP2、RBM38、REPIN1、RNF38、RNF44、ROR1、RPL30、RPL32、RPLP1、RPS20、RPS24、RPS27、RPS6、RPS9、RXRA、RYK、SCAND2、SEMA4C、SETD1B、SETD6、SETX、SF3B1、SH2B1、SLC2A4RG、SLC35E2B、SLC46A3、SMAGP、SMARCE1、SMPD1、SNPH、SP140L、SPATA6、SPG7、SREK1IP1、SRSF5、STAT5B、SVIL、SYF2、SYNJ2BP、TAF1C、TBC1D4、TCF20、TECTA、TES、TMEM127、TMEM159、TMEM30B、TMEM66、TMEM8B、TP53TG1、TPCN1、TRIM22、TRIM44、TSC1、TSC22D1、TSC22D3、TSPYL2、TTC9、TTN、UBE2G2、USP33、USP34、VAMP1、VILL、VIPR1、VPS13C、ZBED5、ZBTB25、ZBTB40、ZC3H3、ZFP161、ZFP36L1、ZFP36L2、ZHX2、ZMYM5、ZNF136、ZNF148、ZNF318、ZNF350、ZNF512B、ZNF609、ZNF652、ZNF83、ZNF862及びZNF91を含む。

【0981】

遺伝子セット「Progressively up in memory differentiation」は、以下の遺伝子：MTCH2、RAB6C、KIAA0195、SETD2、C2orf24、NRD1、GNA13、COPA、SELT、TNIP1、CBFA2T2、LRP10、PRKCI、BRE、ANKS1A、PNPLA6、ARL6IP1、WDFY1、MAPK1、GPR153、SHKBP1、MAP1LC3B2、PIP4K2A、HCN3、GTPBP1、TLN1、C4orf34、KIF3B、TCIRG1、PPP3CA、ATG4D、TYMP、TRAF6、C17orf76、WIPF1、FAM108A1、MYL6、NRM、SPCS2、GGT3P、GALK1、CLIP4、ARL4C、YWHAQ、LPCAT4、ATG2A、IDS、TBC1D5、DMPK、ST6GALNAC6、REEP5、ABHD6、KIAA0247、EMB、TSEN54、SPIRE2、PIWIL4、ZSCAN22、ICAM1、CHD9、LPIN2、SETD8、ZC3H12A、ULBP3、IL15RA、HLA-DQB2、LCP1、CHP、RUNX3、TMEM43、REEP4、MEF2D、ABL1、TMEM39A、PCBP4、PLCD1、CHST12、RASGRP1、C1orf58、C11orf63、C6orf129、FHOD1、DKFZp434F142、PIK3CG、ITPR3、BTG3、C4orf50、CNNM3、IFI16、AK1、CDK2AP1、REL、BCL2L1、MVD、TTC39C、PLEKHA2、FKBP11、EML4、FANCA、CDCA4、FUCA2、MFS10、TBCD、CAPN2、IQGAP1、CHST11、PIK3R1、MYO5A、KIR2DL3、DLG3、MXD4、RALGDS、S1PR5、WSB2、CCR3、TIPARP、SP140、CD151、SOX13、KRTAP5-2、NFB1、PEA15、PARP8、RNF166、UEVLD、LIMK1、CACNB1、TMX4、SLC6A6、LBA1、SV2A、LLGL2、IRF1、PPP2R5C、CD99、RAPGEF1、PPP4R1、OSBPL7、FOXP4、SLA2、TBC1D2B、ST7、JAZF1、GGA2、PI4K2A、CD68、LPGAT1、STX11、ZAK、FAM160B1、RORA、C8orf80、APOBEC3F、TGFB1、DNAJC1、GPR114、LRP8、CD69、CMIP、NAT13、TGFB1、FLJ00049、ANTXR2、NR4A3、IL12RB1、

NTNG2、RDX、MLLT4、GPRIN3、ADCY9、CD300A、SCD5、ABI3、PTPN22、LGALS1、SYTL3、BMPR1A、TBK1、PM AIP1、RASGEF1A、GCNT1、GABARAPL1、STOM、CALHM2、ABCA2、PPP1R16B、SYNE2、PAM、C12orf75、CLCF1、MXRA7、APOBEC3C、CLSTN3、ACOT9、HIP1、LAG3、TNFAIP3、DCBLD1、KLF6、CACNB3、RNF19A、RAB27A、FADS3、DLG5、APOBEC3D、TNFRSF1B、ACTN4、TBKBP1、ATXN1、ARAP2、ARHGEF12、FAM53B、MAN1A1、FAM38A、PLXNC1、GRLF1、SRGN、HLA-DRB5、B4GALT5、WIPI1、PTPRJ、SLFN11、DUSP2、ANXA5、AHNAK、NEO1、CLIC1、EIF2C4、MAP3K5、IL2RB、PLEKHG1、MYO6、GTDC1、EDARADD、GALM、TARP、ADAM8、MSC、HNRPLL、SYT11、ATP2B4、NHSL2、MATK、ARHGAP18、SLFN12L、SPATS2L、RAB27B、PIK3R3、TP53INP1、MBOAT1、GYG1、KATNAL1、FAM46C、ZC3HAV1L、ANXA2P2、CTNNA1、NPC1、C3AR1、CRIM1、SH2D2A、ERN1、YPEL1、TBX21、SLC1A4、FASLG、PHACTR2、GALNT3、ADRB2、PIK3AP1、TLR3、PLEKHA5、DUSP10、GNAO1、PTGDR、FRMD4B、ANXA2、EOMES、CADM1、MAF、TPRG1、NBEAL2、PPP2R2B、PELO、SLC4A4、KLRF1、FOSL2、RGS2、TGFBR3、PRF1、MYO1F、GAB3、C17orf66、MICAL2、CYTH3、TOX、HLA-DRA、SYNE1、WEE1、PYHIN1、F2R、PLD1、THBS1、CD58、FAS、NETO2、CXCR6、ST6GALNAC2、DUSP4、AUTS2、C1orf21、KLRG1、TNIP3、GZMA、PRR5L、PRDM1、ST8SIA6、PLXND1、PTPRM、GFPT2、MYBL1、SLAMF7、FLJ16686、GNLY、ZEB2、CST7、IL18RAP、CCL5、KLRD1及びKLRB1を含む。

【0982】

遺伝子セット「Up TEM vs. Down TN」は、以下の遺伝子：MYO5A、MXD4、STK3、S1PR5、GLCCI1、CCR3、SOX13、KRTAP5-2、PEA15、PARP8、RNF166、UEVLD、LIMK1、SLC6A6、SV2A、KPNA2、OSBPL7、ST7、GGA2、PI4K2A、CD68、ZAK、RORA、TGFB1、DNAJC1、JOSD1、ZFYVE28、LRP8、OSBPL3、CMIP、NAT13、TGFB1、ANTXR2、NR4A3、RDX、ADCY9、CHN1、CD300A、SCD5、PTPN22、LGALS1、RASGEF1A、GCNT1、GLUL、ABCA2、CLDND1、PAM、CLCF1、MXRA7、CLSTN3、ACOT9、METRNL、BMPR1A、LRIG1、APOBEC3G、CACNB3、RNF19A、RAB27A、FADS3、ACTN4、TBKBP1、FAM53B、MAN1A1、FAM38A、GRLF1、B4GALT5、WIPI1、DUSP2、ANXA5、AHNAK、CLIC1、MAP3K5、ST8SIA1、TARP、ADAM8、MATK、SLFN12L、PIK3R3、FAM46C、ANXA2P2、CTNNA1、NPC1、SH2D2A、ERN1、YPEL1、TBX21、STOM、PHACTR2、GBP5、ADRB2、PIK3AP1、DUSP10、PTGDR、EOMES、MAF、TPRG1、NBEAL2、NCAPH、SLC4A4、FOSL2、RGS2、TGFBR3、MYO1F、C17orf66、CYTH3、WEE1、PYHIN1、F2R、THBS1、CD58、AUTS2、FAM129A、TNIP3、GZMA、PRR5L、PRDM1、PLXND1、PTPRM、GFPT2、MYBL1、SLAMF7、ZEB2、CST7、CCL5、GZMK及びKLRB1を含む。

【0983】

また、類似のプロセス及び/又は特徴を記述する他の遺伝子セットを用いて、前述した細胞表現型を特性決定することもできる。

【0984】

Cell Ranger VDJを使用して、単一細胞VDJ配列及び各単一細胞5'ライブラリーのアノテーションを作成した。データ解析及び視覚化のために、Loupe Cell Browserソフトウェア及びBioconductorパッケージを用いた。

【0985】

結果

この実施例は、インプット細胞として使用される精製T細胞、ARMプロセスを用いて製造されるCART細胞(「第1日」細胞と標識される)及びTMプロセスを用いて製造されるCART細胞(「第9日」細胞と標識される)間のT細胞状態を単一細胞RNA-seq(scRNA-seq)により比較することを目標とする。加えて、単一細胞TCR-seq(scTCR-seq)を実施して、クローン性を調べ、インプットから製造後材料への細胞分化を追跡する。 10

【0986】

図23A~23Cに示すように、インプット細胞は、最も少ない発現遺伝子及びUMIを有したが、これは、これらの細胞が、転写的に活性ではなく、休止状態であることを示唆している。第1日及び第9日細胞は、より多くの遺伝子を発現し、第9日細胞が転写的に最も活性であった。同様の結果を図24A~24Dに示す。インプット細胞は、増殖遺伝子を発現していない(図24A及び24D)。 20

【0987】

追加の遺伝子セット解析を図25A~25Eに示す。メディアン遺伝子セットスコア中央値を用いて、様々な細胞集団を比較した。第1日細胞及びインプット細胞は、より若く、よりステム様メモリー状態であった(図25A~25C)。図25Aでは、第1日細胞、第9日細胞及びインプット細胞のGeneSetScore(Up TEM vs. Down TSCM)中央値は、それぞれ-0.084、0.035及び-0.1である。図25Bでは、第1日細胞、第9日細胞及びインプット細胞のGeneSetScore(Up TEM vs. Down TSCM)中央値は、それぞれ-0.082、0.087及び-0.071である。図25Cでは、第1日細胞、第9日細胞及びインプット細胞のGeneSetScore(Down Stemness)中央値は、それぞれ-0.062、0.14及び-0.081である。 30

【0988】

加えて、第1日細胞は、第9日細胞と比べて、より理想的代謝状態にあった(図25D及び25E)。図25Dでは、第1日細胞、第9日細胞及びインプット細胞のGeneSetScore(Up hypoxia)中央値は、それぞれ0.019、0.11及び-0.096である。図25Eでは、第1日細胞、第9日細胞及びインプット細胞のGeneSetScore(Up autophagy)中央値は、それぞれ0.066、0.11及び-0.09である。 40

【0989】

遺伝子発現に基づいて、インプット細胞は、4つのクラスターを含有する。クラスター0は、LMNA、S100A4などの高度発現を特徴とする。クラスター1は、RP913、PRKCQ-AS1などの高度発現を特徴とする。クラスター2は、PR11-291B21.2、CD8Bなどの高度発現を特徴とする。クラスター3は、NKG7、GZMH、CCL5、CST7、GNLY、FGFBP2、GZMA、CCL4、CTSW、CD8Aなどの高度発現を特徴とする。インプット細胞のT分布型確率的近傍埋め込み法(T-Distributed Stochastic Neighbor Embedding)(TSNE)プロットにおいて、クラスター3は他の細胞から突出しており、クラスター1及び2は、識別するのが難しい。 50

【0990】

図 2 6 A ~ 2 6 C に示す遺伝子セット解析によれば、クラスター 0 及びクラスター 3 は、T エフェクター表現型が濃縮されたクラスター 1 及びクラスター 2 と比べて、T 調節表現型が濃縮されていた。クラスター 3 は、後期メモリー/エフェクターメモリー (TEM) 細胞により占められ、クラスター 1 及びクラスター 2 は、早期メモリー及びナイーブ細胞であり、クラスター 0 は、中間にある。インプット細胞の大部分は、早期メモリー、ナイーブ状態にあった。理論に縛られることを意図しないが、これらの細胞が、製造工程中、最良に機能し得る。

【 0 9 9 1 】

第 1 日細胞及び第 9 日細胞に、より低い転写不均一性が認められた (データは示していない)。

10

【 0 9 9 2 】

インプット集団と同様に、第 1 日細胞は、インプット細胞のクラスター 3 にみられるものと類似して、T S N E プロットにおいて早期メモリー細胞の大きいクラスターと、後期メモリー細胞のより小さいクラスターを示した。対照的に、第 9 日細胞は、T S N E プロットに早期メモリー細胞の明確なクラスターは示さなかった。これは、第 9 日までに、細胞がより均質になったことを意味する。

【 0 9 9 3 】

T C R を配列決定し、クロノタイプ多様性を測定した。全体として、3 つのクロノタイププロフィールは、非常に平坦であった (ほとんどのクローンは、1 回のみ選び出された) (図 2 7 A ~ 2 7 C 及び表 2 4)。表 2 4 のシャノンエントロピーは、分布の平坦性を測定する。インプット細胞中の優勢なクローンは、後期メモリー細胞であった。第 1 日細胞は、インプット細胞と類似しているようにみえたが、均一になり始めた。9 日までに、優勢なクローンは実質的に均一になり、分布がはるかに平坦になった。多様性測定は、インプット細胞又は第 1 日細胞よりも第 9 日にはるかに均一且つ平坦な分布が存在したため、第 9 日で最も高かった。

20

【 0 9 9 4 】

【 表 1 1 0 】

表 24: TCR 多様性の測定

	インプット	第 1 日産物	第 9 日産物
クロノタイプ別平均 クローン	1.10	1.05	1.07
細胞の推定数	7344	7687	7233
クロノタイプの総数	5325	7403	6736
多様性	342.27	802.94	3382.62
正規化されたシャノン エントロピー	9.98E-01	9.95E-01	9.96E-01

30

40

【 0 9 9 5 】

まとめ

第 1 日及び第 9 日産物間に有意な T 細胞状態の差があった。第 1 日細胞は、インプット細胞とはるかによく類似し、幹細胞性シグネチャーが豊富であったが、これは、より有効な産物を示す。

【 0 9 9 6 】

実施例 9 : B C M A C A R 及び C D 1 9 C A R の共形質導入、M O I の評価及び有効性試験

50

この実施例では、BCMA CARをコードするレンチウイルスベクター及びCD19 CARをコードするレンチウイルスベクターでT細胞を共形質導入することにより製造されるCAR T細胞の特性決定を説明する。BCMA CARは、配列番号107のアミノ酸配列を含み、CD19 CARは、配列番号225のアミノ酸配列を含む。

【0997】

細胞調製及びCAR形質導入

T細胞の形質導入においてBCMA及びCD19 CARの4つの異なるMOI組み合わせを24ウェルフォーマットで試験した。BCMA CARレンチウイルスベクター及びCD19 CARレンチウイルスベクターは、それぞれ5及び1のMOIで(図28A及び28Bの5/1);それぞれ5及び0.5のMOIで(図28A及び28Bの5/0.5);それぞれ2.5及び1のMOIで(図28A及び28Bの2.5/1);又はそれぞれ2.5及び0.5のMOIで(図28A及び28Bの2.5/0.5)を使用した。Prodigyにより精製したT細胞を 3×10^6 /mL、1/mLで24ウェルプレートに接種し、BCMA及びCD19 CARベクターの両方を、上に示す異なるMOIで添加した。接種時に、抗CD3及び抗CD28アゴニストに共役したポリマーナノマトリックスであるTransAct(Milenyi Biotech)を添加した。100IU/mLのヒト組換えIL-2(Prometheus, San Diego, CA)及び2%ICRS(Life Technologies)を含有するOptimizer(商標)完全T細胞培地中で細胞を37℃及び5%CO₂で24時間インキュベートして採取した。

【0998】

次に、3×用量のPBS+1%HASで細胞を3回洗浄した。培養及びハーベスト洗浄後、生存率及び細胞数を評価して、最終産物に対するベクター力価測定の影響を決定した。

【0999】

その後、24ウェルプレートにおいて、 1×10^6 VNC/mLで細胞を再培養し、さらに6日間インキュベートした。抗BCMA CAR発現を評価するためのFACS解析を形質導入から4及び7日後(採取から3及び6日後)に実施した。

【1000】

CAR発現分析

サンプルをフローサイトメーター(BD LSRT Fortessa)で測定し、データをFlowJoソフトウェアで解析した。ARMプロセスを用いた場合、CARは、24h以内に十分に組み込まれてエキスピボで発現されない可能性があるため、CARが安定して発現されている場合、ウイルス添加後96hをインビトロ及びインビボ用量設定戦略のための代替時点として使用することができた。二重ターゲティングカクテルCAR測定のために同じ戦略を採用した。

【1001】

FACS解析は、T細胞へのBCMA及びCD19 CARの共形質導入によって3つの異なるCAR+亜集団が形成されたことを示し、その割合は、試験した4つの異なるMOI組み合わせで変動する(図28A)が、これは、カクテルCAR-T細胞産物が、BCMA及びCD19 CARの共形質導入により好適に産生され得ることを示している。5/0.5のMOIでは、モノ抗BCMA CAR+(抗CD19 CAR陰性)が、20.7%と最も高く、次いで16.2%の二重+CAR及び10.5%のモノ抗CD19 CAR+と続いた。二重CAR+%及びモノ抗BCMA CAR+として算出される総BCMA CAR+は、36.9%であったのに対し、総CD19 CAR+%は、26.7%であった(図28A及び28B)。2.5/0.5及び2.5/1比のMOIのいずれも、二重+%及びモノ抗BCMA CAR+%よりはるかに高いモノCD19 CAR+%が得られた。さらには、二重+CAR%は、総MOI使用と正に相関した(図28B)。総CAR+%は、MOI5/1及びMOI5/0.5で類似している。各集団におけるCAR発現は、BCMA及びCD19 CAR形質導入T細胞を含め、形質導入後第4

日～第7日まで比較的安定していることが認められた(図28A及び28B)。データは、3つのドナーで一致していた。一部の実施形態では、共形質導入のために、MOI 4～5のBCMA CAR及びMOI 0.5のCD19 CARを用いて、二重ターゲティングカクテルCAR T産物を作製した。

【1002】

加えて、製剤化及び凍結保存前に、T細胞濃縮から、T細胞接種、活性化、形質導入及び培養、CentriCult中のハーベスト洗浄まで、CliniMACS Prodigyで、ラージスケールラン実験を完全に実施した。BCMA/CD19 CARについて4/0.5又は4.75/0.5のMOIを使用した。この試験では、 7.5×10^8 の総細胞の場合、合計250 mL中 3×10^6 / mLの接種密度を使用した。24 hで細胞を採取し、PBS + 1% HASで3x洗浄した後、下流適用のために凍結保存した。残ったT細胞を収集して、UTD、BCMA CAR T及びCD19 CAR Tとしてそれぞれの対照群を作製した。アリコートを取得し、フローサイトメトリー解析のために24ウェルプレート中 1×10^6 / mLで再培養して、形質導入後の第4日のBCMA - CAR発現を評価した。

10

【1003】

図29は、二重ターゲティングカクテルCAR Tが、形質導入後の第4日に、11.8%のモノ抗BCMA CAR T細胞、4.31%の二重CAR T細胞及び約9%のモノ抗CD19 CAR T細胞を含有することを示した。この試験では、二重CAR + %及びモノ抗BCMA CAR + %として算出される総抗BCMA CAR + %は、16%であったのに対し；二重CAR + %及びモノ抗CD19 CAR + %として算出される総抗CD19 CAR + %は、13.4%であった。

20

【1004】

インビボ活性に関する二重カクテルCAR Tを3つの異種移植マウスモデルにおいて解析した；1)多発性骨髄腫のKMS11-1ucモデル(このBCMA発現モデルは、ルシフェラーゼリポーター構築物でタグ付けされ、これは、生物発光イメージングにより骨髄中の疾患を全身モニターすることを可能にする)；2)MM患者の不均一性を模倣するために、95%のKMS-11-1uc骨髄腫細胞を5%のCD19+腫瘍(例えば、Nalm6-1uc)と混合することにより定着させた混合型腫瘍モデル；並びに3)二重ターゲティングカクテルCAR Tの二重陽性CAR T集団のCD19ターゲティングの特異性及びさらなる拡大を評価するためのNalm6-1ucモデル。BCMA CAR T及びCD19 CAR Tは、それぞれのモデルの対照として使用した。CAR-T細胞の用量計算のために、総抗BCMA CAR + %は、モデル1及び2について形質導入後の第4日に測定し、総抗CD19 CAR + %は、モデル3について形質導入後の第4日に測定した。UTD用量は、それぞれのプロセスの最も高い総T細胞用量を表した。

30

【1005】

3つのモデルにおける全ての群の腫瘍退縮曲線を図30A～Eに示す。KMS-11-1ucモデルでは、二重ターゲティングカクテルCAR T及びBCMA CAR Tの両方が、図30Aに示すように、腫瘍退縮を用量依存的に誘導した。 1×10^4 用量では、二重ターゲティングカクテルCAR T及びBCMA CAR Tの両方が、同様のペースで遅延した腫瘍阻害を示し、いずれも、試験の終了時には腫瘍を排除することができた。二重ターゲティングカクテルCAR Tは、 5×10^4 用量のBCMA CAR Tより有効な腫瘍クリアランスを示し、その場合、二重ターゲティングカクテルCAR Tは、CAR-T注入後の第14日までに腫瘍を排除したのに対し、BCMA CAR Tは、少なくとも1週間の効果遅延を示した。より広い用量範囲(1×10^4 、 5×10^4 、 1.5×10^5) (図30B)に及ぶ同じバッチからの残留細胞産物を使用することによる反復試験では、二重ターゲティングカクテルCAR Tによる腫瘍退縮において用量依存性が確認された。 1.5×10^5 、 5×10^4 での二重ターゲティングカクテルCAR Tと、 1.5×10^5 でのBCMA CAR Tの退縮曲線は重なり合う。 5×10^4 でのBCMA CAR Tは、CAR-T注入後14日の期間にわたって同じ用量の二重ターゲティングカクテルCAR Tより若干遅い腫瘍退縮にもかかわらず、この

40

50

マウスコホートにおいてCAR-T注入後の第14日までには腫瘍を排除することができた。1e⁴用量では、二重ターゲティングカクテルCARTは、BCMACARTより優れた有効性を示した。手短には、KMS-11-lucモデルを用いると、二重ターゲティングカクテルCARTは、BCMAを特異的にターゲティングすることができ、BCMA+多発性骨髄腫の殺傷に際してBCMACARTと同等の効力があることが示され、より低い用量でBCMACARTより強力でもあることが実証された。

【1006】

次に、BCMAとCD19の両方が「混合型」モデルに存在するとき、5%のNa1m6-luc細胞と混合したKMS-11-luc細胞をマウスに移植した場合の、二重ターゲティングカクテルCARTの有効性を評価した。図30Cに示す混合型腫瘍モデルにおいて、5e⁴及び1e⁴の二重ターゲティングカクテルCARTのみが部分的な腫瘍阻害を用量依存的に示したのに対し、BCMACART又はCD19CARTのいずれも5e⁴用量で何らの効果も示さなかった。図30に示すように、より高い用量群を対象とする反復試験において、1.5e⁵の二重ターゲティングカクテルCARTは、CAR-T注入後の第14日までに混合型腫瘍を排除できることが実証され、腫瘍抑制は用量依存的であった。対照的に、1.5e⁵のBCMACART及びCD19CARTは、BCMA及びCD19の両方が存在するとき、この混合型モデルに部分的な腫瘍阻害のみを示した。

10

【1007】

最後に、二重ターゲティングカクテルCARTが、CD19+腫瘍を特異的にターゲティングすることができるか否かを示すために、Na1m6-lucモデルを使用した。図30Eに示すように、二重ターゲティングカクテルCARTは、より高い用量のモノCD19CARTと同等に、且つより低い用量のモノCD19CARTより優れた様式で用量依存的にNa1m6-luc腫瘍を排除することができた。

20

【1008】

実施例10：BCMA/CD19 CART細胞産物製造のためのMOIの評価

qPCR力価に基づいて、BCMA-CARウイルスの力価測定を実施して、BCMA-CAR/CD19-CARの最適ベクター比を決定した。手短には、T細胞を解凍し、3×10⁶VNC/mL又は6×10⁶VNC/mLの密度で再懸濁した。試験した各MOIについて、1mLの細胞懸濁物を24ウェルプレート中に平板培養し、時点0で形質導入した後、20~24時間インキュベートした。次に、各1mLの培養物を、3×2mLのPBS+1%HSAを用い、手で洗浄した。培養及びハーベスト洗浄の後、生存率及び細胞数を評価して、最終産物に対するベクター力価測定の影響を決定した。続いて、採取した細胞を1×10⁶VNC/mLで培養物に導入し、採取後72時間及び144時間(採取後(PH)の第3日及び第6日(形質導入後の第4日及び第7日)表34及び図31)でCAR(BCMA及びCD19)発現を測定した。

30

【1009】

40

50

【表 1 1 1】

表 34 BCMA/CD19 二重 CART 細胞産物の形質導入 GMP ベクターの力価測定

ドナーID	第 0 H 接種密度 (VNC/mL)	MOI (TU/ 細胞) BCMA- CAR /CD19- CAR	% CAR (総 BCMA-CAR = モノ BCMA 集団+ 二重 BCMA/CD19 CAR 集団)		%モノ CD19 CAR		
			第 3 H PH	第 6 H PH	第 3 日 PH	第 6 日 PH	
ドナーA	3e6	4/0.5	34.4	40.6	11.0	14.4	10
		5/0.5	38.3	49.1	8.9	12.1	
	6e6	4/0.5	32.6	40.7	9.4	13.3	
		5/0.5	38.1	47.8	8.7	11.7	
ドナーB	3e6	4/0.5	38.0	47.9	11.1	14.9	20
		5/0.5	40.6	52.9	9.7	12.6	
	6e6	4/0.5	40.6	51.2	12.1	16.7	
		5/0.5	43.0	55.9	9.9	13.6	

【 1 0 1 0 】

一部の実施形態では、形質導入から 4 日後（又は採取から 3 日後）に、フローサイトメトリーによって測定された BCMA CAR + 生存 T 細胞の総数を用量関連計算に使用した。一部の実施形態では、CentriCult に約 4 e 6 VNC / mL の密度で T 細胞を接種した。一部の実施形態では、BCMA CAR ベクターは、4 . 7 5 の MOI で使用し、CD 1 9 CAR ベクターは、0 . 5 の MOI で使用した。

【 1 0 1 1 】

個別の試験では、自動化閉鎖式装置、CliniMACS Prodigy により、ラージスケールで上記の共形質導入高速製造アプローチを用いて、BCMA / CD 1 9 CAR T 細胞を製造した。手短には、本プロセスは、凍結保存ロイコパックからの T 細胞の選択で開始する。CD 4 及び CD 8 マイクロビーズを用いて、T 細胞をポジティブ選択する。選択後、T 細胞をリアプリケーションバッグに溶出してから、サンプルを取り出して、細胞濃度、生存率及び純度を評価する。次に、T 細胞を活性化した後、抗 BCMA CAR をコードするレンチウイルスベクター及び抗 CD 1 9 CAR をコードするレンチウイルスベクターで形質導入する。図 3 2 に示すように、Prodigy のアウトプットからの T 細胞サブセットは、アフエーシス用のインプットと相違しなかった。

【 1 0 1 2 】

実施例 1 1 : 抗 BCMA CAR 及び抗 CD 1 9 CAR を発現するように操作された T 細胞のさらなる特性決定

この実施例では、実施例 9 に記載のように作製された BCMA / CD 1 9 CAR T 細胞産物のさらなる特性決定を説明する。この細胞産物は、3 つの異なる CAR + 集団：モノ抗 BCMA CAR - T 細胞、モノ抗 CD 1 9 CAR - T 細胞及び二重陽性抗 BCMA / 抗 CD 1 9 CAR - T 細胞を含む。加えて、この細胞産物は、非形質導入 T 細胞の集団も含有する。

【 1 0 1 3 】

BCMA / CD 1 9 CAR T 細胞産物で処置したマウスにおける血漿 IFN -

IFN - は、標的結合に応答する CAR - T 細胞活性化の目印である。実施例 9 に記

10

20

30

40

50

載したインビボ試験において血漿 I F N - γ の動態を解析した。図 3 3 A 及び 3 3 B に示すように、全ての C A R - T 処置群が、第 2 日に低レベルの循環 I F N - γ (1 0 ~ 5 0 p g / m l) を示し、その後も引き続き I F N - γ 分泌を増加した。

【 1 0 1 4 】

非臨床薬物動態及び代謝

末梢血 (モノ抗 B C M A 、モノ抗 C D 1 9 又は二重陽性抗 B C M A / 抗 C D 1 9 C A R - T 細胞を含む) 中の B C M A / C D 1 9 二重 C A R T 細胞産物の増殖を注入から 3 週間後までフローサイトメトリーにより解析し、K M S - 1 1 - l u c モデルの基準 B C M A C A R T と比較した。C D 3 + T 細胞及び C A R + T 細胞増殖の両方が、全ての C A R - T 処置群に観察された。二重又はモノ C A R + T 細胞集団中の B C M A / C D 1 9 二重 C A R T 細胞産物について、用量依存的細胞増殖が観察された。2 つの試験からのデータに基づいて、B C M A / C D 1 9 二重 C A R T 細胞産物は、B C M A C A R T と比べて、わずかにより高い B C M A ターゲティング C A R + T 細胞及び総 C A R + T 細胞の増殖を示した。

10

【 1 0 1 5 】

3 つのモデル (K M S - 1 1 、 N a l m - 6 及び混合型) における C A R + T 細胞の増殖を評価することにより、B C M A / C D 1 9 二重 C A R T 細胞産物の抗原依存的増殖を実証した。B C M A 発現 K M S - 1 1 異種移植モデルでは、二重陽性抗 B C M A / 抗 C D 1 9 及びモノ抗 B C M A C A R + T 細胞が大幅に拡大したのに対し、C D 1 9 発現 N a l m - 6 異種移植モデルでは、二重陽性抗 B C M A / 抗 C D 1 9 及びモノ抗 C D 1 9 C A R + T 細胞が大幅に拡大した。二重陽性 C A R - T 細胞集団は、B C M A 又は C D 1 9 抗原のいずれか単独からの活性化によって拡大することができた。K M S - 1 1 モデルにおいて、二重陽性抗 B C M A / 抗 C D 1 9 及びモノ抗 B C M A C A R + T 細胞の初期増殖速度は同等であり、また、N a l m - 6 モデルにおける二重陽性抗 C A R 及びモノ抗 C D 1 9 C A R + T 細胞の初期増殖速度も同様であった。

20

【 1 0 1 6 】

結論

B C M A / C D 1 9 二重 C A R T 細胞産物は、高速製造プロセスを用いて作製される新規の抗 B C M A 及び抗 C D 1 9 二重ターゲティング C A R - T 細胞産物であり、これは、T 細胞の幹細胞性を保存する。

30

【 1 0 1 7 】

3 つの異種移植マウスモデル (K M S - 1 1 、 N a l m - 6 及び混合型) において、B C M A / C D 1 9 二重 C A R T 細胞産物は、抗原依存的及び用量依存的様式で、腫瘍増殖を抑制し、C A R - T 拡大及びサイトカイン産生を誘導することにより、強力なインビボ薬効薬理を示した。

【 1 0 1 8 】

二重ターゲティング B C M A / C D 1 9 C A R T 細胞産物を用いることにより、混合型モデルにおける腫瘍排除が、用量依存的様式で増大する腫瘍退縮と共に達成された。モノ B C M A C A R T 又はモノ C D 1 9 C A R T のいずれも、混合型モデルにおいて腫瘍退縮を示さなかった。加えて、B C M A / C D 1 9 二重 C A R T 細胞産物は、持続的なインビボでの C A R - T 拡大を示したのに対し、二重陽性 C A R 集団は、B C M A 又は C D 1 9 いずれか単独からの活性化と共に拡大した。多発性骨髄腫の K M S - 1 1 - l u c モデルでは、B C M A / C D 1 9 二重 C A R T 細胞産物は、より高い試験用量レベルで腫瘍増殖抑制に改善を示し、B C M A C A R T と比べて低い試験用量レベルで優れた腫瘍増殖抑制を示した。

40

【 1 0 1 9 】

これらの結果は、多発性骨髄腫再発に対する B C M A - / C D 1 9 + 幹 / 前駆細胞の寄与の可能性に対処して、伝統的に製造されたか、又は単一抗原 B C M A ターゲティング C A R - T よりも強力且つ持続的な応答を提供することにより、臨床転帰を変化させることができる二重ターゲティング C A R - T としての B C M A / C D 1 9 二重 C A R T 細胞産

50

物を支持するものである。

【1020】

実施例12：ARMプロセスを用いて作製された抗BCMA CAR-T細胞の第I相臨床試験

この実施例では、再発及び/又は難治性多発性骨髄腫を有する成人患者におけるARMプロセスを用いて製造された抗BCMA CAR-T細胞療法の安全性及び忍容性を評価するためのオープンラベル、第I相試験を説明する。

【1021】

主要評価項目測定基準は、以下を含む：抗BCMA CAR-T細胞投与後最初の28日間の用量制限毒性(DLT)の発生率及び性質並びに有害事象(AE)及び重篤な有害事象(SAE)(抗BCMA CAR-T細胞投与後の臨床検査値、EGG及びバイタルサインの変化など)の発生率及び重症度。

【1022】

副次評価項目測定基準は、以下を含む：製造完遂率(計画目標用量で処置される対象の数を処置された対象の総数で割った値として定義される)、ORR(IMWG基準(Kumar et al., Lancet Oncol. 2016 Aug; 17(8): e328 - e346、その全体が、参照により本明細書に組み込まれる)を用いて現地の治験責任医師により決定される、3及び6ヶ月時点でsCR+CR+VGPR+PRの最良総合効果(BOR)を有する対象の割合)、CRR(IMWG基準を用いて現地の治験責任医師により決定される、3ヶ月時点でsCR+CRのBORを有する対象の割合)、現地の治験責任医師により評価されるDOR(sCR+CR+VGPR+PRの達成からMMによる再発又は死亡までの時間)、末梢血及び骨髄中の経時的qPCR検出CAR-Tのトランスジーン濃度並びにBCMA CAR-T細胞療法の既存の免疫原性及び処置誘発免疫原性(細胞及び体液性)の要約。

【1023】

参加基準は以下の通りである：

IMiD(例えば、レナリドミド又はボマリドミド)、プロテアソーム阻害剤(例えば、ボルテゾミブ、カルフィルゾミブ)、さらに、利用可能であれば、承認済抗CD38抗体(例えば、ダラツムマブ)を含む処置レジメンの少なくとも2週間前に再発し、且つ/又はそうした処置に対して治療不応性であり、及び疾患進行(IMWG)の記録を有する、MMを有する対象；

プロトコルにより定義される通り、測定可能な疾患；

スクリーニング時に0又は1のいずれかであるECOGパフォーマンスステータス；

適切な血液検査値；及び

製造に容認される非動員細胞の白血球アフェレーシス材料を有していなければならない。

【1024】

除外基準は以下の通りである：

過去のBCMA CAR-T治療歴を含め、過去の遺伝子修飾細胞産物の投与歴。過去にBCMA指向二重特異性抗体又は抗体-薬物コンジュゲート(ADC)を受けたことがある患者は除外されない；

登録前の6週間以内の自家HSCT又は同種異系造血幹細胞移植の過去のあらゆる医療歴(HSCT)；

アフェレーシス前の2週間以内の化学療法又はあらゆる同時抗癌療法(プロトコル処方リンパ球枯渇(LD)化学療法以外)；

アフェレーシス収集の2週間以内又は5半減期以内のいずれか短い方の小分子標的化抗腫瘍薬による処置；並びに

アフェレーシス収集前の4週間以内に抗体又は免疫療法薬(ダラツムマブ以外)を受けたことがある。アフェレーシス収集前の3週間以内のダラツムマブ。

【1025】

10

20

30

40

50

実施例 13 : BCMA / CD19 ダイアボディ CART の評価

NALM-6 ルシフェラーゼ処置モデルを用いて、新規の単鎖ダイアボディ CART 中の CD19 抗原応答性エレメントの有効性を評価する。1 × 10⁶ NALM-6 Luc 細胞を CART 投与の第 - 7 日に、外側尾静脈注射から移植する。体重を測定し、インビボ生物発光イメージング (BLI) を実施して、腫瘍進行を週 2 回実施した。動物を週 2 回測定し、腫瘍負荷が 3 × 10⁶ 光子/秒 (光子/秒) に達したら、動物をその特定の群にランダム化する (第 - 1 日)。第 0 日に、ダイアボディ CART を液体窒素から取り出し、注射のために解凍する。1 × 10⁶ 二重 CAR 陽性細胞を外側尾静脈注射から注射する。数週間の期間にわたって実験評価を実施して、BLI の減少を経時的に評価することにより、いずれの構築物が最良の機能的有効性を有するかを決定する。

10

【 1026 】

均等物

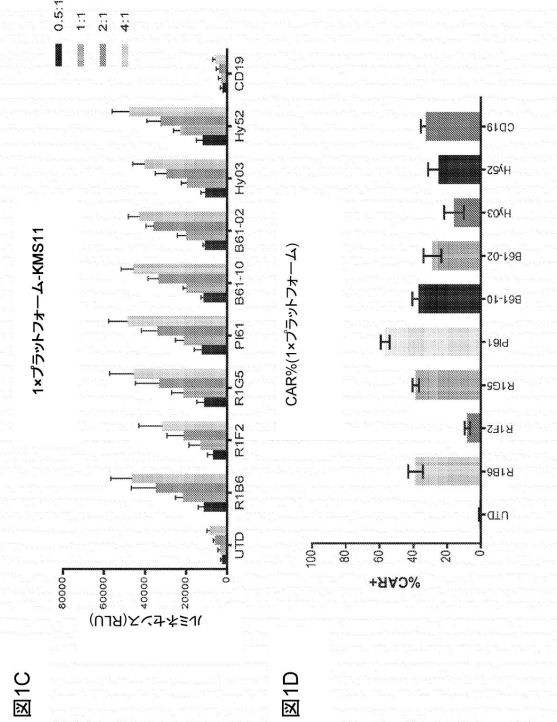
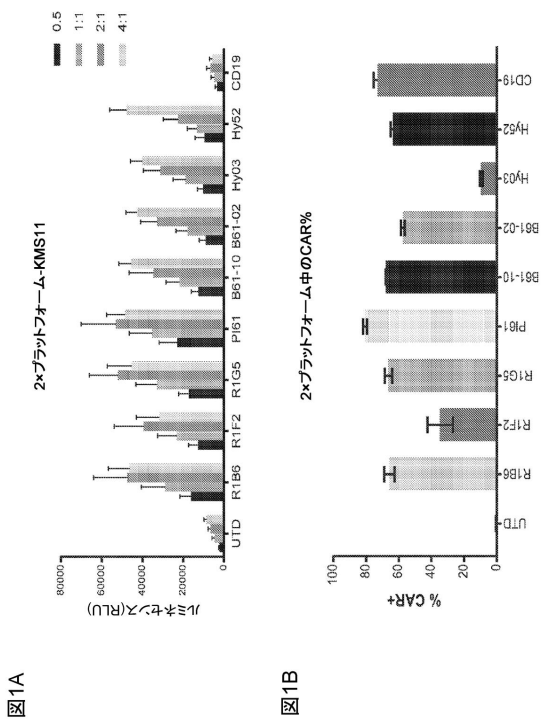
本明細書に引用するそれぞれの及び全ての特許、特許出願及び刊行物の開示は、その全体が参照により本明細書に援用される。本発明は、特定の実施形態を参照して開示しているが、本発明のさらなる実施形態及び変形形態は、本発明の真の趣旨及び範囲から逸脱することなく他の当業者によって考案され得ることが明らかである。下記の特許請求の範囲は、全てのこのような実施形態及び均等な変形形態を含むと解釈されることを意図する。

【 図面 】

【 図 1 - 1 】

【 図 1 - 2 】

20



30

40

50

【 図 1 - 3 】

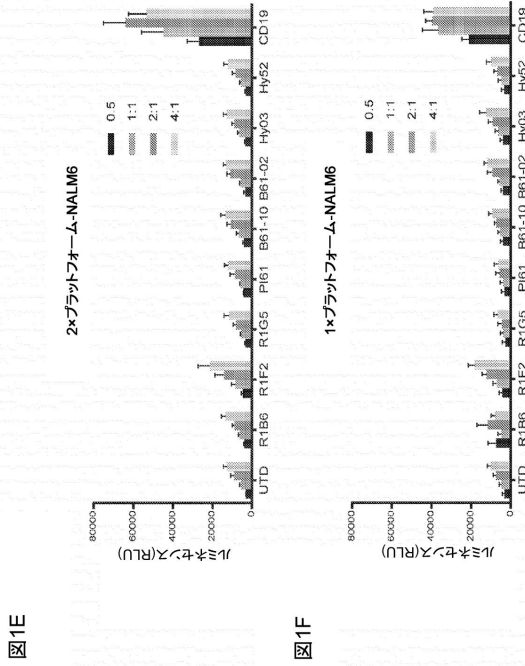


図1E

図1F

【 図 1 - 4 】

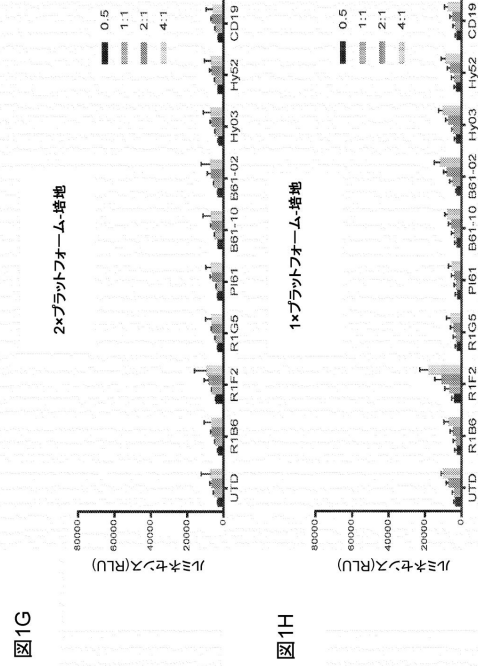


図1G

図1H

10

20

【 図 2 】

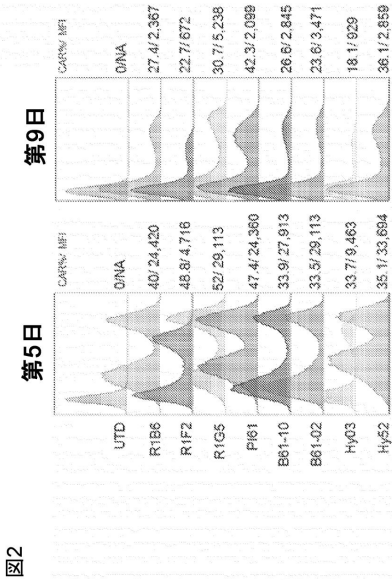


図2

【 図 3 - 1 】

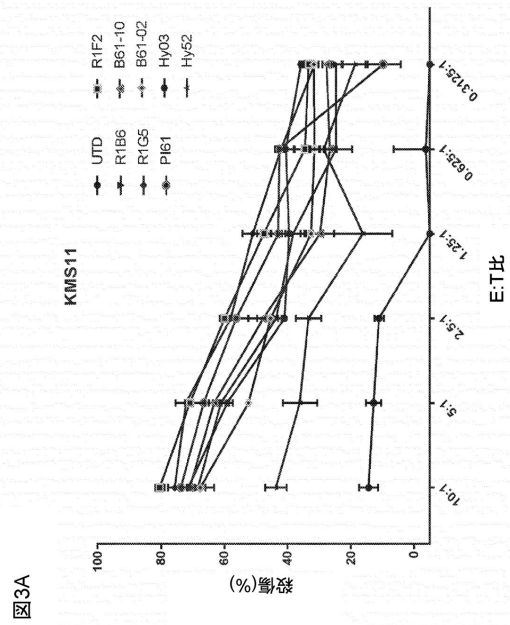


図3A

30

40

50

【 図 3 - 2 】

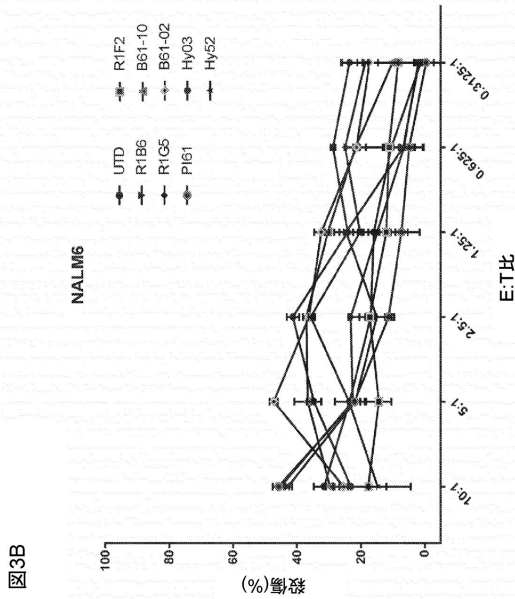


図3B

【 図 3 - 3 】

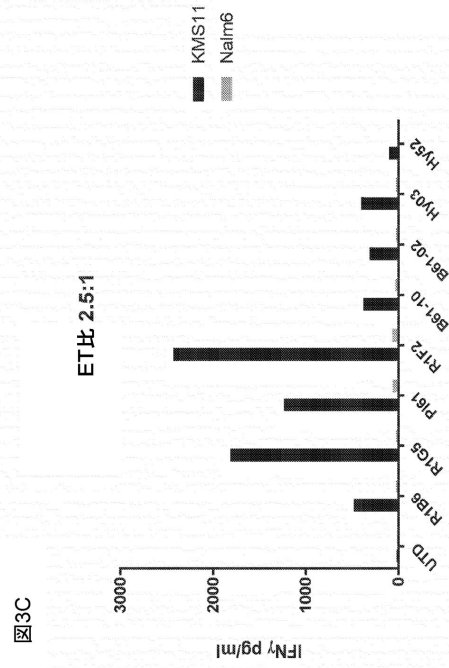


図3C

10

20

【 図 4 - 1 】

構築物	%CD19 CAR	%BCMA CAR	二重陽性 (%)	CD19 CAR のみ	BCMA CAR のみ
UTD	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01
234	7.43	3.47	3.73	3.62	0.06
235	1.35	1.35	1.21	0.13	0.18
236	10.10	10.30	9.62	0.35	0.77
237	10.40	9.61	9.31	0.96	0.59
238	12.10	9.89	9.74	2.12	0.47
244	31.60	0.04	0.04	31.40	0.01

図4A

【 図 4 - 2 】

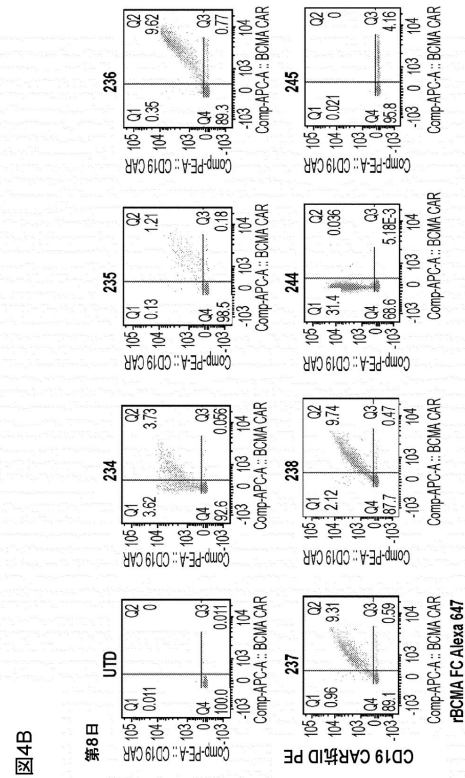


図4B

30

40

50

【 図 4 - 3 】

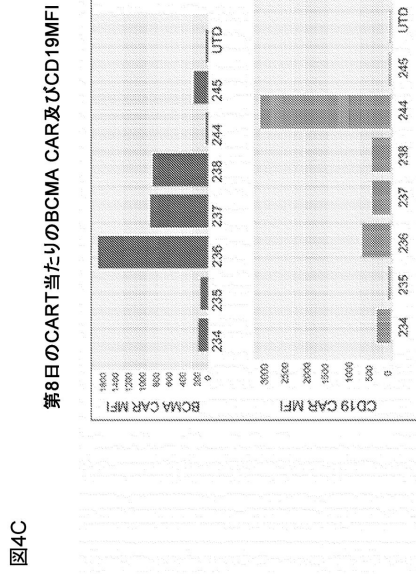


図4C

【 図 5 】

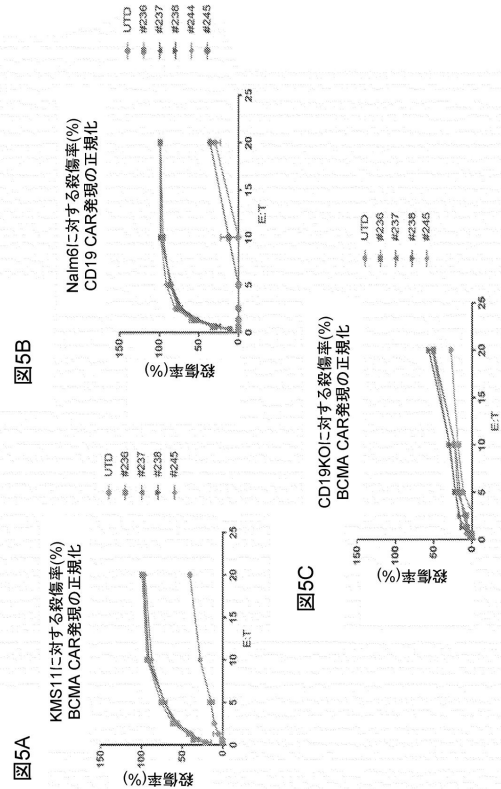


図5B

図5A

図5C

10

20

【 図 6 】

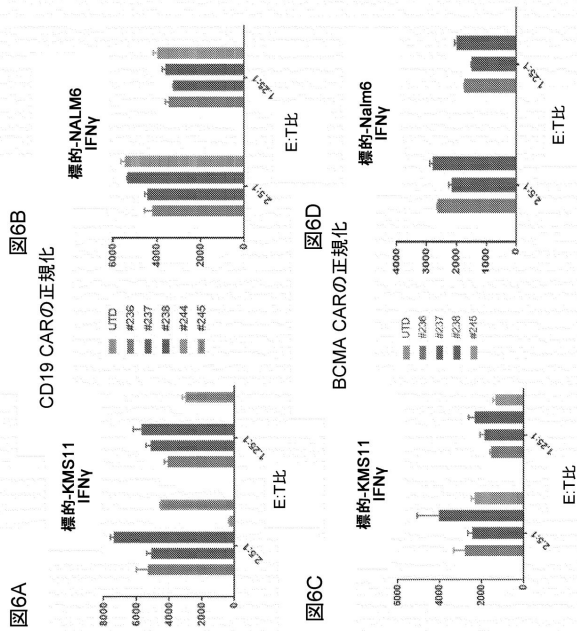


図6A

図6B

図6C

図6D

【 図 7 - 1 】

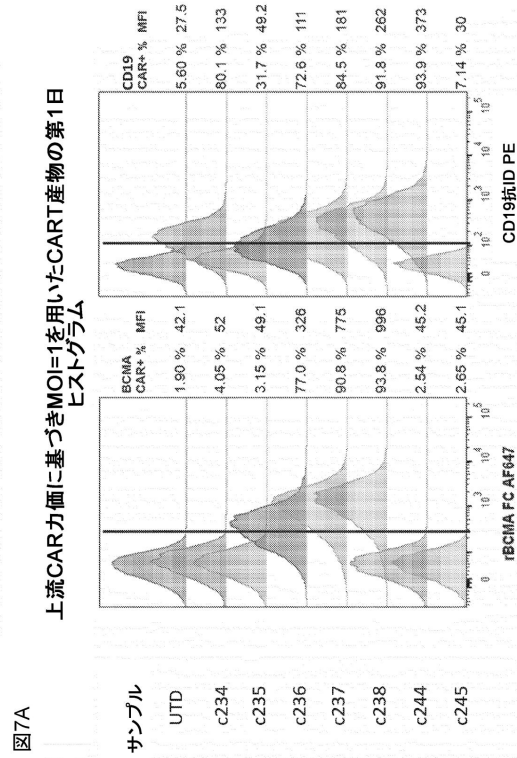


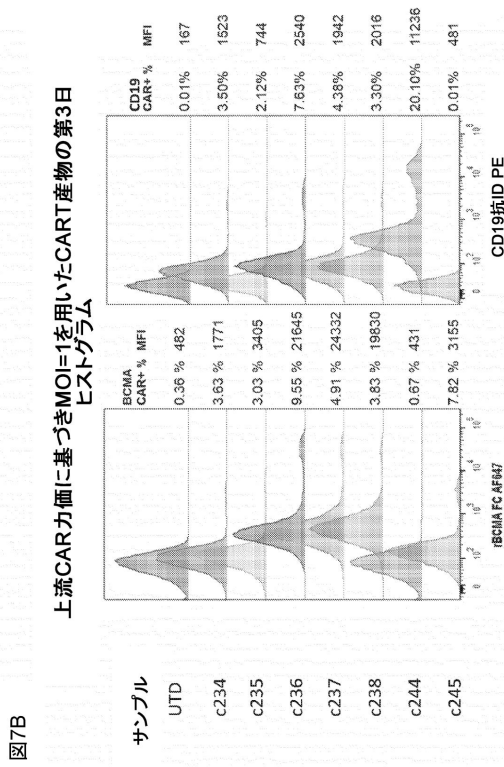
図7A

30

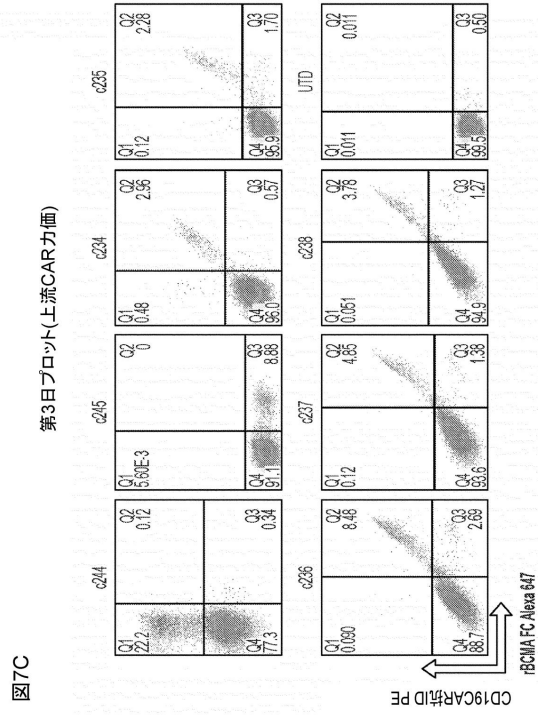
40

50

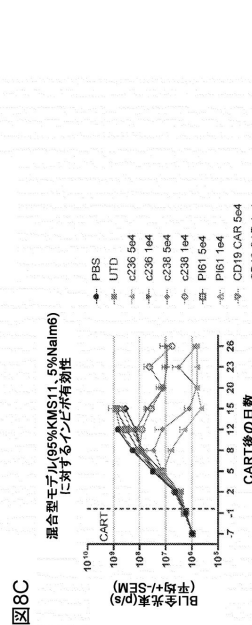
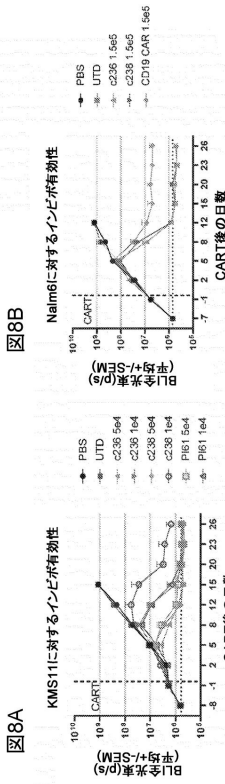
【 図 7 - 2 】



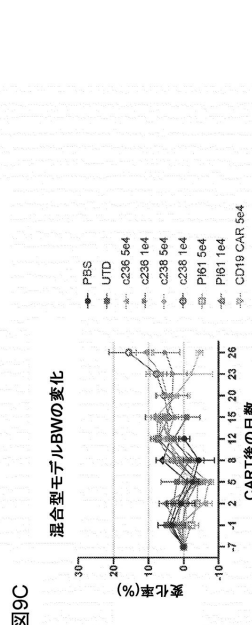
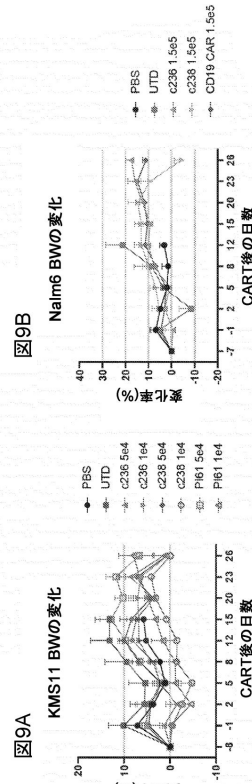
【 図 7 - 3 】



【 図 8 】



【 図 9 】



10

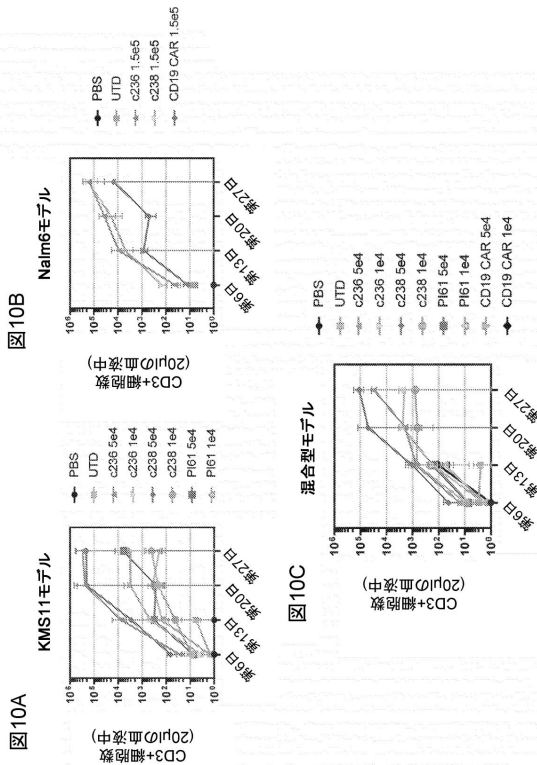
20

30

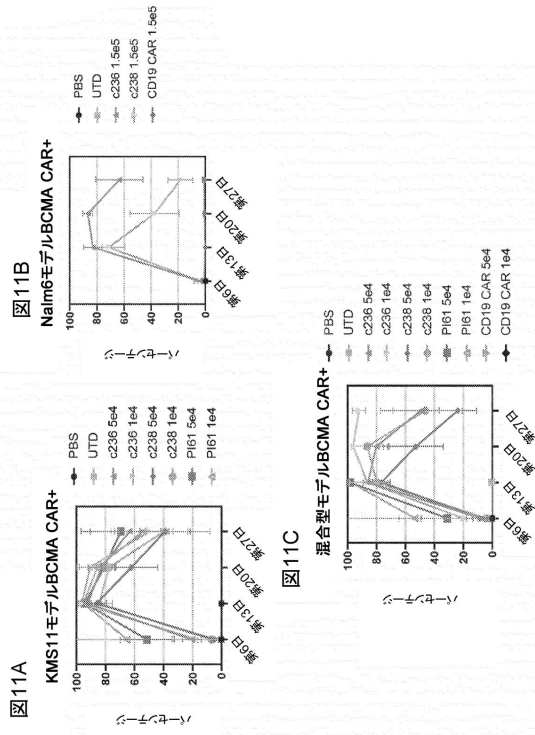
40

50

【 図 1 0 】



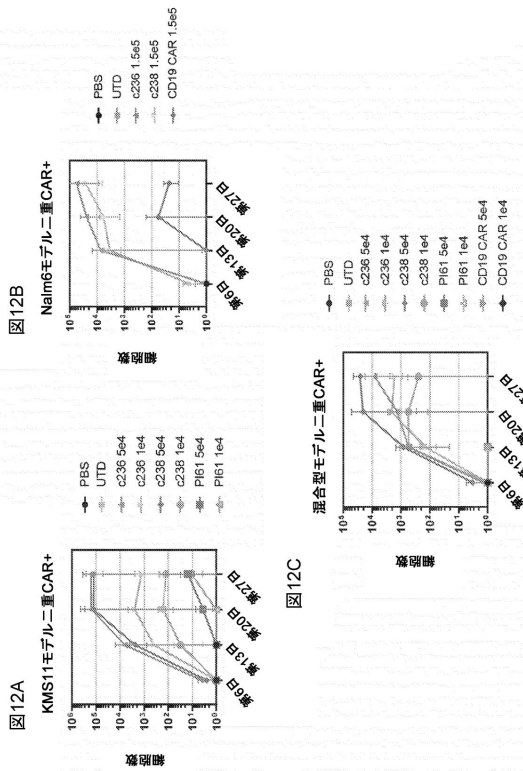
【 図 1 1 】



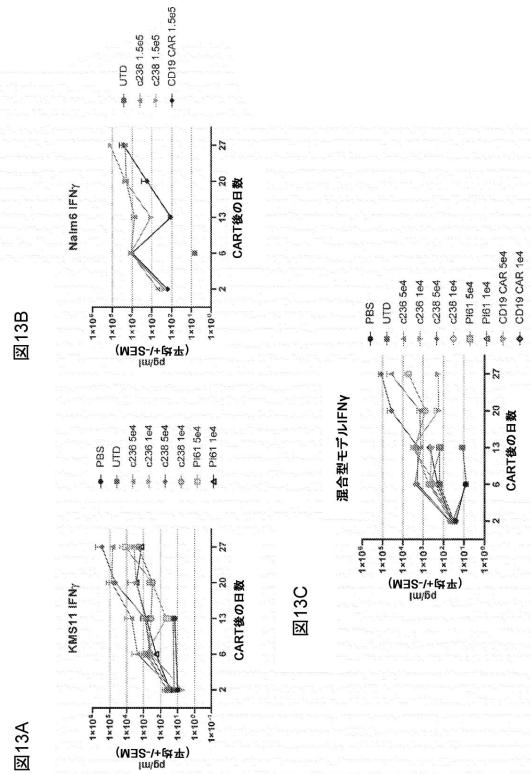
10

20

【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



30

40

50

【 図 1 4 】

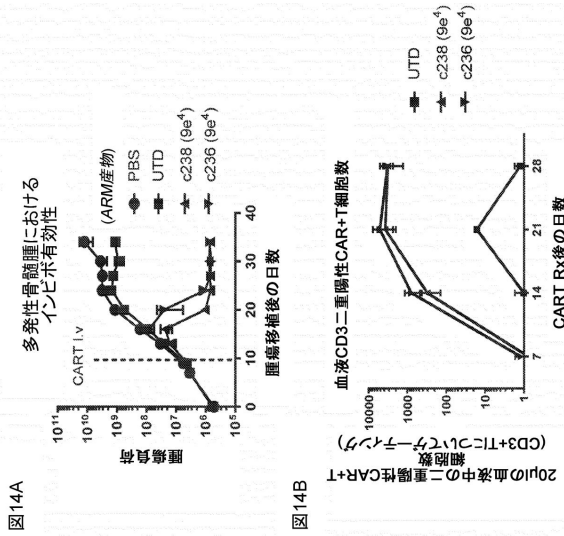


図14A

図14B

【 図 1 5 - 2 】

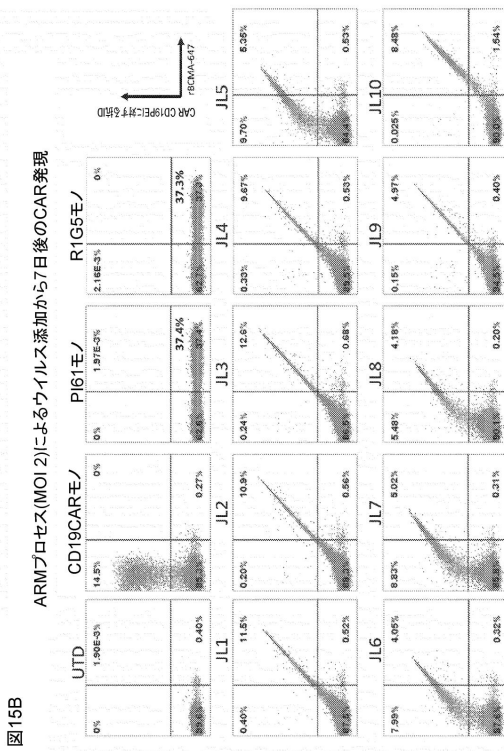


図15B

ARMプロセス(MOI 2)によるウイルス添加から7日後のCAR発現

【 図 1 5 - 1 】

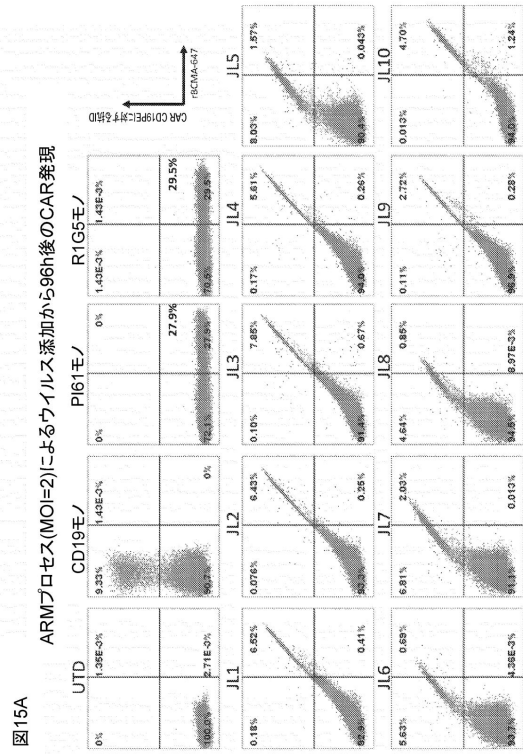


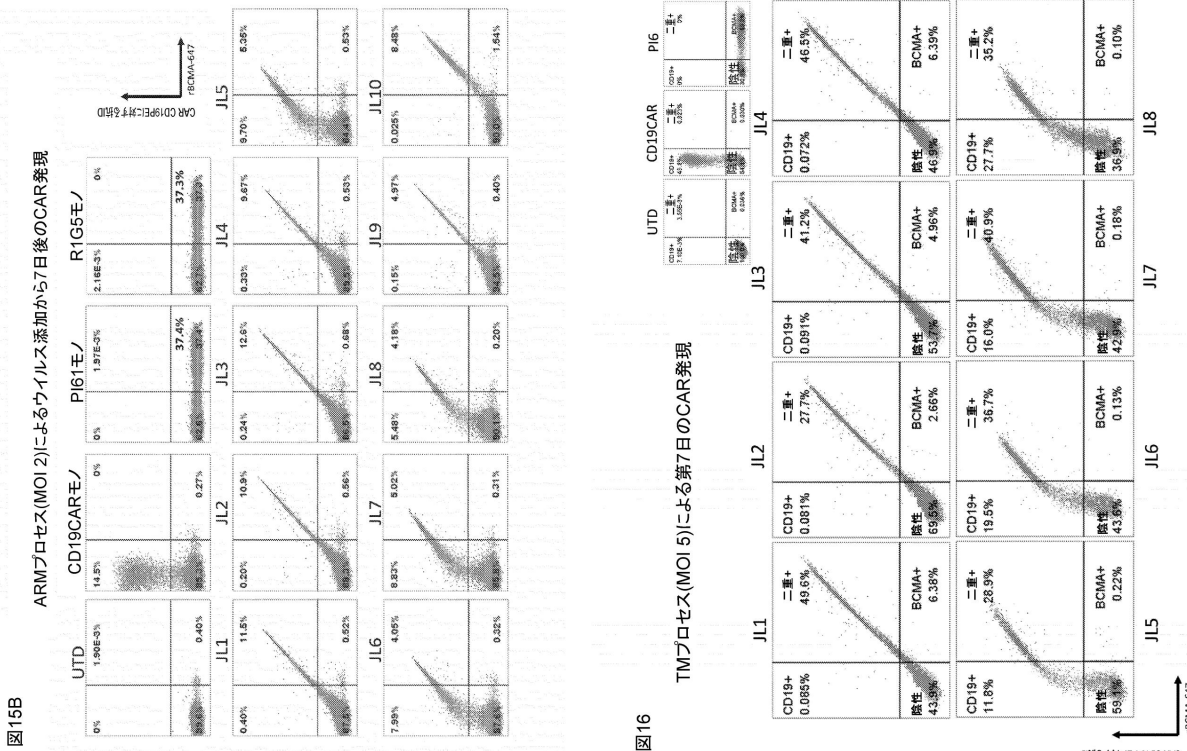
図15A

ARMプロセス(MOI=2)によるウイルス添加から96h後のCAR発現

10

20

図16



TMプロセス(MOI 5)による第7日のCAR発現

30

40

50

【 図 1 7 】

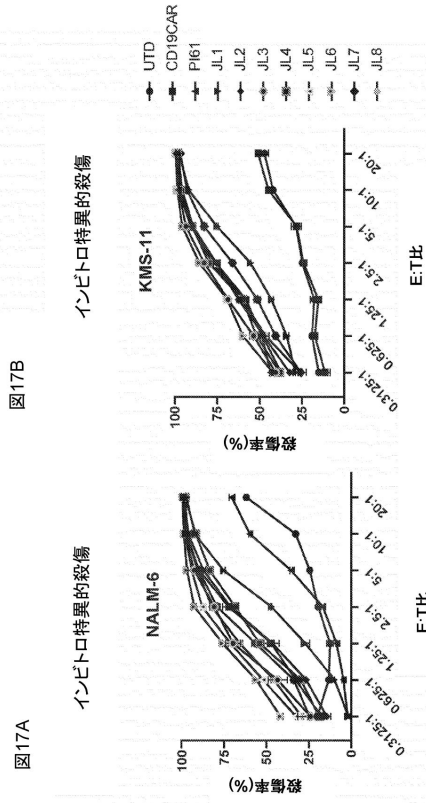


図17B

インビトロ特異的殺傷

図17A

インビトロ特異的殺傷

【 図 1 9 】

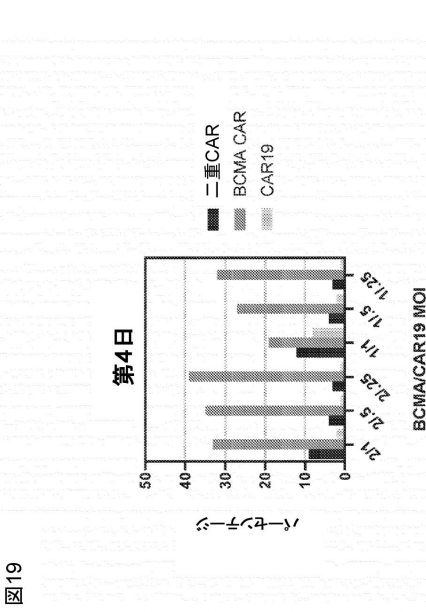


図19

【 図 1 8 】

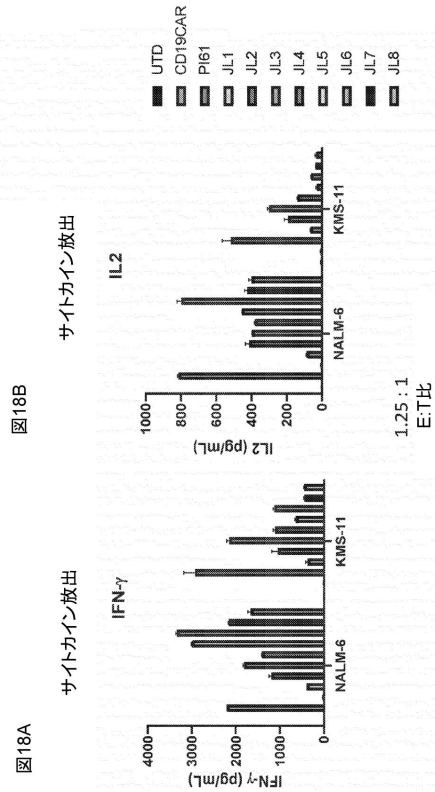


図18B

サイトカイン放出

図18A

サイトカイン放出

【 図 2 0 】

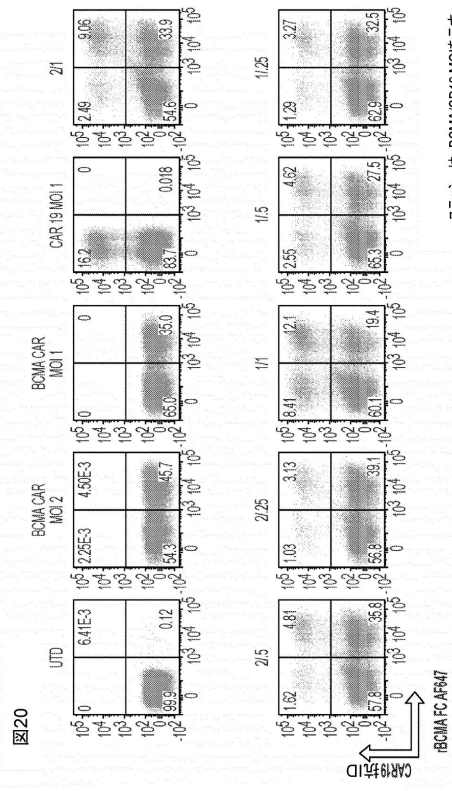


図20

スラッシュは、BCMA/CD19 MOIを示す

【 図 2 1 】

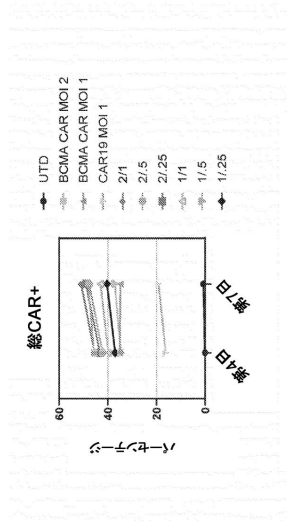


図21

【 図 2 2 】

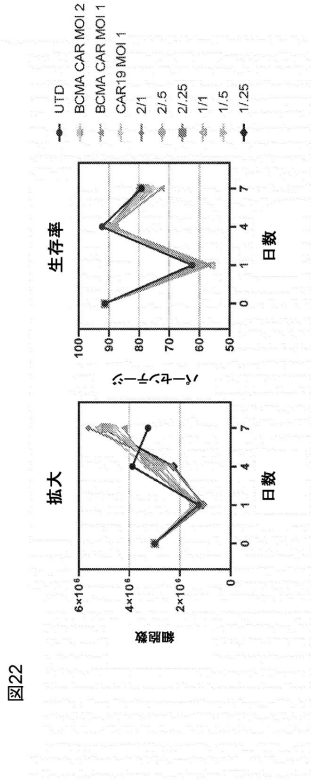


図22

10

20

【 図 2 3 】

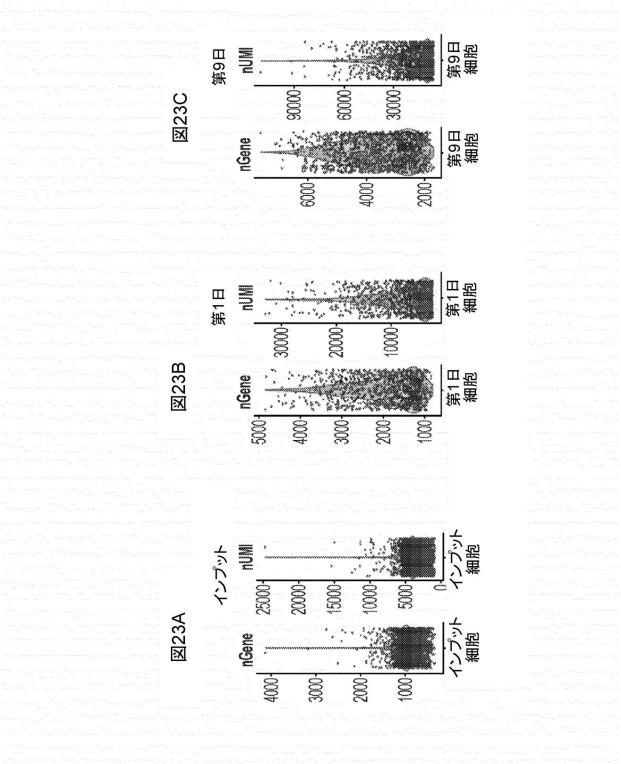


図23A

図23B

図23C

【 図 2 4 - 1 】

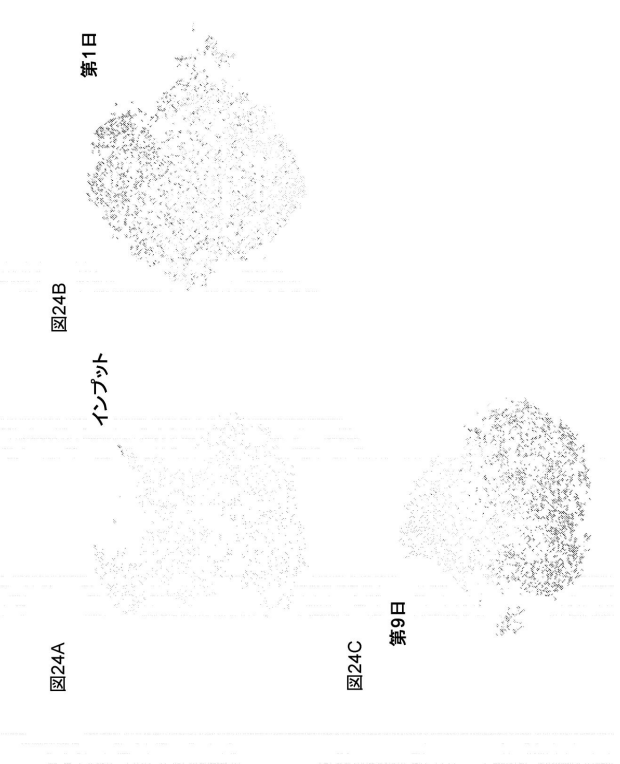


図24A

図24B

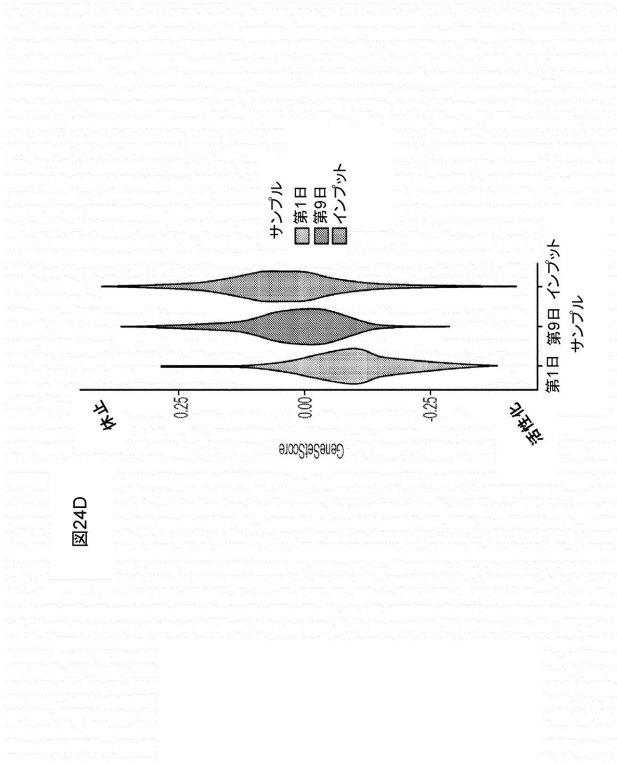
図24C

30

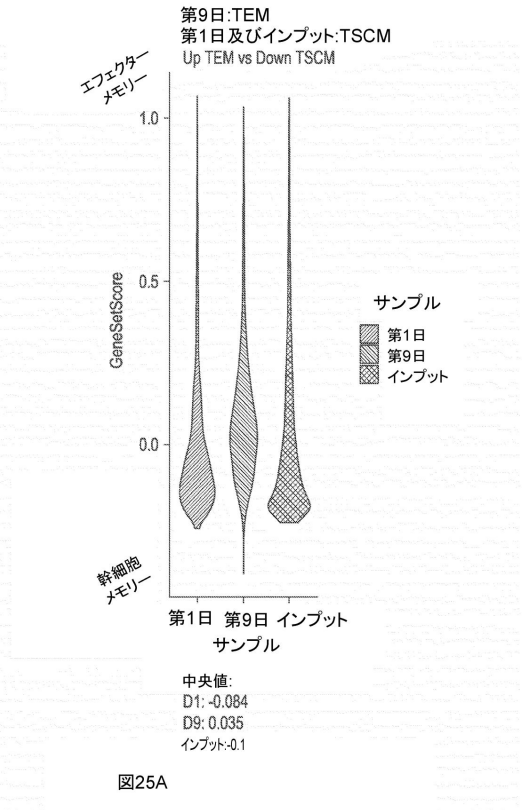
40

50

【 図 2 4 - 2 】



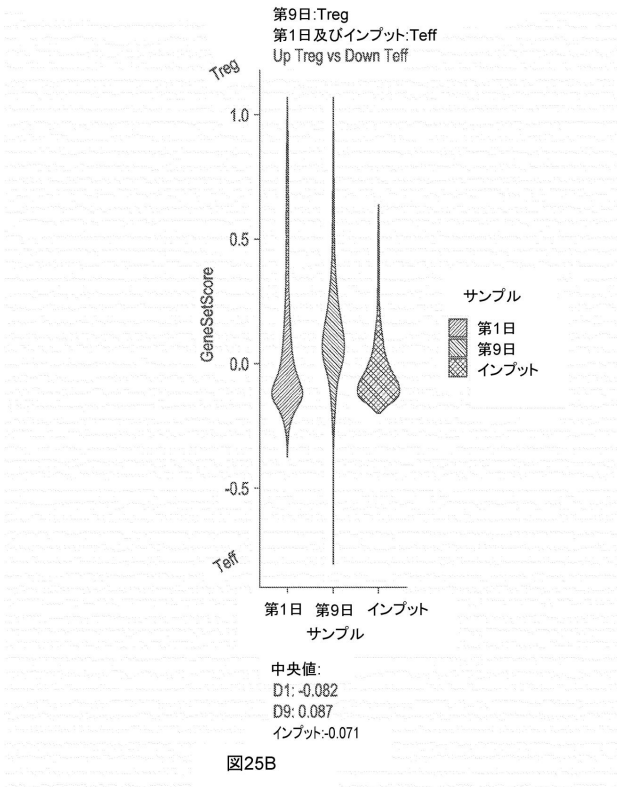
【 図 2 5 - 1 】



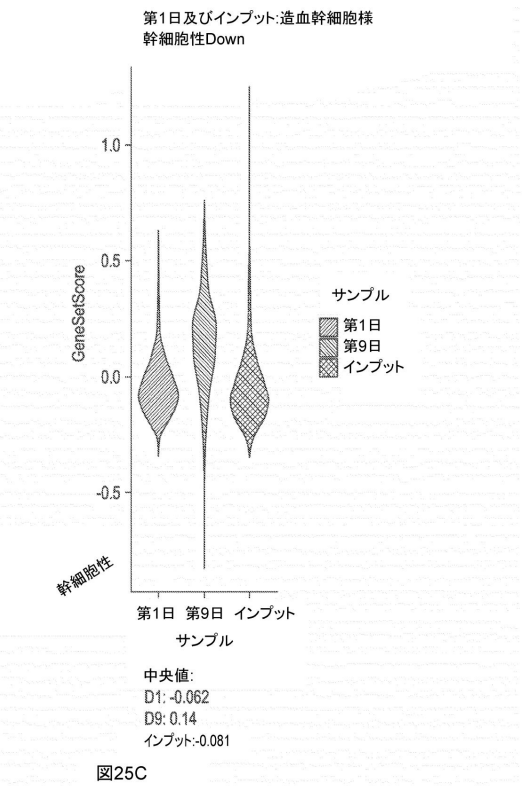
10

20

【 図 2 5 - 2 】



【 図 2 5 - 3 】



30

40

50

【 図 2 5 - 4 】

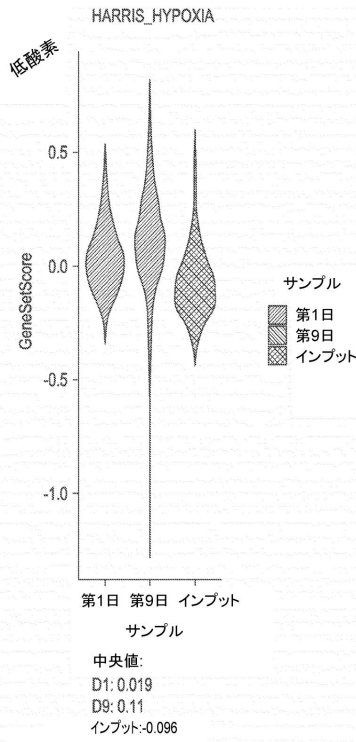


図25D

【 図 2 5 - 5 】

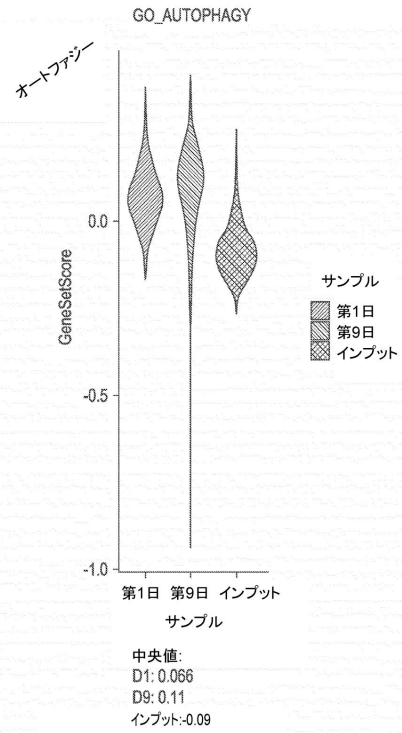


図25E

10

20

【 図 2 6 】

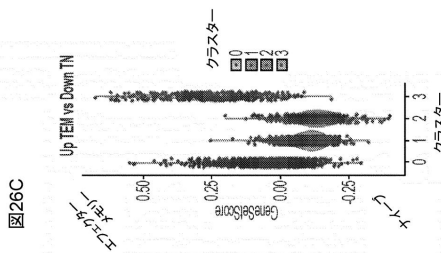


図26C

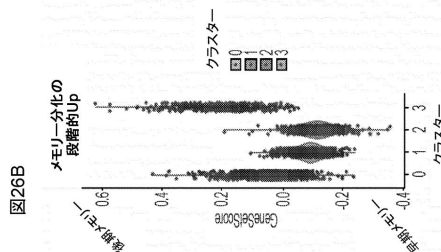


図26B

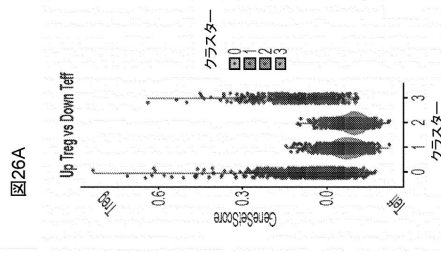


図26A

【 図 2 7 】

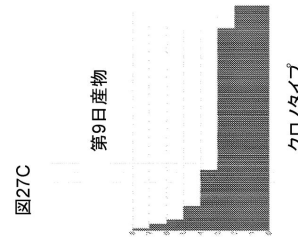


図27C

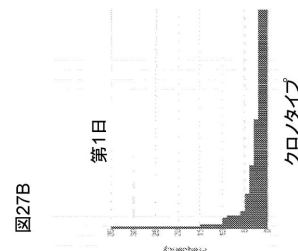


図27B

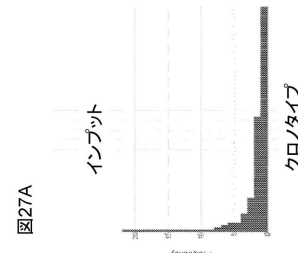


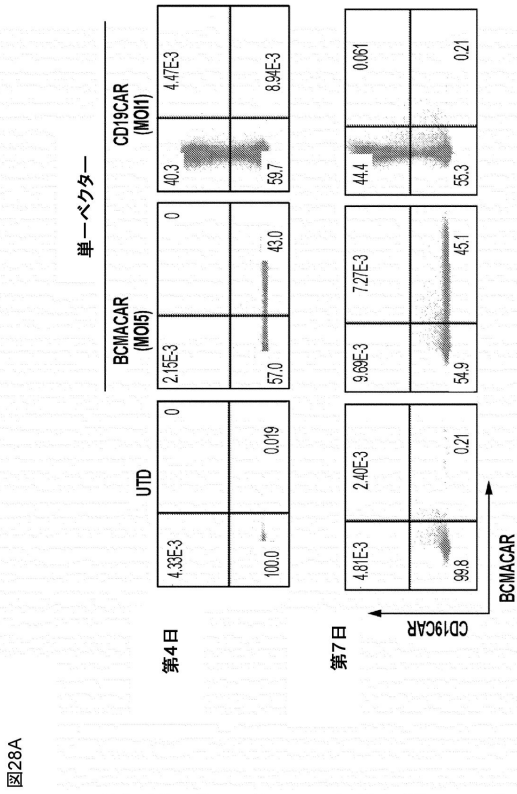
図27A

30

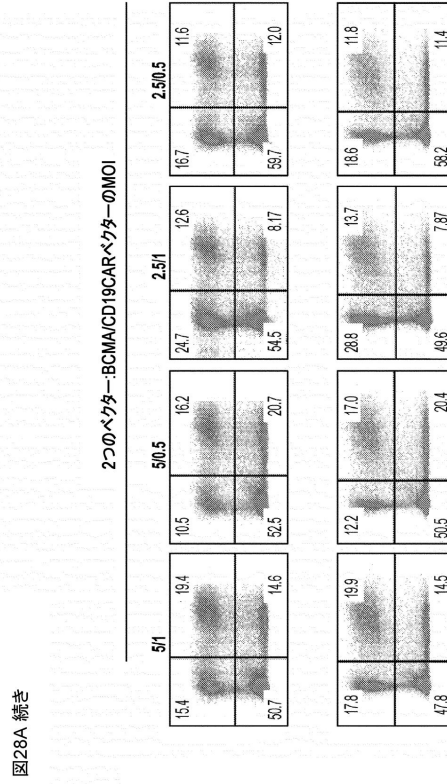
40

50

【 図 28 - 1 】



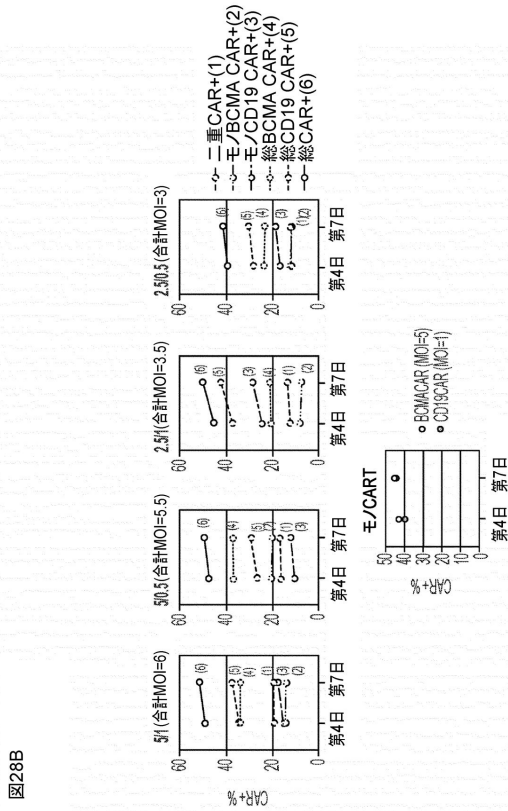
【 図 28 - 2 】



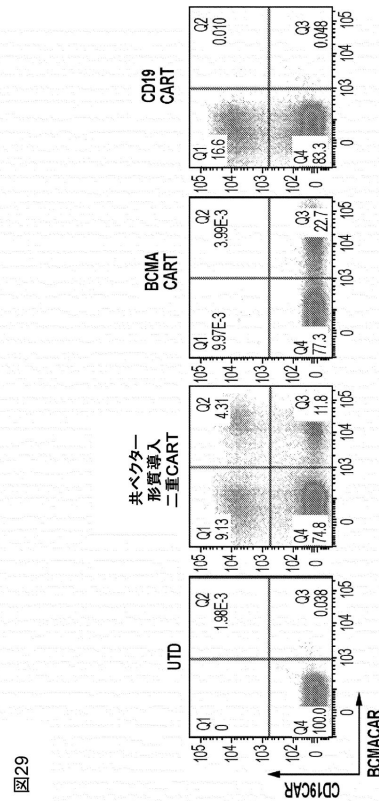
10

20

【 図 28 - 3 】



【 図 29 】



30

40

50

【 図 3 0 - 1 】

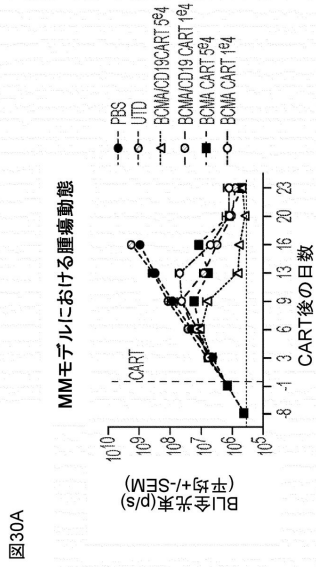


図30A

【 図 3 0 - 2 】

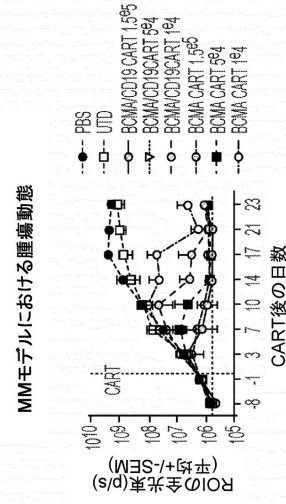


図30B

10

20

【 図 3 0 - 3 】

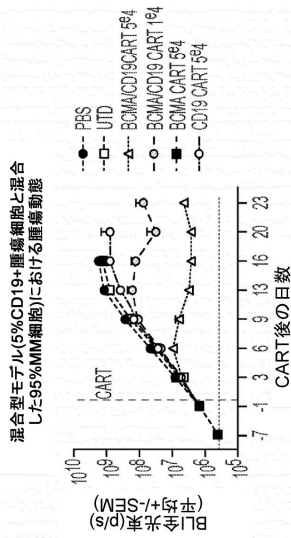


図30C

【 図 3 0 - 4 】

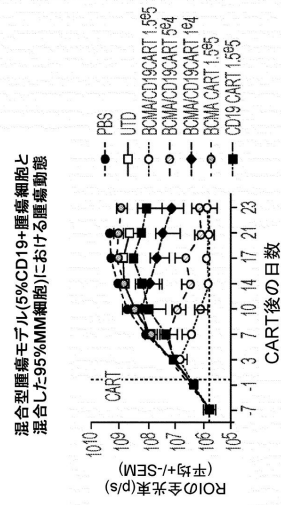


図30D

30

40

50

【 図 3 0 - 5 】

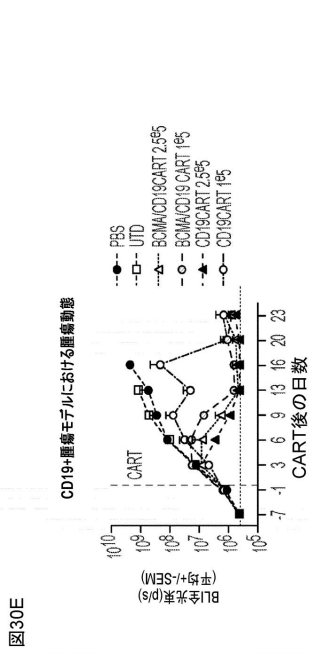


図30E

【 図 3 1 】

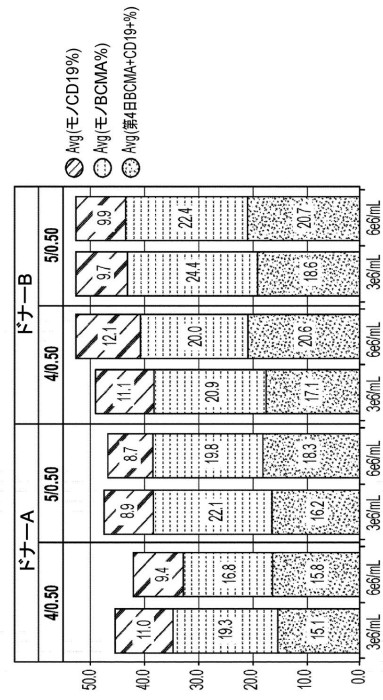


図31

10

20

【 図 3 2 】

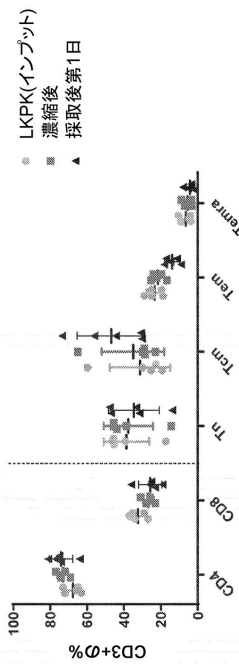


図32

【 図 3 3 - 1 】

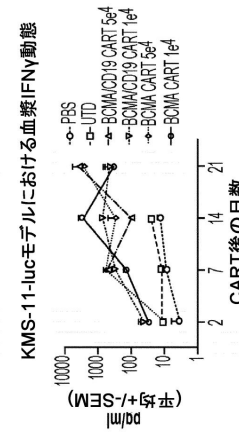


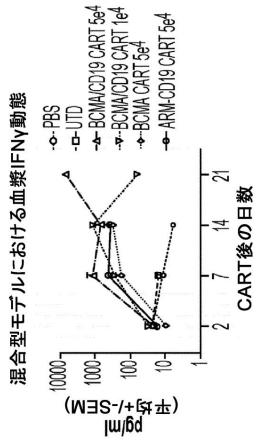
図33A

30

40

50

【 図 3 3 - 2 】



10

20

図33B

30

40

50

【 配列表 】

[2023503163000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2020/062357

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/00 C07K14/705 C07K16/28 A61P35/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YAN ZHILING ET AL: "A combination of humanised anti-CD19 and anti-BCMA CAR T cells in patients with relapsed or refractory multiple myeloma: a single-arm, phase 2 trial", THE LANCET HAEMATOLOGY, vol. 6, no. 10, 1 October 2019 (2019-10-01), pages e521-e529, XP055780850, GB ISSN: 2352-3026, DOI: 10.1016/S2352-3026(19)30115-2 Retrieved from the Internet: URL:http://dx.doi.org/10.1016/S2352-3026(19)30115-2> the whole document	1-9, 26-54, 56,58, 59, 61-92, 141-148
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 16 March 2021		Date of mailing of the international search report 25/05/2021
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Le Flao, Katell

2

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

page 1 of 3

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/062357

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018/237022 A1 (ICELL GENE THERAPEUTICS LLC [US]) 27 December 2018 (2018-12-27) page 199 - page 202; claims 1-41 -----	1-9, 26-54, 56,58, 59, 61-92, 141-148
X	WO 2019/108900 A1 (NOVARTIS AG [CH]; UNIV PENNSYLVANIA [US]) 6 June 2019 (2019-06-06) claims 52-83; example 4; sequences 1312,1314,1321,1329,1335,1337 -----	1-9, 26-54, 56,58, 59, 61-92, 141-148
X	WO 2016/130598 A1 (UNIV FLORIDA [US]) 18 August 2016 (2016-08-18) cited in the application page 55 - page 60; claims 1-27; examples 1,2 -----	1-9, 26-54, 56,58, 59, 61-92, 141-148
X	WO 2019/089798 A1 (NOVARTIS AG [CH]; UNIV PENNSYLVANIA [US]) 9 May 2019 (2019-05-09) claims 1-53 -----	1-9, 26-54, 56,58, 59, 61-92, 141-148
A	WO 2016/090320 A1 (SLOAN KETTERING INST CANCER [US]; EUREKA THERAPEUTICS INC [US]) 9 June 2016 (2016-06-09) cited in the application examples 1-11 -----	1-9, 26-54, 56,58, 59, 61-92, 141-148
A	WO 2016/102965 A1 (UCL BUSINESS PLC [GB]; AUTOLUS LTD [GB]) 30 June 2016 (2016-06-30) claims 1-45 -----	1-9, 26-54, 56,58, 59, 61-92, 141-148

10

20

30

40

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/062357

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	<p>WO 2020/047452 A2 (NOVARTIS AG [CH]; TRENOR LOUISE [US] ET AL.) 5 March 2020 (2020-03-05)</p> <p>sequences 93, 102, 105, 107, 112, 118, 124,</p> <p>-----</p>	<p>1-9,26, 28, 30-54, 56,59, 61-92, 141-148</p>
L	<p>US 2019/382500 A1 (ABUJOUR A; BLANKENSHIP J ET AL.) 19 December 2019 (2019-12-19) sequences 93,102,105,107,112,120,122,124,126,128,257 & WO 2019/241426 A1 (NOVARTIS AG [CH]; ABUJOUR AIDA [US] ET AL.) 19 December 2019 (2019-12-19) SEQ ID identical to the ones of the clones claimed</p> <p>-----</p>	
T	<p>LIQING KANG ET AL: "Characterization of novel dual tandem CD19/BCMA chimeric antigen receptor T cells to potentially treat multiple myeloma", BIOMARKER RESEARCH, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON, UK, vol. 8, no. 1, 13 May 2020 (2020-05-13), pages 1-11, XP021276693, DOI: 10.1186/S40364-020-00192-6 the whole document</p> <p>-----</p>	

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2020/062357

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. forming part of the international application as filed:

in the form of an Annex C/ST.25 text file.

on paper or in the form of an image file.

b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2020/062357

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.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

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

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

see additional 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 an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
3-9, 56, 141-143(completely); 1, 2, 26-54, 58, 59, 61-92
144-148(partially)

30

40

Remark on Protest

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

50

International Application No. PCT/ US2020/ 062357

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 3-9, 56, 141-143(completely); 1, 2, 26-54, 58, 59, 61-92, 144-148(partially)

An isolated cell comprising an anti-BCMA binding domain with the HC CDR1-3 and LC CDR1-3 of, respectively, SEQ ID NO: 86, 130, 88, 95, 131 and 132 (Kabat) and a second antigen-binding domain. The six CDRs are, according to Kabat numbering, of SEQ ID NO: 86, 87, 88, 95, 96, 97 (PI61) ; 86, 109, 88, 95, 114, 115 (B61-02) ; 86, 109, 88, 95, 114, 97 (B61-10). Amino acid sequences of VH, VL, scFvs and CAR are SEQ ID NO: 93 or 112 (VH), 102, 118 or 124 (VL), 105, 120 or 126 (scFv) and 107, 122, 128 or 226 (CAR). Related methods and uses.

2. claims: 10-16, 57(completely); 1, 2, 26-54, 58, 59, 61-92, 144-148(partially)

An isolated cell comprising an anti-BCMA binding domain with the HC CDR1-3 and LC CDR1-3 of, respectively, SEQ ID NO: 44, 45, 84, 54, 55 and 56 (Kabat) and a second antigen-binding domain. The six CDRs are also defined as SEQ ID NO: 44, 45, 76, 54-56 ; 44-46, 54-56 ; 44, 45, 68, 54-56. Amino acid sequences of VH, VL, scFvs and CAR are SEQ ID NO: 52, 70, or 78 (VH), 61 (VL), 64, 72 or 80 (scFv) and 66, 74, 82 or 224 (CAR). Related methods and uses.

3. claims: 17-23(completely); 1, 2, 26-54, 58, 59, 61-92, 144-148(partially)

An isolated cell comprising an anti-BCMA binding domain with the HC CDR1-3 and LC CDR1-3 of, respectively, SEQ ID NO: 137, 138, 139, 147, 148 and 149 (Kabat) and a second antigen-binding domain. The six CDRs are also defined as SEQ ID NO: 137-139, 147-149 or 160-161, 147, 170, 171. Amino acid sequences of VH, VL, scFvs and CAR are SEQ ID NO: 145 or 168 (VH), 154 or 173 (VL), 156 or 175 (scFv) and 158 or 177 (CAR). Related methods and uses.

4. claims: 24, 25, 55, 60(completely); 26-28, 30-36, 58, 61-92(partially)

An isolated cell comprising an anti-BCMA binding domain with the HC CDR1-3 and LC CDR1-3 of SEQ ID NO: 231-233, 54, 55, 240 (Kabat), 234, 235, 233, 57, 58, 241 (Chothia) or 236, 237, 238, 60, 58, 240 (IMGT) and a second antigen-binding domain. Amino acid sequences of VH, VL, scFvs and CAR are SEQ ID NO: 239 (VH), 242, (VL), 200 (scFv) and 230 (CAR). Related methods and uses.

10

20

30

40

50

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

5. claims: 93-99

10

An isolated cell or an isolated nucleic acid molecule as defined in independent claims 93 or 94 and dependent claims 95-99.

6. claims: 100-140

An isolated CAR as defined in independent claims 100 or dependent claims 101-108. A method of making a population of cells that express a chimeric antigen receptor according to independent claims 109 or 128 and dependent claims 110-127 and 129-134. A population of cells according to product-by-process claims 135-139 and independent claim 140.

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2020/062357

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 2018237022 A1	27-12-2018	AU 2018288814 A1	06-02-2020		
		CA 3070578 A1	27-12-2018		
		CN 111247242 A	05-06-2020		
		EP 3641768 A1	29-04-2020		
		JP 2020524512 A	20-08-2020		
		SG 11202000555U A	27-02-2020		
		US 2020223918 A1	16-07-2020		
		WO 2018237022 A1	27-12-2018		
WO 2019108900 A1	06-06-2019	AU 2018375738 A1	11-06-2020		
		BR 112020010579 A2	10-11-2020		
		CA 3083949 A1	06-06-2020		
		CN 111727373 A	29-09-2020		
		EP 3717907 A1	07-10-2020		
		JP 2021509009 A	18-03-2021		
		KR 20200096253 A	11-08-2020		
		SG 11202005005Y A	29-06-2020		
		TW 201925782 A	01-07-2019		
		US 2020371091 A1	26-11-2020		
		WO 2019108900 A1	06-06-2019		
		WO 2016130598 A1	18-08-2016	EP 3256492 A1	20-12-2017
				US 2018022815 A1	25-01-2018
WO 2016130598 A1	18-08-2016				
WO 2019089798 A1	09-05-2019	NONE			
WO 2016090320 A1	09-06-2016	AU 2015357526 A1	29-06-2017		
		BR 112017011909 A2	27-02-2018		
		CA 2969870 A1	09-06-2016		
		CN 107208047 A	26-09-2017		
		EP 3227432 A1	11-10-2017		
		JP 2017537925 A	21-12-2017		
		JP 2020114254 A	30-07-2020		
		KR 20170109538 A	29-09-2017		
		PH 12017501040 A1	05-03-2018		
		RU 2017123548 A	14-01-2019		
		SG 10201900931X A	27-02-2019		
		SG 11201704549U A	28-07-2017		
		US 2018360880 A1	20-12-2018		
		US 2020276239 A1	03-09-2020		
		US 2020276240 A1	03-09-2020		
		WO 2016090320 A1	09-06-2016		
WO 2016102965 A1	30-06-2016	AU 2015370679 A1	01-06-2017		
		AU 2020213352 A1	27-08-2020		
		BR 112017013690 A2	06-03-2018		
		CA 2970440 A1	30-06-2016		
		CL 2017001314 A1	15-12-2017		
		CL 2018003216 A1	01-02-2019		
		CL 2018003217 A1	01-02-2019		
		CN 107002045 A	01-08-2017		
		DK 3237442 T3	23-09-2019		
		EP 3237442 A1	01-11-2017		
		EP 3560953 A1	30-10-2019		
		ES 2744910 T3	26-02-2020		
		HU E046262 T2	28-02-2020		
		JP 6633081 B2	22-01-2020		

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2020/062357

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
		JP 2018501794 A	25-01-2018	
		JP 2020022508 A	13-02-2020	
		JP 2021036913 A	11-03-2021	
		KR 20170092695 A	11-08-2017	
		KR 20200003939 A	10-01-2020	
		PL 3237442 T3	28-02-2020	
		PT 3237442 T	26-09-2019	
		RU 2017121892 A	24-01-2019	
		SG 11201704084V A	29-06-2017	
		US 2017340704 A1	30-11-2017	
		US 2017340705 A1	30-11-2017	
		US 2017369550 A1	28-12-2017	
		US 2018371054 A1	27-12-2018	
		US 2019161531 A1	30-05-2019	
		US 2020181232 A1	11-06-2020	
		WO 2016102965 A1	30-06-2016	
		ZA 201703381 B	29-08-2018	

WO 2020047452	A2	05-03-2020	AU 2019331496 A1	18-03-2021
			CA 3109959 A1	05-03-2020
			CN 112639083 A	09-04-2021
			SG 11202101825Q A	30-03-2021
			TW 202030323 A	16-08-2020
			WO 2020047452 A2	05-03-2020

US 2019382500	A1	19-12-2019	AU 2019284911 A1	17-12-2020
			BR 112020025048 A2	06-04-2021
			CA 3100724 A1	19-12-2019
			CN 112203725 A	08-01-2021
			EP 3806962 A1	21-04-2021
			KR 20210020932 A	24-02-2021
			SG 11202011830S A	30-12-2020
			TW 202016139 A	01-05-2020
			US 2019382500 A1	19-12-2019
			WO 2019241426 A1	19-12-2019

10

20

30

40

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/725 (2006.01)	C 0 7 K 14/725	4 H 0 4 5
C 1 2 N 5/0783(2010.01)	C 1 2 N 5/0783	
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z
C 1 2 N 15/861(2006.01)	C 1 2 N 15/861	Z
C 1 2 N 15/867(2006.01)	C 1 2 N 15/867	Z
C 1 2 N 7/01 (2006.01)	C 1 2 N 7/01	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 K 39/395(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 K 35/12 (2015.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 38/17 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	L
A 6 1 K 38/20 (2006.01)	A 6 1 K 35/12	
A 6 1 K 31/436(2006.01)	A 6 1 K 35/17	Z
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	A 6 1 K 38/17	
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	A 6 1 K 38/20	
	A 6 1 K 31/436	
	C 1 2 N 15/12	
	C 1 2 N 15/62	Z

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . P L U R O N I C

2 . V E C T O F U S I N

・アベニュー 2 5 0

(72)発明者 ボンダンザ, アッティリオ

スイス 4 0 0 2 パーゼル、ポストファッハ

(72)発明者 ブログドン, ジェニファー

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 2 5
0、ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレイ
テッド

(72)発明者 ブー, デシウ

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 2 5
0

(72)発明者 デ ヴィータ, セレーナ

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 2 5
0

(72)発明者 ドラノフ, グレン

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 2 5
0

(72)発明者 エンヘルス, ボリス

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 2 5
0

- (72)発明者 フレミング, トニー
アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 2 5 0
- (72)発明者 グリーン, マイケル アール
アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 2 5 0
- (72)発明者 ハック, アニーシャ
アメリカ合衆国 0 7 9 3 6 ニュージャージー州イースト・ハノーバー、ヘルス・プラザ 1
- (72)発明者 ホルムバーグ, ブライアン
アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 2 5 0
- (72)発明者 ホン, コニー
アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 2 5 0
- (72)発明者 ホアン, ルウ
アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 2 5 0
- (72)発明者 コドラジ, オージャ
アメリカ合衆国 0 2 1 6 9 マサチューセッツ州クインシー、ガーディナー・ロード 2 2 0
- (72)発明者 イム, ヒョンウ
アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 2 5 0
- (72)発明者 ブラティコ, エリザベス ドロシー
アメリカ合衆国 0 2 1 2 8 マサチューセッツ州イースト・ボストン、ピアーズ・パーク・レイン 8 0、アパートメント 3 2 2 1
- (72)発明者 ブライス, アンドリュー
アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 2 5 0
- (72)発明者 ソホニ, アカシュ
アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 2 5 0
- (72)発明者 スタイン, アンドリュー マーク
アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 2 5 0
- (72)発明者 トリーナー, ルイーズ
アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 2 5 0
- (72)発明者 ジャン, チョンホイ
アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 2 5 0
- (72)発明者 グランダ, ブライアン ウォルター
アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 2 5 0、ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレイテッド
- (72)発明者 ラム, ジョニ ワイイー
アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 2 5 0
- (72)発明者 ギマラエス, カルラ パトリシア
アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 2 5 0

(72)発明者 ジュー , シュー

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 2 5
0

Fターム(参考) 4B065 AA92X AA92Y AA94X AA94Y AA95X AA95Y AA97X AA97Y AB01 AC14
BA01 BA02 CA24 CA25 CA44
4C084 AA02 AA03 AA19 BA44 CA18 DA12 DA46 MA02 NA05 ZB091
ZB092 ZB211 ZB212 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272 ZC411 ZC412 ZC751
4C085 AA14 AA25 BB36 BB44 CC23 EE01 EE03 GG02 GG03 GG04
4C086 AA01 AA02 CB22 GA16 MA02 MA04 NA05 ZB09 ZB21 ZB26
ZB27 ZC41 ZC75
4C087 AA01 AA02 BB37 BB64 BB65 CA04 CA12 MA02 NA05 NA13
ZB09 ZB21 ZB26 ZB27 ZC41 ZC75
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA76 EA22
EA28 FA74