

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6961490号
(P6961490)

(45) 発行日 令和3年11月5日(2021.11.5)

(24) 登録日 令和3年10月15日(2021.10.15)

(51) Int.Cl.	F I	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	Z N A
A 6 1 K 35/12 (2015.01)	A 6 1 K 35/12	
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17	A
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 K 35/761 (2015.01)	A 6 1 K 35/761	
請求項の数 30 (全 576 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-552972 (P2017-552972)	(73) 特許権者	504389991
(86) (22) 出願日	平成28年4月8日(2016.4.8)		ノバルティス アーゲー
(65) 公表番号	特表2018-518939 (P2018-518939A)		スイス国 バーゼル リヒトシュトラッセ
(43) 公表日	平成30年7月19日(2018.7.19)		35
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/026655	(73) 特許権者	500429103
(87) 国際公開番号	W02016/164731		ザ トラストィーズ オブ ザ ユニバー
(87) 国際公開日	平成28年10月13日(2016.10.13)		シティ オブ ペンシルバニア
審査請求日	平成31年4月8日(2019.4.8)		アメリカ合衆国 19104 ペンシルベ
(31) 優先権主張番号	62/207,255		ニア州 フィラデルフィア シビック セ
(32) 優先日	平成27年8月19日(2015.8.19)		ンター ブールバード 3600 ナイン
(33) 優先権主張国・地域又は機関			ス フロア
	米国 (US)	(74) 代理人	100106518
(31) 優先権主張番号	62/144,639		弁理士 松谷 道子
(32) 優先日	平成27年4月8日(2015.4.8)	(74) 代理人	100122301
(33) 優先権主張国・地域又は機関			弁理士 富田 憲史
	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CD2O療法、CD22療法、およびCD19キメラ抗原受容体 (CAR) 発現細胞との併用療法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

CD19の発現に関連する疾患を有する対象の、CD22阻害剤と組み合わせての処置において使用するための、CD19に結合するキメラ抗原受容体 (CAR) ポリペプチド (CD19 CAR) を発現する細胞または細胞集団を含む組成物であって、CD22阻害剤がCD22に結合するCAR分子 (CD22 CAR) を発現する細胞または細胞集団を含み、CD22 CARが：

(i) 配列番号647の軽鎖相補性決定領域1 (LC CDR1)、配列番号658の軽鎖相補性決定領域2 (LC CDR2)、配列番号669の軽鎖相補性決定領域3 (LC CDR3)、配列番号497または配列番号1344の重鎖相補性決定領域1 (HC CDR1)、配列番号508または配列番号1353の重鎖相補性決定領域2 (HC CDR2) および配列番号519または配列番号1362の重鎖相補性決定領域3 (HC CDR3)；または

(ii) 配列番号648のLC CDR1、配列番号659のLC CDR2、配列番号670のLC CDR3、配列番号498または配列番号1345のHC CDR1、配列番号509または配列番号1354のHC CDR2および配列番号520または配列番号1363のHC CDR3、を含むCD22結合ドメインを含むものである、組成物。

【請求項2】

前記対象がCD22阻害剤を受けたことがあるか、受けているか、または受ける予定で

ある、請求項 1 に記載の使用のための組成物。

【請求項 3】

CD19 CARを発現する細胞または細胞集団が、前記 CD22 阻害剤と同時に、その前に、またはその後に対象に投与されるものである、請求項 1 または 2 に記載の使用のための組成物。

【請求項 4】

前記対象が、CD19 CARを発現する 1 つまたは複数の細胞または細胞集団での処置後に再発したか、または再発したものとして同定される、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 5】

(a) 前記対象が、完全応答の後、血液、骨髄、もしくは髄外部位における 1 もしくは複数の芽球再出現に基づき、再発したか、もしくは再発したものとして同定される；

(b) 前記対象が、所定の閾値より高い CD19-芽球の検出に基づき、再発したか、もしくは再発したものとして同定される；

(c) 前記対象が、MIR199A1、MIR1203、ITM2CもしくはHLA-DQB1の 1 つもしくは複数の RNA レベルの増加に基づき、再発したか、もしくは再発したものとして同定される；または

(d) 前記対象が、PPIAL4D、TTY10、TXLNG2P、MIR4650-1、KDM5D、USP9Y、PRKY、RPS4Y2、RPS4Y1、NCRNA00185、SULT1E1またはEIF1AYの 1 つもしくは複数の RNA レベルの減少に基づき、再発したか、再発したものとして同定される、請求項 4 に記載の使用のための組成物。

【請求項 6】

CD19 CAR発現細胞が、CD19 CARをコードする第一の核酸を含み、CD22 CAR発現細胞が、CD22 CARをコードする第二の核酸を含む、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の使用のための組成物であって：

(i) 第一の核酸および第二の核酸が、各々、第一の免疫エフェクター細胞内に含有される；または

(ii) 第一の免疫エフェクター細胞が、第一の核酸を含有し、第二の免疫エフェクター細胞が、第二の核酸を含有する、ものである、組成物。

【請求項 7】

CD19 CAR発現細胞が、CD19 結合ドメインとCD22 結合ドメインの両方を含む、請求項 6 に記載の使用のための組成物。

【請求項 8】

抗原結合ドメインが二重特異性抗体を含む、請求項 7 に記載の使用のための組成物。

【請求項 9】

処置が、その対象においてリンパ球枯渇を行うことをさらに含む、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 10】

前記 CD19 CARが、

(a) CD19 結合ドメインと、膜貫通ドメインと、細胞内シグナル伝達ドメインとを含む抗体または抗体フラグメントを含み、前記 CD19 結合ドメインが、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 59、配列番号 109、配列番号 111、および配列番号 114 のいずれかの CD19 scFv の軽鎖相補性決定領域 1 (LC CDR1)、軽鎖相補性決定領域 2 (LC CDR2)、軽鎖相補性決定領域 3 (LC CDR3)、重鎖相補性決定領域 1 (HC CDR1)、重鎖相補性決定領域 2 (HC CDR2) および重鎖相補性決定領域 3 (HC CDR3) を含む；

10

20

30

40

50

(b) 配列番号25のLC CDR1、配列番号26のLC CDR2、配列番号27のLC CDR3、配列番号19のHC CDR1、配列番号20～23のいずれかのHC CDR2および配列番号24のHC CDR3を含むCD19結合ドメインを含む；

(c) 配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号59、配列番号109、配列番号111、および配列番号114のいずれかの軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含む；または

(d) 配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11および配列番号12からなる群から選択される配列、もしくはそれらと95～99%の同一性を有する配列、または配列番号58のポリペプチド、もしくはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む、

請求項1～9のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項11】

前記CD22 CARが：

(a) CD22結合ドメインと、膜貫通ドメインと、細胞内シグナル伝達ドメインとを含む抗体または抗体フラグメント；

(b) 下記(i)および／または(ii)を含むCD22結合ドメイン：

(i) 配列番号690のアミノ酸配列、または配列番号690と95～99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD22 CAR22-65軽鎖可変領域；

(ii) 配列番号680のアミノ酸配列、または配列番号680と95～99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD22 CAR22-65重鎖可変領域；および／または

(c) 下記(i)および／または(ii)を含むCD22結合ドメイン：

(i) 配列番号689のアミノ酸配列、または配列番号689と95～99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD22 CAR22-64軽鎖可変領域；

(ii) 配列番号679のアミノ酸配列、または配列番号679と95～99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCD22 CAR22-64重鎖可変領域、

を含む、

請求項1～10のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項12】

CD22結合ドメインがscFvを含む、請求項11に記載の使用のための組成物。

【請求項13】

CD22 CARが、(Gly4-Ser)nリンカーを含むCD22結合ドメインを含み、ここでnは、1、2、3、または4（配列番号53）である、請求項1～12のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項14】

CD19 CAR、またはCD22 CARが：

(i) T細胞受容体のアルファ、ベータまたはゼータ鎖、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、およびCD154からなる群より選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含む；

(ii) ヒンジ領域によって膜貫通ドメインに接続される抗原結合ドメインを含む；

(iii) OX40、CD2、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1（CD11a/CD18）、ICOS（CD278）、および4-1BB（CD137）からなる群から選択されるタンパク質から得られる機能的なシグナル伝達ドメインを含む共刺激ドメインを含む；

(iv) 4-1BBの機能的なシグナル伝達ドメインおよび／またはCD3ゼータの機能的なシグナル伝達ドメインを含む；および／または

(v) リーダー配列を含む、

請求項1～13のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 15】

(i) ヒンジ領域が、配列番号 14、またはそれと 95～99%の同一性を有する配列を含む；

(ii) 共刺激ドメインが、配列番号 16 または配列番号 51 の配列を含む；

(iii) 細胞内シグナル伝達ドメインが、配列番号 16 の配列、および／または配列番号 17 もしくは配列番号 43 の配列、を含む；および／または

(iv) リーダー配列が配列番号 13 の配列を含む、

請求項 14 に記載の使用のための組成物。

【請求項 16】

CD19 CAR または CD22 CAR を発現する前記細胞または細胞集団が、免疫エフェクター細胞を含む、請求項 1～15 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

10

【請求項 17】

(a) CD19 発現に関連する前記疾患が、

(i) がん、腫瘍もしくは悪性腫瘍などの増殖性疾患、

(ii) 脊髄形成異常、骨髄異形成症候群もしくは前白血病状態などの前がん状態、

(iii) CD19 の発現に関連する非がん関連の徴候；あるいは

(iv) 血液がん、急性白血病、B細胞急性リンパ芽球性白血病 (BALL)、T細胞急性リンパ芽球性白血病 (TALL)、小リンパ球性リンパ腫 (SLL)、急性リンパ芽球性白血病 (ALL)、慢性白血病、慢性骨髄性白血病 (CML)、慢性リンパ球性白血病 (CLL)、非ホジキンリンパ腫、または骨髄腫；あるいは、

20

(b) CD19 陰性のがん、または CD19 陰性の再発がんである、請求項 1～16 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 18】

処置が、

(a) CD19 CAR または CD22 CAR を発現する細胞の効能を増加させる薬剤；

(b) CD19 CAR または CD22 CAR を発現する細胞の投与に関連する 1 つもしくは複数の副作用を改善する薬剤；

(c) CD19 と関連する疾患を処置する薬剤；または

(d) チェックポイント阻害剤

30

を投与することをさらに含む、請求項 1～17 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 19】

対象が、CD19 陰性がん細胞、および／または

(i) CD22；または

(ii) CD10、CD20、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179b または CD79a、

の 1 つまたは複数に関して陽性であるがん細胞を有する、請求項 1～18 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 20】

40

処置が、

対象が CD19 陰性がん細胞を有するかどうか、および／または対象が、

(i) CD22；または

(ii) CD10、CD20、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179b または CD79a、

の 1 つまたは複数に関して陽性であるがん細胞を有するかどうかを判定する工程をさらに含む、請求項 1～19 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 21】

処置が、対象に、がん細胞が陽性の CD10、CD34、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179b または CD79a の 1 つまたは複数の阻害剤を投与することを

50

、請求項19または20に記載の使用のための組成物。

【請求項22】

処置が、細胞を、対象に移植することをさらに含む、請求項1～21のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項23】

別々に、または混合された、

(i) CD19に結合するキメラ抗原受容体(CAR)ポリペプチド(CD19 CAR)を発現する1つまたは複数の細胞；および

(ii) CD22阻害剤、ここで、CD22阻害剤がCD22に結合するCAR分子(CD22 CAR)を発現する細胞または細胞集団を含み、CD22 CARが：

(a) 配列番号647の軽鎖相補性決定領域1(LC CDR1)、配列番号658の軽鎖相補性決定領域2(LC CDR2)、配列番号669の軽鎖相補性決定領域3(LC CDR3)、配列番号497または配列番号1344の重鎖相補性決定領域1(HC CDR1)、配列番号508または配列番号1353の重鎖相補性決定領域2(HC CDR2)および配列番号519または配列番号1362の重鎖相補性決定領域3(HC CDR3)；または

(b) 配列番号648のLC CDR1、配列番号659のLC CDR2、配列番号670のLC CDR3、配列番号498または配列番号1345のHC CDR1、配列番号509または配列番号1354のHC CDR2および配列番号520または配列番号1363のHC CDR3、

を含むCD22結合ドメインを含む、
を含む組成物。

【請求項24】

(i) CD19に結合するキメラ抗原受容体(CAR)ポリペプチド(CD19 CAR)をコードする第一の核酸、および

(ii) CD22に結合するCARポリペプチド(CD22 CAR)をコードする第二の核酸、ここで、CD22 CARが：

(a) 配列番号647の軽鎖相補性決定領域1(LC CDR1)、配列番号658の軽鎖相補性決定領域2(LC CDR2)、配列番号669の軽鎖相補性決定領域3(LC CDR3)、配列番号497または配列番号1344の重鎖相補性決定領域1(HC CDR1)、配列番号508または配列番号1353の重鎖相補性決定領域2(HC CDR2)および配列番号519または配列番号1362の重鎖相補性決定領域3(HC CDR3)；または

(b) 配列番号648のLC CDR1、配列番号659のLC CDR2、配列番号670のLC CDR3、配列番号498または配列番号1345のHC CDR1、配列番号509または配列番号1354のHC CDR2および配列番号520または配列番号1363のHC CDR3、

を含むCD22結合ドメインを含む、

を含み、前記第一の核酸および第二の核酸が同じまたは別々の核酸分子中にある、組成物。

【請求項25】

免疫エフェクター細胞の集団、および

(i) CD19に結合するキメラ抗原受容体(CAR)ポリペプチド(CD19 CAR)をコードする第一の核酸、またはそのようなCARポリペプチドを含む第一のポリペプチド、および

(ii) CD22に結合するCARポリペプチド(CD22 CAR)をコードする第二の核酸、またはそのようなCAR分子を含む第二のポリペプチド、ここで、CD22 CARが：

(a) 配列番号647の軽鎖相補性決定領域1(LC CDR1)、配列番号658の軽鎖相補性決定領域2(LC CDR2)、配列番号669の軽鎖相補性決定領域3(LC

10

20

30

40

50

C D R 3)、配列番号 4 9 7 または配列番号 1 3 4 4 の重鎖相補性決定領域 1 (H C C D R 1)、配列番号 5 0 8 または配列番号 1 3 5 3 の重鎖相補性決定領域 2 (H C C D R 2) および配列番号 5 1 9 または配列番号 1 3 6 2 の重鎖相補性決定領域 3 (H C C D R 3); または

(b) 配列番号 6 4 8 の L C C D R 1、配列番号 6 5 9 の L C C D R 2、配列番号 6 7 0 の L C C D R 3、配列番号 4 9 8 または配列番号 1 3 4 5 の H C C D R 1、配列番号 5 0 9 または配列番号 1 3 5 4 の H C C D R 2 および配列番号 5 2 0 または配列番号 1 3 6 3 の H C C D R 3、
を含む C D 2 2 結合ドメインを含む、
を含む組成物。

10

【請求項 2 6】

(a) 前記第一の核酸または第一のポリペプチドと前記第二の核酸または第二のポリペプチドが、各々、第一の免疫エフェクター細胞内に含有され;

(b) 前記組成物が、前記第一の核酸もしくは第一のポリペプチドを含有する第一の免疫エフェクター細胞、および前記第二の核酸もしくは第二のポリペプチドを含有する第二の免疫エフェクター細胞を含む; または

(c) 前記組成物が、前記第一の核酸もしくは第一のポリペプチドと、前記第二の核酸もしくは第二のポリペプチドの両方を含む細胞を含まない、
請求項 2 5 に記載の組成物。

20

【請求項 2 7】

免疫エフェクター細胞の集団が、ヒト T 細胞、C D 8 + T 細胞、および/または N K 細胞を含む、請求項 2 6 に記載の組成物。

【請求項 2 8】

P D - 1、P D - L 1、C T L A 4、T I M 3、C E A C A M、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、またはそれらのフラグメントから選択される阻害分子を含む第一のポリペプチド; および

共刺激細胞内シグナル伝達ドメイン、および/または一次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第二のポリペプチド、
を含む阻害分子をさらに含む、請求項 2 6 に記載の組成物。

30

【請求項 2 9】

共刺激細胞内シグナル伝達ドメインが 4 - 1 B B、C D 2 7、または C D 2 8 に由来し、一次シグナル伝達ドメインが C D 3 ゼータに由来する、請求項 2 8 に記載の組成物。

【請求項 3 0】

第一の核酸および/または第二の核酸がベクター内に含まれる、請求項 2 4 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本出願は、2 0 1 5 年 4 月 8 日付けで出願された米国特許出願第 6 2 / 1 4 4, 6 1 5 号、2 0 1 5 年 4 月 8 日付けで出願された米国特許出願第 6 2 / 1 4 4, 4 9 7 号、2 0 1 5 年 4 月 8 日付けで出願された米国特許出願第 6 2 / 1 4 4, 6 3 9 号、2 0 1 5 年 8 月 1 9 日付けで出願された米国特許出願第 6 2 / 2 0 7, 2 5 5 号、2 0 1 5 年 1 2 月 4 日付けで出願された米国特許出願第 6 2 / 2 6 3, 4 2 3 号の優先権を主張するものであり、これらの出願の内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる。

40

【0 0 0 2】

本発明は、一般に、表面抗原分類 1 9 タンパク質 (C D 1 9) の発現に関連する疾患を処置するための、キメラ抗原受容体 (C A R) を発現するように加工された T 細胞の、適宜、B 細胞阻害剤、例えば C D 1 0、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 2、C D 3 4、C D 1 2 3、F L T - 3、R O R 1、C D 7 9 b、C D 1 7 9 b または C D 7 9 a の 1 つまたは複数の阻害剤と組み合わせての使用に関する。

50

【背景技術】

【0003】

B細胞悪性腫瘍を有する多くの患者は、標準治療では治らない。加えて、旧来の処置の選択肢は、重篤な副作用を有することが多い。様々な試みががんの免疫療法において行われてきたが、数々の障害があるため、これは、臨床効果の達成が非常に困難な目標である。何百ものいわゆる腫瘍抗原が同定されたが、これらは一般に自己に由来し、それゆえに免疫原性が低い。さらに、腫瘍は、数々のメカニズムを使用して、免疫攻撃の開始および伝播に敵対する。

【0004】

B細胞悪性腫瘍などのがん細胞上の好適な細胞表面分子へのT細胞の再指向化に依存する、キメラ抗原受容体(CAR)で改変された自己T細胞(CART)療法を使用する最近の発展は、免疫系の力を利用してB細胞悪性腫瘍および他のがんを処置することに関して有望な結果を示している[例えば、Sadelain et al., Cancer Discovery 3:388-398 (2013)を参照されたい]。マウス由来のCART19(すなわち、「CTL019」)の臨床結果は、CLLに罹患している患者ではもちろん小児ALLにおいても完全応答の達成に効果を発揮した[例えば、Kalos et al., Sci Transl Med 3:95ra73 (2011)、Porter et al., NEJM 365:725-733 (2011)、Grupp et al., NEJM 368:1509-1518 (2013)を参照されたい]。遺伝子改変されたT細胞上のキメラ抗原受容体の、標的細胞を認識し、破壊する能力に加えて、白血病再発を調査するために長い期間にわたって増殖し、持続する能力が、治療的T細胞療法成功には必要である。アネルギー、抑制または消耗に起因するT細胞のばらつきのある質は、CARで形質転換されたT細胞の性能に影響を与えることになり、現時点では当業者によるその制御には限界がある。効果的であるために、CARで形質転換された患者T細胞は、同種抗原に応答して増殖する能力を持続し、維持する必要がある。マウス scFvを含むCART19を用いてALL患者のT細胞がこれを実行できることは証明されている[例えば、Grupp et al., NEJM 368:1509-1518 (2013)参照されたい]。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

本開示は、少なくとも一部は、表面抗原分類19タンパク質(CD19)(例えば、OMIM受託番号107265、Swiss Prot. 受託番号P15391)の発現に関連する障害を処置する方法を特徴とする。ある特定の実施形態において、障害は、がん、例えば血液がんである。一部の実施形態において、方法は、CD19に結合するキメラ抗原受容体(CAR)分子をB細胞阻害剤、例えば1つまたは複数(例えば、1つ、2つ、3つ以上)のB細胞阻害剤と組み合わせて投与することを含む。一部の実施形態において、B細胞阻害剤は、CD10、CD19、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3もしくはROR1の阻害剤、またはそれらの組合せから選ばれる。一部の実施形態において、組合せは、いずれかの治療単独と比較して良好な臨床的有効性を維持するか、または有する。一部の実施形態において、本明細書における方法は、CD19の発現に関連する障害を処置するために、CD19に結合するCAR分子を発現するように加工された細胞、例えばT細胞を、B細胞阻害剤[例えば、第二のB標的、例えばCD10、CD19、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3もしくはROR1)に対する抗体(例えば、単一特異性もしくは二重特異性抗体)]、もしくは第二のB細胞標的と結合するCAR発現細胞、例えばCAR発現免疫エフェクター細胞、またはそれらの組合せと組み合わせて使用することを含む。本開示は、CD20およびCD22に向けられた新規の抗原結合ドメインおよびCAR分子、ならびに例えば単剤療法としてのまたは併用療法における使用をさらに特徴とする。

【0006】

したがって、一態様において、本発明は、CD19の発現に関連する疾患を有する対象(例えば、哺乳動物)を処置する方法に関する。方法は、CD19阻害剤、例えば、本明

10

20

30

40

50

細書で説明されるCD19に結合するCAR分子を、B細胞阻害剤と組み合わせて対象に投与することを含む。例えば、方法は、CD19に結合するCAR分子、例えば、本明細書で説明されるCD19（例えば、野生型または突然変異CD19）に結合するCAR分子を発現する1つまたは複数の細胞の有効な数をB細胞阻害剤と組み合わせて対象に投与することを含む。ある特定の実施形態において、B細胞阻害剤は、CD10阻害剤、例えば、本明細書で説明される1つもしくは複数のCD10阻害剤；CD20阻害剤、例えば、本明細書で説明される1つもしくは複数のCD20阻害剤；CD22阻害剤、例えば、本明細書で説明される1つもしくは複数のCD22阻害剤；CD34阻害剤、例えば、本明細書で説明される1つもしくは複数のCD34阻害剤；CD123阻害剤、例えば、本明細書で説明される1つもしくは複数のCD123阻害剤；FLT-3阻害剤、例えば、本明細書で説明される1つもしくは複数のFLT-3阻害剤；ROR1阻害剤、例えば、本明細書で説明される1つもしくは複数のROR1阻害剤；CD79b阻害剤、例えば、本明細書で説明される1つもしくは複数のCD79b阻害剤；CD179b阻害剤、例えば、本明細書で説明される1つもしくは複数のCD179b阻害剤；CD79a阻害剤、例えば、本明細書で説明される1つもしくは複数のCD79a阻害剤、またはそれらのあらゆる組合せから選ばれる。ある特定の態様において、B細胞白血病またはB細胞リンパ腫を有する対象を処置する方法であって、CD19に結合するCAR分子を発現する1つまたは複数の細胞の有効な数をCD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179bまたはCD79aの1つまたは複数の阻害剤と組み合わせて対象に投与することを含む方法を開示する。

10

20

【0007】

関連する態様において、本開示は、CD19発現細胞の増殖を低減させる方法であって、例えば、対象、例えばそれを必要とする患者に、本明細書で説明されるような併用療法を投与すること、例えば、CD19阻害剤をB細胞阻害剤、例えば本明細書で説明されるような1つまたは複数のB細胞阻害剤と組み合わせて投与することによる方法を提供する。別の態様において、本開示は、CD19発現細胞を選択的に死滅させる方法であって、例えば、対象、例えばそれを必要とする患者に、本明細書で説明されるような併用療法を投与すること、例えば、CD19阻害剤をB細胞阻害剤、例えば本明細書で説明されるような1つまたは複数のB細胞阻害剤と組み合わせて投与することによる方法を提供する。ある特定の態様において、本開示は、対象、例えば哺乳動物において抗腫瘍免疫を提供する方法であって、本明細書で説明されるような組合せ（例えば、1種または複数のCAR発現細胞）の有効量を前記哺乳動物に投与することを含む方法を提供する。

30

【0008】

ある態様において、本開示は、哺乳動物におけるCD19陰性の再発を予防する方法であって、1つまたは複数のB細胞阻害剤を前記哺乳動物に投与することを含み、前記B細胞阻害剤が、CD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179bまたはCD79aの1つまたは複数の阻害剤を含む、方法を提供する。

【0009】

別の態様では、本開示は、CD19の発現に関連する疾患、例えばDLBCL（例えば、原発性DLBCL）を有する対象を処置する方法を提供する。方法は、CD19に結合するCAR分子、例えばCD19 CARを発現する1つまたは複数の細胞の有効な数を、適宜、PD1阻害剤と組み合わせて、対象に投与することを含む。対象は、CD3+/PD1+であるがん細胞、例えばDLBCL細胞、少なくとも5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%または90%を有してもよく、またはこれを有するものとして同定されてもよい。

40

【0010】

ある態様では、本開示は、CD19の発現に関連する疾患、例えばDLBCLを有する対象を処置する方法を提供する。方法は、CD19に結合するCAR分子、例えばCD19 CARを発現する1つまたは複数の細胞の有効な数をPD-L1阻害剤と組み合わせ

50

て対象に投与することを含む。対象は、がん、例えばがん微小環境、において、CD19 およびPD-L1に関して二重陽性である細胞 (cells in the cancer, e.g., cancer microenvironment, are double positive for CD19 and PD-L1) 20%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、または1%未満を有してもよく、またはこれを有するものとして同定されてもよい。

【0011】

ある態様では、本開示は、CD19の発現に関連する疾患を有する対象の処置において使用するための1つまたは複数のB細胞阻害剤であって、CD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179bまたはCD79aの1つまたは複数の阻害剤を含み、前記対象が、CD19に結合するCAR分子、例えばCD19 CARを発現する細胞を受けたことがあるか、受けているか、または受ける予定である、1つまたは複数のB細胞阻害剤を提供する。

10

【0012】

併用投与のタイミングおよび投与量

本明細書で説明される1つまたは複数の治療を実質的に同時にまたは任意の順序で対象に投与することができる。例えば、CD19阻害剤、例えば、本明細書で説明されるCD19 CAR発現細胞、1つまたは複数のB細胞阻害剤、および／または、適宜、少なくとも1種の追加の治療剤を、同じまたは別の組成物で同時に投与してもよいし、または逐次的に投与してもよい。

【0013】

逐次的な投与の場合、本明細書で説明されるCAR発現細胞（例えば、CD19 CAR発現細胞、CD20 CAR発現細胞、またはCD22 CAR発現細胞）を最初に投与し、2番目に追加の薬剤を投与してもよいし、または投与順はその逆でもよい。一部の実施形態において、最初の治療（例えば、CAR発現細胞、例えばCD19 CART細胞、CD20 CART細胞、またはCD22 CART細胞）は、2番目の治療が導入されるとき継続しており、他の実施形態において、最初の治療は、2番目の治療が導入される前、導入された後、または導入されるのと同時に中止される。逐次的な投与の場合、一部の実施形態において、2番目の治療は、所定の時間の後、または対象が、再発が起こったもしくは起こる可能性がある1つもしくは複数の徴候を示した後、開始される。徴候は、例えば、最初の治療、例えばCD19、CD20またはCD22、の標的に障害が認められるがん細胞の存在であり得る。障害は、例えば、フレームシフト突然変異および／または未成熟終止コドンであってもよい。

20

30

【0014】

他の実施形態において、2種以上の治療（例えば、CD19 CAR発現細胞およびB細胞阻害剤）は、同時に投与される。理論に縛られることは望まないが、一部の実施形態において、治療の同時投与は、再発の尤度を低下させることができ、および／または再発を遅延させることができる。

【0015】

組み合わせで投与する場合、最初の治療（例えば、CAR療法、例えば、CD19、CD20もしくはCD22に対して向けられたCAR発現細胞）および追加の薬剤（例えば、第二もしくは第三の薬剤、例えばB細胞阻害剤）、または全ては、個別に、例えば、単剤療法として使用される各薬剤の量または投与量より高量または高用量で投与することもでき、これより低量または低用量で投与することもでき、これと同量または同用量で投与することもできる。ある特定の実施形態において、最初の治療、2番目の治療、適宜3番目の治療、または全ての投与される量または投与量は、個別に、例えば単剤療法として使用される各薬剤の量または投与量より低量または低投与量（例えば、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、または少なくとも50%の量または投与量）である。他の実施形態において、所望の効果（例えば、がんの処置）を結果としてもたらす、最初の治療、2番目の治療、適宜3番目の治療、または全ての量または投与量は、同じ治療効果を達成するのに必要とされる個別に、例えば単剤療法として使用される各薬剤の量

40

50

または投与量より低量または低投与量（例えば、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、または少なくとも50%低量または低投与量）である。ある特定の実施形態において、より低用量は、常用量（単剤療法の用量）が投与されたときに見られるものと比較して副作用の低減をもたらす。

【0016】

ある実施形態において、治療は、細胞の集団を含む。実施形態において、細胞は、免疫エフェクター細胞、例えば、CAR発現細胞である。

【0017】

代替的に、または本明細書で説明される方法と組み合わせて、診断工程または患者選択工程、例えば以下で説明されるような工程を含む方法を開示する。

【0018】

一態様において、本発明は、再発例ステータス（例えば、CAR療法後の再発例または非再発例）について対象、例えば患者を評価する方法を提供する。一実施形態において、方法は、CAR療法（例えば、CD19 CAR T療法、例えば本明細書で説明されるCD19 CAR T療法、例えばCTL019療法）での処置後、再発した対象、例えば患者（「再発例」）、または再発する可能性がある対象、例えば患者、または再発していない対象、例えば患者（「非再発例」）、または再発する可能性がない対象、例えば患者を同定する。ある実施形態において、再発例ステータス（例えば、CAR T療法後の再発例または非再発例）は、CD19の1つまたは複数の特徴についてアッセイすることによって決定される。

【0019】

一実施形態において、CD19の1つまたは複数の特徴としては、核酸配列の変化（例えば、挿入、欠失もしくは置換またはこれらの組合せなどの、突然変異）、核酸レベルの変化、タンパク質配列の変化、もしくはタンパク質レベルの変化、またはそれらの組合せが挙げられる。一実施形態において、再発例は、CD19における1つまたは複数の突然変異、例えば、CD19のエキソン2における1つまたは複数の突然変異（例えば、挿入または欠失）を有する。ある実施形態において、再発例は、CD19のエキソン1、エキソン2、エキソン3、エキソン4、エキソン5、エキソン6またはエキソン7における1つまたは複数の突然変異を有する。ある実施形態において、突然変異は、例えばCD19のエキソン2において、例えば、フレームシフトに至る挿入または欠失によって、未成熟終止コドンを生成する。ある実施形態において、突然変異は、表31の突然変異である。

【0020】

ある実施形態において、CD19の特徴は、参照特徴と比較される。例えば、特徴が配列（例えば、生体試料からのタンパク質または核酸配列）である場合、参照特徴は、CD19の野生型配列（例えば、タンパク質または核酸配列）であり得る。特徴は、突然変異配列を有する試料中の細胞のパーセントであってもよい。特徴がレベル（例えば、タンパク質または核酸レベル）である場合、参照特徴は、CD19の野生型レベル（例えば、タンパク質または核酸レベル）であり得る。特徴は、試料中のタンパク質または核酸のレベルであってもよい。特徴は、所与の閾値を超えるタンパク質または核酸のレベルを有する試料中の細胞のパーセンテージであってもよい。

【0021】

ある実施形態において、がん、例えば、血液がん、例えばCLLまたはALLなどを有する対象を、CAR療法、例えばCD19 CAR T療法を含む処置後に再発例または非再発例であるとして同定する方法を提供する。方法は、（1）対象から試料（例えば、対象の血液から得られるアフレーシス試料；および／または例えば、製造された生成物試料、例えば、対象の血液から得られる遺伝子加工されたT細胞）を得ること；（2）CD19の特徴、例えば配列またはレベルを本明細書で説明されるように決定すること；および（3）決定されたCD19の特徴を基準特徴と（適宜）比較すること（この場合、参照特徴と比較して決定された特徴との差、例えば、統計学的に有意な差は、CAR療法に対して再発することを予示する）；および（4）対象を、例えば、決定されたCD19の特

10

20

30

40

50

徴に基づき、CAR療法に対する再発例または非再発例として同定することを含む。一実施形態において、CD19の特徴の存在または非存在は、例えばフレームシフトに至る挿入または欠失による、未成熟終止コドンの存在または非存在である。ある実施形態において、CD19の特徴の存在は、表31の突然変異である。

【0022】

ある実施形態において、提供する方法は、(1)対象から試料(例えば、対象の血液から得られるアフエレーシス試料;および/または例えば、製造された生成物試料、例えば、対象の血液から得られる遺伝子加工されたT細胞、例えば製造されたCAR T19生成物)を得ること;(2)CD19の特徴、例えば配列またはレベルを本明細書で説明されるように決定すること;および(3)決定されたCD19の特徴を基準特徴と(適宜)比較することを含み、CD19の特徴の存在(例えば、参照特徴と比較して決定された特徴との差、例えば、統計学的に有意な差)は、CAR療法に対して再発することを予示する。一実施形態において、CD19の特徴の存在は、例えばフレームシフトに至る挿入または欠失による、未成熟終止コドンの存在である。ある実施形態において、CD19の特徴の存在は、表31の突然変異である。

10

【0023】

ある実施形態において、がん、例えば、CLLまたはALLなどの血液がんを有する対象の再発を、CAR療法、例えば、本明細書で説明されるCD19 CAR療法を含む処置後に決定する方法を提供する。方法は、再発前に得た試料中のCD19の特徴を決定することを含む。ある実施形態において、CD19の特徴の存在(例えば、参照特徴と比較して決定された特徴との差、例えば、統計学的に有意な差)は、CAR療法後の再発を示す。一実施形態において、CD19の特徴の存在は、例えばフレームシフトに至る挿入または欠失による、未成熟終止コドンの存在である。ある実施形態において、CD19の特徴の存在は、表31の突然変異である。

20

【0024】

ある実施形態において、がん、例えば、CLLまたはALLなどの血液がんを有する対象を評価する方法を提供する。方法は、CD19の1つまたは複数の特徴(one or characteristics)、例えば本明細書で説明されるようなCD19の特徴の1つまたは複数の測度を含む、対象の再発例ステータスの値を得ることによって前記対象を評価することを含む。

30

【0025】

ある実施形態において、がんを有する対象におけるCAR療法、例えば、CD19 CAR T療法の有効性を評価またはモニタリングする方法であって、CD19の1つまたは複数の特徴、例えば本明細書で説明されるようなCD19の特徴の1つまたは複数の測度を含む、前記対象の再発例ステータスの値を得ることによって前記対象におけるCAR療法の有効性を評価またはモニタリングすることを含む方法を提供する。

【0026】

ある実施形態において、がんを有する対象におけるCAR療法、例えばCD19 CAR T療法、例えば、本明細書で説明されるCD19 CAR T療法の成功率の予測を提供する方法であって、前記対象からの生体試料を用意する工程;CD19の1つまたは複数の特徴、例えば、本明細書で説明されるようなCD19の特徴の1つまたは複数の決定する工程、および決定された特徴に基づき、前記対象に予後を提供する工程を含む方法を提供する。

40

【0027】

一部の態様において、本開示は、例えば、がんを有する対象を、キメラ抗原受容体(CAR)療法を含む処置に応答する尤度増加もしくは減少を有すると同定する方法、またはそれを同定するためのアッセイを提供し、前記方法は、

(1)対象から試料を得ること;

(2)(i)試料中の表29に列挙した1つまたは複数のマーカーのレベル、

(ii)CD19の特徴、例えば、突然変異、例えば、フレームシフトもしくは未

50

成熟終止コドンまたは両方を引き起こす突然変異、あるいは

(i i i) T_{REG}細胞のレベルもしくは活性
の1つまたは複数についての値を決定すること；

(3) 決定された値、例えば、(i)、(i i) もしくは(i i i) またはそれらの組合せのレベル、活性もしくは特徴を基準値と(適宜) 比較すること(この場合、参照値と比較して決定された値との差、例えば、統計学的に有意な差は、CAR療法に対する対象の応答性を予示する) ；および

(4) 前記対象を決定された値に基づいてCAR療法に対する完全応答例、部分応答例もしくは非応答例、または再発例もしくは非再発例として同定することを含む。

10

【 0 0 2 8 】

ある特定の実施形態において、前述の方法のいずれかが、以下のことをさらに包含し得る：

(i) (i) 表 2 9 に列挙した1つまたは複数のマーカーのレベルまたは活性、(i i) CD 1 9 の特徴、例えば突然変異、例えばフレームシフトもしくは未成熟終止コドンまたは両方を引き起こす突然変異、あるいは(i i i) 生体試料中のT_{REG}細胞のレベル、の1つ、2つ以上(全て) の値に関して差が検出されなかった、例えば、統計学的に有意な差が検出されなかった場合、CAR療法、例えば、CD 1 9 発現細胞を含む治療の治療有効用量を対象に投与すること；

(i i) (i) 表 2 9 に列挙した1つまたは複数のマーカーのレベルまたは活性、(i i) CD 1 9 の特徴、例えば突然変異、例えばフレームシフトもしくは未成熟終止コドンまたは両方を引き起こす突然変異、あるいは(i i i) 生体試料中のT_{REG}細胞のレベル、の1つ、2つ以上(全て) の値に関して差、例えば統計学的に有意な差が検出された場合、CAR療法、例えば、CD 1 9 発現細胞を含む治療、および1つまたは複数のB細胞阻害剤(例えば、本明細書で説明されるようなCD 1 0、CD 2 0、CD 2 2、CD 3 4、CD 1 2 3、FLT-3またはROR1の1つまたは複数の阻害剤) の治療有効用量を対象に投与すること；あるいは

20

(i i i) (i) 表 2 9 に列挙した1つまたは複数のマーカーのレベルまたは活性、(i i) CD 1 9 の特徴、例えば突然変異、例えばフレームシフトもしくは未成熟終止コドンまたは両方を引き起こす突然変異、あるいは(i i i) 生体試料中のT_{REG}細胞のレベル、の1つ、2つ以上(または全て) の値に関して差、例えば統計学的に有意な差が検出された場合、最初の治療、例えば、CD 1 9 発現細胞を含む治療を中止して、2番目の治療、例えば、1つまたは複数のB細胞阻害剤(例えば、本明細書で説明されるようなCD 1 0、CD 2 0、CD 2 2、CD 3 4、CD 1 2 3、FLT-3またはROR1の1つまたは複数の阻害剤) を投与すること。

30

【 0 0 2 9 】

投与工程(i) ~ (i i i) は、下記の例示的な実施形態で説明されるように、患者評価工程の前に実施してもよく、またはその後実施してもよい。

【 0 0 3 0 】

ある特定の態様において、がんを有する対象を処置する方法を開示する。方法は、
(a) 対象が、

40

(i) 表 2 9 に列挙した1つまたは複数のマーカーのレベル、
(i i) CD 1 9 の特徴、例えば、フレームシフトもしくは未成熟終止コドンまたは両方を引き起こす突然変異、あるいは

(i i i) 生体試料中のT_{REG}細胞のレベルまたは活性
の1つ、2つ以上(全て) の値を有した場合、それを得ること、例えば決定することを含み、

(b) 前記値に応じて、以下のことをさらに包含する：

(i) (i) 表 2 9 に列挙した1つまたは複数のマーカーのレベルまたは活性、(i i) CD 1 9 の特徴、例えば突然変異、例えばフレームシフトもしくは未成熟終止コドン

50

または両方を引き起こす突然変異、あるいは (i i i) 生体試料中の T_{REG} 細胞のレベル、の1つ、2つ以上（または全て）に関して差が検出されなかった、例えば、統計学的に有意な差が検出されなかった場合、CAR療法、例えば、CD19発現細胞を含む治療の治療有効用量を対象に投与すること；

(i i) (i) 表29に列挙した1つまたは複数のマーカーのレベルまたは活性、(i i) CD19の特徴、例えば突然変異、例えばフレームシフトもしくは未成熟終止コドンまたは両方を引き起こす突然変異、あるいは (i i i) 生体試料中の T_{REG} 細胞のレベル、の1つ、2つ以上（または全て）に関して差、例えば、統計学的に有意な差が検出された場合、CAR療法、例えば、CD19発現細胞を含む治療、および1つまたは複数のB細胞阻害剤（例えば、本明細書で説明されるようなCD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3またはROR1の1つまたは複数の阻害剤）の治療有効用量を対象に投与すること；あるいは

10

(i i i) (i) 表29に列挙した1つまたは複数のマーカーのレベルまたは活性、(i i) CD19の特徴、例えば突然変異、例えばフレームシフトもしくは未成熟終止コドンまたは両方を引き起こす突然変異、あるいは (i i i) 生体試料中の T_{REG} 細胞のレベル、の1つまたは複数に関して差、例えば、統計学的に有意な差が検出された場合、最初の治療、例えば、CD19発現細胞を含む治療を中止して、2番目の治療、例えば、1つまたは複数のB細胞阻害剤（例えば、本明細書で説明されるようなCD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3またはROR1の1つまたは複数の阻害剤）を投与すること。

20

【0031】

別の態様において、がんを有する対象を処置する方法を提供する。方法は、以下のことを包含する：

(a) CAR療法、例えば、CD19発現細胞を含む治療の治療有効用量を対象に投与すること、

(b) (I) 表29に列挙した1つまたは複数のマーカーのレベル、

(I I) CD19の特徴、例えば、突然変異、例えば、フレームシフトもしくは未成熟終止コドンまたは両方を引き起こす突然変異、あるいは

(I I I) 生体試料中の T_{REG} 細胞のレベルまたは活性、

の1つ、2つ以上（全て）についての値を得ること（例えば、対象がそれを有する場合、それを決定すること）、および

30

(c) 工程(b) (I ~ I I I) における値または決定に応じて、以下の1つまたは複数を実施すること：

(i) (I) 表29に列挙した1つまたは複数のマーカーのレベルまたは活性、(I I) CD19の特徴、例えば突然変異、例えばフレームシフトもしくは未成熟終止コドンまたは両方を引き起こす突然変異、あるいは (I I I) 生体試料中の T_{REG} 細胞のレベル、の1つまたは複数に関して差が検出されなかった、例えば、統計学的に有意な差が検出されなかった場合、CAR療法、例えば、CD19発現細胞を含む治療の治療有効用量を対象に投与すること；

(i i) (I) 表29に列挙した1つまたは複数のマーカーのレベルまたは活性、(I I) CD19の特徴、例えば突然変異、例えばフレームシフトもしくは未成熟終止コドンまたは両方を引き起こす突然変異、あるいは (I I I) 生体試料中の T_{REG} 細胞のレベル、の1つまたは複数に関して差、例えば、統計学的に有意な差が検出された場合、CAR療法、例えば、CD19発現細胞を含む治療、および1つまたは複数のB細胞阻害剤（例えば、本明細書で説明されるようなCD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3またはROR1の1つまたは複数の阻害剤）の治療有効用量を対象に投与すること；あるいは

40

(i i i) (I) 表29に列挙した1つまたは複数のマーカーのレベルまたは活性、(I I) CD19の特徴、例えば突然変異、例えばフレームシフトもしくは未成熟終止コドンまたは両方を引き起こす突然変異、あるいは (I I I) 生体試料中の T_{REG} 細胞

50

、のレベルの1つまたは複数に関して差、例えば、統計学的に有意な差が検出された場合、最初の治療、例えば、CD19発現細胞を含む治療を中止して、2番目の治療、例えば、1つまたは複数のB細胞阻害剤（例えば、本明細書で説明されるようなCD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3またはROR1の1つまたは複数の阻害剤）を投与すること。

【0032】

前述の方法のいずれかについての一部の実施形態において、試料は、血液、血漿または血清試料から選択される生体試料である。特定の実施形態において、生体試料は、血液試料である。一実施形態において、試料は、アフレーシス試料、例えば、対象の血液から得られるT細胞である。ある実施形態において、試料は、製造された生成物試料、例えば、対象の血液から得られる遺伝子加工されたT細胞、例えば、製造されたCAR生成物、例えば、製造されたCAR T19生成物である。

10

【0033】

ある実施形態において、本明細書における方法は、患者が、CAR療法（例えば、CD19 CAR T）に応答する可能性があるかどうか、例えば、CAR療法を受けたことがない患者が、CAR療法に応答する可能性があるかどうか、またはCAR療法を受けたことがある患者が、継続的なCAR療法に応答する可能性があるかどうかを決定するために使用することができる。一般に、再発を予示する同じCD19の特徴が、患者がCD19

CAR療法に応答する可能性が低いことを予示する。CD19 CAR療法に応答する可能性が低いと同定される患者には、異なるタイプの治療、例えば、B細胞阻害剤（例えば、本明細書で説明されるようなCD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3またはROR1、CD79b、CD179bまたはCD179aの1つまたは複数の阻害剤）を投与することができる。

20

【0034】

別の態様において、がん、例えば血液がんを有する対象を処置する方法を提供する。ある実施形態において、方法は、対象が、参照特徴と比べてCD19の特徴の差、例えば統計学的に有意な差を有するかどうかを決定すること、および決定された特徴と参照特徴間に差、例えば統計学的に有意な差があった場合、CAR療法、例えばCAR Tの治療有効用量を対象に投与することによって対象を処置することを包含する。ある実施形態において、特徴は、CD19配列、例えば、タンパク質または核酸配列である。ある実施形態において、方法は、フレームシフトしたCD19、例えば、未成熟終止コドンを含むCD19の存在または非存在についてアッセイすることを含む。

30

【0035】

前述の方法のいずれかについての実施形態において、処置は、CD19 CAR発現細胞を、適宜、1つまたは複数のB細胞阻害剤と組み合わせて、投与することを含む。ある実施形態において、CD19 CAR療法は、1つまたは複数のB細胞阻害剤（例えば、本明細書で説明されるようなCD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179bまたはCD179aの1つまたは複数の阻害剤）と同時に投与される。ある実施形態において、CD19 CAR療法は、B細胞阻害剤の1つまたは複数の前に投与される。ある実施形態において、CD19 CAR療法は、B細胞阻害剤の1つまたは複数の後に投与される。

40

【0036】

ある実施形態において、決定された特徴と参照特徴間に差があった場合、方法は、対象への注入前にCAR生成物を改変することを含む。ある実施形態において、決定された特徴と参照特徴間に差があった場合、方法は、対象への注入前にCAR生成物の製造を改変することを含む。ある実施形態において、決定された特徴と参照特徴間に差があった場合、方法は、抗がん作用を達成するようにCAR注入用量を調整することを含む。

【0037】

ある実施形態において、処置の方法は、参照特徴に対して対象からの試料中のCD19の特徴を比較することによって、対象が、CAR療法、例えば、CD19 CAR T療法

50

、例えば本明細書で説明されるようなCD19 CART療法に応答する尤度増加を有するかどうかを決定すること（この場合、参照特徴に対する特徴の差は、応答の尤度増加を示す）、およびCAR療法の治療有効用量を対象に投与することによって、対象を処置することを含む。

【0038】

ある実施形態において、処置の方法は、対象から試料を得ること、参照特徴と比べてCD19の特徴（例えば、フレームシフトまたは未成熟終止コドンの存在または非存在）を決定すること；および対象が、試料のCD19特徴と試料における参照特徴との統計学的に有意な差を有するものとして同定された場合、CAR発現細胞の治療有効用量を投与することを含む。

10

【0039】

CD19特徴は、患者の処置を設計するために使用することができる。例えば、ある実施形態において、患者試料が野生型CD19を含んでいた場合、患者にCD19阻害剤、例えば、CD19 CAR発現細胞、例えば、CD19 CARTを投与する。ある実施形態において、患者試料が突然変異CD19、例えばフレームシフトしたCD19、例えば、未成熟終止コドンを含むCD19を含んでいた場合、患者にCD19阻害剤以外の治療を投与する、例えば、患者に別のB細胞阻害剤を投与する。ある実施形態において、患者試料が少なくとも正常レベルのCD19を含んでいた場合、患者にCD19阻害剤、例えばCD19 CAR発現細胞、例えばCD19 CARTを投与する。ある実施形態において、患者試料が正常レベル未満のCD19を含んでいた場合、患者にCD19阻害剤以外の治療を投与する、例えば、患者に別のB細胞阻害剤（例えば、本明細書で説明されるようなCD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179bまたはCD79aの1つまたは複数の阻害剤）を投与する。

20

【0040】

ある実施形態において、処置の方法は、CD19特徴の測度を含む、対象の再発例ステータスの値を得ること、および再発例ステータスの決定に応じて、次の1つ、2つ、3つ、4つ以上（three four or more）を実施することを含む：（1）対象を再発例または非再発例として同定すること；（2）CAR療法を投与すること；（3）CAR療法の投与を選択または変更すること；（4）CAR療法のスケジュールまたは時間経過を選択または変更すること；（5）例えば再発例に、CAR療法と組み合わせて追加の薬剤を投与すること、例えば、1つもしくは複数のB細胞阻害剤、またはチェックポイント阻害剤、例えば本明細書で説明されるチェックポイント阻害剤、もしくはキナーゼ阻害剤、例えば、本明細書で説明されるキナーゼ阻害剤を投与すること；（6）CAR療法での処置の前に対象におけるナイーブT細胞の数を増加させる治療を再発例に投与すること；CAR療法の製造工程を改変すること、例えば、CARをコードする核酸を導入する前に、例えば再発例として同定された対象について、ナイーブT細胞を濃縮すること；あるいは（7）例えば再発例のための代替治療、例えば特定のがんの標準治療（例えば、本明細書で説明される通り）を選択すること；それによって対象のがんを処置すること。

30

【0041】

一部の実施形態において、方法は、1つ、2つ、3つ以上のB細胞阻害剤（例えば、本明細書で説明されるようなCD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3またはROR1の1つまたは複数の阻害剤）を投与することを含む。例えば、ある実施形態において、方法は、CD19阻害剤、例えば、CD19 CARを発現する細胞を、CD10阻害剤と組み合わせて、またはCD10阻害剤と本明細書で説明されるようなCD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3もしくはROR1の阻害剤との任意の組合せと組み合わせて、投与することを包含する。別の実施形態において、方法は、CD19阻害剤、例えば、CD19 CARを発現する細胞を、CD20阻害剤と組み合わせて、またはCD20阻害剤と本明細書で説明されるようなCD10、CD22、CD34、CD123、FLT-3もしくはROR1の阻害剤との任意の組合せと組み合わせて、投与することを包含する。別の実施形態において、方法は、CD19阻害剤、例えば、C

40

50

D19 CARを発現する細胞を、CD22阻害剤と組み合わせて、またはCD22阻害剤と本明細書で説明されるようなCD10、CD20、CD34、CD123、FLT-3もしくはROR1の阻害剤との任意の組合せと組み合わせて、投与することを包含する。別の実施形態において、方法は、CD19阻害剤、例えば、CD19 CARを発現する細胞を、CD34阻害剤と組み合わせて、またはCD4阻害剤と本明細書で説明されるようなCD10、CD20、CD22、CD123、FLT-3もしくはROR1の阻害剤との任意の組合せと組み合わせて、投与することを包含する。別の実施形態において、方法は、CD19阻害剤、例えば、CD19 CARを発現する細胞を、CD123阻害剤と組み合わせて、またはCD123阻害剤と本明細書で説明されるようなCD10、CD20、CD34、CD22、FLT-3もしくはROR1の阻害剤との任意の組合せと組み合わせて、投与することを包含する。別の実施形態において、方法は、CD19阻害剤、例えば、CD19 CARを発現する細胞を、FLT-3阻害剤と組み合わせて、またはFLT-3阻害剤と本明細書で説明されるようなCD10、CD20、CD34、CD123もしくはROR1の阻害剤との任意の組合せと組み合わせて、投与することを包含する。別の実施形態において、方法は、CD19阻害剤、例えば、CD19 CARを発現する細胞を、ROR1阻害剤と組み合わせて、またはROR1阻害剤と本明細書で説明されるようなCD10、CD20、CD34、CD123もしくはFLT-3の阻害剤との任意の組合せと組み合わせて、投与することを包含する。一部の実施形態において、方法は、1つ、2つ、3つ以上のB細胞阻害剤（例えば、本明細書で説明されるようなCD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3またはROR1、CD79b、CD179bまたはCD79aの1つまたは複数の阻害剤）を投与することを含む。

10

20

【0042】

一部の実施形態において、本明細書で説明される処置の方法は、患者試料中の免疫チェックポイント分子（例えば、PD-L1、PD1、LAG3またはTIM3）のレベルを決定すること、および免疫チェックポイント阻害剤（例えば、PD-L1、PD1、LAG3およびTIM3の1つまたは複数の阻害剤）を患者に投与することの一方または両方をさらに含む。例えば、方法は、本明細書で説明される1つまたは複数のCAR発現細胞（例えば、B細胞阻害剤、CD20 CARまたはCD22 CARと組み合わせたCD19 CAR）で患者を処置すること、および前記処置の前にまたはその後に患者における免疫チェックポイント分子のレベルを決定することを含んでもよい。一部の実施形態において、方法は、参照レベルと比較して上昇した免疫チェックポイント分子レベルを有する患者に免疫チェックポイント阻害剤を投与すること、例えば、上昇したPD-L1レベルに応じてPD-L1阻害剤を投与すること、上昇したPD1レベルに応じてPD1阻害剤を投与すること、上昇したLAG3レベルに応じてLAG3阻害剤を投与すること、または上昇したTIM3レベルに応じてTIM3阻害剤を投与することを含む。一部の実施形態において、方法は、本明細書で説明される1つまたは複数のCAR発現細胞（例えば、B細胞阻害剤と組み合わせたCD19 CAR、CD20 CAR、またはCD22 CAR）での治療を受けたことがあるか、受けているか、または受ける予定である患者であって、参照レベルと比較して上昇した免疫チェックポイント分子レベルを有するか、または有するものとして同定される患者に、免疫チェックポイント阻害剤を投与することを含む。

30

40

【0043】**組成物**

一部の態様において、本開示は、例えば、次のものを含む組成物を提供する：(i) CD19に結合するCAR分子、例えば、本明細書で説明されるCD19に結合するCAR分子、例えばCD19 CARを発現する1つまたは複数の細胞、および(ii) B細胞阻害剤、例えば、CD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3またはROR1の1つまたは複数の阻害剤。実施形態において(i)および(ii)は別々に提供され、実施形態において(i)および(ii)は混合される。

【0044】

50

一部の態様において、本開示は、例えば、次のものをコードする核酸を提供する：（i）CD19に結合するCAR分子、例えば、本明細書で説明されるCD19に結合するCAR分子、例えばCD19 CAR、および（ii）1つまたは複数のB細胞阻害剤、例えば、CD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3またはROR1の1つまたは複数の阻害剤。一部の態様において、本開示は、例えば、次のものをコードする核酸を提供する：（i）CD19に結合するCAR分子、例えば、本明細書で説明されるCD19に結合するCAR分子、例えばCD19 CAR、および（ii）B細胞抗原、例えばCD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3またはROR1の1つまたは複数、に結合するCAR分子。実施形態において、核酸は、RNAまたはDNAを含む。

10

【0045】

一部の態様において、本開示は、例えば、次のものをコードする核酸を提供する：（i）CD19に結合するCAR分子、例えば、本明細書で説明されるCD19に結合するCAR分子、例えばCD19 CAR、および（ii）B細胞抗原、例えばCD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179bまたはCD79aの1つまたは複数、に結合するCAR分子。実施形態において、核酸は、RNAまたはDNAを含む。実施形態において、（i）および（ii）をコードする核酸配列は、同じ配置で位置し、例えば、（i）および（ii）をコードする核酸配列の転写は、同じ方向に進行する。実施形態において、（i）および（ii）をコードする核酸配列は、異なる配置で位置する。実施形態において、単一のプロモーターが、（i）および（ii）をコードする核酸配列の発現を制御する。実施形態において、プロテアーゼ切断部位（例えば、T2A、P2A、E2AまたはF2A切断部位）をコードする核酸が、（i）および（ii）をコードする核酸配列間に位置する。実施形態において、プロテアーゼ切断部位は、細胞が、（i）および（ii）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、後に前記タンパク質はタンパク質切断によって2つのペプチドにプロセッシングされる。一部の実施形態において、（i）をコードする核酸配列は、（ii）をコードする核酸配列の上流にあり、または（ii）をコードする核酸配列は、（i）をコードする核酸配列の上流にある。実施形態において、第一のプロモーターは、（i）をコードする核酸配列の発現を制御し、第二のプロモーターは、（ii）をコードする核酸配列の発現を制御する。実施形態において、核酸はプラスミドである。実施形態において、核酸は、ウイルスパッケージング要素を含む。一部の態様において、本開示は、本明細書で説明される核酸、例えば上記の（i）および（ii）を含む核酸、を含む細胞、例えば免疫エフェクター細胞を提供する。細胞は、T2A、P2A、E2AまたはF2A切断部位を切断するプロテアーゼ（例えば、内因性または外因性）を含むこともある。

20

30

【0046】

一部の態様において、本開示は、例えば、次のものを含む組成物を提供する：（i）CD19に結合するCAR分子、例えば、本明細書で説明されるCD19に結合するCAR分子、例えばCD19 CAR、をコードする第一の核酸、および（ii）1つまたは複数のB細胞阻害剤、例えば、CD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3またはROR1の1つまたは複数の阻害剤、をコードする第二の核酸。一部の態様において、本開示は、例えば、次のものを含む組成物を提供する：（i）CD19に結合するCAR分子、例えば、本明細書で説明されるCD19に結合するCAR分子、例えばCD19 CAR、をコードする第一の核酸、および（ii）B細胞抗原、例えば、CD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3またはROR1の1つまたは複数、に結合するCAR分子。実施形態において、第一の核酸および第二の核酸は、各々、RNAまたはDNAを含む。

40

【0047】

一部の態様において、本開示は、例えば、本明細書で説明されるよう核酸（単数または複数）を含むベクターを提供する。本開示は、ある特定の態様において、本明細書で説明されるようなベクターまたは核酸を含む細胞も提供する。

50

【0048】

本開示は、ある特定の態様において、1種または複数の免疫エフェクター細胞、および (i) CD19 に結合する CAR 分子、例えば、本明細書で説明される CD19 に結合する CAR 分子、例えば CD19 CAR、をコードする第一の核酸、またはそのような CAR 分子を含む第一のポリペプチド、および (ii) B 細胞抗原、例えば CD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179b または CD79a の 1 つまたは複数、に結合する CAR 分子をコードする第二の核酸、またはそのような CAR 分子を含む第二のポリペプチドを含む、組成物も提供する。実施形態において、第一の核酸または第一のポリペプチド、および第二の核酸または第二のポリペプチドは、各々、第一の免疫エフェクター細胞内に含有される、例えば、第一の免疫エフェクター細胞によって発現される。実施形態において、組成物は、第一の核酸または第一のポリペプチドを含有する、例えば発現する、第一の免疫エフェクター細胞、および前記第二の核酸または第二のポリペプチドを含有する、例えば発現する、第二の免疫エフェクター細胞を含む。実施形態において、組成物は、第一の核酸または第一のポリペプチドと第二の核酸または第二のポリペプチドの両方を含有する、例えば発現する、細胞を含まない。

10

【0049】

製造

ある特定の態様において、本開示は、細胞を作製する方法であって、本明細書で説明されるようなベクター、例えば、CAR をコードするベクターで免疫エフェクター細胞、例えば、T 細胞または NK 細胞に形質導入することを含む方法を提供する。ある特定の態様において、本開示は、細胞を作製する方法であって、本明細書で説明されるような核酸 (例えば、CAR をコードする核酸) を免疫エフェクター細胞、例えば、T 細胞または NK 細胞に導入することを含む方法を提供する。ある特定の態様において、本開示は、RNA が加工された細胞の集団を生成する方法であって、インビトロ (in vitro) で転写された RNA または合成 RNA を細胞に導入することを含み、ここで該 RNA が本明細書で説明されるような核酸、例えば、CAR をコードする核酸を含む、方法を提供する。

20

【0050】

一部の実施形態において、本明細書で開示される作製方法は、細胞 (例えば、CD19 CAR 発現細胞、CD20 CAR 発現細胞、CD22 CAR 発現細胞、B 細胞阻害剤細胞、または CD19 CAR 発現細胞と B 細胞阻害剤細胞の両方) の集団と、テロメラーゼサブユニット、例えば hTERT、をコードする核酸とを接触させることをさらに含む。テロメラーゼサブユニットをコードする核酸は、DNA であり得る。

30

【0051】

一部の実施形態において、本明細書で開示される作製方法は、2% hAB 血清を含む血清中で、細胞 (例えば、CD19 CAR 発現細胞、CD20 CAR 発現細胞、CD22 CAR 発現細胞、B 細胞阻害剤細胞、または CD19 CAR 発現細胞と B 細胞阻害剤細胞の両方) の集団を培養することをさらに含む。

【0052】

徴候

一実施形態において、CD19 発現に関連する疾患は、がんもしくは悪性腫瘍などの増殖性疾患、または脊髄形成異常、骨髄異形成症候群もしくは前白血病状態などの前がん状態から選択されるか、あるいは CD19 の発現に関連する非がん関連の徴候である。一実施形態において、疾患は、固形または液性腫瘍である。一実施形態において、がんは、膵臓がんである。一実施形態では、疾患は、血液がんである。一実施形態において、血液がんは、白血病である。一実施形態において、がんは、これらに限定されないが B 細胞急性リンパ芽球性白血病 (BALL)、T 細胞急性リンパ芽球性白血病 (TALL)、小リンパ球性リンパ腫 (SLL)、急性リンパ芽球性白血病 (ALL) (例えば、再発性および難治性 ALL) を包含する 1 種または複数の急性白血病; これらに限定されないが慢性骨髄性白血病 (CML) および慢性リンパ球性白血病 (CLL) を包含する 1 種または複数

40

50

の慢性白血病からなる群より選択される。追加の血液がんまたは血液学的状態としては、これらに限定されないが、マンツル細胞リンパ腫（MCL）、B細胞前リンパ球性白血病、芽球性形質細胞様樹状細胞の新生物、バーキットリンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、ヘアリーセル白血病、小細胞型または大細胞型濾胞性リンパ腫、悪性のリンパ増殖性状態、MAL Tリンパ腫、辺縁帯リンパ腫、多発性骨髄腫、脊髄形成異常および骨髄異形成症候群、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、形質芽細胞リンパ腫、形質細胞様樹状細胞の新生物、ワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症、ならびに「前白血病状態」が挙げられる。前白血病状態は、骨髄の血液細胞の無効な産生（または異形成）を併せもつ血液学的な状態の多様な集合体を包含する。実施形態において、CD19発現に関連する疾患としては、これらに限定されないが、CD19を発現する非定型のおよび／または非典型的ながん、悪性腫瘍、前がん状態または増殖性疾患、ならびにそれらのあらゆる組合せが挙げられる。

10

【0053】

一実施形態において、CD19発現に関連する疾患は、リンパ腫、例えば、MCLまたはホジキンリンパ腫である。一実施形態において、CD19発現に関連する疾患は、白血病、例えば、SLL、CLLおよび／またはALLである。

【0054】

一実施形態において、腫瘍抗原、例えば本明細書で説明される腫瘍抗原に関連する疾患は、がんもしくは悪性腫瘍などの増殖性疾患、または脊髄形成異常、骨髄異形成症候群もしくは前白血病状態などの前がん状態から選択されるか、あるいは本明細書で説明される腫瘍抗原の発現に関連する非がん関連の徴候である。ある実施形態において、本明細書で説明される腫瘍抗原に関連する疾患は、固形腫瘍、例えば、本明細書で説明される固形腫瘍、例えば、前立腺、結腸直腸、膵臓、子宮頸、胃、卵巣、頭部または肺がんである。

20

【0055】

ある実施形態において、がんは、AML、ALL、B-ALL、T-ALL、B細胞前リンパ球性白血病、慢性リンパ球性白血病、CML、ヘアリーセル白血病、ホジキンリンパ腫、マスト細胞障害、骨髄異形成症候群、骨髄増殖性新生物、形質細胞性骨髄腫、形質細胞様樹状細胞の新生物、またはそれらの組合せから選ばれる。

【0056】

ある実施形態において、対象（例えば、PD1阻害剤またはPD-L1阻害剤などの第二の薬剤と適宜組み合わせるCD19 CARで処置される対象）は、CD3+／PD1+であるがん細胞、例えばDLBCL細胞、少なくとも5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%または90%を有するか、または有するものとして同定される。

30

【0057】

ある実施形態において、対象は、CD19に結合するCAR分子、例えばCD19 CAR、を発現する1つまたは複数の細胞での処置後に再発したか、または再発したものとして同定される。ある実施形態において、対象は、完全応答の後、血液、骨髄(>5%)または任意の髄外部位における1つまたは複数の芽球再出現に基づき、再発したか、または再発したものとして同定される。ある実施形態において、対象は、所定の閾値より高い、例えば、1%、2%、3%、4%、5%または10%上回るCD19-芽球の検出に基づき、再発したか、または再発したものとして同定される。

40

【0058】**CAR療法**

ある特定の実施形態において、処置の方法は、CAR療法、例えば、1つまたは複数のCAR分子を発現する1つまたは複数の細胞の投与を含む。1つまたは複数のCAR分子を発現する細胞は、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞であり得る。ある実施形態において、対象はヒトである。

【0059】

一実施形態において、CAR分子を発現する細胞は、CAR分子をコードする核酸配列

50

を包含するベクターを含む。一実施形態において、ベクターは、DNA、RNA、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またはレトロウイルスベクターからなる群より選択される。一実施形態において、ベクターは、レンチウイルスベクターである。一実施形態において、ベクターは、プロモーターをさらに含む。一実施形態において、プロモーターは、EF-1プロモーターである。一実施形態において、EF-1プロモーターは、配列番号100の配列を含む。一実施形態において、ベクターは、インビトロで転写されたベクター、例えば、本明細書で説明される核酸分子のRNAを転写するベクターである。一実施形態において、インビトロベクター中の核酸配列は、ポリ(A)テール、例えば、本明細書で説明されるポリAテール、例えば、約150個のアデノシン塩基を含むポリAテールをさらに含む。一実施形態において、インビトロベクター中の核酸配列は、3'UTR、例えば、本明細書で説明される3'UTR、例えば、ヒトベータグロブリン由来の3'UTRの少なくとも1つの反復を含む3'UTRをさらに含む。一実施形態において、インビトロベクター中の核酸配列は、プロモーターをさらに含む。一実施形態において、核酸配列は、T2A配列を含む。

10

【0060】

一実施形態において、CAR分子を発現する細胞は、本明細書で説明される細胞、例えば、ヒトT細胞またはヒトNK細胞、例えば、本明細書で説明されるヒトT細胞または本明細書で説明されるヒトNK細胞である。一実施形態において、ヒトT細胞は、CD8+T細胞である。一実施形態において、ヒトT細胞は、CD4+T細胞である。一実施形態において、ヒトT細胞は、CD4+/CD8+T細胞である。一実施形態において、ヒトT細胞は、CD8+T細胞とCD4+T細胞の混合物である。一実施形態において、細胞は、自己T細胞である。一実施形態において、細胞は、同種異系のT細胞である。一実施形態において、細胞はT細胞であり、該T細胞は、ジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)欠損である。一実施形態において、細胞はT細胞であり、該T細胞は、イカロス欠損である。一実施形態において、細胞はT細胞であり、該T細胞は、DGKとイカロス両方欠損である。

20

【0061】

別の実施形態において、CAR分子、例えば本明細書で説明されるようなCAR分子を発現する細胞は、別の薬剤、例えば、CAR発現細胞の活性を増強する薬剤をさらに発現することができる。

30

【0062】

一実施形態において、方法は、本明細書で説明されるようなCAR分子を発現する細胞を、CAR発現細胞の活性を増強する薬剤と組み合わせて投与することを包含し、前記薬剤は、サイトカイン、例えば、IL-7、IL-15、IL-21、またはそれらの組合せである。サイトカインは、CAR発現細胞の投与と組み合わせて、例えば、その投与と同時に、またはその投与の直後にデリバリーすることができる。代替的に、サイトカインは、CAR発現細胞の投与後、長期間の後に、例えば、CAR発現細胞に対する対象の応答の査定の後にデリバリーすることができる。

【0063】

例えば、一実施形態において、CAR発現細胞の活性を増強する薬剤は、免疫阻害分子を阻害する薬剤であってもよい。免疫阻害分子の例としては、PD1、PD-L1、CTLA4、TIM3、CEACAM（例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および/またはCEACAM-5）、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4およびTGFRベータが挙げられる。一実施形態において、免疫阻害分子を阻害する薬剤は、細胞に正のシグナルを提供する第二のポリペプチド、例えば本明細書で説明される細胞内シグナル伝達ドメインと会合している第一のポリペプチド、例えば阻害分子を含む。一実施形態において、薬剤は、例えば免疫阻害分子の第一のポリペプチド、例えば、PD1、PD-L1、CTLA4、TIM3、CEACAM（例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および/もしくはCEACAM-5）、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4もしくはTGFR

40

50

Rベータ、また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細胞外ドメインの少なくとも一部）と、本明細書で説明される細胞内シグナル伝達ドメイン〔例えば、共刺激ドメイン（例えば、41BB、CD27もしくはCD28）および／または一次シグナル伝達ドメイン（例えば、本明細書で説明されるCD3ゼータシグナル伝達ドメイン）を含む〕である第二のポリペプチドとを含む。一実施形態において、薬剤は、PD1またはそれらのフラグメントの第一のポリペプチド（例えば、PD1の細胞外ドメインの少なくとも一部）、および本明細書で説明される細胞内シグナル伝達ドメインの第二のポリペプチド（例えば、本明細書で説明されるCD28シグナル伝達ドメインおよび／または本明細書で説明されるCD3ゼータシグナル伝達ドメイン）を含む。

【0064】

10

一実施形態において、リンパ球輸液、例えば、同種異系リンパ球輸液であって、本明細書で説明される少なくとも1種のCD19 CAR発現細胞を含み、B細胞抗原に対して向けられたCARを発現する少なくとも1種の細胞を含んでいてもよい、リンパ球輸液が、がんの処置に使用される。一実施形態において、自己リンパ球輸液であって、少なくとも1種のCD19発現細胞を含み、B細胞抗原に対して向けられたCARを発現する少なくとも1種の細胞を含んでいてもよい、自己リンパ球輸液が、がんの処置に使用される。

【0065】

一実施形態において、CAR発現細胞、例えばT細胞は、事前の幹細胞移植、例えば、自己幹細胞移植を受けた対象、または事前のメルファラン用量を受けた対象に投与される。

20

【0066】

一実施形態において、CAR分子、例えば本明細書で説明されるCAR分子、を発現する細胞は、CAR分子を発現する細胞の投与またはB細胞阻害剤の投与に関連する1つもしくは複数の副作用を改善する薬剤、例えば、本明細書で説明される薬剤と組み合わせて投与される。

【0067】

一実施形態において、CAR分子、例えば本明細書で説明されるCD19 CAR分子を発現する細胞、およびB細胞阻害剤は、CD19に関連する疾患を処置する追加の薬剤、例えば、本明細書で説明される追加の薬剤と組み合わせて投与される。

【0068】

30

一実施形態において、CAR分子、例えば、本明細書で説明されるCAR分子を発現する細胞は、本明細書で説明される用量および／または投与スケジュールで投与される。

【0069】

一実施形態において、CAR分子は、例えばインビトロ転写を使用して、T細胞に導入され、対象（例えば、ヒト）は、CAR分子を含む細胞の初回投与、およびCAR分子を含む細胞の1回または複数回の後続投与を受け、前記1回または複数回の後続投与は、先行投与の15日未満後、例えば、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、または2日後に行われる。一実施形態において、CAR分子を含む細胞の1回を超える投与が対象（例えば、ヒト）に毎週行われ、例えば、CAR分子を含む細胞の2、3、または4回の投与が毎週行われる。一実施形態において、対象（例えば、ヒト対象）は、CAR分子を含む細胞の1回を超える毎週の投与（例えば、2、3、または4回にわたる毎週の投与）（本明細書ではまた、サイクルとも称する）を受け、続いて1週間にわたり、CAR分子を含む細胞を投与がなく、次いで、CAR分子を含む細胞の1回または複数回のさらなる投与（例えば、CAR分子を含む細胞の1回を超える毎週の投与）が対象に対して行われる。別の実施形態において、対象（例えば、ヒト対象）は、1つを超えるサイクルの、CAR分子を含む細胞を受け、各サイクルの間の時間は、10、9、8、7、6、5、4、または3日間未満である。一実施形態において、CAR分子を含む細胞は、隔日で、毎週3回投与される。一実施形態において、CAR分子を含む細胞は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8週間、またはこれを超えて投与される。

40

【0070】

50

一実施形態において、本明細書で説明される治療（例えば、CD20 CAR療法、CD22 CAR療法、またはB細胞阻害剤とCD19 CAR分子、例えば本明細書で説明されるCD19 CAR分子を発現する細胞との組合せ）は、疾患、例えば、がん、例えば本明細書で説明されるがんの第一選択の処置として投与される。別の実施形態において、本明細書で説明される治療（例えば、CD20 CAR療法、CD22 CAR療法、またはB細胞阻害剤とCD19 CAR分子、例えば本明細書で説明されるCD19 CAR分子を発現する細胞との組合せ）は、疾患、例えば、がん、例えば本明細書で説明されるがんの第二、第三、第四選択の処置として投与される。

【0071】

一実施形態において、本明細書で説明される細胞の集団が投与される。一部の実施形態において、細胞の集団は、単離または精製されている。

【0072】

一実施形態において、方法は、その大多数が本明細書で説明されるCAR分子を含む、細胞の集団を投与することを包含する。一部の実施形態において、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を発現する細胞の集団は、本明細書で説明される抗CD19結合ドメインを有するCARを発現する第一の細胞、および異なるB細胞抗原結合ドメインを有するCARを発現する第二の細胞を包含し得る。実施形態において、第一および第二の細胞集団は、T細胞である。実施形態において、T細胞の第一および第二の集団は、同じアイソタイプであり、例えば、両方ともCD4+T細胞であるか、または両方ともCD8+T細胞である。他の実施形態において、T細胞の第一および第二の集団は、異なるアイソタイプであり、例えば、第一の集団はCD4+T細胞を含み、第二の集団はCD8+T細胞を含む。実施形態において、T細胞の第一および第二の集団は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられるWO2012/129514に記載されている細胞型である。別の例として、細胞の集団は、本明細書で説明される抗CD19結合ドメインを有するCARと異なるB細胞抗原結合ドメインを有するCARの両方を発現する、単一の細胞型を含むことができる。別の例として、細胞の集団は、2つ以上（例えば、2つ、3つ、4つまたは5つ）のB細胞抗原結合ドメインを有するCAR、例えば、二重特異性CAR、例えば、本明細書で説明されるような二重特異性CARを発現する単一の細胞型を含むことができる。別の例として、CAR発現細胞の集団は、抗CD19結合ドメイン、例えば本明細書で説明されるような抗CD19結合ドメイン、を包含するCARを発現する第一の細胞、およびCD19以外の標的（例えば、CD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179b、CD79a、またはメソセリン）に対する抗原結合ドメインを包含するCARを発現する第二の細胞を、包含し得る。一実施形態において、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包含する第一のCAR発現細胞、および二次シグナル伝達ドメインを包含する第二のCAR発現細胞を包含する。一実施形態において、CAR発現細胞の集団は、例えば、第一の二次シグナル伝達ドメインを含むCARを発現する第一の細胞、および前記第一の二次シグナル伝達ドメインとは異なる二次シグナル伝達ドメインを包含するCARを発現する第二の細胞を包含する。

【0073】

例として、第一のB細胞阻害剤がCD19 CAR発現細胞であり、第二のB細胞阻害剤がCD10 CAR発現細胞である場合、第一のCARおよび第二のCARは、同じ細胞型によって発現されることもあり、または異なる型によって発現されることもある。例えば、一部の実施形態において、CD19 CARを発現する細胞はCD4+T細胞であり、CD10 CARを発現する細胞はCD8+T細胞であるか、またはCD19 CARを発現する細胞はCD8+T細胞であり、CD10 CARを発現する細胞はCD4+T細胞である。他の実施形態において、CD19 CARを発現する細胞はT細胞であり、CD10 CARを発現する細胞はNK細胞であるか、またはCD19 CARを発現する細胞はNK細胞であり、CD10 CARを発現する細胞はT細胞である。他の実施

形態において、CD19 CARを発現する細胞およびCD10 CARを発現する細胞は、両方ともNK細胞であるか、または両方ともT細胞であり、例えば、両方ともCD4+T細胞であり、もしくは両方ともCD8+T細胞である。さらに他の実施形態において、単一の細胞がCD19 CARおよびCD10 CARを発現し、この細胞は、例えば、NK細胞またはT細胞、例えばCD4+T細胞もしくはCD8+T細胞である。第一のCARおよび第二のCARは、同じ細胞内シグナル伝達ドメインを含んでいてもよく、または異なる細胞内シグナル伝達ドメインを含んでいてもよい。例えば、一部の実施形態において、CD19 CARは、CD3ゼータシグナル伝達ドメインを含み、CD10 CARは、共刺激ドメイン、例えば41BB、CD27またはCD28共刺激ドメインを含み、その一方で、一部の実施形態において、CD19 CARは、共刺激ドメイン、例えば41BB、CD27またはCD28共刺激ドメインを含み、CD10 CARは、CD3ゼータシグナル伝達ドメインを含む。他の実施形態において、CD19 CARおよびCD10 CARの各々は、同じタイプの一次シグナル伝達ドメイン、例えばCD3ゼータシグナル伝達ドメインを含むが、CD19 CARおよびCD10 CARは、異なる共刺激ドメインを含み、例えば、(1) CD19 CARは、41BB共刺激ドメインを含み、CD10 CARは、異なる共刺激ドメイン、例えばCD27共刺激ドメインを含むか、(2) CD19 CARは、CD27共刺激ドメインを含み、CD10 CARは、異なる共刺激ドメイン、例えば41BB共刺激ドメインを含むか、(3) CD19 CARは、41BB共刺激ドメインを含み、CD10 CARは、CD28共刺激ドメインを含むか、(4) CD19 CARは、CD28共刺激ドメインを含み、CD10 CARは、異なる共刺激ドメイン、例えば41BB共刺激ドメインを含むか、(5) CD19 CARは、CD27共刺激ドメインを含み、CD10 CARは、CD28共刺激ドメインを含むか、または(6) CD19 CARは、CD28共刺激ドメインを含み、CD10 CARは、CD27共刺激ドメインを含む。別の実施形態において、細胞は、CD19抗原結合ドメインとCD10抗原結合ドメインの両方を含むCAR、例えば、二重特異性抗体を含む。

【0074】

別の例として、第一のB細胞阻害剤がCD19 CAR発現細胞であり、第二のB細胞阻害剤がCD20 CAR発現細胞である場合、第一のCARおよび第二のCARは、同じ細胞型によって発現されることもあり、または異なる型によって発現されることもある。例えば、一部の実施形態において、CD19 CARを発現する細胞はCD4+T細胞であり、CD20 CARを発現する細胞はCD8+T細胞であるか、またはCD19 CARを発現する細胞はCD8+T細胞であり、CD20 CARを発現する細胞はCD4+T細胞である。他の実施形態において、CD19 CARを発現する細胞はT細胞であり、CD20 CARを発現する細胞はNK細胞であるか、またはCD19 CARを発現する細胞はNK細胞であり、CD20 CARを発現する細胞はT細胞である。他の実施形態において、CD19 CARを発現する細胞およびCD20 CARを発現する細胞は、両方ともNK細胞であるか、または両方ともT細胞であり、例えば、両方ともCD4+T細胞であり、もしくは両方ともCD8+T細胞である。さらに他の実施形態において、単一の細胞がCD19 CARおよびCD20 CARを発現し、この細胞は、例えば、NK細胞またはT細胞、例えばCD4+T細胞もしくはCD8+T細胞である。第一のCARおよび第二のCARは、同じ細胞内シグナル伝達ドメインを含んでいてもよく、または異なる細胞内シグナル伝達ドメインを含んでいてもよい。例えば、一部の実施形態において、CD19 CARは、CD3ゼータシグナル伝達ドメインを含み、CD20 CARは、共刺激ドメイン、例えば41BB、CD27またはCD28共刺激ドメインを含み、その一方で、一部の実施形態において、CD19 CARは、共刺激ドメイン、例えば41BB、CD27またはCD28共刺激ドメインを含み、CD20 CARは、CD3ゼータシグナル伝達ドメインを含む。他の実施形態において、CD19 CARおよびCD20 CARの各々は、同じタイプの一次シグナル伝達ドメイン、例えばCD3ゼータシグナル伝達ドメインを含むが、CD19 CARおよびCD20 CARは、異なる

10

20

30

40

50

る共刺激ドメインを含み、例えば、(1) CD19 CARは、41BB共刺激ドメインを含み、CD20 CARは、異なる共刺激ドメイン、例えばCD27共刺激ドメインを含むか、(2) CD19 CARは、CD27共刺激ドメインを含み、CD20 CARは、異なる共刺激ドメイン、例えば41BB共刺激ドメインを含むか、(3) CD19 CARは、41BB共刺激ドメインを含み、CD20 CARは、CD28共刺激ドメインを含むか、(4) CD19 CARは、CD28共刺激ドメインを含み、CD20 CARは、異なる共刺激ドメイン、例えば41BB共刺激ドメインを含むか、(5) CD19 CARは、CD27共刺激ドメインを含み、CD20 CARは、CD28共刺激ドメインを含むか、または(6) CD19 CARは、CD28共刺激ドメインを含み、CD20 CARは、CD27共刺激ドメインを含む。別の実施形態において、細胞は、CD19抗原結合ドメインとCD20抗原結合ドメインの両方を含むCAR、例えば、二重特異性抗体を含む。

10

【0075】

別の例として、第一のB細胞阻害剤がCD19 CAR発現細胞であり、第二のB細胞阻害剤がCD22 CAR発現細胞である場合、第一のCARおよび第二のCARは、同じ細胞型によって発現されることもあり、または異なる型によって発現されることもある。例えば、一部の実施形態において、CD19 CARを発現する細胞はCD4+T細胞であり、CD22 CARを発現する細胞はCD8+T細胞であるか、またはCD19 CARを発現する細胞はCD8+T細胞であり、CD22 CARを発現する細胞はCD4+T細胞である。他の実施形態において、CD19 CARを発現する細胞はT細胞であり、CD22 CARを発現する細胞はNK細胞であるか、またはCD19 CARを発現する細胞はNK細胞であり、CD22 CARを発現する細胞はT細胞である。他の実施形態において、CD19 CARを発現する細胞およびCD22 CARを発現する細胞は、両方ともNK細胞であるか、または両方ともT細胞であり、例えば、両方ともCD4+T細胞であり、もしくは両方ともCD8+T細胞である。さらに他の実施形態において、単一の細胞がCD19 CARおよびCD22 CARを発現し、この細胞は、例えば、NK細胞またはT細胞、例えばCD4+T細胞もしくはCD8+T細胞である。第一のCARおよび第二のCARは、同じ細胞内シグナル伝達ドメインを含んでいてもよく、または異なる細胞内シグナル伝達ドメインを含んでいてもよい。例えば、一部の実施形態において、CD19 CARは、CD3ゼータシグナル伝達ドメインを含み、CD22

20

30

CARは、共刺激ドメイン、例えば41BB、CD27またはCD28共刺激ドメインを含み、その一方で、一部の実施形態において、CD19 CARは、共刺激ドメイン、例えば41BB、CD27またはCD28共刺激ドメインを含み、CD22 CARは、CD3ゼータシグナル伝達ドメインを含む。他の実施形態において、CD19 CARおよびCD22 CARの各々は、同じタイプの一次シグナル伝達ドメイン、例えばCD3ゼータシグナル伝達ドメインを含むが、CD19 CARおよびCD22 CARは、異なる共刺激ドメインを含み、例えば、(1) CD19 CARは、41BB共刺激ドメインを含み、CD22 CARは、異なる共刺激ドメイン、例えばCD27共刺激ドメインを含むか、(2) CD19 CARは、CD27共刺激ドメインを含み、CD22 CARは、異なる共刺激ドメイン、例えば41BB共刺激ドメインを含むか、(3) CD19

40

CARは、41BB共刺激ドメインを含み、CD22 CARは、CD28共刺激ドメインを含むか、(4) CD19 CARは、CD28共刺激ドメインを含み、CD22 CARは、異なる共刺激ドメイン、例えば41BB共刺激ドメインを含むか、(5) CD19 CARは、CD27共刺激ドメインを含み、CD22 CARは、CD28共刺激ドメインを含むか、または(6) CD19 CARは、CD28共刺激ドメインを含み、CD22 CARは、CD27共刺激ドメインを含む。別の実施形態において、細胞は、CD19抗原結合ドメインとCD22抗原結合ドメインの両方を含むCAR、例えば、二重特異性抗体を含む。

【0076】

別の例として、第一のB細胞阻害剤がCD19 CAR発現細胞であり、第二のB細胞

50

阻害剤がCD34 CAR発現細胞である場合、第一のCARおよび第二のCARは、同じ細胞型によって発現されることもあり、または異なる型によって発現されることもある。例えば、一部の実施形態において、CD19 CARを発現する細胞はCD4+T細胞であり、CD34 CARを発現する細胞はCD8+T細胞であるか、またはCD19 CARを発現する細胞はCD8+T細胞であり、CD34 CARを発現する細胞はCD4+T細胞である。他の実施形態において、CD19 CARを発現する細胞はT細胞であり、CD34 CARを発現する細胞はNK細胞であるか、またはCD19 CARを発現する細胞はNK細胞であり、CD34 CARを発現する細胞はT細胞である。他の実施形態において、CD19 CARを発現する細胞およびCD34 CARを発現する細胞は、両方ともNK細胞であるか、または両方ともT細胞であり、例えば、両方ともCD4+T細胞であり、もしくは両方ともCD8+T細胞である。さらに他の実施形態において、単一の細胞がCD19 CARおよびCD34 CARを発現し、この細胞は、例えば、NK細胞またはT細胞、例えばCD4+T細胞もしくはCD8+T細胞である。第一のCARおよび第二のCARは、同じ細胞内シグナル伝達ドメインを含んでいてもよく、または異なる細胞内シグナル伝達ドメインを含んでいてもよい。例えば、一部の実施形態において、CD19 CARは、CD3ゼータシグナル伝達ドメインを含み、CD34

CARは、共刺激ドメイン、例えば41BB、CD27またはCD28共刺激ドメインを含み、その一方で、一部の実施形態において、CD19 CARは、共刺激ドメイン、例えば41BB、CD27またはCD28共刺激ドメインを含み、CD34 CARは、CD3ゼータシグナル伝達ドメインを含む。他の実施形態において、CD19 CARおよびCD34 CARの各々は、同じタイプの一次シグナル伝達ドメイン、例えばCD3ゼータシグナル伝達ドメインを含むが、CD19 CARおよびCD34 CARは、異なる共刺激ドメインを含み、例えば、(1)CD19 CARは、41BB共刺激ドメインを含み、CD34 CARは、異なる共刺激ドメイン、例えばCD27共刺激ドメインを含むか、(2)CD19 CARは、CD27共刺激ドメインを含み、CD34 CARは、異なる共刺激ドメイン、例えば41BB共刺激ドメインを含むか、(3)CD19 CARは、41BB共刺激ドメインを含み、CD34 CARは、CD28共刺激ドメインを含むか、(4)CD19 CARは、CD28共刺激ドメインを含み、CD34 CARは、異なる共刺激ドメイン、例えば41BB共刺激ドメインを含むか、(5)CD19 CARは、CD27共刺激ドメインを含み、CD34 CARは、CD28共刺激ドメインを含むか、または(6)CD19 CARは、CD28共刺激ドメインを含み、CD34 CARは、CD27共刺激ドメインを含む。別の実施形態において、細胞は、CD19抗原結合ドメインとCD34抗原結合ドメインの両方を含むCAR、例えば、二重特異性抗体を含む。

【0077】

別の例として、第一のB細胞阻害剤がCD19 CAR発現細胞であり、第二のB細胞阻害剤がCD123 CAR発現細胞である場合、第一のCARおよび第二のCARは、同じ細胞型によって発現されることもあり、または異なる型によって発現されることもある。例えば、一部の実施形態において、CD19 CARを発現する細胞はCD4+T細胞であり、CD123 CARを発現する細胞はCD8+T細胞であるか、またはCD19 CARを発現する細胞はCD8+T細胞であり、CD123 CARを発現する細胞はCD4+T細胞である。他の実施形態において、CD19 CARを発現する細胞はT細胞であり、CD123 CARを発現する細胞はNK細胞であるか、またはCD19 CARを発現する細胞はNK細胞であり、CD123 CARを発現する細胞はT細胞である。他の実施形態において、CD19 CARを発現する細胞およびCD123 CARを発現する細胞は、両方ともNK細胞であるか、または両方ともT細胞であり、例えば、両方ともCD4+T細胞であり、もしくは両方ともCD8+T細胞である。さらに他の実施形態において、単一の細胞がCD19 CARおよびCD123 CARを発現し、この細胞は、例えば、NK細胞またはT細胞、例えばCD4+T細胞もしくはCD8+T細胞である。第一のCARおよび第二のCARは、同じ細胞内シグナル伝達ドメインを含

10

20

30

40

50

んでいてもよく、または異なる細胞内シグナル伝達ドメインを含んでいてもよい。例えば、一部の実施形態において、CD19 CARは、CD3ゼータシグナル伝達ドメインを含み、CD123 CARは、共刺激ドメイン、例えば41BB、CD27またはCD28共刺激ドメインを含み、その一方で、一部の実施形態において、CD19 CARは、共刺激ドメイン、例えば41BB、CD27またはCD28共刺激ドメインを含み、CD123 CARは、CD3ゼータシグナル伝達ドメインを含む。他の実施形態において、CD19 CARおよびCD123 CARの各々は、同じタイプの一次シグナル伝達ドメイン、例えばCD3ゼータシグナル伝達ドメインを含むが、CD19 CARおよびCD123 CARは、異なる共刺激ドメインを含み、例えば、(1)CD19 CARは、41BB共刺激ドメインを含み、CD123 CARは、異なる共刺激ドメイン、例えばCD27共刺激ドメインを含むか、(2)CD19 CARは、CD27共刺激ドメインを含み、CD123 CARは、異なる共刺激ドメイン、例えば41BB共刺激ドメインを含むか、(3)CD19 CARは、41BB共刺激ドメインを含み、CD123 CARは、CD28共刺激ドメインを含むか、(4)CD19 CARは、CD28共刺激ドメインを含み、CD123 CARは、異なる共刺激ドメイン、例えば41BB共刺激ドメインを含むか、(5)CD19 CARは、CD27共刺激ドメインを含み、CD123 CARは、CD28共刺激ドメインを含むか、または(6)CD19 CARは、CD28共刺激ドメインを含み、CD123 CARは、CD27共刺激ドメインを含む。別の実施形態において、細胞は、CD19抗原結合ドメインとCD123抗原結合ドメインの両方を含むCAR、例えば、二重特異性抗体を含む。

10

20

【0078】

別の例として、第一のB細胞阻害剤がCD19 CAR発現細胞であり、第二のB細胞阻害剤がFLT-3 CAR発現細胞である場合、第一のCARおよび第二のCARは、同じ細胞型によって発現されることもあり、または異なる型によって発現されることもある。例えば、一部の実施形態において、CD19 CARを発現する細胞はCD4+T細胞であり、FLT-3 CARを発現する細胞はCD8+T細胞であるか、またはCD19 CARを発現する細胞はCD8+T細胞であり、FLT-3 CARを発現する細胞はCD4+T細胞である。他の実施形態において、CD19 CARを発現する細胞はT細胞であり、FLT-3 CARを発現する細胞はNK細胞であるか、またはCD19 CARを発現する細胞はNK細胞であり、FLT-3 CARを発現する細胞はT細胞である。他の実施形態において、CD19 CARを発現する細胞およびFLT-3 CARを発現する細胞は、両方ともNK細胞であるか、または両方ともT細胞であり、例えば、両方ともCD4+T細胞であり、もしくは両方ともCD8+T細胞である。さらに他の実施形態において、単一の細胞がCD19 CARおよびFLT-3 CARを発現し、この細胞は、例えば、NK細胞またはT細胞、例えばCD4+T細胞もしくはCD8+T細胞である。第一のCARおよび第二のCARは、同じ細胞内シグナル伝達ドメインを含んでいてもよく、または異なる細胞内シグナル伝達ドメインを含んでいてもよい。例えば、一部の実施形態において、CD19 CARは、CD3ゼータシグナル伝達ドメインを含み、FLT-3 CARは、共刺激ドメイン、例えば41BB、CD27またはCD28共刺激ドメインを含み、その一方で、一部の実施形態において、CD19 CARは、共刺激ドメイン、例えば41BB、CD27またはCD28共刺激ドメインを含み、FLT-3 CARは、CD3ゼータシグナル伝達ドメインを含む。他の実施形態において、CD19 CARおよびFLT-3 CARの各々は、同じタイプの一次シグナル伝達ドメイン、例えばCD3ゼータシグナル伝達ドメインを含むが、CD19 CARおよびFLT-3 CARは、異なる共刺激ドメインを含み、例えば、(1)CD19 CARは、41BB共刺激ドメインを含み、FLT-3 CARは、異なる共刺激ドメイン、例えばCD27共刺激ドメインを含むか、(2)CD19 CARは、CD27共刺激ドメインを含み、FLT-3 CARは、異なる共刺激ドメイン、例えば41BB共刺激ドメインを含むか、(3)CD19 CARは、41BB共刺激ドメインを含み、FLT-3 CARは、CD28共刺激ドメインを含むか、(4)CD19 CARは、CD28共刺

30

40

50

激ドメインを含み、F L T-3 C A Rは、異なる共刺激ドメイン、例えば4 1 B B共刺激ドメインを含むか、(5) C D 1 9 C A Rは、C D 2 7共刺激ドメインを含み、F L T-3 C A Rは、C D 2 8共刺激ドメインを含むか、または(6) C D 1 9 C A Rは、C D 2 8共刺激ドメインを含み、F L T-3 C A Rは、C D 2 7共刺激ドメインを含む。別の実施形態において、細胞は、C D 1 9抗原結合ドメインとF L T-3抗原結合ドメインの両方を含むC A R、例えば、二重特異性抗体を含む。

【0079】

別の例として、第一のB細胞阻害剤がC D 1 9 C A R発現細胞であり、第二のB細胞阻害剤がR O R 1 C A R発現細胞である場合、第一のC A Rおよび第二のC A Rは、同じ細胞型によって発現されることもあり、または異なる型によって発現されることもある。例えば、一部の実施形態において、C D 1 9 C A Rを発現する細胞はC D 4 + T細胞であり、R O R 1 C A Rを発現する細胞はC D 8 + T細胞であるか、またはC D 1 9 C A Rを発現する細胞はC D 8 + T細胞であり、R O R 1 C A Rを発現する細胞はC D 4 + T細胞である。他の実施形態において、C D 1 9 C A Rを発現する細胞はT細胞であり、R O R 1 C A Rを発現する細胞はNK細胞であるか、またはC D 1 9 C A Rを発現する細胞はNK細胞であり、R O R 1 C A Rを発現する細胞はT細胞である。他の実施形態において、C D 1 9 C A Rを発現する細胞およびR O R 1 C A Rを発現する細胞は、両方ともNK細胞であるか、または両方ともT細胞であり、例えば、両方ともC D 4 + T細胞であり、もしくは両方ともC D 8 + T細胞である。さらに他の実施形態において、単一の細胞がC D 1 9 C A RおよびR O R 1 C A Rを発現し、この細胞は、例えば、NK細胞またはT細胞、例えばC D 4 + T細胞もしくはC D 8 + T細胞である。第一のC A Rおよび第二のC A Rは、同じ細胞内シグナル伝達ドメインを含んでいてもよく、または異なる細胞内シグナル伝達ドメインを含んでいてもよい。例えば、一部の実施形態において、C D 1 9 C A Rは、C D 3ゼータシグナル伝達ドメインを含み、R O R 1

C A Rは、共刺激ドメイン、例えば4 1 B B、C D 2 7またはC D 2 8共刺激ドメインを含み、その一方で、一部の実施形態において、C D 1 9 C A Rは、共刺激ドメイン、例えば4 1 B B、C D 2 7またはC D 2 8共刺激ドメインを含み、R O R 1 C A Rは、C D 3ゼータシグナル伝達ドメインを含む。他の実施形態において、C D 1 9 C A RおよびR O R 1 C A Rの各々は、同じタイプの一次シグナル伝達ドメイン、例えばC D 3ゼータシグナル伝達ドメインを含むが、C D 1 9 C A RおよびR O R 1 C A Rは、異なる共刺激ドメインを含み、例えば、(1) C D 1 9 C A Rは、4 1 B B共刺激ドメインを含み、R O R 1 C A Rは、異なる共刺激ドメイン、例えばC D 2 7共刺激ドメインを含むか、(2) C D 1 9 C A Rは、C D 2 7共刺激ドメインを含み、R O R 1 C A Rは、異なる共刺激ドメイン、例えば4 1 B B共刺激ドメインを含むか、(3) C D 1 9

C A Rは、4 1 B B共刺激ドメインを含み、R O R 1 C A Rは、C D 2 8共刺激ドメインを含むか、(4) C D 1 9 C A Rは、C D 2 8共刺激ドメインを含み、R O R 1 C A Rは、異なる共刺激ドメイン、例えば4 1 B B共刺激ドメインを含むか、(5) C D 1 9 C A Rは、C D 2 7共刺激ドメインを含み、R O R 1 C A Rは、C D 2 8共刺激ドメインを含むか、または(6) C D 1 9 C A Rは、C D 2 8共刺激ドメインを含み、R O R 1 C A Rは、C D 2 7共刺激ドメインを含む。別の実施形態において、細胞は、C D 1 9抗原結合ドメインとR O R 1抗原結合ドメインの両方を含むC A R、例えば、二重特異性抗体を含む。

【0080】

より一般的に、第一のB細胞阻害剤がC D 1 9 C A Rを含み、第二のB細胞阻害剤、例えば第二のC A Rを含む第二のB細胞阻害剤がある場合、第一のC A Rおよび第二のB細胞阻害剤は、同じ細胞型によって発現されることもあり、または異なる型によって発現されることもある。例えば、一部の実施形態において、C D 1 9 C A Rを発現する細胞はC D 4 + T細胞であり、第二のB細胞阻害剤を発現する細胞はC D 8 + T細胞であるか、またはC D 1 9 C A Rを発現する細胞はC D 8 + T細胞であり、第二のB細胞阻害剤を発現する細胞はC D 4 + T細胞である。他の実施形態において、C D 1 9 C A Rを発現

する細胞はT細胞であり、第二のB細胞阻害剤を発現する細胞はNK細胞であるか、またはCD19 CARを発現する細胞はNK細胞であり、第二のB細胞阻害剤を発現する細胞はT細胞である。他の実施形態において、CD19 CARを発現する細胞および第二のB細胞阻害剤を発現する細胞は、両方ともNK細胞であるか、または両方ともT細胞であり、例えば、両方ともCD4+T細胞であり、もしくは両方ともCD8+T細胞である。さらに他の実施形態において、単一の細胞がCD19 CARおよび第二のB細胞阻害剤を発現し、この細胞は、例えば、NK細胞またはT細胞、例えばCD4+T細胞もしくはCD8+T細胞である。第一のCARおよび第二のCARは、同じ細胞内シグナル伝達ドメインを含んでいてもよく、または異なる細胞内シグナル伝達ドメインを含んでいてもよい。例えば、一部の実施形態において、CD19 CARは、CD3ゼータシグナル伝達ドメインを含み、第二のB細胞阻害剤（またはCAR）は、共刺激ドメイン、例えば41BB、CD27またはCD28共刺激ドメインを含み、その一方で、一部の実施形態において、CD19 CARは、共刺激ドメイン、例えば41BB、CD27またはCD28共刺激ドメインを含み、第二のB細胞阻害剤（または第二のCAR）は、CD3ゼータシグナル伝達ドメインを含む。他の実施形態において、CD19 CARおよび第二のB細胞阻害剤（または第二のCAR）の各々は、同じタイプの一次シグナル伝達ドメイン、例えばCD3ゼータシグナル伝達ドメインを含むが、CD19 CARおよび第二のB細胞阻害剤は、異なる共刺激ドメインを含み、例えば、（1）CD19 CARは、41BB共刺激ドメインを含み、第二のB細胞阻害剤（もしくは第二のCAR）は、異なる共刺激ドメイン、例えばCD27共刺激ドメインを含むか、（2）CD19 CARは、CD27共刺激ドメインを含み、第二のB細胞阻害剤（もしくは第二のCAR）は、異なる共刺激ドメイン、例えば41BB共刺激ドメインを含むか、（3）CD19 CARは、41BB共刺激ドメインを含み、第二のB細胞阻害剤（もしくは第二のCAR）は、CD28共刺激ドメインを含むか、（4）CD19 CARは、CD28共刺激ドメインを含み、第二のB細胞阻害剤（もしくは第二のCAR）は、異なる共刺激ドメイン、例えば41BB共刺激ドメインを含むか、（5）CD19 CARは、CD27共刺激ドメインを含み、第二のB細胞阻害剤（もしくは第二のCAR）は、CD28共刺激ドメインを含むか、または（6）CD19 CARは、CD28共刺激ドメインを含み、第二のB細胞阻害剤（もしくは第二のCAR）は、CD27共刺激ドメインを含む。別の実施形態において、細胞は、CD19抗原結合ドメインと第二の抗原に向けられた抗原結合ドメインの両方を含むCAR、例えば、二重特異性抗体を含む。

【0081】

一実施形態において、4-1BB共刺激ドメインは、配列番号16の配列を含む。一実施形態において、4-1BB共刺激ドメインは、配列番号16のアミノ酸配列、または配列番号16のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列の、少なくとも1、2または3個の改変（例えば、置換）であるが20、10または5個以下の改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態において、4-1BB共刺激ドメインは、配列番号60の核酸配列、またはそれと95～99%の同一性を有する配列によってコードされる。

【0082】

一実施形態において、CD27共刺激ドメインは、配列番号16の配列を含む。一実施形態において、CD27共刺激ドメインは、配列番号16のアミノ酸配列、または配列番号16のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列の、少なくとも1、2または3個の改変（例えば、置換）であるが20、10または5個以下の改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態において、CD27共刺激ドメインは、配列番号17の核酸配列、またはそれと95～99%の同一性を有する配列によってコードされる。

【0083】

一実施形態において、CD28共刺激ドメインは、配列番号1317の配列を含む。一実施形態において、CD28共刺激ドメインは、配列番号1317のアミノ酸配列、また

10

20

30

40

50

は配列番号1317のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列の、少なくとも1、2または3個の改変（例えば、置換）であるが20、10または5個以下の改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態において、CD28共刺激ドメインは、配列番号1318の核酸配列、またはそれと95～99%の同一性を有する配列によってコードされる。

【0084】

一実施形態において、野生型ICOS共刺激ドメインは、配列番号1319の配列を含む。一実施形態において、野生型ICOS共刺激ドメインは、配列番号1319のアミノ酸配列、または配列番号1319のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列の、少なくとも1、2または3個の改変（例えば、置換）であるが20、10または5個以下の改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態において、野生型ICOS共刺激ドメインは、配列番号1320の核酸配列、またはそれと95～99%の同一性を有する配列によってコードされる。

10

【0085】

一実施形態において、Y→F突然変異ICOS共刺激ドメインは、配列番号1321の配列を含む。一実施形態において、Y→F突然変異ICOS共刺激ドメインは、配列番号1321のアミノ酸配列、または配列番号1321のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列の、少なくとも1、2または3個の改変（例えば、置換）であるが20、10または5個以下の改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態において、Y→F突然変異ICOS共刺激ドメインは、配列番号1320（ここで配列番号1320は野生型ICOSをコードする）の核酸配列と95～99%の同一性を有する核酸配列によってコードされる。

20

【0086】

実施形態において、一次シグナル伝達ドメインは、CD3ゼータの機能的なシグナル伝達ドメインを含む。実施形態において、CD3ゼータの機能的なシグナル伝達ドメインは、配列番号17（突然変異CD3ゼータ）または配列番号43（野生型ヒトCD3ゼータ）を含む。

【0087】

一実施形態において、方法は、集団中の少なくとも1種の細胞がCAR、例えば本明細書で説明される抗CD19ドメインを有するCARを発現する、細胞の集団と、CAR発現細胞の活性を増強する薬剤、例えば、CAR発現細胞の活性を増強する薬剤を発現する第二の細胞とを投与することを包含する。例えば、一実施形態において、薬剤は、免疫阻害分子を阻害する薬剤であってもよい。免疫阻害分子の例としては、PD1、PD-L1、CTLA4、TIM3、CEACAM（例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および／またはCEACAM-5）、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4およびTGFRベータが挙げられる。一実施形態において、免疫阻害分子を阻害する薬剤は、細胞に正のシグナルを提供する第二のポリペプチド、例えば本明細書で説明される細胞内シグナル伝達ドメインと会合している第一のポリペプチド、例えば阻害分子を含む。一実施形態において、薬剤は、阻害分子の第一のポリペプチド、例えば、PD1、PD-L1、CTLA4、TIM3、CEACAM（例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および／またはCEACAM-5）、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4もしくはTGFRベータ、また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細胞外ドメインの少なくとも一部）と、本明細書で説明される細胞内シグナル伝達ドメイン〔例えば、共刺激ドメイン（例えば、本明細書で説明されるような41BB、CD27もしくはCD28）および／または一次シグナル伝達ドメイン（例えば、本明細書で説明されるCD3ゼータシグナル伝達ドメイン）を含む〕である第二のポリペプチドとを含む。一実施形態において、薬剤は、PD1の第一のポリペプチドまたはそれらのフラグメント（例えば、PD1の細胞外ドメインの少なくとも一部）、ならびに本明細書で説明される細胞内シグナル伝達ドメイン（例えば、本明細書で説明されるCD28シグナル伝達ドメインおよ

30

40

50

び／または本明細書で説明されるCD3ゼータシグナル伝達ドメイン)の第二のポリペプチドを含む。

【0088】

ある実施形態において、B細胞阻害剤は、CD10、CD19、CD20、CD22、CD34、FLT-3またはROR1の1つまたは複数の阻害剤を含む。ある実施形態において、B細胞阻害剤は、CD10、CD20、CD22、CD34、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179bまたはCD79aの1つまたは複数の結合するCAR分子を発現する1つまたは複数の細胞の有効な数を含む。ある実施形態において、B細胞阻害剤は、CD123 CARを含む。ある実施形態において、B細胞阻害剤は、CD123に結合するCAR分子を発現する1つまたは複数の細胞を含む。ある実施形態において、疾患は、CD19陰性のがん、例えば、CD19陰性の再発がんである。ある実施形態において、CD19 CAR発現細胞は、1つまたは複数のB細胞阻害剤と同時に、その前に、またはその後投与される。

10

【0089】

ある実施形態において、方法は、CD19阻害剤、例えば、CD19 CAR発現細胞を投与することをさらに含む。ある実施形態において、CD19阻害剤は、CD19 CARを含み、B細胞阻害剤は、CD123 CARを含む。ある実施形態において、CD19 CARまたはCD123 CARは、CD19 CARとCD123 CARの両方が標的細胞、例えば標的CD19+CD123+細胞(例えば、B-ALL芽球細胞)と結合したときに、CD19 CARおよびCD123 CARがCD19またはCD123(例えば、造血幹細胞)の一方を発現する標的細胞と結合したときの活性化と比較して、細胞、例えば免疫エフェクター細胞集団、の完全な活性化が起こるような、分割された細胞内シグナル伝達ドメインを含む。ある実施形態において、CD123 CARは、4-1BBシグナル伝達ドメインを含み、CD19 CARは、CD3ゼータシグナル伝達ドメインを含む。ある実施形態において、CD123 CARは、共刺激ドメイン、例えば4-1BBシグナル伝達ドメインを含み、CD19 CARは、一次シグナル伝達ドメイン、例えばCD3ゼータシグナル伝達ドメインを含む。ある実施形態において、CD123 CARは、一次シグナル伝達ドメイン、例えば、CD3ゼータシグナル伝達ドメインを含み、CD19 CARは、共刺激ドメイン、例えば4-1BBシグナル伝達ドメインを含む。ある実施形態において、B細胞阻害剤は、共刺激ドメインを含むCAR(例えば、CD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179bまたはCD79aに対して向けられたCAR)を含み、CD19 CARは、一次シグナル伝達ドメインを含む。ある実施形態において、B細胞阻害剤は、一次シグナル伝達ドメインを含むCAR(例えば、CD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179bまたはCD79aに対して向けられたCAR)を含み、CD19 CARは、共刺激ドメインを含む。ある実施形態において、B細胞阻害剤は、CD123に結合するCAR分子を発現する1つまたは複数の細胞を含み、CD19 CAR発現細胞は、B細胞阻害剤と同時に投与される。ある実施形態において、CD123 CARは、4-1BBシグナル伝達ドメインを含み、CD19 CARは、CD3ゼータシグナル伝達ドメインを含む。

20

30

40

【0090】

ある実施形態において、方法は、細胞、例えば造血幹細胞、または骨髄を、哺乳動物に移植することをさらに含む。

【0091】

別の態様において、本発明は、B細胞阻害剤、例えば本明細書で説明されるB細胞阻害剤と組み合わせて医薬品として使用するための、本明細書で説明されるCAR分子、例えばCD19 CAR分子、を発現する細胞に関する。別の態様において、本発明は、本明細書で説明されるCAR分子、例えばCD19 CAR分子、を発現する細胞と組み合わせて医薬品として使用するための、本明細書で説明されるB細胞阻害剤に関する。

【0092】

50

別の態様において、本発明は、CD19を発現する疾患の処置において、B細胞阻害剤、例えば本明細書で説明されるB細胞阻害剤と組み合わせて使用するための、本明細書で説明されるCAR分子、例えばCD19 CAR分子、を発現する細胞に関する。別の態様において、本発明は、CD19を発現する疾患の処置において、本明細書で説明されるCAR分子、例えばCD19 CAR分子、を発現する細胞と組み合わせて使用するための、本明細書で説明されるB細胞阻害剤に関する。別の態様において、本発明は、がん、例えば本明細書で説明されるがんの処置における、B細胞阻害剤、例えば本明細書で説明されるB細胞阻害剤と組み合わせて使用するための、本明細書で説明されるCAR分子、例えばCD19 CAR分子、を発現する細胞に関する。

【0093】

一実施形態において、方法は、集団中の少なくとも1種の細胞が本明細書における治療薬（例えば、CD20 CAR、CD22 CAR、またはB細胞阻害剤と組み合わせた本明細書で説明される抗CD19ドメインを有するCAR）を発現する、細胞の集団、およびCAR発現細胞の活性を増強する薬剤を投与することを包含し、前記薬剤は、サイトカイン、例えば、IL-7、IL-15、IL-21、またはそれらの組合せである。サイトカインは、CAR発現細胞の投与と組み合わせて、例えば、その投与と同時に、またはその投与の直後にデリバリーすることができる。代替的に、サイトカインは、CAR発現細胞の投与後、長期間の後に、例えば、CAR発現細胞に対する対象の応答の査定の後にデリバリーすることができる。医薬品を作製する使用のための関連組成物、および医薬品を作製する方法も提供する。

【0094】

一実施形態において、本明細書で説明される細胞（例えば、CD20 CAR分子を発現する細胞、CD22 CAR分子を発現する細胞、またはCD19 CAR分子、例えば本明細書で説明されるCD19 CAR分子、を発現する細胞、B細胞阻害剤との組合せ）は、CAR分子を発現する細胞の効能または阻害剤の1つの効能を増加させる薬剤、例えば、本明細書で説明される薬剤と組み合わせて投与される。

【0095】

一実施形態において、本明細書で説明される細胞（例えば、CD20 CAR分子を発現する細胞、CD22 CAR分子を発現するか、またはCD19 CAR分子、例えば本明細書で説明されるCD19 CAR分子、をB細胞阻害剤と組み合わせて発現する細胞）は、CAR分子を発現する細胞の投与、または阻害剤の1つの投与に関連する1つもしくは複数の副作用を改善する薬剤、例えば、本明細書で説明される薬剤と組み合わせて投与される。

【0096】

一実施形態において、CD19 CAR分子、例えば本明細書で説明されるCD19 CAR分子を発現する細胞は、B細胞阻害剤、およびホジキンリンパ腫を処置する薬剤、例えば本明細書で説明される薬剤と組み合わせて投与される。

【0097】

一部の態様において、本開示は、CD19阻害剤、例えばCD19 CAR療法に対する非応答例、部分応答例または再発例である患者を処置する方法であって、B細胞阻害剤、例えば本明細書で説明されるB細胞阻害剤、例えば、CD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179bまたはCD79aの1つまたは複数（例えば、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つまたは全て）の阻害剤を前記患者に投与することを含む方法を提供する。一実施形態において、B細胞阻害剤は、CD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3またはROR1の1つまたは複数（例えば、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、または全て）の阻害剤である、CAR発現細胞（例えば、T細胞またはNK細胞）である。実施形態において、患者は、CD19陰性がん細胞、およびCD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179bもしくはCD79aの1つもしくは複数（例えば、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つもし

10

20

30

40

50

くは全て) に関して陽性であるがん細胞を有するか、またはこれらを有するものとして同定される。実施形態において、方法は、がん細胞が陽性であるB細胞阻害剤、例えば、がん細胞が陽性であるCD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179bもしくはCD79aの1つもしくは複数(例えば、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つもしくは全て)の阻害剤を患者に投与することをさらに含む。実施形態において、方法は、患者が、CD19陰性がん細胞を有するかどうかを判定する工程、および患者が、CD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179bもしくはCD79aの1つもしくは複数(例えば、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つもしくは全て)に関して陽性であるがん細胞を有するかどうか判定する工程の一方または両方をさらに含む。実施形態において、対象は、抗CD19抗体、例えば、表2または表3中のCAR分子のいずれかと同じ特異性を有する抗体との結合によって測定される検査でCD19発現に関して陰性を示す腫瘍またはがん細胞の集団を有するか、またはこれを有するものとして同定される。

10

【0098】

別の態様において、本発明は、B細胞阻害剤、例えば、CD10、CD19、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179bもしくはCD79aの阻害剤から選ばれるB細胞阻害剤またはそれらの組合せと組み合わせて、CD19に結合するキメラ抗原受容体(CAR)分子を発現する細胞を含む、組成物を特徴とする。CAR発現細胞およびB細胞阻害剤は、単一の剤形で存在してもよく、または2つ以上剤形として存在してもよい。

20

【0099】

ある実施形態において、組成物は、薬学的に許容される組成物である。

【0100】

実施形態において、本明細書で開示される組成物(例えば、核酸、ベクターまたは細胞)は、医薬品として使用するためのものである。

【0101】

実施形態において、本明細書で開示される組成物は、B細胞抗原(例えば、CD19)の発現に関連する疾患、例えば、B細胞白血病またはリンパ腫の処置において使用するためのものである(are use)。

30

【0102】

CD19阻害剤

実施形態において、CD19阻害剤は、小分子、抗体、抗体のフラグメント、または細胞治療薬である。

【0103】

一部の実施形態において、CD19阻害剤(例えば、細胞治療薬または抗体)は、B細胞阻害剤、例えば、CD10、CD19、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179bまたはCD79aの1つまたは複数の阻害剤と組み合わせて投与されるか、そのようなB細胞阻害剤と一緒に組成物中に存在する。

40

【0104】

一実施形態において、細胞は、抗CD19結合ドメイン(例えば、CD19と特異的に結合するマウスまたはヒト化抗体または抗体フラグメント)と、膜貫通ドメインと、細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、共刺激ドメインおよび/または一次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)とを含むCAR分子を発現する。一実施形態において、CAR分子は、本明細書で説明される抗CD19結合ドメイン(例えば、本明細書で説明されるCD19と特異的に結合するマウスまたはヒト化抗体または抗体フラグメント)と、本明細書で説明される膜貫通ドメインと、本明細書で説明される細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、本明細書で説明される共刺激ドメインおよび/または一次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)とを包含する、抗体または抗体フ

50

ラグメントを含む。

【0105】

一実施形態において、CAR分子は、本明細書で説明される抗CD19結合ドメインの、1つまたは複数（例えば、3つ全て）の、軽鎖相補性決定領域1（LC CDR1）、軽鎖相補性決定領域2（LC CDR2）および軽鎖相補性決定領域3（LC CDR3）、ならびに本明細書で説明される抗CD19結合ドメインの1つまたは複数（例えば、3つ全て）の、重鎖相補性決定領域1（HC CDR1）、重鎖相補性決定領域2（HC CDR2）および重鎖相補性決定領域3（HC CDR3）を含む、抗CD19結合ドメイン、例えば、1つまたは複数、例えば3つ全て、のLC CDRおよび1つまたは複数、例えば3つ全て、のHC CDRを含む抗CD19結合ドメインを含む。一実施形態において、抗CD19結合ドメインは、本明細書で説明される抗CD19結合ドメインの、1つまたは複数（例えば、3つ全て）の、重鎖相補性決定領域1（HC CDR1）、重鎖相補性決定領域2（HC CDR2）および重鎖相補性決定領域3（HC CDR3）を含み、例えば、抗CD19結合ドメインは、本明細書で説明されるHC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3を各々が含む2つの可変重鎖領域を有する。一実施形態において、抗CD19結合ドメインは、本明細書で（例えば表3で）説明されるマウス軽鎖可変領域、および／または本明細書で（例えば表3で）説明されるマウス重鎖可変領域を含む。一実施形態において、抗CD19結合ドメインは、表3のアミノ酸配列のマウス軽鎖およびマウス重鎖を含むscFvである。ある実施形態において、抗CD19結合ドメイン（例えば、scFv）は、表3において提供される軽鎖可変領域のアミノ酸配列もしくは表3のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列の、少なくとも1、2もしくは3個の改変（例えば、置換）であるが30、20もしくは10個以下の改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および／または表3において提供される重鎖可変領域のアミノ酸配列もしくは表3のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列の、少なくとも1、2もしくは3個の改変（例えば、置換）であるが30、20もしくは10個以下の改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。一実施形態において、抗CD19結合ドメインは、配列番号59の配列、またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む。一実施形態において、抗CD19結合ドメインはscFvであり、本明細書で、例えば表3で説明されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域は、リンカー、例えば本明細書で説明されるリンカーを介して、本明細書で、例えば表3で説明されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に付着している。一実施形態において、抗CD19結合ドメインは、（Gly₄-Ser）_nリンカーを包含し、ここでnは、1、2、3、4、5または6、例えば3または4（配列番号53）である。scFvの軽鎖可変領域および重鎖可変領域は、例えば、以下の配置：軽鎖可変領域ーリンカーー重鎖可変領域または重鎖可変領域ーリンカーー軽鎖可変領域のいずれであってもよい。

【0106】

一実施形態において、CAR分子は、本明細書で説明されるヒト化抗CD19結合ドメインの、1つまたは複数（例えば、3つ全て）の、軽鎖相補性決定領域1（LC CDR1）、軽鎖相補性決定領域2（LC CDR2）および軽鎖相補性決定領域3（LC CDR3）、ならびに本明細書で説明されるヒト化抗CD19結合ドメインの、1つまたは複数（例えば、3つ全て）の、重鎖相補性決定領域1（HC CDR1）、重鎖相補性決定領域2（HC CDR2）および重鎖相補性決定領域3（HC CDR3）を包含する、ヒト化抗CD19結合ドメイン、例えば、1つまたは複数、例えば3つ全て、のLC CDRおよび1つまたは複数、例えば3つ全て、のHC CDRを含むヒト化抗CD19結合ドメインを含む。一実施形態において、ヒト化抗CD19結合ドメインは、少なくともHC CDR2を含む。一実施形態において、ヒト化抗CD19結合ドメインは、本明細書で説明されるヒト化抗CD19結合ドメインの、1つまたは複数（例えば、3つ全て）の、重鎖相補性決定領域1（HC CDR1）、重鎖相補性決定領域2（HC CDR2）および重鎖相補性決定領域3（HC CDR3）を含み、例えば、ヒト化抗CD19

10

20

30

40

50

結合ドメインは、本明細書で説明されるHC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3を各々が含む2つの可変重鎖領域を有する。一実施形態において、ヒト化抗CD19結合ドメインは、少なくともHC CDR2を含む。一実施形態において、軽鎖可変領域は、VK3_L125生殖系由来配列の1つ、2つ、3つまたは4つ全てのフレームワーク領域を含む。一実施形態において、軽鎖可変領域は、改変（例えば置換、例えば、配列番号58のマウス軽鎖可変領域内の対応する位置において見出される1つまたは複数のアミノ酸の置換、例えば、71および87位の1つまたは複数における置換）を有する。一実施形態において、重鎖可変領域は、VH4_4-59生殖系由来配列の1つ、2つ、3つまたは4つ全てのフレームワーク領域を含む。一実施形態において、重鎖可変領域は、改変（例えば置換、例えば、配列番号58のマウス重鎖可変領域内の対応する位置において見出される1つまたは複数のアミノ酸の置換、例えば、71、73および78位の1つまたは複数における置換）を有する。一実施形態において、ヒト化抗CD19結合ドメインは、本明細書で（例えば表2で）説明される軽鎖可変領域、および／または本明細書で（例えば表2で）説明される重鎖可変領域を含む。一実施形態において、ヒト化抗CD19結合ドメインは、表2のアミノ酸配列の軽鎖および重鎖を含むscFvである。ある実施形態において、ヒト化抗CD19結合ドメイン（例えば、scFv）は、表2において提供される軽鎖可変領域のアミノ酸配列もしくは表2のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列の、少なくとも1、2もしくは3個の改変（例えば、置換）であるが30、20もしくは10個以下の改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および／または表2において提供される重鎖可変領域のアミノ酸配列もしくは表2のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列の、少なくとも1、2もしくは3個の改変（例えば、置換）であるが30、20もしくは10個以下の改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。一実施形態において、ヒト化抗CD19結合ドメインは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11および配列番号12からなる群より選択される配列、またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む。一実施形態において、ヒト化抗CD19結合ドメインはscFvであり、本明細書で、例えば表2で説明されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域は、リンカー、例えば本明細書で説明されるリンカーを介して、本明細書で、例えば表2で説明されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に付着している。一実施形態において、ヒト化抗CD19結合ドメインは、(Gly₄-Ser)_nリンカーを包含し、ここでnは、1、2、3、4、5または6、例えば3または4（配列番号53）である。scFvの軽鎖可変領域および重鎖可変領域は、例えば、以下の配置：軽鎖可変領域-リンカー-重鎖可変領域または重鎖可変領域-リンカー-軽鎖可変領域のいずれであってもよい。

【0107】

一実施形態において、CAR分子は、表4および5のコンストラクト、例えば、マウス_CART19、ヒト化_CART19a、ヒト化_CART19bまたはヒト化_CART19cの、1つまたは複数（例えば、2つ、3つ、4つ、5つもしくは6つ）の、LC CDR1、LC CDR2、LC CDR3、HC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3を包含する、抗CD19結合ドメインを含む。

【0108】

一実施形態において、CAR分子は、リーダー配列、例えば本明細書で説明されるリーダー配列、例えば、配列番号13の、またはそれと95～99%同一性を有する、リーダー配列；本明細書で説明される抗CD19結合ドメイン、例えば、本明細書で説明されるLC CDR1、LC CDR2、LC CDR3、HC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3を含む抗CD19結合ドメイン、例えば、表3に記載のマウス抗CD19結合ドメイン、表2に記載のヒト化抗CD19結合ドメイン、またはそれらと95～99%の同一性を有する配列；ヒンジ領域、例えば本明細書で説明されるヒンジ領域、例えば、配列番号14の、またはそれと95～99%の同一性を有する、ヒンジ領域；膜貫通ドメイン、例えば本明細書で説明される膜貫通ドメイン、例えば、配列番号15の配列

またはそれと95～99%の同一性を有する配列を有する、膜貫通ドメイン；細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば本明細書で説明される細胞内シグナル伝達ドメイン（例えば、共刺激ドメインおよび／または一次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、共刺激ドメイン、例えば本明細書で説明される共刺激ドメイン、例えば、配列番号16もしくは配列番号51の配列、またはそれと95～99%の同一性を有する配列を有する、4-1BB共刺激ドメイン；および／あるいは一次シグナル伝達ドメイン、例えば本明細書で説明される一次シグナル伝達ドメイン、例えば、配列番号17もしくは配列番号43の配列、またはそれと95～99%の同一性を有する配列を有する、CD3ゼータ刺激ドメインを含む。

【0109】

一実施形態において、CAR分子は、配列番号58、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41または配列番号42のアミノ酸配列、または配列番号58、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41または配列番号42のアミノ酸配列の、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、10、15、20もしくは30個の改変（例えば、置換）であるが60、50もしくは40個以下の改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列、または配列番号58、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41または配列番号42のアミノ酸配列と85%、90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む（例えば、からなる）。

【0110】

本発明は、一般に、一部の態様において、表面抗原分類19タンパク質（CD19）の発現に関連する疾患を処置するために、1つまたは複数のB細胞阻害剤と組み合わせての、CARを発現するように加工された細胞、例えばT細胞またはナチュラルキラー（NK）細胞を使用することに関する。一部の実施形態において、B細胞阻害剤は、CD10、CD19、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179bまたはCD79aの1つまたは複数の阻害剤である。

【0111】

一部の実施形態において、CD19阻害剤は、抗体分子、例えば、本明細書で説明されるようなCD19結合配列を有する抗体分子を含む。例えば、抗体分子は、表2、3、4および5のいずれかに記載のCDRもしくはVHおよびVL、またはそれらとの相同性を有する、例えばそれらと95～99%の同一性を有する配列を含んでもよい。抗体分子は、このセクションにおいて例えばCARに関連して説明される配列を有するCD19結合領域を含んでもよい。

【0112】

実施形態において、B細胞阻害剤は、1つまたは複数のB細胞抗原、例えば、CD10、CD19、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179bまたはCD79aの1つまたは複数と結合する、阻害核酸、可溶性リガンド、抗体もしくはその抗原結合フラグメント、CARまたはCAR発現細胞から選ばれる。

【0113】

CD20結合ドメインおよび阻害剤

一部の態様において、本開示は、CD20阻害剤または結合ドメイン、例えば、本明細書で説明されるようなCD20阻害剤または結合ドメインを提供する。本開示は、CD20結合ドメインをコードする、例えば、CD20結合ドメインを含むCARをコードする核酸も提供する。組成物は、第二の薬剤、例えば、抗CD19 CAR発現細胞またはCD19結合ドメインも含むことがある。薬剤は、例えば、単一の核酸によってコードされていてもよく、または異なる核酸によってコードされていてもよい。

【0114】

一部の態様において、CD20阻害剤または結合ドメインは、単剤療法として投与される。一部の態様において、CD20阻害剤または結合ドメインは、抗CD19 CAR発現細胞などの第二の薬剤と組み合わせて投与される。

【0115】

CD20阻害剤は、例えば、小分子、抗体もしくはその抗原結合フラグメント、CARまたはCAR発現細胞であってもよい。一実施形態において、CD20阻害剤は、抗CD20抗体またはそのフラグメントである。ある実施形態において、抗体は、単一特異性抗体であり、別の実施形態において、抗体は、二重特異性抗体である。ある実施形態において、CD20阻害剤は、キメラマウス／ヒトモノクローナル抗体、例えばリツキシマブである。ある実施形態において、CD20阻害剤は、オフアツムマブなどのヒトモノクローナル抗体である。ある実施形態において、CD20阻害剤は、オクレリズマブ、ベルツズマブ、オビヌツズマブ、オカラツズマブ、またはPRO131921 (Genentech) などの、ヒト化抗体である。ある実施形態において、CD20阻害剤は、TRU-015 (Trubion Pharmaceuticals) などの、抗CD20抗体の一部を含む融合タンパク質である。

10

【0116】

一実施形態において、CD20阻害剤は、抗CD20発現細胞、例えば、CD20 CARTまたはCD20発現NK細胞である。

【0117】

一部の実施形態において、CD20-CARは、任意のリーダー配列（例えば、本明細書で説明される任意のリーダー配列）、細胞外抗原結合ドメイン、ヒンジ（例えば、本明細書で説明されるヒンジ）、膜貫通ドメイン（例えば、本明細書で説明される膜貫通ドメイン）、および細胞内刺激ドメイン（例えば、本明細書で説明される細胞内刺激ドメイン）を含む。一実施形態において、典型的なCD20 CARコンストラクトは、任意のリーダー配列（例えば、本明細書で説明されるリーダー配列）、細胞外抗原結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメイン、細胞内共刺激ドメイン（例えば、本明細書で説明される細胞内共刺激ドメイン）および細胞内刺激ドメインを含む。

20

【0118】

一実施形態において、CD20結合ドメインは、本明細書で説明されるCD20結合ドメインの、1つもしくは複数（例えば、3つ全て）の、軽鎖相補性決定領域1 (LC CDR1)、軽鎖相補性決定領域2 (LC CDR2) および軽鎖相補性決定領域3 (LC CDR3)、ならびに／または本明細書で説明されるCD20結合ドメインの、1つもしくは複数（例えば、3つ全て）の、重鎖相補性決定領域1 (HC CDR1)、重鎖相補性決定領域2 (HC CDR2) および重鎖相補性決定領域3 (HC CDR3) を含み、例えば、1つまたは複数、例えば3つ全て、のLC CDRおよび1つまたは複数、例えば3つ全て、のHC CDRを含むCD20結合ドメインを含む。これらのCDRは、例えば、表12A、12B、および／または表13のものであってもよい。一実施形態において、CD20結合ドメインは、本明細書で説明されるCD20結合ドメインの、1つまたは複数（例えば、3つ全て）の、重鎖相補性決定領域1 (HC CDR1)、重鎖相補性決定領域2 (HC CDR2) および重鎖相補性決定領域3 (HC CDR3) を含み、例えば、CD20結合ドメインは、本明細書で説明されるHC CDR1、HC CDR2 およびHC CDR3 を各々が含む2つの可変重鎖領域を有する。一実施形態において、CD20結合ドメインは、本明細書で（例えば、表15Aもしくは15Bで）説明される軽鎖可変領域、および／または本明細書で（例えば、表14Aもしくは14Bで）説明される重鎖可変領域を含む。一実施形態において、CD20結合ドメインは、本明細書で（例えば、表14Aもしくは14Bで）説明される重鎖可変領域、例えば、本明細書で（例えば、表14Aもしくは14Bで）説明される少なくとも2つの重鎖可変領域を含む。一実施形態において、CD20結合ドメインは、表14Aまたは14Bまたは15Aまたは15Bのアミノ酸配列の軽鎖および重鎖を含むscFvである。ある実施形態に

30

40

50

において、CD20結合ドメイン（例えば、scFv）は、表15Aもしくは15Bにおいて提供される軽鎖可変領域のアミノ酸配列または表15Aもしくは15Bのアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列の、少なくとも1、2または3個の改変（例えば、置換）であるが30、20または10個以下の改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および／あるいは表14Aもしくは14Bにおいて提供される重鎖可変領域のアミノ酸配列または表14Aもしくは14Bのアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列の、少なくとも1、2または3個の改変（例えば、置換）であるが30、20または10個以下の改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。CD20結合ドメインは、例えば、抗体分子またはCAR分子の一部であってもよい。

10

【0119】

一実施形態において、CAR分子は、表12A、12Bおよび／または13のコンストラクト、例えば、CAR20-1、CAR20-2、CAR20-3、CAR20-4、CAR20-5、CAR20-6、CAR20-7、CAR20-8、CAR20-9、CAR20-10、CAR20-11、CAR20-12、CAR20-13、CAR20-14、CAR20-15、またはCAR20-16の、1つまたは複数（例えば、2つ、3つ、4つ、5つもしくは6つ）の、LC CDR1、LC CDR2、LC CDR3、HC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3を包含する、抗CD20結合ドメインを含む。

【0120】

20

一実施形態において、CAR分子は、表14Aまたは14Bおよび15Aまたは15Bのコンストラクト、例えば、CAR20-1、CAR20-2、CAR20-3、CAR20-4、CAR20-5、CAR20-6、CAR20-7、CAR20-8、CAR20-9、CAR20-10、CAR20-11、CAR20-12、CAR20-13、CAR20-14、CAR20-15、またはCAR20-16の、VLおよび／またはVHを包含する、抗CD22結合ドメインを含む。

【0121】

CD20 scFvの前に、配列番号13で提供されるもののような任意のリーダー配列、それに続いて、配列番号14または配列番号45または配列番号47または配列番号49で提供されるもののような任意のヒンジ配列、配列番号15で提供されるもののような膜貫通領域、配列番号16または配列番号51を包含する細胞内シグナル伝達ドメイン、および配列番号17または配列番号43を包含するCD3ゼータ配列が存在していてもよく、例えば、前記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。

30

【0122】

さらなる実施形態は、表11A～15Bのいずれかのポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を包含する。さらなる実施形態は、表11A～15Bのいずれかのポリペプチドならびに配列番号13、14、15、16、17および適宜51のドメインの各々をコードする、ヌクレオチド配列を包含する。

【0123】

40

一実施形態において、CD20結合ドメインは、抗体または抗体フラグメントの特定の機能的な特徴または特性を特徴とする。例えば、一実施形態において、抗原結合ドメインを含む本発明のCAR組成物の一部は、ヒトCD20またはそのフラグメントに特異的に結合する。

【0124】

一実施形態において、CD20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。一実施形態において、CD20結合ドメインは、Fv、Fab、（Fab'）₂、または二重機能性（例えば、二重特異的）ハイブリッド抗体〔例えば、Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)〕である。一態様において、本発明の抗体およびそれらのフラグメントは、野生型の、または増強された親和性で

50

CD20タンパク質またはそのフラグメントに結合する。いくつかの場合において、ヒト s c F v は、ディスプレイライブラリーに由来し得る。

【0125】

一実施形態において、突然変異した s c F v によって C A R T 20 コンストラクトに安定性の向上が付与されるように、CD20結合ドメイン、例えば s c F v は、少なくとも1つの突然変異を含む。別の実施形態において、突然変異した s c F v によって C A R T 20 コンストラクトに安定性の向上が付与されるように、CD20A結合ドメイン、例えば s c F v は、例えばヒト化プロセスから生じる少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10の突然変異を含む。

【0126】

一部の実施形態において、CD20阻害剤は、抗体分子、例えば、本明細書で説明されるようなCD20結合配列を有する抗体分子を含む。例えば、抗体分子は、表11A～15Bのいずれかに記載のCDRもしくはVHおよびVL、またはそれらとの相同性を有する、例えばそれらと95～99%の同一性を有する配列を含んでいてもよい。抗体分子は、このセクションにおいて例えばCARに関連して説明される配列を有するCD20結合領域を含んでいてもよい。

【0127】

一態様において、本開示は、CD19 CARを発現する細胞とCD20 CARを発現する細胞の混合物を含むCAR発現細胞、例えばCART細胞、の集団を提供する。例えば、一実施形態において、CART細胞の集団は、CD19 CARを発現する第一の細胞、およびCD20 CARを発現する第二の細胞を包含し得る。

【0128】

一部の態様において、本明細書で説明される結合ドメインまたは抗体分子は、CD20に対する第二の抗体分子と同じ（または実質的に同じ）またはオーバーラップしている（または実質的にオーバーラップしている）エピトープに結合し、前記第二の抗体分子は、本明細書で説明される抗体分子、例えば、表11A～15Bから選ばれる抗体分子である。一部の実施形態において、本明細書で説明される結合ドメインまたは抗体分子は、CD20に対する第二の抗体分子と、同じ（または実質的に同じ）またはオーバーラップしている（または実質的にオーバーラップしている）エピトープへの結合について競合し、および／またはそのようなエピトープに結合し、前記第二の抗体分子は、本明細書で説明される抗体分子、例えば、表11A～15Bから選ばれる抗体分子、例えば、実施例25で説明される方法によって決定されるような抗体分子である。一部の実施形態において、バイパトピック (biparatopic) CD20結合ドメインは、第一のエピトープ、例えば、表11A～15Bから選ばれる抗体分子によって結合されるエピトープに結合し、前記バイパトピック結合ドメインは、第二のエピトープ、例えば、表11A～15Bから選ばれる抗体分子によって結合される第二のエピトープにも結合する。一部の態様において、本開示は、第一のエピトープ、例えば、表11A～15Bから選ばれる抗体分子によって結合されるエピトープに結合する第一のCD20結合ドメイン、および第二のエピトープ、例えば、表11A～15Bから選ばれる抗体分子によって結合される第二のエピトープに結合する第二のCD20結合ドメインを投与することを含む処置の方法を提供する。一部の実施形態において、CD20結合ドメインは、例えばCAR発現細胞によって発現される、CAR分子の一部である。

【0129】

CD22結合ドメインおよび阻害剤

一部の態様において、本開示は、CD22阻害剤または結合ドメイン、例えば、本明細書で説明されるようなCD22阻害剤または結合ドメインを提供する。本開示は、CD22結合ドメインをコードする、例えば、CD22結合ドメインを含むCARをコードする核酸も提供する。組成物はまた、第二の薬剤、例えば、抗CD19 CAR発現細胞またはCD19結合ドメインを含んでいてもよい。薬剤は、例えば、単一の核酸によってコードされていてもよく、または異なる核酸によってコードされていてもよい。

【0130】

一部の態様において、CD22阻害剤または結合ドメインは、単剤療法として投与される。一部の態様において、CD22阻害剤または結合ドメインは、抗CD19 CAR発現細胞などの第二の薬剤と組み合わせて投与される。

【0131】

CD22阻害剤は、例えば、小分子、抗体もしくはその抗原結合フラグメント、CARまたはCAR発現細胞であってもよい。一実施形態において、CD22阻害剤は、抗CD22抗体またはそのフラグメントである。ある実施形態において、抗体は、単一特異性抗体であり、別の実施形態において、抗体は、二重特異性抗体である。ある実施形態において、抗体は、化学療法剤などの第二の薬剤にコンジュゲートしていてもよい、単一特異性抗体である。例えば、ある実施形態において、抗体は、抗CD22モノクローナル抗体-MMAEコンジュゲート（例えば、DCDT2980S）である。ある実施形態において、抗体は、抗CD22抗体のscFv、例えば、抗体RFB4のscFvである。このscFvは、緑膿菌外毒素-A（例えば、BL22）の全てまたはフラグメントに融合していてもよい。ある実施形態において、抗体は、ヒト化抗CD22モノクローナル抗体（例えば、エブラツズマブ）である。ある実施形態において、抗体またはそのフラグメントは、緑膿菌外毒素-A（例えば、モキセツモマブパストトクス（moxetumomab pasudotox））の全てまたはフラグメント（もしくは38kDaフラグメント）に共有結合で融合していてもよい、抗CD22抗体のFv部分を含む。ある実施形態において、抗CD22抗体は、毒素にコンジュゲートしていてもよい、抗CD19/CD22二重特異性抗体である。例えば、一実施形態において、抗CD22抗体は、ジフテリア毒素（DT）の全てまたは一部に、例えば、ジフテリア毒素（DT）、DT 390、例えば、リガンド指向型毒素、例えばDT2219ARL、の最初の389アミノ酸に連結されていてもよい、抗CD19/CD22二重特異性部分（例えば、ヒトCD19およびCD22を認識する、2つのscFvリガンド）を含む。別の実施形態において、二重特異性部分（例えば、抗CD19/抗CD22）は、脱グリコシル化リシンA鎖（例えば、Combotox）などの毒素に連結されている。

【0132】

一実施形態において、CD22阻害剤は、抗CD22発現細胞、例えば、CD22 CARTまたはCD22発現NK細胞である。

【0133】

一態様において、本開示は、CD19 CARを発現する細胞とCD22 CARを発現する細胞の混合物を含む、CAR発現細胞、例えばCART細胞、の集団を提供する。例えば、一実施形態において、CART細胞の集団は、CD19 CARを発現する第一の細胞、およびCD22 CARを発現する第二の細胞を包含し得る。別の例として、CAR T細胞の集団は、1つより多くの、例えば2つ、3つ、4つ、5つまたは6つ以上のCAR、例えば、CD19 CARおよびCD22 CARを発現する、単一の集団を包含し得る。

【0134】

一部の実施形態において、CD22-CARは、任意のリーダー配列（例えば、本明細書で説明される任意のリーダー配列）、細胞外抗原結合ドメイン、ヒンジ（例えば、本明細書で説明されるヒンジ）、膜貫通ドメイン（例えば、本明細書で説明される膜貫通ドメイン）、および細胞内刺激ドメイン（例えば、本明細書で説明される細胞内刺激ドメイン）を含む。一実施形態において、典型的なCD22 CARコンストラクトは、任意のリーダー配列（例えば、本明細書で説明されるリーダー配列）、細胞外抗原結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメイン、細胞内共刺激ドメイン（例えば、本明細書で説明される細胞内共刺激ドメイン）および細胞内刺激ドメインを含む。

【0135】

一実施形態において、CD22結合ドメインは、本明細書で説明されるCD22結合ドメインの、1つもしくは複数（例えば、3つ全て）の、軽鎖相補性決定領域1（LC C

10

20

30

40

50

DR1)、軽鎖相補性決定領域2(LC CDR2)および軽鎖相補性決定領域3(LC CDR3)、ならびに／または本明細書で説明されるCD22結合ドメインの、1つもしくは複数(例えば、3つ全て)の、重鎖相補性決定領域1(HC CDR1)、重鎖相補性決定領域2(HC CDR2)および重鎖相補性決定領域3(HC CDR3)を含み、例えば、1つまたは複数、例えば3つ全て、のLC CDRおよび1つまたは複数、例えば3つ全て、のHC CDRを含むCD22結合ドメインを含む。これらのCDRは、例えば、表7A、7B、7C、8A、および／または表8Bの1つまたは複数のCDRであってもよい。一実施形態において、CD22結合ドメインは、本明細書で説明されるCD22結合ドメインの、1つまたは複数(例えば、3つ全て)の、重鎖相補性決定領域1(HC CDR1)、重鎖相補性決定領域2(HC CDR2)および重鎖相補性決定領域3(HC CDR3)を含み、例えば、CD22結合ドメインは、本明細書で説明されるHC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3を各々が含む2つの可変重鎖領域を有する。一実施形態において、CD22結合ドメインは、本明細書で(例えば、表10Aもしくは10Bで)説明される軽鎖可変領域、および／または本明細書で(例えば、表9Aもしくは9Bで)説明される重鎖可変領域を含む。一実施形態において、CD22結合ドメインは、本明細書で(例えば、表9Aもしくは9Bで)説明される重鎖可変領域、例えば、本明細書で(例えば、表9Aもしくは9Bで)説明される少なくとも2つの重鎖可変領域を含む。一実施形態において、CD22結合ドメインは、表9Aまたは9Bおよび10Aまたは10Bのアミノ酸配列の軽鎖および重鎖を含むscFvである。ある実施形態において、CD22結合ドメイン(例えば、scFv)は、表10Aもしくは10Bにおいて提供される軽鎖可変領域のアミノ酸配列または表10Aもしくは10Bのアミノ酸配列と95~99%の同一性を有する配列の、少なくとも1、2または3個の改変(例えば、置換)であるが30、20または10個以下の改変(例えば、置換)を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および／あるいは表9Aもしくは9Bにおいて提供される重鎖可変領域のアミノ酸配列または表9Aもしくは9Bのアミノ酸配列と95~99%の同一性を有する配列の、少なくとも1、2または3個の改変(例えば、置換)であるが30、20または10個以下の改変(例えば、置換)を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。CD22結合ドメインは、例えば、抗体分子またはCAR分子の一部であってもよい。

【0136】

一実施形態において、CAR分子は、表7A、7B、7C、8A、および／または8Bのコンストラクト、例えば、m971、CAR22-1、CAR22-2、CAR22-3、CAR22-4、CAR22-5、CAR22-6、CAR22-7、CAR22-8、CAR22-9、CAR22-10、CAR22-11、CAR22-12、CAR22-13、CAR22-14、CAR22-15、CAR22-16、CAR22-17、CAR22-18、CAR22-19、CAR22-20、CAR22-21、CAR22-22、CAR22-23、CAR22-24、CAR22-25、CAR22-26、CAR22-27、CAR22-28、CAR22-29、CAR22-30、CAR22-31、CAR22-32、CAR22-33、CAR22-34、CAR22-35、CAR22-36、CAR22-37、またはCAR22-38の、1つまたは複数(例えば、2つ、3つ、4つ、5つもしくは6つ)の、LC CDR1、LC CDR2、LC CDR3、HC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3を包含する、抗CD22結合ドメインを含む。

【0137】

一実施形態において、CAR分子は、表9A、9B、10Aおよび／または10Bのコンストラクト、例えば、m971、CAR22-1、CAR22-2、CAR22-3、CAR22-4、CAR22-5、CAR22-6、CAR22-7、CAR22-8、CAR22-9、CAR22-10、CAR22-11、CAR22-12、CAR22-13、CAR22-14、CAR22-15、CAR22-16、CAR22-17、CAR22-18、CAR22-19、CAR22-20、CAR22-21、CAR22-22、CAR22-23、CAR22-24、CAR22-25、CAR22-26、CAR22-27、CAR22-28、CAR22-29、CAR22-30、CAR22-31、CAR22-32、CAR22-33、CAR22-34、CAR22-35、CAR22-36、CAR22-37、またはCAR22-38の、1つまたは複数(例えば、2つ、3つ、4つ、5つもしくは6つ)の、LC CDR1、LC CDR2、LC CDR3、HC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3を包含する、抗CD22結合ドメインを含む。

2-22、CAR 22-23、CAR 22-24、CAR 22-25、CAR 22-26、CAR 22-27、CAR 22-28、CAR 22-29、CAR 22-30、CAR 22-31、CAR 22-32、CAR 22-33、CAR 22-34、CAR 22-35、CAR 22-36、CAR 22-37、またはCAR 22-38、またはそれらと95～99%の同一性を有する配列の、VLおよび／またはVHを包含する、抗CD22結合ドメインを含む。

【0138】

s c F vの前に、配列番号13で提供されるもののような任意のリーダー配列、それに続いて、配列番号14または配列番号45または配列番号47または配列番号49で提供されるもののような任意のヒンジ配列、配列番号15で提供されるもののような膜貫通領域、配列番号16または配列番号51を包含する細胞内シグナル伝達ドメイン、および配列番号17または配列番号43を包含するCD3ゼータ配列が存在していてもよく、例えば、前記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。

【0139】

さらなる実施形態は、表6A～10Bのいずれかのポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を包含する。さらなる実施形態は、表6A～10Bのいずれかのポリペプチドならびに配列番号13、14、15、16、17および適宜51のドメインの各々をコードする、ヌクレオチド配列を包含する。

【0140】

一実施形態において、CD22結合ドメインは、抗体または抗体フラグメントの特定の機能的な特徴または特性を特徴とする。例えば、一実施形態において、抗原結合ドメインを含む本発明のCAR組成物の一部は、ヒトCD22またはそのフラグメントに特異的に結合する。

【0141】

一実施形態において、CD22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(s c F v)である。一実施形態において、CD22結合ドメインは、F v、F a b、(F a b')₂、または二重機能性(例えば、二重特異的)ハイブリッド抗体[例えば、Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)]である。一態様において、本発明の抗体およびそれらのフラグメントは、野生型の、または増強された親和性でCD22タンパク質またはそのフラグメントに結合する。いくつかの場合において、ヒトs c F vは、ディスプレイライブラリーに由来し得る。

【0142】

一実施形態において、突然変異したs c F vによってCAR T22コンストラクトに安定性の向上が付与されるように、CD22結合ドメイン、例えばs c F vは、少なくとも1つの突然変異を含む。別の実施形態において、突然変異したs c F vによってCAR T22コンストラクトに安定性の向上が付与されるように、CD22結合ドメイン、例えばs c F vは、例えばヒト化プロセスから生じる少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10の突然変異を含む。

【0143】

一部の実施形態において、CD22阻害剤は、抗体分子、例えば、本明細書で説明されるようなCD22結合配列を有する抗体分子を含む。例えば、抗体分子は、表6A～10Bのいずれかに記載のCDRもしくはVHおよびVL、またはそれらとの相同性を有する、例えばそれらと95～99%の同一性を有する配列を含んでいてもよい。抗体分子は、このセクションにおいて例えばCARに関連して説明される配列を有するCD22結合領域を含んでいてもよい。

【0144】

一実施形態において、本開示は、CD19 CARを発現する細胞とCD22 CARを発現する細胞の混合物を含むCAR発現細胞、例えばCAR T細胞、の集団を提供する。例えば、一実施形態において、CAR T細胞の集団は、CD19 CARを発現する第

10

20

30

40

50

一の細胞、およびCD22 CARを発現する第二の細胞を包含し得る。

【0145】

一部の態様において、本明細書で説明される結合ドメインまたは抗体分子は、CD22に対する第二の抗体分子と同じ（または実質的に同じ）またはオーバーラップしている（または実質的にオーバーラップしている）エピトープに結合し、前記第二の抗体分子は、本明細書で説明される抗体分子、例えば、表6A～10Bから選ばれる抗体分子である。一部の実施形態において、本明細書で説明される結合ドメインまたは抗体分子は、CD22に対する第二の抗体分子と、同じ（または実質的に同じ）またはオーバーラップしている（または実質的にオーバーラップしている）エピトープへの結合について競合し、および／またはそのようなエピトープに結合し、前記第二の抗体分子は、本明細書で説明される抗体分子、例えば、表6A～10Bから選ばれる抗体分子、例えば、実施例25で説明される方法によって決定されるような抗体分子である。一部の実施形態において、バイパ

ラトピックCD22結合ドメインは、第一のエピトープ、例えば、表6A～10Bから選ばれる抗体分子によって結合されるエピトープに結合し、前記バイパトピック結合ドメインは、第二のエピトープ、例えば、表6A～10Bから選ばれる抗体分子によって結合される第二のエピトープにも結合する。一部の態様において、本開示は、第一のエピトープ、例えば、表6A～10Bから選ばれる抗体分子によって結合されるエピトープに結合する第一のCD22結合ドメイン、および第二のエピトープ、例えば、表6A～10Bから選ばれる抗体分子によって結合される第二のエピトープに結合する第二のCD22結合ドメインを投与することを含む処置の方法を提供する。一部の実施形態において、CD22結合ドメインは、例えばCAR発現細胞によって発現される、CAR分子の一部である。

10

20

【0146】

一部の実施形態において、CD22結合ドメインは、CD22のIg様ドメイン1、2、3、4、5、6または7の1つまたは複数と結合する。一部の実施形態において、CD22結合ドメインは、ドメイン1および2と結合するか、ドメイン3および4と結合するか、またはドメイン5、6および7と結合する。

【0147】

一部の態様において、本開示は、CD19陰性のがん、例えば白血病、例えばALL、例えばB-ALLを処置する方法であって、CD22阻害剤、例えば本明細書で説明されるCD22結合ドメインまたはCD22 CAR発現細胞、を投与することを含む方法を提供する。一部の実施形態において、方法は、がんがCD19陰性であるかどうかを判定する工程を含む。一部の態様において、対象は、CD19阻害剤、例えばCD19 CAR発現細胞を受けたことがあり、CD19阻害剤に対して耐性であるか、再発するか、またはCD19阻害剤が無効である。

30

【0148】

ROR1阻害剤

ROR1阻害剤は、例えば、小分子、抗体、またはそのフラグメントであってもよい。一実施形態において、ROR1阻害剤は、抗ROR1抗体またはそのフラグメントである。一実施形態において、抗ROR1抗体またはそのフラグメントは、モノクローナル抗体、例えばシルムツズマブ（cirmtuzumab）である。

40

【0149】

一実施形態において、ROR1阻害剤は、抗ROR1発現細胞、例えば、ROR1 CARTまたはROR1発現NK細胞である。

【0150】

一部の実施形態において、ROR1-CARは、任意のリーダー配列（例えば、本明細書で説明される任意のリーダー配列）、細胞外抗原結合ドメイン、ヒンジ（例えば、本明細書で説明されるヒンジ）、膜貫通ドメイン（例えば、本明細書で説明される膜貫通ドメイン）、および細胞内刺激ドメイン（例えば、本明細書で説明される細胞内刺激ドメイン）を含む。一実施形態において、典型的なROR1 CARコンストラクトは、任意のR

50

リーダー配列（例えば、本明細書で説明されるリーダー配列）、細胞外抗原結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメイン、細胞内共刺激ドメイン（例えば、本明細書で説明される細胞内共刺激ドメイン）および細胞内刺激ドメインを含む。

【0151】

一実施形態において、ROR1結合ドメインは、s c F v部分、例えばヒトs c F v部分を含む。s c F vの前に、配列番号13で提供されるもののような任意のリーダー配列、それに続いて、配列番号14または配列番号45または配列番号47または配列番号49で提供されるもののような任意のヒンジ配列、配列番号15で提供されるもののような膜貫通領域、配列番号16または配列番号51を包含する細胞内シグナル伝達ドメイン、および配列番号17または配列番号43を包含するCD3ゼータ配列が存在していてもよく、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。

10

【0152】

一部の態様において、本開示は、ROR1 CARをコードする核酸分子を含む組換え核酸コンストラクトを包含し、前記核酸分子は、ROR1結合ドメイン、例えば、本明細書で説明される、例えば、細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列と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ROR1結合ドメイン、をコードする核酸配列を含む。CARにおいて使用することができる典型的な細胞内シグナル伝達ドメインとしては、例えば、CD3-ゼータ、CD28、4-1BB、および同種のものの1つまたは複数の細胞内シグナル伝達ドメインが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの場合において、CARは、CD3-ゼータ、CD28、4-1BBおよび同種のもののあらゆる組合せを含んでいてもよい。

20

【0153】

一実施形態において、ROR1結合ドメインは、抗体または抗体フラグメントの特定の機能的な特徴または特性を特徴とする。例えば、一実施形態において、抗原結合ドメインを含む本発明のCAR組成物の一部は、ヒトROR1またはそのフラグメントに特異的に結合する。ある特定の実施形態において、s c F vは、リーダー配列と連続しており同じリーディングフレーム内にある。一態様において、リーダー配列は、配列番号13として提供されるポリペプチド配列である。

【0154】

一実施形態において、ROR1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(s c F v)である。一実施形態において、ROR1結合ドメインは、F v、F a b、(F a b')₂、または二重機能性（例えば、二重特異的）ハイブリッド抗体[例えば、Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)]である。一態様において、本発明の抗体およびそれらのフラグメントは、野生型の、または強化された親和性でROR1タンパク質またはそのフラグメントに結合する。いくつかの場合において、ヒトs c F vは、ディスプレイライブラリーに由来し得る。

30

【0155】

一実施形態において、突然変異したs c F vによってROR1 CARTコンストラクトに安定性の向上が付与されるように、ROR1結合ドメイン、例えばs c F vは、少なくとも1つの突然変異を含む。別の実施形態において、突然変異したs c F vによってROR1 CARTコンストラクトに安定性の向上が付与されるように、ROR1結合ドメイン、例えばs c F vは、ヒト化プロセスから生じる少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10の突然変異を含む。

40

【0156】

一実施形態において、本開示は、CD19 CARを発現する細胞とROR1 CARを発現する細胞の混合物を含むCAR発現細胞、例えばCART細胞、の集団を提供する。例えば、一実施形態において、CART細胞の集団は、CD19 CARを発現する第一の細胞、およびROR1 CARを発現する第二の細胞を包含し得る。

【0157】

50

C D 1 2 3 阻害剤

C D 1 2 3 阻害剤は、例えば、小分子、抗体もしくはそのフラグメント（例えば、単一特異性もしくは二重特異性抗体、またはそのフラグメント）；C D 1 2 3 と結合する組換えタンパク質、例えば融合タンパク質；阻害核酸；またはC D 1 2 3 C A R を発現する細胞、例えばC D 1 2 3 C A R T であってもよい。

【0158】

一実施形態において、C D 1 2 3 阻害剤は、例えばC D 1 2 3 受容体の天然リガンド（またはフラグメント）、例えばS L - 4 0 1 [D T 3 8 8 I L 3 と呼ばれる；テキサス大学サウスウエスタンメディカルセンター（University of Texas Southwestern Medical Center）] を含む、組換えタンパク質である。

10

【0159】

別の実施形態において、C D 1 2 3 阻害剤は、抗C D 1 2 3 抗体またはそのフラグメント、例えば、モノクローナル抗体（例えば、単一特異性もしくは二重特異性抗体、またはそのフラグメント）、例えばC S L 3 6 0 (C S L L i m i t e d)、C S L 3 6 2 (C S L L i m i t e d) またはM G D 0 0 6 (M a c r o G e n i c s) である。

【0160】

一実施形態において、C D 1 2 3 阻害剤は、抗C D 1 2 3 C A R 発現細胞、例えば、C D 1 2 3 C A R T またはC D 1 2 3 C A R 発現N K 細胞である。

【0161】

一部の実施形態において、C D 1 2 3 - C A R は、任意のリーダー配列（例えば、本明細書で説明される任意のリーダー配列）、細胞外抗原結合ドメイン、ヒンジ（例えば、本明細書で説明されるヒンジ）、膜貫通ドメイン（例えば、本明細書で説明される膜貫通ドメイン）、および細胞内刺激ドメイン（例えば、本明細書で説明される細胞内刺激ドメイン）を含む。一実施形態において、典型的なC D 1 2 3 C A R コンストラクトは、任意のリーダー配列（例えば、本明細書で説明されるリーダー配列）、細胞外抗原結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメイン、細胞内共刺激ドメイン（例えば、本明細書で説明される細胞内共刺激ドメイン）および細胞内刺激ドメインを含む。

20

【0162】

一実施形態において、C D 1 2 3 結合ドメインは、本明細書で説明されるC D 2 0 結合ドメインの、1 つもしくは複数（例えば、3 つ全て）の、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) および軽鎖相補性決定領域3 (L C C D R 3)、ならびに／または本明細書で説明されるC D 1 2 3 結合ドメインの、1 つもしくは複数（例えば、3 つ全て）の、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) および重鎖相補性決定領域3 (H C C D R 3) を含み、例えば、1 つまたは複数、例えば3 つ全て、のL C C D R および1 つまたは複数、例えば3 つ全て、のH C C D R を含むC D 1 2 3 結合ドメインを含む。これらのC D R は、例えば、表17、18、26または27のいずれかのものであってもよい。一実施形態において、C D 1 2 3 結合ドメインは、本明細書で説明されるC D 1 2 3 結合ドメインの、1 つまたは複数（例えば、3 つ全て）の、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) および重鎖相補性決定領域3 (H C C D R 3) を含み、例えば、C D 1 2 3 結合ドメインは、本明細書で説明されるH C C D R 1、H C C D R 2 およびH C C D R 3 を各々が含む2 つの可変重鎖領域を有する。一実施形態において、C D 1 2 3 結合ドメインは、本明細書で説明される軽鎖可変領域、および／または本明細書で説明される重鎖可変領域を含む。一実施形態において、C D 1 2 3 結合ドメインは、本明細書で説明される重鎖可変領域、例えば、本明細書で説明される少なくとも2 つの重鎖可変領域を含む。一実施形態において、C D 1 2 3 結合ドメインは、表16または25のアミノ酸配列の軽鎖および重鎖を含むs c F v である。ある実施形態において、C D 1 2 3 結合ドメイン（例えば、s c F v）は、表16もしくは25における軽鎖可変領域のアミノ酸配列または表16もしくは25における軽鎖可変領域と95～99%の同一性を有する配列の、少なくとも1、2または3個の改変（例えば、置換

30

40

50

）であるが30、20または10個以下の改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および／あるいは表16もしくは25における重鎖可変領域のアミノ酸配列または表16もしくは25における重鎖可変領域と95～99%の同一性を有する配列の、少なくとも1、2または3個の改変（例えば、置換）であるが30、20または10個以下の改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。

【0163】

一実施形態において、CAR分子は、表17および18のコンストラクト、例えば、CAR123-1、CAR123-2、CAR123-3またはCAR123-4の、1つまたは複数（例えば、2つ、3つ、4つ、5つもしくは6つ）の、LC CDR1、LC CDR2、LC CDR3、HC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3を包含する、抗CD123結合ドメインを含む。一実施形態において、CAR分子は、表26および27のコンストラクト、例えばh z CAR123の、1つまたは複数（例えば、2つ、3つ、4つ、5つもしくは6つ）の、LC CDR1、LC CDR2、LC CDR3、HC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3を包含する、抗CD123結合ドメインを含む。

10

【0164】

CD123 scFvの前に、配列番号13で提供されるもののような任意のリーダー配列、それに続いて、配列番号14または配列番号45または配列番号47または配列番号49で提供されるもののような任意のヒンジ配列、配列番号15で提供されるもののような任意の膜貫通領域、配列番号16または配列番号51を包含する細胞内シグナル伝達ドメイン、および配列番号17または配列番号43を包含するCD3ゼータ配列が存在していてもよく、例えば、前記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。

20

【0165】

さらなる実施形態は、表16～27のいずれかのポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を包含する。さらなる実施形態は、表16～27のいずれかのポリペプチドならびに配列番号13、14、15、16、17および適宜51のドメインの各々をコードする、ヌクレオチド配列を包含する。

【0166】

一実施形態において、CD123結合ドメインは、抗体または抗体フラグメントの特定の機能的な特徴または特性を特徴とする。例えば、一実施形態において、抗原結合ドメインを含む本発明のCAR組成物の一部は、ヒトCD123またはそのフラグメントに特異的に結合する。

30

【0167】

一実施形態において、CD123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。一実施形態において、CD123結合ドメインは、Fv、Fab、（Fab'）₂、または二重機能性（例えば、二重特異的）ハイブリッド抗体[例えば、Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)]である。一態様において、本発明の抗体およびそれらのフラグメントは、野生型の、または増強された親和性でCD123タンパク質またはそのフラグメントに結合する。いくつかの場合において、ヒトscFvは、ディスプレイライブラリーに由来し得る。

40

【0168】

一実施形態において、突然変異したscFvによってCART123コンストラクトに安定性の向上が付与されるように、CD123結合ドメイン、例えばscFvは、少なくとも1つの突然変異を含む。別の実施形態において、突然変異したscFvによってCART123コンストラクトに安定性の向上が付与されるように、CD123結合ドメイン、例えばscFvは、例えばヒト化プロセスから生じる少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10の突然変異を含む。

【0169】

一部の実施形態において、CD123阻害剤は、抗体分子、例えば、本明細書で説明さ

50

れるようなCD123結合配列を有する抗体分子を含む。例えば、抗体分子は、表16～27のいずれかに記載のCDRもしくはVHおよびVL、またはそれらとの相同性を有する、例えばそれらと95～99%の同一性を有する配列を含んでいてもよい。抗体分子は、このセクションにおいて例えばCARに関連して説明される配列を有するCD123結合領域を含んでいてもよい。

【0170】

一実施形態において、本開示は、CD19 CARを発現する細胞とCD123 CARを発現する細胞の混合物を含むCAR発現細胞、例えばCART細胞、の集団を提供する。例えば、一実施形態において、CART細胞の集団は、CD19 CARを発現する第一の細胞、およびCD123 CARを発現する第二の細胞を包含し得る。

10

【0171】

CD10阻害剤

CD10阻害剤は、例えば、小分子、抗体もしくはそのフラグメント（例えば、単一特異性もしくは二重特異性抗体、またはそのフラグメント）；CD10と結合する組換えタンパク質、例えば融合タンパク質；阻害核酸；またはCD10 CARを発現する細胞、例えばCD10 CARTであってもよい。

【0172】

ある実施形態において、CD10阻害剤は、小分子、例えばサクビトリル（Novartis）、バルサルタン／サクビトリル（Novartis）、オマパトリラート（Bristol-Myers Squibb）、RB-101、UK-414, 495（Pfizer）、またはそれらの薬学的に許容される塩もしくは誘導体を含む。

20

【0173】

一実施形態において、CD10阻害剤は、抗CD10 CAR発現細胞、例えば、CD10 CART、またはCD10 CAR発現NK細胞である。

【0174】

一実施形態において、本開示は、CD19 CARを発現する細胞とCD10 CARを発現する細胞の混合物を含むCAR発現細胞、例えばCART細胞、の集団を提供する。例えば、一実施形態において、CART細胞の集団は、CD19 CARを発現する第一の細胞、およびCD10 CARを発現する第二の細胞を包含し得る。

【0175】

CD34阻害剤

CD34阻害剤は、例えば、小分子、抗体もしくはそのフラグメント（例えば、単一特異性もしくは二重特異性抗体、またはそのフラグメント）；CD34と結合する組換えタンパク質、例えば融合タンパク質；阻害核酸；またはCD34 CARを発現する細胞、例えばCD34 CARTであってもよい。

30

【0176】

ある実施形態において、CD34阻害剤は、CD34を標的とするモノクローナル抗体もしくはそのフラグメント、または抗CD34モノクローナル抗体もしくはそのフラグメントを含むイムノリポソームを含む。

【0177】

一実施形態において、CD34阻害剤は、抗CD34 CAR発現細胞、例えば、CD34 CART、またはCD34 CAR発現NK細胞である。

40

【0178】

一実施形態において、本開示は、CD19 CARを発現する細胞とCD34 CARを発現する細胞の混合物を含むCAR発現細胞、例えばCART細胞、の集団を提供する。例えば、一実施形態において、CART細胞の集団は、CD19 CARを発現する第一の細胞、およびCD34 CARを発現する第二の細胞を包含し得る。

【0179】

FLT-3阻害剤

FLT-3阻害剤は、例えば、小分子、抗体もしくはそのフラグメント（例えば、単一

50

特異性もしくは二重特異性抗体、またはそのフラグメント) ; F L T - 3 と結合する組換えタンパク質、例えば融合タンパク質 ; 阻害核酸 ; または F L T - 3 C A R を発現する細胞、例えば F L T - 3 C A R T であってもよい。

【0180】

一部の実施形態において、F L T - 3 阻害剤は、小分子、例えば、キザルチニブ (A m b i t B i o s c i e n c e s) 、ミドスタウリン (T e c h n i s c h e U n i v e r s i t ä t D r e s d e n) 、ソラフェニブ (B a y e r および O n y x P h a r m a c e u t i c a l s) 、スニチニブ (P f i z e r) 、レスタウルチニブ (C e p h a l o n) 、またはそれらの薬学的に許容される塩もしくは誘導体を含む。

【0181】

一実施形態において、F L T - 3 阻害剤は、抗 F L T - 3 C A R 発現細胞、例えば、F L T - 3 C A R T 、または F L T - 3 C A R 発現 N K 細胞である。

【0182】

一実施形態において、本開示は、C D 1 9 C A R を発現する細胞と F L T - 3 C A R を発現する細胞の混合物を含む C A R 発現細胞、例えば C A R T 細胞、の集団を提供する。例えば、一実施形態において、C A R T 細胞の集団は、C D 1 9 C A R を発現する第一の細胞、および F L T - 3 C A R を発現する第二の細胞を包含し得る。

【0183】

C D 7 9 b 阻害剤

ある特定の実施形態において、C D 1 9 C A R 発現細胞は、C D 7 9 b 阻害剤とともに投与される。C D 7 9 b 阻害剤は、例えば、小分子、抗体もしくはそのフラグメント (例えば、単一特異性もしくは二重特異性抗体、またはそのフラグメント) ; C D 7 9 b と結合する組換えタンパク質、例えば融合タンパク質 ; 阻害核酸 ; または C D 7 9 b C A R を発現する細胞、例えば、C D 7 9 b C A R 発現 T 細胞もしくは N K 細胞であってもよい。一実施形態において、C D 7 9 b 阻害剤は、抗 C D 7 9 b C A R 発現細胞、例えば、C D 7 9 b C A R T 、または C D 7 9 b C A R 発現 N K 細胞である。典型的な C D 7 9 b 阻害剤は、以下でより詳細に説明される。

【0184】

ある実施形態において、本開示は、C D 1 9 C A R を発現する細胞と C D 7 9 b C A R を発現する細胞の混合物を含む C A R 発現細胞、例えば C A R T 細胞または C A R 発現 N K 細胞、の集団を提供する。例えば、一実施形態において、C A R 発現細胞の集団は、C D 1 9 C A R を発現する第一の細胞、および C D 7 9 b C A R を発現する第二の細胞を包含する。

【0185】

C D 1 7 9 b 阻害剤

ある特定の実施形態において、C D 1 9 C A R 発現細胞は、C D 1 7 9 b 阻害剤とともに投与される。C D 1 7 9 b 阻害剤は、例えば、小分子、抗体もしくはそのフラグメント (例えば、単一特異性もしくは二重特異性抗体、またはそのフラグメント) ; C D 1 7 9 b と結合する組換えタンパク質、例えば融合タンパク質 ; 阻害核酸 ; または C D 1 7 9 b C A R を発現する細胞、例えば、C D 1 7 9 b C A R 発現 T 細胞もしくは N K 細胞であってもよい。一実施形態において、C D 7 9 b 阻害剤は、抗 C D 1 7 9 b C A R 発現細胞、例えば、C D 1 7 9 b C A R T 、または C D 1 7 9 b C A R 発現 N K 細胞である。典型的な C D 1 7 9 b 阻害剤は、以下でより詳細に説明される。

【0186】

ある実施形態において、本開示は、C D 1 9 C A R を発現する細胞と C D 1 7 9 b C A R を発現する細胞の混合物を含む C A R 発現細胞、例えば C A R T 細胞または C A R 発現 N K 細胞、の集団を提供する。例えば、一実施形態において、C A R 発現細胞の集団は、C D 2 0 C A R を発現する第一の細胞、および C D 1 7 9 b C A R を発現する第二の細胞を包含する。

【0187】

10

20

30

40

50

CD79a阻害剤

ある特定の実施形態において、CD19 CAR発現細胞は、CD79a阻害剤とともに投与される。CD79a阻害剤は、例えば、小分子、抗体もしくはそのフラグメント（例えば、単一特異性もしくは二重特異性抗体、またはそのフラグメント）；CD79aと結合する組換えタンパク質、例えば融合タンパク質；阻害核酸；またはCD79a CARを発現する細胞、例えば、CD79a CAR発現T細胞もしくはNK細胞であってもよい。一実施形態において、CD79a阻害剤は、抗CD79a CAR発現細胞、例えば、CD79a CART、またはCD79a CAR発現NK細胞である。典型的なCD79a阻害剤は、以下でより詳細に説明される。

【0188】

10

ある実施形態において、本開示は、CD19 CARを発現する細胞とCD79a CARを発現する細胞の混合物を含むCAR発現細胞、例えばCART細胞またはCAR発現NK細胞、の集団を提供する。例えば、一実施形態において、CAR発現細胞の集団は、CD19 CARを発現する第一の細胞、およびCD79a CARを発現する第二の細胞を包含する。

【0189】

CAR分子

本明細書で説明される結合ドメイン（例えば、CD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179bまたはCD79aの1つまたは複数に対する結合ドメイン）は、1つまたは複数の追加のアミノ酸配列をさらに含んでいてもよい。

20

【0190】

一実施形態において、CAR分子は、T細胞受容体のアルファ、ベータまたはゼータ鎖、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137およびCD154からなる群より選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含む。一実施形態において、膜貫通ドメインは、配列番号15の配列を含む。一実施形態において、膜貫通ドメインは、配列番号15のアミノ酸配列、または配列番号15のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列の、少なくとも1、2または3個の改変（例えば、置換）であるが20、10または5個以下の改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列を含む。

30

【0191】

一実施形態において、結合ドメインは、ヒンジ領域、例えば本明細書で説明されるヒンジ領域によって膜貫通ドメインに接続されている。一実施形態において、コードされたヒンジ領域は、配列番号14もしくは配列番号45、またはそれらと95～99%の同一性を有する配列を含む。

【0192】

一実施形態において、CAR分子は、共刺激ドメイン、例えば本明細書で説明される共刺激ドメインをコードする配列をさらに含む。一実施形態において、共刺激ドメインは、OX40、CD2、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1（CD11a/CD18）、ICOS（CD278）、および4-1BB（CD137）からなる群より選択されるタンパク質の機能的なシグナル伝達ドメインを含む。一実施形態において、共刺激ドメインは、配列番号16の配列を含む。一実施形態において、共刺激ドメインは、配列番号51の配列を含む。一実施形態において、共刺激ドメインは、配列番号16もしくは配列番号51のアミノ酸配列、または配列番号16もしくは配列番号51のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列の、少なくとも1、2もしくは3個の改変（例えば、置換）であるが20、10または5個以下の改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態において、共刺激ドメインは、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、B

40

50

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 S、I C A M-1、L F A-1 (C D 1 1 a / C D 1 8)、4-1 B B (C D 1 3 7)、B 7-H 3、C D S、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 アルファ、C D 8 ベータ、I L 2 R ベータ、I L 2 R ガンマ、I L 7 R アルファ、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 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 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、および C D 8 3 と特異的に結合するリガンドからなる群より選択されるタンパク質の機能的なシグナル伝達ドメインを含む。実施形態において、共刺激ドメインは、4-1 B B、C D 2 7、C D 2 8 または I C O S を含む。

10

【0193】

20

一実施形態において、C A R 分子は、細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、本明細書で説明される細胞内シグナル伝達ドメイン、をコードする配列をさらに含む。一実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインは、4-1 B B の機能的なシグナル伝達ドメイン、および／または C D 3 ゼータの機能的なシグナル伝達ドメインを含む。一実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号 1 6 の配列、および／または配列番号 1 7 の配列を含む。一実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号 1 6 の配列、および／または配列番号 4 3 の配列を含む。一実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインは、C D 2 7 の機能的なシグナル伝達ドメイン、および／または C D 3 ゼータの機能的なシグナル伝達ドメインを含む。一実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号 5 1 の配列、および／または配列番号 1 7 の配列を含む。一実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号 5 1 の配列、および／または配列番号 4 3 の配列を含む。一実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号 1 6 もしくは配列番号 5 1 のアミノ酸配列および／または配列番号 1 7 もしくは配列番号 4 3 のアミノ酸配列、あるいは配列番号 1 6 もしくは配列番号 5 1 のアミノ酸配列、および／または配列番号 1 7 もしくは配列番号 4 3 のアミノ酸配列と 9 5 ~ 9 9 % の同一性を有する配列の、少なくとも 1、2 または 3 個の改変（例えば、置換）であるが 2 0、1 0 または 5 個以下の改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号 1 6 または配列番号 5 1 の配列、および配列番号 1 7 または配列番号 4 3 の配列を含み、前記細胞内シグナル伝達ドメインを構成する前記配列は、同じフレーム内で単一のポリペプチド鎖として発現される。

30

40

【0194】

一実施形態において、C A R 分子は、リーダー配列、例えば、本明細書で説明されるリーダー配列をさらに含む。一実施形態において、リーダー配列は、配列番号 1 3 のアミノ酸配列、または配列番号 1 3 のアミノ酸配列と 9 5 ~ 9 9 % の同一性を有する配列を含む。

【0195】

一態様において、C A R（例えば、C D 1 9 C A R、R O R 1 C A R、C D 2 0 C A R、C D 2 2 C A R、C D 1 2 3 C A R、C D 1 0 C A R、C D 3 4 C A R、F L T-3 C A R、C D 7 9 b C A R、C D 1 7 9 b C A R または C D 7 9 a C A R）は、任意のリーダー配列（例えば、本明細書で説明される任意のリーダー配列）

50

、細胞外抗原結合ドメイン、ヒンジ（例えば、本明細書で説明されるヒンジ）、膜貫通ドメイン（例えば、本明細書で説明される膜貫通ドメイン）、および細胞内刺激ドメイン（例えば、本明細書で説明される細胞内刺激ドメイン）を含む。一態様において、例示的なCARコンストラクトは、任意のリーダー配列（例えば、本明細書で説明される任意のリーダー配列）、細胞外抗原結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメイン、細胞内共刺激ドメイン（例えば、本明細書で説明される細胞内共刺激ドメイン）、および細胞内刺激ドメインを含む。

【0196】

二重特異性抗体

二重特異性抗体分子（例えば、単独で、またはCARの一部として、投与することができる）は、2つのVH領域および2つのVL領域を含むことができる。一部の実施形態において、上流の抗体またはその一部（例えば、scFv）は、全体的な二重特異性抗体分子がVH₁-VL₁-VL₂-VH₂のアレンジメントを有するように、そのVL（VL₁）の上流にそのVH（VH₁）があるようにアレンジされ、下流の抗体またはその一部（例えば、scFv）は、そのVH（VH₂）の上流にそのVL（VL₂）があるようにアレンジされる。他の実施形態において、上流の抗体またはその一部（例えば、scFv）は、全体的な二重特異性抗体分子がVL₁-VH₁-VH₂-VL₂のアレンジメントを有するように、そのVH（VH₁）の上流にそのVL（VL₁）があるようにアレンジされ、下流の抗体またはその一部（例えば、scFv）は、そのVL（VL₂）の上流にそのVH（VH₂）があるようにアレンジされる。

【0197】

二重特異性CD22/CD19阻害剤

ある実施形態において、B細胞阻害剤は、二重特異性CAR19/CAR22抗体分子を含む。例えば、一部の実施形態において、B細胞阻害剤は、表28の1つもしくは複数のアミノ酸配列、またはそれらと95～99%の同一性を有する配列を含む。表28に従って核酸を、またはそれらと95～99%の同一性を有する配列を、さらに提供する。ある実施形態において、B細胞阻害剤は、表2または3のCD19特異的抗体分子（またはそれらと95～99%の同一性を有する配列）および表6Aまたは6BのCD22特異的抗体分子（またはそれらと95～99%の同一性を有する配列）を含む。ある実施形態において、B細胞阻害剤は、表4または5の1つまたは複数のCDR（またはそれに対する1、2、3、4、5または6個の変更、例えば置換を有する配列）を有するCD19特異的抗体分子、および表7A、7B、7C、8Aまたは8BのCDR（またはそれに対する1、2、3、4、5または6個の変更、例えば置換を有する配列）を有するCD22特異的抗体分子を含む。

【0198】

mTOR阻害剤

一実施形態において、CAR分子、例えば、CD19 CAR分子、CD20 CAR分子またはCD22 CAR分子、例えば本明細書で説明されるCAR分子、を発現する細胞であって、適宜、B細胞阻害剤と組み合わせて投与される前記細胞は、免疫を増強する低い用量のmTOR阻害剤と共投与される。理論に縛られることは望まないが、免疫を増強する低い用量（例えば、免疫系を完全に抑制するには不十分であるが免疫機能を向上させるには十分な用量）での処置は、PD-1陽性T細胞の減少、またはPD-1陰性細胞の増加を伴うと考えられる。PD-1陰性T細胞ではなくPD-1陽性T細胞は、PD-1リガンド、例えば、PD-L1またはPD-L2を発現する細胞との接触によって排除することができる。

【0199】

一実施形態において、このアプローチは、対象における本明細書で説明されるCAR細胞の性能を最適化するのに使用できる。理論に縛られることは望まないが、一実施形態において、内因性の非改変免疫エフェクター細胞、例えばT細胞の性能が、向上すると考えられる。理論に縛られることは望まないが、一実施形態において、CARを発現する細胞

の性能が、向上すると考えられる。他の実施形態において、CARを発現するように加工された、または加工されると予想される細胞、例えば、T細胞は、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、またはPD1陽性免疫エフェクター細胞、例えばT細胞に対するPD1陰性免疫エフェクター細胞、例えばT細胞の比率を増加させる量のmTOR阻害剤と接触させることによって、エクスピボで処置され得る。

【0200】

一実施形態において、免疫を増強する低い用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001、または触媒性阻害剤の投与は、本明細書で説明されるCARを発現する細胞、例えば、T細胞の投与の前に開始される。一実施形態において、PD1陰性免疫エフェクター細胞、例えばT細胞のレベル、またはPD1陽性免疫エフェクター細胞、例えばT細胞に対するPD1陰性免疫エフェクター細胞、例えばT細胞の比率が、少なくとも一時的に増加するように、CAR細胞は、十分な時間、または十分なmTOR阻害剤投与の後に投与される。

10

【0201】

一実施形態において、CARを発現するように加工される細胞、例えば、T細胞は、対象における、または対象から回収された、PD1陰性免疫エフェクター細胞、例えばT細胞のレベル、またはPD1陽性免疫エフェクター細胞、例えばT細胞に対するPD1陰性免疫エフェクター細胞、例えばT細胞の比率が少なくとも一時的に増加するように、十分な時間の後に、または十分な免疫を増強する低い用量のmTOR阻害剤投与の後に回収される。

20

【0202】

本明細書で説明される組成物または方法のさらなる特徴または実施形態は、下記の1つまたは複数を包含する。

【0203】

実施形態において、B細胞阻害剤は、CD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3またはROR1の1つまたは複数の阻害剤を含む。実施形態において、前記B細胞阻害剤は、CD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3またはROR1の1つまたは複数の阻害剤に結合するCAR分子を発現する1つまたは複数の細胞の有効な数を含む。

【0204】

実施形態において、CD19に結合するCAR分子を発現する1つまたは複数の細胞は、1つまたは複数のB細胞阻害剤と同時に、その前に、またはその後に投与される。

30

【0205】

実施形態において、対象は、生体試料中の表29に列挙した1つまたは複数のマーカーの参照レベルと比較して決定されたレベルとの差、例えば統計学的に有意な差を有するか、またはこれを有するものとして同定される。

【0206】

実施形態において、対象は、生体試料において、CD19の特徴、例えば、フレームシフトもしくは未成熟終止コドンまたは両方を引き起こす突然変異に関して、参照特徴と比較して決定された特徴との差を有するか、またはこれを有するものとして同定される。

40

【0207】

実施形態において、対象は、生体試料中のTreg細胞の参照レベルと比較して決定されたレベルとの差、例えば統計学的に有意な差を有するか、または有するものとして同定される。

【0208】

ある実施形態において、方法は、対象が、(i)表29に列挙した1つまたは複数のマーカーのレベルまたは活性、(ii)CD19の特徴、例えば突然変異、例えば、フレームシフトもしくは未成熟終止コドンまたは両方を引き起こす突然変異、あるいは(iii)生体試料中のT_{REG}細胞のレベル、の1つまたは複数の阻害剤に関して、参照レベルと比較して決定されたレベルとの、または参照特徴と比較して決定された特徴との差、例えば統計

50

学的に有意な差を有するものとして同定された場合、キメラ抗原受容体（CAR）療法、例えば本明細書で説明されるようなCAR療法、例えば、CD19 CAR発現細胞を含む治療および適宜1つまたは複数のB細胞阻害剤の、治療有効用量を前記対象に投与することを含む。ある実施形態において、方法は、対象が、（i）表29に列挙した1つまたは複数のマーカーのレベル、（ii）CD19の特徴、例えば突然変異、例えば、フレームシフトもしくは未成熟終止コドンまたは両方を引き起こす突然変異、あるいは（iii）生体試料中のT_{REG}細胞のレベルまたは活性、の1つまたは複数に関して、参照レベルと比較して決定されたレベルとの、または参照特徴と比較して決定された特徴との差、例えば統計学的に有意な差を有するかどうかを判定すること、およびキメラ抗原受容体（CAR）療法、例えば本明細書で説明されるようなCAR療法、例えば、CD19 CAR発現細胞を含む治療および適宜1つまたは複数のB細胞阻害剤の、治療有効用量を前記対象に投与することを含む。ある実施形態において、方法は、対象が、（i）表29に列挙した1つまたは複数のマーカーのレベル、（ii）CD19の特徴、例えば突然変異、例えば、フレームシフトもしくは未成熟終止コドンまたは両方を引き起こす突然変異、あるいは（iii）生体試料中のT_{REG}細胞のレベルまたは活性、の1つまたは複数に関して、参照レベルと比較して決定されたレベルとの、または参照特徴と比較して決定された特徴との差、例えば統計学的に有意な差を有するかどうかを判定すること、およびキメラ抗原受容体（CAR）療法、例えば本明細書で説明されるようなCAR療法、例えば、CD19 CAR発現細胞を含む治療および適宜1つまたは複数のB細胞阻害剤の、治療有効用量を前記対象に投与することを含む。ある実施形態において、方法は、キメラ抗原受容体（CAR）療法、例えば本明細書で説明されるCAR療法、例えば、CD19 CAR発現細胞を含む治療の、治療有効用量を前記対象に投与すること；対象が、（i）表29に列挙した1つまたは複数のマーカーのレベル、（ii）CD19の特徴、例えば突然変異、例えば、フレームシフトもしくは未成熟終止コドンまたは両方を引き起こす突然変異、あるいは（iii）生体試料中のT_{REG}細胞のレベルまたは活性、の1つまたは複数に関して、参照レベルと比較して決定されたレベルとの、または参照特徴と比較して決定された特徴との差、例えば統計学的に有意な差を有するかどうかを判定すること；および差が存在した場合、1つまたは複数のB細胞阻害剤の治療有効用量を対象に投与することを含む。

【0209】

実施形態において、対象は、生体試料中のT_{reg}細胞の決定されたレベルと参照レベル間に増加、例えば統計学的に有意な増加を有するか、または有するものとして同定される。

【0210】

実施形態において、対象は、CD19に結合するCAR分子、例えばCD19 CARを発現する1つまたは複数の細胞での処置後に再発したか、または再発したものとして同定される。

【0211】

実施形態において、前記B細胞阻害剤は、CD10に結合するCAR分子、例えば本明細書で説明されるようなCD10 CAR；CD20に結合するCAR分子、例えば本明細書で説明されるようなCD20 CAR；CD22に結合するCAR分子、例えば本明細書で説明されるようなCD22 CAR；CD34に結合するCAR分子、例えば本明細書で説明されるようなCD34 CAR；CD123に結合するCAR分子、例えば本明細書で説明されるようなCD123 CAR；FLT-3に結合するCAR分子、例えば本明細書で説明されるようなFLT-3 CAR；またはROR1に結合するCAR分子、例えば本明細書で説明されるようなROR1 CAR、を発現する1つまたは複数の細胞の有効な数を含む。

【0212】

実施形態において、CD19阻害剤は、CD19結合ドメインと、膜貫通ドメインと、刺激ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインとを含む抗体または抗体フラグメントを

含み、前記CD19結合ドメインは、表2または3に列挙したいずれかのCD19軽鎖結合ドメインアミノ酸配列の軽鎖相補性決定領域1（LC CDR1）、軽鎖相補性決定領域2（LC CDR2）および軽鎖相補性決定領域3（LC CDR3）の1つまたは複数（例えば、3つ全て）、ならびに表2または3に列挙したいずれかのCD19重鎖結合ドメインアミノ酸配列の重鎖相補性決定領域1（HC CDR1）、重鎖相補性決定領域2（HC CDR2）および重鎖相補性決定領域3（HC CDR3）の1つまたは複数（例えば、3つ全て）を含む。

【0213】

実施形態において、CD19 CARは、表2または3に列挙した軽鎖可変領域、および表2または3に列挙したいずれかの重鎖可変領域を含む。

10

【0214】

実施形態において、CD19阻害剤は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11および配列番号12からなる群より選択される配列またはそれらと95～99%の同一性を有する配列を含む、CD19結合ドメインを含む。実施形態において、CD19 CARは、配列番号58のポリペプチドを含む。

【0215】

実施形態において、B細胞阻害剤は、CD20 CARを含み、前記CD20 CARは、CD20結合ドメインと、膜貫通ドメインと、刺激ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインとを含む抗体または抗体フラグメントを含み、前記CD20結合ドメインは、表13に列挙したいずれかのCD20軽鎖結合ドメインアミノ酸配列の軽鎖相補性決定領域1（LC CDR1）、軽鎖相補性決定領域2（LC CDR2）および軽鎖相補性決定領域3（LC CDR3）の1つまたは複数、ならびに表12Aまたは12Bに列挙したいずれかのCD20重鎖結合ドメインアミノ酸配列の重鎖相補性決定領域1（HC CDR1）、重鎖相補性決定領域2（HC CDR2）および重鎖相補性決定領域3（HC CDR3）の1つまたは複数を含む。

20

【0216】

実施形態において、B細胞阻害剤は、CD22 CARを含み、前記CD22 CARは、CD22結合ドメインと、膜貫通ドメインと、刺激ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインとを含む抗体または抗体フラグメントを含み、前記CD22結合ドメインは、表8A、8B、10Aおよび／または10Bに列挙したいずれかのCD22軽鎖結合ドメインアミノ酸配列の軽鎖相補性決定領域1（LC CDR1）、軽鎖相補性決定領域2（LC CDR2）および軽鎖相補性決定領域3（LC CDR3）の1つまたは複数、ならびに表7A、7B、7C、9Aおよび／または9Bに列挙したいずれかのCD22重鎖結合ドメインアミノ酸配列の重鎖相補性決定領域1（HC CDR1）、重鎖相補性決定領域2（HC CDR2）および重鎖相補性決定領域3（HC CDR3）の1つまたは複数を含む。

30

【0217】

実施形態において、CD22 CARは、表10Aまたは10Bに列挙したいずれかの軽鎖可変領域を含む。実施形態において、CD22 CARは、表9Aまたは9Bに列挙したいずれかの重鎖可変領域を含む。実施形態において、CD22 CARは、表10Aまたは10Bに列挙したいずれかの軽鎖可変領域、および表9Aまたは9Bに列挙したいずれかの重鎖可変領域を含む。

40

【0218】

実施形態において、B細胞阻害剤はCARを含み、前記CARは、抗原結合ドメインと、膜貫通ドメインと、刺激ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインとを含む抗体または抗体フラグメントを含み、前記抗原結合ドメインは、軽鎖相補性決定領域1（LC CDR1）、軽鎖相補性決定領域2（LC CDR2）および軽鎖相補性決定領域3（LC CDR3）の1つまたは複数（例えば全て）、ならびに重鎖相補性決定領域1（HC CDR1）、重鎖相補性決定領域2（HC CDR2）および重鎖相補性決定領域3（H

50

C CDR3)の1つまたは複数(例えば全て)を含む。

【0219】

実施形態において、B細胞阻害剤は、s c F vを含むCARを含む。実施形態において、B細胞阻害剤は、膜貫通ドメインを含むCARを含み、前記膜貫通ドメインは、T細胞受容体のアルファ、ベータまたはゼータ鎖、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137およびCD154からなる群より選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含む。実施形態において、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接続されている。実施形態において、ヒンジ領域は、配列番号14、またはそれと95〜99%の同一性を有する配列を含む。実施形態において、共刺激ドメインは、OX40、CD2、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、ICOS(CD278)および4-1BB(CD137)からなる群より選択されるタンパク質から得られる機能的なシグナル伝達ドメインである。実施形態において、共刺激ドメインは、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、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アルファ、CD8ベータ、IL2Rベータ、IL2Rガンマ、IL7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、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、およびCD83と特異的に結合するリガンドからなる群より選択されるタンパク質から得られる機能的なシグナル伝達ドメインである。実施形態において、共刺激ドメインは、配列番号16または配列番号51の配列を含む。実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインは、4-1BBの機能的なシグナル伝達ドメインおよび/またはCD3ゼータの機能的なシグナル伝達ドメインを含む。

【0220】

実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号16の配列、および/または配列番号17もしくは配列番号43の配列を含む。実施形態において、CARは、リーダー配列をさらに含む。実施形態において、リーダー配列は、配列番号13を含む。

【0221】

実施形態において、CAR分子を発現する細胞は、T細胞またはNK細胞を含む。

【0222】

実施形態において、CD19発現に関連する疾患は、がんもしくは悪性腫瘍などの増殖性疾患、または脊髄形成異常、骨髓異形成症候群もしくは前白血病状態などの前がん状態から選択されるか、またはCD19発現に関連する非がん関連の徴候である。実施形態において、疾患は、血液がん、急性白血病、B細胞急性リンパ芽球性白血病(BALL)、T細胞急性リンパ芽球性白血病(TALL)、小リンパ球性リンパ腫(SLL)、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、慢性白血病、慢性骨髓性白血病(CML)または慢性リン

10

20

30

40

50

パ球性白血病（CLL）の1つまたは複数である。

【0223】

実施形態において、方法は、CAR分子を発現する細胞の効能を増加させる薬剤を投与することをさらに含む。実施形態において、方法は、CAR分子を発現する細胞の投与に関連する1つまたは複数の副作用を改善する薬剤を投与することをさらに含む。実施形態において、CAR分子を発現する細胞は、CD19に関連する疾患を処置する薬剤と組み合わせて投与される。

【0224】

本明細書で説明される方法、例えば、哺乳動物に抗腫瘍免疫を提供する方法、または哺乳動物を処置する方法による、実施形態において、哺乳動物は、以前に投与されたがん治療、例えば、CD19 CAR療法、またはCD19 CAR発現細胞以外のがん治療に対する、非応答例、部分応答例または完全応答例である。実施形態において、哺乳動物は、以前に投与されたがん治療、例えば、CD19 CAR療法、またはCD19 CAR発現細胞以外のがん治療に対する、非再発例、部分再発例または完全再発例である。実施形態において、哺乳動物は、CD19陰性がん細胞またはCD19陽性がん細胞を有し、前記哺乳動物は、CD22陽性、CD123陽性、FLT-3陽性、ROR-1陽性、CD79b陽性、CD179b陽性、CD79a陽性、CD10陽性、CD34陽性および／またはCD20陽性がん細胞をさらに有してもよい。実施形態において、哺乳動物は、再発ALLがんを有する。実施形態において、哺乳動物は、CD19 CAR発現細胞を以前に投与されており、CD19 CAR処置が無効である。

【0225】

実施形態において、薬剤は、mTOR阻害剤であり、対象は、免疫を増強する低い用量のmTOR阻害剤、例えばRAD001またはラパマイシンを投与される。実施形態において、mTOR阻害剤は、RAD001である。実施形態において、用量は、アロステリックmTOR阻害剤および触媒性mTOR阻害剤を含む。実施形態において、mTOR阻害剤は、対象の末梢血中の、または対象から単離されたT細胞の製剤中の、PD-1陽性T細胞の比率を減少させる、PD-1陰性T細胞の比率を増加させる、またはPD-1陰性T細胞／PD-1陽性T細胞の比率を増加させるのに十分な時間にわたり投与される。

【0226】

実施形態において、CARを発現するように加工される免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞は、十分な時間の後に、または免疫を増強する低い用量のmTOR阻害剤の十分な投与の後に回収され、その結果、対象における、または対象から回収された、PD1陰性免疫エフェクター細胞、例えばT細胞のレベル、または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細胞の比率は、少なくとも一時的に増加した。実施形態において、mTOR阻害剤の前記用量は、例えばp70S6K阻害によって測定して、少なくとも5%であるが90%以下のmTOR阻害を伴う。実施形態において、mTOR阻害剤の前記用量は、例えばp70S6K阻害によって測定して、少なくとも10%であるが40%以下のmTOR阻害を伴う。

【0227】

ある実施形態において、方法は、チェックポイント阻害剤を投与することをさらに含む。実施形態において、対象は、CAR T療法の開始前に、薬剤、例えば、mTOR阻害剤および／またはチェックポイント阻害剤での前処置を受ける。実施形態において、対象は、薬剤、例えば、mTOR阻害剤および／またはチェックポイント阻害剤での同時処置を受ける。実施形態において、対象は、CAR T療法後、薬剤、例えば、mTOR阻害剤および／またはチェックポイント阻害剤での処置を受ける。

【0228】

実施形態において、決定されたレベルまたは決定された特徴は、CAR T療法の前に、それと同時に、またはその過程で得られる。

【0229】

実施形態において、方法は、対象が再発する可能性があるかどうか、または再発したか

10

20

30

40

50

どうかを示す、遺伝子シグネチャーをアッセイすることを含む。実施形態において、方法は、CAR発現細胞での処置、例えばCAR T処置（例えば、CAR T 19処置、例えばCTL 019治療）での処置の前に、CAR処置に対する再発を予示する対象における遺伝子シグネチャーをアッセイすることを含む。実施形態において、1つまたは複数のマーカーのレベルは、表29に列挙した少なくとも2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つまたは10のマーカーのレベルである。実施形態において、マーカーのレベルは、mRNAレベルまたは可溶性タンパク質のレベルを含む。

【0230】

実施形態において、CD19の特徴は、エキソン2における突然変異、例えば、フレームシフトもしくは未成熟終止コドンまたは両方を引き起こす突然変異である。実施形態において、T_{REG}細胞のレベルは、T_{REG}細胞によって発現されるマーカーについて試料を染色することによって決定される。実施形態において、T_{REG}細胞のレベルは、対象の体内の関連位置における、例えば、がん微小環境におけるTreg細胞のレベルである。

10

【0231】

実施形態において、方法は、アフェレーシスの前に対象におけるT_{REG}シグネチャーを減少させることをさらに含む。実施形態において、方法は、例えば、シクロホスファミド、抗GITR抗体または両方を対象に投与することによって、対象におけるT_{REG}シグネチャーを減少させることをさらに含む。実施形態において、方法は、CAR発現細胞生成物製造のための細胞の収集前に、シクロホスファミド、抗GITR抗体または両方で対象を前処置することを含む。実施形態において、方法は、対象から試料を得ることをさらに含み、前記試料は、細胞画分（例えば、血液を含む）、組織画分、アフェレーシス試料、または骨髓試料を含む。

20

【0232】

実施形態において、細胞は、細胞内シグナル伝達ドメインからの正のシグナルを含む第二のポリペプチドと会合している、阻害分子の少なくとも一部を含む第一のポリペプチドを含む阻害分子を発現する。実施形態において、阻害分子は、PD1の少なくとも一部を含む第一のポリペプチドと、共刺激ドメインおよび一次シグナル伝達ドメインを含む第二のポリペプチドとを含む。

【0233】

実施形態において、方法は、細胞で処置された対象が、再発する可能性があるかどうか、または再発したかどうかを示す、遺伝子シグネチャーをアッセイすることを含む。実施形態において、方法は、対象への注入の前に細胞における遺伝子シグネチャーをアッセイすることを含む。実施形態において、方法は、形質導入された細胞を含む細胞集団のT_{REG}シグネチャーを減少させることをさらに含む。実施形態において、T_{REG}シグネチャーを減少させることは、細胞集団に対してCD25枯渇を実施することを含む。

30

【0234】

実施形態において、対象は、哺乳動物、例えばヒトである。

【0235】

特に他の定義がない限り、本明細書において使用される全ての専門用語や科学用語は、本発明が属する分野の当業者が一般的に理解するものと同じ意味を有する。以下で好適な方法および材料を説明するが、本発明の実施または試験において、本明細書で説明したものに類似した、または同等な方法および材料を使用することができる。本明細書の中で（例えば、配列データベース参照番号に関して）言及される全ての公報、特許出願、特許および他の参考文献は、参照によりそれら全体が組み入れられる。例えば、本明細書において、例えば本明細書のいずれかの表の中で参照される全てのGenBank、UniGeneおよびEntrez配列は、参照により組み入れられる。特に他の明記がない限り、本明細書に明記される配列受託番号は、本明細書におけるあらゆる表中のものを含めて、2015年4月8日現在のデータベースエントリーを指す。1つの遺伝子またはタンパク質について複数の配列受託番号が参照用に記載されている場合、それらの配列変異体の全

40

50

てが包含される。

【0236】

加えて、材料、方法、および実施例は単なる例示にすぎず、限定することを意図しない。

【0237】

見出し、小見出しまたは番号付けもしくは文字で分類された要素、例えば、(a)、(b)、(i)などは、単に読解しやすくするために示されたにすぎない。この文書における見出しまたは番号付けもしくは文字で分類された要素の使用は、工程または要素をアルファベット順に実行すること、または工程または要素が必ずしも互いに不連続であることを必要としない。

10

【0238】

本発明の他の特色、目的、および利点は、説明および図面から、ならびに特許請求の範囲から明らかであると予想される。

【図面の簡単な説明】

【0239】

【図1】図1および図1Bは、代表的なCARの模式図である。

【図2】図2は、腫瘍に存在するCD19発現細胞を示すホジキンリンパ腫の免疫組織化学的分析の画像を含む。左側パネルは倍率1倍であり、右側パネルは倍率20倍である。

【図3】図3は、ホジキンリンパ腫を有する患者におけるCAR T19治療の治療効率を評価するための研究の実験構成の模式図である。

20

【図4】図4A、4B、4Cおよび4Dは、T細胞におけるPD1およびCAR19発現のフローサイトメトリー分析を示す。図4Aおよび4Bは、CAR T療法に対する完全応答例(CR)または非応答例(NR)である対象由来のCD4+T細胞におけるPD-1およびCAR19発現の分布を実証する代表的なフローサイトメトリープロファイルである。図4Cは、CAR T療法に対する異なる応答を有する対象群由来のCD4+T細胞集団におけるPD1細胞のパーセントを示すグラフである。図4Dは、CAR T療法に対する異なる応答を有する対象群由来のCD8+T細胞集団におけるPD1細胞のパーセントを示すグラフである。

【図5】図5Aおよび5Bは、CAR T療法に対する異なる応答を有する対象群由来のCD4およびCAR19発現細胞(図5A)またはCD8およびCAR19発現細胞(図5B)におけるPD1発現の分布を示す。

30

【図6】図6は、CAR T療法に対する完全応答例(CR)または非応答例(NR)である対象由来のT細胞におけるPD1、CAR19、LAG3およびTIM3発現のフローサイトメトリー分析を示す。

【図7】図7Aおよび7Bは、CAR T療法に対する異なる応答を有する対象群由来のPD1およびLAG3発現(図7A)またはPD1およびTIM3発現(図7B)の分布を示す。

【図8】図8は、CAR T19を受けた骨髄腫患者由来の形質細胞IgA免疫表現型解析を示し、CAR T19療法に対する応答を実証する。

【図9】図9Aおよび9Bは、癌細胞株およびCAR T細胞上のIL-7受容体(CD127)発現を示す。CD127発現は、3つの癌細胞株: RL(マントル細胞リンパ腫)、JEKO(Jeko-1としても知られている、マントル細胞リンパ腫)、およびNalm-6(B-ALL)におけるフローサイトメトリー分析によって測定された(図9A)。CD127の発現は、NSGマウスに注入され、循環していたCD3陽性(CAR T)細胞についてフローサイトメトリー分析によって測定された(図9B)。

40

【図10】図10A、図10B、および図10Cは、CAR T19治療、およびその後のIL-7治療後の抗腫瘍応答を示す。0日目にルシフェラーゼを発現するマントルリンパ腫細胞株(RL-luc)を生着させたNSGマウスは、6日目に様々な用量のCAR T19細胞で処置され、腫瘍負荷をモニターされた。マウスは4群に分けられ、CAR T19細胞を受けず、 0.5×10^6 個のCAR T19細胞(CAR T19 0.5E6)、

50

1×10^6 個CART19細胞(CART19 1E6)、または 2×10^6 個CART19細胞(CART19 2E6)を受けた。CART処置後の腫瘍負荷は、生物発光(平均BLI)の検出によって測定された(図10A)。 0.5×10^6 個のCART19細胞(CART19 0.5E6)または 1×10^6 個のCART19細胞(CART19

1E6)を受けるマウスは無作為化され、組換えヒトIL-7(rhIL-7)を受けたか、または受けなかった。ここでは平均生物発光(BLI)によって表される腫瘍負荷は、85日目に開始されたIL-7を用いて処置された、図10Aからの3匹のマウス(#3827、#3829および#3815、示された初期CART19用量を受けた)についてモニターされた(図10B)。IL-7は、週に3回、IP注射により投与された。ここでは85日前(PRE)および115日後(POST)の平均生物発光(BLI)によって表される腫瘍負荷は、IL-7(CTRL)を受けなかったマウスとIL-7処置を受けたマウス(IL-7)の間で比較された(図10C)。

10

【図11】図11Aおよび11Bは、IL-7処置後のT細胞動態を示す。血液中に検出されるヒトT細胞のレベルは、IL-7を受けたマウスまたは対照マウスのそれぞれについてモニターされた(図11A)。血液中に検出されるCART19細胞(CD3+細胞)のレベルは、IL-7処置の開始前(PRE)および14日後(14日目)に測定された(図11B)。

【図12】図12は、2つの例となるRCAR配置の構造を描いている。抗原結合メンバーは抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびスイッチドドメインを含む。細胞内結合メンバーは、スイッチドドメイン、共刺激シグナル伝達ドメインおよび一次シグナル伝達ドメインを含む。2つの配置は、本明細書で説明される第1および第二のスイッチドドメインが、抗原結合メンバーおよび細胞内結合メンバーに関して異なる方向付けで可能であることを示している。他のRCAR配置は本明細書にさらに記載されている。

20

【図13】図13は、抗C22および抗CD19結合ドメインを有する二重特異性CARについての2つのコンストラクトを示す。「4G4S」は、リンカー配列GGGGSGGGSGGGGGSGGGGGSG(配列番号1311)を表す。

【図14】図14は、NFATアッセイにおける二重特異性CD19/CD22 CARコンストラクトの活性を示すグラフである。

【図15】図15A、15B、および15Cは、様々な腫瘍標的細胞株の存在下でのCAR T細胞活性化の程度(相対発光によって測定される)を示すグラフである。図15Aは、CD20を発現する標的細胞株であるDaudiの存在下でのCAR T細胞活性化を示す。図15Bは、CD20を発現する標的細胞株であるRajiの存在下でのCAR T細胞活性化を示す。図15Cは、CD20を発現しない陰性対照であるK562の存在下でのCAR T細胞活性化を示す。

30

【図16】図16は、遺伝子シグネチャー分析の概要を示す例示的な模式図である。略述すると、各遺伝子セットについて、2群統計モデルを適用して、メタ遺伝子がCR、PRおよびNRの間で統計的に異なるかどうかを決定した。CRは、休止 T_{EFF} 細胞によく似ているが、NRは、活性化 T_{EFF} 細胞によく似ている。活性化 T_{EFF} 細胞と休止 T_{EFF} 細胞において上方調節された遺伝子はまたNRにおいても上方調節される。

【図17】再発しなかった完全応答例(CR)と比較して、再発例(R)となった完全応答例である小児患者由来の試料において、 T_{REG} 遺伝子が高発現レベルを有する例示的な結果を示す($p=0.000215$)。x軸は、レスポンス群による試料であり、CR=再発のない完全応答例であり、R=応答例である。y軸は、標準化されたメタ遺伝子発現スコアである。

40

【図18】図18A、図18B、および図18Cは、腫瘍標的細胞株の存在下でのCAR T細胞活性化を示すグラフである。図18Aにおいて、CARを発現するJNL細胞は、示されたE対T比でDaudi CD22を発現する標的細胞株と混合された。図18Bにおいて、CARを発現するJNL細胞は、示されたE対T比でRaji CD22を発現する標的細胞株と混合された。図18Cにおいて、CARを発現するJNL細胞は、示されたE対T比で陰性対照であるK562細胞株と混合された。

50

【図19-1】図19は、細胞表面上のキメラ抗原受容体の原発性T細胞発現を示すグラフである。タンパク質-L-ビオチン/SA-PE（図19-1および図19-2）およびrhCD22-Fc/抗Fc488（図19-3および19-4）を使用して、CAR表面発現レベルを決定した。CARを有さない細胞を陰性対照として使用した。

【図19-2】同上

【図19-3】同上

【図19-4】同上

【図20】図20A、20B、20C、20D、20E、および20Fは、原発性T細胞腫瘍標的の死滅アッセイを示すグラフである。CD22 CARで活性化され形質導入された原発性T細胞は、示された比率でルシフェラーゼを安定に発現する標的細胞株と混合され、標的細胞死滅を測定した。死滅率は、hCD22-8（28.8%形質導入）に対して標準化された。CD22を発現する細胞株であるRaji（図20A）、SEM（図20B）、K562-hCD22（図20C）、Dauidi（図20D）、およびNalm6（図20E）を使用し、陽性対照CD22 CAR m971（m971-HL）、陰性対照CAR m971-LH、および陰性対照としての非形質導入T細胞と比較して、機能CD22 CARクローンを試験した。K562細胞株はCD22を発現せず、陰性対照として使用された（図20F）。

【図21-1】図21A、図21B、図21C、図21D、図21E、および図21Fは、CD22 CARクローンによる有意な炎症促進性サイトカイン応答の誘導を示すグラフである。原発性T細胞死滅アッセイを用いて、炎症促進性サイトカインであるIFN- γ 、IL-2およびTNF α を産生するCD22 CARクローンの能力を決定した。エフェクター細胞は、異なる標的細胞株のそれぞれと20時間共培養され、28.8%の形質導入に対して標準化された。上清は、Raji CD22を発現する標的細胞（図21A）、Nalm6 CD22を発現する標的細胞（図21B）、Dauidi CD22を発現する標的細胞（図21C）、SEM CD22を発現する標的細胞（図21D）、K562-hCD22 CD22を発現する標的細胞（図21E）、およびK562非CD22発現細胞（陰性対照）（図21F）から、2.5対1および10対1のE対T比を変化させて異なる培養物から採取された。

【図21-2】同上

【図21-3】同上

【図22】図22は、フローサイトメトリーによって検出された再発したALLにおける様々なB細胞抗原の発現を示すグラフである。16r/r患者由来の試料は、以下のマーカー：CD19（16pts）、CD22（16pts）、CD123（16pts）、FLT-3（9pts）、ROR-1（3pts）、CD79b（15pts）、CD179b（8pts）、CD79a（16pts）、CD10（16pts）、CD34（16pts）、およびCD20（16pts）についてマルチパラメトリックフローサイトメトリーによりスクリーニングされた。CD22およびCD123は、r/r ALL患者の芽球において、高く（>60%）および均一に発現した（バーは発現%中央値を示し、それぞれ99.50%、98.80%、95.70%、72.00%、47.00%、15.00%、13.45%、4.200%、98.00%、87.65%、および7.00%である）。各患者について、示されたマーカーを発現する細胞のパーセンテージは、単一のデータポイントとして示される。

【図23】図23は、CART19処置前（ベースライン）と処置後（CD19陰性再発）の両方で、CD19陰性白血病で再発した6人の患者におけるCD22およびCD123の発現を示す一連のグラフである。全ての分析において、目的とする集団に順方向対側方散乱特性、続くシングルレットゲーティングに基づいてゲートをかけ、生存細胞にLive Dead Aqua（Invitrogen）を用いてゲートをかけた。タイムゲーティングが、品質管理のために含まれた。ゲーティング戦略は、タイムゲーティング→SSC低→シングルレット→生存→CD45dim→CD10+を含む。

【図24】図24は、CART19処置後のCD19陰性疾患で再発した患者由来の芽球

におけるCD22の発現を示す一連のグラフである（臨床試験UPCC04409/CHP959、患者UPNは四角のボックスに示されている）。一番上の列は、CART19処置前の芽球におけるCD19およびCD22発現を示し、一方、一番下の列は、再発時の疾患表現型を示す。CD22発現はまた、CD19発現が失われた場合、再発時に維持された。

【図25】図25は、CART19処置後のCD19陰性疾患で再発した患者由来の芽球におけるCD123の発現を示す1セットのグラフである（臨床試験UPCC04409/CHP959、患者UPNは四角のボックスに示される）。一番上の列は、CART19処置前の芽球におけるCD19およびCD123発現を示し、一方、一番下の列は、再発時の疾患表現型を示す。CD123発現は、ほとんどの患者において再発時に維持されたが、一方、CD19発現は失われた。

10

【図26】図26は、CD19陰性疾患で再発した患者におけるCART19処置の前後のCD19、CD22、およびCD123の発現中央値を示すグラフである。CD19発現は再発時に失われたが（94.25%対0%、 $p=0.0009$ ）、CD22（99.20%対97.30%、 $p=ns$ ）およびCD123（63.00%対48.75%、 $p=ns$ ）は依然として発現した。各患者について、示されたマーカーを発現する細胞のパーセンテージは、単一のデータポイントとして示される。

【図27】図27Aおよび図27Bは、16人のr/r患者由来の試料、およびCART19治療後のCD19陰性疾患で再発した4人の患者由来の試料におけるCD22発現を示す一連のグラフである。試料は、B細胞マーカーであるCD22についてマルチパラメトリックフローサイトメトリーによりスクリーニングされた。CD22は、15人中11人のr/r ALL患者の芽球において高く（>60%）および均一に発現した（図27A）。CD22は、CD19陰性白血病で再発した4人中4人の患者において、CART19処置前（ベースライン）と処置後（CD19陰性再発）の両方で陽性であった（2ptsを示す）（図27B）。ゲーティング戦略：SSC低→シングレット→生存→CD45dim。

20

【図28】図28A、28B、および28Cは、CD19およびCD22発現におけるCD22 CARTの効果を示す一連のグラフである。異なる鎖配向（HからLおよびLからH）を用いて生成された2つのCAR22コンストラクトの概要を示す（図28A）。抗CD22 scFv（m971）をコドン最適化し、CD8ヒンジ、41-BB共刺激およびCD3ゼータシグナリングドメインを含有するマウスCAR19ベクターにクローニングした（図28A）。NALM6 ALL細胞株におけるCD19、CD22およびアイソタイプ対照の発現は、平均蛍光強度（MFI）（図28B）および抗体結合能（ABC）として示される（図28C）。NALM-6において、CD19の発現はCD22より高かった。しかしながら、ほとんどの原発性ALL試料において、CD19およびCD22発現は同様であった（図27A参照）。

30

【図29】図29A、図29Bおよび図29Cは、（UTD細胞とともに）CART22およびCART19を生成するための正常なドナーT細胞の増殖を示す一連のグラフである。集団倍加（PD）対培養の日数：増殖の終了時（11日目）に、CART22および対照T細胞は約4.5PDに達し、CART19またはUTD細胞と比較して有意差はなかった（図29A）。T細胞容量（f1）対培養日数：6日目にはピーク容量（約450f1）であり、一方、翌日、容量は、細胞が回収され、凍結されたときには300f1に減少した。CART19またはUTD細胞と比較して、有意な差異は観察されなかった（図29B）。増殖の11日目のCD4陽性およびCD8陽性T細胞のCAR発現を図29Cに示す。CAR発現についてのゲーティングは、UTDに基づいている。ゲーティング戦略：FSS対SSCリンパ球→シングレット→生存→CD3+。

40

【図30】図30は、細胞質内サイトカイン産生を伴うCD107a脱顆粒アッセイを示す一連のグラフである。CART19、CART22 HtoLおよびLtoHを異なる標的（単独、PMA/イオノマイシン、MOLM-14およびNALM-6）と共培養した。CART19およびCART22 HtoLは、ALL細胞株（NALM-6）と共

50

培養し、陰性対照と共培養しなかった場合には、高レベルのCD107a脱顆粒、IL-2、IFN γ およびTNF α 産生を示す。UTDおよびCART22 LtoHは、脱顆粒およびサイトカイン産生を示さなかった。ゲーティング戦略：FSS対SSCリンパ球→シングレット→生存→CD3+。

【図31】図31は、ルシフェラーゼに基づく死滅アッセイを示すグラフである。UTD細胞ではなく、CART22およびCART19 HtoLは、24時間共培養した場合にNALM-6細胞を溶解することができた。細胞毒性活性とE対T比の間の直接相関が観察され、2対1のE対T比（CART19およびCART22について78%および75%の死滅）でより良好な抗白血病効果であった。

【図32】図32Aおよび32Bは、CFSEベースの増殖アッセイを示す一連のグラフである。ALL細胞株であるNALM-6を用いたCART22およびCART19の5日間の共培養は、有意なT細胞増殖（それぞれ94%および92.9%）をもたらした。また、対照が示されている（TCM=培地のみ、P-I=PMA/イオノマイシン、MOLM-14）（図32A）。CART19およびCART22におけるCFSE希釈の動態を示すヒストグラムにおいて、ほとんどのT細胞が複数の増殖サイクルを経た（図32B）。ゲーティング戦略：FSS対SSCリンパ球→シングレット→生存→CD3+。

【図33】図33は、サイトカイン産生を示す一連のグラフである。CART22、CART19およびUTDを異なる照射標的（単独、PMA/イオノマイシン、MOLM-14およびNALM-6）とともに24時間インキュベートした。ALL細胞株であるNALM-6と共培養した場合、CART22およびCART19 HtoLのみが複数のサイトカイン（ここでは、IFN γ 、IL-2、GM-CSF、TNF α およびMIP1bを示す）を放出することができた。結果は、平均強度蛍光（MFI）として示される。

【図34】図34Aおよび34Bは、原発性ALL芽球を伴うT細胞脱顆粒を示す一連のグラフである。CART22、CART19およびUTD細胞は、ベースライン時、および患者がCD19陰性疾患で再発した場合のCART19処置後、ALL患者由来の芽球（CHP-959-101）と4時間、同時インキュベートされた。CART19とCART22の両方は、ベースライン時（芽細胞がCD19+およびCD22+である場合）に脱顆粒することができたが、再発時にはCART22のみが脱顆粒していた（疾患がCD19陰性の場合）（図34A）。再発時にCHP101試料とともにインキュベートした後、CD8陽性およびCD8陰性CART19およびCART22エフェクターにおけるCD107a脱顆粒を示すドットプロットは、CD8とCD4 T細胞の両方において脱顆粒を示したCART22のみを実証した（図34B）。ゲーティング戦略：FSS対SSCリンパ球→シングレット→生存→CD3+。

【図35-1】図35A、図35B、図35C、および図35Dは、NALM-6に対するインビボでのCART22の有効性を示す一連のグラフである。A. 実験の概要：100万個のNALM-6ルシフェラーゼ+細胞/マウスをNSGマウスにおいてi.v.注射した。6日後、腫瘍の生着を生物発光によって評価した。次に、マウスは、無作為化され、非形質導入T細胞または異なる用量のCART22（1.25~500万個の総細胞/マウス、75%のCAR発現）を受けた。その後、マウスは、腫瘍負荷、PB T細胞増殖、および生存についてモニターされた（図35A）。生物発光（BLI）による腫瘍負荷は、用量関連の抗白血病反応を検出した。5e⁶個のCART22細胞を受けたマウスは、より良好な腫瘍制御を示した（図35B）。CART22で処置されたマウスは、UTD細胞で処置したマウスと比較して、統計的に有意に良好な全生存（OS）を示した。OSについて、より高用量のCART22と良好なOSの間に有意な相関があった（図35C）。T細胞のインビボ増殖は、眼窩後出血により毎週モニターされた。T細胞注入の1週間後、高用量のCART22を受けたマウスは、より良好なCART拡張（中央値12T細胞/ μ l）を示した（図35D）。

【図35-2】同上

【図36-1】図36Aおよび図36Bは、NALM-6に対するCART22とCART19の間インビボ比較を示す一連のグラフである。実験の概要：100万個のNALM

ー6ルシフェラーゼ＋細胞／マウスは、NSGマウスにおいてi.v.注射された。6日後、腫瘍の生着を生物発光によって評価した。次に、マウスは、無作為化され、非形質導入T細胞、CAR T19またはCAR T22（500万個の総細胞、75%のCAR発現）を受けた。その後、マウスは、腫瘍負荷、PB T細胞増殖、および生存についてモニターされた（図36A）。生物発光（BLI）による腫瘍負荷は、CAR T22とCAR T19の両方で処置されたマウスにおいて抗白血病応答を示したが、一方、UTDマウスは急速に進行した（図36B）。おそらくNALM-6（CD19>>CD22）における異なる標的発現のために、CAR T19処置されたマウスは、CAR T22と比較してより良好な全生存（OS）を示した（図36C）。

【図36-2】同上

10

【図37-1】図37Aおよび図37Bは、原発性ALLのモデルにおけるCAR T22とCAR T19の間のインビボ比較を示す一連のグラフである。初回ALL患者の芽球（JH331）をインビボで継代し、ルシフェラーゼで形質導入して腫瘍負荷を追跡した。実験の概要：100万個のJH331ルシフェラーゼ＋細胞／マウスをNSGマウスにi.v.注射した。14日後、腫瘍の生着を生物発光によって評価した。その後、マウスは、無作為化され、非形質導入T細胞、CAR T19またはCAR T22（500万個の全細胞、75%のCAR発現）を受けた。マウスは、腫瘍負荷、PB T細胞増殖、および生存についてモニターされた（図37A）。生物発光（BLI）による腫瘍負荷は、CAR T22とCAR T19の両方で処置されたマウスにおいて抗白血病応答を検出したが、一方、UTDマウスは急速に進行した（図37B）。

20

【図37-2】同上

【図38-1】図38A、図38B、および図38Cは、免疫組織化学染色により、28個のヒト正常組織におけるCD22発現の組織マイクロアレイを示す一連の画像である。リンパ器官は、CD22発現（扁桃、リンパ節、脾臓および胸腺）について陽性であった（図38A）。非リンパ様器官は、CD22の発現を示さなかった（図38B）。CD22陽性の常在性B細胞は、複数の組織において観察された（図38C）。*＝非特異的染色。

【図38-2】同上

【図38-3】同上

【図39-1】図39は、GeneAtlas U133AからのCD22 RNA発現データを示すグラフである。CD22発現は、B細胞、扁桃およびリンパ節において高レベルで観察された。Bリンパ芽球および白血病／リンパ腫細胞株もまた高い陽性であった。

30

【図39-2】同上

【図39-3】同上

【図39-4】同上

【図40】図40は、CAR T22毒性について51-クロム放出アッセイを示す一連のグラフである。UTD細胞ではなく、CAR T22とCAR T19の両方は、ALL細胞株であるNALM-6の溶解を誘発した。CAR T22の細胞毒性効果は、いずれの正常組織（CD34+、ヒトニューロン前駆体もしくはニューロンおよびケラチノサイト）または対照（K562細胞株）において観察されなかった。

40

【図41】図41は、FACSによって評価され、検出試薬としてタンパク質Lを使用して非形質導入（CAR陰性）細胞におけるシグナルのレベルを超えるシグナルを示す細胞のパーセントとして報告される、抗CD123 CARコンストラクトを用いて形質導入されたJNL細胞におけるCAR発現のグラフ表示を示す。

【図42】図42A、42B、および42Cは、JNL細胞におけるCD123 CAR活性のグラフ表示を示す。抗CD123 CARコンストラクトは、NFATプロモーターによって駆動されるルシフェラーゼレポーターを含有するJurkat細胞株（JNL細胞と称する）を用いて活性について評価された。CAR活性は、このNFAT駆動レポーターの活性化として測定される。

50

【図43】図43Aおよび43Bは、CD123発現および活性を示す。図43Aは、原発性T細胞におけるCD123 CAR発現のグラフ表示を示す。形質導入された細胞のパーセンテージ（細胞表面上の抗CD123 CARを発現する）およびそれらの発現の相対蛍光強度は、検出試薬としてタンパク質Lを使用するBD LSRTessaまたはBD-FACS Cant oにおけるフローサイトメトリー分析によって決定された。非染色細胞上のシグナルに対するそのFACSからの相対蛍光強度のゲーティングヒストグラムプロットは、形質導入されたT細胞のパーセンテージを示す。形質導入は、12～42%のCAR陽性細胞の範囲をもたらした。図43Bは、CD123-CART媒介性の細胞死滅のグラフ表示を示す。T細胞死滅は、ルシフェラーゼを安定的に発現するCD123発現MOLM13急性骨髄性白血病細胞に向けられた。非形質導入T細胞を使用して、非特異的なバックグラウンド死滅レベルを決定した。CART-CD123の細胞溶解活性は、エフェクター対標的細胞比が4対1であり、およびT細胞の2倍下方希釈の範囲にわたって測定され、この場合、抗CD123キメラ受容体を発現するT細胞としてエフェクターが定義された。アッセイは、適切な数のT細胞を一定数の標的細胞と混合することによって開始された。20時間後、ルシフェラーゼシグナルは、EnVision装置のBright-Glo（商標）ルシフェラーゼアッセイを用いて測定された。

10

【図44】図44Aおよび44Bは、CD123-CARを用いたT細胞の形質導入効率を示す。図44Aは、1172および1176を用いたT細胞の形質導入効率を示す。図44Bは、CD123 CARs 2-4を用いたT細胞の形質導入効率を示す。

【図45】図45は、CD4対CD8比を決定するためのCD123 CARs 2-4ならびに1172および1176のフローサイトメトリーを示す。

20

【図46】図46は、CD123+腫瘍細胞への曝露時のCD123 CARs 2-4ならびに1172および1176の脱顆粒を示す。

【図47】図47は、腫瘍標的細胞（MOLM14）に対するCART細胞（NVS 2-4、1172および1176クローン）の細胞毒性を評価するためのルシフェラーゼアッセイのグラフ表示を示す。

【図48】図48は、D6（CART注射前）および13日目（NVS 2-4、1172または1176クローンによる注射後6日）または20日目に、ルシフェラーゼを発現するMOLM14細胞を注射されたNSGマウスにおける腫瘍負荷の比較を示す。

【図49-1】図49A、図49B、図49C、図49D、図49E、および図49Fは、CD123が、CART19処置後に生じるCD19陰性B細胞急性リンパ芽球性白血病の再発において高度に発現されることを示す。図49Aは、42人の再発性／難治性ALL試料における、CD19と比較したCD123の発現を示す。図49Bは、B-ALL芽球におけるCD123およびCD19同時発現を示す。芽球にゲートをかける（SSC低、シングレット、生存、CD45dim）。図49Cは、白血病幹細胞（LSC）のゲーティング戦略を示す。CD123は、このサブセットにおいて高度に発現される。図49Dは、CD123およびCD19の同時発現およびFISH分析の結果を示す。図49Eおよび49Fは、ベースライン時または再発後のCD19およびCD123発現の比較を示す。

30

【図49-2】同上

40

【図49-3】同上

【図50-1】図50A、50B、50C、50D、50E、および50Fは、CD19 CAR（CAR19）またはCD123 CAR（CAR123）を発現するT細胞を用いた様々なインビトロアッセイの結果を示す。図50Aは、CD19およびCD123の発現を示す；図50Bは、CD107a脱顆粒アッセイを示す；図50Cは、標的化された細胞死滅の能力を示す；図50Dおよび50Eは、増殖能を示す；図50Fは、示されたサイトカインについてのサイトカイン産生を示す。

【図50-2】同上

【図51】図51A、図51B、および図51Cは、CD19 CAR（CAR19）またはCD123 CAR（CAR123）を発現するCART細胞が、インビボマウスモ

50

デルにおいて抗腫瘍効果を有することを示す。図5 1 Aは、生物発光イメージングによって表される腫瘍負荷を示す；図5 1 Bは、CART療法を受けたマウスの全生存曲線を示す；図5 1 Cは、末梢血中のCART1 2 3細胞の増殖を示す。

【図5 2－1】図5 2 A、図5 2 B、図5 2 C、図5 2 D、図5 2 E、および図5 2 Fは、CART1 2 3が抗原欠損再発のインビボマウスモデルにおいて活性であることを示す。図5 2 Aは、実験概要を示す；図5 2 Bは、CD1 9発現についてベースラインと再発疾患（上のグラフ）、およびCART1 9療法による治療に対する応答（下のグラフ）における生物発光イメージングによって表される疾患の進行を示す；図5 2 Cは、非形質導入T細胞またはCART1 9細胞を投与したマウスの生物発光画像を示す；図5 2 Dは、CART1 9またはCART1 2 3を用いて治療するための実験概要を示す；図5 2 Eは、疾患の進行を示す；図5 2 Fは、処置されたマウスの全生存率を示す。

10

【図5 2－2】同上

【図5 2－3】同上

【図5 2－4】同上

【図5 3－1】図5 3 A、5 3 B、および5 3 Cは、異種移植マウスの頭骨骨髄におけるALL-CART相互作用を示す。図5 3 Aは実験概要を示す；図5 3 Bは、CD1 9およびCD1 2 3またはCD1 2 3単独のいずれかを発現するように遺伝子操作された、ALL腫瘍と相互作用するCART1 9細胞およびCART1 2 3細胞の代表的な多光子XY平面画像を示す（運動細胞は破線の円で示され、非運動細胞は矢印で示される）；図5 3 Cは、顕微鏡画像のグラフ表現である。

20

【図5 3－2】同上

【図5 4－1】図5 4 A、5 4 B、および5 4 Cは、CART1 9およびCART1 2 3を用いたCD1 9陰性再発の予防を示す。図5 4 Aは、実験概要を示す；図5 4 Bは、非形質導入T細胞（上のグラフ）、CART1 9（中央のグラフ）、またはCART1 9およびCART1 2 3の組合せ（下のグラフ）で処置されたマウスの疾患進行（BLIに代表される腫瘍負荷）を示す；図5 4 Cは、この実験からの全生存率を示す。

【図5 4－2】同上

【図5 5】図5 5 Aおよび5 5 Bは、CAR1 9とCAR1 2 3の両方を発現するT細胞（図5 5 A）および脱顆粒アッセイの結果（図5 5 B）を示す。

【図5 6】図5 6 Aおよび5 6 Bは、ALL芽球の特徴付けを示す。図5 6 Aは、様々なマーカーであるCD1 9、CD1 2 3、CD1 0、CD3 4、およびCD2 0の発現を示す；図5 6 Bは、CD1 9－CD1 2 3＋細胞を選別するためのゲーティング戦略を示す。

30

【図5 7】図5 7 A、図5 7 B、図5 7 C、および図5 7 Dは、CART1 2 3の抗白血病活性を示す。図5 7 Aは、NALM6細胞におけるCD1 9およびCD1 2 3の発現を示す；図5 7 Bは、CART1 9またはCART1 2 3療法に応答する腫瘍負荷（BLIに代表される）を示す；図5 7 Cは、CART1 9またはCART1 2 3を投与されたマウスの全生存率を示す；図5 7 Dは、様々な用量のCART1 2 3を投与されたマウスの全生存率を示す。

【図5 8】図5 8 Aおよび5 8 Bは、抗原損失再発のインビボモデルの特徴付けを示す。図5 8 Aは、CD1 9陰性再発疾患におけるCD1 2 3の発現を示す；図5 8 Bは、インビトロでのベースライン細胞または再発細胞とともに培養した場合のCART1 9またはCART1 2 3細胞の脱顆粒アッセイを示す。

40

【図5 9】図5 9は、CAR発現形質導入されたT細胞の増殖が細胞培養系において低用量のRAD001により増強されることを示している。CARTは異なる濃度のRAD001（nM）の存在下でNALM6（Nal m-6）細胞と共培養された。CAR陽性CD3陽性T細胞（黒色）および全T細胞（灰色）の数は共培養の4日後に評価された。

【図6 0】図6 0は、0. 3、1、3、および10 mg / kg（mpk）での毎日RAD001投与またはビヒクル投与でのNALM6-luc細胞の腫瘍成長測定を描いている。丸形はビヒクルを表し、四角形は10 mg / kg用量のRAD001を表し、三角形は

50

3 mg/kg用量のRAD001を表し、逆三角形は1 mg/kg用量のRAD001を表し、ダイヤモンド形は0.3 mg/kg用量のRAD001を表す。

【図61】図61Aおよび61Bは、NALM6腫瘍を有するNSGマウスの血液中のRAD001の量を示す薬物動態曲線を示す。図61AはRAD001の最初の投与に続く0日目のPKを示す。図61Bは最終RAD001投与に続く14日目のPKを示す。ダイヤモンド形は10 mg/kg用量のRAD001を表し、四角形は1 mg/kg用量のRAD001を表し、三角形は3 mg/kg用量のRAD001を表し、xは10 mg/kg用量のRAD001を表す。

【図62】図62Aおよび62Bは、RAD001投与する、およびしないヒト化CD19 CAR T細胞のインビボ増殖を示している。毎日の低用量のRAD001 (0.003 mg/kg) により、huCAR19増殖の正常レベルを超えて、CAR T細胞増殖は増強される。図62AはCD4+CAR T細胞を示す；図62BはCD8+CAR T細胞を示す。丸形はPBSを表し、四角形はhuCTL019を表し、三角形は3 mg/kg RAD001でのhuCTL019を表し、逆三角形は0.3 mg/kg RAD001でのhuCTL019を表し、ダイヤモンド形は0.03 mg/kg RAD001でのhuCTL019を表し、黒色の丸形は0.003 mg/kg RAD001でのhuCTL019を表す。

【図63】図63は、原発性および続発性ヒトDLBCL患者試料におけるCD3+/PD-1+細胞集団間の有意差を示す多重FISHC AQUA分析を示す。

【図64】図64は、DLBCL試料の原発性および続発性部位における種々のレベルのCD19 (下段パネル) およびPD-L1 (上段パネル) を示すAQUA分析を示す。総数40人のヒトDLBCL患者試料、25個の原発性部位および15個の続発性部位を多重FISHCに供され、続いてAQUA分析を行い、CD19およびPD-L1タンパク質の発現レベルを同定した。

【図65】図65は、CAR発現細胞の2つの集団の模式図を示す。左側の集団 (プールされた) において、各細胞は1種類のCARを発現する。右側の集団 (2シストロン性CAR) において、各細胞は2種類のCARを発現する。

【図66】図66は、バイシストロン性CARの図を示す。上段CARは、P2Aプロテアーゼ切断部位によって分離されたCD19 CARおよびCD22 CARを有する。下段CARは、P2Aプロテアーゼ切断部位によって分離されたCD19 CARおよびCD123 CARを有する。

【図67】図67は、バイシストロン性ベクターからのCD19およびCD22 CARの同時発現を示す。

【図68】図68は、バイシストロン性ベクターからのCD19およびCD123 CARの同時発現を示す。図68下のパネルは、これらの細胞の抗白血病効果を示す。

【図69】図69は、UTD対照、CART19、またはCART22による処置後のCD19陰性B-ALL異種移植片を有するマウスにおける腫瘍負荷を示す。

【図70】図70は、5人のCR患者、1人の未分類の患者、および6人のPD患者由来のリンパ節および骨髄試料におけるPD-L1、PD1、LAG3、およびTIM3 (4つのバーの各セットにおいて左から右) の発現を示す

【図71】図71は、m971競合物質の存在下および非存在下におけるいくつかのCD22 CARコンストラクトの活性化 (RLU) を示すグラフである。

【図72】図72は、追加のCD22 CARコンストラクトの活性化 (RLU) を示すグラフである。

【図73】図73は、IFN-γアッセイにおけるCD22 CAR活性を示す3つの棒グラフを示す。

【図74】図74は、CD22-64およびCD22-65 CARの結合活性を示す。

【図75】図75は、様々なCD22 scFvによって結合されたエピトープをマッピングする図である。

【発明を実施するための形態】

【0240】

定義

特に他の指定がない限り、本明細書において使用される全ての専門用語や科学用語は、本発明が関連する当業者により一般的に理解されるのと同じ意味を有する。

【0241】

用語「1つの(a)」および「1つの(an)」は、文法上の目的語である物品が1つであるか、または1つより多く(すなわち、少なくとも1つの)であることを指す。一例として、「要素(an element)」は、1つの要素または1つより多くの要素を意味する。

【0242】

用語「約」は、量、一時的な持続時間、および同種のものなどの測定可能な値を指す場合、規定された値から、±20%の変動、またはいくつかの場合において±10%の変動、またはいくつかの場合において±5%の変動、またはいくつかの場合において±1%の変動、またはいくつかの場合において±0.1%の変動を包含することを意味しており、これはなぜなら、このような変動は開示された方法を行うのに適切であるためである。

【0243】

用語「アフエーシス」は、本明細書で使用される場合、当業界で認識されている体外プロセスであって、ドナーまたは患者の血液を、そのドナーまたは患者から除去し、選択された特定の成分を分離除去する装置を通過させ、残りを、ドナーまたは患者の循環に、例えば返血によって戻すプロセスを指す。したがって、「アフエーシス試料」は、アフエーシスを使用して得られた試料を指す。

【0244】

用語「生物学的に同等な」は、参照化合物(例えば、RAD001)の参照用量または参照量によって生産された作用と同等な作用を生産するのに必要な、参照化合物(例えば、RAD001)以外の薬剤の量を指す。一実施形態において、作用は、例えば、P70S6キナーゼ阻害によって測定される場合の、例えば、インビボ(in vivo)またはインビトロでのアッセイで評価される場合の、例えば、本明細書で説明されるアッセイ、例えばBoulayアッセイ、またはウェスタンブロットによるリン酸化されたS6のレベルの測定によって測定される場合のmTOR阻害のレベルである。一実施形態において、作用は、セルソーティングによって測定される場合のPD-1陽性/PD-1陰性T細胞の比率の変更である。一実施形態において、mTOR阻害剤の生物学的に同等な量または用量は、参照化合物の参照用量または参照量が達成するのと同じレベルのP70S6キナーゼ阻害を達成する量または用量である。一実施形態において、mTOR阻害剤の生物学的に同等なものの量または用量は、参照化合物の参照用量または参照量が達成するのと同じレベルの、PD-1陽性/PD-1陰性T細胞の比率における変更を達成する量または用量である。

【0245】

用語「阻害」または「阻害剤」は、ある特定のパラメーターの低下、例えば、所与の分子、例えばCD20、CD10、CD19、CD22、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179bまたはCD79a、の活性の低下を包含する。例えば、活性の阻害、例えばCD20、CD10、CD19、CD22、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179bまたはCD79aの活性の、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%以上阻害が、この用語によって包含される。したがって、阻害が100%である必要はない。阻害剤の活性は、本明細書で説明されるように判定してもよく、または当業界公知のアッセイによって判定してもよい。「B細胞阻害剤」は、B細胞のある特定のパラメーター、例えば活性、例えば成長もしくは増殖の低下を引き起こす、またはB細胞に関連する分子のある特定のパラメーター、例えば活性の低下を引き起こす分子、例えば、小分子、抗体、CAR、またはCARを含む細胞である。B細胞に関連する分子の非限定的な例としては、B細胞の表面で発現されるタンパク質、例えば、CD20、CD10、CD19、CD22、CD34、CD123、

F L T-3、R O R 1、C D 7 9 b、C D 1 7 9 bまたはC D 7 9 aが挙げられる。

【0246】

用語「キメラ抗原受容体」またはその代わりに「C A R」は、免疫エフェクター細胞中にあるとき、標的細胞、典型的にはがん細胞への特異性および細胞内シグナルの生成をその細胞にもたらすポリペプチドのセット、最も簡単な実施形態では典型的には2つのポリペプチドのセットを指す。一部の実施形態において、C A Rは、細胞外抗原結合ドメインと、膜貫通ドメインと、下記で定義されるような刺激分子および／または共刺激分子由来の機能的なシグナル伝達ドメインを含む細胞質内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」とも称される）とを少なくとも含む。一部の実施形態において、ポリペプチドのセットは、同じポリペプチド鎖中にあり、例えば、キメラ融合タンパク質を含む。一部の実施形態において、ポリペプチドのセットは、互いに連続しておらず、例えば、異なるポリペプチド鎖中にある。一部の実施形態において、ポリペプチドのセットは、二量体化分子の存在下でポリペプチドを互いにカップリングすることができ、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カップリングすることができる、二量体化スイッチを包含する。一態様において、C A Rの刺激分子は、T細胞受容体複合体と会合しているゼータ鎖（例えば、C D 3ゼータ）である。一態様において、細胞質内の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-ゼータの一次シグナル伝達ドメイン）を含む。一態様において、細胞質内シグナル伝達ドメインは、以下で定義されるような少なくとも1つの共刺激分子由来の1つまたは複数の機能的なシグナル伝達ドメインをさらに含む。一態様において、共刺激分子は、本明細書で説明される共刺激分子、例えば、4-1 B B（すなわち、C D 1 3 7）、C D 2 7および／またはC D 2 8から選ばれる。一態様において、C A Rは、細胞外抗原結合ドメインと、膜貫通ドメインと、刺激分子由来の機能的な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とを含むキメラ融合タンパク質を含む。一態様において、C A Rは、細胞外抗原認識ドメインと、膜貫通ドメインと、共刺激分子由来の機能的なシグナル伝達ドメインおよび刺激分子由来の機能的な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とを含むキメラ融合タンパク質を含む。一態様において、C A Rは、細胞外抗原結合ドメインと、膜貫通ドメインと、1つまたは複数の共刺激分子由来の2つの機能的なシグナル伝達ドメインおよび刺激分子由来の機能的な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とを含むキメラ融合タンパク質を含む。一態様において、C A Rは、細胞外抗原結合ドメインと、膜貫通ドメインと、1つまたは複数の共刺激分子由来の少なくとも2つの機能的なシグナル伝達ドメインおよび刺激分子由来の機能的な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とを含むキメラ融合タンパク質を含む。一態様において、C A Rは、C A R融合タンパク質のアミノ末端（N-ter）に任意のリーダー配列を含む。一態様において、C A Rは、細胞外抗原結合ドメインのN末端におけるリーダー配列をさらに含み、ここでリーダー配列は、細胞内プロセッシングおよび細胞膜へのC A Rの局在化の間に、抗原結合ドメイン（例えば、s c F v）から切断されてもよい。

【0247】

成句「C D 2 0の発現に関連する疾患」は、本明細書で使用される場合、例えば、がんもしくは悪性腫瘍などの増殖性疾患、または脊髄形成異常、骨髄異形成症候群もしくは前白血病状態などの前がん状態を包含する、C D 2 0（例えば、野生型または突然変異C D 2 0）の発現に関連する疾患、またはC D 2 0（例えば、野生型または突然変異C D 2 0）を発現するか、もしくはいずれかの時点で発現していた、細胞に関連する状態；あるいはC D 2 0（例えば、野生型または突然変異C D 2 0）を発現する細胞に関連する非がん関連の徴候を包含するが、これらに限定されない。誤解を避けるために言えば、C D 2 0の発現に関連する疾患は、例えば、C D 2 0発現が、例えば、C D 2 0を標的とする分子、例えばC D 2 0 C A Rでの処置のため、下方調節されているために現時点ではC D 2 0を発現しないが、かつてはC D 2 0を発現していた細胞に関連する状態を包含し得る。一態様において、C D 2 0の発現に関連するがんは、血液がんである。一態様において、血液がんとしては、A M L、骨髄異形成症候群、A L L、ヘアリーセル白血病、前リンパ

10

20

30

40

50

球性白血病、慢性骨髄性白血病、ホジキンリンパ腫、芽球性形質細胞様樹状細胞の新生物および同種のもものが挙げられるが、これらに限定されない。さらに、CD20発現の発現に関連する疾患としては、例えば、CD20の発現に関連する非定型のおよび／または非典型的ながん、悪性腫瘍、前がん状態または増殖性疾患が挙げられるが、これらに限定されない。CD20の発現に関連する非がん関連の徴候も挙げることができる。一部の実施形態において、CD20発現細胞は、CD20 mRNAを発現するか、またはいずれかの時点で発現していた。ある実施形態において、CD20発現細胞は、CD20タンパク質（例えば、野生型または突然変異）を産生し、そのCD20タンパク質が正常なレベルで存在することもあり、または低下したレベルで存在することもある。ある実施形態において、CD20発現細胞は、ある時点で検出可能なレベルのCD20タンパク質を産生したが、その後、実質的に検出可能なCD20タンパク質を産生しなかった。

10

【0248】

成句「CD22の発現に関連する疾患」は、本明細書で使用される場合、例えば、がんもしくは悪性腫瘍などの増殖性疾患、または脊髄形成異常、骨髄異形成症候群もしくは前白血病状態などの前がん状態を包含する、CD22（例えば、野生型または突然変異CD22）の発現に関連する疾患、またはCD22（例えば、野生型または突然変異CD22）を発現するか、もしくはいずれかの時点で発現していた、細胞に関連する状態；あるいはCD22（例えば、野生型または突然変異CD22）を発現する細胞に関連する非がん関連の徴候を包含するが、これらに限定されない。誤解を避けるために言えば、CD22の発現に関連する疾患は、例えば、CD22発現が、例えば、CD22を標的とする分子、例えばCD22 CARでの処置のため、下方調節されているために現時点ではCD22を発現しないが、かつてはCD22を発現していた細胞に関連する状態を包含し得る。一態様において、CD22の発現に関連するがんは、血液がんである。一態様において、血液がんとしては、AML、骨髄異形成症候群、ALL、ヘアリーセル白血病、前リンパ球性白血病、慢性骨髄性白血病、ホジキンリンパ腫、芽球性形質細胞様樹状細胞の新生物および同種のもものが挙げられるが、これらに限定されない。さらに、CD22発現の発現に関連する疾患としては、例えば、CD22の発現に関連する非定型のおよび／または非典型的ながん、悪性腫瘍、前がん状態または増殖性疾患が挙げられるが、これらに限定されない。CD22の発現に関連する非がん関連の徴候も挙げることができる。一部の実施形態において、CD22発現細胞は、CD22 mRNAを発現するか、またはいずれかの時点で発現していた。ある実施形態において、CD22発現細胞は、CD22タンパク質（例えば、野生型または突然変異）を産生し、そのCD22タンパク質が正常なレベルで存在することもあり、または低下したレベルで存在することもある。ある実施形態において、CD22発現細胞は、ある時点で検出可能なレベルのCD22タンパク質を産生したが、その後、実質的に検出可能なCD22タンパク質を産生しなかった。

20

30

【0249】

本明細書で使用される場合、特に他の指定がない限り、用語「予防する」、「予防すること」および「予防」は、対象が前記状態に苦しみ始める前にまたは前記状態の再発前に行われる行為を指す。予防は、前記状態の完全な予防をもたらす必要がなく、前記状態または前記状態の症状の部分的予防もしくは軽減、または前記状態を発症するリスクの低下が、この用語に包含される。

40

【0250】

「組み合わせる」投与されるとは、本明細書で使用される場合、対象が障害に罹っている間に、2種の（またはそれより多くの）異なる処置が対象にデリバリーされることを意味し、例えば、対象が障害を有すると診断された後、かつ障害が治癒もしくは除去されたり、または他の理由で処置が中止されたりする前に、2種以上の処置がデリバリーされる。いくつかの実施形態において、投与に関して重複があるように、1種の処置のデリバリーが、第二のデリバリーが始まるときもなお行われている。これは、本明細書では「同時」または「並列デリバリー」とも称されることもある。他の実施形態において、1つの処置のデリバリーは、他の処置のデリバリーが始まる前に終わる。いずれのケースのいくつ

50

かの実施形態において、投与を組み合わせることによって、処置はより有効である。例えば、第二の処置を行わなかった場合と等しい作用が見られるか、または第一の処置の非存在下で第二の処置が投与された場合に見られると予想される程度、もしくは第一の処置を用いて類似の状況が見られる程度より大きい程度に、第二の処置が症状を低減する場合、例えば、第二の処置はより有効である。いくつかの実施形態において、デリバリーは、症状、または障害に関する他のパラメーターの低減が、他方の非存在下でデリバリーされた一方の処置で観察されると予想されるパラメーターの低減より大きくなるようなデリバリーである。2つの処置の作用は、部分的に相加的、全体的に相加的、またはそれより大きく相加的であってもよい。デリバリーは、デリバリーされた第一の処置の作用が、第二がデリバリーされたときもなお検出可能になるようなデリバリーであってもよい。一実施形態において、CAR発現細胞は、本明細書で説明される用量および／または投与スケジュールで投与され、B細胞阻害剤、またはCD19 CAR発現細胞の活性を増強する薬剤は、本明細書で説明される用量および／または投与スケジュールで投与される。

10

【0251】

「由来の」は、この用語が本明細書で使用される場合、第一の分子と第二の分子との関係を示す。これは一般的に、第一の分子と第二の分子との構造的な類似性を指し、第二の分子由来の第一の分子におけるプロセスまたは源の限定を意味したりまたは包含したりしない。例えば、CD3ゼータ分子由来の細胞内シグナル伝達ドメインのケースにおいて、細胞内シグナル伝達ドメインは、必要な機能、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のに十分なCD3ゼータ構造を保持する。これは、細胞内シグナル伝達ドメインを生産する特定のプロセスへの限定を意味したりまたは包含したりすることはなく、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ゼータ配列から開始して不要な配列を欠失させたりまたは突然変異を付与したりして、細胞内シグナル伝達ドメインを得なければならないことを意味しない。

20

【0252】

用語「シグナル伝達ドメイン」は、第2メッセンジャーを生成したり、またはこのようなメッセンジャーに応答してエフェクターとして機能化したりすることにより規定のシグナル伝達経路を介して細胞活性を調節するために、細胞内の情報を伝えることによって作用するタンパク質の機能的な部分を指す。

【0253】

本明細書で使用される場合、用語「CD19」は、白血病前駆細胞上で検出可能な抗原決定基である、表面抗原分類19タンパク質を指す。ヒトおよびマウスアミノ酸および核酸配列は、GenBank、UniProtおよびSwiss-Protなどの公開データベースで見出すことができる。例えば、ヒトCD19のアミノ酸配列は、UniProt/Swiss-Prot受託番号P15391として見出すことができ、ヒトCD19をコードする(encoding of)ヌクレオチド配列は、受託番号NM_001178098で見出すことができる。本明細書で使用される場合、「CD19」は、完全長野生型CD19の突然変異、例えば点突然変異、フラグメント、挿入、欠失およびスプライス変異体を含むタンパク質を包含する。CD19は、例えば、急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ球性白血病および非ホジキンリンパ腫を包含する、ほとんどのB系統のがんにおいて発現される。CD19を発現する他の細胞(Other cells with express CD19)は、下記の「CD19の発現に関連する疾患」の定義において提供される。これは、B細胞前駆体の初期マーカーでもある。例えば、Nicholson et al. Mol. Immun. 34 (16-17): 1157-1165 (1997)を参照されたい。一態様において、CAR Tの抗原結合部分は、CD19タンパク質の細胞外ドメイン内の抗原を認識し、それに結合する。一態様において、CD19タンパク質は、がん細胞上で発現される。

30

40

【0254】

用語「抗体」は、本明細書で使用される場合、抗原と特異的に結合する免疫グロブリン分子由来のタンパク質またはポリペプチド配列を指す。抗体は、ポリクローナルもしくはモノクローナルの、複数もしくは単一の鎖の、または無傷の免疫グロブリンであってもよ

50

く、自然源由来でもよいし、または組換え源由来でもよい。抗体は、免疫グロブリン分子の四量体であってもよい。

【0255】

用語「抗体フラグメント」は、抗原のエピトープと（例えば、結合、立体障害、安定化／不安定化、空間分布によって）特異的に相互作用する能力を保持する、抗体の少なくとも一部を指す。抗体フラグメントの例としては、F a b、F a b'、F (a b')₂、F vフラグメント、s c F v抗体フラグメント、ジスルフィド連結F v (s d F v)；VHおよびCH1ドメインからなるF dフラグメント；線形抗体；単ドメイン抗体、例えばs d A b（V LまたはV Hのいずれか）；ラクダ化V H Hドメイン；ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つのF a b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重特異性抗体；および抗体の単離されたC D Rまたは他のエピトープ結合フラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。抗原結合フラグメントはまた、単ドメイン抗体、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-N A Rおよびビス-s c F vに取り込まれていてもよい（例えば、Hollinger and Hudson, Nature Biotechnology 23: 1126-1136, 2005を参照）。抗原結合フラグメントは、フィブロネクチンI I I型（F n 3）などのポリペプチドをベースとした足場にグラフト化することもできる（フィブロネクチンポリペプチドのミニボディを説明している米国特許第6, 703, 199号を参照）。

【0256】

用語「s c F v」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であって、軽鎖および重鎖可変領域が、例えば合成リンカー、例えば短いフレキシブルなポリペプチドリンカーを介して連続的に連結されており、単鎖のポリペプチドとして発現することができ、さらにs c F vが、その元となった無傷の抗体の特異性を保持している、上記融合タンパク質を指す。特段の規定がなければ、s c F vは、本明細書で使用される場合、V LおよびV H可変領域をいずれの順番で有していてもよく、例えばポリペプチドのN末端およびC末端の終端に関して、s c F vは、V LーリンカーーV Hを含んでいてもよいし、またはV HーリンカーーV Lを含んでいてもよい。

【0257】

用語「相補性決定領域」または「C D R」は、本明細書で使用される場合、抗原特異性と結合親和性を付与する抗体可変領域内のアミノ酸配列を指す。例えば、一般的に、各重鎖可変領域中に3つのC D R（例えば、H C D R 1、H C D R 2、およびH C D R 3）および各軽鎖可変領域中に3つのC D R（L C D R 1、L C D R 2、およびL C D R 3）がある。所与のC D Rの正確なアミノ酸配列の境界は、Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD（「K a b a t」番号付けスキーム）、Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948（「C h o t h i a」番号付けスキーム）によって説明されたもの、またはそれらの組合せなどの多数の周知のスキームのいずれかを使用して決定することができる。K a b a t 番号付けスキームによれば、一部の実施形態において、重鎖可変ドメイン（V H）におけるC D Rのアミノ酸残基は、31～35（H C D R 1）、50～65（H C D R 2）、および95～102（H C D R 3）と番号付けされ、軽鎖可変ドメイン（V L）におけるC D Rのアミノ酸残基は、24～34（L C D R 1）、50～56（L C D R 2）、および89～97（L C D R 3）と番号付けされる。C h o t h i a 番号付けスキームによれば、一部の実施形態において、V HにおけるC D Rのアミノ酸は、26～32（H C D R 1）、52～56（H C D R 2）、および95～102（H C D R 3）と番号付けされ、V LにおけるC D Rのアミノ酸残基は、26～32（L C D R 1）、50～52（L C D R 2）、および91～96（L C D R 3）と番号付けされる。K a b a t およびC h o t h i a 番号付けスキームの組合せでは、一部の実施形態において、C D Rは、K a b a t のC D R、C h o t h i a のC D R、またはその両方

の一部であるアミノ酸残基に相当する。例えば、一部の実施形態において、C D Rは、V H、例えば哺乳動物のV H、例えばヒトV Hにおいて、アミノ酸残基26～35（H C D R 1）、50～65（H C D R 2）、および95～102（H C D R 3）；ならびにV L、例えば哺乳動物のV L、例えばヒトV Lにおいて、アミノ酸残基24～34（L C D R 1）、50～56（L C D R 2）、および89～97（L C D R 3）に相当する。

【0258】

本明細書で使用される場合、用語「結合ドメイン」または「抗体分子」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またはそのフラグメントを指す。用語「結合ドメイン」または「抗体分子」は、抗体および抗体フラグメントを包含する。ある実施形態において、抗体分子は、多重特異性抗体分子であり、例えば、複数の免疫グロブリン可変ドメイン配列を含み、前記複数の免疫グロブリン可変ドメイン配列の第一の免疫グロブリン可変ドメイン配列は、第一のエピトープへの結合特異性を有し、前記複数の免疫グロブリン可変ドメイン配列の第二の免疫グロブリン可変ドメイン配列は、第二のエピトープへの結合特異性を有する。一実施形態において、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つ以下の抗原に特異性を有する。二重特異性抗体分子は、第一のエピトープに結合特異性を有する第一の免疫グロブリンの可変ドメイン配列および第二のエピトープに結合特異性を有する第二の免疫グロブリンの可変ドメイン配列を特徴とする。用語「抗体重鎖」は、それらの天然に存在するコンフォメーションの抗体分子中に存在する2つのタイプのポリペプチド鎖のうち大きい方を指し、通常これが抗体が属するクラスを決定する。

【0259】

抗体またはそれらの抗体フラグメントを含む本発明のC A Rの一部は、様々な形態で存在していてもよく、その場合、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（s d A b）、単鎖抗体（s c F v）、ヒト化抗体、二重特異性抗体などの連続的ポリペプチド鎖の一部として発現される（Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: 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）。一態様において、本発明のC A R組成物の抗原結合ドメインは、抗体フラグメントを含む。さらなる態様において、C A Rは、s c F vを含む抗体フラグメントを含む。

【0260】

用語「抗体重鎖」は、それらの天然に存在するコンフォメーションの抗体分子中に存在する2つのタイプのポリペプチド鎖のうち大きい方を指し、通常これが抗体が属するクラスを決定する。

【0261】

用語「抗体軽鎖」は、それらの天然に存在するコンフォメーションの抗体分子中に存在する2つのタイプのポリペプチド鎖のうち小さい方を指す。カッパ（κ）およびラムダ（λ）軽鎖は、2つの主要な抗体軽鎖アイソタイプを指す。

【0262】

用語「組換え抗体」は、例えばバクテリオファージまたは酵母発現系によって発現される抗体などの、組換えD N A技術を使用して生成される抗体を指す。この用語はまた、抗体をコードするD N A分子（このD N A分子は抗体タンパク質を発現する）、または抗体を指定するアミノ酸配列の合成によって生成された抗体も意味すると解釈されるものとし、この場合、D N Aまたはアミノ酸配列は、当業界で利用可能であり周知の組換えD N Aまたはアミノ酸配列技術を使用して得られたものである。

【0263】

用語「抗原」または「A g」は、免疫反応を惹起する分子を指す。この免疫反応は、抗体産生または特異的な免疫担当細胞の活性化のいずれか、またはその両方を含み得る。当業者であれば、実質的に全てのタンパク質またはペプチドを包含するあらゆる高分子が抗

原として役立つ可能性があることを理解しているものと予想される。さらに抗原は、組換えまたはゲノムDNA由来であってもよい。当業者であれば、免疫反応を惹起するタンパク質をコードするヌクレオチド配列または部分的なヌクレオチド配列を含むあらゆるDNAが、結果的に本明細書において抗原という用語が使用される場合と同様の「抗原」をコードすることを理解しているものと予想される。さらに当業者であれば、抗原は、必ずしも遺伝子の全長ヌクレオチド配列によってのみコードされるわけではないことを理解しているものと予想される。本発明は、これらに限定されないが、1つより多くの遺伝子の部分的なヌクレオチド配列の使用を包含すること、さらに望ましい免疫反応を惹起するポリペプチドがコードされるように、これらのヌクレオチド配列は様々な組合せで配置されることが容易に理解される。さらに当業者であれば、抗原は、必ずしも「遺伝子」によってコードされていなくてもよいことを理解しているものと予想される。抗原は、生成されるか合成されてもよく、または生体試料由来であってもよく、またはポリペプチド以外にも高分子であってもよいことが容易に理解される。このような生体試料としては、これらに限定されないが、組織試料、腫瘍試料、細胞または他の生物学的成分を含む流体を挙げることができる。

10

【0264】

用語「競合する」または「交差競合する」は、抗体分子、例えば本明細書において提供される抗CD20またはCD22抗体分子の、標的、例えばヒトCD20またはCD22への結合に干渉する抗体分子の能力を指すために、本明細書において同義的に使用される。結合への干渉は、直接的であってもよく、または間接的（例えば、抗体分子もしくは標的のアロステリックな改変によって）であってもよい。抗体分子が別の抗体分子の標的への結合に干渉することができる程度および、したがって、それを競合すると言うことができるかどうかは、例えば本明細書で説明されるような、競合結合アッセイを使用して判定することができる。一部の実施形態において、競合結合アッセイは、定量的競合アッセイである。一部の実施形態において、競合結合アッセイ（例えば、本明細書で説明される競合アッセイ）において、第一の抗体分子の標的への結合が10%以上、例えば、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、55%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上、99%以上、低減された場合、第一の抗体分子は、標的への結合について第二の抗体分子と競合すると言われる。

20

30

【0265】

本明細書で使用される場合、用語「エピトープ」は、抗体分子と特異的に相互作用する抗原（例えば、ヒトCD20またはCD22）の成分を指す。このような成分は、本明細書ではエピトープ決定基と称され、典型的には、アミノ酸側鎖もしくは糖側鎖などの要素を含むか、またはそのような要素の一部である。エピトープ決定基（determinate）は、例えば、当業界公知のまたは本明細書で開示される方法によって、例えば、結晶学によって、または水素-重水素交換によって定義することができる。エピトープ決定基と特異的に相互作用する、抗体分子上の成分の少なくとも1つまたはいくつかは、典型的には、CDR内に位置する。典型的に、エピトープは、特異的な三次元構造の特徴を有する。典型的に、エピトープは、特異的な電荷の特徴を有する。直線状エピトープであるエピトープもあり、その一方で、立体構造エピトープであるエピトープもある。

40

【0266】

用語「抗がん作用」は、これらに限定されないが、例えば、腫瘍容積の減少、がん細胞の数の減少、転移の数の減少、期待寿命の増加、がん細胞増殖の減少、がん細胞生存の減少、またはがん性状態に関連する様々な生理学的な症状の改善などの、様々な手段によって証明することができる生物学的作用を指す。「抗がん作用」はまた、最初の場所でのがん発生の予防における、本明細書で説明されるペプチド、ポリヌクレオチド、細胞および抗体の能力によって証明することもできる。用語「抗腫瘍効果」は、これらに限定されないが、例えば、腫瘍容積の減少、腫瘍細胞の数の減少、腫瘍細胞増殖の減少、または腫瘍細胞生存の減少などの、様々な手段によって証明することができる生物学的作用を指す。

50

【0267】

用語「自己」は、後でそれが再導入されることになる個体と同じ個体由来のあらゆる材料を指す。

【0268】

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由来のあらゆる材料を指す。2以上の個体は、1つまたは複数の遺伝子座における遺伝子が同一ではない場合、互いに同種異系といわれる。いくつかの態様において、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な程度、遺伝学的に異なっている。10

【0269】

用語「異種」は、異なる種の動物由来の移植片を指す。

【0270】

用語「がん」は、異常な細胞の制御不能な成長を特徴とする疾患を指す。がん細胞は、局所的に、または血流およびリンパ系を介して体の他の部分に蔓延する可能性がある。様々ながんの例が本明細書で説明されており、これらに限定されないが、乳がん、前立腺がん、卵巣がん、子宮頸がん、皮膚がん、膵臓がん、結腸直腸がん、腎臓がん、肝臓がん、脳がん、リンパ腫、白血病、肺がんおよび同種のものが挙げられる。用語「腫瘍」および「がん」は、本明細書において同義的に使用され、例えば、どちらの用語も、固体および液性、例えば、びまん性または循環性の腫瘍を包含する。用語「がん」または「腫瘍」は、本明細書で使用される場合、前がん性の、同様に悪性のがんおよび腫瘍を包含する。20

【0271】

用語「がん関連抗原」または「腫瘍抗原」または「増殖性障害抗原」または「増殖性障害に関連する抗原」は、全体的にまたはフラグメントとして（例えば、MHC／ペプチド）のいずれかで、正常細胞と比較してがん細胞の表面で優先的に発現され、がん細胞への医薬物質の優先的な標的化に有用である、分子（典型的にはタンパク質、炭水化物または脂質）を同義的に指す。一部の実施形態において、腫瘍抗原は、正常細胞とがん細胞の両方によって発現されるマーカー、例えば系統マーカー、例えば、B細胞上のCD19である。ある特定の態様において、本発明の腫瘍抗原は、原発性または転移性黒色腫、胸腺腫、リンパ腫、肉腫、肺がん、肝臓がん、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、白血病、子宮がん、子宮頸がん、膀胱がん、腎臓がん、および腺癌、例えば乳がん、前立腺がん、卵巣がん、膵臓がんおよび同種のを包含するがこれらに限定されない、がん由来する。一部の実施形態において、腫瘍抗原は、特定の増殖性障害に共通である抗原である。一部の実施形態において、がん関連抗原は、正常細胞と比較してがん細胞において過剰発現される、例えば、正常細胞と比較して、1倍の発現、2倍の過剰発現、3倍の過剰発現またはそれ以上である細胞表面分子である。一部の実施形態において、がん関連抗原は、がん細胞において不適切に合成される細胞表面分子、例えば、正常細胞で発現された分子と比較して欠失、付加または突然変異を含有する分子である。一部の実施形態において、がん関連抗原は、全体が、またはフラグメント（例えば、MHC／ペプチド）として、排他的にがん細胞の細胞表面で発現され、正常細胞の表面では合成も発現もされない。一部の実施形態において、本発明のCARは、MHCによって提示されるペプチドに結合する抗原結合ドメイン（例えば、抗体または抗体フラグメント）を含むCARを包含する。40

通常、内因性タンパク質由来のペプチドは、主要組織適合複合体（MHC）クラスI分子のポケットを満たし、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、全ての有核細胞によって構成的に発現される。がんにおいて、ウイルス特異的および／または腫瘍特異的ペプチド／MHC複合体は、免疫療法のための細胞表面標的の特有なクラスの代表である。ヒト白血球抗原（HLA）-A1またはHLA-A2の状況においてウイルスまたは腫瘍抗原由来のペプチドを標的とするTCR様抗体が、説明されている[例えば、Sastry et al., J Virol.2011 85(5):1935-1942; Sergeeva et al., Bood, 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 50

を参照されたい]。例えば、TCR様抗体は、ヒトscFvファージ提示型ライブラリーなどのライブラリーをスクリーニングすることにより同定することができる。

【0272】

成句「CD19の発現に関連する疾患」は、例えば、がんもしくは悪性腫瘍などの増殖性疾患、または脊髄形成異常、骨髄異形成症候群もしくは前白血病状態などの前がん状態を包含する、CD19（例えば、野生型または突然変異CD19）の発現に関連する疾患、またはCD19（例えば、野生型または突然変異CD19）を発現するか、もしくはいずれかの時点で発現していた、細胞に関連する状態；あるいはCD19を発現する細胞に関連する非がん関連の徴候を包含するが、これらに限定されない。誤解を避けるために言えば、CD19の発現に関連する疾患は、例えば、CD19発現が、例えばCD19を標的とする分子、例えばCD19 CAR、での処置のため、下方調節されているために現時点ではCD19を発現しないが、かつてはCD19を発現していた細胞に関連する状態を包含する。一態様において、CD19の発現に関連するがんは、血液がんである。一態様において、血液がんは、白血病またはリンパ腫である。一態様において、CD19発現に関連するがんは、例えば、これらに限定されないが、例えば、B細胞急性リンパ芽球性白血病（BALL）、T細胞急性リンパ芽球性白血病（TALL）、急性リンパ芽球性白血病（ALL）などの1つまたは複数の急性白血病；これらに限定されないが、例えば、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性リンパ性白血病（CLL）などの1種または複数の慢性白血病などのがんおよび悪性腫瘍を包含するが、これらに限定されない。CD19の発現に関連する追加のがんまたは血液学的な状態としては、これらに限定されないが、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の新生物、バーキットリンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、ヘアリーセル白血病、小細胞型または大細胞型濾胞性リンパ腫、悪性のリンパ増殖性状態、MALTリンパ腫、マントル細胞リンパ腫（MCL）、辺縁帯リンパ腫、多発性骨髄腫、脊髄形成異常および骨髄異形成症候群、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、形質芽細胞リンパ腫、形質細胞様樹状細胞の新生物、ワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症、および骨髄の血液細胞の無効な生産（または異形成）を併せもつ血液学的な状態の多様な集合体である「前白血病状態」、および同種のものが挙げられる。さらに、CD19発現の発現に関連する疾患としては、例えば、CD19の発現に関連する非定型のおよび／または非典型的ながん、悪性腫瘍、前がん状態または増殖性疾患が挙げられるが、これらに限定されない。CD19の発現に関連する非がん関連の徴候としては、例えば、自己免疫疾患（例えば、狼瘡）、炎症性障害（アレルギーおよび喘息）および移植が挙げられるが、これらに限定されない。一部の実施形態において、CD19発現細胞は、CD19 mRNAを発現するか、またはいずれかの時点で発現していた。ある実施形態において、CD19発現細胞は、CD19タンパク質（例えば、野生型または突然変異）を産生し、そのCD19タンパク質が正常なレベルで存在することもあり、または低下したレベルで存在することもある。ある実施形態において、CD19発現細胞は、ある時点で検出可能なレベルのCD19タンパク質を産生したが、その後は実質的に検出可能なCD19タンパク質を産生しなかった。

【0273】

用語「保存的配列改変」は、そのアミノ酸配列を含有する抗体または抗体フラグメントの結合特徴に有意に影響を与えたりまたは変更したりしないアミノ酸改変を指す。このような保存的改変としては、アミノ酸の置換、付加および欠失が挙げられる。改変は、部位特異的変異誘発およびPCR介在変異誘発などの当業界公知の標準的な技術によって本発明の抗体または抗体フラグメントに導入することができる。保存的アミノ酸置換とは、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられる置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当業界において定義されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リシン、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）、非荷電性極性側鎖（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)、ベータ分岐側鎖(例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン)および芳香族側鎖(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)を包含する。したがって、本発明のCAR内の1つまたは複数のアミノ酸残基が、同じ側鎖ファミリーの他のアミノ酸残基で置き換えられていてもよく、変更されたCARは、本明細書で説明される機能アッセイを使用してテストすることができる。

【0274】

用語「刺激」は、刺激分子(例えば、TCR/CD3複合体またはCAR)とその同起源のリガンド(またはCARの場合は腫瘍抗原)との結合により誘導される一次応答を指し、それによって、これらに限定されないが、TCR/CD3複合体を介したシグナル伝達、またはCARの適切なNK受容体もしくはシグナル伝達ドメインを介したシグナル伝達などの、シグナル伝達事象が媒介される。刺激は、ある特定の分子の変更された発現を媒介することもある。

10

【0275】

用語「刺激分子」は、免疫細胞シグナル伝達経路の少なくとも一部の態様に関して、刺激の形で免疫細胞の活性化を調節する細胞質内シグナル伝達配列をもたらし免疫細胞、例えば、T細胞、NK細胞またはB細胞によって発現される分子を指す。一態様において、シグナルは、例えば、TCR/CD3複合体とペプチドを提示したMHC分子との結合によって始動する一次シグナルであり、それにより、これらに限定されないが、増殖、活性化、分化、および同種のものなどのT細胞応答の媒介が起こる。刺激の形態で作用する一次細胞質内シグナル伝達配列(また、「一次シグナル伝達ドメイン」とも称される)は、シグナル伝達モチーフを含有していてもよく、これは、免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフまたはITAMとして知られている。本発明において特定の用途を有する細胞質内シグナル伝達配列を含有するITAMの例としては、これらに限定されないが、CD3ゼータ、共通FcRガンマ(FcER1G)、FcガンマRIIa、FcRベータ(FcイプシロンR1b)、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD79a、CD79b、DAP10およびDAP12由来のものが挙げられる。本発明の特定のCARにおいて、本発明のいずれか1つまたは複数のCARにおける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-ゼータの一次シグナル伝達配列を含む。本発明の特定のCARにおいて、CD3-ゼータの一次シグナル伝達配列は、配列番号17として提供される配列であるか、または非ヒト種、例えばマウス、げっ歯類、サル、類人猿および同種のものからの等価の残基である。本発明の特定のCARにおいて、CD3-ゼータの一次シグナル伝達配列は、配列番号43で提供される配列であるか、または非ヒト種、例えばマウス、げっ歯類、サル、類人猿および同種のものからの等価の残基である。

20

30

【0276】

用語「抗原提示細胞」または「APC」は、その表面上に主要組織適合複合体(MHC)と複合体化した外来抗原を提示するアクセサリー細胞(例えば、B細胞、樹状細胞、および同種のもの)などの免疫系細胞を指す。T細胞は、それらのT細胞受容体(TCR)を使用してこれらの複合体を認識する可能性がある。APCは抗原をプロセッシングし、それらをT細胞に提示させる。

40

【0277】

「免疫エフェクター細胞」は、この用語が本明細書において使用される場合、免疫応答、例えば、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としては、T細胞、例えば、アルファ/ベータT細胞およびガンマ/デルタ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、ならびに骨髄系由来の食細胞が挙げられる。

【0278】

「免疫エフェクター機能または免疫エフェクター応答」は、この用語が本明細書において使用される場合、例えば、免疫エフェクター細胞の、標的細胞の免疫攻撃を増強または

50

促進する機能または応答を指す。例えば、免疫エフェクター機能または応答は、標的細胞の成長または増殖の殺滅または阻害を促進するTまたはNK細胞の特性を指す。T細胞のケースにおいて、一次刺激および副刺激が、免疫エフェクター機能または応答の例である。

【0279】

用語「エフェクター機能」は、細胞の特殊化した機能を指す。T細胞のエフェクター機能は、例えば、細胞溶解活性またはサイトカイン分泌などのヘルパー活性であり得る。

【0280】

「細胞内シグナル伝達ドメイン」は、この用語が本明細書において使用される場合、分子の細胞内部分を指す。細胞内シグナル伝達ドメインは、CARを含有する細胞、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ことができる。例えばCAR T細胞における、免疫エフェクター機能の例としては、細胞溶解活性およびヘルパー活性、例えばサイトカイン分泌などが挙げられる。実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインは、エフェクター機能シグナルを伝達し、細胞に特殊化した機能を実行させる、タンパク質の部分である。細胞内シグナル伝達ドメイン全体が採用される場合もあるが、多くの場合において鎖全体を使用することは必ずしも必要ではない。細胞内シグナル伝達ドメインのトランケートされた部分を使用される限りにおいて、このようなトランケートされた部分は、それがエフェクター機能シグナルを伝達しさえすれば無傷の鎖の代わりに使用することができる。したがって細胞内シグナル伝達ドメインという用語は、エフェクター機能シグナルを伝達するのに十分な細胞内シグナル伝達ドメインのあらゆるトランケートされた部分を包含することを意味する。

【0281】

ある実施形態において、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んでいてもよい。典型的な一次細胞内シグナル伝達ドメインとしては、一次刺激、または抗原依存性刺激 (antigen dependent simulation) に関与する分子由来のものが挙げられる。ある実施形態において、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んでいてもよい。典型的な共刺激細胞内シグナル伝達ドメインとしては、共刺激シグナル、または抗原非依存性刺激に関与する分子由来のものが挙げられる。例えば、CAR Tの場合において、一次細胞内シグナル伝達ドメインは、T細胞受容体の細胞質内配列を含んでいてもよいし、共刺激細胞内シグナル伝達ドメインは、補助受容体または共刺激分子からの細胞質内配列を含んでいてもよい。

【0282】

一次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またはITAMとして公知のシグナル伝達モチーフを含んでいてもよい。ITAMを含有する一次細胞質内シグナル伝達配列の例としては、これらに限定されないが、CD3ゼータ、FcRガンマ、共通FcRガンマ (FCER1G)、FcガンマRIIa、FcRベータ (FcイプシロンR1b)、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD22、CD79a、CD79b、CD278 (「ICOS」)、FcεRI、CD66d、CD32、DAP10およびDAP12由来のものが挙げられる。

【0283】

用語「ゼータ」またはその代わりに「ゼータ鎖」、「CD3-ゼータ」もしくは「TCR-ゼータ」は、GenBank受託番号BAG36664.1として提供されるタンパク質、または非ヒト種、例えばマウス、げっ歯類、サル、類人猿および同種のものからの等価の残基と定義され、「ゼータ刺激ドメイン」またはその代わりに「CD3-ゼータ刺激ドメイン」もしくは「TCR-ゼータ刺激ドメイン」は、T細胞の活性化に必要な最初のシグナルを機能的に伝えるのに十分な、ゼータ鎖の細胞質内ドメインからのアミノ酸残基、またはその機能的誘導体と定義される。一態様において、ゼータの細胞質内ドメインは、GenBank受託番号BAG36664.1の残基52から164、またはそれらの機能的なオソログである非ヒト種、例えばマウス、げっ歯類、サル、類人猿および同種のものからの等価の残基を含む。一態様において、「ゼータ刺激ドメイン」または「CD

「3-ゼータ刺激ドメイン」は、配列番号17として提供される配列である。一態様において、「ゼータ刺激ドメイン」または「CD3-ゼータ刺激ドメイン」は、配列番号43として提供される配列である。

【0284】

用語「共刺激分子」は、共刺激リガンドと特異的に結合することにより、これらに限定されないが増殖などのT細胞による共刺激応答を媒介する、T細胞上の同起源の結合パートナーを指す。共刺激分子は、効率的な免疫反応の一因となる、抗原受容体以外の細胞表面分子またはそれらのリガンドである。共刺激分子としては、これらに限定されないが、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、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アルファ、CD8ベータ、IL2Rベータ、IL2Rガンマ、IL7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、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、およびCD83と特異的に結合するリガンドが挙げられる。

【0285】

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。細胞内シグナル伝達ドメインは、細胞内の部分全体、もしくはそれが得られた分子の天然型細胞内シグナル伝達ドメインの全体、またはそれらの機能的なフラグメントまたは誘導体を含んでもよい。

【0286】

用語「4-1BB」は、GenBank受託番号AAA62478.2として提供される配列アミノ酸配列を有するTNFRスーパーファミリーの一員、または非ヒト種、例えばマウス、げっ歯類、サル、類人猿および同種のものからの等価の残基を指し、「4-1BB共刺激ドメイン」は、GenBank受託番号AAA62478.2のアミノ酸残基214～255、または非ヒト種、例えばマウス、げっ歯類、サル、類人猿および同種のものからの等価の残基と定義される。一態様において、「4-1BB共刺激ドメイン」は、配列番号16として提供される配列または非ヒト種、例えばマウス、げっ歯類、サル、類人猿および同種のものからの等価の残基である。

【0287】

用語「コード（すること）」は、ヌクレオチド（例えば、rRNA、tRNAおよびmRNA）の規定の配列またはアミノ酸の規定の配列のいずれかを有する、生物学的プロセスにおける他のポリマーおよび高分子の合成のための鋳型として役立つ、遺伝子、cDNA、またはmRNAなどのポリヌクレオチド中のヌクレオチドの特異的配列の固有の特性、およびそれにより生じる生物学的な特性を指す。したがって、細胞または他の生物系中で、遺伝子に対応するmRNAの転写および翻訳によりタンパク質が産生される場合、その遺伝子、cDNA、またはRNAは、タンパク質をコードする。そのヌクレオチド配列

がmRNA配列と同一であり、通常配列表に示されるコード鎖と、遺伝子またはcDNAの転写のための鋳型として使用される非コード鎖はどちらも、その遺伝子またはcDNAのタンパク質または他の生成物をコードすると称することができる。

【0288】

特に他の規定がない限り、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」は、互いの縮重型であるヌクレオチド配列や同じアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列全てを包含する。また、タンパク質またはRNAをコードするヌクレオチド配列という成句は、いくつかの場合においてそのタンパク質をコードするヌクレオチド配列がイントロンを含有し得る程度にイントロンを包含していてもよい。

【0289】

用語「有効量」または「治療有効量」は、本明細書では同義的に使用され、本明細書で説明されているような化合物、調合物、材料、または組成物の、特定の生物学的な結果を達成するのに有効な量を指す。

【0290】

用語「内因性」は、生物、細胞、組織または系由来の材料、またはそれらの内部で産生されたあらゆる材料を指す。

【0291】

用語「外因性」は、生物、細胞、組織または系の外部から導入された材料、またはそれらの外部で産生されたあらゆる材料を指す。

【0292】

用語「発現」は、プロモーターによって駆動される特定のヌクレオチド配列の転写および／または翻訳を指す。

【0293】

用語「トランスファーベクター」は、単離された核酸を含み、細胞内部に単離された核酸をデリバリーするのに使用できるものの組成物を指す。多数のベクターが当業界公知であり、これらに限定されないが、直鎖状ポリヌクレオチド、イオン性または両親媒性化合物と結合したポリヌクレオチド、プラスミド、およびウイルスなどが挙げられる。したがって、用語「トランスファーベクター」は、自律複製型プラスミドまたはウイルスを包含する。この用語はまた、例えばポリリジン化合物、リポソーム、および同種のものなどの、細胞への核酸のトランスファーを容易にする非プラスミドおよび非ウイルス化合物をさらに包含するとも解釈されるものとする。ウイルストランスファーベクターの例としては、これらに限定されないが、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、および同種のもものが挙げられる。

【0294】

用語「発現ベクター」は、発現しようとするヌクレオチド配列に機能するよう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、発現のための十分なシス作用性要素を含み、発現のための他の要素は、宿主細胞によって供給されてもよいし、またはインビトロでの発現系中に供給されてもよい。発現ベクターは、当業界公知のあらゆるものを包含し、例えば、組換えポリヌクレオチドを取り込んでいる、コスミド、プラスミド（例えば、裸の状態の、またはリポソーム中に含有された）およびウイルス（例えば、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルス）が挙げられる。

【0295】

用語「レンチウイルス」は、レトロウイルス科の属の1つを指す。レンチウイルスは、レトロウイルスのなかでも非分裂細胞に感染することができるという点で独特であり、これらは、宿主細胞のDNAに相当な量の遺伝情報をデリバリーすることができることから、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、およびFIVが、レンチウイルスの全ての例である。

【0296】

用語「レンチウイルスベクター」は、レンチウイルスゲノムの少なくとも一部に由来す

10

20

30

40

50

るベクターを指し、特に、Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009)で示されるような自己不活性化レンチウイルスベクターが挙げられる。診療施設で使用される可能性があるレンチウイルスベクターの他の例としては、これらに限定されないが、例えば、Oxford BioMedica製のLENTIVECTOR（登録商標）遺伝子デリバリー技術、Lentigen製のLENTIMAX（商標）ベクター系および同種のものが挙げられる。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、当業者公知であると予想される。

【0297】

用語「相同」または「同一性」は、2つの高分子間の、例えば2つの核酸分子間の、例えば2つのDNA分子もしくは2つのRNA分子間の、または2つのポリペプチド分子間のサブユニット配列の同一性を指す。2つの分子の両方におけるサブユニットの位置が同じモノマーのサブユニットで占められている場合、例えば、2つのDNA分子それぞれにおける位置がアデニンで占められている場合、それらは、その位置において相同または同一である。2つの配列間の相同性は、マッチした位置または相同な位置の数の一次関数であり、例えば、2つの配列中の位置の半分（例えば、ポリマーの長さが10個のサブユニット中の5個の位置）が相同である場合、2つの配列は50%相同であり、位置の90%（例えば、10個のうち9個）がマッチしているかまたは相同である場合、2つの配列は90%相同である。

【0298】

非ヒト（例えば、マウス）抗体の「ヒト化された」形態は、非ヒト免疫グロブリン由来の最小の配列を含有する、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはそれらのフラグメント〔例えばFv、Fab、Fab'、F(ab')₂または抗体の他の抗原結合部分配列〕である。大抵の場合、ヒト化抗体およびそれらの抗体フラグメントは、レシピエントの相補性決定領域（CDR）からの残基が、望ましい特異性、親和性、および能力を有するマウス、ラットまたはウサギなどの非ヒト種（ドナー抗体）のCDRからの残基で置き換えられている、ヒト免疫グロブリン（レシピエントの抗体または抗体フラグメント）である。いくつかの場合において、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域（FR）残基は、対応する非ヒト残基で置き換えられている。さらに、ヒト化抗体／抗体フラグメントは、レシピエント抗体でも移入されたCDRまたはフレームワーク配列でも見出されない残基を含んでいてもよい。これらの改変は、抗体または抗体フラグメントの性能をさらに洗練させて最適化する可能性がある。一般的に、ヒト化抗体またはそれらの抗体フラグメントは、CDR領域の全部または実質的に全部が非ヒト免疫グロブリンのCDR領域に相当し、FR領域の全部のまたはかなりの部分がヒト免疫グロブリン配列のFR領域である、少なくとも1つの、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全部を含むと予想される。ヒト化抗体または抗体フラグメントはまた、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免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部を含んでいてもよい。さらなる詳細に関しては、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。

【0299】

「完全にヒト」は、分子全体がヒト由来であるか、または抗体もしくは免疫グロブリンのヒト形態に同一なアミノ酸配列からなる場合の、免疫グロブリン、例えば抗体または抗体フラグメントを指す。

【0300】

用語「単離された」は、天然状態から変更された、または天然状態から除去されたことを意味する。例えば、生きた動物中に自然に存在する核酸またはペプチドは「単離されていない」が、同じ核酸またはペプチドでもその天然状態において共存する材料から部分的または完全に分離されていれば、「単離されている」。単離された核酸またはタンパク質は、実質的に精製された形態で存在していてもよいし、または例えば宿主細胞などの非天然の環境中に存在していてもよい。

【0301】

本発明の内容では、以下に示す通常存在する核酸塩基の略語が使用される。「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、「U」は、ウリジンを指す。

【0302】

用語「機能するように連結した」または「転写制御」は、調節配列と異種核酸配列とが機能的に連結されて、結果として後者の発現をもたらすことを指す。例えば、第一の核酸配列が第二の核酸配列と機能的な関係で配置される場合、第一の核酸配列は第二の核酸配列と機能するように連結している。例えば、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響を与える場合、プロモーターはコード配列に機能するように連結している。機能するように連結したDNA配列は、互いに連続していてもよく、例えば2つのタンパク質のコード領域を合体させることが必要な場合、同じリーディングフレーム内であってもよい。

10

【0303】

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.）もしくは胸骨内注射、腫瘍内、または点滴技術を包含する。

【0304】

用語「核酸」または「ポリヌクレオチド」は、デオキシリボ核酸（DNA）またはリボ核酸（RNA）、および一本鎖または二本鎖いずれかの形態のそれらのポリマーを指す。用語「核酸」は、遺伝子、cDNAまたはmRNAを包含する。一実施形態において、核酸分子は、合成（例えば、化学的に合成された）核酸分子または組換え核酸分子である。特に限定されない限り、この用語は、参照核酸と類似の結合特性を有し、天然に存在するヌクレオチドと類似の方式で代謝される天然ヌクレオチドの類似体または誘導体を含む核酸を包含する。特に他の指定がない限り、特定の核酸配列はまた、それらの保存的に改変された変異体（例えば、縮重コドンの置換）、対立遺伝子、オーソログ、SNP、および相補配列、加えて明確に提示された配列も事実上包含する。具体的に言えば、縮重コドンの置換は、1つまたは複数の選択された（または全ての）コドンの第三の位置が混成の塩基および／またはデオキシイノシン残基で置換されている配列を生成することによって達成される可能性がある[Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); and Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)]。

20

30

【0305】

用語「ペプチド」、「ポリペプチド」、および「タンパク質」は、同義的に使用され、ペプチド結合により共有結合で連結されたアミノ酸残基で構成される化合物を指す。タンパク質またはペプチドは、少なくとも2つのアミノ酸を含有していなければならない。タンパク質またはペプチドの配列を構成し得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で合体した2つ以上のアミノ酸を含むあらゆるペプチドまたはタンパク質を包含する。この用語は、本明細書で使用される場合、当業界では一般的に例えばペプチド、オリゴペプチドおよびオリゴマーとも称される短鎖と、当業界では一般的に多くのタイプが存在するタンパク質と称されるそれより長い鎖との両方を指す。「ポリペプチド」としては、例えば、なかでも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、改変されたポリペプチド、誘導体、類似体、融合タンパク質が挙げられる。ポリペプチドとしては、天然ペプチド、組換えペプチド、またはそれらの組合せが挙げられる。

40

【0306】

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な、細胞の合成機構によって認識されるDNA配列、または導入された合成機構を指す。

【0307】

用語「プロモーター／調節配列」は、プロモーター／調節配列に機能するように連結し

50

た遺伝子産物の発現に必要な核酸配列を指す。いくつかの場合において、この配列はコアプロモーター配列であってもよく、他の例において、この配列はまた、遺伝子産物の発現に必要なエンハンサー配列および他の調節因子を包含していてもよい。プロモーター／調節配列は、例えば、組織特異的な方式で遺伝子産物を発現するプロモーター／調節配列であってもよい。

【0308】

用語「構成的」プロモーターは、遺伝子産物をコードするかまたは遺伝子産物を指定するポリヌクレオチドと機能するように連結している場合、細胞のほとんどまたは全ての生理学的条件下において細胞中で遺伝子産物を産生させるヌクレオチド配列を指す。

【0309】

用語「誘導性」プロモーターは、遺伝子産物をコードするかまたは遺伝子産物を指定するポリヌクレオチドと機能するように連結している場合、実質的にプロモーターに対応する誘導物質が細胞中に存在するときだけ、細胞中で遺伝子産物を産生させるヌクレオチド配列を指す。

【0310】

用語「組織特異的」プロモーターは、遺伝子をコードするかまたは遺伝子によって指定されたポリヌクレオチドと機能するように連結されている場合、実質的に細胞がプロモーターに対応する組織タイプの細胞であるときだけ、細胞中で遺伝子産物を産生させるヌクレオチド配列を指す。

【0311】

用語「フレキシブルなポリペプチドリンカー」または「リンカー」は、s c F v の状況で使用される場合、可変重鎖領域と可変軽鎖領域と一緒に連結するために、単独で、または組み合わせて使用されるグリシンおよび／また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。一実施形態において、フレキシブルなポリペプチドリンカーは、G l y / S e r リンカーであり、アミノ酸配列 (G l y - G l y - G l y - S e r)_n を含み、式中nは、1に等しいかまたは1より大きい正の整数である。例えば、n = 1、n = 2、n = 3、n = 4、n = 5、n = 6、n = 7、n = 8、n = 9およびn = 10（配列番号105）である。一実施形態において、フレキシブルなポリペプチドリンカーとしては、これらに限定されないが、(G l y₄ S e r)₄（配列番号106）または(G l y₄ S e r)₃（配列番号107）が挙げられる。別の実施形態において、リンカーは、(G l y₂ S e r)、(G l y S e r) または (G l y₃ S e r) の複数の反復を包含する（配列番号108）。参照により本明細書に組み入れられるWO 2012 / 138475で説明されているリンカーも本発明の範囲内に包含される。

【0312】

5' キャップ（RNA キャップ、RNA 7-メチルグアノシンキャップまたはRNA m⁷G キャップともいう）は、本明細書で使用される場合、転写開始直後に真核性メッセンジャーRNAの「前部」または5' 末端に付加された改変されたグアニンヌクレオチドである。5' キャップは、最初に転写される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およびRNAアーゼからの保護にとって重要である。キャップの付加は転写とカップリングされ、それぞれ他方に影響を与えるようにともに転写されることによって実行される。転写開始直後、合成されているmRNAの5' 末端は、RNAポリメラーゼと会合したキャップを合成する複合体に結合される。この酵素的な複合体は、mRNAのキャッピングに必要な化学反応を触媒する。合成は、多段階の生化学反応として進行する。キャッピング成分を改変して、その安定性または翻訳効率などのmRNAの機能性を調節してもよい。

【0313】

「インビトロで転写されたRNA」は、本明細書で使用される場合、インビトロで合成されたRNA、例えばmRNAを指す。一般的に、インビトロで転写されたRNAは、インビトロの転写ベクターから生成される。インビトロの転写ベクターは、インビトロで転写されたRNAを生成するのに使用される鋳型を含む。

【0314】

本明細書で使用される場合、「ポリ(A)」は、ポリアデニル化によってmRNAに付着した一連のアデノシンである。一過性発現のためのコンストラクトの一部の実施形態において、ポリAは、50から5000個の間(配列番号28)であり、例えば64個より多く、例えば100個より多く、例えば300または400個より多い。ポリ(A)配列を化学的または酵素的に改変して、局在化、安定性または翻訳効率などのmRNAの機能性を調節してもよい。

【0315】

「ポリアデニル化」は、本明細書で使用される場合、ポリアデニル成分またはその改変された変異体をメッセンジャーRNA分子に共有結合で連結させることを指す。真核生物において、ほとんどのメッセンジャーRNA(mRNA)分子は、3'末端でポリアデニル化されている。3'ポリ(A)テールは、酵素のポリアデニル酸ポリメラーゼの作用を介してプレーンmRNAに付加されたアデニンヌクレオチドの長い配列(しばしば数百にもなる)である。より高次の真核生物において、ポリ(A)テールは、特異的配列であるポリアデニル化シグナルを含有する転写物上に付加される。ポリ(A)テールとそれに結合したタンパク質は、エキソヌクレアーゼによる分解からmRNAを保護するのに役立つ。またポリアデニル化は、転写終結、細胞核外へのmRNA輸送、および翻訳にとっても重要である。ポリアデニル化は、RNAへのDNA転写直後に細胞核で起こるが、それに加えて後に細胞質内でも起こる可能性がある。転写が終結した後、mRNA鎖は、RNAポリメラーゼと会合したエンドヌクレアーゼ複合体の作用を介して切断される。切断部位は通常、切断部位付近における塩基配列AAUAAAの存在を特徴とする。mRNAが切断された後、切断部位において遊離の3'末端にアデノシン残基が付加される。

【0316】

「一過性」は、本明細書で使用される場合、数時間、数日または数週間にわたり統合されていない導入遺伝子が発現されることを指し、ここで発現期間は、宿主細胞中でゲノムに統合されているかまたは安定なプラスミドレプリコン内に含有されている場合の遺伝子の発現期間より短い。

【0317】

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伝達において役割を果たす様々なシグナル伝達分子間の生化学的な関係を指す。成句「細胞表面受容体」は、シグナルを受けて細胞膜を通過してシグナルを伝えることができる分子および分子複合体を包含する。

【0318】

用語「対象」は、免疫反応を惹起させることができる生物(例えば、哺乳動物、ヒト)を包含することが意図される。

【0319】

用語「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。また実質的に精製された細胞は、通常その天然に存在する状況で共存する他の細胞型から分離された細胞も指す。いくつかの場合において、実質的に精製された細胞の集団は、細胞の同種の集団を指す。他の例において、この用語は単に、それらの天然の状態において自然に共存する細胞から分離された細胞を指す。いくつかの態様において、このような細胞は、インビトロで培養される。他の態様において、このような細胞は、インビトロで培養されない。

【0320】

用語「治療」は、本明細書で使用される場合、処置を意味する。治療効果は、病状の回復、抑制、寛解、または根絶により得られる。

【0321】

用語「予防」は、本明細書で使用される場合、疾患または病状の予防または予防的処置を意味する。

【0322】

10

20

30

40

50

本発明の内容において、「腫瘍抗原」または「過剰増殖性障害抗原」または「過剰増殖性障害に関連する抗原」は、特定の過剰増殖性障害に共通する抗原を指す。ある特定の態様において、本発明の過剰増殖性障害抗原は、これらに限定されないが、原発性もしくは転移性黒色腫、胸腺腫、リンパ腫、肉腫、肺がん、肝臓がん、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、白血病、子宮がん、子宮頸がん、膀胱がん、腎臓がんおよび腺癌、例えば乳がん、前立腺がん、卵巣がん、膵臓がん、および同種のもの、などのがん由来である。

【0323】

用語「トランスフェクション」または「形質転換」または「形質導入」は、宿主細胞に外因性核酸を移入または導入させるプロセスを指す。「トランスフェクション」または「形質転換」または「形質導入」された細胞は、外因性核酸でトランスフェクトされた、形質転換した、または形質導入された細胞である。細胞は、対象の初代細胞およびその後代を包含する。

10

【0324】

対象におけるがんのパラメーター（例えば血液がん、例えば、がん細胞成長、増殖および／または生存期間）が、いずれかの適切な尺度によって、例えば、質量、細胞数または容積によって判定して、検出可能な量、例えば、約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上遅延または低減される場合、対象は、処置に「応答する」。一例において、対象が、処置が投与されない場合に予測される期待寿命を約5%、10%、20%、30%、40%、50%以上を超えて延長された期待寿命を経験する場合、対象は、処置に応答する。別の例において、対象が、増加した無病生存期間、全生存期間、または増加した無増悪期間を有する場合、対象は、処置に応答する。例えば、NCCN腫瘍学臨床診療ガイドライン [NCCN Guidelines (登録商標)] によって提供されている基準をはじめとする、いくつかの方法を使用して、患者が処置に応答するかどうかを判定することができる。例えば、B-A L L の状況において、完全応答または完全応答例は、次の1つまたは複数を含み得る：<5% BM芽球、>1000好中球／ANC（／ μ L）。>100,000血小板（／ μ L）で循環芽球も髄外疾患もなし（リンパ節腫大、巨脾症、皮膚／歯肉浸潤／精巣腫瘍／CNS病変なし）、三血球系造血、および4週間にわたり再発なし。部分応答例は、次の1つまたは複数を含み得る：BM芽球の>50%低減、>1000好中球／ANC（／ μ L）。>100,000血小板（／ μ L）。非応答例は、疾患進行、例えば、BM芽球に関して>25%を示し得る。

20

30

【0325】

「難治性」は、本明細書で使用される場合、疾患、例えば処置に応答しないがんを指す。実施形態において、難治性がんは、処置の前または開始時に、処置に対して耐性である可能性がある。他の実施形態において、難治性がんは、処置中に耐性になる可能性がある。難治性がんはまた、耐性がんとも呼ばれる。

【0326】

用語「再発」は、本明細書で使用される場合、初期応答（例えば、完全応答または部分応答）期間後のがんの再出現を指す。初期応答期間は、がん細胞のレベルが、ある特定の閾値未満、例えば、20%、1%、10%、5%、4%、3%、2%または1%未満に低下することを含み得る。再出現は、がん細胞のレベルが、ある特定の閾値より高く、例えば、20%、1%、10%、5%、4%、3%、2%または1%より高く上昇することを含み得る。例えば、例えばB-A L L の状況において、再出現は、例えば、完全応答後の血液、骨髄（>5%）またはいずれかの髄外部位における芽球の再出現を含み得る。この文脈での完全応答は、<5% BM芽球を含み得る。より一般的には、ある実施形態において、応答（例えば、完全応答または部分応答）は、検出可能なMRDの非存在（最小の残留疾患）を含み得る。ある実施形態において、初期応答期間は、少なくとも1、2、3、4、5もしくは6日、少なくとも1、2、3もしくは4週間、少なくとも1、2、3、4、6、8、10もしくは12カ月、または少なくとも1、2、3、4もしくは5年続く。

40

【0327】

50

一部の実施形態において、CD19阻害剤を包含する治療、例えばCD19 CAR療法は、再発することもあり、または処置が無効であることもある。再発または耐性は、CD19欠損（例えば、抗原欠損突然変異）によって引き起こされることもあり、またはCD19レベルを低下させる他のCD19の変化（例えば、CD19陰性クローンのクローン選択によって引き起こされる）によって引き起こされることもある。このようなCD19欠損または変化を保有するがんは、本明細書では「CD19陰性のがん」または「CD19陰性の再発がん」と称される。CD19陰性のがんは、CD19の100%欠損でなく、がんが再発するまたは難治性になるようなCD19療法の有効性を低下させるのに十分な低減を有する必要があると理解されるものとする。一部の実施形態において、CD19陰性のがんは、CD19 CAR療法の結果として生じる。

10

【0328】

用語「特異的に結合する」は、試料中に存在する結合パートナー（例えば、刺激腫瘍抗原）タンパク質を認識してそれと結合する抗体またはリガンドを指すが、これらの抗体またはリガンドは、試料中の他の分子を実質的に認識したりまたはそれと結合したりしない。

【0329】

本明細書で使用される場合、用語「薬学的に許容される塩」は、健全な医学的判断の範囲内で、対象の組織と接触して使用することに好適であり、過度の毒性、刺激作用、アレルギー反応および同種のもものがなく、かつ妥当な損益比に見合っている塩を指す。薬学的に許容される塩は、当業界周知である。例えば、Bergerらは、J. Pharmaceutical Sciences (1977) 66:1-19において薬学的に許容される塩を詳細に説明している。

20

【0330】

「調節可能なキメラ抗原受容体（RCAR）」は、この用語が本明細書で使用される場合、RCARX細胞中にあるとき、標的細胞、典型的にはがん細胞への特異性、および調節可能な細胞内シグナルの生成または増殖を、そのRCARX細胞にもたらし、それによってそのRCARX細胞の免疫エフェクター特性を最適化することができる、ポリペプチドのセット、最も簡単な実施形態では典型的には2つのポリペプチドのセットを指す。RCARX細胞は、抗原結合ドメインによって結合された抗原を含む標的細胞に特異性を提供するのに、抗原結合ドメインに少なくとも部分的に依存する。ある実施形態において、RCARは、二量体化分子の存在下で細胞内シグナル伝達ドメインを抗原結合ドメインにカップリングすることができる二量体化スイッチを包含する。

30

【0331】

「膜アンカー」または「膜係留ドメイン」は、この用語が本明細書において使用される場合、細胞外または細胞内ドメインを原形質膜に固定するのに十分なポリペプチドまたは部分、例えばミリストイル基を指す。

【0332】

「スイッチドメイン」は、この用語が本明細書において使用される場合、例えばRCARについて述べられる場合、二量体化分子の存在下で別のスイッチドメインと会合する物体、典型的にはポリペプチドベースの物体を指す。会合は、第一のスイッチドメインに連結された、例えば融合した第一の物体と、第二のスイッチドメインに連結された、例えば融合した第二の物体との機能的なカップリングを引き起こす。第一および第二のスイッチドメインは、集合的に二量体化スイッチと称される。実施形態において、第一および第二のスイッチドメインは、互いに同じであり、例えばそれら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称される。実施形態において、第一および第二のスイッチドメインは、互いに異なっており、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称される。実施形態において、スイッチは、細胞内である。実施形態において、スイッチは、細胞外である。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物体、例えば、FKBPまたはFRBベースの物体であり、二量体化分子は、小分子、例えば、ラパログ（rapalogue）である。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

40

50

の物体、例えばm y c ペプチドと結合するs c F vであり、二量体化分子は、ポリペプチド、それらのフラグメント、またはポリペプチドの多量体、例えば、1つまたは複数のm y c s c F vに結合するm y c リガンドまたはm y c リガンドの多量体である。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物体、例えばm y c 受容体であり、二量体化分子は、抗体またはそれらのフラグメント、例えば、m y c 抗体である。

【0333】

「二量体化分子」は、この用語が本明細書において使用される場合、例えばR C A Rについて述べられる場合、第一のスイッチドメインと第二のスイッチドメインとの会合を促進する分子を指す。実施形態において、二量体化分子は、対象において天然に存在しないか、または有意な二量体化を引き起こすと予想される濃度で存在しない。実施形態において、二量体化分子は、小分子、例えばラパマイシンまたはラパログ、例えばR A D O O 1である。

10

【0334】

用語「免疫を増強する低い用量」は、m T O R阻害剤、例えばアロステリックm T O R阻害剤、例えばR A D O O 1もしくはラパマイシン、または触媒性m T O R阻害剤とともに使用される場合、例えばP 7 0 S 6 キナーゼ活性阻害によって測定した場合に、m T O R活性を、完全ではないが部分的に阻害するm T O R阻害剤の用量を指す。例えばP 7 0 S 6 キナーゼ阻害によるm T O R活性を評価するための方法が、本明細書で論じられている。この用量は、完全な免疫抑制を引き起こすには不十分であるが、免疫応答を増強するには十分である。一実施形態において、免疫を増強する低い用量のm T O R阻害剤は、P D - 1 陽性T細胞の数の減少、および／またはP D - 1 陰性T細胞の数の増加、またはP D - 1 陰性T細胞／P D - 1 陽性T細胞の比率の増加を引き起こす。一実施形態において、免疫を増強する低い用量のm T O R阻害剤は、ナイーブT細胞の数の増加を引き起こす。一実施形態において、免疫を増強する低い用量のm T O R阻害剤は、以下：

20

例えばメモリーT細胞、例えばメモリーT細胞前駆体における、以下のマーカー：C D 6 2 L^{h i g h}、C D 1 2 7^{h i g h}、C D 2 7⁺、およびB C L 2の1つまたは複数の発現の増加；

例えばメモリーT細胞、例えばメモリーT細胞前駆体におけるK L R G 1発現の減少；および

メモリーT細胞前駆体、例えば、以下の特徴：C D 6 2 L^{h i g h}の増加、C D 1 2 7^{h i g h}の増加、C D 2 7⁺の増加、K L R G 1の減少、およびB C L 2の増加のいずれか1つのまたは組合せを有する細胞の数の増加の1つまたは複数を引き起こし、ここで上述した変化はいずれも、例えば未処置の対象と比較して、例えば少なくとも一時的に起こる。

30

【0335】

範囲：本開示全体にわたり、本発明の様々な態様は、範囲の様式で示される場合がある。範囲の様式での記載は、単に利便性および簡潔さのためであり、本発明の範囲における柔軟性のない限定として解釈されるべきではないことが理解されるものとする。したがって、範囲の記載は、全ての可能性のある部分範囲、加えてその範囲内の個々の数値を具体的に開示しているとみなされるものとする。例えば、1から6などの範囲の記載は、例えば1から3、1から4、1から5、2から4、2から6、3から6などの具体的に開示された部分範囲、加えてその範囲内の個々の数値、例えば、1、2、2.7、3、4、5、5.3、および6を有するとみなされると予想される。別の例として、95～99%の同一性などの範囲は、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有する何かを包含し、さらに、96～99%、96～98%、96～97%、97～99%、97～98%および98～99%の同一性などの部分範囲を包含する。これは、範囲の幅に関係なく適用される。

40

【0336】

説明

C D 1 9阻害剤および結合ドメイン

50

CD19キメラ抗原受容体(CAR)を使用するがんなどの疾患を処置するための、物の組成物および使用方法が本明細書において提供される。方法は、とりわけ、本明細書で説明されるCD19 CARをB細胞阻害剤などの別の薬剤と組み合わせて投与することを包含する。方法は、例えば、ホジキンリンパ腫などのリンパ腫を処置するために本明細書で説明されるCD19 CARを投与することも包含する。

【0337】

一態様において、本発明は、CD19タンパク質と特異的に結合するように加工された抗体または抗体フラグメントを含む、多数のキメラ抗原受容体(CAR)を提供する。一態様において、本発明は、CARを発現するように加工された細胞(例えば、T細胞)を提供し、ここでCAR T細胞(「CART」)は抗がん特性を示す。一態様において、細胞はCARで形質転換され、CARは細胞表面上に発現される。いくつかの実施形態において、細胞(例えば、T細胞)は、CARをコードするウイルスベクターで形質導入される。いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは、レトロウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。いくつかのこのような実施形態において、細胞は、CARを安定して発現することができる。別の実施形態において、細胞(例えば、T細胞)は、CARをコードする、核酸、例えばmRNA、cDNA、DNAでトランスフェクトされる。いくつかのこのような実施形態において、細胞は、CARを一過性発現することができる。

【0338】

一態様において、CARの抗CD19タンパク質結合部分は、scFv抗体フラグメントである。一態様において、このような抗体フラグメントは、それらが等価の結合親和性を保持する、例えばそれらがその元となったIgG抗体と同等の親和性で同じ抗原に結合するという点において、機能的である。一態様において、このような抗体フラグメントは、それらが、これらに限定されないが、当業者によって理解されると予想されるような免疫反応の活性化、その標的抗原からのシグナル伝達開始の阻害、キナーゼ活性の阻害、および同種のものなどの生体反応をもたらす点で機能的である。一態様において、CARのCD19抗原結合ドメインは、その元となったscFvのマウス配列と比較してヒト化されたscFv抗体フラグメントである。一態様において、親マウスscFv配列は、PCT公開WO2012/079000において提供されているおよび本明細書において配列番号59として提供されるCAR19コンストラクトである。一実施形態において、抗CD19結合ドメインは、WO2012/079000において説明されているおよび配列番号59で提供されるscFv、またはこれと少なくとも95%、例えば、95~99%同一の配列である。ある実施形態において、抗CD19結合ドメインは、PCT公開WO2012/079000において提供されているおよび本明細書において配列番号58で提供されるCARコンストラクトの一部、またはこれと少なくとも95%、例えば、95%~99%同一の配列である。ある実施形態において、抗CD19結合ドメインは、表4および/または表5から選択される少なくとも1つ(例えば、2つ、3つ、4つ、5つまたは6つ)のCDRを含む。

【0339】

一部の態様において、本発明の抗体は、キメラ抗原受容体(CAR)に取り込まれている。一態様において、CARは、PCT公開WO2012/079000において配列番号12として提供されているおよび本明細書において配列番号58として提供されるポリペプチド配列であって、scFvドメインが、配列番号1~12から選択される1つまたは複数の配列によって置換されている、ポリペプチド配列を含む。一態様において、配列番号1~12のscFvドメインは、ヒトCD19と特異的に結合するマウス由来のscFvフラグメントである、配列番号59のscFvドメインのヒト化変異体である。このマウスscFvのヒト化は、CART19処置、例えば、CAR19コンストラクトが形質導入されたT細胞での処置を受けている患者において、マウス特異的な残基がヒト抗マウス抗原(HAMA)応答を誘導することが可能な臨床条件にとって望ましい場合がある。

【0340】

一態様において、抗CD19結合ドメイン、例えば本発明のCARの一部であるヒト化scFvは、その配列のコドンが哺乳動物細胞での発現に最適化された導入遺伝子によってコードされている。一態様において、本発明のCARコンストラクト全体は、その配列全体のコドンが哺乳動物細胞での発現に最適化された導入遺伝子によってコードされている。コドンの最適化は、コードDNA中の同義コドン（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で偏っているという発見を指す。このようなコドンの縮重は、同一なポリペプチドを様々なヌクレオチド配列でコードすることを可能にする。様々なコドン最適化方法が当業界公知であり、例えば、少なくとも米国特許第5,786,464号および6,114,148号で開示された方法が挙げられる。

10

【0341】

一態様において、ヒト化CAR19は、配列番号1で提供されるscFv部分を含む。一態様において、ヒト化CAR19は、配列番号2に示されるscFv部分を含む。一態様において、ヒト化CAR19は、配列番号3に示されるscFv部分を含む。一態様において、ヒト化CAR19は、配列番号4に示されるscFv部分を含む。一態様において、ヒト化CAR19は、配列番号5に示されるscFv部分を含む。一態様において、ヒト化CAR19は、配列番号6に示されるscFv部分を含む。一態様において、ヒト化CAR19は、配列番号7に示されるscFv部分を含む。一態様において、ヒト化CAR19は、配列番号8に示されるscFv部分を含む。一態様において、ヒト化CAR19は、配列番号9に示されるscFv部分を含む。一態様において、ヒト化CAR19は、配列番号10に示されるscFv部分を含む。一態様において、ヒト化CAR19は、配列番号11に示されるscFv部分を含む。一態様において、ヒト化CAR19は、配列番号12に示されるscFv部分を含む。

20

【0342】

一態様において、本発明のCARは、特異的な抗体抗原結合ドメインを細胞内シグナル伝達分子と組み合わせている。例えば、いくつかの態様において、細胞内シグナル伝達分子としては、これらに限定されないが、CD3-ゼータ鎖、4-1BBおよびCD28シグナル伝達モジュールならびにそれらの組合せが挙げられる。一態様において、CD19CARは、配列番号31~42の1つまたは複数で提供される配列から選択されるCARを含む。一態様において、CD19CARは、配列番号31で提供される配列を含む。一態様において、CD19CARは、配列番号32で提供される配列を含む。一態様において、CD19CARは、配列番号33で提供される配列を含む。一態様において、CD19CARは、配列番号34で提供される配列を含む。一態様において、CD19CARは、配列番号35で提供される配列を含む。一態様において、CD19CARは、配列番号36で提供される配列を含む。一態様において、CD19CARは、配列番号37で提供される配列を含む。一態様において、CD19CARは、配列番号38で提供される配列を含む。一態様において、CD19CARは、配列番号39で提供される配列を含む。一態様において、CD19CARは、配列番号40で提供される配列を含む。一態様において、CD19CARは、配列番号41で提供される配列を含む。一態様において、CD19CARは、配列番号42で提供される配列を含む。

30

40

【0343】

したがって、一態様において、抗原結合ドメインは、ヒト化抗体または抗体フラグメントを含む。一実施形態において、ヒト化抗CD19結合ドメインは、本明細書で説明されるマウスまたはヒト化抗CD19結合ドメインの、1つまたは複数（例えば、3つ全て）の、軽鎖相補性決定領域1（LC CDR1）、軽鎖相補性決定領域2（LC CDR2）および軽鎖相補性決定領域3（LC CDR3）、ならびに／または本明細書で説明されるマウスまたはヒト化抗CD19結合ドメインの、1つまたは複数（例えば、3つ全て）の、重鎖相補性決定領域1（HC CDR1）、重鎖相補性決定領域2（HC CDR2）および重鎖相補性決定領域3（HC CDR3）を含み、例えば、1つまたは複数、例えば3つ全て、のLC CDRおよび1つまたは複数、例えば3つ全て、のHC CDR

50

を含むヒト化抗CD19結合ドメインを含む。一実施形態において、ヒト化抗CD19結合ドメインは、本明細書で説明されるマウスまたはヒト化抗CD19結合ドメインの、1つまたは複数（例えば、3つ全て）の、重鎖相補性決定領域1（HC CDR1）、重鎖相補性決定領域2（HC CDR2）および重鎖相補性決定領域3（HC CDR3）を含み、例えば、ヒト化抗CD19結合ドメインは、本明細書で説明されるHC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3を各々が含む2つの可変重鎖領域を有する。一実施形態において、ヒト化抗CD19結合ドメインは、本明細書で（例えば表2で）説明されるヒト化軽鎖可変領域、および／または本明細書で（例えば表2で）説明されるヒト化重鎖可変領域を含む。一実施形態において、ヒト化抗CD19結合ドメインは、本明細書で（例えば表2で）説明されるヒト化重鎖可変領域、例えば、本明細書で（例えば表2で）説明される少なくとも2つのヒト化重鎖可変領域を含む。一実施形態において、抗CD19結合ドメインは、表2のアミノ酸配列の軽鎖および重鎖を含むscFvである。ある実施形態において、抗CD19結合ドメイン（例えば、scFv）は、表2において提供される軽鎖可変領域のアミノ酸配列もしくは表2のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列の、少なくとも1、2もしくは3個の改変（例えば、置換）であるが30、20もしくは10個以下の改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および／または表2において提供される重鎖可変領域のアミノ酸配列もしくは表2のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列の、少なくとも1、2もしくは3個の改変（例えば、置換）であるが30、20もしくは10個以下の改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。一実施形態において、ヒト化抗CD19結合ドメインは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、および配列番号12からなる群より選択される配列、またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む。一実施形態において、ヒト化抗CD19結合ドメインをコードする核酸配列は、配列番号61、配列番号62、配列番号63、配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号70、配列番号71および配列番号72からなる群より選択される配列、またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む。一実施形態において、ヒト化抗CD19結合ドメインはscFvであり、本明細書で、例えば表2で説明されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域は、リンカー、例えば本明細書で説明されるリンカーを介して、本明細書で、例えば表2で説明されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に付着している。一実施形態において、ヒト化抗CD19結合ドメインは、（Gly₄-Ser）_nリンカーを包含し、ここでnは、1、2、3、4、5または6、例えば3または4（配列番号53）である。scFvの軽鎖可変領域および重鎖可変領域は、例えば、以下の配置：軽鎖可変領域-リンカー-重鎖可変領域または重鎖可変領域-リンカー-軽鎖可変領域のいずれであってもよい。

【0344】

一態様において、抗原結合ドメイン部分は、配列番号1～12から選択される1つまたは複数の配列を含む。一態様において、ヒト化CARは、配列番号31～42から選択される1つまたは複数の配列から選択される。一部の態様において、非ヒト化抗体は、ヒト化され、前記抗体の特異的な配列または領域は、ヒトにおいて自然に産生された抗体またはそのフラグメントに対する類似性が増加するように改変される。

【0345】

一実施形態において、CAR分子は、本明細書で説明される抗CD19結合ドメインの、1つまたは複数（例えば、3つ全て）の、軽鎖相補性決定領域1（LC CDR1）、軽鎖相補性決定領域2（LC CDR2）および軽鎖相補性決定領域3（LC CDR3）、ならびに本明細書で説明される抗CD19結合ドメインの1つまたは複数（例えば、3つ全て）の、重鎖相補性決定領域1（HC CDR1）、重鎖相補性決定領域2（HC CDR2）および重鎖相補性決定領域3（HC CDR3）を含む、抗CD19結合ドメイン、例えば、1つまたは複数、例えば3つ全て、のLC CDRおよび1つまたは複数、例えば3つ全て、のHC CDRを含む抗CD19結合ドメインを含む。一実施形態

において、抗CD19結合ドメインは、本明細書で説明される抗CD19結合ドメインの、1つまたは複数（例えば、3つ全て）の、重鎖相補性決定領域1（HC CDR1）、重鎖相補性決定領域2（HC CDR2）および重鎖相補性決定領域3（HC CDR3）を含み、例えば、抗CD19結合ドメインは、本明細書で説明されるHC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3を各々が含む2つの可変重鎖領域を有する。

【0346】

一態様において、抗CD19結合ドメインは、抗体または抗体フラグメントの特定の機能的な特徴または特性を特徴とする。例えば、一態様において、抗原結合ドメインを含む本発明のCAR組成物の一部は、ヒトCD19に特異的に結合する。一態様において、本発明は、抗体または抗体フラグメントを含む抗原結合ドメインであって、抗体結合ドメインがCD19タンパク質またはそのフラグメントと特異的に結合し、前記抗体または抗体フラグメントが、配列番号1～12または配列番号59のアミノ酸配列を包含する可変軽鎖および／または可変重鎖を含む、抗原結合ドメインに関する。一態様において、抗原結合ドメインは、配列番号1～12または配列番号59から選択されるscFvのアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態において、scFvは、リーダー配列と連続しており同じリーディングフレーム内にある。一態様において、リーダー配列は、配列番号13として提供されるポリペプチド配列である。

【0347】

一態様において、抗原結合ドメインを含むCARの部分は、CD19を標的とする抗原結合ドメインを含む。一態様において、抗原結合ドメインは、ヒトCD19を標的とする。一態様において、CARの抗原結合ドメインは、Nicholson et al. Mol. Immun. 34 (16-17): 1157-1165 (1997)において説明されているFMC63 scFvフラグメントと同じもしくは類似した結合特異性を有し、またはそのようなFMC63 scFvフラグメントを含む。一態様において、抗原結合ドメインを含むCARの部分は、B細胞抗原、例えば、ヒトB細胞抗原を標的とする抗原結合ドメインを含む。CD19抗体分子は、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み入れられるWO2014/153270において説明されている抗体分子（例えば、ヒト化抗CD19抗体分子）であってもよい。WO2014/153270では、様々なCARTコンストラクトの結合および効能をアッセイする方法も説明されている。

【0348】

一実施形態において、抗CD19結合ドメインは、本明細書で（例えば表3で）説明されるマウス軽鎖可変領域、および／または本明細書で（例えば表3で）説明されるマウス重鎖可変領域を含む。一実施形態において、抗CD19結合ドメインは、表3のアミノ酸配列のマウス軽鎖およびマウス重鎖を含むscFvである。ある実施形態において、抗CD19結合ドメイン（例えば、scFv）は、表3において提供される軽鎖可変領域のアミノ酸配列もしくは表3のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列の、少なくとも1、2もしくは3個の改変（例えば、置換）であるが30、20もしくは10個以下の改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および／または表3において提供される重鎖可変領域のアミノ酸配列もしくは表3のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列の、少なくとも1、2もしくは3個の改変（例えば、置換）であるが30、20もしくは10個以下の改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。一実施形態において、抗CD19結合ドメインは、配列番号59の配列、またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む。一実施形態において、抗CD19結合ドメインはscFvであり、本明細書で、例えば表3で説明されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域は、リンカー、例えば本明細書で説明されるリンカーを介して、本明細書で、例えば表3で説明されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に付着している。一実施形態において、抗原結合ドメインは、(Gly₄-Ser)_nリンカーを包含し、ここでnは、1、2、3、4、5または6、例えば3または4（配列番号53）である。scFvの軽鎖可変領域および重鎖可変領域は、例えば、以下の配置：軽鎖可変領域ーリンカーー重鎖可変領域または重鎖可変領域ーリンカーー軽鎖可変領域のいずれであって

10

20

30

40

50

もよい。

【0349】

さらに、本発明は、B細胞阻害剤と適宜組み合わせたCD19 CAR組成物、および疾患の中でも、CD19を発現する細胞または組織を侵すがんまたはあらゆる悪性腫瘍または自己免疫疾患を処置するための医薬品または方法におけるそれらの使用を（とりわけ）提供する。

【0350】

一態様において、本発明のCARは、CD19を発現する正常細胞を根絶するのに使用することができ、それによって細胞移植前の細胞調整療法（cellular conditioning therapy）としての使用に適用できる。一態様において、CD19を発現する正常細胞は、CD19を発現する正常幹細胞であり、細胞移植は、幹細胞移植である。

10

【0351】

一態様において、本発明は、キメラ抗原受容体（CAR）を発現するように加工された細胞（例えば、T細胞）を提供し、ここでCAR発現細胞、例えばCAR T細胞（「CAR T」）は、抗がん特性を示す。好適な抗原は、CD19である。一態様において、CARの抗原結合ドメインは、部分的にヒト化された抗CD19抗体フラグメントを含む。一態様において、CARの抗原結合ドメインは、scFvを含む、部分的にヒト化された抗CD19抗体フラグメントを含む。したがって、本発明は、ヒト化抗CD19結合ドメインを含み、免疫エフェクター細胞、例えばT細胞またはNK細胞に遺伝子操作される、CD19-CAR、および養子療法のためのそれらの使用方法を（とりわけ）提供する。

20

【0352】

一態様において、CAR、例えばCD19-CARは、CD137（4-1BB）シグナル伝達ドメイン、CD28シグナル伝達ドメイン、CD3ゼータシグナルドメイン、およびそれらのあらゆる組合せの群から選択される少なくとも1つの細胞内ドメインを含む。一態様において、CAR、例えばCD19-CARは、CD137（4-1BB）またはCD28以外の1つまたは複数の共刺激分子由来の少なくとも1つの細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【0353】

本発明は、これに限定されないが、CARをコードする配列を含む組換えDNAコンストラクトを包含し、前記CARは、CD19、CD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3またはROR1、例えば、ヒトCD19、CD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3またはROR1と特異的に結合する抗体または抗体フラグメントを含み、前記抗体フラグメントの配列は、細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列と連続しており同じリーディングフレーム内にある。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および／または一次シグナル伝達ドメイン、例えばゼータ鎖を含んでいてもよい。共刺激シグナル伝達ドメインは、共刺激分子の細胞内ドメインの少なくとも一部を構成するCARの一部を指す。一実施形態において、抗原結合ドメインは、本明細書で説明されるマウス抗体または抗体フラグメントである。一実施形態において、抗原結合ドメインは、ヒト化抗体または抗体フラグメントである。

30

40

【0354】

具体的な態様において、本発明のCARコンストラクトは、配列番号1～12からなる群より選択されるscFvドメインまたは配列番号59のscFvドメインを含み、ここでscFvの前に、配列番号13で提供されるもののような任意のリーダー配列、それに続いて配列番号14または配列番号45または配列番号47または配列番号49で提供されるもののような任意のヒンジ配列、配列番号15で提供されるもののような膜貫通領域、配列番号16または配列番号51などの細胞内シグナル伝達ドメイン、および配列番号17または配列番号43などのCD3ゼータ配列が存在していてもよく、ここで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。また本発明は（とりわけ）、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番

50

号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、および配列番号59からなる群より選択されるs c F vフラグメントのそれぞれのポリペプチドをコードするヌクレオチド配列も包含する。また本発明は（とりわけ）、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、および配列番号59からなる群より選択されるs c F vフラグメントのそれぞれ、ならびに配列番号13～17のドメインのそれぞれのポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、加えてコードされた本発明のCD19 CAR融合タンパク質も包含する。一態様において、典型的なCD19 CARコンストラクトは、任意のリーダー配列、細胞外抗原結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメイン、および細胞内刺激ドメインを含む。一態様において、典型的なCD19 CARコンストラクトは、任意のリーダー配列、細胞外抗原結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメイン、細胞内共刺激ドメインおよび細胞内刺激ドメインを含む。一部の実施形態において、本発明のヒト化s c F vドメインを含有する特異的CD19 CARコンストラクトは、配列番号31～42として提供されるか、または配列番号59として提供されるようなマウスs c F vドメインである。

【0355】

完全長CAR配列も、表2および表3に示される通り、配列番号31～42および58として本明細書において提供される。

【0356】

典型的なリーダー配列は、配列番号13として提供される。典型的なヒンジ／スペーサー配列は、配列番号14または配列番号45または配列番号47または配列番号49として提供される。典型的な膜貫通ドメイン配列は、配列番号15として提供される。4-1BBタンパク質の細胞内シグナル伝達ドメインの典型的な配列は、配列番号16として提供される。CD27の細胞内シグナル伝達ドメインの典型的な配列は、配列番号51として提供される。典型的なCD3ゼータドメイン配列は、配列番号17または配列番号43として提供される。これらの配列を、例えば、CD19、CD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3またはROR1の1つまたは複数を認識するs c F vと組み合わせて使用してもよい。

【0357】

様々なs c F vフラグメントおよび他のCAR構成要素の典型的な配列が本明細書において提供される。リーダー配列のない（例えば、配列番号13のアミノ酸配列も、配列番号54のヌクレオチド配列もない）これらのCAR構成要素（例えば、配列番号121のもの、または表2、3、6、11A、11B、16もしくは25の配列）も本明細書において提供されることに留意されたい。

【0358】

実施形態において、本明細書で説明されるCAR配列は、CD3ゼータ鎖由来の共刺激ドメインのシグナルドメインにおけるQ/K残基変化を含有する。

【0359】

一態様において、本発明は、CARをコードする核酸分子を含む組換え核酸コンストラクトを包含し、前記核酸分子は、細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列と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、例えば本明細書で説明される、抗CD19結合ドメインをコードする核酸配列を含む。一態様において、抗CD19結合ドメインは、配列番号1～12および58の1つまたは複数から選択される。一態様において、抗CD19結合ドメインは、配列番号67～72および97の1つまたは複数で提供される配列のヌクレオチド残基64～813によってコードされる。一態様において、抗CD19結合ドメインは、配列番号61のヌクレオチド残基64～813によってコードされる。一態様において、抗CD19結合ドメインは、配列番号62のヌクレオチド残基64～813によってコードされる。一態様において、抗CD19結合ドメインは、配列番号63のヌクレオチド残基64～813によってコードされる。一態様において、抗CD19結合ドメインは、配列番号64のヌクレオチド残基64～813によってコードさ

10

20

30

40

50

れる。一態様において、抗CD19結合ドメインは、配列番号65のヌクレオチド残基64～813によってコードされる。一態様において、抗CD19結合ドメインは、配列番号66のヌクレオチド残基64～813によってコードされる。一態様において、抗CD19結合ドメインは、配列番号67のヌクレオチド残基64～813によってコードされる。一態様において、抗CD19結合ドメインは、配列番号68のヌクレオチド残基64～813によってコードされる。一態様において、抗CD19結合ドメインは、配列番号69のヌクレオチド残基64～813によってコードされる。一態様において、抗CD19結合ドメインは、配列番号70のヌクレオチド残基64～813によってコードされる。一態様において、抗CD19結合ドメインは、配列番号71のヌクレオチド残基64～813によってコードされる。一態様において、抗CD19結合ドメインは、配列番号72のヌクレオチド残基64～813によってコードされる。

10

【0360】

CD19阻害剤および併用療法が本明細書において提供される。一部の実施形態において、CD19阻害剤（例えば、細胞治療薬または抗体）は、B細胞阻害剤、例えばCD10、CD19、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3またはROR1の1つまたは複数の阻害剤と組み合わせて投与される。CD19阻害剤としては、CD19 CAR発現細胞、例えばCD19 CART細胞、あるいは抗CD19抗体（例えば、抗CD19単一もしくは二重特異性抗体）またはそのフラグメントもしくはコンジュゲートが挙げられるが、これらに限定されない。ある実施形態において、CD19阻害剤は、B細胞阻害剤、例えば、本明細書で説明されるCAR発現細胞と組み合わせて投与される。

20

【0361】

多数のCD19 CAR発現細胞が本開示で説明される。例えば、一部の実施形態において、CD19阻害剤は、抗CD19 CAR発現細胞、例えばCART、例えば、表2に記載の抗CD19 CARコンストラクトを発現するか、または表2、4もしくは5に記載のscFv、CDRもしくはVHおよびVL鎖を含むCD19結合CARによってコードされている、細胞を包含する。例えば、抗CD19 CAR発現細胞、例えばCARTは、例えば、本明細書で説明されるCAR発現細胞と組み合わせて投与するために、CD19-CAR（CD19結合ドメインを含む）を細胞（例えば、T細胞またはNK細胞）に遺伝子操作することによって生成される。本明細書で説明されるCAR発現細胞の養子療法のための使用方法も本明細書において提供される。

30

【0362】

一実施形態において、抗原結合ドメインは、本明細書に、例えば表2、4もしくは5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のHC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3、ならびに／または本明細書に、例えば表2、4もしくは5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のLC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3を含む。一実施形態において、抗原結合ドメインは、上に列挙または記載した抗体の重鎖可変領域および／または軽鎖可変領域を含む。

【0363】

40

ある実施形態において、CD19結合ドメイン（例えば、scFv）は、表2において提供される軽鎖可変領域のアミノ酸配列もしくは表2のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列の、少なくとも1、2もしくは3個の改変（例えば、置換）であるが30、20もしくは10個以下の改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および／または表2において提供される重鎖可変領域のアミノ酸配列もしくは表2のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列の、少なくとも1、2もしくは3個の改変（例えば、置換）であるが30、20もしくは10個以下の改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。実施形態において、CD19結合ドメインは、表4もしくは表5の1つもしくは複数のCDR（例えば、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3

50

の各々1つ)、または前記CDRの1つもしくは複数の1個、2個、3個、4個、5個もしくは6個の改変(例えば、置換)を有するCDRを含む。

【0364】

典型的な抗CD19抗体またはそれらのフラグメントもしくはコンジュゲートとしては、ブリナツモマブ、SAR3419(Sanofi)、MEDI-551(MedImmune LLC)、Combotox、DT2219ARL(Masoni Cancer Center)、MOR-208(XmAb-5574とも呼ばれる; MorphoSys)、XmAb-5871(Xencor)、MDX-1342(Bristol-Myers Squibb)、SGN-CD19A(Seattle Genetics)、およびAFM11(Affimed Therapeutics)が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、Hammer.MAbs.4.5(2012): 571-77を参照されたい。ブリナツモマブは、2つのscFv-CD19と結合するものとCD3と結合するものからなる二重特異性抗体である。ブリナツモマブは、T細胞にがん細胞を攻撃させる。例えば、Hammer et al.; 臨床試験識別番号NCT00274742およびNCT01209286を参照されたい。MEDI-551は、増強された抗体依存性細胞媒介細胞毒性(ADCC)を有するように加工されたFcを有するヒト化抗CD19抗体である。例えば、Hammer et al.; および臨床試験識別番号NCT01957579を参照されたい。Combotoxは、CD19と結合する免疫毒素と、CD22と結合する免疫毒素の混合物である。前記免疫毒素は、脱グリコシル化リシンA鎖に融合されたscFv抗体フラグメントで構成されている。例えば、Hammer et al.; およびHerrera et al.J. Pediatr.Hematol.Oncol.31.12(2009):936-41; Schindler et al.Br. J. Haematol.154.4(2011):471-6を参照されたい。DT2219ARLは、2つのscFvとトランケートされたジフテリア毒素とを含む、CD19およびCD22を標的とする二重特異性免疫毒素である。例えば、Hammer et al.; および臨床試験識別番号NCT00889408を参照されたい。SGN-CD19Aは、合成細胞毒性細胞殺滅剤であるモノメチルオーリスタチンF(MMAF)に連結された抗CD19ヒト化モノクローナル抗体からなる抗体薬物コンジュゲート(ADC)である。例えば、Hammer et al.; ならびに臨床試験識別番号NCT01786096およびNCT01786135を参照されたい。SAR3419は、切断可能なリンカーを介してメイタンシン誘導体とコンジュゲートしている抗CD19ヒト化モノクローナル抗体を含む抗CD19抗体薬物コンジュゲート(ADC)である。例えば、Younes et al.J. Clin.Oncol.30.2(2012): 2776-82; Hammer et al.; 臨床試験識別番号NCT00549185; およびBlanc et al.Clin Cancer Res., 2011;17:6448-58を参照されたい。XmAb-5871は、Fcが加工されたヒト化抗CD19抗体である。例えば、Hammer et al.を参照されたい。MDX-1342は、増強されたADCCを有する、Fcが加工されたヒト抗CD19抗体である。例えば、Hammer et al.を参照されたい。実施形態において、抗体分子は、二重特異性抗CD19および抗CD3分子である。例えば、AFM11は、CD19およびCD3を標的とする二重特異性抗体である。例えば、Hammer et al.; および臨床試験識別番号NCT02106091を参照されたい。一部の実施形態において、本明細書で説明される抗CD19抗体は、治療剤、例えば、化学療法剤、ペプチドワクチン(例えば、Izumoto et al. 2008 J Neurosurg 108:963-971で説明されているもの)、免疫抑制剤、もしくは免疫除去剤(immunoablative agents)、例えばシクロスポリン、アザチオプリン、メトトレキサート、ミコフェノール酸塩、FK506、CAMPATH、抗CD3抗体、シトキサン(cytosan)、フルダラビン、ラパマイシン、ミコフェノール酸、ステロイド、FR901228、またはサイトカインとコンジュゲートされるか、または他の形で結合される。

【0365】

典型的な抗CD19抗体分子(抗体またはそれらのフラグメントもしくはコンジュゲートを含む)としては、表2、4または5に記載のscFv、CDR、またはVHおよびVL鎖を挙げることができる。ある実施形態において、CD19結合抗体分子は、表2において提供される軽鎖可変領域のアミノ酸配列もしくは表2のアミノ酸配列と95~99%

の同一性を有する配列の、少なくとも1、2もしくは3個の改変（例えば、置換）であるが30、20もしくは10個以下の改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および／または表2において提供される重鎖可変領域のアミノ酸配列もしくは表2のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列の、少なくとも1、2もしくは3個の改変（例えば、置換）であるが30、20もしくは10個以下の改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。実施形態において、CD19結合抗体分子は、表4もしくは表5の1つもしくは複数のCDR（例えば、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3の各々1つ）、または前記CDRの1つもしくは複数の1個、2個、3個、4個、5個もしくは6個の改変（例えば、置換）を有するCDRを含む。抗体分子は、例えば、単離された抗体分子であってもよい。

10

【0366】

一実施形態において、CD19に対する抗原結合ドメインは、本明細書中の表に記載の抗原結合ドメインの抗原結合部分、例えばCDRである。一実施形態において、CD19抗原結合ドメインは、任意のCD19 CAR、例えば、LG-740；米国特許第8,399,645号；米国特許第7,446,190号；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(18):4817-4828 (2011)；Kochenderfer et al., Blood 116(20):4099-102 (2010)；Kochenderfer et al., Blood 122 (25):4129-39(2013)；および16th Annu Meet Am Soc Gen Cell Ther (ASGCT) (May 15-18, Salt Lake City) 2013, Abst 10からのものであってもよく、前記参考文献の各々は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

20

【0367】

一実施形態において、CD19と特異的に結合するCAR T細胞は、USAN名TISAGENLECLEUCEL-Tを有する。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アルファプロモーターの制御下のCTL019導入遺伝子を含む自己不活性化、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デリバリーされる導入遺伝子陽性T細胞と導入遺伝子陰性T細胞の混合物であってもよい。

30

【0368】

一態様において、本発明のCARコンストラクトの核酸配列は、配列番号85～96の1つまたは複数から選択される。一態様において、CARコンストラクトの核酸配列は、配列番号85である。一態様において、CARコンストラクトの核酸配列は、配列番号86である。一態様において、CARコンストラクトの核酸配列は、配列番号87である。一態様において、CARコンストラクトの核酸配列は、配列番号88である。一態様において、CARコンストラクトの核酸配列は、配列番号89である。一態様において、CARコンストラクトの核酸配列は、配列番号90である。一態様において、CARコンストラクトの核酸配列は、配列番号91である。一態様において、CARコンストラクトの核酸配列は、配列番号92である。一態様において、CARコンストラクトの核酸配列は、配列番号93である。一態様において、CARコンストラクトの核酸配列は、配列番号94である。一態様において、CARコンストラクトの核酸配列は、配列番号95である。一態様において、CARコンストラクトの核酸配列は、配列番号96である。一態様において、CARコンストラクトの核酸配列は、配列番号97である。一態様において、CARコンストラクトの核酸配列は、配列番号98である。一態様において、CARコンストラクトの核酸配列は、配列番号99である。

40

【0369】

CD20阻害剤および結合ドメイン

本明細書で使用される場合、用語「CD20」は、B細胞上で検出可能であることが公知の抗原決定基のことをいう。ヒトCD20は、4膜貫通ドメイン、サブファミリーA、

50

メンバー1 (MS4A1) とも呼ばれる。ヒトおよびマウスアミノ酸および核酸配列は、GenBank、UniProtおよびSwiss-Protなどの公開データベースで見出すことができる。例えば、ヒトCD20のアミノ酸配列は、受託番号NP_690605.1およびNP_068769.2として見出すことができ、ヒトCD20の転写変異体1および3をコードするヌクレオチド配列は、それぞれ、受託番号NM_152866.2およびNM_021950.3で見出すことができる。本明細書で使用される場合、「CD20」は、完全長野生型CD20の突然変異、例えば点突然変異、フラグメント、挿入、欠失およびスプライス変異体を含むタンパク質を包含する。一態様において、CARの抗原結合部分は、CD20タンパク質の細胞外ドメイン内の抗原を認識し、それに結合する。一態様において、CD20タンパク質は、がん細胞上で発現される。

10

【0370】

一部の態様において、本開示は、CD20阻害剤または結合ドメイン、例えば、本明細書で説明されるようなCD20阻害剤または結合ドメインを提供する。本開示は、CD20結合ドメインをコードする核酸、またはCD20結合ドメインを含むCARも提供する。CD20阻害剤としては、CD20 CAR発現細胞、例えばCD20 CART細胞、または抗CD20抗体（例えば、抗CD20単一もしくは二重特異性抗体）もしくはそのフラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。組成物は、第二の薬剤、例えば、抗CD19 CAR発現細胞、またはCD19結合ドメインも含んでいてもよい。薬剤は、例えば、単一の核酸によってコードされていてもよく、または異なる核酸によってコードされていてもよい。

20

【0371】

一部の態様において、CD20阻害剤または結合ドメインは、単剤療法として投与される。一部の態様において、CD20阻害剤または結合ドメインは、抗CD19 CAR発現細胞などの第二の薬剤と組み合わせて投与される。ある実施形態において、CD20阻害剤は、CD19阻害剤、例えば、CD19 CAR発現細胞、例えば、本明細書で説明されるCAR発現細胞、例えば、マウスのものであるか、ヒトのものであるか、またはヒト化されている抗体結合ドメインを含むCARを発現する細胞と組み合わせて投与される。

【0372】

CD20 CAR発現細胞、例えばCART

30

ある実施形態において、CD20抗体分子は、表15Aもしくは15Bにおいて提供される軽鎖可変領域のアミノ酸配列または表15Aもしくは15Bのアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列の、少なくとも1、2または3個の改変（例えば、置換）であるが30、20または10個以下の改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および／あるいは表14Aもしくは14Bにおいて提供される重鎖可変領域のアミノ酸配列または表14Aもしくは14Bのアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列の、少なくとも1、2または3個の改変（例えば、置換）であるが30、20または10個以下の改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。一実施形態において、CD20抗体分子は、本明細書で説明されるCD20結合ドメインの、1つもしくは複数（例えば、3つ全て）の、軽鎖相補性決定領域1（LC CDR1）、軽鎖相補性決定領域2（LC CDR2）および軽鎖相補性決定領域3（LC CDR3）、ならびに／または本明細書で説明されるCD20結合ドメインの、1つもしくは複数（例えば、3つ全て）の、重鎖結合ドメインアミノ酸配列の重鎖相補性決定領域1（HC CDR1）、重鎖相補性決定領域2（HC CDR2）および重鎖相補性決定領域3（HC CDR3）を含み、例えば、1つまたは複数、例えば3つ全てのLC CDRおよび1つまたは複数、例えば3つ全て、のHC CDRを含むCD20結合ドメインを含む。これらのCDRは、例えば、表12A、12B、および／もしくは表13のもの、またはそれらと実質的に同一の配列であってもよい。ある実施形態において、CD20抗体分子は、表12A、12Bおよび／または表13のアミノ酸配列の1個、2個、3個、4個、5個または6個の改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列を含む1つま

40

50

たは複数のCDR（例えば、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3）を含む。抗体分子は、例えば、単離された抗体分子であってもよい。

【0373】

一部の実施形態において、CD20阻害剤は、抗CD20 CAR発現細胞、例えばCART、例えば、表11Aもしくは11Bに記載の抗CD20 CARコンストラクト、またはそれと実質的に同一の配列を発現するか、あるいは表11A～15Bに記載のscFv、CDRもしくはVHおよびVL鎖、またはそれと実質的に同一の配列を含むCD20結合CARによってコードされてい、細胞を包含する。例えば、抗CD20 CAR発現細胞、例えばCARTは、例えば、本明細書で説明されるCAR発現細胞と組み合わせて投与するために、CD20-CAR（CD20結合ドメインを含む）を細胞（例えば、T細胞またはNK細胞）に遺伝子操作することによって生成される。本明細書で説明されるCAR発現細胞の養子療法のための使用方法も本明細書において提供される。

10

【0374】

ある実施形態において、CD20結合ドメイン（例えば、scFv）は、表15Aもしくは15Bにおいて提供される軽鎖可変領域のアミノ酸配列または表15Aもしくは15Bのアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列の、少なくとも1、2または3個の改変（例えば、置換）であるが30、20または10個以下の改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および／あるいは表14Aもしくは14Bにおいて提供される重鎖可変領域のアミノ酸配列または表14Aもしくは14Bのアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列の、少なくとも1、2または3個の改変（例えば、置換）であるが30、20または10個以下の改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。

20

【0375】

一実施形態において、CD20結合ドメインは、本明細書で説明されるCD20結合ドメインの、1つもしくは複数（例えば、2つもしくは3つ全て）の、軽鎖相補性決定領域1（LC CDR1）、軽鎖相補性決定領域2（LC CDR2）および軽鎖相補性決定領域3（LC CDR3）、ならびに／または本明細書で説明されるCD20結合ドメインの、1つもしくは複数（例えば、3つ全て）の、重鎖相補性決定領域1（HC CDR1）、重鎖相補性決定領域2（HC CDR2）および重鎖相補性決定領域3（HC CDR3）を含み、例えば、1つまたは複数、例えば3つ全て、のLC CDRおよび1つまたは複数、例えば3つ全て、のHC CDRを含むCD20結合ドメインを含む。これらのCDRは、例えば、表12A、12B、および／もしくは表13のもの、またはそれらと実質的に同一の配列であってもよい。ある実施形態において、CD20結合ドメイン（例えば、scFv）は、表12A、12Bおよび／または表13のアミノ酸配列の1個、2個、3個、4個、5個または6個の改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列を含む1つまたは複数のCDR（例えば、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3）を含む。

30

【0376】

一部の実施形態において、CARは、CD20結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを包含する、抗体または抗体フラグメントを含む。CD20結合ドメインは、表13、15Aまたは15Bに列挙したいずれかのCD20軽鎖結合ドメインアミノ酸配列の軽鎖相補性決定領域1（LC CDR1）、軽鎖相補性決定領域2（LC CDR2）および軽鎖相補性決定領域3（LC CDR3）の1つまたは複数、ならびに表12A、12B、14Aまたは14Bに列挙したいずれかのCD20重鎖結合ドメインアミノ酸配列の重鎖相補性決定領域1（HC CDR1）、重鎖相補性決定領域2（HC CDR2）および重鎖相補性決定領域3（HC CDR3）の1つまたは複数を含んでいてもよい。

40

【0377】

ある実施形態において、CD20結合ドメインは、CAR20-1、CAR20-2、

50

CAR20-3、CAR20-4、CAR20-5、CAR20-6、CAR20-7、CAR20-8、CAR20-9、CAR20-10、CAR20-11、CAR20-12、CAR20-13、CAR20-14、CAR20-15、またはCAR20-16のいずれか1つまたはそれと実質的に同一の配列の、6つのCDR（例えば、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3の各々1つ）を含む。ある実施形態において、CD20結合ドメインは、CAR20-1、CAR20-2、CAR20-3、CAR20-4、CAR20-5、CAR20-6、CAR20-7、CAR20-8、CAR20-9、CAR20-10、CAR20-11、CAR20-12、CAR20-13、CAR20-14、CAR20-15、またはCAR20-16のいずれか1つまたはそれと実質的に同一の配列の、3つのCDR（例えば、HC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3の各々1つ、またはLC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3の各々1つ）を含む。

10

【0378】

一実施形態において、CD20結合ドメインは、本明細書で（例えば、表15Aもしくは15Bで）説明される軽鎖可変領域、および／または本明細書で（例えば、表14Aもしくは14Bで）説明される重鎖可変領域、あるいはそれと実質的に同一の配列を含む。ある実施形態において、CD20結合ドメイン（例えば、scFv）は、表15Aもしくは15Bにおいて提供される軽鎖可変領域のアミノ酸配列または表15Aもしくは15Bのアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列の、少なくとも1、2または3個の改変（例えば、置換）であるが30、20または10個以下の改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および／あるいは表14Aもしくは14Bにおいて提供される重鎖可変領域のアミノ酸配列または表14Aもしくは14Bのアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列の、少なくとも1、2または3個の改変（例えば、置換）であるが30、20または10個以下の改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。

20

【0379】

さらなる実施形態は、このセクションで説明されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を包含する。例えば、さらなる実施形態は、表11A～15Bのいずれかのポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を包含する。例えば、ヌクレオチド配列は、表11Aまたは11BのCARコンストラクトまたはscFvを含んでもよい。ヌクレオチドは、表14Aもしくは14BのVH、表15Aもしくは15BのVL、または両方をコードし得る。ヌクレオチドは、表12Aもしくは12BのVH CDR1、VH CDR2もしくはVH CDR3の1つもしくは複数（例えば、2つもしくは3つ）をコードし得るか、および／またはヌクレオチドは、表13のVL CDR1、VL CDR2もしくはVL CDR3の1つもしくは複数（例えば、2つもしくは3つ）をコードし得る。ヌクレオチド配列はまた、配列番号13、14、15、16、17および51のドメインの1つまたは複数、例えば全てを包含し得る。

30

【0380】

別の態様において、CD19 CARを発現する細胞とCD20 CARを発現する細胞の混合物を含む、CAR発現細胞、例えばCAR T細胞、の集団が本明細書において提供される。例えば、一実施形態において、CAR T細胞の集団は、CD19 CARを発現する第一の細胞、およびCD20 CARを発現する第二の細胞を包含し得る。一実施形態において、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包含するCAR（例えば、CD19 CAR、ROR1 CAR、CD20 CAR、またはCD22 CAR）を発現する第一の細胞、および二次シグナル伝達ドメインを包含するCAR（例えば、CD19 CAR、ROR1 CAR、CD20 CAR、またはCD22 CAR）を発現する第二の細胞を包含する。

40

【0381】

CD20 CARはまた、膜貫通ドメイン、例えば本明細書で説明されるような膜貫通ドメイン、細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば本明細書で説明されるような細胞内シグ

50

ナル伝達ドメイン、共刺激ドメイン、例えば本明細書で説明されるような共刺激ドメイン、リーダー配列、例えば本明細書で説明されるようなリーダー配列、またはヒンジ、例えば本明細書で説明されるようなヒンジ、の1つまたは複数を含んでいてもよい。

【0382】

典型的な抗CD20抗体としては、リツキシマブ、オフアツムマブ、オクレリズマブ、ベルツズマブ、オビスツズマブ、TRU-015 (Trubion Pharmaceuticals)、オカラツズマブおよびPro131921 (Genentech) が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、Lim et al. Haematologica. 95. 1 (2010):135-43を参照されたい。

【0383】

一部の実施形態において、抗CD20抗体は、リツキシマブを含む。リツキシマブとは、例えば、www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/103705s53111bl.pdfにおいて説明されているように、CD20と結合し、CD20発現細胞の細胞溶解を引き起こす、キメラマウス/ヒトモノクローナル抗体IgG1カッパーである。一部の実施形態において、リツキシマブを使用して、非ホジキンリンパ腫(NHL)(例えば、濾胞性NHL、びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫)および慢性リンパ球性白血病(CLL)などの、B細胞悪性腫瘍を処置することができる。他の実施形態において、リツキシマブは、関節リウマチ、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、慢性炎症性脱髄性多発神経炎、自己免疫性貧血、自己免疫性溶血性貧血、赤芽球ろう、特発性血小板減少性紫斑病(ITP)、エバンス症候群、血管炎、水疱性皮膚障害、1型糖尿病、シェーグレン症候群、抗NMDA受容体脳炎およびデビック病、グレーブス眼症、ならびに自己免疫性膵炎などの、自己免疫疾患を処置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、リツキシマブは、移植片拒絶を処置するために使用することができる。

【0384】

いくつかの実施形態において、リツキシマブを、静脈内投与する、例えば、静脈内注入として投与する。例えば、各回の注入は、約500~2000mg(例えば、約500~550、550~600、600~650、650~700、700~750、750~800、800~850、850~900、900~950、950~1000、1000~1100、1100~1200、1200~1300、1300~1400、1400~1500、1500~1600、1600~1700、1700~1800、1800~1900、または1900~2000mg)のリツキシマブを施す。

【0385】

いくつかの実施形態において、リツキシマブを、 $150\text{ mg/m}^2 \sim 750\text{ mg/m}^2$ 、例えば、約 $150 \sim 175\text{ mg/m}^2$ 、 $175 \sim 200\text{ mg/m}^2$ 、 $200 \sim 225\text{ mg/m}^2$ 、 $225 \sim 250\text{ mg/m}^2$ 、 $250 \sim 300\text{ mg/m}^2$ 、 $300 \sim 325\text{ mg/m}^2$ 、 $325 \sim 350\text{ mg/m}^2$ 、 $350 \sim 375\text{ mg/m}^2$ 、 $375 \sim 400\text{ mg/m}^2$ 、 $400 \sim 425\text{ mg/m}^2$ 、 $425 \sim 450\text{ mg/m}^2$ 、 $450 \sim 475\text{ mg/m}^2$ 、 $475 \sim 500\text{ mg/m}^2$ 、 $500 \sim 525\text{ mg/m}^2$ 、 $525 \sim 550\text{ mg/m}^2$ 、 $550 \sim 575\text{ mg/m}^2$ 、 $575 \sim 600\text{ mg/m}^2$ 、 $600 \sim 625\text{ mg/m}^2$ 、 $625 \sim 650\text{ mg/m}^2$ 、 $650 \sim 675\text{ mg/m}^2$ 、または $675 \sim 700\text{ mg/m}^2$ (表記中、 m^2 は、対象の体表面積を指し示す)の用量で投与する。

【0386】

いくつかの実施形態において、リツキシマブを、少なくとも4日間、例えば、4、7、14、21、28、35日間、またはこれを超える投与間隔で投与する。例えば、リツキシマブを、少なくとも0.5週間、例えば、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8週間、またはこれを超える投与間隔で投与する。

【0387】

いくつかの実施形態において、リツキシマブを、本明細書で説明される用量および投与間隔で、ある期間、例えば、少なくとも2週間、例えば、少なくとも、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20

10

20

30

40

50

週間、またはこれを超える期間にわたり投与する。例えば、リツキシマブを、本明細書で説明される用量および投与間隔で、処置サイクル1つあたり、のべ少なくとも4回の投与（dose）（例えば、処置サイクル1つあたり、少なくとも4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16回、またはこれを超える投与）にわたり投与する。

【0388】

一部の態様において、抗CD20抗体は、オフアツムマブを含む。オフアツムマブとは、分子量を約149kDaとする、抗CD20 IgG1κヒトモノクローナル抗体である。例えば、オフアツムマブは、トランスジェニックマウスおよびハイブリドーマ技術を使用して生成し、組換えマウス細胞株（NS0）から発現し、精製する。例えば、www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/125326lbl.pdf；ならびに臨床試験識別番号NCT01363128、NCT01515176、NCT01626352、およびNCT01397591を参照されたい。

10

【0389】

オフアツムマブは、CLL、非ホジキンリンパ腫（NHL）（例えば、濾胞性NHLおよびDLBCL）、B細胞前リンパ球性白血病、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、マントル細胞リンパ腫、関節リウマチおよび多発性硬化症などの疾患を処置するために使用することができる。

【0390】

いくつかの実施形態において、オフアツムマブを、静脈内注入として投与する。例えば、各回の注入は、約150～3000mg（例えば、約150～200、200～250、250～300、300～350、350～400、400～450、450～500、500～550、550～600、600～650、650～700、700～750、750～800、800～850、850～900、900～950、950～1000、1000～1200、1200～1400、1400～1600、1600～1800、1800～2000、2000～2200、2200～2400、2400～2600、2600～2800、または2800～3000mg）のオフアツムマブを施す。

20

【0391】

一部の実施形態において、オフアツムマブは、少なくとも4日間、例えば、4、7、14、21、28、35日間、またはこれを超える投与間隔で投与される。例えば、オフアツムマブは、少なくとも1週間、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、24、26、28、20、22、24、26、28、30週間、またはこれを超える投与間隔で投与する。

30

【0392】

一部の実施形態において、オフアツムマブは、本明細書で説明される用量および投与間隔で、ある期間、例えば、少なくとも1週間、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、24、26、28、30、40、50、60週間、もしくはこれを超える期間、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12カ月、もしくはこれを超える期間、または1、2、3、4、5年、もしくはこれを超える期間にわたり投与される。例えば、オフアツムマブは、本明細書で説明される用量および投与間隔で、処置サイクル1つあたり、のべ少なくとも2回の投与（例えば、処置サイクル1つあたり、少なくとも、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、18、20回、またはこれを超える投与）にわたり投与される。

40

【0393】

一部の態様において、抗CD20抗体は、オクレリズマブを含む。オクレリズマブとは、例えば、臨床試験識別番号NCT00077870、NCT01412333、NCT00779220、NCT00673920、NCT01194570、およびKappos et al. Lancet. 19.378(2011):1779-87において説明されているような、ヒト化抗CD20モノクローナル抗体である。例えば、オクレリズマブは、関節リウマチ、多発性硬化症およ

50

び狼瘡などの疾患を処置することために使用することができる。

【0394】

一部の実施形態において、オクレリズマブは、静脈内注入として投与される。例えば、各回の注入は、約50～2000mg（例えば、約50～100、100～150、150～200、200～250、250～300、300～350、350～400、400～450、450～500、500～550、550～600、600～650、650～700、700～750、750～800、800～850、850～900、900～950、950～1000、1000～1100、1100～1200、1200～1300、1300～1400、1400～1500、1500～1600、1600～1700、1700～1800、1800～1900、または1900～2000mg）のオクレリズマブを施す。

10

【0395】

一部の実施形態において、オクレリズマブは、少なくとも7日間、例えば、7、14、21、28、35日間、またはこれを超える投与間隔で投与される。例えば、オクレリズマブは、少なくとも1週間、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、24、26、28、20、22、24、26、28、30週間、またはこれを超える投与間隔で投与される。

【0396】

一部の実施形態において、オクレリズマブは、本明細書で説明される用量および投与間隔で、ある期間、例えば、少なくとも2週間、例えば、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、24、26、28、30、40、50、60週間、もしくはこれを超える期間、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12カ月、もしくはこれを超える期間、または1、2、3、4、5年、もしくはこれを超える期間にわたり投与される。例えば、オクレリズマブは、本明細書で説明される用量および投与間隔で、処置サイクル1つあたり、のべ少なくとも4回の投与（例えば、処置サイクル1つあたり、少なくとも4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、18、20回、またはこれを超える投与）にわたり投与される。

20

【0397】

一部の態様において、抗CD20抗体は、ベルツズマブを含む。ベルツズマブとは、CD20に対するヒト化モノクローナル抗体である。例えば、臨床試験識別番号NCT00547066、NCT00546793、NCT01101581、およびGoldenberg et al. Leuk Lymphoma.51(5)(2010):747-55を参照されたい。例えば、ベルツズマブは、NHL（例えば、DLBCL、濾胞性リンパ腫）、CLL、および自己免疫疾患、例えば免疫血小板減少性紫斑病（TIP）を処置するために使用することができる。

30

【0398】

一部の実施形態において、ベルツズマブは皮下投与されるか、または例えば静脈内注入として静脈内投与される。一部の実施形態において、ベルツズマブは、50～800mg/m²、例えば、約50～60、60～70、70～80、80～90、90～100、100～110、110～120、120～130、130～140、140～150、150～160、160～170、170～180、180～190、190～200、200～225、225～250、250～275、275～300、300～325、325～350、350～375、375～400、400～425、425～450、450～475、475～500、500～525、525～550、550～575、575～600、600～625、625～650、650～675、675～700、700～725、725～750、750～775、または775～800mg/m²の用量で投与される。一部の実施形態において、50～400mg、例えば、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、または400mgの用量のベルツズマブが投与される。

40

【0399】

50

一部の実施形態において、ベルツズマブは、少なくとも7日間、例えば、7、14、21、28、35日間、またはこれを超える投与間隔で投与される。例えば、ベルツズマブは、少なくとも1週間、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、24、26、28、20、22、24、26、28、30週間、またはこれを超える投与間隔で投与される。

【0400】

一部の実施形態において、ベルツズマブは、本明細書で説明される用量および投与間隔で、ある期間、例えば、少なくとも2週間、例えば、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、24、26、28、30、40、50、60週間、もしくはこれを超える期間、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12カ月、もしくはこれを超える期間、または1、2、3、4、5年、もしくはこれを超える期間にわたり投与される。例えば、ベルツズマブは、本明細書で説明される用量および投与間隔で、処置サイクル1つあたり、のべ少なくとも4回の投与（例えば、処置サイクル1つあたり、少なくとも4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、18、20回、またはこれを超える投与）にわたり投与される。

10

【0401】

一部の態様において、抗CD20抗体は、GA101を含む。GA101（オビヌツマブまたはRO5072759とも呼ばれる）とは、ヒト化および糖鎖加工された抗CD20モノクローナル抗体である。例えば、GA101は、B細胞リンパ系悪性腫瘍、例えば、CLL、非ホジキンリンパ腫（NHL）およびびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫（DLBCL）などの疾患を処置するために使用することができる。例えば、Robak.Curr.Opin.Investig.Drugs.10.6(2009):588-96；臨床試験識別番号NCT01995669、NCT01889797、NCT02229422およびNCT01414205；ならびにwww.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/125486s000lbl.pdfを参照されたい。

20

【0402】

一部の実施形態において、GA101は、例えば静脈内注入として、静脈内投与される。例えば、各回の注入は、約100～3000mg（例えば、約100～150、150～200、200～250、250～500、300～350、350～400、400～450、450～500、500～550、550～600、600～650、650～700、700～750、750～800、800～850、850～900、900～950、950～1000、1000～1200、1200～1400、1400～1600、1600～1800、1800～2000、2000～2200、2200～2400、2400～2600、2600～2800、または2800～3000mg）のGA101を施す。

30

【0403】

一部の実施形態において、GA101は、少なくとも7日間、例えば、7、14、21、28、35日間、またはこれを超える投与間隔で投与される。例えば、GA101は、少なくとも1週間、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、24、26、28、20、22、24、26、28、30週間、またはこれを超える投与間隔で投与される。例えば、GA101は、少なくとも1カ月、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12カ月、またはこれを超える投与間隔で投与される。一部の実施形態において、GA101は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13または14日間の投与間隔で投与される。

40

【0404】

一部の実施形態において、GA101は、本明細書で説明される用量および投与間隔で、ある期間、例えば、少なくとも1週間、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、24、26、28、30、40、50、60週間、もしくはこれを超える期間、または1、2、

50

3、4、5、6、7、8、9、10、11、12カ月、もしくはこれを超える期間、または1、2、3、4、5年、もしくはこれを超える期間にわたり投与される。例えば、GA101は、本明細書で説明される用量および投与間隔で、処置サイクル1つあたり、のべ少なくとも2回の投与（例えば、処置サイクル1つあたり、少なくとも、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、18、20回、またはこれを超える投与）にわたり投与される。

【0405】

一部の態様において、抗CD20抗体は、AME-133vを含む。AME-133v（LY2469298またはオカラツズマブとも呼ばれる）とは、CD20に対するヒト化IgG1モノクローナル抗体であって、リツキシマブと比較して、FcγRIIIa受容体に対する親和性を増加させ、抗体依存性細胞介在性細胞毒性（ADCC）活性を増強した、ヒト化IgG1モノクローナル抗体である。例えば、Robak et al. *BioDrugs* 25.1(2011):13-25を参照されたい。一部の実施形態において、AME-133vは、NHL、例えば濾胞性リンパ腫などの、がんを処置するために使用することができる。例えば、Ferro-Torres et al. *Clin Cancer Res.*, 18.5(2012):1395-403を参照されたい。

【0406】

一部の態様において、抗CD20抗体は、PRO131921を含む。PRO131921とは、リツキシマブと比較して、FcγRIIIaへの結合が良好となり、ADCCが増強されるように加工された、ヒト化抗CD20モノクローナル抗体である。例えば、Robak et al. *BioDrugs* 25.1(2011):13-25；およびCasulo et al. *Clin Immunol.* 154.1(2014):37-46を参照されたい。一部の実施形態において、PRO131921は、NHLを処置するために使用することができる。例えば、臨床試験識別番号NCT00452127を参照されたい。一部の実施形態において、PRO131921は、例えば静脈内注入として、静脈内投与される。一部の実施形態において、PRO131921は、15mg/m²～1000mg/m²、例えば、約15～20、20～25、25～30、30～35、35～40、40～45、45～50、50～55、55～60、60～65、65～70、70～75、75～80、80～85、85～90、90～95、95～100、100～125、125～150、150～175、175～200、200～225、225～250、250～300、300～325、325～350、350～375、375～400、400～425、425～450、450～475、475～500、500～525、525～550、550～575、575～600、600～625、625～650、650～675、675～700、700～725、725～750、750～775、775～800、800～825、825～850、850～875、875～900、900～925、925～950、950～975、または975～1000mg/m²の用量で投与され、ここで、m²は、対象の体表面積を示す。

【0407】

一部の態様において、抗CD20抗体は、TRU-015を含む。TRU-015とは、CD20に対する抗体のドメイン由来の抗CD20融合タンパク質である。TRU-015は、モノクローナル抗体より小型であるが、Fcに媒介されるエフェクター機能を保持する。例えば、Robak et al. *BioDrugs* 25.1(2011):13-25を参照されたい。TRU-015は、ヒトIgG1ヒンジ、CH2およびCH3ドメインに連結されているが、CH1およびCLドメインを欠く、抗CD20単鎖可変性フラグメント（scFv）を含有する。一部の実施形態において、TRU-015は、B細胞リンパ腫および関節リウマチを処置するために使用することができる。場合によって、TRU-015は、例えば静脈内注入として、静脈内投与される。一部の実施形態において、TRU-015は、0.01～30mg/kg、例えば、0.01～0.015、0.015～0.05、0.05～0.15、0.15～0.5、0.5～1、1～1.5、1.5～2.5、2.5～5、5～10、10～15、15～20、20～25、または25～30mg/kg体重の用量で投与される。一部の実施形態において、TRU-015は、少なくとも1日、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13または14日間離した投

と間隔で投与される。例えば、Burge et al.Clin Ther.30.10(2008):1806-16を参照されたい。

【0408】

一部の実施形態において、本明細書で説明される抗CD20抗体は、本明細書で説明される治療剤、例えば、化学療法剤（例えば、シトキサン、フルダラビン、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、脱メチル化剤、ペプチドワクチン、抗腫瘍抗生剤、チロシンキナーゼ阻害剤、アルキル化剤、抗微小管剤または抗有糸分裂薬剤、本明細書で説明されるCD20抗体またはCD20抗体薬物コンジュゲート）、抗アレルギー剤、吐き気止め（または制吐剤）、鎮痛剤、または細胞保護剤にコンジュゲートされるか、または他の形で結合される。

10

【0409】

CD22阻害剤および結合ドメイン

本明細書で使用される場合、「CD22」は、白血病前駆細胞上で検出可能であることが公知の抗原決定基を指す。ヒトおよびマウスアミノ酸および核酸配列は、GenBank、UniProtおよびSwiss-Protなどの公開データベースで見出すことができる。例えば、アイソフォーム1～5ヒトCD22のアミノ酸配列は、受託番号NP001762.2、NP001172028.1、NP001172029.1、NP001172030.1およびNP001265346.1でそれぞれ見出すことができ、ヒトCD22の変異体1～5をコードするヌクレオチド配列は、受託番号NM001771.3、NM001185099.1、NM001185100.1、NM001185101.1およびNM001278417.1でそれぞれ見出すことができる。本明細書で使用される場合、「CD22」は、完全長野生型CD22の突然変異、例えば点突然変異、フラグメント、挿入、欠失およびスプライス変異体を含むタンパク質を包含する。一態様において、CARの抗原結合部分は、CD22タンパク質の細胞外ドメイン内の抗原を認識し、それに結合する。一態様において、CD22タンパク質は、がん細胞上で発現される。

20

【0410】

一部の態様において、本開示は、CD22阻害剤または結合ドメイン、例えば、本明細書で説明されるようなCD22阻害剤または結合ドメインを提供する。本開示は、CD22結合ドメインをコードする核酸、またはCD22結合ドメインを含むCARも提供する。CD22阻害剤としては、CD22CAR発現細胞、例えばCD22CART細胞、または抗CD22抗体（例えば、抗CD22単一もしくは二重特異性抗体）もしくはそのフラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。組成物はまた、第二の薬剤、例えば、抗CD19CAR発現細胞またはCD19結合ドメインを含んでもよい。薬剤は、例えば、単一の核酸によってコードされていてもよく、または異なる核酸によってコードされていてもよい。

30

【0411】

一部の態様において、CD22阻害剤または結合ドメインは、単剤療法として投与される。一部の態様において、CD22阻害剤または結合ドメインは、抗CD19CAR発現細胞などの第二の薬剤と組み合わせて投与される。ある実施形態において、CD22阻害剤は、CD19阻害剤、例えば、CD19CAR発現細胞、例えば、本明細書で説明されるCAR発現細胞、例えば、マウスのものであるか、ヒトのものであるか、またはヒト化されている抗体結合ドメインを含むCARを発現する細胞と組み合わせて投与される。

40

【0412】

CD22CAR発現細胞、例えばCART

一実施形態において、CD22阻害剤は、CD22CAR発現細胞、例えば、CD22結合ドメインを含み、ならびにCD19CAR発現細胞、例えばCARTと組み合わせて投与するためにおよび養子療法のためのそれらの使用方法のために、細胞（例えば、T細胞またはNK細胞）に遺伝子操作される、CD22-CARである。

50

【0413】

別の態様において、本発明は、CD19 CARを発現する細胞とCD22 CARを発現する細胞の混合物を含む、CAR発現細胞、例えばCART細胞、の集団を提供する。例えば、一実施形態において、CART細胞の集団は、CD19 CARを発現する第一の細胞、およびCD22 CARを発現する第二の細胞を包含し得る。一実施形態において、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包含するCAR（例えば、CD19 CARまたはCD22 CAR）を発現する第一の細胞、および二次シグナル伝達ドメインを包含するCAR（例えば、CD19 CARまたはCD22 CAR）を発現する第二の細胞を包含する。

【0414】

一態様において、CD22-CARは、任意のリーダー配列（例えば、本明細書で説明される任意のリーダー配列）、細胞外抗原結合ドメイン、ヒンジ（例えば、本明細書で説明されるヒンジ）、膜貫通ドメイン（例えば、本明細書で説明される膜貫通ドメイン）、および細胞内刺激ドメイン（例えば、本明細書で説明される細胞内刺激ドメイン）を含む。一実施形態において、典型的なCD22 CARコンストラクトは、任意のリーダー配列（例えば、本明細書で説明されるリーダー配列）、細胞外抗原結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメイン、細胞内共刺激ドメイン（例えば、本明細書で説明される細胞内共刺激ドメイン）、および細胞内刺激ドメインを含む。

【0415】

一態様において、CAR22結合ドメインは、配列番号200～428のいずれかで提供されるアミノ酸配列（または核酸配列によってコードされるアミノ酸配列）のscFv部分を含む。一態様において、CAR22結合ドメインは、配列番号203、209、215、221、227、232、238、244、250、256、262、268、274、280、286、292、298、304、310、316、322、328、334、340、346、352、358、364、370、376、382、388、394、400、406、412、418、または423のいずれかで提供されるscFv部分を含む。

【0416】

特異的な態様において、本発明のCARコンストラクトは、配列番号203、209、215、221、227、232、238、244、250、256、262、268、274、280、286、292、298、304、310、316、322、328、334、340、346、352、358、364、370、376、382、388、394、400、406、412、418、または423からなる群より選択されるscFvドメインを含み、scFvの前に、配列番号13で提供されるもののようなリーダー配列、それに続いて、配列番号14または配列番号45または配列番号47または配列番号49で提供されるもののような任意のヒンジ配列、配列番号15で提供されるもののような膜貫通領域、配列番号16または配列番号51を包含する細胞内シグナル伝達ドメイン、および配列番号17または配列番号43を包含するCD3ゼータ配列が存在していてもよく、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。一部の実施形態において、scFvドメインは、配列番号203、209、215、221、227、232、238、244、250、256、262、268、274、280、286、292、298、304、310、316、322、328、334、340、346、352、358、364、370、376、382、388、394、400、406、412、418、または423からなる群より選択されるヒトscFvドメインである。

【0417】

また本発明は、配列番号203、209、215、221、227、232、238、244、250、256、262、268、274、280、286、292、298、304、310、316、322、328、334、340、346、352、358、364、370、376、382、388、394、400、406、412、418、

10

20

30

40

50

または423からなる群より選択されるs c F vフラグメントのそれぞれのポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を包含する。また本発明は、配列番号203、209、215、221、227、232、238、244、250、256、262、268、274、280、286、292、298、304、310、316、322、328、334、340、346、352、358、364、370、376、382、388、394、400、406、412、418、または423、からなる群より選択されるs c F vフラグメントのそれぞれ、ならびに配列番号13～17のドメインのそれぞれのポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、加えてコードされた本発明のCD22 CARを包含する。

【0418】

一部の実施形態において、完全長CD22 CAR配列も、表6Aまたは6Bで示される通り、配列番号207、213、219、225、230、236、242、248、254、260、266、272、278、284、290、296、302、308、314、320、326、332、338、344、350、356、362、368、374、380、386、392、398、404、410、416、422、または427として本明細書において提供される。

【0419】

一態様において、本発明は、CARをコードする核酸分子を含む組換え核酸コンストラクトを包含し、前記核酸分子は、例えば本明細書で説明される、例えば、細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列と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CD22結合ドメインをコードする核酸配列を含む。一態様において、CD22結合ドメインは、配列番号203、209、215、221、227、232、238、244、250、256、262、268、274、280、286、292、298、304、310、316、322、328、334、340、346、352、358、364、370、376、382、388、394、400、406、412、418、または423の1つまたは複数から選択される。一態様において、本発明は、CARをコードする核酸分子を含む組換え核酸コンストラクトを包含し、前記核酸分子は、CD22結合ドメインをコードする核酸配列を含み、例えば、前記配列は、細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列と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。CARにおいて使用することができる典型的な細胞内シグナル伝達ドメインとしては、例えば、CD3-ゼータ、CD28、4-1BB、および同種のものの1つまたは複数の細胞内シグナル伝達ドメインが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの場合において、CARは、CD3-ゼータ、CD28、4-1BBおよび同種のもののあらゆる組合せを含んでいてもよい。

【0420】

一態様において、本発明のCARコンストラクトの核酸配列は、配列番号200、208、214、220、226、231、237、243、249、255、261、267、273、279、285、291、297、303、309、315、321、327、333、339、345、351、357、363、369、375、381、387、393、399、405、411、417、422、または428の1つまたは複数のCARコンストラクトを含む。一態様において、本発明のCARコンストラクトの核酸配列は、配列番号204、210、216、222、116、233、239、245、251、257、263、269、275、281、287、293、299、305、311、317、323、329、335、341、347、353、359、365、371、377、383、389、395、401、407、413、117、または424の1つまたは複数の、s c F vをコードする配列を含む。

【0421】

いくつかの場合において、抗原結合ドメインにとって、CARが最終的に使用されると予想される同じ種由来であることが有益である。例えば、ヒトで使用するためには、CARの抗原結合ドメインにとって、抗体または抗体フラグメントの抗原結合ドメインに関し

10

20

30

40

50

てヒトまたはヒト化残基を含むことが有益であり得る。したがって、一態様において、抗原結合ドメインは、ヒト抗体または抗体フラグメントを含む。一実施形態において、ヒトCD22結合ドメインは、本明細書で説明されるヒトCD22結合ドメインの、1つもしくは複数（例えば、3つ全て）の、軽鎖相補性決定領域1（LC CDR1）、軽鎖相補性決定領域2（LC CDR2）および軽鎖相補性決定領域3（LC CDR3）、ならびに／または本明細書で説明されるヒトCD22結合ドメインの、1つもしくは複数（例えば、3つ全て）の、重鎖相補性決定領域1（HC CDR1）、重鎖相補性決定領域2（HC CDR2）および重鎖相補性決定領域3（HC CDR3）を含み、例えば、1つまたは複数、例えば3つ全て、のLC CDRおよび1つまたは複数、例えば3つ全て、のHC CDRを含むヒトCD22結合ドメインを含む。一実施形態において、ヒトCD22結合ドメインは、本明細書で説明されるヒトCD22結合ドメインの、1つまたは複数（例えば、3つ全て）の、重鎖相補性決定領域1（HC CDR1）、重鎖相補性決定領域2（HC CDR2）および重鎖相補性決定領域3（HC CDR3）を含み、例えば、ヒトCD22結合ドメインは、本明細書で説明されるHC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3を各々が含む2つの可変重鎖領域を有する。一実施形態において、ヒトCD22結合ドメインは、本明細書で（例えば、表6A、6B、10Aもしくは10Bで）説明されるヒト軽鎖可変領域、および／または本明細書で（例えば、表6A、6B、9Aもしくは9Bで）説明されるヒト重鎖可変領域を含む。一実施形態において、ヒトCD22結合ドメインは、本明細書で（例えば、表6A、6B、9Aもしくは9Bで）説明されるヒト重鎖可変領域、例えば、本明細書で（例えば、表6A、8B、9Aもしくは9Bで）説明される少なくとも2つのヒト重鎖可変領域を含む。一実施形態において、CD22結合ドメインは、表6A、6B、9A、9B、10Aまたは10Bのアミノ酸配列の軽鎖および重鎖を含むscFvである。ある実施形態において、CD22結合ドメイン（例えば、scFv）は、表6A、6B、10Aもしくは10Bにおいて提供される軽鎖可変領域のアミノ酸配列または表6A、6B、10Aもしくは10Bのアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列の、少なくとも1、2または3個の改変（例えば、置換）であるが30、20または10個以下の改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および／あるいは表6A、6B、9Aもしくは9Bにおいて提供される重鎖可変領域のアミノ酸配列または表6A、6B、9Aもしくは9Bのアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列の、少なくとも1、2または3個の改変（例えば、置換）であるが30、20または10個以下の改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。一実施形態において、ヒトCD22結合ドメインは、配列番号203、209、215、221、227、232、238、244、250、256、262、268、274、280、286、292、298、304、310、316、322、328、334、340、346、352、358、364、370、376、382、388、394、400、406、412、418、または423からなる群より選択される配列、またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む。一実施形態において、ヒトCD22結合ドメインはscFvであり、本明細書で、例えば表6A、6B、10Aまたは10Bで説明されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域は、リンカー、例えば本明細書で説明されるリンカーを介して、本明細書で、例えば表6A、6B、9Aまたは9Bで説明されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に付着している。一実施形態において、ヒトCD22結合ドメインは、(Gly₄-Ser)_nリンカーを包含し、ここでnは、1、2、3、4、5または6、例えば3または4（配列番号53）である。scFvの軽鎖可変領域および重鎖可変領域は、例えば、以下の配置：軽鎖可変領域ーリンカーー重鎖可変領域または重鎖可変領域ーリンカーー軽鎖可変領域のいずれであってもよい。

【0422】

一態様において、CD22結合ドメインは、抗体または抗体フラグメントの特定の機能的な特徴または特性を特徴とする。例えば、一態様において、抗原結合ドメインを含む本発明のCAR組成物の一部は、ヒトCD22またはそのフラグメントに特異的に結合する

10

20

30

40

50

。一態様において、本発明は、抗体または抗体フラグメントを含む抗原結合ドメインであって、抗体結合ドメインがCD22タンパク質またはそのフラグメントと特異的に結合し、前記抗体または抗体フラグメントが、配列番号700、701、702、703、704、705、706、707、708、709、710、711、712、713、714、715、716、717、718、719、720、721、722、723、724、725、726、727、728、729、730、731、732、733、734、735、736、737、または738のいずれかのアミノ酸配列を包含する可変重鎖および／または配列番号739、740、741、742、743、744、745、746、747、748、749、750、751、752、753、754、755、756、757、758、759、760、761、762、763、764、765、766、767、768、769、770、771、772、773、774、775、776、または777のいずれかのアミノ酸配列を包含する可変軽鎖を含む、抗原結合ドメインに関する。ある特定の態様において、scFvは、リーダー配列と連続しており同じリーディングフレーム内にある。一態様において、リーダー配列は、配列番号13として提供されるポリペプチド配列である。

10

【0423】

実施形態において、CARは、CD22結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを包含する、抗体または抗体フラグメントを含む。実施形態において、CD22結合ドメインは、表8A、8B、10Aまたは10Bに列挙したいずれかのCD22軽鎖結合ドメインアミノ酸配列の軽鎖相補性決定領域1(LC CDR1)、軽鎖相補性決定領域2(LC CDR2)および軽鎖相補性決定領域3(LC CDR3)の1つまたは複数、ならびに表7A、7B、7C、9Aまたは9Bに列挙したいずれかのCD22重鎖結合ドメインアミノ酸配列の重鎖相補性決定領域1(HC CDR1)、重鎖相補性決定領域2(HC CDR2)および重鎖相補性決定領域3(HC CDR3)の1つまたは複数を含む。

20

【0424】

一態様において、CD22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。一態様において、CD22結合ドメインは、Fv、Fab、(Fab')₂、または二重機能性(例えば、二重特異的)ハイブリッド抗体[例えば、Lanzavecchia et al., Eur.J. Immunol.17, 105 (1987)]である。一態様において、本発明の抗体およびそれらのフラグメントは、野生型の、または増強された親和性でCD22タンパク質またはそのフラグメントに結合する。

30

【0425】

いくつかの場合において、ヒトscFvは、ディスプレイライブラリーに由来し得る。

【0426】

一実施形態において、突然変異したscFvによってCART22コンストラクトに安定性の向上が付与されるように、CD22A結合ドメイン、例えばscFvは、少なくとも1つの突然変異を含む。別の実施形態において、突然変異したscFvによってCART22コンストラクトに安定性の向上が付与されるように、CD22結合ドメイン、例えばscFvは、例えばヒト化プロセスから生じる少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10の突然変異を含む。

40

【0427】

一態様において、本発明は、機能的に同等な分子を生成する開始時の抗体またはフラグメント(例えば、scFv)のアミノ酸配列の改変を意図している。例えば、CARに含まれる、CD22結合ドメイン、例えばscFv、のVHまたはVLは、CD22結合ドメイン、例えばscFv、の開始時のVHまたはVLフレームワーク領域の、少なくとも約70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の同一性が保持されるように改変してもよい。本発明は、機能的に同等な分子を生成する

50

ために、CARコンストラクト全体の改変、例えば、CARコンストラクトの様々なドメインの1つまたは複数のアミノ酸配列における改変を意図している。CARコンストラクトは、開始時のCARコンストラクトの、少なくとも約70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の同一性が保持されるように改変してもよい。

【0428】

ある実施形態において、CD22結合ドメインは、CAR22-1、CAR22-2、CAR22-3、CAR22-4、CAR22-5、CAR22-6、CAR22-7、CAR22-8、CAR22-9、CAR22-10、CAR22-11、CAR22-12、CAR22-13、CAR22-14、CAR22-15、またはCAR22-16、CAR22-17、CAR22-18、CAR22-19、CAR22-20、CAR22-21、CAR22-22、CAR22-23、CAR22-24、CAR22-25、CAR22-26、CAR22-27、CAR22-28、CAR22-29、CAR22-30、CAR22-31、CAR22-32、CAR22-33、CAR22-34、CAR22-35、CAR22-36、CAR22-37、またはCAR22-38（例えば、表7A、7B、7C、8Aおよび／もしくは8Cに記載のもの）のいずれか1つまたはそれと実質的に同一の配列の、6つのCDR（例えば、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3の各々1つ）を含む。ある実施形態において、CD22結合ドメインは、CAR22-1、CAR22-2、CAR22-3、CAR22-4、CAR22-5、CAR22-6、CAR22-7、CAR22-8、CAR22-9、CAR22-10、CAR22-11、CAR22-12、CAR22-13、CAR22-14、CAR22-15、またはCAR22-16、CAR22-17、CAR22-18、CAR22-19、CAR22-20、CAR22-21、CAR22-22、CAR22-23、CAR22-24、CAR22-25、CAR22-26、CAR22-27、CAR22-28、CAR22-29、CAR22-30、CAR22-31、CAR22-32、CAR22-33、CAR22-34、CAR22-35、CAR22-36、CAR22-37、またはCAR22-38（例えば、表7A、7B、7C、8Aおよび／もしくは8Cに記載のもの）のいずれか1つまたはそれと実質的に同一の配列の、3つのCDR（例えば、HC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3の各々1つ、またはLC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3の各々1つ）を含む。

【0429】

さらなる実施形態は、このセクションで説明されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を包含する。例えば、さらなる実施形態は、表6A~10Bのいずれかのポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を包含する。例えば、ヌクレオチド配列は、表6Aまたは6BのCARコンストラクトまたはscFvを含んでもよい。ヌクレオチドは、表9Aもしくは9BのVH、表10Aもしくは10BのVL、または両方をコードしてもよい。ヌクレオチドは、表7A、7Bもしくは7CのVH CDR1、VH CDR2もしくはVH CDR3の1つもしくは複数（例えば、2つもしくは3つ）をコードしていてもよく、および／またはヌクレオチドは、表8Aもしくは8BのVL CDR1、VL CDR2もしくはVL CDR3の1つもしくは複数（例えば、2つもしくは3つ）をコードしていてもよい。ヌクレオチド配列はまた、配列番号13、14、15、16、17および51のドメインの1つまたは複数、例えば全てを包含し得る。

【0430】

CD22 CARはまた、膜貫通ドメイン、例えば本明細書で説明されるような膜貫通ドメイン、細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば本明細書で説明されるような細胞内シグナル伝達ドメイン、共刺激ドメイン、例えば本明細書で説明されるような共刺激ドメイン、リーダー配列、例えば本明細書で説明されるようなリーダー配列、またはヒンジ、例え

ば本明細書で説明されるようなヒンジ、の1つまたは複数を含んでいてもよい。

【0431】

一実施形態において、CD22阻害剤は、本明細書で説明されるCD22阻害剤である。CD22阻害剤は、例えば、抗CD22抗体（例えば、抗CD22単一もしくは二重特異性抗体）、小分子、またはCD22 CARであってもよい。一部の実施形態において、抗CD22抗体を治療剤とコンジュゲートされるか、または他の形で結合される。典型的な治療剤としては、例えば、微小管破壊剤（例えば、モノメチルオーリスタチンE）および毒素（例えば、ジフテリア毒素または緑膿菌外毒素-A、リシン）が挙げられる。ある実施形態において、CD22阻害剤は、CD19阻害剤、例えば、CD19 CAR発現細胞、例えば、本明細書で説明されるCAR発現細胞、例えば、マウスのものであるか、ヒトのものであるか、またはヒト化されている抗体結合ドメインを含むCARを発現する細胞と組み合わせて投与される。

10

【0432】

一実施形態において、抗CD22抗体は、抗CD19/CD22二重特異性リガンド指向型毒素〔例えば、ジフテリア毒素（DT）、DT 390、例えばDT2219ARL、の最初の389アミノ酸に連結されている、ヒトCD19およびCD22を認識する、2つのscFvリガンド〕；抗CD22モノクローナル抗体-MMAEコンジュゲート（例えば、DCDT2980S）；緑膿菌外毒素-A（例えば、BL22）のフラグメントに融合された抗CD22抗体RFB4のscFv；脱グリコシル化リシンA鎖とコンジュゲートしている抗CD19/抗CD22（例えば、Combotox）；ヒト化抗CD22モノクローナル抗体（例えば、エプラツズマブ）；または緑膿菌外毒素-Aの38KDaフラグメントに共有結合で融合している抗CD22抗体（例えば、モキセツモマブパストクス）のFv部分から選択される。

20

【0433】

一実施形態において、抗CD22抗体は、抗CD19/CD22二重特異性リガンド指向型毒素（例えば、DT2219ARL）であり、前記抗CD19/CD22二重特異性リガンド指向型毒素は、約1μg/kg、2μg/kg、3μg/kg、4μg/kg、5μg/kg、6μg/kg、7μg/kg、8μg/kg、9μg/kg、10μg/kg、11μg/kg、12μg/kg、13μg/kg、14μg/kg、15μg/kg、20μg/kg、25μg/kg、30μg/kg、40μg/kg、60μg/kg、80μg/kg、100μg/kg、120μg/kg、140μg/kg、160μg/kg、180μg/kg、200μg/kg、220μg/kg、250μg/kg、300μg/kg、350μg/kg、400μg/kg、450μg/kg、500μg/kg、600μg/kg、700μg/kg、800μg/kg、900μg/kg、1mg/kg（例えば、30μg/kg、40μg/kg、60μg/kg、または80μg/kg）の用量で、ある期間にわたり、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12日またはこれを超える日数ごとに投与される。一部の実施形態において、抗CD19/22二重特異性リガンド指向型毒素は、静脈内注入によって投与される。

30

【0434】

一実施形態において、抗CD22抗体はBL22であり、BL22は、約1μg/kg、2μg/kg、3μg/kg、4μg/kg、5μg/kg、6μg/kg、7μg/kg、8μg/kg、9μg/kg、10μg/kg、11μg/kg、12μg/kg、13μg/kg、14μg/kg、15μg/kg、20μg/kg、25μg/kg、30μg/kg、40μg/kg、60μg/kg、80μg/kg、100μg/kg、120μg/kg、140μg/kg、160μg/kg、180μg/kg、200μg/kg、220μg/kg、250μg/kg、300μg/kg、350μg/kg、400μg/kg、450μg/kg、500μg/kg、600μg/kg、700μg/kg、800μg/kg、900μg/kg、1mg/kg（例えば、3μg/kg、30μg/kg、40μg/kg、または50μg/kg）の用量で、ある期間

40

50

にわたり、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12日またはそれを超える日数ごとに投与される。一部の実施形態において、BL22は、ある期間にわたり、例えば、4日間のサイクル、6日間のサイクル、8日間のサイクル、10日間のサイクル、12日間のサイクル、または14日間のサイクルにわたり、毎日、1日おきに、3日おきに、または4日おきに投与される。一実施形態において、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12またはこれを超えるサイクルのBL22が投与される。一部の実施形態において、BL22は、静脈内注入によって投与される。

【0435】

一部の実施形態において、抗CD22抗体は、脱グリコシル化リシンA鎖とコンジュゲートしている抗CD19／抗CD22（例えば、Combotox）であり、前記脱グリコシル化リシンA鎖とコンジュゲートしている抗CD19／抗CD22は、約500 μ g/m²、600 μ g/m²、700 μ g/m²、800 μ g/m²、900 μ g/m²、1mg/m²、2mg/m²、3mg/m²、4mg/m²、5mg/m²、6mg/m²、または7mg/m²の用量で、ある期間にわたり、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または12日またはこれを超える日数ごとに投与される。一部の実施形態において、脱グリコシル化リシンA鎖とコンジュゲートしている抗CD19／抗CD22は、ある期間にわたり、例えば、4日間のサイクル、6日間のサイクル、8日間のサイクル、10日間のサイクル、12日間のサイクル、または14日間のサイクルにわたり、毎日、1日おきに、3日おきに、または4日おき（例えば、6日間にわたり1日おきに）に投与される。一実施形態において、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12またはこれを超えるサイクルの、脱グリコシル化リシンA鎖とコンジュゲートしている抗CD19／抗CD22が投与される。一部の実施形態において、脱グリコシル化リシンA鎖とコンジュゲートしている抗CD19／抗CD22は、静脈内注入によって投与される。

【0436】

一実施形態において、抗CD22抗体は、ヒト化抗CD22モノクローナル抗体（例えば、エブラツズマブ）であり、前記ヒト化抗CD22モノクローナル抗体は、約10mg/m²/週、20mg/m²/週、50mg/m²/週、100mg/m²/週、120mg/m²/週、140mg/m²/週、160mg/m²/週、180mg/m²/週、200mg/m²/週、220mg/m²/週、250mg/m²/週、260mg/m²/週、270mg/m²/週、280mg/m²/週、290mg/m²/週、300mg/m²/週、305mg/m²/週、310mg/m²/週、320mg/m²/週、325mg/m²/週、330mg/m²/週、335mg/m²/週、340mg/m²/週、345mg/m²/週、350mg/m²/週、355mg/m²/週、360mg/m²/週、365mg/m²/週、370mg/m²/週、375mg/m²/週、380mg/m²/週、385mg/m²/週、390mg/m²/週、400mg/m²/週、410mg/m²/週、420mg/m²/週、430mg/m²/週、440mg/m²/週、450mg/m²/週、460mg/m²/週、470mg/m²/週、480mg/m²/週、490mg/m²/週、500mg/m²/週、600mg/m²/週、700mg/m²/週、800mg/m²/週、900mg/m²/週、1g/m²/週、または2g/m²/週（例えば、360mg/m²/週または480mg/m²/週）の用量で、ある期間にわたり、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12週またはこれを超える週数ごとに投与される。一部の実施形態において、初回用量は、後続用量より低い（例えば、360mg/m²/週の初回用量、続いて370mg/m²/週の後続用量）。一部の実施形態において、ヒト化抗CD22モノクローナル抗体は、静脈内注入によって投与される。

【0437】

一実施形態において、抗CD22抗体はモキセツモマブパストクスであり、モキセツモマブパストクスは、約1 μ g/kg、2 μ g/kg、3 μ g/kg、4 μ g/kg、5 μ g/kg、6 μ g/kg、7 μ g/kg、8 μ g/kg、9 μ g/kg、10 μ g/kg

kg、11 μg/kg、12 μg/kg、13 μg/kg、14 μg/kg、15 μg/kg、20 μg/kg、25 μg/kg、30 μg/kg、40 μg/kg、60 μg/kg、80 μg/kg、100 μg/kg、120 μg/kg、140 μg/kg、160 μg/kg、180 μg/kg、200 μg/kg、220 μg/kg、250 μg/kg、300 μg/kg、350 μg/kg、400 μg/kg、450 μg/kg、500 μg/kg（例えば、5 μg/kg、10 μg/kg、20 μg/kg、30 μg/kg、40 μg/kg、または50 μg/kg）の用量で、ある期間、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12日またはこれを超える日数ごとに投与される。一部の実施形態において、モキセツモマブパストクスは、ある期間にわたり、例えば、4日間のサイクル、6日間のサイクル、8日間のサイクル、10日間のサイクル、12日間のサイクル、または14日間のサイクルにわたり、毎日、1日おきに、3日おきに、または4日おき（例えば、6日間にわたり1日おきに）に投与される。一実施形態において、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12またはこれを超えるサイクルのモキセツモマブパストクスが投与される。一部の実施形態において、モキセツモマブパストクスは、静脈内注入によって投与される。

10

【0438】

ある実施形態において、CD22抗体分子は、CAR22-1、CAR22-2、CAR22-3、CAR22-4、CAR22-5、CAR22-6、CAR22-7、CAR22-8、CAR22-9、CAR22-10、CAR22-11、CAR22-12、CAR22-13、CAR22-14、CAR22-15、またはCAR22-16、CAR22-17、CAR22-18、CAR22-19、CAR22-20、CAR22-21、CAR22-22、CAR22-23、CAR22-24、CAR22-25、CAR22-26、CAR22-27、CAR22-28、CAR22-29、CAR22-30、CAR22-31、CAR22-32、CAR22-33、CAR22-34、CAR22-35、CAR22-36、CAR22-37、またはCAR22-38（例えば、表7A、7B、7C、8Aおよび/もしくは8Cに記載のもの）のいずれか1つまたはそれと実質的に同一の配列の、6つのCDR（例えば、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3の各々1つ）を含む。ある実施形態において、CD22抗体分子は、CAR22-1、CAR22-2、CAR22-3、CAR22-4、CAR22-5、CAR22-6、CAR22-7、CAR22-8、CAR22-9、CAR22-10、CAR22-11、CAR22-12、CAR22-13、CAR22-14、CAR22-15、またはCAR22-16、CAR22-17、CAR22-18、CAR22-19、CAR22-20、CAR22-21、CAR22-22、CAR22-23、CAR22-24、CAR22-25、CAR22-26、CAR22-27、CAR22-28、CAR22-29、CAR22-30、CAR22-31、CAR22-32、CAR22-33、CAR22-34、CAR22-35、CAR22-36、CAR22-37、またはCAR22-38（例えば、表7A、7B、7C、8Aおよび/もしくは8Cに記載のもの）のいずれか1つまたはそれと実質的に同一の配列の、3つのCDR（例えば、HC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3の各々1つ、またはLC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3の各々1つ）を含む。ある実施形態において、CD22抗体分子は、表6Aもしくは6Bに記載の重鎖可変領域、軽鎖可変領域、もしくは重鎖可変領域と軽鎖可変領域の両方、またはscFv、あるいはそれらと実質的に同一の配列を含む。実施形態において、CD22抗体分子は、単離された抗体分子である。

20

30

40

【0439】

ROR1阻害剤

本明細書で使用される場合、用語「ROR1」は、白血病前駆細胞上で検出可能であることが公知の抗原決定基を指す。ヒトおよびマウスアミノ酸および核酸配列は、GenBank、UniProtおよびSwiss-Protなどの公開データベースで見出すことができる。例えば、ヒトROR1のアイソフォーム1および2前駆体のアミノ酸配列は

50

、受託番号NP__005003、2およびNP__001077061、1でそれぞれ見出すことができ、それらをコードするmRNA配列は、受託番号NM__005012、3およびNM__001083592、1でそれぞれ見出すことができる。本明細書で使用される場合、「ROR1」は、完全長野生型ROR1の突然変異、例えば点突然変異、フラグメント、挿入、欠失およびスプライス変異体を含むタンパク質を包含する。一態様において、CARの抗原結合部分は、ROR1タンパク質の細胞外ドメイン内の抗原を認識し、それに結合する。一態様において、ROR1タンパク質は、がん細胞上で発現される。

【0440】

ROR1阻害剤および併用療法も本明細書において提供される。ROR1阻害剤としては、抗ROR1 CAR発現細胞、例えばCART、および抗ROR抗体（例えば、抗ROR1単一もしくは二重特異性抗体）もしくはそれらのフラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。一部の実施形態において、抗ROR1阻害剤は、B細胞悪性腫瘍（例えば、CLLなどの白血病、マントル細胞リンパ腫などのB細胞リンパ腫；ALL；小リンパ球性リンパ腫；辺縁細胞B細胞リンパ腫；およびバーキットリンパ腫）または上皮がん（例えば、乳がん、腎細胞癌、肺がん、結腸直腸がん、卵巣がんおよび黒色腫）を処置するために使用することができる。ある実施形態において、CD20阻害剤は、CD19阻害剤、例えば、CD19 CAR発現細胞、例えば、本明細書で説明されるCAR発現細胞、例えば、マウスのものであるか、ヒトのものであるか、またはヒト化されている抗体結合ドメインを含むCARを発現する細胞と組み合わせて投与される。

【0441】

典型的な抗ROR1阻害剤は、参照により本明細書に組み入れられるHudecek, et al. Clin. Cancer Res. 19.12(2013):3153-64において説明されている。例えば、抗ROR1阻害剤は、Hudecek et al.において説明されている（例えば、参照により本明細書に組み入れられるHudecek et al.の3155頁の第一段落全体で説明されているように生成された）抗ROR1 CARTを包含する。他の例において、抗ROR1阻害剤は、参照により本明細書に組み入れられる、Hudecek et al.の3154～55頁にまたがる段落；Baskar et al. MAbs 4(2012):349-61；およびYang et al. PLoS ONE 6(2011):e21018において説明されている、2A2およびR12抗ROR1モノクローナル抗体のVHおよび／またはVL配列を含む抗体またはそのフラグメントを包含する。

【0442】

他の実施形態において、ROR1阻害剤は、参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第2013/0101607号において説明されているもの、例えば、米国特許出願公開第2013/0101607号の配列番号1または2を包含する、ROR1を標的とする抗体またはそのフラグメント〔例えば、単鎖可変フラグメント（scFv）〕を包含する。一部の実施形態において、抗ROR1抗体フラグメント（例えば、scFv）は、例えば、ROR1発現細胞に応答するように免疫細胞、例えばT細胞に指示するキメラ抗原受容体（CAR）を形成するために、生物学的に活性な分子にコンジュゲートまたは融合される。

【0443】

一部の実施形態において、典型的なROR1阻害剤としては、UC-961（シルムツズマブ）と呼ばれる抗ROR1モノクローナル抗体が挙げられる。例えば、臨床試験識別番号NCT02222688を参照されたい。シルムツズマブは、慢性リンパ球性白血病（CLL）、卵巣がんおよび黒色腫などのがんを処置するために使用することができる。例えば、Hojjat-Farsangi et al. PLoS One. 8(4): e61167；およびNCT02222688を参照されたい。

【0444】

一部の実施形態において、シルムツズマブは、例えば静脈内注入として、静脈内投与される。例えば、各回の注入は、約700～7000 μg（例えば、700～750、750～800、800～850、850～900、900～950、950～1000、1000～1500、1500～2000、2000～2500、2500～3000、3

10

20

30

40

50

000～3500、3500～4000、4000～4500、4500～5000、5000～5500、5500～6000、6000～6500、または6500～7000 μg) のシルムツズマブを施す。他の実施形態において、シルムツズマブは、10～100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、例えば、10～15、15～20、20～25、25～30、30～35、35～40、40～45、45～50、50～55、55～60、60～65、65～70、70～75、75～80、80～85、85～90、90～95、または95～100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重の用量で投与される。一実施形態において、シルムツズマブは、15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重の開始用量で投与される。

【0445】

一部の実施形態において、シルムツズマブは、少なくとも7日間、例えば、7、14、21、28、35日間、またはこれを超える投与間隔で投与される。例えば、シルムツズマブは、少なくとも1週間、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、24、26、28、20、22、24、26、28、30週間、またはこれを超える投与間隔で投与される。

10

【0446】

一部の実施形態において、シルムツズマブは、本明細書で説明される用量および投与間隔で、ある期間、例えば、少なくとも1週間、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、24、26、28、30、40、50、60週間、もしくはこれを超える期間、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12カ月、もしくはこれを超える期間、または1、2、3、4、5年、もしくはこれを超える期間にわたり投与される。例えば、シルムツズマブは、本明細書で説明される用量および投与間隔で、処置サイクル1つあたり、のべ少なくとも2回の投与（例えば、処置サイクル1つあたり、少なくとも、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、18、20回、またはこれを超える投与）にわたり投与される。

20

【0447】

一部の実施形態において、抗ROR1抗体は、治療剤とコンジュゲートされるか、または他の形で結合される。

【0448】

一部の実施形態において、ROR1阻害剤は、抗ROR1 CAR発現細胞、例えばCART、例えば、抗ROR1 CARコンストラクトを発現する、またはscFv、CDRもしくはVHおよびVL鎖を含むROR1結合CARによってコードされている、細胞を包含する。例えば、抗ROR1 CAR発現細胞、例えばCARTは、例えば、本明細書で説明されるCAR発現細胞と組み合わせて投与するために、ROR1-CAR（ROR1結合ドメインを含む）を細胞（例えば、T細胞またはNK細胞）に遺伝子操作することによって生成される。本明細書で説明されるCAR発現細胞の養子療法のための使用方法も本明細書において提供される。

30

【0449】

別の態様において、CD19 CARを発現する細胞とROR1 CARを発現する細胞の混合物を含む、CAR発現細胞、例えばCART細胞、の集団が本明細書において提供される。例えば、一実施形態において、CART細胞の集団は、CD19 CARを発現する第一の細胞、およびROR1 CARを発現する第二の細胞を包含し得る。

40

【0450】

CD123阻害剤

CD123阻害剤は、インターロイキン-3受容体のアルファ鎖（IL-3R α ）とも呼ばれる。IL-3受容体（IL-3R）は、アルファおよびベータ鎖で構成されているヘテロ二量体である。IL-3Rは、膜受容体である。IL-3R α 鎖は、360アミノ酸残基の糖タンパク質である。一部の白血病性障害ではCD123の異常が観察されることが多い。CD123は、多発性血液悪性疾患、例えば、急性骨髄性およびBリンパ性白血病、芽球性形質細胞様樹状細胞の新生物（BPDCN）およびヘアリーセル白血病にお

50

いて過剰発現される。

【0451】

本明細書で使用される場合、用語「CD123」は、一部の悪性血液がん細胞、例えば白血病細胞上で検出可能であることが公知の抗原決定基を指す。ヒトおよびマウスアミノ酸および核酸配列は、GenBank、UniProtおよびSwiss-Protなどの公開データベースで見出すことができる。例えば、ヒトCD123のアミノ酸配列は、受託番号NP_002174.1（アイソフォーム1前駆体）、NP_001254642.1（アイソフォーム2前駆体）で見出すことができ、それらをコードするmRNA配列は、受託番号NM_002183.3（変異体1）、NM_001267713.1（変異体2）で見出すことができる。本明細書で使用される場合、「CD123」は、完全長野生型CD123の突然変異、例えば点突然変異、フラグメント、挿入、欠失およびスプライス変異体を含むタンパク質を包含する。一態様において、CARの抗原結合部分は、CD123タンパク質の細胞外ドメイン内の抗原を認識し、それに結合する。一態様において、CD123タンパク質は、がん細胞上で発現される。

10

【0452】

CD123阻害剤および併用療法が本明細書において提供される。CD123阻害剤としては、小分子、組換えタンパク質、抗CD123 CAR発現細胞、例えばCAR-T、および抗CD123抗体（例えば、抗CD123単一または二重特異性抗体）およびこれらのフラグメントが挙げられるが、それらに限定されない。一部の実施形態において、抗CD123阻害剤は、本明細書で説明されるB細胞悪性腫瘍を処置するために使用することができる。ある実施形態において、CD123阻害剤は、CD19阻害剤、例えば、CD19 CAR発現細胞、例えば、本明細書で説明されるCAR発現細胞、例えば、マウスのものであるか、ヒトのものであるか、またはヒト化されている抗体結合ドメインを含むCARを発現する細胞と組み合わせて投与される。

20

【0453】

一実施形態において、CD123阻害剤は、例えばCD123受容体の天然リガンド（またはフラグメント）を含む、組換えタンパク質である。例えば、組換えタンパク質は、トランケートされたジフテリア毒素に融合しているヒトIL-3を含む融合タンパク質であるSL-401（DT388IL3とも呼ばれる；テキサス大学サウスウエスタンメディカルセンター）である。例えば、Testa et al. Biomark Res. 2014；2：4；および臨床試験識別番号NCT00397579を参照されたい。

30

【0454】

別の実施形態において、CD123阻害剤は、抗CD123抗体またはそのフラグメントである。一実施形態において、抗CD123抗体またはそのフラグメントは、モノクローナル抗体、例えば、単一特異性もしくは二重特異性抗体またはそのフラグメントを含む。例えば、抗CD123抗体またはそのフラグメントは、CSL360（CSL Limited）を含む。CSL360は、CD123と結合する組換えキメラモノクローナル抗体である。一部の実施形態において、CSL360は、例えば静脈内注入によって、静脈内投与される。例えば、CSL360は、0.1～10mg/kg、例えば、0.1～0.5mg/kg、0.5～1mg/kg、1～5mg/kg、または5～10mg/kgの用量で投与される。例えば、臨床試験識別番号NCT01632852；およびTesta et al.を参照されたい。

40

【0455】

別の実施形態において、CD123抗体またはそのフラグメントは、CSL362（CSL Limited）を含む。CSL362は、CD123を標的とするヒト化モノクローナル抗体であり、抗体依存性細胞媒介性細胞毒性（ADCC）の活性化を増強するように最適化されている。一部の実施形態において、CSL362は、例えば静脈内注入によって、静脈内投与される。一部の例において、CSL362は、0.1～12mg/kg、例えば、0.1～0.2mg/kg、0.2～0.5mg/kg、0.5～1mg/kg、1～6mg/kg、または6～12mg/kgの用量で投与される。例えば、臨

50

床試験識別番号NCT01632852を参照されたい。

【0456】

一実施形態において、CD123抗体またはそのフラグメントは、二重特異性抗体、例えばMGD006 (MacroGenics)を含む。MGD006は、CD123およびCD3を標的とする二重特異性抗体である。例えば、臨床試験識別番号NCT02152956を参照されたい。

【0457】

一部の実施形態において、CD123阻害剤は治療剤とコンジュゲートされるか、または他の形で結合される。

【0458】

一部の実施形態において、CD123阻害剤は、抗CD123 CAR発現細胞、例えばCAR T、例えば、抗CD123 CARコンストラクトを発現する、またはscFv、CDRもしくはVHおよびVL鎖を含むCD123結合CARによってコードされている、細胞を包含する。例えば、抗CD123 CAR発現細胞、例えばCAR Tは、例えば、本明細書で説明されるCAR発現細胞と組み合わせて投与するために、CD123-CAR (CD123結合ドメインを含む)を細胞 (例えば、T細胞またはNK細胞)に遺伝子操作することによって生成される。ある実施形態において、抗CD123 CARコンストラクトは、scFv配列、例えば、参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第2014/0322212号A1において提供されているscFv配列を含む。一実施形態において、抗CD123結合ドメインは、米国特許出願公開第2014/0322212号A1において説明されているscFvである。ある実施形態において、抗CD123結合ドメインは、米国特許出願公開第2014/0322212号A1において提供されているCARコンストラクトの一部である。本明細書で説明されるCAR発現細胞の養子療法のための使用方法も本明細書において提供される。

【0459】

別の態様において、CD19 CARを発現する細胞とCD123 CARを発現する細胞の混合物を含むCAR発現細胞、例えばCAR T細胞、の集団が本明細書において提供される。例えば、一実施形態において、CAR T細胞の集団は、CD19 CARを発現する第一の細胞、およびCD123 CARを発現する第二の細胞を包含し得る。

【0460】

CD10阻害剤

表面抗原分類10 (CD10)は、ネプリライシン、膜メタロエンドペプチダーゼ (MME)、中性エンドペプチダーゼ (NEP)、および急性リンパ芽球性白血病共通抗原 (CALLA)とも呼ばれる。CD10は、膜メタロエンドペプチダーゼ (MME) 遺伝子によってコードされる酵素である。CD10は、プレB表現型の白血病細胞上で発現され、急性リンパ球性白血病共通抗原である。

【0461】

本明細書で使用される場合、用語「CD10」は、白血病細胞上で検出可能であることが公知の抗原決定基を指す。ヒトおよびマウスアミノ酸および核酸配列は、GenBank、UniProtおよびSwiss-Protなどの公開データベースで見出すことができる。例えば、ヒトCD10のアミノ酸配列は、受託番号NP_009218.2、NP_000893.2、NP_009219.2、NP_009220.2で見出すことができ、それらをコードするmRNA配列は、受託番号NM_007287.2 (異性体1 bis)、NM_000902.3 (異性体1)、NM_007288.2 (異性体2 a)、NM_007289.2 (異性体2 b)で見出すことができる。本明細書で 사용되는場合、「CD10」は、完全長野生型CD10の突然変異、例えば点突然変異、フラグメント、挿入、欠失およびスプライス変異体を含むタンパク質を包含する。一態様において、CARの抗原結合部分は、CD10タンパク質の細胞外ドメイン内の抗原を認識し、それに結合する。一態様において、CD10タンパク質は、がん細胞上で発現される。

【0462】

CD10阻害剤および併用療法も本明細書において提供される。CD10阻害剤としては、小分子、組換えタンパク質、抗CD10 CAR発現細胞、例えばCART、および抗CD10抗体（例えば、抗CD10単一または二重特異性抗体）およびそれらのフラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。一部の実施形態において、抗CD10阻害剤は、本明細書で説明されるB細胞悪性腫瘍を処置するために使用することができる。ある実施形態において、CD10阻害剤は、CD19阻害剤、例えば、CD19 CAR発現細胞、例えば本明細書で説明されるCAR発現細胞、例えば、マウスのものであるか、ヒトのものであるか、またはヒト化されている抗体結合ドメインを含むCARを発現する細胞と組み合わせて投与される。

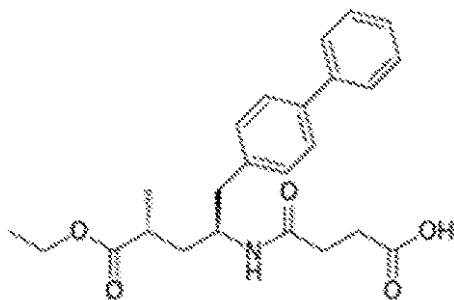
【0463】

10

ある実施形態において、CD10阻害剤は、サクビトリル（AHU-377；Novartis）{4- { [(2S, 4R) -1- (4-ビフェニル) -5-エトキシ-4-メチル-5-オキソ-2-ペンタニル] アミノ} -4-オキソブタン酸}、またはその薬学的に許容される塩もしくは誘導体を含む。サクビトリルの構造を下記に示す。

【0464】

【化1】



20

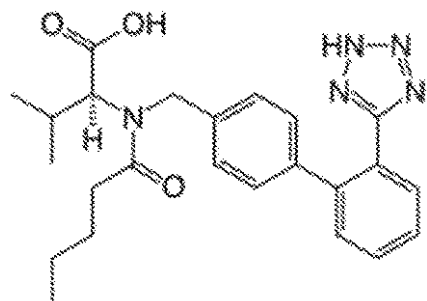
【0465】

別の実施形態において、CD10阻害剤は、バルサルタン／サクビトリル（LCZ696；Novartis）またはその薬学的に許容される塩もしくは誘導体を含む。バルサルタン／サクビトリルは、バルサルタンとサクビトリルの1：1混合物を含む複合薬である。バルサルタン { (S) -3-メチル-2- (N- { [2' - (2H-1, 2, 3, 4-テトラゾール-5-イル) ビフェニル-4-イル] メチル} ペンタンアミド) ブタン酸 } の構造を下記に示す。

30

【0466】

【化2】



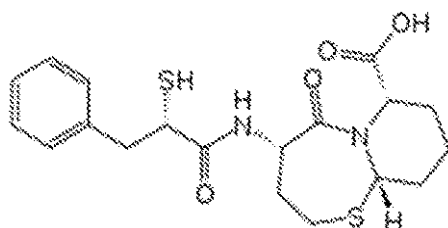
40

【0467】

ある実施形態において、CD10阻害剤は、オマパトリラート（Bristol-Myers Squibb）{ (4S, 7S, 10aS) -5-オキソ-4- { [(2S) -3-フェニル-2-スルファニルプロパノイル] アミノ} -2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 10a-オクタヒドロピリド [6, 1-b] [1, 3] チアゼピン-7-カルボン酸 }、またはその薬学的に許容される塩もしくは誘導体を含む。オマパトリラートの構造を下記に示す。

【0468】

【化 3】



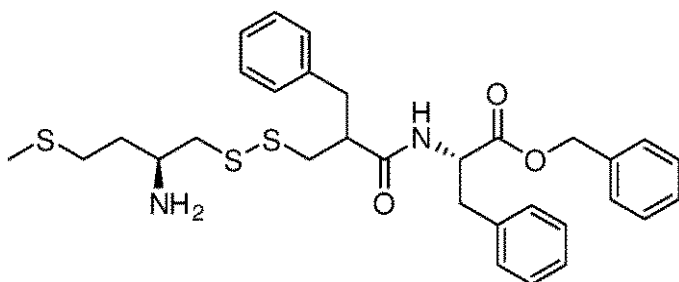
【0469】

ある実施形態において、CD10阻害剤は、RB-101 {ベンジルN-(3-{[(2S)-2-アミノ-4-(メチルチオ)ブチル]ジチオ}-2-ベンジルプロパノイル)-L-フェニルアラニネート}、またはその薬学的に許容される塩もしくは誘導体を含む。RB-101の構造を下記に示す。

10

【0470】

【化 4】



20

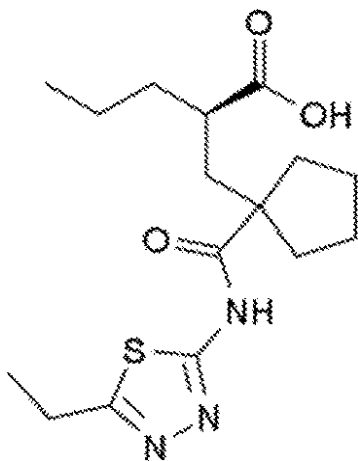
【0471】

ある実施形態において、CD10阻害剤は、UK-414, 495 (Pfizer) {(R)-2-({1-[(5-エチル-1,3,4-チアジアゾール-2-イル)カルバモイル]シクロペンチル}メチル)吉草酸}、またはその薬学的に許容される塩もしくは誘導体を含む。UK-414, 495の構造を下記に示す。

【0472】

【化 5】

30



40

【0473】

一部の実施形態において、CD10阻害剤は、治療剤とコンジュゲートされるか、または他の形で結合される。

【0474】

一部の実施形態において、CD10阻害剤は、抗CD10 CAR発現細胞、例えばCART、例えば、抗CD10 CARコンストラクトを発現する、またはscFv、CDRもしくはVHおよびVL鎖を含むCD10結合CARによってコードされている、細胞を包含する。例えば、抗CD10 CAR発現細胞、例えばCARTは、例えば、本明細

50

書で説明されるCAR発現細胞と組み合わせて投与するために、CD10-CAR (CD10結合ドメインを含む)を細胞(例えば、T細胞またはNK細胞)に遺伝子操作することによって生成される。本明細書で説明されるCAR発現細胞の養子療法のための使用方法も本明細書において提供される。

【0475】

別の態様において、CD19-CARを発現する細胞とCD10-CARを発現する細胞の混合物を含むCAR発現細胞、例えばCAR-T細胞、の集団が本明細書において提供される。例えば、一実施形態において、CAR-T細胞の集団は、CD19-CARを発現する第一の細胞、およびCD10-CARを発現する第二の細胞を包含し得る。

【0476】

CD34阻害剤

表面抗原分類34 (CD34)は、造血前駆細胞抗原CD34とも呼ばれ、細胞間接着因子として機能する細胞表面糖タンパク質である。CD34は、一部のがん/腫瘍、例えば、肺軟部肉腫、プレB-ALL、AML、AML-M7、隆起性皮膚線維肉腫、消化管間質腫瘍、巨細胞線維芽腫、顆粒球性肉腫、カポジ肉腫、脂肪肉腫、悪性線維性組織球腫、悪性末梢神経鞘腫瘍、髄膜(meningeal)血管周皮腫、髄膜腫、神経線維腫、シュワン腫、および甲状腺乳頭癌上で発現されることがある。

【0477】

本明細書で使用される場合、用語「CD34」は、造血幹細胞および一部のがん細胞上で検出可能であることが公知の抗原決定基を指す。ヒトおよびマウスアミノ酸および核酸配列は、GenBank、UniProtおよびSwiss-Protなどの公開データベースで見出すことができる。例えば、ヒトCD34のアミノ酸配列は、受託番号NP_001020280.1 (アイソフォームa前駆体)、NP_001764.1 (アイソフォームb前駆体)で見出すことができ、それらをコードするmRNA配列は、受託番号NM_001025109.1 (変異体1)、NM_001773.2 (変異体2)で見出すことができる。本明細書で使用される場合、「CD34」は、完全長野生型CD34の突然変異、例えば点突然変異、フラグメント、挿入、欠失およびスプライス変異体を含むタンパク質を包含する。一態様において、CARの抗原結合部分は、CD34タンパク質の細胞外ドメイン内の抗原を認識し、それに結合する。一態様において、CD34タンパク質は、がん細胞上で発現される。

【0478】

CD34阻害剤および併用療法も本明細書において提供される。CD34阻害剤としては、小分子、組換えタンパク質、抗CD34-CAR発現細胞、例えばCAR-T、および抗CD34抗体(例えば、抗CD34単一または二重特異性抗体)およびこれらのフラグメントが挙げられるが、それらに限定されない。一部の実施形態において、抗CD34阻害剤は、本明細書で説明されるB細胞悪性腫瘍を処置するために使用することができる。ある実施形態において、CD34阻害剤は、CD19阻害剤、例えば、CD19-CAR発現細胞、例えば、本明細書で説明されるCAR発現細胞、例えば、マウスのものであるか、ヒトのものであるか、またはヒト化されている抗体結合ドメインを含むCARを発現する細胞と組み合わせて投与される。

【0479】

ある実施形態において、CD34阻害剤は、抗体またはそのフラグメント、例えば、Mrcadal et al. Biochim. Biophys. Acta. 1371.1 (1998): 17-23において説明されているような、My-10モノクローナル抗体またはMy-10モノクローナル抗体を含むイムノリポソームを含む。他の実施形態において、CD34阻害剤は、Carrion et al. Life Sci. 75. 3 (2004): 313-28において説明されているような、CD34発現細胞を標的とするがんの薬、例えばドキソルビシン、を含有するイムノリポソームを含む。ある実施形態において、CD34阻害剤は、Maleki et al. Hum. Antibodies. 22 (2013): 1-8において説明されているような、CD34に対するモノクローナル抗体を含む。別の実施形態において、CD34阻害剤は、Maleki et al. Cell J. 16.3 (2014): 361-66において説明されているような、C

10

20

30

40

50

D 3 4 を標的とするモノクローナル抗体を含む。

【0480】

一部の実施形態において、C D 3 4 阻害剤は、治療剤とコンジュゲートされるか、または他の形で結合される。

【0481】

一部の実施形態において、C D 3 4 阻害剤は、抗 C D 3 4 C A R 発現細胞、例えば C A R T、例えば、抗 C D 3 4 C A R コンストラクトを発現する、または s c F v、C D R もしくは V H および V L 鎖を含む C D 3 4 結合 C A R によってコードされている、細胞を包含する。例えば、抗 C D 3 4 C A R 発現細胞、例えば C A R T は、例えば、本明細書で説明される C A R 発現細胞と組み合わせて投与するために、C D 3 4 - C A R (C D 3 4 結合ドメインを含む)を細胞(例えば、T 細胞または N K 細胞)に遺伝子操作することによって生成される。本明細書で説明される C A R 発現細胞の養子療法のための使用方法も本明細書において提供される。

10

【0482】

別の態様において、C D 1 9 C A R を発現する細胞と C D 3 4 C A R を発現する細胞の混合物を含む C A R 発現細胞、例えば C A R T 細胞、の集団が本明細書において提供される。例えば、一実施形態において、C A R T 細胞の集団は、C D 1 9 C A R を発現する第一の細胞、および C D 3 4 C A R を発現する第二の細胞を包含し得る。

【0483】

F L T - 3 阻害剤

20

F m s 様チロシンキナーゼ 3 (F L T - 3) は、表面抗原分類抗原 1 3 5 (C D 1 3 5)、受容体型チロシンプロテインキナーゼ F L T 3、または胎児肝キナーゼ 2 (F l k 2) と呼ばれ、受容体チロシンキナーゼである。F L T - 3 は、そのリガンドである サイトカイン F l t 3 リガンド (F L T 3 L) の サイトカイン受容体である。F L T - 3 は、多くの造血前駆細胞の表面で発現され、リンパ球発生にとって重要である。F L T 3 遺伝子は、白血病、例えば急性骨髄性白血病 (A M L) では一般に突然変異している。

【0484】

本明細書で使用される場合、用語「F L T - 3」は、造血前駆細胞および一部のがん細胞、例えば白血病細胞上で検出可能であることが公知の抗原決定基を指す。ヒトおよびマウスアミノ酸および核酸配列は、G e n B a n k、U n i P r o t および S w i s s - P r o t などの公開データベースで見出すことができる。例えば、ヒト F L T - 3 のアミノ酸配列は、受託番号 N P _ 0 0 4 1 1 0 . 2 で見出すことができ、それらをコードする m R N A 配列は、受託番号 N M _ 0 0 4 1 1 9 . 2 で見出すことができる。本明細書で使用される場合、「F L T - 3」は、完全長野生型 F L T - 3 の突然変異、例えば点突然変異、フラグメント、挿入、欠失およびスプライス変異体を含むタンパク質を包含する。一態様において、C A R の抗原結合部分は、F L T - 3 タンパク質の細胞外ドメイン内の抗原を認識し、それに結合する。一態様において、F L T - 3 タンパク質は、がん細胞上で発現される。

30

【0485】

F L T - 3 阻害剤および併用療法も本明細書において提供される。F L T - 3 阻害剤としては、小分子、組換えタンパク質、抗 F L T - 3 C A R 発現細胞、例えば C A R T、および抗 F L T - 3 抗体(例えば、抗 F L T - 3 単一または二重特異性抗体)およびそれらのフラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。一部の実施形態において、抗 F L T - 3 阻害剤は、本明細書で説明される B 細胞悪性腫瘍を処置するために使用することができる。ある実施形態において、F L T - 3 阻害剤は、C D 1 9 阻害剤、例えば、C D 1 9 C A R 発現細胞、例えば、本明細書で説明される C A R 発現細胞、例えば、マウスのものであるか、ヒトのものであるか、またはヒト化されている抗体結合ドメインを含む C A R を発現する細胞と組み合わせて投与される。

40

【0486】

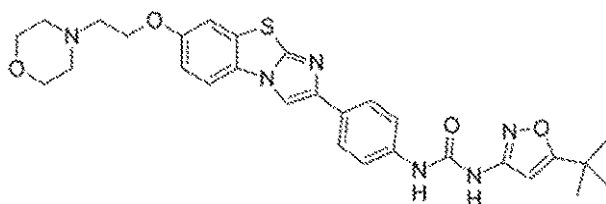
一部の実施形態において、F L T - 3 阻害剤は、キザルチニブ (A C 2 2 0 ; A m b i

50

t Biosciences) またはその薬学的に許容される塩もしくは誘導体を含む。キザルチニブは、小分子受容体チロシンキナーゼ阻害剤である。キザルチニブ {1-(5-(tert-ブチル)イソオキサゾール-3-イル)-3-(4-(7-(2-モルホリノエトキシ)ベンゾ[d]イミダゾ[2,1-b]チアゾール-2-イル)フェニル)尿素} の構造を下記に示す。

【0487】

【化6】



10

【0488】

一部の実施形態において、FLT-3阻害剤は、ミドスタウリン (PKC412; Technische Universitaet Dresden) またはその薬学的に許容される塩もしくは誘導体を含む。ミドスタウリンは、細菌ストレプトマイセス・スタウロスポレウス (Streptomyces staurosporeus) からのアルカロイドであるスタウロスポリンの半合成誘導体である、プロテインキナーゼ阻害剤である。

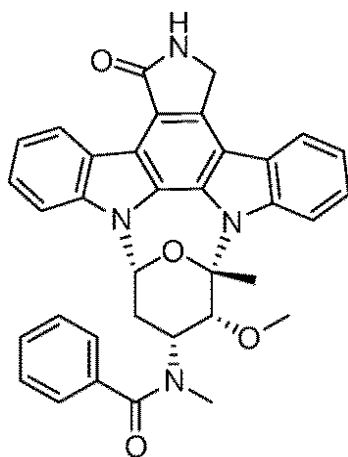
20

【0489】

ミドスタウリン {(9S, 10R, 11R, 13R)-2, 3, 10, 11, 12, 13-ヘキサヒドロ-10-メトキシ-9-メチル-11-(メチルアミノ)-9, 13-エポキシ-1H, 9H-ジインドロ[1, 2, 3-gh:3', 2', 1'-lm]ピロロ[3, 4-j][1, 7]ベンゾジアゾニン (benzodiamzoning)-1-オン} の構造を下記に示す。

【0490】

【化7】



30

【0491】

一部の実施形態において、ミドスタウリンは、例えば約25~200mg、例えば、約25~50mg、50~100mg、100~150mg、または150~200mgの用量で、経口投与される。例えば、ミドスタウリンは、例えば、1日2回、約25~200mg、例えば、1日2回、約25~50mg、50~100mg、100~150mg、または150~200mgの用量で、例えば経口で投与される。例えば、臨床試験識別番号NCT01830361を参照されたい。

【0492】

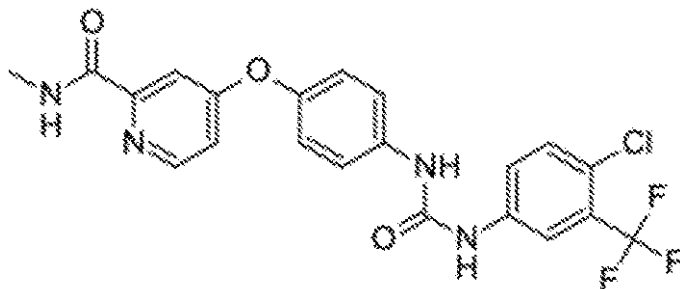
ある実施形態において、FLT-3阻害剤は、ソラフェニブ (BayerおよびOnyx Pharmaceuticals) またはその薬学的に許容される塩もしくは誘導体

50

を含む。ソラフェニブは、複数のチロシンプロテインキナーゼ（例えば、VEGFRおよびPDGFR）、Rafキナーゼ（例えば、C-RafおよびB-Raf）、およびいくつかの細胞内セリン／スレオニンキナーゼ（例えば、C-Raf、野生型B-Raf、および突然変異B-Raf）の小分子阻害剤である。例えば、labeling.bayerhealthcare.com/html/products/pi/Nexavar_PI.pdfを参照されたい。ソラフェニブ {4- [4- [4-クロロ-3- (トリフルオロメチル) フェニル] カルバモイルアミノ] フェノキシ}-N-メチル-ピリジン-2-カルボキサミド} の構造を下記に示す。

【0493】

【化8】



10

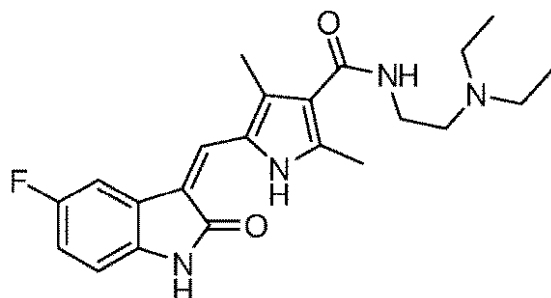
【0494】

一部の実施形態において、FLT-3阻害剤は、スニチニブ（旧称SU11248; Pfizer）またはその薬学的に許容される塩もしくは誘導体を含む。スニチニブは、FLT3を包含する複数の受容体チロシンキナーゼを阻害する、小分子経口薬である。スニチニブは、腎細胞癌（RCC）およびイマチニブ耐性消化管間質腫瘍（GIST）の処置用に米国食品医薬品局（FDA）によって承認されている。スニチニブ {N- (2-ジエチルアミノエチル) -5- [(Z) - (5-フルオロ-2-オキソ-1H-インドール-3-イリデン) メチル] -2, 4-ジメチル-1H-ピロール-3-カルボキサミド} の構造を下記に示す。

20

【0495】

【化9】



30

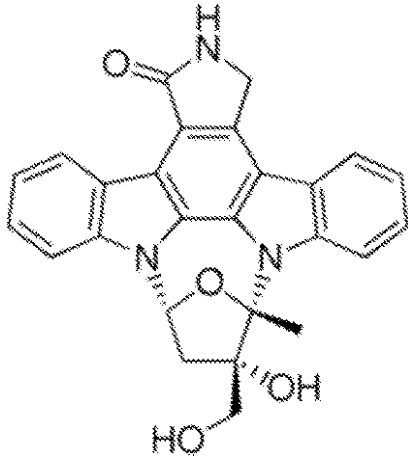
【0496】

一部の実施形態において、FLT-3阻害剤は、レスタウルチニブ（CEP-701; Cephalon）またはその薬学的に許容される塩もしくは誘導体を含む。レスタウルチニブは、スタウロスポリンに構造的に関連しているチロシンキナーゼ阻害剤である。レスタウルチニブ { (9S, 10S, 12R) -2, 3, 9, 10, 11, 12-ヘキサヒドロ-10-ヒドロキシ-10- (ヒドロキシメチル) -9-メチル-9, 12-エポキシ-1H-ジインドロ [1, 2, 3-fg: 3', 2', 1'-kl] ピロロ [3, 4-i] [1, 6] ベンゾジアゾシン-1-オン} の構造を下記に示す。

40

【0497】

【化 10】



10

【0498】

一部の実施形態において、レスタウルチニブは、例えば、1日2回、約40～100mg、例えば、1日2回、約40～60mg、50～70mg、60～80mg、70～90mg、または80～100mgの用量で、経口投与される。例えば、臨床試験識別番号NCT00079482、またはNCT00030186を参照されたい。

【0499】

一部の実施形態において、FLT-3阻害剤は、治療剤とコンジュゲートされるか、または他の形で結合される。

20

【0500】

一部の実施形態において、FLT-3阻害剤は、抗FLT-3 CAR発現細胞、例えばCART、例えば、抗FLT-3 CARコンストラクトを発現する、またはscFv、CDRもしくはVHおよびVL鎖を含むFLT-3結合CARによってコードされている、細胞を包含する。例えば、抗FLT-3 CAR発現細胞、例えばCARTは、例えば、本明細書で説明されるCAR発現細胞と組み合わせて投与するために、FLT-3-CAR（FLT-3結合ドメインを含む）を細胞（例えば、T細胞またはNK細胞）に遺伝子操作することによって生成される。本明細書で説明されるCAR発現細胞の養子療法のための使用方法も本明細書において提供される。

30

【0501】

別の態様において、CD19 CARを発現する細胞とFLT-3 CARを発現する細胞の混合物を含むCAR発現細胞、例えばCART細胞、の集団が本明細書において提供される。例えば、一実施形態において、CART細胞の集団は、CD19 CARを発現する第一の細胞、およびFLT-3 CARを発現する第二の細胞を包含し得る。

【0502】

一実施形態において、抗原結合ドメインCAR（例えば、CD19、ROR1、CD20、CD22、CD123、CD10、CD34、またはFLT-3抗原結合ドメイン）は、scFvタンパク質、例えばヒトscFv部分を含む。scFvの前に、配列番号13で提供されるもののような任意のリーダー配列、それに続いて、配列番号14または配列番号45または配列番号47または配列番号49で提供されるもののような任意のヒンジ配列、配列番号15で提供されるもののような膜貫通領域、配列番号16または配列番号51を包含する細胞内シグナル伝達ドメイン、および配列番号17または配列番号43を包含するCD3ゼータ配列が存在していてもよく、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。

40

【0503】

一部の態様において、本開示は、CAR（例えば、CD19 CAR、ROR1 CAR、CD20 CAR、CD22 CAR、CD123 CAR、CD10 CAR、CD34 CAR、またはFLT-3 CAR）をコードする核酸分子を含む組換え核酸コンストラクトを包含し、前記核酸分子は、例えば本明細書で説明される、例えば、細胞内

50

シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列と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、抗原結合ドメインをコードする核酸配列を含む。CARにおいて使用することができる典型的な細胞内シグナル伝達ドメインとしては、例えば、CD3-ゼータ、CD28、4-1BB、および同種のものの1つまたは複数の細胞内シグナル伝達ドメインが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの場合において、CARは、CD3-ゼータ、CD28、4-1BBおよび同種のもののあらゆる組合せを含んでいてもよい。

【0504】

一実施形態において、抗原結合ドメイン（例えば、CD19、ROR1、CD20、CD22、CD123、CD10、CD34またはFLT-3抗原結合ドメイン）は、抗体または抗体フラグメントの特定の機能的特徴または特性を特徴とする。例えば、一実施形態において、抗原結合ドメインを含む本発明のCAR組成物の一部は、ヒトB細胞抗原（例えば、CD19、ROR1、CD20、CD22、CD123、CD10、CD34、もしくはFLT-3）またはそのフラグメントに特異的に結合する。ある特定の実施形態において、scFvは、リーダー配列と連続しており同じリーディングフレーム内にある。一態様において、リーダー配列は、配列番号13として提供されるポリペプチド配列である。

10

【0505】

一実施形態において、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。一実施形態において、抗原結合ドメインは、Fv、Fab、(Fab')₂、または二重機能性（例えば、二重特異的）ハイブリッド抗体[例えば、Lanzavecchia et al., Eur.J. Immunol.17, 105 (1987)]である。一態様において、本発明の抗体およびそれらのフラグメントは、野生型の、または増強された親和性でB細胞タンパク質またはそのフラグメントに結合する。いくつかの場合において、ヒトscFvは、ディスプレイライブラリーに由来し得る。

20

【0506】

一実施形態において、突然変異したscFvによってCARコンストラクトに安定性の向上が付与されるように、抗原結合ドメイン、例えばscFvは、少なくとも1つの突然変異を含む。別の実施形態において、突然変異したscFvによってCARコンストラクトに安定性の向上が付与されるように、抗原結合ドメイン、例えばscFvは、例えばヒト化プロセスから生じる、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10の突然変異を含む。

30

【0507】

一実施形態において、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包含するCAR（例えば、CD19 CAR、ROR1 CAR、CD20 CAR、CD22 CAR、CD123 CAR、CD10 CAR、CD34 CAR、またはFLT-3 CAR）を発現する第一の細胞、および二次シグナル伝達ドメインを包含するCAR（例えば、CD19 CAR、ROR1 CAR、CD20 CAR、CD22 CAR、CD123 CAR、CD10 CAR、CD34 CAR、またはFLT-3 CAR）を発現する第二の細胞を包含する。

40

【0508】

CD79b阻害剤

本明細書で使用される場合、用語「CD79b」は、一部の悪性血液がん細胞、例えば白血病細胞上で検出可能であることが公知の抗原決定基を指す。ヒトおよびマウスアミノ酸および核酸配列は、GenBank、UniProtおよびSwiss-Protなどの公開データベースで見出すことができる。例えば、ヒトCD79bのアミノ酸配列は、受託番号NP_000617.1（アイソフォーム1前駆体）、NP_067613.1（アイソフォーム2前駆体）、またはNP_001035022.1（アイソフォーム3前駆体）で見出すことができ、それらをコードするmRNA配列は、受託番号NM_000626.2（転写変異体1）、NM_021602.2（転写変異体2）、またはNM

50

— 001039933. 1 (転写変異体3)で見出すことができる。本明細書で使用される場合、「CD79b」は、完全長野生型CD79bの突然変異、例えば点突然変異、フラグメント、挿入、欠失およびスプライス変異体を含むタンパク質を包含する。一態様において、CARの抗原結合部分は、CD79bタンパク質の細胞外ドメイン内の抗原を認識し、それに結合する。一態様において、CD79bタンパク質は、がん細胞上で発現される。実施形態において、CD79bタンパク質は、野生型CD79bタンパク質であり、他の実施形態において、CD79bタンパク質は、突然変異CD79bタンパク質である。

【0509】

CD79bは、免疫グロブリン関連ベータとも呼ばれ、これはBリンパ球抗原受容体多量体複合体の構成要素である。CD79bは、CD79a (免疫グロブリン関連アルファ) と呼ばれる別のアクセサリタンパク質を有するヘテロ二量体を形成し、このヘテロ二量体は、B細胞上の表面免疫グロブリンと複合体化する。CD79bは、Bリンパ球抗原受容体のアセンブリーおよび表面発現にとって重要である。CD79bおよびCD79aは、前駆B細胞およびB細胞発生にとって重要である。突然変異および異常なCD79発現が多く、B-CLL細胞において起こり、そのような発現は、B-CLLにおけるBリンパ球抗原受容体の表面発現の減少および／または不完全なシグナル伝達と相関関係がある可能性がある。例えば、Thompson et al. Blood 90.4(1997):1387-94を参照されたい。一部の症例において、CD79bの突然変異形またはスプライス変異体の過剰発現は、B-CLLおよび他のリンパ系悪性腫瘍においてBリンパ球抗原受容体減少との相互関係が証明されている。例えば、Cragg et al. Blood 100.9(2002):3068-76を参照されたい。

【0510】

CD79b阻害剤および併用療法が本明細書において提供される。CD79b阻害剤としては、小分子、組換えタンパク質、抗CD79b CAR発現細胞、例えばCART、および抗CD79b抗体 (例えば、抗CD79b単一または二重特異性抗体) およびそれらのフラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。一部の実施形態において、抗CD79b阻害剤は、本明細書で説明されるB細胞悪性腫瘍を処置するために使用することができる。ある実施形態において、CD79b阻害剤は、CD19阻害剤、例えば、CD19 CAR発現細胞、例えば、本明細書で説明されるCAR発現細胞、例えば、マウスのものであるか、ヒトのものであるか、またはヒト化されている抗体結合ドメインを含むCARを発現する細胞と組み合わせて投与される。

【0511】

ある実施形態において、CD79b阻害剤は、抗CD79b抗体またはそのフラグメントである。一実施形態において、抗CD79b抗体またはそのフラグメントは、モノクローナル抗体、例えば、単一特異性もしくは二重特異性抗体またはそのフラグメントを含む。例えば、抗CD79b抗体またはそのフラグメントは、ポラツズマブドチン (Roche) などの抗CD79b抗体薬物コンジュゲートを含む。実施形態において、ポラツズマブドチンは、がん、例えばNHL、例えば、濾胞性リンパ腫またはDLBCL、例えば、再発性または難治性濾胞性リンパ腫またはDLBCLを処置するために使用される。例えば、NCT02257567を参照されたい。実施形態において、抗CD79b抗体またはそのフラグメントは、MGD010 (MacroGenics) などの、CD32BおよびCD79Bと結合する構成要素を含む二重特異性抗体である。例えば、NCT02376036を参照されたい。

【0512】

一部の実施形態において、CD79b阻害剤は、治療剤とコンジュゲートされるか、または他の形で結合される。

【0513】

一部の実施形態において、CD79b阻害剤は、抗CD79b CAR発現細胞、例えばCART、例えば、抗CD79b CARコンストラクトを発現する、またはscFv、CDRもしくはVHおよびVL鎖を含むCD79b結合CARによってコードされてい

10

20

30

40

50

る、細胞を包含する。例えば、抗CD79b CAR発現細胞、例えばCAR Tは、例えば、本明細書で説明されるCAR発現細胞と組み合わせて投与するために、CD79b-CAR (CD79b結合ドメインを含む)を細胞(例えば、T細胞またはNK細胞)に遺伝子操作することによって生成される。本明細書で説明されるCAR発現細胞の養子療法のための使用方法も本明細書において提供される。

【0514】

別の態様において、CD19 CARを発現する細胞とCD79b CARを発現する細胞の混合物を含むCAR発現細胞、例えばCAR T細胞またはCARを発現するNK細胞、の集団が本明細書において提供される。例えば、一実施形態において、CAR発現細胞の集団は、CD19 CARを発現する第一の細胞、およびCD79b CARを発現する第二の細胞を包含し得る。

10

【0515】

CD179b阻害剤

本明細書で使用される場合、用語「CD179b」は、一部の悪性血液がん細胞、例えば白血病細胞上で検出可能であることが公知の抗原決定基を指す。ヒトおよびマウスアミノ酸および核酸配列は、GenBank、UniProtおよびSwiss-Protなどの公開データベースで見出すことができる。例えば、ヒトCD179bのアミノ酸配列は、受託番号NP_064455.1 (アイソフォームa前駆体)またはNP_690594.1 (アイソフォームb前駆体)で見出すことができ、それらをコードするmRNA配列は、受託番号NM_020070.3 (転写変異体1)またはNM_152855.2 (転写変異体2)で見出すことができる。本明細書で使用される場合、「CD179b」は、完全長野生型CD179bの突然変異、例えば点突然変異、フラグメント、挿入、欠失およびスプライス変異体を含むタンパク質を包含する。一態様において、CARの抗原結合部分は、CD179bタンパク質の細胞外ドメイン内の抗原を認識し、それに結合する。一態様において、CD179bタンパク質は、がん細胞上で発現される。実施形態において、CD179bタンパク質は、野生型CD179bタンパク質であり、他の実施形態において、CD179bタンパク質は、突然変異CD179bタンパク質である。

20

【0516】

CD179bは、免疫グロブリンラムダ様ポリペプチド1 (IGLL1)とも呼ばれる。CD179bは、膜結合Ig mu重鎖と複合体化するヘテロ二量体軽鎖のサブユニットである。一緒に軽鎖と重鎖が前駆B細胞受容体を形成する。CD179bの突然変異は、B細胞欠損および無ガンマグロブリン血症との相互関係が証明されている。CD179bは、一部のがん細胞、例えば、前駆体B細胞リンパ芽球性リンパ腫細胞において発現される。

30

【0517】

CD179b阻害剤および併用療法が本明細書において提供される。CD179b阻害剤としては、小分子、組換えタンパク質、抗CD179b CAR発現細胞、例えばCAR T、および抗CD179b抗体(例えば、抗CD179b単一または二重特異性抗体)およびそれらのフラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。一部の実施形態において、抗CD179b阻害剤は、本明細書で説明されるB細胞悪性腫瘍を処置するために使用することができる。ある実施形態において、CD179b阻害剤は、CD20阻害剤、例えば、CD19 CAR発現細胞、例えば、本明細書で説明されるCAR発現細胞、例えば、マウスのものであるか、ヒトのものであるか、またはヒト化されている抗体結合ドメインを含むCARを発現する細胞と組み合わせて投与される。

40

【0518】

ある実施形態において、CD179b阻害剤は、抗CD179b抗体またはそのフラグメントである。一実施形態において、抗CD179b抗体またはそのフラグメントは、モノクローナル抗体、例えば、単一特異性もしくは二重特異性抗体またはそのフラグメントを含む。

【0519】

50

一部の実施形態において、CD179b阻害剤は、治療剤とコンジュゲートされるか、または他の形で結合される。

【0520】

一部の実施形態において、CD179b阻害剤は、抗CD179b CAR発現細胞、例えばCAR T、例えば、抗CD179b CARコンストラクトを発現する、またはscFv、CDRもしくはVHおよびVL鎖を含むCD179b結合CARによってコードされている、細胞を包含する。例えば、抗CD179b CAR発現細胞、例えばCAR Tは、例えば、本明細書で説明されるCAR発現細胞と組み合わせて投与するために、CD179b-CAR (CD179b結合ドメインを含む)を細胞 (例えば、T細胞またはNK細胞)に遺伝子操作することによって生成される。本明細書で説明されるCAR発現細胞の養子療法のための使用方法も本明細書において提供される。

10

【0521】

別の態様において、CD19 CARを発現する細胞とCD179b CARを発現する細胞の混合物を含むCAR発現細胞、例えば、CAR T細胞またはCAR発現NK細胞、の集団が本明細書において提供される。例えば、一実施形態において、CAR発現細胞の集団は、CD19 CARを発現する第一の細胞、およびCD179b CARを発現する第二の細胞を包含し得る。

【0522】

CD79a阻害剤

本明細書で使用される場合、用語「CD79a」は、一部の悪性血液がん細胞、例えば白血病細胞上で検出可能であることが公知の抗原決定基を指す。ヒトおよびマウスアミノ酸および核酸配列は、GenBank、UniProtおよびSwiss-Protなどの公開データベースで見出すことができる。例えば、ヒトCD79aのアミノ酸配列は、受託番号NP_001774.1 (アイソフォーム1前駆体)またはNP_067612.1 (アイソフォーム2前駆体)で見出すことができ、それらをコードするmRNA配列は、受託番号NM_001783.3 (転写変異体1)またはNM_021601.3 (転写変異体2)で見出すことができる。本明細書で使用される場合、「CD79a」は、完全長野生型CD79aの突然変異、例えば点突然変異、フラグメント、挿入、欠失およびスプライス変異体を含むタンパク質を包含する。一態様において、CARの抗原結合部分は、CD79aタンパク質の細胞外ドメイン内の抗原を認識し、それに結合する。一態様において、CD79aタンパク質は、がん細胞上で発現される。実施形態において、CD79aタンパク質は、野生型CD79aタンパク質であり、他の実施形態において、CD79aタンパク質は、突然変異CD79aタンパク質である。

20

30

【0523】

CD79aは、免疫グロブリン関連アルファとも呼ばれる。CD79aは、CD79bとヘテロ二量体化して、Bリンパ球抗原受容体多量体複合体の構成要素を形成する。CD79aは、多くの血液がん、例えば、急性白血病 (例えば、AML)、B細胞リンパ腫、および骨髄腫において発現される。

【0524】

CD79a阻害剤および併用療法が本明細書において提供される。CD79a阻害剤としては、小分子、組換えタンパク質、抗CD79a CAR発現細胞、例えばCAR T、および抗CD79a抗体 (例えば、抗CD79a単一または二重特異性抗体)およびそれらのフラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。一部の実施形態において、抗CD79a阻害剤は、本明細書で説明されるB細胞悪性腫瘍を処置するために使用することができる。ある実施形態において、CD79a阻害剤は、CD19阻害剤、例えば、CD19 CAR発現細胞、例えば、本明細書で説明されるCAR発現細胞、例えば、マウスのものであるか、ヒトのものであるか、またはヒト化されている抗体結合ドメインを含むCARを発現する細胞と組み合わせて投与される。

40

【0525】

ある実施形態において、CD79a阻害剤は、抗CD79a抗体またはそのフラグメン

50

トである。一実施形態において、抗CD79a抗体またはそのフラグメントは、モノクローナル抗体、例えば、単一特異性もしくは二重特異性抗体またはそのフラグメントを含む。例えば、抗CD79a抗体またはそのフラグメントは、参照により本明細書に組み入れられるPolson et al. Blood 110.2(2007):616-23において説明されている抗CD79a抗体またはそのフラグメント（例えば、可変領域もしくはCDR）を含む。例えば、抗CD79a抗体またはそのフラグメントは、Polson et al.において説明されている7H7、15E4または16C11抗体またはそのフラグメント（例えば、可変領域もしくはCDR）を含む。同文献を参照されたい。

【0526】

一部の実施形態において、CD79a阻害剤は、治療剤とコンジュゲートされるか、または他の形で結合される。

10

【0527】

一部の実施形態において、CD79a阻害剤は、抗CD79a CAR発現細胞、例えばCART、例えば、抗CD79a CARコンストラクトを発現する、またはscFv、CDRもしくはVHおよびVL鎖を含むCD79a結合CARによってコードされている、細胞を包含する。例えば、抗CD79a CAR発現細胞、例えばCARTは、例えば、本明細書で説明されるCAR発現細胞と組み合わせて投与するために、CD79a-CAR（CD79a結合ドメインを含む）を細胞（例えば、T細胞またはNK細胞）に遺伝子操作することによって生成される。本明細書で説明されるCAR発現細胞の養子療法のための使用方法も本明細書において提供される。

20

【0528】

別の態様において、CD19 CARを発現する細胞とCD79a CARを発現する細胞の混合物を含むCAR発現細胞、例えばCART細胞またはCAR発現NK細胞、の集団が本明細書において提供される。例えば、一実施形態において、CAR発現細胞の集団は、CD20 CARを発現する第一の細胞、およびCD79a CARを発現する第二の細胞を包含し得る。

【0529】

CAR療法

本明細書における阻害剤、例えば、CD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179bまたはCD79aに対して向けられたCAR発現細胞は、本明細書で説明される組成物、例えば、膜貫通ドメイン、細胞内シグナル伝達ドメイン、共刺激ドメイン、リーダー配列またはヒンジの1つまたは複数を含んでいてもよい。

30

【0530】

一態様において、本発明は、CARをコードする導入遺伝子を含む組換え核酸コンストラクトを包含する。一部の実施形態において、核酸分子は、配列番号61～72の1つまたは複数から選択される抗CD19結合ドメインをコードする核酸配列を含み、前記配列は、細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列と連続しており同じリーディングフレーム内にある。CARにおいて使用することができる典型的な細胞内シグナル伝達ドメインとしては、例えば、CD3-ゼータ、CD28、4-1BB、および同種のものの1つまたは複数の細胞内シグナル伝達ドメインが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの場合において、CARは、CD3-ゼータ、CD28、4-1BB、および同種のもののあらゆる組合せを含んでいてもよい。

40

【0531】

一態様において、本発明は、機能的に同等な分子を生成する開始時の抗体またはフラグメント（例えば、scFv）のアミノ酸配列の改変を意図している。例えば、CARに含まれる、抗原結合ドメイン、例えばscFv、のVHまたはVLは、抗原結合ドメイン、例えばscFv、の開始時のVHまたはVLフレームワーク領域との少なくとも約70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%

50

、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の同一性が保持されるように改変してもよい。本発明は、機能的に同等な分子を生成するために、CARコンストラクト全体の改変、例えば、CARコンストラクトの様々なドメインの1つまたは複数のアミノ酸配列における改変を意図している。CARコンストラクトを、開始時のCARコンストラクトとの少なくとも約70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の同一性が保持されるように改変してもよい。本発明は、機能的に同等な分子を生成するために、CDRの改変、例えば、CARコンストラクトの1つまたは複数のCDRの1つまたは複数のアミノ酸配列における改変も意図している。例えば、CDRは、本明細書において提供されるCDR配列と比較して1、2、3、4、5または6個を含めてこの数までの変更（例えば、置換）を有してもよい。

10

【0532】

所望の分子をコードする核酸配列は、当業界公知の組換え方法を使用して得ることができ、例えば遺伝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、遺伝子を包含することがわかっているベクターからその遺伝子を抽出すること、またはその遺伝子を含有する細胞および組織から標準的な技術を使用して直接単離することなどによって得ることができる。その代わりに、対象の核酸は、クローニングされるのではなく合成的に産生されてもよい。

【0533】

20

本発明は、とりわけ、細胞に直接形質導入することができる、CARを発現するレトロウイルスおよびレンチウイルスベクターコンストラクトを包含する。

【0534】

本発明はまた、細胞に直接トランスフェクトすることができるRNAコンストラクトも包含する。トランスフェクションで使用するためのmRNAを生成するための方法は、長さが典型的には50～2000塩基の3'および5'非翻訳配列（「UTR」）、5'キャップおよび／または内部リボソーム侵入部位（IRES）、発現しようとする核酸、およびポリAテールを含有するコンストラクト（配列番号118）を産生するために、インビトロでの特別に設計されたプライマーを用いた鋳型の転写（IVT）、それに続くポリA付加を含む。このようにして産生されたRNAは、異なる種の細胞に効率的にトランスフェクトすることができる。一実施形態において、鋳型は、CARに関する配列を包含する。ある実施形態において、RNA CARベクターは、エレクトロポレーションによってT細胞に形質導入される。

30

【0535】

抗原結合ドメイン

一態様において、本発明のCARは、他に抗原結合ドメインと称される標的特異性の結合要素を含む。成分の選択は、標的細胞の表面を特徴付けるリガンドのタイプおよび数に依存する。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ぶことができる。したがって、本発明のCARにおける抗原結合ドメインのリガンドとして作用することができる細胞表面マーカーの例としては、ウイルス、細菌および寄生虫感染症、自己免疫疾患およびがん細胞に関連するものが挙げられる。抗原結合ドメインは、例えば、CD10、CD19、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179bまたはCD79aの1つまたは複数に結合することができる。

40

【0536】

一態様において、CARが介在するT細胞応答は、CARの中に所望の抗原と特異的に結合する抗原結合ドメインを作製することによって、対象の抗原に向けることができる。

【0537】

抗原結合ドメイン（例えば、CD10、CD19、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179bまたはCD79aの1つま

50

たは複数に結合する抗原結合ドメイン)は、これらに限定されないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、組換え抗体、マウス抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、およびこれらの機能的なフラグメント〔これらに限定されないが、単一ドメイン抗体、例えば、ラクダ由来のナノボディの重鎖可変ドメイン(VH)、軽鎖可変ドメイン(VL)および可変ドメイン(VHH)を包含する〕を包含する抗体、ならびに組換えフィブロネクチンドメインおよび同種のものなどの、抗原結合ドメインとして機能することが当業界公知の代替足場と結合するあらゆるドメインであり得る。

【0538】

いくつかの場合において、抗原結合ドメインにとって、CARが最終的に使用されると予想される同じ種由来であることは有益である。例えば、ヒトに使用する場合、CARの抗原結合ドメイン(例えば、CD10、CD19、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179bまたはCD79aの1つまたは複数に結合する抗原結合ドメイン)にとって、抗体または抗体フラグメントの抗原結合ドメインにヒトまたはヒト化残基を含むことは有益であり得る。

【0539】

ヒト化抗体は、当業界公知の様々な技術を使用して産生することができ、このような技術としては、これらに限定されないが、CDRグラフティング(例えば、それぞれ参照によりその全体が本明細書に組み入れられる欧州特許EP239,400号;国際特許公開WO91/09967;および米国特許第5,225,539号、5,530,101号、および5,585,089号を参照)、ベニアリング(veneering)またはリサーフェイシング(resurfacing)〔例えば、それぞれ参照によりその全体が本明細書に組み入れられる欧州特許EP592,106号およびEP519,596号;Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498;Studnicka et al., 1994, Protein Engineering, 7(6):805-814;およびRoguska et al., 1994, PNAS, 91:969-973を参照〕、チェーンシャッフリング(例えば、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる米国特許第5,565,332号を参照)、ならびに例えば、それぞれ参照によりその全体が本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第2005/0042664号、米国特許出願公開第2005/0048617号、米国特許第6,407,213号、米国特許第5,766,886号、国際特許公開WO9317105、Tan et al., J. Immunol., 169:1119-25 (2002)、Caldas et al., Protein Eng., 13(5):353-60 (2000)、Morea et al., Methods, 20(3):267-79 (2000)、Baca et al., J. Biol. Chem., 272(16):10678-84 (1997)、Roguska et al., Protein Eng., 9(10):895-904 (1996)、Couto et al., Cancer Res., 55 (23 Supp):5973s-5977s (1995)、Couto et al., Cancer Res., 55(8):1717-22 (1995)、Sandhu J S, Gene, 150(2):409-10 (1994)、およびPedersen et al., J. Mol. Biol., 235(3):959-73 (1994)で開示された技術などが挙げられる。抗原結合を変更する、例えば向上させるために、しばしばフレームワーク領域中のフレームワーク残基は、CDRドナー抗体からの対応する残基で置換されると予想される。これらのフレームワーク置換は、当業界周知の方法によって同定され、例えば、抗原結合に重要なフレームワーク残基を同定するための、CDRおよびフレームワーク残基の相互作用のモデリング、および特定の位置における異常なフレームワーク残基を同定するための配列比較によって同定される(例えば、参照によりそれらの全体が開示に組み入れられるQueen et alの米国特許第5,585,089号;およびRiechmann et al., 1988, Nature, 332:323を参照)。

【0540】

ヒト化抗体または抗体フラグメントは、その中に非ヒトである源からの残存する1つまたは複数のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、「移入」残基と称されることが多く、これは、典型的には「移入」可変ドメインから採取される。本明細書で示したように、ヒト化抗体または抗体フラグメントは、非ヒト免疫グロブリン分子からの1つまたは複数のCDRおよびフレームワーク領域を含み、ここでフレームワークを含むアミノ酸残基は、完全にまたは大部分がヒト生殖細胞系由来である。抗体または抗体フラグメントのヒト化に関する複数の技術が当業界周知であり、本質的に、Winterおよ

10

20

30

40

50

び協同研究者の方法 [Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)] に従って、げっ歯類 C D R またはヒト抗体の対応する配列に関する C D R 配列を置換すること、すなわち、C D R グラフティング (その内容が参照によりそれらの全体として本明細書に組み入れられる E P 2 3 9, 4 0 0; P C T 公開 W O 9 1 / 0 9 9 6 7; および米国特許第 4, 8 1 6, 5 6 7 号; 6, 3 3 1, 4 1 5 号; 5, 2 2 5, 5 3 9 号; 5, 5 3 0, 1 0 1 号; 5, 5 8 5, 0 8 9 号; 6, 5 4 8, 6 4 0 号) によって行うことができる。このようなヒト化抗体および抗体フラグメントにおいて、無傷のヒト可変ドメインより実質的に小さい部分が、非ヒト種からの対応する配列で置換されている。ヒト化抗体は、いくつかの C D R 残基および場合によってはいくつかのフレームワーク (F R) 残基がげっ歯類抗体中の類似の部位からの残基で置換されているヒト抗体であることが多い。また抗体および抗体フラグメントのヒト化は、ベニアリングまたはリサーフェイシング [その内容が参照によりそれらの全体として本明細書に組み入れられる E P 5 9 2, 1 0 6; E P 5 1 9, 5 9 6; Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., Protein Engineering, 7(6):805-814 (1994); および Roguska et al., PNAS, 91:969-973 (1994)] またはチェーンシャッフリング (米国特許第 5, 5 6 5, 3 3 2 号) によっても達成することができる。

【0541】

ヒト化抗体を作製するのに使用するために、軽鎖および重鎖の両方のヒト可変ドメインを選択することは、抗原性を低下させることになる。いわゆる「最良適合 (best-fit)」法に従って、公知のヒト可変ドメイン配列のライブラリー全体に対してげっ歯類抗体の可変ドメインの配列がスクリーニングされる。次いでげっ歯類配列に最も近いヒト配列がヒト化抗体のためのヒトフレームワーク (F R) として容認される [その内容が参照によりそれらの全体として本明細書に組み入れられる Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)]。別の方法は、軽鎖または重鎖の特定のサブグループにおける全てのヒト抗体のコンセンサス配列由来の特定のフレームワークを使用する。様々な異なるヒト化抗体に同じフレームワークを使用することができる [例えば、その内容が参照によりそれらの全体として本明細書に組み入れられる Nicholson et al. Mol. Immun. 34 (16-17): 1157-1165 (1997); Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993) を参照]。いくつかの実施形態において、フレームワーク領域、例えば重鎖可変領域の全ての4つのフレームワーク領域は、V H 4 _ 4 - 5 9 生殖細胞系配列由来である。一実施形態において、フレームワーク領域は、例えば、対応するマウス配列 (例えば配列番号 5 9 の) におけるアミノ酸からの 1、2、3、4 または 5 つの改変、例えば置換を含んでもよい。一実施形態において、フレームワーク領域、例えば軽鎖可変領域の全ての4つのフレームワーク領域は、V K 3 _ 1 . 2 5 生殖細胞系配列由来である。一実施形態において、フレームワーク領域は、例えば、対応するマウス配列 (例えば配列番号 5 9 の) におけるアミノ酸からの 1、2、3、4 または 5 つの改変、例えば置換を含んでもよい。

【0542】

いくつかの態様において、抗体フラグメントを含む本発明の C A R 組成物の一部は、標的抗原への高親和性および他の好都合な生物学的特性を保持したままヒト化される。本発明の一態様によれば、ヒト化抗体および抗体フラグメントは、親の配列およびヒト化された配列の三次元モデルを使用して、親の配列および様々な概念的なヒト化生成物を分析するプロセスによって調製される。三次元免疫グロブリンモデルが一般的に入手可能であり、当業者によく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の可能性のある三次元立体配座構造を例示して表示するコンピュータープログラムが利用可能である。これらの表示を精査することで、候補免疫グロブリン配列の機能化において見込みのある残基の役割の分析、例えば、候補免疫グロブリンの標的抗原と結合する能力に影響を与える残基の分析が可能になる。この方法で、標的抗原に対する高い親和性などの所望の抗体または抗体フラグメントの特徴が達成されるように、レシピエントおよび移入配列から F R 残基を

選択して組み合わせることができる。一般的に、C D R 残基が、直接的にかつ最も実質的に抗原結合への影響に関与する。

【0543】

ヒト化抗体または抗体フラグメントは、元の抗体と類似の抗原特異性、例えば、本発明においてはヒト C D 1 9、C D 2 0、または C D 2 2 と結合する能力を保持している可能性がある。いくつかの実施形態において、ヒト化抗体または抗体フラグメントは、ヒト C D 1 9、C D 2 0、または C D 2 2 への結合の向上した親和性および／または特異性を有する可能性がある。

【0544】

一態様において、結合ドメイン（例えば、C D 1 0、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 2、C D 3 4、C D 1 2 3、F L T-3、R O R 1、C D 7 9 b、C D 1 7 9 b または C D 7 9 a の 1 つまたは複数に結合する抗原結合ドメイン）は、フラグメント、例えば単鎖可変フラグメント（s c F v）である。一態様において、結合ドメインは、F v、F a b、（F a b'）₂、または二重機能性（例えば、二重特異的）ハイブリッド抗体 [例えば、Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)] である。一態様において、本発明の抗体およびそれらのフラグメントは、野生型の、または増強された親和性で C D 1 9、C D 2 0 または C D 2 2 タンパク質に結合する。

【0545】

いくつかの場合において、s c F v は、当業界公知の方法に従って調製できる [例えば、Bird et al., (1988) Science 242:423-426 および Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 を参照]。s c F v 分子は、フレキシブルなポリペプチドリンカーを使用して V H および V L 領域と一緒に連結することによって産生することができる。s c F v 分子は、長さおよび／またはアミノ酸組成が最適化されたリンカー（例えば、S e r - G l y リンカー）を含む。リンカーの長さは、s c F v の可変領域がどのようにフォールディングして相互作用するかに大きく影響を与える可能性がある。実際、短いポリペプチドリンカーが採用される場合（例えば、5～10 アミノ酸の間）、鎖内のフォールディングが予防される。鎖間のフォールディングは、2つの可変領域と一緒に架橋して機能的なエピトープ結合部位を形成するのにも必要である。リンカーの方向およびサイズの例に関しては、例えば、参照により本明細書に組み入れられる 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、2005/0175606 号、2007/0014794 号、および P C T 公開 W O 2006/020258 および W O 2007/024715 を参照されたい。

【0546】

s c F v は、その V L と V H 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 アミノ酸残基、またはそれより多くのアミノ酸残基のリンカーを含んでいてもよい。リンカー配列は、あらゆる天然に存在するアミノ酸を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、リンカー配列は、アミノ酸であるグリシンおよびセリンを含む。別の実施形態において、リンカー配列は、一連のグリシンおよびセリン反復を含み、例えば (G l y₄ S e r)_n を含み、ここで式中 n は、1 以上の正の整数である（配列番号 18）。一実施形態において、リンカーは、(G l y₄ S e r)₄（配列番号 106）または (G l y₄ S e r)₃（配列番号 107）であってもよい。リンカーの長さを変化させることで、活性を保持したりまたは強化したりすることが可能であり、それにより活性研究において優れた効能がもたらされる。

【0547】

一部の実施形態において、例えば保存的置換によって、抗原結合ドメイン（例えば、C D 1 0、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 2、C D 3 4、C D 1 2 3、F L T-3、R O R 1、C D 7 9 b、C D 1 7 9 b もしくは C D 7 9 a の 1 つまたは複数に結合する抗原結合ドメイン）または他の部分もしくは C A R 全体のアミノ酸配列を改変してもよく、例えば本明細書で説明されるアミノ酸配列を改変してもよい。類似の側鎖を有するアミノ酸残基の

ファミリーは、当業界において定義されており、塩基性側鎖（例えば、リシン、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）、非荷電性極性側鎖（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）、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、トリプトファン）、ベータ分岐側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖（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）を包含する。

【0548】

2つ以上の核酸またはポリペプチド配列の状況における完全同一（Percent identity）とは、2つ以上の配列が同一であることを指す。以下の配列比較アルゴリズムの1つを使用して、または手作業でのアライメントと目視検査により測定する場合、比較ウィンドウ、または指示された領域にわたり最大限一致するように比較して並べたときに、2つの配列が、同一であるアミノ酸残基またはヌクレオチドの特定のパーセンテージ（例えば、特定の領域にわたり、または特に指定されない場合は配列全体にわたり、60%の同一性であり、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の同一性であってもよい）を有する場合、その2つの配列は「実質的に同一」である。同一性は、長さが少なくとも約50ヌクレオチド（または10アミノ酸）の領域にわたり、または長さが100～500もしくは1000以上のヌクレオチド（または20、50、200以上のアミノ酸）の領域にわたり存在してもよい。

【0549】

配列の比較のために、典型的には1つの配列が、テスト配列と比較される参照配列として作用する。配列比較アルゴリズムを使用する場合、テストおよび参照配列をコンピューターに入力し、部分配列の座標を指定し、必要に応じて配列アルゴリズムのプログラムパラメーターを指定する。デフォルトプログラムのパラメーターを使用してもよいし、または代替パラメーターを指定してもよい。次いで配列比較アルゴリズムは、プログラムパラメーターに基づき参照配列に対するテスト配列のパーセント配列同一性を計算する。比較のための配列のアライメント方法は当業界周知である。比較のための最適な配列のアライメントは、例えば、Smith and Waterman, (1970) Adv. Appl. Math. 2:482cのローカルホモロジーアルゴリズムによって、Needleman and Wunsch, (1970) J. Mol. Biol. 48:443のホモロジーアライメントアルゴリズムによって、Pearson and Lipman, (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444の類似性検索方法によって、これらのアルゴリズムのコンピューター化された実行（Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WIにおける、GAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA）によって、または手作業でのアライメントと目視検査〔例えば、Brent et al., (2003) Current Protocols in Molecular Biologyを参照〕によって行うことができる。

【0550】

パーセント配列同一性および配列類似性を決定するのに好適なアルゴリズムの2つの例は、BLASTおよびBLAST2.0アルゴリズムであり、これらはそれぞれ、Altschul et al., (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402; およびAltschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410で説明されている。BLAST分析を行うためのソフトウェアは、国立バイオテクノロジー情報センター（National Center for Biotechnology Information）を介して公共的に利用可能である。

【0551】

また2つのアミノ酸配列間のパーセント同一性は、ALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれ、PAM120重量残基表、12のギャップの伸長ペナルティーお

10

20

30

40

50

よび4のギャップペナルティーを使用するE. MeyersおよびW. Miller [(1988) Comput. Appl. Biosci. 4:11-17] のアルゴリズムを使用しても決定することができる。加えて、2つのアミノ酸配列間のパーセント同一性は、GCGソフトウェアパッケージ中のGAPプログラム (www.gcg.comで利用可能) に組み込まれ、Blossom62マトリックスまたはPAM250マトリックスのいずれか、ならびに16、14、12、10、8、6、または4のギャップウェイトおよび1、2、3、4、5、または6のレンジスウェイトを使用するNeedlemanおよびWunsch [(1970) J. Mol. Biol. 48:444-453] のアルゴリズムを使用して決定することもできる。

【0552】

一態様において、本発明は、機能的に同等な分子を生成する開始時の抗体またはフラグメント (例えば、scFv) のアミノ酸配列の改変を意図している。例えば、CARに含まれる結合ドメイン (例えば、CD10、CD19、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179bまたはCD79aの1つまたは複数に結合する抗原結合ドメイン)、例えばscFv、のVHまたはVLは、抗CD19結合ドメイン、例えばscFv、の開始時のVHまたはVLフレームワーク領域との少なくとも約70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の同一性が保持されるように改変してもよい。より広義には、CARに含まれる、CD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3またはROR1へのB細胞抗原結合ドメイン、例えばscFv、のVHまたはVLは、抗原結合ドメイン、例えばscFv、の開始時のVHまたはVLフレームワーク領域との少なくとも約70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の同一性が保持されるように改変してもよい。本発明は、機能的に同等な分子を生成するために、CARコンストラクト全体の改変、例えば、CARコンストラクトの様々なドメインの1つまたは複数のアミノ酸配列における改変を意図している。CARコンストラクトを、開始時のCARコンストラクトとの少なくとも約70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の同一性が保持されるように改変してもよい。

【0553】

二重特異性CAR

一実施形態において、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つ以下の抗原に特異性を有する。二重特異性抗体分子は、第一のエピトープに結合特異性を有する第一の免疫グロブリンの可変ドメイン配列および第二のエピトープに結合特異性を有する第二の免疫グロブリンの可変ドメイン配列を特徴とする。一実施形態において、第一および第二のエピトープは、同じ抗原、例えば、同じタンパク質 (または多量体タンパク質のサブユニット) 上にある。一実施形態において、第一および第二のエピトープは、オーバーラップしている。一実施形態において、第一および第二のエピトープは、オーバーラップしていない。一実施形態において、第一および第二のエピトープは、異なる抗原、例えば、異なるタンパク質 (または異なる多量体タンパク質のサブユニット) 上にある。一実施形態において、二重特異性抗体分子は、第一のエピトープに結合特異性を有する重鎖可変ドメイン配列および軽鎖可変ドメイン配列、ならびに第二のエピトープに結合特異性を有する重鎖可変ドメイン配列および軽鎖可変ドメイン配列を含む。一実施形態において、二重特異性抗体分子は、第一のエピトープに結合特異性を有する半抗体、および第二のエピトープに結合特異性を有する半抗体を含む。一実施形態において、二重特異性抗体分子は、第一のエピトープに結合特異性を有する半抗体、またはそれらの

フラグメント、および第二のエピトープに結合特異性を有する半抗体、またはそれらのフラグメントを含む。一実施形態において、二重特異性抗体分子は、第一のエピトープに結合特異性を有する s c F v、またはそれらのフラグメント、および第二のエピトープに結合特異性を有する s c F v、またはそれらのフラグメントを含む。ある実施形態において、第一のエピトープは C D 1 9 上に位置し、第二のエピトープは C D 1 0、C D 2 0、C D 2 2、C D 3 4、C D 1 2 3、F L T - 3 または R O R 1 上に位置する。

【0554】

ある特定の実施形態において、抗体分子は、多重特異性（例えば、二重特異性または三重特異性）抗体分子である。二重特異性またはヘテロ二量体抗体分子を生成するためのプロトコールは当業界において公知であり、例えば、これらに限定されないが、例えば U S 5 7 3 1 1 6 8 で説明されている、例えば、「ノブインアホール (knob in a hole)」アプローチ；例えば W O 0 9 / 0 8 9 0 0 4、W O 0 6 / 1 0 6 9 0 5 および W O 2 0 1 0 / 1 2 9 3 0 4 で説明されている、静電的操作による F c 対形成；例えば W O 0 7 / 1 1 0 2 0 5 で説明されている、鎖交換加工ドメイン (Strand Exchange Engineered Domains : S E E D) ヘテロ二量体形成；例えば W O 0 8 / 1 1 9 3 5 3、W O 2 0 1 1 / 1 3 1 7 4 6、および W O 2 0 1 3 / 0 6 0 8 6 7 で説明されている、F a b アーム交換；例えば U S 4 4 3 3 0 5 9 で説明されている、例えば、アミン応答性基とスルフヒドリル応答性基とを有するヘテロ二官能性試薬を使用して二重特異性構造を生成するための抗体架橋による、二重の抗体コンジュゲート；例えば U S 4 4 4 4 8 7 8 で説明されている、2つの重鎖間のジスルフィド結合の還元および酸化のサイクルを介して異なる抗体からの半抗体 (重鎖-軽鎖対または F a b) を組み換えることによって生成された二重特異性抗体決定基；例えば U S 5 2 7 3 7 4 3 で説明されている、スルフヒドリル (sulfhydryl) 応答性基を介して架橋された三官能性の抗体、例えば、3つの F a b ' フラグメント；例えば U S 5 5 3 4 2 5 4 で説明されている、C 末端尾部を介して架橋された、好ましくはジスルフィドまたはアミン応答性の化学的架橋を介した、生合成結合タンパク質、例えば s c F v 対；例えば U S 5 5 8 2 9 9 6 で説明されている、二機能性抗体、例えば、定常ドメインと置き換えられたロイシンジッパー (例えば、c - f o s および 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 a b フラグメント；例えば U S 5 5 9 1 8 2 8 で説明されている、二重特異性および多重特異性のモノーおよび多価受容体、例えば、一方の抗体の C H 1 領域と、典型的には軽鎖が結合した他方の抗体の V H 領域との間でポリペプチドスペーサーを介して連結された2つの抗体 (2つの F a b フラグメント) の V H - C H 1 領域；例えば U S 5 6 3 5 6 0 2 で説明されている、二重特異性 D N A - 抗体コンジュゲート、例えば、D N A の二本鎖断片を介した抗体または F a b フラグメントの架橋形成；例えば U S 5 6 3 7 4 8 1 で説明されている、二重特異性融合タンパク質、例えば、親水性のらせん状ペプチドリンカーを間に有する2つの s c F v および完全な定常領域を含有する発現コンストラクト；例えば U S 5 8 3 7 2 4 2 で説明されている、多価および多重特異性結合タンパク質、例えば、一般的にダイアボディと呼ばれる I g 重鎖可変領域の結合領域を有する第一のドメインと I g 軽鎖可変領域の結合領域を有する第二のドメインとを有するポリペプチドの二量体 (二重特異性、三重特異性、または四重特異性の分子のために作り出されるより高次の構造も包含される)；例えば U S 5 8 3 7 8 2 1 で説明されている、V L および V H 鎖が連結されており、さらにペプチドスペーサーを用いて抗体のヒンジ領域および C H 3 領域と接続されているミニボディコンストラクトであって、二量体化されて二重特異性/多価分子を形成することができるミニボディコンストラクト；短いペプチドリンカー (例えば、5 または 1 0 アミノ酸) を用いて、またはまったくリンカーを用いずにいずれかの方向で連結された V H および V L ドメインであって、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、ドメイン；例えば U S 5 8 4 4 0 9 4 で説明されている、三量体および四量体；例えば U S 5 8 6 4 0 1 9 で説明されている、C 末端で架橋性基を用いたペプチド結合によって接続され、V L ドメインとさらに結合して一連の F V (または s c F v) を形成する、V H ドメイン (またはファミリーメンバー中の V L ドメイン) のストリング；ならびに例えば U S 5 8 6 9 6

10

20

30

40

50

20で説明されている、VHおよびVLドメインの両方がペプチドリンカーを介して連結された単一の鎖結合ポリペプチドであって、非共有結合または化学的な架橋形成を介して多価構造に組み合わされて、s c F Vまたはダイアボディタイプの様式の両方を使用して例えばホモ2価、ヘテロ2価、3価、および4価構造を形成する、ポリペプチドが挙げられる。追加の例示的な多重特異性および二重特異性分子ならびにそれらの作製方法は、例えば、US 5 9 1 0 5 7 3、US 5 9 3 2 4 4 8、US 5 9 5 9 0 8 3、US 5 9 8 9 8 3 0、US 6 0 0 5 0 7 9、US 6 2 3 9 2 5 9、US 6 2 9 4 3 5 3、US 6 3 3 3 3 9 6、US 6 4 7 6 1 9 8、US 6 5 1 1 6 6 3、US 6 6 7 0 4 5 3、US 6 7 4 3 8 9 6、US 6 8 0 9 1 8 5、US 6 8 3 3 4 4 1、US 7 1 2 9 3 3 0、US 7 1 8 3 0 7 6、US 7 5 2 1 0 5 6、US 7 5 2 7 7 8 7、US 7 5 3 4 8 6 6、US 7 6 1 2 1 8 1、US 2 0 0 2 0 0 4 5 8 7 A 1、US 2 0 0 2 0 7 6 4 0 6 A 1、US 2 0 0 2 1 0 3 3 4 5 A 1、US 2 0 0 3 2 0 7 3 4 6 A 1、US 2 0 0 3 2 1 1 0 7 8 A 1、US 2 0 0 4 2 1 9 6 4 3 A 1、US 2 0 0 4 2 2 0 3 8 8 A 1、US 2 0 0 4 2 4 2 8 4 7 A 1、US 2 0 0 5 0 0 3 4 0 3 A 1、US 2 0 0 5 0 0 4 3 5 2 A 1、US 2 0 0 5 0 6 9 5 5 2 A 1、US 2 0 0 5 0 7 9 1 7 0 A 1、US 2 0 0 5 1 0 0 5 4 3 A 1、US 2 0 0 5 1 3 6 0 4 9 A 1、US 2 0 0 5 1 3 6 0 5 1 A 1、US 2 0 0 5 1 6 3 7 8 2 A 1、US 2 0 0 5 2 6 6 4 2 5 A 1、US 2 0 0 6 0 8 3 7 4 7 A 1、US 2 0 0 6 1 2 0 9 6 0 A 1、US 2 0 0 6 2 0 4 4 9 3 A 1、US 2 0 0 6 2 6 3 3 6 7 A 1、US 2 0 0 7 0 0 4 9 0 9 A 1、US 2 0 0 7 0 8 7 3 8 1 A 1、US 2 0 0 7 1 2 8 1 5 0 A 1、US 2 0 0 7 1 4 1 0 4 9 A 1、US 2 0 0 7 1 5 4 9 0 1 A 1、US 2 0 0 7 2 7 4 9 8 5 A 1、US 2 0 0 8 0 5 0 3 7 0 A 1、US 2 0 0 8 0 6 9 8 2 0 A 1、US 2 0 0 8 1 5 2 6 4 5 A 1、US 2 0 0 8 1 7 1 8 5 5 A 1、US 2 0 0 8 2 4 1 8 8 4 A 1、US 2 0 0 8 2 5 4 5 1 2 A 1、US 2 0 0 8 2 6 0 7 3 8 A 1、US 2 0 0 9 1 3 0 1 0 6 A 1、US 2 0 0 9 1 4 8 9 0 5 A 1、US 2 0 0 9 1 5 5 2 7 5 A 1、US 2 0 0 9 1 6 2 3 5 9 A 1、US 2 0 0 9 1 6 2 3 6 0 A 1、US 2 0 0 9 1 7 5 8 5 1 A 1、US 2 0 0 9 1 7 5 8 6 7 A 1、US 2 0 0 9 2 3 2 8 1 1 A 1、US 2 0 0 9 2 3 4 1 0 5 A 1、US 2 0 0 9 2 6 3 3 9 2 A 1、US 2 0 0 9 2 7 4 6 4 9 A 1、EP 3 4 6 0 8 7 A 2、WO 0 0 0 6 6 0 5 A 2、WO 0 2 0 7 2 6 3 5 A 2、WO 0 4 0 8 1 0 5 1 A 1、WO 0 6 0 2 0 2 5 8 A 2、WO 2 0 0 7 0 4 4 8 8 7 A 2、WO 2 0 0 7 0 9 5 3 3 8 A 2、WO 2 0 0 7 1 3 7 7 6 0 A 2、WO 2 0 0 8 1 1 9 3 5 3 A 1、WO 2 0 0 9 0 2 1 7 5 4 A 2、WO 2 0 0 9 0 6 8 6 3 0 A 1、WO 9 1 0 3 4 9 3 A 1、WO 9 3 2 3 5 3 7 A 1、WO 9 4 0 9 1 3 1 A 1、WO 9 4 1 2 6 2 5 A 2、WO 9 5 0 9 9 1 7 A 1、WO 9 6 3 7 6 2 1 A 2、WO 9 9 6 4 4 6 0 A 1で見出される。上記で参照した出願の内容は、この参照によりそれらの全体が開示に組み入れられる。

【0555】

二重特異性抗体分子の各抗体または抗体フラグメント（例えば、s c F v）内で、VHは、VLの上流であってもよいし、または下流であってもよい。一部の実施形態において、上流の抗体または抗体フラグメント（例えば、s c F v）は、全体的な二重特異性抗体分子がVH₁-VL₁-VL₂-VH₂のアレンジメントを有するように、そのVL（VL₁）の上流にそのVH（VH₁）があるようにアレンジされ、下流の抗体または抗体フラグメント（例えば、s c F v）は、そのVH（VH₂）の上流にそのVL（VL₂）があるようにアレンジされる。他の実施形態において、上流の抗体または抗体フラグメント（例えば、s c F v）は、全体的な二重特異性抗体分子がVL₁-VH₁-VH₂-VL₂のアレンジメントを有するように、そのVH（VH₁）の上流にそのVL（VL₁）があるようにアレンジされ、下流の抗体または抗体フラグメント（例えば、s c F v）は、そのVL（VL₂）の上流にそのVH（VH₂）があるようにアレンジされる。リンカーは、2つの抗体または抗体フラグメント（例えば、s c F v）の間に配置されてもよく、例えば、コンストラクトがVH₁-VL₁-VL₂-VH₂のようにアレンジされる場合はVL₁とVL₂との間に、またはコンストラクトがVL₁-VH₁-VH₂-VL₂のようにアレンジされる場合はVH₁とVH₂との間に配置されてもよい。リンカーは、本

10

20

30

40

50

明細書で説明されるリンカー、例えば、(Gly₄-Ser)_nリンカーであってもよく、ここでnは、1、2、3、4、5、または6であり、例えば4（配列番号53）である。一般的に、2つのscFv間のリンカーは、2つのscFvのドメイン間での誤った対形成が回避される程度に長いと予想される。リンカーは、第一のscFvのVLとVHとの間に配置されてもよい。リンカーは、第二のscFvのVLとVHとの間に配置されてもよい。複数のリンカーを有するコンストラクトにおいて、リンカーのいずれか2つ以上は、同一のものであってもよいし、または異なるものであってもよい。したがって、一部の実施形態において、二重特異性CARは、本明細書で説明されるアレンジメントにおいて、VL、VH、および任意に1つまたは複数のリンカーを含む。

【0556】

10

ある特定の実施形態において、抗体分子は、第一のB細胞エピトープへの第一の結合特異性、および別のB細胞抗原への第二の結合特異性を有する、二重特異性抗体分子である。例えば、一部の実施形態において、二重特異性抗体分子は、CD19への第一の結合特異性、およびCD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179bまたはCD79aの1つまたは複数への第二の結合特異性を有する。一部の実施形態において、二重特異性抗体分子は、CD19への第一の結合特異性、およびCD22への第二の結合特異性を有する。

【0557】

キメラTCR

一態様において、本明細書で開示される抗体および抗体フラグメント（例えば、CD10、CD19、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179bまたはCD79aに対して向けられたもの）をT細胞受容体（「TCR」）鎖、例えば、TCRアルファまたはTCRベータ鎖の1つまたは複数の定常ドメインにグラフト化して、がん関連抗原と特異的に結合するキメラTCRを作り出すことができる。理論に縛られることはないが、キメラTCRは、抗原結合直後に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、本明細書で開示されるscFvは、TCR鎖、例えば、TCRアルファ鎖および／またはTCRベータ鎖の、定常ドメイン、例えば細胞外定常ドメインの少なくとも一部、膜貫通ドメインおよび細胞質内ドメインにグラフト化されてもよい。別の例として、抗体フラグメント、例えば本明細書で説明されるVLドメインは、TCRアルファ鎖の定常ドメインにグラフト化されてもよいし、抗体フラグメント、例えば本明細書で説明されるVHドメインは、TCRベータ鎖の定常ドメインにグラフト化されてもよい（または代替として、VLドメインは、TCRベータ鎖の定常ドメインにグラフト化されてもよいし、VHドメインは、TCRアルファ鎖にグラフト化されてもよい）。別の例として、抗体または抗体フラグメントのCDR、例えば、本明細書のあらゆる表で説明されるような抗体または抗体フラグメントのCDRをTCRアルファおよび／またはベータ鎖にグラフト化して、がん関連抗原と特異的に結合するキメラTCRを作り出してもよい。例えば、本明細書で開示されるLC CDRをTCRアルファ鎖の可変ドメインにグラフト化してもよいし、本明細書で開示されるHC CDRをTCRベータ鎖の可変ドメインにグラフト化してもよく、または逆もまた同様である。このようなキメラTCRは、任意の適切な方法によって産生され得る〔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〕。

【0558】

非抗体足場

実施形態において、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、小モジュラー免疫薬、マキシボディ（maxybody）、プロテインAまたはアフィリンを含む。非抗体足場は、細胞上の標的抗原と結合する能力を有する。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またはそのフラグメントである。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。結果として得られるポリペプチドが、標的細胞

50

上の標的抗原と特異的に結合する少なくとも1つの結合領域を含むのであれば、多種多様な非抗体足場を利用することができる。

【0559】

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、Switzerland)、ドメイン抗体 (Domantis, Ltd.、Cambridge、MA、および Ablynx nv、Zwijnaarde、Belgium)、リボカリン (Pieris Proteolab AG、Freising、Germany)、小モジュラー免疫薬 (Trubion Pharmaceuticals Inc.、Seattle、WA)、マキシボディ (Avidia, Inc.、Mountain View、CA)、プロテインA (Affibody AG、Sweden)、およびアフィリン (ガンマクリスタリンまたはユビキチン) (Scil Proteins GmbH、Halle、Germany) が挙げられる。

10

【0560】

フィブロネクチン足場は、フィブロネクチンIII型ドメイン [例えば、10番目のフィブロネクチンIII型モジュール (¹⁰Fn3ドメイン)] に基づくこともある。フィブロネクチンIII型ドメインは、2つのベータシート間に分布している7または8本のベータ鎖を有し、該ベータ鎖は、それら自体が互いに密集してタンパク質のコアを形成しており、および前記ドメインは、(CDRに類似した) ループをさらに含有し、該ループは、前記ベータ鎖を互いに接続しており、溶媒に露出している。ベータシートサンドイッチの各縁部にはこのようなループが少なくとも3つあり、前記縁部は、ベータ鎖の方向に対して垂直のタンパク質の境界である (米国特許第6, 818, 418号を参照されたい)。この構造のため、この非抗体足場は、抗体のものと性質および親和性の点で類似している抗原結合特性を模倣する。これらの足場をインビトロでのルーブランダム化およびシャフリング戦略に使用することができ、この戦略は、インビボ (in vivo) での抗体の親和性成熟過程に類似している。

20

【0561】

アンキリン技術は、異なる標的との結合に使用することができる可変領域を支持するための足場としてアンキリン由来の反復モジュールを有するタンパク質を使用することに基づく。アンキリン反復モジュールは、2つの逆平行の α ヘリックスと β ターンからなる33アミノ酸ポリペプチドである。可変領域の結合は、ほとんどの場合、リボソームディスプレイを使用することによって最適化される。

30

【0562】

アビマーは、HER3などの天然Aドメイン含有タンパク質に由来する。これらのドメインは、本質的にタンパク質間相互作用に使用され、ヒトの場合、250を超えるタンパク質が構造的にAドメインに基づいている。アビマーは、アミノ酸リンカーを介して連結された多数の異なる「Aドメイン」単量体 (2~10) からなる。例えば、米国特許出願公開第2004/0175756号、同第2005/0053973号、同第2005/0048512号および同第2006/0008844号において説明されている方法論を使用して、標的抗体と結合することができるアビマーを作り出すことができる。

40

【0563】

アフィボディ親和性リガンドは、プロテインAのIgG結合ドメインの1つの足場に基づく3ヘリックスバンドルで構成されている、小さい単純なタンパク質である。プロテインAは、細菌ストレプトコッカス・アウレウス (Staphylococcus aureus) からの表面タンパク質である。この足場ドメインは58のアミノ酸からなり、そのうちの13がランダム化されて、多数のリガンド変異体を有するアフィボディライブラリーが生成される (例えば、米国特許第5, 831, 012号を参照されたい)。アフィボディ分子は抗体を模倣する。それらは、150kDaである抗体の分子量と比較して、6kDaの分子量を有する。その小さいサイズにもかかわらず、アフィボディ分子の結合部位は、抗体のものに類似している。

50

【0564】

タンパク質エピトープ模倣体（PEM）は、タンパク質間相互作用に関与する主要二次構造であるタンパク質のペーターヘパリン二次構造を模倣する、中型で環状のペプチド様分子（MW1～2kDa）である。抗体結合ドメイン、例えば、scFv、単ドメイン抗体またはラクダ化抗体を含むものを、本明細書で説明されるいずれかの標的受容体／リガンド、例えば、PD1受容体、PD-L1またはPD-L2に指向させることができる。

【0565】

ある実施形態において、抗原結合ドメインは、標的細胞の表面のカウンターリガンドに結合する分子の細胞外ドメインまたはそのカウンターリガンド結合フラグメントを含む。

10

【0566】

抗原結合ドメインは、阻害性受容体の細胞外ドメインを含んでいてもよい。共阻害分子のカウンターリガンドとの会合は、免疫エフェクター応答の最適化にリダイレクトされる。

【0567】

抗原結合ドメインは、共刺激ECDドメインと称される共刺激分子の細胞外ドメインを含んでいてもよい。共刺激分子のカウンターリガンドとの会合は、免疫エフェクター細胞の最適化をもたらす。

【0568】

膜貫通ドメイン

20

膜貫通ドメインに関して、様々な実施形態において、CARの細胞外ドメインに付着した膜貫通ドメインが含まれるように、CARを設計することができる。膜貫通ドメインは、膜貫通領域に隣接する1つまたは複数の追加のアミノ酸、例えば、膜貫通が誘導されたタンパク質の細胞外領域と会合する1つまたは複数のアミノ酸（例えば、細胞外領域の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10から最大15のアミノ酸）、および／または膜貫通タンパク質が誘導されたタンパク質の細胞内領域に会合した1つまたは複数の追加のアミノ酸（例えば、細胞内領域の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10から最大15のアミノ酸）を包含していてもよい。一態様において、膜貫通ドメインは、CARの他のドメインの1つと会合しているものであり、例えば、一実施形態において、膜貫通ドメインは、シグナル伝達ドメイン、共刺激ドメインまたはヒンジドメインが由来する同じタンパク質からのものであってもよい。別の態様において、膜貫通ドメインは、CARのいずれかの他のドメインが由来する同じタンパク質に由来しない。いくつかの場合において、膜貫通ドメインが同一または異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインと結合しないように、例えば、受容体複合体の他の一員との相互作用が最小化されるように、膜貫通ドメインを選択してもよいし、またはアミノ酸置換によって改変してもよい。一態様において、膜貫通ドメインは、CARを発現する細胞表面上で別のCARとホモ二量体化することができる。異なる態様において、膜貫通ドメインのアミノ酸配列は、同じCARを発現する細胞に存在する天然型の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または置換されていてもよい。

30

【0569】

40

膜貫通ドメインは、天然源から得てもよいし、または組換え源から得てもよい。源が天然である場合、そのドメインは、あらゆる膜結合タンパク質または膜貫通タンパク質に由来するものであってもよい。一態様において、膜貫通ドメインは、CARが標的に結合したときはいつでも細胞内ドメインにシグナル伝達することができる。本発明において特定の用途を有する膜貫通ドメインは、少なくとも、例えば、T細胞受容体のアルファ、ベータまたはゼータ鎖、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154の膜貫通領域を包含していてもよい。一部の実施形態において、膜貫通ドメインは、少なくとも膜貫通領域、例えば、KIRDS2、OX40、CD2、CD27、LFA-1（CD11a／CD18）、ICOS（CD278）、

50

4-1BB (CD137)、GITR、CD40、BAFFR、HVEM (LIGHTR)、SLAMF7、NKp80 (KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD160、CD19、IL2Rベータ、IL2Rガンマ、IL7R α 、ITGA1、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELP LG (CD162)、LTBR、PAG/Cbp、NKG2D、NKG2C、またはCD19と特異的に結合するリガンドを包含してもよい。

【0570】

いくつかの場合において、膜貫通ドメインは、ヒンジ、例えばヒトタンパク質由来のヒンジを介して、CARの細胞外領域、例えばCARの抗原結合ドメインに付着してもよい。例えば、一実施形態において、ヒンジは、ヒトIg (免疫グロブリン) ヒンジ、例えばIgG4ヒンジ、IgDヒンジ、GSリンカー (例えば、本明細書で説明されるGSリンカー)、KIR2DS2ヒンジ、またはCD8aヒンジであってもよい。一実施形態において、ヒンジまたはスペーサーは、配列番号14のアミノ酸配列を含む (例えば、からなる)。一態様において、膜貫通ドメインは、配列番号15の膜貫通ドメインを含む (例えば、からなる)。

【0571】

一態様において、ヒンジまたはスペーサーは、IgG4ヒンジを含む。例えば、一実施形態において、ヒンジまたはスペーサーは、アミノ酸配列ESKYGPPCPPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSEFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHENHNTQKSLSLGKM (配列番号45) のヒンジを含む。一部の実施形態において、ヒンジまたはスペーサーは、GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGCCCTGCCCCGAGTTCCTGGGCGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCTCCCTCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAGGACCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGACAAACGCCAAGACCAAGCCCCGGGAGGAGCAGTTCAATAGCACCTACCGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCAC CAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCCAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGGTGTACACCTGCCCCCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAAC TACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAGGGCAACGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATG (配列番号46) のヌクレオチド配列によってコードされたヒンジを含む。

【0572】

一態様において、ヒンジまたはスペーサーは、IgDヒンジを含む。例えば、一実施形態において、ヒンジまたはスペーサーは、アミノ酸配列RWPESPKAQASSVPTAQPAEGLAKATTA PATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLDKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSHSRLTLPRSLWNAGTSVCTLNHPSLPQRLMALREPAAQAPVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSIVTDH (配列番号47) のヒンジを含む。一部の実施形態において、ヒンジまたはスペーサーは、AGGTGGCCCCGAAAGTCCCAAGGCCAGGCATCTAGTGTTCCTACTGCACAGCCCCAGGCAGAGGCAGCCTAGCCAAAGCTACTACTGCACCTGCCACTACGCGCAATACTGGCCGTGGCGGGAGGAGAAGAAAAAGGAGAAAGAGAAAGAACAGGAAGAGAGGGAGACCAAGACCCCTGAATGTCCATCCCATACCCAGCCGTGGGCGTCTATCTCTTGA CTCCCGCAGTACAGGACTTGTGGCTTAGAGATAAGGCCACCTTTACATGTTTCGTCGTGGGCTCTGACCTGAAGGATGCC

CATTTGACTTGGGAGGTTGCCGGAAGGTACCCACAGGGGGGGTTGAGGAAGGGTTGCTGGAGCGCCATTCCAATGGCTC
TCAGAGCCAGCACTCAAGACTCACCCCTCCGAGATCCCTGTGGAACGCCGGGACCTCTGTACATGTACTCTAAATCATC
CTAGCCTGCCCCCAGCGTCTGATGGCCCTTAGAGAGCCAGCCGCCAGGCACCAGTTAAGCTTAGCCTGAATCTGCTC
GCCAGTAGTGATCCCCAGAGGCCGCCAGCTGGCTCTTATGCGAAGTGTCGGGCTTTAGCCCCGCCAACATCTTGCTCAT
GTGGCTGGAGGACCAGCGAGAAGTGAACACCAGCGGCTTCGCTCCAGCCCGGCCCCACCCAGCCGGGTTCTACCACAT
TCTGGGCCTGGAGTGCTTAAGGGTCCCAGCACCTAGCCCCAGCCAGCCACATACACCTGTGTTGTGTCCCATGAA
GATAGCAGGACCCTGCTAAATGCTTCTAGGAGTCTGGAGGTTTCTACGTGACTGACCATT（配列番号４８）の
ヌクレオチド配列によってコードされたヒンジを含む。

【０５７３】

一態様において、膜貫通ドメインは組換えであってもよく、その場合、膜貫通ドメインは、主としてロイシンおよびバリンなどの疎水性残基を含むと予想される。一態様において、フェニルアラニン、トリプトファンおよびバリンの三つ組は、組換え膜貫通ドメインのそれぞれの末端で見出すことができる。

10

【０５７４】

CARの膜貫通ドメインと細胞質内領域との間で、長さが２から１０アミノ酸の間の短いオリゴリンカーまたはポリペプチドリンカーが連結を形成していてもよい。グリシンセリンの二つ組が特に好適なリンカーを付与する。例えば、一態様において、リンカーは、GGGSGGGGS（配列番号４９）のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、リンカーは、GGTGGCGGAGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC（配列番号５０）のヌクレオチド配列によってコードされる。

20

【０５７５】

一態様において、ヒンジまたはスペーサーは、KIR2DS2ヒンジを含む。

【０５７６】

細胞質内ドメイン

CARの細胞質内ドメインまたは領域は、細胞内シグナル伝達ドメインを包含する。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なエフェクター機能の少なくとも１つの活性化に関与する。

【０５７７】

本発明のCARで使用するための細胞内シグナル伝達ドメインの例としては、抗原受容体と接触した後にシグナル伝達を開始させるように協同して作用するT細胞受容体（TCR）および補助受容体の細胞質内配列、加えて同じ機能的な能力を有するこれらの配列およびあらゆる組換え配列のあらゆる誘導体または変異体が挙げられる。

30

【０５７８】

TCR単独により生成されたシグナルは、T細胞を完全に活性化させるには不十分であり、さらに二次的および／または共刺激シグナルも必要であることが知られている。したがって、T細胞の活性化は、細胞質内シグナル伝達配列の２つの別個のクラス：TCRを介した抗原依存性の一次活性化を開始させるクラス（一次細胞内シグナル伝達ドメイン）および抗原非依存性の方式で作用して二次シグナルまたは共刺激シグナルを提供するクラス（二次細胞質内ドメイン、例えば共刺激ドメイン）によって媒介されるということができ

40

【０５７９】

一次シグナル伝達ドメインは、刺激による方式または阻害による方式のいずれかでTCR複合体の一次的な活性化を調節する。刺激による方式で作用する一次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またはITAMとして知られるシグナル伝達モチーフを含有していてもよい。

【０５８０】

本発明において特に有用なITAMを含有する一次細胞内シグナル伝達ドメインの例としては、CD3ゼータ、共通FcRガンマ（FCER1G）、FcガンマRIIa、FcRベータ（FcイプシロンR1b）、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD79a、CD79b、CD278（「ICOS」としても公知）FcεRI、DAP

50

10、DAP12およびCD66dの上記ドメインが挙げられる。一実施形態において、本発明のCARは、細胞内シグナル伝達ドメイン、例えばCD3-ゼータの一次シグナル伝達ドメインを含む。

【0581】

一実施形態において、一次シグナル伝達ドメインは、改変されたITAMドメイン、例えば、天然ITAMドメインと比較して活性が変更された（例えば、増加または減少した）、突然変異したITAMドメインを含む。一実施形態において、一次シグナル伝達ドメインは、改変されたITAMを含有する一次細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、最適化および／またはトランケートされたITAMを含有する一次細胞内シグナル伝達ドメインを含む。ある実施形態において、一次シグナル伝達ドメインは、1つ、2つ、3つ、4つまたはそれより多くのITAMモチーフを含む。

10

【0582】

本発明において特定の用途を有する一次細胞内シグナル伝達ドメインを含有する分子のさらなる例としては、DAP10、DAP12、およびCD32のものが挙げられる。

【0583】

共刺激シグナル伝達ドメイン

CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3-ゼータシグナル伝達ドメインそれ自身を含んでいてもよいし、または本発明のCARの状況において有用な他のあらゆる所望の細胞内シグナル伝達ドメインと組み合わせることができる。例えば、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3-ゼータ鎖の部分、および共刺激シグナル伝達ドメインを含んでいてもよい。共刺激シグナル伝達ドメインは、共刺激分子の細胞内ドメインを含むCARの一部を指す。一実施形態において、細胞内ドメインは、CD3-ゼータのシグナル伝達ドメインおよびCD28のシグナル伝達ドメインを含むように設計される。一態様において、細胞内ドメインは、CD3-ゼータのシグナル伝達ドメインおよびICOSのシグナル伝達ドメインを含むように設計される。

20

【0584】

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とされる、抗原受容体またはそのリガンド以外の細胞表面分子であり得る。このような分子の例としては、CD27、CD28、4-1BB（CD137）、OX40、CD30、CD40、PD1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1（LFA-1）、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、およびCD83と特異的に結合するリガンド、ならびに同種のものが挙げられる。例えば、CD27の共刺激は、インビトロにおけるヒトCAR-T細胞の拡大、エフェクター機能、および生存を強化し、インビボにおけるヒトT細胞の持続性および抗腫瘍活性を増大させることが実証されている [Song et al. Blood. 2012; 119(3):696-706]。このような共刺激分子のさらなる例としては、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、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アルファ、CD8ベータ、IL2Rベータ、IL2Rガンマ、IL7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1（CD226）、SLAMF4（CD244、2B4）、CD84、CD96（Tactile）、CEACAM1、CRTAM、Ly9（CD229）、CD160（BY55）、PSGL1、CD10

30

40

50

0 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELP LG (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、およびCD83と特異的に結合するリガンドが挙げられる。

【0585】

本発明のCARの細胞質内部分内の細胞内シグナル伝達配列は、ランダムな順番または特定の順番で互いに連結されていてもよい。例えば長さが2から10アミノ酸の間（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、または10アミノ酸）の短いオリゴリンカーまたはポリペプチドリinkerが、細胞内シグナル伝達配列間の連結を形成していてもよい。一実施形態において、好適なリンカーとして、グリシン-セリンの二つ組を使用することができる。一実施形態において、好適なリンカーとして、単一のアミノ酸、例えばアラニン、グリシンを使用することができる。

10

【0586】

一態様において、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、またはそれより多くの共刺激シグナル伝達ドメインが含まれるように設計される。ある実施形態において、2つ以上、例えば、2、3、4、5、またはそれより多くの共刺激シグナル伝達ドメインは、リンカー分子、例えば本明細書で説明されるリンカー分子によって隔てられる。一実施形態において、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。いくつかの実施形態において、リンカー分子は、グリシン残基である。いくつかの実施形態において、リンカーは、アラニン残基である。

20

【0587】

一態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3-ゼータのシグナル伝達ドメインおよびCD28のシグナル伝達ドメインを含むように設計される。一態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3-ゼータのシグナル伝達ドメインおよび4-1BBのシグナル伝達ドメインを含むように設計される。一態様において、4-1BBのシグナル伝達ドメインは、配列番号16のシグナル伝達ドメインである。一態様において、CD3-ゼータのシグナル伝達ドメインは、配列番号17のシグナル伝達ドメインである。

【0588】

一態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3-ゼータのシグナル伝達ドメインおよびCD27のシグナル伝達ドメインを含むように設計される。一態様において、CD27のシグナル伝達ドメインは、QRRKYRSNKGESPVPAEPCRYSCPREEGSTIPIQEDYRKPEPACSP（配列番号51）のアミノ酸配列を含む。一態様において、CD27のシグナル伝達ドメインは、AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCCCACCCGC AAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC（配列番号52）の核酸配列によってコードされる。

30

【0589】

ナチュラルキラー細胞受容体 (NKR) CAR

一実施形態において、本明細書で説明されるCAR分子は、ナチュラルキラー細胞受容体 (NKR) の1つまたは複数の構成要素を含み、それによってNKR-CARを形成する。NKRの構成要素は、以下のナチュラルキラー細胞受容体：キラー細胞免疫グロブリン様受容体 (KIR)、例えば、KIR2DL1、KIR2DL2/L3、KIR2DL4、KIR2DL5A、KIR2DL5B、KIR2DS1、KIR2DS2、KIR2DS3、KIR2DS4、KIR2DS5、KIR3DL1/S1、KIR3DL2、KIR3DL3、KIR2DP1、およびKIR3DP1；天然細胞毒性 (cytotoxicity) 受容体 (NCR)、例えば、NKP30、NKP44、NKP46；免疫細胞受容体のシグナル伝達リンパ球活性化分子 (SLAM) ファミリー、例えば、CD48、CD229、2B4、CD84、NTB-A、CRACC、BLAME、およびCD2F-10；Fc受容体 (FcR)、例えば、CD16、およびCD64；ならびにLy49受容体、例えば、LY49A、LY49Cのいずれかからの、膜貫通ドメイン、ヒンジドメイン、または細胞質内ドメインであり得る。本明細書で説明されるNKR-CAR分子は、アダブ

40

50

ター分子または細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、D A P 1 2 と相互作用する可能性がある。N K R 構成要素を含むC A R 分子の例示的な配置および配列は、その内容が参照により本明細書に組み入れられる国際公報W O 2 0 1 4 / 1 4 5 2 5 2 号で説明されている。

【0590】

キメラ抗原受容体を調節するための戦略

一部の実施形態において、C A R 活性を制御することができる調節可能なC A R (R C A R) は、C A R 療法の安全性および効能を最適化するのに望ましい。C A R 活性を調節することができる多くの方法がある。例えば二量体化ドメインに融合したカスパーゼを使用してアポトーシスを誘導すること(例えば、Di et al., N Engl. J. Med. 2011 Nov. 3 ;365(18):1673-1683を参照)は、例えば本発明のC A R 療法における安全性スイッチとして使用できる。一実施形態において、本発明のC A R を発現する細胞(例えば、T細胞またはN K細胞)は、ヒトカスパーゼ(例えば、カスパーゼ9)または改変バージョンをヒトF K Bタンパク質の改変形に融合させることで条件付き二量体化を可能にするアポトーシス誘導性スイッチをさらに含む。ラパログ(例えば、A P 1 9 0 3、A P 2 0 1 8 7)などの小分子の存在下で、誘導性カスパーゼ(例えば、カスパーゼ9)は活性化され、本発明のC A R を発現する細胞(例えば、T細胞またはN K細胞)の急速なアポトーシスおよび死滅をもたらす。カスパーゼベースのアポトーシス誘導性スイッチ(またはこのようなスイッチの1つもしくは複数の態様)の例は、例えば、米国特許出願公開第2 0 0 4 0 4 0 0 4 7号、同第2 0 1 1 0 2 8 6 9 8 0号、同第2 0 1 4 0 2 5 5 3 6 0号、W O 1 9 9 7 0 3 1 8 9 9、W O 2 0 1 4 1 5 1 9 6 0、W O 2 0 1 4 1 6 4 3 4 8、W O 2 0 1 4 1 9 7 6 3 8、W O 2 0 1 4 1 9 7 6 3 8において説明されており、これらの特許文献の全てが参照により本明細書に組み入れられる。

【0591】

別の例において、C A R を発現する細胞はまた、二量体化剤[例えば、リミツシド(ri miducid)(A P 1 9 0 3 (B e l l i c u m P h a r m a c e u t i c a l s)またはA P 2 0 1 8 7 (A r i a d)とも呼ばれる]投与の際にカスパーゼ9の活性化および細胞のアポトーシスを引き起こす誘導性カスパーゼ9(iカスパーゼ9)分子も発現することができる。iカスパーゼ9分子は、C I Dの存在下で二量体化を媒介する二量体化(C I D)結合ドメインの化学的な誘導物質を含有する。これは、C A R を発現する細胞の誘導性で選択的な枯渇を引き起こす。いくつかの場合において、iカスパーゼ9分子は、C A R をコードするベクターとは別の核酸分子によってコードされる。いくつかの場合において、iカスパーゼ9分子は、C A R をコードするベクターと同じ核酸分子によってコードされる。iカスパーゼ9は、C A R を発現する細胞のあらゆる毒性を回避するための安全性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;臨床試験識別番号NCT02107963;およびDi Stasi et al. N. Engl. J. Med. 2011; 365:1673-83を参照されたい。

【0592】

本発明のC A R 療法を調節するための代替の戦略としては、例えば、C A R を発現する細胞を欠失させることによって、例えば、抗体依存性細胞媒介性細胞毒性(A D C C)を誘導することによって、C A R 活性を非活性化したりまたは止めたりする小分子または抗体を利用することが挙げられる。例えば、本明細書で説明されるC A R を発現する細胞もまた、細胞死、例えばA D C Cまたは補体(compliment)誘導性の細胞死を誘導することが可能な分子によって認識される抗原を発現する可能性がある。例えば、本明細書で説明されるC A R を発現する細胞はまた、抗体または抗体フラグメントによって標的化される可能性がある受容体を発現する可能性もある。このような受容体の例としては、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 $\alpha v \beta 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha I 3 / 4 \beta 3$ 、 $\alpha 4 \beta 7$ 、 $\alpha 5 \beta 1$ 、 $\alpha v \beta 3$ 、 αv)、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

、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/ベシジン、CD152/CTLA-4、CD154/CD40L、CD195/CCR5、CD319/SLAMF7、およびEGFR、ならびにそれらのトランケートされたバージョン（例えば、1つまたは複数の細胞外のエピトープを保存するが細胞質内ドメイン内の1つまたは複数の領域が欠失したバージョン）が挙げられる。

【0593】

例えば、本明細書で説明されるCARを発現する細胞はまた、シグナル伝達能力を欠失しているが、ADCC、例えばセツキシマブ〔ERBITUX（登録商標）〕を誘導することが可能な分子によって認識されるエピトープを保持するトランケートされた上皮増殖因子受容体（EGFR）を発現してもよく、それにより、セツキシマブの投与が、ADCCとその後のCARを発現する細胞の枯渇を誘導するようになる（例えば、WO2011/056894、およびJonnalagadda et al., Gene Ther. 2013; 20(8)853-860を参照）。別の戦略としては、リツキシマブと結合し、その結果として例えばADCCによるCARを発現する細胞の選択的な枯渇を引き起こす、本明細書で説明されるCARを発現する細胞中でCD32およびCD20抗原の両方からの標的エピトープを組み合わせた高度に圧縮されたマーカー/自殺遺伝子を発現することが挙げられる（例えば、Philip et al., Blood. 2014; 124(8)1277-1287を参照）。本明細書で説明されるCARを発現する細胞を枯渇させるための他の方法としては、例えばADCCを誘導することによる破壊のために、成熟リンパ球、例えばCARを発現する細胞と選択的に結合してそれを標的とする、モノクローナル抗CD52抗体であるCAMPATHの投与が挙げられる。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を使用して、CARを発現する細胞を選択的に標的化することができる。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またはADC活性を引き起こすことによって、CARを発現する細胞の数を低減させることができる。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を、細胞の死滅を誘導する薬剤、例えば毒素とカップリングさせることによって、CARを発現する細胞の数を低減させることができる。代替として、CAR分子それ自身を、後述するように、活性を調節することができるように、例えば開始させたり止めたりすることができるように設計することができる。

【0594】

他の実施形態において、本明細書で説明されるCARを発現する細胞は、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こともできる。一実施形態において、標的タンパク質はCD20であり、T細胞枯渇剤は、抗CD20抗体、例えばリツキシマブである。このような実施形態において、T細胞枯渇剤は、CARを発現する細胞を低減または排除すること、例えばCAR誘導毒性を減弱することが望ましくなったら、投与される。他の実施形態において、T細胞枯渇剤は、抗CD52抗体、例えばアレムツズマブである。

【0595】

ある態様において、RCARは、ポリペプチドのセット、最も簡単な実施形態において、典型的には、2つのポリペプチドのセットを含み、別々のポリペプチドまたはメンバーに、本明細書で説明される標準的なCARの構成要素、例えば抗原結合ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインが分配されている。一部の実施形態において、ポリペプチドのセットは、二量体化分子の存在下でポリペプチドを互いにカップリングすることができ、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カップリングすることができる、二量体化スイッチを包含する。一実施形態において、本発明のCARは、例えば参照により本明細書に組み入れられるWO2014127261において説明されているもののような二量体化スイッチを利用する。このような調節可能なCARのさらなる説明および

例示的な配置は、本明細書において提供され、その全体が参照により本明細書に組み入れられる国際公報WO2015/090229において提供されている。

【0596】

一部の実施形態において、RCARは、スイッチドメイン、例えば、配列番号122に記載のFKBPスイッチドメインを含むか、またはFRBと結合する能力を有する、例えば配列番号123に記載の、FKBPのフラグメントを含む。一部の実施形態において、RCARは、例えば配列番号124に記載のFRB配列、または例えばDVPDYASLGGPSSPKKKRKVS RGV QVETISPGDGRTFPKRGQTCTCVVHYTGMLLEDGKKFDSSSRDRNKPFFKFMLGKQEVIRGWEEGV AQMSVGQRAKLTISPDIAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLLET SY (配列番号122)

VQVETISPGDGRTFPKRGQTCTCVVHYTGMLLEDGKKFDSSSRDRNKPFFKFMLGKQEVIRGWEEGV AQMSVGQRAKLTISPDIAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLLET S (配列番号123)

ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAEQWCRKYMKGSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRISKTS (配列番号124)

のいずれかに記載の突然変異FRB配列を含む、スイッチドメインを含む。

【0597】

【表1】

表1. 二量体化分子への親和性が増加した例示的な突然変異FRB。

FRB突然変異体	アミノ酸配列	配列番号
E2032I突然変異体	ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAEQWCRKYMKGSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRISKTS	125
E2032L突然変異体	ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAEQWCRKYMKGSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRISKTS	126
T2098L突然変異体	ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAEQWCRKYMKGSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRISKTS	127
E2032, T2098突然変異体	ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAEQWCRKYMKGSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRISKTS	128
E2032I, T2098L突然変異体	ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAEQWCRKYMKGSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRISKTS	129
E2032L, T2098L突然変異体	ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAEQWCRKYMKGSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRISKTS	130

【0598】

スプリットCAR

一部の実施形態において、CARを発現する細胞は、スプリットCARを使用する。スプリットCARアプローチは、公報WO2014/055442およびWO2014/055657においてより詳細に説明されている。簡単に言えば、スプリットCARシステムは、第一の抗原結合ドメインおよび共刺激ドメイン（例えば、41BB）を有する第一のCARを発現する細胞を含み、この細胞は、第二の抗原結合ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメイン（例えば、CD3ゼータ）を有する第二のCARも発現する。細胞が第一の抗原と遭遇すると、共刺激ドメインが活性化され、細胞は増殖する。細胞が第二の抗原と遭遇すると、細胞内シグナル伝達ドメインが活性化され、細胞を殺滅する活性が開始される。したがって、CARを発現する細胞は、両方の抗原の存在下でのみ完全に活性化される。

【0599】

RNAトランスフェクション

本明細書において、インビトロで転写されたRNA CARを産生する方法が開示される。本発明はまた、細胞に直接トランスフェクトすることができる、CARをコードするRNAコンストラクトを（とりわけ）包含する。トランスフェクションで使用するためのmRNAを生成するための方法は、3'および5'非翻訳配列（「UTR」）、5'キャップおよび／または内部リボソーム侵入部位（IRES）、発現しようとする核酸、およびポリAテールを含有する、長さが典型的には50～2000塩基のコンストラクト（配列番号118）を産生するために、特別に設計されたプライマーを用いる鋳型のインビトロで転写（IVT）、それに続くポリA付加を含み得る。このようにして産生されたRNAは、異なる種類の細胞に効率的にトランスフェクトすることができる。一態様において、鋳型は、CARに関する配列を包含する。

10

【0600】

一態様において、CARは、メッセンジャーRNA（mRNA）によってコードされる。一態様において、CARをコードするmRNAは、CARを発現する細胞、例えば、CAR T細胞またはCAR NK細胞の産生のために、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞に導入される。

【0601】

一実施形態において、インビトロで転写されたRNA CARは、一過性トランスフェクションの形態として細胞に導入することができる。RNAは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）で生成した鋳型を使用したインビトロでの転写によって産生される。あらゆる源からの対象のDNAを、インビトロでの適切なプライマーおよびRNAポリメラーゼを使用したmRNA合成のための鋳型に直接PCRで変換させることができる。DNA源は、例えば、ゲノムDNA、プラスミドDNA、ファージDNA、cDNA、合成DNA配列または他のあらゆる適切なDNA源であってもよい。インビトロでの転写のための所望の鋳型（temple）は、本発明のCARである。例えば、RNA CARのための鋳型は、抗腫瘍抗体の単鎖可変ドメインを含む細胞外領域；ヒンジ領域、膜貫通ドメイン（例えば、CD8aの膜貫通ドメイン）；ならびに細胞内シグナル伝達ドメインを包含する細胞質内領域を含み、前記細胞質内領域は、例えば、CD3-ゼータのシグナル伝達ドメインおよび4-1BBのシグナル伝達ドメインを含む。

20

【0602】

一実施形態において、PCRに使用しようとするDNAは、オープンリーディングフレームを含有する。DNAは、生物のゲノムからの天然に存在するDNA配列由来であってもよい。一実施形態において、核酸は、5'および／または3'非翻訳領域（UTR）の一部または全部を包含していてもよい。核酸は、エキソンおよびイントロンを包含していてもよい。一実施形態において、PCRに使用しようとするDNAは、ヒト核酸配列である。別の実施形態において、PCRに使用しようとするDNAは、5'および3'UTRを包含するヒト核酸配列である。その代わりにDNAは、天然に存在する生物では通常発現されない人工DNA配列であってもよい。典型的な人工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ために一緒にライゲートされる遺伝子の一部を含有する配列である。一緒にライゲートされるDNAの一部は、単一の生物由来であってもよいし、または1種より多くの生物由来であってもよい。

30

40

【0603】

PCRは、トランスフェクションに使用されるmRNAのインビトロでの転写のための鋳型を生成するために使用される。PCRを行う方法は当業界周知である。PCRで使用するためのプライマーは、PCRのための鋳型として使用しようとするDNAの領域に実質的に相補的な領域を有するように設計される。「実質的に相補的」は、本明細書で 사용되는場合、プライマー配列中の塩基の大部分または全部が相補的であるか、または1つもしくは複数の塩基が非相補的であるかもしくはミスマッチであるヌクレオチド配列を指す。実質的に相補的な配列は、PCRに使用されるアニーリング条件下で、意図したDNA標的にアニールしたり、または意図したDNA標的とハイブリダイズしたりすることが可能である。プライマーは、DNA鋳型のいずれかの部分に実質的に相補的になるように

50

設計することができる。例えば、プライマーは、5'および3' UTRを包含する、細胞中で正常に転写される核酸（オープンリーディングフレーム）の一部が増幅されるように設計することができる。プライマーは、対象の特定のドメインをコードする核酸の一部が増幅されるように設計することもできる。一実施形態において、プライマーは、5'および3' UTRの全部または一部を包含するヒトcDNAのコード領域が増幅されるように設計される。PCRに有用なプライマーは、当業界周知の合成方法によって生成することができる。「フォワードプライマー」は、増幅されるべきDNA配列の上流にあるDNA鋳型上のヌクレオチドに実質的である相補的なヌクレオチドの領域を含有するプライマーである。「上流」は、コード鎖を基準にして、増幅しようとするDNA配列の5位を指すものとして本明細書では使用される。「リバースプライマー」は、増幅されるべきDNA配列の下流にある二本鎖DNA鋳型に実質的に相補的であるヌクレオチドの領域を含有するプライマーである。「下流」は、コード鎖を基準にして、増幅しようとするDNA配列の3'位を指すものとして本明細書では使用される。

10

【0604】

本明細書で開示される方法において、PCRに有用なあらゆるDNAポリメラーゼを使用することができる。試薬およびポリメラーゼは、多数の供給元から市販されている。

【0605】

安定性および／または翻訳効率を促進する能力を有する化学構造も使用が可能である。RNAは、一部の実施形態において、5'および3' UTRを有する。一実施形態において、5' UTRは、長さが1から3000ヌクレオチドの間である。コード領域に付加しようとする5'および3' UTR配列の長さは、これらに限定されないが、UTRの異なる領域にアニールするPCRのためのプライマーを設計することなど様々な方法によって変更することができる。このアプローチを使用すれば、当業者は、転写されたRNAのトランスフェクション後に最適な翻訳効率を達成するのに必要な5'および3' UTRの長さを改変することができる。

20

【0606】

5'および3' UTRは、対象の核酸にとって、天然に存在する内因性5'および3' UTRであってもよい。その代わりに、フォワードおよびリバースプライマーにUTR配列を取り入れることによって、または鋳型の他のあらゆる改変によって、対象の核酸にとって内因性ではないUTR配列を付加してもよい。対象の核酸にとって内因性ではないUTR配列の使用は、RNAの安定性および／または翻訳効率を改変するのに有用な可能性がある。例えば、3' UTR配列中のAUリッチ要素は、mRNAの安定性を減少させる可能性があることが知られている。それゆえに、当業界周知のUTRの特性に基づき転写されたRNAの安定性を増加させるには、3' UTRを選択または設計することができる。

30

【0607】

一実施形態において、5' UTRは、内因性核酸のコザック配列を含有していてもよい。その代わりに、対象の核酸にとって内因性ではない5' UTRを上述したようにPCRによって付加しようとする場合、5' UTR配列を付加することによってコンセンサスコザック配列の設計を改めてもよい。コザック配列は一部のRNA転写物の翻訳効率を増加させることができるが、効率的な翻訳を可能にするために全てのRNAに必要であるとは考えられていない。多くのmRNAにとってのコザック配列の必要条件は当業界公知である。他の実施形態において、5' UTRは、RNAのゲノムが細胞中で安定であるRNAウイルスの5' UTRであってもよい。他の実施形態において、様々なヌクレオチド類似体は、3'または5' UTRにおいて、エキソヌクレアーゼによるmRNAの分解を妨害するのに使用できる。

40

【0608】

遺伝子クローニングを必要とすることなくDNA鋳型からのRNAの合成を可能にするためには、転写プロモーターは、転写しようとする配列の上流でDNA鋳型に付着すると予想される。RNAポリメラーゼのプロモーターとして機能する配列がフォワードプライ

50

マーの 5' 末端に付加される場合、RNAポリメラーゼのプロモーターは、転写しようとするオープンリーディングフレームの上流でPCR産物に取り入れられるようになる。一実施形態において、プロモーターは、本明細書の他所で説明したように、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としては、これらに限定されないが、T3およびSP6 RNAポリメラーゼプロモーターが挙げられる。T7、T3およびSP6プロモーターのコンセンサスヌクレオチド配列は、当業界公知である。

【0609】

ある実施形態において、mRNAは、5'末端上のキャップと3'ポリ(A)テールの両方を有しており、これらがリボソーム結合、翻訳開始および細胞中でのmRNAの安定性を決定する。環状DNA鋳型、例えばプラスミドDNAにおいて、RNAポリメラーゼは、真核細胞での発現には好適ではない長いコンカテマー様の生成物を産生する。3'UTRの末端で直線化したプラスミドDNAの転写は、正常なサイズのmRNAをもたらすが、これは転写後にポリアデニル化されたとしても真核性のトランスフェクションにおいて有効ではない。

10

【0610】

直鎖状DNA鋳型において、ファージT7RNAポリメラーゼは、鋳型の最後の塩基を過ぎても転写物の3'末端を伸長することができる [(Schenborn and Mierendorf, Nuc Acids Res., 13:6223-36 (1985); Nacheva and Berzal-Herranz, Eur. J. Biochem., 270:1485-65 (2003)]。

【0611】

20

ポリA/TストレッチをDNA鋳型に統合する従来の方法は、分子クローニングである。しかしながら、プラスミドDNAに統合されたポリA/T配列は、プラスミドを不安定化する可能性があり、これが、なぜ細菌細胞から得られたプラスミドのDNA鋳型に、欠失や他の異常が高度に混入していることが多いのかの理由である。そのため、クローニング手法は面倒で時間がかかるだけでなく、信頼できないものになっている。これが、クローニングを用いずにポリA/T3'ストレッチを有するDNA鋳型の構築が可能になる方法が極めて望ましい理由である。

【0612】

転写のDNA鋳型のポリA/Tセグメントは、ポリTテール、例えば100Tテール(配列番号29) [サイズは、50~5000Tであり得る(配列番号30)] を含有するリバースプライマーを使用することによってPCR中に産生してもよいし、またはこれらに限定されないがDNAライゲーションまたはインビトロでの組換えを包含する他のいずれかの方法によってPCR後に産生してもよい。またポリ(A)テールは、RNAに安定性ももたらし、それらの分解を少なくする。一般的に、ポリ(A)テールの長さは、転写されたRNAの安定性と正の相関がある。一実施形態において、ポリ(A)テールは、100から5000アデノシンの間である(配列番号57)。

30

【0613】

RNAのポリ(A)テールは、E. コリのポリAポリメラーゼ(E-PAP)などのポリ(A)ポリメラーゼを使用して、インビトロでの転写の後にさらに伸長させることができる。一実施形態において、ポリ(A)テールの長さを100ヌクレオチドから、300~400ヌクレオチド(配列番号104)に増加させることにより、RNAの翻訳効率の約2倍の増加が得られる。加えて、3'末端への異なる化学基の付着は、mRNAの安定性を増加させることができる。このような付着は、改変された/人工ヌクレオチド、アプタマーおよび他の化合物を含有していてもよい。例えば、ATP類似体は、ポリ(A)ポリメラーゼを使用してポリ(A)テールに取り入れられてもよい。ATP類似体は、RNAの安定性をさらに増加させることができる。

40

【0614】

また5'キャップは、RNA分子に安定性ももたらす。ある実施形態において、本明細書で開示された方法によって産生されたRNAは、5'キャップを包含する。5'キャップは、当業界公知の技術や本明細書で説明される技術を使用してもたらされる [Cougot,

50

et al., Trends in Biochem. Sci., 29:436-444 (2001); Stepinski, et al., RNA, 7:14 68-95 (2001); Elango, et al., Biochim. Biophys. Res. Commun., 330:958-966 (2005)]。

【0615】

本明細書で開示された方法によって産生されたRNAはまた、内部リボソーム侵入部位 (IRES) 配列を含有していてもよい。IRES配列は、あらゆるウイルス配列、染色体配列または人工的に設計された配列であってもよく、これは、キャップ非依存性のmRNAへのリボソーム結合を開始させて翻訳開始を容易にするものである。細胞のエレクトロポレーションに好適なあらゆる溶質、すなわち糖、ペプチド、脂質、タンパク質、抗酸化剤、および界面活性剤などの細胞の透過性および生存能力を助長する因子を含有し得る溶質が包含されていてもよい。

10

【0616】

RNAは、多数の異なる方法、例えば市販の方法のいずれかを使用して標的細胞に導入することができ、このような方法としては、これらに限定されないが、エレクトロポレーション [Amaza Nucleofector-II (Amaza Biosystems, Cologne, Germany)]、[ECM830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.)] またはジーンパルサーII (BioRad, Denver, Colo.)、マルチポレーター (Eppendorf, Hamburg Germany)、リポフェクションを使用したカチオン性リボソーム介在トランスフェクション、ポリマーのカプセル封入、ペプチド介在トランスフェクション、または遺伝子銃粒子デリバリー系、例えば「ジーンガン」 [例えば、Nishikawa, et al. Hum Gene Ther., 12(8):861-70 (2001) を参照] が挙げられる。

20

【0617】

非ウイルスのデリバリー方法

いくつかの態様において、非ウイルス方法は、細胞または組織または対象に本明細書で説明されるCARをコードする核酸をデリバリーするのに使用することができる。

【0618】

一部の実施形態において、非ウイルス方法としては、トランスポゾン (転移因子とも呼ばれる) の使用が挙げられる。一部の実施形態において、トランスポゾンは、ゲノム中の位置にそれ自身を挿入することができるDNAの断片、例えば、自己増殖してそのコピーをゲノムに挿入することができるDNAの断片、またはより長い核酸からプライミングしてゲノム中の別の場所に挿入することができるDNAの断片である。例えば、トランスポゾンは、転移のための遺伝子の端にある逆方向反復配列で構成されるDNA配列を含む。

30

【0619】

トランスポゾンを使用する核酸デリバリーの例示的な方法としては、スリーピングビューティートランスポゾンシステム (SBTS) およびpiggyBac (PB) トランスポゾンシステムが挙げられる。例えば、全てが参照により本明細書に組み入れられる、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; およびDing et al. Cell. 122.3(2005):473-83を参照されたい。

40

【0620】

SBTSは、2つの構成要素：1) 導入遺伝子を含有するトランスポゾンおよび2) トランスポゼース酵素源を包含する。トランスポゼースは、担体プラスミド (または他のドナーDNA) から標的DNA、例えば宿主細胞染色体/ゲノムにトランスポゾンを転移させることができる。例えば、トランスポゼースは、担体プラスミド/ドナーDNAに結合し、プラスミドからトランスポゾン (導入遺伝子を包含する) を切り出して、それを宿主細胞のゲノムに挿入する。例えばAronovich et al.を参照されたい。

【0621】

50

例示的なトランスポゾンとしては、p T 2 ベースのトランスポゾンが挙げられる。例えば、全てが参照により本明細書に組み入れられる、Grabundzija et al. Nucleic Acids Res. 41.3(2013):1829-47;および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ゼースとしては、T c 1 /マリナー型トランスポゼース、例えばS B 1 0 トランスポゼースまたはS B 1 1 トランスポゼース（例えばサイトメガロウイルスプロモーターから発現させることができる過剰活性化トランスポゼース）が挙げられる。例えば、全てが参照により本明細書に組み入れられるAronovich et al.; Kebr iaei et al.; およびGrabundzija et al.を参照されたい。

【0622】

S B T Sの使用は、導入遺伝子、例えば、本明細書で説明されるC A Rをコードする核酸の効率的な統合および発現を許容する。例えばS B T Sなどのトランスポゾンシステムを使用して本明細書で説明されるC A Rを安定して発現する細胞、例えばT細胞またはN K細胞を生成する方法が本明細書で示される。

10

【0623】

本明細書で説明される方法によれば、一部の実施形態において、S B T S構成要素を含有する1つまたは複数の核酸、例えばプラスミドが、細胞（例えば、TまたはN K細胞）にデリバリーされる。例えば、核酸は、核酸（例えば、プラスミドD N A）デリバリーの標準的な方法、例えば本明細書で説明される方法、例えば、エレクトロポレーション、トランスフェクション、またはリポフェクションによってデリバリーされる。一部の実施形態において、核酸は、導入遺伝子、例えば、本明細書で説明されるC A Rをコードす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、本明細書で説明されるC A Rをコードする核酸）に加えてトランスポゼース酵素をコードする核酸配列を含むトランスポゾンを含む。他の実施形態において、2つの核酸を含むシステムが提供され、例えば、二重プラスミドシステム、例えば、第一のプラスミドが導入遺伝子を含むトランスポゾンを含むし、第二のプラスミドがトランスポゼース酵素をコードする核酸配列を含むシステムが提供される。例えば、第一および第二の核酸は、宿主細胞とともにデリバリーされる。

20

【0624】

一部の実施形態において、本明細書で説明されるC A Rを発現する細胞、例えば、TまたはN K細胞は、S B T Sを使用した遺伝子挿入と、ヌクレアーゼ（例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（Z F N）、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（T A L E N）、C R I S P R / C a sシステム、または加工されたメガヌクレアーゼを再加工したホーミングエンドヌクレアーゼ）を使用した遺伝学的編集との組合せを使用することによって生成される。

30

【0625】

一部の実施形態において、デリバリーの非ウイルス方法の使用は、細胞、例えばTまたはN K細胞の再プログラミング、および細胞の対象への直接注入を許容する。非ウイルスベクターの利点としては、これらに限定されないが、患者集団を満たすのに必要となる十分な量を生産するのが容易かつ比較的低コストであること、貯蔵中の安定性、および免疫原性の欠如が挙げられる。

40

【0626】

C A R、例えばC D 1 9 C A R、C D 2 0 C A RまたはC D 2 2 C A R、をコードする核酸コンストラクト

本発明はまた、本明細書で説明される1種または複数のC A Rコンストラクト、例えばC D 1 9 C A R、C D 2 0 C A RまたはC D 2 2 C A R、をコードする核酸分子も提供する。一態様において、核酸分子は、メッセンジャーR N Aの転写物として提供される。一態様において、核酸分子は、D N Aコンストラクトとして提供される。

【0627】

したがって、一態様において、本発明は、キメラ抗原受容体（C A R）をコードする単離された核酸分子であって、前記C A Rが、結合ドメイン（例えば、C D 1 9、C D 2 0

50

またはCD22に結合する結合ドメイン)、膜貫通ドメイン、ならびに刺激ドメインを含む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および／または一次シグナル伝達ドメイン、例えばゼータ鎖を含む、単離された核酸分子に関する。

【0628】

一実施形態において、結合ドメインは、本明細書で説明される抗CD19結合ドメイン、例えば、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12および配列番号59からなる群より選択される配列、またはそれらと95～99%の同一性を有する配列を含む、抗CD19結合ドメインである。

【0629】

一実施形態において、核酸は、表6Aに記載の、CD22をコードする核酸(CD22-encoding a nucleic acid)、またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む。一実施形態において、核酸は、表6A～10Bのいずれかに記載のアミノ酸配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列をコードする核酸である。

【0630】

一実施形態において、核酸は、表11Aに記載の、CD20をコードする核酸(CD20-encoding a nucleic acid)、またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む。一実施形態において、核酸は、表11A～15Bのいずれかに記載のアミノ酸配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列をコードする核酸である。

【0631】

一実施形態において、膜貫通ドメインは、T細胞受容体のアルファ、ベータまたはゼータ鎖、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137およびCD154からなる群より選択されるタンパク質の膜貫通ドメインである。一実施形態において、膜貫通ドメインは、配列番号15の配列、またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む。一実施形態において、抗CD19結合ドメインは、ヒンジ領域、例えば本明細書で説明されるヒンジ領域によって膜貫通ドメインに接続されている。一実施形態において、ヒンジ領域は、配列番号14もしくは配列番号45もしくは配列番号47もしくは配列番号49、またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む。一実施形態において、単離された核酸分子は、共刺激ドメインをコードする配列をさらに含む。一実施形態において、共刺激ドメインは、OX40、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、ICOS(CD278)および4-1BB(CD137)からなる群より選択されるタンパク質の機能的なシグナル伝達ドメインである。一実施形態において、共刺激ドメインは、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、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アルファ、CD8ベータ、IL2Rベータ、IL2Rガンマ、IL7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、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)、

10

20

30

40

50

S L A M (S L A M 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、および C D 8 3 と特異的に結合するリガンドからなる群より選択されるタンパク質の機能的なシグナル伝達ドメインである。一実施形態において、共刺激ドメインは、配列番号 1 6 の配列、またはそれと 9 5 ~ 9 9 % の同一性を有する配列を含む。一実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインは、4-1 B B の機能的なシグナル伝達ドメイン、および C D 3 ゼータの機能的なシグナル伝達ドメインを含む。一実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号 1 6 もしくは配列番号 5 1 の配列、またはそれと 9 5 ~ 9 9 % の同一性を有する配列、および配列番号 1 7 もしくは配列番号 4 3 の配列、またはそれと 9 5 ~ 9 9 % の同一性を有する配列を含み、前記細胞内シグナル伝達ドメインを構成する前記配列は、同じフレーム内で単一のポリペプチド鎖として発現される。

10

【0632】

別の態様において、本発明は、配列番号 1 3 のリーダー配列と、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 1 0、配列番号 1 1、配列番号 1 2、および配列番号 5 9 からなる群より選択される配列（またはそれと 9 5 ~ 9 9 % の同一性を有する配列）を有する s c F v ドメインと、配列番号 1 4 もしくは配列番号 4 5 もしくは配列番号 4 7 もしくは配列番号 4 9（またはそれと 9 5 ~ 9 9 % の同一性を有する配列）のヒンジ領域と、配列番号 1 5 の配列（またはそれと 9 5 ~ 9 9 % の同一性を有する配列）を有する膜貫通ドメインと、配列番号 1 6 の配列を有する 4-1 B B 共刺激ドメインまたは配列番号 5 1 の配列（もしくはそれと 9 5 ~ 9 9 % の同一性を有する配列）を有する C D 2 7 共刺激ドメインと、配列番号 1 7 もしくは配列番号 4 3 の配列（またはそれと 9 5 ~ 9 9 % の同一性を有する配列）を有する C D 3 ゼータ刺激ドメインとを含む C A R コンストラクトをコードする、単離された核酸分子に関する。

20

【0633】

別の態様において、本発明は、核酸分子によってコードされた、単離されたポリペプチド分子に関する。一実施形態において、単離されたポリペプチド分子は、配列番号 3 1、配列番号 3 2、配列番号 3 3、配列番号 3 4、配列番号 3 5、配列番号 3 6、配列番号 3 7、配列番号 3 8、配列番号 3 9、配列番号 4 0、配列番号 4 1、配列番号 4 2、配列番号 5 9 からなる群より選択される配列、またはそれと 9 5 ~ 9 9 % の同一性を有する配列を含む。

30

【0634】

別の態様において、本発明は、抗 C D 1 9 結合ドメインと、膜貫通ドメインと、刺激ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインとを含むキメラ抗原受容体 (C A R) 分子をコードする核酸分子であって、前記抗 C D 1 9 結合ドメインが、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 1 0、配列番号 1 1、配列番号 1 2 および配列番号 5 9 からなる群より選択される配列、またはそれと 9 5 ~ 9 9 % の同一性を有する配列を含む、核酸分子に関する。

40

【0635】

一実施形態において、コードされた C A R 分子（例えば、C D 1 9 C A R、C D 2 0 C A R、または C D 2 2 C A R）は、共刺激ドメインをコードする配列をさらに含む。一実施形態において、共刺激ドメインは、O X 4 0、C D 2 7、C D 2 8、C D S、I C A M-1、L F A-1 (C D 1 1 a/C D 1 8) および 4-1 B B (C D 1 3 7) からなる群より選択されるタンパク質の機能的なシグナル伝達ドメインである。一実施形態において、共刺激ドメインは、配列番号 1 6 の配列を含む。一実施形態において、膜貫通ドメインは、T 細胞受容体のアルファ、ベータまたはゼータ鎖、C D 2 8、C D 3 イプシロン、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 および C D 1 5 4 からなる

50

る群より選択されるタンパク質の膜貫通ドメインである。一実施形態において、膜貫通ドメインは、配列番号15の配列を含む。一実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインは、4-1BBの機能的なシグナル伝達ドメイン、およびゼータの機能的なシグナル伝達ドメインを含む。一実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号16の配列および配列番号17の配列を含み、前記細胞内シグナル伝達ドメインを構成する前記配列は、同じフレーム内で単一のポリペプチド鎖として発現される。一実施形態において、抗CD19結合ドメインは、ヒンジ領域によって膜貫通ドメインに接続されている。一実施形態において、ヒンジ領域は、配列番号14を含む。一実施形態において、ヒンジ領域は、配列番号45または配列番号47または配列番号49を含む。

【0636】

別の態様において、本発明は、配列番号13のリーダー配列と、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、および配列番号59からなる群より選択される配列またはそれと95〜99%の同一性を有する配列を有するscFvドメインと、配列番号14または配列番号45または配列番号47または配列番号49のヒンジ領域と、配列番号15の配列を有する膜貫通ドメインと、配列番号16の配列を有する4-1BB共刺激ドメインまたは配列番号51の配列を有するCD27共刺激ドメインと、配列番号17または配列番号43の配列を有するCD3ゼータ刺激ドメインとを含むコードされたCAR分子に関する。一実施形態において、コードされたCAR分子は、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号42、および配列番号59からなる群より選択される配列、またはそれと95〜99%の同一性を有する配列を含む。

【0637】

所望の分子をコードする核酸配列は、当業界公知の組換え方法を使用して得ることができ、例えば遺伝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、遺伝子それを包含することがわかっているベクターからその遺伝子を抽出すること、またはその遺伝子を含有する細胞および組織から標準的な技術を使用して直接単離することなどによって得ることができる。その代わりに、対象の遺伝子は、クローニングされるのではなく合成的に産生されてもよい。

【0638】

本発明はまた、本発明のDNAが挿入され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ベクターは、導入遺伝子の長期にわたり安定な統合および娘細胞中でのその増殖を可能にすることから、長期にわたる遺伝子移入を達成するためのツールとして好適である。レンチウイルスベクターは、肝細胞などの非増殖細胞に形質導入することができるという点で、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に勝る追加の利点を有する。またレンチウイルスベクターは、低い免疫原性という追加の利点も有する。またレトロウイルスベクターは、例えば、ガンマレトロウイルスベクターであってもよい。ガンマ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つまたは複数の(例えば、2つの)ロングターミナルリピート(LTR)、および目的の導入遺伝子、例えば、CARをコードする遺伝子を包含していてもよい。ガンマレトロウイルスベクターは、gag、pol、およびenvなどのウイルスの構造遺伝子(gens)を欠失していてもよい。例示的なガンマレトロウイルスベクターとしては、マウス白血病ウイルス(MLV)、脾フォーカス形成ウイルス(SFFV)、および骨髄増殖性肉腫ウイルス(MPSV)、およびそれら由来のベクターが挙げられる。他のガンマレトロウイルスベクターは、例えば、To bias Maetzig et al., "Gammaretroviral Vectors: Biology, Technology and Application" Viruses. 2011 Jun; 3(6): 677-713で説明されている。

【0639】

別の実施形態において、本発明の所望の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。別の実施形態において、CARをコードする核酸の発現は、スリーピングビューティー、crispr、CAS9、およびジンク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することができる。以下の、参照により本明細書に組み入れられるJune et al. 2009 Nature Reviews Immunology 9.10: 704-716を参照されたい。

【0640】

ベクターはまた、例えば、分泌を容易にするためのシグナル配列、ポリアデニル化シグナルおよび転写ターミネーター（例えば、ウシ成長ホルモン（BGH）遺伝子からのもの）、エピソームの複製および原核生物における複製を可能にする要素（例えばSV40オリジンおよびColE1または当業界において公知の他のもの）ならびに／また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および／またはゼオシンマーカー）を包含していてもよい。

10

【0641】

簡単にまとめると、CARをコードする天然または合成核酸の発現は、典型的には、CARポリペプチドまたはそれらの一部をコードする核酸をプロモーターに機能するように連結して、そのコンストラクトを発現ベクターに取り入れることによって達成される。ベクターは、真核生物の複製および統合に好適であってもよい。典型的なクローニングベクターは、転写および翻訳ターミネーター、開始配列、ならびに所望の核酸配列の発現の調節に有用なプロモーターを含有する。

【0642】

20

一部の態様において、発明の発現コンストラクトは、標準的な遺伝子デリバリープロトコールを使用して核酸の免疫化および遺伝子治療にも使用することができる。遺伝子デリバリー方法は、当業界公知である。例えば、参照によりそれらの全体が本明細書に組み入れられる米国特許第5,399,346号、5,580,859号、5,589,466号を参照されたい。別の実施形態において、本発明は、遺伝子治療用ベクターを提供する。

【0643】

核酸は、多数のタイプのベクターにクローニングすることができる。例えば、核酸は、これらに限定されないが、プラスミド、ファージミド、ファージ誘導体、動物ウイルス、およびコスミドなどのベクターにクローニングすることができる。特に興味深いベクターとしては、発現ベクター、複製ベクター、プローブ生成ベクター（probe generation vector）、および配列決定ベクターが挙げられる。

30

【0644】

さらに、発現ベクターは、ウイルスベクターの形態で細胞に供給されてもよい。ウイルスベクター技術は当業界周知であり、例えば、Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NYや他のウイルス学および分子生物学マニュアルで説明されている。ベクターとして有用なウイルスとしては、これらに限定されないが、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、およびレンチウイルスが挙げられる。一般的に、好適なベクターは、少なくとも1種の生物において機能的な複製起点、プロモーター配列、便利な制限エンドヌクレアーゼ部位、および1つまたは複数の選択マーカーを含有する（例えば、WO01／96584；WO01／29058；および米国特許第6,326,193号）。

40

【0645】

哺乳動物細胞への遺伝子移入のための多数のウイルスベース系が開発されてきた。例えば、レトロウイルスは、遺伝子デリバリー系に便利なプラットフォームを提供する。選択された遺伝子を、当業界公知の技術を使用してベクターに挿入し、レトロウイルス粒子中にパッケージ化してもよい。次いで組換えウイルスを単離して、インビボまたはエクスピボのいずれかで対象の細胞にデリバリーしてもよい。多数のレトロウイルス系が当業界公知である。いくつかの実施形態において、アデノウイルスベクターが使用される。多数のアデノウイルスベクターが当業界公知である。一実施形態において、レンチウイルスベク

50

ターが使用される。

【0646】

追加のプロモーター要素、例えばエンハンサーは、転写開始の頻度を調節する。これらは、典型的には開始部位上流の領域30～110bpに配置されるが、多数のプロモーターが開始部位の下流に同様に機能的な要素を含有することが示されている。要素が互いに逆転または移動したときにプロモーターの機能が保存されるように、プロモーター要素間の間隔はフレキシブルであることが多い。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間隔は、活性が衰退し始める手前の50bpの間隔まで大きくすることができる。個々の要素は、転写を活性化するために、プロモーターに応じて協調的または独立的のいずれかによって機能する可能性があることが考えられる。典型的なプロモーターとしては、CMV IE遺伝子、EF-1 α 、ユビキチンC、またはホスホグリセロキナーゼ(PGK)プロモーターが挙げられる。ある実施形態において、プロモーターは、PGKプロモーター、例えば、本明細書で説明されるランケートされたPGKプロモーターである。

10

【0647】

哺乳動物のT細胞においてCARの導入遺伝子を発現することができるプロモーターの例は、EF1 α プロモーターである。天然型のEF1 α プロモーターは、アミノアシルtRNAのリボソームへの酵素によるデリバリーに関与する延長因子-1複合体のアルファサブユニットの発現を駆動する。EF1 α プロモーターは、哺乳動物の発現プラスミドにおいて広く使用されており、レンチウイルスベクターにクローニングした導入遺伝子からのCAR発現の駆動において有効であることが示されてきた。例えば、Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009)を参照されたい。一態様において、EF1 α プロモーターは、配列番号100として提供される配列を含む。

20

【0648】

プロモーターの別の例は、前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、それに機能するよう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することができる強い構成的プロモーター配列である。しかしながら他の構成的プロモーター配列も使用が可能であり、このような構成的プロモーター配列としては、これらに限定されないが、シミアンウイルス40(SV40)初期プロモーター、マウス乳がんウイルス(MMTV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)ロングターミナルリピート(LTR)プロモーター、MoMuLVプロモーター、トリ白血病ウイルスプロモーター、エプスタインバーウイルス前初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、加えてヒト遺伝子プロモーター、例えば、これらに限定されないが、アクチンプロモーター、ミオシンプロモーター、延長因子-1 α プロモーター、ヘモグロビンプロモーター、およびクレアチンキナーゼプロモーターなどが挙げられる。さらに本発明は、構成的プロモーターの使用に限定されないものとする。誘導性プロモーターも、本発明の一部として意図される。誘導性プロモーターの使用は、分子スイッチを提供し、このような分子スイッチは、分子スイッチが機能するように連結したポリヌクレオチド配列の発現が望ましい場合に、そのポリヌクレオチド配列の発現を開始させ、または発現が望ましくない場合に、その発現を停止させることができる。誘導性プロモーターの例としては、これらに限定されないが、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、およびテトラサイクリンプロモーターが挙げられる。

30

40

【0649】

プロモーターの別の例は、ホスホグリセリン酸キナーゼ(PGK)プロモーターである。実施形態において、ランケートされたPGKプロモーター(例えば、野生型PGKプロモーター配列と比較した場合、1つまたは複数の、例えば、1、2、5、10、100、200、300、または400個のヌクレオチド欠失を有するPGKプロモーター)が望ましい場合がある。例示的なPGKプロモーターのヌクレオチド配列を以下に示す。

【0650】

50

W T P G K プロモーター：

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGT
GGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGTGTGATGGCGGGGTGTGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCC
GCGCGGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTGCGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACGAGGGACCGCGACAGGCAGA
CGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAAGGCAAATAGTGCAGGCCGTGCGGCGCTTGGCGTTCCTTGAAGGGCTGAATC
CCCGCTCGTCCTTTCGACGCGGGCCCCCGGGTGTTCCTATCGCCGCTTCTAGGCCCACTGCGACGCTTGCCTGCACTTCT
TACACGCTCTGGGTCCCAGCCGCGCGACGCAAAGGGCCTTGGTGCGGGTCTCGTCGGCGCAGGGACGCGTTTGGGTCCC
GACGGAACCTTTTCCGCGTTGGGGTTGGGGCACCATAAGCT

(配列番号 1 3 2 3)

【0 6 5 1】

10

例示的なトランケートされた P G K プロモーター：

P G K 1 0 0：

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGT
GGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGTGTGATGGCGGGGTGTGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCC

(配列番号 1 3 2 4)

【0 6 5 2】

P G K 2 0 0：

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGT
GGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGTGTGATGGCGGGGTGTGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCC
GCGCGGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTGCGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACG

(配列番号 1 3 2 5)

【0 6 5 3】

P G K 3 0 0：

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGT
GGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGTGTGATGGCGGGGTGTGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCC
GCGCGGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTGCGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACGAGGGACCGCGACAGGCAGA
CGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAAGGCAAATAGTGCAGGCCGTGCGGCGCTTGGCGTTCCTTGAAGGGCTGAATC
CCCG

(配列番号 1 3 2 6)

【0 6 5 4】

30

P G K 4 0 0：

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGT
GGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGTGTGATGGCGGGGTGTGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCC
GCGCGGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTGCGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACGAGGGACCGCGACAGGCAGA
CGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAAGGCAAATAGTGCAGGCCGTGCGGCGCTTGGCGTTCCTTGAAGGGCTGAATC
CCCGCTCGTCCTTTCGACGCGGGCCCCCGGGTGTTCCTATCGCCGCTTCTAGGCCCACTGCGACGCTTGCCTGCACTTCT
TACACGCTCTGGGTCCCAGCCG

(配列番号 1 3 2 7)

【0 6 5 5】

ベクターはまた、例えば、分泌を容易にするためのシグナル配列、ポリアデニル化シグナルおよび転写ターミネーター（例えば、ウシ成長ホルモン（B G H）遺伝子からの）、エピソームの複製およ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 オリジンおよび C o l E 1 または当業界において公知の他のもの）ならびに／また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および／またはゼオシンマーカー）を包含していてもよい。

40

【0 6 5 6】

C A R ポリペプチドまたはそれらの一部の発現を検討するために、細胞に導入しようとする発現ベクターはまた、ウイルスベクターを介してトランスフェクトまたは感染させたようとする細胞の集団から発現する細胞を同定および選択しやすくするために、選択マーカー遺伝子もしくはレポーター遺伝子のいずれかまたはその両方を含有していてもよい。

50

他の態様において、選択マーカーは、DNAの別の断片に搭載させてコトランスフェクション手法で使用されてもよい。選択マーカーおよびレポーター遺伝子はどちらも、宿主細胞で発現できるように適切な調節配列を端部に有していてもよい。有用な選択マーカーとしては、例えば、neoなどの抗生物質耐性遺伝子および同種のものが挙げられる。

【0657】

レポーター遺伝子は、トランスフェクトされる可能性がある細胞を同定するために、さらには調節配列の機能性を評価するために使用することができる。一般的に、レポーター遺伝子は、レシピエント生物または組織に存在しないかまたはそれらによって発現されない遺伝子であり、さらに、その発現がいくつかの容易に検出可能な特性、例えば酵素活性によって証明されるポリペプチドをコードする遺伝子である。レポーター遺伝子の発現は、DNAがレシピエントの細胞に導入された後の好適な時間にアッセイされる。好適なレポーター遺伝子としては、ルシフェラーゼ、ベクターガラクトシダーゼ、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をコードする遺伝子、または緑色蛍光タンパク質遺伝子を挙げることができる（例えば、Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82）。好適な発現系は周知であり、公知の技術を使用して調製してもよいし、または商業的に入手してもよい。一般的に、レポーター遺伝子の最大レベルの発現を示す最小の5'フランキング領域を有するコンストラクトは、プロモーターとして同定される。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されて、プロモーターによって駆動された転写を調整する能力に関して薬剤を評価するために使用することができる。

【0658】

実施形態において、ベクターは、CAR、例えば、CD19と結合する第一のCAR、および第二のCAR、例えば、阻害性CAR、または第二の抗原、例えばCD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179bまたはCD79aと特異的に結合するCARをコードする、2つ以上の核酸配列を含んでいてもよい。このような実施形態において、CARをコードする2つ以上の核酸配列は、同じフレーム中で単一のポリペプチド鎖として単一の核酸分子によってコードされる。この態様において、2つ以上のCARは、例えば、1つまたは複数のペプチド切断部位（例えば、自動切断部位または細胞内プロテアーゼの基質）によって分離していてもよい。ペプチド切断部位の例としては、以下が挙げられ、ここでGSG残基は任意である：

T2A: (GSG) EGRGSLLTCDV EENPGP (配列番号1328)

P2A: (GSG) ATNFSLLKQAGDV EENPGP (配列番号1329)

E2A: (GSG) QCTNYALLKL AGDVESNPGP (配列番号1330)

F2A: (GSG) VKQTLNFDLLKL AGDVESNPGP (配列番号1331)

【0659】

遺伝子を細胞に導入して発現させる方法は当業界公知である。発現ベクターの場合において、ベクターは、当業界におけるあらゆる方法によって宿主細胞、例えば哺乳動物、細菌、酵母、または昆虫細胞に容易に導入することができる。例えば、発現ベクターは、物理的、化学的、または生物学的な手段によって宿主細胞に移入させることができる。

【0660】

宿主細胞にポリヌクレオチドを導入する物理的な方法としては、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、粒子衝撃、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、および同種のものが挙げられる。ベクターおよび／または外因性核酸を含む細胞を産生する方法は当業界周知である。例えば、Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NYを参照されたい。宿主細胞にポリヌクレオチドを導入する好適な方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションである。

【0661】

宿主細胞に対象のポリヌクレオチドを導入する生物学的な方法としては、DNAおよびRNAベクターの使用が挙げられる。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、例えばヒト細胞に遺伝子を挿入するための最も広く使用されている方法になりつつある。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、単純疱疹ウイルス I、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス、ならびに同種のもの由来のものであってもよい。例えば、米国特許第 5, 350, 674 号および 5, 585, 362 号を参照されたい。

【0662】

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としては、例えば高分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズなどのコロイド分散系、ならびに水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセル、およびリポソームなどの脂質ベースの系が挙げられる。インビトロおよびインビボでのデリバリービヒクルとして使用するための典型的なコロイド系は、リポソーム（例えば人工膜小胞）である。最先端の核酸の標的化デリバリーの他の方法が利用可能であり、例えば、標的化ナノ粒子を用いたポリヌクレオチドのデリバリー、または他の好適なサブミクロンサイズのデリバリーシステムなどが挙げられる。

【0663】

非ウイルスデリバリーシステムが利用されるケースにおいて、典型的なデリバリービヒクルは、リポソームである。脂質調合物の使用は、宿主細胞への核酸の導入（インビトロ、エクスピボまたはインビボ）を意図している。別の態様において、核酸は、脂質と会合していてもよい。脂質に会合した核酸は、リポソームの水性の内部に封入されていてもよいし、リポソームの脂質二重層内に点在させてもよいし、リポソームとオリゴヌクレオチドの両方と会合する連結分子を介してリポソームに付着していてもよいし、リポソーム中に閉じ込められていてもよいし、リポソームと複合体化していてもよいし、脂質を含有する溶液中に分散されていてもよいし、脂質と混合されてもよいし、脂質と組み合わせられていてもよいし、脂質中の懸濁液として含有されてもよいし、ミセルとともに含有されるかもしくはミセルと複合体化していてもよいし、またはそれ以外の方法で脂質と会合していてもよい。脂質、脂質／DNA または脂質／発現ベクターが会合した組成物は、溶液中におけるいかなる特定の構造にも限定されない。例えば、上記組成物は、二重層構造で、ミセルとして、または「崩壊した」構造で存在していてもよい。また上記組成物は、単に溶液中に点在した状態であってもよく、サイズまたは形状が均一でない凝集体を形成する可能性もある。脂質は、天然に存在する可能性がある脂肪性の物質であるか、または合成脂質である。例えば、脂質としては、細胞質中で自然に発生する脂肪の小滴、加えて長鎖脂肪族炭化水素およびそれらの誘導体、例えば脂肪酸、アルコール、アミン、アミノアルコール、ならびにアルデヒドなどを含有する化合物のクラスが挙げられる。

【0664】

使用に好適な脂質は、商業的な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」）および他の脂質は、Avanti Polar Lipids, Inc.（Birmingham、AL）から得ることができる。クロロホルムまたはクロロホルム／メタノール中の脂質のストック溶液は、約 -20℃ で保存することができる。クロロホルムは、メタノールより容易に蒸発するため、唯一の溶媒として使用される。「リポソーム」は、封入された脂質二重層または凝集体の生成によって形成された様々な単層および多層の脂質ビヒクル（lipid vehicles）を包括する一般名称である。リポソームは、リン脂質二重層膜と内部の水性媒体とを有する小胞構造を有することを特徴とすることができる。多重膜リポソームは、水性媒体によって隔てられた複数の脂質層を有する。これらは、リン脂質が過量の水溶液中に懸濁されると自発的に形成される。脂質成分は、閉じた構造が形成される前に自己再構成を経て、水を閉じ込め、脂質二重層の間に溶質を溶解させる（Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5: 505-10）。しかしながら、溶液中で通常の小胞構造とは異なる構造を有する組成物も包括される。例えば、脂質は、

ミセル構造であると推定することができ、または単に脂質分子の不均一な凝集体として存在する可能性もある。また、リポフェクトアミン-核酸複合体も考慮される。

【0665】

宿主細胞に外因性核酸を導入するのに使用される方法、またはそれとは別に細胞を本発明の阻害剤に晒す方法にかかわらず、宿主細胞中の組換えDNA配列の存在を確認するために様々なアッセイを行うことができる。このようなアッセイとしては、例えば、当業者周知の「分子生物学的な」アッセイ、例えばサザンおよびノーザンブロットイング、RT-PCRおよびPCR；「生化学的な」アッセイ、例えば、免疫学的な手段（ELISAおよびウェスタンブロット）による、または本発明の範囲内に含まれる薬剤を同定するための本明細書で説明されるアッセイによる、特定のペプチドの存在または非存在の検出などが挙げられる。

10

【0666】

本発明はさらに、CARをコードする核酸分子を含むベクターを提供する。一態様において、CARベクターは、細胞、例えばT細胞に直接形質導入することができる。一態様において、ベクターは、クローニングまたは発現ベクターであり、例えば、これらに限定されないが、1つまたは複数のプラスミド（例えば、発現プラスミド、クローニングベクター、ミニサークル、ミニベクター、二重微小染色体）、レトロウイルスおよびレンチウイルスベクターコンストラクトなどのベクターである。一態様において、ベクターは、哺乳動物のT細胞中でCARコンストラクトを発現することができる。一態様において、哺乳動物T細胞は、ヒトT細胞である。

20

【0667】

CARを発現する免疫エフェクター細胞

別の態様において、本発明は、CAR発現細胞の集団を提供する。一部の実施形態において、CAR発現細胞の集団は、本明細書で説明される1つまたは複数のCARを発現する細胞を含む。一部の実施形態において、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。

【0668】

例えば、一実施形態において、CAR T細胞の集団は、本明細書で説明される腫瘍抗原、例えばCD19、に対する抗原結合ドメインを有するCARを発現する第一の細胞、および異なる抗原結合ドメインを有するCARを発現する第二の細胞であって、例えば、本明細書で説明される異なる腫瘍抗原に対する抗原結合ドメイン、例えば、第一の細胞によって発現されるCARの抗原結合ドメインによって結合される腫瘍抗原とは異なる本明細書で説明される腫瘍抗原、例えばCD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179bまたはCD79aに対する抗原結合ドメイン、を有するCARを発現する第二の細胞を包含し得る。

30

【0669】

別の例として、CAR発現細胞の集団は、本明細書で説明される腫瘍抗原に対する抗原結合ドメインを包含するCARを発現する第一の細胞、および本明細書で説明されるような腫瘍抗原以外の標的に対する抗原結合ドメインを包含するCARを発現する第二の細胞を包含し得る。一実施形態において、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包含するCARを発現する第一の細胞、および二次シグナル伝達ドメインを包含するCARを発現する第二の細胞を包含する。前記CAR発現細胞のいずれか一方または両方は、CARをコードする核酸に機能するように連結した、例えば本明細書で説明されるような、トランケートされたPGKプロモーターを有してもよい。

40

【0670】

別の態様において、本発明は、集団中の少なくとも1種の細胞が、本明細書で説明される腫瘍抗原に対する抗原結合ドメインを有するCARを発現し、第二の細胞が、別の薬剤、例えばCARを発現する細胞の活性を増強する薬剤を発現する、細胞の集団を提供する。集団のCAR発現細胞は、CARをコードする核酸に機能するように連結した、例えば本明細書で説明されるような、トランケートされたPGKプロモーターを有してもよい。

50

一実施形態において、薬剤は、阻害分子を阻害する薬剤であってもよい。阻害分子、例えばPD-1は、一部の実施形態において、免疫エフェクター応答を開始するCAR発現細胞の能力を低下させることができる。阻害分子の例としては、PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM（CEACAM-1、CEACAM-3および／またはCEACAM-5）、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3（CD276）、B7-H4（VTCN1）、HVEM（TNFRSF14またはCD270）、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシン、およびTGFR（例えば、TGFRベータ）が挙げられる。一実施形態において、阻害分子を阻害する薬剤は、第一のポリペプチド、例えば阻害分子を含み、このようなポリペプチドは、細胞に正のシグナルを提供する第二のポリペプチド、例えば、本明細書で説明される細胞内シグナル伝達ドメインと会合している。一実施形態において、薬剤は、例えば、PD1、PD-L1、CTLA4、TIM3、CEACAM（例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および／もしくはCEACAM-5）、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4もしくはTGFRベータなどの阻害分子の第一のポリペプチド、またはこれらのいずれかのフラグメント、ならびに本明細書で説明される細胞内シグナル伝達ドメインである〔例えば、共刺激ドメイン（例えば、41BB、CD27、OX40またはCD28、例えば、本明細書で説明されているようなもの）および／または一次シグナル伝達ドメイン（例えば、本明細書で説明されるCD3ゼータシグナル伝達ドメイン）を含む〕第二のポリペプチドを含む。一実施形態において、薬剤は、PD-1の第一のポリペプチドまたはそのフラグメント、および本明細書で説明される細胞内シグナル伝達ドメイン（例えば、本明細書で説明されるCD28シグナル伝達ドメインおよび／または本明細書で説明されるCD3ゼータシグナル伝達ドメイン）の第二のポリペプチドを含む。

10

20

【0671】

CARと他の分子または薬剤の共発現

第二のCARの共発現

一態様において、本明細書で説明されるCAR発現細胞は、第二のCAR、例を挙げると、例えば同じ標的（CD19）または異なる標的（例えば、CD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179bもしくはCD79a）に対する、異なる抗原結合ドメインを包含する第二のCARをさらに含んでいてもよい。一実施形態において、第二のCARは、急性骨髄性白血病細胞上で発現される標的、例えば、CD20、CD22、ROR1、CD10、CD33、CLL-1、CD34、CD123、FLT3、CD79b、およびCD79aに対する抗原結合ドメインを包含する。一実施形態において、CAR発現細胞は、第一の抗原を標的とし、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さない細胞内シグナル伝達ドメインを包含する第一のCAR、および第二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さない細胞内シグナル伝達ドメインを包含する第二のCARを含む。理論に縛られることは望まないが、第一のCARにおける、共刺激シグナル伝達ドメイン、例えば4-1BB、CD28、CD27、またはOX-40、および第二のCARにおける、一次シグナル伝達ドメイン、例えばCD3ゼータの設置は、両方の標的が発現される細胞に対するCAR活性を制限することができる。一実施形態において、CAR発現細胞は、CD19結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび共刺激ドメインを包含する第一のCD19 CAR、ならびにCD19以外の抗原（例えば、AML細胞上で発現される抗原、例えば、CD22、CD20、ROR1、CD10、CD33、CLL-1、CD34、CD123、FLT3、CD79b、CD179b、もしくはCD79a）を標的とし、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび一次シグナル伝達ドメインを包含する第二のCARを含む。別の実施形態において、CAR発現細胞は、CD19結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび一次シグナル伝達ドメインを包含する第一のCD19 CAR、ならびにCD19以外の抗原（例えば、AML細胞上で

30

40

50

発現される抗原、例えば、CD22、CD20、ROR1、CD10、CD33、CD123、CLL-1、CD34、FLT3、CD79b、CD179b、もしくはCD79a)を標的とし、抗原に対する抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび共刺激シグナル伝達ドメインを包含する第二のCARを含む。

【0672】

一態様において、本明細書で説明されるCAR発現細胞は、第二のCAR、例を挙げると、例えば同じ標的（例えば、CD19）または異なる標的（例えば、CD19以外の標的、例えばCD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179bもしくはCD79a）に対する、異なる抗原結合ドメインを包含する第二のCARをさらに含んでもよい。一実施形態において、CAR発現細胞は、第一の抗原を標的とする第一のCARであって、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さない細胞内シグナル伝達ドメインを包含する第一のCARと、第二の異なる抗原を標的とする第二のCARであって、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さない細胞内シグナル伝達ドメインを包含する第二のCARとを含む。第一の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、もしくはICOSの配置、および第二のCARへの一次シグナル伝達ドメイン、例えばCD3ゼータの配置は、両方の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、膜貫通ドメインおよび共刺激ドメインを包含する第一のCARと、別の抗原を標的とし、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび一次シグナル伝達ドメインを包含する第二のCARとを含む。別の実施形態において、CAR発現細胞は、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび一次シグナル伝達ドメインを包含する第一のCARと、別の抗原を標的とし、抗原に対する抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび共刺激シグナル伝達ドメインを包含する第二のCARとを含む。

【0673】

一実施形態において、CAR発現細胞は、本明細書で説明されるXCAR（例えば、CD19 CAR、CD20 CAR、またはCD22 CAR）、および阻害性CARを含む。一実施形態において、CAR発現細胞は、本明細書で説明されるCD19 CAR、および阻害性CARを含む。一実施形態において、阻害性CARは、がん細胞ではなく正常細胞、例えば、CD19も発現する正常細胞上で見出すことができる抗原に結合する抗原結合ドメインを含む。一実施形態において、阻害性CARは、阻害分子の抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよ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、PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM（CEACAM-1、CEACAM-3および／またはCEACAM-5）、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3（CD276）、B7-H4（VTCN1）、HVEM（TNFRSF14またはCD270）、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシン、およびTGFR（例えばTGFRベータ）の細胞内ドメインであってもよい。

【0674】

一実施形態において、CAR発現細胞が2種以上の異なるCARを含む場合、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になっていてもよい。例えば、第一および第二のCARを発現する細胞は、例えばフラグメント、例えばscFvとして、第二のCARの抗原結合ドメインとの会合を形成しない第一のCARの抗原結合ドメインを有していてもよく、例えば、第二のCARの抗原結合ドメインは、VHHである。

【0675】

CAR活性を増強する薬剤の共発現

別の態様において、本明細書で説明されるCAR発現細胞は、別の薬剤、例えば、CAR発現細胞の活性を増強するまたは適合度を向上させる薬剤をさらに発現することができ

10

20

30

40

50

る。

【0676】

例えば、一実施形態において、薬剤は、T細胞機能をモジュレートまたは調節する、例えば阻害する分子を阻害する薬剤であってもよい。一部の実施形態において、T細胞機能をモジュレートまたは調節する分子は、阻害分子である。いくつかの実施形態において、阻害分子、例えばPD1は、免疫エフェクター応答を仕掛けるCAR発現細胞の能力を減少させることができる。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および／またはCEACAM-5）、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3（CD276）、B7-H4（VTCN1）、HVEM（TNFRSF14またはCD270）、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシン、およびTGFR（例えばTGFRベータ）が挙げられる。

10

【0677】

一実施形態において、阻害核酸、例えば、例えば本明細書で説明されるような、阻害核酸、例えばdsRNA、例えばsiRNAもしくはshRNA、クラスター化規則的間隔短鎖回文配列リピート（CRISPR）、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、またはジンクフィンガーエンドヌクレアーゼ（ZFN）は、CAR発現細胞におけるT細胞の機能をモジュレートまたは調節する、例えば阻害する分子の発現を阻害するために使用することができる。ある実施形態において、薬剤は、shRNA、例えば本明細書で説明されるshRNAである。ある実施形態において、T細胞の機能をモジュレートまたは調節する、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細胞の機能をモジュレートまたは調節する、例えば阻害する分子の発現を阻害するdsRNA分子は、CARの構成要素、例えば構成要素の全て、をコードする核酸に連結される。

20

【0678】

一実施形態において、阻害分子を阻害する薬剤は、第一のポリペプチド、例えば阻害分子を含み、このようなポリペプチドは、細胞に正のシグナルを提供する第二のポリペプチド、例えば、本明細書で説明される細胞内シグナル伝達ドメインと会合している。一実施形態において、薬剤は、例えば、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM（例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および／またはCEACAM-5）、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3（CD276）、B7-H4（VTCN1）、HVEM（TNFRSF14またはCD270）、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシン、またはTGFR（例えばTGFRベータ）、また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細胞外ドメインの少なくとも一部）などの阻害分子の第一のポリペプチド、ならびに本明細書で説明される細胞内シグナル伝達ドメインである〔例えば、共刺激ドメイン（例えば、本明細書で説明されるような41BB、CD27、またはCD28）および／または一次シグナル伝達ドメイン（例えば、本明細書で説明されるCD3ゼータシグナル伝達ドメインを含む）第二のポリペプチドを含む〕PD1は、CD28、CTLA-4、ICOS、およびBTLAも包含するCD28受容体ファミリーの阻害性の一員である。PD-L1は、活性化されたB細胞、T細胞および骨髄細胞で発現される（Agata et al. 1996 Int. Immunol 8:765-75）。PD1、PD-L1およびPD-L2に対する2つのリガンドは、PD1に結合したときのT細胞の活性化を下方調節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、ヒトがん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との局所的な相互作用を阻害することによって、回復させること

30

40

50

ができる。

【0679】

一実施形態において、薬剤は、阻害分子、例えばプログラム死1（PD1：Programmed Death 1）の細胞外ドメイン（ECD）を含み、41BBおよびCD3ゼータなどの膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインに融合させることができる（また本明細書では、PD1CARとも称される）。一実施形態において、PD1 CARは、本明細書で説明されるCD19 CARと組み合わせて使用される場合、T細胞の持続性を向上させる。一実施形態において、CARは、配列番号121において下線で示されたPD1の細胞外ドメインを含むPD1 CARである。一実施形態において、PD1 CARは、配列番号121のアミノ酸配列を含む。

10

【0680】

Malpvtalllplalllhaarppgwflsdprpwnpptfspalllvtegdnatftcsfsntsesfvlnwyrmspsnqtdklaafpedrsqpgqdcfrvrtqlpngrdfhmsvvrarrndsgtylcgaislapkaikeslraelrvterraevptahpspsprpagqfqlvtttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrglldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqtqtteedgcscrfpееееggcelrvkfsrsadapaykqggnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr（配列番号121）。

【0681】

一実施形態において、PD1 CARは、以下に示されるアミノ酸配列（配列番号119）を含む。

20

【0682】

pgwflsdprpwnpptfspalllvtegdnatftcsfsntsesfvlnwyrmspsnqtdklaafpedrsqpgqdcfrvrtqlpngrdfhmsvvrarrndsgtylcgaislapkaikeslraelrvterraevptahpspsprpagqfqlvtttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrglldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqtqtteedgcscrfpееееggcelrvkfsrsadapaykqggnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr（配列番号119）。

【0683】

一実施形態において、薬剤は、PD1 CAR、例えば本明細書で説明されるPD1 CARをコードする核酸配列を含む。一実施形態において、PD1 CARに関する核酸配列は、以下に示され、PD1 ECDは、以下の配列番号120において下線で示される。

30

【0684】

atggccctccctgtcactgccctgcttctccccctcgactcctgctccacgccgctagaccacccggatggttctg
gactctccggatgcccggtggaatcccccaaccttctcaccggcactcttggttgtagtgaggggcgataatgcgacctt
cacgtgctcgttctccaacacctccgaatcattcgtgctgaactggtagcgcatgagcccgtaaacagaccgacaagc
tcgcccggttccggaagatcggtcgcaaccgggacaggattgtcggttcgcgctgactcaactgccgaatggcagagac
tccacatgagcggtggtagcgctaggcgaaacgactccgggacctacctgtgcggagccatctcgctggcgccctaaggc
ccaaatcaaagagagcttgaggggcgaactgagagtgaccgagcgagagctgaggtgccaactgcacatccatcccat
cgcttcggcctgcggggcagtttcagaccttggtcacgaccactccggcgccgcgccaccgactccggccccaactatc
gcgagccagccctgtcgctgagccggaagcatgccgcctgccgcggaggtgctgtgcatacccggggattggactt
cgcattgcgacatctacatttgggtcctctcgccggaacttgtagcgctgctccttctgtccctggteatccctgtact
gcaagcggggtcggaaaaagcttctgtacattttcaagcagcccttcatgaggcccgtaaacacccaggaggaggac
ggttgctcctgcgggttccccgaagaggaagaaggaggttgcgagctgcgcgtgaagtctcccgagcgccgacgcccc
cgcctataagcaggggccagaaccagctgtacaacgaactgaacctgggacggcggaagagtacgatgtgctggacaagc
ggcgcgccgggacccccgaaatggcggggaagcctagaagaaagaacctcaggaaggcctgtataacgagctgcagaag
gacaagatggccgagggcctactccgaaattgggatgaaggagagcgcgaggggaaaggggcacgacggcctgtacca
aggactgtccaccgccaccaaggacacatacgatgcctgcacatgcaggcccttccccctgc（配列番号120）。

40

【0685】

別の例では、一実施形態において、CAR発現細胞の活性を増強する薬剤は、共刺激分

50

子または共刺激分子リガンドであってもよい。共刺激分子の例としては、MHCクラスⅠ分子、BTLAおよびTollリガンド受容体、ならびにOX40、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278) および4-1BB (CD137) が挙げられる。このような共刺激分子のさらなる例としては、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM (LIGHTR)、SLAMF7、NKP80 (KLRF1)、NKP44、NKP30、NKP46、CD160、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL2Rベータ、IL2Rガンマ、IL7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、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、およびCD83に特異的に結合するリガンド、例えば本明細書で説明されるようなものが挙げられる。共刺激分子リガンドの例としては、CD80、CD86、CD40L、ICOSL、CD70、OX40L、4-1BBL、GITR およびLIGHTが挙げられる。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は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じである、共刺激分子のリガンドである。ある実施形態において、共刺激分子リガンドは、4-1BBLである。ある実施形態において、共刺激分子リガンドは、CD80またはCD86である。ある実施形態において、共刺激分子リガンドは、CD70である。実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現免疫エフェクター細胞は、1つまたは複数の追加の共刺激分子または共刺激分子リガンドを発現するようにさらに加工され得る。

【0686】

CARとケモカイン受容体の共発現

実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現細胞は、ケモカイン受容体分子をさらに含む。T細胞におけるケモカイン受容体CCR2bまたはCXCR2のトランスジェニック発現は、黒色腫および神経芽細胞腫を包含するCCL2分泌またはCXCL1分泌固形腫瘍へのトラフィックを増進する [Craddock et al., J Immunother.2010 Oct ;33(8):780-8およびKershaw et al., Hum Gene Ther.2002 Nov 1 ;13(16):1971-80]。したがって、理論に縛られることは望まないが、腫瘍、例えば固形腫瘍によって分泌されるケモカインを認識するCAR発現細胞において発現されるケモカイン受容体は、CAR発現細胞の腫瘍へのホーミングを向上させ、CAR発現細胞の腫瘍への浸潤を助長し、CAR発現細胞の抗腫瘍効能を増強すると考えられる。ケモカイン受容体分子は、天然に存在するケモカイン受容体もしくは組換えケモカイン受容体またはそれらのケモカイン結合フラグメントを含んでもよい。本明細書で説明されるCAR発現細胞における発現に好適なケモカイン受容体分子としては、CXCKケモカイン受容体 (例えば、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6もしくはCXCR7)、CCケモカイン受容体 (例えば、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10もしくは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)、またはそれらのケモカイン結合フラグメントが挙げられる。一実施形態において、本明細書で説明されるCARとともに発現されるケモカイン受容体分子は、腫瘍によって分泌されるケモカインに基づいて選択される。一実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現細胞は、CCR2b受容体またはCXCR2受容体をさらに含む、例えば発現

する。ある実施形態において、本明細書で説明されるCAR、およびケモカイン受容体分子は、同じベクター上にあるか、または2つの異なるベクター上にある。本明細書で説明されるCAR、およびケモカイン受容体分子が、同じベクター上にある実施形態において、前記CARおよびケモカイン受容体分子は、各々が2つの異なるプロモーターの制御下にあるか、または同じプロモーターの制御下にある。

【0687】

免疫応答増強剤の条件付き発現 (conditional expression)

本明細書で説明されるCAR発現細胞の免疫応答または活性を増強する薬剤を条件付きで発現させるための組成物および方法も、本明細書において提供する。

【0688】

一態様において、本開示は、本明細書では非条件付きCARとも称される、CARを構成的に発現するように加工されている免疫エフェクター細胞を特徴とする。一実施形態において、本明細書で説明されるような非条件付きCARは、がん関連抗原、例えば、CD19、CD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3またはROR1と結合する抗原結合ドメインを含む。実施形態において、非条件付きCAR発現免疫エフェクター細胞は、CAR発現免疫エフェクター細胞の治療の効能、例えば免疫応答を増強する、条件付きで発現される薬剤をさらに含む。このような実施形態において、条件付きで発現される薬剤の発現は、非条件付きCAR発現免疫エフェクター細胞の活性化直後に、例えば、非条件付きCAR分子のその標的、例えばがん関連抗原、例えば、CD19、CD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3またはROR1への結合直後に起こる。

【0689】

本明細書で説明されるような免疫応答増進剤は、次の1つまたは複数の特徴とし得る：1) 非条件付きCARによって標的にされるものとは異なるがん関連抗原を標的とするか、もしくはそれと結合する；2) 免疫チェックポイントもしくは阻害分子の発現もしくは活性を阻害する；ならびに／または3) 免疫エフェクター細胞の免疫応答もしくは活性化を増強する構成要素の発現および／もしくは分泌を活性化する。免疫応答増強剤は、ポリペプチドであってもよく、または核酸、例えば、免疫応答を増強するポリペプチドをコードする核酸であってもよい。免疫応答を増進する、条件付きで発現される薬剤の例としては、追加のCAR (条件付きCARと称される)；TCRベースの分子 (例えば、TCR-CAR)；免疫チェックポイントもしくは阻害分子の阻害剤；および／またはサイトカインが挙げられるが、これらに限定されない。実施形態において、条件付きCARは、非条件付きCARによって標的にされるものとは異なるがん関連抗原と結合する。実施形態において、本明細書で説明される免疫チェックポイントまたは阻害分子の阻害剤は、抗体またはその抗原結合フラグメント；阻害核酸 (例えば、siRNAまたはshRNA)；あるいはPD1、PD-L1、CTLA4、TIM3、CEACAM (例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および／もしくはCEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3 (CD276)、B7-H4 (VTCN1)、HVEM (TNFRSF14もしくはCD270)、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシンまたはTGFRベータから選択される免疫チェックポイントもしくは阻害分子の活性を阻害するか、またはそれを低下させる小分子である。実施形態において、サイトカインは、IL-2、IL-7、IL-15もしくはIL-21、またはそれらの機能的なフラグメントもしくは誘導体を含む。

【0690】

実施形態において、免疫エフェクター細胞は、非条件付きCARおよび1つまたは複数の条件付きCARを含み、前記条件付きCARは、非条件付きCARによって標的にされるものとは異なるがん関連抗原と結合する。例として、一実施形態において、免疫エフェクター細胞は、CD19と結合する非条件付きCAR、およびCD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3もしくはROR1またはこれらの組合せと結合

10

20

30

40

50

する1つまたは複数の条件付きCARを含む。別の実施形態において、免疫エフェクター細胞は、CD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3またはROR1と結合する非条件付きCAR、およびCD19と結合する条件付きCARを含む。

【0691】

CAR発現免疫エフェクター細胞の活性化直後に免疫応答を増強する薬剤の条件付き発現は、免疫応答（例えば、このような薬剤をコードする核酸配列への応答）を増強する薬剤に活性化条件付き制御領域を機能するように連結させることによって達成される。一実施形態において、活性化条件付き制御領域は、機能するように連結した免疫応答増強剤の発現、例えば転写、を免疫エフェクター細胞の活性化直後に開始させるプロモーター配列を含む。一実施形態において、活性化条件付き制御領域は、免疫エフェクター細胞の活性化直後の発現開始を助長する1つまたは複数の調節配列（例えば、転写因子結合配列または部位）を含む。実施形態において、活性化条件付き制御領域は、免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞）活性化、T細胞分化、T細胞極性化またはヘルパーT細胞発生の1つまたは複数の直後に上方調節される遺伝子のプロモーター配列、および／または、そのような遺伝子のプロモーターもしくは調節配列からの1つもしくは複数の転写因子結合配列を含む。このような遺伝子の例としては、NFAT（活性化T細胞核内因子）、ATF2（活性化転写因子2）、NF-κB（核内因子-κB）、IL-2、IL-2受容体（IL-2R）、IL-3、GM-CSF、IL-4、IL-10およびIFN-γが挙げられるが、これらに限定されない。

【0692】

一実施形態において、活性化条件付き制御領域は、1つまたは複数、例えば1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ以上のNFAT結合配列または部位を含む。実施形態において、プロモーター内のNFAT結合配列は、（5'-GGAAA-3'）（配列番号1312）を含み、これは、5'（A/T）GGAAA（A/N）（A/T/C）N 3'（配列番号1313）のより長いコンセンサス配列中に位置していてもよい。実施形態において、NFAT結合配列は、GGGACT（配列番号1314）などのκb様配列である。（Gibson et al., The Journal of Immunology, 2007, 179: 3831-3840を参照されたい）。

【0693】

一実施形態において、活性化条件付き制御領域は、IL-2プロモーター（もしくは最小IL-2プロモーター）、IL-2Rプロモーター、ATF2プロモーターもしくはNF-κBプロモーター、またはこれらのいずれかの機能的なフラグメントもしくは誘導体をさらに含む。一実施形態において、活性化条件付き制御領域は、1つまたは複数のNFAT結合配列、例えば、3つまたは6つのNFAT結合配列、およびIL-2プロモーター、例えばIL-2最小プロモーターを含む。一実施形態において、活性化条件付き制御領域は、AGCTTGGATCCAAGAGGAAAATTTGTTTCATACAGAAGGCGTTAAGAGGAAAATTTGTTTCATACAGAAGGCGTTAAGAGGAAAATTTGTTTCATACAGAAGGCGTTCAAGCTTGTCGAC（配列番号1315）の配列を含む。

【0694】

細胞源

拡大および遺伝子改変または他の改変の前に、細胞源、例えば、T細胞またはナチュラルキラー（NK）細胞源を対象から得ることができる。対象の例としては、ヒト、サル、チンパンジー、イヌ、ネコ、マウス、ラット、およびそれらのトランスジェニック種が挙げられる。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、胸膜滲出、脾臓組織、および腫瘍などの多数の源から得ることができる。

【0695】

本開示の所定の態様において、免疫エフェクター細胞、例えばT細胞は、Fico11（商標）セパレーションなどの当業者公知の多数の技術を使用して対象から収集された血液のユニットから得ることができる。一態様において、個体の循環血液からの細胞は、ア

フェレーシスによって得られる。アフレーシス産物は、典型的には、T細胞などのリンパ球、単球、顆粒球、B細胞、他の有核の白血球、赤血球、および血小板を含有する。一態様において、アフレーシスによって収集された細胞を洗浄して血漿画分を除去し、それに続く処理工程のために細胞を適切な緩衝液または培地中に適宜、置くことができる。一実施形態において、細胞は、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で洗浄される。代替の実施形態において、洗浄溶液はカルシウムを含まず、マグネシウムを含んでいなくもよく、または2価カチオンの全てとはいかないまでもその多くを含んでいなくともよい。

【0696】

カルシウムの非存在下における初期の活性化工程により、活性化を増大させることができる。当業者であれば容易に認識するものと予想されるが、洗浄工程は、当業者公知の方法によって、例えば半自動の「流水式」遠心分離機（例えば、Cobe 2991細胞処理装置、Baxter Cytomate、またはHaemonetics Cell Saver 5）を製造元の説明書に従って使用することによって達成されてもよい。洗浄後、細胞は、様々な生体適合性緩衝液、例えばCa非含有、Mg非含有PBS、PlasmaLyte Aなど、または他の緩衝液含有または非含有食塩水に再懸濁されもよい。その代わりに、アフレーシス試料の望ましくない成分を除去し、細胞を培養培地に直接再懸濁させてもよい。

10

【0697】

適用方法は、5%またはそれ未満、例えば2%のヒトAB血清を含む培養培地条件を利用でき、公知の培養培地条件および組成、例えばSmith et al., “Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement” Clinical & Translational Immunology (2015) 4, e31; doi:10.1038/cti.2014.31で説明されるものを採用できることが認識されている。

20

【0698】

一態様において、T細胞は、例えば、PERCOLL（商標）の勾配を介した遠心分離によって、または対向流遠心溶出法によって赤血球を溶解させ単球を枯渇させることにより末梢血リンパ球から単離される。

【0699】

本明細書で説明される方法は、例えば陰性選択技術、例えば本明細書で説明される陰性選択技術を使用する、免疫エフェクター細胞の特定の部分集団、例えば、調節性T細胞枯渇集団、CD25+細胞枯渇集団であるT細胞の選択を包含していてもよい。一部の実施形態において、調節性T細胞枯渇集団は、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%未満のCD25+細胞を含有する。

30

【0700】

一実施形態において、調節性T細胞、例えばCD25+T細胞は、抗CD25抗体、もしくはそれらのフラグメント、またはCD25結合リガンド、IL-2を使用して集団から除去される。一実施形態において、抗CD25抗体、もしくはそれらのフラグメント、またはCD25結合リガンドは、基質、例えばビーズにコンジュゲートされているか、または別の方法で基質、例えばビーズ上にコーティングされている。一実施形態において、抗CD25抗体、またはそれらのフラグメントは、本明細書で説明される基質にコンジュゲートされている。

40

【0701】

一実施形態において、調節性T細胞、例えばCD25+T細胞は、Miltenyi（商標）からのCD25枯渇試薬を使用して、集団から除去される。一実施形態において、CD25枯渇試薬に対する細胞の比率は、20 μ Lに対して細胞 1×10^7 個、または15 μ Lに対して細胞 1×10^7 個、または10 μ Lに対して細胞 1×10^7 個、または5 μ Lに対して細胞 1×10^7 個、または2.5 μ Lに対して細胞 1×10^7 個、または1.25 μ Lに対して細胞 1×10^7 個である。一実施形態において、例えば調節性T細胞、例えばCD25+枯渇の場合、細胞5億個/mlより多くが使用される。さらなる態様において、細胞6億、7億、8億、または9億個/mlの細胞濃度が使用される。

50

【0702】

一実施形態において、枯渇させる免疫エフェクター細胞の集団は、約 6×10^9 個の CD25+T細胞を包含する。他の態様において、枯渇させる免疫エフェクター細胞の集団は、約 1×10^9 から 1×10^{10} 個、およびその間のあらゆる整数値の CD25+T細胞を包含する。一実施形態において、結果得られた調節性T細胞枯渇集団は、 2×10^9 個またはそれ未満の調節性T細胞、例えば CD25+細胞（例えば、 1×10^9 、 5×10^8 、 1×10^8 、 5×10^7 、 1×10^7 個、またはそれ未満の CD25+細胞）を有する。

【0703】

一実施形態において、調節性T細胞、例えば CD25+細胞は、CliniMACシステムを例えばチューピング162-01などの枯渇チューピングセットとともに使用して、集団から除去される。一実施形態において、CliniMACシステムは、例えば DEPLETION2.1などの枯渇設定で実行される。

10

【0704】

特定の理論に縛られることは望まないが、アフェレーシスの前の対象において、または CARを発現する細胞生成物の製造中に、免疫細胞の負の調節因子のレベルを減少させること（例えば、不要な免疫細胞、例えば T_{REG}細胞の数を減少させること）は、対象の再発リスクを有意に低減させることができる。例えば、T_{REG}細胞を枯渇させる方法は、当業界公知である。T_{REG}細胞を減少させる方法としては、これらに限定されないが、シクロホスファミド、抗GITR抗体（本明細書で説明される抗GITR抗体）、CD25枯渇、mTOR阻害剤、およびそれらの組合せが挙げられる。

20

【0705】

一部の実施形態において、製造方法は、CARを発現する細胞の製造前に、T_{REG}細胞の数を低減させること（例えば、枯渇させること）を含む。例えば、製造方法は、例えば、CARを発現する細胞（例えば、T細胞、NK細胞）生成物の製造前にT_{REG}細胞を枯渇させるために、試料、例えばアフェレーシス試料を、抗GITR抗体および／もしくは抗CD25抗体（もしくはそれらのフラグメント、またはCD25結合リガンド）と接触させることを含む。

【0706】

特定の理論に縛られることは望まないが、対象においてアフェレーシスの前にまたは CARを発現する細胞生成物の製造中に免疫細胞の負の調節因子のレベルを減少させること（例えば、不要な免疫細胞、例えば T_{REG}細胞の数を減少させること）は、T_{REG}再発リスクを低減させることができる。ある実施形態において、対象は、CARを発現する細胞生成物の製造のために細胞を収集する前に、T_{REG}細胞を低減させる1つまたは複数の療法で前処置され、それによって対象がCARを発現する細胞の処置に戻るリスクを低減させる。ある実施形態において、T_{REG}細胞を減少させる方法としては、これらに限定されないが、シクロホスファミド、抗GITR抗体、CD25枯渇の1つまたは複数、またはそれらの組合せを対象に投与することが挙げられる。ある実施形態において、T_{REG}細胞を減少させる方法としては、これらに限定されないが、シクロホスファミド、抗GITR抗体、CD25枯渇、mTOR阻害剤の1つまたは複数、またはそれらの組合せを対象に投与することが挙げられる。シクロホスファミド、抗GITR抗体、CD25枯渇の1つまたは複数、またはそれらの組合せの投与は、CARを発現する細胞生成物の注入の前に、その間に、またはその後に行うことができる。シクロホスファミド、抗GITR抗体、CD25枯渇、mTOR阻害剤の1つまたは複数、またはそれらの組合せの投与は、CARを発現する細胞生成物の注入の前に、その間に、またはその後に行うことができる。

30

40

【0707】

一部の実施形態において、製造方法は、CARを発現する細胞の製造前に、T_{REG}細胞の数を低減すること（例えば、を枯渇させること）を含む。例えば、製造方法は、例えば、CARを発現する細胞（例えば、T細胞、NK細胞）生成物の製造前にT_{REG}細胞

50

を枯渇させるために、試料、例えばアフレーシス試料を、抗G I T R抗体および／もしくは抗C D 2 5抗体（もしくはそれらのフラグメント、またはC D 2 5結合リガンド）と接触させることを含む。

【0708】

一実施形態において、対象は、C A Rを発現する細胞生成物の製造のために細胞を収集する前に、T R E G細胞を低減させる1つまたは複数の療法で前処置され、それによって対象がC A Rを発現する細胞の処置に戻るリスクを低減させる。一実施形態において、T R E G細胞を減少させる方法としては、これらに限定されないが、シクロホスファミド、抗G I T R抗体、C D 2 5枯渇の1つまたは複数、またはそれらの組合せを対象に投与することが挙げられる。シクロホスファミド、抗G I T R抗体、C D 2 5－枯渇の1つまたは複数、またはそれらの組合せの投与は、C A Rを発現する細胞生成物の注入の前に、その間に、またはその後に行うことができる。

10

【0709】

一実施形態において、対象は、C A Rを発現する細胞生成物の製造のために細胞を収集する前に、シクロホスファミドで前処置され、それによって対象がC A Rを発現する細胞の処置に戻るリスクを低減させる。一実施形態において、対象は、C A Rを発現する細胞生成物の製造のために細胞を収集する前に、抗G I T R抗体で前処置され、それによって対象がC A Rを発現する細胞の処置に戻るリスクを低減させる。

【0710】

一実施形態において、除去される細胞の集団は、調節性T細胞または腫瘍細胞ではなく、別の様式でC A R T細胞、例えばC D 1 4、C D 1 1 b、C D 3 3、C D 1 5、または免疫抑制細胞によって発現される可能性がある他のマーカーを発現する細胞の拡張および／または機能に負の影響を与える細胞である。一実施形態において、このような細胞は、調節性T細胞および／もしくは腫瘍細胞と同時に、または前記枯渇の後に、または別の順番で除去されることが想定される。

20

【0711】

本明細書で説明される方法は、1つより多くの選択工程、例えば1つより多くの枯渇工程を包含していてもよい。陰性選択によるT細胞集団の濃縮は、例えば、陰性選択された細胞に独特な表面マーカーに向けられた抗体の組合せを用いて達成することができる。1つの方法は、陰性選択された細胞上に提示される細胞表面マーカーに向けられたモノクローナル抗体のカクテルを使用する負磁気免疫接着またはフローサイトメトリーによるセルソーティングおよび／もしくは選択である。例えば、陰性選択によりC D 4＋細胞を濃縮するために、モノクローナル抗体カクテルは、C D 1 4、C D 2 0、C D 1 1 b、C D 1 6、H L A－D R、およびC D 8に対する抗体を包含していてもよい。

30

【0712】

本明細書で説明される方法は、集団から、腫瘍抗原、例えばC D 2 5を含まない腫瘍抗原、例えばC D 1 9、C D 3 0、C D 3 8、C D 1 2 3、C D 2 0、C D 1 4またはC D 1 1 bを発現する細胞を除去することにより、C A R、例えば本明細書で説明されるC A Rの発現に好適な、調節性T細胞枯渇、例えばC D 2 5＋枯渇、および腫瘍抗原枯渇細胞の集団を提供することをさらに包含していてもよい。一実施形態において、腫瘍抗原を発現する細胞は、調節性T細胞、例えばC D 2 5＋細胞と同時に除去される。例えば、抗C D 2 5抗体またはそれらのフラグメント、および抗腫瘍抗原抗体またはそれらのフラグメントは、同じ基質、例えば細胞を除去するのに使用できるビーズに付着することができ、または抗C D 2 5抗体もしくはそれらのフラグメント、または抗腫瘍抗原抗体もしくはそれらのフラグメントは、別々のビーズに付着することができ、それらの混合物は、細胞を除去するのに使用することができる。他の実施形態において、調節性T細胞、例えばC D 2 5＋細胞の除去、および腫瘍抗原を発現する細胞の除去は、逐次的であり、例えばどちらの順番でも行うことができる。

40

【0713】

また、集団から、チェックポイント阻害剤、例えば本明細書で説明されるチェックポイ

50

ント阻害剤を発現する細胞、例えばPD1+細胞、LAG3+細胞、およびTIM3+細胞の1種または複数を除去することによって、調節性T細胞枯渇、例えばCD25+枯渇細胞、およびチェックポイント阻害剤枯渇細胞、例えばPD1+、LAG3+および/またはTIM3+枯渇細胞の集団を提供することを包含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、例えば本明細書で説明されるように、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM（例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および/またはCEACAM-5）、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3（CD276）、B7-H4（VTCN1）、HVEM（TNFRSF14またはCD270）、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシン、およびTGFR（例えばTGFRベータ）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を発現する細胞は、調節性T細胞、例えばCD25+細胞と同時に除去される。例えば、抗CD25抗体またはそのフラグメント、および抗チェックポイント阻害剤抗体またはそのフラグメントを同じビーズに付着させることができ、これを使用して細胞を除去することができ、または抗CD25抗体またはそのフラグメント、および抗チェックポイント阻害剤抗体またはそのフラグメントを別々のビーズに付着させることができ、その混合物を使用して細胞を除去することができる。他の実施形態において、調節性T細胞、例えばCD25+細胞の除去、およびチェックポイント阻害剤を発現する細胞の除去は、逐次的であり、例えばどちらの順番でも行うことができる。

10

【0714】

20

本明細書で説明される方法は、陽性選択工程を包含し得る。例えば、所望のT細胞の陽性選択に十分な期間にわたり、抗CD3/抗CD28（例えば、3×28）がコンジュゲートしたビーズ、例えばDYNABEADS（登録商標）M-450 CD3/CD28 Tとインキュベートすることによって、T細胞を単離することができる。一態様において、期間は、約30分である。さらなる態様において、期間は、30分から36時間の範囲またはそれより長く、およびその間の全ての整数値である。さらなる態様において、期間は、少なくとも1、2、3、4、5、または6時間である。さらに別の態様において、期間は、10から24時間である。一態様において、インキュベート期間は、24時間である。腫瘍組織または免疫不全個体から腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を単離する場合のように、他の細胞型と比較してT細胞がわずかしかないあらゆる状況においてT細胞を単離するためには、より長いインキュベート時間が使用される可能性がある。さらに、より長いインキュベート時間の使用は、CD8+T細胞の捕獲効率を増加させることができる。したがって、時間を単に短くしたりまたは長くしたりすることによって、T細胞をCD3/CD28ビーズに結合させることができ、および/またはT細胞に対するビーズの比率（本明細書でさらに説明されるように）を増加または減少させることによって、培養開始時またはプロセス中の他のタイムポイントで、T細胞の部分集団を可否に応じて優先的に選択することができる。加えて、ビーズまたは他の表面に対する抗CD3および/または抗CD28抗体の比率を増加または減少させることによって、培養開始時または他の所望のタイムポイントで、T細胞の部分集団を可否に応じて優先的に選択することができる。

30

【0715】

40

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、およびパーフォリンの1種または複数、または他の適切な分子、例えば他のサイトカインを発現するT細胞集団を選択する場合がある。細胞発現に関してスクリーニングする方法は、例えば、PCT公開WO2013/126712で説明されている方法によって決定することができる。

【0716】

陽性または陰性選択によって細胞の所望の集団を単離するために、細胞および表面（例えば、ビーズなどの粒子）の濃度は様々であってもよい。所定の態様において、細胞およびビーズの接触を最大にするために、ビーズおよび細胞が一緒に混合される容量を有意に減少させる（例えば、細胞濃度を増加させる）ことが望ましい場合がある。例えば、一態

50

様において、細胞約100億個/ml、90億個/ml、80億個/ml、70億個/ml、60億個/ml、または50億個/mlの濃度が使用される。一態様において、細胞10億個/mlの濃度が使用される。一態様において、1mlあたり、細胞7500万個以上、8000万個以上、8500万個以上、9000万個以上、9500万個以上、または1億個の細胞濃度が使用される。さらなる態様において、1mlあたり細胞1億2500万または1億5000万個の濃度が使用できる。

【0717】

高濃度の使用は、細胞収量、細胞の活性化、および細胞拡大の増加をもたらすことができる。さらに、高い細胞濃度の使用は、CD28陰性T細胞などの対象の標的抗原の発現が弱い可能性がある細胞、または多くの腫瘍細胞が存在する試料（例えば、白血病の血液、腫瘍組織など）からの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する可能性があり、取得が望ましいと予想される。例えば、高濃度の細胞の使用は、通常のCD28発現が比較的弱いCD8+T細胞のより効率的な選択を可能にする。

10

【0718】

関連する態様において、より低い細胞の濃度を使用することが望ましい場合がある。T細胞および表面（例えば、ビーズなどの粒子）の混合物を相当に希釈することによって、粒子と細胞との相互作用を最小化する。それにより、粒子に結合させるために、大量の所望の抗原を発現する細胞が選択される。例えば、CD4+T細胞は、より高レベルのCD28を発現するが、薄い濃度でCD8+T細胞より効率的に捕捉される。一態様において、使用される細胞の濃度は、 5×10^6 /mlである。他の態様において、使用される濃度は、約 1×10^5 /mlから 1×10^6 /mlまで、およびその間のあらゆる整数値であってよい。

20

【0719】

他の態様において、細胞は、回転器で、様々な長さの時間にわたり、様々な速度、2〜10℃または室温のいずれかでインキュベートすることができる。

【0720】

刺激のためのT細胞を洗浄工程後に凍結してもよい。理論に縛られるつもりはないが、凍結工程とそれに続く融解工程は、細胞集団中の顆粒球とある程度の単球を除去することによってより均一な生成物をもたらす。血漿と血小板を除去する洗浄工程の後、細胞を凍結溶液に懸濁してもよい。多くの凍結のための溶液およびパラメーターが当業界公知であり、この状況において有用であると予想されるが、1つの方法は、20% DMSOおよび8% ヒト血清アルブミンを含有するPBS、または10% デキストラン40および5% デキストロース、20% ヒト血清アルブミンならびに7.5% DMSOを含有する培養培地、または31.25% Plasma l y t e - A、31.25% デキストロース5%、0.45% NaCl、10% デキストラン40および5% デキストロース、20% ヒト血清アルブミン、および7.5% DMSOを含有する培養培地、または例えばヘスパンおよびPlasma L y t e - Aを含有する他の好適な細胞凍結媒体を使用し、次いで細胞を1度/分の速度で-80℃に凍結させ、液体窒素貯蔵タンクの蒸気相中で保存することを含む。他の制御冷凍方法を使用してもよいし、同様に-20℃で即座に、または液体窒素中で非制御冷凍してもよい。

30

40

【0721】

所定の態様において、低温保存した細胞を融解させて、本明細書で説明したようにして洗浄し、本発明の方法を使用して活性化する前に室温で1時間そのまま置く。

【0722】

また、本発明の状況では、本明細書で説明したようにして拡大させた細胞が必要になるかもしれないときの前の期間に、対象から血液試料またはアフエレーシス産物を収集することも考慮される。そのようなものとして、拡大させようとする細胞の源を必要なあらゆる時点で収集することができ、さらに、本明細書で説明されるものなどの免疫エフェクター細胞治療によって利益を得ると予想される多数の疾患または状態のための免疫エフェク

50

ター細胞治療で後に使用するために、T細胞などの所望の細胞を単離して凍結してもよい。一態様において、血液試料またはアフエレーシスは、一般的に健康な対象から採取される。所定の態様において、血液試料またはアフエレーシスは、疾患を発症させる危険性があるが、まだ疾患を発症させていない、一般的に健康な対象から採取され、さらに、後の使用のために対象の細胞を単離して凍結してもよい。所定の態様において、T細胞は、後の時点で拡大、凍結、および使用されてもよい。所定の態様において、本明細書で説明したような特定の疾患の診断の直後に、ただしいかなる処置の前に、試料が患者から収集される。さらなる態様において、これらに限定されないが、ナタリズマブ、エファリズマブなどの薬剤、抗ウイルス剤、化学療法、放射線、免疫抑制剤、例えばシクロスポリン、アザチオプリン、メトトレキセート、ミコフェノール酸塩、およびFK506、抗体、または他の免疫除去剤（immunoablative agents）、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、マイコフェノール酸、ステロイド、FR901228、および放射線照射での処置などの多数の関連する処置様式の前に、細胞が、対象からの血液試料またはアフエレーシスから単離される。

【0723】

本発明のさらなる態様において、対象に機能的なT細胞を残す処置の後に、患者から直接T細胞を得る。これに関して、所定のがん処置の後、特定には、免疫系にダメージを与える薬物での処置の後、患者が通常処置から回復すると予想される期間中の処置の直後に、得られたT細胞の品質が、エキスピボで拡大するそれらの能力に関して最適であるかまたは向上している可能性があることが観察されている。同様に、本明細書で説明される方法を使用したエキスピボでの操作の後、これらの細胞は、生着およびインビボでの拡大の強化にとって好ましい状況にある可能性がある。したがって、本発明の内容において、この回収期間中に、T細胞、樹状細胞、または造血細胞系の他の細胞を包含する血液細胞を収集することが考慮される。さらに、所定の態様において、動員（例えば、GM-CSFを用いた動員）および前処置レジメン（conditioning regimen）を使用して、特に療法後の規定の時間帯中に、特定の細胞型の再増殖、再循環、再生、および／または拡大にとって好都合な対象における状態を作り出すことができる。例示的な細胞型としては、T細胞、B細胞、樹状細胞、および他の免疫系細胞が挙げられる。

【0724】

一実施形態において、CAR分子、例えば、本明細書で説明されるCAR分子を発現する免疫エフェクター細胞は、免疫を増強する低い用量のmTOR阻害剤を受けた対象から得られる。一実施形態において、対象における、または対象から回収された、PD1陰性免疫エフェクター細胞、例えばT細胞のレベル、またはPD1陰性免疫エフェクター細胞の比率、例えばT細胞／PD1陽性免疫エフェクター細胞、例えばT細胞が少なくとも一時的に増加した状態になるように、十分な時間の後、または十分な免疫を増強する低い用量のmTOR阻害剤投与の後に、CARを発現するように加工される免疫エフェクター細胞、例えばT細胞の集団が回収される。

【0725】

他の実施形態において、CARを発現するように加工されているかまたは加工されると予想される免疫エフェクター細胞、例えばT細胞の集団は、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、またはPD1陰性免疫エフェクター細胞の比率、例えばT細胞／PD1陽性免疫エフェクター細胞、例えばT細胞を増加させる量のmTOR阻害剤との接触によって、エキスピボで処置され得る。

【0726】

一実施形態において、T細胞集団は、ジアシルグリセロールキナーゼ（diacylglycerol kinase）（DGK）欠損である。DGK欠損細胞は、DGKのRNAまたはタンパク質を発現しない細胞を包含するか、または低減または阻害されたDGK活性を有する。DGK欠損細胞は、遺伝学的アプローチによって、例えば、DGK発現を低減または予防するためにRNA干渉剤、例えばsiRNA、shRNA、miRNAを投与することによって生成することができる。代替として、DGK欠損細胞は、本明細書で説明されるDGK阻害

剤での処置によって生成することができる。

【0727】

一実施形態において、T細胞集団は、イカロス欠損である。イカロス欠損細胞は、イカロスのRNAまたはタンパク質を発現しない細胞を包含するか、または低減または阻害されたイカロス活性を有する。イカロス欠損細胞は、遺伝学的アプローチによって、例えば、イカロス発現を低減または予防するためにRNA干渉剤、例えばsiRNA、shRNA、miRNAを投与することによって生成することができる。代替として、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置によって生成することができる。

【0728】

実施形態において、T細胞集団は、DGK欠損およびイカロス欠損であり、例えば、DGKおよびイカロスを発現しないか、または低減もしくは阻害されたDGKおよびイカロス活性を有する。このようなDGKおよびイカロス欠損細胞は、本明細書で説明される方法のいずれかによって生成することができる。

【0729】

一実施形態において、NK細胞は、対象から得られる。別の実施形態において、NK細胞は、NK細胞株、例えばNK-92細胞株（Conkwest）である。

【0730】

同種異系CAR

本明細書で説明される実施形態において、免疫エフェクター細胞は、同種異系の免疫エフェクター細胞、例えばT細胞またはNK細胞であってもよい。例えば、細胞は、同種異系のT細胞、例えば、機能的なT細胞受容体（TCR）および／またはヒト白血球抗原（HLA）、例えばHLAクラスIおよび／またはHLAクラスIIの発現が欠失した同種異系のT細胞であってもよい。

【0731】

機能的なTCRが欠失したT細胞は、例えば、その表面上にいかなる機能的なTCRも発現しないように加工されていてもよいし、機能的なTCRを含む1つまたは複数のサブユニットを発現しないように加工されていてもよいし〔例えば、TCRアルファ、TCRベータ、TCRガンマ、TCRデルタ、TCRイプシロン、および／またはTCRゼータを発現しない（またはその低減された発現を示す）ように加工される〕、またはその表面上に非常にわずかな機能的なTCRしか生産しないように加工されていてもよい〔例えば、TCRアルファ、TCRベータ、TCRガンマ、TCRデルタ、TCRイプシロン、および／またはTCRゼータを発現しない（またはその低減された発現を示す）ように加工される〕。代替として、T細胞は、例えば、TCRのサブユニットの1つまたは複数の突然変異またはランケットされた形態の発現によって、実質的に機能が損なわれたTCRを発現することができる。用語「実質的に機能が損なわれたTCR」は、このTCRが、宿主において有害な免疫反応を惹起しないと予想されることを意味する。

【0732】

本明細書で説明されるT細胞は、例えば、その表面上に機能的なHLAを発現しないように加工されていてもよい。例えば、本明細書で説明されるT細胞は、HLA、例えばHLAクラスIおよび／またはHLAクラスIIの細胞表面での発現が下方調節されるように加工されていてもよい。一部の実施形態において、HLAの下方調節は、ベーター2ミクログロブリン（B2M）の発現を低減したりまたはなくしたりすることによって達成され得る。

【0733】

一部の実施形態において、T細胞は、機能的なTCRおよび機能的なHLA、例えばHLAクラスIおよび／またはHLAクラスIIを欠失していてもよい。

【0734】

機能的なTCRおよび／またはHLAの発現が欠失した改変T細胞は、TCRまたはHLAの1つまたは複数のサブユニットのノックアウトまたはノックダウンなどのあらゆる

10

20

30

40

50

好適な手段により得ることができる。例えば、T細胞は、s i R N A、s h R N A、クラスター化規則的間隔短鎖回文配列リピート（C R I S P R）転写活性化剤様のエフェクターヌクレアーゼ（T A L E N）、またはジンクフィンガーエンドヌクレアーゼ（Z F N）を使用した、T C Rおよび／またはH L Aのノックダウンを包含していてもよい。

【0735】

一部の実施形態において、同種異系の細胞は、阻害分子を発現しないかまたは低いレベルで発現する細胞、例えば本明細書で説明されるいずれかの方法によって加工された細胞であってもよい。例えば、細胞は、阻害分子を発現しないかまたは低いレベルで発現する細胞、例えば、C A Rを発現する細胞の免疫エフェクター応答を展開する能力を減少させることができる細胞であってもよい。阻害分子の例としては、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および／または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または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、およびT G F R（例えばT G F Rベータ）が挙げられる。阻害分子の阻害、例えばD N A、R N Aまたはタンパク質レベルでの阻害による阻害は、C A Rを発現する細胞の性能を最適化することができる。実施形態において、阻害核酸、例えば、本明細書で説明される阻害核酸、例えばd s R N A、例えばs i R N Aまたはs h R N A、クラスター化規則的間隔短鎖回文配列リピート（C R I S P R）、転写活性化剤様のエフェクターヌクレアーゼ（T A L E N）、またはジンクフィンガーエンドヌクレアーゼ（Z F N）が使用できる。

【0736】

T C RまたはH L Aを阻害するs i R N Aおよびs h R N A

いくつかの実施形態において、T C Rの発現および／またはH L Aの発現は、T細胞におけるT C R、および／またはH L A、および／または本明細書で説明される阻害分子〔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および／または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または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、およびT G F Rベータ〕をコードする核酸を標的とするs i R N Aまたはs h R N Aを使用して阻害することができる。

【0737】

s i R N Aおよびs h R N Aのための発現系、ならびに典型的なs h R N Aは、例えば、参照によりその全体が組み入れられる2015年3月13日に出版された国際出願WO 2015/142675の段落649および650において説明されている。

【0738】

T C RまたはH L Aを阻害するC R I S P R

本明細書で使用される場合、「C R I S P R」または「T C Rおよび／もしくはH L Aに対するC R I S P R」または「T C Rおよび／もしくはH L Aを阻害するC R I S P R」とは、クラスター化規則的間隔短鎖回文配列リピートのセット、またはリピートのこのようなセットを含む系を指す。本明細書で使用される場合、「C a s」とは、C R I S P R関連タンパク質を指す。「C R I S P R / C a s」系とは、C R I S P RおよびC a sに由来する系であって、T C R遺伝子および／もしくはH L A遺伝子、ならびに／または本明細書で説明される阻害分子〔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および／または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または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、およびT G F Rベータ〕をサイレ

ンシングするか、または突然変異させるのに使用し得る系を指す。

【0739】

CRISPR/Cas系およびその使用は、例えば、参照によりその全体が組み入れられる2015年3月13日に出願された国際出願WO2015/142675の段落651～658において説明されている。

【0740】

TCRおよび／またはHLAを阻害するTALEN

「TALEN」または「HLAおよび／もしくはTCRに対するTALEN」または「HLAおよび／もしくはTCRを阻害するTALEN」とは、HLA遺伝子および／もしくはTCR遺伝子、ならびに／または本明細書で説明される阻害分子〔例えば、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM（例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および／またはCEACAM-5）、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3（CD276）、B7-H4（VTCN1）、HVEM（TNFRSF14またはCD270）、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシン、およびTGFRベータ〕を編集するのに使用し得る人工ヌクレアーゼである、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼを指す。

10

【0741】

TALEN、TALE、およびそれらの使用は、例えば、参照によりその全体が組み入れられる2015年3月13日に出願された国際出願WO2015/142675の段落659～665において説明されている。

20

【0742】

HLAおよび／またはTCRを阻害するジंकフィンガーヌクレアーゼ

「ZFN」または「ジंकフィンガーヌクレアーゼ」または「HLAおよび／もしくはTCRに対するZFN」または「HLAおよび／もしくはTCRを阻害するZFN」とは、HLA遺伝子および／もしくはTCR遺伝子、ならびに／または本明細書で説明される阻害分子〔例えば、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM（例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および／またはCEACAM-5）、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3（CD276）、B7-H4（VTCN1）、HVEM（TNFRSF14またはCD270）、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシン、およびTGFRベータ〕を編集するのに使用し得る人工ヌクレアーゼである、ジंकフィンガーヌクレアーゼを指す。

30

【0743】

ZFN、およびそれらの使用は、例えば、参照によりその全体が組み入れられる2015年3月13日に出願された国際出願WO2015/142675の段落666～671において説明されている。

【0744】

テロメラーゼの発現

いかなる特定の理論にも縛られるつもりはないが、いくつかの実施形態において、患者における治療的T細胞の持続性は、T細胞におけるテロメアの短縮に起因して短期間であり、したがって、テロメラーゼ遺伝子のトランスフェクションは、T細胞のテロメアを長くし、患者におけるT細胞の持続性を改善する可能性がある。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。したがって、ある実施形態において、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞は、テロメラーゼサブユニット、例えば、テロメラーゼの触媒性サブユニット、例えば、TERT、例えば、hTERTを異所的に発現する。いくつかの態様において、本開示は、CAR発現細胞を作製する方法であって、細胞を、テロメラーゼサブユニット、例えば、テロメラーゼの触媒性サブユニット、例えば、TERT、例えば、hTERTをコードする核酸と接触させることを含む方法を提示する。細胞は、CA

40

50

Rをコードするコンストラクトと接触させる前に、核酸と接触させることもでき、これと並列して接触させることもでき、この後で接触させることもできる。

【0745】

一態様において、本開示は、免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞またはNK細胞）の集団を作製する方法を特徴とする。ある実施形態において、方法は、免疫エフェクター細胞の集団（例えば、T細胞またはNK細胞）を用意することと；免疫エフェクター細胞の集団を、CARをコードする核酸と接触させることと；CARおよびテロメラーゼの発現を可能とする条件下で、免疫エフェクター細胞の集団をテロメラーゼサブユニット、例えば、hTERTをコードする核酸と接触させることとを含む。

【0746】

ある実施形態において、テロメラーゼサブユニットをコードする核酸は、DNAである。ある実施形態において、テロメラーゼサブユニットをコードする核酸は、テロメラーゼサブユニットの発現を駆動することが可能なプロモーターを含む。

【0747】

ある実施形態において、hTERTは、GenBank Protein ID AAC51724.1のアミノ酸配列 [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] であって、以下：

MPRAPRCRAVRSLLRSHYREVLPATFVRRLLGPQGWRLVQRGDPAAAFRALVAQCLVCPWDARPPPAAPSFRQVSCCLK
ELVARVLQRLCERGAKNVLAFGFALLDGARGGPPEAFTTSVRSYLPNTVTDALRGSGAWGLLLRRVGGDDVLVHLLARCAL
FVLVAPSCAYQVCGPPLYQLGAATQARPPPHASGPRRRLLGCERAWNHSVREAGVPLGLPAPGARRRGGSSASRSLPLPKRP
RRGAAPPERTPVGQGSWAHPGRTRGPSDRGFCVVSPPARPAEEATSLEGALSGTRHSHPSVGRQHAGPPSTSRPPRPWD
TPCPPVYAETKHFYSSGDKEQLRPSFLLSSLRPSLTGARRLVETIFLGSRPWMPGTPRRLPRLPQRYWQMRPLFLELLG
NHAQCPYGVLLKTHCPLRAAVTPAAGVCAREKPGQSVAAPEEEDTDPRRLVQLLRQHSSPWQVYGFVRACLRRLVPPGLW
GSRHNERRFLRNTKKFISLGKHAKLSLQELTWKMSVRGCAWLRRSPGVGCVPAAEHRLREEILAKFLHWLMSVYVVELLR
SFFYVTETTFQKNRLFFYRKS VWSKLQSIGIRQHLKRVQLRELSEAEVRQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPIVNMDY
VVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVLNIYERARRPGLLGASVLGLDDIHRWRTFVLRVRAQDPPPELYFVKVDVTGAYD
TIPQDRLTEVIASIIKPQNTYCVRRYAVVQKAAHGHVRKAFKSHVSTLTDLQPYMRQFVAHLQETSPLRDAVIEQSSSL
NEASSGLFDVFLRFMCHHAVRIRGKSYVQCQGI PQGSILSTLLCSLCYGD MENKLFAGIRRDGLLLRLVDDFLLVTPHLT
HAKTFLRTLVRGVPEYGCVVNLRKTVVNFVDEALGGTAFVQMPAHGLFPWCGLLLDTRTLEVQSDYSSYARTSIRASL
TFNRGFKAGRNMRRKLFGLVRLKCHSLFLDLQVNSLQTVCTNIYKILLQAYRFHACVLQLPFHQVQVWKNPTFFLRVISD
TASLCYSILKAKNAGMSLGAKGAAGPLPSEAVQWLCHQAFLLKLTRHRVTYVPLLGSRLTAQTQLSRKLP GTTTLTALEAA
ANPALPSDFKTILD（配列番号1332）

のアミノ酸配列を有する。

【0748】

ある実施形態において、hTERTは、配列番号1332の配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一な配列を有する。ある実施形態において、hTERTは、配列番号1332の配列を有する。ある実施形態において、hTERTは、N末端、C末端、またはこれらの両方において、欠失（例えば、5、10、15、20、または30アミノ酸を超えない）を含む。ある実施形態において、hTERTは、N末端、C末端、またはこれらの両方において、トランスジェニックのアミノ酸配列（例えば、5、10、15、20、または30アミノ酸を超えない）を含む。

【0749】

ある実施形態において、hTERTは、GenBank受託番号AF018167の核酸配列 (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)：

1 caggcagcgt ggtcctgctg cgcacgtggg aagccctggc cccggccacc cccgcgatgc

61	cgcgcgctcc	ccgctgccga	gccgtgcgct	ccctgctgcg	cagccactac	cgcgaggtgc	
121	tgccgctggc	cacgttcgtg	cggcgcctgg	ggccccaggg	ctggcggctg	gtgcagcgcg	
181	gggacccggc	ggctttccgc	gcgctggtgg	cccagtgcc	ggtgtgcgtg	ccctggggacg	
241	cacggccgcc	ccccgccgcc	ccctcccttc	gccaggtgtc	ctgcctgaag	gagctggtgg	
301	cccagtgct	gcagaggctg	tgcgagcgcg	gcgcgaagaa	cgtgctggcc	ttcggtctcg	
361	cgctgctgga	cggggcccg	gggggcccc	ccgaggcctt	caccaccagc	gtgcgcagct	
421	acctgccc	cacggtgacc	gacgcactgc	gggggagcgg	ggcgtggggg	ctgctgttgc	
481	gccgctggg	cgacgacgtg	ctggttcacc	tgttggcacg	ctgcgcgtc	tttgtgctgg	
541	tggctcccag	ctgcgcctac	caggtgtg	ggccgcgct	gtaccagctc	ggcgctgcc	
601	ctcaggcccc	gccccgcc	cacgctagt	gacccgaag	gcgtctggga	tgcgaacggg	10
661	cctggaacca	tagcgtcagg	gaggccgggg	tccccctggg	cctgccagcc	ccgggtgcga	
721	ggaggcgcg	gggcagtgcc	agccgaagtc	tgccgttgcc	caagaggccc	aggcgtggcg	
781	ctgcccctga	gccggagcgg	acgcccgttg	ggcaggggtc	ctgggcccac	ccgggcagga	
841	cgcgctggac	gagtgaccgt	ggtttctgtg	tgggtgcacc	tgccagaccc	gccgaagaag	
901	ccacctcttt	ggagggtgcg	ctctctggca	cgcgccactc	ccaccatcc	gtgggcccgc	
961	agcaccacgc	gggccccca	tccacatcgc	ggccaccacg	tccctgggac	acgccttgtc	
1021	ccccggtgta	cgccgagacc	aagcacttcc	tctactcctc	aggcgacaag	gagcagctgc	
1081	ggccctcctt	cctactcagc	tctctgaggc	ccagcctgac	tggcgctcgg	aggctcgtgg	
1141	agaccatctt	tctgggttcc	aggccctgga	tgccagggac	tccccgcagg	ttgccccgcc	20
1201	tgccccagcg	ctactggcaa	atgcccgc	tgtttctgga	gctgcttggg	aaccacgcgc	
1261	agtcccccta	cggggtgctc	ctcaagacgc	actgcccgt	gcgagctgcg	gtcaccacag	
1321	cagccggtgt	ctgtgcccgg	gagaagcccc	agggctctgt	ggcgcccc	gaggaggagg	
1381	acacagaccc	ccgtgcctg	gtgcagctgc	tccgccagca	cagcagcccc	tggcaggtgt	
1441	acggcttcgt	gcgggcctgc	ctgcgccggc	tgggtcccc	aggcctctgg	ggctccaggc	
1501	acaacgaacg	ccgcttcctc	aggaacacca	agaagttcat	ctccctgggg	aagcatgcc	
1561	agctctcgct	gcaggagctg	acgtggaaga	tgagcgtgcg	gggctgcgt	tggctgcga	
1621	ggagcccagg	ggttggtgt	gttccggccg	cagagcacccg	tctgcgtgag	gagatcctgg	
1681	ccaagtctct	gacttggtg	atgagtgtgt	acgtcgtcga	gctgctcagg	tctttctttt	
1741	atgtcacgga	gaccagttt	caaaagaaca	ggctcttttt	ctaccggaag	agtgtctgga	
1801	gcaagttaga	aagcattgga	atcacacagc	acttgaagag	ggtgcagctg	cgggagctgt	30
1861	cgaagcaga	ggtcaggcag	catcggaag	ccaggccccgc	cctgctgacg	tccagactcc	
1921	gcttcatccc	caagcctgac	gggctgcggc	cgattgtgaa	catggactac	gtcgtgggag	
1981	ccagaacgtt	ccgcagagaa	aagaggggcg	agcgtctcac	ctcagggtg	aaggcactgt	
2041	tcagcgtgct	caactacgag	cgggcgcggc	gccccggcct	cctgggcgcc	tctgtgctgg	
2101	gcctggacga	tatccacagg	gcctggcgca	ccttcgtgct	gcgtgtgcgg	gcccaggacc	
2161	cgcgcctga	gctgtacttt	gtcaaggtgg	atgtgacggg	cgcgtacgac	accatcccc	
2221	aggacaggct	cacggaggtc	atcgccagca	tcatcaaacc	ccagaacacg	tactgcgtgc	
2281	gtcggtatgc	cgtggtccag	aaggccgccc	atgggcacgt	ccgcaaggcc	ttcaagagcc	
2341	acgtctctac	cttgacagac	ctccagccgt	acatgcgaca	gttcgtggct	cacctgcagg	
2401	agaccagccc	gctgagggat	gccgtcgtca	tcgagcagag	ctcctccctg	aatgaggcca	40
2461	gcagtggcct	cttcgacgtc	ttcctacgt	tcatgtgcca	ccacgccgtg	cgcacaggg	
2521	gcaagtccta	cgtccagtgc	caggggatcc	cgcagggctc	catcctctcc	acgtctctct	
2581	gcagcctgtg	ctacggcgac	atggagaaca	agctgtttgc	ggggattcgg	cgggacgggc	
2641	tgtcctgcg	tttgggtgat	gatttcttgt	tgggtgacacc	tcacctcacc	cacgcgaaaa	
2701	ccttcctcag	gaccctggtc	cgaggtgtcc	ctgagtatgg	ctgcgtgggtg	aacttgcgga	
2761	agacagtgg	gaacttccct	gtagaagacg	aggccctggg	tggcacggct	tttgttcaga	
2821	tgccggccca	cggcctatcc	ccctggtgcg	gcctgctgct	ggatacccg	accctggagg	
2881	tgcagagcga	ctactccagc	tatgcccgga	cctccatcag	agccagtctc	accttcaacc	
2941	gcggcttcaa	ggctgggagg	aacatgcgtc	gcaaactctt	tggggtcttg	cggctgaagt	
3001	gtcacagcct	gtttctggat	ttgcagggtga	acagcctcca	gacggtgtgc	accaacatct	50

3061 acaagatcct cctgctgcag gcgtagcaggt ttacgcacatg tgtgctgcag ctcccatttc
 3121 atcagcaagt ttggaagaac cccacatttt tcctgcgcgt catctctgac acggcctccc
 3181 tctgctactc catcctgaaa gccagaacg cagggatgtc gctgggggcc aaggcgccg
 3241 ccggccctct gccctccgag gccgtgcagt ggctgtgccca ccaagcattc ctgctcaagc
 3301 tgactcgaca ccgtgtcacc tacgtgccac tcctgggggtc actcaggaca gccagacgc
 3361 agctgagtcg gaagctcccg gggacgacgc tgactgccct ggaggccgca gccaacccgg
 3421 cactgccctc agacttcaag accatcctgg actgatggcc acccgccac agccaggccg
 3481 agagcagaca ccagcagccc tgtagcgcg ggctctacgt ccaggaggagg gagggcgccg
 3541 ccacaccag gcccgaccg ctgggagtc gaggcctgag tgagtgtttg gccgaggcct
 3601 gcatgtccgg ctgaaggctg agtgtccggc tgaggcctga gcgagtgtcc agccaagggc
 3661 tgagtgtcca gcacacctgc cgtcttact tccccacagg ctggcgctcg gctccacccc
 3721 agggccagct ttctctacc aggagcccg cttccactcc ccacatagga atagtccatc
 3781 cccagattcg ccattgttca cccctcgccc tgccctcctt tgccttccac cccaccatc
 3841 caggtggaga ccttgagaag gaccctggga gctctgggaa ttggagtga ccaaagggtg
 3901 gccctgtaca caggcgagga cctgcacct ggatgggggt cctgtgggt caaattgggg
 3961 ggaggtgctg tgggagtaaa atactgaata tatgagtttt tcagttttga aaaaaaaaa
 4021 aaaaaaa (配列番号 1 3 3 3)

10

によりコードされる。

【0750】

ある実施形態において、h T E R T は、配列番号 1 3 3 3 の配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % 同一な配列を有する核酸によりコードされる。ある実施形態において、h T E R T は、配列番号 1 3 3 3 の核酸によりコードされる。

20

【0751】

免疫エフェクター細胞（例えば T 細胞）の活性化および拡大

T 細胞などの免疫エフェクター細胞は、一般的に、例えば米国特許第 6, 3 5 2, 6 9 4 号；6, 5 3 4, 0 5 5 号；6, 9 0 5, 6 8 0 号；6, 6 9 2, 9 6 4 号；5, 8 5 8, 3 5 8 号；6, 8 8 7, 4 6 6 号；6, 9 0 5, 6 8 1 号；7, 1 4 4, 5 7 5 号；7, 0 6 7, 3 1 8 号；7, 1 7 2, 8 6 9 号；7, 2 3 2, 5 6 6 号；7, 1 7 5, 8 4 3 号；5, 8 8 3, 2 2 3 号；6, 9 0 5, 8 7 4 号；6, 7 9 7, 5 1 4 号；6, 8 6 7, 0 4 1 号；および米国特許出願公開第 2 0 0 6 0 1 2 1 0 0 5 号で説明されているような方法を使用して活性化させて拡大させてもよい。

30

【0752】

エキスピボで造血幹および前駆細胞を拡大させるための手法は、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第 5, 1 9 9, 9 4 2 号で説明されており、本発明の細胞に適用することができる。他の好適な方法が当業界公知であり、それゆえに本発明は、いかなる特定のエキスピボでの細胞拡大方法にも限定されない。簡単に言えば、エキスピボでの T 細胞の培養および拡大は、(1) 末梢血液の回収物または骨髓外植片から、哺乳動物由来の C D 3 4 + 造血幹および前駆細胞を収集すること；および (2) このような細胞をエキスピボで拡大させることを含み得る。米国特許第 5, 1 9 9, 9 4 2 号で説明されている細胞成長因子に加えて、f l t 3 - L、I L - 1、I L - 3 および c - k i t リガンドなどの他の因子を細胞の培養および拡大に使用することができる。

40

【0753】

一般に、C D 3 / T C R 複合体関連シグナルを刺激する薬剤と、T 細胞の表面上の共刺激分子を刺激するリガンドとを付着させた表面と接触させることによって、免疫エフェクター細胞集団を拡大させることができる。特定には、本明細書で説明したようにして、例えば、表面上に固定された抗 C D 3 抗体もしくはそれらの抗原結合フラグメント、または抗 C D 2 抗体と接触させることによって、またはカルシウムイオノフォアとともにプロテインキナーゼ C 活性化剤（例えば、プリオスタチン）と接触させることによって、T 細胞集団を刺激してもよい。T 細胞表面上のアクセサリ分子の共刺激のために、アクセサリ

50

一分子に結合するリガンドが使用される。例えば、T細胞の増殖を刺激するのに適切な条件下で、T細胞の集団を抗CD3抗体および抗CD28抗体と接触させてもよい。CD4+T細胞またはCD8+T細胞のいずれかの増殖を刺激するため、抗CD3抗体および抗CD28抗体を使用することができる。抗CD28抗体の例としては、9.3、B-T3、XR-CD28 (Diacione, Besancon, France) が挙げられ、これらは、一般的に当業界で知られている他の方法と同様にして使用することができる [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]

。

【0754】

一部の実施形態において、免疫エフェクター細胞（例えば、PBMCまたはT細胞）は、該細胞を抗CD3抗体およびIL2の一方または両方と接触させることによって拡大され、刺激される。実施形態において、細胞は、抗CD3ビーズも抗CD28ビーズも用いずに拡大される。

【0755】

所定の態様において、T細胞に関する一次刺激シグナルおよび共刺激シグナルは、様々なプロトコールによって供給することができる。例えば、各シグナルを供給する薬剤は、溶解した状態かまたは表面にカップリングされていてもよい。表面にカップリングされる場合、薬剤は、同じ表面にカップリングされてもよいし（すなわち、「シス」形成）、または別の表面に（すなわち、「トランス」形成）カップリングされてもよい。その代わりに、1種の薬剤が表面にカップリングされ、他の薬剤が溶解した状態であってもよい。一態様において、共刺激シグナルを供給する薬剤が細胞表面に結合しており、一次活性化シグナルを供給する薬剤が、溶解した状態かまたは表面にカップリングされていてもよい。所定の態様において、両方の薬剤が溶解した状態であってもよい。一態様において、薬剤は、可溶性の形態であってもよく、次いで、Fc受容体を発現する細胞などの表面に、または薬剤に結合すると予想される抗体もしくは他の結合剤に架橋されていてもよい。これに関して、例えば、本発明においてT細胞を活性化して拡大させることに使用することが意図された人工抗原提示細胞（aAPC）に関する米国特許出願公開第20040101519号および20060034810号を参照されたい。

【0756】

一態様において、2種の薬剤が、同じビーズ上、すなわち「シス」、または別のビーズ上、すなわち「トランス」のいずれかでビーズ上に固定される。一例として、一次活性化シグナルを供給する薬剤は、抗CD3抗体またはそれらの抗原結合フラグメントであり、共刺激シグナルを供給する薬剤は、抗CD28抗体またはそれらの抗原結合フラグメントであり、どちらの薬剤も、等しい分子の量で同じビーズにともに固定される。一態様において、CD4+T細胞の拡大およびT細胞成長のために、ビーズに結合した1:1の比率の各抗体が使用される。所定の態様において、1:1の比率を使用して観察された拡大と比較してT細胞拡大の増加が観察されるような、ビーズに結合した抗CD3:CD28抗体の比率が使用される。特定の一態様において、1:1の比率を使用して観察された拡大と比較して、約1から約3倍の増加が観察される。一態様において、ビーズに結合したCD3:CD28抗体の比率は、100:1から1:100の範囲、およびその間の全ての整数値である。一態様において、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の比率は1未満である。所定の態様において、ビーズに結合した抗CD28抗体と抗CD3抗体との比率は、2:1より大きい。特定の一態様において、1:100のCD3:CD28の比率のビーズに結合した抗体が使用される。一態様において、1:75のCD3:CD28の比率のビーズに結合した抗体が使用される。さらなる態様において、1:50のCD3:CD28の比率のビーズに結合した抗体が使用される。一態様において、1:30のCD3:CD28の比率のビーズに結合した抗体が使用される。一態様において、1:10のCD3:CD28の比率のビーズに結合した抗体が使用される。一態様において、1:3のCD3:CD28の比率のビーズに

結合した抗体が使用される。さらなる一態様において、3 : 1のCD3 : CD28の比率のビーズに結合した抗体が使用される。

【0757】

T細胞または他の標的細胞を刺激するために、1 : 500から500 : 1まで、およびその間のあらゆる整数値の粒子と細胞との比率を使用することができる。当業者であれば容易に認識できるように、粒子と細胞との比率は、標的細胞に対する粒度によって決まる可能性がある。例えば、小さいサイズのビーズは、わずかな数の細胞としか結合できないが、より大きいビーズは多くと結合できる。所定の態様において、細胞と粒子との比率は、1 : 100から100 : 1の範囲、およびその間のあらゆる整数値であり、さらなる態様において、この比率は、1 : 9から9 : 1、およびその間のあらゆる整数値を含み、T細胞を刺激するのに使用することができる。抗CD3および抗CD28がカップリングされた粒子とT細胞との、T細胞の刺激をもたらす比率は上述したように様々なであってよいが、所定の好ましい値としては、1 : 100、1 : 50、1 : 40、1 : 30、1 : 20、1 : 10、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、10 : 1、および15 : 1が挙げられ、1つの好ましい比率は、粒子とT細胞とが少なくとも1 : 1である。一態様において、1 : 1またはそれ未満の粒子と細胞との比率が使用される。特定の一態様において、好ましい粒子 : 細胞の比率は、1 : 5である。さらなる態様において、粒子と細胞との比率は、刺激の日に応じて変更することができる。例えば、一態様において、粒子と細胞との比率は、1日目では1 : 1から10 : 1であり、その後、毎日または1日おきに最大10日まで細胞に追加の粒子が添加され、最終的には1 : 1から1 : 10の比率である（添加した日の細胞数に基づく）。特定の一態様において、粒子と細胞との比率は、刺激の1日目には1 : 1であり、刺激の3日目および5日目には1 : 5に調整される。一態様において、粒子は、毎日または1日おきに添加して、1日目に最終的な1 : 1の比率にし、刺激の3日目および5日目に1 : 5にする。一態様において、粒子と細胞との比率は、刺激の1日目には2 : 1であり、刺激の3日目および5日目には1 : 10に調整される。一態様において、粒子は、毎日または1日おきに添加して、1日目に最終的な1 : 1の比率にし、刺激の3日目および5日目に1 : 10にする。当業者であれば、様々な他の比率が本発明で使用するのに適している可能性があることを認識するものと予想される。特定には、比率は、粒度ならびに細胞のサイズおよびタイプに応じて様々なであると予想される。一態様において、使用のための最も典型的な比率は、1日目に1 : 1、2 : 1および3 : 1の付近である。

【0758】

本発明のさらなる態様において、T細胞などの細胞は、薬剤でコーティングされたビーズと組み合わせられ、その後ビーズおよび細胞を分離して、次いで細胞を培養する。代替の態様において、培養の前に薬剤でコーティングしたビーズと細胞とを分離せずに、一緒に培養する。さらなる態様において、まず磁力などの力の適用によってビーズおよび細胞を濃縮し、その結果として細胞表面マーカーのライゲーションを増加させることにより、細胞の刺激を誘導する。

【0759】

一例として、抗CD3および抗CD28が付着している常磁性ビーズ（3 × 28個のビーズ）をT細胞に接触させることによって、細胞表面タンパク質をライゲートさせることができる。一態様において、細胞（例えば、10⁴から10⁹個のT細胞）およびビーズ〔例えば、DYNABEADS（登録商標）M-450CD3/CD28 T常磁性ビーズを1 : 1の比率で〕を、緩衝液、例えばPBS（カルシウムおよびマグネシウムなどの2価カチオンを含まない）中で組み合わせる。ここでも、あらゆる細胞濃度が使用できることは、当業者であれば容易に認識することができる。例えば、標的細胞は、試料中で極めて希少であってもよいし、試料のわずか0.01%しか含んでいなくてもよいし、または試料全体（すなわち、100%）が対象の標的細胞を構成していてもよい。したがって、あらゆる細胞数が本発明の内容に含まれる。所定の態様において、細胞と粒子とが最大限

に接触するように、粒子および細胞と一緒に混合されている容量を有意に減少させること（すなわち、細胞の濃度を増加させること）が望ましい場合がある。例えば、一態様において、細胞約20億個/mlの濃度が使用される。一態様において、1mlあたり1億個より多くの細胞が使用される。さらなる態様において、1mlあたり細胞1000万、1500万、2000万、2500万、3000万、3500万、4000万、4500万、または5000万個の細胞の濃度が使用される。さらなる一態様において、1mlあたり細胞7500万、8000万、8500万、9000万、9500万、または1億個の細胞の濃度が使用される。例えば、一態様において、1mlあたりの細胞約100億個、1mlあたりの細胞90億個、1mlあたりの細胞80億個、1mlあたりの細胞70億個、1mlあたりの細胞60億個、または1mlあたりの細胞50億個、または1mlあたりの細胞20億個の濃度を使用する。一態様において、1mlあたりの細胞1億個超を使用する。さらに、高い細胞濃度の使用は、CD28陰性T細胞などの対象の標的抗原の発現が弱い可能性がある細胞のより効率的な捕獲を可能にする。所定の態様において、このような細胞集団は治療的価値を有する可能性があり、取得が望ましいと予想される。例えば、高濃度の細胞の使用は、通常のCD28発現が比較的弱いCD8+T細胞のより効率的な選択を可能にする。

10

【0760】

一実施形態において、CARをコードする核酸、例えば、本明細書で説明されるCARで形質導入した細胞を、例えば、本明細書で説明される方法により拡大する。一実施形態において、細胞を、培養物中で、数時間（例えば、約2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、18、21時間）～約14日間（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、または14日間）にわたり拡大させる。一実施形態において、細胞を、4～9日間にわたり拡大させる。一実施形態において、細胞を、8日間またはこれ未満、例えば、7、6、または5日間にわたり拡大させる。一実施形態において、細胞、例えば、本明細書で説明されるCAR細胞を、培養物中で、5日間にわたり拡大させると、結果として得られる細胞は、培養物中の同じ培養条件下において9日間にわたり拡大させた同じ細胞より強力である。効力は、例えば、種々のT細胞機能、例えば、増殖、標的細胞の殺滅、サイトカインの産生、活性化、遊走、またはこれらの組合せにより規定することができる。一実施形態において、細胞、例えば、本明細書で説明されるCD19 CAR細胞であって、5日間にわたり拡大させたCD19 CAR細胞は、抗原刺激時に、培養物中の同じ培養条件下において9日間にわたり拡大させた同じ細胞と比較して、細胞倍加の少なくとも1、2、3、または4倍の増加を示す。一実施形態において、細胞、例えば、本明細書で説明されるCARを発現する細胞を、培養物中で、5日間にわたり拡大させると、結果として得られる細胞は、培養物中の同じ培養条件下において9日間にわたり拡大させた同じ細胞と比較して、高度な炎症促進性サイトカインの産生、例えば、IFN- γ レベルおよび/またはGM-CSFレベルを呈示する。一実施形態において、細胞、例えば、本明細書で説明されるCAR細胞であって、5日間にわたり拡大させたCAR細胞は、培養物中の同じ培養条件下において9日間にわたり拡大させた同じ細胞と比較して、炎症促進性サイトカインの産生、例えば、IFN- γ レベルおよび/またはGM-CSFレベルの、pg/ml単位で、少なくとも1、2、3、4、5、10倍、またはこれを超える増加を示す。

20

30

40

【0761】

本発明の一態様において、混合物は、数時間（約3時間）から約14日間、またはその間の1時間ごとのあらゆる整数値の時間、培養されてもよい。一態様において、混合物は、21日間培養されてもよい。本発明の一態様において、ビーズおよびT細胞は、約8日間、一緒に培養される。一態様において、ビーズおよびT細胞は、2～3日間、一緒に培養される。

【0762】

またT細胞の培養時間が60日間またはそれより長くなるように、数サイクルの刺激が望ましい場合がある。T細胞培養に適切な条件としては、血清（例えば、ウシ胎児または

50

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 、およびTNF- α などの増殖および生存能力に必要な因子、または当業者公知の細胞成長に関する他のあらゆる添加剤を含有していてもよい適切な培地 [例えば、最小必須培地またはRPMI培地1640または、X-vivo 15、(Lonza)] が挙げられる。細胞成長に関する他の添加剤としては、これらに限定されないが、界面活性剤、プラスマネート、ならびにN-アセチルシステインおよび2-メルカプトエタノールなどの還元剤が挙げられる。培地としては、アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム、およびビタミンが添加され、無血清であるか、または適切な量の血清 (または血漿) または規定された一連のホルモン、および/またはT細胞の成長および拡大に十分な量のサイトカインが補充されたかのいずれかの、RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-Vivo 15、およびX-Vivo 20、Optimizerを挙げることができる。抗生物質、例えばペニシリンおよびストレプトマイシンは、実験的培養の場合のみに包含され、対象に注入しようとする細胞の培養の場合は包含されない。標的細胞は、例えば、適切な温度 (例えば、37℃) および雰囲気 (例えば、空気および5%CO₂) などの成長を支持するのに必要な条件下で維持される。

10

【0763】

一実施形態において、細胞を、1つまたは複数のインターロイキンを含む、適切な培地 (例えば、本明細書で説明される培地) 中で拡大させ、これにより、14日間の拡大期間にわたり、例えば、フローサイトメトリーなど、本明細書で説明される方法により測定される通り、細胞の、少なくとも200倍 (例えば、200倍、250倍、300倍、350倍) の増加を結果としてもたらす。一実施形態において、細胞を、IL-15および/またはIL-7 (例えば、IL-15およびIL-7) の存在下において拡大させる。

20

【0764】

いくつかの実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現細胞 (例えばCD4+T細胞またはCD8+T細胞などのT細胞) を、CAR発現細胞の製造時に、例えば、エクスピボにおいて、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受容体アルファ (IL-15Ra) ポリペプチド、またはIL-15ポリペプチドおよびIL-15Raポリペプチド、例えば、hetIL-15の両方の組合せを含む組成物と接触させる。実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、CAR発現細胞の製造時に、例えば、エクスピボにおいて、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、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、CAR発現細胞の製造時に、例えば、エクスピボにおいて、IL-15ポリペプチドおよびIL-15Raポリペプチドの両方の組合せを含む組成物と接触させる。実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、CAR発現細胞の製造時に、例えば、エクスピボにおいて、hetIL-15を含む組成物と接触させる。

30

【0765】

一実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現細胞 (例えばT細胞またはNK細胞) を、エクスピボにおける拡大時に、hetIL-15を含む組成物と接触させる。ある実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、エクスピボにおける拡大時に、IL-15ポリペプチドを含む組成物と接触させる。ある実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、エクスピボにおける拡大時に、IL-15ポリペプチドおよびIL-15Raポリペプチドの両方を含む組成物と接触させる。一実施形態において、接触させることは、リンパ球亜集団、例えば、CD8+T細胞の生存および増殖を結果としてもたらす。

40

【0766】

ある実施形態において、本明細書で開示される作製方法は、免疫エフェクター細胞 (例えば、T細胞またはNK細胞) の集団と、テロメラーゼサブユニット、例えばhTERTをコードする核酸とを接触させることをさらに含む。テロメラーゼサブユニットをコードする核酸は、DNAであってもよい。

50

【0767】

様々な刺激時間に晒されたT細胞は、異なる特徴を示す可能性がある。例えば、典型的な血液またはアフエレーシスで得られた末梢血単核細胞産物は、細胞毒性またはサプレッサー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。エクスピボでのCD3およびCD28受容体を刺激することによるT細胞拡大は、約8～9日目以前には主としてTH細胞からなるT細胞集団を産生するが、約8～9日目の後、T細胞の集団は、よりいっそう多くのTC細胞集団を含む。したがって、処置目的に応じて、主としてTH細胞を含むT細胞集団を対象に注入することが有利な場合がある。同様に、TC細胞の抗原特異的なサブセットが単離された場合、このようなサブセットは、このサブセットをより高度に拡大させるのに有益な場合がある。

10

【0768】

さらに、CD4およびCD8マーカーに加えて、細胞拡大プロセスの経過中、他の表現型マーカーが有意に、ただし大部分は再生可能に変化する。したがって、このような再現性は、活性化されたT細胞産物を特定の目的に合わせる能力を可能にする。

【0769】

CAR、例えばCD19 CARが構築されたら、これらに限定されないが、抗原刺激後にT細胞を拡大させて再刺激の非存在下でT細胞の拡大を維持する能力、および適切なインビトロおよび動物モデルにおける抗癌活性などの分子の活性を評価するために、様々なアッセイを使用することができる。CAR、例えばCD19 CARの作用を評価するためのアッセイは、以下のさらなる詳細で説明される。

20

【0770】

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、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる2015年3月13日に出願された国際出願WO2015/142675の段落695において説明されているように、単量体および二量体の存在を検出するために使用することができる。

【0771】

インビトロにおける抗原刺激後のCAR⁺T細胞拡大は、フローサイトメトリーによって測定することができる。例えば、CD4⁺およびCD8⁺T細胞の混合物を、αCD3/αCD28ビーズで刺激し、続いて分析しようとするプロモーターの制御下でGFPを発現するレンチウイルスベクターを移入させる。典型的なプロモーターとしては、CMV

30

IE遺伝子、EF-1α、ユビキチンC、またはホスホグリセロキナーゼ（PGK）プロモーターが挙げられる。培養から6日目に、CD4⁺および/またはCD8⁺T細胞サブセットにおいてGFP蛍光をフローサイトメトリーによって評価する。例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)を参照されたい。その代わりに、0日目に、CD4⁺およびCD8⁺T細胞の混合物を、αCD3/αCD28でコーティングされた磁気ビーズで刺激し、1日目に、2Aリボゾームスキッピング配列（ribosomal skipping sequence）を使用してeGFPとともにCARを発現するパシストロン性のレンチウイルスベクターを使用して、CARで形質導入する。培養物は、洗浄の後、CD19⁺K562細胞（K562-CD19）、野生型K562細胞（K562野生型）、または抗CD3および抗CD28抗体の存在下でhCD32および4-1BBLを発現するK562細胞（K562-BBL-3/28）のいずれかで再刺激する。1日おきに外因性IL-2を100 IU/mlで培養に添加する。GFP⁺T細胞は、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って数えられる。例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464(2009)を参照されたい。

40

【0772】

再刺激の非存在下において持続されるCAR⁺T細胞拡大もまた、測定することができる。例えば、[Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)]を参照されたい。略述すると、0日目における、αCD3/αCD28でコーティングされた磁気ビーズによる刺激、および1日目における、表示のCARの形質導入に続き、Coulter Multisizer粒子カウンター、Nexcelom Cellometer

50

Vision、またはMillipore Scepterを使用して、培養の8日目に、平均T細胞容量（f1）を測定する。

【0773】

CAR発現細胞活性を測定するために、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる2015年3月13日に出願された国際出願WO2015/142675の段落698において説明されているように、動物モデルもまた使用することができる。

【0774】

用量依存的CAR処置応答は、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる2015年3月13日に出願された国際出願WO2015/142675の段落699において説明されているように、評価することができる。細胞増殖およびサイトカイン産生の査定は、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる2015年3月13日に出願された国際出願WO2015/142675の段落700において説明されているように、すでに説明されている。細胞毒性は、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる2015年3月13日に出願された国際出願WO2015/142675の段落701において説明されているように、標準的な⁵¹Cr放出アッセイによって査定することができる。腫瘍を有する動物モデルにおけるCARの特異的なトラフィックおよび増殖を評価するために、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる2015年3月13日に出願された国際出願WO2015/142675の段落702において説明されているように、イメージング技術を使用することができる。

【0775】

また、本明細書における実施例のセクションで説明されているアッセイはもちろん当業界公知のアッセイも包含する他のアッセイも、本明細書で説明されるCARを評価するために使用することができる。

【0776】

代替的に、または本明細書で開示された方法と組み合わせて、CAR発現細胞の検出および／または定量化〔例えば、インビトロまたはインビボ（例えば、臨床モニタリング）〕；免疫細胞の拡大および／もしくは活性化；ならびに／またはCARリガンドの使用を伴う、CAR特異的選択の1つまたは複数のための方法および組成物も開示される。例示的な一実施形態において、CARリガンドは、CAR分子に結合する抗体、例えば、CARの細胞外抗原結合ドメインに結合する抗体（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；または細胞外結合ドメインの定常領域に結合する抗体）である。他の実施形態において、CARリガンドは、CAR抗原分子（例えば、本明細書で説明されるCAR抗原分子）である。

【0777】

一態様において、CAR発現細胞を検出および／または定量化するための方法が開示される。例えば、CARリガンドを使用して、インビトロまたはインビボにおいて、CAR発現細胞を検出および／または定量化する（例えば、患者におけるCAR発現細胞または患者への投与の臨床モニタリングを行う）ことができる。方法は、

CARリガンド（適宜、標識されたCARリガンド、例えば、タグ、ビーズ、放射性標識または蛍光標識を含むCARリガンド）を用意することと；

CAR発現細胞を得ること（例えば、製造用試料または臨床試料など、CAR発現細胞を含有する試料を得ること）と；

結合が生じる条件下において、CAR発現細胞を、CARリガンドと接触させ、これにより、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発現細胞の、CARリガンドとの結合は、FACS、ELISAなど、標準的な技術を使用して検出することができる。

【0778】

別の態様において、細胞（例えば、免疫エフェクター細胞）を拡大および／または活性化させる方法が開示される。方法は、

CAR発現細胞（例えば、第一のCAR発現細胞またはCARを一過性に発現する細胞

10

20

30

40

50

）を用意することと；

前記CAR発現細胞を、CARリガンド、例えば、本明細書で説明されるCARリガンドと、免疫細胞の拡大および／または増殖が生じる条件下において接触させ、これにより、活性化および／または拡大させた細胞集団をもたらすこととを含む。

【0779】

ある特定の実施形態において、CARリガンドは、存在する（例えば、基質、例えば、天然では存在しない基質に固定化するかまたは接合させる）。いくつかの実施形態において、基質は、非細胞性基質である。非細胞性基質は、例えば、プレート（例えば、マイクロ滴定プレート）、膜（例えば、ニトロセルロース膜）、マトリックス、チップ、また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（例えば、基質表面上）に存在する。CARリガンドは、基質に固定化することもでき、接合させることもでき、共有結合的または非共有結合的に会合させる（例えば、架橋する）こともできる。一実施形態において、CARリガンドは、ビーズに接合させる（例えば、共有結合的に接合させる）ことができる。前述の実施形態において、免疫細胞集団は、インビトロまたはエクスピボにおいて拡大させることができる。方法はさらに、例えば、本明細書で説明される方法のいずれかを使用して、CAR分子のリガンドの存在下において、免疫細胞の集団を培養することを含み得る。

10

【0780】

他の実施形態において、細胞を拡大および／または活性化させる方法は、第二の刺激分子、例えば、CD28の添加をさらに含む。例えば、CARリガンドおよび第二の刺激分子を、基質、例えば、1つまたは複数のビーズに固定化し、これにより、細胞の拡大および／または活性化を増加させることができる。

20

【0781】

他の実施形態において、CAR発現細胞について選択または濃縮する方法が提供される。方法は、CAR発現細胞を、本明細書で説明されるCARリガンドと接触させることと；CARリガンドの結合に基づき、細胞を選択することとを含む。

【0782】

さらに他の実施形態において、CAR発現細胞を枯渇させる（例えば、低減し、かつ／または死滅させる）ための方法が提供される。方法は、CAR発現細胞を、本明細書で説明されるCARリガンドと接触させることと；CARリガンドの結合に基づき、細胞を標的とし、これにより、CAR発現細胞の数を低減し、かつ／またはこれらを死滅させることとを含む。一実施形態において、CARリガンドを、毒性薬剤（例えば、毒素または細胞除去薬）にカップリングさせることができる。別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またはADC活性を引き起こし得る。

30

【0783】

本明細書で開示された方法において使用し得る例示的な抗CAR抗体は、例えば、その内容が参照により組み入れられる、WO2014/190273および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において説明されている。いくつかの態様および実施形態において、本明細書における組成物および方法を、例えば、その内容が参照によりそれらの全体において本明細書に組み入れられる、2015年7月31日に出版されたPCT/US2015/043219において説明されている通り、T細胞の特異的なサブセットについて最適化する。いくつかの実施形態において、T細胞の最適化されたサブセットは、対照T細胞、例えば、同じコンストラクトを発現する、異なるタイプのT細胞（例えば、CD8+TまたはCD4+T）と比較して、持続性の増強を提示する。

40

【0784】

いくつかの実施形態において、CD4+T細胞は、本明細書で説明されるCARであっ

50

て、CD4⁺T細胞に適する細胞内シグナル伝達ドメイン（例えば、CD4⁺T細胞について最適化された細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、CD4⁺T細胞における持続性の増強をもたらす細胞内シグナル伝達ドメイン）、例えば、ICOSドメインを含むCARを含む。いくつかの実施形態において、CD8⁺T細胞は、本明細書で説明されるCARであって、CD8⁺T細胞に適する細胞内シグナル伝達ドメイン（例えば、CD8⁺T細胞について最適化された細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、CD8⁺T細胞における持続性の増強をもたらす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、またはICOSドメイン以外の、別の共刺激ドメインを含むCARを含む。いくつかの実施形態において、本明細書で説明されるCARは、本明細書で説明される抗原結合ドメイン、例えば、CARは、抗原結合ドメインを含む。

10

【0785】

ある態様において、本明細書では、対象、例えば、がんを有する対象を処置する方法が説明される。方法は、前記対象に、

1) CAR (CARCD4⁺)を含むCD4⁺T細胞であって、

抗原結合ドメイン、例えば、本明細書で説明される抗原結合ドメインと；

膜貫通ドメインと；

細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、第一の共刺激ドメイン、例えば、ICOSドメインと

を含むCD4⁺T細胞；および

2) CAR (CARCD8⁺)を含むCD8⁺T細胞であって、

抗原結合ドメイン、例えば、本明細書で説明される抗原結合ドメインと；

膜貫通ドメインと；

細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、第二の共刺激ドメイン、例えば、4-1BBドメイン、CD28ドメイン、またはICOSドメイン以外の、別の共刺激ドメインとを含み、

CARCD4⁺とCARCD8⁺とが互いに異なる、CD8⁺T細胞

の有効量を投与することを含む。

【0786】

方法はさらに、

3) CAR (第二のCARCD8⁺)を含む、第二のCD8⁺T細胞であって、

抗原結合ドメイン、例えば、本明細書で説明される抗原結合ドメインと；

膜貫通ドメインと；

細胞内シグナル伝達ドメインと

を含み、第二のCARCD8⁺が、細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、CARCD8⁺において存在しない共刺激シグナル伝達ドメインを含み、適宜、ICOSシグナル伝達ドメインを含まない、第二のCD8⁺T細胞

を投与することを含んでもよい。

【0787】

製造／産生方法

一部の実施形態において、本明細書で開示される方法は、細胞（例えば、本明細書で説明されるような免疫エフェクター細胞、例えば、トランケートされたPGK1プロモーターによって駆動されるCARを発現する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によってCAR発現細胞（例えば、CD19CAR発現細胞）を低減させること（例えば、枯渇させること）をさらに含む。このようなT細胞枯渇剤は、CAR発現細胞（例えば、CD19CAR発現細胞）を有効に枯渇させて毒性を減弱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発現細胞を、本明細書における方法に従って製造し、例えば、本明細書における方法に従ってアッセイを（例えば、トランスフェクションまたは形質導入の前または後に）行った。

【0788】

20

30

40

50

一部の実施形態において、T細胞枯渇剤は、本明細書で説明される細胞、例えば免疫エフェクター細胞集団の投与の1、2、3、4または5週間後に投与される。

【0789】

一実施形態において、T細胞枯渇剤は、例えば、抗体依存性細胞媒介細胞毒性（ADCC）および／または補体誘導性の細胞死を誘導することによって、CAR発現細胞を枯渇させる薬剤である。例えば、本明細書で説明されるCAR発現細胞はまた、細胞死、例えばADCCまたは補体誘導性の細胞死を誘導することが可能な分子によって認識される抗原（例えば、標的抗原）を発現する可能性がある。例えば、本明細書で説明されるCAR発現細胞はまた、抗体または抗体フラグメントによって標的化される可能性がある標的タンパク質（例えば、受容体）を発現する可能性もある。このような標的タンパク質の例としては、これらに限定されないが、EPCAM、VEGFR、インテグリン（例えば、インテグリン $\alpha v \beta 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha I 3 / 4 \beta 3$ 、 $\alpha 4 \beta 7$ 、 $\alpha 5 \beta 1$ 、 $\alpha v \beta 3$ 、 αv ）、TNF受容体スーパー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、CD23/1gE受容体、CD25、CD28、CD30、CD33、CD38、CD40、CD41、CD44、CD51、CD52、CD62L、CD74、CD80、CD125、CD147/ベシジン、CD152/CTLA-4、CD154/CD40L、CD195/CCR5、CD319/SLAMF7、およびEGFR、ならびにそれらのトランケートされたバージョン（例えば、1つまたは複数の細胞外のエピトープを保存するが細胞質内ドメイン内の1つまたは複数の領域が欠失したバージョン）が挙げられる。

【0790】

一部の実施形態において、CAR発現細胞は、CARおよび標的タンパク質を共発現し、例えば、標的タンパク質を自然に発現し、または標的タンパク質を発現するように加工される。例えば、細胞、例えば免疫エフェクター細胞集団は、CAR核酸（例えば、本明細書で説明されるようなCAR核酸）および標的タンパク質をコードする核酸を含む核酸（例えば、ベクター）を包含し得る。

【0791】

一実施形態において、T細胞枯渇剤は、CD52阻害剤、例えば、抗CD52抗体分子、例えばアレムツズマブである。

【0792】

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集団は、本明細書で説明されるようなCAR分子（例えば、CD19CAR）、および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。一実施形態において、標的タンパク質は、CD20である。標的タンパク質がCD20である実施形態において、T細胞枯渇剤は、抗CD20抗体、例えばリツキシマブである。

【0793】

上述の方法のさらなる実施形態において、方法は、細胞、例えば造血幹細胞、または骨髄を、哺乳動物に移植することをさらに含む。

【0794】

別の態様において、本発明は、細胞移植の前に哺乳動物を調整する方法を特徴とする。方法は、CAR核酸またはポリペプチド、例えばCD19 CAR核酸またはポリペプチド、を含む細胞の有効量を哺乳動物に投与することを包含する。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、または骨髄移植である。他の実施形態において、細胞移植前の対象の調整は、対象における標的を発現する細胞、例えば、CD19を発現する正常細胞またはCD19を発現するがん細胞の数を低減させることを含む。

【0795】

バイオポリマーのデリバリー法

いくつかの実施形態において、本明細書で開示された、1つまたは複数のCAR発現細胞を、対象に、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を介して、投与またはデリバリーすることができる。バイオポリマー足場は、本明細書で説明されるCAR発現細胞のデリバリー、拡大、および／または分散を支援または増強し得る。バイオポリマー足場は、天然に存在する場合もあり、合成の場合もある、生体適合性ポリマー（例えば、炎症応答または免疫応答を実質的に誘導しない）および／または生体分解性ポリマーを含む。典型的なバイオポリマーは、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる2015年3月13日に出願された国際出願WO2015/142675の段落1004～1006において説明されている。

10

【0796】

治療的適用

CD19関連疾患および／または障害

一態様において、本発明は、CD19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、がんの一部がCD19に関して陰性であり、がんの一部がCD19に関して陽性である疾患を処置する方法を提供する。例えば、本発明の方法および組成物は、CD19の発現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、この場合、CD19発現に関する処置、例えばCD19 CARでの処置を受けたことがある対象は、CD19の発現に関連する疾患を呈示する。

【0797】

別の態様において、本発明は、B細胞抗原、例えばCD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3またはROR1の1つまたは複数、の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B細胞抗原に関して陰性であり、腫瘍の一部がB細胞抗原に関して陽性である疾患を処置する方法を提供する。例えば、本発明の組成物および方法は、B細胞抗原の発現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、この場合、B細胞抗原の発現に関する処置、例えばB細胞抗原を標的とするCARでの処置を受けたことがある対象は、B細胞抗原の発現に関連する疾患を呈示する。第三の態様において、本発明は、B細胞抗原の発現に関連する、例えば、CD19および1つまたは複数の他のB細胞抗原の発現に関連する、疾患を処置する方法を提供する。

20

30

【0798】

一態様において、本発明は、哺乳動物細胞、例えばT細胞またはNK細胞における発現のためにプロモーターに機能するように連結したCD19 CARを含むベクターに関する。一態様において、本発明は、CD19を発現するがんの処置に使用するためのCD19 CARを発現する組換え細胞、例えばT細胞またはNK細胞を提供し、ここで前記CD19 CARを発現する組換えT細胞は、CD19 CARTと称される。一態様において、本明細書で説明されるCD19 CARTは、その表面上で発現される少なくとも1つのCD19 CARとがん細胞を接触させることが可能であり、その結果、前記CARTが、前記がん細胞を標的とし、前記がんの成長を阻害する。

【0799】

一態様において、本発明は、CD22を発現する腫瘍の処置にCD19 CARTSと組み合わせて使用するための、CD22 CARを発現するCD22 CART、例えばT細胞であるCD22阻害剤に関し、ここで前記CD22 CARを発現する組換えT細胞は、CD22 CARTと称される。一態様において、本明細書で説明されるCD22 CARTは、その表面上で発現される少なくとも1つのCD22 CARと腫瘍細胞を接触させることが可能であり、その結果、前記CD22 CARTが、腫瘍細胞を標的とし、腫瘍の成長を阻害する。

40

【0800】

一態様において、本発明は、CD19を発現するがん細胞の成長を阻害する方法であって、前記がん細胞を、記載のCD19 CAR発現細胞、例えばCD19 CART細胞

50

、および1つまたは複数のCAR発現細胞、例えば本明細書で説明されるようなものと接触させることを含み、その結果、前記CAR Tが抗原に応答して活性化され、前記がん細胞を標的とし、前記がんの成長が阻害される、方法に関する。CD19 CAR発現細胞、例えばT細胞は、B細胞阻害剤、例えば本明細書で説明されるB細胞阻害剤と組み合わせて投与される。

【0801】

一部の実施形態において、CD19阻害剤（例えば、CD19に結合するCAR分子、例えば本明細書で説明されるCD19に結合するCAR分子、を発現する1つまたは複数の細胞）およびB細胞阻害剤（例えば、CD10、CD19、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3またはROR1の1つまたは複数の阻害剤、例えば本明細書で説明されるようなもの）は、同時に投与される。一部の実施形態において、CD19阻害剤およびB細胞阻害剤は、対象に同時に注入され、例えば、同じ注入容積で混合される。他の実施形態において、同時投与は、CD19阻害剤およびB細胞阻害剤の別々の投与を含み、例えば、各々の投与が所定の時間間隔以内（例えば、互いに15、30または45分以内）に開始される。

10

【0802】

一部の実施形態において、CD19阻害剤のデリバリーの開始とB細胞阻害剤のデリバリーの開始は、互いに1、2、3、4、6、12、18もしくは24時間以内、または互いに1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、60、80もしくは100日以内である。一部の実施形態において、CD19阻害剤のデリバリーの終了とB細胞阻害剤のデリバリーの終了は、互いに1、2、3、4、6、12、18もしくは24時間以内、または互いに1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、60、80もしくは100日以内である。一部の実施形態において、CD19阻害剤のデリバリー（例えば、注入）とB細胞阻害剤のデリバリー（例えば、注入）終了の間の投与に関する重複は、少なくとも1、2、3、4、5、10、15、20、25、30または45分である。

20

【0803】

一部の実施形態において、B細胞阻害剤は、CD19に結合するCAR分子を発現する1つまたは複数の細胞が対象において存在する（例えば、拡大されている）間に投与される。一部の実施形態において、CD19阻害剤は、CD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179bまたはCD79aの1つまたは複数の結合するCAR分子を発現する1種または複数の細胞が対象において存在する（例えば、拡大されている）間に投与される。

30

【0804】

本発明は、キメラ抗原受容体（CAR）を発現するようにT細胞を遺伝子改変し、それを必要とするレシピエントにそのCAR T細胞を注入する、細胞療法のタイプを（とりわけ）包含する。注入される細胞は、レシピエントにおける腫瘍細胞を死滅させることが可能である。抗体療法と異なり、CARで改変されたT細胞は、インビボにおける複製が可能であり、持続的な腫瘍制御につながり得る、長期にわたる持続性を結果としてもたらす。種々の態様において、患者に投与されたT細胞、またはそれらの子孫細胞は、T細胞の、患者への投与後、少なくとも4カ月間、5カ月間、6カ月間、7カ月間、8カ月間、9カ月間、10カ月間、11カ月間、12カ月間、13カ月間、14カ月間、15カ月間、16カ月間、17カ月間、18カ月間、19カ月間、20カ月間、21カ月間、22カ月間、23カ月間、2年間、3年間、4年間、または5年間にわたり、患者において存続する。

40

【0805】

本発明は、例えば、インビトロで転写されるRNAにより、キメラ抗原受容体（CAR）を一過性に発現するように免疫エフェクター細胞、例えば、NK細胞またはT細胞を改変し、それを必要とするレシピエントに、CAR発現（例えば、CAR T）細胞を注入する、細胞療法のタイプも包含する。注入される細胞は、レシピエントにおけるがん細胞

50

を死滅させることが可能である。したがって、様々な態様において、患者に投与された C A R 発現細胞、例えば T 細胞は、患者への該 C A R 発現細胞、例えば T 細胞の投与後、1 カ月間未満、例えば、3 週間、2 週間、1 週間にわたり存在する。

【0806】

いかなる特定の理論にも縛られるつもりはないが、C A R で改変された T 細胞により惹起される抗がん免疫応答は、能動的免疫応答である場合もあり、受動的免疫応答である場合もあり、代替的に、間接的免疫応答と対比される直接的免疫応答に起因する場合もある。一態様において、C A R (例えば、C D 19-C A R) が形質導入された T 細胞は、標的抗原 (例えば C D 19) を発現するヒトがん細胞に応答して、特異的な炎症促進性サイトカインの分泌および強力な細胞溶解活性を呈示し、可溶性標的抗原による阻害に抵抗し、バースタンダー死滅を媒介し、確立されたヒトがんの退縮を媒介する。例えば、標的抗原を発現するがんの不均質場内の無抗原がん細胞は、標的抗原によりリダイレクトされた T 細胞であって、隣接する抗原陽性がん細胞に対してあらかじめ反応している T 細胞による間接的破壊を受けやすい可能性がある。

10

【0807】

一態様において、本発明の C A R で改変された細胞、例えば完全ヒト C A R T 細胞は、エキスビボでの免疫化のためのワクチンのタイプであってもよく、および／または哺乳動物におけるインビボ治療のためのワクチンのタイプであってもよい。一態様において、哺乳動物はヒトである。

【0808】

エキスビボでの免疫化に関して、哺乳動物に細胞を投与する前に、インビトロで、以下：i) 細胞の拡大、i i) 細胞への C A R をコードする核酸の導入、または i i i) 細胞の低温保存のうち少なくとも 1 つが行われる。

20

【0809】

エキスビボの手法は当業界周知であり、以下でより詳細に論じられる。簡単に言えば、哺乳動物 (例えば、ヒト) から細胞を単離し、本明細書で開示された C A R を発現するベクターで遺伝子改変する (すなわち、インビトロで形質導入またはトランスフェクトする)。C A R で改変された細胞を哺乳動物のレシピエントに投与することによって、治療的利益をもたらすことができる。哺乳動物のレシピエントはヒトであってもよいし、C A R で改変された細胞はレシピエントにとって自己であってもよい。その代わりに、細胞は、レシピエントにとって同種異系、同系または異種であってもよい。

30

【0810】

エキスビボで造血幹および前駆細胞を拡大させる手法は、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第 5, 199, 942 号で説明されており、本発明の細胞に適用することができる。他の好適な方法が当業界公知であり、それゆえに本発明は、いかなる特定のエキスビボでの細胞拡大方法にも限定されない。簡単に言えば、エキスビボでの T 細胞の培養および拡大は、(1) 末梢血液の回収物または骨髓外植片から、哺乳動物由来の C D 34+造血幹および前駆細胞を収集すること；および (2) このような細胞をエキスビボで拡大させることを含む得る。米国特許第 5, 199, 942 号で説明されている細胞成長因子に加えて、f l t 3-L、I L-1、I L-3 および c-k i t リガンドなどの他の因子を細胞の培養および拡大に使用することができる。

40

【0811】

エキスビボでの免疫化に関して細胞ベースのワクチンを使用することに加えて、本明細書で説明される方法には、患者における抗原に対して向けられる免疫反応を惹起するためのインビボでの免疫化のための、組成物および方法も包含される。

【0812】

一般的に、本明細書で説明されるように活性化され拡大された細胞は、免疫不全の個体において生じる疾患の処置および予防に利用することができる。特に、本明細書で説明される C A R 発現細胞は、1 つまたは複数の B 細胞抗原の発現に関連する疾患、障害および状態の処置に使用される。ある特定の態様において、細胞は、1 つまたは複数の B 細胞抗

50

原の発現に関連する疾患、障害および状態を発症するリスクがある患者の処置に使用される。したがって、本発明は、B細胞抗原の発現に関連する疾患、障害および状態の処置または予防のための方法であって、それを必要とする対象に、本明細書で説明されるCD19 CAR発現細胞の治療有効量を、本明細書で説明されるB細胞阻害剤の1つまたは複数と組み合わせて投与することを含む方法を（とりわけ）提供する。

【0813】

本発明は、増殖を阻害するためのまたはCD19発現細胞集団を低減させるための方法であって、CD19発現細胞含む細胞集団を、該CD19発現細胞と結合する本明細書で説明される抗CD19 CAR発現細胞と接触させること、および前記CD19発現細胞集団を本明細書で説明されるB細胞阻害剤の1つまたは複数と接触させることを含む方法も提供する。特異的な態様において、本発明は、CD19を発現するがん細胞の増殖を阻害するためのまたはそのようながん細胞の集団を低減させるための方法であって、CD19発現がん細胞集団を、CD19発現細胞と結合する本明細書で説明される抗CD19 CAR発現細胞と接触させること、および前記CD19発現細胞を本明細書で説明される1つまたは複数のB細胞と接触させることを含む方法を提供する。一態様において、本発明は、CD19を発現するがん細胞の増殖を阻害するためのまたはそのようながん細胞の集団を低減させるための方法であって、CD19発現がん細胞集団を、CD19発現細胞と結合する本明細書で説明される抗CD19 CAR発現細胞と接触させること、および前記CD19発現細胞を本明細書で説明される1つまたは複数のB細胞と接触させることを含む方法も提供する。ある特定の態様において、本明細書で説明される抗CD19 CAR発現細胞と本明細書で説明される1つまたは複数のB細胞の組合せは、細胞および／またはがん細胞の量、数、数量またはパーセンテージを、CD19発現細胞に関連する血液がんまたは別のがんを有する対象またはこれらのがんの動物モデルにおいて、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%、または少なくとも99%低減させる。一態様において、対象はヒトである。

【0814】

本発明は、増殖を阻害するためのまたはCD19発現細胞および第二のB細胞抗原を発現する細胞を含む細胞集団を低減させるための方法も提供する。一態様において、CD19および第二のB細胞抗原は、集団内の同じ細胞によって発現される。別の態様において、CD19および第二のB細胞抗原は、集団内の細胞の異なるサブセットによって発現される。別の態様において、CD19および第二のB細胞抗原は、集団内の細胞の重複するサブセットによって発現され、したがって、CD19および第二のB細胞抗原を発現する細胞もあり、CD19を発現する細胞もあり、第二のB細胞抗原を発現する細胞もある。

【0815】

本発明は、増殖を阻害するためのまたはCD19および第二のB細胞抗原を発現する細胞集団を低減させるための方法であって、(i) CD19発現細胞を含む細胞の集団を、CD19発現細胞と結合する本明細書で説明される抗CD19 CAR発現細胞と接触させること、および(ii) 第二のB細胞抗原発現細胞を、第二のB細胞抗原発現細胞と結合する本明細書で説明される第二のCAR発現細胞と接触させることを含む方法も提供する。特異的な態様において、本発明は、CD19および第二のB細胞抗原を発現するがん細胞の増殖を阻害するためのまたはそのようながん細胞の集団を低減させるための方法であって、(i) CD19発現がん細胞集団を、CD19発現細胞と結合する本明細書で説明される抗CD19 CAR発現細胞と接触させること、および(ii) 第二のB細胞抗原発現細胞集団を、第二のB細胞抗原を発現する細胞と結合する本明細書で説明される第二のCAR発現細胞と接触させることを含む方法も提供する。一態様において、本発明は、CD19および／もしくは第二のB細胞抗原を発現するがん細胞の増殖を阻害するためのまたはそのようながん細胞の集団を低減させるための方法であって、(i) CD19発現がん細胞集団を、CD19発現細胞と結合する本明細書で説明される抗CD19 CAR発現細胞と接触させること、および(ii) 第二のB細胞抗原発現細胞集団を、第二の

B細胞抗原を発現する細胞と結合する本明細書で説明される第二のCAR発現細胞と接触させることを含む方法を提供する。ある特定の態様において、本明細書で説明される抗CD19 CAR発現細胞と本明細書で説明される第二のCAR発現細胞の組合せは、細胞および／またはがん細胞の量、数、数量またはパーセンテージを、CD19および／または第二のB細胞抗原を発現する細胞に関連する血液がんまたは別のがんを有する対象またはこれらのがんの動物モデルにおいて、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%、または少なくとも99%低減させる。一態様において、対象はヒトである。

【0816】

10

本発明は、CD19発現細胞に関連する疾患（例えば、CD19を発現する血液がんまたは非定型的ながん）を予防、処置および／または管理するための方法であって、それを必要とする対象に、CD19発現細胞と結合する抗CD19 CAR発現細胞を投与すること、および本明細書で説明されるものまたはB細胞阻害剤を投与することを含む方法も提供する。一態様において、対象はヒトである。CD19発現細胞に関連する障害の非限定的な例としては、自己免疫障害（例えば、狼瘡）、炎症性疾患（例えば、アレルギーおよび喘息）およびがん（例えば、CD19を発現する血液がんまたは非定型的ながん）が挙げられる。

【0817】

本発明は、CD19および／または第二のB細胞抗原を発現する細胞に関連する疾患（例えば、CD19および／または第二のB細胞抗原を発現する血液がんまたは非定型的ながん）を予防、処置および／または管理するための方法であって、それを必要とする対象に、CD19発現細胞およびB細胞阻害剤と結合する抗CD19 CAR発現細胞を投与することを含む方法も提供する。

20

【0818】

本発明は、CD19発現細胞に関連する疾患を予防、処置および／または管理するための方法であって、必要とする対象に、CD19発現細胞と結合する本発明の抗CD19 CART細胞を投与することを含む方法も提供する。一態様において、対象はヒトである。

【0819】

30

本発明は、CD19発現細胞に関連するがんの再発を予防する方法であって、それを必要とする対象に、CD19発現細胞と結合する本発明の抗CD19 CART細胞を投与することを含む方法も提供する。一態様において、方法は、それを必要とする対象に、CD19発現細胞と結合する本明細書で説明される抗CD19 CART細胞の有効量を、別の治療の有効量と組み合わせて投与することを含む。

【0820】

一態様において、本発明は、対象におけるがんを処置する方法に関する。方法は、対象におけるがんを処置するために、本明細書で説明されるCD19発現細胞、例えばT細胞をB細胞阻害剤と組み合わせて対象に投与することを含む。本明細書で説明される方法によって処置可能であるがんの一例は、CD19の発現に関連するがんである。一実施形態において、疾患は、固形または液性腫瘍である。一実施形態において、疾患は、血液がん、例えば本明細書で説明されるような血液がんである。

40

【0821】

CD19の発現に関連する非がん関連の徴候としては、例えば、自己免疫疾患（例えば、狼瘡）、炎症性障害（アレルギーおよび喘息）および移植が挙げられるが、これらに限定されない。

【0822】

一部の実施形態において、本明細書で説明される組合せで処置することができるがんは、多発性骨髄腫である。多発性骨髄腫は、骨髄への形質細胞クローンの蓄積を特徴とする血液のがんである。多発性骨髄腫の現行の治療としては、サリドマイドの類似体であるレ

50

ナミドマイドでの処置が挙げられるが、これに限定されない。レナミドマイドは、抗腫瘍活性、血管新生阻害およびイムノモジュレーションを包含する活性を有する。一部の実施形態において、CD19 CAR、例えば本明細書で説明されるようなCD19 CARは、骨髄腫細胞を処置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、本明細書で説明される組合せは、1つまたは複数の追加の治療、例えばレナミドマイド処置とともに使用することができる。

【0823】

本明細書で説明されるCAR発現細胞は、単独で投与してもよいし、あるいは希釈剤とおよび／または他の構成要素、例えばIL-2または他のサイトカインもしくは細胞集団と組み合わせて医薬組成物として投与してもよい。

10

【0824】

血液がん

血液がん状態とは、血液、骨髄およびリンパ系を冒す白血病、リンパ腫および悪性リンパ増殖性状態などのがんの型である

【0825】

一実施形態において、血液がんは、白血病である。一実施形態において、がんは、これらに限定されないが、B細胞急性リンパ芽球性白血病(BALL)、T細胞急性リンパ芽球性白血病(TALL)、小リンパ球性リンパ腫(SLL)、急性リンパ芽球性白血病(ALL)を包含する、1種または複数の急性白血病；これらに限定されないが、慢性骨髄性白血病(CML)、慢性リンパ球性白血病(CLL)を包含する、1種または複数の慢性白血病；これらに限定されないが、マンツル細胞リンパ腫(MCL)、B細胞前リンパ球性白血病、芽球性形質細胞様樹状細胞の新生物、バーキットリンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、ヘアリーセル白血病、小細胞型または大細胞型濾胞性リンパ腫、悪性のリンパ増殖性状態、MALTLリンパ腫、辺縁帯リンパ腫、多発性骨髄腫、脊髄形成異常および骨髄異形成症候群、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、形質芽細胞リンパ腫、形質細胞様樹状細胞の新生物、ワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症、および骨髄の血液細胞の無効な産生(または異形成)を併せもつ血液学的な状態の多様な集合体である「前白血病状態」を包含する、追加の血液がんまたは血液学的状態からなる群より選択される。CD19、CD20またはCD22発現に関連する疾患としては、これらに限定されないが、CD19、CD20またはCD22を発現する非定型

20

30

【0826】

白血病は、急性白血病および慢性白血病として分類することができる。急性白血病は、急性骨髄性白血病(AML)および急性リンパ性白血病(ALL)としてさらに分類することができる。慢性白血病は、慢性骨髄性白血病(CML)および慢性リンパ性白血病(CLL)を包含する。他の関連する状態は、骨髄の血液細胞の無効な産生(または異形成)およびAMLに形を変えるリスクを併せもつ血液学的な状態の多様な集合体である骨髄異形成症候群(MDS、旧称「前白血病状態」)を包含する。

【0827】

リンパ腫は、リンパ球から発生する血液細胞腫瘍の一群である。典型的なリンパ腫としては、非ホジキンリンパ腫およびホジキンリンパ腫が挙げられる。

40

【0828】

一態様において、本発明は、ホジキンリンパ腫を有する哺乳動物を処置する方法であって、CD19 CAR分子、例えば本明細書で説明されるCD19 CAR分子およびB細胞阻害剤を発現する細胞の有効量を前記哺乳動物に投与することを含む方法に関する。

【0829】

ある態様において、本発明の組成物およびCAR T細胞またはCAR発現NK細胞は、非ホジキンリンパ腫、例えばDLBCL、濾胞性リンパ腫、またはCLLなどの、B細胞悪性腫瘍を処置するのに特に有用である。

50

【0830】

非ホジキンリンパ腫（NHL）は、B細胞またはT細胞のいずれかから形成される、リンパ球のがんの一群である。NHLは、あらゆる年齢で起こり、多くの場合、正常なものより大きいリンパ節、体重減少および発熱を特徴とする。異なるNHL型は、中悪性度（aggressive）（急速進行）および低悪性度（緩徐進行）型として大別される。B細胞非ホジキンリンパ腫は、バーキットリンパ腫、慢性リンパ球性白血病／小リンパ球性リンパ腫（CLL／SLL）、びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫（DLBCL）、濾胞性リンパ腫、免疫芽球性大細胞型リンパ腫、前駆Bリンパ芽球性リンパ腫、およびマントル細胞リンパ腫を包含する。T細胞非ホジキンリンパ腫の例としては、菌状息肉症、未分化大細胞リンパ腫、および前駆Tリンパ芽球性リンパ腫が挙げられる。骨髄または幹細胞移植後に起こるリンパ腫は、通常はB細胞非ホジキンリンパ腫である。例えば、Maloney.NEJM.366.21(2012):2008-16を参照されたい。

10

【0831】

びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫（DLBCL）は、B細胞から発生するNHLの一形態である。DLBCLは、リンパ節内またはリンパ系の外部、例えば、胃腸管、精巣、甲状腺、皮膚、乳房、骨または脳において生じ得る中悪性度リンパ腫である。DLBCLでは細胞の形状の3つの変異体、中心芽球型、免疫芽球型および未分化型が、一般に観察される。中心芽球型の形状が最もよく見られ、最小の細胞質を伴う中～大型リンパ球の外観を有する。DLBCLにはいくつかの亜型がある。例えば、原発性中枢神経系リンパ腫は、もっぱら脳を冒すDLBCLの1つの型のことをいい、脳外の領域を冒すDLBCLとは別ものとして処置される。DLBCLのもう1つの型は、原発性縦隔B細胞リンパ腫であり、これは、多くの場合、若年患者において起こり、胸部で急速に進行する。DLBCLの症状としては、肥大したリンパ節に起因する頸部、腋窩部または鼠径部における無痛の急速な腫脹が挙げられる。一部の対象については、腫脹が有痛であることもある。DLBCLの他の症状としては、寝汗、原因不明の発熱、および体重減少が挙げられる。DLBCLを有するほとんどの患者は成人であるが、この疾患が小児において起こることもある。DLBCLの処置としては、化学療法（例えば、シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾン、エトポシド）、抗生物質（例えば、リツキシマン）、放射線、または幹細胞移植が挙げられる。

20

【0832】

非ホジキンリンパ腫の1つの型である濾胞性リンパ腫は、少なくとも部分的に濾胞性のパターンを有する、濾胞中心B細胞（セントロサイトおよび中心芽球）のリンパ腫である。濾胞性リンパ腫細胞は、B細胞マーカーCD10、CD19、CD20およびCD22を発現する。濾胞性リンパ腫細胞は、一般に、CD5に関して陰性である。形態学的には、濾胞性リンパ腫腫瘍は、セントロサイト（くびれのある濾胞中心細胞または小細胞とも呼ばれる）と中心芽球（くびれのない大型濾胞中心細胞または大細胞とも呼ばれる）の混合物を含有する濾胞で構成されている。濾胞は、非悪性細胞、主にT細胞、によって包囲されている。濾胞は、主としてセントロサイトを含有し、少数の中心芽細胞を有する。世界保健機関（WHO）は、形態学的にこの疾患を次のように分類している：グレード1〔高倍率視野（hpf）あたり<5個の中心芽球〕；グレード2（6～15個の中心芽球／hpf）；グレード3（>15個の中心芽球／hpf）。グレード3は、以下のグレードにさらに細分される：グレード3A（セントロサイトがまだ存在する）；グレード3B（濾胞がほぼ全て中心芽球からなる）。濾胞性リンパ腫の処置としては、化学療法、例えばアルキル化剤、ヌクレオシド類似体、アントラサイクリン含有レジメン、例えばCHOPと呼ばれる併用療法ーシクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾン／プレドニゾロン、抗体（例えば、リツキシマブ）、放射免疫療法、および造血幹細胞移植が挙げられる。

30

40

【0833】

CLLは、骨髄、血液、リンパ節および脾臓における新生物細胞増殖および蓄積を特徴とするB細胞悪性腫瘍である。CLLの診断時の年齢中央値は、約65歳である。現行の

50

処置としては、化学療法、放射線療法、生物学的療法、または骨髄移植が挙げられる。症状は、外科的に（例えば、肥大した脾臓の脾摘出術での除去）、または放射線療法（例えば、腫脹したリンパ節を減量すること）によって処置されることもある。CLLを処置するための化学療法剤としては、例えば、フルダラビン、2-クロロデオキシアデノシン（クラドリビン）、クロラムブシル、ビンクリスチン、ペントスタチン、シクロホスファミド、アレムツズマブ（Campath-1H）、ドキシソルピシンおよびプレドニゾンが挙げられる。CLLのための生物学的療法としては、抗体、例えば、アレムツズマブ、リツキシマブおよびオファツムマブ；ならびにチロシンキナーゼ阻害剤療法が挙げられる。多数の基準、例えば、RaiまたはBinetシステムを使用して、CLLの病期を分類することができる。Raiシステムは、5つの病期を有するものとして（has having）CLLを説明する：リンパ球増加のみが存在する病期0；リンパ節腫大が存在する病期I；巨脾症、リンパ節腫大、または両方が存在する病期II；貧血、臓器肥大、または両方が存在する病期III（進行は体重減少、疲労、発熱、広範囲の臓器肥大、およびリンパ球数急増によって定義される）；および貧血、血小板減少症、臓器肥大、またはこれらの組合せが存在する病期IV。Binet病期分類システムのもとには3つのカテゴリーがある：リンパ球増加が存在し、3つ未満のリンパ節が肥大している病期A（この病期は、Rai病期0の患者全て、Rai病期Iの患者の半分、およびRai病期IIの患者の3分の1を含む）；3つ以上のリンパ節が罹患している病期B；および貧血もしくは血小板減少症、または両方が存在する病期C。これらの分類システムを免疫グロブリン遺伝子の突然変異の測定値と併用して、その疾患の状況のより正確な特徴付けを行うことができる。突然変異した免疫グロブリン遺伝子の存在は、予後改善と関連する。

10

20

【0834】

別の実施形態において、本発明のCAR発現細胞は、例えば白血病幹細胞を用いて、がんまたは白血病を処置するために使用される。例えば、白血病幹細胞は、CD34⁺/CD38⁻白血病細胞である。

【0835】

CD20およびCD22関連疾患および／または障害

本発明は、例えば、がんもしくは悪性腫瘍などの増殖性疾患または前がん状態を包含する、CD20もしくはCD22の発現に関連する疾患またはCD20もしくはCD22を発現する細胞に関連する状態；あるいはCD20またはCD22を発現する細胞に関連する非がん関連の徴候を処置するための組成物および方法とをとりわけ提供する。一態様において、CD22の発現に関連するがんは、血液がん、例えば本明細書で説明される血液がんである。

30

【0836】

CD20またはCD22の発現に関連する非がん関連の徴候も包含され得る。CD20またはCD22の発現に関連する非がん関連の徴候としては、例えば、自己免疫疾患（例えば、狼瘡、関節リウマチ、多発性硬化症、自己免疫性溶血性貧血、赤芽球ろう、特発性血小板減少性紫斑病、エバンス症候群、血管炎、水疱性皮膚障害、1型糖尿病、シェーグレン症候群、抗NMDA受容体脳炎およびデビック病、グレーブス眼症、ならびに自己免疫性膵炎）、炎症性障害（アレルギーおよび喘息）および固形臓器移植または造血細胞移植が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0837】

本明細書で開示される組成物および方法は、これらに限定されないが、とりわけ、脊髄形成異常、貧血、発作性夜間ヘモグロビン尿症、再生不良性貧血、後天性赤芽球ろう（acquired pure red cell anemia）、ダイヤモンド・ブラックファン貧血（Diamond-Blackfan anemia）、ファンコニ貧血、血球減少症、無巨核球性（amegakaryotic）血小板減少症、骨髄増殖性障害、真正赤血球増加症、本態性血小板増加症、骨髄線維症、ヘモグロビン異常症、鎌状赤血球症、重症型βサラセミアなどの血液疾患を処置するために使用することができる。

【0838】

50

一態様において、本発明は、CD22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CD20またはCD22に関して陰性であり、腫瘍の一部がCD20またはCD22に関して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、CD20またはCD22の発現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、この場合、CD20またはCD22の発現に関する処置を受けたことがある対象は、CD20またはCD22の発現に関連する疾患を呈示する。

【0839】

一態様において、本発明は、CD20またはCD22を発現する腫瘍細胞の成長を阻害する方法であって、前記腫瘍細胞を、本発明のCD20またはCD22 CAR細胞（例えば、T細胞またはNK細胞）と接触させることを含み、その結果、CAR Tが、抗原に応答して活性化され、がん細胞を標的とし、腫瘍の成長が阻害される、方法に関する。

10

【0840】

一態様において、本発明は、対象におけるがんを処置する方法に関する。方法は、対象におけるがんを処置するために、本発明のCD20またはCD22 CAR発現細胞（例えばT細胞またはNK細胞）を対象に投与することを含む。本発明のCD20またはCD22 CAR発現細胞（例えば、T細胞またはNK細胞）によって処置可能であるがんの例は、CD20またはCD22の発現に関連するがんである。本発明のCD20またはCD22 CAR発現細胞（例えば、T細胞またはNK細胞）によって処置可能であるがんの例としては、本明細書で説明される血液がんが挙げられるが、これに限定されない。

20

【0841】

本発明は、キメラ抗原受容体（CAR）を発現するように細胞（例えば、T細胞またはNK細胞）を遺伝子改変し、それを必要とするレシピエントにCAR発現細胞（例えば、T細胞またはNK細胞）を注入する、細胞療法のタイプを包含する。注入される細胞は、レシピエントにおける腫瘍細胞を死滅させることが可能である。抗体療法とは異なり、CARで改変された細胞（例えば、T細胞またはNK細胞）は、インビボでの複製が可能であり、持続的な腫瘍制御につながり得る、長期にわたる持続性を結果としてもたらす。様々な態様において、患者に投与された細胞（例えば、T細胞またはNK細胞）、またはそれらの子孫細胞は、患者へのT細胞の投与後、少なくとも4カ月間、5カ月間、6カ月間、7カ月間、8カ月間、9カ月間、10カ月間、11カ月間、12カ月間、13カ月間、14カ月間、15カ月間、16カ月間、17カ月間、18カ月間、19カ月間、20カ月間、21カ月間、22カ月間、23カ月間、2年間、3年間、4年間、または5年間にわたり、患者において存続する。

30

【0842】

本発明は、例えば、インビトロで転写されたRNAにより、キメラ抗原受容体（CAR）を一過性に発現するように免疫エフェクター細胞、例えばNK細胞またはT細胞を改変し、それを必要とするレシピエントに、CAR発現（例えば、CAR TまたはCAR発現NK細胞）細胞を注入する、細胞療法のタイプも包含する。注入される細胞は、レシピエントにおけるがん細胞を死滅させることが可能である。したがって、様々な態様において、CAR発現細胞、例えばT細胞またはNK細胞は、患者に投与され、患者へのCAR発現細胞、例えばT細胞またはNK細胞の投与後、1カ月間未満、例えば、3週間、2週間、1週間にわたり存在する。

40

【0843】

いかなる特定の理論にも縛られるつもりはないが、CARで改変された細胞（例えば、T細胞またはNK細胞）により惹起される抗腫瘍免疫応答は、能動的免疫応答である場合もあり、受動的免疫応答である場合もあり、代替的に、間接的免疫応答と対比される直接的免疫応答に起因する場合もある。一態様において、CARが形質導入された細胞（例えば、T細胞またはNK細胞）は、CD20またはCD22を発現するヒトがん細胞に応答して、特異的な炎症促進性サイトカインの分泌および強力な細胞溶解活性を呈示し、可溶性CD20またはCD22による阻害に抵抗し、バイスタンダー死滅を媒介し、確立され

50

たヒト腫瘍の退縮を媒介する。例えば、C D 2 0 または C D 2 2 を発現する腫瘍の不均質場内の無抗原腫瘍細胞は、C D 2 0 または C D 2 2 によりリダイレクトされた T 細胞であって、隣接する抗原陽性がん細胞に対してあらかじめ反応している T 細胞による間接的破壊を受けやすい可能性がある。

【0844】

一態様において、本発明の C A R で改変された細胞（例えば、T 細胞または N K 細胞）、例えば、完全ヒト C A R 発現細胞は、エキスビボでの免疫化のためのワクチンのタイプであってもよく、および／または哺乳動物におけるインビボ治療のためのワクチンのタイプであってもよい。一態様において、哺乳動物はヒトである。

【0845】

エキスビボでの免疫化に関しては、哺乳動物に細胞を投与する前に、次の少なくとも 1 つがインビトロで行われる：i) 細胞の拡大、i i) 細胞への C A R をコードする核酸の導入、または i i i) 細胞の低温保存。

【0846】

エキスビボの手法は当業界周知であり、以下でより詳細に論じられる。簡単に言えば、哺乳動物（例えば、ヒト）から細胞を単離し、本明細書で開示される C A R を発現するベクターで遺伝子改変する（すなわち、インビトロで形質導入またはトランスフェクトする）。C A R で改変された細胞を哺乳動物のレシピエントに投与することによって、治療的利益をもたらすことができる。哺乳動物のレシピエントはヒトであってもよいし、C A R で改変された細胞はレシピエントにとって自己であってもよい。その代わりに、細胞は、

【0847】

エキスビボで造血幹および前駆細胞を拡大させる手法は、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第 5, 199, 942 号で説明されており、本発明の細胞に適用することができる。他の好適な方法が当業界公知であり、それゆえに本発明は、いかなる特定のエキスビボでの細胞拡大方法にも限定されない。簡単に言えば、エキスビボでの T 細胞の培養および拡大は、(1) 末梢血液の回収物または骨髓外植片から、哺乳動物由来の C D 3 4 + 造血幹および前駆細胞を収集すること；および (2) このような細胞をエキスビボで拡大させることを含む。米国特許第 5, 199, 942 号で説明されている細胞成長因子に加えて、f l t 3 - L、I L - 1、I L - 3 および c - k i t リガンドなどの他の因子を細胞の培養および拡大に使用することができる。

【0848】

エキスビボでの免疫化に関して細胞ベースのワクチンを使用することに加えて、本発明はまた、患者中の抗原に対して向けられた免疫反応を惹起するための、インビボでの免疫化のための組成物および方法も提供する。

【0849】

一般的に、本明細書で説明したようにして活性化され拡大させた細胞は、免疫不全の個体において生じた疾患の処置および予防で利用することができる。特に、本発明の C A R で改変された細胞（例えば、T 細胞または N K 細胞）は、C D 2 0 または C D 2 2 の発現に関連する疾患、障害、および状態の処置において使用される。所定の態様において、本発明の細胞は、C D 2 0 または C D 2 2 の発現に関連する疾患、障害および状態を発症する危険性がある患者の処置に使用することができる。したがって、本発明は、C D 2 0 または C D 2 2 の発現に関連する疾患、障害、および状態の処置または予防のための方法であって、それを必要とする対象に、本発明の C A R で改変された免疫エフェクター細胞（例えば、T 細胞または N K 細胞）の治療有効量を投与することを含む方法を提供する。

【0850】

一態様において、本発明の C A R 発現細胞は、がんもしくは悪性腫瘍などの増殖性疾患、または前がん状態を処置するために使用することができる。一態様において、C D 2 0 または C D 2 2 の発現に関連するがんは、細胞の異常成長を特徴とする血液がん、前白血病状態、過剰増殖性障害、過形成または異形成である。

【0851】

本発明のCARで改変された細胞は、単独で投与されてもよいし、または希釈剤と、および／またはIL-2もしくは他のサイトカインなどの他の成分もしくは細胞集団と組み合わせた医薬組成物として投与されてもよい。

【0852】

本発明は、増殖を阻害するためのまたはCD20もしくはCD22発現細胞集団を低減させるための方法であって、CD20またはCD22発現細胞を含む細胞の集団を、CD20またはCD22発現細胞と結合する本発明のCD20またはCD22 CAR発現細胞と接触させることを含む方法も提供する。特異的な態様において、本発明は、CD20もしくはCD22を発現するがん細胞の増殖を阻害するためのまたはそのようながん細胞の集団を低減させるための方法であって、CD20またはCD22発現がん細胞集団を、CD20またはCD22発現細胞と結合する本発明のCD20またはCD22 CAR発現細胞と接触させることを含む方法を提供する。一態様において、本発明は、CD20もしくはCD22を発現するがん細胞の増殖を阻害するためのまたはそのようながん細胞の集団を低減させるための方法であって、CD20またはCD22発現がん細胞集団を、CD20またはCD22発現細胞と結合する本発明のCD20またはCD22 CARTと接触させることを含む方法を提供する。ある特定の態様において、本明細書のCD20またはCD22 CAR発現細胞は、細胞および／またはがん細胞の量、数、数量またはパーセンテージを、CD20またはCD22発現細胞に関連するB細胞悪性腫瘍もしくは別のがんを有する対象、またはそのような悪性腫瘍もしくはがんの動物モデルにおいて、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%、または少なくとも99%低減させる。一態様において、対象はヒトである。

【0853】

本発明は、CD20またはCD22発現細胞に関連するがんの再発を予防する方法であって、それを必要とする対象に、CD20またはCD22発現細胞と結合する本発明のCD20またはCD22 CAR発現細胞を投与することを含む方法を提供する。一態様において、方法は、それを必要とする対象に、CD20またはCD22発現細胞と結合する本明細書で説明されるCD20またはCD22 CAR発現細胞の有効量を、別の治療の有効量と組み合わせて投与することを含む。

【0854】

一部の実施形態において、CD22発現細胞は、CD19、CD123、FLT-3、ROR-1、CD79b、CD179b、CD79a、CD10、CD34および／またはCD20を発現する。ある特定の実施形態において、CD22発現細胞は、CD19を発現する。一部の実施形態において、CD22発現細胞は、CD19を発現しない。一部の実施形態において、CD20発現細胞は、CD19、CD123、FLT-3、ROR-1、CD79b、CD179b、CD79a、CD10、CD34および／またはCD22を発現する。ある特定の実施形態において、CD20発現細胞は、CD19を発現する。一部の実施形態において、CD20発現細胞は、CD19を発現しない。

【0855】

一部の実施形態において、対象は、CD19 CAR療法に対する非応答例である。一部の実施形態において、対象は、CD19 CAR療法に対する部分応答例である。一部の実施形態において、対象は、CD19 CAR療法に対する完全応答例である。一部の実施形態において、対象は、CD19 CAR療法に対する非再発例である。一部の実施形態において、対象は、CD19 CAR療法に対する部分再発例である。一部の実施形態において、対象は、CD19 CAR療法に対する完全再発例である。

【0856】

一部の実施形態において、CD19 CAR発現細胞での処置に以前に応答性であったがんまたは他の状態は、CD19を発現しない。一部の実施形態において、CD19 CAR発現細胞での処置に以前に応答性であったがんまたは他の状態は、前記がんまたは他

の状態がCD19 CAR発現細胞での処置に応答性であったときと比べてCD19発現レベルの10%、20%、30%、40%、50%以上の低減を有する。一部の実施形態において、CD19 CAR発現細胞での処置に以前に応答性であったがんまたは他の状態は、CD20、CD22、CD123、またはそれらのいずれかの組合せを発現する。

【0857】

一部の実施形態において、本発明のCD20またはCD22 CAR発現細胞は、CD19 CAR発現細胞で以前に処置されたがんまたは他の状態の再発後に投与される。一部の実施形態において、CD19 CAR発現細胞およびCD20またはCD22 CAR発現細胞は、本明細書で説明されるように、同時に投与される。

【0858】

骨髄除去

一態様において、本発明は、骨髄除去のための組成物および方法を提供する。例えば、一態様において、本発明は、対象における既存の骨髄の少なくとも一部の除去のための組成物および方法を提供する。ある特定の場合において、本発明のCARを含むCD19、CD20またはCD22 CAR発現細胞は、CD19、CD20またはCD22陽性の骨髄の骨髄腫前駆細胞を除去することが、本明細書において説明される。

【0859】

一態様において、本発明は、骨髄除去の方法であって、骨髄除去を必要とする対象に本発明のCD19、CD20またはCD22発現CAR細胞（例えば、T細胞またはNK細胞）を投与することを含む方法を提供する。例えば、本方法は、骨髄移植または骨髄リコンディショニングが有益な治療戦略である疾患または障害を有する対象の既存の骨髄の一部または全てを除去するために使用することができる。一態様において、本明細書の他の箇所でも説明されるCD19、CD20またはCD22発現CAR細胞（例えば、T細胞またはNK細胞）の投与を含む本発明の骨髄除去方法は、対象において骨髄移植の前に行われる。したがって、一態様において、本発明の方法は、骨髄または幹細胞移植の前の細胞調整レジメンを提供する。一態様において、骨髄移植は、幹細胞の移植を含む。骨髄移植は、自己または同種異系細胞の移植を含み得る。

【0860】

本発明は、疾患または障害を処置する方法であって、本発明のCD19、CD20またはCD22発現CAR細胞（例えば、T細胞またはNK細胞）を投与して、既存の骨髄の少なくとも一部を除去することを含む方法を提供する。この方法は、骨髄移植が有益であるあらゆる疾患または障害を処置するための処置レジメンの少なくとも一部として使用することができる。すなわち、本方法は、移植骨髄を必要とするあらゆる対象において使用することができる。一態様において、CD19、CD20またはCD22発現CAR細胞（例えば、T細胞またはNK細胞）の投与を含む骨髄除去は、AMLの処置に有用である。ある特定の態様において、本方法による骨髄除去は、血液がん、固形腫瘍、血液疾患、代謝障害、HIV、HTLV、リソソーム蓄積障害、および免疫不全の処置に有用である。

【0861】

本明細書で開示される組成物および方法は、これらに限定されないが、本明細書で説明されるがん、例えば、白血病、リンパ腫、骨髄腫、ALL、AML、CLL、CML、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫（例えば、DLBCLまたは濾胞性リンパ腫）および多発性骨髄腫を包含する、血液がんを処置するために、既存の骨髄の少なくとも一部を除去するために使用することができる。

【0862】

一態様において、本発明は、がんを処置する方法であって、対象の骨髄の少なくとも一部が本発明のCD22 CAR細胞（例えば、T細胞またはNK細胞）によって除去される骨髄調整（bone marrow conditioning）を含む方法を提供する。例えば、ある特定の場合において、対象の骨髄は、悪性前駆細胞を含み、それをCD20またはCD22 CAR細胞（例えば、T細胞またはNK細胞）の活性によって標的化し、排除することができ

10

20

30

40

50

る。一態様において、骨髄調整療法は、天然骨髄の除去後に対象に骨髄移植または幹細胞移植を投与することを含む。一態様において、骨髄リコンディショニング療法は、これらに限定されないが抗腫瘍CAR療法、化学療法、照射線および同種のものを包含する、1種またはそれ以上の他の抗がん療法と併用される。

【0863】

一態様において、骨髄移植または幹細胞移植の注入の前に、投与されたCD19、CD20またはCD22CAR発現細胞の除去が必要とされることがある。CD19、CD20またはCD22発現CAR細胞（例えば、T細胞またはNK細胞）の除去は、これらに限定されないが、自殺遺伝子、RNAにコードされたCARを使用するCARの持続性制限、または抗体もしくは化学療法を包含する抗T細胞様式の使用を包含する、いずれの好適な戦略または処置を使用して果たしてもよい。

10

【0864】

併用療法

本明細書で説明されるようなCARの組合せ（例えば、本明細書で説明されるCD20CAR、CD22CARまたはCD19CAR発現細胞、例えば、それと1つまたは複数のB細胞阻害剤、例えば本明細書で説明されるようなB細胞阻害剤）を、他の公知の薬剤および療法と組み合わせて使用してもよい。

【0865】

本明細書で説明されるCAR発現細胞（例えば、CD20CAR、CD22CARまたはCD19CAR発現細胞）、適宜、1種または複数のB細胞阻害剤、および／または少なくとも1種の追加の治療剤を、同じまたは別の組成物で同時に投与してもよいし、または逐次的に投与してもよい。逐次的な投与の場合、本明細書で説明されるCAR発現細胞（例えば、CD20CAR、CD22CARまたはCD19CAR発現細胞）を最初に投与し、2番目に追加の薬剤を投与してもよいし、または投与順はその逆でもよい。

20

【0866】

CAR療法および／または他の治療剤（第二のCAR療法など）、手順、もしくはモダリティは、障害が活性である期間において投与することもでき、寛解期間または疾患がそれほど活性でない期間において投与することもできる。CAR療法は、他の処置の前に投与することもでき、他の処置と並列して投与することもでき、他の処置後に投与することもでき、障害の寛解時に投与することもできる。

30

【0867】

例えば、一部の実施形態において、CAR療法を、CD19、CD20またはCD22発現に関連する疾患、例えばがんを有する対象に投与する。対象を、応答性または再発の徴候についてアッセイしてもよい。一部の実施形態において、対象が1つまたは複数の再発の徴候、例えば、CD19におけるフレームシフトおよび／または未成熟終止コドンを示した場合、追加の治療を投与する。実施形態において、追加の治療は、B細胞阻害剤である。CD19療法を継続してもよく（例えば、検出可能ないくつかのCD19発現がん細胞が対象にまだ存在する場合）、または中止してもよい（例えば、損益分析が治療の中止を支持した場合）。

40

【0868】

組み合わせて投与する場合、CAR療法およびさらなる薬剤（例えば、第二の薬剤または第三の薬剤）、または全ての薬剤は、個別に、例えば、単剤療法として使用される各薬剤の量または投与量より高量または高用量で投与することもでき、これより低量または低用量で投与することもでき、これと同量または同用量で投与することもできる。ある特定の実施形態において、CAR療法、追加の薬剤（例えば、2番目もしくは3番目の薬剤）、または全ての投与される量または投与量は、個別に、例えば、単剤療法として使用される各薬剤の量または投与量より低量または低投与量（例えば、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、または少なくとも50%の量または投与量）である。他の実施形態において、所望の効果（例えば、がんの処置）を結果としてもたらす、CAR

50

療法、さらなる薬剤（例えば、第二の薬剤または第三の薬剤）、または全ての薬剤の量または投与量は、同じ治療効果を達成するのに必要とされる個別に、例えば、単剤療法として使用される各薬剤の量または投与量より低量または低投与量（例えば、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、または少なくとも50%の低量または低投与量）である。

【0869】

実施形態において、併用療法における治療薬の1つまたは複数は、抗体分子である。モノクローナル抗体療法を用いて、がん抗原を標的化することができる。モノクローナル抗体（mAb）療法は、標的分子を過剰発現する腫瘍細胞に対する補体依存性細胞毒性（CDC）、抗体依存性細胞介在細胞毒性（ADCC）および直接細胞阻害またはアポトーシス誘導効果を包含する、複数のメカニズムによって強力な抗腫瘍効果を発揮することが証明されている。

10

【0870】

さらなる態様において、本明細書で説明されるCAR発現細胞の組合せ（例えば、1つまたは複数のB細胞阻害剤と適宜組み合わせ、CD20 CAR、CD22 CARまたはCD19 CAR発現細胞）は、外科手術、化学療法、放射線、mTOR経路阻害剤、免疫抑制剤、例えばシクロスポリン、アザチオプリン、メトトレキサート、ミコフェノール酸塩、およびFK506、抗体、または他の免疫除去剤、例えばCAMPATH、抗CD3抗体もしくは他の抗体療法、シトキサン（cytotoxin）、フルダラビン、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、マイコフェノール酸、ステロイド、FR901228、サイトカイン、ならびに放射線照射、ペプチドワクチン、例えばIzumoto et al. 2008 J Neurosurg 108:963-971で説明されているものと組み合わせた処置レジメンで使用する

20

【0871】

一実施形態において、本明細書で説明されるCD19、CD20またはCD22 CAR発現細胞（例えば、それと1つまたは複数のB細胞阻害剤）の組合せは、化学療法剤と組み合わせで使用することができる。典型的な化学療法剤としては、アントラサイクリン[例えば、ドキシソルビシン（例えば、リポソーマルドキシソルビシン（liposomal doxorubicin））]；ビンカアルカロイド（例えば、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、ビノレルビン）；アルキル化剤（例えば、シクロホスファミド、ダカルバジン（decarbazine）、メルファラン、イフォスファミド、テモゾロマイド）；免疫細胞抗体（例えば、アレムツズマブ（alemtuzumab）、ゲムツズマブ、リツキシマブ、トシツモマブ）；代謝拮抗物質（例えば、葉酸アンタゴニスト、ピリミジン類似体、プリン類似体およびアデノシンデアミナーゼ阻害剤（例えば、フルダラビン）など）；TNFRグルココルチコイド誘導性TNFR関連タンパク質（GITR）アゴニスト；プロテアソーム阻害剤（例えば、アクラシノマイシンA、グリオトキシンまたはボルテゾミブ）；イムノモジュレーター、例えばサリドマイドまたはサリドマイド誘導体（例えば、レナリドマイド）が挙げられる。

30

【0872】

併用療法で使用するために考慮される一般的な化学療法剤としては、アナストロゾール[Arimidex（登録商標）]、ビカルタミド[Casodex（登録商標）]、硫酸ブレオマイシン[Blenoxane（登録商標）]、ブスルファン[Myleran（登録商標）]、ブスルファン注射剤[Busulfex（登録商標）]、カペシタビン[Xeloda（登録商標）]、N4-ペントキシカルボニル-5-デオキシ-5-フルオロシチジン、カルボプラチン[Paraplatin（登録商標）]、カルムスチン[BiCNU（登録商標）]、クロラムブシル[Leukeran（登録商標）]、シスプラチン[Platinol（登録商標）]、クラドリビン[Leustatin（登録商標）]、シクロホスファミド[Cytosan（登録商標）またはNeosar（登録商標）]、シタラビン、シトシンアラビノシド[Cytosar-U（登録商標）]、シタラビンリポソーム注射剤[DepoCyt（登録商標）]、ダカルバジン[DTIC-D

40

50

ome（登録商標）]、ダクチノマイシン [アクチノマイシンD、コスメガン (Cosmegan)]、塩酸ダウノルビシン [Cerubidine（登録商標）]、クエン酸ダウノルビシンリポソーム注射剤 [DaunoXome（登録商標）]、デキサメタゾン、ドセタキセル [Taxotere（登録商標）]、塩酸ドキソルビシン [Adriamycin（登録商標）、Rubex（登録商標）]、エトポシド [Vepesid（登録商標）]、リン酸フルダラビン [Fludara（登録商標）]、5-フルオロウラシル [Adrucil（登録商標）、Efudex（登録商標）]、フルタミド [Eulexin（登録商標）]、テザシチビン (tezacitibine)、ゲムシタビン (ジフルオロデオキシシチジン)、ヒドロキシ尿素 [Hydrea（登録商標）]、イダルビシン [Idamycin（登録商標）]、イフォスファミド [IFEX（登録商標）]、イリノテカン [Camptosar（登録商標）]、L-アスパラギナーゼ [ELSPAR（登録商標）]、ロイコボリンカルシウム、メルファラン [Alkeran（登録商標）]、6-メルカプトプリン [Purinethol（登録商標）]、メトトレキセート [Folex（登録商標）]、ミトキサントロン [Novantrone（登録商標）]、マイロタッグ、パクリタキセル [Taxol（登録商標）]、nab-パクリタキセル [Abraxane（登録商標）]、フェニックス (イットリウム90/MX-DTPA)、ペントスタチン、カルムスチンインプラント含有ポリフェプロサン20 [Gliadel（登録商標）]、クエン酸タモキシフェン [Nolvadex（登録商標）]、テニポシド [Vumon（登録商標）]、6-チオグアニン、チオテパ、チラパザミン [Tirazone（登録商標）]、注射用の塩酸トポテカン [Hycamptin（登録商標）]、ビンブラスチン [Velban（登録商標）]、ビンクリスチン [Oncovin（登録商標）]、およびビノレルビン [Navelbine（登録商標）] が挙げられる。

10

20

【0873】

化学療法剤と本明細書で説明されるCAR分子を発現する細胞との組合せでの処置を使用して、本明細書で説明される血液がん、例えばAMLを処置することができる。実施形態において、化学療法剤とCAR発現細胞の組合せは、例えばAMLを有する対象において、がん幹細胞、例えば白血病幹細胞を標的化する、例えば死滅させるのに有用である。実施形態において、化学療法剤とCAR発現細胞の組合せは、微小残存病変 (MRD) を処置するのに有用である。MRDは、処置、例えば化学療法中に、または処置後に、対象に残存する少数のがん細胞を指す。MRDは、再発の主原因であることが多い。本発明は、がん、例えばMRDを処置する方法であって、CAR発現細胞、例えば本明細書で説明されるようなCAR発現細胞と組み合わせて化学療法剤を投与することを含む方法を提供する。

30

【0874】

ある実施形態において、化学療法剤は、CAR分子、例えば本明細書で説明されるCAR分子、を発現する細胞の投与の前に投与される。化学療法剤の1回を超える投与が所望される化学療法レジメンの場合、CAR分子、例えば本明細書で説明されるCAR分子、を発現する細胞の投与の前に化学療法レジメンを開始または完了する。実施形態において、CAR分子を発現する細胞の投与の少なくとも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、14日、15日、20日、25日または30日前に化学療法剤を投与する。実施形態において、CAR分子を発現する細胞の投与の少なくとも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、14日、15日、20日、25日または30日前に、化学療法レジメンを開始または完了する。実施形態において、前記化学療法剤は、がん細胞、例えば腫瘍細胞上のCD19、CD20またはCD22の発現を、例えば正常細胞または非がん細胞上での発現と比較して、増加させる化学療法剤である。発現は、例えば、免疫組織化学染色またはフローサイトメトリー分析により、判定することができる。例えば、化学療法剤は、シタラビン (Ara-C) である。

40

【0875】

本発明の化合物と組み合わせるための、特に目的の抗がん剤は、代謝拮抗剤；カルシウ

50

ム依存性ホスファターゼであるカルシニューリンもしくはp70S6キナーゼであるFK506を阻害する薬物、またはp70S6キナーゼを阻害する薬物；アルキル化剤；mTOR阻害剤；イムノモジュレーター；アントラサイクリン；ビンカアルカロイド；プロテアソーム（proteasome）阻害剤；GITRアゴニスト；タンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤；CDK4キナーゼ阻害剤；BTKキナーゼ阻害剤；MKNキナーゼ阻害剤；DGKキナーゼ阻害剤；または腫瘍崩壊ウイルスを含む。

【0876】

典型的な代謝拮抗剤としては、限定ではないが、葉酸アンタゴニスト（本明細書では葉酸代謝拮抗薬とも称される）、ピリミジン類似体、プリン類似体およびアデノシンデアミナーゼ阻害剤：メトトレキセート [Rheumatrex（登録商標）、Trexall（登録商標）]、5-フルオロウラシル [Acrucil（登録商標）、Efudex（登録商標）、Fluoroplex（登録商標）]、フロクスウリジン [FUDF（登録商標）]、シタラビン [Cytosar-U（登録商標）、Tarabine PFS]、6-メルカプトプリン [Puri-Nethol（登録商標）]、6-チオグアニン [Thioguanine Tabloid（登録商標）]、リン酸フルダラビン [Fludara（登録商標）]、ペントスタチン [Nipent（登録商標）]、ペメトレキセド [Alimta（登録商標）]、ラルチトレキセド [Tomudex（登録商標）]、クラドリビン [Leustatin（登録商標）]、クロファラビン [Clofarex（登録商標）、Clolar（登録商標）]、メルカプトプリン [Puri-Nethol（登録商標）]、カペシタビン [Xeloda（登録商標）]、ネララビン [Arranon（登録商標）]、アザシチジン [Vidaza（登録商標）] およびゲムシタビン [Gemzar（登録商標）] が挙げられる。好ましい代謝拮抗剤としては、例えば、5-フルオロウラシル [Acrucil（登録商標）、Efudex（登録商標）、Fluoroplex（登録商標）]、フロクスウリジン [FUDF（登録商標）]、カペシタビン [Xeloda（登録商標）]、ペメトレキセド [Alimta（登録商標）]、ラルチトレキセド [Tomudex（登録商標）] およびゲムシタビン [Gemzar（登録商標）] が挙げられる。

【0877】

典型的なアルキル化剤としては、これらに限定されないが、ナイトロジェンマスタード、エチレンイミン誘導体、スルホン酸アルキル、ニトロソウレアおよびトリアゼン：ウラシルマスタード [Aminouracil Mustard（登録商標）、Chlorethaminacil（登録商標）、Demethyldopan（登録商標）、Desmethyldopan（登録商標）、Haemanthamine（登録商標）、Nordopan（登録商標）、Uracil nitrogen mustard（登録商標）、Uracillost（登録商標）、Uracilmostaza（登録商標）、Uramustin（登録商標）、Uramustine（登録商標）]、chloromethine [Mustargen（登録商標）]、シクロホスファミド（Cytosan（登録商標）、Neosar（登録商標）、Clafen（登録商標）、Endoxan（登録商標）、Procytox（登録商標）、Revimmune（商標））、イフォスファミド [Mitoxana（登録商標）]、メルファラン [Alkeran（登録商標）]、クロラムブシル [Leukeran（登録商標）]、ピポブroman [Amedel（登録商標）、Vercyte（登録商標）]、トリエチレンメラミン [Hemel（登録商標）、Hexalen（登録商標）、Hexastat（登録商標）]、トリエチレンチオホスファラミン、テモゾロマイド [Temodar（登録商標）]、チオテパ [Thioplex（登録商標）]、ブスルファン [Busilvex（登録商標）、Myleran（登録商標）]、カルムスチン [BiCNU（登録商標）]、ロムスチン [CeeNU（登録商標）]、ストレプトゾシン [Zanosar（登録商標）]、およびダカルバジン [DTIC-Dome（登録商標）] が挙げられる。追加の典型的なアルキル化剤としては、これらに限定されないが、オキサリプラチン [Eloxatin（登録商標）]；テモゾロマイド [Temodar（登録商標）] および Temodal（登録

10

20

30

40

50

商標)] ; ダクチノマイシン [また、アクチノマイシン-D としても公知、Cosmegen (登録商標)] ; メルファラン [また、L-PAM、L-サルコリシン、およびフェニルアラニンマスタードとしても公知、Alkeran (登録商標)] ; アルトレタミン [また、ヘキサメチルメラミン (HMM) としても公知、Hexalen (登録商標)] ; カルムスチン [BiCNU (登録商標)] ; ベンダムスチン [Treanda (登録商標)] ; ブスルファン [Busulfex (登録商標) および Myleran (登録商標)] ; カルボプラチン [Paraplatin (登録商標)] ; ロムスチン [また、CCNU としても公知、CeeNU (登録商標)] ; シスプラチン (また、CDDP としても公知、Platinol (登録商標) および Platinol (登録商標) -AQ) ; クロラムブシル [Leukeran (登録商標)] ; シクロホスファミド [Cytosan (登録商標) および Neosar (登録商標)] ; ダカルバジン [また、DTIC、DTIC および イミダゾールカルボキサミド としても公知、DTIC-Dome (登録商標)] ; アルトレタミン [また、ヘキサメチルメラミン (HMM) としても公知、Hexalen (登録商標)] ; イフォスファミド [Ifex (登録商標)] ; プレドニマスチン (prednimustine) ; プロカルバジン [Matulane (登録商標)] ; メクロレタミン [また、ナイトロジェンマスタード、ムスチン および 塩酸メクロレタミン (mechlorethamine) としても公知、Mustargen (登録商標)] ; ストレプトゾシン [Zanosar (登録商標)] ; チオテパ [また、チオホスファミド (thiophosphoamide)、TESPA および TSPA としても公知、Thioplex (登録商標)] ; シクロホスファミド [Endoxan (登録商標)、Cytosan (登録商標)、Neosar (登録商標)、Procytos (登録商標)、Revimmune (登録商標)] ; および ベンダムスチン HCl [Treanda (登録商標)] が挙げられる。

【0878】

実施形態において、本明細書で説明される CAR 発現細胞を、対象に、フルダラビン、シクロホスファミド、および／または リツキシマブ と組み合わせて投与する。実施形態において、本明細書で説明される CAR 発現細胞を、対象に、フルダラビン、シクロホスファミド、および リツキシマブ (FCR) と組み合わせて投与する。実施形態において、対象は、CLL を有する。例えば、対象は、第 17 染色体の短腕部における欠失 [例えば、白血病性細胞における del (17p)] を有する。他の例において、対象は、del (17p) を有さない。実施形態において、対象は、免疫グロブリン重鎖可変領域 (IgV_H) 遺伝子において突然変異を含む白血病性細胞を含む。他の実施形態において、対象は、免疫グロブリン重鎖可変領域 (IgV_H) 遺伝子において突然変異を含む白血病性細胞を含まない。実施形態において、フルダラビンを、約 10~50 mg/m² (例えば、約 10~15、15~20、20~25、25~30、30~35、35~40、40~45、または 45~50 mg/m²) の投与量で、例えば、静脈内投与する。実施形態において、シクロホスファミドを、約 200~300 mg/m² (例えば、約 200~225、225~250、250~275、または 275~300 mg/m²) の投与量で、例えば、静脈内投与する。実施形態において、リツキシマブを、約 400~600 mg/m² (例えば、400~450、450~500、500~550、または 550~600 mg/m²) の投与量で、例えば、静脈内投与する。

【0879】

実施形態において、本明細書で説明される CAR 発現細胞を、対象に、ベンダムスチン および リツキシマブ と組み合わせて投与する。実施形態において、対象は、CLL を有する。例えば、対象は、第 17 染色体の短腕部における欠失 [例えば、白血病性細胞における del (17p)] を有する。他の例において、対象は、del (17p) を有さない。実施形態において、対象は、免疫グロブリン重鎖可変領域 (IgV_H) 遺伝子において突然変異を含む白血病性細胞を含む。他の実施形態において、対象は、免疫グロブリン重鎖可変領域 (IgV_H) 遺伝子において突然変異を含む白血病性細胞を含まない。実施形態において、ベンダムスチンを、約 70~110 mg/m² (例えば、70~80、80~90、90~100、または 100~110 mg/m²) の投与量で、例えば、静脈内

投与する。実施形態において、リツキシマブを、約400～600mg/m²（例えば、400～450、450～500、500～550、または550～600mg/m²）の投与量で、例えば、静脈内投与する。

【0880】

実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、対象に、リツキシマブ、シクロホスファミド、ドキシソルピシン、ビンクリスチン、および／またはコルチコステロイド（例えば、プレドニゾン）と組み合わせて投与する。実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、対象に、リツキシマブ、シクロホスファミド、ドキシソルピシン、ビンクリスチン、およびプレドニゾン（R-CHOP）と組み合わせて投与する。実施形態において、対象は、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）を有する。実施形態において、対象は、巨大腫瘍がない限局期DLBCL（例えば、サイズ／直径が7cm未満である腫瘍を含む）を有する。実施形態において、対象を、R-CHOPと組み合わせた放射線により処置する。例えば、対象に、R-CHOP（例えば、R-CHOPの1～6サイクル、例えば、1、2、3、4、5、または6サイクル）に続いて、放射線を投与する。場合によって、対象に、R-CHOP（例えば、R-CHOPの1～6サイクル、例えば、1、2、3、4、5、または6サイクル）に続いて、放射線を投与する。

10

【0881】

実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、対象に、エトポシド、プレドニゾン、ビンクリスチン、シクロホスファミド、ドキシソルピシン、および／またはリツキシマブと組み合わせて投与する。実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、対象に、エトポシド、プレドニゾン、ビンクリスチン、シクロホスファミド、ドキシソルピシン、およびリツキシマブ（EPOCH-R）と組み合わせて投与する。実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、対象に、用量を調整したEPOCH-R（DA-EPOCH-R）と組み合わせて投与する。実施形態において、対象は、B細胞リンパ腫、例えば、My cが再構成された侵襲性B細胞リンパ腫を有する。

20

【0882】

実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、対象に、リツキシマブおよび／またはレナリドマイドと組み合わせて投与する。レナリドマイド（（RS）-3-（4-アミノ-1-オキソ1,3-ジヒドロ-2H-イソインドール-2-イル）ピペリジン-2,6-ジオン）は、イムノモジュレーターである。実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、対象に、リツキシマブおよびレナリドマイドと組み合わせて投与する。実施形態において、対象は、濾胞性リンパ腫（FL）またはマントル細胞リンパ腫（MCL）を有する。実施形態において、対象は、FLを有し、かつてがん治療により処置されたことがない。実施形態において、レナリドマイドを、約10～20mg（例えば、10～15、または15～20mg）の投与量で、例えば、毎日投与する。実施形態において、リツキシマブを、約350～550mg/m²（例えば、350～375、375～400、400～425、425～450、450～475、または475～500mg/m²）の投与量で、例えば、静脈内投与する。

30

【0883】

典型的なmTOR阻害剤としては、例えば、テムシロリムス；リダフォロリムス（公式には、デフォロリムス（deferolimus）、（1R,2R,4S）-4-[(2R)-2-[(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18-ジヒドロキシー-19,30-ジメトキシ-15,17,21,23,29,35-ヘキサメチル-2,3,10,14,20-ペンタオキソ-11,36-ジオキサ-4-アザトリシクロ[30.3.1.0⁴,⁹]ヘキサトリアコンタ-16,24,26,28-テトラエン-12-イル]プロピル]-2-メトキシシクロヘキシルジメチルホスフィネートとして公知であり、また、AP23573およびMK8669としても公知であり、PCT公開WO03/064383で説明されている）；エベロリムス（Afinitor（登録商標）またはRAD001

40

50

); ラパマイシン [AY22989、Sirolimus (登録商標)]; セマピモド (simapimod) (CAS164301-51-3); テムシロリムス (emsirolimus)、(5-{2, 4-ビス[(3S)-3-メチルモルホリン-4-イル]ピリド[2, 3-d]ピリミジン-7-イル}-2-メトキシフェニル)メタノール (AZD8055); 2-アミノ-8-[トランス-4-(2-ヒドロキシエトキシ)シクロヘキシル]-6-(6-メトキシ-3-ピリジニル)-4-メチル-ピリド[2, 3-d]ピリミジン-7(8H)-オン (PF04691502、CAS1013101-36-4); および N^2 -[1, 4-ジオキソ-4-[4-(4-オキソ-8-フェニル-4H-1-ベンゾピラン-2-イル)モルホリニウム-4-イル]メトキシ]ブチル-L-アルギニルグリシル-L- α -アスパルチル-L-セリン-、分子内塩 (SF1126、CAS936487-67-1) (配列番号1316)、および XL765 が挙げられる。

10

【0884】

典型的なイムノモジュレーターとしては、例えば、アフツズマブ (Roche (登録商標) より入手可能); ペグフィルグラスチム [Neulasta (登録商標)]; レナリドマイド [CC-5013、Revlimid (登録商標)]; サリドマイド [Thalomid (登録商標)]; アクチミド (CC4047); および IRX-2 (インターロイキン1、インターロイキン2、およびインターフェロン γ などのヒトサイトカインの混合物、CAS951209-71-5、IRX Therapeutics より入手可能) が挙げられる。

【0885】

20

典型的なアントラサイクリンとしては、例えば、ドキシソルビシン [Adriamycin (登録商標) および Rubex (登録商標)]; プレオマイシン [lenoxane (登録商標)]; ダウノルビシン [塩酸ダウノルビシン (daunorubicin hydrochloride)、ダウノマイシン、および塩酸ルビドマイシン、Cerubidine (登録商標)]; ダウノルビシンリポソーム [クエン酸ダウノルビシンリポソーム、DaunoXome (登録商標)]; ミトキサントロン [DHAD、Novantrone (登録商標)]; エピルビシン [Ellienc (商標)]; イダルビシン [Idamycin (登録商標)、Idamycin PFS (登録商標)]; マイトマイシンC [Mutamycin (登録商標)]; ゲルダナマイシン; ハービマイシン; ラビドマイシン; および デスアセチルラビドマイシン が挙げられる。

30

【0886】

典型的なビンカアルカロイドとしては、例えば、酒石酸ビンOREルビン [Navelbine (登録商標)]; ビンクリスチン [Oncovin (登録商標)]; および ビンデシン [Eldisine (登録商標)]; ビンブラスチン [また、硫酸ビンブラスチン、ビンカロイコブラスチン および VLB としても公知、Alkaban-AQ (登録商標) および Velban (登録商標)]; および ビンOREルビン [Navelbine (登録商標)] が挙げられる。

【0887】

典型的なプロテオソーム阻害剤としては、ボルテゾミブ [Velcade (登録商標)]; カーフィルゾミブ (PX-171-007、(S)-4-メチル-N-((S)-1-((S)-4-メチル-1-((R)-2-メチルオキシラン-2-イル)-1-オキソペンタン-2-イル)アミノ)-1-オキソ-3-フェニルプロパン-2-イル)-2-((S)-2-(2-モルホリノアセトアミド)-4-フェニルブタンアミド)-ペンタンアミド); マリゾミブ (NPI-0052); クエン酸イキサゾミブ (MLN-9708); デランゾミブ (CEP-18770); および O-メチル-N-[(2-メチル-5-チアゾリル)カルボニル]-L-セリル-O-メチル-N-[(1S)-2-[(2R)-2-メチル-2-オキシラニル]-2-オキソ-1-(フェニルメチル)エチル]-L-セリンアミド (ONX-0912) が挙げられる。

40

【0888】

実施形態において、本明細書で説明される CAR 発現細胞を、対象に、ブレンツキシマ

50

ブと組み合わせて投与する。ブレンツキシマブとは、抗CD30抗体とモノメチルアウリスチンEとの抗体-薬物コンジュゲートである。実施形態において、対象は、ホジキンリンパ腫（HL）、例えば、再発性HLまたは不応性HLを有する。実施形態において、対象は、CD30+ HLを含む。実施形態において、対象は、自己幹細胞移植（ASCT）を受けている。実施形態において、対象は、ASCTを経していない。実施形態において、ブレンツキシマブを、約1~3mg/kg（例えば、約1~1.5、1.5~2、2~2.5、または2.5~3mg/kg）の投与量で、例えば、静脈内において、例えば、3週間ごとに投与する。

【0889】

実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、対象に、ブレンツキシマブおよびダカルバジンと組み合わせるか、またはブレンツキシマブおよびベンダムスチンと組み合わせて投与する。ダカルバジンとは、化学名を5-（3，3-ジメチル-1-トリアゼニル）イミダゾール-4-カルボキサミドとするアルキル化剤である。ベンダムスチンとは、化学名を4-〔5-〔ビス（2-クロロエチル）アミノ〕-1-メチルベンズイミダゾール-2-イル〕ブタン酸とするアルキル化剤である。実施形態において、対象は、ホジキンリンパ腫（HL）を有する。実施形態において、対象は、かつてがん治療により処置されたことがない。実施形態において、対象は、少なくとも60歳であり、例えば、60、65、70、75、80、85歳、またはこれを超える。実施形態において、ダカルバジンを、約300~450mg/m²（例えば、約300~325、325~350、350~375、375~400、400~425、または425~450mg/m²）の投与量で、例えば、静脈内投与する。実施形態において、ベンダムスチンを、約75~125mg/m²（例えば、75~100、または100~125mg/m²）の投与量で、例えば、約90mg/m²）、例えば、静脈内投与する。実施形態において、ブレンツキシマブを、約1~3mg/kg（例えば、約1~1.5、1.5~2、2~2.5、または2.5~3mg/kg）の投与量で、例えば、静脈内において、例えば、3週間ごとに投与する。

【0890】

いくつかの実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、対象に、CD20阻害剤、例えば、抗CD20抗体（例えば、抗CD20単一特異性抗体または抗CD20二特異性抗体）またはそのフラグメントと組み合わせて投与する。例示的な抗CD20抗体は、リツキシマブ、オファツムマブ、オクレリズマブ、ベルツズマブ、オビヌツズマブ、TRU-015（Trubion Pharmaceuticals）、オカラツズマブ、およびPRO131921（Genentech）を含むがこれらに限定されない。例えば、Lim et al. Haematologica. 95.1(2010):135-43を参照されたい。

【0891】

いくつかの実施形態において、抗CD20抗体は、リツキシマブを含む。リツキシマブとは、例えば、www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/103705s53111bl.pdfにおいて説明されている通りに、CD20に結合し、CD20を発現する細胞の細胞溶解を引き起こす、マウス/ヒトキメラモノクローナル抗体IgG1カップ鎖である。実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、対象に、リツキシマブと組み合わせ

【0892】

一部の実施形態において、リツキシマブを、例えば静脈内注入として、静脈内投与する。例えば、各回の注入は、約500~2000mg（例えば、約500~550、550~600、600~650、650~700、700~750、750~800、800~850、850~900、900~950、950~1000、1000~1100、1100~1200、1200~1300、1300~1400、1400~1500、1500~1600、1600~1700、1700~1800、1800~1900、または1900~2000mg）のリツキシマブを施す。一部の実施形態において、リツキシマブを、150mg/m²~750mg/m²、例えば、約150~175mg/m

2 、 $175 \sim 200 \text{ mg/m}^2$ 、 $200 \sim 225 \text{ mg/m}^2$ 、 $225 \sim 250 \text{ mg/m}^2$ 、 $250 \sim 300 \text{ mg/m}^2$ 、 $300 \sim 325 \text{ mg/m}^2$ 、 $325 \sim 350 \text{ mg/m}^2$ 、 $350 \sim 375 \text{ mg/m}^2$ 、 $375 \sim 400 \text{ mg/m}^2$ 、 $400 \sim 425 \text{ mg/m}^2$ 、 $425 \sim 450 \text{ mg/m}^2$ 、 $450 \sim 475 \text{ mg/m}^2$ 、 $475 \sim 500 \text{ mg/m}^2$ 、 $500 \sim 525 \text{ mg/m}^2$ 、 $525 \sim 550 \text{ mg/m}^2$ 、 $550 \sim 575 \text{ mg/m}^2$ 、 $575 \sim 600 \text{ mg/m}^2$ 、 $600 \sim 625 \text{ mg/m}^2$ 、 $625 \sim 650 \text{ mg/m}^2$ 、 $650 \sim 675 \text{ mg/m}^2$ 、または $675 \sim 700 \text{ mg/m}^2$ （表記中、 m^2 は、対象の体表面積を指し示す）の用量で投与する。一部の実施形態において、リツキシマブを少なくとも4日間、例えば、4、7、14、21、28、35日間、またはこれを超える投与間隔で投与する。例えば、リツキシマブを少なくとも0.5週間、例えば、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8週間、またはこれを超える投与間隔で投与する。一部の実施形態において、リツキシマブを、本明細書で説明される用量および投与間隔で、ある期間、例えば、少なくとも2週間、例えば、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20週間、またはこれを超える期間にわたり投与する。例えば、リツキシマブを、本明細書で説明される用量および投与間隔で、処置サイクル1つあたり、のべ少なくとも4回の投与（例えば、処置サイクル1つあたり、少なくとも4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16回、またはこれを超える投与）にわたり投与する。

【0893】

一部の実施形態において、抗CD20抗体は、オフアツムマブを含む。オフアツムマブとは、分子量を約 149 kDa とする、抗CD20 IgG1 κ ヒトモノクローナル抗体である。例えば、オフアツムマブは、トランスジェニックマウスおよびハイブリドーマ技術を使用して生成し、組換えマウス細胞株（NS0）から発現し、精製する。例えば、www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/125326lbl.pdf；ならびに臨床試験識別番号NCT01363128、NCT01515176、NCT01626352およびNCT01397591を参照されたい。実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、対象に、オフアツムマブと組み合わせて投与する。実施形態において、対象は、CLLまたはSLLを有する。

【0894】

一部の実施形態において、オフアツムマブを静脈内注入として投与する。例えば、各回の注入は、約 $150 \sim 3000 \text{ mg}$ （例えば、約 $150 \sim 200$ 、 $200 \sim 250$ 、 $250 \sim 300$ 、 $300 \sim 350$ 、 $350 \sim 400$ 、 $400 \sim 450$ 、 $450 \sim 500$ 、 $500 \sim 550$ 、 $550 \sim 600$ 、 $600 \sim 650$ 、 $650 \sim 700$ 、 $700 \sim 750$ 、 $750 \sim 800$ 、 $800 \sim 850$ 、 $850 \sim 900$ 、 $900 \sim 950$ 、 $950 \sim 1000$ 、 $1000 \sim 1200$ 、 $1200 \sim 1400$ 、 $1400 \sim 1600$ 、 $1600 \sim 1800$ 、 $1800 \sim 2000$ 、 $2000 \sim 2200$ 、 $2200 \sim 2400$ 、 $2400 \sim 2600$ 、 $2600 \sim 2800$ 、または $2800 \sim 3000 \text{ mg}$ ）のオフアツムマブを施す。実施形態において、オフアツムマブを、約 300 mg の出発投与量に続いて、 2000 mg で、例えば、約11回の投与、例えば、24週間にわたり投与する。いくつかの実施形態において、オフアツムマブを、少なくとも4日間、例えば、4、7、14、21、28、35日間、またはこれを超える投与間隔で投与する。例えば、オフアツムマブを、少なくとも1週間、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、24、26、28、20、22、24、26、28、30週間、またはこれを超える投与間隔で投与する。いくつかの実施形態において、オフアツムマブを、本明細書で説明される用量および投与間隔で、ある期間、例えば、少なくとも1週間、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、24、26、28、30、40、50、60週間、もしくはこれを超える期間、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12カ月間、もしくはこれを超える期間、または1、2、3、4、5年間、もしくはこれを超える期間にわたり投与する。例えば、オフアツムマブを、本明細書で説明される用量および投与間隔で、処置サイクル

1つあたり、のべ少なくとも2回の投与（例えば、処置サイクル1つあたり、少なくとも、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、18、20回、またはこれを超える投与）にわたり投与する。

【0895】

場合によって、抗CD20抗体は、オクレリズマブを含む。オクレリズマブとは、例えば、臨床試験識別番号NCT00077870、NCT01412333、NCT00779220、NCT00673920、NCT01194570、およびKappos et al. Lancet. 19.378(2011):1779-87において説明されている、ヒト化抗CD20モノクローナル抗体である。

【0896】

場合によって、抗CD20抗体は、ベルツズマブを含む。ベルツズマブとは、CD20に対するヒト化モノクローナル抗体である。例えば、臨床試験識別番号NCT00547066、NCT00546793、NCT01101581、およびGoldenberg et al. Leuk Lymphoma. 51(5) (2010):747-55を参照されたい。

【0897】

場合によって、抗CD20抗体は、GA101を含む。GA101（オビヌツズマブまたはRO5072759ともまた呼ばれる）とは、ヒト化され、糖鎖加工された、抗CD20モノクローナル抗体である。例えば、Robak. Curr. Opin. Investig. Drugs. 10.6(2009):588-96；臨床試験識別番号NCT01995669、NCT01889797、NCT02229422、およびNCT01414205；ならびにwww.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/125486s0001bl.pdfを参照されたい。

【0898】

場合によって、抗CD20抗体は、AME-133vを含む。AME-133v（LY2469298またはオカラツズマブともまた呼ばれる）は、CD20に対するヒト化IgG1モノクローナル抗体であって、リツキシマブと比較して、FcγRIIIa受容体に対するアフィニティーを増加させ、抗体依存性細胞介在性細胞毒性（ADCC）活性を増強した、ヒト化IgG1モノクローナル抗体である。例えば、Robak et al. BioDrugs 25.1(2011):13-25；およびForero-Torres et al. Clin Cancer Res. 18.5(2012):1395-403を参照されたい。

【0899】

場合によって、抗CD20抗体は、PRO131921を含む。PRO131921とは、リツキシマブと比較して、FcγRIIIaへの結合が良好となり、ADCCが増強されるように加工された、ヒト化抗CD20モノクローナル抗体である。例えば、Robak et al. BioDrugs 25.1(2011):13-25；およびCasulo et al. Clin Immunol. 154.1(2014):37-46；ならびに臨床試験識別番号NCT00452127を参照されたい。

【0900】

場合によって、抗CD20抗体は、TRU-015を含む。TRU-015とは、CD20に対する抗体のドメインに由来する、抗CD20融合タンパク質である。TRU-015は、モノクローナル抗体より小型であるが、Fcに媒介されるエフェクター機能を保持する。例えば、Robak et al. BioDrugs 25.1(2011):13-25を参照されたい。TRU-015は、ヒトIgG1のヒンジドメイン、CH2ドメイン、およびCH3ドメインに連結されているが、CH1ドメインおよびCLドメインを欠く、抗CD20単鎖可変性フラグメント（scFv）を含有する。

【0901】

いくつかの実施形態において、本明細書で説明される抗CD20抗体を、本明細書で説明される治療剤、例えば、化学療法剤（例えば、シトキサン、フルダラビン、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、脱メチル化剤、ペプチドワクチン、抗腫瘍抗生剤、チロシンキナーゼ阻害剤、アルキル化剤、抗微小管剤または抗有糸分裂薬剤）、抗アレルギー剤、吐き気止め（または制吐剤）、鎮痛剤、または細胞保護剤にコンジュゲートさせるか、または他の形で結合させる。

10

20

30

40

50

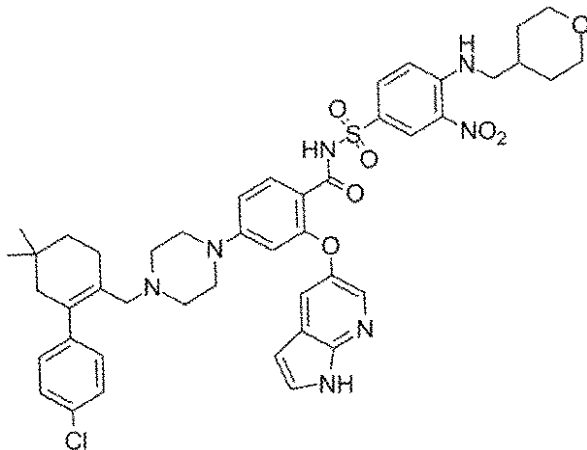
【0902】

実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、対象に、B細胞リンパ腫2（BCL-2）阻害剤（例えば、ABT-199またはGDC-0199ともまた呼ばれるベネトクラクス）および／またはリツキシマブと組み合わせて投与する。実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、対象に、ベネトクラクスおよびリツキシマブと組み合わせて投与する。ベネトクラクスとは、抗アポトーシスタンパク質であるBCL-2を阻害する低分子である。ベネトクラクス {4- (4- { [2- (4-クロロフェニル) -4, 4-ジメチルシクロヘキス-1-エン-1-イル] メチル} ピペラジン-1-イル) -N- ({3-ニトロ-4- [(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルメチル) アミノ] フェニル} スルホニル) -2- (1H-ピロロ [2, 3-b] ピリジン-5-イルオキシ) ベンズアミド} の構造を、下記に示す。

10

【0903】

【化11】



20

【0904】

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、再発性CLLを有し、例えば、対象は、かつて、がん治療を投与されたことがある。実施形態において、ベネトクラクスを、約15～600mg（例えば、15～20、20～50、50～75、75～100、100～200、200～300、300～400、400～500、または500～600mg）の投与量で、例えば、毎日投与する。実施形態において、リツキシマブを、約350～550mg/m²（例えば、350～375、375～400、400～425、425～450、450～475、または475～500mg/m²）の投与量で、例えば、静脈内において、例えば、毎月投与する。

30

【0905】

いくつかの実施形態において、本明細書で説明される1つまたは複数のCAR発現細胞（例えば、CAR）を、オキサリプラチンと組み合わせて投与する。実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、オキサリプラチンと組み合わせて投与して、がん、例えば、固形がん、例えば、前立腺がん、膀胱がん、または肺がんを処置する。いくつかの実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、腫瘍崩壊ウイルスと組み合わせて投与する。実施形態において、腫瘍崩壊ウイルスは、がん細胞において選択的に複製され、がん細胞の死を惹起するか、またはその増殖を遅らせることが可能である。場合によって、腫瘍崩壊ウイルスは、非がん細胞に対して影響を及ぼさないか、またはその影響が最小限である。腫瘍崩壊ウイルスは、腫瘍崩壊アデノウイルス、腫瘍崩壊単純ヘルペスウイルス、腫瘍崩壊レトロウイルス、腫瘍崩壊パルボウイルス、腫瘍崩壊ワクシニアウイルス、腫瘍崩壊シンドビスウイルス、腫瘍崩壊インフルエンザウイルス、または腫瘍崩壊RNAウイルス [例えば、腫瘍崩壊レオウイルス、腫瘍崩壊ニューカッスル病ウイルス (NDV)、腫瘍崩壊麻疹ウイルス、または腫瘍崩壊水泡性口内炎ウイルス (VSV)] を含むがこれらに限定されない。

40

【0906】

50

いくつかの実施形態において、腫瘍崩壊ウイルスとは、ウイルス、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる、US 2010/0178684 A1において説明されている、組換え腫瘍崩壊ウイルスである。いくつかの実施形態において、組換え腫瘍崩壊ウイルスは、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる、US 2010/0178684 A1において説明されている、免疫応答または炎症応答の阻害剤をコードする核酸配列（例えば、異種核酸配列）を含む。実施形態において、組換え腫瘍崩壊ウイルス、例えば、腫瘍崩壊NDVは、アポトーシス促進性タンパク質（例えば、アポプチン）、サイトカイン（例えば、GM-CSF、インターフェロンガンマ、インターロイキン2（IL-2）、腫瘍壊死因子アルファ）、免疫グロブリン（例えば、ED-Bフィブロネクチンに対する抗体）、腫瘍関連抗原、二特異性アダプタータンパク質（例えば、NDV HNタンパク質およびCD3またはCD28などのT細胞共刺激受容体に対して方向付けられた、二特異性抗体または二特異性抗体フラグメント；またはヒトIL-2と、NDV HNタンパク質に対して方向付けられた単鎖抗体との融合タンパク質）を含む。例えば、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる、Zamarin et al. Future Microbiol. 7.3(2012):347-67を参照されたい。いくつかの実施形態において、腫瘍崩壊ウイルスとは、それらの各々が参照によりその全体が本明細書に組み入れられる、US 8591881 B2、US 2012/0122185 A1、またはUS 2014/0271677 A1において説明されている、キメラ腫瘍崩壊NDVである。

【0907】

いくつかの実施形態において、腫瘍崩壊ウイルスは、がん細胞においてもっぱら複製されるように設計された、条件づけ複製型アデノウイルス（CRAV）を含む。例えば、Alemany et al. Nature Biotechnol. 18(2000):723-27を参照されたい。いくつかの実施形態において、腫瘍崩壊アデノウイルスは、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる、Alemany et al. の725頁の表1において説明されている、腫瘍崩壊アデノウイルスを含む。

【0908】

例示的な腫瘍崩壊ウイルスは、以下：

群B腫瘍崩壊アデノウイルス（Coload1）（PsiOxus Therapeutics Ltd.）（例えば、臨床試験識別子：NCT02053220を参照されたい）；

顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）を含むアデノウイルスである、ONCOS-102（旧称：CGTG-102）（Oncos Therapeutics）（例えば、臨床試験識別子：NCT01598129を参照されたい）；

ヒトPH20ヒアルロニダーゼをコードする、遺伝子改変された腫瘍崩壊ヒトアデノウイルスである、VCN-01（VCN Biosciences, S. L.）（例えば、臨床試験識別子：NCT02045602およびNCT02045589を参照されたい）；

網膜芽細胞腫/E2F経路が調節異常であるがん細胞（Institut Catala d'Oncologia）において選択的に複製されるように改変された、野生型ヒトアデノウイルス血清型5（HAd5）に由来するウイルスである、条件づけ複製型アデノウイルスであるICOVIR-5（例えば、臨床試験識別子：NCT01864759を参照されたい）；

腫瘍崩壊アデノウイルスである、ICOVIR5を感染させた骨髄由来の自己間葉系幹細胞（MSC）（Hospital Infantil Universitario Nino Jesus, Madrid, Spain/Ramon Alemany）を含む、Celyvir（例えば、臨床試験識別子：NCT01844661を参照されたい）；

ヒトE2F-1プロモーターが、不可欠のE1ウイルス遺伝子の発現を駆動し、これにより、ウイルスの複製および細胞毒性を、Rb経路欠損腫瘍細胞に制限する、条件づけ複製型腫瘍崩壊血清型5アデノウイルス（Ad5）である、CG0070（Cold Ge

10

20

30

40

50

nesys, Inc.) (例えば、臨床試験識別子: NCT02143804を参照されたい); または

網膜芽細胞腫 (Rb) 経路欠損細胞において選択的に複製され、インテグリンに結合するある特定のRGDを発現する細胞により効率的に感染するように加工されたアデノウイルスである、DNX-2401 (旧称: Delta-24-RGD) (Clinica Universidad de Navarra, Universidad de Navarra/DNAtrix, Inc.) (例えば、臨床試験識別子: NCT01956734を参照されたい) を含むがこれらに限定されない。

【0909】

いくつかの実施形態において、本明細書で説明される腫瘍崩壊ウイルスを、注射、例えば、皮下注射、動脈内注射、静脈内注射、筋内注射、髄腔内注射、または腹腔内注射により投与する。実施形態において、本明細書で説明される腫瘍崩壊ウイルスを、腫瘍内投与、皮内投与、経粘膜投与、経口投与、鼻腔内投与するか、または肺内投与を介して投与する。

10

【0910】

ある実施形態において、本明細書で説明されるCARを発現する細胞を、対象に、Treg細胞集団を減少させる分子と組み合わせて投与する。Treg細胞の数を減少させる (例えば、枯渇させる) 方法は、当業界公知であり、例えば、CD25の枯渇、シクロホスファミドの投与、GITR機能をモジュレートすることを含む。理論に縛られるつもりはないが、アフエレーシスの前、または本明細書で説明されるCAR発現細胞の投与の前に、対象におけるTreg細胞の数を低減することは、腫瘍微小環境における望ましくない免疫細胞 (例えば、Treg) の数を低減し、対象の再発の危険性を低減すると考えられる。

20

【0911】

ある実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、対象に、Treg細胞集団を減少させる分子と組み合わせて投与する。Treg細胞の数を減少させる (例えば、枯渇させる) 方法は、当業界公知であり、例えば、CD25の枯渇、シクロホスファミドの投与、GITR機能をモジュレートすることを含む。理論に縛られるつもりはないが、アフエレーシスの前、または本明細書で説明されるCAR発現細胞の投与の前に、対象におけるTreg細胞の数を低減させることは、腫瘍微小環境における望ましくない免疫細胞 (例えば、Treg) の数を低減させ、対象の再発の危険性を低減させると考えられる。一実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、対象に、GITRアゴニストおよび/または調節性T細胞 (Treg) を枯渇させるGITR抗体などの、GITRを標的とする分子および/またはGITR機能をモジュレートする分子と組み合わせて投与する。一実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、対象に、シクロホスファミドと組み合わせて投与する。一実施形態において、GITR結合分子および/またはGITR機能をモジュレートする分子 (例えば、GITRアゴニストおよび/またはTregを枯渇させるGITR抗体) を、CAR発現細胞の前に投与する。例えば、一実施形態において、GITRアゴニストは、細胞のアフエレーシスの前に投与することができる。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、注入もしくは再注入) の前、または細胞のアフエレーシスの前に投与する。実施形態において、シクロホスファミドおよび抗GITR抗体を、対象に、CAR発現細胞の投与 (例えば、注入もしくは再注入) の前、または細胞のアフエレーシスの前に投与する。一実施形態において、対象は、がん (例えば、固形がん、またはALLもしくはCLLなどの血液がん) を有する。一実施形態において、対象は、CLLを有する。実施形態において、対象は、固形がん、例えば、本明細書で説明される固形がんを有する。

30

40

【0912】

一実施形態において、本明細書で説明されるCD19 CAR発現細胞と本明細書で説明される1つまたは複数のB細胞阻害剤の組合せを、対象に、GITRアゴニスト、例えば本明細書で説明されるGITRアゴニストと組み合わせて投与する。一実施形態におい

50

て、GITRアゴニストをCAR発現細胞、例えばCD19 CAR発現細胞の前に投与する。例えば、一実施形態において、GITRアゴニストは、細胞のアフェレーシスの前に投与することができる。一実施形態において、対象は、CLLを有する。

【0913】

一実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、対象に、GITRアゴニスト、例えば、本明細書で説明されるGITRアゴニストと組み合わせて投与する。一実施形態において、GITRアゴニストをCAR発現細胞の前に投与する。例えば、一実施形態において、GITRアゴニストを細胞のアフェレーシスの前に投与することができる。

【0914】

典型的なGITRアゴニストとしては、例えば、GITR融合タンパク質および抗GITR抗体（例えば、2価抗GITR抗体）、例えば、米国特許第6,111,090号、欧州特許第090505号B1、米国特許第8,586,023号、PCT公開WO2010/003118および2011/090754で説明されているGITR融合タンパク質、または例えば米国特許第7,025,962号、欧州特許第1947183号B1、米国特許第7,812,135号、米国特許第8,388,967号、米国特許第8,591,886号、欧州特許EP1866339号、PCT公開WO2011/028683、PCT公開WO2013/039954、PCT公開WO2005/007190、PCT公開WO2007/133822、PCT公開WO2005/055808、PCT公開WO99/40196、PCT公開WO2001/03720、PCT公開WO99/20758、PCT公開WO2006/083289、PCT公開WO2005/115451、米国特許第7,618,632号、およびPCT公開WO2011/051726で説明されている抗GITR抗体が挙げられる。

【0915】

一実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、対象に、タンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤、例えば、本明細書で説明されるタンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤と組み合わせて投与する。一実施形態において、タンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤は、SHP-1阻害剤、例えば、本明細書で説明されるSHP-1阻害剤、例えば、スチボグルコン酸ナトリウムなどである。一実施形態において、タンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤は、SHP-2阻害剤、例えば、本明細書で説明されるSHP-2阻害剤である。

【0916】

一実施形態において、1つまたは複数のB細胞阻害剤と適宜組み合わせた、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、キナーゼ阻害剤と組み合わせて使用することができる。一実施形態において、キナーゼ阻害剤は、CDK4阻害剤、例えば、本明細書で説明されるCDK4阻害剤、例えば、6-アセチル-8-シクロペンチル-5-メチル-2-(5-ピペラジーン-1-イル-ピリジン-2-イルアミノ)-8H-ピリド[2,3-d]ピリミジン-7-オン塩酸塩（バルボシクリブまたはPD0332991ともまた称する）などの、例えば、CD4/6阻害剤である。一実施形態において、キナーゼ阻害剤は、BTK阻害剤、例えば、イブルチニブなど、例えば、本明細書で説明されるBTK阻害剤である。一実施形態において、キナーゼ阻害剤は、mTOR阻害剤、例えば、ラパマイシン、ラパマイシン類似体である、OSI-027など、例えば、本明細書で説明されるmTOR阻害剤である。mTOR阻害剤は、例えば、mTORC1阻害剤および／またはmTORC2阻害剤、例えば、mTORC1阻害剤および／または本明細書で説明されるmTORC2阻害剤であり得る。一実施形態において、キナーゼ阻害剤は、MNK阻害剤、例えば、4-アミノ-5-(4-フルオロアニリノ)-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジンなど、例えば、本明細書で説明されるMNK阻害剤である。MNK阻害剤は、例えば、MNK1a阻害剤、MNK1b阻害剤、MNK2a阻害剤、および／またはMNK2b阻害剤であり得る。

【0917】

一実施形態において、キナーゼ阻害剤は、アロイシンA；2-（2-クロロフェニル）-5,7-ジヒドロキシ-8-〔（3S,4R）-3-ヒドロキシ-1-メチル-4-ペリジニル〕-4-クロメノンである、フラボピリドールまたはHMR-1275；クリゾチニブ（PF-02341066；2-（2-クロロフェニル）-5,7-ジヒドロキシ-8-〔（2R,3S）-2-（ヒドロキシメチル）-1-メチル-3-ピロリジニル〕-4H-1-ベンゾピラン-4-オン塩酸塩（P276-00）；1-メチル-5-〔〔2-〔5-（トリフルオロメチル）-1H-イミダゾール-2-イル〕-4-ピリジニル〕オキシ〕-N-〔4-（トリフルオロメチル）フェニル〕-1H-ベンズイミダゾール-2-アミン（RAF265）；インジスラム（E7070）；ロスコビチン（CYC202）；パルボシクリブ（PD0332991）；ジナシクリブ（SCH727965）；N-〔5-〔〔（5-tert-ブチルオキサゾール-2-イル）メチル〕チオ〕チアゾール-2-イル〕ピペリジン-4-カルボキサミド（BMS387032）；4-〔〔9-クロロ-7-（2,6-ジフルオロフェニル）-5H-ピリミド〔5,4-d〕〔2〕ベンズアゼピン-2-イル〕アミノ〕-安息香酸（MLN8054）；5-〔3-（4,6-ジフルオロ-1H-ベンズイミダゾール-2-イル）-1H-インダゾール-5-イル〕-N-エチル-4-メチル-3-ピリジンメタンアミン（AG-024322）；4-（2,6-ジクロロベンゾイルアミノ）-1H-ピラゾール-3-カルボン酸N-（ピペリジン-4-イル）アミド（AT7519）；4-〔2-メチル-1-（1-メチルエチル）-1H-イミダゾール-5-イル〕-N-〔4-（メチルスルホニル）フェニル〕-2-ピリミジンアミン（AZD5438）；およびXL281（BMS908662）から選択されるCDK4阻害剤である。

10

20

【0918】

一実施形態において、キナーゼ阻害剤は、CDK4阻害剤、例えば、パルボシクリブ（PD0332991）であり、パルボシクリブを、約50mg、60mg、70mg、75mg、80mg、90mg、100mg、105mg、110mg、115mg、120mg、125mg、130mg、135mg（例えば、75mg、100mg、または125mg）の用量で、ある期間にわたり毎日、例えば、28日間のサイクルの14～21日間にわたり毎日、または21日間のサイクルの7～12日間にわたり毎日を投与する。一実施形態において、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、またはこれを超えるサイクルのパルボシクリブを投与する。

30

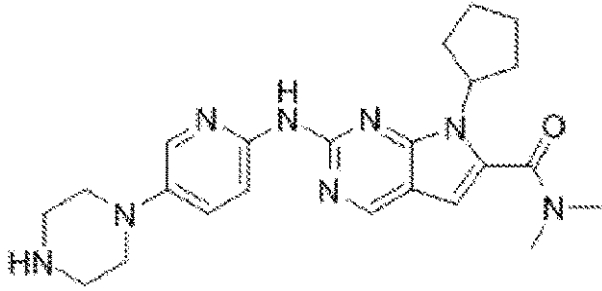
【0919】

実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、対象に、サイクリン依存性キナーゼ（CDK）4阻害剤またはCDK6阻害剤、例えば、本明細書で説明されるCDK4阻害剤またはCDK6阻害剤と組み合わせて投与する。実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、対象に、CDK4/6阻害剤（例えば、CDK4およびCDK6の両方を標的とする阻害剤）、例えば、本明細書で説明されるCDK4/6阻害剤と組み合わせて投与する。ある実施形態において、対象は、MCLを有する。MCLとは、現行で利用可能な治療に対する応答性が不良である、すなわち、本質的に治癒不可能である、侵襲性のがんである。MCLの多くの症例において、サイクリンD1（CDK4/6の調節因子）は、MCL細胞において（例えば、免疫グロブリンおよびCyclin D1遺伝子を伴う染色体転座に起因して）発現される。したがって、理論に縛られずに述べると、MCL細胞は、CDK4/6の阻害に対して、高度な特異性で、高度に感受性である（すなわち、正常な免疫細胞に対する影響は最小限である）と考えられる。CDK4/6阻害剤は、単独でも、MCLの処置において、ある程度の効果をもたらしたが、部分寛解を達成したのにとどまり、再発率は高かった。例示的なCDK4/6阻害剤は、LEE011（リボシクリブともまた呼ばれる）であり、その構造を下記に示す。

40

【0920】

【化 1 2】



【0 9 2 1】

10

理論に縛られずに述べると、本明細書で説明される C A R 発現細胞の、C D K 4 / 6 阻害剤（例えば、L E E 0 1 1 または他の本明細書で説明される C D K 4 / 6 阻害剤）を伴う投与は、例えば、C D K 4 / 6 阻害剤単独と比較して、例えば、高い寛解率および／または低い再発率を伴う、高い応答性を達成し得ると考えられる。

【0 9 2 2】

一実施形態において、キナーゼ阻害剤は、イブルチニブ（P C I - 3 2 7 6 5）；G D C - 0 8 3 4；R N - 4 8 6；C G I - 5 6 0；C G I - 1 7 6 4；H M - 7 1 2 2 4；C C - 2 9 2；O N O - 4 0 5 9；C N X - 7 7 4；および L F M - A 1 3 から選択される B T K 阻害剤である。ある実施形態において、B T K 阻害剤は、インターロイキン 2 誘導性キナーゼ（I T K）のキナーゼ活性を低減または阻害せず、G D C - 0 8 3 4；R N - 4 8 6；C G I - 5 6 0；C G I - 1 7 6 4；H M - 7 1 2 2 4；C C - 2 9 2；O N O - 4 0 5 9；C N X - 7 7 4；および L F M - A 1 3 から選択される。

20

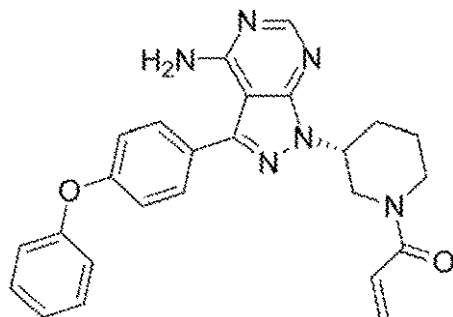
【0 9 2 3】

一実施形態において、キナーゼ阻害剤は、B T K 阻害剤、例えば、イブルチニブ（P C I - 3 2 7 6 5）である。実施形態において、本明細書で説明される C A R 発現細胞を、対象に、B T K 阻害剤（例えば、イブルチニブ）と組み合わせて投与する。実施形態において、本明細書で説明される C A R 発現細胞を、対象に、イブルチニブ（P C I - 3 2 7 6 5 とともにまた呼ばれる）と組み合わせて投与する。イブルチニブ { 1 - [(3 R) - 3 - [4 - アミノ - 3 - (4 - フェノキシフェニル) - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - d] ピリミジン - 1 - イル] ピペリジン - 1 - イル] プロパ - 2 - エン - 1 - オン } の構造を、下記

30

【0 9 2 4】

【化 1 3】



40

【0 9 2 5】

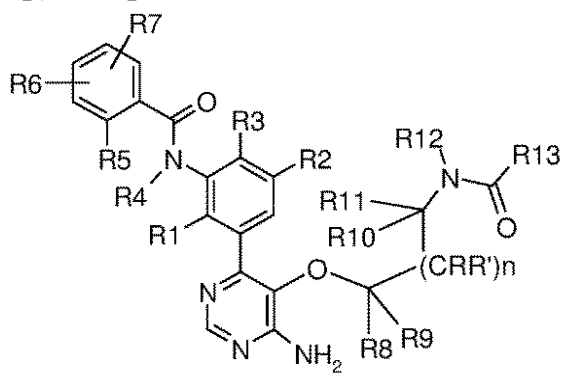
実施形態において、対象は、C L L、マンツル細胞リンパ腫（M C L）、または小リンパ球性リンパ腫（S L L）を有する。例えば、対象は、第 1 7 染色体の短腕部における欠失 [例えば、白血病性細胞における d e l (1 7 p)] を有する。他の例において、対象は、d e l (1 7 p) を有さない。実施形態において、対象は、再発性 C L L または S L L を有し、例えば、対象は、かつて、がん治療を投与されたことがある（例えば、かつて、1 つ、2 つ、3 つ、または 4 つの既往のがん治療を投与されたことがある）。実施形態において、対象は、不応性 C L L または S L L を有する。他の実施形態において、対象は

50

、濾胞性リンパ腫、例えば、再発性リンパ腫または不応性濾胞性リンパ腫を有する。一実施形態において、キナーゼ阻害剤は、BTK阻害剤、例えばイブルチニブ（PCI-32765）であり、イブルチニブを、約250mg、300mg、350mg、400mg、420mg、440mg、460mg、480mg、500mg、520mg、540mg、560mg、580mg、600mg（例えば、250mg、420mgまたは560mg）の用量で、ある期間にわたり毎日、例えば、21日間のサイクルにわたり毎日、または28日間のサイクルにわたり毎日投与する。一実施形態において、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、またはこれを超えるサイクルのイブルチニブを投与する。いくつかの実施形態において、イブルチニブを、リツキシマブと組み合わせて投与する。例えば、Burger et al. (2013) Ibrutinib In Combination With Rituximab (iR) Is Well Tolerated and Induces a High Rate Of Durable Remissions In Patients With High-Risk Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): New, Updated Results Of a Phase II Trial In 40 Patients, Abstract 675 presented at 55th ASH Annual Meeting and Exposition, New Orleans, LA 7-10 Decを参照されたい。理論に縛られずに述べると、イブルチニブの添加は、T細胞増殖性応答を増強し、T細胞を、ヘルパーT2（Th2）表現型から、ヘルパーT1（Th1）表現型にシフトさせると考えられる。Th1およびTh2は、ヘルパーT細胞の表現型であり、Th1は、Th2と対比して、異なる免疫応答経路を方向付ける。Th1表現型は、例えば、細胞内病原体／ウイルスまたはがん性細胞などの細胞を死滅させるための炎症促進性応答、または永続的な自己免疫応答に関連する。Th2表現型は、好酸球の蓄積および抗炎症性応答に関連する。本明細書の方法、使用、および組成物のいくつかの実施形態において、BTK阻害剤は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる、国際出願第WO／2015／079417号において説明されている、BTK阻害剤である。例えば、いくつかの実施形態において、BTK阻害剤は、式（I）の化合物または薬学的に許容されるその塩である。

【 0 9 2 6 】

【化 1 4】



「式中、

R 1 は、水素、ヒドロキシにより適宜置換される、C 1 ~ C 6 アルキルであり、

R²は、水素もしくはハロゲンであり、

R 3 は、水素もしくはハロゲンであり、

R 4 は、水素であり、

R 5 は、水素もしくはハロゲンであるか、

またはR 4およびR 5は、互いと接合し、結合、 $-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH=CH-$ 、 $-CH=CH-CH_2-$ ； $-CH_2-CH=CH-$ ；もしくは $-CH_2-CH_2-CH_2-$ を表し、

R 6 および R 7 は、互いと独立に、H、ヒドロキシルにより適宜置換される、C 1 ～ C 6 アルキル、ハロゲンもしくはヒドロキシにより適宜置換される、C 3 ～ C 6 シクロアルキル、またはハロゲンを表し、

R 8、R 9、R、R'、R 10、およびR 11は、互いと独立に、H、もしくはC 1～C 6アルコキシにより適宜置換される、C 1～C 6アルキルを表すか；またはR 8、R 9

、R、R'、R10、およびR11の任意の2つは、それらが結合する炭素原子と併せて、3～6員の飽和炭素環を形成することが可能であり、

R12は、水素、またはハロゲンもしくはC1～C6アルコキシにより適宜置換される、C1～C6アルキルであり、

またはR12、およびR8、R9、R、R'、R10、またはR11の任意の1つは、それらが結合する原子と併せて、4、5、6、または7員のアザシクロ環を形成することが可能であり、この環は、ハロゲン、シアノ、ヒドロキシル、C1～C6アルキル、またはC1～C6アルコキシにより適宜置換され、

nは、0、または1であり、

R13は、C1～C6アルキル、C1～C6アルコキシ、もしくはN、N-ジ-C1～C6アルキルアミノにより適宜置換される、C2～C6アルケニル；C1～C6アルキルもしくはC1～C6アルコキシにより適宜置換される、C2～C6アルキニル；またはC1～C6アルキルにより適宜置換される、C2～C6酸化アルキレニルである]

【0927】

いくつかの実施形態において、式IのBTK阻害剤は、N-(3-(5-(1-アクリロイルアゼチジン-3-イル)オキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；(E)-N-(3-(6-アミノ-5-(1-(ブタ-2-エノイル)アゼチジン-3-イル)オキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；N-(3-(6-アミノ-5-(1-プロピオロイルアゼチジン-3-イル)オキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；N-(3-(6-アミノ-5-(1-(ブタ-2-イノイル)アゼチジン-3-イル)オキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；N-(3-(5-(1-アクリロイルピペリジン-4-イル)オキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；N-(3-(6-アミノ-5-(2-(N-メチルアクリルアミド)エトキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；(E)-N-(3-(6-アミノ-5-(2-(N-メチルブタ-2-エンアミド)エトキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；N-(3-(6-アミノ-5-(2-(N-メチルプロピオールアミド)エトキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；(E)-N-(3-(6-アミノ-5-(2-(4-メトキシ-N-メチルブタ-2-エンアミド)エトキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；N-(3-(6-アミノ-5-(2-(N-メチルブタ-2-インアミド)エトキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；N-(2-(4-アミノ-6-(3-(4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)ピリミジン-5-イル)オキシ)エチル)-N-メチルオキシラン-2-カルボキサミド；N-(2-(4-アミノ-6-(3-(6-シクロプロピル-8-フルオロ-1-オキシイソキノリン-2(1H)-イル)フェニル)ピリミジン-5-イル)オキシ)エチル)-N-メチルアクリルアミド；N-(3-(5-(2-アクリルアミドエトキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；N-(3-(6-アミノ-5-(2-(N-エチルアクリルアミド)エトキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；N-(3-(6-アミノ-5-(2-(N-(2-フルオロエチル)アクリルアミド)エトキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；N-(3-

10

20

30

40

50

(5-(1-アクリルアミドシクロプロピル)メトキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド; (S)-N-(3-(5-(2-アクリルアミドプロポキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド; (S)-N-(3-(6-アミノ-5-(2-(ブタ-2-インアミド)プロポキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド; (S)-N-(3-(6-アミノ-5-(2-(N-メチルアクリルアミド)プロポキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド; (S)-N-(3-(6-アミノ-5-(2-(N-メチルブタ-2-インアミド)プロポキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド; N-(3-(6-アミノ-5-(3-(N-メチルアクリルアミド)プロポキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド; (S)-N-(3-(5-(1-アクリロイルピロリジン-2-イル)メトキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド; (S)-N-(3-(6-アミノ-5-(1-(ブタ-2-イノイル)ピロリジン-2-イル)メトキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド; (S)-2-(3-(5-(1-アクリロイルピロリジン-2-イル)メトキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-(ヒドロキシメチル)フェニル)-6-シクロプロピル-3, 4-ジヒドロイソキノリン-1(2H)-オン; N-(2-(4-アミノ-6-(3-(6-シクロプロピル-1-オキソ-3, 4-ジヒドロイソキノリン-2(1H)-イル)-5-フルオロ-2-(ヒドロキシメチル)フェニル)ピリミジン-5-イル)オキシ)エチル)-N-メチルアクリルアミド; N-(3-(5-(2S, 4R)-1-アクリロイル-4-メトキシピロリジン-2-イル)メトキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド; N-(3-(6-アミノ-5-(2S, 4R)-1-(ブタ-2-イノイル)-4-メトキシピロリジン-2-イル)メトキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド; 2-(3-(5-(2S, 4R)-1-アクリロイル-4-メトキシピロリジン-2-イル)メトキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-(ヒドロキシメチル)フェニル)-6-シクロプロピル-3, 4-ジヒドロイソキノリン-1(2H)-オン; N-(3-(5-(2S, 4S)-1-アクリロイル-4-メトキシピロリジン-2-イル)メトキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド; N-(3-(6-アミノ-5-(2S, 4S)-1-(ブタ-2-イノイル)-4-メトキシピロリジン-2-イル)メトキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド; N-(3-(5-(2S, 4R)-1-アクリロイル-4-フルオロピロリジン-2-イル)メトキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド; N-(3-(6-アミノ-5-(2S, 4R)-1-(ブタ-2-イノイル)-4-フルオロピロリジン-2-イル)メトキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド; (S)-N-(3-(5-(1-アクリロイルアゼチジン-2-イル)メトキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド; (S)-N-(3-(6-アミノ-5-(1-プロピオイルアゼチジン-2-イル)メトキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド; (S)-2-(3-(5-(1-アクリロイルアゼチジン-2-イル)メトキシ)-

10

20

30

40

50

6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-(ヒドロキシメチル)フェニル)-6-シクロプロピル-3,4-ジヒドロイソキノリン-1(2H)-オン;(R)-N-(3-(5-(1-アクリロイルアゼチジン-2-イル)メトキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド;(R)-N-(3-(5-(1-アクリロイルピペリジン-3-イル)メトキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド;N-(3-(5-(2R,3S)-1-アクリロイル-3-メトキシピロリジン-2-イル)メトキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド;N-(3-(5-(2S,4R)-1-アクリロイル-4-シアノピロリジン-2-イル)メトキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド;またはN-(3-(5-(2S,4S)-1-アクリロイル-4-シアノピロリジン-2-イル)メトキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミドから選択される。

【0928】

他の形で提示されない限りにおいて、式IのBTK阻害剤を説明するのに上記で使った化学用語は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる、国際出願第WO/2015/079417号において明示されるそれらの意味に従い使用する。

【0929】

一実施形態において、キナーゼ阻害剤は、テムシロリムス;AP23573およびMK8669としてもまた公知の、リダホロリムス{(1R,2R,4S)-4-[(2R)-2-[(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18-ジヒドロキシ-19,30-ジメトキシ-15,17,21,23,29,35-ヘキサメチル-2,3,10,14,20-ペンタオキソ-11,36-ジオキサ-4-アザトリシクロ[30.3.1.0⁴,⁹]ヘキサトリアコンター16,24,26,28-テトラエン-12-イル]プロピル]-2-メトキシシクロヘキシルジメチルホスフィネート};エベロリムス(RAD001);ラパマイシン(AY22989);セマピモド(simapimod);(5-{2,4-ビス[(3S)-3-メチルモルホリン-4-イル]ピリド[2,3-d]ピリミジン-7-イル}-2-メトキシフェニル)メタノール(AZD8055);2-アミノ-8-[trans-4-(2-ヒドロキシエトキシ)シクロヘキシル]-6-(6-メトキシ-3-ピリジニル)-4-メチル-ピリド[2,3-d]ピリミジン-7(8H)-オン(PF04691502);およびN²-[1,4-ジオキソ-4-[[4-(4-オキソ-8-フェニル-4H-1-ベンゾピラン-2-イル)モルホリニウム-4-イル]メトキシ]ブチル]-L-アルギニルグリシル-L-α-アスパルチル-L-セリンの分子内塩(SF1126)(配列番号1316);およびXL765から選択される、mTOR阻害剤である。

【0930】

一実施形態において、キナーゼ阻害剤は、mTOR阻害剤、例えば、ラパマイシンであり、ラパマイシンを、約3mg、4mg、5mg、6mg、7mg、8mg、9mg、10mg(例えば、6mg)の用量で、ある期間にわたり毎日、例えば、21日間のサイクルにわたり毎日、または28日間のサイクルにわたり毎日投与する。一実施形態において、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、またはこれを超えるサイクルのラパマイシンを投与する。一実施形態において、キナーゼ阻害剤は、mTOR阻害剤、例えば、エベロリムスであり、エベロリムスを、約2mg、2.5mg、3mg、4mg、5mg、6mg、7mg、8mg、9mg、10mg、11mg、12mg、13mg、14mg、15mg(例えば、10mg)の用量で、ある期間にわたり毎日、例えば、28日間のサイクルにわたり毎日投与する。一実施形態において、

1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、またはこれを超えるサイクルのエベロリムスを投与する。

【0931】

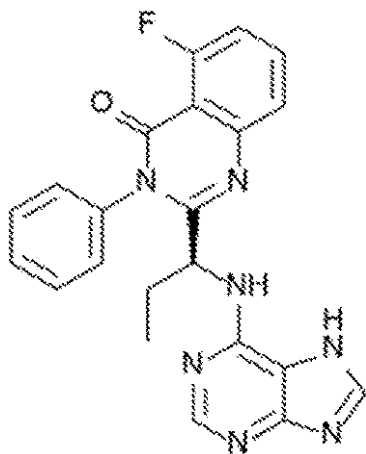
一実施形態において、キナーゼ阻害剤は、CGP052088；4-アミノ-3-(p-フルオロフェニルアミノ)-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン(CGP57380)；セルコスポラミド；ETC-1780445-2；および4-アミノ-5-(4-フルオロアニリノ)-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジンから選択される、MNK阻害剤である。

【0932】

実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、対象に、ホスホイノシチド3キナーゼ(PI3K)阻害剤(例えば、本明細書で説明されるPI3K阻害剤、例えば、イデラリシブまたはドゥベリシブ)および/またはリツキシマブと組み合わせて投与する。実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、対象に、イデラリシブおよびリツキシマブと組み合わせて投与する。実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、対象に、ドゥベリシブおよびリツキシマブと組み合わせて投与する。イデラリシブ(GS-1101またはCAL-101ともまた呼ばれる；Gilead)は、PI3Kのデルタアイソフォームを遮断する低分子である。イデラリシブ{5-フルオロ-3-フェニル-2-[(1S)-1-(7H-プリン-6-イルアミノ)プロピル]-4(3H)-キナゾリノン}の構造を、下記に示す。

【0933】

【化15】

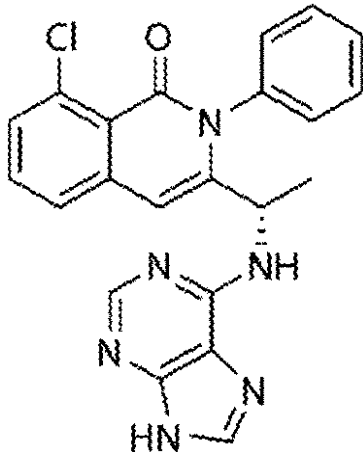


【0934】

ドゥベリシブ(IPI-145ともまた呼ばれる；Infinity PharmaceuticalsおよびAbbvie)は、PI3K- δ 、PI3K- γ を遮断する低分子である。ドゥベリシブ{8-クロロ-2-フェニル-3-[(1S)-1-(9H-プリン-6-イルアミノ)エチル]-1(2H)-イソキノリノン}の構造を、下記に示す。

【0935】

【化 16】



10

【0936】

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、再発性CLL、例えば、対象は、かつて、がん治療を投与されたことがある（例えば、かつて、抗CD20抗体を投与されたことがあるか、またはイブルチニブを投与されたことがある）。例えば、対象は、第17染色体の短腕部における欠失〔例えば、白血病性細胞におけるdel(17p)〕を有する。他の例において、対象は、del(17p)を有さない。実施形態において、対象は、免疫グロブリン重鎖可変領域(IgV_H)遺伝子において突然変異を含む白血病性細胞を含む。他の実施形態において、対象は、免疫グロブリン重鎖可変領域(IgV_H)遺伝子において突然変異を含む白血病性細胞を含まない。実施形態において、対象は、第11染色体の長腕部における欠失〔del(11q)〕を有する。他の実施形態において、対象は、del(11q)を有さない。実施形態において、イデラリシブを、約100～400mg（例えば、100～125、125～150、150～175、175～200、200～225、225～250、250～275、275～300、325～350、350～375、または375～400mg）の投与量で、例えば、毎日2回投与する。実施形態において、ドゥベリシブを、約15～100mg（例えば、約15～25、25～50、50～75、または75～100mg）の投与量で、例えば、毎日2回投与する。実施形態において、リツキシマブを、約350～550mg/m²（例えば、350～375、375～400、400～425、425～450、450～475、または475～500mg/m²）の投与量で、例えば、静脈内投与する。

20

30

【0937】

一実施形態において、キナーゼ阻害剤は、2-アミノ-8-[trans-4-(2-ヒドロキシエトキシ)シクロヘキシル]-6-(6-メトキシ-3-ピリジニル)-4-メチル-ピリド[2,3-d]ピリミジン-7(8H)-オン(PF-04691502)；N-[4-[[4-(ジメチルアミノ)-1-ペピリジニル]カルボニル]フェニル]-N'-[4-(4,6-ジ-4-モルホリニル-1,3,5-トリアジン-2-イル)フェニル]尿素(PF-05212384、PKI-587)；2-メチル-2-{4-[3-メチル-2-オキソ-8-(キノリン-3-イル)-2,3-ジヒドロ-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル]フェニル}プロパンニトリル(BEZ-235)；アピトリシブ(GDC-0980、RG7422)；2,4-ジフルオロ-N-{2-(メチルオキシ)-5-[4-(4-ピリダジニル)-6-キノリニル]-3-ピリジニル}ベンゼンスルホンアミド(GSK2126458)；8-(6-メトキシピリジン-3-イル)-3-メチル-1-(4-(ピペラジン-1-イル)-3-(トリフルオロメチル)フェニル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-2(3H)-オンマレイン酸(NVP-BGT226)；3-[4-(4-モルホリニルピリド[3',2':4,5]フロ[3,2-d]ピリミジン-2-イル]フェノール(PI-103)；5-(9-イソプロピル-8-メチル-2-モルホリノ-9H-プリン-6-イル)ピリミ

40

50

ジン-2-アミン (VS-5584、SB2343) ; および N-[2-[(3, 5-ジメトキシフェニル) アミノ] キノキサリン-3-イル] -4-[(4-メチル-3-メトキシフェニル) カルボニル] アミノフェニルスルホンアミド (XL765) から選択される、ホスファチジルイノシトール3キナーゼ (PI3K) および mTOR の二重阻害剤である。

【0938】

実施形態において、本明細書で説明される CAR 発現細胞を、対象に、未分化リンパ腫キナーゼ (ALK) 阻害剤と組み合わせて投与する。例示的な ALK キナーゼは、クリゾチニブ (Pfizer)、セリチニブ (Novartis)、アレクチニブ (Chugai)、ブリガチニブ (AP26113 とともにまた呼ばれる; Ariad)、エントレクチニブ (Ignyta)、PF-06463922 (Pfizer)、TSR-011 (Tesarro) (例えば、臨床試験識別番号 NCT02048488 を参照されたい)、CEP-37440 (Teva)、および X-396 (Xcovery) を含むがこれらに限定されない。いくつかの実施形態において、対象は、固形がん、例えば、本明細書で説明される固形がん、例えば、肺がんを有する。

【0939】

クリゾチニブの化学名は、3-[(1R) -1-(2, 6-ジクロロ-3-フルオロフェニル) エトキシ] -5-(1-ピペリジン-4-イルピラゾール-4-イル) ピリジン-2-アミンである。セリチニブの化学名は、5-クロロ-N²-[2-イソプロポキシ-5-メチル-4-(4-ピペリジニル) フェニル] -N⁴-[2-(イソプロピルスルホニル) フェニル] -2, 4-ピリミジンジアミンである。アレクチニブの化学名は、9-エチル-6, 6-ジメチル-8-(4-モルホリノピペリジン-1-イル) -11-オキソ-6, 11-ジヒドロ-5H-ベンゾ [b] カルバゾール-3-カルボニトリルである。ブリガチニブの化学名は、5-クロロ-N²-{4-[4-(ジメチルアミノ)-1-ピペリジニル] -2-メトキシフェニル} -N⁴-[2-(ジメチルホスホリル) フェニル] -2, 4-ピリミジンジアミンである。エントレクチニブの化学名は、N-(5-(3, 5-ジフルオロベンジル) -1H-インダゾール-3-イル) -4-(4-メチルピペラジン-1-イル) -2-((テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル) アミノ) ベンズアミドである。PF-06463922 の化学名は、(10R) -7-アミノ-12-フルオロ-2, 10, 16-トリメチル-15-オキソ-10, 15, 16, 17-テトラヒドロ-2H-8, 4-(メテノ) ピラゾロ [4, 3-h] [2, 5, 11] -ベンゾキサジアザシクロテトラデシン-3-カルボニトリルである。CEP-37440 の化学構造は、(S) -2-((5-クロロ-2-((6-(4-(2-ヒドロキシエチル) ピペラジン-1-イル) -1-メトキシ-6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-5H-ベンゾ [7] アヌレン-2-イル) アミノ) ピリミジン-4-イル) アミノ) -N-メチルベンズアミドである。X-396 の化学名は、(R) -6-アミノ-5-(1-(2, 6-ジクロロ-3-フルオロフェニル) エトキシ) -N-(4-(4-メチルピペラジン-1-カルボニル) フェニル) ピリダジン-3-カルボキサミドである。

【0940】

一実施形態において、キナーゼ阻害剤は、イブルチニブ; N-(5-(5-(4-アセチルピペラジン-1-カルボニル) -4-メトキシ-2-メチルフェニルチオ) チアゾール-2-イル) -4-((3, 3-ジメチルブタン-2-イルアミノ) メチル) ベンズアミド (BMS-509744) ; 7-ベンジル-1-(3-(ピペリジン-1-イル) プロピル) -2-(4-(ピリジン-4-イル) フェニル) -1H-イミダゾ [4, 5-g] キノキサリン-6(5H) -オン (CTA056) ; R-3-(1-(1-アクリロイルピペリジン-3-イル) -4-アミノ-1H-ピラゾロ [3, 4-d] ピリミジン-3-イル) -N-(3-メチル-4-(1-メチルエチル)) ベンズアミド (PF-06465469) から選択される ITK 阻害剤である。

【0941】

カルシウム依存性ホスファターゼであるカルシニューリンを阻害する薬物 (サイクロス

10

20

30

40

50

ポリリンおよびFK506)、または増殖因子によって誘導されたシグナル伝達に重要なp70S6キナーゼを阻害する薬物(ラパマイシン)(Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993)のいずれかも使用することができる。さらなる態様において、本発明の細胞組成物は、骨髄移植、フルダラビンなどの化学療法剤を使用したT細胞除去療法、外部ビーム放射線療法(XRT)、シクロホスファミド、および/またはOKT3もしくはCAMPATHなどの抗体とともに(例えば、その前、それと同時またはその後に)患者に投与することができる。一態様において、本発明の細胞組成物は、CD20と反応する薬剤、例えばリツキサンなどのB細胞除去療法の後に投与される。例えば、一実施形態において、対象は、高用量化学療法、それに続いて末梢血幹細胞移植での標準的な処置を受けてもよい。所定の実施形態において、移植後、対象は、本発明の拡大させた免疫細胞の注入を受ける。さらなる実施形態において、拡大させた細胞は、外科手術の前に、またはその後に投与される。

10

【0942】

実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、対象に、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ(IDO)阻害剤と組み合わせて投与する。IDOとは、アミノ酸であるL-トリプトファンの、キヌレニンへの分解を触媒する酵素である。多くのがん、例えば、前立腺がん、結腸直腸がん、膵臓がん、子宮頸がん、胃がん、卵巣がん、頭部がん、および肺がんは、IDOを過剰発現する。pDC、マクロファージ、および樹状細胞(DC)は、IDOを発現し得る。理論に縛られずに述べると、L-トリプトファンの減少(例えば、IDOにより触媒される)は、T細胞のアネルギーおよびアポトーシスを誘導することにより、免疫抑制環境を結果としてもたらすと考えられる。したがって、理論に縛られずに述べると、IDO阻害剤は、例えば、CAR発現免疫細胞の抑制または死を減少させることにより、本明細書で説明されるCAR発現細胞の効能を増強し得ると考えられる。実施形態において、対象は、充実性腫瘍、例えば、本明細書で説明される充実性腫瘍、例えば、前立腺がん、結腸直腸がん、膵臓がん、子宮頸がん、胃がん、卵巣がん、頭部がん、または肺がんを有する。例示的なIDO阻害剤は、1-メチルトリプトファン、インドキシモド(New Link Genetics)(例えば、臨床試験識別番号:NCT01191216;NCT01792050を参照されたい)、およびINCB024360(Incyte Corp.)(例えば、臨床試験識別番号:NCT01604889;NCT01685255を参照されたい)を含むがこれらに限定されない。

20

30

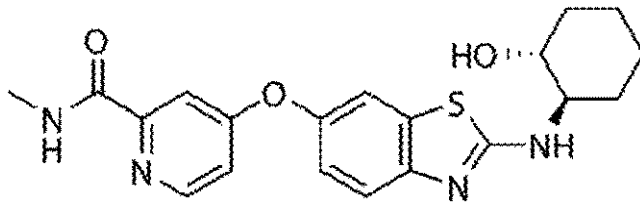
【0943】

実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、対象に、骨髄由来免疫抑制細胞(MDSC)のモジュレーターと組み合わせて投与する。MDSCは、末梢および多くの充実性腫瘍の腫瘍部位に蓄積される。これらの細胞は、T細胞応答を抑制し、これにより、CAR発現細胞療法の効能を妨げる。理論に縛られずに述べると、MDSCモジュレーターの投与は、本明細書で説明されるCAR発現細胞の効能を増強すると考えられる。ある実施形態において、対象は、充実性腫瘍、例えば、本明細書で説明される充実性腫瘍、例えば、神経膠芽腫を有する。例示的なMDSCモジュレーターは、MCS110およびBLZ945を含むがこれらに限定されない。MCS110とは、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)に対するモノクローナル抗体(mAb)である。例えば、臨床試験識別番号NCT00757757を参照されたい。BLZ945とは、コロニー刺激因子1受容体(CSF1R)の低分子阻害剤である。例えば、Pyonteck et al. Nat. Med. 19(2013):1264-72を参照されたい。BLZ945の構造を、下記に示す。

40

【0944】

【化 17】



【0945】

実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、対象に、CD19 CAR T細胞（例えば、参照により本明細書に組み入れられる、WO2012/079000 10
 において説明されている、例えば、CTL019）と組み合わせて投与する。実施形態において、対象は、急性骨髄性白血病（AML）、例えば、CD19陽性AMLまたはCD19陰性AMLを有する。実施形態において、対象は、CD19+リンパ腫、例えば、CD19+非ホジキンリンパ腫（NHL）、CD19+ FL、またはCD19+ DLBCLを有する。実施形態において、対象は、再発性CD19+リンパ腫または不応性CD19+リンパ腫を有する。実施形態において、リンパ枯渇化学療法を、対象に、CD19

CART細胞の投与（例えば、注入）の前に、投与と並列して、または投与の後で投与する。ある例では、リンパ枯渇化学療法を、対象に、CD19 CART細胞の投与の前に投与する。例えば、リンパ枯渇化学療法は、CD19 CART細胞の注入の1～4日（例えば、1、2、3、または4日）前に終了する。実施形態において、CD19 CA 20
 RT細胞の複数回投与を、例えば、本明細書で説明される通りに行う。例えば、単回投与は、CD19 CART細胞約 5×10^8 個を含む。実施形態において、リンパ枯渇化学療法を、対象に、本明細書で説明されるCAR発現細胞、例えば、非CD19 CAR発現（expressing）細胞の投与（例えば、注入）の前に、投与と並列して、または投与の後で投与する。実施形態において、CD19 CARTを、対象に、非CD19 CAR発現細胞、例えば、本明細書で説明される非CD19 CAR発現細胞の投与（例えば、注入）の前に、投与と並列して、または投与の後で投与する。

【0946】

いくつかの実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、対象に、CD19 CAR発現細胞、例えば、参照により本明細書に組み入れられる、WO2012/ 30
 079000において説明されている、例えば、CTL019と組み合わせて、CLL-1の発現に関連する疾患、例えば、本明細書で説明されるがんの処置のために投与する。理論に縛られずに述べると、CD19 CAR発現細胞を、CAR発現細胞と組み合わせて投与することは、初期系統のがん幹細胞、例えば、がん幹細胞を標的とし、免疫応答をモジュレートし、調節性B細胞を枯渇させ、かつ/または腫瘍微小環境を改善することにより、本明細書で説明されるCAR発現細胞の効能を改善すると考えられる。例えば、CD19 CAR発現細胞が、初期系統マーカーを発現するがん細胞、例えば、がん幹細胞およびCD19発現細胞を標的とするのに対し、本明細書で説明されるCAR発現細胞は、後期系統マーカーを発現するがん細胞、例えば、CLL-1を標的とする。このプレコ 40
 ンディショニング法は、本明細書で説明されるCAR発現細胞の効能を改善し得る。このような実施形態において、CD19 CAR発現細胞を、本明細書で説明されるCAR発現細胞投与（例えば、注入）の前に、投与と並列して、または投与の後で投与する。

【0947】

実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現細胞はまた、CD19を標的とするCAR、例えば、CD19 CARも発現する。ある実施形態において、本明細書で説明されるCARおよびCD19 CARを発現する細胞を、対象に、本明細書で説明されるがん、例えば、AMLの処置のために投与する。ある実施形態において、CAR分子の一方または両方の配置は、一次細胞内シグナル伝達ドメインと、共刺激シグナル伝達ドメインとを含む。別の実施形態において、CAR分子の一方または両方の配置は、一次細胞内シグナル伝達ドメインと、2つまたはこれを超える、例えば、2、3、4、もしくは5 50

つ、またはこれを超える共刺激シグナル伝達ドメインとを含む。このような実施形態において、本明細書で説明されるCAR分子と、CD19 CARとは、同じ一次細胞内シグナル伝達ドメインを有してもよく、異なる一次細胞内シグナル伝達ドメインを有してもよく、同じ共刺激シグナル伝達ドメインを有してもよく、異なる共刺激シグナル伝達ドメインを有してもよく、同じ数の共刺激シグナル伝達ドメインを有してもよく、異なる数の共刺激シグナル伝達ドメインを有してもよい。代替的に、本明細書で説明されるCARと、CD19 CARとは、CAR分子の1つが、抗原結合ドメインおよび共刺激ドメイン（例えば、4-1BB）を含むのに対し、他のCAR分子は、抗原結合ドメインおよび一次細胞内シグナル伝達ドメイン（例えば、CD3ゼータ）を含む、スプリットCARとしても配置される。

10

【0948】

いくつかの実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、対象に、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受容体アルファ（IL-15Ra）ポリペプチド、またはIL-15ポリペプチドおよびIL-15Raポリペプチド、例えば、hetIL-15（Admune Therapeutics, LLC）の両方の組合せと組み合わせて投与する。hetIL-15とは、IL-15とIL-15Raとの、ヘテロ二量体の非共有結合的複合体である。hetIL-15は、例えば、参照により本明細書に組み入れられる、U. S. 8, 124, 084、U. S. 2012/0177598、U. S. 2009/0082299、U. S. 2012/0141413、およびU. S. 2011/0081311において説明されている。実施形態において、hetIL-15を、皮下投与する。実施形態において、対象は、がん、例えば、固形がん、例えば、黒色腫または結腸がんを有する。実施形態において、対象は、転移性がんを有する。

20

【0949】

実施形態において、本明細書で説明される疾患、例えば血液障害、例えばAMLまたはMDSを有する対象に、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、薬剤、例えば、細胞毒性薬剤もしくは化学療法剤、生物学的療法（例えば、抗体、例えばモノクローナル抗体、もしくは細胞療法）、または阻害剤（例えば、キナーゼ阻害剤）と組み合わせて投与する。実施形態において、対象に、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、細胞毒性薬剤、例えば、CPX-351（Celator Pharmaceuticals）、シタラビン、ダウノルビシン、ボサロキシシン（Sunesis Pharmaceuticals）、サパシタビン（Cyclacel Pharmaceuticals）、イダルビシンまたはミトキサントロンと組み合わせて投与する。CPX-351とは、シタラビンとダウノルビシンを5：1のモル比で含むリポソーム製剤である。実施形態において、対象に、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、DNAメチル化抑制剤（hypomethylating agent）、例えばDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤、例えば、アザシチジンまたはデシタビンと組み合わせて投与する。実施形態において、対象に、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、生物学的療法、例えば抗体または細胞療法、例えば、225Ac-リンツズマブ（Actimab-A; Actinium Pharmaceuticals）、IPH2102（Innate Pharma/Bristol Myers Squibb）、SGN-CD33A（Seattle Genetics）、またはゲムツズマブ・オゾガマイシン（Mylotarg; Pfizer）と組み合わせて投与する。SGN-CD33Aとは、抗CD33抗体に付着しているピロロベンゾジアゼピン二量体を含む、抗体薬物複合体（ADC）である。Actimab-Aとは、アクチニウムで標識された抗CD33抗体（リンツズマブ）である。IPH2102とは、キラー免疫グロブリン様受容体（KIR）を標的とするモノクローナル抗体である。実施形態において、対象に、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、FLT3阻害剤、例えば、ソラフェニブ（Bayer）、ミドスタウリン（Novartis）、キザルチニブ（第一三共株式会社）、クレノラニブ（Arog Pharmaceuticals）、PLX3397（第一三共株式会社）、AKN-028（Akinion Pharmaceutic

30

40

50

als)、またはASP2215(アステラス製薬株式会社)と組み合わせて投与する。実施形態において、対象に、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ(IDH)阻害剤、例えば、AG-221(Celgene/Agios)またはAG-120(Agios/Celgene)と組み合わせて投与する。実施形態において、対象に、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、細胞周期調節剤、例えば、ポロ様キナーゼ1(Plk1)の阻害剤、例えばボラセルチブ(Boehringer Ingelheim);またはサイクリン依存性キナーゼ9(Cdk9)の阻害剤、例えばアルボシジブ(Tolero Pharmaceuticals/Sanofi Aventis)と組み合わせて投与する。実施形態において、対象に、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、B細胞受容体シグナル伝達ネットワーク阻害剤、例えば、B細胞リンパ腫2(Bcl-2)の阻害剤、例えば、ベネトクラクス(Abbvie/Roche);またはブルトン型チロシンキナーゼ(Btk)の阻害剤、例えばイブルチニブ(Pharmacyclics/Johnson & Johnson Janssen Pharmaceutical)と組み合わせて投与する。実施形態において、対象に、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、M1アミノペプチダーゼの阻害剤、例えば、トセドスタット(CTI BioPharma/Vernalis);ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の阻害剤、例えば、プラシノスタット(MEI Pharma);多標的キナーゼ阻害剤、例えば、リゴサチブ(Onconova Therapeutics/Baxter/SymBio);またはペプチド性CXCR4インバーサゴニスト、例えば、BL-8040(BioLineRx)と組み合わせて投与する。

10

20

【0950】

別の実施形態において、細胞の移植、例えば同種異系幹細胞移植の前に、対象に、CAR発現細胞、例えば、CD19 CAR発現細胞、本発明の組成物の注入を施す。好ましい実施形態において、CAR発現細胞は、例えば、mRNA CARのエレクトロポレーションにより、CARを一過性に発現し、それによって、CARの標的にされる抗原、例えばCD19の発現をドナー幹細胞の注入の前に停止させて生着不全を回避する。一実施形態において、対象は、CAR発現細胞の投与に関連する副作用を低減または改善する薬剤を投与されてもよい。CAR発現細胞の投与に関連する副作用としては、これらに限定されないが、CRS、およびマクロファージ活性化症候群(MAS)とも称される血球貪食性リンパ組織球症(HLH)が挙げられる。CRSの症状としては、高熱、吐き気、一過性の低血圧、低酸素症、および同種のものが挙げられる。したがって、本明細書で説明される方法は、本明細書で説明されるCAR発現細胞を対象に投与することと、薬剤をさらに投与して、CAR発現細胞による処置から生じる可溶性因子のレベルの上昇を管理することとを含み得る。一実施形態において、対象において上昇する可溶性因子は、IFN- γ 、TNF α 、IL-2およびIL-6の1つまたは複数である。したがって、この副作用を処置するのに投与される薬剤は、これらの可溶性因子の1つまたは複数を中和する薬剤であり得る。このような薬剤の例は、ステロイド(例えば、コルチコステロイド)、TNF α の阻害剤、およびIL-6の阻害剤を含むがこれらに限定されない。TNF α 阻害剤の例は、インフリキシマブ、アダリムマブ、セルトリズマブペゴル、およびゴリムマブなどの抗TNF α 抗体分子である。TNF α 阻害剤の別の例は、融合タンパク質、エタネルセプトなどである。TNF α の低分子阻害剤は、キササンチン誘導体(例えば、ペントキシフィリン)およびブプロピオンを含むがこれらに限定されない。IL-6阻害剤の例は、トシリズマブ(toc)、サリルマブ、エルシリモマブ、CNTO 328、ALD 518/BMS-945429、CNTO 136、CPSI-2364、CDP6038、VX30、ARGX-109、FE301、およびFM101などの抗IL-6抗体分子である。一実施形態において、抗IL-6抗体分子は、トシリズマブである。IL-1Rベースの阻害剤の例は、アナキンラである。

30

40

【0951】

実施形態において、例えば、本明細書で説明されるCARを発現する1つまたは複数の細胞を投与する前に、対象においてリンパ枯渇を実施する。実施形態において、リンパ枯

50

渴は、メルファラン、シトキサン、シクロホスファミドおよびフルダラビンの1つまたは複数を投与することを含む。

【0952】

実施形態において、リンパ枯渴化学療法を、対象に、CAR細胞、例えば、本明細書で説明される細胞の投与（例えば、注入）の前に、投与と並列して、または投与の後で投与する。ある例では、リンパ枯渴化学療法を、対象に、CAR細胞の投与の前に投与する。例えば、リンパ枯渴化学療法は、CAR細胞の注入の1～4日（例えば、1、2、3、または4日）前に終了する。実施形態において、CAR細胞の複数回投与を、例えば、本明細書で説明される通りに行う。例えば、単回投与は、CAR細胞約 5×10^8 個を含む。実施形態において、リンパ枯渴化学療法を、対象に、本明細書で説明されるCAR発現細胞の投与（例えば、注入）の前に、投与と並列して、または投与の後で投与する。

10

【0953】

一部の実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現細胞を、対象に、CD19 CAR発現細胞、例えばCTL019、例えば、参照により本明細書に組み入れられるWO2012/079000において説明されているようなCTL019と組み合わせて、がん抗原の発現に関連する疾患、例えば、本明細書で説明されるがんの処置のために投与する。理論に縛られずに述べると、CD19 CAR発現細胞を、別のCAR発現細胞と組み合わせて投与することは、初期系統のがん細胞、例えば、がん幹細胞を標的とすること、免疫応答をモジュレートすること、調節性B細胞を枯渴させること、および／または腫瘍微小環境を改善することにより、本明細書で説明されるCAR発現細胞の効能を改善すると考えられる。例えば、CD19 CAR発現細胞は、初期系統マーカーを発現するがん細胞、例えば、がん幹細胞およびCD19発現細胞を標的とするのに対し、本明細書で説明される一部の他のCAR発現細胞は、後期系統マーカーを発現するがん細胞を標的とする。このプレコンディショニング法は、本明細書で説明されるCAR発現細胞の効能を改善し得る。このような実施形態において、CD19 CAR発現細胞を、第二のCAR発現細胞の投与（例えば、注入）の前に、投与と並列して、または投与の後で投与する。

20

【0954】

実施形態において、CD19以外のがん抗原を標的とするCARを発現するCAR発現細胞はまた、CD19を標的とするCAR、例えば、CD19 CARも発現する。ある実施形態において、非CD19 CARおよびCD19 CARを発現する細胞を、対象に、本明細書で説明されるがん、例えば、AMLの処置のために投与する。ある実施形態において、前記CAR分子の一方または両方の配置は、一次細胞内シグナル伝達ドメインおよび共刺激シグナル伝達ドメインを含む。別の実施形態において、前記CAR分子の一方または両方の配置は、一次細胞内シグナル伝達ドメインおよび2つ以上、例えば、2つ、3つ、4つまたは5つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインを含む。このような実施形態において、非CD19 CAR分子およびCD19 CARは、同じ一次細胞内シグナル伝達ドメインを有してもよく、異なる一次細胞内シグナル伝達ドメインを有してもよく、同じ共刺激シグナル伝達ドメインを有してもよく、異なる共刺激シグナル伝達ドメインを有してもよく、同じ数の共刺激シグナル伝達ドメインを有してもよく、異なる数の共刺激シグナル伝達ドメインを有してもよい。代替的に、非CD19 CARおよびCD19 CARは、前記CAR分子の一方が抗原結合ドメインおよび共刺激ドメイン（例えば、4-1BB）を含むのに対して他方のCAR分子が抗原結合ドメインおよび一次細胞内シグナル伝達ドメイン（例えば、CD3ゼータ）を含む、スプリットCARとして配置される。

30

40

【0955】

阻害分子阻害剤／チェックポイント阻害剤

一実施形態において、対象に、CAR発現細胞の活性を増強する薬剤を投与することができる。例えば、一実施形態において、薬剤は、阻害分子を阻害する薬剤であってもよく、例えば、薬剤は、チェックポイント阻害剤である。阻害分子またはチェックポイント分

50

子、例えばプログラム死1 (PD1) は、一部の実施形態において、免疫エフェクター応答を開始するCAR発現細胞の能力を低下させることができる。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および/またはCEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3 (CD276)、B7-H4 (VTCN1)、HVEM (TNFRSF14またはCD270)、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシンおよびTGFR (例えば、TGFRベータ) が挙げられる。実施形態において、本明細書で説明されるCAR発現細胞は、スイッチ共刺激受容体、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み入れられるWO2013/019615 10
において説明されているようなスイッチ共刺激受容体を含む。

【0956】

本明細書で説明される方法は、CAR発現細胞をチェックポイント阻害剤と組み合わせて投与することを包含し得る。一実施形態において、対象は、完全応答例である。別の実施形態において、対象は、部分応答例または非応答例であり、例えば、一部の実施形態において、チェックポイント阻害剤をCAR発現細胞の前に、例えば、CAR発現細胞の投与の2週間、12日、10日、8日、1週間、6日、5日、4日、3日、2日または1日前に投与する。一部の実施形態において、チェックポイント阻害剤をCAR発現細胞と同時に投与する。

【0957】

例えば、DNAレベル、RNAレベル、またはタンパク質レベルにおける阻害による阻害分子の阻害は、CAR発現細胞の性能を最適化し得る。実施形態において、阻害核酸、例えば、dsRNA、例えば、siRNAまたはshRNA、またはクラスター化規則的間隔短鎖回文配列リピート (CRISPR)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、またはジンクフィンガーエンドヌクレアーゼ (ZFN) を使用して、CAR発現細胞における阻害分子の発現を阻害することができる。一実施形態において、阻害剤は、shRNAである。ある実施形態において、阻害分子は、CAR発現細胞内で阻害される。これらの実施形態において、阻害分子の発現を阻害するdsRNA分子は、構成要素、例えばCARの構成要素の全てをコードする核酸に連結されている。

【0958】

ある実施形態において、T細胞の機能をモジュレートまたは調節する、例えば、T細胞の機能を阻害する分子の発現を阻害するdsRNA分子が発現される、例えば、CAR発現細胞内で発現されるように、T細胞の機能をモジュレートまたは調節する、例えば、T細胞の機能を阻害する分子の発現を阻害するdsRNA分子をコードする核酸分子を、プロモーター、例えば、H1由来のプロモーターまたはU6由来のプロモーターに作動可能に連結する。例えば、Tiscornia G., "Development of Lentiviral Vectors Expressing siRNA," Chapter 3, in Gene Transfer: Delivery and Expression of DNA and RNA (eds. Friedmann and Rossi). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2007; Brummelkamp TR, et al. (2002) Science 296: 550-553; Miyagishi M, et al. (2002) Nat. Biotechnol. 19: 497-500を参照されたい。ある実施形態において、T細胞機能をモジュレートまたは調節する、例えば阻害する、分子の発現を阻害するdsRNA分子をコードする核酸分子は、CARの構成要素、例えば構成要素の全て、をコードする核酸分子を含む同じベクター、例えばレンチウイルスベクター、上に存在する。このような実施形態において、T細胞の機能をモジュレートまたは調節する、例えば、T細胞の機能を阻害する分子の発現を阻害するdsRNA分子をコードする核酸分子は、ベクター、例えば、レンチウイルスベクターの、CARの構成要素、例えば、構成要素の全てをコードする核酸に対して、5'側または3'側に配置される。T細胞の機能をモジュレートまたは調節する、例えば、T細胞の機能を阻害する分子の発現を阻害するdsRNA分子をコードする核酸分子は、CARの構成要素、例えば、構成要素の全てをコードする核酸と、同じ方向に転写される場合もあり、異なる方向に転写される場合もある。ある実施 40
50

形態において、T細胞の機能をモジュレートまたは調節する、例えば、T細胞の機能を阻害する分子の発現を阻害するdsRNA分子をコードする核酸分子は、CARの構成要素、例えば、構成要素の全てをコードする核酸分子を含むベクター以外のベクターに存在する。ある実施形態において、T細胞の機能をモジュレートまたは調節する、例えば、T細胞の機能を阻害する分子の発現を阻害するdsRNA分子をコードする核酸分子は、CAR発現細胞内で一過性に発現される。ある実施形態において、T細胞の機能をモジュレートまたは調節する、例えば、T細胞の機能を阻害する分子の発現を阻害するdsRNA分子をコードする核酸分子は、CAR発現細胞のゲノムに安定的に統合される。ある実施形態において、T細胞機能をモジュレートまたは調節する、例えば阻害する分子は、PD-1である。

10

【0959】

一実施形態において、阻害シグナルの阻害剤は、例えば阻害分子に結合する抗体または抗体フラグメントであってもよい。例えば、薬剤は、PD-1、PD-L1、PD-L2またはCTLA-4に結合する抗体または抗体フラグメントであってもよい[例えば、イピリムマブ(また、MDX-010およびMDX-101とも称され、Yervoy(登録商標)として販売されている; Bristol-Myers Squibb; トレメリムマブ(Pfizerより入手可能なIgG2モノクローナル抗体、以前はチシリムマブとして公知、CP-675, 206)。]。ある実施形態において、薬剤は、TIM-3に結合する抗体または抗体フラグメントである。ある実施形態において、薬剤は、LAG-3に結合する抗体または抗体フラグメントである。ある実施形態において、薬剤は、CEACAM(例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および/またはCEACAM-5)と結合する、抗体または抗体フラグメントである。実施形態において、CAR発現細胞の活性を増強する薬剤、例えば、阻害分子の阻害剤を、同種異系のCAR、例えば、本明細書で説明される(例えば、本明細書の「同種異系のCAR」節において説明される)同種異系のCARと組み合わせて投与する。

20

【0960】

PD-1は、CD28、CTLA-4、ICOS、およびBTLAも包含する受容体のCD28ファミリーの阻害性の一員である。PD-1は、活性化されたB細胞、T細胞および骨髄細胞で発現される(Agata et al. 1996 Int. Immunol 8:765-75)。PD-1、PD-L1およびPD-L2に関する2つのリガンドは、PD-1に結合する際にT細胞の活性化を下方調節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、ヒトがん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、PD-1とPD-L1との局所的な相互作用を阻害することによって、回復させることができる。

30

【0961】

当業界では、PD-1、PD-L1、およびPD-L2の、抗体、抗体フラグメント、および他の阻害剤が利用可能であり、本明細書で説明されるCD19 CARと組み合わせて使用することができる。例えば、ニボルマブ(また、BMS-936558またはMDX-1106とも称される; Bristol-Myers Squibb)は、PD-1を特異的にブロックする完全ヒトIgG4モノクローナル抗体である。PD-1に特異的に結合するニボルマブ(クローン5C4)および他のヒトモノクローナル抗体は、US8, 008, 449およびWO2006/121168に開示されている。ピジリズマブ(Pidilizumab)(CT-011; Cure Tech)は、PD-1ピジリズマブに結合するヒト化IgG1kモノクローナル抗体であり、他のヒト化抗PD-1モノクローナル抗体は、WO2009/101611に開示されている。ペンブロリズマブ(かつては、ランブロリズマブとして公知であり、また、キイトルーダ、MK03475とも称する; Merck)とは、PD-1に結合するヒト化IgG4モノクローナル抗体である。ペンブロリズマブ および他のヒト化抗PD-1抗体は、US8, 354, 509およびWO2

40

50

009/114335において開示されている。MEDI4736 (Medimmune) は、PD-L1に結合するヒトモノクローナル抗体であり、リガンドの、PD-1との相互作用を阻害する。MDPL3280A (Genentech/Roche) は、PD-L1に結合するヒトFcに最適化されたIgG1モノクローナル抗体である。MDPL3280Aおよび他のPD-L1に対するヒトモノクローナル抗体は、米国特許第7,943,743号および米国特許出願公開第20120039906号に開示されている。他の抗PD-L1結合剤としては、YW243.55.S70 (WO2010/077634において、重鎖および軽鎖可変領域は、配列番号20および21に示される) およびMDX-1105 (また、BMS-936559とも称され、例えばWO2007/005874で開示された抗PD-L1結合剤である) が挙げられる。AMP-224 (B7-DCIg; アンプリミューン; 例えば、WO2010/027827およびWO2011/066342で開示されたもの) は、PD-1とB7-H1との相互作用をブロックするPD-L2Fc融合可溶性受容体である。他の抗PD-1抗体としては、なかでもAMP514 (アンプリミューン) が挙げられ、例えば、US8,609,089、US2010028330、および/またはUS20120114649で開示された抗PD-1抗体である。

10

【0962】

一部の実施形態において、本明細書で説明されるPD-1阻害剤 (例えば、PD-1抗体、例えば本明細書で説明されるPD-1抗体) を、本明細書で説明されるCD19 CARと組み合わせて使用して、CD19の発現に関連する疾患を処置する。一部の実施形態において、本明細書で説明されるPD-L1阻害剤 (例えば、PD-L1抗体、例えば本明細書で説明されるPD-L1抗体) を、本明細書で説明されるCD19 CARと組み合わせて使用して、CD19の発現に関連する疾患を処置する。疾患は、例えばリンパ腫、例えば、原発性DLBCLまたは続発性DLBCLを包含するDLBCLであってもよい。一部の実施形態において、対象は、CD3+/PD1+であるがん細胞、例えばDLBCL細胞、少なくとも5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%または90%を有してもよく、またはこれを有するものとして同定されてもよい。一部の実施形態において、対象は、がん、例えばがん微小環境において、実質的に重複しないCD19+細胞およびPD-L1+細胞集団を有するか、またはこれを有するものとして同定される。例えば、一部の実施形態において、がん、例えばがん微小環境において、細胞の20%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、または1%未満は、CD19およびPD-L1に関して二重陽性である。

20

30

【0963】

一部の実施形態において、対象をCD19 CARとPD-1阻害剤とPD-L1阻害剤の組合せで処置する。一部の実施形態において、対象をCD19 CARとPD-1阻害剤とCD3阻害剤の組合せで処置する。一部の実施形態において、対象をCD19 CARとPD-1阻害剤とPD-L1阻害剤とCD3阻害剤の組合せで処置する。

【0964】

一部の実施形態において、本明細書における方法は、生体試料、例えば、DLBCL細胞を含む試料中の細胞を、CD3および/またはPD-1 (例えば、CD3および/またはPD-1発現) についてアッセイする工程を包含する。一部の実施形態において、方法は、生体試料、例えば、DLBCL細胞を含む試料中の細胞を、CD19および/またはPD-L1 (例えば、CD19および/またはPD-L1発現) についてアッセイする工程を包含する。一部の実施形態において、方法は、例えば、がん細胞を含む試料を用意する工程、およびCD3、PD-1、CD19またはPD-L1の1つまたは複数についての検出工程を、例えば、免疫組織化学によって実施する工程を包含する。方法は、処置、例えば、CD19 CARを含む処置を推奨または投与するさらなる工程を含んでいてもよい。

40

【0965】

50

一実施形態において、抗PD-1抗体またはそのフラグメントは、参照によりその全体が組み入れられる、「Antibody Molecules to PD-1 and Uses Thereof」という表題の米国特許出願公開第2015/0210769号において説明されているような、抗PD-1抗体分子である。一実施形態において、抗PD-1抗体分子は、BAP049-hum01、BAP049-hum02、BAP049-hum03、BAP049-hum04、BAP049-hum05、BAP049-hum06、BAP049-hum07、BAP049-hum08、BAP049-hum09、BAP049-hum10、BAP049-hum11、BAP049-hum12、BAP049-hum13、BAP049-hum14、BAP049-hum15、BAP049-hum16、BAP049-Clone-A、BAP049-Clone-B、BAP049-Clone-C、BAP049-Clone-DもしくはBAP049-Clone-E、あるいは米国特許出願公開第2015/0210769号の表1に記載のもの、または表1のヌクレオチド配列、もしくは前述の配列のいずれかと実質的に同一の（例えば、少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれを超えて同一の）配列、によってコードされるもの、のいずれかから選ばれる抗体からの重鎖および軽鎖可変領域からの少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つまたは6つのCDR（またはまとめて全てのCDR）；あるいは密接な関連のあるCDR、例えば、同一であるCDR、または少なくとも1つのアミノ酸の変更を有するが、2つ、3つもしくは4つより多くの変更（例えば、置換、欠失もしくは挿入、例えば保存的置換）を有さないCDRを包含する。

【0966】

さらに別の実施形態において、抗PD-1抗体分子は、本明細書で説明される抗体、例えば、BAP049-hum01、BAP049-hum02、BAP049-hum03、BAP049-hum04、BAP049-hum05、BAP049-hum06、BAP049-hum07、BAP049-hum08、BAP049-hum09、BAP049-hum10、BAP049-hum11、BAP049-hum12、BAP049-hum13、BAP049-hum14、BAP049-hum15、BAP049-hum16、BAP049-Clone-A、BAP049-Clone-B、BAP049-Clone-C、BAP049-Clone-DもしくはBAP049-Clone-E、あるいは米国特許出願公開第2015/0210769号の表1に記載のもの、または表1のヌクレオチド配列、もしくは前述の配列のいずれかと実質的に同一の（例えば、少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれを超えて同一の）配列、によってコードされるもの、のいずれかから選ばれる抗体からの少なくとも1つ、2つ、3つまたは4つの可変領域を含む。

【0967】

TIM3（T細胞免疫グロブリン3）もまた、特に、IFN- γ を分泌するCD4+1型ヘルパーT細胞およびCD8+1型細胞毒性T細胞において、T細胞の機能を負に調節し、T細胞の消耗において極めて重要な役割を果たす。TIM3と、そのリガンド、例えば、ガレクチン9（Gal9）、ホスファチジルセリン（phosphatidylserine）（PS）、およびHMGB1との相互作用の阻害は、免疫応答を増加させ得る。当業界では、TIM3およびそのリガンドの抗体、抗体フラグメント、および他の阻害剤が利用可能であり、本明細書で説明されるCD19 CARと組み合わせて使用することができる。例えば、TIM3を標的とする、抗体、抗体フラグメント、低分子、またはペプチド阻害剤は、TIM3のIgVドメインに結合して、そのリガンドとの相互作用を阻害する。TIM3を阻害する抗体およびペプチドは、WO2013/006490およびUS20100247521において開示されている。他の抗TIM3抗体は、RMT3-23（Ngio w et al., 2011, Cancer Res, 71:3540-3551において開示されている）およびクローン8B.2C12（Monney et al., 2002, Nature, 415:536-541において開示されている）のヒト化形を含む。TIM3およびPD-1を阻害する二特異性抗体は、US20130156774において開示されている。

【0968】

一実施形態において、抗TIM3抗体またはそのフラグメントは、参照によりその全体が組み入れられる、「Antibody Molecules to TIM3 and Uses Thereof」という表題の米国特許出願公開第2015/0218274号において説明されているような、抗TIM3抗体分子である。一実施形態において、抗TIM3抗体分子は、ABTIM3、ABTIM3-hum01、ABTIM3-hum02、ABTIM3-hum03、ABTIM3-hum04、ABTIM3-hum05、ABTIM3-hum06、ABTIM3-hum07、ABTIM3-hum08、ABTIM3-hum09、ABTIM3-hum10、ABTIM3-hum11、ABTIM3-hum12、ABTIM3-hum13、ABTIM3-hum14、ABTIM3-hum15、ABTIM3-hum16、ABTIM3-hum17、ABTIM3-hum18、ABTIM3-hum19、ABTIM3-hum20、ABTIM3-hum21、ABTIM3-hum22、ABTIM3-hum23、あるいは米国特許出願公開第2015/0218274号の表1～4に記載のもの、または表1～4のヌクレオチド配列、もしくは前述の配列のいずれかと実質的に同一の（例えば、少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれを超えて同一の）配列、によってコードされるもの、のいずれかから選ばれる抗体からの重鎖および軽鎖可変領域からの少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つまたは6つのCDR（またはまとめて全てのCDR）；あるいは密接な関連のあるCDR、例えば、同一であるCDR、または少なくとも1つのアミノ酸の変更を有するが、2つ、3つもしくは4つより多くの変更（例えば、置換、欠失もしくは挿入、例えば保存的置換）を有さないCDRを包含する。

10

20

【0969】

さらに別の実施形態において、抗TIM3抗体分子は、本明細書で説明される抗体、例えば、ABTIM3、ABTIM3-hum01、ABTIM3-hum02、ABTIM3-hum03、ABTIM3-hum04、ABTIM3-hum05、ABTIM3-hum06、ABTIM3-hum07、ABTIM3-hum08、ABTIM3-hum09、ABTIM3-hum10、ABTIM3-hum11、ABTIM3-hum12、ABTIM3-hum13、ABTIM3-hum14、ABTIM3-hum15、ABTIM3-hum16、ABTIM3-hum17、ABTIM3-hum18、ABTIM3-hum19、ABTIM3-hum20、ABTIM3-hum21、ABTIM3-hum22、ABTIM3-hum23、あるいは米国特許出願公開第2015/0218274号の表1～4に記載のもの、または表1～4のヌクレオチド配列、もしくは前述の配列のいずれかと実質的に同一の（例えば、少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれを超えて同一の）配列、によってコードされるもの、のいずれかから選ばれる抗体からの少なくとも1つ、2つ、3つまたは4つの可変領域を含む。

30

【0970】

他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、CEACAM阻害剤（例えば、CEACAM-1、CEACAM-3、および／またはCEACAM-5阻害剤）である。一実施形態において、CEACAMの阻害剤は、抗CEACAM抗体分子である。例示的な抗CEACAM-1抗体は、WO2010/125571、WO2013/082366、WO2014/059251、およびWO2014/022332において説明されており、例えば、US2004/0047858、US7,132,255、およびWO99/052552において説明されている、例えば、モノクローナル抗体である、34B1、26H7、および5F4、またはこれらの組換え形態である。他の実施形態において、抗CEACAM抗体は、例えば、Zheng et al. PLoS One. 2010 Sep 2; 5(9). pii: e12529 (DOI:10.1371/journal.pone.0021146)において説明されているCEACAM-5に結合するか、または例えば、WO2013/054331およびUS2014/0271618において説明されている、CEACAM-1およびCEACAM-5と交差反応する。

40

50

【0971】

理論に縛られるつもりはないが、CEACAM-1およびCEACAM-5などの癌胎児性抗原細胞接着分子（CEACAM）は、少なくとも部分的に、抗腫瘍免疫応答の阻害を媒介すると考えられる（例えば、Markel et al. J Immunol. 2002 Mar 15;168(6):2803-10; Markel et al. J Immunol. 2006 Nov 1;177(9):6062-71; Markel et al. Immunology. 2009 Feb;126(2):186-200; Markel et al. Cancer Immunol Immunother. 2010 Feb;59(2):215-30; Ortenberg et al. Mol Cancer Ther. 2012 Jun;11(6):1300-10; Stern et al. J Immunol. 2005 Jun 1;174(11):6692-701; Zheng et al. PLoS One. 2010 Sep 2;5(9). pii: e12529を参照されたい）。例えば、CEACAM-1は、TIM-3に対する異好性リガンドとして、TIM-3に媒介されるT細胞の忍容性および消耗において、役割を果たすものとして説明されている（例えば、WO2014/022332; Huang, et al. (2014) Nature doi:10.1038/nature13848を参照されたい）。実施形態において、CEACAM-1およびTIM-3の共遮断は、異種移植片結腸直腸がんモデルにおいて、抗腫瘍免疫応答を増強することが示されている（例えば、WO2014/022332; Huang, et al. (2014), supraを参照されたい）。他の実施形態において、CEACAM-1およびPD-1の共遮断は、例えば、WO2014/059251において説明されている、T細胞忍容性を低減する。したがって、CEACAM阻害剤は、がん、例えば、黒色腫、肺がん（例えば、NSCLC）、膀胱がん、結腸がん、卵巣がん、および本明細書で説明される他のがんに対する免疫応答を増強するのに、本明細書で説明される他のイムノモジュレーター（例えば、抗PD-1および／または抗TIM-3阻害剤）とともに使用することができる。

10

20

【0972】

LAG3（リンパ球活性化遺伝子3またはCD223）は、活性化したT細胞およびB細胞において発現される細胞表面分子であって、CD8+ T細胞の消耗において役割を果たすことが示されている細胞表面分子である。当業界では、LAG3およびそのリガンドの抗体、抗体フラグメント、および他の阻害剤が利用可能であり、本明細書で説明されるCD19 CARと組み合わせて使用することができる。例えば、BMS-986016（Bristol-Myers Squibb）は、LAG3を標的とするモノクローナル抗体である。IMP701（Immutep）は、LAG3アンタゴニスト抗体であり、IMP731（ImmutepおよびGlaxoSmithKline）は、LAG3枯渇抗体である。他のLAG3阻害剤は、LAG3の可溶性部分と、MHCクラスII分子に結合し、抗原提示細胞（APC）を活性化させる、Igとの組換え融合タンパク質である、IMP321（Immutep）を含む。他の抗体は、例えば、WO2010/019570において開示されている。

30

【0973】

一実施形態において、抗LAG3抗体またはそのフラグメントは、参照によりその全体が組み入れられる、「Antibody Molecules to LAG3 and Uses Thereof」という表題の米国特許出願公開第2015/0259420号において説明されているような、抗LAG3抗体分子である。一実施形態において、抗LAG3抗体分子は、BAP050-hum01、BAP050-hum02、BAP050-hum03、BAP050-hum04、BAP050-hum05、BAP050-hum06、BAP050-hum07、BAP050-hum08、BAP050-hum09、BAP050-hum10、BAP050-hum11、BAP050-hum12、BAP050-hum13、BAP050-hum14、BAP050-hum15、BAP050-hum16、BAP050-hum17、BAP050-hum18、BAP050-hum19、BAP050-hum20、huBAP050（Ser）（例えば、BAP050-hum01-Ser、BAP050-hum02-Ser、BAP050-hum03-Ser、BAP050-hum04-Ser、BAP050-hum05-Ser、BAP050-hum06-Ser、BAP050-hum07-Ser、BAP050-hum08-Ser、BAP050-hum09-Ser、BAP050-hum10-Ser、BA

40

50

P050-hum11-Ser、BAP050-hum12-Ser、BAP050-hum13-Ser、BAP050-hum14-Ser、BAP050-hum15-Ser、BAP050-hum18-Ser、BAP050-hum19-Ser、もしくはBAP050-hum20-Ser)、BAP050-Clone-F、BAP050-Clone-G、BAP050-Clone-H、BAP050-Clone-I、もしくはBAP050-Clone-J、あるいは米国特許出願公開第2015/0259420号の表1に記載のもの、または表1のヌクレオチド配列、もしくは前述の配列のいずれかと実質的に同一の（例えば、少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれを超えて同一の）配列、によってコードされるものの、のいずれかから選ばれる抗体からの重鎖および軽鎖可変領域からの少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つもしくは6つのCDR（またはまとめて全てのCDR）；あるいは密接な関連のあるCDR、例えば、同一であるCDR、または少なくとも1つのアミノ酸の変更を有するが、2つ、3つもしくは4つより多くの変更（例えば、置換、欠失もしくは挿入、例えば保存的置換）を有さないCDRを包含する。

10

【0974】

さらに別の実施形態において、抗LAG3抗体分子は、本明細書で説明される抗体、例えば、BAP050-hum01、BAP050-hum02、BAP050-hum03、BAP050-hum04、BAP050-hum05、BAP050-hum06、BAP050-hum07、BAP050-hum08、BAP050-hum09、BAP050-hum10、BAP050-hum11、BAP050-hum12、BAP050-hum13、BAP050-hum14、BAP050-hum15、BAP050-hum16、BAP050-hum17、BAP050-hum18、BAP050-hum19、BAP050-hum20、huBAP050(Ser)（例えば、BAP050-hum01-Ser、BAP050-hum02-Ser、BAP050-hum03-Ser、BAP050-hum04-Ser、BAP050-hum05-Ser、BAP050-hum06-Ser、BAP050-hum07-Ser、BAP050-hum08-Ser、BAP050-hum09-Ser、BAP050-hum10-Ser、BAP050-hum11-Ser、BAP050-hum12-Ser、BAP050-hum13-Ser、BAP050-hum14-Ser、BAP050-hum15-Ser、BAP050-hum18-Ser、BAP050-hum19-Ser、もしくはBAP050-hum20-Ser)、BAP050-Clone-F、BAP050-Clone-G、BAP050-Clone-H、BAP050-Clone-I、もしくはBAP050-Clone-J、あるいは米国特許出願公開第2015/0259420号の表1に記載のもの、または表1のヌクレオチド配列、もしくは前述の配列のいずれかと実質的に同一の（例えば、少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれを超えて同一の）配列、によってコードされるものの、のいずれかから選ばれる抗体からの少なくとも1つ、2つ、3つまたは4つの可変領域を含む。

20

30

【0975】

理論に縛られるつもりはないが、一部の実施形態において、腫瘍微小環境は、該腫瘍微小環境内のPD-L1+発現細胞またはPD1+T細胞の存在によって発揮される直接的または間接的な阻害効果のため、がん細胞を攻撃するCART細胞へ伝導性を有さない。より具体的には、腫瘍微小環境は、腫瘍細胞（一般にCD19+である）、免疫エフェクター細胞（CD3+T細胞であってもよく、およびPD1+であってもまたはPD1-であってもよく、および内在性細胞であってもまたはCAR発現細胞であってもよい）、および活性化骨髄腫細胞（一般にPD-L1+である）を含み得る。PD1+T細胞は、腫瘍へのCART細胞の侵入を妨げる（preventing entry of CART cells the tumor）ことによって腫瘍微小環境の周囲に「バリア」を作り出すことができる。本明細書中の非限定的理論によれば、PD1阻害剤および／またはPD-L1阻害剤の事前投与は、腫瘍微小環境を、該腫瘍微小環境へのCAR発現細胞の侵入および標的陽性がん細胞の有効なクリ

40

50

アランスに有利なものにする。このモデルを支持するデータを、本明細書において、例えば実施例 20 および 21 において提供する。

【0976】

したがって、ある特定の態様において、本開示は、併用療法の方法であって、対象に、CD19 に結合する CAR 分子、例えば CD19 CAR、を発現する細胞を、PD1 阻害剤、PD-L1 阻害剤、または両方と組み合わせて投与することを含む方法を提供する。一部の実施形態において、PD1 阻害剤および／または PD-L1 阻害剤を CAR 療法の前に投与する。他の実施形態において、PD1 阻害剤および／または PD-L1 阻害剤を CAR 療法と同時に、またはその後に投与する。一部の態様において、対象は、CD19 の発現に関連する疾患、例えば血液系悪性腫瘍、例えば、白血病またはリンパ腫、例えば DLBCL、例えば原発性 DLBCL を有する対象である。一部の実施形態において、患者は、PD1、PD-L1 もしくは CD3 またはこれらのいずれかの組合せの上昇したレベルを有するか、またはそれを有するものとして同定される。一部の実施形態において、患者は、CD3 および PD1 に関して陽性である DLBCL 細胞少なくとも 5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80% または 90% を有するか、またはこれを有するものとして同定される。

10

【0977】

CAR 療法、例えば、CD19 CAR 療法の効能をモニタリングする方法も、本明細書において提供される。CAR 発現細胞を、該細胞が腫瘍細胞にホーミングする、例えば、腫瘍に浸潤することを意図して、患者の血流に投与することができる。したがって、一部の実施形態において、方法は、腫瘍試料を CAR 発現細胞の存在についてアッセイすることを含む。実施形態において、方法は、腫瘍マーカー、例えば CD19 を検出することを含む。実施形態において、方法は、CAR 発現細胞のマーカー、例えば、CAR コンストラクトのマーカー、または CAR コンストラクトをコードする核酸のマーカーを検出することを含む。実施形態において、方法は、T 細胞マーカー、例えば CD3 を検出することを含む。一部の態様において、対象は、CD19 の発現に関連する疾患、例えば血液系悪性腫瘍、例えば、白血病またはリンパ腫、例えば DLBCL、例えば原発性 DLBCL を有する対象である。一部の実施形態において、CAR 発現細胞が腫瘍の不良な浸潤を示した場合、対象は、良好な腫瘍浸潤を有する対象と比較して再発リスクが高いものとして同定される。一部の実施形態において、CAR 発現細胞が不良な腫瘍浸潤を示した場合、対象に、PD1 阻害剤および／または PD-L1 阻害剤を、例えば、CAR 発現細胞の第二の用量と組み合わせて投与する。

20

30

【0978】

いくつかの実施形態において、CAR 発現細胞の活性を強化する薬剤は、例えば、第一のドメインおよび第二のドメインを含む融合タンパク質であってもよく、ここで第一のドメインは阻害分子またはそれらのフラグメントであり、第二のドメインは、正のシグナルと会合するポリペプチドであり、例えば、本明細書で説明したような細胞内 (intracellular) シグナル伝達ドメインを含む (comprising) ポリペプチドである。いくつかの実施形態において、正のシグナルと会合するポリペプチドとしては、CD28、CD27、ICOS の共刺激ドメイン、例えば、CD28、CD27 および／または ICOS の細胞内シグナル伝達ドメイン、および／または例えば、本明細書で説明されたような、例えば CD3 ゼータの一次シグナル伝達ドメインを挙げることができる。一実施形態において、融合タンパク質は、CAR を発現した同じ細胞によって発現される。別の実施形態において、融合タンパク質は、細胞、例えば抗 CD19 CAR を発現しない T 細胞によって発現される。

40

【0979】

一実施形態において、本明細書で説明される CAR 発現細胞の活性を強化する薬剤は、mIR-17-92 である。

【0980】

一実施形態において、本明細書で説明される CAR の活性を増強する薬剤は、サイトカ

50

インである。サイトカインは、T細胞の拡大、分化、生存、およびホメオスタシスに関する、重要な機能を有する。本明細書で説明されるCAR発現細胞を施される対象に投与し得るサイトカインは、IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15、IL-18、およびIL-21、またはこれらの組合せを含む。実施形態において、投与されるサイトカインは、IL-7、IL-15、またはIL-21、またはこれらの組合せである。サイトカインは、毎日1回、または毎日1回を超えて、例えば、毎日2回、毎日3回、または毎日4回投与することができる。サイトカインは、1日超にわたり投与することができ、例えば、サイトカインを、2日間にわたり、3日間、4日間、5日間、6日間、1週間、2週間、3週間、または4週間にわたり投与する。例えば、サイトカインを、毎日1回ずつ7日間にわたり投与する。

10

【0981】

実施形態において、サイトカインを、CAR発現細胞と組み合わせて投与する。サイトカインは、CAR発現細胞と同時に投与することもでき、並列して、例えば、同じ日に投与することもできる。サイトカインは、CAR発現細胞と同じ医薬組成物中に調製することもでき、別個の医薬組成物中に調製することもできる。代替的に、サイトカインは、CAR発現T細胞の投与の直後に、例えば、CAR発現細胞の投与の1日後、2日後、3日後、4日後、5日後、6日後、または7日後に投与することができる。サイトカインを、1日超にわたり施される投与レジメンにおいて投与する、実施形態において、サイトカイン投与レジメンの1日目は、CAR発現細胞の投与と同じ日であってもよく、サイトカイン投与レジメンの1日目は、CAR発現T細胞の投与の1日後、2日後、3日後、4日後、5日後、6日後、または7日後であってもよい。一実施形態において、1日目に、CAR発現細胞を、対象に投与し、2日目に、サイトカインを、毎日1回ずつ、次の7日間にわたり投与する。ある実施形態において、CAR発現細胞と組み合わせて投与されるサイトカインは、IL-7、IL-15、および／またはIL-21である。

20

【0982】

他の実施形態において、サイトカインを、CAR発現細胞の投与後、十分な期間にわたり、例えば、CAR発現細胞を投与して、少なくとも2週間、3週間、4週間、6週間、8週間、10週間、12週間、4カ月間、5カ月間、6カ月間、7カ月間、8カ月間、9カ月間、10カ月間、11カ月間、もしくは1年間、またはこれを超える後に投与する。一実施形態において、サイトカインを、対象の、CAR発現細胞への応答を評価した後で投与する。例えば、対象に、本明細書で説明される投与量およびレジメンに従い、CAR発現細胞を投与する。本明細書で説明される方法のいずれかを使用して、対象の、CAR T療法への応答であって、腫瘍増殖の阻害、循環腫瘍細胞の低減、または腫瘍の退縮を含む応答を、CAR発現細胞を投与した、2週間、3週間、4週間、6週間、8週間、10週間、12週間、4カ月間、5カ月間、6カ月間、7カ月間、8カ月間、9カ月間、10カ月間、11カ月間、もしくは1年間、またはこれを超える後に評価する。CAR T療法に対して十分な応答を呈示しない対象には、サイトカイン投与することができる。CAR T療法に対する応答が最適未満である対象へのサイトカインの投与は、CAR Tの効能および／または抗がん活性を改善する。ある実施形態において、CAR発現細胞の投与の後で投与されるサイトカインは、IL-7である。

30

40

【0983】

さらなる併用療法は、抗アレルギー剤、制吐剤、鎮痛薬、補助療法を包含し得る。

【0984】

一部の患者は、本明細書で説明される療法および／または他の抗がん剤に対して、投与中または投与後にアレルギー反応を経験することがあるため、アレルギー反応のリスクを最小化するために抗アレルギー剤を投与することが多い。好適な抗アレルギー剤としては、コルチコステロイド、例えば、デキサメタゾン [例えば、Decadron (登録商標)]、ベクロメタゾン [例えば、Becloment (登録商標)]、ヒドロコルチゾン [コルチゾン、ヒドロコルチゾンコハク酸エステルナトリウム、ヒドロコルチゾンリン酸エステルナトリウムとしてもまた公知であり、Ala-Cort (登録商標)、ヒドロコ

50

ルチゾンリン酸エステル、Sol u-Cortef（登録商標）、Hydrocort Acetate（登録商標）およびLanacort（登録商標）の商標名で販売されている]、プレドニゾン [Delta-Cortel（登録商標）、Orapred（登録商標）、Pediapred（登録商標）およびPrelone（登録商標）の商標名で販売されている]、プレドニゾン [Deltasone（登録商標）、Liquid Red（登録商標）、Meticorten（登録商標）およびOrasone（登録商標）の商標名で販売されている]、メチルプレドニゾン [6-メチルプレドニゾン、メチルプレドニゾン酢酸エステル、メチルプレドニゾンコハク酸エステルナトリウムとしてもまた公知であり、Duralone（登録商標）、Medralone（登録商標）、Medrol（登録商標）、M-Prednisol（登録商標）およびSol u-Medrol（登録商標）の商標名で販売されている]；抗ヒスタミン剤、例えば、ジフェンヒドラミン [例えば、Benadryl（登録商標）]、ヒドロキシジンおよびシプロヘプタジン；ならびに気管支拡張剤、例えば、ベーターアドレナリン作動性受容体アゴニスト、アルブテロール [例えば、Proventil（登録商標）]、およびテルブタリン [Brethine（登録商標）] が挙げられる。

10

【0985】

一部の患者は、本明細書で説明される療法および／または他の抗がん剤の投与中または投与後に悪心を経験することがあるため、悪心（胃）および嘔吐の予防に制吐剤を使用する。好適な制吐剤としては、アプレピタント [Emend（登録商標）]、オンダンセトロン [Zofran（登録商標）]、グラニセトロンHCl [Kytrel（登録商標）]、ロラゼパム [Ativan（登録商標）]、デキサメタゾン [Decadron（登録商標）]、プロクロルペラジン [Compazine（登録商標）]、カソピタント [Rezonic（登録商標）] およびZunrisa（登録商標）]、ならびにこれらの組合せが挙げられる。

20

【0986】

患者をより快適にするために、処置期間中に経験する疼痛を緩和するための薬物を処方することが多い。Tylenol（登録商標）などの一般的な市販の鎮痛薬を使用することが多い。しかし、ヒドロコドン／パラセタモールまたはヒドロコドン／アセトアミノフェン [例えば、Vicodin（登録商標）]、モルヒネ [例えば、Astramorph（登録商標）またはAvinza（登録商標）]、オキシコドン [例えば、OxyContin（登録商標）またはPercocet（登録商標）]、オキシモルフォン塩酸塩 [Opana（登録商標）] およびフェンタニル [例えば、Duragesic（登録商標）] などのオピオイド鎮痛剤も中等度から重度の疼痛に有用である。

30

【0987】

正常細胞を処置の毒性から保護し、臓器毒性を制限するための努力の一環として、細胞保護剤（例えば、神経保護剤、フリーラジカルスカベンジャー、心保護剤、アントラサイクリン、血管外漏出中和剤、栄養剤および同種のもの）を補助療法として使用してもよい。好適な細胞保護剤としては、アミフォスチン [Ethyol（登録商標）]、グルタミン、ジメスナ [Tavocept（登録商標）]、メスナ [Mesnex（登録商標）]、デクスラゾキササン [Zinecard（登録商標）またはTotect（登録商標）]、キサリプロデン [Xapрила（登録商標）]、およびロイコボリン（ロイコボリンカルシウム、シトロバラム因子およびフォリン酸としても公知）が挙げられる。

40

【0988】

コード番号、遺伝子名または商品名によって識別される活性化合物の構造は、標準的便覧「The Merck Index」の現行版から、またはデータベース、例えばPatents International（例えば、IMS World Publications）から得ることができる。

【0989】

本発明の化合物と組み合わせて使用することができる上述の化合物は、当業界において、例えば、上で引用した文献において説明されているように調製し、投与することができ

50

る。

【0990】

一実施形態において、本発明は、薬学的に許容される担体と一緒に本発明の少なくとも1つの化合物（例えば、本発明の化合物）またはその薬学的に許容される塩を含む、単独でまたは他の抗がん剤と一緒にヒトまたは動物対象に投与するのに好適な医薬組成物を提供する。

【0991】

一実施形態において、本発明は、がんなどの細胞増殖性疾患を患っているヒトまたは動物対象を処置する方法を提供する。本発明は、そのような処置を必要とするヒトまたは動物対象を処置する方法であって、前記対象に、本発明の化合物（例えば、本発明の化合物）またはその薬学的に許容される塩の治療有効量を、単独で、または他の抗がん剤と組み合わせて投与することを含む方法を提供する。

10

【0992】

詳細には、組成物は、併用療法薬として一緒に製剤化されるか、または別々に投与されることになる。

【0993】

併用療法の場合、本発明の化合物および他の抗がん剤を、具体的な時間制限なく、同時に、並行して、または逐次的に投与してもよく、このような投与により患者の体内で前記2種の化合物の治療上有効なレベルが得られる。

【0994】

好ましい実施形態において、本発明の化合物および他の抗がん剤は、一般に、任意の順序で、逐次的に、注入により投与されるか、または経口投与される。投与レジメンは、疾患の病期、患者の身体フィットネス、個々の薬物の安全性プロファイル、および個々の薬物の許容度、ならびにその組合せを投与する主治医および医師によく知られている他の基準によって変わることもある。本発明の化合物および他の抗がん剤は、処置に使用される特定のサイクルに依存して、互いに数分以内に投与してもよく、数時間、数日またはさらには数週間離して投与してもよい。加えて、サイクルは、処置サイクル中に一方の薬物を他方のものより高頻度に、および薬物の投与ごとに異なる用量で投与することを包含し得る。

20

【0995】

本発明の別の態様において、本発明の1つまたは複数の化合物と本明細書に開示の組合せパートナーとを包含するキットを提供する。代表的なキットは、（a）本発明の化合物またはその薬学的に許容される塩、（b）少なくとも1つの組合せパートナー、例えば上で示したような組合せパートナーを包含し、それでこのようなキットは、投与の指示を包含する添付文書または他の標識を含むことがある。

30

【0996】

本発明の化合物を公知の治療プロセス、例えば、ホルモン剤または特に放射線の投与と組み合わせて使用して利益を得ることもできる。本発明の化合物は、特に、放射線増感剤として、特に、放射線療法に対して低い感度を示す腫瘍の処置に使用することができる。

【0997】

免疫を増強する低い用量のmTOR阻害剤との組合せ

40

一実施形態において、CAR分子、例えば本明細書で説明されるCAR分子、を発現する細胞を、免疫を増強する低い用量のmTOR阻害剤と組み合わせて投与する。例えば、ある実施形態において、併用療法は、CD19 CAR発現細胞、B細胞阻害剤（CD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3またはROR1の1つまたは複数の阻害剤、例えば、CD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3またはROR1の1つまたは複数を経路標的とするCAR発現細胞）、およびmTOR阻害剤を包含する。本明細書で説明される方法は、mTOR阻害剤、例えば、RAD001など、ラパログを含む、mTORのアロステリック阻害剤の、免疫を増強する低用量を使用する。mTOR阻害剤の、免疫を増強する低用量（例えば、免疫系を完全に抑制する

50

には不十分であるが、免疫機能を改善するには十分な用量)の投与は、対象における免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはCAR発現細胞の性能を最適化し得る。mTORの阻害を測定するための方法、投与量、処置レジメン、および適切な医薬組成物は、参照により本明細書に組み入れられる、米国特許出願第2015/01240036号において説明されている。

【0998】

ある実施形態において、mTOR阻害剤の、免疫を増強する低用量の投与は、以下：

i) PD-1陽性免疫エフェクター細胞の数の減少；
 ii) PD-1陰性免疫エフェクター細胞の数の増加；
 iii) PD-1陰性免疫エフェクター細胞／PD-1陽性免疫エフェクター細胞の比の増加；

iv) ナイーブT細胞の数の増加；

v) 例えば、メモリーT細胞、例えば、メモリーT細胞前駆体における、以下のマーカー：CD62L^{high}、CD127^{high}、CD27⁺、およびBCL2、の1つまたは複数の発現の増加；

vi) 例えば、メモリーT細胞、例えば、メモリーT細胞前駆体における、KLRG1の発現の減少；または

vii) メモリーT細胞前駆体、例えば、以下の特徴：CD62L^{high}の増加、CD127^{high}の増加、CD27⁺の増加、KLRG1の減少、およびBCL2の増加の任意の1つまたはこれらの組合せを有する細胞の数の増加；

の1つまたは複数を結果としてもたらすことができ、

この場合、前出、例えば、i)、ii)、iii)、iv)、v)、vi)、またはvii)のいずれかは、例えば、処置されていない対象と比較して、例えば、少なくとも一過性に生じる。

【0999】

別の実施形態において、mTOR阻害剤の、免疫を増強する低用量の投与は、例えば、培養物または対象における、CAR発現細胞の増殖または持続性の、例えば、処置されていないCAR発現細胞または処置されていない対象と比較した増加または延長を結果としてもたらす。実施形態において、増殖または持続性の増加は、CAR発現細胞の数の増加に関連する。増殖の増加または延長を測定するための方法は、実施例18および19において説明されている。別の実施形態において、mTOR阻害剤の、免疫を増強する低用量の投与は、例えば、培養物または対象における、CAR発現細胞によるがん細胞の殺滅の、例えば、処置されていないCAR発現細胞または処置されていない対象と比較した増加を結果としてもたらす。実施形態において、がん細胞の殺滅の増加は、腫瘍容量の減少に関連する。

【1000】

一実施形態において、CAR分子、例えば、本明細書で説明されるCAR分子を発現する細胞を、mTOR阻害剤、例えば、mTORのアロステリック阻害剤、例えば、RAD001、またはmTORの触媒阻害剤の、免疫を増強する低用量と組み合わせて投与する。例えば、mTOR阻害剤の、免疫を増強する低用量の投与は、本明細書で説明されるCAR発現細胞の投与の前に開始し、本明細書で説明されるCAR発現細胞の投与の前に完了することもでき、本明細書で説明されるCAR発現細胞の投与と同時に開始し、本明細書で説明されるCAR発現細胞の投与と重複させることもでき、本明細書で説明されるCAR発現細胞の投与の後で持続することもできる。

【1001】

代替的にまたは加えて、mTOR阻害剤の、免疫を増強する低用量の投与は、本明細書で説明されるCAR分子を発現するように加工される、免疫エフェクター細胞を最適化することができる。このような実施形態において、mTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001、または触媒阻害剤の、免疫を増強する低用量の投与を、本明細書で説明されるCAR分子を発現するように加工される、免疫エフェクター細胞

、例えば、T細胞またはNK細胞の、対象からの採取の前に開始または完了する。

【1002】

別の実施形態において、本明細書で説明されるCAR分子を発現するように加工される、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞を、例えば、対象からの採取の後で、mTOR阻害剤の、免疫を増強する低用量の存在下において培養することもでき、CAR発現免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞を、例えば、対象への投与の前に、mTOR阻害剤の、免疫を増強する低用量の存在下において培養することもできる。

【1003】

ある実施形態において、対象への、mTOR阻害剤の、免疫を増強する低用量の投与は、例えば、毎週1回、例えば、即放剤形で、0.1～20、0.5～10、2.5～7.5、3～6、もしくは約5mgのRAD001、またはその生物学的同等用量を投与することを含む。ある実施形態において、対象への、mTOR阻害剤の、免疫を増強する低用量の投与は、例えば、毎週1回、例えば、徐放剤形で、0.3～60、1.5～30、7.5～22.5、9～18、もしくは約15mgのRAD001、またはその生物学的同等用量を投与することを含む。

【1004】

ある実施形態において、mTOR阻害剤の用量は、少なくとも5%であるが90%を超えないか、少なくとも10%であるが90%を超えないか、少なくとも15%であるが90%を超えないか、少なくとも20%であるが90%を超えないか、少なくとも30%であるが90%を超えないか、少なくとも40%であるが90%を超えないか、少なくとも50%であるが90%を超えないか、少なくとも60%であるが90%を超えないか、少なくとも70%であるが90%を超えないか、少なくとも5%であるが80%を超えないか、少なくとも10%であるが80%を超えないか、少なくとも15%であるが80%を超えないか、少なくとも20%であるが80%を超えないか、少なくとも30%であるが80%を超えないか、少なくとも40%であるが80%を超えないか、少なくとも50%であるが80%を超えないか、少なくとも60%であるが80%を超えないか、少なくとも5%であるが70%を超えないか、少なくとも10%であるが70%を超えないか、少なくとも15%であるが70%を超えないか、少なくとも20%であるが70%を超えないか、少なくとも30%であるが70%を超えないか、少なくとも40%であるが70%を超えないか、少なくとも50%であるが70%を超えないか、少なくとも5%であるが60%を超えないか、少なくとも10%であるが60%を超えないか、少なくとも15%であるが60%を超えないか、少なくとも20%であるが60%を超えないか、少なくとも30%であるが60%を超えないか、少なくとも40%であるが60%を超えないか、少なくとも5%であるが50%を超えないか、少なくとも10%であるが50%を超えないか、少なくとも15%であるが50%を超えないか、少なくとも20%であるが50%を超えないか、少なくとも30%であるが50%を超えないか、少なくとも40%であるが50%を超えないか、少なくとも5%であるが40%を超えないか、少なくとも10%であるが40%を超えないか、少なくとも15%であるが40%を超えないか、少なくとも20%であるが40%を超えないか、少なくとも30%であるが40%を超えないか、少なくとも35%であるが40%を超えないか、少なくとも5%であるが30%を超えないか、少なくとも10%であるが30%を超えないか、少なくとも15%であるが30%を超えないか、少なくとも20%であるが30%を超えないか、または少なくとも25%であるが30%を超えない、mTORの阻害に関連するか、またはmTORの阻害をもたらす。

【1005】

mTOR阻害の程度は、P70 S6キナーゼ阻害の程度として伝え得るか、またはこれに対応し得る、例えば、mTOR阻害の程度は、P70 S6キナーゼ活性の減少のレベルにより、例えば、P70 S6キナーゼ基質のリン酸化の減少により決定することができる。mTOR阻害のレベルは、参照により本明細書に組み入れられる、米国特許出願

10

20

30

40

50

第2015/01240036号において説明されている、または参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第7,727,950号において説明されている、ブーレーアッセイにより、P70 S6キナーゼ活性を測定すること；ウェスタンブロットによりリン酸化したS6のレベルを測定すること；またはPD1陰性免疫エフェクター細胞の、PD1陽性免疫エフェクター細胞に対する比の変化を査定することなど、種々の方法により査定することができる。

【1006】

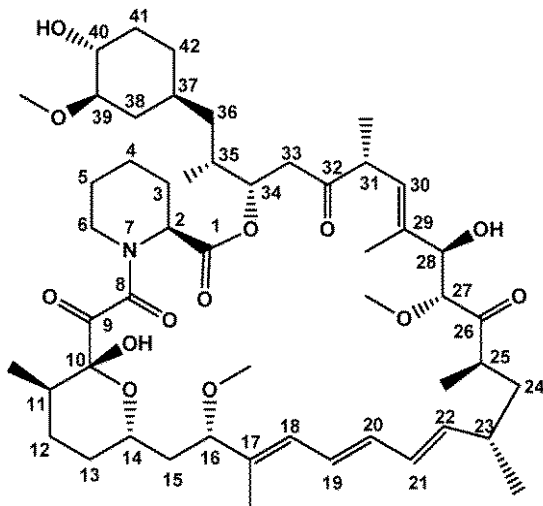
本明細書で使用される場合、用語「mTOR阻害剤」は、細胞内のmTORキナーゼを阻害する化合物もしくはリガンド、または薬学的に許容されるその塩を指す。ある実施形態において、mTOR阻害剤は、アロステリック阻害剤である。mTORのアロステリック阻害剤は、中性の三環式化合物であるラパマイシン（シロリムス）、ラパマイシンと構造的類似性および機能的な類似性を有する化合物であり、例えば、ラパマイシン誘導体、ラパマイシン類似体（ラパログともまた称する）を含む、ラパマイシン関連化合物、およびmTOR活性を阻害する、他のマクロリド化合物を含む。ある実施形態において、mTOR阻害剤は、触媒阻害剤である。

【1007】

ラパマイシンとは、*Streptomyces hygroscopicus*により産生される、公知のマクロリド抗生剤であって、式Aに示される構造を有する抗生剤である。

【1008】

【化18】



(A)

【1009】

例えば、McAlpine, J.B., et al., J. Antibiotics (1991) 44: 688; Schreiber, S.L., et al., J. Am. Chem. Soc. (1991) 113: 7433；米国特許第3,929,992号を参照されたい。ラパマイシンについては、種々の番号付けスキームが提起されている。混乱を回避するために、本明細書では、具体的なラパマイシン類似体を名づける場合、式Aの番号付けスキームを使用する、ラパマイシンを参照して、名称を与える。

【1010】

本発明において有用なラパマイシン類似体は、例えば、ラパマイシンのシクロヘキシル環におけるヒドロキシル基を、OR₁〔式中、R₁は、ヒドロキシアルキル、ヒドロキシアルコキシアルキル、アシルアミノアルキル、またはアミノアルキルである〕により置き換えた、O置換された類似体；例えば、各々の内容が参照により組み入れられる、US5,665,772およびWO94/09010において説明されている、エベロリムスとしてもまた公知のRAD001である。

【1011】

他の適切なラパマイシン類似体は、26位または28位において置換されたラパマイシ

ン類似体を含む。ラパマイシン類似体は、上述の類似体のエピマー、特に、40、28、または26位において置換された類似体のエピマーであることが可能であり、例えば、それらの内容が参照により組み入れられるUS6,015,815、WO95/14023およびWO99/15530において説明されている通り、さらに水素化してもよく、例えば、ゾタロリムスとしてもまた公知のABT578、またはそれらの内容が参照により組み入れられる、US7,091,213、WO98/02441、およびWO01/14387において説明されている、ラパマイシン類似体、例えば、リダホロリムスとしてもまた公知のAP23573であり得る。

【1012】

本発明における使用に適するラパマイシン類似体の例であって、US5,665,772による例は、40-O-ベンジル-ラパマイシン、40-O-(4'-ヒドロキシメチル)ベンジル-ラパマイシン、40-O-[4'-(1,2-ジヒドロキシエチル)]ベンジル-ラパマイシン、40-O-アリル-ラパマイシン、40-O-[3'-(2,2-ジメチル-1,3-ジオキソラン-4(S)-イル)-プロパー-2'-エン-1'-イル]-ラパマイシン、(2'E,4'S)-40-O-(4',5'-ジヒドロキシペンタ-2'-エン-1'-イル)-ラパマイシン、40-O-(2-ヒドロキシ)エトキシカルボニルメチル-ラパマイシン、40-O-(2-ヒドロキシ)エチル-ラパマイシン、40-O-(3-ヒドロキシ)プロピル-ラパマイシン、40-O-(6-ヒドロキシ)ヘキシル-ラパマイシン、40-O-[2-(2-ヒドロキシ)エトキシ]エチル-ラパマイシン、40-O-[3S)-2,2-ジメチルジオキソラン-3-イル]メチル-ラパマイシン、40-O-[2S)-2,3-ジヒドロキシプロパー-1-イル]-ラパマイシン、40-O-(2-アセトキシ)エチル-ラパマイシン、40-O-(2-ニコチノイルオキシ)エチル-ラパマイシン、40-O-[2-(N-モルホリノ)アセトキシ]エチル-ラパマイシン、40-O-(2-N-イミダゾリルアセトキシ)エチル-ラパマイシン、40-O-[2-(N-メチル-N'-ピペラジニル)アセトキシ]エチル-ラパマイシン、39-O-デスメチル-39,40-O, O-エチレン-ラパマイシン、(26R)-26-ジヒドロ-40-O-(2-ヒドロキシ)エチル-ラパマイシン、40-O-(2-アミノエチル)-ラパマイシン、40-O-(2-アセトアミノエチル)-ラパマイシン、40-O-(2-ニコチンアミドエチル)-ラパマイシン、40-O-(2-(N-メチル-イミダゾ-2'-イルカルボエトキサミド)エチル)-ラパマイシン、40-O-(2-エトキシカルボニルアミノエチル)-ラパマイシン、40-O-(2-トリルスルホンアミドエチル)-ラパマイシンおよび40-O-[2-(4',5'-ジカルボエトキシ-1',2',3'-トリアゾール-1'-イル)-エチル]-ラパマイシンを含むがこれらに限定されない。

【1013】

本発明において有用な他のラパマイシン類似体は、ラパマイシンのシクロヘキシル環におけるヒドロキシル基および/または28位におけるヒドロキシ基を、ヒドロキシエステル基により置き換えた類似体であり、例えば、USRE44,768において見出されるラパマイシン類似体、例えば、テムシロリムスが公知である。

【1014】

本発明において有用な他のラパマイシン類似体は、16位におけるメトキシ基を、別の置換基、例えばアルキニルオキシ、ベンジル、オルトメトキシベンジル、もしくはクロロベンジルにより置き換え(ヒドロキシにより適宜置換される)、かつ/またはラパマイシンのシクロヘキシル環が、39位のメトキシ(methoxy)基を欠くシクロペンチル環となるように、39位におけるメトキシ(mexthoxy)基を、39炭素と併せて欠失させた類似体であって、例えば、それらの内容が参照により組み入れられる、WO95/16691およびWO96/41807において説明されている類似体を含む。類似体は、ラパマイシンの40位におけるヒドロキシをアルキル化し、かつ/または32カルボニルを還元するように、さらに改変することができる。

【1015】

WO 95 / 1 6 6 9 1 によるラパマイシン類似体は、1 6 - デメトキシ (demthoxy) - 1 6 - (ペンター 2 - イニル) オキシ - ラパマイシン、1 6 - デメトキシ - 1 6 - (ブター 2 - イニル) オキシ - ラパマイシン、1 6 - デメトキシ - 1 6 - (プロパルギル) オキシ - ラパマイシン、1 6 - デメトキシ - 1 6 - (4 - ヒドロキシ - ブター 2 - イニル) オキシ - ラパマイシン、1 6 - デメトキシ - 1 6 - ベンジルオキシ - 4 0 - O - (2 - ヒドロキシエチル) - ラパマイシン、1 6 - デメトキシ - 1 6 - ベンジルオキシ - ラパマイシン、1 6 - デメトキシ - 1 6 - オルト - メトキシベンジル - ラパマイシン、1 6 - デメトキシ - 4 0 - O - (2 - メトキシエチル) - 1 6 - ペンター 2 - イニル) オキシ - ラパマイシン、3 9 - デメトキシ - 4 0 - デスオキシ - 3 9 - ホルミル - 4 2 - ノル - ラパマイシン、3 9 - デメトキシ - 4 0 - デスオキシ - 3 9 - ヒドロキシメチル - 4 2 - ノル - ラパマイシン、3 9 - デメトキシ - 4 0 - デスオキシ - 3 9 - カルボキシ - 4 2 - ノル - ラパマイシン、3 9 - デメトキシ - 4 0 - デスオキシ - 3 9 - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) カルボニル - 4 2 - ノル - ラパマイシン、3 9 - デメトキシ - 4 0 - デスオキシ - 3 9 - (モルホリン - 4 - イル) カルボニル - 4 2 - ノル - ラパマイシン、3 9 - デメトキシ - 4 0 - デスオキシ - 3 9 - [N - メチル、N - (2 - ピリジン - 2 - イル - エチル)] カルバモイル - 4 2 - ノル - ラパマイシンおよび 3 9 - デメトキシ - 4 0 - デスオキシ - 3 9 - (p - トルエンスルホニルヒドラゾノメチル) - 4 2 - ノル - ラパマイシンを含むがこれらに限定されない。

【1016】

WO 96 / 4 1 8 0 7 によるラパマイシン類似体は、3 2 - デオキソ - ラパマイシン、1 6 - O - ペント - 2 - イニル - 3 2 - デオキソ - ラパマイシン、1 6 - O - ペント - 2 - イニル - 3 2 - デオキソ - 4 0 - O - (2 - ヒドロキシ - エチル) - ラパマイシン、1 6 - O - ペント - 2 - イニル - 3 2 - (S) - ジヒドロ - 4 0 - O - (2 - ヒドロキシエチル) - ラパマイシン、3 2 (S) - ジヒドロ - 4 0 - O - (2 - メトキシ) エチル - ラパマイシン、および 3 2 (S) - ジヒドロ - 4 0 - O - (2 - ヒドロキシエチル) - ラパマイシンを含むがこれらに限定されない。

【1017】

別の適切なラパマイシン類似体は、その内容が参照により組み入れられる、US 2005 / 0101624 において説明されている、ウミロリムスである。

【1018】

他にエベロリムス [A f i n i t o r (登録商標)] としても公知の RAD001 は、各々の内容が参照により組み入れられる、US 5, 665, 772 および WO 94 / 09010 において説明されている通り、化学名 (1R, 9S, 12S, 15R, 16E, 18R, 19R, 21R, 23S, 24E, 26E, 28E, 30S, 32S, 35R) - 1, 18 - ジヒドロキシ - 12 - { (1R) - 2 - [(1S, 3R, 4R) - 4 - (2 - ヒドロキシエトキシ) - 3 - メトキシシクロヘキシル] - 1 - メチルエチル} - 19, 30 - ジメトキシ - 15, 17, 21, 23, 29, 35 - ヘキサメチル - 11, 36 - ジオキサ - 4 - アザ - トリシクロ [3.0.3.1.04, 9] ヘキサトリアコンター 16, 24, 26, 28 - テトラエン - 2, 3, 10, 14, 20 - ペンタオンを有する。

【1019】

mTOR のアロステリック阻害剤のさらなる例は、シロリムス (ラパマイシン、AY - 22989)、40 - [3 - ヒドロキシ - 2 - (ヒドロキシメチル) - 2 - メチル - プロパノエート] - ラパマイシン (テムシロリムスまたは CCI - 779 とともにまた呼ばれる)、およびリダホロリムス (AP - 23573 / MK - 8669) を含む。mTor のアロステリック阻害剤の他の例は、ゾタロリムス (ABT578) およびウミロリムスを含む。

【1020】

代替的にまたは加えて、mTOR キナーゼドメインを直接標的とし、mTORC1 および mTORC2 の両方を標的とする、mTOR の ATP 競合型触媒阻害剤も見出されている。これらはまた、4EBP1 - T37 / 46 のリン酸化およびキャップ依存性翻訳など

10

20

30

40

50

、ラパマイシン耐性mTORC1のアウトプットをモジュレートするため、ラパマイシンなど、mTORのアロステリック阻害剤より有効な、mTORC1の阻害剤でもある。

【1021】

触媒阻害剤は、BEZ235、もしくは2-メチル-2-[4-(3-メチル-2-オキソ-8-キノリン-3-イル)-2,3-ジヒドロイミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル]-フェニル]-プロピオニトリル、またはモノトシル酸塩形態(BEZ235の合成は、WO2006/122806において説明されている)；化学名{5-[2,4-ビス-(S)-3-メチル-モルホリン-4-イル]-ピリド[2,3-d]ピリミジン-7-イル]-2-メトキシフェニル}-メタノールを有する、CCG168[他にAZD-8055としても公知である；Chresta, C.M., et al., Cancer Res, 2010, 70(1), 288-298]；3-[2,4-ビス[(3S)-3-メチルモルホリン-4-イル]ピリド[2,3-d]ピリミジン-7-イル]-N-メチルベンズアミド(WO09104019)；3-(2-アミノベンゾ[d]オキサゾール-5-イル)-1-イソプロピル-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-アミン(WO10051043およびWO2013023184)；N-(3-(N-(3-(3,5-ジメトキシフェニル)アミノ)キノキサリン-2-イル)スルファモイル)フェニル)-3-メトキシ-4-メチルベンズアミド(WO07044729およびWO12006552)；化学名1-[4-[4-(ジメチルアミノ)ピペリジン-1-カルボニル]フェニル]-3-[4-(4,6-ジモルホリノ-1,3,5-トリアジン-2-イル)フェニル]尿素を有する、PKI-587(Venkatesan, A.M., J. Med.Chem., 2010, 53, 2636-2645)；化学名2,4-ジフルオロ-N-{2-メトキシ-5-[4-(4-ピリダジニル)-6-キノリニル]-3-ピリジニル}ベンゼンスルホンアミドを有する、GSK-2126458(ACS Med. Chem. Lett., 2010, 1, 39-43)；5-(9-イソプロピル-8-メチル-2-モルホリノ-9H-プリン-6-イル)ピリミジン-2-アミン(WO10114484)；および(E)-N-(8-(6-アミノ-5-(トリフルオロメチル)ピリジン-3-イル)-1-(6-(2-シアノプロパン-2-イル)ピリジン-3-イル)-3-メチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-2(3H)-イリデン)シアナミド(WO12007926)を含む。

【1022】

さらなるmTORの触媒阻害剤の例は、8-(6-メトキシピリジン-3-イル)-3-メチル-1-(4-ピペラジン-1-イル)-3-トリフルオロメチルフェニル)-1,3-ジヒドロイミダゾ[4,5-c]キノリン-2-オン(WO2006/122806)、およびKu-0063794[Garcia-Martinez JM, et al., Biochem J., 2009, 421(1), 29-42；Ku-0063794とは、ラパマイシンの哺乳動物標的(mTOR)の特異的阻害剤である]を含む。WYE-354とは、別のmTORの触媒阻害剤の例である(Yu K, et al. (2009). Biochemical, Cellular, and In vivo Activity of Novel ATP-Competitive and Selective Inhibitors of the Mammalian Target of Rapamycin. Cancer Res. 69(15): 6232-6240)。

【1023】

本発明に従い有用なmTOR阻害剤はまた、前出のいずれかのプロドラッグ、誘導体、薬学的に許容される塩、または類似体も含む。RAD001などのmTOR阻害剤は、本明細書で説明される特定の投与に基づく、当業界で十分に確立された方法に基づくデリバリーのために製剤化することができる。特に、米国特許第6,004,973号(参照により本明細書に組み入れられる)は、本明細書で説明されるmTOR阻害剤とともに使用可能な製剤の例を提示している。

【1024】

CARの有効性または試料の適性を査定するための方法およびバイオマーカー本開示は、CAR療法で処置されたがん患者が、再発する可能性があるかどうか、または再発したかどうかを示す遺伝子シグネチャーを、とりわけ提供する。理論に縛られるつもりはないが、この遺伝子シグネチャーについての実験の基礎を実施例12において述べる

。

【1025】

ある実施形態において、本明細書で（例えば、実施例12の表29で）説明される新規転写遺伝子シグネチャーを使用して、製造された生成物の改善を可能にすることによって、患者の再発の尤度を低下させる。ある実施形態において、本明細書で説明される遺伝子シグネチャーを使用して、製造された生成物の治療的適用を改変することによって、患者の再発の尤度を低下させる。

【1026】

ある実施形態において、本明細書で（例えば、実施例12の表29で）説明される遺伝子シグネチャーは、CAR発現細胞での処置、例えばCART処置（例えば、CART19処置、例えばCTL019治療）での処置の前の対象において同定され、それによって、CAR処置に対する再発が予測される。ある実施形態において、本明細書で説明される遺伝子シグネチャーは、アフェレーシス試料または骨髓試料において同定される。ある実施形態において、本明細書で説明される遺伝子シグネチャーは、製造されたCAR発現細胞生成物、例えばCART生成物（例えば、CART19生成物、例えばCTL019）において、注入前に同定される。

【1027】

本開示はまた、（理論に縛られるつもりはないが）アフェレーシスの前またはCART生成物の製造中に患者のT_{REG}シグネチャーを減少させることが患者の再発リスクを低減させるということの証拠を例えば実施例12において提供する。

【1028】

ある実施形態において、CAR生成物の製造、例えば、CART生成物の製造のために細胞を収集する前に、T_{REG}細胞を低減させる1つまたは複数の療法で患者を前処置し、それによって患者がCAR発現細胞処置（例えば、CTL019処置）に戻るリスクを低減させる。T_{REG}細胞を減少させる方法としては、これらに限定されないが、シクロホスファミド、抗GITR抗体、CD25枯渇、およびそれらの組合せが挙げられる。

【1029】

ある実施形態において、CAR発現細胞生成物の製造のために細胞を収集する前に、シクロホスファミドまたは抗GITR抗体で患者を前処置し、それによって患者がCAR発現細胞処置（例えば、CTL019処置）に戻るリスクを低減させる。

【1030】

ある実施形態において、CAR発現細胞製造プロセスを、CAR発現細胞生成物（例えば、CTL019生成物）の製造の前に、T_{REG}細胞を枯渇させるように改変する。ある実施形態において、CD25枯渇を使用して、CAR発現細胞生成物（例えば、CTL019生成物）の製造の前に、T_{REG}細胞を枯渇させる。

【1031】

ある実施形態において、T_{REG}細胞を低減させる処置での患者またはCAR発現細胞生成物の処置の後、患者を併用療法で処置する。併用療法は、例えば、CD19 CAR発現細胞などのCD19阻害剤、および1つまたは複数のB細胞阻害剤、例えば本明細書で説明されるようなB細胞阻害剤を含んでもよい。

【1032】

ある実施形態において、患者を、患者試料、例えば、がん細胞を含む試料および／または腫瘍微小環境を表す試料中のT_{REG}細胞のレベルについてアッセイする。ある実施形態において、この情報を使用して、患者のための処置コースを決定する。例えば、ある実施形態において、患者が、対照と比較して上昇したT_{REG}細胞レベルを有するものとして同定された場合、治療は、CAR発現細胞以外の処置を投与することを含む。例えば、治療は、抗体分子の投与、小分子治療薬の投与、外科手術もしくは放射線療法、またはこれらの任意の組合せを含み得る。この治療は、1つまたは複数のB細胞抗原を標的とすることもある。

【1033】

ある実施形態において、再発例とは、非再発例と比較して、次の遺伝子：MIR199A1、MIR1203、uc021ovp、ITM2CおよびHLA-DQB1、の1つまたは複数（例えば、2つ、3つ、4つ、または全て）の発現レベルの上昇（例えば、RNAレベルの上昇）、ならびに／または非再発例と比較して、次の遺伝子：PPIAL4D、TTY10、TXLNG2P、MIR4650-1、KDM5D、USP9Y、PRKY、RPS4Y2、RPS4Y1、NCRNA00185、SULT1E1およびEIF1AY、の1つまたは複数（例えば、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、または全て）の発現レベルの低下（例えば、RNAレベルの低下）を有するか、またはこれを有するものとして同定される患者である。

【1034】

10

別の態様において、本発明は、対象（例えば、がんを有する対象）におけるCAR発現細胞療法の有効性、またはCAR療法、例えば、免疫を増強する低い用量のmTOR阻害剤の投与を包含する治療のための試料（例えば、アフェレーシス試料）の適性を、査定またはモニタリングする方法を特徴とする。方法は、CAR療法の有効性または試料の適性の値を得ることを含み、この場合、前記値は、CAR発現細胞療法の有効性または適性を示す。

【1035】

実施形態において、CAR療法の有効性または試料の適性の値は、以下の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、またはこれ超（全て）の尺度を含む：

(i) 試料（例えば、アフェレーシス試料または製造されたCAR発現細胞生成物の試料）中の休眠中のT_{EFF}細胞、休眠中のT_{REG}細胞、幼若T細胞（例えば、幼若CD4細胞もしくは幼若CD8細胞、またはガンマ／デルタT細胞）、もしくは初期メモリーT細胞、またはこれらの組合せの1つ、2つ、3つ、またはこれ超（例えば、全て）のレベルまたは活性；

20

(ii) 試料（例えば、アフェレーシス試料または製造されたCAR発現細胞生成物の試料）中の、活性化したT_{EFF}細胞、活性化したT_{REG}細胞、経時T細胞（例えば、経時CD4細胞または経時CD8細胞）、もしくは後期メモリーT細胞、またはこれらの組合せの1つ、2つ、3つ、またはこれ超（例えば、全て）のレベルまたは活性；

(iii) 試料（例えば、アフェレーシス試料または製造されたCAR発現細胞生成物の試料）中の、免疫細胞消耗マーカー、例えば、1つ、2つ、またはこれを超える免疫チェックポイント阻害剤（例えば、PD-1、PD-L1、TIM-3および／またはLAG-3）のレベルまたは活性。一実施形態において、免疫細胞は、消耗表現型を有し、例えば、少なくとも2つの消耗マーカーを共発現し、例えば、PD-1およびTIM-3を共発現する。他の実施形態において、免疫細胞は、消耗表現型を有し、例えば、少なくとも2つの消耗マーカーを共発現し、例えば、PD-1およびLAG-3を共発現する；

30

(iv) 試料（例えば、アフェレーシス試料または製造されたCAR発現細胞生成物の試料）中の、例えば、CD4+T細胞集団内またはCD8+T細胞集団内の、CD27および／またはCD45RO-（例えば、CD27+CD45RO-）免疫エフェクター細胞のレベルまたは活性；

(v) CCL20、IL-17aおよび／またはIL-6、PD-1、PD-L1、LAG-3、TIM-3、CD57、CD27、CD122、CD62L、KLRG1から選ばれるバイオマーカーの1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、10、12、またはこれ超のレベルまたは活性；

40

(vi) CAR発現細胞生成物の試料中のサイトカインのレベルまたは活性（例えば、サイトカインレパートリーの質）；あるいは

(vii) 製造されたCAR発現細胞生成物の試料中の、CAR発現細胞の形質導入効率。

【1036】

本明細書で開示された方法のいずれかの、いくつかの実施形態において、CAR発現細胞療法は、複数のCAR発現免疫エフェクター細胞（例えば、CAR発現免疫エフェクタ

50

一細胞の集団)、例えば、複数のT細胞またはNK細胞(例えば、T細胞またはNK細胞の集団)、またはこれらの組合せを含む。一実施形態において、CAR発現細胞療法は、免疫を増強する低い用量のmTOR阻害剤の投与を包含する。

【1037】

本明細書で開示された方法のいずれかの、いくつかの実施形態において、(i)～(vii)の1つまたは複数の尺度は、対象から入手されたアフェレーシス試料から得る。アフェレーシス試料は、注入または再注入の前に査定することができる。

【1038】

本明細書で開示された方法のいずれかの、いくつかの実施形態において、(i)～(vii)の1つまたは複数の尺度は、製造されたCAR発現細胞生成物の試料から得る。製造されたCAR発現細胞生成物は、注入または再注入の前に査定することができる。

10

【1039】

本明細書で開示された方法のいずれかの、いくつかの実施形態において、CAR発現細胞療法を施される前に、これを施されるときに、またはこれを施された後で、対象を査定する。

【1040】

本明細書で開示された方法のいずれかの、いくつかの実施形態において、(i)～(vii)の1つまたは複数の尺度は、遺伝子発現、フローサイトメトリー、またはタンパク質発現の1つまたは複数についてのプロファイルを検定する。

【1041】

本明細書で開示された方法のいずれかの、いくつかの実施形態において、方法は、(i)～(vii)の1つまたは複数の尺度に基づき、対象を、応答例、非応答例、再発例、または非再発例として同定することをさらに含む。

20

【1042】

本明細書で開示された方法のいずれかの、いくつかの実施形態において、応答例(例えば、完全応答例)は、GZMK、PPF1BP2、またはナイーブT細胞の1つ、2つ、またはこれ超(全て)の、非応答例と比較して、高度なレベルまたは大きな活性を有するか、またはこれを有するものとして同定される。

【1043】

本明細書で開示された方法のいずれかの、いくつかの実施形態において、非応答例は、IL22、IL-2RA、IL-21、IRF8、IL8、CCL17、CCL22、エフェクターT細胞、または調節性T細胞の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、またはこれ超(例えば、全て)の、応答例と比較して、高度なレベルまたは大きな活性を有するか、またはこれを有するものとして同定される。

30

【1044】

ある実施形態において、再発例とは、以下の遺伝子:MIR199A1、MIR1203、uc021ovp、ITM2C、およびHLA-DQB1の1つまたは複数(例えば、以下の遺伝子の2つ、3つ、4つ、または全て)の発現レベルの、非再発例と比較した上昇、ならびに/または以下の遺伝子:PPIAL4D、TTY10、TXLNG2P、MIR4650-1、KDM5D、USP9Y、PRKY、RPS4Y2、RPS4Y1、NCRNA00185、SULT1E1、およびEIF1AYの1つまたは複数(例えば、以下の遺伝子の2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、または全て)の発現のレベルの、非再発例と比較した低下を有するか、またはこれを有するものとして同定される患者である。

40

【1045】

本明細書で開示された方法のいずれかの、いくつかの実施形態において、完全応答例は、参照値、例えば、非応答例におけるCD8+ T細胞のパーセンテージと比較して大きな、例えば、統計学的に有意な大きな、CD8+ T細胞のパーセンテージを有するか、またはこれを有するものとして同定される。

【1046】

50

本明細書で開示された方法のいずれかの、いくつかの実施形態において、完全応答例は、参照値、例えば、非応答例におけるCD27+ CD45RO-免疫エフェクター細胞の数と比較して大きな、例えば、CD8+ 集団内の、CD27+ CD45RO-免疫エフェクター細胞のパーセンテージを有するか、またはこれを有するものとして同定される。

【1047】

本明細書で開示された方法のいずれかの、いくつかの実施形態において、完全応答例または部分応答例は、参照値、例えば、非応答例におけるCD4+ T細胞のパーセンテージと比較して大きな、例えば、統計学的に有意な大きな、CD4+ T細胞のパーセンテージを有するか、またはこれを有するものとして同定される。

10

【1048】

本明細書で開示された方法のいずれかの、いくつかの実施形態において、完全応答例は、休眠中のT_{EFF}細胞、休眠中のT_{REG}細胞、幼若T細胞（例えば、幼若CD4細胞もしくは幼若CD8細胞、またはガンマ/デルタT細胞）、もしくは初期メモリーT細胞、またはこれらの組合せの1つ、2つ、3つ、またはこれ超（例えば、全て）の、参照値、例えば、非応答例における休眠中のT_{EFF}細胞、休眠中のT_{REG}細胞、幼若T細胞（例えば、幼若CD4細胞または幼若CD8細胞）、または初期メモリーT細胞の数と比較して大きなパーセンテージを有するか、またはこれを有するものとして同定される。

【1049】

本明細書で開示された方法のいずれかの、いくつかの実施形態において、非応答例は、活性化したT_{EFF}細胞、活性化したT_{REG}細胞、経時T細胞（例えば、経時CD4細胞または経時CD8細胞）、もしくは後期メモリーT細胞、またはこれらの組合せの1つ、2つ、3つ、またはこれ超（例えば、全て）の、参照値、例えば、応答例における活性化したT_{EFF}細胞、活性化したT_{REG}細胞、経時T細胞（例えば、経時CD4細胞または経時CD8細胞）、または後期メモリーT細胞の数と比較して大きなパーセンテージを有するか、またはこれを有するものとして同定される。

20

【1050】

本明細書で開示された方法のいずれかの、いくつかの実施形態において、非応答例は、免疫細胞消耗マーカー、例えば、1つ、2つ、またはこれを超える免疫チェックポイント阻害剤（例えば、PD-1、PD-L1、TIM-3、および/またはLAG-3）大きなパーセンテージを有するか、またはこれを有するものとして同定される。一実施形態において、非応答例は、PD-1、PD-L1、またはLAG-3を発現する免疫エフェクター細胞（例えば、CD4+ T細胞および/またはCD8+ T細胞）（例えば、CAR発現CD4+ 細胞および/またはCD8+ T細胞）の、応答例に由来するPD-1またはLAG-3を発現する免疫エフェクター細胞のパーセンテージと比較して大きなパーセンテージを有するか、またはこれを有するものとして同定される。

30

【1051】

一実施形態において、非応答例は、消耗表現型を有する免疫細胞、例えば、少なくとも2つの消耗マーカーを共発現する、例えば、PD-1、PD-L1および/またはTIM-3を共発現する免疫細胞大きなパーセンテージを有するか、またはこれを有するものとして同定される。他の実施形態において、非応答例は、消耗表現型を有する免疫細胞、例えば、少なくとも2つの消耗マーカーを共発現する、例えば、PD-1およびLAG-3を共発現する免疫細胞が大きなパーセンテージを有するか、またはこれを有するものとして同定される。

40

【1052】

本明細書で開示された方法のいずれかの、いくつかの実施形態において、非応答例は、CAR発現細胞集団内のPD-1/PD-L1+/LAG-3+細胞の、CAR発現細胞療法に対する応答例（例えば、完全応答例）と比較して大きなパーセンテージを有するか、またはこれを有するものとして同定される。

【1053】

50

本明細書で開示された方法のいずれかの、いくつかの実施形態において、部分応答例は、C A R発現細胞集団内のP D - 1 / P D - L 1 + / L A G - 3 +細胞の、応答例より高度なパーセンテージを有するか、またはこれを有するものとして同定される。

【1054】

本明細書で開示された方法のいずれかの、いくつかの実施形態において、非応答例は、C A R発現細胞集団内のP D 1 / P D - L 1 + C A R +の消耗表現型およびL A G 3の共発現を有するか、またはこれを有するものとして同定される。

【1055】

本明細書で開示された方法のいずれかの、いくつかの実施形態において、非応答例は、C A R発現細胞集団内のP D - 1 / P D - L 1 + / T I M - 3 +細胞の、応答例（例えば、完全応答例）と比較して大きなパーセンテージを有するか、またはこれを有するものとして同定される。

10

【1056】

本明細書で開示された方法のいずれかの、いくつかの実施形態において、部分応答例は、C A R発現細胞集団内のP D - 1 / P D - L 1 + / T I M - 3 +細胞の、応答例より高度なパーセンテージを有するか、またはこれを有するものとして同定される。

【1057】

本明細書で開示された方法のいずれかの、いくつかの実施形態において、アフエレーション試料中のC D 8 + C D 2 7 + C D 4 5 R O - T細胞の存在は、C A R発現細胞療法に対する対象の応答の、正の予測因子である。

20

【1058】

本明細書で開示された方法のいずれかの、いくつかの実施形態において、アフエレーション試料中のP D 1 + C A R + T細胞およびL A G 3 + T細胞またはT I M 3 + T細胞の高度なパーセンテージは、C A R発現細胞療法に対する対象の応答の、予後不良の予測因子である。

【1059】

本明細書で開示された方法のいずれかの、いくつかの実施形態において、応答例（例えば、完全応答例または部分応答例）以下のプロファイル：

(i) C D 2 7 +免疫エフェクター細胞の数が、参照値、例えば、非応答例におけるC D 2 7 +免疫エフェクター細胞の数と比較して大きいこと；

30

(i i) C D 8 + T細胞の数が、参照値、例えば、非応答例におけるC D 8 + T細胞の数と比較して大きいこと；

(i i i) 1つまたは複数のチェックポイント阻害剤、例えば、P D - 1、P D - L 1、L A G - 3、T I M - 3、もしくはK L R G - 1、またはこれらの組合せから選択されるチェックポイント阻害剤を発現する免疫細胞の数が、参照値、例えば、非応答例における1つまたは複数のチェックポイント阻害剤を発現する細胞の数と比較して小さいこと；あるいは

(i v) 休眠中のT E F F細胞、休眠中のT_{REG}細胞、ナイーブC D 4細胞、刺激されていないメモリー細胞もしくは初期メモリーT細胞、またはこれらの組合せの1つ、2つ、3つ、4つ、またはこれ超（全て）の数が、参照値、例えば、非応答例における休眠中のT_{EFF}細胞、休眠中のT_{REG}細胞、ナイーブC D 4細胞、刺激されていないメモリー細胞または初期メモリーT細胞の数と比較して大きいこと

40

の1つ、2つ、3つ、またはこれ超（または全て）を有する。

【1060】

本明細書で開示された方法のいずれかの、いくつかの実施形態において、(v i) のサイトカインのレベルまたは活性は、サイトカインである、C C L 2 0 / M I P 3 a、I L 1 7 A、I L 6、G M - C S F、I F N γ 、I L 1 0、I L 1 3、I L 2、I L 2 1、I L 4、I L 5、I L 9、もしくはT N F α 、またはこれらの組合せの1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、またはこれ超（全て）から選択される。サイトカインは、I L - 1 7 a、C C L 2 0、I L 2、I L 6、またはT N F α の1つ、2つ、3つ、4

50

つ、またはこれ超（全て）から選択することができる。一実施形態において、サイトカインのレベルの上昇または活性の増加は、I L-17aおよびCCL20の一方または両方から選択され、応答性の増加または再発の減少を指し示す。

【1061】

本明細書で開示された方法のいずれかの、いくつかの実施形態において、(vii)における形質導入効率が15%またはこれを超えることは、応答性の増加または再発の減少を指し示す。

【1062】

本明細書で開示された方法のいずれかの、いくつかの実施形態において、(vii)における形質導入効率が15%未満であることは、応答性の減少または再発の増加を指し示す。

10

【1063】

実施形態において、本明細書の方法により同定される応答例、非応答例、再発例、または非再発例は、臨床基準に従い、さらに査定することができる。例えば、完全応答例は、疾患、例えば、がんを有するか、またはこれを有する対象であって、処置に対する完全応答、例えば、完全寛解を呈示する対象として同定される。完全応答は、例えば、本明細書で説明される通り、NCCN Guidelines（登録商標）（参照によりその全体が本明細書に組み入れられる）を使用して、同定することができる。部分応答例は、疾患、例えば、がんを有するか、またはこれを有する対象であって、処置に対する部分応答、例えば、部分寛解を呈示する対象として同定される。部分応答は、例えば、本明細書で説明される通り、NCCN Guidelines（登録商標）を使用して同定することができる。非応答例は、疾患、例えば、がんを有するか、またはこれを有する対象であって、処置に対する応答を呈示しない対象として同定され、例えば、患者は、安定（stable disease）または進行（progressive disease）を有する。非応答例は、例えば、本明細書で説明される通り、NCCN Guidelines（登録商標）を使用して同定することができる。

20

【1064】

代替的に、または本明細書で開示された方法と組み合わせて、前記値に応じて、

例えば、応答例または非再発例に、CAR発現細胞療法を投与すること；

CAR発現細胞療法の用量を変更して投与すること；

30

CAR発現細胞療法のスケジュールまたは時間経過を変更すること；

例えば、非応答例または部分応答例に、CAR発現細胞療法と組み合わせたさらなる薬剤、例えば、本明細書で説明されるチェックポイント阻害剤、例えば、チェックポイント阻害剤を投与すること；

非応答例または部分応答例に、CAR発現細胞療法による処置の前に、対象における幼若T細胞の数を増加させる治療を投与すること；

CAR発現細胞療法の製造工程を改変すること、例えば、CARをコードする核酸を導入する前に、幼若T細胞を濃縮すること、または、例えば、非応答例もしくは部分応答例として同定された対象について、形質導入効率を増加させること；

例えば、非応答例または部分応答例または再発例のための代替的治療を投与すること；
あるいは

40

対象が、非応答例または再発例であるか、またはこれとして同定される場合、例えば、CD25の枯渇、シクロホスファミド、抗GITR抗体、またはこれらの組合せの投与の1つまたは複数により、T_{REG}細胞集団および／またはT_{REG}遺伝子シグネチャーを減少させること

の1つ、2つ、3つ、4つ、またはこれ超を実施する。

【1065】

ある特定の実施形態において、対象を、抗GITR抗体により前処置する。ある特定の実施形態において、注入または再注入の前に、対象を、抗GITR抗体により処置する。

【1066】

50

本明細書で説明される方法の一部の実施形態において、FDG-PET/CT (PET/CT)でのイメージングを、CAR療法で処置されたことのある対象に関して実施する。この測定は、前記療法に対する応答を予測することができる。例えば、実施形態において、代謝活性腫瘍体積(MTV)および/または $[11F]-2$ -フルオロ-2-デオキシ-D-グルコース(FDG)取り込みを測定する。実施形態において、MTVの減少は、応答、例えば、CR(完全応答)またはPR(部分応答)を示し、例えば、処置後の約0のMTV値はCRを示すのに対して、MTVの増加はPD(進行)を示す。実施形態において、FDG取り込みの減少は、応答、例えば、CRまたはPRを示すのに対して、FDG取り込みの増加はPDを示す。実施形態において、イメージングは、CAR療法の投与後に、例えば、CAR療法の投与の約1週間、2週間、3週間、4週間、1カ月、2カ月、3カ月、4カ月、5カ月または6カ月後に実施する。実施形態において、CRS(サイトカイン放出症候群)の症状を有さない対象、例えば、CRSを患っていたがイメージングの前に症状が解消された患者に関してイメージングを実施する。実施形態において、CRSの症状を有する対象に関してイメージングを実施する。実施形態において、イメージングをCAR療法の前に実施し、この療法前の画像を療法後の画像と比較する。実施形態において、対象は、がん、例えばリンパ腫、例えば、びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫(DLBCL)または濾胞性リンパ腫(FL)を有する。一部の実施形態において、CAR療法は、CAR19発現細胞、例えばCTL019を含む。一部の実施形態において、CAR療法は、本明細書で説明されるCAR療法、例えば、CAR20発現細胞、CAR22発現細胞、またはCAR19発現細胞を、適宜、B細胞療法と組み合わせて含む。

10

20

【1067】

個別化医療(セラノスティクス)

CD19の特徴、E. G. 突然変異

理論に縛られるつもりはないが、一部のがん患者は、CD19 CAR発現細胞などのCD19阻害剤に対して初期応答を示し、そしてその後、再発する。一部の実施形態において、再発は、がん細胞のCD19におけるフレームシフトおよび/もしくは未成熟終止コドン、またはがん細胞を標的とするCD19 CAR発現細胞の能力を低減させるCD19の発現の他の変化(発現レベルの変化を含む)に、(少なくとも一部は)起因する。このような突然変異は、CD19療法の有効性を低下させ、患者の再発の一因となり得る。したがって、一部の実施形態において、CD19療法に、第二の、異なる標的、例えば、B細胞において発現される標的、例えば、CD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3またはROR1の1つまたは複数、に向けた治療を補充すると、またはCD19療法をそのような治療で置き換えると、有益であり得る。このタイプの様々な例示的な併用療法を本明細書において開示する。

30

【1068】

本出願は、がんを有する対象を処置する方法であって、(1)対象が、参照特徴に対してCD19の特徴の差、例えば統計学的に有意な差を有するかどうかを判定すること、および(2)決定された特徴と参照特徴とに差があった場合、CAR療法、例えばCARTの治療有効用量を対象に投与することによって対象を処置すること、の1つまたは複数を含む方法を、とりわけ、開示する。患者は、例えば、CD19阻害剤、例えばCD19 CAR発現細胞での処置後に再発した患者であってもよい。患者は、CD19 CAR療法を受けたことがあるか、またはこれを受けていて、再発のリスクがある患者であってもよい。患者は、CD19 CAR療法に対する非応答例であってもよい。

40

【1069】

特徴は、例えばCD19配列、例えば、タンパク質または核酸配列であってもよい。配列は、例えば実施例で説明するように、ハイスループット核酸シーケンシングによって、またはタンパク質の質量分析によって決定することができる。本明細書の実施例で説明するように、患者は、CD19 CART療法後、CD19における、例えばCD19のエキソン2における突然変異、例えば、CD19におけるフレームシフトおよび未成熟終止コドンを引き起こす突然変異のため、再発することがある。実施形態において、挿入ま

50

たは欠失は、フレームシフトおよび未成熟終止コドンの一方または両方を引き起こさない。突然変異は、例えば、挿入、欠失、置換、転移、または前述のもののいずれかの組合せであってもよい。挿入、欠失または置換には、例えば、少なくとも1、2、3、4、5、10、15、20、20または50のヌクレオチドが関与し得る。挿入、欠失または置換には、例えば、最大で2、3、4、5、10、15、20、20、50または100のヌクレオチドが関与し得る。場合によっては、細胞の集団は、1つより多くの突然変異を含むことになる。このような場合、突然変異は、重複する、細胞の部分集団におけるものであることもあり、または重複しない、細胞の部分集団におけるものであることもある。

【1070】

場合によっては、患者は、CD19 CAR発現細胞などのCD19阻害剤と会合するCD19の能力を低減させるCD19の特徴を有するものとして同定される。このような特徴は、例えば、フレームシフト突然変異、未成熟終止コドン、核酸配列の変化、または一次mRNA転写物の構造の変化であってもよい。特徴は、例えば、スプライシングより先に起こるCD19の正常な産生からの逸脱であってもよい。特徴は、例えば、エキソンスキッピング以外の特徴であってもよい。このような患者は、別の標的の阻害剤、例えばB細胞阻害剤、例えば、別のエピトープ、例えばCD10、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3またはROR1の1つまたは複数の中のエピトープに対して向けられたCAR発現細胞で処置することができる。

【1071】

場合によっては、患者は、CD19 CAR発現細胞などのCD19阻害剤と会合するCD19の能力を低減させるが、CD19上の異なる領域と結合するCD19阻害剤などの第二のCD19阻害剤と会合するCD19の能力を低減または消失させない、CD19の特徴を有するものとして同定される。このような特徴は、例えば、フレームシフト突然変異または未成熟終止コドンの一方または両方を引き起こさない突然変異であってもよい。このような特徴は、例えば、核酸配列の変化、または一次mRNA転写産物の構造の変化であってもよく、スプライシングより先に起こるCD19の正常な産生からの逸脱であってもよく、またはエキソンスキッピング以外の特徴であってもよい。このような患者は、CD19の阻害剤、例えば、CD19の無傷の領域、例えばCD19の野生型部分、に対して向けられたB細胞阻害剤で、処置することができる。例えば、突然変異がエキソン2に存在した場合、第二のCD19阻害剤は、エキソン2以外エキソンと結合することもあり、または突然変異がないエキソン2の部分と結合することもある。第二のCD19阻害剤は、例えば、本明細書で説明されるCD19阻害剤であってもよい。

【1072】

T_{EFF}およびT_{REG}シグネチャー

本明細書における方法は、例えば、患者における、または細胞、例えば免疫細胞、の集団における、T_{REG}シグネチャーを決定する工程またはT_{EFF}細胞もしくはT_{REG}細胞のレベルを決定する工程を包含し得る。本明細書における方法は、患者における、または細胞の集団における、T_{REG}細胞のレベルを低減させる工程またはT_{REG}シグネチャーを減少させる工程も包含し得る。一部の実施形態において、T_{EFF}は、次の遺伝子：AIM2、ALAS1、B4GALT5、BATF、C3orf26、C4orf43、CCL3、CCL4、CCT3、CCT7、CD40LG、CHAC2、CSF2、CTNNA1、EBNA1BP2、EDARADD、EEF1E1、EIF2B3、EIF2S1、FABP5、FAM40B、FKBP4、FOSL1、GFOD1、GLRX2、HSPD1、HSPE1、IFNG、IL15RA、IL21、IL2RA、IL3、KCNK5、KIAA0020、LARP4、LRP8、LTA、MANF、MIR1182、MIR155、MIR155HG、MTCH2、MYOF、NDUFAF1、NLN、NME1、NME1-NME2、OTUD7B、PAM、PDIA6、PEA15、PFKM、PGAM1、PGAM4、PPIL1、PRDX4、PRSS23、PSMD1、PSMD11、PSMD14、PTRH2、PUS7、RBBP8、RPF2、RPP25、SFXN1、SLC27A2、SLC39A14、SLC43A3、SORD

10

20

30

40

50

、S P R、S R X N 1、S T I P 1、S T T 3 A、T B X 2 1、T M C C 2、T M E M 1
6 5、T N F R S F 9、T X N、T X N D C 5、U C K 2、V D R、W D R 1 2、Y W H
A G、およびZ D H H C 1 6の1つまたは複数（例えば、少なくとも10、20、30、
40、50、60、70、80または全て）の発現が上方調節された細胞である。一部の
実施形態において、T_{R E G}細胞は、次の遺伝子：A I M 2、A L A S 1、B A T F、C
5 o r f 3 2、C C L 1 7、C D 4 0 L G、C H A C 2、C S F 1、C T S L 1、E B N
A 1 B P 2、E D A R A D D、E M P 1、E P A S 1、F A B P 5、F A M 4 0 B、F K
B P 4、F O S L 1、G C L M、G K、G P R 5 6、H M O X 1、H S P D 1、H S P E
1、I K B I P、I L 1 0、I L 1 3、I L 1 5 R A、I L 1 R N、I L 2 R A、I L 3
、I L 4、I L 5、I L 9、K C N K 5、L T A、M A N F、M I R 1 1 8 2、M I R 1
5 5、M I R 1 5 5 H G、M Y O F、N D U F A F 1、N L N、N M E 1、N M E 1 - N
M E 2、P A N X 2、P D I A 6、P G A M 4、P P I L 1、P P P D E 2、P R D X 4
、P R K A R 1 B、P S M D 1、P S M D 1 1、P U S 7、R B B P 8、S L C 2 7 A 2
、S L C 3 9 A 1 4、S L C 4 3 A 3、S R X N 1、S T I P 1、S T T 3 A、T B X 2
1、T N F R S F 1 1 A、T N F R S F 1 B、T N F R S F 8、T N F R S F 9、T X N
、U C K 2、V D R、V T R N A 1 - 3、W D R 1 2、Y W H A G、Z D H H C 1 6、お
よびZ N F 2 8 2の1つまたは複数（例えば、少なくとも10、20、30、40、50
、60、70または全て）の発現が上方調節された細胞である。上方調節された発現は、
例えば、刺激の16時間後に測定することができる。上方調節された発現は、例えば、示
した遺伝子についてのRNAレベルを測定することによって、決定することができる。

10

20

【1073】

医薬組成物および処置

本発明の医薬組成物は、一部の態様において、本明細書で説明されるようなCAR発現
細胞、例えば複数のCAR発現細胞を、1つまたは複数の薬学的にまたは生理学的に許容
される担体、希釈剤または賦形剤と組み合わせて含むことができる。このような組成物は
、緩衝液、例えば中性緩衝食塩水、リン酸緩衝生理食塩水および同種のもの；炭水化物、
例えばグルコース、マンノース、スクロースまたはデキストラン、マンニトール；タンパ
ク質；ポリペプチドまたはアミノ酸、例えばグリシン；抗酸化剤；キレート剤、例えばE
D T Aまたはグルタチオン；アジュバント（例えば、水酸化アルミニウム）；および保存
剤を含んでもよい。一態様において、本発明の組成物は、静脈内投与用に製剤化され
る。

30

【1074】

本発明の医薬組成物は、処置しようとする（または予防しようとする）疾患に適切な方
式で投与されてもよい。投与の量および頻度は、患者の状態、ならびに患者の疾患のタイ
プおよび重症度のような要素によって決定されると予想されるが、適切な投薬は臨床試験
によって決定してもよい。

【1075】

一実施形態において、医薬組成物は、例えば、内毒素、マイコプラズマ、複製能を有す
るレンチウイルス（RCL）、p24、VSV-G核酸、HIV gag、残留した抗C
D3／抗CD28でコーティングされたビーズ、マウス抗体、プールされたヒト血清、ウ
シ血清アルブミン、ウシ血清、培養培地の成分、ベクターのパッケージング細胞またはプ
ラスミド成分、細菌および真菌からなる群より選択される汚染物質を実質的に含まず、例
えば、それらのレベルが検出可能ではない。一実施形態において、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 infl
uenza*）、ナイセリア・メニンギティディス（*Neisseria meningi
tides*）、シュードモナス・アエルギノーサ（*Pseudomonas aerug
inosa*）、スタフィロコッカス・アウレウス（*Staphylococcus au
reus*）、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*Streptococcus pne*

40

50

umonia)、およびストレプトコッカス・ピオゲネス (Streptococcus pyogenes) A群からなる群より選択される少なくとも1つである。

【1076】

「免疫学的有効量」、「抗腫瘍有効量」、「腫瘍阻害有効量」、または「治療量」が提示される場合、投与しようとする本発明の組成物の正確な量は、患者(対象)の年齢、体重、腫瘍のサイズ、感染または転移の程度、および状態の個体差を医師が検討することによって決定することができる。一部の実施形態において、細胞、例えば、本明細書で説明されるT細胞を含む医薬組成物を、範囲内の全ての整数値を含めて、細胞 $10^4 \sim 10^9$ 個/kg体重の投薬量、いくつかの場合において細胞 $10^5 \sim 10^6$ 個/kg体重の投薬量で投与してもよい。一部の実施形態において、細胞、例えば、本明細書で説明されるT細胞を、細胞 3×10^4 、 1×10^6 、 3×10^6 、または 1×10^7 個/kg体重で投与してもよい。細胞組成物はまた、これらの投薬量で複数回投与してもよい。細胞は、免疫療法で一般的によく知られている注入技術を使用することによって投与してもよい(例えば、Rosenberg et al., New Eng. J. of Med.319:1676, 1988を参照されたい)。

【1077】

一部の実施形態において、CAR細胞(例えば、CD10、CD19、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3またはROR1 CAR細胞)の用量は、細胞約 1×10^5 、 2×10^5 、 5×10^5 、 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 または 5×10^8 個/kgを含む。一部の実施形態において、CAR細胞(例えば、CD10、CD19、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3またはROR1 CAR細胞)の用量は、細胞少なくとも約 1×10^5 、 2×10^5 、 5×10^5 、 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 または 5×10^8 個/kgを含む。一部の実施形態において、CAR細胞(例えば、CD10、CD19、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3またはROR1 CAR細胞)の用量は、細胞約 1×10^5 、 2×10^5 、 5×10^5 、 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 または 5×10^8 個/kg以下を含む。一部の実施形態において、CAR細胞(例えば、CD10、CD19、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3またはROR1 CAR細胞)の用量は、細胞約 $1.1 \times 10^6 \sim 1.8 \times 10^7$ 個/kg、または細胞約 $8 \times 10^5 \sim 1.5 \times 10^6$ 個/kgを含む。一部の実施形態において、CAR細胞(例えば、CD10、CD19、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3またはROR1 CAR細胞)の用量は、細胞約 1×10^7 、 2×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、または 5×10^9 個を含む。一部の実施形態において、CAR細胞(例えば、CD10、CD19、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3またはROR1 CAR細胞)の用量は、細胞少なくとも約 1×10^7 、 2×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、または 5×10^9 個を含む。一部の実施形態において、CAR細胞(例えば、CD10、CD19、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3またはROR1 CAR細胞)の用量は、細胞約 1×10^7 、 2×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、または 5×10^9 個以下を含む。

【1078】

ある特定の態様において、活性化された細胞、例えばT細胞またはNK細胞、を対象に投与し、その後続いて血液(またはアフエーシスを行った)を再び採取し、それからの細胞を本発明に従って活性化し、これらの活性化され拡大した細胞を患者に再注入することが望ましい場合がある。このプロセスを数週間ごとに複数回実行してもよい。ある特定の態様において、 $10 \text{ cc} \sim 400 \text{ cc}$ の採取された血液から、細胞、例えばT細胞またはNK細胞を活性化することができる。ある特定の態様において、 20 cc 、 30 cc 、

10

20

30

40

50

40cc、50cc、60cc、70cc、80cc、90cc、または100ccの採取された血液から、細胞、例えばT細胞またはNK細胞を活性化する。

【1079】

本組成物の投与は、例えばエアロゾル吸入法、注射、取り込み、輸注、埋め込みまたは移植などによるあらゆる便利な方式で実行することができる。本明細書で説明される組成物は、動脈経由、皮下、皮内、腫瘍内、リンパ節経由（intranodally）、髄内、筋肉内、静脈内（i. v.）注射で、または腹腔内で、患者に投与されてもよい。一態様において、本発明の細胞組成物、例えばT細胞またはNK細胞組成物を、患者に皮内または皮下注射によって投与する。一態様において、本発明の細胞組成物、例えばT細胞またはNK細胞組成物を、i. v. 注射によって投与する。細胞組成物、例えばT細胞またはNK細胞組成物を、腫瘍、リンパ節、または感染部位に直接注射してもよい。

10

【1080】

特定の例示的な態様において、対象は、リユーカフェレーシスを受けることがあり、この場合、白血球を、エクスピボで収集するか、濃縮するか、または枯渇させて、目的の細胞、例えばT細胞を選択および／または単離する。これらの細胞単離物、例えば、T細胞またはNK細胞単離物を、当業界公知の方法により拡大し、本発明の1つまたは複数のCARコンストラクトを導入しすることができるように処置し、これにより、本発明のCAR発現細胞、例えば、CAR T細胞を作り出すことができる。それを必要とする対象は、その後、高用量の化学療法による標準的な処置に続き、末梢血幹細胞移植を受けることができる。ある特定の態様において、移植に続き、または移植と並列して、対象に、拡大させた本発明のCAR発現細胞の注入を施す。さらなる態様において、拡大させた細胞を、外科手術の前に、または外科手術に続いて投与する。

20

【1081】

患者に投与される上記の処置の投与量は、処置される状態の正確な性質および処置を受けるレシピエントに応じて変わることになる。ヒトへの投与に関する投与量の尺度化は、当業界で容認された実施に従って行うことができる。例えば、治療薬、例えば抗体、例えばCAMPATHに関する用量は、例えば、成人の患者の場合、1～約100mgの範囲であってもよく、例えば、1～30日の期間にわたって毎日投与してもよい。好適な1日用量は、1～10mg/日であるが、いくつかの場合において、それより多い最大40mg/日の用量が使用されることもある（米国特許第6,120,766号で説明されている）。

30

【1082】

一実施形態において、例えば、インビトロでの転写を使用して、CARを、細胞、例えば、T細胞またはNK細胞に導入し、対象（例えば、ヒト）に、本発明のCAR発現細胞、例えば、CAR T細胞の初回投与、および本発明のCAR発現細胞、例えばCAR T細胞の1回または複数回の後続投与を施し、この場合、前記1回または複数回の後続投与は、先行投与の15日未満後、例えば、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、または2日後に行う。一実施形態において、本発明のCAR発現細胞、例えばCAR T細胞の1回を超える投与を対象（例えば、ヒト）に毎週行い、例えば、本発明のCAR発現細胞、例えばCAR T細胞の、2、3、または4回の投与を毎週行う。一実施形態において、対象（例えば、ヒト対象）にCAR発現細胞、例えばCAR T細胞の1回を超える毎週の投与（例えば、2、3、または4回の毎週の投与）（本明細書ではまた、サイクルとも称する）を施し、続いて1週間、CAR発現細胞、例えばCAR T細胞を投与せず、そしてその後、CAR発現細胞、例えばCAR T細胞の、1回または複数回のさらなる投与（例えば、CAR発現細胞、例えばCAR T細胞の、1回を超える毎週の投与）を、対象に行う。別の実施形態において、対象（例えば、ヒト対象）に、1つを超えるサイクルのCAR発現細胞、例えばCAR T細胞を施し、各サイクルの間の時間は、10、9、8、7、6、5、4、または3日間未満である。一実施形態において、CAR発現細胞、例えばCAR T細胞を、隔日で、毎週3回の投与にわたり投与する。一実施形態において、本発明のCAR発現細胞、例えばCAR T細胞を、少

40

50

なくとも2、3、4、5、6、7、8週間、またはこれを超えて投与する。

【1083】

一部の実施形態において、対象は、成人対象（すなわち、18歳以上）であり得る。ある特定の実施形態において、対象は、1～30歳であり得る。一部の実施形態において、対象は、16歳以上である。ある特定の実施形態において、対象は、16～30歳である。一部の実施形態において、対象は、小児対象（すなわち、1～18歳）である。

【1084】

一態様において、レンチウイルスなど、レンチウイルスウイルスベクターを使用して、CAR発現細胞、例えば、CAR Tを生成する。このようにして生成されたCAR発現細胞、例えば、CAR Tは、安定的なCAR発現を示すであろう。

10

【1085】

一態様において、ガンマレトロウイルスベクター、例えば、本明細書で説明されるガンマレトロウイルスベクターなどのウイルスベクターを使用して、CAR発現細胞、例えば、CAR Tを生成する。これらのベクターを使用して生成されたCAR Tは、安定的なCAR発現を示すことができる。

【1086】

一態様において、CAR発現細胞、例えば、CAR Tは、CARベクターを、形質導入後4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15日間にわたり、一過性に発現する。CARの一過性発現は、RNA CARベクターのデリバリーにより実行することができる。一態様において、CAR RNAで細胞、例えば、NK細胞またはT細胞に、エレクトロポレーションにより形質導入する。

20

【1087】

一過性に発現するCAR T細胞を使用して（特に、CAR Tを保有するマウス scFvを用いて）処置される患者において生じ得る潜在的な問題は、複数回の処置の後のアナフィラキシーである。

【1088】

この理論に縛られることは望まないが、このようなアナフィラキシー応答は、患者が体液性抗CAR応答、すなわち抗IgEアイソタイプを有する抗CAR抗体を発生させることによって引き起こされる可能性があると考えられる。抗原への曝露が10～14日中断されると、患者の抗体産生細胞が、IgGアイソタイプ（アナフィラキシーを引き起こさない）からIgEアイソタイプへのクラススイッチを経ると考えられる。

30

【1089】

患者が、一過性CAR療法の経過中に、抗CAR抗体応答（RNAの形質導入により発生する抗CAR抗体応答など）を発生させる危険性が高い場合も、CAR Tの注入の中断は、10～14日間を超えないものとする。

【1090】

CD19抗体およびCAR

マウス抗CD19抗体のヒト化

マウスCD19抗体のヒト化は、CAR T19処置、すなわち、CAR19コンストラクトが形質導入されたT細胞での処置を受けている患者において、マウス特異的な残基がヒト抗マウス抗原（HAMA）応答を誘導することが可能な臨床条件にとって望ましい。ヒト化CD19 CAR配列の産生、特徴付けおよび効能は、実施例1～5（115～159頁）、例えば表3、4および5（125～147頁）を含めて、その全体が参照により本明細書に組み入れられる国際出願WO2014/153270において説明されている。

40

【1091】

CARコンストラクト、例えばCD19 CARコンストラクト

国際出願WO2014/153270に記載のCD19 CARコンストラクトのうち、ある特定の配列を本明細書において再現する。当然のことながら、このセクションにおける配列は、他のCAR、例えば、CD10 CAR、CD20 CAR、CD22 C

50

AR、CD34 CAR、CD123 CAR、FLT-3 CAR、ROR1 CAR、CD79b CAR、CD179b CAR、またはCD79a CARに関しても使用することができる。

【 1 0 9 2 】

ヒト化 s c F v フラグメント（配列番号 1 ～ 1 2）の配列を下の表 2 に提供する。配列番号 1 ～ 1 2 と、下に示されている追加の配列、配列番号 1 3 ～ 1 7、を使用して完全 C A R コンストラクトを生成して、配列番号 3 1 ～ 4 2 を有する完全 C A R コンストラクトを生成した。

【 1 0 9 3 】

- ・リーダー（アミノ酸配列）（配列番号13）

MALPVTALLPLALLHAARP

10

【 1 0 9 4 】

- ・リーダー（核酸配列）（配列番号54）

ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCATGCCGCTAGACCC

【 1 0 9 5 】

- ・ C D 8 ヒンジ (アミノ酸配列) (配列番号 14)

TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL
DEACD

【 1 0 9 6 】

- ・ C D 8 ヒンジ (核酸配列) (配列番号 55)

ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTG
CCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT

20

【 1 0 9 7 】

- ・ C D 8 膜貫通 (アミノ酸配列) (配列番号 15)

I Y I W A P L A G T C G V L L L S L V I T L Y C

【 1 0 9 8 】

- ・膜貫通（核酸配列）（配列番号56）

ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGC

【 1 0 9 9 】

- ・ 4-1 BB細胞内ドメイン (アミノ酸配列) (配列番号16)

KRGRKKLLYIFKOPFMRPVOTTOEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

30

【 1 1 0 0 】

- ・ 4-1 BB細胞内ドメイン (核酸配列) (配列番号60)

AAACGGGGCAGAAAGAACTCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGG
CTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAGGAGGATGTGAACTG

【 1 1 0 1 】

- ・CD3ゼータドメイン（アミノ酸配列）（配列番号17）

RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGER
RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMOALPPR

【 1 1 0 2 】

- ・ C D 3 ゼータ (核酸配列) (配列番号 1 0 1)

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGG
ACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACC
CTCAGGAAGGCCTGTACAAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGC
CGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCATATGCA
GGCCCTGCCCCCTCGG

40

【 1 1 0 3 】

- ・CD3ゼータドメイン（アミノ酸配列；NCBI参照配列NM_000734.3）
配列番号43）

RVKFSRSADAPAYOOGONOLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPOEGLYNELOKDKMAEAYSEIGMKGER

50

RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

【1104】

・C D 3 ゼータ（核酸配列；NCBI 参照配列 NM_000734.3）（配列番号 44）

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAG
AACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTT
TGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGA
AGAACCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGG
AGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGG
ACGATGGCCTTTACCAGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGC
CCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

10

【1105】

C D 28 ドメイン（アミノ酸配列）（配列番号 1317）
RSKRSLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS

【1106】

C D 28 ドメイン（核酸配列）（配列番号 1318）
AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTA
CCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC

【1107】

野生型 I C O S ドメイン（アミノ酸配列、配列番号 1319）
TKKKYSSSVHDPNGEYFMRAVNTAKKSRLTDVTL

20

【1108】

野生型 I C O S ドメイン（核酸配列、配列番号 1320）
ACAAAAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAACGGTGAATACATGTTCATGAGAGCAGTGAACACAGCCAAAA
ATCCAGACTCACAGATGTGACCCTA

【1109】

Y→F 突然変異 I C O S ドメイン（アミノ酸配列、配列番号 1321）
TKKKYSSSVHDPNGEFMFRAVNTAKKSRLTDVTL

【1110】

I g G 4 ヒンジ（アミノ酸配列）（配列番号 102）
ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS
TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKM

30

【1111】

I g G 4 ヒンジ（核酸配列）（配列番号 103）
GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGCCCTGCCCCGAGTTCCTGGGCGGACCCAGCGTGTTCTGTTCCTGTTCCCCC
CAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGACCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAGGACCCCG
AGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGGGAGGAGCAGTTCAATAGC
ACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGTAAGGTGTCCAA
CAAGGGCCTGCCCAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGC
CCCCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCC
GTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAATAAGACCAACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTT
CCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAGGCAACGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCC
TGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATG

40

【1112】

これらのクローンは全て、4-1BB 由来の共刺激ドメインのシグナルドメインにおける Q/K 残基変化を含有した。

【1113】

【表 2 - 1】

表2: ヒト化CD19 CARコンストラクト

名称	配列番号	配列
CAR 1		
CAR1 scFv ドメイン	1	EIVMTQSPATLSLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYH TSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQ GTKLEIKGGGSGGGGSGGGGSGVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVS LPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYSLSKSRVTISKDNSKNQV SLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLLVTVSS
103101 CAR1 可溶性 scFv - nt	61	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggtctcttctgctccacgccg ctcgcccgaaattgtgatgaccagtcacccgccactcttagcctttcaccggg tgagcgcgcaaccctgtcttgacagagcctccaagacatctcaaaatacctta tggtatcaacagaagcccgacaggtcctcgcttctgatctaccacaccagcc ggctccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgacta caccctcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcag caaggaacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaag gtggaggtggcagcggaggaggtgggtccggcgggtggaggaagccaggtccaact ccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgt actgtgagcggagtgctctctccccgattacgggggtgtcttggatcagacagccac cggggaaggtctggaatggattggagtgatttggggctctgagactacttacta ctcttcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcag gtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgcg ctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacaggggtac tctgggtcaccgtgtccagccaccaccatcatcaccatcaccat
103101 CAR1 可溶性 scFv - aa	73	<u>MALPVTALLLPLALLLHAAR</u> Peivmtqspatls slspgeratlscrasqdiskyl nwyqqkpgqaprrlliyhtsrhlsgiparfsgsgsgtdytltiisslpedfavyfcq qgntlpytfgggtkleikgggsgggsgggsgvqlqesgpplvkpsetlsltc tvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyysslksrvtiskdnsknq vslklssvtaadtavyycahyyyggsyamdyywgqgtllvtvsshhhhhhh

10

20

30

【表 2 - 2】

104875 CAR 1 - 完全 - nt	85	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccg ctcggcccgaaattgtgatgaccagtcacccgccactcttagcctttcaccggg tgagcgcgcaaccctgtcttgacagagcctcccaagacatctcaaaataccttaat tggatcaacagaagcccgacaggtcctcgcttctgatctaccacaccagcc ggctccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgacta caccctcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatcttctgtcag caaggaacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaag gtggaggtggcagcggaggaggtgggtccggcgggtggaggaagccaggtccaact ccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgt actgtgagcggagtgtctctccccgattacgggggtgtcttgatcagacagccac cggggaaggtctggaatggattggagtgatttggggctctgagactacttacta ctcttcacccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcag gtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgcg ctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacaggggtac tctggtcaccgtgtccagcaccactacccagcaccgaggccaccaccccggt cctaccatcgctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcag ctggtggggccgtgcatacccggtcttgacttcgctgcgatctacatttg ggccctctggctggtagcttgccgggtcctgctgctttcactcgtgatcactctt tactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatga ggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcagccggttccagagga ggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgtcca gcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagag aggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaa gccgcgcagaaagaatcccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataag atggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaag gccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgc tcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
104875 CAR 1 - 完全 - aa	31	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlsispgeratlscrasqdiskyl nyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcg qgntlpytfgggtkleikgggsgggsgggsgqvqlqesgpglvkpsetlsltc tvsgvslpdygvswirppgkglewigviwgsettyysslksrvtiskdnskq vslklssvtaadtavyycakhyyyggsyandywgqgtlvtvssttpprptpa ptiasqpplsrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitl yckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrpfpeeeeggcelrvkfsrsadap aykqqnqllynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprkrnpqeglynelqkdk maeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr

10

20

30

【表 2 - 3】

CAR 2		
CAR2 scFv ドメイン	2	eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprrlliyhtsrh sgiparfsgsgsgtdytltlisslqpedfavyfcqqgntlpytfgggtkleikggg gsgggsgsggsgvqlqesgpglvkpsetlslctvsgvslpdygvswirqppgk glewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnknqvsllkssvtaadtavyycakh yyyggsyamydwgggtlvtvss
103102 CAR2 - 可溶性 sc Fv - nt	62	atggccctccctgtcaccgcctgtctgcttccgctggctcttctgctccacgccg ctcgccccgaaattgtgatgaccagtcacccgccactcttagcctttcaccgg tgagcgcgcaaccctgtcttgagagcctcccaagacatctaaaataccttaat tggtatcaacagaagcccgacaggctcctcgcttctgatctaccacaccagcc ggctccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgacta caccctcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcag caaggaacaccctgcctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaag gtggaggtggcagcggaggaggtgggtccggcgggtggaggaagccaggtccaact ccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgt actgtgagcggagtgtctctccccgattacgggggtgtcttgatcagacagccac cggggaagggctctggaatggattggagtgatttggggctctgagactactacta ccaatcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcag gtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgcg ctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtag tctggtcaccgtgtccagccaccaccatcatcaccatcaccat
103102 CAR2 - 可溶性 sc Fv - aa	74	<u>MALPVTALLLPLALLLHAARPe</u> ivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskyln wyqqkpgqaprrlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytltlisslqpedfavyfcq qgntlpytfgggtkleikgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpsetlslct tvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnknq vsllkssvtaadtavyycakhyyyggsyamydwgggtlvtvsshhhhhhh

10

20

【表 2 - 4】

104876 CAR 2 - 完全 - nt	86	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccg ctcgcccgaaattgtgatgaccagtcacccgccactcttagcctttcaccggg tgagcgcgcaaccctgtcttgacagagcctccaagacatctcaaaataccttaat tggatcaacagaagcccgacaggtcctcgcttctgatctaccacaccagcc ggctccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgacta caccctcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcag caaggaacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaag gtggaggtggcagcggaggaggtgggtccggcgggtggaggaagccaggtccaact ccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgt actgtgagcggagtgctctctcccgattacgggggtgtcttggatcagacagccac cggggaaggtctggaatggattggagtgatttggggctctgagactacttacta ccaatcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcag gtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgcg ctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacaggggtac tctggtcaccgtgtccagcaccactacccagcaccgaggccaccaccccggt cctaccatcgctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcag ctggtggggccgtgcatacccggtcttgacttcgctgcgatctacatttg ggccctctggctggacttgccgggtcctgctgctttcactcgtgatcactctt tactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatga ggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttccagagga ggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgtcca gcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagag aggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatgggcgggaa gccgcgcagaaagaatcccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataag atggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaag gccacgacggactgtaccaggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgc tcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
104876 CAR 2 - 完全 - aa	32	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskyl nyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcg qgntlpytfgggtkleikgggsgggsgggsgqvqlqesgpglvkpsetlsltc tvsgvslpdygvswirppgkglewigviwgsettyyqsslkstrvtiskdsknq vslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamywgqgtlvtvssttppaprpptpa ptiasqpplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitl yckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrpfpeeeeggcelrvkfsrsadap aykqqnqllynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprkrnpqeglynelqkdk maeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr

10

20

30

【表 2 - 5】

CAR 3		
CAR3 scFv ドメイン	3	qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyyssslksrvtiskdnsknqvsllkssvtaadtavyycahyyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsgggsggggseivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqqgntlpytfgggtkleik
103104 CAR 3 - 可溶性 scFv - nt	63	atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccgctcgcccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggctctggtgaagccatctgagactctgtccctcacttgaccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtgagctggattagacagcctcccgaaagggactggagtggatcggagtgatttggggtagcgaaccacttactattcatcttccctgaagtcacgggtcaccatttcaaaaggataactcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccgctgacaccgccgtgtattactgtgccaagcattactactatggaggggtcctacgccatggactactggggccagggaactctggctactgtgtcatctgggtggaggaggtagcggaggaggcgggagcgggtggagggtggctccgaaatcgtgatgaccagagccctgcaacctgtccctttctccggggaacgggctacctttcttgtcgggcatcacaagatatctcaaaatacctcaattggtatcaacagaagccgggacaggcccctaggcttcttatctaccacacctctcgctgcatacgggattcccgacgcttttagcgggtctggaagcgggaccgactacactctgaccatctcatctctccagcccaggacttcgccgtctacttctgccagcagggtaacacctgccgtacaccttcggccagggcaccaagcttgagatcaaaccatcaccaccatcatcaccatcac
103104 CAR 3 - 可溶性 scFv - aa	75	<u>MALPVTALLLPLALLLHAARP</u> qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyyssslksrvtiskdnsknqvsllkssvtaadtavyycahyyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsgggsggggseivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqqgntlpytfgggtkleikhhhhhhh

10

20

【表 2 - 6】

104877 CAR 3 - 完全 - nt	87	atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccg ctcgcccacaagtccagcttcaagaatcagggcctgggtctgggtgaagccatctga gactctgtccctcacttgaccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtg agctggattagacagcctcccgaaagggactggagtggatcgagtgatttggg gtagcgaaaccacttactattcatcttccctgaagtcacgggtcaccatttcaaa ggataactcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccgctgac accgccgtgtattactgtgccaaagcattactactatggaggggtcctacgccatgg actactggggccagggaactctggctactgtgtcatctgggtggaggaggtagcgg aggaggcgggagcgggtggaggtggctccgaaatcgtgatgaccagagccctgca accctgtccctttctccggggaacgggctaccctttcttctcgggcatcacaag atatctcaaaatacctcaattggtatcaacagaagccgggacaggcccttaggct tcttatctaccacacctctcgctgcatagcgggattcccgacgcttttagcggg tctggaagcgggaccgactacactctgaccatctcatctctccagcccgaggact tcgccgtctacttctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggccaggg caccaagcttgagatcaaaaccactactcccgtccaaggccaccaccctgcc ccgaccatcgctctcagccgctttccctgcgtccggaggcatgtagaccgcag ctggtggggccgtgcatacccggtcttgacttcgctgcgatatctacatttg ggccctctggctgggtacttgccgggtcctgctgctttcactcgtgatcactctt tactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatga ggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttccagagga ggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctcca gcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagag aggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatgggcgggaa gccgcgcagaaagaatcccaagaggcctgtacaacgagctccaaaaggataag atggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaag gccacgacggactgtaccaggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgc tcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
104877 CAR 3 - 完全 - aa	33	MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdyqv swirppgkglewigviwgsettyssslksrvtiskdsknqvslklssvtaad tavyycahyyyggsyamdyywgqgtlvtvssgggsgggsggggseivmtqspa tlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprllyhtsrhsgiparfsg sgsgtdytlitisslqpedfavycqqgntlpytfqggtkleiktttppaprpptpa ptiasqpplsrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitl yckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcsrfpeeeeggcelrvkfsrsadap aykqqnqlyneInlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdk maeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr

10

20

30

【表 2 - 7】

CAR 4		
CAR4 scFv v ドメイン	4	qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnknqvsllkssvtaadtavyycahyyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsgggsggggseivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqqgntlpytfgggtkleik
103106 CAR4 - 可溶性 scFv - nt	64	atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccgctcgcccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggctctggtgaagccatctgagactctgtccctcacttgcaccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagttagctggattagacagcctcccgaaagggactggagtggatcggagtgatttggggtagcgaaccacttactatcaatcttccctgaagtcacgggtcaccatttcaaaaggataactcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccgctgacaccgccgtgtattactgtgccaagcattactactatggaggggtcctacgccatggactactggggccagggaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcgggagcgggtggagggtggctccgaaatcgtgatgaccagagccctgcaacctgtccctttctccggggaacgggtaccctttcttgtcgggcatcacaagatatctcaaaatacctcaattggtatcaacagaagccgggacaggccctaggcttcttactaccacacctctcgctgcatacgggattcccgacgcttttagcgggtctggaagcgggaccgactacactctgaccatctcatctctccagcccgaggacttcgccgtctacttctgccagcagggtaacacctgccgtacaccttcggccagggcaccaagcttgagatcaaaccatcaccaccatcatcaccatcac
103106 CAR4 - 可溶性 scFv -aa	76	<u>MALPVTALLLPLALLLHAARP</u> qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnknqvsllkssvtaadtavyycahyyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsgggsggggseivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqqgntlpytfgggtkleikhhhhhhh

10

20

【表 2 - 8】

104878 CAR 4 - 完全 - nt	88	atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccc ctcgcccacaagtccagcttcaagaatcagggcctgggtctgggtgaagccatctga gactctgtccctcacttgaccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtg agctggattagacagcctcccgaaagggactggagtggatcgagtgatttggg gtagcgaaaccacttactatcaatcttcctgaagtcacgggtcaccatttcaaa ggataactcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccgctgac accgccgtgtattactgtgcccaagcattactactatggaggggtcctacgccatgg actactggggccagggaactctggctactgtgtcatctgggtggaggaggtagcgg aggaggcgggagcgggtggaggtggctccgaaatcgtgatgaccagagccctgca accctgtccctttctccggggaacgggctaccctttcttctcgggcatcacaag atatctcaaaatacctcaattggtatcaacagaagccgggacaggcccttaggct tcttatctaccacacctctcgctgcatagcgggattcccgacgcttttagcggg tctggaagcgggaccgactacactctgaccatctcatctctccagcccaggact tcgccgtctacttctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggccaggg caccaagcttgagatcaaaaccactactcccgtccaaggccaccaccctgcc ccgaccatcgctctcagccgctttccctgcgtccggaggcatgtagaccgcag ctggtggggccgtgcatacccggtcttgacttcgctgcgatatctacatttg ggccctctggctgggtacttgccgggtcctgctgctttcactcgtgatcactctt tactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatga ggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttccagagga ggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctcca gcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagag aggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatgggcgggaa gccgcgcagaaagaatcccaagaggcctgtacaacgagctccaaaaggataag atggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaag gccacgacggactgtaccaggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgc tcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
104878 CAR 4 - 完全 - aa	34	MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdyqv swirppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnskqvslklssvtaad tavyycahyyyggsyamdyywggtlvtvssgggsgggsggggseivmtqspa tlslspgeratlscrasqdiskylnwyyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsg sgsgtdytlitisslqpedfavyfcqqgntlpytfqggtkleiktttppaprpptpa ptiasqpplsrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitl yckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpееееggcelrvkfrsadap aykqqnqlyneInlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdk maeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr

10

20

30

CAR 5		
CAR5 scFv ドメイン	5	eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpggaprlliyhtsrhlhsgiparfsgsgsgtdytltlisslqpedfavyfcqqgntlpytfqggtkleikgggsgsgggsgsgggsgsgggsgvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyyssslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvss
99789 CAR5 - 可溶性 sc Fv - nt	65	atggccctcccagtgaccgctctgctgctgcctctcgcacttcttctccatgccgctcggcctgagatcgtcatgacccaaagccccgctaccctgtccctgtcaccggcgagagggcaaccctttcatgcagggccagccaggacatttctaagtacctcaactggtatcagcagaagccagggcagggtcctcgccctgctgatctaccacaccagccgcctccacagcggtatccccgccagattttccgggagcgggtctggaaccgactacacctcaccatctcttctctgcagcccaggatttcgccgtctatttctgccagcaggggaatactctgccgtacaccttcggtcaaggtaggaagctggaaatcaaggaggcgaggatcaggcgggtggcggaagcggaggagggtggctccggaggaggaggttcccaagtgcagcttcaagaatcaggacccggacttgtgaagccatcagaaacctctccctgacttgtaccgtgtccgggtgtgagcctccccgactacggagtctcttggattcggcagcctccgggggaaggtcttgaatggattgggggtgatttggggatcagagactacttactactcttcatcacttaagtcacgggtcaccatcagcaaagataatagcaagaaccaagtgtcacttaagctgtcatctgtgaccgccgctgacaccgccgtgtactattgtgccaaacattactattacggaggggtcttatgctatggactactggggacaggggaccctgggtgactgtctctagccatcaccatcaccaccatcatcac
99789 CAR5 - 可溶性 sc Fv -aa	77	<u>MALPVTALLLPLALLLHAAR</u> Peivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpggaprlliyhtsrhlhsgiparfsgsgsgtdytltlisslqpedfavyfcqqgntlpytfqggtkleikgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyyssslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvsshhhhhhh

20

【表 2 - 1 0】

104879 CAR 5 - 完全 - nt	89	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccg ctcggcccgaaattgtgatgaccagtcacccgccactcttagcctttcaccggg tgagcgcgcaaccctgtcttgacagagcctccaagacatctcaaaataccttaat tggatcaacagaagcccgacaggtcctcgcttctgatctaccacaccagcc ggctccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgacta caccctcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatcttctgtcag caagggacacccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaag gtggaggtggcagcggaggaggtgggtccggcggaggaggaagcggcggaggcgg gagccaggtccaactccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaact ctttcactgacttgtactgtgagcggagtgctctctcccgattacggggtgtctt ggatcagacagccaccggggaaggtctggaatggattggagtgatttggggctc tgagactacttactactcttcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggac aactctaagaatcaggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccg ccgtgtactattgcgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggatta ctggggacagggtagtctgtgtcaccgtgtccagcaccactacccagcaccgagg ccaccaccccggtcctaccatcgctcccagcctctgtccctgcgtccggagg catgtagaccgcagctgggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctg cgatatctacatttgggcccctctggctggtagtcttgcggggtcctgctgcttca ctcgtgatcactcttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatcttta agcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatg ccggttcccagaggaggaggaagggcgtgcgaactgcgcgtgaaattcagccgc agcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactca atcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacc agaaatgggcggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgag ctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggatgaaaggggaac gcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacca ggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
104879 CAR 5 - 完全 - aa	35	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskyl nyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcg qgnltlpytfgggtkleikgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpset lsltctvsgvslpdygvswirppgkglewigviwgsettyyssslksrvtiskd nsknqvs1klssvtaadtavyycakhyyyggsyamydgqgtltvtssttpapr pptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllls lvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrpfpeeeeggcelrvkfsr sadapaykqqnqlyne1nlgrreeydvldkrrgrdpemggkprknpqeglyne lqdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtaldhmqalppr

10

20

30

CAR 6		
CAR6 scFv ドメイン	6	eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprrlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqqgntlpytfqggtkleikggggsggggsggggsggggsgvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirpppgkglewigviwgsettyyyqsslksrvtiskdnsknqvsllkssvtaadtavyycakhyyyggsyamydgqgtlvtvss
99790 CAR6 - 可溶性 sc Fv - nt	66	atggccctcccagtgaccgctctgctgctgcctctcgcacttcttctccatgccgctcggcctgagatcgtcatgacccaaagccccgctaccctgtccctgtcaccggcgagagggcaaccctttcatgcagggccagccaggacatttctaagtacctcaactggtatcagcagaagccagggcagggtcctcgctgctgatctaccacaccagccgcctccacagcggtatccccgccagattttccgggagcgggtctggaaccgactacacctcaccatctcttctctgcagcccaggatttcgccgtctatttctgccagcaggggaatactctgcgtacaccttcggtcaaggtaggaagctggaaatcaaggaggcgaggatcaggcgggtggcggaagcggaggaggtggctccggaggaggaggttcccaagtgcagcttcaagaatcaggaccggacttgtgaagccatcagaaacctctccctgacttgtaccgtgtccgggtgtgagcctccccgactacgggagtctcttgatttcgccagcctccggggaagggcttgaatggattgggggtgatttggggatcagagactacttactaccagtcacttaagtcacgggtcaccatcagcaaagataatagcaagaaccaagtgtcacttaagctgtcatctgtgaccgccgctgacaccgccgtgtactattgtgccaaacattactattacggagggcttatgtcatggactactggggacaggggaccctgggtgactgtctctagccatcaccatcaccaccatcatcac
99790 CAR6 - 可溶性 sc Fv - aa	78	<u>MALPVTALLLPLALLLHAAR</u> Peivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprrlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqqgntlpytfqggtkleikggggsggggsggggsggggsgvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirpppgkglewigviwgsettyyyqsslksrvtiskdnknqvsllkssvtaadtavyycakhyyyggsyamydgqgtlvtvss <h>hhhhhhhh</h>

20

【表 2 - 1 2】

104880 CAR6 - 完全 - nt	90	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccg ctcggcccgaaattgtgatgaccagtcacccgccactcttagcctttcaccggg tgagcgcgcaaccctgtcttgacagacccccaagacatctcaaaataccttaat tggatcaacagaagcccgacaggtcctcgcttctgatctaccacaccagcc ggctccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgacta caccctcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatcttctgtcag caagggacacccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaag gtggaggtggcagcggaggtgggtccggcgggtggaggaagcggagggcggagg gagccaggtccaactccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaact ctttcactgacttgtactgtgagcggagtgctctctcccgattacggggtgtctt ggatcagacagccaccggggaaggtctggaatggattggagtgatttggggctc tgagactacttactaccaatcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggac aactctaagaatcaggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccg ccgtgtactattgcgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggatta ctggggacagggactctgtgtcaccgtgtccagcaccactacccagcaccgagg ccaccaccccggtcctaccatcgctcccagcctctgtccctgcgtccggagg catgtagaccgcagctgggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctg cgatatctacatttgggcccctctggctggtagcttgcggggctctgtgctttca ctcgtgatcactcttactgtaagcgcggctcggaagaagctgctgtacatcttta agcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatg ccggttcccagaggaggaggaagcggtgcgaactgcgcgtgaaattcagccgc agcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactca atcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacc agaaatgggcggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgag ctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggatgaaaggggaac gcagaagaggcaaaggccacgcagcgtgtaccagggactcagcaccgccacca ggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
104880 CAR6 - 完全 - aa	36	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskyl nyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcg qgntlpytfgggtkleikgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpset lsltctvsgvslpdygvswirppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskd nsknqvs1klssvtaadtavyycakhyyyggsyamywgqgtltvtssttpapr pptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllls lvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrpfpeeeeggcelrvkfsr sadaykqggnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprknpqeglyne lqdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtaldhmqalppr

10

20

30

【表 2 - 1 3】

CAR 7		
CAR7 scFv ドメイン	7	qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyyssslksrvtiskdnknqvsllkssvtaadtavyycahyyyggsyamdywgqgtlvtvssgggsgggsgggsgggsgggseivmtqspatlsispgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprllyhtsrllhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqp edfavyfcqqgntlpytfqggtkleik
100796 CAR7 - 可溶性 sc Fv - nt	67	atggcactgcctgtcactgcctcctgctgcctctggccctccttctgcatgccg ccagggcccaagtccagctgcaagagtcaggaccggactggtgaagccgtctga gactctctcactgacttgtaccgtcagcggcgtgtccctccccgactacggagtgc atcatggatccgccaacctcccggaagggccttgatggattggtgtcatctggg gttctgaaaccacactactcatcttccctgaagtcagggtgacctacagcaa ggataattccaagaaccaggtcagccttaagctgtcatctgtgaccgctgctgac accgccgtgtattactgcgccaagcactactattacggaggaagctacgctatgg actattggggacagggcactctcgtgactgtgagcagcggcggtggagggtctgg aggtggaggatccggtggtggtgggtcaggcggaggaggagcgagattgtgatg actcagtcaccagccacctttctctttcaccggcgagagagcaacctgagct gtagagccagccaggacatttctaagtacctcaactggtatcagcaaaaaccggg gcagggccctcgctcctgatctaccatacctcacgccttcactctggtatcccc gctcggttttagcggtcaggtatctggtaccgactacactctgaccatttccagcc tgcagccagaagatttcgcagtgatatttctgccagcagggcaatacccttcctta caccttcggtcaggggaaccaagctcgaaatcaagcaccatcaccatcatcaccac cat
100796 CAR7 - 可溶性 sc Fv - aa	79	<u>MALPVTALLLPLALLLHAARP</u> qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygv swirqppgkglewigviwgsettyyssslksrvtiskdnknqvsllkssvtaad tavyycahyyyggsyamdywgqgtlvtvssgggsgggsgggsgggsgggseivm tqspatlsispgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprllyhtsrllhsgip arfsgsgsgtdytlitisslqp edfavyfcqqgntlpytfqggtkleik <u>hhhhhhh</u> <u>h</u>

10

20

30

【表 2 - 1 4】

104881 CAR 7 完全 - nt	91	atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccg ctcgcccacaagtccagcttcaagaatcagggcctgggtctgggtgaagccatctga gactctgtccctcacttgaccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtg agctggattagacagcctcccgaaagggactggagtggatcgagtgatttggg gtagcgaaaccacttactattcatcttccctgaagtcacgggtcaccatttcaa ggataactcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccgctgac accgccgtgtattactgtgccaaagcattactactatggaggggtcctacgccatgg actactggggccagggaactctggctactgtgtcatctgggtggaggaggtagcgg aggaggcgggagcgggtggaggtggctccggaggtggcggaagcgaaatcgtgatg acccagagccctgcaaccctgtccctttctcccgggaacgggctaccctttctt gtcgggcatcacaagatatctcaaaatacctcaattggtatcaacagaagccggg acaggccccctaggcttcttctaccacacctctcgcctgcatagcgggattccc gcacgcttttagcgggtctggaagcgggaccgactacactctgaccatctcatctc tcagccccgaggacttcgccgtctacttctgccagcagggtaacaccctgccgt caccttcggccagggcaccaagcttgagatcaaaaccactactcccgctccaagg ccacccacccctgccccgaccatcgctctcagccgctttccctgcgtccggagg catgtagaccgcagctgggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctg cgatatctacatttgggcccctctggctggtaacttgccgggtcctgctgctttca ctctgtgatcactctttactgtaagcgcggctcggaagaagctgctgtacatcttta agcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatg ccggttcccagaggaggaggaagcggtgcgaactgcgcgtgaaattcagccgc agcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactca atcttggctcgagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacc agaaatgggcggaagccgcgcagaagaatccccagagggtcgtacaacgag ctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaac gcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacca ggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
104881 CAR 7 完全 - aa	37	MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdyqv <u>swirppgkglewigviwgsettyssslksrvtiskdsknqvslklssvtaad</u> tavyycakhyyyggsyamdyywggtlvtvssgggsgggsgggsgggsgggseivm tqspatlsispgeratlscrasqdiskylnwyyqkpgqaprrlliyhtsrhsgip arfsgsgsgtdytlitisslqpedefavyfcqqgntlpytfgggtkleiktttpapr pptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllls lvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrpfpeeeeggcelrvkfsr sadapaykqqnqlyneInlgrreeydvldkrrgrdpemggkprknpqeglyne lqdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr

10

20

30

【表 2 - 1 5】

CAR 8		
CAR8 scFv v ドメイン	8	qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnknqvsllkssvtaadtavyycahyyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsgggsgggsggggseivmtqspatlsispgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprllyhtsrllhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqp edfavyfcqqgntlpytfgggtkleik
100798 CAR8 - 可溶性 sc Fv - nt	68	atggcactgcctgtcactgcctcctgctgcctctggccctccttctgcatgccg ccaggccccaagtccagctgcaagagtcaggaccggactggtgaagccgtctga gactctctcactgacttgtaccgtcagcggcgtgtccctccccgactacggagt tcatggatccgccaacctcccggaagggccttgatggattggtgtcatctggg gttctgaaaccacactactaccagtcttccctgaagtcagggtgaccatcagcaa ggataattccaagaaccaggtcagccttaagctgtcatctgtgaccgctgctgac accgccgtgtattactgcgccaagcactactattacggaggaagctacgctatgg actattggggacagggcactctcgtgactgtgagcagcggcggtggagggtctgg aggtggaggatccggtggtggtgggtcaggcggaggaggagcagagattgtgatg actcagtcaccagccaccttttctctttcaccggcgagagagcaacctgagct gtagagccagccaggacatttctaagtacctcaactggtatcagcaaaaaccggg gcaggccctcgcctcctgatctaccatacctcacgccttcactctggtatcccc gctcggttttagcggtcaggatctggtaccgactacactctgaccatttcagcc tgcagccagaagatttcgcagtgtatttctgccagcagggcaatacccttcctta caccttcggtcaggggaaccaagctcgaaatcaagcaccatcaccatcatcatcac cac
100798 CAR8 - 可溶性 sc Fv - aa	80	<u>MALPVTALLLPLALLLHAARP</u> qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygv swirqppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnknqvsllkssvtaad tavyycahyyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsgggsgggsggggseivm tqspatlsispgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprllyhtsrllhsgip arfsgsgsgtdytlitisslqp edfavyfcqqgntlpytfgggtkleik <u>hhhhhhh</u> <u>h</u>

10

20

30

【表 2 - 1 6】

104882 C AR 8 - 完全 - nt	92	atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccg ctcgcccacaagtccagcttcaagaatcagggcctgggtctggtgaagccatctga gactctgtccctcacttgaccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtg agctggattagacagcctcccgaaagggactggagtggatcgagtgatttggg gtagcgaaaccacttactatcaatcttcctgaagtcacgggtcaccatttcaa ggataactcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccgctgac accgccgtgtattactgtgccaaagcattactactatggaggggtcctacgccatgg actactggggccagggaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcgg aggaggcgggagcgggtggaggtggctccggaggcgggtgggtcagaaatcgtgatg accagagccctgcaaccctgtccctttctcccggggaacgggctaccctttctt gtcgggcatcacaagatatctcaaaatacctcaattggtatcaacagaagccggg acaggccccctaggcttcttctaccacacctctcgcctgcatagcgggattccc gcacgcttttagcgggtctggaagcgggaccgactacactctgaccatctcatctc tcagccccgaggacttcgccgtctacttctgccagcagggtaacaccctgccgta caccttcggccagggcaccaagcttgagatcaaaaccactactcccgctccaagg ccaccacccctgccccgaccatcgctctcagccgctttccctgcgtccggagg catgtagaccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctg cgatatctacatttgggcccctctggtggtacttgccgggtcctgctgctttca ctcgtgatcactcttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatcttta agcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatg ccggttcccagaggaggaggaagcggtgcgaactgcgcgtgaaattcagccgc agcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactca atcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacc agaaatgggcggaagccgcgcagaaagaatccccagagggcctgtacaacgag ctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaac gcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacca ggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
104882 CAR 8 - 完全 - aa	38	MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdyqv swirppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdsknqvslklssvtaad tavyycahyyyggsyamdyywggtlvtvssgggsgggsgggsgggsgggseivm tqspatlsispgeratlscrasqdiskylnwyyqkpgqaprllyhtsrhsgip arfsgsgsgtdytlitisslqpedefavyfcqqgntlpytfgggtkleiktttpapr pptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllls lvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrpfpeeeeggcelrvkfsr sadaykqggnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprknpqeglyne lqdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr

10

20

30

【表 2 - 1 7】

CAR 9		
CAR9 scFv ドメイン	9	eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprrlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavycqqgntlpytfgggtkleikgggsgsgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamydwgggtlvtvss
99789 CAR9 - 可溶性 sc Fv - nt	69	atggccctcccagtgaccgctctgctgctgcctctcgcacttcttctccatgccgctcggcctgagatcgatcatgacccaaagccccgctaccctgtccctgtcaccggcgagaggggcaaccctttcatgcagggccagccaggacatttctaagtacctaactggtatcagcagaagccagggcaggctcctcgccctgctgatctaccacaccagccgctccacagcggatcccccgccagattttcggggagcgggtctggaaccgactacacctcaccatctcttctctgcagcccaggatttcgccgtctatttctgccagcaggggaatactctgccgtacaccttcggtcaaggtagcaagctggaaatcaaggaggcgaggatcaggcggtggcggaagcggaggagggtggctccggaggaggaggttccaagtgcagcttcaagaatcaggacccggacttgtgaagccatcagaaacctctccctgacttgtaccgtgtccggtgtgagcctccccgactacggagtctcttggattcgccagcctccggggaagggtcttgaatggattgggggtgatttggggatcagagactacttactacaattcatcacttaagtcacgggtcaccatcagcaaagataatagcaagaaccaagtgtcacttaagctgtcatctgtgaccgccgtgacaccgcccgtgtactattgtgccaacattactattacggaggggtcttatgctatggactactggggacaggggaccctgggtgactgtctctagccatcaccatcaccaccatcatcac
99789 CAR9 - 可溶性 sc Fv - aa	81	<u>MALPVTALLLPLALLLHAAR</u> Peivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprrlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavycqqgntlpytfgggtkleikggggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamydwgggtlvtvss <u>hhhhhhh</u> <u>h</u>

10

20

30

【表 2 - 1 8】

105974 CAR 9 - 完全 - nt	93	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccg ctcggcccgaaattgtgatgaccagtcacccgccactcttagcctttcaccggg tgagcgcgcaaccctgtcttgacagagcctcccaagacatctcaaaataccttaat tggatcaacagaagcccgacaggtcctcgcttctgatctaccacaccagcc ggctccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgacta caccctcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatcttctgtcag caagggacacccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaag gtggaggtggcagcggaggtgggtccggcgggtggaggaagcggagggcgggtgg gagccaggtccaactccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaact ctttcactgacttgtactgtgagcggagtgctctctcccgattacgggggtgtctt ggatcagacagccaccggggaaggtctggaatggattggagtgatttggggctc tgagactacttactacaactcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggac aactctaagaatcaggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccg ccgtgtactattgcgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggatta ctggggacagggtagtctgtgtcaccgtgtccagcaccactacccagcaccgagg ccaccaccccggtcctaccatcgctcccagcctctgtccctgcgtccggagg catgtagaccgcagctgggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctg cgatatctacatttgggcccctctggctggtagtcttgcggggctctgtgctttca ctcgtgatcactctttactgtaagcgcggctcggaagaagctgctgtacatcttta agcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatg ccggttcccagaggaggaggaagggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgc agcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactca atcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacc agaaatgggcggaagccgcgcagaaagaatcccaagagggcctgtacaacgag ctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggatgaaaggggaac gcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacca ggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
105974 CAR 9 - 完全 - aa	39	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskyl nyqqkpgqaprlliyhtsrllhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcg qgnltlpytfgqgtkleikgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpset lsltctvsgvslpdygvswirppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskd nsknqvsllkssvtaadtavyycakhyyyggsyamywgggtltvtssttpapr pptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllls lvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrpfpeeeeggcelrvkfsr sadaykqggnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprknpqeglyne lqdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtaldhmqalppr

10

20

30

【表 2 - 1 9】

CAR10		
CAR10 sc Fv ドメイン	10	qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnknqvsllkssvtaadtavyycahyyyggsyamdywgqgtlvtvssgggsgggsgggsgggsgggseivmtqspatlsispgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhlhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqp edfavyfcqqgntlpytfqggtkleik
100796 CAR10 - 可溶性 sc Fv - nt	70	atggcactgcctgtcactgcctcctgctgcctctggccctccttctgcatgccg ccagggcccaagtccagctgcaagagtcaggaccggactggtgaagccgtctga gactctctcactgacttgtaccgtcagcggcgtgtccctccccgactacggagtgc atcatggatccgccaacctcccggaagggccttgatggattggtgtcatctggg gttctgaaaccacactactacaactcttccctgaagtcagggtgacctacgcaa ggataattccaagaaccaggtcagccttaagctgtcatctgtgaccgctgctgac accgccgtgtattactgcgccaagcactactattacggaggaagctacgctatgg actattggggacagggcactctcgtgactgtgagcagcggcggtggagggtctgg aggtggaggatccggtggtggtgggtcaggcggaggaggaggagcgagattgtgatg actcagtcaccagccacctttctctttcaccggcgagagagcaacctgagct gtagagccagccaggacatttctaagtacctcaactggtatcagcaaaaaccggg gcagggccctcgctcctgatctaccatacctcacgccttcactctggtatcccc gctcggttttagcggtatcaggatctggtaccgactacactctgaccatttccagcc tgcagccagaagatttcgcagtgatatttctgccagcagggcaatacccttcctta caccttcggtcaggggaaccaagctcgaaatcaagcaccatcaccatcatcaccac cat
100796 CAR10 - 可溶性 sc Fv - aa	82	MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygv swirqppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnknqvsllkssvtaad tavyycahyyyggsyamdywgqgtlvtvssgggsgggsgggsgggsgggseivm tqspatlsispgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhlhsgip arfsgsgsgtdytlitisslqp edfavyfcqqgntlpytfqggtkleik <h>h</h>

10

20

30

【表 2 - 2 0】

105975 C AR 10 完 全 - nt	94	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccg ctcggcccgaaattgtgatgaccagtcacccgccactcttagcctttcaccggg tgagcgcgcaaccctgtcttgacagacccccaagacatctcaaaataccttaat tggatcaacagaagcccgacaggtcctcgcttctgatctaccacaccagcc ggctccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgacta caccctcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatcttctgtcag caagggacacccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaag gtggaggtggcagcggaggaggtgggtccggcgggtggaggaagcggaggcgggtgg gagccaggtccaactccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaact ctttcactgacttgtactgtgagcggagtgctctctccccgattacggggtgtctt ggatcagacagccaccggggaaggtctggaatggattggagtgatttggggctc tgagactacttactacaactcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggac aactctaagaatcaggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccg ccgtgtactattgcgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggatta ctggggacagggtagtctgtgtcaccgtgtccagcaccactacccagcaccgagg ccaccaccccggtcctaccatcgctcccagcctctgtccctgcgtccggagg catgtagaccgcagctgggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctg cgatatctacatttgggcccctctggctggtagtcttgcggggctctgtgctttca ctcgtgatcactctttactgtaagcgcggctcggaagaagctgctgtacatcttta agcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatg ccggttcccagaggaggaggaagggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgc agcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactca atcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacc agaaatgggcggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgag ctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggatgaaaggggaac gcagaagaggcaaaggccacgcagcgtgtaccagggactcagcaccgccacca ggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
105975 CAR 10 完全 - aa	40	MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLN WYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGGTDTLTITSSLPEDFAVYFCQ QGNTLPTYTFGQGTKLEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLQESGPGLVKPS ETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYNSSLKSRVTISKD NSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLVTVSSITTPAPR PPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLS LVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSR SADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNE LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

10

20

30

【表 2 - 2 1】

CAR11		
CAR11 s cFv ドメ イン	11	eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprrlliyhtsrh sgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavycqqgntlpytfgggtkleikggg gsgggsgsggsgvqlqesgpglvkpsetlslctvsgvslpdygvswirqppgk glewigviwgsettyynsslksrvtiskdnknqvsllkssvtaadtavyycakh yyyggsyamydwgggtlvtvss
103101 CAR11 - 可溶性 s cFv - nt	71	Atggccctccctgtcaccgcctgtgcttccgctggctcttctgctccacgccg ctcgccccgaaattgtgatgaccagtcacccgccactcttagcctttcaccgg tgagcgcgcaaccctgtcttgagagcctcccaagacatctaaaataccttaat tggtatcaacagaagcccgacaggctcctcgcttctgatctaccacaccagcc ggctccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgacta caccctcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatcttctgtcag caaggaacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaag gtggaggtggcagcggaggaggtgggtccggcggtggaggaagccaggtccaact ccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgt actgtgagcggagtgtctctccccgattacgggggtgtcttgatcagacagccac cggggaagggctctggaatggattggagtgatttggggctctgagactactacta caattcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcag gtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgacctgtactattgcg ctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtag tctgggtcacctgtccagccaccaccatcatcaccatcaccat
103101 C AR11 - 可溶性 sc Fv - aa	83	<u>MALPVTALLLPLALLLHAARPe</u> ivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskyln wyqqkpgqaprrlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavycq qgntlpytfgggtkleikgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpsetlslct tvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnknq vsllkssvtaadtavyycakhyyyggsyamydwgggtlvtvsshhhhhhh

10

20

【表 2 - 2 2】

105976 C AR 11 完 全 - nt	95	atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccg ctcgcccacaagtccagcttcaagaatcagggcctgggtctggtgaagccatctga gactctgtccctcacttgaccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtg agctggattagacagcctcccgaaagggactggagtggatcggagtgatttggg gtagcgaaaccacttactataactcttcctgaagtcacgggtcaccatttcaaa ggataactcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccgctgac accgccgtgtattactgtgccaaagcattactactatggaggggtcctacgccatgg actactggggccagggaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcgg aggaggcgggagcgggtggaggtggctccggaggtggcggaagcgaaatcgtgatg accagagccctgcaaccctgtccctttctcccgggaacgggctaccctttctt gtcgggcatcacaagatatctcaaaatacctcaattggtatcaacagaagccggg acaggccccctaggcttcttctaccacacctctcgccctgcatagcgggattccc gcacgcttttagcgggtctggaagcgggaccgactacactctgaccatctcatctc tcagccccgaggacttcgccgtctacttctgccagcagggtaacaccctgccgta caccttcggccagggcaccaagcttgagatcaaaaccactactcccgctccaagg ccaccacccctgccccgaccatcgctctcagccgctttccctgctccggagg catgtagaccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctg cgatatctacatttgggcccctctggtggtacttgccgggtcctgctgctttca ctcgtgatcactcttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatcttta agcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatg ccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgc agcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactca atcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacc agaaatgggcggaagccgcgcagaagaatccccagagggcctgtacaacgag ctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaac gcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacca ggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
105976 CAR 11 完全 - aa	41	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGV SWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYNSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAAD TAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVM TQSPATLSLSPGERATLSRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIP ARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKEIKTITTPAPR PPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLS LVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVKFSR SADAPAYKQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNE LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

20

30

【表 2 - 2 3】

CAR12		
CAR12 scFv ドメ イン	12	qvqlqesgpglvkpseltstctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgse ttyynsslksrvtiskdnknqvsllkssvtaadtavyycahyyyggsyamdyw gggtltvtvssggggsgggsggggseivmtqspatlslspgeratlscrasqdis kylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfav yfcqqgntlpytfgggtkleik
103104 CAR12 - 可溶性 s cFv - nt	72	atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccg ctcgcccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggctctggtgaagccatctga gactctgtccctcacttgaccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtg agctggattagacagcctcccgaaagggactggagtggatcggagtgatttggg gtagcgaaccacttactataactcttccctgaagtacggggtcaccatttcaaa ggataactcaaagaatcaagtgaacctcaagctctcatcagtcaccgccgtgac accgccgtgtattactgtgccaagcattactactatggaggggtcctacgccatgg actactggggccagggaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcgg aggaggcgggagcgggtggagggtggctccgaaatcgtgatgaccagagccctgca accctgtccctttctccggggaacgggctaccctttcttgtcgggcatcacaag atatctcaaaatacctcaattggtatcaacagaagccgggacaggccctaggct tcttatctaccacacctctcgctgcatacgggattcccgacgcttttagcggg tctggaagcgggaccgactacactctgaccatctcatctctccagcccgaggact tcgccgtctacttctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggccaggg caccaagcttgagatcaaaccatcaccaccatcatcaccatcac
103104 CAR12 - 可溶性 s cFv -aa	84	<u>MALPVTALLLPLALLLHAARP</u> qvqlqesgpglvkpseltstctvsgvslpdygv swirqppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnknqvsllkssvtaad tavyycahyyyggsyamdywggtltvtvssggggsgggsggggseivmtqspa tlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsg sgsgtdytlitisslqpedfavyfcqqgntlpytfgggtkleikhhhhhhh

10

20

【表 2 - 2 4】

105977 CAR 12 - 完全 - nt	96	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccg ctcgcccgaaattgtgatgaccagtcacccgccactcttagcctttcaccggg tgagcgcgcaaccctgtcttgagagcctccaagacatctcaaaataccttaat tggatcaacagaagcccgagaggtcctcgcttctgatctaccacaccagcc ggctccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgacta caccctcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatcttctgtcag caaggaacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaag gtggaggtggcagcggaggtgggtccggcgggtggaggaagccaggtccaact ccaagaaagcggaccgggtcttgtagaaccatcagaaactctttcactgacttgt actgtgagcggagtgtctctccccgattacgggggtgtcttggatcagacagccac cggggaaggtctggaatggattggagtgatttggggctctgagactacttacta caactcatccctcaagtcacgctcaccatctcaaaggacaactctaagaatcag gtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgcg ctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacaggggtac tctggtcaccgtgtccagcaccactacccagcaccgaggccaccaccccggt cctaccatcgctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcag ctggtggggccgtgcatacccggtcttgacttcgctgcgatctacatttg ggccctctggtgtgtacttgccgggtcctgctgctttcactcgtgatcactctt tactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatga ggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttccagagga ggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgtcca gcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagag aggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaa gccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataag atggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaag gccacgacggactgtaccaggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgc tcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
105977 CAR 12 - 完全 - aa	42	MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLN WYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSDYTLTISSLPEDFAVYFCQ QGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTC TVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKLEWIGVIWGSETTYYNSSLKSRVTISKDNSKNQ VSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYGGSYAMDYWGQTLVTVSSTTTPAPRPPTPA PTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITL YCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAP AYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPFMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

20

30

【表 3 - 1】

表3: マウスCD19 CARコンストラクト

CTL019		
CTL019 - 可溶性 s cFv-Hisタ グ - nt	97	Atggccctgcccgtcaccgctctgctgctgccccttgctctgcttcttcatgcag caaggccggacatccagatgacccaaaccacctcatccctctctgcctctcttg agacaggggtgaccatttcttgtcgcgccagccaggacatcagcaagtatctgaac tggatcagcagaagccggacggaaccgtgaagctcctgatctaccatacctctc gcctgcatagcggcgtgccctcacgcttctctggaagcggatcaggaaccgatta ttctctcactatttcaaattcttgagcaggaagatattgccacctatttctgccag cagggtaataccctgccctacaccttcggaggaggaccgaagctcgaaatcaccg gtggaggaggcagcggcgggtggagggtctggtggagggtggttctgaggatgaagct gcaagaatcaggccctggacttgtggcccccttcacagtccttgagcgtgacttgc accgtgtccggagtctccctgcccgactacggagtgtcatggatcagacaacctc cacggaaaggactggaatggctcggtgtcatctggggtagcgaaactacttacta caattcagccctcaaaagcaggctgactattatcaaggacaacagcaagtcccaa gtctttcttaagatgaactcactccagactgacgacaccgcaatctactattgtg ctaagcactactactacggaggatcctacgctatggattactggggacaaggtag ttccgtcactgtctcttcacaccatcatcaccatcaccatcac
CTL019 - 可溶性 s cFv-Hisタ グ - aa	98	<u>MALPVTALLLPLALLLHAARP</u> diqmtqttsslsaslgdrvtiscrasqdiskyl nwyqqkpdgtvkllyhtsrhsgvpsrfsqsgsgtdysltisnleqediatyfcq qgntlpytfgggtkleitggggsgggsggggsevklqesgpglvapsqslsvtc tvsgvslpdygvswirqprrglewlgviwgsettyynsalksrltiikdnksq vflkmnslqtddtaiyycahyyyggsyamywgggtsvtvsshhhhhhh

10

20

【表 3 - 2】

CTL019 完全 - nt	99	atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgtggccttgctgctccacgccg ccaggccggacatccagatgacacagactacatcctccctgtctgcctctctggg agacagagtcaccatcagttgcagggaagtgcaggacattagtaaataatttaa tggatcagcagaaaccagatggaactgttaaactcctgatctaccatacatcaa gattacactcaggagtcctcatcaagggttcagtggcagtggtctggaacagatta ttctctcaccattagcaacctggagcaagaagatattgccacttacttttgcaa cagggttaatacgccttcctgacacgttcggaggggggaccaagctggagatcacag gtggcggtggctcggcggtggtgggtcgggtggcgggcggtctgaggtgaaact gcaggagtcaggacctggcctggtggcgccctcacagagcctgtccgtcacatgc actgtctcaggggtctcattaccgcactatggtgtaagctggattcgccagcctc cacgaaaggtctggagtggtgggagtaatatggggtagtgaaccacatacta taattcagctctcaaatacagactgaccatcatcaaggacaactccaagagccaa gttttcttaaaaaatgaacagctctgcaaactgatgacacagccatttactactgtg ccaaacattattactacggtggtagctatgctatggactactggggccaaggaac ctcagtcaccgtctcctcaaccacgacgccagcgccgcgaccaccaacaccggcg cccaccatcgctcgagccctgtccctgcgccagaggcgtgccggccagcgg cggggggcgagtgacacgagggggtggacttcgcctgtgatctacatctg ggcgcccttggcgggacttgtgggtccttctcctgtcactggttatcaccctt tactgcaaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaacaaccatttatga gaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgatttccagaaga agaagaaggaggatgtgaactgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgcccc gcgtacaagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagag aggagtacgatgttttggacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggaaa gccgagaaggaagaacctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataag atggcgaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaagg ggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgc ccttcacatgcaggccctgccccctcgc
CTL019 完全 - aa	58	MALPVTALLLPLALLLHAARPdiqmtqttsslsaslgdrvtiscrasqdiskyl nyqqkpdgtvkllyhtsrhsgvpsrfsqsgsgtdysltisnleqediatyfcq qgntlpytfgggtkleitggggsgggsggggsevkqlqesgpglvapsqslsvtc tvsgvslpdygvswirqprrglewlgviwgsettyynsalksrltiikdnksq vflkmnslqtddtaiyycahyyyggsyandywgqgtsvtvssttppaprpptpa ptiasqpplsrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitl yckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrpfeeeeggcclrvkfsrsadap aykqqnqllynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprkrnpqeglynelqkdk maeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr

10

20

30

【表 3 - 3】

CTL019 sc Fv ドメイ ン	59	Diqmtqttsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnwyqqkpdgtvkllyhtsrh sgvpsrfsqsgsgtdysltisnleqediatyfcqqgntlpytfgggtkleitggg gsgggsggggsevkqlqesgpglvapsqslsvtctvsgvslpdygvswirqp gglewlgviwgsettyynsalksrltiikdnksqvflkmnslqtdddaiyycah yyyggsyamydwgqgtsvtvss
mCAR1 sc Fv	109	QVQLLES GAELVRPGSSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKRPGQGLEWIGQIYPGD GDTNNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYSCARKTISSVDFYFD YWGQGTITVTGGGSGGGSGGGSGGSELVLTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVG TNVAWYQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVDPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLAD YFCQYNRYPYTSFFFTKLEIKRRS
mCAR1 完全 - aa	110	QVQLLES GAELVRPGSSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKRPGQGLEWIGQIYPGD GDTNNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYSCARKTISSVDFYFD YWGQGTITVTGGGSGGGSGGGSGGSELVLTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVG TNVAWYQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVDPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLAD YFCQYNRYPYTSFFFTKLEIKRRSKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCP PLFPGPSKPFVLLVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRR PGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPGEGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDG LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
mCAR2 sc Fv	111	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRH SGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKEITGSGT SGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQP PRKGLEWLGVWGSETTYNSALKSRLTIKDNKSQVFLKMNSLQTDDETAIYYC AKHYGGSYAMDYWGQGTSTVTSSE
mCAR2 C AR - aa	112	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRH SGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKEITGSGT SGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQP PRKGLEWLGVWGSETTYNSALKSRLTIKDNKSQVFLKMNSLQTDDETAIY Y CAKHYYGGSYAMDYWGQGTSTVTSSESKYGPPCPPCPMFVLLVVGGLACYS LLVTVAFIIFWVGRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEGGCELRVK FSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRGRDPGEGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRL

10

20

30

【表 3 - 4】

mCAR2 完全 - aa	113	DIQMTQTT SLSASLGDR VTISCRASQD ISKYLNWYQQ KPDGTVKLLI YH TSRLHSGV PSRFSGSGSG TDYSLTISNL EQEDIATYFC QQGNTLPYTF GG GTKLEITG STSGSGKPGS GEGSTKGEVK LQESGPGIVA PSQSLSVTCT VS GVSPLDYG VSWIRQPPRK GLEWLGVWG SETTYNSAL KSRLTIKDN SK SQVFLKMN SLQTDITAIY YCAKHYGG SYAMDYWGQG TSVTVSSESK YG PPCPPCPM FWVLVVGGV LACYSLLVTV AFIIFWVCRG RKKLLYIFKQ PFMRPVQTTQ EEDGCSCRFE EEEGGCELRV KFSRSADAPA YQQGQNQLYN ELNLGRREEY DVLDKRRGRD PEMGGKPRRK NPQEGLYNEL QKDKMAEAYS EIGMKGERRR GKGDGLYQG LSTATKDTYD ALHMQUALPPR LEGGGEGRGS LLTCGDVEEN PGPRMLLLVT SLLLCCLPHP AFLILPRKVC NGIGIGEFKD SLSINATNIK HFKNCTSIG DLHILPVAFR GDSFTHTPPL DPQELDILKT VKEITGFLLI QAWPENRTDL HAFENLEIIR GRTKQHGQFS LAVVSLNITS LGLRSLKEIS DGDVIISGNK NLGYANTINW KKLFGTSGQK TKIISNRGEN SCKATGQVCH ALCSPEGCWG PEPRDCVSCR NVSRGRECDV KCNLEGEPR EFVENSECIQ CHPECLPQAM NITCTGRGPD NCIQCAHYID GPHCVKTCPA GVMGENNTLV WKYADAGHVC HLCHPNCTYG CTGPGLEGCP TNGPKIPSIA TGMVGALLLL LVVALGIGLF M
mCAR3 sc Fv	114	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRHL SGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGST SGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGIVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQP PRKGLEWLGVWGSETTYNSALKSRLTIKDNKSKSQVFLKMNSLQTDITAIYYC AKHYGGSYAMDYWGQTSVTVSS
mCAR3 完全 - aa	115	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRHL SGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGST SGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGIVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQP PRKGLEWLGVWGSETTYNSALKSRLTIKDNKSKSQVFLKMNSLQTDITAIYYC AKHYGGSYAMDYWGQTSVTVSSAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVGKHL CPSPLFPGPSKPFWWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKSRLLHSDYMNMT PRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

10

20

30

【1115】

一部の実施形態において、抗原結合ドメインは、表2に列挙したいずれかの重鎖結合ドメインアミノ酸配列のHC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3を含む。実施形態において、抗原結合ドメインは、LC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3をさらに含む。実施形態において、抗原結合ドメインは、表2に列挙したいずれかの軽鎖結合ドメインアミノ酸配列のLC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3を含む。

40

【1116】

一部の実施形態において、抗原結合ドメインは、表2に列挙したいずれかの軽鎖結合ドメインアミノ酸配列のLC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3の1つ、2つまたは全て、ならびに表2に列挙したいずれかの重鎖結合ドメインアミノ酸配列のHC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3の1つ、2つまたは全てを含む。

【1117】

一部の実施形態において、CDRは、Kabat番号付けスキーム、Chothia番号付けスキーム、またはこれらの組合せに従って定義される。

【1118】

scFvドメインのヒト化CDR配列の配列を、重鎖可変ドメインについて表4に、軽

50

鎖可変ドメインについて表 5 に示す。「ID」は、各 C D R のそれぞれの配列番号を意味する。

【1119】

【表 4】

表 4. 重鎖可変ドメイン CDR(Kabat)

候補	FW	HCDR1	ID	HCDR2	ID	HCDR3	ID
マウス_CART19		GVSLPDYGV	19	VIWGSETTYNSALKS	20	HYYYGGSYAMDY	24
ヒト化_CART19 a	VH4	GVSLPDYGV	19	VIWGSETTY ~~SS~~ SLKS	21	HYYYGGSYAMDY	24
ヒト化_CART19 b	VH4	GVSLPDYGV	19	VIWGSETTY ~~QS~~ SLKS	22	HYYYGGSYAMDY	24
ヒト化_CART19 c	VH4	GVSLPDYGV	19	VIWGSETTYNS ~~SLKS~~	23	HYYYGGSYAMDY	24

【1120】

【表 5】

表 5. 軽鎖可変ドメイン CDR

候補	FW	LCDR1	ID	LCDR2	ID	LCDR3	ID
マウス_CART19		RASQDISKYL	25	HTSRLHS	26	QQGNTLPYT	27
ヒト化_CART19 a	VK3	RASQDISKYL	25	HTSRLHS	26	QQGNTLPYT	27
ヒト化_CART19 b	VK3	RASQDISKYL	25	HTSRLHS	26	QQGNTLPYT	27
ヒト化_CART19 c	VK3	RASQDISKYL	25	HTSRLHS	26	QQGNTLPYT	27

【1121】

次いで、C A R の s c F v フラグメントを、レンチウイルスベクターにクローニングして、単一のコーディングフレーム中に、発現のための E F 1 アルファプロモーター（配列番号 100）を使用して、全長 C A R コンストラクトを作り出した。

【1122】

E F 1 アルファプロモーター

CGTGAGGCTCCGGTCCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCCGCAAT
TGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGG
TGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAA
GTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTG
CAGTACGTGATTCTTGATCCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCTTC
GCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCG
CTGCTTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTA
AATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGGCTCCAGCGCAC
ATGTTTCGGCGAGGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGG
TGCCTGGCCTCGCGCCGCGGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTGCGCACAGTTGCGTGAGCGGAA
AGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACC
CACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACGGGGCGCCGTCCAGGCACC
TCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACT
GAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATC
TTGGTTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTTCAGGTGTCGTGA（配列番号 100
）

【1123】

C A R 2 2 コンストラクト：設計および機能

完全ヒト抗CD22単鎖可変フラグメントを単離した。抗CD22 S c F vを、CD3ゼータ鎖および4-1BB共刺激分子を有するレンチウイルスCAR発現ベクターにクローニングした。CAR含有プラスミドを、STBL3細胞における細菌形質転換によって増幅させ、続いて、エンドトキシンフリーQiagen Plasmid Maxiキットを使用するMaxiprepによって増幅させた。レンチウイルスの上清は、標準的な技術を使用して293T細胞において産生した。

【1124】

ヒトCARの配列を下の表6Aおよび6Bに提供する。

【1125】

これらのクローンは全て、CD3ゼータ鎖由来の共刺激ドメインのシグナルドメインにおけるQ/K残基変化を含有した。

【1126】

【表6-1】

表6A: ヒトCD22 CARコンストラクト

名称	配列番号	配列
m971 NT	200	gtgcacgagtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttgcgc ccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaagttctgctatgtggcgcggtattatccc gtattgacgccgggcaagagcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatgacttggttg agtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtg ctgccataaccatgagtataaactcggtcgccaaacttacttctgacaacgatcgaggaccga aggagctaaccgcttttttgcacaacatgggggatcatgtaactgccttgatcgttggaac cggagctgaatgaagccataaccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaa caacgttgcgcaaactattaactggcgaactacttactctagcttcccgcaacaattaatag actggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcgcccttccggctggtggt ttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggc cagatggtaagccctccgctatcgtagtattctacacgacggggagtcaggcaactatggatg aacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaagcattggtaaactgtcagacc aagtttactcatatatacttttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaggatctagg tgaagatcctttttgataatctcatgacaaaatcccttaacgtgagtttctgctccactgag cgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatccttttttctgcgcgtaatct gctgcttgcaacaaaaaaccaccgctaccagcgggtggtttgtttgccggatcaagagctac caactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgttcttctag tgtagccgtagtttagccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgtctgc taatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggaactcaa gacgatagttaccggataaggcgcagcggctcggtgaacggggggttcgtgcacacagccca gcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgcca cgcttcccgaaggagaaaggcggaaggatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagc gcacgaggagcttccaggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcggtttcgccacc tctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcagggggcgaggcctatggaaaaacgcca gcaacgcggcctttttacggttcttgcccttttctggtccttttctcacatgttcttctg cgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagctgataccgctcgcc gcagccgaacgaccgagcgcagcagtcagtgagcaggaagcggaagagcgcccaatacgca aaccgcctctccccgcgcttgccgattcattaatgcagctggcagcagaggtttccgact ggaaagcgggcagtgagcgaacgaattaatgtgagttagctcactcattaggcaccacagg ctttacactttatgcttccggctcgatgttgtgtggaattgtgagcggataacaatttcaca c

10

20

30

40

【表 6 - 2】

	aggaaacagctatgacccatgattacgccaagcgcgcaattaaccctcactaaagggaaacaaa gctggagctgcaagcttaatgtagtcttatgcaatactctttagtcttgcacatggtaacg atgagttagcaacatgccttacaaggagagaaaaagcaccgtgcatgccgattgggtggaagta aggtggtacgatcgtgccttattaggaaggcaacagacgggtctgacatggattggacgaacc actgaattgccgcattgcagagatattgtatttaagtgccttagctcgatacataaacgggtct ctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactaggaacccactgcttaag cctcaataaagcttgcccttagtgcttcaagtagtggtgtgcccgctggtgtgtgactctgggt aactagagatccctcagacccttttagtcagtgtggaaaatctctagcagtgccgcccgaaca gggacttgaaagcgaaagggaaaccagaggagctctctcgacgcaggactcggttgcctgaag cgcgcacggcaagaggcgagggcgccgactggtagtacgcaaaaattttgactagcggag gctagaaggagagagatgggtgcgagagcgtcagtattaagcgggggagaattagatcgcgat gggaaaaaattcggttaaggccagggggaagaaaaaataataataaaacatatagtatggg caagcagggagctagaacgattcgagttaatcctggcctgttagaaacatcagaaggctgta gacaaatactgggacagctacaaccatcccttcagacaggatcagaagaacttagatcattat ataatacagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaggatagagataaaagacaccaaggaag ctttagacaagatagaggaagagcaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcggccgctg atcttcagacctggagaggagatatgagggacaattggagaagtgaattatataataataaa gtagtaaaaattgaaccattaggagtagcaccaccaaggcaagagaagagtggtgcagaga gaaaaaagagcagtggaataggagctttgttccttgggttcttgggagcagcaggaagcact atgggcgcagcgtcaatgacgctgacgggtacagggcagacaattattgtctggtatagtgag cagcagaacaatttgctgagggctattgagggcgcaacagcatctgttgcaactcacagctctgg ggcatacagcagctccaggcaagaatcctggctgtggaaagatacctaaaggatcaacagctc ctggggatttggggttgctctggaaaactcatttgaccactgctgtgccttgggaatgctagt tggagtaataaatctctggaacagatttggaatcacacgacctggatggagtggaacagagaa attacaattacacaagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaag aatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtttggtgaattggtttaacataaca aattggctgtggtatataaaattattcataatgatagtaggagccttggttaggtttaagaata gtttttgctgtactttctatagtgatagagtttaggcaggatattcaccattatcgtttcag accacctcccaaccccgaggggacccgacagggccgaaggaatagaagaagaaggtggagag aga	10 20 30

【表 6 - 3】

gacagagacagatccattcgattagtgaaacggatctcgacggtatcgattagactgtagccca
 ggaatatggcagctagattgtacacatttagaaggaaaagttatcttggtagcagttcatgta
 gccagtggaatatagaagcagaagtaattccagcagagacagggcaagaaacagcatacttc
 ctcttaaaattagcaggaagatggccagtaaaaacagtacatacagacaatggcagcaatttc
 accagtactacagttaagggcgcctgttggtggcggggatcaagcaggaatttggcattccc
 tacaatccccaaagtcaaggagtaataagaatctatgaataaagaattaaagaaaattatagga
 caggtaagagatcaggctgaacatcttaagacagcagtaaaaatggcagtaattcatccacaat
 tttaaaagaaaaggggggattgggggggtacagtgcaggggaaagaatagtagacataatagc
 aacagacatacaaaactaaagaattacaaaaacaaattacaaaattcaaaaatttccgggttta
 ttacagggacagcagagatccagtttgctgcatacgcgtcgtgaggctccgggtcccgtcag
 tgggcagagcgcacatcgcccacagtcctccgagaagttggggggaggggtcggaattgaacc
 ggtgcctagagaaggtggcgcggtgaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgcctt
 tttcccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgcccgtgaacgttcttttccg
 aacgggtttgcccagacaacacaggtgaagtgcgtgtgtggttcccggggcctggcctctt
 acgggttatggccttgcgtgccttgaattacttccacctggctgcagtagctgattcttgat
 cccgagcttcgggttggaagtgggtgggagagttcgaggccttgcgttaaggagcccttcg
 cctcgtgcttgagttgaggcctggcctggcgctggggccgcgcgtgcgaatctggtggcac
 cttcgcgcctgtctcgtgctttcgataagtctctagccatttaaaatttttgatgacctgct
 ggcagccttttttctggcaagatagttctgtaaatgcgggccaagatctgcacactggtatt
 tcggtttttggggccggcgggcgacggggcccgctgcgtcccagcgcacatgttcggcgagg
 cggggcctgcgagcgcggccaccgagaatcggaacgggggtagttctcaagctggccggcctgct
 ctggtgcctggcctcgccgcgcctgtatcgccccgccttggcgcgcaaggctggcccggtcg
 gcaccagttgcgtgagcggaaagatggccgcttcccgccctgctgcaggagctcaaaatgg
 aggacgcggcgctcgggagagcggcggggtgagtcacccacacaaaggaaaagggccttccg
 tcctcagccgtcgcttcattgtgactccactgagtaaccggcgccgtccaggcacctcgattag
 ttctcgtgcttttgagtagctcgtctttaggttggggggaggggttttatgcgatggagttt
 cccacactgagtggtggagactgaagtttagccagcttggcacttgatgtaattctccttg
 gaatttgcctttttgagtttgatcttggttcattctcaagcctcagacagtggttcaaagt
 tttttcttccatttcaggtgtcgtgagctagctctagagccaccatggccctgcctgtgaca
 gcc

10

20

30

【表 6 - 4】

	ctgctgctgcctctggctctgctgctgcatgccgctagacccggatcccaggtgcagctgcag cagtctggaccggcctcgtgaagcctagccagaccctgtctctgacctgcgccatcagcggc gtagcgtgtccagcaatagcgcgcgctggaactggatcagacagagccctagcagaggcctg gaatggctggccggacctactaccggtccaagtgggtacaacgactacgccgtgtccgtgaag tcccggatcaccatcaaccccgacaccagcaagaaccagttctccctgcagctgaacagcgtg accccgaggataccgccgtgtactactgcgccagagaagtgaccggcgacctggaagatgcc ttcgacatctggggccagggcacaatggtcaccgtgtctagcggaggcggaggatctggcggc ggaggaagtggcggagggggaatctgggggaggcgaagcgatatccagatgacccagagcccc agctccctgtctgccagcgtggcgacagagtgaccatcacctgtaggggcagccagaccatc tggctctacctgaactggtatcagcagcggcctggcaaggcccccaacctgctgatctatgcc gccagctctctgcagtcggcggtgccagcagattttccggcagaggctccggcaccgacttc acctgacaatcagttccctgcaggccgaggacttcgccacctactactgccagcagagctac agcatccccagaccttcggccaggggaccaagctggaaatcaagtcggaaaccacgacgcca ggcgcgcgaccaccaacaccggcgcccaccatcgctgcagccctgtccctgcgcccagag gcgtgccggccagcggcgggggcgagtgacacagagggggctggacttcgctgtgatatc tacatctgggcgcccttggccgggacttgtggggtccttctcctgtcactggttatcacctt tactgcaaacggggcagaaagaactcctgtatatattcaacaaccatttatgagaccagta caaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaagaagaggaggtgt gaactgagagtgaagttcagcaggagcgcagaccccccgctacaagcagggccagaaccag ctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggc cgggacctgagatggggggaagccgagaaggagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaa ctgcagaaagataagatggcgaggccctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggagg ggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtagccaccaaggacacctacgacgcc cttcacatgcaggccctgccccctcgctaagtcgacaatcaacctctggattacaaaatttgt gaaagattgactggtattcttaactatgttgctccttttacgctatgtggatacgtgcttta atgcctttgtatcatgctattgtcttcccgatggctttcattttctcctccttgataaatcc tggttgctgtctctttatgaggagtgttgggccgtgtgcaggcaacgtggcgtggtgtgact gtgtttgctgacgcaacccccactggttggggcattggccaccacctgtcagctcctttccggg actttcgctttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgcctgccttgcccgtgc tgg	10 20 30

【表 6 - 5】

	acaggggctcggtgttgggcactgacaattccgtggtgttgcggggaagctgacgtccttt ccatggctgctcgctgtgttggccacctggattctgcgcgggacgtccttctgtacgtccct tcggccctcaatccagcggaccttcttcccgcggcctgtgcgggctctgcggcctcttcg cgtcttcgccttcgcctcagacgagtcggatctcccttggggccctcccgcctggaatt cgagctcggtagctttaagaccaatgacttacaaggcagctgtagatcttagccacttttta aagaaaaggggggactggaagggttaattcactcccaacgaagacaagatctgcttttgcct gtactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaacc cactgcttaagcctcaataaagcttgcccttgagtgttcaagtagtgtgtgccgctctgttgt gtgactctggttaactagagatccctcagacccttttagtcagtggtgaaaatctctagcagta gtagttcatgtcatcttattattcagtatttataacttgcaaagaaatgaatatcagagagt agaggaaacttgtttattgcagcttataatggttacaaataaagcaatagcatcacaatttca caaataaagcatttttttctcagctattctagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatctt atcatgtctggtctagctatcccgccttaactccgcctcagttccgccttctccgcctca tggtgactaattttttttttatgagagggcgaggccgcctcggcctctgagctattcca gaagtagtgaggaggctttttggaggcctaggcttttgcgtcgagacgtacccaattcgccc tatagtgagtcgtattacgcgcgctcactggcgcgtgtttacaacgtcgtgactgggaaaac cctggcgttacccaacttaatcgcttgagcacatccccctttcgccagctggcgtaatagc gaagaggcccgacccgatcgcccttccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatgggacgcg ccctgtagcggcgcattaagcgcggcggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctacactt gccagcgccttagcgcgcgtcctttcgctttcttcccttcttctcgccacgttcgcggc tttccccgtcaagctctaaatcggggctccctttagggtccgatttagtgetttacggcac ctcgacccccaaaaaacttgattaggggtgatggttcacgtagtgggccatcgccctgtagacg gtttttcgccctttgacgttgagtgccacgttctttaatagtgactcttgttccaaactgga acaacactcaaccctatctcggctctattcttttgatttataagggttttgcgatttcggcc tattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatttaacgcgaattttaacaaaatattaacg cttacaatttaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaaccctatttggttttttct aaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatatt gaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttcggtgcgccttattcccttttttcggcat tttgccttctgtttttgctcaccagaaacgctgggtgaaagtaaagatgctgaagatcagt tgg	10 20 30

【表 6 - 6】

m971 VH	201	qvqlqqsgpg lvkpsqtlsl tcalsgdsvs snsawnwir qsparglew l grtyyrskw y ndyavsvksr itinpdt skn qfslqlnsvt pedtavyyca revtgdleda fdiwgggtm v tvssastkqp svfplapssk stsggtaalg clvkdyfpep vtvswngal tsgvhtfpa v lqssglysls svvtvpsssl gtqtyicnvs hkpsntkvdk kvepkscdkt sgqag
m971 VL	202	diqmtqspss lsasvgdrvt itcrasqtiw sylnwyqqrp gkapnlliya asslqsgvp s rfsgrgsgtd ftltisslqa edfatyyccq sysipqtfgq gtleikrtv aapsvfifp p sdeqlksgta svvcllnnfy preakvqkw dnalqsgnsq esvteqdsd styslsstl t lskadyekhk vyacevthqg lsspytksf n rgec
CAR22-1 scFv AA	203	qvqlvqsgggliqpggslrlscaasgftvssnymswvrqapqgkglewsviysggstyyadsv kgrftisrdnskntlylqmns lraedtavyycasqstpydssgyysgdafdiwgggtmvtvss ggggsgggsgggssyvtlqppsasgtpgqrvtiscsgsssnigsnvyvyqqlpgtapkll iyrnnqrpsgvpdrfsgsksgtsasla isqlrsedeadyycaawddslsgyvfgtgtkl tvl
CAR22-1 scFv NT	204	caagtgcactcgtccaatccggcggcgactgattcaaccaggaggtcccttagactctca tgtgccgctagcggattcactgtgtcctcaaactacatgagctgggtccgccaggcgcccgga aagggcctggaatgggtgtccgtgatctactcggcggtatcaactactacgccgattccgtg aagggcggttcaccatctcgcgggataactccaagaacaccctgtacttgaaatgaactca ctgagggccgaagataccgcgtctactactgcgcgagccagtcactccctacgactcgagc gggtactactccggggacgccttcgacatctggggacagggaaactatggtcacgggtgctcg ggaggagggggcagcggcgggcggaggaaagcgggggaggggttcgtcctatgtgctgacctag ccgccgagcgctccgggactccgggcagcgcgtgaccatttctgtcgggtcctcatcc aacatcggttcgaattatgtgtactggtaccagcagctgcctggtactgccctaagcttctc atctaccggaacaaccagcgccgtctggcgtgcccagaccggttctccggctcgaagtccggc accagcgctccctggctatctccgggctgagatccgaggatgagggcactactattgcgca gcgtgggacgacagcctgtcgggatacgtgttggaaaccggaaccaagctcaccgtgctg

10

20

30

【表 6 - 7】

CAR22-1 可溶性 sc FV NT	205	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccc caagtgaactcgtccaatccggcggggactgattcaaccaggagggtcccttagactctca tgtgccgctagcggattcactgtgtcctcaaactacatgagctgggtccgccaggcgcccgga aagggcctggaatgggtgtcctgatctactcggcggaatcaacctactacgccgattccgtg aagggcggttcaccatctcggggataactccaagaacaccctgtacttgcaaataactca ctgagggccgaagataccgccgtctactactgcgcgagccagtcactccctacgactcgagc gggtactactccggggacgccttcgacatctggggacagggaactatggtcacgggtgctcgc ggaggagggggcagcgggcgagggaagcgggggagggggttcgtcctatgtgctgacccag ccgccgagcgctccgggactccgggccagcgctgacctttctgctccggctcctcatcc aacatcgggtcgaattatgtgtactggtaccagcagctgcctggtactgccctaagcttctc atctaccggaacaaccagcgcccgctctggcgtgcccgaaccggttctccggctcgaagtccggc accagcgctccctggctatctccgggctgagatccgaggatgagggcgactactatgcgca gcgtgggacgacagcctgtcgggatacgtgttgaaccggaaccaagctcaccgtgctggga tcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR22-1 可溶性 sc FV AA	206	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsggqliqpggslrlscaasgftvssnymswvrqapg kglewvsviysggstyadsvkgrftisrdnsntlylqmnsdraedtavyycasqstpydss gyysgdafdiwgqgtmvtvssggggsgggsgggssyvtqppsasgtpgqrvtisgsgss nigsnyvywyqqlpgtapklliyrrnnqrpsgvpdrfsgsksgtsaslaiglrseadeayyca awddslsgyvfgtgtklvtlgshhhhhhhh
CAR22-1 完全 AA	207	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsggqliqpggslrlscaasgftvssnymswvrqapg kglewvsviysggstyadsvkgrftisrdnsntlylqmnsdraedtavyycasqstpydss gyysgdafdiwgqgtmvtvssggggsgggsgggssyvtqppsasgtpgqrvtisgsgss nigsnyvywyqqlpgtapklliyrrnnqrpsgvpdrfsgsksgtsaslaiglrseadeayyca awddslsgyvfgtgtklvtlttppaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfa cdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttgeedgcscrfeeee ggcelrvkfsrsadapaykqgnqlynelnlgrreedyvldkrrgrdpemggkprrrknpgql ynelqkdkmaeyseigmkgerrrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr

10

20

【表 6 - 8】

CAR22-1 完全 NT レンチウ イルス	208	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccc caagtgaactcgtccaatccggcgccgactgattcaaccaggagggtcccttagactctca tgtgccgctagcggattcactgtgtcctcaaactacatgagctgggtccgccaggcgcccgga aagggcctggaatgggtgtccgtgatctactcggcgcatcaacctactacgccgattccgtg aagggcggttcaccatctcgccggataaactccaagaacaccctgtacttgcaaatgaactca ctgagggccgaagataccgccgtctactactgcgcgagccagtcactccctacgactcgagc gggtactactccggggacgccttcgacatctggggacagggaactatggtcacgggtgctcg ggaggagggggcagcgccggcgagggaagcgggggagggggttcgtcctatgtgctgacccag ccgccgagcgctccgggactccgggccagcgctgaccatttctgctccggtcctcatcc aacatcggttcgaattatgtgtactggtaccagcagctgcctggtactgccctaagcttctc atctaccggaacaaccagcgcccgctctggcggtcccagaccggttctccggctcgaagtccggc accagcgctccctggctatctccgggctgagatccgaggatgagccgactactattgcgca gcgtgggacgacagcctgtcgggatacgtgtttggaaccggaaccaagctcaccgtgctgacc actacccagcaccgagggcaccaccccggtcctaccatcgctccagcctctgtccctg cgtccggagggatgtagaccgcagctggtggggccgtgcataccgggggtcttgacttcgcc tgcgatatctacatttggggccctctggtggtacttgccgggtcctgctgctttcactcgtg atcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcag aggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaa ggcggtgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcagggg cagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaag cggagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccaagaggcctg tacaacgagctccaaaaggataaagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaa cgcagaagaggcaaagccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacc tatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR22-2 scFv AA	209	evqlqqsgpglvkpsqtlsltcalsgdsvsnsaawnwirqspgrglewlgtrtyyrskwyndy avsvksritinpdtsknqfslqlnsvtpedtavyyccardlgwiavagtfdywgggtlvtvssg ggsgggsgggsgsaltqpasvsgspgqsitictgtssdvgyynyvswyqqhpgkapklm iydvskrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaeadyyccsytssslhvfgtgtkvtvl

10

20

30

【表 6 - 9】

CAR22-2 scFv NT	210	gaagtgcaactccaacagagcggaccggacttgtgaaaccatcccagactctcagcctgacg tgtgcgatcagcggggactctgtgtcctccaactccgccgctggaactggattaggcagtcg ccgtcgagagggctggagtgggtgggtagaacctactaccggtccaagtggatgactac gccgtgtccgtgaagtcccgatcactattaaccggatacctcaagaaccagttctccctg caactgaactcggtagccctgaggacaccgcagtgactactgcgccgggatctgggttgg atcgtgtcgcggcaccttcgactattggggacagggcactctcgtgaccgtgtcgtcgggt ggaggagggagcggagggggcggaagcgggtggcgcggttcccagtcgcgctgaccagcct gctagcgtgtccgggtcgcccgacagtcgaatcaccatctcctgcactgggactagcagcgac gtgggcggctacaactacgtgtcatggtaccagcagcaccgggaaggcgcccaagctgatg atctacgacgtgtccaagcgcccttcgggagtcctcaaccgctttagcggctccaagtcgggc aacactgcctccctgaccattagcggactgcaggccgaagatgagccgactattactgctca tcctacacctcctcctcactgaaccatgtgttcggcaccggaaccaaggtcacagtcctc
CAR22-2 可溶性 sc FV NT	211	atggccctcctgtcaccgccctgctgttccgctggctcttctgctccacgccgctcgccc gaagtgcaactccaacagagcggaccggacttgtgaaaccatcccagactctcagcctgacg tgtgcgatcagcggggactctgtgtcctccaactccgccgctggaactggattaggcagtcg ccgtcgagagggctggagtgggtgggtagaacctactaccggtccaagtggatgactac gccgtgtccgtgaagtcccgatcactattaaccggatacctcaagaaccagttctccctg caactgaactcggtagccctgaggacaccgcagtgactactgcgccgggatctgggttgg atcgtgtcgcggcaccttcgactattggggacagggcactctcgtgaccgtgtcgtcgggt ggaggagggagcggagggggcggaagcgggtggcgcggttcccagtcgcgctgaccagcct gctagcgtgtccgggtcgcccgacagtcgaatcaccatctcctgcactgggactagcagcgac gtgggcggctacaactacgtgtcatggtaccagcagcaccgggaaggcgcccaagctgatg atctacgacgtgtccaagcgcccttcgggagtcctcaaccgctttagcggctccaagtcgggc aacactgcctccctgaccattagcggactgcaggccgaagatgagccgactattactgctca tcctacacctcctcctcactgaaccatgtgttcggcaccggaaccaaggtcacagtcctcgga tcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR22-2 可溶性 sc FV AA	212	Malpvtalllplalllhaarpevqlqqsgpglvkpsqtlsltcalsgdsvsnsaawnwirqs psrglewlgertyyrskwyndyavsvksritinpdtsknqfslqlnsvtpedtavyyccardlgw iavagtfdywqgtlvtvssggggsgggsgggsgsaltqpasvsgspggsitictgtssd vggynyvswyqqhpgkapklmiydvskrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeaddyys sytssslnhvfgtgktvlgshhhhhhhh

10

20

30

【表 6 - 1 0】

CAR22-2 完全 AA	213	malpvtallllplallllhaarpevqlqqsgpglvkpsqtlsltcalsgdsvsnsaawnwirqs psrglewlgertyyrskwyndyavsvksritinpdtsknqfslqlnsvtpedtavyyccardlgw iavagtfdywgqgtlvtvssggggsgggsgggsgsaltqpasvsgspgqsitistgtssd vggynyvswyqghpgkapklmiydvskrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaeadyyys sytssslhvfgtgtkvtvlttppaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfa cdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpmpvpqttqeedgcscrfeeee ggcelrvkfssadapaykqqgnqlynelnlgrreedydldkrrgrdpemggkprrknpqegl ynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
CAR22-2 完全 NT レンチウ イルス	214	atggccctccctgtcaccgcctgtcttccgctggctcttctgctccacgccgtcgcccc gaagtgcactccaacagagcggaccggacttgtgaaaccatcccagactctcagcctgacg tgtgcgatcagcgggactctgtgtcctccaactccgccgctggaactggattaggcagtcg ccgtcgagagggtgagtggttgggtagaacctactaccggtccaagtgtacaatgactac gccgtgtccgtgaagtcccgatcactattaaccggatacctcaaagaaccagttctccctg caactgaactcggtagccctgaggacaccgcagtgactactgcgccgggatctgggttg atcgctgtcgccgcaccttcgactattggggacagggcactctcgtagccgtgtcgctgggt ggaggaggagcggaggggcggaagcggtagggcggttcccagtcgcgctgaccagcct gctagcgtgtccgggtcgcccgacagtcaatcaccatctcctgcactgggactagcagcgac gtggcggttacaactacgtgtcatgtaccagcagcaccgggaaaggcgcccaagctgatg atctacgagctgtccaagcgcccttcgggagcttccaaccgctttagcggctccaagtcgggc aacactgcctccctgaccattagcggactgcaggccgaagatgagccgactattactgtc tcctacacctcctcctcactgaaccatgtgttcggcaccggaaccaaggtcacagtcctcacc actacccagcaccgagggcaccaccggctcctaccatcgctcctccagcctctgtccctg cgtagggagcatgtagaccgcagctggtagggcgctgcataccggggtcttgacttcgcc tgcgatatctacatttgggcccctctggctggtagcttgcggggtcctgctgtttcactcgtg atcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatg aggcctgtgcagactactcaagaggagcggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaa ggcggtgcgaactgcggtgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcagggg cagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtaggagagggagtagcagctgctggacaag cggagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccaagaggcctg tacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaa cgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacc tatgacgctcttcacatgcaggccctgcgcctcgg

10

20

30

【表 6 - 1 1】

CAR22-3 scFv AA	215	evqlqqsgpglvkpsqtlsltcalsgdsvlsnsdtnwirqspsrglewlgertyhrstwyddy assvrgrvrsinvdtsknqyslqlnavtpedtgayycardrlqdgnsdwsdafdvwgggtmvtvs sgggsgggsgggsggsaltqpasvsgspgqsitistgtssdvggynyvswyqqhpgkapk lmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaeadyycssytssstpyvfgtgtqltv l
CAR22-3 scFv NT	216	gaagtgcactccaacagagcggaccggacttgtaaaccttccaaactctctccctgacc tgtgcgatctctggggattcgggtgctgctgaatagcgacacctggactggatcagacagtca ccctcccggggctggagtggtcgggagaacttaccaccggtccacttggtacgacgactat gccagctcagtgcggaagggtgtccattaacgtggacacctccaagaaccagtacagcctg cagttgaacgctgtgaccccggaagataccggagcctactactgcgcccgacccggctgcag gacggaaactcctggtccgatgccttcgacgtctggggccagggaacatggtcactgtgtca tccggcggtggcggttcggggcggtggtggcagcggtggaggcggtcccagtcggcactgact cagccagcttcagttccgggtcgccgggacagtcctaccatttctgcactggaaccagc tccgatgtcgggggtataactacgtgtcgtggtaccagcaacatcctggaaggcccccaag ctcatgatctacgacgtgtccaatcgccctagcggagtgtaaacgggttttccggctccaag tccgggaacaccggtccctgacaatcagcggactgcaggccgaggacgaagccgactactac tgctcgagctacaccagctcgtccacgacctgacgtgttcggaactgggaccagctgaccgtg ctg
CAR22-3 可溶性 sc FV NT	217	atggccctccctgtcaccgcctgctgcttccgctgggtcttctgctccacgcccctcgccc gaagtgcactccaacagagcggaccggacttgtaaaccttccaaactctctccctgacc tgtgcgatctctggggattcgggtgctgctgaatagcgacacctggactggatcagacagtca ccctcccggggctggagtggtcgggagaacttaccaccggtccacttggtacgacgactat gccagctcagtgcggaagggtgtccattaacgtggacacctccaagaaccagtacagcctg cagttgaacgctgtgaccccggaagataccggagcctactactgcgcccgacccggctgcag gacggaaactcctggtccgatgccttcgacgtctggggccagggaacatggtcactgtgtca tccggcggtggcggttcggggcggtggtggcagcggtggaggcggtcccagtcggcactgact cagccagcttcagttccgggtcgccgggacagtcctaccatttctgcactggaaccagc tccgatgtcgggggtataactacgtgtcgtggtaccagcaacatcctggaaggcccccaag ctcatgatctacgacgtgtccaatcgccctagcggagtgtaaacgggttttccggctccaag tccgggaacaccggtccctgacaatcagcggactgcaggccgaggacgaagccgactactac tgctcgagctacaccagctcgtccacgacctgacgtgttcggaactgggaccagctgaccgtg ctgggatcgaccaccatcaccatcatcatcac

10

20

30

【表 6 - 1 2】

CAR22-3 可溶性 sc FV AA	218	malpvtalllplalllhaarpevqlqqsgpglvkpsqtlsltcalsgdsvlsnsdtnwirqs psrglewlgertyhrstwyddyassvrgrvrsinvdtsknqyslqlnavtpedtgayycardrlq dgnsdwsdafdvwgggtmvtvssggggsgggsgggsggsaltqpasvsgspgqsitistgts sdvggynyvswyqqhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaeadyyc cssytssstpyvfgtgtqltlvgshhhhhhhh
CAR22-3 完全 AA	219	malpvtalllplalllhaarpevqlqqsgpglvkpsqtlsltcalsgdsvlsnsdtnwirqs psrglewlgertyhrstwyddyassvrgrvrsinvdtsknqyslqlnavtpedtgayycardrlq dgnsdwsdafdvwgggtmvtvssggggsgggsgggsggsaltqpasvsgspgqsitistgts sdvggynyvswyqqhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaeadyyc cssytssstpyvfgtgtqltlvtltpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgld facdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkillyifkqpfmrpvqtteedgcscrfee eeggcelrvkfsrsadapaykqqnqllynelnlgrreeydvldkrgrdpemggkprkrnpqe glynelqkdkmaeyseigmkgerrrgkghdglyqqlstatktdydlhmqlppr

40

50

【表 6 - 1 3】

CAR22-3 完全 NT レンチウ イルス	220	atggccctccctgtcaccgccctgtgtcttccgctggctcttctgtctccacgccgtcggccc gaagtgaactccaacagagcggaccggacttgtgaaaccttccaaactctctccctgacc tgtgcgatctctggggattcgggtgtgtcgaatagcgacacctggaactggatcagacagtca ccctcccggggcctggagtggctcgggagaacttaccaccggtccacttggtagcagactat gccagctcagtgcgcggaagggtgtccattaacgtggacacctccaagaaccagtagcctg cagttgaacgtgtgaccccggaagataccggagcctactactgcgcccgacccggtgcag gacggaaactcctgggtccgatgccttcgacgtctggggccagggaaccatggtcactgtgtca tccggcggtggcggttcggggcggtgggtggcagcggtggaggcggtcccagtcggcactgact cagccagcttcagtctcgggtcgcgggacagtcctaccatttccctgactggaaccagc tccgatgtcgggggtataactacgtgtcgtgggtaccagcaacatcctggaaggccccaag ctcatgatctacgacgtgtccaatcgccctagcggagtgtcaaaccggttttccggctccaag tccgggaacaccggtccctgacaatcagcggactgcaggccgagacgaagccgactactac tgctcgagctacaccagctcgtccacgcgtacgtgttcggaactgggaccagctgaccgtg ctgaccactacccagcaccgagggcaccaccccggtcctaccatcgctcccagcctctg tccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgcataccggggtcttgac ttcgctgcgatatactacatttggggccctctggtggtacttgcggggtcctgtgctttca ctcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacc ttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggag gaggaaggcggtgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaag caggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctg gacaagcggagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgagaaagaatcccaagag ggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaa ggggaacgcagaagaggcaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaag gacacctatgacgtctctcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR22-4 scFv AA	221	evqlvesggglvqpgrslrlscaasgftfddyamhwvrqapqkglewvsgiswnsgsigyads vkgrftisrdnaknslylqmnsraedtalyykakglsswhfhaldldiwgggtmtvsvsgggg sgggsgggsseltqdpavsvalgqtvrircqgdsrlsyyaswyqqkpgqapvlviygnn rpsgipdrfsgsssgntasltitgaqaeadyycnsrdssgnhlwvfgggtkltl

10

20

30

【表 6 - 1 4】

CAR22-4 scFv NT	222	gaagtgcagttggtggaatcaggaggaggacttgtgcaacctggaagatctctcagactctcg tgtgcggcctccggtttcaccttcgacgactacgccatgcattgggtcagacaggccccggga aagggcctggagtgggtgtcaggcatctcatggaacagcggtccattgggtacgccgactcg gtcaagggaaggttactatctcccgggacaacgccaagaactccctgtacctccaaatgaac agcctgcgcgcgaggatactgccctgtactactgcgccaaggggtgtccagctggcacttt cacgacgcacttgatatctggggacagggatccatggtcaccgtgtcctccggtggcggaggc tcagggggaggaggaagcggggcggtggttcctcctccgaactgacccaggacccggccgtg tccgtggcgtgggacaaaccgtgcgcattacttgccagggcgacagcttgcggtcgactac gcctcgtggtaccagcagaagcccgccagggtcccggtgctggtcatctatggcaaaaacaac cgcccagcgggaattccagaccggttctccgggagctcgtccgggaacaccgcttcgctcacc atcacgggggcccaggcgaggagcgaagcagattactactgcaactcgcgggattccagcggc aatcacctctgggtgttcgggggagggaaccaagctgactgtgctg	10
CAR22-4 可溶性 sc FV NT	223	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgcgctcgcccc gaagtgcagttggtggaatcaggaggaggacttgtgcaacctggaagatctctcagactctcg tgtgcggcctccggtttcaccttcgacgactacgccatgcattgggtcagacaggccccggga aagggcctggagtgggtgtcaggcatctcatggaacagcggtccattgggtacgccgactcg gtcaagggaaggttactatctcccgggacaacgccaagaactccctgtacctccaaatgaac agcctgcgcgcgaggatactgccctgtactactgcgccaaggggtgtccagctggcacttt cacgacgcacttgatatctggggacagggatccatggtcaccgtgtcctccggtggcggaggc tcagggggaggaggaagcggggcggtggttcctcctccgaactgacccaggacccggccgtg tccgtggcgtgggacaaaccgtgcgcattacttgccagggcgacagcttgcggtcgactac gcctcgtggtaccagcagaagcccgccagggtcccggtgctggtcatctatggcaaaaacaac cgcccagcgggaattccagaccggttctccgggagctcgtccgggaacaccgcttcgctcacc atcacgggggcccaggcgaggagcgaagcagattactactgcaactcgcgggattccagcggc aatcacctctgggtgttcgggggagggaaccaagctgactgtgctgggatcgaccaccatcac catcatcatcac	20
CAR22-4 可溶性 sc FV AA	224	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvqpgrslrlscaasgftfddyamhwvrqapg kglewvsgiswnsgsigyadsvkgrftisrdnaknslylqmnsdraedtalyyakglsswhf hdalldiwgggtmvtvssgggsgggsgggssseItqdpavsvalgqtvritcggdslrsyy aswyqqkpgqapvlviygknnrpsqipdrfsgsssgntasltitgaqaedeaddyencsrds nhlwvfgggtklvtlvgshhhhhhhh	30

【表 6 - 1 5】

CAR22-4 完全 AA	225	malpvtallllplallllhaarpevqlvesggglvqpgsrslrlscaasgftfddyamhwvrqapg kglewvsgiswnsgsigyadsvkgrftisrdnaknslylqmnsraedtalyyacagklswhf hdalldiwgggtmvtvssgggsgggsgggsseltqdpavsvallgqtvritcggdslrsyy aswyqqkpgqapvlviygknnrpsgipdrfsgsssgntasltitgaqaedeaddyccnsrdssg nhlwfvgggtklvtlttppaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrglfacdiyi waplagtcgvlllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfeeeeeggcel rvkfsrsadapaykqqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelq kdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
CAR22-4 完全 NT レンチウ イルス	226	atggccctccctgtcaccgcctgtcgtctccgctggctcttctgctccacgccgctcggccc gaagtgcagttggtggaatcaggaggaggacttgtgcaacctggaagatctctcagactctcg tgtgcggcctccggtttcaccttcgacgactacgccatgattgggtcagacaggccccggga aaggccctggagtgggtgtcaggcatctcatggaacagcggtccattgggtacgccgactcg gtcaagggaaggttactatctccgggacaacgccaagaactccctgtacctccaaatgaac agcctgcgcgcgaggatactgcctgtactactgcgccaaggggctgtccagctggcacttt cacgacgcacttgatatctggggacaggtaccatggtcaccgtgtcctccggtggcggaggc tcagggggaggaggaagcggggcggtggttccctccgaactgacccaggacccggcgtg tccgtggcgctgggacaaaccgtgcgcattacttgccaggcgacagcttgcggtcgactac gcctcggtgtaccagcagaagccggccagggtcccggtgctggtcatctatggcaaaaacaac cgcccagcggaattccagaccggttctccgggagctcgccgggaacaccgcttcgctcacc atcacggggggccaggcgaggacgaagcagattactactgcaactcgcgggattccagcggc aatcacctctgggtgttcggggcggaaccaagctgactgtgctgaccactacccagcaccg aggccacccaccccggtcctaccatcgctccaccgctctgtccctgcgtccggaggcatgt agaccgcagctggtggggcggtgcatacccggggtcttgacttcgctcgcatctacatt tgggcccctctggtggtacttgcggggtcctgtgctttcactcgatcactctttactgt aagcgcggtcgaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagact actcaaggaggagcggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggtgcgaactg cgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctac aacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcgagaggacgggac ccagaaatggcggggaagccgcgcagaaagaatccccaaggggcctgtacaacgagctccaa aaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaa ggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcac atgcaggccctgccgcctcgg

10

20

30

【表 6 - 1 6】

CAR22-5 scFv AA	227	evqlvesggglvqpgrslrlscaasgftfddyamhwvrqapgkglewvsgiswnsgsigyads vkgrftisrdnaknslylqmnsraedtalyycaakdkgggyydfwsgsdywgqgtlvtvssgg ggsgggsgggsseltqdpavsalgqtvritcggdslrsyyaswyqqkpgqapvlviyqk nnrpsgipdrfsgsssgntasltitgaqaeadyycnsrdssgwvfgggtklvtl
CAR22-5 scFv NT	116	gaagtgaacttgtggaatctggtggaggacttgtgcaacctggaagatcactgagactgtca tgtgcagcctcggggtttaccttcgacgactacgccatgcactgggtgcccagggtccgggg aaggccctcgaatgggtgtcgggcatcagctggaactccggttccattggctatgcggactcc gtgaaaggacgcttcacaatttccgggataacgccaagaacagcctgtacttgagatgaac tccctgcgggccgaggataaccgacctgtactactgcgctaaggacaagggcggtggatactac gacttctggagcggaagcgactactggggacaggaactctggtcaccgtgtcctccggcgga gggggctccggcggggtggtagcgggggtggagggtcgctcgtagactgacccaggaccccc gcagtgtccgtcgccctggggcagactgtgcggatcacttgccaaggagacagcctgcggtcc tactacggtcctggtatcagcagaagccggggcagggcccagtcctcgatcatctacgaaag aacaataggcccgaggaatccctgaccgcttctcgggctcatctccgggaacaccgcctcc ctgaccatcacgggcgcgcaggccgaggacgaagccgattactactgcaactcacgggattcc agcggatgggtgttcggaggaggaaccaagctcactgtgctc
CAR22-5 可溶性 sc FV NT	228	atggccctccctgtcaccgcctgtgcttccgctgggtcttctgtctccacgccgtcgcccc gaagtgaacttgtggaatctggtggaggacttgtgcaacctggaagatcactgagactgtca tgtgcagcctcggggtttaccttcgacgactacgccatgcactgggtgcccagggtccgggg aaggccctcgaatgggtgtcgggcatcagctggaactccggttccattggctatgcggactcc gtgaaaggacgcttcacaatttccgggataacgccaagaacagcctgtacttgagatgaac tccctgcgggccgaggataaccgacctgtactactgcgctaaggacaagggcggtggatactac gacttctggagcggaagcgactactggggacaggaactctggtcaccgtgtcctccggcgga gggggctccggcggggtggtagcgggggtggagggtcgctcgtagactgacccaggaccccc gcagtgtccgtcgccctggggcagactgtgcggatcacttgccaaggagacagcctgcggtcc tactacggtcctggtatcagcagaagccggggcagggcccagtcctcgatcatctacgaaag aacaataggcccgaggaatccctgaccgcttctcgggctcatctccgggaacaccgcctcc ctgaccatcacgggcgcgcaggccgaggacgaagccgattactactgcaactcacgggattcc agcggatgggtgttcggaggaggaaccaagctcactgtgctcggtcgaccaccatcaccat catcatcac

10

20

30

【表 6 - 1 7】

CAR22-5 可溶性 sc FV AA	229	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvqpgrslrlscaasgftfddyamhwvrqapg kglewvsgiswnsgsigyadsvkgrftisrdnaknslylqmnsraedtalyycaakdkgggyy dfwsgsdywgqgtlvtvssggggsgggsgggsseltqdpavsalgqtvritcggdslrs yyaswyqqkpgqapvlviyqknnrpsgipdrfsgsssgntasltitgaqaeadyycnsrds sgwvfgggtklvtlqshhhhhhhh
CAR22-5 完全 AA	230	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvqpgrslrlscaasgftfddyamhwvrqapg kglewvsgiswnsgsigyadsvkgrftisrdnaknslylqmnsraedtalyycaakdkgggyy dfwsgsdywgqgtlvtvssggggsgggsgggsseltqdpavsalgqtvritcggdslrs yyaswyqqkpgqapvlviyqknnrpsgipdrfsgsssgntasltitgaqaeadyycnsrds sgwvfgggtklvtltpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrglfacdiyi w aplagtcgvllslvitlyckgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrpfpeeeeggcelr vkfsrsadapaykqgnqlynelnlgrreedyvldkrrgrdpemggkprkrnpqeglynelqk dkmaeyseigmkgerrrgkghdglqyqglstatkdydalhmqalppr

40

【表 6 - 1 8】

CAR22-5 完全 NT レンチウ イルス	231	atggccctccctgtcaccgcccctgtgtcttccgctggctcttctgtctccacgcccgtcggccc gaagtgaacttgtggaatctggaggacttgtgcaacctggaagatcactgagactgtca tgtgcagcctcgggtttaccttcgacgactacgccatgactgggtgccaggctccgggg aagggcctcgaatgggtgtcgggcacagctggaactccgggtccattggctatgcggactcc gtgaaaggacgcttcacaatttcccgggataacgccaagaacagcctgtacttgagatgaac tccctcggggccgaggataaccgcccctgtactactgcgctaaggacaagggcggtggatactac gacttctggagcggaagcgactactggggacagggaaactctggtcaccgtgtcctccggcgga gggggctccggcgggcggtggttagcgggggtggagggtcgtcgtcggagctgacccaggacccc gcagtgtccgtcgccttggggcagactgtgcggatcacttgccaaggagacagcctcggtcc tactacgctcctggtatcagcagaagccggggcaggccccagtcctcgtcatctacggaaag aacaataggcccagcggaatccctgaccgcttctcgggtcctcctccggcaacaccgccc ctgaccatcacgggcgcgagccgaggacgaagccgattactactgcaactcacgggattcc agcggatgggtgttcggaggaggaaccaagctcactgtgctcaccactacccagcaccgagg ccaccaccccggtcctaccatcgctcccagcctctgtccctcgtcggaggcatgtaga cccgcagctggtggggcggtgcataccggggtcttgacttcgctcgcgatctacatttg gcccctctggtggtacttgccgggtcctgtgtcttactcgtgatcactcttactgtaag cgcggtcgggaagaagctgtgtacatcttaagcaaccctcatgagcctgtgcagactact caagaggaggacggctgtcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggtgcgaactgcgc gtgaaattcagccgcagcgcagatgtccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaac gaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccca gaaatggcggggaagccgcgcagaaagaatcccaagaggcctgtacaacgagctccaaaag gataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggc cacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatg cagccctgccgctcgg
CAR22-6 scFv AA	232	evqlqqsgpglvkpsltlsltcalsgdsvsnsatwtwirqspgrglewlgtrtyrstwyndy avsvksritinpdtsknqfslqlnsvtpedtavyycaregsgsyaywgqgtlvtvssggggs gggsggggsqsaltqpasvsgspgqstisctgtssdvgyynyvswyqqhpgkapklmiydv snrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyyccsytsstlyvfgtgtkvtvl

10

20

30

【表 6 - 1 9】

CAR22-6 scFv NT	233	gaagtgaactccaacaatcaggtccaggactcgtcaaaccctcgcttactctgtcgtgact tgtgctatctcgggagactccgtgagctccaacagcgccacctggacttggattagacagtcc ccgtcacggggcctcgaatggctgggaaggacactactaccggagcacctggtacaacgactat gctgtgtccgtgaagtcccgcatcaccatcaaccccgatacctccaagaaccagttcagcttg caactgaactccgtgaccttgaggatacggccgtctattactgcgccgcgaggggtccggt tcctactacgcctactggggacagggactctggtcaccgtgtcgagcggaggggggggtcc ggcggaggaggatctggtggcggagggtcccagtcgcgctgaccagcctgcgtccgtgtcc ggctcaccgggccagtctatcaccattagctgcaccggcactagctcagacgtgggaggggtac aactacgtgtcgtggtaccagcagcaccctggaaaggccccgaagctgatgatctacgacgtg tccaaccggcccagcgggggtgtcgaatcgcttctccggctcaaagtccggcaacacagccagc ctgaccattagcggactgcaggccgaggatgaagcagactactactgctcgtcctacacctcc tcctcgactctctacgtgtttggcaccggaactaaggtcaccgtgctg
CAR22-6 可溶性 sc FV NT	234	atggccctccctgtcaccgcctgctgcttccgctggctcttctgctccacgcgctcgcccc gaagtgaactccaacaatcaggtccaggactcgtcaaaccctcgcttactctgtcgtgact tgtgctatctcgggagactccgtgagctccaacagcgccacctggacttggattagacagtcc ccgtcacggggcctcgaatggctgggaaggacactactaccggagcacctggtacaacgactat gctgtgtccgtgaagtcccgcatcaccatcaaccccgatacctccaagaaccagttcagcttg caactgaactccgtgaccttgaggatacggccgtctattactgcgccgcgaggggtccggt tcctactacgcctactggggacagggactctggtcaccgtgtcgagcggaggggggggtcc ggcggaggaggatctggtggcggagggtcccagtcgcgctgaccagcctgcgtccgtgtcc ggctcaccgggccagtctatcaccattagctgcaccggcactagctcagacgtgggaggggtac aactacgtgtcgtggtaccagcagcaccctggaaaggccccgaagctgatgatctacgacgtg tccaaccggcccagcgggggtgtcgaatcgcttctccggctcaaagtccggcaacacagccagc ctgaccattagcggactgcaggccgaggatgaagcagactactactgctcgtcctacacctcc tcctcgactctctacgtgtttggcaccggaactaaggtcaccgtgctgggatcgaccaccat caccatcatcatcac
CAR22-6 可溶性 sc FV AA	235	malpvtalllplalllhaarpevqlqqsgpglvkpsltlsltcalsgdsvsnsatwtwirqs psrglewlgertyrstwyndyavsvksritinpdtsknqfslqlnsvtpedtavyyicaregsg syyaywqggtlvtvssgggsgggsgggsgsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvgy nyvswyqhpqkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeaddyccsyts sstlyvfgtgtkvtvlqshhhhhhhh

10

20

30

【表 6 - 2 0】

CAR22-6 完全 AA	236	malpvtallllplalllhaarpevqlqsgpgglvkpsltlsltcalsgdsvsnsatwtwirqs psrglewlgertyyrstwyndyavsvksritinpdtsknqfslqlnsvtpedtavyycaregsg syyaywgggtlvtvssgggsgggsgggsgsalsaltqpasvsgspggsitictgtssdvgy nyvswyqqhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeaddyccsyts sstlyvfgtgtkvlttppaprptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiy iwaplagtcgvlllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttgeedgcsrfpeeeeggce lrvkfsrsadapaykqggnqlynelnlgrreedydldkrgrdpemggkprkrnpqeglynel qkdkmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
CAR22-6 完全 NT レンチウ イルス	237	atggccctccctgtcaccgcctgtcgtctccgctggctcttctgctccacgccgctcggccc gaagtgcactccaacaatcaggctccaggactcgtcaaaccctcgcttactctgtcgtgact tgtgtatctcgggagactccgtgagctccaacagcgccacctggacttggtattagacagtcc ccgtcacggggcctcgaatggctgggaaggacctactaccggagcacctgggtacaacgactat gctgtgtccgtgaagtcccgcatcaccatcaaccccgatacctccaagaaccagttcagcttg caactgaactccgtgacctgaggatcggccgtctattactgcgccgcgaggggtccgggt tcctactacgcctactggggacaggggtactctgttcaccgtgtcgagcggaggggggggtcc ggcggaggaggatctggtggcggagggtcccagtcgcgctgaccagcctgcgtccgtgtcc ggctcaccgggcccagctctatcaccattagctgcaccggcactagctcagacgtgggagggtac aactacgtgtcgtggtaccagcagcaccctggaaagggcccgagctgatgatctacgacgtg tccaaccggcccagcggggtgtcgaatcgcttctccggctcaaagtccgggaacacagccagc ctgaccattagcggactgcaggccgagatgaagcagactactactgctcgtcctacacctcc tcctcgactctctacgtgttggcaccggaactaaggtaaccgtgctgaccactacccagca ccgaggccaccaccccggtcctaccatcgccctcccagcctctgtccctgcgtccggaggca tgtagaccgcagctggtggggccgtgcataccgggggtcttgacttcgctgcgatctctac atttgggcccctctggtggtacttgccgggtcctgctgctttactcgtgatcactctttac tgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcag actactcaagaggaggacggctgttcatgccggtcccagaggaggaggaaggcggtgcgaa ctgcgctgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctc tacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgg gacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccaagaggcctgtacaacgagctc caaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggc aaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccggccaccaaggacacctatgacgctctt cacatgcaggccctgcgcctcgg

10

20

30

【表 6 - 2 1】

CAR22-7 scFv AA	238	qvqlvqsgaevkkgasvkvscasgytftgyymhwvrqapggglewmginpnsggttnyaqk fqgrvtmtrdtsistaymelsrlrsddtavyyccardyyggygsgtldywgqgtlvtvssgggg sgggsgggsgsqsaltqpgsvsgspgqsitistgtssdvgyynyvswyqqhpgkapkliiyd vssrpsgvsnrfsqsgntasltisglqaedeaddyssyagsntlvfgtgktkvtvl
CAR22-7 scFv NT	239	caagtccaactcgtccagtcgggtgcagaagtcagaagccaggagcgtccgtgaaagtgtcc tgcaaagcctcgggtacaccttcaccggatactacatgcactgggtgcgccagggtcccggga caaggattggagtggtgggttggatcaacccgaactccggcggaaccaactacgcccagaag ttccaggagcgcgtgactatgactcgggacacgtccatcagcactgcctacatggaactgagc cggcttagatcagacgacaccgctgtactactgcgcccgcatctactggggtactacgga agcggaaacctcgactactggggacaggaactctcgtgactgtgtcgagcgggtggaggcggc tccggcgagggggttccgggtggtggaggctcccagtcgcgctgacccagcctgggtcgggtg tccggctcacctggccaatccatcaccatttctcgcaccggcacttctccgacgtgggaggg tacaactacgtgtcgtggtaccagcagcatccgggaaaggccccaagctgatcatctacgat gtgtcgtcccggcgagcggagtggtcaaacagggttagcgggagccagtcgggaataactgcc tcgctgacaattagcgggctgcaggctgaggacgaggccgattatctgtgttctcatatgcg ggctctaaccacctggtgttcggcaccgggaccaaggtcaccgtgctg
CAR22-7 可溶性 sc FV NT	240	atggccctccctgtcaccgcctcgtgcttccgctgggtcttctgtctccacgccgctcggccc caagtccaactcgtccagtcgggtgcagaagtcagaagccaggagcgtccgtgaaagtgtcc tgcaaagcctcgggtacaccttcaccggatactacatgcactgggtgcgccagggtcccggga caaggattggagtggtgggttggatcaacccgaactccggcggaaccaactacgcccagaag ttccaggagcgcgtgactatgactcgggacacgtccatcagcactgcctacatggaactgagc cggcttagatcagacgacaccgctgtactactgcgcccgcatctactggggtactacgga agcggaaacctcgactactggggacaggaactctcgtgactgtgtcgagcgggtggaggcggc tccggcgagggggttccgggtggtggaggctcccagtcgcgctgacccagcctgggtcgggtg tccggctcacctggccaatccatcaccatttctcgcaccggcacttctccgacgtgggaggg tacaactacgtgtcgtggtaccagcagcatccgggaaaggccccaagctgatcatctacgat gtgtcgtcccggcgagcggagtggtcaaacagggttagcgggagccagtcgggaataactgcc tcgctgacaattagcgggctgcaggctgaggacgaggccgattatctgtgttctcatatgcg ggctctaaccacctggtgttcggcaccgggaccaaggtcaccgtgctgggatcgaccaccat caccatcatcatcac

10

20

30

【表 6 - 2 2】

CAR22-7 可溶性 sc FV AA	241	malpvtalllplalllhaarqvqlvqsgaevkkgasvkvscasgytftgyymhwvrqapg qglewmginpnsggttnyaqkfqqgrvtmtrdtsistaymelsrlrsddtavyyccardyyggyg sgtldywgqgtlvtvssggggsgggsgggsgsqsaltqpgsvsgspgqsitistgtssdvgy ynyvswyqqhpgkapkliiydvssrpsgvsnrfsqsgntasltisglqaedeaddyssya gsntlvfgtgktkvtvlqshhhhhhhh
CAR22-7 完全 AA	242	malpvtalllplalllhaarqvqlvqsgaevkkgasvkvscasgytftgyymhwvrqapg qglewmginpnsggttnyaqkfqqgrvtmtrdtsistaymelsrlrsddtavyyccardyyggyg sgtldywgqgtlvtvssggggsgggsgggsgsqsaltqpgsvsgspgqsitistgtssdvgy ynyvswyqqhpgkapkliiydvssrpsgvsnrfsqsgntasltisglqaedeaddyssya gsntlvfgtgktkvtvlhttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrglldfacdiy iwaplagtcgvlslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrpfpeeeeggce lrvkfsrsadapaykqqnqlynelnlgrreedyvldkrgrdpemggkprkrnpqeglynel qkdkmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatktdtydalhmqalppr

40

【表 6 - 2 3】

CAR22-7 完全 NT レンチウ イルス	243	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccc caagtccaactcgtccagtcgggtgcagaagtcagaagccaggagcgtccgtgaaagtgtcc tgcaaagcctcgggttacaccttcaccggatactacatgactgggtgcccagggtcccggga caaggattggagtggatgggttggatcaaccggaactccggcggaaccaactacgcccagaag ttccaggacgcgtgactatgactcgggacacgtccatcagcactgcctacatggaactgagc cggcttagatcagacgacaccgccgtgtactactgcgcccgcgattactggggctactacgga agcggaaacctcgactactggggacagggaactctcgtgactgtgtcgagcgggtggaggcggc tccggcgagggggttccgggtggagggtcccagtcgcgctgacccagcctgggtcgggtg tccggctcacctggccaatccatcaccatttctcgaccggcacttcctccgacgtggagggg tacaactacgtgtcgtgggtaccagcagcatccgggaaaggccccaagctgatcatctacgat gtgtcgtcccggccgagcggagtgtcaaacagggttagcgggagccagtcgggaatactgcc tcgctgacaattagcgggctgcaggctgaggacgaggccgattatcgtgttctcatatgcg ggctctaaccacctggtgttcggcaccgggaccaagggtaccgctgctgaccactacccagca ccgagggccaccaccccggtcctaccatcgctcccagcctctgtccctgcgtccggaggca tgtagaccgcagctggtggggccgtgcataccgggggtcttgacttcgctgcgatcttac atttgggcccctctggtggtacttgccgggtcctgctgctttactcgtgatcactctttac tgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcag actactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggagggaaggcggctgcgaa ctgcgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctc tacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgg gaccagaaatggcggggaagccgcgcagaaagaatcccaagaggcctgtacaacgagctc caaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagggaacgcagaagaggc aaaggccacgacggactgtaccagggaactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctctt cacatgcaggccctgccgctcgg
CAR22-8 scFv AA	244	qvqlvqsgaevkkgasvkvscasgytftsygiswvrqapggglewmgi sayngntnyaqk lqgrvtmttdtststaymelrslrsddtavyyicaraglalysnyvpyyygmdvwgqgttvtv ssgggsgggsgggsggnfmltqphsvsespgktvtisctrssgsiasnyvqwyqrpqsspt tviyednqrpsgvpdfrfsgsidssnsasltisglktedeadyyccsydssnpwvfqggtkl v1

10

20

30

【表 6-24】

30

【表 6 - 2 5】

CAR22-8 完全 AA	248	malpvtallllplallllhaarpqvqlvqsgaevkkgasvkvscasgytftsyygiswvrqapg qglewmqwisayngntnyaqklqgrvtmttdtststaymelrslrsddtavyyacaraglalys nyvpyyyygmdvwgqgttvtvssgggsgggsgggsgnfmlltqphsvsespgktvtisctrs sgsiasnyvqwyqqrpgsspttviyednqrpsgvpdrfsgsidssnsasltisglktedead yycqsydssnpwvfgggtklvtlttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgl dfacdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttgeedgcscrfe eeeggcelrvkfssadapaykqqgnqlynelnlgrreeydvldkrgrdpemggkprrknpq eglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
CAR22-8 完全 NT レンチウ イルス	249	atggccctccctgtcaccgcctgtcgtctccgctggctcttctgctccacgccgtcggccc caagtccaactggtgcagtcgggagccgaagtcaagaagccggggcctccgtcaaaagtgtcc tgcaaagccagcggtacactttcacctcctatgggatctcatgggtcagacaggtcccggc caaggactggaatggatgggttggtatctccgcctacaacggaacactaactacgccagaag ctgcaggggagagtgaccatgacaactgacacctcgacctcaaccgcgtacatggaactgcgc agccttaggtccgacgatacggcggtgtactatgtgcacggggcggttgcccttactcg aactacgtgccctactactactacggaatggacgtctggggacagggaaccactgtgaccgtg tcctccgggggtggaggtcagcgaggagggaagcggggggtggaagcaactttatgctg accagcctcactcgggtgtcggagagccctggaagactgtgaccatctcctgcactcggagc tcgggtccattgctcaaactacgtgcagtggtaccagcagcggcggttctcgcgaacc accgtgatctacgaggacaaccaacgcccggtccgggtgctgaccggttctccggtccatc gattcctcttccaactccgttccctgaccattagcgccctcaagaccgaggtgaagccgac tactactgccagtcctacgactcaagcaatccgtgggtgttcggtggaggaaactaagctgacc gtgctcaccactacccagcaccgaggccaccaccccggtcctaccatcgccctccagcct ctgtccctgcgtccggaggtatgtagaccgcagctggtggggcggtgcataccgggggtctt gacttcgctgcgatctacatttggggccctctgggtggtacttgcggggtcctgctgctt tcactcgtgatcactctttactgtaagcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaa cccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcagccgggtcccagag gaggaggaaggcggtgcgaactgcgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctac aagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtg ctggacaagcgagagagcgggacccagaaatggcggggaagccgcgagaagaatcccaa gagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatg aaaggggaacgcagaagaggcaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacc aaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgcgcctcgg

10

20

30

【表 6 - 2 6】

CAR22-9 scFv AA	250	evqlvesggglvkgpgslrlscvasgftfsnawmnwvrqapgkglewvgriksktddggtadya apvkgrftisrddskntmylqmnsllktedtgvyycitgatdvwgqgttvtvssgggsggggs ggggssyvltpppsasgtpgqrvtiscsgssnignsnyvywyqqlpgtapklliyrrnnqrpsg vpdrfsgsksgtsaslaigslrsedeaddycaawddslsgpvfgggtkltl
CAR22-9 scFv NT	251	gaagtgcagctcgtggaatcggcggtggactggtcaagccaggaggttccctgcggtgtcc tgctggcctccggtttcacattctccaacgcgtggatgaattgggtgcgccaaagccctgga aagggaacttgaatgggtcggacggatcaagagcaaaaccgacggaggaactgccgattacgcc gcacccgtgaagggcagattcaccatttcgcggtgactcgaagaacaccatgtacctccag atgaactcgctcaagaccgaggataccggcgtctactactgcacaccggcgtactgacgtc tggggacagggaaactaccgtgactgtgtcctccggcgaggcggaagcgaggagggggcagc ggggcgggggatcatcctacgtgctcactcagccgcttcagcctccggtaccccgggccag cgctgaccatttcatgctcgggtcctcctcaaacatcgggagcaactacgtgtactggtac cagcagctgcccggtactgccccaaagctgctgatctaccgaacaaccaacgcccgagcgga gtgccggacagatttccgggtccaagtctgggacctccgctagcctggcgatctccggtctg aggagcgaggacgaggcagactactattgtgcggcctgggacgatccctgtcggggcctgtg tttgaggcgggcacgaagttgaccgtgctg
CAR22-9 可溶性 sc FV NT	252	atggcctcctctgacccgctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccc gaagtgcagctcgtggaatcggcggtggactggtcaagccaggaggttccctgcggtgtcc tgctggcctccggtttcacattctccaacgcgtggatgaattgggtgcgccaaagccctgga aagggaacttgaatgggtcggacggatcaagagcaaaaccgacggaggaactgccgattacgcc gcacccgtgaagggcagattcaccatttcgcggtgactcgaagaacaccatgtacctccag atgaactcgctcaagaccgaggataccggcgtctactactgcacaccggcgtactgacgtc tggggacagggaaactaccgtgactgtgtcctccggcgaggcggaagcgaggagggggcagc ggggcgggggatcatcctacgtgctcactcagccgcttcagcctccggtaccccgggccag cgctgaccatttcatgctcgggtcctcctcaaacatcgggagcaactacgtgtactggtac cagcagctgcccggtactgccccaaagctgctgatctaccgaacaaccaacgcccgagcgga gtgccggacagatttccgggtccaagtctgggacctccgctagcctggcgatctccggtctg aggagcgaggacgaggcagactactattgtgcggcctgggacgatccctgtcggggcctgtg tttgaggcgggcacgaagttgaccgtgctgggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR22-9 可溶性 sc FV AA	253	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvkgpgslrlscvasgftfsnawmnwvrqapg kglewvgriksktddggtadyaapvkgrftisrddskntmylqmnsllktedtgvyycitgatdv wgqgttvtvssgggsgggsgggssyvltpppsasgtpgqrvtiscsgssnignsnyvywy qqlpgtapklliyrrnnqrpsgvpdrfsgsksgtsaslaigslrsedeaddycaawddslsgpv fgggtkltvlqshhhhhhhh

10

20

30

【表 6 - 2 7】

CAR22-9 完全 AA	254	malpvtallllplallllhaarpevqlvesggglvkpggslrlscvasgftfsnawmnwvrqapg kglewvgriksktdggtdadyaapvkgrftisrddskntmlylqmnslktdetgvyyicitgatdv wgggttvtvssgggsgggsgggssyvltpppsasgtpgqrvtiscsgssnignsyvywy qqllpgtapklliyrrnnqrpsgvpdfrfsgsksgtsaslaissglrsedeadyycaawddslsgpv fgggtkltvlttpprptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwapla gtcgvlllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttgeedgcsrfeeeeeggcelrvkfs rsadapaykqggnqlynelnlgrreeydvldkrgrdpemggkprkrnpqeglynelqkdka eayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
CAR22-9 完全 NT レンチウ イルス	255	atggccctccctgtcaccgcctgtcgtctccgctggctcttctgctccacgccgctcgcccc gaagtgcagctcgtggaatcggcggtggactggtcaagccaggaggttccctgcggtgtcc tgcgtggcctccggtttcacattctccaacgcgtggatgaattgggtgcccagccctgga aagggacttgaatgggtcggacggatcaagagcaaaaccgacggaggaaactgccgat tacgcc gcacccgtgaaggcagattcaccatttcgcggtgactcgaagaacaccatgtacctcag atgaactcgtcaagaccgaggataccggcgtctactactgcatcaccggcgtactgacgtc tggggacagggaaactaccgtgactgtgtcctccggcggaggcgaagcggaggagggggcagc gggggcgggggatcatcctacgtgctcactcagccgccttcagcctccggtaccccgggccag cgctgaccatttcatgctcgggtcctcctcaaacatcgggagcaactacgtgtactggtac cagcagctgccgggtactgcccccaagctgctgatctaccggaacaaccaacgcccgagcggg gtgccggacagatttccgggtccaagtctgggacctccgctagcctggcgatctccggtctg aggagcggagcagaggcagactactattgtgcgccctgggacgatccctgtcggggcctgtg tttgaggcggcaggaagttgaccgtgctgaccactacccagcaccgagccacccaccccg gtcctaccatcgccctccagcctctgtccctgctccggaggcatgtagaccgcagctggt ggggccgtgcatacccggtcttgacttcgcctgcgatctacatttggggccctctggt ggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaag aagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggac ggctgttcatgccggttcccagaggagggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagc cgacgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatctt ggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatgggcggg aagccgcgcagaaagaatcccaagaggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggca gaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactg taccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccg cctcgg

10

20

30

【表 6 - 2 8】

CAR22-10 scFv AA	256	evqlqqsgpglvkpsqtlsltcalsgdsvlsnsdtnwirqspgrglewlgertyhrstwyddy assvrgvrsinvdtsknqyslqlnavtpedtgvyycardrlqdgnsdwsdafdvwgggtmvtvs sgggsgggsgggsgggsgsaltqpasvsgspgqsitistgtssdvggynyvswyqqhpgkapk lmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaeadyycssytssstlvvyfvggtgkvt vl
CAR22-10 scFv NT	257	gaagtcagcttcagcagctctggtcccgggcttgtcaaaccatcgagaccctgtccctgact tgcgcatcagcggcgatagcgtgctgtcaaactcggacacctggaactggatcaggcagtc ccttcccgggactggaatggttggccggacgtaccatcgctccacttggtacgacgactat gccagctccgtgagagggcggtgtcgatcaacgtggatacttcaaagaaccagtactccctc caactcaatgctgtgacccggaggacaccggagtgtactactgtgccgggtagactgcag gacggaaactcatggagcgacgccttcgacgtgtggggacagggcaccatggtcaccgtgtcc agcgtgaggagggtccggcggtggaggttcgggggaggaggaggagccaatcggtctgacc caaccggcctcagtcagcgttcgcccggacagtccattactattagctgcaccggaacctcc agcgacgtggcggttacaactatgtgtcggtgtaccagcagaccggggaaggcccttaag ctgatgatctacgacgtgtcaatcgccctccggggtgtccaaccgcttctccggctcgaag tccggcaactgcactgacatcagcggactgcaagccgaggacgaagcggattactac tgctcctcctacacctcctcctccactctcgctacgtgttggaaacgggaccaaggtcacc gtgctg
CAR22-10 可溶性 s cFV NT	258	atggccctccctgtcaccgcctctgctgttccgctggctcttctgctccacgcgcctcgcccc gaagtcagcttcagcagctctggtcccgggcttgtcaaaccatcgagaccctgtccctgact tgcgcatcagcggcgatagcgtgctgtcaaactcggacacctggaactggatcaggcagtc ccttcccgggactggaatggttggccggacgtaccatcgctccacttggtacgacgactat gccagctccgtgagagggcggtgtcgatcaacgtggatacttcaaagaaccagtactccctc caactcaatgctgtgacccggaggacaccggagtgtactactgtgccgggtagactgcag gacggaaactcatggagcgacgccttcgacgtgtggggacagggcaccatggtcaccgtgtcc agcgtgaggagggtccggcggtggaggttcgggggaggaggaggagccaatcggtctgacc caaccggcctcagtcagcgttcgcccggacagtccattactattagctgcaccggaacctcc agcgacgtggcggttacaactatgtgtcggtgtaccagcagaccggggaaggcccttaag ctgatgatctacgacgtgtcaatcgccctccggggtgtccaaccgcttctccggctcgaag tccggcaactgcactgacatcagcggactgcaagccgaggacgaagcggattactac tgctcctcctacacctcctcctccactctcgctacgtgttggaaacgggaccaaggtcacc gtgctgggatcgaccaccatcaccatcatcatcac

10

20

30

【表 6 - 2 9】

CAR22-10 可溶性 s cFV AA	259	malpvtalllplalllhaarpevqlqqsgpglvkpsqtlsltcalsgdsvlsnsdtnwirqs psrglewlgertyhrstwyddyassvrgvrsinvdtsknqyslqlnavtpedtgvyycardrlq dgnsdwsdafdvwgggtmvtvssggggsgggsgggsgsaltqpasvsgspgqsitistgts sdvggynyvswyqqhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaeadyyc cssytssstlvvyfvggtgkvtvlqshhhhhhhh
CAR22-10 完全 AA	260	malpvtalllplalllhaarpevqlqqsgpglvkpsqtlsltcalsgdsvlsnsdtnwirqs psrglewlgertyhrstwyddyassvrgvrsinvdtsknqyslqlnavtpedtgvyycardrlq dgnsdwsdafdvwgggtmvtvssggggsgggsgggsgsaltqpasvsgspgqsitistgts sdvggynyvswyqqhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaeadyyc cssytssstlvvyfvggtgkvtvltttpprptpaptiasqplslrpeacrpaggavhtrgl dfacdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqtteedgcscrfe eeeggcelrvkfsrsadapaykqqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprkrnpq eglynelqkdkmaeyseigmkgerrrrkghdglyqglstatkdydalhmqalppr

40

50

【表 6 - 3 0】

CAR22-10 完全 N T レンチウ イルス	261	atggccctccctgtcaccgccctgtgtcttccgctggctcttctgtctccacgccgtcggccc gaagtgcagcttcagcagctctgggtccgggtgtgtcaaaccatcgagaccctgtccctgact tgcgcgatcagcggcgatagcgtgtgtcaaactcggacacctggaactggatcaggcagtc ccttcccgcgactggaatggttggccggacgtaccatcgctccacttggtagcagcactat gccagctccgtgagaggccgggtgtcgatcaacgtggatacttcaaagaaccagtactccctc caactcaatgctgtgaccccgaggacaccggagtgtactactgtgccgggatagactgcag gacggaaactcatggagcgacgccttcgacgtgtggggacagggcaccatggtcaccgtgtcc agcgtgtggaggaggtccggcggtggaggttcggggggaggaggagccaatcggctctgacc caaccggcctcagtcagcgggttcgcccggacagtcattactattagctgcaccggaacctcc agcgacgtggcggttacaactatgtgtcgtggtaccagcagcaccggggaaggccctaaag ctgatgatctacgacgtgtccaatcggccctccgggtgtccaaccgcttctccggctcgaag tccggcaactgcactcactgacaatcagcggactgcaagccgagagcgaagcggattactac tgctcctcctacacctcctcctcactctcgtctacgtgtttggaaccgggaccaaggtcacc gtgctgaccactaccaccagcaccgaggccaccaccccgctcctaccatcgctccagcct ctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctggtggggcgtgcatacccggtgtctt gacttcgctgcgatctacatttggccccctctggctggtacttgccgggtcctgtgtctt tactcgtgatcactcttactgttaagcgcggtcggaagaagctgtgtacatctttaagcaa cccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttccagag gaggaggaaggcggtgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctac aagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtg ctggacaagcggagaggacgggaccagaaatggcggggaagccgcgagaagaatcccaa gagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatg aaaggggaacgcagaagaggcaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacc aaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR22-11 scFv AA	262	evqlqqsgpglvkpsqtlsltcalsgdsyssnsaawnwirqspgrglewlgtrtyrskwyndy avsvksritinpdtsknqfslqlnsvtpedtavyycareesssgwyegnwfdpwgqgtlvtvs sgggsgggsgggsseltqdpavsalgqtvritcggdslrsyyaswyqqkpgqapvlvi ygknhrpsgipdrfsgsssgdtdsltitgaqaedeadyychsrdsqnhlfgggtklvtl

10

20

30

【表 6 - 3 1】

CAR22-11 scFv NT	263	gaagtgaacttcagcagtcaggctcctggcttgggtcaagccgtcacagaccctgtcgctgact tgtgctattagcggggactctgtgtcctcaaactccgccgcatggaactggattagacagtcg ccctcccggggactggagtggctgggcccgcacactactaccggtccaagtggatgacaatgactac gccgtgtccgtgaagtcccgcattactatcaaccccgacacttcgaagaaccagttttcgctg caactcaactccgtcaccctgaggataccgccgtgtactattgcgccgggaagaatcctcc agcggttggtacgaaggaaactggttcgacccatggggccagggcaccctggctactgtgtcc tcgggaggagggggcagcgggtggcggagggaagcggaggaggaggtccagctccgagctcacc caggacccggcggtgtcagtggccctgggccaacgggtccgcatcacatgccagggggattcc ctgaggtcatactacgcgagctggatcagcagaacccggacaagccctgtgctcgtgatc tacgggaagaaccacaggccgagcggaatcccggatagattctccgggtcctcatcgggagac actgacagcctcaccatcaccggcgcgaggccgaggacgaagctgattactactgccattcc cgggactcgagcgggaaccaccttttcgggtggcgggaaccaagctgaccgtgctg	10
CAR22-11 可溶性 s cFV NT	264	atggccctcctgtcaccgcctgtgtcttcgctggctcttctgctccacgcgctcgccc gaagtgaacttcagcagtcaggctcctggcttgggtcaagccgtcacagaccctgtcgctgact tgtgctattagcggggactctgtgtcctcaaactccgccgcatggaactggattagacagtcg ccctcccggggactggagtggctgggcccgcacactactaccggtccaagtggatgacaatgactac gccgtgtccgtgaagtcccgcattactatcaaccccgacacttcgaagaaccagttttcgctg caactcaactccgtcaccctgaggataccgccgtgtactattgcgccgggaagaatcctcc agcggttggtacgaaggaaactggttcgacccatggggccagggcaccctggctactgtgtcc tcgggaggagggggcagcgggtggcggagggaagcggaggaggaggtccagctccgagctcacc caggacccggcggtgtcagtggccctgggccaacgggtccgcatcacatgccagggggattcc ctgaggtcatactacgcgagctggatcagcagaacccggacaagccctgtgctcgtgatc tacgggaagaaccacaggccgagcggaatcccggatagattctccgggtcctcatcgggagac actgacagcctcaccatcaccggcgcgaggccgaggacgaagctgattactactgccattcc cgggactcgagcgggaaccaccttttcgggtggcgggaaccaagctgaccgtgctgggatcgcac caccatcaccatcatcatcac	20
CAR22-11 可溶性 s cFV AA	265	malpvtalllplalllhaarpevqlqqsgpglvkpsqtlsltcalsgdsvsnsaawnwirqs psrglewlgtrtyyrskwyndyavsvksritinpdtsknqfslqlnsvtpedtavyycareess sgwyegnwfdpwgggtlvtvssgggsgggsgggsseltqdpavsvalgqtvritcggds lrsyyaswyqqkpgqapvlviygnhrpsqipdrfsgsssgdtdsltitgaqedeadyychs rdssgnhlfgggtklvtlgsghhhhhh	30

【表 6 - 3 2】

CAR22-11 完全 AA	266	malpvtallllplallllhaarpevqlqsgpglvkpsqtlsltcalsgdsvsnsaawnwirqs psrglewlgtrtyyrskwyndyavsvksritinpdtsknqfslqlnsvtpedtavyycaress sgwyegnwfdpwgqgtlvtvssggggsgggsgggsseltqdpavsvalgqtvritcggds lrsyyaswyqqkpggqapvlviygknhrrpsgipdrfsgsssgdtdsltitgaqadeadyychs rdssgnhlfgggtklvtlttpprptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacd iyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgkkllyifkqpfmrpvqttgeedgcscrfeeegg celrvkfsrsadapaykqqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglyn elqkdmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
CAR22-11 完全 N T レンチウ イルス	267	atggccctccctgtcaccgcctgtcgtcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccc gaagtgaacttcagcagtcggctcctggcttggtcaagccgtcacagacctgtcgtgact tgtgtattagcgggactctgtgtcctcaaactccgccgatggaactggattagacagtcg ccctcccgggactggagtggctgggcccacactactaccggtccaagtgtacaatgactac gccgtgtcgtgaagtcccgacttactatcaaccccgacacttcgaagaaccagtttctgctg caactcaactccgtcacccctgaggataccgccgtgtactattgcgccgggaagaatcctcc agcgttggtacgaaggaaactggttcgacctggggccagggcaccctggtcactgtgtcc tcgggaggagggggacgcggtggcggagggaagcggaggaggaggtccagctccgagctcacc caggaccggcggtgtcagtgccctgggccaacgggtccgcacatgcagggggattcc ctgaggtcatactacgcgagctggtatcagcagaacccggacaagccctgtgctcgtgatc tacgggaagaaccacaggccgagcggaatcccgatagattctccgggtcctcatcgggagac actgacagcctcaccatcaccggcgcgaggccgaggacgaagctgattactactgccattcc cgggactcgagcgggaaccaccttttcggtggcggaaccaagctgaccgtgctgaccactacc ccagcaccgagggcaccaccccggtcctaccatcgctccagcctctgtccctgcgtccg gaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgcataccggggtcttgacttcgctgcgat atctacatttgggcccctctggtggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcact ctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcct gtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggc tgcaactgcgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaac cagctctacaacgaactcaatcttggtcgagagaggagtacgacgtgctggacaagcggaga ggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgagaaagaatccccaagaggcctgtacaac gagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcaga agaggcaaaggccacgacggactgtaccagggaactcagcaccgccaccaaggacacctatgac gctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg

10

20

30

【表 6 - 3 3】

CAR22-12 scFv AA	268	evqlqqsgpglvkpsqtlsltcalsgdsvlsnsdtnwirqspsrglewlgertyhrstwyddy assvrgvrsinvdtsknqyslqlnavtpedtgvyycardrlqdgnsdwsdafdvwgggtmvtvs sgggsgggsgggsggsaltqpasasgspgqsvtisctgtssdvggynyvswyqqhpgkapk lmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaeadyycssytssstlyvfgtgtqltv l
CAR22-12 scFv NT	269	gaagtgcagctgcagcagagcggaccgggctggtcaaaccctcccaaaccctgtccctcact tgcgcatctccgggactccgtgctctcgaactccgacacctggaactggattcggcagagc ccatcgaggggctggaatggctgggaagaacctaccaccggtccacttggtacgatgactac gcgagctcagtgcggcagcgcgtgtcgattaacgtggacacctccaagaaccagtacagcttg caactgaacggctgaccctgaggacaccggagtgtactattgcgcccgggtagacttcag gacggaaacagctggtccgacgcctttgacgtctggggacagggcaccatggtcactgtgtcc tcgggtggcggggggtccggtggaggaggttcaggcggaggcgggtcacagtcagcactgacg cagccggttccgcttccgggagccctggacagagcgtgacctctcgtgtaccgggacttcc agcgatgtcggcgggtacaactacgtgtcttgggtaccaacagcatccgggaaaggccccaag ctcatgatctacgacgtgtcaaaccggcccagcggagtgtccaatcgcttctccggtccaag tcgggcaatactgcctcgctgactatcagcgggtctgcaagccgaagatgaggccgactattac tgctcctcctacacctcgtcctccacactctacgtgttcggaaccggtactcagctgaccgtg ctt
CAR22-12 可溶性 s cFV NT	270	atggccctccctgtcaccgcctgctgcttccgctgggtcttctgctccacgccgctcgcccc gaagtgcagctgcagcagagcggaccgggctggtcaaaccctcccaaaccctgtccctcact tgcgcatctccgggactccgtgctctcgaactccgacacctggaactggattcggcagagc ccatcgaggggctggaatggctgggaagaacctaccaccggtccacttggtacgatgactac gcgagctcagtgcggcagcgcgtgtcgattaacgtggacacctccaagaaccagtacagcttg caactgaacggctgaccctgaggacaccggagtgtactattgcgcccgggtagacttcag gacggaaacagctggtccgacgcctttgacgtctggggacagggcaccatggtcactgtgtcc tcgggtggcggggggtccggtggaggaggttcaggcggaggcgggtcacagtcagcactgacg cagccggttccgcttccgggagccctggacagagcgtgacctctcgtgtaccgggacttcc agcgatgtcggcgggtacaactacgtgtcttgggtaccaacagcatccgggaaaggccccaag ctcatgatctacgacgtgtcaaaccggcccagcggagtgtccaatcgcttctccggtccaag tcgggcaatactgcctcgctgactatcagcgggtctgcaagccgaagatgaggccgactattac tgctcctcctacacctcgtcctccacactctacgtgttcggaaccggtactcagctgaccgtg cttgatcgccaccaccatcaccatcatcatcac

10

20

30

【表 6 - 3 4】

CAR22-12 可溶性 s cFV AA	271	malpvtalllplalllhaarpevqlqqsgpglvkpsqtlsltcalsgdsvlsnsdtnwirqs psrglewlgertyhrstwyddyassvrgvrsinvdtsknqyslqlnavtpedtgvyycardrlq dgnsdwsdafdvwgggtmvtvssgggsgggsgggsggsaltqpasasgspgqsvtisctgts sdvggynyvswyqqhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaeadyyc cssytssstlyvfgtgtqltlvgshhhhhhhh
CAR22-12 完全 AA	272	malpvtalllplalllhaarpevqlqqsgpglvkpsqtlsltcalsgdsvlsnsdtnwirqs psrglewlgertyhrstwyddyassvrgvrsinvdtsknqyslqlnavtpedtgvyycardrlq dgnsdwsdafdvwgggtmvtvssgggsgggsgggsggsaltqpasasgspgqsvtisctgts sdvggynyvswyqqhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaeadyyc cssytssstlyvfgtgtqltlvtltpaprptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgld facdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkillyifkqpfmrpvqtteedgcscrfee eeggcelrvkfsrsadapaykqqnqllynelnlgrreeydvldkrgrdpemggkprkrnpqe glynelqkdkmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr

40

50

【表 6 - 3 5】

CAR22-12 完全 N T レンチウ イルス	273	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccc gaagtgcagctgcagcagagcggaccgggctggtcaaaccctccaaaccctgtccctcact tgcgcgatctccggggactccgtgctctcgaactccgacacctggaactggattcggcagagc ccatcgaggggctggaatggctgggaagaacctaccaccggtccacttggtagcatgactac gcgagctcagtcgcggagcgcgtgtcgattaacgtggacacctccaagaaccagtagccttg caactgaacgccgtgacccctgaggacaccggagtgtactattgcgccgggtagaacttcag gacggaaacagctggtccgacgcctttgacgtctggggacagggcaccatggtcactgtgtcc tcgggtggcgggggtccggtggaggaggttcaggcggagggcgtcacagtcagcactgacg cagccggcttccgcttccgggagccctggacagagcgtgaccatctcgtgtaccgggacttcc agcgatgtcggcgggtacaactacgtgtcttggtagcaacagcatccgggaaggccccaag ctcatgatctacgacgtgtcaaaccggcccagcggagtgtccaatcgcttctccggctccaag tcgggcaatactgcctcgtgactatcagcggctgtgcaagccgaagtagagccgactattac tgctcctcctacacctcgtcctccacactctacgtgttcggaaccggtactcagctgaccgtg cttaccactaccccagcacaggccacccaccccggtcctaccatcgctcccagcctctg tcctcgtcgtccggagcatgtagaccgcagctggtggggcgtgcataccggggtcttgac ttcgctgcatatctacatttgggcccctctggtggtacttgagggtcctgctgctttca ctcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacc ttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggag gaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaag caggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggcggagagaggtagcagctgctg gacaagcggagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccaagag ggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaa ggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaag gacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR22-13 scFv AA	274	qvqlqesgpglvkpssetlsltctvsggsissssywgiwrqppgkglewigsiyyysgstyynp slksrvtisvdtksnqfslklssvtaadtavyycargrmdtamaqiwgqgtmvtvssgdggsg ggsgggggnfmltqphsvsespgktvtipctgssgsfassyvqwyqrpqgsapatviyednq rpsgvpdrfsgsvdssnsasltisglktedeavyyccsydgatwvfgggtkltlvl

10

20

30

【表 6 - 3 6】

CAR22-13 scFv NT	275	caagtgcagctccaagaatcaggtcccggcctcgtgaagccttccgaaaccctctcccttact tgtaccgtgtccgggggaagcatctcgagcagctcctattactggggatggatcaggcagcct cccggaaaggactggagtgattgggtccatctactactcgggggccacctactacaaccg tcactgaagtcccgcgtgaccatctcgggtggatacctccaagaaccagttcagcctgaagctg tcctccgtgactgccgccgacactgccgtgtactactgcgcgcggggtcggatggacacagcg atggctcagatttggggacagggcaccatgggtcactgtgtcctccggggatggaggctccggg ggcggaggatctggtggcggggggtcgaaacttcattgttgaccagccacactccgtgtcggaa agcccaggaaagaccgtcaccatcccttgcaactggaagcagcgggttcgttcgcatacaagctac gtgcagtgggtaccagcaaagaccggcagcgtccggccaccgtcatctatgaggacaatcag cggccgtccggcgtgccggaccgcttcagcggatcgggtggactcatcctcaaactccgcctcc ctgacgatttccgggtctgaaaaccgaggacgaagccgtctactactgccagtcgtacgatggc gccacttgggtgtttggaggaggaccaaagctgaccgtgctg
CAR22-13 可溶性 s cFV NT	276	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgcgcctcggccc caagtgcagctccaagaatcaggtcccggcctcgtgaagccttccgaaaccctctcccttact tgtaccgtgtccgggggaagcatctcgagcagctcctattactggggatggatcaggcagcct cccggaaaggactggagtgattgggtccatctactactcgggggccacctactacaaccg tcactgaagtcccgcgtgaccatctcgggtggatacctccaagaaccagttcagcctgaagctg tcctccgtgactgccgccgacactgccgtgtactactgcgcgcggggtcggatggacacagcg atggctcagatttggggacagggcaccatgggtcactgtgtcctccggggatggaggctccggg ggcggaggatctggtggcggggggtcgaaacttcattgttgaccagccacactccgtgtcggaa agcccaggaaagaccgtcaccatcccttgcaactggaagcagcgggttcgttcgcatacaagctac gtgcagtgggtaccagcaaagaccggcagcgtccggccaccgtcatctatgaggacaatcag cggccgtccggcgtgccggaccgcttcagcggatcgggtggactcatcctcaaactccgcctcc ctgacgatttccgggtctgaaaaccgaggacgaagccgtctactactgccagtcgtacgatggc gccacttgggtgtttggaggaggaccaaagctgaccgtgctgggatcgcaccaccatcaccat catcatcac
CAR22-13 可溶性 s cFV AA	277	malpvtalllplalllhaarpqvqlqespgglvlpsetlsltctvsggsissssywqwirqp pgkglewigsiiyygstyynpslksrvtisvdtksnqfslklssvtaadtavyyccargmdta maqiwgqgtmtvsvsgdggsgggsgggsgnfmlltqphsvsespgktvtipctgssgsfassy vqwyqqrpgsapatviyednqrpsgvpdrfsgsvdssnsasltisglktedeavyycqsydg atwvfgggtklvtlglshhhhhhhh

10

20

30

【表 6 - 3 7】

CAR22-13 完全 AA	278	malpvtallllplallllhaarpqvlqesgpglvkpselstlctvsggsissssyywgwirqp pgkglewigsiiyygstyympslksrvtisvdtstknqfslklssvtaadtavyyccargrmdta maqiwgqgtmtvssgdggsgggsgggsgnfmiltqphsvsespgktvtipctgssgsfassy vqwyqqrpgsapatviyednqrpqsgvpdrfsgsvdssnsasltisglktedeavyycqsydg atwvfqgggkltvlttppaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyi w aplagtcgvlllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrvpvtqteedgcscrfppeeeeggcclr vkfssradapaykqggqnllynelnlgrreedydldkrrgrdpemggkprknpqeglynelqk dkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
CAR22-13 完全 N T	279	atggccctccctgtcaccgcctgtcgtctccgctggctcttctgctccacgccgctcgcccc caagtgcagctccaagaatcaggctcccgccctcgtgaagccttccgaaacctctcccttact tgtaccgtgtccgggggaagcatctcgagcagctcctattactggggatggatcaggcagcct cccggaaaggactggagtggattggctccatctactactcgggggccactactacaacccg tcactgaagtcccgctgaccatctcggtggatacctccaagaaccagttcagcctgaagtgt tcctccgtgactgccgcgcgacactgccgtgtactactgcgcgagggtcggtgagacacagcg atggctcagatttggggacagggcaccatggctactgtgtcctccggggatggaggctccggg ggcggaggatctggtggcggggggtcgaaacttcattgtgaccagccacactccgtgtcgga agcccaggaaagaccgtcaccatcccttgactggaagcagcgggtcggttcgcatcaagctac gtgcagtgggtaccagcaagaccggcagcgtccggccaccgtcatctatgaggacaatcag cgccgtccggcgtgccggaccgcttcagcggatcggtggactcatcctcaaactccgcctcc ctgacgatttccggtctgaaaaccgaggaagcgaagccgtctactactgccagtcgtacgatggc gccacttgggtgtttggaggaggcaccagctgaccgtgtgaccactacccagcaccgagg ccaccaccccggtcctaccatcgccctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtaga cccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatattacatttgg gcccctctggctggtacttgccgggtcctgctgctttactcgtgatcactctttactgtaa cgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcagaggcctgtgcagactact caagaggaggacggctgttcattgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgc gtgaaattcagccgagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaac gaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacca gaaatgggcgggaagccgcgagaaagaatccccagaggcctgtacaacgagctccaaaag gataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaagggc cacgacggactgtaccaggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatg caggccctgccgcctcgg

10

20

30

【表 6 - 3 8】

CAR22-14 scFv AA	280	qvqlvqsgaevkpkpgasvkvscasgytftsyymhwvrqapggglewmgiinpsggstsyaqk fqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycardldvslldiwgqgtmvtvssggggsgggg sggggsqsaltqpasvsgspggsitiscsgtssdvgyynsvswyqypgkapklmiydvnnrp sgvssrfsgsksgntasltisglqaedeaddyccsytsstlffgagtkvtvl
CAR22-14 scFv NT	281	caagtgcacttgtccagagcggagcagaagtcaagaaaccaggagcaagcgtgaaggtgtcc tgcaaagcgtcaggctacactttcacctcctactatatgcactgggtccgccaggccctgga caaggcctggaatggatgggtatcatcaaccggtccgggtggaagcaccagctacgcccagaag tttcagggaagagtgaccatgactcgggacacttcaacctcgacggtgtacatggagctgtcc tcctcggtcgaggacaccggtgtactactgcgcgagggatctcgatgtgtccctggac atttggggacagggcaccatggtcaccgtgtcctccggggggggcggtcaggcggcgagggt tcagggggcgggggtcccagtcgcgctgactcagccggttagcgtgtccggtcgcgggga cagagcattaccatctcgtgctcgggtaccagctccgacgtgggaggtataactccgtgtcc tggtaccagcagtaccccgaaaggccccaagctgatgatctacgacgtgaacaatcgccct tctgggtgtcctctcggttctccgggtcaaagagcggaaacaccgcctccctgaccatctcg ggactccaagctgaggatgaagccgactactactgttcgagctacacctcctcctccactctc ttcttcggtgccggaactaaggtcacagtgttg
CAR22-14 可溶性 s cFV NT	282	atggccctccctgtcaccgcctgtcgttccgctggctcttctgctccacgccgtcggccc caagtgcacttgtccagagcggagcagaagtcaagaaaccaggagcaagcgtgaaggtgtcc tgcaaagcgtcaggctacactttcacctcctactatatgcactgggtccgccaggccctgga caaggcctggaatggatgggtatcatcaaccggtccgggtggaagcaccagctacgcccagaag tttcagggaagagtgaccatgactcgggacacttcaacctcgacggtgtacatggagctgtcc tcctcggtcgaggacaccggtgtactactgcgcgagggatctcgatgtgtccctggac atttggggacagggcaccatggtcaccgtgtcctccggggggggcggtcaggcggcgagggt tcagggggcgggggtcccagtcgcgctgactcagccggttagcgtgtccggtcgcgggga cagagcattaccatctcgtgctcgggtaccagctccgacgtgggaggtataactccgtgtcc tggtaccagcagtaccccgaaaggccccaagctgatgatctacgacgtgaacaatcgccct tctgggtgtcctctcggttctccgggtcaaagagcggaaacaccgcctccctgaccatctcg ggactccaagctgaggatgaagccgactactactgttcgagctacacctcctcctccactctc ttcttcggtgccggaactaaggtcacagtgttg
CAR22-14 可溶性 s cFV AA	283	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkpkpgasvkvscasgytftsyymhwvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycardldvsl iwgqgtmvtvssggggsgggsggggsqsaltqpasvsgspggsitiscsgtssdvgyynsvs wyqypgkapklmiydvnnrpsgvssrfsgsksgntasltisglqaedeaddyccsytsstl ffgagtkvtvlqshhhhhhhh

10

20

30

【表 6 - 3 9】

CAR22-14 完全 AA	284	malpvtallllplallllhaarpqvqlvqsgaevkkgasvkvscasgytftsyyhmhwvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfgrvtmtrdtststvmelsslrstedtavyyccardldvsld iwgggtmvtvssgggsgggsgggsgsaltqpasvsgspgqsitiscsgtssdvgyynsvs wyqqypgkapklmiydvnnrpsgvssrfsgsksgntasltisglqaeadedyccssytsstl ffgagtkvtvlttppaprptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwapl agtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfeeeggcclrvkf srsadapaykqqgnqlynelnlgrreeydvldkrgrdpemggkprkrnpqeglynelqkdkm aeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtaldhmqalppr
CAR22-14 完全 N T	285	atggccctccctgtcaccgcctgtcgtcttcgctggctcttctgctccacgccgtcgccc caagtgaacttgtccagagcggagcagaagtcaagaaaccaggagcaagcgtgaaggtgtcc tgcaaagcgtcaggctacactttcacctcctactatatgactgggtccgccaggccctgga caaggcctggaatggatgggtatcatcaaccgcgtccgggtggaagcaccagctacgccagaag tttcagggaagagtgaccatgactcgggacacttcaacctcgacggtgtacatggagctgtcc tccctgcggtcggaggacaccgcgtgtactactgcgcgagggtatctcgatgtgtccctggac atttggggacagggcaccatggtcaccgtgtcctccggggggggcggtatcaggcggcgagggt tcagggggcgggggtcccagtcgcgctgactcagccggttagcgtgtccggtcgcgggga cagagcattaccatctcgtgctcgggtaccagctccgacgtgggaggctataactccgtgtcc tggtaccagcagtaccccgaaaggccccaagctgatgatctacgacgtgaacaatcgccct tctggggtgtcctctcgggttctccgggtcaaagagcggaaacaccgcctccctgaccatctcg ggactccaagctgaggatgaagccgactactactgttcgagctacacctcctcctccactctc ttcttcggtgcccgaactaaggtcacagtgttgaccactacccagcaccgagggcaccacc ccggctcctaccatcgctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagct gggtggggcgtgcatacccggttcttgacttcgcctgcgatctacatttgggcccctctg gctggtacttgcggggtcctgctgtcttcaactcgtgatcactcttactgtaagcgcggtcgg aagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggag gacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggtgcgaactgcgctgaaattc agccgcagcgcagatgtccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaat cttggtcggagagaggagtacgacgtgtggacaagcggagaggacgggaccagaaatgggc gggaagccgcgcagaaagaatcccaagaggcctgtacaacgagctccaaaggataagatg gcagaagcctatagcgagattgggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacgga ctgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctg ccgcctcgg

10

20

30

【表 6 - 4 0】

CAR22-15 scFv AA	286	evqlvesggglvqpqgslrlscaasgftfssyamhwvrqapgkleyvsaisnnggstyyans vkdrftisrdnskntlylqmgsraedmavyyicarvhssgyyhpqndywgqgtlvtvssggg gsgggsgggsseltqdpavsalgqtvritcggdslrtyyatwyqqkpgqapvlvfyden nrpsgipdrfsgsssgntasltitgtqaedeaddyccssrdssgnpscvfgggtklvtl
CAR22-15 scFv NT	287	gaagtgcagttggtggagagcggaggacttgtgcaacctggaggatcattgagactgtcg tgtgcggcctccggctttaccttctcgtcctacgctatgcattgggtccgccaggccccggg aaaggactcgaatacgtcagcgccatctcctcaaacgggggatcaacctactacgccaattcc gtgaaggatcggttcaccatctccgggataacagcaagaacaccctgtatctgcaaatgggg tccttgagggcagaggacatggcgtctactactgcgcgcgctgcacagctctggatactac caccctggaccgaacgattactggggccaggcactctcgtgaccgtgtcctcggggggtggt ggaagcggcggcggaggatcggggggagcggctcctcgagcgaactgacacaggaccctgcc gtgtccgtggctctgggtcagactgtgcgcatcagtggtcaaggagactcctgagaacttat tacgcgacctggtaccagcagaagcgggacaggcaccggtgctggtgttctacgacgaaaac aaccggccatccgggattcccgaccggttctccggtcatcgagcggcaacactgcctccctg accatcaccgggaccaggccgaggacgagccgattactactgctcctcgcgggactcctcc ggcaaccctcctgcgtgttcggcgggtggaaccaagctgactgtcctc
CAR22-15 可溶性 s cFV NT	288	atggccctccctgtcaccgcctcgtgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccc gaagtgcagttggtggagagcggaggacttgtgcaacctggaggatcattgagactgtcg tgtgcggcctccggctttaccttctcgtcctacgctatgcattgggtccgccaggccccggg aaaggactcgaatacgtcagcgccatctcctcaaacgggggatcaacctactacgccaattcc gtgaaggatcggttcaccatctccgggataacagcaagaacaccctgtatctgcaaatgggg tccttgagggcagaggacatggcgtctactactgcgcgcgctgcacagctctggatactac caccctggaccgaacgattactggggccaggcactctcgtgaccgtgtcctcggggggtggt ggaagcggcggcggaggatcggggggagcggctcctcgagcgaactgacacaggaccctgcc gtgtccgtggctctgggtcagactgtgcgcatcagtggtcaaggagactcctgagaacttat tacgcgacctggtaccagcagaagcgggacaggcaccggtgctggtgttctacgacgaaaac aaccggccatccgggattcccgaccggttctccggtcatcgagcggcaacactgcctccctg accatcaccgggaccaggccgaggacgagccgattactactgctcctcgcgggactcctcc ggcaaccctcctgcgtgttcggcgggtggaaccaagctgactgtcctcgatcgaccaccat caccatcatcatcac

10

20

30

【表 6 - 4 1】

CAR22-15 可溶性 s cFV AA	289	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvqpqgslrlscaasgftfssyamhwvrqapg kleyvsaisnnggstyyansvkdrftisrdnskntlylqmgsraedmavyyicarvhssgyy hpgpndywgqgtlvtvssgggsgggsgggsseltqdpavsalgqtvritcggdslrty yatwyqqkpgqapvlvfydennrpsgipdrfsgsssgntasltitgtqaedeaddyccssrdss gnpscvfgggtklvtlqshhhhhhhh
CAR22-15 完全 AA	290	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvqpqgslrlscaasgftfssyamhwvrqapg kleyvsaisnnggstyyansvkdrftisrdnskntlylqmgsraedmavyyicarvhssgyy hpgpndywgqgtlvtvssgggsgggsgggsseltqdpavsalgqtvritcggdslrty yatwyqqkpgqapvlvfydennrpsgipdrfsgsssgntasltitgtqaedeaddyccssrdss gnpscvfgggtklvtlttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrglfdacdiy iwaplagtcgvlslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfeeeggce lrvkfsrsadapaykqqnqlynelnlgrreedyvldkrgrdpemggkprkrnpqeglynel qkdkmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatktdtydalhmqalppr

40

【表 6 - 4 2】

CAR22-15 完全 N T	291	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccc gaagtgcagttggtggagagcggaggacttgtgcaacctggaggatcattgagactgtcg tgtgcggcctccggctttaccttctcgtcctacgctatgcattgggtccgccaggccccggg aaaggactcgaatacgtcagcgccatctcctcaacgggggatcaacctactacgccaattcc gtgaaggatcgggttcaccatctcccgggataacagcaagaacaccctgtatctgcaaatggg tccctgagggcagaggacatggcgtctactactgcgcgcgctgtcacagctctggatactac caccctggaccgaacgattactggggccagggcactctcgtgaccgtgtcctcggggggtggt ggaagcggcgcgaggatcggggggaggcggctcctcgagcgaactgacacaggaccctgcc gtgtccgtggctctgggtcagactgtgcgcattacgtgtcaaggagactccctgagaacttat tacgcgacctggtaccagcagaagccgggacaggcaccggtgctggtgttctacgacgaaaac aaccggccatccgggattcccagccggttctccggtcatcgagcggcaacactgcctccctg accatcaccgggacccaggccgaggacaggccgattactactgtcctcggggactcctcc ggcaacccctcctgctgttcggcgggtggaaccaagctgactgtcctcaccactaccccagca ccgaggccacccaccccggtcctaccatcgctcctccagcctctgtccctgcgtccggaggca tgtagaccgcagctggtggggccgtgcataccggggtcttgacttcgctgcgatatctac atttgggcccctctggtggtacttgccgggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttac tgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcagaggcctgtgcag actactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaa ctgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgtccagcctacaagcaggggcagaaccagctc tacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgg gaccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccaagaggcctgtacaacgagctc caaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggc aaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctctt cacatgcaggccctgccgctcgg
CAR22-16 scFv AA	292	evqlvesgaevkpgasvkvscasgytftsyymhwvrqapggglewmgiinpsggstsyak fqgrvtmtrdtststaymelsslrstedtavyycareagvvavdywgggtlvtvssggggsgg gsggggsqsaltqpasvsgspggsitistgtssdvgyynyvswyqqhpgkapklmiydvsnr psgvsnrfsqsksgntasltisglqaedeadyycssytsstwvfgggtkltl

10

20

30

【表 6 - 4 3】

CAR22-16 scFv NT	293	gaagtgaactcgtcgaatctggagcggaagtcaagaagcctggagcaagcgtgaaagtgtcc tgtaaagcgtccggttacaccttcacttcgtattacatgactgggtccgccaagctccggga cagggactggaatggatgggcatcatcaaccctagcggaggatcgacctcctacgccccaaaag ttccagggcagagtgaccatgacccgggacaccagcacatcaactgcctacatggagctgtca tactgaggtccgaggataaccgccgtgtactattgcgcccgagggccggcgtggtggccgtc gactactggggacagggcactctcgtgaccgtgtcatcgggaggcggcggttccgggggggga gggtcggggggcgaggtcccagtcgcactgacgcagccggcttccgtgtctggttcgccc ggacagtccatcaccatttctcgtcactggaaccagcagcgacgtggcggttacaactacgtg tcatggtaccagcagcatcccggaaaggccccaaagcttatgatctacgacgtgtccaatcgg ccgtcgggcgtcagcaaccggttctccggtccaagtccgggaactgccagcctgaccatt agcgggctgcaggccgaggacgaagcggattactactgctcctcctacacttctcctcgacc tgggtgtttggtggaggcaccaagttgactgtgctg
CAR22-16 可溶性 s cFV NT	294	atggccctcctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgtcggccc gaagtgaactcgtcgaatctggagcggaagtcaagaagcctggagcaagcgtgaaagtgtcc tgtaaagcgtccggttacaccttcacttcgtattacatgactgggtccgccaagctccggga cagggactggaatggatgggcatcatcaaccctagcggaggatcgacctcctacgccccaaaag ttccagggcagagtgaccatgacccgggacaccagcacatcaactgcctacatggagctgtca tactgaggtccgaggataaccgccgtgtactattgcgcccgagggccggcgtggtggccgtc gactactggggacagggcactctcgtgaccgtgtcatcgggaggcggcggttccgggggggga gggtcggggggcgaggtcccagtcgcactgacgcagccggcttccgtgtctggttcgccc ggacagtccatcaccatttctcgtcactggaaccagcagcgacgtggcggttacaactacgtg tcatggtaccagcagcatcccggaaaggccccaaagcttatgatctacgacgtgtccaatcgg ccgtcgggcgtcagcaaccggttctccggtccaagtccgggaactgccagcctgaccatt agcgggctgcaggccgaggacgaagcggattactactgctcctcctacacttctcctcgacc tgggtgtttggtggaggcaccaagttgactgtgctgggatcgcaccaccatcaccatcatcat cac
CAR22-16 可溶性 s cFV AA	295	malpvtalllplalllhaarpevqlvesgaevkkgasvkvsckasgytftsyyhmwvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqrvtmtrdtststaymelsslrstedavyycareagvvav dywqggtlvtvssgggsgggsgggsgsaltqpasvsgspgqsitistgtssdvgyynyv swyqghpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeaddyccsytsst wvfgggtklvtlgshhhhhhh

10

20

30

【表 6 - 4 4】

CAR22-16 完全 AA	296	malpvtallllplalllhaarpevqlvesgaevkkgasvkvscasgytftsyyhmwvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststaymelsslrstedtavyyicareagvvav dywgqgtlvtvssggsgsgsgsgsgsgsaltqpasvsgspggsitistgtssdvqgynyv swyqghpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeaddyccssytsst wvfgggtklvtlttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrglldfacdiyiwap lagtcgvlllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttgeedgcscrpfpeeeeggcelrvk fsrsadapaykqqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdk maeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
CAR22-16 完全 N T	297	atggccctccctgtcaccgcctgtcgtctccgctggctcttctgctccacgccgtcgccc gaagtgaactcgtcgaatctggagcgaagtcaagaagcctggagcaagcgtgaaagtgtcc tgtaaagcgtccggttacaccttcacttcgtattacatgactgggtccgcaagctccggga cagggactggaatggatgggcatcatcaaccctagcggaggatcgacctcctacgccaaaaag ttccagggcagagtgacctgacctgggacaccagcacatcaactgcctacatggagctgtca tactgaggtccgaggataccgcgtgtactattgcgcccgagagccggcgtgggtggcgtc gactactggggacagggcactctcgtgacctgtcatcgggagggcgcggttccgggggggga gggtcggggggcgaggtcccagtcgcactgacgcagccggcttccgtgtctggttcgccc ggacagtccatcaccatttcctgcactggaaccagcagcagcgtggcggttacaactacgtg tcatggtaccagcagcatcccgaaagcccaaaagcttatgatctacgactgtccaatcgg ccgtcggcgctcagcaaccggttctccggtcccaagtcgggaacactgccagcctgaccatt agcgggctgcaggccgaggacgaagcggttactactgctcctcctacacttctcctcgacc tgggtgtttggtggaggcaccaagttgactgtgctgacctacccagcaccgagggccacc accccggtcctaccatcgctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgca gctggtggggcgtgcataccggggtcttgacttcgctgcgatctacatttgggccct ctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcggt cggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagag gaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggtgcgaactgcgcgtgaaa ttcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactc aatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcgagaggacgggaccagaaatg ggcggaagccgcgcagaaagaatcccaagaggcctgtacaacgagctccaaaaggataag atggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaggccacgac ggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggcc ctgccgctcgg

10

20

30

【表 6 - 4 5】

CAR22-17 scFv AA	298	qvqlvqsgggvvqpgrslrlscaasgftfssyamswvrqapgkglewvsaisgsggstyyads vkgrftisrdnskntlylqmnsraedtavyycakeplfgvveedvdywgqgtlvtvssgggg sgggsggggsdvmtqspplsplvtppgepasiscrsssqslagngnyldwylqkpgqspqll iylgsnrasgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycmqalqnppltfggggtkleikr
CAR22-17 scFv NT	299	caagtgcagttggtccagagcggaggaggagtggtgcaacccggaagatcattgaggtctca tgtgtgcaagcggattcaccttctcgagctacgcaatgtcctgggtgcccaggccctgga aagggactggaatgggtgtccgccatctcgggctccggcggatcaacgtactacgccgactcc gtgaaggccgctttactatttcaagagacaactccaagaacactctgtacctccaaatgaac tctctgcgggccgaggacaccgctgtactactgcggaaggagccgctgttcggcggtggtg gaggaagatgtggactactggggccaggcactctcgtaaccgtgtcctccggcgggtggagga tcgggagggcggaggcagcgggggtggtggtcgcagctcgatgacccagtcgcccctgtcc ctgcccgtgaccctggggaaccggcctccatttctgcccgtccagccagtcgctgctggct ggaaacggacacaattaccttgattggtatctgcaaaagcctgggcagtcaccgcagctgctg atctacctcggaagcaaccgggctccgggggtgcccggaccggttctccgggtccgggagcggc accgacttcaccctgaaaatctcgagggtggaggccgaagatgtcgagtgactattgcatg caggcgcttcagaaccactcactttcgggggcggtactaagctggaaatcaagcgc
CAR22-17 可溶性 s cFV NT	300	atggccctccctgtcacgcctctgtgcttccgctggctcttctgtctccacgccgctcggccc caagtgcagttggtccagagcggaggaggagtggtgcaacccggaagatcattgaggtctca tgtgtgcaagcggattcaccttctcgagctacgcaatgtcctgggtgcccaggccctgga aagggactggaatgggtgtccgccatctcgggctccggcggatcaacgtactacgccgactcc gtgaaggccgctttactatttcaagagacaactccaagaacactctgtacctccaaatgaac tctctgcgggccgaggacaccgctgtactactgcggaaggagccgctgttcggcggtggtg gaggaagatgtggactactggggccaggcactctcgtaaccgtgtcctccggcgggtggagga tcgggagggcggaggcagcgggggtggtggtcgcagctcgatgacccagtcgcccctgtcc ctgcccgtgaccctggggaaccggcctccatttctgcccgtccagccagtcgctgctggct ggaaacggacacaattaccttgattggtatctgcaaaagcctgggcagtcaccgcagctgctg atctacctcggaagcaaccgggctccgggggtgcccggaccggttctccgggtccgggagcggc accgacttcaccctgaaaatctcgagggtggaggccgaagatgtcgagtgactattgcatg caggcgcttcagaaccactcactttcgggggcggtactaagctggaaatcaagcgcggatcg caccaccatcaccatcatcatcac

10

20

30

【表 6 - 4 6】

CAR22-17 可溶性 s cFV AA	301	malpvtalllplalllhaarqvqlvqsgggvvqpgrslrlscaasgftfssyamswvrqapg kglewvsaisgsggstyyadsvkgrftisrdnskntlylqmnsraedtavyycakeplfgvv eedvdywgqgtlvtvssggggsgggsggggsdvmtqspplsplvtppgepasiscrsssqsla gngnyldwylqkpgqspqlliylgsnrasgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycm qalqnppltfggggtkleikrgshhhhhhh
CAR22-17 完全 AA	302	malpvtalllplalllhaarqvqlvqsgggvvqpgrslrlscaasgftfssyamswvrqapg kglewvsaisgsggstyyadsvkgrftisrdnskntlylqmnsraedtavyycakeplfgvv eedvdywgqgtlvtvssggggsgggsggggsdvmtqspplsplvtppgepasiscrsssqsla gngnyldwylqkpgqspqlliylgsnrasgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycm qalqnppltfggggtkleikrttpaprpptpaptiasqplsirpeacrpaaggavhtrgldfac diyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrpfpeeeeg gcelrvkfsrsadapaykqqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprkrnpqegly nelqdkmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr

40

【表 6 - 4 7】

CAR22-17 完全 N T	303	atggccctccctgtcaccgccctgtgtcttccgctggctcttctgtctccacgccgctcgcccc caagtgcagttggtccagagcggaggagtggtgcaacccggaagatcattgaggctctca tgtgtgtgcaagcggattcaccttctcgagctacgcaatgtcctgggtgcccaggccctgga aagggactggaatgggtgtccgccatctcgggctccggcggatcaacgtactacgccgactcc gtgaagggccgctttactatttcaagagacaactccaagaacactctgtacctccaaatgaac tctctgcgggccgaggacaccgccgtgtactactgcgcgaaggagccgctgttcggcgtggtg gaggaagatgtggactactggggccagggcactctcgtaaccgtgtcctccggcgggtggagga tcgggagggcggaggcagcgggggtggtggtcgcgactcgtgatgacccagtcgcccctgtcc ctgcccgtgacccctgggaaccggcctccatttctgcccgtccagccagtcgctgtgtggt ggaaacggacacaattaccttgattggtatctgcaaaagcctgggcagtcaccgcagctgtg atctacctcggaagcaaccgggcgtccggggtgccgaccggttctccggttccgggagcggc accgacttcaccctgaaaatctcgagggtggaggccgaagatgtcggagtgtactattgcatg caggcgcttcagaaccactcactttcgggggcggtactaagctggaaatcaagcgcaccact acccagcaccgaggccaccaccccggtcctaccatcgctccagcctctgtccctgctg ccggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgctgc gatatctacatttgggcccctctggtggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatc actctttactgtaagcgggtcggagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgagg cctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggc ggctgcgaactgcgctgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcag aaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgactgctggacaagcgg agaggacgggaccagaaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccaagaggccctgtac aacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgc agaagaggcaagggccacgagcgactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctat gacgctcttcacatgcagggcctgcccctcgg
CAR22-18 scFv AA	304	qvqlvqsgaevkpkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapggglewmgiinpsggstsyaqk fqgrvtmtrdtststvymelsslrstedtavyycargsgslgdafdiwgggtmvtvssgggsg ggsgggsgsaltqpasvsgspqgsitiscgsssdvgyynyvwyqhpqkapklmiyevs nrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeaddyccssytssstlvfgtgtkvtvl

10

20

30

【表 6 - 4 8】

CAR22-18 scFv NT	305	caagtccaactcgtccaaagcggagctgaagtcaagaagcctggagcgtcagtgaagtgtcc tgcaaggcctccggctacacgtttacttctactacatgcattgggtgaggcagggcccagggt caaggactggaatggatgggcatcattaacccttccgggggggtccacctcgtatgcgcagaag ttccagggcagagtgaccatgacccgcgacacctccacctccactgtgtacatggaactgtcc agcctgaggtctgaggacactgccgtgtactactgtgcgcgcggtagcggatcactgggcgat gccttcgacatctggggccagggaactatggtcaccgtgtcctccgggggagggggctcgggt ggaggaggttcaggcggaggaggtcccagagcgcattgacacagcccgttcgggtgtccggc tccccgggacagtccattaccatctcgtgcaccggaagctcaagcgatgtcggaggggtacaac tacgtgtcgtggtatcagcagcaccgggaaaggccccaagctcatgatctacgaagtgtcc aatcgccgtccgggggtgtcgaaccggttcagcgggtccaagtcgggcaacactgccagcctg accatcagcgggtgcaggccgaggacgagccgactactactgtcctcgtacacctcctcc tcaaccctggtgttcggcactggaactaagggtcaccgtgctt	10
CAR22-18 可溶性 s cFV NT	306	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgtctccacgccgtcggccc caagtccaactcgtccaaagcggagctgaagtcaagaagcctggagcgtcagtgaagtgtcc tgcaaggcctccggctacacgtttacttctactacatgcattgggtgaggcagggcccagggt caaggactggaatggatgggcatcattaacccttccgggggggtccacctcgtatgcgcagaag ttccagggcagagtgaccatgacccgcgacacctccacctccactgtgtacatggaactgtcc agcctgaggtctgaggacactgccgtgtactactgtgcgcgcggtagcggatcactgggcgat gccttcgacatctggggccagggaactatggtcaccgtgtcctccgggggagggggctcgggt ggaggaggttcaggcggaggaggtcccagagcgcattgacacagcccgttcgggtgtccggc tccccgggacagtccattaccatctcgtgcaccggaagctcaagcgatgtcggaggggtacaac tacgtgtcgtggtatcagcagcaccgggaaaggccccaagctcatgatctacgaagtgtcc aatcgccgtccgggggtgtcgaaccggttcagcgggtccaagtcgggcaacactgccagcctg accatcagcgggtgcaggccgaggacgagccgactactactgtcctcgtacacctcctcc tcaaccctggtgttcggcactggaactaagggtcaccgtgcttggatcgcaccaccatcaccat catcatcac	20
CAR22-18 可溶性 s cFV AA	307	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkgasvkvsckasgytftsyyhmhwvrqapg qglewmgiinpsggstsyakfkqgrvtmtrdtststvymelsslrsestavyycargsgslgd afdiwgqgtmtvssggggsgggsgggsgsalsaltqpasvsgspgqsitistgsssdvggyn yvswwqghpgkapklmiyevsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeaddyccsyts stlvfgtgtkvtvlgshhhhhhhh	30

【表 6 - 4 9】

CAR22-18 完全 AA	308	malpvtallllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkgasvkvscasgytftsyyhmwvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqqrvmttrdtststvmelsslrstedtavyyccargsgslgd afdiwqgqtmvtvssggggsgggsgggsgsaltqpasvsgspggsitistgsssdvggyn yvswwqghpgkapklmiyevsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeaddyccssytss stlvfgtgktvtvlttppaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrglldfacdiyiw aplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrvpvtqteedgcscrfeeeeeggcclr vkfsrsadapaykqggnqlynelnlgrreedydldkrrgrdpemggkprkrnpqeglynelqk dkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
CAR22-18 完全 N T	309	atggccctccctgtcaccgcctgtcgtctccgctggctcttctgctccacgccgctcgcccc caagtccaactcgtccaaagcggagctgaagtcaagaagcctggagcgtcagtgaaagtgtcc tgcaaggcctccggtacacgtttacttccactacatgcattgggtgaggcaggccccaggt caaggactggaatggatgggcatcattaacccttccggggggtccacctcgatgcgcagaag ttccagggcagagtgaccatgacccgcgacacctccacctccactgtgtacatggaactgtcc agcctgaggtctgaggacactgccgtgtactactgtgcgcgaggtagcggtcactggcgat gccttcgacatctggggccagggaactatggtcaccgtgtcctccgggggagggggctcggt ggaggaggttcaggcggaggaggtcccagagcgattgacacagcccgttcggtgtccggc tccccgggacagtccattaccatctcgtgcaccggaagctcaagcgatgtcgagggtacaac tacgtgtcgtggtatcagcagacccgggaaagcccccaagctcatgatctacgaagtgtcc aatcgccgtccgggtgtcgaaccggttcagcggttccaagtcgggcaacactgccagcctg accatcagcgggtgcaggccgaggacgaggccgactactactgctcctcgtaacctcctcc tcaaccctggtgttcggcactggaactaaggtcaccgtgttaccactacccagcaccgagg ccaccacccccggtcctaccatcgccctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtaga cccgagctggtggggccgtgcatacccggtcttgacttcgctgcgatctacatttgg gcccctctggtggtacttgcggtgctctgctgttctactcgtgatcactcttactgtgaag cgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcagaggcctgtgcagactact caagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggtgcgaactgcgc gtgaaattcagccgagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaac gaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacca gaaatggcggggaagccgcgagaaagaatccccagaggcctgtacaacgagctccaaaag gataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggc cacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatg caggccctgccgcctcgg

10

20

30

【表 6 - 5 0】

CAR22-19 scFv AA	310	qvqlvqsgaevkkgasvkvscasgytftsyyhmvrqapggglewmgiinpsggstsyaqk fqgrvtmtrdtststvmelsslrsedtavyycardgfgelsgafdiwgggtmvtvssggggs gggsgggsgsaltqpasvsgspggsitisctgtssdvgyynyvswyqqhpgkapklmiydv snrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeaddyccssyassstlvfgggtkvtvl
CAR22-19 scFv NT	311	caagtgcactcgtccagtcagggtgcagaagtcaagaaacccggagcctccgtgaaagtgtcc tgcaaggcctccggctacacgttcaacttcatactacatgcactgggtccgccaggcgcccgga cagggactggagtgagtgaggcatcatcaacccttccggcggtcgacctcctacgccaaaaag ttccagggaagagtgacaatgaccagggatacttcaaccagcactgtctacatggaactgtct agcttgcgggtccgaggacactgccgtgtactattgcgctcgggacgggttccggggagctgtcc ggggcctttgacatctggggccaggggactatggtgaccgtgtcctcgggaggagcgccagc ggaggaggaggttcgggaggcgagggaagccagtcagcactgaccagccagcctcgggtgtcc gggagcccgggcccagagcatcactatttctgtaccgggacctcctccgacgtgggagggtac aattacgtgtcatggtatcaacagcatccgggaaggcgccgaagctgatgatctacgacgtg tcgaaccgccctagcggagtggtccaaccgggttctccggttcgaagtcgggaacaccgcgagc ctgaccattagcggactccaggccgaggatgaagccgactactactgtcctcctacgttca tcgtccaccctggtgttcgggtggtggcaccaaggtcaccgtgctt
CAR22-19 可溶性 s cFV NT	312	atggccctccctgtcaccgcctctgtgcttccgctgggtcttctgtctccacgccgctcggccc caagtgcactcgtccagtcagggtgcagaagtcaagaaacccggagcctccgtgaaagtgtcc tgcaaggcctccggctacacgttcaacttcatactacatgcactgggtccgccaggcgcccgga cagggactggagtgagtgaggcatcatcaacccttccggcggtcgacctcctacgccaaaaag ttccagggaagagtgacaatgaccagggatacttcaaccagcactgtctacatggaactgtct agcttgcgggtccgaggacactgccgtgtactattgcgctcgggacgggttccggggagctgtcc ggggcctttgacatctggggccaggggactatggtgaccgtgtcctcgggaggagcgccagc ggaggaggaggttcgggaggcgagggaagccagtcagcactgaccagccagcctcgggtgtcc gggagcccgggcccagagcatcactatttctgtaccgggacctcctccgacgtgggagggtac aattacgtgtcatggtatcaacagcatccgggaaggcgccgaagctgatgatctacgacgtg tcgaaccgccctagcggagtggtccaaccgggttctccggttcgaagtcgggaacaccgcgagc ctgaccattagcggactccaggccgaggatgaagccgactactactgtcctcctacgttca tcgtccaccctggtgttcgggtggtggcaccaaggtcaccgtgcttggatcgaccaccatcac catcatcatcac

10

20

30

【表 6 - 5 1】

CAR22-19 可溶性 s cFV AA	313	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkgasvkvscasgytftsyyhmvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqqgrvtmtrdtststvmelsslrsedtavyycardgfgels gafdiwgggtmvtvssgggsgggsgggsgggsgsaltqpasvsgspggsitisctgtssdvgy nyvswyqqhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeaddyccssyas sstlvfgggtkvtvlqshhhhhhhh
CAR22-19 完全 AA	314	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkgasvkvscasgytftsyyhmvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqqgrvtmtrdtststvmelsslrsedtavyycardgfgels gafdiwgggtmvtvssgggsgggsgggsgggsgsaltqpasvsgspggsitisctgtssdvgy nyvswyqqhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeaddyccssyas sstlvfgggtkvtvltttpprptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrglfacdiyi waplagtcgvlslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfeeeeeggcel rvkfsrsadapaykqqnqllynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprnknpqeglynelq kdkmaeyseigmgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr

40

【表 6 - 5 2】

CAR22-19 完全 N T	315	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccc caagtgaactcgtccagtcagggtgcagaagtcagaaacccggagcctccgtgaaagtgtcc tgcaaggcctccggctacacgttcacttcatactacatgactgggtccgccaggcgcccgga cagggactggagtggatgggcatcatcaacccttccggcggtctgacctctacgccaaaag ttccagggaagagtgacaatgaccagggatacttcaaccagcactgtctacatggaactgtct agcttgcgggtccgaggacactgccgtgtactattgcgctcgggacggtttcggggagctgtcc ggggcctttgacatctggggccaggggactatggtgaccgtgtcctcgggcggaggcggcagc ggaggaggaggttcgggaggcgagggaagccagtcagcactgaccagccagcctcggtgtcc gggagcccgccagagcatcactatctctgtaccgggacctctccgacgtgggagggtac aattacgtgtcatggtatcaacagcatccgggaaggcgccaagctgatgatctacgacgtg tcgaaccgccctagcggagtgtccaaccggttctccggttcgaagtcgggaacaccgcgagc ctgaccattagcggactccaggccgaggatgaagccgactactactgctcctctacgcttca tcgtccaccctggtgttcggtggtggaccaaggtcaccgtgcttaccactacccagcaccg aggccacccaccccggtcctaccatcgctccagcctctgtcctgcgtccggaggcatgt agaccgcagctggtggggcctgcataccggggtcttgacttcgctgcgatatctacatt tgggccctctggtggtacttgccgggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgt aagcgcggtcggagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgagcctgtgcagact actcaaggaggagcggctgttcatgccggttccagaggaggaggaaggcggtgcgaactg cgctgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctac aacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcgagaggacgggac ccagaaatggcggggaagccgcgcagaaagaatcccaagaggcctgtacaacgagctccaa aaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaa ggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcac atgcaggccctgccgcctcgg
CAR22-20 scFv AA	316	evqlvesgaevkpkpgasvkvsckasgytftsyyhmhwrqapggglewmgiinpsggstsyaqk fqgrvtmtrdtststvymelsslrstedtavyycargpiggscldywgqgtltvtvssggg sgggsgggsgsaltqpavysgspggsitistgtnsdvgrnyvswyqqhpgkapklmiye vsyrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyyccsyttstldfgtgtkvtvl

10

20

30

【表 6 - 5 3】

CAR22-20 scFv NT	317	gaagtgcaactcgtcgaatcaggagcagaagtcaagaaaccaggagcctccgtgaaagtcagc tgcaaggcctcgggtacactttcacttcctactacatgcattgggtgcccaggccccgggc cagggactggaatggatgggcatcatcaatccctcgggaggttccactagctacgcgcagaag ttccaggaagagtgaccatgaccagagacacctcgacttcgacgggtgtacatggagctgagc tcctgaggagcaggacactgccgtgtactactgcgccggggcccgatcggtgcagcggg gggtcctgtctcgattactggggccagggcacactcgtgaccgtgtccagcgggggcggtggt agcggaggaggggatcgggcggtggaggatcgagtcgccctgacccaaccggcgtagctg tctggatcaccggacagtccattaccatctcctgcaccggaaccaactcggacgtggccgc tacaactacgtgtcatggtaccagcagcaccgggaaggctcctaagctgatgatctacgag gtgtcctatcgccctagcgggtgtcagcaaccggttctccggctccaagtccggcaacactgct tccttaccatttccgggttgcaagccgaggacgagggcgattactactgttctctctatacc acttcatccaccctggactttggaaccggcaccaagggtcaccgtgctg	10
CAR22-20 可溶性 s cFV NT	318	atggccctcctgtcaccgccctgctgcttccgctgggtcttctgctccacgccgtcggccc gaagtgcaactcgtcgaatcaggagcagaagtcaagaaaccaggagcctccgtgaaagtcagc tgcaaggcctcgggtacactttcacttcctactacatgcattgggtgcccaggccccgggc cagggactggaatggatgggcatcatcaatccctcgggaggttccactagctacgcgcagaag ttccaggaagagtgaccatgaccagagacacctcgacttcgacgggtgtacatggagctgagc tcctgaggagcaggacactgccgtgtactactgcgccggggcccgatcggtgcagcggg gggtcctgtctcgattactggggccagggcacactcgtgaccgtgtccagcgggggcggtggt agcggaggaggggatcgggcggtggaggatcgagtcgccctgacccaaccggcgtagctg tctggatcaccggacagtccattaccatctcctgcaccggaaccaactcggacgtggccgc tacaactacgtgtcatggtaccagcagcaccgggaaggctcctaagctgatgatctacgag gtgtcctatcgccctagcgggtgtcagcaaccggttctccggctccaagtccggcaacactgct tccttaccatttccgggttgcaagccgaggacgagggcgattactactgttctctctatacc acttcatccaccctggactttggaaccggcaccaagggtcaccgtgctgggatcgaccacat caccatcatcatcac	20
CAR22-20 可溶性 s cFV AA	319	malpvtalllplalllhaarpevqlvesgaevkkgasvkvsckasgytftsyyhmwvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfgrvtmtrdtststvymelsslrse dtavyyccargpigcsg gscldywgggtlvtvssgggsgggsgggsgsaltqpayvsgspgqsitiscgtnsdvgr ynyvswyqqhpgkapklmiyevsyrpsgvsnrfsqsksgntasltisglqaeadyyccsy tsstldfgtgtkvtvlgshhhhhhhh	30

【表 6 - 5 4】

CAR22-20 完全 AA	320	malpvtallllplalllhaarpevqlvesgaevkkgasvkvscasgytftsyyhmhwvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqqrvmttrdtststvmelsslrstedtavyyccargpigcsq gscldywgggtlvtvssgggsgggsgggsgsalsaltqpayvsgspgqstisctgtnsdvgr ynyvswyqqhpgkapklmiyevsyrrpsgvsnrfsqsksgntasltisglqaedeaddyccsytt tsstldfgtgtkvlttppaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiy iwaplagtcgvlllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttgeedgcsrpfpeeeeggce lrvkfsrsadapaykqqgnqlynelnlgrreeydvldkrgrdpemggkprkrnpqeglynel qkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
CAR22-20 完全 N T	321	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcgcccc gaagtgaactcgtcgaatcaggagcagaagtcaagaaaccaggagcctccgtgaaagtgcgc tgcaaggcctcgggtacactttcacttccactacatgcattgggtgcgcaggccccgggc cagggactggaatggatgggcatcatcaatccctcgggaggttccactagctacgcgcagaag ttccagggaagagtaccatgaccagagacacctcgacttcgacggtgtacatggagctgagc tccctgaggagcaggacactgccgtgtactactgcgccccggggcccgatcggtatgcagcggg gggtcctgtctcgattactggggccagggcacactcgtgaccgtgtccagcggggcggtggt agcggaggagggggtcgggcggtggaggatcgagtcgccctgacccaaccggcgctacgtg tctggatcaccggacagtccattaccatctcctgcaccggaaccaactcgacgtgggccgc tacaactacgtgtcatggtaccagcagacccccgggaaggctcctaagctgatgatctacgag gtgtcctatcgccctagcgtgtcagcaaccggttctccggtccaagtcgggaacactgct tcccttaccatttccgggttgcaagccgaggacgaggccgattactactgttccctctatacc acttcatccaccctggactttggaaccggcaccaaggtcaccgtgctgaccactaccccagca ccgaggccaccaccccggtcctaccatcgccctcccagcctctgtccctgcgtccggaggca tgtagaccgcagctggtggggccgtgcataccggggtcttgacttcgctgcgatatctac atttgggcccctctggtggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttac tgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcag actactcaagaggaggacggtgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggtgcgaa ctgcgctgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctc tacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgg gacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagaggccgtgtacaacgagctc caaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggc aaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctctt cacatgcaggccctgcgcctcgg

10

20

30

【表 6 - 5 5】

CAR22-21 scFv AA	322	qvqlvqsgaevkpkpgasvkvscasgytftsyyhmvrqapggglewmgiinpsggstsyaqk fqgrvtmtrdtststvmelsslrstedtavyycargsygdygdafdiwgggttvtvssggggs gggsgsggsgsaltqpasvsgspggsitistgtssdvgykyvswyqqhpgkapklmiydv snrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeaddyccssytsstlvfvgggtkltlvl
CAR22-21 scFv NT	323	caagtgcactcgtccagtcagggtgcagaagtcaagaaacccggagcctccgtgaaagtgtcc tgcaaggcctcgggtacaccttcacctcctactacatgcactgggtgcgccagggcggggc cagggacttgagtggatgggtatcatcaaccggtccggcggaagcacctcgtacgccaaaaag tttcaggggagagtaccatgaccagggacacttcaaccagcaccgtgtacatggaactgtca agcttgcgctccgaggatactgctgtactactgctgcgggggagcgtacggagactacggc gacgctttcgatatctggggacagggcacaaccgtgaccgtgtcctccggcgagggggctcg ggcgaggaggctcaggttcggcgaggagccagtcgcactgactcagccagcgtccgtgagc ggtagccctgggcagctctatcacgatttcgtgcactggcacctcctccgacgtgggaggctat aagtacgtcagctggtaccaacagcatccgggaaaggcgctaagctgatgatctatgacgtc agcaaccggccctccggggtgtcaaaccggttcagcgggtccaagtcgggaaataccgcctcc ctgaccattagcgggctgcaggccgaagatgaggctgactactactgttcctcctacacttca tcgtccactctcgtgttcgggggaggaactaagctcaccgtgctg
CAR22-21 可溶性 s cFV NT	324	atggccctccctgtcacgcctcgtgcttcggctgcttctgtctccacgccgctcggccc caagtgcactcgtccagtcagggtgcagaagtcaagaaacccggagcctccgtgaaagtgtcc tgcaaggcctcgggtacaccttcacctcctactacatgcactgggtgcgccagggcggggc cagggacttgagtggatgggtatcatcaaccggtccggcggaagcacctcgtacgccaaaaag tttcaggggagagtaccatgaccagggacacttcaaccagcaccgtgtacatggaactgtca agcttgcgctccgaggatactgctgtactactgctgcgggggagcgtacggagactacggc gacgctttcgatatctggggacagggcacaaccgtgaccgtgtcctccggcgagggggctcg ggcgaggaggctcaggttcggcgaggagccagtcgcactgactcagccagcgtccgtgagc ggtagccctgggcagctctatcacgatttcgtgcactggcacctcctccgacgtgggaggctat aagtacgtcagctggtaccaacagcatccgggaaaggcgctaagctgatgatctatgacgtc agcaaccggccctccggggtgtcaaaccggttcagcgggtccaagtcgggaaataccgcctcc ctgaccattagcgggctgcaggccgaagatgaggctgactactactgttcctcctacacttca tcgtccactctcgtgttcgggggaggaactaagctcaccgtgctgggatcgaccaccatcac catcatcatcac

10

20

30

【表 6 - 5 6】

CAR22-21 可溶性 s cFV AA	325	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkpkpgasvkvscasgytftsyyhmvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvmelsslrstedtavyycargsygdyg dafdiwgggttvtvssgggsgggsgsgsgsaltqpasvsgspggsitistgtssdvgy kyvswyqqhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeaddyccssyts sstlvfvgggtkltlvlqshhhhhhhh
CAR22-21 完全 AA	326	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkpkpgasvkvscasgytftsyyhmvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvmelsslrstedtavyycargsygdyg dafdiwgggttvtvssgggsgggsgsgsgsaltqpasvsgspggsitistgtssdvgy kyvswyqqhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeaddyccssyts sstlvfvgggtkltlvlttpprptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrglfacdiyi waplagtcgvlslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttgeedgcscrpfeeeeggcel rvkfsrsadapaykqqnqllynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprnknpqeglynelq kdkmaeyseigmgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr

40

【表 6 - 5 7】

CAR22-21 完全 N T	327	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccc caagtgaactcgtccagtcagggtgcagaagtcagaaacccggagcctccgtgaaagtgtcc tgcaaggcctcgggtacaccttcacctcctactacatgactgggtgcccaggccggggc cagggacttgagtggatgggtatcatcaaccggtccggcgggaagcacctcgtacgccaaaag tttcaggggagagtgaccatgaccagggacacttcaaccagcaccgtgtacatggaactgtca agcttgcgctccgaggatactgccgtctactactgcgcccggggatcgtacggagactacggc gacgctttcgatatctggggacagggcacaaccgtgaccgtgtcctccggcggagggggctcg ggcggaggaggtcaggttccggcgggagccagtcgcgactgactcagccagcgtccgtgagc ggtagccctgggcagtcctatcacgatttcgtgactggcacctcctccgacgtgggaggctat aagtacgtcagctggtaccaacagcatccgggaaggcgctaagctgatgatctatgacgtc agcaaccggccctccggggtgtcaaaccggttcagcgggtccaagtcgggaaataccgcctcc ctgaccattagcgggtgcaggccgaagatgaggctgactactactgttctcctacacttca tcgtccactctcgtgttcgggggaggaactaagctcaccgtgtgaccactacccagcaccg aggccacccaccccggtcctaccatcgctccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgt agaccgcagctggtggggcgtgcatacccggttcttgacttcgctgcgatatctacatt tgggcccctctggtggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgt aagcgcgtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcagaggcctgtgcagact actcaaggaggagcggctgttcagtcgggttccagaggaggaggaaggcggtgcgaactg cgctgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctac aacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggac ccagaaatggcggggaagccgcgcagaaagaatcccaagaggcctgtacaacgagctccaa aaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaa ggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcac atgcaggccctgccgcctcgg
CAR22-22 scFv AA	328	evqlvesgaevkkgpssvkvscasggtfssyaaiswvrqapggglewmggiipifgtanyaqk fqgrvtitadeststaymelsslrstedtavyycardhkvvrfgywgggtlvtvssggggsggg gsggggshviltqppsasaslqasvklctclssghssyaiawhqqpekgprylmkvnsdgs skgdgipdrfsgstsgaeryltisslqsedeayycqtwgsgmaifgggtklvtl

10

20

30

【表 6 - 5 8】

CAR22-22 scFv NT	329	gaagtgaattggtggaatcaggcgagaaagtcagaaacccggaagcagcgtgaaagtgtcc tgcaaggcctcaggaggacacattctcgtcctatgccatttctggtccgccaggccccggga cagggcctggaatggatggcggaattatccctatcttcggaaccggaactacgccagaag tttcaggagcgcgtgaccatcactgccgatgaatcaacctccactgcgtacatggaactgtcc tcctcgaggagcagggacaccgccgtgtactactgcgcaaggatcataaggtcgtgcggttc ggatactggggacagggaaaccttgtgaccgtgtcctccggcggggggtccggcgagggg ggttccgggggaggcgatcgacgtgatcctgactcaaccacctcagcctccgcctctctg ggagccagcgtgaagctcacctgtactctgagctcgggacactcgtcgtacgccatcgcttg caccagcagcagccgagaagggcctagatacctgatgaaggtcaactccgacggttcgctg agcaagggcgacggcatcccgatcggttcagcggttcacgtccggcgaggagatacctc acaatctcctcgtccaatccgaggacagggctgactactactgccagacctggggtagcggc atggcgattttcgggggtggaactaagctgaccgtgctg	10
CAR22-22 可溶性 s cFV NT	330	atggccctcctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgcgctcgcccc gaagtgaattggtggaatcaggcgagaaagtcagaaacccggaagcagcgtgaaagtgtcc tgcaaggcctcaggaggacacattctcgtcctatgccatttctggtccgccaggccccggga cagggcctggaatggatggcggaattatccctatcttcggaaccggaactacgccagaag tttcaggagcgcgtgaccatcactgccgatgaatcaacctccactgcgtacatggaactgtcc tcctcgaggagcagggacaccgccgtgtactactgcgcaaggatcataaggtcgtgcggttc ggatactggggacagggaaaccttgtgaccgtgtcctccggcggggggtccggcgagggg ggttccgggggaggcgatcgacgtgatcctgactcaaccacctcagcctccgcctctctg ggagccagcgtgaagctcacctgtactctgagctcgggacactcgtcgtacgccatcgcttg caccagcagcagccgagaagggcctagatacctgatgaaggtcaactccgacggttcgctg agcaagggcgacggcatcccgatcggttcagcggttcacgtccggcgaggagatacctc acaatctcctcgtccaatccgaggacagggctgactactactgccagacctggggtagcggc atggcgattttcgggggtggaactaagctgaccgtgctgggatcgaccaccatcaccatcat catcac	20
CAR22-22 可溶性 s cFV AA	331	malpvtalllplalllhaarpevqlvesgaevkpgssvkvscasggtfssyaiswvrqapg qglewmggiipifgtanyaqkfgrvtitadeststaymelsslrsestavyycardhkvvrf gywgggtlvtvssgggsgggsggggshviltqppsasaslgaavklcttclssghssyiaiw hqqqpekpprylmkvnsdgslskgdgiipdrfsgstsgaeryltisslqsedeaddyccqtwgsg maifgggtklvtlgsghhhhhhh	30

【表 6 - 5 9】

CAR22-22 完全 AA	332	malpvtallllplallllhaarpevqlvesgaevkkgsssvkvsckasggtfssyaiswvrqapg qglewmggiipifgtanyaqkfqgrvtitadeststaymelsslrstedtavyyccardhkvvrf gywgggtlvtvssggsgggsgggsgggshviltqppsasaslgaavklctclssghssyiaiw hqqqpekgyprylmkvnsdgskskgdgiipdrfsgstsgaeryltisslqsedeaddyccqtwgsg maifgggtklvtlttpprptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwa plagtcgvlllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfeeeeeggcclrv kfsrsadapaykqggnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkd kmaeyseigmkgerrrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
CAR22-22 完全 N T	333	atggccctccctgtcaccgcctgtcgtctccgctggctcttctgctccacgccgctcgcccc gaagtgaattggtggaatcaggcgaggaagtcaagaaacccggaagcagcgtgaaagtgtcc tgcaaggcctcaggaggcaccttctcgtcctatgccatttctcgggtccgccaggccccggga cagggcctggaatggatggcggaattatccctatcttcggaaccgcgaactacgcccagaag tttcagggacgcgtgaccatcactgccgatgaatcaacctccactgcgtacatggaactgtcc tccctgcggagcgaggacaccgcctgtactactgcgcaagggatcataaggtcgtgcggttc ggatactggggacagggaacccttgtgaccgtgtcctccggcggggggtccggcgagggg ggttccgggggaggcggtatgcacgtgatcctgactcaaccacctcagcctccgctctctg ggagccagcgtgaagctcacctgtactctgagctcgggacactcgtcgtagccatcgcttg caccagcagcagccggagaagggcctagatacctgatgaaggtcaactccgacggttcgctg agcaagggcgacggcatcccggatcggttcagcggttccacgtccggcgaggagatacctc acaatctcctcgtccaatccgaggacaggctgactactactgccagacctgggtagcggc atggcgattttcgggggtggaactaagctgaccgtgctgaccactacccagcaccgaggcca cccaccccggtcctaccatcgctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacc gcagctggtggggcgtgcatacccggggtcttgacttcgctcgcgatctacatttgggccc cctctggctggtacttgcgggtcctgctgctttcactcgtgatcactcttactgtaagcgc ggtcggagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaa gaggaggacggctgttcatgccggttccagaggaggaggaaggcggtgcgaactgcgctg aaattcagccgcagcgagatgtccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaa ctcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcgagaggacgggaccagaa atgggcgggaagccgcgagaaagaatcccaagggcctgtacaacgagctccaaaaggat aagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaggggaacgcagaagaggcaaaaggccac gacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcag gccctgccgctcgg

10

20

30

【表 6 - 6 0】

CAR22-23 scFv AA	334	qvqlvqsgaevkpkpgasvkvscasgytftsyyhmvrqapggglewmgiinpsggstsyaqk fqgrvtmtrdtststvmelsslrsedtavyycargdyymdvwgkgttvtvssgggsggggs ggggsqsaltqpasasgspgqsvtisctgtssdvggynyvswyqqhpgkapklmiyevskrps gvpdfsgsksgntasltisglqaedeaddyccssytssgtlvfvgggtklvtl
CAR22-23 scFv NT	335	caagtgcactcgtccagtcagggtgcagaagtcaagaaacccgggtcttccgtgaaagtgtcc tgcaaggcctcaggttacaccttcacctcctactacatgcattgggtccgccaagccccggga caaggcctggagtgagtggaattatcaacccgtccggcggcagcacaagctacgccagaag ttccaggagacgctgactatgaccagagatacctccacctccaccgtgtacatggaactgtcc tcactccgggtcgaagataaccgctgtactactgtgcccgaggagactactatatggacgtc tggggaaagggcaccaccgtgactgtgtcgtcggcgggcggggttcgggaggaggaggaagc gggtggcgggggaagccagtcgcactgactcagcccgcgtcggccagcgggagccctggccag agcgtgaccatttcgtgcaccggaacttcctctgacgtcggcggaatacaactacgtgtcctgg taccagcagcaccctgaaagggccccgaagctgatgatctacagaggtgtccaagaggccatcc ggcgtgccggaccggttttcgggatcaaagtccgggaacacggccagcctgaccatcagcggg cttcaggctgaggacgaagcggattactactgtcctcctatacttcacccggcaccttggtg ttcggcgaggaggactaagctgactgtgctc
CAR22-23 可溶性 s cFV NT	336	atggccctccctgtcaccgcctcgtgcttccgctgggtcttctgtctccacgccgtcggccc caagtgcactcgtccagtcagggtgcagaagtcaagaaacccgggtcttccgtgaaagtgtcc tgcaaggcctcaggttacaccttcacctcctactacatgcattgggtccgccaagccccggga caaggcctggagtgagtggaattatcaacccgtccggcggcagcacaagctacgccagaag ttccaggagacgctgactatgaccagagatacctccacctccaccgtgtacatggaactgtcc tcactccgggtcgaagataaccgctgtactactgtgcccgaggagactactatatggacgtc tggggaaagggcaccaccgtgactgtgtcgtcggcgggcggggttcgggaggaggaggaagc gggtggcgggggaagccagtcgcactgactcagcccgcgtcggccagcgggagccctggccag agcgtgaccatttcgtgcaccggaacttcctctgacgtcggcggaatacaactacgtgtcctgg taccagcagcaccctgaaagggccccgaagctgatgatctacagaggtgtccaagaggccatcc ggcgtgccggaccggttttcgggatcaaagtccgggaacacggccagcctgaccatcagcggg cttcaggctgaggacgaagcggattactactgtcctcctatacttcacccggcaccttggtg ttcggcgaggaggactaagctgactgtgctcggatcgaccaccatcaccatcatcatcac

10

20

30

【表 6 - 6 1】

CAR22-23 可溶性 s cFV AA	337	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkpkpgasvkvscasgytftsyyhmvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqqgrvtmtrdtststvmelsslrsedtavyycargdyymdv wgkgttvtvssgggsgggsggggsqsaltqpasasgspgqsvtisctgtssdvggynyvsw yqqhpgkapklmiyevskrpsgvpdfsgsksgntasltisglqaedeaddyccssytssgtlv fgggtkltvlqshhhhhhhh
CAR22-23 完全 AA	338	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkpkpgasvkvscasgytftsyyhmvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqqgrvtmtrdtststvmelsslrsedtavyycargdyymdv wgkgttvtvssgggsgggsggggsqsaltqpasasgspgqsvtisctgtssdvggynyvsw yqqhpgkapklmiyevskrpsgvpdfsgsksgntasltisglqaedeaddyccssytssgtlv fgggtkltvltttpprptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrglfacdiyiwapla gtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttgeedgcscrfeeeggcclrvkfs rsadapaykqqnqlynelnlgrreedyvldkrrgrdpemggkprkrnpqeglynelqkdma eayseigmkgerrrgkghdglyqqllstatkdktydalhmqalppr

40

【表 6 - 6 2】

CAR22-23 完全 N T	339	atggccctccctgtcaccgccctgtgtcttccgctggctcttctgtctccacgccgtcggccc caagtgcactcgtccagtcgggtgcagaagtcagaaacccgggtgttccgtgaaagtgtcc tgcaaggcctcaggttacaccttcacctcctactacatgcattgggtccgccaagcccccgga caaggcctggagtgatgggaattatcaaccggtccggcggcagcacaagctacgcccagaag ttccagggacgcgtgactatgaccagagatacctccacctccaccgtgtacatggaactgtcc tcaactccggtcggaagataccgccgtgtactactgtgcccggggagactactatatggacgtc tggggaaagggcaccaccgtgactgtgtcgtcggcgggcggggttcgggaggaggaggaagc gggtggcgggggaagccagtcgcactgactcagcccggtcggccagcgaggacctggccag agcgtgaccatcttctgtcaccggaacttctctgacgtcggcggaatacaactacgtgtcctgg taccagcagcaccctggaaagccccgaagctgatgatctacgaggtgtccaagaggccatcc ggcgtgccggaccgggttttcgggatcaaagtcgggaacacggccagcctgaccatcagcggg cttcagggtgaggacgaagcggattactactgtcctcctatacttcacccggcaccttggtg ttcggcgaggaggactaagctgactgtgtcaccactacccagcaccgaggccacccaccccg gtcctaccatcgctcccgacctgttccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctgggt ggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgctcgatctacatcttgggccctctggct gggtacttgcggggtcctgtgtcttctactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaag aagctgctgtacatctttaagcaacccttcagtgagcctgtgcagactactcaagaggaggac ggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaagcggtgcgaactgcgcgtgaaattcagc cgcagcgcagatgtccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatctt ggtcggagagaggagtacgacgtgtggacaagcgagaggacgggacccagaaatggcggg aagccgcgcagaaagaatccccagaggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggca gaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaggccacgacggactg taccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccg cctcgg
CAR22-24 scFv AA	340	evqlvesggglvqpqgsrlrlscaasgftfssyamswvrqapqkglewvsyisssstiyads vkgrftisrdnaknslylqmnsraedtavyycardgpiryfdhskafdiwgqgtmvtvssgg ggsgggsgggsseltqdpavsvalgqtvritcggdslrsyyaswyqqkpgqapvlviyqk nnrpsgipdrfsgsssgntasltitgaqaedeadyyrnsrdssgnpyvfgtgtkvtvl

10

20

30

【表 6 - 6 3】

CAR22-24 scFv NT	341	gaagtgaattggtggaatcaggaggaggacttgtgcaacctggaggatctctgagactgtca tgccgcgcgtcgggattcactttctcctcctacgcaatgtcgtgggtcagacaggccccgga aagggcctggaatgggtgtcatacatcagctcctcctcctccacgatctactacgccgactct gtgaaggggcggttcaccattagccgggacaacgcaaagaactccctgtatctgcaaatgaac agcctcagggcggaagataaccgccgtgtactactgtgcgcgcgatgggccgattcgctatttc gaccactccaaggccttcgatatctggggccagggaacctgggtaccggtgtcgtccggtgga ggcggcagcggggggggcggaagcggcgccgggggttcacccctcggagctgactcaggacccc gccgtgtccgtggctctgggacagaccgtgcgcacacatgccaggagattccctgcggtcg tactacgcctcctgggtaccagcagaaaccggggccaggccccctcctcgtgatctacggaaag aacaacaggccttcgggtatcccagaccggttcagcggcagctccagcggaaacaccgcaagc ctcactattaccggggcccaggctgaggacgagggcgactactaccggaactcccgcgactcc tcgggcaatccgtacgtctttggtactgggaccaagggtcaccgtgctg	10
CAR22-24 可溶性 s cFV NT	342	atggccctcctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccc gaagtgaattggtggaatcaggaggaggacttgtgcaacctggaggatctctgagactgtca tgccgcgcgtcgggattcactttctcctcctacgcaatgtcgtgggtcagacaggccccgga aagggcctggaatgggtgtcatacatcagctcctcctcctccacgatctactacgccgactct gtgaaggggcggttcaccattagccgggacaacgcaaagaactccctgtatctgcaaatgaac agcctcagggcggaagataaccgccgtgtactactgtgcgcgcgatgggccgattcgctatttc gaccactccaaggccttcgatatctggggccagggaacctgggtaccggtgtcgtccggtgga ggcggcagcggggggggcggaagcggcgccgggggttcacccctcggagctgactcaggacccc gccgtgtccgtggctctgggacagaccgtgcgcacacatgccaggagattccctgcggtcg tactacgcctcctgggtaccagcagaaaccggggccaggccccctcctcgtgatctacggaaag aacaacaggccttcgggtatcccagaccggttcagcggcagctccagcggaaacaccgcaagc ctcactattaccggggcccaggctgaggacgagggcgactactaccggaactcccgcgactcc tcgggcaatccgtacgtctttggtactgggaccaagggtcaccgtgctgggatcgcaccaccat caccatcatcatcac	20
CAR22-24 可溶性 s cFV AA	343	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvqpqgslrlscaasgftfssyamswvrqapg kglewvsyissssstiyyadsvkgrftisrdnaknsllylqmnsraedtavyycardgpiryf dhskafdiwggqtmvtvssgggsgggsgggsseltqdpavvalgqtvritcggdslrs yyaswyqqkpgqapvlviygnnrpsgipdrfsgsssgntasltitgaqaedeaddyrrnsrds sgnpyvfgtgtkvtvlqshhhhhhhh	30

【表 6 - 6 4】

CAR22-24 完全 AA	344	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvqpggslrlscaasgftfssyamswvrqapg kglewvsyissssstiyyadsvkgrftisrdnaknslylqmnsraedtavyycardgpiryf dhskafdiwgggtmvtvssgggsgggsgggsgsseltqdpavsvalggtvritcggdsrls yyaswyqqkpgqgapvlviygnnrpsgipdrfsgsssgntasltitgaqaedeaddyrsrds sgnpyvfgtgtkvlttppaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiy iwaplagtcgvlllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcsrfpeeeeggce lrvkfsrsadapaykqqnqlynelnlgrreeydvldkrgrdpemggkprkrnpqeglynel qkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
CAR22-24 完全 N T	345	atggccctccctgtcaccgcctgtcgtcttccgctggctcttctgctccacgccgctcgccc gaagtgaattggtggaatcaggaggaggacttgtgaacctggaggatctctgagactgtca tgccgccgctcgggattcactttctcctcctacgaatgtcgtgggtcagacaggccccgga aaggccctggaatgggtgtcatatcatcagctcctcctcctccacgatctactacgccgactct gtgaagggcggttcaccattagccgggacaacgcaaagaactccctgtatctgcaaatgaac agcctcaggcggaagataccgcctgtactactgtgcgcgcgatggtcgattcgctatttc gaccactccaaggccttcgatctcgtgggcccagggaacctgggtcaccgtgtcgtccggtgga ggcgccagcgggggggcggaagcggcggcggggttcacctcggagctgactcaggacccc gccgtgtccgtggctctgggacagaccgtgcgcacacatgccaggagagattccctcggtcg tactacgcctcctggtaccagcagaaaccgggcccaggccccgctcctcgtgatctacggaag aacaacaggccttcgggtatccagaccggttcagcggcagctccagcggaacaccgcaagc ctcactattaccggggcccaggctgaggacgagccgactactaccggaactcccgcgactcc tcgggcaatccgtacgtctttggtactgggaccaaggtcaccgtgctgaccactacccagca ccgaggccaccaccccggtcctaccatcgccctcccagcctctgtccctcggtccggaggca tgtagaccgcagctggtggggccgtgcataccggggtcttgacttcgcctgcgatcttac atttgggcccctctggtggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttac tgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcag actactcaagaggaggacggctgttcacgccggttcccagaggaggaggaaggcggtgcgaa ctgcgcgtgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctc tacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgg gacccagaaatggcggggaagccgcgcagaaagaatccccaagaggcctgtacaacgagctc caaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggc aaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctctt cacatgcaggccctgcgcctcgg

10

20

30

【表 6 - 6 5】

CAR22-25 scFv AA	346	qvqlvqsgaevkkgasvkvscasgytftsyymhwvrqapggglewmgiinpsggstsyaqk fqgrvtmtrdtsistaymelsrlrsddtavyyccaremdssgpdyywqggtltvtvssgggsgg ggsgggsgsalsaltqpasvsgspggsitistgtssdvvggynyvswyqqhpgkapklmiyevsn rpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeaddyccsytsstltvfgtgtkltlv
CAR22-25 scFv NT	347	caagtgcagctcgtccagtcagggtgcagaagtcaagaaacccggtgcttccgtgaaagtgtcc tgcaaggcatccggctacacgttcacctcctactacatgcattgggtccgccaagccccggc caaggcctggagtggatggggatcattaacccaagcggaggaagcactagctacgcgcagaag tttcagggccgctgaccatgaccagggatacttccatctccaccgcttacatggaactgtcg cggctgagaagcgacgacacagccgtgtactactgtgcccggaatggacgactcctccggg cctgattactggggacaggggactctggtcaccgtgtcgccggtggaggcggatcggggggc ggaggttccggcggagggggctcacagtccgcgctgaccagcggccagcgtgtcaggatca ccgggccagagcatcaccatttctgcaccggaacctcatcgacgtcggcggatataactac gtgtcgtggtaccagcagcaccctggaaggccccgaagctcatgatctacagggtgtccaat agaccagcggagtgtcgaaccggttcagcgggtccaagtcgggaacaccgccagcttgacc atctctggactgcaagccgaggacgaagccgattactactgtcctcgtatacttctcctca acccttgtgttcggaactggcactaagctgaccgtgtc
CAR22-25 可溶性 s cFV NT	348	atggccctccctgtcacccgctgtgcttccgctggctcttctgtctccacgccgctcggccc caagtgcagctcgtccagtcagggtgcagaagtcaagaaacccggtgcttccgtgaaagtgtcc tgcaaggcatccggctacacgttcacctcctactacatgcattgggtccgccaagccccggc caaggcctggagtggatggggatcattaacccaagcggaggaagcactagctacgcgcagaag tttcagggccgctgaccatgaccagggatacttccatctccaccgcttacatggaactgtcg cggctgagaagcgacgacacagccgtgtactactgtgcccggaatggacgactcctccggg cctgattactggggacaggggactctggtcaccgtgtcgccggtggaggcggatcggggggc ggaggttccggcggagggggctcacagtccgcgctgaccagcggccagcgtgtcaggatca ccgggccagagcatcaccatttctgcaccggaacctcatcgacgtcggcggatataactac gtgtcgtggtaccagcagcaccctggaaggccccgaagctcatgatctacagggtgtccaat agaccagcggagtgtcgaaccggttcagcgggtccaagtcgggaacaccgccagcttgacc atctctggactgcaagccgaggacgaagccgattactactgtcctcgtatacttctcctca acccttgtgttcggaactggcactaagctgaccgtgtcggatcgccaccatcaccatcat catcac

10

20

30

【表 6 - 6 6】

CAR22-25 可溶性 s cFV AA	349	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkgasvkvscasgytftsyymhwvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqqgrvtmtrdtsistaymelsrlrsddtavyyccaremdssg pdywqggtltvtvssgggsgggsgggsggsalsaltqpasvsgspggsitistgtssdvvggyny vswyqqhpgkapklmiyevsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeaddyccsytsst tlvfgtgtkltlvlgshhhhhhh
CAR22-25 完全 AA	350	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkgasvkvscasgytftsyymhwvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqqgrvtmtrdtsistaymelsrlrsddtavyyccaremdssg pdywqggtltvtvssgggsgggsgggsggsalsaltqpasvsgspggsitistgtssdvvggyny vswyqqhpgkapklmiyevsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeaddyccsytsst tlvfgtgtkltlvlttpprptpaptiasqplslrpeacrpaagavhtrglfacdiyiwa plagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfeeeeeggcclrv kfsrsadapaykqqgnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprknpqeglynelqkd kmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr

40

【表 6 - 6 7】

CAR22-25 完全 N T	351	atggccctccctgtcaccgccctgtgtcttccgctggctcttctgtctccacgccgtcggccc caagtgcagctcgtccagtcagggtgcagaagtcagaaacccgggtcttccgtgaaagtgtcc tgcaaggcatccggctacacgttcacctcctactacatgcattgggtccgccaagccccggc caaggcctggagtggatgggatcattaacccaagcggaggaagcactagctacgcgcagaag tttcagggccgctgacctgaccagggatacttccatctccaccgcttacatggaactgtcg cggctgagaagcgacgacacagccgtgtactactgtgcccggaatggacgactcctccggg cctgattactggggacaggggactctggtcaccgtgtcgtccgggtggaggcgatcggggggc ggaggttccggcggaggggggtcacagtcgcgctgaccagccggccagcgtgtcaggatca ccgggccagagcatcaccatttctgcaccggaacctcatcgacgtcggcgatataactac gtgtcgtggtaccagcagcaccctggaaaggccccgaagctcatgatctacagggtgtccaat agaccagcggagtgtcgaaccgggttcagcgggtccaagtcgggaacaccgccagcttgacc atctctggactgcaagccgaggacgaagccgattactactgtctcctgtatacttctcctca acccttgtgttcggaactggcactaagctgaccgtgtcaccactacccagcaccgaggcca cccacccggctcctaccatgcctccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacc gcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacattggggc cctctggtggtacttgccgggtcctgtgtcttctactcgtgatcactcttactgtgaagcgc ggtcggagaagctgtgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaa gaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggagggaaggcggtgcgaactgcgctg aaattcagccgcagcgcagatgtccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaa ctcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaa atgggcgggaagccgcagaaagaatcccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggat aagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaagggggaacgcagaagaggcaaaaggccac gacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcag gcctgccgcctcgg
CAR22-26 scFv AA	352	evqlvesgaevkpkgeslkiscksgysftgswigwgrqmpgkglewmgiipygdsdtrypsp fqqqvtsadksistaylqwsslkasdtamyycargflrggdccgaldiwgqgtmtvssggg gsgggsggggsdivmtqspslpvtgpepasiscrssqslhsngynyldwylqkpgqspql liylgsnrasgvpdfrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyymqalqtpptwtfgggtkleikr

10

20

30

【表 6 - 6 8】

CAR22-26 scFv NT	353	gaagtgcagttggtggaatcaggagcagaagtcaagaaacccggagaaagcctgaagatctcg tgcaaagggagcggatactcgttcaccggatcatggattggatggggccgcagatgcctgga aagggctctggaatggatgggaatcatctacccggggactccgatactcggactccccgagc tttcagggccaggtcaccatctccgcccagacaagtcacatctccactgcgtatttgagtgaggc tactgaaggcctcggacaccgctatgtactactgcgcccgcggtttcctgaggggaggagat tggtgcggcgcccttgatatctggggccaggggaccatggtgaccgtgtcctccggtggtggc ggctccggcgaggagggtccgggggaggaggctccgacattgtgatgaccagagccccctg tccctgccgtgactcctggggagccagcctcgatcagctgccggtcgtcccagtccttctg cactccaacggctacaactatctcgattggtacctccagaagcctggtcaaagccgcagctg ctgatctacctcgggttcaaacagagcttccggggtgccggacagattcagcggatctggatcg ggcacagacttcacgctcaagatttcccgctggaggccgaggacgtcggcgtgtactactgt atgcaagcgctgcagaccccgccctggactttcggacaaggaaccaagctggagattaagcgg	10
CAR22-26 可溶性 s cFV NT	354	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccc gaagtgcagttggtggaatcaggagcagaagtcaagaaacccggagaaagcctgaagatctcg tgcaaagggagcggatactcgttcaccggatcatggattggatggggccgcagatgcctgga aagggctctggaatggatgggaatcatctacccggggactccgatactcggactccccgagc tttcagggccaggtcaccatctccgcccagacaagtcacatctccactgcgtatttgagtgaggc tactgaaggcctcggacaccgctatgtactactgcgcccgcggtttcctgaggggaggagat tggtgcggcgcccttgatatctggggccaggggaccatggtgaccgtgtcctccggtggtggc ggctccggcgaggagggtccgggggaggaggctccgacattgtgatgaccagagccccctg tccctgccgtgactcctggggagccagcctcgatcagctgccggtcgtcccagtccttctg cactccaacggctacaactatctcgattggtacctccagaagcctggtcaaagccgcagctg ctgatctacctcgggttcaaacagagcttccggggtgccggacagattcagcggatctggatcg ggcacagacttcacgctcaagatttcccgctggaggccgaggacgtcggcgtgtactactgt atgcaagcgctgcagaccccgccctggactttcggacaaggaaccaagctggagattaagcgg ggatcgaccaccatcaccatcatcatcac	20
CAR22-26 可溶性 s cFV AA	355	malpvtalllplalllhaarpevqlvesgaevkkgpesslkisccksgysftgswigwgrqmpg kglewmgiipygdsdtryspsfqqqvtisadksistaylqwsslkasdtamyycargflrggd ccgaldiwgqgtmvtvssgggsgggsgggsgdivmtqspslpvtgpepasiscrssqsll hsngynyldwylqkpgqspqlliylgsnrsgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyy mqalqtpwtfqggtkleikrgshhhhhhh	30

【表 6 - 6 9】

CAR22-26 完全 AA	356	malpvtallllplallllhaarpevqlvesgaevkkpgeslkisckgsgysftgswigwgrqmpg kglewmgiipygdstdtryspsfqqvvtisadksistaylqwsslkasdtamyycargflrggd ccgaldiwgggtmvtvssgggsgggsgggsgggsgdivmtqspslslpvtppgepasiscrssqsl hsngynyldwylqkpgqspqlllylgsnrsgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyyg mqalqtpwtfqggtkleikrttppaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldf acdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttgeedgcsrpfpeee eggcelrvkfssadapaykqggqnllynelnlgrreedyvldkrrgrdpemggkprrknpqeg lynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
CAR22-26 完全 N T	357	atggccctccctgtcaccgcccctgtcgttccgctggctcttctgctccacgccgctcgccc gaagtgcagttggtggaatcaggagcagaagtcaagaaacccggagaaagcctgaagatctcg tgcaaaggagcggatactcgttaccggatcatggattggatggggccgagatgcctgga aagggtctggaatggatgggaatcatctaccgggggactccgatactcggactccccgagc tttcagggccaggtcaccatctccgcccacaagtcctatctccactgcgtatttgagtgaggc tactgaaggcctcgacaccgctatgtactactgcgcccgcggttctctgaggggaggagat tgttgccgccccttgatatctggggccagggaccatggtgaccgtgtcctccggtggtggc ggctccggcggaggaggtccgggggaggaggtccgacattgtgatgaccagagccccctg tcctgcccgtgactcctggggagccagcctcgatcagctgccggtcgctccagtccttctg cactccaacggctacaactatctcgattggtacctccagaagcctggtcaaagcccgagctg ctgatctacctcggttcaaacagagcttccgggggtgcggacagattcagcggatctggatcg ggcacagacttcacgctcaagatttcccgctggaggccgaggacgtcggcgtgtactactgt atgcaagcgtgcagaccccgccctggacttccggacaaggaaccaagctggagattaagcgg accactacccagcaccgaggccacccaccccggtcctaccatgcctccagcctctgtcc ctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttc gcctgcgatctctacatttggggccctctggctggtacttgcggggtcctgctgcttctactc gtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttc atgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcagtcgggttccagaggaggag gaaggcggctgcgaactgcgctgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcag gggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggac aagcggagaggacgggacccagaaatggcggggaagccgcgcagaaagaatccccaaagggc ctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggg gaacgcagaagaggcaaaaggccacgagcgtgtaccagggactcagcaccgccaccaaggac acctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgctcgg

10

20

30

【表 6 - 7 0】

CAR22-27 scFv AA	358	qvqlqesgpglvkpssetlsltcsvsggsinsyywswirqapgkglewiftshsgnvkynpsl tgrvtiavdtsknqfylevtsvtaadtavyfcargldplfaydafiwlgtmtvsvsggggs ggggsggggseivltqspplsipvtppgepasiscrssqslhsngynyldwylqkpgqspqlli ylgsnrasgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycmqvltqtppltfgggtkvdkr
CAR22-27 scFv NT	359	caagtgcacttcaggaatcaggccccggacttgtgaaaccatcagaaactctctccctcact tgctccgtgagcgggggtccatcaactcctactactggtcggtgattagacaggccccctgga aaggggctggagtgatcgcggttcacttcgcactccggcaacgtcaagtacaaccggtccctg accggaagagtaccattgccgtggatacctccaagaaccagttctacctggaagtcacgtcg gtgaccgtgctgacaccgctgtacttctgcgcacgggggctggaccattgtttgcctac gatgcgttcgaaatctgggggctcggaaccatggtcactgtgtcctccggcggaggcggcagc ggtggaggaggcagcggaggaggaggttccgagatcggtgctgaccagagccccctgtccctc cccgtgaccctggagaaccggccagcatttctgcccgtcgagccagtcctctgttcattca aatggctacaactacctggattggtatctgcagaagccccggccagtcaccgcaactgctcatc tacctgggaagcaaccgcgcctcgggtgtcccggaccgcttctccggctcggggtctggcact gacttcacactgaagatctccaggtggaggccgaggacgtgggagtgattactgtatgcaa gtgctgcagaccccgctctgaccttcggcgggtggaactaaggtcgacatcaagcgg
CAR22-27 可溶性 s cFV NT	360	atggccctccctgtcaccgcctctgtgcttccgctggctcttctgtctccacgccgctcggccc caagtgcacttcaggaatcaggccccggacttgtgaaaccatcagaaactctctccctcact tgctccgtgagcgggggtccatcaactcctactactggtcggtgattagacaggccccctgga aaggggctggagtgatcgcggttcacttcgcactccggcaacgtcaagtacaaccggtccctg accggaagagtaccattgccgtggatacctccaagaaccagttctacctggaagtcacgtcg gtgaccgtgctgacaccgctgtacttctgcgcacgggggctggaccattgtttgcctac gatgcgttcgaaatctgggggctcggaaccatggtcactgtgtcctccggcggaggcggcagc ggtggaggaggcagcggaggaggaggttccgagatcggtgctgaccagagccccctgtccctc cccgtgaccctggagaaccggccagcatttctgcccgtcgagccagtcctctgttcattca aatggctacaactacctggattggtatctgcagaagccccggccagtcaccgcaactgctcatc tacctgggaagcaaccgcgcctcgggtgtcccggaccgcttctccggctcggggtctggcact gacttcacactgaagatctccaggtggaggccgaggacgtgggagtgattactgtatgcaa gtgctgcagaccccgctctgaccttcggcgggtggaactaaggtcgacatcaagcggggatcg caccaccatcaccatcatcatcac

10

20

30

【表 6 - 7 1】

CAR22-27 可溶性 s cFV AA	361	malpvtalllplalllhaarpqvqlqesgpglvkpssetlsltcsvsggsinsyywswirqapg kglewiftshsgnvkynpsltgrvtiavdtsknqfylevtsvtaadtavyfcargldplfay dafiwlgtmtvsvsgggsgggsggggseivltqspplsipvtppgepasiscrssqslhs ngynyldwylqkpgqspqlliylgsnrasgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycmq vlqtppltfgggtkvdkrgshhhhhh
CAR22-27 完全 AA	362	malpvtalllplalllhaarpqvqlqesgpglvkpssetlsltcsvsggsinsyywswirqapg kglewiftshsgnvkynpsltgrvtiavdtsknqfylevtsvtaadtavyfcargldplfay dafiwlgtmtvsvsgggsgggsggggseivltqspplsipvtppgepasiscrssqslhs ngynyldwylqkpgqspqlliylgsnrasgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycmq vlqtppltfgggtkvdkrttppaprpptpaptiasqplsirpeacrpaaggavhtrglfac diyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqtteedgcscrpfpeeeeg gcelrvkfsrsadapaykqqnqlynelnlgrreedyvldkrrgrdpemggkprkrnpqegly nelqdkmaeyseigmgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr

40

【表 6 - 7 2】

CAR22-27 完全 N T	363	atggccctccctgtcaccgccctgtgtcttccgctggctcttctgtctccacgccgtcggccc caagtgcacttcagggaatcaggccccggacttgtgaaaccatcagaaactctctccctcact tgctccgtgagcggggggtccatcaactcctactactggtcgtggattagacaggccccctgga aaggggctggagtggatcgcggttcacttcgcactccggcaacgtcaagtacaacccgtccctg accggaagagtgaccattgccgtggatacctccaagaaccagttctacctggaagtcacgtcg gtgaccgctgctgacaccgccgtgtacttctgcgcacgggggctggagccattgtttgcctac gatcgcttcgaaatctgggggctcggaaccatggtcactgtgtccctccggcggaggcggcagc ggtggaggaggcagcggaggaggaggttccgagatcgtgctgaccagagccccctgtccctc cccgtgacccctggagaaccggccagcatttctgcgggtcgagccagtcctgttgctattca aatggctacaactacctggattggtatctgcagaagccccggccagtcaccgcaactgctcatc tacctgggaagcaaccgcgcctcggtgtcccggaccgcttctccggtcggggtctggcact gacttcacactgaagatctccaggtggaggccgaggacgtgggagtgtattactgtatgaa gtgtgcagaccccgctctgaccttcggcgggtggaactaaggtcgacatcaagcggaccact acccagcaccgaggccaccaccccggtcctaccatcgctccagcctctgtccctgctg ccggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgctgc gatatctacatttgggcccctctggctggtaacttgcggggtcctgctgcttctactcgtgatc actctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccctcatgagg cctgtgcagactactcaagaggaggacggtgttcatgccggttccagaggaggaggaaggc ggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcag aaccagctctacaacgaactcaatcttggtcgagagaggagtacgactgctggacaagcgg agaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagaggcctgtac aacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgc agaagaggcaagggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctat gacgctcttcacatgcagccctgcgcctcgg
CAR22-28 scFv AA	364	evqlvesggglvlpkpggsrlrlscaasgftfsdymswirqapqkglewvsyisssgstiyyads vkgrftisrdnaknslylqmnsraedtavyycarddfwsgsvdywqggtlvtvssgggsgg ggsgggsgggssyvtqppsvsvapgktatitcggtnigsknvhwyyqkpgqapvlaiyyd sdrpsgiperfsgsngntatltisrveagdeadyfcqvwdsssdhwvfgggtklvtl

10

20

30

【表 6 - 7 3】

CAR22-28 scFv NT	365	gaagtgcagttggtggaatctggtggtggactcgtgaaacctggaggaagcttgcgcctgtct tgcgcggcctccggcttcaactttctcggtactacatgtcctggattagacaggctccgggg aagggactcgaatgggtgtcctacatttcatcaagcggcagcaccatctactatgcggactcc gtgaaggggcggttcaactatttcccggtataacgaaagaaacagcctgtaccttcaaatgaat tcaactgcgcgcgaggacaccgcctgtactattgcgcccggtatgacttctggtcgggggtcc gtggactactggggccaggggaccctggtcaccgtgtcctcgggaggaggaggaagcggggga ggcggttccgggggcgcggtcgggcggcggtggtccagctacgtgtcaccagccgccc tccgtgtccgtggccccgggaaagaccgccaccatcacctgtggaggaacgaacatcggtcc aagaacgtccattggtaccagcagaagcccgacaggccccgtgtggcaatctactacgac tccgaccgccaagcggtatccctgaaagggttctccggctccaacagcggaaactgcgact ctgaccatctcaagagtggaggctggcgatgagggcgactacttctgccaagtctgggactcg tcctcggaccactgggtgtttgggggaggcaccaagctgactgtcctg	10
CAR22-28 可溶性 scFV NT	366	atggccctcctgtcaccgcctgtgtcttccgtggctcttctgtctccacgcgcctcggccc gaagtgcagttggtggaatctggtggtggactcgtgaaacctggaggaagcttgcgcctgtct tgcgcggcctccggcttcaactttctcggtactacatgtcctggattagacaggctccgggg aagggactcgaatgggtgtcctacatttcatcaagcggcagcaccatctactatgcggactcc gtgaaggggcggttcaactatttcccggtataacgaaagaaacagcctgtaccttcaaatgaat tcaactgcgcgcgaggacaccgcctgtactattgcgcccggtatgacttctggtcgggggtcc gtggactactggggccaggggaccctggtcaccgtgtcctcgggaggaggaggaagcggggga ggcggttccgggggcgcggtcgggcggcggtggtccagctacgtgtcaccagccgccc tccgtgtccgtggccccgggaaagaccgccaccatcacctgtggaggaacgaacatcggtcc aagaacgtccattggtaccagcagaagcccgacaggccccgtgtggcaatctactacgac tccgaccgccaagcggtatccctgaaagggttctccggctccaacagcggaaactgcgact ctgaccatctcaagagtggaggctggcgatgagggcgactacttctgccaagtctgggactcg tcctcggaccactgggtgtttgggggaggcaccaagctgactgtcctgggatcgcaccaccat caccatcatcatcac	20
CAR22-28 可溶性 scFV NT	367	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvkpggslrlscaasgftfsdymswirqapg kglewvsyissgstiyyadsvkgrftisrdnaknslylqmnsraedtavyycarddfwsgs vdywgggtlvtvssggggsgggsgggsgggssyvltppsvsvapgktatitcggnigs knvhwyyqkpgqapvlaiyydsrpsgiperfsgsngntatltisrveagdeadyfcqvws ssdhwvfgggtklvtlgsghhhhhhh	30

【表 6 - 7 4】

CAR22-28 完全 AA	368	malpvtallllplalllhaarpevqlvesggglvkpggslrlscaasgftfsdyymswirqapg kglewvsyissqgstiyyadsvkgrftisrdnaknslylqmnsraedtavyycarddfwsgs vdywgqgtlvtvssggggsgggsgggsgggssyvltqppsvsvapgktatitcggtngs knvhwyyqqkpgqapvlaiyydsdrpsgiperfsgsngntatltisrveagdeadyfcqvws ssdhwvfgggtklvtltpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiy iwaplagtcgvlllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcsrfpeeeeggce lrvkfsrsadapaykqqnqlynelnlgrreeydvldkrgrdpemggkprkrnpqeglynel qkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
CAR22-28 完全 NT	369	atggccctccctgtcaccgcctgtcgtctccgctggctcttctgctccacgccgctcgccc gaagtgcagttggtggaatctggtggtggactcgtgaaacctggaggaagcttgcgcctgtct tgcgcgccctccggttctactttctcggtactacatgtcctggattagacaggctccgggg aagggactcgaatgggtgtcctacatttcatcaagcggcagcaccatctactatgcggactcc gtgaagggcggttctactatttccgggataaacgaaagacagcctgtaccttcaaataaat tctactgcgcgcgaggacaccgcgtgtactattgcgcccgggatgacttctggtcggggtcc gtggactactggggccagggaccctggtcaccgtgtcctcgggaggaggaggaagcggggga ggcggttccggggcgggcggtcgggcggcggtggtccagctacgtgctcaccagccgccc tccgtgtcctggggccgggaaagaccgccaccatcacctgtggaggaaacacatcggtcc aagaacgtccattggtaccagcagaagcccgacaggcccggtgctggcaatctactacgac tccgaccgccaagcggtatccctgaaagggttctccggctccaacagcggaactgcgact ctgaccatctcaagagtggaggtggcgatgagccgactacttctgccaagtctgggactcg tcctcggaacttgggtgttgggggaggaaccaagctgactgtcctgaccactacccagca ccgaggccaccaccccggtcctaccatcgccctccagcctctgtccctgcgtccggaggca ttagacccgcagctggtggggcggtgcataccgggggtcttgacttcgctgcgatctctac atttgggcccctctggtggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttac tgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcag actactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggtgcgaa ctgcgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctc tacaacgaactcaatcttggtcgagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgg gacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccaagaggcctgtacaacgagctc caaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggc aaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctctt cacatgcaggccctgccgctcgg

10

20

30

【表 6 - 7 5】

CAR22-29 scFv AA	370	qvqlvqsgaevkkgasvkvscasgytftsyymhwvrqapggglewmgiinpsggstsyakf fqgrvtmtrdtststvmelsslrstedavyycareddssgytspfdywgqgtlvtvssgggg sgggsgggsgggrrssyeltqppsvsvapgetasiacgghnirsknvwhyqqkpgqapvlvi sydgdrrpsgiperfsgsnlgstatltisrveagdeadyycqvwdssdshyvfgtgtkvtvl
CAR22-29 scFv NT	371	caagtccaactcgtccagtcgggtgcagaagtcaagaaacccggagcttccgtgaaagtgtcc tgcaaggcctcgggttacacattcacctcctactacatgcactgggtgcgcaggccccgggc cagggactggaatggatgggaatcattaacccgtccggcggatcgaccagctacgcccagaag tttcagggacgcgtgaccatgacccgggacactagcaccagcactgtgtacatggaactgagc tcactgcggtccgaggacactgcggtgtactattgcgcccgggagacgattcctccgggtac acttcgcccttcgactattggggacaggaaccttggtcaccgtgtcatcggtggtggagga agcggaggagcggtccggcggcggggttcaggcgggtggcagaagctcctacgaactgacc cagcctccgtccgtgtccgtggccccggcgaaacccgctcgatcgctgtggagggcacaat attcgagcaagaacgtgcattggtaccagcagaagccgggacaggcaccagtgtcgtgatc tcctacgatggggacaggccttctggcatccctgagagattcagcgggtccaacctgggtcc actgctaccctgaccatctcgcgctggaagccggggatgagggcgactactactgccaagtc tgggactccgacagcgatcactacgtgttcggaactggaaccaaggtcacggtgctt
CAR22-29 可溶性 scFv - nt	372	atggccctccctgtcacgcctcgtgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccc caagtccaactcgtccagtcgggtgcagaagtcaagaaacccggagcttccgtgaaagtgtcc tgcaaggcctcgggttacacattcacctcctactacatgcactgggtgcgcaggccccgggc cagggactggaatggatgggaatcattaacccgtccggcggatcgaccagctacgcccagaag tttcagggacgcgtgaccatgacccgggacactagcaccagcactgtgtacatggaactgagc tcactgcggtccgaggacactgcggtgtactattgcgcccgggagacgattcctccgggtac acttcgcccttcgactattggggacaggaaccttggtcaccgtgtcatcggtggtggagga agcggaggagcggtccggcggcggggttcaggcgggtggcagaagctcctacgaactgacc cagcctccgtccgtgtccgtggccccggcgaaacccgctcgatcgctgtggagggcacaat attcgagcaagaacgtgcattggtaccagcagaagccgggacaggcaccagtgtcgtgatc tcctacgatggggacaggccttctggcatccctgagagattcagcgggtccaacctgggtcc actgctaccctgaccatctcgcgctggaagccggggatgagggcgactactactgccaagtc tgggactccgacagcgatcactacgtgttcggaactggaaccaaggtcacggtgcttggatcg caccaccatcaccatcatcatcac

10

20

30

【表 6 - 7 6】

CAR22-29 可溶性 scFv AA	373	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkgasvkvscasgytftsyymhwvrqapg qglewmgiinpsggstsyakfqgrvtmtrdtststvmelsslrstedavyycareddssgy tspfdywgqgtlvtvssggggsgggsgggrrssyeltqppsvsvapgetasiacgghn irsknvwhyqqkpgqapvlvisydgdrrpsgiperfsgsnlgstatltisrveagdeadyycq wdsdshyvfgtgtkvtvlqshhhhhhh
CAR22-29 完全 AA	374	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkgasvkvscasgytftsyymhwvrqapg qglewmgiinpsggstsyakfqgrvtmtrdtststvmelsslrstedavyycareddssgy tspfdywgqgtlvtvssggggsgggsgggrrssyeltqppsvsvapgetasiacgghn irsknvwhyqqkpgqapvlvisydgdrrpsgiperfsgsnlgstatltisrveagdeadyycq wdsdshyvfgtgtkvtvltttpprptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrglfac diyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrpfpeeeeg gcelrvkfsrsadapaykqqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprkrnpqegly nelqdkmaeyseigmgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr

40

【表 6 - 7 7】

CAR22-29 完全 NT	375	atggccctccctgtcaccgccctgtgtcttccgctggctcttctgtctccacgccgtcggccc caagtccaactcgtccagtcgggtgcagaagtcagaaacccggagcttccgtgaaagtgtcc tgcaaggcctcgggttacacattcacctcctactacatgactgggtgccacggccccgggc cagggactggaatggatgggaatcattaaccggtccggcggatcgaccagctacgccagaag tttcagggacgcgtgaccatgacccgggacactagcaccagcactgtgtacatggaactgagc tactgcgggtccgaggacactgcgggtgtactattgcgccgggaggacgattcctccgggtac acttcgcccttcgactattggggacagggaaaccttggtcaccgtgtcatcgggtggtggagga agcggaggagcggtccggcgccgggggttcaggcgggtggcagaagctcctacgaactgacc cagcctccgtccgtgtccgtggccccggcgaaaccgctcgatcgctgtggagggcacaat attcgagcaagaacgtgcattggtaccagcagaagccgggacaggcaccagtgtcgtgatc tctacgatggggacaggccttctggcatccctgagagattcagcgggtccaacctgggctcc actgtaccctgacctctcgcgctggaagccggggatgaggccgactactactgccaagtc tgggactccgacagcatcactcgtgttcggaactggaaccaaggtcacggtgcttaccact acccagcaccgaggccaccaccccggtcctaccatcgctccagcctctgtccctgctg ccggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgcatacccggttcttgacttcgctgc gatatctacatttgggcccctctggctggtaacttgcgggtcctgctgcttctactcgtgatc actcttactgtaagcgggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccttcatgagg cctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttccagaggaggaggaaggc ggctgcgaactgcgctgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcag aaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgactgctggacaagcgg agaggacgggaccagaaatggcggggaagccgcgcagaaagaatcccaagaggccctgtac aacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgc agaagaggcaaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctat gacgctcttcacatgcagccctgccgcctcgg
CAR22-30 scFv AA	376	evqlvesgaevkpgasvkvsckasgytftgyymhwvrqapggglewmginpnsggtnyaqk fqgrvtmtrdtsistaymelsrlrsddtavyyicarepasswygyyyymdvwgkgtlvtvssg ggsgggsgggsgggsgggsgdiqmtqspsslsasvgdrvtitcrasqsintylnwyqqkpgkpp klliyaasnlgsgvpsrfsqsgsgthftltisslqpddfattyccqsysslltfgggkkleik

10

20

30

【表 6 - 7 8】

CAR22-30 scFv NT	377	gaagtgcagttggtggaatcaggagcagaagtcagaaacccggagcatcagtcagaaagtgtcc tgcaaggcctccgggtacactttcactggttactacatgcattgggtgcccaggcgcccggga caaggactcgagtggatgggctggattaaccccaactccggcggaaccaactacgcccagaag ttccagggtagagtgcgatgactcgggacaccagcatctccaccggtacatggagctgtcg agactgaggtccgacgataaccgctgtactactgcgccgggaaccggcttctcgtcttgg tacggatattactattacatggatgtctgggaaagggaacacttgtcactgtgtccagcgggt ggcggaggcagcggcggtggagggtccggcgccggcgatcgggagggggaggcagcgacatc cagatgactcagtcacctcctcgtgtcggctagcgtggcgaccgctgaccattacctgt cgggccagccaatccatcaacacctacctaactgggtaccagcagaagccggggaagcctcca aagctgctcatctacgcggcctcaaactctgcaatccgggggtgccttcccggttctccggttcc gggtcggggagccacttcactctgaccattagctcactgcaaccggagcactttgccacctac tactgccagcagagctactcctccctcctgaccttcggcgagggaaccaagctcgagatcaag	10
CAR22-30 可溶性 scFv NT	378	atggccctcctgtcaccgcctgtgtcttccgctggctcttctgtctccacgcgctcggccc gaagtgcagttggtggaatcaggagcagaagtcagaaacccggagcatcagtcagaaagtgtcc tgcaaggcctccgggtacactttcactggttactacatgcattgggtgcccaggcgcccggga caaggactcgagtggatgggctggattaaccccaactccggcggaaccaactacgcccagaag ttccagggtagagtgcgatgactcgggacaccagcatctccaccggtacatggagctgtcg agactgaggtccgacgataaccgctgtactactgcgccgggaaccggcttctcgtcttgg tacggatattactattacatggatgtctgggaaagggaacacttgtcactgtgtccagcgggt ggcggaggcagcggcggtggagggtccggcgccggcgatcgggagggggaggcagcgacatc cagatgactcagtcacctcctcgtgtcggctagcgtggcgaccgctgaccattacctgt cgggccagccaatccatcaacacctacctaactgggtaccagcagaagccggggaagcctcca aagctgctcatctacgcggcctcaaactctgcaatccgggggtgccttcccggttctccggttcc gggtcggggagccacttcactctgaccattagctcactgcaaccggagcactttgccacctac tactgccagcagagctactcctccctcctgaccttcggcgagggaaccaagctcgagatcaag ggatcgaccaccatcaccatcatcatcac	20
CAR22-30 可溶性 scFv AA	379	malpvtalllplalllhaarpevqlvesgaevkkgasvkvscasgytftgyymhwvrqapg qglewmgwinpnsggttnyaqkfgrvtmtrdtsistaymelsrlrsddtavyyarepasssw ygyyyymdvwgkgtlvtvssggggsgggsgggsgggsgdiqmtqspsslssavgdrvtitc rasqsintylnwyyqkpgkppklliyaasnlqsgvpsrfsqsgsgthftltisslqpddfaty ycqqsysslltfgggtkleikgshhhhhhhh	30

【表 6 - 7 9】

CAR22 -3 0 完全 AA	380	malpvtallllplalllhaarpevqlvesgaevkkgasvkvscasgytftgyymhwvrqapg qglewmqwinpnsnggtntyaqkfqgrvtmtrdtsistaymelsrlrsddtavyyicarepasssw ygyyyymdvwgkgtlvtvssggggsgggsgggsgggsgdiqmtqspsslsasvgdrvtitc rasqsintylnwyyqkpgkppklliyaasnlqsgvpsrfsqsgsgthftltisslqpddfaty ycqqsysslltfgggtkleiktttpprptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldf acdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttgeedgcsrpfpeee eggcelrvkfssadapaykqggnqlynelnlgrreedyvldkrrgrdpemggkprrknpqeg lynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
CAR22-30 完全 NT	381	atggccctccctgtcaccgcctgtcgtcttccgctggctcttctgctccacgccgtcggccc gaagtgcagttggtggaatcaggagcagaagtcaagaaacccggagcatcagtcaaaagtgtcc tgcaaggcctccgggtacactttcactggttactacatgcattgggtgcgccaggcgcccgga caaggactcgagtggatgggctggattaaccccaactccggcggaaccaactacgcccagaag ttccagggtagagtgcagatgactcgggacaccagcatctccaccgcgtacatggagctgtcg agactgaggtccgacgataccgcgtgtactactgcgcccggaaccggcttctctgctcttg tacggatattactattacatggatgtctgggaaagggaacacttgcactgtgtccagcgg ggcggaggcagcgcggtggagggtccggcgccggcgatcgggagggggaggcagcgacatc cagatgactcagtcacctcctcgctgtcggctagcgtggcgacccgctgaccattacctgt cgggccagccaatccatcaacacctacctaactggtaccagcagaagccggggaagcctcca aagctgctcatctacgcggcctcaaactctgcaatccgggggtgccttccgggttctccgggtcc gggtcggggaccacttctactctgaccattagctcactgcaaccggagcactttgccacctac tactgccagcagagctactcctccctcctgaccttcggcgagggaaccaagctcgagatcaag accactacccagcaccgaggccacccaccccggtcctaccatgcctccagcctctgtcc ctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttc gcctgcgatattctacatttggggccctctggctggtacttgcggggtcctgctgcttctactc gtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttc atgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccgggttccagaggaggag gaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcag gggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggac aagcgagaggacgggacccagaaatggcggggaagccgcgagaaagaatccccaagagggc ctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggg gaacgcagaagaggcaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggac acctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgctcgg

10

20

30

【表 6 - 8 0】

CAR22-31 scFv AA	382	Qvqlvqsgaevkpkpgasvkvscasgytftsdydinwvrqatggglewmgnpnsngntgyaak fqgrvtmtrntsistaymelsslrstedtavyycargdsnywsyygmdvwgqgtlvtvssgggg sgggsgggsgggsgqsvltqprsvsgspgqsvtisctgtssdvgyynyvswyqqhpgeapk liiydadkrpsgisnrfssgksngntasltisglqvdeadyccsyaggstwvfgggtkvtvl
CAR22-31 scFv NT	383	Caagtccaactcgtccagtcagggtgcagaagtcaagaaaccggagcttccgtgaaagtgtcc tgcaaggcctcgggttacaccttcacctcctacgacattaactgggtgcgccaggccactggg cagggactggaatggatgggctggatgaaccctaactcgggcaacaccggctatgcccagaag tttcagggacgcgtgacgatgacccggaatacctccatctcaaccgctacatggaactgagc agcctgagggtccgaggatactgcagtgtactactgcgctcggggagactccaactattggtcc tactacggaatggacgtgtggggccagggaaccctcgtcactgtgtcgagcggggaggcggt tcagggggcgcggaagcggagcggaggggtccggcgaggagggttctcagagcgtgctgact caaccgagatccgtgtccgggagcccgggccagtgcagtactatctcgtgcaccgggaccagc tccgacgtgggaggggtacaactacgtgtcgtggtaccagcagcaccgggagaggcgccaaag ttgattatctacgacgcgataagcgcccttcgggaatctccaaccgggttctcctccgggaag tccggcaactgcctccctgaccatcagcggacttcaagtggaggacgaagcggattactac tgctgttcatacgccggcggtacgacctgggtgttcggcggtggtaccaaggtcacagtgtctg
CAR22-31 可溶性 scFv NT	384	atggccctccctgtcacgcctcgtgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccc caagtccaactcgtccagtcagggtgcagaagtcaagaaaccggagcttccgtgaaagtgtcc tgcaaggcctcgggttacaccttcacctcctacgacattaactgggtgcgccaggccactggg cagggactggaatggatgggctggatgaaccctaactcgggcaacaccggctatgcccagaag tttcagggacgcgtgacgatgacccggaatacctccatctcaaccgctacatggaactgagc agcctgagggtccgaggatactgcagtgtactactgcgctcggggagactccaactattggtcc tactacggaatggacgtgtggggccagggaaccctcgtcactgtgtcgagcggggaggcggt tcagggggcgcggaagcggagcggaggggtccggcgaggagggttctcagagcgtgctgact caaccgagatccgtgtccgggagcccgggccagtgcagtactatctcgtgcaccgggaccagc tccgacgtgggaggggtacaactacgtgtcgtggtaccagcagcaccgggagaggcgccaaag ttgattatctacgacgcgataagcgcccttcgggaatctccaaccgggttctcctccgggaag tccggcaactgcctccctgaccatcagcggacttcaagtggaggacgaagcggattactac tgctgttcatacgccggcggtacgacctgggtgttcggcggtggtaccaaggtcacagtgtctg ggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac

10

20

30

【表 6 - 8 1】

CAR22-31 可溶性 s cFv AA	385	malpvtalllplalllhaarqvqlvqsgaevkpkpgasvkvscasgytftsdydinwvrqatg qglewmgnpnsngntgyaakfqgrvtmtrntsistaymelsslrstedtavyycargdsnyws yygmdvwgqgtlvtvssggggsgggsgggsgggsgqsvltqprsvsgspgqsvtisctgts sdvgyynyvswyqqhpgeapkliiydadkrpsgisnrfssgksngntasltisglqvdeady ccsyaggstwvfgggtkvtvlqshhhhhhhh
CAR22-31 完全 AA	386	malpvtalllplalllhaarqvqlvqsgaevkpkpgasvkvscasgytftsdydinwvrqatg qglewmgnpnsngntgyaakfqgrvtmtrntsistaymelsslrstedtavyycargdsnyws yygmdvwgqgtlvtvssggggsgggsgggsgggsgqsvltqprsvsgspgqsvtisctgts sdvgyynyvswyqqhpgeapkliiydadkrpsgisnrfssgksngntasltisglqvdeady ccsyaggstwvfgggtkvtvlhttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgl acdiyiwaplagtcgvlslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrpfpeee eggcelrvkfrrsadapaykqgnqlynelnlgrreeydvldkrrrdpemgkprknpqeg lynelqkdkmaeyseigmkgerrrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr

40

【表 6 - 8 2】

CAR22-31 完全 NT	387	atggccctccctgtcaccgccctgtgtcttccgctggctcttctgtctccacgccgtcggccc caagtccaactcgtccagtcgggtgcagaagtcagaaacccggagcttccgtgaaagtgtcc tgcaaggcctcgggttacaccttcacctcctacgacattaactgggtgcgccaggccactggg cagggactggaatggatgggctggatgaaccctaactcgggcaacaccggctatgccagaag tttcagggacgcgtgacgatgacccggaatacctccatctcaaccgcctacatggaactgagc agcctgaggtccgaggatactgcagtgtactactgcgctcggggagactccaactattggtcc tactacggaatggacgtgtggggccagggaaccctcgtcactgtgtcgcagcgggggaggcgggt tcagggggcgcggaagcggaggcggagggtccggcggaggaggttctcagagcgtgctgact caaccgagatccgtgtccgggagcccgggccagtgcagtactatctcgtgcaccgggaccagc tccgacgtgggagggtacaactacgtgtcgtggtaccagcagcaccgggagaggcgccaaag ttgattatctacgacgccgataagcgcccttcgggaatctccaaccggttctcctccgggaag tccggcaactgcctccctgaccatcagcggacttcaagtggaggacgaagcggattactac tgctgttcatacgccggcgatcgacctgggtgttcggcgggtggtaccaaggtcacagtgtg accactaccacagcaccgaggccaccaccccggtcctaccatgcctccagcctctgtcc ctgctccggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtccttgacttc gcctgcgatatctacatttgggccctctggctggtacttgccgggtcctgtgctttcactc gtgatcactctttactgtaagcgcggtcggagaagctgctgtacatctttaagcaacccttc atgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccgggtcccgaggaggag gaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcag gggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggac aagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaagaatcccaagagggc ctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggg gaacgcagaagaggcaaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggac acctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR22-32 scFv AA	388	qvqlvqsgaevkpkpgasvkvsckasgytftsygiswvrqapggglewmgi sayngntnyaqk lqgrvtmttdtststaymelrslrsddtavyycasfssdsydywgggtltvtvssggggsggg gsgggsggggseivltqspatlsvspgeratlscrasqsvtsnlawyqqkpgqaprlliyaa stratgiparfsgsgsteftltissmqsedfavyfcqqyhtwppltfgggtkveikt

10

20

30

10

20

30

【表 6-84】

30

【表 6 - 8 5】

CAR22-33 scFv AA	394	qvnresgpalkvptqtltlctfsgfslntfgmsvswirppgkalewlalidwdddkyyst slrtrltiskdtaknqvvlrmtndpmdtatyyccariyggdrntqapyffdlwgggtlvtvs sgggsgggsgggsgggsvmtqspslslpvtppgepasiscrssqslhshngynyldwylqkpgg spqliylgsnrasgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveadvgvvyymqalqtpwtfgggtkle ik
CAR22-33 scFv NT	395	caagtcaacctcagagaatcaggtcctgccctcgtcaaacctaccagacctcaccttgacc tgtaccttctccgggttctcgtgaacaccttcgggatgtccgtgagctggattaggcagccc ccgggaaaggccctggagtggtggccctgacgattgggatgacgacaagtactactccacc tcaactccgactcgctgacctctcaaaggacactgccagaaccaagtgggtgctgcggatg actaatggaccgatggacaccgccacctattactgcgcccgatctacggaggcgacaga accaacactcagggccctacttcttcgatctgtggggacagggcactcttgtagccgtgtcc tcgggaggaggggtccgggtggaggggatcaggaggaggcgagcagctcgtgatgact caatccccgctgtccttgctgtgacctggcgaaccgcgtccattagctgccggagcagc cagtcctcctgcactcgaacggatacaactacctggattggatctgcagaagcccgccag tccccacaactcctgatctacctgggtctaatcgggcacccgggtcccgatcgcttcagc gggtcgggctcgggtaccgacttcacgctgaagatttcagggtggaagctgaggacgtggga gtgtactactgcatgcaggcgcttcagactccatggacatttgacaggggaccaagctggag atcaag
CAR22-33 - 可溶 性 scFv N T	396	atggccctccctgtcaccgcctcgtgcttccgctgggtcttctgctccacgcgcctcgcccc caagtcaacctcagagaatcaggtcctgccctcgtcaaacctaccagacctcaccttgacc tgtaccttctccgggttctcgtgaacaccttcgggatgtccgtgagctggattaggcagccc ccgggaaaggccctggagtggtggccctgacgattgggatgacgacaagtactactccacc tcaactccgactcgctgacctctcaaaggacactgccagaaccaagtgggtgctgcggatg actaatggaccgatggacaccgccacctattactgcgcccgatctacggaggcgacaga accaacactcagggccctacttcttcgatctgtggggacagggcactcttgtagccgtgtcc tcgggaggaggggtccgggtggaggggatcaggaggaggcgagcagctcgtgatgact caatccccgctgtccttgctgtgacctggcgaaccgcgtccattagctgccggagcagc cagtcctcctgcactcgaacggatacaactacctggattggatctgcagaagcccgccag tccccacaactcctgatctacctgggtctaatcgggcacccgggtcccgatcgcttcagc gggtcgggctcgggtaccgacttcacgctgaagatttcagggtggaagctgaggacgtggga gtgtactactgcatgcaggcgcttcagactccatggacatttgacaggggaccaagctggag atcaagggatcgaccaccatcaccatcatcatcac

10

20

30

【表 6 - 8 6】

CAR22-33 可溶性 scFv AA	397	malpvtalllplalllhaarpqvnresgpalkvptqtltlctfsgfslntfgmsvswirpp pgkalewlalidwdddkyystslrtrltiskdtaknqvvlrmtndpmdtatyyccariyggdr tntqapyffdlwgggtlvtvssgggsgggsgggsgggsvmtqspslslpvtppgepasiscrss qslhshngynyldwylqkpggspqliylgsnrasgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveadvg vvyymqalqtpwtfgggtkleikqshhhhhhhh
CAR22-33 完全 AA	398	malpvtalllplalllhaarpqvnresgpalkvptqtltlctfsgfslntfgmsvswirpp pgkalewlalidwdddkyystslrtrltiskdtaknqvvlrmtndpmdtatyyccariyggdr tntqapyffdlwgggtlvtvssgggsgggsgggsgggsvmtqspslslpvtppgepasiscrss qslhshngynyldwylqkpggspqliylgsnrasgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveadvg vvyymqalqtpwtfgggtkleiktttpprpptpaptiasqplslrpeacrpaggavhtrgl dfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqtteedgcscrfe eeeggcelrvkfsrsadapaykqqnqlynelnlgrreeydvldkrgrdpemggkprkrnpq eglynelqkdkmaeyseigmkgerrrrqkghdglyqglstatkdydalhmqalppr

40

50

【表 6 - 8 7】

CAR22-33 完全 NT	399	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcgcccc caagtcaacctcagagaatcaggctcctgccctcgtcaaacctaccagacctcaccttgacc tgtaccttctccgggttctcgtgaacaccttcgggatgtccgtgagctggattaggcagccc ccgggaaaggccctggagtggctggccctgatcgattgggatgacgacaagtactactccacc tcactccgactcgctgaccatctcaaaggacactgccaagaaccaagtgggtgctgcggatg actaacatggaccgatggacaccgccacctattactgcgcccgatctacggaggcgacaga accaacactcaggccccctacttcttcgatctgtggggacagggcactcttgtagccgtgtcc tcgggcgaggagggctccggtggagggggatcaggaggaggcgagcgacgtcgtgatgact caatccccgctgtccttgctgtgaccttgccgaaccgcgtccattagctgccggagcagc cagtcctcctgcactcgaacggatacaactacctggattgggtatctgcagaagcccgccag tccccacaactcctgatctacctgggtctaatcgggcatccggggtcccgatcgcttcagc ggttcgggctcgggtaccgacttcacgctgaagatttccagggtggaagctgaggacgtggga gtgtactactgcatgcaggcgcttcagactccatggacatttgacaggggaccaagctggag atcaagaccactaccaccagcaccgaggccaccaccgcgtcctaccatcgctccagcct ctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctgggtggggccgtgcatacccggtctt gacttcgctgcgatctacatttgggccctctggctgggtacttgccgggtcctgctgctt tcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaa cccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttccagag gaggaggaaggcggtgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctac aagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtg ctggacaagcgagagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcagaaagaatcccaa gagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatg aaaggggaacgcagaagaggcaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacc aaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR22-34 scFv AA	400	qvqlqesgpglvkpsgtlsltcavsgasitsrhwnwvrhspgkglewigqiyhsgtttynps lgsrvtisvdksknqislselrsvtaadtatyycvrldylelatyygmdvwgqgttvtvssggg sgggsggggseivltqspslpvtppgepasiscrssqsllysdgynyldwylqkpgqspqll iylgsnrasgvpdrfsgsgsgtdftlqisgvetedvgvyycmqalqtqsfqggtkleik

10

20

30

【表 6 - 8 8】

CAR22-34 scFv NT	401	caagtgcagcttcaagaatcaggacctggcctcgtaaaccctccggtaccctctccctcacc tgtgccgtgtccggggcatctatcacctcccgcactggtggaactgggtcagacactccccg ggaaagggattggagtggattggccagatctaccattccggcaccactacttacaaccctcc ctgggctcccgcgtcactatctccgtggacaagtccaagaatcagattagcctggagctgcgg tccgtgaccgtgccgataccgcgacctattactgcgtgcgggactacctggagctcgccacg tactacggaatggacgtctggggccagggcactaccgtgaccgtgtcaagcggggggggcgga tcgggtggtggaggatcgggaggaggagggtcgaaatcgtgctgactcagtcacctgtcg ctgcctgtgactcctgggaaccagcctcaattagctgccgtcgagccagtcctgtctgtat tccgacggatacaactacctggattggtaccttcaaaagcccggccagagcccgagctgctg atctacctgggttcaaacagggcctccggcgtgccggatcggttctcggaagcggtagcggg acagacttcacctgcaaatcagcggagtggaaactgaggacgtggcggtgtactactgcatg caggcggttgagacccagtcctttggacaaggcaccaagctcgaaatcaag
CAR22-34 可溶性 scFv NT	402	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgcgctcgcccc caagtgcagcttcaagaatcaggacctggcctcgtaaaccctccggtaccctctccctcacc tgtgccgtgtccggggcatctatcacctcccgcactggtggaactgggtcagacactccccg ggaaagggattggagtggattggccagatctaccattccggcaccactacttacaaccctcc ctgggctcccgcgtcactatctccgtggacaagtccaagaatcagattagcctggagctgcgg tccgtgaccgtgccgataccgcgacctattactgcgtgcgggactacctggagctcgccacg tactacggaatggacgtctggggccagggcactaccgtgaccgtgtcaagcggggggggcgga tcgggtggtggaggatcgggaggaggagggtcgaaatcgtgctgactcagtcacctgtcg ctgcctgtgactcctgggaaccagcctcaattagctgccgtcgagccagtcctgtctgtat tccgacggatacaactacctggattggtaccttcaaaagcccggccagagcccgagctgctg atctacctgggttcaaacagggcctccggcgtgccggatcggttctcggaagcggtagcggg acagacttcacctgcaaatcagcggagtggaaactgaggacgtggcggtgtactactgcatg caggcggttgagacccagtcctttggacaaggcaccaagctcgaaatcaagggatcgaccac catcaccatcatcatcac
CAR22-34 可溶性 scFv AA	403	Malpvtalllplalllhaarpqvqlqesgpglvkpsgtlsltcavsgasitshhwnvrhsp gkglewigqiyhsgtttynpslgsrvtisvdksknqislelrsvtadatatyyvrdylelat yygmdvwgqgtvtvssgggsgggsggggseivltqspslpvtppgepasiscrssqslly sdgynyldwylqkpgqspqlliylnrasgvprfsgsgsgtdftlqisgvetedvgvyycm qalqtqsfgggtkleikgshhhhhhh

10

20

30

【表 6 - 8 9】

CAR22-34 完全 AA	404	malpvtallllplallllhaarpqvlqesgpglvkpsgtlsltcavsgasitsrhwwnwvrhsp gkglewigqiyhsgettynpslgsrvtisvdksknqislelrsvtadatatyycvrdylelat yygmdvwgqgttvtvssgggsgggsggggseivltqspslslpvtppgepasiscrssqslly sdgynyldwylqkpgqspqlllylgsnrsgvdpdrfsgsgsgtdftlqisgvetedvgvyycm qalqtqsfqggtkleiktttpprptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrglfacdi yiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrpfpeeeegg elrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrgrdpemggkprknpqeglyne lqkdkmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtaldhmqalppr
CAR22-34 完全 NT	405	atggccctccctgtcaccgcctgtcgtctccgctggctcttctgctccacgccgctcgcccc caagtgcagcttcaagaatcaggacctggcctcgtcaaaccctccggtaccctctccctcacc tgtgccgtgtccggggcatctatcacctcccgcactggtggaactgggtcagacactccccg ggaaagggattggagtgattggccagatctaccattccggcaccactacttacaaccgctcc ctgggctcccgcgtcactatctccgtggacaagtccaagaatcagattagcctggagctgcgg tccgtgaccgctgccgataccgcgacctattactgcgtgcgggactacctggagctcgccacg tactacggaatggacgtctggggccaggccactaccgtgaccgtgtcaagcggggggggcgga tcgggtggtggaggatcgggaggaggagggtcgaaatcgtgctgactcagtcacctgtcg ctgctgtgactcctgggaaccagcctcaattagctgccgctcgagccagtcctgtgtat tccgacggatacaactacctgattggtaccttcaaaagccggccagagcccgagctgctg atctacctgggttcaaacaggccctccggcgtgccggatcggttctcggaagcggtagcggg acagacttcacctgcaaatcagcggagtggaaactgaggacgtggcggtgtactactgcatg caggcgttgacagaccagtccttggacaaggcaccaagctcgaaatcaagaccactaccca gcaccgaggccacccacccggctcctaccatgcctcccagcctctgtccctgcgtccggag gcatgtagaccgcagctggtggggcgtgcatacccggggtcttgacttcgctgcgatatc tacatttgggccctctggctggtacttgcggggctcctgctgcttactcgtgatcactctt tactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtg cagactactcaagaggaggacggtgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgc gaactgcgctgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccag ctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagagga cgggacccagaaatggcggaagccgcgagaaagaatccccagagggcctgtacaacgag ctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaaga ggcaaaggccacgagcgtgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgct cttcacatgcaggccctgccgcctcgg

10

20

30

【表 6 - 9 0】

CAR22-35 scFv AA	406	qvqlvqsgaevkkgasvkvscasgytftsyymhwvrqapggglewmgiinpsggstsyaqk fqgrvtmtrdtststvmelsslrsedtavyycardlaaagnyyyygmdivwvqggttvtvssgg ggsgggsgggsseltqdpavsalggtaritcggdslrsyftswyqhkgqgqapvlviygn nnrpsgipdrfsgsssgntasltitgaqaedegdyycdsrdssgdhlfvfgggtklvtl
CAR22-35 scFv NT	407	caagtccaactcgtccagtcgggtgcagaagtcaagaaaccaggagcttcagtgaagtgtcg tgcaaggcctccggctataccttcacctcctactacatgcactgggtgcgcaggccccgggc cagggactggagtggatgggaattatcaacccttcgggcggctccactagctacgccccaaaag tttcaggggagagtgaccatgactcgggacacctcaacctcgaccgtgtacatggaactgtcg tactgcgggtccgaggacaccgcggtgtactactgcgcgcgcgacttgccgcgcgcgggaat tactactactacggaatggatgtctggggacaggaaccactgtgactgtgtcgtctggtggt ggtggaagcgggggaggggttcgggcggcgccggaagctcctccgaactgaccaggaccct gcggtgtccgtggccctgggacagaccgcaaggatcacgtgtcaggagacagcctccgctcc tacttcacatcctggtatcatcagaagcccgccaggctccggtgctggtcatctacgaaac aacaacagaccgtccgggattcccgaccggttcagcggctcctcatccggcaacaccgcctcc ctgaccatcaccggcgccaggccgaggacgaggagattactactgcgactcccgggatagc agcggcgatcacctcgtgttcgggggagggactaagcttactgtgctg
CAR22-35 可溶性 s cFv NT	408	atggccctccctgtcacgcctcgtgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccc caagtccaactcgtccagtcgggtgcagaagtcaagaaaccaggagcttcagtgaagtgtcg tgcaaggcctccggctataccttcacctcctactacatgcactgggtgcgcaggccccgggc cagggactggagtggatgggaattatcaacccttcgggcggctccactagctacgccccaaaag tttcaggggagagtgaccatgactcgggacacctcaacctcgaccgtgtacatggaactgtcg tactgcgggtccgaggacaccgcggtgtactactgcgcgcgcgacttgccgcgcgcgggaat tactactactacggaatggatgtctggggacaggaaccactgtgactgtgtcgtctggtggt ggtggaagcgggggaggggttcgggcggcgccggaagctcctccgaactgaccaggaccct gcggtgtccgtggccctgggacagaccgcaaggatcacgtgtcaggagacagcctccgctcc tacttcacatcctggtatcatcagaagcccgccaggctccggtgctggtcatctacgaaac aacaacagaccgtccgggattcccgaccggttcagcggctcctcatccggcaacaccgcctcc ctgaccatcaccggcgccaggccgaggacgaggagattactactgcgactcccgggatagc agcggcgatcacctcgtgttcgggggagggactaagcttactgtgctgggatcgaccaccat caccatcatcatcac

10

20

30

【表 6 - 9 1】

CAR22-35 可溶性 s cFv AA	409	malpvtalllplalllhaarqvqlvqsgaevkkgasvkvscasgytftsyymhwvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvmelsslrsedtavyycardlaaagn yyyygmdivwvqggttvtvssggggsgggsgggsseltqdpavsalggtaritcggdslrs yftswyqhkgqgqapvlviygnnnrpsgipdrfsgsssgntasltitgaqaedegdyycdsrds sgdhlfvfgggtklvtlqshhhhhhhh
CAR22-35 完全 AA	410	malpvtalllplalllhaarqvqlvqsgaevkkgasvkvscasgytftsyymhwvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvmelsslrsedtavyycardlaaagn yyyygmdivwvqggttvtvssggggsgggsgggsseltqdpavsalggtaritcggdslrs yftswyqhkgqgqapvlviygnnnrpsgipdrfsgsssgntasltitgaqaedegdyycdsrds sgdhlfvfgggtklvtlttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrglldfacdiy iwaplagtcgvlslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfeeeggce lrvkfsrsadapaykqqnqlynelnlgrreedyvldkrgrdpemggkprkrnpqeglynel qkdkmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatktdtydalhmqalppr

40

【表 6 - 9 2】

CAR22-35 完全 NT	411	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcgcccc caagtccaactcgtccagtcgggtgcagaagtcagaaaccaggagcttcagtgaagtgctg tgcaaggcctccggctataccttcacctcctactacatgactgggtgcccaggccccgggc cagggactggagtgatgggaattatcaacccttcgggcggctccactagctacgccaaaag tttcaggggagagtgaccatgactcgggacacctcaacctcgaccgtgtacatggaactgtcg tactgcgggtccgaggacaccgccgtgtactactgcgcgcgcgacttggccgccgggggaat tactactactacggaatggatgtctggggacaggggaaccactgtgactgtgtcgctgtggtggt ggtggaagcgggggagggaggttcgggcggcgccggaagctcctccgaactgaccaggaccct gcgggtgtccgtggccctgggacagaccgcaaggatcacgtgtcagggagacagcctccgctcc tacttcacatcctggtatcatcagaagcccggccaggctccgggtgctggtcatctacggaaac aacaacagaccgtccgggattcccgaaccggttcagcgggtcctcatccggcaacaccgcctcc ctgaccatcacgggcgccaggccgaggacgagggagattactactgcgactcccgggatagc agcggcgatcacctcgtgttcgggggagggactaagcttactgtgtgactactacccagca ccgaggccaccaccccggtcctaccatcgctcctccagcctctgtccctgcgtccggaggca tgtagaccgcagctggtggggccgtgcataccggggtcttgacttcgctgcgatatctac atttgggcccctctggtggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttac tgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcagaggcctgtgcag actactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggtgcgaa ctgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctc tacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgg gaccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccaagaggcctgtacaacgagctc caaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagggaacgcagaagaggc aaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctctt cacatgcagggcctgccgcctcgg
CAR22-36 scFv AA	412	Qvqlvqsgaevkpkpgasvkvsckasgytftsyyhwhvrqapggglewmgiinpsggstsyaqk fqgrvtmtrdtststvymelsslrstedtavyycardddfwsgsgafdiwgggttvtvssgggg sgggsggggssseltdqpavsvalgqtvrircqgdsrlsyyaswyqqkpgqapvlviygnn rpsqipdrfsgsssgntasltitgaqaeadyycnsrdssgnhpvfvfgggtkltl

10

20

30

【表 6 - 9 3】

CAR22-36 scFv NT	413	caagtccaactcgtccaatccggtgcagaagtcagaaacctggagcttccgtgaaagtgtcc tgcaaggcgtcaggctacacctttacgtcctactacatgactgggtccgccaggccccgggc cagggcttggagtggatgggaatcattaacccagcggcggcagcactagctatgccagaag ttccagggtcgggtcaccatgactagagacacatccacctccaccgtgtacatggaactgagc tccctgcggtccgaggataaccgcggtgtactactgcgcccgcatgacgacttctggtccggc tcgggggcatctcgacatctggggacagggcaccaccgtgactgtgtcctccggcggtggagga tcgggtggcgagggaagcgggtggaggcggatcttcgtccgaactgactcaggaccctgccgtg tcgggtggccctgggacagactgtgcgcacacctgtcaaggagatagcctgaggtcgactactat gcctcctggtaccagcagaagcccgacaggccccgggtgcttgtgatctacgggaagaacaac agaccgtcagggattccagaccggttcagcgggtcatccagcgggaataaccgcttccctcact atcaccggagcccaggcgaggacgagggccgattactactgcaactcgcgggactcatccggc aaccatcccgtggtgttcggagggggcactaagctgaccgtgctg	10
CAR22-36 可溶性 scFv NT	414	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgcgctcgcccc caagtccaactcgtccaatccggtgcagaagtcagaaacctggagcttccgtgaaagtgtcc tgcaaggcgtcaggctacacctttacgtcctactacatgactgggtccgccaggccccgggc cagggcttggagtggatgggaatcattaacccagcggcggcagcactagctatgccagaag ttccagggtcgggtcaccatgactagagacacatccacctccaccgtgtacatggaactgagc tccctgcggtccgaggataaccgcggtgtactactgcgcccgcatgacgacttctggtccggc tcgggggcatctcgacatctggggacagggcaccaccgtgactgtgtcctccggcggtggagga tcgggtggcgagggaagcgggtggaggcggatcttcgtccgaactgactcaggaccctgccgtg tcgggtggccctgggacagactgtgcgcacacctgtcaaggagatagcctgaggtcgactactat gcctcctggtaccagcagaagcccgacaggccccgggtgcttgtgatctacgggaagaacaac agaccgtcagggattccagaccggttcagcgggtcatccagcgggaataaccgcttccctcact atcaccggagcccaggcgaggacgagggccgattactactgcaactcgcgggactcatccggc aaccatcccgtggtgttcggagggggcactaagctgaccgtgctgggatcgaccaccatcac catcatcatcac	20
CAR22-36 -可溶性 scFv AA	415	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkgasvkvscasgytftsyyhmwvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrstedtavyycardddfwsg sgafdiwgggttvtvssgggsgggsgggssseltdpavsvalgqtvritcggdslrsyy aswyqqkpgqapvlviygknnrpsqipdrfsgsssgntasltitgaqaedeaddyencsrssg nhpvvfgggtklvtlgshhhhhhhh	30

【表 6 - 9 4】

CAR22-36 完全 AA	416	malpvtallllplallllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvscasgytftsyyhmwvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqqrvmttrdtststvmelsslrstedtavyyccardddfwsg sgafdiwgggtttvtvssgggsgggsgggssseltdqpavsvallgqtvritcggdslrsyy aswyqqkpgqapvlviygknnrpsgipdrfsgsssgntasltitgaqaeadadyycnsrdssg nhpvvfgggtklvtlttppaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrglfacdiyi waplagtcgvlllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrpfeeeeggccl rvkfssadapaykqqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelq kdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
CAR22-36 完全 NT	417	atggccctccctgtcaccgcctgtcgtctccgctggctcttctgctccacgccgtcggccc caagtccaactcgtccaatccggtgcagaagtcaagaaacctggagcttccgtgaaagtgtcc tgcaaggcgtcaggctacacctttacgtcctactacatgcactgggtccgccaggccccgggc cagggttggtgagtggaatcattaacccagcggcggcagcactagctatgccagaag ttccagggtcgggtcaccatgactagagacacatccacctccaccgtgtacatggaactgagc tccctgcggtccgaggataccgcggtgtactactgcgcccgcgatgacgacttctgttccggc tcgggggcattcgacatctggggacagggcaccaccgtgactgtgtcctccggcggtggagga tcgggtggcgagggaagcggtggaggcggtatcttcgtccgaactgactcaggacctgccgtg tcgggtggccctgggacagactgtgcgcacacctgtcaaggagatagcctgaggtcgactat gcctcctggtaccagcagaagcccgacaggccccgggtgcttgtgatctacgggaagaacaac agaccgtcagggtattccagaccggttcagcgggtcatccagcgggaataaccgcttccctcact atcaccggagcccaggcgaggacgagggcggttactactgcaactcgcgggactcatccggc aaccatcccgtggtgttcggagggggcactaagctgaccgtgctgaccactaccccagcaccg aggccacccaccccggtcctaccatcgctccaccgctctgtccctgcgtccggaggcatgt agaccgcagctggtggggcggtgcatacccggggtcttgacttcgctcgcatatctacatt tgggcccctctggtggtacttgcggggctcctgtgctttcactcgatgactctttactgt aagcgcggtcgaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagact actcaaggaggagcggtgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggtgcgaactg cgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctac aacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcgagaggacgggac ccagaaatggcggggaagccgcgcagaaagaatccccaaggggcctgtacaacgagctccaa aaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaa ggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcac atgcaggccctgccgcctcgg

10

20

30

【表 6 - 9 5】

CAR22-37 scFv AA	418	qvqlvqsgaevkkgasvkvscasgytftsyyhmvrqapggglewmgiinpsggstsyaqk fqgrvtmtrdtststvmelsslrsedtavyycarpegvsyydssvldywgggtlvtvssggg gsgggsgggsgsaltqpasvsgspggsitistgtssdvgykhvswyqhpgkapklmiy dvsnrpsgvsnrfsqsksgntasltvsglqaedeahyycvsyrfnslvfgtgtkvltvl
CAR22-37 scFv NT	117	caagtccaactcgtccagtcgggtgcagaagtcaagaaacccggagcttccgtgaaagtgtcc tgcaaggcctcgggtatataccttcaacttctactacatgcactgggtccggcaggcgccggga cagggactggaatggatgggtatcatcaacccctcgggcgggttccactagctacgccagaag ttccagggaagagtgaccatgacccgggacacttccacttcgaccgtgtacatggaactgagc agcctgaggagcgaggacaccgctgtactactgtgcccgccccgaggagtgctactac gattcctccgtgctggattactggggacagggaaacttgtgaccgtgtcctcgggaggaggc ggaagcggggcgagggtctggggaggcggtcccagtcgctctgacgcagcctgcgtcc gtgtccgggagccctggccagagcattactatttcatgcaccggtaccagctccgacgtgggc ggatataagcacgtgtcatggtaccagcatcaccgggaaaggccccaaagctgatgatctac gacgtgtcgaacagaccgagcggggtgtcaaatcgcttttccggttcaaagtcgggcaacact gcctcactcaccgtgtcgggcctccaagcggaggacgaagccactactactgcgtgtcctac cgcaacttcaactccttgggtgttcggcaccggcaccaaggtcaccgtcctg
CAR22-37 可溶性 s cFv NT	419	atggccctccctgtcacgcctcgtgcttccgctggctcttctgtctccacgccgtcggccc caagtccaactcgtccagtcgggtgcagaagtcaagaaacccggagcttccgtgaaagtgtcc tgcaaggcctcgggtatataccttcaacttctactacatgcactgggtccggcaggcgccggga cagggactggaatggatgggtatcatcaacccctcgggcgggttccactagctacgccagaag ttccagggaagagtgaccatgacccgggacacttccacttcgaccgtgtacatggaactgagc agcctgaggagcgaggacaccgctgtactactgtgcccgccccgaggagtgctactac gattcctccgtgctggattactggggacagggaaacttgtgaccgtgtcctcgggaggaggc ggaagcggggcgagggtctggggaggcggtcccagtcgctctgacgcagcctgcgtcc gtgtccgggagccctggccagagcattactatttcatgcaccggtaccagctccgacgtgggc ggatataagcacgtgtcatggtaccagcatcaccgggaaaggccccaaagctgatgatctac gacgtgtcgaacagaccgagcggggtgtcaaatcgcttttccggttcaaagtcgggcaacact gcctcactcaccgtgtcgggcctccaagcggaggacgaagccactactactgcgtgtcctac cgcaacttcaactccttgggtgttcggcaccggcaccaaggtcaccgtcctgggatcgaccac catcaccatcatcatcac

10

20

30

【表 6 - 9 6】

CAR22-37 可溶性 s cFv AA	420	Malpvtalllplalllhaarqvqlvqsgaevkkgasvkvscasgytftsyyhmvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvmelsslrsedtavyycarpegvsyy dssvldywgggtlvtvssggggsgggsgggsgsaltqpasvsgspggsitistgtssdv gykhvswyqhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsqsksgntasltvsglqaedeahyycvsy rnfslvfgtgtkvltvgshhhhhhhh
CAR22-37 完全 AA	421	malpvtalllplalllhaarqvqlvqsgaevkkgasvkvscasgytftsyyhmvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvmelsslrsedtavyycarpegvsyy dssvldywgggtlvtvssggggsgggsgggsgsaltqpasvsgspggsitistgtssdv gykhvswyqhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsqsksgntasltvsglqaedeahyycvsy rnfslvfgtgtkvltlttpprptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrglfacdi yiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfeeeggc elrvkfsrsadapaykqqnqllynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprnrnpqeglyne lqkdmaeyseigmgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr

40

【表 6 - 9 7】

CAR22-37 完全 NT	422	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccc caagtccaactcgtccagtcgggtgcagaagtcagaaacccggagcttccgtgaaagtgtcc tgcaaggcctcggggataccttcaacttctactacatgactgggtccggcaggcgccggga cagggactggaatggatgggtatcatcaacccctcgggcgggtccactagctacgccagaag ttccagggaagagtgaccatgacccgggacacttccacttcgaccgtgtacatggaactgagc agcctgaggagcgaggacaccgccgtgtactactgtgcccgccccgagggagtgtcctactac gattcctccgtgctggattactggggacagggaaacacttgtgaccgtgtcctcgggaggaggc ggaagcggggcgagggtctgggggaggcggctcccagtcgctctgacgcagcctgcgtcc gtgtccgggagccctggccagagcattactatttcatgaccgggtaccagctccgacgtgggc ggatataagcacgtgtcatggtaccagcatcacccgggaaggcccaagctgatgatctac gacgtgtcgaacagaccgagcggggtgtcaaactcgcttttccgggtcaaagtcgggcaacact gcctcactcacgtgtcgggcctccaagcggagagcgaagccactactactgctgttcctac cgcaacttcaactccttgggtgttcggcacccggcaccaaggtcaccgtcctgaccactaccca gcaccgaggccacccaccccggtcctaccatcgctccagcctctgtccctgcgtccggag gcatgtagaccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgctgcgatatac tacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgtgctttcactcgtgatcactctt tactgtaagcgcggtcgaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtg cagactactcaagaggaggacggctgttcatgccgggttcccagaggaggaggaaggcggctgc gaactgcgctgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccag ctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagagga cgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccaagagggcctgtacaacgag ctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaaga ggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgct cttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR22-38 scFv AA	423	qvqlvqsgaevkpkpgasvkvsckasgytftsyyhmhwrqapggglewmgiinpsggstsyaqk fqgrvtmtrdtststvmelsslraedtavyycarggygdyldafdiwgqgttvtvssggggs gggsgsggsqsaltqpasvsgspgqsitistgtssdvgyynyvswyqqhpgkapklmiyev snrpsgvsnrfsgksqntasltisglqaedeaddyccssytssstlvfgtgtqltlvl

10

20

30

【表 6 - 9 8】

CAR22-38 scFv NT	424	caagtccaactcgtccaatccggtgcagaagtcaagaaacctggagcatccgtgaaagtgtcc tgcaaggcgtccgggtatacgttcacctcctactacatgactgggtgcccaggccccggga cagggactggaatggatgggaatcatcaatcctagcggcggcagcaccagctacgccagaag tttcagggccgctgaccatgaccagggacactagcacctccaccgtgtacatggaattgtcc agcctgagagccgaggatactgctgtgtactactgcgccggggcggtacggagattatctg gacgccttcgacatttggggacagggcactactgtgaccgtgtcctcggggggagggcggtcg gggggcggcggtacaggatcaggcggttcccagtcgcgctgacacagcccgttccgtgagc gggtcgccccggcagtcctaccatttcgtgtaccggaacttctccgacgtcggtggctac aactacgtgtcgtggtaccagcaacatccgggaaaggcccaagctcatgatctacgaggtg tccaaccggccgtccgggggtgtcaaaccggttcagcgggtcaaagagcggaaacaccgcctcc ctcaccatctcgggactgcaggccgaggatgaagcggactactactgctcgagctacacttcc tcatctaccctggtgttcgggactggtaccagcttaccgtgctg	10
CAR22-38 可溶性 scFv NT	425	atggccctcctgtcaccgcctgtgtcttcgctggctcttctgctccacgcgctcgcccc caagtccaactcgtccaatccggtgcagaagtcaagaaacctggagcatccgtgaaagtgtcc tgcaaggcgtccgggtatacgttcacctcctactacatgactgggtgcccaggccccggga cagggactggaatggatgggaatcatcaatcctagcggcggcagcaccagctacgccagaag tttcagggccgctgaccatgaccagggacactagcacctccaccgtgtacatggaattgtcc agcctgagagccgaggatactgctgtgtactactgcgccggggcggtacggagattatctg gacgccttcgacatttggggacagggcactactgtgaccgtgtcctcggggggagggcggtcg gggggcggcggtacaggatcaggcggttcccagtcgcgctgacacagcccgttccgtgagc gggtcgccccggcagtcctaccatttcgtgtaccggaacttctccgacgtcggtggctac aactacgtgtcgtggtaccagcaacatccgggaaaggcccaagctcatgatctacgaggtg tccaaccggccgtccgggggtgtcaaaccggttcagcgggtcaaagagcggaaacaccgcctcc ctcaccatctcgggactgcaggccgaggatgaagcggactactactgctcgagctacacttcc tcatctaccctggtgttcgggactggtaccagcttaccgtgctgggatcgaccaccatcac catcatcatcac	20
CAR22-38 可溶性 scFv AA	426	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkgasvkvsckasgytftsyyhmwvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslraedtavyycarggygdy dafdiwqggttvtvssgggsgggsgsggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvgy nyvswyqghpgkapklmiyevsnrpsgvsnrfskskgnasltisglqaedeaddyccsyts sstlvfgtgtqltlvgshhhhhhhh	30

【表 6 - 9 9】

CAR22-38 完全 AA	427	malpvtallllplallllhaarpqvqlvqsgaevkkgasvkvscasgytftsyyhmhwvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvmelsslraedtavyycarggygdy dafdiwgggtttvtvssgggsgggsgsgsqsaltqpasvsgspggsititictgtssdvgy nyvswyqqhpgkapklmiyevsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeaddyccsyts sstlvfgtgtqltvltttpprptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyi waplagtcgvlllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfeeeeeggcel rvkfsrsadapaykqggnqlynelnlgrreedydldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelq kdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
CAR22-38 完全 NT	428	atggccctccctgtcaccgcctgtcgtctccgctggctcttctgctccacgccgctcgcccc caagtccaactcgtccaatccggtgcagaagtcaagaaacctggagcatccgtgaaagtgtcc tgcaaggcgtccgggtatacgttcacctcctactacatgcactgggtgcgccaggccccggga cagggactggaatggatgggaatcatcaatcctagcggcggcagcaccagctacgccagaag tttcagggccgctgaccatgaccaggacactagcacctccaccgtgtacatggaattgtcc agcctgagagccgaggatactgctgtgtactactgcgccccggggcgatagcgagattatctg gacgccttcgacatttggggacagggcactactgtgaccgtgtcctcggggggaggcggtcg gggggcggcgatcaggatcaggcggttcccagtcgcgctgacacagccgcttccgtgagc ggttcgccccgggcagtcacatcaccatttcgtgtaccggaacttccctccgacgtcggtggctac aactacgtgtcgtggtaccagcaacatccgggaaggcccaagctcatgatctacgaggtg tccaaccggccgtccggggtgtcaaaccggttcagcggtcaaagagcggaacaccgcctcc ctcaccatctcgggactgcaggccgagatgaagcggactactactgctcgagctacacttcc tcatctaccctggtgttcgggactggtaccagcttaccgtgtgaccactacccagcaccg aggccacccaccccggtcctaccatcgctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgt agaccgcagctggtggggcgtgcataccggggtcttgacttcgctcgcatatctacatt tgggcccctctggtggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgt aagcgcggtcgaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagact actcaagaggaggacggtgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggtgcgaactg cgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctac aacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcgagaggacgggac ccagaaatggcggggaagccgcgagaaagaatccccaaggggcctgtacaacgagctccaa aaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaa ggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcac atgcaggccctgcccgcctcg

10

20

30

【1 1 2 7】

いくつかの追加の C D 2 2 s c F v 配列を生成した。それらを下の表 6 B に記載する。クローン C D 2 2 - 6 4 および C D 2 2 - 6 5 は、上記クローン C D 2 2 - 1 2 の親和性成熟に基づいた。一部の実施形態において、親和性成熟した結合ドメインの C D 2 2 に対する親和性は、C D 2 2 - 1 2 の C D 2 2 に対する親和性より強い。一部の実施形態において、親和性成熟した結合ドメインの C D 2 2 に対する結合速度 (on-rate) は、C D 2 2 - 1 2 の C D 2 2 に対する結合速度より速い。

40

【1 1 2 8】

【表 7 - 1】

表6B: ヒトCD22 scFv配列

名称	配列番号	配列
CAR22-53 s cFv ドメイン AA	131	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYSDYA VSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDPYDFWSGYPDAFDIWGQGTMTVTVSSG GGGSGGGSGGGGSQALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKVII SEVNNRPSGVSHRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYFCSSYTSGRITLYVFGTGSKVTVLG
CAR22-53 s cFv NT	1108	GAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCT GTGCCATCTCCGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGCTGCTTGAAGCTGGATCAGGCAGTCCCC ATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTATAGTGATTATGCA GTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGC TGAAGTCTGTGACTCCCAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGATCCTTACGATTTTTG GAGTGGTTATCCTGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAGGT GGTGGTGGCAGCGCGCGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCCAGTCTGCCCTGACTCAGCCTG CCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACAGCAGTGACGT TGGTGGTTACAACATATGTCTCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCAAGGTCAATAATT TCTGAGGTCAATAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTCATCGCTTCTCTGGGTCCAAGTCTGGCAACA CGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTTCTGCAGCTCATA TACAAGTGGCAGGACTCTTTATGTCTTCGGAAGTGGGAGCAAGGTACCCGTCTTAGGT
CAR22-53 完全 AA	1109	<u>MALPVTALLLPLALLLHAARPE</u> EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSP SRGLEWLGRTYYRSKWYSDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDPYDFW SGYPDAFDIWGQGTMTVTVSSGGGSGGGSGGGGSQALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDV GGYNYVSWYQQHPGKAPKVIISEVNNRPSGVSHRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYFCSSY TSGRTLYVFGTGSKVTVLGTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGC ELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDFEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

20

30

【表 7 - 2】

CAR22-53 完全 NT (C D22-53 scFv + ヒトCD8 アルファ + 41-BB + C D3ゼータ)	1110	ATGGCCCTCCCTGTACACGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCCCCG AGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCTG TGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGTGCTTGGAACTGGATCAGGCAGTCCCCA TCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTATAGTGATTATGCAG TATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGCT GAACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGATCCTTACGATTTTGG AGTGGTTATCCTGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGACAATGGTCACCGCTCTCTTCAGGTG GTGGTGGCAGCGCGCGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGC CTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTT GGTGGTTACAACATATGTCTCCTGGTACCAACAGCACCAGGCAAAGCCCCCAAGTCAATAATTT CTGAGGTCAATAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTCATCGCTTCTCTGGGTCCAAGTCTGGCAACAC GGCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTTCTGCAGCTCATAT ACAAGTGGCAGGACTCTTTATGTCTTCGGAAC TGGGAGCAAGGTCAACGCTCTAGGTACCACTA CCCCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCC GGAGGCATGTAGACCCGAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCTGCGAT ATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGGTCTGCTGCTTTCACTCGTGATCACTC TTTACTGTAAGCGCGTTCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCTTCATGAGGCCTGT GCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTATGCCGGTTCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGC GAACTGCGCGTGAATTCAGCCGAGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCAGAACCAGC TCTACAACGAACTCAATCTTGGTTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACG GGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTC CAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCA AAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCA CATGCAGGCCCTGCCGCTCGG
CAR 22-57	132	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSNNAAWNIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYNDYV GSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARETDYGDYGAFDIWGQGTITVTVSSGGGG SGGGSGGGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSRNDIGAYESVSWYQQHPGNAPKLIHGV NNRPSGVFDRFSVSQSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSHTTTSTLYVFGTGKTVTLG
CAR22-58	133	EVQLQQSGPGLVNPSTLSITCAISGDSVSSNSAAWNIRQSPSRGLEWLGRTFYRSKWYNDYA VSVKGRITISPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAGDYYGLDVWGQGTITVTVSSGGGGSGG GGSGGGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSSSDVGGYNSVSWYQQHPGKAPKLMIYEVINR PSGVSHRFSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTYVFGTGKTVTLG

10

20

30

【表 7 - 3】

CAR22-59	134	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYA SSVRGRVSIINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARDRLQDGNWSDAFDVWGQGTMTVTVSSG GGGSGGGSGGGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSSSDIGGFNYVSWYQQHAGEAPKLMI YEVNRPSPGVSDFRSGSKSDNTASLTISGLQAEDEADYYCSSLASGSPLYVFGTGKVTVLG
CAR22-60	135	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYA SSVRGRVSIINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARDRLQDGNWSDAFDVWGQGTMTVTVSSG GGGSGGGSGGGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGGFNYVSWYQQHAGEAPKLMI YEVNRPSPGVSDFRSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSLASGSPLYVFGTGKVTVLG
CAR22-61	136	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYA SSVRGRVSIINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARDRLQDGNWSDAFDVWGQGTMTVTVSSG GGGSGGGSGGGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHAGEAPKLMI YEVNRPSPGVSDFRSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSLASGSPLYVFGTGKVTVLG
CAR22-62	137	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYA SSVRGRVSIINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARDRLQDGNWSDAFDVWGQGTMTVTVSSG GGGSGGGSGGGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHAGEAPKLMI YDVSNRPSPGVSDFRSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSLASGSPLYVFGTGKVTVLG
CAR22-63	138	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYA SSVRGRVSIINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARDRLQDGNWSDAFDVWGQGTMTVTVSSG GGGSGGGSGGGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHAGEAPKLMI YEVNRPSPGVSDFRSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSLASGSPLYVFGTGKVTVLG
CAR22-64	139	EVQLQQSGPGLVKPSQTLPLTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYA SSVRGRVSIINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARDRLQDGNWSDAFDVWGQGTMTVTVSSG GGGSGGGSGGGGPPQSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHAGEAPKLMI YDVSNRPSPGVSDFRSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSLASGSPLYVFGTGQTLTVL
CAR22-65	140	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSMLNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYA SSVRGRVSIINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARDRLQDGNWSDAFDVWGQGTMTVTVSSG GGGSGGGSGGGGSQSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHAGEAPKLMI YDVSNRPSPGVSDFRSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSLASGSPLYVFGTGQTLTVL

10

20

30

【1129】

一部の実施形態において、抗原結合ドメインは、表 6 A または 6 B に列挙したいずれかの重鎖結合ドメインアミノ酸配列の H C C D R 1、H C C D R 2 および H C C D R 3 を含む。実施形態において、抗原結合ドメインは、L C C D R 1、L C C D R 2 および L C C D R 3 をさらに含む。実施形態において、抗原結合ドメインは、表 6 A または 6 B に列挙したいずれかの軽鎖結合ドメインアミノ酸配列の L C C D R 1、L C C D R 2 および L C C D R 3 を含む。

【1130】

一部の実施形態において、抗原結合ドメインは、表 6 A または 6 B に列挙したいずれかの軽鎖結合ドメインアミノ酸配列の L C C D R 1、L C C D R 2 および L C C D R 3 の 1 つ、2 つまたは全て、ならびに表 6 A または 6 B に列挙したいずれかの重鎖結合ドメインアミノ酸配列の H C C D R 1、H C C D R 2 および H C C D R 3 の 1 つ、2 つまたは全てを含む。

40

【1131】

一部の実施形態において、C D R は、K a b a t 番号付けスキーム、C h o t h i a 番号付けスキーム、またはこれらの組合せに従って定義される。

【1132】

C D 2 2 - 6 4 および C D 2 2 - 6 5 は、クローン C D 2 2 - 1 2 の親和性成熟に基づいた。3 つ全てのコンストラクトを試験し、活性を有することを見出した（本明細書中の実施例 2 5 を参照されたい）。これらの観察に基づいて、これらの実施例を包含するよう

50

に構造属を設計した。したがって、一部の実施形態において、本明細書で説明されるCD 2 2結合ドメインは、配列：XRLQDGNSWSDAFDV（配列番号141）を有するHC DR 3を含む。一部の実施形態において、Xは、いずれかのアミノ酸、いずれかの標準的アミノ酸、非極性アミノ酸（例えば、G、A、V、L、I、P、M、FもしくはW）、芳香族環を有さない非極性アミノ酸（例えば、G、A、V、L、I、PもしくはM）、または酸性アミノ酸（例えば、DもしくはE）である。

【1133】

さらに、CAR 2 2-53およびCAR 2 2-57からCAR 2 2-65は、それらのCD Rに関して構造的類似性を有する。これらの実施例を包含するように構造属を設計した。したがって、一部の実施形態において、本明細書で説明されるCD 2 2結合ドメインは、配列：TGX₁X₂X₃DX₄GX₅X₆X₇X₈VS（配列番号__）を有するLC DR 1を含む。一部の実施形態において、X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₇もしくはX₈、またはこれらのいずれかの組合せは、各々独立して、いずれかのアミノ酸、例えば、いずれかの標準的アミノ酸である。一部の実施形態において、X₄もしくはX₅、または両方は、各々独立して、非極性アミノ酸（例えば、G、A、V、L、I、P、M、FもしくはW）、または芳香族環を有さない非極性アミノ酸（例えば、G、A、V、L、I、PもしくはM）である。一部の実施形態において、X₆は、芳香族アミノ酸（例えば、F、YまたはW）である。一部の実施形態において、X₁は、SまたはTであり、X₂は、RまたはSであり、X₃は、NまたはSであり、X₄は、VまたはIであり、X₅は、AまたはGであり、X₆は、YまたはFであり、X₇は、EまたはNであり、あるいはX₈は、SもしくはY、またはこれらのいずれかの組合せである。一部の実施形態において、X₁は、SまたはTであり、X₂は、RまたはSであり、X₃は、NまたはSであり、X₄は、VまたはIであり、X₅は、AまたはGであり、X₆は、YまたはFであり、X₇は、EまたはNであり、およびX₈は、SまたはYである。

【1134】

同様に、一部の実施形態において、本明細書で説明されるCD 2 2結合ドメインは、配列：X₁VX₂NRPS（配列番号__）を有するLC DR 2を含む。一部の実施形態において、X₁もしくはX₂、または両方は、各々独立して、いずれかのアミノ酸、例えば、いずれかの標準的アミノ酸である。一部の実施形態において、X₁は、酸性アミノ酸（例えば、DもしくはE）、非極性アミノ酸（例えば、G、A、V、L、I、P、M、FもしくはW）、または芳香族環を有さない非極性アミノ酸（例えば、G、A、V、L、I、PもしくはM）である。実施形態において、X₂は、非極性アミノ酸（例えば、G、A、V、L、I、P、M、FもしくはW）、芳香族環を有さない非極性アミノ酸（例えば、G、A、V、L、I、PもしくはM）、または極性非荷電アミノ酸（例えば、S、T、NもしくはQ）である。一部の実施形態において、X₁は、E、GもしくはDであり、および／またはX₂は、N、I、SもしくはTである。

【1135】

同様に、一部の実施形態において、本明細書で説明されるCD 2 2結合ドメインは、配列：SSX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉（配列番号__）を有するLC DR 3を含む。一部の実施形態において、X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₇もしくはX₈、またはこれらのいずれかの組合せは、各々独立して、いずれかのアミノ酸、例えば、いずれかの標準的アミノ酸である。一部の実施形態において、X₁は、芳香族アミノ酸（例えば、F、YもしくはW）または正荷電アミノ酸（例えば、K、RもしくはH）である。一部の実施形態において、X₂は、非極性アミノ酸（例えば、G、A、V、L、I、P、M、FもしくはW）、芳香族環を有さない非極性アミノ酸（例えば、G、A、V、L、I、PもしくはM）、または極性非荷電アミノ酸（例えば、S、T、NもしくはQ）である。一部の実施形態において、X₃は、極性非荷電アミノ酸（例えば、S、T、NまたはQ）である。一部の実施形態において、X₄は、非極性アミノ酸（例えば、G、A、V、L、I、P、M、FもしくはW）、芳香族環を有さない非極性アミノ酸（例えば、G、A、V、L、I、PもしくはM）、または極性非荷電アミノ酸（例えば、S、T、Nもしくは

10

20

30

40

50

Q)である。一部の実施形態において、X₅は、正荷電アミノ酸（例えば、K、RもしくはH）または極性非荷電アミノ酸（例えば、S、T、NもしくはQ）である。一部の実施形態において、X₆は、極性非荷電アミノ酸（例えば、S、T、NもしくはQ）、非極性アミノ酸（例えば、G、A、V、L、I、P、M、FもしくはW）、芳香族環を有さない非極性アミノ酸（例えば、G、A、V、L、I、PもしくはM）である。一部の実施形態において、X₇は、非極性アミノ酸（例えば、G、A、V、L、I、P、M、FもしくはW）、芳香族環を有さない非極性アミノ酸（例えば、G、A、V、L、I、PもしくはM）、または芳香族アミノ酸（例えば、F、YもしくはW）である。一部の実施形態において、X₈は、非存在であるか、または芳香族アミノ酸（例えば、F、YまたはW）である。一部の実施形態において、X₉は、非極性アミノ酸（例えば、G、A、V、L、I、P、M、FもしくはW）、芳香族環を有さない非極性アミノ酸（例えば、G、A、V、L、I、PもしくはM）である。一部の実施形態において、X₁は、YまたはHであり、X₂は、AまたはTであり、X₃は、SまたはTであり、X₄は、G、TまたはSであり、X₅は、RまたはSであり、X₆は、TまたはPであり、X₇は、LまたはYであり、X₈は、Yであるか、非存在であり、あるいはX₉は、VもしくはI、またはこれらのいずれかの組合せである。一部の実施形態において、X₁は、YまたはHであり、X₂は、AまたはTであり、X₃は、SまたはTであり、X₄は、G、TまたはSであり、X₅は、RまたはSであり、X₆は、TまたはPであり、X₇は、LまたはYであり、X₈は、Yであるか、非存在であり、およびX₉は、VまたはIである。s c F vドメインのヒトCD R配列の配列を、重鎖可変ドメインについて表7 A、7 Bまたは7 Cに、軽鎖可変ドメインについて表8 Aまたは8 Bに示す。「I D」は、各CD Rのそれぞれの配列番号を意味する。

【1136】

10

20

【表 8 - 1】

表 7A. CD22 CAR の重鎖可変ドメイン CDR。CDR は、「組合せ型」定義に従って同定される。

候補	HCDR1	配 列 番号	HCDR2	配 列 番号	HCDR3	配 列 番号
m971	GDSVSSNSAAWN	142	RTYYRSKWYNDYAVSVKS	181	EVTGDLEDAFDI	449
CAR22-1	GFTVSSNYMS	143	VIYSGGSTYYADSVKG	182	QSTPYDSSGYSGDAFDI	450
CAR22-2	GDSVSSNSAAWN	144	RTYYRSKWYNDYAVSVKS	183	DLGWIAVAGTFDY	451
CAR22-3	GDSVLSNSDTWN	145	RTYHRSTWYDDYASSVRG	184	DRLQDGNWSDAFDV	452
CAR22-4	GFTFDDYAMH	146	GISWNSGSIGYADSVKG	185	GLSSWHFHDALDI	453
CAR22-5	GFTFDDYAMH	147	GISWNSGSIGYADSVKG	186	DKGGGYDFWSGSDY	454
CAR22-6	GDSVSSNSATWT	148	RTYYRSTWYNDYAVSVKS	187	EGSGSYAY	455
CAR22-7	GYTFTGYMH	149	WINPNSGGTNYAQKFQG	188	DYWGYYGSGTLDY	456
CAR22-8	GYTFTSYGIS	150	WISAYNGNTNYAQKLQG	189	AGLALYSNYVPYYYGMDV	457
CAR22-9	GFTFSNAWMN	151	RIKSKTDGGTADYAAPVKQ	190	GATDV	458
CAR22-10	GDSVLSNSDTWN	152	RTYHRSTWYDDYASSVRG	191	DRLQDGNWSDAFDV	459
CAR22-11	GDSVSSNSAAWN	153	RTYYRSKWYNDYAVSVKS	192	EESSSGWYEGNWFDP	460
CAR22-12	GDSVLSNSDTWN	154	RTYHRSTWYDDYASSVRG	193	DRLQDGNWSDAFDV	461
CAR22-13	GGSISSSSYYWG	155	SIYSGSTYYNPSLKS	194	GRMDTAMAQI	462
CAR22-14	GYTFTSYMH	156	IINPSGGSTSYAQKFQG	195	DLDVSLDI	463
CAR22-15	GFTFSSYAMH	157	AISSNGGSTYYANSVKD	196	VHSSGYHFGPNDY	464
CAR22-16	GYTFTSYMH	158	IINPSGGSTSYAQKFQG	197	EAGVVAVDY	465

10

20

30

【表 8 - 2】

CAR22-17	GFTFSSYAMS	159	AISGSGGSTYYADSVKG	198	EPLFGVVEEDVDY	466
CAR22-18	GYTFTSYMH	160	IINPSGGSTSYAQKFQG	199	GSGSLGDAFDI	467
CAR22-19	GYTFTSYMH	161	IINPSGGSTSYAQKFQG	429	DGFGELSGAFDI	468
CAR22-20	GYTFTSYMH	162	IINPSGGSTSYAQKFQG	430	GPICSGSGSCLDY	469
CAR22-21	GYTFTSYMH	163	IINPSGGSTSYAQKFQG	431	GSYGDYGDFAFDI	470
CAR22-22	GGTFSSYALS	164	GIPIPIGTANYAQKFQG	432	DHKVVRFGY	471
CAR22-23	GYTFTSYMH	165	IINPSGGSTSYAQKFQG	433	GDYYMDV	472
CAR22-24	GFTFSSYAMS	166	YISSSSSTIYYADSVKG	434	DGPIRYFDHSAFDI	473
CAR22-25	GYTFTSYMH	167	IINPSGGSTSYAQKFQG	435	EMDDSSGPDY	474
CAR22-26	GYSFTGSWIG	168	IIPGDSSTRYSPSFQG	436	GFLRGDCCGALDI	475
CAR22-27	GGINSYYWS	169	FTSHSGNVKYNPSLTG	437	GLDPLFAYDAFEI	476
CAR22-28	GFTFSDYYMS	170	YISSSGSTIYYADSVKG	438	DDFWSGSVDY	477
CAR22-29	GYTFTSYMH	171	IINPSGGSTSYAQKFQG	439	EDDSSGYTSPFDY	478
CAR22-30	GYTFTGYMH	172	WINPNSGGTNYAQKFQG	440	EPASSSWYGYYYMDV	479
CAR22-31	GYTFTSYDIN	173	WMNPNSGNTGYAQKFQG	441	GDSNYWSYYGMDV	480
CAR22-32	GYTFTSYGIS	174	WISAYNGNTNYAQKLQG	442	FSSSDSYDY	481
CAR22-33	GFSLNTFGMSVS	175	LIDWDDDKYYSTSLRT	443	IYGGDRTNTQAPYFFDL	482
CAR22-34	GASITSRHWWN	176	QIYHSGTTTYPNPSLGS	444	DYLELATYYGMDV	483
CAR22-35	GYTFTSYMH	177	IINPSGGSTSYAQKFQG	445	DLAAAGNYYYGMDV	484
CAR22-36	GYTFTSYMH	178	IINPSGGSTSYAQKFQG	446	DDDFWSGSGAFDI	485
CAR22-37	GYTFTSYMH	179	IINPSGGSTSYAQKFQG	447	PEGVSYYDSSVLDY	486
CAR22-38	GYTFTSYMH	180	IINPSGGSTSYAQKFQG	448	GGYGDYLDFAFDI	487

【 1 1 3 7 】

【表 9 - 1】

表 7B. CD22 CAR の重鎖可変ドメイン CDR。

候補	HCDR1	配 列 番号	HCDR2	配 列 番号	HCDR3	配 列 番号
CAR22-53 Kabat	SNSAAWN	488	RTYYRSKWYS DYAVSVKS	499	DPYDFWSGYPDAFDI	510
CAR22-53 Chothia	GDSVSSNSA	489	YYRSKWY	500	DPYDFWSGYPDAFDI	511
CAR22-53 組合せ型 Kabat/Chot hia	GDSVSSNSAAWN	1111	RTYYRSKWYS DYAVSVKS	1113	DPYDFWSGYPDAFDI	1115
CAR22-53 IMGT	GDSVSSNSAA	1112	TYYSRSKWYS	1114	ARDPYDFWSGYPDAFDI	1116
CAR22-57 組合せ型	GDSVSNNNAAWN	490	RTYHRSTWYNDYVGSVKS	501	ETDYG DYGAFDI	512
CAR22-57 Kabat	NNNAAWN		RTYHRSTWYNDYVGSVKS		ETDYG DYGAFDI	
CAR22-58 組合せ型	GDSVSSNSAAWN	491	RTFYRSKWYNDYAVSVKG	502	GDYYYGLDV	513
CAR22-58 Kabat	SNSAAWN		RTFYRSKWYNDYAVSVKG		GDYYYGLDV	
CAR22-59 組合せ型	GDSVLSNSDTWN	492	RTYHRSTWYDDYASSVRG	503	DRLQDGNSWSDAFDV	514

10

20

30

【表 9 - 2】

CAR22-59 Kabat	SNSDTWN		RTYHRSTWYDDYASSVRG		DRLQDGNSWSDAFDV	
CAR22-60 組合せ型	GDSVLSNSDTWN	493	RTYHRSTWYDDYASSVRG	504	DRLQDGNSWSDAFDV	515
CAR22-60 Kabat	SNSDTWN		RTYHRSTWYDDYASSVRG		DRLQDGNSWSDAFDV	
CAR22-61 組合せ型	GDSVLSNSDTWN	494	RTYHRSTWYDDYASSVRG	505	DRLQDGNSWSDAFDV	516
CAR22-61 Kabat	SNSDTWN		RTYHRSTWYDDYASSVRG		DRLQDGNSWSDAFDV	
CAR22-62 組合せ型	GDSVLSNSDTWN	495	RTYHRSTWYDDYASSVRG	506	DRLQDGNSWSDAFDV	517
CAR22-62 Kabat	SNSDTWN		RTYHRSTWYDDYASSVRG		DRLQDGNSWSDAFDV	
CAR22-63 組合せ型	GDSVLSNSDTWN	496	RTYHRSTWYDDYASSVRG	507	DRLQDGNSWSDAFDV	518
CAR22-63 Kabat	SNSDTWN		RTYHRSTWYDDYASSVRG		DRLQDGNSWSDAFDV	
CAR22-64 組合せ型	GDSVLSNSDTWN	497	RTYHRSTWYDDYASSVRG	508	VRLQDGNSWSDAFDV	519
CAR22-64 Kabat	SNSDTWN		RTYHRSTWYDDYASSVRG		VRLQDGNSWSDAFDV	
CAR22-65 組合せ型	GDSMLSNSDTWN	498	RTYHRSTWYDDYASSVRG	509	VRLQDGNSWSDAFDV	520
CAR22-65 Kabat	SNSDTWN		RTYHRSTWYDDYASSVRG		VRLQDGNSWSDAFDV	

10

20

30

【 1 1 3 8 】

【表10-1】

表 7C. CD22 CAR の重鎖可変ドメイン CDR。CDR は、Kabat に従って同定される。

候補	HCDR1 番号	配列 番号	HCDR2 番号	配列 番号	HCDR3 番号	配列 番号
m971	SNSAAWN		RTYYRSKWYNDYAVSVKS		EVTGDLEDAFDI	
CAR22-1	SNYMS		VIYSGGSTYYADSVKG		QSTPYDSSGYISGDAPDI	
CAR22-2	SNSAAWN		RTYYRSKWYNDYAVSVKS		DLGWIAVAGTFDY	
CAR22-3	SNSDTWN		RTYHRSTWYDDYASSVRG		DRLQDGNWSDAFDV	
CAR22-4	DYAMH		GISWNSGSGYADSVKG		GLSSWHFHDALDI	
CAR22-5	DYAMH		GISWNSGSGYADSVKG		DKGGGYDFWGSDDY	
CAR22-6	SNSATWT		RTYYRSTWYNDYAVSVKS		EGSGSYAY	
CAR22-7	GYMH		WINPNSGGTNYAQKFQG		DYWGYYGSGTLDY	
CAR22-8	SYGIS		WISAYNGNTNYAQLQG		AGLALYSNYVPYYYGMDV	
CAR22-9	NAWMN		RIKSKTDGGTADYAAPVKG		GATDV	
CAR22-10	SNSDTWN		RTYHRSTWYDDYASSVRG		DRLQDGNWSDAFDV	
CAR22-11	SNSAAWN		RTYYRSKWYNDYAVSVKS		EESSSGWYEGNWFDI	
CAR22-12	SNSDTWN		RTYHRSTWYDDYASSVRG		DRLQDGNWSDAFDV	
CAR22-13	SSSYWG		SIYYSGSTYYNPSLKS		GRMDTAMAQI	
CAR22-14	SYMH		IINPSGGSTSYAQKFQG		DLDVSLDI	
CAR22-15	SYAMH		AISSNGGSTYYANSVKD		VHSSGYHFGPNDDY	
CAR22-16	SYMH		IINPSGGSTSYAQKFQG		EAGVVAVDY	
CAR22-17	SYAMS		AISGSGGSTYYADSVKG		EPLFGVVEEDVDY	

10

20

30

【表 10 - 2】

CAR22-18	SYMH	IINPSGGSTSYAQKFQG	GSGSLGDAFDI
CAR22-19	SYMH	IINPSGGSTSYAQKFQG	DGFGELSGAFDI
CAR22-20	SYMH	IINPSGGSTSYAQKFQG	GPIGCSGGSCLDY
CAR22-21	SYMH	IINPSGGSTSYAQKFQG	GSYGDYGDFAFDI
CAR22-22	SYAIS	GIIPIFGTANYAQKFQG	DHKVVRFGY
CAR22-23	SYMH	IINPSGGSTSYAQKFQG	GDYYMDV
CAR22-24	SYAMS	YISSSSSTIYADSVKG	DGPIRYFDHSAFDI
CAR22-25	SYMH	IINPSGGSTSYAQKFQG	EMDDSSGPDY
CAR22-26	GSWIG	IIPGDSDDTRYSPSFQG	GFLRGDCCGALDI
CAR22-27	SYWVS	FTSHSGNVKYNPSLTG	GLDPLFAYDAFEI
CAR22-28	DYMS	YISSSGSTIYADSVKG	DDFWSGSVDY
CAR22-29	SYMH	IINPSGGSTSYAQKFQG	EDDSSGYTSPFDY
CAR22-30	GYMH	WINPNSGGTNYAQKFQG	EPASSSWYGYYYMDV
CAR22-31	SYDIN	WMNPNSGNTGYAQKFQG	GDSNYWSYYGMDV
CAR22-32	SYGIS	WISAYNGNTNYAQKLQG	FSSSDSYDY
CAR22-33	TFGMSVS	LIDWDDDKYVSTSLRT	IYGGDRNTQAPYFFDL
CAR22-34	TSRHWWN	QIYHSGTTTTYNPSLGS	DYLELATYYGMDV
CAR22-35	SYMH	IINPSGGSTSYAQKFQG	DLAAAGNYYYGMDV
CAR22-36	SYMH	IINPSGGSTSYAQKFQG	DDDFWSGSGAFDI
CAR22-37	SYMH	IINPSGGSTSYAQKFQG	PEGVSYYDSSVLDY
CAR22-38	SYMH	IINPSGGSTSYAQKFQG	GGYGDYLDFAFDI

【 1 1 3 9 】

【表 11-1】

表 8A. CD22 CAR の軽鎖可変ドメイン CDR。この表中の LC CDR 配列は、Kabat または組合せ型定義のもとで同じ配列を有する。

候補	LCDR1	配列 番号	LCDR2	配列 番号	LCDR3	配列 番号
m971	RASQTIWSYLN	521	AASSLQS	560	QQSYSSIPQT	599
CAR22-1	SGSSSNIGSNYVY	522	RNNQRPS	561	AAWDDSLSGYV	600
CAR22-2	TGTSSDVGGYNYVS	523	DVSKRPS	562	SSYTSSSLNHV	601
CAR22-3	TGTSSDVGGYNYVS	524	DVSNRPS	563	SSYTSSSTPYV	602
CAR22-4	QGDSLRSYYAS	525	GKNNRPS	564	NSRDSSGNHLWV	603
CAR22-5	QGDSLRSYYAS	526	GKNNRPS	565	NSRDSSGWV	604
CAR22-6	TGTSSDVGGYNYVS	527	DVSNRPS	566	SSYTSSSTLYV	605
CAR22-7	TGTSSDVGGYNYVS	528	DVSSRPS	567	SSYAGSNTLV	606
CAR22-8	TRSSGSTIASNYVQ	529	EDNQRPS	568	QSYDSSNFWV	607
CAR22-9	SGSSSNIGSNYVY	530	RNNQRPS	569	AAWDDSLSGPV	608
CAR22-10	TGTSSDVGGYNYVS	531	DVSNRPS	570	SSYTSSSTLVYV	609
CAR22-11	QGDSLRSYYAS	532	GKNHRPS	571	HSRDSSGNHL	610
CAR22-12	TGTSSDVGGYNYVS	533	DVSNRPS	572	SSYTSSSTLYV	611
CAR22-13	TGSSGSFASSYVQ	534	EDNQRPS	573	QSYDGATWV	612
CAR22-14	SGTSSDVGGYNSVS	535	DVNNRPS	574	SSYTSSSTLF	613
CAR22-15	QGDSLRTYYAT	536	DENNRPS	575	SSRDSSGNPSCV	614
CAR22-16	TGTSSDVGGYNYVS	537	DVSNRPS	576	SSYTSSSTWV	615

10

20

30

【表 1 1 - 2】

CAR22-17	RSSQSLLAGNGHNYLD	538	LGSNRAS	577	MQALQNPLT	616
CAR22-18	TGSSSDVGGYNYVS	539	EVSNRPS	578	SSYTSSSTLV	617
CAR22-19	TGTSSDVGGYNYVS	540	DVSNRPS	579	SSYASSSTLV	618
CAR22-20	TGTNSDVGRYNYVS	541	EVSYRPS	580	SSYTSSSTLD	619
CAR22-21	TGTSSDVGGYKYVS	542	DVSNRPS	581	SSYTSSSTLV	620
CAR22-22	TLSSGHSSYAIA	543	VNSDGSLSKGD	582	QTWGSMAI	621
CAR22-23	TGTSSDVGGYNYVS	544	EVSKRPS	583	SSYTSSGTLV	622
CAR22-24	QGDSLRSYYAS	545	GKNNRPS	584	NSRDSSGNPYV	623
CAR22-25	TGTSSDVGGYNYVS	546	EVSNRPS	585	SSYTSSSTLV	624
CAR22-26	RSSQSLHLSNGYNYLD	547	LGSNRAS	586	MQALQTPPWT	625
CAR22-27	RSSQSLHLSNGYNYLD	548	LGSNRAS	587	MQVLQTPPLT	626
CAR22-28	GGTNIGSKNVH	549	YDSRPS	588	QVWDSSSDHWV	627
CAR22-29	GGHNIRSKNVH	550	YDGDPRS	589	QVWDSDSDHYV	628
CAR22-30	RASQSINTYLN	551	AASNLQS	590	QQSYSSLLT	629
CAR22-31	TGTSSDVGGYNYVS	552	DADKRPS	591	CSYAGGSTIWV	630
CAR22-32	RASQSVTSNLA	553	AASTRAT	592	QQYHTWPPLT	631
CAR22-33	RSSQSLHLSNGYNYLD	554	LGSNRAS	593	MQALQTPWT	632
CAR22-34	RSSQSLLYSDGYNYLD	555	LGSNRAS	594	MQALQTQS	633
CAR22-35	QGDSLRSYFTS	556	GNNNRPS	595	DSRDSSGDHLV	634
CAR22-36	QGDSLRSYYAS	557	GKNNRPS	596	NSRDSSGNHPVV	635
CAR22-37	TGTSSDVGGYKHVS	558	DVSNRPS	597	VSYRNFNSLV	636
CAR22-38	TGTSSDVGGYNYVS	559	EVSNRPS	598	SSYTSSSTLV	637

10

20

30

【 1 1 4 0 】

【表 1 2】

表 8B. CD22 CAR の軽鎖可変ドメイン CDR。この表中の LC CDR 配列は、Kabat または組合せ型定義のもとで同じ配列を有する。

候補	LCDR1	配列 番号	LCDR2	配列 番号	LCDR3	配列 番号
CAR22-53 Kabat	TGTSSDVGGYNYVS	638	EVNNRPS	649	SSYTSGRTLYV	660
CAR22-53 Chothia	TSSDVGGYNY	639	EVN	650	YTSGRTLY	661
CAR22-53 組合せ型	TGTSSDVGGYNYVS	1117	EVNNRPS	1119	SSYTSGRTLYV	1121
CAR22-53 IMGT	SSDVGGYNY	1118	EVN	1120	SSYTSGRTLYV	1122
CAR22-57 組合せ型	TGSRNDIGAYESVS	640	GVNNRPS	651	SSHTTTSTLYV	662
CAR22-58 組合せ型	TGSSSDVGGYNSVS	641	EVINRPS	652	SSYTSSSTLYV	663
CAR22-59 組合せ型	TGSSSDIGGFNYVS	642	EVTNRPS	653	SSYASGSPLYV	664
CAR22-60 組合せ型	TGTSSDIGGYNYVS	643	EVSNRPS	654	SSYTSSSTLYV	665
CAR22-61 組合せ型	TGTSSDVGGYNYVS	644	EVSNRPS	655	SSYTSSSTLYV	666
CAR22-62 組合せ型	TGTSSDVGGYNYVS	645	DVSNRPS	656	SSYTSSSTLYV	667
CAR22-63 組合せ型	TGTSSDVGGYNYVS	646	EVSNRPS	657	SSYTSSSTLYI	668
CAR22-64 組合せ型	TGTSSDVGGYNYVS	647	DVSNRPS	658	SSYTSSSTLYV	669
CAR22-65 組合せ型	TGTSSDVGGYNYVS	648	DVSNRPS	659	SSYTSSSTLYV	670

【 1 1 4 1 】

【表 13-1】

表9A. CD22抗体分子の重鎖可変領域

候補	ID	重鎖可変領域
m971	700	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSK WYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREVTGDLEDAFDIWG QGTMTVT
CAR22-1	701	QVQLVQSGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWVSVIYSGGST YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASQSTPYDSSGGYYSGDAFDI WGQGTMTVT
CAR22-2	702	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSK WYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDLGWIAVAGTFDYW GQGTLVTV
CAR22-3	703	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRYYHRST WYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGAYYCARDRLQDGNSWSDAF DVWGQGTMTVT
CAR22-4	704	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSG SIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKGLSSWHFHDALDIWG QGTMTVT
CAR22-5	705	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSG SIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDKGGGYDFWGS D YWGQGTTLVTV
CAR22-6	706	EVQLQQSGPGLVKPSLTSLTCAISGDSVSSNSATWTWIRQSPSRGLEWLGRYYRST WYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREGSGSYAYWGQGT LTV
CAR22-7	707	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHWVRQAPGQGLEWMGWINP-N SGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSLRSDDTAVYYCARDYWGYYGSGTLD YWGQGTTLVTV
CAR22-8	708	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNG NTNYAQKLQGRVTMTTDTSTAYMELSLRSDDTAVYYCARAGLALYSNYVPYYY YGMDVWGQGTTLVTV

10

20

30

【表 1 3 - 2】

CAR22-9	709	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCVASGFTFSNAWMNVVRQAPGKGLEWVGRIKSKTD GGTADYAAPVKGRFTISRDDSKNTMYLQMNSLKTEDTGVVYCYITGATDVWGQGT TV
CAR22-10	710	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRITYHRST WYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVVYCYCARDRLQDGNSWSDAF DVWGQGTMTVTV
CAR22-11	711	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRITYYRSK WYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVVYCYAREESSSGWYEGNWFD PWGQGTLLTVTV
CAR22-12	712	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRITYHRST WYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVVYCYCARDRLQDGNSWSDAF DVWGQGTMTVTV
CAR22-13	713	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYSGST YYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAAADTAVVYCYARGRMDTAMAQIWGQGT MTVTV
CAR22-14	714	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGG STSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVVYCYCARDLDVSLDIWGQGT MTVTV
CAR22-15	715	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEYSVAISSNGGS TYYANSVKDRFTISRDNKNTLYLQMGSLRAEDMAVVYCYCARVHSSGYYHPGPNDYW GQGTLLTVTV
CAR22-16	716	EVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGG STSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVVYCYAREAGVVAVDYWGQGT LTVTV
CAR22-17	717	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS TYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVVYCYAKEPLFGVVEEDVDYWG QGTLLTVTV
CAR22-18	718	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGG STSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVVYCYARGSGSLGDAFDIWGQGT MTVTV

10

20

30

【表 1 3 - 3】

CAR22-19	719	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGG STSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARDGFGELSGAFDIWGQ GTMVTV
CAR22-20	720	EVQLVESGAIEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGG STSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGPIGCSGGSCLDYWG QGTLVTV
CAR22-21	721	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGG STSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGSYGDYGDAFDIWGQ GTTVTV
CAR22-22	722	EVQLVESGAIEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTA NYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDHKVVRFGYWGQGTLLV TV
CAR22-23	723	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGG STSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGDYYMDVWGKGTTV TV
CAR22-24	724	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSYISSSSTI YYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGPIRYFDHSKAFDIWG QGTMVTV
CAR22-25	725	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGG STSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTAYMELSLRSDDTAVYYCAREMDDSSGPDYWGQG TLVTV
CAR22-26	726	EVQLVESGAIEVKKPGESLKISCKSGYSFTGSWIGWGRQMPGKGLEWMGIHYPGDS TRYSPSFQGVITISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGFLRGDCCGALDIWG QGTMVTV
CAR22-27	727	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGGSINSYYWSWIRQAPGKGLEWIAFTSHSGNVK YNPSLTGRVTIAVDTSKNQFYLEVTSVTAADTAVYFCARGLDPLFAYDAFEIWGLGT MVTV
CAR22-28	728	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTI YYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDDFWGSVDYWGQGTLL VTV

10

20

30

【表 1 3 - 4】

CAR22-29	729	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGG STSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCAREDDSSGYTSPFDYWG QGTLVTV
CAR22-30	730	EVQLVESGAIEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNS GGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSLRSDDTAVYYCAREPASSSWYGYYYY MDVWGKGTLLTV
CAR22-31	731	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQATGQGLEWMGWMNPNS GNTGYAQKFQGRVTMTRNTSISTAYMELSLRSEDTAVYYCARG-DSNYWSYYGMD VWGQGTLLTV
CAR22-32	732	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNG NTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELSLRSDDTAVYYCASFSSSDSYDYWGQGT LLTV
CAR22-33	733	QVNLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLNFGMSVSWIRQPPGKALEWLALIDWDDD KYYSTSLRRLTISKDTAKNQVVLRLMTNMDPMDTATYYCARIYGGDRNTQAPYFFD LWGQGTLLTV
CAR22-34	734	QVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGASITSRHWWNVVRHSPGKGLEWIGQIYHSGT TTYNPISLGSRTISVDKSKNQISLELRVTAADTATYYCVRDYLELATYYGMDVWGQ GTTTV
CAR22-35	735	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGG STSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARDLAAAGNYYYYGMD VWGQGTTTV
CAR22-36	736	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGG STSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARDLDFWSGSGAFDIWG QGTTTV
CAR22-37	737	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGG STSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARPEGVSYYDSSVLDYW GQGTLLTV
CAR22-38	738	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGG STSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRAEDTAVYYCARGGYGDYLDADFIDWG QGTTTV

10

20

30

【表 1 4】

表9B. CD22抗体分子の重鎖可変領域

候補	配列 番号	重鎖可変領域
CAR22-5 3	671	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSK WYSDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDPYDFWSGYPDAFDI WGQGTMVTVSS
CAR22-5 7	672	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSNNAAWNWIRQSPSRGLEWLGRYYHRST WYNDYVGSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARETDYGDYGAFDIWG QGTTVTVSS
CAR22-5 8	673	EVQLQQSGPGLVNPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRIFYRSK WYNDYAVSVKGRITISPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAGGDYGLDVGWQGG TTVTVSS
CAR22-5 9	674	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRYYHRST WYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARDRLQDGNSWSDAF DVWGQGTMTVTVSS
CAR22-6 0	675	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRYYHRST WYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARDRLQDGNSWSDAF DVWGQGTMTVTVSS
CAR22-6 1	676	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRYYHRST WYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARDRLQDGNSWSDAF DVWGQGTMTVTVSS
CAR22-6 2	677	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRYYHRST WYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARDRLQDGNSWSDAF DVWGQGTMTVTVSS
CAR22-6 3	678	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRYYHRST WYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARDRLQDGNSWSDAF DVWGQGTMTVTVSS
CAR22-6 4	679	EVQLQQSGPGLVKPSQTLPLTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRYYHRST WYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARVRLQDGNSWSDAF DVWGQGTMTVTVSS
CAR22-6 5	680	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSMLNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRYYHRST WYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARVRLQDGNSWSDAF DVWGQGTMTVTVSS

10

20

30

【 1 1 4 3 】

【表 15-1】

表10A. CD22抗体分子の軽鎖可変領域

候補	ID	軽鎖可変領域
m971	739	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQTIWSYLNWYQQRPGKAPNLLIYAASSLQSGVP SRFSGRSGTDFLTITSSSLQAEDFATYYCQSYSPQTFGQGTKLEIK
CAR22-1	740	SYVLTPPPSASGTPGQRTITSCSGSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGV PDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGYVFGTGTCLTVL
CAR22-2	741	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQHPGKAPKLMYDVSKRPS GVSNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDADYYCSSYTSSSLNHVFGTGTCLTVL
CAR22-3	742	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQHPGKAPKLMYDVSNRPS GVSNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDADYYCSSYTSSSTPYVFGTGTCLTVL
CAR22-4	743	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYASWYQKPGQAPVLVIYGNRPSGIP DRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDADYYCNSRDSSGNHLWVFGGGTCLTVL
CAR22-5	744	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYASWYQKPGQAPVLVIYGNRPSGIP DRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDADYYCNSRDSSGWVFGGGTCLTVL
CAR22-6	745	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQHPGKAPKLMYDVSNRPS GVSNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTCLTVL
CAR22-7	746	QSALTQPGSVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQHPGKAPKLIYDVSSRPSG VSNRFGSQSGNTASLTISGLQAEDADYYCSSYAGSNTLVFGTGTCLTVL
CAR22-8	747	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNQRPSGV PDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSNPWVFGGGTCLTVL
CAR22-9	748	SYVLTPPPSASGTPGQRTITSCSGSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGV PDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGPVFGGGTCLTVL
CAR22-10	749	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQHPGKAPKLMYDVSNRPS GVSNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTCLTVL
CAR22-11	750	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYASWYQKPGQAPVLVIYGNRPSGIP DRFSGSSSGDTDSLITITGAQAEDADYYCHSRDSSGNHLFGGGTCLTVL
CAR22-12	751	QSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQHPGKAPKLMYDVSNRPS GVSNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTCLTVL

10

20

30

【表 15-2】

CAR22-1 3	752	NFMLTQPHSVSESPGKTVTIPCTGSSGSFASSYVQWYQQRPGSAPATVIYEDNQRP SGV PDRFSGSV DSSSNSASLTISGLKTEDEAVYYCQSYDGATWVFGGGTKLTVL
CAR22-1 4	753	QSALTQPASVSGSPGQSITISCSGTSSDVGGYNSVSWYQQYPGKAPKLMYDVNNRPS GVSSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLFFGAGTKVTVL
CAR22-1 5	754	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYATWYQQKPGQAPVLVFIYDENNRPSGIP DRFSGSSSGNTASLTITGTQAEDEADYYCSSRDSSGNPSCVFGGGTKLTVL
CAR22-1 6	755	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPS GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTWVFGGGTKLTVL
CAR22-1 7	756	DVVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLAGNGHNYLDWYLLQKPGQSPQLLIYLGSN RASGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQNPLTFGGGKLEIKR
CAR22-1 8	757	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYEVSNRPS GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLVFGTGKTVL
CAR22-1 9	758	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPS GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYASSSTLVFGGGTKVTVL
CAR22-2 0	759	QSALTQPAYVSGSPGQSITISCTGTNSDVGRYNYVSWYQQHPGKAPKLMYEVSYRPS GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLDFGTGKTVL
CAR22-2 1	760	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYKYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPS GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLVFGGGTKLTVL
CAR22-2 2	761	HVILTQPPSASASLGASVKLTCTLSSGHSSYAIAWHQQQPEKGPRYLMKVNSDGSLSK GDGIPDRFSGSTSGAERYLTISSLQSEDEADYYCQTWGS GMAIFGGGKLTVL
CAR22-2 3	762	QSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYEVSKRPS GV PDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSGTLVFGGGTKLTVL
CAR22-2 4	763	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYASWYQQKPGQAPVLVIY GKNNRPSGIP DRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYRNSRDSSGNPYVFGTGKTVL
CAR22-2 5	764	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYEVSNRPS GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLVFGTGKLTVL
CAR22-2 6	765	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLLQKPGQSPQLLIYLGSNR ASGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPPWTFGQGT KLEIKR

10

20

30

【表 1 5 - 3】

CAR22-2 7	766	EIVLTQSPLSLPVTGPGEASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRA SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQVLTQTPPLTFGGGTKVDIKR
CAR22-2 8	767	SYVLTQPPSVSVAPGKTATITCGGTNIGSKNVHWYQQKPGQAPVLAIIYDSDRPSGIPE RFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYFCQVWDSDDH-WVFGGGTKLTVL
CAR22-2 9	768	SYELTQPPSVSVAPGETASACGGHNIRSKNVHWYQQKPGQAPVLVISYDGDPSGIPE RFSGSNLGSATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSDDH-YVFGTGTKVTVL
CAR22-3 0	769	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINTYLNWYQQKPGKPPKLLIYAASNLQSGVP SRFSGSGSGTHFTLTISLQPDFAFYCQSYSSLLTFGGGTKLEIK
CAR22-3 1	770	QSVLTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQHPGEAPKLIYDADKRPS GISNRFSSGKSGNTASLTISGLQVEDEADYYCCSYAGGSTWVFGGGTKVTVL
CAR22-3 2	771	EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVTSNLAWYQQKPGQAPRLIYAASSTRATGIP ARFSGSGSGTEFTLTISSMQSEDAVYFCQQYHTWPPLTFGGGTKVEIKT
CAR22-3 3	772	DVVMTQSPLSLPVTGPGEASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNR ASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPWTFGGGTKLEIK
CAR22-3 4	773	EIVLTQSPLSLPVTGPGEASISCRSSQSLLYSDGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRA SGVPDRFSGSGSGTDFTLQISGVETEDVGVYYCMQALQTQSFQGTGKLEIK
CAR22-3 5	774	SSELTQDPAVSVALGQTARITCQGDSLRSYFTSWYHQKPGQAPVLVIYGNRNRPSGIP DRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEGDYCDSDSSGDHLVFGGGTKLTVL
CAR22-3 6	775	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIP DRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNHPVVFGGGTKLTVL
CAR22-3 7	776	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYKHSVWYQHHPGKAPKLMYDVSNRPS GVSNRFSGSKSGNTASLTVSGLQAEDEAHYYCVSYRNFNSLVFGTGTKVTVL
CAR22-3 8	777	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQHPGKAPKLMYEVSNRPS GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLVFGTGTQLTVL

10

20

【 1 1 4 4 】

【表 16】

表10B. CD22抗体分子の軽鎖可変領域

候補	ID	軽鎖可変領域
CAR22-53	681	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKVIIEVNNRPSG VSHRFGSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYFCSSYTSGRITLYVFGTGSKVTVLG
CAR22-57	682	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSRNDIGAYESVSWYQQHPGNAPKLIIHGVNNRPSG VFDRFSVSQSGNTASLTISGLQAEDEADYCCSHTTTSTLYVFGTGKVTVLG
CAR22-58	683	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSSSDVGGYNSVSWYQQHPGKAPKLMIYEVINRPSG VSHRFGSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYCCSSYTSSTYVFGTGKVTVLG
CAR22-59	684	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSSSDIGGFNYVSWYQQHAGEAPKLMIYEVNTRPSG VSDRFGSGKSDNTASLTISGLQAEDEADYCCSSYASGSPLYVFGTGKVTVLG
CAR22-60	685	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYEVSNRPSG VSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYCCSSYTSSTLYVFGTGKLTVLG
CAR22-61	686	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYEVSNRPS GVSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYCCSSYTSSTLYVFGTGKVTVLG
CAR22-62	687	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPS GVSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYCCSSYTSSTLYVFGTGKVTVLG
CAR22-63	688	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYEVSNRPS GVSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYCCSSYTSSTLYIFGTGKVTVLG
CAR22-64	689	QSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPS GVSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYCCSSYTSSTLYVFGTGQTLTVL
CAR22-65	690	QSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPS GVSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYCCSSYTSSTLYVFGTGQTLTVL

10

20

【1145】

一部の実施形態において、抗原結合ドメインは、表9Aまたは9Bに列挙したいずれかの重鎖結合ドメインアミノ酸配列のHC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3を含む。実施形態において、抗原結合ドメインは、LC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3をさらに含む。実施形態において、抗原結合ドメインは、表10Aまたは10Bに列挙したいずれかの軽鎖結合ドメインアミノ酸配列のLC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3を含む。

30

【1146】

一部の実施形態において、抗原結合ドメインは、表10Aまたは10Bに列挙したいずれかの軽鎖結合ドメインアミノ酸配列のLC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3の1つ、2つまたは全て、ならびに表9Aまたは9Bに列挙したいずれかの重鎖結合ドメインアミノ酸配列のHC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3の1つ、2つまたは全てを含む。

【1147】

一部の実施形態において、CDRは、Kabat番号付けスキーム、Chothia番号付けスキーム、またはこれらの組合せに従って定義される。

40

【1148】

VLおよびVHドメインがscFv内に出現する順番は様々（すなわち、VL-VH、またはVH-VL方向）であってもよく、この場合、各サブユニットが配列GGGGS（配列番号18）〔例えば、(G4S)₃（配列番号107）または(G4S)₄（配列番号106）〕を含む「G4S」（配列番号18）サブユニットの3つか4つのコピーが、前記可変ドメインを接続して、scFvドメイン全体を作り出すことができる。代替的に、CARコンストラクトは、例えば、配列GSTSGSGKPGSGEGSTKG（配列番号1322）を包含するリンカーを包含していてもよい。

【1149】

50

これらのクローンは全て、CD3ゼータ鎖由来の共刺激ドメインのシグナルドメインにおけるQ/K残基変化を含有する。

【1150】

CAR20コンストラクト

抗CD20単鎖可変フラグメントを単離した。表11Aおよび11Bを参照されたい。抗CD20 scFvを、CD3ゼータ鎖および4-1BB共刺激分子を有するレンチウイルスCAR発現ベクターにクローニングした。CAR含有プラスミドを、STBL3細胞における細菌形質転換によって増幅させ、続いて、エンドトキシンフリーQiagen Plasmid Maxiキットを使用するMaxiprepによって増幅させた。レンチウイルスの上清は、標準的な技術を使用して293T細胞において産生した。

10

【1151】

CARの配列を下の表11Aおよび11Bに提供する。CARのさらなる構成要素（例えば、リーダー、ヒンジ、膜貫通およびシグナル伝達ドメイン）は、本明細書中で説明されている。

【1152】

【表 17-1】

表11A: ラットCD20 CARコンストラクト

名称	配列 番号	配列
CAR20-1 scFv ドメ イン	800	qiqlvqsgpelkkgesvkiscktsyftfdyafhwvkqapgkglkwmgwintysgkpt yaddfkgrfvfsledsartanlqisnlknedtatyfcargaygyrdwftywgqgtlvtvssg ggsgggsgggsgggsgggsgdivmtqtpssqavsagekvmtmsckssqsllysenkknyla wyqqkpgqspklliywastresgvpdrfigsgsgtdftltissvqaedlavyyccqyyfnfp wtfgggtklelk
CAR20-1 scFv ドメ イン nt	801	caaattcaactggtccagtccggccctgagctgaagaagccgggagaatccgtgaagatctcc tgcaagacctcggagtacaccttactgactacgccttccactgggtcaagcaggcacctggg aaaggcctgaagtggatgggtggatcaacacttactcggggaagccaacctacgccgatga ttcaagggaagattcgtgttagcctggaggactccgccggacagctaacctccaaatctcc aaccttaagaacgaggacactgcgacctacttctgcgcgggggagcctattacgggtatcgc gactggtcacctactggggacagggcaccctcgtgaccgtgtcctccggcggtggaggctc agggggggggcggtcgggaggggggtggaagcggaggaggaggtccgatattgtgatgac ccagaccccgctgagccaggcagtgctcgtggagaaaaggtaccatgtcctgcaagagct cacagtcctgttctactccgaaaacaagaagaattacctggcctggtaccagcagaagcccg gacagtccttaaaactgctgatctactgggcctcgaactagggaatctggcgtgcccggaccgctt tatcggaagcgggtcagggactgacttaccctgaccattagcagcgtgcaggccgaggacct ggcggtgtactactgtcaacagtactacaacttccgcccctggacttccggcggtggaacgaag ctcgaactcaag
CAR20-1 可溶性 sc Fv - nt	802	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccca aattcaactggtccagtccggccctgagctgaagaagccgggagaatccgtgaagatctcctg caagacctcggagtacaccttactgactacgccttccactgggtcaagcaggcacctgggaa aggcctgaagtggatgggtggatcaacacttactcggggaagccaacctacgccgatattt caagggaagattcgtgttagcctggaggactccgccggacagctaacctccaaatctcaa ccttaagaacgaggacactgcgacctacttctgcgcgggggagcctattacgggtatcgcga ctggtcacctactggggacagggcaccctcgtgaccgtgtcctccggcggtggaggctcag ggggggggcggtcgggaggggggtggaagcggaggaggaggtccgatattgtgatgacc agaccccgctgagccaggcagtgctcgtggagaaaaggtaccatgtcctgcaagagctca cagtcctgttctactccgaaaacaagaagaattacctggcctggtaccagcagaagcccgga cagtccttaaaactgctgatctactgggcctcgaactagggaatctggcgtgcccggaccgcttat cggaagcgggtcagggactgacttaccctgaccattagcagcgtgcaggccgaggacctgg cggtgtactactgtcaacagtactacaacttccgcccctggacttccggcggtggaacgaagct cgaactcaagggtatcgaccaccatcaccatcatcatcac

10

20

30

CAR20-1 可溶性 sc Fv - aa	803	malpv tallplalllhaarpqilvqsgpelkkpge svkiskctseytftdyafhwvkqapg kgikwmgwintysgkptyaddfkgrfvfsledsartanlqisnlknedtatyfcargayygy rdwftlywggqgtlvrvssggggsgggsgggsgggsgggsgdivmtqtpssqavsagekvts ckssqsllysenkknylawyqqkpgqspklliywastresgvpdrfigsgsgtdftltissvq aedlavyycqyyfnppwtfgggtkllelkgshhhhhhhh
CAR20-1 完全 - nt レンチウ イルス	804	atggccctccctgtcaccgccctgtctgtctccgctggctcttctgtctccacgccgctcggcccca aattcaactgttcagtcgccctgtgagctgaagaagccgggagaatccgtgaagatctcctg caagacctcggagtacaccttactgactacgcccttccactgggtcaagcaggcacctgggaa aggcctgaagtggatgggctggatcaacacttactcggggaagccaacctacgccgatgttt caagggaagattcgtgtttagcctggaggactccgccggacagctaacctccaaatccaa ccttaagaacgaggacactgcgacctacttctgcgcgcggggagcctattacggttatcgga ctgggtcacctactggggacagggcacctcgtgaccgtgtcctccggcggtggaggctcag ggggggggcggtcggggaggggtgggaagcggaggaggaggtccgatatgtgatgacc agaccccgctcgagccaggcagtgctccgctggagaaaaggtcaccatgtcctgcaagagctca cagtcctgttgttactccgaaaacaagaagaattacctggcctgttaccagcagaagcccgga cagtcctccaaactgtgtatctactgggctcgcactagggaatctggcgtgcccagccgtttat cgggaagcgggttcagggactgacttcacctgaccattagcagcgtgcaggccgaggacctgg cgggtgtactactgtcaacagtactacaacttcccgccctggactttcggcggtggaaacgaagct cgaactcaagaccactacccagcaccgaggccacccacccggctcctaccatcgctccc agcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctgggtggggcggtgcataccgg ggctctgacttcgcctgcgatatctacatttggggccctctggctgggtacttgcggggctcgtctg ctttcactcgtgatcactctttactgttaagcgcggctgggaagaagctgctgtacatctttaagcaa cccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggcgtgttcatgccgggtccagag gaggagggaaggcggtgcgaactgcgcgtgaattcagccgcagcgcagatgtccagcct acaagcagggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggctggagagaggagtacga cgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatggggggggaagccgcgcagaaga atccccaaaggggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgag attggtatgaagggggaacgcagaagaggcaaggccacgacggactgtaccagggactca gcaccggccaccaaggacacctatgacgctcttccatgcaggcccttccgctcgg

30

10

20

30

40

【表 17-5】

CAR20- 2 - 完全 - nt	810	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgtccacgccgctcgcccg aggtgcagctcgtcgaatccgggtggaggactgggcagccaggaagatccctgaagctgtcc tgtctcgctcgggcttcactttctccaaatacggcatgaattggattcgccaggcaccggaaa ggggctggaatgggtggccagcatcagctcgaactagcatctacatctactatgccgataccgtc aaggggcgcttactatctcccgcgagaacgctaagaacaccccttacttgcaaatgacctccct gaggtccgaagataccgccctgtactatgtcgcccgccagactactatctactcctactgg ggacaggaggagtcagtgaccgtgtcctccggcggtggaggctcagggggggggcggtcgcg ggaggggggtggaagcggaggaggaggctcccaagtcgtgctgacgcaaccaagtccgtg agcaccagcctggagagcaccgtgaagctcagctgcaagattaactcgggcaacattgggtc ctacttcattcattgggtaccagcagcacgaaggacgggtccctaccactatgatctaccgggac gacaagcggccgcacggagtgccggacagattctcgggttaatcgattcctcatctaactcg gcgtttctaccatcaacaacgtgcagaccgaggacgaagcgatctacttctgccactcctacg actcgggtattaacattgtgttcggcgggcgggactaagctgacagtgtgaccactacccagc accgaggccaccaccccggtcctaccatcgctcccgacctctgtccctgcgtccggagg catgtagaccgcagctggtggggcggtgcataccgggggtcttgacttcgctgcgatatcta catttggggccctctggctggtacttgcgggggtcctgctgcttctactcgtgatcactcttactgta agcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactac tcaagaggaggacggctgttcagccgggtccagaggaggaggaaggcggctgcgaactg cgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcagggggcagaaccagctcta caacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgg gaccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccaagaggcgctgtacaacgag ctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattgggtatgaaaggggaacgcagaag aggcaaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgac gctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR20- 2 - 完全 - aa	811	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvqpgrslklscslasgftfskygmnwirqapg kglewvasisstsiyyadtvkgrftisrenakntlylqmtslrsedtalyyarhdyssysy wggqvmvtvssggggsgggsgggsgggsgggsgqvvtqpksvstslstvlksckinsgni gsyfihwyqqhegrspptmiyrdkrphgvpdrfsgsidssnsafltinmvqtedaiyfc hsydsginivfgggtklvtltpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdi yiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqtteedgcscrfeeegge lrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreedydldkrrgdpemggkprknpqeglyn elqkdkmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr

10

20

30

【表 17-6】

CAR20-3 scFv ドメイン	812	evqlvesggglvqpgrslklscasgftfrdyymawvrqapkkglewvasisycgnpyyg dsvkgrftisrnnakstlylqmnsrlsedyatyyicarhdhnmvdwfoywgqgtltvssggg gsgggsgggsgggsgggsgdivmtqtpssqavsagekvtmsckssqsllysenkknylawy qqkpgqspklifwastresgvpdrfigsgsgtdftltissvqaedlavyyccqyyynfptfgsg tkleik
CAR20-3 scFv ドメイン nt	813	gaagtgcagcttgaggagctctggcgccggtctggtgcagccgggaagatccctgaagctgtc atgcgccgctccgggtttaccttccgcgattactacatggcctgggtcagacaggcacctaag aaggggctggaatgggtggcatccatctcatatgaaggaaaccgtactacggagactcggtg aaaggccgttactatctcacggaacaacgctaagagcacgctgtacttgcaaatgaactccc tccggtcggaggacacagccacttactactgtgcccggcacgaccataacaacgtcgattggtt cgcctactgggtcaaggaaacctcgtgaccgtgtcctccggcggtggaggctcagggggg ggcggtcgggaggggggtggaagcggaggaggaggtccgacatcgtgatgactcagact ccaagcagccaggccgtgtccgccggagagaaagtcacatgtcgtgcaagagctcccagt ccctgtgtactccgaaaacaagaagaattatctgcctggtaccagcagaagcctggacagt ccccgaagctcctgatctttggcgctgaccagggaatccggcggtgcccgatcgttcatgg ctcgggtccggcaccgacttaccctgaccattagcagcgtccaggcggaggacctggctgt gtactactgccaacagtactacaacttccccactttcggatcggggaccaagctggagatcaag
CAR20-3 - 可溶性 scFv - nt	814	atggccctccctgtcaccgccctgctgttccgctggctcttctgtccacgccgctcggccc aagtgcagcttgaggagctctggcgccggtctggtgcagccgggaagatccctgaagctgtcat gcgccgctccgggtttaccttccgcgattactacatggcctgggtcagacaggcacctaaga aggggctggaatgggtggcatccatctcatatgaaggaaaccgtactacggagactcggtg aagggcgttactatctcacggaacaacgctaagagcacgctgtacttgcaaatgaactccct ccggtcggaggacacagccacttactactgtgcccggcacgaccataacaacgtcgattggtt cgcctactgggtcaaggaaacctcgtgaccgtgtcctccggcggtggaggctcagggggg ggcggtcgggaggggggtggaagcggaggaggaggtccgacatcgtgatgactcagact ccaagcagccaggccgtgtccgccggagagaaagtcacatgtcgtgcaagagctcccagt ccctgtgtactccgaaaacaagaagaattatctgcctggtaccagcagaagcctggacagt ccccgaagctcctgatctttggcgctgaccagggaatccggcggtgcccgatcgttcatgg ctcgggtccggcaccgacttaccctgaccattagcagcgtccaggcggaggacctggctgt gtactactgccaacagtactacaacttccccactttcggatcggggaccaagctggagatcaag ggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac

10

20

30

CAR20- 3 - 可溶 性 scFv - aa	815	malpv tallplalllhaarpevqlvesggglvqpgrslklascaasgftfrdyymawvrqapk kglewvasisyecnppyygdsvkgrftisrnnakstlylqmnslrstedatyycarhdhnnv dwfaywgggtlvtvssggggsgggsgggsgggsgggsgdivmtqtpssqavsagekvtns ckssqsllysenkknylawyqqkpgqspkllifwastresgvpdrfigsgsgtdfilitssvqa edlavyyccqyyynfptfgsgtkleikgshhhhhhhh
CAR20- 3 - 完全 - nt	816	atggccctccctgtcaccgccctgtctgtctccgctggctcttctgtctccacgccgctcggcccg aagtgcagcttgtggagctggcgggcggtctggtgcagccgggaagatccctgaagctgtcat gcgccgcgtccgggtttaccttccgcgattactacatggcctgggtcagacaggcacctaaga aggggctggaaatgggtggcatcatctcatatgaaggaaaccgctactacggagactcgggtga aaggccgcttcactatctcacggaacaacgctaagagcacgctgtacttgc aaatgaactccct ccggctcggaggacacagccacttactactgtgccggcacgaccataacaacgtcgattggtt cgctacttgggttcaaggaaacctcgtgaccgtgtcctccggcggttggaggctcagggggg ggcggtcgggagggggtggaaaggaggaggaggtccgacatcgtgatgactcagact ccaagcagccaggccgtgtccggcggagagaaagtcaccatgtcgtgcaagagctcccagt ccctgtgtactccgaaaacaagaagaattatctcgctgggtaccagcagaagcctggacagt ccccgaagctcctgatcttttgggctgcgaccagggaaatccggcgtgcccgatcgtcttattgg ctccggttccggcaccgacttcacctgaccattagcagcgtccaggcggaggacctggctgt gtactactgccaacagtactacaacttccccactttcggatcggggaccaagctggagatcaag accactacccagcaccgaggccaccaccccggtcctaccatcgctcccagcctctgtcc ctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctggtggggcgtgcataccgggggtcttgacttc gcctgcgatatctacatttggggccctctggctgggtacttgcgggggtcctgtctgttctactcgtg atcactctttactgtaagcgggtcggaaagaagctgtgtacatctttaagcaaccttcatgagg cctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccgggttccagaggaggaggaagg cggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgagcgcagatgtccagcctacaagcagggg cagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgtcggacaa ggggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagag ggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaa ggggaaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccac caaggacacctatgacgccttctacatgcaggccctgccgcctcgg

20

30

10

20

30

40

【表 17-10】

CAR20- 4 - 完全 - nt	822	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcgcccca agtcacgctgaaggaatcgggccctggaattctgcagccaagccagaccctcgccttacttgc accttcacccgcttctcactgtccacttacggaatgtccgtgggatggattcggcagcccagcg gaaagggtttgagtggtggccgacatttgggtggatgacgacaagcattacaaccctagcc tgaagaatcggctcaccatcagcaaagacacctccaagaaccaggcggtcctgaagatcacca acgtggataccgcccacactgcaacatactattgtgccgctcctcaaccaccgatgggatcgt gacctacgtgatggacgtctggggccaggaggcttccgtgaccgtgtcctccggcggtggag gctcagggggggggcgctcgggaggggggtggaagcggaggaggaggctccgacgtgca gatgactcagtccccgtcgtcctgtccgctccgtcggcgacgccgtgactattaactgcaag gcgtcccagaacatcaatcggtagctgaactggtagcagcaaaaactgggagaagggccga gacttctcatctactccgccaactccctgcaaaactggcatcccgctcagggttcagcggatcagg ctctgggtgccgacttctactttagaccatcacgagccctcagccgaagatgtggccacctacttct gccccaacacaactcctggccccctgaccttgggttcgggcaccaagctggagatcaagacca ctaccccagcaccgaggccaccaccccggtcctaccatcgctcccagcctctgtccctgc gtccggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttgcct gcgatatctacatttggggccccctctggctggtacttgcggggctctgctgcttactcgtatca ctcttactgtaagcgcggtcgggaagaagctgctgtacatcttaagcaaccctcataggcct gtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaaggcg gctgcgaactgcgctgaattcagccgcagcgcagatgtccagcctacaagcaggggca gaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtagcacgtgctggacaagc ggagaggacgggaccagaaatggggcgggaagccgcgcagaaagaatcccaagaggg cctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagg ggaacgcagaagaggcaaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacca ggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR20- 4 - 完全 - aa	823	malpvtalllplalllhaarqvltkesgpgilqpsqtlstctftrfslstygmvgwirqpsgk glewladiwwdddkhynpslknrltiskdtsknqaflikitnvdadtatyycarssttdgivt yvmdvwgqgasvtvssgggsgggsgggsgggsgggsgdvqmtqspillsasvgdavin ckasqninrylnwyqqklgegrllysanslqtgipsrfsgsggadfltitpqppevatyf clqhnswwpltfsgtkleiktttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaagavhtrgldfacd iyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkillyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpceeeegg elrvkfsrsadapaykqgnqlynelnlgrrcydvldkrrgrdpemggkprkrnpqegly nelqkdkmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr

10

20

30

【表 17-11】

CAR20-5 scFv ドメイン	824	evqlvesggglvqpqtslklscvasgftfsssgmqwirqapkkglewisgiyydsykksya dsvkgrftisrdnsntlylemnsrsedatyycaksayygykdyfdywgqgmvtvss ggggsgggsgggsgggsgggsgdiqmtqspplsaslgdkvtitcqasqninkyiawyqqk pgkaprllirytsltlesgtpsrfsgsgsgrdysfsisnvesgdvasyyclqyddlpytfgpgtkl elk
CAR20-5 scFv ドメイン nt	825	gaggctcagctgttggaatcaggaggcggactcgtccagccgggtactagcctgaagctcag ctgtgtggccagcgggtttaccttctcgtcctccgggatgcagtggattcggcaggctcccaaga agggactggaatggatctcgggcatctactacgactcgtacaagaagtcctacgccgattccgt gaaaggctcgttcaccatctcccgggacaacagcaagaacactctgtacctcgagatgaactc cttgcgctccgaggataccgcaacctattactgcgccaagtcggcctactacggctacaagga ctacttcgactattggggccaggaggatgatgtgaccgtgtcctccggcggtggaggctcagg ggggggcggtcgggaggggggtggaagcggaggaggaggtccgacatccaaatgacac agtcaccccttctcttccgcgagcctgggagataaggctaccattacgtgccaagcgtccca gaacatcaacaagtacatcgcttggtaccagcagaaccgggaaaggcccccggtgctg attagatacacctcgactctggaatccggcactccatcaagattcagcggctccggcagcggg agggactactcgttccatctccaatgtggagtccggggacgtggccagctactattgcctgc aatacgcgatctgccctacaccttcggacctggaaccaagctggaactcaag
CAR20-5 - 可溶性 scFv - nt	826	atggccctccctgtcaccgcctgtcgttccgctggctcttctgctccacgcgctcggccc aggctcagctgttggaatcaggaggcggactcgtccagccgggtactagcctgaagctcagct gtgtggccagcgggtttaccttctcgtcctccgggatgcagtggattcggcaggctcccaagaa gggactggaatggatctcgggcatctactacgactcgtacaagaagtcctacgccgattccgtg aaaggctcgttcaccatctcccgggacaacagcaagaacactctgtacctcgagatgaactcct tgcgctccgaggataccgcaacctattactgcgccaagtcggcctactacggctacaaggact acttcgactattggggccaggaggatgatgtgaccgtgtcctccggcggtggaggctcagg ggggggcggtcgggaggggggtggaagcggaggaggaggtccgacatccaaatgacaca gtcaccccttctcttccgcgagcctgggagataaggctaccattacgtgccaagcgtccca aacatcaacaagtacatcgcttggtaccagcagaaccgggaaaggcccccggtgctgat tagatacacctcgactctggaatccggcactccatcaagattcagcggctccggcagcgggag ggactactcgttccatctccaatgtggagtccggggacgtggccagctactattgcctgcaat acgacgatctgccctacaccttcggacctggaaccaagctggaactcaagggtcgcaccac catcaccatcatcatcac

10

20

30

CAR20-5 - 可溶性 scFv -aa	827	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvqpgtslklscvasgftfsssgmqwirqapk kglewisgiyydsykksyadsvkgrftisrdnsksntlylemnslrsedatatyycaksayygy kdyfdywggqvmvmtvssggggsgggsgggsgggsgggsgdiqmtqsppslsaslgdkvtit cqasqninkyiawyqqkpgkaprllirytstlesgtpsrfsrgsgsgrdysfsisnvesgdvas yyclqyddlpytfgpgtklelkgshhhhhhhh
CAR20- 5 - 完全 - nt	828	atggccctccctgtcaccgccctgtctctccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg aggccagcttgggaatcaggaggcgactcgtccagccgggtactagcctgaagctcagct gtgtggccagcgggtttaccttctcgtcctccgggatgcagtggattcggcaggctcccaagaa gggactgggaatggatctcgggcacatctactacgactcgtacaagaagtctacgccgattccgtg aaaggctgccttcaccatctcccgggacaacagcaagaacactctgtacctcgagatgaactcct tgcgctccgaggataccgcaacctattactgcgccaagtcggcctactacggctacaaggact acttcgactaltggggccaggggagtgtatgtgaccgtgtcctccggcggtggaggctcaggg ggggggcggtcgggagggggtgggaagcggaggagggtccgacatccaaatgacaca gtcaccctctcttcttccgcgagcctgggagataaggctaccattacgtgccaagcgtccag aacatcaacaagtacatcgcttggtaccagcagaaccgggaaaggccccgcggctgtgat tagatacacctcgactctgggaatccggcactccatcaagattcagcggctccggcagcgggag ggactactcgttctccatctccaatgtggagtcgggggacgtggccagctactattgcctgcaat acgacgatctgccctacaccttcggacctggaaccaagctggaactcaagaccactacccag caccgaggccaccaccccggtcctaccatcgctccagcctctgtccctgcgtccggag gcatgtagaccgcagctggtggggccgtgcataccgggggtcttgacttcgctgcgatct acatttgggccccctctggctggtacttgcggggctcctgctgtcttcactcgtgatcactcttactgt aagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaaagcaaccctcatgaggcctgtgcagacta ctcaagaggaggacggctgtcatgccggttccagaggaggagggaaggcggtcgaact gcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctc tacaacgaactcaatcttggtcgggagagaggagtacgacgtgtcggacaagcggagaggac gggaccagaaatgggcgggaagccgcgcagaagaatccccaaaggggcctgtacaacg agctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcaga agaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctat gacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg

20

30

【表 1 7 - 1 3】

CAR20- 5 - 完全 - aa	829	malpvtalllpalllhaarpevqlvesggglvqpgtslklscvasgftfsssgmqwirqapk kglewisgiyydsykksyadsvkgrftisrnsknltlylemnslrsedatyycaksayygy kdyfdywgqgvmtvtvssggsgsgsgsgsgsgsgsgsdqmtqspplsaslgdkvtit cqasqninkyiawyqqkpgkaprllirytstlesgtpsrfsrgsgsgrdysfsisnvesgdvas yyclqyddlpfytfgpgtklelkttpaprpptpaptiasqplsrlpeacrpaagavhtrgldfa cdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqtqeedgcscrfeeeg gcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprkrnpqe glynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
CAR20-6 scFv ドメ イン	830	qvtlkespgllqpsqtsltctfagfslnthmgvvgwirqpsgkglewlaniwwdddkeyy npslknrltmskdtstnnqaflikitnvdtdatyyccariegspvvtvfdywgqgvmtvtvss ggsgsgsgsgsgsgsgsgsgsdqmtqspplsasvgrvtinckasqninrylnwyqqkl geapkliynanslqtgipsrfsrgsgsgtdftltisslqpadvatyfclqhnsrpltfsgstleik
CAR20-6 scFv ドメ イン nt	831	caagtcactcttaaggaatccgggccaggactgttcagccgagccagaccctgtccctcactt gtaccttcgccggcttttactgaacacccacggaatggcgctgggatggattaggcagccctc gggaaaggactggagtggtcgccaacatttgggtgggacgacgacaagtattacaacccga gcctcaagaaccgcctgactatgtccaaggatacctccaacaaccaggccttctgaaaatcac taacgtggataccgctgacaccgcaacgtactactgcgccccggatcgaaaggtcccccgctgt gacaactgtgttcgactactggggacagggcgatggtgaccgtgtcctccggcggtggag gctcagggggggggcggtcgggaggggggtggaagcggaggaggaggtccgacatccaa atgaccagtcacctagcttctgtcggcctcggcgacagagtgaccattaactgcaaag cgtcccagaacatcaaccgctacctgaattgtaccagcagaagctgggggaagccccgaag ctgctgatctacaacgcgaacagcctccagactggatttcttcccggttctccgggagcggct cgggtaccgatttcacctcaccatctctctccctcaacccgctgacgtggccacctacttctgct tgaacataattctcggcctctgaccttcggaagcggcactatcctcgagatcaag

【表 17-14】

CAR20-6 - 可溶性 scFv - nt	832	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccca agtcactcttaaggaatccggggcaggactgttgcagccgagccagacctgtccctcacttgt accttcgccggcttttactgaacacccacgggaatgggcgtgggatggattaggcagccctcg ggaaaggggactggagtggctggccaacatttggaggacgacgacaagtattacaacccgag cctcaagaaccgcctgactatgtccaaggataccccaacaaccaggcccttctgaaaatcact aacgtggataccgctgacaccgcaacgtactactgcgcccggatcgaaggttccccgctcgtg acaactgtgttcgactactggggacagggcgatgggtgaccgtgtcttcggcggtggagg ctcagggggggggcggtctggggaggggggtggaagcggaggaggagggtccgacatccaaa tgaccagtcacctagcttctgtcggcctcggtcggcgacagagtaccattaaactgcaaagc gtcccagaacatcaaccgctacctgaattggtaccagcagaagctgggggaagccccgaagc tgtgtatctacaacgcgaacagcctccagactggattcttctccgggtctccgggagcggctc gggtaccgatttcacccctaccatctcttccctcaaccgcgtgacgtggccacctacttctgtt gcaacataattctcggcctctgaccttcggaagcggcactatctcgagatcaagggatcgcac caccatcaccatcatcatcac
CAR20-6 - 可溶性 scFv - aa	833	malpvtalllplalllhaarpqvtlkesgpqlqpsqtlslctctfagfslnthgmvgvwirqp sgkglewlaniwdddkyynpslknrltmskdtssnnqafllkitnvdadtatyycariegs pvtvfdywgqgvmtvsvssggggsgggsgggsgggsgdiqmtqspslsasvgrdvti nckasqninrylnwyqqklgeapkllynnanslqtgipsrfsrgsgsgtdftltisslqpadv atyfclqhnsrpltfsgtileikgshhhhhhhh

【表 1 7 - 1 5】

CAR20-6 - 完全 - nt	834	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcgcccca agtcactcttaaggaatccgggccaggactgttgagccgagccagacctgtccctcacttgt accttcgccggcttttactgaacacccacgggaatgggcgtgggatggattaggcagccctcg ggaaagggactggagtggtcggccaacatttggggagcagacgacaagtattacaacccgag cctcaagaaccgcctgactatgtccaaggatacctccaacaaccaggccttctgaaaatcact aacgtggataccgctgacaccgcaacgtactactgcgccggatcgaagggtccccgcgtg acaactgtgttcactactggggacagggcggtatggtagcgtgtcctccggcggtggagg ctcagggggggcggtcgggaggggggtggaagcggaggaggagggtccgacatccaaa tgaccagtcacctagctttctgtcggcctcggtcggcgacagagtaccattaaactgcaaagc gtcccagaacatcaaccgctacctgaattggtaccagcagaagctgggggaagccccgaagc tgctgatctacaacgcgaacagcctccagactggatctcctccgggttctccgggagcggctc gggtaccgatttcacccaccatctcctcctcaaccgctgacgtggccacctacttctgctt gcaacataattctcggccttgaccttcggaagcggcactatcctcgagatcaagaccactacc ccagcaccgaggccaccaccccggtcctaccatcgctcccagcctctgtccctgcgtccg gaggcatgtagaccgcagctgggtggggccgtgcataccgggggtctgacttcgctcgat atctacatttgggccctctggctggtacttgcggggtctgtgcttctactcgtgatcactctta ctgtaagcgcgtcgggaagagctgctgtacatcttaagcaacccctcatgaggcctgtgcag actactcaagaggaggacggctgttcagccgggtcccagaggaggagggaagggcggtgcg aactgcgcgtgaaatcagccgcagcgcagatgtccagcctacaagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggctggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggaccagaaatggcggggaagccgcgcagaaagaatcccaagagggcctgtaca acgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgc agaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacc tatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR20-6 - 完全 - aa	835	malpvtalllplalllhaarqvltkesgpgllqpsqlslctfagfslnthmgvgwirqpsg kglewlaniwdddkyynpslknrltmskdtstnnqafkitnvdadtatyycariegspv vttvfdywgqgvmtvssgggsgggsgggsgggsgggsgdiqmtqspslsasvgdrvti nckasqninrylnwyqqklgeapkllynnanslqtgipsrfsrgsgtdftlisslpadvat yfcqhnsrpltfsgtileikttppaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfac diyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyikqpfmrpvqttqeedgcscrfeeeeegg celrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreedydldkrrgrdpemggkprknpqegl ynelqkdkmacayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr

10

20

30

【表 17-16】

CAR20-7 scFv ドメイン	836	qvtlkesgpgmlqpskltlscsfsgfslstsgmvvswirqpsgkslewlaiawdgdkeyy npslksrvtskdsntqvflritsvdiadtatyycrrdydvgyyfdfwgqgvmtvssg gggsggsgsgsgsgsgsgskivltqspitaaapgekvtitclassrvsnwyqqksgasp klliystsslasgvpyrfsgsgsgtsysltintmeaadaatyychqwssnpwtfgggtklelk
CAR20-7 scFv ドメイン nt	837	caagtcaccctgaaagaatcgggtcccgggaatgctgcagccatccaagacgctgtccctaca tgctccttctccgggttcagcctctcaacttccgggatggtggtgcatggatcagacagccgag cggaaagtccttgagtggtggtggcggccatcgatgggatggcgataagtactacaacccga gctgaagtcaagggctactgtgtccaaggacacctccaacacccaagtgttcttcggatcac ctcgtggacattgctgacaccgccacctattactgcactcgcgggactacgacgtgggttac tactacttcgatttctggggacaggggtgcatggtgaccgtgtctcggcggtggaggctcag ggggggggcggtcgggaggggggtggaagcggaggaggaggtccaagattgtgtgacc cagagccccactattaccgccctccccgggggaaaaggtcaccatcacttgcctggcgtcc tcacgcgtgtcgaatatctactggtatcagcagaagtccggcgccagccccagctgctgatct actcgacctctccctcgcgtcgggagtgcttaccgggttttctggctcgggaagcgggaaccag ctactccttgaccatcaacaccatggaagccgaggacgctgccacttactactgccaccagtgg tcgagcaacccttggacttctgggtggaggcaccaaacctcgagctcaag
CAR20-7 - 可溶性 scFv - nt	838	atggccctccctgtcaccgccctgctgttccgctggcttctgtctccacgccgctcggcccca agtcaccctgaaagaatcgggtcccgggaatgctgcagccatccaagacgctgtcccttacatg ctccttctccgggttcagcctctcaacttccgggatggtggtgcatggatcagacagccgagc ggaaagtccttgagtggtggtggcggccatcgatgggatggcgataagtactacaacccgag cctgaagtcaagggctactgtgtccaaggacacctccaacacccaagtgttcttcggatcac tccgtggacattgctgacaccgccacctattactgcactcgcgggactacgacgtgggttact actacttcgatttctggggacaggggtgcatggtgaccgtgtctcggcggtggaggctcagg ggggggcggtcgggaggggggtggaagcggaggaggaggtccaagattgtgtgacc agagccccactattaccgccctccccgggggaaaaggtcaccatcacttgcctggcgtcct cacgcgtgtcgaatatctactggtatcagcagaagtccggcgccagccccagctgctgatcta ctcgacctctccctcgcgtcgggagtgcttaccgggttttctggctcgggaagcgggaaccagc tactccttgaccatcaacaccatggaagccgaggacgctgccacttactactgccaccagtgg cgagcaacccttggacttctgggtggaggcaccaaacctcgagctcaagggatcgaccaccat caccatcatcatcac

10

20

30

【表 17-17】

CAR20-7 - 可溶性 scFv - a a	839	malpvtalllplalllhaarqvltkesgpgmlqpsktilstcsfsgfslstsgmvvswirqpsg kslewlaaiawdgdkiynpslksrvtvskdtsntqvflritsvdiadtatyctrrdydvgyy yfdfwgqgvmtvssggggsgggsgggsgggsgggskivltqspitaaaspgekvitcllas srvsniwyqqksgaspkliystsslasgvpyrfsgsgsgtsysltintmeadaatyychq wssnpwtfgggtklelkgshhhhhhhh
CAR20- 7 完全 - nt	840	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccca agtcaccctgaaagaatcgggtcccgaatgctgcagccatccaagacgctgtcccttacatg ctccttctccgggttcagcctctcaacttccgggatgggtgcatggatcagacagccgagc ggaaagtccctggagtggctggcggccatcgcatggatggcgataagtactacaacccgag cctgaagtcaagggctactgtgtccaaggacacctccaacacccaagtgttcttccggtaccc tccgtggacattgctgacaccgccacctaactgactcgcggggactacgacgtgggtact actacttcgatttctggggacaggggtgcatgggtgaccgtgtcctccggcgggtggaggctcagg ggggggcggctcgggaggggggtggaagcggaggaggaggctccaagattgtgtgacct agagccccactattaccgccgcctccccggggaaaagggtaccatcactgtctggcgctct cacgcgtgtcgaatatctactggatcagcagaagtcggcgccagccccaagctgtgtatcta ctcgacctcctcctcgcgtcgggagtgcttaccgggttttctggctcgggaagcgggaaccagc tactccttgaccatcaacacccatggaagccgaggacgctgccacttactactgccaccagtgg cgagcaacccttggacttctgggtggaggcaccaaactcagctcaagaccactacccagca ccgagggccaccaccccggtcctaccatcgctcccagcctctgtccctgcgtccggaggc atgtagaccgcagctgggtggggccgtgcataccgggggtcttgacttcgctcgcgatactac atttggggccctctggctgggtacttgcggggctcgtgctgttctactcgtgacactcttactgtaa ggcggtcgggaagaagctgctgtacatcttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactact caagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggagggaaggcggctgcgaactgc gctgaaattcagccgagcgcagatgtcaccagcctacaagcaggggcagaaccagctctac aacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacggg acccagaaatgggcgggaagccgcgcagaagaatcccaagaggcctgtacaacgagc tccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaaga ggcaagggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgac gctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg

10

20

30

【表 17-18】

完全 - aa	841	malpv tallplalllhaar pqv t l k e s g p g m l q p s k t l s l t c s f s g f s l s t s g m v v s w i r q p s g k s l e w l a a i a w d g d k y n p s l k s r v t v s k d t s n t q v l f r i t s v d i a d t a t y c t r d y d v g y y y f d f w g q g v m v t v s s g g g g s g g g g s g g g s g g g s k i v l t q s p t i t a a s p g e k v t i c l a s s r v s n i y w y q q k s g a s p k l i y s t s s l a s g v p y r f s g s g s g t s y s l t i n t m e a e d a a t y y c h q w s s n p w t f g g g t k l e l k t t p a p r p p t p a p t i a s q p l s r p e a c r p a a g g a v h t r g l d f a c d i y i w a p l a g t c g v l l l s v i t l y c k r g r k k l l y i f k q p f m r p v q t t q e e d g c s c r f p e e e e g g c e l r v k f s r s a d a p a y k q g q n q l y n e l n l g r r e e y d v l d k r r g r d p e m g g k p r r k n p q e g l y n e l q k d k m a e a y s e i g m k g e r r r g k g h d g l y q g l s t a t k d t y d a l h m q a l p p r
scFv ドメイン	842	q i q l v q s g p e l k k p g e s v k i s c k a s g n t v t g y a m h w v r q a p g k g l k w m g w i n t y s g k p t y a d d f k g r e v f s l e a s a s t a h l q i s n l k n e d t a t y f c a r s t y y g y k d w f a y w g q g t l v t v s s g g g s g g g s g g g s g g g s g n i q l t q s p s r l s a s v g d r v t l s c k g s q n i n n y l a w y q q k l g e a p k l i y n t n l q t g i p s r f s g s g s g t d y t f t i s g l q p e d v a t y f c c q y n n g n t f g a g t k l e l k
scFv ドメイン nt	843	c a a a t t c a g t g g t g c a g t c c g g c c c g g a g c t g a a g a a g c t g g a g a a t c c g t g a a g a t c t c g t g c a a a g c t t c c g g g a a c a c c g t g a c c g g a t a c g c a a t g c a c t g g g t c c g c c a g g c a c c g g g a a a g g g a c t g a a g t g g a t g g g g t g g a t c a a c a c t a c a g c g g a a a g c g a c t t a c g c c g a t g a c t t a a g g g a c g c t g t g t t c t c c c t g g a a g c g t c c g c c t c g a c t g c c c a t c t t c a a a t c t c c a a c t g a a g a a t g a g g a c a c c g c c a c t t a c t t c t g c g c c c g g a g c a c c t a t t a c g g t a c a a g g a c t g g t t c g c g t a t t g g g g c c a g g g c a c t c t c g t g a c c g t g t c t c c g g c g g t g g a g g c t c a g g g g g g g g c g g c t c g g g a g g g g t g g a a g c g g a g g a g g g c t c c a a c a t c c a a c t g a c t c a g a g c c c c a g c c g g c t g t c c g c c t c c g t g g g g g a c a g g g t c a c a c t g a g c t g c a a g g g t t c t c a g a a c a t c a a c a a c t a c t c g c g t g g t a c c a g c a g a a g c t g g g a g a g g c c c c a a g c t g t c a t c t a c a a c a c c a a c a a t c t g c a a a c t g g c a t t c a t c g a g a t t c t c a g g a t c a g g t c c g g t a c c g a c t a c a c t t c a c g a t t c g g g a c t t c a g c c t g a g g a t g t g g c c a c c t a c t t c t g t g t c a g t a c a a c a a c g g c a a c a c c t t c g g t c t c g c a c c a a g c t g g a a c t c a a a

【表 17-19】

CAR20-8 - 可溶性 scFv - n t	844	atggccctccctgtcaccgccctgctgctccgctggcctcttctgctccacgccgctcggcccca aattcagttggcgagtcggcccgagctgaagaagcctggagaatccgtgaagatctcgtg caaagcttccgggaacaccgtgaccggatacgaatgcactgggtccgccaggcaccggga aagggactgaagtggatgggtggatcaacacctacagcggaaagccgacttacgccgatg actttaagggacgctgtgttctccctggaagcgtccgccctcactgcccatttcaaattcca acctgaagaatgaggacaccgccacttacttctcgcccgagcacctattacggctacaagg actggttcgcgtattggggccagggcactctcgtgaccgtgtctccggcggtggaggctcag ggggggggcggtcgggaggggggtggaagcggaggaggaggtccaacatccaactgact cagagccccagccggctgtccgcctccgtgggggacagggtcacactgagctgcaagggtt ctcagaacatcaacaactacctcgcgtgtgtaccagcagaagctgggagaggccccaagctg ctcatctacaacaccaacaatctgaaactggcattccatcgagattctcaggatcagggtccg gtaccgactacaccttcacgatttcgggacttcagcctgaggatgtggccacctacttctgtgtc agtacaacaacggcaacaccttcgggtgtgtggaccaagctggaactcaaaggatcgaccac catccatcatcatcac
CAR20-8 - 可溶性 scFv - a a	845	malpvtalllplalllhaarppqilvqsgpelkkgpgevsvisckasgntvtgyamhwvrqap gkgikwmgwintysgkptyaddfkgrcvfsleasastahlqisnlknedatyfcarstyyg ykdwfaywgqgtlvvtvssggggsgggsgggsgggsgniqltqpsrslsasvgdrvtlsc kgsqninnylawyqqklgeapkllyntnnlqtgipsrfsrgsgsgtdyfttisglqpdevatyf ccqynnentfgagtklelkgshhhhhhhh

【表 17-20】

CAR20- 8 - 完全 - nt	846	atggccctccctgtcaccgcccgtctgtctccgctggtcttctgtccacgcccgtcgcccca aatcagttgggtcagtcgggcccggagctgaagaagcctggagaatccgtgaagatctcgtg caaagcttccgggaacaccgtgaccggatacgaatgcactgggtccgccaggcaccggga aagggtactgaagtggatgggtggatcaaacctacagcggaaaaggcgttacgccgatg actttaagggtacgtgtgttctccctggaagcgtccgcctcgtactgccatcttcaaattcca acctgaagaatgaggacaccgccacttacttctgcgcccggagcacctattacggctacaagg actggttcgcgtattggggccagggcactctcgtgaccgtgtctcgcggcggtggaggctcag ggggggggcggtcgggaggggggtggaagcggaggaggaggtccaacatccaactgact cagagccccagccggctgtccgcctcgtgggggacagggtcacactgagctgcaagggtt ctcagaacatcaacaactacctcgcgtgtaccagcagaagctgggagaggccccaaagctg ctcatctacaacaccaacaatctgcaaactggcattccatcgagattctcaggatcagggtccg gtaccgactacaccttcacgattcgggacttcagcctgaggatgtggccactacttctgtgtc agtacaacaacggcaacaccttcgggtgtggcaccaagctggaactcaaaaccactacccca gcaccgaggccaccaccccggtcctaccatcgctcccagcctctgtccctgcgtccgga ggcatgtagaccgcagctgggtggggccgtgcataccgggggtcttgacttcgctcgatat ctacatttgggcccctctggctgtgtacttgcgggtcctgtgtcttactcgtgatcactttact gtaagcgggtcggagaagctgtgtacatcttaagcaaccttcagaggcctgtgcagac tactcaaggaggagacggctgttcacgtccgggtcccagaggaggaggaaaggcggctgcgaa ctgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgtccagcctacaagcaggggcagaaccagc tctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaaggcggagagga cgggaccagaaatggcggggaagccgcgcagaaagaatccccaaaggggcctgtacaac gagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaagggggaacgca gaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacct atgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR20- 8 - 完全 - aa	847	malpvtalllplalllhaarpiqlvqsgpelkpgesvkisckasgntvtgyamhwvrqap gkglkwmgwintysgkptyaddfkgrcvfsleasastahlqisnlknedtatyfcarstygg ykdwfaywgqgtltvssggggsgggsgggsgggsgggsgniqltqpsrslsasvgdrvtlsc kgsqninnylawyqqklgeapkllyntnmlqtgipsrfsrgsgtdyftisglqpedvatyf ccqymngntfgagtklelkttpaprpptpaptiasqpplrpeacrpaaaggavhtrglfacdi yiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkillyifkqpfmrpvqtteedgcscrfeeeggce lrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreedydvldkrrgrdpemggkprknpqeglyn elqkdkmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr

10

20

30

【表 17-21】

CAR20-9 scFv ドメイン	848	divmtqtpssqavsagekvmtmsckssqsllysenkknylawyqqkpgqspkllifwastre sgvpdrfigsgsgtdftltissvqaedlavyyccqyyfnptfgsgtkleikggggsgggsgg ggsgggsevqlvesggglvqpgrslklscaasgftfrdyymawvrqapkkglewvasis yegnpyygdsvkgrftisrnnakstlylqmmslrstedatyycarhdhnnvdwfwywgqg tlvtvss
CAR20-9 scFv ドメイン nt	849	gacatcgtgatgactcagactccaagcagccaggccgtgtccgccggagagaaagtcacat gtcgtgcaagagctcccagtcctgtgtactccgaaaacaagaagaattatctgcctggtac cagcagaagcctggacagtccccgaagctcctgatcttttggcgctcgaccagggaaatccgg cgtgcccgatcgtctcattggctccggtccggcaccgacttcacctgaccattagcagcgtc caggcggaggacctggctgtgtactactgccaacagtactacaacttccccactttcggatcgg ggaccaagctggagatcaaggcggtggaggctcagggggggggcggtcgggaggggggt ggaagcggaggaggaggctccgaagtgcagcttctggagcttggcgcggtctggtgcagc cgggaagatccctgaagctgtcatgcgccgctccgggtttaccttccgcgattactacatggc ctgggtcagacaggcacctaagaaggggctggaatgggtggcatccatctcatatgaaggaa acctgtactacggagactcgggtgaaggccgcttactatctcacggaacaacgctaagagca cgtgtacttgcaaatgaactccctccggtcggaggacacagccacttactactgtgcccggca cgaccataacaacgtcgattggttcgcctactggggtaagggaacctcgtgacctgtcctcc
CAR20-9 - 可溶性 scFv - nt	850	atggccctccctgtcaccgcccgtgtctccgctggtcttctgtccacgcccgtcggccc acatcgtgatgactcagactccaagcagccaggccgtgtccgccggagagaaagtcacatg tcgtgcaagagctcccagtcctgtgtactccgaaaacaagaagaattatctgcctggtacc agcagaagcctggacagtccccgaagctcctgatcttttggcgctcgaccagggaaatccggc gtgcccgatcgtctcattggctccggtccggcaccgacttcacctgaccattagcagcgtcc aggcggaggacctggctgtgtactactgccaacagtactacaacttccccactttcggatcggg gaccaagctggagatcaaggcggtggaggctcagggggggggcggtcgggaggggggtg gaagcggaggaggaggctccgaagtgcagcttctggagcttggcgcggtctggtgcagcc gggaagatccctgaagctgtcatgcgccgctccgggtttaccttccgcgattactacatggcc tgggtcagacaggcacctaagaaggggctggaatgggtggcatccatctcatatgaaggaaa cccgtactacggagactcgggtgaaggccgcttactatctcacggaacaacgctaagagcac gctgtacttgcaaatgaactccctccggtcggaggacacagccacttactactgtgcccggcac gaccataacaacgtcgattggttcgcctactggggtaagggaacctcgtgacctgtcctccg gatcgaccaccatcaccatcatcatcac

10

20

30

[illegible]

30

【表 17-23】

CAR20-9 - 完全 - aa	853	malpvtalllplalllhaardivmtqtpssqavsagekvtmsckssqsllysenkknlaw yqqkpgqspkllifwastresgvpdrfsgsgtdftltissvqaedlavvycqqyynftfsg gtkleikggggsgggsgggsgggsgggsevglvesggglvqpgrslklscaasgftfrdyym awvrqapkkglewvasisycgnpyygdsvkgrftisrnnakstlylqmnsrledtatyyc arhdhnnvdwfaywgqglvtvsssttpaprpptpaptiasqplsrlpeacrpaaggavhtr glfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckgrgklllyifkqpfmrpvqtteedgcscrfe eeeggcelrvkfsrsadapaykqgnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprkn pqeglynelqkdkmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
CAR20-10 scFv ドメ イン	854	diqmtqsppslsaslgdkvtitcqaqninkyiawyqqkpgkaprllirytstlesgtpsrfsg sgsgrdysfsisnvesgdvasyyclqyddlpytfgpgtklelkgggsgggsgggsgggsggg gsevglvesggglvqpgrslklscaasgftfssgmqwirapkkglewisgiyydsykks yadsvkgrftisrnnakstlylqmnsrledtatyycaksayygykdyfdywgqgvmtv ss
CAR20-10 scFv ドメ イン nt	855	gacatccaaatgacacagtcacccccctctcttccgagcctgggagataaggtcaccatta cgtgccaagcgtcccagaacatcaacaagtacatcgctgggtaccagcagaaccgggaaa ggccccgcggctgctgattagatacacctcgactctggaatccggcactccatcaagattcagc ggctccggcagcgggaggactactcgttccatctccaatgtggagtccggggacgtggc cagctactattgctgcaatacagcagatctgccctacaccttcggacctggaaccaagctggaa ctcaaggcggtggaggctcagggggggggcggtcggagggggtggaggcgaggaggag gaggctccagggtccagcttgggaatcaggaggcggtcgtccagccgggtactagcctg aagctcagctgtgtggcagcgggtttaccttctcgtctccgggatgcagtggattcggcagg ctccaagaaggactggaatggatctcgggcactactacgactcgtacaagaagtcctacg ccgattccgtgaaaggctcgttccatctcccgggacaacagcaagaacactctgtacctcga gatgaactccttgcgtccgaggataccgcaacctattactgcgccaagtcggcctactacggc tacaaggactacttcgactattggggccaggaggatgatggtagcgtgtctcc

10

20

【表 17-24】

CAR20-10 - 可溶 性 scFv - nt	856	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggtcttctgctccacgccgctcggcccc acatccaaatgacacagtcacccccctctcttccgagcctgggagataaggtcaccattac gtgccaagcgtcccagaacatcaacaagtacatcgctgggtaccagcagaaccgggaaag gccccgcggctgctgattagatacacctcgactctggaatccggcactccatcaagattcagcg gctccggcagcgggaggactactcgttccatctccaatgtggagtccggggacgtggc agctactattgctgcaatacagcagatctgccctacaccttcggacctggaaccaagctggaa tcaaggcggtggaggctcagggggggggcggtcggagggggtggaggcgaggagg aggctccgagggtccagcttgggaatcaggaggcggtcgtccagccgggtactagcctga agctcagctgtgtggcagcgggtttaccttctcgtctccgggatgcagtggattcggcaggct ccaagaaggactggaatggatctcgggcactactacgactcgtacaagaagtcctacgcc gattccgtgaaaggctcgttccatctcccgggacaacagcaagaacactctgtacctcga atgaactccttgcgtccgaggataccgcaacctattactgcgccaagtcggcctactacggct acaaggactacttcgactattggggccaggaggatgatggtagcgtgtctccggatgcacc accatcaccatcatcatcac
CAR20-10 - 可溶 性 scFv - aa	857	malpvtalllplalllhaarpmqmtqspssqavsagekvtmsckssqsllysenkknlaw yqqkpgqspkllifwastresgvpdrfsgsgtdftltissvqaedlavvycqqyynftfsg gtkleikggggsgggsgggsgggsgggsevglvesggglvqpgrslklscaasgftfrdyym awvrqapkkglewvasisycgnpyygdsvkgrftisrnnakstlylqmnsrledtatyyc arhdhnnvdwfaywgqglvtvsssttpaprpptpaptiasqplsrlpeacrpaaggavhtr glfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckgrgklllyifkqpfmrpvqtteedgcscrfe eeeggcelrvkfsrsadapaykqgnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprkn pqeglynelqkdkmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr

30

40

50

【表 17 - 25】

194181 CAR20- 1 0 - 完全 - nt	858	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcgcccg acatccaaatgacacagtcaccccccttcttctccgagcctgggagataaggtcaccattac gtgccaagcgtcccagaacatcaacaagtacatcgcttggtaccagcagaaaccgggaaag gccccgcggctgctgattagatacacctcgactctggaatccggcactccatcaagattcagcg gctccggcagcgggaggactactcgttctccatctccaatgtggagtccggggacgtggcc agctactattgcttgaatacagacatctgccctacaccttccgacctgggaaccaagcttgaac tcaagggcgggtggaggctcagggggggggcggtcgggaggggggtggaagcggaggagg aggctccgaggtccagcttgggaatcaggaggcgactcgtccagccgggtactagcctga agctcagctgtgtggccagcgggtttaccttctgctctccgggatgcagtggattcggcaggct cccaagaagggaactggaatggatctcgggcacttactacgactcgtacaagaagtcctacgcc gattccgtgaaaggctcgcttaccatctccgggacaacagcaagaacactctgtacctcgag atgaactccttgcgtccgaggataccgcaacctattactcgccaagtcggcctactacggct acaaggactacttcgactattggggccaggagtgatgggtgaccgtgtcctccaccactaccc cagcaccgaggccaccaccccggtcctaccatcgctcccagcctctgtccctgcgtccg gaggcatgtagaccgcagctgggtggggccgtgcataccgggggtctgacttgccttgcgat atctacatttgggccctctggctggtacttgcggggtctgctgcttctactcgtatcactctta ctgtaagcgcggtcgggaagagctgctgtacatcttgaagcaaccttcatgaggcctgtgcag actactcaagaggaggacggctgttcatgccggttccagaggaggaggaaggcggctgcg aactgcgcgtgaaatcagccgcagcgcagatgtccagcctacaagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggctggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggaccagaaatggcggggaagccgcgcagaaagaatcccaagagggcctgtaca acgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgc agaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggaactcagcaccgccaccaaggacacc tatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
194181 CAR20- 1 0 - 完全 - aa	859	malpvtalllplalllhaarpdqmtqsppslsaslgdkvtitcasqninkyiawyqqkpgk aprllyrstlesgtpsrfsrgsgsgrdysfsisnvesgdvasyyclqyddlpytfgpgtklelkg ggsgggsgggsgggsgggsevqlvesggglvqpgtslklscvasgftfssgmqwirqap kkglewisgiyydsykksyadsvkgrftisrdnsntlylemnslrsedatyycaksayyg ykdyfdywqgvmtvssttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfac diyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyikqpfmrpvqttqeedgcscrfeeegg celrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreedydldkrrgrdpemggkprknpqegl ynelqkdkmacayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr

10

20

30

【表 17-26】

CAR20-11 scFv ドメイン	860	divmtqtpssqavsagekvmtmsckssqsllysenkknylawyqqkpgqspklliywastr esgvprdrfigsgsgtdflitissvqaedlavyyccqyyfnppwtfgggkklkkgggsggg gsgggsgggsgqqlvqsgpelkkpgeevkiskctseytftdyafhwvkqapgkglkw mgwintysgkptyaddfkgrfvfsledsartanlqisnlknedtatycargayygyrdwft ywgqgtlvtvss
CAR20-11 scFv ドメイン nt	861	gatatgtgatgaccagaccccgctgagccaggcagtgctccgctggagaaaagggtaccat gtcctgcaagagctcacagtcctgtgtactccgaaaacaagaagaattacctggcctgttac cagcagaagcccgacagtcctcctaaactgctgatctactgggctcgcactagggaatctggc gtgcccagaccgctttatcggaagcgggtcagggaactgacttcacctgaccattagcagcgtgc aggccgaggacctggcgggtgtactactgtcaacagtactacaacttccgcccctggacttccgg cgggtggaacgaagctcgaactcaaggcggtggaggctcagggggggggcggtcgggag gggggtggaagcggaggaggaggctcccaattcaactggccagtcggccctgagctgaa gaagccgggagaatccgtgaagatctcctgcaagacctcggagtacaccttactgactacgc cttccactgggtcaagcaggcacctgggaaaggcctgaagtggatggcctggatcaacactta ctcggggaagccaacctacgccgatgattcaagggaagattcgtgttagcctggaggactcc gcccggacagctaacctccaaatctcaaccttaagaacgaggacactgcgacctacttctgc gcgcggggagcctattacggttatcgcgactggttcacctactggggacagggcacctcgtg accgtgtctctcc
CAR20-11 - 可溶性 scFv - nt	862	atggccctccctgtcaccgcccgtgctgttccgctggctcttctgtctccacgccgctcggccc atatgtgatgaccagaccccgctgagccaggcagtgctccgctggagaaaagggtaccatgt cctgcaagagctcacagtcctgtgtactccgaaaacaagaagaattacctggcctgtgtacca gcagaagcccgacagtcctcctaaactgctgatctactgggctcgcactagggaatctggcgt gcccagaccgctttatcggaagcgggtcagggaactgacttcacctgaccattagcagcgtgca ggccgaggacctggcgggtgtactactgtcaacagtactacaacttccgcccctggacttccggc gggtggaacgaagctcgaactcaaggcggtggaggctcagggggggggcggtcgggagg gggtggaagcggaggaggaggctcccaattcaactggccagtcggccctgagctgaag aagccgggagaatccgtgaagatctcctgcaagacctcggagtacaccttactgactacgcc ttccactgggtcaagcaggcacctgggaaaggcctgaagtggatggcctggatcaacacttac tcggggaagccaacctacgccgatgattcaagggaagattcgtgttagcctggaggactcc gcccggacagctaacctccaaatctcaaccttaagaacgaggacactgcgacctacttctgc gcgcggggagcctattacggttatcgcgactggttcacctactggggacagggcacctcgtg accgtgtctcggatcgaccaccatcaccatcatcatcac

10

20

30

【表 1 7 - 2 7】

CAR20-11 - 可溶 性 scFv - aa	863	malpvtalllplalllhaarpdvmtqtpssqavsagekvtmsckssqsllysenkknlaw yqqkpgqspklliYWastresgvprdfigsgsgtdflitissvqaedlavvycqqyynfppw tfgggtklelkgggsgggsgggsgggsgggsggiqlvqsgpelkkpgesvkiscktsyftfd yafhvwkqapgkglkwmgwintysgkptyaddfkgrfvfsledsartanlqisnlknedt atyfcargayygyrdwftwywgqgtlvtvssgshhhhhhhh
CAR20- 1 1 - 完全 - nt	864	atggccctccctgtcaccgccctgtctctccgctggctcttctgtctccacgccgctcggcccg atatgtgatgaccagaccccgctcgagccaggcagtgctcgctggagaaaaggcaccatgt cctgcaagagctcagctccctgtgtactccgaaaacaagaagaattaccctggcctggtacca gcagaagcccgacagctccctaaactgtgatctactgggctcgactagggaatctggcgt gcccgaccgctttatcggaagcgggtcagggactgacttcacctgaccattagcagcgtgca ggccgaggacctggcgggtgtactactgtcaacagtactacaacttcccgccttgactttcggc gggtggaacgaagctgaactcaaggcggtggaggctcagggggggggcggtcgggagg gggtggaagcggaggaggagggtctccaaattcaactgtccagtcggccctgagctgaag aagccgggagaatccgtgaagatctctgcaagacctcggagtacaccttactgactacgcc ttccactgggtcaagcaggcacctgggaaaggcctgaagtggatgggctggatcaacacttac tcggggaagccaacctacgccgatattcaagggaagattcgtgtttagcctggaggactcc gcccggacagctaacctccaaatctcaaccttaagaacgaggacactgcgacctactctgc gcgcggggagcctattacggttatcgcgactggttcacctactggggacagggcacctcgtg accgtgtctccaccactacccagcaccgagggcaccaccccggtcctaccatcgccctcc cagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctgggtggggccgtgcatacccg gggtcttgacttcgcctgcgatatctacattggggccctctggctgggtacttgcggggtcctgct gctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagca accttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccaga ggaggagggaaggcggctgcgaactgcgctgaaattcagccgcagcgagatgtccagc ctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacg acgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgcaaaag aatccccaagaggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcga gattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactc agcaccgccaccaaggacacatatgacgctcttcacatgcaggccctgcccgcctcgg

10

20

30

【表 17-28】

CAR20-11 - 完全 - aa	865	malpvtalllplalllhaarpdivmtqtpssqavsagekvtmsckssqsllysenkknlaw yqqkpgqspklliYWastresgvpdRfigsgsgtdfItissvqaedlavvycqqyynfppw tfgggtklElkgggsgggsgggsgggsgggsggiqlvqsgpelkkgpgevkiscktsyftId yafhwvkqapgkglkwmgwintysgkptyaddfkgrfvfsledsartanlqisnlknedt atyfcargayygyrdwftYwgqgtlvtssttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaagg avhtrglDfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqtteedgcs crfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggk prknppqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmq alppr
CAR20-12 scFv ドメ イン	866	qvvltpkksvstslstvlksckinsgnisYfihwyqqhegrspttmirddkrphgvpdr fsgsidssnsafltmnvqtdeaiYfchsydsGinivfgggtklvlgggsgggsgggsgggsg ggggseqlvesggglvqpgrslklslclsgftfskygmnnwirqapgkglewvasisstsiy iyyadvtkgrftisrenakntlylqmtslrsedtalyycarhdyssysywgqgmvtvss
CAR20-12 scFv ドメ イン nt	867	caagtcgtgctgacgcaacccaagtccgtgagcaccagcctggagagcaccgtgaagctca gctgcaagattaactcgggcaacattgggtcctacttcatccattggtaccagcagcacgaagg acgggtccctaccactatgatctaccgggacgacaagcggccgcacggagtgccggacaga ttctcgggttcaatcgattcctcatctaactcggcggttctcaccatcaacaacgtgcagaccgag gacgaagcgatctacttctgccactcctacgactcgggtattaacattgtgttcggcggcggga ctaagctgacagtgcgtggcggtggaggctcagggggggggcggtcgggaggggggtggaa gcgaggaggaggctccgaggtgcagctcgtcgaatccggtggaggactggtgcagccag gaagatccctgaagctgtcctgtctcgcctcgggcttactttctccaaatacggcatgaattgga ttcggcaggcaccggaaaggggctggaatgggtggccagcatcagctcactagcatctac atctactatgccgataccgtcaaggccgcttactatctcccgcgagaacgctaagaacacc tttacttgcaaatgacctccctgaggtccgaagataccgacctgtactattgcgcccggcacgac tactatcctactcctacttgggacagggagtcattggtgaccgtgtctctcc

10

20

【表 17-29】

CAR20-12 - 可溶 性 scFv - nt	868	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggtcttctgctccacgccgctcgcccca agtcgtgctgacgcaacccaagtccgtgagcaccagcctggagagcaccgtgaagctcagct gcaagattaactcgggcaacattgggtcctacttcatccattggtaccagcagcacgaaggacg gtcccctaccactatgatctaccgggacgacaagcggccgcacggagtgccggacagattct cgggttcaatcgattcctcatctaactcggcggttctcaccatcaacaacgtgcagaccgaggac gaagcgatctacttctgccactcctacgactcgggtattaacattgtgttcggcggcgggactaa gctgacagtgcgtggcggtggaggctcagggggggggcggtcgggaggggggtggaagcg gaggaggaggctccgaggtgcagctcgtcgaatccggtggaggactggtgcagccaggaa gatccctgaagctgtcctgtctcgcctcgggcttactttctccaaatacggcatgaattggattc gccaggcaccggaaaggggctggaatgggtggccagcatcagctcactagcatctacatc tactatgccgataccgtcaaggccgcttactatctcccgcgagaacgctaagaacacccttt acttgcaaatgacctccctgaggtccgaagataccgacctgtactattgcgcccggcacgacta ctcatctactcctacttgggacagggagtcattggtgaccgtgtctccggatcgaccacat caccatcatcatcac
CAR20-12 - 可溶 性 scFv - aa	869	malpvtalllplalllhaarpqvvltpkksvstslstvlksckinsgnisYfihwyqqhegrs pttmirddkrphgvpdrfsgsidssnsafltmnvqtdeaiYfchsydsGinivfgggtkl tvlgggsgggsgggsgggsgggsgggseqlvesggglvqpgrslklslclsgftfskygmnnwir qapgkglewvasisstsiyiyadvtkgrftisrenakntlylqmtslrsedtalyycarhdy ssysywgqgmvtvssgshhhhhhhh

30

40

50

【表 17-30】

CAR20- 1 2 - 完全 - nt	870	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggtcttctgctccacgccgctcgcccca agtcgtgctgacgcaaccaagtcctgagcaccagcctggagagcaccgtgaagctcagct gcaagattaactcgggcaacattgggtcctacttcatccattggtaccagcagcaggaaggacg gtcccttaccactatgatctaccgggacgacaagcggccgcacggagtgccggacagattct cgggttcaatcgattcctcatctaactcggcgtttctaccatcaacaacgtgcagaccgaggac gaagcgaatctacttctgccactcctacgactcgggtattaacattgtgttcggcggcgggactaa gctgacagtgtcgggcggtggaggctcagggggggcggtcgggaggggggtggaagcg gaggaggaggctccgagggtgcagctcgtcgaatccggtggaggactgggtgcagccaggaa gatccctgaagctgtcctgtctcgcctcgggcttctcctcaaatcggcatgaattggattc gccaggcaccggaaaggggctggaaatgggtggccagcatcagctcgaactagcatctacatc tactatgccgataccgtcaaggggcggcttactatctcccgcgagaacgctaagaacaccctt acttgcaaatgacctccctgaggctcgaagataccgccctgtactattgcggcggcagacta ctatcttactcctactggggacaggaggatcatgggtgaccgtgtctccaccactacccagca ccgaggccaccaccccggtcctaccatcgctcccagcctctgtccctgcgtccggaggc atgtagaccgcagctggtggggccgtgcataccgggggtcttgacttcgctgcgatactac atttggggccctctggctgggtacttgcggggctcctgctgtttcactcgtatcactttactgtaa gcgcggtcgggaagaagctgtgtacatcttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactact caagaggaggacggctgttcatgccggttccagaggaggaggaaaggcggctgcgaactgc gcgtgaaatcagccgcagcgcagatgtccagcctacaagcagggggcagaaccagctctac aacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacggg acccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccaagaggcctgtacaacgagc tccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaaga ggcaagggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgac gctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR20- 1 2 - 完全 - aa	871	malpvtalllplalllhaarqvvtltpksvstslstvlkskinsgnigsyfihwyqqhegrs pttmiyrdckrphgvpdfrfsgsidssnsafltmnvqtedaiyfchsydsminivfgggtkl tvlggggsgggsgggsggggseqlvesggglvqpgrslklslasgftfskygmnwir qapgkglewvasisstsiyyadtvkgrftisrenakntlylqmtslrsedtalyycarhdys sysywgqgvmtvsttppaprpptpaptiasqplsrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyi waplactcgvlslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfeeeggcelr vkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreedydldkrrgrdpemggkprknpqeglyne lqkdkmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr

10

20

30

CAR20-13 scFv ド メイン	872	dvqmtqspslsasvvgdavtincasqninrylnwyyqqklgegrlliyanslqtgiprsfs gsgsgadfltlitpsqppeadvatyfclqhnswppltfgsgtkleikgggsgggsgggsgggsggg gsqvtlkesgpgilqpsqtlsltctftrfslstygmsvgwirqpsgkglewladiwwdddkh ynpslknrltiskdtsknqafllkitnvdtdatatyycarssttdgivtyvmdvwwgqgasvtvs s
CAR20-13 scFv ド メイン nt	873	gacgtgcagatgactcagtcctcccgctcgtcctcgtccgcctccgctcggcgacgcccgtgactatfa actgcaaggcgctccagaacatcaatcgggtacctgaactggtaccagcaaaaactgggagaa gggcccagagacttctcatctactccgccaactccctgcaaactggcatcccgtcagaggttcagcg gatcaggctctggtgcccgaacttaccatcacgagccctcagcccgaagatgtggccac ctacttctgctccaacacaactcctggcccctgaccttgggtcgggcaccaagctggagatca agggcggtggaggctcagggggggggcggtcgggaggggggtggaagcggaggaggag gtcccaagtcacgtgaaggaaatcgggccctggaaattctgcagccaagccagacctctcgt cttacttgcaccttcacccgcttctcactgtccacttacggaatgtccgtgggatggattcggcag cccagcggaaagggttggagtggctggccgacatttgggtgggatgacgacaagcattacaa ccctagcctgaagaatcgggtcacatcagcaaaagacacctccaagaaccaggcggttcttgaa gatcaccaacgtggataccgccgacactgcaacatactattgtgccgctcctcaaccaccgat gggatcgtgacctacgtgatggagctctggggccaggaggagctccgtgacctgtctctcc
CAR20-13 - 可溶 性 scFv - nt	874	atggccctccctgtcaccgcccgtcgtcttccgctggctcttctgctccacgcccgtcggccc acgtgcagatgactcagtcctccgctcgtcctcgtccgcctccgtcggcgacgcccgtgactatfaa ctgcaaggcgctccagaacatcaatcgggtacctgaactggtaccagcaaaaactgggagaag ggccgagacttctcatctactccgccaactccctgcaaactggcatcccgtcaggttcagcgg atcaggctctggtgcccgaacttaccatcacgagccctcagcccgaagatgtggccacc tacttctgctccaacacaactcctggcccctgaccttgggtcgggcaccaagctggagatcaa ggcggttggagggtcagggggggggcggtcgggaggggggtggaagcggaggaggagg ctcccaagtcacgtgaaggaaatcgggccctggaaattctgcagccaagccagacctctcgt tacttgcaccttcacccgcttctcactgtccacttacggaatgtccgtgggatggattcggcagcc cagcggaaagggttggagtggctggccgacatttgggtgggatgacgacaagcattacaacc ctagcctgaagaatcgggtcacatcagcaaaagacacctccaagaaccaggcggttcttgaa atcaccaacgtggataccgccgacactgcaacatactattgtgccgctcctcaaccaccgatg ggatcgtgacctacgtgatggagctctggggccaggaggagctccgtgacctgtcctccggat cgcaccaccatcacatcatcatcac

30

CAR20-13 - 可溶性 scFv - aa	875	malpv tallplalllhaarpdvqmtqspslsasvgdavtincasqninrylnwyyqqklge gprliysanslqtgiprsfsgsgsgadflititsppedvatyfcqlhnswppltfgsgtkleikg ggsgggsgsgsgsgsgsgsgsqtllkesgpgilqpsqtllstctftrfslstygmsvgwirpqsg kglew ladiwwdddkhynpslknrltiskdtsknqafllkitnvdadtatyycarssttdgiv tyvmdvwwgqgasvtvssgshhhhhhhh
CAR20-13 - 完全 nt	876	atggccctccctgtcaccgccctgtctgtctccgctggctcttctgtctccacgccgctcggcccg acgtgcagatgactcagtcctccgtctctgtctccgctccgctcggcgacgccgtgactattaa ctgcaaggcgctccagaacatcaatcggctacgtgaactggtaccagcaaaactgggagaag ggcggagacttctcatctactccgccactccttgcaaaactggcatccgtcggaggttcagcgg atcagggtctgggtggcgaacttctgaccatcacgagccctcagccgaagatgtggccacc tacttctgctccaacacaactcctggccctgaccttgggttcgggcaccaagctggagatcaa ggcggtgtggaggtcagggggggggcggtcgggaggggggtggaagcggaggaggagg ctcccaagtcacgctgaaggaaatcgggccctggaaattctgcagccaagccagacctctcgt tacttgcacctcaccgccttctactgtccacttacggaatgtccgtgggatggattcggcagcc cagcggaaaggggttggagtggctggccgacatttgggtggatgacgacaagcattacaacc ctagcctgaagaatcggctcaccatcagcaaagacacctccaagaaccaggcgcttctgaag atcaccaacgtggataccgccgacactgcaacatactattgtgccgctctcaaccaccgatg ggatcgtgacctacgtgatggagctctggggccaggggagcttccgtgaccgtgtcctccacca ctacccagcaccgaggccaccaccccggtccttaccatgcctcccagcctctgtccctgc gtccggaggcatgtagaccgcagctgtgtggggcgtgcataccgggggttctgacttgcct gcgatactacatttggggccctctggctgtgtacttgcgggttctgtctgttctactcgtgatca ctcttactgtaagcgcggtcgggaagaagctgtgtacatctttaagaaccttcatgaggcct gtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgcccgttcccagaggaggagggaaggcg gctgcgaactgcgctgaaattcagccgcagcgcagatgtccagcctacaagcagggggca gaaccagctctacaacgaactcaatcttggctggagagaggagtacgacgtcgtggacaagc ggagaggacgggaccagaaatggcggggaagccgcgcagaaagaatcccaagagggg cctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaagg ggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacca ggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgcggcctcgg

20

30

[illegible]

20

CAR20-14 - 可溶性 scFv - nt	880	atggccctccctgtcaccgacctgctgcttccgctggctcttctgctccacgcccgtcggcccc acatccaaatgaccagtcacctagctttctgtcgccctcggtcgggcgacagagtaccattaa ctgcaaagcgtcccagaacatcaaccgctacctgaattggtaccagcagaagctgggggaag ccccgaagctgctgatctacaacgcgaacagccctccagactgggtattccttcccgggttctccgg gagcggctcgggtaccgatttcacccacacatctcttccctcaacccgctgacgtggccacc tacttctgcttgaacataattctcggccctctgaccttcggaagcgggactatctcgcagatcaag ggcgggtggaggctcagggggggggcggtctcgggaggggggtggaagcggaggaggaggct cccaagtcactcttaaggaaatccggggccaggactgttcagccgagccagaccctgtccctca cttgaccttcgccggcttttactgaacacccacggaatgggcgtgggatggattaggcagcc ctcgggaaagggactggagtggctggccaacatttggtgggacgacgacaagtattacaacc cgagcctcaagaaccgcctgactatgtccaaggatacctccaacaaccaggccttctgaaaa tactaacgtggataccgctgacaccgcaacgtactactcgcggcgatcgaaggttcccccg tcgtgacaactgtgttcgactactggggacagggcggtgatgggtaccgtgtctccggatcgca ccaccatcaccatcatcatcac
CAR20-14 - 可溶性 scFv - aa	881	malpvtallplallhaarpdqmtqspstlsasvgsdrvtinckasqninrylnwyqqklge apkllhynanslqtgiprsfsgsgsgtdftltisslqpadvatyfclqhnsrpltfsgtyleikgg ggsggggsgggsgggsgsqvtlkesgpgllqpsqtlstctfagfslnthgmvgvwirqpss kglewlaniwdddkyynpslknrltmskdtssnnqafllkitnvdtdatatyycariegspv vttvfdivwgqgvmtvsvssgshhhhhhhh

40

【表 1 7 - 3 5】

CAR20-14 - 完全 nt	882	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggtcttctgctccacgccgctcgcccg acatccaaatgaccagtcacctagcttctgctcgccctcggtcgccgacagagtaccattaa ctgcaaagcgtcccagaacatcaaccgctacctgaattggtaccagcagaagctgggggaag ccccgaagctgctgactacacgcgaacagccctccagactggtattcctcccggttctccgg gagcggctcggttaccgatttcaccctcaccatctctccctcaacccgctgacgtggccacc tacttctgcttgaacataattctcgccctctgaccttcggaagcggcactatctcgagatcaag ggcgggtggaggctcagggggggggcggtctcgagggggggtggaagcggaggaggaggct cccaagtcactcttaaggaaatccggggccaggactgtgcagccgagccagacctgtccctca ctgtaccttcgccggcttttactgaacaccacggaaatgggcgtgggatggattaggcagcc ctccgggaaaggactggagtggctggccaacattggtgggacgacgacaagtattacaacc cgagcctcaagaaccgcctgactatgtccaaggatacctccaacaaccaggccttctgaaaa tcactaacgtggataccgctgacaccgcaacgtactactcgcccggtcgaaggttccccg tctgacaaactgtgttcgactactggggacagggcggtgatgggtgacctgtcctccaccactac ccagcaccgaggccaccaccccggtcctaccatcgctccagcctctgtccctgcgtcc ggaggcatgtagaccgcagctgggtggggcggtgcataccgggggtcttgacttcgctgcg atatctacatttggggccctctggctggctacttgcggggctctgctgtttcactcggtatcacttt tactgtaagcgggtcggaagaagctgctgtacatcttaagcaacccttcagggcctgtgca gactactcaagaggaggacggctgttcatgccgggtccagaggaggagggaaggcggctgc gaactgcgctgaaatcagccgcagcgcagatgtccagcctacaagcagggggcagaacc agctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggaga ggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccaagaggggcctgta caacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaac gcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggaca cctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR20-14 - 完全 aa	883	malpvtalllplalllhaarpdqmtqspstlsasvgdrvtinckasqninrylnwyqqklge apklliynanslqtgipsrfsrgsgtdftltisslqpadvatyfclqhnslptfgsgtileikgg gsgsgggsgggsgggsgqvtlkesgpgllqpsqtlsltctfagfslnthgmvgwvirqpsg kglewlaniwwdddkyynpslknrltmskdtstnnqafkitnvdadtatyycariegspv vttvfdywgqgvmtvssttpaprpptpaptiasqplsrlpeacrpaaggavhtrgldfacd iyiwaplagtcgvllslvitlyckrgkrkillyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpceeeegg elrvkfsrsadapaykqggnqlynelnlgrreedyvldkrrgrdpemggkprkrnpqegly nelqkdkmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr

10

20

30

【表 17-36】

CAR20-15 scFv ド メイン	884	kivltqsptitaaspgekvtitclassrvsnnywyqqksgaspkliystsslasgvpyrfsgsg sgtsysltintmeaedaatyqhwsnpwtfgggkklkkgggsgggsgggsgggsggg sqvtlkesgpgmlqpskltlscsfsgfslstsgmvsvwirqpsgkslewlaaiawdgdky npslksrvtskdsntqvflritsvdiadtatyctrdydvgyydfwggqgvmvtvss
CAR20-15 scFv ド メイン nt	885	aagattgtctgaccagagccccactattaccgccctccccgggggaaaaggcaccatc actgtctggcgtcctcacgcgtgtcgaatatctactggatcagcagaagtcggcgccagcc ccaagctgctgatctactcgacctcctccctcgctcgggagtgccctaccggtttctggctcg ggaagcgggaaccagctactccttgaccatcaacaccatggaagccgaggacgctgccactta ctactgccaccagtggtcgagcaacccttgactttcggtggaggcaccaaactcgagctcaa ggcggtggaggctcagggggggcggtcgggaggggggtggaagcggaggaggagg ctcccaagtcaccctgaaagaatcgggtcccgggaatgctgcagccatccaagacgctgtccct tacatgctccttctcgggttcagcctctcaacttcgggatgggtgtcatggatcagacagc cgagcgggaagtcctggagtggtcggtggccatcgcatgggatggcgataagtactacaac ccgagcctgaagtcaagggtcactgtgtccaaggacacctccaacaccaagtgttcttcgg atcacctccgtggacattgctgacaccgccacctattactgcactcgccgggactacgacgtgg gctactactactcgtatttctggggacagggtgcatggtagcgtgtctctcc
CAR20-15 - 可溶 性 scFv - nt	886	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggcttctgtctccagccgctcggcccaa gattgtgtgaccagagccccactattaccgccctccccgggggaaaaggcaccatcac ttgtctggcgtcctcacgcgtgtcgaatatctactggatcagcagaagtcggcgccagcccc aagctgctgatctactcgacctcctccctcgctcgggagtgccctaccggtttctggctcggg aagcgggaaccagctactccttgaccatcaacaccatggaagccgaggacgctgccacttacta ctgccaccagtggtcgagcaacccttgactttcggtggaggcaccaaactcgagctcaagg gcggtggaggctcagggggggcggtcgggaggggggtggaagcggaggaggaggctc ccaagtcaccctgaaagaatcgggtcccgggaatgctgcagccatccaagacgctgtcccttac atgctccttctcgggttcagcctctcaacttcgggatgggtgtcatggatcagacagccga gcggaagtcctggagtggtcggtggccatcgcatgggatggcgataagtactacaacccg agcctgaagtcaagggtcactgtgtccaaggacacctccaacaccaagtgttcttcggatca cctccgtggacattgctgacaccgccacctattactgcactcgccgggactacgacgtgggcta ctactactcgtatttctggggacagggtgcatggtagcgtgtctctccggatcgaccaccatc accatcatcatcac

10

20

30

【表 17-37】

CAR20-15 - 可溶性 scFv - aa	887	malpvtalllplalllhaarpkivltqsptitaaspgekvtitclassrvsnwyqqksgaspl liystsslasgvpyrfsgsgsgtsysltintmeaadaatyychqwssnpwtfgggkklkkg ggsgggsgggsgggsgggsgqvtlkesgpgmlqpskltlscsfsgfslstsgmvswirqps gkslewlaaiawdgdkyynpslksrvtskdtstntqvflritsvdiadtatyctrrdydvgy yyfdfwgggvmtvssgshhhhhhhh
CAR20-15 - 完全 nt	888	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccaa gattgtgctgaccagagccccactattaccgccgctccccgggggaaaagggtcaccatcac ttgtctggcgtcctcacgctgtcgaatactactggtatcagcagaagtcggcgccagcccc aagctgctgatctactcgaacctctccctcgcgtcgggagtgcttaccggtttctggctcggg aagcgggaaccagctactccttgaccatcaacaccatggaagccgaggacgctgccattacta ctgccaccagtggctcagcaacccttggactttcgggtggaggcacaaactcgagctcaagg gcgggtggaggctcagggggggggcggtcgggaggggggtggaagcggaggaggaggctc ccaagtcacctgaagaatcgggtcccgggaatgctgcagccatccaagacgctgtcccttac atgctccttctcgggttcagccttcaacttccgggatgggtggtgcatggtatcagacagccga gcggaaagtccctggagtggtcggcgccatcgcattggatggcgataagtactacaacccg agcctgaagtcaagggtcactgtgtccaaggacacctccaacaccaagtgttctcggatca cctccgtggacattgctgacaccgccacctattactgcactcggcggaactacgagctgggcta ctactacttcgatttctggggacagggtgcatggtgaccgtgtcctccaccactacccagcac cgaggccacccaccccgctcctaccatcgcttccagcctctgtccctgcgtccggaggcat gtagaccgcagctgggtggggcggtgcataccggggtcttgacttcgctgcgatatctacat ttgggccctctggctggtacttgcggggctctgctgttctactcgtgatcacttttactgtaag cgcggtcggagaagctgctgtacatcttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactc aagaggaggacggctgttcatgccggttccagaggaggagggaaggcggtgcgaactgc gcgtgaaattcagccgcagcgagatgtccagcctacaagcaggggcagaaccagctctac aacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacggg acccagaaatggcggggaagccgcgcagaagaatcccaaggggcctgtacaacgagc tccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaaga ggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgac gctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg

10

20

30

【表 17-38】

CAR20-15 - 完全 aa	889	malpvtalllplalllhaarpkivltqsptitaaspgkvititclassrvsnnywyqqksgaspl liystsslasgvpyrfsrgsgsgtsysltintmeadaatyychqwssnpwtfgggkklkkgg ggsgggsgggsgsgsgsgsqvltkesgpgmlqpsktsltcsfsgfslstsgmvvswirqps gkslewlaaiawdgdkyynpslksrvtskdsntqvflritsvdiadtatyctrrdydvy yyfdfwgqgvmtvssttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiy iwaplagtcgvllslvitlyckrgkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrpfpeeeeggcelr vkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreedydvlkrrgrdpemggkprknpqeglyne lqkdkmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
CAR20-16 scFv ド メイン	890	niqltqpsrslsasvgdrvtlsckgsqninnylawyqqklgeapkllyntnnlqtgipsrfsg sgsgtdyftisglqpedvatyfccqynnntfgagtklelkgggsgggsgggsgggsg qiqlvqsgpelkkgpessvkiskasgntvtgyamhwvrqapgkglkwmgwintysgkp tyaddfkgrcvfsleasastahlqisnlknedtatyfcarstygykdwfaywgqgtlvtvss
CAR20-16 scFv ド メイン nt	891	aacatccaactgactcagagccccagccggctgtccgcctccgtgggggacagggtcacact gagctgcaagggttctcagaacatcaacaactacctcgcgtgtaccagcagaagctgggag aggcccccaagctgctcatctacaacaccaacaatctgcaactggcattccatcgagattctc aggatcagggtccggtaccgactacaccttcacgatttcgggacttcagcctgaggatgtggcc acactactctgctgtcagtaacaacggcaacaccttcggtgctggcaccaagctggaactca aaggcgggtggaggctcagggggggggcggctcgggaggggggtggaagcggaggaggagg ctcccaaattcagttggtgcagtcggcccgagctgaagaagcctggagaatccgtgaagat ctcgtgcaaagcttcgggaacaccgtgaccggatagcaatgcactgggtccgccaggcac cgggaaaggactgaagtggatgggtggatcaacacctacagcggaaagccgacttacgc cgatgactttaaggacgctgtgtgttccctggaagcgtccgcctcactgcccatttcaaa tctcaacctgaagaatgaggacaccgccacttactctgcggccggagcacctattacggcta caaggactggttcgctattggggccagggcactctcgtgaccgtgtcctcc

10

20

【表 17-39】

CAR20-16 - 可溶 性 scFv - nt	892	atggccctccctgtcaccgcccgtgctctccgctggctcttctgctccacgcccgtcggcccaa catccaactgactcagagccccagccggctgtccgcctcctggtggggacagggtcacactga gctgcaagggttctcagaacatcaacaactacctcgcgtgtaccagcagaagctgggagag gcccccaagctgctcatctacaacaccaacaatctgcaactggcattccatcgagattctcag gatcagggtccggtaccgactacaccttcacgatttcgggacttcagcctgaggatgtggccac ctacttctgtgtcagtaacaacggcaacaccttcggtgctggcaccaagctggaactcaaa ggcgggtggaggctcagggggggggcggctcgggaggggggtggaagcggaggaggaggct cccaaattcagttggtgcagtcggcccgagctgaagaagcctggagaatccgtgaagatct cgtgcaaagcttcgggaacaccgtgaccggatagcaatgcactgggtccgccaggcacc gggaaaggactgaagtggatgggtggatcaacacctacagcggaaagccgacttacgcc gatgactttaaggacgctgtgtgttccctggaagcgtccgcctcactgcccatttcaaat ctccaacctgaagaatgaggacaccgccacttactctgcggccggagcacctattacggctac aaggactggttcgctattggggccagggcactctcgtgaccgtgtcctccggatcgaccac catcaccatcatcatc
CAR20-16 - 可溶 性 scFv - aa	893	malpvtalllplalllhaarpnqltqpsrslsasvgdrvtlsckgsqninnylawyqqklgea pkliyntnnlqtgipsrfsgsgsgtdyftisglqpedvatyfccqynnntfgagtklelkgg ggsgggsgggsgggsgsgsqiqlvqsgpelkkgpessvkiskasgntvtgyamhwvrqa pgkglkwmgwintysgkptyaddfkgrcvfsleasastahlqisnlknedtatyfcarsty gykdwfaywgqgtlvtvssgshhhhhhhh

30

40

50

【表 17-40】

CAR20-16 - 完全 nt	894	atggccctccctgtcaccgccctgctgttccgctggtcttctgtccacgccgctcgcccaa catccaactgactcagagccccagccggctgtccgctcgtgggggacagggctacactga gctgcaagggttctcagaacatcaacaactacctcgcgtggtaccagcagaagctgggagag gccccaaagctgtcatctacaacaccaacaatctgcaaactggcaltccatcgagattctcag gatcagggtccgggtaccgactacaccttcacgatttcgggacttcagcctgaggatgtggccac ctacttctgtgtcagtacaacaacggcaacaccttcgggtgtggcaccaggctggaactcaaa ggcggtggaggctcagggggggggcggtctgggagggggtggaagcggaggaggaggct cccaaattcagttggtgagtcgggccgggagctgaagaagcctggagaatccgtgaagatct cgtgcaaagcttcgggaacaccgtgaccggatagcaatgcactgggtccgccaggcacc gggaaaggagactgaagtggatgggtggatcaacacctacagcggaaagccgacttacgcc gatgactttaaggagcgtgtgtgttctccctggaagcgtccgcctcgtactgcccatcttcaat ctccaacctgaagaatgaggacaccgccacttacttctgcggcgaggacatttacggctac aaggactgggttcgctattggggccaggggcactctcgtgaccgtgtcctccaccactaccca gcaccgaggccaccaccccggtctaccatcgctcccagcctctgtccctgcgtccgga ggcatgtagaccgcagctgggtggggccgtgcataccgggggtcttgacttcgctcgatat ctacattggggccctctggctggtacttgcgggtcctgtgttactcgtgacacttttact gtaagcgggtcggagaagctgtgtacatcttaagcaaccttcagaggcctgtgcagac tactcaaggaggagacggctgttcagtcgggtcccagaggaggaggaaaggcggctgcgaa ctgcgctgaaattcagccgcagcgcagatgtccagcctacaagcaggggcagaaccagc tctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggga cgggaccagaaatggcggggaagccgcgcagaaagaatccccagagggcctgtacaac gagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaagggggaacgca gaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacct atgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR20-16 - 完全 aa	895	malpvtalllplalllhaarpmniqltqsprrlsasvdrvtlsckgsqninnylawyqqklgea pkliyntnnlqtgipsrfsrgsgtdyftisglqpedvatyfccqynnngntfgagtklelkgg gsggggsgggsgggsgqqlvqsgpelkkpgesvkiskasgntvtgyamhwvrqa pgkglkwmgwintysgkptyaddfkgrcvfslasastahlqisnlknedtatyfcarstyy gykdwfaywgqgtlvtvssttpaprrpptpaptiasqplslrpeacrpaggavhtrglfac diyiwaplagtcgvllslvitlyckgrkillyikqpfmrpvqttqeedgcscrfeeeeegg celrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreedydldkrrgrdpemggkprknpqegl ynelqkdkmacayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr

10

20

30

【表 18】

表11B. ヒト化CD20 CARコンストラクト

名称	配列番号	配列
CD20-3m sc Fv	691	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRDYYMAWVRQAPGKG LEWVASISYEGNPYYGDSVKGRFTISRDNASTLYLQMSSLRAEDT AVYYCARHDHNNVDWFAYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSDIVMTQTPLSLSVTPGQPVSMSCSSQSLLYSENKKNYLA WYLQKPGQSPQLLIFWASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYCQYYNFPTEFGQGTKLEIK
CD20-3J sc Fv	692	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFRDYYMAWVRQAPGQR LEWMGSISYEGNPYYGDSVKGRVTITRDNSASTLYMELSSLRSED AVYYCARHDHNNVDWFAYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYSENKKNYLA WYQQKPGKVPKLLIFWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDV ATYYCQYYNFPTEFGQGTKLEIK
CD20-3H5k3 scFv	693	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGFTFRDYYMAWVRQMPGKGL EWMGSISYEGNPYYGDSVKGQVTISRDNASTLYLQWSSLKASDTA MYYCARHDHNNVDWFAYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGG GGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCKSSQSLLYSENKKNYLA WYQQKPGQAPRLIFWASTRESGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDL AVYYCQYYNFPTEFGQGTKLEIK
CD20-3H5k1 scFv	694	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGFTFRDYYMAWVRQMPGKGL EWMGSISYEGNPYYGDSVKGQVTISRDNASTLYLQWSSLKASDTA MYYCARHDHNNVDWFAYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGG GGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYSENKKNYLA WYQQKPGKVPKLLIFWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDV ATYYCQYYNFPTEFGQGTKLEIK
CD20-3H1k3 scFv	695	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFRDYYMAWVRQAPGQG LEWMGSISYEGNPYYGDSVKGRVTMTRDNASTLYMELSSLRSED AVYYCARHDHNNVDWFAYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCKSSQSLLYSENKKNYLA WYQQKPGQAPRLIFWASTRESGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDL AVYYCQYYNFPTEFGQGTKLEIK
CD20-3H1k1 scFv	696	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFRDYYMAWVRQAPGQG LEWMGSISYEGNPYYGDSVKGRVTMTRDNASTLYMELSSLRSED AVYYCARHDHNNVDWFAYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYSENKKNYLA WYQQKPGKVPKLLIFWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDV ATYYCQYYNFPTEFGQGTKLEIK

10

20

30

40

【1154】

一部の実施形態において、抗原結合ドメインは、表11Aおよび11Bに列挙したいずれかの重鎖結合ドメインアミノ酸配列のHC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3を含む。実施形態において、抗原結合ドメインは、LC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3をさらに含む。実施形態において、抗原結合ドメインは、表11Aまたは11Bに列挙したいずれかの軽鎖結合ドメインアミノ酸配列のLC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3を含む。

【1155】

一部の実施形態において、抗原結合ドメインは、表11Aまたは11Bに列挙したいず

50

れかの軽鎖結合ドメインアミノ酸配列のLC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3の1つ、2つまたは全て、ならびに表11Aまたは11Bに列挙したいずれかの重鎖結合ドメインアミノ酸配列のHC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3の1つ、2つまたは全てを含む。

【1156】

一部の実施形態において、CDRは、Kabatt番号付けスキーム、Chothia番号付けスキーム、またはこれらの組合せに従って定義される。

【1157】

s c F vドメインのヒトCDR配列の配列を、重鎖可変ドメインについて表12Aまたは12Bに、軽鎖可変ドメインについて表13に示す。「ID」は、各CDRのそれぞれの配列番号を意味する。

【1158】

【表19】

表12A. CD20 CARの重鎖可変ドメインCDR。CDRは、「組合せ型」定義に従って同定される。

候補	HCDR1	配列 番号	HCDR2	配列 番号	HCDR3	配列 番号
CAR20-1	EYTFDYAFH	697	WINTYSGKPTYADDFKG	791	DWFTY	903
CAR20-2	GFTFSKYGMN	698	SISSTSIYIYYADTVKG	792	HDYSSYSY	904
CAR20-3	GFTFRDYMA	699	SISYEGNPYYGDSVKG	793	HDHNNVDWFAY	905
CAR20-4	RFSLSYGMMSG	778	DIWWDDDKHYNPSLKN	794	SSTTDGIVTYVMDV	906
CAR20-5	GFTFSSSGMQ	779	GIYYDSYKKSADSVKG	795	SAYYGYKDYFDY	907
CAR20-6	GFSLNTHGMGV G	780	NIWWDDDKYYNPSLKN	796	IEGSPVTTTVFDY	908
CAR20-7	GFSLSYGMMSG	781	AIAWDGDKYYNPSLKS	797	RDYDVGYYYFDF	909
CAR20-8	GNTVTGYAMH	782	WINTYSGKPTYADDFKG	798	DWFAY	910
CAR20-9	GFTFRDYMA	783	SISYEGNPYYGDSVKG	799	HDHNNVDWFAY	911
CAR20-10	GFTFSSSGMQ	784	GIYYDSYKKSADSVKG	896	SAYYGYKDYFDY	912
CAR20-11	EYTFDYAFH	785	WINTYSGKPTYADDFKG	897	GAYYGYRDWFTY	913
CAR20-12	GFTFSKYGMN	786	SISSTSIYIYYADTVKG	898	HDYSSYSY	914
CAR20-13	RFSLSYGMMSG	787	DIWWDDDKHYNPSLKN	899	SSTTDGIVTYVMDV	915
CAR20-14	GFSLNTHGMGV G	788	NIWWDDDKYYNPSLKN	900	IEGSPVTTTVFDY	916
CAR20-15	GFSLSYGMMSG	789	AIAWDGDKYYNPSLKS	901	RDYDVGYYYFDF	917
CAR20-16	GNTVTGYAMH	790	WINTYSGKPTYADDFKG	902	STYYGYKDWFAF	918

【 1 1 5 9 】

【表 2 0】

表 12B. CD20 CAR の重鎖可変ドメイン CDR。CDR は、Kabat に従って同定される。

候補	HCDR1	配列 番号	HCDR2	配列 番号	HCDR3	配列 番号
CAR20-1	DYAFH		WINTYSGKPTYADDFKG		GAYYGYRDWFTY	
CAR20-2	KYGMN		SISSTSIYIYYADTVKG		HDYSSYSY	
CAR20-3	DYYMA		SISYEGNPYYGDSVKG		HDHNNVDWFAY	
CAR20-4	TYGMSVG		DIWWDDDKHYNPSLKN		SSTTDGIVTYVMDV	
CAR20-5	SSGMQ		GIYYDSYKKSYADSVKG		SAYYGYKDYFDY	
CAR20-6	THGMGVG		NIWWDDDKYYNPSLKN		IEGSPVTTTVFDY	
CAR20-7	TSGMVVS		AIAWDGDKYYNPSLKS		RDYDVGYYYFDF	
CAR20-8	GYAMH		WINTYSGKPTYADDFKG		STYYGYKDWFAF	
CAR20-9	DYYMA		SISYEGNPYYGDSVKG		HDHNNVDWFAY	
CAR20-10	SSGMQ		GIYYDSYKKSYADSVKG		SAYYGYKDYFDY	
CAR20-11	DYAFH		WINTYSGKPTYADDFKG		GAYYGYRDWFTY	
CAR20-12	KYGMN		SISSTSIYIYYADTVKG		HDYSSYSY	
CAR20-13	TYGMSVG		DIWWDDDKHYNPSLKN		SSTTDGIVTYVMDV	
CAR20-14	THGMGVG		NIWWDDDKYYNPSLKN		IEGSPVTTTVFDY	
CAR20-15	TSGMVVS		AIAWDGDKYYNPSLKS		RDYDVGYYYFDF	
CAR20-16	GYAMH		WINTYSGKPTYADDFKG		STYYGYKDWFAF	

【 1 1 6 0 】

【表 2 1】

表 13. CD20 CAR の軽鎖可変ドメイン CDR。この表中の LC CDR 配列は、Kabat または組合せ型定義のもとで同じ配列を有する。

候補	LCDR1	配 列 番号	LCDR2	配 列 番号	LCDR3	配 列 番号
CAR20-1	KSSQSLLYSENKKNYLA	919	WASTRES	935	QQYYNFPPWT	951
CAR20-2	KINSGNIGSYFIH	920	RDDKRPH	936	HSYDSGINIV	952
CAR20-3	KSSQSLLYSENKKNYLA	921	WASTRES	937	QQYYNFPT	953
CAR20-4	KASQNINRYLN	922	SANSLQT	938	LQHNSWPLT	954
CAR20-5	QASQNINKYIA	923	YTSTLES	939	LQYDDLPLYT	955
CAR20-6	KASQNINRYLN	924	NANSLQT	940	LQHNSRPLT	956
CAR20-7	LASSRVSNIY	925	STSSLAS	941	HQWSSNPWT	957
CAR20-8	KGSQNINNYLA	926	NTNNLQT	942	CQYNNGNT	958
CAR20-9	KSSQSLLYSENKKNYLA	927	WASTRES	943	QQYYNFPT	959
CAR20-10	QASQNINKYIA	928	YTSTLES	944	LQYDDLPLYT	960
CAR20-11	KSSQSLLYSENKKNYLA	929	WASTRES	945	QQYYNFPPWT	961
CAR20-12	KINSGNIGSYFIH	930	RDDKRPH	946	HSYDSGINIV	962
CAR20-13	KASQNINRYLN	931	SANSLQT	947	LQHNSWPLT	963
CAR20-14	KASQNINRYLN	932	NANSLQT	948	LQHNSRPLT	964
CAR20-15	LASSRVSNIY	933	STSSLAS	949	HQWSSNPWT	965
CAR20-16	KGSQNINNYLA	934	NTNNLQT	950	CQYNNGNT	966

【 1 1 6 1 】

【表 2 2 - 1】

表14A. CD20抗体分子の重鎖可変領域

候補	配列番号	重鎖可変領域
CAR-1	967	QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKTSEYTFDIAAFHWVKQAPGKGL KWMGWINTYSGKPTYADDFKGRFVFSLEDSARTANLQISNLKNE DTATYFCARGAYYGYRDWFTYWGQGTLVTV
CAR20-2	968	EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCLASGFTFSKYGMNWIRQAPGKGL EWVASISSTSIYIYYADTVKGRFTISRNAKNTLYLQMTSLRSEDTA LYYCARHDYSSYSYWGQGVMVTV
CAR20-3	969	EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSAASGFTFRDYMAWVRQAPKKG LEWVASISYEGNPYYGDSVKGRFTISRNNAKSTLYLQMNSLRSED TATYYCARHDHNNVDWFAYWGQGTLVTV
CAR20-4	970	QVTLKESGPGILQPSQTLSTCTFTRFSLSTYGMVSGWIRQPSGKG LEWLADIWWDDDKHYNP SLKNRLTISKDTSKNQAFKITNVDTA DTATYYCARSTTDGIVTYVMDVWGQGASVTV
CAR20-5	971	EVQLVESGGGLVQPGTSLKLSCLVASGFTFSSSGMQWIRQAPKKGL EWISGIYYDSYKKSYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLEMNSLRSEDT ATYYCAKSAYYGYKDYFDYWGQGVMVTV
CAR20-6	972	QVTLKESGPGLLQPSQTLSTCTFAGFSLNTHGMGVGWIRQPSGK GLEWLANIWWDDDKYYNP SLKNRLTMSKDTSNNAFLKITNVD ADTATYYCAREGSPVVTTFDYWGQGVMVTV
CAR20-7	973	QVTLKESGPGMLQPSKTLSTCSFSGFSLSTSGMVVSWIRQPSGKS LEWLAAIAWDGDKYYNP SLKSRVTVSKDTSNTQVFLRITSVDIAD TATYYCTRRDYDVGYYYFDFWGQGVMVTV
CAR20-8	974	QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKASGNTVTGYAMHWVRQAPGKG LKWMGWINTYSGKPTYADDFKGRCVFSLEASASTAHLQISNLKNE DTATYFCARSTYYGYKDWFAIWGQGTLVTV

10

20

30

【表 2 2 - 2】

CAR20-9	975	EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCAASGFTFRDYMAWVRQAPKKGL LEWVASISYEGNPYYGDSVKGRFTISRNNAKSTLYLQMNSLRSED TATYYCARHDHNNVDWFAYWGQGTLVTV
CAR20-10	976	EVQLVESGGGLVQPGTSLKLSCLVASGFTFSSSGMQWIRQAPKKGL EWISGIYYDSYKKSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLEMNSLRSEDT ATYYCAKSAYYGYKDYFDYWGQGVMTV
CAR20-11	977	QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKTSEYTFDIAFHVKQAPGKGL KWMGWINTYSGKPTYADDFKGRFVFSLEDSARTANLQISNLKNE DTATYFCARGAYYGYRDWFTYWGQGTLVTV
CAR20-12	978	EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCLASGFTFSKYGMNWIRQAPGKGL EWVASISSTSIYIYYADTVKGRFTISRRENAKNTLYLQMTSLRSEDTA LYYCARHDYSSYSYWGQGVMTV
CAR20-13	979	QVTLKESGPGILQPSQTLSTCTFTRFSLSTYGMVSGWIRQPSGKG LEWLADIWWDDDKHYNP SLKNRLTISKDTSKNQAF LKITNVDTA DTATYYCARSSITDGI VTYVMDVWGQGASVTV
CAR20-14	980	QVTLKESGPGLLQPSQTLSTCTFAGFSLNTHGMGVGWIRQPSGK GLEWLANIWWDDDKYYNP SLKNRLTMSKDTSNNAFLKITNVD T ADTATYYCARI EGSPVTTVF DYWGQGVMTV
CAR20-15	981	QVTLKESGPGMLQPSKTLSTCSFSGFSLSTSGMVVSWIRQPSGKS LEWLAAIAWDGDKYYNP SLKSRVTVSKDTSNTQVFLRITSVDIAD TATYYCTRRDYDVGYYYFDFWGQGVMTV
CAR20-16	982	QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKASGNTVTGYAMHWVRQAPGKG LKWMGWINTYSGKPTYADDFKGRCVFSLEASASTAHLQISNLKNE DTATYFCARSTYYGYKDWFA YWGQGTLVTV

10

20

【1 1 6 2】

【表 2 3】

表14B. ヒト化CD20抗体分子の重鎖可変領域

候補	配列 番号	重鎖可変領域
CD20-3_VH1_1-46	983	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFRDYMAWVRQAPG QGLEWMGSISYEGNPYYGDSVKGRVTMTRDNSTSTLYMELSSL RSEDTAVYYCARHDHNNVDWFAYWGQGTLVTVSS
CD20-3_VH5_5-51	984	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGFTFRDYMAWVRQMPGK GLEWMGSISYEGNPYYGDSVKGQVTISRDNSTSTLYLQWSSLKA SDTAMYYCARHDHNNVDWFAYWGQGTLVTVSS
CD20-3_VH M	985	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCLASGFTFRDYMAWVRQAPG KGLEWVASISYEGNPYYGDSVKGRFTISRDNKSTLYLQMSSLR AEDTAVYYCARHDHNNVDWFAYWGQGTLVTVSS
CD20-3_VH J	986	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFRDYMAWVRQAPG QRLEWMGSISYEGNPYYGDSVKGRVTITRDNASTLYMELSSLR SEDTAVYYCARHDHNNVDWFAYWGQGTLVTVSS

30

40

【1 1 6 3】

【表 2 4 - 1】

表15A. CD20抗体分子の軽鎖可変領域

候補	配列番号	軽鎖可変領域
CAR20-1	987	DIVMTQTPSSQAVSAGEKVTMSCKSSQSLLYSENKKNYLAWYQQ KPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFIGSGSGTDFLTITSSVQAEDLAV YYCQQYYNFPPWTFGGGTKLELK
CAR20-2	988	QVVLTPKSVSTSLSTVKLSCKINSGNIGSYFIHWYQQHEGRSPTT MIYRDDKRPHGVPDRFIGSIDSSNSAFLTINNVQTEDEAIYFCHSY DSGINIVFGGGTKLTVL
CAR20-3	989	DIVMTQTPSSQAVSAGEKVTMSCKSSQSLLYSENKKNYLAWYQQ KPGQSPKLLIFWASTRESGVPDRFIGSGSGTDFLTITSSVQAEDLAV YYCQQYYNFPTFGSGTKLEIK
CAR20-4	990	DVQMTQSPSLLSASVGDAVTINCKASQNINRYLNWYQQKLGEPR LLIYSANSLQTGIPSRFSGSGSGADFTLTITSPQPEDVATYFCLQHNS WPLTFGSGTKLEIK
CAR20-5	991	DIQMTQSPPSLSASLGDKVITTCQASQNINKYIAWYQQKPGKAPRL LIRYTSSTLESSTPSRFSGSGSGRDYSFISNVESGDVASYYCLQYDD LPYTFGPSTKLELK
CAR20-6	992	DIQMTQSPSFLSASVGDRVTINCKASQNINRYLNWYQQKLGEAPK LLIYNANSLQTGIPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPADVATYFCLQHNS RPLTFGSGTILEIK
CAR20-7	993	KIVLTQSPITTAASPGEKVITTCCLASSRVSNYWYQQKSGASPKLLI YSTSSLASGVPPYRFSGSGSGTSYSLTINTMEAEDAATYYCHQWSSN PWTFGGGTKLELK
CAR20-8	994	NIQLTQSPSRLSASVGDRVTLSCKGSQNINNYLAWYQQKLGEAPK LLIYNINNLQTGIPSRFSGSGSGTDYFTISGLQPEDVATYFCCQYN NGNTFGAGTKLELK

10

20

30

【表 2 4 - 2】

CAR20-9	995	DIVMTQTPSSQAVSAGEKVTMSCKSSQSLLYSENKKNYLAWYQQ KPGQSPKLLIFWASTRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAV YYCQQYYNFPTFGSGTKLEIK
CAR20-10	996	DIQMTQSPPSLSASLGDKVITTCQASQNINKYIAWYQQKPGKAPRL LIRYTSITLESSTPSRFSGSGSGRDYSFISNVESGDVASYYCLQYDD LPYTFGPGTKLELK
CAR20-11	997	DIVMTQTPSSQAVSAGEKVTMSCKSSQSLLYSENKKNYLAWYQQ KPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAV YYCQQYYNFPPWTFGGGTKLELK
CAR20-12	998	QVVLTPKSVSTSLSTVKLSCKINSGNIGSYFIHWYQQHEGRSPTT MIYRDDKRPHGVPDRFSGSIDSSNSAFLTINNVTQTEDEAIYFCHSY DSGINIVFGGGTKLTVL
CAR20-13	999	DVQMTQSPSLLSASVGDAVTINCKASQNINRYLNWYQQKLGEPR LLIYSANSLQTGIPSRFSGSGSGADFTLTITSPQPEDVATYFCLQHNS WPLTFGSGTKLEIK
CAR20-14	1000	DIQMTQSPSFLSASVGDRVTINCKASQNINRYLNWYQQKLGEAPK LLIYNANSLQTGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPADVATYFCLQHNS RPLTFGSGTILEIK
CAR20-15	1001	KIVLTQSPITTAASPGEKVITTCCLASSRVSNYIYWYQQKSGASPKLLI YSTSSLASGVPPYRFSGSGSGTSYSLTINTMEAEDAATYCHQWSSN PWTFGGGTKLELK
CAR20-16	1002	NIQLTQSPSRLSASVGDRVTLSCKGSQNINNYLAWYQQKLGEAPK LLIYNINNLQTGIPSRFSGSGSGTIDYFTISGLQPEDVATYFCCQYN NGNTFGAGTKLELK

10

20

【1 1 6 4】

【表 2 5】

表15B. ヒト化CD20抗体分子の軽鎖可変領域

候補	配列番号	軽鎖可変領域
CD20-3_VK1_A20	1003	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYSENKKNYLAWYQQ KPGKVPKLLIFWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDV ATYYCQQYYNFPTFGQGTKLEIK
CD20-3_VK3_L25	1004	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCKSSQSLLYSENKKNYLAWYQQ KPGQAPRLIFWASTRESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDLA VYYCQQYYNFPTFGQGTKLEIK
CD20-3_VL M および C D20-3_VL J	1005	DIVMTQIPLSLSVTPGQPVSMSCKSSQSLLYSENKKNYLAWYL QKPGQSPQLLIFWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED VGVYYCQQYYNFPTFGQGTKLEIK

30

40

【1 1 6 5】

一部の実施形態において、抗原結合ドメインは、表 1 4 A または 1 4 B に列挙したいずれかの重鎖結合ドメインアミノ酸配列の HC CDR 1、HC CDR 2 および HC CDR 3 を含む。実施形態において、抗原結合ドメインは、LC CDR 1、LC CDR 2 および LC CDR 3 をさらに含む。実施形態において、抗原結合ドメインは、表 1 5 A または 1 5 B に列挙したいずれかの軽鎖結合ドメインアミノ酸配列の LC CDR 1、LC CDR 2 および LC CDR 3 を含む。

【1 1 6 6】

50

一部の実施形態において、抗原結合ドメインは、表 1 5 A または 1 5 B に列挙したいずれかの軽鎖結合ドメインアミノ酸配列の L C C D R 1、L C C D R 2 および L C C D R 3 の 1 つ、2 つまたは全て、ならびに表 1 4 A または 1 4 B に列挙したいずれかの重鎖結合ドメインアミノ酸配列の H C C D R 1、H C C D R 2 および H C C D R 3 の 1 つ、2 つまたは全てを含む。

【1 1 6 7】

一部の実施形態において、C D R は、K a b a t 番号付けスキーム、C h o t h i a 番号付けスキーム、またはこれらの組合せに従って定義される。

【1 1 6 8】

C A R 1 2 3 コンストラクト

10

抗 C D 1 2 3 単鎖可変フラグメントを単離した。抗 C D 1 2 3 s c F v を、C D 3 ゼータ鎖および 4 - 1 B B 共刺激分子を有するレンチウイルス C A R 発現ベクターにクローニングした。C A R 含有プラスミドを、S T B L 3 細胞における細菌形質転換によって増幅させ、続いて、エンドトキシンフリー Q i a g e n P l a s m i d M a k i キットを使用する M a x i p r e p によって増幅させた。レンチウイルスの上清は、標準的な技術を使用して 2 9 3 T 細胞において産生した。

【1 1 6 9】

C A R の配列を下の表 1 6 に提供する。C A R のさらなる構成要素（例えば、リーダー、ヒンジ、膜貫通およびシグナル伝達ドメイン）は、本明細書中で説明されている。

【1 1 7 0】

20

V L および V H ドメインが s c F v 内に出現する順番は様々（すなわち、V L - V H、または V H - V L 方向）であった。この場合、各サブユニットが配列 G G G G S（配列番号 1 8）[例えば、(G 4 S)₃（配列番号 1 0 7）または (G 4 S)₄（配列番号 1 0 6）] を含む「G 4 S」（配列番号 1 8）サブユニットの 3 つか 4 つのコピーが、可変ドメインを接続して、s c F v ドメイン全体を作り出している。

【1 1 7 1】

ヒト C A R の配列を下の表 1 6 に提供する。

【1 1 7 2】

これらのクローンは全て、C D 3 ゼータ鎖由来の共刺激ドメインのシグナルドメインにおける Q / K 残基変化を含有する。

30

【1 1 7 3】

【表 2 6 - 1】

表16: ヒトCD123 CARコンストラクト

名称	配列 番号	配列
CAR123-1 NT	1123	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgc tcggccccaagtccaactcgtccagtcaggagcggaagtcaagaagcccgagcgt cagtc aaagtgtcatgcaaagcctcgggctacactttcactgggtactacatgcac tgggtgcgccaggctccaggacagggactggaatggatgggatggatcaacccgaa ctccggtggcaccaattacgccagaaagttccaggggaggggtgacctgactcgcg acacgtcgatcagcaccgcatacatggagctgtcaagactccggtccgacgatact gccgtgtactactgcgcacgggacatgaacattctggccaccgtgccttttgacat ctggggtcagggaactatggttacgtgtcctctggtggaggcggctccggcgggg ggggaagcggaggcgggtggaagcgacattcagatgaccagtcgccttcatccctt tcggcgagcgtgggagatcgcgctactatcacttgtcgggcctcgcagtcacatctc cacctacctcaattggtaccagcagaagccaggaaaagcaccgaatctgctgatct acgccgcgttttcttgcaatcgggagtgccaagcagattcagcggatcgggatca ggcactgatttcacctcaccatcaactcgtgcaaccggaggatttcgctacgta ctattgccaacaaggagacagcgtgccgctcaccttcggcgaggaggactaagctgg aatcaagaccactacccagcaccgaggccacccaccccggtcctaccatcgcc tccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctgggtggggccgt gcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttggggccctctggctg gtacttgcggggtcctgtgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggt cggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactac tcaagaggaggacggctgttcatgccggttccagaggaggaggaaggcggctgcg aactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcag aaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctgga caagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccc aagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgag attggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccaggg actcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgc ctcgg

10

20

30

【表 2 6 - 2】

CAR123-1 AA	1124	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHWRQAP GQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARDMNIL ATVPFDIWGQGTMTVTVSSGGGSGGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSI STYLNWYQQKPGKAPNLLIYAAFSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCQQG DSVPLTFGGGTKLEIKTTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGG CELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
CAR123-1 scFv	1125	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHWRQAP GQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARDMNIL ATVPFDIWGQGTMTVTVSSGGGSGGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSI STYLNWYQQKPGKAPNLLIYAAFSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCQQG DSVPLTFGGGTKLEIK
CAR123-1 VH	1126	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQ KFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARDMNILATVPFDIWGQGTMTVTVSS
CAR123-1 VL	1127	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSI STYLNWYQQKPGKAPNLLIYAAFSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCQQGDSVPLTFGGGTKLEIK

10

20

【表 2 6 - 3】

CARI23-2 NT	1128	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggtctttctgctccacgccgctcggcc ccaagtgaactcgtccaaagcggagcggaggtcaagaaacccggagcgagcgtgaaagtgt cctgcaaagcctccggtacacctttacgggctactacatgcactgggtgcgccaggcacca ggacaggggtcttgaatggatggatggatcaaccctaattcgggcggaactaactacgcaca gaagttccaggggagagtgactctgactcgggatacctccatctcaactgtctacatggaac tctcccgttgcggtcagatgatacggcagtgactactgcgcccgacatgaatactctg gctaccgtgccgttcgacatctggggacaggggactatggttactgtctcatcgggcgggtgg aggttcaggaggagggcggctcgggagggcggaggttcggacattcagatgaccagtcctcat cctctctgtcggccagcgtcggagataggtgaccattacctgtcgggcctcgaaagcatc tcctcgtacctcaactggatcagcaaaagccgggaaaggcgcctaagctgctgatctacgc cgcttcgagcttgcaaagcgggtgccatccagattctcgggatcaggctcaggaaccgact tcacctgaccgtgaacagcctccagccggaggactttgccacttactactgccagcagggga gactccgtgccgttactttcggggggggtaccgcctggagatcaagaccactaccacagc accgagggccaccaccccggtcctaccatcgctccagcctctgtccctgcgtccggagg catgtagaccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatc tacatttggggccctctggtggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcaactct ttactgtaagcgcggtcggagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctg tgcagactactcaagaggagacggctgttcatgccggttccagaggaggaggaaggcggc tgcgaactgcgctgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaa ccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggga gaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagaggcctgtac aacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagggaacg cagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacct atgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CARI23-2 AA	1129	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYTFTGYIMHWVRQAP GQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTLTRDTSISTVYMELSRLRSDDTAVYYCARDMNIL ATVPFDIWGQGTMTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSI SSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTVNSLQPEDFATYYCQQG DSVPLTFGGGTRLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI YIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGG CELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLY NELQDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

20

30

【表 2 6 - 4】

CAR123-2 scFv	1130	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYTFTGYMHWRQAP GQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTLTRDTSISTVYMELSRRLSDDTAVYYCARDMNIL ATVPFDIWGQGTMTVTSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSI SSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTVNSLQPEDFATYYCQQG DSVPLTFGGGTRLEIK
CAR123-2 VH	1131	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYTFTGYMHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQ KFQGRVTLTRDTSISTVYMELSRRLSDDTAVYYCARDMNILATVPFDIWGQGTMTVTSS
CAR123-2 VL	1132	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTVNSLQPEDFATYYCQQGDSVPLTFGGGTRLEIK
CAR123-3 NT	1133	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcgcc ccaagtccaactcgttcaatccggcgagaaagtcagaagccaggagcatcagtgaagtgt cctgcaaagcctcaggctacatcttcacgggatactacatccactgggtgcccaggctccg ggccaggcccttgagtggatgggctggatcaaccctaactctgggggaaccaactacgtca gaagttccaggggagggtcactatgactcgcgatacctccatctccactgctgacatggaac tctcgggactgagatccgacgactcctgccgtgtactactgcgcccgggacatgaacatcttg gcgaccgtgccgtttgacatttggggacagggcaccctcgtcactgtgctgagcgggtggagg aggctcgggggtggcgatcaggaggggagggaagcgacatccagctgactcagagcccat cgtcgttgcgcgtcgggtgggggatagagtaccattacttgcgcgccagccagagcatc tcatcatatctgaattggtaccagcagaagcccggaaggcccaaaactgctgatctacgc tgcaagcagcctccaatcgggagtgccgtcacggttctccgggtccgggttcgggaactgact ttaccctgaccgtgaattcgtgcaaccggaggatttcgccagctactactgtcagcaagga gactccgtgccgtgaccttcgggtggaggaccaaggtcgaaatcaagaccactacccagc accgagggccaccaccccggtcctaccatcgctcccagcctctgtccctgcgtccggagg catgtagaccgcagctgggtggggcgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatc tacatttggggccctctggctgggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactct ttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctg tgcagactactcaagaggaggacggctgttcattgccggttcccagaggagggaaggcggc tgcgaaactgcgctgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaa ccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcgga gaggacgggaccagaaatggcggggaagccgcgcagaaagaatccccaagaggcctgtac aacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacg cagaagaggcaaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacct atgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg

10

20

30

【表 2 6 - 5】

CAR123-3 AA	1134	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTGYIHWVRQAP GQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSGLRSDPAVYYCARDMNIL ATVPFDIWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSI SSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTVNSLQPEDFATYYCQQG DSVPLTFGGGTKVEIKTTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEEGG CELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
CAR123-3 scFv	1135	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTGYIHWVRQAP GQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSGLRSDPAVYYCARDMNIL ATVPFDIWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSI SSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTVNSLQPEDFATYYCQQG DSVPLTFGGGTKVEIK
CAR123-3 VH	1136	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTGYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQ KFQGRVTMTRDTSISTAYMELSGLRSDPAVYYCARDMNILATVPFDIWGQGTTLVTVSS
CAR123-3 VL	1137	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTVNSLQPEDFATYYCQQGDSVPLTFGGGTKVEIK

10

20

【表 2 6 - 6】

CAR123-4 NT	1138	atggccctccctgtcaccgcccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgcccgc tcggccccaagtccaactccaacagttagggcgagaagtgaagaaagagcgggtgcat cgggtgaaagtgtcatgcaaagcctcgggctacaccttactgactactatgacac tggctgaggcaggcaccgggacagggacttgagtggatggatggaacccgaa ttcaggggacactaactacgagcagaagttccaggggagagtgaccctgacgaggg acacctcaatttcgaccgtctacatggaattgtcgcgccctgagatcggacgatact gctgtgtactactgtgcccgcgacatgaacatcctcgcgactgtgccttttgatat ctggggacaggggactatgggtcacggtttcctccgcttccgggtggcgagggtcgg gaggccgggctccgggtggaggaggcagcgacatccagatgactcagagcccttcc tcgctgagcgccctcagtgggagatcgcgtagccatcacttgccggggcagccagtc catttcgtcctacctcaattggtaccagcagaagccgggaaaggcgcccaagctct tgatctacgctgagagctccctgcaaagcggggtgcccagagccgattctcgggttcc ggctcgggaaccgacttactctgaccatctcatccctgcaaccagaggactttgc cacctactactgccaacaaggagattctgtccactgacgttcggcgagggaacca aggtcgaaatcaagaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggtcctacc atcgccctccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctggtgg ggcgtgcatacccggttcttgacttcgcctgagatctacatttggggccctc tggctggtacttgccgggtcctgtgctttcactcgtgatcactcttactgtaag cgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgca gactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttccagaggaggagggaaggcg gctgcgaactgcgctgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcag gggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttgggtcggagagaggagtacgacgt gctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcggaagccgcgcagaaaga atccccaagaggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctat agcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgta ccagggactcagcaccgcccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccc tgccgcctcgg
CAR123-4 AA	1139	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQQSGAEVKKSGASVKVSKCASGYTFTDYMHWLRQAP GQGLEWMGWINPNSGDTNYAQKFQGRVTLTRDTSISTVYMELSRLRSDDTAVYYCARDMNIL ATVPFDIWGQGTMTVSSASGGGSGGRASGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQ SISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QGDSVPLTFGGGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC DIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCK

【表 2 6 - 7】

CAR123-4 scFv	1140	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQQSGAEVKKSGASVKVSKCASGYTFTDYMHWLRQAP GQGLEWMGWINPNSGDTNYAQKFQGRVTLTRDTSISTVYMELSRLRSDDTAVYYCARDMNIL ATVPFDIWGQGTMTVSSASGGGSGGRASGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQ SISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QGDSVPLTFGGGTKVEIK
CAR123-4 VH	1141	QVQLQQSGAEVKKSGASVKVSKCASGYTFTDYMHWLRQAPGQGLEWMGWINPNSGDTNYAQ KFQGRVTLTRDTSISTVYMELSRLRSDDTAVYYCARDMNILATVPFDIWGQGTMTVSS
CAR123-4 VL	1142	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQGDSVPLTFGGGTKVEIK

【1174】

一部の実施形態において、抗原結合ドメインは、表16に列挙したいずれかの重鎖結合ドメインアミノ酸配列のHC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3を含む。
実施形態において、抗原結合ドメインは、LC CDR1、LC CDR2およびLC

10

20

30

40

50

CDR3をさらに含む。実施形態において、抗原結合ドメインは、表16に列挙したいずれかの軽鎖結合ドメインアミノ酸配列のLC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3を含む。

【1175】

一部の実施形態において、抗原結合ドメインは、表16に列挙したいずれかの軽鎖結合ドメインアミノ酸配列のLC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3の1つ、2つまたは全て、ならびに表16に列挙したいずれかの重鎖結合ドメインアミノ酸配列のHC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3の1つ、2つまたは全てを含む。

【1176】

一部の実施形態において、CDRは、Kabat番号付けスキーム、Chothia番号付けスキーム、またはこれらの組合せに従って定義される。

【1177】

scFvドメインのヒトCDR配列の配列を、重鎖可変ドメインについて表17に、軽鎖可変ドメインについて表18に示す。「ID」は、各CDRのそれぞれの配列番号を意味する。

【1178】

【表27】

表17. 重鎖可変ドメイン CDR

候補	HCDR1	配列 番号	HCDR2	配列 番号	HCDR3	配列 番号
CAR123-1	GYTFTDYMH	1006	WINPNSGDTNYAQKFQG	1010	DMNILATVPFDI	1014
CAR123-2	GYTFTGYMH	1007	WINPNSGGTNYAQKFQG	1011	DMNILATVPFDI	1015
CAR123-3	GYTFTGYMH	1008	WINPNSGGTNYAQKFQG	1012	DMNILATVPFDI	1016
CAR123-4	GYIFTGYYIH	1009	WINPNSGGTNYAQKFQG	1013	DMNILATVPFDI	1017

【1179】

【表28】

表18. 軽鎖可変ドメイン CDR

候補	LCDR1	配列 番号	LCDR2	配列 番号	LCDR3	配列 番号
CAR123-1	RASQSISSYLN	1018	AASSLQS	1022	QQGDSVPLT	1026
CAR123-2	RASQSISTYLN	1019	AAFSLQS	1023	QQGDSVPLT	1027
CAR123-3	RASQSISSYLN	1020	AASSLQS	1024	QQGDSVPLT	1028
CAR123-4	RASQSISSYLN	1021	AASSLQS	1025	QQGDSVPLT	1029

【1180】

ある実施形態において、B細胞阻害剤は、CD123 CARを含み、前記CD123 CARは、CD123結合ドメインを含む抗体または抗体フラグメントを含み、前記CD123結合ドメインは、表18に列挙した軽鎖相補性決定領域1 (LC CDR1)、軽鎖相補性決定領域2 (LC CDR2) および軽鎖相補性決定領域3 (LC CDR3) アミノ酸配列の1つまたは複数、ならびに表17に列挙したいずれかのCD123重鎖結合ドメインアミノ酸配列の重鎖相補性決定領域1 (HC CDR1)、重鎖相補性決定領域2 (HC CDR2) および重鎖相補性決定領域3 (HC CDR3) の1つまたは

複数を含む。

【1181】

s c F v ドメインのさらなる C D 1 2 3 C D R 配列の配列を、重鎖可変ドメインについて表 1 9、2 1 および 2 3 に、軽鎖可変ドメインについて表 2 0、2 2 および 2 4 に示す。「I D」は、各 C D R のそれぞれの配列番号を意味する。

【1182】

表 1 9 および 2 0 において提供する C D R は、K a b a t 番号付けスキームと C h o t h i a 番号付けスキームの組合せによるものである。

【1183】

【表 2 9】

表 19. 重鎖可変ドメイン CDR

候補	HCDR1	配列 番号	HCDR2	配列 番号	HCDR3	配列 番号
CAR123-1	GYTFTDYMH	1030	WINPNSGDTNYAQKFQG	1034	DMNILATVPFDI	1038
CAR123-2	GYFTGYMH	1031	WINPNSGGTNYAQKFQG	1035	DMNILATVPFDI	1039
CAR123-3	GYFTGYIH	1032	WINPNSGGTNYAQKFQG	1036	DMNILATVPFDI	1040
CAR123-4	GYFTGYMH	1033	WINPNSGGTNYAQKFQG	1037	DMNILATVPFDI	1041

【1184】

【表 3 0】

表 20. 軽鎖可変ドメイン CDR

候補	LCDR1	配列 番号	LCDR2	配列 番号	LCDR3	配列 番号
CAR123-1	RASQSISTYLN	1042	AASSLQS	1046	QQGDSVPLT	1050
CAR123-2	RASQSISSYLN	1043	AAFSLQS	1047	QQGDSVPLT	1051
CAR123-3	RASQSISSYLN	1044	AASSLQS	1048	QQGDSVPLT	1052
CAR123-4	RASQSISSYLN	1045	AASSLQS	1049	QQGDSVPLT	1053

【1185】

ある実施形態において、B細胞阻害剤は、C D 1 2 3 C A R を含み、前記 C D 1 2 3 C A R は、C D 1 2 3 結合ドメインを含む抗体または抗体フラグメントを含み、前記 C D 1 2 3 結合ドメインは、表 2 0 に列挙した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) および軽鎖相補性決定領域 3 (L C C D R 3) アミノ酸配列の 1 つまたは複数、ならびに表 1 9 に列挙したいずれかの C D 1 2 3 重鎖結合ドメインアミノ酸配列の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) および重鎖相補性決定領域 3 (H C C D R 3) の 1 つまたは複数を含む。

【1186】

10

20

30

40

【表 3 1】

表21. Kabat番号付けスキーム[Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD]による重鎖可変ドメインCDR

候補	HCDR1	配列番号	HCDR2	配列番号	HCDR3	配列番号
CAR123-1	GYMH	1054	WINPNSGGTNYAQKFQG	1058	DMNILATVPFDI	1062
CAR123-2	GYMH	1055	WINPNSGGTNYAQKFQG	1059	DMNILATVPFDI	1063
CAR123-3	GYIH	1056	WINPNSGGTNYAQKFQG	1060	DMNILATVPFDI	1064
CAR123-4	DYMH	1057	WINPNSGDTNYAQKFQG	1061	DMNILATVPFDI	1065

10

【1187】

【表 3 2】

表22. Kabat番号付けスキーム[Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD]による軽鎖可変ドメインCDR

候補	LCDR1	配列番号	LCDR2	配列番号	LCDR3	配列番号
CAR123-1	RASQSISTYLN	1066	AAFSLQS	1070	QQGDSVPLT	1074
CAR123-2	RASQSISSYLN	1067	AASSLQS	1071	QQGDSVPLT	1075
CAR123-3	RASQSISSYLN	1068	AASSLQS	1072	QQGDSVPLT	1076
CAR123-4	RASQSISSYLN	1069	AASSLQS	1073	QQGDSVPLT	1077

20

【1188】

ある実施形態において、B細胞阻害剤は、CD123 CARを含み、前記CD123 CARは、CD123結合ドメインを含む抗体または抗体フラグメントを含み、前記CD123結合ドメインは、表22に列挙した軽鎖相補性決定領域1（LCDR1）、軽鎖相補性決定領域2（LCDR2）および軽鎖相補性決定領域3（LCDR3）アミノ酸配列の1つまたは複数、ならびに表21に列挙したいずれかのCD123重鎖結合ドメインアミノ酸配列の重鎖相補性決定領域1（HCDR1）、重鎖相補性決定領域2（HCDR2）および重鎖相補性決定領域3（HCDR3）の1つまたは複数を含む。

30

【1189】

【表 3 3】

表23. Chothia番号付けスキーム[Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948]による重鎖可変ドメインCDR

候補	HCDR1	配列番号	HCDR2	配列番号	HCDR3	配列番号
CAR123-1	GYTFTGY	1078	NPNSGG	1082	DMNILATVPFDI	1086
CAR123-2	GYTFTGY	1079	NPNSGG	1083	DMNILATVPFDI	1087
CAR123-3	GYIFTGY	1080	NPNSGG	1084	DMNILATVPFDI	1088
CAR123-4	GYTFTDY	1081	NPNSGD	1085	DMNILATVPFDI	1089

40

【1190】

【表 3 4】

表24. Chothia番号付けスキーム[Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948]による軽鎖可変ドメインCDR

候補	LCDR1	配列 番号	LCDR2	配列 番号	LCDR3	配列 番号
CAR123-1	SQSISTY	1090	AAF	1094	GDSVPL	1098
CAR123-2	SQSISSY	1091	AAS	1095	GDSVPL	1099
CAR123-3	SQSISSY	1092	AAS	1096	GDSVPL	1100
CAR123-4	SQSISSY	1093	AAS	1097	GDSVPL	1101

10

【1191】

ある実施形態において、B細胞阻害剤は、CD123 CARを含み、前記CD123 CARは、CD123結合ドメインを含む抗体または抗体フラグメントを含み、前記CD123結合ドメインは、表24に列挙した軽鎖相補性決定領域1（LC CDR1）、軽鎖相補性決定領域2（LC CDR2）および軽鎖相補性決定領域3（LC CDR3）アミノ酸配列の1つまたは複数、ならびに表23に列挙したいずれかのCD123重鎖結合ドメインアミノ酸配列の重鎖相補性決定領域1（HC CDR1）、重鎖相補性決定領域2（HC CDR2）および重鎖相補性決定領域3（HC CDR3）の1つまたは複数を含む。

20

【1192】

これらのCD123 CARのさらなる説明は、例えば、PCT/CN2014/090508において提供されており、前記出願は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【1193】

NFATプロモーターによって駆動されるルシフェラーゼレポーターを含有するジャーカット細胞株（JNL細胞と称する）を使用して、ヒト抗CD123 CARコンストラクトを活性について評価した。本明細書で説明される4つのヒトCARコンストラクト（CD123 CAR1-4）ならびにマウスCD123 CARコンストラクト1172および1176について、CD123 CAR活性を測定した。CAR活性は、このNFAT駆動レポーターの活性として測定した。CARTコンストラクトを含有するレンチウイルス上清を形質導入のためにJNL細胞に添加した。形質導入の4～6日後、JNL細胞を、下で説明する通りのFACSによってCAR発現について評価したか、または標的陽性[MO LM3、CD123を発現するように加工されたK562細胞（CD123-K562）]もしくは標的陰性（K562）細胞株と、3：1のエフェクター（JNL）対標的細胞株（E：T）比で混合して活性化を誘発した（図41）。コインキュベーションの20時間後、図42に示されているようにEnVision装置でのBright-Glo（商標）Luciferase Assayを使用してルシフェラーゼシグナルを測定した。

30

【1194】

CD123発現（「CD123+」）標的に応じてのCD123 CAR形質導入T細胞（「CART-CD123」または「CART-CD123 T細胞」）のエフェクターT細胞応答の量および質に基づいて、最適な抗CD123 CARコンストラクトを選択した。エフェクターT細胞応答としては、細胞の拡大、増殖、倍加、サイトカイン産生および標的細胞死滅または細胞溶解活性（脱顆粒）が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【1195】

CART-CD123の生成

ヒトscFvをコードするレンチウイルストランスファーベクター（human scFv encoding lentiviral transfer vectors）を使用して、VSVgシュードタイプ化レンチウイ

50

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。レンチウイルストランスファーベクターDNAを、リポフェクタミン試薬と組み合わせたVSVg gag/polおよびrevの3つのパッケージング構成要素と混合して、それらを一緒にLenti-X 293T細胞(Clonotech)にトランスフェクトした。

【1196】

30時間後、培地を収集し、濾過し、 -80°C で保存した。T細胞、CD4+およびCD8+リンパ球の陰性選択によってナイーブT細胞を得た、アフェレーシスを受けた正常ドナーからの血液を用いて開始することにより、治療用CART-CD123を生成した。これらの細胞を、 37°C 、5% CO_2 で、RPMI 1640、10%熱不活性化ウシ胎児血清(FCS)、2mMのL-グルタミン、1xペニシリン/ストレプトマイシン、100 μM の非必須アミノ酸、1mMのピルビン酸Na、10mMのHepesおよび55 μM の2-メルカプトエタノール中、1:3の比でのCD3x28ビーズ[Dynabeads (登録商標) Human T-Expander CD3/CD28, Invitrogen]によって活性化した。T細胞は、24ウェルプレートの1ウェルあたり0.5mLの培地中、T細胞 1×10^6 個で培養した。24時間後、T細胞をブラスティングし、0.5mLのウイルス上清を添加した。するとT細胞は対数成長パターンで分裂し始め、それを、mLあたりの細胞数を測定することによってモニタリングし、T細胞を2日ごとに新鮮な培地で希釈した。およそ10日後にT細胞が落ち着き始めると、対数成長が衰退した。成長速度の緩徐化と約300 cfu に近いT細胞のサイズの組合せが、後の分析のために凍結保存されるT細胞の状態を決めた。

【1197】

凍結保存前に、形質導入された(細胞表面に抗CD123 CARを発現している)細胞のパーセンテージおよびそれらの発現の相対的蛍光強度を、検出試薬としてプロテインLを使用するBD LSRFortessaまたはBD-FACS Cantoflowでのフローサイトメトリ分析により決定した。このFACSからの非染色細胞を超えるシグナルの相対的蛍光強度のゲーティングヒストグラムプロットが、形質導入T細胞のパーセンテージを示した。形質導入は、図42に示されているように12~42%の範囲のCART陽性細胞をもたらした。

【1198】

CART-CD123によりリダイレクトされたT細胞の細胞溶解活性の評価

標的発現細胞を死滅させるCART-CD123 T細胞の機能的能力を評価するために、細胞を解凍し、一晚、回復させた。

【1199】

T細胞による死滅は、ルシフェラーゼを安定的に発現する、CD123発現MOLM13急性骨髄性白血病細胞株に向けられた。非形質導入T細胞を使用して、非特異的背景グラウンド死滅レベルを決定した。4:1のエフェクター:標的細胞比に用量設定し、T細胞を2倍下方希釈して、CART-CD123の細胞溶解活性を測定し、この場合、エフェクターは、抗CD123キメラ受容体を発現するT細胞と定義した。アッセイを、適切な数のT細胞と一定数の標的細胞を混合することにより開始した。20時間後、ルシフェラーゼシグナルを、EnVision装置でBright-Glo(商標)ルシフェラーゼアッセイを使用して測定した。CD123-CART発現細胞の非形質導入T細胞に対する比率を増加させると、CD123細胞の死滅も同様に増加した。本明細書において提示するデータは、CD123を発現する細胞が、もっぱらCD123-CART発現細胞によって破壊され、非形質導入T細胞によって破壊されないことを示唆している。図43。

【1200】

T細胞形質導入

ヒト抗CD123クローンNVS2(CAR123-2を発現する)、NVS3(CAR123-3を発現する)、NVS4(CAR123-4を発現する)をさらなる研究用に選択した。これらのクローンは、全て、カニクイザルCD123に対して交差反応性で

あった。それらの活性を、軽鎖から重鎖の方向にCD8ヒンジドメイン、CD8膜貫通ドメインそして41BB共刺激ドメインを有するVHおよびVLドメインを含むマウスクローン1172および1176と比較した。1176もまたカニクイザルCD123に対して交差反応性である。1172は、そうではない。

【1201】

プラスミドをコンピテント細胞に形質転換し、500ccのブロスで成長させ、maxiprepにより単離し、標準的な方法を使用して293T細胞に形質導入した。レンチウイルス上清を24および48時間の時点で収集し、超遠心分離を使用して濃縮し、凍結した。

【1202】

SupT1細胞を用いてレンチウイルスの力価を測定し、3のMOIでの初代T細胞への形質導入のためのウイルスの適量を決定した。初代正常ドナーCD4+CD8細胞を、抗CD3/CD28ビーズ(Dynal、Invitrogen)およびインターロイキン-2 100U/mlを使用して6日間刺激し、その後、脱ビーズ(debeading)し、一度凍結した(and were and frozen once)。T細胞の細胞容量は、<300fLに(およそ10~12日後)減少した。

【1203】

T細胞形質導入効率は、全てのクローンについて事実上100%であった(図44Aおよび44B)。CD4:CD8比は、NVSクローンではおよそ1:1であり、1172および1176クローンでは3:2であった(図45)。

【1204】

脱顆粒

脱顆粒を評価するために、CART細胞(NVS2~4、1172および1176クローン)を解凍し、T細胞培地中、細胞 2×10^6 個/mlの濃度で、一晚、休ませた。次いで、細胞を計数し、翌日、細胞 1×10^6 個/mlで再懸濁させた。腫瘍標的細胞(TCM、PMA/iono、MOLM14またはジャーカット)を細胞 5×10^6 個/mlで再懸濁させた。細胞を、T細胞 1×10^5 個:腫瘍細胞 5×10^5 個の比で48ウェルプレートに播種し、2時間、抗CD107a PE Cy7、抗CD49d精製および抗CD28精製抗体の存在下でインキュベートした。その後、細胞を回収し、抗CD3 APCで染色し、BD LSR Fortessaを使用して獲得した(図46)。

【1205】

T細胞脱顆粒が図46の各プロットの右上象限に示されている。本明細書において提示する結果は、2時間インビトロアッセイ中の同様の脱顆粒によって明示された、CD123+標的の同様のT細胞認識を示す。C1176は、他のクローンにおけるおよそ80%と比較して65%の劣った脱顆粒を有した。

【1206】

細胞毒性

細胞毒性を評価するために、CART細胞(NVS2~4、1172および1176クローン)を解凍し、一晚、T細胞培地中、細胞 2×10^6 個/mlで休ませた。細胞を計数し、翌日、細胞 1×10^6 個/mlで再懸濁させた。腫瘍標的細胞(MOLM14)を細胞 1×10^6 個/mlで再懸濁させた。細胞を、黒色平底96ウェルプレートに、示されている通りの漸減E:T比で(図47)、2回ずつ播種した。20時間のインキュベーション後、ルシフェリンを添加し、プレートをイメージングして、残留生細胞の尺度として光子束を判定した。MOLM14細胞の死滅は、20時間の時点で、ほとんどのエフェクター:標的比で、全てのクローン間で同等であった。

【1207】

インビボマウスモデル

NSGマウスに、D0に、ルシフェラーゼ発現MOLM14細胞 1×10^6 個をiv注射した。D6に、マウスを腫瘍量についてイメージング(IVIS Spectrum)し、処置分は無作為化した。最低腫瘍量を有するマウスを対照群(非形質導入T細胞、UTD

10

20

30

40

50

）に割り当てた。CART細胞（NVS2～4、1172および1176クローン）または対照T細胞（1e6）をD7にi.v.注射した。実施したD13におけるイメージングからのデータを図48に示す。注射の6日後、全ての抗CD123コンストラクトは、インビトロデータと一致する、同等の抗腫瘍効果をもたらした。

【1208】

カニクイザルCD123に対して交差反応性であるマウス1176に基づくヒト化抗CD123単鎖可変フラグメント（scFv）を生成し、細胞内CD3ゼータ鎖と4-1BBの細胞内共刺激ドメインとを有するレンチウイルス発現ベクターにクローニングする。

【1209】

VLおよびVHドメインがscFv内に出現する順番は様々（すなわち、VL-VH、またはVH-VL方向）であった。この場合、表25に示すように、各サブユニットが配列GGGS（配列番号18）[例えば、(G4S)₃（配列番号107）または(G4S)₄（配列番号106）]を含む「G4S」（配列番号18）サブユニットの3つか4つのコピーが可変ドメインを接続してscFvドメインの全体を作り出している。

【1210】

ヒト化CARの配列を下の表25に提供する。

【1211】

これらのクローンは全て、CD3ゼータ鎖由来の共刺激ドメインのシグナルドメインにおけるQ/K残基変化を含有する。

【1212】

10

20

【表 3 5 - 1】

表25: ヒト化CD123 CARコンストラクト

名称	配列 番号	配列
hzCAR123-1 NT	1143	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGC TCGGCCCCAAGTGCAGCTGGTCCAGTCCGGAGCCGAAGTCAAGAAGCCCGCGCTA GCGTGAAAGTGTCTGCAAAGCC'TCCGGGTACACATTACCTCCTACTGGATGAAT TGGGTCAGACAGGCGCCCGCCAGGGACTCGAGTGGATGGGAAGGAT'TGATCCTTA CGACTCCGAAACCCATTACAACCAGAAGT'TCAAGGACCGCGTGACCATGACTGTGG ATAAGTCCACTTCCACCGCTTACATGGAGCTGTCCAGCCTGCGCTCCGAGGATACC GCAGTGTAATACTGCGCCCGGGGAACTGGGACGACTATTGGGGACAGGGAACCTAC CGTGACCGTGTCAAGCGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGCTCCGGCGCGGCG GCTCAGGGGGCGGAGGAAGCGACGTGCAGCTCACCAGTCGCCC'TCA'TTCTGTCTG GCCTCAGTGGGAGACAGAGTGACCATTACTTGTCTGGGCCTCCAAGAGCATCTCCAA GGACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGAAAGGCGCCTAAGT'TGCTCATCTACT CGGGGTCGACCC'TGCAATCTGGCGTGCCGTCCCGGT'TCTCCGGTTCGGGAAGCGGT ACCGAATTCACCTTACTATCTCC'TCCCTGCAACCGGAGGACTTCGCCACCTACTA CTGCCAACAGCACACAAGTACCCGTACACTTTCGGGGGTGGCAGGAAGGTCGAAA TCAAGACCAC'TACCCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCC CAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgca taccgggggtcttgacttcgcctgcgatctacatttggggccctctggctggtg cttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcgg aagaagctgctgtacatctttaagcaaccctcatgaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggtgcgaac tgcgctgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaac cagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaa gcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccaag agggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagatt ggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggact cagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgcccgcctc gg

10

20

30

【表 3 5 - 2】

hzCAR123-1 AA	1144	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMN WVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVMTVDKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARGNWDDYWGQGT'TVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDVQLTQSPSFLS ASVGDRVTTTCRASKSISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSG TEFTLTITSSLPEDFATYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKTTTTAPRPPTPAPTIAS QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGR KKLLYIFKQPFMRPVQ'TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQN QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
hzCAR123-1 scFv	1145	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMN WVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVMTVDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARGNWDDYWGQGT'TVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDVQLTQSPSFLS ASVGDRVTTTCRASKSISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSG TEFTLTITSSLPEDFATYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-1 VH	1146	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMN WVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVMTVDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARGNWDDYWGQGT'TVTVSS
hzCAR123-1 VL	1147	DVQLTQSPSFLSASVGDRVTTTCRASKSISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSR FSGSGSGTEFTLTITSSLPEDFATYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK

10

20

【表 3 5 - 3】

hzCAR123-2 NT	1148	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGC TCGGCCCCAAGTGCAGCTGGTCCAGTTCGGGAGCCGAAGTCAAGAAGCCCGGCGCTA GCGTGAAAGTGTCCTGCAAAGCCTCCGGGTACACATTACCTCCTACTGGATGAAT TGGGTGAGACAGGCGCCCGCCAGGGACTCGAGTGGATGGGAAGGATTGATCCCTTA CGACTCCGAAACCCATTACAACCAGAAGTTCAAGGACCGCGTGACCATGACTGTGG ATAAGTCCACTTCCACCGCTTACATGGAGCTGTCCAGCCTGCGCTCCGAGGATACC GCAGTGTACTACTGCGCCCGGGGAACTGGGACGACTATTGGGGACAGGGAACCTAC CGTGACCGTGTCAAGCGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGCTCCGGCGGCGGCG GCTCAGGGGGCGGAGGAAGCGAAGTGGTGTGACCCAGTCGCGCGCAACCCCTCTCT CTGTGCGCGGGAGAACGCGCCACTCTTTCTGTGCGGCGTCCAAGAGCATCTCAAA GGACCTCGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGTCAAGCCCCGCGGTGCTGATCTACT CCGGCTCCACGCTGCAATCAGGAATCCCAGCCAGATTTTCCGGTTCGGGGTCGGGG ACTGACTTCACCTTGACCATTAGCTCGCTGGAACCTGAGGACTTCGCCGTGTATTA CTGCCAGCAGCACACAAGTACCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACTAAGGTCGAGA TCAAGACCACTACCCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCC CAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgca taccgggggtcttgacttcgctcgatatactacatttggggccctctggtggtgta cttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcgg aagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggagggaaggcggtgcgaac tgcggtgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaac cagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaa gcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaag agggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagatt ggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggact cagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctc gg
hzCAR123-2 AA	1149	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMNWVRQ APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARG NWDDYWQGTTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVVLTSQSPATLSLSPGERATLSCR ASKSISKDLAWYQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFA VYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNEINLGRREEYDVLDRKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR

10

20

30

【表 3 5 - 4】

hzCAR123-2 scFv	1150	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYTFSTSYWMNWVRQ APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARG NWDDYWGGQTTTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGGSEVVLTSQSPATLSLSPGERATLSCR ASKSISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFA VYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-2 VH	1151	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYTFSTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGNWDDYWGGQTTTVTVSS
hzCAR123-2 VL	1152	EVVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARF SGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-3 NT	1153	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CCAAGTGCAGCTGGTCCAGTCGGGAGCCGAAGTCAAGAAGCCCGCGCTAGCGTGAAAGTGT CCTGCAAAGCCTCCGGGTACACATTACCTCCTACTGGATGAATTGGGTGAGACAGGCGCCC GGCCAGGGACTCGAGTGGATGGGAAGGATTGATCCTTACGACTCCGAAACCCATTACAACCA GAAGTTCAAGGACCGCGTGACCATGACTGTGGATAAGTCCACTTCCACCGCTTACATGGAGC TGTCACGCTGCGCTCCGAGGATACCGCAGTGTACTACTGCGCCCGGGGAACTGGGACGAC TATTGGGGACAGGGAACCTACCGTGACCGTGTCAAGCGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGG CTCCGCGCGCGCGGCTCAGGGGGCGGAGGAAGCGACGTCGTGATGACCCAGTCAACCGCAT TCCTGTCCGTGACTCCCGGAGAAAAGGTCACGATTACTTGCCGGGCGTCCAAGAGCATCTCC AAGGACCTCGCCTGGTACCAACAGAAGCCGAGCAGGCCCTAAGCTGTTGATCTACTCGGG GTCCACCCTTCAATCGGGAGTGCCATCGCGGTTTAGCGGTTTCGGGTTCTGGGACCGACTTCA CTTTCACCATCTCCTCACTGGAAGCCGAGGATGCCGCCACTTACTACTGTCAGCAGCACAAAC AAGTATCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACCAAAGTGGAGATCAAGACCACTACCCAGCACC GAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGgcat gtagacccgcagctggtggggccgtgcataaccggggtcttgacttcgcctgcgatctctac atgtgggcccctctggtggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgatcactcttta ctgtaagcgcggtcggagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcagaggcctgtgc agactactcaagaggaggacggtgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggtgc gaactgcgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggacccagaaatggcggggaagccgcagaaagaatcccaagagggcctgtacaac gagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcag aagaggcaagggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaagacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg

10

20

30

【表 3 5 - 5】

hzCAR123-3 AA	1154	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQ APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARG NWDDYWQGTTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAA TYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-3 scFv	1155	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQ APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARG NWDDYWQGTTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAA TYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-3 VH	1156	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGNWDDYWQGTTTVTVSS
hzCAR123-3 VL	1157	DVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRF SGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK

10

20

【表 3 5 - 6】

hzCAR123-4 NT	1158	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CCAAGTGCAGCTGGTCCAGTCCGGGAGCCGAAGTCAAGAAGCCCGCGCTAGCGTGAAAGTGT CCTGCAAAGCCTCCGGGTACACATTACCTCCTACTGGATGAATTGGGTGACAGGCGCCC GGCCAGGGACTCGAGTGGATGGGAAGGATTGATCCTTACGACTCCGAAACCCATTACAACCA GAAGTTCAAGGACCGCGTGACCATGACTGTGGATAAGTCCACTTCCACCGCTTACATGGAGC TGTCCAGCCTGCGCTCCGAGGATACCGCAGTGTACTACTGCGCCCGGGGAACTGGGACGAC TATTGGGGACAGGGAATACCGTGACCGTGTCAAGCGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGG CTCCGGCGGGCGGGCTCAGGGGGCGGAGGAAGCGACGTGGTCATGACTCAGTCCCCGGACT CACTCGCGGTGTCGCTTGGAGAGAGAGCGACCATCAACTGTGGGCTCAAAGAGCATCAGC AAGGACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCGGGACAGCCGCCAAAGCTGCTGATCTACTCCGG GTCCACCTTGCAATCTGGTGTCCCTGACCGGTTCTCCGGTTCGGGTACCGACTTCA CGCTCACTATTTCTGCTGCTGCAAGCCGAAGATGTGGCCGTGTACTATTGCCAACAGCACAAC AAGTACCCCTACACTTTTGGCGGAGGCACCAAGGTGAAATCAAGACCCTACCCAGCACC GAGGCCACCCACCCGGCTCTTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAggcat gtagacccgcagctggtggggcgtgcatacccggtcttgacttcgctgcgatatctac atttgggcccctctggtggtacttgccgggtcctgctgctttcactcgtgatcactcttta ctgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctcatgaggcctgtgc agactactcaagaggaggacggtgttcatgcccgttcccagaggaggagggaaggcggtgc gaactgcgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggacccagaaatggcggggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaac gagctccaaaagataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcag aagaggcaaagggcacgcagcactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
hzCAR123-4 AA	1159	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMNVRQ APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARG NWDDYWQGTTTVVSSGGGSGGGGSGGGGSDVMTQSPDSLAVSLGERATINCR ASKSISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQHNKYPYTFGGGTKEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPMEG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR

10

20

30

【表 3 5 - 7】

hzCAR123-4 scFv	1160	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMNWVRQ APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARG NWDDYWGGQTTTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDVVMTQSPDSLAVSLGERATINCR ASKSISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-4 VH	1161	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGNWDDYWGGQTTTVTVSS
hzCAR123-4 VL	1162	DVVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-5 NT	1163	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGACGTGCAGCTCACCCAGTCGCCCTCATTTCTGTGCGCCTCAGTGGGAGACAGAGTGACCA TTACTTGTGCGGCCCTCCAAGAGCATCTCCAAGGACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGA AAGGCGCCTAAGTTGCTCATCTACTCGGGGTCGACCCTGCAATCTGGCGTGCCGTCCCGGTT CTCCGGTTCGGGAAGCGGTACCGAATTACCCCTTACTATCTCCTCCCTGCAACCGGAGGACT TCGCCACCTACTACTGCCAACAGCACAACAAGTACCCGTACACTTTCGGGGGTGGCACGAAG GTCGAAATCAAGGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGCTCCGGCGGCGGCGGCTCAGGGGG CGGAGGAAGCCAAGTGCAGCTGGTCCAGTCGGGAGCCGAAGTCAAGAAGCCCGGCGCTAGCG TGAAAGTGTCTGCAAAGCCTCCGGGTACACATTACCTCCTACTGGATGAATTGGGTGAGA CAGGCGCCCGGCCAGGGACTCGAGTGGATGGGAAGGATTGATCCTTACGACTCCGAAACCCA TTACAACCAGAAGTTCAAGGACCGCGTGACCATGACTGTGGATAAGTCCACTTCCACCGCTT ACATGGAGCTGTCCAGCCTGCGCTCCGAGGATACCGCAGTGTACTACTGCGCCCGGGGAAAC TGGGACGACTATTGGGGACAGGGAACCTACCGTGACCGTGTCAAGCACCACTACCCAGCACC GAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGgcat gtagacccgcagctggtggggcgtgcataaccgggtcttgacttcgectgcgatctctac atgtgggcccctctggtggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactcttta ctgtaagcgcggtcggagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcagaggcctgtgc agactactcaagaggaggacggtgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggtgc gaactgcgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcgagag gacgggacccagaaatggcggggaagccgcagaaagaatcccaagagggcctgtacaac gagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcag aagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg

10

20

30

【表 3 5 - 8】

hzCAR123-5 AA	1164	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQK PGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVMTVVKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGNWDDYWGQTTVTVSSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-5 scFv	1165	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQK PGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVMTVVKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGNWDDYWGQTTVTVSS
hzCAR123-5 VH	1166	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFKDRVMTVVKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGNWDDYWGQTTVTVSS
hzCAR123-5 VL	1167	DVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRF SGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK

10

20

【表 3 5 - 9】

hzCAR123-6 NT	1168	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGAAGTGGTGTGCTGACCCAGTCGCCCCGCAACCCTCTCTGTGCGCCGGGAGAACGCGCCACTC TTTCCTGTGCGGGCGTCCAAGAGCATCTCAAAGGACCTCGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGT CAAGCCCCGCGGCTGCTGATCTACTCCGCTCCACGCTGCAATCAGGAATCCAGCCAGATT TTCCGGTTCGGGGTCGGGGACTGACTTCACCTTGACCATTAGCTCGCTGGAACCTGAGGACT TCGCCGTGTATTACTGCCAGCAGCACAAAGTACCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACTAAG GTCGAGATCAAGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGCTCCGGCGGCGGCGGCTCAGGGGG CGGAGGAAGCCAAGTGCAGCTGGTCCAGTCGGGAGCCGAAGTCAAGAAGCCCGGCGCTAGCG TGAAAGTGTCTTGCAAAGCCTCCGGGTACACATTACCTCCTACTGGATGAATTGGGTGAGA CAGGCGCCCGGCCAGGGACTCGAGTGGATGGGAAGGATTGATCCTTACGACTCCGAAACCCA TTACAACCAGAAGTTCAAGGACCGCGTGACCATGACTGTGGATAAGTCCACTTCCACCGCTT ACATGGAGCTGTCCAGCCTGCCTCCGAGGATACCGCAGTGTACTACTGCGCCCGGGGAAAC TGGGACGACTATTGGGGACAGGGAACACCGTGACCGTGTCAAGCACCACACCCAGCACC GAGGCCACCCACCCCGGCTCTTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAaggcat gtagacccgcagctggtggggcgtgcatacccggtcttgacttcgctgcgatatctac atgtggccctctggtggtacttgccgggtcctgctgctttcactcgtgatcactcttta ctgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctcatgaggcctgtgc agactactcaagaggaggacggtgttcatgcccgttcccagaggaggaggaaggcggtgc gaactgcgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggacccagaaatggcggggaagccgcgcagaaagaatccccaagaggcgctgtacaac gagctccaaaagataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcag aagaggcaaaggccacgacggaactgtaccagggaactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgcccgcctcgg
hzCAR123-6 AA	1169	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVVLTSQSPATLSLSPGERATLSRASKSISKDLAWYQQK PGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTITVTSSTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR

10

20

30

【表 3 5 - 1 0】

hzCAR123-6 scFv	1170	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVVLTSQSPATLSLSPGERATLSCRASKSISKDLAWYQQK PGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTITVTVSS
hzCAR123-6 VH	1171	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFKDRVMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDFAVYYCARGNWDDYWGQGTITVTVSS
hzCAR123-6 VL	1172	EVVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARF SGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-7 NT	1173	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGACGTCGTGATGACCCAGTCACCGGCATTCTGTCCGTGACTCCCGGAGAAAAGGTCACGA TTACTTGCCGGGCGTCCAAGAGCATCTCCAAGGACCTCGCCTGGTACCAACAGAAGCCGGAC CAGGCCCTAAGCTGTTGATCTACTCGGGGTCCACCCTCAATCGGGAGTGCCATCGCGGTT TAGCGGTTCTGGGTTCTGGGACCGACTTCACTTTACCATCTCCTCACTGGAAGCCGAGGATG CCGCCACTTACTACTGTGTCAGCAGCACAACAAGTATCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACAAA GTGGAGATCAAGGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGCTCCGGCGGCGGCGGTCTAGGGGG CGGAGGAAGCCAAGTGCAGCTGGTCCAGTCGGGAGCCGAAGTCAAGAAGCCCGCGCTAGCG TGAAAGTGTCTGCAAAGCCTCCGGGTACACATTACCTCCTACTGGATGAATTGGGTGAGA CAGGCGCCCGGCCAGGGACTCGAGTGGATGGGAAGGATTGATCCTTACGACTCCGAAACCCA TTACAACCAGAAGTTCAAGGACCGCGTGACCATGACTGTGGATAAGTCCACTTCCACCGCTT ACATGGAGCTGTCCAGCCTGCGCTCCGAGGATACCGCAGTGTACTACTGCGCCCGGGGAAAC TGGGACGACTATTGGGGACAGGGAACCTACCGTGACCGTGTCAAGCACCCTACCCAGCACC GAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAaggcat gtagacccgcagctggtggggccgtgcataaccggggtcttgacttcgctgcgatctctac atgtgggcccctctggtggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgatcactcttta ctgtaagcgcggtcggagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcagaggcctgtgc agactactcaagaggaggacggtgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggtgc gaactgcgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggacccagaaatggcggggaagccgcagaaagaatcccaagagggcctgtacaac gagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcag aagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg

10

20

30

【表 3 5 - 1 1】

hzCAR123-7 AA	1174	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQK PDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGNWDDYWGQTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-7 scFv	1175	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQK PDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGNWDDYWGQTTVTVSS
hzCAR123-7 VH	1176	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFKDRVMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGNWDDYWGQTTVTVSS
hzCAR123-7 VL	1177	DVVTMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRF SGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQQHNKYPYTFGGGKVEIK

10

20

【表 3 5 - 1 2】

hzCAR123-8 NT	1178	ATGGCCCTCCCTGTCAACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGACGTGGTCATGACTCAGTCCCCGGACTCACTCGCGGTGTGCTTGGAGAGAGAGCGACCA TCAACTGTCGGGCCCTCAAAGAGCATCAGCAAGGACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCGGGA CAGCCGCCAAAGCTGCTGATCTACTCCGGGTCCACCTTGCAATCTGGTGTCCCTGACCGGTT CTCCGGTTCCGGGTCCGGTACCGACTTCACGCTCACTATTTCTGCTGCTGCAAGCCGAAGATG TGGCCGTGTACTATTGCCAACAGCACACAAGTACCCCTACACTTTTGGCGGAGGCACCAAG GTGGAATCAAGGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGCTCCGGCGGCGGGGCTCAGGGGG CGGAGGAAGCCAAGTGCAGCTGGTCCAGTCCGGGAGCCGAAGTCAAGAAGCCCGGCGCTAGCG TGAAAGTGTCTTGCAAAGCCTCCGGGTACACATTACCTCCTACTGGATGAATTGGGTGAGA CAGGCGCCCGGCCAGGGACTCGAGTGGATGGGAAGGATTGATCCTTACGACTCCGAAACCCA TTACAACCAGAAGTTCAAGGACCGCGTGACCATGACTGTGGATAAGTCCACTTCCACCGCTT ACATGGAGCTGTCCAGCCTGCGCTCCGAGGATACCGCAGTGTACTACTGCGCCCGGGGAAAC TGGGACGACTATTGGGGACAGGGAACACCGTGACCGTGTCAAGCACCACACCCAGCACC GAGGCCACCCACCCCGGCTCTTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAaggcat gtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctac atttgggcccctctggtggtacttgccgggtcctgctgcttttactcgtgatcactcttta ctgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgc agactactcaagaggaggacggtgttcatgcccgttcccagaggaggagggaaggcggtgc gaactgcgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggacccagaaatggcggggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaac gagctccaaaagataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcag aagaggcaaagggcacgacgactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
hzCAR123-8 AA	1179	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTPSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWYQQK PGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGNWDYWGQGT'TVTVSSTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR

10

20

30

【表 3 5 - 1 3】

hzCAR123-8 scFv	1180	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWYQQK PGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTITVTVSS
hzCAR123-8 VH	1181	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGNWDDYWGQGTITVTVSS
hzCAR123-8 VL	1182	DVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-9 NT	1183	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CCAAGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCAGCGAACTGAAGAAGCCCGGAGCCTCCGTCAAAGTGT CCTGCAAAGCCTCGGGATACACCTTCACCTCCTACTGGATGAACCTGGGTCCGCCAGGCACCT GGACAGGGGCTGGAGTGGATGGGAAGGATCGATCCCTACGATTCCGAAACCCATTACAATCA GAAGTTCAAGGACCGGTTTGTGTTCTCCGTGGACAAGTCCGTGTCCACCGCTACCTCCAAA TTAGCAGCCTGAAGGCGGAGGATACAGCTGTCTACTACTGCGCTCGCGGAACTGGGATGAC TATTGGGGCCAGGGAACCTACCGTGAAGTGTGTCCTCCGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGG CTCCGCGCGCGCGGCTCAGGGGGCGGAGGAAGCGACGTGCAGCTCACCCAGTCGCCCTCAT TTCTGTGCGGCTCAGTGGGAGACAGAGTGACCATTACTTGTGCGGCTCCAAGAGCATCTCC AAGGACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGAAAGCGCCTAAGTTGTCTACTACTCGGG GTCGACCCTGCAATCTGGCGTGCCGTCCCGGTTCTCCGGTTCGGGAAGCGGTACCGAATTCA CCCTTACTATCTCCTCCCTGCAACCGGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAACAGCACAAAC AAGTACCCGTACACTTTCGGGGGTGGCACGAAGGTCGAAATCAAGACCCTACCCAGCACC GAGGCCACCCACCCGGCTCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGgcat gtagacccgcagctggtggggccgtgcataaccggggtcttgacttcgectgcgatatctac atgtgggcccctctggtggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgatcactcttta ctgtaagcgcggtcggagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcagagacctgtgc agactactcaagaggaggacggtgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggtgc gaactgcgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggacccagaaatggcggggaagccgcgagaaagaatcccaagagggacctgtacaac gagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcag aagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg

10

20

30

【表 3 5 - 1 4】

hzCAR123-9 AA	1184	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQ APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARG NWDDYWQGTTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFA TYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-9 scFv	1185	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQ APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARG NWDDYWQGTTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFA TYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-9 VH	1186	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGNWDDYWQGTTTVTVSS
hzCAR123-1 0 VL	1187	DVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRF SGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK

10

20

【表 3 5 - 1 5】

hzCAR123-1 0 NT	1188	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CCAAGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCAGCGAACTGAAGAAGCCCGGAGCCTCCGTCAAAGTGT CCTGCAAAGCCTCGGGATACACCTTACCTCCTACTGGATGAAGTGGGTCCGCCAGGCACCT GGACAGGGGCTGGAGTGGATGGGAAGGATCGATCCCTACGATTCCGAAACCCATTACAATCA GAAGTTCAAGGACCGGTTTGTGTTCTCCGTGGACAAGTCCGTGTCCACCGCCTACCTCCAAA TTAGCAGCCTGAAGGCGGAGGATACAGCTGTCTACTACTGCGCTCGCGGAACTGGGATGAC TATTGGGGCCAGGGAATACCGTGAAGTGTCTCCCGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGG CTCCGGCGGCGGGGCTCAGGGGGCGGAGGAAGCGAAGTGGTGTGACCCAGTCGCCCCGAA CCCTCTCTCTGTGCGCGGGAGAACGCGCCACTCTTTCTGTGCGGGCGTCCAAGAGCATCTCA AAGGACCTCGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGTCAAGCCCCGCGGCTGTGTATCTACTCCGG CTCCACGCTGCAATCAGGAATCCCAGCCAGATTTTCCGGTTCGGGGTTCGGGGACTGACTTCA CCTTGACCATTAGCTCGCTGGAACCTGAGGACTTCGCCGTGTATTACTGCCAGCAGCACAAAC AAGTACCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACTAAGGTCGAGATCAAGACCAC'TACCCAGCACC GAGGCCACCCACCCCGGCTCTTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAaggcat gtagacccgcagctggtggggcgtgcatacccggttcttgacttcgcctgcgatatctac atttgggccccctctggtggtacttgccgggtcctgctgctttcactcgtgatcactcttta ctgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctcatgaggcctgtgc agactactcaagaggaggacggtgttcatgcccgttcccagaggaggagggaaggcggtgc gaactgcgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggacccagaaatggcggggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaac gagctccaaaagataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcag aagaggcaaagggcacgcagactgtaccagggaactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
hzCAR123-1 0 AA	1189	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWRQ APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARG NWDDYWQGTTTVVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVVLTSQSPATLSLSPGERATLSCR ASKSISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFA VYYCQQHNKYPYTFGGGTKEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR

10

20

30

【表 3 5 - 1 6】

hzCAR123-1 0 scFv	1190	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGSELKKPGASVKVSKKASGYTFSTSYWMNWVRQ APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDEVVYVCARG NWDDYWGGTTFVTSSGGGGSGGGSGGGSGGGGSEVVLTSQSPATLSLSPGERATLSCR ASKSISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFA VYYCQQHNKYPYTFGGGKVEIK
hzCAR123-1 0 VH	1191	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKKASGYTFSTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDEVVYVCARGNWDDYWGGTTFVTSS
hzCAR123-1 0 VL	1192	EVVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARF SGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQHNKYPYTFGGGKVEIK
hzCAR123-1 1 NT	1193	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CCAAGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCAGCGAACTGAAGAAGCCCGAGCCTCCGTCAAAGTGT CCTGCAAAGCCTCGGGATACACCTTCACCTCCTACTGGATGAAGTGGGTCCGCCAGGCACCT GGACAGGGGCTGGAGTGGATGGGAAGGATCGATCCCTACGATTCCGAAACCCATTACAATCA GAAGTTCAAGGACCGGTTTGTGTTCTCCGTGGACAAGTCCGTGTCCACCGCTACCTCCAAA TTAGCAGCCTGAAGGCGGAGGATACAGCTGTCTACTACTGCGCTCGCGGAACTGGGATGAC TATTGGGGCCAGGGAACCTACCGTGAAGTGTGTCCTCCGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGG CTCCGGCGGCGGCGGCTCAGGGGGCGGAGGAAGCGACGTCGTGATGACCCAGTCACCGGCAT TCCTGTCCGTGACTCCCGGAGAAAAGGTCACGATTACTTGCCGGGCGTCCAAGAGCATCTCC AAGGACCTCGCCTGGTACCAACAGAAGCCGAGCAGGCCCTAAGCTGTTGATCTACTCGGG GTCCACCCCTTCAATCGGGAGTGCCATCGCGGTTTAGCGGTTTCGGGTTCTGGGACCGACTTCA CTTTCACCATCTCCTCACTGGAAGCCGAGGATGCCGCCACTTACTACTGTGACGAGCACAAC AAGTATCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACCAAAGTGGAGATCAAGACCACTACCCAGCACC GAGGCCACCCACCCGGCTCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGgcat gtagacccgcagctggtggggcgtgcataaccggggtcttgacttcgctgcgatctctac atgtgggcccctctggtggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgatcactcttta ctgtaagcgcggtcggagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcagagcctgtgc agactactcaagaggaggacggtgttcattgcccgttcccagaggaggaggaaggcggtgc gaactgcgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggacccagaaatgggcggaagccgcagaaagaatcccaagaggcctgtacaac gagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcag aagaggcaagggccacgacgactgtaccagggactcagcaccgccaccaagacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgcccgcctcgg

10

20

30

【表 3 5 - 1 7】

hzCAR123-1 1 AA	1194	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQ APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARG NWDDYWQGTTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAA TYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-1 1 scFv	1195	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQ APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARG NWDDYWQGTTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAA TYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-1 1 VH	1196	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGNWDDYWQGTTTVTVSS
hzCAR123-1 1 VL	1197	DVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRF SGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK

10

20

【表 3 5 - 1 8】

hzCAR123-1 2 NT	1198	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CCAAGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCAGCGAACTGAAGAAGCCCGGAGCCTCCGTCAAAGTGT CCTGCAAAGCCTCGGGATACACCTTACCTCCTACTGGATGAAGTGGGTCCGCCAGGCACCT GGACAGGGGCTGGAGTGGATGGGAAGGATCGATCCCTACGATTCCGAAACCCATTACAATCA GAAGTTCAAGGACCGGTTTGTGTTCTCCGTGGACAAGTCCGTGTCCACCGCCTACCTCCAAA TTAGCAGCCTGAAGGCGGAGGATACAGCTGTCTACTACTGCGCTCGCGGAACTGGGATGAC TATTGGGGCCAGGGAATACCGTGAAGTGTCTCTCCGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGG CTCCGGCGGCGGCGGCTCAGGGGGCGGAGGAAGCGACGTGGTCATGACTCAGTCCCCGGACT CACTCGCGGTGTGCTTGGAGAGAGAGCGACCATCAACTGTGGGCGCTCAAAGAGCATCAGC AAGGACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCGGGACAGCCGCCAAAGCTGTGATCTACTCCGG GTCCACCTTGCAATCTGGTGTCCCTGACCGGTTCTCCGGTTCGGGTACCGACTTCA CGCTCACTATTTCTGCTGCTGCAAGCCGAAGATGTGGCCGTGTACTATTGCCAACAGCACAA AAGTACCCCTACACTTTTGGCGGAGGCACCAAGGTGAAATCAAGACCCTACCCAGCACC GAGGCCACCCACCCGGCTCTTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAaggcat gtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctac atttgggcccctctggtggtacttgccgggtcctgctgctttcactcgtgatcactcttta ctgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctcatgaggcctgtgc agactactcaagaggaggacggtgttcatgccggttcccagaggaggagggaaggcggtgc gaactgcgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggacccagaaatggcggggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaac gagctccaaaagataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcag aagaggcaaagggcacgacgactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
hzCAR123-1 2 AA	1199	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWRQ APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARG NWDDYWQGTTTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVMTQSPDSLAVSLGERATINCR ASKSISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQHNKYPYTFGGGTKEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR

10

20

30

【表 3 5 - 1 9】

hzCAR123-1 2 scFv	1200	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQ APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARG NWDDYWGGQTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQSPDSLAVSLGERATINCR ASKSISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTLSISLQAEDVA VYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-1 2 VH	1201	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGNWDDYWGGQTTVTVSS
hzCAR123-1 2 VL	1202	DVVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRF SGSGSGTDFTLTLSISLQAEDVAVYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-1 3 NT	1203	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGACGTGCAGCTCACCCAGTCGCCCTCATTTCTGTCGGCCTCAGTGGGAGACAGAGTGACCA TTACTTGTCTGGGCTCCAAGAGCATCTCCAAGGACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGA AAGCGCCTAAGTTGCTCATCTACTCGGGGTCGACCCTGCAATCTGGCGTCCGCTCCCGGTT CTCCGGTTCGGGAAGCGGTACCGAATTACCCCTTACTATCTCCTCCCTGCAACCGGAGGACT TCGCCACCTACTACTGCCAACAGCACAACAAGTACCCGTACACTTTCGGGGTGGCACGAAG GTCGAAATCAAGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGCTCCGGCGGCGCGGCTCAGGGGG CGGAGGAAGCCAAGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCAGCGAACTGAAGAAGCCCGAGCCTCCG TCAAAGTGTCTGCAAAGCCTCGGGATACACCTTCACCTCCTACTGGATGAACTGGGTCCGC CAGGCACCTGGACAGGGGCTGGAGTGGATGGGAAGGATCGATCCCTACGATTCGGAACCCA TTACAATCAGAAGTTCAAGGACCGGTTTGTGTTCTCCGTGGACAAGTCCGTGTCCACCGCCT ACCTCCAAATTAGCAGCCTGAAGGCGGAGGATACAGCTGTCTACTACTGCGCTCGCGGAAAC TGGGATGACTATTGGGGCCAGGGAACCTACCGTGACTGTGTCTCCACCACTACCCAGCACC GAGGCCACCCACCCGGCTCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAaggcat gtagacccgcagctggtggggcgtgcataaccgggtcttgacttcgectgcgatctctac atgtgggcccctctggtggtacttgcggtgctgctgttctactcgatcactcttta ctgtaagcgcggtcggagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcagaggcctgtgc agactactcaagaggaggacggtgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggtgc gaactgcgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggacccagaaatgggcggaagccgcagaaagaatcccaagaggcctgtacaac gagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcag aagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg

10

20

30

【表 3 5 - 2 0】

hzCAR123-1 3 AA	1204	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQK PGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTA VYYCARGNWDDYWGGTTTVTSSTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-1 3 scFv	1205	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQK PGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTA VYYCARGNWDDYWGGTTTVTVSS
hzCAR123-1 3 VH	1206	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGNWDDYWGGTTTVTVSS
hzCAR123-1 3 VL	1207	DVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRF SGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK

10

20

【表 3 5 - 2 1】

hzCAR123-1 4 NT	1208	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGAAGTGGTGTGCTGACCCAGTCGCCCCGCAACCCTCTCTGTGCGCCGGGAGAACGCGCCACTC TTTCCTGTGCGGGCGTCCAAGAGCATCTCAAAGGACCTCGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGT CAAGCCCCGCGGCTGCTGATCTACTCCGCTCCACGCTGCAATCAGGAATCCAGCCAGATT TTCCGGTTCGGGGTCGGGGACTGACTTCACCTTGACCATTAGCTCGCTGGAACCTGAGGACT TCGCCGTGTATTACTGCCAGCAGCACACAAGTACCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACTAAG GTCGAGATCAAGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGCTCCGGCGGCGGGGCTCAGGGGG CGGAGGAAGCCAAGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCAGCGAACTGAAGAAGCCCGAGCCTCCG TCAAAGTGTCTTCAAAGCCTCGGGATACACCTTCACCTCCTACTGGATGAACTGGGTCCGC CAGGCACCTGGACAGGGGCTGGAGTGGATGGGAAGGATCGATCCCTACGATTCCGAAACCCA TTACAATCAGAAGTTCAAGGACCGGTTTGTGTTCTCCGTGGACAAGTCCGTGTCCACCGCT ACCTCCAAATTAGCAGCCTGAAGGCGGAGGATACAGCTGTCTACTACTGCGCTCGCGGAAAC TGGGATGACTATTGGGGCCAGGGAACACCGTGACTGTGTCTCCACCACACCCAGCACC GAGGCCACCCACCCCGGCTCTTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAaggcat gtagaccgcagctggtggggcgtgcatacccggtcttgacttcgctgcgatatctac atgtggccctctggtggtacttgccgggtctgctgctttcactcgtgatcactcttta ctgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctcatgaggcctgtgc agactactcaagaggaggacggtgttcatgcccgttcccagaggaggagggaaggcggtgc gaactgcgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggacccagaaatggcggggaagccgcgcagaaagaatccccaagaggcgctgtacaac gagctccaaaagataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcag aagaggcaaagggcacgacgactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
hzCAR123-1 4 AA	1209	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVVLTSQSPATLSLSPGERATLSRASKSISKDLAWYQQK PGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTA VYYCARGNWDYWGQGTITVTSSTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPMEG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR

10

20

30

【表 3 5 - 2 2】

hzCAR123-1 4 scFv	1210	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVVLTSQSPATLSLSPGERATLSCRASKSISKDLAWYQQK PGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTITVTVSS
hzCAR123-1 4 VH	1211	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTITVTVSS
hzCAR123-1 4 VL	1212	EVVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARF SGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-1 5 NT	1213	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGACGTCGTGATGACCCAGTCACCGGCATTCTGTCCGTGACTCCCGGAGAAAAGGTCACGA TTACTTGCCGGGCGTCCAAGAGCATCTCCAAGGACCTCGCCTGGTACCAACAGAAGCCGGAC CAGGCCCTAAGCTGTTGATCTACTCGGGGTCCACCCTCAATCGGGAGTGCCATCGCGGTT TAGCGGTTCTGGGTTCTGGGACCGACTTCACTTTACCATTCTCTCACTGGAAGCCGAGGATG CCGCCACTTACTACTGTGTCAGCAGCACAACAAGTATCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACAAA GTGGAGATCAAGGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGCTCCGGCGGCGCGGCTCAGGGGG CGGAGGAAGCCAAGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCAGCGAACTGAAGAAGCCCGAGCCTCCG TCAAAGTGTCTGCAAAGCCTCGGGATACACCTTCACCTCCTACTGGATGAACTGGGTCCGC CAGGCACCTGGACAGGGGTGGAGTGGATGGGAAGGATCGATCCCTACGATTCGGAAACCCA TTACAATCAGAAGTTCAAGGACCGGTTTGTGTTCTCCGTGGACAAGTCCGTGTCCACCGCCT ACCTCCAAATTAGCAGCCTGAAGGCGGAGGATACAGCTGTCTACTACTGCGCTCGCGGAAAC TGGGATGACTATTGGGGCCAGGGAACCTACCGTGACTGTGTCTCCACCACTACCCAGCACC GAGGCCACCCACCCGGCTCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGgcat gtagacccgcagctggtggggcgtgcatacccggtcttgacttcgctgcgatctctac atgtgggcccctctggtggtacttgcggtgctgctgttctactcgatcactcttta ctgtaagcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcagagcctgtgc agactactcaagaggaggacggtgttcattgcccgttcccagaggaggaggaaggcggtgc gaactgcgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcgagagaggagtacgacgtgctggacaagcgagag gacgggacccagaaatgggcggaagccgcagaaagaatcccaagaggcctgtacaac gagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcag aagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgcccgcctcgg

10

20

30

【表 3 5 - 2 3】

hzCAR123-1 5 AA	1214	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQK PDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTITVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNLNLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-1 5 scFv	1215	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQK PDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTITVTVSS
hzCAR123-1 5 VH	1216	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTITVTVSS
hzCAR123-1 5 VL	1217	DVVTMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRF SGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQQHNKYPYTFGGGKVEIK

10

20

【表 3 5 - 2 4】

hzCAR123-1 6 NT	1218	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGACGTGGTCATGACTCAGTCCCCGGACTCACTCGCGGTGTCGCTTGGAGAGAGAGCGACCA TCAACTGTCGGGCCCTCAAAGAGCATCAGCAAGGACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCGGGA CAGCCGCCAAAGCTGCTGATCTACTCCGGGTCCACCTTGCAATCTGGTGTCCCTGACCGGTT CTCCGGTTCCGGGTCGGGTACCGACTTCACGCTCACTATTTCTGCTCGCTGCAAGCCGAAGATG TGGCCGTGTACTATTGCCAACAGCACACAAGTACCCCTACACTTTTGGCGGAGGCACCAAG GTGGAAATCAAGGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGCTCCGGCGGCGGGGCTCAGGGGG CGGAGGAAGCCAAGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCAGCGAACTGAAGAAGCCCGGAGCCTCCG TCAAAGTGTCTTCAAAGCCTCGGGATACACCTTCACCTCCTACTGGATGAACTGGGTCCGC CAGGCACCTGGACAGGGGCTGGAGTGGATGGGAAGGATCGATCCCTACGATTCCGAAACCCA TTACAATCAGAAGTTCAAGGACCGGTTTGTGTTCTCCGTGGACAAGTCCGTGTCCACCGCCT ACCTCCAAATTAGCAGCCTGAAGGCGGAGGATACAGCTGTCTACTACTGCGCTCGCGGAAAC TGGGATGACTATTGGGGCCAGGGAACACCGTGACTGTGTCTCCACCACACTACCCAGCACC GAGGCCACCCACCCCGGCTCTTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAaggcat gtagacccgcagctggtggggcgtgcatacccggtcttgacttcgcctgcgatatctac atgtggccctctggtggtacttgccgggtcctgctgctttcactcgtgatcactcttta ctgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcagtaggcctgtgc agactactcaagaggaggacggtgttcatgcccgttcccagaggaggagggaaggcggtgc gaactgcgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggacccagaaatggcggggaagccgcgcagaaagaatccccaagaggcgctgtacaac gagctccaaaagataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcag aagaggcaaagggcacgacgactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
hzCAR123-1 6 AA	1219	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTPSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWYQQK PGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGSEIKKPGASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTA VYYCARGNWDYWGQGTITVTSSTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR

10

20

30

【表 3 5 - 2 5】

hzCAR123-1 6 scFv	1220	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWYQQK PGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTLSLQAEDVAVYYCQQHKNKPYTTFG GGTKVEIKGGGSGGGGSGGGSGGGSGGGSGVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTITVTVSS
hzCAR123-1 6 VH	1221	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTITVTVSS
hzCAR123-1 6 VL	1222	DVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRF SGSGSGTDFTLTLSLQAEDVAVYYCQQHKNKPYTTFGGTKVEIK
hzCAR123-1 7 NT	1223	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGGTCAAGAAGCCTGGAGAATCCCTGAGGATCA GCTGCAAAGGCAGCGGGTATACCTTCACCTCCTACTGGATGAATTGGGTCCGCCAGATGCCC GGAAAAGGCCTGGAGTGGATGGGACGGATTGACCCCTACGACTCGGAAACCCATTACAACCA GAAGTTCAAGGATCACGTGACCATCTCCGTGGACAAGTCCATTTCCACTGCGTACCTCCAGT GGTCAAGCCTGAAGGCCTCCGACACTGCTATGTACTACTGCGCACGCGGAACTGGGATGAT TACTGGGGACAGGGAACAACCGTGAAGTGTCTCCGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGG CTCCGCGCGCGCGGCTCAGGGGGCGGAGGAAGCGACGTGCAGCTCACCCAGTCGCCCTCAT TTCTGTCGGCCTCAGTGGGAGACAGAGTGACCATTACTTGTGCGGCCCTCCAAGAGCATCTCC AAGGACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGAAAGCGCCTAAGTTGCTCATCTACTCGGG GTCGACCTGCAATCTGGCGTGCCGTCCCGGTTCTCCGGTTCGGGAAGCGGTACCGAATTCA CCCTTACTATCTCCTCCCTGCAACCGGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAACAGCACAAAC AAGTACCCGTACACTTTTCGGGGGTGGCACGAAGGTCGAAATCAAGACCCTACCCAGCACC GAGGCCACCCACCCGGCTCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGgcat gtagaccgcagctggtggggccgtgcataaccggggtcttgacttcgectgcgatctctac atgtgggcccctctggtggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgatcactcttta ctgtaagcgcggtcggagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcagaggcctgtgc agactactcaagaggaggacggtgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggtgc gaactgcgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggacccagaaatgggcggaagccgcgagaaagaatcccaagaggcctgtacaac gagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcag aagaggcaagggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg

10

20

30

【表 3 5 - 2 6】

hzCAR123-1 7 AA	1224	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSYWMNWVRQ MPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARG NWDDYWQGTTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFA TYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-1 7 scFv	1225	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSYWMNWVRQ MPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARG NWDDYWQGTTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFA TYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-1 7 VH	1226	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSYWMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGNWDDYWQGTTTVTVSS
hzCAR123-1 7 VL	1227	DVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRF SGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK

10

20

【表 3 5 - 2 7】

hzCAR123-1 8 NT	1228	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGGTCAAGAAGCCTGGAGAATCCCTGAGGATCA GCTGCAAAGGCAGCGGGTATACCTTACCTCCTACTGGATGAATTGGGTCCGCCAGATGCCC GGAAAAGGCCTGGAGTGGATGGGACGGATTGACCCCTACGACTCGGAAACCCATTACAACCA GAAGTTCAAGGATCACGTGACCATCTCCGTGGACAAGTCCATTTCCACTGCGTACCTCCAGT GGTCAAGCCTGAAGGCCTCCGACACTGCTATGTACTACTGCGCACGCGGAACTGGGATGAT TACTGGGGACAGGGAACAACCGTGAAGTGTCTCCGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGG CTCCGGCGGCGGGGCTCAGGGGGCGGAGGAAGCGAAGTGGTGTGACCCAGTCGCCCGCAA CCCTCTCTCTGTGCGCGGGAGAACGCGCCACTCTTTCTGTGCGGGCGTCCAAGAGCATCTCA AAGGACCTCGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGTCAAGCCCCGCGGCTGTGTACTACTCCGG CTCCACGCTGCAATCAGGAATCCCAGCCAGATTTTCCGGTTCGGGGTTCGGGGACTGACTTCA CCTTGACCATTAGCTCGCTGGAACCTGAGGACTTCGCCGTGTATTACTGCCAGCAGCACAAAC AAGTACCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACTAAGGTCGAGATCAAGACCAC'TACCCAGCACC GAGGCCACCCACCCCGGCTCTTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAaggcat gtagacccgcagctggtggggcgtgcatacccggtcttgacttcgcctgcgatatctac atthggccccctctggtggtacttgccgggtcctgctgcttttactcgtgatcactcttta ctgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcagtaggcctgtgc agactactcaagaggaggacggtgttcatgcccgttcccagaggaggagggaaggcggtgc gaactgcgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggacccagaaatggcggggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaac gagctccaaaagataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcag aagaggcaaagggcacgacgactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
hzCAR123-1 8 AA	1229	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTTFTSYWMNVRQ MPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARG NWDDYWQGTTTVVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVVLTSQSPATLSLSPGERATLSR ASKSISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFA VYYCQQHNKYPYTFGGGTKEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPMEG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR

10

20

30

【表 3 5 - 2 8】

hzCAR123-1 8 scFv	1230	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFFTSYWMNWVRQ MPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARG NWDDYWQGTTVTVPSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVVL TQSPATLSLSPGERATLSCR ASKSISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFA VYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-1 8 VH	1231	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFFTSYWMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFKDHVTISVDKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARGNWDDYWQGTTVTVPSS
hzCAR123-1 8 VL	1232	EVVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARF SGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-1 9 NT	1233	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGGTCAAGAAGCCTGGAGAATCCCTGAGGATCA GCTGCAAAGGCAGCGGGTATACCTTCACCTCCTACTGGATGAATTGGGTCCGCCAGATGCCC GGAAAAGGCCTGGAGTGGATGGGACGGATTGACCCCTACGACTCGGAAACCCATTACAACCA GAAGTTCAAGGATCACGTGACCATCTCCGTGGACAAGTCCATTTCCACTGCGTACCTCCAGT GGTCAAGCCTGAAGGCCTCCGACACTGCTATGTACTACTGCGCACGCGGAACTGGGATGAT TACTGGGGACAGGGAACAACCGTGACTGTGTCTCCGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGG CTCCGGCGGCGGGGCTCAGGGGGCGGAGGAAGCGACGTCGTGATGACCCAGTCACCGGCAT TCCTGTCCGTGACTCCCGGAGAAAAGGTCACGATTACTTGCCGGGCGTCCAAGAGCATCTCC AAGGACCTCGCCTGGTACCAACAGAAGCCGGACGAGCCCTAAGCTGTTGATCTACTCGGG GTCCACCCCTTCAATCGGGAGTGCCATCGCGGTTTAGCGGTTTCGGGTTCTGGGACCGACTTCA CTTTCACCATCTCCTCACTGGAAGCCGAGGATGCCGCCACTTACTACTGTCAGCAGCACAAAC AAGTATCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACCAAAGTGGAGATCAAGACCCTACCCAGCACC GAGGCCACCCACCCGGCTCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGgcat gtagacccgcagctggtggggccgtgcataaccggggtcttgacttcgectgcgatctctac atgtgggcccctctggtggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgatcactcttta ctgtaagcgcggtcggagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcagaggcctgtgc agactactcaagaggaggacggtgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggtgc gaactgcgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggacccagaaatgggcggaagccgcagaaagaatcccaagaggcctgtacaac gagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcag aagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg

10

20

30

【表 3 5 - 2 9】

hzCAR123-1 9 AA	1234	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTTSYWMNWVRQ MPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARG NWDDYWQGTTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAA TYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-1 9 scFv	1235	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTTSYWMNWVRQ MPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARG NWDDYWQGTTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAA TYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-1 9 VH	1236	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTTSYWMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGNWDDYWQGTTTVTVSS
hzCAR123-1 9 VL	1237	DVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRF SGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK

10

20

【表 3 5 - 3 0】

hzCAR123-2 0 NT	1238	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGGTCAAGAAGCCTGGAGAATCCCTGAGGATCA GCTGCAAAGGCAGCGGGTATACCTTCACCTCCTACTGGATGAATTGGGTCCGCCAGATGCCC GGAAAAGGCCTGGAGTGGATGGGACGGATTGACCCCTACGACTCGGAAACCCATTACAACCA GAAGTTCAAGGATCACGTGACCATCTCCGTGGACAAGTCCATTTCCACTGCGTACCTCCAGT GGTC AAGCCTGAAGGCCTCCGACACTGCTATGTACTACTGCGCACGCGGAACTGGGATGAT TACTGGGGACAGGGAACAACCGTGA CTGTCTCCGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGG CTCCGGCGGCGGGCTCAGGGGGCGGAGGAAGCGACGTGGTCATGACTCAGTCCCCGGACT CACTCGCGGTGTCGCTTGGAGAGAGAGCGACCATCAACTGTGGGCGCTCAAAGAGCATCAGC AAGGACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCGGGACAGCCGCCAAAGCTGCTGATCTACTCCGG GTCCACCTTGCAATCTGGTGTCCCTGACCGGTTCTCCGGTTCGGGTACCGACTTCA CGCTCACTATTTCTGCTGCTGCAAGCCGAAGATGTGGCCGTGTACTATTGCCAACAGCACAA AAGTACCCCTACACTTTTGGCGGAGGCACCAAGGTGGAATCAAGACCAC TACCCAGCACC GAGGCCACCCACCCGGCTCTTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAaggcat gtagaccgcagctggtggggccgtgcatacccggttcttgacttcgcctgcgatatctac atttgggcccctctggtggtacttgccgggtcctgctgctttcactcgtgatcactcttta ctgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcagtaggcctgtgc agactactcaagaggaggacggtgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggtgc gaactgcgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggacccagaaatggcggggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaac gagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcag aagaggcaaaggccacgacggaactgtaccagggaactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
hzCAR123-2 0 AA	1239	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSYWMNVRQ MPKGLEWMGRIDPYDSETHYNQFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARG NWDDYWQGTTTVVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVMTQSPDSLAVSLGERATINCR ASKSISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR

10

20

30

【表 3 5 - 3 1】

hzCAR123-2 0 scFv	1240	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFFTSYWMNWVRQ MPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARG NWDDYWQGTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDVMTQSPDSLAVSLGERATINCR ASKSISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTLSISLQAEDVA VYYCQQHNKYPYTFGGGKVEIK
hzCAR123-2 0 VH	1241	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFFTSYWMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFKDHVTISVDKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARGNWDDYWQGTTVTVSS
hzCAR123-2 0 VL	1242	DVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRF SGSGSGTDFTLTLSISLQAEDVAVYYCQQHNKYPYTFGGGKVEIK
hzCAR123-2 1 NT	1243	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGACGTGCAGCTCACCCAGTCGCCCTCATTTCTGTCGGCCTCAGTGGGAGACAGAGTGACCA TTACTTGTCTGGGCTTCCAAGAGCATCTCCAAGGACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGA AAGCGCCTAAGTTGCTCATCTACTCGGGGTCGACCCTGCAATCTGGCGTCCGCTCCCGGTT CTCCGGTTCGGGAAGCGGTACCGAATTACCCCTTACTATCTCCTCCCTGCAACCGGAGGACT TCGCCACCTACTACTGCCAACAGCACAACAAGTACCCGTACACTTTCGGGGGTGGCACGAAG GTCGAAATCAAGGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGCTCCGGCGGCGGCGGCTCAGGGGG CGGAGGAAGCGAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGGTCAAGAAGCCTGGAGAATCCC TGAGGATCAGCTGCAAAGGCAGCGGTATACCTTCACCTCCTACTGGATGAATTGGGTCCGC CAGATGCCCGGAAAAGGCCGTGGAGTGGATGGGACGGATTGACCCCTACGACTCGGAAACCCA TTACAACCAGAAGTTCAAGGATCAGGTGACCATCTCCGTGGACAAGTCCATTTCCACTGCGT ACCTCCAGTGGTCAAGCCTGAAGGCCTCCGACACTGCTATGTACTACTGCGCACGCGGAAAC TGGGATGATTACTGGGGACAGGGAACAACCGTGACTGTGTCTCCACCCTACCCAGCACC GAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAaggcat gtagaccgcagctggtggggcgtgcataaccggggtcttgacttcgectgcgatctctac atgtgggcccctctggtggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactcttta ctgtaagcgcggtcggagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcagaggcctgtgc agactactcaagaggaggacggtgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggtgc gaactgcgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggacccagaaatgggcggaagccgcgagaaagaatcccaagagggcctgtacaac gagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcag aagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg

10

20

30

【表 3 5 - 3 2】

hzCAR123-2 1 AA	1244	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQK PGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSY WMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARGNWDDYWGGTTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-2 1 scFv	1245	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQK PGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSY WMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARGNWDDYWGGTTTVTVSS
hzCAR123-2 1 VH	1246	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSYWMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGNWDDYWGGTTTVTVSS
hzCAR123-2 1 VL	1247	DVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRF SGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK

10

20

【表 3 5 - 3 3】

hzCAR123-2 2 NT	1248	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGAAGTGGTGTGACCCAGTCGCCCCGCAACCCTCTCTGTGCGCCGGGAGAACGCGCCACTC TTTCTGTGCGGGCGTCCAAGAGCATCTCAAAGGACCTCGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGT CAAGCCCCGCGGCTGCTGATCTACTCCGCTCCACGCTGCAATCAGGAATCCCAGCCAGATT TTCCGGTTCGGGGTCGGGGACTGACTTCACCTTGACCATTAGCTCGCTGGAACCTGAGGACT TCGCCGTGTATTACTGCCAGCAGCACAAAGTACCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACTAAG GTCGAGATCAAGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGCTCCGGCGGCGGGGCTCAGGGGG CGGAGGAAGCGAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGGTCAAGAAGCCTGGAGAATCCC TGAGGATCAGCTGCAAAGGCAGCGGGTATACCTTCACCTCCTACTGGATGAATTGGGTCCGC CAGATGCCCCGAAAAGGCCCTGGAGTGGATGGGACGGATTGACCCCTACGACTCGGAAACCCA TTACAACCAGAAGTTCAAGGATCAGTGACCATCTCCGTGGACAAGTCCATTTCCTACTGCGT ACCTCCAGTGGTCAAGCCTGAAGGCCTCCGACACTGCTATGTACTACTGCGCACGCGGAAAC TGGGATGATTACTGGGGACAGGAACAACCGTGACTGTGTCTCCACCACCTACCCAGCACC GAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAaggcat gtagaccgcagctggtggggcgtgcatacccggtcttgacttcgctgcgatatctac atttgggcccctctggtggtacttgccgggtcctgctgctttcactcgtgatcactcttta ctgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctcatgaggcctgtgc agactactcaagaggaggacggtgttcatgcccgttcccagaggaggagggaaggcggtgc gaactgcgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggacccagaaatggcggggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaac gagctccaaaagataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcag aagaggcaaaggccacgacggaactgtaccagggaactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
hzCAR123-2 2 AA	1249	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVVLTSQSPATLSLSPGERATLSRASKSISKDLAWYQQK PGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSY WMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARGNWDDYWQGTTVTVSSTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR

10

20

30

【表 3 5 - 3 4】

hzCAR123-2 2 scFv	1250	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVVLTSQSPATLSLSPPERATLSCRASKSISKDLAWYQQK PGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSY WMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSIISTAYLQWSSLKASDTA MYCARGNWDDYWGQGTITVTVSS
hzCAR123-2 2 VH	1251	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSYWMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFKDHVTISVDKSIISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGNWDDYWGQGTITVTVSS
hzCAR123-2 2 VL	1252	EVVLTQSPATLSLSPPERATLSCRASKSISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARF SGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQHNKYPYTFGGGKVEIK
hzCAR123-2 3 NT	1253	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGACGTCGTGATGACCCAGTCACCGGCATTCTGTCCGTGACTCCCGGAGAAAAGGTCACGA TTACTTGCCGGGCGTCCAAGAGCATCTCCAAGACCTCGCCTGGTACCAACAGAAGCCGGAC CAGGCCCTAAGCTGTTGATCTACTCGGGGTCCACCCTCAATCGGGAGTGCCATCGCGGTT TAGCGGTTCTGGGTTCTGGGACCGACTTCACTTTACCATCTCCTCACTGGAAGCCGAGGATG CCGCCACTTACTACTGTGTCAGCAGCACAACAAGTATCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACAAA GTGGAGATCAAGGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGCTCCGGCGGCGCGGCTCAGGGGG CGGAGGAAGCGAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGGTCAAGAAGCCTGGAGAATCCC TGAGGATCAGCTGCAAAGGCAGCGGTATACCTTCACCTCCTACTGGATGAATTGGGTCCGC CAGATGCCCGGAAAAGGCCGTGGAGTGGATGGGACGGATTGACCCCTACGACTCGGAAACCCA TTACAACCAGAAGTTCAAGGATCAGGTGACCATCTCCGTGGACAAGTCCATTTCCTACTGCGT ACCTCCAGTGGTCAAGCCTGAAGGCCTCCGACACTGCTATGTACTACTGCGCACGCGGAAAC TGGGATGATTACTGGGGACAGGGAACAACCGTGACTGTGTCTCCACCCTACCCAGCACC GAGGCCACCCACCCGGCTCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAaggcat gtagaccgcagctggtggggcgtgcataaccgggtcttgacttcgctgcgatctctac atgtgggcccctctggtggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgatcactcttta ctgtaagcgcggtcggagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcagaggcctgtgc agactactcaagaggaggacggtgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggtgc gaactgcgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggacccagaaatgggcggaagccgcgagaaagaatcccaaggggcctgtacaac gagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcag aagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg

10

20

30

【表 3 5 - 3 5】

hzCAR123-2 3 AA	1254	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQK PDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSY WMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARGNWDDYWGGTTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-2 3 scFv	1255	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQK PDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSY WMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARGNWDDYWGGTTTVTVSS
hzCAR123-2 3 VH	1256	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSYWMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGNWDDYWGGTTTVTVSS
hzCAR123-2 3 VL	1257	DVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRF SGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQQHNKYPYTFGGGKVEIK

10

20

【表 3 5 - 3 6】

hzCAR123-2 4 NT	1258	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGACGTGGTCATGACTCAGTCCCCGGACTCACTCGCGGTGTCGCTTGGAGAGAGAGCGACCA TCAACTGTCGGGCCCTCAAAGAGCATCAGCAAGGACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCGGGA CAGCCGCCAAAGCTGCTGATCTACTCCGGGTCCACCTTGCAATCTGGTGTCCCTGACCGGTT CTCCGGTTCCGGGTCCGGTACCGACTTCACGCTCACTATTTCTGCTCGCTGCAAGCCGAAGATG TGGCCGTGTACTATTGCCAACAGCACACAAGTACCCCTACACTTTTGGCGGAGGCACCAAG GTGGAAATCAAGGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGCTCCGGCGGCGGGGCTCAGGGGG CGGAGGAAGCGAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGGTCAAGAAGCCTGGAGAATCCC TGAGGATCAGCTGCAAAGGCAGCGGGTATACCTTCACCTCCTACTGGATGAATTGGGTCCGC CAGATGCCCCGAAAAGGCCCTGGAGTGGATGGGACGGATTGACCCCTACGACTCGGAAACCCA TTACAACCAGAAGTTCAAGGATCAGTGACCATCTCCGTGGACAAGTCCATTTCCTACTGCGT ACCTCCAGTGGTCAAGCCTGAAGGCCTCCGACACTGCTATGTACTACTGCGCACGCGGAAAC TGGGATGATTACTGGGGACAGGAACAACCGTGACTGTGTCTCCACCCTACCCACGACC GAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAaggcat gtagacccgcagctggtggggcgtgcatacccggtcttgacttcgctgcgatatctac atgtggccctctggtggtacttgccgggtctgctgctttcactcgtgatcactcttta ctgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctcatgaggcctgtgc agactactcaagaggaggacggtgttcatgcccgttcccagaggaggagggaaggcggtgc gaactgcgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggacccagaaatggcggggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaac gagctccaaaagataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcag aagaggcaaaggccacgacggaactgtaccagggaactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
hzCAR123-2 4 AA	1259	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTPSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWYQQK PGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSY WMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARGNWDDYWQGTTVTVSSTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR

10

20

30

【表 3 5 - 3 7】

hzCAR123-2 4 scFv	1260	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWYQQK PGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTLSLQAEDVAVYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSY WMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSIISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARGNWDDYWGQGTITVTVSS
hzCAR123-2 4 VH	1261	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSYWMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFKDHVTISVDKSIISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGNWDDYWGQGTITVTVSS
hzCAR123-2 4 VL	1262	DVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRF SGSGSGTDFTLTLSLQAEDVAVYYCQQHNKYPYTFGGGKVEIK
hzCAR123-2 5 NT	1263	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGAAGTGCAGCTCGTCGAGAGCGGAGGGGACTGGTGCAGCCCGAGGAAGCCTGAGGCTGT CCTGCGCTGCCTCCGGCTACACCTTCACCTCCTACTGGATGAACCTGGGTGAGACAGGCACCT GGAAAGGGACTGGTCTGGGTGTCGCGCATTGACCCCTACGACTCCGAAACCCATTACAATCA GAAATTCAAGGACCGCTTCACCATCTCCGTGGACAAAGCCAAGAGCACCGCGTACCTCCAAA TGAATCCCTGCGCGCTGAGGATACAGCAGTGTACTATTGCGCCCGGGGAACTGGGATGAT TACTGGGGCCAGGGAACCTACTGTGACTGTGTTCATCCGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGG CTCCGCGCGCGCGGCTCAGGGGGCGGAGGAAGCGACGTGCAGCTCACCCAGTCGCCCTCAT TTCTGTCGGCCTCAGTGGGAGACAGAGTGACCATTACTTGTGCGGCCCTCAAGAGCATCTCC AAGGACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGAAAGCGCCTAAGTTGCTCATCTACTCGGG GTCGACCCTGCAATCTGGCGTGCCGTCCCGGTTCTCCGGTTCGGGAAGCGGTACCGAATTCA CCCTTACTATCTCCTCCCTGCAACCGGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAACAGCACAAAC AAGTACCCGTACACTTTCGGGGGTGGCACGAAGGTCGAAATCAAGACCCTACCCAGCACC GAGGCCACCCACCCGGCTCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGgcat gtagaccgcagctggtggggccgtgcataaccgggtcttgacttcgectgcgatcttac atgtgggcccctctggtggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactcttta ctgtaagcgcggtcggagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcagaggcctgtgc agactactcaagaggaggacggtgttcattgcccgttcccagaggaggaggaaggcggtgc gaactgcgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggacccagaaatgggcggaagccgcgagaaagaatcccaagaggcctgtacaac gagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcag aagaggcaagggccacgacgactgtaccagggactcagcaccgccaccaagacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg

10

20

30

【表 3 5 - 3 8】

hzCAR123-2 5 AA	1264	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQ APGKGLVWVSRIIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARG NWDDYWQGTTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFA TYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-2 5 scFv	1265	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQ APGKGLVWVSRIIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARG NWDDYWQGTTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFA TYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-2 5 VH	1266	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQAPGKGLVWVSRIIDPYDSETHYNQ KFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGNWDDYWQGTTTVTVSS
hzCAR123-2 5 VL	1267	DVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRF SGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK

10

20

【表 3 5 - 3 9】

hzCAR123-2 6 NT	1268	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGAAGTGCAGCTCGTCGAGAGCGGAGGGGACTGGTGCAGCCCGGAGGAAGCCTGAGGCTGT CCTGCGCTGCCGCCGCTACACCTTACCTCCTACTGGATGAAGTGGGTGAGACAGGCACCT GGAAAGGGACTGGTCTGGGTGTCGCGCATTGACCCCTACGACTCCGAAACCCATTACAATCA GAAATTCAGGACCGCTTACCATCTCCGTGGACAAAGCCAAGAGCACCGCGTACCTCCAAA TGAATCCCTGCGCGCTGAGGATACAGCAGTGTACTATTGCGCCCGGGGAACTGGGATGAT TACTGGGGCCAGGGAAGTACTGTGACTGTGTCATCCGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGG CTCCGGCGGCGGGGCTCAGGGGGCGGAGGAAGCGAAGTGGTGTGACCCAGTCGCCCCGAA CCCTCTCTCTGTGCGCGGAGAACGCGCCACTCTTTCTGTGCGGGCGTCCAAGAGCATCTCA AAGGACCTCGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGTCAAGCCCCGCGGCTGTGATCTACTCCGG CTCCACGCTGCAATCAGGAATCCCAGCCAGATTTTCCGGTTCGGGGTTCGGGGACTGACTTCA CCTTGACCATTAGCTCGCTGGAACCTGAGGACTTCGCCGTGTATTACTGCCAGCAGCACAAAC AAGTACCCGTACACCTTCGAGGCGGTACTAAGGTCGAGATCAAGACCAC'TACCCAGCACC GAGGCCACCCACCCCGGCTCTTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAaggcat gtagacccgcagctggtggggcgtgcatacccggtcttgacttcgctgcgatatctac atttgggccccctctggtggtacttgcggttctgctgcttttactcgtgatcactcttta ctgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctcatgaggcctgtgc agactactcaagaggaggacggtgttcatgccggttcccagaggaggagggaaggcggtgc gaactgcgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggacccagaaatggcggggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaac gagctccaaaagataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcag aagaggcaaagggcacgacgactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
hzCAR123-2 6 AA	1269	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWRQ APGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARG NWDDYWQGTTTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVVLTSQSPATLSLSPGERATLSCR ASKSISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSTDFTLTISSELEPEDFA VYYCQQHNKYPYTFGGGTKEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR

10

20

30

【表 3 5 - 4 0】

hzCAR123-2 6 scFv	1270	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTF ^T SYWMNWVRQ APGKGLVWVSRI ^D DPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQ ^M NSLRAEDTAVYYCARG NWDDYWGGQTTVT ^V SSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVVL ^T QSPATLSLSPGERATLSCR ASKSISKDLAWYQQKPGQAPRLLI ^Y SGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLT ^I SSLEPEDFA VYYCQQHNKYPYTFGGG ^T KVEIK
hzCAR123-2 6 VH	1271	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTF ^T SYWMNWVRQAPGKGLVWVSRI ^D DPYDSETHYNQ KFKDRFTISVDKAKSTAYLQ ^M NSLRAEDTAVYYCARGNWDDYWGGQTTVT ^V SS
hzCAR123-2 6 VL	1272	EVVL ^T QSPATLSLSPGERATLSCRASKSISKDLAWYQQKPGQAPRLLI ^Y SGSTLQSGIPARF SGSGSGTDFTLT ^I SSLEPEDFAVYYCQQHNKYPYTFGGG ^T KVEIK
hzCAR123-2 7 NT	1273	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGAAGTGCAGCTCGTCGAGAGCGGAGGGGACTGGTGCAGCCCGGAGGAAGCCTGAGGCTGT CCTGCGCTGCCTCCGGCTACACCTTCACCTCCTACTGGATGAAC ^T TGGGT ^C CAGACAGGCACCT GGAAAGGGACTGGTCTGGGTGTCGCGCATTGACCCCTACGACTCCGAAACCCATTACAATCA GAAATTCAAGGACCGCTTCACCATCTCCGTGGACAAAGCCAAGAGCACCGCGTACCTCCAAA TGAAC ^T CCCTGCGCGCTGAGGATACAGCAGTGTACTATTGCGCCCGGGGAAACTGGGATGAT TACTGGGGCCAGGGAAC ^T ACTGTGACTGTGTGCATCCGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGG CTCCGCGCGCGCGGCTCAGGGGGCGGAGGAAGCGACGTCGTGATGACCCAGTCACCGGCAT TCCTGTCCGTGACTCCCGGAGAAAAGGTCACGATTACTTGC ^C GGGCGTCCAAGAGCATCTCC AAGGACCTCGCCTGGTACCAACAGAAGCCGAGACCAGGCCCTAAGCTGTTGATCTACTCGGG GTCCACCCTTCAATCGGGAGTGCCATCGCGGTTTAGCGGTTCTGGGACCGACTTCA CTTTCACCATCTCCTCACTGGAAGCCGAGGATGCCGCCACTTACTACTGTCAGCAGCACAAAC AAGTATCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACCAAAGTGGAGATCAAGACCACTACCC ^C CAGCACC GAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAggcat gtagaccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatctctac at ^t tgggccctctggtggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgatcactcttta ctgtaagcgcggtcggagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgc agactactcaagaggaggacggtgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggtgc gaactgcgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggaccagaaatggg ^c gggaagccgcagaaagaatcccc ^a agagggcctgtacaac gagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcag aagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg

10

20

30

【表 3 5 - 4 1】

hzCAR123-2 7 AA	1274	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQ APGKGLVWVSRIIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARG NWDDYWGQGTITVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAA TYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-2 7 scFv	1275	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQ APGKGLVWVSRIIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARG NWDDYWGQGTITVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAA TYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-2 7 VH	1276	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQAPGKGLVWVSRIIDPYDSETHYNQ KFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTITVTVSS
hzCAR123-2 7 VL	1277	DVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRF SGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK

10

20

【表 3 5 - 4 2】

hzCAR123-2 8 NT	1278	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGAAGTGCAGCTCGTCGAGAGCGGAGGGGACTGGTGCAGCCCGGAGGAAGCCTGAGGCTGT CCTGCGCTGCCGCCGCTACACCTTACCTCCTACTGGATGAACTGGGTGAGACAGGCACCT GGAAAGGGACTGGTCTGGGTGTCGCGCATTGACCCCTACGACTCCGAAACCCATTACAATCA GAAATTC AAGGACCGCTTACCATCTCCGTGGACAAAGCCAAGAGCACCGCGTACCTCCAAA TGAATCCCTGCGCGCTGAGGATACAGCAGTGTACTATTGCGCCCGGGGAACTGGGATGAT TACTGGGGCCAGGGAATACTGTGACTGTGTCATCCGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGG CTCCGGCGGCGGCGGCTCAGGGGGCGGAGGAAGCGACGTGGTCATGACTCAGTCCCCGGACT CACTCGCGGTGTCGCTTGGAGAGAGAGCGACCATCAACTGTGGGCTCAAAGAGCATCAGC AAGGACCTGGCTGGTACCAGCAGAAGCCGGGACAGCCGCCAAAGCTGTGATCTACTCCGG GTCCACCTTGCAATCTGGTGTCCCTGACCGGTTCTCCGGTTCGGGTACCGACTTCA CGCTCACTATTTCTGCTGCTGCAAGCCGAAGATGTGGCCGTGTACTATTGCCAACAGCACAA AAGTACCCCTACACTTTTGGCGGAGGCACCAAGGTGAAATCAAGACCAC TACCCAGCACC GAGGCCACCCACCCGGCTCTTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAaggcat gtagacccgcagctggtggggcgtgcatacccggtcttgacttcgctgcgatatctac atthggccccctctggtggtacttgccgggtctctgctgctttcactcgtgatcactcttta ctgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctcatgaggcctgtgc agactactcaagaggaggacggtgttcatgccggttcccagaggaggagggaaggcggtgc gaactgcgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggacccagaaatggcggggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaac gagctccaaaagataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcag aagaggcaaagggcacgacgactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
hzCAR123-2 8 AA	1279	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWRQ APGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARG NWDDYWQGTTTVVSSGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQSPDSLAVSLGERATINCR ASKSISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQHNKYPYTFGGGTKEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR

10

20

30

【表 3 5 - 4 3】

hzCAR123-2 8 scFv	1280	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFFTSYWMNWVRQ APGKGLVWVSRIIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARG NWDDYWGGQTTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDVMTQSPDSLAVSLGERATINCR ASKSISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTITSSLAEDVA VYYCQQHNKYPYTFGGGKVEIK
hzCAR123-2 8 VH	1281	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFFTSYWMNWVRQAPGKGLVWVSRIIDPYDSETHYNQ KFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGNWDDYWGGQTTVTVSS
hzCAR123-2 8 VL	1282	DVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRF SGSGSGTDFTLTITSSLAEDVAVYYCQQHNKYPYTFGGGKVEIK
hzCAR123-2 9 NT	1283	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGACGTGCAGCTCACCCAGTCGCCCTCATTTCTGTCGGCCTCAGTGGGAGACAGAGTGACCA TTACTTGTCTGGGCTTCCAAGAGCATCTCCAAGACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGA AAGGCGCCTAAGTTGCTCATCTACTCGGGGTCGACCCTGCAATCTGGCGTCCGCTCCCGGTT CTCCGGTTCGGGAAGCGGTACCGAATTACCCCTTACTATCTCCTCCCTGCAACCGGAGGACT TCGCCACCTACTACTGCCAACAGCACAACAAGTACCCGTACACTTTCGGGGGTGGCACGAAG GTCGAAATCAAGGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGCTCCGGCGGCGCGGCTCAGGGGG CGGAGGAAGCGAAGTGCAGCTCGTCGAGAGCGGAGGGGGACTGGTGCAGCCCGGAGGAAGCC TGAGGCTGTCTGCGCTGCCCTCCGGCTACACCTTACCTCCTACTGGATGAACTGGGTGAGA CAGGCACCTGGAAGGGACTGGTCTGGGTGTCGCGCATTGACCCCTACGACTCCGAAACCCA TTACAATCAGAAATCAAGGACCGCTTACCATCTCCGTGGACAAAGCCAAGAGCACCGCGT ACCTCCAAATGAACTCCCTGCGCGCTGAGGATACAGCAGTGTACTATTGCGCCCGGGGAAAC TGGGATGATTACTGGGGCCAGGGAACCTACTGTGACTGTGTCTATCCACCCTACCCAGCACC GAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGgcat gtagaccgcagctggtggggcgtgcataaccgggtcttgacttcgectgcgatcttac atgtgggcccctctggtggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactcttta ctgtaagcgcggtcggagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcagaggcctgtgc agactactcaagaggaggacggtgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggtgc gaactgcgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggacccagaaatgggcggaagccgcagaaagaatcccaagaggcctgtacaac gagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcag aagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaagacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg

10

20

30

【表 3 5 - 4 4】

hzCAR123-2 9 AA	1284	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQK PGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSY WMNWVRQAPGKGLVWVSRIIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTITVTVSSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPPEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-2 9 scFv	1285	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQK PGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSY WMNWVRQAPGKGLVWVSRIIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTITVTVSS
hzCAR123-2 9 VH	1286	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQAPGKGLVWVSRIIDPYDSETHYNQ KFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTITVTVSS
hzCAR123-2 9 VL	1287	DVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRF SGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK

10

20

【表 3 5 - 4 5】

hzCAR123-3 0 NT	1288	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGAAGTGGTGTGACCCAGTCGCCCCGCAACCCTCTCTGTGCGCCGGGAGAACGCGCCACTC TTTCTGTGCGGGCGTCCAAGAGCATCTCAAAGGACCTCGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGT CAAGCCCCGCGGCTGCTGATCTACTCCGCTCCACGCTGCAATCAGGAATCCCAGCCAGATT TTCCGGTTCGGGGTTCGGGGACTGACTTCACCTTGACCATTAGCTCGCTGGAACCTGAGGACT TCGCCGTGTATTACTGCCAGCAGCACAAAGTACCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACTAAG GTCGAGATCAAGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGCTCCGGCGGCGGCGGCTCAGGGGG CGGAGGAAGCGAAGTGCAGCTCGTCGAGAGCGGAGGGGGACTGGTGCAGCCCGAGGAAGCC TGAGGCTGTCCTGCGCTGCCGCCGCTACACCTTCACCTCCTACTGGATGAACTGGGTGAGA CAGGCACCTGGAAGGGACTGGTCTGGGTGTGCGCGATTGACCCCTACGACTCCGAAACCCA TTACAATCAGAAATTCAAGGACCGCTTCACCATCTCCGTGGACAAAGCCAAGAGCACCGCGT ACCTCCAAATGAACTCCCTGCGCGCTGAGGATACAGCAGTGTACTATTGCGCCCGGGGAAAC TGGGATGATTACTGGGGCCAGGGAACACTGTGACTGTGTATCCACCACACTACCCAGCACC GAGGCCACCCACCCCGGCTCTTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAaggcat gtagacccgcagctggtggggcgtgcatacccggtcttgacttcgctgcgatatctac atgtggccctctggtggtacttgccgggtcctgctgctttcactcgtgatcactcttta ctgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctcatgaggcctgtgc agactactcaagaggaggacggtgttcatgcccgttcccagaggaggagggaaggcggtgc gaactgcgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggacccagaaatggcggggaagccgcgcagaaagaatccccaagaggcgctgtacaac gagctccaaaagataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcag aagaggcaaagggcacgacgactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
hzCAR123-3 0 AA	1289	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVVLTSQSPATLSLSPGERATLSRASKSISKDLAWYQQK PGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSY WMNWVRQAPGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARGNWDYWGQGT'TVTSSTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR

10

20

30

【表 3 5 - 4 6】

hzCAR123-3 0 scFv	1290	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVVLTSQSPATLSLSPGERATLSCRASKSISKDLAWYQQK PGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSY WMNWVRQAPGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTITVTVSS
hzCAR123-3 0 VH	1291	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQAPGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQ KFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTITVTVSS
hzCAR123-3 0 VL	1292	EVVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARF SGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-3 1 NT	1293	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGACGTCGTGATGACCCAGTCACCGGCATTCTGTCCGTGACTCCCGGAGAAAAGGTCACGA TTACTTGCCGGGCGTCCAAGAGCATCTCCAAGACCTCGCCTGGTACCAACAGAAGCCGGAC CAGGCCCTAAGCTGTTGATCTACTCGGGGTCCACCCTCAATCGGGAGTGCCATCGCGGTT TAGCGGTTCTGGGTTCTGGGACCGACTTCACTTTACCATCTCCTCACTGGAAGCCGAGGATG CCGCCACTTACTACTGTGTCAGCAGCACAACAAGTATCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACAAA GTGGAGATCAAGGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGCTCCGGCGGCGCGGCTCAGGGGG CGGAGGAAGCGAAGTGCAGCTCGTCGAGAGCGGAGGGGGACTGGTGCAGCCCGAGGAAGCC TGAGGCTGTCTGCGCTGCCCTCCGGCTACACCTTACCTCCTACTGGATGAACTGGGTGAGA CAGGCACCTGGAAGGGACTGGTCTGGGTGTCGCGCATTGACCCCTACGACTCCGAAACCCA TTACAATCAGAAATTCAAGGACCGCTTACCATCTCCGTGGACAAAGCCAAGAGCACCGCGT ACCTCCAAATGAACTCCCTGCGCGCTGAGGATACAGCAGTGTACTATTGCGCCCGGGAAAC TGGGATGATTACTGGGGCCAGGGAACCTACTGTGACTGTGTATCCACCCTACCCAGCACC GAGGCCACCCACCCGGCTCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAaggcat gtagaccgcagctggtggggcgtgcatacccggtcttgacttcgctgcgatcttac atgtgggcccctctggtggtacttgcggtgctgctgttctactcgatcactcttta ctgtaagcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcagaggcctgtgc agactactcaagaggaggacggtgttcattgcccgttcccagaggaggaggaaggcggtgc gaactgcgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcgagagaggagtagcagctgctggacaagcgagag gacgggacccagaaatgggcggaagccgcagaaagaatcccaagaggcctgtacaac gagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcag aagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgcccgcctcgg

10

20

30

【表 3 5 - 4 7】

hzCAR123-3 1 AA	1294	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQK PDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSY WMNWVRQAPGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTITVTVSSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-3 1 scFv	1295	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQK PDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSY WMNWVRQAPGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTITVTVSS
hzCAR123-3 1 VH	1296	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQAPGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQ KFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTITVTVSS
hzCAR123-3 1 VL	1297	DVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRF SGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK

10

20

【表 3 5 - 4 8】

hzCAR123-3 2 NT	1298	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGACGTGGTCATGACTCAGTCCCCGACTCACTCGCGGTGTGCTTGGAGAGAGAGCGACCA TCAACTGTCGGGCCCTCAAAGAGCATCAGCAAGGACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCGGGA CAGCCGCCAAAGCTGCTGATCTACTCCGGGTCCACCTTGCAATCTGGTGTCCCTGACCGGTT CTCCGGTTCCGGGTCCGGTACCGACTTCACGCTCAC'TATTTCTGCTGCTGCAAGCCGAAGATG TGGCCGTGTACTATTGCCAACAGCACACAAGTACCCCTACACTTTTGGCGGAGGCACCAAG GTGGAATCAAGGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGCTCCGGCGGCGGGGCTCAGGGGG CGGAGGAAGCGAAGTGCAGCTCGTCGAGAGCGGAGGGGGACTGGTGCAGCCCGAGGAAGCC TGAGGCTGTCTGCGCTGCC'TCCGGCTACACCTTACCTCCTACTGGATGAAGTGGGTGAGA CAGGCACCTGGAAAGGGACTGGTCTGGGTGTGCGCATTGACCCCTACGACTCCGAAACCCA TTACAATCAGAAATCAAGGACCGCTTACCATCTCCGTGGACAAAGCCAAGAGCACCGCGT ACCTCCAAATGAACTCCCTGCGCGCTGAGGATACAGCAGTGTACTATTGCGCCCCGGGAAAC TGGGATGATTACTGGGGCCAGGAACTACTGTGACTGTGTATCCACCAC'TACCCAGCACC GAGGCCACCCACCCCGGCTCTTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAaggcat gtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctac atttgggcccctctggtggtacttgccgggtcctgctgctttcactcgtgatcactcttta ctgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctcatgaggcctgtgc agactactcaagaggaggacggtgttcatgcccgttcccagaggaggagggaaggcggtgc gaactgcgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggacccagaaatggcggggaagccgcgcagaaagaatcccaagaggcgctgtacaac gagctccaaaagataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcag aagaggcaaagccacgacgactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgcccgcctcgg	10
hzCAR123-3 2 AA	1299	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWYQQK PGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSY WMNWVRQAPGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGT'TVTVSS'TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR	30

【表 3 5 - 4 9】

hzCAR123-3 2 scFv	1300	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWYQQK PGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSY WMNWVRQAPGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGT'TVTVSS	40
hzCAR123-3 2 VH	1301	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQAPGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQ KFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGT'TVTVSS	
hzCAR123-3 2 VL	1302	DVVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHNKYPYTFGGGTTKVEIK	

【1 2 1 3】

h z C D 1 2 3 C A R 1 - 3 2 の s c F v ドメインのヒト化 C D R 配列の配列を、重鎖可変ドメインについて表 2 6 に、軽鎖可変ドメインについて表 2 7 に示す。「I D」は、各 C D R のそれぞれの配列番号を意味する。

【1214】

【表36】

表 26. 重鎖可変ドメイン CDR

	HCDR1	配列 番号	HCDR2	配列 番号	HCDR3	配列 番号
hzcAR123	GYTFTSYWMN	1102	RIDPYDSETHYNQKFKD	1103	GNWDDY	1104

【1215】

【表37】

表 27. 軽鎖可変ドメイン CDR

	LCDR1	配列 番号	LCDR2	配列 番号	LCDR3	配列 番号
hzcAR123	RASKSISKDLA	1105	SGSTLQS	1106	QQHNKYPYT	1107

【1216】

一部の実施形態において、CAR123は、配列YCARGNWDDY（配列番号__）を有するHCDR3を有する。

【1217】

次いで、CAR scFvフラグメントを、レンチウイルスベクターにクローニングして、単一のコーディングフレーム中に、発現のためのEF1アルファプロモーターを使用して、全長CARコンストラクトを作り出した。

【1218】

二重特異性CAR19／CAR22コンストラクトおよびそれらの機能

このセクションは、二重特異性CAR19／CAR22コンストラクトの産生および機能を説明する。2つの二重特異性scFvタンデム融合体：抗CD22（HL）4G4Sー抗CD19（LH）および抗CD19ー4G4Sー抗CD22を設計した。表示（HL）は、重鎖可変領域が、示されているscFv内の軽鎖領域の上流にあることを示し、表示（LH）は、軽鎖可変領域が、示されているscFv内の重鎖領域の上流にあることを示す。抗CD22ベース分子は、hCD22-2であり、HLの向きを使用する。抗CD19ベース分子は、本明細書において表2のコンストラクトID104876として提供するヒト化抗CD19配列であり、これはLHの向きを使用する。これらのコンストラクトを図13に模式的に示す。

【1219】

両方の二重特性コンストラクトおよびそれらのscFv部分のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を下の表28に与える。

【1220】

【表 38-1】

表28. 二重特異性CAR19/CAR22コンストラクト

名称	配列番号	配列
抗CD22-4G4S- 抗CD19 scFvア ミノ酸配列	1303	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGR RTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARD LGWIAVAGTFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQSALTQPASVSGS PGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQHPGKAPKLMYDVSKRPSGVSNRF SGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSLNHVFGTGTKVTVLTGGG GSGGGSGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLN WYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFAV YFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKP SETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYQSSLSKS RVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYHYGGSYAMDYWGQGLV TVSS
抗CD22-CD19 CARアミノ酸 配列	1304	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGR RTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARD LGWIAVAGTFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQSALTQPASVSGS PGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQHPGKAPKLMYDVSKRPSGVSNRF SGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSLNHVFGTGTKVTVLTGGG GSGGGSGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLN WYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFAV YFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKP SETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYQSSLSKS RVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYHYGGSYAMDYWGQGLV TVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY IWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS CRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGDGL YQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

10

20

30

【表 3 8 - 2】

抗CD22-4G4S- 抗CD19 scFv核 酸配列	1305	gaagtgcagctccaacagtcaggaccaggactcgtcaaaccctcccaaacc ctcagccttacttgtgccatttccggggattccgtgtcgagcaattccgcc gcctggaactggatcaggcagtcctccgtcgcgcggtcgaaatggctggga cgcaattactaccggtccaagtgggtacaacgactacgccgtcagcgtgaag tcgcggtatcaccattaaccccgacacctccaagaaccagttcagcctccaa ctgaactccgtgacccctgaggataaccgcggtctactattgtgcccgggac ctgggttggattgccgtggcggggaccttcgattactggggccagggaact ctcgtcacctgtcctcgggaggggggtggctcaggggggtggatcggtt gggtggcggtcccagtcctcgtctgactcagcccggtccgtgtccgggtcc ccgggacagtcgatcacaatcagctgcactggcacctcctccgacgtcggc gggtacaactacgtgtcgtgggtaccaacagcacccctggaaaagccccgaag ctgatgatctacgacgtgtccaagaggccaagcggagtgtaaatacgcttt tccggctcgaagtgggaaacaccgcccagcctgactatctcgggactgcag gccgaggacgaggccgactactactgtcgtcttacacctcctcatccttg aaccacgtgttcggaaccggaaccaaggtcacctgtcgtgactggaggggga ggctccgggtggcgggcgtctggaggaggagggtccggcgaggaggatcg gaaatcgtgatgacccagtcctcccgcaaccctgtccctgagcccgggcgaa agagctaccctgtcgtgccggggtcgaggacatctccaagtacctgaac tggtaccagcagaagcccgggccaggcaccgagactgctgatctaccacact agccgcctgcattccgggtatcccgccacgggttcagcggcagcgggagcggga accgattacacgtcactatttctcactgcaacccgaggatttcgctgtg tacttctgccaacaaggaaacaccctgccttataccttcggacaggggtaca aagctggagattaagggaggaggggggtccggcgggcgggggcagcgggggc ggcggaagccaggtccagctgcaggaatccgggtccgggactcgtgaagccc tccgaaactctctcccttacgtgcaccgtgtcaggggtgtccctgccggac tacggagtgtcctggattcggcaacctccggggaagggactggagtggatc ggagtgatctggggctccgaaactacactaccagtcattgaagtca agagtgaccatttcgaaggacaacagcaagaaccaggtgtcccttaaactg tccagcgtgaccgcggcggtactgctgtctactactgcgccaagcactat tactacggcggaagctatgcgatggactactggggacagggcaccttggtc actgtgtcctcc

10

20

30

【表 3 8 - 3】

抗CD22-CD19 CAR核酸配列	1306	gaagtgcagctccaacagtcaggaccaggactcgtcaaaccctcccaaacc ctcagccttacttgtgccatttccggggattccgtgtcgagcaattccgcc gcctggaactggatcaggcagtcctccgtcgcgcggtcgaatggctggga cgcaattactaccggtccaagtgggtacaacgactacgccgtcagcgtgaag tcgcggtatcaccattaaccccgacacctccaagaaccagttcagcctccaa ctgaactccgtgacccctgaggataccgcggtctactattgtgcccgggac ctgggttggattgccgtggcgggaccttcgattactggggccagggaact ctcgtcacctgtctcctcgggaggggggtggctcaggggggtggatcggt gggtggcggtcccagtcctgtctgactcagcccggtcgtgtccgggttcc ccgggacagtcgatcacaatcagctgcactggcacctcctccgacgtcggc gggtacaactacgtgtcgtgggtaccaacagcacccctggaaaagccccgaag ctgatgatctacgacgtgtccaagaggccaagcggagtgtaaactcgcttt tccggctcgaagtgggaaacaccgccagcctgactatctcgggactgcag gccgaggacgaggccgactactgtctgtcttacacctcctcatccttg aaccacgtgttcggaaccggaaccaagggtcacctgtgtgactggaggggga ggctccgggtggcgggcgtctggaggaggagggtccggcgaggaggatcg gaaatcgtgatgacccagtcctcccgcaaccctgtccctgagcccgggcgaa agagctaccctgtcgtgcggggcgtcgaggacatctccaagtacctgaac tggtaccagcagaagcccgccaggcaccgagactgctgatctaccacact agccgcctgcattccggtatcccgccacgggttcagcggcagcgggagcgga accgattacacgtcactatttctcactgcaacccgaggatttcgctgtg tacttctgccaacaaggaaacaccctgccttataccttcggacaggggtaca aagctggagattaagggaggaggggggtccggcgggcgggggcagcgggggc ggcggaagccaggtccagctgcaggaatccgggtccgggactcgtgaagccc tccgaaactctctcccttacgtgcaccgtgtcaggggtgtccctgccggac tacggagtgtcctggattcggcaacctccggggaagggaactggagtggatc ggagtgatctgggggtccgaaactacctactaccagtcattgaagtca agagtgaccatttcgaaggacaacagcaagaaccaggtgtcccttaaactg tccagcgtgaccgcggcggtactgctgtctactactgcgccaagcactat tactacggcggaagctatgcgatggactactggggacagggcaccttggtc actgtgtcctccaccactacccagcaccgaggccaccaccccggtcct accatcgctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcga gctgggtggggcggtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctac atttgggccccctctggctgggtacttgcggggt	10
			20
			30

【表 3 8 - 4】

	cctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcgggaagaa gctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggtg cgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagca ggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagta cgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatggcggggaagcc gcgcagaaagaatccccaagaggcctgtacaacgagctccaaaaggataa gatggcagaagcctatagcgagattgggtatgaaaggggaacgcagaagagg caaaggccacgacggactgtaccagggactcagcacccgccaccaaggacac ctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg	40

【表 3 8 - 5】

抗CD19-4G4S- 抗CD22 scFvア ミノ酸配列	1307	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHT SRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGT KLEIKGGGSGGGGSGGGGSGVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYQSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKL SSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGG GSGGGGSEVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPS RGLEWLGRITYYRSKWINDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTA VYYCARDLGWIAGVAGTFDYWGQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGSALTQ PASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIDVSKRP SGVSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSLNHVFGTGTKV TVLT
抗CD19-4G4S- 抗CD22 CAR アミノ酸配列	1308	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHT SRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGT KLEIKGGGSGGGGSGGGGSGVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYQSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKL SSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGG GSGGGGSEVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPS RGLEWLGRITYYRSKWINDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTA VYYCARDLGWIAGVAGTFDYWGQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGSALTQ PASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIDVSKRP SGVSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSLNHVFGTGTKV TVLT'TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY IWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQ'TTQEEDGCS CRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGDGL YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

20

【表 3 8 - 6】

抗CD19-4G4S- 抗CD22 scFv核 酸配列	1309	gaaatcgtgatgaccaggtcccccgcaaccctgtccctgagccccggcgaa agagctaccctgtcgtgccggcggtcgaggacatctccaagtacctgaac tggtagcagcagaagccccggccaggcaccgagactgctgatctaccacact agccgctgcattccgggtatccccgcacgggttcagcggcagcgggagcggga accgattacacgctcactatctcctcactgcaacccgaggatttcgctgtg tacttctgccaacaaggaaacaccctgccttataccttcggacaggggtaca aagctggagattaagggaggaggggggtccggcgggcgggggcagcgggggc ggcggaagccagggtccagctgcaggaatccgggtccgggactcgtgaagccc tccgaaactctctcccttacgtgcaccgtgtcaggggtgtccctgccggac tacggagtgtcctggattcggcaacctccggggaagggaactggagtggatc ggagtgatctgggggtccgaaactacctaccagtcattcattgaagtca agagtgaccatttcgaaggacaacagcaagaaccagggtgtcccttaaactg tccagcgtgaccggcggtgatactgccgtctactactgcgccaagcactat tactacggcggaagctatgcgatggactactggggacagggcaccttgggtc actgtgtcctccggaggggggagggtccgggtggcgggcggtcttgaggaggga gggtccggcgaggaggatcggaagtgcagctccaacagtcaggaccaggga ctcgtcaaaccctcccaaaccctcagccttacttgtgccatttcgggggat tccgtgtcagcaattccgcgcctggaactggatcaggcagtcctccgtcg cgggggtcgaatgggtgggacgcacttactaccgggtccaagtgggtacaac gactacgccgtcagcgtgaagtcgaggatcaccattaaccccgacacctcc aagaaccagttcagcctccaactgaactccgtgaccttgaggataccgcg gtctactattgtgccccgggacctgggttggttgccgtggccgggaccttc gattactggggccagggaactctcgtcacctgtcctcgggaggggggtggc tcagggggtgggtggatcgggtgggtggcggtccagtcggtctgactcag cccgcgtccgtgtccgggtcccgggacagtcgatcacaatcagctgcact ggcacctcctccgacgtcggcggttacaactacgtgtcgtggtaccaacag cacctggaaaagccccgaagctgatgatctacgacgtgtccaagaggcca agcggagtgtcaaatacgcttttcgggtcgaagtcgggaaacaccgccagc ctgactatctcgggactgcaggccgaggacgaggccgactactactgctcg tcttacacctcctcatccttgaaccacgtgttcggaaccggaaccaagggtc accgtgctgact

10

20

30

【表 3 8 - 7】

抗CD19-4G4S- 抗CD22 CAR 核酸配列	1310	gaaatcgtgatgaccaggtcccccgcaaccctgtccctgagccccgggcgaa agagctaccctgtcgtgcccggcgctcgaggacatctccaagtacctgaac tgggtaccagcagaagccccggccaggcaccgagactgctgatctaccacact agccgcctgcatctccggtatccccgcacgggttcagcggcagcgggagcgga accgattacacgctcactatcttccctcactgcaacccgaggatttcgctgtg tacttctgccaacaaggaaacaccctgccttataccttcggacaggggtaca aagctggagattaagggaggagggggctccggcggcgggggcagcgggggc ggcgggaagccaggtccagctgcaggaatccgggtccgggactcgtgaagccc tccgaaactctctcccttacgtgcaccgtgtcaggggtgtccctgccggac tacggagtgtcctggattcggcaacctccggggaagggaactggagtggatc ggagtgatctgggggtccgaaactacctactaccagtcattgaagtca agagtgaccatttcgaaggacaacagcaagaaccaggtgtcccttaaactg tccagcgtgaccgcggcggatactgccgtctactactgcgccaagcactat tactacggcgggaagctatgcgatggactactggggacagggcaccttgggtc actgtgtcctccggaggggggaggctccgggtggcggcggctctggaggagga gggtccggcggaggaggatcgggaagtgcagctccaacagtcaggaccagga ctcgtcaaaccctcccaaaccctcagccttacttgtgccatttcgggggat tccgtgtcagcaattccgcgcctggaactggatcaggcagtcctccgtcg cgggggtcgaatggctgggacgcacttactaccgggtccaagtgggtacaac gactacgccgtcagcgtgaagtgcgggatcaccattaaccccgacacctcc aagaaccagttcagcctccaactgaactccgtgacccctgaggataccgcg gtctactattgtgcccgggacctgggttggttgccgtggccgggaccttc gattactggggccagggaactctcgtcaccgtgtcctcgggaggggggtggc tcagggggtgggtggatcgggtgggtggcgggtcccagtcgcgtctgactcag cccgcgtccgtgtccgggtccccgggacagtcgatcacaatcagctgcact ggcacctcctccgacgtcggcgggtacaactacgtgtcgtggtagcaacag caccctggaaaagccccgaagctgatgatctacgacgtgtccaagaggcca agcggagtgtcaaactcgttttccgggtcgaagtccgggaaacaccgccagc ctgactatctcgggactgcaggccgaggacgaggccgactactactgtcgtc tcttacacctcctcatccttgaaccacgtgttcggaaccggaaccaagggtc accgtgtgactaccactacccagcaccgaggccaccaccccggtcct accatcgctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcga gctgggtggggcgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctac atttgggccccctctgggtgggtacttgcggggt	10
			20
			30

【表 3 8 - 8】

	cctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcgggaagaa gctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttcatgccgggtcccagaggaggaggaaggcggctg cgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagca ggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagta cgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatggcggggaagcc gcgcagaaagaatccccaagaggcctgtacaacgagctccaaaaggataa gatggcagaagcctatagcgagattgggtatgaaaggggaacgcagaagagg caaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacac ctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg	40

【1 2 2 1】

一部の実施形態において、抗原結合ドメインは、表 2 8 に列挙したいずれかの重鎖結合

ドメインアミノ酸配列のHC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3を含む。実施形態において、抗原結合ドメインは、LC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3をさらに含む。実施形態において、抗原結合ドメインは、表28に列挙したいずれかの軽鎖結合ドメインアミノ酸配列のLC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3を含む。

【1222】

一部の実施形態において、抗原結合ドメインは、表28に列挙したいずれかの軽鎖結合ドメインアミノ酸配列のLC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3の1つ、2つまたは全て、ならびに表28に列挙したいずれかの重鎖結合ドメインアミノ酸配列のHC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3の1つ、2つまたは全てを含む。

10

【1223】

一部の実施形態において、CDRは、Kabat番号付けスキーム、Chothia番号付けスキーム、またはこれらの組合せに従って定義される。

【1224】

上で説明した二重特異性CD19-CD22およびCD22-CD19コンストラクトを、下の実施例で説明する通り、NFATアッセイで試験した。対照として、抗CD19単独のCARおよび抗CD22単独のCARを使用した。このアッセイの結果を図14に示す。データは、抗CD19 scFvと抗CD22 scFvの両方がそれらの標的に対して活性であることを示した。

20

【実施例】

【1225】

以下の実施例を参照しながら本発明をさらに詳細に説明する。これらの実施例は単に例示のために示されたものであり、特に他の規定がない限り限定を意図していない。したがって、本発明は、以下の実施例に限定されると決して解釈されず、本明細書で示された教示の結果として明らかになるありとあらゆるバリエーションを包含すると解釈されるものとする。

【1226】

当業者は、さらなる説明がなくても、前述の説明および以下の説明に役立つ例を使用して、本発明の化合物を作製し利用して、特許請求された方法を実施することができると考えられる。以下の実施例は、本発明の様々な態様を具体的に指摘するが、開示のその他の部分を限定すると決して解釈されないものとする。

30

【実施例1】

【1227】

多発性骨髄腫の処置において使用するためのCD19 CART細胞

化学療法、標的化療法、および自己幹細胞移植の現行のレジメンを用いてさえも、骨髄腫は治療不能の疾患とみなされている。本発明の実施例は、キメラ抗原受容体（レンチウイルス/CD19：4-1BB：CD3ゼータ；「CART19」またはCTL019としても知られている）を有するCD19に向けられた自己T細胞での多発性骨髄腫（MM）の処置を説明する。この実施例から、CD19を対象とするCAR療法は、極めて低い（ほとんどの方法で検出不可能な）レベルのCD19しか発現しない骨髄腫幹細胞および/または腫瘍細胞の標的化に基づいて、深く長期的に持続する寛解を確立する可能性を有することが実証される。

40

【1228】

侵襲性二次プラズマ細胞性白血病を有する患者の処置において、本発明者らは、サルベージ自己幹細胞移植から2日後に投与されたCART19は、複数のラインの化学療法を経て進行している患者において、プラズマ細胞性白血病の急速なクリアランスと極めて優れた部分応答を引き起こしたことを見出した。処置前の数カ月間、この患者は輸血依存性であった。処置の2カ月後、彼女は彼女の血球数を回復しており（正常な範囲の血小板数および白血球数を有しており）、自身の処置のために入院していた病院から退院したために輸血は必要ではなかった。

50

【1229】

骨髓腫細胞はCD19を自然に発現しないため、この腫瘍においてCAR T19処置が急速で有意な腫瘍応答を誘導したという発見は驚くべきことであった。特定の理論に縛られることは望まないが、骨髓腫を処置するのにCAR T19を使用することができるというのは、以下の理由：（１）骨髓腫細胞は従来、フローサイトメトリーによりCD19発現に関して陰性であると考えられているが、骨髓腫細胞は、RNAによっては発現が検出可能であるがフローサイトメトリーまたは免疫組織化学によっては検出不可能であるような極めて低いレベルのCD19を発現する場合があることを示すデータがあり；さらに（２）多発性骨髓腫を引き起こし、特に化学療法に耐性のがん性幹細胞であると考えられる、クローン型B細胞を標的化する概念であることから、理にかなっている。B細胞と骨髓腫瘍細胞とはクローンの関係であるが、従来の骨髓腫療法は、B細胞よりも悪性形質細胞を目的としている。したがって、骨髓腫を治療するためのCAR T19は、大部分の骨髓腫療法とは異なる細胞集団を標的とする。

10

【1230】

本発明者らの一人の患者の経験においては、患者は循環血漿細胞を有し、本発明者らは、CD19の発現のために患者の腫瘍細胞を試験することができた。患者の腫瘍細胞の約1～2%がCD19抗原を発現した。したがって、CAR T19は、患者の腫瘍細胞のごく少数の集団に直接的な影響を及ぼす可能性があるとして推論された；しかし、非常に良好な部分応答は、CD19＋腫瘍細胞のごく少数の集団のみを標的とすることに基づいては予測されなかった。

20

【1231】

このケースでは、高用量のメルファラン後の自己幹細胞移植レスキューに続いてCAR T19が投与された。これは骨髓腫において標準的な療法であるが、治療効果はない。さらにこの患者は以前にタンデム自己幹細胞移植を受けており、移植後の初期（＜6カ月）に再発していた。特定の理論に縛られることは望まないが、本発明の実施例で説明されるようなCAR T19細胞の使用は、サルベージ自己幹細胞移植と組み合わせた場合、骨髓腫の処置において重複しないメカニズムを有する可能性がある。

【1232】

10人の追加の多発性骨髓腫患者は、第I相試験においてCAR T19で治療され、少なくとも3人の患者はこれまでに治療されている。

30

【1233】

用量の論理的説明およびリスク／利益

本発明者らは、このプロトコールのための静脈内投与経路による一定の投薬を使用することを選択した。このプロトコールの主たる目的は、多発性骨髓腫を有する患者にCAR T-19細胞を投与することの安全性および実施可能性を試験することであった。予想された主たる毒性は、（１）CARが悪性または正常B細胞上の代理CD19抗原に遭遇したときのサイトカイン放出；（２）リツキシマブ療法と同様に正常B細胞の枯渇；（３）拡大／共刺激された自己T細胞がMMのためにASCTと結合された場合に以前に見られたように、移植片対宿主病に似たステロイド応答性の皮膚および胃腸の症候群である。理論的な懸念は、CAR T-19 T細胞の形質転換または制御されない増殖が、高レベルのCD19に応答して起こり得るかどうかであった。これは、MMにおけるクローン形質のB細胞の負荷が、その研究で治療された難治性CLL患者における悪性B細胞の負担よりはるかに低いと予想されるため、本出願においては、CLL患者の別の研究と比較して懸念が少なかった。

40

【1234】

用量の論理的説明

第一の3人の患者に関して、 $1.4 \times 10^7 \sim 1.1 \times 10^9$ 個のCAR T-19細胞の範囲の用量で臨床活性が観察された。この観察から、少なくとも処置された第一の3人の患者において、明白な用量応答関係はなかったことが実証される。用量において2の対数倍数差で投与された患者において、完全応答が観察された。したがって、代謝される標準

50

的な薬物とは異なり、CAR T細胞は、広範な用量応答範囲を有する可能性がある。CAR T細胞は患者において広範にわたり増殖することができるために、これは最も可能性がある。それゆえに本発明者らは、注入の場合、 $1 \sim 5 \times 10^8$ 個のCAR T-19細胞の用量範囲を設定した。範囲外使用に基づき提供されたこの一人の患者の研究において、患者に最大 5×10^8 個のCAR T-19細胞が提供され、用量の下限は設けなかった。患者10人のトライアルの場合、患者には、 $1 \sim 5 \times 10^7$ 個のCAR T-19細胞が提供されると予想される。

【1235】

一般的な設計

これは、範囲外使用に基づき提供された一人の患者の研究であった；これは、CAR T-19が発現されるように形質導入された自己T細胞の注入が安全であるかどうかを決定するための第I相研究の後にモデル化された。この研究の主な目的は、1回目のASCTに続く初期の再発後にサルベージASCTを受けた患者におけるCAR T-19T細胞の安全性、忍容性および生着可能性を決定することであった。そのプロトコールは、非盲検の予備的研究からなる。

【1236】

登録時に、対象は、骨髄生検と、それらのMMの慣例的な実験的およびイメージングの検討を受ける。適格の対象は、CAR T-19製造のための膨大な数の末梢血単核細胞(PBMC)を得るために、定常状態のアフェレーシスを受ける。TCR ζ /4-1BBレンチウイルスベクターで形質導入されたPBMCからT細胞を精製し、インビトロで拡大させ、次いで将来的な投与のために凍結する。T細胞がうまく製造された患者の数と比較して、T細胞の収集、拡大または製造が不十分な患者の数を記録する；この患者集団において、生成物製造の実行可能性は、問題があるとは予測されない。

【1237】

対象は、一般的に、追加の2回のASCTを行うためにそれらの1回目のASCTのための調製で行われた動員／収集から保存されたままの十分な末梢血幹細胞を有していたとされる。そうではない対象は、処置を行う医師の選択に従ったレジメンを用いたそれらの定常状態のアフェレーシスの前または後のいずれかに2回目の動員／収集手法を受ける。最初の白血球除去血輸血からおよそ2週間後、対象は病院に入院して、高用量のメルファラン(-2日目)、それに続いて2日日後(0日目)に自己幹細胞の注入を受け、全ての対象は、12~14日後(+12~14日目)にCAR T-19細胞の注入を受ける。最大10人の患者が登録される。

【1238】

全ての対象は、CAR T-19細胞の安全性、および生着および持続性を検討するために、研究の4週目を過ぎたら定期的に血液テストを受ける。+42日目および+100日目に、骨髄の形質細胞の負荷およびCAR T-19細胞の骨髄へのトラフィックキングを検討するために、対象は骨髄穿刺液／生検を受ける。100日目に、国際骨髄腫作業部会(IMWG: International Myeloma Working Group)の基準136に従って形式的な応答の検討を行い、多発性骨髄腫を有する患者に関する慣例的な臨床実践に従ってTTPをモニターする。この研究で測定された主要な効果の結果は、患者の最初のASCT後のTTPと、この研究でのASCT後のTTPとの比較である。

【1239】

この研究の主たるエンドポイントは、ASCTを用いたCAR T-19細胞注入の安全性および実施可能性であるため、この研究では早期停止規則が採用される。略述すると、治療された最初の5人の対象において生じた重大な予期しない有害事象が2つ未満の場合、研究は、標的被験者の10人に向けてさらに5人の対象を獲得する。本発明者らは、5人の対象が登録され、そのように観察されるまで、その後の対象を登録する前に、処置された対象をCAR T-19注入後の40日間(すなわち、42日目の第一の公式な応答評価を通じて)観察する。5人の患者からなる第2群の処置のために、対象間の待ち時間は

必要とされない。

【1240】

6カ月間の徹底的なフォローアップ後、対象は、病歴、身体検査、および血液検査とともに、少なくとも四半期ごとに2年間評価される。この評価に続いて、対象は、新しい悪性腫瘍の発症などの長期的な健康問題の診断を評価するために、さらに13年までの電話とアンケートによる毎年のフォローアップのためのロールオーバー試験に入る。

【1241】

主たる研究エンドポイント

このパイロット試験は、最初のASCT後の早期再発後にMMについて救済ASCTを受ける患者において、CD19 TCRζ/4-1BBで形質導入された自己T細胞の安全性および実施可能性を試験するために設計されている。

10

【1242】

主たる安全性および実施可能性のエンドポイントは、以下を含む：

NCJ CTC 2と定義される、研究に関連する有害事象の発生：注入から24週までの任意の時点で研究治療に可能性があり、見込みがあり、または確かに関連している、グレード3の徴候／症状、実験室の毒性および臨床事象。これは、注入毒性およびCAR T-19細胞におそらく関連する毒性を含み、以下を含むが、これらに限定されない：

- a. 発熱
- b. 発疹
- c. 好中球減少症、血小板減少症、貧血、骨髄無形成症
- d. 肝機能障害
- e. 肺の浸潤または他の肺毒性
- f. 胃腸管または皮膚に影響を及ぼすGVHD様症候群。

20

【1243】

患者アフエーシス製品からCAR T-19細胞を製造する実施可能性。ベクター形質導入効率、T細胞純度、生存率、無菌性および腫瘍汚染のための放出基準を満たさない製造された製品の数決定される。

【1244】

CART19を用いた自己幹細胞移植後の応答の深度および持続時間は、各患者が標準的自己幹細胞移植後に最初に達成した応答の深度および持続時間と比較される。

30

【1245】

患者選択および取消し

試験対象患者基準

対象は、MMについて前回ASCTを受けていなければならない、幹細胞注入の365日以内に進行していなければならない。計画されたタンデムASCT統合レジメンの一部として前回ASCTを2回受けた対象は適格である。進行は、進行性疾患のIMWG基準、または最初のASCT後にCRまたはsCRに達した患者について、CRからの再発の基準(Durie et al. Leukemia 2006;20(9):1467-1473)に従って定義される。N. B. : 患者が前回ASCTの365日以内に登録しなければならないという要件はなく、患者は、この試験に登録する前の前回ASCT後の再発／進行に続いて、実験薬剤を含む他の薬剤を用いて治療することができる。

40

【1246】

対象は書面によるインフォームドコンセントに署名していなければならない。

【1247】

対象は、メルファラン注入直前の12週間以内に測定される以下の基準により定義される高用量メルファランを受けるための十分な生存臓器機能を有していなければならない：

- a. 血清クレアチニン ≤ 2.5 または推定クレアチニークリアランス $\geq 30\text{ ml/分}$ であり、透析依存ではない。
- b. SGOT ≤ 3 倍の正常の上限および総ビリルビン $\leq 2.0\text{ mg/dl}$ （高ビリルビン血症がギルバート症候群に起因する患者を除く）。
- c. 左心室駆出率(LVEF) $\geq 45\%$ 、またはLVEFが $< 45\%$ である場合、臨床的に有意な心血

50

管機能障害のないものと同定する心臓病専門医による正式評価。登録から6週間以内にLVEFの評価が行われていなければならない。d. FEV1、FVC、TLC、DLCO（肺容量およびヘモグロビン濃度の適切な調整後）の予測される値が $\geq 40\%$ である適切な肺機能。肺機能検査は、登録から6週間以内に実施されていなければならない。

【1248】

高性能状態が骨痛のみに起因する場合を除いて、対象は、ECOG性能状態が0～2でなければならない。

【1249】

除外基準

対象は：

いずれにおいて活性で制御されていない感染があってはならない。

活発なB型肝炎、C型肝炎、またはHIV感染があってはならない。

概説されているように参加を妨げる制御されていない医学的障害があってはならない。

【1250】

処置レジメン

再発した／進行性多発性骨髄腫のための療法

患者は、登録前に、それらの処置を行う医師の選択に従って再発した／進行性の多発性骨髄腫のための療法を受けていてもよい。療法は、登録時に継続していてもよい。

【1251】

患者は、アフエレーシスの2週間前および高用量のメルファランの2週間前に全ての療法を止めなければならない。アフエレーシスと高用量のメルファランとの間の中断が2週間より長いと予想される場合、患者は、それらの処置を行う医師の裁量でアフエレーシス後に療法を再開してもよい。

【1252】

高用量のメルファラン（-2日目）

-3日目または-2日目に患者は病院に入院して、処置プロトコール開始の前に、腫瘍溶解症候群に関するパラメーターをモニターすることを包含する主治医による試験と慣例的な実験室検査を受ける。MMをモニターする実験室検査（SPEP、定量的な免疫グロブリン、および無血清の軽鎖分析）のための血液は、このような検査で承認から7日以内に採血されなかった場合、療法開始前に採取する。

【1253】

高用量療法は、-2日目に、 200 mg/m^2 の用量のメルファランをおよそ20分かけて静脈内投与することからなる。メルファランの用量は、70歳より高齢の患者か、または処置を行う医師の裁量で 200 mg/m^2 の用量に耐えられない可能性があるあらゆる年齢の患者である場合、 140 mg/m^2 に下げる。全ての患者は、標準的な制吐剤の予防的投与を受け、このような予防的投与としては、デキサメタゾンおよび標準的な抗生物質の予防的投与を挙げることができる。

【1254】

幹細胞の再注入（0日目）

幹細胞の注入は、0日目に、高用量メルファランの投与から少なくとも18時間後に行われる。幹細胞は、標準的な規格化された実施に従って、前投与の後におよそ20～60分間かけて静脈内注入される。少なくとも 2×10^6 個のCD34+前駆体/kg体重が注入されると予想される。加えて、少なくとも 1×10^6 個のCD34+前駆体/kg体重が、生着の遅延のまたは後の移植片失敗の場合に注入され得るバックアップ用の幹細胞生成物として利用可能であると予想される。G-CSFは、+5日目から開始してSQ投与され、標準的な規格化された実施に従って投与されると予想される。輸注サポートなどの他の支持療法の測定が、標準的な規格化されたガイドラインに従って行われると予想される。

【1255】

CART19細胞の注入（+12～14日目）

最大 5×10^7 個の CAR T-19 細胞からなる、CAR T-19 を形質導入された T 細胞の単回投薬が与えられる。この単一患者プロトコールにおける CD19 TCRζ4-1BB ベクターで形質導入された細胞の注入のための最小許容用量は、 1×10^7 である。CAR T-19 細胞は、胸骨細胞注入後の +12 ~ 14 日目に迅速な i.v. 注入により単回投薬として与えられる。患者が 12 ~ 14 日のウィンドウにおいて本明細書で説明される組み入れ基準のいずれも満たせない場合、CAR T-19 注入は基準が満たされるまで +12 ~ 14 日過ぎに遅延され得る。

【1256】

維持的なレナリドマイド

それらの 1 回目の ASCT の後に維持的なレナリドマイドを受けてそれに耐えた対象は、処置を行う医師の判断で禁忌がないと仮定しておよそ +100 日目に、レナリドマイド維持療法を再開させる。開始用量は、過去の経験が特定の患者に対して代わりの開始用量を指示していなければ一日 10 mg になる。維持療法は疾患進行または不耐性まで続くことになる。

【1257】

研究薬物の調製および投与

CAR T-19 T 細胞は、CVPF において調製され、注入細胞の FDA 承認による放出基準（例えば、細胞用量、細胞純度、無菌性、ベクター／細胞の平均コピー数など）が満たされるまで、CVPF から放出されない。放出すると、細胞は、投与のためにベッドサイドに運ばれる。

【1258】

細胞解凍。凍結された細胞は、ドライアイスで対象のベッドサイドに運ばれる。細胞は、 $36 \sim 38^\circ\text{C}$ に維持された水浴を使用して、ベッドサイドで解凍される。バッグは、細胞がちょうど解凍するまで静かにマッサージされる。容器に凍結した塊が残らないようにしなければならない。CAR T-19 細胞製品が破損し、もしくはバッグが漏れているように見えるか、または他には損傷しているように見える場合は、注入するべきではなく、下記のように CVPF に返却する必要がある。

【1259】

前投薬。T 細胞注入後の副作用には、一過性の発熱、悪寒および／または吐き気が含まれる；概説のために Cruz et al (Cytotherapy 2010; 12(6):743-749) を参照されたい。対象は、CAR T-19 細胞の注入前に、アセトアミノフェンおよびジフェンヒドラミン塩酸塩で前投薬されることが推奨される。これらの投薬は、必要に応じて 6 時間ごとに繰り返してもよい。患者が発熱を続け、アセトアミノフェンで寛解しない場合、一連の非ステロイド系抗炎症薬の投薬を処方することができる。生命を脅かす緊急事態を除いて、患者はいつでもヒドロコルチゾン、プレドニゾン、メチルプレドニゾンまたはデキサメタゾンなどの全身性コルチコステロイドを受けないことが推奨される。これは T 細胞に悪影響を及ぼす可能性があるためである。

【1260】

発熱反応。万一、対象が、CAR T 細胞注入後に敗血症または全身性菌血症を発症するような場合には、適切な培養および医学的管理を開始すべきである。汚染された CAR T-19 T 細胞生成物が疑われる場合、生成物は、CVPF に保存された保存試料を用いて、無菌性について再試験することができる。

【1261】

投与。注入は免疫抑制された患者のための予防策を使用して、Rhodes の隔離室で行われる。形質導入された T 細胞は、三方活栓付の 18 ゲージラテックスフリー Y 型血液セットを通じて 1 分間あたりおよそ 10 mL から 20 mL の流速で急速静脈注入により投与する。注入期間は注入される全容量および推奨される注入速度に基づくことになる。各注入バッグは、以下：「自己使用のみ」と記されたラベルが添付されている。加えてラベルには、対象のイニシャル、生年月日、および研究番号などの少なくとも 2 つの固有の識別子が記載されている。注入前、2 人の人が独立して、対象立ち会いのもとでこの情報の

全てを検証することにより、情報が参加者と正確に合致していることを確認する。

【1262】

対象が、アレルギー反応、または重度の低血圧症の危機、または注入に対する他の反応を有する場合、救急医療機器（すなわち、緊急用トロリー）が注入中に利用可能となる。バイタルサイン（温度、呼吸数、脈拍数、および血圧）は、注入の前後で、15分ごとに少なくとも1時間、これらの徴候が十分であり、安定するまで取られる。対象は、医師が、対象にそうすることが安全であると判断するまで、退院しないように求められる。

【1263】

パッケージング

注入は、注入のための 1×10^7 個の CART-19 細胞の最小許容用量で、 $1 \sim 5 \times 10^7$ 個の CART-19 を形質導入された細胞の単回用量で構成される。各バッグは、以下の注入可能なグレード試薬（v/v%）：31.25% Plasmalyte-A、31.25% デキストロス（5%）、0.45% NaCl、最大 7.5% DMSO、1% デキストラン 40、5% ヒト血清アルブミン、を含有する低温媒体のアリコート（容量は用量に依存する）を含有する。

【1264】

アフエレーシス

アフエレーシスセンターで、大容量（12～15リットルまたは血液容量の4～6倍）のアフエレーシス手法を実行する。この手法の間に CART-19 のための PBMC を得る。目的は、1回の白血球除去血輸血で、CART-19 T細胞を製造するために少なくとも 5×10^9 個の白血球を回収することである。FDAの遡及要件および調査のためのベースラインの血液白血球も得て、低温保存する。細胞生成物は、およそ2～4週間後のリリースの準備ができていることが予測される。フローサイトメトリーによるリンパ球サブセットの定量は、CD19およびCD20 B細胞の決定を包含する。ベースラインの検討は、ヒト抗VSV-Gおよび抗マウス抗体（HAM-A）に関して行われる。対象は、以前に臨床細胞およびワクチン生産施設における現在の適正製造基準に従って保存される十分なアフエレーシス回収を行っていた場合、これらの細胞は、CART-19製造のための細胞源として使用され得る。保存されたアフエレーシス製品を使用することにより、追加のアフエレーシス回収を受ける対象に対する費用、時間、およびリスクを回避することができる。

【1265】

腫瘍縮小化学療法 (cytoreductive chemotherapy)

リンパ球枯渇化学療法 (lymphodepleting chemotherapy) は、本明細書で説明したような高用量のメルファランである。

【1266】

CART-19 注入

注入は、幹細胞再注入後の12～14日目に開始される。

【1267】

最初の注入の+12～14日前に、化学療法が部分的にリンパ球減少症を誘発するため、患者は、CD3、CD4およびCD8カウントの差異および評価を有するCBCを有する。

【1268】

第一の用量は、単回用量を使用して投与される。患者のベッドのそばで細胞を融解させる。融解させた細胞を、注入期間がおよそ10～15分間になるように、耐えられる限り速い注入速度で与える。混合を容易にするために、細胞は、Y-アダプターを使用して同時に投与される。本明細書で説明したようにして、対象は注入を受けて前投与される。対象のバイタルサインを検討し、投与前に、注入の最後に、その後1時間にわたり15分ごとに、これらが安定して問題のない状態になるまで、パルスオキシメトリーを行う。第一の注入前のあらゆる時間と各注入後に20分から4時間まで、ベースラインの CART-19 レベルを決定するための血液試料を得る（続いて TCSL に送る）。

【1269】

高用量のメルファランに関連する毒性を経験している患者は、これらの毒性が解消するまで、その注入スケジュールを遅らせる。T細胞注入の遅れを保証する特定の毒性には以下が含まれる：1) 肺：95%超の飽和を維持する補充酸素の要求または漸進的である胸部X線上の放射線異常の存在；2) 心臓：医療管理で制御されていない新しい心臓不整脈；3) 昇圧剤を必要とする低血圧；4) 能動的感染：T細胞注入の48時間以内に細菌、真菌またはウイルスの陽性血液培養。

【1270】

毒性の管理

制御されていないT細胞の増殖。同種異系または自己のT細胞注入に関連する毒性は、薬理学的免疫抑制の過程で管理されている。T体関連毒性は、全身性コルチコステロイドに応答することが報告されている。制御されていないT細胞増殖が起こる場合（CAR T-19細胞に関連するグレード3または4の毒性）、対象は、コルチコステロイドを用いて処置され得る。対象は、パルスメチルプレドニゾロン（2mg/kg i.v. 分割q8時間×2日）で処置され、続いて迅速テパが施される。

10

【1271】

さらに、別のプロトコルで処置された対象の観察に基づいて、マクロファージ活性化症候群（MAS）にはいくつかの懸念があるが、CLL患者よりも骨髄腫を有する患者において、CD19+腫瘍負荷がはるかに低いと予想される。この毒性の処置および時期は、患者の医師および治験責任医師の裁量に委ねられる。推奨される管理には、対象が連続2日を超えて続く101°F超の発熱を示し、感染の徴候がない（陰性血液培養、CXRまたは他の供給源）場合、トシリズマブ4mg/kgが考慮され得る。医師の判断により、コルチコステロイドおよび抗TNF療法の追加が考慮され得る。

20

【1272】

B細胞枯渇。B細胞の枯渇および低ガンマグロブリン血症が起こる可能性がある。これは、抗CD20指向性療法に共通している。臨床的に重要な低ガンマグロブリン血症（すなわち、全身感染）の場合、リツキシマブで行われるように、対象は、血清免疫グロブリンレベルの正常なレベルを回復させるための確立された臨床投薬ガイドラインによって静脈内免疫グロブリン（IVIg）が与えられる。

【1273】

初回移植片不全。第一のASCTと比較して第二のASCT後に初回移植片不全（すなわち、非生着）がより一般的であり得る。適格性基準は、初回移植片不全の場合に治療医師の裁量で救助の再注入に十分な幹細胞が利用可能でなければならぬと規定している。

30

【1274】

結果

3人の処置抵抗性、進行多発性骨髄腫患者が、この進行中の試験においてCTL019を用いてこれまで処置を受けてきた。これらの患者のうちの2人についての結果は、両者が3カ月時点での主要効能評価に基づいてCTL019療法から実質的な抗腫瘍効果を受けていることを示している。3人目の患者はまだ3カ月時点に達していない。2人の患者についての結果は下にさらに詳細に記載されている。

40

【1275】

最初の骨髄腫患者は、+100日の応答評価を完了し、患者は、CAR T19療法に対して非常に良好な反応を示した。以下のテストを行って、以下の結果を得た：

－SPEP/免疫固定：陰性

－尿免疫固定：患者の免疫固定における微弱な測定不能なカッパ軽鎖バンド（38日目にも存在するため、新規ではない）。

他には、患者は、以下を含む厳格な完全寛解の基準を満たしている：

－無血清軽鎖比：正常

－骨髄生検：陰性

－IgA免疫表現型検査：IgAは検出限界を下回る。

50

【1276】

尿免疫固定による微弱な測定不可能なκ軽鎖の結果を除いて、患者は「厳格な完全寛解」の基準を全て満たしていた。3つの時点（-2日、+38日、+103日）における血漿細胞の免疫表現型の概要を図8に示し、患者のIgAが検出限界を下回ることが実証される。前記要約は、-2日目での重い骨髄腫負荷ならびに+38日目および+103日目では検出可能な負荷なしを示しており、これにより患者はフロー分析による「MRD陰性」に分類される。+103日目、前記要約は正常なポリクローナルCD19+形質細胞およびB細胞の回復を示している。患者には疾患または治療の症候がなく、健常人のように機能している。

【1277】

処置を受けた第二の患者はまだ+100日時点に到達していない。しかし、この時点で、彼女は健康が回復しつつあるが、CTL019注入の効果を判定するには時期尚早である。

【実施例2】

【1278】

ホジキンリンパ腫に対するCAR19 T細胞療法

CAR19 T細胞療法はまた、ホジキンリンパ腫（HL）を治療するために使用することができる。ホジキンリンパ腫は、クローン胚中心B細胞に由来する悪性ホジキンリドスターンバーク（HRS）細胞の存在により特徴付けられる。HLに対するCAR19 T細胞療法の治療効果を示すいくつかの要因が存在する。HL腫瘍のCD19染色は、腫瘍および腫瘍微小環境内のCD19発現細胞（CD19⁺）を示す（図2）。研究は、CD19を発現するクローンB細胞集団（CD20⁺CD27⁺ALDH⁺）がホジキンリンパ腫細胞株の発生および維持に関与し、またほとんどのHL患者の血液中を循環することを示す（Jones et al., Blood, 2009, 113(23):5920-5926）。このクローン性B細胞集団はまた、悪性HRS細胞の発生を引き起こし、またはそれに寄与することが示唆されている。したがって、CART19療法は、腫瘍細胞の腫瘍形成または維持に寄与するこのB細胞集団を枯渇させる。別の研究は、B細胞枯渇が、複数のマウスモデルにおいて固形腫瘍増殖を遅らせることを示した（Kim et al., J Immunotherapy, 2008, 31(5):446-57）。HL腫瘍微小環境におけるB細胞の枯渇が、いくらかの抗腫瘍効果をもたらすという考えの支持において、リツキサンの現在の療法が、HLにおける腫瘍性B細胞の標的化および枯渇について臨床的に試験されている（Younes et al., Blood, 2012, 119(18):4123-8）。慢性炎症に関連したデノボ発癌はまた、B細胞依存性であることが示されている（de Visser, et al., Cancer Cell, 2005, 7(5):411-23）。これらの研究からの結果は、B細胞集団、特にHL腫瘍微小環境の標的化が、疾患の進行または腫瘍増殖を低減または阻害することによってHLを治療するために有用であることを示す。

【1279】

さらに、正常なCD19発現B細胞はまたHLの腫瘍微小環境に浸潤する。CLLおよびALLにおけるCART19療法を用いた従前の研究（例えば、実施例4および5に記載される）は、CD19+標的へのCART19曝露が、サイトカイン産生およびマクロファージ産生をもたらすことを示す。したがって、前腫瘍微小環境から抗腫瘍微小環境へのHL腫瘍微小環境の調節は、HL中に存在する正常なCD19+B細胞と相互作用するようにCART19を注入することにより達成することができる。例えば、CD19発現標的へのCART19曝露は、細胞傷害性T細胞の増殖、マクロファージの活性化、および腫瘍増殖を阻害する様々な機能を有する他の免疫エフェクター細胞、例えば、白血球、マクロファージ、および抗原提示細胞の動員によって、抗腫瘍活性を促進するサイトカイン産生、例えば、炎症性サイトカイン産生を引き起こす。標的CD19+B細胞は悪性ではない（例えば、正常に循環するB細胞である）ため、長期のCART19効果ではなく一時的なCART19効果が腫瘍微小環境の調節に好ましい場合がある。

【1280】

HL患者におけるCART19療法の治療効果を調べるための研究は、以下に記載され

10

20

30

40

50

るように行うことができる（図3）。この研究はまた、HL対象におけるCAR T19の安全性および忍容性を評価し、HL腫瘍微小環境におけるCAR T19細胞の効果を決定する。

【1281】

この研究においては、古典的HLを有する8人の患者が治療される。患者は全ての年齢であるが、小児および成人患者のためにドラッグデリバリーの別々のプロトコルを確立することができる。この研究の患者は、利用可能で潜在的な治癒的治療オプション（例えば、自己（ASCT）または同種異系の幹細胞移植など）がなく、またはこのような治癒的治療オプションには適していない。例えば、患者は、以下のいずれかであり得る：救済化学療法後のPET+、ブレントキシマブによる治療後のPET+、またはブレントキシマブの事前曝露の有無によるASCT後のPET+。患者は、現在利用可能な療法では限られた予後（数カ月から2年以下の期待生存率）を有する。最後に、患者は、抗CD20抗体療法を受けていない。患者は、例えば、患者がCAR T19の6回の注入のためにT細胞の数が不十分である場合、実施可能性の欠如のために除外される。

【1282】

mRNA CAR19は、インビトロ転写によって産生される。CAR19 mRNAは、ドナーT細胞にエレクトロポレートされ、得られた細胞は拡大され、CD3/CD28ビーズを伴うインキュベーションにより刺激される。 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ 個のRNAがエレクトロポレートされCAR19 T細胞を含む用量は、患者に週に3回、2週間（例えば、0、2、4、7、9および11日目に）送達される。全反応率は、治療後1カ月で臨床、CT、およびPETスキャンによって評価される。応答および生存率は、最初の6カ月間毎月モニターされ、次に3カ月ごとに、最初のCAR T19注入（0日目）後2年までモニターされる。モニター技術には、腫瘍またはリンパ節の生検（例えば、免疫組織化学分析および／または遺伝子発現プロファイリングのためのRNA）およびCAR T19処置の前後のPETスキャンが含まれる。例えば、HL腫瘍微小環境におけるCAR T19細胞の効果は、処置前および処置後の約1週間（または細胞表現型の変化を可能にする処置後の適切な時間）の選択された患者からのアクセス可能なリンパ節生検で行われた遺伝子発現プロファイリングの結果を比較することによって分析される。CAR T19処置の安全性および忍容性を評価するために、サイトカイン放出症候群（CRS）およびマクロファージ活性化症候群（MAS）の頻度を含む有害事象の頻度および重症度が報告される。

【1283】

化学療法は、CAR T19処置と同時に投与することができる。CAR T19の最初の投与に先立って、リンパ穿孔化学療法、例えば、シトキサンを行うことができる。

【実施例3】

【1284】

CLL患者の非応答例サブセットは、免疫チェックポイント阻害剤分子の発現増加を示す

この研究において、34人のCLL患者由来の臨床製造品からのCAR T19細胞は、PD-1、LAG3、およびTIM3などの免疫チェックポイント阻害剤分子の発現について評価された。CAR T19に対するこのコホートの応答は公知であり、したがって、応答とバイオマーカー発現パターン間の相関を評価することができた。

【1285】

CART療法に対する異なる応答を有するCLL患者由来の製造されたCAR T19細胞は、フローサイトメトリーで分析され、CARおよび免疫チェックポイント阻害剤分子であるPD-1、LAG3およびTIM3の発現を測定した。CAR T19細胞は、健常ドナー（HD）（ $n=2$ ）；CART療法に応答したCLL患者（CR）（ $n=5$ ）；CART療法に部分的に応答したCLL患者（PR）（ $n=8$ ）；CART療法に応答しなかったCLL患者（NR）（ $n=21$ ）に由来した。細胞は、当該技術分野において公知であるフローサイトメトリー分析のための標準的な方法に従って、CD3、CD4、CD8、CD27、CD45RO、CAR19分子、ならびに免疫チェックポイント分子であ

るPD-1、LAG3およびTIM3を特異的に認識する蛍光標識抗体を用いて染色された。例えば、CD4+、CD8+などの各マーカーの発現は、フローサイトメトリー分析ソフトウェアにより決定され、さらに、亜集団（例えば、CD4+T細胞、CD8+T細胞、またはCAR19発現T細胞）は、免疫チェックポイント分子であるPD-1、LAG3、およびTIM3の発現について分析された。

【1286】

表面マーカー発現を決定するために使用されるフローサイトメトリープロファイル分析の例を図4Aおよび4Bに示す。CD4を発現するT細胞は、フローサイトメトリーを用いて決定され、さらに、CAR19およびPD-1発現について分析された。この場合、プロファイルのx軸は、CAR19発現を示し（左上象限（Q5）および左下象限（Q8）は、CAR19陰性CD+細胞を示し、一方で、右上象限（Q6）および右下象限（Q7）は、CAR19を発現するCD4+細胞を示す）、y軸は、PD-1発現を示す（左下象限（Q8）および右下象限（Q7）はPD-1陰性CD4+細胞を示し、左上象限（Q5）および右上象限（Q6）はPD-1を発現するCD4+細胞を示す）。CART応答例由来のCD4+集団において、CD4+細胞全体の44.7%がPD-1を発現し、CAR19を発現する細胞の約22.3%がPD-1陽性であり、一方で、CAR19を発現する細胞の27.2%がPD-1陰性であった（図4A）。対照的に、非応答例由来のCD4+集団において、CAR19を発現する細胞全体で有意に減少し（CR中の49.5%と比較して約15.3%）、CAR19を発現する細胞の14.7%がPD-1陽性であり、一方で、わずかに0.64%がPD-1陰性であった（図4B）。図4Aと図4Bのプロファイル間の比較は、CART応答例（約44.7%）と比較して、非応答例由来のCD4+細胞の非常に高いパーセンテージがPD-1（約92.9%）を発現することを示す。

【1287】

上記の方法および分析を用いて、CD4+集団およびCD8+集団のPD-1発現（PD-1+）細胞のパーセンテージは、各応答例群の各患者について決定された。非応答例は、CAR療法に応答したもの（CR）と比較して、CD4+集団（図4C）とCD8+（図4D）集団の両方においてPD-1+細胞のパーセンテージが高いことが示された；平均PD-1パーセンテージの増加は、CD4集団+とCD8+集団の両方について統計的に有意であった。部分的応答例（PR）は、CD4+集団（図4C）とCD8+（図4D）の両方の集団において、応答例（CR）よりもPD-1+細胞のパーセンテージが高いことを示した。

【1288】

次に、CAR19を発現するCD4+集団およびCAR19を発現するCD8+集団のPD-1発現（PD-1+）細胞のパーセンテージは、各応答群の各患者について決定された。同様の分析が上記のように行われ、CAR19発現についてのCD4+およびCD8+細胞を分析し、CAR19を発現する細胞を同定した後、CAR19を発現する細胞の集団からのPD-1発現を伴う細胞のパーセンテージを決定する追加の工程も行われた。CD4+およびCD8+集団全体で観察された傾向と同様の傾向が、CAR19を発現するCD4+およびCD8+集団について観察された：非応答例は、CAR療法に
40
応答した集団（CR）と比較して、CD4+集団（図5A）とCD8+集団（図5B）の両方においてPD-1+細胞のパーセンテージが高いことを示した；平均PD-1パーセンテージの増加は、CD4+集団とCD8+集団の両方について統計的に有意であった。部分
50
応答例（PR）は、CD4+集団（図5A）とCD8+集団（図5B）の両方において、
50
応答例（CR）よりもPD-1+細胞のパーセンテージが高いことを示した。

【1289】

さらなる分析は、CAR療法に対する異なる応答を有する患者由来のPD-1、LAG3、およびTIM3を発現する細胞の分布を決定するために行われた。CD4+集団におけるPD-1、LAG3、およびTIM3発現の代表的な細胞プロファイル分析を図6に示す。細胞集団は、最初にCD4+およびCD8+発現について分析された。次に、CD

4+集団（またはCD8+集団、図示せず）は、PD-1およびCAR19発現について分析された（図6、左のプロファイル）。先に記載されたように、非応答例（NR）は、CAR-T応答例（CR）と比較して、PD-1+全体であった細胞の割合が有意に増加した（CRについて44.7%PD-1陽性と比較してNRについて約92.9%PD-1陽性）。さらに、非応答例において、CAR19を発現する細胞は、ほとんどPD-1陽性であった（0.64%PD-1陰性およびCAR+と比較して14.7%PD-1陽性およびCAR+）。次に、集団は、PD-1およびLAG3の共発現について分析された（図6、中央プロファイル）。PD-1とLAG3の両方を発現する細胞は、右上象限（Q2）に示される。非応答例は、CAR-T応答例と比較して、免疫チェックポイント阻害剤であるPD-1とLAG3の両方を発現した細胞のパーセンテージが有意に増加した（7.31%と比較して67.3%）。PD-1発現はまた、TIM3発現とともに分析された。図6の右のプロファイルにおいて、ボックスは、PD-1とTIM3の両方を表現する細胞を示す。PD-1およびLAG3で得られた結果と同様に、非応答例は、CAR-T応答例と比較して、免疫チェックポイント阻害剤であるPD-1とTIM3の両方を発現した細胞のパーセンテージが有意に高かった（28.3%と比較して83.3%）。PD-1を発現する細胞（PD1+）、PD-1およびLAG3を発現する細胞（PD1+LAG3+）、ならびにPD-1およびTIM3を発現する細胞（PD1+TIM3+）のパーセンテージは、上記のようにフローサイトメトリー分析を用いて、各応答群の各患者について決定された。非応答例は、両方の細胞集団について統計的に有意であるCAR-T応答例と比較して、PD1+LAG3+細胞（図7A）およびPD1+TIM3+細胞（図7B）のパーセンテージが増加したことが示された。部分応答例はまた、CAR-T応答例と比較して、両方の細胞集団の増加した割合を示し、非応答例と比較して平均が減少した。

10

20

【1290】

これらの結果は、CAR療法に应答しない患者が、CAR療法に应答するかまたは部分的に应答する患者と比較して、免疫チェックポイント阻害剤（例えば、PD-1、LAG3、およびTIM3）の発現増加を示すことを示す。したがって、これらの結果は、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-1、LAG3、またはTIM3の発現を阻害または減少させる薬剤が、免疫チェックポイント経路を介した（例えば、PD-1、LAG3、またはTIM3を媒介して）免疫抑制を予防するCAR療法を受けている患者への投与に有用であり、それによってCARを発現する細胞の効力を増加させることができる。

30

【実施例4】

【1291】

高齢者の免疫老化におけるmTOR阻害の影響

免疫老化におけるmTOR阻害の有効性は、例えば、国際出願第2015/073644号の実施例1に記載され、この出願の全体は参照により本明細書に組み込まれる。

【実施例5】

【1292】

高齢対象におけるワクチンに対する免疫応答の増強

免疫応答の増強におけるmTOR阻害の有効性は、例えば、国際出願第2015/073644号の実施例2に記載され、この出願の全体は参照により本明細書に組み込まれる。

40

【実施例6】

【1293】

低用量mTOR阻害はエネルギーおよび運動を増加させる；

エネルギーおよび運動におけるmTOR阻害の効果は、例えば、国際出願第2015/073644号の実施例3に記載され、この出願の全体は参照により本明細書に組み込まれる。

【実施例7】

【1294】

50

RAD001を用いたP70 S6キナーゼ阻害

P70 S6キナーゼ阻害におけるmTOR阻害の効果は、例えば、国際出願第2015/073644号の実施例4に記載され、この出願の全体は参照により本明細書に組み込まれる。

【実施例8】

【1295】

外因性IL-7はCAR T細胞の機能を増強する

CAR T細胞の養子移入後、患者の一部は、CAR T細胞の持続性が制限されることを経験し、これは、最適ではないレベルの抗腫瘍活性をもたらす得る。この実施例において、外因性ヒトIL-7の投与の効果は、CAR T細胞に対する初期の最適な応答が観察されたマウス異種移植モデルにおいて評価される。

10

【1296】

IL-7受容体CD127の発現は、最初に、異なる癌細胞株およびCARを発現する細胞において評価された。2つのマントル細胞リンパ腫細胞株（RLおよびJeko-1）および1つのB-ALL細胞株（Nalm-6）は、CD127発現についてフローサイトメトリーによって分析された。図9Aに示されるように、試験された3つの癌細胞株のうちRLは、CD127、続いてJeko-1およびNalm-6の発現が最も高いことが示された。CART19細胞は、NSGマウスに注入され、CD127発現は、フローサイトメトリーにより循環CART19細胞において評価された。図9Bに示されるように、CD127は、循環する全てのCART19細胞において均一に発現される。

20

【1297】

次に、CART19細胞の抗腫瘍活性における外因性IL-7処置の効果は、リンパ腫動物モデルにおいて評価された。NSGマウスに、0日目（D0）にルシフェラーゼを発現するマントル細胞株（RL-luc）を生着させ、続いて、6日目にCART19細胞の処置を施した。NSGマウスを群に分け、第一の群はCART19細胞を受けず、第二の群は 0.5×10^6 個のCART19細胞を受け、第三の群は 1×10^6 個のCART19細胞を受け、第四の群は 2×10^6 個のCART19細胞を受けた。腫瘍サイズは、80日を超える生着腫瘍の平均生物発光を測定することによってモニターされた。 2×10^6 個のCART19細胞を受けたマウスのみが、腫瘍の拒絶および腫瘍増殖の阻害を実証した（図10A）。 0.5×10^6 個のCART19細胞または 1×10^6 個のCART19細胞を受けた2つの群からのマウスは、最適ではない抗腫瘍応答を示した。次に、これらの2つの群のマウスを無作為化した。この場合、3匹のマウス（ 0.5×10^6 個のCART19細胞を受けたマウス#3827および#3829、 1×10^6 個のCART19細胞を受けたマウス#3815）は、外因性の組換えヒトIL-7を200ng/マウスの用量で腹腔内注射により受け、週に3回、85日目から開始され、2匹のマウスは腹腔内注射されなかった。平均生物発光によって検出されるように、85～125日目に外因性IL-7を受けたマウスの腫瘍負荷を図10Bに示す。IL-7を受けた全てのマウスは、腫瘍負荷において1～3logの減少の劇的な応答を示した。もともと高用量のCART19細胞を受けたマウス（ 1×10^6 個のCART19細胞を受けたマウス#3815）は、より深遠な応答を示した。IL-7処置を受けたマウスの腫瘍負荷をIL-7処置の前後で対照と比較すると、腫瘍負荷の腫瘍減少は、IL-7処置を受けたマウスでのみ見られた（図10C）。

30

40

【1298】

また、リンパ腫動物モデルにおけるIL-7処理後のT細胞動態について調べた。ヒトCART19細胞は、IL-7処理前に血液中で検出できなかった。IL-7の処置に際して、処置されたマウスにおいてT細胞数は急速に増加したが、可変的な増加であった（図11A）。IL-7を受けたマウスにおいて観察されたT細胞増殖の程度もまた、腫瘍応答と相関した。IL-7処置中のピーク拡大時に血液中に検出された最大数のT細胞を有するマウス（マウス#3815）は、腫瘍負荷において最も堅牢な減少を示した（図10B参照）。さらに、ピークの拡大時間は、ベースラインとして注入されたT細胞用量と

50

関連した。血液中のCD3を発現する細胞の数／レベルもまた、IL-7処置の前後で測定された。対照マウスにおいて、CD3を発現する細胞はほとんど検出されず、一方で、IL-7処置されたマウスは、IL-7処置後にCD3+細胞の有意な増加を示した(図11B)。

【1299】

併せて、本実施例の結果は、外因性IL-7処置が、T細胞増殖および抗腫瘍活性をインビボで増加させることを実証し、これは、CAR療法後の最適ではない結果を有する患者におけるIL-7の使用が、これらの患者において抗腫瘍応答を改善することができることを示す。

【実施例9】

【1300】

CD22 CARの評価

自動化されたJurkat-NFAT-ルシフェラーゼ(JNL)細胞アッセイ

自動化されたアッセイは、特定のCD22 CARTクロンの反応性を決定するために行われた。NFATプロモーターからのルシフェラーゼを安定的に発現する、 3×10^4 個のレンチウイルス形質導入Jurkat細胞株細胞(JNL細胞)は、CD22を発現する標的細胞株(Daudi、Raji)、および陰性対照としてCD22を発現しない細胞株(K562)を用いて96ウェルプレートに播種された。翌日、ルシフェリン基質を96ウェルプレートの各ウェルに添加し、ルシフェラーゼレポーターの相対発光を決定した。このアッセイにおいて、CD22 CARコンストラクトは、陽性対照として役立つCD19 CARコンストラクトおよびCD22(m971由来)CARコンストラクト(m971-HL)と比較された。m971-HLのVHおよびVL鎖を含むが、逆方向(H-Lの代わりにL-H)を含むm971-LH CARコンストラクトは、CARを含有したが、特異性の欠如のために標的に結合することができず、陰性対照として役立った。CARを含まない、非形質導入T細胞(Neg cnt)もまた陰性対照として役立った。Jurkat T細胞活性化からのルシフェラーゼ活性をグラフにした。本明細書に提示された結果は、CD-22を形質導入したJNLクロンのいくつかは、用量依存的に増加したCD22を発現する細胞株に対する特異的反応性を示したことを実証する(図18A~18C)。

【1301】

原発性ヒトT細胞におけるCD22 CARの発現

原発性ヒトT細胞は、0日目に抗CD3／抗CD28刺激ビーズを用いて活性化され、続いて1日目に特定のCARコンストラクトのレンチウイルス形質導入を行った。細胞は10日目までインビトロで拡大させ、その時点で、CARの表面発現についてサイトメトリーにより分析された。2つの異なるアプローチがCARの表面発現を決定するために利用された：プロテイン-L-ビオチン、続いてストレプトアビジン-PE、および組換えヒトCD22-Fc、続いて抗Fc-アレクサフルオロ488。結果を図19に示す。本明細書に提示される結果は、CD22 CARクロン2(hCD22-2)、クロン5(hCD22-5)、クロン7(hCD22-7)、クロン8(hCD22-8)、クロン10(hCD22-10)、クロン12(hCD22-12)、クロン30(hCD22-30)およびクロン31(hCD22-31)が陽性の表面発現を示すことを実証した。CD22 CAR m971は、Protein-LとhCD22-Fcの両方に対する結合の陽性対照として役立ち、特異性のないアイソタイプCAR(抗gH)は、Protein-Lに対する陽性対照として役立った。CARを発現しないT細胞を陰性対照として使用した。

【1302】

原発性T細胞腫瘍標的の死滅アッセイ

上記のように活性化および形質導入された原発性T細胞は、示された比でルシフェラーゼを安定に発現する標的細胞株と混合された(図20A~20F)。標的細胞株であるRaji、SEM、K562-hCD22、DaudiおよびNALM6は全て、CD22

10

20

30

40

50

標的を発現したが、一方で、K 5 6 2 細胞株はC D 2 2 を発現せず、陰性対照として役立った（図 2 0 A ～ 2 0 F）。本明細書に提示される結果は、いくつかのC D 2 2 C A R クローン（例えば、C D 2 2 C A R クローン 2、5、7、8、1 0、1 2、3 0 および 3 1）および陽性対照C D 2 2 m 9 7 1 - H L C A R が、用量依存性の標的細胞死滅を示し、死滅の程度は標的細胞型の種類に応じて異なることを実証する。非形質導入T細胞（U T D）は、標的細胞株を死滅させる能力を欠いていた。

【1 3 0 3】

原発性T細胞サイトカインビーズアレイ

C D 2 2 を発現するC A R T細胞からの炎症促進性サイトカインの放出を誘導するC D 2 2 を発現する細胞株の能力を調べた。炎症促進性サイトカイン濃度は、原発性T細胞死滅アッセイから採取された試料について、サイトカインビーズアレイキットを用いて決定された。インターフェロン- γ （I F N - γ ）、腫瘍壊死因子アルファ（T N F α ）およびインターロイキン 2（I L - 2）は全て、2. 5 対 1 の E 対 T 比および 1 0 対 1 の E 対 T 比の試料について測定された。結果を図 2 1 A ～ 図 2 1 F に示す。本明細書に提示される結果は、複数のC D 2 2 C A R クローンが、m 9 7 1 - L H C A R（陰性対照）または非形質導入T細胞（U T D）よりも有意に多くの I F N - γ 、T N F α および I L - 2 を誘導し、サイトカイン誘導レベルが標的細胞型によって異なることを実証する。

【実施例 1 0】

【1 3 0 4】

C D 2 2 C A R T 処置の用量漸増研究

第 1 相臨床試験は、以前にC A R T療法を受けていたかまたは以前に受けていないA L L 対象において、C D 1 9 C A R Tの有無によるC D 2 2 C A R Tの最適用量を決定するために実施される。この研究の目的は、確立された放出基準を満たす、抗C D 2 2 C A R 遺伝子操作されたT細胞の生成の実施可能性を決定し、シクロホスファミド／フルダラビンリンパ球枯渇レジメンに従って、B細胞悪性腫瘍を有する小児および若年成人における自己の抗C D 2 2 C A R 遺伝子操作されたT細胞の漸増用量の投与の安全性を評価することである。

【1 3 0 5】

対象は、1 歳から 3 0 歳までの年齢であり、体重が少なくとも 1 5 k g であり、C D 2 2 + A L L を有するものである。疾患活性は、骨髄分析またはF D G - P E T によって測定可能である。最小限の残存疾患活性を有する対象は許容される。中枢神経系（C N S）の状態が 1 または 2 である対象は許容される。対象は、十分な臓器機能および十分なC D 3 カウントを有していなければならない。

【1 3 0 6】

拡張コホートをを用いた第 1 相用量漸増試験が実施される。対象は、C A R T療法を以前に受けていたかまたは受けていないかによって層別化される。対象には、 3×10^5 細胞／k g 体重、 1×10^6 細胞／k g 体重、 3×10^6 細胞／k g 体重、および 1×10^7 細胞／k g 体重の 4 種類の用量の自己抗C D 2 2 C A R 遺伝子操作されたT細胞の 4 つの用量レベルの 1 つが与えられる。 3×10^6 細胞／k g 体重の用量を受ける対象のサブセットはまた、抗C D 1 9 C A R 遺伝子操作されたT細胞が投与される。各用量レベルの最初の 2 人の患者は 1 6 歳以上である。

【1 3 0 7】

適格性が決定された後、アフエレーシスを実施してT細胞を単離する。その後、対象は分取化学療法を受ける。対象は、 $25 \text{ mg} / \text{m}^2$ のフルダラビンを用いて 3 日間、毎日処置され、 $900 \text{ mg} / \text{m}^2$ のシクロホスファミドの単回用量を与えられる。次に、抗C D 2 2 C A R 遺伝子操作されたT細胞を投与し、2 8 日後に応答および毒性を評価する。

【実施例 1 1】

【1 3 0 8】

B細胞悪性腫瘍を治療するためのC D 2 0 標的化キメラ抗原受容体（C A R S）の利用

J u r k a t - N F A T ールシフェラーゼ（J N L）細胞アッセイは、特定のC D 2 0

CARTクローンの反応性を決定するために行われた。NFATプロモーター由来のルシフェラーゼを安定して発現するJurkat細胞(JNL細胞)は、図15A～図15Cに示されるCARコンストラクトを用いてレンチウイルスにより形質導入された。CARを発現するJNL細胞(3e4)は、0.5対1、1対1、2対1および4対1のエフェクター細胞対標的細胞(E:T)比で、CD20を発現する標的細胞株Daudi(図15A)およびRaji(図15B)、ならびにCD20を発現しない陰性対照K562(図15C)と混合された。レンチウイルスで形質導入されたJNL細胞は、CD20を発現する標的細胞株(Daudi、Raji)、および陰性対照としてCD20を発現しない細胞株(K562)とともに96ウェルプレートに播種された。翌日、ルシフェリン基質を96ウェルプレートの各ウェルに添加し、ルシフェラーゼレポーター(Jurkat T細胞活性化由来)の相対発光を決定した。このアッセイにおいて、CD20 CARコンストラクトは、陽性対象として役立つCD19 CARコンストラクト、およびHassan et al., Blood, 14 Feb 2013, Vol. 121, No. 7に記載されるCD22(m971由来)CARコンストラクトと比較された。CARを含むが、特異性の欠如のために標的に結合することができないアイソタイプCAR、およびCARを含まない非形質導入T細胞(Neg. cnt)は陰性対照として役立った。結果を図15A～15Cに示す。CD20を形質導入したJNLクローンのいくつかは、用量依存的に増加するCD20を発現する細胞株に対して特異的反応性を示した。

【実施例12】

【1309】

B細胞急性リンパ芽球性白血病(B-ALL)におけるCD19 CART療法に対する対象の再発を予測する因子の同定

本実施例は、とりわけ、本発明に従って使用するための、B細胞急性リンパ芽球性白血病(B-ALL)におけるCD19 CART療法(例えば、CTL019療法)に対する患者の再発を予測する新規な転写遺伝子シグネチャーの同定を記載する。

【1310】

とりわけ、本実施例は、CD19 CART処置前の患者(例えば、CTL019)(アフレーシスまたは骨髄)、または再注入前の製造されたCD19 CART産物試料(例えば、CTL019)における選択された遺伝子のmRNA発現レベルに基づく新規な遺伝子シグネチャーを記載する。一実施形態において、本実施例は、B-ALLにおけるCTL019療法に対する再発例とB-ALLにおけるCTL019療法に対する非再発例を区別する新規な遺伝子シグネチャーを記載する。

【1311】

本実施例は、本発明による使用のための、B-ALLにおけるCD19 CART療法(例えば、CTL019)に対する対象の再発を予測する新規な遺伝子サインを発見するための偏りのない特徴選択の方法を記載する。

【1312】

本実施例はまた、本発明に従って使用するための新規遺伝子シグネチャーを発見するための遺伝子セット分析の方法を記載する。

【1313】

B細胞急性リンパ芽球性白血病(B-ALL)におけるCD19 CART療法に対する対象の再発を予測する、再輸注前の製造されたCD19 CART製造試料におけるmRNA発現レベルに基づく新規な遺伝子シグネチャーが同定された。同定されたシグネチャーは、7つのB-ALL対象試料を含む製造された製造物試料の全ゲノムRNAseq研究において発見された。B-ALL対象試料(全7つ)は以下のように層別化された: 生物学的試料は、CTL019療法後に再発しなかった4人の対象(「非再発例」)およびCTL019治療後に再発した3人の対象(「再発例」)から採取された。製造された製造物試料における、応答例と非応答例、および再発例と非再発例を区別するいくつかの遺伝子シグネチャーが発見され、以下においてさらに詳細に記載される。

【1314】

次に、新規な遺伝子シグネチャーは、様々なデータ解析アプローチ：1) 不偏な特徴選択；2) 遺伝子セット分析；および3) 目的とする選択された遺伝子の差次的発現分析を用いて発見された。

【1315】

不偏の特徴選択に由来する新規な遺伝子シグネチャーは、3人の再発例と4人の非再発例比較した再発例と非再発例の2群比較の間にどの遺伝子が差次的に発現しているかを決定することにより発見された。遺伝子は、その差異発現が、0.25のFDR p値カットオフを有する2群比較において統計学的に有意であった場合、差別的に発現されると定義された。再発例対非再発例比較(N=17)の遺伝子リストを表29に一覧にする。2群統計モデルを適用して、メタ遺伝子が群間で統計的に異なるかどうかを判定し、そのア
10
プローチを例証する概模式図を図2に示す。図32は、CLLを有する、完全応答例(CR)、部分応答例(PR)および非応答例(NR)について、活性化された T_{EFF} 対休止 T_{EFF} 細胞において上方調節された遺伝子の例示的ヒートマップを示す。

【1316】

特定の理論に縛られることを望むものではないが、これらのデータは、CD19 CART製造物(例えば、CTL019)におけるT細胞の分化状態が、対象応答(すなわち、CR、PR、またはNR)と相関し、B-ALLにおけるCD19 CART療法(例えば、CTL019療法)に対して対象の再発を予測することを示す。完全な応答例の遺伝子シグネチャーは、 T_{REG} および T_{EFF} 細胞の休止によく類似する。とりわけ、再発例(例えば、CTL019療法に対して再発する完全応答例)の遺伝子シグネチャーは、休息
20
時に T_{REF} 細胞対 T_{EFF} 細胞において上方調節された遺伝子を含む。特定の理論に縛られることを望むものではないが、これらのデータは、B-ALLにおけるCART療法(例えば、CTL019)に対する再発例が、CART療法に対する非再発例(例えば、CTL019)と比較して、 T_{REG} のレベルが高いことを示す。図17は、 T_{REG} が、再発例(R)対非再発例において差次的に富化され、例えば、再発例が、完全応答例(CR)(例えば、非再発例)と比較して高レベルの T_{REG} 遺伝子を発現することを例証する例示的な結果を記載する。

【1317】

【表 3 9】

表29: CTL019療法に対する患者の再発を予測する例示的な遺伝子

遺伝子	miRBase	Unigene	アクセッション番号	FDR
MIR199A1	MI0000242		NR_029586.1	2.11E-05
PPIAL4D		Hs.730589	NM_001164261.1	3.94E-05
MIR1203	MI0006335		NR_031607.1	4.63E-03
uc021ovp				6.73E-03
ITM2C		Hs.111577	NM_001012514.2 NM_001012516.2 NM_001287240.1 NM_001287241.1 NM_030926.5	1.17E-01
HLA-DQB1		Hs.409934 Hs.534322	NM_001243961.1 NM_001243962.1 NM_002123.4	1.17E-01
TTY10		Hs.461175	NR_001542.1	1.25E-01
TXLNG2P		Hs.522863	NR_045128.1 NR_045129.1	2.27E-01
MIR4650-1	MI0017277		NR_039793.1	2.27E-01
KDM5D		Hs.80358	NM_001146705.1 NM_001146706.1 NM_004653.4	2.27E-01
USP9Y		Hs.598540	NM_004654.3	2.27E-01
PRKY		Hs.584730	NR_028062.1	2.27E-01
RPS4Y2		Hs.367761	NM_001039567.2	2.27E-01
RPS4Y1		Hs.282376	NM_001008.3	2.27E-01
NCRNA00185		Hs.138453 Hs.729534 Hs.734681	NR_001543.3 NR_125733.1 NR_125734.1 NR_125735.1 NR_125736.1 NR_125737.1	2.28E-01
SULT1E1		Hs.479898	NM_005420.2	2.33E-01
EIF1AY		Hs.461178	NM_001278612.1 NM_004681.3	2.38E-01

【1318】

以下の遺伝子：MIR199A1、MIR1203、uc021ovp、ITM2C、およびHLA-DQB1は、再発例においてレベルの増加および非再発例においてレベルの減少を示した。以下の遺伝子：PPAL4D、TTY10、TXLNG2P、MIR4650-1、KDM5D、USP9Y、PRKY、RPS4Y2、RPS4Y1、NCRNA00185、SULT1E1、およびEIF1AYは、再発例においてレベルの減少および非再発例においてレベルの増加を示した。

【1319】

遺伝子セット分析は、B-ALLにおけるCTL019療法に対する対象の再発を予測する多数の遺伝子シグネチャーを提供した。

【1320】

とりわけ、本実施例は、B-ALLにおけるCD19 CART療法（例えば、CTL

10

20

30

40

50

019) に対する患者 (patent) の再発を予測する、遺伝子セット分析に基づく新規な遺伝子シグネチャーを記載する。遺伝子セット分析は、3つの遺伝子セットに基づいて行われた。すなわち、遺伝子セットは、(1) 追加の実験が、Szaboらによる未公開の実験(以下に記載)に基づく；(2) Genome Research 2005においてAbbasらによって公開された遺伝子セット；および(3) Nature Medicine 2011においてGattinoniらによって公開された遺伝子セットから供給された。遺伝子セットは、Szabo、Abbas、およびGattinoniによって定義され、米国仮特許出願第62/061553号の実施例1に記載されるこの分析において考慮された。

【1321】

Szaboコア遺伝子セットは、Teff細胞(16時間v0時間)において上方調節される以下の遺伝子：AIM2、ALAS1、B4GALT5、BATF、C3orf26、C4orf43、CCL3、CCL4、CCT3、CCT7、CD40LG、CHAC2、CSF2、CTNNA1、EBNA1BP2、EDARADD、EEF1E1、EIF2B3、EIF2S1、FABP5、FAM40B、FKBP4、FOSL1、GFOD1、GLRX2、HSPD1、HSPE1、IFNG、IL15RA、IL21、IL2RA、IL3、KCNK5、KIAA0020、LARP4、LRP8、LTA、MANF、MIR1182、MIR155、MIR155HG、MTCH2、MYOF、NDUFAF1、NLN、NME1、NME1-NME2、OTUD7B、PAM、PDIA6、PEA15、PFKM、PGAM1、PGAM4、PPIL1、PRDX4、PRSS23、PSMD1、PSMD11、PSMD14、PTRH2、PUS7、RBBP8、RPF2、RPP25、SFXN1、SLC27A2、SLC39A14、SLC43A3、SORD、SPR、SRXN1、STIP1、STT3A、TBX21、TMC2、TMEM165、TNFRSF9、TXN、TXNDC5、UCK2、VDR、WDR12、YWHAG、およびZDHHC16を含む。また、Szaboコア遺伝子セットは、Treg細胞(16時間v0時間)において上方調節される以下の遺伝子：AIM2、ALAS1、BATF、C5orf32、CCL17、CD40LG、CHAC2、CSF1、CTSL1、EBNA1BP2、EDARADD、EMP1、EPAS1、FABP5、FAM40B、FKBP4、FOSL1、GCLM、GK、GPR56、HMOX1、HSPD1、HSPE1、IKBIP、IL10、IL13、IL15RA、IL1RN、IL2RA、IL3、IL4、IL5、IL9、KCNK5、LTA、MANF、MIR1182、MIR155、MIR155HG、MYOF、NDUFAF1、NLN、NME1、NME1-NME2、PANX2、PDIA6、PGAM4、PPIL1、PPPDE2、PRDX4、PRKAR1B、PSMD1、PSMD11、PUS7、RBBP8、SLC27A2、SLC39A14、SLC43A3、SRXN1、STIP1、STT3A、TBX21、TNFRSF11A、TNFRSF1B、TNFRSF8、TNFRSF9、TXN、UCK2、VDR、VTRNA1-3、WDR12、YWHAG、ZDHHC16、およびZNF282を含む。

【1322】

各遺伝子セット(例えば、Szabo遺伝子セット、Abbas遺伝子セット、およびGattinoni遺伝子セット)を評価して、以下の方法において対象応答(すなわち、再発例または非再発例)との関連性を決定した：メタ遺伝子は各対象について計算され、ここで、対象jについてのメタ遺伝子スコアは、以下のように定義された。

【1323】

【数1】

$$m_j = \sum_{i=1}^G \frac{x_{ij} - \mu(x_j)}{\sigma(x_j)}$$

式中、 x_{ij} は、所与の遺伝子セット $n=1, \dots, G$ について対象jにおける遺伝子iの発現値であり、 $\mu(x_j)$ は、対象jにおける遺伝子1、 $\dots$ 、Gの平均であり、 $\sigma(x_j)$ は、対象jにおける遺伝子1、 $\dots$ 、Gの標準偏差である。

【1324】

2群統計モデルを各遺伝子セットに適用して、メタ遺伝子が、再発例と非再発例の製造されたCTL019製造物間で統計的に異なるかどうかを決定した。このアプローチを示す模式図を図16に示す。Szabo、Abbas、およびGattinoni遺伝子セットのうち、再発例と非再発例の間に有意に差次的に富化された1つの遺伝子セットがあった。この遺伝子セットは、Szabo回収に由来し、休止時に T_{REF} 細胞対 T_{EFF} 細胞において上方調節された遺伝子を含み、CTL019療法に対する患者の再発と相関した。具体的には、この遺伝子セットは、再発例において富化されることが見出され、再発例は、非再発例と比較してより高いレベルの T_{REGS} を有することが示された。例えば、 T_{EFF} 細胞と比較して T_{REG} において上方調節された遺伝子を含む遺伝子セットのメタ遺伝子スコアは、製造物試料における患者の再発と相関することが見出された（図17参照）。図17は、 T_{REG} 遺伝子が、非再発例の完全応答例（CR）と比較して、再発例（R）において高い発現レベルを有することを示す例示的な結果を記載する（ $p=0.000215$ ）。x軸は、応答例群による試料であり、この場合、CR＝完全応答例であり、R＝再発例である。y軸は、標準化されたメタ遺伝子発現スコアである。

10

【1325】

特定の理論に縛られることを望むものではないが、これらのデータは、アフェレーシスに先立って、またはCART製造物の製造中に患者における T_{REG} シグネチャーを減少させることが、患者の再発のリスクを有意に減少させることを示す。

20

【実施例13】

【1326】

挿入突然変異は、B細胞急性リンパ芽球性白血病（B-ALL）におけるCTL019治療に対する耐性の機構である

いくつかの耐性機構は、ベースライン時および再発後に採取されたB-ALL患者試料由来のmRNA配列決定データを比較することによって発見された。ある種の耐性機構は「CD19-再発」と呼ばれ、すなわち、患者の腫瘍細胞は、フローサイトメトリーによって測定された、CTL019において使用されるFMC63エピトープに結合しないため、CD19-として特徴付けられる。いくつかの耐性機構が発見されており、本実施例において詳細に記載される。

30

【1327】

mRNA配列決定（RNAseq）は、CTL019処置前および再発後のB-ALL患者の転写プロファイルと比較するために行われた。再発時にCD19-であった1人の患者（患者#29）、および再発時にCD19+であった2人の患者（患者#104および#105）の3人の患者が考慮された。患者のリスト、それらの分類、および両方の時点での白血病のパーセンテージについては、以下の表30を参照されたい。

【1328】

【表40】

表30.

試料	再発のタイプ	BMにおける白血病%、ベースライン	BMにおける白血病%、再発
患者#29	CD19-	N/A	N/A
患者# 104	CD19+	33%	98.5%
患者# 105	CD19+	46% CART前	65%

40

【1329】

CD19遺伝子のRNAseqデータの分析は、いくつかの注目すべき観察結果を示した。

【1330】

3つの挿入がCD19のエキソン2に見出された。挿入は、患者#29の再発試料にお

50

いてのみ見出された。3つの挿入のいずれか、またはC D 1 9のエキソン2における他の挿入を支持する読み取りは、他の2人の患者においておよび患者# 2 9のベースライン時に観察されなかった。ゲノムの位置および実際の挿入を以下の表3 1に示す。

【1 3 3 1】

【表4 1】

表3 1.

挿入	位置	野生型	挿入された配列
1	28943706	C	C→CA
2	28943707	A	A→AT
3	28943811	T	T→TTTGG

10

【1 3 3 2】

3つの挿入の長さは、それぞれ1、1、および4塩基長であり、全てのフレームシフト挿入である可能性が高い。3つ全ての挿入は、エキソン2内の早期終止コドンを生じる（挿入1および2については、新しい終止コドンはc h 1 6 : 2 8 9 4 3 7 5 2で起こり、挿入3については、c h 1 6 : 2 8 9 4 3 8 8 7で起こる）。以下の表3 2は、挿入および野生型、ならびに関連するパーセンテージを支持する読み取りの数を列挙する。最も一般的な挿入は「挿入3」であり、これは4塩基の挿入であり、約30%生じる。さらに、1を超える挿入にまたがる15対の読み取りのうち、対になった読み取りのいずれも1を超える挿入を含んでおらず、これは、挿入が相互に排他的であることを示唆している。

20

【1 3 3 3】

【表4 2】

表32.

試料	Ins1 (Ins, wt)	Ins2 (Ins, wt)	Ins3 (Ins, wt)
29B	0, 62	0, 62	0, 50
29R	21, 308	4, 327	67, 151
104B	0, 69	0, 69	0, 79
104R	0, 392	0, 398	0, 413
105B	0, 42	0, 42	0, 63
105R	0, 184	0, 185	0, 212

30

【1 3 3 4】

この表において、「試料」は、ベースライン試料については「B」、または再発時に採取される試料については「R」が続く患者番号を列挙する。Ins 1と表示された列は、Ins 1（左の番号）対その位置での野生型配列（右の番号）を示す読み取りの数を示す；Ins 2と表示された列は、Ins 2（左の番号）対その位置での野生型配列（右の番号）を示す読み取りの数を示す；Ins 3と表示された列は、Ins 3（左の番号）対その位置での野生型配列（右の番号）を示す読み取りの数を示す。この表は、患者2 9のみがこれら3つの挿入を示し、挿入は再発時にのみ観察されたことを示す。これらの結果は、C D 1 9のエキソン2における挿入が一部の患者において耐性をもたらすことを示唆している。

40

【1 3 3 5】

この研究は、B-A L LにおけるC T L 0 1 9療法に対する耐性機構、すなわち、腫瘍細胞がC D 1 9-になり、C D L 0 1 9治療に耐性となるC D 1 9のエキソン2における挿入であることを同定した。この観察は、C D 1 9以外の標的、例えば、C D 2 0、C D 2 2、およびR O R 1に対するC A RとのC T L 0 1 9組合せ戦略のための支持を提供する。

【実施例1 4】

50

【1336】

再発したALL患者におけるB細胞抗原の発現

種々のB細胞抗原の発現は、以前にCAR療法以外の癌療法で治療された、すなわち、いずれものCAR療法で治療されていなかった、再発性急性リンパ芽球性白血病（ALL）癌患者において測定された。

【1337】

方法

試料は、同定されていない原発性ヒトALL骨髓（BM）および末梢血（PB）標本として得られた。抗ヒト抗体は、Abcam、Biolegend、Invitrogen、eBioscience、またはBecton Dickinsonから購入された。単核細胞はフィコール分離により単離され、2%ウシ胎仔血清が補充されたPBSで1回洗浄され、室温で15分間染色された。細胞数定量のために、Countbright（Invitrogen）ビーズを製造者の指示に従って使用した。全ての分析において、目的とする集団に順方向対側方散乱特性、続くシングレットゲーティングに基づいてゲートをかけ、生存細胞にLive Dead Aqua（Invitrogen）を用いてゲートをかけた。品質管理のためにタイムゲーティングが含まれた。動物研究のために、マウス抗CD45抗体（Biolegend）は、マウス白血球をゲートアウトするために添加された。CD22の表面発現は、クローンHI B22由来の抗CD22モノクローナル抗体（Biolegend）を用いて染色することにより検出された。CD123の表面発現は、クローン6H6由来の抗CD123モノクローナル抗体（eBioscience）を用いて染色することにより検出された。FLT3の表面発現は、クローンIM2234U由来の抗FLT3モノクローナル抗体（Beckman Coulter）を用いて染色することにより検出された。ROR1の表面発現は、クローン2H6由来の抗ROR1モノクローナル抗体（Abcam）を用いて染色することにより検出された。CD79bの表面発現は、クローンCB3-1由来の抗CD79bモノクローナル抗体（Biolegend）を用いて染色することによって検出された。CD79aの表面発現は、クローンHM47の抗CD79aモノクローナル抗体（R&D Systems）を用いて染色することにより検出された。CD10の表面発現は、クローンeBioCV-CALLA由来の抗CD10モノクローナル抗体（eBioscience）を用いて染色することにより検出された。CD34の表面発現は、クローン561の抗CD34モノクローナル抗体（Biolegend）を用いて染色することにより検出された。CD20の表面発現は、クローンL27由来の抗CD20モノクローナル抗体（BD Biosciences）を用いて染色することにより検出された。抗体結合能（ABC）単位における細胞抗原発現の定量は、標準的手順（<http://static.abdserotec.com/uploads/ifu/fcsc815b.pdf>）に従って、Quantum（商標）Simply Cellular（登録商標）（Bangs Lab., Inc）を用いて行われた。フローサイトメトリーは、4レーザーFortessa-LSRサイトメーター（Becton-Dickinson）で行われ、FlowJo X 10.0.7r2（Tree Star）を用いて分析された。

【1338】

結果

再発したALL患者において、いくつかのB細胞抗原が発現され、例えば、CD19、CD22、CD123、FLT-3、CD10、およびCD34が含まれる。図22を参照されたい。

【1339】

潜在的な追加のB細胞急性リンパ芽球性白血病（B-ALL）標的を同定するために、16r/r患者由来の試料は、以下のマーカー：CD19（16pts）、CD22（16pts）、CD123（16pts）、FLT-3（9pts）、ROR-1（3pts）、CD79b（15pts）、CD179b（8pts）、CD79a（16pts）、CD10（16pts）、CD34（16pts）、およびCD20（16pts）

について多様性フローサイトメトリーによりスクリーニングされた。CD 2 2 および CD 1 2 3 は、r / r A L L 患者の芽球において高く (> 6 0 %) および均一に発現された (バーは発現 % 中央値を示し、それぞれ 9 9 . 5 0 %, 9 8 . 8 0 %, 9 5 . 7 0 %, 7 2 . 0 0 %, 4 7 . 0 0 %, 1 5 . 0 0 %, 1 3 . 4 5 %, 4 . 2 0 0 %, 9 8 . 0 0 %, 8 7 . 6 5 % および 7 . 0 0 %) (図 2 2)。

【実施例 1 5】

【1 3 4 0】

再発した CD 1 9 陰性癌患者における B 細胞抗原の発現

様々な B 細胞抗原の発現は、以前に CD 1 9 C A R で治療され、CD 1 9 陰性腫瘍で再発した患者において測定された。実施例 1 4 の方法に従ってフローサイトメトリーを使用して、抗原の発現を決定し、図 2 3 に示されるゲーティング戦略を用いた。

【1 3 4 1】

CD 2 2 および CD 1 2 3 の発現は、C A R T 1 9 処置前 (ベースライン) および処置後 (CD 1 9 陰性再発) の両方で、CD 1 9 陰性白血病で再発した 6 人の患者由来の BM および PB 試料において分析された。全ての分析において、目的とする集団に順方向対側方散乱特性、続くシングレットゲーティングに基づいてゲートをかけ、生存細胞に Live Dead Aqua (Invitrogen) を用いてゲートをかけた。品質管理のためにタイムゲーティングが含まれた。ゲーティング戦略には、タイムゲーティング → S S C 低 → シングレット → 生存 → CD 4 5 d i m → CD 1 0 + を含んだ。

【1 3 4 2】

結果

CD 1 9 陰性になったほとんど全ての患者は、CD 2 2 陽性と CD 1 2 3 陽性の両方のままであった。図 2 4 および図 2 5 を参照されたい。結果は、図 2 6 に要約され、CD 1 9 C A R T 処理は CD 1 9 発現の喪失を生じるが (フローサイトメトリーによって測定される)、CD 2 2 および CD 1 2 3 の発現は高いままであることを実証する。

【実施例 1 6】

【1 3 4 3】

難治性 B 細胞悪性腫瘍における自己 CD 2 2 転嫁された C A R T 細胞による拡大されたアクセス治療

再発 / 難治性 (r / r) B 細胞急性リンパ芽球性白血病 (A L L) は、小児および成人患者両方の予後不良と関連している。抗 CD 1 9 キメラ抗原受容体 T 細胞 (C A R T 1 9、C T L 0 1 9) または二重特異性抗 CD 1 9 / CD 3 抗体 (ブリナツモマブ) などの白血病性芽球に関する CD 1 9 を標的とする新規療法は、この集団において有意な応答を誘発する。しかしながら、CD 1 9 陰性の再発は、C A R T 1 9 またはブリナツモマブ療法後の患者の 5 ~ 1 0 % で報告されている。

【1 3 4 4】

方法

細胞株および原発性試料

A L L 細胞株である N A L M - 6 の細胞は、1 0 % ウシ胎仔血清、ペニシリン、およびストレプトマイシンを補充した R P M I 培地を用いて培養液中に維持された。いくつかの実験について、N A L M - 6 細胞は、ルシフェラーゼ / G F P + を形質導入され、次に選別して > 9 9 % の陽性集団を得た。急性骨髄性白血病細胞株である M O L M - 1 4 または K 5 6 2 および T - A L L 細胞株である J U R K A T は、CD 2 2 陰性対照として使用された。

【1 3 4 5】

同定されなかった原発性ヒト A L L 骨髄 (BM) および末梢血 (PB) 標本、ならびに C A R T - 1 9 療法後に再発した 2 人の患者由来の BM および PB 試料を得た。C A R T - 1 9 で処置され、CD 1 9 陰性白血病で再発した患者由来の全ての芽球は、ベースライン (I R 8 2、C A R T 1 9 療法前) および再発 (I R 2 4 3) で収集された。これら 2 つの時点からの原発性芽球は、N S G マウスにおいてインビボで拡大させ、いくつかの継

代後にルシフェラーゼ／GFPで形質導入された (Barrett, D et al. (2011) Blood 118 (15):e112-117)。全ての機能的研究について、ALL細胞は、分析の少なくとも12時間前に解凍され、37℃で静置された。

【1346】

CARコンストラクトおよびCAR T細胞の生成

CD22に対するキメラ抗原受容体 (CAR) は、抗CD22完全ヒトモノクローナル抗体m971 (Xiao, X et al. (2009) MAbs. 1(3):297-303) の生成について記載する米国特許出願第2011/0020344 A1号に記載される抗CD22一本鎖可変断片軽鎖 (L) および重鎖 (H) 鎖配列を用いて生成した。配列はコドン最適化され、2つの異なるCARコンストラクトは、2つの異なる可変鎖配向 (HからLおよびLからH) を使用して生成された。次に、これらの2つの抗CD22 scFvは、マウスCAR19骨格 (CD8ヒンジ、41BB共刺激ドメインおよびCD3ゼータシグナリングドメイン) にクローニングされ、続いてpTRPEレンチウイルスベクターにクローニングされた。マウスCAR19は、以前に記載されたように生成させた (Milone, M et al. (2009) Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy 17(8):1453-1464)。

【1347】

CAR陽性T細胞の生成は、以前に記載されたように行われた (Gill, S et al. (2014) Blood 123(15):2343-2354)。正常なドナーCD4陽性T細胞およびCD8陽性T細胞は、1対1のCD4対CD8の比で 1×10^6 /mlの濃度にて播種され、培養1日目で添加され、6日目で除去される、X-vivo 15培地 (Lonza、04-418Q)、ヒト血清AB5% (Gemini、100-512)、ペニシリン/ストレプトマイシン (Gibco、15070063) およびGlutamax (Gibco、35050061) 中で、抗CD3/CD28 Dynabeads (Life Technologies、11161D) を用いて拡大された。T細胞は、2日目にトランスフェクションされたCAR22、CAR19または模造物のいずれかを保有するレンチウイルスを用いて形質導入された。T細胞は、10~15日間、培養液中で拡大され、細胞容量の中央値が300f1以下になったときに回収された。次に、T細胞は、将来の実験のためにFBS10% DMSO中で凍結保存された。全ての実験前に、T細胞を解凍し、37℃で一晩静置した。

【1348】

多様性フローサイトメトリー分析

抗ヒト抗体は、Biolegend、eBioscience、またはBecton Dickinsonから購入した。細胞は、インビトロ培養からまたは動物から単離され、2%ウシ胎仔血清が補充されたPBSで1回洗浄され、室温で15分間染色された。細胞数定量的のために、Countbright (Invitrogen) ビーズを製造者の指示に従って使用した。全ての分析において、目的とする集団に順方向対側方散乱特性、続くシングレットゲーティングに基づいてゲートをかけ、生存細胞にLive Dead Aqua (Invitrogen) を用いてゲートをかけた。品質管理のためにタイムゲーティングが含まれた。動物研究のために、マウス抗CD45抗体 (Biolegend) は、マウス白血球をゲートアウトするために添加された。抗CD22 CARの表面発現は、CD22-Hisタンパク質 (11958-H08H-50) および抗His-APCモノクローナル抗体 (IC050A) を用いて染色することにより検出された。CAR19は、以前に記載されたように検出された (Kalos, M et al. (2011) Science translational medicine 3(95):95ra73)。抗体結合能 (ABC) 単位におけるCD19およびCD22細胞抗原発現の定量は、標準的手順 (<http://static.abdserotec.com/uploads/ifu/fcsc815b.pdf>) に従って、Quantum (商標) Simply Cellular (登録商標) (Bangs Lab., Inc) を用いて、NALM-6および対照について行われた。フローサイトメトリーは、4レーザーFortessa-LSRサイトメーター (Becton-Dickinson) で行われ、FlowJo X 10.0

． 7 r 2 (T r e e S t a r) を用いて分析された。

【1349】

脱顆粒化アッセイ

脱顆粒化アッセイは、以前に記載されたように行われた。T細胞は、T細胞培地中で1対5の比で標的細胞とともにインキュベートされた。抗CD107a-PECY7 (Biolengend)、抗CD28 (BD Biosciences)、抗CD49d (BD Biosciences) 抗体およびモネンシン (BD Biosciences) は、開始時間の30分後に共培養に添加された。4時間後、細胞を回収し、CAR発現、CD3、CD8、およびLive Dead Aqua染色 (Invitrogen) について染色された。細胞を固定し、透過性にし (Invitrogen Fix/Perm緩衝液)、次に細胞内染色を行い、複数のサイトカイン (IFN、TNFα、IL-2、GM-CSF、MIP1b) を検出した。

10

【1350】

増殖アッセイ

T細胞を洗浄し、100 μlのPBS中に $1 \times 10^7 / \text{ml}$ で再懸濁し、100 μlのCFSE 2.5 μM (Invitrogen) を用いて5分間、37℃で染色した。次に、反応を冷培地で停止させ、細胞を3回洗浄した。標的は、100 Gyの線量で照射された。T細胞は、照射された標的細胞とともに1対1の比で120時間インキュベートされ、24時間で培地を添加した。次に、細胞を回収し、CD3、CARおよびLive Dead Aqua (Invitrogen) について染色し、Countbright ビーズ (Invitrogen) は、絶対定量のためにフローサイトメトリー分析の前に添加した。

20

【1351】

細胞毒性アッセイ

ルシフェラーゼ/GFP+NALM-6細胞または原発性ALL試料は、以前に記載されたように細胞毒性アッセイのために使用された。4つの標的は、示された比でエフェクターT細胞とともに4時間または16時間インキュベートされた。死滅は、Xenogen IVIS-200 Spectrumカメラによる生物発光イメージングまたはフローサイトメトリーのいずれかによって計算された。後者について、細胞を回収し、Countbright ビーズおよび7-AAD (Invitrogen) を分析前に添加した。残存した標的生細胞は、CFSE陽性の7-AAD陰性であった。

30

【1352】

サイトカイン測定

エフェクター細胞および標的細胞は、T細胞培地中で1対1の比で24時間、同時インキュベートされた。上清を回収し、製造業者のプロトコル (Invitrogen) に従って、30-プレックスLuminexアレイ (Luminex Corp、FLEXMAP 3D) により分析された (Kalos, M et al. (2011))。

【1353】

インビボ実験

NOD-SCID-γ鎖-/- (NSG) マウスを得た。全ての実験は、ペンシルベニア大学の施設動物管理および使用委員会 (IACUC) によって承認されたプロトコルで行われた。利用された異種移植モデルの概説は、結果セクションで詳細に論じられる。示された濃度の200 μlのPBS中の細胞 (NALM-6またはT細胞) がマウスの尾静脈に注射された。生物発光イメージングは、Xenogen IVIS-200 Spectrumカメラを使用して実施され、Living Imageソフトウェアv4.3.1 (Caliper Life Sciences) を用いて分析された。動物は、IACUCの方針に従って、実験終了時または必要に応じて安楽死させた。

40

【1354】

免疫組織化学

28個のヒト正常組織 (脂肪、副腎、虫垂、小脳、子宮頸部、結腸、子宮内膜、食道、

50

脂肪、心臓、腎臓、肝臓、リンパ節、肺、筋肉、卵巣、膵臓、副甲状腺、胎盤、前立腺、唾液、脊髄、脾臓、胃、精巣、胸腺、甲状腺、扁桃)の組織マイクロアレイ(TMA)は、CD22の腫瘍外(off-tumor)発現を評価するために実施された(三連)。ホルマリン固定され、パラフィン包埋された組織の免疫組織化学的(IHC)染色は、Bond Polymer Refine Detection Systemを用いてLeica Bond-III機器で行われた。CD22に対する抗体(クローンFPC1; Leica PA0249)は、希釈せずに使用した。熱誘導エピトープ回収は、ER2溶液(Leica Microsystems AR9640)を用いて20分間行われた。画像は、Aperio ScanScope(商標)を使用してデジタルで取得された。

【1355】

10

遺伝子発現プロファイリング

公的に入手可能なRNA発現データベース(GeneAtlas U133A、gc)は、CD22発現のためのBioGPS.orgウェブサイトを用いて分析された。中央値CD22 RNA発現は、75種の異なるヒト正常細胞型および7つの腫瘍細胞株について報告された(図39参照)。

【1356】

51-クロム放出アッセイ

可能性のある腫瘍外CART22毒性について評価するために、正常なヒト組織(CD34+、ヒトニューロン、ヒトニューロン前駆細胞、ケラチノサイト)および対照としてのK562またはNALM-6を標的としてクロム放出アッセイを行った。標的細胞は、51Cr 50 μ Ci/0.5e6細胞とともに1~2時間、37℃でインキュベートされた。細胞を洗浄し、異なるE対T比でエフェクター細胞とともに3連で播種した。4時間のインキュベーション後、各ウェルからのアリコートリーダープレートに入れ、一晩乾燥させた。翌日、クロム放出は、1450マイクロベータプラス液体シンチレーションカウンターを用いて定量された。

20

【1357】

結果

【1358】

【表43】

表 33: ドナーおよび CART22 評価に実施されたそれぞれの実験の要約

30

ドナ ー	増殖	脱顆粒+ i.c.サ イトカイン	増殖+ ルミ ネックス	死滅	インビ ボ	毒性ス クリー ニング
1	✓	✓ X2	✓ X2	✓ X2	✓	
2	✓	✓				
3	✓				✓	✓
4	✓					
5	✓				✓	

40

【1359】

潜在的なB-ALL標的を同定するために、CART19療法による治療後に16人のr/r患者およびCD19陰性疾患で再発した4人の患者由来の試料は、B細胞マーカーCD22について多様性フローサイトメトリーによってスクリーニングされた。CD22は、11/15 r/r ALL患者の芽球において高く(>60%)および均一に発現された(図27A)。CD22はまた、CART19処置前(ベースライン)と後(CD19陰性再発)(2pts示される)の両方において、CD19陰性白血病で再発した4人

50

中4人の患者において陽性であった(図27B)。(ゲーティング戦略: SSC低→シングルレット→生存→CD45dim)。

【1360】

異なる鎖配向(HからLおよびLからH)を用いて生成されたCAR22コンストラクトの概要を図28Aに示す。抗CD22 scFv(m971)をコドン最適化し、CD8ヒンジ、41-BB共刺激およびCD3ゼータシグナリングドメインを含有するマウスCAR19ベクターにクローニングした。NALM6 ALL細胞株におけるCD19、CD22およびアイソタイプ対照の発現は、平均蛍光強度(MFI)(図28B)および抗体結合能(ABC)として示される(図28C)。本明細書に提示される結果は、NALM-6細胞において、CD19の発現がCD22よりも高いことを実証する。しかしながら、ほとんどの原発性ALL試料において、CD19およびCD22の発現は類似している(図28A参照)。

10

【1361】

CART22およびCART19(非形質導入細胞(UTD)とともに)を生成するための正常なドナーT細胞の増殖を行った。集団倍加時間およびT細胞容量は、培養日数に対して測定された。増殖の終了時(培養11日目)に、CART22および対照のT細胞は、約4.5の集団倍加(PD)に達し、CART19またはUTD細胞との比較で有意差はなかった(図29A)。培養6日目に、ピーク容量は約450flであったが、後日、容量は、細胞が回収され、凍結されたときに300flまで低下した(図29B)。CART19またはUTDと比較して、有意差は観察されなかった。CD4陽性およびCD8陽性T細胞におけるCAR発現は、増殖の11日目にフローサイトメトリーにより観察された(図29C)。CAR発現についてのゲーティングは、UTDに基づいている。(ゲーティング戦略: FSS対SSCリンパ球→シングルレット→生存→CD3+)。

20

【1362】

細胞質内サイトカイン産生によるCD107a脱顆粒アッセイを行った。CART19、CART22 HtoLおよびLtoHは、異なる標的(単独、PMA/イオノマイシン、MOLM-14およびNALM-6)とともに共培養された。CART19およびCART22 HtoLは、ALL細胞株(NALM-6)と共培養した場合であり、陰性対照と共培養しなかった場合は、高レベルのCD107a脱顆粒、IL-2、IFN γ およびTNF α 産生を示した(図30)。UTDおよびCART22 LtoHは、脱顆粒およびサイトカイン産生を示さない(図30)。(ゲーティング戦略: FSS対SSCリンパ球→シングルレット→生存→CD3+)。

30

【1363】

ルシフェラーゼに基づく死滅アッセイにおいて、24時間、共培養した場合、UTDではなく、CART22およびCART19 HtoLは、NUTM-6細胞を溶解することができた(図31)。細胞毒性活性とE対T比の間の直接相関が観察され、2対1のE対T比でより良好な抗白血病効果であった(CART19およびCART22について78%および75%の死滅)。

【1364】

CFS Eに基づく増殖アッセイにおいて、ALL細胞株であるNALM-6とのCART22およびCART19の5日間の共培養は、有意なT細胞増殖(それぞれ94%および92.9%)をもたらした。対照もまた示される(TCM=培地単独、P-I=PMA/イオノマイシン、MOLM-14)(図32A)。CART19およびCART22におけるCFS E希釈の動態を示すヒストグラムは、ほとんどのT細胞が複数の増殖サイクルを経たことを実証する(図32B)。(ゲーティング戦略: FSS対SSCリンパ球→シングルレット→生存→CD3+)

40

【1365】

CART22、CART19およびUTD細胞は、異なる照射標的(単独、PMA/イオノマイシン、MOLM-14およびNALM-6)とともに24時間インキュベートされた。ALL細胞株であるNALM-6とともに共培養した場合、CART22およびC

50

ART19 Ht o Lのみが、複数のサイトカイン（ここではIFN γ 、IL-2、GM-CSF、TNF α およびMIP1 β を示す）を放出することができた（図33）。

【1366】

CART22、CART19およびUTD細胞は、ベースライン時、および患者がCD19陰性疾患で再発した場合にはCART19処置後に、ALL患者由来の芽球（CHP-959-101）とともに4時間、同時インキュベートされた。脱顆粒を測定した。CART19とCART22はともに、ベースライン時（芽細胞がCD19+およびCD22+である）に脱顆粒することができたが、再発時にはCART22のみが脱顆粒された（疾患がCD19陰性の場合）（図34A）。CD107a脱顆粒は、再発時にCHP101試料を伴うインキュベーション後に、CD8陽性およびCD8陰性CART19およびCART22エフェクターにおいて測定された。CART22のみが、CD8とCD4 T細胞の両方で脱顆粒を示した（図34B）。（ゲーティング戦略：FSS対SSCリンパ球→シングレット→生存→CD3+）。

【1367】

NALM-6に対するインビボCART22の有効性は、以下のように評価された：100万個のNALM-6ルシフェラーゼ+細胞/マウスをi.v.でNSGマウスに注射した。6日後、腫瘍の生着を生物発光によって評価した。次に、マウスは、無作為化され、非形質導入T細胞または異なる用量のCART22（75%CAR発現で1.25~500万の総細胞/マウス）を受けた。その後、マウスは、腫瘍負荷、PB T細胞増殖、および生存についてモニターされた（図35A）。生物発光（BLI）による腫瘍負荷を測定し、用量関連の抗白血病応答が観察された。5e6個のCART22細胞を受けたマウスは、より良好な腫瘍制御を示した（図35B）。CART22処置されたマウスは、UTD処置されたマウスと比較して、統計的に有意に良好な全生存期間（OS）を示した。OSについても、より高い用量のCART22とより良好なOSの間に有意な相関があった（図35C）。T細胞のインビボ増殖は、眼窩後出血により毎週モニターされた。T細胞注入の1週間後、高用量のCART22を受けたマウスは、より良好なCART増殖（12T細胞/ μ lの中央値）を示した（図35D）。

【1368】

NALM-6に対するCART22とCART19間のインビボ比較を、以下のように評価した：100万個のNALM-6ルシフェラーゼ+細胞/マウスをNSGマウスに静脈内注射した。6日後、腫瘍の生着を生物発光によって評価した。次に、マウスは、無作為化され、非形質導入T細胞、CART19またはCART22（500万の全細胞、75%のCAR発現）を受けた。その後、マウスは、腫瘍負荷、PB T細胞増殖、および生存についてモニターされた（図36A）。生物発光（BLI）による腫瘍負荷は測定され、抗白血病応答は、CART22とCART19で処置されたマウスの両方において観察されたが、一方で、UTDマウスは急速に進行した（図36B）。CART19で処置されたマウスは、おそらくNALM-6（CD19>>CD22）における異なる標的発現のために、CART22と比較してより良好な全生存（OS）を示した（図36C）。

【1369】

CART22およびCART19は、原発性ALLのモデルにおいてインビボで比較された。初回ALL患者の芽球（JH331）をインビボで継代し、ルシフェラーゼで形質導入して腫瘍負荷を追跡した。100万個のJH331ルシフェラーゼ+細胞/マウスをNSGマウスにi.v.で注射した。14日後、腫瘍生着を生物発光によって評価した。次に、マウスは、無作為化され、非形質導入T細胞、CART19またはCART22（500万の全細胞、75%のCAR発現）を受けた。その後、マウスは、腫瘍負荷、PB T細胞増殖、および生存についてモニターされた（図37A）。生物発光（BLI）による腫瘍負荷は測定され、抗白血病応答は、CART22とCART19で処置されたマウスの両方において観察されたが、一方で、UTD細胞で処置されたマウスは急速に進行した（図37B）。

【1370】

CD22発現のための組織マイクロアレイは、免疫組織化学染色により28個のヒト正常組織について行われた。リンパ器官は、CD22発現に対して陽性であった（扁桃、リンパ節、脾臓および胸腺）（図38A）。全ての非リンパ様器官は、CD22の発現を示さなかった（図38B）。CD22陽性の常在性B細胞は、複数の組織において観察された（図38C）。

【1371】

CD22 RNA発現は、Gene Atlas U133Aからの発現データに示されるように、B細胞、扁桃およびリンパ節において高レベルで観察された。Bリンパ芽球および白血病／リンパ腫細胞株はまた高い陽性であった（図39）。

【1372】

UTD細胞ではなく、CART22とCART19の両方は、CART22毒性についての51クロム放出アッセイにおいて、ALL細胞株であるNALM-6の溶解を誘発した（図40）。CART22の細胞毒性効果は、正常組織（CD34+、ヒトニューロン前駆体またはニューロンおよびケラチノサイト）または対照（K562細胞株）においては観察されなかった。

【実施例17】

【1373】

抗原欠損再発の治療および予防のための抗CD123および抗CD19 CART細胞の組合せ

化学療法抵抗性または再発性（r/r）B細胞急性リンパ芽球性白血病（B-ALL）は予後不良と関連するが、最近示されたように、免疫系に高い感受性のままである。特に、抗CD19キメラ抗原受容体T細胞（CART19、CTL019）および二重特異性抗CD19／CD3抗体（ブリナツモマブ）は、この患者集団において45～90%の前例のない完全応答率を生じる。両方のアプローチは、自己T細胞を、CD19発現細胞を認識するように再誘導する。ブリナツモマブは、抗CD19一本鎖可変断片（scFv）と抗CD3 scFvを組み合わせた二重特異性コンストラクトの連続的な長期注入を使用する；CART19の場合には、T細胞は、T細胞受容体に融合した抗CD19 scFvを発現し、組み込みの共刺激ドメインを用いてシグナル伝達するように遺伝子改変される。最近の研究は、CTL019で処置されたr/r B-ALL患者の90%が完全寛解（CR）に達し、6カ月で78%が全生存期間（OS）であることが示された。CART19による有望な結果はまた、慢性リンパ球性白血病および非ホジキンリンパ腫などの他のB細胞新生物を有する患者において得られた。

【1374】

しかしながら、CART19またはブリナツモマブを用いて処置された患者の一部は再発を起こし、これらの再発のかなりの部分がCD19の喪失によって特徴付けられる。B-ALLにおいて、CD19陰性の再発は、CART19またはブリナツモマブ療法後の患者の10～20%で報告されており、他の治療法の設定においては報告されていない；ブリナツモマブ後の全体で約30%の再発、およびCART19後の最大50%の再発はCD19陰性である。CD19は、成熟B細胞へのB細胞発生の非常に初期の段階から発現されるプロトタイプのB細胞マーカーである。CD19欠損B細胞は選択的増殖の欠点を示すため、CD19はB細胞生物学において重要な役割を果たす。したがって、CD19の欠如は、B-ALLにおいて非常に独特な所見であり、強力なCD19指向性免疫療法の時期以前にごく稀な患者において報告されている。抗原喪失の可能性のある機構は現在調査中であり、これら強力な抗CD19薬剤による白血病サブクローンにおける選択圧によって引き起こされる可能性が最も高い。ブリナツモマブのFDAによる最近の承認とCTL019によるブレイクスルー状態のため、r/r B-ALLを有する増加する患者がこれらの薬剤を用いて治療される可能性が高い。したがって、CART19またはブリナツモマブ後にCD19陰性の芽球により再発する患者を治療できるようにするために、新規の有効な戦略が必要である。理想的には、新たなアプローチは、活性な抗原喪失の再発を有する患者を治療するだけでなく、先験的に使用される場合、それらの発生を潜在

10

20

30

40

50

的に防止することができる。

【1375】

インターロイキン-3受容体アルファ（またはCD123）は、造血に関与し、急性骨髄性白血病（AML）、急性リンパ性白血病（ALL）、形質細胞様樹状細胞新生物、ヘアリー細胞白血病、ホジキンリンパ腫を含むいくつかの血液学的新生物において発現されることが示されている。CD33（骨髄系）またはCD19（Bリンパ系）などの系統関連の表面抗原とは異なり、CD123は、造血前駆細胞およびAMLについて階層的に発現される。CD123は、初期治療後の化学療法および再発に対する耐性に関与する白血病幹細胞において発現される。これらの特徴により、CD123は、標的療法に大きな関心を示しており、IL3-ジフテリア毒素融合タンパク質（SL-401、DT388 IL3）、裸の抗CD123モノクローナル抗体（CSL-360、CSL-362）、抗体-薬物コンジュゲート、二重特異性抗体またはCD3Fv-IL3融合コンストラクト、およびより最近では、抗CD123キメラ抗原受容体T細胞などの複数の薬剤が開発されつつある。これらのアプローチのいくつかは、現在、臨床試験で検証されており、今後数年間でさらに多くが臨床において試験される。キメラ抗原レセプターT細胞（CAR T123）を用いてCD123を標的化することは、ヒト原発性AML異種移植において深度および長期の応答をもたらし、抗白血病T細胞メモリーを確立することができる。ここで、CD123は、CD19指向性療法後に生じるCD19陰性のB-ALL再発において発現され、CAR T19（CTL019）と併用されるCAR-123 T細胞は、B-ALL異種移植片における抗原喪失再発の治療および予防のための有効な療法である。

【1376】

材料および方法

細胞株および原発性試料。細胞株は、もともとATCC（バージニア州マナッサス）（K-562）またはDSMZ（ブラウンシュヴァイク、ドイツ）（MOLM-14およびNALM-6）から得られた。全ての細胞株は、マイコプラズマ汚染の存在について試験された（MycAlert（商標）Mycoplasma Detection Kit、LT07-318、Lonza、バーゼル、スイス）。いくつかの実験について、細胞株をホタルルシフェラーゼ/eGFPを用いて形質導入し、次に、選別して、>99%の陽性集団を得た。ルシフェラーゼ陽性K-562細胞株はまた、切断型CD19または切断型CD123を用いて形質導入され、それらのいずれも発現しない細胞株、CD19のみまたはCD123のみを得た。MOLM-14およびK562は、関連する図に示されるように対照として使用された。細胞株は、10%ウシ胎仔血清（FBS、Gemin i、100-106、West Sacramento、CA）と50UI/mlペニシリン/ストレプトマイシン（Gibco、Life Technologies、15070-063）が補充されたRPMI培地1640（Gibco、11875-085、Life Technologies、Grand Island、NY）を含む培養液中に維持された。同定されていない原発性ヒトALL骨髄（BM）および末梢血（PB）標本は、Institutional Review Board（IRB）プロトコールの下でペンシルベニア大学/フィラデルフィア小児病院の臨床実践から得られ、ペンシルベニア大学の幹細胞および異種移植片コアから購入されたか、または現在のCTL019臨床試験（ペンシルベニア大学の翻訳および相関試験研究所）の研究試料から購入された。全ての機能的な研究について、初代細胞は、実験の少なくとも12時間前に解凍され、37℃で静置させた。

【1377】

原発性B-ALL芽球のインビボでの増殖。D. M. Barrett, A. E. Seif, C. Carpenit o, D. T. Teachey, J. D. Fish, C. H. June, S. A. Grupp, G. S. Reid, Noninvasive bioluminescent imaging of primary patient acute lymphoblastic leukemia: a strategy for preclinical modeling. Blood 118, e112-117 (2011)に開示されている方法。

【1378】

蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（FISH）および免疫組織化学。FISH

10

20

30

40

50

分析および免疫組織化学は、記述されているように標準的な方法に従って行われた。(M. A. Belaud-Rotureau, M. Parrens, P. Dubus, J. C. Garroste, A. de Mascarel, J. P. Merlio, A comparative analysis of FISH, RT-PCR, PCR, and immunohistochemistry for the diagnosis of mantle cell lymphomas. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 15, 517-525 (2002))。FISH分析は、標準的な方法に従って行われた。簡単には、回収されたALL細胞を固定液(酢酸およびメタノール)に懸濁させ、スライド上に沈着させ、乾燥させた。二色遺伝子融合プローブBCR/ABL(Abbott Molecular)をハイブリダイゼーション緩衝溶液に適用した。スライドをカバーガラスに載せ、密封し、HYBr i t eチャンバー内に37℃で6時間放置した。密封剤およびカバーガラスを除去した後、スライドを2回洗浄し、プロットし、乾燥させ、DAPIで対比染色した。スライドを蛍光顕微鏡下で検査し、各標本において最小200核を評価した。

【1379】

CARコンストラクトおよびCAR T細胞の作製。マウス抗CD19キメラ抗原受容体(CD8ヒンジ、4-1BB共刺激ドメインおよびCD3ゼータシグナリングドメイン)を以前に記載されたように作製した。(Milone, et al., *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 17, 1453-1464 (2009) and Imai, et al., *Leukemia* 18, 676-684 (2004))。これは、ペンシルベニア大学のCTL019臨床試験において現在使用されているものと同じコンストラクトである。CAR123について、scFv抗CD123(1172コンストラクト(配列番号707、および国際出願第PCT/US2014/017328号に記載されている))を使用し、これはCAR19と同じ骨格のコンストラクトである。CARを発現するT細胞の生成は、以前に記載されたように行われた。(Gill, et al., *Blood* 123, 2343-2354 (2014))。正常ドナーであるCD4およびCD8 T細胞またはPB単核細胞(PBMC)は、ペンシルベニア大学のヒト免疫学コアから得た。T細胞は、1対1のCD4対CD8比で $1 \times 10^6 / \text{ml}$ にて播種され、培養1日目に添加され、6日目に除去される抗CD3/CD28 Dynabeads(Life Technologies、11161D)を用いて、ヒトAB血清5%(Gemini、100-512)、ペニシリン/ストレプトマイシン(Gibco、15070063)およびGlutamax(Gibco、35050061)が補充されたX-vivo 15培地(Lonza、04-418Q)中で増殖させた。T細胞は、2日目にレンチウイルスを用いて形質導入された。T細胞は、培養液中で8~15日間増殖され、細胞容量の中央値が300flを下回ったときに回収された。次に、T細胞は、将来の実験のために、10%DMSOを含むFBS中で凍結保存された。全ての実験前に、T細胞を解凍し、37℃で一晩放置した。

【1380】

多様性フローサイトメトリー。フローサイトメトリーは、以前に記載されたように行われた(Kenderian, et al., *Leukemia*, (2015))。抗ヒト抗体は、Biolegend、eBioscience、またはBecton Dickinsonから購入された。細胞は、インビトロ培養または動物から単離され、2%ウシ胎仔血清が補充されたPBSで1回洗浄され、15分間、室温で染色された。細胞数の定量について、Countbright(Invitrogen)ビーズを製造者の指示に従って使用した。全ての分析において、目的とする集団に順方向対側方散乱特性、続くシングレットゲーティングに基づいてゲートをかけ、生存細胞は、Live Dead Fixable Aqua(Invitrogen)を用いてゲートをかけた。品質管理のためにタイムゲーティングが含まれた。CAR19の表面発現は、抗イディオタイプ抗体を用いて、以前に記載されたようにして検出された。CAR123の検出は、ヤギ抗マウス抗体(Jackson Laboratories)またはCD123-Fc/His(Sino Biologicals)および抗His-APC(R&D)またはPE(AbCam)を用いて行われた。フローサイトメトリーは、4レーザーFortessa-LSRサイトメーター(Becton-Dickinson)で行われ、FlowJo X 10.0.7r2(Tr

ee Star) を用いて分析された。

【1381】

インビトロT細胞エフェクター機能アッセイ。脱顆粒、CFSE増殖、細胞毒性アッセイおよびサイトカイン測定は、以前に記載されたように行われた。(Gill, et al., Blood 123, 2343-2354 (2014) and Kalos, et al., Science translational medicine 3, 95ra73 (2011))。

【1382】

脱顆粒アッセイ。略述すると、T細胞は、T細胞培地中で1対5の比で標的細胞とともにインキュベートされた。抗CD107a-PECY7抗体(Biolegend)、抗CD28抗体(BD Biosciences)、抗CD49d抗体(BD Biosciences)およびモノニンシン(BD Biosciences)を共培養物に添加した。4時間後、細胞を回収し、CAR発現、CD3、CD8およびLive Dead Aqua染色(Invitrogen)について染色した。細胞を固定し、透過性にし(Invitrogen Fix/Perm緩衝液)、次に細胞内染色を行い、複数のサイトカイン(IFN、TNF α 、IL-2、GM-CSF、MIP1 β)を検出した。

【1383】

増殖アッセイ。T細胞を洗浄し、100 μ lのPBS中に 1×10^7 /mlで再懸濁し、100 μ lのCFSE2.5 μ M(Invitrogen)を用いて5分間、37℃で染色した。次に、反応を冷培地で停止させ、細胞を3回洗浄した。標的は、100Gyの線量で照射された。T細胞は、照射された標的細胞とともに1対1の比で120時間インキュベートされ、24時間で培地を添加した。次に、細胞を回収し、CD3、CARおよびLive Dead Aqua(Invitrogen)について染色し、Count brightビーズ(Invitrogen)は、絶対定量のためにフローサイトメトリ分析の前に添加した。

【1384】

細胞毒性アッセイ。ルシフェラーゼ/eGFP細胞株は、以前に記載されたように細胞毒性アッセイのために使用された。略述すると、標的は、示された比でエフェクターT細胞とともに24時間インキュベートされた。死滅は、Xenogen IVIS-200 Spectrumカメラによる生物発光イメージングによって計算された。

【1385】

サイトカイン測定。エフェクター細胞および標的細胞は、T細胞培地中で1対1の比で24時間、同時インキュベートされた。上清を回収し、製造業者のプロトコル(Invitrogen)に従って、30-プレックスLuminexアレイ(Luminex Corp、FLEXMAP 3D)により分析された。

【1386】

動物実験。インビボ実験は、以前に記載されたように行われた。(Kenderian, et al., Leukemia, (2015))。利用される異種移植片モデルのスキームは、関連する図、結果において詳述されている。もともとはJackson Laboratoriesから得られたNOD-SCID- γ 鎖-/- (NSG)は、ペンシルベニア大学の幹細胞および異種移植片コアから購入された。全ての実験は、実験動物のケアおよび使用についてのNIHガイドに従う施設動物管理および使用委員会(IACUC)によって承認されたプロトコル(#803230)に従って行われた。示された濃度の200 μ lのPBS中の細胞(白血病細胞株またはT細胞)がマウスの尾静脈に注射された。生物発光イメージングは、Xenogen IVIS-200 Spectrumカメラを使用して実施され、Living Imageソフトウェアv4.3.1(Caliper Life Sciences)を用いて分析された。動物は、IACUCプロトコルに従って、実験終了時またはあらかじめ指定されたエンドポイントを満たしたときに安楽死させた。

【1387】

多光子顕微鏡法。マウスを麻酔し、37℃の中心温度に維持した。頭皮を除去し、頭蓋骨を固定した後、骨髄を画像化した。イメージングは、ピコ秒レーザー(Coherent

10

20

30

40

50

t)を備えたLeica SP5 2光子顕微鏡システム(Leica Microsystems)を用いて行われた。各々のイメージング取得は、20分間続き、その後、マウス鎮静の評価を行った。CellTrace Violet、GFP、CellTrace Orange(またはTRITC)を850nmのレーザー光で励起した。画像は、20倍の水浸レンズを使用して得られた。得られた画像は、VoloCityソフトウェア(PerkinElmer)を用いて分析された。

【1388】

統計分析。全ての統計は、Windows用のGraphPad Prism 6、バージョン6.04(La Jolla, CA)を用いて指示通りに行われた。スチューデントt検定を用いて、2つの群を比較した；複数の群を比較した分析においては、複数比較のためにHolm-Sidak補正を用いて、一方向分散分析(ANOVA)を行った。複数の時点／比で複数の群を比較した場合、各時点／比についてスチューデントt検定またはANOVAを用いた。生存曲線を、対数ランク検定を用いて比較した。図中、アスタリスクを使用して、p値(*=<0.05、**=<0.01、***=<0.001、****=<0.0001)を表し、「ns」は「有意でない」ことを意味する(p>0.05)。各実験の統計の詳細は、図の凡例に列挙される。

【1389】

結果

CD123は、B-ALL、白血病幹細胞およびCD19陰性再発において発現される

B細胞急性リンパ芽球性白血病においてCD123の発現を評価するために、本発明者らの現在のCTL019臨床試験に登録された14人の対象を含む成人および小児のALL患者由来の42試料を分析した。図49A、49Bおよび49Cに示されるように、CD123は、ほとんどのALL芽球の表面上に高く、および均一に発現され、標的療法のための理想的な候補を示す。さらに、CD123はまた、CD34+CD38-として同定された推定の白血病幹細胞(LSC)において発現されることが見出される(図49C)。CD19陰性芽球の小さなサブセットが、一部のB-ALL患者において同定され得、悪性表現型の細胞を含む場合、これらの細胞は抗原喪失再発に寄与する可能性がある。CD19陰性サブセットにおける疾患の存在を評価するために、フィラデルフィア染色体陽性B-ALLバルク集団由来のCD19-CD123+細胞を選別した(CD45dim、図56Bに示すゲーティング戦略)。これらの細胞は、CD19+芽球よりも低い頻度であるにもかかわらず、BCR-ABL転座のクローンであることが見出された(図49D)。この知見は、CD19単独を標的とすることが、場合によっては、CD19-CD123+細胞に由来するサブクローン性再発をもたらす得ることを示す。さらに、この知見は、CD123を標的とすることが、LSCおよび場合によってはCD19陰性白血病クローンの排除により、より深い応答を導くことができることを示唆している。

【1390】

最後に、CD123の発現はまた、CD19の喪失を伴うCTL019後に再発するB-ALL患者の試料において評価された。重要なことに、CD19の完全な喪失とは対照的に、大部分の患者は、再発時にCD123発現を維持した(図49E、49Fおよび56C)。これらの知見は、CD123が、CART19またはブリナツモマブ後に起こるCD19陰性ALL芽球を標的とするための理想的なマーカーであることを示している。

【1391】

抗CD123キメラ抗原受容体T細胞は、インビトロおよびインビボにおけるヒトB-ALLに対して活性である

レンチウイルスを用いて形質導入され、抗CD3/CD28磁性ビーズとともに拡大させた抗CD123キメラ抗原受容体T細胞(CART123)を作製した。B急性リンパ芽球性白血病に対するCART123のインビトロおよびインビボ活性を本明細書に記載されるように評価した。

【1392】

CD19++およびCD123+であるB-ALL細胞株NALM-6(図50Aおよ

び57A)および原発性B-A L L試料を使用した。C A R T 1 2 3とC A R T 1 9の間のインビトロでの直接比較は、T細胞をN A L M-6または原発性A L Lと共培養した場合のC D 1 0 7 a脱顆粒の類似した比率を示した(図50B)。C A R T 1 2 3はまた、C A L 1 9と同様の有効性を有するN A L M-6細胞を用量依存的に死滅させることができた(図50C)。より長期の実験では、N A L M-6または原発性A L Lと3~5日間共培養した場合、C A R T 1 2 3は増殖し(図50Dおよび50E)、複数のサイトカインを産生した(図50F)。これらの結果は、C A R T 1 2 3が複数のB-A L L標的に対してC A R T-1 9と同等の効力を示すことを示す。

【1393】

インビボモデルにおいてこれらのデータを確認するために、原発性A L Lモデルを利用した。このモデルにおいて、B-A L L患者から得られた原発性芽球をN O D-S C I D- γ 鎖ノックアウト(N S G)マウスにおいて継代し、e G F Pおよびクリックビートルシフェラーゼ(G F P/L u c)を含むレポーターコンストラクトを用いて形質導入した。N S Gマウスは、G F P/L u c+原発性A L L芽球をi. v.注射され(J H 3 3 1、C D 1 9+、C D 1 2 3+、表現型を加える)、生着後、マウスは、無作為化され、C A R T 1 9、C A R T 1 2 3または対照の非形質導入T細胞(U T D)を受けた。対照T細胞を用いて処置されたマウスは、疾患に対してすぐに死亡したが、C A R T 1 9またはC A R T 1 2 3のいずれかを用いて処置されたマウスは腫瘍根絶および長期生存を示した(図51Aおよび51B)。C A R 1 2 3 T細胞は、対照T細胞と比較してマウスの末梢血(P B)において有意に拡大し、高レベルのC A R 1 2 3を発現した(図51C)。C A R T 1 2 3の抗白血病活性は特異的であり、芽球の表面におけるC D 1 2 3の認識に基づいた。これは、本発明者らがマウスにC D 1 2 3-C D 1 9+白血病(A V 5 7 6)を生着させた場合、C A R T 1 9のみが抗白血病活性を示し、一方で、C A R T 1 2 3は、対照U T Dと比較して効果がなかったためであった(図57Bおよび57C)。

【1394】

C A R T 1 2 3用量と抗腫瘍活性の相関関係を検出するために、(N A L M-6細胞株を用いて)高白血病負荷を有するマウスのインビボモデルを開発した。このモデルにおいて、C A R T 1 2 3の標準用量(200万個のC A R+細胞)は、腫瘍を除くことができない。これらのマウスは、異なる用量のC A R T 1 2 3(1.25、2および500万個のC A R+細胞)を用いて注射され、用量関連の抗白血病活性を観察した(図57D)。

【1395】

C A R T 1 9ではなくC A R T 1 2 3は抗原欠損再発の新規な前臨床モデルにおいて高く活性である

C D 1 9陰性再発を標的とする新しい戦略を試験するために、抗原喪失再発の新規なインビボモデルが開発された。本発明者らのC T L 0 1 9臨床試験の1つに登録された患者(C H P 1 0 1)由来のB細胞芽球は、疾患がC D 1 9++およびC D 1 2 3+である場合にはベースライン時(C T L 0 1 9療法前)、患者がC D 1 9陰性疾患(C D 1 2 3をなおも発現している、図58A)を発症している場合にはC T L 0 1 9後の再発時に回収された。次に、芽球をN S Gマウスにおいて拡大させ、ベースライン疾患(C D 1 9+)に関してはクリックビートルグリーンシフェラーゼ(C B G)、または再発(C D 1 9-)に関してはクリックビートルレッドシフェラーゼ(C B R)を用いて形質導入した(方法の部を参照されたい)。重要なことに、インビボでの増殖中に、芽球は、C D 1 9以外のB細胞同一性のマーカーを保持した(データは示さず)。最初の実験において、N S Gマウスに、ベースライン疾患C D 1 9+(C B G、緑色)またはC D 1 9陰性(C B R、赤色)の白血病のいずれかを生着させた。両方の群は、無作為化され、C A R T 1 9または対照T細胞(U T D)を受けた(図52A)。図52Bに示されるように、両方の群において、U T Dで処置されたマウスは、C D 1 9の発現により独自に、ベースラインと再発疾患の両方の急速な進行を示した。反対に、C A R T 1 9を用いて処置されたマウスの群において、ベースライン疾患(C D 1 9陽性)を生着させたマウスのみがC A R T 1 9処置に応答し、一方で、再発疾患(C D 1 9陰性)を生着させたマウスは予想通りに不

応性を示した。これはまた、CD107a脱顆粒アッセイにおいてインビトロで再現された(図58B)。CD19を発現するかまたはそれを欠損している異なるクローンの存在をインビボでシミュレートするために、NSGマウスに、ベースラインおよび再発疾患の1対1混合物を生着させた;8日目に、マウスは、無作為化され、CART19または対照T細胞を受けた。腫瘍負荷は、インビボでのCD19+(CBG、緑色)/CD19-(CBR、赤色)白血病の間の相対的増殖を識別することができる生物発光イメージングを用いてモニターされた。図52Cに示されるように、UTDを受けたマウスにおいて、6日目に存在するCD19+(緑色)およびCD19-(赤色)白血病の両方は、11日目で同様に増加したが、一方で、CART19を用いて処置されたマウスにおいて、ベースライン疾患(緑色)は完全に除去され、再発疾患(赤色)は進行を示した。

10

【1396】

原発CD19陰性B-ALLおよびCART19不全のこの独特な異種移植片モデルを用いて、抗原喪失再発の治療におけるCART123の役割を評価した。原発CD19陰性芽細胞(CBR陽性)をNSGマウスに注入し(図52D)、マウスを無作為化して、CART19、CART123または対照T細胞を与えた。CART19および対照T細胞は、抗腫瘍活性の完全な欠如を示したが、CART123は、これらのマウスにおいて、疾患の完全な根絶および長期生存をもたらした(図52Eおよび52F)。実際に、CART19に難治性の原発B-ALLの前臨床モデルにおいて、新規なCART123は、この疾患を根絶し、長期生存をもたらすことができる。

20

【1397】

単一細胞レベルでこのインビボモデルにおけるCART19およびCART123の異なる挙動を理解するために、一連の実験は、差次的に標識されたCART19(Cell Trace Violet、青色)およびCART123(Cell Tracker OrangeまたはTRITC、赤色)の混合物を、CD19陽性原発芽球(GFP)またはCD19陰性再発芽細胞(GFP)を有するマウスに注入することによって行われ、注入後の約24時間、頭蓋冠骨髓の2光子顕微鏡法を用いてそれらの挙動を追跡した(実験スキーム、図53A)。これらの研究は、CART19およびCART123が、白血病を含む骨髓空間に輸送され、同族抗原のCART細胞認識が運動性停止と関連することを示した。具体的には、ベースラインCD19+CD123+白血病を生着させたマウスにおいて、62.9±3.8%のCART19および81.1±1.2%のCART123は、芽球に隣接して、丸い形態で失速していることが見出されたが、再発CD19-CD123+白血病を生着させたマウスにおいて、CART123細胞のみが腫瘍細胞の次に停止した(CART123 80.9±5.1%対CART19 12.4±2.2%)(図53Bおよび53C)。これらの所見は、CD19陰性の再発ALLにおいて、CART123のみが、白血病細胞(GFP)との生産性シナプスを確立し、したがって、それらの運動性を低下させることができたが、CART19細胞は、白血病芽球を認識せずに環境中でサンプリングおよび移動を続けることを示した。

30

【1398】

CART123およびCART19の組合せはCD19陰性再発を防止することができる。CART123は、CART19耐性の前臨床モデルにおいて、CD19指向性療法後に生じるCD19陰性再発の治療に有効であることが判明した。しかしながら、コンビナトリアルアプローチは、同時に抗原損失再発を防止しながら、活性なCD19陽性疾患を治療することができた。この仮説を試験するために、CD19陰性逃避の潜在性を有するB-ALLの新たな臨床的問題を、NS19マウスにおける原発CD19-およびCD19+疾患を一緒に注射することによってモデル化した。次に、マウスを無作為化し、対照T細胞(UTD)、CART19またはCART19およびCART123の組合せを与え、T細胞の総用量を同じにした(図54A)。図54Bに示されるように、対照T細胞を用いて処置されたマウスは、両方の白血病クローンの進行を有し、CART19はCD19陰性疾患(赤色)の大半の急速な進行を示した。対照的に、CART123およびCART19の組合せを用いて処置されたマウスは、図54Cに示されるように、疾患のク

40

50

リアランスおよび改善された全生存を示した。実験終了時に屠殺されたマウスの分析は、プールされたCAR T細胞群における残留白血病の証拠を示さなかった。対照的に、CAR T 19単独療法後の進行性疾患を有するマウスは、予想されるCD 19陰性表現型を保持した(図54D)。

【1399】

最後に、CD 19および／またはCD 123の両方によって活性化され得るCAR Tを開発するために、一方がCAR 19を保持し、他方がCAR 123を有する2つのレンチウイルスを用いてT細胞に形質導入した。図55Aに示されるように、4つの異なる形質導入T細胞サブセットを検出した：CAR 19およびCAR 123二重陰性、CAR 19単一陽性、CAR 123単一陽性、および二重陽性CAR 19／CAR 123のT細胞。これらの4つのサブセットを選別し、それらの機能性および特異性をK562-WT、K562 CD 19+またはK562 CD 123+に対して試験した。図55Bは、単一陽性サブセットがそれらの特異的標的に応答し、二重陽性集団のみがK562を発現するCD 19とCD 123の両方の存在下で脱顆粒することができるCD 107a脱顆粒アッセイの結果を示す。さらに、二重刺激CAR T細胞は、同等数の単刺激CAR T細胞と比較して、二重陽性標的に対してより強力な細胞毒性を示した。これは、2つの異なる抗原によって誘発されるCARを使用することによる効力の潜在的増加を示唆している(図55C)。

【1400】

検討

CD 19指向性免疫療法は、再発性および難治性急性リンパ芽球性白血病の治療のパラダイムを変えつつある。以前は結果が望ましくなかった患者は、現在は、完全応答と長期の疾患寛解を達成する現実的な可能性を有する。しかしながら、他の形態の強力な標的療法を用いて治療された白血病の一部の状況下で示されるように、白血病細胞は、耐性および再発をもたらす抗原欠損突然変異を発症する可能性がある。CAR T 19の場合、2つの主要な再発パターンが観察されている。持続性の欠如によるCAR T 19の早期喪失を有する患者は、元のクローンの再発にリスクがある；確かに、最小の残存疾患分析は、悪性腫瘍を完全に根絶するためには、1～6カ月の持続的なCAR T活性が必要とされ得ることを示している。対照的に、再発の約50%は、CAR T 19持続性にもかかわらず生じ、CD 19陰性白血病の発生によって特徴付けられる。後者の観察は、CAR T 19による強力な選択圧を示唆している。特に、CD 19陰性再発はまた、ブリナツモマブ療法後に生じているが、これらは、おそらくそれほど強力でない療法後に少数の再発発生を示す。CD 19陰性疾患の発症には複数の可能性のある機構がある。これらのうちの1つは、非常に低い頻度でベースライン時に存在したCD 19陰性クローンの選択および相対的生存の利点であり、これは当初、CD 19陰性再発をもたらす最も可能性の高い因子と考えられた。より最近では、CD 19のスプライシングの調節不全などの他の機構もまた重要であると考えられている。ここで、B-ALLの稀なCD 19-v e芽細胞が、CD 19陰性再発の可能性のある機構として確認された、より一般的なCD 19陽性白血病芽球に見出される顕著な細胞遺伝学的異常を含み得ることが初めて示される。本発明者らは、CD 123+CD 19-v e芽球を、免疫不全マウスに生着させることができることを実証することによってこれらの知見を確認し、これは、CD 123が、AMLの場合と同じように、B-ALLにおける白血病幹細胞のマーカーであり得ることを示した。

【1401】

この研究の目的は、CD 19指向性療法後の抗原喪失により再発する患者を治療するための新しい戦略を確定することであった。CD 123は、B-ALLの大部分において高く発現され、特にCD 123はCD 19陰性疾患で再発した患者において発現されたままである。CD 19-CD 123+集団におけるクローン性白血病細胞の存在が実証され、これは、CAR T 19と組み合わせたCD 123の標的化は、CAR T 19圧による選択的利点により、増殖することができるサブクローンの根絶の可能性を増加させる可能性があることを示す。CD 123は、以前にAMLにおける白血病幹細胞のマーカーとして確

認されている。ここでは、CD123がALLの免疫表現型として定義された白血病幹細胞（LSC）において発現され、LSC上のCD123を標的とすることがALL根絶を促進する可能性を高まることが示された。

【1402】

抗原喪失再発におけるCAR T123の役割を研究するために、ペンシルベニア大学／フィラデルフィアの小児病院のCTL019試験の1つに登録されたB-ALL患者（CHP101）由来の原発芽球からCD19陰性再発の新規な異種移植片モデルが開発された。この患者は、ベースライン時に古典的なCD19+CD123+表現型を有したが、その後、CD19-CD123+疾患によるCAR T19治療後に再発した。このモデルを用いて、CAR T123が再発疾患を根絶でき、CAR T19と組み合わせて、抗原喪失再発を予防することができることが実証された。これは、臨床関連の患者由来モデルにおける二重CARコンビネーションの最初のデモンストレーションである。さらに、生体内イメージングの使用により、CAR T細胞は、静脈注射後の24時間未満に骨髓に入り、それらの標的を探索し、同族抗原担持細胞と相互作用するために減速することが示された。さらに、二重シグナル伝達CAR T123/19は、以前に公開された結果と一致して、CAR T単独または両方のCARのプールよりも効果的であることが示された。

10

【1403】

これまで、急性骨髄性白血病の治療のための抗CD123キメラ抗原受容体の前臨床の有効性が示されていた。顕著な幹細胞毒性が恒久的な骨髓除去につながる可能性があるため、CAR T123は、臨床翻訳への潜在的な大きな課題である、造血幹細胞および前駆細胞上のCD123の認識により造血毒性を引き起こす。造血毒性を最小限に抑えるために、CD19とCD123とがともに同時に結合したときにのみT細胞を活性化した新規コンストラクトが、この造血毒性を取り除き得ると仮定された。ここで、CD19認識からの活性化シグナルおよびCD123認識からの刺激シグナルを受けたCAR T細胞は、B-ALL細胞を死滅させ、ならびに本発明者らが以前に記載した顕著な造血毒性を回避することができるが見出された。この概念はCD19/PsMA認識の人工的なシステムを用いて以前公開されたが、この臨床的に関連するコンストラクトは、臨床翻訳への比較的明確な経路で、この分野における大きな進歩を表している。特に、このような二重CAR設計は、毒性の減少と関連している可能性が高いが、CAR認識をより限定的ではなくすることによって、抗原喪失再発の問題に取り組んでいない可能性がある。しかしながら、CD123の標的化がALL幹細胞の根絶に成功すれば、このアプローチは安全であり、有効である可能性がある。

20

30

【1404】

要約すると、CD123を標的とすることによりB-ALLを治療するための新規であり、有効な戦略がここで実証される。このアプローチは、CD123が、B-ALLを有する一部の患者において、稀なCD19陰性悪性細胞において発現され、CD19指向性免疫療法後に生じる抗原喪失再発において保持されるため、特に魅力的である。さらに、CAR T19とCAR T123の組合せは、CD19陰性再発の発生を防止することができる。

【実施例18】

40

【1405】

低用量のRAD001は細胞培養モデルにおいてCAR T増殖を刺激する

インビトロでのCAR T細胞増殖に対する低用量のRAD001の効果を、CAR T発現細胞を異なる濃度のRAD001の存在下で標的細胞と共培養することにより評価した。

【1406】

材料および方法

CAR形質導入T細胞の生成

ヒト化抗ヒトCD19 CAR (huCAR T19) レンチウイルス移送ベクター (transfer vector) を使用して、VSVgシュードタイプ化レンチウイルス

50

粒子にパッケージングされたゲノム物質を生成した。ヒト化抗ヒトCD19 CAR (hu CART 19) のアミノ酸およびヌクレオチド配列は、2014年3月15日に提出されたPCT出願、WO2014/153270に記載されるCAR1、ID 104875であり、その中で配列番号85および31と命名されている。

【1407】

レンチウイルス移送ベクターDNAは、Lenti-X 293T細胞をトランスフェクトするためのリポフェクタミン試薬と組み合わせて、3つのパッケージング成分、VSVg env、gag/polおよびrevと混合させる。培地はその後24時間および30時間後に交換し、ウイルス含有培地は収集し、濾過して-80℃で保存する。CARTは、健康なドナーの血液またはロイコパック (leukopak) の負磁気選択により得られる新鮮なまたは凍結未処理のT細胞の形質導入により生成される。T細胞は抗CD3/抗CD28ビーズと一緒に24時間のインキュベーションにより活性化され、その後ウイルス上清または濃縮されたウイルス (それぞれ、MOI=2または10) が培養物に添加される。改変されたT細胞は約10日間拡大させておく。形質導入された細胞 (細胞表面でCARを発現している) のパーセンテージおよびCAR発現のレベル (相対的蛍光強度、幾何平均) は7日目から9日目の間でフローサイトメトリー分析により決定される。遅い成長速度と約350 fLに近づくT細胞サイズの組合せによりT細胞が後の分析のために凍結保存される状態が決定される。

【1408】

CARTの増殖を評価する

CARTの機能性を評価するため、T細胞を解凍し、計数し、生存率をセロメーター (Cellometer) により評価する。それぞれの培養物中のCAR陽性細胞の数は非形質導入T細胞 (UTD) を使用して標準化する。CARTに対するRAD001の効果はRAD001を用いた滴定において試験し、50 nMで開始した。共培養実験全てにおいて使用する標的細胞株はNALM6 (NALm-6)、CD19を発現しルシフェラーゼを発現するように形質導入されているヒトプレB細胞急性リンパ性白血病 (ALL) 細胞株である。

【1409】

CARTの増殖を測定するため、T細胞は1対1の比で標的細胞と一緒に培養する。細胞がCD3、CD4、CD8およびCAR発現のために染色されるとき、アッセイは4日間実行される。T細胞の数は基準としてビーズの計数を使用するフローサイトメトリーにより評価する。

【1410】

結果

CART細胞の増殖能力を4日間共培養アッセイにおいて試験した。CAR陽性CD3陽性T細胞 (暗いバー) および全CD3陽性T細胞 (明るいバー) の数は、CAR形質導入および非形質導入T細胞をNALM6 (NALm-6) と一緒に培養した後に評価した (図59)。hu CART 19細胞は、0.016 nM未満のRAD001の存在下で培養すると拡大し、もっと高い濃度の化合物では拡大の程度はそれよりも少なかった。重要なのは、0.0032と0.016 nMのRAD001の両方で増殖はRAD001の添加なしで観測された場合より高かったことである。非形質導入T細胞 (UTD) は検出可能な拡大を示さなかった。

【実施例19】

【1411】

低用量のRAD001はCART発現をインビボで刺激する

この実施例では、異なる濃度のRAD001と一緒にインビボで増殖するhu CAR 19細胞の能力を評価する。

【1412】

材料および方法

NALM6-luc細胞: NALM6ヒト急性リンパ性白血病 (ALL) 細胞株を再発

10

20

30

40

50

A L Lに罹った患者の末梢血から発現させた。次に、細胞にホタルルシフェラーゼをタグ付けした。これらの懸濁細胞は10%の熱失活させたウシ胎仔血清を補充したRPMIにおいて成長する。

マウス：生後6週間のNSG (NOD. Cg-PrkdcscidIl2rgtm1Wjl/SzJ) マウスはJackson Laboratory (ストック番号005557) から入手した。

腫瘍移植：NALM6-luc細胞を10%熱失活させたウシ胎仔血清を補充したRPMIにおいてインビトロで成長させ拡大させた。次に、細胞は15mlのコニカルチューブに移し、冷たい無菌PBSを用いて2度洗浄した。次に、NALM6-luc細胞を計数し、ミリリットルのPBSあたり 10×10^6 細胞の濃度で再懸濁させた。細胞を氷上に置き、直ちに(1時間以内)マウスに移植した。NALM6-luc細胞は尾静脈を経て静脈内に100 μ l容量で注射され、マウスあたり総数で 1×10^6 細胞であった。

【1413】

CAR T細胞投与：マウスは腫瘍移植の7日後 5×10^6 T細胞を投与された。細胞は37℃の水浴中で部分的に解凍し、次に細胞を含有するチューブに1mlの冷たい無菌PBSを添加することにより完全に解凍させた。解凍された細胞は15mlのファルコンチューブに移し、PBSを用いて最終容量10mlに調整した。細胞は、毎回1000rpmで10分間2度洗浄し、次に血球計数器上で計数した。次に、T細胞は冷PBS1mlあたり 50×10^6 CAR T細胞の濃度で再懸濁し、マウスに投与するまで氷上で保管した。マウスは尾静脈を経て静脈内に100 μ lのCAR T細胞を注射され、マウスあたり 5×10^6 CAR T細胞の用量であった。群あたり8マウスを100 μ lのPBS単独で(PBS)、またはヒト化CD19 CAR T細胞で処置した。

RAD001投与：1mgのRAD001に等しい濃縮したマイクロエマルジョン50mgを処方し、次に、投与時にD5W (デキストロース5%水溶液) に再懸濁した。マウスには毎日、所望の用量のRAD001を、200 μ lを用いて経口投与した(経口経管栄養を介して)。

PK分析：マウスは腫瘍移植の7日後に開始してRAD001を毎日投与した。投与群は以下の通りであった：0.3mg/kg、1mg/kg、および10mg/kg。マウスは最初と最後のRAD001投与に続いて0日目および14日目にPK分析のため以下の時点で血を採った：15分、30分、1時間、2時間、4時間、8時間、12時間、および24時間。

【1414】

結果：

RAD001の展開および薬物動態はNSGマウスにおいてNALM6-luc腫瘍を用いて試験した。RAD001だけを毎日経口投与してもNALM6-luc腫瘍の成長には影響を及ぼさなかった(図60)。RAD001の薬物動態分析によれば、腫瘍担持マウスの血液の中ではRAD001はかなり安定していることが示されている(図61Aおよび61B)。0日目と14日目の両方でのPK分析では、血液中のRAD001濃度は、試験された最も低い用量(0.3mg/kg)での投与の24時間後でも約10nmであることを示している。

【1415】

これらの用量に基づいて、huCAR19 CAR T細胞は、これらの細胞の増殖能力を判定するためにRAD001と一緒に、およびそれなしで投与された。使用した最も高い用量は、投与の24時間後の血液中のRAD001レベルに基づいて3mg/kgであった。RAD001の濃度はRAD001の最終投与の24時間後10nMを超えていたので、CAR T細胞を用いたインビボ研究ではいくつかのもっと低い用量のRAD001が使用された。CAR T細胞は毎日経口RAD001投与の開始に1日先立って静脈内投与された。マウスはT細胞拡大ではFACSを介してモニターされた。

【1416】

最も低い用量のRAD001は、CAR T細胞の増強された増殖を示している(図6

10

20

30

40

50

2 Aおよび6 2 B)。この増強された増殖は、C D 8 + C A R T細胞よりもC D 4 + C A R T細胞を用いる方が明白であり長期である。しかし、C D 8 + C A R T細胞を用いると増強された増殖は、C A R T細胞投与に続く初期の時点で見ることが可能である。

【実施例 2 0】

【1 4 1 7】

原発性D L B C Lを有する特定の患者はC D 3 + / P D 1 +二重陽性癌細胞を示す

最近、キメラ抗原受容体（C A R）修飾されたT細胞およびチェックポイント阻害剤の形態で癌免疫療法の分野において魅力的な進歩があったが、それらの組合せの療法機構を探索するための高度なツールは広く利用することができない。この増大する必要性に対処するために、多重A Q U A（自動定量分析）技術を用いた堅牢な定量的蛍光免疫組織化学プラットフォームが開発され、チェックポイントインヒビター発現を評価し、C A R T細胞を列挙し、新規な共局在化アルゴリズムを用いて腫瘍細胞と免疫細胞間の相互作用を決定した。この方法の有用性は、前臨床モデル系および臨床モデル系の両方において特徴付けられた。B細胞リンパ腫の免疫不全マウスモデルにおいて、一次リンパ器官の悪性B細胞へのC A R T細胞のホーミングが評価された。C D 4、C D 8、P D 1およびF O X P 3発現の多重分析によるC A R T細胞の表現型および機能的状態が決定された。さらに、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（D L B C L）設定における免疫療法の併用を可能にするために、免疫細胞および腫瘍細胞コンパートメントにおけるP D 1およびP D - L 1の発現の形態における適応免疫耐性機構の有病率は、D L B C L患者（n = 6 3）からの原発性と続発性の生検の両方において細胞質および核の染色によって作製される目印を介して調べられた。C A R T試験のための患者選択を支持するために、従来の方法によって再現可能に採点できなかった関連腫瘍抗原の発現および罹患率を定量し、客観的なカットポイントを得た。患者の最適な選択のためのこれらの定量的多重化I H C法は、今後の新規な組み合わせ免疫療法試験に利用することができる。

【1 4 1 8】

D L B C L組織試料の試料調製、画像化、および画像化の分析を原発性D L B C L（n = 4 9）および続発性D L B C L（1 5）ヒト患者において行われた。

【1 4 1 9】

試料調製。ホルマリン固定され、パラフィン包埋（F F P E）された組織試料を脱ろうした。次に、スライドは、蒸留水中でインキュベートする前に、一連のキシレンからアルコール洗浄までを通じて再水和させた。その後、熱誘発された抗原回収は、高圧および高温条件を用いて行われ、冷却させ、T r i s緩衝化生理食塩水に移された。次に、染色が行われ、この場合、以下のステップが実施された。最初に、内因性ペルオキシダーゼをブロックし、続いて、タンパク質ブロッキング溶液とともにインキュベートして、非特異的な抗体染色を減少させた。次に、スライドは、マウス抗P D L 1一次抗体を用いて染色させた。その後、スライドは、抗マウスH R P二次抗体とともにインキュベートする前に洗浄された。スライドを洗浄し、次にP D A 1染色をT S A + C y（登録商標）5（P e r k i n E l m e r）を用いて検出した。次に、一次および二次抗体試薬をマイクロ波で除去した。再度、スライドを洗浄した後、ウサギ抗C D 3一次抗体を用いて染色した。スライドを洗浄し、次いで抗ウサギH R P二次抗体 + 4 '，6 - ジアミジノー 2 - フェニルインドール（D A P I）のカクテルとともにインキュベートした。スライドを洗浄し、次にT S A - C y（登録商標）3（P e r k i n E l m e r）を用いてC D 3染色を検出した。スライドを最終的に洗浄した後、積層媒体とともにカバーガラスに載せ、室温で一晩乾燥させた。

【1 4 2 0】

試料イメージングと分析。次に、蛍光画像は、V e c t r aソフトウェアバージョン2. 0. 8（P e r k i n E l m e r）を使用するV e c t r a 2インテリジェントスライド分析システムを用いて取得された。最初に、D A P Iを用いて倍率4倍のスライドの単色撮像を行った。自動アルゴリズム（i n F o r mを使用して開発された）を用い

て、組織を含むスライドの領域を同定した。

【1421】

組織を含むものとして同定されたスライドの領域は、DAPI（青色）、Cy（登録商標）3（緑色）、およびCy（登録商標）5（赤色）に関連するチャンネルについて倍率4倍で画像化して、RGB画像を作製した。これらの倍率4倍の画像は、視野セクタの自動濃縮アルゴリズム（inFormを使用して開発された）を使用して処理され、Cy（登録商標）3の最大発現に従って可能な倍率20倍の視野を識別し、ランク付けした。

【1422】

DAPI、Cy（登録商標）3、およびCy5（登録商標）波長にわたって倍率20倍でトップ40視野を撮像した。生の画像を受け入れ可能性について調べ、焦点が合っていないか、腫瘍細胞が欠如しているか、大部分が壊死しているか、または期待される抗体局在化に関連しない高レベルの蛍光シグナル（すなわち、バックグラウンド染色）を含む画像を分析前に排除した。受け入れられた画像は、AQUAduct（Perkin Elmer）を用いて処理され、ここで、各蛍光色素分子は、スペクトルアンミキサーによって個々のチャンネルにスペクトル的に混在させないようにし、別々のファイルとして保存した。

【1423】

処理されたファイルは、AQUAnalysis（商標）を使用するか、またはAQUAserve（商標）を使用する完全自動化プロセスによってさらに分析された。各DAPI画像は、その画像内の全ての細胞核を識別するために細胞マスキによって処理され、次に、細胞全体のおおよその大きさを表すために2ピクセルだけ拡張された。この得られたマスクは、その画像内の全ての細胞を表した。各Cy（登録商標）5画像をバイオマーカーマスキにより処理して、PD-1陽性である全ての細胞のバイナリーマスクを作製した。各Cy（登録商標）3画像をバイオマーカーマスキにより処理して、CD3陽性である全ての細胞のバイナリーマスクを作製した。PD-1陽性およびCD3陽性である全ての細胞のバイナリーマスクを組み合わせ、PD-1およびCD3に対して二重陽性である全ての細胞のバイナリーマスクを作製した。PD-1を発現する全てのCD3細胞についてのバイオマーカー陽性%（PBP）は、ピクセルで測定され、面積評価者によって決定される、全てのPD-1陽性腫瘍細胞のマスクの総面積を、ピクセルで測定され、面積評価者によって決定される、全てのCD3陽性細胞のマスクの総面積で割ることによって、陽性計算機を用いて導き出された。原発性および続発性のDLBCLヒト試料においてPD-1を発現する全てのCD3陽性細胞についてのPBPの代表値を図63に示す。CD3およびPD-1の状態は、原発性におけるCD3+/PD-1+細胞の有病率が、続発性DLBCL設定よりも高く、単一または組合せ処置のいずれかに患者を選択する機会を提供することを示した。

【1424】

同様の実験が行われ、原発性DLBCLヒト患者由来のDLBCL組織試料について、ウサギ抗PD-L1一次抗体およびTSA+Cy5（Perkin Elmer）を用いてPD-L1が検出された。PD-1およびCD3はまた同じ試料で検出された。この実験は、腫瘍微小環境がPD-1、CD3およびPD-L1を発現する細胞を含むことを示した。この実験はまた、CD3+PD-1+である細胞の部分集団を同定した（データは示さず）。これらの結果は、腫瘍微小環境が、PD-1+またはPD-L1+細胞に特異的な薬剤を用いて標的化され得る免疫抑制細胞の温床となるとするモデルを支持する。

【実施例21】

【1425】

DLBCL細胞を含む試料中のCD19およびPD-L1の相互排他的発現

試料調製。ホルマリン固定され、パラフィン包埋（FFPE）された組織試料を脱ろうした。次に、スライドは、一連のキシレンからアルコール洗浄までを通じて再水和させた後、蒸留水中でインキュベートした。その後、熱誘発された抗原回収は、高圧および高温条件を用いて行われ、冷却させ、Tris緩衝化生理食塩水に移された。次に、染色が

10

20

30

40

50

行われ、この場合、以下のステップが実施された。最初に、内因性ペルオキシダーゼをブロックし、続いて、タンパク質ブロッキング溶液とともにインキュベートして、非特異的な抗体染色を減少させた。次に、スライドは、ウサギ抗PD-L1一次抗体を用いて染色させた。その後、スライドは洗浄され、その後抗ウサギHRP二次抗体とともにインキュベートされた。スライドを洗浄し、次にPDA1染色をTSA+Cy（登録商標）3（Perkin Elmer）を用いて検出した。次に、一次および二次抗体試薬をマイクロ波で除去した。再度、スライドを洗浄した後、マウス抗CD19一次抗体を用いて染色した。スライドを洗浄し、次いで抗マウスHRP二次抗体+4', 6-ジアミジノー2-フェニルインドール（DAPI）のカクテルとともにインキュベートした。スライドを洗浄し、次にTSA-Cy（登録商標）5（Perkin Elmer）を用いてCD19染色を検出した。スライドを最終的に洗浄した後、積層媒体とともにカバーガラスに載せ、室温で一晩乾燥させた。

10

【1426】

試料イメージングと分析。次に、蛍光画像は、Vectraソフトウェアバージョン2.0.8（Perkin Elmer）を使用するVectra 2インテリジェントスライド分析システムを用いて取得された。最初に、DAPIを用いて倍率4倍のスライドの単色撮像を行った。自動アルゴリズム（inFormを使用して開発された）を用いて、組織を含むスライドの領域を同定した。

【1427】

組織を含むものとして同定されたスライドの領域は、DAPI（青色）、Cy（登録商標）3（緑色）、およびCy（登録商標）5（赤色）に関連するチャンネルについて倍率4倍で画像化して、RGB画像を作製した。これらの倍率4倍の画像は、視野セクタの自動濃縮アルゴリズム（inFormを使用して開発された）を使用して処理され、Cy（登録商標）3の最大発現に従って可能な倍率20倍の視野を識別し、ランク付けした。

20

【1428】

DAPI、Cy（登録商標）3、およびCy（登録商標）5波長にわたって倍率20倍でトップ40視野を撮像した。生の画像を受け入れ可能性について調べ、焦点が合っていないか、腫瘍細胞が欠如しているか、大部分が壊死しているか、または期待される抗体局在化に関連しない高レベルの蛍光シグナル（すなわち、バックグラウンド染色）を含む画像を分析前に排除した。受け入れられた画像は、AQUAduct（Perkin Elmer）を用いて処理され、ここで、各蛍光色素分子は、スペクトルアンミキサーによって個々のチャンネルにスペクトル的に混在させないようにし、別々のファイルとして保存した。

30

【1429】

処理されたファイルは、AQUAanalysis（商標）を使用するか、または先の実施例において記載されたようにAQUAserve（商標）を使用する完全自動化プロセスによってさらに分析された。

【1430】

原発性および続発性DLBCLヒト試料中の全てのCD19陽性およびPD-L1陽性細胞についてのPBPの代表値を図64に示す。CD19およびPD-L1発現は、DLBCL試料において変化した。CD19およびPD-L1の発現は、相互に排他的である傾向があり、すなわち、一般に、所与の細胞はCD19またはPD-L1を発現したが、両方は発現しなかった。理論に縛られることを望むものではないが、これは、CD19がDLBCL腫瘍細胞において発現され、一方で、PD-L1が非腫瘍細胞、例えば、腫瘍微小環境を支持する細胞において発現されるためであり得る。この観察は、CD19阻害剤（例えば、CD19 CAR発現細胞）とPD-L1シグナル伝達の阻害剤の併用療法が、これらの2つの細胞集団の標的化に有用であり得ることを示唆する。

40

【1431】

同様の実験は、例えば、CART19有効性をモニターするAQUA分析の能力を実証するために実施された。この研究は、混合された細胞株をCART19+Jurkat細胞

50

胞およびCD19+REH細胞とともに含む試料中のCD19、CD3、およびCAR T19核酸をモニターした。CD19およびCD3タンパク質は、抗体によって検出され、CAR T19は、CAR核酸の3'UTRに対するRNAプローブを用いて検出された。この実験は、細胞株試料が、CD19、CD3、およびCAR T19を発現する細胞を含むことを示した（データは示さず）。この実験はまた、細胞株試料がCD3+/CAR T19+である細胞の部分集団を含むことを示した（データは示さず）。近接分析を行ったところ、CAR T19細胞はCD19+細胞に物理的に近接していることが示された（データは示さず）。これらの実験は、CD3+CAR T19細胞が、CD19+細胞を含む腫瘍微小環境に浸潤し、CD19およびCAR T19細胞の物理的位置がCAR T19療法の有効性を左右するというモデルを支持する。

10

【実施例22】

【1432】

CARのバイシストロン性発現

この実施例において、2つのタイプの細胞集団の有効性を比較した。「プールされた」と呼ばれる最初の細胞集団において、各細胞は1つのCARを発現する。第一の複数の細胞はCD19 CARを用いて形質導入され、第二の複数の細胞はCD22 CARまたはCD123 CARを用いて形質導入され、次に2つの複数の細胞がプールされた。第二のタイプの細胞集団において、複数の細胞は、CD19 CARおよび第二のCARを発現するバイシストロン性ベクターを用いて形質導入され、それにより、ほとんどのまたは全ての細胞が両コンストラクトを発現した。第二のCARは、いくつかの実験においてはCD22 CARであり、他の実験においてはCD123 CARであった。これらの細胞集団を図65に示す。

20

【1433】

図66に図示された2つの新規なコンストラクトは、単一のバイシストロン性レンチウイルスベクターを用いて同じT細胞において2つの完全長CARを発現させるためにP2Aシステムを用いて作製された。T細胞は、標準プロトコールに従って拡大させ、CAR19とCAR123の両方を保有する単一レンチウイルス（感染多重度、MOI=3）を用いて形質導入された。同様の形質導入は、記載されたバイシストロン性レンチウイルスベクターを用いて得られた同じT細胞集団において、CAR19およびCAR22について行われた。図67は、CD19およびCD22 CARの同時発現を示す。二重のCAR19+/CAR123+集団および二重陰性集団を含む、CAR19および/またはCAR123の特異的発現に基づく明確な集団を認識することができる（図68、上段パネル）。

30

【1434】

バイシストロン性CD19 CARおよびCD123 CARを用いて形質導入された細胞は、CD19またはCD123 CARのいずれかを発現するプールされた細胞と比較された（図68、下段パネル）。NSGマウスにB-ALL細胞株（NALM-6、CBG+）を生着させた。7日目に、マウスは、腫瘍負荷（BLI、生物発光）に基づいて無作為化され、対照T細胞（UTD）、CAR T19、CAR T123、1対1のCAR T123とCAR T19がプールされた組合せ、または二重CAR T19/123（CAR+細胞の総数は同じ）を受けた。CD19 CARを発現する細胞単独（四角形）およびCD123 CARを発現する細胞単独（三角形）はともに、対照（丸）と比較して初期の有効性を示し、その後、白血病細胞レベルが上昇した。CD19またはCD123を発現するプールされた細胞（ダイヤモンド）はまた、初期の有効性を示し、その後、白血病細胞のレベルが上昇した。対照的に、バイシストロン性ベクターをトランスフェクトされた細胞（逆三角形、「二重CAR T」）は、処置後、少なくとも60日で延長された応答を維持した。この実験は、二重CAR Tが、単一のCAR T処置より優れているだけでなく、プールされたCAR T細胞よりも優れている、強力な抗白血病効果を発揮することを示す。

40

【実施例23】

50

【1435】

CART22は動物モデルにおけるCD19陰性B-ALLに対して有効である。

CD19陰性B-ALL細胞は、動物モデルにおいてCD19 CAR発現細胞およびCD22 CAR発現細胞に対する応答性について試験された。100万個のCD19陰性B-ALL細胞が0日目にマウスに注入され、2e6CAR+T細胞が7日目（無作為化後）に注入された。腫瘍負荷を生物発光によって測定した。図69に示されるように、陰性対照マウスおよびCART19により処置されたマウスにおいて癌が進行し、一方で、CART22は、NSG異種移植においてCD19陰性ALLを消失させることができる。

【1436】

10

アッセイは、以下のように行われた：1e6個のCD19陰性ALL細胞（CBG+）をNSGマウスに注射した。5日目に、マウスは、無作為化され、2e6個の対照の非形質導入T細胞（UTD）、CART19またはCART22（m971 scFv）のいずれかを受けた。次に、マウスは、腫瘍負荷（生物発光）について追跡された。

【実施例24】

【1437】

低レベルの免疫チェックポイント分子は、改善された結果と関連する

免疫チェックポイント分子（PD-L1、PD1、LAG3、およびTIM3）は、免疫組織化学によってリンパ腫患者由来の試料において検出された。陽性および陰性対照の組織および細胞株もまた実施された。免疫チェックポイント発現分析は、腫瘍細胞、および免疫細胞などの非腫瘍細胞を含むことができる、目的とする領域に関する定量的な画像解析を用いて行われた。試料は、組織、リンパ節または骨髄から採取された。

20

【1438】

免疫チェックポイントのタンパク質発現は、CD19標的化CAR療法による処置後に、完全応答例（CR）、および進行性疾患（PD）を有する患者において比較された。図70に示されるように、CR患者は、治療前後にPD-L1、PD1、LAG3、TIM3のレベルが低い傾向にあるが、一方で、PD患者は、治療前後でこれらの分子のレベルが高い傾向にあった。この実施例は、CAR発現細胞および免疫チェックポイント阻害剤との併用療法を支持し、CAR療法を受けている患者における免疫チェックポイント分子レベルを決定するために試験することを支持する。

30

【実施例25】

【1439】

CD22 CARを発現する細胞の機能的アッセイ

いくつかのCD22 CARコンストラクトをNFATアッセイにおいて機能的に検証した。略述すると、以下のように実験を行った。CD22結合scFvドメインを有するCD22 CARをコードする核酸を保有するレンチウイルスベクター（pELPS）は、NFAT応答エレメント（JNL）の制御下でルシフェラーゼを発現するように修飾されたJurkat T細胞株にエレクトロポレーションによって導入された。細胞を培養し、CARコンストラクトを発現させた。エレクトロポレートされた細胞を標的抗原（CD22）でコーティングされたプレートに適用した。コーティングされたプレートにおけるルシフェラーゼシグナルの検出は、その抗原に対するCD22 CARの結合活性を示し、T細胞の活性化およびルシフェラーゼの発現をもたらした。

40

【1440】

図71は、m971 scFv競合物質の存在下および非存在下において、いくつかのCD22 CARコンストラクトの活性化（RLU）を示すグラフである。これらの結果は、CD22-53およびCD22-12、ならびに他のscFvのサブセットが、m971陽性対照とほぼ同様に抗原に結合することを示す。この結果はまた、異なるscFvがm971と異なる程度で競合することを示す。

【1441】

16個の追加のヒトCD22結合ドメインを試験し、弱い結合活性を有することが見出

50

されたため（データは示されない）、さらに追求しなかった。

【1442】

図72は、CD22-57、CD22-58、CD22-59、CD22-60、CD22-61、CD22-62、およびCD22-63を含むいくつかのCD22 CARを発現するJNL細胞の活性化（RLU）を示すグラフであり、そのscFv配列は本明細書に提供される。3つの異なる標的タンパク質（CD22-FL-Fc、CD22-D567-Fc、およびCD22-D67）を用いて、組織培養プレートをコートした；陰性対照（Fc）もまた含まれた。メソテリン結合CAR（Meso-G07）を陰性対照として使用した。CD22-12およびCD22-53を陽性対照として使用した。本実験は、このアッセイにおいて、全てのCAR（CD22-57、CD22-58、CD22-59、CD22-60、CD22-61、CD22-62、およびCD22-63）が機能的であることを示した。さらに、これらの結果は、試験したCAR（CD22-12および-53を含む）がCD22のドメイン6および7に結合することを示した。ドメインマッピングは、CD22結合ドメインについて行われた。以下の3つの異なる形態の抗原を用いた：7つの外部ドメインを有するCD22全長、Domain567（ドメイン1～4が欠失している）、およびDomain67（ドメイン1～5が欠失している）。理論に縛られることを望むものではないが、様々なCD22クローンの結合が、図75に示されるエピトープにマッピングされるようである。

10

【1443】

CD22 CARコンストラクトはまた、IFN- γ およびIL-2の分泌を促進する能力についても試験された。略述すると、異なるCD22 CARを発現する健常ドナーからの形質導入された原発性T細胞は、CD22陽性標的細胞であるRaji-LucおよびDaudi-Luc、ならびに陰性対照であるK562-Lucとともに共培養された。T細胞および標的細胞を10対1のエフェクター対標的細胞比（E対T）で培養した。20時間の共培養後に上清を回収した。図73は、IFN- γ 産生（pg/mL）を示す3つの棒グラフを示す。Raji-Luc細胞株（上のパネル）およびDaudi-Luc細胞株（中央のパネル）との共培養は、hCD22-12、hCD22-53 CAR T細胞、ならびに2つの陽性対照であるCAR19およびm971-HLによるIFN- γ 分泌を誘導した。注目すべきことに、最大量はhCD22-53細胞を試験した場合に観察され、hCD22-12細胞を試験した場合にはより少ない程度で観察された。Nalm6-Luc、Pfeiffer-Luc、およびK562-CD22-Luc、ならびにSEM-Luc細胞を試験した場合、同様の結果が観察された（データは示さず）。K562-Luc陰性対照細胞株を試験した場合、最小のIFN- γ の分泌が観察された（下段パネル）。

20

30

【1444】

CD22-12は、細胞死滅アッセイおよびサイトカイン分泌アッセイにおいてm971に匹敵する活性を示した（実施例9）。CD22-64およびCD22-65と命名された2つのscFvは、hCD22-12の親和性成熟によって産生された。これらのscFvを含有するCARコンストラクトは、上記されるようにNFATアッセイで活性について試験された。図74に示されるように、CD22-64とCD22-65の両方は、同様にCD22に結合し、またはCD22-12とCD22-53よりも良好であり、JNL活性化をもたらす。図中のバーは、左から右に、CD22全長-Fc；CD22-D567-Fc；およびプレートのコーティングのために使用されるFcのみの陰性対照を表す。CD22-12の4つの変異体を試験することにより、LCDR3およびHCDR3がある程度結合に寄与し（データは示されない）、HCDR3がLCDR3よりも多くの突然変異を許容し得ることが示唆された。

40

【1445】

等価体

本明細書において引用されたありとあらゆる特許、特許出願、および出版物の開示は、それによってそれらの全体が参照により本明細書に組み入れられる。本発明を具体的な態

50

様を参照しながら開示してきたが、本発明の他の態様およびバリエーションが、本発明の真の本質および範囲から逸脱することなく当業者によって考え出され得ることは明らかである。添付の特許請求の範囲は、このような態様および等価なバリエーションの全てを包含するものと解釈されることが意図される。

【図 1】

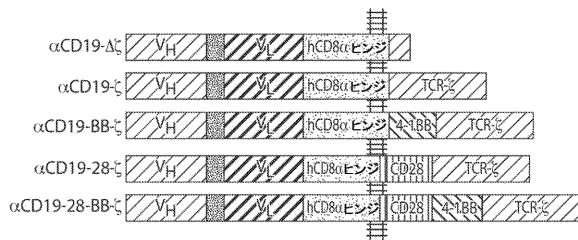


FIG. 1A

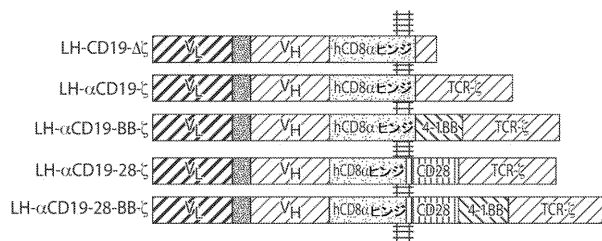


FIG. 1B

【図 2】

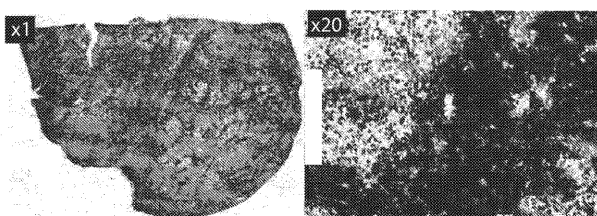


FIG. 2

【図 3】

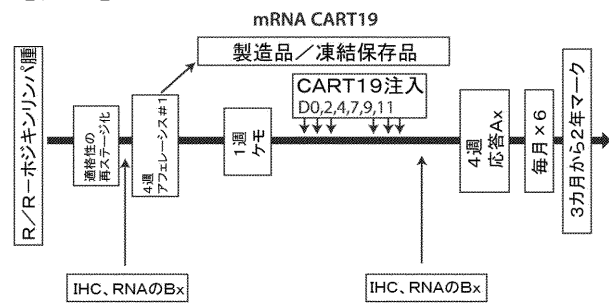
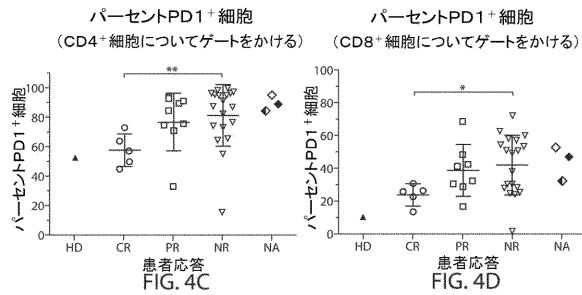
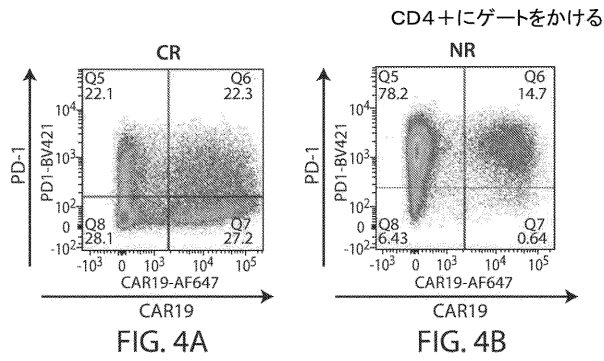
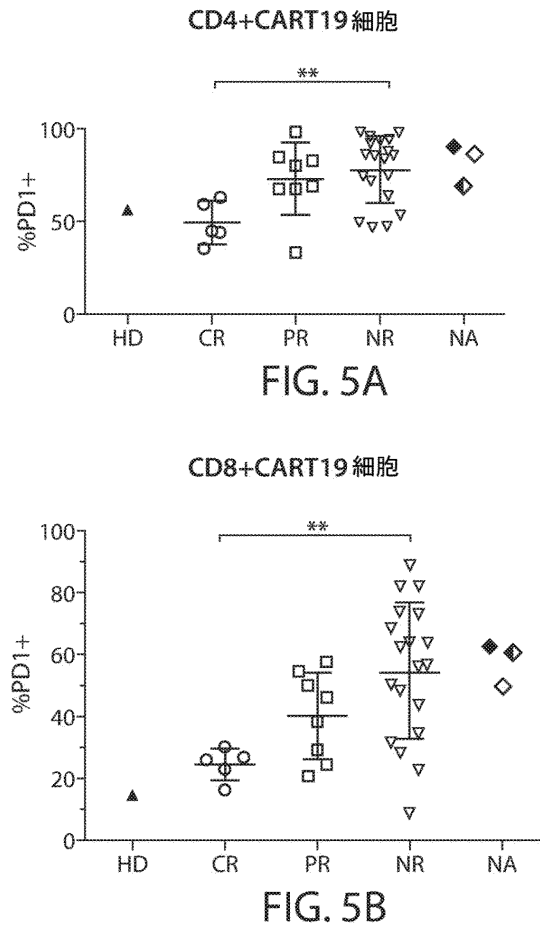


FIG. 3

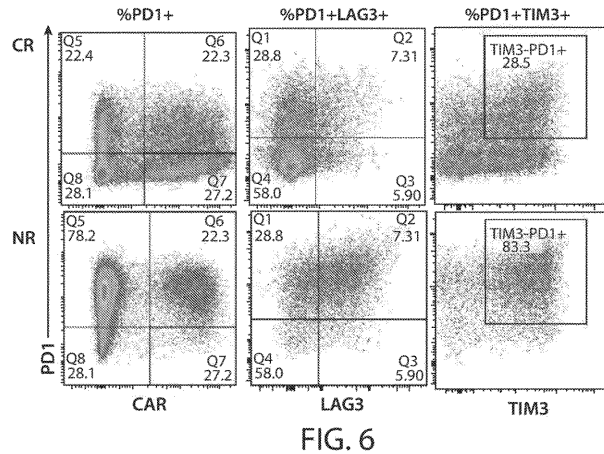
【図 4】



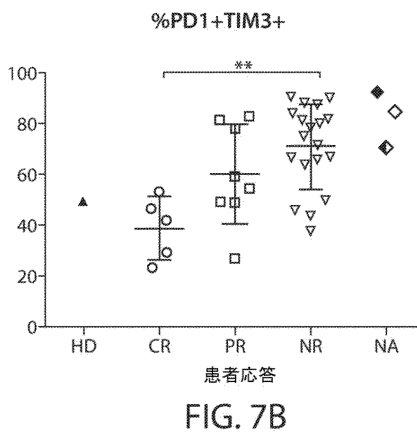
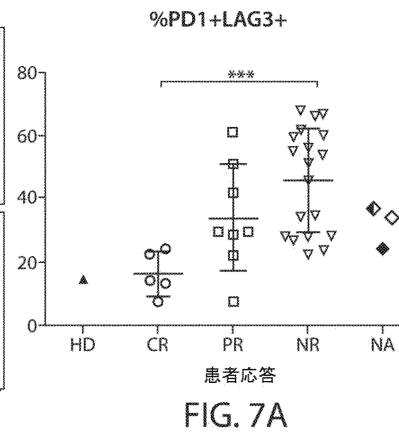
【図 5】



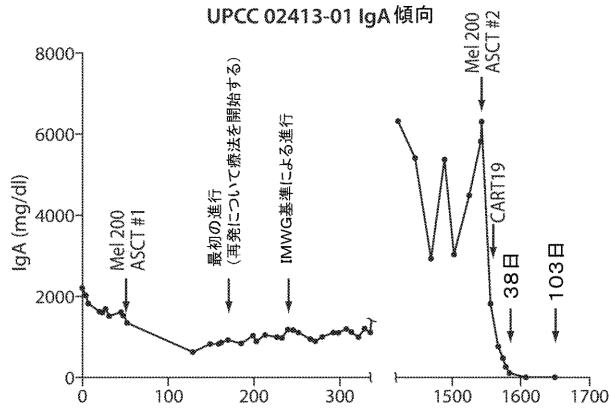
【図 6】



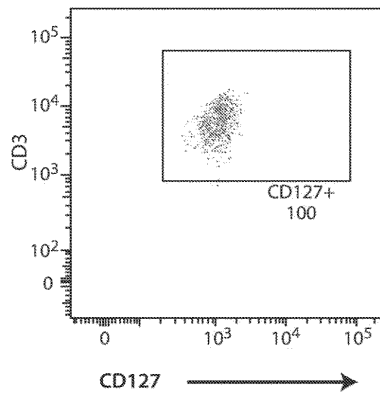
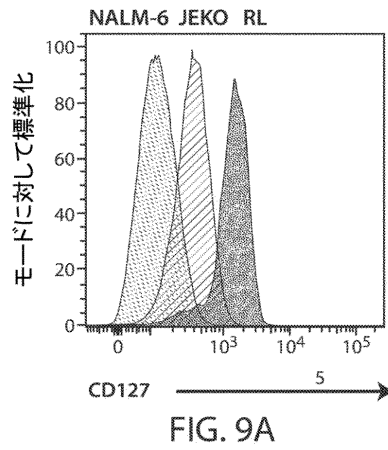
【図 7】



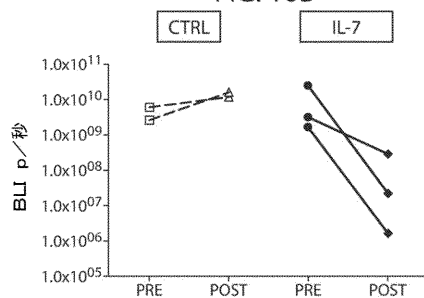
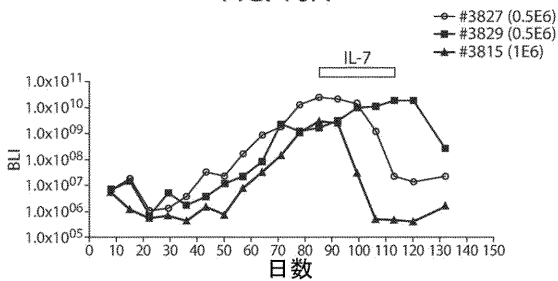
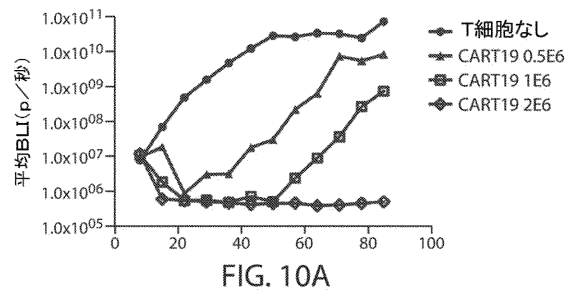
【図 8】



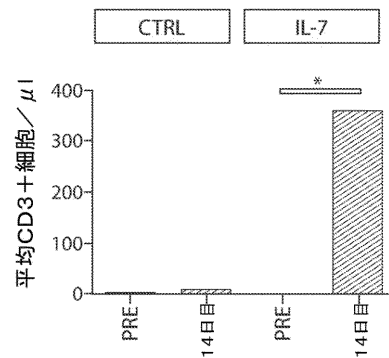
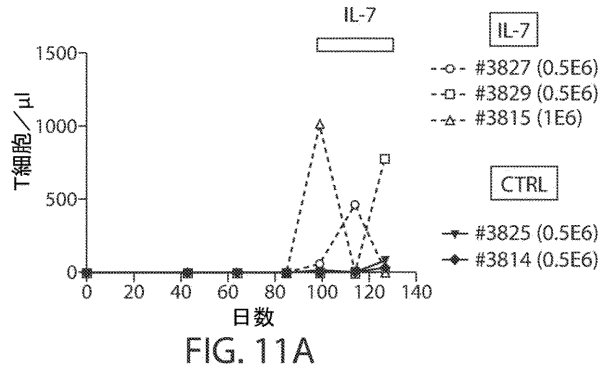
【図 9】



【図 10】



【図 11】



【図 1 2】

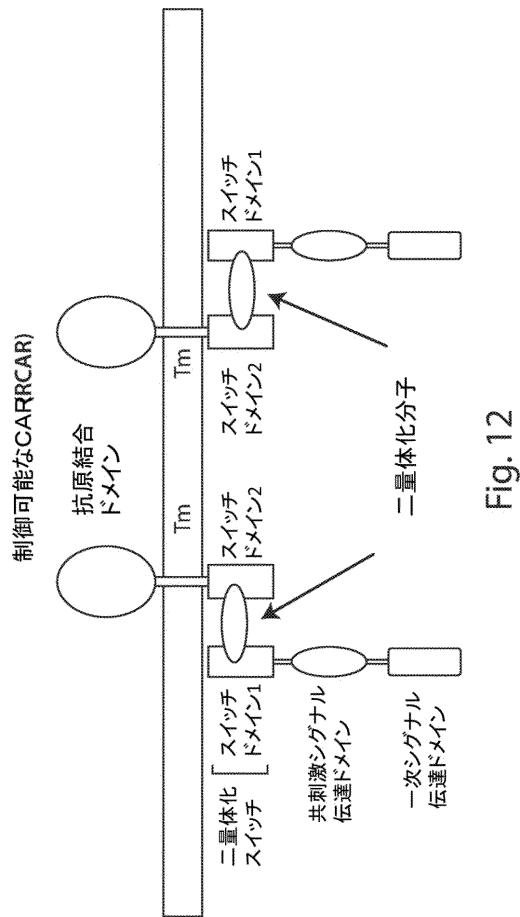


Fig. 12

【図 1 4】

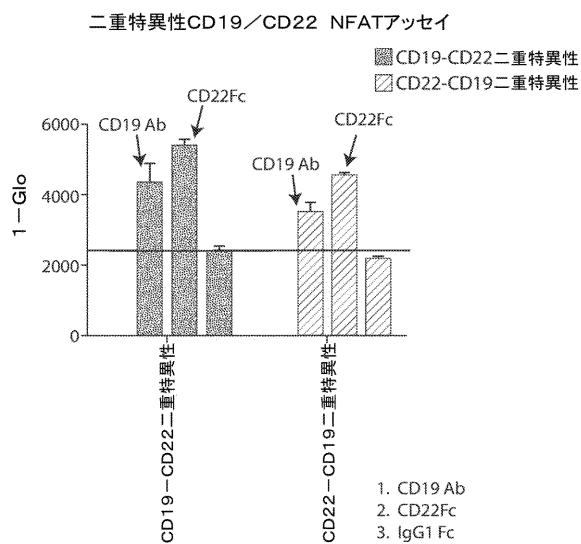


FIG. 14

【図 1 3】

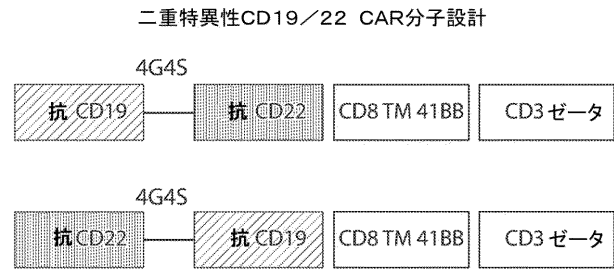


FIG. 13

【図 1 5】

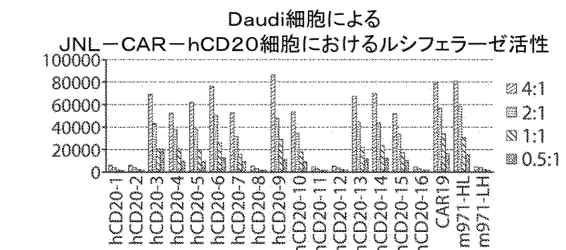


FIG. 15A

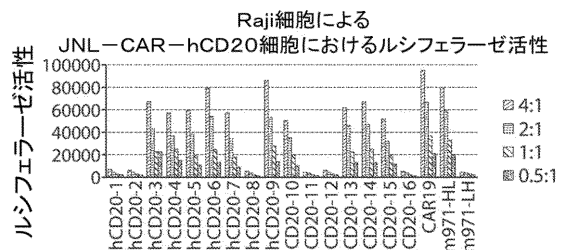


FIG. 15B

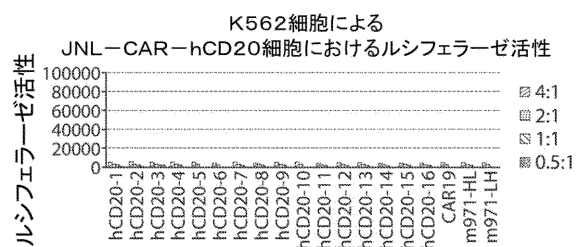


FIG. 15C

【図 16】

NR対CRにおいて富化された活性化Teff
活性化対静止Teffにおいて上方調節された遺伝子はまたNRにおいても上方調節される。

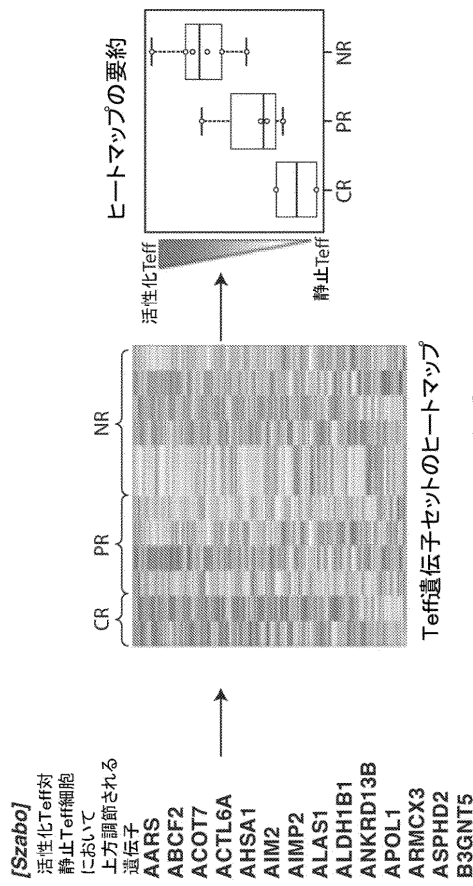
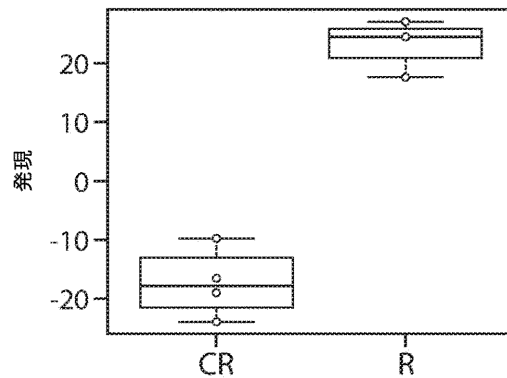


FIG. 16

【図 17】

Treg対Teffで上方調節、0時間に対して標準化



$p=0.000215$

FIG. 17

【図 18】

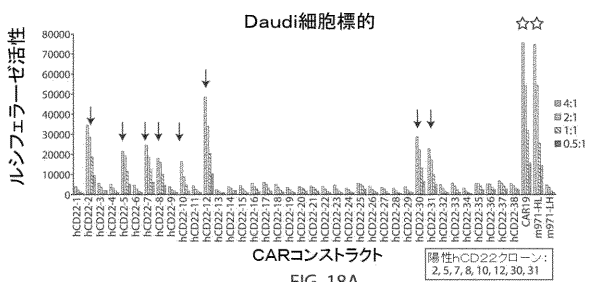


FIG. 18A

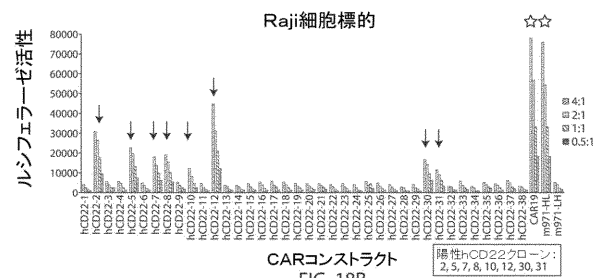


FIG. 18B

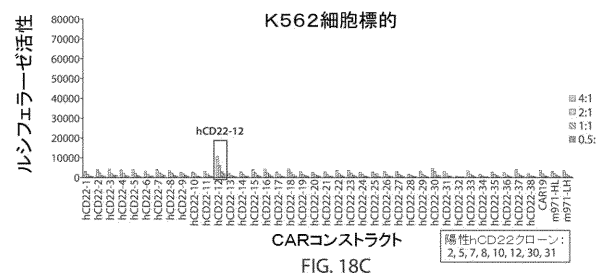


FIG. 18C

【図 19-1】

タンパク質L

*ビオチン化タンパク質-L (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) およびストレプトアビジン-PE (1対200) による染色

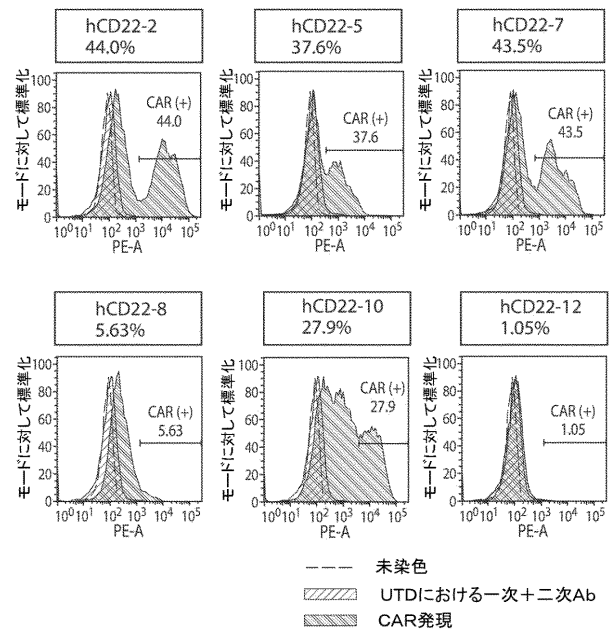


FIG. 19-1

【図 19-2】

タンパク質L

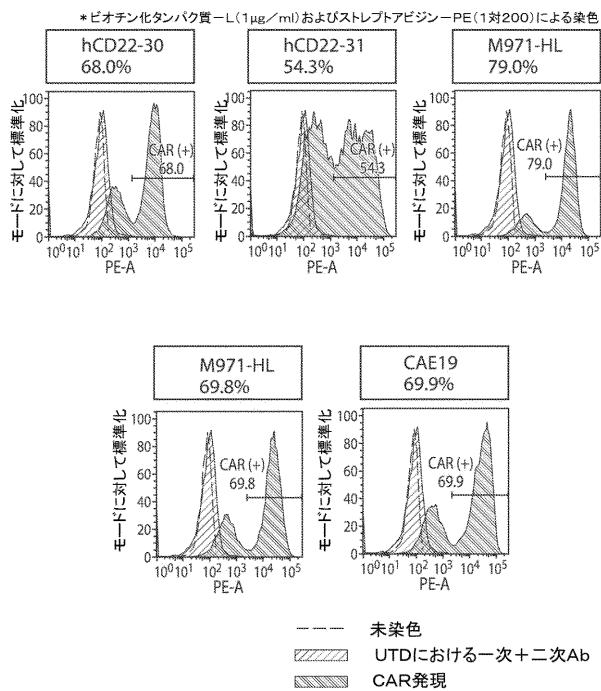


FIG. 19-2

【図 19-3】

Fcタンパク質

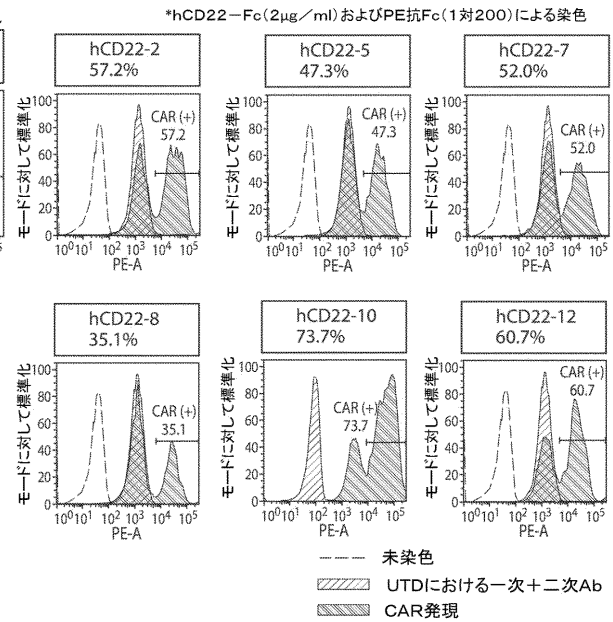


FIG. 19-3

【図 19-4】

Fcタンパク質

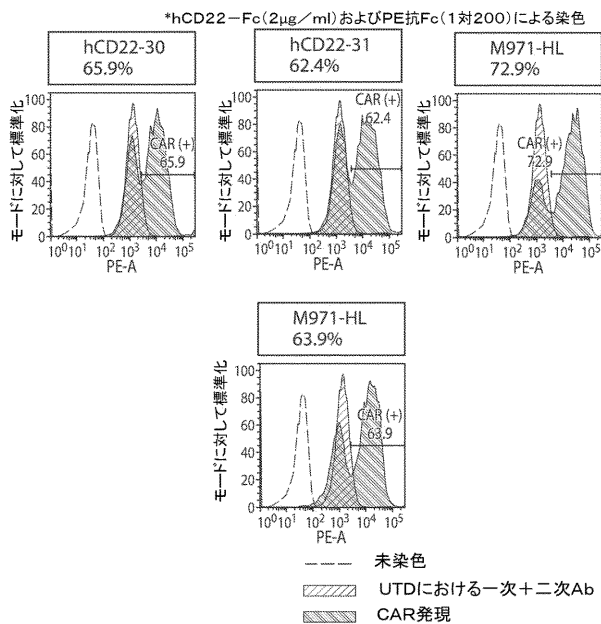
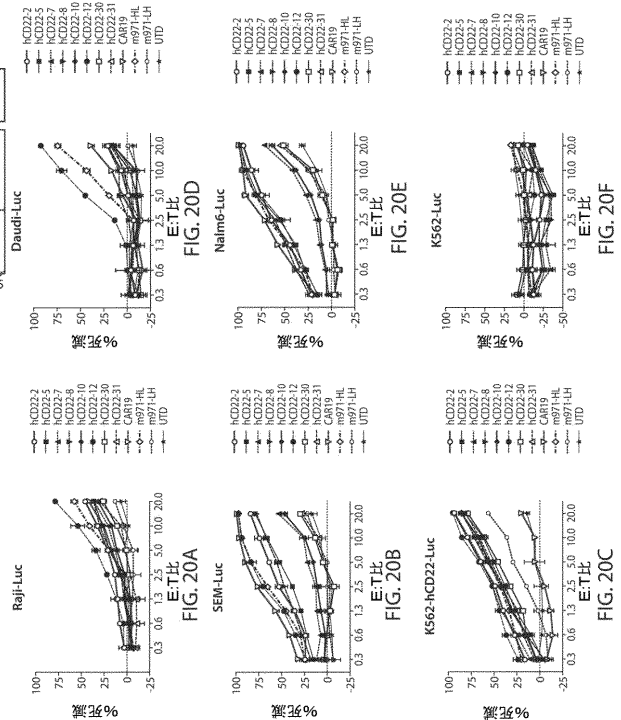
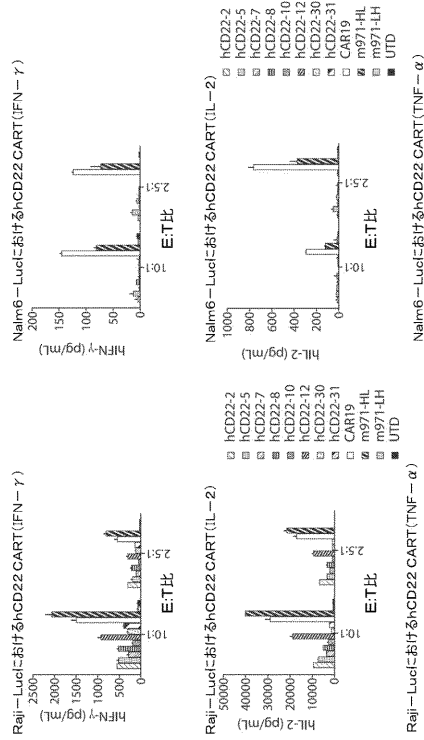


FIG. 19-4

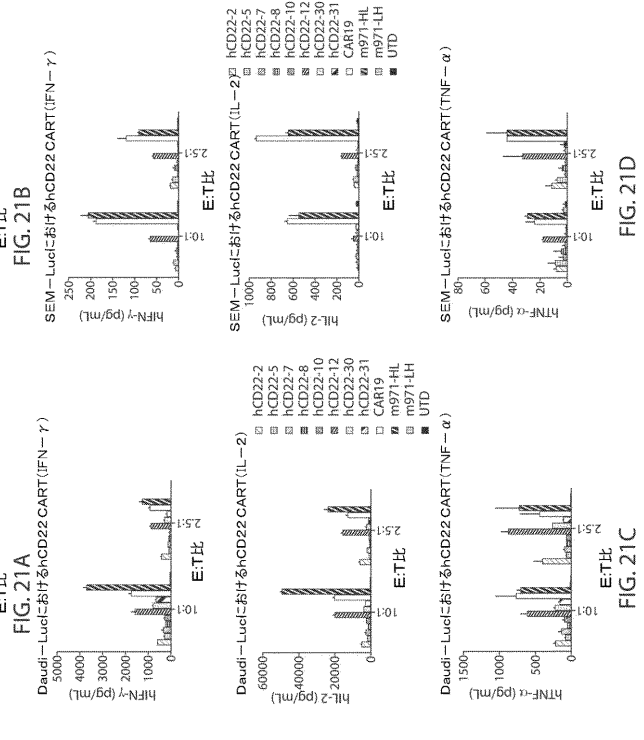
【図 20】



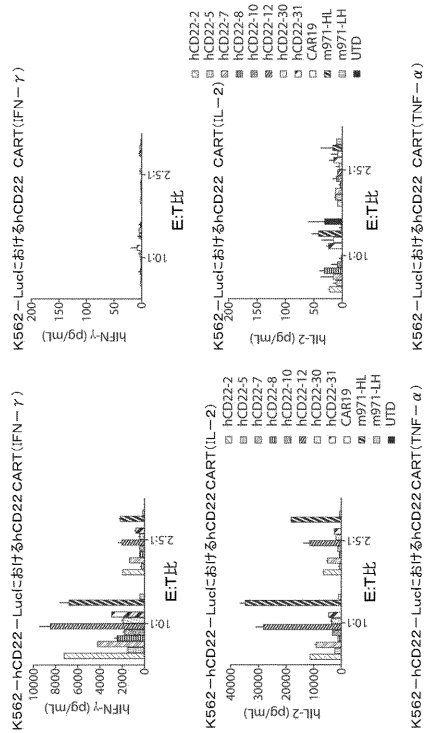
【図 2 1 - 1】



【図 2 1 - 2】



【図 2 1 - 3】



【図 2 2】

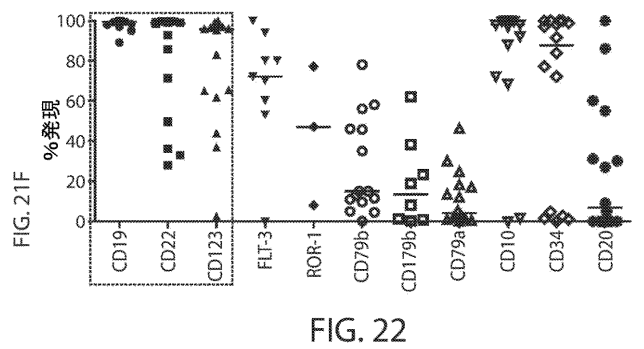


FIG. 22

FIG. 21E

【図 2 3】

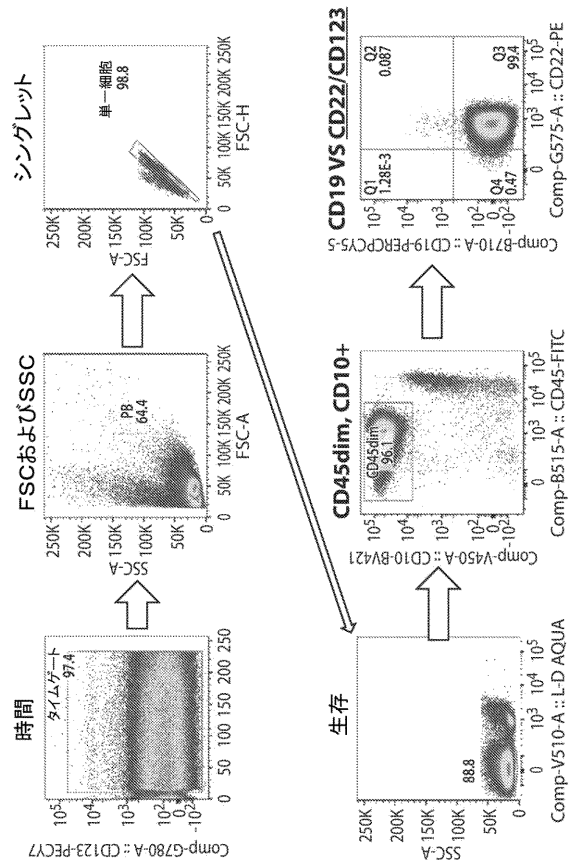


FIG. 23

【図 2 4】

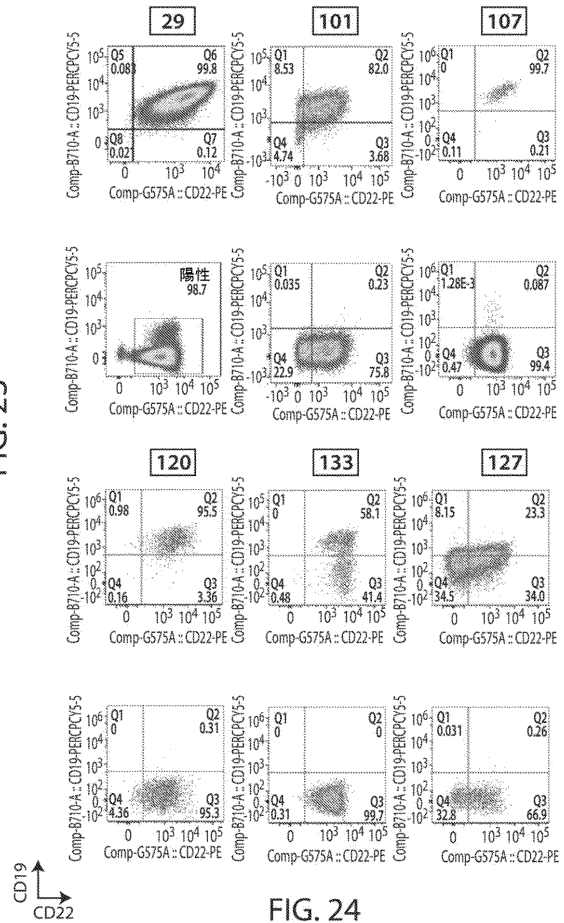


FIG. 24

【図 2 5】

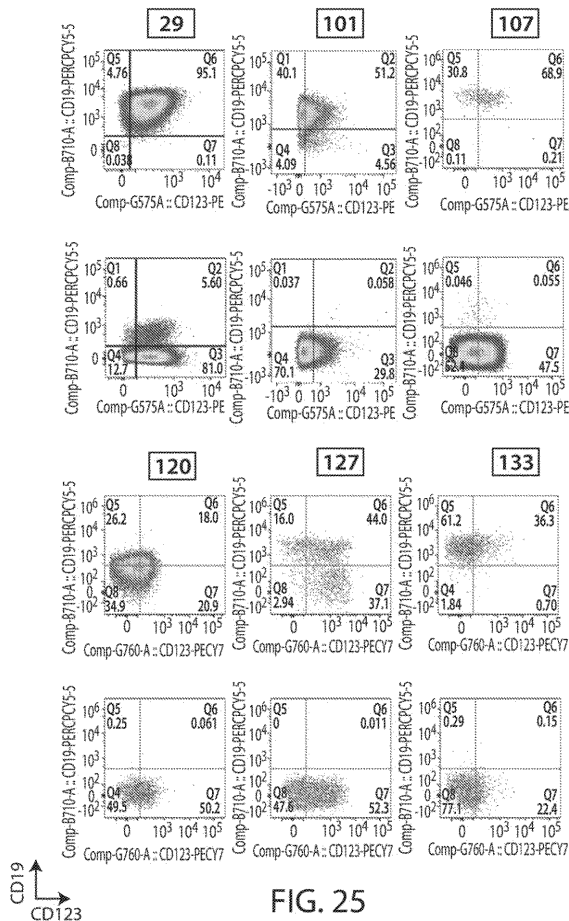


FIG. 25

【図 2 6】

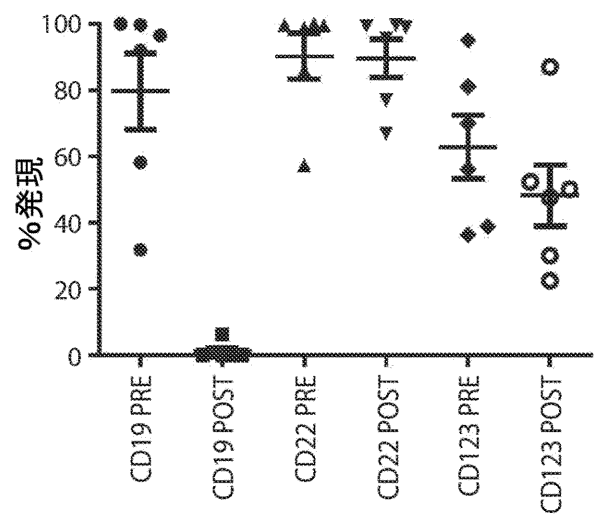


FIG. 26

【図 27】

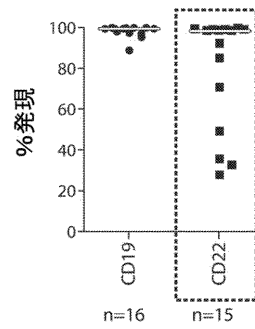


FIG. 27A

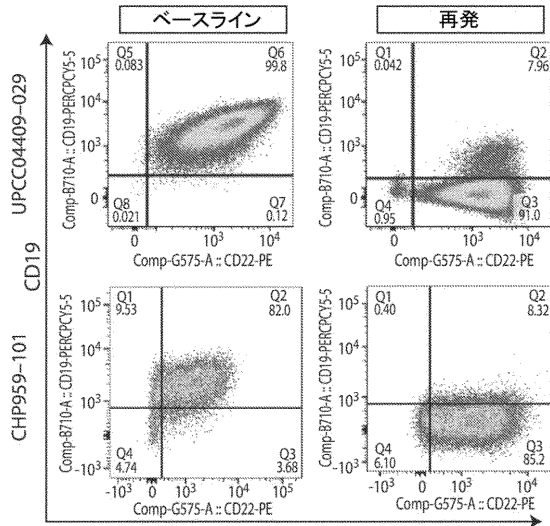


FIG. 27B

【図 28】

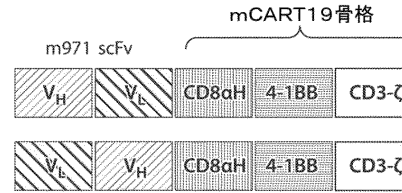


FIG. 28A

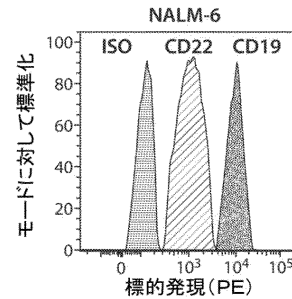


FIG. 28B

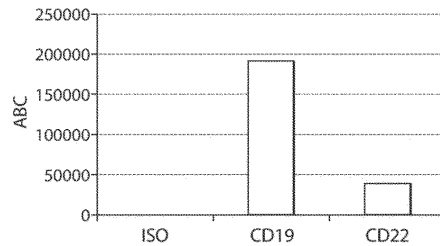
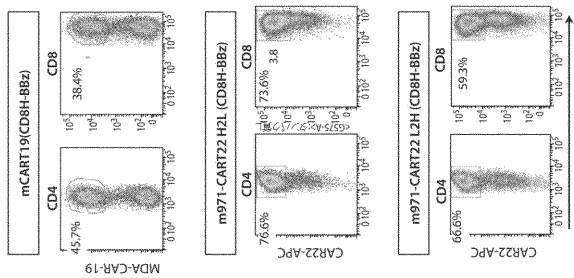


FIG. 28C

【図 29】



集団倍化

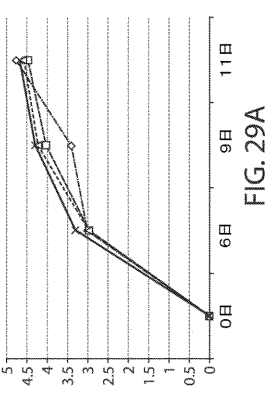


FIG. 29A

細胞容量

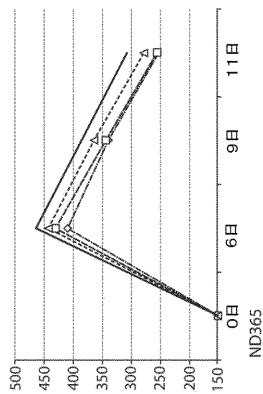
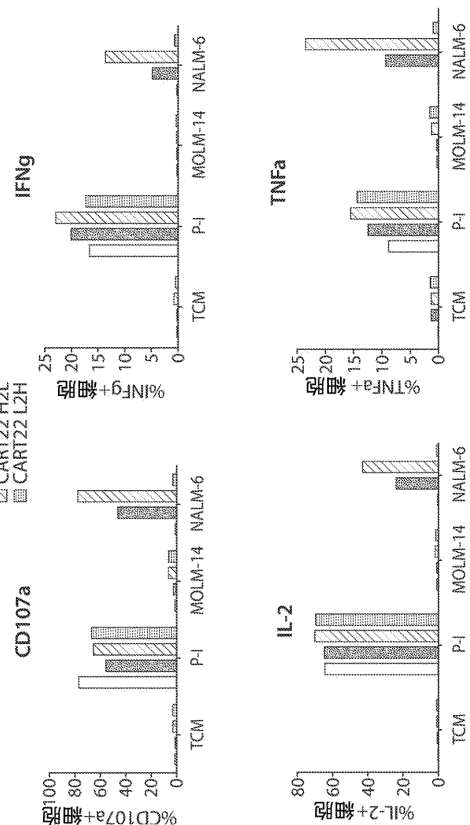


FIG. 29B

【図 30】



全ての値はUTDと比較して統計的に有意である

FIG. 30

【図 3 1】

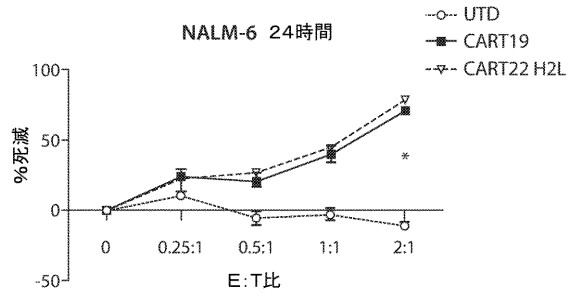


FIG. 31

【図 3 2】

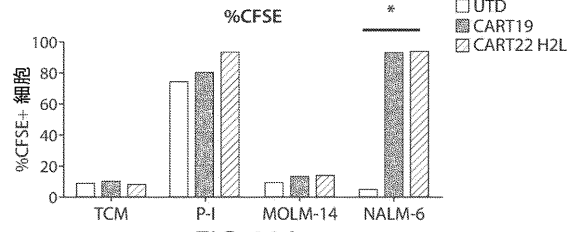


FIG. 32A

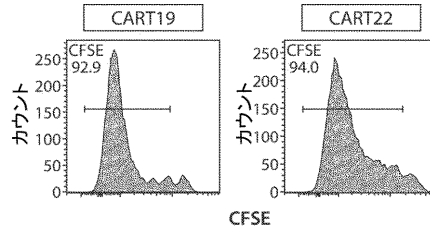


FIG. 32B

【図 3 3】

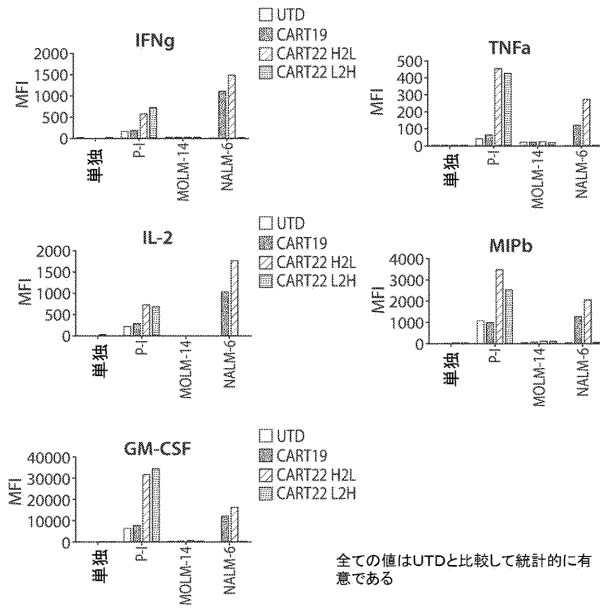


FIG. 33

【図 3 4】

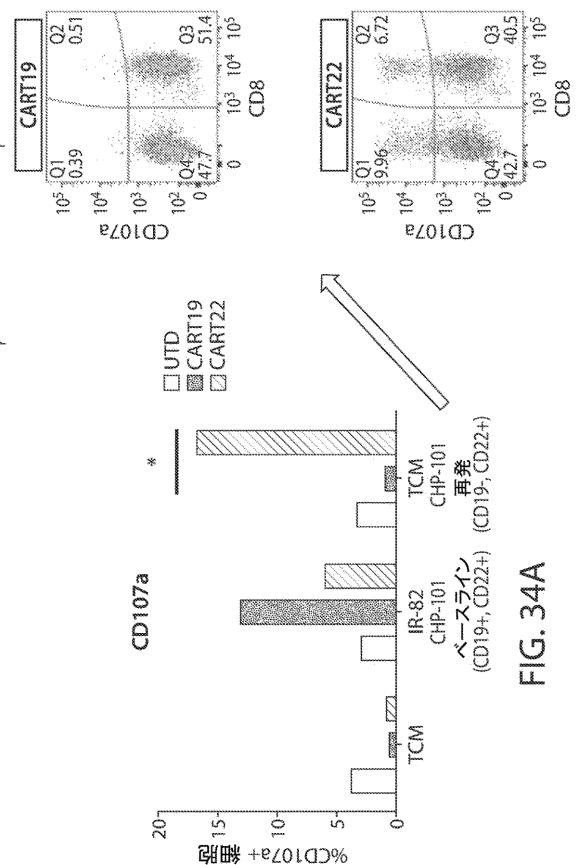
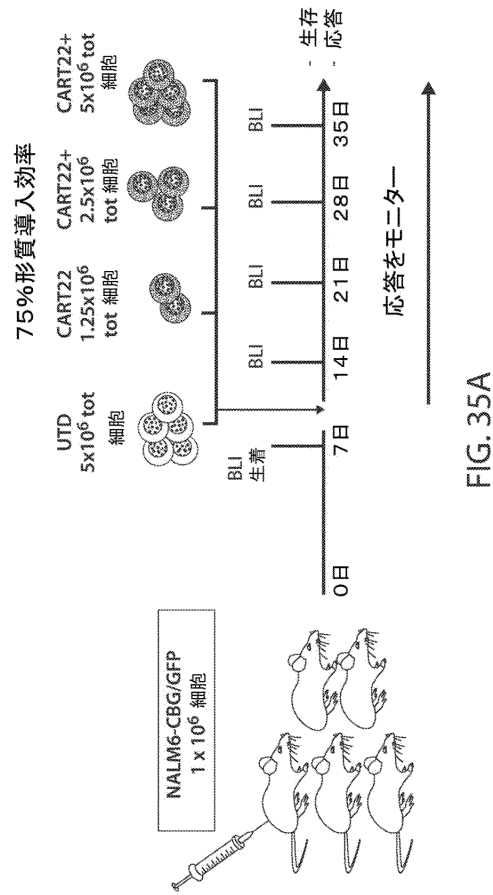


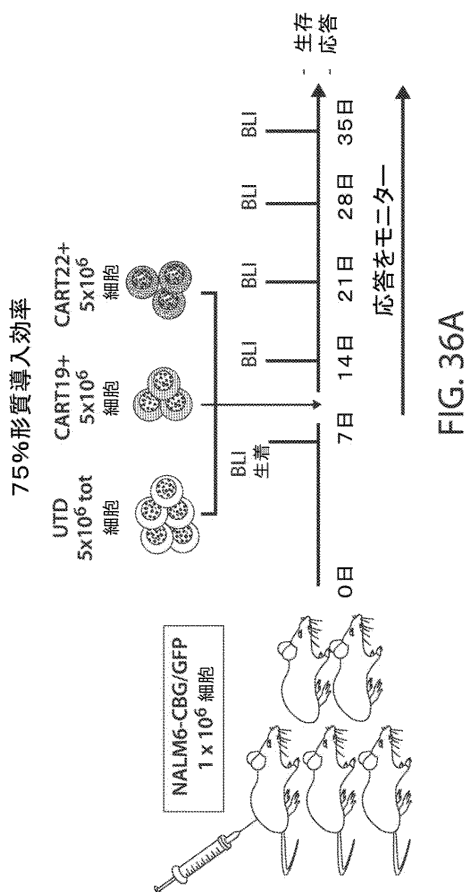
FIG. 34B

FIG. 34A

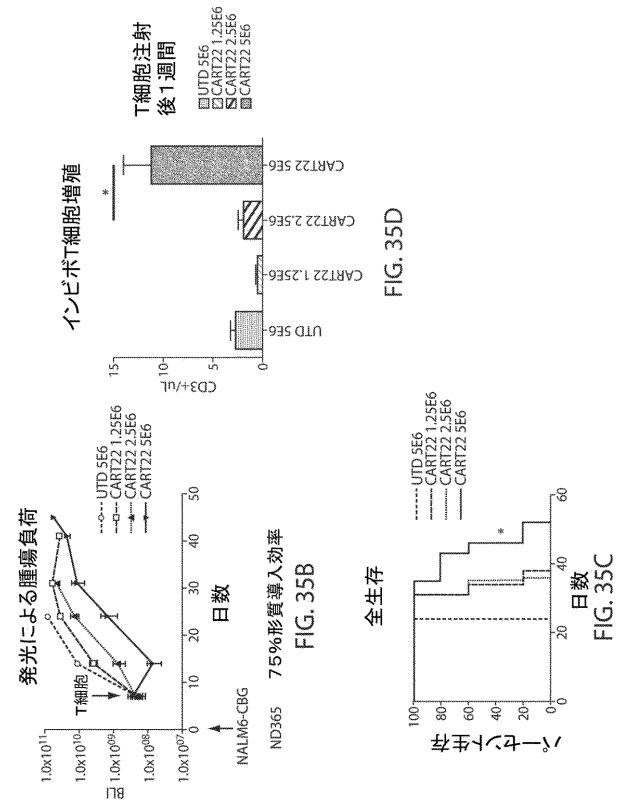
【図 35-1】



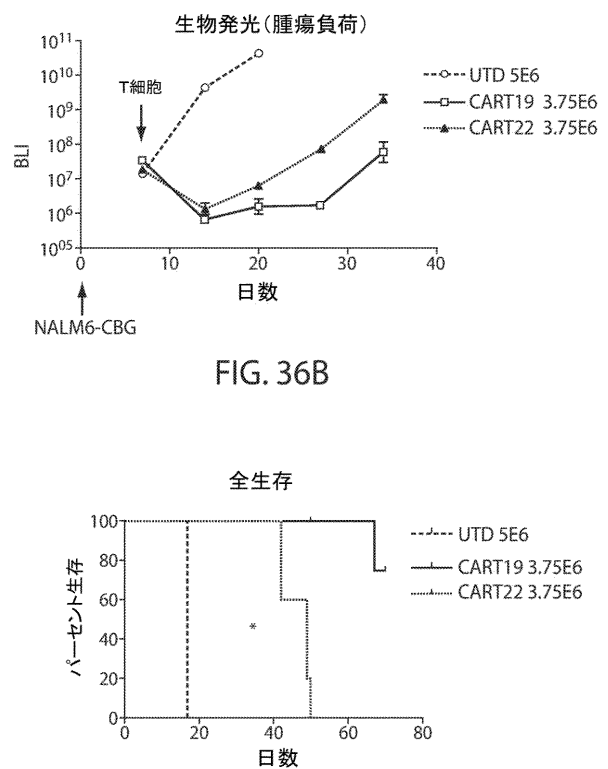
【図 36-1】



【図 35-2】



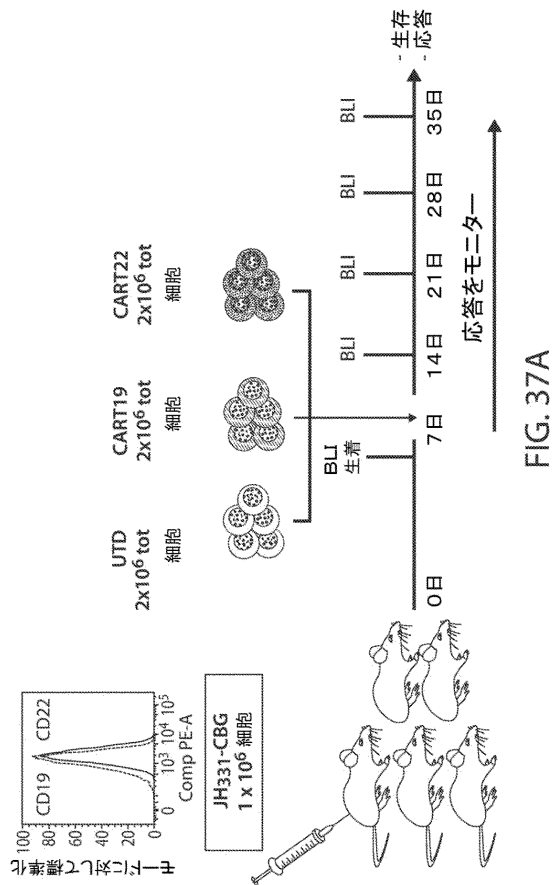
【図 36-2】



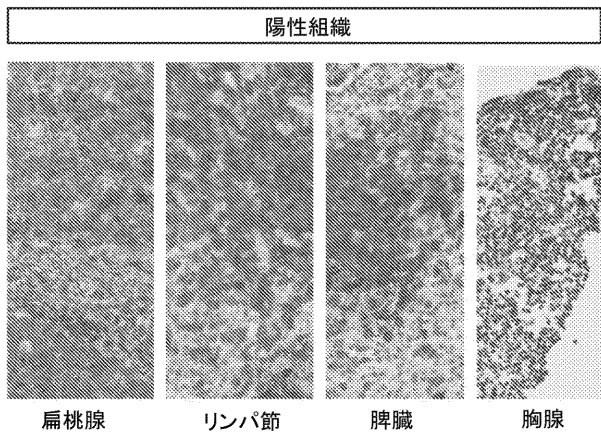
*CARTは同数のCAR-posに対して標準化(3.75e6/マウス)

FIG. 36C

【図 37-1】



【図 38-1】



20X

FIG. 38A

【図 37-2】

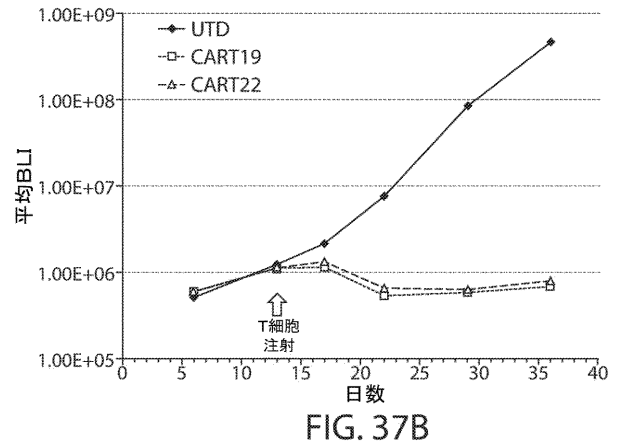
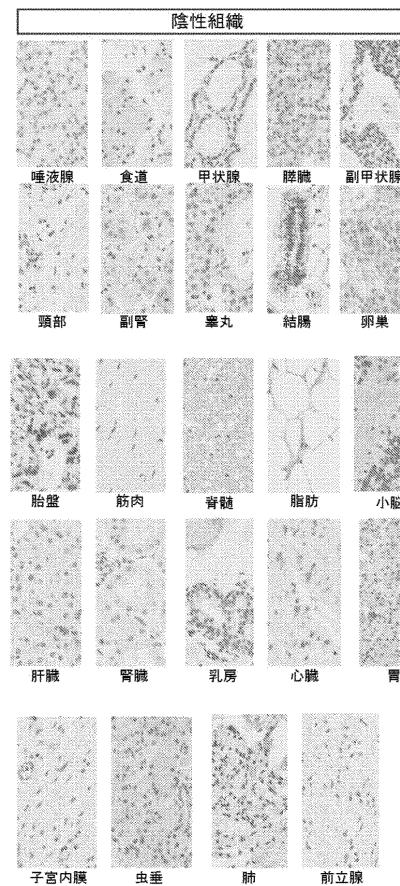


FIG. 37B

【図 38-2】



20X

FIG. 38B

【図 38-3】

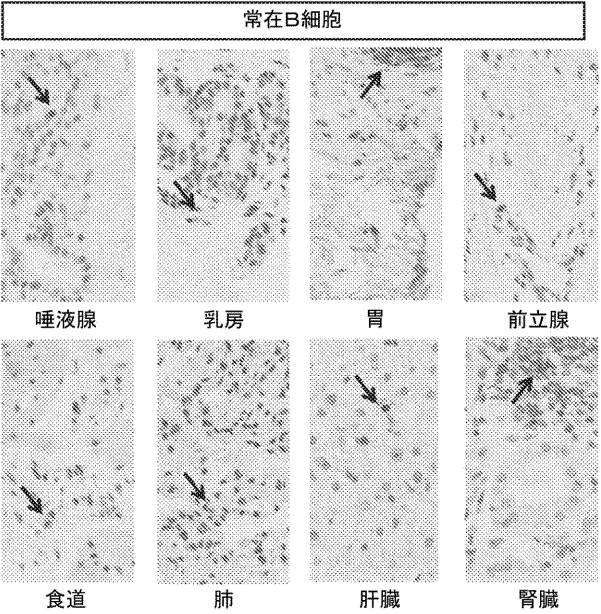


FIG. 38C

【図 39-1】

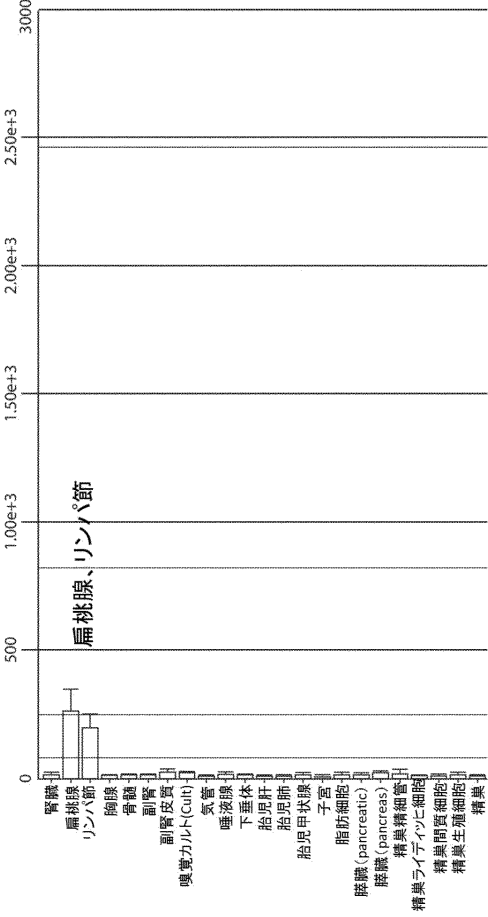


FIG. 39-1

【図 39-2】

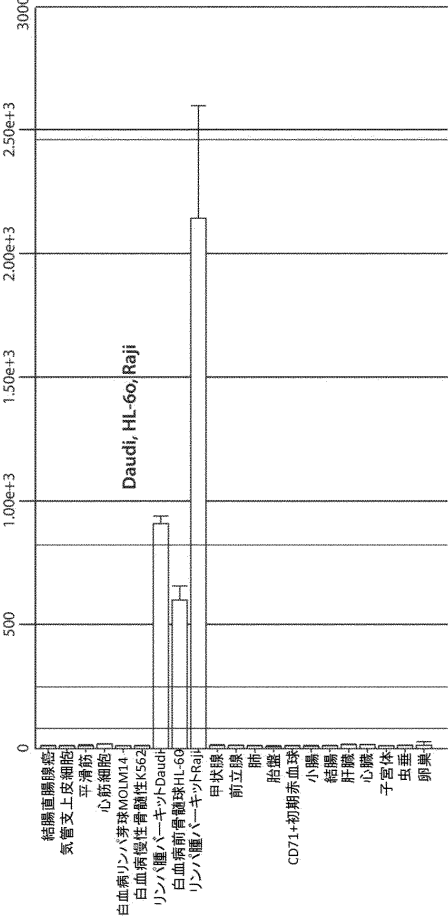
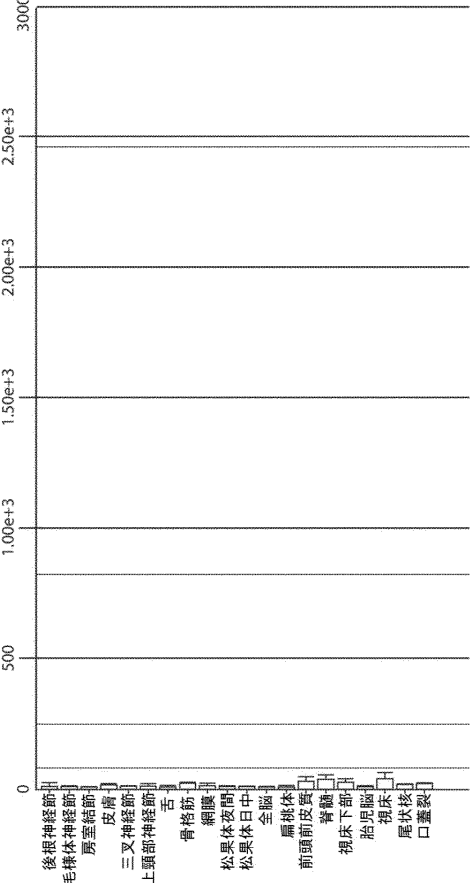
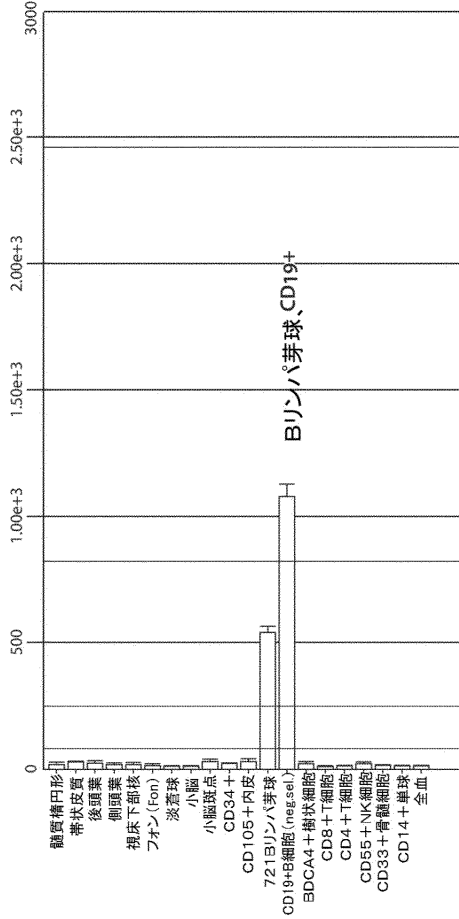


FIG. 39-2

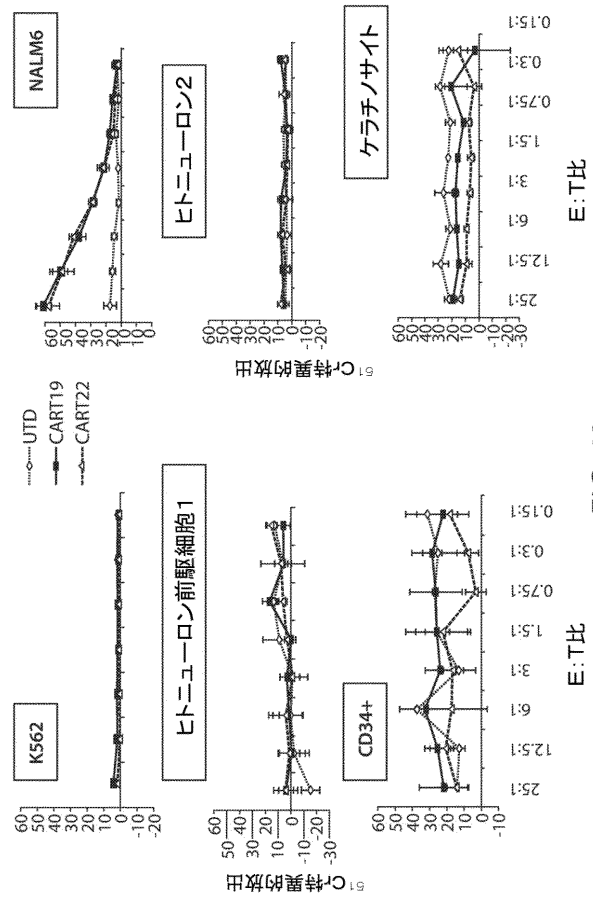
【図 39-3】



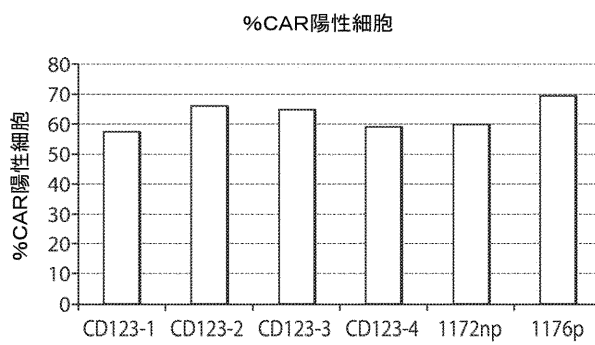
【図 39-4】



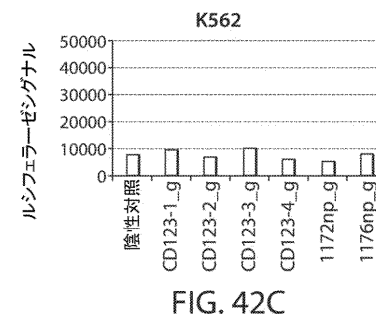
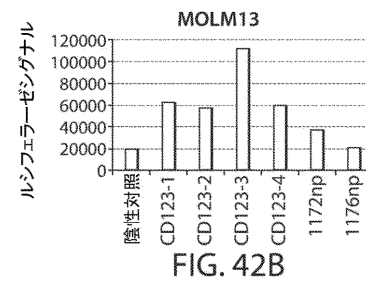
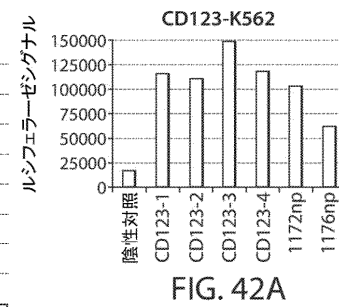
【図 40】



【図 41】



【図 42】



【図 4 3】

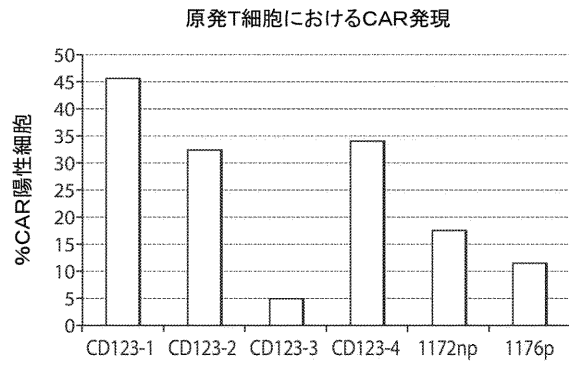


FIG. 43A

【図 4 4】

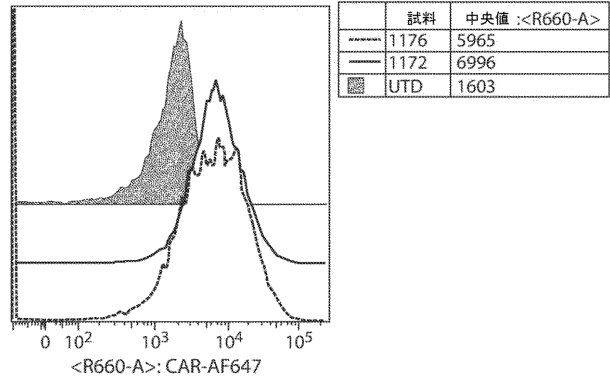


FIG. 44A

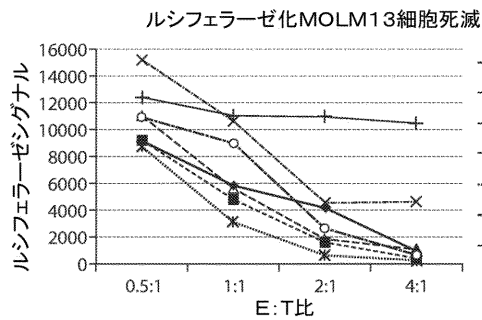


FIG. 43B

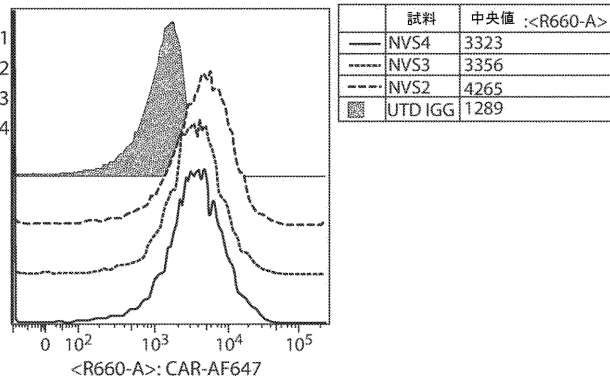


FIG. 44B

【図 4 5】

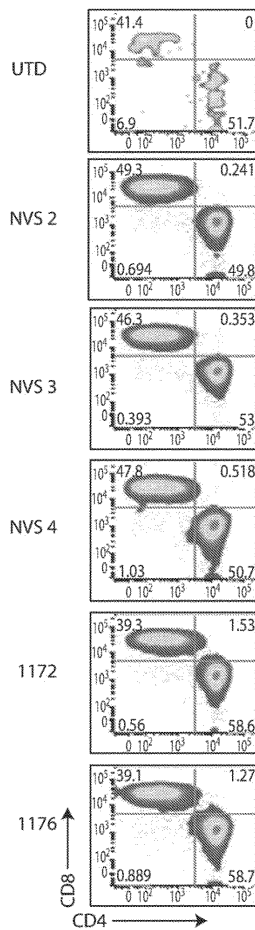


FIG. 45

【図 4 6】

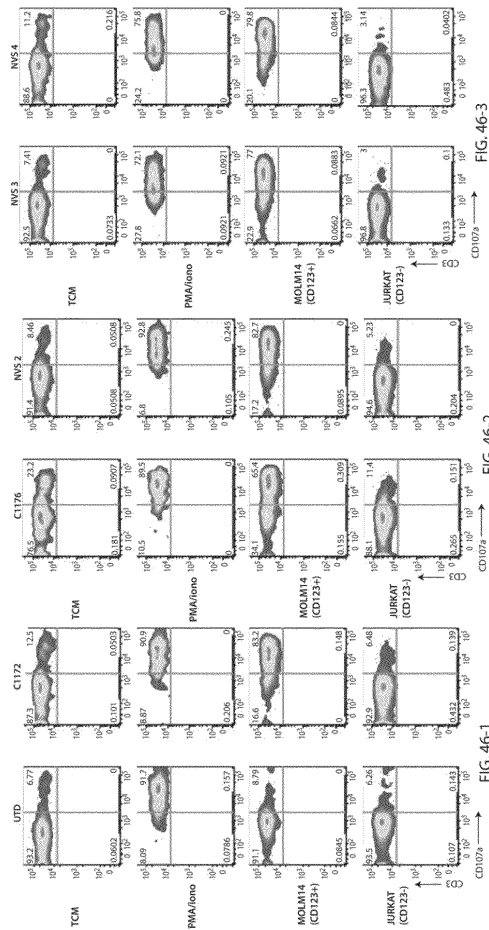


FIG. 46-3

FIG. 46-2

FIG. 46-1

【図 4 7】

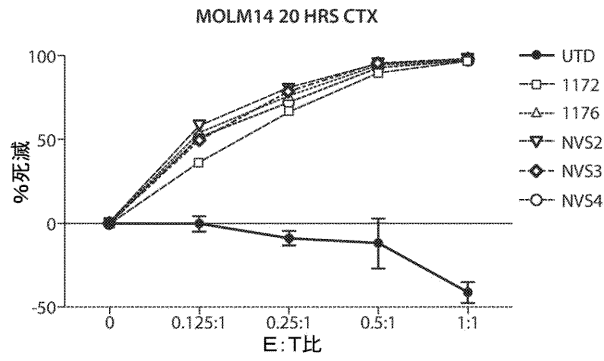


FIG. 47

【図 4 9 - 1】

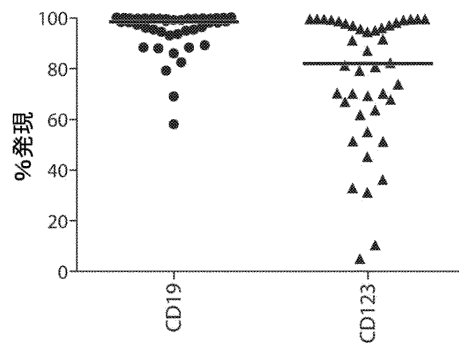


FIG. 49A

【図 4 8】

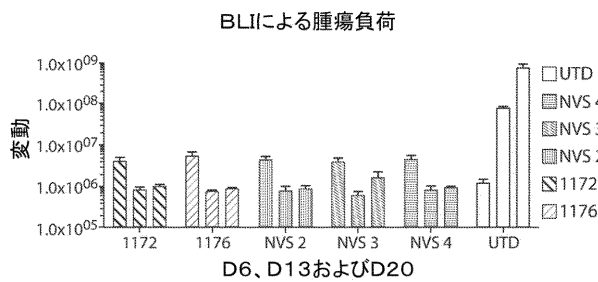


FIG. 48

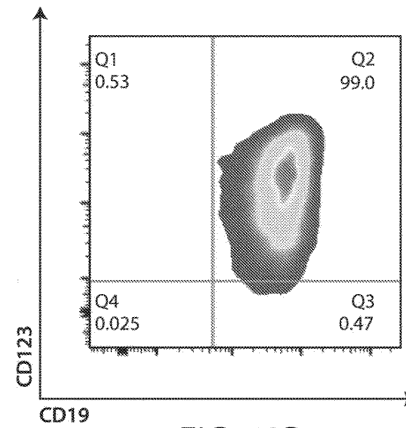


FIG. 49B

【図 4 9 - 2】

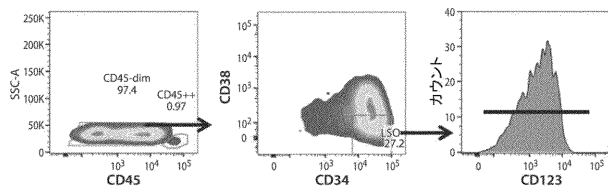


FIG. 49C

【図 4 9 - 3】

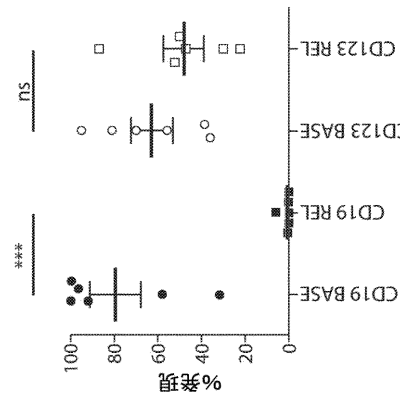


FIG. 49F

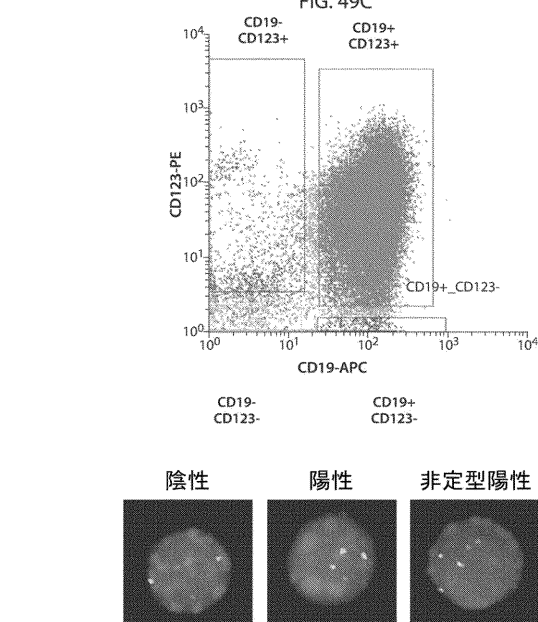


FIG. 49D

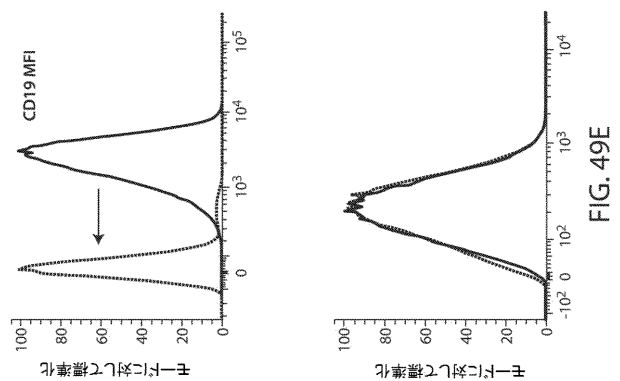


FIG. 49E

【図 50-1】

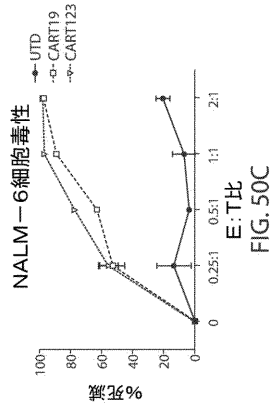


FIG. 50C

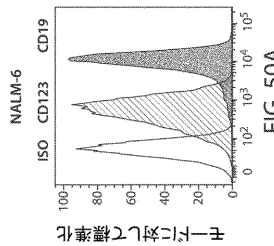


FIG. 50A

5日目の増殖

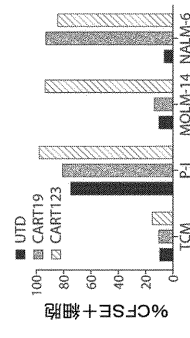


FIG. 50D

CD107a脱顆粒化

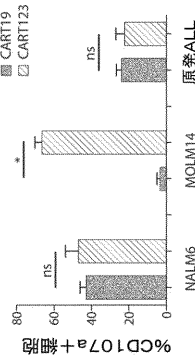


FIG. 50B

【図 50-2】

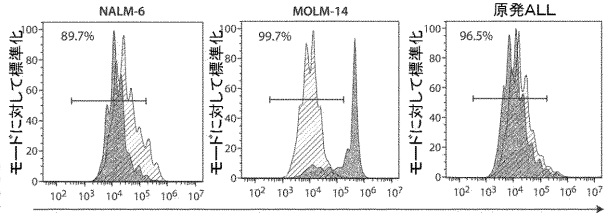


FIG. 50E

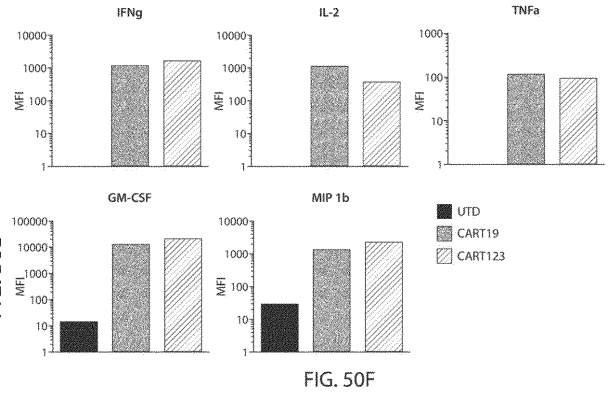


FIG. 50F

【図 51】

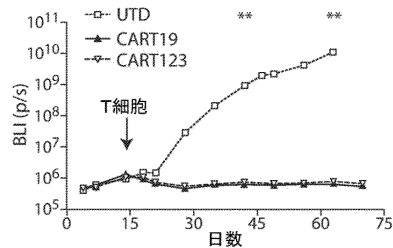


FIG. 51A

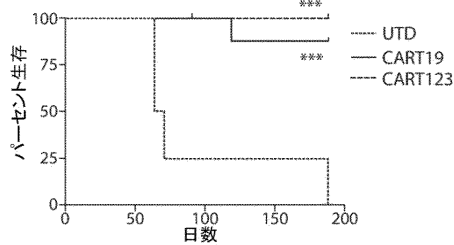


FIG. 51B

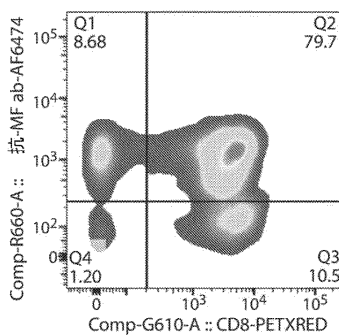


FIG. 51C

【図 52-1】

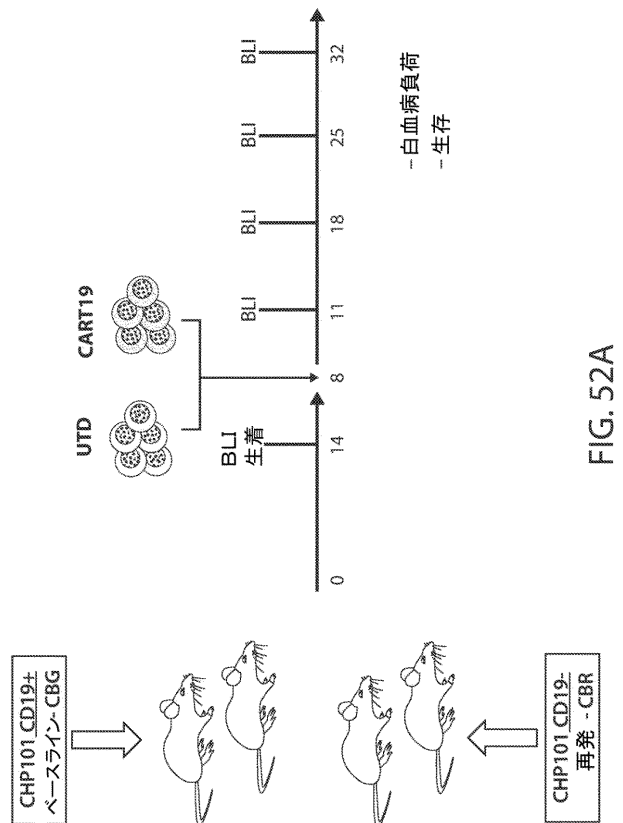
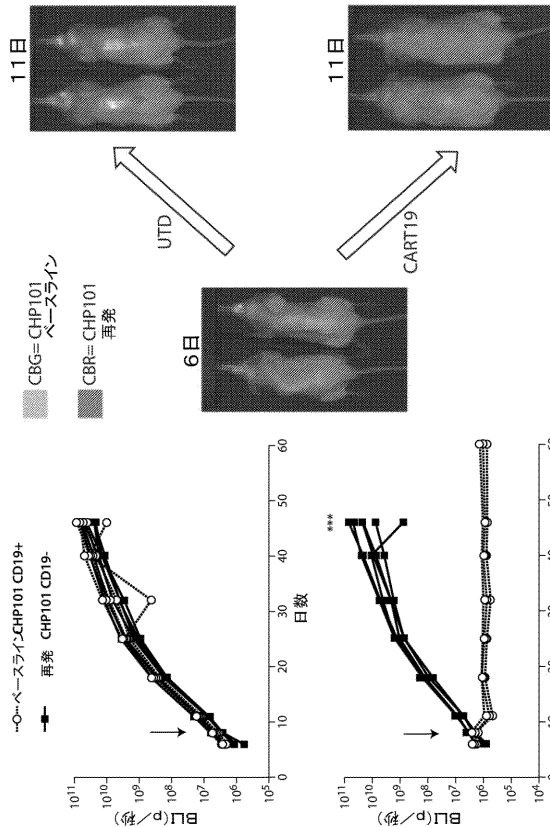
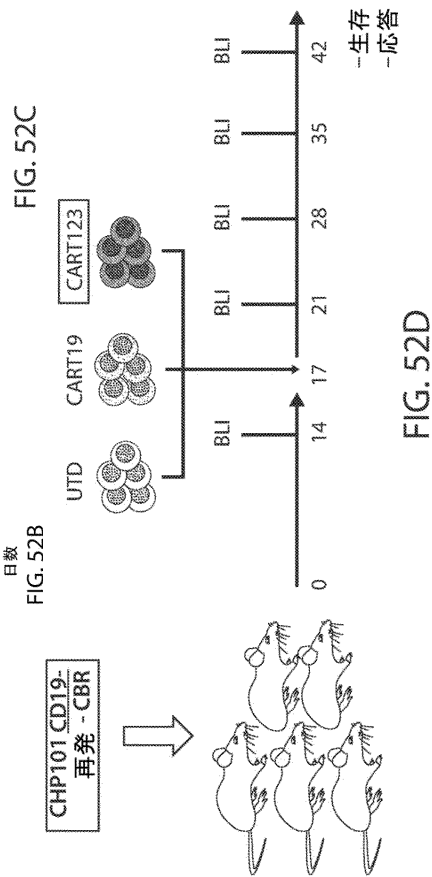


FIG. 52A

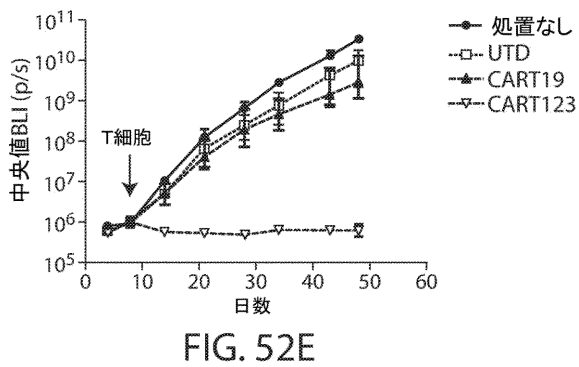
【図 5 2 - 2】



【図 5 2 - 3】



【図 5 2 - 4】



【図 5 3 - 1】

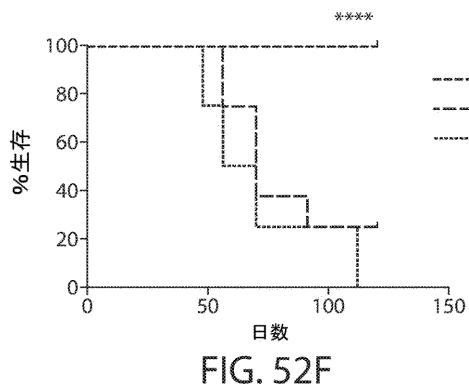
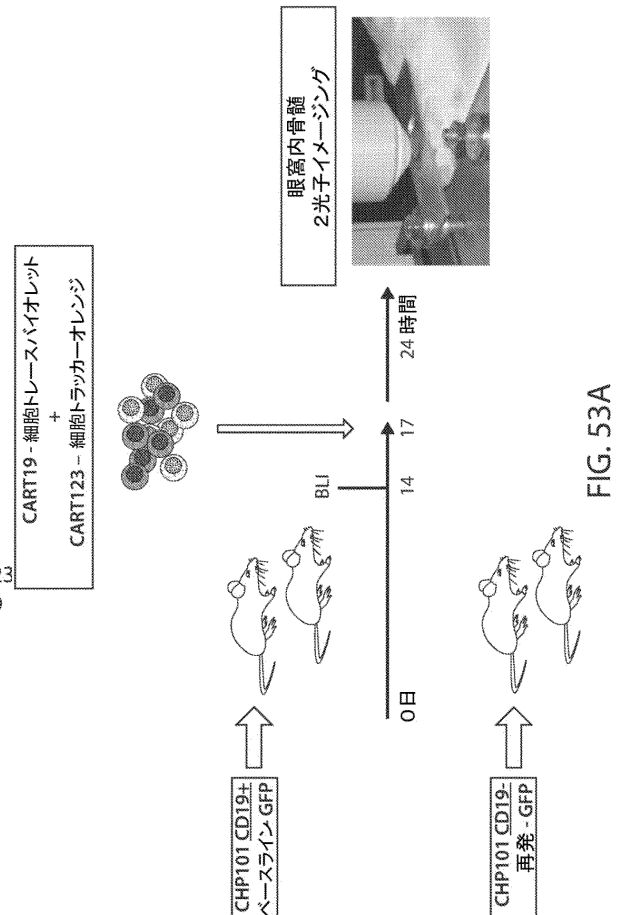


FIG. 53A

【図 5 3 - 2】

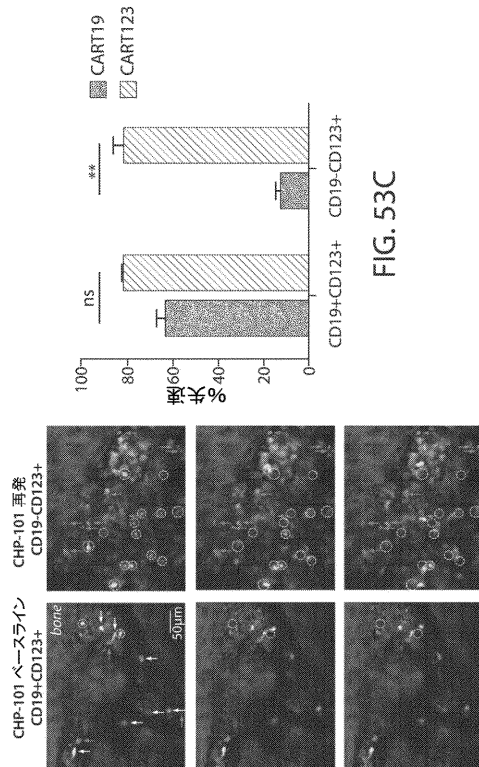


FIG. 53C

【図 5 4 - 1】

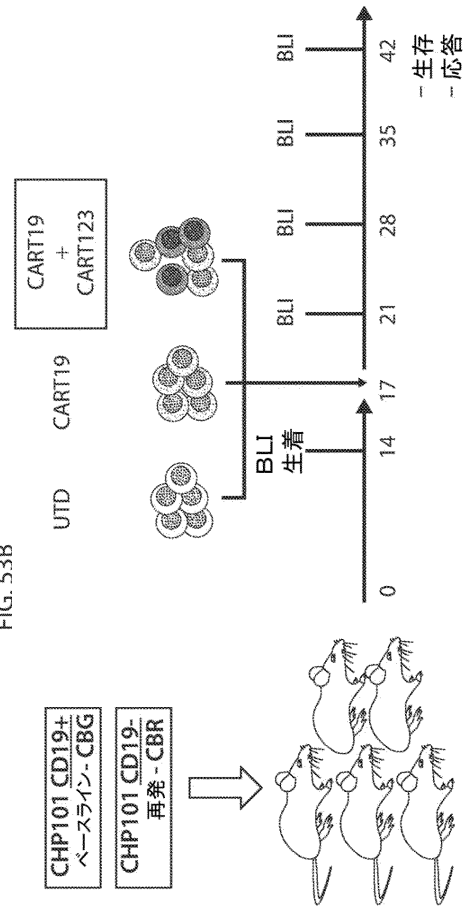


FIG. 54A

【図 5 4 - 2】

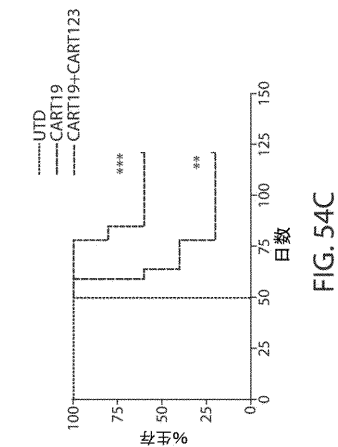


FIG. 54C

【図 5 5】

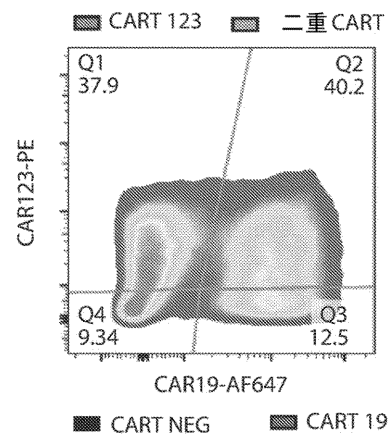


FIG. 55A

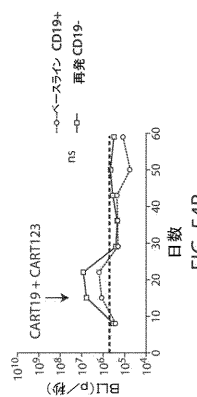
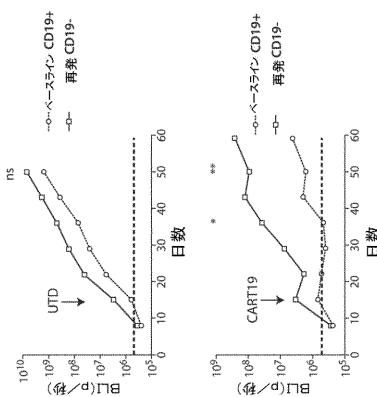


FIG. 54B

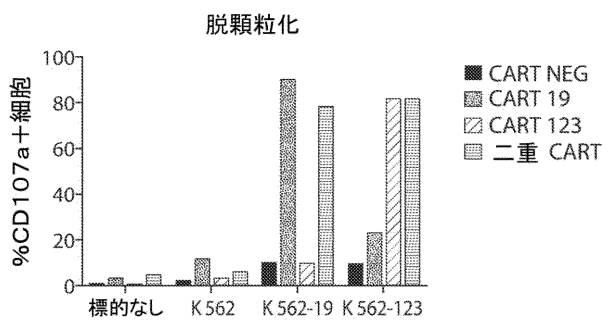


FIG. 55B

【図 56】

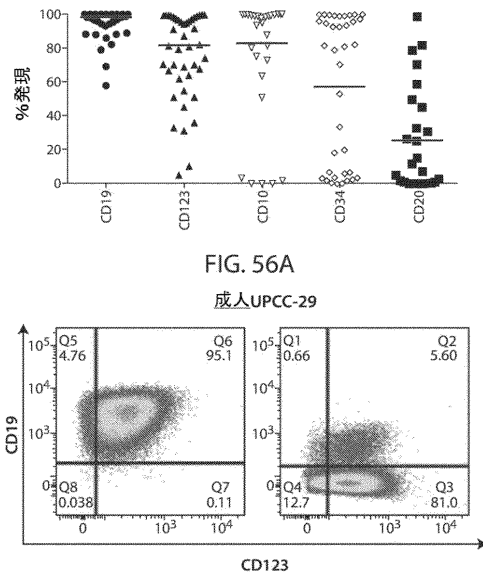
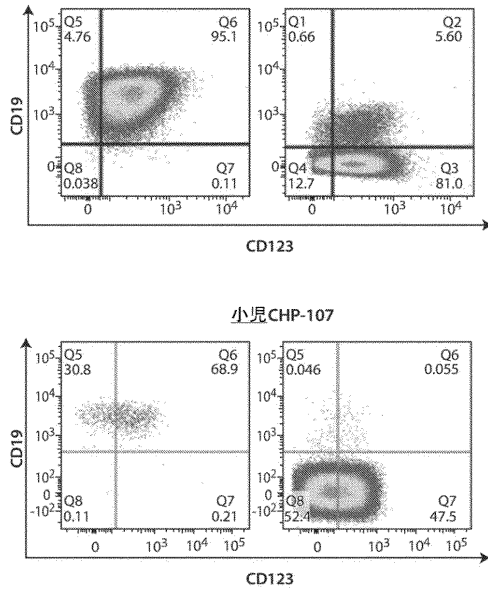


FIG. 56A

成人UPCC-29



小児CHP-107

FIG. 56B

【図 58】

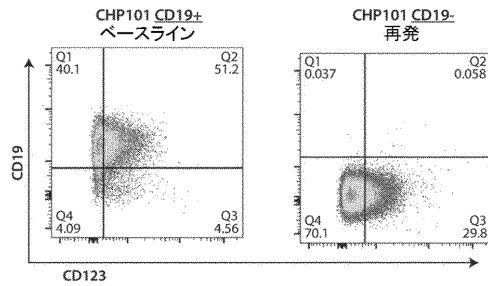


FIG. 58A

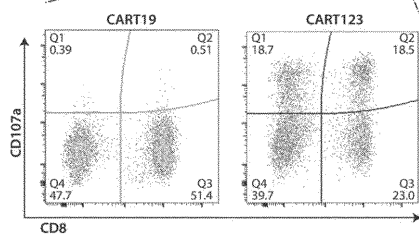
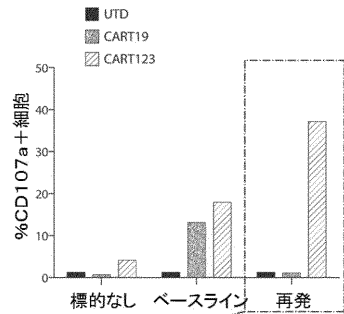


FIG. 58B

【図 57】

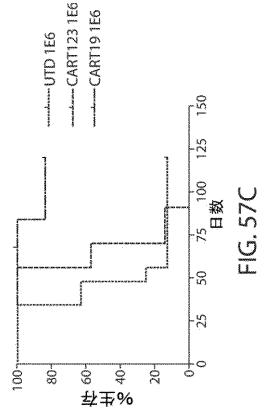


FIG. 57C

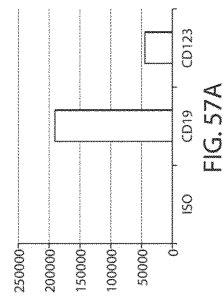


FIG. 57A

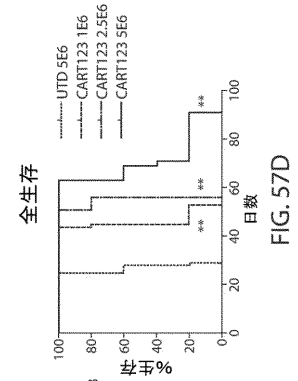


FIG. 57D

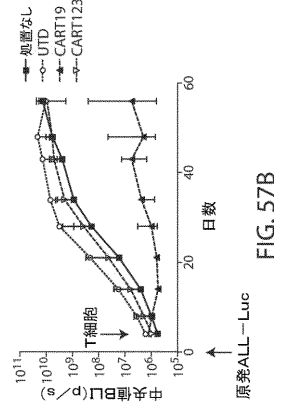


FIG. 57B

【図 59】

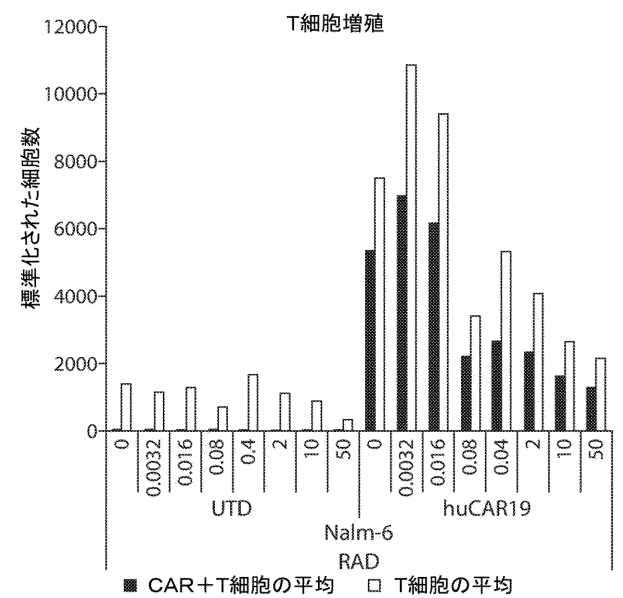


FIG. 59

【図 60】

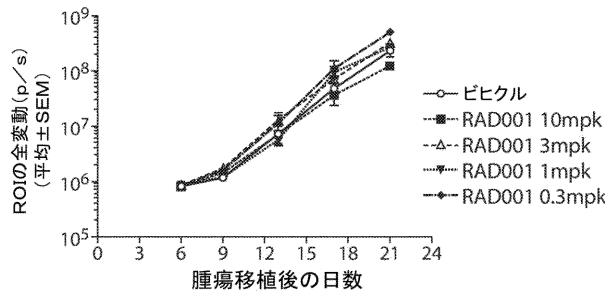


FIG. 60

【図 61】

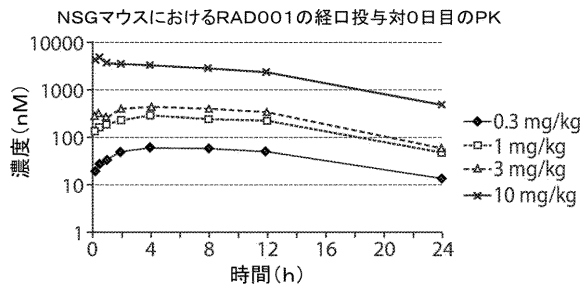


FIG. 61A

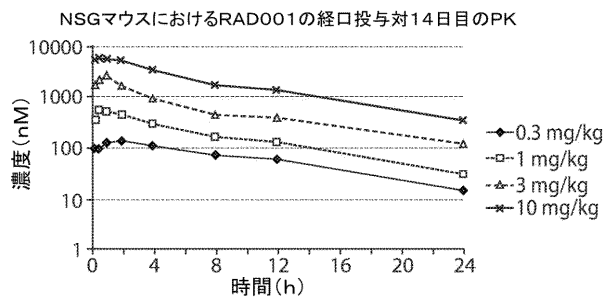


FIG. 61B

【図 62】

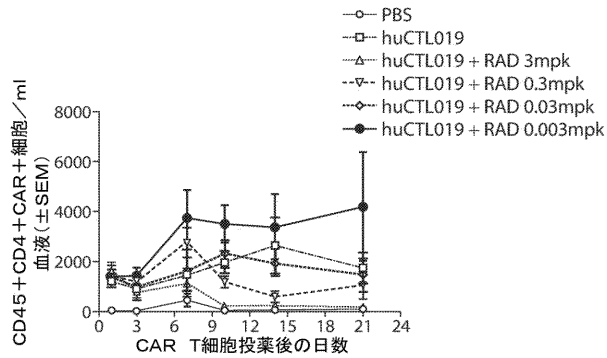


FIG. 62A

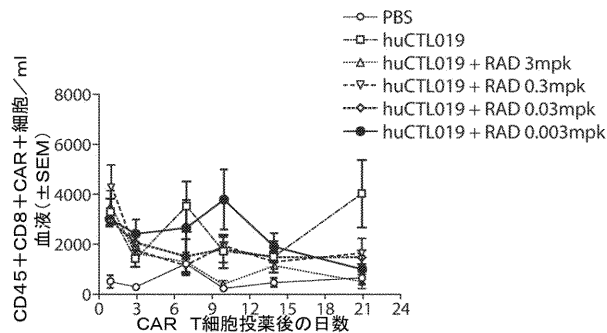


FIG. 62B

【図 63】

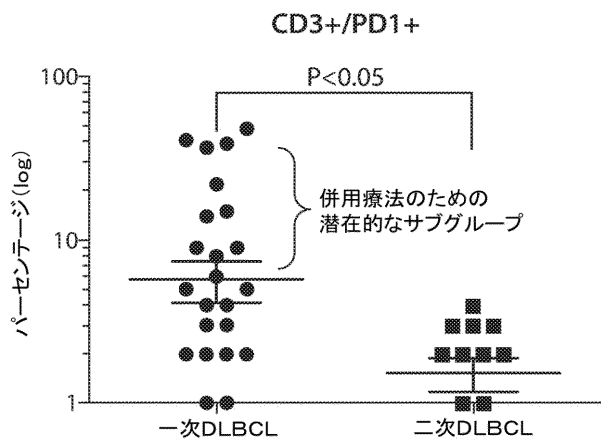


FIG. 63

【図 6 4】

広範囲のCD19はDLBCL患者において発現される
PD-L1は非腫瘍細胞DLBCL患者と関連付けられる

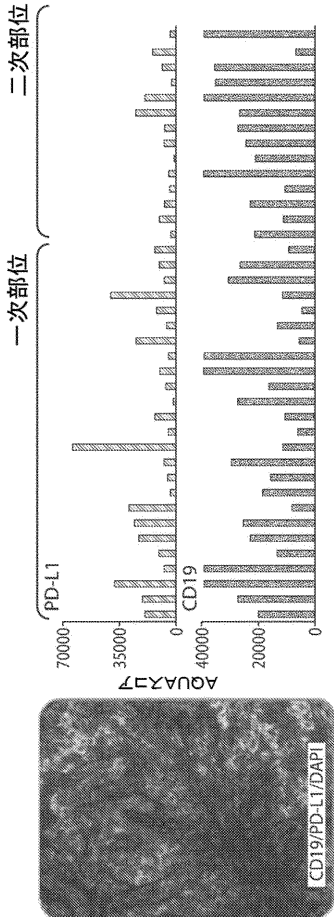


FIG. 64

【図 6 5】

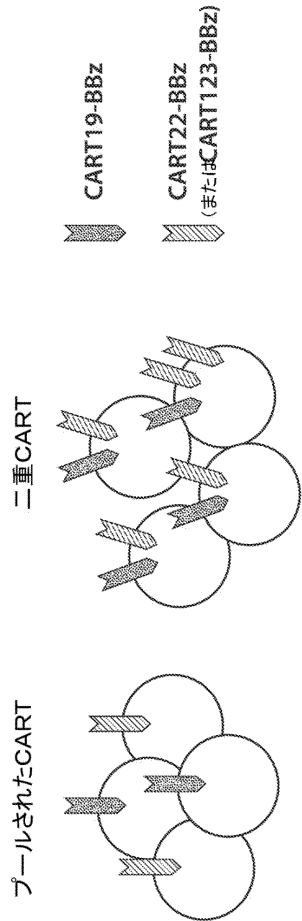
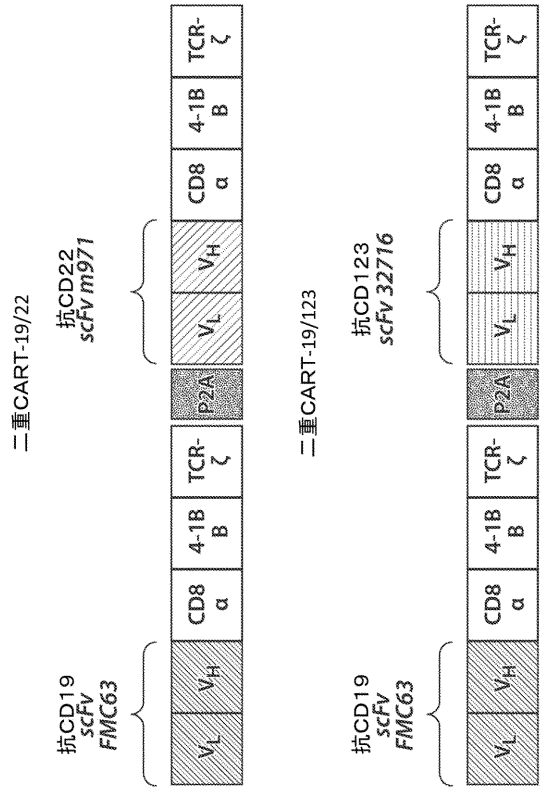


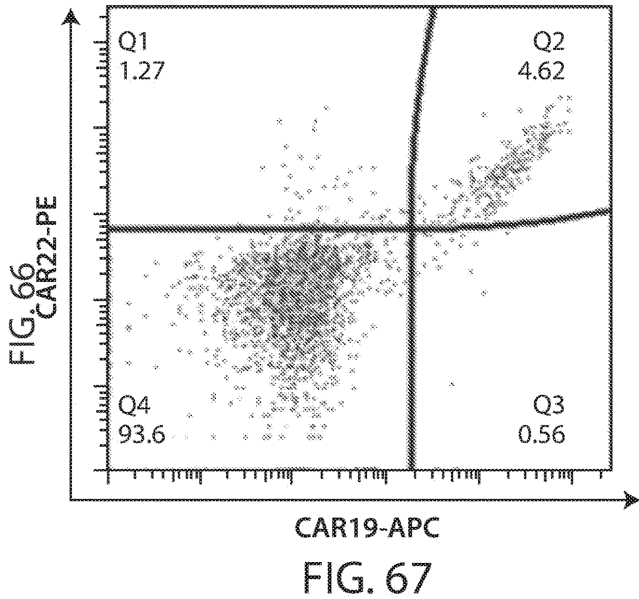
FIG. 65

【図 6 6】



【図 6 7】

二重CAR19-CAR22 P2Aプラスミド



【図 68】

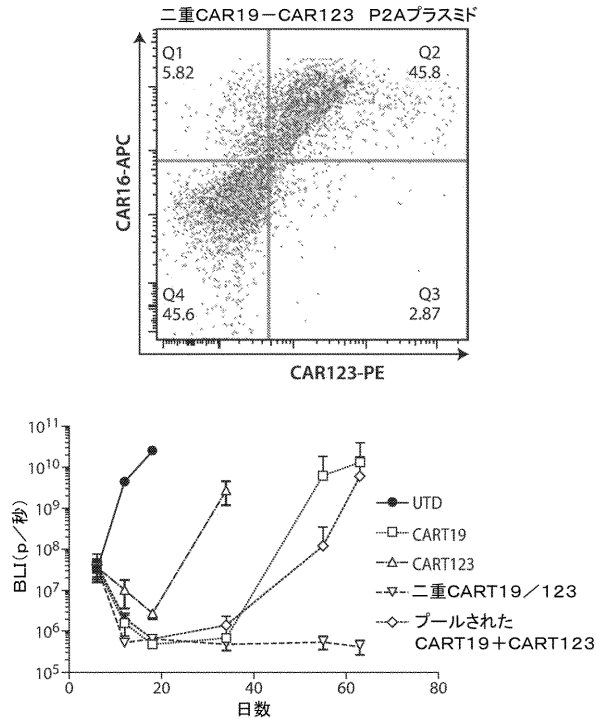


FIG. 68

【図 70】

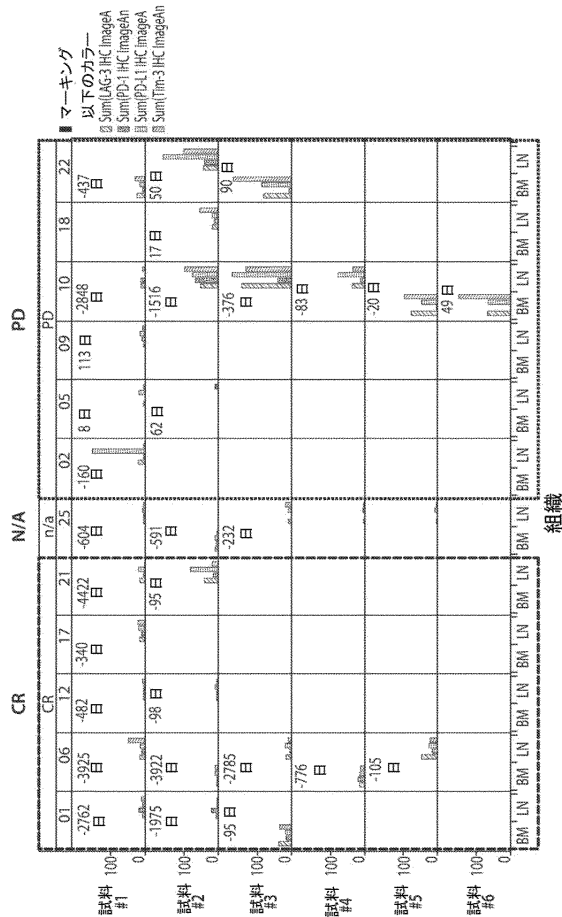


FIG. 70

抗原被覆プレート上のNFAT36-P1-CD22結合剤

【図 71】

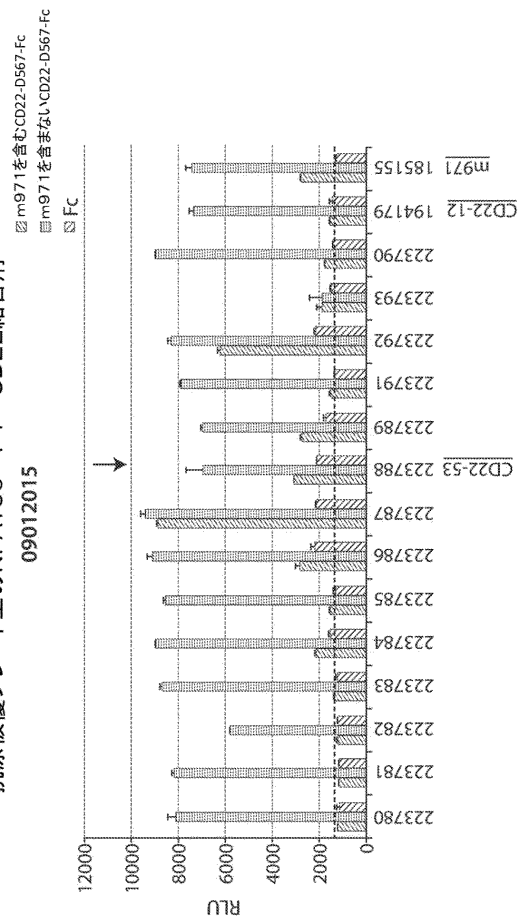
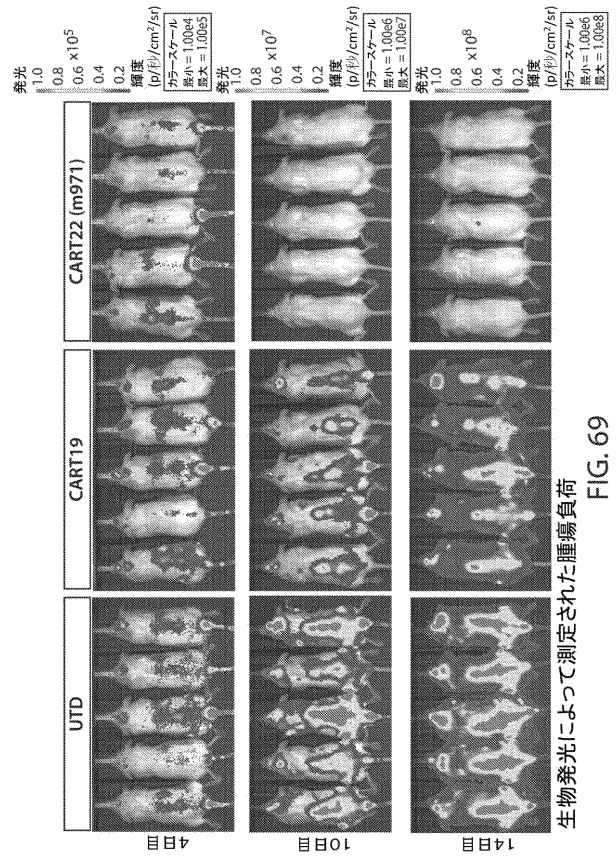


FIG. 71

【図 69】



生物発光によって測定された腫瘍負荷
FIG. 69

【図 7 2】

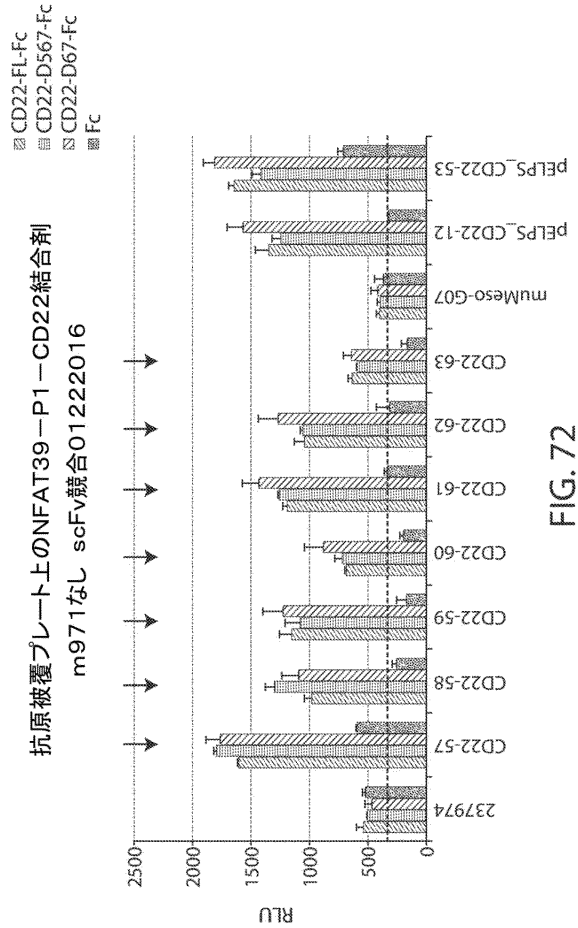


FIG. 72

【図 7 3】

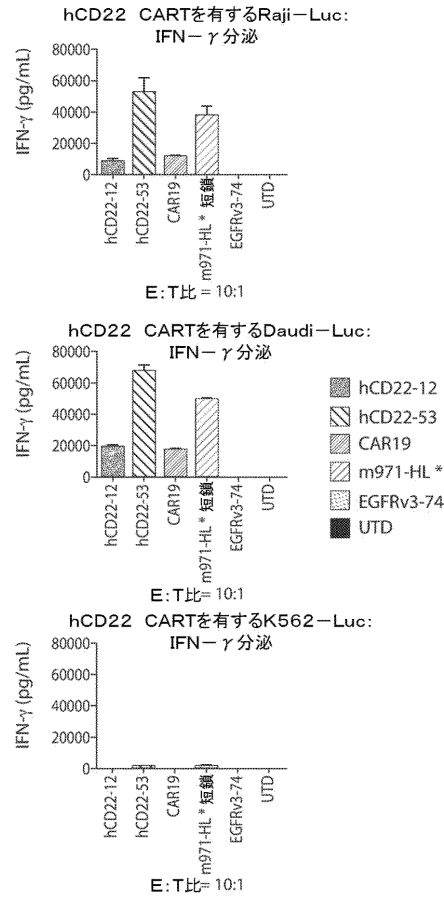


FIG. 73

【図 7 4】

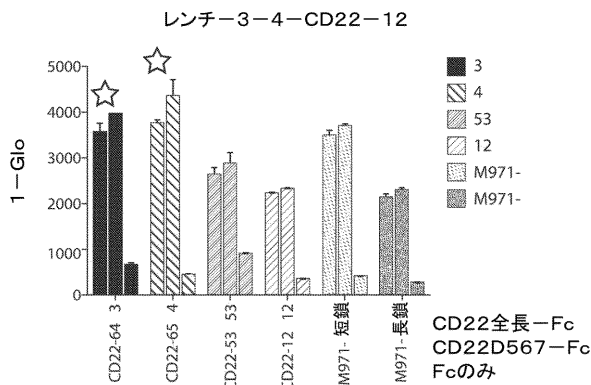


FIG. 74

【図 7 5】

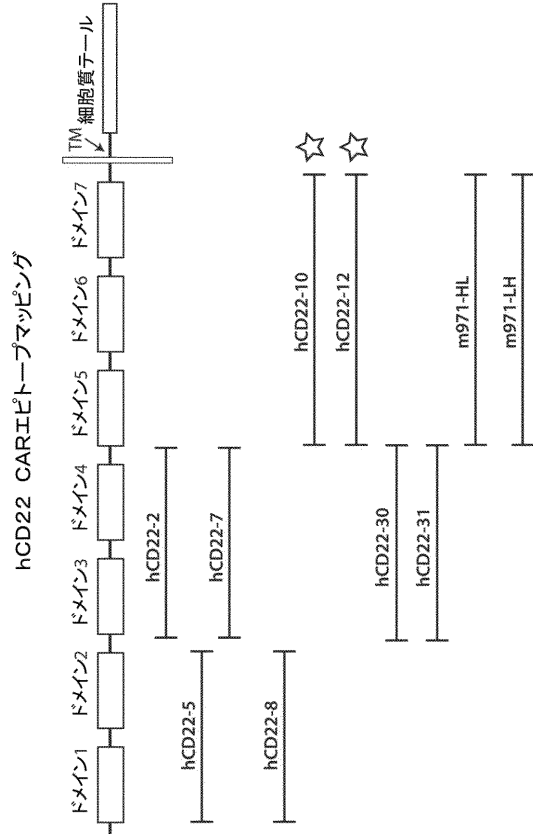


FIG. 75

【配列表】

0006961490000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 38/02 (2006.01)	A 6 1 K 38/02		
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00		
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00		
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/00		
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/02		
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 14/705		
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 0 7 K 19/00		
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 5/10		
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N 15/62	Z	
	C 1 2 N 5/0783		

(31)優先権主張番号 62/144,615

(32)優先日 平成27年4月8日(2015.4.8)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/144,497

(32)優先日 平成27年4月8日(2015.4.8)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/263,423

(32)優先日 平成27年12月4日(2015.12.4)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(72)発明者 ハンス・ビター

アメリカ合衆国01773マサチューセッツ州リンカーン、タワー・ロード245番

(72)発明者 ジェニファー・メアリー・ボルドー

アメリカ合衆国92008カリフォルニア州カールスバッド、アストン・アベニュー1811番

(72)発明者 バルバラ・ブラッネッティ

スイス4056バーゼル、リヒトシュトラッセ35番

(72)発明者 ジェニファー・ブログドン

アメリカ合衆国02139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250番、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 ナビーン・クマール・ダカッパガリ

アメリカ合衆国92008カリフォルニア州カールスバッド、アストン・アベニュー1811番

(72)発明者 サール・ギル

アメリカ合衆国19106ペンシルベニア州フィラデルフィア、ノース・サード・ストリート30番、アパートメント4エイ

(72)発明者 スティーブン・ハイフィル

アメリカ合衆国20814メリーランド州ベセスダ、バッテリー・レイン5015番、ナンバー1108

(72)発明者 ルウ・ホアン

- アメリカ合衆国02139マサチューセッツ州ケンブリッジ、テクノロジー・スクエア200番
(72)発明者 カール・エイチ・ジューン
アメリカ合衆国19066ペンシルベニア州メリオン・ステーション、ベアード・ロード409番
(72)発明者 キム・ジュヨン
アメリカ合衆国92008カリフォルニア州カールスバッド、アストン・アベニュー1811番
(72)発明者 レイ・ミン
アメリカ合衆国02139マサチューセッツ州ケンブリッジ、テクノロジー・スクエア200番、
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 リィ・ナァ
アメリカ合衆国02139マサチューセッツ州ケンブリッジ、テクノロジー・スクエア200番、
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 アンドレアス・レーヴ
アメリカ合衆国02143マサチューセッツ州サマービル、ボウ・ストリート50番、アパートメント・ナンバー13
(72)発明者 エレナ・オーランド
アメリカ合衆国02143マサチューセッツ州サマービル、ギルソン・テラス4番、ナンバー1
(72)発明者 マルコ・ルエッラ
アメリカ合衆国19143ペンシルベニア州フィラデルフィア、サウス・フォーティセブンス・ストリート500番、アパートメント302
(72)発明者 タイ・トラン
アメリカ合衆国92008カリフォルニア州カールスバッド、アストン・アベニュー1811番
(72)発明者 ジミン・ジャン
アメリカ合衆国02139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250番
(72)発明者 リー・ジョウ
アメリカ合衆国02139マサチューセッツ州ケンブリッジ、テクノロジー・スクエア200番、
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

審査官 田村 直寛

- (56)参考文献 国際公開第2013/123061 (WO, A1)
国際公開第2014/153270 (WO, A1)
CURRENT HEMATOLOGIC MALIGNANCY REPORTS, 2014年02月02日, Vol. 9, pp. 50-56
OncoImmunology, 2013, Vol. 2, No. 4, e23621, p. 1-3
ASH - Novartis, Juno, June and Rosenberg steal the T-cell show, EP Vantage [online], 2014年12月09日, <http://epvantage.com/Universal/View.aspx?type=Story&id=546429&isEPVantage=yes>, [retrieved on 2018.02.15], Retrieved from the Internet
BLOOD, 2012年12月14日, Vol. 121, No. 7, pp. 1165-1174

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/13
C12N 5/10
C07K 14/705
C07K 19/00
A61K 45/00
A61P 43/00
A61K 35/12

A 6 1 K	3 5 / 1 7
A 6 1 K	3 1 / 1 9 8
A 6 1 K	3 1 / 6 7 5
A 6 1 K	3 1 / 7 0 7 6
A 6 1 P	3 5 / 0 0
A 6 1 P	3 5 / 0 2
A 6 1 K	3 8 / 0 2
A 6 1 K	3 1 / 7 0 8 8
A 6 1 K	4 8 / 0 0
A 6 1 K	3 5 / 7 6
A 6 1 K	3 5 / 7 6 1
A 6 1 K	3 9 / 3 9 5
A 6 1 K	3 1 / 2 1 6
A 6 1 K	3 1 / 4 1
A 6 1 K	3 1 / 5 5 4
A 6 1 K	3 1 / 4 3 3
A 6 1 K	3 1 / 5 3 7 7
A 6 1 K	3 1 / 7 0 5 6
A 6 1 K	3 1 / 4 4
A 6 1 K	3 1 / 4 0 4 5
A 6 1 K	3 1 / 5 1 9
A 6 1 K	3 1 / 3 6 5
A 6 1 K	3 1 / 5 2
A 6 1 K	3 1 / 4 3 6
A 6 1 K	3 1 / 4 1 6 4
A 6 1 K	3 1 / 5 3
A 6 1 K	3 1 / 7 0 4
A 6 1 K	3 1 / 4 7 5
A 6 1 K	3 1 / 5 7 3
A 6 1 K	3 9 / 0 0
A 6 1 K	3 1 / 4 9 6
A 6 1 K	3 1 / 4 4 3 9
C 1 2 N	5 / 0 7 8 3
C 0 7 H	1 9 / 1 9
C 0 7 D	2 5 7 / 0 4
C 0 7 D	5 1 3 / 0 4
C 0 7 D	2 8 5 / 1 3 5
C 0 7 H	1 9 / 2 3
C 0 7 D	2 1 3 / 8 1
C 0 7 D	4 0 3 / 0 6
C 0 7 D	4 7 5 / 0 8
C 0 7 D	3 0 7 / 8 8
C 0 7 D	4 7 3 / 3 8
C 0 7 D	4 9 8 / 1 8
C 0 7 D	2 3 3 / 9 0
C 0 7 D	2 5 1 / 7 0
C 0 7 H	1 5 / 2 5 2
C 0 7 D	5 1 9 / 0 4
C 0 7 J	5 / 0 0
C 0 7 D	4 7 1 / 0 4

C07D 487/04

C07D 473/34

C07D 417/12

CAplus/REGISTRY (STN)