

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-500894

(P2021-500894A)

(43) 公表日 令和3年1月14日 (2021.1.14)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10 Z N A	4 B O 6 3
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z	4 B O 6 5
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 206 頁)

(21) 出願番号	特願2020-523416 (P2020-523416)	(71) 出願人	504389991
(86) (22) 出願日	平成30年10月25日 (2018.10.25)		ノバルティス アーゲー
(85) 翻訳文提出日	令和2年5月13日 (2020.5.13)		スイス国 バーゼル リヒトシュトラーセ
(86) 国際出願番号	PCT/US2018/057545		3 5
(87) 国際公開番号	W02019/084288	(71) 出願人	500429103
(87) 国際公開日	令和1年5月2日 (2019.5.2)		ザ トラスティーズ オブ ザ ユニバー
(31) 優先権主張番号	62/577, 099		シティ オブ ペンシルバニア
(32) 優先日	平成29年10月25日 (2017.10.25)		アメリカ合衆国 1 9 1 0 4 ペンシルベ
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		ニア州 フィラデルフィア シビック セ
(31) 優先権主張番号	62/637, 854		ンター ブールバード 3 6 0 0 ナイン
(32) 優先日	平成30年3月2日 (2018.3.2)	(74) 代理人	100106518
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 松谷 道子
		(74) 代理人	100122301
			弁理士 富田 憲史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 キメラ抗原受容体発現細胞を作製する方法

(57) 【要約】

本開示は、C A R 発現免疫エフェクター細胞（例えば、T 細胞又はN K 細胞）を作製する方法並びにそれを含む組成物及び反応混合物を提供する。本開示は、前記C A R 発現免疫エフェクター細胞を使用する方法を更に提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

キメラ抗原受容体（CAR）発現免疫エフェクター細胞の集団を作製する方法であって、

- a) 免疫エフェクター細胞、例えばT細胞の集団を提供すること；
- b) 前記免疫エフェクター細胞の集団を、CARポリペプチドをコードする核酸と接触させること；
- c) 前記免疫エフェクター細胞の集団をStat3アクティベーターと接触させること；及び
- d) 前記CARポリペプチドの発現を可能にする条件下で前記細胞を維持し、それによりCAR発現免疫エフェクター細胞の集団を作製することを含む方法。

10

【請求項 2】

前記Stat3アクティベーターは、

- i) gp130アクティベーター、例えばgp130に結合する抗体分子、例えば本明細書に記載されるような抗gp130抗体又はIL-6分子、IL-11分子、IL-27分子、CNTF分子、CT-1分子、CLC分子、LIF分子、NP分子、OSM分子；
 - ii) 例えば、本明細書に記載されるような可溶性IL-6受容体（sIL-6R）；
 - iii) 例えば、本明細書に記載されるようなIL-6／IL-6R複合体、例えば二量体；
 - iv) IL-6ファミリーサイトカイン（例えば、IL-6分子、IL-11分子、IL-27分子、IL-31分子、CNTF分子、CT-1分子、CLC分子、LIF分子、NP分子又はOSM分子）；
 - v) CCL20分子；
 - vi) 例えば、本明細書に記載されるようなIL-10R2受容体（IL-10R2）アクティベーター、例えばIL-10分子、IL-22分子、IL-26分子、IL-28A分子、IL-28B分子、IL-29分子又はIL-10R2に結合する抗体分子；
 - vii) IL-10ファミリーサイトカイン（例えば、IL-10分子、IL-19分子、IL-20分子、IL-22分子、IL-24分子、IL-26分子、IL-28A分子、IL-28B分子又はIL-29分子）；
 - viii) IL-17ファミリーサイトカイン（例えば、IL17A分子、IL17B分子、IL17C分子、IL17D分子、IL17E分子又はIL17F分子）；又は
 - ix) IL-23分子
- の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ若しくは全て又はその任意の組み合わせから選択される、請求項1に記載の方法。

20

30

【請求項 3】

前記免疫エフェクター細胞の集団の少なくとも1つの細胞に、

- gp130分子を、例えば前記gp130分子をコードする核酸を、前記gp130分子の翻訳を可能にする条件下で前記免疫エフェクター細胞の集団の前記少なくとも1つの細胞に導入することにより；又は
- Stat3分子（例えば、構成的活性型Stat3分子（STAT3C））を、例えば前記Stat3分子をコードする核酸を、前記Stat3分子の翻訳を可能にする条件下で前記免疫エフェクター細胞の集団の前記少なくとも1つの細胞に導入することにより、導入することを更に含む、請求項1又は2に記載の方法。

40

【請求項 4】

キメラ抗原受容体（CAR）発現免疫エフェクター細胞の集団を作製する方法であって、

- a) 免疫エフェクター細胞、例えばT細胞の集団を提供すること；
- b) 前記免疫エフェクター細胞の集団を、CARポリペプチドをコードする核酸と接触させること；

50

c) 前記免疫エフェクター細胞の集団の少なくとも1つの細胞に、
g p 1 3 0分子を、例えば前記 g p 1 3 0分子をコードする核酸を、前記 g p 1 3 0分子の翻訳を可能にする条件下で前記免疫エフェクター細胞の集団の前記少なくとも1つの細胞に導入することにより；又は

S t a t 3分子（例えば、構成的活性型 S t a t 3分子（S T A T 3 C））を、例えば前記 S t a t 3分子をコードする核酸を、前記 S t a t 3分子の翻訳を可能にする条件下で前記免疫エフェクター細胞の集団の前記少なくとも1つの細胞に導入することにより、導入すること；及び

d) 前記 C A Rポリペプチド、g p 1 3 0分子又は S t a t 3分子の発現を可能にする条件下で前記細胞を維持し、それにより C A R発現免疫エフェクター細胞の集団を作製することを含む方法。

10

【請求項5】

前記免疫エフェクター細胞の集団を、

i) g p 1 3 0アクティベーター、例えばg p 1 3 0に結合する抗体分子、例えば本明細書に記載されるような抗g p 1 3 0抗体又はI L-6分子、I L-11分子、I L-27分子、C N T F分子、C T-1分子、C L C分子、L I F分子、N P分子、O S M分子；

i i) 例えば、本明細書に記載されるような可溶性I L-6受容体（s I L-6 R）；

i i i) 例えば、本明細書に記載されるようなI L-6 / I L-6 R複合体、例えば二量体；

20

i v) I L-6ファミリーサイトカイン（例えば、I L-6分子、I L-11分子、I L-27分子、I L-31分子、C N T F分子、C T-1分子、C L C分子、L I F分子、N P分子又はO S M分子）；

v) C C L 2 0分子；

v i) 例えば、本明細書に記載されるようなI L-10 R 2受容体（I L-10 R 2）アクティベーター、例えばI L-10分子、I L-22分子、I L-26分子、I L-28 A分子、I L-28 B分子、I L-29分子又はI L-10 R 2に結合する抗体分子；

v i i) I L-10ファミリーサイトカイン（例えば、I L-10分子、I L-19分子、I L-20分子、I L-22分子、I L-24分子、I L-26分子、I L-28 A分子、I L-28 B分子又はI L-29分子）；

30

v i i i) I L-17ファミリーサイトカイン（例えば、I L 17 A分子、I L 17 B分子、I L 17 C分子、I L 17 D分子、I L 17 E分子又はI L 17 F分子）；又は

i x) I L-23分子

の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ若しくは全て又はその任意の組み合わせから選択されるS t a t 3アクティベーターと接触させることを更に含む、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記g p 1 3 0分子又は前記S t a t 3分子の発現は、一過性（例えば、誘導性若しくは非誘導性）又は恒常性である。請求項3～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

40

前記g p 1 3 0分子又は前記S t a t 3分子は、前記免疫エフェクター細胞の集団を、C A Rポリペプチドをコードする核酸；又は

例えば、本明細書に記載されるようなS t a t 3アクティベーター

と接触させる前、それと同時に又はその後に前記免疫エフェクター細胞の集団に導入される、請求項3～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

S t a t 3分子（例えば、構成的活性型S t a t 3（S T A T 3 C））をコードするヌクレオチドを含む核酸は、C A R、例えばC D 1 9 C A Rをコードするヌクレオチド配列を更に含む、請求項3又は4に記載の方法。

【請求項9】

50

前記 S t a t 3 アクティベーターは、g p 1 3 0 に結合する抗体分子、例えば本明細書に記載されるような抗 g p 1 3 0 抗体である、請求項 1 ～ 3 又は 5 ～ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 0】

例えば、初期メモリー T 細胞又は疲弊していない初期メモリー T 細胞について濃縮されている T 細胞、例えば C D 4 + 又は C D 8 + T 細胞の集団をもたらす、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 1】

初期メモリー T 細胞は、以下の特徴： C D 2 7 + 及び／又は C D 4 5 R O d i m / n e g の一方又は両方を有する、請求項 1 0 に記載の方法。

10

【請求項 1 2】

疲弊していない初期メモリー T 細胞は、以下の特徴： (i) P D - 1 陰性； (i i) C D 2 7 ^{h i}； (i i i) C C R 7 ^{h i}；又は (i v) C D 4 5 R O d i m / n e g の 1 つ以上、例えば全てを有する、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 3】

T 細胞、例えば初期メモリー T 細胞又は疲弊していない初期メモリー T 細胞の濃縮集団は、例えば、前記 S t a t 3 アクティベーターと接触されなかった以外には同様の T 細胞の集団と比較して、増加したレベル又は量の、例えば少なくとも 5 %、例えば 5 ～ 9 0 % 多い（例えば、少なくとも 5 ～ 1 0、1 0 ～ 2 0、2 0 ～ 3 0、3 0 ～ 5 0、5 0 ～ 7 0 又は 7 0 ～ 9 0 % 多い、例えば少なくとも 5、6、7、8、9、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9 又は 3 0 % 多い）初期メモリー T 細胞又は疲弊していない初期メモリー T 細胞を有する、請求項 1 0 ～ 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 1 4】

前記 S t a t 3 アクティベーターは、I L - 6 分子、I L - 1 7 分子、I L - 2 2 分子又は C C L 2 0 分子の 1 つ、2 つ、3 つ又は全てを含む、請求項 1 ～ 3 又は 5 ～ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記 S t a t 3 アクティベーターは、天然に存在する分子、組換え分子又は精製された分子である、請求項 1 ～ 3 又は 5 ～ 9 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 1 6】

前記 S t a t 3 アクティベーターは、血清中に存在せず、例えば実施例 2 のアッセイによって測定されるように、例えばチロシン 7 0 5 (Y 7 0 5) 上の S t a t 3 を活性化する、例えば S t a t 3 をリン酸化するのに十分な量で存在しない、請求項 1 ～ 3 又は 5 ～ 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記 S t a t 3 アクティベーターは、基質、例えばビーズ又は細胞上に配置、例えば固定化される、請求項 1 ～ 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記 S t a t 3 アクティベーターは、S t a t 3 アクティベーター細胞上に配置される、請求項 1 7 に記載の方法。

40

【請求項 1 9】

前記 S t a t 3 アクティベーター細胞は、人工抗原提示細胞である、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記 S t a t 3 アクティベーターは、前記 S t a t 3 アクティベーター細胞によって発現されるか、又は前記 S t a t 3 アクティベーター細胞の表面にコンジュゲートされる、請求項 1 7 ～ 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

例えば、本明細書に記載されるような前記 S t a t 3 アクティベーターは、例えば、実

50

施例 2 のアッセイによって測定されるように、例えばチロシン 705 (Y705) 上の S t a t 3 を活性化する、例えば S t a t 3 をリン酸化するのに十分な量で提供される、請求項 1 ~ 3、5 又は 9 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

例えば、本明細書に記載されるような前記 S t a t 3 アクティベーターは、前記 S t a t 3 アクティベーターと接触されていない以外には同様の条件下で培養された同様の細胞の集団と比較して、例えば実施例 2 のアッセイによって測定されるように、12 日間の培養期間後、前記免疫エフェクター細胞の集団を、少なくとも 1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9 倍又はそれを超えて増殖させるのに十分な量で提供される、請求項 1 ~ 3、5 又は 9 ~ 21 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 23】

例えば、本明細書に記載されるような前記 S t a t 3 アクティベーターは、前記 S t a t 3 アクティベーターと接触されていない以外には同様の条件下で培養された同様の細胞の集団と比較して、C D 27 + P D - 1 である前記免疫エフェクター細胞集団中の細胞の割合を、例えば少なくとも 1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、2、3、4、5 倍又はそれを超えて増加させるのに十分な量で提供される、請求項 1 ~ 3、5 又は 9 ~ 22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

例えば、本明細書に記載されるような前記 S t a t 3 アクティベーターは、前記 S t a t 3 アクティベーターと接触されていない以外には同様の条件下で培養された同様の細胞の集団と比較して、例えば実施例 2 のアッセイによって測定されるように、前記免疫エフェクター細胞集団において、g p 130 の発現レベルを、少なくとも 1.5、2、3、4、5、10 倍又はそれを超えて増加させるのに十分な量で提供される、請求項 1 ~ 3、5 又は 9 ~ 23 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 25】

例えば、本明細書に記載されるような前記 S t a t 3 アクティベーターは、I L - 6 分子、I L - 17 分子、I L - 22 分子、I L 31 分子及び C C L 20 分子の 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ又は全て (例えば、5 つ) から選択される、請求項 1 ~ 3、5 又は 9 ~ 24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

例えば、本明細書に記載されるような前記 S t a t 3 アクティベーターは、I L - 6 分子、例えば組換え I L - 6 を含む、請求項 1 ~ 3、5 又は 9 ~ 25 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 27】

前記 I L - 6 分子、例えば組換え I L - 6 は、少なくとも 1、5、10、15、20 若しくは 30 n g / m l の量又は 1 ~ 20、1 ~ 15 若しくは 5 ~ 15 n g / m l の範囲、例えば少なくとも 10 n g / m l で提供される、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 28】

前記抗 g p 130 抗体分子は、B - S 12 若しくは B - P 8 又は B - S 12 若しくは B - P 8 からの 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ若しくは 6 つの C D R を有する抗体分子から選択される、請求項 2、5 又は 9 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 29】

前記免疫エフェクター細胞の集団を B - S 12 及び B - P 8 の両方と接触させることを含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

抗 g p 130 抗体分子の総量は、約 0.1 ~ 1000、0.5 ~ 500 又は 1 ~ 100 u g / m l である、請求項 28 又は 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記抗 g p 130 抗体分子は、少なくとも 0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9 又

50

は 2 u g / m l、例えば約 1 u g / m l の量で提供される、請求項 28 又は 29 に記載の方法。

【請求項 32】

前記抗 g p 1 3 0 抗体は、
S T A T 3 のリン酸化によって測定されるように、g p 1 3 0 によって媒介されるシグナル伝達を誘導するか、又は
例えば、L I F、O S M 又は C N T F による二量体化、例えば g p 1 3 0 のホモ二量体化又は g p 1 3 0 のヘテロ二量体化を誘導する、請求項 28～31 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

例えば、本明細書に記載されるように、前記 S t a t 3 アクティベーターの存在下で培養された前記細胞の集団は、前記 S t a t 3 アクティベーターと接触されていない以外には同様の条件下で培養された同様の細胞の集団と比較して、
例えば、実施例 2 のアッセイによって測定されるような、例えばチロシン 705 (Y 705) 上の S t a t 3 の活性化、例えば S t a t 3 のリン酸化；
例えば、実施例 2 のアッセイによって測定されるような、12 日間の培養期間後の、少なくとも 1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9 倍又はそれを超える前記免疫エフェクター細胞の集団の増殖；
C D 2 7 + P D - 1 である前記免疫エフェクター細胞集団中の細胞の割合の、例えば少なくとも 1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、2、3、4、5 倍又はそれを超える増加；及び／又は
例えば、実施例 2 のアッセイによって測定されるような、前記免疫エフェクター細胞集団における少なくとも 1.5、2、3、4、5、10 倍又はそれを超える g p 1 3 0 の発現レベルの増加
を示す、請求項 1～32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

例えば、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 若しくは 21 日間又は 1～7、7～14 若しくは 14～21 日間にわたり、前記集団を増殖させることを含む、請求項 1～33 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

S t a t 3 転写標的、例えば c - M y c、c - F o s、S o x 2、B c l - 2 又は R O R C のレベル又は活性を測定することにより、前記免疫エフェクター細胞の集団における S t a t 3 経路活性化をアッセイして、S t a t 3 経路活性化の値を決定することを更に含む、請求項 1～34 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 36】

前記 S t a t 3 経路活性化値を基準値と比較することを更に含み、前記基準値は、例えば、本明細書に記載されるような、前記 S t a t 3 アクティベーターと接触されていない以外には同様の条件下で培養された同様の免疫エフェクター細胞の集団から得られる、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記 S t a t 3 経路活性化値の基準値との比較に応答して、
前記集団を治療剤としての使用に適切又は不適切なものとして分類すること；
治療的使用のための前記集団又はそのアリコート処方又はパッケージングすること；又は
培養パラメーターを変更すること、例えば、i) 培養の時間の長さを変更すること、又は i i) 例えば、本明細書に記載されるように、前記 S t a t 3 アクティベーターの濃度を増加若しくは減少させること
の 1 つ以上を実行することを更に含む、請求項 1～36 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 38】

キメラ抗原受容体（CAR）発現免疫エフェクター細胞の集団を作製する方法であって、

- a) 免疫エフェクター細胞、例えばT細胞の集団を提供すること；
 - b) 前記免疫エフェクター細胞の集団を、CARポリペプチドをコードする核酸と接触させること；
 - c) 前記免疫エフェクター細胞の集団を、解糖阻止剤、例えば小分子解糖阻止剤、例えば小分子ヘキソキナーゼ阻害剤、例えばグルコース類似体、例えば2-デオキシ-D-グルコース（2-DG）と接触させること、及び
 - d) 前記CARポリペプチドの発現を可能にする条件下で前記細胞を維持し、それによりCAR発現免疫エフェクター細胞の集団を作製すること
- を含む方法。

10

【請求項39】

前記解糖阻止剤、例えば小分子解糖阻止剤、例えば小分子ヘキソキナーゼ阻害剤、例えばグルコース類似体、例えば2-DGは、前記解糖阻止剤で処置されていない以外には同様の条件下で培養された同様の細胞の集団と比較して、

前記免疫エフェクター細胞の集団を、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%又はそれを超えて増加させること；又は

セントラルメモリー表現型を有する、例えばCD45RO+CCR7+である前記免疫エフェクター細胞集団中の細胞の割合を、例えば少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%又はそれを超えて増加させること

20

のために十分な量で添加される、請求項38に記載の方法。

【請求項40】

前記解糖阻止剤、例えば2-DGは、少なくとも0.5、1、1.5、2若しくは2.5mM、0.5～2.5mM又は1～2mMの濃度で添加される、請求項38又は39に記載の方法。

【請求項41】

前記解糖阻害剤の存在下で培養された前記細胞の集団は、前記解糖阻止剤で処置されていない以外には同様の条件下で培養された同様の細胞の集団と比較して、

30

前記免疫エフェクター細胞の集団の、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%又はそれを超える増加；又はセントラルメモリー表現型を有する、例えばCD45RO+CCR7+である前記免疫エフェクター細胞集団中の細胞の割合の、例えば少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%又はそれを超える増加

を示す、請求項38～40のいずれか一項に記載の方法。

【請求項42】

例えば、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若しくは21日間又は1～7、7～14若しくは14～21日間にわたり、前記集団を増殖させること；又は

40

例えば、実施例1の増殖条件下において、例えば少なくとも1.5、2、2.5、3、4、5、5、7、8、9、10、20、30、40、50倍又はそれを超える細胞数の変化、例えば最大約40又は50倍だけ前記集団を増殖させること

を含む、請求項38～41のいずれか一項に記載の方法。

【請求項43】

例えば、2-NBDG取り込みアッセイ、例えば実施例1のアッセイを使用してグルコース代謝値を決定するために、前記免疫エフェクター細胞の集団におけるグルコース代謝をアッセイすることを更に含む、請求項38～42のいずれか一項に記載の方法。

【請求項44】

50

前記グルコース代謝値を基準値と比較することを更に含む、請求項 38～43 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 45】

前記グルコース代謝値の基準値との比較に応答して、
前記集団を治療剤としての使用に適切又は不適切なものとして分類すること；
治療的使用のための前記集団又はそのアリコート処方又はパッケージングすること；又は
培養パラメーターを変更すること、例えば、i) 培養の時間の長さを変更すること、又は
ii) 前記解糖阻止剤、例えば前記小分子解糖阻止剤、例えば前記小分子ヘキソキナーゼ
阻害剤、例えば前記グルコース類似体、例えば 2-デオキシ-D-グルコース (2-DG) の濃度を増加若しくは減少させること
の 1 つ以上を実施することを更に含む、請求項 38～44 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 46】

前記免疫エフェクター細胞の集団を、請求項 1 に記載の Stat3 アクティベーター又は請求項 3 若しくは 4 に記載の細胞の集団と接触させることを更に含む、請求項 38～45 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 47】

前記免疫エフェクター細胞の集団を解糖阻止剤、例えば小分子解糖阻止剤、例えば小分子ヘキソキナーゼ阻害剤、例えばグルコース類似体、例えば 2-デオキシ-D-グルコース (2-DG) と接触させることを更に含む、請求項 1～37 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 48】

(b) は、(c) 前に実施されるか、(c) は、(b) 前に実施されるか、又は (b) 及び (c) は、同時に実施される、請求項 1～47 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 49】

前記核酸は、DNA 又は RNA である、請求項 1～48 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 50】

(b) は、前記核酸を前記免疫エフェクター細胞に送達するためにレンチウイルス形質導入を実施することを含む、請求項 1～49 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 51】

前記免疫エフェクター細胞の集団を、前記 CAR に結合する抗原 (例えば、CD19) を発現する細胞の集団と接触させることを更に含む、請求項 1～50 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 52】

前記免疫エフェクター細胞の集団を、CD3/TCR 複合体結合シグナルを刺激する薬剤及び前記細胞の表面上の共刺激分子を刺激するリガンドと接触させることを更に含む、例えば、前記薬剤は、抗 CD3 抗体若しくはそのフラグメント及び／又は抗 CD28 抗体若しくはそのフラグメントとコンジュゲートされたビーズである、請求項 1～51 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 53】

前記 CAR ポリペプチドは、CD19 CAR、CD22 CAR、CD123 CAR、BCMA CAR、EGFRvIII CAR、CLL-1 CAR、CD20 CAR 又は CD33 CAR である、請求項 1～52 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 54】

前記 CAR は、CD19 CAR、例えば配列番号 39～51 の scFv アミノ酸配列を含む CAR 又は配列番号 77～89 のアミノ酸配列を含む CAR である、請求項 1～53 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 55】

前記 CAR は、抗 CD19 結合ドメイン、膜貫通ドメイン及び刺激ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む抗体分子を含み、前記抗 CD19 結合ドメインは、表 3 B

50

に列挙される任意の抗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) 及び軽鎖相補性決定領域3 (LC CDR3) の1つ以上並びに表3Aに列挙される任意の抗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) 及び重鎖相補性決定領域3 (HC CDR3) の1つ以上を含む、請求項1～54のいずれか一項に記載の方法。

【請求項56】

前記抗CD19結合ドメインは、配列番号40又は配列番号51の配列を含む、請求項50に記載の方法。

【請求項57】

前記CARは、配列番号78又は配列番号89の配列を有するポリペプチドを含む、請求項54～56のいずれか一項に記載の方法。

【請求項58】

反応混合物であって、

a) (i) CAR発現免疫エフェクター細胞の集団 (例えば、本明細書に記載されるCAR発現細胞、例えばCD19 CAR発現細胞)、又は(ii)免疫エフェクター細胞及びCARをコードする核酸 (例えば、本明細書に記載されるCAR、例えばCD19 CAR) ; 及び

b) 薬剤であって、

(i) Stat3アクティベーター ;

(ii) 請求項3又は4に記載の細胞又は細胞の集団 ; 又は

(iii) gp130分子若しくはStat3分子又はgp130分子若しくはStat3分子をコードする核酸

から選択される薬剤

を含む反応混合物。

【請求項59】

前記Stat3アクティベーターは、

b-i-i) gp130アクティベーター、例えばgp130に結合する抗体分子、例えば本明細書に記載されるような抗gp130抗体又はIL-6分子、IL-11分子、IL-27分子、CNTF分子、CT-1分子、CLC分子、LIF分子、NP分子、OSM分子 ;

b-i-ii) 例えば、本明細書に記載されるような可溶性IL-6受容体 (sIL-6R) ;

b-i-iii) 例えば、本明細書に記載されるようなIL-6 / IL-6R複合体、例えば二量体 ;

b-i-iv) IL-6ファミリーサイトカイン (例えば、IL-6分子、IL-11分子、IL-27分子、IL-31分子、CNTF分子、CT-1分子、CLC分子、LIF分子、NP分子又はOSM分子) ;

b-i-v) CCL20分子 ;

b-i-vi) 例えば、本明細書に記載されるようなIL-10R2受容体 (IL-10R2) アクティベーター、例えばIL-10分子、IL-22分子、IL-26分子、IL-28A分子、IL-28B分子、IL-29分子又はIL-10R2に結合する抗体分子 ;

b-i-vii) IL-10ファミリーサイトカイン (例えば、IL-10分子、IL-19分子、IL-20分子、IL-22分子、IL-24分子、IL-26分子、IL-28A分子、IL-28B分子又はIL-29分子) ;

b-i-viii) IL-17ファミリーサイトカイン (例えば、IL17A分子、IL17B分子、IL17C分子、IL17D分子、IL17E分子又はIL17F分子) ; 又は

b-i-ix) IL-23分子

10

20

30

40

50

から選択される、請求項 58 に記載の反応混合物。

【請求項 60】

(a) (i) CAR 発現免疫エフェクター細胞の集団を含む、請求項 58 又は 59 に記載の反応混合物。

【請求項 61】

(a) (ii) CAR をコードする核酸（例えば、本明細書に記載される CAR、例えば CD19 CAR）を含む、請求項 58 又は 59 に記載の反応混合物。

【請求項 62】

(b) (i) 請求項 59 に記載の Stat3 アクティベーターを含む、請求項 58 ～ 61 のいずれか一項に記載の反応混合物。

10

【請求項 63】

(b) (ii) 請求項 3 又は 4 に記載の細胞又は細胞の集団を含む、請求項 58 ～ 61 のいずれか一項に記載の反応混合物。

【請求項 64】

(b) (iii) gp130 分子若しくは Stat3 分子又はそれをコードする核酸を含む、請求項 58 ～ 61 のいずれか一項に記載の反応混合物。

【請求項 65】

(a) (i) CAR 発現免疫エフェクター細胞の集団；及び (b) (i) 請求項 59 に記載の Stat3 アクティベーターを含む、請求項 58 に記載の反応混合物。

【請求項 66】

(a) (i) CAR 発現免疫エフェクター細胞の集団；及び (b) (ii) 請求項 3 又は 4 に記載の細胞又は細胞の集団を含む、請求項 58 に記載の反応混合物。

20

【請求項 67】

(a) (i) CAR 発現免疫エフェクター細胞の集団；及び (b) (iii) gp130 分子若しくは Stat3 分子又はそれをコードする核酸を含む、請求項 58 に記載の反応混合物。

【請求項 68】

(a) (ii) CAR をコードする核酸；及び (b) (i) 請求項 59 に記載の Stat3 アクティベーターを含む、請求項 58 に記載の反応混合物。

【請求項 69】

(a) (ii) CAR をコードする核酸；及び (b) (ii) 請求項 3 又は 4 に記載の細胞又は細胞の集団を含む、請求項 58 に記載の反応混合物。

30

【請求項 70】

(a) (ii) CAR をコードする核酸；及び (b) (iii) gp130 分子若しくは Stat3 分子又は gp130 分子若しくは Stat3 分子をコードする核酸を含む、請求項 53 に記載の反応混合物。

【請求項 71】

(a) (i) 及び b-i-i)；(a) (i) 及び b-i-ii)；(a) (i) 及び b-i-iii)；(a) (i) 及び b-i-iv)；(a) (i) 及び b-i-v)；(a) (i) 及び b-i-vi)；(a) (i) 及び b-i-vii)；(a) (i) 及び b-i-viii)；(a) (ii) 及び b-i-i)；(a) (ii) 及び b-i-ii)；(a) (ii) 及び b-i-iii)；(a) (ii) 及び b-i-iv)；(a) (ii) 及び b-i-v)；(a) (ii) 及び b-i-vi)；(a) (ii) 及び b-i-vii)；並びに (a) (ii) 及び b-i-viii) の 1 つ以上を含む、請求項 58 ～ 62、65 又は 68 のいずれか一項に記載の反応混合物。

40

【請求項 72】

反応混合物であって、

a) CAR 発現免疫エフェクター細胞、例えば本明細書に記載される CAR 発現細胞、例えば CD19 CAR 発現細胞の集団、及び

b) 解糖阻止剤、例えば小分子解糖阻止剤、例えば小分子ヘキソキナーゼ阻害剤、例えば

50

グルコース類似体、例えば 2-デオキシ-D-グルコース (2-DG) を含む反応混合物。

【請求項 73】

反応混合物であって、

- a) 免疫エフェクター細胞の集団、
- b) CAR をコードする核酸、例えば本明細書に記載される CAR、例えば CD19 CAR、及び
- c) 解糖阻止剤、例えば小分子解糖阻止剤、例えば小分子ヘキソキナーゼ阻害剤、例えばグルコース類似体、例えば 2-デオキシ-D-グルコース (2-DG) を含む反応混合物。

10

【請求項 74】

前記解糖阻止剤、例えば 2-DG は、少なくとも 0.5、1、1.5、2、2.5 mM、0.5~2.5 mM 又は 1~2 mM の濃度で存在する、請求項 72 又は 73 に記載の反応混合物。

【請求項 75】

Stat3 アクティベーター；細胞若しくは細胞の集団；或いは請求項 58 又は 59 に記載の gp130 分子若しくは Stat3 分子又は gp130 分子若しくは Stat3 分子をコードする核酸を更に含む、請求項 72~74 のいずれか一項に記載の反応混合物。

【請求項 76】

解糖阻止剤、例えば小分子解糖阻止剤、例えば小分子ヘキソキナーゼ阻害剤、例えばグルコース類似体、例えば 2-デオキシ-D-グルコース (2-DG) を更に含む、請求項 59~71 のいずれか一項に記載の反応混合物。

20

【請求項 77】

レンチウイルスを更に含み、例えば、CAR をコードする前記核酸は、レンチウイルス中にパッケージされている、請求項 59~76 のいずれか一項に記載の反応混合物。

【請求項 78】

前記核酸は、DNA 又は RNA である、請求項 58~77 のいずれか一項に記載の反応混合物。

【請求項 79】

前記 CAR に結合する抗原 (例えば、CD19) を発現する細胞の集団を更に含む、請求項 58~78 のいずれか一項に記載の反応混合物。

30

【請求項 80】

例えば、CAR 発現細胞の投与前の、前記 CAR 発現細胞による治療的処置に対する、癌 (例えば、本明細書に記載される癌) を有する対象の応答性を評価又は予測する方法であって、前記対象からの免疫エフェクター細胞において、

- i) グルコース代謝のレベルであって、グルコース代謝基準値よりも低いグルコース代謝のレベルは、前記対象が前記 CAR 発現細胞による処置に応答する、例えば完全応答又は部分応答を示す可能性が高いことを示し、及び

グルコース代謝基準値よりも高いグルコース代謝のレベルは、前記対象が前記 CAR 発現細胞による処置に応答する可能性がより低く、例えば完全応答又は部分応答を示さないことを示す、グルコース代謝のレベル；又は

40

- ii) (例えば、チロシン 705 (Y705) 上の) 例えば Stat3 のリン酸化又は Stat3 転写標的 (例えば、c-Myc、c-Fos、Sox2 若しくは Bcl-2) のレベル若しくは活性によって測定されるような Stat3 活性化のレベルであって、Stat3 活性化基準値よりも高い Stat3 活性化のレベルは、前記対象が前記 CAR 発現細胞による処置に応答する、例えば完全応答又は部分応答を示す可能性が高いことを示し、及び

Stat3 活性化基準値よりも低い Stat3 活性化のレベルは、前記対象が前記 CAR 発現細胞による処置に応答する可能性がより低く、例えば完全応答又は部分応答を示さな

50

いことを示す、S t a t 3 活性化のレベルを評価し、それにより前記対象を評価するか、又は前記 C A R 発現細胞に対する前記対象の前記応答性を予測することを含む方法。

【請求項 8 1】

前記免疫エフェクター細胞は、C A R をコードする核酸と接触されていない、請求項 8 0 に記載の方法。

【請求項 8 2】

前記免疫エフェクター細胞は、C A R をコードする核酸と接触されており、例えば C A R ポリペプチドを発現する、請求項 8 0 に記載の方法。

10

【請求項 8 3】

前記免疫エフェクター細胞は、

i) 請求項 1 に記載の S t a t 3 アクティベーター；

i i) 請求項 3 又は 4 に記載の細胞又は細胞の集団；

i i i) g p 1 3 0 分子若しくは S t a t 3 分子又は g p 1 3 0 分子若しくは S t a t 3 分子をコードする核酸；又は

i v) 少なくとも 0. 5、1、1. 5、2 又は 2. 5 m M の濃度の解糖阻止剤、例えば小分子解糖阻止剤、例えば小分子ヘキソキナーゼ阻害剤、例えばグルコース類似体、例えば 2-デオキシ-D-グルコース (2-D G)

と接触されている、請求項 8 0 ~ 8 2 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 8 4】

細胞数、例えば C A R 発現細胞の数の倍率変化を決定することを更に含む、請求項 8 0 ~ 8 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記 C A R 発現細胞による処置に応答する可能性がより低い前記対象は、例えば、完全応答 (C R) 又は部分応答 (P R) を有しない、例えば非応答者 (N R) であると予測される、請求項 8 0 ~ 8 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 6】

i) 前記グルコース代謝のレベルが前記グルコース代謝基準値よりも低いか；又は

i i) 前記 S t a t 3 活性化のレベルが前記 S t a t 3 活性化基準値よりも高い

という判定に応答して、前記対象は、C A R 発現療法の投与のために選択されるか又はそれを投与される、請求項 8 0 ~ 8 5 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 8 7】

i) 前記グルコース代謝のレベルが前記グルコース代謝基準値よりも高いか；又は

i i) 前記 S t a t 3 活性化のレベルが前記 S t a t 3 活性化基準値よりも低い

という判定に応答して、前記対象は、C A R 発現療法以外の療法の投与のために選択されるか又はそれを投与される、請求項 8 0 ~ 8 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 8】

前記グルコース代謝基準値は、実施例 1 に記載されるような完全応答対象の細胞のグルコース代謝値であり、例えば、前記細胞 (例えば、前記細胞を含有するサンプル) は、例えば、実施例 1 に記載されるように、偽刺激、例えば C A R 抗原以外の抗原による刺激と接触される、請求項 8 0 ~ 8 7 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 8 9】

前記 S t a t 3 活性化基準値は、例えば、実施例 2 に記載されるような非応答対象の細胞の S t a t 3 活性化値である、請求項 8 0 ~ 8 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 0】

癌 (例えば、本明細書に記載される癌) を有する対象の応答性を評価又は予測する方法であって、前記対象は、C A R 発現細胞で処置されており、前記方法は、前記対象からの C A R 発現細胞において、

i) グルコース代謝のレベルであって、

50

グルコース代謝基準値よりも低いグルコース代謝のレベルは、前記対象が前記 C A R 発現細胞による処置に応答する、例えば完全応答又は部分応答を示す可能性が高いことを示し、及び

グルコース代謝基準値よりも高いグルコース代謝のレベルは、前記対象が前記 C A R 発現細胞による処置に応答する可能性がより低く、例えば完全応答又は部分応答を示さないことを示す、グルコース代謝のレベル；又は

i i) (例えば、チロシン 7 0 5 (Y 7 0 5) 上の) 例えば S t a t 3 のリン酸化又は S t a t 3 転写標的 (例えば、c-Myc、c-Fos、Sox 2 若しくは Bcl-2) のレベル若しくは活性によって測定されるような S t a t 3 活性化のレベルであって、S t a t 3 活性化基準値よりも高い S t a t 3 活性化のレベルは、前記対象が前記 C A R 発現細胞による処置に応答する、例えば完全応答又は部分応答を示す可能性が高いことを示し、及び

S t a t 3 活性化基準値よりも低い S t a t 3 活性化のレベルは、前記対象が前記 C A R 発現細胞による処置に応答する可能性がより低く、例えば完全応答又は部分応答を示さないことを示す、S t a t 3 活性化のレベル

を評価し、それにより前記対象を評価するか、又は前記 C A R 発現細胞に対する前記対象の前記応答性を予測すること

を含む、方法。

【請求項 9 1】

前記 C A R 発現細胞における前記グルコース代謝のレベル又は前記 S t a t 3 活性化のレベルを評価する前に前記対象から前記 C A R 発現細胞を得ることを更に含む、請求項 9 0 に記載の方法。

【請求項 9 2】

前記 C A R 発現細胞による処置に応答する可能性がより低い前記対象は、例えば、完全応答 (C R) 又は部分応答 (P R) を有しない、例えば非応答者 (N R) であると予測される、請求項 9 0 又は 9 1 に記載の方法。

【請求項 9 3】

i) 前記グルコース代謝のレベルが前記グルコース代謝基準値よりも低いか；又は
i i) 前記 S t a t 3 活性化のレベルが前記 S t a t 3 活性化基準値よりも高い
という判定に応答して、前記対象は、C A R 発現療法 of 1 回以上の追加の投与のために選択されるか又はそれを投与される、請求項 9 0 ~ 9 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 4】

i) 前記グルコース代謝のレベルが前記グルコース代謝基準値よりも高いか；又は
i i) 前記 S t a t 3 活性化のレベルが前記 S t a t 3 活性化基準値よりも低い
という判定に応答して、前記対象は、C A R 発現療法以外の療法の投与のために選択されるか又はそれを投与される、請求項 9 0 ~ 9 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 5】

前記グルコース代謝基準値は、実施例 1 に記載されるような完全応答対象の細胞のグルコース代謝値であり、例えば、前記細胞 (例えば、前記細胞を含有するサンプル) は、例えば、実施例 1 に記載されるように、偽刺激、例えば C A R 抗原以外の抗原による刺激と接触される、請求項 9 0 ~ 9 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 6】

前記 S t a t 3 活性化基準値は、例えば、実施例 2 に記載されるような非応答対象の細胞の S t a t 3 活性化値である、請求項 9 0 ~ 9 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 7】

C A R 発現細胞、例えば C A R 1 9 発現細胞 (例えば、C T L 0 1 9) を評価する方法であって、対象からのサンプル中の前記 C A R 発現細胞において、

i) グルコース代謝のレベルであって、
グルコース代謝基準値よりも低いグルコース代謝のレベルは、前記サンプルが処置に適していることを示し、及び

10

20

30

40

50

グルコース代謝基準値よりも高いグルコース代謝のレベルは、前記サンプルが処置により適さないことを示す、グルコース代謝のレベル；又は

i i) S t a t 3 活性化のレベルであって、

S t a t 3 活性化基準値よりも高い S t a t 3 活性化のレベルは、前記サンプルが処置に適していることを示し、及び

S t a t 3 活性化基準値よりも低い S t a t 3 活性化のレベルは、前記サンプルが処置により適さないことを示す、S t a t 3 活性化のレベル

を評価し、それにより前記 C A R 発現細胞を評価することを含む方法。

【請求項 9 8】

前記 C A R 発現細胞における前記グルコース代謝又は S t a t 3 活性化のレベルを評価する前に前記対象から前記 C A R 発現細胞を得ることを更に含む、請求項 9 7 に記載の方法。

【請求項 9 9】

i) 前記グルコース代謝のレベルが前記グルコース代謝基準値よりも低い；又は

i i) 前記 S t a t 3 活性化のレベルが前記 S t a t 3 活性化基準値よりも高い

という判定に応答して、前記サンプルは、前記対象への投与のために選択されるか又は投与される、請求項 9 7 又は 9 8 に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

i) 前記グルコース代謝のレベルが前記グルコース代謝基準値よりも高い、

i i) 前記 S t a t 3 活性化のレベルが前記 S t a t 3 活性化基準値よりも低い

という判定に応答して、前記サンプルは、前記対象への投与のために選択されないか又は投与されない、請求項 9 7 又は 9 8 に記載の方法。

【請求項 1 0 1】

前記グルコース代謝基準値は、実施例 1 に記載されるような完全応答対象の細胞のグルコース代謝値であり、例えば、前記細胞（例えば、前記細胞を含有するサンプル）は、例えば、実施例 1 に記載されるように、偽刺激、例えば C A R 抗原以外の抗原による刺激と接触される、請求項 9 7 ～ 1 0 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 0 2】

前記 S t a t 3 活性化基準値は、例えば、実施例 2 に記載されるような非応答対象の細胞の S t a t 3 活性化値である、請求項 9 7 ～ 1 0 0 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、概して、キメラ抗原受容体（C A R）発現免疫エフェクター細胞（例えば、T 細胞又は N K 細胞）を作製する方法並びにそれを含む組成物及び反応混合物に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

自己 T 細胞、特にキメラ抗原受容体（C A R）を形質導入した T 細胞での養子細胞移入（A C T）治療は、いくつかの血液癌の試験において有望性が示されている。

【0 0 0 3】

自己遺伝子改変 T 細胞の製造は、現在、C A R を発現する操作された治療用 T 細胞が由来する患者の材料（例えば、白血球アフェレーシスから得られたもの）から開始する複雑なプロセスである。患者の白血球アフェレーシス材料は、高レベルの細胞成分の変動性を有し得る。この出発材料は、細胞組成が患者ごとに且つ 1 つの病状の範囲内で大きく異なり得る。細胞不純物は、顆粒球、単球、赤血球、循環芽細胞及び血小板を含み得る。自己細胞治療製品の製造プロセスは、患者の異なる処置歴、病状などにも対処する必要がある、これは、出発物質の細胞含有量に更なる影響を与える（非特許文献 1、非特許文献 2、非特許文献 3）。更に、出発物質からのそのような不純物は、製造プロセス、最終的な製品品質及び製品の治療有効性に負の影響を及ぼし得る。

10

20

30

40

50

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Burger et al. 2014

【非特許文献2】Kaiser et al. 2015

【非特許文献3】Ramos et al. 2009

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

したがって、CAR発現細胞治療製品のより一貫した生産を提供し、それにより製造プロセスを合理化し、製品品質を改善し、製品の治療有効性を最大化する方法及びプロセスに対する必要性が存在する。 10

【課題を解決するための手段】

【0006】

本開示は、CAR発現免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞、NK細胞）を作製する方法並びにそれを含む組成物及び反応混合物に関する。いくつかの実施形態において、作製方法は、免疫エフェクター細胞の集団を、（i）例えば、本明細書に記載されるようなStat3アクティベーター；（ii）解糖阻止剤、例えば小分子解糖阻止剤、例えば小分子ヘキソキナーゼ阻害剤、例えばグルコース類似体、例えば2デオキシ-D-グルコース（2-DG）、又は（i）及び（ii）の両方と接触させることを含む。本開示は、 20
いくつかの態様において、CAR発現細胞による治療的処置を受ける、受けようとしている、受けた又は受けている対象を評価、予測、選択又は監視する方法も提供する。CAR発現細胞による治療的処置に対する、癌（例えば、本明細書に記載の癌）を有する対象の応答性を評価又は予測する方法も本明細書に記載される。

【0007】

いくつかの態様において、キメラ抗原受容体（CAR）発現免疫エフェクター細胞の集団を作製する方法であって、

- a) 免疫エフェクター細胞、例えばT細胞の集団を提供すること；
 - b) 免疫エフェクター細胞集団を、CARポリペプチドをコードする核酸と接触させること； 30
 - c) 免疫エフェクター細胞集団をStat3アクティベーターと接触させること；及び
 - d) CARポリペプチドの発現を可能にする条件下で細胞を維持し、それによりCAR発現免疫エフェクター細胞の集団を作製すること
- を含む方法が本明細書に開示される。

【0008】

- いくつかの実施形態において、Stat3アクティベーターは、
- i) gp130アクティベーター、例えばgp130に結合する抗体分子、例えば本明細書に記載されるような抗gp130抗体又はIL-6分子、IL-11分子、IL-27分子、CNTF分子、CT-1分子、CLC分子、LIF分子、NP分子、OSM分子；
 - ii) 例えば、本明細書に記載されるような可溶性IL-6受容体（sIL-6R）； 40
 - iii) 例えば、本明細書に記載されるようなIL-6/IL-6R複合体、例えば二量体；
 - iv) IL-6ファミリーサイトカイン（例えば、IL-6分子、IL-11分子、IL-27分子、IL-31分子、CNTF分子、CT-1分子、CLC分子、LIF分子、NP分子又はOSM分子）；
 - v) CCL20分子；
 - vi) 例えば、本明細書に記載されるようなIL-10R2受容体（IL-10R2）アクティベーター、例えばIL-10分子、IL-22分子、IL-26分子、IL-28A分子、IL-28B分子、IL-29分子又はIL-10R2に結合する抗体分子；
 - vii) IL-10ファミリーサイトカイン（例えば、IL-10分子、IL-19分子 50

、I L-20分子、I L-22分子、I L-24分子、I L-26分子、I L-28A分子、I L-28B分子又はI L-29分子)；

v i i i) I L-17ファミリーサイトカイン(例えば、I L17A分子、I L17B分子、I L17C分子、I L17D分子、I L17E分子又はI L17F分子)；又は

i x) I L-23分子

の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ若しくは全て又はその任意の組み合わせから選択される。

【0009】

いくつかの実施形態において、S t a t 3アクティベーターは、g p 1 3 0アクティベーター、例えばg p 1 3 0に結合する抗体分子、例えば本明細書に記載されるような抗g p 1 3 0抗体である。

10

【0010】

いくつかの実施形態において、本明細書の方法は、I L-21分子、例えばI L-21を添加することを含むか、又は本明細書の反応混合物は、それを含む。いくつかの実施形態において、本明細書の反応混合物は、I L-21分子、例えばI L-21を含まないか、又は本明細書の方法は、それを添加することを含む。いくつかの実施形態において、本明細書の方法は、I L-30分子を添加することを含むか、又は本明細書の反応混合物は、それを含む。いくつかの実施形態において、本明細書の方法は、I L-6 R αアクティベーター、例えばI L-6 R αに結合する抗体分子を添加することを含むか、又は本明細書の反応混合物は、それを含む。

20

【0011】

いくつかの実施形態において、I L-6ファミリーサイトカインは、I L-6分子を含まない。

【0012】

いくつかの実施形態において、方法は、免疫エフェクター細胞の集団の少なくとも1つの細胞に、

g p 1 3 0分子を、例えばg p 1 3 0分子をコードする核酸を、g p 1 3 0分子の翻訳を可能にする条件下で免疫エフェクター細胞の集団の少なくとも1つの細胞に導入することにより；又は

S t a t 3分子(例えば、構成的活性型S t a t 3分子(S T A T 3 C))を、例えばS t a t 3分子をコードする核酸を、S t a t 3分子の翻訳を可能にする条件下で免疫エフェクター細胞の集団の少なくとも1つの細胞に導入することにより、導入することを更に含む。

30

【0013】

いくつかの態様において、キメラ抗原受容体(C A R)発現免疫エフェクター細胞の集団を作製する方法であって、

a) 免疫エフェクター細胞、例えばT細胞の集団を提供すること；

b) 免疫エフェクター細胞集団を、C A Rポリペプチドをコードする核酸と接触させること；

c) 免疫エフェクター細胞の集団の少なくとも1つの細胞に、

40

g p 1 3 0分子を、例えばg p 1 3 0分子をコードする核酸を、g p 1 3 0分子の翻訳を可能にする条件下で免疫エフェクター細胞の集団の少なくとも1つの細胞に導入することにより；又は

S t a t 3分子(例えば、構成的活性型S t a t 3分子(S T A T 3 C))を、例えばS t a t 3分子をコードする核酸を、S t a t 3分子の翻訳を可能にする条件下で免疫エフェクター細胞の集団の少なくとも1つの細胞に導入することにより、導入すること；及び

d) C A Rポリペプチド、g p 1 3 0分子又はS t a t 3分子の発現を可能にする条件下で細胞を維持し、それによりC A R発現免疫エフェクター細胞の集団を作製することを含む方法が本明細書に開示される。

【0014】

50

いくつかの実施形態において、方法は、免疫エフェクター細胞の集団を、

i) g p 1 3 0 アクティベーター、例えば g p 1 3 0 に結合する抗体分子、例えば本明細書に記載されるような抗 g p 1 3 0 抗体又は I L - 6 分子、I L - 1 1 分子、I L - 2 7 分子、C N T F 分子、C T - 1 分子、C L C 分子、L I F 分子、N P 分子、O S M 分子；

i i) 例えば、本明細書に記載されるような可溶性 I L - 6 受容体 (s I L - 6 R) ；

i i i) 例えば、本明細書に記載されるような I L - 6 / I L - 6 R 複合体、例えば二量体；

i v) I L - 6 ファミリーサイトカイン (例えば、I L - 6 分子、I L - 1 1 分子、I L - 2 7 分子、I L - 3 1 分子、C N T F 分子、C T - 1 分子、C L C 分子、L I F 分子、N P 分子又は O S M 分子) ；

v) C C L 2 0 分子；

v i) 例えば、本明細書に記載されるような I L - 1 0 R 2 受容体 (I L - 1 0 R 2) アクティベーター、例えば I L - 1 0 分子、I L - 2 2 分子、I L - 2 6 分子、I L - 2 8 A 分子、I L - 2 8 B 分子、I L - 2 9 分子又は I L - 1 0 R 2 に結合する抗体分子；

v i i) I L - 1 0 ファミリーサイトカイン (例えば、I L - 1 0 分子、I L - 1 9 分子、I L - 2 0 分子、I L - 2 2 分子、I L - 2 4 分子、I L - 2 6 分子、I L - 2 8 A 分子、I L - 2 8 B 分子又は I L - 2 9 分子) ；

v i i i) I L - 1 7 ファミリーサイトカイン (例えば、I L 1 7 A 分子、I L 1 7 B 分子、I L 1 7 C 分子、I L 1 7 D 分子、I L 1 7 E 分子又は I L 1 7 F 分子) ；又は

i x) I L - 2 3 分子

の 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ若しくは全て又はその任意の組み合わせから選択される S t a t 3 アクティベーターと接触させることを更に含む。

10

20

【0015】

いくつかの実施形態において、S t a t 3 アクティベーターは、g p 1 3 0 アクティベーター、例えば g p 1 3 0 に結合する抗体分子、例えば本明細書に記載されるような抗 g p 1 3 0 抗体である。

【0016】

一実施形態において、I L - 6 ファミリーサイトカインは、I L - 6 分子を含まない。

【0017】

本明細書に開示される製造方法のいくつかの実施形態において、g p 1 3 0 分子又は S t a t 3 分子の発現は、一過性 (例えば、誘導性若しくは非誘導性) 又は恒常性である。

30

【0018】

本明細書に開示される製造方法のいくつかの実施形態において、g p 1 3 0 分子又は S t a t 3 分子は、免疫エフェクター細胞の集団を、C A R ポリペプチドをコードする核酸；又は例えば、本明細書に記載されるような S t a t 3 アクティベーターと接触させる前、それと同時に又はその後に免疫エフェクター細胞の集団に導入される。

【0019】

本明細書に開示される製造方法のいくつかの実施形態において、S t a t 3 分子 (例えば、構成的活性型 S t a t 3 (S T A T 3 C)) をコードするヌクレオチドを含む核酸は、C A R、例えば C D 1 9 C A R をコードするヌクレオチド配列を更に含む。

40

【0020】

本発明に開示される製造方法のいくつかの実施形態において、S t a t 3 アクティベーターは、g p 1 3 0 に結合する抗体分子、例えば本明細書に記載されるような抗 g p 1 3 0 抗体である。いくつかの実施形態において、方法は、例えば、初期メモリー T 細胞又は疲弊していない初期メモリー T 細胞について濃縮されている (例えば、そのレベルが増加している) T 細胞、例えば C D 4 + 又は C D 8 + T 細胞の集団をもたらす。いくつかの実施形態において、方法は、例えば、本明細書に記載されるように、C D 4 + 又は C D 8 + 初期メモリー T 細胞の濃縮をもたらす。いくつかの実施形態において、初期メモリー T 細胞は、以下の特徴：C D 2 7 + 及び / 又は C D 4 5 R O ^{d i m} / ^{n e g} の一方又は両方 (

50

例えば、CD 27 + CD 45 RO^{d i m / n e g}) を有する。いくつかの実施形態において、方法は、例えば、本明細書に記載されるように、CD 4 + 又は CD 8 + が疲弊していない初期メモリーT細胞の濃縮をもたらす。いくつかの実施形態において、疲弊していない初期メモリーT細胞は、以下の特徴：(i) PD-1 陰性；(i i) CD 27^{h i}；(i i i) CCR 7^{h i}；又は(i v) CD 45 RO^{d i m / n e g} の1つ以上、例えば全てを有する。いくつかの実施形態において、疲弊していない初期メモリーT細胞は、PD-1 陰性 CD 27^{h i} CCR 7^{h i} CD 45 RO^{d i m / n e g} である。いくつかの実施形態において、T細胞、例えば初期メモリーT細胞又は疲弊していない初期メモリーT細胞の濃縮集団は、例えば、増加したレベルの、例えば少なくとも5~90%多い（例えば、少なくとも5~10、10~20、20~30、30~50、50~70若しくは70~90%多い又は5~90、10~85、15~80、20~75、25~70、30~70、35~65、40~60若しくは45~55%多い）初期メモリーT細胞又は疲弊していない初期メモリーT細胞を有する。いくつかの実施形態において、T細胞、例えば初期メモリーT細胞又は疲弊していない初期メモリーT細胞の濃縮集団は、増加したレベルの、例えば少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30%多い）初期メモリーT細胞又は疲弊していない初期メモリーT細胞を有する。いくつかの実施形態において、増加したレベルの初期メモリーT細胞又は疲弊していない初期メモリーT細胞は、例えば、実施例2に記載されているように、St a t 3アクティベーターと接触されなかった以外には同様のT細胞集団と比較される。いくつかの実施形態において、St a t 3アクティベーターと接触されなかった以外には同様のT細胞集団は、同じT細胞集団、例えば濃縮が実施されたもの、例えば前濃縮集団、例えば開始集団、例えば実施例2に記載されるようなものである。いくつかの実施形態において、St a t 3アクティベーターと接触されなかった以外には同様のT細胞集団は、異なるT細胞集団、例えば濃縮が実施されなかった集団である。

【0021】

いくつかの実施形態において、CD 4 + T細胞、例えば初期メモリーT細胞又は疲弊していない初期メモリーT細胞の濃縮集団は、St a t 3アクティベーターと接触されなかった以外には同様のT細胞集団と比較して、増加したレベルの、例えば少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20%（例えば、少なくとも8%）多い初期メモリーT細胞又は疲弊していない初期メモリーT細胞を有する。

【0022】

いくつかの実施形態において、CD 8 + T細胞、例えば初期メモリーT細胞又は疲弊していない初期メモリーT細胞の濃縮集団は、St a t 3アクティベーターと接触されなかった以外には同様のT細胞集団と比較して、増加したレベルの、例えば少なくとも15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30%（例えば、少なくとも20%）多い初期メモリーT細胞又は疲弊していない初期メモリーT細胞を有する。

【0023】

本明細書に開示される製造方法のいくつかの実施形態において、St a t 3アクティベーターは、IL-6分子、IL-17分子、IL-22分子又はCCL20分子の1つ、2つ、3つ又は全てを含む。一実施形態において、St a t 3アクティベーターは、天然に存在する分子、組換え分子又は精製された分子である。一実施形態において、St a t 3アクティベーターは、血清中に存在せず、例えば実施例2のアッセイによって測定されるように、例えば、チロシン705（Y705）上のSt a t 3を活性化する、例えばSt a t 3をリン酸化するのに十分な量で存在しない。

【0024】

本明細書に開示される製造方法のいくつかの実施形態において、St a t 3アクティベーターは、可溶性であり（例えば、基質に結合せず）、いくつかの実施形態において、S

t a t 3 アクティベーターは、基質（例えば、ビーズ又は細胞）上に配置、例えば固定化される。

【0025】

本明細書に開示される製造方法のいくつかの実施形態において、S t a t 3 アクティベーターは、基質、例えばビーズ又は細胞上に配置、例えば固定化される。一実施形態において、S t a t 3 アクティベーターは、例えば、本明細書に記載されるように、S t a t 3 アクティベーター細胞、例えば人工抗原提示細胞（A P C）上に配置される。

【0026】

いくつかの実施形態において、人工A P Cは、

（i）M H C分子（例えば、その表面でM H C分子を発現する）；

10

（i i）共刺激タンパク質（例えば、その表面に共刺激タンパク質を発現するか、又はそれに共刺激タンパク質がコンジュゲートしているもの）；及び／又は

（i i i）例えば、本明細書に記載されるような抗原、例えばC A R発現細胞、例えば本明細書に記載されるC A R発現細胞によって認識される抗原の1つ、2つ又は全てを含む。

【0027】

本明細書に開示される製造方法のいくつかの実施形態において、S t a t 3 アクティベーターは、S t a t 3 アクティベーター細胞によって発現されるか、又はS t a t 3 アクティベーター細胞の表面にコンジュゲートされる。

【0028】

20

本明細書に開示される製造方法のいくつかの実施形態において、例えば、本明細書に記載されるようなS t a t 3 アクティベーターは、例えば、実施例2のアッセイによって測定されるように、例えばチロシン705（Y705）上のS t a t 3を活性化する、例えばS t a t 3をリン酸化するのに十分な量で提供される。

【0029】

本明細書に開示される製造方法のいくつかの実施形態において、例えば、本明細書に記載されるようなS t a t 3 アクティベーターは、S t a t 3 アクティベーターと接触されていない以外には同様の条件下で培養された同様の細胞の集団と比較して、例えば実施例2のアッセイによって測定されるように、12日間の培養期間後、免疫エフェクター細胞の集団を、少なくとも1. 1、1. 2、1. 3、1. 4、1. 5、2、3、4、5、6、

30

7、8、9倍又はそれを超えて増殖させるのに十分な量で提供される。

【0030】

本明細書に開示される製造方法のいくつかの実施形態において、例えば、本明細書に記載されるようなS t a t 3 アクティベーターは、S t a t 3 アクティベーターと接触されていない以外には同様の条件下で培養された同様の細胞の集団と比較して、C D 2 7 + P D - 1 である免疫エフェクター細胞集団中の細胞の割合を、例えば少なくとも1. 1、1. 2、1. 3、1. 4、1. 5、2、3、4、5倍又はそれを超えて増加させるのに十分な量で提供される。

【0031】

本明細書に開示される製造方法のいくつかの実施形態において、例えば、本明細書に記載されるようなS t a t 3 アクティベーターは、S t a t 3 アクティベーターと接触されていない以外には同様の条件下で培養された同様の細胞の集団と比較して、例えば実施例2のアッセイによって測定されるように、免疫エフェクター細胞集団において、g p 1 3 0の発現レベルを、少なくとも1. 5、2、3、4、5、10倍又はそれを超えて増加させるのに十分な量で提供される。

40

【0032】

本明細書に開示される製造方法のいくつかの実施形態において、例えば、本明細書に記載されるようなS t a t 3 アクティベーターは、I L - 6分子、I L - 1 7分子、I L - 2 2分子、I L 3 1分子及びC C L 2 0分子の1つ、2つ、3つ、4つ又は全て（例えば、5つ）から選択される。

50

【0033】

本明細書に開示される製造方法のいくつかの実施形態において、例えば、本明細書に記載されるようなStat3アクティベーターは、IL-6分子、例えば組換えIL-6を含む。一実施形態において、IL-6分子、例えば組換えIL-6は、少なくとも1、5、10、15、20若しくは30 ng/mlの量又は1~20、1~15若しくは5~15 ng/mlの範囲、例えば少なくとも10 ng/mlで提供される。

【0034】

本明細書に開示される製造方法のいくつかの実施形態において、抗gp130抗体分子は、B-S12若しくはB-P8又はB-S12若しくはB-P8からの1つ、2つ、3つ、4つ、5つ若しくは6つのCDRを有する抗体分子から選択される。一実施形態において、方法は、免疫エフェクター細胞の集団をB-S12及びB-P8の両方と接触させることを含む。一実施形態において、抗gp130抗体分子の総量は、0.1~1000、0.5~500又は1~1000 µg/mlである。一実施形態において、抗gp130抗体分子は、少なくとも0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9又は2 µg/ml、例えば約1 µg/mlの量で提供される。

10

【0035】

いくつかの実施形態において、抗gp130抗体は、STAT3のリン酸化によって測定されるように、gp130によって媒介されるシグナル伝達を誘導するか、又は例えば、LIF、OSM又はCNTFによる二量体化、例えばgp130のホモ二量体化又はgp130のヘテロ二量体化を誘導する。

20

【0036】

本明細書に開示される製造方法のいくつかの実施形態において、例えば、本明細書に記載されるように、Stat3アクティベーターの存在下で培養された細胞の集団は、Stat3アクティベーターと接触されていない以外には同様の条件下で培養された同様の細胞の集団と比較して、

例えば、実施例2のアッセイによって測定されるような、例えばチロシン705 (Y705) 上のStat3の活性化、例えばStat3のリン酸化；

例えば、実施例2のアッセイによって測定されるような、12日間の培養期間後の、少なくとも1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9倍又はそれを超える免疫エフェクター細胞の集団の増殖；

30

CD27+PD-1-である免疫エフェクター細胞集団中の細胞の割合の、例えば少なくとも1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、2、3、4、5倍又はそれを超える増加；

例えば、実施例2のアッセイによって測定されるような、免疫エフェクター細胞集団における少なくとも1.5、2、3、4、5、10倍又はそれを超えるgp130の発現レベルの増加を示す。

【0037】

いくつかの実施形態において、CCl20分子は、全長の天然に存在するCCl20 (例えば、哺乳動物CCl20、例えばヒトCCl20)、CCl20の活性フラグメント又はCCl20の天然に存在する野生型ポリペプチド若しくはそのフラグメントと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有する活性変異体を含む。

40

【0038】

いくつかの実施形態において、可溶性IL-6受容体は、全長の天然に存在するIL-6受容体 (例えば、哺乳動物IL-6受容体、例えばヒトIL-6受容体)、IL-6受容体の活性フラグメント又はIL-6受容体の天然に存在する野生型ポリペプチド若しくはそのフラグメントと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、9

50

8 %又は99 %の配列同一性を有する活性変異体を含む。

【0039】

いくつかの実施形態において、IL-10R2受容体アクティベーターは、IL-10R2シグナル伝達経路を活性化する分子を含む。いくつかの実施形態において、IL-10R2受容体アクティベーターは、例えば、ポリペプチド又は小分子を含む。

【0040】

いくつかの実施形態において、IL-6/IL-6R複合体は、IL-6分子とIL-6受容体(IL-6R)分子との間の複合体を含む。いくつかの実施形態において、IL-6R分子は、全長の天然に存在するIL-6受容体(例えば、哺乳動物IL-6受容体、例えばヒトIL-6受容体)、IL-6受容体の活性フラグメント又はIL-6受容体の天然に存在する野生型ポリペプチド若しくはそのフラグメントと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有する活性変異体を含む。

【0041】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される製造方法は、例えば、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若しくは21日間又は1~7、7~14若しくは14~21日間にわたり、集団を増殖させることを含む。

【0042】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される製造方法は、Stat3転写標的、例えばc-Myc、c-Fos、Sox2、Bcl-2又はRORCのレベル又は活性を測定することにより、免疫エフェクター細胞の集団におけるStat3経路活性化をアッセイして、Stat3経路活性化の値を決定することを更に含む。一実施形態において、方法は、Stat3経路活性化値を基準値と比較することを含み、基準値は、例えば、本明細書に記載されるような、Stat3アクティベーターと接触されていない以外には同様の条件下で培養された同様の免疫エフェクター細胞集団から得られる。

【0043】

いくつかの実施形態において、Stat3経路活性化値の基準値との比較に応答して、集団を治療剤としての使用に適切又は不適切なものとして分類すること；治療的使用のための集団又はそのアリコート処方又はパッケージングすること；又は培養パラメーターを変更すること、例えば、i) 培養の時間の長さを変更すること、又はii) 例えば、本明細書に記載されるように、Stat3アクティベーターの濃度を増加若しくは減少させることの1つ以上を実行する。

【0044】

本明細書に開示される製造方法のいくつかの実施形態において、(b)は、(c)前に実施されるか、(c)は、(b)前に実施されるか、又は(b)及び(c)は、同時に実施される。

【0045】

いくつかの実施形態において、核酸は、DNA又はRNAである。

【0046】

いくつかの実施形態において、(b)は、核酸を免疫エフェクター細胞に送達するためにレンチウイルス形質導入を実施することを含む。

【0047】

いくつかの実施形態において、方法は、免疫エフェクター細胞の集団を、CARに結合する抗原(例えば、CD19)を発現する細胞の集団と接触させることを更に含む。

【0048】

いくつかの実施形態において、方法は、免疫エフェクター細胞の集団を、CD3/TCR複合体結合シグナルを刺激する薬剤及び細胞の表面上の共刺激分子を刺激するリガンドと接触させることを更に含む、例えば、薬剤は、抗CD3抗体若しくはそのフラグメント

及び／又は抗CD28抗体若しくはそのフラグメントとコンジュゲートされたビーズである。

【0049】

いくつかの実施形態において、CARポリペプチドは、CD19 CAR、CD22 CAR、CD123 CAR又はCD33 CARである。一実施形態において、CARは、CD19 CAR、例えば配列番号39～51のscFvアミノ酸配列を含むCAR又は配列番号77～89のアミノ酸配列を含むCARである。

【0050】

いくつかの実施形態において、CARは、抗CD19結合ドメイン、膜貫通ドメイン及び刺激ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む抗体分子を含み、前記抗CD19結合ドメインは、表3Bに列挙される任意の抗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）及び軽鎖相補性決定領域3（LC CDR3）の1つ以上並びに表3Aに列挙される任意の抗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）及び重鎖相補性決定領域3（HC CDR3）の1つ以上を含む。

【0051】

いくつかの実施形態において、抗CD19結合ドメインは、配列番号40又は配列番号51の配列を含む。

【0052】

いくつかの実施形態において、CARは、配列番号78又は配列番号89の配列を有するポリペプチドを含む。

【0053】

一態様において、キメラ抗原受容体（CAR）発現免疫エフェクター細胞の集団を作製する方法であって、

- a) 免疫エフェクター細胞、例えばT細胞の集団を提供すること；
 - b) 免疫エフェクター細胞集団を、CARポリペプチドをコードする核酸と接触させること；
 - c) 免疫エフェクター細胞の集団を、解糖阻止剤、例えば小分子解糖阻止剤、例えば小分子ヘキソキナーゼ阻害剤、例えばグルコース類似体、例えば2-DGと接触させること、及び
 - d) CARポリペプチドの発現を可能にする条件下で細胞を維持し、それによりCAR発現免疫エフェクター細胞の集団を作製すること
- を含む方法が本明細書に開示される。

【0054】

一実施形態において、（b）は、（c）前に実施されるか、（c）は、（b）前に実施されるか、又は（b）及び（c）は、同時に実施される。

【0055】

一実施形態において、核酸は、DNA又はRNAである。

【0056】

一実施形態において、（b）は、核酸を免疫エフェクター細胞に送達するためにレンチウイルス形質導入を実施することを含む。

【0057】

一実施形態において、解糖阻止剤、例えば小分子解糖阻止剤、例えば小分子ヘキソキナーゼ阻害剤、例えばグルコース類似体、例えば2-DGは、解糖阻止剤で処置されていない以外には同様の条件下で培養された同様の細胞の集団と比較して、免疫エフェクター細胞の集団を、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%又はそれを超えて増加させること；又は
セントラルメモリー表現型を有する、例えばCD45RO+CCR7+である免疫エフェ

10

20

30

40

50

クター細胞集団中の細胞の割合を、例えば少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%又はそれを超えて増加させること

のために十分な量で添加される。

【0058】

一実施形態において、解糖阻止剤、例えば2-DGは、少なくとも0.5、1、1.5、2若しくは2.5mM、0.5～2.5mM又は1～2mMの濃度で添加される。

【0059】

一実施形態において、解糖阻害剤の存在下で培養された細胞の集団は、解糖阻止剤で処置されていない以外には同様の条件下で培養された同様の細胞の集団と比較して、免疫エフェクター細胞の集団の、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%又はそれを超える増加；又はセントラルメモリー表現型を有する、例えばCD45RO+CCR7+である免疫エフェクター細胞集団中の細胞の割合の、例えば少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%又はそれを超える増加を示す。

【0060】

一実施形態において、方法は、

例えば、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若しくは21日間又は1～7、7～14若しくは14～21日間にわたり、集団を増殖させること；又は

例えば、実施例1の増殖条件下において、例えば少なくとも1.5、2、2.5、3、4、5、5、7、8、9、10、20、30、40、50倍又はそれを超える細胞数の変化、例えば最大約40又は50倍だけ集団を増殖させること

を含む。

【0061】

一実施形態において、方法は、例えば、2-NBDG取り込みアッセイ、例えば実施例1のアッセイを使用してグルコース代謝値を決定するために、免疫エフェクター細胞の集団におけるグルコース代謝をアッセイすることを更に含む。

【0062】

一実施形態において、方法は、グルコース代謝値を基準値と比較することを更に含む。

【0063】

一実施形態において、方法は、グルコース代謝値の基準値との比較に応答して、集団を治療剤としての使用に適切又は不適切なものとして分類すること；

治療的使用のための集団又はそのアリコート処方又はパッケージングすること；又は培養パラメーターを変更すること、例えば、i) 培養の時間の長さを変更すること、又はii) 解糖阻止剤、例えば小分子解糖阻止剤、例えば小分子ヘキソキナーゼ阻害剤、例えばグルコース類似体、例えば2-デオキシ-D-グルコース(2-DG)の濃度を増加若しくは減少させること

の1つ以上を実施することを更に含む。

【0064】

一実施形態において、方法は、免疫エフェクター細胞の集団を、CARに結合する抗原(例えば、CD19)を発現する細胞の集団と接触させることを更に含む。

【0065】

一実施形態において、方法は、免疫エフェクター細胞の集団を、CD3/TCR複合体結合シグナルを刺激する薬剤及び細胞の表面上の共刺激分子を刺激するリガンドと接触させることを更に含み、例えば、薬剤は、抗CD3抗体若しくはそのフラグメント及び/又は抗CD28抗体若しくはそのフラグメントとコンジュゲートされたビーズである。

【0066】

一実施形態において、CARは、CD19 CAR、CD22 CAR、CD123

10

20

30

40

50

CAR又はCD33 CARである。一実施形態において、CARは、CD19 CAR、例えば配列番号39～51のscFvアミノ酸配列を含むCAR又は配列番号77～89のアミノ酸配列を含むCARである。

【0067】

一実施形態において、CARは、抗CD19結合ドメイン、膜貫通ドメイン及び刺激ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む抗体又は抗体フラグメントを含み、前記抗CD19結合ドメインは、表3に列挙される任意の抗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）及び軽鎖相補性決定領域3（LC CDR3）の1つ以上並びに表3に列挙される任意の抗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）及び重鎖相補性決定領域3（HC CDR3）の1つ以上を含む。

10

【0068】

一実施形態において、CARは、抗CD19結合ドメイン、膜貫通ドメイン及び刺激ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む抗体又は抗体フラグメントを含み、前記抗CD19結合ドメインは、表3Bに列挙される任意の抗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）及び軽鎖相補性決定領域3（LC CDR3）の1つ以上並びに表3Aに列挙される任意の抗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）及び重鎖相補性決定領域3（HC CDR3）の1つ以上を含む。

20

【0069】

一実施形態において、抗CD19結合ドメインは、配列番号40又は配列番号51の配列を含む。

【0070】

一実施形態において、CARは、配列番号78又は配列番号89の配列を有するポリペプチドを含む。

【0071】

いくつか態様において、キメラ抗原受容体（CAR）発現免疫エフェクター細胞の集団を作製する方法であって、

30

- a) 免疫エフェクター細胞、例えばT細胞の集団を提供すること；
 - b) 免疫エフェクター細胞集団を、CARポリペプチドをコードする核酸と接触させること；
 - c) 免疫エフェクター細胞集団を、
 - c-i) 例えば、本明細書に記載されるようなStat3アクティベーター；及び
 - c-ii) 解糖阻止剤、例えば小分子解糖阻止剤、例えば小分子ヘキソキナーゼ阻害剤、例えばグルコース類似体、例えば2-デオキシ-D-グルコース（2-DG）と接触させること；及び
 - d) CARポリペプチドの発現を可能にする条件下で細胞を維持し、それによりCAR発現免疫エフェクター細胞の集団を作製すること
- を含む方法が本明細書に開示される。

40

【0072】

いくつかの実施形態において、Stat3アクティベーターは、

- i) gp130アクティベーター、例えばgp130に結合する抗体分子、例えば本明細書に記載されるような抗gp130抗体又はIL-6分子、IL-11分子、IL-27分子、CNTF分子、CT-1分子、CLC分子、LIF分子、NP分子、OSM分子；
- ii) 例えば、本明細書に記載されるような可溶性IL-6受容体（sIL-6R）；
- iii) 例えば、本明細書に記載されるようなIL-6／IL-6R複合体、例えば二量体；
- iv) IL-6ファミリーサイトカイン（例えば、IL-6分子、IL-11分子、IL

50

－27分子、IL-31分子、CNTF分子、CT-1分子、CLC分子、LIF分子、NP分子又はOSM分子）；

v) CCL20分子；

v i) 例えば、本明細書に記載されるようなIL-10R2受容体（IL-10R2）アクティベーター、例えばIL-10分子、IL-22分子、IL-26分子、IL-28A分子、IL-28B分子、IL-29分子又はIL-10R2に結合する抗体分子；

v i i) IL-10ファミリーサイトカイン（例えば、IL-10分子、IL-19分子、IL-20分子、IL-22分子、IL-24分子、IL-26分子、IL-28A分子、IL-28B分子又はIL-29分子）；

v i i i) IL-17ファミリーサイトカイン（例えば、IL17A分子、IL17B分子、IL17C分子、IL17D分子、IL17E分子又はIL17F分子）；又は

i x) IL-23分子

の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ若しくは全て又はその任意の組み合わせから選択される。

【0073】

いくつかの態様において、キメラ抗原受容体（CAR）発現免疫エフェクター細胞の集団を作製する方法であって、

a) 免疫エフェクター細胞、例えばT細胞の集団を提供すること；

b) 免疫エフェクター細胞集団を、CARポリペプチドをコードする核酸と接触させること；

c) 免疫エフェクター細胞集団を、

c - i) 解糖阻止剤、例えば小分子解糖阻止剤、例えば小分子ヘキソキナーゼ阻害剤、例えばグルコース類似体、例えば2-デオキシ-D-グルコース（2-DG）と、且つ

c - i i) gp130分子と、例えばgp130分子をコードする核酸を、gp130分子の翻訳を可能にする条件下で免疫エフェクター細胞の集団の少なくとも1つの細胞に導入することにより；又はStat3分子（例えば、構成的活性型Stat3分子（STAT3C））を、例えばStat3分子をコードする核酸を、Stat3分子の翻訳を可能にする条件下で免疫エフェクター細胞の集団の少なくとも1つの細胞に導入することにより、接触させること；

d) CARポリペプチド、gp130分子又はStat3分子の発現を可能にする条件下で細胞を維持し、それによりCAR発現免疫エフェクター細胞の集団を作製すること
方法が本明細書に開示される。

【0074】

いくつかの実施形態において、Stat3アクティベーター又はgp130分子若しくはStat3分子を含む細胞の集団を含む製造方法は、免疫エフェクター細胞の集団を解糖阻止剤、例えば小分子解糖阻止剤、例えば小分子ヘキソキナーゼ阻害剤、例えばグルコース類似体、例えば2-デオキシ-D-グルコース（2-DG）と接触させることを更に含む。

【0075】

いくつかの実施形態において、例えば、本明細書に記載されるような解糖阻止剤を含む製造方法は、免疫エフェクター細胞の集団を、Stat3アクティベーター又はgp130分子若しくはStat3分子を含む細胞集団と接触させることを更に含む。

【0076】

いくつかの態様において、反応混合物であって、

a) (i) CAR発現免疫エフェクター細胞の集団（例えば、本明細書に記載されるCAR発現細胞、例えばCD19 CAR発現細胞）、又は(ii) 免疫エフェクター細胞及びCARをコードする核酸（例えば、本明細書に記載されるCAR、例えばCD19 CAR）；及び

b) 薬剤であって、

(i) Stat3アクティベーター；

10

20

30

40

50

(i i) g p 1 3 0 分子又は S t a t 3 分子を発現する細胞又は細胞の集団；又は
(i i i) g p 1 3 0 分子若しくは S t a t 3 分子又はそれをコードする核酸
から選択される薬剤
を含む反応混合物が本明細書に開示される。

【0077】

本明細書に開示される反応混合物の一実施形態において、S t a t 3 アクティベーターは、

b - i - i) g p 1 3 0 アクティベーター、例えば g p 1 3 0 に結合する抗体分子、例えば本明細書に記載されるような抗 g p 1 3 0 抗体又は I L - 6 分子、I L - 1 1 分子、I L - 2 7 分子、C N T F 分子、C T - 1 分子、C L C 分子、L I F 分子、N P 分子、O S M 分子；

b - i - i i) 例えば、本明細書に記載されるような可溶性 I L - 6 受容体 (s I L - 6 R)；

b - i - i i i) 例えば、本明細書に記載されるような I L - 6 / I L - 6 R 複合体、例えば二量体；

b - i - i v) I L - 6 ファミリーサイトカイン (例えば、I L - 6 分子、I L - 1 1 分子、I L - 2 7 分子、I L - 3 1 分子、C N T F 分子、C T - 1 分子、C L C 分子、L I F 分子、N P 分子又は O S M 分子)；

b - i - v) C C L 2 0 分子；

b - i - v i) 例えば、本明細書に記載されるような I L - 1 0 R 2 受容体 (I L - 1 0 R 2) アクティベーター、例えば I L - 1 0 分子、I L - 2 2 分子、I L - 2 6 分子、I L - 2 8 A 分子、I L - 2 8 B 分子、I L - 2 9 分子又は I L - 1 0 R 2 に結合する抗体分子；

b - i - v i i) I L - 1 0 ファミリーサイトカイン (例えば、I L - 1 0 分子、I L - 1 9 分子、I L - 2 0 分子、I L - 2 2 分子、I L - 2 4 分子、I L - 2 6 分子、I L - 2 8 A 分子、I L - 2 8 B 分子又は I L - 2 9 分子)；又は

b - i - v i i i) I L - 1 7 ファミリーサイトカイン (例えば、I L 1 7 A 分子、I L 1 7 B 分子、I L 1 7 C 分子、I L 1 7 D 分子、I L 1 7 E 分子又は I L 1 7 F 分子)
から選択される。

【0078】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される反応混合物は、(a) (i) C A R 発現免疫エフェクター細胞の集団を含む。

【0079】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される反応混合物は、(a) (i i) C A R をコードする核酸 (例えば、本明細書に記載される C A R、例えば C D 1 9 C A R) を含む。

【0080】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される反応混合物は、(b) (i) 例えば、本明細書に記載されるような S t a t 3 アクティベーターを含む。

【0081】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される反応混合物は、(b) (i i) g p 1 3 0 分子又は S t a t 3 分子を含む細胞又は細胞集団を含む。

【0082】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される反応混合物は、(b) (i i i) g p 1 3 0 分子若しくは S t a t 3 分子又はそれをコードする核酸を含む。

【0083】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される反応混合物は、(a) (i) C A R 発現免疫エフェクター細胞の集団；及び (b) (i) 例えば、本明細書に記載されるような S t a t 3 アクティベーターを含む。

【0084】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される反応混合物は、(a) (i) C A R 発現免疫エフェクター細胞の集団；及び (b) (i i) g p 1 3 0 分子又は S t a t 3 分子を含む細胞又は細胞集団を含む。

【0085】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される反応混合物は、(a) (i) C A R 発現免疫エフェクター細胞の集団；及び (b) (i i i) g p 1 3 0 分子若しくは S t a t 3 分子又はそれをコードする核酸を含む。

【0086】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される反応混合物は、(a) (i i) C A R をコードする核酸；及び (b) (i) 例えば、本明細書に記載されるような S t a t 3 アクティベーターを含む。

10

【0087】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される反応混合物は、(a) (i i) C A R をコードする核酸；及び (b) (i i) g p 1 3 0 分子又は S t a t 3 分子を含む細胞又は細胞の集団を含む。

【0088】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される反応混合物は、(a) (i i) C A R をコードする核酸；及び (b) (i i i) g p 1 3 0 分子若しくは S t a t 3 分子又はそれをコードする核酸を含む。

【0089】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される反応混合物は、(a) (i) 及び b - i - i)；(a) (i) 及び b - i - i i)；(a) (i) 及び b - i - i i i)；(a) (i) 及び b - i - i v)；(a) (i) 及び b - i - v)；(a) (i) 及び b - i - v i)；(a) (i) 及び b - i - v i i)；(a) (i) 及び b - i - v i i i)；(a) (i i) 及び b - i - i)；(a) (i i) 及び b - i - i i)；(a) (i i) 及び b - i - i i i)；(a) (i i) 及び b - i - i v)；(a) (i i) 及び b - i - v)；(a) (i i) 及び b - i - v i)；(a) (i i) 及び b - i - v i i)；並びに (a) (i i) 及び b - i - v i i i) の 1 つ以上を含む。

20

【0090】

一態様において、反応混合物であって、
a) C A R 発現免疫エフェクター細胞、例えば本明細書に記載される C A R 発現細胞、例えば C D 1 9 C A R 発現細胞の集団、及び
b) 解糖阻止剤、例えば小分子解糖阻止剤、例えば小分子ヘキソキナーゼ阻害剤、例えばグルコース類似体、例えば 2 - デオキシ - D - グルコース (2 - D G) を含む反応混合物が本明細書に開示される。

30

【0091】

別の態様において、反応混合物であって、
a) 免疫エフェクター細胞の集団、
b) C A R をコードする核酸、例えば本明細書に記載される C A R、例えば C D 1 9 C A R、及び
c) 解糖阻止剤、例えば小分子解糖阻止剤、例えば小分子ヘキソキナーゼ阻害剤、例えばグルコース類似体、例えば 2 - デオキシ - D - グルコース (2 - D G) を含む反応混合物が本明細書に開示される。

40

【0092】

特定の態様において、本明細書に開示される反応混合物は、
(i) S t a t 3 アクティベーター；
(i i) g p 1 3 0 分子又は S t a t 3 分子を発現する細胞又は細胞の集団；
(i i i) g p 1 3 0 分子若しくは S t a t 3 分子又はそれをコードする核酸；及び
(i v) 解糖阻止剤、例えば小分子解糖阻止剤、例えば小分子ヘキソキナーゼ阻害剤、例えばグルコース類似体、例えば 2 - デオキシ - D - グルコース (2 - D G)

50

を含む。

【0093】

一実施形態において、本明細書に開示される反応混合物は、レンチウイルスを更に含み、例えば、CARをコードする核酸は、レンチウイルス中にパッケージされている。

【0094】

本明細書に開示される反応混合物の一実施形態において、核酸は、DNA又はRNAである。

【0095】

一実施形態において、本明細書で開示される反応混合物は、CARに結合する抗原（例えば、CD19）を発現する細胞の集団を更に含む。

【0096】

本明細書に開示される反応混合物の一実施形態において、解糖阻止剤、例えば、2-DGは、少なくとも0.5、1、1.5、2、2.5mM、0.5～2.5mM又は1～2mMの濃度で存在する。

【0097】

いくつかの態様において、本開示は、例えば、CAR発現細胞投与前の、CAR発現細胞による治療的処置に対する、癌（例えば、本明細書に記載される癌）を有する対象の応答性を評価又は予測する方法であって、対象からの免疫エフェクター細胞において、

i) グルコース代謝のレベルであって、

グルコース代謝基準値よりも低いグルコース代謝のレベルは、対象がCAR発現細胞による処置に応答する、例えば完全応答又は部分応答を示す可能性が高いことを示し、及びグルコース代謝基準値よりも高いグルコース代謝のレベルは、対象がCAR発現細胞による処置に応答する可能性がより低く、例えば完全応答又は部分応答を示さないことを示す、グルコース代謝のレベル；又は

ii)（例えば、チロシン705（Y705）上の）例えばStat3のリン酸化又はStat3転写標的（例えば、c-Myc、c-Fos、Sox2、Bcl-2若しくはRORC）のレベル若しくは活性によって測定されるようなStat3活性化のレベルであって、

Stat3活性化基準値よりも高いStat3活性化のレベルは、対象がCAR発現細胞による処置に応答する、例えば完全応答又は部分応答を示す可能性が高いことを示し、及び

Stat3活性化基準値よりも低いStat3活性化のレベルは、対象がCAR発現細胞による処置に応答する可能性がより低く、例えば完全応答又は部分応答を示さないことを示す、Stat3活性化のレベル

を評価し、それにより対象を評価するか、又はCAR発現細胞に対する対象の応答性を予測すること

を含む方法を提供する。

【0098】

いくつかの実施形態において、免疫エフェクター細胞は、CARをコードする核酸と接触されていない。

【0099】

いくつかの実施形態において、免疫エフェクター細胞は、CARをコードする核酸と接触されており、例えばCARポリペプチドを発現する。

【0100】

いくつかの実施形態において、免疫エフェクター細胞は、

i) 例えば、本明細書に記載されるようなStat3アクティベーター；

ii) gp130分子又はStat3分子を含む細胞又は細胞の集団；

iii) gp130分子若しくはStat3分子又はそれをコードする核酸；又は

iv) 少なくとも0.5、1、1.5、2又は2.5mMの濃度の解糖阻止剤、例えば小分子解糖阻止剤、例えば小分子ヘキソキナーゼ阻害剤、例えばグルコース類似体、例えば

10

20

30

40

50

2-デオキシ-D-グルコース (2-DG)

と接触されている。

【0101】

いくつかの実施形態において、方法は、細胞数、例えばCAR発現細胞の数の倍率変化を決定することを更に含む。

【0102】

いくつかの実施形態において、CAR発現細胞による処置に応答する可能性がより低い対象は、無応答 (NR) 又は部分応答 (PR) を示すと予測される。

【0103】

いくつかの実施形態において、

10

i) グルコース代謝のレベルがグルコース代謝基準値よりも低いか；又は

ii) Stat3活性化のレベルがStat3活性化基準値よりも高い

という判定に応答して、対象は、CAR発現療法の投与のために選択されるか又はそれを投与される。

【0104】

いくつかの実施形態において、

i) グルコース代謝のレベルがグルコース代謝基準値よりも高いか；又は

ii) Stat3活性化のレベルがStat3活性化基準値よりも低い

という判定に応答して、対象は、CAR発現療法以外の療法の投与のために選択されるか又はそれを投与される。

20

【0105】

いくつかの実施形態において、グルコース代謝基準値は、例えば、実施例1に記載されるような完全応答対象の細胞のグルコース代謝値であり、例えば、細胞 (例えば、細胞を含有するサンプル) は、例えば、実施例1に記載されるように、偽刺激、例えばCAR抗原以外の抗原による刺激と接触される。

【0106】

いくつかの実施形態において、Stat3活性化基準値は、例えば、実施例2に記載されるような非応答対象の細胞のStat3活性化値である。

【0107】

一態様において、本開示は、例えば、CAR発現細胞投与前の、CAR発現細胞による治療的処置に対する、癌 (例えば、本明細書に記載される癌) を有する対象の応答性を評価又は予測する方法であって、

30

対象からの免疫エフェクター細胞におけるグルコース代謝のレベルを評価することであって、

基準値よりも低いグルコース代謝のレベルは、対象がCAR発現細胞による処置に応答する、例えば完全応答又は部分応答を示す可能性が高いことを示し、及び

基準値よりも高いグルコース代謝のレベルは、対象がCAR発現細胞による処置に応答する可能性がより低く、例えば完全応答又は部分応答を示さないことを示す、評価することを行い、それにより対象を評価するか、又はCAR発現細胞に対する対象の応答性を予測すること

40

を含む方法を提供する。

【0108】

一実施形態において、免疫エフェクター細胞は、CARをコードする核酸と接触されていない。

【0109】

一実施形態において、免疫エフェクター細胞は、CARをコードする核酸と接触されており、例えばCARポリペプチドを発現する。

【0110】

一実施形態において、免疫エフェクター細胞は、少なくとも0.5、1、1.5、2又は2.5 mMの濃度の解糖阻止剤、例えば小分子解糖阻止剤、例えば小分子ヘキソキナー

50

ゼ阻害剤、例えばグルコース類似体、例えば2-デオキシ-D-グルコース（2-DG）と接触されている。

【0111】

一実施形態において、方法は、細胞数の倍率変化を決定することを更に含む。

【0112】

一実施形態において、CAR発現細胞による処置に応答する可能性がより低い対象は、無応答（NR）又は部分応答（PR）を示すと予測される。

【0113】

一実施形態において、グルコース代謝のレベルが基準値よりも低いという判定に応答して、対象は、CAR発現療法の投与のために選択されるか又はそれを投与される。

10

【0114】

一実施形態において、グルコース代謝のレベルが基準値よりも高いという判定に応答して、対象は、CAR発現療法以外の療法の投与のために選択されるか又はそれを投与される。

【0115】

一実施形態において、基準値は、実施例1に記載されるような完全応答対象の細胞のグルコース代謝値であり、例えば、細胞（例えば、細胞を含有するサンプル）は、例えば、実施例1に記載されるように、偽刺激、例えばCAR抗原以外の抗原による刺激と接触される。

【0116】

いくつかの態様において、癌（例えば、本明細書に記載される癌）を有する対象の応答性を評価又は予測する方法であって、対象は、CAR発現細胞で処置されている、方法が本明細書に開示され、この方法は、対象からのCAR発現細胞において、

20

i) グルコース代謝のレベルであって、

グルコース代謝基準値よりも低いグルコース代謝のレベルは、対象がCAR発現細胞による処置に応答する、例えば完全応答又は部分応答を示す可能性が高いことを示し、及びグルコース代謝基準値よりも高いグルコース代謝のレベルは、対象がCAR発現細胞による処置に応答する可能性がより低く、例えば完全応答又は部分応答を示さないことを示す、グルコース代謝のレベル；又は

ii)（例えば、チロシン705（Y705）上の）例えばStat3のリン酸化又はStat3転写標的（例えば、c-Myc、c-Fos、Sox2、Bcl-2若しくはRORC）のレベル若しくは活性によって測定されるようなStat3活性化のレベルであって、

30

Stat3活性化基準値よりも高いStat3活性化のレベルは、対象がCAR発現細胞による処置に応答する、例えば完全応答又は部分応答を示す可能性が高いことを示し、及び

Stat3活性化基準値よりも低いStat3活性化のレベルは、対象がCAR発現細胞による処置に応答する可能性がより低く、例えば完全応答又は部分応答を示さないことを示す、Stat3活性化のレベル

を評価し、それにより対象を評価するか、又はCAR発現細胞に対する対象の応答性を予測すること

40

を含む。

【0117】

いくつかの実施形態において、方法は、CAR発現細胞におけるグルコース代謝のレベル又はStat3活性化のレベルを評価する前に対象からCAR発現細胞を得ることを更に含む。

【0118】

いくつかの実施形態において、CAR発現細胞による処置に応答する可能性がより低い対象は、NR又はPRを示すと予測される。

【0119】

50

いくつかの実施形態において、

i) グルコース代謝のレベルがグルコース代謝基準値よりも低いか；又は

i i) S t a t 3 活性化のレベルが S t a t 3 活性化基準値よりも高い

という判定に応答して、対象は、C A R 発現療法の 1 回以上の追加の投与のために選択されるか又はそれを投与される。

【0120】

いくつかの実施形態において、

i) グルコース代謝のレベルがグルコース代謝基準値よりも高いか；又は

i i) S t a t 3 活性化のレベルが S t a t 3 活性化基準値よりも低い

という判定に応答して、対象は、C A R 発現療法以外の療法の投与のために選択されるか又はそれを投与される。

10

【0121】

いくつかの実施形態において、グルコース代謝基準値は、実施例 1 に記載されるような完全応答対象の細胞のグルコース代謝値であり、例えば、細胞（例えば、細胞を含有するサンプル）は、例えば、実施例 1 に記載されるように、偽刺激、例えば C A R 抗原以外の抗原による刺激と接触される。

【0122】

いくつかの実施形態において、S t a t 3 活性化基準値は、例えば、実施例 2 に記載されるような非応答対象の細胞の S t a t 3 活性化値である。

【0123】

一態様において、癌（例えば、本明細書に記載される癌）を有する対象の応答性を評価又は予測する方法であって、対象は、C A R 発現細胞で処置されている、方法が本明細書に開示され、この方法は、

対象からの C A R 発現細胞においてグルコース代謝のレベルを評価することであって、基準値よりも低いグルコース代謝のレベルは、対象が C A R 発現細胞による処置に応答する、例えば完全応答又は部分応答（例えば、P R_{T D}）を示す可能性が高いことを示し、及び

基準値よりも高いグルコース代謝のレベルは、対象が C A R 発現細胞による処置に応答する可能性がより低く、例えば完全応答又は部分応答、例えば P R_{T D} を示さないことを示す、評価することを行い、それにより対象を評価するか、又は C A R 発現細胞に対する対象の応答性を予測することを含む。

20

30

【0124】

一実施形態において、方法は、C A R 発現細胞におけるグルコース代謝のレベルを評価する前に対象から C A R 発現細胞を得ることを更に含む。

【0125】

一実施形態において、C A R 発現細胞による処置に応答する可能性がより低い対象は、N R 又は P R を示すと予測される。

【0126】

一実施形態において、グルコース代謝のレベルが基準値よりも低いという判定に応答して、対象は、C A R 発現療法の 1 回以上の追加の投与のために選択されるか又はそれを投与される。

40

【0127】

一実施形態において、グルコース代謝のレベルが基準値よりも高いという判定に応答して、対象は、C A R 発現療法以外の療法の投与のために選択されるか又はそれを投与される。

【0128】

一実施形態において、基準値は、実施例 1 に記載されるような完全応答対象の細胞のグルコース代謝値であり、例えば、細胞（例えば、細胞を含有するサンプル）は、例えば、実施例 1 に記載されるように、偽刺激、例えば C A R 抗原以外の抗原による刺激と接触さ

50

れる。

【0129】

いくつかの態様において、本開示は、CAR発現細胞、例えばCAR19発現細胞（例えば、CTL019）を評価する方法であって、対象からのサンプル中のCAR発現細胞において、

i) グルコース代謝のレベルであって、
グルコース代謝基準値よりも低いグルコース代謝のレベルは、サンプルが処置に適していることを示し、及び
グルコース代謝基準値よりも高いグルコース代謝のレベルは、サンプルが処置により適さないことを示す、グルコース代謝のレベル；又は

ii) Stat3活性化のレベルであって、
Stat3活性化基準値よりも高いStat3活性化のレベルは、サンプルが処置に適していることを示し、及び
Stat3活性化基準値よりも低いStat3活性化のレベルは、サンプルが処置により適さないことを示す、Stat3活性化のレベル
を評価し、それによりCAR発現細胞を評価すること
を含む方法を提供する。

【0130】

いくつかの実施形態において、方法は、細胞を選択すること又は複数の細胞を濃縮することを更に含み、その細胞又は複数の細胞は、処置に適している。いくつかの実施形態において、方法は、細胞を除去すること又は複数の細胞を希釈することを更に含み、その細胞又は複数の細胞は、処置により適さない。

【0131】

いくつかの実施形態において、方法は、細胞を選択すること又は複数の細胞を濃縮することを更に含み、ここで、
グルコース代謝のレベルがグルコース代謝基準値よりも低いか；又は
Stat3活性化基準値よりも高いStat3活性化のレベル
である。

【0132】

いくつかの実施形態において、方法は、複数の細胞のうちの細胞を対象に投与することを更に含む。

【0133】

いくつかの実施形態において、方法は、CAR発現細胞におけるグルコース代謝のレベル又はStat3活性化を評価する前に対象からCAR発現細胞を得ることを更に含む。

【0134】

いくつかの実施形態において、

i) グルコース代謝のレベルがグルコース代謝基準値よりも低いか；又は
ii) Stat3活性化のレベルがStat3活性化基準値よりも高い
という判定に応答して、サンプルは、対象への投与のために選択されるか又は投与される。

【0135】

いくつかの実施形態において、

i) グルコース代謝のレベルがグルコース代謝基準値よりも高い、
ii) Stat3活性化のレベルがStat3活性化基準値よりも低い
という判定に応答して、サンプルは、対象への投与のために選択されないか又は投与されない。

【0136】

いくつかの実施形態において、グルコース代謝基準値は、実施例1に記載されるような完全応答対象の細胞のグルコース代謝値であり、例えば、細胞（例えば、細胞を含有するサンプル）は、例えば、実施例1に記載されるように、偽刺激、例えばCAR抗原以外の

抗原による刺激と接触される。

【0137】

いくつかの実施形態において、Stat3活性化基準値は、例えば、実施例2に記載されるような非応答対象の細胞のStat3活性化値である。

【0138】

一態様において、本開示は、CAR発現細胞、例えばCAR19発現細胞（例えば、CTL019）を評価する方法を提供し、前記方法は、

対象からのサンプル中のCAR発現細胞においてグルコース代謝のレベルを評価することであって、

基準値よりも低いグルコース代謝のレベルは、サンプルが処置に適していることを示し、及び

基準値よりも高いグルコース代謝のレベルは、サンプルが処置により適さないことを示す、評価することを行い、それによりCAR発現細胞を評価することを含む。

【0139】

一実施形態において、方法は、CAR発現細胞におけるグルコース代謝のレベルを評価する前に対象からCAR発現細胞を得ることを更に含む。

【0140】

一実施形態において、グルコース代謝のレベルが基準値よりも低いという判定に応答して、サンプルは、対象への投与のために選択されるか又は対象に投与される。

【0141】

一実施形態において、グルコース代謝のレベルが基準値よりも高いという判定に応答して、サンプルは、対象への投与のために選択されないか又は対象に投与されない。

【0142】

一実施形態において、基準値は、実施例1に記載されるような完全応答対象の細胞のグルコース代謝値であり、例えば、細胞（例えば、細胞を含有するサンプル）は、例えば、実施例1に記載されるように、偽刺激、例えばCAR抗原以外の抗原による刺激と接触される。

【0143】

本明細書の態様のいずれか、例えば上記の免疫エフェクター細胞組成物及び方法は、本明細書の1つ以上の実施形態、例えば以下の実施形態と組み合わせることができる。

【0144】

一実施形態において、本明細書における方法は、キメラ抗原受容体（CAR）を発現するように操作することができる免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞）の集団を作製又は濃縮することを含み、方法は、水籤を実施することを含む。方法は、免疫エフェクター細胞を含む凍結インプットサンプルを提供すること、凍結したインプットサンプルを解凍して、解凍したサンプルを産生すること、及び解凍したサンプルの水籤を行い、免疫エフェクター細胞を回収し、それによりCARの発現に適した免疫エフェクター細胞を含むアウトプットサンプルを産生することを含み得る。

【0145】

一実施形態において、凍結インプットサンプルは、血漿アフェレーシスサンプルである。

【0146】

一実施形態において、方法は、

i) 流動条件下でCD19+細胞を枯渇させること；

ii) イオジキサノール、例えば水中60%イオジキサノールを含み、且つ／又はフィコールより高い密度（例えば、1.077g/mL超、例えば約1.32g/mL）を有する培地（例えば、Optiprep培地）を使用して密度遠心分離を実施すること；

iii) デキストロース及び／又は塩化ナトリウムを含む緩衝液、例えばD5 1/2 NS培地（5%デキストロース及び0.45%塩化ナトリウム）で洗浄工程を（例えば、

10

20

30

40

50

解凍されたサンプルについて）実施することであって、例えば、洗浄工程は、細胞プロセシング装置、例えば細胞洗浄装置又は密度勾配遠心分離に使用される装置、例えばC S 5（C e l l S a v e r 5 +）機器を使用して行われる、実施すること；及びi v）流動条件下でC D 3 / C D 2 8 +細胞のポジティブ選択を実施することの1つ、2つ、3つ又は全てを更に含む。

【0147】

一実施形態において、方法は、例えば、解凍されたサンプルに等張溶液、例えばP B Sを加えることにより、解凍されたサンプルの粘度を調整する工程を更に含む。

【0148】

一実施形態において、水簾は、約30～82 mL / 分又は50～80 mL / 分の流速を使用して実施され、及び／又は回収体積は、各画分について約250～1250 mL又は300～1000 mLである。一実施形態において、水簾は、約30、40、50、60、70、72又は82 mL / 分、例えば約70又は72 mL / 分の流速を使用して実施される。一実施形態において、水簾は、約30～40、40～50、50～60、60～70、70～72、70～82、72～82 mL / 分の流速を使用して実施される。一実施形態において、水簾は、約250、400、500、900又は975 mL、例えば約400又は975 mLの回収体積を使用して実施される。一実施形態において、水簾は、約250～400、400～500、500～900、900～1000又は1000～1259 mLの回収体積を使用して実施される。一実施形態において、水簾は、約2400 r p mで実施される。一実施形態において、水簾は、約2000～2800、2200～2600又は2300～2500 r p mで実施される。

【0149】

一実施形態において、インプットサンプルは、少なくとも10%、15%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、35%又は40%の単球を含む。一実施形態において、インプットサンプルは、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%又は20%未満のT細胞を含む。一実施形態において、インプットサンプルは、少なくとも1%、2%、5%、10%、15%、20%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%又は95%のB細胞を含む。

【0150】

一実施形態において、アウトプットサンプルは、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、2%、2%、1%、0.5%、0.2%又は0.1%未満の単球を含む。一実施形態において、アウトプットサンプルは、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%又は95%のT細胞を含む。一実施形態において、アウトプットサンプルは、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、2%、2%、1%、0.5%、0.2%又は0.1%未満のB細胞を含む。一実施形態において、アウトプットサンプルは、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.7%又は99.9%のC D 4 + C D 2 5 +細胞を含む。一実施形態において、アウトプットサンプルは、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.7%又は99.9%のC D 8 + C D 2 5 +細胞を含む。

【0151】

一実施形態において、方法は、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%又は95%のT細胞のT細胞回収率をもたらす。

【0152】

一実施形態において、アウトプットサンプルは、C A Rをコードする核酸と接触される。一実施形態において、アウトプットサンプルを、C A Rをコードする核酸と接触させた後、アウトプットサンプルは、少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、3

5 %、40 %、45 %又は50 %のCAR+細胞を含む。そのような実施形態において、アウトプットサンプルは、少なくとも40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %又は95 %のCAR+CD4+セントラルメモリー細胞を含む。そのような実施形態において、アウトプットサンプルは、少なくとも40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %又は95 %のCAR+CD8+セントラルメモリー細胞を含む。

【0153】

一実施形態において、アウトプットサンプルを、CARをコードする核酸と接触させた後、アウトプットサンプルは、1つのCAR発現細胞、例えば形質導入細胞あたり1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2又は0.1pg未満のIFN- γ (IFN- γ)を産生する。IFN γ (IFN- γ)放出アッセイは、本明細書、例えば実施例に記載される。一実施形態において、アウトプットサンプルを、CARをコードする核酸と接触させた後、アウトプットサンプルは、少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25又は30の細胞毒性レベル（例えば、EC50rec）を含む。細胞毒性アッセイは、本明細書、例えば実施例に記載されている。

【0154】

一実施形態において、本明細書における方法は、CARを発現するように操作することができる免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞）の集団を作製又は濃縮することを含み、方法は、密度勾配遠心分離（本明細書では密度遠心分離とも称される）を実施することを含む。方法は、免疫エフェクター細胞を含むインプットサンプルを提供すること、及びイオジキサノール、例えば水中60 %イオジキサノールを含み、且つ／又はフィコールより高い密度（例えば、1.077g/mL超、例えば約1.32g/mL）を有する培地、例えば、Optiprep培地を使用して密度遠心分離工程を実施し、それによりCARの発現に適した免疫エフェクター細胞を含むアウトプットサンプルを産生することを含み得る。

【0155】

一実施形態において、本明細書に記載される密度勾配遠心分離法は、

i) 流動条件下でCD19+細胞を枯渇させること；

ii) インプットサンプルが、任意選択により、解凍されたインプットサンプルである、インプットサンプルの水簍；

iii) デキストロース及び／又は塩化ナトリウムを含む緩衝液、例えばD5 1/2 NS培地（5 %デキストロース及び0.45 %塩化ナトリウム）で洗浄工程を（例えば、密度遠心分離前に）実施することであって、例えば、洗浄工程は、CS5 (CellSaver 5+) 機器を使用して行われる、実施すること；及び流動条件下でのCD3/CD28+細胞のポジティブ選択

の1つ、2つ、3つ又は全てを実施することを更に含む。

【0156】

一実施形態において、本明細書に記載される密度勾配遠心分離法は、グリコールを含む溶液、例えばフィコール溶液を使用すること；又はデキストロース及び／又は塩化ナトリウムを含む緩衝液、例えばD5 1/2 NS培地中で洗浄工程を実施することであって、例えば、洗浄工程は、CS5機器を使用して行われる、実施すること；又はポジティブ選択工程を実施することの1つ以上を含まない。

【0157】

一実施形態において、密度遠心分離は、細胞分離装置、例えばSepax 2装置を使用して実施される。

【0158】

一実施形態において、インプットサンプルは、60 %、55 %、50 %、45 %、40 %、35 %、30 %、25 %、20 %、19 %、18 %、17 %、16 %又は15 %未満のT細胞を含む。一実施形態において、インプットサンプルは、少なくとも10 %、15

%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%又は70%の単球を含む。一実施形態において、インプットサンプルは、少なくとも1%、2%、5%、10%、15%、20%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%又は80%のB細胞を含む。

【0159】

一実施形態において、アウトプットサンプルは、少なくとも25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%又は95%のT細胞を含む。一実施形態において、アウトプットサンプルは、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、2%、2%、1%、0.5%、0.2%又は0.1%未満の単球を含む。一実施形態において、アウトプットサンプルは、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、2%、2%、1%、0.5%、0.2%、0.1%、0.05%又は0.01%未満のB細胞を含む。

【0160】

一実施形態において、本明細書に記載の密度勾配遠心分離方法は、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%又は95%のT細胞の回収率をもたらす。

【0161】

一実施形態において、本明細書における方法は、CARを発現するように操作することができる免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞）の集団を作製することを含み、ここで、方法は、癌関連抗原発現細胞、例えばCD19発現（CD19+）細胞を除去するためのネガティブ選択工程を含む。方法は、免疫エフェクター細胞を含むインプットサンプルを提供すること、及び流動条件下で例えばフロースルーデバイス、例えば本明細書に記載の細胞プロセッシングシステムを使用して、インプットサンプルからCD19+細胞を除去し、それによりCARの発現に適した免疫エフェクター細胞を含むアウトプットサンプルを産生することを含み得る。一実施形態において、CD19+細胞は、B細胞を含む。一実施形態において、CD19+細胞は、リンパ芽球を含む。

【0162】

一実施形態において、本明細書に記載されるネガティブ選択方法は、
i) インプットサンプルが、任意選択により、解凍されたインプットサンプルである、インプットサンプルの水簍；
ii) イオジキサノール、例えば水中60%イオジキサノールを含み、且つ／又はフィコールより高い密度（例えば、1.077 g/mL超、例えば約1.32 g/mL）を有する培地（例えば、Optiprep培地）を使用した密度遠心分離工程；
iii) デキストロース及び／又は塩化ナトリウムを含む緩衝液、例えばD5 1/2 NS培地（5%デキストロース及び0.45%塩化ナトリウム）で洗浄工程を（例えば、CD19+細胞の除去前及び／又はインプットサンプルの解凍後に）実施することであって、例えば、洗浄工程は、CS5（Cell Saver 5+）機器を使用して行われる、実施すること；及び
iv) 流動条件下でのCD3/CD28+細胞のポジティブ選択の1つ、2つ、3つ又は全てを実施することを更に含む。

【0163】

一実施形態において、本明細書に記載されるネガティブ選択方法は、水簍又は密度遠心分離を実施することを含まない。

【0164】

一実施形態において、CD19+細胞は、磁気分離によってインプットサンプルから除去される。一実施形態において、磁気分離は、細胞を分離試薬と接触させることを含む。一実施形態において、分離試薬は、磁性又は常磁性のメンバー及びCD19結合メンバー

を含む。一実施形態において、磁気分離は、フローサイトメトリー又はFACSを含む。一実施形態において、CD19+細胞は、FACSによって除去される。一実施形態において、磁気分離は、磁気細胞分離装置、例えばCliniMACs装置の使用を含む。一実施形態において、CD19+細胞は、CliniMACs装置によって除去される。一実施形態において、CD19+細胞は、本明細書に記載されるようなフロースルー装置、例えば本明細書に記載されるような細胞プロセッシングシステムによって除去される。

【0165】

一実施形態において、インプットサンプルは、少なくとも1%、2%、5%、10%、15%、20%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又は99%のCD19+細胞を含む。一実施形態において、アウトプットサンプルは、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、2%、2%、1%、0.5%、0.2%、0.1%、0.05%又は0.01%未満のCD19+細胞を含む。一実施形態において、アウトプットサンプルは、インプットサンプルと比較して50%、45%、40%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、2%、2%又は1%未満の割合のCD19+細胞を含む。

10

【0166】

一実施形態において、インプットサンプルは、少なくとも10%、15%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、35%又は40%の単球を含む。一実施形態において、インプットサンプルは、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%又は20%未満のT細胞を含む。一実施形態において、インプットサンプル（例えば、洗浄後のインプットサンプル）は、少なくとも1%、2%、5%、10%、15%、20%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%又は80%のB細胞を含む。

20

【0167】

一実施形態において、アウトプットサンプルは、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、2%、2%、1%、0.5%、0.2%又は0.1%未満の単球を含む。一実施形態において、アウトプットサンプルは、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%又は95%のT細胞を含む。一実施形態において、アウトプットサンプルは、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、2%、2%、1%、0.5%、0.2%、0.1%、0.05%又は0.01%未満のB細胞を含む。

30

【0168】

一実施形態において、本明細書に記載のネガティブ選択方法は、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%又は95%のT細胞の回収率をもたらす。

【0169】

一実施形態において、本明細書における方法は、CARを発現するように操作することができる免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞）の集団を作製することを含み、方法は、ポジティブ選択を含む。方法は、免疫エフェクター細胞を含むインプットサンプルを提供すること、及び流動条件下でインプットサンプルからCD3+/CD28+細胞をポジティブ選択し、それによりCARの発現に適した免疫エフェクター細胞を含むアウトプットサンプルを産生することであって、例えば、ポジティブ選択は、流動条件下で実施される、産生することを含み得る。

40

【0170】

一実施形態において、本明細書に記載されるポジティブ選択方法は、

i) CD19+細胞を例えば流動条件下で枯渇させること；インプットサンプルが、任意選択により、解凍されたインプットサンプルである、インプットサンプルの水簾；

ii) イオジキサノール、例えば水中60%イオジキサノールを含み、且つ／又はフィコ

50

ールより高い密度（例えば、 1.077 g/mL 超、例えば約 1.32 g/mL ）を有する培地（例えば、Optiprep培地）を使用して密度遠心分離を実施すること；及び
i i i）デキストロース及び／又は塩化ナトリウムを含む緩衝液、例えばD5 1/2
NS培地（5%デキストロース及び0.45%塩化ナトリウム）で洗浄工程を（例えば、
CD19+細胞の除去前及び／又はインプットサンプルの解凍後に）実施することであっ
て、例えば、洗浄工程は、CS5（Cell Saver 5+）機器を使用して行われる、
実施すること

の1つ、2つ、3つ又は全てを実施することを更に含む。

【0171】

一実施形態において、本明細書に記載されるポジティブ選択方法は、インプットサンプ
ルの水簾（例えば、インプットサンプルは、解凍されたインプットサンプルである）を実
施することを更に含む。任意選択により、水簾は、CD19+細胞を枯渇させること（例
えば、上記（i）に記載されるように）、密度遠心分離を実施すること（例えば、上記（
i i）に記載されるように）、及び洗浄工程を実施すること（例えば、上記（i i i）に
記載されるように）の1つ以上（例えば、1つ、2つ又は全て）と共に実施される。

【0172】

一実施形態において、本明細書に記載のポジティブ選択方法は、ポジティブ選択を実施
する前に水簾、洗浄工程（任意選択による）及び密度遠心分離（例えば、フィコール又は
Optiprep培地を使用）を実施することを更に含む。一実施形態において、本明細
書に記載のポジティブ選択方法は、ポジティブ選択を実施する前に洗浄工程（任意選択に
よる）及び密度遠心分離（例えば、フィコール又はOptiprep培地を使用）を実施
することを更に含む。一実施形態において、本明細書に記載されるポジティブ選択方法
は、水簾を実施することを含まない。一実施形態において、本明細書に記載されるポジ
ティブ選択方法は、デキストロース及び／又は塩化ナトリウムを含む緩衝液、例えばD5 1
/2 NS緩衝液で例えばCS5+機器を使用して洗浄を実施することを更に含む。

【0173】

一実施形態において、ポジティブ選択は、インプットサンプルを分離試薬と接触させる
ことを含み、この分離試薬は、磁性又は常磁性のメンバー並びにCD3及び／又はCD2
8結合メンバーを含む。一実施形態において、CD3+／CD28+細胞のポジティブ選
択は、約10～90分間、約10～60分間、約10～45分間、約12～90分間、約
12～60分間、約12～45分間、約15～90分間、約15～60分間、約15～4
5分間、例えば約30分間又は約20分間にわたり、インプットサンプルを分離試薬とイ
ンキュベートすることを含む。一実施形態において、分離試薬は、抗CD3及び／又は抗
CD28抗体にカップリングされる（例えば、共有結合的又は非共有結合的にカップリン
グされる）ビーズを含む。一実施形態において、ポジティブ選択は、約3：1の比率の磁
気分離メンバー（例えば、ビーズ）対T細胞を使用する。

【0174】

一実施形態において、ポジティブ選択は、免疫エフェクター細胞及び磁気分離メンバ
ーを含む流体を、磁気分離が発生する閉鎖系、例えばチャンバー又はバッグ内に流動さ
せることを含む。1つの実施形態において、流動は、メンバー（任意選択により免疫エ
フェクター細胞に結合される）の磁気分離が発生するような速度で実施される。一実施
形態において、CD3+／CD28+細胞のポジティブ選択は、約6、5、6、3、2若しくは1
分未満又は約50、40、30、20、10、5、4、3、2若しくは1秒未満の分離又は
滞留時間を含む。

【0175】

一実施形態において、ポジティブ選択は、磁気装置、例えばDynamag CTS、
本明細書に記載されるような磁気要素を含むフロースルー装置又は磁気要素の他の設備
で実施される。

【0176】

一実施形態において、ポジティブ選択は、少なくとも1つの細胞懸濁液モジュール；少

10

20

30

40

50

なくとも1つのフロースルー磁気分離／ビーズ除去モジュール；少なくとも1つの非磁気アウトプットモジュール；少なくとも1つの磁気アウトプットモジュール；任意選択により、磁力及び／又は勾配を生成する、磁気分離／ビーズ除去モジュールの外部にある少なくとも1つの磁気成分；及び任意選択により、少なくとも1つのバッファモジュールを含む装置を使用して実施される。一実施形態において、装置は、磁力及び／又は勾配を生成する、磁気分離／ビーズ除去モジュールの外部にある少なくとも1つの磁気成分を更に含む。一実施形態において、装置は、少なくとも1つのバッファモジュールを更に含む。一実施形態において、磁気分離／ビーズ除去モジュールは、壁によって画定され、x方向、y方向及びz方向を有するチャンバー；チャンバーの両端（例えば、x方向、y方向又はz方向）に配置された入口及び出口；チャンバーの壁に隣接又は近接し、入口と出口との間のチャンバー内でゼロ勾配線を確立するように配置された少なくとも2つの磁石を含む。一実施形態において、免疫エフェクター細胞は、チャンバーを流れて、チャンバー内の各点は、磁石から2 cm以内にある。

10

【0177】

一実施形態において、ポジティブ選択方法は、免疫エフェクター細胞を、デキストロース及び／又は塩化ナトリウムを含む溶液、例えばD5 1/2 NS培地（5%デキストロース及び0.45%塩化ナトリウム）と接触させることを（例えば、工程a）及びb）間に）含み、任意選択により、溶液は、環境温度、例えば約20～25℃である。一実施形態において、免疫エフェクター細胞は、例えば工程a）及びb）間において可撓性容器、例えばバッグ内に存在する。一実施形態において、方法は、バッグを、断熱材、例えば紙、例えばペーパータオル又はワイプを含む複数の層の上に置くことを（例えば、工程a）及びb）間、例えば免疫エフェクター細胞を生理食塩水と接触させた後に）含む。一実施形態において、方法は、細胞を約37℃で約10分間にわたりインキュベートすることを（例えば、工程b後に）含む。一実施形態において、方法は、細胞を約36～38、35～39又は34～40℃、例えば約10分間にわたりインキュベートすることを（例えば、工程b後に）含む。一実施形態において、インキュベーション工程は、約8～12、5～15又は5～20分間続く。一実施形態において、インキュベーションは、Plasmatherm装置で実施される。

20

【0178】

ポジティブ選択方法の一実施形態において、免疫エフェクター細胞を含むインプットサンプルは、少なくとも20%の単球を含む。一実施形態において、免疫エフェクター細胞を含むインプットサンプルは、少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、60%の単球を含む。

30

【0179】

一実施形態において、ポジティブ選択方法は、

a) 血液悪性腫瘍を有する患者からの免疫エフェクター細胞を含む凍結インプットサンプル（例えば、白血球アフェレーシスサンプル）を解凍することであって、任意選択により、サンプルは、20%を超えるリンパ芽球を含む、解凍すること；

b) 免疫エフェクター細胞を例えば環境温度、例えば20～25℃において洗浄溶液、例えば「改変培地」（MM）と呼ばれるX-VIVO15培地（Lonza）中で洗浄すること；

40

c) インプットサンプルを、磁性又は常磁性のメンバー並びにCD3及び／又はCD28結合メンバーを含む分離試薬と接触させること；

d) インプットサンプル及び分離試薬を回転子上において例えば2～6 rpm、例えば4 rpmで回転させることであって、回転は、例えば、10～30分間、例えば20分間続く、回転させること；及び

e) ポジティブ選択を実施して、分離試薬に結合する細胞を例えば30秒間～2分間、例えば1分間にわたり濃縮すること

の1つ以上（例えば、2つ、3つ、4つ又は全て）を、例えば列挙された順で含む。

【0180】

50

一実施形態において、ポジティブ選択方法は、

- a) 血液悪性腫瘍を有する患者からの免疫エフェクター細胞を含む凍結インプットサンプル（例えば、白血球アフェレーシスサンプル）を解凍することであって、任意選択により、サンプルは、20%を超える単球を含む、解凍すること；
 - b) 免疫エフェクター細胞を例えば環境温度、例えば20～25℃において洗浄溶液、例えば約5%のデキストロース及び0.45%の塩化ナトリウムを含むもの、例えばD5 1/2 NS中で洗浄すること；
 - c) 細胞を含む可撓性容器を、断熱材、例えば紙、例えばペーパータオル又はワイプを含む複数の層の上に置くこと；
 - d) インプットサンプルを、磁性又は常磁性のメンバー並びにCD3及び／又はCD28結合メンバーを含む分離試薬と接触させること；
 - e) インプットサンプルと分離試薬とを例えば37℃において例えば5～15分間、例えば10分間にわたりインキュベートすること；
 - f) インプットサンプル及び分離試薬を回転子上において例えば2～6rpm、例えば4rpmで回転させることであって、回転は、例えば、10～30分間、例えば20分間続く、回転させること；及び
 - g) ポジティブ選択を実施して、分離試薬に結合する細胞を例えば30秒間～2分間、例えば1分間にわたり濃縮すること
- の1つ以上（例えば、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ又は全て）を、例えば列挙された順で含む。

【0181】

一実施形態において、サンプル、例えばインプットサンプルは、血液学的悪性腫瘍、例えば本明細書に記載の血液学的悪性腫瘍、例えばALL又はDLBCLを有する患者からのものである。

【0182】

一実施形態において、インプットサンプルは、約 1×10^5 有核細胞/ml、 2×10^5 有核細胞/ml、 5×10^5 有核細胞/ml、 7×10^5 有核細胞/ml、 1×10^6 有核細胞/ml、 2×10^6 有核細胞/ml、 5×10^6 有核細胞/ml、 7×10^6 有核細胞/ml、 1×10^7 有核細胞/ml、 2×10^7 有核細胞/ml、 5×10^7 有核細胞/ml、 7×10^7 有核細胞/ml、 1×10^7 有核細胞/ml、 2×10^8 有核細胞/ml、 5×10^8 有核細胞/ml及び 7×10^8 有核細胞/mlを含む。一実施形態において、インプットサンプルは、約1～ 1.5×10^7 個のT細胞を含む。

【0183】

一実施形態において、インプットサンプルは、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%又は95%の単球を含む。一実施形態において、インプットサンプルは、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%又は95%の腫瘍細胞、例えばリンパ芽球を含む。一実施形態において、インプットサンプルは、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%又は20%未満の免疫エフェクター細胞、例えばT細胞を含む。一実施形態において、インプットサンプルは、少なくとも約5%、10%、15%、18%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%又は95%のB細胞、例えばCD45+CD19+B細胞を含む。一実施形態において、インプットサンプルは、少なくとも約5%、10%、15%、18%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%又は95%のB細胞、例えばCD45-CD19+B細胞を含む。

【0184】

一実施形態において、アウトプットサンプルは、20%、15%、10%、9%、8%

、7%、6%、5%、4%、2%、2%、1%、0.5%、0.2%又は0.1%未満の単球を含む。一実施形態において、アウトプットサンプルは、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、2%、2%、1%、0.5%、0.2%又は0.1%未満の腫瘍細胞を含む。一実施形態において、アウトプットサンプルは、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.8%又は99.9%の免疫エフェクター細胞、例えばT細胞を含む。一実施形態において、アウトプットサンプルは、少なくとも25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%のT細胞、例えばCD3+CD45+T細胞を含む。一実施形態において、アウトプットサンプルは、約10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%又は1%未満のB細胞、例えばCD45+CD19+B細胞を含む。一実施形態において、アウトプットサンプルは、約10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%又は1%未満のB細胞、例えばCD45-CD19+B細胞を含む。一実施形態において、アウトプットサンプルは、少なくとも5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%又は20%のT細胞を含む。

10

【0185】

一実施形態において、本明細書における方法は、キメラ抗原受容体（CAR）を発現するように操作することができる免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞）の集団を作製することを含み、方法は、

20

i) インプットサンプル、例えば免疫エフェクター細胞を含む凍結インプットサンプル又は新鮮なインプットサンプルを提供すること；任意選択により、インプットサンプルが凍結インプットサンプルであり、凍結インプットサンプルを解凍して解凍サンプルを生成すること；

ii) インプットサンプルが、任意選択により、解凍されたインプットサンプルである、インプットサンプルの水籤を実施すること；又はイオジキサノール、例えば水中60%イオジキサノールを含み、且つ／又はフィコールより高い密度（例えば、1.077 g/mL超、例えば約1.32 g/mL）を有する培地、例えばOptiprep培地を使用して密度遠心分離工程を実施することを含む、濃縮工程を実施すること；及び

iii) 選択工程を実行することであって、選択は、ポジティブ選択、例えばCD3/CD28+細胞のポジティブ選択又はネガティブ選択、例えばCD19+、CD25+又はCD14+細胞のネガティブ選択である、実行することを行い、それによりCARの発現に適した免疫エフェクター細胞を含むアウトプットサンプルを産生することを含む。

30

【0186】

一実施形態において、本明細書における方法は、キメラ抗原受容体（CAR）を発現するように操作することができる免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞）の集団を作製することを含み、方法は、

i) インプットサンプル、例えば免疫エフェクター細胞を含む凍結インプットサンプル又は新鮮なインプットサンプルを提供すること；

40

ii) 任意選択により、インプットサンプルが凍結インプットサンプルであり、凍結インプットサンプルを解凍して解凍サンプルを生成すること；

iii)

1) インプットサンプルが、任意選択により、解凍されたインプットサンプルである、インプットサンプルの水籤を実施すること；又は

2) イオジキサノール、例えば水中60%イオジキサノールを含み、且つ／又はフィコールより高い密度（例えば、1.077 g/mL超、例えば約1.32 g/mL）を有する培地、例えばOptiprep培地を使用して密度遠心分離工程を実施することを含む、濃縮工程を実施すること；及び

iv) 選択工程を実行することであって、選択は、ポジティブ選択、例えばCD3/CD

50

28+細胞のポジティブ選択又はネガティブ選択、例えばCD19+、CD25+又はCD14+細胞のネガティブ選択である、実行することを行い、それによりCARの発現に適した免疫エフェクター細胞を含むアウトプットサンプルを産生することを含む。

【0187】

一実施形態において、本明細書における方法は、キメラ抗原受容体（CAR）を発現するように操作することができる免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞）の集団を作製することを含み、方法は、

i) インプットサンプル、例えば免疫エフェクター細胞を含む凍結インプットサンプル又は新鮮なインプットサンプルを提供すること；

ii) 水簸又は密度遠心分離を（例えば、フィコール又はOptiprep培地を使用して）実施することを含む、濃縮工程を実施すること；及び

iii) 選択工程を実行することであって、選択は、ポジティブ選択、例えばCD3/CD28+細胞のポジティブ選択又はネガティブ選択、例えばCD19+、CD25+又はCD14+細胞のネガティブ選択である、実行することを行い、それによりCARの発現に適した免疫エフェクター細胞を含むアウトプットサンプルを産生すること

を含む。一実施形態において、選択工程は、例えば、フロースルー装置を使用することによって流動条件下で実施される。

【0188】

本明細書に記載の方法又は組成物のいずれかの追加の特徴又は実施形態は、以下の1つ以上を含む。

【0189】

本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態におけるインプットサンプルは、免疫エフェクター細胞、例えばT細胞及び／又はNK細胞を含む対象からの生体サンプルである。一実施形態において、インプットサンプルは、血液サンプル、例えば全血サンプルである。一実施形態において、インプットサンプルは、アフエレーシスサンプル、例えば白血球アフエレーシスサンプルである。一実施形態において、インプットサンプルは、新鮮なサンプルであり、サンプルは、対象から得られ、対象から得てから1日、2日、5日又は7日以内に本明細書に記載の方法のいずれかを使用してプロセスされる。一実施形態において、インプットサンプルは、凍結又は凍結保存されたサンプルであり、例えば-20℃又は液体窒素で凍結されるか、又は毎分1°の速度で-80℃に凍結され、液体窒素保存タンクの蒸気相に保存される。

【0190】

本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態において、インプットサンプルは、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%又は95%の単球（及び任意選択により最大40%、70%又は95%の単球）を含む。本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態において、インプットサンプルは、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%又は95%の腫瘍細胞、例えばリンパ芽球（及び任意選択により最大50%又は95%の単球）を含む。本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態において、インプットサンプルは、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%又は20%未満の免疫エフェクター細胞、例えばT細胞（及び任意選択により20%を超えるT細胞）を含む。

【0191】

本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態において、アウトプットサンプルは、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、2%、2%、1%、0.5%、0.2%又は0.1%未満の単球（及び任意選択により1%又は0.1%を超える単球）を含む。本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態において、アウトプットサンプルは、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、2%、2%、1

10

20

30

40

50

%、0.5%、0.2%又は0.1%未満の腫瘍細胞（及び任意選択により1%又は0.1%を超える腫瘍細胞）を含む。本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態において、アウトプットサンプルは、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.8%又は99.9%の免疫エフェクター細胞、例えばT細胞（及び任意選択により最大60%又は95%のT細胞）を含む。

【0192】

本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態において、アウトプットサンプルは、インプットサンプルと比較して50%、45%、40%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、2%、2%又は1%未満の割合の単球を含む。本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態において、アウトプットサンプルは、インプットサンプルと比較して50%、45%、40%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、2%、2%又は1%未満の割合の腫瘍細胞を含む。本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態において、アウトプットサンプルは、インプットサンプルと比較して少なくとも50%、45%、40%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、2%、2%又は1%の割合の免疫エフェクター細胞、例えばT細胞を含む。

10

【0193】

本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態において、方法は、例えば、形質導入により、CARをコードする核酸をアウトプットサンプル中の1つ以上の免疫エフェクター細胞に導入することを更に含む。CARをコードする核酸を導入するための他の方法は、本明細書に記載されている。

20

【0194】

本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態において、CARは、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを含み、例えば一次シグナル伝達ドメイン及び／又は共刺激シグナル伝達ドメインを含む。

【0195】

本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態において、方法は、形質導入効率をアッセイする工程を更に含む。本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態において、形質導入は、少なくとも約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%又は50%の形質導入効率をもたらす。

30

【0196】

本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態において、方法は、デキストロース及び／又は塩化ナトリウムを含む緩衝液、例えばD5培地で例えばCS5+機器を使用してインプットサンプルに洗浄工程を実施することを更に含む。

【0197】

本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態において、免疫エフェクター細胞は、ヒト免疫エフェクター細胞である。

【0198】

本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態において、アウトプットサンプルは、CD8+T細胞を含む。本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態において、アウトプットサンプルは、CD4+T細胞を含む。

40

【0199】

本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態において、インプットサンプルは、腫瘍抗原に関連する疾患を有する患者由来であり、例えば本明細書に記載の腫瘍抗原、例えばCD19は、癌若しくは悪性腫瘍などの増殖性疾患又は骨髓異形成、骨髓異形成症候群若しくは前白血病などの前癌状態から選択されるか、又は本明細書に記載の腫瘍抗原の発現に関連する非癌関連適応症である。一実施形態において、疾患は、本明細書に記載の癌、例えば本明細書に記載の標的に関連した本明細書に記載の癌である。一実施形態において、血液癌は、白血病である。一実施形態において、癌は、これらに限定されないが、B細胞

50

急性リンパ性白血病（「BAL L」）、T細胞急性リンパ性白血病（「TAL L」）、急性リンパ性白血病（ALL）を包含する1種以上の急性白血病；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種以上の慢性白血病；これらに限定されないが、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、小細胞型又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、マントル細胞リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、多発性骨髄腫、脊髄形成異常及び骨髄異形成症候群、非ホジキンリンパ腫、形質芽細胞リンパ腫、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及び骨髄の血液細胞の無効な産生（又は異形成）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、追加の血液癌又は血液学的状態からなる群から選択され、本明細書に記載の腫瘍抗原の発現に関連する疾患には、限定されないが、本明細書に記載されるような腫瘍抗原を発現する非定型的及び／又は非典型的な癌、悪性腫瘍、前癌状態又は増殖性疾患；並びにそれらの任意の組み合わせが含まれる。別の実施形態において、本明細書に記載の腫瘍抗原に関連する疾患は、固形腫瘍、例えば本明細書に記載の固形腫瘍、例えば前立腺癌、結腸直腸癌、膵臓癌、子宮頸癌、胃癌、卵巣癌、頭部癌又は肺癌である。

【0200】

本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態において、インプットサンプルは、これらに限定されないが、B細胞急性リンパ性白血病（BAL L）、T細胞急性リンパ性白血病（TAL L）、急性リンパ性白血病（ALL）を包含する1種以上の急性白血病；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種以上の慢性白血病；これらに限定されないが、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、小細胞型又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、マントル細胞リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、多発性骨髄腫、脊髄形成異常及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、前白血病状態、非定型及び／又は非古典的癌、悪性腫瘍、前癌状態又は増殖性疾患を含む追加の血液癌又は血液学的状態並びにそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される癌を有する患者からのものである。

【0201】

本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態において、インプットサンプルは、ALLを有する患者由来である。

【0202】

本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態において、方法は、アウトプットサンプル中の細胞上の1つ以上の細胞表面マーカー、例えばCD45、CD19、CD3、CD28、CD25又はCD14をアッセイする工程を更に含む。

【0203】

本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態において、方法は、免疫エフェクター細胞の増殖を刺激する、例えばCD3/TCR複合体結合シグナルを刺激する薬剤及び／又はT細胞の表面上の共刺激分子を刺激するリガンド、例えば抗CD3抗体及び抗CD28抗体でアウトプットサンプルを刺激することを更に含む。

【0204】

本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態において、方法は、CARをコードする核酸を例えば形質導入、トランスフェクション又はエレクトロポレーションによって導入することを更に含む。

【0205】

別の態様において、本開示は、本明細書に開示される方法、例えば上記に開示される方法によって産生された反応混合物を特徴とする。

【0206】

別の実施形態において、本明細書の反応混合物は、少なくとも80%、85%、90%又は95%のT細胞及び10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%又は1%未満の単球を含み、反応混合物中の細胞の総数は、合計で100%になる。一実施形態において、反応混合物は、合計で少なくとも 1×10^6 、 2×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 又は 5×10^8 の細胞を含む。一実施形態において、反応混合物は、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%又は1%未満のB細胞を含む。一実施形態において、反応混合物は、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%又は1%未満の癌細胞、例えばリンパ芽球を含む。

【0207】

本明細書に記載の反応混合物のいずれかにおいて、1つ以上のT細胞は、CAR、例えば本明細書に記載の任意のCARを発現する。

【0208】

本明細書に記載の反応混合物のいずれかにおいて、反応混合物は、CARをコードする核酸を更に含み、例えば、核酸は、T細胞の内部又はT細胞の外部に配置される。

【0209】

本明細書に記載のものと同様の又は均等な方法及び材料を本発明の実施又は試験に使用することができるが、適切な方法及び材料を以下に記載する。本明細書に記載の全ての刊行物、特許出願、特許及び他の参考文献（例えば、配列データベース参照番号）は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。例えば、本明細書で（例えば、本明細書の任意の表において）言及される全てのGenBank、UniGene及びEntrez配列は、参照により組み込まれる。特に指定がない限り、本明細書で指定されている配列受託番号は、2017年10月25日現在のデータベースエントリーを参照する。1つの遺伝子又はタンパク質が複数の配列受託番号を参照する場合、全ての配列変異体が包含される。

【0210】

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

【図面の簡単な説明】

【0211】

【図1A-1D】臨床応答に関連するT細胞固有の品質属性を明らかにする、CAR T細胞産物の転写プロファイルを示す。各点は、個々の患者の細胞産物サンプルにおけるこれらの特性の相対的な濃縮を表し、バーは、最小値から最大値を反映している。各遺伝子セットの正規化された濃縮スコアがy軸にプロットされる（* $P < 0.05$ ；** $P < 0.01$ ；*** $P < 0.001$ （両側ウェルチt検定による））。図1Aは、初期メモリー後期メモリー遺伝子セットの相対的濃縮を示す。図1Bは、メモリーエフェクター遺伝子セットの相対的濃縮を示す。図1Cは、高解糖-低解糖遺伝子セットの相対的濃縮を示す。図1Dは、高疲弊-低疲弊遺伝子セットの相対的濃縮を示す。

【図2】フローサイトメトリーによって評価された偽刺激又はCAR刺激レトロスペクティブ患者CTL019細胞における蛍光グルコース類似体2-NBDGの取り込みを示す（** $P < 0.01$ 、対応のある両側t検定）。

【図3】応答者（CR、 $n = 4$ ；PRTD、 $n = 2$ ；PR、 $n = 2$ ）と非応答者（NR、 $n = 6$ ）とのCTL019サンプル（** $P < 0.01$ 、対応のない両側t検定；NS、有意でない）間の2-NBDG取り込みの比較を示す。

【図4】解糖を阻害する2-デオキシ-D-グルコース（2-DG）の非存在下（対照）又は存在下で9日間培養した後のCD8+CAR T細胞の分化表現型を示す代表的なフ

10

20

30

40

50

ローサイトメトリーを示す。

【図5】2-DGの存在下又は非存在下で培養した後のCD8+及びCD4+CAR T細胞内のT細胞サブセットの頻度(%)を示す(**P<0.01、*P<0.05、対応のある両側t検定)。次のT細胞サブセットが示される: ナイブ様(CCR7+CD45RO-); セントラルメモリー(CCR7+CD45RO+); エフェクターメモリー(CCR7-CD45RO+); 及びエフェクター(CCR7-CD45RO-)。

【図6】2-DGの存在下又は非存在下で製造されたCTL019細胞の増殖能力を示す。矢印で示されているように、CAR T細胞は、培養の0、7、12日目にCD19又はメソテリン(無関係な標的抗原)を発現するように操作されたK562細胞で連続的に再刺激された。2人の代表的な対象からのデータが示される。

【図7A-7D】CAR T細胞におけるIL-6/STAT3経路の濃縮を示す。図7Aは、各応答カテゴリーからの評価可能な患者サンプルにおいて、匹敵する未刺激の対照によって産生されたベースラインレベルを超える、CAR刺激CTL019細胞から産生された可溶性サイトカインのレベルを示す(CR、n=6; PR_{TD}、n=3; PR、n=5; NR、n=21; *P<0.05; **P<0.01、両側マンホイットニー検定による)。グラフは、平均値を標準誤差と共に示す。図7Bは、各応答群の患者からのCAR刺激CTL019細胞におけるIL-6/STAT3経路の単一サンプル濃縮分析を示す(両側非対応t検定を使用して*P<0.05)。バーは、平均値及び標準誤差を表す。図7Cは、アイソタイプ対照抗体被覆ビーズ(偽刺激)又はCAR19に対する抗イディオタイプ抗体でコーティングされたビーズ(CAR19刺激)による、一晚の刺激後のCR及びNR患者からの注入前のCTL019細胞におけるpSTAT3のレベルを示す代表的なフローサイトメトリープロットを示す(左パネル)。高機能(CR、n=3; PR_{TD}、n=2)対低機能(PR、n=3; NR、n=11)のCAR T細胞を有する患者からのプールされたデータがボックスプロットに示される(右パネル)。ひげは、最小値から最大値を表し; ボックスは、25~75パーセンタイルを表し; 中央の線は、中央値を示す。蛍光強度の変化(MFI)は、刺激された細胞におけるpSTAT3のMFIを、未刺激の細胞におけるものから差し引くことによって計算された。図7Dは、養子移入されたCAR T細胞の最大in vivo増殖能力と、血清IL-6のピークレベル(CTL019注入後28日以内; 左パネル)又は患者適合CAR刺激(上記の通り)CTL019細胞におけるIL-6/STAT3遺伝子濃縮(右パネル)とのスピアマンのロー相関を示す。

【図8A-8C】CAR T細胞におけるSTAT3経路の阻害を示す。図8Aは、アイソタイプ対照ビーズ(偽)又はCAR19に対する抗イディオタイプ抗体でコーティングされたビーズで一晩刺激されたCTL019細胞におけるpSTAT3のレベルを表す代表的なフローサイトメトリープロットを示す。CAR固有の刺激は、STAT3活性化の小分子阻害剤である5µM Stat₃ inhibitorの存在下又は非存在下で実施された。図8Bは、5µM Stat₃ inhibitor又は同等量のDMSO(対照)の存在下又は非存在下で製造されたCTL019細胞の増殖能力を示す。次いで、この代表的な対象からのCAR T細胞を、矢印で示されているように、培養の0、7及び12日目にCD19を発現するように操作されたK562細胞で連続的に再刺激した。ベースラインからのCAR T細胞数の倍率変化は、破線(右のy軸)で表示される細胞生存率と平行して実線(左のy軸)で表示される。図8Cは、再刺激前に5µM Stat₃ inhibitorを使用して又は使用せずに増殖したn=8の異なる対象からのCTL019細胞の細胞増殖及び生存率データの概要を示す。

【図9】組換えIL-6又は同等量のDMSO(対照)の存在下又は非存在下で製造されたCTL019細胞の増殖能力を表すグラフを示す。次いで、この代表的な対象からのCTL019細胞を、矢印で示されているように、培養の0、7及び12日目にCD19又はメソテリン(ネガティブ対照)を発現するように操作されたK562細胞で連続的に再刺激した。

【図10】応答患者(n=14)と非応答患者(n=21)とに注入された異なる表現型

10

20

30

40

50

を有するCAR T細胞の総用量（細胞／kg）に基づく被投与者動作特性（ROC）曲線を示す。

【図11A-11B】IL-6に応答したCD27+PD-1-CD8 T細胞におけるpSTAT3のレベルを示す。図11Aは、蛍光活性化細胞選別により精製され、組換えIL-6（10ng/ml）で刺激されたCD8+T細胞集団におけるpSTAT3のレベルを示す代表的なヒストグラム（左パネル）を示す。n=4の異なる対象からのCD27及びPD-1発現によって定義されたCD8+T細胞サブセットにおけるIL-6誘導性pSTAT3レベルの概要を右のパネルに示す。平均蛍光強度（MFI）の変化は、IL-6処置細胞におけるpSTAT3のMFIを、匹敵する未刺激の細胞における同じパラメーターから差し引くことによって決定された。図11Bは、代表的なフローサイトメ

10

トリー（左パネル）及びn=7の異なる対象（右パネル）からのプールされたデータを示し、CD27及びPD-1発現によって定義されるCD8+T細胞集団におけるインターロイキン6受容体サブユニットβ（CD130）のレベルを示す。

【図12】CD8+T細胞サブセット上のgp130発現（左パネル）又はgp130を

発現するCD8+T細胞サブセットの頻度（右パネル）を表すグラフを示す。CD8+T細胞サブセットは、CD27+CD45RO-、CD27+CD45RO+、CD27-CD45RO+及びCD27-CD45RO-細胞に分類される。

【図13】構成的に活性なSTAT3（STAT3C）構築物を含むベクターを示す。

【図14A-14B】T細胞上のgp130発現及びgp130によるT細胞の選択を示す。図14Aは、CD4+T細胞（上段）又はCD8+T細胞（下段）におけるgp130の発現を示す。ドットプロットは、x軸上にgp130、y軸上にCCR7、CD27、PD1又はCD45ROでフローサイトメトリーデータを示す。図14Bは、CD4+T細胞（上段）又はCD8+T細胞（下段）のgp130ベースのポジティブ選択を示す。左側のパネルは、選択前のT細胞におけるCD27及びCD45ROの発現を示し、右側のパネルは、gp130による選択後の同じマーカーの発現を示す。

20

【発明を実施するための形態】

【0212】

定義

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

30

【0213】

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

【0214】

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

40

【0215】

「グルコース代謝」という用語は、生物体におけるグルコースの形成、分解又は転換を含むプロセス、例えば1つ以上の生化学的プロセスを指す。本明細書で使用される場合、「グルコース代謝値」は、例えば、2-NBDG（蛍光標識デオキシグルコース類似体）を含むグルコース取り込み細胞ベースのキット又はグルコース比色アッセイキットによってアッセイされるようなグルコース代謝の測定値を指す。

【0216】

用語「キメラ抗原受容体」又は代わりに「CAR」は、一連のポリペプチド、典型的には最も単純な実施形態で2ポリペプチドを指し、免疫エフェクター細胞にあるとき、細胞に標的細胞、典型的には癌細胞に対する特異性及び細胞内シグナル産生を与える。いくつかの実施形態において、CARは、下に定義されるような、少なくとも細胞外抗原結合ド

50

メイン、膜貫通ドメイン及び刺激性分子由来の機能的シグナル伝達ドメイン及び／又は共刺激分子を含む細胞質シグナル伝達ドメイン（本明細書では「細胞内シグナル伝達ドメイン」とも称する）を含む。いくつか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る（例えば、キメラ融合タンパク質を含む）。いくつかの実施形態において、一連のポリペプチドは、互いに隣接しておらず、例えば異なるポリペプチド鎖にある。いくつかの実施形態において、一連のポリペプチドは、二量体化分子存在下において、互いにポリペプチドを結合できる、例えば抗原結合ドメインを細胞内シグナル伝達ドメインに結合できる二量体化スイッチを含む。一実施形態において、CARの刺激性分子は、T細胞受容体複合体と関係する鎖である。一態様において、細胞質シグナル伝達ドメインは、一次シグナル伝達ドメイン（例えば、CD3ζの一次シグナル伝達ドメイン）を含む。一実施形態において、細胞質シグナル伝達ドメインは、下に定義するような少なくとも1つの共刺激分子の1つ以上の機能的シグナル伝達ドメインを更に含む。一実施形態において、共刺激分子は、本明細書に記載の共刺激分子、例えば4-1BB（すなわちCD137）、CD27、ICOS及び／又はCD28である。一実施形態において、CARは、細胞外抗原結合ドメインを含むキメラ融合タンパク質、膜貫通ドメイン及び刺激分子の機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一実施形態において、CARは、細胞外抗原結合ドメインを含むキメラ融合タンパク質、膜貫通ドメイン並びに共刺激分子の機能的シグナル伝達ドメイン及び刺激分子の機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む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、CARは、細胞外抗原結合ドメインを含むキメラ融合タンパク質、膜貫通ドメイン並びに1つ以上の共刺激分子の2つの機能的シグナル伝達ドメイン及び刺激分子の機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む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、CARは、細胞外抗原結合ドメインを含むキメラ融合タンパク質、膜貫通ドメイン並びに1つ以上の共刺激分子の少なくとも2つの機能的シグナル伝達ドメイン及び刺激分子の機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む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、CARは、CAR融合タンパク質のアミノ末端（N末端）に任意選択によるリーダー配列を含む。一実施形態において、CARは、細胞外抗原結合ドメインのN末端のリーダー配列を更に含み、リーダー配列は、細胞プロセッシング及びCARの細胞膜への局在化中に抗原結合ドメイン（例えば、scFv）から任意選択により切断される。

【0217】

本明細書に記載のものなどの特定の腫瘍抗原Xを標的とする抗原結合ドメイン（例えば、scFv又はTCR）を含むCARは、XCARとも称される。例えば、CD19を標的とする抗原結合ドメインを含むCARは、CD19CARと称される。

【0218】

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

【0219】

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

【0220】

用語「抗体フラグメント」は、抗原のエピトープと特異的に相互作用する（例えば、結合、立体障害、安定化／不安定化、空間分布による）能力を保持する抗体の少なくとも一部分を指す。抗体フラグメントの例は、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fvフラグメント、scFv抗体フラグメント、ジスルフィド結合Fv(sdFv)、VHドメイン及びCH1ドメインからなるFdフラグメント、線形抗体、sdAbなどの単一ドメイン

抗体（V L又はV Hのいずれか）、ラクダ科V H Hドメイン、ヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結した2個のF a bフラグメント及び単離C D Rを含む二価フラグメントなどの抗体フラグメントから形成される多特異性抗体又は抗体の他のエピトープ結合フラグメントを含むが、これらに限定されない。抗原結合フラグメントは、シングルドメイン抗体、マキシボディ、ミニボディ、ナノボディ、イントラボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、v-N A R及びビス-s c F vにも取り込まれ得る（例えば、H o l l i n g e r a n d H u d s o n, N a t u r e B i o t e c h n o l o g y 23:1126-1136, 2005を参照されたい）。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する足場にもグラフトされ得る（フィブロネクチンポリペプチドミニボディについて記載している米国特許第6, 703, 199号明細書を参照されたい）。 10

【0221】

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を指し、軽鎖及び重鎖可変領域は、例えば、合成リンカー、例えば短い可動性ポリペプチドリンカーによって近接して連結されており、単鎖ポリペプチドとして発現することが可能であり、及びs c F vは、その由来であるインタクトな抗体の特異性を保持している。指定されない限り、本明細書で使用されるとき、s c F vは、V L及びV H可変領域を例えばポリペプチドのN端側及びC端側末端に対していずれの順序でも有し得、s c F vは、V LーリンカーーV Hを含み得るか又はV HーリンカーーV Lを含み得る。 20

【0222】

抗体又はその抗体フラグメントを含むC A Rの一部は、種々の形態で存在し得、抗原結合ドメインは、例えば、シングルドメイン抗体フラグメント（s d A b）、単鎖抗体（s c F v）及びヒト化抗体を含め、連続したポリペプチド鎖の一部として発現する（H a r l o w e t a l., 1999, U s i n g A n t i b o d i e s : A L a b o r a t o r y M a n u a l, C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s, N Y; H a r l o w e t a l., 1989, A n t i b o d i e s : A L a b o r a t o r y M a n u a l, C o l d S p r i n g H a r b o r, N e w Y o r k; H o u s t o n e t a l., 1988, P r o c. N a t l . A c a d. S c i. U S A 85:5879-5883; B i r d e t a l., 1988, S c i e n c e 242:423-426）。一実施形態において、C A Rの抗原結合ドメインは、抗体フラグメントを含む。更なる実施形態において、C A Rは、s c F vを含む抗体フラグメントを含む。 30

【0223】

本明細書で使用されるとき、用語「結合ドメイン」又は「抗体分子」は、少なくとも1つの免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むタンパク質、例えば免疫グロブリン鎖又はそのフラグメントを指す。用語「結合ドメイン」又は「抗体分子」は、抗体及び抗体フラグメントを包含する。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、これは、複数個の免疫グロブリン可変ドメイン配列を含み、ここで、複数個のうちの第1の免疫グロブリン可変ドメイン配列が第1のエピトープに対する結合特異性を有し、複数個のうちの第2の免疫グロブリン可変ドメイン配列が第2のエピトープに対する結合特異性を有する。ある実施形態において、多重特異性抗体分子は、二重特異性抗体分子である。二重特異性抗体は、2つ以下の抗原に対して特異性を有する。二重特異性抗体分子は、第1のエピトープに対して結合特異性を有する第1の免疫グロブリン可変ドメイン配列及び第2のエピトープに対して結合特異性を有する第2の免疫グロブリン可変ドメイン配列によって特徴付けられる。 40

【0224】

本発明のC A Rの抗体又は抗体そのフラグメントを含む部分は、例えば、単一ドメイン抗体フラグメント（s d A b）、単鎖抗体（s c F v）、ヒト化抗体又は二機能性抗体を含む、抗原結合ドメインが連続的ポリペプチド鎖の一部として発現される多様な形態で存 50

在し得る (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CAR組成物の抗原結合ドメインは、抗体フラグメントを含む。更なる態様において、CARは、scFvを含む抗体フラグメントを含む。

【0225】

10

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

【0226】

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

【0227】

本明細書で使用される「相補性決定領域」又は「CDR」という用語は、抗原特異性及び結合親和性を与える抗体可変領域内のアミノ酸の配列を指す。例えば、一般に、各重鎖可変領域 (例えば、HCDR1、HCDR2 及び HCDR3) には3つのCDRがあり、各軽鎖可変領域 (LCDR1、LCDR2 及び LCDR3) には3つのCDRがある。ある所与のCDRの厳密なアミノ酸配列境界は、Kabat et al. (1991), “Sequences of Proteins of Immunological Interest”, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (「Kabat」番号付けスキーム)、Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273, 927-948 (「Chothia」番号付けスキーム) により記載のもの又はその組み合わせを含む、多くの周知のスキームのいずれかを使用して決定できる。Kabat 番号付けスキームでは、いくつかの実施形態において、重鎖可変ドメイン (VH) のCDRアミノ酸残基には、31~35 (HCDR1)、50~65 (HCDR2) 及び95~102 (HCDR3) の番号が付され、軽鎖可変ドメイン (VL) のCDRアミノ酸残基には、24~34 (LCDR1)、50~56 (LCDR2) 及び89~97 (LCDR3) の番号が付される。Chothia 番号付けスキームでは、いくつかの実施形態において、VHのCDRアミノ酸には、26~32 (HCDR1)、52~56 (HCDR2) 及び95~102 (HCDR3) の番号が付され、VLのCDRアミノ酸残基には、26~32 (LCDR1)、50~52 (LCDR2) 及び91~96 (LCDR3) の番号が付される。KabatとChothiaを組み合わせた番号付けスキームでは、いくつかの実施形態において、CDRは、Kabat CDRの一部、Chothia CDRの一部又はその両方であるアミノ酸残基に対応する。例えば、いくつかの実施形態において、CDRは、VH、例えば哺乳動物VH、例えばヒトVHにおけるアミノ酸残基26~35 (HCDR1)、50~65 (HCDR2) 及び95~102 (HCDR3) ; 並びにVL、例えば哺乳動物VL、例えばヒトVLにおけるアミノ酸残基24~34 (LCDR1)、50~56 (LCDR2) 及び89~97 (LCDR3) に対応する。

20

30

40

【0228】

用語「組換え抗体」は、例えば、バクテリオファージ又は酵母発現システムによって発現される抗体など、組換えDNA技術を用いて作成される抗体を指す。この用語は、抗体をコードするDNA分子であって、抗体タンパク質を発現するDNA分子又はその抗体を指定するアミノ酸配列の合成によって作成された抗体を意味するとも解釈されるべきであ

50

り、DNA又はアミノ酸配列は、当技術分野において利用可能な周知の組換えDNA又はアミノ酸配列技術を用いて得られたものである。

【0229】

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

10

【0230】

20

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

【0231】

用語「同種異系」は、材料が導入される個体と同じ種の異なる動物に由来する任意の材料を指す。2つ以上の個体は、1つ以上の遺伝子座の遺伝子が同一でないとき、互いに同種異系であると言われる。一部の態様において、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に遺伝的に異なり得る。

【0232】

用語「異種」は、異なる種の動物に由来する材料を指す。

【0233】

30

用語「癌」は、異常細胞の無制御の成長によって特徴付けられる疾患を指す。癌細胞は、局所的に又は血流及びリンパ系を通じて体の他の部位に広がり得る。様々な癌の例が本明細書に記載され、限定されないが、乳癌、前立腺癌、卵巢癌、子宮頸癌、皮膚癌、膀胱癌、結腸直腸癌、腎癌、肝癌、脳癌、リンパ腫、白血病、肺癌などが挙げられる。用語「腫瘍」及び「癌」は、本明細書では同義的に使用され、例えば、両方の用語とも固形及び液性、例えばびまん性又は循環性腫瘍を包含する。本明細書で使用されるとき、用語「癌」又は「腫瘍」は、前癌性並びに悪性の癌及び腫瘍を含む。

【0234】

「由来する」は、この用語が本明細書で使用される場合、第1の分子と第2の分子との間の関係を指す。これは、概して、第1の分子と第2の分子との間の構造的類似性に言及するものであり、第2の分子に由来する第1の分子に関する方法又は供給源を限定することを含意又は包含しない。例えば、CD3ζ分子に由来する細胞内シグナル伝達ドメインの場合、細胞内シグナル伝達ドメインは、求められる機能、すなわち適切な条件下でシグナルを生成する能力を有するような十分なCD3ζ構造を保持している。これは、細胞内シグナル伝達ドメインの特定の作製方法に限定することを含意又は包含せず、例えば細胞内シグナル伝達ドメインを提供するためにCD3ζ配列で開始して不要な配列を欠失させるか、又は変異を付与して細胞内シグナル伝達ドメインに至らせなければならないことを意味しない。

40

【0235】

語句「本明細書に記載されるような腫瘍抗原の発現に関連する疾患」には、限定されな

50

いが、例えば癌若しくは悪性腫瘍などの増殖性疾患又は骨形成異常、骨髄異形成症候群若しくは前白血病などの前癌病態を含めた、本明細書に記載されるような腫瘍抗原の発現に関連する疾患又は本明細書に記載されるような腫瘍抗原を発現する細胞に関連する病状又は本明細書に記載されるような腫瘍抗原を発現する細胞に関連する非癌関連の適応症が含まれる。一実施形態において、本明細書に記載されるような腫瘍抗原の発現と関連する癌は、血液癌である。一実施形態において、本明細書に記載されるような腫瘍抗原の発現と関連する癌は、固形癌である。更に、本明細書に記載されるような腫瘍抗原の発現に関連する疾患としては、限定されないが、例えば、本明細書に記載されるような腫瘍抗原の発現に関連する、非定型的及び／又は非典型的な癌、悪性腫瘍、前癌状態又は増殖性疾患が挙げられる。本明細書に記載されるような腫瘍抗原の発現に関連する非癌関連の適応症には、限定されないが、例えば自己免疫疾患（例えば、狼瘡）、炎症性障害（アレルギー及び喘息）及び移植が含まれる。いくつかの態様において、腫瘍抗原発現細胞は、腫瘍抗原をコードするmRNAを発現するか、又は任意のときに発現している。一実施形態において、腫瘍抗原発現細胞は、腫瘍抗原タンパク質（例えば、野生型又は変異体）を産生し、腫瘍抗原タンパク質は、正常レベル又は低下したレベルで存在し得る。一実施形態において、腫瘍抗原発現細胞は、ある時点で検出可能なレベルの腫瘍抗原タンパク質を産生し、その後、検出可能な腫瘍抗原タンパク質を実質的に生成しなかった。

10

【0236】

「CD19の発現に関連する疾患」という句は、例えば、癌若しくは悪性腫瘍などの増殖性疾患又は骨髄形成異常症、骨髄異形成症候群若しくは前白血病などの前癌状態を含む、CD19の発現に関連する疾患又はCD19を発現する細胞に関連する状態；又はCD19を発現する細胞に関連する非癌関連の適応症を含むが、これらに限定されるものではない。一態様において、CD19の発現と関係する癌は、血液癌である。一態様において、血液癌は、白血病又はリンパ腫である。一態様において、CD19の発現に関連する癌には、限定されないが、例えば急性骨髄性白血病（AML）、B細胞急性リンパ性白血病（BALL）、T細胞急性リンパ性白血病（TALL）、急性リンパ性白血病（ALL）を例えば含むがそれに限定されない1つ以上の急性白血病、慢性骨髄球性白血病（CML）、慢性リンパ性白血病（CLL）を例えば含むがそれに限定されない1つ以上の慢性白血病を含めた癌及び悪性腫瘍が含まれる。CD19の発現に関連する追加の癌又は血液学的病態は、限定されないが、例えばB細胞前リンパ球性白血病、芽球性形質細胞様樹状細胞新生物、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、ヘアリー細胞白血病、小細胞型又は大細胞型濾胞性リンパ腫、悪性リンパ球増殖性病態、MALTL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、骨髄形成異常及び骨髄異形成症候群、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、形質芽球性リンパ腫、形質細胞様樹状細胞新生物、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、骨髄増殖性新生物；組織球性障害（例えば、肥満細胞障害又は芽球性形質細胞様樹状細胞新生物）；マスト細胞障害、例えば全身性肥満細胞症又は肥満細胞白血病；B細胞前リンパ球性白血病、形質細胞骨髄腫及び骨髄性血球細胞の無効な産生（又は異形成）によってまとめられる種々の血液学的病態の群である「前白血病」などを含む。更に、CD19発現の発現に関連する疾患には、限定されないが、例えばCD19の発現に関連する非定型的及び／又は非古典的な癌、悪性腫瘍、前癌病態又は増殖性疾患が含まれる。CD19の発現に関連する非癌関連徴候には、限定されないが、例えば自己免疫疾患（例えば、ループス）、炎症性障害（アレルギー及び喘息）及び移植が含まれる。一部の実施形態において、腫瘍抗原発現細胞は、腫瘍抗原をコードするmRNAを発現するか、又はいずれかの時点で発現した。ある実施形態において、腫瘍抗原発現細胞は、腫瘍抗原タンパク質（例えば、野生型又は突然変異体）を産生し、腫瘍抗原タンパク質は、正常レベル又は低下したレベルで存在し得る。一実施形態において、腫瘍抗原発現細胞は、ある時点で検出可能なレベルの腫瘍抗原タンパク質を産生し、その後、検出可能な腫瘍抗原タンパク質を実質的に生成しなかった。他の実施形態において、疾患は、CD19陰性の癌、例えばCD19陰性の再発癌である。いくつかの態様において、腫瘍抗原（例えば、CD19）発現細胞

20

30

40

50

は、腫瘍抗原をコードするmRNAを発現するか、又は任意のときに発現している。一実施形態において、腫瘍抗原（例えば、CD19）発現細胞は、腫瘍抗原タンパク質（例えば、野生型又は変異体）を産生し、腫瘍抗原タンパク質は、正常レベル又は低下したレベルで存在し得る。一実施形態において、腫瘍抗原（例えば、CD19）発現細胞は、ある時点で検出可能なレベルの腫瘍抗原タンパク質を産生し、その後、検出可能な腫瘍抗原タンパク質を実質的に産生しなかった。

【0237】

語句「B細胞抗原の発現に関連する疾患」は、例えば、癌若しくは悪性腫瘍などの増殖性疾患又は脊髄形成異常症、骨髄異形成症候群若しくは前白血病などの前癌状態を含む、CD19、CD20、CD22若しくはROR1の1つ以上の発現に関連する疾患又はCD19、CD20、CD22若しくはROR1の1つ以上を発現するか若しくは任意の時点で発現していた細胞に関連する状態又はCD19、CD20、CD22若しくはROR1の1つ以上を発現する細胞に関連する非癌関連の適応症を含むが、これらに限定されるものではない。疑義を回避するために、B細胞抗原の発現に関連する疾患は、例えば、B細胞抗原を標的とする分子（例えば、B細胞標的CAR）であるが、かつてはB細胞抗原を発現していた分子を用いた処置により、抗原発現が下方制御されているため、現在B細胞抗原を発現していない細胞に関連する状態を含み得る。語句「B細胞抗原の発現に関連する疾患」は、本明細書に記載のように、CD19の発現に関連する疾患を含む。実施形態において、CAR発現細胞は、B細胞抗原に関連する疾患を処置するために使用される。実施形態において、本明細書の方法によって産生されるCARは、B細胞抗原を標的とする抗原結合ドメインを含む。

【0238】

本明細書で使用される「再発」という用語は、初期の応答性期間（例えば、完全応答又は部分応答）後、例えばある治療（例えば、癌治療）による先の処置後の疾患（例えば、癌）の再出現を指す。初期の応答性期間は、癌細胞のレベルの、ある閾値未満、例えば20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%又は1%未満への低下を含み得る。再出現は、癌細胞のレベルの、ある閾値を越える、例えば20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%又は1%を超える増加を含み得る。例えば、再出現は、例えば、B-ALLに関連して、完全応答後の、例えば血液、骨髄(>5%)又は任意の髄外部位における芽球の再出現を含み得る。これに関連して、完全応答は、5%未満のBM芽球を含み得る。より一般的には、一実施形態において、応答（例えば、完全応答又は部分応答）は、検出可能なMRD（微小残存病変）の非存在を含み得る。一実施形態において、応答性の初期期間は、少なくとも1、2、3、4、5又は6日間；少なくとも1、2、3又は4週間；少なくとも1、2、3、4、6、8、10又は12ヶ月間；又は少なくとも1、2、3、4又は5年間続く。

【0239】

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

【0240】

用語「保存的配列改変」は、そのアミノ酸配列を含む抗体又は抗体フラグメントの結合特性が大きい影響又は変化を被ることのないアミノ酸改変を指す。かかる保存的改変には、アミノ酸置換、付加及び欠失が含まれる。改変は、部位特異的突然変異誘発及びPCR媒介性突然変異誘発など、当技術分野において公知の標準技法によって本発明の抗体又は抗体フラグメントに導入することができる。保存的アミノ酸置換は、アミノ酸残基が同様の側鎖を有するアミノ酸残基に置き換えられるものである。同様の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野において定義されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン

、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、 β 分枝側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸が含まれる。したがって、本明細書に記載のCAR内の1つ以上のアミノ酸残基は、同じ側鎖ファミリーからの他のアミノ酸残基に置き換えることができ、及び変化したCARは、本明細書に記載される機能アッセイを用いて試験することができる。

【0241】

用語「刺激」は、刺激性分子（例えば、TCR/CD3複合体又はCAR）とその同族のリガンド（又はCARの場合には腫瘍抗原）との結合によって誘導される一次応答を指し、それにより、限定されないが、TCR/CD3複合体を介したシグナル伝達又は適切なNK受容体若しくはCARの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を媒介する。刺激は、特定の分子の発現変化を媒介することができる。

10

【0242】

用語「刺激性分子」は、免疫細胞（例えば、T細胞、NK細胞、B細胞）によって発現され、免疫細胞シグナル伝達経路の少なくともいくつかの態様について、免疫細胞の活性化を刺激的に調節する細胞質シグナル伝達配列を提供する分子を指す。一態様において、シグナルは、例えば、TCR/CD3複合体と、ペプチドを載せたMHC分子との結合により開始される一次シグナルであり、これは、増殖、活性化、分化などを含むが、これらに限定されないT細胞応答の媒介をもたらす。刺激性方向に作用する初代細胞質シグナル伝達配列（「一次シグナル伝達ドメイン」とも称される）は、免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ又はITAMとして知られるシグナル伝達モチーフを含み得る。本発明において特に有用であるITAM含有細胞質シグナル伝達配列の例には、CD3 ζ 、共通FcR γ （FCER1G）、Fc γ RIIa、FcR β （Fc ϵ R1b）、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD79a、CD79b、DAP10及びDAP12由来のものが含まれるが、これらに限定されない。本発明の具体的なCARにおいて、本発明の任意の1つ以上のCARの細胞内シグナル伝達ドメインは、細胞内シグナル伝達配列、例えばCD3- ζ 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- ζ の一次シグナル伝達配列は、配列番号9（変異体CD3 ζ ）として提供される配列又は非ヒト種、例えばマウス、げっ歯類、サル、類人猿などからの同等の残基である。本発明の特定のCARにおいて、CD3- ζ の一次シグナル伝達配列は、配列番号10（野生型ヒトCD3 ζ ）に提供される配列又は非ヒト種、例えばマウス、げっ歯類、サル、類人猿などからの同等の残基である。

20

30

【0243】

用語「抗原提示細胞」又は「APC」は、その表面上に主要組織適合遺伝子複合体（MHC）と複合体化した外来抗原を提示するアクセサリー細胞などの免疫系細胞（例えば、B細胞、樹状細胞など）を指す。T細胞は、そのT細胞受容体（TCR）を用いてこうした複合体を認識し得る。APCは、抗原をプロセッシングしてそれをT細胞に提示する。

【0244】

「細胞内シグナル伝達ドメイン」は、この用語が本明細書で使用されるとき、分子の細胞内部分を指す。細胞内シグナル伝達ドメインは、CAR含有細胞、例えばCAR T細胞の免疫エフェクター機能を促進するシグナルを生成することができる。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、細胞溶解活性及びサイトカインの分泌を含めたヘルパー活性が挙げられる。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形質導入し、細胞に特殊な機能を果たすよう指示す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を用いることができるが、多くの場合、鎖全体を使用する必要はない。細胞内シグナル伝達ドメインの切断された一部を使用する範囲内で、このような切断された一部を、それがエフェクター機能シグナルを伝達する限り、完全鎖の代わりに使用し得る。用語細胞内シグナル伝達ドメインは、そのため、エフェクター機能シグナルの伝達に十分な細胞内シグナル伝達ドメインのあらゆる切断

40

50

された一部を含むことを意図する。

【0245】

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

10

【0246】

一次細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫受容活性化チロシンモチーフ又はITAMとして知られるシグナル伝達モチーフを含むことができる。ITAMを含む一次細胞質シグナル伝達配列の例には、限定されないが、CD3 ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278（「ICOS」）、Fc ϵ RI及びCD66d、CD32、DAP10及びDAP12に由来するものが含まれる。

【0247】

用語「 ζ 」若しくは代わりに「 ζ 鎖」、「CD3- ζ 」又は「TCR- ζ 」は、GenBank受託番号BAG36664.1として提供されるタンパク質又は非ヒト種、例えばマウス、げっ歯類、サル、類人猿などからの均等な残基として定義され、「 ζ 刺激ドメイン」若しくは代わりに「CD3- ζ 刺激ドメイン」又は「TCR- ζ 刺激ドメイン」は、T細胞活性化に必要な初期シグナルを機能的に伝達するのに十分な ζ 鎖の細胞質ドメインからのアミノ酸残基として定義される。一態様において、 ζ の細胞質ドメインは、GenBank受託番号BAG36664.1の残基52～164又はその機能性オルソログである非ヒト種、例えばマウス、げっ歯類、サル、類人猿などからの均等な残基を含む。一態様において、「 ζ 刺激ドメイン」又は「CD3- ζ 刺激ドメイン」は、配列番号9として提供される配列である。一態様において、「 ζ 刺激ドメイン」又は「CD3- ζ 刺激ドメイン」は、配列番号10として提供される配列である。

20

【0248】

「共刺激分子」という用語は、共刺激リガンドと特異的に結合し、それにより、T細胞の、限定されないが、増殖などによる共刺激応答を媒介する、T細胞上の同族結合パートナーを指す。共刺激分子は、効率的な免疫応答に必要な抗原受容体又はそのリガンド以外の細胞表面分子である。共刺激分子は、MHCクラスI分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ性活性化分子（SLAMタンパク質）、活性化NK細胞受容体、BTLA、Tollリガンド受容体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD5、ICAM-1、LFA-1（CD11a/CD18）、4-1BB（CD137）、B7-H3、CD5、ICAM-1、ICOS（CD278）、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM（LIGHTR）、KIRDS2、SLAMF7、NKp80（KLRF1）、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、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）

30

40

50

、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a及びCD83と特異的に結合するリガンドを含むが、これらに限定されるものではない。

【0249】

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

【0250】

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

10

【0251】

用語「4-1BB」は、GenBank受託番号AAA62478.2として提供されるアミノ酸配列又は非ヒト種、例えばマウス、げっ歯類、サル、類人猿などからの均等な残基を有するTNFRスーパーファミリーのメンバーを指し、及び「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又は非ヒト種、例えばマウス、げっ歯類、サル、類人猿などからの均等な残基として定義される。一態様において、「4-1BB共刺激ドメイン」は、配列番号7として提供される配列又は非ヒト種、例えばマウス、げっ歯類、サル、類人猿などからの均等な残基である。

【0252】

「免疫エフェクター細胞」は、その用語が本明細書で使用される場合、免疫応答、例えば、免疫エフェクター応答の促進に関与する細胞を指す。免疫エフェクター細胞の例には、T細胞、例えば α/β T細胞及び γ/δ 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(NKT)細胞、肥満細胞及び骨髄由来食細胞が含まれる。

20

【0253】

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

30

【0254】

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

【0255】

本明細書で互換的に使用される「枯渇」又は「枯渇すること」という用語は、プロセス、例えば選択工程、例えばネガティブ選択が実施された後の、サンプル中の細胞、タンパク質又は高分子のレベル又は量の減少又は低下を指す。枯渇は、細胞、タンパク質又は高分子の完全又は部分的な枯渇であり得る。一実施形態において、枯渇は、プロセスが実施される前のサンプル中の細胞、タンパク質又は高分子のレベル又は量と比較した、細胞、タンパク質又は高分子のレベル又は量の少なくとも1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又は99%の減少又は低下である。

40

【0256】

本明細書で互換的に使用される「濃縮された」又は「濃縮」という用語は、プロセス、例えば選択工程、例えばポジティブ選択が実施された後の、サンプル中の細胞、タンパク質又は高分子のレベル又は量の増加を指す。濃縮は、細胞、タンパク質又は高分子の完全又は部分的な濃縮であり得る。一実施形態において、濃縮は、参照サンプル中の細胞、タンパク質又は高分子のレベル又は量と比較した、細胞、タンパク質又は高分子のレベル又は量の少なくとも1%、例えば、少なくとも1~200%、例えば少なくとも1~10、10~20、20~30、30~50、50~70、70~90、90~110、110

50

～130、130～150、150～170又は170～200%の増加である。いくつかの実施形態において、濃縮は、参照サンプル中の細胞、タンパク質又は高分子のレベル又は量と比較した、細胞、タンパク質又は高分子のレベル又は量の少なくとも5%、例えば少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95又は99%の増加である。いくつかの実施形態において、濃縮は、参照サンプル中の細胞、タンパク質又は高分子のレベル又は量と比較した、細胞、タンパク質又は高分子のレベル又は量の少なくとも1.1倍、例えば1.1～200倍、例えば、1.1～10、10～20、20～30、30～50、50～70、70～90又は90～100倍の増加である。いくつかの実施形態において、参照サンプルは、同じサンプル、例えばプロセスが実施される前のサンプルであり得る。いくつかの実施形態において、同じサンプルは、濃縮がその後実施されるサンプル、例えば前濃縮集団、例えば開始集団を指す。いくつかの実施形態において、参照サンプルは、異なるサンプル、例えばプロセスが実施されないサンプルであり得る。

10

【0257】

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

20

【0258】

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

30

【0259】

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

【0260】

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

【0261】

用語「発現」は、プロモーターによってドライブされる特定のヌクレオチド配列の転写及び／又は翻訳を指す。

40

【0262】

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

50

ベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターなどが挙げられる。

【0263】

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

【0264】

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

【0265】

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

【0266】

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

【0267】

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

10

20

30

40

50

疫グロブリンのFcの少なくとも一部分も含むことができる。更なる詳細については、Jones et al., Nature, 321:522-525, 1986; Reichmann et al., Nature, 332:323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596, 1992を参照されたい。

【0268】

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

【0269】

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

【0270】

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

【0271】

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

【0272】

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

【0273】

用語「核酸」又は「ポリヌクレオチド」は、一本鎖又は二本鎖の形態のデオキシリボ核酸(DNA)又はリボ核酸(RNA)又はそれらのDNA又はRNAの組み合わせ及びそれらのポリマーを指す。用語「核酸」は、遺伝子、cDNA又はmRNAを含む。一実施形態において、核酸分子は、合成(例えば、化学合成)又は組換えである。具体的に限定しない限り、この用語には、参照核酸と同様の結合特性を有し、且つ天然に存在するヌクレオチドと同じように代謝される、天然ヌクレオチドの類似体又は誘導体を含む核酸が包含される。特に指示されない限り、ある詳細な核酸配列は、黙示的に、その保存的に改変された変異体(例えば、縮重コドン置換)、アレル、オルソログ、SNP及び相補配列並びに明示的に指示される配列も包含する。具体的には、縮重コドン置換は、1つ以上の選択の(又は全ての)コドンの3番目の位置が混合塩基及び/又はデオキシイノシン残基で置換されている配列を作成することによって達成し得る(Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081(1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608(1985); 及び Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98(1994))。

【0274】

用語「ペプチド」、「ポリペプチド」及び「タンパク質」は、同義的に使用され、ペプチド結合によって共有結合的に連結したアミノ酸残基で構成される化合物を指す。タンパ

10

20

30

40

50

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

10

【0275】

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

【0276】

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

【0277】

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

20

【0278】

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

【0279】

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

30

【0280】

用語「癌関連抗原」又は「腫瘍抗原」は、互換的に、癌細胞の表面上に、完全に又は代わりにフラグメント（例えば、MHC／ペプチド）として、正常細胞と比較して優先的に発現する分子（典型的にはタンパク質、炭水化物又は脂質）であって、癌細胞への薬理的薬剤の優先的な標的化に有用な分子を指す。いくつかの実施形態において、腫瘍抗原は、正常細胞及び癌細胞の両方が発現するマーカー、例えば系列マーカー、例えばB細胞上のCD19である。特定の態様において、本発明の腫瘍抗原は、原発性又は転移性黒色腫、胸腺腫、リンパ腫、肉腫、肺癌、肝臓癌、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、白血病、子宮癌、子宮頸癌、膀胱癌、腎臓癌及び乳癌、前立腺癌、卵巣癌、膵臓癌などの腺癌などを含むが、これらに限定されない癌に由来する。いくつかの実施形態において、癌関連抗原は、正常細胞と比較して癌細胞で過剰発現する（例えば、正常細胞と比較して1倍の過剰発現、2倍の過剰発現、3倍の過剰発現又はそれを超える）細胞表面分子である。いくつかの実施形態において、癌関連抗原は、癌細胞で不適切に合成される細胞表面分子、例えば正常細胞に発現する分子と比較して欠失、付加又は変異を含む分子である。いくつかの実施形態において、癌関連抗原は癌細胞の細胞表面にのみ、完全に又は代わりにフラグメント（例えば、MHC／ペプチド）として発現することになり、正常細胞の表面に合成されないか又は発現しない。いくつかの実施形態において、本発明のCARは、M

40

50

H C 提示ペプチドに結合する抗原結合ドメイン（例えば、抗体又は抗体フラグメント）を含む C A R を含む。通常、内因性タンパク質に由来するペプチドは、主要組織適合遺伝子複合体（M H C）クラス I 分子のポケットに嵌まり、C D 8 + T リンパ球上の T 細胞受容体（T C R）によって認識される。M H C クラス I 複合体は、あらゆる有核細胞によって構成的に発現される。癌では、ウイルス特異的及び／又は腫瘍特異的ペプチド／M H C 複合体が免疫療法用のユニークなクラスの細胞表面標的となる。ヒト白血球抗原（H L A）－A 1 又は H L A－A 2 のコンテキストでウイルス又は腫瘍抗原由来のペプチドを標的とする T C R 様抗体が記載されている（例えば、S a s t r y e t a l . , J V i r o l . 2 0 1 1 8 5 (5) : 1 9 3 5 - 1 9 4 2 ; S e r g e e v a e t a l . , B l o o d , 2 0 1 1 1 1 7 (1 6) : 4 2 6 2 - 4 2 7 2 ; V e r m a e t a l . , J I m m u n o l 2 0 1 0 1 8 4 (4) : 2 1 5 6 - 2 1 6 5 ; W i l l e m s e n e t a l . , G e n e T h e r 2 0 0 1 8 (2 1) : 1 6 0 1 - 1 6 0 8 ; D a o e t a l . , S c i T r a n s l M e d 2 0 1 3 5 (1 7 6) : 1 7 6 r a 3 3 ; T a s s e v e t a l . , C a n c e r G e n e T h e r 2 0 1 2 1 9 (2) : 8 4 - 1 0 0 を参照されたい）。例えば、T C R 様抗体は、ヒト s c F v ファージディスプレイライブラリなど、ライブラリのスクリーニングによって同定することができる。

【0281】

用語「可動性ポリペプチドリinker」又は「リンカー」は、s c F v との関連で使用されるとき、可変重鎖領域と可変軽鎖領域とを共に連結するために単独又は組み合わせで使用されるグリシン及び／又はセリン残基などのアミノ酸からなるペプチドリinkerを指す。一実施形態において、可動性ポリペプチドリinker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 （配列番号15）（式中、 n は、1以上の正の整数、例えば $n=1$ 、 $n=2$ 、 $n=3$ 、 $n=4$ 、 $n=5$ 、 $n=6$ 、 $n=7$ 、 $n=8$ 、 $n=9$ 及び $n=10$ である）を含む。一実施形態において、可動性ポリペプチドリinkerには、限定されないが、（G l y₄ S e r）₄（配列番号27）又は（G l y₄ S e r）₃（配列番号28）が含まれる。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）又は（G l y₃ S e r）（配列番号29）の複数の繰り返しを含む。また、国際公開第2012/138475号パンフレット（参照により本明細書に援用される）に記載されるリンカーも本発明の範囲内に含まれる。

【0282】

本明細書で使用されるとき、5'キャップ（RNAキャップ、RNA 7-メチルグアノシンキャップ又はRNA m⁷Gキャップとも称される）は、転写開始直後に真核生物メッセンジャーRNAの「前」又は5'末端に付加された修飾グアニンヌクレオチドである。5'キャップは、1番目の転写ヌクレオチドに連結される末端基からなる。その存在は、リボソームによる認識及びRNAアーゼからの保護に重要である。キャップ付加は転写と結び付いており、それぞれが他方に影響を与えるようにして同時転写的に起こる。転写開始直後、合成されているmRNAの5'末端に、RNAポリメラーゼに関連するキャップ合成複合体が結合する。この酵素複合体は、mRNAキャッピングに必要な化学反応を触媒する。合成は、多段階生化学反応として進行する。キャッピング部分は、mRNAのその安定性又は翻訳効率などの機能を調整するために改変することができる。

【0283】

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

【0284】

本明細書で使用されるとき、「ポリ（A）」は、ポリアデニル化によってmRNAに付加される一連のアデノシンである。一過性発現用のコンストラクトのいくつかの実施形態において、ポリAは、50～5000（配列番号30）、例えば64より多く、例えば1

00より多く、例えば300又は400より多い。ポリ(A)配列は、局在性、安定性又は翻訳効率などのmRNA機能を調整するために化学的又は酵素的に改変することができる。

【0285】

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

10

【0286】

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

20

【0287】

アフエーシスは、全血が個体から取り出され、選択成分に分離され、残りが循環に戻されるプロセスである。一般に、血液成分の分離には、遠心分離と非遠心分離の2つの方法がある。白血球アフエーシスは、患者の白血球の活性な選択及び除去をもたらす。

【0288】

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

30

【0289】

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

40

【0290】

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

【0291】

用語の「実質的に精製された」細胞は、他の細胞型を本質的に含まない細胞を指す。実質的に精製された細胞とは、その天然に存在する状態でそれが通常結び付いている他の細胞型と分離されている細胞も指す。一部の例では、実質的に精製された細胞集団とは、均

50

質な細胞集団を指す。他の例では、この用語は、単に、その自然状態でそれが天然に結び付いている細胞から分離されている細胞を指す。一部の態様において、これらの細胞は、インビトロで培養される。他の態様において、これら細胞は、インビトロで培養されない。

【0292】

本発明に関連して、「腫瘍抗原」又は「過剰増殖性障害抗原」又は「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。特定の実施形態において、腫瘍抗原は、原発性又は転移性黒色腫、胸腺腫、リンパ腫、肉腫、肺癌、肝臓癌、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、白血病、子宮癌、子宮頸癌、膀胱癌、腎臓癌及び乳癌、前立腺癌、卵巣癌、膵臓癌などの腺癌などを含むが、これらに限定されない癌に由来する。

10

【0293】

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

【0294】

用語「特異的に結合する」は、試料中に存在するコグネイト結合パートナータンパク質を認識し、結合する抗体又はリガンドであって、しかし、試料中の他の分子は、実質的に認識又は結合しない、抗体又はリガンドを指す。

20

【0295】

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

30

【0296】

本明細書で使用される場合、用語「Stat3アクティベーター」は、Stat3経路を活性化して、例えばStat3のリン酸化の増加（例えば、チロシン705（Y705）上）を引き起こすか若しくはStat3活性化遺伝子の転写を増加させるか、又はStat3阻害遺伝子の転写を減少させることにより、Stat3経路を活性化する分子を指す。Stat3アクティベーターは、例えば、ポリペプチド又は小分子を含み得る。いくつかの実施形態において、Stat3アクティベーターは、例えば、gp130に結合することにより、Stat3の上流で作用する。いくつかの実施形態において、Stat3アクティベーターは、Stat3に結合する。Stat3アクティベーターは、IL-6ファミリーサイトカイン；IL-10ファミリーサイトカイン；IL-17ファミリーサイトカイン；CCL20分子；gp130アクティベーター；IL-10R2受容体アクティベーター；可溶性IL-6受容体；及びIL-6/IL-6R複合体を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、Stat3アクティベーターは、例えば、インビトロ又はインビボで、CAR T細胞の増殖をもたらすことができる。

40

【0297】

本明細書で使用される「Stat3アクティベーター細胞」という用語は、Stat3アクティベーター（例えば、可溶性タンパク質として又は細胞の表面上）を含む（例えば

50

、発現する)細胞又はS t a t 3アクティベーターがその細胞の表面にコンジュゲートしている、例えばその上に位置している、細胞を指す。

【0298】

本明細書で使用される「I L-6ファミリーサイトカイン」という用語は、I L-6サイトカインファミリーの分子を指し、全長の天然に存在するI L-6サイトカインファミリーメンバー、その活性フラグメント又は活性変異体を指す。実施形態において、I L-6ファミリーサイトカインは、I L-6分子、I L-11分子、I L-27分子、I L-31分子、C N T F分子、C T-1分子、C L C分子、L I F分子、N P分子又はO S M分子から選択される。いくつかの実施形態において、I L-6ファミリーサイトカインは、受容体、例えば α 受容体(例えば、I L-6 R α 、I L-11 R α 又はC N T F R α)に結合する。いくつかの実施形態において、 α 受容体に結合したI L-6ファミリーサイトカインは、複合体、例えば α 受容体とシグナル伝達 β 受容体、例えばg p 130とを含む複合体の形成をもたらす。実施形態において、I L-6ファミリーサイトカインは、シグナル伝達 β 受容体、例えばg p 130を介してシグナル伝達する。いくつかの実施形態において、I L-6ファミリーサイトカインは、S t a t 3経路を活性化し、例えばチロシン705をリン酸化するか、又はS t a t 3活性化遺伝子の転写を増加させるか若しくはS t a t 3阻害遺伝子の転写を減少させる。いくつかの実施形態において、I L-6ファミリーサイトカインは、例えば、インビトロ又はインビボでC A R T細胞の増殖をもたらす。

10

【0299】

本明細書で使用される「I L-6分子」という用語は、全長の天然に存在するI L-6(例えば、哺乳動物I L-6、例えば、ヒトI L-6、例えばG e n B a n k受託番号C A A 6 8 2 7 8. 1)、I L-6の活性フラグメント又はI L-6の天然に存在する野生型ポリペプチド又はそのフラグメントと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有する活性変異体を指す。いくつかの実施形態において、変異体、例えば活性変異体は、野生型ポリペプチド又はそれをコードする核酸の誘導体、例えば変異体である。いくつかの実施形態において、I L-6変異体、例えばI L-6の活性変異体は、少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の、例えば実施例2のアッセイによって測定されるような、野生型I L-6ポリペプチドの活性を有する。いくつかの実施形態において、I L-6分子は、g p 130受容体を介してシグナル伝達する。いくつかの実施形態において、I L-6分子は、S t a t 3経路を活性化し、例えばチロシン705をリン酸化するか、又はS t a t 3活性化遺伝子の転写を増加させるか若しくはS t a t 3阻害遺伝子の転写を減少させる。いくつかの実施形態において、I L-6分子は、1つ以上の翻訳後修飾を含む。

20

30

【0300】

本明細書で使用される場合、サイトカイン分子の「活性変異体」は、少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の、例えば当技術分野で認識されているアッセイによって測定されるような、野生型サイトカインの活性を有するサイトカイン変異体を指す。

40

【0301】

本明細書で使用される「I L-10ファミリーサイトカイン」という用語は、I L-10サイトカインファミリーの分子を指し、全長の天然に存在するI L-10サイトカインファミリーメンバー、その活性フラグメント又は活性変異体を指す。実施形態において、I L-10ファミリーサイトカインは、I L-10分子、I L-19分子、I L-20分子、I L-22分子、I L-24分子、I L-26分子、I L-28A分子、I L-28B分子又はI L-29分子から選択される。いくつかの実施形態において、I L-10ファミリーサイトカインは、I L-10 R 2受容体を介してシグナル伝達する。いくつかの実施形態において、I L-10ファミリーサイトカインは、例えば、インビトロ又はインビボでC A R T細胞の増殖をもたらす。

50

【0302】

本明細書で使用される「IL-17ファミリーサイトカイン」という用語は、IL-17サイトカインファミリーの分子を指し、全長の天然に存在するIL-17サイトカインファミリーメンバー、その活性フラグメント又は活性変異体を指す。実施形態において、IL-17ファミリーサイトカインは、IL17A分子、IL17B分子、IL17C分子、IL17D分子、IL17E分子又はIL17F分子から選択される。いくつかの実施形態において、IL-17ファミリーサイトカインは、例えば、インビトロ又はインビボでCAR T細胞の増殖をもたらす。

【0303】

本明細書で使用される「gp130アクティベーター」という用語は、gp130を活性化し、例えば二量体化、例えばgp130のホモ二量体化又は例えばLIF、OSM又はCNTFとのgp130のヘテロ二量体化を引き起こす分子を指す。いくつかの実施形態において、gp130アクティベーターは、IL-6分子、IL-11分子、IL-27分子、CNTF分子、CT-1分子、CLC分子、LIF分子、NP分子、OSM分子又はgp130に結合する抗体分子、例えば抗gp130抗体分子から選択される。いくつかの実施形態において、gp130アクティベーターは、gp130を介したシグナル伝達をもたらす。いくつかの実施形態において、gp130アクティベーターは、Stat3経路を活性化し、例えばチロシン705をリン酸化するか、又はStat3活性化遺伝子の転写を増加させるか若しくはStat3阻害遺伝子の転写を減少させる。いくつかの実施形態において、gp130アクティベーターは、例えば、インビトロ又はインビボでCAR T細胞の増殖をもたらす。

【0304】

「gp130分子」という用語は、全長の天然に存在するgp130（例えば、哺乳動物gp130、例えばヒトgp130、例えばGenBank受託番号AA117403）、gp130の活性フラグメント又はgp130の天然に存在する野生型ポリペプチド又はそのフラグメントと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有する活性変異体を指す。いくつかの実施形態において、変異体は、野生型ポリペプチド又はそれをコードする核酸の誘導体、例えば変異体である。いくつかの実施形態において、gp130変異体、例えばgp130の活性変異体は、少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の野生型gp130ポリペプチドの活性を有する。いくつかの実施形態において、gp130分子は、Stat3経路を活性化し、例えばチロシン705をリン酸化するか、又はStat3活性化遺伝子の転写を増加させるか若しくはStat3阻害遺伝子の転写を減少させる。いくつかの実施形態において、gp130アクティベーターは、例えば、インビトロ又はインビボでCAR T細胞の増殖をもたらす。gp130は、CD130又はIL-6受容体サブユニット β （IL-6RB）とも称される。

【0305】

本明細書で使用される「Stat3分子」という用語は、Stat3経路を活性化して、例えばStat3のリン酸化の増加（例えば、チロシン705（Y705）上）を引き起こすか、又はStat3活性化遺伝子の転写を増加させることにより若しくはStat3阻害遺伝子の転写を減少させることにより、Stat3経路を活性化する分子を指す。「Stat3分子」という用語は、全長の天然に存在するStat3（例えば、哺乳動物Stat3、例えばヒトStat3、例えば、GenBank AAS66986.1）、Stat3の活性フラグメント又はStat3の天然に存在する野生型ポリペプチド又はそれをコードする核酸と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有する活性変異体を含む。いくつかの実施形態において、変異体は、野生型ポリペプチド又はそれをコードする核酸の誘導体、例えば変異体である。いくつかの実施形態において、Stat3変異体、例えばStat3の活性変異体は、少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、9

7%、98%、99%又は100%の、例えば実施例2のアッセイによって測定されるような、野生型Statt3ポリペプチドの活性を有する。いくつかの実施形態において、Statt3分子は、例えば、インビトロ又はインビボでCAR T細胞の増殖をもたらす。

【0306】

説明

本開示は、とりわけ、CAR発現細胞（例えば、CAR19発現細胞）の改善された作製方法、例えば製造方法を提供する。本開示は、それを含む組成物及び反応混合物も提供する。いくつかの実施形態において、作製方法は、免疫エフェクター細胞集団を、(i) 例えば、本明細書に記載されるようなStatt3アクティベーター；(ii) 解糖阻止剤、例えば小分子解糖阻止剤、例えば小分子ヘキソキナーゼ阻害剤、例えばグルコース類似体、例えば2-デオキシ-D-グルコース(2-DG)又は(i)及び(ii)の両方と接触させることを含む。本開示は、いくつかの態様において、CAR発現細胞による治療的処置を受ける、受けようとしている、受けた又は受けている対象を評価、予測、選択又は監視する方法も提供する。CAR発現細胞による治療的処置に対する、癌（例えば、本明細書に記載の癌）を有する対象の応答性を評価又は予測する方法も本明細書に記載される。

10

【0307】

一態様において、本開示は、CAR発現細胞を製造する改善された方法を提供する。本明細書の実施例1に記載されているように、グルコース代謝を低下させることは、CAR発現細胞の有効性の改善につながり得る。したがって、免疫エフェクター細胞をより低いグルコース代謝を有することに基づいてCAR治療のために選択することができるか、又はグルコース代謝の阻害剤を製造プロセスに加えてCAR発現細胞の有効性を改善することができる。更に、本明細書の実施例2は、CAR発現細胞の有効性を改善する方法としてStatt3経路活性化を説明している。

20

【0308】

本開示は、CAR、例えば本明細書に記載のCARで操作することができる免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞、NK細胞）の製造方法並びにそのような細胞を含む反応混合物及び組成物も説明する。本明細書で提供される方法は、CARの発現に適した細胞の収量及び品質、例えば純度を改善する。理論に拘束されることを望むものではないが、CARを発現するように操作することができる細胞の改善された収量及び品質は、CARをコードする核酸を導入する効率を改善し、得られるCAR発現細胞の増殖を改善すると考えられている。したがって、本明細書に記載の方法及び組成物は、対象の疾患の処置における使用のための改善されたCAR発現細胞産物を提供する。

30

【0309】

本開示は、CARの発現又はCAR発現細胞の治療有効性に負の影響を及ぼし得る望ましくない物質、非標的細胞又は細胞を除去する方法も説明する。例えば、本明細書で取り上げられる方法は、単球、顆粒球、赤血球、血小板、B細胞、癌細胞、例えば、リンパ芽球、抗凍結剤（凍結サンプル由来）、ヘモグロビン又は細胞破片のいずれかの1つ以上を除去するか又は枯渇させるために使用することができる。例えば、本明細書で取り上げられる方法は、T細胞(CD4+及び/又はCD8+T細胞)、NK細胞、樹状細胞のいずれかの1つ以上を濃縮するか又はその数を増加させるために使用することができる。本明細書に記載の各方法を単独で又は本明細書に記載の方法のそれぞれ若しくは全てと任意に組み合わせて実行することで、CARを発現するように操作するのに適した改善された出発物質が得られる。

40

【0310】

新鮮なアフレーシス材料は、CARの発現に適した細胞の製造に一般的に使用される。凍結された、例えば凍結保存されたアフレーシス材料の使用は、容易に輸送され、それによりCAR発現細胞産物の製造施設への患者の位置の近接性に関する制限が取り除かれ、CAR発現細胞製造プロセスの工業化及びそれを必要とする患者への治療製品のより大きいアクセス性を可能にするという利点を提供する。CAR発現細胞の製造に現在使用

50

されている方法は、新鮮なアフエーシス材料のプロセッシング用に最適化されており、冷凍アフエーシスサンプルからCAR発現に適した細胞の同様の品質又は収量を得るために使用することができない。対照的に、本明細書に記載の方法は、冷凍、例えば凍結保存されたアフエーシスサンプルから、CAR発現に適した細胞をプロセス及び製造するために使用することができる。出発材料が凍結される、例えば凍結保存される実施形態において、本明細書に記載の方法は、任意選択により、凍結細胞が、例えば解凍プロセスを加速するためのオペレーター又は装置による干渉なしに解凍することが許容されるか、又は凍結細胞が、例えば解凍装置、例えばPlasmaThermの使用により、解凍プロセスを加速する装置又はプロセスに供される、解凍工程を含む。そのような実施形態において、解凍された材料は、周囲環境と同じ温度、例えば部屋の環境温度と同じ温度又は解凍された材料が加えられるか、洗浄されるか若しくはインキュベートされる緩衝液と同じ温度を有する。本明細書に記載の方法は、凍結又は解凍されたインプットサンプル、例えば凍結又は解凍されたアフエーシスサンプルからCARを発現するように操作することができる免疫エフェクター細胞の集団を生成又は濃縮するために特に有用である。

【0311】

本明細書で言及されるプロセスBは、現在使用されているCARを発現するように操作することができる免疫エフェクター細胞を濃縮するための標準的なプロトコルである。プロセスBは、フィコールによる密度勾配精製及びCD3/CD28 Dynabeadsを使用したポジティブ選択を実施することを含み、ここで、インプットサンプルは、新鮮なアフエーシス材料である。本明細書に記載の方法は、CARの発現に適した所望の免疫エフェクター細胞のより高い濃縮、改善された品質及び収量を提供する。

【0312】

別の態様において、本開示は、例えば、本明細書に記載の製造方法のいずれかによって作製され、CARを発現するように操作された、免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞、NK細胞）を特徴とし、ここで、操作された免疫エフェクター細胞は、抗腫瘍特性を示す。一実施形態において、CARは、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを含む。例示的な抗原は、本明細書に記載の癌関連抗原（すなわち腫瘍抗原）である。一態様において、細胞は、CARで形質転換され、CARは、細胞表面に発現される。いくつかの実施形態において、細胞（例えば、T細胞、NK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を安定に発現し得る。別の実施形態において、細胞（例えば、T細胞、NK細胞）に、CARをコードする核酸、例えばmRNA、cDNA、DNAをトランスフェクトする。いくつかのこのような実施形態において、細胞は、CARを一過性に発現し得る。

【0313】

更に、本開示は、CAR発現細胞組成物及び数ある疾患の中で、癌又は本明細書に記載されるような腫瘍抗原を発現する細胞又は組織が関与するあらゆる悪性腫瘍若しくは自己免疫性疾患を処置するための医薬又は方法におけるそれらの使用を提供する。

【0314】

水簾

一態様において、本明細書に記載の方法は、望ましくない細胞、例えば単球及び芽球を除去し、それによりCAR発現に適した所望の免疫エフェクター細胞の濃縮の改善をもたらす水簾方法の特徴とする。一実施形態において、本明細書に記載の水簾方法は、凍結されていたサンプル、例えば解凍されたサンプルからのCAR発現に適した所望の免疫エフェクター細胞の濃縮のために最適化される。一実施形態において、本明細書に記載の水簾方法は、当技術分野で公知の水簾プロトコルから回収された細胞の調製物と比較して改善された純度を有する細胞の調製物を提供する。

【0315】

製造物流（リモートサンプルの回収、出荷、保管及び生産ユニットのスケジューリング）を容易にするために、細胞原料は、典型的には、製造開始前に解凍する必要のある凍結保存された全血又はアフエレーシス材料である。しかしながら、解凍した凍結材料からの細胞の密度及びサイズは、新鮮な材料のものと非常に異なっている。そのため、CAR発現を操作するための細胞分離に一般的に使用される標準的な水簾プロトコルは、凍結保存及び解凍された全血又はアフエレーシス材料から単球、顆粒球又は任意のより大きいサイズの細胞を大いに除去し損なっている。この状況は、後続のCAR T製造工程の結果に負の影響を及ぼし、収率の不良、製品品質の問題、仕様外のプロセス偏差につながる。水簾は、単球を除去できるものの、芽球細胞は、Tリンパ球と同様の密度及びサイズを有するため、芽球細胞の除去に効率的でない。

10

【0316】

一実施形態において、本明細書に記載の水簾方法は、特定の等張溶液（例えば、PBS）で希釈することにより、出発サンプル、例えば細胞サンプル、例えば解凍された細胞サンプルの最適化された粘度を使用すること、並びに水簾装置によって回収された各画分について、流速及び回収体積の最適化された組み合わせを使用することを含む。改変水簾プログラムの例は、実施例1に記載される。

【0317】

単球からリンパ球、例えばT細胞を分離するための水簾設定の例示的な範囲が表4に提供される。例示的な水簾プログラムの流速、遠心分離及び体積の設定も、表4の「Ex」と指定された列に提供される。

20

【0318】

【表1】

表4. 水簾範囲の設定

画分	流速(mL/分)		遠心分離(rpm)		体積(mL)	
	範囲	Ex	範囲	Ex	範囲	Ex
F1	30.0~50.0	30.0	1800~2400	2400	100~1000	900
F2	0.0~50.0	30.0	0~2400	2400	0~500	500
F3	50.0~80.0	70.0	1800~2400	2400	500~1000	975
F4	50.0~80.0	72.0	1800~2400	2400	500~1000	400
F5	80.0~150.0	82.0	0	0	0~500	250

30

【0319】

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つ若しくは10又はそれを超える画分が水簾工程から回収される。一実施形態において、5つの画分が水簾工程から回収される。5つの画分が回収される実施形態において、第3の画分（F3）若しくは第4の画分（F4）又は第3の画分と第4の画分との組み合わせは、最小量の単球、顆粒球、他の非リンパ球細胞を伴う所望のリンパ球集団を含有する。一実施形態において、各画分は、異なる流速を使用して回収される。一実施形態において、各画分について、流速は、前の画分を回収するために使用された流速から増加される。一実施形態において、1つ以上の画分は、異なる回収体積を使用して回収される。

40

【0320】

一実施形態において、水簾は、約20~90mL/分、約30~90mL/分、約40~90mL/分、約50~90mL/分、約60~90mL/分、約70~90mL/分、約40~85mL/分、約50~82mL/分、約60~82mL/分、約70~82mL/分、約50~80mL/分、約60~80mL/分、約70~80mL/分の流速を使用して実施される。一実施形態において、水簾は、約30~82mL/分又は約50

50

～80 mL/分の流速を使用して実施される。一実施形態において、水簾は、約30、40、50、60、70、72、80又は82 mL/分の流速を使用して実施される。一実施形態において、水簾は、約70 mL/分又は72 mL/分の流速を使用して実施される。

【0321】

一実施形態において、最小量の単球、顆粒球、他の非リンパ球細胞及び他の望ましくない成分を伴う所望のリンパ球集団を含有する1つ以上の画分の流速は、約20～90 mL/分、約30～90 mL/分、約40～90 mL/分、約50～90 mL/分、約60～90 mL/分、約70～90 mL/分、約40～85 mL/分、約50～82 mL/分、約60～82 mL/分、約70～82 mL/分、約50～80 mL/分、約60～80 mL/分、約70～80 mL/分である。一実施形態において、所望のリンパ球集団を含有する1つ以上の画分の流速は、約50～82 mL/分、約50～80 mL/分、約60～82 mL/分、約60～80 mL/分、約70～82 mL/分、約70～80 mL/分、約70～75 mL/分、約70～72 mL/分である。一実施形態において、所望のリンパ球集団を含有する1つ以上の画分の流速は、約70 mL/分又は72 mL/分である。

【0322】

一実施形態において、水簾は、約250～1250 mL、約250～1000 mL、約300～1000 mL、約400～1000 mL、約500～1000 mL、約600～1000 mL、約700～1000 mL、約800～1000 mL、約900～1000 mL、約250～975 mL、約300～975 mL、約400～975 mL、約500～975 mL、約600～975 mL、約700～975 mL、約800～975 mL、約300～900 mL、約300～800 mL、約300～700 mL、約300～600 mL、約300～500 mL又は約300～400 mLの回収体積を使用して実施される。一実施形態において、水簾は、約250、400、500、900又は975 mLの回収体積を使用して実施される。一実施形態において、水簾は、約400 mL又は約975 mLの回収体積を使用して実施される。

【0323】

一実施形態において、最小量の単球、顆粒球、他の非リンパ球細胞及び他の望ましくない成分を伴う所望のリンパ球集団を含有する1つ以上の画分の回収体積は、約250～1250 mL、約250～1000 mL、約300～1000 mL、約400～1000 mL、約500～1000 mL、約600～1000 mL、約700～1000 mL、約800～1000 mL、約900～1000 mL、約250～975 mL、約300～975 mL、約400～975 mL、約500～975 mL、約600～975 mL、約700～975 mL、約800～975 mL、約300～900 mL、約300～800 mL、約300～700 mL、約300～600 mL、約300～500 mL又は約300～400 mLである。一実施形態において、所望のリンパ球集団を含有する1つ以上の画分の回収体積は、約250、400、500、900又は975 mLである。一実施形態において、所望のリンパ球集団を含有する1つ以上の画分の回収体積は、約400 mL又は約975 mLである。

【0324】

一実施形態において、本明細書で説明される水簾方法は、水簾装置によって実施される。例えば、水簾装置は、Caridian BCT Elutra™細胞分離システム (Terumo BCT Model 71800) である。Caridian BCT Elutra™細胞分離システム (Terumo BCTモデル71800) は、連続的な逆流水簾技術を利用して、第一にサイズ、第二に比重によって細胞分離を行う閉鎖系である。分離チャンバーへの培地の流れと、遠心力によって生成される沈降速度とによって生成される反力により、細胞がサイズ及び密度によって分離チャンバー内で整理され、そこで自動的に回収バッグに吸引される。カスタマイズされたElutra設定は、異なる画分で顆粒球と組み合わせたリンパ球及び単球の分布を可能にするように設計されている。Elutraは、製造元の指示に従って操作することができる。

【0325】

密度勾配遠心分離

養子細胞治療製品の製造は、末梢血アフエーシス出発材料に存在する血液細胞及び血液要素の複合混合物から離れて、所望の細胞、例えば免疫エフェクター細胞をプロセッシングすることを必要とする。末梢血由来のリンパ球サンプルは、フィコール溶液による密度勾配遠心分離を使用した分離に成功している。しかしながら、フィコールは、臨床使用に適格ではないため、フィコールは、治療用途で細胞を分離するための好ましい試薬ではない。更に、フィコールは、グリコールを含有し、これは、細胞に対して毒性を有する可能性がある。更に、凍結保存後に解凍したアフエーシス産物のフィコール密度勾配遠心分離は、例えば、本明細書の実施例に記載されるように、準最適なT細胞産物をもたらす。例えば、フィコール溶液による密度勾配遠心分離によって分離された細胞調製物では、非T細胞、特に望ましくないB細胞、芽細胞及び単球の相対的な増加を伴う、最終製品でのT細胞の喪失が観察された。

10

【0326】

理論に拘束されることを望むものではないが、免疫エフェクター細胞、例えばT細胞は、凍結保存中に脱水して、新鮮な細胞よりも密度が高くなると考えられている。理論に拘束されることを望むものではないが、免疫エフェクター細胞、例えばT細胞は、他の血液細胞よりも長い間密度が高いままであり、したがって他の細胞と比較してより容易にフィコール密度勾配分離中に失われると考えられている。したがって、理論に拘束されることを望むものではないが、フィコールより大きい密度の培地は、フィコール又はフィコールと同じ密度、例えば1.077 g/mLの他の培地と比較して、望ましい免疫エフェクター細胞の分離の改善を提供すると考えられている。

20

【0327】

一実施形態において、本明細書に記載の密度勾配遠心分離法は、イオジキサノールを含む密度勾配媒体の使用を含む。一実施形態において、密度勾配媒体は、水中に約60%のイオジキサノールを含む。

【0328】

一実施形態において、本明細書に記載の密度勾配遠心分離法は、フィコールより大きい密度を有する密度勾配媒体の使用を含む。一実施形態において、本明細書に記載の密度勾配遠心分離法は、1.077 g/mL超、例えば1.077 g/mL超、1.1 g/mL超、1.15 g/mL超、1.2 g/mL超、1.25 g/mL超、1.3 g/mL超、1.31 g/mL超の密度を有する密度勾配媒体の使用を含む。一実施形態において、密度勾配媒体は、約1.32 g/mLの密度を有する。

30

【0329】

一実施形態において、本明細書に記載の密度勾配遠心分離法は、イオジキサノール、例えば水中に約60%のイオジキサノールを含む密度勾配媒体の使用を含み、フィコールより高い、例えば1.077 g/mL超、例えば約1.32 g/mLの密度を有する。一実施形態において、本明細書に記載される密度勾配遠心分離法は、密度勾配媒体OptiPrep（商標）（Sigma）の使用を含む。OptiPrep（商標）は、密度が1.320±0.001 g/mLの60%（w/v）イオジキサノールの既製の無菌エンドトキシントキシンテスト済み溶液である。対照的に、フィコール密度勾配溶液の密度は、わずか1.077 g/mLである。フィコールに対するOptiPrep（商標）の別の利点は、OptiPrep（商標）がGMPグレードで利用できるため、治療用途に適していることである。

40

【0330】

理論に拘束されることを望むものではないが、OptiPrep密度勾配遠心分離工程の、例えば解凍したアフエーシス材料での利用は、望ましくないB細胞及び単球を保持する可能性がより低いと考えられており、したがって、その後の活性化及び形質導入工程のために、所望の標的免疫エフェクター細胞、例えばT細胞の回収を更に改善すると考えられている。したがって、理論に拘束されることを望むものではないが、フィコールと比

50

較してより高いOptiPrepの密度は、所望の免疫エフェクター細胞、例えばT細胞の精製及び回収の両方の強化並びにCAR発現免疫エフェクター細胞、例えばT細胞の製品製造の一貫して成功した結果を妨害し得る、他の場合に望ましくない非T細胞型の同時除去を可能にすると考えられている。

【0331】

一実施形態において、密度勾配遠心分離は、細胞分離装置を使用して実施される。細胞分離装置の例には、Sepax2 (Biosafe) が含まれる。例えば密度勾配遠心分離工程前又は後に、洗浄工程、例えば本明細書に記載されるような改善された洗浄工程が実施される実施形態において、洗浄工程は、密度勾配遠心分離工程で使用されるものと同じ装置を使用して実行することができる。

10

【0332】

選択による濃縮

CAR発現に適した所望の免疫エフェクター細胞の濃縮を改善するための特定の細胞の選択方法が本明細書に提供される。一実施形態において、選択は、ポジティブ選択、例えば所望の免疫エフェクター細胞の選択を含む。別の実施形態において、選択は、ネガティブ選択、例えば望ましくない細胞の選択、例えば望ましくない細胞の除去を含む。実施形態において、本明細書に記載されるポジティブ又はネガティブ選択方法は、フロースルー装置、例えば本明細書に記載のフロースルー装置を使用することによって流動条件下で実施される。

【0333】

現在の選択方法、例えばポジティブ選択、例えばDynabeads (登録商標) CD3/CD28 CTS (商標) を使用するものは、濃縮のために更に最適化できる。第一に、選択中に使用されるDynabeadsの量は、典型的には、密度勾配遠心分離後のサンプル、例えばSepaxフィコールサンプル中に存在するCD45+/3+細胞、例えばCD45+/3+細胞の割合に基づくものではなく、元の患者材料に存在する細胞、例えばCD45+/3+細胞の割合に基づくものである。密度勾配遠心分離工程、例えばSepaxフィコール分離手順によって引き起こされる組成の有意な変化を考慮すると、この計算は、典型的には、T細胞の割合の減少及び単球の含有量の増加をもたらす。第二に、2時間のインキュベーション時間は、Dynabeads (登録商標) の非標的細胞 (すなわち非CD3及び/又は非CD28細胞) への両方の非特異的結合並びにエンドサイトーシスを介した非標的細胞 (例えば、単球) によるビーズの取り込みの十分な機会を提供し、ポジティブ選択産物におけるT細胞の収率及び純度を損ない得る問題を提供する。最後に、選択を用いた磁気装置及び操作は、準最適であり得る。現在、磁気分離は、大きい体積の液体 (200ml) 内で行われ、これは、磁気標識された細胞と磁気面との間の大きい距離をもたらす。これにより、分離に利用できる磁力が制限されるため、分離感度が低下し、より長い分離時間が要求される。更に、現在、磁気分離は、統計的に実施されており、サンプルは、負の画分を除去する前に5分間磁気面の上に配置される。このような長い分離時間は、細胞に有害であり、その生存率は、「パイルアップ」効果により手順中に負の影響を受けることが多く、非標的細胞がビーズに結合又は内部移行する機会が更に提供される。

20

30

40

【0334】

現在の選択方法とは対照的に、本明細書に記載の選択方法は、現在の「静的」分離手順とは反対に、例えば流動条件下で「動的に」発生する分離を含む。一実施形態において、流動条件下での分離は、磁気分離試薬、例えば標的抗原、インプットサンプル及び磁石に選択的に結合する磁気ビーズと磁石とを含み、磁気分離試薬及びインプットサンプルは、磁石上を通過する、例えば流れる。特定の実施形態において、磁気分離試薬及びインプットサンプルは、連続的に磁石上を通過する、例えば流れる。理論に拘束されるものではないが、この動的な手法により、インキュベーション時間 (すなわちサンプルと分離試薬の接触) 及び分離時間を短縮でき、したがって標的細胞への負の影響を最小限に抑え、非標的集団による非特異的結合及び/又はビーズの取り込みの可能性を有意に低減できる。更

50

に、本明細書に記載の選択方法は、選択試薬（Dyna beads（登録商標）CD3／CD28 CTS（商標））又は選択に使用する試薬の量（3対1のビーズ対T細胞比率）の改変を要しない。

【0335】

一実施形態において、本明細書に記載されるような流動条件下での分離又は選択は、フロースルー抗体ベースの選択技術（FAST、Flow-through Antibody-based Selection Technique）プロトコルを含む。表12は、現在の選択技術とFASTプロトコルとで異なるパラメーターの概要を示す。

【0336】

【表2】

10

表 12: 現在のポジティブ選択とFAST ポジティブ選択の比較

変更されていないパラメーター	改変されたパラメーター
試薬(CD3/28 Dynabeads CTS)	インキュベーション時間(2 時間～20 分)
ビーズ対 T 細胞比率(3:1)	静的構成でなくフロースルー濃縮キット
磁気プレート(DynaMag CTS、平台型磁石)	磁気プレート用プラスチック蓋

20

【0337】

一実施形態において、本明細書に記載の選択方法は、分離試薬及びインプットサンプルの現在の標準プロトコルよりも短いインキュベーション期間を含み、その後、磁気分離が続く。一実施形態において、インキュベーション期間は、2 時間未満、例えば、110 分未満、100 分未満、90 分未満、80 分未満、70 分未満、60 分未満、50 分未満、40 分未満、30 分未満、25 分未満、20 分未満、15 分未満、10 分未満又は5 分未満である。一実施形態において、インキュベーションは穏やかな回転下で実施される。

30

【0338】

選択のための例示的なキットは、例えば、国際公開第2017／117112号パンフレットに記載され、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。例えば、一実施形態において、キットは、スパイクを介して又は無菌溶接により、追加のサンプル／緩衝液バッグに接続できる3つのバッグのアセンブリから構成される。更に、改変されたDynaMagの蓋が分離で使用され、これは、分離中の最大容量を低容量、例えば、100 mL未満、90 mL未満、80 mL未満、70 mL未満、60 mL未満、50 mL未満、40 mL未満、例えば、約50 mLに制限する。理論に拘束されることを望むものではないが、分離中に使用される低容量は、分離手順中に作用する磁力を最適化し、分離時間を最小化すると考えられている。改変されたDynaMagの蓋は、ビーズ：細胞コンジュゲートが磁石から移動する最大距離も制限し、位置選択中に経験者のために磁力を標準化する。

40

【0339】

一実施形態において、本明細書に記載のキットのバッグの1つ以上は、三角形のバッグである。一実施形態において、選択バッグは三角形のバッグであり、バッグが選択バッグの両端にポートを提供するため、「フロースルー」モードでの磁気分離を可能にする。そのような実施形態において、細胞を磁気要素（例えば、DynaMagなどの磁気プレート）上に連続的に流すことができ、それにより、磁気標識粒子のリアルタイム分離を可能にする一方で、非標識細胞は磁場に引き寄せられず、外向きに流れる。このフロースルー構成により、システムは特に自動化に適するようになる。改変された分離バッグは、追加

50

のポートを収容するための改変された蓋を含む。

【0340】

一実施形態において、選択バッグは三角形のバッグではない。選択バッグが三角形のバッグではない実施形態において、インキュベーション時間は、2時間未満、例えば、110分未満、100分未満、90分未満、80分未満、70分未満、60分未満、50分未満、40分未満、30分未満、25分未満、20分未満、15分未満、10分未満又は5分未満である。

【0341】

ポジティブ選択

実施形態において、本明細書に記載されるポジティブ選択方法は、所望の免疫エフェクター細胞を選択、例えば、濃縮することを含む。一実施形態において、本明細書に記載されるポジティブ選択方法は、CD3+/CD28+細胞を選択することを含む。他の実施形態において、本明細書に記載されるポジティブ選択方法は、CD3+細胞、CD28+細胞、CD4+細胞、CD8+細胞又はCD45+細胞の1つ以上を選択することを含む。

10

【0342】

本明細書に記載される選択方法で使用される分離試薬は、磁性又は常磁性メンバー及び抗原結合メンバーを含む。1つの実施形態において、分離試薬は、例えば抗原結合メンバーに（例えば、共有結合的に又は非共有結合的に）カップリングされた磁性又は常磁性特性を有する、ビーズを含む。一実施形態において、抗原結合メンバーは、抗体又はその抗体フラグメントである。一実施形態において、CD3+/CD28+細胞のポジティブ選択で使用される分離試薬は、CD3及び/又はCD28結合メンバー、例えば抗CD3及び/又は抗CD28抗体又は抗体フラグメントに（例えば、共有結合的に又は非共有結合的に）カップリングされたビーズを含む。

20

【0343】

ネガティブ選択

望ましくない細胞、例えば、単球、顆粒球、赤血球、血小板及びB細胞のインプットサンプルをネガティブ選択又は枯渇させ、それにより、得られるアウトプットサンプルを所望の免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞で濃縮するネガティブ選択方法も本明細書に提供される。一実施形態において、本明細書に記載されるネガティブ選択方法は、フロースルー装置、例えば本明細書に記載のフロースルー装置を使用して、流動条件下で実施される。

30

【0344】

一実施形態において、本明細書に記載のネガティブ選択方法は、単球、顆粒球、赤血球、血小板、B細胞又は癌細胞、例えばリンパ芽球の1つ以上のネガティブ選択を含む。

【0345】

単球、顆粒球、赤血球、血小板又はB細胞の1つ以上の枯渇又は除去が望まれる実施形態において、ネガティブ選択方法は、CD19、CD25、CD14又は単球、顆粒球、赤血球、血小板若しくはB細胞によって発現される他の表面マーカー又はタンパク質の1つ以上を発現する細胞を選択する。

40

【0346】

対象が血液癌を有する実施形態において、癌細胞がアフレーシスサンプル中に存在する場合があります、癌細胞の除去が望ましい場合がある。一実施形態において、本明細書に記載のネガティブ選択方法は、CD19+細胞、例えばリンパ芽球をネガティブに選択することを含む。別の実施形態において、本明細書に記載されるネガティブ選択方法は、CD19、CD33、CD123、CLL-1、BCMA、ROR1又はFLT3の1つ以上を発現する癌細胞をネガティブに選択することを含む。

【0347】

本明細書に記載される選択方法で使用される分離試薬は、磁性又は常磁性メンバー及び抗原結合メンバーを含む。1つの実施形態において、分離試薬は、例えば抗原結合メンバ

50

ーに（例えば、共有結合的に又は非共有結合的に）カップリングされた磁性又は常磁性特性を有する、ビーズを含む。一実施形態において、抗原結合メンバーは、抗体又はその抗体フラグメントである。一実施形態において、C D 1 9 + 細胞のネガティブ選択で使用される分離試薬は、C D 1 9 結合メンバー、例えば抗 C D 1 9 抗体又は抗体フラグメントに（例えば、共有結合的に又は非共有結合的に）カップリングされたビーズを含む。一実施形態において、C D 1 4 + 細胞のネガティブ選択で使用される分離試薬は、C D 1 4 結合メンバー、例えば抗 C D 1 4 抗体又は抗体フラグメントに（例えば、共有結合的に又は非共有結合的に）カップリングされたビーズを含む。一実施形態において、C D 2 5 + 細胞のネガティブ選択で使用される分離試薬は、C D 2 5 結合メンバー、例えば抗 C D 2 5 抗体又は抗体フラグメントに（例えば、共有結合的に又は非共有結合的に）カップリングされたビーズを含む。

10

【0348】

いくつかの実施形態において、選択方法は、例えばフロースルー装置を使用することによって流動条件下で実施することができる。例示的なフロースルー装置は、2016年12月27日に出願された国際公開第2017/117112号パンフレットの57～86ページに記載されており、これは、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。

【0349】

改善された洗浄工程

アフエレーシス、例えば白血球アフエレーシスの産物の細胞組成は、患者によって大きく異なる。顆粒球（例えば、好中球）の割合が高い白血球アフエレーシス産物は、プロセスBを使用したCAR T細胞製造中の上昇した細胞凝集の例と相関している。理論に拘束されることを望むものではないが、そのような不可逆的な凝集は、利用可能な細胞数を減らし、濃縮プロセス（例えば、ポジティブ選択）を妨害することにより、細胞収率に負の影響を与え、これが細胞数及び純度の全体的な低下をもたらすと考えられている。更に、理論に拘束されることを望むものではないが、細胞の純度及び収率の低下は、後続のプロセスのパフォーマンス（例えば、形質導入効率と増殖）及び最終産物の細胞数及び品質に直接影響する。この正味の結果は、プロセッシングサイクルの最後に用量仕様を満たすことができる製品を製造する能力を低下させる。したがって、理論に拘束されることを望むものではないが、凝集の防止により、細胞の損失を低減し、T細胞の純度を改善することができ、これにより、後続のプロセッシング工程について、より良い質及び量の開始材料を生成でき、全体的に改善された治療製品をもたらすことができると考えられている。

20

30

【0350】

当技術分野における現在の製造プロセス、例えばプロセスBでは、患者の細胞白血球アフエレーシス材料をPlasmatherm (Genesis)で解凍し、CellSaver 5+機器 (Haemonetics)を使用して洗浄した後、その後のリンパ球のフィコール選択のために、「改変培地」と呼ばれるX-VIVO15培地 (Lonzaに基づく細胞増殖培地) 又はリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) などの緩衝等張生理食塩水のいずれかに再懸濁する。改変培地は、実施例2で提供されるプロトコルに従って調製される。しかしながら、実施例2に記載されているように、解凍した細胞を改変培地又はPBS溶液のいずれかに移すと、細胞の凝集を引き起こし得る。

40

【0351】

したがって、凝集を防止するために細胞を洗浄するための改善された方法も本明細書に提供され、これは後続の製造工程、例えば刺激による（例えば、抗C D 3 / C D 2 8 C T S Dynabeads (Thermo Fisher) による）ポジティブ選択と適合する。更に、本明細書に記載の改善された洗浄工程は、例えば解凍された細胞に対して実施されて、細胞内破片、遊離ヘモグロビン及び抗凍結剤を除去し、体積の減少を達成し、その後の密度勾配分離を可能にする。一実施形態において、洗浄工程は、改変培地又はPBS溶液に対する代替の細胞再懸濁緩衝液を用いて行われる。一実施形態において、洗浄工程は、デキストロース及び／又は塩化ナトリウムを含む緩衝液を用いて行われる。一実施形態において、緩衝液は、約5%及び約0.45%の塩化ナトリウム、例えば、D 5

50

1 / 2 NS 培地を含む。一実施形態において、緩衝液は、細胞懸濁液を安定化し、例えば少なくとも30分間、45分間、1時間、1.5時間、2時間、2.5時間、3時間、3.5時間、4時間、4.5時間、5時間、5.5時間又は6時間にわたり、凝集を防止する。

【0352】

一実施形態において、本明細書に記載される改善された洗浄工程は、装置、例えば細胞分離装置、例えば密度勾配遠心分離に使用されるものと同じ装置を使用して実施される。例えば、改善された洗浄工程は、Sepax 2 RM装置 (Biosafe) を使用して実施される。

【0353】

一実施形態において、本明細書に開示される洗浄工程は、新鮮なアフエーシスサンプル又は凍結されていた、例えば解凍された、アフエーシスサンプルに使用することができる。実施形態において、本明細書に開示される洗浄工程は、本明細書に記載の水籤、密度勾配遠心分離又は選択方法のいずれかの前又は後に使用することができる。別の実施形態において、本明細書に開示される洗浄工程は、密度勾配遠心分離工程、例えば、Opti Prep 培地を使用した密度勾配遠心分離後に実施される。

【0354】

改善された製造プロセス

CARを発現するのに適した免疫エフェクター細胞の品質及び収率を、当技術分野で現在使用されている方法よりも大幅に改善する方法が本明細書に提供される。一実施形態において、水籤、密度勾配遠心分離、流動条件下でのポジティブ及びネガティブ選択並びに先の項に記載した改善された洗浄工程は、CARの発現に適した所望の免疫エフェクター細胞を単離又は濃縮するために、互いに又は当技術分野で現在使用されている若しくは本明細書に記載の追加の方法と任意の組み合わせで使用できる。

【0355】

一般に、CARを発現するように操作することができる免疫エフェクター細胞の集団を産生又は濃縮するための方法は、インプットサンプルを提供すること、濃縮工程を実施すること、及び選択工程を実施すること、それにより、CARの発現に適した免疫エフェクター細胞を含むアウトプットサンプルを産生することを含む。CARを発現する免疫エフェクター細胞の集団を作製する方法は、CARを発現するように操作することができる免疫エフェクター細胞の集団を産生又は濃縮するための方法を含み、刺激工程を更に含み、例えば、ここで、細胞は増殖又は存続するように刺激され、CARをコードする核酸の導入を更に含む。CARの刺激及び導入／発現に関する追加の開示は、次項で更に説明される。

【0356】

一実施形態において、インプットサンプルは、対象から得られた新鮮なサンプル、例えば新鮮なアフエーシス、白血球アフエーシス又は全血サンプルである。別の実施形態において、インプットサンプルは凍結サンプルである。インプットサンプルが凍結サンプル、例えば、凍結若しくは凍結保存アフエーシス、白血球アフエーシス又は全血サンプルである実施形態において、方法は、凍結サンプルを解凍するか、又は解凍サンプルを提供することを含む。凍結、例えば凍結保存されたサンプルは、受動的又は能動的手段によって解凍することができる。受動的手段による解凍は、サンプルを解凍すること、例えば、周囲環境の温度に到達すること、例えば、室温に到達すること、又はサンプルが移動又は混合される緩衝液又は溶液の温度に到達することを可能にすることを含む。能動的手段による解凍は、サンプルを解凍する、例えば、受動的手段により解凍した場合よりも速くサンプルを周囲環境の温度にする装置の使用を含む。

【0357】

一実施形態において、濃縮工程は、水籤又は密度勾配遠心分離を実施することを含む。水籤は、当技術分野で公知の水籤条件又は凍結サンプル又は凍結されていたサンプルの水籤のために本明細書に記載の改善された設定を使用して実施することができる。密度勾配

遠心分離は、フィコール又はイオジキサノールを含む媒体、例えば、水中約60%のイオジキサノール、例えば、OptiPrep（商標）を使用して実施することができる。

【0358】

本明細書に記載される方法のいずれかにおいて、選択工程は、ポジティブ選択工程及び／又はネガティブ選択工程を実施することを含む。ポジティブ選択工程は、静止又は流動条件下のいずれかで（例えばaを使用）、例えば分離剤（例えば、抗CD3及び／又は抗CD28抗体にカップリングしたビーズ）を使用して、CD3＋／CD28＋細胞を選択することを含み得る。ネガティブ選択工程は、例えば分離剤（例えば、抗CD19抗体にカップリングしたビーズ）を使用して、CD19＋B細胞又はCD19＋リンパ芽球をネガティブ選択することを含み得る。

10

【0359】

本明細書に記載の方法のいずれかにおいて、洗浄工程は、サンプル回収後、サンプルの解凍後、濃縮工程前、濃縮工程後、選択工程前若しくは選択工程後又はそれらの任意の組み合わせで実施することができる。

【0360】

水簸、密度勾配遠心分離、ポジティブ又はネガティブ選択（例えば、流動条件下）又は改善された洗浄工程の1つ以上を含む、CARを発現するように操作できる免疫エフェクター細胞の集団を産生又は濃縮するための例示的な方法は、更に本明細書に記載される。

【0361】

一実施形態において、CARを発現するように操作することができる免疫エフェクター細胞の集団を産生又は濃縮するための方法は、免疫エフェクター細胞を含む凍結インプットサンプルを提供すること；凍結したインプットサンプルを解凍して、解凍したサンプルを産生すること；インプットサンプルが、任意選択により解凍されたインプットサンプルである、インプットサンプルの水簸を実施することを含む、濃縮工程を実施すること；及び選択工程を実行することであって、選択は、ポジティブ選択、例えばCD3／CD28＋細胞のポジティブ選択又はネガティブ選択、例えばCD19＋、CD25＋又はCD14＋細胞のネガティブ選択である、実行することを含む。

20

【0362】

別の実施形態において、CARを発現するように操作することができる免疫エフェクター細胞の集団を産生又は濃縮するための方法は、免疫エフェクター細胞を含む新鮮又は凍結インプットサンプルを提供すること；及び任意選択により、インプットサンプルが凍結インプットサンプルであり、凍結インプットサンプルを解凍して解凍サンプルを生成すること；イオジキサノール、例えば水中60%イオジキサノールを含み、且つ／又はフィコールより高い密度（例えば1.077g/mL超、例えば約1.32g/mL）を有する培地、例えばOptiPrep培地を使用して密度遠心分離工程を実施することを含む、濃縮工程を実施すること；及び選択工程を実行することであって、選択は、ポジティブ選択、例えばCD3／CD28＋細胞のポジティブ選択又はネガティブ選択、例えばCD19＋、CD25＋又はCD14＋細胞のネガティブ選択である、実行することを含む。

30

【0363】

別の実施形態において、CARを発現するように操作することができる免疫エフェクター細胞の集団を産生又は濃縮するための方法は、免疫エフェクター細胞を含む新鮮又は凍結インプットサンプルを提供すること；水簸又は密度遠心分離を（例えば、フィコール又はOptiPrep培地を使用して）実施することを含む、濃縮工程を実施すること；及び流動条件下で例えばCD3／CD28＋細胞についてポジティブ選択工程を実施することを含む。

40

【0364】

別の実施形態において、CARを発現するように操作することができる免疫エフェクター細胞の集団を産生又は濃縮するための方法は、免疫エフェクター細胞を含む新鮮又は凍結インプットサンプルを提供すること；水簸又は密度遠心分離を（例えば、フィコール又はOptiPrep培地を使用して）実施することを含む、濃縮工程を実施すること；及

50

び流動条件下で例えばC D 1 9 +、C D 2 5 +又はC D 1 4 +細胞についてネガティブ選択工程を実施することを含む。

【0365】

本明細書に記載の方法のいずれかにおいて、洗浄工程は、サンプル回収後、サンプルの解凍後、濃縮工程前、濃縮工程後、選択工程前若しくは選択工程後又はそれらの任意の組み合わせで実施することができる。

【0366】

所望の免疫エフェクター細胞の濃縮を最適化し、製造の成功及び製品品質を確保するために、インプットサンプル又は本明細書に記載の方法の1つ以上の工程後の特性の範囲又は閾値を特定し、次の工程を指示又は決定する、管理限界が定義され得る。実施形態において、管理限界は、インプットサンプルが得られる対象の癌のタイプに応じて異なり得る。例として、A L L又はD L B C Lを有する対象から得られたインプットサンプル中の単球の存在に関する管理限界は、以下の通りである：単球がインプットサンプル、例えば白血球アフェレーシス全血細胞の20%を超える場合、最適な方法は、水簸及び／又は流動条件下でのC D 3 / C D 2 8 ポジティブ選択を含む；又は単球がインプットサンプルの20%未満の場合、インプットサンプルは洗浄され、芽球の含有量に基づいて最適な方法が決定される。別の例において、A L L又はD L B C Lを有する対象から得られたインプットサンプル中の芽球細胞の存在に関する管理限界は、以下の通りである：芽球細胞が、入ってくる白血球アフェレーシスW B Cの20%以上である場合、水簸（単球、顆粒球、細胞破片を除去するため）及び／又は改変されたC D 1 9 ネガティブ選択（芽球を除去するため）又は芽球を枯渇させる他の技術を実施すべきである；又は芽球細胞が、入ってくる白血球アフェレーシスの20%未満である場合、白血球アフェレーシス材料は洗浄され、プロセスは単球の含有量に基づいて決定される。

【0367】

C A Rを発現するのに適した免疫エフェクター細胞を濃縮した後、一実施形態において、免疫エフェクター細胞は、例えば「免疫エフェクター細胞の活性化及び増殖」と題された項に記載されているように、当技術分野で公知の又は本明細書に記載の方法のいずれかを使用して、例えば増殖するように刺激される。

【0368】

C A Rを発現するのに適した免疫エフェクター細胞を濃縮した後、及び任意選択により、本明細書に記載されるような刺激及び／又は増殖後、C A R、例えば本明細書に記載のC A Rをコードする核酸を免疫エフェクター細胞に導入することができる。核酸（例えば、C A Rをコードするもの）を導入する方法は、当技術分野で周知であり、例えば「C A Rをコードする核酸構築物」、「R N Aトランスフェクション」及び「非ウイルス性送達方法」と題された項に記載されているように、本明細書に記載される。

【0369】

免疫エフェクター細胞の供給源

この項では、所望の免疫エフェクター細胞を含むインプットサンプルを取得し、所望の免疫エフェクター細胞、例えばT細胞を分離及びプロセッシングし、望ましくない物質、例えば望ましくない細胞を除去するための追加の方法又は工程を提供する。この項に記載する追加の方法又は工程は、水簸、密度勾配遠心分離、流動条件下での選択又は先の項に記載した改善された洗浄工程のいずれかと組み合わせて使用することができる。

【0370】

細胞の供給源、例えば、T細胞又はナチュラルキラー（NK）細胞は、対象から得ることができる。対象の例は、ヒト、サル、チンパンジー、イヌ、ネコ、マウス、ラット及びそれらのトランスジェニック種を含む。T細胞は、末梢血単核細胞、骨髓、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位からの組織、腹水、胸水、脾臓組織及び腫瘍を含む、多数の供給源から得ることができる。

【0371】

本開示の特定の態様において、免疫エフェクター細胞、例えばT細胞は、当業者に公知

の任意の数の技術及び本明細書に開示される方法のいずれかを使用して、それらの工程の任意の組み合わせで、対象から回収した血液の単位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をアフエレーシスにより得る。アフエレーシス産物は、典型的にはT細胞、単球、顆粒球、B細胞、他の有核白血球を含む、リンパ球、赤血球及び血小板を含む。一態様において、アフエレーシスにより回収した細胞は血漿画分を除去するために洗浄し、任意選択により細胞を続くプロセッシング工程のために適切な緩衝液又は媒体に入れる。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欠き、マグネシウムを欠き得るか、又は全てではないとしても多くの二価カチオンを欠き得る。別の実施形態において、細胞は、本明細書に記載の改善された洗浄工程を使用して洗浄される。

10

【0372】

カルシウム非存在下の初期活性化工程は、活性化の増強に至り得る。当業者には容易に認識されるように、洗浄工程は、製造業者の指示に従う、半自動化「フロースルー」遠心分離(例えば、Cobe 2991 cell processor、Baxter Cytomate又はHaemonetics Cell Saver 5)により達成され得る。洗浄後、細胞を、例えば、無Ca、無Mg PBS、PlasmaLyte A又は他の緩衝剤を含む又は含まない食塩水溶液など、多様な生体適合性緩衝液に再懸濁し得る。代わりに、アフエレーシスサンプルの望ましくない要素を除去し、細胞を培養培地に直接再懸濁し得る。

20

【0373】

一態様において、所望の免疫エフェクター細胞、例えばT細胞は、赤血球を溶解し、例えば、PERCOLL(商標)勾配による遠心分離又は向流遠心水簸により単球を枯渇させることにより、末梢血リンパ球から単離する。

【0374】

本明細書に記載の方法は、例えば、本明細書に記載の、例えば、陰性選択技術を使用する、例えば、T制御性細胞枯渇集団、CD25+枯渇細胞である、免疫エフェクター細胞の特異的亜集団、例えば、T細胞の選択を含み得る。いくつかの実施形態において、T制御性枯渇細胞の集団は30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%未満のCD25+細胞を含む。

【0375】

一実施形態において、T制御性細胞、例えば、CD25+T細胞を、抗CD25抗体又はそのフラグメント又はCD25結合リガンド、例えば、IL-2を使用して集団から除去する。一実施形態において、抗CD25抗体又はそのフラグメント又はCD25結合リガンドを、基質、例えば、ビーズにコンジュゲートするか又は他に基質、例えば、ビーズ上に被覆させる。一実施形態において、抗CD25抗体又はそのフラグメントを、本明細書に記載されるような基質にコンジュゲートさせる。

30

【0376】

一実施形態において、T制御性細胞、例えば、CD25+T細胞を、Miltenyi(商標)からのCD25枯渇剤を使用して集団から除去する。一実施形態において、細胞対CD25枯渇剤の比は1e7細胞対20µL又は1e7細胞対15µL又は1e7細胞対10µL又は1e7細胞対5µL又は1e7細胞対2.5µL又は1e7細胞対1.25µLである。一実施形態において、例えば、T制御性細胞、例えば、CD25+枯渇のために、5億細胞/mlを使用する。更なる態様において、6億、7億、8億又は9億細胞/mlの細胞濃度を使用する。

40

【0377】

一実施形態において、枯渇すべき免疫エフェクター細胞の集団は、約 6×10^9 CD25+T細胞を含む。他の態様において、枯渇すべき免疫エフェクター細胞の集団は、約 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ (及びその間の任意の整数値) CD25+T細胞を含む。一実施形態において、得られたT制御性枯渇細胞集団は、 2×10^9 T制御性細胞、例えば、CD25+細胞又はそれ未満(例えば、 1×10^9 、 5×10^8 、 1×10^8 、 5×10^7

50

、 1×10^7 又はそれ未満の CD25+細胞)を含む。

【0378】

一実施形態において、T制御性細胞、例えば、CD25+細胞を、例えば、チュービング162-01など、枯渇チュービングセットと共にCliniMAC系を使用して集団から除去する。一実施形態において、CliniMAC系を、例えば、DEPLETION2.1などの枯渇設定において動かす。

【0379】

特定の理論に拘束されることを望むものではないが、アフェレーシス前又はCAR発現細胞産物の製造中の対象における免疫細胞の負のレギュレーターのレベルの減少(例えば、望まない免疫細胞、例えば、T_{REG}細胞の数の減少)は、対象の再発リスクを有意に減少させる。例えば、T_{REG}細胞を枯渇する方法は当分野で知られる。T_{REG}細胞を減少させる方法は、シクロホスファミド、抗GITR抗体(抗GITR本明細書に記載の抗体)、CD25枯渇、mTOR阻害剤及びそれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない。

【0380】

いくつかの実施形態において、製造法は、CAR発現細胞製造前のT_{REG}細胞の数の減少(例えば、枯渇)を含む。例えば、製造法は、例えば、サンプル、例えば、アフェレーシスサンプルと抗GITR抗体及び／又は抗CD25抗体(又はそのフラグメント又はCD25結合リガンド)を接触させ、CAR発現細胞(例えば、T細胞、NK細胞)産物の製造前にT_{REG}細胞を枯渇させることを含む。

【0381】

特定の理論に拘束されることを望むものではないが、アフェレーシス前又はCAR発現細胞産物の製造中の対象における免疫細胞の負のレギュレーターのレベルの減少(例えば、望まない免疫細胞、例えば、T_{REG}細胞の数の減少)は、対象の再発リスクを減らし得る。一実施形態において、対象は、CAR発現細胞産物製造のための細胞採取前にT_{REG}細胞を減らす1つ以上の治療で前処置されており、それにより対象がCAR発現細胞処置を再び必要とするリスクを軽減する。一実施形態において、T_{REG}細胞を低減する方法は、対象へのシクロホスファミド、抗GITR抗体、CD25枯渇又はこれらの組み合わせの1つ以上の投与を含むが、これらに限定されない。一実施形態において、T_{REG}細胞を低減する方法は、対象へのシクロホスファミド、抗GITR抗体、CD25枯渇、mTOR阻害剤又はこれらの組み合わせの1つ以上の投与を含むが、これらに限定されない。シクロホスファミド、抗GITR抗体、CD25枯渇又はこれらの組み合わせの1つ以上の投与は、CAR発現細胞産物注入前、注入中又は注入後に行い得る。シクロホスファミド、抗GITR抗体、CD25枯渇、mTOR阻害剤又はこれらの組み合わせの1つ以上の投与は、CAR発現細胞産物注入前、注入中又は注入後に行い得る。

【0382】

いくつかの実施形態において、製造法は、CAR発現細胞製造前のT_{REG}細胞の数の減少(例えば、枯渇)を含む。例えば、製造法は、例えば、サンプル、例えば、アフェレーシスサンプルと抗GITR抗体及び／又は抗CD25抗体(又はそのフラグメント又はCD25結合リガンド)を接触させ、CAR発現細胞(例えば、T細胞、NK細胞)産物の製造前にT_{REG}細胞を枯渇させることを含む。

【0383】

一実施形態において、対象は、CAR発現細胞産物製造のための細胞の採取前にシクロホスファミドで前処置され、それにより対象がCAR発現細胞処置(例えば、CTL019処置)を再発するリスクを軽減する。一実施形態において、対象は、CAR発現細胞(例えば、T細胞又はNK細胞)産物製造のための細胞の採取前に抗GITR抗体で前処置され、それにより対象がCAR発現細胞処置を再発するリスクを軽減する。

【0384】

一実施形態において、CAR発現細胞(例えば、T細胞、NK細胞)製造プロセスは、CAR発現細胞(例えば、T細胞、NK細胞)産物(例えば、CTL019産物)の製造

前に T R E G 細胞を枯渇させるように改変される。一実施形態において、C D 2 5 枯渇を使用して、C A R 発現細胞（例えば、T 細胞、N K 細胞）産物（例えば、C T L 0 1 9 産物）の製造前に、T R E G 細胞を枯渇させる。

【0385】

一実施形態において、除去すべき細胞の集団は、制御性 T 細胞又は腫瘍細胞ではなく、C A R T 細胞の増殖及び／又は機能に他に負に影響する細胞、例えば C D 1 4、C D 1 1 b、C D 3 3、C D 1 5 又は潜在的免疫抑制性細胞により発現される他のマーカーを発現する細胞である。一実施形態において、このような細胞は、制御性 T 細胞及び／又は腫瘍細胞と同時に又は前記枯渇後に又は別の順番で除去することが意図される。

【0386】

本明細書に記載の方法は、2 つ以上の選択工程、例えば 2 つ以上の枯渇工程を含み得る。陰性選択による T 細胞集団の濃縮は、例えば、陰性に選択される細胞に独特な表面マーカーを指向する抗体の組み合わせにより達成できる。一つの方法は、陰性に選択される細胞に存在する細胞表面マーカーを指向するモノクローナル抗体のカクテルを使用する陰性磁気免疫粘着又はフローサイトメトリーによる細胞選別及び／又は選択である。例えば、陰性選択により C D 4 + 細胞を富化するために、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 及び C D 8 に対する抗体を含み得る。

【0387】

本明細書に記載の方法は、更に腫瘍抗原、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 又は C D 1 1 b を発現する細胞の集団からの除去を含み、それにより C A R、例えば、本明細書に記載の C A R の発現に適する T 制御性枯渇、例えば、C D 2 5 + 枯渇及び腫瘍抗原枯渇細胞の集団を提供する。一実施形態において、腫瘍抗原発現細胞は、T 制御性、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 抗体又はそのフラグメント及び抗腫瘍抗原抗体又はそのフラグメントを同じ基質、例えば、ビーズに結合でき、これを、細胞の除去に使用でき又は抗 C D 2 5 抗体又はそのフラグメント及び抗腫瘍抗原抗体又はそのフラグメントを別のビーズに結合でき、その混合物を細胞の除去に使用できる。他の実施形態において、T 制御性細胞、例えば、C D 2 5 + 細胞の除去及び腫瘍抗原発現細胞の除去は逐次的であり、例えば、いずれの順番でも生じ得る。

【0388】

チェックポイント阻害剤、例えば、本明細書に記載のチェックポイント阻害剤を発現する細胞、例えば、P D 1 + 細胞、L A G 3 + 細胞及び T I M 3 + 細胞の 1 つ以上の集団からの除去を含み、それにより T 制御性枯渇、例えば、C D 2 5 + 枯渇細胞及びチェックポイント阻害剤枯渇細胞、例えば、P D 1 +、L A G 3 + 及び／又は T I M 3 + 枯渇細胞の集団を提供する方法も提供される。例示的なチェックポイント阻害剤は、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 及び／又は C E A C A M - 5）、L A G 3、V I S T A、B T L A、T I G I T、L A I R 1、C D 1 6 0、2 B 4、C D 8 0、C D 8 6、B 7 - H 3（C D 2 7 6）、B 7 - H 4（V T C N 1）、H V E M（T N F R S F 1 4 又は 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 I I、G A L 9、アデノシン及び T G F（例えば、T G F β ）、例えば本明細書に記載されるようなものを含む。一実施形態において、チェックポイント阻害剤発現細胞は、T 制御性、例えば、C D 2 5 + 細胞と同時に除去される。例えば、抗 C D 2 5 抗体又はそのフラグメント及び抗チェックポイント阻害剤抗体又はそのフラグメントを同じビーズに結合でき、それを細胞の除去に使用でき又は抗 C D 2 5 抗体又はそのフラグメント及び抗チェックポイント阻害剤抗体又はそのフラグメントを別のビーズに結合でき、その混合物を細胞の除去に使用できる。他の実施形態において、T 制御性細胞、例えば、C D 2 5 + 細胞の除去及びチェックポイント阻害剤発現細胞の除去は逐次的であり、例えば、いずれの順序の順番でも生じ得る。

【0389】

本明細書に記載の方法は、陽性選択工程を含み得る。例えば、T細胞を、所望のT細胞の陽性選択に十分な時間、DYNABEADS（登録商標）M-450 CD3/CD28 Tなどの抗CD3/抗CD28（例えば、3x28）コンジュゲートビーズとインキュベーションすることにより単離することができる。一実施形態において、時間は、約30分である。更なる実施形態において、時間は、30分～36時間又はそれより長い範囲及びその間の任意の整数値である。更なる実施形態において、時間は、少なくとも1時間、2時間、3時間、4時間、5時間又は6時間である。更に別の実施形態において、時間は、10～24時間、例えば、24時間である。腫瘍組織又は免疫不全状態個体から腫瘍浸潤性リンパ球（TIL）を単離するような、他の細胞型と比較してT細胞が少ないあらゆる状況において、T細胞を単離するために長いインキュベーション時間が使用され得る。更に、長いインキュベーション時間の使用は、CD8+T細胞の捕獲効率を高め得る。そのため、単にT細胞をCD3/CD28ビーズと結合させる時間を短くする又は長くする及び/又はビーズ対T細胞比を増加又は減少させる（更に本明細書に記載の通り）ことにより、T細胞の亜集団が、培養開始時又は工程中の他の時点で優先的に選択される。更に、ビーズ又は他の表面上の抗CD3及び/又は抗CD28抗体比を増加又は減少させることにより、T細胞の亜集団が、培養開始時又は工程中の他の所望の時点で優先的に選択される。

10

【0390】

一実施形態において、T細胞IFN- γ 、TNF α 、IL-17A、IL-2、IL-3、IL-4、GM-CSF、IL-10、IL-13、グランザイムB及びパーフォリン又は他の適切な分子、例えば、他のサイトカインの1つ以上を発現するT細胞集団を選択できる。細胞発現についてスクリーニングする方法は、例えば、国際公開第2013/126712号パンフレットに記載する方法により決定できる。

20

【0391】

陽性又は陰性選択により所望の細胞の集団を単離するために、細胞及び表面（例えば、ビーズなどの粒子）の濃度は変わり得る。特定の態様において、細胞とビーズの最大接触を確実にするために、ビーズと細胞と一緒に混合する体積を有意に低下させる（例えば、細胞濃度を増加させる）ことが望まれ得る。例えば、一態様において、100億細胞/ml、90億/ml、80億/ml、70億/ml、60億/ml又は50億/mlの濃度が使用される。一態様において、10億細胞/mlの濃度が使用される。更なる態様において、細胞の7500万、8000万、8500万、9000万、9500万又は1億細胞/mlの濃度が使用される。更なる態様において、1億2500万又は1億5000万細胞/mlの濃度を使用できる。

30

【0392】

高濃度を使用して、細胞収率、細胞活性化及び細胞増殖を増加できる。更に、高細胞濃度の使用は、CD28陰性T細胞などの目的の標的抗原を弱く発現し得る細胞の又は多くの腫瘍細胞が存在するサンプル（例えば、白血病性血液、腫瘍組織など）からのより効率的な捕獲を可能にする。このような細胞集団は、治療的価値を有しており、取得することが望ましい。例えば、高濃度細胞の使用は、通常CD28発現が弱いCD8+T細胞のより効率的な選択を可能にする。

40

【0393】

関連する態様において、低濃度の細胞を使用することが望ましいことがある。T細胞と表面（例えば、ビーズなどの粒子）の混合物を有意に希釈することにより、粒子と細胞の相互作用が最小化される。これは、粒子に結合する所望の抗原を高量で発現する細胞で選択する。例えば、CD4+T細胞は、高レベルのCD28を発現し、希釈濃度でCD8+T細胞より効率的に捕獲される。一態様において、使用する細胞の濃度は 5×10^6 /mlである。他の態様において、使用する濃度は約 1×10^5 /ml～ 1×10^6 /ml及びその間の任意の整数値であり得る。

【0394】

他の態様において、細胞を、種々の長さの時間、種々の速度で、2～10℃又は室温で

50

、ローテータでインキュベートし得る。

【0395】

一実施形態において、集団の複数の免疫エフェクター細胞は、ジアグリセロールキナーゼ（DGK）を発現せず、例えば、DGK欠損性である。一実施形態において、集団の複数の免疫エフェクター細胞は、Ikarosを発現せず、例えば、Ikaros欠損性である。一実施形態において、集団の複数の免疫エフェクター細胞は、DGK及びIkarosを発現せず、例えば、DGK及びIkaros両方の欠損性である。

【0396】

刺激のためのT細胞はまた、洗浄工程後に凍結させ得る。理論に縛られることを望まないが、凍結と続く解凍工程は、細胞集団から顆粒球及びある程度単球を除去することにより、より均一な産物を提供する。血漿及び血小板を除去する洗浄工程後、細胞を凍結溶液に懸濁し得る。多くの凍結溶液及びパラメーターが当分野で知られ、これに関連して有用であるが、ある方法は、20% DMSO及び8% ヒト血清アルブミンを含むPBS又は10% Dextran 40及び5% デキストロース、20% ヒト血清アルブミン及び7.5% DMSO又は31.25% Plasmalyte-A、31.25% デキストロース5%、0.45% NaCl、10% Dextran 40及び5% デキストロース、20% ヒト血清アルブミン及び7.5% DMSOを含む培養培地又は例えば、Hespan及びPlasmaLyte Aを含む他の適当な細胞凍結媒体を使用し、次いで細胞を1°/分の速度で-80℃に凍結し、気相の液体窒素貯蔵タンクに保存する。制御凍結の他の方法並びに直ちに-20℃又は液体窒素の非制御凍結も使用できる。

【0397】

特定の態様において、凍結保存細胞を本明細書に記載されるように解凍し、洗浄し、本発明の方法を使用する活性化前に室温で1時間休息させる。

【0398】

本発明に関連して、本明細書に記載されるような増殖細胞が必要となり得る時点前の期間における、対象からの血液サンプル又はアフレーシス産物の採取も企図されている。したがって、増殖する細胞の供給源は、必要な任意の時点で採取でき、T細胞などの所望の細胞は、本明細書に記載のものなど、免疫エフェクター細胞治療からの利益があるであろう任意の数の疾患及び状態について、免疫エフェクター細胞治療におけるその後の使用のために単離及び凍結され得る。一態様において、血液サンプル又はアフレーシスを、一般に健常対象から採取する。一態様において、血液サンプル又はアフレーシスを、一般に、疾患を発症するリスクにあるが、まだ疾患を発症していない健常対象から採取し、目的の細胞をその後の使用のために単離及び凍結する。特定の態様において、T細胞は、増殖され、凍結され、後に使用され得る。特定の態様において、サンプルを、本明細書に記載されるような特定の疾患の診断の直後に、しかし、何らかの処置前に患者から採取する。更なる態様において、ナタリズマブ、エファリズマブ、抗ウイルス剤、化学療法剤、放射線、シクロスポリン、アザチオプリン、メトトレキサート、ミコフェノレート及びFK506などの免疫抑制剤、CAMPATH、抗CD3抗体、シトキサン、フルダラビン、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノール酸、ステロイド、FR901228及び照射などの抗体又は他の免疫除去剤による処置を含むが、これらに限定されない、任意の数の関連する処置モダリティー前に対象からの血液サンプル又はアフレーシスから細胞を単離する。

【0399】

本発明の更なる態様において、T細胞を、対象に機能的T細胞を残す処置後、患者から直接得る。この点について、ある癌処置、特に免疫系を損傷させる薬物での処置後、処置の直後、患者が通常その処置から回復するまでの間、得られるT細胞の品質がエクスピボで増殖する能力について最適である又は改善されていることが観察されている。同様に、本明細書に記載の方法を使用するエクスピボ操作後、これらの細胞は、生着及びインビボ増殖増強について好ましい状態であり得る。そのため、本発明に関連して、T細胞、樹状細胞又は造血細胞系統の他の細胞を含む血液細胞をこの回復期に採取することが企図され

る。更に、特定の態様において、可動化（例えば、GM-CSFでの可動化）及びコンディショニングレジメンを使用して、特定の細胞型の再増殖、再循環、再生及び／又は増殖に好都合である条件を、特に、治療後の定められた時間枠中に、対象に形成できる。細胞型の例には、T細胞、B細胞、樹状細胞及び免疫系の他の細胞を含む。

【0400】

一実施形態において、免疫エフェクターCAR分子を発現する細胞、例えば、本明細書に記載のCAR分子は、低い、免疫増強用量のmTOR阻害剤を受けた対象から得る。一実施形態において、CARを発現するように操作される免疫エフェクター細胞の集団、例えば、T細胞を、対象又は対象から採取したPD1陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞のレベル又はPD1陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞／PD1陽性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞の比が少なくとも一過性に増加するように、低い、免疫増強用量のmTOR阻害剤の投薬から十分な時間後又は十分な用量後に採取する。

10

【0401】

他の実施形態において、CARを発現するように操作されている又は操作する免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞の集団を、PD1陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞の数を増やす又はPD1陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞／PD1陽性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞の比を増やす量のmTOR阻害剤と接触させることにより、エクスピボで処理できる。

【0402】

本出願の方法は、5%以下、例えば2%の、ヒトAB血清を含む培養培地条件を利用でき、既知培養培地条件及び組成物、例えばSmith et al., “Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement” Clinical & Translational Immunology (2015) 4, e31; doi:10.1038/cti.2014.31に記載のものをを用いることができることは認識される。

20

【0403】

一実施形態において、適用方法は、無血清培地を含む培地条件を利用することができる。一実施形態において、無血清培地は、Optmizer CTS (LifeTech)、Immunocult XF (Stemcell technologies)、CellGro (CellGenix)、TexMacs (Miltenyi)、Stemline (Sigma)、Xvivo15 (Lonza)、PrimeXV (Irvine Scientific) 又はStemXVivo (RandD systems) である。無血清培地には、LifeTechのICSR (免疫細胞血清代替品) などの血清代替物を添加できる。血清代替物 (例えば、ICSR) のレベルは、例えば最大5%、例えば、約1%、2%、3%、4%又は5%であり得る。

30

【0404】

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 (DGK) 欠損である。DGK欠損細胞は、DGK RNA又はタンパク質を発現しないか又はDGK活性が低下した又は阻害された細胞である。DGK欠損細胞は、DGK発現を低減又は阻止するための遺伝的方法、例えば、RNA干渉剤、例えば、siRNA、shRNA、miRNAの投与により生成できる。代わりに、DGK欠損細胞は、本明細書に記載のDGK阻害剤での処置により生成できる。

40

【0405】

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RNA又はタンパク質を発現しないか又はイカロス活性が低下した又は阻害された細胞を含み、イカロス欠損細胞は、イカロス発現を低減又は阻止するための遺伝的方法、例えば、RNA干渉剤、例えば、siRNA、shRNA、miRNAの投与により生成できる。代わりに、イカロス欠損細胞は、イカロス阻害剤、例えば、レナリドマイドでの処

50

置により生成できる。

【0406】

実施形態において、T細胞集団は、DGK欠損及びイカロス欠損であり、例えば、DGK及びイカロスを発現せず又はDGK及びイカロス活性が低下又は阻害されている。このようなDGK及びイカロス欠損細胞は、本明細書に記載の方法のいずれかにより生成できる。

【0407】

一実施形態において、NK細胞を対象から得る。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。

【0408】

同種CAR発現細胞

本明細書に記載の実施形態において、免疫エフェクター細胞は、同種免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞又はNK細胞であり得る。例えば、細胞は、同種T細胞、例えば、機能的T細胞受容体（TCR）及び／又はヒト白血球抗原（HLA）、例えば、HLAクラスI及び／又はHLAクラスIIの発現を欠く同種T細胞である。

【0409】

機能的TCRを欠くT細胞は、例えば、その表面に何ら機能的TCRを発現しないように操作され、機能的TCRを含む1つ以上のサブユニットを発現しないように操作され（例えば、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、TCR ϵ 及び／又はTCR ζ の発現がない（又は発現の減少を示す）ように操作される）又はその表面に微少の機能的TCRを産生するように操作され得る。代わりに、T細胞は、例えば、TCRのサブユニットの1つ以上の変異した又は切断型の発現により、実質的に障害されたTCRを発現する。用語「実質的に障害されたTCR」は、このTCRが、宿主で有害な免疫反応を惹起しないことを意味する。

【0410】

本明細書に記載のT細胞は、例えば、その表面に機能的HLAを発現しないように操作され得る。例えば、本明細書に記載のT細胞は、細胞表面発現HLA、例えば、HLAクラスI及び／又はHLAクラスIIが下方制御されるように操作され得る。いくつかの実施形態において、HLAの下方制御は、 β -2ミクログロブリン（B2M）の発現の減少又は排除を伴い得る。

【0411】

いくつかの実施形態において、T細胞は、機能的TCR及び機能的HLA、例えば、HLAクラスI及び／又はHLAクラスIIを欠き得る。

【0412】

機能的TCR及び／又はHLAの発現を欠く修飾T細胞は、TCR又はHLAの1つ以上のサブユニットのノックアウト又はノックダウンを含む、任意の適当な手段により得ることができる。例えば、T細胞は、siRNA、shRNA、群生性等間隔短回文反復配列（CRISPR）転写アクティベーター様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）又は亜鉛フィンガーエンドヌクレアーゼ（ZFN）を使用して、TCR及び／又はHLAのノックダウンを含み得る。

【0413】

いくつかの実施形態において、同種細胞は、例えば、本明細書に記載の方法のいずれかにより、阻害性分子を発現しない又は低レベルで発現する細胞であり得る。例えば、細胞は、例えば、CAR発現細胞が免疫エフェクター応答を開始する能力を低下できる、阻害分子を発現しない又は阻害分子を低レベルで発現する細胞であり得る。阻害分子の例は、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM（例えば、CEACAM-1、CEACAM-3及び／又はCEACAM-5）、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3（CD276）、B7-H4（VTCN1）、HVEM（TNFRSF14又はCD270）、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノ

10

20

30

40

50

シン及びTGF（例えば、TGF β ）を含む。DNA、RNA又はタンパク質レベルでの阻害による、阻害分子の阻害はCAR発現細胞性能を最適化できる。実施形態において、例えば、本明細書に記載されるような、阻害性核酸、例えば、阻害性核酸、例えば、dsRNA、例えば、siRNA又はshRNA、群生性等間隔短回文反復配列（CRISPR）、転写アクティベーター様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）又は亜鉛フィンガーエンドヌクレアーゼ（ZFN）を使用できる。

【0414】

TCR又はHLAを阻害するためのsiRNA及びshRNA

いくつかの実施形態において、TCR発現及び／又はHLA発現を、細胞、例えば、T細胞における、TCR及び／又はHLA及び／又は本明細書に記載の阻害分子（例えば、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM（例えば、CEACAM-1、CEACAM-3及び／又はCEACAM-5）、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3（CD276）、B7-H4（VTCN1）、HVEM（TNFRSF14又はCD270）、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシン及びTGF β ）をコードする核酸を標的とするsiRNA又はshRNAを使用して、阻害できる。

【0415】

siRNA及びshRNAの発現系及び例示的なshRNAは、例えば、2015年3月13日に出願された国際公開第2015/142675号パンフレットの段落649及び650に記載され、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0416】

TCR又はHLAを阻害するためのCRISPR

本明細書で使用する「CRISPR」又は「TCR及び／又はHLAに対するCRISPR」又は「TCR及び／又はHLAを阻害するためのCRISPR」は、一連の群生性等間隔短回文反復配列又はこのような一連の反復を含む系を指す。本明細書で使用する「Cas」は、CRISPR関連タンパク質を指す。「CRISPR/Cas」系は、細胞、例えば、T細胞における、TCR及び／又はHLA遺伝子及び／又は本明細書に記載の阻害分子（例えば、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM（例えば、CEACAM-1、CEACAM-3及び／又はCEACAM-5）、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3（CD276）、B7-H4（VTCN1）、HVEM（TNFRSF14又はCD270）、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシン及びTGF β ）の発現抑制又は変異に使用できる、CRISPR及びCas由来の系を指す。

【0417】

CRISPR/Casシステム及びその使用は、例えば、2015年3月13日に出願された国際公開第2015/142675号パンフレットの段落651～658に記載され、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0418】

TCR及び／又はHLAを阻害するためのTALEN

「TALEN」又は「HLA及び／又はTCRに対するTALEN」又は「HLA及び／又はTCRを阻害するためのTALEN」は、細胞、例えば、T細胞における、HLA及び／又はTCR遺伝子及び／又は本明細書に記載の阻害分子（例えば、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM（例えば、CEACAM-1、CEACAM-3及び／又はCEACAM-5）、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3（CD276）、B7-H4（VTCN1）、HVEM（TNFRSF14又はCD270）、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシン及びTGF β ）の編集に使用できる人工ヌクレアーゼである、転写アクティベーター様エフェクター

10

20

30

40

50

ヌクレアーゼを指す。

【0419】

TALEN及びその使用は、例えば、2015年3月13日に出願された国際公開第2015/142675号パンフレットの段落659～665に記載され、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0420】

HLA及び／又はTCRを阻害するための亜鉛フィンガーヌクレアーゼ

「ZFN」又は「亜鉛フィンガーヌクレアーゼ」又は「HLA及び／又はTCRに対するZFN」又は「HLA及び／又はTCRを阻害するためのZFN」は、細胞、例えば、T細胞における、HLA及び／又はTCR遺伝子及び／又は本明細書に記載の阻害分子（例えば、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM（例えば、CEACAM-1、CEACAM-3及び／又はCEACAM-5）、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3（CD276）、B7-H4（VTCN1）、HVEM（TNFRSF14又はCD270）、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシン及びTGFβ）の編集に使用できる人工ヌクレアーゼである、亜鉛フィンガーヌクレアーゼを指す。

【0421】

ZFN及びその使用は、例えば、2015年3月13日に出願された国際公開第2015/142675号パンフレットの段落666～671に記載され、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0422】

テロメラーゼ発現

テロメアは、体細胞の持続に重要な役割を果たし、その長さはテロメラーゼ（TERT）によって維持される。CLL細胞のテロメア長は非常に短い可能性があり（Roth et al., “Significantly shorter telomeres in T-cells of patients with ZAP-70+/CD38 chronic lymphocytic leukaemia” British Journal of Haematology, 143, 383-386., 2008年8月28日）、製造されたCAR発現細胞、例えばCART19細胞では、更に短くなる可能性があり、患者への養子移入後にそれが増殖する可能性を制限する。テロメラーゼの発現は、CAR発現細胞を複製疲弊から救済することができる。

【0423】

何らかの特定の理論に縛られることを望まないが、いくつかの実施形態において、治療的T細胞は、T細胞における短縮されたテロメアのために、患者における残留性が短く、したがって、テロメラーゼ遺伝子を用いるトランスフェクションは、T細胞のテロメアを延長し、患者におけるT細胞の残留性を改善し得る。Carl June, “Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic”, Journal of Clinical Investigation, 117:1466-1476 (2007)を参照されたい。そのため、一実施形態において、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞、異所性にテロメラーゼサブユニットを、例えば、テロメラーゼの触媒的サブユニット、例えば、TERT、例えば、hTERT発現する。いくつかの態様において、本開示は、細胞とテロメラーゼサブユニット、例えば、テロメラーゼの触媒的サブユニット、例えば、TERT、例えば、hTERTをコードする核酸を接触させることを含む、CAR発現細胞を産生する方法を提供する。細胞を、CARをコードする構築物と接触させる前に、同時に又は後に核酸と接触させ得る。

【0424】

テロメラーゼの発現は安定しているか（例えば、核酸が細胞のゲノムに組み込まれ得る）、又は一過性である（例えば、核酸が組み込まれず、一定の時間、例えば数日後に発現が低下する）可能性がある。安定した発現は、テロメラーゼサブユニット及び選択可能な

マーカをコードするDNAで細胞をトランスフェクト又は形質導入し、安定な組み込み体を選択することによって達成され得る。代替的に又は組み合わせて、安定した発現は、例えばCre/Lox又はFLP/FRTシステムを使用した、部位特異的組換えによって達成され得る。

【0425】

一過性の発現は、核酸、例えば、DNA又はmRNAなどのRNAによるトランスフェクション又は形質導入を含み得る。いくつかの実施形態において、一過性のmRNAトランスフェクションは、TERTによる安定したトランスフェクションに関連する場合のある遺伝的不安定性を回避する。外因性テロメラーゼ活性の一過性発現は、例えば、国際公開第2014/130909号パンフレットに記載され、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。実施形態において、テロメラーゼサブユニットのmRNAベースのトランスフェクションは、Moderna Therapeuticsによって商品化されたメッセンジャーRNA Therapeutics (商標) プラットフォームに従って実施される。例えば、方法は、米国特許第8710200号、同第8822663号、同第8680069号、同第8754062号、同第8664194号又は同第8680069号明細書に記載の方法であり得る。

10

【0426】

一実施形態において、hTERTは、GenBank Protein ID AAC51724.1のアミノ酸配列を有する(Meyerson et al., "hEST2, the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization" Cell Volume 90, Issue 4, 22 August 1997, Pages 785-795)。

20

【化 1】

MPRAPRCRAVRSLRSHYREVLPLATFVRRLLGPQGWRLVQRGDP
 AAFRALVAQCLVCVPWDARPPPAAPSFRQVSCLKELVARVLQRLCERCAKNVLAFCFA
 LLDGARGGPPEAFTTSVRSYLPNTVTDALRGSGAWGLLLRRVCGDDVLVHLLARCALFV
 LVAPSCAYQVCGPPLYQLGAATQARPPPHASGPRRRLCCERAWNHSVREACVPLGLPA
 PGARRRGGSASRSLPLPKRPRRGAAPEPERTPVGQGSWAHPGRTRGFSDRGEFCVVSPA
 RPAEEATSLEGALSGTRHSHPSVGRQHAGPPSTSRPPRPWDTPCPPVYAETKHFLYS
 SGDKEQLRPSFLLSSLRPSLTGARRLVETIFLGSRPWMPGTTPRRLPRLPQRYWQMRPL
 FLELLCNHAQCPYGVLLKTHCP LRAAVTPAACVCAREKPPQCSVAAP EEDTDPRRLVQ
 LLRQHSSPWQVYGFVRACLRLVPPGLWGSRHNEERFLRNTKKFISLGKHAKLSLQEL
 TWKMSVRGCACLRRSPGVGCVPAAEHRLREEILAKFLHWLMSVYVVELLSFFYVTET
 TFQKNRLFFYRKSVWSKLQSIGRQHLKRVQLRELSAEVROHREARPALTSRLRFI
 PKPDGLRPIVNM DYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVLNYERARRPGLLGASVIG
 LDDIHRAWRTFVLRVRAQDPPELYFVKVDVTGAYDTIPQDRLTEVLASIIKPQNTYC
 VRRYAVVQKAAHGHVRKAFKSHVSTLTDLQPYMRQFVAHLQETSPLRDAVVIEQSSSL
 NEASSGLEFDVFLRFMCHHAVRINGKSYVQCQGIPQGSILSTLLCSLCYGD MENKLFAG
 IRRDGLLLRLVDDFLLVTPHILTHAKIFLRCLVRGVPEYGCVVNLRKTVVNFPVEDEAL
 GGTA FVQMPAHGLFPWCGLLIDTRILEVQSDYSSYARTSIRASLTFNRGFKAGRNMR
 KLFGVLRKCHSLFLDLQVNSLQTVCTNIYKILLQAYRFHACVLQLPFPHQVWKNPT
 FFLRVISDTASLCYSILKAKNAGMSLGAKGAAGPLPSEAVQWLCHQAFLLIKLTRHRVT
 YVPELGSIRTAQTQLSRKLP GTTLTALEAAANPALPSDFKTI LD

10

20

30

(配列番号108)

【0427】

一実施形態において、hTERTは、配列番号108の配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%同一の配列を有する。一実施形態において、hTERTは、配列番号108の配列を有する。一実施形態において、hTERTは、N末端、C末端又は両方に欠失（例えば、5、10、15、20又は30アミノ酸を超えない）を含む。一実施形態において、hTERTは、N末端、C末端又は両方にトランスジェニックアミノ酸配列（例えば、5、10、15、20又は30アミノ酸を超えない）を含む。

【0428】

40

一実施形態において、hTERTは、GenBank Accession No. AF018167の核酸配列によりコードされる(Meyerson et al., "hEST2, the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization" Cell Volume 90, Issue 4, 22 August 1997, Pages 785-795)。

【化 2】

```
1  caggcagcgt  ggtcctgctg  cgcacgtggg  aagccctggc  cccggccacc  cccgcgatgc
61  cgcgcgctcc  ccgctgccga  gccgtgcgct  ccctgctgcg  cagccactac  cgcgaggtgc
121 tgcgcgtggc  cacgttcgtg  cggcgcctgg  ggcccaggg  ctggcggctg  gtgcagcgcg
181 gggacccggc  ggctttccgc  gcctggtgg  cccagtgcct  ggtgtgcgtg  cctgggacg
241 cccggccgcc  ccccgccgcc  cctccttcc  gccaggtgtc  ctgcctgaag  gagctggtgg
301 cccgagtgtc  gcagaggctg  tgcgagcgcg  gcgcgaagaa  cgtgctggcc  ttcggttcg
361 cgtgctgga  cggggccgc  gggggcccc  ccgaggcctt  caccaccagc  gtgcgcagct
421 acctgcccaa  cccggtgacc  gacgcactgc  gggggagcgg  ggcgtggggg  ctgctgttgc
481 gccgcgtggg  cgacgacgtg  ctggttcacc  tgctggcacg  ctgcgcgctc  tttgtgctgg
```

【化 3】

```

541 tgggtcccag ctggcctac caggtgtgag ggccgcctgt gtaccagctc ggccgtgcca
601 ctcaggcccg gcccgcgcca cagctagtag gaccccgagg ggcgtctggg tgcgaacggg
661 cclggaacca tagcgtcagg gaggcggggg tccccclggg cctgccagcc cggggtgcga
721 ggaggcgcgg gggcagtgcc agccgaagtc tgcgtgtgac caagaggccc aggcgtggcg
781 ctgcccctga gcgggagcgg acgcccgttg ggcaagggtc ctgggcccac cgggcagga
841 cgggtggacc gagtgaacct ggtttctgtg tgggtgcacc tgccagaccc gccgaagaag
901 ccacctcttt ggagggtgag ctctctggca cgcgcacac ccacctatcc gtgggcgcgc
961 agcaccacgc ggccccccca tccacatcgc ggccaccacg tccctgggac agcccttctc
1021 ccccggtgta cgcggagacc aagcacttcc tctactctcc aggcgacaag gaggagctgc
1081 ggccclcttt cctactcagc tctctgagga ccagcctgac tggcgctcgg aggcctctgg
1141 agaccatctt ctctgggttcc aggccttggg tgcagggac tcccgcgagg ttgcccgcgc
1201 tgcccacagg ctaactggca atgcggcccc tgtttctgga cctgcttggg aaccacgcgc
1261 agtgcctcta cggggtgclc ctcaagaagc actgcctgcl gcgagclgag gtcaccccag
1321 cagccggtgt ctgtgcccgg gagaagcccc aggcctctgt ggccgccccg gaggaggagg
1381 acacagaccc cgtgcctctg gtgcagctgc tccgcagca cagcagcccc tggcaggtgt
1441 acggctctct ggcggcctgc ctgcgcgggc lgggtgcccc aggcctclgg ggcctcaggc
1501 acaacgaacg ccgttctctc aggaacacca agaagtctat ctccctgggg aagcatgcca
1561 agctctctct gcaggagctg acgtggaaga tgagcgtgag ggcctgcctg tggctgcgca
1621 ggagcccagg ggttggtctg gtcccgccgc cagagcaccc tctgctgag gagatctctg
1681 ccaagttctt ccaclggclg atgagtgltg acgtcgtcga gctgctcagg tcltctcttt
1741 atgtcacgga gaccacgttt caaaagaaca ggctcttttt ctaccggaag agtgtctgga
1801 gcaagltgca aagcatttga atcagacagc acttgaagag ggtgcagctg cgggagctgt
1861 cgggaagcaga ggtcaggcag catcggaag ccaggcccc cctgctgacg tccagactcc
1921 gcllcalccc caagcclgac ggclgagggc cgalclglaa calggacclac gclgaggag
1981 ccagaacggt ccgcagagaa aagaggcccg agcgtctcac ctgcagggtg aaggcactgt
2041 tcaagclgcl caactacgag cgggcggcgc gcccgccct cctgggcgc tclgtctgg
2101 gctgggacga tatccacagg gcctggcgca cctcgtgct ggcgtgtcgg gccaggacc
2161 cgcgcctgta gctgtacttt gtcaaggtgg atgtgacggg cgcgtacgac accatcccc
2221 aggcagaggt cagggaggtc atgcagcaca tcatcaaac ccagaacacg tactgctgc
2281 gtccgtatgc cgtgggtccag aagggccccc atgggacagt ccgcaaggcc tccaagagcc
2341 acgtctctac cttgacagac ctccagccgt acatgcgaca gttcgtggtt cactgaggg
2401 agaccagccc gctgagggat gccgtcgtca tgcagcagag ctctccctg aatgagcca
2461 gcagtggtct cctgcagctc tctctacgtc tcatgtgcca ccagccgtg cgcctcaggg
2521 gcaagtctta cgtccagtgc caggggctcc cgcagggtcc cactctctcc acgtgctct
2581 gcagcctgtg clacggcgac atggagaaca agctgtllgc ggggallcgg cgggacgggc
2641 tgcctctgag tttgggtggat gatctcttgt tggtagacac tcaactcac cagcgaaaa
2701 ccttctctag gacctgggtc caggtgtgtc ctgagtatgg ctgctggtg aacttgcgga
2761 agacagtggg gaacttccct gtagaagacg aggcctlggg tggcagcgt tttgttcaag
2821 tgccggccca cggcctatcc cctggtgag gcctgctgct ggataccgg accctggagg
2881 lgcagagcga clacccagc lalgcgggga cclccalcag agccagclcc accllcaacc
2941 ggcgttcaaa ggcgtgggag aacatgcgtc gcaactcttt tggggtcttg cgttgaggt
3001 gtcacagcct gtttctggat ttgcaggtga acagcctcca gacgtgtgc accaactct
3061 acaagatcct cctgctgcag gcgtacaggt ttcacgcalt ggtgctgcag ctccatllc
3121 atcagcaagt ttggaagaac cccacatttt tctgcgcgt catctctgac acggcctccc
3181 tctgctactc catcctgaaa gccagaacg cagggtatgc gctgggggac aaggcgcccg
3241 cgggcctctt gccctccgag gccgtgcagt ggcgtgtgca ccaagcatc ctgctcaagc
3301 tgactgcaga ccgtgtcacc tacgtgcacc tctgggggtc actcaggaca gccacagcgc
3361 agctgagctg gaagctccc gggacgacgc tgactgcct ggaggccga gccacccgg
3421 cactgcctc gaacttcaag accalclgg actgalggc acccgccac gccaggccg
3481 agagcagaca ccagcagccc tgtagcgcg ggcctacgt cccaggagg gaggggcggc
3541 ccacaccag gccgcaccc ctgggagctt gaggcctgag tgagtgtttg gccaggcct
3601 gcagtgcgg ctgaaggctg agtgtccggc tgaggcctga gcagtgctc agccaagggc
3661 tgagtgtcca gcacacctgc cgtcttcat tcccacagg ctggcgtctg gctccacccc
3721 agggccagcl tttctcacc aggagcccg cltccactcc ccacatagga atagtccatc
3781 ccagattctg ccattgttca cccctgcgc tgccctctt tgccctccac cccaccatc
3841 cagggtgaga cctgagaag gccctggga gctctggga tttggagtga ccaaggtgt
3901 gccctgtaca caggcgagga cctgcacct ggatgggggt cctgtgggt caaattgggg
3961 ggagggtgtg tgggagttaa atactgaata tatgagtttt tcagttttga aaaaaaaaa
4021 aaaaaaa

```

(配列番号23)

【0 4 2 9】

一実施形態において、h T E R Tは、配列番号23の配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%同一である配列を有する核酸によりコードされる。一実施形態において、h T E R Tは、配列番号23の核酸によりコードされる。

10

20

30

40

50

【0430】

キメラ抗原受容体 (CAR)

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

【0431】

したがって、免疫エフェクター細胞（例えば、本明細書に記載の方法によって得られるもの）は、以下の癌関連抗原（腫瘍抗原）の1つを標的とするCARを含有するように操作することができる：CD19、CD123、CD22、CD30、CD171、CS-1、CLL-1、CD33、EGFRvIII、GD2、GD3、BCMA、Tn Ag、PSMA、ROR1、FLT3、FAP、TAG72、CD38、CD44v6、CEA、EPCAM、B7H3、KIT、IL-13Ra2、メソテリン、IL-11Ra、PSCA、VEGFR2、ルイスY、CD24、PDGFR-β、PRSS21、SSEA-4、CD20、葉酸受容体α、ERBB2 (Her2/neu)、MUC1、EGFR、NCAM、Prostate、PAP、ELF2M、エフリンB2、IGF-I受容体、CAIX、LMP2、gp100、bcr-abl、チロシナーゼ、EphA2、フコシルGM1、sLe、GM3、TGS5、HMWMAA、o-アセチル-GD2、葉酸受容体β、TEM1/CD248、TEM7R、CLDN6、TSHR、GPRC5D、CXORF61、CD97、CD179a、ALK、ポリシアル酸、PLAC1、GloboH、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、GPR20、LY6K、OR51E2、TARP、WT1、NY-ESO-1、LAGE-1a、レグマイン、HPV E6、E7、MAGE-A1、MAGE A1、ETV6-AML、精子タンパク質17、XAGE1、Tie 2、MAD-CT-1、MAD-CT-2、Fos関連抗原1、p53、p53変異体、プロステイン、サバイビン及びテロメラーゼ、PCTA-1/ガレクチン8、MelanA/MART1、Ras変異体、hTERT、肉腫転座切断点、ML-IAP、ERG (TMPRSS2 ETS融合遺伝子)、N 30
A17、PAX3、アンドロゲン受容体、サイクリンB1、MYCN、Rhoc、TRP-2、CYP1B1、BORIS、SART3、PAX5、OY-TES1、LCK、AKAP-4、SSX2、RAGE-1、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、RU1、RU2、腸カルボキシルエステラーゼ及びmut hsp70-2。

【0432】

二特異性CAR

一実施形態において、多特異性抗体分子は二特異性抗体分子である。二特異性抗体は、2以下の抗原に特異性を有する。二特異性抗体分子は、第1のエピトープに対する結合特異性を有する第1の免疫グロブリン可変ドメイン配列及び第2のエピトープに対する結合特異性を有する第2の免疫グロブリン可変ドメイン配列により特徴付けられる。一実施形態において、第1及び第2のエピトープは同じ抗原、例えば、同じタンパク質（又は多量体タンパク質のサブユニット）である。一実施形態において、第1及び第2のエピトープは重複する。一実施形態において、第1及び第2のエピトープは重複しない。一実施形態において、第1及び第2のエピトープは、異なる抗原、例えば、異なるタンパク質（又は多量体タンパク質の異なるサブユニット）にある。一実施形態において、二特異性抗体分子は、第1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及び軽鎖可変ドメイン配列並びに第2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及び軽鎖可変ドメイン配列を含む。一実施形態において、二特異性抗体分子は、第1のエピトープに結合特異性を有する半抗体及び第2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、二特異性抗体分子は、第1のエピトープに結合特異性を有する半抗体又 50

はそのフラグメント及び第2のエピトープに結合特異性を有する半抗体又はそのフラグメントを含む。一実施形態において、二特異性抗体分子は、第1のエピトープに結合特異性を有するs c F v又はそのフラグメント及び第2のエピトープに結合特異性を有するs c F v又はそのフラグメントを含む。

【0433】

特定の実施形態において、抗体分子は、多特異性（例えば、二特異性又は三特異性）抗体分子である。二重特異性又はヘテロ二量体性抗体分子を産生するためのプロトコル及び二重特異性抗体分子の様々な構成は、例えば、2015年3月13日に出版された国際公開第2015/142675号パンフレットの段落455～458に記載されており、その全体が参照により組み込まれる。

【0434】

一態様において、二特異性抗体分子は、第1の免疫グロブリン可変ドメイン配列、例えば、s c F vにより特徴付けられ、これは、CD19に結合特異性を有し、例えば、本明細書に記載されるようなs c F vを含むか、又は本明細書に記載のs c F vからの軽鎖CDR及び／又は重鎖CDR及び第2のエピトープに対する結合特異性を有する第2の免疫グロブリン可変ドメイン配列を異なる抗原に含む。

【0435】

キメラTCR

一態様において、本発明の抗原及び抗原フラグメント（例えば、CD19抗体及びフラグメント）を、キメラTCRを作るために、T細胞受容体（「TCR」）鎖の1つ以上の定常ドメイン、例えば、TCR α 又はTCR β 鎖に移植できる。理論に縛られないが、キメラTCRは、抗原結合によりTCR複合体を経てシグナル伝達すると考えられる。例えば、本明細書に記載するようなs c F vを、TCR鎖、例えば、TCR α 鎖及び／又はTCR β 鎖の定常ドメイン、例えば、少なくとも細胞外定常ドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインの部分に移植できる。別の例として、抗体フラグメント、例えば本明細書に記載されるようなVLドメインを、TCR α 鎖の定常ドメインに移植でき、抗体フラグメント、例えば本明細書に記載されるようなVHドメインを、TCR β 鎖の定常ドメインに移植できる（又は代わりにVLドメインをTCR β 鎖の定常ドメインに移植し得、VHドメインを、TCR α 鎖に移植し得る）。別の例として、抗体又は抗体フラグメントのCDRは、キメラTCRを作るために、TCR α 鎖及び／又は β 鎖に移植され得る。例えば、本明細書に記載のLCDRをTCR α 鎖の可変ドメインに移植し得、本明細書に記載のHCDRをTCR β 鎖の可変ドメインに移植し得るか又はその逆も可能である。このようなキメラTCRは、例えば、当技術分野で公知の方法により産生し得る（例えば、Willemssen 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）。

【0436】

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、小モジュラー免疫医薬品、マキシボディ、プロテインA又はアフィリンを含む。非抗体足場は、細胞上の標的抗原に結合する能力を有する。実施形態において、抗原結合ドメインは、細胞上で発現される天然に存在するタンパク質のポリペプチド又はそのフラグメントである。いくつかの実施形態において、抗原結合ドメインは、非抗体足場を含む。得られるポリペプチドが標的細胞上の標的抗原に特異的に結合する少なくとも1つの結合領域を含む限り、多様な非抗体足場を使用することができる。

【0437】

非抗体足場は、フィブロネクチン（Novartis, MA）、アンキリン（Molecular Partners AG, Zurich、スイス）、ドメイン抗体（Dom

10

20

30

40

50

antis, Ltd.、Cambridge、MA及びAblynx nv、Zwijnaarde、ベルギー）、リポカリン（Pieris Proteolab AG、Freising、ドイツ）、小モジュラー免疫医薬品（Trubion Pharmaceuticals Inc.、Seattle、WA）、マキシボディ（Avidia, Inc.、Mountain View、CA）、プロテインA（Affibody AG、スウェーデン）及びアフィリン（ γ クリスタリン又はユビキチン）（Scil Proteins GmbH、Halle、ドイツ）を含む。

【0438】

一実施形態において、抗原結合ドメインは、標的細胞の表面上の対リガンドに結合する分子の細胞外ドメイン又はその対リガンド結合フラグメントを含む。

10

【0439】

免疫エフェクター細胞は、CARをコードする配列を含む組換えDNA構築物を含むことができ、CARは、腫瘍抗原、例えば本明細書に記載の腫瘍抗原及び細胞内シグナル伝達ドメインに特異的に結合する抗原結合ドメイン（例えば、抗体又は抗体フラグメント、TCR又はTCRフラグメント）を含む。細胞内シグナル伝達ドメインは共刺激性シグナル伝達ドメイン及び／又は一次シグナル伝達ドメイン、例えば、 ζ 鎖を含み得る。他の箇所に記載されるように、本明細書に記載される方法は、細胞（例えば、T制御性枯渇細胞の集団からのもの）を、CAR、例えば、本明細書に記載されるCARをコードする核酸で形質導入することを含み得る。

【0440】

20

具体的な態様において、CARはscFvドメインを含み、scFvの前には、配列番号1に提供されるような任意選択のリーダー配列があり得、後ろには、配列番号2又は配列番号36又は配列番号38に提供されるような任意選択のヒンジ配列、配列番号6に提供されるような膜貫通領域、配列番号7又は配列番号16を含む細胞内シグナル伝達ドメイン及び配列番号9又は配列番号10を含むCD3 ζ 配列があり得、例えば、これらのドメインは、連続しており、同じリーディングフレーム内にあり、単一の融合タンパク質を形成する。

【0441】

一態様において、例示的CAR構築物は、任意選択のリーダー配列（例えば、本明細書に記載されるリーダー配列）、細胞外抗原結合ドメイン（例えば、本明細書に記載される抗原結合ドメイン）、ヒンジ（例えば、本明細書に記載されるヒンジ領域）、膜貫通ドメイン（例えば、本明細書に記載される膜貫通ドメイン）及び細胞内刺激ドメイン（例えば、本明細書に記載される細胞内刺激ドメイン）を含む。一態様において、例示的CAR構築物は、任意選択のリーダー配列（例えば、本明細書に記載されるリーダー配列）、細胞外抗原結合ドメイン（例えば、本明細書に記載される抗原結合ドメイン）、ヒンジ（例えば、本明細書に記載されるヒンジ領域）、膜貫通ドメイン（例えば、本明細書に記載される膜貫通ドメイン）、細胞内共刺激シグナル伝達ドメイン（例えば、本明細書に記載される共刺激シグナル伝達ドメイン）及び／又は細胞内一次シグナル伝達ドメイン（例えば、本明細書に記載される一次シグナル伝達ドメイン）を含む。

30

【0442】

40

例示的なリーダー配列は、配列番号1として提供される。ヒンジ／スペーサー配列の例は、配列番号2又は配列番号36又は配列番号38として提供される。例示的な膜貫通ドメイン配列は、配列番号6として提供される。例示的な4-1BBタンパク質の細胞内シグナル伝達ドメインの配列は、配列番号7として提供される。例示的なCD27の細胞内シグナル伝達ドメインの配列の例は、配列番号16として提供される。例示的なCD3 ζ ドメイン配列は、配列番号9又は配列番号10として提供される。

【0443】

一態様において、免疫エフェクター細胞は、CARをコードする核酸分子を含む組換え核酸構築物を含み、核酸分子は、抗原結合ドメインをコードする核酸配列を含み、この配列は、細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列に連続しており、それと同じリ

50

ーディングフレーム内にある。CARに使用し得る例示的細胞内シグナル伝達ドメインには、限定されないが、例えばCD3-ζ、CD28、4-1BBなどの1つ以上の細胞内シグナル伝達ドメインが含まれる。一部の例では、CARは、CD3-ζ、CD28、CD27、4-1BBなどの任意の組み合わせを含み得る。

【0444】

所望の分子をコードする核酸配列は、標準的な技法を用いて、例えば核酸分子を発現する細胞からのライブラリをスクリーニングすることによるか、それを含むことが知られるベクターから核酸分子を誘導することによるか、又はそれを含む細胞及び組織から直接単離することによるなど、当技術分野において公知の組換え方法を用いて得ることができる。代わりに、目的の核酸はクローニングでなく、むしろ合成的に作製することができる。

10

【0445】

CARをコードする核酸は、例えばレトロウイルス又はレンチウイルスベクター構築物を使用して、免疫エフェクター細胞に導入することができる。

【0446】

CARをコードする核酸は、例えば、細胞に直接トランスフェクトされ得るRNA構築物を使用しても免疫エフェクター細胞に導入され得る。トランスフェクションに使用するためのmRNAの作成方法には、特別に設計したプライマーによるテンプレートのインビトロ転写(IVT)と、続くポリA付加が含まれ、それにより、3'及び5'非翻訳配列(「UTR」)(例えば、本明細書に記載の3'及び/又は5'UTR)、5'キャップ(例えば、本明細書に記載の5'キャップ)及び/又は配列内リボソーム進入部位(IRE S)(例えば、本明細書に記載のIRES)、発現させようとする核酸及びポリAテールを含む構築物、典型的には50~2000塩基長(例えば、実施例に記載されるもの、例えば、配列番号35)が産生される。このように産生されたRNAは、異なる種の細胞において効率的にトランスフェクトされ得る。一実施形態において、テンプレートは、CARの配列を含む。一実施形態において、RNA-CARベクターは、電気穿孔によって細胞、例えばT細胞に、形質導入される。

20

【0447】

抗原結合ドメイン

一態様において、複数の免疫エフェクター細胞、例えばT制御性枯渇細胞の集団は、抗原結合ドメインとも称される標的特異的結合要素を含むCARをコードする核酸を含む。結合要素の選択は、標的細胞の表面を定義するリガンドのタイプ及び数に依存する。例えば、抗原結合ドメインは、特定の病状に関連する標的細胞上の細胞表面マーカーとして作用するリガンドを認識するように選択され得る。したがって、本明細書に記載のCARにおいて抗原結合ドメインのリガンドとして作用し得る細胞表面マーカーの例には、ウイルス、細菌及び寄生虫感染、自己免疫疾患並びに癌細胞に関連するものが含まれる。

30

【0448】

一態様において、抗原結合ドメインを含むCARの一部は、腫瘍抗原、例えば本明細書に記載される腫瘍抗原を標的とする抗原結合ドメインを含む。

【0449】

抗原結合ドメインは、限定されないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、組換え抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体及びその機能性フラグメント、例えば、限定されないが、重鎖可変ドメイン(VH)、軽鎖可変ドメイン(VL)及びラクダ科動物由来ナノボディの可変ドメイン(VHH)などのシングルドメイン抗体及び組換えフィブロネクチンドメイン、T細胞受容体(TCR)又はそのフラグメント、例えば、単鎖TCRなど、抗原結合ドメインとして機能することが当技術分野において公知の代替的足場を含め、抗原に結合する任意のドメインであり得る。一部の例において、抗原結合ドメインは、CARが最終的に使用されることになる同じ種に由来することが有益である。例えば、ヒトでの使用には、CARの抗原結合ドメインが抗体又は抗体フラグメントの抗原結合ドメインにヒト又はヒト化残基を含むことが有益であり得る。

40

【0450】

50

一実施形態において、抗原結合ドメインは、抗CD19抗体又はそのフラグメント、例えばscFvを含む。例えば、抗原結合ドメインは、表1に列挙されている可変重鎖及び可変軽鎖を含む。可変重鎖及び可変軽鎖を連結するリンカー配列は、例えば、本明細書中に記載される任意のリンカー配列であり得るか、又はGSTSGSGKPGSGEGSTKG（配列番号104）であり得る。

【0451】

【表 3】

表1: 抗CD19抗体結合ドメイン

CD19	huscFv1 (配列番号 39)	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRL HSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIKG GGGSGGGSGGGGSGVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQP PGKGLEWIGVIWGSETTYSSSLKSRVTISKDNQVSLKSSVTAADTAVYY CAKHYYYGGSYAMDYWGQGLTVTVSS
CD19	huscFv2 (配列番号 40)	Eivmtqspatlspsgeratlsqrasqdiskylnwyyqqkpgqaprllyhtsrhsgip arfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgggtkleikggggsgggsgg gggsgvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirpppgkglewigviwgse ttyyqsslskrvtiskdnknqvslkssvtaadtavyycahyyyggsyamydwgqgt ltvss
CD19	huscFv3 (配列番号 41)	Qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirpppgkglewigviwgsettyy sslskrvtiskdnknqvslkssvtaadtavyycahyyyggsyamydwgqgtltv ssggggsgggsgggsgggseivmtqspatlspsgeratlsqrasqdiskylnwyyqqkpgq aprllyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfggg tkleik
CD19	huscFv4 (配列番号 42)	Qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirpppgkglewigviwgsettyy qsslskrvtiskdnknqvslkssvtaadtavyycahyyyggsyamydwgqgtltv ssggggsgggsgggsgggseivmtqspatlspsgeratlsqrasqdiskylnwyyqqkpgq aprllyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfggg tkleik
CD19	huscFv5 (配列番号 43)	Eivmtqspatlspsgeratlsqrasqdiskylnwyyqqkpgqaprllyhtsrhsgip arfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgggtkleikggggsgggsgg gggsgggsgvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirpppgkglewigv iwgsettyysslskrvtiskdnknqvslkssvtaadtavyycahyyyggsyamyd wgqgtltvss
CD19	huscFv6 (配列番号 44)	Eivmtqspatlspsgeratlsqrasqdiskylnwyyqqkpgqaprllyhtsrhsgip arfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgggtkleikggggsgggsgg gggsgggsgvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirpppgkglewigv iwgsettyyqsslskrvtiskdnknqvslkssvtaadtavyycahyyyggsyamyd wgqgtltvss
CD19	huscFv7 (配列番号 45)	Qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirpppgkglewigviwgsettyy sslskrvtiskdnknqvslkssvtaadtavyycahyyyggsyamydwgqgtltv ssggggsgggsgggsgggseivmtqspatlspsgeratlsqrasqdiskylnwyyq kpgqaprllyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpy tfgggtkleik
CD19	huscFv8 (配列番号 46)	Qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirpppgkglewigviwgsettyy qsslskrvtiskdnknqvslkssvtaadtavyycahyyyggsyamydwgqgtltv ssggggsgggsgggsgggseivmtqspatlspsgeratlsqrasqdiskylnwyyq kpgqaprllyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpy tfgggtkleik
CD19	huscFv9 (配列番号 47)	Eivmtqspatlspsgeratlsqrasqdiskylnwyyqqkpgqaprllyhtsrhsgip arfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgggtkleikggggsgggsgg gggsgggsgvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirpppgkglewigv iwgsettyynsslskrvtiskdnknqvslkssvtaadtavyycahyyyggsyamyd wgqgtltvss
CD19	Hu scFv10 (配列番号 48)	Qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirpppgkglewigviwgsettyy nsslskrvtiskdnknqvslkssvtaadtavyycahyyyggsyamydwgqgtltv ssggggsgggsgggsgggseivmtqspatlspsgeratlsqrasqdiskylnwyyq kpgqaprllyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpy tfgggtkleik
CD19	Hu scFv11 (配列番号 49)	Eivmtqspatlspsgeratlsqrasqdiskylnwyyqqkpgqaprllyhtsrhsgip arfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgggtkleikggggsgggsgg gggsgvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirpppgkglewigviwgse ttyynsslskrvtiskdnknqvslkssvtaadtavyycahyyyggsyamydwgqgt ltvss
CD19	Hu scFv12 (配列番号 50)	Qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirpppgkglewigviwgsettyy nsslskrvtiskdnknqvslkssvtaadtavyycahyyyggsyamydwgqgtltv ssggggsgggsgggsgggseivmtqspatlspsgeratlsqrasqdiskylnwyyqqkpgq aprllyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfggg tkleik
CD19	muCTL019 (配列番号 51)	DIqmtqtsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnwyyqqkpdgtvkllyhtsrhsgvp srfsfgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgggtkleikggggsgggsgg gggsevklqesgpglvapsqslvtctvsgvslpdygvswirpppgkglewigviwgse ttyynsalksrliikdnksqvflkmnslqtdtdaiyycahyyyggsyamydwgqgt svtvss

10

20

30

40

【表 4】

表2: 追加の抗CD19抗体結合ドメイン

抗体	VH 配列	VL 配列
SSJ25-C1	QVQLLES GAELVRPGSSVKISCKASGYAFSS YWMNWVKRPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNG KFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAV YSCARKTISSVDFYFDYWGGTTVT (配列番号 3)	ELVLTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVA WYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVDPDRFTGSGSG TDFLTITNVQSKDLADYFYFCQYNRYPYTSGGG TKLEIKRRS (配列番号 4)

10

【 0 4 5 3 】

【表 5】

表2A: 追加のマウス抗CD19抗体結合ドメイン及びCAR

mCAR1 scFv	配列番号 124	QVQLLES GAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKRPGQGLEWIGQIYPGDG DTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYSCARKTISSVDFYFDYW GQGTTVTGGSGGGSGGGSGGGSELVLTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNV AWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVDPDRFTGSGSGTDFLTITNVQSKDLADYFCQ YNRYPYTSFFFTKLEIKRRS
mCAR1 全長 - aa		QVQLLES GAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKRPGQGLEWIGQIYPGDG DTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYSCARKTISSVDFYFDYW GQGTTVTGGSGGGSGGGSGGGSELVLTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNV AWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVDPDRFTGSGSGTDFLTITNVQSKDLADYFCQ YNRYPYTSFFFTKLEIKRRSKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPG PSKPFVVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRK HYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTA TKDTYDALHMQALPPR

20

30

【 0 4 5 4 】

【表 6】

mCAR2 scFv	配列番号 125	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHS GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSG SGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGVLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRK GLEWLGVWGSSETTYNSALKSRLTIHKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHY YYGGSYAMDYWGQGSTVTVSSE
mCAR2 CAR-aa		DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHS GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSG SGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGVLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRK GLEWLGVWGSSETTYNSALKSRLTIHKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIY YCAKHYYYGGSYAMDYWGQGSTVTVSSESKYGPPCPPCPMFVVLVVVGGVLACYSL LVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFE EEGGCEL RVKFS RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRL
mCAR2 全長 - aa		DIQMTQTT SSSLASLGDR VTISCRASQD ISKYLNWYQQ KPDGTVKLLI YHTSRLHSGV PSRFSGSGSG TDYSLTISNL EQEDIATYFC QQGNTLPYTF GGGKLEITG STSGSGKPGS GEGSTKGEVK LQESGPGVLA PSQSLSVTCT VSGVSLPDYG VSWIRQPPRK GLEWLGVWGS SETTYNSAL KSRLTIHKDN SKSQVFLKMN SLQTDDTAIY YCAKHYYYGG SYAMDYWGQG TSVTVSSESK YGPPCPPCPM FWVLVVVGGV LACYSLVTV AFIIFWVKRG RKKLLYIFKQ PFMRPVQTTQ EEDGCSCRFE EEGGCEL RV KFSRSADAPA YQQGQNQLYN ELNLGRREEY DVL DKRRGRD PEMGGKPRRK NPQEGLYNEL QDKMAEAYS EIGMKGERRR GKGHDLGLYQG LSTATKDTYD ALHMQALPPR LEGGGEGRGS LLTCGDVEEN PGPRMLLLVT SLLLCELPHP AFLIPRKVC NGIGIGEFKD SLSINATNIK HFKNCTSIG DLHILPVAFR GDSFTHTPPL DPQELDILKT VKEITGFLLI QAWPENRTDL HAFENLEIIR GRTKQHGQFS LAVVSLNITS LGLRSLKEIS DGDVIISGNK NLCYANTINW KKLFGTSGQK TKIISNRGEN SCKATGQVCH ALCSPEGCWG PEPRDCVSCR NVSARGRECV D KCNLEGEPR EFVENSECIQ CHPECLPQAM NITCTGRGPD NCIQCAHYID GPHCVKTCPA GVMGENNTLV WKYADAGHVC HLCHPNCTYG CTGPGLEGCP TNGPKIPSIA TGMVGALLL LVVALGIGLF M

10

20

30

【 0 4 5 5 】

【表 7】

mCAR3 scFv	配列番号 126	DIQMTQTSSLSASLGDRVITISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHS GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIAFYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSG SGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRK GLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQLVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHY YYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSS
mCAR3 全長 - aa		DIQMTQTSSLSASLGDRVITISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHS GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIAFYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSG SGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRK GLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQLVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHY YYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSSAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LPGPSKPFVVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSLHSDYMNMTPRRPGP TRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGL STATKDTYDALHMQALPPR

10

【0456】

いくつかの実施形態において、抗原結合ドメインは、表1に列挙する重鎖結合ドメインアミノ酸配列のいずれかのHC CDR1、HC CDR2及びHC CDR3を含む。実施形態において、抗原結合ドメインは、更にLC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3を含む。実施形態において、抗原結合ドメインは、表1に列挙する軽鎖結合ドメインアミノ酸配列のいずれかのLC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3を含む。

20

【0457】

いくつかの実施形態において、抗原結合ドメインは、表1に記載する軽鎖結合ドメインアミノ酸配列のいずれかのLC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3の1、2又は全て及び表1に記載する重鎖結合ドメインアミノ酸配列のいずれかのHC CDR1、HC CDR2及びHC CDR3の1、2又は全てを含む。

30

【0458】

任意のCD19 CAR、例えば、任意の公知のCD19 CARのCD19抗原結合ドメインは、本開示に従って使用することができる。例えば、LG-740；米国特許第8,399,645号明細書に記載のCD19 CAR；米国特許第7,446,190号明細書；Xu et al., Leuk Lymphoma. 2013 54(2): 255-260 (2012)；Cruz et al., Blood 122(17): 2965-2973 (2013)；Brentjens et al., Blood, 118(18): 4817-4828 (2011)；Kochenderfer et al., Blood 116(20): 4099-102 (2010)；Kochenderfer et al., Blood 122(25): 4129-39 (2013)；及び16th Annu Meet Am Soc Gen Cell Ther (ASGCT) (May 15-18, Salt Lake City) 2013, Abst 10。

40

【0459】

CAR発現細胞を使用して標的とすることができる例示的な標的抗原には、例えば、それぞれ参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第2014/130635号パンフレット、国際公開第2014/130657号パンフレット及び国際公開第2015/090230号パンフレットに記載されるように、とりわけ、CD19、CD123、EGFRvIII、メソテリンが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0460】

50

一実施形態において、CD19に特異的に結合する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 α 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送達される導入遺伝子陽性T細胞と導入遺伝子陰性T細胞の混合物であり得る。

【0461】

他の実施形態において、CAR発現細胞は、ヒトCD19に特異的に結合することができ、例えば、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2014/153270号パンフレットの表3に記載のCAR分子又は抗原結合ドメイン(例えば、ヒト化抗原結合ドメイン)を含み得る。

10

【0462】

他の実施形態において、CAR発現細胞は、CD123に特異的に結合することができ、例えば、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2014/130635号パンフレットの表1～2に記載のCAR分子(例えば、CAR1～CAR8のいずれか)又は抗原結合ドメインを含み得る。

【0463】

ある実施形態において、CAR分子は、本明細書に記載のCD123 CAR、例えば、米国特許出願公開第2014/0322212A1号明細書又は米国特許出願公開第2016/0068601A1号明細書(いずれも参照により本明細書に組み込まれる)に記載されるCD123 CARを含む。実施形態において、CD123 CARは、米国特許出願公開第2014/0322212A1号明細書又は米国特許出願公開第2016/0068601A1号明細書(いずれも参照により本明細書に組み込まれる)に示される、アミノ酸を含むか、又はヌクレオチド配列を有する。

20

【0464】

他の実施形態において、CAR発現細胞は、EGFRvIIIに特異的に結合することができ、例えば、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2014/130657号パンフレットの表2又は配列番号11に記載のCAR分子又は抗原結合ドメインを含み得る。

30

【0465】

一実施形態において、CAR分子は、本明細書に記載されるEGFRvIII CAR分子、例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2014/0322275A1号パンフレットに記載されるEGFRvIII CARを含む。実施形態において、EGFRvIII CARは、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2014/0322275A1に示される、アミノ酸を含むか、又はヌクレオチド配列を有する。

【0466】

他の実施形態において、CAR発現細胞は、メソテリンに特異的に結合することができ、例えば、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2015/090230号パンフレットの表2～3に記載のCAR分子又は抗原結合ドメインを含み得る。

40

【0467】

一実施形態において、CAR分子は、本明細書に記載のメソテリンCAR、例えば、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2015/090230号パンフレットに記載されるメソテリンCARを含む。実施形態において、メソテリンCARは、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2015/090230号パンフレットに示される、アミノ酸を含むか、又はヌクレオチド配列を有する。

【0468】

一実施形態において、CAR分子は、本明細書に記載のBCMA CAR分子、例えば、米国特許出願公開第2016-0046724-A1号明細書に記載されるBCMA

50

CARを含む。実施形態において、BCMA CARは、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2016-0046724-A1号明細書に示される、アミノ酸を含むか、又はヌクレオチド配列を有する。

【0469】

一実施形態において、CAR分子は、本明細書に記載のCLL1 CAR、例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2016/0051651A1号明細書に記載されるCLL1 CARを含む。実施形態において、CLL1 CARは、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2016/0051651A1号明細書に示される、アミノ酸を含むか、又はヌクレオチド配列を有する。

【0470】

一実施形態において、CAR分子は、本明細書に記載のCD33 CAR、例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2016/0096892A1号明細書に記載されるCD33 CARを含む。実施形態において、CD33 CARは、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2016/0096892A1号明細書に示される、アミノ酸を含むか、又はヌクレオチド配列を有する。

【0471】

本明細書に記載の任意の方法又は組成物に従って、ある実施形態において、CAR分子は、本明細書に記載のCD123 CAR、例えば、米国特許出願公開第2014/0322212A1号明細書又は米国特許出願公開第2016/0068601A1号明細書（いずれも参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるCD123 CARを含む。実施形態において、CD123 CARは、米国特許出願公開第2014/0322212A1号明細書又は米国特許出願公開第2016/0068601A1号明細書（いずれも参照により本明細書に組み込まれる）に示される、アミノ酸を含むか、又はヌクレオチド配列を有する。他の実施形態において、CAR分子は、本明細書に記載のCD19 CAR分子、例えば、米国特許出願公開第2015-0283178-A1号明細書に記載されるCD19 CAR分子、例えば、CTL019を含む。実施形態において、CD19 CARは、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2015-0283178-A1号明細書に示される、アミノ酸を含むか、又はヌクレオチド配列を有する。一実施形態において、CAR分子は、本明細書に記載のBCMA CAR分子、例えば、米国特許出願公開第2016-0046724-A1号明細書に記載されるBCMA

CARを含む。実施形態において、BCMA CARは、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2016-0046724-A1号明細書に示される、アミノ酸を含むか、又はヌクレオチド配列を有する。一実施形態において、CAR分子は、本明細書に記載のCLL1 CAR、例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2016/0051651A1号明細書に記載されるCLL1 CARを含む。実施形態において、CLL1 CARは、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2016/0051651A1号明細書に示される、アミノ酸を含むか、又はヌクレオチド配列を有する。一実施形態において、CAR分子は、本明細書に記載のCD33 CAR、例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2016/0096892A1号明細書に記載されるCD33 CARを含む。実施形態において、CD33 CARは、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2016/0096892A1号明細書に示される、アミノ酸を含むか、又はヌクレオチド配列を有する。一実施形態において、CAR分子は、本明細書に記載されるEGFRvIII CAR分子、例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2014/0322275A1号パンフレットに記載されるEGFRvIII CARを含む。実施形態において、EGFRvIII CARは、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2014/0322275A1に示される、アミノ酸を含むか、又はヌクレオチド配列を有する。一実施形態において、CAR分子は、本明細書に記載のメソテリンCAR、例えば、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2015/090230号パンフレットに記載されるメソテリンCARを含む。実施形態において、メソテリンCA

10

20

30

40

50

Rは、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2015/090230号パンフレットに示される、アミノ酸を含むか、又はヌクレオチド配列を有する。

【0472】

例示的なCD19 CARは、例えば、本明細書、例えば本明細書の1つ以上の表に記載されるCD19 CAR又はXu et al. Blood 123. 24 (2014) : 3750-9; Kochenderfer et al. Blood 122. 25 (2013) : 4129-39, Cruz et al. Blood 122. 17 (2013) : 2965-73、NCT00586391、NCT01087294、NCT02456350、NCT00840853、NCT02659943、NCT02650999、NCT02640209、NCT01747486、NCT02546739、NCT02656147、NCT02772198、NCT00709033、NCT02081937、NCT00924326、NCT02735083、NCT02794246、NCT02746952、NCT01593696、NCT02134262、NCT01853631、NCT02443831、NCT02277522、NCT02348216、NCT02614066、NCT02030834、NCT02624258、NCT02625480、NCT02030847、NCT02644655、NCT02349698、NCT02813837、NCT02050347、NCT01683279、NCT02529813、NCT02537977、NCT02799550、NCT02672501、NCT02819583、NCT02028455、NCT01840566、NCT01318317、NCT01864889、NCT02706405、NCT01475058、NCT01430390、NCT02146924、NCT02051257、NCT02431988、NCT01815749、NCT02153580、NCT01865617、NCT02208362、NCT02685670、NCT02535364、NCT02631044、NCT02728882、NCT02735291、NCT01860937、NCT02822326、NCT02737085、NCT02465983、NCT02132624、NCT02782351、NCT01493453、NCT02652910、NCT02247609、NCT01029366、NCT01626495、NCT02721407、NCT01044069、NCT00422383、NCT01680991、NCT02794961又はNCT02456207に記載される抗CD19 CARを含み、それぞれその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0473】

一実施形態において、抗原結合ドメインは、本明細書に記載の抗体からの1つ、2つ、3つ（例えば、3つ全て）の重鎖CDR、HC CDR1、HC CDR2及びHC CDR3（例えば、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2015/142675号パンフレット、米国特許出願公開第2015-0283178-A1号明細書、2016-0046724-A1号明細書、米国特許出願公開第2014/0322212A1号明細書、米国特許出願公開第2016/0068601A1号明細書、米国特許出願公開第2016/0051651A1号明細書、米国特許出願公開第2016/0096892A1号明細書、米国特許出願公開第2014/0322275A1号明細書又は国際公開第2015/090230号パンフレットに記載の抗体）及び／又は本明細書に記載の抗体からの1つ、2つ、3つ（例えば、3つ全て）の軽鎖CDR、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3（例えば、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2015/142675号パンフレット、米国特許出願公開第2015-0283178-A1号明細書、2016-0046724-A1号明細書、米国特許出願公開第2014/0322212A1号明細書、米国特許出願公開第2016/0068601A1号明細書、米国特許出願公開第2016/0051651A1号明細書、米国特許出願公開第2016/0096892A1号明細書、米国特許出願公開第2014/0322275A1号明細書又は国際公開第2015/090230号パンフレットに記載の抗体）を含む。一実施形態において、抗原結合ドメインは、上に列挙した抗体の重鎖可変領域及

び／又は軽鎖可変領域を含む。

【0474】

実施形態において、抗原結合ドメインは、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2015/142675号パンフレット、米国特許出願公開第2015-0283178-A1号明細書、2016-0046724-A1号明細書、米国特許出願公開第2014/0322212A1号明細書、米国特許出願公開第2016/0068601A1号明細書、米国特許出願公開第2016/0051651A1号明細書、米国特許出願公開第2016/0096892A1号明細書、米国特許出願公開第2014/0322275A1号明細書又は国際公開第2015/090230号パンフレットに記載の抗原結合ドメインである。

10

【0475】

実施形態において、抗原結合ドメインはBCMAを標的とし、米国特許出願公開第2016-0046724-A1号明細書に記載されている。

【0476】

実施形態において、抗原結合ドメインはCD19を標的とし、米国特許出願公開第2015-0283178-A1号明細書に記載されている。

【0477】

実施形態において、抗原結合ドメインはCD123を標的とし、米国特許出願公開第2014/0322212A1号明細書、米国特許出願公開第2016/0068601A1号明細書に記載されている。

20

【0478】

実施形態において、抗原結合ドメインはCLL1を標的とし、米国特許出願公開第2016/0051651A1号明細書に記載されている。

【0479】

実施形態において、抗原結合ドメインはCD33を標的とし、米国特許出願公開第2016/0096892A1号明細書に記載されている。

【0480】

CAR発現細胞を使用して標的とすることができる例示的な標的抗原には、例えば、それぞれ参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第2014/153270号パンフレット、国際公開第2014/130635号パンフレット、国際公開第2016/028896号パンフレット、国際公開第2014/130657号パンフレット、国際公開第2016/014576号パンフレット、国際公開第2015/090230号パンフレット、国際公開第2016/014565号パンフレット、国際公開第2016/014535号パンフレット及び国際公開第2016/025880号パンフレットに記載されるように、とりわけ、CD19、CD123、EGFRvIII、CD33、メソテリン、BCMA及びGFR α 4が含まれるが、これらに限定されるものではない。

30

【0481】

他の実施形態において、CAR発現細胞は、ヒト化CD19に特異的に結合することができ、例えば、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2014/153270号パンフレットの表3に記載のCAR分子又は抗原結合ドメイン（例えば、ヒト化抗原結合ドメイン）を含み得る。CD19 CAR分子及び抗原結合ドメインをコードするアミノ酸及びヌクレオチド配列（例えば、1つ、2つ、3つのVH CDR及びKabata又はChothiaによる1つ、2つ、3つのVL CDRを含む）は、国際公開第2014/153270号パンフレットで特定されている。

40

【0482】

他の実施形態において、CAR発現細胞は、CD123に特異的に結合することができ、例えば、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2014/130635号パンフレットの表1～2に記載のCAR分子（例えば、CAR1～CAR8のいずれか）又は抗原結合ドメインを含み得る。CD123 CAR分子及び抗原結合ドメインをコードす

50

るアミノ酸及びヌクレオチド配列（例えば、1つ、2つ、3つのVH CDR及びKabat又はChothiaによる1つ、2つ、3つのVL CDRを含む）は、国際公開第2014/130635号パンフレットで特定されている。

【0483】

他の実施形態において、CAR発現細胞は、CD123に特異的に結合することができ、例えば、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2016/028896号パンフレットの表2、6、及び9に記載のCAR分子（例えば、CAR123-1～CAR123-4及びhzCAR123-1～hzCAR123-32のいずれか）又は抗原結合ドメインを含み得る。CD123 CAR分子及び抗原結合ドメインをコードするアミノ酸及びヌクレオチド配列（例えば、1つ、2つ、3つのVH CDR及びKabat又はChothiaによる1つ、2つ、3つのVL CDRを含む）は、国際公開第2016/028896号パンフレットで特定されている。

10

【0484】

他の実施形態において、CAR発現細胞は、EGFRvIIIに特異的に結合することができ、例えば、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2014/130657号パンフレットの表2又は配列番号11に記載のCAR分子又は抗原結合ドメインを含み得る。EGFRvIII CAR分子及び抗原結合ドメインをコードするアミノ酸及びヌクレオチド配列（例えば、1つ、2つ、3つのVH CDR及びKabat又はChothiaによる1つ、2つ、3つのVL CDRを含む）は、国際公開第2014/130657号パンフレットで特定されている。

20

【0485】

他の実施形態において、CAR発現細胞は、CD33に特異的に結合することができ、例えば、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2016/014576号パンフレットの表2又は9に記載のCAR分子（例えば、CAR33-1～CAR33-9のいずれか）又は抗原結合ドメインを含み得る。CD33 CAR分子及び抗原結合ドメインをコードするアミノ酸及びヌクレオチド配列（例えば、1つ、2つ、3つのVH CDR及びKabat又はChothiaによる1つ、2つ、3つのVL CDRを含む）は、国際公開第2016/014576号パンフレットで特定されている。

【0486】

他の実施形態において、CAR発現細胞は、メソテリンに特異的に結合することができ、例えば、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2015/090230号パンフレットの表2～3に記載のCAR分子又は抗原結合ドメインを含み得る。メソテリンCAR分子及び抗原結合ドメインをコードするアミノ酸及びヌクレオチド配列（例えば、1つ、2つ、3つのVH CDR及びKabat又はChothiaによる1つ、2つ、3つのVL CDRを含む）は、国際公開第2015/090230号パンフレットで特定されている。

30

【0487】

他の実施形態において、CAR発現細胞は、BCMAに特異的に結合することができ、例えば、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2016/014565号パンフレットの表1～16、配列番号271又は配列番号273に記載のCAR分子又は抗原結合ドメインを含み得る。BCMA CAR分子及び抗原結合ドメインをコードするアミノ酸及びヌクレオチド配列（例えば、1つ、2つ、3つのVH CDR及びKabat又はChothiaによる1つ、2つ、3つのVL CDRを含む）は、国際公開第2016/014565号パンフレットで特定されている。

40

【0488】

他の実施形態において、CAR発現細胞は、CLL-1に特異的に結合することができ、例えば、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2016/014535号パンフレットの表2に記載のCAR分子又は抗原結合ドメインを含み得る。CLL-1 CAR分子及び抗原結合ドメインをコードするアミノ酸及びヌクレオチド配列（例えば、1つ、2つ、3つのVH CDR及びKabat又はChothiaによる1つ、2つ、3つ

50

の V L C D R を含む) は、国際公開第 2 0 1 6 / 0 1 4 5 3 5 号パンフレットで特定されている。

【0489】

他の実施形態において、C A R 発現細胞は、G F R A L P H A - 4 に特異的に結合することができ、例えば、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第 2 0 1 6 / 0 2 5 8 8 0 号パンフレットの表 2 に記載の C A R 分子又は抗原結合ドメインを含み得る。G F R A L P H A - 4 C A R 分子及び抗原結合ドメインをコードするアミノ酸及びヌクレオチド配列 (例えば、1 つ、2 つ、3 つの V H C D R 及び K a b a t 又は C h o t h i a による 1 つ、2 つ、3 つの V L C D R を含む) は、国際公開第 2 0 1 6 / 0 2 5 8 8 0 号パンフレットで特定されている。

10

【0490】

一実施形態において、本明細書に記載の C A R 分子のいずれか (例えば、C D 1 9、C D 1 2 3、E G F R v I I I、C D 3 3、メソテリン、B C M A 及び G F R A L P H A - 4 のいずれか) の抗原結合ドメインは、上に列挙した抗原結合ドメインからの 1 つ、2 つ、3 つ (例えば、3 つ全て) の重鎖 C D R、H C C D R 1、H C C D R 2 及び H C C D R 3 並びに / 又は上に列挙した抗体からの 1 つ、2 つ、3 つ (例えば、3 つ全て) の軽鎖 C D R、L C C D R 1、L C C D R 2 及び L C C D R 3 を含む。一実施形態において、抗原結合ドメインは、上に列挙又は記載した抗体の重鎖可変領域及び / 又は軽鎖可変領域を含む。

20

【0491】

一実施形態において、抗原結合ドメインは、上に列挙した抗体からの 1 つ、2 つ、3 つ (例えば、3 つ全て) の重鎖 C D R、H C C D R 1、H C C D R 2 及び H C C D R 3 並びに / 又は上に列挙した抗体からの 1 つ、2 つ、3 つ (例えば、3 つ全て) の軽鎖 C D R、L C C D R 1、L C C D R 2 及び L C C D R 3 を含む。一実施形態において、抗原結合ドメインは、上に列挙又は記載した抗体の重鎖可変領域及び / 又は軽鎖可変領域を含む。

【0492】

いくつかの実施形態において、腫瘍抗原は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる 2 0 1 5 年 3 月 1 3 日出願の国際公開第 2 0 1 5 / 1 4 2 6 7 5 号パンフレットに記載の腫瘍抗原である。いくつかの実施形態において、腫瘍抗原は、C D 1 9 ; C D 1 2 3 ; C D 2 2 ; C D 3 0 ; C D 1 7 1 ; C S - 1 (C D 2 サブセット 1、C R A C C、S L A M F 7、C D 3 1 9、1 9 A 2 4 と称される) ; C 型レクチン様分子 1 (C L L - 1 又は C L E C L 1) ; C D 3 3 ; 上皮増殖因子受容体変異体 I I I (E G F R v I I I) ; ガングリオシド G 2 (G D 2) ; ガングリオシド G D 3 (a N e u 5 A c (2 - 8) a N e u 5 A c (2 - 3) b D G a l p (1 - 4) b D G l c p (1 - 1) C e r) ; T N F 受容体ファミリーメンバー B 細胞成熟 (B C M A) ; T n 抗原 ((T n A g) 又は (G a l N A c α - S e r / T h r)) ; 前立腺特異的膜抗原 (P S M A) ; 受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体 1 (R O R 1) ; F m s 様チロシンキナーゼ 3 (F L T 3) ; 腫瘍関連糖タンパク質 7 2 (T A G 7 2) ; C D 3 8 ; C D 4 4 v 6 ; 癌胎児性抗原 (C E A) ; 上皮細胞接着分子 (E P C A M) ; B 7 H 3 (C D 2 7 6) ; K I T (C D 1 1 7) ; インターロイキン 1 3 受容体サブユニット α 2 (I L - 1 3 R a 2 又は C D 2 1 3 A 2) ; メソテリン ; インターロイキン 1 1 受容体 α (I L - 1 1 R a) ; 前立腺幹細胞抗原 (P S C A) ; プロテアーゼセリン 2 1 (テスティシン又は P R S S 2 1) ; 血管内皮増殖因子受容体 2 (V E G F R 2) ; ルイス (Y) 抗原 ; C D 2 4 ; 血小板由来増殖因子受容体 β (P D G F R - β) ; ステージ特異的胚性抗原 - 4 (S S E A - 4) ; C D 2 0 ; 葉酸受容体 α ; 受容体チロシントタンパク質キナーゼ E R B B 2 (H e r 2 / n e u) ; ムチン 1、細胞表面関連 (M U C 1) ; 上皮増殖因子受容体 (E G F R) ; 神経細胞接着分子 (N C A M) ; プロテアーゼ ; 前立腺酸性ホスファターゼ (P A P) ; 伸長因子 2 変異体 (E L F 2 M) ; エフリン B 2 ; 線維芽細胞活性化タンパク質 α (F A P) ; インスリン様増殖因子 1 受容体 (I G F - I 受容体)、炭酸脱水酵素 I X (C A I X) ;

30

40

50

プロテアソーム（プロソーム、マクロペイン）サブユニット、 β タイプ、9（LMP2）
 ；糖タンパク質100（gp100）；切断点クラスター領域（BCR）及びアベルソン
 マウス白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ1（Ab1）（bcr-ab1）；チロシナーゼ
 ；エフリンA型受容体2（EphA2）；フコシルGM1；シアリルルイス接着分子（s
 Le）；ガングリオシドGM3（aNeu5Ac（2-3）bDGalp（1-4）bD
 Glcp（1-1）Cer）；トランスグルタミナーゼ5（TGS5）；高分子量黒色腫
 関連抗原（HMWMAA）； α -アセチル-GD2ガングリオシド（OAcGD2）；葉
 酸受容体 β ；腫瘍内皮マーカー1（TEM1/CD248）；腫瘍内皮マーカー7関連（
 TEM7R）；クローディン6（CLDN6）；甲状腺刺激ホルモン受容体（TSHR）
 ；Gタンパク質共役受容体クラスCグループ5、メンバーD（GPRC5D）；染色体X
 オープンリーディングフレーム61（CXORF61）；CD97；CD179a；未分
 化リンパ腫キナーゼ（ALK）；ポリシアル酸；胎盤特異的1（PLAC1）；glo
 boHグリコセラミド（GloboH）の六糖部分；乳腺分化抗原（NY-BR-1）；ウ
 ロプラキン2（UPK2）；A型肝炎ウイルス細胞受容体1（HAVCR1）；アドレナ
 リン受容体 β 3（ADRB3）；パネキシン3（PANX3）；Gタンパク質共役受容体
 20（GPR20）；リンパ球抗原6複合体、遺伝子座K9（LY6K）；嗅覚受容体5
 1E2（OR51E2）；TCR γ 代替オープンリーディングフレームタンパク質（TA
 RP）；ウィルムス腫瘍タンパク質（WT1）；癌／精巣抗原1（NY-ESO-1）；
 癌／精巣抗原2（LAGE-1a）；黒色腫関連抗原1（MAGE-A1）；染色体12
 p上に位置するETS転座変異体遺伝子6（ETV6-AML）；精子タンパク質17（
 SPA17）；X抗原ファミリー、メンバー1A（XAGE1）；アンジオポエチン結合
 細胞表面受容体2（Tie2）；黒色腫癌精巣抗原-1（MAD-CT-1）；黒色腫癌
 精巣抗原-2（MAD-CT-2）；Fos関連抗原1；腫瘍タンパク質p53（p53
 ）；p53変異体；プロステイン（prosttein）；生存；テロメラゼ；前立腺癌
 腫瘍抗原-1（PCTA-1又はガレクチン8）、T細胞によって認識される黒色腫抗原
 1（MelanA又はMART1）；ラット肉腫（Ras）変異体；ヒトテロメラゼ逆
 転写酵素（hTERT）；肉腫転座切断点；黒色腫由来アポトーシス阻害剤（ML-IA
 P）；ERG（膜貫通型プロテアーゼ、セリン2（TMPRSS2）ETS融合遺伝子）；
 N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼV（NA17）；ペアードボックスタン
 パク質Pax-3（PAX3）；アンドロゲン受容体；サイクリンB1；v-mycトリ
 骨髄球症ウイルス癌遺伝子神経芽腫由来ホモログ（MYCN）；Rasホモログファミリ
 ーメンバーC（RhoC）；チロシナーゼ関連タンパク質2（TRP-2）；チトクロム
 P450 1B1（CYP1B1）；CCCTC結合因子（ジンクフィンガータンパク質
 ）様（BORIS、すなわちBrother of the Regulator of
 Imprinted Sites）；T細胞により認識される扁平上皮癌抗原3（SA
 RT3）；ペアードボックスタンパク質Pax-5（PAX5）；プロアクロシン結合タ
 ンパク質sp32（OY-TES1）；リンパ球特異的プロテインチロシンキナーゼ（L
 CK）；Aキナーゼアンカータンパク質4（AKAP-4）；滑膜肉腫、X染色体切断点
 2（SSX2）；終末糖化産物受容体（RAGE-1）；腎ユビキタス1（RU1）；腎
 ユビキタス2（RU2）；レグマイン；ヒトパピローマウイルスE6（HPV E6）；
 ヒトパピローマウイルスE7（HPV E7）；腸カルボキシルエステラーゼ；熱ショッ
 クタンパク質70-2変異体（mut hsp70-2）；CD79a；CD79b；C
 D72；白血球関連免疫グロブリン様受容体1（LAIR1）；IgA受容体のFcフラ
 グメント（FCAR又はCD89）；白血球関連免疫グロブリン様受容体サブファミリー
 Aメンバー2（LILRA2）；CD300分子様ファミリーメンバーf（CD300L
 F）；C型レクチンドメインファミリー12メンバーA（CLEC12A）；骨髄間質細胞
 抗原2（BST2）；EGF様モジュール含有ムチン様ホルモン受容体様2（EMR2
 ）；リンパ球抗原75（LY75）；グリピカン3（GPC3）；Fc受容体様5（FC
 RL5）；並びに免疫グロブリンラムダ様ポリペプチド1（IGLL1）の1つ以上から
 選択される。

10

20

30

40

50

【0493】

一実施形態において、抗原結合ドメインは、上に列挙した抗体からの1つ、2つ、3つ（例えば、3つ全て）の重鎖CDR、HC CDR1、HC CDR2及びHC CDR3並びに／又は上に列挙した抗体からの1つ、2つ、3つ（例えば、3つ全て）の軽鎖CDR、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3を含む。一実施形態において、抗原結合ドメインは、上に列挙又は記載した抗体の重鎖可変領域及び／又は軽鎖可変領域を含む。

【0494】

一態様において、抗腫瘍抗原結合ドメインは、フラグメント、例えば、単鎖可変フラグメント（scFv）である。一態様において、本明細書に記載されるような抗癌関連抗原結合ドメインは、Fv、Fab、（Fab'）2又は二機能性（例えば、二特異性）ハイブリッド抗体（例えば、Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105（1987））である。一態様において、本発明の抗体及びそのフラグメントは、野生型又は増強した親和性で本明細書に記載されるような癌関連抗原に結合する。

【0495】

ある例において、scFvsは、当技術分野で公知の方法により製造できる（例えば、Bird et al.,（1988）Science 242:423-426及びHuston et al.,（1988）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883を参照されたい）。ScFv分子は、可動性ポリペプチドリンカーを使用して、VH領域とVL領域を一緒に連結することにより産生できる。scFv分子は、最適長及び／又はアミノ酸組成を有するリンカー（例えば、Ser-Glyリンカー）を含む。リンカー長は、scFvの可変領域がどのように折りたたまれ、相互作用するかに大きく影響し得る。実際、短ポリペプチドリンカーを用いる場合、（例えば、5～10アミノ酸）、鎖内折りたたみは阻止される。鎖内折りたたみは、2可変領域が一体となって機能的エピトープ結合部位を形成させるためにも必要である。リンカー方向及びサイズの例は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Hollinger et al. 1993 Proc Natl Acad. Sci. U. S. A. 90:6444-6448、米国特許出願公開第2005/0100543号、同第2005/0175606号、同第2007/0014794号明細書及び国際公開第2006/020258号パンフレット及び国際公開第2007/024715号パンフレットを参照されたい。

【0496】

scFvは、そのVL領域とVH領域との間に少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50又はそれを超えるアミノ酸残基のリンカーを含み得る。リンカー配列は、あらゆる天然に存在するアミノ酸を含み得る。一実施形態において、リンカー配列は、アミノ酸グリシン及びセリンを含む。別の実施形態において、リンカー配列は、（Gly4Ser）_n（ここで、nは1つ以上の正の整数である）など、一連のグリシン及びセリン反復を含む（配列番号25）。一実施形態において、リンカーは（Gly4Ser）₄（配列番号27）又は（Gly4Ser）₃（配列番号28）であり得る。リンカー長の変動は、活性を維持又は増強し、活性試験において優れた有効性を生じ得る。

【0497】

別の態様において、抗原結合ドメインは、T細胞受容体（「TCR」）又はそのフラグメント、例えば単鎖TCR（scTCR）である。そのようなTCRを作製する方法は当技術分野で公知である。例えば、illemsen RA et al, Gene Therapy 7:1369-1377（2000）；Zhang T et al, Cancer Gene Ther 11:487-496（2004）；Aggen et al, Gene Ther. 19（4）:365-74（2012）（参考文献はその

全体が本明細書に組み込まれる)を参照されたい。例えば、リンカー(例えば、柔軟なペプチド)によって連結されたT細胞クローン由来のV α 及びV β 遺伝子を含むscTCRを操作することができる。このアプローチは、それ自体が細胞内にある癌関連標的にとって非常に有用であるが、そのような抗原(ペプチド)のフラグメントは、MHCによって癌細胞の表面に提示される。

【0498】

追加の例示的な抗原結合ドメイン

一実施形態において、CD22に対する抗原結合ドメインは、例えば、Haso et al., Blood, 121(7):1165-1174(2013); Wayne et al., Clin Cancer Res 16(6):1894-1903(2010); Kato et al., Leuk Res 37(1):83-88(2013); Creative BioMart (creativebiomart.net): MOM-18047-S(P)に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

10

【0499】

一実施形態において、CS-1に対する抗原結合ドメインは、エロツズマブ(BMS)の抗原結合部分、例えば、CDRを含み、例えば、Tai et al., 2008, Blood 112(4):1329-37; Tai et al., 2007, Blood 110(5):1656-63を参照されたい。

20

【0500】

一実施形態において、GD2に対する抗原結合ドメインは、例えば、Mujo et al., Cancer Res. 47(4):1098-1104(1987); Cheung et al., Cancer Res 45(6):2642-2649(1985)、Cheung et al., J Clin Oncol 5(9):1430-1440(1987)、Cheung et al., J Clin Oncol 16(9):3053-3060(1998)、. Handgretinger et al., Cancer Immunol Immunother 35(3):199-204(1992)に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。いくつかの実施形態において、GD2に対する抗原結合ドメインは、mAb 14.18、14G2a、ch14.18、hu14.18、3F8、hu3F8、3G6、8B6、60C3、10B8、ME36.1及び8H9(例えば、国際公開第2012033885号パンフレット、国際公開第2013040371号パンフレット、国際公開第2013192294号パンフレット、国際公開第2013061273号パンフレット、国際公開第2013123061号パンフレット、国際公開第2013074916号パンフレット及び国際公開第201385552号パンフレットを参照されたい)から選択される抗体の抗原結合部分である。いくつかの実施形態において、GD2に対する抗原結合ドメインは、米国特許出願公開第20100150910号明細書又は国際公開第2011160119号パンフレットに記載されている抗体の抗原結合部分である。

30

【0501】

一実施形態において、Tn抗原に対する抗原結合ドメインは、例えば、米国特許第8,440,798号明細書、Brooks et al., PNAS 107(22):10056-10061(2010)及びStone et al., OncoImmunology 1(6):863-873(2012)に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

40

【0502】

一実施形態において、PSMAに対する抗原結合ドメインは、例えば、Parker et al., Protein Expr Purif 89(2):136-145(2013)、米国特許出願公開第20110268656号明細書(J591 ScFv); Frigerio et al., European J Cancer 49(9):2223-2232(2013)(scFvD2B); 国際公開第200612548

50

1号パンフレット (mAb s 3/A12、3/E7及び3/F11)に記載されている抗体及び単鎖抗体フラグメント (scFv A5及びD7)の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

【0503】

一実施形態において、ROR1に対する抗原結合ドメインは、例えば、Hudecek et al., Clin Cancer Res 19(12):3153-3164 (2013); 国際公開第2011159847号パンフレット; 及び米国特許出願公開第20130101607号明細書に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

【0504】

一実施形態において、FLT3に対する抗原結合ドメインは、例えば国際公開第2011076922号パンフレット、米国特許第5777084号明細書、欧州特許第0754230号明細書、米国特許出願公開第20090297529号明細書及びいくつかの市販カタログ抗体 (R&D、ebiosciences、Abcam)に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

10

【0505】

一実施形態において、TAG72に対する抗原結合ドメインは、例えば、Hombach et al., Gastroenterology 113(4):1163-1170 (1997)に記載されている抗体; 及びAbcam ab691の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

20

【0506】

一実施形態において、FAPに対する抗原結合ドメインは、例えば、Ostermann et al., Clinical Cancer Research 14:4584-4592 (2008) (FAP5)、米国特許出願公開第2009/0304718号明細書; シブロットマブ (例えば、Hofheinz et al., Oncology Research and Treatment 26(1), 2003を参照されたい); 及びTran et al., J Exp Med 210(6):1125-1135 (2013)に記載の抗体の抗原結合部分、例えば、CDRを含む。

【0507】

一実施形態において、CD38に対する抗原結合ドメインは、ダラツムマブ (例えば、Groen et al., Blood 116(21):1261-1262 (2010); MOR202 (例えば、米国特許第8,263,746号明細書を参照されたい); 又は米国特許第8,362,211号明細書に記載の抗体の抗原結合部分、例えば、CDRを含む。

30

【0508】

一実施形態において、CD44v6に対する抗原結合ドメインは、例えば、Casucci et al., Blood 122(20):3461-3472 (2013)に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

【0509】

一実施形態において、CEAに対する抗原結合ドメインは、例えば、Chmielewski et al., Gastroenterology 143(4):1095-1107 (2012)に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

40

【0510】

一実施形態において、EPCAMに対する抗原結合ドメインは、MT110、EpCAM-CD3二特異性Ab (例えば、clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00635596を参照されたい); エドレコロマブ; 3622W94; ING-1; 及びアダカツムマブ (MT201)から選択される抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

【0511】

一実施形態において、PRSS21に対する抗原結合ドメインは、米国特許第8,08

50

0, 650号明細書に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

【0512】

一実施形態において、B7H3に対する抗原結合ドメインは、例えば、抗体MGA271 (Macrogenics) の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

【0513】

一実施形態において、KITに対する抗原結合ドメインは、例えば、米国特許第7915391号明細書、米国特許出願公開第20120288506号明細書に記載されている抗体及びいくつかの市販のカatalog抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

【0514】

一実施形態において、IL-13Ra2に対する抗原結合ドメインは、例えば、国際公開第2008/146911号パンフレット、国際公開第2004087758号パンフレット、いくつかの市販Catalog抗体及び国際公開第2004087758号パンフレットに記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

10

【0515】

一実施形態において、CD30に対する抗原結合ドメインは、例えば、米国特許第7090843B1号明細書及び欧州特許第0805871号明細書に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

【0516】

一実施形態において、GD3に対する抗原結合ドメインは、例えば、米国特許第7253263号明細書；米国特許第8,207,308号明細書；米国特許出願公開第20120276046号明細書；欧州特許第1013761号明細書；国際公開第2005035577号パンフレット；及び米国特許第6437098号明細書に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

20

【0517】

一実施形態において、CD171に対する抗原結合ドメインは、例えば、Hong et al., J Immunother 37(2):93-104 (2014)に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

【0518】

一実施形態において、IL-11Raに対する抗原結合ドメインは、Abcam (Catalog番号ab55262) 又はNovus Biologicals (Catalog番号EPR5446) から入手可能な抗体の抗原結合部分、例えば、CDRを含む。別の実施形態において、IL-11Raに対する抗原結合ドメインは、ペプチドである、例えば、Huang et al., Cancer Res 72(1):271-281 (2012)を参照されたい。

30

【0519】

一実施形態において、PSCAに対する抗原結合ドメインは、例えば、Morgenroth et al., Prostate 67(10):1121-1131 (2007) (scFv 7F5)；Nejatollahi et al., J of Oncology 2013 (2013), article ID 839831 (scFv C5-11)；及び米国特許出願公開第20090311181号明細書に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

40

【0520】

一実施形態において、VEGFR2に対する抗原結合ドメインは、例えば、Chinnasamy et al., J Clin Invest 120(11):3953-3968 (2010)に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

【0521】

一実施形態において、ルイスYに対する抗原結合ドメインは、例えば、Kelly et al., Cancer Biother Radiopharm 23(4):411-423 (2008) (hu3S193 Ab(scFvs))；Dolezal et al., Protein Engineering 16(1):47-56 (20

50

03) (NC10 scFv)に記載の抗体の抗原結合部分、例えば、CDRを含む。

【0522】

一実施形態において、CD24に対する抗原結合ドメインは、例えば、Malliar et al., Gastroenterology 143(5):1375-1384 (2012)に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

【0523】

一実施形態において、PDGFR β に対する抗原結合ドメインは、抗体Abcam ab32570の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

【0524】

一実施形態において、SSEA-4に対する抗原結合ドメインは、抗体MC813 (Cell Signaling)又は他の市販の抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

10

【0525】

一実施形態において、CD20に対する抗原結合ドメインは、抗体リツキシマブ、オファツムマブ、オクレリズマブ、ベルツズマブ若しくはGA101の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

【0526】

一実施形態において、葉酸受容体 α に対する抗原結合ドメインは、抗体IMGN853又は米国特許出願公開第20120009181号明細書；米国特許第4851332号明細書、LK26；米国特許第5952484号明細書に記載の抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

20

【0527】

一実施形態において、ERBB2に対する抗原結合ドメイン (Her2/neu) は、抗体トラスツマブ又はベルツズマブの抗原結合部分、例えばCDRを含む。

【0528】

一実施形態において、MUC1に対する抗原結合ドメインは、抗体SAR566658の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

【0529】

一実施形態において、EGFRに対する抗原結合ドメインは、抗体セツキシマブ、パニツムマブ、ザルツムマブ、ニモツズマブ又はマツズマブの抗原結合部分、例えばCDRを含む。

30

【0530】

一実施形態において、NCAMに対する抗原結合ドメインは、抗体クローン2-2B: MAB5324 (EMD Millipore)の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

【0531】

一実施形態において、エフリンB2に対する抗原結合ドメインは、例えば、Abengozar et al., Blood 119(19):4565-4576 (2012)に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

【0532】

一実施形態において、IGF-I受容体に対する抗原結合ドメインは、例えば、米国特許第8344112B2号明細書；欧州特許出願公開第2322550A1号明細書；国際公開第2006/138315号パンフレット又はPCT/米国特許出願公開第2006/022995号明細書に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

40

【0533】

一実施形態において、CAIXに対する抗原結合ドメインは、抗体クローン303123 (R&D Systems)の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

【0534】

一実施形態において、LMP2に対する抗原結合ドメインは、例えば、米国特許第7,410,640号明細書又は米国特許出願公開第20050129701号明細書に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

50

【0535】

一実施形態において、gp100に対する抗原結合ドメインは、抗体HMB45、NK1betab、又は国際公開第2013165940号パンフレット、又は米国特許出願公開第20130295007号明細書に記載の抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

【0536】

一実施形態において、チロシナーゼに対する抗原結合ドメインは、例えば、米国特許第5843674号明細書；又は米国特許出願公開第19950504048号明細書に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

【0537】

一実施形態において、EphA2に対する抗原結合ドメインは、例えば、Yu et al., Mol Ther 22(1):102-111(2014)に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

【0538】

一実施形態において、GD3に対する抗原結合ドメインは、例えば、米国特許第7253263号明細書；米国特許第8,207,308号明細書；米国特許出願公開第20120276046号明細書；欧州特許出願公開第1013761A3号明細書；20120276046；国際公開第2005035577号パンフレット；又は米国特許第6437098号明細書に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

【0539】

一実施形態において、フコシルGM1に対する抗原結合ドメインは、例えば、米国特許出願公開第20100297138号明細書；又は国際公開第2007/067992号パンフレットに記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

【0540】

一実施形態において、sLeに対する抗原結合ドメインは、抗体G193（ルイスYについて）の抗原結合部分、例えばCDRを含む。Scott AM et al, Cancer Res 60:3254-61(2000)を参照されたく、Neeson et al, J Immunol May 2013 190(Meeting Abstract Supplement) 177.10にも記載される。

【0541】

一実施形態において、GM3に対する抗原結合ドメインは、抗体CA2523449（mAb 14F7）の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

【0542】

一実施形態において、HMWMAAに対する抗原結合ドメインは、Kmiecik et al., Oncoimmunology 3(1):e27185(2014)(PMID:24575382)(mAb9.2.27)；米国特許第6528481号明細書；国際公開第2010033866号パンフレット；又は米国特許出願公開第20140004124号明細書に記載の抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

【0543】

一実施形態において、o-アセチル-GD2に対する抗原結合ドメインは、抗体8B6の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

【0544】

一実施形態において、TEM1/CD248に対する抗原結合ドメインは、例えば、Marty et al., Cancer Lett 235(2):298-308(2006)；Zhao et al., J Immunol Methods 363(2):221-232(2011)に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

【0545】

一実施形態において、CLDN6に対する抗原結合ドメインは、抗体IMAB027（Ganymed Pharmaceuticals）の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

10

20

30

40

50

む。例えば、clinicaltrial.gov/show/NCT02054351を参照されたい。

【0546】

一実施形態において、TSHRに対する抗原結合ドメインは、例えば、米国特許第8,603,466号明細書；米国特許第8,501,415号明細書；又は米国特許第8,309,693号明細書に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

【0547】

一実施形態において、GPCR5Dに対する抗原結合ドメインは、抗体FAB6300A (R&D Systems)；又はLS-A4180 (Lifespan Biosciences)の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

10

【0548】

一実施形態において、CD97に対する抗原結合ドメインは、例えば、米国特許第6,846,911号明細書；de Groot et al., J Immunol 183(6):4127-4134(2009)に記載されている抗体；又はR&D:MAB3734からの抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

【0549】

一実施形態において、ALKに対する抗原結合ドメインは、例えば、Minor-Kendudson et al., Clin Cancer Res 16(5):1561-1571(2010)に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

【0550】

一実施形態において、プリシアル酸 (plysialic acid) に対する抗原結合ドメインは、例えば、Nagae et al., J Biol Chem 288(47):33784-33796(2013)に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

20

【0551】

一実施形態において、PLAC1に対する抗原結合ドメインは、例えば、Ghods et al., Biotechnol Appl Biochem 2013 doi:10.1002/bab.1177に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

【0552】

一実施形態において、GloboHに対する抗原結合ドメインは、抗体VK9；又は例えばKudryashov V et al, Glycoconj J. 15(3):243-9(1998)、Lou et al., Proc Natl Acad Sci USA 111(7):2482-2487(2014)；MBr1:Bremer E-G et al. J Biol Chem 259:14773-14777(1984)に記載されている抗体の抗原結合部分を含む。

30

【0553】

一実施形態において、NY-BR-1に対する抗原結合ドメインは、例えば、Jager et al., Appl Immunohistochem Mol Morphol 15(1):77-83(2007)に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

40

【0554】

一実施形態において、WT-1に対する抗原結合ドメインは、例えば、Dao et al., Sci Transl Med 5(176):176ra33(2013)；又は国際公開第2012/135854号パンフレットに記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

【0555】

一実施形態において、MAGE-A1に対する抗原結合ドメインは、例えば、Willemssen et al., J Immunol 174(12):7853-7858(2005)(TCR様scFv)に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDR

50

を含む。

【0556】

一実施形態において、精子タンパク質17に対する抗原結合ドメインは、例えば、Song et al., Target Oncol 2013 Aug 14 (PMID: 23943313); Song et al., Med Oncol 29(4): 2923-2931 (2012)に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

【0557】

一実施形態において、Tie2に対する抗原結合ドメインは、抗体AB33 (Cell Signaling Technology)の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

10

【0558】

一実施形態において、MAD-CT-2に対する抗原結合ドメインは、例えば、PMID: 2450952; 米国特許第7635753号明細書に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

【0559】

一実施形態において、Fos関連抗原1に対する抗原結合ドメインは、抗体12F9 (Novus Biologicals)の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

【0560】

一実施形態において、MelanA/MART1に対する抗原結合ドメインは、欧州特許第2514766A2号明細書; 又は米国特許第7,749,719号明細書に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

20

【0561】

一実施形態において、肉腫転座切断点に対する抗原結合ドメインは、例えば、Luo et al, EMBO Mol. Med. 4(6): 453-461 (2012)に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

【0562】

一実施形態において、TRP-2に対する抗原結合ドメインは、例えば、Wang et al, J Exp Med. 184(6): 2207-16 (1996)に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

【0563】

一実施形態において、CYP1B1に対する抗原結合ドメインは、例えば、Maecker et al, Blood 102(9): 3287-3294 (2003)に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

30

【0564】

一実施形態において、RAGE-1に対する抗原結合ドメインは、抗体MAB5328 (EMD Millipore)の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

【0565】

一実施形態において、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素に対する抗原結合ドメインは、抗体カタログ番号: LS-B95-100 (Lifespan Biosciences)の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

40

【0566】

一実施形態において、腸管カルボキシルエステラーゼに対する抗原結合ドメインは、抗体4F12: カタログ番号: LS-B6190-50 (Lifespan Biosciences)の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

【0567】

一実施形態において、mut hsp70-2に対する抗原結合ドメインは、抗体Lifespan Biosciences: モノクローナル: カタログ番号: LS-C133261-100 (Lifespan Biosciences)の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

【0568】

50

一実施形態において、CD79aに対する抗原結合ドメインは、Abcamから入手可能な抗体抗CD79a抗体 [HM47/A9] (ab3121) ; Cell Signalling Technologyから入手可能な抗体CD79A抗体番号3351 ; 又はSigma Aldrichから入手可能なウサギにおいて産生した抗CD79A抗体である抗体HPA017748の抗原結合部分、例えば、CDRを含む。

【0569】

一実施形態において、CD79bに対する抗原結合ドメインは、抗体ポラツズマブベドチン、Dornan et al., "Therapeutic potential of an anti-CD79b antibody-drug conjugate, anti-CD79b-vc-MMAE, for the treatment of non-Hodgkin lymphoma" Blood. 2009 Sep 24 ; 114 (13) : 2721-9. doi:10.1182/blood-2009-02-205500. Epub 2009 Jul 24に記載の抗CD79b又は"4507 Pre-Clinical Characterization of T Cell-Dependent Bispecific Antibody Anti-CD79b/CD3 As a Potential Therapy for B Cell Malignancies" Abstracts of 56th ASH Annual Meeting and Exposition, San Francisco, CA December 6-9 2014に記載の二特異性抗体抗CD79b/CD3の抗原結合部分、例えば、CDRを含む。

【0570】

一実施形態において、CD72に対する抗原結合ドメインは、Myers及びUckun, "An anti-CD72 immunotoxin against therapy-refractory B-lineage acute lymphoblastic leukemia." Leuk Lymphoma. 1995 Jun; 18 (1-2) : 119-22に記載の抗体J3-109又はPolson et al., "Antibody-Drug Conjugates for the Treatment of Non-Hodgkin's Lymphoma: Target and Linker-Drug Selection" Cancer Res March 15, 2009 69; 2358に記載の抗CD72 (10D6. 8. 1, mIgG1) の抗原結合部分、例えば、CDRを含む。

【0571】

一実施形態において、LAIR1に対する抗原結合ドメインは、ProSpecから入手可能な抗体ANT-301 LAIR1抗体 ; 又はBioLegendから入手可能な抗ヒトCD305 (LAIR1) 抗体の抗原結合部分、例えば、CDRを含む。

【0572】

一実施形態において、FCARに対する抗原結合ドメインは、Sino Biological Inc. から入手可能な抗体CD89/FCAR Antibody (カタログ番号10414-H08H) の抗原結合部分、例えばCDRを含む。

【0573】

一実施形態において、LILRA2に対する抗原結合ドメインは、Abnovaから入手可能な抗体LILRA2モノクローナル抗体 (M17)、クローン3C7又はLife span Biosciencesから入手可能なマウス抗LILRA2抗体、モノクローナル (2D7) の抗原結合部分、例えば、CDRを含む。

【0574】

一実施形態において、CD300LFに対する抗原結合ドメインは、BioLegendから入手可能な抗体マウス抗CMRF35様分子1抗体、モノクローナル [UP-D2] 又はR&D Systemsから入手可能なラット抗CMRF35様分子1抗体、モノクローナル [234903] の抗原結合部分、例えば、CDRを含む。

【0575】

10

20

30

40

50

一実施形態において、CLEC12Aに対する抗原結合ドメインは、抗体二特異性T細胞エンゲージャー（BiTE）scFv抗体及びNoordhuis et al., “Targeting of CLEC12A In Acute Myeloid Leukemia by Antibody-Drug-Conjugates and Bispecific CLL-1xCD3 BiTE Antibody” 53rd ASH Annual Meeting and Exposition, December 10-13, 2011に記載のADC及びMCLA-117（Merus）の抗原結合部分、例えば、CDRを含む。

【0576】

一実施形態において、BST2（CD317とも称される）に対する抗原結合ドメインは、Antibodies-Onlineから入手可能な抗体マウス抗CD317抗体、モノクローナル[3H4]又はR&D Systemsから入手可能なマウス抗CD317抗体、モノクローナル[696739]の抗原結合部分、例えば、CDRを含む。

【0577】

一実施形態において、EMR2（CD312とも称される）に対する抗原結合ドメインは、Lifespan Biosciencesから入手可能な抗体マウス抗CD312抗体、モノクローナル[LS-B8033]又はR&D Systemsから入手可能なマウス抗CD312抗体、モノクローナル[494025]の抗原結合部分、例えば、CDRを含む。

【0578】

一実施形態において、LY75に対する抗原結合ドメインは、EMD Milliporeから入手可能な抗体マウス抗リンパ球抗原75抗体、モノクローナル[HD30]又はLife Technologiesから入手可能なマウス抗リンパ球抗原75抗体、モノクローナル[A15797]の抗原結合部分、例えば、CDRを含む。

【0579】

一実施形態において、GPC3に対する抗原結合ドメインは、Nakano K, Ishiguro T, Konishi H, et al. Generation of a humanized anti-glypican 3 antibody by CDR grafting and stability optimization. Anticancer Drugs. 2010 Nov; 21(10):907-916に記載の抗体hGC33、又はMDX-1414、HN3、又はYP7の抗原結合部分、例えば、CDRを含み、これら3つは全て、Feng et al., “Glypican-3 antibodies: a new therapeutic target for liver cancer.” FEBS Lett. 2014 Jan 21; 588(2):377-82に記載される。

【0580】

一実施形態において、FCRL5に対する抗原結合ドメインは、Elkins et al., “FcRL5 as a target of antibody-drug conjugates for the treatment of multiple myeloma” Mol Cancer Ther. 2012 Oct; 11(10):2222-32に記載の抗FcRL5抗体の抗原結合部分、例えば、CDRを含む。

【0581】

一実施形態において、IGLL1に対する抗原結合ドメインは、Lifespan Biosciencesから入手可能な抗体マウス抗免疫グロブリンラムダ様ポリペプチド1抗体、モノクローナル[AT1G4]、BioLegendから入手可能なマウス抗免疫グロブリンラムダ様ポリペプチド1抗体、モノクローナル[HSL11]の抗原結合部分、例えば、CDRを含む。

【0582】

膜貫通ドメイン

膜貫通ドメインに関して、種々の実施形態において、CARは、CARの細胞外ドメイ

10

20

30

40

50

ンに結合する膜貫通ドメインを含むように設計できる。膜貫通ドメインは、膜貫通領域に隣接した1つ以上の更なるアミノ酸、例えば膜貫通が由来するタンパク質の細胞外領域と関係する1つ以上のアミノ酸（例えば、細胞外領域の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10～最大で15のアミノ酸）及び／又は膜貫通タンパク質が由来するタンパク質の細胞内領域と関係する1つ以上のアミノ酸（例えば、細胞内領域の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10～最大で15のアミノ酸）を含み得る。一態様において、膜貫通ドメインは、CARの他のドメインの1つに関連するものである。ある例において、膜貫通ドメインは、このようなドメインが、同一又は異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインと結合するのを避けるように、例えば受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小化するように選択され又はアミノ酸置換による改変ができる。一態様において、膜貫通ドメインは、CAR発現細胞の細胞表面上の別のCARとホモ二量体化できる。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CARTに存在する天然結合パートナーの結合ドメインとの相互作用を最小化するように改変又は置換され得る。

10

【0583】

膜貫通ドメインは、天然由来又は組換え源由来であり得る。源が天然であるとき、ドメインは、あらゆる膜結合又は膜貫通タンパク質由来であり得る。一態様において、膜貫通ドメインは、CARが標的に結合したときは常に細胞内ドメインにシグナル伝達できる。本発明において特に有用な膜貫通ドメインは、例えば、T細胞受容体の α 、 β 又は ζ 鎖、CD28、CD27、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154の少なくとも膜貫通領域を含み得る。一実施形態において、膜貫通ドメインは、例えば、KIR2DS2、OX40、CD2、CD27、LFA-1（CD11a、CD18）、ICOS（CD278）、4-1BB（CD137）、GITR、CD40、BAFFR、HVEM（LIGHTR）、SLAMF7、NKP80（KLRF1）、NKP44、NKP30、NKP46、CD160、CD19、IL2R β 、IL2R γ 、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）、SELPLG（CD162）、LTBR、PAG/Cbp、NKG2D、NKG2C又はCD19の少なくとも膜貫通領域を含み得る。

20

30

【0584】

ある例において、膜貫通ドメインは、ヒンジ、例えばヒトタンパク質からのヒンジを介して、CARの細胞外領域、例えばCARの抗原結合ドメインに結合できる。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ヒンジ又はCD8aヒンジであり得る。一実施形態において、ヒンジ又はスペーサーは、配列番号2のアミノ酸配列を含む（例えば、これからなる）。一態様において、膜貫通ドメインは、配列番号6の膜貫通ドメインを含む（例えば、これからなる）。

40

【0585】

一態様において、ヒンジ又はスペーサーは、IgG4ヒンジを含む。例えば、一実施形態において、ヒンジ又はスペーサーは、アミノ酸配列

【化 4】

ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGKM

(配列番号36)

のヒンジを含む。いくつかの実施形態において、ヒンジ又はスペーサーは、

【化 5】

GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCCTTGCCCTGCCCCCGAGTTCTGGGCGG
ACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGA
CCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCCGAGGTCCA
GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGG
GAGGAGCAGTTCAATAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCA
GGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCC
AGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGG
TGACACCCTGCCCCCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAC
CTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAC
GGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCA
GCTTCTTCCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAGGGCAA
CGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGA
GCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATG (配列番号37)

のヌクレオチド配列によりコードされたヒンジを含む。

【0586】

一態様において、ヒンジ又はスペーサーは、IgDヒンジを含む。例えば、一実施形態において、ヒンジ又はスペーサーは、アミノ酸配列

【化 6】

RWPESPKAQASSVPTAQPAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERET
KTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTG
GVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAQA
PVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPG
STTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSyvTDH (配列番号38)

のヒンジを含む。いくつかの実施形態において、ヒンジ又はスペーサーは、

【化 7】

AGGTGGCCCGAAAGTCCCAAGGCCAGGCATCTAGTGTTCCTACTGCACAGCCCCA
 GGCAGAAGGCAGCCTAGCCAAAGCTACTACTGCACCTGCCACTACGCGCAATACT
 GGCCGTGGCGGGGAGGAGAAGAAAAAGGAGAAAGAGAAAGAAGAACAGGAAGA
 GAGGGAGACCAAGACCCCTGAATGTCCATCCCATACCCAGCCGCTGGGCGTCTATC
 TCTTGACTCCCGCAGTACAGGACTTGTGGCTTAGAGATAAGGCCACCTTTACATGT
 TTCGTCTGGGCTCTGACCTGAAGGATGCCCATTTGACTTGGGAGGTTGCCGGAAA
 GGTACCCACAGGGGGGGTTGAGGAAGGGTTGCTGGAGCGCCATTCCAATGGCTCT
 CAGAGCCAGCACTCAAGACTCACCTTCCGAGATCCCTGTGGAACGCCGGGACCTC
 TGTCACATGTACTCTAAATCATCCTAGCCTGCCCCACAGCGTCTGATGGCCCTTAG
 AGAGCCAGCCGCCAGGCACCAGTTAAGCTTAGCCTGAATCTGCTCGCCAGTAGTG
 ATCCCCCAGAGGCCGCCAGCTGGCTCTTATGCGAAGTGTCCGGCTTTAGCCCGCCC
 AACATCTTGCTCATGTGGCTGGAGGACCAGCGAGAAGTGAACACCAGCGGCTTCG
 CTCCAGCCCGGCCCCCAGCCGGGTTCTACCACATTCTGGGCCTGGAGTGTC
 TTAAGGGTCCCAGCACCACTAGCCCCCAGCCAGCCACATACACCTGTGTTGTGTC
 CCATGAAGATAGCAGGACCCTGCTAAATGCTTCTAGGAGTCTGGAGGTTTCCTACG
 TGA CTGACCATT (配列番号103)

10

20

のヌクレオチド配列によりコードされたヒンジを含む。

【0587】

一態様において、膜貫通ドメインは組換えであり得、その場合、ロイシン及びバリンなどの疎水性残基を優勢に含む。一態様において、フェニルアラニン、トリプトファン及びバリンのトリプレットを、組換え膜貫通ドメインの各末端に見ることができる。

【0588】

任意選択により、2～10アミノ酸長の短オリゴ又はポリペプチドリinkerが、CARの膜貫通ドメインと細胞質領域との間に結合を形成し得る。グリシン-セリンダブレットは特に適当なリンカーを提供する。例えば、一態様において、リンカーは、GGGSGGGSGのアミノ酸配列を含む（配列番号5）。一実施形態において、リンカーは、GTGGCGGAGGTTCGTGGAGGTGGAGGTTCのヌクレオチド配列によりコードされる（配列番号8）。

30

【0589】

一態様において、ヒンジ又はスペーサーは、KIR2DS2ヒンジを含む。

【0590】

細胞質ドメイン

本CARの細胞質ドメイン又は領域は、細胞内シグナル伝達ドメインを含む。細胞内シグナル伝達ドメインは、一般的に、CARが導入されている免疫細胞の正常エフェクター機能の少なくとも1つの活性化を担う。

40

【0591】

本明細書に記載のCARにおいて使用する細胞内シグナル伝達ドメインの例は、T細胞受容体（TCR）及び抗原受容体結合後にシグナル伝達を開始するために協調して機能する共受容体の細胞質配列並びにこれらのあらゆる誘導体又はバリエーション及び同じ機能的能力を有するあらゆる組換え配列を含む。

【0592】

TCR単独により産生されたシグナルはT細胞の完全活性化には不十分であり、二次及び／又は共刺激性シグナルも必要であることが知られている。そのため、T細胞活性化は

50

、2つの異なるクラスの細胞質シグナル伝達配列が介在するということができる：TCR（初代細胞内シグナル伝達ドメイン）を介して抗原依存性一次活性化を開始するもの及び二次又は共刺激性シグナル（二次細胞質ドメイン、例えば共刺激ドメイン）を提供するように抗原非依存的方法で作用するもの。

【0593】

一次シグナル伝達ドメインは、TCR複合体の一次活性化を刺激性方向又は阻害性方向のいずれかで制御する。刺激性方向で作用する初代細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ又はITAMとして知られるシグナル伝達モチーフを含み得る。

【0594】

本発明において特に有用であるITAM含有初代細胞内シグナル伝達ドメインの例は、TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278（「ICOS」としても知られる）、Fc ϵ RI、DAP10、DAP12及びCD66dのものを含む。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 ζ 、例えば本明細書に記載のCD3 ζ 配列の一次シグナル伝達ドメインを含む。

【0595】

一実施形態において、一次シグナル伝達ドメインは、天然ITAMドメインと比較して改変された（例えば、増加又は減少した）活性を有する、修飾ITAMドメイン、例えば変異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、修飾ITAM含有初代細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば最適化及び／又は切断されたITAM含有初代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、一次シグナル伝達ドメインは、1つ、2つ、3つ、4つ又はそれを超えるITAMモチーフを含む。

【0596】

共刺激性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 ζ シグナル伝達ドメインをそれ自体で含むことができ又は本発明のCARに関連して、有用な任意の他の所望の細胞内シグナル伝達ドメインと組み合わせ得る。例えば、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3 ζ 鎖部分及び共刺激性シグナル伝達ドメインを含み得る。共刺激性シグナル伝達ドメインは、共刺激性分子の細胞内ドメインを含むCARの部分を目指す。一実施形態において、細胞内ドメインは、CD3 ζ のシグナル伝達ドメイン及び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 ζ のシグナル伝達ドメイン及びICOSのシグナル伝達ドメインを含むように設計される。

【0597】

共刺激性分子は、リンパ球の抗原に対する効率的応答に必要である、抗原受容体又はそのリガンド以外の細胞表面分子であり得る。そのような分子の例には、CD27、CD28、4-1BB（CD137）、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1（LFA-1）、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3及びCD83と特異的に結合するリガンド等が含まれる。例えば、CD27共刺激は、インビトロでヒトCAR T細胞の増殖、エフェクター機能及び生存を増強し、インビボでヒトT細胞残留性及び抗腫瘍活性を増強することが示されている（Song et al. Blood. 2012; 119(3): 696-706）。そのような共刺激分子の更なる例は、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM（LIGHTR）、SLAMF7、NKP80（KLRF1）、NKP30、NKP44、NKP46、CD160、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、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、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1（CD226）、SLAMF4（CD244

10

20

30

40

50

、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、NKG2D、NKG2C及びPAG/Cbpを含む。

【0598】

CARの細胞質部分内の細胞内シグナル伝達配列は、互いに無作為に又は特定の順序で連結し得る。任意選択により、例えば、2～10アミノ酸（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9又は10アミノ酸）長の短オリゴ又はポリペプチドリンカーは、細胞内シグナル伝達配列間に結合を形成し得る。一実施形態において、グリシン-セリンダブレットを適当なリンカーとして使用できる。一実施形態において、単一アミノ酸、例えばアラニン、グリシンを適当なリンカーとして使用できる。

【0599】

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つ、3つ、4つ、5つ又はそれを超える共刺激性シグナル伝達ドメインを含むように設計される。一実施形態において、2つ以上、例えば2つ、3つ、4つ、5つ又はそれを超える共刺激性シグナル伝達ドメインは、リンカー分子、例えば本明細書に記載のリンカー分子により分けられる。一実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインは、2つの共刺激性シグナル伝達ドメインを含む。一実施形態において、リンカー分子はグリシン残基である。一実施形態において、リンカー分子はアラニン残基である。

【0600】

一態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3ζのシグナル伝達ドメイン及び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、CD3ζのシグナル伝達ドメイン及び4-1BBのシグナル伝達ドメインを含むように設計される。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7のシグナル伝達ドメインである。一態様において、CD3-ζのシグナル伝達ドメインは、配列番号9のシグナル伝達ドメインである。

【0601】

一態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3ζのシグナル伝達ドメイン及び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、QRRKYRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEGSTIP IQEDYRKPEPACSP（配列番号16）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、

【化8】

```
AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCC
GCCCCGGGCCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCA
GCCTATCGCTCC (配列番号14)
```

の核酸配列によりコードされる。

【0602】

一態様において、本明細書に記載のCAR発現細胞は、第2のCAR、例えば同じ標的又は異なる標的（例えば、本明細書に記載の癌関連抗原以外の標的又は本明細書に記載の異なる癌関連抗原、例えば、CD19、CD33、CLL-1、CD34、FLT3又は葉酸受容体β）に対する、例えば第2のCARの異なる抗原結合ドメインを更に含み得る。一実施形態において、第2のCARは、癌関連抗原と同じ癌細胞型を発現する標的に対する抗原結合ドメインを含む。一実施形態において、CAR発現細胞は、第1の抗原を標的とし、共刺激性シグナル伝達ドメインを有するが、一次シグナル伝達ドメインを有しない細胞内シグナル伝達ドメインを含む第1のCAR及び第2の、異なる、抗原を標的とし

10

20

30

40

50

、一次シグナル伝達ドメインを有するが、共刺激性シグナル伝達ドメインを有しない細胞内シグナル伝達ドメインを含む第2のCARを含む。理論に拘束されることを望まないが、第1のCARへの共刺激シグナル伝達ドメイン、例えば4-1BB、CD28、ICOS、CD27又はOX-40及び一次シグナル伝達ドメイン、例えばCD3ζの第2のCARへの配置は、両標的が発現される細胞に対してCAR活性を制限する。一実施形態において、CAR発現細胞は、本明細書に記載の標的抗原に結合する抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン及び共刺激ドメインを含む第1の癌関連抗原CAR及び異なる標的抗原（例えば、第1の標的抗原と同一の癌細胞型に発現される抗原）を標的とし、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン及び一次シグナル伝達ドメインを含む第2のCARを含む。別の実施形態において、CAR発現細胞は、本明細書に記載の標的抗原に結合する抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン及び一次シグナル伝達ドメインを含む第1のCAR及び第1の標的抗原以外の抗原（例えば、第1の標的抗原と同一の癌細胞型に発現される抗原）を標的とし、抗原に対する抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン及び共刺激シグナル伝達ドメインを含む第2のCARを含む。

10

【0603】

別の態様において、本開示は、CAR発現細胞、例えば、CAR T細胞の集団を特徴とする。一実施形態において、CAR発現細胞の集団は、種々のCARを発現する細胞の混合物を含む。

【0604】

例えば、一実施形態において、CAR T細胞の集団は、本明細書に記載の癌関連抗原に対する抗原結合ドメインを有するCARを発現する第1の細胞及び異なる抗原結合ドメイン、例えば、本明細書に記載の異なる癌関連抗原に対する抗原結合ドメイン、例えば、第1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た癌関連抗原と異なる、本明細書に記載の癌関連抗原に対する抗原結合ドメインを有するCARを発現する第2の細胞を含み得る。

20

【0605】

別の例として、CAR発現細胞の集団は、本明細書に記載の癌関連抗原に対する抗原結合ドメインを含むCARを発現する第1の細胞及び本明細書に記載されるような癌関連抗原以外の標的に対する抗原結合ドメインを含むCARを発現する第2の細胞を含み得る。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含むCARを発現する第1の細胞及び二次シグナル伝達ドメインを含むCARを発現する第2の細胞を含む。

30

【0606】

他の態様において、本開示は細胞の集団を特徴とし、ここで、集団内の少なくとも1細胞は、本明細書に記載の癌関連抗原に対する抗原結合ドメインを有するCARを発現し、第2の細胞は他の薬剤、例えば、CAR発現細胞の活性を増強する薬剤を発現する。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り得る。阻害分子、例えば、PD-1は、CAR発現細胞が免疫エフェクター応答を開始する能力を減少させ得る。阻害分子の例は、PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM（CEACAM-1、CEACAM-3及び／又はCEACAM-5）、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3（CD276）、B7-H4（VTCN1）、HVEM（TNFRSF14又はCD270）、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシン及びTGF（例えば、TGFβ）を含む。一実施形態において、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2のポリペプチド、例えば、本明細書に記載の細胞内シグナル伝達ドメインに結合した、第1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、PD-1、PD-L1、CTLA4、TIM3、CEACAM（CEACAM-1、CEACAM-3及び／又はCEACAM-5）、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4及びTGFβ又はこれらのいずれかのフラグメントなどの阻害分子の第1のポリペ

40

50

プチド及び本明細書に記載の細胞内シグナル伝達ドメインである第2のポリペプチド（例えば、共刺激ドメイン（例えば、本明細書に記載されるような、例えば、41BB、CD27、OX40又はCD28）及び／又は一次シグナル伝達ドメイン（例えば、本明細書に記載のCD3ζシグナル伝達ドメインを含む）である第2のポリペプチドを含む。一実施形態において、薬剤は、PD-1又はそのフラグメントの第1のポリペプチド並びに本明細書に記載の細胞内シグナル伝達ドメイン（例えば、本明細書に記載のCD28シグナル伝達ドメイン及び／又は本明細書に記載のCD3ζシグナル伝達ドメイン）の第2のポリペプチドを含む。

【0607】

抗CD19結合ドメインの配列は、本明細書において表1に提供される。全長CAR構築物は、表1に記載される抗原結合ドメインのいずれかを、以下に提供される1つ以上の追加のCAR成分と共に使用して生成することができる。

・リーダー（アミノ酸配列）（配列番号1）

M A L P V T A L L L P L A L L L H A A R P

・リーダー（核酸配列）（配列番号12）

【化9】

ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCATG

CCGCTAGACCC

・リーダー（核酸配列2）（配列番号127）

【化10】

ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCT

CGGCCC

・リーダー（核酸配列3）（配列番号128）

【化11】

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCC

AGGCCG

・CD8ヒンジ（アミノ酸配列）（配列番号2）

T T T P A P R P P T P A P T I A S Q P L S L R P E A C R P A A G G A V H T R G L
D F A C D

・CD8ヒンジ（核酸配列）（配列番号13）

【化12】

ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGCGCCCAACATCGCGTC

GCAGCCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTG

CACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT

・CD8ヒンジ（核酸配列2）（配列番号129）

【化13】

ACCACTACCCAGCACCAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCC

CAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGCAGCTGGTGGGGCCGTGCA

TACCCGGGGTCTTGACTTCGCCTGCGAT

・CD8膜貫通（アミノ酸配列）（配列番号6）

I Y I W A P L A G T C G V L L L S L V I T L Y C

・膜貫通（核酸配列）（配列番号17）

【化 1 4】

ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCAC
TGGTTATCACCCCTTTACTGC

- ・膜貫通（核酸配列 2）（配列番号 1 3 0）

【化 1 5】

ATCTACATTTGGGCCCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGGTCCTGCTGCTTTCAC
TCGTGATCACTCTTTACTGT

10

- ・4-1 B B 細胞内ドメイン（アミノ酸配列）（配列番号 7）

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

- ・4-1 B B 細胞内ドメイン（核酸配列）（配列番号 1 8）

【化 1 6】

AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTATGAG
ACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCAGAAGAA
GAAGAAGGAGGATGTGAACTG

20

- ・4-1 B B 細胞内ドメイン（核酸配列 2）（配列番号 1 3 1）

【化 1 7】

AAGCGCGGTCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCCTTCATGAGG
CCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTCATGCCGGTTCCCAGAGGAGG
AGGAAGGCGGCTGCGAACTG

- ・C D 3 ζ ドメイン（アミノ酸配列）（配列番号 9）

【化 1 8】

RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR
KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM
QALPPR

30

- ・C D 3 ζ（核酸配列）（配列番号 2 0）

【化 1 9】

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCGTACAAGCAGGGCCA
GAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTG
GACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAAC
CCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACA
GTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTA
CCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCC
TGCCCCCTCGC

40

- ・C D 3 ζ（核酸配列 2）（配列番号 1 3 2）

【化 2 0】

CGCGTGAAATTCAGCCGCAGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCA
GAACCAGCTCTACAACGAACCTCAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTG
GACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAAT
CCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATA
GCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCCAAAGGCCACGACGGACTGT
ACCAGGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCACATGCAGGC
CCTGCCGCCTCGG

10

・ C D 3 ζ ドメイン（アミノ酸配列；N C B I 対照配列 N M _ 0 0 0 7 3 4 . 3 ）（配列番号 1 0）

【化 2 1】

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR
KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM
QALPPR

・ C D 3 ζ（核酸配列；N C B I 対照配列 N M _ 0 0 0 7 3 4 . 3 ）；（配列番号 2 1）

20

【化 2 2】

agagtgaggtcagcaggagcgcagacgccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctag
gacgaagagaggagtagcatgtttggacaagagacgtggccgggaccctgagatggggggaagccgagaaggaagaaccctca
ggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcgggagcctacagttagattgggatgaaaggcgagcggcgaggggca
agggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgccccctcgc

I g G 4 ヒンジ（アミノ酸配列）（配列番号 3 6）

【化 2 3】

ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV
QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSLG
KM

30

I g G 4 ヒンジ（ヌクレオチド配列）（配列番号 3 7）

【化 2 4】

GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGCCCTGCCCCGAGTTCCTG
GGCGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAG
CCGGACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCCGAG
GTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGC
CCCGGGAGGAGCAGTTCAATAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTG
CACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGGCC
TGCCAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCC
CCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCC
CTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
GCAACGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGA
CGGCAGCTTCTTCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAG
GGCAACGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCA
GAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATG

10

E F 1 α プロモーター

20

【化 2 5】

CGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCC
CCGAGAAGTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCG
CGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTG
GGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGG
TTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTT
TACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGAT
TCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTT
AAGGAGCCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGC
CGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTA
GCCATTTAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTT
GTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGG
CGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCG
CGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGC
CTGGCCTCGCGCCGCGGTGATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTGCG
GCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCT
CAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAA
GGAAAAGGGCCTTTCCGTCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGG
GCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGT
TGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTG
AAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGT
TTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCCAT
TTCAGGTGTCGTGA (配列番号11)

30

40

50

G l y / S e r (配列番号 25)

G G G G S

G l y / S e r (配列番号 26) この配列は、1～6「G l y G l y G l y G l y
S e r」反復単位を含み得る

G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S

G l y / S e r (配列番号 27)

G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S

G l y / S e r (配列番号 28)

G G G G S G G G G S G G G G S

G l y / S e r (配列番号 29)

G G G S

ポリ A (配列番号 30) : A 5 0 0 0

ポリ A (配列番号 31) : A 1 0 0

ポリ T (配列番号 32) : T 5 0 0 0

ポリ A (配列番号 33) : A 5 0 0 0

ポリ A (配列番号 34) : A 4 0 0

ポリ A (配列番号 35) ” A 2 0 0 0

G l y / S e r (配列番号 15) : この配列は、1～10「G l y G l y G l y S
e r」反復単位を含み得る。

G G G S G G G S G G G S G G G S G G G S G G G S G G G S G G G S G G G S G G S 20

【0608】

本明細書に記載の方法で使用できる例示的な C D 1 9 C A R 構築物を表 3 に示す。

【0609】

表3: CD19 CAR構築物

名称	配列番号	配列
CAR 1		
CAR1 scFv ドメイン	39	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHT SRLHSCIPARFSGSGSCTDYTLTISSLPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGT KLEIKCCGCSGGCGSCGGCSQVQLQESCPGLVKPSETLSLTCTVSCVSLPD YGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYIYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKI SSVTAADTAVYYCAKHYIYGGSYAMDYWGQGTLVTVSS
103101 CAR1 可溶性 scFv - nt	52	atggccctccctgtcaaccgccctgtgcttccgctggctcttctgctccacgcgcg tcggcccgaaattgtgatgaccagtcacccgccactcttagcctttcacccggtg agcgcgcaaccctgtcttgcagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccgacaggctcctcgcccttctgatctaccacaccagccggt ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacacc tcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatcttctgtcagcaagg aacaccctgccctacaccttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcggtggaggaagccaggtccaactccaagaaa gcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaaactctttcactgaattgtactgtgagc ggagtgctctctcccgattacgggggtgcttggacagacagccaccggggaagg tctggaatggattggagtgatttggggctctgagactacttactactcttcatccc tcaagtcacgcgtcaccatctcaaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaa ctgtcatctgtgacgcagccgacaccgcggtgtactattgcgctaagcattacta ttatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtactctgggtcacggtgt ccagccaccaccatcatcaccatcaccat
103101 CAR1 可溶性 scFv - aa	64	<u>MALPVTALLPLALLHAARPe</u> ivmtqspatls slspgeratls crasqdiskylnw yqqkpggqaprllyhtsr l hsgiparfsgsgsgtdytl ti ss l qpedfavyfcqgg ntlpytfqggtkleikgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpsetlsitctvs gvslpdygvswirpppgkglewigviwgsettyys slksrvtiskdnsknqvslk lssvtaadtavyycakhyyyggsyandywgqgtlvtvss <u>hhhhhhhh</u>
104875 CAR 1 - 全長 - nt	90	atggccctccctgtcaaccgccctgtgcttccgctggctcttctgctccacgcgcg tcggcccgaaattgtlgtatgaccagtcacccgccactcttagcctttcacccggtg agcgcgcaaccctgtcttgcagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccgacaggctcctcgcccttctgatctaccacaccagccggt ccattctggaatccctgccaggttcagcggttagcggatctgggaccgactacacc tcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatcttctgtcagcaagg aacaccctgccctacaccttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcggtggaggaagccaggtccaactccaagaaa gcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaaactctttcactgaattgtactgtgagc ggagtgctctctcccgattacgggggtgttggatcagacagccaccggggaagg

【表 9】

		Lctggaatggattggagtgatttggggcletgagactacttactactcttcatccc tcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaa ctgtcatclgtgaccgcagccgacacccgcogtgtactattgcgctaagcatlacta ttatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtaactetggtcaccgtgt ccagcaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggtcctaccatcgctcc cagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctgggtgggcccgtgca taccggggcletgacttgcctgcgatactacatttggggccctctggctggta cttgcgggggtcctgtctgttttactcgtgatcactctttactgttaagcgcggtcgg aagaagctgtgtacatctttaagcaaccttcatgaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttcatgccgggtcccagaggaggaggaaggcggctgcgaac tgcgctgaaattcagccgcagcgcagatgtccagcctacaagcaggggcagaac cagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtaacgacgtgtctggaaa gcccagaggacgggacccagaaaatgggcgggaagccgcagaaaagaatcccaag agggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagatt ggtatgaaaggggacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggact cagcaccgccaccaaggacacclatgacgctcttcacatgcaggccctgcgcctc gg
104875 CAR 1 - 全長 - aa	77	MALPVTALLIPLALLHAARFeivmtqspatlslspgeratlsc<u>rasqdiskylnw</u> yqqkpggqaprlliyhtsrlhsqiparfsgsgsgtdytlttisslqpedfavyfc<u>qgg</u> <u>ntlpyt</u>fgqgkkleikgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpsetlslctvs gvslp<u>dygvs</u>wirppgkglewig<u>viwgsettyysslsks</u>rvtiskdnsknqvsik lssvtaadtavyycah<u>hyyyggsyamy</u>wgggtltvsvsttppaprpptpaptias qplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgr kkilyifkqpfmrpvqttqeedgcscripeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqn qlyneinlgrreeydvldkrrgrdpemggkprkrnpqeglynelqkdmaeysei gmkgerrrgkghdglyqglstatkdttydalhmqalppr
CAR 2		
CAR2 scFv ドメイン	40	eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpggqaprlliyhtsrlhs qiparfsgsgsgtdytlttisslqpedfavyfcqggntlpytfgqgkkleikgggsg gggsgggsgvqlqesgpglvkpsetlslctvsgvslpdygvswirppgkgle wigviwgsettyyqsslsksrvtiskdnsknqvsiklssvtaadtavyycahyyyg gsyamywgggtltvsvs
103102 CAR2 - 可溶性 scFv - nt	53	atggccctccctgtcacgcctctgtcttccgctggctcttctgtctccacgcgc tcggcccgaattgtgatgaccagtcacccgccactcttagcctttcaccgggtg agcgcgcaaccctgtcltgcagagcctcccaagacatclcaaaatacctlaattgg tataacagaagcccgacaggtcctcgccttctgtatctaccacaccagcggct ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaaccgactacaccc tactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaagg

10

20

30

40

【表 1 1】

		ggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggact cagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgcgcctc gg
104876 CAR 2 - 全長 - aa	78	MALPVTALLPLALLHAARPeivmtqspatlsispgeratlsc <u>rasqdiskyl</u> nw yqqkpgqaprliliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqgg <u>ntlpyt</u> fgggtkleikggggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpsetlsltctvs gvslpdygvswirppgkglewigviwgsettyyqsslsksrvtiskdsknqvslk lssvtaadtavyycakhyyyggsyamydwgggtltvtvssgttppaprpptpaptias qplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgr kklliyifkqpfmrpvqttgeedgcscrifpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqn qlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprkrnpqeglynelqkdkmaeysei gmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqaippr
CAR 3		
CAR3 scFv ドメイン	41	qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirppgkglewigviwgset tyysssksrvtiskdsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamydwgg gtltvtvssggsgggsgggsgggseivmtqspatlsispgeratlscrasqdiskyl nwyqqkpgqaprliliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcq qgntlpytfgggtkleik
103104 CAR 3 - 可溶性 scFv - nt	54	atggctctgccgtgaccgcactcctcclgccactggctctgctgctcaccgcgc tcgcccacaagtcacgcttcaagaatcagggcctggctctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgaccgtgagcggagtgtccctccagactacggagtgagc tggattagacagcctcccgaaagggaclggagtggatcggagtgaattggggtag cgaaaccacttactatctcatcttccctgaagtcacgggtcaccatttcaaaggata actcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgcgcgtgacaccgce gtgtattactgtgccaagcatlactactatggagggtcctacgccatggactactg gggcccagggaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcg ggagcgggtggaggtggctccgaaatcgtgatgaccagagccclgcaacctgtcc ctttctcccggggaacgggctaccctttcttctgctgggcacacaaagatatctcaa ataccccaattgglatcaacagaagccgggacaggcccttaggcttcttaltacc acacctctgcctgcatacgggattccgcacgcttagcgggtctggaagcggg accgactacactctgaccatctcatctctccagcccgaggacttcgccgtctactt ctgccagcagggttaacacctgccgtacaccttcggccagggaaccaagcttgaga tcaaacatcaccaccatcatcaccatcac
103104 CAR 3 - 可溶性 scFv - aa	66	<u>MALPVTALLPLALLHAARP</u> qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvs wirppgkglewigviwgsettyysssksrvtiskdsknqvslklssvtaadta vyycakhyyyggsyamydwgggtltvtvssggsgggsgggsgggseivmtqspatls ispgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprliliyhtsrlhsgiparfsgsgsg tdytlitisslqpedfavyfcqqgntlpytfgggtkleik <u>hhhhhhh</u>

10

20

30

40

【表 1 2】

104877 CAR 3 - 全長 - nt	92	atggetctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggetctctgetgcttcacgccgc tcgccacacaagtcacgcttcaagaatcagggcctggctctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgacccglgagcggaglgctccctccagacacagcagtgagc tggattagacagcctcccgaaagggactggagtgatcggagtgatttggggtag cgaaaccacttactatctcctcctgaagtcacgggtcaccatttcaaggata actcaaagaatcaagtgaagcctcaagctctcatcagtcacgcgcgctgacaccgcc gtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactg gggccagggaactctggcactgtgtcatctggaggaggtagcggaggaggcg ggagcgggtggagtggtcgcgaatcgtgatgaccagagccctgcaaccctgtcc ctllctcccggggaacggggtaccclllctllgtcgggcalcacaagatctctcaa atacctcaattggtatcaacagaagccgggacagggcccttaggcttcttatctacc acacctctcgctgcatagcgggattcccgacgctttagcgggtctggaagcggg accgactacactctgaccatctcatctctccagcccgaggacttgcgcgtctactt ctgccagcagggtaacacctgcctgacaccttgcgcagggcaccgaagcttgaga tcaaaaccactactccgcctccaaggccaccaccctgcccgaaccatgcctct cagccgctllcctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctggggggcgtgca taccgggggtcttgacttgcctgcgatctctacatttgggcccctctggctggta cttgccgggtcctgctgcttctcactcgtgatcactcttactglaagccggtcgg aagaagctgctgtacalcLLtaagcaaccttcalgaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttcatgcgggttccagaggaggagggaaggcggctgcgaac tgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaac cagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaa gcccagaggacgggaaccagaaatggcggggaagccgcgcagaaagaatcccaag agggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagatt gggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggacl cagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgcgcctc gg
104877 CAR 3 - 全長 - aa	79	MALPVTAALLPLALLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyysslksrvtliskdsknqvslkissvtaadta vyycakhyyyggsyandywgqgtlvtvssgggsgggsggggseivmtqspatls lspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrllhsqiparfsgsgg ldyltltisslqpedfavyfcgggntlpytfgqgkklklttppaprpptpaptias qplslrpeacrpaaggavhtrglfdacdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgr kklliyifkqpfmrpvqttgeedgcscrfeeeeeggceirvkfsrsadapaykqgn qlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqdkmaeysei gmkgerrrgkghdglyqglstatkdlydalhmqalppr
CAR 4		
CAR4 scFv	42	qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgset

【表 1 3】

ドメイン		tyyqsslksrvtiskdnskqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamydwgq gtlvlvssggsgggsgggsgggseivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskyl nwyqqkpggqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcoq qgntlpytfgggtkleik
103106 CAR4 – 可溶性 scFv - nt	55	atggctctgcccgtagccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcaagccgc tcgcccacaagtcagcttcaagaatcagggcctggctctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgcaacgtagcggagtgctcctccagactacggagtgagc tggattagacagcctcccgaaaggactggagtgcatcggagtgatttggggtag cgaaaccacttactatcaatcttccctgaagtcacgggtcaccatttcaaaggata actcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcacggcgctgacaccgce gtgtattactgtgccaaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactg gggccagggaactclggtaactlgtlcatctggtaggaggagtagcggaggaggcg ggagcggtaggagtggttcgaaatcgtgatgacccagagccctgcaacctgtcc ctttctccggggaaacgggctaccctttcttctgtagggcatcacaagatatctcaa atacctcaaltggatcaacagaagccgggacaggcccttaggcttcttatctacc acacctctcgctgcatacgaggattcccgacgctttagcgggtctggaagcggg accgaactacactctgaccatctcatctccagcccgaggactlccgctctactt ctgccagcagggtaacacctgccttacaccttcggccagggcaccaagcttgaga tcaaacatcaccaccatcatcaccatcac
103106 CAR4 – 可溶性 scFv -aa	67	<u>MALPVTALLPLALLLHAARP</u> qvqlqesgpglvkpsetislctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnskqvslklssvtaadta vyycakhyyyggsyamydwggtltvssggsgggsgggsgggseivmtqspatlsl lspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpggqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsg tdytlitisslqpedfavyfcoqqntlpytfgggtkleik <hhhhhhhh< h=""></hhhhhhhh<>
104878 CAR 4 – 全長 - nt	93	atggctctgcccgtagccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcaagccgc tcgcccacaagtcagcttcaagaatcagggcctggctctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgcaacgtagcggagtgctcctccagactacggagtgagc tggattagacagcctcccgaaaggactggagtgcatcggagtgatttggggtag cgaaaccacttactalcaatcttccctgaagtcacgggtcaccatttcaaaggata actcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcacggcgctgacaccgce gtgtattactgtgccaaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactg gggccagggaactclggtaactlgtlcatclggtaggaggagtagcggaggaggcg ggagcggtaggagtggttcgaaatcgtgatgacccagagccctgcaacctgtcc clllctccggggaaacgggclaccclllcllglcgggcaltcacaagalatclcaa atacctcaattggatcaacagaagccgggacaggcccttaggcttcttatctacc acacctctcgctgcatacgaggattcccgacgctttagcgggtctggaagcggg accgaactacactctgaccatctcatctccagcccgaggactlccgctctactt ctgccagcagggtaacacctgccttacaccttcggccagggcaccaagcttgaga

【表 1 4】

		tcaaaaccactactcccgctccaaggccaccaccctgcccggaccatcgccctct cagccgctltccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctgglggggcccgtgca taccgggggtcttgacttcgctcgcatatctacatttgggcccctctggctggta cttgccgggtctctgctgctttcactcgtgatcaactctttactgtaagccgggtcgg aagaagctgctgtacatcttcaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggcgcgaac tgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaac cagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtagcagcgtgctggacaa gcggagaggacgggaccagaaatggcggggaagccgcgcagaaagaatccccaag aggccctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagatt ggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggaact cagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttccatgcaggccctgcgcctc gg	10
104878 CAR 4 – 全長 - aa	80	MAIPVTAILLPIALLLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyygsslksrvtiskdsknqvsiklssvtaadta vyyca<hygyggsyandy< h="">wgggtltvtvssggggsgggsggggseivmtqspatls lspgeratlscrasqdiskylnwyyqqkpgqaprllyhtsrlhs</hygyggsyandy<>	20
CAR 5			
CAR5 scFv ドメイン	43	eivmtqspatlsispgeratlscrasqdiskylnwyyqqkpgqaprllyhtsrlhs giparfsgsgsgtdytltlsslqpedfavycqggntlpytfgqgtkleikggggs ggggsgggsgggsgqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyysssksrvtiskdsknqvsiklssvtaadta vyyca<hygyggsyandy< h="">wgggtltvtvss</hygyggsyandy<>	30
99789 CAR5 - 可溶性 scFv - nt	56	atggccctccagtgaccgctctgctgctgctcctcgcacttcttctcatgccgc tcggcctgagatcgtcatgacccaaagcccgcctaccctgtccctgtcaccggcg agagggcaacccttcatgcagggccagccaggacatttctaagtaactcaactgg tatcagcagaagccagggcaggtcctcgcctgctgatctaccacaccagccgct ccacagcggatccccgcagattttccgggagcgggtctggaaccgactacacc tcaccatctcttctctgcagcccgaggatttcgcctctatttctgccagcagggg aalactctgccgtacaccttcggtcaaggtaaccaagclggaatcaaggaggcgg aggatcaggcgggtggcggaagcggaggaggtggctccggaggaggaggttcccaag tgcagcttcaagaatcaggaccggacttctgaagccatcagaaaccctctccctg acttgtaccgtgtccggtgtgagcctccccgaactacggagtctcttggattcgcca	40

【表 15】

		gcctccggggaagggtcttgaatggattgggggtgatttggggatcagagactactt actactcttcatcacitlaagtcacgggtcaccatcagcaaagalaatagcaagaac caagtgtcacttaagctgtcatctgtgacccgcgcgtgacacccgcgtgtactattg tgccaaacattactattacggagggtcttatgctatggactactggggacagggga ccctgggtgactgtctctagccatcaccatcaccaccatcatcac
99789 CAR5 - 可溶性 scFv -aa	68	<u>MALPVTALLPLALLHAARP</u> Peivmtqspatlsispgeratlsccrasqdiskylnw yqqkpgqaprlllyhtsrllhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqgg ntlpytfgggtkleikgggsgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpsctlsl tctvsgvslpdygvswirppgkglewigviwgsettyssslksrvtiskdnkn qvsllkssvtlaadtavyycahyyyggsyamdywgggtlvlvss <u>hhhhhhhh</u>
104879 CAR 5 - 全長 - nt	94	atggccctccclgtcacccgcctgctgcttccgcctggcctctctgctccacgcgc tcggcccgaaatlgtgatgaccagtcacccgcacactcttagcctttcaccgcgtg agcgcgcgaaccctgtcttgcagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattgg latcaacagaagccggacaggtctctgccttctgactacacacaccagccggt ccattctgggaatccclgtccaggttcagcggtagcggatctgggaaccgaclacccc tcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatctctgtcagcaagg aacaccctgcctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcggtaggaggaagcggcggaggcggagccagg tccaaactccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactcttctactg acttgtactgtgagcggagtgtctctcccgattacggggtgtcttggatcagaca gccaccggggaagggtctggaatggattggagtgattlggggctctgagactactt actactcttcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaat cagggtgtcactgaaactgtcatctgtgacccgcagccgacacccgcgtgtactattg cgcLaagcattactaltalggcgggagctacgcaatggattacLggggacagggta ctctgggtcaccgtgtccagcaccactaccccagcaccgaggecccccaccgcgt cctaccalgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtlagaccgcagc tgggtggggccgtgcatacccggggtcttgaacttcgcctgcgatctctacatttggg ccctctgggtggtacttgcgggggtccLgctgclttcaclcgctgatcaclctttac tgtaaagcgggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcc tgtLgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccgggttcccagaggaggagg aaggcgggtgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctac aagcaggggcagaaccagclclacaacgaacLcaalclLggLcggagagagagla cgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgca gaaagaatcccagagggtgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa gcctatagcgagattggatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacgg actgtaccagggaactcagcaccgccaccaaggacacclatgacgctcltcacatgc aggccctgcgcclcg
104879	81	MALPVTALLPLALLHAARP <i>Peivmtqspatlsispgeratlscc</i> <u>rasqdiskylnw</u>

【表 16】

CAR5 - 全長- aa		yqqkpgqapriliiyhtsrllhsqiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqgg ntlpytfgggtkleikgggsgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpsetls lctvsgvslpdygvswwirppgkglewigviwgsettyyqsslsksrvtiskdnsk qvsiklssvtaadtavyycahhyyyggsyamydywgqgtlvtvsssttpaprpptpa ptiasqpilsrpeacrpaaggavhtcgldfacdiyiwaplagtogvllislvitly ckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrffpeeeeggcelrvkfssadapay kqqgnqlynelnlgrrreedydvldkrrgrdpemggkprknpqeglynelqkdkmae ayseigmkgerrrgkghdglyqglstatktdtydalhmqalppr
CAR6		
CAR6 scFv ドメイン	44	eivmtqspatlsispgeratlscrasqdiskylnwyyqqkpgqapriliiyhtsrllhs qiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqggntlpytfgggtkleikgggsg gggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswwirpp gkglewigviwgsettyyqsslsksrvtiskdnskqvsiklssvtaadtavyycah hyyyggsyamydywgqgtlvtvss
99790 CAR6 - 可溶性 scFv - nt	57	atggccctcccagtgaccgctctgctgctgctgctcctctcgcaacttcttctccatgcgc tcggcctgagatcgctcatgacccaaagcccgctaccctgtccctgtcaccggcg agagggcaacccttctcatgcagggcagccaggacattctcaglacctcaactgg tatcagcagaagccagggcaggctcctcgccctgctgatctaccacaccagccgct ccacagcggtatccccgccagattttccgggagcggtctggaaccgactacaccc tcaccatctcttctctgcagcccgaggatttccgctctatttctgccagcagggg aalactctgccttacacclcggtcaaggtaaccaagctggaaatcaaggcaggcgg aggatcaggcggtggcggaagcggaggaggtggctccggaggaggaggttcccaag tgcagcttcaagaatcaggaccggacttgtgaagccatcagaaaccctctccctg acclgtaccgtgtccggtgtgagcctcccgactacggagctctctggatttcgcca gcctccggggaagggtcttgaaaggattgggggtgatttggggatcagagactactt actaccagtcacttaagtcacgggtcaccatcagcaagataatagcaagaac caagtgctacttaagctgtcatctgtgaccgcgcgclgacaccgcctgtactattg tgccaaacattactattacggagggtcttatgctatggactactggggacagggga ccctgggtgactgtctctagccatcaccatcaccaccatcatcac
99790 CAR6 - 可溶性 scFv - aa	69	<u>MALPVTALLPLALLHAARP</u> eivmtqspatlsispgeratlscrasqdiskylnw yqqkpgqapriliiyhtsrllhsqiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqgg ntlpytfgggtkleikgggsgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpsetls lctvsgvslpdygvswwirppgkglewigviwgsettyyqsslsksrvtiskdnsk qvsiklssvtaadtavyycahhyyyggsyamydywgqgtlvtvss <hhhhhhhh< h=""></hhhhhhhh<>
104880 CAR6 - 全長- nt	95	atggccctcccagtgaccgctctgctgctcctcgctgctcctctctcctccacgcgc tcggcccgaaattgtgatgaccagtcacccgccactcttagcctttcaccgggtg agcgcgcaaccctgtcttgcagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagccggacaggctcctcgccctctgatctaccacaccagccgct

10

20

30

40

【表 17】

		ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacaccc tcaactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatcttctgtcagcaagg aacacccctgcctacacotttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcgggtggaggaagcggaggcggaggaggcagg tccaaactccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactg acttgtactgtgagcggagtgtctctcccgattacgggggtgtcttggatcagaca gccaccggggaagggtctggaatggattggagtgatctggggctctgagactactL actaccaatcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactotaagaat cagggtgtcactgaaactgtcatctgtgacgcagccgacacccgcgtgtactattg cgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggt ctctgggtaccgtgtccagcaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggt cctaccatcgctcccgacctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagc tgggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgctcgcatatctacatttggg ccccctctgggtggtaacttgcgggggtcctgtcttctcactcgtgatcactctttac tgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccctcatgaggcc tgtgcagactactcaagaggaggacggctgltcatgcgggtcccagaggaggagg aaggcgggtgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctac aagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagta cgacgtgctggacaaqcggaaggacgggacccagaaaatgggcgggaagccgcga gaaagaatccccagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa gcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaggccacgacgg actgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgaagctcttcacatgc aggccctgcgcgctcgg	10
104880 CAR6 – 全長 – aa	82	MALPVTALLPLALLHAARPeivmtqspatlsispgeratlsr <u>crasqdiskyl</u> nw yqqkpgqaprlly <u>htsr</u> lhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfc <u>qgg</u> <u>ntlpyt</u> fgqgtkleikggggsgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpsetls lctlvsgvslp <u>dygvs</u> wirppgkglewig <u>viwgsettyyqsslks</u> rvtlskdnsk qvsiklssvtaadtavyycak <u>hyyyggsyamy</u> wgqgtlvtssttppaprpptpa ptiasqpislrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitly ckrgrkkillyifkqpfmrpvqttqeedgcscrifpeeeeggcelrvkfsrsadapay kqqgnqlynelnlgrrreydvldkrzgrdpemggkprkrnpqeglynelqdkmae ayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr	30
CAR 7			
CAR7 scFv ドメイン	45	qvqlqesgpglvkpsetlsllctlvsgvslpdygvswirppgkglewigviwgset tyysssllksrvtlskdnskqvsiklssvtaadtavyycakhyyyggsyamywgq glvtvssggggsgggsgggsgggsgggseivmtqspatlsispgeratlsr <u>crasq</u> <u>iskyl</u> nwyqqkpgqaprlly <u>htsr</u> lhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfa vyfcqqgntlpytfgqgtkleik	40

【表 18】

100796 CAR7 - 可溶性 scFv - nt	58	atggcactgccgtgcaactgccclectgtgacctctggcclecttctgcatgccgc caggccccaagtccagctgcaagagtcaggaccggactgggtgaagccgtctgaga ctctctcactgacttgtaccgtcagcggcgltgacctcccgaactacggagtgtca tggatccgccaaacctcccggaagggcttgaatggattgggtgcatctggggttc tgaaaccacctactactcatcttccctgaagtcacgggtgaccatcagcaaggata attccaagaaccagggtcagccttaagctgtcatctgtgacctgtgtgacaccgcc gtgtattactgcgccaaagcactactattacggaggaagctacgctatggactattg gggacagggcactctcgtgaactgtgagcagcggcggtggagggtctggagggtggag gatccgggtgggtgggtcaggcggaggaggaggagcagattgtgatgactcagtca ccagccaccttctctcttccaccggcgagagagcaacctgtagctgtagagccag ccaggacatttctaagtaacctcaactgglatcagcaaaaaccggggcaggccctc gctcctgatctaccataacctcagccttcaactctggtatccccgctcggtttagc ggatcaggatctggtaaccgactacactctgacctttccagcctgcagccagaaga ttctgcagtgtatttctgccagcagggaataaccttcttacccttcgggtcagg gaaccaagctcgaaatcaagcaccatcaccatcatcaccaccat
100796 CAR7 - 可溶性 scFv - aa	70	<u>MALPVTALLPLALLHAARP</u> qvqlqesgpglvkpsetlsitctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyyslksrvtiskdsknqvslklssvtaadta vyycahyyyggsyamydwggllvtvssggggsgggsgggsgggsgggseivmlqs patlsispgeratlsccrasqdiskyinwyqqkpggaprlliyhtsrllhsgiparfs qsgsqtdytlitisslqpedfavfyfcqqnllpytfcqglkleik <u>hhhhhhh</u>
104881 CAR 7 全長 - nt	96	atggctctgcccgtgaccgcactcctccgcccactggctctgctgctllacgccgc lcqcccacaaglcagccllcaagaalcaggccctgctctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgcaccgtgagcggagtgtccctcccgaactacggagtgtgc tggattagacagcctcccggaagggactggagtggatcggagtgtatttggggtag cgaaaccacttactatctatcttccctgaagtcacgggtcaccatttcaaaggata actcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgcctgtgacaccgcc gtgtattactgtgccaaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactg gggccagggaactctggtaactgtgtcatctgggtggaggaggtagcggaggaggcg ggagcgggtggagggtggctccggagggtggcggaagcgaaatcgtgatgaccagagc cctgcaacctgtcccttctcccggggaacgggctacccttcttctgctgggcac acaagatalcclcaaaataacctcaaltgglatcaacagaagccgggacaggccclla ggcllcllcllaccacacclclcgccclgcalagcgggallcccgcaagclltagc gggctctggaagcgggacccgactacactctgacctctcatctclccagcccgagga ctctgcctgtacttctgccagcagggtaacacctgcctgacaccttcggccagg gcaaccaagcttgagatcaaaaccactactccgctccaaggccaccaccctgcc ccgaccatcgctctcagccgttctccclggclccggaggcatgtagaccgcagc tgggtggggccgtgcatacccgggclcttgaacttgcctgcgatactacatttggg cccctctggctggtaacttgggggtcctgtgttctactcgtgatcactctttac

10

20

30

40

【表 19】

		tgl aagcgcggcgcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggec tgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccgggtcccagaggaggagg aaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctac aagcaggggcagaaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagta cgacgtgctggacaagcggagaggacgggaaccagaaatgggcgggaagccgcgca gaaagaatccccagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa gcctatagcgagattgggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacgg actgtaccagggaactcagcaaccgccaccaaggacacctatgaogctcttcacatgc aggccctgcgcctcggg	10
104881 CAR 7 全長 - aa	83	MALPVTAILLPLALLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyvssslksrvtliskdsknqvslklssvtaadta vyycahhyvvggsyamydwgggtltvtvssgggsgggsgggsgggsgggseivmtqs patlsispgeratlscrasqdiskylnwyyqkpgqaprllyhtsrllhsgiparfs gsgsgtdytltlisslqpedfavyfcqggntlpytfgqggtkleiktttpprpplp ptiasqpislrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitly ckrgrkkilyifkqpfmrpvqttqeedgcscrifeeeeggcelrvkfssradapay kqgqnqlynelnigrreeydvldkrzrdrpemmkkprknpqeglynelqkdkmae ayseigmkgerrrrgkghdglyqglstatkdttydalhmqalppr	20
CAR 8			
CAR8 scFv ドメイン	46	qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgset tyyqssslksrvtliskdsknqvslklssvtaadtavyycahhyvvggsyamydwgg gtltvtvssgggsgggsgggsgggsgggseivmtqspatlsispgeratlscrasqd iskylnwyyqkpgqaprllyhtsrllhsgiparfsqsgsgtdytltlisslqpedfa vyfcqggntlpytfgqggtkleik	
100798 CAR8 - 可溶性 scFv - nt	59	atggcaclgectglcaactgcctcctgctgcctctggccctccttctgcatgcgc caggccccaagtcagctgcaagagtcaggaccggactggatgaagccgtctgaga ctctctcaactgactgtacgtcagcggcgtgtccctcccgaactacggagtgtca tggatccgccaaacctcccggaagggcttgaalggatlggtgtcaatctgggggttc tgaaaccacclacaccagttctccctgaagtcagggtgaccalcagcaaggata attccaagaaccaggtcagccttaagctgtcatctgtgaccgtgctgacaccgcc gtgtattactgcgccaaagcactactattacggagggaagctacgctatggactattg gggacagggcactctcgtgactgtgagcagcggcgggtggagggtctggagggtggag gatccgggtggtggtgggtcaggcggaggaggaggagcagattgtgatgactcagtc ccagccaccctttctctttcaccggcgagagagcaaccctgagctgtagagccag ccaggacattlctaagtaacctcaactggatcagcaaaaaccggggcaggccctc gcctcctgatctaccatacctcagccttcaactctcgtatcccccgtcgggttagc ggatcaggatctggtaacgactacactctgaccatttccagcctgcagccagaaga tttccgagtgatatttctgccagcagggcaalacccttcttaccacttcggtcagg	30
			40

【 0 6 2 2 】

10
20
30
40

40

【表 2 2】

		tccaactccaagaaagcggacgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactg acttgtactgtgagcggagtgtctctcccgattacgggtgtcttggatcagaca gccaccggggaaggtctggaatggatlggagtgattlggggclctgagactactt actacaactcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaat caggtgtcactgaaactgtcatctgtgacgcagccgacacgcgcgtgtaactattg cgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggta ctctgggtcacgtgtccagcaccactacccagcaccgaggccacccaccccggt cctaccatgcctccagcctctgtccctgggtccggaggcatgtagaccgcagc tgggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatattacatttggg ccccctcggctggtacltgcgggggtccctgctgctttcactcgtgatcactcttla tgtgaagcgggtcggagaagctgctgtacatctttaagcaacccctcatgaggcc tgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgcgggttccagaggaggagg aaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgclccagcctac aagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggctggagagaggagta cgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgca gaaagaalccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa gcctatagcagatttggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaggccacgcgg actgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggccctgcgcctcgg
105974 CAR 9 - 全長 - aa	85	MALPVTALLPLALLHAARPeivmtqspatlsispgeratlsc<u>rasqdiskylnw</u> yqqkpgqaprllly<u>htsrllhsg</u>iparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfc<u>qgg</u> <u>ntlpyt</u>fgqgtkleikggggsgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpsetls tctvsgvslp<u>dygvs</u>wirppgkglewig<u>viwgsettyynsslks</u>rvtiskdnskn qvsllkssvtaadtavyycah<u>hyvvggsyandy</u>wgggtlvtvsssttpaprpptpa ptiasqpislrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllsivitly ckrgkklilyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfeeeeeggcclrvkfsrsadapay kqqqnqlynelnigrreeydvldkrzrdrpennggkprknpqeglynelqkdmae ayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdttdalhmqalppr
CAR10		
CAR10 scFv ドメイン	48	qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirppgkglewigviwgset tyynsslksrvtiskdnsknqvsllkssvtaadtavyycahhyvvggsyandywgg gtlvtvssggggsgggsgggsgggsgggseivmtqspatlsispgeratlscrasq iskylnwyyqqkpgqaprlllyhtsrllhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfa vyfcqqgnllpytfgqgtkleik
100796 CAR10 - 可溶性	61	alggcactgcctgtcactgcctcctgctgcctctggccctccctctgcatgcgc caggccccaagtccagctgcaagagtcaaggaccggactggtgaagccgtctgaga ctctctcactgacttgtacgtcagcggcgtgtccctcccgactacggagtgtca tggatccgccaacctccgggaaagggttgaatggattgggtgtcatctggggttc

10

20

30

40

【表 2 3】

scFv - nt		tgaaccacactactacaactcttccctgaagtcacaggtgaccatcagcaaggata atlccaagaaccaggllcagcccttaagclgtcalclgtgaccgctgctgacaccgce gtgtattactgogccaagcactactattacggaggaagctacgctatggactattg gggacagggcactctcgtgacclgtgagcagcggcggtggagggctcggaggtggag gatccgggtggtggtgggtcaggcggaggaggaggagagattgtgatgactcagtc ccagccaccctttctccllccaccggcgagagagcaaccctgagctgtagagccag ccaggacatttttaagtaacctcaactgggtatcagcaaaaaccggggcaggccctc gcctcctgatctaccatacctcagcccltcaactctcgtatccccgctcgggttagc ggatcaggatctggtaccgaactacactctgaccatttccagcctgcagccagaaga tttcgcagtgtattttctgccagcagggaataaccttcccttacaccttcggtcagg gaaccaagctcgaaatcaagcaccatcaccatcatcaccaccat
100796 CAR10 - 可溶性 scFv - aa	73	<u>MALPVTALLPLALLHAARP</u> qvqlqesgpglvkpsetlsitctvsgvslpdygvs wirqppgkglewlgviwgsettyynsslksrvtiskdnknqvslklssvtaadta vyycahyyyggsyamydwgggtlvtvssggggsgggsgggsgggsgggseivmtqs pallslspgeratlscrasqdiskylwyyqqkpggapriliyhtsrhsgiparfs gsgsgtdytlitisslqpedfavycqqgntlpvtfsggtkleik <hbhbhbhbhb< h=""></hbhbhbhbhb<>
105975 CAR 10 全長 - nt	99	atggccctccctgtcacgcctcgtgcttccgctggctcttctgctccacgcgcg tcggcccgaaattgtgatgaccagtcacccgcactcttagcctttcaccgggtg agcgcgcaaccctgtcttgagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattgg talcaacagaagccggacaggctcctcgccttclgatclaccacaccagccggt ccattctggaatccctgccagggtcagcggtagcggaclctgggaccgactacacc tcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctattctgtcagcaaggg aacaccctgccctacacctttggacagggcaccgaagctcgagattaaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcggtggagggaagcggaggcggtgggagccagg tccaaactccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactcttcaactg acttgtactgtgagcggagtgctctcccgattacgggglgtcttggatcagaca gccaccggggaagggtctggaatggattggagtgatttggggclctgagactactt actacaactcaccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaat cagggtgctactgaaactgtcactgtgacccgagccgacaccgcctgtactattg cgctaagcaltactattatggcgggagctacgcaatggatlaactggggacagggt ctctgggtcacctgtccagcaccactacccagcaccgaggccaccaccccggt cclaccaclgcclcccagcclctglcccclggclcccgaggcatglagaccgcagc tgggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatattacatttggg ccctctgggtggtacttgcgggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttac tgtgaagcgggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcc tgtgcagactactcaagaggaggacggctglcatgcggllcccagagcaggagg aaggcggtgcgaactgcgcgtgaatlcagccgcagcgcagatgctccagcctac aagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagta

10

20

30

40

【表 2 4】

		cgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgca gaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa gcctatagcagagattgglatgaaaggggaacgcagaagaggcaaggccacgacgg actgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggccctgccgcctcgg
105975 CAR 10 全長 - aa	86	MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLS C <u>RASQDISKYL</u> NW YQQKPGQAPRLIY HTSRLHS GIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFC QQG NTLPYT FGQGTKLEIKGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGVQLQESGPGLVKPSSETLSL TCTVSGVSLP DYGV SWIRQPPGKGLEWIG VIWGSETTYNSSLKS RVTLISKDNSKN QVSLKLSSVTAADTAVYYCAKH HY <u>YGGSYAMDYWG</u> QGTIVTVSSITTPAPRPPTFA PTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY CKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY KQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRKRGDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPFR
CAR11		
CAR11 scFv ドメイン	49	eivmtqspatlsispggeratlsclrasqdiskylnwyyqqkpgqaprllyhtsrllhs giparfsgsgsgtdytltitisslqpedfavyfcqqgntlpytfgggtkleikggggs ggggsgggsgqvqlqesgpglvkpssetlsitctvsgvslpdygvswirppgkgle wigviwgsettyynssiksrvtiskdnsknqvsiklssvtaadtavyycakhyyyg gsyamdywgqgtlvtvss
103101 CAR11 - 可溶性 scFv - nt	62	Atggccctccctgtcaccgcctgctgcttccgctcggtctttctgctccacgcgc tcggcccgaaattgtgatgaccagtcacccgccactcttagcctttcaccgcgtg agcgcgcgaacctgltctlgcagagcctcccaagacatctcaaaatacctlaattgg tatcaacagaagccgggacaggtcctcgccttctgatctaccacaccagccggt ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaaccgactacacc tcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatctctgtcagcaagg aacacctgccctacaccttggacagggcaaccaagctcgagatlaaagggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcggtggaggaagccaggtccaactccaagaaa gcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagc ggagtgtctctcccgattacggggtgtcttggtatcagacagccaccggggaagg tctggaatggattggagtgatttggggtcttgagactacttactacaattcatccc tcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaa ctgtcatctgtgaccgcagccgacaccgcggtgtactaltgcgctaagcatlacta ttatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtaactctggtcacctgt ccagccaccaccatcaccatcaccat
103101	74	MALPVTALLLPLALLLHAARPE eivmtqspatlsispggeratlsclrasqdiskylnw

10

20

30

40

【表 2 5】

CAR11 - 可溶性 scFv - aa		yqqkpggaprlllyhtsrllhsgiparfgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqqg ntlpytfgqgtkleikgggsgggsgggsgqvlqesgpglvkpsetlsitctvs gvslpdygvswirpppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnskqnqvsik lssvtaadtavyycakhyyyggsyandywgqgtltvtvss <u>hhhhhhh</u>
105976 CAR 11 全長- nt	100	atggctctgcccgtgaacgcactcctcctgccactggctctgctgcttcaacgcgc tcgcccacnagtcacagcttcaagaatcagggcctgctctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgcaacgtgagcggagtgtccctccagactacggagtgagc tggalttagacagcctcccgaaagggaclggagtggatcggagtgatttggggtag cgaaaccacttactataactcttccctgaagtcacgggtcaccatttcaaaggata actcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcacggcgcgtgacacgcgc gtgtattactgtgccaagcatlactactalggagggtctcagccatggactactg gggccagggaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcg ggagcgggagggtggctccggagggtggcggaagcgaaatcgtgatgaccagagc cctgcaaccctgtccctttctcccggggaacgggctaccctttcttctgctgggcac acaagatatctcaaaatacctcaattgggtatcaacagaagccgggacaggcccta ggcttcttctaccacacctctcgctgcatacgagggtcccgcaacgcttttagc gggtctggaagcgggacgcactacactctgaccatctcatctctccagcccgagga cttcgcgtctactctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggccagg gcaccaagcttgagatcaaaaccactactccgcctccaaggccaccaccctgcc ccgaccatcgctctcagccqctllccctgcgtccggaggcatqlagaccocqacg tgggtggggccgtgcataaccgggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttggg ccctctggctggtaacttgccgggtctgctgctttcactcgtgatcactctttac tgtgaagcgggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcc tgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgcgggttccagaggaggagg aaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctac aagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagta cgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatggcggggaagccgcga gaaagaatccccaagaggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa gcctatagcgagattggatgaaaggggaacgcagaagaggcaaggccacgacgg actgtaccagggaactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggccctgcgcctcgg
105976 CAR 11 全長- aa	87	MALPVTALLPLALLHAARFQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLP <u>DYGV</u> WIRQPPGKGLEWIG <u>VIWGSETTYYNSSLKS</u> RVTIISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTA VYYCAK <u>HYYYGGSYAMDY</u> WGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGSEFVMTQS PATLSLSPGERATLS <u>RASQDISKYL</u> NWYQQKPGQAPRLLIY <u>HTSRLHS</u> GIPARFS GSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFC <u>QQGNTLPYT</u> FGQGTKLEIKTTTPAPRPPIPA PTIASQPLSLRPEACRPAAGCAVHTRGLDFACDIYIWAPLACTCGVLLSLVITLY

10

20

30

40

【表 2 6】

		CKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY KQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKFRKKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRRGKHGDLGYQGLSTATKDTYDALHMQALPFR
CAR12		
CAR12 scFv ドメイン	50	qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirppgkglewigviwgset tyynsslksrvtiskdnknqvsllkssvtaadtavyycahyyyggsyamydwgg gtlvtvssggsgggsgggsgggseivmtqspatlsispgeratlscrasqdiskyl nwyqqkpgqaprlllyhtsrllhsgiparfsgsgsgtdytltlisslqpedfavyfcq qgntlpytfgggtkleik
103104 CAR12 - 可溶性 scFv - nt	63	atggcctcgcggcggacgcacccctcctgccactggcctcgcctcgcctcgcacgcgc tcgcccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgacccgtgagcggagtgtccctccagactacggagtgagc tggattagacagcctcccggaaggactggagtggatcggagtgatttggggtag cgaaaccacttactataactcttccctgaagtcacgggacaccattlcaaaggata actcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcacgcgcgctgacaccgcc gtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactg gggcccagggaactctgggtcactgtgtcatctggtggaggaggttagcggaggaggcg ggagcgggtggagggtggctccgaaatcgtgatgacccagagccctgcaacctgtcc ctttctcccggggaacgggctaccctttcttctgctgggcacacaaagatatctcaa ataacctcaattgggtatcaacagaagccgggacaggcccttaggcttcttactacc acacctctcgctgcatacgagggttcccgacgcttttagcgggtctggaagcggg acgcactacactctgacccatctcatctctccagcccgaggacttgcgcgtctactt ctgccagcagggttaacaccctgccgtacaccttcggccagggaaccaagcttgaga tcaaacatcaccaccacatcaccatcac
103104 CAR12 - 可溶性 scFv - aa	75	<u>MALPVTALLPLALLHAARP</u> qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvs wirppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnknqvsllkssvtaadta vyycahyyyggsyamydwgggtlvtvssggsgggsgggsgggseivmtqspatls lspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlllyhtsrllhsgiparfsgsgs tdytltlisslqpedfavyfcqgntlpytfgggtkleik <hh<hh<hh<hh<hh< td=""></hh<hh<hh<hh<hh<>
105977 CAR 12 - 全長 - nt	101	atggccctccctgtcacgcctcgtgcttccgctggctcttctgctccacgcgc tcggcccgaaattgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcaccgggtg agcgcgcaacctgtcttgcagagcctcccaagacatctcaaaatacctlaattgg tatcaacagaagcccgacaggctcctcgccttctgactacacaccagccggct ccattctggaatccctgccagggtcagcggtagcggatctgggacgcactacccc tactatcagctcactgcagccagaggacttgcgtgtctatcttctgtcagcaaggg aacacctgcctacaccttggacagggaaccaagctcgagattaaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcgggtggagggaagccagggtccaactccaagaaa

10

20

30

40

【表 2 7】

		gcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagc ggagtgtctctcccgattacggggtgtcttggatcagacagccaccggggaaggg tctggaatggattggagtgatttggggtctctgagactacttactacaactcatccc tcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcaatgaaa ctgtcatctgtgacgcagccgacacgcgcgtglaactatlgcgctaagcattacta ttatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtaactctgggtaccgltg ccagcaccactaccccagcaccgagggccacccaccccggtcctaccatcgctcc cagcctctgtccclgcgtccggaggcatglagaccgcagctgggtggggccgtgca taaccgggggtcttgacttgcgcclgcgatalactacatttgggcccctctgggtggta cttgcgggggtcctgtctgttctcactcgtgatcactcttactgtgaagcgggtcgg aagaagctgtgtacatctttaagcaacccctcatgaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttcatgcgggtlcccagaggaggaggaaggcggctgcgaac tgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaac cagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaa gcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgagaaagaatccccaa aggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagatt ggatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggaact cagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcagggcctgcgcclc gg	10
105977 CAR 12 – 全長 - aa	88	MALPVTALLPLALLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSC<u>RASQDISKYL</u>NW YQQKPGQAPRLIY<u>HTSRLHS</u>GIPARFSGSGSDTYTLTISSLQPEDFAVYFC<u>QQG</u> <u>N</u>TLPYTFGQCTKLEIKGGGSGGGSGGGGQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GVSLP<u>DYGVS</u>WIRQPPGKGLEWIG<u>VIWGSETTYNSSLKSR</u>VTISKDNSKNQVSLK LSSVTAADTAVYYCAK<u>HYYYGGSYAMDY</u>WCQCTLVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIAS QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCCVLLSLVITLYCKRGR KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAFAYKQGQN QLYNEINLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNFQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKCHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALFPR	30
CTL019			
CTL019 – 可溶性 scFv-His タグ - nt	22	atggccctgccgctaccgctctgctgctgcccttgcctctgcttcttcatgcagc aaggccggacatccagatgacccaaaccacctcatccctctctgcctctctlggag acagggtgaccattctctgtgcgcgcagccaggacatcagcaagtaletgaacagg tatcagcagaagccggacgggaaccgtgaagctcctgatctaccatacctctcgct gcatagcggcgtgccctcacgcttctctggaagcggatcaggaaccgattattctc tcactatttcaaatcttgagcaggaagatattgccacctatttctgccagcagggt aataccctgcctacaccttcggaggagggaaccaagctcgaaatcacccgtggagg	40

		aggcagcggcggtggaggggtctggtggaggtggttctgaggtgaagctgcaagaat caggccclggacttglggccccccttcacaglccectgagcgtgacttgccacgtglcc ggagtctccctgcccgaactacggagtgatggatcagacaacctccacggaaagg actggaatggctcggltgcatctgggttagcgaaactactactacaattcagccc tcaaaagcaggcctgactallalcaaggacaaacagcaaglccecaagctcttcttaag algaactcactccagactgacgacaccgcaatctactattgtgctaagcactacta ctacggaggatcctacgctatggattactggggacaaggtacttcogtcaactgtct cttcacaccatcatcaccatcaccatcac
CTL019 – 可溶性 scFv-His タグ- aa	76	MALPVTALLLPLALLHAARPdiqmtgttsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnw yqqkpdgtvkiliiyhtsrllhsgvpsrfsqsgsgtdysititnleqediattyfcqqg ntlpytfggggtkleitggggsgggsggggsevkqlqesgpglvapsqslsvtctvs gvslpdygvswirqprrkglewlgviwgssettyynsaiksrlltiikdnksqvfik mnsllqtdddaitycakhyygygsyandywgqgtsvtvsshhhhhhhh
CTL019 全長- nt	102	atggccttaccagtgaacgccttgcctcctgcgcgtggccttgcctgcctccacgcgcg caggccggacatccagatgacacagactacatcctccctgtctgcctctctgggag acagagtcaccatcagttgcagggcaagtcaggacattagtaaatatttaaatagg tatcagcagaaaccagatggaactgttaaactcctgatctaccatacatcaagatt aactcaggagtcacatcaagggtcagtggcagtggtctggaacagattattctc tcaccattagcaacctggagcaagaagataltgccacttactlltgccaaacagggt aatacgccttcogtcaacgttcggaggggggaccaagctggagatcacagggtggcgg tggtcggggcgggtggtgggtcgggtggcggcggatctgaggtgaaactgcaggagt caggacctggcctggtgggcgcctcacagagcctgtccgtcacatgcactgtctca ggggtctcattaccgcactatggtgtaagctggatlcgccagcctccacgaaaggg tctggagtggctgggagtaatatggggtagtgaaccacataactataattcagctc tcaaatccagactgaccatcatcaaggacaactccaagagccaagttttcttaaaa algaacagctctgcaaaactgalgacacagccatttactactgtgccaaacattlatta ctacgggtggtagctatgctatggactactggggccaaggaaacctcagtcaccgtct cctcaaccacgacgcgcagcgcgcgaccaccaacacgcggcgccaccatcgcgtcg cagccccglctccctgcgcgccagaggcglgcgcggccagcggcgggggggcgcagtgca cacgagggggctggacttcgcctgtgatctctacatctgggcgccttcggccggga cttgtggggtccttctcctgtcactggttatcacccttactgcaaacggggcaga aagaaactcctgtatatattcaaacaccatttatgagaccagtacaaactactca agaggaagatggcglgagclgccgatllccagaagaagaagaaggaggatgtgaac tgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgcgcgcgcgtacaagcaggggccagaac cagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttgacaa gagacgtggccggggaccctgagatggggggaaagccgagaaggaagaacctcagg aaggcclglacaalgaactgcagaaagalaagalggcggaggccctacagtgagall gggatgaaaggcgcgcgcggaggggcaaggggcacgatggccttaccagggtct

30

40

【表 29】

		cagtacagccaccaaggacacctaagacgccecttcacatgcagggccctgccccctcgc
CTL019 全長- aa	89	MALFVTALLPLALLHAARFdiqmtqttsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnw yqqkpdgtvkllyhtsrhsgvpsrfsgsgsgtdysltisnlegediatyfcqqg ntlpytfgggtkleitggggsgggsgggsgggsevkiquesgpglvapsqslsvtctvs gvslpdygvswirqprrkglewlgviwgsettyynsalksrlltiikdnksqvflk mnsiqtdddtaiyycahyyyggsyamydgqgtsvtvsssttppaprpptpaptias qplslrpeacrpaaggavhtrgldfaadiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgz kklliyifkqpfmrpvqttgeedgcscrfeeeeeggcclrvkfrrsadapaykqgqn qlyneinlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdmaeysei gnkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
CTL019 scFv ドメイン	51	diqmtqttsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnwyyqqkpdgtvkllyhtsrhsg vpsrfsgsgsgtdysltisnlegediatyfcqqgntlpytfgggtkleitggggs ggggsgggsgggsevkiquesgpglvapsqslsvtctvsgvslpdygvswirqprrkg lewlgviwgsettyynsalksrlltiikdnksqvflkmnsiqtdddtaiyycahyyyg gsyamydgqgtsvtvss

10

20

【0631】

いくつかの実施形態において、抗原結合ドメインは、表3に列挙する重鎖結合ドメインアミノ酸配列のいずれかのHC CDR1、HC CDR2及びHC CDR3を含む。実施形態において、抗原結合ドメインは、更にLC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3を含む。実施形態において、抗原結合ドメインは、表3に列挙する軽鎖結合ドメインアミノ酸配列のいずれかのLC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3を含む。

【0632】

一実施形態において、抗原結合ドメインは、表3に記載する軽鎖結合ドメインアミノ酸配列のいずれかのLC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3の1、2又は全て及び表3に記載する重鎖結合ドメインアミノ酸配列のいずれかのHC CDR1、HC CDR2及びHC CDR3の1、2又は全てを含む。

30

【0633】

いくつかの実施形態において、CDRは、Kabat番号付けスキーム、Chothia番号付けスキーム又はそれらの組み合わせに従って定義される。

【0634】

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3A及び軽鎖可変ドメインについて表3Bに示す。「ID」は、各CDRの各配列番号を意味する。

【0635】

【表 3 0】

表3A. 重鎖可変ドメインCDR (Kabat)

候補	FW	HCDR1	ID	HCDR2	ID	HCDR3	ID
マウス_CART19		DYGVS	133	VIWGSETTYNSALKS	134	HYYYGGSYAMDY	138
ヒト化_CART19 a	VH4	DYGVS	133	VIWGSETTYSSSLKS	135	HYYYGGSYAMDY	138
ヒト化_CART19 b	VH4	DYGVS	133	VIWGSETTYQSSSLKS	136	HYYYGGSYAMDY	138
ヒト化_CART19 c	VH4	DYGVS	133	VIWGSETTYNSSLKS	137	HYYYGGSYAMDY	138

10

【 0 6 3 6】

【表 3 1】

表 3B 軽鎖可変ドメイン CDR

候補	FW	LCDR1	ID	LCDR2	ID	LCDR3	ID
マウス_CART19		RASQDISKYLN	139	HTSRLHS	140	QQGNTLPYT	141
ヒト化_CART19 a	VK3	RASQDISKYLN	139	HTSRLHS	140	QQGNTLPYT	141
ヒト化_CART19 b	VK3	RASQDISKYLN	139	HTSRLHS	140	QQGNTLPYT	141
ヒト化_CART19 c	VK3	RASQDISKYLN	139	HTSRLHS	140	QQGNTLPYT	141

20

【 0 6 3 7】

C A R と他の分子又は薬剤との共発現

第 2 の C A R の共発現

一態様において、本明細書に記載の C A R 発現細胞は、第 2 の C A R、例えば同じ標的（例えば、C D 1 9）又は異なる標的（例えば、C D 1 9 以外の標的、例えば、本明細書に記載の標的）に対する、例えば第 2 の C A R の異なる抗原結合ドメインを更に含む得る。一実施形態において、C A R 発現細胞は、第 1 の抗原を標的とし、共刺激性シグナル伝達ドメインを有するが、一次シグナル伝達ドメインを有しない細胞内シグナル伝達ドメインを含む第 1 の C A R 及び第 2 の、異なる、抗原を標的とし、一次シグナル伝達ドメインを有するが、共刺激性シグナル伝達ドメインを有しない細胞内シグナル伝達ドメインを含む第 2 の C A R を含む。第 1 の C A R への共刺激シグナル伝達ドメイン、例えば 4-1 B B、C D 2 8、C D 2 7、O X-4 0 又は I C O S 及び一次シグナル伝達ドメイン、例えば C D 3 ζ の第 2 の C A R への配置は、両標的が発現される細胞に対して C A R 活性を制限する。一実施形態において、C A R 発現細胞は、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン及び共刺激ドメインを含む第 1 の C A R 及び他の抗原を標的とし、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン及び一次シグナル伝達ドメインを含む第 2 の C A R を含む。別の実施形態において、C A R 発現細胞は、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン及び一次シグナル伝達ドメインを含む第 1 の C A R 及び他の抗原を標的とし、抗原に対する抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン及び共刺激性シグナル伝達ドメインを含む第 2 の C A R を含む。

30

40

【 0 6 3 8】

一実施形態において、C A R 発現細胞は、本明細書に記載の X C A R 及び阻害性 C A R を含む。一実施形態において、阻害性 C A R は、正常細胞、例えば X も発現する正常細胞で見られるが、癌細胞で見られない抗原と結合する抗原結合ドメインを含む。一実施形態において、阻害性 C A R は、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン及び阻害分子の細胞内ド

50

メインを含む。例えば、阻害性CARの細胞内ドメインは、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM（CEACAM-1、CEACAM-3及び／又はCEACAM-5）、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3（CD276）、B7-H4（VTCN1）、HVEM（TNFRSF14又はCD270）、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシン及びTGF（例えば、TGFβ）の細胞内ドメインであり得る。

【0639】

一実施形態において、CAR発現細胞が2以上の異なるCARを含むとき、異なるCARの抗原結合ドメインは、抗原結合ドメインが互いに相互作用しないようなものである。例えば、第1及び第2のCARを発現する細胞は、第2のCARの抗原結合ドメイン、例えばVHHである第2のCARの抗原結合ドメインと結合を形成しない、例えばフラグメント、例えばscFvとしての第1のCARの抗原結合ドメインを有し得る。

【0640】

一実施形態において、抗原結合ドメインは、単一ドメイン抗原結合（SDAB）分子を含み、相補的決定領域が単一ドメインポリペプチドの一部である分子を含む。例は、重鎖可変ドメイン、軽鎖を天然に欠く結合分子、慣用の4鎖抗体由来の単一ドメイン、操作されたドメイン及び抗体由来のもの以外の単一ドメインスキフォールドを含むが、これらに限定されない。SDAB分子は、当技術分野の又は将来的な単一ドメイン分子であり得る。SDAB分子は、マウス、ヒト、ラクダ、ラマ、ヤツメウナギ、魚類、サメ、ヤギ、ウサギ及びウシを含むが、これらに限定されない任意の種由来であり得る。この用語は、ラクダ科（Camelidae）及びサメ以外の種由来の天然に存在する単一ドメイン抗体分子も含む。

【0641】

一態様において、SDAB分子は、例えば、サメの血清に見られる新規抗原受容体（NAR）として知られる免疫グロブリンアイソタイプ由来であるような、魚類で見られる免疫グロブリンの可変領域に由来し得る。NAR（「IgNAR」）の可変領域由来の単一ドメイン分子を製造する方法は、国際公開第03/014161号パンフレット及びStreitsov（2005）Protein Sci. 14:2901-2909に記載されている。

【0642】

別の態様によると、SDAB分子は、軽鎖を欠く重鎖として知られる天然に存在する単一ドメイン抗原結合分子である。このような単一ドメイン分子は、例えば、国際公開第9404678号パンフレット及びHamers-Casterman, C. et al.（1993）Nature 363:446-448に記載されている。明確化するために、天然に軽鎖を欠く重鎖分子由来のこの可変ドメインは、ここでは、4鎖免疫グロブリンの慣用のVHと区別するためにVHH又はナノボディとして知られている。このようなVHH分子は、ラクダ科（Camelidae）種、例えばラクダ、ラマ、ヒトコブラクダ、アルパカ及びグアナコ由来であり得る。ラクダ科（Camelidae）以外の他の種は、天然に軽鎖を欠く重鎖分子を産生し得、このようなVHHは、本発明の範囲内である。

【0643】

SDAB分子は、組換え、CDR移植、ヒト化、ラクダ化、脱免疫化及び／又はインビトロ産生され得る（例えば、ファージディスプレイにより選択）。

【0644】

受容体の抗原結合ドメイン間を相互作用する抗原結合ドメインを含む複数のキメラ膜包埋受容体を有する細胞は、例えば、抗原結合ドメインの1つ以上がその同族抗原に結合することを阻止するため、望ましくない可能性があることも判明した。したがって、本明細書に開示されるのは、このような相互作用を最小化する、抗原結合ドメインを含む第1及び第2の天然に存在しないキメラ膜包埋受容体を有する細胞である。また、本明細書に開

10

20

30

40

50

示されるのは、このような相互作用を最小化する抗原結合ドメインを含む第1及び第2の天然に存在しないキメラ膜包埋受容体をコードする核酸並びにこのような細胞及び核酸を製造及び使用する方法である。一実施形態において、第1及び第2の天然に存在しないキメラ膜包埋受容体の抗原結合ドメインの一方は、s c F vを含み、他方は、単一V Hドメイン、例えばラクダ科、サメ若しくはヤツメウナギ単一V Hドメイン又はヒト若しくはマウス配列由来の単一V Hドメインを含む。

【0645】

一実施形態において、本明細書における組成物は、第1及び第2のC A Rを含み、ここで、第1及び第2のC A Rの一方の抗原結合ドメインは、可変軽ドメイン及び可変重ドメインを含まない。一実施形態において、第1及び第2のC A Rの一方の抗原結合ドメインは、s c F vであり、他方は、s c F vではない。一実施形態において、第1及び第2のC A Rの一方の抗原結合ドメインは、単一V Hドメイン、例えばラクダ科、サメ若しくはヤツメウナギ単一V Hドメイン又はヒト若しくはマウス配列由来の単一V Hドメインを含む。一実施形態において、第1及び第2のC A Rの一方の抗原結合ドメインは、ナノボディを含む。一実施形態において、第1及び第2のC A Rの一方の抗原結合ドメインは、ラクダ科V H Hドメインを含む。

【0646】

一実施形態において、第1及び第2のC A Rの一方の抗原結合ドメインは、s c F vを含み、他方は、単一V Hドメイン、例えばラクダ科、サメ若しくはヤツメウナギ単一V Hドメイン又はヒト若しくはマウス配列由来の単一V Hドメインを含む。一実施形態において、第1及び第2のC A Rの一方の抗原結合ドメインは、s c F vを含み、他方は、ナノボディを含む。一実施形態において、第1及び第2のC A Rの一方の抗原結合ドメインは、s c F vを含み、他方は、ラクダ科V H Hドメインを含む。

【0647】

一実施形態において、細胞の表面上に存在するとき、第1のC A Rの抗原結合ドメインのその同族抗原への結合は、第2のC A Rの存在により実質的に低減されない。一実施形態において、第2のC A Rの存在下の第1のC A Rの抗原結合ドメインのその同族抗原への結合は、第2のC A Rの非存在下の第1のC A Rの抗原結合ドメインのその同族抗原への結合の少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%、例えば85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%である。

【0648】

一実施形態において、細胞の表面上に存在するとき、第1及び第2のC A Rの抗原結合ドメインは、両方がs c F v抗原結合ドメインである場合より少なく互いに結合する。一実施形態において、第1及び第2のC A Rの抗原結合ドメインは、両方がs c F v抗原結合ドメインである場合より少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%少なく、例えば85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%少なく互いに結合する。

【0649】

C A R活性を強化する薬剤の共発現

別の態様において、本明細書に記載のC A R発現細胞は、別の薬剤、例えば、C A R発現細胞の活性又は適応度を増強する薬剤を更に発現できる。

【0650】

例えば、一実施形態において、薬剤は、T細胞機能を調節又は制御する、例えば、阻害する分子を阻害する薬剤であり得る。いくつかの実施形態において、T細胞機能を調節又は制御する分子は、阻害分子である。阻害分子、例えば、P D 1は、いくつかの実施形態において、C A R発現細胞が免疫エフェクター応答を開始する能力を減少させ得る。阻害分子の例は、P D 1、P D - L 1、C T L A 4、T I M 3、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又は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 I I、G A L 9、アデノシン又

10

20

30

40

50

は TGFβ を含む。

【0651】

実施形態において、例えば本明細書に記載されるような、薬剤、例えば阻害性核酸、例えば dsRNA、例えば siRNA 若しくは shRNA；又は例えば阻害性タンパク質若しくはシステム、例えば群生性等間隔短回文反復配列 (CRISPR)、転写一アクティベーター様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN) 又は亜鉛フィンガーエンドヌクレアーゼ (ZFN) を使用して、CAR 発現細胞において T 細胞の機能を調節又は制御する、例えば阻害する、分子の発現を阻害できる。一実施形態において、薬剤は、shRNA、例えば、本明細書に記載の shRNA である。一実施形態において、T 細胞機能を調節又は制御する、例えば阻害する薬剤は、CAR 発現細胞内で阻害される。例えば、T 細胞機能を調節又は制御する、例えば、阻害する分子の発現を阻害する dsRNA 分子は、CAR の成分、例えば全ての成分をコードする核酸に連結される。

10

【0652】

一実施形態において、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 2 のポリペプチド、例えば、本明細書に記載の細胞内シグナル伝達ドメインに結合した、第 1 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、PD1、PD-L1、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3 (CD276)、B7-H4 (VTCN1)、HVEM (TNFRSF14 又は CD270)、KIR、A2aR、MHC クラス I、MHC クラス II、GAL9、アデノシン若しくは TGFβ 又はこれらのいずれかのフラグメント (例えば、これらのいずれかの少なくとも細胞外ドメインの部分) などの阻害分子の第 1 のポリペプチド及び本明細書に記載の細胞内シグナル伝達ドメインである第 2 のポリペプチド (例えば、共刺激ドメイン (例えば、本明細書に記載のような例えば 41BB、CD27 又は CD28) 及び/又は一次シグナル伝達ドメイン (例えば、本明細書に記載の CD3ζ シグナル伝達ドメインを含む) である第 2 のポリペプチドを含む。一実施形態において、薬剤は、PD1 又はそのフラグメント (例えば、PD1 の少なくとも細胞外ドメインの部分) の第 1 のポリペプチド並びに本明細書に記載の細胞内シグナル伝達ドメイン (例えば、本明細書に記載の CD28 シグナル伝達ドメイン及び/又は本明細書に記載の CD3ζ シグナル伝達ドメイン) の第 2 のポリペプチドを含む。PD1 は、CD28、CTLA-4、ICOS 及び BTLA も含む受容体の CD28 ファミリーの阻害性メンバーである。PD-1 は、活性化 B 細胞、T 細胞及び骨髄細胞に発現される (Agata et al. 1996 Int. Immunol 8: 765-75)。PD1 に対する 2 リガンド、PD-L1 及び PD-L2 は、PD1 への結合により T 細胞活性化を下方制御することが示されている (Freeman et al. 2000 J Exp Med 192: 1027-34; Latchman et al. 2001 Nat Immunol 2: 261-8; Carter et al. 2002 Eur J Immunol 32: 634-43)。PD-L1 は、ヒト癌において豊富である (Dong et al. 2003 J Mol Med 81: 281-7; Blank et al. 2005 Cancer Immunol. Immunother 54: 307-314; Konishi et al. 2004 Clin Cancer Res 10: 5094)。免疫抑制は、PD1 と PD-L1 との局所相互作用の阻害により逆転できる。

20

30

40

【0653】

一実施形態において、薬剤は、阻害分子、例えばプログラム細胞死 1 (PD1) (本明細書では PD1 CAR と称する) の細胞外ドメイン (ECD) を含み、膜貫通ドメイン及び 41BB 及び CD3ζ などの細胞内シグナル伝達ドメインに融合され得る。一実施形態において、PD1 CAR は、本明細書に記載の XCAR と組み合わせて使用したとき、T 細胞の残留性を改善する。一実施形態において、CAR は、配列番号 105 において下線で示す PD1 の細胞外ドメインを含む PD1 CAR である。一実施形態において、PD1 CAR は、配列番号 105 のアミノ酸配列を含む。

50

【化 2 6】

Malpvtalllplalllhaarppgwflsdprpwnpptfspallvvtgednatficsfsntsesfvlnwyrmspsnqtdklaaf
pedrsqpgqdcfrvrtqlpngrdfhmsvvrarrndsgtylclgaislapkaqikesraelrvterraevptahpspsprpagqfqlvttt
 paprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrglldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqtqee
 dgscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnllynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprknpqeglynelqkdkma
 cayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqlppr (配列番号105)

【0 6 5 4】

10

一実施形態において、PD1 CARは、下記アミノ酸配列を含む（配列番号106）。

【化 2 7】

pgwflsdprpwnpptfspallvvtgednatficsfsntsesfvlnwyrmspsnqtdklaafpedrsqpgqdcfrvrtqlp
ngrdfhmsvvrarrndsgtylclgaislapkaqikesraelrvterraevptahpspsprpagqfqlvttt
 paprpptpaptiasqplslr
 eacrpaaggavhtrglldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqtqeedgscrfpeeeeggcelrvkf
 srsadapaykqgqnllynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdgl
 yqglstatkdydalhmqlppr (配列番号106)

20

【0 6 5 5】

一実施形態において、薬剤は、PD1 CAR、例えば、本明細書に記載のPD1 CARをコードする核酸配列を含む。一実施形態において、下記配列番号107でPD1 ECDに下線を付して、PD1 CARの核酸配列を下に示す。

【化 2 8】

atggccctccctgtcactgacctgcttctccccctgcactcctgctccacgccgctagaccacccggatggtttctgactctc
cgatcgcccggtgaatcccccaacctctcaccggcactcttggttgactgagggcgataatgcaccttcacgtctcgttctccaa
cacctccgaatcattctgctgaactggtaccgcatgagcccgtaaacagaccgacaagctcgccggtttccggaagatcggtcgc
aaccgggacaggaftgtcggttccgcgtgactcaactgccgaatggcagagactccacatgagcggtgctccgcgtagcggaacga
ctccgggacctacctgtcgaggagccatctcgtcgccctaaaggccaaatcaaaagagacttgaggcggaactgagagtgaaccga
ggcgagagctgaggtgccaaactgcacatccatccccatgcctcgccctgcccggcagtttcagaccctggtcacgaccactccggcg
ccgcgcccaccgactccggccccaactatcgagagccagccctgtcgtgagggcggaagcatgccgacctgcccgggaggtgc
tgtgcataccggggatggacttgcacgacatctacatttgggtctctcgcgggaactgtggcggtctctctgtccctgtcat
cacctgtactgcaagcggggtcggaataagcttctgtacatttcaagcagcccttcagagcccggtgcaaacaccagaggagg
acggttgctctgcccgttccccgaagaggaagaaggaggttcgagctgcgcgtgaagtctccggagcgccgacgccccgcct
ataagcaggggcagaaccagctgtacaacgaactgaacctgggacggcggaagatgacatgtgtggacaagcgccgcccgg
ggaccccgaaatggcggggaagcctagaagaaagaacctcaggaaggcctgtataacgagctgcagaaggacaagatggccgag
gcctactccgaaattgggatgaaggagagcgggcgagggggaaaggggcacgacggcctgtaccaaggactgtccaccgccacca
 aggacacatacagatgcctgcacatgcaggcccttccccctcgc (配列番号107)

30

40

【0 6 5 6】

別の例において、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、共刺激分子又は共刺激分子リガンドであり得る。共刺激分子の例には、MHCクラスI分子、BTLA及びTollリガンド受容体並びにOX40、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1（CD11a/CD18）、ICOS（CD278）及び4-1BB（CD137）が含まれる。そのような共刺激分子の更なる例は、CDS、ICAM

50

- 1、G I T R、B A F F R、H V E M (L I G H T R)、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 6 0、C D 1 9、C D 4、C D 8 α、C D 8 β、I L 2 R β、I L 2 R γ、I L 7 R α、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 及び C D 8 3 と特異的に結合するリガンド、例えば本明細書に記載されるようなものを含む。共刺激分子リガンドの例には、C D 8 0、C D 8 6、C D 4 0 L、I C O S L、C D 7 0、O X 4 0 L、4 - 1 B B L、G I T R L 及び L I G H T が含まれる。実施形態において、共刺激分子リガンドは、C A R の共刺激分子ドメインと異なる共刺激分子のリガンドである。実施形態において、共刺激分子リガンドは、C A R の共刺激分子ドメインと同一の共刺激分子のリガンドである。一実施形態において、共刺激分子リガンドは 4 - 1 B B L である。一実施形態において、共刺激リガンドは、C D 8 0 又は C D 8 6 である。一実施形態において、共刺激分子リガンドは C D 7 0 である。実施形態において、本明細書に記載される C A R 発現免疫エフェクター細胞は、1 つ以上の追加の共刺激分子又は共刺激分子リガンドを発現するように更に操作され得る。

【0657】

C A R と ケモカイン受容体の共発現

実施形態において、本明細書に記載の C A R 発現細胞、例えば C D 1 9 C A R 発現細胞は、更に、ケモカイン受容体分子を含む。T 細胞におけるケモカイン受容体 C C R 2 b 又は C X C R 2 のトランスジェニック発現は、黒色腫及び神経芽腫を含む C C L 2 - 又は C X C L 1 分泌固形腫瘍への輸送を促進する (C r a d d o c k e t a l . , J I m m u n o t h e r . 2 0 1 0 O c t ; 3 3 (8) : 7 8 0 - 8 及び K e r s h a w e t a l . , H u m G e n e T h e r . 2 0 0 2 N o v 1 ; 1 3 (1 6) : 1 9 7 1 - 8 0) 。そのため、理論に拘束されることを望むものではないが、腫瘍、例えば、固形腫瘍により分泌されるケモカインを認識する C A R 発現細胞で発現されるケモカイン受容体は、C A R 発現細胞の腫瘍への帰巢を改善し、C A R 発現細胞の腫瘍への浸潤を促進し、及び C A R 発現細胞の抗腫瘍効果を増強すると考えられる。ケモカイン受容体分子は、天然に存在する又は組換えケモカイン受容体又はそのケモカイン結合フラグメントを含み得る。本明細書に記載の C A R 発現細胞 (例えば、C A R - T x) における発現に適するケモカイン受容体分子は、C X C ケモカイン受容体 (例えば、C X C R 1、C X C R 2、C X C R 3、C X C R 4、C X C R 5、C X C R 6 又は C X C R 7)、C C ケモカイン受容体 (例えば、C C R 1、C C R 2、C C R 3、C C R 4、C C R 5、C C R 6、C C R 7、C C R 8、C C R 9、C C R 1 0 又は C C R 1 1)、C X 3 C ケモカイン受容体 (例えば、C X 3 C R 1)、X C ケモカイン受容体 (例えば、X C R 1) 又はそのケモカイン結合フラグメントを含む。一実施形態において、本明細書に記載の C A R と共に発現するケモカイン受容体分子は、腫瘍により分泌されるケモカインに基づき選択する。一実施形態において、本明細書に記載の C A R 発現細胞は、更に、C C R 2 b 受容体又は C X C R 2 受容体を含む、例えば、発現する。一実施形態において、本明細書に記載の C A R 及びケモカイン受容体分子は、同じベクターにある又は 2 つの異なるベクターにある。本明細書に記載の C A R 及びケモカイン受容体分子が同じベクターに実施形態において、C A R 及びケモカイン受容体分子は、各々、2 つの異なるプロモーターの制御下にあるか又は同じプロモーターの制御下にある。

【0658】

CARをコードする核酸構築物

本発明は、本明細書に記載される1つ以上のCAR構築物をコードする核酸分子を含む免疫エフェクター細胞、例えば本明細書に記載の方法によって作製されたものも提供する。一態様において、核酸分子は、メッセンジャーRNA転写物として提供される。一態様において、核酸分子は、DNA構築物として提供される。

【0659】

本明細書に記載される核酸分子は、DNA分子、RNA分子又はそれらの組み合わせであり得る。一実施形態において、核酸分子は、本明細書に記載されるようなCARポリペプチドをコードするmRNAである。他の実施形態において、核酸分子は、前述の核酸分子のいずれかを含むベクターである。

10

【0660】

一態様において、本発明のCARの抗原結合ドメイン（例えば、scFv）は、その配列が哺乳動物細胞における発現のためにコドン最適化されている核酸分子によってコードされる。一態様において、本発明のCAR構築物全体は、その配列全体が哺乳動物細胞での発現のためにコドン最適化されている核酸分子によってコードされる。コドン最適化とは、コーディングDNAにおける同義コドン（すなわち同じアミノ酸をコードするコドン）の出現頻度が異なる種に偏っているという発見を指す。そのようなコドン縮重は、同一のポリペプチドが様々なヌクレオチド配列によってコードされることを可能にする。様々なコドン最適化方法が当技術分野で知られており、例えば、少なくとも米国特許第5,786,464号明細書及び同第6,114,148号明細書に開示される方法が含まれる。

20

【0661】

したがって、一態様において、免疫エフェクター細胞、例えば本発明の方法により作製されたものは、キメラ抗原受容体（CAR）をコードする核酸分子を含み、CARは、本明細書に記載の腫瘍抗原に結合する抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン（例えば、本明細書に記載の膜貫通ドメイン）並びに刺激ドメイン、例えば、共刺激シグナル伝達ドメイン（例えば、本明細書に記載の共刺激シグナル伝達ドメイン）及び／又は一次シグナル伝達ドメイン（例えば、本明細書に記載の一次シグナル伝達ドメイン、例えば、本明細書に記載の鎖）を含む細胞内シグナル伝達ドメイン（例えば、本明細書に記載の細胞内シグナル伝達ドメイン）を含む。

30

【0662】

本発明は、CARをコードする核酸分子、例えば、本明細書に記載の核酸分子が挿入されているベクターも提供する。レンチウイルスなどのレトロウイルス由来のベクターは、それらが導入遺伝子の長期の安定した組み込み及び娘細胞への伝播を可能にするため、長期遺伝子導入を達成するのに適するツールである。レンチウイルスベクターは、肝細胞などの非増殖細胞を形質導入できる点で、マウス白血病ウイルスなどのオンコレトロウイルス由来のベクターを超える更なる利点を有する。更に、それらは、低免疫原性であるという付加的利点も有する。レトロウイルスベクターは、例えば、γレトロウイルスベクターでもあり得る。γレトロウイルスベクターは、例えば、プロモーター、パッケージングシグナル（ψ）、プライマー結合部位（PBS）、1つ以上の（例えば、2）末端反復配列（LTR）及び目的の導入遺伝子、例えば、CARをコードする遺伝子を含み得る。γレトロウイルスベクターは、gag、pol及びenvなどのウイルス構造的遺伝子を欠き得る。例示的なγレトロウイルスベクターは、マウス白血病ウイルス（MLV）、脾フォーカス形成ウイルス（SFFV）及び骨髓増殖性肉腫ウイルス（MPSV）及びそれら由来のベクターを含む。他のγレトロウイルスベクターは、例えば、Tobias Maetzig et al., "Gammaretroviral Vectors: Biology, Technology and Application" Viruses . 2011 Jun; 3 (6) : 677-713に記載される。

40

【0663】

50

別の実施形態において、所望のCARをコードする核酸を含むベクターは、アデノウイルスベクター（A5／35）である。別の実施形態において、CARをコードする核酸の発現は、sleeping beauty、crisper、CAS9及び亜鉛フィンガーヌクレアーゼなどのトランスポゾンを使用して達成できる。参照により本明細書に包含される下記のJune et al. 2009 Nature Reviews Immunology 9. 10: 704-716を参照されたい。

【0664】

概説すると、CARをコードする天然又は合成核酸の発現は、典型的には、CARポリペプチドをコードする核酸又はその一部をプロモーターに操作可能に連結させ、その構築物を発現ベクターに取り込むことにより達成される。ベクターは、真核生物での複製及び組込みに適し得る。典型的クローニングベクターは、所望の核酸配列の発現の制御に有用な転写及び翻訳ターミネーター、開始配列及びプロモーターを含む。

10

【0665】

核酸は、多数のタイプのベクターにクローン化できる。例えば、核酸は、プラスミド、ファージミド、ファージ誘導体、動物ウイルス及びコスミドを含むが、これらに限定されないベクターにクローン化できる。特に興味深いベクターは、発現ベクター、複製ベクター、プローブ産生ベクター及びシーケンシングベクターを含む。

【0666】

更に、発現ベクターは、ウイルスベクターの形で細胞に提供され得る。ウイルスベクターテクノロジーは当分野で周知であり、例えば、Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY及び他のウイルス学及び分子生物学マニュアルに記載されている。ベクターとして有用なウイルスは、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス及びレンチウイルスを含むが、これらに限定されない。一般に、適当なベクターは、少なくとも1生物で機能的な複製起点、プロモーター配列、便利な制限エンドヌクレアーゼ部位及び1つ以上の選択可能マーカーを含む（例えば、国際公開第01／96584号パンフレット；国際公開第01／29058号パンフレット；及び米国特許第6,326,193号明細書）。

20

【0667】

多数のウイルスベースの系が、哺乳動物細胞への遺伝子移入のために開発されている。例えば、レトロウイルスは、遺伝子送達系のための簡便なプラットフォームを提供する。選択した遺伝子を、当分野で知られる技術を使用して、ベクターに挿入し、レトロウイルス粒子に包装できる。次いで、組換えウイルスが単離され、対象の細胞にインビボ又はエキスピボで送達され得る。多数のレトロウイルス系が当分野で知られる。一実施形態において、アデノウイルスベクターを使用する。多数のアデノウイルスベクターが当分野で知られる。一実施形態において、レンチウイルスベクターを使用する。

30

【0668】

更なるプロモーター要素、例えば、エンハンサーは、転写開始の頻度を制御する。典型的には、これらは、開始部位の上流30～110bpの領域に位置するが、多数のプロモーターが、同様に開始部位の下流に機能的要素を含むことが示されている。プロモーター要素間の空間はしばしば可動性であり、そのため、要素が互いに逆になったとき又は移動したときにプロモーター機能が保持される。チミジンキナーゼ（tk）プロモーターにおいて、プロモーター要素間の空間は、活性が落ち始める前、50bp離れるまで増加し得る。プロモーターにより、個々の要素は、転写を活性化するために協調的又は独立的に機能できるように見える。代表的プロモーターは、CMV IE遺伝子、EF-1 α 、ユビキチンC又はホスホグリセロキナーゼ（PGK）プロモーターを含む。

40

【0669】

哺乳動物T細胞においてCARコード核酸分子を発現することができるプロモーターの例は、EF1 α プロモーターである。天然EF1 α プロモーターは、アミノアシルtRN

50

Aのリボソームへの酵素送達を担う伸長因子-1複合体のαサブユニットの発現を駆動する。EF1αプロモーターは、哺乳動物発現プラスミドで広く使用されており、レンチウイルスベクターにクローン化された核酸分子からCAR発現を駆動するのに有効であることが示されている。例えば、Milone et al., Mol. Ther. 17 (8) : 1453-1464 (2009)を参照されたい。一態様において、EF1αプロモーターは、実施例で提供される配列を含む。

【0670】

プロモーターの別の例は、最初期サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター配列である。このプロモーター配列は、それに操作可能に連結したあらゆるポリヌクレオチド配列の高レベルの発現を駆動できる、強い構成的プロモーター配列である。しかしながら、サルウイルス40 (SV40) 初期プロモーター、マウス乳房腫瘍ウイルス (MMTV)、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 末端反復配列 (LTR) プロモーター、MoMuLVプロモーター、トリ白血病ウイルスプロモーター、エプスタインバーウイルス最初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーターを含むが、これらに限定されない他の構成的プロモーター配列並びにアクチンプロモーター、ミオシンプロモーター、伸長因子-1αプロモーター、ヘモグロビンプロモーター及びクレアチンキナーゼプロモーターなど、しかし、これらに限定されないヒト遺伝子プロモーターも使用し得る。更に、本発明は、構成的プロモーターの使用に限定すべきではない。誘導性プロモーターも本発明の一部であるとして意図される。誘導性プロモーターの使用は、操作可能に連結したポリヌクレオチド配列の発現を、発現が望まれるときに発現を活性化し、発現が望まれないときに発現を遮断することができる分子スイッチを提供する。誘導性プロモーターの例は、メタロチオネインプロモーター、グルココルチコイドプロモーター、プロゲステロンプロモーター及びテトラサイクリンプロモーターを含むが、これらに限定されない。

【0671】

プロモーターの別の例は、ホスホグリセラートキナーゼ (PGK) プロモーターである。実施形態において、切断PGKプロモーター (例えば、野生型PGKプロモーター配列と比較したとき、1つ以上の、例えば、1、2、5、10、100、200、300又は400ヌクレオチド欠失を有するPGKプロモーター) が望ましいことがある。

【0672】

PGKプロモーター例のヌクレオチド配列を下に提供する。

WT PGKプロモーター：

【化29】

```
ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACG
CGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGA
TGGCGGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCCGC
GCGGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTGCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGT
AACGAGGGACCGCGACAGGCAGACGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAAGGCA
AATAGTGCAGGCCGTGCGGCGCTTGGCGTTCCTTGGAAGGGCTGAATCCCCGCCTC
GTCCTTCGCAGCGGCCCCCGGGTGTTCCTTCGCGCTTCTAGGCCCACTGCGAC
GCTTGCCTGCACTTCTTACACGCTCTGGGTCCCAGCCGCGGCGACGCAAAGGGCCT
TGGTGCGGGTCTCGTCGGCGCAGGGACGCGTTTGGGTCCCGACGGAACCTTTTCCG
CGTTGGGGTTGGGGCACCATAAGCT (配列番号109)
```

例示的な切断型PGKプロモーター：

PGK100：

【化 3 0】

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACG
CGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGA
TGGCGGGGTG (配列番号110)

P G K 2 0 0 :

【化 3 1】

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACG
CGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGA
TGGCGGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCCGC
GCGGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGT
AACG (配列番号111)

10

P G K 3 0 0 :

【化 3 2】

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACG
CGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGA
TGGCGGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCCGC
GCGGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGT
AACGAGGGACCGCGACAGGCAGACGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAAGGCA
AATAGTGCAGGCCGTGCGGCGCTTGGCGTTCCTTGGAAGGGCTGAATCCCCG (配列
番号112)

20

P G K 4 0 0 :

【化 3 3】

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACG
CGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGA
TGGCGGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCCGC
GCGGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGT
AACGAGGGACCGCGACAGGCAGACGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAAGGCA
AATAGTGCAGGCCGTGCGGCGCTTGGCGTTCCTTGGAAGGGCTGAATCCCCGCCTC
GTCCTTCGCAGCGGCCCCCGGGTGTTCCTTCGCGCTTCTAGGCCCACTGCGAC
GCTTGCCTGCACTTCTTACACGCTCTGGGTCCCAGCCG (配列番号113)

30

40

【0 6 7 3】

ベクターは、例えば、分泌を促進するためのシグナル配列、ポリアデニル化シグナル及び転写ターミネーター（例えば、ウシ成長ホルモン（B G H）遺伝子から）、エピソード複製及び原核生物における複製を可能にする要素（例えばS V 4 0 起源及びC o l E 1 又は当分野で知られるその他）及び／又は選択を可能にする要素（例えば、アンピシリン耐性遺伝子及び／又はゼオシンマーカ）も含み得る。

【0 6 7 4】

C A R ポリペプチド又はその一部の発現を評価するために、細胞に導入する発現ベクタ

50

一遺伝子導入又はウイルスベクターによる感染が探求される細胞の集団から発現細胞から発現細胞の同定及び選択を容易にするために、選択可能マーカー遺伝子又はレポーター遺伝子又は両者も含み得る。他の態様において、選択可能マーカーは、DNAの別の断面に担持され、共トランスフェクション法において使用される。選択可能マーカー及びレポーター遺伝子のいずれも、宿主細胞における発現が可能であるように、適切な制御配列が隣接し得る。有用な選択可能マーカーは、例えば、neoなどの抗生物質耐性遺伝子を含む。

【0675】

レポーター遺伝子は、恐らく遺伝子導入されている細胞を同定し、制御配列の機能性を評価するために使用される。一般に、レポーター遺伝子は、レシピエント生物又は組織に存在又は発現されず、発現がある容易に検出可能な特性、例えば、酵素活性により顕在化されるポリペプチドをコードする、遺伝子である。レポーター遺伝子の発現を、DNAがレシピエント細胞に導入されてから適当な時間後にアッセイする。適当なレポーター遺伝子は、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、分泌型アルカリホスファターゼ又は緑色蛍光タンパク質遺伝子をコードする遺伝子を含み得る（例えば、U i - T e i e t a l . , 2000 F E B S L e t t e r s 479:79-82）。適当な発現系は周知であり、既知技術により製造でき又は商業的に入手できる。一般に、レポーター遺伝子の最高レベルの発現を示す最小5'フランキング領域を有する構築物をプロモーターとして同定する。このようなプロモーター領域は、レポーター遺伝子に連結し、プロモーター駆動転写を調節する能力について薬剤を評価するのに使用し得る。

【0676】

実施形態において、ベクターは、CAR、例えば本明細書に記載のCAR、例えばCD19 CAR及び第2のCAR、例えば阻害性CAR又はCD19以外の抗原に特異的に結合するCARをコードする2つ以上の核酸配列を含み得る。このような実施形態において、2以上のCARをコードする核酸配列は、同じフレームにおいて単一核分子により且つ単一ポリペプチド鎖としてコード化される。この態様において、2以上のCARは、例えば、1つ以上のペプチド開裂部位により分けられ得る（例えば、自己開裂部位又は細胞内プロテアーゼのための基質）。ペプチド切断部位の例には、T2A、P2A、E2A又はF2A部位が含まれる。

【0677】

細胞に遺伝子を導入し、発現させる方法は当分野で知られる。発現ベクターに関連して、ベクターは、任意の方法、例えば当技術分野で知られたものにより、宿主細胞、例えば、哺乳動物、細菌、酵母又は昆虫細胞に容易に導入できる。例えば、例えば、発現ベクターは、物理的、化学的又は生物学的手段により、宿主細胞に移入される。

【0678】

宿主細胞にポリヌクレオチドを導入するための物理的方法は、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、微粒子銃、微量注入、エレクトロポレーションなどを含む。ベクター及び／又は外来性核酸を含む細胞を産生する方法は、当分野で周知である。例えば、S a m b r o o k e t a l . , 2012, M O L E C U L A R C L O N I N G : A L A B O R A T O R Y M A N U A L , v o l u m e s 1 - 4 , C o l d S p r i n g H a r b o r P r e s s , N Yを参照されたい）。宿主細胞へのポリヌクレオチドの導入するための適切な方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションである。

【0679】

宿主細胞に目的のポリヌクレオチドを導入するための生物学的方法は、DNA及びRNAベクターの使用を含む。ウイルスベクター、特にレトロウイルスベクターは、哺乳動物、例えば、ヒト細胞への遺伝子挿入に最も広く使用される方法となってきた。他のウイルスベクターは、レンチウイルス、ポックスウイルス、単純ヘルペスウイルスI、アデノウイルス及びアデノ関連ウイルスなどに由来し得る。例えば、米国特許第5,350,674号明細書及び同第5,585,362号明細書を参照されたい。

【0680】

宿主細胞にポリヌクレオチドを導入するための化学的手段は、巨大分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズ及び水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセル及びリポソームを含む脂質ベースの系などのコロイド分散体系を含む。インビトロ及びインビボで送達媒体として使用するための代表的コロイド系は、リポソーム（例えば、人工膜小胞）である。標的化ナノ粒子又は他の適当なサブミクロンサイズの送達系を用いるポリヌクレオチドの送達など、最新式の核酸の標的化送達の他の方法が利用可能である。

【0681】

非ウイルス送達系を利用する場合、代表的送達媒体はリポソームである。脂質製剤の使用は、宿主細胞への核酸の導入のために意図される（インビトロ、エクスビボ又はインビボ）。別の態様において、核酸は、脂質と結合され得る。脂質と結合した核酸は、リポソームの水性内部への被包、リポソームの脂質二重層内への分散、リポソームとオリゴヌクレオチドの両者と結合する連結分子を介するリポソームへの結合、リポソームへの封入、リポソームとの複合体化、脂質含有溶液への分散、脂質との混合、脂質との組み合わせ、脂質中の懸濁液としての包含、ミセル内への包含又は複合体化又は他の方法で脂質と結合する。脂質、脂質／DNA又は脂質／発現ベクター結合組成物は、溶液中の何らかの特定の構造に限定されない。例えば、それらは、二重層構造において、ミセルとして又は「崩壊」構造を有して存在し得る。それらはまた、単に溶液に分散され、恐らくサイズ又は形が均一ではない凝集体を形成し得る。脂質は、天然に存在する又は合成脂質であり得る脂肪物質である。例えば、脂質は、細胞質に天然に生じる脂肪滴並びに脂肪酸、アルコール、アミン、アミノアルコール及びアルデヒドなどの長鎖脂肪族炭化水素を含む化合物群及びその誘導体を含む。

【0682】

使用に適する脂質は、商業的供給源から得ることができる。例えば、ジミリスチルホスファチジルコリン（「DMPC」）は、Sigma, St. Louis, MOから得ることができ、リン酸ジセチル（「DCP」）はK&K Laboratories (Plainview, NY) から得ることができ；コレステロール（「Choi」）はCalbiochem-Behringから得ることができ、ジミリスチルホスファチジルグリセロール（「DMPG」）及び他の脂質は、Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL.) から得ることができる。クロロホルム又はクロロホルム／メタノール中の脂質の原液を、約-20℃で保存できる。クロロホルムを、メタノールよりも容易に揮発するために、唯一の溶媒として使用する。「リポソーム」は、封入された脂質二重層又は凝集体の産生により形成される多様な単及び多層状脂質媒体を包含する一般的用語である。リポソームは、リン脂質二重層膜及び内部水性媒体を伴う小胞構造を有することにより特徴付けられる。多層状リポソームは、水性媒体により分離された、複数の脂質層を有する。それらは、リン脂質が過剰の水溶液に懸濁されたときに自然に形成される。脂質要素は、閉構造形成前に自己凝集し、水及び溶解した溶質を脂質二重層間に封入する（Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5: 505-10）。しかしながら、通常の小胞構造と異なる構造を溶液で有する組成物も包含される。例えば、脂質は、ミセル構造であるか又は単に脂質分子の不均一凝集体として存在すると考えられ得る。リポフェクタミン-核酸複合体も考慮される。

【0683】

外来性核酸を宿主細胞に導入する又はそうでなければ細胞を本発明の阻害剤に曝す方法に関係なく、宿主細胞における組換え核酸配列の存在を確認するために、多様なアッセイを行い得る。このようなアッセイは、例えば、サザン及びノーザンブロットイング、RT-PCR及びPCRなどの当業者に周知の「分子生物学的」アッセイ、薬剤の同定に使用するのための、例えば、免疫学的手段（ELISA及びウェスタンブロット）により、特定のペプチドの存在又は不在を検出するような「生化学的」アッセイ又は本発明の範囲内に入る本明細書に記載のアッセイを含む。

【0684】

ナチュラルキラー細胞受容体（NK R）CAR

一実施形態において、本明細書に記載のCAR分子はナチュラルキラー細胞受容体（NK R）の1つ以上の成分を含み、それによりNK R-CARを形成する。NK R成分は、次のナチュラルキラー細胞受容体のいずれか由来の膜貫通ドメイン、ヒンジドメイン又は細胞質ドメインであり得る：キラー細胞免疫グロブリン様受容体（KIR）、例えば、KIR2DL1、KIR2DL2/L3、KIR2DL4、KIR2DL5A、KIR2DL5B、KIR2DS1、KIR2DS2、KIR2DS3、KIR2DS4、DIR2DS5、KIR3DL1/S1、KIR3DL2、KIR3DL3、KIR2DP1及びKIR3DP1；天然細胞傷害性受容体（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及びCD2F-10；Fc受容体（FcR）、例えばCD16及びCD64；及びLY49受容体、例えばLY49A、LY49C。本明細書に記載のNK R-CAR分子は、アダプター分子又は細胞内シグナル伝達ドメイン、例えばDAP12と相互作用し得る。NK R要素を含むCAR分子の例示的な配置及び配列は、国際公開第2014/145252号パンフレットに記載され、その内容が参照により本明細書に援用される。

10

【0685】

スプリットCAR

一実施形態において、CAR発現細胞は、スプリットCARを使用する。スプリットCARアプローチは、国際公開第2014/055442号パンフレット及び国際公開第2014/055657号パンフレットにより詳細に記載されている。簡潔には、スプリットCAR系は、第1の抗原結合ドメイン及び共刺激ドメイン（例えば、41BB）を有する第1のCARを発現する細胞を含み、細胞は、第2の抗原結合ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメイン（例えば、CD3ζ）を有する第2のCARも発現する。細胞が第1の抗原に遭遇したとき、共刺激ドメインが活性化され、細胞が増殖する。細胞が第2の抗原に遭遇したとき、細胞内シグナル伝達ドメインが活性化され、殺細胞活性が開始される。そのため、CAR発現細胞は、両方の抗原の存在下でのみ完全活性化される。

20

【0686】

キメラ抗原受容体を制御するための戦略

いくつかの実施形態において、CAR活性が制御できる制御可能CAR（RCAR）は、CAR治療の安全性及び有効性を最適化するために望ましい。CAR活性が制御され得る多くの方法がある。例えば、誘導性アポトーシス（例えば二量体化ドメインに融合したカスパーゼを使用するもの）（例えば、Di Stasa et al., N Engl J. Med. 2011 Nov. 3; 365 (18): 1673-1683を参照されたい）を本発明のCAR治療における安全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CARを発現する細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）は、誘導性アポトーシススイッチを更に含み、ヒトカスパーゼ（例えば、カスパーゼ9）又は改変バージョンは、条件付き二量体化を可能にするヒトFKBタンパク質の改変に融合される。ラパログ（例えば、AP1903、AP20187）などの小分子の存在下では、誘導性カスパーゼ（例えば、カスパーゼ9）が活性化され、本発明のCARを発現する細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）の急速なアポトーシス及び死をもたらす。カスパーゼベースの誘導性アポトーシススイッチ（又はそのようなスイッチの1つ以上の態様）の例は、例えば、米国特許出願公開第2004040047号明細書；米国特許出願公開第20110286980号明細書；米国特許出願公開第20140255360号明細書；国際公開第1997031899号パンフレット；国際公開第2014151960号パンフレット；国際公開第2014164348号パンフレット；国際公開第2014197638号パンフレット；国際公開第2014197638号パンフレットに記載され、参照により全て本明細書に組み込まれる。

30

40

【0687】

別の例において、CAR発現細胞は、誘導性カスパーゼ-9（iCaspase-9）

50

分子も発現でき、これは、二量体化因子薬物（例えば、rimiducid（AP1903（Bellimum Pharmaceuticals）又はAP20187（Ariad）とも呼ばれる）の投与により、細胞のカスパーゼ-9活性化及びアポトーシスに至る。iCaspase-9分子は、二量体化（CID）結合ドメインの化学誘導因子を含み、これは、CIDの存在下で二量体化に介在する。これは、CAR発現細胞の誘導的及び選択的枯渇に至る。ある場合、iCaspase-9分子は、CARコードベクターと別の核酸分子によりコードされる。ある場合、iCaspase-9分子は、CARコードベクターと同じ核酸分子によりコードされる。iCaspase-9は、CAR発現細胞の何らかの毒性を避けるための安全スイッチを提供できる。例えば、Song et al. Cancer Gene Ther. 2008; 15(10): 667-75; Clinical Trial Id. No. NCT02107963; 及び Di Stasi et al. N. Engl. J. Med. 2011; 365: 1673-83を参照されたい。

【0688】

本発明のCAR治療を制御するための代替的戦略は、例えば、抗体依存性細胞傷害（ADCC）の誘発により、例えばCAR発現細胞を消失させることにより、CAR活性の脱活性化又は遮断する小分子又は抗体の利用を含む。例えば、本明細書に記載のCAR発現細胞は、細胞死、例えばADCC又は補体誘導性細胞死を誘発できる分子により認識される抗原も発現し得る。例えば、本明細書に記載のCAR発現細胞は、抗体又は抗体フラグメントにより標的化され得る受容体も発現し得る。このような受容体の例は、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/lgE受容体、CD25、CD28、CD30、CD33、CD38、CD40、CD41、CD44、CD51、CD52、CD62L、CD74、CD80、CD125、CD147/ヘシジン、CD152/CTLA-4、CD154/CD40L、CD195/CCR5、CD319/SLAMF7及びEGFR並びにその切断バージョン（例えば、1つ以上の細胞外エピトープを保持するが、細胞質ドメイン内の1つ以上の領域を欠くバージョン）を含む。

【0689】

例えば、本明細書に記載のCAR発現細胞は、シグナル伝達能力を欠くが、ADCCを誘発できる分子、例えばセツキシマブ（アービタックス（登録商標））により認識されるエピトープを保持する切断型上皮細胞増殖因子受容体（EGFR）も発現し、その結果、セツキシマブの投与がADCC及び続くCAR発現細胞の枯渇を誘発する（例えば、国際公開第2011/056894号パンフレット及びJonnalagadda et al., Gene Ther. 2013; 20(8) 853-860を参照されたい）。別の戦略は、例えば、ADCCによりCAR発現細胞の選択的枯渇をもたらす、リツキシマブに結合する、本明細書に記載のCAR発現細胞におけるCD32及びCD20抗原の両方からの標的エピトープをあわせる、高度に小型のマーカー/自殺遺伝子の発現を含む（例えば、Philip et al., Blood. 2014; 124(8) 1277-1287を参照されたい）。本明細書に記載のCAR発現細胞を枯渇させる他の方法は、例えば、ADCC誘発により、破壊するために成熟リンパ球、例えばCAR発現細胞に選択的に結合し、標的とするモノクローナル抗CD52抗体であるCAMPATH（登録商標）の投与を含む。他の実施形態において、CAR発現細胞は、CARリガンド、例えば抗イディオタイプ抗体を使用して選択的に標的化され得る。一実施形態において、抗イディオタイプ抗体は、エフェクター細胞活性、例えばADCC又はADC活性を引き起こし、それによりCAR発現細胞数を減らすことができる。他の実施形態において、CARリ

ガンド、例えば抗イディオタイプ抗体は、細胞致死を誘発する薬剤、例えばトキシンに結合させ、それによりC A R発現細胞数を減らすことができる。代わりに、C A R分子自体、下記のように、活性が制御され得る、例えば活性化又は遮断され得るように配置できる。

【0690】

他の実施形態において、本明細書に記載のC A R発現細胞は、T細胞除去剤により認識される標的タンパク質も発現し得る。一実施形態において、標的タンパク質は、C D 2 0であり、T細胞除去剤は、抗C D 2 0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、C A R発現細胞を減少又は除去する、例えばC A R誘発毒性を軽減することが望まれるときにT細胞除去剤を投与する。他の実施形態において、T細胞除去剤は、本明細書の実施例に記載されるように、抗C D 5 2抗体、例えばアレムツズマブである。

10

【0691】

他の実施形態において、R C A Rは、本明細書に記載の標準的C A Rの要素、例えば抗原結合ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインが個別のポリペプチド又はメンバーに配置された、一連の典型的には最も単純な実施形態において2つのポリペプチドを含む。一部の実施形態において、一連のポリペプチドは、二量体化分子の存在下で互いにポリペプチドを結合できる、例えば抗原結合ドメインを細胞内シグナル伝達ドメインに結合できる二量体化スイッチを含む。一実施形態において、本発明のC A Rは、例えば、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2014127261号パンフレットに記載されるような二量体化スイッチを利用する。このような制御可能C A Rの更なる記載及び例示定期配置は、本明細書及び2015年3月13日に出願された国際公開第2015/090229号パンフレット（例えば、段落527～551）に提供され、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態において、R C A Rは、スイッチドメイン、例えば、配列番号114に記載されるようなF K B Pスイッチドメインを含むか、又は例えば配列番号115に示されるような、F R Bと結合する能力を有するF K B Pのフラグメントを含む。いくつかの実施形態において、R C A Rは、例えば配列番号116に示されるような、F R B配列を含むスイッチドメイン又は例えば配列番号117～122のいずれかに記載されるような、変異型F R B配列を含む。

20

【化34】

DVPDYASLGGPSSPKKKRKVSRGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGML
DGKKFDSSRDRNKPFFKMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHP
GIIPPHATLVFDVELLKLETSY (配列番号114)

30

VQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLDGKKFDSSRDRNKPFFKMLGKQ
VIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLETS (配
列番号115)

ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQ
AYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRISK (配列番号116)

40

【0692】

【表 3 2】

表13. 二量体化分子に対する親和性が増加した例示的な変異体FRB。

FRB 変異体	アミノ酸配列	配列 番号
E2032I 変異体	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYG RDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRISKTS	117
E2032L 変異体	ILWHEMWHEGLLEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYG RDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRISKTS	118
T2098L 変異体	ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKEISFNQAYG RDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRISKTS	119
E2032, T2098 変異体	ILWHEMWHEGL ~~X~~ EASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYG RDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDL ~~X~~ QAWDLYYHVFRISKTS	120
E2032I, T2098L 変異体	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYG RDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRISKTS	121
E2032L, T2098L 変異体	ILWHEMWHEGLLEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYG RDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRISKTS	122

10

【0693】

RNA トランスフェクション

20

インビトロで転写されたRNA CARを産生する方法が本明細書に開示される。RNA CAR及びそれを使用する方法は、例えば、2015年3月13日に出願された国際公開第2015/142675号パンフレットの段落553～570に記載され、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0694】

免疫エフェクター細胞は、メッセンジャーRNA (mRNA) によってコードされたCARを含み得る。一態様において、本明細書に記載のCARをコードするmRNAは、CAR発現細胞の産生のために、例えば本明細書に記載される方法により作製される、免疫エフェクター細胞に導入される。

【0695】

一実施形態において、インビトロ転写RNA CARを一過性トランスフェクションの形態として細胞に導入できる。RNAは、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 産生鋳型を使用するインビトロ転写により産生される。任意の供給源からの目的のDNAを、適切なプライマー及びRNAポリメラーゼを使用してインビトロmRNA合成のための鋳型にPCRにより直接変換できる。DNAの供給源は、例えば、ゲノムDNA、プラスミドDNA、ファージDNA、cDNA、合成DNA配列又はDNAのあらゆる他の適切な供給源であり得る。インビトロ転写のための所望の鋳型は本明細書中に記載されるCARである。例えば、RNA CARの鋳型は、本明細書に記載の腫瘍関連抗原に対する抗体の単鎖可変ドメインを含む細胞外領域；ヒンジ領域（例えば、本明細書に記載のヒンジ領域）、膜貫通ドメイン（例えば、CD8aの膜貫通ドメインなどの本明細書に記載の膜貫通ドメイン）；及び細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば本明細書に記載の細胞内シグナル伝達ドメイン、例えばCD3-ζのシグナル伝達ドメイン及び4-1BBのシグナル伝達ドメインを含むものを含む細胞質領域を含む。

30

40

【0696】

一実施形態において、PCRに使用するDNAは、オープンリーディングフレームを含む。DNAは、生物のゲノムからの天然に存在するDNA配列由来であり得る。一実施形態において、核酸は、5'及び/又は3'非翻訳領域 (UTR) のいくらか又は全てを含み得る。核酸は、エクソン及びイントロンを含み得る。一実施形態において、PCRに使用するDNAは、ヒト核酸配列である。別の実施形態において、PCRに使用するDNAは、5'及び3'UTRを含むヒト核酸配列である。DNAは、代わりに、天然に存在す

50

る生物で通常発現されない人工DNA配列であり得る。例示的な人工DNA配列は、融合タンパク質をコードするオープンリーディングフレームを形成するようにライゲートされた遺伝子の部分を含むものである。ライゲートされたDNAの部分は、単一生物由来又は1つを超える生物由来であり得る。

【0697】

PCRを使用して、トランスフェクションに使用するmRNAのインビトロ転写のための鋳型を産生する。PCRを実施する方法は、当技術分野で周知である。PCRにおいて使用するプライマーは、PCRのための鋳型として使用するDNAの領域に実質的に相補的である領域を有するように設計する。本明細書で使用する「実質的に相補的」は、プライマー配列の残基の大部分又は全てが相補的であるか又は1つ以上の塩基が非相補的又はミスマッチである、ヌクレオチドの配列を指す。実質的に相補的な配列は、PCRに使用するアニーリング条件下においてDNA標的とアニール又はハイブリダイズできる。プライマーは、DNA鋳型の任意の部分と実質的に相補的であるように設計できる。例えば、プライマーは、5'及び3' UTRを含む、細胞において通常転写される（オープンリーディングフレーム）核酸の部分を増幅するように設計できる。プライマーは、目的の特定のドメインをコードする核酸の部分を増幅するようにも設計できる。一実施形態において、プライマーは、5'及び3' UTRの全て又は一部を含む、ヒトcDNAのコーディング領域を増幅するように設計される。PCRに有用なプライマーは、当技術分野で周知の合成法により産生できる。「順方向プライマー」は、増幅するDNA配列の上流であるDNA鋳型上にヌクレオチドに対して実質的に相補的であるヌクレオチドの領域を含むプライマーである。「上流」は、コード鎖に対して、増幅するDNA配列に対する5位を指すために本明細書で使用する。「逆方向プライマー」は、増幅するDNA配列の下流である、二本鎖DNA鋳型に対して実質的に相補的なヌクレオチドの領域を含むプライマーである。「下流」は、コード鎖に対して、増幅するDNA配列に対する3'位を指すために本明細書で使用する。

【0698】

PCRに有用なあらゆるDNAポリメラーゼを本明細書に開示する方法で使用する。試薬及びポリメラーゼは、多数の供給元から市販されている。

【0699】

安定性及び／又は翻訳効率を促進する能力を有する化学構造も使用し得る。実施形態において、RNAは、5'及び3' UTRを有する。一実施形態において、5' UTRは、1～3000ヌクレオチド長である。コーディング領域に付加する5'及び3' UTR配列の長さは、UTRの異なる領域をアニールするPCRのためのプライマーの設計を含むが、これに限定されない異なる方法により変わり得る。このアプローチを使用して、当業者は、転写RNAのトランスフェクション後、最適翻訳効率を達成するのに必要な5'及び3' UTR長を修飾できる。

【0700】

5'及び3' UTRは、目的の核酸のための天然に存在する内在性5'及び3' UTRであり得る。代わりに、目的の核酸に対して内在性ではないUTR配列を順方向及び逆方向プライマーへのUTR配列の取り込みにより又は鋳型の任意の他の修飾により付加できる。目的の核酸に対して内在性ではないUTR配列の使用は、RNAの安定性及び／又は翻訳効率の修飾のために有用であり得る。例えば、3' UTR配列のAUリッチ要素は、mRNAの安定性を低下させ得ることが知られる。したがって、3' UTRを、当技術分野で周知であるUTRの特性に基づき、転写されたRNAの安定性を増加するように選択及び設計できる。

【0701】

一実施形態において、5' UTRは、内在性核酸のKozak配列を含み得る。代わりに、目的の核酸に対して内在性ではない5' UTRを上記のようにPCRにより付加するとき、コンセンサスKozak配列を5' UTR配列の付加により再設計できる。Kozak配列は、あるRNA転写物の翻訳効率を上げることができるが、効率的翻訳を可能と

するために全RNAで必要であるように見えない。多くのmRNAについてのKozak配列に対する必要性は、当技術分野で公知である。他の実施形態において、5' UTRは、RNAゲノムが細胞で安定であるRNAウイルスの5' UTRであり得る。他の実施形態において、種々のヌクレオチドアナログを、mRNAのエキソヌクレアーゼ分解を妨害するために3'又は5' UTRにおいて使用できる。

【0702】

遺伝子クローニングの必要性なしにDNA鋳型からのRNAの合成を可能にするために、転写のプロモーターは、転写する配列の上流のDNA鋳型に結合すべきである。RNAポリメラーゼのプロモーターとして機能する配列が順方向プライマーの5'末端に追加されるとき、RNAポリメラーゼプロモーターは、転写されるオープンリーディングフレームの上流のPCR産物に取り込まれる。一実施形態において、プロモーターは、本明細書の他の箇所に記載するような、T7ポリメラーゼプロモーターである。他の有用なプロモーターは、T3及びSP6 RNAポリメラーゼプロモーターを含むが、これらに限定されない。T7、T3及びSP6プロモーターのコンセンサスヌクレオチド配列が当技術分野で公知である。

【0703】

一実施形態において、mRNAは、リボソーム結合、翻訳開始及び細胞におけるmRNAの安定性を決定する、5'末端及び3'ポリ(A)テールの両者にキャップを有する。環状DNA鋳型、例えばプラスミドDNA上において、RNAポリメラーゼは、真核細胞における発現に適しない長いコンカテマー産物を産生する。3' UTRの末端で直線化されたプラスミドDNAの転写は、転写後ポリアデニル化されても、真核トランスフェクションに有効ではない正常サイズのmRNAを生じる。

【0704】

直鎖状DNA鋳型で、ファージT7 RNAポリメラーゼは、鋳型の最後の塩基を越えて転写物の3'末端を伸長できる(Schenborn and Mierendorf, Nuc Acids Res., 13:6223-36(1985); Nacheva and Berzal-Herranz, Eur. J. Biochem., 270:1485-65(2003))。

【0705】

DNA鋳型に伸びるポリA/Tの組込みの慣用法は、分子クローニングである。しかしながら、プラスミドDNAに統合されたポリA/T配列は、プラスミド不安定性を生じ得、これは、細菌細胞から得たプラスミドDNA鋳型が多くの場合に欠失及び他の異常で高度に汚染されている理由である。これにより、クローニング工程は、困難で時間がかかるだけでなく、多くの場合に信頼できないものとなる。これが、クローニングを伴わないポリA/T 3'ストレッチを有するDNA鋳型の産生を可能にする方法が非常に望ましい理由である。

【0706】

転写DNA鋳型のポリA/Tセグメントは、100TテールなどのポリTテールを含む逆方向プライマーを使用するPCR中(配列番号123)(サイズは、50~5000Tであり得る(配列番号32))又はDNAライゲーション若しくはインビトロ組換えを含むが、これらに限定されない任意の他の方法によりPCR後に産生できる。ポリ(A)テールはまた、RNAに安定性を提供し、その分解を減らす。一般に、ポリ(A)テールの長さは、転写されたRNAの安定性と正に相関する。一実施形態において、ポリ(A)テールは、100~5000アデノシンである(例えば、配列番号33)。

【0707】

RNAのポリ(A)テールは、大腸菌(E. coli)ポリAポリメラーゼ(E-PAP)のなどのポリ(A)ポリメラーゼの使用により、インビトロ転写後更に伸長できる。一実施形態において、ポリ(A)テールの100ヌクレオチドから300~400ヌクレオチドへの長さの延長(配列番号34)は、RNAの翻訳効率の約2倍増加を生じる。更に、3'末端への異なる化学基の付加は、mRNA安定性を増加させ得る。このような結

合は、修飾／人工ヌクレオチド、アプタマー及び他の化合物を含み得る。例えば、ATPアナログは、ポリ（A）ポリメラーゼを使用してポリ（A）テールに取り込まれ得る。ATPアナログは、RNAの安定性を更に高め得る。

【0708】

5'キャップもRNA分子に安定性を提供する。一実施形態において、本明細書に開示する方法により産生されたRNAは、5'キャップを含む。5'キャップは、当技術分野で公知であり、本明細書に記載の技術を使用して提供される（Cougot, et al., Trends in Biochem. Sci., 29:436-444 (2001); Stepinski, et al., RNA, 7:1468-95 (2001); Elango, et al., Biochim. Biophys. Res. Commun., 330:958-966 (2005)）。 10

【0709】

本明細書に開示する方法により産生されたRNAは、配列内リボソーム進入部位（IRES）配列も含み得る。IRES配列は、mRNAへのキャップ非依存的リボソーム結合を開始し、翻訳開始を促進するあらゆるイルス、染色体又は人工設計配列であり得る。糖、ペプチド、脂質、タンパク質、抗酸化剤及び界面活性剤などの細胞透過性及び生存能を促進する因子を含有し得る、細胞電気穿孔に適した任意の溶質が含まれ得る。

【0710】

RNAを、多数の異なる方法、例えば商業的に利用可能な方法のいずれかを使用して標的細胞に導入でき、これは、電気穿孔（Amaxa Nucleofector-11（Amaxa Biosystems, Cologne, Germany））、（ECM 830（BTX）（Harvard Instruments, Boston, Mass.）又はGene Pulser 11（BioRad, Denver, Colo.））、Multiporator（Eppendorf, Hamburg Germany）、リポフェクションを使用するカチオン性リボソーム介在トランスフェクション、ポリマー封入、ペプチド介在トランスフェクション又は「遺伝子銃」などの微粒子銃粒子送達系（例えば、Nishikawa, et al. Hum Gene Ther., 12（8）：861-70（2001）を参照されたい）を含むが、これらに限定されない。 20

【0711】

非ウイルス送達方法 30

いくつかの態様において、非ウイルス方法を使用して、本明細書に記載のCARをコードする核酸を細胞又は組織又は対象に送達できる。

【0712】

いくつかの実施形態において、非ウイルス方法は、トランスポゾン（転位因子とも呼ばれる）の使用を含む。いくつかの実施形態において、トランスポゾンは、ゲノムの位置にそれ自体挿入できるDNAのフラグメント、例えば自己複製性であり、そのコピーをゲノムに挿入することができるDNAのフラグメント又は長い核酸の外にスプライシングされ、ゲノムの別の場所に挿入されることができるDNAのフラグメントである。例えば、トランスポゾンは、転位のための逆位反復フランキング遺伝子からなるDNA配列を含む。

【0713】

例示的なトランスポゾンを使用する核酸送達法は、Sleeping Beautyトランスポゾン系（SBTS）及びpiggyBac（PB）トランスポゾン系を含む。例えば、Aronovich et al. Hum. Mol. Genet. 20. R1（2011）：R14-20；Singh et al. Cancer Res. 15（2008）：2961-2971；Huang et al. Mol. Ther. 16（2008）：580-589；Grabundzija et al. Mol. Ther. 18（2010）：1200-1209；Kebriaei et al. Blood. 122. 21（2013）：166；Williams. Molecular Therapy 16. 9（2008）：1515-16；Bell et al. Nat. Protoc. 2. 12（2007）：3153-65；及びDing et al. Cell 40 50

． 1 2 2 . 3 (2 0 0 5) : 4 7 3 - 8 3 (これらの全ては、参照により本明細書に組み込まれる) を参照されたい。

【 0 7 1 4 】

S B T S は 2 つの成分： 1) 導入遺伝子を含むトランスポゾン、及び 2) トランスポサアーゼ酵素の供給源を含む。トランスポサアーゼは、担体プラスミド (又は他のドナー DNA) から、宿主細胞染色体 / ゲノムなどの標的 DNA にトランスポゾンを転位できる。例えば、トランスポサアーゼは、担体プラスミド / ドナー DNA に結合し、トランスポゾン (導入遺伝子含有) をプラスミドの外に切り出し、宿主細胞のゲノムに入れる。例えば、A r o n o v i c h e t a l . 上掲を参照されたい。

【 0 7 1 5 】

例示的なトランスポゾンは、p T 2 ベースのトランスポゾンを含む。例えば、全て参照により本明細書に組み込まれる G r a b u n d z i j a e t a l . N u c l e i c A c i d s R e s . 4 1 . 3 (2 0 1 3) : 1 8 2 9 - 4 7 ; 及び S i n g h e t a l . C a n c e r R e s . 6 8 . 8 (2 0 0 8) : 2 9 6 1 - 2 9 7 1 を参照されたい。例示的なトランスポサアーゼは、T c 1 / m a r i n e r 型トランスポサアーゼ、例えば S B 1 0 トランスポサアーゼ又は S B 1 1 トランスポサアーゼを含む (例えば、サイトメガロウイルスプロモーターから発現できる機能亢進トランスポサアーゼ) 。例えば、全て参照により本明細書に組み込まれる A r o n o v i c h e t a l . ; K e b r i a e i e t a l . ; 及び G r a b u n d z i j a e t a l . を参照されたい。

【 0 7 1 6 】

S B T S の使用は、導入遺伝子、例えば本明細書に記載の C A R をコードする核酸の効率的組込み及び発現を可能にする。例えば、S B T S などのトランスポゾン系を使用する、本明細書に記載の C A R を安定に発現する細胞、例えば T 細胞又は N K 細胞を産生する方法が本明細書に提供される。

【 0 7 1 7 】

本明細書に記載の方法により、いくつかの実施形態において、S B T S 成分を含む 1 つ以上の核酸、例えばプラスミドが細胞に送達される (例えば、T 細胞又は N K 細胞) 。例えば、核酸は、核酸 (例えば、プラスミド DNA) 送達の標準法、例えば本明細書に記載の方法、例えば電気穿孔、トランスフェクション又はリポフェクションにより送達される。いくつかの実施形態において、核酸は、導入遺伝子、例えば本明細書に記載の C A R をコードする核酸を含むトランスポゾンを含む。いくつかの実施形態において、核酸は、導入遺伝子 (例えば、本明細書に記載の C A R をコードする核酸) を含むトランスポゾン並びにトランスポサアーゼ酵素をコードする核酸配列を含む。他の実施形態において、例えば、デュアルプラスミド系、例えば第 1 のプラスミドが導入遺伝子を含むトランスポゾンを含み、第 2 のプラスミドがトランスポサアーゼ酵素をコードする核酸配列を含む、2 核酸の系が提供される。例えば、第 1 及び第 2 の核酸は、宿主細胞に共送達される。

【 0 7 1 8 】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の C A R を発現する細胞、例えば、T 細胞又は N K 細胞は、ヌクレアーゼ (例えば、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ (Z F N) 、転写アクティベーター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 系又は操作されたメガヌクレアーゼ再操作ホーミングエンドヌクレアーゼ) を使用する S B T S 及び遺伝子編集の遺伝子挿入の組み合わせを使用して産生される。

【 0 7 1 9 】

いくつかの実施形態において、非ウイルス送達方法の使用は、細胞、例えば T 細胞又は N K 細胞の再プログラミング及び対照への細胞の直接注入を可能にする。非ウイルスベクターの利点は、患者集団に見合うために必要な十分量の産生が容易且つ比較的安価であること、保存中の安定性及び免疫原性の欠如を含むが、これらに限定されない。

【 0 7 2 0 】

製造 / 生産の方法

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法は、細胞 (例えば、本明細書

10

20

30

40

50

に記載されるような免疫エフェクター細胞)での処置後にT細胞枯渇剤を投与すること、それにより、CAR発現細胞(例えば、CD19CAR発現細胞)を減少させる(例えば、枯渇させる)ことを更に含む。そのようなT細胞枯渇剤は、CAR発現細胞(例えば、CD19CAR発現細胞)を効果的に枯渇させて、毒性を緩和するために使用することができる。いくつかの実施形態において、CAR発現細胞は、本明細書の方法に従って製造され、例えば、本明細書の方法に従ってアッセイされた(例えば、トランスフェクション又は形質導入前又は後)。

【0721】

いくつかの実施形態において、T細胞枯渇剤は、本明細書に記載の細胞、例えば免疫エフェクター細胞の集団の投与の1、2、3、4又は5週間後に投与される。

10

【0722】

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性細胞毒性(ADCC)及び/又は補体誘導性細胞死を誘導することにより、CAR発現細胞を枯渇させる薬剤である。例えば、本明細書に記載のCAR発現細胞は、細胞死、例えば、ADCC又は補体誘導性細胞死を誘発できる分子により認識される抗原(例えば、標的抗原)も発現し得る。例えば、本明細書に記載のCAR発現細胞は、抗体又は抗体フラグメントにより標的化され得る標的タンパク質(例えば、受容体)も発現し得る。このような標的タンパク質の例は、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/lgE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及びEGFR及びその切断バージョン(例えば、1つ以上の細胞外エピトープを保持するが、細胞質ドメイン内の1つ以上の領域を欠くバージョン)を含むが、これらに限定されるものではない。

20

30

【0723】

いくつかの実施形態において、CAR発現細胞は、CAR及び標的タンパク質を共発現し、例えば、天然で標的タンパク質を発現するか、又は標的タンパク質を発現するように操作される。例えば、細胞、例えば、免疫エフェクター細胞の集団は、CAR核酸(例えば、本明細書に記載されるようなCAR核酸)及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)を含み得る。

【0724】

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。

【0725】

他の実施形態において、細胞、例えば、免疫エフェクター細胞の集団は、本明細書に記載されるようなCAR分子(例えば、CD19CAR)及びT細胞枯渇剤によって認識される標的タンパク質を発現する。一実施形態において、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細胞除去剤は抗CD20抗体、例えば、リツキシマブである。

40

【0726】

前述の方法のいずれかの更なる実施形態において、方法は、細胞、例えば造血幹細胞又は骨髄を、哺乳動物に移植することを更に含む。

【0727】

別の態様において、本発明は、細胞移植前に哺乳動物をコンディショニングする方法を

50

特徴とする。方法は、哺乳動物に、CAR核酸又はポリペプチド、例えば、CD19 CAR核酸又はポリペプチドを含む、有効量の細胞を投与することを含む。いくつかの実施形態において、細胞移植は、幹細胞移植、例えば、造血幹細胞移植又は骨髓移植である。他の実施形態において、細胞移植前に対象をコンディショニングすることは、対象における標的発現細胞、例えば、CD19発現正常細胞又はCD19発現癌細胞の数を減少させることを含む。

【0728】

免疫エフェクター細胞（例えばT細胞）の活性化及び増殖

本明細書に記載の方法により生成又は濃縮されたT細胞などの免疫エフェクター細胞は、例えば、米国特許第6,352,694号明細書；同第6,534,055号明細書；同第6,905,680号明細書；同第6,692,964号明細書；同第5,858,358号明細書；同第6,887,466号明細書；同第6,905,681号明細書；同第7,144,575号明細書；同第7,067,318号明細書；同第7,172,869号明細書；同第7,232,566号明細書；同第7,175,843号明細書；同第5,883,223号明細書；同第6,905,874号明細書；同第6,797,514号明細書；同第6,867,041号明細書；及び米国特許出願公開第20060121005号明細書に記載する方法を使用して、一般的に活性化及び増殖され得る。

【0729】

一般に、免疫エフェクター細胞、例えばT制御性細胞枯渇細胞の集団を、CD3/TCR複合体結合シグナルを刺激する薬剤が結合したその表面と、T細胞の表面上の共刺激分子を刺激するリガンドを接触させることにより増殖できる。特に、T細胞集団は、表面上に固定された抗CD3抗体若しくはその抗原結合フラグメント又は抗CD2抗体との接触又はカルシウムイオノフォアと組み合わせたタンパク質キナーゼCアクティベーター（例えば、ブリオスタチン）との接触により、本明細書に記載のように刺激し得る。T細胞表面上のアクセサリー分子の共刺激のために、アクセサリー分子と結合するリガンドである。例えば、T細胞集団を、T細胞の増殖刺激に適する条件下で抗CD3抗体及び抗CD28抗体と接触させ得る。CD4+T細胞又はCD8+T細胞の増殖を刺激するために、抗CD3抗体及び抗CD28抗体を使用できる。抗CD28抗体の例は、9.3、B-T3、XR-CD28を含み（Diaclone, Besancon, France）、当技術分野で一般に知られる他の方法のように使用できる（Berg et al., Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Haanen et al., J. Exp. Med. 190(9):1319-1328, 1999; Garland et al., J. Immunol. Meth. 227(1-2):53-63, 1999）。

【0730】

一態様において、T細胞のための一次刺激シグナル及び共刺激シグナルは、異なるプロトコルにより提供され得る。例えば、各シグナルを提供する薬剤は、溶液中でも表面と結合し得る。表面に結合しているとき、薬剤は、同じ表面（すなわち「シス」形態）又は別の表面（すなわち「トランス」形態）に結合し得る。代わりに、一方の薬剤が表面に結合し、他方が溶液にあり得る。一態様において、共刺激シグナルを提供する薬剤は、細胞表面に結合し、一次活性化シグナルを提供する薬剤は、溶液中であるか又は表面と結合する。一態様において、両剤は、溶液中にあり得る。一態様において、薬剤は、不溶性形態であり、Fc受容体又は抗体又は薬剤と結合する他の結合剤を発現する細胞などの表面に架橋され得る。この点に関して、例えば本発明におけるT細胞の活性化及び増殖のために意図される人工抗原提示細胞（aAPC）について、米国特許出願公開第20040101519号明細書及び同第20060034810号明細書を参照されたい。

【0731】

一態様において、2剤は、ビーズに、同じビーズ、すなわち「シス」又は別のビーズ、すなわち「トランス」で固定化される。例として、一次活性化シグナルを提供する薬剤は、抗CD3抗体又はその抗原結合フラグメントであり、共刺激シグナルを提供する薬剤は

、抗CD28抗体又はその抗原結合フラグメントであり、両剤は、均等な分子量で同じビーズに共固定化される。一態様において、CD4＋T細胞増殖及びT細胞増殖のためのビーズに結合した1：1比の各抗体を使用する。本発明の一態様において、1：1比を使用して観察された増殖と比較して、T細胞増殖の増殖が観察されるように、ビーズに結合した抗CD3：CD28抗体の比を使用する。特定の一態様において、1：1比を使用して観察された増殖と比較して約1～約3倍増加が観察される。一態様において、ビーズに結合したCD3：CD28抗体比は、100：1～1：100及びその間の全ての整数値の範囲である。一態様において、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比が1未満である。一態様において、ビーズに結合した抗CD28抗体対抗CD3抗体比は、2：1より大きい。特定の一態様において、ビーズに結合した1：100 CD3：CD28比の抗体を使用する。一態様において、ビーズに結合した1：75 CD3：CD28比の抗体を使用する。更なる態様において、ビーズに結合した1：50 CD3：CD28比の抗体を使用する。一態様において、ビーズに結合した1：30 CD3：CD28比の抗体を使用する。一態様において、ビーズに結合した1：10 CD3：CD28比の抗体を使用する。一態様において、ビーズに結合した1：3 CD3：CD28比の抗体を使用する。更なる態様において、ビーズに結合した3：1 CD3：CD28比の抗体を使用する。

10

【0732】

1：500～500：1及びその間の任意の整数値の粒子対細胞比をT細胞又は他の標的細胞の刺激のために使用し得る。当業者に容易に認識され得るように、粒子対細胞比は、標的細胞に対する粒子径に依存し得る。例えば、小さいサイズのビーズは、少ない細胞にのみ結合でき、大きいビーズは、多く結合できる。一態様において、細胞対粒子比は、1：100～100：1及びその間の任意の整数値の範囲であり、更なる態様において1：9～9：1及びその間の任意の整数値からなる比をT細胞刺激に使用し得る。T細胞刺激をもたらす抗CD3及び抗CD28結合粒子対T細胞の比は、上記のように変わり得るが、しかしながら、ある好適な値は、1：100、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及び15：1を含み、1つの好適な比は少なくとも1：1粒子対T細胞である。一態様において、1：1以下の粒子対細胞比を使用する。特定の一態様において、好適な粒子：細胞比は、1：5である。更なる態様において、粒子対細胞比は、刺激の日により変わり得る。例えば、一態様において、粒子対細胞比は、1日目は1：1～10：1であり、更なる粒子をその後10日目まで連日又は隔日で細胞に添加し、最終比1：1～1：10である（添加の比の細胞数に基づく）。特定の一態様において、粒子対細胞比は、刺激1日目に1：1であり、刺激3日目及び5日目に1：5に調節する。一態様において、粒子を、1日目の1：1及び刺激3日目及び5日目の1：5の最終比に基づき、連日又は隔日で添加する。一態様において、粒子対細胞比は、刺激1日目は2：1であり、刺激3日目及び5日目に1：10に調節する。一態様において、粒子を、1日目の1：1及び3日目及び5日目の1：10の最終比に基づき、連日又は隔日で添加する。当業者は、多様な他の比が本発明における使用に適し得ることを認識する。特に、比は、粒子径並びに細胞サイズ及びタイプによる。一態様において、使用するための最も典型的な比は、1日目の1：1、2：1及び3：1付近である。

20

30

40

【0733】

更なる態様において、T細胞などの細胞を薬剤被覆ビーズと組み合わせ、ビーズ及び細胞をその後分離し、次いで細胞を培養する。異なる態様において、培養前に薬剤被覆ビーズ及び細胞を分離するが、一緒に培養する。更なる態様において、ビーズ及び細胞を磁力などの力の適用によりまず濃縮し、細胞表面マーカーのライゲーションを増加させ、それにより細胞刺激を誘導する。

【0734】

例として、細胞表面タンパク質を、抗CD3及び抗CD28が結合した常磁性ビーズ（

50

3 x 28 ビーズ) と T 細胞を接触させることにより、ライゲートし得る。一態様において、細胞 (例えば、 $10^4 \sim 10^9$ T 細胞) 及びビーズ (例えば、DYNABEADS (登録商標) M-450 CD3/CD28 T 常磁性ビーズを 1:1 比) を緩衝液、例えば PBS (カルシウム及びマグネシウムなどの二価カチオンなし) 中で合わせる。再び、任意の細胞濃度を使用し得ることが当業者に容易に認識され得る。例えば、標的細胞は、試料中で極めて稀であり、試料の 0.01% のみが含まれるか又は試料全体 (すなわち 100%) が目的の標的細胞で構成され得る。したがって、あらゆる細胞数が本発明に関連して一体となる。一態様において、細胞と粒子との最大接触を確実にするために、粒子及び細胞を混合する体積を有意に減少させる (すなわち細胞の濃度を高める) ことが望ましいことがある。例えば、一態様において、約 100 億細胞/ml、90 億細胞/ml、80 億細胞/ml、70 億細胞/ml、60 億細胞/ml、50 億細胞/ml 又は 20 億細胞/ml の濃度を使用する。一態様において、1 億細胞/ml 超を使用する。更なる態様において、1000 万、1500 万、2000 万、2500 万、3000 万、3500 万、4000 万、4500 万又は 5000 万細胞/ml の細胞濃度を使用する。更なる態様において、細胞の 7500 万、8000 万、8500 万、9000 万、9500 万又は 1 億細胞/ml の濃度を使用する。更なる態様において、1 億 2500 万又は 1 億 5000 万細胞/ml の濃度を使用できる。高濃度を使用して、細胞収率、細胞活性化及び細胞増殖を増加できる。更に、高細胞濃度の使用は、CD28 陰性 T 細胞などの目的の標的抗原を弱く発現し得る細胞のより効率的な捕獲を可能にする。このような細胞集団は、治療的価値を有し得、及び特定の態様では得ることが望ましいであろう。例えば、高濃度細胞の使用は、通常、CD28 発現が弱い CD8+ T 細胞のより効率的な選択を可能にする。

【0735】

一実施形態において、CAR、例えば本明細書に記載の CAR、例えば本明細書に記載の CD19 CAR をコードする核酸が形質導入された細胞を例えば本明細書に記載の方法により増殖する。一実施形態において、細胞を数時間 (例えば、約 2 時間、3 時間、4 時間、5 時間、6 時間、7 時間、8 時間、9 時間、10 時間、15 時間、18 時間、21 時間) ~ 約 14 日 (例えば、1 日、2 日、3 日、4 日、5 日、6 日、7 日、8 日、9 日、10 日、11 日、12 日、13 日又は 14 日) の期間の培養により増殖する。一実施形態において、細胞は、4~9 日の期間増殖される。一実施形態において、細胞は、8 日以下、例えば 7 日、6 日又は 5 日の期間増殖される。一実施形態において、細胞は、5 日の培養により増殖され、得られた細胞は、同じ培養条件において 9 日間培養で増殖された同じ細胞よりも強力である。効力は、例えば、多様な T 細胞機能、例えば増殖、標的細胞死、サイトカイン産生、活性化、遊走又はそれらの組み合わせにより規定され得る。一実施形態において、5 日増殖された細胞、例えば本明細書に記載の CD19 CAR 細胞は、同じ培養条件下において 9 日間培養で増殖された同じ細胞と比較して、抗原刺激による細胞倍加の少なくとも 1 倍、2 倍、3 倍又は 4 倍増加を示す。一実施形態において、細胞、例えば本明細書に記載の CD19 CAR 発現細胞を発現する細胞は、5 日の培養により増殖され、得られた細胞は、同じ培養条件下において 9 日間培養で増殖された同じ細胞と比較して、高い炎症誘発性サイトカイン産生、例えば IFN- γ 及び/又は GM-CSF レベルを示す。一実施形態において、5 日増殖された細胞、例えば本明細書に記載の CD19 CAR 細胞は、同じ培養条件下において 9 日間培養で増殖された同じ細胞と比較して、炎症誘発性サイトカイン産生、例えば IFN- γ 及び/又は GM-CSF レベルの pg/ml で少なくとも 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、10 倍又はそれを超えて増加する。

【0736】

T 細胞の培養期間が 60 日以上となり得るような数サイクルの刺激も望まれ得る。T 細胞培養に適する条件は、血清 (例えば、胎児ウシ又はヒト血清)、インターロイキン-2 (IL-2)、インスリン、IFN- γ 、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF β 及び TNF- α 又は当業者に知られる細胞増殖のための任意の他の添加剤を含む、増殖及び生存能に必要な因子を含み得る、適切な培地 (例えば、最小必須培地又は RPMI 培地 1640 又は X-vivo 15 (Lonza))

）を含む。細胞の増殖のための他の添加剤は、界面活性剤、プラスマネート、及びN-アセチル-L-システイン、及び2-メルカプトエタノールなどの還元剤を含むが、これらに限定されない。培地は、無血清又は適切な量の血清（又は血漿）が添加されたか、又は規定されたセットのホルモン及び／又はT細胞の増殖及び拡大に十分な量のサイトカインが添加されたRPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-Vivo 15及びX-Vivo 20、Optimizerを含み得る。抗生物質、例えばペニシリン及びストレプトマイシンは、実験的培養においてのみ包含され、対象に注入すべき細胞の培養に含まれない。標的細胞は、増殖を支持するのに必要な条件、例えば適切な温度（例えば、37℃）及び雰囲気（例えば、空気+5%CO₂）で維持される。

【0737】

一実施形態において、細胞は、例えば、フローサイトメトリーなどの本明細書に記載の方法により測定して、14日の増殖期間にわたり、細胞の少なくとも200倍（例えば、200倍、250倍、300倍、350倍）増加をもたらす1つ以上のインターロイキンを含む適切な培地（例えば、本明細書に記載の培地）で増殖させる。一実施形態において、細胞は、IL-15及び／又はIL-7（例えば、IL-15及びIL-7）の存在下で増殖させる。

【0738】

実施形態において、本明細書に記載の方法、例えばCAR発現細胞製造法は、T制御性細胞、例えばCD25+T細胞を、例えば抗CD25抗体又はそのフラグメント又はCD25結合リガンド、IL-2を使用して細胞集団から除去することを含む。細胞集団からT制御性細胞、例えばCD25+T細胞を除去する方法は、本明細書に記載される。実施形態において、方法、例えば製造法は、細胞集団（例えば、CD25+T細胞などのT制御性細胞が枯渇されている細胞集団；又は抗CD25抗体、そのフラグメント又はCD25結合リガンドと前に接触された細胞集団）とIL-15及び／又はIL-7との接触を更に含む。例えば、細胞集団（例えば、抗CD25抗体、そのフラグメント又はCD25結合リガンドと先に接触されている）をIL-15及び／又はIL-7の存在下で増殖させる。

【0739】

一実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞を、インターロイキン-15（IL-15）ポリペプチド、インターロイキン-15受容体 α （IL-15Ra）ポリペプチド又はIL-15ポリペプチドとIL-15Raポリペプチドの組み合わせ、例えばhetIL-15を含む組成物とCAR発現細胞の製造中に例えばエキスピボで接触させることを含む。実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞をCAR発現細胞の製造中に例えばエキスピボで、IL-15ポリペプチドを含む組成物と接触させる。実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞をCAR発現細胞の製造中に例えばエキスピボで、IL-15ポリペプチド及びIL-15Raポリペプチドの両方の組み合わせを含む組成物と接触させる。実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞をCAR発現細胞の製造中に例えばエキスピボで、hetIL-15を含む組成物と接触させる。

【0740】

一実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞を、エキスピボ増殖中、hetIL-15を含む組成物と接触させる。一実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞を、エキスピボ増殖中、IL-15ポリペプチドを含む組成物と接触させる。一実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞を、エキスピボ増殖中、IL-15ポリペプチド及びIL-15Raポリペプチドの両方を含む組成物と接触させる。一実施形態において、接触は、リンパ球垂集団、例えばCD8+T細胞の生存及び増殖をもたらす。

【0741】

種々の刺激時間に曝されているT細胞は、異なる特徴を示し得る。例えば、典型的な血液又はアフエレーシスした末梢血単核細胞産物は、細胞毒性又はサプレッサーT細胞集団

10

20

30

40

50

(TC、CD8+)より大きいヘルパーT細胞集団(TH、CD4+)を有する。CD3及びCD28受容体での刺激によるT細胞のエキスポ増殖は、約8~9日目前まで主にTH細胞からなるT細胞集団を産生するが、約8~9日目後、T細胞集団は、徐々に大きくなるTC細胞集団を含む。したがって、処置の目的により、主にTH細胞を含むT細胞集団を対象に注入することは有利であり得る。同様に、TC細胞の抗原特異的サブセットが単離されている場合、このサブセットを大きい程度まで増殖させることが有利であり得る。

【0742】

更に、CD4及びCD8マーカーに加えて、他の表現型マーカーは、細胞増殖過程の経過中、有意に、しかし、主に再現性よく変化する。そうして、このような再現性は、特定の目的のために活性化T細胞産物をもたらす能力を可能とする。

10

【0743】

本明細書に記載のCARが構築されると、適切なインビトロ及び動物モデルにおける抗原刺激後にT細胞を増殖させる能力、再刺激の非存在下でのT細胞増殖の持続及び抗癌活性など、しかし、これらに限定されない分子の活性を評価するために種々のアッセイが使用され得る。本発明のCARの効果を評価するためのアッセイは、以下に更に詳細に記載される。

【0744】

初代T細胞におけるCAR発現のウェスタンブロット分析は、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる2015年3月13日に出願された国際公開第2015/142675号パンフレットの段落695に記載されるように、単量体及び二量体の存在を検出するために使用できる。

20

【0745】

抗原刺激後のCAR⁺T細胞のインビトロ増殖をフローサイトメトリーにより測定できる。例えば、CD4⁺及びCD8⁺T細胞の混合物をαCD3/αCD28 aAPCで刺激し、続いて分析すべきプロモーターの制御下において、GFPを発現するレンチウイルスベクターで形質導入する。代表的プロモーターは、CMV IE遺伝子、EF-1α、ユビキチンC又はホスホグリセロキナーゼ(PGK)プロモーターを含む。GFP蛍光を、CD4⁺及び/又はCD8⁺T細胞サブセットの培養6日目にフローサイトメトリーにより評価する。例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009)を参照されたい。代わりに、CD4⁺とCD8⁺T細胞の混合物を、0日目にαCD3/αCD28被覆磁気ビーズで刺激し、2Aリボソームスキッピング配列を使用するCARとeGFPを発現するバイシストロニックレンチウイルスベクターを使用して、1日目にCARを形質導入する。培養物を本明細書に記載されるような癌関連抗原⁺K562細胞(本明細書に記載されるような癌関連抗原を発現するK562)、野生型K562細胞(K562野生型)又は抗CD3及び抗CD28抗体存在下でhCD32及び4-1BBLを発現するK562細胞(K562-BBL-3/28)でのいずれかで再刺激し、続いて洗浄する。外来性IL-2を、100IU/mlを隔日で培養物に添加する。GFP⁺T細胞を、ビーズベースの計数を使用するフローサイトメトリーにより数える。例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009)を参照されたい。

30

40

【0746】

再刺激非存在下の持続するCAR⁺T細胞増殖も測定できる。例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009)を参照されたい。簡潔には、平均T細胞体積(fl)を、0日目のαCD3/αCD28被覆磁気ビーズでの刺激及び1日目の記載するCARの形質導入後、培養8日目にCoulter Multisizer III粒子カウンター、Nexcelom Cellometer Vision又はMillipore Scepterを使用して測定する。

50

【0747】

動物モデルも、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる2015年3月13日に出願された国際公開第2015/142675号パンフレットの段落698に記載されるように、CAR発現細胞活性の測定に使用できる。

【0748】

用量依存的CAR処置応答は、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる2015年3月13日に出願された国際公開第2015/142675号パンフレットの段落699に記載されるように、評価できる。

【0749】

細胞増殖及びサイトカイン産生の評価は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる2015年3月13日に出願された国際公開第2015/142675号パンフレットの段落700に記載されるように、以前に説明されている。

【0750】

細胞毒性は、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる2015年3月13日に出願された国際公開第2015/142675号パンフレットの段落701に記載されるように、標準的51Cr放出アッセイにより評価できる。

【0751】

細胞毒性は、例えば、xCeLLigenceリアルタイム細胞アナライザー(RTCA)を使用して、付着細胞の電気インピーダンスの変化を測定することによっても評価できる。いくつかの実施形態において、細胞毒性は複数の時点で測定される。

【0752】

造影テクノロジーは、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる2015年3月13日に出願された国際公開第2015/142675号パンフレットの段落702に記載されるように、腫瘍担持動物モデルにおけるCARの特異的輸送及び増殖を評価するために使用することができる。

【0753】

本明細書の実施例部分に記載のもの並びに当分野で知られるものを含む、他のアッセイも、本明細書に記載のCARの評価に使用できる。

【0754】

ここに開示する方法の代わりに又はこれと組み合わせて、CARリガンドの使用を含む、CAR発現細胞(例えば、インビトロ又はインビボ(例えば、臨床モニタリング))、免疫細胞増殖及び/又は活性化及び/又はCAR特異的選択の1つ以上の検出及び/又は定量のための方法及び組成物が開示される。一つの例示的实施形態において、CARリガンドは、CAR分子に結合する、例えば、CARの細胞外抗原結合ドメインに結合する抗体である(例えば、抗原結合ドメインに結合する抗体、例えば、抗イディオタイプ抗体;又は細胞外結合ドメインの定常領域に結合する抗体)。他の実施形態において、CARリガンドは、CAR抗原分子である(例えば、本明細書に記載されるようなCAR抗原分子)。

【0755】

一態様において、CAR発現細胞を検出及び/又は定量する方法が開示される。例えば、CARリガンドは、インビトロ又はインビボでCAR発現細胞の検出及び/又は定量に使用できる(例えば、患者におけるCAR発現細胞の臨床モニタリング又は患者への投薬)。方法は、

CARリガンド(任意選択により、標識CARリガンド、例えば、タグ、ビーズ、放射活性又は蛍光標識を含むCARリガンド)を提供し;

CAR発現細胞を獲得し(例えば、製造サンプル又は臨床サンプルなどのCAR発現細胞含有サンプルの獲得);

CAR発現細胞とCARリガンドを、結合が生じる条件下で接触させ、それにより、存在するCAR発現細胞のレベル(例えば、量)を検出することを含む。CAR発現細胞とCARリガンドの結合は、FACS、ELISAなどのような標準技術を使用して検出でき

10

20

30

40

50

る。

【0756】

別の態様において、増殖及び／又は活性化細胞（例えば、免疫エフェクター細胞）を増殖する方法が開示される。方法は、

CAR発現細胞（例えば、第1のCAR発現細胞又は一過性に発現されるCAR細胞）を提供し）；

前記CAR発現細胞とCARリガンド、例えば、本明細書に記載されるようなCARリガンドを、免疫細胞増殖及び／又は増殖が生じる条件下で接触させ、それにより、活性化及び／又は増殖集団を産生することを含む。

【0757】

特定の実施形態において、CARリガンドは基質上に存在する（例えば、基質、例えば、天然に存在しない基質に固定化又は結合される）。いくつかの実施形態において、基質は、非細胞基質である。非細胞基質は、例えば、プレート（例えば、マイクロタイタープレート）、膜（例えば、ニトロセルロース膜）、マトリックス、チップ又はビーズから選択される固体支持体であり得る。実施形態において、CARリガンドは、基質に存在する（例えば、基質表面上）。CARリガンドを、基質に共有又は非共有（例えば、架橋）により固定、結合又は会合させ得る。一実施形態において、CARリガンドは、ビーズに結合（例えば、共有結合）する。前記実施形態において、免疫細胞集団をインビトロ又はエクスピボで増殖できる。方法は、例えば、本明細書に記載の方法のいずれかを使用して、CAR分子のリガンド存在下、免疫細胞の集団を培養することを更に含む。

【0758】

他の実施形態において、細胞を増殖及び／又は活性化する方法は、更に第2の刺激性分子、例えば、CD28の添加を含む。例えば、CARリガンド及び第2の刺激性分子を基質、例えば、1つ以上のビーズに固定し、それにより細胞増殖及び／又は活性化を増加させ得る。

【0759】

更に別の態様において、CAR発現細胞を選択又は富化する方法を提供する。方法は、CAR発現細胞と本明細書に記載されるようなCARリガンドを接触させ、CARリガンドの結合に基づき細胞を選択することを含む。

【0760】

更に他の実施形態において、CAR発現細胞を枯渇、減少及び／又は死滅する方法が提供される。方法は、CAR発現細胞と本明細書に記載されるようなCARリガンドを接触させ；及び細胞を、CARリガンドの結合に基づき標的化し、それによりCAR発現細胞の数を減らす及び／又は殺傷することを含む。一実施形態において、CARリガンドは、毒性剤と結合する（例えば、トキシン又は細胞除去剤）。別の実施形態において、抗イデオタイプ抗体は、エフェクター細胞活性、例えば、ADCC又はADC活性を生じ得る。

【0761】

本明細書に開示する方法において使用できる例示的な抗CAR抗体は、例えば、国際公開第2014/190273号パンフレット及びJena et al., “Chimeric Antigen Receptor (CAR) – Specific Monoclonal Antibody to Detect CD19 – Specific T cells in Clinical Trials”, PLOS March 2013 8:3 e57838に記載され、その内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0762】

いくつかの態様及び実施形態において、本明細書における組成物及び方法は、例えば、その内容が全体として参照により本明細書に組み込まれる、2015年7月31日出願の米国特許出願PCT/米国特許出願公開第2015/043219号明細書に記載のような、T細胞の特定のサブセットのために最適化される。いくつかの実施形態において、T

細胞の最適化サブセットは、対照 T 細胞、例えば、同じ構築物を発現する異なるタイプ（例えば、CD 8 + 又は CD 4 +）の T 細胞と比較して、残留性の増強を示す。

【0763】

いくつかの実施形態において、CD 4 + T 細胞は、本明細書に記載の CAR を含み、その CAR は、CD 4 + T 細胞に適する（例えば、最適化、例えば、残留性の増強に至る）細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、ICOS ドメインを含む。いくつかの実施形態において、CD 8 + T 細胞は、本明細書に記載の CAR を含み、その CAR は、CD 8 + T 細胞に適する（例えば、最適化、例えば、残留性の増強に至る）細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、4-1BB ドメイン、CD 28 ドメイン又は ICOS ドメイン以外の共刺激ドメインを含む。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の CAR は、本明細書に記載の抗原結合ドメイン、例えば、抗原結合ドメインを含む CAR を含む。

10

【0764】

一態様において、本明細書に記載されるのは、対象、例えば、癌を有する対象を処置する方法である。方法は、前記対象に、有効量の：

1) 抗原結合ドメイン、例えば、本明細書に記載の抗原結合ドメイン；
膜貫通ドメイン；及び

細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば第 1 の共刺激ドメイン、例えば ICOS ドメインを含む、CAR を含む CD 4 + T 細胞（CAR CD 4 +）；並びに

2) CAR を含む CD 8 + T 細胞（CAR CD 8 +）であって、
抗原結合ドメイン、例えば、本明細書に記載の抗原結合ドメイン；
膜貫通ドメイン；及び

20

細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば第 2 の共刺激ドメイン、例えば 4-1BB ドメイン、CD 28 ドメイン又は ICOS ドメイン以外の別の共刺激ドメインを含むもの

を投与することを含み、ここで、CAR CD 4 + と CAR CD 8 + は互いに異なる。任意選択により、方法は、更に、

3) CAR を含む第 2 の CD 8 + T 細胞（第 2 の CAR CD 8 +）であって、
抗原結合ドメイン、例えば、本明細書に記載の抗原結合ドメイン；
膜貫通ドメイン；及び

第 2 の CAR CD 8 + が、CAR CD 8 + 上に存在しない細胞内シグナル伝達ドメイン、
例えば共刺激シグナル伝達ドメインを含み、任意選択により、ICOS シグナル伝達ドメインを含まない、細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

30

【0765】

バイオポリマー送達方法

いくつかの実施形態において、本明細書に開示する 1 つ以上の CAR 発現細胞を、バイオポリマー足場、例えば、バイオポリマーインプラントにより対象に投与又は送達し得る。バイオポリマー足場は、本明細書に記載の CAR 発現細胞の送達、増殖及び／分散を支持又は強化することができる。バイオポリマー足場は、生体適合性（例えば、炎症性又は免疫応答を実質的に誘発しない）及び／又は天然に存在し得るか又は合成である生分解性ポリマーを含む。例示的なバイオポリマーは、例えば、2015 年 3 月 13 日に出版された国際公開第 2015/142675 号パンフレットの段落 1004～1006 に記載され、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0766】

医薬組成物及び処置

いくつかの態様において、本開示は、本明細書に記載されるように産生された CAR 発現細胞を、任意選択により 1 つ以上の他の治療と組み合わせて、投与することを含む、患者を処置する方法を提供する。いくつかの態様において、本開示は、本明細書に記載されるような CAR 発現細胞を含む反応混合物を、任意選択により 1 つ以上の他の治療と組み合わせて、投与することを含む、患者を処置する方法を提供する。いくつかの態様において、本開示は、本明細書に記載されるような CAR 発現細胞を含む反応混合物を送送又は

50

受領する方法を提供する。いくつかの態様において、本開示は、本明細書に記載されるように産生されたCAR発現細胞を受領することを含み、CAR発現細胞を、任意選択により1つ以上の他の治療と組み合わせて、患者に投与することを更に含む、患者を処置する方法を提供する。いくつかの態様において、本開示は、本明細書に記載されるようなCAR発現細胞を産生することを含み、CAR発現細胞を、任意選択により1つ以上の他の治療と組み合わせて、患者に投与することを更に含む、患者を処置する方法を提供する。他の療法は、例えば、化学療法などの癌療法であり得る。

【0767】

一実施形態において、本明細書に記載のCARを発現する細胞を、Treg細胞集団を減少させる分子と組み合わせて対象に投与する。Treg細胞数を減らす（例えば、枯渇させる）方法は当分野で知られ、例えば、CD25枯渇、シクロホスファミド投与、GITR機能修飾を含む。理論に拘束されることを望むものではないが、アフエレーシス前又は本明細書に記載のCAR発現細胞投与前に対象におけるTreg細胞数を減らすことは、腫瘍微小環境における望まない免疫細胞（例えば、Treg）の数を減らし、対象の再発のリスクを減らすと考えられる。

【0768】

一実施形態において、本明細書に記載の治療、例えば、CAR発現細胞は、制御性T細胞（Treg）を枯渇させるGITRアゴニスト及び／又はGITR抗体などのGITRを標的とする及び／又はGITR機能を調節する分子と組み合わせて対象に投与される。実施形態において、本明細書に記載のCARを発現する細胞を、対象にシクロホスファミドと組み合わせて投与する。一実施形態において、GITR結合分子及び／又はGITR機能を調節する分子（例えば、GITRアゴニスト及び／又はTreg枯渇GITR抗体）を、CAR発現細胞の前に投与する。例えば、一実施形態において、GITRアゴニストを細胞のアフエレーシス前に投与できる。実施形態において、シクロホスファミドを、対象にCAR発現細胞の投与（例えば、注入又は再注入）前又は細胞のアフエレーシス前に投与する。実施形態において、シクロホスファミド及び抗GITR抗体を、対象にCAR発現細胞の投与（例えば、注入又は再注入）前又は細胞のアフエレーシス前に投与する。一実施形態において、対象は癌（例えば、固形癌又はALL又はCLLなどの血液癌）を有する。一実施形態において、対象は、CLLを有する。実施形態において、対象はALLを有する。実施形態において、対象は固形癌、例えば、本明細書に記載の固形癌を有する。例示的なGITRアゴニストは、例えば、米国特許第6,111,090号明細書、欧州特許第090505B1号明細書、米国特許第8,586,023号明細書、国際公開第2010/003118号パンフレット及び同2011/090754号パンフレットに記載のGITR融合タンパク質又は例えば米国特許第7,025,962号明細書、欧州特許第1947183B1号明細書、米国特許第7,812,135号明細書、米国特許第8,388,967号明細書、米国特許第8,591,886号明細書、欧州特許出願公開第EP1866339号明細書、国際公開第2011/028683号パンフレット、国際公開第2013/039954号パンフレット、国際公開第2005/007190号パンフレット、国際公開第2007/133822号パンフレット、国際公開第2005/055808号パンフレット、国際公開第99/40196号パンフレット、国際公開第2001/03720号パンフレット、国際公開第99/20758号パンフレット、国際公開第2006/083289号パンフレット、国際公開第2005/115451号パンフレット、米国特許第7,618,632号明細書及び国際公開第2011/051726号パンフレットに記載される抗GITR抗体など、例えば、GITR融合タンパク質及び抗GITR抗体（例えば、二価抗GITR抗体）を含む。

【0769】

一実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞を、GITRアゴニスト、例えば、本明細書に記載のGITRアゴニストと組み合わせて対象に投与する。一実施形態において、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エレーシス前に投与できる。一実施形態におい

10

20

30

40

50

て、対象は、C L Lを有する。

【0770】

本明細書に記載の方法は、医薬組成物中にC A R発現細胞を製剤化することを更に含み得る。医薬組成物は、本明細書に記載のように、C A R発現細胞、例えば複数のC A R発現細胞を1つ以上の薬学的に又は生理学的に許容される担体、希釈剤又は添加物と組み合わせて含む。このような組成物は、中性緩衝化食塩水、リン酸緩衝化食塩水などの緩衝液；グルコース、マンノース、スクロース又はデキストラン、マンニトールなどの炭水化物；タンパク質；グリシンなどのポリペプチド又はアミノ酸；抗酸化剤；E D T A又はグルタチオンなどのキレート剤；アジュバント（例えば、水酸化アルミニウム）；及び防腐剤を含み得る。組成物は、例えば静脈内投与のために、製剤化することができる。

10

【0771】

一実施形態において、医薬組成物は、例えば、エンドトキシン、マイコプラズマ、複製可能レンチウイルス（R C L）、p 2 4、V S V－G核酸、H I V g a g、残留抗C D 3／抗C D 2 8被覆ビーズ、マウス抗体、貯留ヒト血清、ウシ血清アルブミン、ウシ血清、培養培地要素、ベクターパッケージング細胞又はプラスミド成分、細菌及び真菌からなる群から選択される汚染物が実質的になく、例えば検出可能なレベルで存在しない。一実施形態において、細菌は、アルカリゲネス・フェカリス（*A l c a l i g e n e s f a e c a l i s*）、カンジダ・アルビカンス（*C a n d i d a a l b i c a n s*）、エシェリキア・コリ（*E s c h e r i c h i a c o l i*）、ヘモフィルス・インフルエンザ（*H a e m o p h i l u s i n f l u e n z a*）、ナイセリア・メニンギティディス（*N e i s s e r i a m e n i n g i t i d e s*）、シュドモナス・エルジノーサ（*P s e u d o m o n a s a e r u g i n o s a*）、スタフィロコッカス・アウレウス（*S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s*）、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a*）及びストレプトコッカス・ピオゲネス（*S t r e p t o c o c c u s p y o g e n e s*）A群からなる群から選択される少なくとも1つである。

20

【0772】

「免疫学的に有効量」、「抗癌有効量」、「癌阻害有効量」又は「治療量」が示される時、組成物の投与すべき正確な量は、年齢、体重、腫瘍サイズ、感染の程度又は転移及び患者（対象）の状態の個体差を考慮して医師が決定できる。本明細書に記載の免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞、NK細胞）を含む医薬組成物を、 $10^4 \sim 10^9$ 細胞／kg体重、いくつかの例において $10^5 \sim 10^6$ 細胞／kg体重の範囲の用量（これらの範囲内の全整数値を含む）で投与し得ると一般に述べることができる。T細胞組成物をまたこの用量で複数回投与し得る。細胞を、免疫療法において一般に知られる注入技術を使用して投与できる（例えば、Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988を参照されたい）。

30

【0773】

いくつかの実施形態において、C A R細胞（例えば、C D 1 9 C A R細胞）の用量は、約 1×10^6 、 1.1×10^6 、 2×10^6 、 3.6×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 1.8×10^7 、 2×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 又は 5×10^8 細胞／kgを含む。いくつかの実施形態において、C A R細胞（例えば、C D 1 9 C A R細胞）の用量は、少なくとも約 1×10^6 、 1.1×10^6 、 2×10^6 、 3.6×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 1.8×10^7 、 2×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 又は 5×10^8 細胞／kgを含む。いくつかの実施形態において、C A R細胞（例えば、C D 1 9 C A R細胞）の用量は、最大約 1×10^6 、 1.1×10^6 、 2×10^6 、 3.6×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 1.8×10^7 、 2×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 又は 5×10^8 細胞／kgを含む。いくつかの実施形態において、C A R細胞（例えば、C D 1 9 C A R細胞）の用量は、約 $1.1 \times 10^6 \sim 1.8 \times 10^7$ 細胞／kgを含む。いくつかの実施形態において、C A R細胞（例えば、C D 1 9 C A R細胞）の用量は、約 1×10^7 、 2×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8

40

50

8 、 2×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 又は 5×10^9 細胞を含む。いくつかの実施形態において、CAR細胞（例えば、CD19 CAR細胞）の用量は、少なくとも約 1×10^7 、 2×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 又は 5×10^9 細胞を含む。いくつかの実施形態において、CAR細胞（例えば、CD19 CAR細胞）の用量は、最大約 1×10^7 、 2×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 又は 5×10^9 細胞を含む。

【0774】

特定の態様において、活性化された免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞、NK細胞）を対象に投与し、その後、血液を再採取し（又はアフエレーシスを実施し）、そこから免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞、NK細胞）を活性化し、これらの活性化及び増殖した免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞、NK細胞）を患者に再注入することが望ましい場合がある。この過程を数週間毎に複数回実施できる。特定の態様において、免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞、NK細胞）は、 $10\text{cc} \sim 400\text{cc}$ の採血した血液から活性化することができる。特定の態様において、免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞、NK細胞）は、 20cc 、 30cc 、 40cc 、 50cc 、 60cc 、 70cc 、 80cc 、 90cc 又は 100cc の採血した血液から活性化される。

【0775】

対象組成物の投与は、任意の簡便な方法により実施し得る。本明細書に記載の組成物は、経動脈的に、皮下に、皮内に、腫瘍内に、節内に、髄内に、筋肉内に、静脈内（i.v.）注射により又は腹腔内に、例えば、皮内又は皮下注射により患者に投与し得る。免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞、NK細胞）の組成物を、腫瘍、リンパ節又は感染部位に直接注射し得る。

【0776】

本明細書に開示される実施形態の例示は、例えば、2016年12月27日に出願された国際公開第2007/117112号パンフレットの204～219ページの実施例1～10に記載されており、これは、前記実施例に関連する図面及び図面の説明文を含め、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。

【0777】

例示的な解糖阻害剤

いくつかの実施形態において、解糖は、解糖阻害剤、例えば、本明細書に記載される小分子解糖阻害剤を用いて、阻害、例えば、抑制することができる。いくつかの実施形態において、解糖阻害剤は、ヘキソキナーゼ（HK）の阻害剤、ミトコンドリアヘキソキナーゼ2（HK2）の阻害剤、ホスホフルクトキナーゼ2（PFK2）の阻害剤、ホスホグリセリン酸ムターゼ（PGAM1）の阻害剤及びピルビン酸キナーゼ2（PKM2）の阻害剤、ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ（PDK）の阻害剤、乳酸デヒドロゲナーゼA（LDHA）の阻害剤、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ（G6PD）の阻害剤、トランスケトラーゼ様1（TKTL1）の阻害剤又は表5に開示された阻害剤から選択される。

【0778】

いくつかの実施形態において、解糖阻害剤、例えば小分子解糖阻害剤は、2-デオキシ-D-グルコース（2-DG）、3-プロモピルビン酸（3-BP）、ロニダミン、（2E）-3-（3-ピリジニル）-1-（4-ピリジニル）-2-プロペン-1-オン（3PO）、N4A、YZ9、PGMI-004A、MJE3、TT-23、シコニン／アルカンニン、FX11、キノリン3-スルホンアミド、ジクロロ酢酸（DCA）、6-アミノニコチンアミド（6-AN）又はオキシチアミンから選択される。

【0779】

いくつかの実施形態において、解糖阻害剤は、2-DGである。2-デオキシ-D-マンノース又は2-デオキシ-D-アラビノーヘキソースとしても知られる2-DGは、グルコース類似体であり、例えば、グルコース代謝の競合的阻害剤として作用する。2-D

10

20

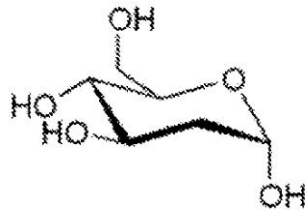
30

40

50

Gは、化学名：（4 R、5 S、6 R）－6－（ヒドロキシメチル）オキサン－2，4，5－トリオール及び以下の化学構造を有する。

【化 3 5】



化学構造

MW: 164.16

10

【0 7 8 0】

【表 3 3】

表 5: 解糖阻害剤

化合物名	標的タンパク質
2-デオキシ-D-グルコース (2-DG)	HK を阻害
3-プロモピルビン酸 (3-BP)	HK を阻害
ロニダミン	ミトコンドリア HK2 を阻害
(2E)-3-(3-ピリジニル)-1-(4-ピリジニル)-2- プロペン-1-オン(3PO)	PFK2 を阻害
N4A, YZ9	PFK2 を阻害
PGMI-004A	PGAM1 を阻害
MJE3	PGAM1 を阻害
TT-232	PKM2 を阻害
シコニン/アルカンニン	PKM2 を阻害
FX11	LDHA を阻害
キノリン 3-スルホンアミド	LDHA を阻害
ジクロロアセテート (DCA)	PDK を阻害
6-アミノニコチンアミド (6-AN)	G6PD を阻害
オキシチアミン	TKTL1 を阻害

20

30

40

【0 7 8 1】

例示的な解糖阻害剤は、Q i a n Y, e t a l. , (2 0 1 4) W o r l d J T r a n s l M e d ; 3 (2) : 3 7 - 5 7 に開示され、その内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

50

【0782】

実施形態において、本明細書に開示される方法、反応混合物又は組成物は、0.5～20 mM、1～10 mM又は1.5～2.5 mMの範囲の濃度で2-DGを含む。いくつかの実施形態において、2-DGの濃度は、少なくとも0.5、1.0、1.5、2.0又は2.5 mMである。他の実施形態において、2-DGの濃度は2 mMである。

【0783】

本明細書に開示される方法、反応混合物又は組成物のいずれかの実施形態において、CAR発現免疫エフェクター細胞集団は、2-DG、例えば、1 mMの2-DGと、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、44、48、52、60、70、80、90、100時間以上（例えば、最大約2又は3週間）にわたり、接触される。いくつかの実施形態において、CAR発現免疫エフェクター細胞集団は、2-DG、例えば、2 mMの2-DGと、少なくとも48時間にわたり、接触される。

10

【0784】

2-DGによる解糖の阻害は、例えば、Huang CC et al., (2015) Disease Models & Mechanisms 8:1247-1254に開示され、その内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0785】

Stat3アクティベーター及びStat3分子

本明細書に開示される方法、使用又は反応混合物のいずれかの実施形態において、Stat3アクティベーターは、

20

i) gp130アクティベーター、例えばgp130に結合する抗体分子、例えば本明細書に記載されるような抗gp130抗体又はIL-6分子、IL-11分子、IL-27分子、CNTF分子、CT-1分子、CLC分子、LIF分子、NP分子、OSM分子；

ii) 例えば、本明細書に記載されるような可溶性IL-6受容体(sIL-6R)；

iii) 例えば、本明細書に記載されるようなIL-6/IL-6R複合体、例えば二量体；

iv) IL-6ファミリーサイトカイン（例えば、IL-6分子、IL-11分子、IL-27分子、IL-31分子、CNTF分子、CT-1分子、CLC分子、LIF分子、NP分子又はOSM分子）；

30

v) CCL20分子；

vi) 例えば、本明細書に記載されるようなIL-10R2受容体(IL-10R2)アクティベーター、例えば、IL-10分子、IL-22分子、IL-26分子、IL-28A分子、IL-28B分子、IL-29分子又はIL-10R2に結合する抗体分子；

vii) IL-10ファミリーサイトカイン（例えば、IL-10分子、IL-19分子、IL-20分子、IL-22分子、IL-24分子、IL-26分子、IL-28A分子、IL-28B分子又はIL-29分子）；

viii) IL-17ファミリーサイトカイン（例えば、IL17A分子、IL17B分子、IL17C分子、IL17D分子、IL17E分子又はIL17F分子）；又は

40

ix) IL-23分子を含む。

【0786】

いくつかの実施形態において、Stat3アクティベーターは、gp130アクティベーター、例えばgp130に結合する抗体分子、例えば本明細書に記載されるような抗gp130抗体である。

【0787】

いくつかの実施形態において、Stat3アクティベーターは、例えば本明細書に記載されるような可溶性IL-6受容体(sIL-6R)である。

【0788】

いくつかの実施形態において、Stat3アクティベーターは、例えば本明細書に記載

50

されるような I L - 6 / I L - 6 R 複合体、例えば二量体である。

【0789】

いくつかの実施形態において、S t a t 3 アクティベーターは、I L - 6 ファミリーサイトカイン（例えば、I L - 6 分子、I L - 1 1 分子、I L - 2 7 分子、I L - 3 1 分子、C N T F 分子、C T - 1 分子、C L C 分子、L I F 分子、N P 分子又は O S M 分子）である。

【0790】

いくつかの実施形態において、S t a t 3 アクティベーターは、C C L 2 0 分子である。

【0791】

10

いくつかの実施形態において、S t a t 3 アクティベーターは、例えば、本明細書に記載されるような I L - 1 0 R 2 受容体（I L - 1 0 R 2）アクティベーター、例えば、I L - 1 0 分子、I L - 2 2 分子、I L - 2 6 分子、I L - 2 8 A 分子、I L - 2 8 B 分子、I L - 2 9 分子又は I L - 1 0 R 2 に結合する抗体分子である。

【0792】

いくつかの実施形態において、S t a t 3 アクティベーターは、I L - 1 7 ファミリーサイトカイン（例えば、I L 1 7 A 分子、I L 1 7 B 分子、I L 1 7 C 分子、I L 1 7 D 分子、I L 1 7 E 分子又は I L 1 7 F 分子）である。

【0793】

いくつかの実施形態において、S t a t 3 アクティベーターは、I L - 2 3 分子である。

20

【0794】

本明細書に開示される方法、使用又は反応混合物のいずれかの実施形態において、S t a t 3 分子は、配列番号 1 0 0 0 のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % 又は 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、S t a t 3 分子は、配列番号 1 0 0 0 のアミノ酸配列を含む。

【0795】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される S t a t 3 分子は、配列番号 1 0 0 1 のヌクレオチド配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % 又は 9 9 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態において、S t a t 3 分子は、配列番号 1 0 0 1 のヌクレオチド配列又は配列番号 1 0 0 1 のヌクレオチド 2 4 1 ~ 2 5 5 3 によってコードされる。

30

【0796】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される細胞、例えば C A R 発現細胞は、配列番号 1 0 0 1 の配列又は配列番号 1 0 0 1 のヌクレオチド 2 4 1 ~ 2 5 5 3 を含む、核酸配列、例えば導入遺伝子を含む。

S t a t 3 アミノ酸配列；N C B I 参照配列 N P _ 6 4 4 8 0 5 . 1 （配列番号 1 0 0 0）

【化 3 6】

```

1 MAQWNQLQQL DTRYLEQLHQ LYSDSFFMEL RQFLAPWIES QDWAYAASKE SHATLVFHNL
61 LGEIDQQYSR FLQESNVLYQ HNEERRIKQFL QSRYLEKPMI IARIVARCLW EESRLQQTAA
121 TAAQGGGQAN HPTAAVTEK QQMLEQHLQD VRKRVQDLEQ KMKVVENLQD DFDFNYKTLK
181 SQGDMQDLNG NNQSVTRQKM QQLEQMLTAL DQMRRSIVSE LAGLLSAMEY VQKTLTDEEL
241 ADWKRRQZIA CIGGPPNICL DRLENWITSL AESQLQTRQQ IKKLEELQOK VSYKGDPIVQ
301 HRPMLEERIV ELFRNLMKSA FVVERQPCMP MHPDRPLVIK TGVQFTTKVR LLVKFPPLNY
361 QLKIKVCIDK DSGDVAALRG SRKFNLGTN TKVMNMEESN NGSLSAEFKH LTLREQRCGN
421 CCRANCDASL IVTEELHLIT FETEVYHQCL KIDLETHSLP VVVISNICQM PNAWASILWY
481 NMLTNNPKNV NFFTKPPIGT WDQVAEVLWS QFSSTTKRGL SLEQLTLAE KLLGPGVNYS
541 GCQITWAKFC KENMAGKCFE FVWLDNIID LVKKYLLALW NECYIMGFIS KERERAILST
601 KPPGTFLLRP SESSKEGGVT FTWVEKDISG KTQIQSVEPY TKQQLNMSF AELIMGYKIM
661 DATNILVSPL VYLYPDIPKE EAFGKYCRPE SQEHPEADPG SAAPYLKTKF ICVTPTTCSN
721 TIDLPMSPRT LDSLMQFGNN GEGAEPGAGG QFESITFDME LTSECATSPM

```

10

S t a t 3ヌクレオチド配列；NCBI参照配列：NM_139276.2（配列番号1001）

【化 3 7】

```

1 ggtttccgga gctgcggcgg cgcagactgg gagggggagc cgggggttcc gacgtcgag
61 cggagggaac aagccccaac cggatcctgg acaggcaacc cggcttgagg ctgtctctcc
121 cctcgggctc ggagaggccc ttccggcctga gggagcctcg ccgcccgtec cgggcacacg
181 cgcagccccc gctctctcggc ctctgcggga gaaacagttg ggacccttga ttllagcagg
241 atggcccaat ggaatcagct acagcagctt gacacacggg acctggagca gctccatcag
301 ctctacagtg acagcttccc aatggagctg cggcagtttc tggcccttg gattgagagt
361 caagattggg catatgcggc cagcaaaaga tcacatgcca ctttggtgtt tcataatctc
421 clgggagaga ttgaccagca gtabagccgc ttcctgcaag aglcgaalgl tclctatcag
481 cacaatctac gaagaatcaa gcagtttctt cagagcaggt atcttgagaa gccaatggag
541 attgcccggg ttgtggcccg gtgcctgtgg gaagaatcac gccttctaca gactgcagcc
601 actgcggccc agcaaggggg ccaggccaac caccacacag cagccgtggg gacggagaag
661 cagcagatgc tggagcagca ccttcaggat gtccggaaga gactgcagga tctagaacag
721 aaaatgaaag tggtagagaa tctccaggat gactttgatt tcaactataa aacctcaag
781 agtcaaggag acatgcaaga tctgaatgga aacaaccagt cagtgaccag gcagaagatg
841 cagcagctgg aacagatgct cactgcctg gaccagatgc ggagaagcat cgtgagttag
901 clggcggggc ttttgcagc gatggaglac gtgcagaaaa ctctcagga cgaggagclg
961 gctgactgga agaggcggca acagattgco lgcattggag gcccgcccaa catctgccia
1021 gatcggctag aaaactggat aacgtcatta gcagaatctc aaactcagac ccgtcaacaa
1081 attaagaaac tggaggagtt gcagcaaaaa gtttctaca aaggggaccc cattgtacag
1141 caccggccga tgcctggagga gagaatcgtg gactgttlla gaaacttaat gaaaagtgc
1201 tttgtggtgg agcggcagcc ctgcatgccc atgcatcctg accggccctt cgtcatcaag
1261 accggcgltc agllcacac laaagtcagg ttgctggcca aatlcclga gllgaallal
1321 cagcttaaaa ttaaagtgtg cattgacaaa gactctgggg acgttgagc tctcagagga
1381 tcccgaaaat ttaacattct gggcacaaac acaaaagtga tgaacatgga agaattcaac
1441 aacggcagcc tctclgcaga attcaaacac ttgacctga gggagcagag atgtgggaat
1501 gggggccgag ccaattgtga tgcctccctg attgtgactg aggagctgca cctgatcacc
1561 tttgagaccg aggtgtatca ccaagacctc aagattgacc tagagacca ctccctgcca
1621 gttgtgggtga tctccaacat ctgicagatg ccaaatgctt gggcgtccat cctgtggtac

```

20

30

【化 3 8】

```

1681 aacatgctga ccaacaatcc caagaatgta aactttttta ccaagccccc aattggaacc
1741 tgggatcaag tggcagaggt cctgagctgg cagtctctct ccaccaccaa gcgaggactg
1801 agcatcgagc agctgactac actggcagag aaactcttgg gacctggtgt gaattattca
1861 ggggtgtcaga tcacatgggc taaatlltgc aaagaaaaca lggclggcaa gggcttctcc
1921 ttctgggtct ggctggacaa tatcattgac cttgtgaaaa agtacatctc ggcccttttg
1981 aacgaagggt acatcatggg ctttatcagt aaggagcggg agcgggccat cttgagcact
2041 aagcctccag gcacctctct gctaagatcc agtgaaagca gcaaagaagg aggogtact
2101 ttactctggg tggagaagga catcagcggg aagaccaga tccagtccgt ggaaccatac
2161 acaaagcagc agctgaacaa catgtcattt gctgaaatca tcatgggcta taagatcatg
2221 gatgctacca atatcttggg gtctccactg gtctatctct atctgacat tcccaaggag
2281 gaggcattcg gaaagtattg tcggccagag agccaggagc atctgaagc tgaccacagg
2341 agcgtctgcc catacctgaa gaccaagttt atctgtgtga caccacgac ctgcagcaat
2401 aacctttgac tgcgatgtc ccccgccact ttgatttcat tgalgcagtl tggaaacaa
2461 ggtgaagggt ctgaacctc agcaggaggg cagtttgagt cctcacctt tgacatggag
2521 ttgacctggg agtgogctac ctcccccact tgaggagctg agaacggaag ctgcagaaag
2581 atacgactga ggcgcctacc tgcattctgc caccctcac acagccaaac ccagatcat
2641 ctgaaactac taactttgtg gtctccagat tttttlaatc tctacttct gctatcttctg
2701 agcaatctgg gcacttttla aaatagagaa atgaglgaa gtgggtgata tgccttttct
2761 taaatgcaaa taaggatgtg ttctctgaga ccatgatca ggggatglgg cgggggggtg
2821 ctgagggggg aaaaaggaaa tgtcttctgt tgttttctt cctgcccct cttctctcagc
2881 agctttttgt taltgttctt ttgttcttta gacaagtgc tctggtgct tgcggcatcc
2941 ttctgctgtt ttctgtaagc aaatgcacac ggccacctat agctacatac tctggcatt
3001 gcacttttla acctlgtcga catccaaata gaagatagga ctatctlaagc cctaggttct
3061 llllllaaall aagaaataal acaalllaa gggcaaaaa cactglalca gcalagcctt
3121 tctgtattta agaaacttaa gcagccggg atggtggtc acgctgtaa tccagcact
3181 ttgggaggcc gagggggalc ataaggctcag gagatcaaga ccatctggc taacacgggtg
3241 aaaccccgct tctactaaaa gtacaaaaaa ttagctgggt gtggtgggtg gcgctgtag
3301 tcccgactac tcgggaggtc gaggcaggag aatcgcttga acctgagagg cggaggttgc
3361 agtgagccaa aattgcacca ctgcacactg cactccatcc tgggcgacag tctgagactc
3421 tgtctcaaaa aaaaaaaaaa aaaaaagaaa cticagtlaa cagcctcctt ggtgcttlaa
3481 gcattcagct tcttcaggc lggtaallla tataatccct gaaacgggct tcaggctcaa
3541 ccttlaagac atctgaagct gcaacctggc ctltggtgtt gaaataggaa ggttlaagga
3601 gaatctaagc attttagact tttttttata aatagactta tttctcttg taatgtattg
3661 gccttttagt gagtaaggct gggcagaggg tcttacaac cttgactccc tttctccctg
3721 gacttgatct gctgtttcag aggttaggtt gttctgtgtg gtgcttctc agggctggga
3781 tacttctgat tctggttctc lctcgtccc accctccga cccaglcct cctgactctg
3841 ctgagggcat gtctccttgc gtgtctaaag gtcctcctc ctgttltgt laggaaatct
3901 ggtctcagga cctcatggaa gaagaggggg agagagttac aggttggaca tgatgcacac
3961 tatggggccc cagcgacgtg tctggttgag ctgagggaat atggttctta gccagttct
4021 lgggtgatalc cagtggaact lglaatggcg lcttcalica gltcalgcag ggcaaaggct
4081 tactgataaa cttgagctctg cctcgtatg aggtgtata cctggcctcc ctctgaggtc
4141 ggtgactcct cctgctggg gcccacagg tgaggcagaa cagctagagg gctccccc
4201 ctgcccgcct tggtggcta gctcgtctc cctgtgcgta tgggaacacc tagcagtg
4261 tggatgggct gctctgact cagagggcat gccggatttg gcaactcaa accacttgc
4321 ctgagctgat cagagtttct gtggaattct gtltgttlaa tcaaatltagc tggltctctga
4381 attagggggg agacgacctt ctctaagatg aacaggttcc gcccagctc tctgcttg
4441 agacagttga tgtgtcatgc agagctctta cttctccagc aacactcttc agtacataat
4501 aagcttaact gataaacaga atatttagaa aggtgagact tgggcttacc attgggttta
4561 aatcataggg acctaggcg aggttcagg gctctctctg agcagatatt gtcaggttca
4621 tggcctttag tagcatgtat ctggtctlaa ctctgaltgt agcaaaagtl ctgagaggag
4681 ctgagccctg ttgtggccca ttaagaaca ggtctctcag gccctgccc cttctgtctc
4741 actgcccctc cccatcccc agcccagccg agggaaatcc gtgggttget tacctacct
4801 taaggtggtt tataagctgc tgtcctggcc actgcattca aattccaatg tgtactcat
4861 aqgtlaaaaa tttatattat tgtgaggttt tttgtctttt ttttttttt ttttttttgg
4921 tatattgctg tatctacttt aacttccaga aataaacgtt atataggaa cgtaaaaa

```

10

20

30

40

【0797】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される S t a t 3 分子は、S t a t 3 ポリペプチド、例えば、野生型 S t a t 3 又は構成的に活性な S t a t 3 ポリペプチド、例えば、S T A T 3 C である。S t a t 3 の構成型は、S t a t 3 遺伝子の S t a t 3 - C 変異型によってコードされる。S t a t 3 - C では、S t a t 3 の S H 2 ドメインの C 末端ループ内の 2 つのシステイン残基の置換により、自然に二量体化し、DNA に結合し、転写を活性化する分子が産生され、こうして構成的に活性な分子が生じる (B r o m b e r g e t a l . , (1999) C e l l 98: 295-303)。

50

【0798】

本明細書に開示される方法、使用又は反応混合物のいずれかの実施形態において、I L-6分子は、配列番号1002のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、I L-6分子は、配列番号1002のアミノ酸配列を含む。

【0799】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるI L-6分子は、配列番号1003のヌクレオチド配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態において、I L-6分子は、配列番号1003のヌクレオチド配列又は配列番号1003のヌクレオチド122~760によってコードされる。

10

【0800】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される細胞、例えばCAR発現細胞は、配列番号1003の配列又は配列番号1003のヌクレオチド122~760を含む、核酸配列、例えば導入遺伝子を含む。

I L-6アミノ酸配列；GenBank受託番号CAA68278.1（配列番号1002）

【化39】

```

1  MNSFSTSAFG PVAFSLGILL VLPAAFPAPV PPGEDSKDVA APHRQPLTSS ERIDKQIRYI
61  LDGISALRKE TCKNSNMCES SKEALAENNL NLPKMAEKDG CFQSGFNEET CLVKIITGLL
121 EFEVYLEYLQ NKFESSEEQA RAVQMSTKVL IQFLQKKAKN LDAITTPDPT UNASLLTKLQ
181 AQNQWLQDMF THLILRSFKE FLQSSLRALR QM

```

20

I L-6ヌクレオチド配列；NCBI参照配列NM_000600.4（配列番号1003）

【化40】

```

1  gtctcaatat tagagtctca accccaata aatataggac tggagatgtc tgaggtccat
61  tctgcccctg agcccaccgg gaacgaaaga gaagctctat ctcccctcca ggagcccagg
121 tatgaactcc ttctccacaa gcgccttcgg tccagttgcc ttctccctgg ggtgctcct
181 ggtggttgcc gctgccttcc ctgccccagc acccccagga gaagattcca aagatgtagc
241 cgcgccacac agacagccac tcacctcttc agaacgaatt gacaaacaaa ttcgggtacat
301 cctcgacggc atctcagccc tgagaaagga gacatgtaac aagagtaaca tgtgtgaaag
361 cagcaaagag gcactggcag aaaacaacct gaaccttcca aagatggctg aaaaagatgg
421 atgcttccaa tclggattca atgaggagac tlgcclgggtg aaaaatcalca ctgggtcttlt
481 ggagtttgag gtatacctag agtaacctca gaacagattt gagagtagtg aggaacaagc
541 cagagctgly cagatgagla caaaagtccl galccagllc ctgcagaaaa aggcacaagaa
601 tctagatgca ataaccaccc ctgacccaac cacaatatgc agcctgctga cgaagctgca
661 ggcacagAAC cagtggctgc aggcacatgac aactcatctc attctgcgca gctttaagga
721 gttcctgcag tccagcctga gggctcttcg gcaaatgtag calgggcacc tcagattgtt
781 gttgttaaat ggcattcctt ctctctggta gaaacctgtc cactgggcac agaacttatg
841 ttgttctcta tggagaacta aaagtatgag cgltaggaca ctatlltaat tatllttaat
901 ttattaatat ttaaatatgt gaagctgagt taatttatgt aagtcatat tatattttta
961 agaagtacca cttgaaacat tttatgtatt agttttgaaa taataatgga aagtggctat
1021 gcagtttgaa tatectttgt ttcagagcca gatcatllct tggaaagltg aggettaccct
1081 caaataaatg gctaacttat acataatttt aaagaaatat ttatattgta tttatataat
1141 gtataaatgg tttttatacc aataaatggc attttaaaaa attcagcaaa aaaaaaa

```

30

40

【0801】

本明細書に開示される方法、使用又は反応混合物のいずれかの実施形態において、gp130分子は、配列番号1004のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、gp130分子は、配列番号1004のアミノ酸配列を含む。

【0802】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるgp130分子は、配列番号1005のヌクレオチド配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%

50

、 98%又は99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態において、g p 1 3 0分子は、配列番号1 0 0 5のヌクレオチド配列又は配列番号1 0 0 5のヌクレオチド1 1 3～2 8 6 9によってコードされる。

【0803】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される細胞、例えばC A R発現細胞は、配列番号1 0 0 5の配列又は配列番号1 0 0 5のヌクレオチド1 1 3～2 8 6 9を含む、核酸配列、例えば導入遺伝子を含む。

g p 1 3 0アミノ酸配列；G e n B a n k受託番号A A I 1 7 4 0 3 . 1（配列番号1 0 0 4）

【化41】

```

1  M L T L Q T W L V Q  A L F I F L T T E S  T G E L L D P C G Y  I S P E S P V V Q L  H S N F T A V C V L  K E K C M D Y F H V
61  N A N Y I V W K T N  H F T I P K E Q Y T  I I N R T A S S V T  F T D E A S I N I Q  L T C N I L T F G Q  L E Q N V Y G I T I
121 I S G L F P E K P K  N L S C I V N E G K  K M R C E W D R G R  E T H L E T N F T L  K S E W A T H K F A  D C K A K R D T P T
181 S C T V D Y S T V Y  F V N I E V W V E A  E N A L G K V T S D  H I N F D P V Y K V  K P N P P H N L S V  I N S E E L S S I L
241 K L T W T N P S I K  S V I I L K Y N I Q  Y R T K D A S T W S  Q I P P E D T A S T  R S S F T V Q D L K  P F T E Y V F R I R
301 C M K E D G K G Y W  S D W S E E A S G I  T Y E D R P S K A P  S F W Y K I D P S H  T Q G Y R T V Q L V  W K T L P P F E A N
361 G K I L D Y E V T L  T R W K S H L Q N Y  T V N A T K L T V N  L T N D R Y V A T L  T V R N I V G K S D  A A V L T I P A C D
421 F Q A T H P V M D I  K A F P K D N M L W  V E W T T P R E S V  K K Y I L E W C V L  S D K A P C I T D W  Q Q E D G T V H R T
481 Y L R C N L A E S K  C Y L I T V T P V Y  A D G P C S P E S I  K A Y L K Q A P P S  K G P T V R T K K V  G K N E A V L E W D
541 Q L P V D V Q N G F  I R N Y T I F Y R T  I I G N E T A V N V  D S S H T E Y T L S  S L T S D T L Y M V  R M A A Y T D E C G
601 K D G P E F T F T T  P K F A Q G E I E A  I V V P V C L A F L  L T T L L G V L F C  F N K R D L I K K H  I W P N V P D P S K
661 S H I A Q W S P H T  P P R H N F N S K D  Q M Y S D G N F T D  V S V V E I E A N D  K K P F P E D L K S  L D L F K K E K I N
721 T E G H S S G I G G  S S C M S S S R P S  I S S S D E N E S S  Q N T S S T V Q Y S  T V V H S G Y R H Q  V P S V Q V F S R S
781 E S T Q P L L D S E  E R P E D L Q L V D  H V D G G D G I L F  R Q Q Y F K Q N C S  Q H E S S P D I S H  F E R S K Q V S S V
841 N E E D F V R L K Q  Q I S D H I S Q S C  G S G Q M K M F Q E  V S A A D A F G P G  T E G Q V E R F E T  V G M E A A T D E G
901 M P K S Y L P Q T V  R Q G G Y M P Q

```

g p 1 3 0ヌクレオチド配列；G e n B a n k受託番号B C 1 1 7 4 0 2 . 1（配列番号1 0 0 5）

【化 4 2】

```

1 cggeectgagt gaaacccaat ggaaaaagca tgacatttag aagtagaaga cttagettca
61 aatccctact ccttcactta ctaattttgt gatttggaaa tatccgcgca agatgltgac
121 gttgcagact tggetagtgc aagcettggt tatttttctc accactgaat ctacaggtga
181 actttctagat ccattgtggt atatcagtc tgaattctca gttgtacaac ttcattctaa
241 tttcactgca gtttgtgtgc taaaggaaaa atgtatggat tattttcatg taaatgctaa
301 ttacattgtc tggaaaacaa accattttac ttttcttaag gagcaatata ctatcalaaa
361 cagaacagca tccagtgtca cctttacaga tatagcttca ttaaattatc agctcacttg
421 caacattctt acattcggac agcttgaaca gaatgtttat ggaatcaca taatttcagg
481 cttgcctcca gaaaaaccta aaaatttgag ttgcattgtg aacgagggga agaaaatgag
541 glgtgaglgg galcgtggaa gggaaacaca ctltggagaca aacttcaact taaaatctga
601 atgggcaaca cacaaglttg ctgattgcaa agcaaaacgt gacaccccca cctcalgcac
661 tgttgattat tctactgtgt attttgtcaa cattgaagtc tgggtagaag cagagaatgc
721 ccttgggaag gttacalcag atcalatcaa ttttgatcct gtatataaag tgaagcccaa
781 tccgccacat aatttatcag tgatcaactc agaggaaactg tctaglatct taaaattgac
841 atggaccaac ccaagtatta agagtgttat aatactaaaa tataacattc aatataggac
901 caaagatgcc tcaacttggg gccagattcc tctgaagac acagcalcca ccgatcttc
961 attcactgtc caagacotta aacottttac agaattgtg tttaggatto gctgtatgaa
1021 ggaagatggt aagggatact ggagtgcact gagtgaagaa gcaagtggga tcacctatga
1081 agalagacca tclaaagcac caagtttctg gtataaaala gatccalccc atactcaagg
1141 ctacagaact gtacaactcg tgtggaagac attgcctcct tttgaagcca atggaaaaat
1201 cttggattat gaagtgactc tcacaagatg gaaatcacat ttacaaaatt acacagttaa
1261 tgccacaaaa ctgacagtaa atctcacaaa tgatogctat gttagcaacc taacagttaag
1321 aaatcttgtt ggcaaatcag atgcagolgt lllaacatc cctgcclgtg aclltcaagc
1381 tactcacctc gtaalggatc ttaaagcatt ccccaaagat aacatgcltt ggggtggaatg
1441 gactactcca agggaatctg taaagaaala tatacttgag tgggtgtgtg tatcagataa
1501 agcacctgt atcacagact ggcaacaaga agatgggtacc gtgcctcgca cctattttaag
1561 agggaactla gcagagagca aalgtalall galaacagll aclocaglal algtlgaagg
1621 accaggaagc cctgaatcca taaaggcata ccttaaacaa gctccacctt ccaaaaggac
1681 lactgttcgg acaaaaaaag lagggaaaaa cgaagclgtc ltagaglggg accaactlcc
1741 tgttgatggt cagaatggat ttatcagaaa ttatactata ttttatagaa ccatcattgg
1801 aaatgaaact gctgtgaatg tggattcttc ccacacagaa tatacattgt cctctttgac
1861 tagtgacaca ttgtacatgg tacgaatggc agcatacaca gatgaagggt ggaaggatgg
1921 tccagaattc acttttacta ccccaaagtt tgcacaagga gaaattgaag ccatagtctg
1981 goctgtttgc tttagcattcc tattgacaaac tcttctggga gtgctgttct gctttaataa
2041 gcgagacctc altaaaaaac acatctggcc taatgttcca gatccttcaa agagtcatat
2101 tgcccagtgg tcacctcaca ctctccaaag gcacaatttt aattcaaaag atcaaatgta
2161 ttcagatggc aatttccactg atgtaagtgt tgtggaaata gaagcaaatg acaaaaaagg
2221 ttttccagaa gatctgaaat caltggacct gttcaaaaag gaaaaaatta alactgaagg
2281 acacagcagt ggtattgggg ggtcttcatg catgtcatct tctaggccaa gcatttctag
2341 cagtgtatgaa aatgaatctt cacaaaacac ttcagcact gtccagtatt ctaccgtggt
2401 acacagtggt tacagacacc aagtccgtc agtccaagtc ttctcaagat ccaggtctac
2461 ccagcccttg ttagattcag aggagcggcc agaagatcta caattagtag atcatgtaga
2521 lggcggltgal gglallltgc ccaggcaaca glactlcaaa cagaactlga glcagcalga
2581 atccagtcca gatatttcac attttgaaag gtcaaagcaa gtttcatcag tcaatgagga
2641 agattttgtt agacttaaac agcagatttc agatcatatt tcacaatcct gtggatctgg
2701 gcaaatgaaa atgtttcagg aagtttctgc agcagatgct tttgggtccag gtactgaggg
2761 acaagttaga agatttgaaa cagttggcat ggaggtgct actgatgaag gcattgctaa
2821 aagtttacta ccacagactg tacggcaagg cgtctacalg cctcagtgaa ggactagtag
2881 ttctgtctac aacttcagca gtacctataa agtaaaagta aaatgatttt atctgtgaat
2941 tcagatttta aaaagtcttc actctctgaa gatgatcatt tgccc

```

10

20

30

40

50

【0804】

抗 g p 1 3 0 抗体

いくつかの実施形態において、S t a t 3 アクティベーターは、g p 1 3 0 アクティベーター、例えば g p 1 3 0 に結合する抗体分子、例えば本明細書に記載されるような抗 g p 1 3 0 抗体である。

【0805】

抗 g p 1 3 0 抗体分子も本明細書に開示される。抗 g p 1 3 0 抗体分子は、例えば、G u Z. J. et al., Leukemia (2000) 14: 188-197 に開示され、その内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0806】

本明細書に開示される方法、使用又は反応混合物のいずれかの実施形態において、抗 g p 1 3 0 抗体分子は、B-S 1 2 抗 g p 1 3 0 抗体若しくは B-P 8 抗 g p 1 3 0 抗体又

はB-S 1 2及びB-P 8抗体の両方を含む。理論に拘束されることを望むものではないが、いくつかの実施形態において、B-S 1 2及び／又はB-P 8抗体分子は、g p 1 3 0の二量体化をもたらすと考えられている。

【0807】

いくつかの実施形態において、抗g p 1 3 0抗体は、以下の特徴：

- i) S T A T 1、S T A T 3、E R K 1又はE R K 2のリン酸化によって測定されるような、g p 1 3 0によって媒介されるシグナル伝達を誘導すること；
 - i i) I L-6阻害剤、例えばS t t a t i c又は本明細書に記載の阻害剤によって阻害されないこと；
 - i i i) 骨髓腫細胞株の増殖を促進すること；
 - i v) 初代骨髓腫細胞の生存を支持すること、又は
 - v) 二量体化、例えばg p 1 3 0のホモ二量体化又はg p 1 3 0のヘテロ二量体化、例えばL I F、O S M若しくはC N T Fによるものを誘導すること
- の1つ、2つ、3つ、4つ又はそれを超える数（例えば、全て）を有する。

10

【0808】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるg p 1 3 0抗体分子は、B-S 1 2又はB-P 8からの少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ又は6つのC D Rを有する抗体分子を含む。いくつかの実施形態において、C D Rは、C h o t h i a、K a b a t又はそれらの組み合わせに従って定義される。

【0809】

いくつかの実施形態において、g p 1 3 0抗体分子は、B-S 1 2からの1つ、2つ、3つ、4つ、5つ又は6つのC D Rを含む。いくつかの実施形態において、g p 1 3 0抗体分子は、B-S 1 2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）及び軽鎖相補性決定領域3（L C C D R 3）の1つ以上を含む。いくつかの実施形態において、g p 1 3 0抗体分子は、B-S 1 2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）及び重鎖相補性決定領域3（H C C D R 3）の1つ以上を含む。いくつかの実施形態において、g p 1 3 0抗体分子は、B-S 1 2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）及び軽鎖相補性決定領域3（L C C D R 3）の1つ以上並びにB-S 1 2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）及び重鎖相補性決定領域3（H C C D R 3）の1つ以上を含む。

20

30

【0810】

いくつかの実施形態において、g p 1 3 0抗体分子は、B-P 8からの1つ、2つ、3つ、4つ、5つ又は6つのC D Rを含む。いくつかの実施形態において、g p 1 3 0抗体分子は、B-P 8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）及び軽鎖相補性決定領域3（L C C D R 3）の1つ以上を含む。いくつかの実施形態において、g p 1 3 0抗体分子は、B-P 8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）及び重鎖相補性決定領域3（H C C D R 3）の1つ以上を含む。いくつかの実施形態において、g p 1 3 0抗体分子は、B-P 8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）及び軽鎖相補性決定領域3（L C C D R 3）の1つ以上並びにB-P 8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）及び重鎖相補性決定領域3（H C C D R 3）の1つ以上を含む。

40

【0811】

いくつかの実施形態において、g p 1 3 0抗体、例えばB-S 1 2又はB-P 8抗体分子は、少なくとも0. 5、0. 6、0. 7、0. 8、0. 9、1. 0、1. 1、1. 2、1. 3、1. 4、1. 5、1. 6、1. 7、1. 8、1. 9又は2 u g / m l、且つ任意選択により最大約2 u g / m l、例えば、約1 u g / m lの量で提供される。いくつかの実施形態において、g p 1 3 0抗体、例えばB-S 1 2又はB-P 8抗体分子は、1 u g / m lの量で提供される。

50

【0812】

いくつかの実施形態において、抗 gp 130 抗体分子は、第1及び第2の抗 gp 130 抗体分子、例えば、B-S 12 及び B-P 8 抗体分子を含む。いくつかの実施形態において、B-S 12 及び B-P 8 抗体分子は、約 1 : 1 の比率で提供される。いくつかの実施形態において、B-S 12 及び B-P 8 抗体は、0.1 ~ 1000、0.5 ~ 500 又は 1 ~ 100 ug/ml の合計量で提供される。いくつかの実施形態において、B-S 12 及び B-P 8 抗体分子は、それぞれ少なくとも 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9 又は 2 ug/ml、且つ任意選択により最大約 2 ug/ml、例えば、それぞれ約 0.5 ug/ml の量で提供される。いくつかの実施形態において、B-S 12 及び B-P 8 抗体分子は、それぞれ 0.5 ug/ml の量で提供される。

10

【0813】

いくつかの実施形態において、Stat 3 アクティベーターは、gp 130 に結合する抗体分子、例えば、本明細書に記載されるような抗 gp 130 抗体である。

【0814】

いくつかの実施形態において、作製方法、例えば製造方法、例えば本明細書に記載されるようなものは、例えば初期メモリーT細胞又は疲弊していない初期メモリーT細胞が濃縮されている（例えば、そのレベルが増加している）、T細胞、例えばCD 4+又はCD 8+ T細胞の集団をもたらす。

20

【0815】

いくつかの実施形態において、方法は、例えば本明細書に記載されるように、CD 4+ 又は CD 8+ 初期メモリーT細胞の濃縮をもたらす。いくつかの実施形態において、初期メモリーT細胞は、以下の特徴の一方又は両方を有する：CD 27+ 及び/又は CD 45 RO^{d i m / n e g}（例えば、CD 27+ CD 45 RO^{d i m / n e g}）。いくつかの実施形態において、方法は、例えば本明細書に記載されるように、CD 4+ 又は CD 8+ が疲弊していない初期メモリーT細胞の濃縮をもたらす。

【0816】

いくつかの実施形態において、方法は、例えば本明細書に記載されるように、CD 4+ 又は CD 8+ が疲弊していない初期メモリーT細胞の濃縮をもたらす。いくつかの実施形態において、疲弊していない初期メモリーT細胞は、以下の特徴：(i) PD-1 陰性；(ii) CD 27^{h i}；(iii) CCR 7^{h i}；又は(iv) CD 45 RO^{d i m / n e g}の1つ以上、例えば全てを有する。いくつかの実施形態において、疲弊していない初期メモリーT細胞は、PD-1 陰性 CD 27^{h i} CCR 7^{h i} CD 45 RO^{d i m / n e g}である。

30

【0817】

いくつかの実施形態において、T細胞、例えば、初期メモリーT細胞又は疲弊していない初期メモリーT細胞の濃縮された集団は、増加したレベルの、例えば、少なくとも5 ~ 90%多い（例えば、少なくとも5 ~ 10、10 ~ 20、20 ~ 30、30 ~ 50、50 ~ 70若しくは70 ~ 90%多い又は少なくとも5 ~ 90、10 ~ 85、15 ~ 80、20 ~ 75、25 ~ 70、30 ~ 70、35 ~ 65、40 ~ 60若しくは45 ~ 55%多い）、初期メモリーT細胞又は疲弊していない初期メモリーT細胞を有する。いくつかの実施形態において、T細胞、例えば、初期メモリーT細胞又は疲弊していない初期メモリーT細胞の濃縮された集団は、増加したレベルの、例えば、少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30%多い）、初期メモリーT細胞又は疲弊していない初期メモリーT細胞を有する。

40

【0818】

いくつかの実施形態において、増加したレベルの初期メモリーT細胞又は疲弊していない初期メモリーT細胞は、例えば実施例2に記載されているように、Stat 3 アクティ

50

ベーターと接触されなかった以外には同様の T 細胞集団と比較される。いくつかの実施形態において、S t a t 3 アクティベーターと接触されなかった以外には同様の T 細胞集団は、同じ T 細胞集団、例えば濃縮が実施されたもの、例えば、前濃縮集団、例えば開始集団、例えば、実施例 2 に記載されるようなものである。いくつかの実施形態において、S t a t 3 アクティベーターと接触されなかった以外の点では同様の T 細胞集団は、異なる T 細胞集団、例えば、濃縮が実施されなかった集団である。

【0819】

いくつかの実施形態において、C D 4 + T 細胞、例えば、初期メモリー T 細胞又は疲弊していない初期メモリー T 細胞の濃縮集団は、S t a t 3 アクティベーターと接触されなかった以外には同様の T 細胞集団と比較して、増加したレベルの、例えば、少なくとも 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 又は 20 % 多い（例えば、少なくとも 8 % 多い）、初期メモリー T 細胞又は疲弊していない初期メモリー T 細胞を有する。

10

【0820】

いくつかの実施形態において、C D 8 + T 細胞、例えば、初期メモリー T 細胞又は疲弊していない初期メモリー T 細胞の濃縮集団は、S t a t 3 アクティベーターと接触されなかった以外には同様の T 細胞集団と比較して、増加したレベルの、例えば、少なくとも 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 又は 30 % 多い（例えば、少なくとも 20 % 多い）、初期メモリー T 細胞又は疲弊していない初期メモリー T 細胞を有する。

20

【実施例】

【0821】

本発明を、次の実験的实施例を参照して更に詳細に記載する。これらの実施例は、説明のみを目的として提供し、特に断らない限り限定を意図しない。したがって、本発明は、決して次の実施例に限定されると解釈してはならず、むしろ本明細書に提供する教示の結果として明らかとなる任意且つ全ての変形形態を含むと解釈すべきである。

【0822】

実施例 1：C T L 0 1 9 細胞の解糖代謝

C D 1 9 指向性 C A R T 細胞を少なくとも 1 回投与された、高度に前処置されたハイリスク C L L の症状の進行した 4 1 人の患者からの C A R T 細胞サンプルの代謝変化について評価した。

30

【0823】

結果

部分応答（P R）又は応答なし（N R）の患者からの C A R T 細胞は、解糖遺伝子の特性を示した。遡及的細胞注入産物サンプルの C A R 特異的刺激は解糖及びグルコース類似体の取り込みを増加させ（図 2）、これは C L L 患者 T 細胞が合成 C A R のライゲーションによって代謝調節を受けることができるという証拠を提供する。C A R は、C R / P R T D（部分応答、輸血依存性）患者と比較して P R / N R から T 細胞を刺激し、これらの細胞の転写プロファイルと一致する（図 1 A - 1 D）グルコース類似体のより高い取り込みを示した（図 3）。更に、2 - デオキシ - D - グルコース（2 - D G）を使用した解糖の遮断により、エフェクター分化が減少し、セントラルメモリー表現型を有する C A R T 細胞の頻度が増加した（図 4 及び図 5）。

40

【0824】

解糖系の薬理的障害は、C D 1 9 発現腫瘍細胞による再刺激後、増殖能力が増強されたメモリー C T L 0 1 9 リンパ球の形成を付随的に促進した（図 6）。これらの結果は、C R 患者と P R T D 患者から生成された T 細胞が、持続性と強力な抗腫瘍効力の特性を付与できる遺伝子発現プロファイルを示し、解糖代謝の低下が C A R T 細胞効力を高めるための使用可能な細胞生産の改善を表す可能性があることを示す。

【0825】

この実施例で説明された知見は、腫瘍制御の媒介に関与するメカニズム的に関連する重

50

集団の高い絶対数又はより高い相対存在量を持つ培養物の選択及び／又はこれらの亜集団のより高い絶対数又は相対存在量に対して、リンパ球集団（CAR+Tリンパ球集団を含む）を偏らせる生産条件を提供することにより、養子導入Tリンパ球の治療有効性を高める潜在的有効性を強調する。最適な分化能とエフェクター活性を備えたCAR T細胞注入産物の生成は、培養時間の最小化、代替サイトカインの使用及び代謝工学によっても達成できる可能性がある。

【0826】

材料及び方法

ベクター産生、T細胞の分離及びCTL019細胞の生成

4-1BB/CD3ζドメイン（GeMCRI S0607-793）を備えたCD-19特異的CARをコードする導入遺伝子を含むレンチウイルスベクターが、構築及び産生された。自己T細胞を白血球アフェレーシスにより回収し、抗CD3及び抗CD28モノクローナル抗体でコーティングした臨床グレードの常磁性ポリスチレンビーズで活性化した後、上記のレンチウイルスベクターで形質導入した。CARで形質導入されたT細胞は、エクスピボで9～11日間増殖した。大規模CTL019細胞培養中の絶対細胞数は、Coulter Counter（Beckman Coulter）を使用して取得された。集団の倍増は、方程式 $A_t = A_0 2^n$ を使用して計算された。nは集団の倍増の数、A0は細胞のインプット数、Atは細胞の総数である。

【0827】

フローサイトメトリー

CTL019細胞の増殖と持続性及び末梢B-CLL負荷の定期的な縦方向の測定は、前述の通り、6パラメーターのAccuri C6フローサイトメーター（BD Biosciences）を使用して行われた。T細胞の深部免疫表現型検査では、PBMC又はCTL019注入産物（バルクT細胞又は蛍光活性化セルソーティングにより精製された特定のサブセット）をアクアブルー死細胞除去色素（Invitrogen）とプレインキュベートし、その後、市販のフローサイトメトリー抗体で表面染色した。CAR19タンパク質発現は、Alexa Fluor 647コンジュゲート抗イディオタイプモノクローナル抗体を使用し検出された。この研究で使用された全ての抗体は、使用前に滴定され、ポジティブイベントのゲートを設定するために各抗体パネルに対して蛍光マイナスワン（FMO）対照が作成された。細胞は、カスタム17色、19パラメーターの特別注文LSRフォルテッサ（BD Biosciences）で取得した。FlowJoソフトウェア（TreeStar）を使用しデータを分析した。

【0828】

CLL患者のCAR T細胞によるグルコース取り込みの測定

週及的CLL患者のCTL019細胞を解凍し、24ウェル組織培養プレート（BD Biosciences）に 1×10^6 細胞/mlで静置した後、抗イディオタイプ抗体被覆ビーズで一晩刺激して、同族CD19抗原による抗CD19BBζCARのトリガーを再現した。同様にコンジュゲートされたアイソタイプ抗体被覆ビーズを偽対照として使用した。ビーズは、各患者の注入産物の形質導入効率に応じて、3ビーズ：1細胞の割合で追加した。酵素診断キットは、製造元（Sigma）の取扱説明書に従い使用された。この代謝産物のさまざまな濃度から生成されたシグナルを使用して、標準曲線を作成した。偽刺激及びCAR刺激T細胞からの細胞上清を回収し、機器に適応した。一晩刺激した後、細胞を洗浄し、新鮮なRPMIでre-458を補給し、2-[N-(7-ニトロベンズ-2-オキサ-1,3-ジアゾール-4-イル)アミノ]-2-デオキシ-D-グルコース（2-NBDG；Sigma Aldrich）を最終濃度500 μMで添加した。2-NBDGと30分間のインキュベーション後、細胞を氷上に置き、フローサイトメトリー用に染色して、蛍光標識されたグルコース類似体を取り込んだCAR+T細胞を検出した。

【0829】

CAR T細胞の代謝調節

解糖阻害剤 2-デオキシグルコース (2-DG; Sigma-Aldrich) の有無にかかわらず、抗 CD19BBζ CAR T細胞を生成した。培養の9日後、これらの細胞の分化表現型をフローサイトメトリーにより決定した。CAR+T細胞を FACS Aria II セルソーター (BD Biosciences) で分取し、CD19 (K562-CD19) を発現するよう操作された照射 K562 細胞を 1:1 で組み合わせた。CTL019 細胞は K562-CD19 標的で3倍に再刺激された。増殖アッセイ中に、LUNA 自動細胞計数装置 (Logos Biosystems) を使用して絶対細胞数を取得した。

【0830】

実施例 2: CD19 発現キメラ抗原受容体 (CAR) T細胞における STAT3 経路の活性化

CD19 指向性 CAR T細胞を少なくとも1回投与された、高度に前処置されたハイリスク CLL の症状の進行した患者からの CAR T細胞サンプルの STAT3 経路活性化について評価した。

【0831】

材料及び方法

患者サンプル

ペンシルベニア大学承認の単剤 CTL019 療法の臨床試験について施設内治験審査委員会 (IRB) に登録されている CLL 患者からサンプルを取得した。全ての参加者は、ヘルシンキ宣言及び臨床試験実施基準のための調和ガイドラインに関する国際会議に従って、書面によるインフォームドコンセントを提出した。これらの研究は、ClinicalTrials.gov に登録されている (識別子: NCT01029366、NCT01747486 及び NCT02640209)。

【0832】

ベクター産生、T細胞の分離及び CTL019 細胞の生成

4-1BB/CD3ζドメイン (GemCRIS 377 0607-793) を備えた CD-19 特異的 CAR をコードする導入遺伝子を含むレンチウイルスベクターが、構築及び産生された。自己 T細胞を白血球アフェレーシスにより回収し、抗 CD3 及び抗 CD28 モノクローナル抗体でコーティングした臨床グレードの常磁性ポリスチレンビーズで活性化した後、上記のレンチウイルスベクターで形質導入した。CAR で形質導入された T細胞は、エクスピボで 9-11 日間増殖した。大規模 CTL019 細胞培養中の絶対細胞数は、Coulter Counter (Beckman Coulter) を使用して取得された。集団の倍増は、方程式 $A_t = A_0 \cdot 2^n$ を使用して計算された。n は集団の倍増の数、 A_0 は細胞のインプット数、 A_t は細胞の総数である。

【0833】

CAR T細胞における pSTAT3 及び STAT3 遮断の測定。

CLL 患者からの CTL019 細胞注入産物を解凍し、抗イディオタイプ抗体被覆ビーズ又は偽ビーズで刺激した。一部の試験では、細胞を最終濃度 10 ng/mL の組換えヒト IL-6 (Miltenyi Biotec.) で10分間刺激した。細胞サブセット評価試験では、IL-6 による急性刺激前に、対象となる集団を表面マーカーで染色し、FACS Aria II セルソーター (BD Biosciences) で分取した。刺激後、細胞を Phosflow Lyse/Fix Buffer (BD Biosciences) で、12分間 37°C で固定し、Phosflow Perm Buffer III (BD Biosciences) を使用して氷上で30分間透過処理した。細胞内染色は、製造元の推奨する濃度において、抗 STAT3 (pY705) 抗体 (BD Biosciences) を使用し室温で60分間行われた。サンプルは、LSR フォルテッサ (BD Biosciences) で直ちに取得された。STAT3 経路の遮断は、最終濃度 $5 \mu\text{M}$ で、STAT3 特異的阻害剤である Stattic (Selleckchem) の存在の有無にかかわらず、抗 CD19BBζ CAR T細胞を産生することにより行われた。当量のジメチルスルホキシド (DMSO) は、ネガティブビヒクルのみの

10

20

30

40

50

対照として役割を果たす。STAT3シグナル伝達を阻害するStat3の能力は、上記のフォスフロー染色で評価した。分取されたCAR T細胞及び照射されたK562-CD19細胞を使用した連続再刺激アッセイは上記のように実施された。LUNA自動細胞計数装置(Logos Biosystems)を使用して、CAR T細胞増殖の過程で絶対細胞数及び生存率を同時に測定した。

【0834】

サイトカイン分析

CTL019産物を、上記のように抗イディオタイプ抗体被覆ビーズ又はアイソタイプ対照抗体被覆ビーズと一晚培養し、上清を回収した。血清は、ベースライン時及び定義されたCTL019後の処置時点で遠心分離により患者の全血から分離された。これらのサンプルは、使い捨てアリコートで分配され、 -80°C で保存された。上記の培養上清及び血清サンプル中のサイトカインの測定は、製造元(Life Technologies)の取扱説明書に従って、Luminesxビーズアレイプラットフォームを使用して行った。全てのサンプルを3回分析し、9ポイントの標準曲線を使用して複数の内部標準と比較した。データの取得はFlexMAP-3Dシステム(Luminesx Corp.)で行われ、分析はXponent 4.0ソフトウェアと5パラメーターロジスティック回帰分析7を使用して実行された。

【0835】

フローサイトメトリー

CTL019細胞の増殖435と持続性及び末梢B-CLL負荷の定期的な縦方向の測定は、前述の通り、6パラメーターのAccuri C6フローサイトメーター(BD Biosciences)を使用して行われた。T細胞の深部免疫表現型検査では、PBMNC又はCTL019注入産物(バルクT細胞又は蛍光活性化セルソーティングにより精製された特定のサブセット)をアクアブルー死細胞除去色素(Invitrogen)とプレインキュベートし、その後、市販のフローサイトメトリー抗体で表面染色した。CAR19タンパク質発現は、Alexa Fluor 647コンジュゲート抗イディオタイプモノクローナル抗体を使用し検出された。この研究で使用された全ての抗体は、使用前に滴定され、ポジティブイベントのゲートを設定するために各抗体パネルに対して蛍光マインスワン(FMO)対照が作成された。細胞は、カスタム17色、19パラメーターの特別注文LSRフォルテッサ(BD Biosciences)で取得した。FlowJoソフトウェア(TreeStar)を使用しデータを分析した。

【0836】

結果

CAR刺激後のCR、PR_{TD}、PR及びNR患者注入産物に由来するCTL019細胞から産生されたサイトカイン及びケモカインのプロファイルを評価した。図7Aに示すように、CR及びPR_{TD}の対象から製造されたCD19指向性T細胞は、PRs及びNRsと比較して、IL-6、IL-17、IL-22、IL-31及びCCl20を含むSTAT3シグナル伝達メディエーター及び標的のレベルが高いことが示された。この発見は、CAR刺激された評価可能なCR及びPR_{TD}患者のCTL019細胞におけるIL-6/STAT3経路の上方制御と一致していた(図7B)。これらの知見は、CAR

T細胞におけるSTAT3の活性化が、分化の少ない多能性Tリンパ球の生成に関与している可能性があることを示唆している。

【0837】

次いで、リン酸化STAT3(pSTAT3)のレベルが、非常に強力なCR/PR_{TD}患者CAR T細胞注入産物を、機能性が不十分なPR/NR対象の産物から分離できるかどうかを判断した。CAR特異的pSTAT3活性は、PR/NR患者から増殖されたCAR T細胞と比較して、CR/PR_{TD}患者からのCTL019細胞において有意に上昇した(図7C)。これらの知見に一致して、刺激後の注入前のCTL019細胞において、インビボでのCAR T細胞の最大増殖及び血清IL-6とIL-6/STAT3経路遺伝子濃縮との間に強い直接的な相関が観察された(図7D)。したがって、CT

L019細胞におけるSTAT3シグナル伝達の薬理的遮断は、生存率に影響を与えることなく（図8C）、CD19発現白血病細胞（図8A-8B）での連続再刺激時にそれらの増殖能力を減少させた。CTL019細胞の製造中に外因性のIL-6を培地に添加することによりpSTAT3の活性を増加させると、CD19発現腫瘍標的で繰り返し刺激した後、増殖能及びCAR T細胞の絶対数が増加した（図9）。メモリーT細胞の形成と維持におけるSTAT3シグナル伝達の新たな役割を考慮すると、この経路の誘導は、CAR T細胞産物におけるあまり分化していない細胞の境界であるだけでなく、注入後、その増殖と長期生存のために機能的にも重要である可能性があり得る。

【0838】

図10に示すように、CTL019療法に対する応答を有する可能性及び高用量のCD27+PD-1-CD8+CAR T細胞を含むCTL019産物の注入との間に非常に有意な関連が観察された。CD27+PD-1-CD8+サブセットは、IL-6受容体-b鎖（CD130又はgp130としても知られている）（図11B）の著しく高いレベルに起因するIL-6刺激に応答するpSTAT3を上方制御する集団から構成される（図11A）。図12（左パネル）は、CD45RO+CD27+CD8+T細胞、CD45RO+CD27-CD8+T細胞又はCD45RO-CD27-CD8+T細胞と比較して、CD45RO-CD27+CD8+T細胞は、より高いレベルのgp130を発現することを示している。図12（右パネル）は、他のサブセットと比較して、より高い頻度のgp130発現細胞がCD45RO-CD27+CD8+T細胞集団で観察されることを示している。更に、図14Aに示すように、PD-1陰性CD27^{hi}CCR7^{hi}CD45RO^{dim/neg}非疲弊初期メモリーT細胞表現型を有するCD4+T細胞又はCD8+T細胞は、gp130を発現、例えば、選択的に発現する。したがって、CD4+T細胞又はCD8+T細胞のgp130ベースのポジティブ選択は濃縮、例えば初期メモリー表現型T細胞を選択的に濃縮した（図14B）。濃縮されたT細胞、例えば初期メモリー表現型T細胞は、CD27+及びCD45RO^{dim/neg}の表現型を有し得る。図14Bに示すように、CD4+T細胞及びCD8+T細胞におけるgp130ベースの濃縮は、濃縮前と比較して、CD27+及びCD45RO^{dim/neg}の表現型を有するT細胞の集団の増加をもたらした。gp130による濃縮後、濃縮前の38.4%と比較して、CD4+T細胞の46%がCD27+CD45RO^{dim/neg}であった。gp130による濃縮後、濃縮前の55.1%と比較して、CD8+T細胞の76.1%がCD27+CD45RO^{dim/neg}であった。

【0839】

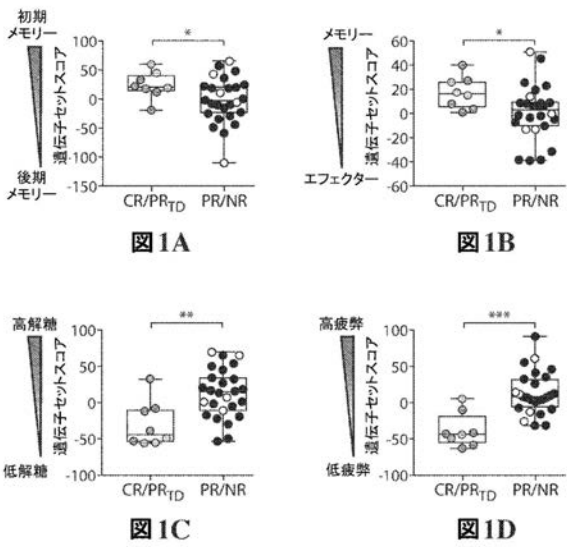
したがって、これらの治験は、CLLに対するCAR T細胞療法の有効性が、増加し得ることを示唆しており、例えば、CD27+PD-1-CD8+細胞の絶対数が多いリンパ球を含む培養液を養子移入することによるものである。

【0840】

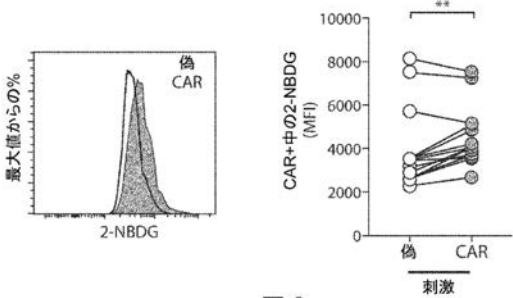
均等物

本明細書に引用するそれぞれの及び全ての特許、特許出願及び刊行物の開示は、その全体が参照により本明細書に援用される。本発明は、具体的態様を参照して開示しているが、本発明の他の態様及び変形形態は、本発明の真の趣旨及び範囲から逸脱することなく他の当業者によって考案され得ることが明らかである。下記の特許請求の範囲は、全てのこのような態様及び均等な変形形態を含むと解釈されることを意図する。

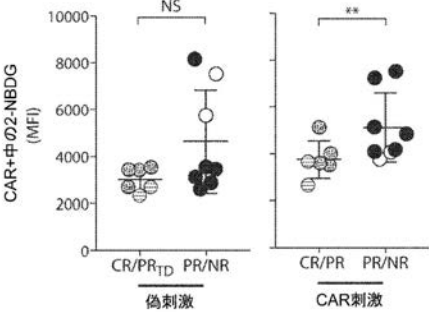
【 図 1 】



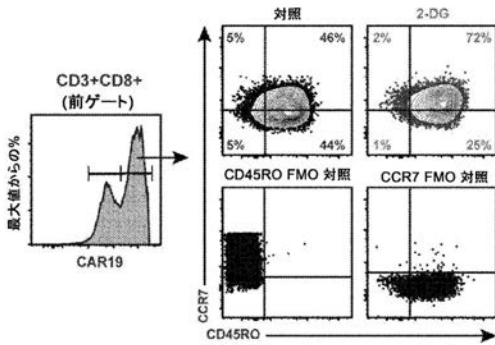
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【図5】

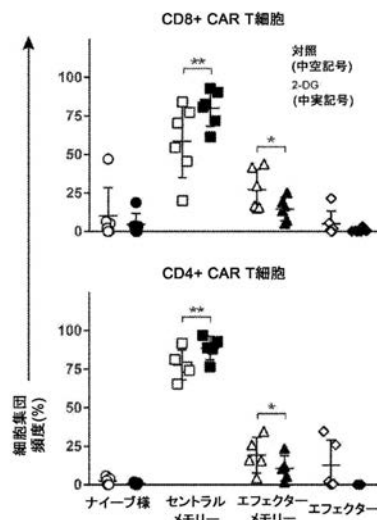


図5

【図6】

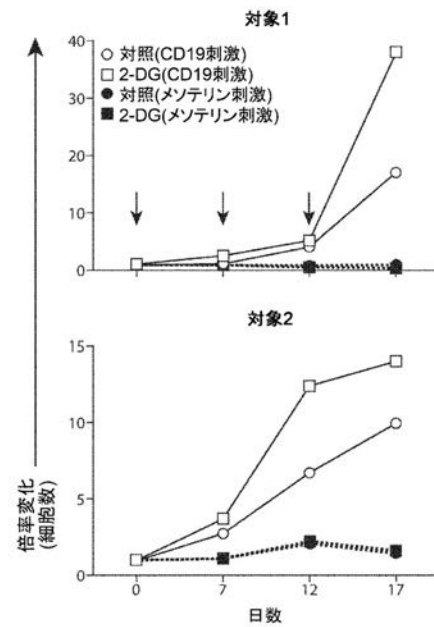


図6

【図7-1】

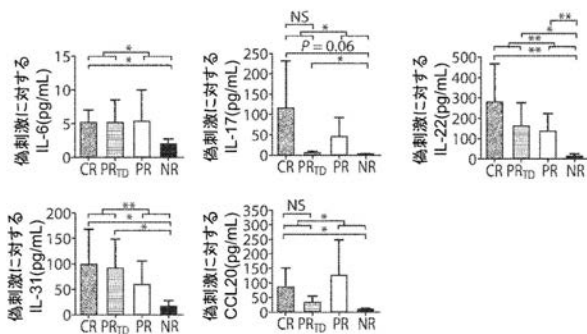


図7A

【図7-2】

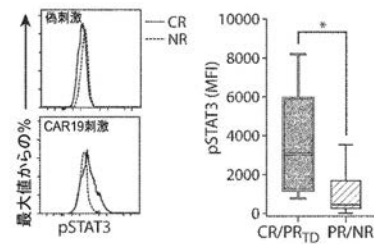


図7C

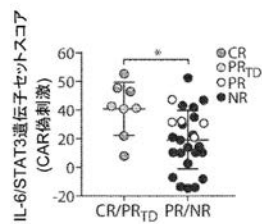


図7B

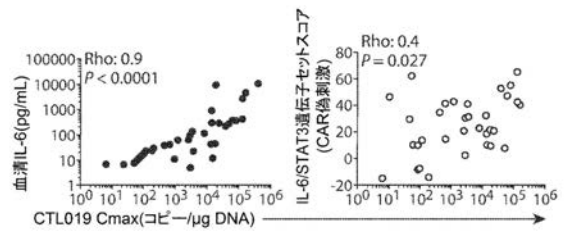


図7D

【図 8】

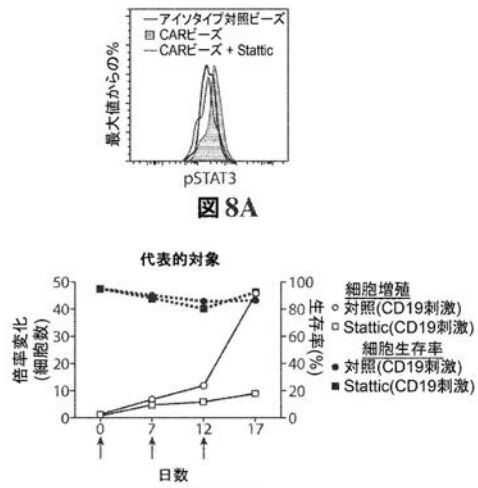


図 8B

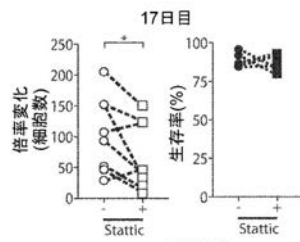


図 8C

【図 9】

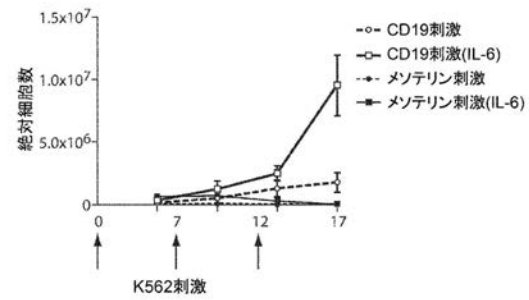


図 9

【図 10】

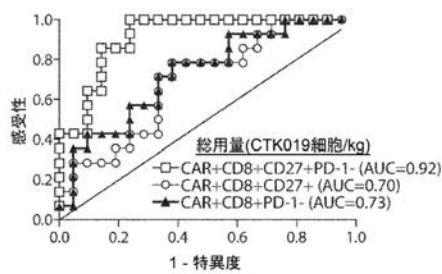


図 10

【図 11】

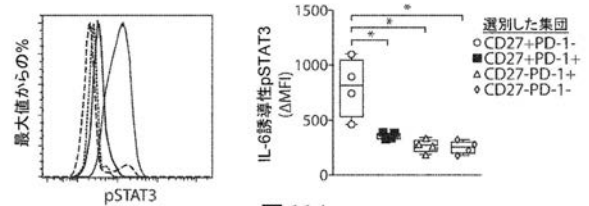


図 11A

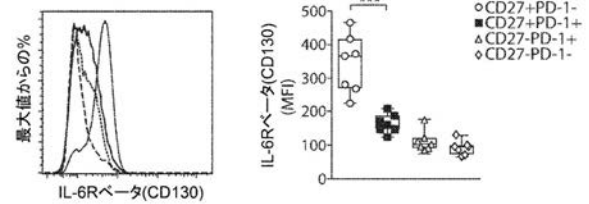


図 11B

【 図 1 2 】

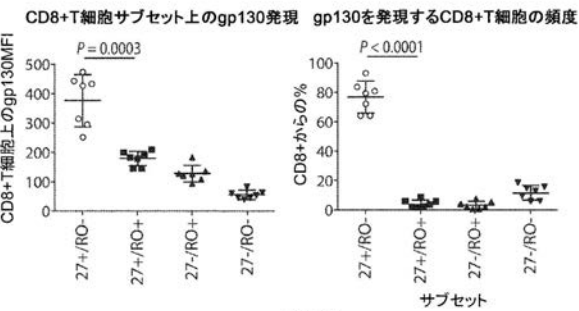


図 12

【 図 1 3 】

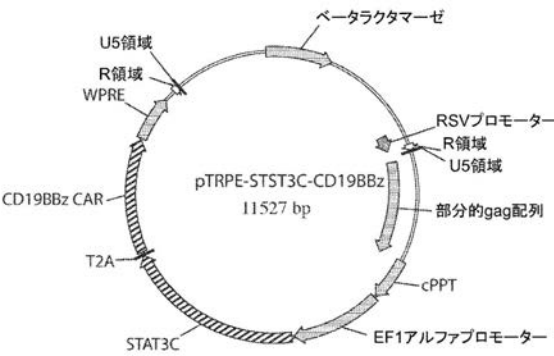


図 13

【 図 1 4 - 1 】

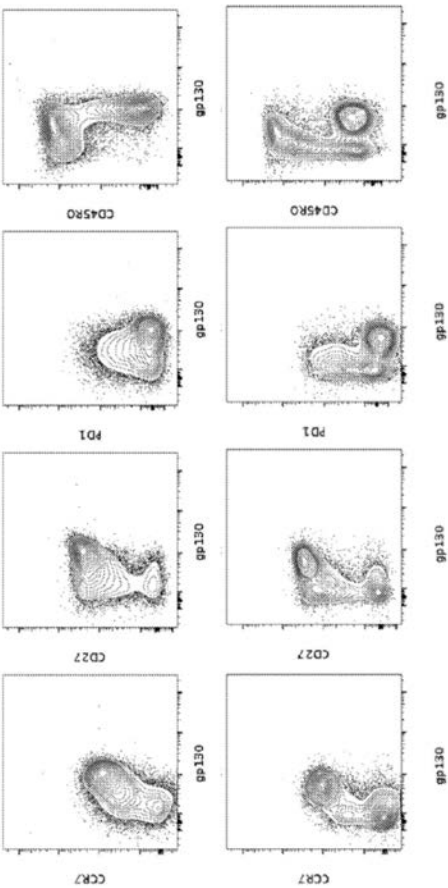


FIG. 14A

【 図 1 4 - 2 】

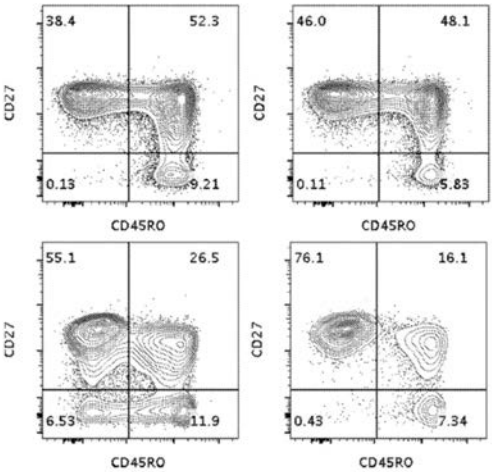


FIG. 14B

【配列表】

2021500894000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2018/057545

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2018/057545

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K14/725 C12N5/0783
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K C12N

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Joseph Fraietta ET AL: "Biomarkers of Response to Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor (CAR) T-Cell Therapy in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia Blood Journal", vol. 128 1 January 2016 (2016-01-01), page 57, XP055543292, Retrieved from the Internet: URL: http://www.bloodjournal.org/content/128/22/57?ssoc-checked=true [retrieved on 2019-01-16] abstract	1-37, 58-71, 80-102
Y	----- -/-	1-37, 58-71, 80-102

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

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 January 2019

Date of mailing of the international search report

04/02/2019

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Petri, Bernhard

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2018/057545

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Y. XU ET AL: "Closely related T-memory stem cells correlate with in vivo expansion of CAR-CD19-T cells and are preserved by IL-7 and IL-15", BLOOD, vol. 123, no. 24, 29 April 2014 (2014-04-29), pages 3750-3759, XP55201372, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2014-01-552174	1-37, 58-71, 80-102
Y	page 3752, right-hand column, paragraph 1 page 3753, right-hand column, paragraph 2 page 3755, right-hand column, paragraph 2 - page 3756, left-hand column, paragraph 1	1-37, 58-71, 80-102
A	M.-L. MICHEL ET AL: "Interleukin 7 (IL-7) selectively promotes mouse and human IL-17-producing cells", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 109, no. 43, 9 October 2012 (2012-10-09), pages 17549-17554, XP055543660, US ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1204327109 abstract	1-37, 58-71, 80-102
A	JAMES E. KROLOPP ET AL: "IL-15 Activates the Jak3/STAT3 Signaling Pathway to Mediate Glucose Uptake in Skeletal Muscle Cells", FRONTIERS IN PHYSIOLOGY, vol. 7, 20 December 2016 (2016-12-20), XP55543671, DOI: 10.3389/fphys.2016.00626 abstract	1-37, 58-71, 80-102
X,P	JOSEPH A. FRAIETTA ET AL: "Determinants of response and resistance to CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy of chronic lymphocytic leukemia", NATURE MEDICINE, vol. 24, no. 5, 30 April 2018 (2018-04-30), pages 563-571, XP055542305, New York ISSN: 1078-8956, DOI: 10.1038/s41591-018-0010-1 the whole document	1-102

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2018/057545

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Julian Smith ET AL: "Abstract 3141: Restricting aerobic glycolysis provides functional improvement of chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells Cancer Research", 1 August 2015 (2015-08-01), XP055542922, Retrieved from the Internet: URL:http://cancerres.aacrjournals.org/content/75/15_Supplement/3141 [retrieved on 2019-01-16]	38-57, 72-102
Y	abstract	38-57, 72-102
X	----- DAVID O'SULLIVAN ET AL: "Targeting T cell metabolism for therapy", TRENDS IN IMMUNOLOGY, vol. 36, no. 2, 1 February 2015 (2015-02-01), pages 71-80, XP55322656, GB ISSN: 1471-4906, DOI: 10.1016/j.it.2014.12.004	38-57, 72-102
Y	page 6, paragraph 2 - page 7, paragraph 1	38-57, 72-102
X	----- KAWALEKAR OMKAR U ET AL: "Distinct Signaling of Coreceptors Regulates Specific Metabolism Pathways and Impacts Memory Development in CAR T Cells", IMMUNITY, CELL PRESS, US, vol. 44, no. 2, 16 February 2016 (2016-02-16), pages 380-390, XP029428484, ISSN: 1074-7613, DOI: 10.1016/J.IMMUNI.2016.01.021	38-57, 72-102
Y	page 380, right-hand column, paragraph 3 page 381, left-hand column, paragraph 1 page 383, right-hand column, paragraph 2-3	1-102
Y	----- D. L. PORTER ET AL: "Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia", SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE, vol. 7, no. 303, 2 September 2015 (2015-09-02), pages 1-13, XP055411906, US ISSN: 1946-6234, DOI: 10.1126/scitranslmed.aac5415 page 6, right-hand column, paragraph 6 -----	1-102

フロントページの続き

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

(72)発明者 ジョセフ・エイ・フライエッタ

アメリカ合衆国08094ニュージャージー州ウィリアムズタウン、ラファエル・コート312番

(72)発明者 ジャン・ジェイ・メレンホースト

アメリカ合衆国08003ニュージャージー州チェリー・ヒル、エクストン・サークル11番

(72)発明者 エレナ・オーランド

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 ロデリック・オコナー

アメリカ合衆国19107ペンシルベニア州フィラデルフィア、パイン・ストリート1021番、
アパートメント・シー

(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

Fターム(参考) 4B063 QA18 QQ61 QR77 QR90 QX02

4B065 AA94X AB01 BA02 CA44