

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7438988号
(P7438988)

(45)発行日 令和6年2月27日(2024.2.27)

(24)登録日 令和6年2月16日(2024.2.16)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62 Z Z N A
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63 Z
C 1 2 N	15/85 (2006.01)	C 1 2 N	15/85 Z
		請求項の数	39 (全206頁) 最終頁に続く
(21)出願番号 特願2020-568398(P2020-568398)		(73)特許権者	504389991
(86)(22)出願日 令和1年6月12日(2019.6.12)			ノバルティス アーゲー
(65)公表番号 特表2021-526814(P2021-526814 A)			スイス国 バーゼル リヒトシュトラーセ 3 5
(43)公表日 令和3年10月11日(2021.10.11)		(74)代理人	100106518
(86)国際出願番号 PCT/US2019/036830			弁理士 松谷 道子
(87)国際公開番号 WO2019/241426		(74)代理人	100122301
(87)国際公開日 令和1年12月19日(2019.12.19)			弁理士 富田 憲史
審査請求日 令和4年6月13日(2022.6.13)		(72)発明者	アイーダ・アブジュブ
(31)優先権主張番号 62/832,991			アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセ
(32)優先日 平成31年4月12日(2019.4.12)			ッツ州ケンブリッジ、マサチューセツ
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)			・アベニュー 2 5 0 番
(31)優先権主張番号 62/684,628		(72)発明者	トニー・フレミング
(32)優先日 平成30年6月13日(2018.6.13)			アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセ
最終頁に続く			ッツ州ケンブリッジ、マサチューセツ
			最終頁に続く
(54)【発明の名称】 B C M A キメラ抗原受容体及びその使用			

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

キメラ抗原受容体（C A R）をコードする単離核酸分子であって、前記 C A R は、抗 B C M A 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及び共刺激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み、前記抗 B C M A 結合ドメインは、重鎖相補性決定領域 1（H C C D R 1）、重鎖相補性決定領域 2（H C C D R 2）及び重鎖相補性決定領域 3（H C C D R 3）を含む重鎖可変領域（V H）並びに軽鎖相補性決定領域 1（L C C D R 1）、軽鎖相補性決定領域 2（L C C D R 2）及び軽鎖相補性決定領域 3（L C C D R 3）を含む軽鎖可変領域（V L）を含み、前記 H C C D R 1、H C C D R 2、H C C D R 3、L C C D R 1、L C C D R 2 及び L C C D R 3 は、それぞれ配列番号 8 6、8 7、8 8、9 5、9 6 及び 9 7 のアミノ酸配列を含み、そして

前記共刺激シグナル伝達ドメインは、4－1 B B に由来する機能的シグナル伝達ドメインを含み、及び前記一次シグナル伝達ドメインは、C D 3 ゼータに由来する機能的シグナル伝達ドメインを含む、単離核酸分子。

【請求項 2】

抗 B C M A 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及び共刺激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単離 C A R であって、前記抗 B C M A 結合ドメインは、重鎖相補性決定領域 1（H C C D R 1）、重鎖相補性決

定領域 2 (H C C D R 2) 及び重鎖相補性決定領域 3 (H C C D R 3) を含む重鎖可変領域 (V H) 並びに軽鎖相補性決定領域 1 (L C C D R 1)、軽鎖相補性決定領域 2 (L C C D R 2) 及び軽鎖相補性決定領域 3 (L C C D R 3) を含む軽鎖可変領域 (V L) を含み、前記 H C C D R 1、H C C D R 2、H C C D R 3、L C C D R 1、L C C D R 2 及び L C C D R 3 は、

それぞれ配列番号 8 6、8 7、8 8、9 5、9 6 及び 9 7

のアミノ酸配列を含み、そして

前記共刺激シグナル伝達ドメインは、4-1 B B に由来する機能的シグナル伝達ドメインを含み、及び前記一次シグナル伝達ドメインは、C D 3 ゼータに由来する機能的シグナル伝達ドメインを含む、

単離 C A R。

【請求項 3】

(i) 前記 V H は、配列番号 9 3 のアミノ酸配列を含む；および

(i i) 前記 V L は、配列番号 1 0 2 のアミノ酸配列を含む、

請求項 1 または 2 に記載の単離核酸分子又は C A R。

【請求項 4】

(i) 前記 V H をコードする核酸配列を含み、前記核酸配列は、配列番号 2 6 0 若しくは 9 4 の核酸配列を含む；および／または

(i i) 前記 V L をコードする核酸配列を含み、前記核酸配列は、配列番号 2 6 1 若しくは 1 0 3 の核酸配列を含む、

請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の単離核酸分子又は C A R。

【請求項 5】

前記 V H 及び V L は、

それぞれ配列番号 9 3 及び 1 0 2

のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の単離核酸分子又は C A R。

【請求項 6】

前記抗 B C M A 結合ドメインは、配列番号 1 0 5 のアミノ酸配列を含む単鎖可変フラグメント (s c F v) を含む、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の単離核酸分子又は C A R。

【請求項 7】

前記抗 B C M A 結合ドメインは、s c F v を含み、前記核酸分子は、前記 s c F v をコードする核酸配列を含み、前記核酸配列は、配列番号 2 5 3 若しくは 1 0 6 の核酸配列を含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の単離核酸分子又は C A R。

【請求項 8】

前記 C A R は、配列番号 1 0 7 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の単離核酸分子又は C A R。

【請求項 9】

前記核酸分子は、配列番号 2 5 9、2 5 8 若しくは 1 0 8 の核酸配列を含む、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の単離核酸分子又は C A R。

【請求項 1 0】

前記 V H 及び V L は、リンカーによって接続され、任意選択により、前記リンカーは、配列番号 6 3 又は 1 0 4 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の単離核酸分子又は C A R。

【請求項 1 1】

(i) 前記膜貫通ドメインは、T 細胞受容体のアルファ鎖、ベータ鎖若しくはゼータ鎖、C D 2 8、C D 3 イプシロン、C D 4 5、C D 4、C D 5、C D 8、C D 9、C D 1 6、C D 2 2、C D 3 3、C D 3 7、C D 6 4、C D 8 0、C D 8 6、C D 1 3 4、C D 1 3 7 又は C D 1 5 4 から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含むか；

(i i) 前記膜貫通ドメインは、配列番号 6 のアミノ酸配列を含むか；又は

(i i i) 前記核酸分子は、前記膜貫通ドメインをコードする核酸配列を含み、前記核酸

10

20

30

40

50

配列は、配列番号 17 の核酸配列を含む、

請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の単離核酸分子又は C A R。

【請求項 12】

前記抗 B C M A 結合ドメインは、膜貫通ドメインにヒンジ領域によって接続され、任意選択により、

(i) 前記ヒンジ領域は、配列番号 2、3 若しくは 4 のアミノ酸配列を含むか；又は

(ii) 前記核酸分子は、前記ヒンジ領域をコードする核酸配列を含み、前記核酸配列は、配列番号 13、14 若しくは 15 の核酸配列を含む、

請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載の単離核酸分子又は C A R。

【請求項 13】

(i) C D 3 ゼータに由来する機能的シグナル伝達ドメインは、配列番号 9 若しくは 10 のアミノ酸配列を含むか；又は

(ii) 前記核酸分子は、前記一次シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列を含み、前記核酸配列は、配列番号 20、配列番号 21 若しくは配列番号 256 の核酸配列を含む、
請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載の単離核酸分子又は C A R。

【請求項 14】

(i) 前記 4-1 B B に由来するシグナル伝達ドメインは、配列番号 7 のアミノ酸配列を含むか；又は

(ii) 前記核酸分子は、前記共刺激シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列を含み、前記核酸配列は、配列番号 18 若しくは配列番号 255 の核酸配列を含む、

請求項 1 ～ 13 のいずれか一項に記載の単離核酸分子又は C A R。

【請求項 15】

前記 4-1 B B に由来する機能的シグナル伝達ドメインは、配列番号 7 のアミノ酸配列を含む、及び／又は前記 C D 3 ゼータに由来する機能的シグナル伝達ドメインは、配列番号 9 若しくは 10 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ～ 14 のいずれか一項に記載の単離核酸分子又は C A R。

【請求項 16】

前記 C A R は、配列番号 1 のアミノ酸配列を含むリーダー配列を更に含む、請求項 1 ～ 15 のいずれか一項に記載の単離核酸分子又は C A R。

【請求項 17】

前記 C A R は、以下の特性：

(i) 前記 C A R は、細胞で発現される場合、B C M A 発現細胞の存在下で前記細胞における N F A T シグナル伝達を活性化すること；

(ii) 前記 C A R は、細胞で発現される場合、B C M A 発現細胞の細胞毒性を誘導すること；及び

(iii) 前記 C A R は、細胞で発現される場合、B C M A 発現細胞の存在下で前記細胞におけるサイトカインの発現を誘導すること

の 1 つ以上を含む、請求項 1 ～ 16 のいずれか一項に記載の単離核酸分子又は C A R。

【請求項 18】

請求項 1 又は 3 ～ 17 のいずれか一項に記載の核酸分子によってコードされる単離ポリペプチド分子。

【請求項 19】

請求項 1 若しくは 3 ～ 17 のいずれか一項に記載の核酸分子、請求項 2、3、5、6、8、および 10 ～ 17 のいずれか一項に記載の C A R をコードする核酸分子、または請求項 18 に記載のポリペプチド分子をコードする核酸分子を含むベクターであって、任意選択により、DNA ベクター、RNA ベクター、プラスミド、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター又はレトロウイルスベクターから選択される、さらに任意選択により、配列番号 11 の核酸配列を含む E F-1 プロモーターを含む、ベクター。

【請求項 20】

請求項 1 若しくは 3 ～ 17 のいずれか一項に記載の核酸分子、請求項 2、3、5、6、

10

20

30

40

50

8、および10～17のいずれか一項に記載のCAR、請求項18に記載のポリペプチド分子、又は請求項19に記載のベクターを含む細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）。

【請求項21】

細胞を作製する方法であって、請求項19に記載のベクターで細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）を形質導入することを含む方法。

【請求項22】

RNA操作細胞を作製する方法であって、インビトロで転写されたRNA又は合成RNAを細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）に導入することを含み、前記RNAは、請求項1若しくは3～17のいずれか一項に記載の核酸分子、又は請求項2、3、5、6、8、および10～17のいずれか一項に記載のCARをコードする核酸分子を含む、方法。

10

【請求項23】

対象において抗腫瘍免疫のための医薬の製造のための、請求項20に記載の細胞の有効量の使用。

【請求項24】

BCMAの発現に関連する疾患を有する対象を処置するための医薬の製造のための、請求項20に記載の細胞の有効量の使用。

【請求項25】

前記細胞は、自己T細胞又は同種異系T細胞である、請求項24に記載の使用。

【請求項26】

BCMA発現に関連する前記疾患は、
(i) 癌若しくは悪性腫瘍又は骨髄異形成、骨髄異形成症候群若しくは前白血病の1つ以上から選択される前癌状態、又は
(ii) BCMAの発現に関連する非癌関連適応症である、請求項24又は25に記載の使用。

20

【請求項27】

前記疾患は、血液癌又は固形癌である、請求項24～26のいずれか一項に記載の使用。

【請求項28】

前記疾患は、急性白血病、B細胞急性リンパ芽球白血病（「BALL」）、T細胞急性リンパ芽球白血病（「TALL」）、急性リンパ芽球白血病（ALL）、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性リンパ性白血病（CLL）、B細胞前リンパ球性白血病、芽球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B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、有毛細胞白血病、小細胞型又は大細胞型濾胞性リンパ腫、悪性リンパ増殖性疾患、MALTリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、多発性骨髄腫、骨髄異形成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新生物、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、前立腺癌（例えば、去勢抵抗性若しくは治療抵抗性の前立腺癌又は転移性前立腺癌）、膵臓癌、肺癌、形質細胞増殖性障害（例えば、無症候性骨髄腫（くすぶり型多発性骨髄腫又は無痛性骨髄腫）、意義不明の単クローン性高ガンマグロブリン血症（MGUS）、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、形質細胞腫（例えば、形質細胞異常増殖症、孤立性骨髄腫、孤立性形質細胞腫、髄外形質細胞腫及び多発性形質細胞腫）、全身性アミロイド軽鎖アミロイドーシス又はPOEMS症候群（クロー・深瀬症候群、高月病及びPEP症候群としても知られる）或いはそれらの組み合わせから選択される、請求項24～27のいずれか一項に記載の使用。

30

【請求項29】

前記疾患は、多発性骨髄腫である、請求項24～28のいずれか一項に記載の使用。

【請求項30】

医薬が、第2の治療剤と組み合わせての投与のために製剤化され、任意選択により、前記第2の治療剤は、

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

40

50

(i i) P D - L 1 阻害剤であって、任意選択により、F A Z 0 5 3、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ及びB M S - 9 3 6 5 5 9 からなる群から選択されるP D - L 1 阻害剤；

(i i i) L A G - 3 阻害剤であって、任意選択により、L A G 5 2 5、B M S - 9 8 6 0 1 6、T S R - 0 3 3、M K - 4 2 8 0 及びR E G N 3 7 6 7 からなる群から選択されるL A G - 3 阻害剤；

(i v) T I M - 3 阻害剤であって、任意選択により、M B G 4 5 3、T S R - 0 2 2 及びL Y 3 3 2 1 3 6 7 からなる群から選択されるT I M - 3 阻害剤；

(v) C T L A - 4 阻害剤であって、任意選択により、イピリムマブ又はトレメリムマブであるC T L A - 4 阻害剤；

(v i) インターロイキン-1 5 (I L - 1 5) ポリペプチド、インターロイキン-1 5 受容体アルファ (I L - 1 5 R a) ポリペプチド又はI L - 1 5 ポリペプチド及びI L - 1 5 R a ポリペプチドの両方の組み合わせ、例えばh e t I L - 1 5；

(v i i) インターロイキン-1 2 (I L - 1 2) ポリペプチド；又は

(v i i i) m T O R 阻害剤であって、任意選択により、R A D 0 0 1 又はラパマイシンであるm T O R 阻害剤

から選択される、請求項 2 7 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 3 1】

N 末端から C 末端に：

(i) 配列番号 1 のリーダー配列；

(i i) 配列番号 8 6 の H C C D R 1；

(i i i) 配列番号 8 7 の H C C D R 2；

(i v) 配列番号 8 8 の H C C D R 3；

(v) 配列番号 9 5 の L C C D R 1；

(v i) 配列番号 9 6 の L C C D R 2；

(v i i) 配列番号 9 7 の L C C D R 3；

(v i i i) 配列番号 2 0 2 の C D 8 膜貫通ドメインおよびヒンジ；

(i x) 配列番号 7 の 4 - 1 B B の機能的シグナル伝達ドメイン；及び

(x) 配列番号 1 0 の C D 3 ゼータの機能的シグナル伝達ドメイン

を含む、B C M A に結合するキメラ抗原受容体 (C A R)。

【請求項 3 2】

配列番号 9 3 の V H 領域及び配列番号 1 0 2 の V L 領域及び／又は配列番号 1 0 5 の s c F v を含む、請求項 3 1 に記載の C A R。

【請求項 3 3】

配列番号 2 5 7 又は配列番号 1 0 7 のアミノ酸配列を含む、請求項 3 1 又は 3 2 に記載の C A R。

【請求項 3 4】

請求項 3 1 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の C A R 分子をコードする単離核酸分子。

【請求項 3 5】

B C M A に結合するキメラ抗原受容体 (C A R) をコードする核酸分子を含むベクターであって、C A R は、N 末端から C 末端に：

(i) 配列番号 1 のリーダー配列；

(i i) 配列番号 8 6 の H C C D R 1；

(i i i) 配列番号 8 7 の H C C D R 2；

(i v) 配列番号 8 8 の H C C D R 3；

(v) 配列番号 9 5 の L C C D R 1；

(v i) 配列番号 9 6 の L C C D R 2；

(v i i) 配列番号 9 7 の L C C D R 3；

(v i i i) 配列番号 2 0 2 の C D 8 膜貫通ドメインおよびヒンジ；

(i x) 配列番号 7 の 4 - 1 B B の機能的シグナル伝達ドメイン；及び

10

20

30

40

50

(x) 配列番号 10 の CD3ゼータの機能的シグナル伝達ドメインを含む、ベクター。

【請求項 36】

BCMAに結合するキメラ抗原受容体(CAR)を含む細胞(例えば、T細胞又はNK細胞)であって、CARは、N末端からC末端に：

- (i) 配列番号 1 のリーダー配列；
- (ii) 配列番号 86 の HC CDR1；
- (iii) 配列番号 87 の HC CDR2；
- (iv) 配列番号 88 の HC CDR3；
- (v) 配列番号 95 の LC CDR1；
- (vi) 配列番号 96 の LC CDR2；
- (vii) 配列番号 97 の LC CDR3；
- (viii) 配列番号 202 の CD8 膜貫通ドメインおよびヒンジ；
- (ix) 配列番号 7 の 4-1BB の機能的シグナル伝達ドメイン；及び
- (x) 配列番号 10 の CD3ゼータの機能的シグナル伝達ドメイン

を含む、細胞(例えば、T細胞又はNK細胞)。

【請求項 37】

請求項 31～33 のいずれか一項に記載の CAR 分子、請求項 34 に記載の核酸分子、又は請求項 35 に記載のベクターを含む細胞(例えば、T細胞又はNK細胞)。

【請求項 38】

BCMAの発現に関連する疾患を処置するための医薬の製造のための、請求項 31～33 のいずれか一項に記載の CAR 又は請求項 36 若しくは 37 に記載の細胞の使用。

【請求項 39】

前記 BCMA の発現に関連する疾患は、多発性骨髄腫である、請求項 38 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本願は、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、2018年6月13日に提出された米国特許出願第62/684,628号明細書及び2019年4月12日に提出された米国特許出願第62/832,991号明細書に対する優先権を主張する。

【0002】

配列表

本願は、ASCII形式で電子的に提出された配列表を含み、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。2019年6月11日に作成された前記ASCIIコピーは、N2067-7155WO__SL.txtという名称であり、サイズが228,604バイトである。

【0003】

本発明は、概して、B細胞成熟抗原タンパク質(BCMA)の発現に関連する疾患を処置するための、キメラ抗原受容体(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)の使用に関する。

【背景技術】

【0004】

B細胞成熟抗原(BCMA)は、腫瘍壊死ファミリー受容体(TNFR)メンバーが発現するB細胞系統の細胞である。BCMAの発現は、最終分化したB細胞で最も高くなる。BCMAは、長期の体液性免疫を維持するために形質細胞の生存を媒介することに関与する。BCMAの発現は、近年、多くの癌、自己免疫疾患及び感染性疾患に関連付けられている。BCMAの発現の増加を有する癌には、多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫、様々な白血病並びに神経膠芽腫などのいくつかの血液癌が含まれる。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

一態様において、本発明は、キメラ抗原受容体（CAR）をコードする単離核酸分子を特徴とし、ここで、CARは、抗BCMA結合ドメイン（例えば、ヒト抗BCMA結合ドメイン、例えば本明細書に記載のヒト抗BCMA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。

【0006】

別の態様において、本発明は、単離CARを提供し、ここで、CARは、抗BCMA結合ドメイン（例えば、ヒト抗BCMA結合ドメイン、例えば本明細書に記載のヒト抗BCMA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。

【0007】

いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメイン（例えば、ヒト抗BCMA結合ドメイン）は、本明細書に記載の抗BCMA結合ドメイン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（例えば、3つ全て）並びに／又は本明細書に記載の抗BCMA結合ドメイン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（例えば、3つ全て）を含む。いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、本明細書（例えば、表2、6又は10）に記載の重鎖可変領域及び／又は本明細書（例えば、表2、6又は10）に記載の軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、表2、6又は10のアミノ酸配列の軽鎖及び重鎖を含むscFvを含む。いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、本明細書（例えば、表2、6又は10）に記載のscFvを含む。いくつかの実施形態において、CARは、本明細書（例えば、表2、6又は10）に開示されるCAR配列を含む。

【0008】

いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、表2～13に記載される任意の抗BCMA重鎖結合ドメインアミノ酸配列（又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えない配列）のいずれかのHC CDR1、HC CDR2及びHC CDR3を含む。いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、表2～13に記載される任意の抗BCMA軽鎖結合ドメインアミノ酸配列（又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えない配列）のいずれかのLC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3を含む。

【0009】

いくつかの実施形態において、HC CDR1、HC CDR2及びHC CDR3は、表3～5（例えば、表3～5の単一の列）に記載されるHC CDR配列（又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えない配列）である。いくつかの実施形態において、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、表3～5（例えば、表3～5の単一の列）に記載されるLC CDR配列（又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えない配列）である。いくつかの実施形態において、HC CDR1、HC CDR2及びHC CDR3は、それぞれ配列番号44、45及び84のアミノ酸配列（又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的

10

20

30

40

50

置換)を有するが、修飾(例えば、置換、例えば保存的置換)が7、6又は5つを超えない配列)を含む。いくつかの実施形態において、HC CDR1、HC CDR2及びHC CDR3は、(i)それぞれ配列番号44、45及び46のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾(例えば、置換、例えば保存的置換)を有するが、修飾(例えば、置換、例えば保存的置換)が7、6又は5つを超えないアミノ酸配列；(ii)それぞれ配列番号44、45及び68のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾(例えば、置換、例えば保存的置換)を有するが、修飾(例えば、置換、例えば保存的置換)が7、6又は5つを超えないアミノ酸配列；又は(iii)それぞれ配列番号44、45及び76のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾(例えば、置換、例えば保存的置換)を有するが、修飾(例えば、置換、例えば保存的置換)が7、6又は5つを超えないアミノ酸配列を含む。

10

【0010】

いくつかの実施形態において、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、それぞれ配列番号54、55及び56のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾(例えば、置換、例えば保存的置換)を有するが、修飾(例えば、置換、例えば保存的置換)が7、6又は5つを超えないアミノ酸配列を含む。

20

【0011】

いくつかの実施形態において、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、(i)それぞれ配列番号44、45、46、54、55及び56又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾(例えば、置換、例えば保存的置換)を有するが、修飾(例えば、置換、例えば保存的置換)が7、6又は5つを超えない配列；(ii)それぞれ配列番号44、45、68、54、55及び56又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾(例えば、置換、例えば保存的置換)を有するが、修飾(例えば、置換、例えば保存的置換)が7、6又は5つを超えない配列；又は(iii)それぞれ配列番号44、45、76、54、55及び56又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾(例えば、置換、例えば保存的置換)を有するが、修飾(例えば、置換、例えば保存的置換)が7、6又は5つを超えない配列のアミノ酸配列を含む。

30

【0012】

いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、配列番号52、70若しくは78のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾(例えば、置換、例えば保存的置換)を有するが、修飾(例えば、置換、例えば保存的置換)が30、20又は10を超えないアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(VH)を含む。

40

【0013】

いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、VHを含み、核酸分子は、VHをコードする核酸配列を含み、核酸配列は、配列番号53、71若しくは79の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列を含む。

【0014】

いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、配列番号61のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾(例えば、置換、例えば保存的置換)を有するが、修飾(例えば、置換、例えば保存的置換)が30、20又は10を超えないア

50

ミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V L）を含む。

【0015】

いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、V Lを含み、核酸分子は、V Lをコードする核酸配列を含み、核酸配列は、配列番号62の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列を含む。

【0016】

いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、V H及びV Lを含み、V H及びV Lは、（i）それぞれ配列番号52及び61又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が30、20又は10を超えないアミノ酸配列、（ii）それぞれ配列番号70及び61又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が30、20又は10を超えないアミノ酸配列、又は（iii）それぞれ配列番号78及び61又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が30、20又は10を超えないアミノ酸配列を含む。

【0017】

いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、配列番号64、72若しくは80のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が30、20又は10を超えないアミノ酸配列を含む単鎖可変フラグメント（scFv）を含む。いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、単鎖可変フラグメント（scFv）を含み、核酸分子は、scFvをコードする核酸配列を含み、核酸配列は、配列番号65、73若しくは81の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列を含む。

【0018】

いくつかの実施形態において、CARは、配列番号66、74若しくは82のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が30、20又は10を超えないアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、核酸分子は、配列番号67、75若しくは83の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列を含む。

【0019】

いくつかの実施形態において、H C C D R 1、H C C D R 2及びH C C D R 3は、表7～9（例えば、表7～9の単一の列）に記載されるH C C D R 配列（又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えない配列）である。いくつかの実施形態において、L C C D R 1、L C C D R 2及びL C C D R 3は、表7～9（例えば、表7～9の単一の列）に記載されるL C C D R 配列（又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えない配列）である。

【0020】

いくつかの実施形態において、H C C D R 1、H C C D R 2及びH C C D R 3は、それぞれ配列番号86、130及び88のアミノ酸配列（又はそれと少なくとも約85%

10

20

30

40

50

、 90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えない配列）を含む。いくつかの実施形態において、HC CDR1、HC CDR2及びHC CDR3は、(i)それぞれ配列番号86、87及び88のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えないアミノ酸配列；(ii)それぞれ配列番号86、109及び88のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えないアミノ酸配列；又は(iii)それぞれ配列番号86、109及び88のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えないアミノ酸配列を含む。

10

【0021】

いくつかの実施形態において、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、それぞれ配列番号95、131及び132のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えないアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、(i)それぞれ配列番号95、96及び97のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えないアミノ酸配列；(ii)それぞれ配列番号95、114及び115のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えないアミノ酸配列；又は(iii)それぞれ配列番号95、114及び97のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えないアミノ酸配列を含む。

20

30

【0022】

いくつかの実施形態において、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、(i)それぞれ配列番号86、87、88、95、96及び97又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えない配列；(ii)それぞれ配列番号86、109、88、95、114及び115又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えない配列；又は(iii)それぞれ配列番号86、109、88、95、114及び97又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えない配列のアミノ酸配列を含む。

40

【0023】

50

いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、配列番号93若しくは112のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が30、20又は10を超えないアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（VH）を含む。いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、VHを含み、核酸分子は、VHをコードする核酸配列を含み、核酸配列は、配列番号260、94若しくは113の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列を含む。

【0024】

いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、配列番号102、118若しくは124のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が30、20又は10を超えないアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含む。いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、VLを含み、核酸分子は、VLをコードする核酸配列を含み、核酸配列は、配列番号261、103、119若しくは125の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列を含む。

【0025】

いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、VH及びVLを含み、VH及びVLは、（i）それぞれ配列番号93及び102又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が30、20又は10を超えないアミノ酸配列、（ii）それぞれ配列番号112及び118又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が30、20又は10を超えないアミノ酸配列、又は（iii）それぞれ配列番号112及び124又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が30、20又は10を超えないアミノ酸配列を含む。

【0026】

いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、配列番号105、120若しくは126のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が30、20又は10を超えないアミノ酸配列を含む単鎖可変フラグメント（scFv）を含む。いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、単鎖可変フラグメント（scFv）を含み、核酸分子は、scFvをコードする核酸配列を含み、核酸配列は、配列番号253、106、121若しくは127の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列を含む。

【0027】

いくつかの実施形態において、CARは、配列番号107、122若しくは128のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が30、20又は10を超えないアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、核酸分子は、配列番号259、108、123若しくは129の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態において、核酸分子は、配列番号258の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95

10

20

30

40

50

%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列を含む。

【0028】

いくつかの実施形態において、HC CDR1、HC CDR2及びHC CDR3は、表11～13（例えば、表11～13の単一の列）に記載されるHC CDR配列（又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えない配列）である。いくつかの実施形態において、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、表11～13（例えば、表11～13の単一の列）に記載されるLC CDR配列（又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えない配列）である。

【0029】

いくつかの実施形態において、HC CDR1、HC CDR2及びHC CDR3は、それぞれ配列番号179、180及び181のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えない配列を含む。いくつかの実施形態において、HC CDR1、HC CDR2及びHC CDR3は、(i)それぞれ配列番号137、138及び139のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えないアミノ酸配列；又は(ii)それぞれ配列番号160、161及び162のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えないアミノ酸配列を含む。

【0030】

いくつかの実施形態において、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、それぞれ配列番号147、182及び183のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えないアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、(i)それぞれ配列番号147、148及び149のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えないアミノ酸配列；又は(ii)それぞれ配列番号147、170及び171のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えないアミノ酸配列を含む。

【0031】

いくつかの実施形態において、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、(i)それぞれ配列番号137、138、139、147、148及び149又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えない配列；又は(ii)それぞれ配列番号160、161、162、147、170及び171又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の

配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えない配列のアミノ酸配列を含む。

【0032】

いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、配列番号145若しくは168のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が30、20又は10を超えないアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（VH）を含む。いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、VHを含み、核酸分子は、VHをコードする核酸配列を含み、核酸配列は、配列番号146若しくは169の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列を含む。

10

【0033】

いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、配列番号154若しくは173のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が30、20又は10を超えないアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含む。いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、VLを含み、核酸分子は、VLをコードする核酸配列を含み、核酸配列は、配列番号155若しくは174の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列を含む。

20

【0034】

いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、VH及びVLを含み、VH及びVLは、（i）それぞれ配列番号145及び154又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が30、20又は10を超えないアミノ酸配列、又は（ii）それぞれ配列番号168及び173又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が30、20又は10を超えないアミノ酸配列を含む。

30

【0035】

いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、配列番号156若しくは175のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が30、20又は10を超えないアミノ酸配列を含む単鎖可変フラグメント（scFv）を含む。いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、単鎖可変フラグメント（scFv）を含み、核酸分子は、scFvをコードする核酸配列を含み、核酸配列は、配列番号157若しくは176の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列を含む。

40

【0036】

いくつかの実施形態において、CARは、配列番号158若しくは177のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が30、20又は10を超えないアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、核酸分子は、配列番号159若しくは178の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列を含む。

【0037】

50

いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、VH及びVLを含み、VH及びVLは、リンカー、例えば本明細書に記載のリンカーによって接続され、任意選択により、リンカーは、配列番号63若しくは104のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0038】

いくつかの実施形態において、膜貫通ドメインは、T細胞受容体のアルファ鎖、ベータ鎖又はゼータ鎖、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137及びCD154から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態において、膜貫通ドメインは、配列番号6のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が30、20又は10を超えないアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、核酸分子は、膜貫通ドメインをコードする核酸配列を含み、核酸配列は、配列番号17の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列を含む。

【0039】

いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、膜貫通ドメインにヒンジ領域によって接続される。いくつかの実施形態において、ヒンジ領域は、配列番号2、3若しくは4のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が30、20又は10を超えないアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、核酸分子は、ヒンジ領域をコードする核酸配列を含み、核酸配列は、配列番号13、14若しくは15の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列を含む。

【0040】

いくつかの実施形態において、膜貫通ドメイン及びヒンジ領域は、配列番号202のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が30、20又は10を超えないアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、膜貫通ドメイン及びヒンジ領域は、配列番号254の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる。

【0041】

いくつかの実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインは、一次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を含み、任意選択により、一次シグナル伝達ドメインは、CD3ゼータ、TCRゼータ、FcRガンマ、FcRベータ、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278（ICOS）、FcεRI、DAP10、DAP12又はCD66dに由来する機能的シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態において、一次シグナル伝達ドメインは、配列番号9若しくは10のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が30、20又は10を超えないアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、核酸分子は、一次シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列を含み、核酸配列は、配列番号20若しくは21の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態において、核酸分子は、一次シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列を含み、核酸配列は、配列番号256の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若し

くは99%の配列同一性を有する核酸配列を含む。

【0042】

いくつかの実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激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を含み、任意選択により、共刺激シグナル伝達ドメインは、MHCクラスII分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ性活性化分子（SLAMタンパク質）、活性化NK細胞受容体、BTLA、Tollリガンド受容体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、4-1BB（CD137）、B7-H3、ICOS（CD278）、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM（LIGHTR）、KIRDS2、SLAMF7、Nkp80（KLRF1）、Nkp44、Nkp30、Nkp46、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL2Rベータ、IL2Rガンマ、IL7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1（CD226）、SLAMF4（CD244、2B4）、CD84、CD96（Tactile）、CEACAM1、CRTAM、Ly9（CD229）、CD160（BY55）、PSGL1、CD100（SEMA4D）、CD69、SLAMF6（NTB-A、Ly108）、SLAM（SLAMF1、CD150、IPO-3）、BLAME（SLAMF8）、SELPLG（CD162）、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、CD28-OX40、CD28-4-1BB又はCD83と特異的に結合するリガンドに由来する機能的シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態において、共刺激シグナル伝達ドメインは、配列番号7のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が30、20又は10を超えないアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、核酸分子は、共刺激シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列を含み、核酸配列は、配列番号18の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態において、核酸分子は、共刺激シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列を含み、核酸配列は、配列番号255の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列を含む。

【0043】

いくつかの実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインは、4-1BBに由来する機能的シグナル伝達ドメイン及びCD3ゼータに由来する機能的シグナル伝達ドメインを含み、任意選択により、細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号7のアミノ酸配列（又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が30、20又は10を超えないアミノ酸配列）及び配列番号9若しくは10のアミノ酸配列（又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が30、20又は10を超えないアミノ酸配列）を含み、任意選択により、細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号7のアミノ酸配列及び配列番号9又は10のアミノ酸配列を含む。

【0044】

いくつかの実施形態において、CARは、配列番号1のアミノ酸配列を含むリーダー配列を更に含む。

【0045】

いくつかの実施形態において、CARは、以下の特性：(i) CARは、細胞（例えば、T細胞）で発現される場合、例えば実施例1に記載されるJNLスクリーニングレポーターアッセイによって測定され、例えば図1A又は1Cに関して実施例1に記載される方法を使用して評価されるとき、BCMA発現細胞の存在下で細胞におけるNFATシグナル伝達を活性化すること；(ii) CARは、細胞（例えば、T細胞）で発現される場合、例えば図3Aに関して実施例1に記載される方法を使用して評価されるとき、BCMA発現細胞の細胞毒性を誘導すること；及び(iii) CARは、細胞（例えば、T細胞）で発現される場合、例えば図3Cに関して実施例1に記載される方法を使用して評価されるとき、BCMA発現細胞の存在下で細胞におけるサイトカイン（例えば、IFN- γ ）の発現を誘導することの1つ以上（例えば、1つ、2つ又は全て）を含む。

10

【0046】

別の態様において、本発明は、重鎖相補性決定領域1（HC CDR1）、重鎖相補性決定領域2（HC CDR2）及び重鎖相補性決定領域3（HC CDR3）を含む重鎖可変領域（VH）並びに軽鎖相補性決定領域1（LC CDR1）、軽鎖相補性決定領域2（LC CDR2）及び軽鎖相補性決定領域3（LC CDR3）を含む軽鎖可変領域（VL）を含む抗BCMA結合ドメインを提供し、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、本明細書に開示されるCDRアミノ酸配列を含む。

【0047】

いくつかの実施形態において、HC CDR1、HC CDR2及びHC CDR3は、表3～5（例えば、表3～5の単一の列）に記載されるHC CDR配列（又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えない配列）である。いくつかの実施形態において、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、表3～5（例えば、表3～5の単一の列）に記載されるLC CDR配列（又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えない配列）である。いくつかの実施形態において、HC CDR1、HC CDR2及びHC CDR3は、それぞれ配列番号44、45及び84のアミノ酸配列（又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えない配列）を含む。いくつかの実施形態において、HC CDR1、HC CDR2及びHC CDR3は、(i) それぞれ配列番号44、45及び46のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えないアミノ酸配列；(ii) それぞれ配列番号44、45及び68のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えないアミノ酸配列；又は(iii) それぞれ配列番号44、45及び76のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えないアミノ酸配列を含む。

20

30

40

【0048】

いくつかの実施形態において、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、それぞれ配列番号54、55及び56のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、9

50

0%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えないアミノ酸配列を含む。

【0049】

いくつかの実施形態において、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、(i)それぞれ配列番号44、45、46、54、55及び56又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えない配列；(ii)それぞれ配列番号44、45、68、54、55及び56又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えない配列；又は(iii)それぞれ配列番号44、45、76、54、55及び56又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えない配列のアミノ酸配列を含む。

10

【0050】

いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、配列番号52、70若しくは78のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が30、20又は10を超えないアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（VH）を含む。

20

【0051】

いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、VHを含み、核酸分子は、VHをコードする核酸配列を含み、核酸配列は、配列番号53、71若しくは79の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列を含む。

【0052】

いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、配列番号61のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が30、20又は10を超えないアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含む。

30

【0053】

いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、VLを含み、核酸分子は、VLをコードする核酸配列を含み、核酸配列は、配列番号62の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列を含む。

【0054】

いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、VH及びVLを含み、VH及びVLは、(i)それぞれ配列番号52及び61又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が30、20又は10を超えないアミノ酸配列、(ii)それぞれ配列番号70及び61又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が30、20又は10を超えないアミノ酸配列、又は(iii)それぞれ配列番号78及び61又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的

40

50

置換)が30、20又は10を超えないアミノ酸配列を含む。

【0055】

いくつかの実施形態において、HC CDR1、HC CDR2及びHC CDR3は、表7～9（例えば、表7～9の単一の列）に記載されるHC CDR配列（又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えない配列）である。いくつかの実施形態において、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、表7～9（例えば、表7～9の単一の列）に記載されるLC CDR配列（又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えない配列）である。

【0056】

いくつかの実施形態において、HC CDR1、HC CDR2及びHC CDR3は、それぞれ配列番号86、130及び88のアミノ酸配列（又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えない配列）を含む。いくつかの実施形態において、HC CDR1、HC CDR2及びHC CDR3は、(i)それぞれ配列番号86、87及び88のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えないアミノ酸配列；(ii)それぞれ配列番号86、109及び88のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えないアミノ酸配列；又は(iii)それぞれ配列番号86、109及び88のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えないアミノ酸配列を含む。

【0057】

いくつかの実施形態において、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、それぞれ配列番号95、131及び132のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えないアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、(i)それぞれ配列番号95、96及び97のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えないアミノ酸配列；(ii)それぞれ配列番号95、114及び115のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えないアミノ酸配列；又は(iii)それぞれ配列番号95、114及び97のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えないアミノ酸配列を含む。

【0058】

いくつかの実施形態において、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、(i)それぞれ配列番号86、87、88、95、96及び97又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾(例えば、置換、例えば保存的置換)を有するが、修飾(例えば、置換、例えば保存的置換)が7、6又は5つを超えない配列；(ii)それぞれ配列番号86、109、88、95、114及び115又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾(例えば、置換、例えば保存的置換)を有するが、修飾(例えば、置換、例えば保存的置換)が7、6又は5つを超えない配列；又は(iii)それぞれ配列番号86、109、88、95、114及び97又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾(例えば、置換、例えば保存的置換)を有するが、修飾(例えば、置換、例えば保存的置換)が7、6又は5つを超えない配列のアミノ酸配列を含む。

10

【0059】

いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、配列番号93若しくは112のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾(例えば、置換、例えば保存的置換)を有するが、修飾(例えば、置換、例えば保存的置換)が30、20又は10を超えないアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(VH)を含む。いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、VHを含み、核酸分子は、VHをコードする核酸配列を含み、核酸配列は、配列番号260、94若しくは113の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列を含む。

20

【0060】

いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、配列番号102、118若しくは124のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾(例えば、置換、例えば保存的置換)を有するが、修飾(例えば、置換、例えば保存的置換)が30、20又は10を超えないアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(VL)を含む。いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、VLを含み、核酸分子は、VLをコードする核酸配列を含み、核酸配列は、配列番号261、103、119若しくは125の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列を含む。

30

【0061】

いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、VH及びVLを含み、VH及びVLは、(i)それぞれ配列番号93及び102又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾(例えば、置換、例えば保存的置換)を有するが、修飾(例えば、置換、例えば保存的置換)が30、20又は10を超えないアミノ酸配列、(ii)それぞれ配列番号112及び118又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾(例えば、置換、例えば保存的置換)を有するが、修飾(例えば、置換、例えば保存的置換)が30、20又は10を超えないアミノ酸配列、又は(iii)それぞれ配列番号112及び124又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾(例えば、置換、例えば保存的置換)を有するが、修飾(例えば、置換、例えば保存的置換)が30、20又は10を超えないアミノ酸配列を含む。

40

【0062】

いくつかの実施形態において、HC CDR1、HC CDR2及びHC CDR3は、表11~13(例えば、表11~13の単一の列)に記載されるHC CDR配列(又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或

50

いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えない配列）である。いくつかの実施形態において、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、表11～13（例えば、表11～13の単一の列）に記載されるLC CDR配列（又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えない配列）である。

【0063】

いくつかの実施形態において、HC CDR1、HC CDR2及びHC CDR3は、それぞれ配列番号179、180及び181のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えない配列を含む。いくつかの実施形態において、HC CDR1、HC CDR2及びHC CDR3は、(i)それぞれ配列番号137、138及び139のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えないアミノ酸配列；又は(ii)それぞれ配列番号160、161及び162のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えないアミノ酸配列を含む。

【0064】

いくつかの実施形態において、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、それぞれ配列番号147、182及び183のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えないアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、(i)それぞれ配列番号147、148及び149のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えないアミノ酸配列；又は(ii)それぞれ配列番号147、170及び171のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えないアミノ酸配列を含む。

【0065】

いくつかの実施形態において、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、(i)それぞれ配列番号137、138、139、147、148及び149又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えない配列；又は(ii)それぞれ配列番号160、161、162、147、170及び171又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が7、6又は5つを超えない配列のアミノ酸配列を含む。

【0066】

いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、配列番号145若しくは1

68のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が30、20又は10を超えないアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（VH）を含む。いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、VHを含み、核酸分子は、VHをコードする核酸配列を含み、核酸配列は、配列番号146若しくは169の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列を含む。

【0067】

いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、配列番号154若しくは173のアミノ酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が30、20又は10を超えないアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含む。いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、VLを含み、核酸分子は、VLをコードする核酸配列を含み、核酸配列は、配列番号155若しくは174の核酸配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する核酸配列を含む。

【0068】

いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、VH及びVLを含み、VH及びVLは、（i）それぞれ配列番号145及び154又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が30、20又は10を超えないアミノ酸配列、又は（ii）それぞれ配列番号168及び173又はそれと少なくとも約85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有する配列或いは少なくとも1、2又は3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が30、20又は10を超えないアミノ酸配列を含む。

【0069】

一態様において、本発明は、本明細書に記載の核酸分子によってコードされる単離ポリペプチド分子を提供する。一態様において、本発明は、本明細書に記載の核酸分子又は本明細書に記載のCARをコードする核酸分子を含むベクターを提供する。いくつかの実施形態において、ベクターは、DNAベクター、RNAベクター、プラスミド、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター又はレトロウイルスベクターから選択される。いくつかの実施形態において、ベクターは、配列番号11の核酸配列を含むEF-1プロモーターを含む。一態様において、本発明は、本明細書に記載の核酸分子、本明細書に記載のCAR、本明細書に記載のポリペプチド分子又は本明細書に記載のベクターを含む細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）を提供する。いくつかの実施形態において、細胞は、細胞内シグナル伝達ドメインからの陽性シグナルを含む第2のポリペプチドに関連する、阻害分子の少なくとも一部を含む第1のポリペプチドを含む阻害剤を更に発現し、任意選択により、阻害剤は、PD-1の少なくとも一部を含む第1のポリペプチドと、共刺激ドメイン及び一次シグナル伝達ドメインを含む第2のポリペプチドとを含む。

【0070】

一態様において、本発明は、細胞を作製する方法であって、本明細書に記載のベクターで細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）を形質導入することを含む方法を提供する。一態様において、本発明は、RNA操作細胞を作製する方法であって、インビトロで転写されたRNA又は合成RNAを細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）に導入することを含む方法を提供し、ここで、RNAは、本明細書に記載の核酸分子又は本明細書に記載のCARをコードする核酸分子を含む。

【0071】

一態様において、本発明は、対象において抗腫瘍免疫を提供する方法であって、対象に、本明細書に記載の細胞の有効量を投与することを含む方法を提供する。一態様において

、本発明は、BCMAの発現に関連する疾患を有する対象を処置する方法であって、対象に、本明細書に記載の細胞の有効量を投与することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態において、細胞は、自己T細胞又は同種異系T細胞である。いくつかの実施形態において、BCMAの発現に関連する疾患は、(i) 癌若しくは悪性腫瘍又は骨髓異形成、骨髓異形成症候群若しくは前白血病の1つ以上から選択される前癌状態、又は(ii) BCMAの発現に関連する非癌関連適応症である。いくつかの実施形態において、疾患は、血液癌又は固形癌である。いくつかの実施形態において、疾患は、急性白血病、B細胞急性リンパ性白血病(「BALL」)、T細胞急性リンパ性白血病(「TALL」)、急性リンパ性白血病(ALL)、慢性骨髓性白血病(CML)、慢性リンパ性白血病(CLL)、B細胞前リンパ球性白血病、芽球性形質細胞様樹状細胞新生物、バーキットリンパ腫、びまん性大B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、有毛細胞白血病、小細胞型又は大細胞型濾胞性リンパ腫、悪性リンパ増殖性疾患、MALTリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、多発性骨髓腫、骨髓異形成及び骨髓異形成症候群、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新生物、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、前立腺癌(例えば、去勢抵抗性若しくは治療抵抗性の前立腺癌又は転移性前立腺癌)、膀胱癌、肺癌、形質細胞増殖性障害(例えば、無症候性骨髓腫(くすぶり型多発性骨髓腫又は無痛性骨髓腫)、意義不明の単クローン性高ガンマグロブリン血症(MGUS)、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、形質細胞腫(例えば、形質細胞異常増殖症、孤立性骨髓腫、孤立性形質細胞腫、髄外形質細胞腫及び多発性形質細胞腫)、全身性アミロイド軽鎖アミロイドーシス又はPOEMS症候群(クロウ・深瀬症候群、高月病及びPEP症候群としても知られる)) 或いはそれらの組み合わせから選択される。いくつかの実施形態において、疾患は、多発性骨髓腫である。いくつかの実施形態において、方法は、対象に第2の治療剤を投与することを更に含む。いくつかの実施形態において、第2の治療剤は、PD-1阻害剤であり、任意選択により、PD-1阻害剤は、PDRO01、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、ピジリズマブ、MED10680、REGN2810、TSR-042、PF-06801591及びAMP-224からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、第2の治療剤は、PD-L1阻害剤であり、任意選択により、PD-L1阻害剤は、FAZ053、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ及びBMS-936559からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、第2の治療剤は、LAG-3阻害剤であり、任意選択により、LAG-3阻害剤は、LAG525、BMS-986016、TSR-033、MK-4280及びREGN3767からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、第2の治療剤は、TIM-3阻害剤であり、任意選択により、TIM-3阻害剤は、MBG453、TSR-022及びLY3321367からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、第2の治療剤は、CTLA-4阻害剤であり、任意選択により、CTLA-4阻害剤は、イピリムマブ又はトレメリムマブである。いくつかの実施形態において、第2の治療剤は、インターロイキン-15(IL-15)ポリペプチド、インターロイキン-15受容体アルファ(IL-15Ra)ポリペプチド又は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、例えばhetIL-15である。いくつかの実施形態において、第2の治療剤は、インターロイキン-12(IL-12)ポリペプチドである。いくつかの実施形態において、第2の治療剤は、mTOR阻害剤であり、任意選択により、mTOR阻害剤は、RAD001又はラパマイシンである。

【0072】

本明細書に開示される抗BCMA結合ドメイン及びそのような抗BCMA結合ドメインを含むCARは、以前の抗BCMA結合ドメイン及びそれらを含むCARよりも改善された特性、例えば増加したBCMAへの結合親和性、細胞(例えば、T細胞又はNK細胞)における増加したCAR発現レベル並びに／又は増強された細胞毒性及び／若しくは細胞(例えば、T細胞若しくはNK細胞)のサイトカイン産生を媒介する能力を有する。

【0073】

特に定義しない限り、本明細書で使用される全ての科学技術用語は、本発明が属する技

10

20

30

40

50

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。本発明の実施又は試験では、本明細書に記載されるものと同様の又は均等な方法及び材料を使用し得るが、好適な方法及び材料を以下に記載する。本明細書において言及される刊行物、特許出願、特許及び他の参考文献の全ては、全体として参照により援用される。加えて、材料、方法及び例は、例示に過ぎず、限定すること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く、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】

【0074】

【図1A-1H】自動システムを使用した Jurkat NFATルシフェラーゼ (JNL) レポーターアッセイを使用して、BCMA CARの機能を試験した。CARクローンは、抗原依存性活性について JNL レポーターアッセイで評価された。示された CAR クローンを含有する JNL 細胞又は非形質導入 JNL 細胞 (UTD) を培地のみで (図1G及び1H) 又は標的細胞株 (BCMA陽性細胞株としての KMS11 (図1A及び1C) 及び BCMA陰性細胞株としての NALM6 (図1E及び1F)) と異なる比率で共培養し、ルシフェラーゼ活性を発光強度として測定した。抗原発現細胞の存在下で発光強度が UTD 細胞のレベルの2倍を超えた場合、クローンは、活性であると見なされた。発光の読み取りは、CAR刺激の直接測定である。図1B及び1Dは、ヒト組換え (r) BCMA_Fc-AF647を使用したフローサイトメトリーによって検出された JNL 細胞上の BCMA CARの発現レベルを示すグラフである。1x又は2xプラットフォームは、ウイルス産生のために播種された 40,000の H293細胞又は 80,000の H293細胞を示していた。

【図2】初代ヒトT細胞上の BCMA CARの発現レベル。細胞をヒト rBCMA_Fc-AF647 試薬で染色し、フローサイトメトリーでアッセイした。CAR+細胞及び MFIのパーセンテージは、細胞培養の5日目及び9日目についてグラフに示される。データは、表17に概括され、これは、それぞれの CARについて達成されたウイルス力価を含む。

【図3A-3C】示された CARを発現するT細胞が細胞溶解及びサイトカイン産生を媒介する能力を、ホタルルシフェラーゼを発現する KMS11 標的細胞株 (KMS11-luc) に対して評価した。図3A: CART細胞は、示された E:T比で KMS11-luc 標的細胞と共培養された。%細胞死滅は、エフェクターT細胞を有しない標的細胞 (対照) と、エフェクターT細胞を有する標的細胞 (実施例) との間のルシフェラーゼシグナルの差によって決定され、対照のパーセントとして表された。UTDは、非形質導入T細胞を表す。図3B: BCMA陰性系統 NALM6について、バックグラウンド死滅が観察された。図3C: IFN γ は、これらの共培養システムから24時間後に E:T比2.5で収集された上清の MSDによって測定された。全てのデータは、平均+/-標準偏差として表される。

【発明を実施するための形態】

【0075】

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。

【0076】

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 (即ち少なくとも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。

【0077】

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。

【0078】

本発明の組成物及び方法は、特定の配列又はそれと実質的に同一若しくは類似の配列、例えば特定の配列と少なくとも85%、90%若しくは95%同一であるか又はそれを超えて同一である配列を有するポリペプチド及び核酸を包含する。アミノ酸配列に関連して、「実質的に同一」という用語は、本明細書では、第1及び第2のアミノ酸配列が共通の構造ドメイン及び／又は共通の機能的活性を有することができるように、第2のアミノ酸配列の整列したアミノ酸残基と、i) 同一であるか、又はii) その保存的置換である、十分又は最小の数のアミノ酸残基を含有する第1のアミノ酸配列、例えば参照配列、例えば本明細書で提供される配列に対して少なくとも約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有する共通の構造ドメインを含有するアミノ酸配列を指すために使用される。

【0079】

ヌクレオチド配列に関連して、「実質的に同一」という用語は、本明細書では、第1及び第2のヌクレオチド配列が、共通の機能的活性を有するポリペプチドをコードするか、又は共通の構造ポリペプチドドメイン若しくは共通の機能的ポリペプチド活性をコードするように、第2の核酸配列の整列したヌクレオチドと同一である、十分又は最小の数のヌクレオチドを含有する第1の核酸配列、例えば参照配列、例えば本明細書で提供される配列に対して少なくとも約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するヌクレオチド配列を指すために使用される。

【0080】

「変異体」という用語は、参照アミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するか、又は実質的に同一のヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドを指す。いくつかの実施形態において、変異体は、機能的変異体である。

【0081】

「機能的変異体」という用語は、参照アミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するか、又は実質的に同一のヌクレオチド配列によってコードされ、参照アミノ酸配列の1つ以上の活性を有することができる、ポリペプチドを指す。

【0082】

本明細書で使用される場合、「BCMA」という用語は、B細胞成熟抗原を指す。BCMA (TNFRSF17、BCM又はCD269としても知られる) は、腫瘍壊死受容体 (TNFR) ファミリーのメンバーであり、最終分化したB細胞、例えばメモリーB細胞及び形質細胞上に主に発現する。そのリガンドは、TNFファミリーのB細胞アクティベータ (BAFF) 及び増殖誘導リガンド (APRIL) と呼ばれる。BCMAは、長期の体液性免疫を維持するために形質細胞の生存を媒介することに関与する。BCMAの遺伝子は、第16染色体上にコードされ、184アミノ酸のタンパク質 (NP_001183.2) をコードする、994ヌクレオチド長の一次mRNA転写産物 (NCBI受託番号 NM_001192.2) を産生する。BCMA遺伝子座に由来する第2のアンチセンス転写物が説明されており、これは、BCMA発現の調節における役割を果たし得る。(Laabiy et al., Nucleic Acids Res., 1994, 22: 1147-1154)。更なる転写変異体は、意義不明で説明されている (Smirnova AS et al. Mol Immunol., 2008, 45 (4): 1179-1183。TV4としても知られる第2のアイソフォームが同定されている (UniProt識別子 Q02223-2)。本明細書で使用される場合、「BCMA」は、野生型全長BCMAの変異、例えば点変異、フラグメント、挿入、欠失及びスプライス変異体を含むタンパク質を含む。

【0083】

用語「キメラ抗原受容体」又は代わりに「CAR」は、少なくとも、細胞外抗原結合ドメインと、膜貫通ドメインと、以下に定義するとおりの刺激分子に由来する機能性シグナル伝達ドメインを含む細胞質シグナル伝達ドメイン（本明細書では「細胞内シグナル伝達ドメイン」とも称される）とを含む組換えポリペプチドコンストラクトを指す。一部の実施形態において、CARポリペプチドコンストラクトのドメインは、同じポリペプチド鎖にあり、例えばキメラ融合タンパク質を含む。一部の実施形態において、CARポリペプチドコンストラクトのドメインは、互いに連続しておらず、例えば本明細書に記載されるとおりのRCARに提供されるように、例えば異なるポリペプチド鎖にある。

【0084】

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、CD3-ゼータの一次シグナル伝達ドメイン）を含む。一態様において、細胞質シグナル伝達ドメインは、以下に定義するとおりの少なくとも1つの共刺激分子に由来する1つ以上の機能性シグナル伝達ドメインを更に含む。一態様において、共刺激分子は、41BB（即ちCD137）、CD27、ICOS及び／又はCD28から選択される。一態様において、CARは、細胞外抗原認識ドメインと、膜貫通ドメインと、刺激分子に由来する機能性シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインとを含むキメラ融合タンパク質を含む。一態様において、CARは、細胞外抗原認識ドメインと、膜貫通ドメインと、共刺激分子に由来する機能性シグナル伝達ドメイン及び刺激分子に由来する機能性シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインとを含むキメラ融合タンパク質を含む。一態様において、CARは、細胞外抗原認識ドメインと、膜貫通ドメインと、1つ以上の共刺激分子に由来する2つの機能性シグナル伝達ドメイン及び刺激分子に由来する機能性シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインとを含むキメラ融合タンパク質を含む。一態様において、CARは、細胞外抗原認識ドメインと、膜貫通ドメインと、1つ以上の共刺激分子に由来する少なくとも2つの機能性シグナル伝達ドメイン及び刺激分子に由来する機能性シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインとを含むキメラ融合タンパク質を含む。一態様において、CARは、CAR融合タンパク質のアミノ末端（N-ter）に任意選択のリーダー配列を含む。一態様において、CARは、細胞外抗原認識ドメインのN末端にリーダー配列を更に含み、リーダー配列は、任意選択により、細胞プロセッシング及びCARの細胞膜局在化中に抗原認識ドメイン（例えば、scFv）から切断される。

【0085】

特定の腫瘍マーカーX（ここで、Xは、本明細書に記載されるような腫瘍マーカーであり得る）を標的とする、抗原結合ドメイン（例えば、scFv、単ドメイン抗体又はTCR（例えば、TCRアルファ結合ドメイン又はTCRベータ結合ドメイン））を含むCARは、XCARとも称される。例えば、BCMAを標的とする抗原結合ドメインを含むCARは、BCMA CARと称される。CARは、任意の細胞、例えば本明細書に記載の免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）で発現させることができる。

【0086】

用語「シグナル伝達ドメイン」は、二次メッセンジャーを生成するか又はかかるメッセンジャーに応答してエフェクターとして機能することにより定義されたシグナル伝達経路を介して細胞活性を調節するように細胞内で情報を伝えることにより機能するタンパク質の機能性の一部分を指す。

【0087】

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、且つ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。

【0088】

用語「抗体フラグメント」は、インタクトな抗体又はその組換え変異体の少なくとも一

10

20

30

40

50

部分を指し、且つ抗原などの標的に対する抗体フラグメントの認識及び特異的結合をもたらすのに十分である、インタクトな抗体の抗原結合ドメイン、例えば抗原決定可変領域を指す。抗体フラグメントの例としては、限定されないが、Fab、Fab'、F(ab')₂及びFvフラグメント、scFv抗体フラグメント、線状抗体、sdAbなどのシングルドメイン抗体（VL又はVHのいずれか）、ラクダ科動物VHHドメイン及びヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つ以上、例えば2つのFabフラグメントを含む二価フラグメントなどの抗体フラグメントで形成された多重特異性分子及び結合された抗体の2つ以上、例えば2つの単離されたCDR又は他のエピトープ結合フラグメントが挙げられる。抗体フラグメントは、シングルドメイン抗体、マキシボディ、ミニボディ、ナノボディ、イントラボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、v-NAR及びビス-scFvにも取り込まれ得る（例えば、Hollinger and Hudson, Nature Biotechnology 23:1126-1136, 2005を参照されたい）。抗体フラグメントは、フィブロネクチンIII型（Fn3）などのポリペプチドをベースとする足場にもグラフトされ得る（フィブロネクチンポリペプチドミニボディについて記載している米国特許第6,703,199号明細書を参照されたい）。
【0089】

用語「scFv」は、軽鎖の可変領域を含む少なくとも1つの抗体フラグメントと、重鎖の可変領域を含む少なくとも1つの抗体フラグメントとを含む融合タンパク質を指し、軽鎖及び重鎖可変領域は、短い可動性ポリペプチドリinker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scFvは、その由来であるインタクトな抗体の特異性を保持している。指定されない限り、本明細書で使用されるとき、scFvは、VL及びVH可変領域を例えばポリペプチドのN端側及びC端側末端に対していずれの順序でも有し得、scFvは、VL-linker-VHを含み得るか又はVH-linker-VLを含み得る。
【0090】

用語「相補性決定領域」又は「CDR」は、本明細書で使用されるとき、抗原特異性及び結合親和性を付与する抗体可変領域内にあるアミノ酸の配列を指す。例えば、一般に、各重鎖可変領域に3つのCDR（例えば、HCDR1、HCDR2及びHCDR3）及び各軽鎖可変領域に3つのCDR（LCDR1、LCDR2及びLCDR3）がある。所与のCDRの正確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」付番スキーム）、Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273, 927-948（「Chothia」付番スキーム）又はこれらの組み合わせを含め、幾つもの周知のスキームのいずれかを用いて決定することができる。Kabat及びChothia付番スキームの組み合わせでは、一部の実施形態において、CDRは、Kabat CDR、Chothia CDR又は両方の一部であるアミノ酸残基に対応する。
【0091】

抗体又はその抗体フラグメントを含む本発明のCAR組成物の一部分は、例えば、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（sdAb）、単鎖抗体（scFv）又は例えばヒト若しくはヒト化抗体を含むポリペプチド鎖の一部として発現する（Harlow et al., 1999, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426）。一態様において、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。

【0092】

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

10

【0093】

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。

【0094】

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。カップパ（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。

20

【0095】

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

【0096】

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、従って、免疫応答を生じさせるタンパク質をコードするヌクレオチド配列又は部分的ヌクレオチド配列を含む任意のDNAが、その用語が本明細書において使用されるとおりの「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。

30

40

【0097】

用語「抗腫瘍効果」は、限定されないが、例えば腫瘍容積の減少、腫瘍細胞数の減少、転移数の減少、平均余命の増加、腫瘍細胞増殖の減少、腫瘍細胞生存の減少又は癌性病態に関連する様々な生理学的症状の改善を含め、様々な手段によって明らかになり得る生物学的効果を指す。「抗腫瘍効果」は、そもそも腫瘍の発生を防ぐことにおける本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、細胞及び抗体の能力によっても明らかになり得る。

50

【0098】

用語「抗癌効果」は、限定されないが、例えば腫瘍容積の減少、癌細胞数の減少、転移数の減少、平均余命の増加、癌細胞増殖の減少、癌細胞生存の減少又は癌性病態に関連する様々な生理学的症状の改善を含め、様々な手段によって明らかになり得る生物学的効果を指す。「抗癌効果」は、そもそも癌の発生を防ぐことにおけるペプチド、ポリヌクレオチド、細胞及び抗体の能力によっても明らかになり得る。用語「抗腫瘍効果」は、限定されないが、例えば腫瘍容積の減少、腫瘍細胞数の減少、腫瘍細胞増殖の減少又は腫瘍細胞生存の減少を含め、様々な手段によって明らかになり得る生物学的効果を指す。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。

10

【0099】

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。

【0100】

用語「異種」は、異なる種の動物に由来する移植片を指す。

【0101】

用語「アフエーシス」は、本明細書で使用されるとき、ドナー又は患者の血液をドナー又は患者から取り出し、装置に通過させて1つ又は複数の選択された特定の構成成分を選び除き、残りを例えば返血法によってドナー又は患者の循環に戻すという当技術分野で認められている体外プロセスを指す。従って、「アフエーシス試料」に関連して、アフエーシスを用いて得られる試料を指す。

20

【0102】

用語「癌」は、異常細胞の急激な無制御の成長によって特徴付けられる疾患を指す。癌細胞は、局所的に又は血流及びリンパ系を通じて体の他の部位に広がり得る。様々な癌の例が本明細書に記載され、限定されないが、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、皮膚癌、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。本明細書に記載の方法によって処置される好ましい癌には、多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫又は非ホジキンリンパ腫が含まれる。

30

【0103】

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。

【0104】

「由来する」は、この用語が本明細書で使用されるとき、第1の分子と第2の分子との間の関係を指す。これは、概して、第1の分子と第2の分子との間の構造的類似性に言及するものであり、第2の分子に由来する第1の分子に関する方法又は供給源を限定することを含意又は包含しない。例えば、CD3ゼータ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、即ち適切な条件下でシグナルを生成する能力を有するような十分なCD3ゼータ構造を保持している。これは、細胞内シグナル伝達ドメインの特定の作製方法に限定することを含意又は包含せず、例えば細胞内シグナル伝達ドメインを提供するためにCD3ゼータ配列で開始して不要な配列を欠失させるか、又は突然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

【0105】

語句「BCMAの発現に関連する疾患」には、限定されないが、例えば癌若しくは悪性腫瘍などの増殖性疾患又は骨髄形成異常、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、BCMA（例えば、野生型又は突然変異体BCMA）を発現する細胞に関連する疾患又はBCMA（例えば、野生型又は突然変異体BCMA）を発現する細胞に関

50

連する病態又はBCMA（例えば、野生型又は突然変異体BCMA）を発現する細胞に関連する非癌関連徴候が含まれる。誤解を避けるため、BCMAの発現に関連する疾患には、例えばBCMAを標的とする分子、例えば本明細書に記載されるBCMA阻害薬による治療によってBCMA発現が下方制御されているため、現在ではBCMAを発現しないが、かつてはBCMAを発現した細胞に関連する病態が含まれ得る。一態様において、BCMA（例えば、野生型又は突然変異体BCMA）の発現に関連する癌は、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、BCMA（例えば、野生型又は突然変異体BCMA）の発現に関連する癌は、分化型形質細胞B細胞の悪性腫瘍である。一態様において、BCMA（例えば、野生型又は突然変異体BCMA）の発現に関連する癌には、限定されないが、例えばB細胞急性リンパ性白血病（「BALL」）、T細胞急性リンパ性白血病（「TALL」）、急性リンパ性白血病（ALL）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。BCMA（例えば、野生型又は突然変異体BCMA）の発現に関連する更なる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、辺縁帯リンパ腫、多発性骨髄腫、骨髄形成異常及び骨髄異形成症候群、非ホジキンリンパ腫、形質芽球性リンパ腫、形質細胞様樹状細胞新生物、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症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様々な血液学的病態の群である「前白血病」などを含む。一部の実施形態において、癌は、多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫又は膠芽腫である。実施形態において、BCMAの発現に関連する疾患には、形質細胞増殖性障害、例えば無症候性骨髄腫（くすぶり型多発性骨髄腫又は無痛性骨髄腫）、意義不明の単クローン性免疫グロブリン血症（MGUS）、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、形質細胞腫（例えば、形質細胞異常増殖症、孤立性骨髄腫、孤立性形質細胞腫、髄外性形質細胞腫及び多発性形質細胞腫）、全身性アミロイド軽鎖アミロイドーシス及びPOEMS症候群（クロウ・深瀬症候群、高月病及びPEP症候群としても知られる）が含まれる。BCMA（例えば、野生型又は突然変異体BCMA）発現の発現に関連する更なる疾患には、限定されないが、例えばBCMA（例えば、野生型又は突然変異体BCMA）の発現に関連する非定型の及び／又は非古典的な癌、悪性腫瘍、前癌病態又は増殖性疾患、例えば本明細書に記載される癌、例えば前立腺癌（例えば、去勢抵抗性若しくは療法抵抗性前立腺癌又は転移性前立腺癌）、膀胱癌又は肺癌が含まれる。

【0106】

BCMA（例えば、野生型又は突然変異体BCMA）に関連する非癌関連病態には、ウイルス感染症、例えばHIV、真菌感染症、例えばC.ネオフォルマンス（*C. neoformans*）、自己免疫疾患、例えば関節リウマチ、全身性エリテマトーデス（SLE又はループス）、尋常性天疱瘡及びシェーグレン症候群、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、粘膜免疫に関連する移植関連アロ特異的免疫障害及び体液性免疫が重要な場合の生物製剤（例えば、第VEII因子）に対する望ましくない免疫応答が含まれる。実施形態において、BCMAの発現に伴う非癌関連徴候には、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。ある実施形態において、腫瘍抗原発現細胞は、一時的に検出可能なレベルの腫瘍抗原タンパク質を産生したが、続いて検出可能な腫瘍抗原タンパク質を実質的に産生しなくなった。

【0107】

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

【0108】

用語「刺激」は、刺激分子（例えば、TCR／CD3複合体）がそのコグネイトリガンと結合して、それにより、限定されないが、TCR／CD3複合体を介したシグナル伝達など、シグナル伝達イベントを媒介することによって生じる一次応答を指す。刺激は、TGF-βの下方制御など、ある種の分子の発現の変化及び／又は細胞骨格構造の認識などを媒介することができる。

【0109】

用語「刺激分子」は、T細胞シグナル伝達経路の少なくとも一部の側面について刺激的方法でTCR複合体の一次活性化を調節する1つ又は複数の一次細胞質シグナル伝達配列を提供するT細胞によって発現される分子を指す。いくつかの実施形態において、CAR内のITAM含有ドメインは、内因性TCR複合体とは独立して、一次TCRのシグナル伝達を再現する。一態様において、一次シグナルは、例えば、TCR／CD3複合体とペプチドが負荷されたMHC分子との結合によって惹起され、これは、限定されないが、増殖、活性化、分化などを含めたT細胞応答の媒介につながる。刺激的方法で機能する一次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み得る。本発明において特に有用であるITAM含有一次細胞質シグナル伝達配列の例には、TCRゼータ、FcRガンマ、FcRベータ、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278（「ICOS」としても知られる）、FcεRI及びCD66d、DAP10及びDAP12に由来するものが含まれるが、これらに限定されない。本発明の特定のCARにおいて、本発明の任意の1つ以上のCARにおける細胞内シグナル伝達ドメインは、細胞内シグナル伝達配列、例えばCD3ゼータの一次シグナル伝達配列を含む。用語「抗原提示細胞」又は「APC」は、その表面上に主要組織適合遺伝子複合体（MHC）と複合体化した外来抗原を提示するアクセサリ細胞などの免疫系細胞（例えば、B細胞、樹状細胞など）を指す。T細胞は、そのT細胞受容体（TCR）を用いてこうした複合体を認識し得る。APCは、抗原をプロセシングしてそれをT細胞に提示する。

【0110】

「細胞内シグナル伝達ドメイン」は、この用語が本明細書で使用されるとき、分子の細胞内部分を指す。実施形態において、細胞内シグナルドメインはエフェクター機能シグナルを伝達し、細胞が特化した機能を果たすように仕向ける。細胞内シグナル伝達ドメイン全体が用いられ得るが、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トランケートされた一部分が使用される範囲で、かかるトランケートされた一部分がエフェクター機能シグナルを伝達する限り、それがインタクトな鎖の代わりに使用

され得る。従って、用語の細胞内シグナル伝達ドメインは、エフェクター機能シグナルを伝達するのに十分な細胞内シグナル伝達ドメインの任意のランケートされた一部分を含むことが意図される。

【0111】

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。免疫エフェクター機能（例えば、CAR T細胞におけるもの）の例には、サイトカインの分泌を含む細胞溶解活性及びヘルパー活性が含まれる。

【0112】

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、CAR Tの場合、一次細胞内シグナル伝達ドメインがT細胞受容体の細胞質配列を含むことができ、及び共刺激細胞内シグナル伝達ドメインが共受容体又は共刺激分子からの細胞質配列を含むことができる。

【0113】

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ゼータ、FcRガンマ、FcRベータ、CD3ガンマ、CD3ベータ、CD3イプシロン、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278（「ICOS」としても知られる）、FcεRI、CD66d、DAP10及びDAP12に由来するものが含まれる。

【0114】

「ゼータ」又は代替的に「ゼータ鎖」、「CD3ゼータ」若しくは「TCRゼータ」という用語は、CD247を指す。Swiss-Prot受託番号P20963は、例示的なヒトCD3ゼータアミノ酸配列を提供する。「ゼータ刺激ドメイン」又は代替的に「CD3ゼータ刺激ドメイン」若しくは「TCRゼータ刺激ドメイン」は、CD3ゼータの刺激ドメイン又はその変異体（例えば、変異、例えば点変異、フラグメント、挿入又は欠失を有する分子）を指す。いくつかの実施形態において、ゼータの細胞質ドメインは、GenBank受託番号BAG36664.1の残基52～164又はその変異体（例えば、変異、例えば点変異、フラグメント、挿入又は欠失を有する分子）を含む。いくつかの実施形態において、「ゼータ刺激ドメイン」又は「CD3ゼータ刺激ドメイン」は、配列番号9若しくは10として提供される配列又はその変異体（例えば、変異、例えば点変異、フラグメント、挿入又は欠失を有する分子）を指す。

【0115】

用語「共刺激分子」は、共刺激リガンドに特異的に結合して、それにより、限定されないが増殖など、T細胞による共刺激応答を媒介するT細胞上のコグネイト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る。共刺激分子には、限定されないが、MHCクラスI分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ球活性化分子（SLAMタンパク質）、活性化NK細胞受容体、BTLA、Tollリガンド受容体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、LFA-1（CD11a/CD18）、4-1BB（CD137）、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS（CD278）、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM（LIGHTR）、KIRDS2、SLAMF7、NKP80（KLRF1）、NKP44、NKP30、NKP46、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL2Rベータ、IL2Rガンマ、IL7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITG

10

20

30

40

50

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、C D 2 8-O X 4 0、C D 2 8-4-1 B B 及び C D 8 3 に特異的に結合するリガンドが含まれる。

10

【0116】

共刺激細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激分子の細胞内部分を指す。

【0117】

細胞内シグナル伝達ドメインは、その由来である分子の細胞内部分全体、又は天然の細胞内シグナル伝達ドメイン全体、又はその機能性フラグメントを含み得る。

【0118】

「4-1 B B」という用語は、C D 1 3 7 又は腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー9を指す。S w i s s - P r o t 受託番号 P 2 0 9 6 3 は、例示的なヒト4-1 B B アミノ酸配列を提供する。「4-1 B B 共刺激ドメイン」は、4-1 B B の共刺激ドメイン又はその変異体（例えば、変異、例えば点変異、フラグメント、挿入又は欠失を有する分子）を指す。いくつかの実施形態において、「4-1 B B 共刺激ドメイン」は、配列番号7として提供される配列又はその変異体（例えば、変異、例えば点変異、フラグメント、挿入又は欠失を有する分子）を指す。

20

【0119】

「免疫エフェクター細胞」は、この用語が本明細書で使用されるとき、免疫応答、例えば免疫エフェクター応答の促進に関与する細胞を指す。免疫エフェクター細胞の例としては、T細胞、例えば 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挙げられる。

【0120】

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

30

【0121】

用語「エフェクター機能」は、細胞の特化した機能を指す。例えば、T細胞のエフェクター機能は、細胞溶解活性又はサイトカインの分泌を含めたヘルパー活性であり得る。

【0122】

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

40

【0123】

50

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。

【0124】

用語「有効量」又は「治療有効量」は、本明細書では同義的に使用され、本明細書に記載されるとおりの化合物、製剤、材料又は組成物が特定の生物学的結果を達成するのに有効な量を指す。

【0125】

用語「内因性」は、生物、細胞、組織又は系由来の又はその内部で産生される任意の材料を指す。

【0126】

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。

【0127】

「発現」という用語は、特定のヌクレオチド配列の転写及び／又は翻訳を指す。いくつかの実施形態において、発現は、細胞に導入されたmRNAの翻訳を含む。

【0128】

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

【0129】

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全てが含まれる。

【0130】

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。

【0131】

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) に提供されるとお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、

10

20

30

40

50

当業者に公知であろう。

【0132】

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。

10

【0133】

「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、且つ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。

20

30

【0134】

「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。

【0135】

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。

40

【0136】

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。

【0137】

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

50

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。

【0138】

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。

【0139】

「核酸」、「核酸分子」、「ポリヌクレオチド」又は「ポリヌクレオチド分子」という用語は、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）及びそれらのポリマーを指す。特に限定されない限り、この用語は、参照核酸と同様の結合特性を有し、天然に存在するヌクレオチドと同様の方法で代謝される、天然ヌクレオチドの既知の類似体を含む核酸を包含する。いくつかの実施形態において、「核酸」、「核酸分子」、「ポリヌクレオチド」又は「ポリヌクレオチド分子」は、ヌクレオチド／ヌクレオシド誘導体又は類似体を含む。特に明記しない限り、特定の核酸配列は、その保存的に修飾された変異体（例えば、縮重コドン置換、例えば保存的置換）、対立遺伝子、オルソログ、SNP及び相補的配列並びに明示的に示された配列も暗黙的に包含する。具体的には、縮重コドン置換、例えば保存的置換は、1つ以上の選択された（又は全ての）コドンの第3位が混合塩基及び／又はデオキシイノシン残基で置換された配列を生成することによって達成され得る（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)）。

【0140】

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。

【0141】

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。

【0142】

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。

【0143】

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。

【0144】

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。

【0145】

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。

【0146】

用語「癌関連抗原」又は「腫瘍抗原」は、同義的に、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、癌細胞への薬理学的薬剤の優先的なターゲティングに有用な分子を指す。一部の実施形態において、腫瘍抗原は、正常細胞及び癌細胞の両方が発現するマーカー、例えば系列マーカー、例えばB細胞上のCD19である。一部の実施形態において、腫瘍抗原は、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。一部の実施形態において、腫瘍抗原は、癌細胞で不適切に合成される細胞表面分子、例えば正常細胞に発現する分子と比較して欠失、付加又は突然変異を含む分子である。一部の実施形態において、腫瘍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。一部の実施形態において、本発明のCARは、MHC提示ペプチドに結合する抗原結合ドメイン（例えば、抗体又は抗体フラグメント）を含むCARを含む。通常、内因性タンパク質に由来するペプチドは、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）クラスI分子のポケットに嵌まり、CD8+ Tリンパ球上のT細胞受容体（TCR）によって認識される。MHCクラスI複合体は、あらゆる有核細胞によって構成的に発現される。癌では、ウイルス特異的及び／又は腫瘍特異的ペプチド／MHC複合体が免疫療法のユニークなクラスの細胞表面標的となる。ヒト白血球抗原（HLA）-A1又はHLA-A2のコンテ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TCR様抗体が記載されている（例えば、Sastrey et al., J Virol. 2011 85 (5): 1935-1942; Sergeeva et al., Blood, 2011 117 (16): 4262-4272; Verma et al., J Immunol 2010 184 (4): 2156-2165; Willemssen et al., Gene Ther 2001 8 (21): 1601-1608; Dao et al., Sci Transl Med 2013 5 (176): 176ra33; Tassev et al., Cancer Gene Ther 2012 19 (2): 84-100を参照されたい）。例えば、TCR様抗体は、ヒトscFvファージディスプレイライブラリなど、ライブラリのスクリーニングによって同定することができる。

【0147】

「腫瘍支持抗原」又は「癌支持抗原」という用語は、互換的に、それ自体癌性ではないが、例えば増殖又は生存、例えば免疫細胞に対する抵抗性を促進することにより、癌細胞を支持する、細胞の表面に発現される分子（典型的には、タンパク質、炭水化物又は脂質）を指す。この型の例示的な細胞は、間質細胞及び骨髓由来サプレッサー細胞（MDSC）を含む。腫瘍支持抗原自体は、抗原が癌細胞を支持する細胞上に存在する限り、腫瘍細胞を支持する役割を果たさなくてもよい。

【0148】

用語「可動性ポリペプチドリinker」又は「リンカー」は、scFvとの関連で使用されるとき、可変重鎖領域と可変軽鎖領域とを共に連結するために単独又は組み合わせで使

10

20

30

40

50

用されるグリシン及び／又はセリン残基などのアミノ酸からなるペプチドリンカーを指す。一部の実施形態において、可動性ポリペプチドリンカーは、Gly／Serリンカーであり、アミノ酸配列 (Gly-Gly-Gly-Ser)_n (式中、*n*は、1以上の正の整数、例えば*n*=1、*n*=2、*n*=3、*n*=4、*n*=5及び*n*=6、*n*=7、*n*=8、*n*=9及び*n*=10である) (配列番号42)を含む。一部の実施形態において、可動性ポリペプチドリンカーには、限定されないが、(Gly₄ Ser)₄ (配列番号27)又は (Gly₄ Ser)₃ (配列番号28)が含まれる。別の実施形態において、リンカーは、(Gly₂ Ser)、(Gly Ser)又は (Gly₃ Ser) (配列番号29)の複数の繰り返しを含む。また、国際公開第2012/138475号パンフレット (参照により本明細書に援用される)に記載されるリンカーも本発明の範囲内に含まれる。

10

【0149】

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

20

【0150】

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、好ましくは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。

【0151】

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好ましい実施形態において、ポリAは、50~5000 (配列番号30)、好ましくは64より多く、より好ましくは100より多く、最も好ましくは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。

30

【0152】

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)テイルは、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)テイルは、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)テイ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。

40

【0153】

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

50

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。

【0154】

本明細書で使用されるとき、用語「治療する」、「治療」及び「治療している」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／又は持続期間の低減又は改善又は増殖性障害の1つ以上の症状（好ましくは1つ以上の認識し得る症状）の改善を指す。具体的な実施形態において、用語「治療する」、「治療」及び「治療している」は、患者には必ずしも認識できない、腫瘍の成長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の改善を指す。他の実施形態において用語「治療する」、「治療」及び「治療している」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「治療する」、「治療」及び「治療している」は、腫瘍サイズ又は癌性細胞数の低減又は安定化を指す。

10

【0155】

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。

【0156】

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。

20

【0157】

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

【0158】

用語「療法的」とは、本明細書で使用されるとき、治療を意味する。療法的効果は疾患状態の低減、抑制、寛解又は根絶によって達成される。

30

【0159】

用語「予防」は、本明細書で使用されるとき、疾患又は疾患状態の予防又はそれに対する予防的治療を意味する。

【0160】

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。特定の態様において、本発明の過剰増殖性障害抗原は、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（例えば、去勢抵抗性若しくは治療抵抗性の前立腺癌又は転移性前立腺癌）などの腺癌、卵巣癌、膵臓癌など、又は形質細胞増殖性障害、例えば無症候性骨髄腫（くすぶり型多発性骨髄腫又は無痛性骨髄腫）、意義不明の単クローン性高ガンマグロブリン血症（MGUS）、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、形質細胞腫（例えば、形質細胞異常増殖症、孤立性骨髄腫、孤立性形質細胞腫、髄外形質細胞腫及び多発性形質細胞腫）、全身性アミロイド軽鎖アミロイドーシス及びPOEMS症候群（クロウ・深瀬症候群、高月病及びPEP症候群としても知られる）を含むが、これらに限定されない癌に由来する。

40

【0161】

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」

50

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。

【0162】

用語「特異的に結合する」は、試料中に存在するコグネイト結合パートナー（例えば、T細胞上に存在する刺激及び／又は共刺激分子）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。

【0163】

本明細書で使用されるとおりの「調節可能なキメラ抗原受容体（RCAR）」は、免疫エフェクター細胞内にあるとき、標的細胞、典型的には癌細胞に対する特異性及び細胞内シグナル生成を細胞に付与するポリペプチドの組、最も単純な実施形態では典型的には2つのポリペプチドを指す。一部の実施形態において、RCARは、少なくとも、細胞外抗原結合ドメインと、膜貫通ドメインと、CAR分子に関連して本明細書に定義されるとおりの刺激分子及び／又は共刺激分子に由来する機能性シグナル伝達ドメインを含む細胞質シグナル伝達ドメイン（本明細書では「細胞内シグナル伝達ドメイン」とも称される）を含む。一部の実施形態において、RCARのポリペプチドの組は、互いに連続しておらず、例えば異なるポリペプチド鎖にある。一部の実施形態において、RCARは、二量化スイッチを含み、このスイッチは、二量化分子の存在を受けてポリペプチドを互いにカップリングすることができ、例えば抗原結合ドメインを細胞内シグナル伝達ドメインにカップリングすることができる。一部の実施形態において、RCARは、本明細書に記載されるとおりの細胞（例えば、免疫エフェクター細胞）、例えばRCAR発現細胞（本明細書では「RCARX細胞」とも称される）に発現する。ある実施形態において、RCARX細胞は、T細胞であり、RCART細胞と称される。ある実施形態において、RCARX細胞は、NK細胞であり、RCARN細胞と称される。RCARは、RCAR発現細胞に標的細胞、典型的には癌細胞に対する特異性及び調節可能な細胞内シグナル生成又は増殖を付与することができ、これがRCAR発現細胞の免疫エフェクター特性を最適化し得る。実施形態において、RCAR細胞は、抗原結合ドメインによって結合される抗原を含む標的細胞に対する特異性を付与するために、少なくとも一部には抗原結合ドメインに依存する。

【0164】

「膜アンカー」又は「膜繫留ドメイン」は、この用語が本明細書で使用されるとき、細胞外又は細胞内ドメインを細胞膜にアンカリングするのに十分なポリペプチド又は部分、例えばミリストイル基を指す。

【0165】

「スイッチドメイン」は、この用語が本明細書で例えばRCARに言及する場合に使用されるとき、二量化分子の存在下で別のスイッチドメインと会合する実体、典型的にはポリペプチドベースの実体を指す。この会合の結果、第1のスイッチドメインに連結、例えば融合した第1の実体と、第2のスイッチドメインに連結、例えば融合した第2の実体との機能的カップリングが生じる。第1及び第2のスイッチドメインは、まとめて二量化スイッチと称される。実施形態において、第1及び第2のスイッチドメインは、互いに同じであり、例えば、これらは、同じ一次アミノ酸配列を有するポリペプチドであり、まとめてホモ二量化スイッチと称される。実施形態において、第1及び第2のスイッチドメインは、互いに異なり、例えば、これらは、異なる一次アミノ酸配列を有するポリペプチドであり、まとめてヘテロ二量化スイッチと称される。実施形態において、スイッチは、細胞内である。実施形態において、スイッチは、細胞外である。実施形態において、スイッチドメインは、ポリペプチドベースの実体、例えばFKBP又はFRBベースであり、二量化分子は、小分子、例えばラパログである。実施形態において、スイッチドメインは、ポリペプチドベースの実体、例えばmycペプチドに結合するscFvであり、二量化分子

10

20

30

40

50

は、ポリペプチド、そのフラグメント又はポリペプチドの多量体、例えば1つ以上のmyc scFvに結合するmycリガンド又はmycリガンドの多量体である。実施形態において、スイッチドメインは、ポリペプチドベースの実体、例えばmyc受容体であり、二量化分子は、抗体又はそのフラグメント、例えばmyc抗体である。

【0166】

「二量化分子」は、この用語が本明細書で例えばRCARに言及する場合に使用される時、第1のスイッチドメインと第2のスイッチドメインとの会合を促進する分子を指す。実施形態において、二量化分子は、対象に天然に存在しないか、又は有意な二量化をもたらす濃度で存在しない。実施形態において、二量化分子は、小分子、例えばラパマイシン又はラパログ、例えばRAD001である。

【0167】

用語「低免疫増強用量」は、mTOR阻害薬、例えばアロステリックmTOR阻害薬、例えばRAD001又はラパマイシン又は触媒mTOR阻害薬と併せて使用されるとき、例えばP70 S6キナーゼ活性の阻害によって測定したときのmTOR活性を、完全ではないが、部分的に阻害するmTOR阻害薬の用量を指す。mTOR活性の、例えばP70 S6キナーゼの阻害による評価方法は、本明細書で考察される。用量は、完全な免疫抑制をもたらすには不十分であるが、免疫応答を増強するには十分である。ある実施形態において、mTOR阻害薬の低免疫増強用量は、PD-1陽性T細胞の数の減少及び／又はPD-1陰性T細胞の数の増加又はPD-1陰性T細胞／PD-1陽性T細胞の比の増加をもたらす。ある実施形態において、mTOR阻害薬の低免疫増強用量は、ナイーブT細胞の数の増加をもたらす。ある実施形態において、mTOR阻害薬の低免疫増強用量は、以下の1つ以上をもたらす：

例えば、メモリーT細胞上、例えばメモリーT細胞前駆体上の、以下のマーカー：CD62L^{high}、CD127^{high}、CD27⁺及びBCL2の1つ以上の発現の増加、

例えば、メモリーT細胞上、例えばメモリーT細胞前駆体上の、KLRG1の発現の減少、及び

メモリーT細胞前駆体、例えば以下の特性：CD62L^{high}の増加、CD127^{high}の増加、CD27⁺の増加、KLRG1の減少及びBCL2の増加のいずれか1つ又は組み合わせを有する細胞の数の増加。

ここで、上記に記載される変化のいずれも、例えば未治療対象と比較したとき、例えば少なくとも一過性に起こる。

【0168】

「不応性」は、本明細書で使用されるとき、治療に応答しない疾患、例えば癌を指す。実施形態において、不応性癌は、治療の開始前又は開始時点で治療に抵抗性であり得る。他の実施形態において、不応性癌は、治療中に抵抗性になり得る。不応性癌は、抵抗性癌とも称される。

【0169】

「再発した」又は「再発する」は、本明細書で使用されるとき、改善又は応答期間後、例えば療法、例えば癌療法の前治療後における疾患（例えば、癌）又は癌などの疾患の徴候及び症状の再来又は再出現を指す。初期応答期間は、特定の閾値を下回る、例えば20%、1%、10%、5%、4%、3%、2%又は1%を下回るレベルの癌細胞を伴い得る。再出現は、特定の閾値を上回る、例えば20%、1%、10%、5%、4%、3%、2%又は1%を上回るレベルの癌細胞を含み得る。例えば、例としてB-ALLのコンテキストにおいて、再出現は、例えば、完全奏効後の血液、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、完全奏効は、<5% BM芽球を含み得る。より一般的には、ある実施形態において、応答（例えば、完全奏効又は部分奏効）は、検出可能なMRD（微小残存病変）が存在しないことを含み得る。ある実施形態において、初期応答期間は、少なくとも1、2、3、4、5若しくは6日、少なくとも1、2、3若しくは4週間、少なくとも1、2、3、4、6、8、10若しくは12ヵ月又は少なくとも1、2、3、4若しくは5年続く。

10

20

30

40

50

【0170】

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。従って、範囲の記載は、具体的に開示される全ての可能な部分範囲並びにその範囲内にある個々の数値を有すると考えられなければならない。例えば、1～6などの範囲の記載は、1～3、1～4、1～5、2～4、2～6、3～6などの具体的に開示される部分範囲並びにその範囲内にある個々の数値、例えば1、2、2.7、3、4、5、5.3及び6を有すると考えられなければならない。別の例として、95～99%の同一性などの範囲は、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するものを含み、且つ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。

10

【0171】

「遺伝子編集系」は、この用語が本明細書で使用される場合、前記系により標的とされる遺伝子DNAの部位又はその近辺の1つ以上の核酸の改変、例えば欠失を導き及び実施する系、例えば1つ以上の分子を指す。遺伝子編集系は、当技術分野において公知であり、以下でより十分に記載する。

【0172】

本明細書で使用する「組み合わせて」投与するとは、2つ（以上）の異なる処置を、対象が障害を患っている過程に対象に送達することを意味し、例えば2つ以上の処置を、対象が障害と診断された後且つ障害が治癒又は撲滅される前又は処置が他の理由で中止される前に送達される。いくつかの実施形態において、投与期間の重複があるように、一方の処置の送達は、第2の処置の送達開始時に依然として行われている。これは、本明細書では「同時（simultaneous）」又は「同時（concurrent）送達」ということがある。他の実施形態において、一方の処置の送達は、他の処置の送達が始まる前に終わる。いずれかの場合のいくつかの実施形態において、処置は、組み合わせ投与のためにより有効である。例えば、第2の処置は、より有効である、例えば等しい効果が少ない第2の処置で見られるか、又は第2の処置が、第2の処置を第1の処置の非存在下で投与したときに見られるよりも大きい程度で症状を軽減するか又は第1の処置で同様の状況が見られる。いくつかの実施形態において、送達は、障害と関係する症状又は他のパラメータの減少が、他方の処置の非存在下で一方の処置の送達で観察されるより大きい。2処置の効果は、一部相加的、完全相加的又は相加的より大きいものであり得る。送達は、送達した第1の処置の効果が第2の処置の送達時になお検出可能であるようなものであり得る。

20

30

【0173】

本明細書の組成物及び方法の様々な態様を以下で更に詳細に説明する。更なる定義は、本明細書全体に記載されている。

【0174】

説明

BCMAキメラ抗原受容体（CAR）を発現する細胞、例えばCART-BCMAを使用した、物質の組成物及び癌などの疾患の処置のための使用方法が本明細書に提供される。

40

【0175】

一態様において、本発明は、CARを発現するように操作された細胞（例えば、免疫エフェクター細胞、例えばT細胞又はNK細胞）を提供し、CART細胞（「CART」）又はCAR-NK細胞は、抗腫瘍特性を呈する。一態様において、細胞がCARで形質転換され、CARが細胞表面上に発現する。一部の実施形態において、細胞（例えば、免疫エフェクター細胞、例えばT細胞又はNK細胞）は、CARをコードするウイルスベクターで形質導入される。一部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。一部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。一部のかかる実施形態において、細胞は、CARを安定に発現し得る。別の実施

50

形態において、細胞（例えば、免疫エフェクター細胞、例えばT細胞又はNK細胞）は、CARをコードする核酸、例えばmRNA、cDNA、DNAをトランスフェクトされる。一部のかかる実施形態において、細胞は、CARを一過性に発現し得る。

【0176】

一態様において、本発明のCARは、特異的抗体の抗原結合ドメインを細胞内シグナル伝達分子と組み合わせる。例えば、いくつかの態様において、細胞内シグナル伝達分子は、CD3-ゼータ鎖、4-1BB及びCD28シグナル伝達モジュール並びにそれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない。一態様において、抗原結合ドメインは、BCMAに結合する。

【0177】

更に、本発明は、疾患の中でも特に、BCMAを発現する細胞又は組織に関わる癌又は任意の悪性腫瘍又は自己免疫疾患を治療するためのBCMA CAR組成物及び薬剤又は方法におけるその使用を提供する。

【0178】

一態様において、本発明のCARは、BCMA発現正常細胞の根絶に使用することができ、従って細胞移植前の細胞コンディショニング療法としての使用に適用可能である。一態様において、BCMA発現正常細胞は、BCMA発現正常幹細胞であり、細胞移植は、幹細胞移植である。

【0179】

一態様において、本発明は、キメラ抗原受容体（CAR）を発現するように操作された細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）を提供し、ここで、CAR T細胞（「CART」）又はCAR NK細胞は抗腫瘍特性を示す。好ましい抗原は、BCMAである。一態様において、CARの抗原結合ドメインは、ヒト抗BCMA抗体フラグメントを含む。一態様において、CARの抗原結合ドメインは、scFvを含むヒト抗BCMA抗体フラグメントを含む。従って、本発明は、ヒト抗BCMA結合ドメインを含み、細胞、例えばT細胞又はNK細胞に操作されたBCMA-CAR及び養子治療のためのその使用方法を提供する。

【0180】

一態様において、BCMA-CARは、例えば、CD137（4-1BB）シグナル伝達ドメイン、CD28シグナル伝達ドメイン、CD3ゼータシグナルドメイン及びこれらの任意の組み合わせの群から選択される少なくとも1つの細胞内ドメインを含む。一態様において、BCMA-CARは、少なくとも1つの細胞内シグナル伝達ドメインを含み、CD137（4-1BB）又はCD28以外の1つ以上の共刺激分子からのものである。

【0181】

キメラ抗原受容体（CAR）

本発明は、抗BCMA結合ドメイン（例えば、本明細書に記載されるようなヒト抗BCMA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CAR（例えば、CARポリペプチド）を提供し、ここで、前記抗BCMA結合ドメインは、表2～13に列挙される任意の抗BMCA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）を含む。CARの抗BCMA結合ドメインは、表2～13に列挙される任意の抗BMCA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）を更に含み得る。

【0182】

本発明は、本明細書に記載されるようなCARをコードする、例えば抗BCMA結合ドメイン（例えば、本明細書に記載されるようなヒト抗BCMA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CARをコードする核酸分子も提供し、ここで、前記抗BCMA結合ドメインは、表2～13に列挙される任意の抗BMCA重鎖結合ドメインアミノ酸配列のHC CDR1、HC CDR2及びHC CDR3を含む。い

10

20

30

40

50

【 0 1 8 3 】

10

【 0 1 8 4 】

20

【 0 1 8 5 】

30

【 0 1 8 6 】

40

50

本明細書に記載のCAR分子の一部となり得る様々な成分の非限定的な例の配列を表1に列挙する。表中、「aa」は、アミノ酸を表し、「na」は、対応するペプチドをコードする核酸を表す。

【0188】

【表1】

表1. CARの様々な成分の配列

配列番号	説明	配列
配列番号 11	EF-1 プロモーター (na)	CGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCG CCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTGGCAATTG AACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAA AGTGATGTCGTGTAAGTGGCTCCGCCTTTTCCCGAGGGTGGG GGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCT TTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGT GTGTGGTTCGCCGCGGGCCTGGCCTCTTACGGGTTATGGCCC TTGCGTGCCCTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGAT TCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTC GAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGT TGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCCGGTGCGAATCT GGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTCGATAAGTCTC TAGCCATTTAAAATTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTT CTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACA CTGGTATTTTCGGTTTTTTGGGGCCGCCGGCGGCGACGGGGCCC GTGCGTCCCAGCGCACATGTTGCGCGAGGCGGGGCTGCGA GCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGG CCGGCCTGCTCTGGTGCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGC CCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTGCGGCACCAAGTTG CGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGG AGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGG GTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCCTTTCCTTCTCA GCCGTGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCC AGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGAGTACGTGCTCT TTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCAC ACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTT GATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTGTAGTTTGGATCT TGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTT CTTCATTTCAGGTGTCGTGA

10

20

30

【0189】

40

50

【表 2】

配列番号 1	リーダー(aa)	MALPVTALLLPLALLLHAARP
配列番号 12	リーダー(aa)	ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCTCTGG CTCTGCTGCTGCATGCCGCTAGACCC
配列番号 2	CD8 ヒンジ(aa)	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG LDFACD
配列番号 13	CD8 ヒンジ(na)	ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCG CCCACCATCGCGTCGCAGCCCTGTCCCTGCGCCCAG AGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACA CGAGGGGGGCTGGACTTCGCTGTGAT
配列番号 3	Ig4 ヒンジ(aa)	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVHLHQLDNLNGKEYKCKVSNKGLPSS IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSR LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG KM
配列番号 14	Ig4 ヒンジ(na)	GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGCCCTG CCCCGAGTTCCTGGGCGGACCCAGCGTGTTCCTGTT CCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCG GACCCCGGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTC CCAGGAGGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCC CCGGGAGGAGCAGTTCATAGCACCTACCGGGTGGT GTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAA CGGCAAGGAATACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGG CCTGCCCAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGC CAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGGTGTACACCCT GCCCCCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT GTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCC GAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGAC AGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCCGGCTGACC GTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAGGGCAACGTCTTT AGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCAC TACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAG ATG

【0190】

10

20

30

40

50

【表 3】

配列番号 4	IgD ヒンジ(aa)	RWPESPKAQASSVPTAQPQAFGSLAKATTAPATTRNTG RGGEKKKEKEKEEQEEREIKIPECPSHTQPLGVYLLT PAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKV PTGGVEEGLLERHSNGSQSHSRLTLPRSLWNAGTSVT CTLNHPSLPPQRLMALREPAAQAPVKLSLNLASSDPPE AASWLLCEVSGFSPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARP PPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSIIEDSR TLLNASRSLEVSIVTDH
配列番号 15	IgD ヒンジ(na)	AGGTGGCCCCGAAAGTCCCAAGGCCAGGCATCTAGT GTTCTACTGCACAGCCCCAGGCAGAGGAGCAGCCTA GCCAAAGCTACTACTGCACCTGCCACTACGCGCAAT ACTGGCCGTGGCGGGGAGGAGAAGAAAAAGGAGAA AGAGAAAGAAGAACAGGAAGAGAGGGAGACCAAGA CCCCTGAATGTCCATCCCATACCCAGCCGCTGGGCGT CTATCTCTTGACTCCCGCAGTACAGGACTTGTGGCTT AGAGATAAGGCCACCTTTACATGTTTCGTCTGTTGGCT CTGACCTGAAGGATGCCCATTTGACTTGGGAGGTTGC CGGAAAGGTACCCACAGGGGGGGTTGAGGAAGGGTT GCTGGAGCGCCATTCCAATGGCTCTCAGAGCCAGCA CTCAAGACTCACCTTCCGAGATCCCTGTGGAACGCC GGGACCTCTGTACATGTAATCAATCACTAGCC TGCCCCACAGCGTCTGATGGCCCTTAGAGAGCCAG CCGCCAGGCACCAAGTTAAGCTTAGCCTGAATCTGCT CGCCAGTAGTGATCCCCAGAGGCCCGCCAGCTGGCT CTTATGCGAAGTGTCCGGCTTAGCCCCGCCAACATC TTGCTCATGTGGCTGGAGGACCAAGCAGAAAGTGAAC ACCAGCGGCTTCGCTCCAGCCCCGCCCCACCCAG CCGGGTTCTACCACATTCTGGGCCTGGAGTGTCTTAA GGGTCCCAGCACCACTAGCCCCAGCCAGCCACAT ACACCTGTGTTGTGTCCCATGAAGATAGCAGGACCT GCTAAATGCTTCTAGGAGTCTGGAGGTTTCCTACGTG ACTGACCATT
配列番号 6	CD8 膜貫通(aa)	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
配列番号 17	CD8 膜貫通(na)	ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGG TCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACTGC
配列番号 7	4-1BB 細胞内 ドメイン(aa)	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEG GCEL
配列番号 18	4-1BB 細胞内 ドメイン(na)	AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAA CAACATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAG GAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCAGAAAGAAGAA GAAGGAGGATGTGAACTG
配列番号 8	CD27 (aa)	QRRKYRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDY RKPEPACSP
配列番号 19	CD27 (na)	AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTAC ATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGC AAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCG CAGCCTATCGCTCC

【 0 1 9 1 】

10

20

30

40

50

【表 4】

配列番号 9	CD3-ゼータ(aa) (Q/K 変異体)	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP PR
配列番号 20	CD3-ゼータ(na) (Q/K 変異体)	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCG TACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTC AATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTGGAC AAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGGAAA GCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAA TGAAGTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAG TGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCA AGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAG CCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGG CCCTGCCCCCTCGC
配列番号 10	CD3-ゼータ(aa) (NCBI 参照配列 NM_000734.3)	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP PR
配列番号 21	CD3-ゼータ(na) (NCBI 参照配列 NM_000734.3)	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCG TACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTC AATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGAC AAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGGAAA GCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAA TGAAGTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAG TGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCA AGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAG CCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGG CCCTGCCCCCTCGC
配列番号 36	CD28 細胞内 ドメイン (アミノ酸配列)	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFA AYRS
配列番号 37	CD28 細胞内 ドメイン (ヌクレオチド配列)	AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTAC ATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGC AAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCG CAGCCTATCGCTCC
配列番号 38	ICOS 細胞内 ドメイン (アミノ酸配列)	TKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKK SRLTDVTL
配列番号 39	ICOS 細胞内 ドメイン (ヌクレオチド配列)	ACAAAAAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCT AACGGTGAATACATGTTTCATGAGAGCAGTGAACACA GCCAAAAAATCCAGACTCACAGATGTGACCCTA
配列番号 5	GS ヒンジ/リンカー (aa)	GGGSGGGGS

【0192】

10

20

30

40

50

【表 5】

配列番号 16	GS ヒンジ/リンカー (na)	GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC
配列番号 40	GS ヒンジ/リンカー (na)	GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGGGGTTCC
配列番号 25	リンカー	GGGGS
配列番号 26	リンカー	(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser) _n , 式中 $n = 1-6$, 例えば GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS
配列番号 27	リンカー	GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS
配列番号 28	リンカー	GGGGS GGGGS GGGGS
配列番号 29	リンカー	GGGS
配列番号 41	リンカー	(Gly-Gly-Gly-Ser) _n 式中, n は 1 以上の正の整数である
配列番号 42	リンカー	(Gly-Gly-Gly-Ser) _n , 式中 $n = 1-10$, 例えば GGGSGGGSGG GSGGGSGGGSG GGGSGGGSGG GSGGGSGGGSG
配列番号 43	リンカー	GSTSGSGKPGSGEGSTKG
配列番号 30	ポリ A	(A) ₅₀₀₀ この配列は、50～5000のアデニンを包含する。
配列番号 31	ポリ T	(T) ₁₀₀
配列番号 32	ポリ T	(T) ₅₀₀₀ この配列は、50～5000のチミンを包含する。
配列番号 33	ポリ A	(A) ₅₀₀₀ この配列は、100～5000のアデニンを包含する。
配列番号 34	ポリ A	(A) ₄₀₀ この配列は、100～400のアデニンを包含する。
配列番号 35	ポリ A	(A) ₂₀₀₀ この配列は、50～2000のアデニンを包含する。
配列番号 22	PD1 CAR (aa)	pgwfldspdrpwnpptfspallvtegdnatfcsfsntsesfvlnwyrmspsnqtd klaafpedrsqpgqdcfrfvqlpngrdfhmsvvrarrndsgtylcgaislapkaqik esraelrvterraevptahpspsprpagqfqlvttppaprpttpaptiasqplsrpeac rpaaggavhtrglldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckgrkkllyifkqpfmrp vqttqeedgescrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqggnqlynelnlgrreeyd vldkrrgrdpemggkprknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghd glyqglstatkdydalhmqalppr

【 0 1 9 3 】

10

20

30

40

50

【表 6】

配列番号 23	PD-1 CAR (na) (PD1 ECD 下線)	atggccctccctgtactgcccctgtcttccccctgcactcctgtctccacgccgctaga ccaccgccgatgggttctggaactctccggatcgcccggtggaaatcccccaacctctaccg gcaactcttggttgactgagggcgataatcgaccttcacgtgtctcgttctcaaacact ccgaatcattctgtctgaactggtaccgcatgagcccgctcaaaccagaccgacaagct cgcccgctttccgggaagatcggtcgcaaccgggacaggattgtcggttcgctgact caactgccgaatggcagagacttccacatgagcgtggtccgctagggcgaaacgact ccgggacctacctgtgctggagccatctcgtggtcgccctaaggccccaaatcaaagaga gcttgaggggccgaactgagagtgaccgagcgagagctgaggtgccactgcacatc catccccatcgctcggcctcggggcagtttcagaccctgttcacgaccactccggc gccgcgcccaccgactccggccccaactatcgcgagccagccctgtcgtgtaggco ggaagcatgcccccctcgccgcggagggtgctgtgcataccggggattggacttgc atgcgacatctacattgggctcctctcgcgcggaacttgtggcgtgctcctctgtccctg gtcatcacctgtactgcaagcggggtcggaanaagcttctgtacatttcaagcagccc ttcatgaggcccgctgcaaacaccaccaggaggagggacggttgcctcgtccgggtccccg aagaggaaagaggaggttgcgagctgcgctgaagtctcccgagcgccgacgcc cccgcctataagcagggccagaaccagctgtacaacgaactgaacctgggacggcg ggaagagtacgatgtgctggacaagcggcgccggccgggaccgccgaatggcggg aagcctagaagaaagaacctcaggaaggcctgtataacgagctgcagaaggacaag atggccgaggcctactccgaaattgggatgaaggagagcgccgggaggggaaagg ggcacgacggcctgtaccaaggactgtccacgccaccaaggacacatagatgcc tgcacatgcaggcccttccccctcg
配列番号 24	PD-1 CAR(aa) シグナルあり (PD1 ECD 下線)	Malpvtalllplallhaarppgwflsdprpwnpptfspallvvtcgdnatficsfsnt sesfvlnwyrmspsnqtdklaafpedrsqpgqdcfrvtqlpngrdfhmsvrvrrn dsqstylcgaislapkaqikeslraelrvterraevptahpspsprpagqfqlvtitpapr pptpaptiasqplslrpeacrpaggavhtrgldfacdiywaplagtcgvllslvitly ckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcsrfpeeeeggccelrvkfsrsadapaykq gqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprknpqeglynelqkdkmaea vseigmkgerrrckghdglvqglstatkdtvdalhmaalnpr

【 0 1 9 4 】

CAR抗原結合ドメイン

一態様において、抗原結合ドメインを含むCARの一部分は、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。一態様において、本発明のCARは、BCMA（例えば、ヒトBCMA）に特異的に結合する結合ドメインを含む。

【 0 1 9 5 】

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ンネクチンドメインなど、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タンパク質であり得る。

【 0 1 9 6 】

例示的な抗BCMA結合ドメインアミノ酸配列を表2～13に提供する。一態様において、抗原結合ドメインは、ヒト抗体又はヒト抗体フラグメントを含む。いくつかの実施形態において、ヒト抗BCMA結合ドメインは、本明細書（例えば、表2～13）に記載のヒト抗BCMA結合ドメインのLC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3の1つ以上（例えば、3つ全て）並びに／又は本明細書（例えば、表2～13）に記載のヒト抗BCMA結合ドメインのHC CDR1、HC CDR2及びHC CDR3の1つ以上（例えば、3つ全て）を含む。いくつかの一実施形態において、ヒト抗BCMA結合ドメインは、本明細書（例えば、表2、6及び10）に記載のヒトVL及び／又は本明細書（例えば、表2、6及び10）に記載のヒトVHを含む。いくつかの実施形態において、抗B

10

20

30

40

50

CMA結合ドメインは、表2、6及び10のアミノ酸配列のVL及びVHを含むscFvである。一実施形態において、抗BCMA結合ドメイン（例えば、scFv）は、表2、6及び10に提供するアミノ酸配列の少なくとも1、2若しくは3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が30、20若しくは10を超えないアミノ酸配列又は表2、6及び10のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列を含むVL；及び／又は表2、6及び10に提供するアミノ酸配列の少なくとも1、2若しくは3修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）を有するが、修飾（例えば、置換、例えば保存的置換）が30、20若しくは10を超えないアミノ酸配列又は表2、6及び10のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列を含むVHを含む。

【0197】

10

20

30

40

50

【表 7】

表 2. 例示的な PALLAS 由来の抗 BCMA 分子のアミノ酸及び核酸配列

配列番号	名称/説明	配列
R1B6		
配列番号 44	HCDR1 (Kabat)	SYAMS
配列番号 45	HCDR2 (Kabat)	AISGSGGSTYYADSVKG
配列番号 46	HCDR3 (Kabat)	REWVPYDVSWYFDY
配列番号 47	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSY
配列番号 48	HCDR2 (Chothia)	SGSGGS
配列番号 46	HCDR3 (Chothia)	REWVPYDVSWYFDY
配列番号 49	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSYA
配列番号 50	HCDR2 (IMGT)	ISGSGGST
配列番号 51	HCDR3 (IMGT)	ARREWVPYDVSWYFDY
配列番号 52	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARREWVPYDVSWYFDYWGQGLTVTVSS
配列番号 53	DNA VH	GAAGTGCAGTTGCTGGAGTCAGGCGGAGGACTGGTGCAGCCCG GAGGATCGCTTCGCTTGAGCTGCGCAGCCTCAGGCTTTACCTTC TCCTCCTACGCCATGTCCTGGGTCAGACAGGCTCCCGGGAAGG GACTGGAATGGGTGTCCGCCATTAGCGGTTCCGGCGGAAGCAC TTACTATGCCGACTCTGTGAAGGGCCGCTTCACTATCTCCCGGG ACAACTCCAAGAACACCTGTATCTCCAAATGAATTCCTTGAG GGCCGAAGATACCGCGGTGTACTACTGCGCTAGACGGGAGTGG GTGCCCTACGATGTCAGCTGGTACTTCGACTACTGGGGACAGG GCACTCTCGIGACTGTGTCCTCC
配列番号 54	LCDR1 (Kabat)	RASQSISSYLN
配列番号 55	LCDR2 (Kabat)	AASSLQS
配列番号 56	LCDR3 (Kabat)	QQSYSTPLT
配列番号 57	LCDR1 (Chothia)	SQSISSY

【0198】

10

20

30

40

50

【表 8】

配列番号 58	LCDR2 (Chothia)	AAS
配列番号 59	LCDR3 (Chothia)	SYSTPL
配列番号 60	LCDR1 (IMGT)	QSISSY
配列番号 58	LCDR2 (IMGT)	AAS
配列番号 56	LCDR3 (IMGT)	QQSYSTPLT
配列番号 61	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQOKPGKAPKL LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYS TPLTFGQGTKVEIK
配列番号 62	DNA VL	GACATTCAAATGACTCAGTCCCCGTCCTCCCTCTCCGCCITCCGT GGGAGATCGCGTCACGATCAGTGCAGGGCCAGCCAGAGCATC TCCAGCTACCTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAGGCAC CGAAGCTCCTGATCTACGCCGCTAGCTCGCTGCAGTCCGGCGTC CCTTCACGGTTCTCGGGATCGGGCTCAGGCACCGACTTCACCCT GACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAGGACTTCGCGACATACTAC TGTCAGCAGTCATACTCCACCCCTCTGACCTTCGGCCAAGGGAC CAAAGTGGAGATCAAG
配列番号 63	リンカー	GGGSGGGSGGGSGGGGS
配列番号 64	scFv (VH- リンカー-VL)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AED TAVYYCARREWVPYDVSWYFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWY QOKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEIK
配列番号 65	DNA scFv	GAAGTGCAGTTGCTGGAGTCAGGCGGAGGACTGGTGCAGCCCCG GAGGATCGCTTCGCTTGAGCTGCGCAGCCTCAGGCITTTACCTTC TCCTCCTACGCCATGTCTGGGTGAGACAGGCTCCCGGGAAGG GACTGGAATGGGTGTCCGCCATTAGCGGTTCCGGCGGAAGCAC TACTATGCCGACTCTGTGAAGGGCCGCTTCACTATCTCCCGG ACAACTCCAAGAACACCCTGTATCTCAAATGAATTCCCTGAG GGCCGAAGATACCGCGGTGTACTACTGCGCTAGACGGGAGTGG GTGCCCTACGATGTCAGCTGGTACTTCGACTACTGGGGACAGG GCACTCTCGTGA CTGTGTCTCCGCTGGTGGTGGATCGGGGGGT GGTGGTTCCGGCGGAGGAGGATCTGGAGGAGGAGGGTCCGAC ATTCAAATGACTCAGTCCCCGTCCTCCCTCTCCGCCTCCGTGGG AGATCGCGTCACGATCAGTGCAGGGCCAGCCAGAGCATCTCC AGCTACCTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAGGCACCG AAGCTCCTGATCTACGCCGCTAGCTCGCTGCAGTCCGGCGTCCC TTCACGGTTCTCGGGATCGGGCTCAGGCACCGACTTCACCCTGA CCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAGGACTTCGCGACATACTACTG TCAGCAGTCATACTCCACCCCTCTGACCTTCGGCCAAGGGACCA AAGTGGAGATCAAG

【0199】

10

20

30

40

50

【表 9】

配列番号 66	全長 CAR アミノ酸配列	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARREWVPYDVSWYFDYWGQGLVTVSSGGGSGGGGS GGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWY QQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQSYSTPLTFGGGTKEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC KRGRKKLLYIEKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKF SRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPPEMGG KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHGGLY QGLSTATKDTYDALHMQALPPR
配列番号 67	全長 CAR DNA 配列	GAAGTGCAGTTGCTGGAGTCAGGCGGAGGACTGGTGCAGCCCCG GAGGATCGCTTCGCTTGAGCTGCGCAGCCTCAGGCTTTACCTTC TCCTCCTACGCCATGTCTGGGTGACACAGGCTCCCGGGAAGG GACTGGAATGGGTGTCCGCCATTAGCGGTTCCGGCGGAAGCAC TTACTATGCCGACTCTGTGAAGGGCCGCTTCACTATCTCCCGGG ACAACTCCAAGAACACCTGTATCTCCAAATGAATTCCTTGAG GGCCGAAGATACCGCGGTGTACTACTGCGCTAGACGGGAGTGG GTGCCCTACGATGTGAGTGGTACTTTCGACTACTGGGACAGG GCACTCTCGTGACTGTGTCTCCGCTGGTGGTGGATCGGGGGGT GGTGGTTCGGGCGGAGGAGGATCTGGAGGAGGAGGGTTCGGAC ATTCAAATGACTCAGTCCCCGTCTCCCTCTCCGCTCCGTGGG AGATCGCGTCACGATCACGTGCAGGGCCAGCCAGAGCATCTCC AGCTACCTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAGGCACCG AAGCTCCTGATCTACGCCGCTAGCTCGCTGCAGTCCGGCGTCCC TTCACGGTTCCTCGGGATCGGGCTCAGGCACCGACTTCACCTTGA CCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAGGACTTCGCGACATACTACTG TCAGCAGTTCATACTCACCCCTCTGACCTTCGGCCAAGGGACCA AAGTGGAGATCAAGACCACTACCCAGCACCGAGGCCACCCAC CCCGGCTCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGG AGGCATGTAGACCCGCAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGG TCTTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCCCTCTGGCTG GTAAGCGCGGTTCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACC CTTCATGAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGT TCATGCCGGTTCCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTGC GCGTGAAATTACGCCGCAGCGCAGATGCTCCAGCCTACCAGCA GGGGCAGAACCAGCTCTACAACGAACCTCAATCTTGGTTCGGAGA GAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCA GAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAGAGGGC CTGTACAACGAGCTCCAAAAAGGATAAAGATGGCAGAAGCCTATA GCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAAGGCC ACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACAC CTATGACGCTCTTCACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG

【0200】

10

20

30

40

50

【表 1 0】

RIF2		
配列番号 44	HCDR1 (Kabat)	SYAMS
配列番号 45	HCDR2 (Kabat)	AISGSGGSTYYADSVKG
配列番号 68	HCDR3 (Kabat)	REWWYDDWYLDY
配列番号 47	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSY
配列番号 48	HCDR2 (Chothia)	SGSGGS
配列番号 68	HCDR3 (Chothia)	REWWYDDWYLDY
配列番号 49	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSYA
配列番号 50	HCDR2 (IMGT)	ISGSGGST
配列番号 69	HCDR3 (IMGT)	ARREWWYDDWYLDY
配列番号 70	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYIQMNSLRAED TAVYYCARREWWYDDWYLDYWGQGTLVTVSS
配列番号 71	DNA VH	GAAGTGCAGTTGCTGGAGTCAGGCGGAGGACTGGTGCAGCCCG GAGGATCGCTTCGCTTGAGCTGCGCAGCCTCAGGCTTTACCTTC TCCTCCTACGCCATGTCTGGGTCAGACAGGCTCCCGGGAAGG GACTGGAATGGGTGTCCGCCATTAGCGGTTCCGGCGGAAGCAC TTACTATGCCGACTCTGTGAAGGGCCGCTTCACTATCTCCCGGG ACAACTCCAAGAACACCCTGTATCTCCAAATGAATTCCTGAG GGCCGAAGATAACGCGGTGTACTACTGCGCTAGACGGGAGTGG TGGTACGACGATTGGTACCTGGACTACTGGGGACAGGGCACTC TCGTGACTGTGTCTCC

【 0 2 0 1】

【表 1 1】

配列番号 54	LCDR1 (Kabat)	RASQSISSYLN
配列番号 55	LCDR2 (Kabat)	AASSLQS
配列番号 56	LCDR3 (Kabat)	QQSYSTPLT
配列番号 57	LCDR1 (Chothia)	SQSISSY
配列番号 58	LCDR2 (Chothia)	AAS
配列番号 59	LCDR3 (Chothia)	SYSTPL
配列番号 60	LCDR1 (IMGT)	QSISSY
配列番号 58	LCDR2 (IMGT)	AAS
配列番号 56	LCDR3 (IMGT)	QQSYSTPLT
配列番号 61	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKL LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYS TPLTFGQGTKVEIK
配列番号 62	DNA VL	GACATTCAAATGACTCAGTCCCCGTCCTCCCTCTCCGCCTCCGT GGGAGATCGCGTCACGATCACGTGCAGGGCCAGCCAGAGCATC TCCAGCTACCTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAGGCAC CGAAGCTCCTGATCTACGCCGCTAGCTCGCTGCAGTCCGGCGTC CCTTCACGGTTCCTCGGGATCGGGCTCAGGCACCGACTTCACCCCT GACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAGGACTTCGCGACATACTAC TGTCAGCAGTCATACTCCACCCCTCTGACCTTCGGCCAAGGGAC CAAAGTGGAGATCAAG
配列番号 63	リンカー	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
配列番号 72	scFv (VH- リンカー-VL)	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTIYLQMNSLRAED TAVYYCARREWWYDDWYLDYWGGQGLVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEIK

【 0 2 0 2 】

10

20

30

40

50

【表 1 2】

配列番号 73	DNA scFv	GAAGTGCAGTTGCTGGAGTCAGGCGGAGGACTGGTGCAGCCCG GAGGATCGCTTCGCTTGAGCTGCGCAGCCTCAGGCTTTACCTTC TCCTCCTACGCCATGTCCTGGGTGACACAGGCTCCCGGGAAGG GACTGGAATGGGTGTCCGCCATTAGCGGTTCCGGCGGAAGCAC TTACTATGCCGACTCTGTGAAGGGCCGCTTCACTATCTCCCGGG ACAACTCCAAGAACACCCTGTATCTCCAAATGAATTCCCTGAG GGCCGAAGATAACCGCGGTGTACTACTGCGCTAGACGGGAGTGG TGGTACGACGATTGGTACCTGGACTACTGGGGACAGGGCACTC TCGTGACTGTGTCTCCGCTGGTGGTGGATCGGGGGGTGGTGGT TCGGGCGGAGGAGGATCTGGAGGAGGAGGGTCGGACATTCAA ATGACTCAGTCCCCGTCTCCCTCTCCGCCTCCGTGGGAGATCG CGTCACGATCACGTGCAGGGCCAGCCAGAGCACTCCAGCTAC CTGAAGTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAGGCACCGAAGCTCC TGATCTACGCCGCTAGCTCGCTGCAGTCCGGCGTCCCTTACGG TTCTCGGGATCGGGGCTCAGGCACCGACTTCACCCTGACCATTAG CAGCCTGCAGCCGGAGGACTTCGCGACATACTACTGTCAGCAG TCATACTCCACCCCTCTGACCTTCGGCCAAGGGACCAAAGTGG AGATCAAG
配列番号 74	全長 CAR アミノ酸配列	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARREWWYDDWYLDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYQCQSYSTPLTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCK RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFS RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPPEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQALPPR

【0 2 0 3】

10

20

30

40

50

【表 1 3】

配列番号 75	全長 CAR DNA 配列	GAAGTGCAAGTTGCTGGAGTCAGGCGGAGGACTGGTGCAGCCCG GAGGATCGCTTCGCTTGAGCTGCGCAGCCTCAGGCTTTACCTTC TCCTCCTACGCCATGTCCTGGGTGACACAGGCTCCCGGGAAGG GACTGGAATGGGTGTCCGCCATTAGCGGTTCCGGCGGAAGCAC TTACTATGCCGACTCTGTGAAGGGCCGCTTCACTATCTCCCGGG ACAACCTCCAAGAACACCCTGTATCTCCAAATGAATTCCCTGAG GGCCGAAGATACCGCGGTGTACTACTGCGCTAGACGGGAGTGG TGGTACGACGATTGGTACCTGGACTACTGGGGACAGGGCACTC TCGTGACTGTGTCTCCGGTGGTGGTGGATCGGGGGGTGGTGGT TCGGGCGGAGGAGGATCTGGAGGAGGAGGGTCGGACATTCAA ATGACTCAGTCCCCGTCTCCCTCTCCGCCTCCGTGGGAGATCG CGTCACGATCACGTGCAGGGCCAGCCAGAGCATCTCCAGCTAC CTGAAGTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAGGCACCGAAGCTCC TGATCTACGCCGCTAGCTTCGCCTGCAGTCCGGCGTCCCTTCACGG TTCTCGGGATCGGGCTCAGGCACCGACTTCACCCTGACCATTAG CAGCCTGCAGCCGGAGGACTTCGCGACATACTACTGTCAGCAG TCATACTCCACCCCTCTGACCTTCGGCCAAGGGACCAAAGTGG AGATCAAGACCACTACCCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGGC TCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCAT GTAGACCCGCGAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGA CTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTT GCGGGGTCTTGCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTACTGTAAG CGCGGTGCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCTTCAT GAGGCCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGC CGGTTCCCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCGCGTGA AATTCAGCCGCGAGCGCAGATGCTCCAGCCTACCAGCAGGGGCA GAACCAGCTCTACAACGAACTCAATCTTGGTTCGGAGAGAGGAG TACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATG GGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAGAGGGCCTGTAC AACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAG ATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGAC GGACTGTACCAGGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATG ACGCTCTTCACATGCAGGCCCTTCCCGCCTCGG
------------	------------------	---

【0 2 0 4】

【表 1 4】

RIG5		
配列番号 44	HCDR1 (Kabat)	SYAMS
配列番号 45	HCDR2 (Kabat)	AISGSGGSTYYADSVKG
配列番号 76	HCDR3 (Kabat)	REWWGESWLFDY
配列番号 47	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSY
配列番号 48	HCDR2 (Chothia)	SGSGGS
配列番号 76	HCDR3 (Chothia)	REWWGESWLFDY
配列番号 49	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSYA
配列番号 50	HCDR2 (IMGT)	ISGSGGST
配列番号 77	HCDR3 (IMGT)	ARREWWGESWLFDY
配列番号 78	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWVSAISGSGGSTYYADSVKGRTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARREWWGESWLFDYWGQGTLVTVSS
配列番号 79	DNA VH	GAAGTGCAGTTGCTGGAGTCAGGCGGAGGACTGGTGCAGCCCG GAGGATCGCTTCGCTTGAGCTGCGCAGCCTCAGGCTTTACCTTC TCCTCCTACGCCATGTCTGGGTCAGACAGGCTCCCGGGAAGG GACTGGAATGGGTGTCCGCCATTAGCGGTTCCGGCGGAAGCAC TACTATGCCGACTCTGTGAAGGGCCGCTTCACTATCTCCCGGG ACAACTCCAAGAACACCCTGTATCTCCAAATGAATTCCTGAG GGCCGAAGATAACCGCGGTGTACTACTGCGCTAGACGGGAGTGG TGGGGAGAAAGCTGGCTGTTCGACTACTGGGGACAGGGCACTC TCGTGACTGTGTCCTCC
配列番号 54	LCDR1 (Kabat)	RASQSISSYLN

【 0 2 0 5 】

【表 15】

配列番号 55	LCDR2 (Kabat)	AASSLQS
配列番号 56	LCDR3 (Kabat)	QQSYSTPLT
配列番号 57	LCDR1 (Chothia)	SQSISSY
配列番号 58	LCDR2 (Chothia)	AAS
配列番号 59	LCDR3 (Chothia)	SYSTPL
配列番号 60	LCDR1 (IMGT)	QSISSY
配列番号 58	LCDR2 (IMGT)	AAS
配列番号 56	LCDR3 (IMGT)	QQSYSTPLT
配列番号 61	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKL LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYS TPLTFGQGTKVEIK
配列番号 62	DNA VL	GACATTCAAATGACTCAGTCCCCGTCCTCCCTCTCCGCCTCCGT GGGAGATCGCGTCACGATCACGTGCAGGGCCAGCCAGAGCATC TCCAGCTACCTGAAC'GGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAGGCAC CGAAGCTCCTGATCTACGCCGCTAGCTCGCTGCAGTCCGGCGTC CCTTCACGGTTCTCGGGATCGGGCTCAGGCACCGACTTCACCCT GACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAGGACTTCGCGACATACTAC TGTCAGCAGTCATACTCCACCCCTCTGACCTTCGGCCAAGGGAC CAAAGTGGAGATCAAG
配列番号 63	リンカー	GGGGSGGGSGGGSGGGGS
配列番号 80	scFv (VH- リンカー-VL)	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARREWWGESWLF DYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSG GGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEIK

【0206】

10

20

30

40

50

【表 1 6】

配列番号 81	DNA scFv	GAAGTGCAGTTGCTGGAGTCAGGCGGAGGACTGGTGCAGCCCG GAGGATCGCTTCGCTTGAGCTGCGCAGCCTCAGGCTTTACCTTC TCCTCCTACGCCATGTCCTGGGTGACACAGGCTCCCGGGAAGG GACTGGAATGGGTGTCCGCCATTAGCGGTTCCGGCGGAAGCAC TTACTATGCCGACTCTGTGAAGGGCCGCTTCACTATCTCCCGGG ACAACTCCAAGAACACCCTGTATCTCCAAATGAATTCCCTGAG GGCCGAAGATAACCGCGGTGTACTACTGCGCTAGACGGGAGTGG TGGGGAGAAAGCTGGCTGTTCGACTACTGGGGACAGGGCACTC TCGTGACTGTGTCTCCGGTGGTGGTGGATCGGGGGGTGGTGGT TCGGGCGGAGGAGGATCTGGAGGAGGAGGGTCGGACATTCAA ATGACTCAGTCCCCGTCCTCCCTCTCCGCCTCCGTGGGAGATCG CGTCACGATCACGTGCAGGGCCAGCCAGAGCATCTCCAGCTAC CTGAAGTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAGGCACCGAAGCTCC TGATCTACGCCGCTAGCTCGCTGCAGTCCGGCGTCCCTTACGG TTCTCGGGATCGGGCTCAGGCACCGACTTCACCCTGACCATTAG CAGCCTGCAGCCGGAGGACTTCGCGACATACTACTGTCAGCAG TCATACTCCACCCCTCTGACCTTCGGCCAAGGGACCAAAGTGG AGATCAAG
配列番号 82	全長 CAR アミノ酸配列	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARREWWGESWLFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYQCQSYSTPLTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPE ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCK RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFS RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGK PRRKNPQFGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQALPPR

【0 2 0 7】

10

20

30

40

50

【 0 2 0 8 】

50

【表 18】

表 3. 例示的な PALLAS 由来の抗 BCMA 分子の Kabat CDR

Kabat	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
R1B6	SYAMS (配列番号 44)	AISGSGGSTY YADSVKG (配列番号 45)	REWVPYDVS WYFDY (配列番号 46)	RASQSISS YLN (配列番号 54)	AASSL QS (配列 番号 55)	QQSYSTP LT (配列 番号 56)
R1F2	SYAMS (配列番号 44)	AISGSGGSTY YADSVKG (配列番号 45)	REWWYDD WYLDY (配列番号 68)	RASQSISS YLN (配列番号 54)	AASSL QS (配列 番号 55)	QQSYSTP LT (配列 番号 56)
R1G5	SYAMS (配列番号 44)	AISGSGGSTY YADSVKG (配列番号 45)	REWWGESW LFDY (配列番号 76)	RASQSISS YLN (配列番号 54)	AASSL QS (配列 番号 55)	QQSYSTP LT (配列 番号 56)
コンセンサス	SYAMS (配列番号 44)	AISGSGGSTY YADSVKG (配列番号 45)	REWX ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ WX ₇ X ₈ D Y (式中、X ₁ は 不存在又は V; X ₂ は不存在 又は P; X ₃ は W 又は Y; X ₄ は G, Y, 又は D; X ₅ は E, D, 又は V; X ₆ は S 又は D; X ₇ は L 又は Y; 及び X ₈ は F 又は L) (配列番号 84)	RASQSISS YLN (配列番号 54)	AASSL QS (配列 番号 55)	QQSYSTP LT (配列 番号 56)

【0209】

10

20

30

40

50

【表 1 9】

表 4. 例示的な PALLAS 由来の抗 BCMA 分子の Chothia CDR

Chothia	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
R1B6	GFTFSSY (配列番号 47)	SGSGGS (配列 番号 48)	REWVPYDVS WYFDY (配列 番号 46)	SQSISSY (配列番号 57)	AAS (配列 番号 58)	SYSTPL (配列 番号 59)
R1F2	GFTFSSY (配列番号 47)	SGSGGS (配列 番号 48)	REWWYDD WYLDY (配列番号 68)	SQSISSY (配列番号 57)	AAS (配列 番号 58)	SYSTPL (配列 番号 59)
R1G5	GFTFSSY (配列番号 47)	SGSGGS (配列 番号 48)	REWWGESW LFDY (配列 番号 76)	SQSISSY (配列番号 57)	AAS (配列 番号 58)	SYSTPL (配列 番号 59)
コンセンサス	GFTFSSY (配列番号 47)	SGSGGS (配列 番号 48)	REWX ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ WX ₇ X ₈ D Y (式中、X ₁ は 不存在又は V; X ₂ は不存在 又は P; X ₃ は W 又は Y; X ₄ は G, Y, 又は D; X ₅ は E, D, 又は V; X ₆ は S 又は D; X ₇ は L 又は Y; 及び X ₈ は F 又は L) (配列番号 84)	SQSISSY (配列番号 57)	AAS (配列 番号 58)	SYSTPL (配列 番号 59)

【 0 2 1 0 】

10

20

30

40

50

【表 20】

表 5. 例示的な PALLAS 由来の抗 BCMA 分子の IMGT CDR

IMGT	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
R1B6	GFTFSSYA (配列番号 49)	ISGSGGST (配列番号 50)	ARREWVPY DVSIFYDY (配列番号 51)	QSISSY (配列番号 60)	AAS (配列番号 58)	QQSYSTP LT (配列番号 56)
R1F2	GFTFSSYA (配列番号 49)	ISGSGGST (配列番号 50)	ARREWWYD DWLYDY (配列番号 69)	QSISSY (配列番号 60)	AAS (配列番号 58)	QQSYSTP LT (配列番号 56)
R1G5	GFTFSSYA (配列番号 49)	ISGSGGST (配列番号 50)	ARREWWGE SWLYDY (配列番号 77)	QSISSY (配列番号 60)	AAS (配列番号 58)	QQSYSTP LT (配列番号 56)
コンセンサス	GFTFSSYA (配列番号 49)	ISGSGGST (配列番号 50)	ARREWX1X2 X3X4X5X6W X7X8DY (式中、X ₁ は 不存在又はV; X ₂ は不存在 又はP; X ₃ は W又はY; X ₄ はG, Y, 又はD; X ₅ は E, D, 又はV; X ₆ はS又は D; X ₇ はL 又はY; 及び X ₈ はF又は L) (配列番号 85)	QSISSY (配列番号 60)	AAS (配列番号 58)	QQSYSTP LT (配列番号 56)

【0211】

【表 21】

表 6. 例示的な B 細胞由来の抗 BCMA 分子のアミノ酸及び核酸配列

配列番号	名称/説明	配列
PI61		
配列番号 86	HCDR1 (Kabat)	SYGMH
配列番号 87	HCDR2 (Kabat)	VISYDGSNKYYADSVKG
配列番号 88	HCDR3 (Kabat)	SGYALHDDYYGLDV
配列番号 47	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSY
配列番号 89	HCDR2 (Chothia)	SYDGSN

【0212】

10

20

30

40

50

【表 2 2】

配列番号 88	HCDR3 (Chothia)	SGYALHDDYYGLDV
配列番号 90	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSYG
配列番号 91	HCDR2 (IMGT)	ISYDGSNK
配列番号 92	HCDR3 (IMGT)	GGSGYALHDDYYGLDV
配列番号 93	VH	QVQLQESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGL EWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCGGSGYALHDDYYGLDVWGQGTLVTVSS
配列番号 94	DNA VH	CAAGTGCAGCTGCAGGAATCCGGTGGCGGAGTCGTGCAGCCTGG AAGGAGCCTGAGACTCTCATGCGCCGCGTCAGGGTTCACCTTTTC CTCCTACGGGATGCATTGGGTGAGACAGGCCCCCGGAAAGGGAC TCGAATGGGTGGCTGTGATCAGCTACGACGGCTCCAACAAGTAC TACGCCGACTCCGTGAAAGGCCGTTCACTATCTCCCGGGACAA CTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAATTCACTGCGCGCGG AGGATACCGCTGTGTACTACTGCGGTGGCTCCGGTTACGCCCTGC ACGATGACTATTACGGCCTTGACGTCTGGGGCCAGGGAACCCCTC GTGACTGTGTCCAGC
配列番号 95	LCDR1 (Kabat)	TGTSSDVGGYNYVS
配列番号 96	LCDR2 (Kabat)	DVSNRPS
配列番号 97	LCDR3 (Kabat)	SSYTSSSTLYV
配列番号 98	LCDR1 (Chothia)	TSSDVGGYNY
配列番号 99	LCDR2 (Chothia)	DVS
配列番号 100	LCDR3 (Chothia)	YTSSSTLY
配列番号 101	LCDR1 (IMGT)	SSDVGGYNY
配列番号 99	LCDR2 (IMGT)	DVS
配列番号 97	LCDR3 (IMGT)	SSYTSSSTLYV
配列番号 102	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAP KI.MIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSY TSSSTLYVFGSGTKVTVI
配列番号 103	DNA VL	CAGAGCGCACTGACTCAGCCGGCATCCGTGTCCGGTAGCCCCGG ACAGTCGATTACCATCTCTGTACCGGCACCTCCTCCGACGTGGG AGGGTACAACCTACGTGTCTGTGTACCGAGCAGCAGGAGGAAAGG CCCCTAAGTTGATGATCTACGATGTGTCAAACCGCCCGTCTGGAG TCTCCAACCGGTTCTCCGGCTCCAAGTCCGGCAACACCGCCAGCC TGACCATTAGCGGGCTGCAAGCCGAGGATGAGGCCGACTACTAC TGCTCGAGCTACACATCTCGAGCACCCTCTACGTGTTCCGGCTCG GGGACTAAGGTCACCGTGCTG
配列番号 104	リンカー	GGGGSGGGSGGGGS

【0 2 1 3】

10

20

30

40

50

【表 2 3】

配列番号 105	scFv (VH- リンカー- VL)	QVQLQESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGL EWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCGGSGYALHDDYYGLDVWGQGT LVTVSSGGGSGGGGSG GGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHP GKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADY YCSSYTSSSTLYVFGSGTKVTVL
配列番号 106	DNA scFv	CAAGTGCAGCTGCAGGAATCCGGTGGCGGAGTCGTGCAGCCTGG AAGGAGCCTGAGACTCTCATGCGCCGCGTCAGGGTTCACCTTTTC CTCCTACGGGATGCATTGGGT CAGACAGGCCCCCGGAAAGGGAC TCGAATGGGTGGCTGTGATCAGCTACGACGGCTCCAACAAGTAC TACGCCGACTCCGTGAAAGGCCGGTTC ACTATCTCCCGGGACAA CTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAATTC ACTGCGCGCGG AGGATACCGCTGTGTACTACTGCGGTGGCTCCGGTTACGCCCTGC ACGATGACTATTACGGCCTTGACGTCTGGGGCCAGGGAACCTTC GTGACTGTGTCCAGCGGTGGAGGAGGTTCGGGCGGAGGAGGATC AGGAGGGGGTGGATCGCAGAGCGCACTGACTCAGCCGGCATCCG TGTCGGTAGCCCCGGACAGTCGATTACCATCTCCTGTACCGGCA CCTCCTCCGACGTGGGAGGGTACA ACTACGTGTCGTGGTACCAG CAGCACCAGGAAAGGCCCTAAGTTGATGATCTACGATGTGTC AAACCGCCCGTCTGGAGTCTCCAACCGGTTCTCCGGCTCCAAGTC CGGCAACACCGCCAGCCTGACCATTAGCGGGCTGCAAGCCGAGG ATGAGGCCGACTACTACTGCTCGAGCTACACATCCTCGAGCACC CTCTACGTGTTCCGGCTCGGGGACTAAGGTCACCGTGCTG
配列番号 107	全長 CAR アミノ酸配列	QVQLQESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGL EWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCGGSGYALHDDYYGLDVWGQGT LVTVSSGGGSGGGGSG GGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHP GKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADY YCSSYTSSSTLYVFGSGTKVTVLTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA CRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRG RKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSA DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPENMGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGFERRRGKGDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQALPPR

【0 2 1 4】

【表 2 4】

配列番号	全長 CAR DNA 配列
108	CAAAGTGCAGCTGCAGGAATCCGGTGGCGGAGTCGTGCAGCCTGG AAGGAGCCTGAGACTCTCATGCGCCGCGTCAGGGTTCACCTTTTC CTCCTACGGGATGCATTGGGTGAGACAGGCCCCCGGAAAAGGGAC TCGAATGGGTGGCTGTGATCAGCTACGACGGCTCCAACAAGTAC TACGCCGACTCCGTGAAAGGCCGGTTCACTATCTCCCGGGACAA CTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAATTCACTGCGCGCGG AGGATACCGCTGTGTACTACTGCGGTGGCTCCGGTTACGCCCTGC ACGATGACTATTACGGCCTTGACGTCTGGGGCCAGGGAACCCCTC GTGACTGTGTCCAGCGGTGGAGGAGGTTTCGGGCGGAGGAGGATC AGGAGGGGGTGGATCGCAGAGCGCACTGACTCAGCCGGCATCCG TGTCGGTAGCCCCGGACAGTCGATTACCATCTCCTGTACCGGCA CCTCCTCCGACGTGGGAGGGTACAACCTACGTGTCTGGTACCAG CAGCACCCAGGAAAGGCCCTAAGTTGATGATCTACGATGTGTC AAACCGCCCGTCTGGAGTCTCCAACCGGTTCTCCGGCTCCAAGTC CGGCAACACCGCCAGCCTGACCATAGCGGGCTGCAAGCCGAGG ATGAGGCCGACTACTACTGCTCGAGCTACACATCCTCGAGCACC CTCTACGTGTTCCGGCTCGGGGACTAAGGTCACCGTGCTGACCACT ACCCCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTC CCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCCGCAGCTG GTGGGGCCCGTGCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCCTGCGATATCT ACATTTGGGCCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGGTCTTGCTGCTTT CACTCGTGATCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTGCGGAAGAAGCTG CTGTACATCTTTAAGCAACCCTTCATGAGGCCTGTGCAGACTACT CAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGGTTCACAGAGGAGGAGG AAGGCCGGCTGCGAACTGCGCGTGAAAATTCAGCCGCAGCGCAGAT GCTCCAGCCTACCAGCAGGGGCAGAACCAGCTCTACAACGAACT CAATCTTGGTTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGA GAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAA TCCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGG CAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACCGCAGAAG AGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACCGCC ACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCACATGCAGGCCCTGCCGCC TCGG

10

20

30

【0 2 1 5】

40

50

【表 2 5】

B61-02		
配列番号 86	HCDR1 (Kabat)	SYGMH
配列番号 109	HCDR2 (Kabat)	VISYKGSNKYYADSVKG
配列番号 88	HCDR3 (Kabat)	SGYALHDDYYGLDV
配列番号 47	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSY
配列番号 110	HCDR2 (Chothia)	SYKGSN
配列番号 88	HCDR3 (Chothia)	SGYALHDDYYGLDV
配列番号 90	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSYG
配列番号 111	HCDR2 (IMGT)	ISYKGSNK
配列番号 92	HCDR3 (IMGT)	GGSGYALHDDYYGLDV
配列番号 112	VH	QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGL EWVAVISYKGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AED TAVYYCGGSGYALHDDYYGLDVWGQGTLVTVSS
配列番号 113	DNA VH	CAAGTGCAGCTTGTCTGAATCGGGAGGCGGAGTGGTGCAGCCTGG ACGATCGCTCCGGCTCTCATGTGCCGCGAGCGGATTCACCTTCIC GAGCTACGGCATGCAC TGGGTCAGACAAGCCCCAGGAAAGGGC CTGGAATGGGTGGCTGT CATCTCGTACAAGGGCTCAAACAAGTA CTACGCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGATA ACTCCAAGAATACCCTCTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGGGCC GAGGATACTGCAGTGTACTACTGCGGGGGTT CAGGCTACGCGCT GCACGACGACTACTACG GATTGGACGCTCTGGGGCCAAGGAATC TTGTGACCGTGTCTCT
配列番号 95	LCDR1 (Kabat)	TGTSSDVGGYNYVS
配列番号 114	LCDR2 (Kabat)	EVSNRLR

【0 2 1 6】

【表 2 6】

配列番号 115	LCDR3 (Kabat)	SSYTSSSALYV
配列番号 98	LCDR1 (Chothia)	TSSDVGGYNY
配列番号 116	LCDR2 (Chothia)	EVS
配列番号 117	LCDR3 (Chothia)	YTSSSALY
配列番号 101	LCDR1 (IMGT)	SSDVGGYNY
配列番号 116	LCDR2 (IMGT)	EVS
配列番号 115	LCDR3 (IMGT)	SSYTSSSALYV
配列番号 118	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAP KLMIYEVSNRLRGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADY YCSSY TSSSALYVFGSGTKVTVL
配列番号 119	DNA VL	CAGAGCGCGCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGAGCGGFTTCGCCGGG ACAGTCCATTACCATTTTCGTGCACCGGGACCTCCTCCGACGTGGG AGGCTACAACCTACGTGTCTGGTACCAGCAGCATCCCCGAAAGG CCCCGAAGCTGATGATCTACGAAGTGTGGAACAGACTGCGGGGA GTCTCCAACCGCTTTTCCGGGTCCAAGTCCGGCAACACCGCCAGC CTGACCATCAGCGGGCTCCAGGCAGAAGATGAGGCTGACTATTA CTGCTCCTCCTACACGTCAAGCTCCGCCCTCTACGTGFTCGGGTC CGGGACCAAAGTCACTGTGCTG
配列番号 63	リンカー	GGGSGGGGSGGGGSGGGGS
配列番号 120	scFv (VH- リンカー- VL)	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGL EWVAVISYKGSNKY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCGSGYALHDDY YGLDVWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSG GGGSGGGGQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSW YQQHPGKAPKLMIYEVSNRLRGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAE DEADY YCSSYTSSSALYVFGSGTKVTVL
配列番号 121	DNA scFv	CAAGTGCAGCTTGTCGAATCGGGAGGCGGAGTGGTGCAGCCTGG ACGATCGCTCCGGCTCTCATGTGCCGCGAGCGGATTACCTTCTC GAGCTACGGCATGCACTGGGTGAGACAAGCCCCAGGAAAGGGC CTGGAATGGGTGGCTGTCACTCTCGTACAAGGGCTCAAACAAGTA CTACGCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGATA ACTCCAAGAATACCCTCTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGGGCC GAGGATACTGCAGTGTACTACTGCGGGGGTTCAGGCTACGCGCT GCACGACGACTACTACGATTGACGTCTGGGGCCAAGGAATC TTGTGACCGTGTCTCTGTTGGAGGCGGATCAGGGGGTGGCGGA TCTGGGGGTGGTGGTTCGGGGGAGGAGGATCGCAGAGCGCGCT GACTCAGCCTGCCTCCGTGAGCGGTTCCGCCGGGACAGTCCATTA CCATTTCTGTGCACCGGGACCTCCTCCGACGTGGGAGGCTACAAC TACGTGTCTGTTACCAGCAGCATCCCGGAAAGGCCCGAAGCT GATGATCTACGAAGTGTGGAACAGACTGCGGGGAGTCTCCAACC GCTTTTCCGGGTCCAAGTCCGGCAACACCGCCAGCCTGACCATC AGCGGGCTCCAGGCAGAAGATGAGGCTGACTATTACTGCTCCTC CTACACGTCAAGCTCCGCCCTCTACGTGTTCCGGTCCGGGACCAA AGTCACTGTGCTG

【0 2 1 7】

10

20

30

40

50

【表 2 7】

配列番号 122	全長 CAR アミノ酸配列	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGL EWVAVISYKGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYIQMNSLR AFD TAVYYCGGSGYALHDDYYGLDVWGQGT LVTVSSGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSW YQHPGKAPKLMIEVSNRLRGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAE DEADYYCSSYTSSSALYVFGSGTKVTVLTTTPAPRPPTPAPTIASQPL SLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITL YCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGDCSRFP EEEEGGCELRV KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDP EMG GKPRRKNPQ EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALPPR
配列番号 123	全長 CAR DNA 配列	CAAGTGCAGCTTGTTCGAATCGGGAGGC GGAGTGGTGCAGCCTGG ACGATCGCTCCGGCTCTCATGTGCGCGAGCGGATTCACCTTCTC GAGCTACGGCATGCACTGGGT CAGACAAGCCCCAGGAAAGGGC CTGGAATGGGTGGCTGTCTATCTCGTACAAGGGCTCAAACAAGTA CTACGCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGATA ACTCCAAGAATACCCCTCTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGGGCC GAGGATACTGCAGTGTACTACTGCGGGGGTT CAGGCTACGCGCT GCACGACGACTACTACGGATTGGACGTCTGGGGCCAAGGAACTC TTGTGACCGTGTCTCTGTGTGGAGGCGGATCAGGGGGTGGCGGA TCTGGGGGTGGTGGTTCCGGGGGAGGAGGATCGCAGAGCGCGCT GACTCAGCCTGCCTCCGTGAGCGGTTCCGCCGGACAGTCCATTA CCATTTCTGTGCACCGGACCTCCTCCGACGTGGGAGGCTACAAC TACGTGTCTGTGTACAGCAGCATCCCGGAAAGGCCCGGAAGCT GATGATCTACGAAGTGTGCAACAGACTGCGGGGAGTCTCCAACC GCTTTTCCGGGTCCAAGTCCGGCAACACCGCCAGCCTGACCATC AGCGGGCTCCAGGCAGAAGATGAGGCTGACTATTACTGCTCCTC CTACACGTCAAGCTCCGCCCTCTACGTGTTCCGGGTCCGGGACCAA AGTCACTGTGTGACCACTACCCAGCACCGAGGCCACCCACCC CGGCTCCTACCATCGCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGG CATGTAGACCCGACGTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGTCTT GACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACT TGCGGGGTCTGTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTACTGTAAAG CGCGGTGCGAAGAAGCTGTGTACATCTTTAAGCAACCCTTCAT GAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCC GGTTCCCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAA ATTCAGCCGCAGCGCAGATGCTCCAGCCTACCAGCAGGGGCAGA ACCAGCTCTACAACGAACTCAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTAC GACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCG GGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAGAGGGCCTGTACAACGA GCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAAGCCTATAGCGAGATTGGTA TGAAAGGGGAACGCAGAAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTA CCAGGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTC ACATGCAGGCCCTGCCGCCCTCGG
B61-10		
配列番号 86	HCDR1 (Kabat)	SYGMH
配列番号 109	HCDR2 (Kabat)	VISYKGSNKYYADSVKG
配列番号 88	HCDR3 (Kabat)	SGYALHDDYYGLDV

【0 2 1 8】

10

20

30

40

50

【表 2 8】

配列番号 47	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSY
配列番号 110	HCDR2 (Chothia)	SYKGSN
配列番号 88	HCDR3 (Chothia)	SGYALHDDYYGLDV
配列番号 90	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSYG
配列番号 111	HCDR2 (IMGT)	ISYKGSNK
配列番号 92	HCDR3 (IMGT)	GGSGYALHDDYYGLDV
配列番号 112	VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGL EWVAVISYKGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCGGSGYALHDDYYGLDVWVGQGLVTVSS
配列番号 113	DNA VH	CAAGTGCAGCTTGTCGAATCGGGAGGCGGAGTGGTGCAGCCTGG ACGATCGCTCCGGCTCTCATGTGCCGCGAGCGGATTCACCTTCTC GAGCTACGGCATGCACTGGGTCAGACAAGCCCCAGGAAAGGGC CTGGAATGGGTGGCTGTCATCTCGTACAAGGGCTCAAACAAGTA CTACGCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGATA ACTCCAAGAATACCCTCTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGGGCC GAGGATACTGCAGTGTAATACTGCGGGGGTTTCAGGCTACGCGCT GCACGACGACTACTACGGATTGGACGTCTGGGGCCAAGGAAGTCT TTGTGACCGTGTCTCT
配列番号 95	LCDR1 (Kabat)	TGTSSDVGGYNYVS
配列番号 114	LCDR2 (Kabat)	EVSNRLR
配列番号 97	LCDR3 (Kabat)	SSYTSSSTLYV
配列番号 98	LCDR1 (Chothia)	TSSDVGGYNY
配列番号 116	LCDR2 (Chothia)	EVS
配列番号 100	LCDR3 (Chothia)	YTSSSTLY
配列番号 101	LCDR1 (IMGT)	SSDVGGYNY
配列番号 116	LCDR2 (IMGT)	EVS
配列番号 97	LCDR3 (IMGT)	SSYTSSSTLYV
配列番号 124	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAP KLMIYEVSNRLRGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSY TSSSTLYVFGSGTKVTVL

【0 2 1 9】

10

20

30

40

50

【表 29】

配列番号 125	DNA VL	CAGAGCGCGCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGAGCGGTTCCGCCGGG ACAGTCCATTACCATTTTCGTGCACCGGGACCTCCTCCGACGTGGG AGGCTACAACCTACGTGTCTGGTACCAGCAGCATCCCGGAAAGG CCCCGAAGCTGATGATCTACGAAGTGTGGAACAGACTGCGGGGA GTCTCCAACCGCTTTTCCGGGTCCAAGTCCGGCAACACCGCCAGC CTGACCATCAGCGGGCTCCAGGCAGAAGATGAGGCTGACTATTA CTGCTCCTCCTACACGTCAAGCTCCACCCTCTACGTGTTCCGGTC CGGGACCAAAGTCACTGTGCTG
配列番号 63	リンカー	GGGSGGGSGGGSGGGSG
配列番号 126	scFv (VH- リンカー- VL)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGL EWVAVISYKGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCGGSGYALHDDYYGLDVWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGSG- GGGSGGGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSW YQHPGKAPKLMIEVSNRLRGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAE DEADYYCSSYTSSSTLYVFGSGTKVTVL
配列番号 127	DNA scFv	CAAGTGCAGCTTGTGCAATCGGGAGGCGGAGTGGTGCAGCCTGG ACGATCGCTCCGGCTCTCATGTGCCGCGAGCGGATTACCTTCTC GAGCTACGGCATGCACTGGGTGAGACAAGCCCCAGGAAAGGGC CTGGAATGGGTGGCTGTCTCTGTAACAAGGGCTCAAACAAGTA CTACGCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGATA ACTCCAAGAATACCCTCTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGGGCC GAGGATACTGCAGTGTACTACTGCGGGGGTTCAGGCTACGCGCT GCACGACGACTACTACGGATTGGACGTCTGGGGCCAAGGAATC TTGTGACCGTGTCTCTGTTGGTGGAGGCGGATCAGGGGGTGGCGGA TCTGGGGGTGGTGGTTCGGGGGGAGGAGGATCGCAGAGCGCGCT GACTCAGCCTGCCTCCGTGAGCGGTTCCCGGGACAGTCCATTAC CCATTTTCGTGCACCGGGACCTCCTCCGACGTGGGAGGCTACAAC TACGTGTCTGGTACCAGCAGCATCCCGGAAAGGCCCGCAAGCT GATGATCTACGAAGTGTGGAACAGACTGCGGGGAGTCTCCAACC GCTTTTCCGGGTCCAAGTCCGGCAACACCGCCAGCCTGACCATC AGCGGGCTCCAGGCAGAAGATGAGGCTGACTATTACTGCTCCTC CTACACGTCAAGCTCCACCCTCTACGTGTTCCGGTCCGGGACCAA AGTCACTGTGCTG
配列番号 128	全長 CAR アミノ酸配列	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGL EWVAVISYKGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCGGSGYALHDDYYGLDVWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGSG- GGGSGGGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSW YQHPGKAPKLMIEVSNRLRGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAE DEADYYCSSYTSSSTLYVFGSGTKVTVLTTTPAPRPPTPAPTIASQPL SLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAFLAGTCGVLLLSLVITL YCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRV KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVI.DKRRGRDPENG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALPPR

【0220】

10

20

30

40

50

【 0 2 2 1 】

50

【表 3 1】

表 7. 例示的な B 細胞由来の抗 BCMA 分子の Kabat CDR

Kabat	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
PI61	SYGMH (配列番号 86)	VISYDGSN KYYADSV KG (配列 番号 87)	SGYALHDD YYGLDV (配列番号 88)	TGTSSDV GGYNYV S (配列 番号 95)	DVSNRPS (配列番号 96)	SSYTSSS TLYV (配列番号 97)
B61-02	SYGMH (配列番号 86)	VISYKGSN KYYADSV KG (配列 番号 109)	SGYALHDD YYGLDV (配列番号 88)	TGTSSDV GGYNYV S (配列 番号 95)	EVSNRLR (配列番号 114)	SSYTSSS ALYV (配列番号 115)
B61-10	SYGMH (配列番号 86)	VISYKGSN KYYADSV KG (配列 番号 109)	SGYALHDD YYGLDV (配列番号 88)	TGTSSDV GGYNYV S (配列 番号 95)	EVSNRLR (配列番号 114)	SSYTSSS TLYV (配列番号 97)
コンセンサス	SYGMH (配列番号 86)	VISYXGSN KYYADSV KG, 式中、 X は D 又は K (配列番号 130)	SGYALHDD YYGLDV (配列番号 88)	TGTSSDV GGYNYV S (配列 番号 95)	X ₁ VSNRX ₂ X ₃ , 式中、X ₁ は D 又は E; X ₂ は P 又は L; 及び X ₃ は S 又は R (配列 番号 131)	SSYTSSS XLYV, 式中、X は T 又は A (配列 番号 132)

【 0 2 2 2 】

【表 3 2】

表 8. 例示的な B 細胞由来の抗 BCMA 分子の Chothia CDR

Chothia	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
PI61	GFTFSSY (配列番号 47)	SYDGSN (配列番号 89)	SGYALHDDY YGLDV (配列 番号 88)	TSSDVGG YNY (配列 番号 98)	DVS (配列 番号 99)	YTSSSTLY (配列番号 100)
B61-02	GFTFSSY (配列番号 47)	SYKGSN (配列番号 110)	SGYALHDDY YGLDV (配列 番号 88)	TSSDVGG YNY (配列 番号 98)	EVS (配列 番号 116)	YTSSSAL Y (配列 番号 117)
B61-10	GFTFSSY (配列番号 47)	SYKGSN (配列番号 110)	SGYALHDDY YGLDV (配列 番号 88)	TSSDVGG YNY (配列 番号 98)	EVS (配列 番号 116)	YTSSSTLY (配列番号 100)
コンセンサス	GFTFSSY (配列番号 47)	SYXGSN, 式中、X は D 又は K (配列 番号 133)	SGYALHDDY YGLDV (配列 番号 88)	TSSDVGG YNY (配列 番号 98)	XVS, 式中、X は D 又は E (配列番号 134)	YTSSSXL Y, 式中、 X は T 又は A (配列番号 135)

【 0 2 2 3 】

10

20

30

40

50

【表 3 3】

表 9. 例示的な B 細胞由来の抗 BCMA 分子の IMGT CDR

IMGT	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
PI61	GFTFSSYG (配列番号 90)	ISYDGSN K (配列 番号 91)	GGSGYALHDD YYGLDV (配列 番号 92)	SSDVGGY NY (配列 番号 101)	DVS (配列 番号 99)	SSYTSSST LYV (配列 番号 97)
B61-02	GFTFSSYG (配列番号 90)	ISYKGSN K (配列 番号 111)	GGSGYALHDD YYGLDV (配列 番号 92)	SSDVGGY NY (配列 番号 101)	EVS (配列 番号 116)	SSYTSSSA LYV (配列 番号 115)
B61-10	GFTFSSYG (配列番号 90)	ISYKGSN K (配列 番号 111)	GGSGYALHDD YYGLDV (配列 番号 92)	SSDVGGY NY (配列 番号 101)	EVS (配列 番号 116)	SSYTSSST LYV (配列 番号 97)
コンセンサス	GFTFSSYG (配列番号 90)	ISYXGSN K, 式中, X は D 又は K (配 列番号 136)	GGSGYALHDD YYGLDV (配列 番号 92)	SSDVGGY NY (配列 番号 101)	XVS, 式中, X は D 又は E (配列番 号 134)	SSYTSSSX LYV, 式中, X は T 又は A (配列番号 132)

10

【 0 2 2 4】

【表 3 4】

表 18. 例示的な PI61 ベースの抗 BCMA 分子のアミノ酸及び核酸配列

識別	タンパク質配列	DNA 配列(5'-3')
シグナルペプチド	MALPVTALLPLALLHAA RP (配列番号 1)	Atggccctccctgtcaccgctctgttctgctcgcttctctgtg ctccacgcagcgcgaccg (配列番号 252)
PI61 VH	QVQLQESGGGVVQPGRSLR LSCAASGFTFSSYGMHWVR QAPGKGLEWVAVISYDGSN KYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYY CGSGYALHDDYYGLDVW GQGTLLTVSS (配列番号 93)	CAGGTACAATTGCAGGAGTCTGGAGG CGGTGTGGTGCAACCCGGTCGCAGCTT GCGCCTGAGTTGTGCTGCGTCTGGATT TACATTTTCATCTTACGGAATGCATTG GGTACGCCAGGCACCGGGGAAAGGCC TTGAATGGGTGGCTGTAATTTACATACG ATGGTTCCAACAAATACTATGCTGACT CAGTCAAGGGTCGATTTACAATTAGTC GGGACAACCTCCAAGAACACCCTTTATC TTCAAATGAATTCCCTTAGAGCAGAGG ATACGGCGGTCTATTACTGTGGTGGCA GTGGTTATGCACTTCATGATGATTACT ATGGCTTGGATGTCTGGGGGCAAGGG ACGCTTGTAACGTATCCTCT (配列番号 260)

30

40

【 0 2 2 5】

50

【表 3 5】

PI61 VL	QSALTQPASVSGSPGQSITIS CTGTSSDVGGYNYVSWYQ QHPGKAPKLMYDVSNRPS GVSNRFSGSKSGNTASLTIS GLQAEDEADYYCSTSSST LYVFGSGTKVTVL (配列番号 102)	CAATCTGCTCTGACTCAACCAGCAAAGC GTATCAGGGTCACCGGGACAGAGTATT ACCATAAGTTGCACGGGGACCTCTAGC GATGTAGGGGGGTATAATTATGTATCT TGGTATCAACAACACCCCGGGAAAGC CCCTAAATIGATGATCTACGACGTGAG CAATCGACCTAGTGGCGTATCAAATCG CTTCTCTGGTAGCAAGAGTGGGAATAC GGCGTCCCTTACTATTAGCGGATTGCA AGCAGAAGATGAGGCCGATTACTACT GCAGCTCCTATACTAGCTCTTCTACAT TGTACGTCTTTGGGAGCGGAACAAAA GTAACAGTACTC (配列番号 261)
リンカー	GGGSGGGSGGGGS (配列 番号 104)	
ScFv PI61	QVQLQESGGGVVQGRSLR LSCAASGFTFSYGMHWVR QAPGKGLEWVAVISYDGSN KYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYY CGGSGYALHDDYYGLDVG GQGTLYTVSSGGGSGGGG SGGGGSQSALTQPASVSGSP GQSITISCTGTSSDVGGYNY VSWYQHPGKAPKLMYD VSNRPSGVSNRFSGSKSGNT ASLTISGLQAEDEADYYCST YTSSSTLYVFGSGTKVTVL (配列番号 105)	CagggtacaaitgcaggagctctggaggcgggtgtGtgcaacc cggtcgcagcttgcgcctgagttgtGctgcgtctgattacatt ttcatcttaacggaAtgcattgggtacgccaggcaccggggaa aggcCttgaatgggtggctgaatttcatacagatggtTccaac aaatactatgctgactcagtcagggtCgattacaattagtcg ggacaactccaagaacAcccttatcttcaaatgaattcccttag agcaGaggatacggcggtctattactgtgtgtgagcgtGgttat geacttcattgatattactatggcttgGatgtctggggcaagg gacgcttgtaactgtaTcctctggtggtggtgtagtggtggg ggaggcTccggcggtggcggtctcaatctgctctgactCaa ccagcaagcgtatcagggtcaccgggacagAgtattaccata agttgcacggggacctctagcGatgtagggggtataattatg tacttggtatCaacaacaccccggaagccctaaattgatg AtctacgacgtgagcaatcgacatagtggtgctaTcaaatcgc ttctctgtagcaagagtggaatAaggcgctcctactattag cgattgcaagcaGaagataggcgagattactactgcagctc ctatActagctcttctacattgtagctcttgggagcggaacaaa agtaacagtactc (配列番号 253)
膜貫通ドメイン 及びヒンジ	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGL DFACDIYIWA!PLAG!CGLVLL LSLVITLYC (配列番号 202)	AcaacaacacctgccccgagaccgectacaccaGccccga ctattgccagccagcctctgagctcAgccctgaggcctgtag gccccgagcggcgccGcagttcatacaccgggcttgattt cgcttGtGatatttatttggctccttggcggggacaTgtgg cggtgctgcttctgacattgtattactactgtactgt (配列 番号 254)
4-1BB	KRGRKKLLYIFKQPFMRPV QTTQEEDGCSCRFPEEEEGG CEL (配列番号 7)	AaacgcgggcgaaaaaattgctgtatattttAagcagccat ttataggcccggttcagacgacGaggaggaggacgggtgct cttgcagggtccagaagagggaagggggctgtgaattg (配列番号 255)
CD3ゼータ	RVKFSRSADAPAYQQGQNQ LYNELNLGRREEYDVLDR RGRDPPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGDGLYQGLST ATKDTYDALIIMQALPPR (配列番号 10)	CgggttaaatttcaagatccgcagacgtccaGcataccaac agggacaaaaccaactctataacGagctgaatttggaaagaa gggaggaaatgatGtctggataaacggcgcgtagagatc cgagAGggcggaacaaaggcggaacaaacccctagG agggactctacaacgaactgcagaaagacaaaAtggcgag gcttattccgaataggcatgaagGcgagcggaggcgagg gaaaggcgacgacggaCtgaatcaaggccctcaaccgcga ctaaggatAcgtacgacgctgcacatgcaggccctgcctc cgaga (配列番号 256)

【0 2 2 6】

10

20

30

40

50

【表 3 6】

PI61 全長 CAR 構築物	MALPVTALLPLALLHAA RPQVQLQESGGGVVQPGRS LRLSCAASGFTFSSYGMHW VRQAPGKGLEWVAVISYDG SNKYYADSVKGRFIIIRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCGGSGYALHDDYYGLDV WGQGTI.VTVSSGGGSGG GGSGGGGSQSALTQPASVS GSPGQSITISCTGTSSDVGGY NYVSWYQQHPGKAPKLM YDVSNRPSGVSNRFSKSG NTASLTISGLQAEDEADYYC SSYTSSSTLYVFGSGTKVT LTTTPAPRPPTPAPTIASQPL SLRPEACRPAAGGAVHTRG LDFACDIYWAPLAGTCGVI LLSLVITLYCKRGRKKLLYI FKQPFMRPVQTTQEEDGCS CRFPEEEGGCELRVKFSRS ADAPAYQQGQNQLYNELN LGRREEYDVLDRRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTY DALHMQUALPPR (配列番号 257)	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCTCTGTG CTGCCGCTTGCTCTGCTGCTCCACGCA GCGCGACCGCAGGTACAATTGCAGGA GTCTGGAGGCGGTGTGGTGCAACCCG GTCGCAGCTTGCGCCTGAGTGTGCTG CGTCTGGATTACATTTTCATCTTACGG AATGCATTGGGTACGCCAGGCACCGG GGAAAGGCCTTGAATGGGTGGCTGTA ATTTCATACGATGGTTCCAACAAATAC TATGCTGACTCAGTCAAGGGTCGATTT ACAATTAGTCGGGACAACCTCCAAGAA CACCCCTTATCTTCAAAATGAATTCCTT AGAGCAGAGGATACGGCGGTCTATTA CTGTGGTGGCAGTGGTTATGCATCTCA TGATGATTACTATGGCTTGGATGTCTG GGGGCAAGGGACGCTTGTAAGTGTATC CTCTGGTGGTGGTGGTAGTGGTGGGGG AGGCTCCGGCGGTGGCGGCTCTCAATC TGCTCTGACTCAACCAGCAAGCGTATC AGGGTCACCGGGACAGAGTATTACCA TAAGTTGCACGGGGACCTCTAGCGATG TAGGGGGGTATAATTATGTATCTTGGT ATCAACAACACCCCGGAAAGCCCCCT AAATTGATGATCTACGACGTGAGCAAT CGACCTAGTGGCGTATCAAATCGCTTC TCTGGTAGCAAGAGTGGGAATACGGC GTCCCTTACTATTAGCGGATTGCAAGC AGAAGATGAGCCGATTACTACTGCA GCTCTATACTAGCTCTTCTACATTGTA CGTCTTTGGGAGCGGAACAAAAGTAA CAGTACTCACAACAACCTGCCCGGA GACCGCTACACCAGCCCCGACTATTG CCAGCCAGCCTCTGAGCCTCAGGCCTG AGGCCTGTAGGCCCGCAGCGGGCGGC GCAGTTCATACACGGGGCTTGGATTTC GCTTGTGATATTTATATTGGGCTCCTT TGGCGGGGACATGTGGCGTGCTGCTTC TGTCACCTGTTATTACACTGTACTGTA AACGCGGGCGAAAAAAATTGCTGTAT ATTTTAAAGCAGCCATTATGAGGCC GTTACAGACGACGAGGAGGAGGACGG TTGCTCTTGCAAGTTCCAGAAAGAGGA AGAAGGGGGCTGTGAATTGCGGGTTA AA'TTTCAAGATCCGCAGACGCTCCAG CATACCAACAGGGACAAAACCAACTC TATAACGAGCTGAATCTTGGAAGAAG GGAGGAATATGATGTGCTGGATAAAC GGCGCGGTAGAGATCCGGAGATGGGC GGAAAACCAAGGCGAAAAAACCTCA GGAGGGACTCTACAACGAACTGCAGA AAGACAAAAATGGCGGAGGCTTATTC GAAATAGGCA'TGAAGGCGAGCGGAG GCGAGGGAAAGGCGACGAGGACTGT ATCAAGGCTCTCAACCGGACTAAGG ATACGTACGACGCCCTGCACATGCAGG CCCTGCCTCCGAGA (配列番号 258)
----------------------------	---	--

10

20

30

40

【0 2 2 7】

【 0 2 2 8 】

PI61 成熟 CAR タンパク質	QVQLQESGGGVVQGRSLR LSCAASGFTFSSYGMHWVR QAPGKGLEWVAVISYDGSN KYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLR AEDTAVYY CGSGYALHDDYYGLDVW GQGTLTVTSSGGGSGGGG SGGGGSQSALTQPASVSGSP GQSITISCTGTSSDVGNY VSWYQQHPGKAPKLMYD VSNRPSGVSNRFSGSKSGNT ASI.TISGLQAEDEADYYCSS YTSSSTLYVFGSGTKVTVL.T TTPAPRPPTPAPTIASQPLSL RPEACRPAAGGAVHTRGLD FACDIYWAPLAGTCGLI.I. SLVITLYCKRGRKLLYIFK QPFMRPVQTTQFEEDGCCSR FPEFEFGGCELRVKFSRSAD APAYQQGQNQLYNELNLG RREFEYDVI.DKRRGRDPFMG GKPRRKNPQEGLYNELQKD KMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDA LHMQUALPPR (配列番号 107)	caggatcaattgcaggagctctggaggcgggtgtggtgcaaccc ggtcgcagcttgccctgagttgtctgcctctggtattacatttt catcttacggaatgcattgggtacgccaggcaccggggaaag gccttgaatgggtgctgaatttcatacagatggttccaacaaat actatgctgactcagctcaagggtcgcgattacaattagtcgggac aactccaagaacacccctttatcttcaaatgaattcccttagagca gaggatacggcggcttacttactgtgggtggcagtggttatgcactt calgatgattactatggcttggtatgtcttgggggcaaggagcgt tgttaactgtatcctctgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt ccggcgggtggcggctctcaatctgctctgacitcaaccagcaag cgtatcagggttcaccgggacagagtattaccataagttgcacg gggacctctagcgatgtagggggtataattatgtatctgtgtat caacaacaccccgggaaagcccttaaatgatgtatctacgacg tgagcaatcgacctagtggcgtatcaaatcgcttctctgttagc aagagtgggaatacggcgtcccttactattagcggattgcaag cagaagatgaggcggattactactgacgctcctatactagctctt ctacattgtacgtcttggggagcgggaacaaaagttaacagtactc acaacaacacctgccccgagaccgccctacaccagccccgact attgccagccagcctctgagcctcaggcctgaggcctgtaggc ccgcagcggggcggcgagcttcatacacggggcttggafttcg ctgtgtatatttatatttgggctccttggcggggacatgtggcgt gctgcttctgtcactgttattacactgtactgtaaacgcgggcga aaaaaattgctgtatattttaagcagccattatgaggcccgctc agacgacgcaggagggagggagcgggtgctcttgagggttccag aagaggnagaagggggcgtgtgaattgcgggtttaaattttcaag atccgcagacgctccagcataccaacaggggacaaaaccaact ctataacgagctgaatcttggaaagaaggagggaatatgatgtg ctggataaacggcgcggtagagatccggagatgggcggaaa accaaggcgaaaaaacctcaggagggtgactctacaacgaact gcagaaagacaaaatggcggagggtattccgaaataggcat gaaggggcgagcggaggcgaggggaaaagggcacgacggact gtatcaaggcctctcaaccgcgactaaggatacgtacgacgcc ctgcacatgcagggccctgctccgaga (配列番号 259)
----------------------	---	---

20

30

40

50

【表 3 8】

表 10. 例示的なハイブリドーマ由来の抗 BCMA 分子のアミノ酸及び核酸配列

配列番号	名称/説明	配列
Hy03		
配列番号 137	HCDR1 (Kabat)	GFWMS
配列番号 138	HCDR2 (Kabat)	NIKQDGSEKYYVDSVRG
配列番号 139	HCDR3 (Kabat)	ALDYYGMDV
配列番号 140	HCDR1 (Chothia)	GFTESGF
配列番号 141	HCDR2 (Chothia)	KQDGSE
配列番号 139	HCDR3 (Chothia)	ALDYYGMDV
配列番号 142	HCDR1 (IMGT)	GFTESGFW
配列番号 143	HCDR2 (IMGT)	IKQDGSEK
配列番号 144	HCDR3 (IMGT)	ARALDYYGMDV
配列番号 145	VII	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISGFWMSWVRQAPGKGL EWVANIKQDGSEKYYVDSVRGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARALDYYGMDVWGQGTTVTVSS
配列番号 146	DNA VH	GAAGTGCAACTGGTGGAGAGCGGTGGAGGGCTTGTCCAGCCCG GAGGATCGCTGCGGCTGTCTGTGCTGCGTCCGGGTTCACCTTCT CCGGCTTCTGGATGTCTGGGTGAGACAGGCACCGGAAAGGGC CTCGAATGGGTGGCCAACATCAAGCAGGATGGCTCCGAGAAGT ACTACGTCGACTCCGTGAGAGGCCGCTTCACCATCTCCCGGGAC AACGCCAAGAACTCGCTGTACCTCCAAATGAATAGCCTCAGGGC GGAAGATACTGCTGTGTATTACTGCGCACGCGCCCTTGACTACT ACGGCATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACTGTGACCGTGTCT AGC
配列番号 147	LCDR1 (Kabat)	RSSQSLLDSDDGNTYLD
配列番号 148	LCDR2 (Kabat)	TL SYRAS
配列番号 149	LCDR3 (Kabat)	TQRLEFPSIT
配列番号 150	LCDR1 (Chothia)	SQSLLDSDDGNTY
配列番号 151	LCDR2 (Chothia)	TLS
配列番号 152	LCDR3 (Chothia)	RLEFPSI
配列番号 153	LCDR1 (IMGT)	QSLLDSDDGNTY

【0 2 2 9】

10

20

30

40

50

【表 3 9】

配列番号 151	LCDR2 (IMGT)	TLS
配列番号 149	LCDR3 (IMGT)	TQRLEFPSIT
配列番号 154	VL	DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLDSDDGNTYLDWYLQKPG QSPRLLIYTLSYRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGLYYC TQRLEFPSITFGQGTRLEIK
配列番号 155	DNA VL	GATATCGTGATGACCCAGAGCTCCCCTGTCCCTGCCTGTGACTCCC GGAGAACCAGCCTCCATTTCCTGCCGGTCCTCCCAGTCCCTGCTG GACAGCGACGACGGCAACACTTACCTGGACTGGTACTTGCAGAA GCCGGGCCAATCGCCTCGCCTGCTGATCTATACCTGTGCATACCG GGCCTCAGGAGTGCCTGACCGCTTCTCGGGATCAGGGAGCGGGA CCGATTTACCCCTGAAAATTTCCCGAGTGGAAGCCGAGGACGTC GGACTGTACTACTGCACCCAGCGCCTCGAATTCCTGTCGATTAC GTTTGGACAGGGTACCCGGCTTGAGATCAAG
配列番号 63	リンカー	GGGGSGGGSGGGGSGGGGS
配列番号 156	scFv (VH- リンカー- VL)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQFWMSWVRQAPGKGL EWVANIKQDGSEKYYVDSVRGRTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARALDYYGMDVWGQGTFTVSSGGGSGGGGSGGGGS GGGGSDIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLDSDDGNTYLDWY LQKPGQSPRLLIYTLSYRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV GLYYCTQRLEFPSITFGQGTRLEIK
配列番号 157	DNA scFv	GAAGTGCAACTGGTGGAGAGCGGTGGAGGGCTTGTCAGCCCG GAGGATCGCTGCGGCTGTCCTGTGCTGCGTCCGGGTTCACCTTCT CCGGCTTCTGGATGTCCTGGGTCAGACAGGCACCGGGAAAGGGC CTCGAATGGGTGGCCAACATCAAGCAGGATGGCTCCGAGAAGT ACTACGTCGACTCCGTGAGAGGCCGCTTACCATCTCCCGGGAC AACGCCAAGAACTCGCTGTACCTCCAAATGAATAGCCTCAGGGC GGAAGATACTGCTGTGTATTACTGCGCACGCGCCCTTGACTACT ACGGCATGGACGCTGGGGCCAAGGGACCACTGTGACCGTGTCT AGCGGAGGCGGAGGTTTCAAGGGGCGGTGGATCAGGCGGAGGAG GATCGGGGGGTGGTGGATCGGATATCGTGATGACCCAGACTCCC CTGTCCCTGCCTGTGACTCCCGGAGAACCAGCCTCCATTTCCTGC CGGTCCCTCCAGTCCCTGCTGGACAGCGACGACGGCAACACTTA CCTGGACTGGTACTTGCAGAAAGCCGGGCCAATCGCCTCGCCTGC TGATCTATACCCTGTCATACCGGGCCTCAGGAGTGCCTGACCGC TTCTCGGGATCAGGGAGCGGGACCGATTTCACCTGAAAATTTTC CCGAGTGGAAGCCGAGGACGTCGGAAGTGTACTACTGCACCCAGC GCCTCGAATTCCTGTCGATTACGTTTGGACAGGGTACCCGGCTT GAGATCAAG

【0 2 3 0】

10

20

30

40

50

10

20

30

40

【表 4 1】

Hy52		
配列番号 160	HCDR1 (Kabat)	SFRMN
配列番号 161	HCDR2 (Kabat)	SISSSSSYIYYADSVKG
配列番号 162	HCDR3 (Kabat)	WLSYYGMDV
配列番号 163	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSF
配列番号 164	HCDR2 (Chothia)	SSSSSY
配列番号 162	HCDR3 (Chothia)	WLSYYGMDV
配列番号 165	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSFR
配列番号 166	HCDR2 (IMGT)	ISSSSSYI
配列番号 167	HCDR3 (IMGT)	ARWLSYYGMDV
配列番号 168	VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSFRMNWVRQAPGKGL EWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARWLSYYGMDVWGQGTTVTVSS
配列番号 169	DNA VH	GAAGTGCAACTGGTGGAGAGCGGTGGAGGGCTTGTC AAGCCCG GAGGATCGCTGCGGCTGTCCTGTGCTGCGTCCGGGTTCACCTTCT CCTCGTTCCGCATGAAC TGGGTCAGACAGGCACCGGGAAAGGGC CTCGAATGGGTGTCCTCAATCTCATCGTCCTCGTCTACATCTAC TACGCCGACTCCGTGAAAGGCCGCTTCACCATCTCCCGGGACAA CGCCAAGAACTCGCTGTACCTCCAAATGAATAGCCTCAGGGCGG AAGATACTGCTGTGTATTACTGCGCACGCTGGCTTTCCTACTACG GCATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACTGTGACCGTGTCTAGC
配列番号 147	LCDR1 (Kabat)	RSSQSLLDSDDGNTYLD
配列番号 170	LCDR2 (Kabat)	TLSFRAS
配列番号 171	LCDR3 (Kabat)	MQRIGFPIT
配列番号 150	LCDR1 (Chothia)	SQSLLDSDDGNTY
配列番号 151	LCDR2 (Chothia)	TLS
配列番号 172	LCDR3 (Chothia)	RIGFPI
配列番号 153	LCDR1 (IMGT)	QSLLDSDDGNTY
配列番号 151	LCDR2 (IMGT)	TLS

【0 2 3 2】

10

20

30

40

50

【表 4 2】

配列番号 171	LCDR3 (IMGT)	MQRIGFPIT
配列番号 173	VL	DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLDSDDGNTYLDWYLQKPG QSPQLLIYTLSEFRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKIRRVEAEDVGVYYC MQRIGFPITFGQGRLEIK
配列番号 174	DNA VL	GATATCGTGATGACCCAGACTCCCCTGTCCCTGCCTGTGACTCCC GGAGAACCAGCCTCCATTTCTGCGCGTCCCTCCAGTCCCTGCTG GACAGCGACGACGGCAACACTTACCTGGACTGGTACTTGCAGAA GCCGGGCCAATCGCCTCAGCTGCTGATCTATACCTGTCATTCCG GGCCTCAGGAGTGCCTGACCGCTTCTCGGGATCAGGGAGCGGGA CCGATTTACCCCTGAAAATTAGGCGAGTGGAAGCCGAGGACGTC GGAGTGTACTACTGCATGCAGCGCATCGGCTTCCCGATTACGTTT GGACAGGGTACCCGGCTTGAGATCAAG
配列番号 63	リンカー	GGGGSGGGSGGGSGGGGS
配列番号 175	scFv (VH- リンカー- VL)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSFRMNWVRQAPGKGL EWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARWLSYYGMDVWGQGTITVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGG GGSDIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLDSDDGNTYLDWYLQ KPGQSPQLLIYTLSEFRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKIRRVEAEDVGV YYCMQRIGFPITFGQGRLEIK
配列番号 176	DNA scFv	GAAGTGCAACTGGTGGAGAGCGGTGGAGGGCTTGTCAGCCCG GAGGATCGCTGCGGCTGTCTGTGCTGCGTCCGGGTTCACCTTCT CCTCGTTCCGCATGAAGTGGGTCAGACAGGCACCGGGAAAGGGC CTCGAATGGGTGTCCTCAATCTCATCGTCCTCGTCCTACATCTAC TACGCCGACTCCGTGAAAGGCCGCTTCACCATCTCCCGGGACAA CGCCAAGAACTCGCTGTACCTCCAAATGAATAGCCTCAGGGCGG AAGATACTGCTGTGTATTACTGCGCACGCTGGCTTTCTACTACG GCATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACTGTGACCGTGTCTAGC GGAGGCGGAGGTTTCAAGGGGGCGGTGGATCAGGCGGAGGAGGAT CGGGGGGTGGTGGATCGGATATCGTGATGACCCAGACTCCCCTG TCCCTGCCTGTGACTCCCGGAGAACCAGCCTCCATTTCTGCGCG TCCTCCCAGTCCCTGTCTGGACAGCGACGACGGCAACACTTACCT GGACTGGTACTTGCAGAAGCCGGGCCAATCGCCTCAGCTGCTGA TCTATAACCTGTCAATTCCGGGCCTCAGGAGTGCCTGACCGCTTCT CGGGATCAGGGAGCGGGACCGATTTCACCCTGAAAATTAGGCG AGTGGAAGCCGAGGACGTCGGAGTGFACTACTGCATGCAGCGC ATCGGCTTCCCGATTACGTTTGGACAGGGTACCCGGCTTGAGAT CAAG

【 0 2 3 3 】

10

20

30

40

50

【表 4 3】

配列番号 177	全長 CAR アミノ酸 配列	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSFRMNWVRQAPGKGL EWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARWLSYYGMDVWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGSGGGSGG GGSDIVMTQTPLSLPVTPEPASISCRSSQSLLDSDDGNTYLDWYLQ KPGQSPQLLIYTLSEFRASGVPDFSGSGSGTDFTLKIRRVAEADVGV YYCMQRIGFPITFGQGTREIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC RPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGR KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSAD APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPGEMGGKPRRKN PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQUALPPR	10
配列番号 178	全長 CAR DNA 配列	GAAGTGCAACTGGTGGAGAGCGGTGGAGGGCTTGTCAGCCCG GAGGATCGCTGCGGCTGTCTGTGCTGCGTCCGGGTTCACCTTCT CCTCGTTCGCGCATGAAGTGGGTGAGACAGGCACCGGGAAAGGGC CTCGAATGGGTGTCTCAATCTCATCGTCCCTCGTCTACATCTAC TACGCCGACTCCGTGAAAGGCCGCTTCACCATCTCCCGGGACAA CGCCAAGAACTCGCTGTACCTCCAAATGAATAGCCTCAGGGCGG AAGATACTGCTGTGTATTACTGCGCACGCTGGCTTTCTACTACG GCATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACTGTGACCGTGTCTAGC GGAGGCGGAGGTTTCAGGGGGCGGTGGATCAGGCGGAGGAGGAT CGGGGGGTGGTGGATCGGATATCGTGATGACCCAGACTCCCTCG TCCCTGCCTGTGACTCCCGGAGAACCAGCCTCCATTTCTGCGCG TCCTCCCAGTCCCTGCTGGACAGCGACGACGGCAACACTTACCT GGACTGGTACTTGCAGAAGCCGGGCCAATCGCCTCAGCTGCTGA TCTATAACCTGTGATTCCGGGCTCAGGAGTGCCGACCGCTTCT CGGGATCAGGAGCGGGACCGATTTCACCTGAAAATTAGGCG AGTGGAAGCCGAGGACGTGCGAGTGTACTACTGCATGCAGCGC ATCGGCTTCCCGATTACGTTTGGACAGGGTACCCGGCTTGAGAT CAAGACCACTACCCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGGCTCCTA CCATCGCTTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGA CCCGCAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGACTTCGC CTGCGATATCTACATTTGGGCCCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGGT CCTGCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTGCG GAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCTTCATGAGGCCTG TGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGGTTCCCA GAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAAATTCAGCC GCAGCGCAGATGCTCCAGCCTACCAGCAGGGGCAGAACCAGCT CTACAACGAACTCAATCTTGGTTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGC TGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCC GCGCAGAAAGAATCCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAA AAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAG GGGAACGCAGAAGAGGCAAGGCCACGACGACTGTACCAGGG ACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCACATGC AGGCCCTGCCGCTCGG	20 30

【0 2 3 4】

10

20

30

40

50

【表 4 4】

表 11. 例示的なハイブリドーマ由来の抗 BCMA 分子の Kabat CDR

Kabat	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
Hy03	GFWMS (配列番号 137)	NIKQDGSEK YYVDSVRG (配列番号 138)	ALDYYGMD V (配列番号 139)	RSSQSLLDS DDGNTYLD (配列番号 147)	TLSYRA S (配列 番号 148)	TQRLEFP SIT (配列 番号 149)
Hy52	SFRMN (配列番号 160)	SISSSSSYIYY ADSVKG (配列番号 161)	WLSYYGMD V (配列番号 162)	RSSQSLLDS DDGNTYLD (配列番号 147)	TLSFRAS (配列番号 170)	MQRIGFP IT (配列 番号 171)
コンセンサス	X ₁ FX ₂ MX ₃ (式中、X ₁ は G 又は S; X ₂ は W 又は R; 及び X ₃ は S 又は N) (配列番号 179)	X ₁ LX ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ YYX ₈ DS VX ₉ G (式中、 X ₁ は N 又は S; X ₂ は K 又は S; X ₃ は Q 又は S; X ₄ は D 又は S; X ₅ は G 又は S; X ₆ は E 又は Y; X ₇ は K 又は I; X ₈ は V 又は A; 及び X ₉ は R 又は K) (配列 番号 180)	X ₁ LX ₂ YYGM DV (式中、 X ₁ は A 又は W; 及び X ₂ は D 又は S) (配列番号 181)	RSSQSLLDS DDGNTYLD (配列番号 147)	TLSXRA S (式中、 Xは Y 又は F) (配列番号 182)	X ₁ QRX ₂ X ₃ FPX ₄ IT (式中、 X ₁ は T 又は M; X ₂ は L 又は I; X ₃ は E 又は G; 及び X ₄ は S 又は 不存在) (配列番号 183)

【 0 2 3 5】

【表 4 5】

表 12. 例示的なハイブリドーマ由来の抗 BCMA 分子の Chothia CDR

Chothia	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
Hy03	GFTFSGF (配列番号 140)	KQDGSE (配列 番号 141)	ALDYYGMD V (配列番号 139)	SQSLLSD DGNTY (配列番号 150)	TLS (配列 番号 151)	RLEFPSI (配列 番号 152)
Hy52	GFTFSF (配列番号 163)	SSSSSY (配列 番号 164)	WLSYYGMD V (配列番号 162)	SQSLLSD DGNTY (配列番号 150)	TLS (配列 番号 151)	RIGFPI (配列 番号 172)
コンセンサス	GFTFSXF (式中、Xは G 又は S) (配列番号 184)	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ SX ₅ (式中、X ₁ は K 又は S; X ₂ は Q 又は S; X ₃ は D 又は S; X ₄ は G 又は S; 及び X ₅ は E 又は Y) (配列番号 185)	X ₁ LX ₂ YYGM DV (式中、 X ₁ は A 又は W; 及び X ₂ は D 又は S) (配列番号 181)	SQSLLSD DGNTY (配列番号 150)	TLS (配列 番号 151)	RX ₁ X ₂ FPX ₃ IT (式中、 X ₁ は L 又は I; X ₂ は E 又は G; 及び X ₃ は S 又は 不存在) (配列番号 186)

【 0 2 3 6】

【表 4 6】

表 13. 例示的なハイブリドーマ由来の抗 BCMA 分子の IMGT CDR

IMGT	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
Hy03	GFTFSGF W (配列 番号 142)	IKQDGSEK (配列番号 143)	ARALDYYG MDV (配列番 号 144)	QSL LDSDD GNTY (配列 番号 153)	TLS (配列 番号 151)	TQRLEFP SIT (配列 番号 149)
Hy52	GFTFSSEF (配列番号 165)	ISSSSSYI (配列番号 166)	ARWLSYYG MDV (配列番 号 167)	QSL LDSDD GNTY (配列 番号 153)	TLS (配列 番号 151)	MQRIGFPI T (配列 番号 171)
コンセンサス	GFTFSX ₁ F X ₂ (式中、 X ₁ は G 又は S; 及び X ₂ は W 又は R) (配列番号 187)	IX ₁ X ₂ X ₃ X ₄ SX ₅ X ₆ (式中、 X ₁ は K 又は S; X ₂ は Q 又は S; X ₃ は D 又は S; X ₄ は G 又は S; X ₅ は E 又は Y; 及び X ₆ は K 又は I) (配列番号 188)	ARX ₁ LX ₂ YY GMDV (式中、X ₁ は A 又は W; 及び X ₂ は D 又は S) (配列番号 189)	QSL LDSDD GNTY (配列 番号 153)	TLS (配列 番号 151)	X ₁ QRX ₂ X ₃ FPX ₄ IT (式中、 X ₁ は T 又は M; X ₂ は L 又は I; X ₃ は E 又は G; 及び X ₄ は S 又は 不存在) (配列番号 183)

10

20

【0237】

いくつかの実施形態において、ヒト抗 BCMA 結合ドメインは、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2 及び LC CDR3 を含む。

【0238】

特定の実施形態において、本明細書に記載の CAR 分子又は本明細書に記載の抗 BCMA 結合ドメインは、

(1) 以下から選択される 1 つ、2 つ又は 3 つの軽鎖 (LC) CDR :

(i) 配列番号 54 の LC CDR1、配列番号 55 の LC CDR2 及び配列番号 56 の LC CDR3 ; 及び / 又は

(2) 以下の 1 つからの 1 つ、2 つ又は 3 つの重鎖 (HC) CDR :

(i) 配列番号 44 の HC CDR1、配列番号 45 の HC CDR2 及び配列番号 84 の HC CDR3 ;

(ii) 配列番号 44 の HC CDR1、配列番号 45 の HC CDR2 及び配列番号 46 の HC CDR3 ;

(iii) 配列番号 44 の HC CDR1、配列番号 45 の HC CDR2 及び配列番号 68 の HC CDR3 ; 又は

(iv) 配列番号 44 の HC CDR1、配列番号 45 の HC CDR2 及び配列番号 76 の HC CDR3

を含む。

【0239】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の CAR 分子又は本明細書に記載の抗 BCMA 結合ドメインは、

(1) 以下の 1 つからの 1 つ、2 つ又は 3 つの軽鎖 (LC) CDR :

(i) 配列番号 95 の LC CDR1、配列番号 131 の LC CDR2 及び配列番号 132 の LC CDR3 ;

(ii) 配列番号 95 の LC CDR1、配列番号 96 の LC CDR2 及び配列番号 97 の LC CDR3 ;

(iii) 配列番号 95 の LC CDR1、配列番号 114 の LC CDR2 及び配列番号

30

40

50

115のLC CDR3；又は

(iv) 配列番号95のLC CDR1、配列番号114のLC CDR2及び配列番号97のLC CDR3；及び／又は

(2) 以下の1つからの1つ、2つ又は3つの重鎖(HC)CDR：

(i) 配列番号86のHC CDR1、配列番号130のHC CDR2及び配列番号88のHC CDR3；

(ii) 配列番号86のHC CDR1、配列番号87のHC CDR2及び配列番号88のHC CDR3；又は

(iii) 配列番号86のHC CDR1、配列番号109のHC CDR2及び配列番号88のHC CDR3

を含む。

【0240】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載のCAR分子又は本明細書に記載の抗BCMA結合ドメインは、

(1) 以下の1つからの1つ、2つ又は3つの軽鎖(LC)CDR：

(i) 配列番号147のLC CDR1、配列番号182のLC CDR2及び配列番号183のLC CDR3；

(ii) 配列番号147のLC CDR1、配列番号148のLC CDR2及び配列番号149のLC CDR3；又は

(iii) 配列番号147のLC CDR1、配列番号170のLC CDR2及び配列番号171のLC CDR3；及び／又は

(2) 以下の1つからの1つ、2つ又は3つの重鎖(HC)CDR：

(i) 配列番号179のHC CDR1、配列番号180のHC CDR2及び配列番号181のHC CDR3；

(ii) 配列番号137のHC CDR1、配列番号138のHC CDR2及び配列番号139のHC CDR3；又は

(iii) 配列番号160のHC CDR1、配列番号161のHC CDR2及び配列番号162のHC CDR3

を含む。

【0241】

いくつかの実施形態において、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、それぞれ配列番号44、45、84、54、55及び56のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、それぞれ配列番号44、45、46、54、55及び56のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、それぞれ配列番号44、45、68、54、55及び56のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、それぞれ配列番号44、45、76、54、55及び56のアミノ酸配列を含む。

【0242】

いくつかの実施形態において、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、それぞれ配列番号47、48、84、57、58及び59のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、それぞれ配列番号47、48、46、57、58及び59のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は、それぞれ配列番号47、48、68、57、58及び59のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3は

10

20

30

40

50

、それぞれ配列番号 47、48、76、57、58 及び 59 のアミノ酸配列を含む。

【0243】

いくつかの実施形態において、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2 及び LC CDR3 は、それぞれ配列番号 49、50、85、60、58 及び 56 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2 及び LC CDR3 は、それぞれ配列番号 49、50、51、60、58 及び 56 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2 及び LC CDR3 は、それぞれ配列番号 49、50、69、60、58 及び 56 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2 及び LC CDR3 は、それぞれ配列番号 49、50、77、60、58 及び 56 のアミノ酸配列を含む。

10

【0244】

いくつかの実施形態において、ヒト抗BCMA結合ドメインは、VH（例えば、本明細書に記載のVH）及びVL（例えば、本明細書に記載のVL）を含むscFvを含む。いくつかの実施形態において、VHは、リンカー、例えば本明細書に記載のリンカー、例えば表1に記載のリンカーを介してVLに結合される。いくつかの実施形態において、ヒト抗BCMA結合ドメインは、(Gly₄-Ser)_nリンカー（ここで、nは、1、2、3、4、5又は6、好ましくは3又は4である）（配列番号26）を含む。scFvの軽鎖可変領域及び重鎖可変領域は、例えば、下記方向のいずれでもあり得る：軽鎖可変領域-リンカー-重鎖可変領域又は重鎖可変領域-リンカー-軽鎖可変領域。

20

【0245】

一態様において、抗BCMA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、抗BCMA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、野生型の親和性又は増強した親和性でBCMAタンパク質に結合する。

【0246】

ある例において、scFvは、当技術分野で知られる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領域と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号明細書、同第2005/0175606号明細書、同第2007/0014794号明細書及び国際公開第2006/020258号パンフレット及び国際公開第2007/024715号パンフレットを参照されたい。

30

40

【0247】

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

50

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、 $(Gly_4Ser)_n$ （ここで、 n は、1以上の正の整数である）などの一連のグリシン及びセリン反復を含む（配列番号25）。いくつかの実施形態において、リンカーは $(Gly_4Ser)_4$ （配列番号27）又は $(Gly_4Ser)_3$ （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。

【0248】

膜貫通ドメイン

膜貫通ドメインに関して、種々の実施形態において、CARは、CARの細胞外ドメインに結合する膜貫通ドメインを含むように設計できる。膜貫通ドメインは、膜貫通領域に隣接した1つ以上の更なるアミノ酸、例えば膜貫通が由来するタンパク質の細胞外領域と関連する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から最大15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連する1つ以上の更なるアミノ酸（例えば、細胞内領域の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10から最大15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の他のドメインと結合するものである。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又はアミノ酸置換による修飾ができる。一態様において、膜貫通ドメインは、CAR発現細胞（例えば、CAR T細胞）表面上の別のCARとホモ二量体化できる。異なる態様において、膜貫通ドメインのアミノ酸配列は、同じCAR発現細胞、例えばCAR Tに存在する天然結合パートナーの結合ドメインとの相互作用を最小化するように修飾又は置換され得る。

【0249】

膜貫通ドメインは、天然由来又は組み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に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細胞受容体のアルファ鎖、ベータ鎖又はゼータ鎖、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8（例えば、CD8アルファ、CD8ベータ）、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。いくつかの実施形態において、膜貫通ドメインは、少なくとも共刺激分子（例えば、MHCクラスI分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ性活性化分子（SLAMタンパク質）、活性化NK細胞受容体、BTLA、Tollリガンド受容体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、LFA-1（CD11a／CD18）、4-1BB（CD137）、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS（CD278）、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM（LIGHTR）、KIRDS2、SLAMF7、Nkp80（KLRF1）、Nkp44、Nkp30、Nkp46、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL2Rベータ、IL2Rガンマ、IL7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE／RANKL、DNAM1（CD226）、SLAMF4（CD244、2B4）、CD84、CD96（Tactile）、CEACAM1、CRTAM、Ly9（CD229）、CD160（BY55）、PSGL1、CD100（SEMA4D）、CD69、SLAMF6（NTB-A、Ly108）、SLAM（SLAMF1、CD150、IPO-3）、BLAME（SLAMF8）、SELP LG（CD162）、LTBR

10

20

30

40

50

、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a及びCD83と特異的に結合するリガンド)の膜貫通領域を含み得る。

【0250】

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、いくつかの実施形態において、ヒンジは、ヒトIg(免疫グロブリン)ヒンジ、例えばIgG4ヒンジ又はCD8aヒンジであり得る。いくつかの実施形態において、ヒンジ又はスペーサーは、配列番号2のアミノ酸配列を含む(例えば、これからなる)。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)。

【0251】

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、いくつかの実施形態において、ヒンジ又はスペーサーは、配列番号3のヒンジを含む。いくつかの実施形態において、ヒンジ又はスペーサーは、配列番号14のヌクレオチド配列によってコードされるヒンジを含む。

【0252】

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、いくつかの実施形態において、ヒンジ又はスペーサーは、配列番号4のアミノ酸配列のヒンジを含む。いくつかの実施形態において、ヒンジ又はスペーサーは、配列番号15のヌクレオチド配列によってコードされるヒンジを含む。

【0253】

一態様において、膜貫通ドメインは、組み換えであり得、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み換え膜貫通ドメインの各末端に見ることができる。

【0254】

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ンカーがCARの膜貫通ドメインと細胞質領域との間に結合を形成し得る。グリシン-セリンダブレットは、特に適当なリンカーを提供する。例えば、一態様において、リンカーは、配列番号5のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、配列番号16のヌクレオチド配列によりコードされる。

【0255】

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。

【0256】

細胞質ドメイン

本発明のCARの細胞質ドメイン又は領域は、細胞内シグナル伝達ドメインを含む。細胞内シグナル伝達ドメインは、一般的に、CARが導入されている免疫細胞の正常エフェクター機能の少なくとも1つの活性化の原因である。

【0257】

本発明のCARにおいて使用する細胞内シグナル伝達ドメインの例は、T細胞受容体(TCR)及び抗原受容体結合後にシグナル伝達を開始するために協調して機能する共受容体の細胞質配列並びにこれらのあらゆる誘導体又は変異体及び同じ機能的能力を有するあらゆる組み換え配列を含む。

【0258】

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る。従って、T細胞活性化は、2つの異なるクラスの細胞質シグナル伝達配列が介在するということができる：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。

【0259】

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

10

20

30

40

50

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。

【0260】

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ゼータ、FcRガンマ、FcRベータ、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278（「ICOS」としても知られる）、FcεRI、DAP10、DAP12及びCD66dのものを含む。いくつかの実施形態において、本発明のCARは、細胞内シグナル伝達ドメイン、例えばCD3ゼータの一次シグナル伝達ドメインを含む。

10

【0261】

いくつかの実施形態において、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。いくつかの実施形態において、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、2、3、4つ又はそれを超えるITAMモチーフを含む。

【0262】

本発明で特に有用である初代細胞内シグナル伝達ドメインを含む分子の更なる例は、DAP10、DAP12及びCD32のものを含む。

20

【0263】

CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、一次シグナル伝達ドメイン、例えばCD3ゼータシグナル伝達ドメインをそれ自体で含むことができるか、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、一次シグナル伝達ドメイン、例えばCD3ゼータ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。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な抗原受容体又はそのリガンド以外の細胞表面分子である。このような分子の例は、MHCクラスI分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ性活性化分子（SLAMタンパク質）、活性化NK細胞受容体、BTLA、Tollリガンド受容体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、LFA-1（CD11a／CD18）、4-1BB（CD137）、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS（CD278）、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM（LIGHTR）、KIRDS2、SLAMF7、NKP80（KLRF1）、NKP44、NKP30、NKP46、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL2Rベータ、IL2Rガンマ、IL7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE／RANKL、DNAM1（CD226）、SLAMF4（CD244、2B4）、CD84、CD96（Tactile）、CEACAM1、CRTAM、Ly9（CD229）、CD160（BY55）、PSGL1、CD100（SEMA4D）、CD69、SLAMF6（NTB-A、Ly108）、SLAM（SLAMF1、CD150、IPO-3）、BLAME（SLAMF8）、SELPLG（CD162）、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG／Cbp、CD19a及びCD83などと特異的に結合するリガンドを含む。例えば、CD27共刺激は、インビトロでヒトCART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

30

40

50

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）。本発明の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。いくつかの実施形態において、グリシン-セリンダブルレットを適当なリンカーとして使用できる。いくつかの実施形態において、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。

【0264】

一態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、2つ以上、例えば2、3、4、5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、3、4、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。いくつかの実施形態において、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。いくつかの実施形態において、リンカー分子は、グリシン残基である。いくつかの実施形態において、リンカーは、アラニン残基である。

【0265】

一態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3ゼータのシグナル伝達ドメイン及び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、CD3ゼータ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ゼータのシグナル伝達ドメインは、配列番号9（変異体CD3ゼータ）又は配列番号10（野生型ヒトCD3ゼータ）のシグナル伝達ドメインである。

【0266】

一態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3ゼータのシグナル伝達ドメイン及び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、配列番号8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、配列番号19の核酸配列によりコードされる。

【0267】

一態様において、細胞内は、CD3ゼータ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、CD28のシグナル伝達ドメインは、配列番号36のアミノ酸配列を含む。一態様において、CD28のシグナル伝達ドメインは、配列番号37の核酸配列によりコードされる。

【0268】

一態様において、細胞内は、CD3ゼータ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。一態様において、ICOSのシグナル伝達ドメインは、配列番号38のアミノ酸配列を含む。一態様において、ICOSのシグナル伝達ドメインは、配列番号39の核酸配列によりコードされる。

【0269】

CARの構成

多特異性CAR

一実施形態において、本発明のCARは、多特異性CARである。いくつかの実施形態において、多特異性CARは、二特異性CARである。いくつかの実施形態において、二特異性CARは、二特異性抗体分子である抗原結合ドメインを含む。二特異性抗体分子は、第1エピトープに対する結合特異性を有する第1免疫グロブリン可変ドメイン配列及び第2エピトープに対する結合特異性を有する第2免疫グロブリン可変ドメイン配列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エピトープに結合特異性を有する半抗体及び第2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及び第2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。

10

【0270】

特定の実施形態において、本発明のCARは、多特異性（例えば、二特異性又は三特異性）抗体分子である抗原結合ドメインを含む。二特異性又はヘテロ二量体抗体分子を産生するためのプロトコルは、当技術分野で知られており、例えば米国特許第5731168号明細書に記載の「ノブインアホール」アプローチ；例えば、国際公開第09/089004号パンフレット、国際公開第06/106905号パンフレット及び国際公開第2010/129304号パンフレットに記載のような静電的ステアリングFc対形成；例えば、国際公開第07/110205号パンフレットに記載のような鎖交換操作ドメイン（SEED）ヘテロ二量体形成；例えば、国際公開第08/119353号パンフレット、国際公開第2011/131746号パンフレット及び国際公開第2013/060867号パンフレットに記載のようなFabアーム交換；例えば、米国特許第4433059号明細書に記載のような、例えばアミン反応性基及びスルフヒドリル反応性基を有するヘテロ二官能性試薬を使用して二特異性構造を製造するための、抗体架橋結合による二重抗体コンジュゲート；例えば、米国特許第4444878号明細書に記載のような、2つの鎖間のジスルフィド結合の還元及び酸化のサイクルを経る異なる抗体からの半抗体（重-軽鎖対又はFab）の組み換えにより産生する二特異性抗体決定基；例えば、米国特許第5273743号明細書に記載のような、三機能性抗体、スルフヒドリル反応性基により架橋された3Fab'フラグメント；例えば、米国特許第5534254号明細書に記載のような、生合成結合タンパク質、例えばC末端テイル、好ましくはジスルフィド又はアミン反応性化学架橋結合により架橋されたscFvの対；例えば、米国特許第5582996号明細書に記載のような、二機能性抗体、例えば置換された定常ドメインを有する、ロイシンジッパー（例えば、c-fos及びc-jun）により二量体化された異なる結合特性を有するFabフラグメント；例えば、米国特許第5591828号明細書に記載のような、二特異性及びオリゴ特異性一価及びオリゴ価受容体、例えば一方の抗体のCH1領域と他方の典型的には軽鎖を伴う抗体のVH領域との間のポリペプチドスパーサーを経て連結した2つの抗体（2つのFabフラグメント）のVH-CH1領域；例えば、米国特許第5635602号明細書に記載のような、二特異性DNA-抗体コンジュゲート、例えば二本鎖切片のDNAを経た抗体又はFabフラグメントの架橋；例えば、米国特許第5637481号明細書に記載のような、二特異性融合タンパク質、例えば親水性らせん状ペプチドリッカーを間に含み、完全定常領域を含む、2つのscFvを含む発現構築物；例えば、米国特許第5837242号明細書に記載のような、多価及び多特異性結合タンパク質、例えばIg重鎖可変領域の結合領域を有する第1ドメイン及びIg軽鎖可変領域の結合領域を有する第2ドメインを有し、一般に二特異性抗体（二特異性、三特異性、四特異性の分子を作るための高次構造も包含される）と呼ばれるポリペプチドの二量体；例えば、米国特許第5837821号明細書に記載のような、二特異性/多価分子を形成するように二量体化できる、ペプチドスパーサーで抗体ヒンジ領域及びCH3領域に更に結合された、連結VL鎖及びVH鎖を有するミニボディ構築物；二特異性抗体を形成するように二量体を形成できる、いずれかの方向で短ペプチドリッカー（例えば、5つ又は10のアミノ酸）により、又はリンカーなしで連結されたVH及びVLドメイン；例えば

20

30

40

50

、米国特許第5844094号明細書に記載のような三量体及び四量体；例えば、米国特許第5864019号明細書に記載のような、一連のFV（又はs c F v）を形成するように更にVLドメインと結合した、C末端で架橋可能基とのペプチド結合により連結した一連のVHドメイン（又はファミリーメンバーにおけるVLドメイン）；及び例えば、米国特許第5869620号明細書に記載のような、s c F V又は二特異性抗体形態の両方を使用して、例えばホモ二価、ヘテロ二価、三価及び四価構造を形成するように非共有又は化学架橋により多価構造に合わさっている、ペプチドリンカーにより連結したVHドメイン及びVLドメインの両方を有する一本鎖結合ポリペプチドを例えば含むが、これらに限定されない。多特異性及び二特異性分子並びにそれを製造するための更なる例は、例えば、米国特許第5910573号明細書、米国特許第5932448号明細書、米国特許第5959083号明細書、米国特許第5989830号明細書、米国特許第6005079号明細書、米国特許第6239259号明細書、米国特許第6294353号明細書、米国特許第6333396号明細書、米国特許第6476198号明細書、米国特許第6511663号明細書、米国特許第6670453号明細書、米国特許第6743896号明細書、米国特許第6809185号明細書、米国特許第6833441号明細書、米国特許第7129330号明細書、米国特許第7183076号明細書、米国特許第7521056号明細書、米国特許第7527787号明細書、米国特許第7534866号明細書、米国特許第7612181号明細書、米国特許出願公開第2002004587A1号明細書、米国特許出願公開第2002076406A1号明細書、米国特許出願公開第2002103345A1号明細書、米国特許出願公開第2003207346A1号明細書、米国特許出願公開第2003211078A1号明細書、米国特許出願公開第2004219643A1号明細書、米国特許出願公開第2004220388A1号明細書、米国特許出願公開第2004242847A1号明細書、米国特許出願公開第2005003403A1号明細書、米国特許出願公開第2005004352A1号明細書、米国特許出願公開第2005069552A1号明細書、米国特許出願公開第2005079170A1号明細書、米国特許出願公開第2005100543A1号明細書、米国特許出願公開第2005136049A1号明細書、米国特許出願公開第2005136051A1号明細書、米国特許出願公開第2005163782A1号明細書、米国特許出願公開第2005266425A1号明細書、米国特許出願公開第2006083747A1号明細書、米国特許出願公開第2006120960A1号明細書、米国特許出願公開第2006204493A1号明細書、米国特許出願公開第2006263367A1号明細書、米国特許出願公開第2007004909A1号明細書、米国特許出願公開第2007087381A1号明細書、米国特許出願公開第2007128150A1号明細書、米国特許出願公開第2007141049A1号明細書、米国特許出願公開第2007154901A1号明細書、米国特許出願公開第2007274985A1号明細書、米国特許出願公開第2008050370A1号明細書、米国特許出願公開第2008069820A1号明細書、米国特許出願公開第2008152645A1号明細書、米国特許出願公開第2008171855A1号明細書、米国特許出願公開第2008241884A1号明細書、米国特許出願公開第2008254512A1号明細書、米国特許出願公開第2008260738A1号明細書、米国特許出願公開第2009130106A1号明細書、米国特許出願公開第2009148905A1号明細書、米国特許出願公開第2009155275A1号明細書、米国特許出願公開第2009162359A1号明細書、米国特許出願公開第2009162360A1号明細書、米国特許出願公開第2009175851A1号明細書、米国特許出願公開第2009175867A1号明細書、米国特許出願公開第2009232811A1号明細書、米国特許出願公開第2009234105A1号明細書、米国特許出願公開第2009263392A1号明細書、米国特許出願公開第2009274649A1号明細書、欧州特許第346087A2号明細書、国際公開第0006605A2号パンフレット、国際公開第02072635A2号パンフレット、国際公開第04081051A1号パンフレット、国際公開第06020258A2号パンフレット、国際公開第2007044887A2号パ

10

20

30

40

50

ンフレット、国際公開第2007095338A2号パンフレット、国際公開第2007137760A2号パンフレット、国際公開第2008119353A1号パンフレット、国際公開第2009021754A2号パンフレット、国際公開第2009068630A1号パンフレット、国際公開第9103493A1号パンフレット、国際公開第9323537A1号パンフレット、国際公開第9409131A1号パンフレット、国際公開第9412625A2号パンフレット、国際公開第9509917A1号パンフレット、国際公開第9637621A2号パンフレット、国際公開第9964460A1号パンフレットに見ることができる。上に引用した出願の内容は、参照によりその全体が本明細書に援用される。

【0271】

二特異性抗体分子の各抗体又は抗体フラグメント（例えば、 $s c F v$ ）内において、 $V H$ は、 $V L$ の上流又は下流にあり得る。一実施形態において、上流抗体又は抗体フラグメント（例えば、 $s c F v$ ）は、その $V L$ （ $V L_1$ ）の上流のその $V H$ （ $V H_1$ ）と共に配置され、下流抗体又は抗体フラグメント（例えば、 $s c F v$ ）は、その $V L$ （ $V L_2$ ）の上流のその $V H$ （ $V H_2$ ）と共に配置され、その結果、全体的二特異性抗体分子は、配置 $V H_1-V L_1-V L_2-V H_2$ を有する。他の実施形態において、上流抗体又は抗体フラグメント（例えば、 $s c F v$ ）は、その $V H$ （ $V H_1$ ）の上流のその $V L$ （ $V L_1$ ）と共に配置され、下流抗体又は抗体フラグメント（例えば、 $s c F v$ ）は、その $V H$ （ $V H_2$ ）の上流のその $V L$ （ $V L_2$ ）と共に配置され、その結果、全体的二特異性抗体分子は、配置 $V L_1-V H_1-V H_2-V L_2$ を有する。任意選択により、リンカーは、2つの抗体又は抗体フラグメント（例えば、 $s c F v$ ）間、例えば構築物が $V H_1-V L_1-V L_2-V H_2$ として配列される場合に $V L_1$ と $V L_2$ との間又は構築物が $V L_1-V H_1-V H_2-V L_2$ として配置される場合に $V H_1$ と $V H_2$ との間に配置される。リンカーは、本明細書に記載のリンカー、例えば（ $G l y_4-S e r$ ） n リンカー（配列番号26）（式中、 n は、1、2、3、4、5又は6、好ましくは4である）であり得る。一般に、2つの $s c F v$ 間のリンカーは、2つの $s c F v$ のドメイン間の誤対合を避けるのに十分長くなければならない。任意選択により、リンカーは、第1の $s c F v$ の $V L$ と $V H$ との間に配置される。任意選択により、リンカーは、第2の $s c F v$ の $V L$ と $V H$ との間に配置される。複数リンカーを有する構築物において、リンカーの任意の2つ以上は、同じであるか又は異なり得る。従って、一実施形態において、二特異性CARは、本明細書に記載のような配置で $V L$ 、 $V H$ 及び任意選択により1つ以上のリンカーを含む。

【0272】

一態様において、二特異性抗体分子は、第1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、BCMAに結合特異性を有し、例えば本明細書に記載のような、例えば表2、6及び10に記載するような $s c F v$ を含むか又は本明細書に記載のBCMA $s c F v$ からの軽鎖CDR及び／又は重鎖CDR及び第2エピトープに対する結合特異性を有する第2免疫グロブリン可変ドメイン配列を異なる抗原に含む。いくつかの態様において、第2免疫グロブリン可変ドメイン配列は、AML細胞上に発現された抗原、例えばBCMA以外の抗原に結合特異性を有する。例えば、第2免疫グロブリン可変ドメイン配列は、CD123に対する結合特異性を有する。別の例として、第2免疫グロブリン可変ドメイン配列は、CLL-1に対する結合特異性を有する。別の例として、第2免疫グロブリン可変ドメイン配列は、CD34に対する結合特異性を有する。別の例として、第2免疫グロブリン可変ドメイン配列は、FLT3に対する結合特異性を有する。例えば、第2免疫グロブリン可変ドメイン配列は、葉酸受容体 β に対する結合特異性を有する。いくつかの態様において、第2免疫グロブリン可変ドメイン配列は、B細胞に発現される抗原、例えばCD10、CD19、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179b又はCD79aに対する結合特異性を有する。

【0273】

キメラTCR

一態様において、本発明の抗BCMA抗体及び抗体フラグメント（例えば、表2、6及び10に開示されるもの）を、BCMAに特異的に結合するキメラ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アルファ又はTCRベータ鎖に移植できる。理論に拘束されるものではないが、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、本明細書に開示するようなBCMA scFvを、TCR鎖、例えばTCRアルファ鎖及び／又はTCRベータ鎖の定常ドメイン、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、BCMA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アルファ鎖の定常ドメインに移植でき、BCMA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ベータ鎖の定常ドメインに移植できる（又は代替的にVLドメインをTCRベータ鎖の定常ドメインに移植し得、VHドメインをTCRアルファ鎖に移植し得る）。別の例として、抗BCMA抗体又は抗体フラグメントのCDR、例えば表2～13に記載されるような抗BCMA抗体又は抗体フラグメントのCDRは、BCMAに特異的に結合するキメラTCRを作るために、TCRアルファ鎖及び／又はベータ鎖に移植され得る。例えば、本明細書に開示のLCDRをTCRアルファ鎖の可変ドメインに移植し得、本明細書に開示のHCDRをTCRベータ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、当技術分野で公知の方法により産生され得る（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）。

【0274】

更なる実施形態

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（BCMA）又は異なる標的（例えば、CD19、CD20若しくはCS-1又は他の多発性骨髄腫標的、例えばカッパ軽鎖、CD138、ルイスY抗原若しくはCD38（Garfall et al., Discovery Medicine, 2014, 17(91):37-46））に対する、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。いくつかの実施形態において、CAR発現細胞は、第1の抗原を標的とし、共刺激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、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への共刺激性シグナル伝達ドメイン、例えば4-1BB、CD28、CD27 ICOS又はOX-40及び一次シグナル伝達ドメイン、例えばCD3ゼータの第2のCARへの配置は、両方の標的が発現される細胞に対してCAR活性を制限し得る。いくつかの実施形態において、CAR発現細胞は、BCMA結合ドメイン、膜貫通ドメイン及び共刺激ドメインを含む第1のBCMA CAR及びBCMA以外の抗原（例えば、白血病又はリンパ腫細胞に発現される抗原、例えばCD19、CD20、CS-1、カッパ軽鎖、CD139、ルイスY抗原又はCD38）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、BCMA結合ドメイン、膜貫通ドメイン及び一次シグナル伝達ドメインを含む第1のBCMA CAR及びBCMA以外の抗原（例えば、白血病又はリンパ腫細胞に発現される抗原、例えばCD19、CD20、CS-1、カッパ軽鎖、CD139、ルイスY抗原又はCD38）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CARを含む。いくつかの実施形態において、CAR発現細胞は、本明細書に記載のBCMA CAR及びCD19を標的とするCAR（CD19 CAR）を含む。

【0275】

いくつかの実施形態において、CAR発現細胞は、本明細書に記載のBCMA CAR及び阻害性CARを含む。いくつかの実施形態において、阻害性CARは、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。いくつかの実施形態において、阻害性CARは、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン及び阻害分子の細胞内ドメインを含む。例えば、阻害性CARの細胞内ドメインは、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM（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TGFRベータの細胞内ドメインであり得る。

10

【0276】

一部の実施形態において、CAR発現細胞が2つ以上の異なるCARを含むとき、種々の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。

【0277】

一実施形態において、抗原結合ドメインは、単ドメイン抗原結合（SDAB）分子を含み、相補的決定領域が単ドメインポリペプチドの一部である分子を含む。例は、重鎖可変ドメイン、軽鎖を天然に欠く結合分子、慣用の4鎖抗体由来の単ドメイン、操作されたドメイン及び抗体由来のもの以外の単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ドメイン抗体分子も含む。

20

【0278】

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Streletssov（2005）Protein Sci. 14:2901-2909に記載されている。

30

【0279】

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ドメイン抗原結合分子である。このような単ドメイン分子は、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。

40

【0280】

SDAB分子は、組み換え、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）。

【0281】

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

50

埋受容体を有する細胞は、例えば、抗原結合ドメインの1つ以上がその同族抗原に結合することを阻止するため、望ましくない可能性があることも判明した。従って、本明細書に開示されるのは、このような相互作用を最小化する、抗原結合ドメインを含む第1及び第2の天然に存在しないキメラ膜包埋受容体を有する細胞である。また、本明細書に開示されるのは、このような相互作用を最小化する抗原結合ドメインを含む第1及び第2の天然に存在しないキメラ膜包埋受容体をコードする核酸並びにこのような細胞及び核酸を製造及び使用する方法である。一実施形態において、前記第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。

10

【0282】

一実施形態において、本発明は、第1及び第2のC A Rを含み、ここで、前記第1のC A R及び前記第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、前記第1のC A R及び前記第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、前記第1のC A R及び前記第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、前記第1のC A R及び前記第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、前記第1のC A R及び前記第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。

20

【0283】

一実施形態において、前記第1のC A R及び前記第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、前記第1のC A R及び前記第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、前記第1のC A R及び前記第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。

【0284】

一実施形態において、細胞の表面上に存在するとき、前記第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、前記第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、前記第2のC A Rの存在下の前記第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、前記第2のC A Rの非存在下の前記第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85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%である。

30

【0285】

一実施形態において、細胞の表面上に存在するとき、前記第1のC A R及び前記第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、前記第1のC A R及び前記第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85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%少なく互いに結合する。

40

【0286】

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発現細胞の活性を増強する薬剤を更に発現できる。例えば、一部の実施形態において、薬剤は、阻害分子を阻害する薬剤、例えば本明細書に記載の薬剤であり得る。阻害分子、例えばP D 1は、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、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

50

D86、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TGFR β を含む。一部の実施形態において、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。一部の実施形態において、薬剤は、例えば、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM (例えば、CEACAM-1、CEACAM-3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TGFR β 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 (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、ICOS又はCD28) 及び／又は一次シグナル伝達ドメイン (例えば、本明細書に記載のCD3ゼータシグナル伝達ドメインを含む) である第2のポリペプチドを含む。一部の実施形態において、薬剤は、PD1又はそのフラグメント (例えば、PD1の少なくとも細胞外ドメインの部分) の第1のポリペプチド並びに本明細書に記載の細胞内シグナル伝達ドメイン (例えば、本明細書に記載のCD28シグナル伝達ドメイン及び／又は本明細書に記載のCD3ゼータシグナル伝達ドメイン) の第2のポリペプチドを含む。実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞は、例えば、参照によりその全体が本明細書に援用される国際公開第2013/019615号パンフレットに記載のようなスイッチ共刺激性受容体を含む。PD1は、CD28、CTLA-4、ICOS及びBTLAも含む受容体のCD28ファミリーの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。

【0287】

一部の実施形態において、阻害分子、例えばプログラム細胞死1 (PD1) の細胞外ドメイン (ECD) を含む薬剤を膜貫通ドメイン及び41BB及びCD3ゼータなどの細胞内シグナル伝達ドメインに融合できる (本明細書ではPD1 CARと称する)。一部の実施形態において、PD1 CARは、本明細書に記載のBCMA CARと組み合わせで使用したとき、CAR発現細胞、例えばT細胞又はNK細胞の残留性を改善する。一部の実施形態において、CARは、配列番号24において下線で示すPD1の細胞外ドメインを含むPD1 CARである。一部の実施形態において、PD1 CARは、配列番号24のアミノ酸配列を含む。

【0288】

いくつかの実施形態において、PD1 CARは、下記アミノ酸配列を含む (配列番号22)。

【0289】

いくつかの実施形態において、薬剤は、PD1 CAR、例えば本明細書に記載のPD1 CARをコードする核酸配列を含む。いくつかの実施形態において、PD1 CARの核

10

20

30

40

50

酸配列は、配列番号 23 として提供され、PD1 ECD には下線が付されている。

【0290】

別の態様において、本発明は、CAR 発現細胞、例えば CART 細胞又は CAR 発現 NK 細胞の集団を提供する。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。例えば、いくつかの実施形態において、CAR 発現細胞（例えば、CART 細胞又は CAR 発現 NK 細胞）の集団は、本明細書に記載の抗 BCMA 結合ドメインを有する CAR を発現する第 1 の細胞及び異なる抗 BCMA 結合ドメインを有する CAR を発現する第 2 の細胞、例えば第 1 の細胞によって発現される CAR の抗 BCMA 結合ドメインと異なる、本明細書に記載の抗 BCMA 結合ドメインを含み得る。別の例として、CAR 発現細胞の集団は、例えば、本明細書に記載のような、抗 BCMA 結合ドメインを含む CAR を発現する第 1 の細胞及び BCMA 以外の標的（例えば、CD19、CD20、CS-1、カップ軽鎖、CD139、ルイス Y 抗原又は CD38）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。いくつかの実施形態において、CAR 発現細胞の集団は、例えば、本明細書に記載のような、抗 BCMA 結合ドメインを含む CAR を発現する第 1 の細胞及び CD19 を標的とする抗原結合ドメインを含む CAR（CD19 CAR）を発現する第 2 の細胞を含む。いくつかの実施形態において、CAR 発現細胞の集団は、例えば、初代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。

【0291】

別の態様において、本発明は細胞の集団を提供し、ここで、集団内の少なくとも 1 つの細胞は、本明細書に記載の抗 BCMA ドメインを有する CAR を発現し、第 2 の細胞は、別の薬剤、例えば CAR 発現細胞の活性を増強する薬剤を発現する。例えば、いくつかの実施形態において、薬剤は、阻害分子を阻害する薬剤であり得る。阻害分子は、例えば、いくつかの実施形態において、CAR 発現細胞が免疫エフェクター応答を開始する能力を減少させ得る。阻害分子の例は、PD1、PD-L1、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 ベータを含む。いくつかの実施形態において、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。一部の実施形態において、薬剤は、例えば、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM（例えば、CEACAM-1、CEACAM-3 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 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（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、ICOS 又は CD28）及び／又は一次シグナル伝達ドメイン（例えば、本明細書に記載の CD3 ゼータシグナル伝達ドメインを含む）である第 2 のポリペプチドを含む。一部の実施形態において、薬剤は、PD1 又はそのフラグメント（例えば、PD1 の少なくとも細胞外ドメインの部分）の第 1 のポリペプチド及び本明細書に記載の細胞内シグナル伝達ドメインの第 2 のポリペプチド（例えば、本明細書に記載の CD28 シグナル伝達ドメイン及び／又は本明細書に記載の CD3 ゼータシグナル伝達ドメイン）を含む。

【0292】

一態様において、本発明は、別の薬剤、例えば本明細書に記載のキナーゼ阻害剤などのキナーゼ阻害剤と組み合わせて、CAR発現細胞集団（例えば、CAR T細胞又はCAR発現NK細胞）、例えば種々のCARを発現する細胞の混合物を投与することを含む方法を提供する。別の態様において、本発明は、集団内の少なくとも1つの細胞が本明細書に記載のような抗癌関連抗原結合ドメインを有するCARを発現し、第2の細胞が別の薬剤、例えばCAR発現細胞の活性を増強する薬剤を発現する細胞集団を別の薬剤、例えば本明細書に記載のキナーゼ阻害剤などのキナーゼ阻害剤と組み合わせて投与することを含む方法を提供する。

【0293】

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に由来する膜貫通ドメイン、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、KIR2DS5、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。

【0294】

キメラ抗原受容体を制御するための戦略

CAR活性が制御され得る多くの方法がある。一実施形態において、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。例えば、例として二量体化ドメインに融合した、カスパーゼを使用するアポトーシスの誘導（例えば、Diet 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。別の例において、CAR発現細胞は、誘導性カスパーゼ-9（iCaspase-9）分子も発現でき、これは、二量体化因子薬物（例えば、rimiducid（AP1903（Belllicum Pharmaceutical）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。

【0295】

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

10

20

30

40

50

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 $\alpha v \beta 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 13 / 4 \beta 3$ 、 $\alpha 4 \beta 7$ 、 $\alpha 5 \beta 1$ 、 $\alpha v \beta 3$ 、 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/ペシジン、CD152/CTLA-4、CD154/CD40L、CD195/CCR5、CD319/SLAMF7、及びEGFR並びにその切断バージョン（例えば、1つ以上の細胞外エピトープを保持するが、細胞質ドメイン内の1つ以上の領域を欠くバージョン）を含む。例えば、本明細書に記載のCAR発現細胞は、シグナル伝達能力を欠くが、ADCCを誘発できる分子、例えばセツキシマブ（アービタックス（登録商標））により認識されるエピトープを保持する切断型上皮細胞増殖因子受容体（EGFR）も発現し、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、例えばトキシシンに結合させ、それによりCAR発現細胞数を減らすことができる。代わりに、CAR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。

【0296】

一実施形態において、RCARは、本明細書に記載の標準的CARの要素、例えば抗原結合ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインが別々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。このような制御可能CARの更なる記載及び例示的な配置は、本明細書及び参照により本明細書にその全体が援用される国際公開第2015/090229号パンフレットに提供される。

【0297】

一実施形態において、RCARは、2つポリペプチド又はメンバーを含む：1）例えば、本明細書に記載の初代細胞内シグナル伝達ドメイン及び第1のスイッチドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメイン；2）例えば、本明細書に記載のような腫瘍抗原を標的化する抗原結合ドメイン及び第2のスイッチドメインを含む抗原結合メンバー。任意選択により、RCARは、本明細書に記載の膜貫通ドメインを含む。一実施形態において、膜貫通

10

20

30

40

50

ドメインは、細胞内シグナル伝達メンバー上、抗原結合メンバー上又は両方の上に配置できる。（特に断らない限り、RCARのメンバー又は要素が本明細書に記載されるものであるとき、順番は記載したとおりであり得るが、他の順番も同様に含まれる。換言すると、一実施形態において、順番は、本書に記載のとおりであるが、他の実施形態において、順番は、異なり得る。例えば、膜貫通領域の一端の要素の順番は、例と異なり得、例えば、細胞内シグナル伝達ドメインに対するスイッチドメインの配置は、異なり、例えば逆であり得る）。

【0298】

一実施形態において、第1及び第2のスイッチドメインは、細胞内又は細胞外二量体化スイッチを形成できる。一実施形態において、二量体化スイッチは、例えば、第1及び第2のスイッチドメインが同一であるホモ二量体化スイッチ又は例えば第1及び第2のスイッチドメインが互いに異なるヘテロ二量体化スイッチであり得る。

【0299】

実施形態において、RCARは、「多スイッチ」を含み得る。多スイッチは、ヘテロ二量体化スイッチドメイン又はホモ二量体化スイッチドメインを含み得る。多スイッチは、複数の、例えば2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ又は10のスイッチドメインを独立して第1のメンバー、例えば抗原結合メンバー及び第2のメンバー、例えば細胞内シグナル伝達メンバー上に含む。一実施形態において、第1のメンバーは、複数の第1のスイッチドメイン、例えばFKBPベースのスイッチドメインを含み得、第2のメンバーは、複数の第2のスイッチドメイン、例えばFRBベースのスイッチドメインを含み得る。一実施形態において、第1のメンバーは、第1及び第2のスイッチドメイン、例えばFKBPベースのスイッチドメイン及びFRBベースのスイッチドメインを含み得、第2のメンバーは、第1及び第2のスイッチドメイン、例えばFKBPベースのスイッチドメイン及びFRBベースのスイッチドメインを含み得る。

【0300】

一実施形態において、細胞内シグナル伝達メンバーは、1つ以上の細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば初代細胞内シグナル伝達ドメイン及び1つ以上の共刺激性シグナル伝達ドメインを含む。

【0301】

一実施形態において、抗原結合メンバーは、1つ以上の細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば1つ以上の共刺激性シグナル伝達ドメインを含み得る。一実施形態において、抗原結合メンバーは、複数の、例えば2つ又は3つの例えば4-1BB、CD28、CD27、ICOS及びOX40から選択される、本明細書に記載の共刺激性シグナル伝達ドメインを含み、一実施形態において、初代細胞内シグナル伝達ドメインを含まない。一実施形態において、抗原結合メンバーは、細胞外から細胞内方向で次の共刺激性シグナル伝達ドメインを含む：4-1BB-CD27；4-1BB-CD28；CD27-4-1BB；4-1BB-CD28；CD28-4-1BB；OX40-CD28；CD28-OX40；CD28-4-1BB；又は4-1BB-CD28。このような実施形態において、細胞内結合メンバーは、CD3ゼータドメインを含む。このような実施形態において、RCARは、（1）抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン及び2つの共刺激ドメイン及び第1のスイッチドメインを含む抗原結合メンバー；及び（2）膜貫通ドメイン又は膜繫留ドメイン及び少なくとも1つの初代細胞内シグナル伝達ドメイン及び第2のスイッチドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【0302】

ある態様は、抗原結合メンバーがCAR細胞表面に繫留されていないRCARを提供する。これは、細胞内シグナル伝達メンバーを有する細胞が、細胞を、抗原結合メンバーをコードする配列で形質転換する必要なく1つ以上の抗原結合ドメインと好都合に対合することを可能とする。このような実施形態において、RCARは、1）第1のスイッチドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば初代細胞内シグナル伝達ドメイン及び第1のスイッチドメインを含む細胞内シグナル伝達メンバー；及び2）抗原結

合ドメイン及び第2のスイッチドメインを含む抗原結合メンバーを含み、ここで、抗原結合メンバーは、膜貫通ドメイン又は膜繫留ドメインを含まず、任意選択により細胞内シグナル伝達ドメインを含まない。一実施形態において、RCARは、3) 第2の抗原結合ドメイン、例えば抗原結合ドメインにより結合されるのと異なる抗原に結合する第2の抗原結合ドメイン；及び第2のスイッチドメインを含む第2の抗原結合メンバーを更に含み得る。

【0303】

抗原結合メンバーが二特異性活性化及びターゲティング能を含むRCARも本明細書で提供される。この実施形態において、抗原結合メンバーは、複数の、例えば2つ、3つ、4つ又は5つの抗原結合ドメイン、例えばscFvを含み得、ここで、各抗原結合ドメインは、標的抗原、例えば異なる抗原又は同じ抗原、例えば同じ抗原の同一又は異なるエピトープに結合する。一実施形態において、複数の抗原結合ドメインは、タンデムであり、任意選択により、リンカー又はヒンジ領域が抗原結合ドメインの各々の間に配置される。適当なリンカー及びヒンジ領域は、本明細書に記載される。

【0304】

ある態様は、増殖のスイッチングが可能な配置を有するRCARを提供する。この実施形態において、RCARは、1) 任意選択により、膜貫通ドメイン又は膜繫留ドメイン；例えば、4-1BB、CD28、CD27、ICOS及びOX40及びスイッチドメインから選択される1つ以上の共刺激性シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達メンバー；及び2) 抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン及び初代細胞内シグナル伝達ドメイン、例えばCD3ゼータドメインを含む抗原結合メンバーを含み、ここで、抗原結合メンバーは、スイッチドメインを含まないか、又は細胞内シグナル伝達メンバー上のスイッチドメインと二量体化するスイッチドメインを含まない。一実施形態において、抗原結合メンバーは、共刺激性シグナル伝達ドメインを含まない。一実施形態において、細胞内シグナル伝達メンバーは、ホモ二量体化スイッチからのスイッチドメインを含む。一実施形態において、細胞内シグナル伝達メンバーは、ヘテロ二量体化スイッチの第1のスイッチドメインを含み、RCARは、ヘテロ二量体化スイッチの第2のスイッチドメインを含む第2の細胞内シグナル伝達メンバーを含む。このような実施形態において、第2の細胞内シグナル伝達メンバーは、細胞内シグナル伝達メンバーと同じ細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一実施形態において、二量体化スイッチは、細胞内である。一実施形態において、二量体化スイッチは、細胞外である。

【0305】

本明細書に記載のRCAR配置のいずれかにおいて、第1及び第2のスイッチドメインは、本明細書に記載のようなFKBP-FRBベースのスイッチを含む。

【0306】

また本明細書で提供されるのは、本明細書に記載のRCARを含む細胞である。RCARを発現するように操作したあらゆる細胞をRCARX細胞として使用できる。一実施形態において、RCARX細胞は、T細胞であり、RCART細胞と称する。一実施形態において、RCARX細胞は、NK細胞であり、RCARN細胞と称する。

【0307】

RCARコード化配列を含む核酸及びベクターも本明細書で提供される。RCARの種々の要素をコードする配列は、同じ核酸分子、例えば同じプラスミド又はベクター、例えばウイルスベクター、例えばレンチウイルスベクターに配置できる。一実施形態において、(i) 抗原結合メンバーをコードする配列及び(ii) 細胞内シグナル伝達メンバーをコードする配列は、同じ核酸、例えばベクターに存在できる。対応するタンパク質の産生は、例えば、別々のプロモーターの使用により又はバイシストロニック転写産物（これは、単一翻訳産物の開裂又は2つの別々のタンパク質産物の翻訳により2つのタンパク質の産生を生じ得る）の使用により達成できる。一実施形態において、開裂可能ペプチドをコードする配列、例えばP2A又はF2A配列を(i)と(ii)との間に配置する。一実施形態において、IRES、例えばEMCV又はEV71 IRESをコードする配列を

10

20

30

40

50

(i) と (ii) との間に配置する。これらの実施形態において、(i) 及び (ii) は、単一RNAとして転写される。一実施形態において、(i) 及び (ii) が別々のmRNAとして転写されるように、第1プロモーターは、(i) に操作可能に連結し、第2プロモーターは、(ii) に操作可能に連結する。

【0308】

代わりに、RCARの種々の要素をコードする配列を種々の核酸分子、例えば異なるプラスミド又はベクター、例えばウイルスベクター、例えばレンチウイルスベクターに配置できる。例えば、(i) 抗原結合メンバーをコードする配列を第1核酸、例えば第1ベクターに配置でき、(ii) 細胞内シグナル伝達メンバーをコードする配列は、第2核酸、例えば第2ベクターに存在できる。

【0309】

二量体化スイッチ

二量体化スイッチは、非共有又は共有であり得る。非共有二量体化スイッチにおいて、二量体化分子は、スイッチドメイン間の非共有相互作用を促進する。共有二量体化スイッチにおいて、二量体化分子は、スイッチドメイン間の共有相互作用を促進する。

【0310】

一実施形態において、RCARは、FKBP／FRAP又はFKBP／FRBベースの二量体化スイッチを含む。FKBP12 (FKBP又はFK506結合タンパク質) は、天然産物免疫抑制剤、ラパマイシンのための最初の細胞内標的としての役割を果たす豊富な細胞質タンパク質である。ラパマイシンは、FKBP及び大PI3KホモログFRAP (RAFT、mTOR) に結合する。FRBは、FKBP-ラパマイシン複合体の結合のために十分であるFRAPの93アミノ酸部分である (Chen, J., Zheng, X. F., Brown, E. J. & Schreiber, S. L. (1995) Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. Proc Natl Acad Sci U S A 92:4947-51.)。

【0311】

実施形態において、FKBP／FRAP、例えばFKBP／FRBベースのスイッチは、二量体化分子、例えばラパマイシン又はラパマイシン類似体を使用できる。

【0312】

FKBPの例示的なアミノ酸配列は、次のとおりである。

【化1】

```
DVPDYASLGGPSSPKKKRKVSRGVQVETISPGDGRTFPKRGQT  
CVVHYTGMLDGGKFDSSRDNRNPKFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQM  
SVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLETSY  
(配列番号275)
```

【0313】

実施形態において、FKBPスイッチドメインは、ラパマイシン又はラパログの存在下でFRB又はそのフラグメント又は類似体と結合する能力を有するFKBPのフラグメントを含み得る。いくつかの実施形態において、FKBPスイッチドメインは、以下のアミノ酸配列を含む。

10

20

30

40

50

【化2】

VQVETISPGDGRTEPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDRN
KPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHP
GIIPPHATLVFDVELLKLETS (配列番号276)

【0314】

FRBのアミノ酸配列は、次のとおりである。

【化3】

ILWHEMWHEG LEEASRLYFG ERNVKGMFEV LEPLHAMMER GPQTLKETSF
NQAYGRDLME AQEWCRKYMK SGNVKDLTQA WDLYYHVFRR ISK (配列番号277)

【0315】

本明細書で使用する用語「FKBP／FRAP、例えばFKBP／FRBベースのスイッチ」は、ラパマイシン又はラパログ、例えばRAD001の存在下でFRB又はそのフラグメント若しくは類似体と結合する能力を有するFKBPフラグメント又はその類似体を含み、配列番号275又は276のFKBP配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するか、又は30、25、20、15、10、5つ、4つ、3つ、2つ又は1つのアミノ酸残基を超えて異なる第1のスイッチドメイン；及びラパマイシン又はラパログの存在下でFRB又はそのフラグメント若しくは類似体と結合する能力を有するFRBフラグメント又はその類似体を含み、配列番号277のFRB配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するか、又は30、25、20、15、10、5つ、4つ、3つ、2つ又は1つのアミノ酸残基を超えて異なる第2のスイッチドメインを含む二量体化スイッチを指す。一実施形態において、本明細書に記載のRCARは、配列番号275（又は配列番号589）に開示するアミノ酸残基を含む1スイッチドメイン及び配列番号277に開示するアミノ酸残基を含む1スイッチドメインを含む。

【0316】

実施形態において、FKBP／FRB二量体化スイッチは、FRBベースのスイッチドメイン、例えば修飾FRBスイッチドメイン、FKBPベースのスイッチドメイン及び二量体化分子、例えばラパマイシン又はラパログ、例えばRAD001間の複合体形成が変えられた、例えば増強された修飾FRBスイッチドメインを含む。一実施形態において、修飾FRBスイッチドメインは、アミノ酸位置L2031、E2032、S2035、R2036、F2039、G2040、T2098、W2101、D2102、Y2105及びF2108から選択される1つ以上、例えば2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10又はそれを超える変異を含み、ここで、野生型アミノ酸は、任意の他の天然に存在するアミノ酸へ変異されている。一実施形態において、変異体FRBは、E2032に変異を含み、ここで、E2032は、フェニルアラニン（E2032F）、メチオニン（E2032M）、アルギニン（E2032R）、バリン（E2032V）、チロシン（E2032Y）、イソロイシン（E2032I）、例えば配列番号278又はロイシン（E2032L）、例えば配列番号279に変異されている。一実施形態において、変異体FRBは、T2098に変異を含み、ここで、T2098は、フェニルアラニン（T2098F）又はロイシン（T2098L）、例えば配列番号280に変異されている。一実施形態において、変異体FRBは、E2032及びT2098に変異を含み、ここで、E2032は、任意のアミノ酸に変異され、T2098は、任意のアミノ酸に変異され、例えば配列番号281である。一実施形態において、変異体FRBは、E2032I

及び T 2 0 9 8 L 変異を含み、例えば配列番号 2 8 2 である。一実施形態において、変異体 F R B は、E 2 0 3 2 L 及び T 2 0 9 8 L 変異を含み、例えば配列番号 2 8 3 である。

【 0 3 1 7 】

【表 4 7】

表 14. 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 F R B。

FRB 変異体	アミノ酸配列	配列番号
E2032I 変異体	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKG MFEVLEPLHAMMERGPQTLKET SFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRISKTS	278
E2032L 変異体	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKG MFEVLEPLHAMMERGPQTLKET SFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRISKTS	279
T2098L 変異体	ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKG MFEVLEPLHAMMERGPQTLKET SFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRISKTS	280
E2032, T2098 変異体	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKG MFEVLEPLHAMMERGPQTLKET SFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLXQAWDLYYHVFRISKTS, X は任意のアミノ酸残基	281
E2032I, T2098L 変異体	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKG MFEVLEPLHAMMERGPQTLKET SFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRISKTS	282
E2032L, T2098L 変異体	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKG MFEVLEPLHAMMERGPQTLKET SFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRISKTS	283

【 0 3 1 8 】

他の適当な二量体化スイッチは、G y r B - G y r B ベースの二量体化スイッチ、ジベレリンベースの二量体化スイッチ、タグ／バインダー二量体化スイッチ及びハロタグ／s n a p タグ二量体化スイッチを含む。本明細書に提供する手引きに従い、このようなスイッチ及び関連する二量体化分子は、当業者に明らかである。

【 0 3 1 9 】

二量体化分子

スイッチドメイン間の結合は、二量体化分子により促進される。二量体化分子存在下でのスイッチドメイン間の相互作用又は結合は、第 1 のスイッチドメインに結合、例えば融合したポリペプチドと、第 2 のスイッチドメインに結合、例えば融合したポリペプチドとの間のシグナル伝達を可能にする。非律速レベルの二量体化分子存在下で本明細書に記載のシステムにおいて測定して、シグナル伝達は、1. 1 倍、1. 2 倍、1. 3 倍、1. 4 倍、1. 5 倍、1. 6 倍、1. 7 倍、1. 8 倍、1. 9 倍、2 倍、5 倍、1 0 倍、5 0 倍、1 0 0 倍増加する。

【 0 3 2 0 】

ラパマイシン及びラパマイシン類似体（ラパログと称される場合もある）、例えば R A D 0 0 1 は、本明細書に記載の F K B P / F R B ベースの二量体化スイッチにおける二量体化分子として使用できる。一実施形態において、二量体化分子は、ラパマイシン（シロリムス）、R A D 0 0 1（エベロリムス）、ゾタロリムス、テムシロリムス、A P - 2 3 5 7 3（リダフォロリムス）、バイオリムス及び A P 2 1 9 6 7 から選択できる。F K B P / F R B ベースの二量体化スイッチで使用するのに適する更なるラパマイシン類似体は、「併用療法」と題される節又は「低い免疫増強用量の m T O R 阻害剤との組み合わせ」と題される節に更に記載する。

【 0 3 2 1 】

スプリット C A R

一実施形態において、C A R 発現細胞は、スプリット C A R を使用する。スプリット C A R アプローチは、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第 2 0 1 4 / 0 5 5 4 4

2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、CD3ゼータ）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。従って、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。実施形態において、第1の抗原結合ドメインは、BCMAを認識し、例えば本明細書に記載の抗原結合ドメインを含み、第2の抗原結合ドメインは、急性骨髄白血病細胞で発現される抗原、例えばCD123、CLL-1、CD34、FLT3又は葉酸受容体ベータを認識する。実施形態において、第1の抗原結合ドメインは、BCMAを認識し、例えば本明細書に記載の抗原結合ドメインを含み、第2の抗原結合ドメインは、B細胞で発現される抗原、例えばCD10、CD19、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179b又はCD79aを認識する。

【0322】

安定性及び変異

抗BCMA結合ドメイン、例えばscFv分子（例えば、可溶性scFv）の安定性を、慣用の対照scFv分子又は完全長抗体の生物物理学的特性（例えば、熱安定性）を参照して評価できる。

【0323】

抗BCMA結合ドメイン、例えばscFvの改善した熱安定性は、続いて、CART-BCMA構築物全体に貢献し、CART-BCMA構築物の治療的性質の改善に至る。抗BCMA結合ドメイン、例えばscFvの熱安定性は、慣用の抗体と比較して少なくとも約2℃又は3℃改善され得る。いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメイン、例えばscFvは、慣用の抗体に対して1℃改善された熱安定性を有する。別の実施形態において、抗BCMA結合ドメイン、例えばscFvは、慣用の抗体に対して2℃改善された熱安定性を有する。別の実施形態において、scFvは、慣用の抗体に対して4℃、5℃、6℃、7℃、8℃、9℃、10℃、11℃、12℃、13℃、14℃、15℃改善された熱安定性を有する。比較は、例えば、本明細書に開示されるscFv分子とscFv-VH及びVLが由来する抗体のscFv分子又はFabフラグメントとの間でなされ得る。熱安定性を、当技術分野で知られる方法を使用して測定できる。例えば、いくつかの実施形態において、Tmを測定できる。Tmを測定する方法及びタンパク質安定性を決定する他の方法は、下に更に詳細に記載する。

【0324】

scFvの変異（可溶性scFvのヒト化又は直接変異誘発により生じる）は、scFvの安定性を変化させ、scFv及びCART33構築物の全体的安定性を改善する。ヒトscFvの安定性は、Tm、変性温度及び凝集温度などの尺度を使用して、マウスscFvと比較することができる。

【0325】

変異体scFvの結合能は、実施例に記載のアッセイを使用して決定できる。

【0326】

いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメイン、例えばscFvは、変異scFvがCART-BCMA構築物の安定性改善を提供するように、ヒト化過程に由来する少なくとも1つの変異を含む。別の実施形態において、抗BCMA結合ドメイン、例えばscFvは、変異scFvがCART-BCMA構築物の安定性改善を提供するように、ヒト化過程に由来する少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10変異を含む。

【0327】

タンパク質安定性を評価する方法

抗原結合ドメインの安定性は、例えば、下記の方法を使用して評価され得る。このよう

な方法は、最小安定ドメインが最初に変性するか又は協調的に変性する多ドメイン単位（例えば、単一変性遷移を示す多ドメインタンパク質）の全体的安定性閾値を制限する、複数熱的変性遷移の決定を可能にする。最小安定ドメインを多数の異なる方法で同定できる。変異誘発を、いずれのドメインが全体的安定性を制限するか探索するために実施できる。更に、多ドメインタンパク質のプロテアーゼ抵抗性を、最小安定ドメインが本質的に変性することが知られる条件下でDSC又は他の分光学的方法により実施できる（Fontana, et al., (1997) Fold. Des., 2: R17-26; Dimasi et al. (2009) J. Mol. Biol. 393: 672-692）。最小安定ドメインが同定されたら、このドメインをコードする配列（又はその部分）を本方法における試験配列として用い得る。

【0328】

a) 熱安定性

組成物の熱安定性を、当技術分野で知られる多数の非限定的生物物理学的又は生化学的技術を使用して分析し得る。特定の実施形態において、熱安定性を分析的分光により評価する。

【0329】

分析的分光法の例は、示差走査熱量測定（DSC）である。DSCは、大部分のタンパク質又はタンパク質ドメインの変性に付随する熱吸収性に感受性である熱量計を用いる（例えば、Sanchez-Ruiz, et al., Biochemistry, 27: 1648-52, 1988を参照されたい）。タンパク質の熱安定性を決定するために、タンパク質サンプルを熱量計に入れ、Fab又はscFvが変性するまで温度を上げる。タンパク質が変性する温度が全体的タンパク質安定性の指標である。

【0330】

分析的分光法の別の例は、円二色性（CD）分光である。CD分光測定は、組成物の光学活性を温度上昇の関数として測定する。円二色性（CD）分光は、構造的な不斉に起因する左手側偏光対右手側偏光の吸収の差異を測定する。障害された又は変性した構造は、規則正しい又は折りたたまれた構造と極めて異なるCDスペクトルをもたらす。CDスペクトルは、温度上昇の変性効果に対するタンパク質の感受性を反映し、従ってタンパク質熱安定性の指標である（van Mierlo and Steemsma, J. Biotechnol., 79 (3): 281-98, 2000を参照されたい）。

【0331】

熱安定性を測定するための分析的分光法の別の例は、蛍光発光分光である（van Mierlo and Steemsma, 上掲を参照されたい）。熱安定性を測定するための分析的分光法の更に別の例は、核磁気共鳴（NMR）分光である（例えば、van Mierlo and Steemsma, 上掲を参照されたい）。

【0332】

組成物の熱安定性は、生化学的に測定できる。熱安定性を評価するための生化学的方法の例は、熱負荷アッセイである。「熱負荷アッセイ」において、組成物を、設定した一定期間、一定範囲の高温に付す。例えば、いくつかの実施形態において、試験scFv分子又はscFv分子を含む分子を例えば1～1.5時間、一定範囲の温度上昇に付す。その後、タンパク質の活性を、関連する生化学的アッセイによりアッセイする。例えば、タンパク質が結合タンパク質（例えば、scFv又はscFv含有ポリペプチド）である場合、結合タンパク質の結合活性を機能的又は定量的ELISAにより決定できる。

【0333】

このようなアッセイは、ハイスループット形式で実施でき、大腸菌（E. coli）及びハイスループットスクリーニングを使用する実施例に開示のものである。抗BCMA結合ドメイン（例えば、scFv変異体）のライブラリは、当技術分野で公知の方法を使用して作成され得る。抗BCMA結合ドメイン、例えばscFvの発現が誘導され得、抗BCMA結合ドメイン、例えばscFvは、熱負荷に供され得る。負荷試験サンプルは、結合についてアッセイでき、安定である抗BCMA結合ドメイン、例えばscFvは、スケ

10

20

30

40

50

ールアップされ、更に特徴付けされ得る。

【0334】

熱安定性を、上記技術のいずれかを使用して、組成物の融解温度 (T_m) を測定することにより評価する (例えば、分析的分光技術)。融解温度は、組成物の分子の50%が折りたたまれた状態である、温度遷移曲線の中点の温度である (例えば、Dimasi et al. (2009) J. Mol Biol. 393: 672-692を参照されたい)。

いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメイン、例えばscFvの T_m 値は、約40°C、41°C、42°C、43°C、44°C、45°C、46°C、47°C、48°C、49°C、50°C、51°C、52°C、53°C、54°C、55°C、56°C、57°C、58°C、59°C、60°C、61°C、62°C、63°C、64°C、65°C、66°C、67°C、68°C、69°C、70°C、71°C、72°C、73°C、74°C、75°C、76°C、77°C、78°C、79°C、80°C、81°C、82°C、83°C、84°C、85°C、86°C、87°C、88°C、89°C、90°C、91°C、92°C、93°C、94°C、95°C、96°C、97°C、98°C、99°C、100°Cである。いくつかの実施形態において、IgGの T_m 値は、約40°C、41°C、42°C、43°C、44°C、45°C、46°C、47°C、48°C、49°C、50°C、51°C、52°C、53°C、54°C、55°C、56°C、57°C、58°C、59°C、60°C、61°C、62°C、63°C、64°C、65°C、66°C、67°C、68°C、69°C、70°C、71°C、72°C、73°C、74°C、75°C、76°C、77°C、78°C、79°C、80°C、81°C、82°C、83°C、84°C、85°C、86°C、87°C、88°C、89°C、90°C、91°C、92°C、93°C、94°C、95°C、96°C、97°C、98°C、99°C、100°Cである。

いくつかの実施形態において、多価抗体の T_m 値は、約40°C、41°C、42°C、43°C、44°C、45°C、46°C、47°C、48°C、49°C、50°C、51°C、52°C、53°C、54°C、55°C、56°C、57°C、58°C、59°C、60°C、61°C、62°C、63°C、64°C、65°C、66°C、67°C、68°C、69°C、70°C、71°C、72°C、73°C、74°C、75°C、76°C、77°C、78°C、79°C、80°C、81°C、82°C、83°C、84°C、85°C、86°C、87°C、88°C、89°C、90°C、91°C、92°C、93°C、94°C、95°C、96°C、97°C、98°C、99°C、100°Cである。

【0335】

熱安定性は、分析的熱量測定技術 (例えば、DSC) を使用して組成物の比熱又は熱容量 (C_p) を測定することによっても評価する。組成物の比熱は、1molの水の温度を1°C上げるのに必要なエネルギー (例えば、kcal/mol) である。大きい C_p は、変性又は不活性タンパク質組成物の特徴である。組成物の熱容量 (ΔC_p) の変化を温度遷移前後の組成物の比熱の決定により測定する。熱安定性は、変性のギブズ自由エネルギー (ΔG)、変性のエンタルピー (ΔH) 又は変性のエントロピー (ΔS) を含む熱力学的安定性の他のパラメータの測定又は決定によっても評価され得る。上記生化学的アッセイ (例えば、熱負荷アッセイ) の1つ以上を使用して、組成物の50%がその活性 (例えば、結合活性) を保持する温度 (即ち T_c 値) を決定する。

【0336】

更に、抗BCMA結合ドメイン、例えばscFvへの変異は、未変異の抗BCMA結合ドメイン、例えばscFvと比較して、抗BCMA結合ドメイン、例えばscFvの熱安定性を変化させる。ヒト又はヒト化抗BCMA結合ドメイン、例えばscFvがBCMA構築物に組み込まれる場合、抗BCMA結合ドメイン、例えばヒト化scFvは、抗BCMA CART構築物全体に熱安定性を与える。いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメイン、例えばscFvは、抗BCMA結合ドメイン、例えばscFvに熱安定性を与える単一の変異を含む。別の実施形態において、抗BCMA結合ドメイン、例えばscFvは、抗BCMA結合ドメイン、例えばscFvに熱安定性を与える複数の変異を含む。いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメイン、例えばscFvにおける複数の変異は、抗BCMA結合ドメイン、例えばscFvの熱安定性に対して相加効果を有する。

【0337】

b) 凝集%

組成物の安定性は、その凝集傾向の測定により決定できる。凝集は、多数の非限定的生化学的又は生物物理学的技術により測定できる。例えば、組成物の凝集は、クロマトグラフィー、例えばサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）を使用して評価し得る。SECは、サイズに基づき分子を分ける。カラムを、イオン及び小分子を内側に入れるが、大きいものが入れないポリマーゲルの半固体ビーズで満たす。タンパク質組成物をカラムの上部に適用したとき、小型の折りたたまれたタンパク質（即ち非凝集タンパク質）は、大タンパク質凝集が利用可能であるより大量の溶媒に分散される。その結果、大きい凝集体は、カラムをより速く移動し、この方法で混合物をその要素に分離又は分画できる。各フラクションは、ゲルから溶出するに連れて別々に定量できる（例えば、光散乱による）。従って、組成物の凝集%を、フラクションの濃度と、ゲルに適用したタンパク質の総濃度との比較により決定できる。安定組成物は、本質的に単一フラクションとしてカラムから溶出し、溶出プロファイル又はクロマトグラムにおいて本質的に単一ピークとして見える。

【0338】

c) 結合親和性

組成物の安定性をその標的結合親和性の決定により評価できる。決定結合親和性のための広範な方法が当技術分野で知られる。結合親和性を決定するための方法の例は、表面プラズモン共鳴を用いる。表面プラズモン共鳴は、例えば、BIAcoreシステム（Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N. J.）を使用する、バイオセンサーマトリックス内のタンパク質濃度の変化の検出により実時間生体分子特異的相互作用の分析を可能にする光学的現象である。更なる記載については、Jonsson, U., et al. (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26; Jonsson, U., i (1991) *Biotechniques* 11:620-627; Johnsson, B., et al. (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131; 及び Johnsson, B., et al. (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277を参照されたい。

【0339】

一態様において、CARの抗原結合ドメインは、本明細書に記載の抗原結合ドメインアミノ酸配列と相同であるアミノ酸配列を含み、抗原結合ドメインは、本明細書に記載の抗BCMA抗体フラグメントの所望の機能的特性を保持する。特定の一態様において、本発明のCAR組成物は、抗体フラグメントを含む。更なる態様において、その抗体フラグメントは、scFvを含む。

【0340】

種々の態様において、CARの抗原結合ドメインは、一方又は両方の可変領域（例えば、VH及び／又はVL）内、例えば1つ以上のCDR領域内及び／又は1つ以上のフレームワーク領域の1つ以上のアミノ酸の修飾により操作される。特定の一態様において、本発明のCAR組成物は、抗体フラグメントを含む。更なる態様において、その抗体フラグメントは、scFvを含む。

【0341】

本発明の抗体又は抗体フラグメントは、アミノ酸配列が（例えば、野生型から）異なるように更に修飾され得るが、所望の活性は、修飾されないことが当業者に理解される。例えば、更なるヌクレオチド置換、例えばアミノ酸置換をもたらず保存的置換、例えば「非必須」アミノ酸残基での保存的置換をタンパク質に対して行い得る。例えば、分子における非必須アミノ酸残基を同じ側鎖ファミリーからの別のアミノ酸残基で置き換え得る。別の実施形態において、一連のアミノ酸を、側鎖ファミリーメンバーの順番及び／又は組成が異なる構造的に類似する一連のもので置き換えることができ、例えばアミノ酸残基が類似側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられた保存的置換をなし得る。

【0342】

塩基性側鎖（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパ

10

20

30

40

50

ラギン酸、グルタミン酸)、非電荷極性側鎖(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖(例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、ベータ分枝側鎖(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)を含む、類似側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野で定義されている。

【0343】

2つ以上の核酸又はポリペプチド配列に関連して、同一性パーセントは、同じである2つ以上の配列を指す。2配列は、次の配列比較アルゴリズムの1つを使用して測定される又は手動アラインメント及び目視により、比較窓又は指定領域にわたり、最大対応を比較及びアラインしたとき、同じであるアミノ酸残基又はヌクレオチドの特定パーセントを有する場合、「実質的に同一」である(特定領域又は特定されていないとき、配列全体にわたり、例えば60%の同一性、任意選択により70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の同一性)。任意選択により、同一性は、少なくとも約50ヌクレオチド(又は10アミノ酸)長の領域又はより好ましくは100~500又は1000又はそれを超えるヌクレオチド(又は20、50、200又はそれを超えるアミノ酸)長の領域にわたり同一性が存在する。

【0344】

配列比較のために、典型的には1配列が対照配列としての役割を果たし、それに対して試験配列を比較する。配列比較アルゴリズムを使用するとき、試験及び対照配列をコンピューターに入力し、必要に応じて部分配列座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。デフォルトプログラムパラメータを使用できるか又は代替パラメータを指定できる。次いで、配列比較アルゴリズムは、プログラムパラメータに基づき、対照配列に対する試験配列の配列同一性パーセントを計算する。比較のために配列をアラインメントする方法は、当技術分野で周知である。比較のための配列の最適アラインメントは、例えば、Smith and Waterman, (1970) Adv. Appl. Math. 2: 482の局所相同性アルゴリズム、Needleman and Wunsch, (1970) J. Mol. Biol. 48: 443の相同性アラインメントアルゴリズム、Pearson and Lipman, (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444のサーチのための類似法、これらのアルゴリズムのコンピューターによる実行(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WIにおけるGAP、BESTFIT、FASTA及びTFASTA)又は手動アラインメント及び目視(例えば、Brent et al., (2003) Current Protocols in Molecular Biologyを参照されたい)により実施できる。

【0345】

配列同一性及び配列類似性パーセントの決定に適するアルゴリズムの2つの例は、BLAST及びBLAST 2.0アルゴリズムであり、これらは、それぞれAltschul et al., (1977) Nuc. Acids Res. 25: 3389-3402; 及びAltschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410に記載されている。BLAST解析を実施するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Informationから公的に入手可能である。

【0346】

2アミノ酸配列間の同一性パーセントは、PAM120荷重残基表、ギャップ長ペナルティ12及びギャップペナルティ4を使用して、ALIGNプログラム(バージョン2.0)に取り込まれているE. Meyers and W. Miller, ((1988) C

omput. Appl. Biosci. 4:11-17) アルゴリズムを使用しても決定できる。加えて、2アミノ酸配列間の同一性パーセントは、Blossom 62マトリックス又はPAM250マトリックス及びギャップ荷重16、14、12、10、8、6又は4及び長さ荷重1、2、3、4、5又は6を使用する、GCGソフトウェアパッケージ(www.gcg.comで利用可能)のGAPプログラムに取り込まれているNeedleman and Wunsch((1970) J. Mol. Biol. 48:444-453) アルゴリズムを使用して決定できる。

【0347】

一態様において、本発明は、機能的に均等な分子を産生する出発抗体又はフラグメント(例えば、scFv)アミノ酸配列の修飾を企図する。例えば、CARに含まれる抗BCMA結合ドメイン(例えば、scFv)のVH又はVLは、抗BCMA結合ドメイン(例えば、scFv)の出発VH又はVLフレームワーク領域の少なくとも約70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の同一性を保持するように修飾することができる。本発明は、機能的に均等な分子を産生するための、CAR構築物全体の修飾、例えばCAR構築物における種々のドメインの1つ以上のアミノ酸配列における修飾を企図する。CAR構築物は、出発CAR構築物の少なくとも約70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の同一性を保持するように修飾され得る。

【0348】

CARをコードする核酸構築物

本発明は、本明細書に記載の1つ以上のCAR構築物をコードする核酸分子も提供する。一態様において、核酸分子は、メッセンジャー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。

【0349】

従って、一態様において、本発明は、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする単離核酸分子に関し、ここで、CARは、抗BCMA結合ドメイン(例えば、ヒト抗BCMA結合ドメイン)、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及び／又は一次シグナル伝達ドメイン、例えばゼータ鎖を含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、本明細書に記載の抗BCMA結合ドメイン又はそれを95~99%同定する配列である。いくつかの実施形態において、膜貫通ドメインは、T細胞受容体のアルファ鎖、ベータ鎖又はゼータ鎖、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137及びCD154からなる群から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインである。いくつかの実施形態において、抗BCMA結合ドメインは、膜貫通ドメインにヒンジ領域、例えば本明細書に記載のヒンジによって接続される。いくつかの実施形態において、単離核酸分子は、一次シグナル伝達ドメインをコードする配列を更に含む。いくつかの実施形態において、一次シグナル伝達ドメインは、CD3ゼータ、TCRゼータ、FcRガンマ、FcRベータ、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278(ICOS)、FcεRI、DAP10、DAP12又はCD66dに由来する機能的シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態において、単離核酸分子は、共刺激ドメインをコードする配列を更に含む。一部の実施形態において、共刺激性ドメインは、例えば、MHCクラスI分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ性活性化分子(SLAMタンパク質)、活性化NK細胞受容体、BTLA、Tollリガンド受容体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS

、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、4-1BB (CD137)、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS (CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM (LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、Nkp80 (KLRF1)、Nkp44、Nkp30、Nkp46、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL2Rベータ、IL2Rガンマ、IL7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a及びCD83と特異的に結合するリガンドからなる群から選択されるタンパク質の機能的シグナル伝達ドメインである。

【0350】

別の態様において、本発明は、配列番号1のリーダー配列を含むCAR構築物をコードする単離核酸分子に関する。

【0351】

別の態様において、本発明は、核酸分子によりコードされる単離ポリペプチド分子に関する。

【0352】

所望の分子をコードする核酸配列は、標準技術を使用して、例えば遺伝子を発現する細胞からのライブラリのスクリーニングにより、それを含むことが知られるベクターからの遺伝子を誘導化することにより又はそれを含むことが知られる細胞及び組織から直接単離することによるような、組み換え当技術分野で知られる方法を使用して得ることができる。代わりに、目的の遺伝子をクローン化ではなく合成により産生できる。

【0353】

本発明は、本発明のDNA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、ガンマレトロウイルスベクターでもあり得る。ガンマレトロウイルスベクターは、例えば、プロモーター、パッケージングシグナル (ψ)、プライマー結合部位 (PBS)、1つ以上の (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。ガンマ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。例示的なガンマ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 (SFV) 及び骨髄増殖性肉腫ウイルス (MPSV) 及びそれら由来のベクターを含む。他のガンマレトロウイルスベクターは、例えば、Tobias Maetzig et al., "Gamma retroviral Vectors: Biology, Technology and Application" Viruses. 2011 Jun; 3 (6): 677-713に記載される。

【0354】

別の実施形態において、所望の本発明の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

10

20

30

40

50

る核酸の発現は、*sleeping beauty*、CRISPR、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。

【0355】

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

【0356】

本発明の構築物の発現は、標準遺伝子送達プロトコルを使用する核酸免疫化及び遺伝子治療にも使用し得る。遺伝子送達のための方法が当技術分野で知られている。例えば、参照によりその全体が本明細書に援用される米国特許第5,399,346号明細書、同第5,580,859号明細書、同第5,589,466号明細書を参照されたい。別の実施形態において、本発明は、遺伝子治療ベクターを提供する。

【0357】

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。

20

【0358】

更に、発現ベクターは、ウイルスベクターの形態で細胞に提供され得る。ウイルスベクター技術は、当技術分野で周知であり、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）。

30

【0359】

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、当技術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、組み換えウイルスが単離され、対象の細胞にインビボ又はエクスピボで送達され得る。多数のレトロウイルス系が当技術分野で知られている。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技術分野で知られている。一部の実施形態において、レンチウイルスベクターを使用する。

40

【0360】

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、多くの場合、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

50

機能できるように見える。

【0361】

哺乳動物T細胞においてCAR導入遺伝子の発現ができるプロモーターの例は、EF1aプロモーターである。天然EF1aプロモーターは、アミノアシルtRNAのリボソームへの酵素送達を担う伸長因子-1複合体のαサブユニットの発現を駆動する。EF1aプロモーターは、哺乳動物発現プラスミドで広く使用されており、レンチウイルスベクターにクローン化された導入遺伝子から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、EF1aプロモーターは、配列番号11として提供される配列を含む。

10

【0362】

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活性化し、発現が望まれないときに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。

20

【0363】

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、例えば1つ、2つ、5つ、10、100、200、300又は400のヌクレオチド欠失を有するPGKプロモーター)が望ましいことがある。PGKプロモーター例のヌクレオチド配列を下に提供する。

30

WT PGKプロモーター

【化4】

```
ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTCCGAACG
TCTTACGCCTTGTGGCGCCCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGATGGCGGGGTGTCGGGGCGCAGGGCGTC
GCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCCGCGCGGGGACGACTCGTCCGGCGATAACCGGTGTTCGGGTAGCG
CCAGCCGCGCGACGGTAACGAGGGGACCGCGACAGGCAGACGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAA
CCCAATAGTGCACGCCCGTGGCGCGCTTGGCGTTCCCTTGGAAAGCGCTGAATCCCCCGCCTCGTCCCTC
GCAGCGGCCCCCGGGTGTTCCTATCGCCGCTTCTAGGCCCACTGCGACGCTTGCCTGCACTTCTTA
CACGCTCTGGGTCCCAGCCCGCGCGACGCAAGGGCCCTTGCTCCCGCTCTCGTCCGGCGCAGGGACCG
CTTGGGTCCCCGACGCAACCTTTTCGGCGTTGGCGCTTGGGGCACCATAAAGCT (配列番号190)
```

40

例示的な切断型PGKプロモーター：

PGK100：

【化5】

```
ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTCCGAACG
TCTTACGCCTTGTGGCGCCCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGATGGCGGGGTG (配列番号198)
```

50

P G K 2 0 0 :**【化 6】**

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTCCGAACG
TCTTACGCCCTTGTGGCGCCCCCTCCTTGTCCCGGGTGTGATGGCGGGGTGTCCCGCCGACGGCCGTG
GCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCCGCGCGGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTCGGGTAGCG
CCAGCCGCGCGACGGTAAACG (配列番号191)

P G K 3 0 0 :**【化 7】**

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTCCGAACG
TCTTACGCCCTTGTGGCGCCCCCTCCTTGTCCCGGGTGTGATGGCGGGGTGTCCCGCCGACGGCCGTG
GCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCCGCGCGGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTCGGGTAGCG
CCAGCCGCGCGACGGTAAACGAGGGACCGCGACAGGCAGACGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAA
GCCAAATAGTGCAGGCCGTGCGCGCTTCCGCTTCTTGAAGGGCTGAATCCCCG (配列番号192)

P G K 4 0 0 :**【化 8】**

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTCCGAACG
TCTTACGCCCTTGTGGCGCCCCCTCCTTGTCCCGGGTGTGATGGCGGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTG
CCGCGCAACGGCCCGCCACGACAGCCCGCCCGGACCACTCCTCGGCCATAACCGGTCTCCGCTAGCC
CCAGCCGCGCGACGGTAAACGAGGGACCGCGACAGGCAGACGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAA
GGCAAAATAGTGCAGGCCGTGCGCGCTTGGCGTTCCCTTGAAGGGCTGAATCCCCGCTCGTCCCTC
CCAGCCGCCCCCGGGTGTTCCTATCGCGCTTCTAGGCCCACTGCGACGCTTGCCTGCACTTCTTA
CACGCTCTGGGTCCCAGCCG (配列番号193)

【 0 3 6 4 】

ベクターは、例えば、分泌を促進するためのシグナル配列、ポリアデニル化シグナル及び転写ターミネーター（例えば、ウシ成長ホルモン（B G H）遺伝子から）、エピソーム複製及び原核生物における複製を可能にする要素（例えば、S V 4 0 起源及びC o l E 1 又は当技術分野で知られる他のもの）及び／又は選択を可能にする要素（例えば、アンピシリン耐性遺伝子及び／又はゼオシンマーカー）も含み得る。

【 0 3 6 5 】

C A R ポリペプチド又はその一部の発現を評価するために、細胞に導入する発現ベクター遺伝子導入又はウイルスベクターによる感染が探求される細胞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方を含み得る。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。

【 0 3 6 6 】

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 . , 2 0 0 0 F E B S L e t t e r s 4 7 9 : 7 9 - 8 2 ）。適当な発現系は、周知であり、既知技術により製造できるか

10

20

30

40

50

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'フランキンク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され得る。

【0367】

いくつかの実施形態において、ベクターは、第2のCARをコードする核酸を更に含む。いくつかの実施形態において、第2のCARは、例えば、CD123、CD34、CLL-1、葉酸受容体ベータ若しくはFLT3など、急性骨髄白血病細胞に発現される標的；又はB細胞上に発現される標的、例えばCD10、CD19、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179b若しくはCD79aに対する抗原結合ドメインを含む。いくつかの実施形態において、ベクターは、第1の抗原に特異的に結合し、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をコードする核酸配列を含み、第2の異なる抗原に特異的に結合し、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CARをコードする核酸配列を含む。いくつかの実施形態において、ベクターは、BCMA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BCMA CARをコードする核酸及びBCMA以外の抗原（例えば、AML細胞に発現される抗原、例えばCD123、CD34、CLL-1、葉酸受容体ベータ若しくはFLT3；又はB細胞上に発現される抗原、例えばCD10、CD19、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179b若しくはCD79a）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をコードする核酸を含む。別の実施形態において、ベクターは、BCMA結合ドメイン、膜貫通ドメイン及び一次シグナル伝達ドメインを含む第1のBCMA CARをコードする核酸及びBCMA以外の抗原（例えば、AML細胞に発現される抗原、例えばCD123、CD34、CLL-1、葉酸受容体ベータ若しくはFLT3；又はB細胞上に発現される抗原、例えばCD10、CD19、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179b若しくはCD79a）に特異的に結合し、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CARをコードする核酸を含む。

【0368】

一部の実施形態において、ベクターは、本明細書に記載のBCMA CARをコードする核酸及び阻害性CARをコードする核酸を含む。一部の実施形態において、阻害性CARは、正常細胞、例えばまたBCMAを発現する正常細胞で見られるが、癌細胞で見られない抗原と結合する抗原結合ドメインを含む。一部の実施形態において、阻害性CARは、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン及び阻害分子の細胞内ドメインを含む。例えば、阻害性CARの細胞内ドメインは、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM（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TGFRβの細胞内ドメインであり得る。

【0369】

実施形態において、ベクターは、CARをコードする2つ以上の核酸配列、例えば本明細書に記載のBCMA CAR及び第2のCAR、例えば阻害性CAR又はBCMA以外の抗原（例えば、AML細胞に発現する抗原、例えばCD123、CLL-1、CD34、FLT3若しくは葉酸受容体ベータ；又は抗原発現B細胞、例えばCD10、CD19、CD20、CD22、CD34、CD123、FLT-3、ROR1、CD79b、CD179b又はCD79a）に特異的に結合するCARを含み得る。このような実施形態において、2つ以上の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

により且つ単一の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つ以上の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）。ペプチド開裂部位の例は、次のものを含み、ここで、GSG残基は、任意選択である。

T2A: (GSG) E G R G S L L T C G D V E E N P G P
(配列番号194)

P2A: (GSG) A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P
(配列番号195)

E2A: (GSG) Q C T N Y A L L K L A G D V E S N P G P
(配列番号196)

F2A: (GSG) V K Q T L N F D L L K L A G D V E S N P G P
(配列番号197)

【0370】

細胞に遺伝子を導入し、発現させる方法は、当技術分野で知られている。発現ベクターに関連して、ベクターは、当技術分野の任意の方法により、宿主細胞、例えば哺乳動物、細菌、酵母又は昆虫細胞に容易に導入できる。例えば、発現ベクターは、物理的、化学的又は生物学的手段により、宿主細胞に移入され得る。

【0371】

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、当技術分野で周知である。例えば、Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NYを参照されたい。宿主細胞へのポリヌクレオチドの導入に好ましい方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションである。

【0372】

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。

【0373】

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。

【0374】

非ウイルス送達系を利用する場合、代表的送達媒体は、リポソームである。脂質製剤の使用は、宿主細胞への核酸の導入のために意図される（インビトロ、エクスピボ又はインビボ）。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方と結合する連結分子を介するリポソームへの結合、リポソームへの封入、リポソームとの複合体化、脂質含有溶液への分散、脂質との混合、脂質との組み合わせ、脂質中の懸濁液としての包含、ミセル内への包含又は複合体化又は他の方法で脂質と結合する。脂質、脂質／DNA又は脂質／発現ベクター結合組成物は、溶液中の何らかの特定の構造に限定されない。例えば、それらは、二重層構造において、ミセルとして又は「崩壊」構造を有して存在し得る。それらは、単に溶液に分散され、恐らくサイズ又は形状

10

20

30

40

50

が均一ではない凝集体も形成し得る。脂質は、天然に存在する又は合成脂質であり得る脂肪物質である。例えば、脂質は、細胞質に天然に生じる脂肪滴並びに脂肪酸、アルコール、アミン、アミノアルコール及びアルデヒドなどの長鎖脂肪族炭化水素を含む化合物群及びその誘導体を含む。

【0375】

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得る。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の間に封入する（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。

【0376】

外来性核酸を宿主細胞に導入するか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み換えDNA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。

【0377】

本発明は、CARコード化核酸分子を含むベクターを更に提供する。一態様において、CARベクターを細胞、例えばT細胞又はNK細胞に直接形質導入し得る。一態様において、ベクターは、クローニング又は発現ベクター、例えば1つ以上のプラスミド（例えば、発現プラスミド、クローニングベクター、ミニサークル、ミニベクター、二重微小染色体）、レトロウイルス及びレンチウイルスベクター構築物を含むが、これらに限定されないベクターである。一態様において、ベクターは、哺乳動物T細胞又はNK細胞においてCAR構築物の発現ができる。一態様において、哺乳動物T細胞は、ヒトT細胞である。一態様において、哺乳動物NK細胞は、ヒトNK細胞である。

【0378】

RNAトランスフェクション

インビトロで転写されたRNA CARを産生する方法が本明細書に開示される。本発明は、細胞に直接トランスフェクトできるRNA構築物をコードするCARも含む。トランスフェクションに使用するためのmRNAを産生する方法は、特異的に設計したプライマーを用いる鋳型のインビトロ転写（IVT）、続くポリA付加を含み、3'及び5'非翻訳配列（「UTR」）、5'キャップ及び／又は配列内リボソーム進入部位（IRES）、発現される核酸及びポリAテイルを含む構築物、典型的には50～2000塩基長（配列番号35）を産生し得る。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。一態様において、鋳型は、CARの配列を含む。

【0379】

一態様において、抗BCMA CARは、メッセンジャーRNA (mRNA) によってコードされている。一態様において、抗BCMA CARをコードするmRNAは、CAR発現細胞（例えば、CAR T細胞又はCAR発現NK細胞）の産生のために、免疫エフェクター細胞、例えばT細胞又はNK細胞に導入される。

【0380】

いくつかの実施形態において、インビトロ転写RNA CARを一過性トランスフェクションの形態で細胞に導入できる。RNAは、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 産生鑄型を使用するインビトロ転写により産生される。任意の供給源からの目的のDNAを、適切なプライマー及びRNAポリメラーゼを使用してインビトロmRNA合成のための鑄型にPCRにより直接変換できる。DNAの供給源は、例えば、ゲノムDNA、プラスミドDNA、ファージDNA、cDNA、合成DNA配列又はDNAのあらゆる他の適切な供給源であり得る。インビトロ転写のための所望の鑄型は、本発明のCARである。例えば、RNA CARの鑄型は、抗腫瘍抗体の単鎖可変ドメインを含む細胞外領域；ヒンジ領域、膜貫通ドメイン（例えば、CD8aの膜貫通ドメイン）；並びに細胞内シグナル伝達ドメイン、例えばCD3-ゼータ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。

【0381】

いくつかの実施形態において、PCRに使用するDNAは、オープンリーディングフレームを含む。DNAは、生物のゲノムからの天然に存在するDNA配列由来であり得る。いくつかの実施形態において、核酸は、5'及び／又は3'非翻訳領域 (UTR) のいくらか又は全てを含み得る。核酸は、エクソン及びイントロンを含み得る。いくつかの実施形態において、PCRに使用するDNAは、ヒト核酸配列である。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、代替的に、天然に存在する生物で通常発現されない人工DNA配列であり得る。例示的な人工DNA配列は、融合タンパク質をコードするオープンリーディングフレームを形成するように一緒にライゲートされた遺伝子の部分を含むものである。一緒にライゲートされたDNAの部分は、単一生物由来又は2つ以上の生物由来であり得る。

【0382】

PCRを使用して、トランスフェクションに使用するmRNAのインビトロ転写のための鑄型を産生する。PCRを実施する方法は、当技術分野で周知である。PCRにおいて使用するプライマーは、PCRのための鑄型として使用するDNAの領域に実質的に相補的である領域を有するように設計する。本明細書で使用する「実質的に相補的」は、プライマー配列の残基の大部分又は全てが相補的である又は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、意図されるDNA標的とアニール又はハイブリダイズできる。プライマーは、DNA鑄型の任意の部分と実質的に相補的であるように設計できる。例えば、プライマーは、5'及び3'UTRを含む、細胞において通常転写される（オープンリーディングフレーム）核酸の部分を増幅するように設計できる。プライマーは、目的の特定のドメインをコードする核酸の部分を増幅するようにも設計できる。いくつかの実施形態において、プライマーは、5'及び3'UTRの全て又は一部を含むヒトcDNAのコーディング領域を増幅するように設計される。PCRに有用なプライマーは、当技術分野で周知の合成法により産生できる。「フォワードプライマー」は、増幅するDNA配列の上流であるDNA鑄型上にヌクレオチドに対して実質的に相補的であるヌクレオチドの領域を含むプライマーである。「上流」は、コード鎖に対して、増幅するDNA配列に対する5'位を指すために本明細書で使用する。「リバースプライマー」は、増幅するDNA配列の下流である、二本鎖DNA鑄型に対して実質的に相補的なヌクレオチドの領域を含むプライマーである。「下流」は、コード鎖に対して、増幅するDNA配列に対する3'位を指すために本明細書で使用する。

【0383】

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、多数の業者から市販されている。

【0384】

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。RNAは、好ましくは、5'及び3'UTRを有する。いくつかの実施形態において、5'UTRは、1〜3000ヌクレオチド長である。コーディング領域に付加する5'及び3'UTR配列の長さは、UTRの異なる領域をアニールするPCRのためのプライマーの設計を含むが、これに限定されない、異なる方法により変わり得る。このアプローチを使用して、当業者は、転写RNAのトランスフェクション後、最適翻訳効率を達成するのに必要な5'及び3'UTR長を修飾できる。

10

【0385】

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。代替的に、目的の核酸に対して内在性ではないUTR配列を、フォワード及びリバースプライマーへのUTR配列の取り込みにより又は鑄型の任意の他の修飾により付加できる。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ることが知られる。従って、3'UTRを、当技術分野で周知であるUTRの特性に基づき、転写されたRNAの安定性を増加するように選択及び設計できる。

【0386】

20

いくつかの実施形態において、5'UTRは、内在性核酸のKozak配列を含み得る。代替的に、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はできるが、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類似体を、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。

【0387】

30

遺伝子クローニングの必要性なしにDNA鑄型からのRNAの合成を可能にするために、転写のプロモーターは、転写する配列の上流のDNA鑄型に結合すべきである。RNAポリメラーゼのプロモーターとして機能する配列がフォワードプライマーの5'末端に付加されたとき、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。好ましい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。

【0388】

40

好ましい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)テイルの両方にキャップを有する。環状DNA鑄型、例えばプラスミドDNA上で、RNAポリメラーゼは両者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ない正常サイズのmRNAを生じる。

【0389】

直鎖状DNA鑄型で、ファージT7 RNAポリメラーゼは両者鑄型の最後の塩基を越えて転写物の3'末端を伸長できる (Schenborn and Mierendorf, Nuc Acids Res., 13:6223-36 (1985); Nacheva

50

and Berzal-Herranz, Eur. J. Biochem., 270:1485-65 (2003))。

【0390】

DNA 鋳型へのポリ A/T 伸長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、クローニング工程が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。これは、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。

10

【0391】

転写 DNA 鋳型のポリ A/T セグメントは、100 T テイルなどのポリ T テイルを含むリバースプライマーを使用する PCR 中 (配列番号 31) (サイズは 50~5000 T であり得る (配列番号 32)) 又は DNA ライゲーション又はインビトロ組み換えを含むが、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) テイルはまた、RNA に安定性を提供し、その分解を減らす。一般に、ポリ (A) テイルの長さは、転写された RNA の安定性と正に相関する。いくつかの実施形態において、ポリ (A) テイルは、100~5000 アデノシンである (配列番号 33)。

【0392】

RNA のポリ (A) テイルは、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。いくつかの実施形態において、ポリ (A) テイルの 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 類似体は、ポリ (A) ポリメラーゼを使用してポリ (A) テイルに取り込まれ得る。ATP 類似体は、RNA の安定性を更に高め得る。

20

【0393】

5' キャップも RNA 分子に安定性を提供する。好ましい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))。

30

【0394】

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ウイルス、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、細胞エレクトロポレーションに適した任意の溶質が含まれ得る。

40

【0395】

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、エレクトロポレーション (Amaxa Nucleofector-II (Amaxa Biosystems, Cologne, Germany))、(ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.)) 又は Gene Pulser II (BioRad, Denver, Colo.)、Multiporator (Eppendorf, Hamburg Germany)、リポフェクションを使用するカチオン性リボソーム媒介トランスフェクション

50

、ポリマー封入、ペプチド媒介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。
【0396】

非ウイルス送達方法

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。

【0397】

一実施形態において、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片、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片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片である。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

10

【0398】

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. 122. 3 (2005) : 473-83（これらは、全て参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

20

【0399】

SBTSは、2つの成分：1）導入遺伝子を含むトランスポゾン及び2）トランスポサ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、Aronovich et al. 上掲を参照されたい。

30

【0400】

例示的なトランスポゾンは、pT2ベースのトランスポゾンを含む。例えば、全て参照により本明細書に組み込まれるGrabundzija et al. Nucleic Acids Res. 41. 3 (2013) : 1829-47; 及びSingh et al. Cancer Res. 68. 8 (2008) : 2961-2971を参照されたい。

例示的なトランスポサアーゼは、Tc1／mariner型トランスポサアーゼ、例えばSB10トランスポサアーゼ又はSB11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Aronovich et al. ; Kebriaei et al. ; 及びGrabundzija et al. を参照されたい。

40

【0401】

SBTSの使用は、導入遺伝子、例えば本明細書に記載のCARをコードする核酸の効率的組込み及び発現を可能にする。例えば、SBTSなどのトランスポゾン系を使用する、本明細書に記載のCARを安定に発現する細胞、例えばT細胞又はNK細胞を産生する方法が本明細書に提供される。

【0402】

50

本明細書に記載の方法により、ある実施形態において、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NK細胞）。例えば、核酸は、核酸（例えば、プラスミドDNA）送達の標準法、例えば本明細書に記載の方法、例えばエレクトロポレーション、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CAR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CARをコードする核酸）を含むトランスポゾン並びにトランスポサゼ酵素をコードする核酸配列を含む。他の実施形態において、例えばデュアルプラスミド系、例えば第1のプラスミドが導入遺伝子を含むトランスポゾンを含み、第2のプラスミドがトランスポサゼ酵素をコードする核酸配列を含む2核酸の系が提供される。例えば、第1及び第2の核酸は、宿主細胞に共送達される。

10

【0403】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載のCARを発現する細胞、例えばT細胞又はNK細胞は、ヌクレアーゼ（例えば、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写アクティベータ様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、CRISPR/Cas系又は操作されたメガヌクレアーゼ再操作ホーミングエンドヌクレアーゼ）を使用する、S B T S及び遺伝子編集を用いる遺伝子挿入の組み合わせを使用して産生される。

【0404】

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NK細胞の再プログラミング及び対象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。

20

【0405】

細胞の供給源

増殖及び遺伝的改変又は他の改変前に細胞、例えば免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）の供給源を対象から得ることができる。用語「対象」は、免疫応答が惹起できる生存生物（例えば、哺乳動物）を含むことを意図する。対象の例は、ヒト、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、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位からの組織、腹水、胸水、脾臓組織及び腫瘍を含む多数の供給源から得ることができる。

30

【0406】

本発明の一態様において、当技術分野で利用可能な任意の数の免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）系を使用し得る。本発明の一態様において、T細胞を、F i c o l l（商標）分離など、当業者に知られるあらゆる技術を使用して、対象から採取した血液の単位から得ることができる。ある好ましい態様において、個体の循環血液からの細胞をアフエーシスにより得る。アフエーシス産物は、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、アフエーシスにより採取した細胞は、血漿画分を除去するために洗浄し、細胞を続くプロセッシング過程のために適切な緩衝液又は媒体に入れる。本発明の一態様において、細胞をリン酸緩衝化食塩水（PBS）で洗浄する。別の態様において、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、又は全てではないにしても多くの二価カチオンを欠き得る。

40

【0407】

カルシウム非存在下の初期活性化過程は、活性化の増強に至り得る。当業者に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MgPBS、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、アフエーシス試料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

50

る。

【0408】

本願の方法は、5%以下、例えば2%の、ヒトAB血清を含む培養培地条件を利用でき、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に記載のものを利用することが認識される。

【0409】

一態様において、T細胞は、赤血球を溶解し、例えばPERCOLL™勾配による遠心分離又は向流遠心溶出法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。CD3+、CD28+、CD4+、CD8+、CD45RA+及びCD45RO+ T細胞などのT細胞の特異的下位集団を陽性又は陰性選択技術により更に単離し得る。例えば、一態様において、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。一態様において、時間は、約30分である。更なる態様において、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。更なる態様において、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。別の好ましい態様において、時間は、10~24時間である。一態様において、インキュベーション時間は、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か若しくは長くし、且つ/又はビーズ対T細胞比を増加若しくは減少させる(更に本明細書に記載のとおり) ことにより、T細胞の亜集団は、培養開始時又は工程中の他の時点で優先的に選択され得る。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細胞の亜集団は、培養開始時又は工程中の他の時点で優先的に選択され得る。複数回の選択も本発明で使用できることを当業者は認識する。一態様において、選択過程を実施し、「未選択」細胞を活性化及び増殖過程で使用する事が望ましいことがある。「未選択」細胞も更なる選択に付され得る。

【0410】

陰性選択によるT細胞集団富化は、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。1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CD4+細胞を富化するために、モノクローナル抗体カクテルは、典型的にはCD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR及びCD8に対する抗体を含む。一態様において、典型的にはCD4+、CD25+、CD62Lhi、GITR+及びFoxP3+を発現する制御性T細胞について富化又は陽性選択することが望ましいことがある。代わりに、一態様において、T制御性細胞を抗CD25コンジュゲートビーズ又は他の類似選択法により枯渇させる。

【0411】

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。好ましくは、T制御性枯渇細胞集団は、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%未満のCD25+細胞を含む。

【0412】

一部の実施形態において、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、IL-2を使用して集団から除去する。一部の実施形態において、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。一部の実施形態において、抗CD25抗体又はそのフラグメントを本明細書に記載の基質にコンジュゲートさせる。

【0413】

一部の実施形態において、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。一部の実施形態において、細胞対CD25枯渇剤の比は、 1×10^7 細胞対 $20 \mu\text{L}$ 、又は 1×10^7 細胞対 $15 \mu\text{L}$ 、又は 1×10^7 細胞対 $10 \mu\text{L}$ 、又は 1×10^7 細胞対 $5 \mu\text{L}$ 、又は 1×10^7 細胞対 $2.5 \mu\text{L}$ 、又は 1×10^7 細胞対 $1.25 \mu\text{L}$ である。一部の実施形態において、例えばT制御性細胞、例えばCD25+細胞枯渇のために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。

【0414】

一部の実施形態において、枯渇すべき免疫エフェクター細胞集団は、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。一部の実施形態において、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 、 1×10^7 又はそれ未満のCD25+細胞）を含む。

【0415】

一部の実施形態において、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。一部の実施形態において、CliniMAC系を例えばDEPLETION2.1などの枯渇設定において動かす。

【0416】

特定の理論に拘束されることを望まないが、アフエーシス前又は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TREG細胞の数の減少）は、対象の再発リスクを減らし得る。例えば、TREG細胞を枯渇する方法は、当技術分野で知られている。例えば、TREG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。

【0417】

一実施形態において、製造法は、CAR発現細胞製造前のTREG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、試料、例えばアフエーシス試料を抗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）と接触させ、CAR発現細胞（例えば、T細胞、NK細胞）産物の製造前にTREG細胞を枯渇させることを含む。

【0418】

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TREG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、TREG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。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われ得る。

【0419】

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

10

20

30

40

50

ホスファミドで前処置され、それにより対象がC A R発現細胞処置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、C A R発現細胞産物製造のための細胞の採取前に抗G I T R抗体で前処置され、それにより対象がC A R発現細胞処置を再発するリスクを軽減する。

【0420】

一部の実施形態において、除去すべき細胞集団は、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。一部の実施形態において、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。

10

【0421】

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細胞集団の富化は、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。1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。

【0422】

本明細書に記載の方法は、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を発現する細胞集団からの除去を更に含み、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集団を提供する。一部の実施形態において、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るか、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。

20

30

【0423】

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II、G A L 9、アデノシン及びT G F Rベータを含む。実施形態において、チェックポイント阻害剤は、P D 1又はP D - L 1である。いくつかの実施形態において、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るか、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、例えばいずれ順序でも生じ得る。

40

【0424】

50

一部の実施形態において、 $IFN-\gamma$ 、 $TNF\alpha$ 、 $IL-17A$ 、 $IL-2$ 、 $IL-3$ 、 $IL-4$ 、 $GM-CSF$ 、 $IL-10$ 、 $IL-13$ 、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。

【0425】

陽性又は陰性選択により所望の細胞集団を単離するために、細胞及び表面（例えば、ビーズなどの粒子）の濃度は、変わり得る。一態様において、細胞とビーズとの最大接触を確実にするために、ビーズと細胞とを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、20億細胞/mlの濃度を使用する。一態様において、10億細胞/mlの濃度を使用する。更なる態様において、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又は多くの腫瘍細胞が存在する試料（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、治療的価値を有し得、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。

【0426】

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）との混合物を有意に希釈することにより、粒子と細胞と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 $\sim 1 \times 10^6$ /ml及びその間の任意の整数値であり得る。

【0427】

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 $\sim$ 10 $^{\circ}C$ 又は室温においてローテータでインキュベートし得る。

【0428】

刺激のためのT細胞は、洗浄工程後にも凍結され得る。理論に拘束さ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が当技術分野で知られ、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 $^{\circ}$ /分の速度で $-80^{\circ}C$ 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接 $-20^{\circ}C$ 又は液体窒素の非制御凍結も使用できる。

【0429】

一態様において、凍結保存細胞を本明細書に記載のように解凍し、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。

【0430】

本発明に関連して、本明細書に記載の増殖細胞が必要となり得る時点の前の期間における対象からの血液試料又はアフエーシス産物の収集も企図されている。従って、増殖する細胞の供給源を必要な任意の時点で採取でき、免疫エフェクター細胞、例えばT細胞又はNK細胞などの所望の細胞を、本明細書に記載のものなどの細胞療法、例えばT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、細胞療法、例えばT細胞治療におけるその後の使用のために単離及び凍結できる。一態様において、血液試料又はアフエーシスを一般に健常対象から採取する。一態様において、血液試料又はアフエーシスを、一般に、疾患を発症するリスクにあるが、依然として疾患を発症していない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。一態様において、免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）をその後の時点で増殖、凍結及び使用し得る。一態様において、試料を、本明細書に記載の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の前に対象からの血液試料又はアフエーシスから細胞を単離する。

【0431】

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。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細胞の品質がエキスピボで増殖する能力について最適であり得るか又は改善され得ることが観察されている。同様に、本明細書に記載の方法を使用するエキスピボ操作後、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、一態様において、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。細胞型の例は、T細胞、B細胞、樹状細胞及び免疫系の他の細胞を含む。

【0432】

一部の実施形態において、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の後に採取する。

【0433】

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か又は操作する免疫エフェクター細胞、例えばT細胞集団を、PD1陰性免疫エフェクター細胞、例えばT細胞の数を増やすか又はPD1陰性免疫エフェクター細胞、例えばT細胞／PD1陽性免疫エフェクター細胞、例えばT細胞の比を増やす量のmTOR阻害剤と接触させることにより、エキスピボで処理できる。

【0434】

一部の実施形態において、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の投与により産生できる。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産生できる。

【0435】

一部の実施形態において、T細胞集団は、イカロス欠損である。イカロス欠損細胞は、イカロス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の投与により産生できる。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置により産生できる。

【0436】

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しないか、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産生できる。

【0437】

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。

【0438】

同種CAR

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。

【0439】

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デルタ、TCRイプシロン及び／又はTCRゼータの発現がない(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を発現し得る。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。

【0440】

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。いくつかの態様において、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。一実施形態において、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。

【0441】

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)を使用したTCR及び／又はHLAのノックダウンを含み得る。

【0442】

一部の実施形態において、同種細胞は、阻害性分子、例えば本明細書に記載の方法のいずれかによって操作された細胞を発現しないか又は低レベルで発現する細胞であり得る。例えば、細胞は、例えば、CAR発現細胞が免疫エフェクター応答を開始する能力を低下できる、阻害分子を発現しないか又は阻害分子を低レベルで発現する細胞であり得る。阻

10

20

30

40

50

害分子の例は、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM（例えば、CEACAM-1、CEACAM-3及び／又はCEACAM-5）、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3（CD276）、B7-H4（VTCN1）、HVEM（TNFRSF14又はCD270）、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシン及びTGFR 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の阻害性核酸、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。

10

【0443】

TCR又はHLAを阻害するためのsiRNA及びshRNA

一実施形態において、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TGFR 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。

20

【0444】

T細胞におけるsiRNA及びshRNAの発現は、例えば、レンチウイルス発現系などの任意の慣用の発現系を使用して達成できる。

【0445】

TCRの要素の発現を下方制御する代表的shRNAは、例えば、米国特許出願公開第2012/0321667号明細書に記載されている。HLAクラスI及び／又はHLAクラスII遺伝子の発現を下方制御する代表的siRNA及びshRNAは、例えば、米国特許出願公開第2007/0036773号明細書に開示されている。

30

【0446】

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、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TGFR 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。

40

【0447】

天然に存在するCRISPR/Cas系は、配列決定された真正細菌ゲノムの約40%及び配列決定された古細菌の90%に見られる。Grissa et al. (2007) BMC Bioinformatics 8:172。この系は、プラスミド及びファージなどの外来遺伝的要素に対する抵抗性を付与する1種の原核生物免疫系であり、後天性免疫の形態を提供する。Barrangou et al. (2007) Science 315:1709-1712; Marragini et al. (2008) Science

50

e 322:1843-1845。

【0448】

CRISPR/Cas系は、マウス又は霊長類などの真核生物における遺伝子エディティング（特定の遺伝子のサイレンシング、増強又は変更）に使用するために改変されている。Wiedenheft et al. (2012) Nature 482:331-8。これは、真核細胞に、特別に設計したCRISPR及び1つ以上の適切なCasを含むプラスミドを導入することにより達成される。

【0449】

CRISPR座位と呼ばれることもあるCRISPR配列は、交互の反復及びスペーサーを含む。天然に存在するCRISPRにおいて、スペーサーは、通常細菌に対して外来であるプラスミド又はファージ配列などの配列を含み、TCR及び／又はHLA CRISPR/Cas系において、スペーサーは、TCR又はHLA遺伝子配列に由来する。

【0450】

CRISPR座位からのRNAは、構成的に発現され、Casタンパク質により小RNAに加工される。これらは、反復配列が隣接したスペーサーを含む。RNAは、他のCasタンパク質をRNA又はDNAレベルで外来性遺伝的要素に対して発現抑制するように導く。Horvath et al. (2010) Science 327:167-170; Makarova et al. (2006) Biology Direct 1:7。スペーサーは、そのため、siRNAに類似して、RNA分子の鋳型としての役割を果たす。Pennisi (2013) Science 341:833-836。

【0451】

多くの異なるタイプの細菌で自然に生じるように、CRISPRの正確な配置及び構造、Cas遺伝子の機能及び数及びそれらの産物は、種毎にいくぶん異なる。Haft et al. (2005) PLoS Comput. Biol. 1:e60; Kunin et al. (2007) Genome Biol. 8:R61; Mojica et al. (2005) J. Mol. Evol. 60:174-182; Bolotin et al. (2005) Microbiol. 151:2551-2561; Pourcel et al. (2005) Microbiol. 151:653-663; 及び Stern et al. (2010) Trends. Genet. 28:335-340。例えば、Cse (Casサブタイプ、大腸菌) タンパク質 (例えば、CasA) は、機能的複合体、Cascadeを形成し、これは、CRISPR RNA転写物を、Cascadeが保持するスペーサー反復単位に加工する。Brouns et al. (2008) Science 321:960-964。他の原核生物において、Cas6は、CRISPR転写物を加工する。大腸菌におけるCRISPRベースのファージ不活性化は、Cascade及びCas3を必要とするが、Cas1又はCas2を必要としない。パイロコッカス・フリオサス (Pyrococcus furiosus) 及び他の原核生物におけるCmr (Cas RAMPモジュール) タンパク質は、小CRISPR RNAと機能的複合体を形成し、これは相補的標的RNAを認識し、開裂する。より単純なCRISPR系は、二重らせんの各鎖のための2活性切断部位を有するヌクレアーゼであるタンパク質Cas9に依存する。Cas9と修飾CRISPR座位RNAの組み合わせを遺伝子エディティングのための系に使用できる。Pennisi (2013) Science 341:833-836。

【0452】

CRISPR/Cas系を使用して、TCR及び／又はHLA遺伝子を編集でき、(塩基対の付加又は欠失) 又は未成熟終止を導入でき、これは、そうしてTCR及び／又はHLAの発現を減少させる。代わりに、CRISPR/Cas系をRNA干渉のように使用し、TCR及び／又はHLA遺伝子を可逆性形式でオフにできる。哺乳動物細胞において、例えば、RNAは、Casタンパク質をTCR及び／又はHLAプロモーターに導くことができ、RNAポリメラーゼを立体的に遮断する。

【0453】

10

20

30

40

50

当技術分野で知られる技術、例えば米国特許出願公開第20140068797号明細書及びCong (2013) Science 339:819-823に記載のものを使用して、TCR及び／又はHLAを阻害する人工CRISPR/Cas系を産生できる。例えば、Tsai (2014) Nature Biotechnol., 32:6569-576、米国特許第8,871,445号明細書；同第8,865,406号明細書；同第8,795,965号明細書；同第8,771,945号明細書；及び同第8,697,359号明細書に記載されるもののような、TCR及び／又はHLAを阻害する当技術分野で知られる他の人工CRISPR/Cas系も産生できる。

【0454】

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、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TGFRβ）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様エフェクターヌクレアーゼを指す。

【0455】

TALENは、TALEエフェクターDNA結合ドメインとDNA開裂ドメインを融合することにより人工的に産生される。転写アクティベータ様効果（TALE）は、HLA又はTCR遺伝子の部分を含む、任意の所望のDNA配列に結合するように操作できる。操作されたTALEとDNA開裂ドメインを合わせることで、HLA又はTCR配列を含む、任意の所望のDNA配列に特異的な制限酵素を産生できる。次いで、これらを細胞に導入でき、そこで、それらは、ゲノムエディティングのために使用され得る。Boch (2011) Nature Biotech. 29:135-6；及びBoch et al. (2009) Science 326:1509-12；Moscou et al. (2009) Science 326:3501。

【0456】

TALEは、ザントモナス細菌により分泌されるタンパク質である。DNA結合ドメインは、12番目及び13番目のアミノ酸以外、反復した高度に保存的な33～34アミノ酸配列を含む。これらの2箇所は、高度に可変であり、特定のヌクレオチド認識と強い相関を示す。それらは、従って、所望のDNA配列と結合するように操作され得る。

【0457】

TALENを産生するために、TALEタンパク質を、野生型又は変異FokIエンドヌクレアーゼであるヌクレアーゼ（N）と融合する。TALENにおいて使用するために、FokIについていくつかの変異が行われており、これらは、例えば、開裂特異性又は活性の改善を含む。Cermak et al. (2011) Nucl. Acids Res. 39:e82；Miller et al. (2011) Nature Biotech. 29:143-8；Hockemeyer et al. (2011) Nature Biotech. 29:731-734；Wood et al. (2011) Science 333:307；Doyon et al. (2010) Nature Methods 8:74-79；Szczeppek et al. (2007) Nature Biotech. 25:786-793；及びGuo et al. (2010) J. Mol. Biol. 200:96。

【0458】

FokIドメインは、二量体として機能し、適切な配向及び間隔を有する標的ゲノムにおける部位のための独特なDNA結合ドメインを有する2つの構築物を必要とする。TALE DNA結合ドメインとFokI開裂ドメインとの間のアミノ酸残基数及び2の個々

10

20

30

40

50

のTALEN結合部位の間の塩基数の両方が高レベルの活性を達成するために重要なパラメータであると考えられる。Miller et al. (2011) Nature Biotech. 29:143-8。

【0459】

HLA又はTCR TALENを細胞内で使用して二重鎖切断(DSB)を産生できる。変異は、修復機構が切断を非相同末端結合により不適切に修復する場合、切断部位に導入できる。例えば、不適切な修復は、フレームシフト変異を導入し得る。代わりに、外来DNAをTALENと共に細胞に導入でき、外来DNAの配列及び染色体配列により、この方法は、HLA又はTCR遺伝子における欠損の補正、又はwt HLA、又はTCR遺伝子におけるこのような欠損の導入に使用でき、そうしてHLA又はTCRの発現を減少させる。

10

【0460】

HLA又はTCRにおける配列に特異的なTALENは、モジュラー要素を使用する多様なスキームを含む、当技術分野で知られる任意の方法を使用して構築できる。Zhang et al. (2011) Nature Biotech. 29:149-53; Geibler et al. (2011) PLoS ONE 6:e19509。

【0461】

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、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TGFRβ)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。

20

【0462】

TALENと同様、ZFNは、DNA結合ドメインに融合したFokIヌクレアーゼドメイン(又はその誘導体)を含む。ZFNの場合、DNA結合ドメインは、1つ以上の亜鉛フィンガーを含む。Carroll et al. (2011) Genetics Society of America 188:773-782; 及びKim et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:1156-1160。

30

【0463】

亜鉛フィンガーは、1つ以上の亜鉛イオンにより安定化される小タンパク質構造モチーフである。亜鉛フィンガーは、例えば、Cys2His2を含むことができ、約3bp配列を認識できる。既知特異性の多様な亜鉛フィンガーを合わせて、約6bp、9bp、12bp、15bp又は18bp配列を認識する多フィンガーポリペプチドを産生できる。ファージディスプレイ、酵母ワンハイブリッド系、細菌ワンハイブリッド及びツーハイブリッド系及び哺乳動物細胞を含む、特異的配列を認識する亜鉛フィンガー(及びそれらの組み合わせ)を産生するための多様な選択及びモジュラーアセンブリー技術が利用可能である。

40

【0464】

TALENと同様、ZFNは、DNAを開裂するために二量体化しなければならない。そのため、ZFNの対が非パ lindロームDNA部位を標的とすることが必要である。2の各々のZFNは、そのヌクレアーゼが適切に離れて、DNAの逆の鎖に結合しなければならない。Bitinaite et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:10570-5。

【0465】

50

またT A L E Nと同様、Z F Nは、DNAに二重鎖切断を創製でき、これは、不適切に修復された場合にフレームシフト変異を創製でき、細胞におけるH L A及び／又はT C Rの発現及び量の減少に至る。Z F Nは、H L A又はT C R遺伝子における変異のために相同組換えとも使用できる。

【0466】

H L A及び／又はT C Rにおける配列に特異的なZ F Nは、当技術分野で知られる任意の方法を使用して構築できる。例えば、Provasi (2011) Nature Med. 18:807-815; Torikai (2013) Blood 122:1341-1349; Cathomen et al. (2008) Mol. Ther. 16:1200-7; Guo et al. (2010) J. Mol. Biol. 400:96; 米国特許出願公開第2011/0158957号明細書; 及び米国特許出願公開第2012/0060230号明細書を参照されたい。

10

【0467】

テロメラーゼ発現

何らかの特定の理論に拘束されることを望まないが、一実施形態において、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、従って、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、例えばテロメラーゼの触媒的サブユニット、例えばT E R T、例えばh T E R Tを発現する。いくつかの態様において、本開示は、細胞をテロメラーゼサブユニット、例えばテロメラーゼの触媒的サブユニット、例えばT E R T、例えばh T E R Tをコードする核酸と接触させることを含む、C A R発現細胞を産生する方法を提供する。細胞を、C A R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。

20

【0468】

一態様において、本開示は、免疫エフェクター細胞集団（例えば、T細胞、NK細胞）を製造する方法に関する。一実施形態において、本方法は、免疫エフェクター細胞集団（例えば、T細胞又はNK細胞）を提供し、免疫エフェクター細胞集団を、C A Rをコードする核酸と接触させ、免疫エフェクター細胞集団をテロメラーゼサブユニット、例えばh T E R Tをコードする核酸と、C A R及びテロメラーゼ発現を可能とする条件下で接触させることを含む。

30

【0469】

一実施形態において、テロメラーゼサブユニットをコードする核酸は、DNAである。一実施形態において、テロメラーゼサブユニットをコードする核酸は、テロメラーゼサブユニットの発現を駆動できるプロモーターを含む。

【0470】

一実施形態において、h T E R Tは、以下のように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)。

40

【化 9】

MPRAPRCRAVRSLLRSHYREVLPLATFVRRLLGPQGWRLVQRGDPAAFRALVAQCLVC
 VPWDARPPPAAPSFRQVSCLELVARVLQRLCERGAKNVLAFGFALLDGARGGPPEAFTTSVR
 SYLPNTVTDALRGSGAWGLLLRRVGDDVLVHLLARCALFVLVAPSCAYQVCGPPLYQLGAAT
 QARPPPHASGPRRRLGCERAWNHSVREAGVPLGLPAPGARRRGGSASRSLPLPKRPRRGAAPE
 PERTPVGQGSWAHPGRTRGPSDRGFCVVSPARPAEEATSLEGALSGTRHSHPSVGRQHHAGPP
 STSRPPRPWDTPCPPVYAETKHFLYSSGDKEQLRPSFLLSSLRPSLTGARRLVETIFLGSRPWMP
 GTPRRLPRLPQRYWQMRPLFLELLGNHAQCPYGVLLKTHCPLRAAVTPAAGVCAREKPQGSV
 AAPEEEDTDPRRLVQLLRQHSSPWQVYGFVRACLRLVPPGLWGSRHNRRLRNTKKFISLG
 KHAKLSLQELTWKMSVRGCAWLRRSPGVGCVPAAEHRLREEILAKFLHWLMSVYVVELLRSF
 FYVTETTFQKNRLFFYRKSVWSKLQSIGIRQHLKRVQLRELSEAEVRQHREARPAALLTSRLRFIP
 KPDGLRPIVNDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVLNYERARRPGLLGASVLGLDDIHR
 AWRTEFVLRVRAQDPPPELYFVKVDVTGAYDTIPQDRLTEVIASIIKPQNTYCVRRYAVVQKAA
 HGHVRKAFKSHVSTLTDLPYMRQFVAHLQETSPLRDAVVIEQSSSLNEASSGLFDVFLRFMC
 HHAVRIRGKSYVQCQGIPQGSILSTLLCSLCYGD MENKLFAGIRRDGLLLRLVDDFLLVTPHLT
 HAKTFLRTLVRGVPEYGCVVNLKRTVVNFPVEDEALGCTAFVQMPAHGLFPWCGLLLDTRTL
 EVQSDYSSYARTSIRASLTFNRGFKAGRNMRRKLFGLVRLKCHSLFLDLQVNSLQTCTNIYKI
 LLLQAYRFHACVLQLPFHQVWKNPTFFLRVISDTASLCYSILKAKNAGMSLGAKGAAGPLPS
 EAVQWLCHQAFLLKLTRHRVTYVPLLGSLRTAQTQLSRKLP GTTTLTALEAAANPALPSDFKITL
 D (配列番号284)

10

20

【0471】

一実施形態において、h T E R Tは、配列番号284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、h T E R Tは、配列番号284の配列を有する。一実施形態において、h T E R Tは、N末端、C末端又は両方に欠失（例えば、5、10、15、20又は30アミノ酸以下）を含む。一実施形態において、h T E R Tは、N末端、C末端又は両方にトランスジェニックアミノ酸配列（例えば、5、10、15、20又は30アミノ酸以下）を含む。

30

【0472】

T細胞の活性化及び増殖

T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できる。

40

【0473】

一般に、本発明のT細胞を、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性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

50

タンパク質キナーゼCアクティベータ（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を使用する。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）。

10

【0474】

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（即ち「シス」形態）又は別の表面（即ち「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。

20

【0475】

一態様において、2剤は、ビーズに、同じビーズ、即ち「シス」又は別のビーズ、即ち「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。本発明の一態様において、抗CD3抗体より多くの抗CD28抗体が粒子に結合しており、即ちCD3:CD28比が1未満である。本発明の一態様において、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。ある好ましい態様において、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。

30

40

【0476】

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

50

：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、ある好ましい値は、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つの好ましい比は少なくとも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、好ましい粒子：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。

【0477】

本発明の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気力などの力の適用によりまず濃縮し、細胞表面マーカーのライゲーションを増加させ、それにより細胞刺激を誘導する。

【0478】

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（3×28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、DYNAビーズS（登録商標）M-450 CD3/CD28 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（即ち100%）が目的の標的細胞で構成され得る。従って、あらゆる細胞数が本発明に関連して一体となる。一態様において、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（即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/ml、80億/ml、70億/ml、60億/ml、50億/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、且つ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。

【0479】

一部の実施形態において、CAR、例えば本明細書に記載の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。一部の実施形態において、細胞を数時間（例えば、約2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、15時間、18時間、21時間）～約14日（例えば、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日又は14日）の期間の培養により増殖する。一部の実施形態において、細胞は、4～9日の期間増殖される。一部の実施形態において、細胞は、8日以下、例えば7日、6日又は5日の期間増殖される。一部の実施形態において、細胞、例えば本明細書に記載のBCMA CAR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。一部の実施形態において、5日増殖された細胞、例えば本明細書に記載のBCMA 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。一部の実施形態において、細胞、例えば本明細書に記載のBCMA CAR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。一部の実施形態において、5日増殖された細胞、例えば本明細書に記載のBCMA 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。

【0480】

本発明の一態様において、混合物を数時間（約3時間）～約14日又はその間の任意の時間的整数値だけ培養し得る。一態様において、混合物を21日培養し得る。本発明の一態様において、ビーズ及びT細胞と一緒に約8日培養する。一態様において、ビーズ及びT細胞と一緒に2～3日培養する。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。

【0481】

一部の実施形態において、細胞は、例えば、フローサイトメトリーなどの本明細書に記載の方法により測定して、14日の増殖期間にわたり、細胞の少なくとも200倍（例えば、200倍、250倍、300倍、350倍）増加をもたらす1つ以上のインターロイキンを含む適切な培地（例えば、本明細書に記載の培地）で増殖させる。一部の実施形態において、細胞は、IL-15及び／又はIL-7（例えば、IL-15及びIL-7）の存在下で増殖させる。

【0482】

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

10

20

30

40

50

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。

【0483】

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受容体アルファ（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。

【0484】

一部の実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞を、エキスピボ増殖中、hetIL-15を含む組成物と接触させる。一実施形態において、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。一部の実施形態において、接触は、リンパ球亜集団、例えばCD8+T細胞の生存及び増殖をもたらす。

【0485】

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（TC、CD8+）より大きいヘルパーT細胞集団（TH、CD4+）を有する。CD3及びCD28受容体での刺激によるT細胞のエキスピボ増殖は、約8～9日目前まで主に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。従って、処置の目的により、主にTH細胞を含むT細胞集団を対象に注入することは有利であり得る。同様に、TC細胞の抗原特異的サブセットが単離されている場合、このサブセットを大きい程度まで増殖させることが有利であり得る。

【0486】

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。

【0487】

BCMA 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。BCMA 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する。

【0488】

初代T細胞におけるCAR発現のウェスタンブロット分析を、単量体及び二量体の存在を検出するために使用できる。例えば、Milone et al., Molecular

10

20

30

40

50

Therapy 17 (8) : 1453-1464 (2009) を参照されたい。極めて簡潔には、CAR を発現する T 細胞 (CD4⁺ 及び CD8⁺ T 細胞の 1 : 1 混合物) をインビトロで 10 日超増殖させ、続いて溶解及び還元条件下の SDS-PAGE を行う。全長 TCR-ゼータ細胞質ドメイン及び内因性 TCR-ゼータ鎖を含む CAR を、TCR-ゼータ鎖に対する抗体を使用するウェスタンブロッティングにより検出する。同じ T 細胞サブセットを、共有結合性二量体形成の評価を可能とするために非還元条件下の SDS-PAGE 分析に使用する。

【0489】

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 α CD3 / α CD28 a APC で刺激し、続いて分析すべきプロモーターの制御下において、GFP を発現するレンチウイルスベクターで形質導入する。代表的プロモーターは、CMV IE 遺伝子、EF-1 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。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⁺ 及び CD8⁺ T 細胞の混合物を 0 日目に α CD3 / α CD28 被覆磁気ビーズで刺激し、2 A 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。培養物は、洗浄後、多発性骨髄腫細胞株又は K562-BCMA などの BCMA 発現細胞で再刺激される。外来性 IL-2 を、100 IU / 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。

【0490】

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 α CD3 / α CD28 被覆磁気ビーズでの刺激及び 1 日目の記載する CAR の形質導入後、培養 8 日目に Coulter Multisizer III 粒子カウンター、Nexcelom Cellometer Vision 又は Millipore Scepter を使用して測定する。

【0491】

動物モデルも、CAR T 活性の測定に使用できる。例えば、免疫不全マウスにおける初代ヒト多発性骨髄腫を処置するための、ヒト BCMA 特異的 CAR⁺ T 細胞を使用する異種移植モデルを使用できる。例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17 (8) : 1453-1464 (2009) を参照されたい。極めて簡潔には、MM 確立後、マウスを処置群に無作為化する。異なる数の BCMA CAR T 細胞を、MM を担持する免疫不全マウスに注射することができる。動物は、1 週間間隔で疾患の進行及び腫瘍負荷について評価される。ログランク検定を使用して、群の生存曲線を比較する。更に、免疫不全マウスへの T 細胞注射 4 週間後の絶対的末梢血 CD4⁺ 及び CD8⁺ T 細胞数も分析し得る。マウスに、多発性骨髄腫細胞を注射し、3 週間後、例えば eGFP に連結した CAR をコードするバイシストロニックレンチウイルスベクターにより、BCMA CAR を発現するように操作された T 細胞を注射する。T 細胞を、注入 GFP⁺ T 細胞の 45 ~ 50 % に、注射前に偽形質導入細胞と混合することにより標準化し、フローサイトメトリーにより確認する。動物を 1 週間間隔で白血病について評価する。CAR⁺ T 細胞群の生存曲線を、ログランク検定を使用して比較する。

【0492】

細胞増殖及びサイトカイン産生の評価は、例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17 (8) : 1453-1464 (2009) に以前に記

10

20

30

40

50

載されている。簡潔には、CARを介した増殖の評価は、マイクロタイタープレートにおいて、洗浄したT細胞を、BCMAを発現するK562細胞と混合することによって実施されるか、又は他のBCMA発現骨髄腫細胞は、使用前にガンマ線を照射される。抗CD3（クローンOKT3）及び抗CD28（クローン9.3）モノクローナル抗体を、これらのシグナルがエクスピボでの長期CD8⁺T細胞増殖を支持するため、刺激T細胞増殖について陽性対照として役立つKT32-BBL細胞の培養物に添加する。T細胞を、製造者により記載のとおりCountBright（商標）蛍光ビーズ（Invitrogen, Carlsbad, CA）及びフローサイトメトリーを使用して培養において数える。CAR⁺T細胞を、eGFP-2A連結CAR発現レンチウイルスベクターで操作されたT細胞を使用するGFP発現により同定する。GFPを発現しないCAR⁺T細胞について、CAR⁺T細胞をビオチニル化組み換えBCMAタンパク質及び二次アビジン-PEコンジュゲートにより検出する。T細胞のCD4⁺及びCD8⁺発現も、特異的モノクローナル抗体（BD Biosciences）を使用して同時に検出する。サイトカイン測定を、製造業者の指示に従ってヒトTH1/TH2サイトカイン細胞数測定ビーズアレイキット（BD Biosciences, San Diego, CA）を使用して再刺激24時間後に回収した上清で実施する。FACS caliber フローサイトメーターを使用して蛍光を評価し、データを製造業者の指示に従って分析する。

【0493】

細胞毒性を標準的51Cr放出アッセイにより評価できる。例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17 (8): 1453-1464 (2009)を参照されたい。簡潔には、標的細胞（例えば、BCMAを発現するK562株及び初代多発性骨髄腫細胞）に51Cr（NaCrO₄として、New England Nuclear, Boston, MA）を37℃で2時間、頻繁に攪拌しながら充填し、完全RPMIで2回洗浄し、マイクロタイタープレートに播種する。エフェクターT細胞をウェル中で完全RPMI中に標的細胞と種々のエフェクター細胞：標的細胞（E:T）比で混合する。更なる培地のみ（自発的放出、SR）又はtriton-X 100洗剤1%溶液（全放出、TR）を含むウェルも調製する。37℃で4時間のインキュベーション後、各ウェルから上清を回収する。放出された51Crを、次いでガンマ粒子カウンター（Packard Instrument Co., Waltham, MA）を使用して測定する。各条件を少なくとも3回行い、溶解のパーセントを式：溶解% = (ER - SR) / (TR - SR)（式中、ERは、各実験条件で放出された平均51Crを示す）を使用して計算する。

【0494】

造影技術を使用して、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できる。このようなアッセイは、例えば、Barrett et al., Human Gene Therapy 22: 1575-1586 (2011)に記載されている。簡潔には、NOD/SCID/γc^{-/-}（NSG）マウス又は他の免疫不全に多発性骨髄腫細胞をIV注射し、7日後、CAR構築物でエレクトロポレーションから4時間後にBCMA CART細胞を注射する。T細胞は、ホタルルシフェラーゼを発現するようにレンチウイルス構築物で安定にトランスフェクトされ、マウスをバイオルミネセンスについて造影する。代わりに、多発性骨髄腫異種移植モデルにおけるCAR⁺T細胞の単回注射の治療有効性及び特異性を次のように測定できる。NSGマウスに、ホタルルシフェラーゼを安定に発現するように形質導入した多発性骨髄腫細胞を注射し、続いて7日後にBCMA CAR構築物で電気穿孔したT細胞を1回尾静脈注射する。動物を注射後の種々の時点で造影する。例えば、5日目（処置2日前）及び8日目（CAR⁺PBL後24時間）に代表的マウスにおけるホタルルシフェラーゼ陽性腫瘍の光子密度ヒートマップを作成できる。

【0495】

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

10

20

30

40

50

定量のための方法及び組成物が開示される。1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、本明細書に記載のようなCAR抗原分子）。

【0496】

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）を提供すること；CAR発現細胞を取得すること（例えば、製造試料又は臨床試料などのCAR発現細胞含有試料の取得）；CAR発現細胞とCARリガンドとを、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リガンドとの結合は、FACS、ELISAなどのような標準技術を使用して検出できる。

【0497】

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）を提供すること；前記CAR発現細胞とCARリガンド、例えば本明細書に記載のようなCARリガンドとを、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。

【0498】

一実施形態において、CARリガンドが存在する（例えば、基質、例えば天然に存在しない基質に固定化又は結合される）。一実施形態において、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非共有（例えば、架橋）により固定、結合又は会合させ得る。一部の実施形態において、CARリガンドは、ビーズに結合（例えば、共有結合）する。前記実施形態において、免疫細胞集団をインビトロ又はエクスピボで増殖できる。方法は、例えば、本明細書に記載の方法のいずれかを使用して、CAR分子のリガンド存在下で免疫細胞集団を培養することを更に含み得る。

【0499】

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。

【0500】

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のようなCARリガンドを接触させ、CARリガンドの結合に基づいて細胞を選択することを含む。

【0501】

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のようなCARリガンドとを接触させ、且つ細胞をCARリガンドの結合に基づいてターゲティングし、それによりCAR発現細胞の数を減らす及び／又は殺傷することを含む。一部の実施形態において、CARリガンドは、毒性剤と結合する（例えば、トキシン又は細胞除去剤）。別の実施形態において、抗イディオタイプ抗体は、エフェクター細胞活性、例えばADCC又はADC活性を生じ得る。

【0502】

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、その内容が参照により本明細書に援用される。一部の実施形態において、抗イディオタイプ抗体分子は、抗CD19抗体分子、例えば抗CD19 sc Fvを認識する。例えば、抗イディオタイプ抗体分子は、Jena et al., PLOS March 2013 8:3 e57838に記載のCD19特異的CAR mAbクローン番号136.20.1と結合について競合でき；CD19特異的CAR mAbクローン番号136.20.1と同じCDR（例えば、Kabat定義、Chothia定義又はKabat及びChothia定義の組み合わせを使用して1つ以上、例えば全てのVH CDR1、VH CDR2、CH CDR3、VL CDR1、VL CDR2及びVL CDR3）を有し得；CD19特異的CAR mAbクローン番号136.20.1のような1つ以上の（例えば、2）可変領域を有し得るか又はCD19特異的CAR mAbクローン番号136.20.1を含み得る。一実施形態において、抗イディオタイプ抗体は、Jena et al.に記載の方法により製造した。別の実施形態において、抗イディオタイプ抗体分子は、国際公開第2014/190273号パンフレットに記載の抗イディオタイプ抗体分子である。一実施形態において、抗イディオタイプ抗体分子は、136.20.1などの国際公開第2014/190273号パンフレットに記載の抗体分子と同じCDR（例えば、1つ以上、例えば全てのVH CDR1、VH CDR2、CH CDR3、VL CDR1、VL CDR2及びVL CDR3）を有し；国際公開第2014/190273号パンフレットの抗体分子の1つ以上の（例えば、2）可変領域を有し得るか又は136.20.1などの国際公開第2014/190273号パンフレットに記載の抗体分子を含み得る。他の実施形態において、抗CAR抗体は、例えば、国際公開第2014/190273号パンフレットに記載のようなCAR分子の細胞外結合ドメインの定常領域に結合する。一実施形態において、抗CAR抗体は、CAR分子の細胞外結合ドメインの定常領域、例えば重鎖定常領域（例えば、CH2-CH3ヒンジ領域）又は軽鎖定常領域に結合する。例えば、一実施形態において、抗CAR抗体は、国際公開第2014/190273号パンフレットに記載の2D3モノクローナル抗体と結合について競合し、2D3と同じCDR（例えば、1つ以上、例えば全てのVH CDR1、VH CDR2、CH CDR3、VL CDR1、VL CDR2及びVL CDR3）を有するか、又は2D3の1つ以上の（例えば、2）可変領域を有するか、又は国際公開第2014/190273号パンフレットに記載のような2D3を含む。

【0503】

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、その全体が参照により本明細書に援用される、2014年7月31日出願の米国特許出願第62/031,699号明細書に記載のようなT細胞の特定のサブセットのために最適化される。一実施形態において、T細胞の最適化サブセットは、対照T細胞、例えば同じ構築物を発現する異なるタイプ（例えば、CD8⁺又はCD4⁺）のT細胞と比較して残留性の増強を示す。

【0504】

一実施形態において、CD4⁺T細胞は、本明細書に記載のCARを含み、そのCARは、CD4⁺T細胞に適する（例えば、最適化、例えば残留性の増強に至る）細胞内シグナル伝達ドメイン、例えばICOSドメインを含む。一実施形態において、CD8⁺T細胞は、本明細書に記載のCARを含み、そのCARは、CD8⁺T細胞に適する（例えば、最適化、例えば残留性の増強に至る）細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば4-1BBドメイン、CD28ドメイン又はICOSドメイン以外の共刺激ドメインを含む。一実施形態において、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を含み、

例えばBCMAを標的化する抗原結合ドメインを含むCAR、例えば表2、6又は10のCARである。

【0505】

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) CARを含むCD4⁺T細胞(CAR^{CD4+})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、例えばBCMAを標的化する抗原結合ドメイン、例えば表2、6又は10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CD4⁺T細胞(CAR^{CD4+})、及び

2) CARを含むCD8⁺T細胞(CAR^{CD8+})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、例えばBCMAを標的化する抗原結合ドメイン、例えば表2、6又は10の抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、及び

細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば第2の共刺激ドメイン、例えば4-1BBドメイン、CD28ドメイン又はICOSドメイン以外の別の共刺激ドメインを含むCD8⁺T細胞(CAR^{CD8+})

を投与することを含み、ここで、CAR^{CD4+}とCAR^{CD8+}とは、互いに異なる。

【0506】

任意選択により、方法は、

3) CARを含む第2のCD8⁺T細胞(第2のCAR^{CD8+})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、BCMAを標的化する抗原結合ドメイン、例えば表2、6又は10の抗原結合ドメイン、

膜貫通ドメイン、及び

第2のCAR^{CD8+}が、CAR^{CD8+}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CD8⁺T細胞(第2のCAR^{CD8+})を投与することを含む。

【0507】

本明細書の実施例の項に記載のもの並びに当技術分野で公知のものを含む他のアッセイも本発明のBCMA CAR構築物の評価に使用できる。

【0508】

治療適用

BCMA関連疾患及び／又は障害

一態様において、本発明は、BCMAの発現と関連する疾患を処置する方法を提供する。一態様において、本発明は、疾患を処置する方法を提供し、ここで、腫瘍の一部がBCMAに対して陰性であり、腫瘍の一部がBCMAに対して陽性である。例えば、本発明のCARは、BCMAの発現の上昇と関連する疾患の処置を受けている対象の処置に有用であり、BCMAのレベルの上昇に対する処置を受けている対象は、BCMAのレベルの上昇と関連する疾患を示す。実施形態において、本発明のCARは、BCMAの発現と関連する疾患の処置を受けている対象の処置に有用であり、BCMAの発現に関する処置を受けている対象は、BCMAの発現と関連する疾患を示す。

【0509】

いくつかの実施形態において、本発明は、疾患を処置する方法を提供し、ここで、BCMAは、正常細胞及び癌細胞の両方で発現されるが、正常細胞ではより低いレベルで発現される。いくつかの実施形態において、方法は、BCMA CARがBCMAを発現する癌細胞に結合して死滅させることができる親和性で結合する、本発明のCARを選択することを更に含むが、BCMAを発現する正常細胞の30%、25%、20%、15%、10%、5%未満又はそれを下回るもの(例えば、本明細書に記載のアッセイにより測定さ

10

20

30

40

50

れる)が死滅する。例えば、Cr51 CTLに基づくフローサイトメトリーなどの死滅アッセイを使用することができる。いくつかの実施形態において、BCMA CARは、標的抗原について、 $10^{-4}M \sim 10^{-8}M$ 、例えば $10^{-5}M \sim 10^{-7}M$ 、例えば $10^{-6}M$ 又は $10^{-7}M$ の結合親和性KDを有する抗原結合ドメインを有する。いくつかの実施形態において、BCMA抗原結合ドメインは、参照抗体、例えば本明細書に記載の抗体より少なくとも5倍、10倍、20倍、30倍、50倍、100倍又は1,000倍小さい結合親和性を有する。

【0510】

一態様において、本発明は、哺乳動物免疫エフェクター細胞、例えばT細胞又はNK細胞における発現のために、プロモーターと操作可能に連結したBCMA CARを含むベクターに関する。一態様において、本発明は、BCMA発現腫瘍の処置における使用のためのBCMA CARを発現する組換え免疫エフェクター細胞、例えばT細胞又はNK細胞を提供し、ここで、BCMA CARを発現する組換え免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）は、BCMA CAR発現細胞（例えば、BCMA CART又はBCMA CAR発現NK細胞）と呼ばれる。一態様において、本発明のBCMA CAR発現細胞（例えば、BCMA CART又はBCMA CAR発現NK細胞）は、BCMA CAR発現細胞（例えば、BCMA CART又はBCMA CAR発現NK細胞）が腫瘍細胞を標的とし、腫瘍の増殖が阻害されるように、腫瘍細胞を、その表面に発現された少なくとも1つの本発明のBCMA CARと接触させることができる。

【0511】

一態様において、本発明は、BCMA発現腫瘍細胞の増殖を阻害する方法であって、BCMA CAR発現細胞（例えば、BCMA CART又はBCMA CAR発現NK細胞）が抗原に応答して活性化し、癌細胞を標的とし、腫瘍の増殖が阻害されるように、腫瘍細胞を、本発明のBCMA CAR発現細胞（例えば、BCMA CART又はBCMA CAR発現NK細胞）と接触させることを含む方法に関する。

【0512】

一態様において、本発明は、対象における癌を処置する方法に関する。この方法は、癌が対象において処置されるように、対象に本発明のBCMA CAR発現細胞（例えば、BCMA CART又はBCMA CAR発現NK細胞）を投与することを含む。本発明のBCMA CAR発現細胞（例えば、BCMA CART又はBCMA CAR発現NK細胞）により処置可能な癌の例は、BCMAの発現と関連する癌である。

【0513】

本発明は、ある種の細胞治療を含み、ここで、免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）は、キメラ抗原受容体（CAR）を発現するように遺伝的に修飾され、BCMA CAR発現細胞（例えば、BCMA CART又はBCMA CAR発現NK細胞）は、それを必要とするレシピエントに注入される。注入された細胞は、レシピエントにおいて腫瘍細胞を殺傷することができる。抗体療法と異なり、CAR修飾細胞、例えばT細胞又はNK細胞は、インビボで複製でき、持続した腫瘍制御をもたらし得る長期残留性をもたらす。種々の態様において、患者に投与された細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）又はその子孫は、患者において、患者に細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）を投与した後に少なくとも4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月、12ヶ月、13ヶ月、14ヶ月、15ヶ月、16ヶ月、17ヶ月、18ヶ月、19ヶ月、20ヶ月、21ヶ月、22ヶ月、23ヶ月、2年、3年、4年又は5年持続する。

【0514】

本発明は、ある種の細胞治療も含み、ここで、免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）は、キメラ抗原受容体（CAR）を一過性に発現するように、例えばインビトロ転写RNAにより修飾され、免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）は、それを必要とするレシピエントに注入される。注入された細胞は、レシピエントで腫瘍細胞を殺傷することができる。そのため、種々の態様において、患者に投与した免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）は、患者に免疫エフェクター細胞（例

例えば、T細胞又はNK細胞)の投与後、1ヶ月、例えば3週間、2週間、1週間未満持続する。

【0515】

何らかの特定の理論に拘束されないが、CAR修飾免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞又はNK細胞)により惹起される抗腫瘍免疫応答は、能動的又は受動的免疫応答であり得るか又は代わりに直接的対間接的免疫応答によるものであり得る。一態様において、CAR形質導入免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞又はNK細胞)は、BCMAを発現するヒト癌細胞に反応して特定の炎症誘発性サイトカイン分泌及び強力な細胞溶解性活性を示し、可溶性BCMA阻害に抵抗し、バスタンダー細胞死に介在し、確立されたヒト腫瘍の退縮に介在する。例えば、BCMA発現腫瘍の不均一な場における抗原低腫瘍細胞は、近辺の抗原陽性癌細胞に対して先に反応している癌関連抗原のBCMA再指向免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞又はNK細胞)による間接的破壊を受け得る。

10

【0516】

一態様において、本発明の完全ヒトCAR修飾免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞又はNK細胞)は、哺乳動物におけるエクスピボ免疫化及び／又はインビボ治療のための1種のワクチンである。一態様において、哺乳動物は、ヒトである。

【0517】

エクスピボ免疫化に関して、次の少なくとも1つは、哺乳動物に細胞を投与する前にインビトロで起こる。i)細胞の増殖、ii)細胞へのCARをコードする核酸の導入又はiii)細胞の凍結保存。

20

【0518】

エクスピボ過程は、当技術分野で周知であり、下により詳細に記載する。簡潔には、細胞を哺乳動物(例えば、ヒト)から単離し、本明細書に記載するCARを発現するベクターで遺伝的に改変(即ちインビトロで形質導入又はトランスフェクト)される。CAR修飾細胞を哺乳動物レシピエントに投与して、治療効果を提供できる。哺乳動物レシピエントは、ヒトであり得、CAR修飾細胞は、レシピエントに対して自己であり得る。代わりに、細胞は、レシピエントに対して同種、同系又は異種であり得る。

【0519】

参照により本明細書に援用される米国特許第5,199,942号明細書に記載する造血幹細胞及び前駆細胞のエクスピボ増殖のための方法を本発明の細胞に適用できる。他の適当な方法は、当技術分野で知られ、従って、本発明は、細胞のエクスピボ増殖の特定の方法に限定されない。簡潔には、T細胞のエクスピボ培養及び増殖は、(1)哺乳動物からの採取した末梢血又は髄外植体からのCD34+造血幹細胞及び前駆細胞回収、及び(2)エクスピボでのこのような細胞の増殖を含む。米国特許第5,199,942号明細書に記載される細胞増殖因子に加えて、flt3L、IL-1、IL-3及びckitリガンドなどの他の因子を細胞の培養及び増殖に使用できる。

30

【0520】

エクスピボ免疫化の点で細胞ベースのワクチンを使用するのに加えて、本発明は、患者における抗原に対する免疫応答を惹起するための、インビボ免疫化のための組成物及び方法も提供する。

40

【0521】

一般に、本明細書に記載のような細胞活性化及び増殖は、免疫不全状態である個体で惹起する疾患の処置及び予防に利用し得る。特に、本発明のCAR修飾免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞又はNK細胞)を、BCMAの発現と関連する疾患、障害及び状態の処置に使用する。特定の態様において、本発明の細胞は、BCMAの発現と関連する疾患、障害及び状態を発症するリスクのある患者の処置に使用される。従って、本発明は、BCMAの発現と関連する疾患、障害及び状態の処置又は予防のための方法であって、それを必要とする対象に本発明のCAR修飾免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞又はNK細胞)の治療有効量を投与することを含む方法を提供する。

【0522】

50

一態様において、本発明のCAR発現細胞（例えば、CAR T細胞又はCAR発現NK細胞）を、癌又は悪性腫瘍などの増殖性疾患又は脊髄形成異常症の処置に使用し得、骨髄異形成症候群又は前白血病状態などの前癌状態である。一態様において、癌は、血液癌である。血液癌状態は、白血病及び血液、骨髄及びリンパ系に影響する悪性リンパ増殖状態などの種類の癌である。一態様において、血液癌は、白血病又は血液学的である。BCM Aに関連する疾患又は障害の例は、多発性骨髄腫（MMとしても知られる）である（C l a u d i o e t a l . , B l o o d . 2 0 0 2 , 1 0 0 (6) : 2 1 7 5 - 8 6 ; 及び N o v a k e t a l . , B l o o d . 2 0 0 4 , 1 0 3 (2) : 6 8 9 - 9 4 を参照されたい）。形質細胞骨髄腫又はカーラー病としても知られる多発性骨髄腫は、骨髄に異常又は悪性の形質B細胞が蓄積することの特徴とする癌である。多くの場合、癌細胞は、隣接する骨に侵入し、骨格構造を破壊し、骨痛及び骨折を引き起こす。骨髄腫の症例の大半は、悪性形質細胞のクローン増殖によって過剰に産生される異常な免疫グロブリンであるパラプロテイン（Mタンパク質又は骨髄腫タンパク質としても知られる）の産生も特徴とする。30g/Lを超える血清パラプロテインレベルは、国際骨髄腫ワーキンググループ（IMWG）の診断基準によると、多発性骨髄腫の診断となる（K y l e e t a l . (2 0 0 9) , L e u k e m i a . 2 3 : 3 - 9 を参照されたい）。多発性骨髄腫の他の症状又は徴候には、腎機能の低下又は腎不全、骨病変、貧血、高カルシウム血症及び神経学的症状が含まれる。

【0523】

多発性骨髄腫を他の形質細胞増殖性障害と区別する基準は、国際骨髄腫ワーキンググループによって確立されている（K y l e e t a l . (2 0 0 9) , L e u k e m i a . 2 3 : 3 - 9 を参照されたい）。次の3つの基準全てが満たされなければならない：

- クローン骨髄形質細胞 $\geq 10\%$
- 血清及び／又は尿中モノクローナルタンパク質の存在（真の非分泌性多発性骨髄腫の患者を除く）
- 基礎形質細胞増殖障害に起因する末端器官損傷のエビデンス、具体的には、
 - 高カルシウム血症：血清カルシウム $\geq 11.5\text{mg}/100\text{ml}$
 - 腎不全：血清クレアチニン $>1.73\text{mmol}/\text{l}$
 - 貧血：ヘモグロビン値が正常値の下限を $2\text{g}/100\text{ml}$ を超えて下回るか、又はヘモグロビン値 $<10\text{g}/100\text{ml}$ である、正色素性、正球性
 - 骨病変：溶解性病変、重度の骨減少症又は病的骨折。

【0524】

本明細書に記載の組成物及び方法によって処置することができる他の形質細胞増殖性障害には、無症候性骨髄腫（くすぶり型多発性骨髄腫又は無痛性骨髄腫）、意義不明の単クローン性高ガンマグロブリン血症（MGUS）、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、形質細胞腫（例えば、形質細胞異常増殖症、孤立性骨髄腫、孤立性形質細胞腫、髄外形質細胞腫及び多発性形質細胞腫）、全身性アミロイド軽鎖アミロイドーシス及びPOEMS症候群（クローウ・深瀬症候群、高月病及びPEP症候群としても知られる）が含まれるが、これらに限定されない。

【0525】

多発性骨髄腫の病期分類には、2つの病期分類システム：国際病期分類システム（ISS）（G r e i p p e t a l . (2 0 0 5) , J . C l i n . O n c o l . 2 3 (1 5) : 3 4 1 2 - 3 4 2 0 を参照されたい）及びD u r i e - S a l m o n 病期分類システム（DSS）（D u r i e e t a l . (1 9 7 5) , C a n c e r 3 6 (3) : 8 4 2 - 8 5 4 を参照されたい）が使用される。2つの病期分類を以下の表に概括する。

【0526】

10

20

30

40

50

【表 48】

表 15. 多発性骨髄腫の病期分類のための病期分類システム

ステージ	国際病期分類システム		Durie-Salmon 病期分類システム	
	基準	生存期間 中央値	基準	生存期間 中央値*
I	$\beta_2M < 3.5 \text{ mg/l}$ 及び血漿 アルブミン $\geq 3.5 \text{ g/dL}$	62 ヶ月	以下全て: ヘモグロビンレベル $> 10 \text{ g/dL}$ 血清カルシウム、正常又は $< 12 \text{ mg/dL}$ 骨 X 線、正常又は 1 つの形質 細胞腫のみ 低いモノクローナルタンパク質 産生 ($\text{IgG} < 5 \text{ g/dL}$, $\text{IgA} < 3 \text{ g/dL}$, Bence Jones タンパク質 $< 4 \text{ g/dL/24 時間}$)	IA: 62 ヶ月 IB: 22 ヶ月
II	ステージ I でもステージ III でもない	44 ヶ月	ステージ I でもステージ III でも ない	IIA: 58 ヶ月 IIB: 354 ヶ月
III	$\beta_2M \geq 5.5 \text{ mg/l}$	29 ヶ月	以下の 1 つ以上: ヘモグロビンレベル $< 8.5 \text{ g/dL}$ 血清カルシウム、正常又は $> 12 \text{ mg/dL}$ 進行した溶骨性病変 高いモノクローナルタンパク質 産生 ($\text{IgG} > 7 \text{ g/dL}$, $\text{IgA} > 5 \text{ g/dL}$, Bence Jones タンパク質 $> 12 \text{ g/dL/24 時間}$)	IIIA: 45 ヶ月 IIIB: 24 ヶ月

【0527】

*Durie-Salmon 病期分類システムには、腎機能の状態を指定する下位分類も含まれる。「A」又は「B」の指定は、ステージ番号の後に追加され、ここで、「A」は、比較的正常な腎機能（血清クレアチニン値 $< 2.0 \text{ mg/dL}$ ）を示し、B は、異常な腎機能（血清クレアチニン値 $> 2.0 \text{ mg/dL}$ ）を示す。

【0528】

多発性骨髄腫の第 3 の病期分類システムは、改訂国際病期分類システム（R-ISS）と称される（Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, et al. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology 2015; 33: 2863-9 を参照されたく、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。R-ISS ステージ I には、ISS ステージ I（血清 β_2 -ミクログロブリンレベル $< 3.5 \text{ mg/L}$ 及び血清アルブミンレベル $\geq 3.5 \text{ g/dL}$ ）、高リスク CA なし [del (17p) 及び/又は t (4; 14) 及び/又は t (14; 16)] 及び正常な LDH レベル（正常範囲の上限未満）が含まれる。R-ISS ステージ II には、ISS ステージ II（血清 β_2 -ミクログロブリンレベル $> 3.5 \text{ mg/L}$ ）及び高リスク CA 又は高 LDH レベルが含まれる。R-ISS ステージ III には、他の全ての可能な組み合わせが含まれる。

【0529】

患者の応答は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる Kumar S, Pava B, Anderson KC, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. The Lancet Onc

ology; 17 (8) : e328 – e346に開示される、IMWG 2016の基準に基づいて決定できる。表16は、応答評価のためのIMWG 2016基準を提供する。

【0530】

【表49】

表 16. 最小残存病変(MRD)の基準を含む応答評価のための IMWG 基準

応答基準*	
IMWG MRD基準(以下に定義される完全応答を要する)	
持続MRD-陰性	骨髓におけるMRD陰性(NGF若しくはNGS、又はその両方)、及び以下に定義する造影により、最低1年間隔で確認された。その後の評価を使用して、陰性の期間を更に特定することができる(例えば、5年でMRD陰性)†
フローMRD-陰性	10 ⁵ 個の有核細胞につき1つ以上の最小感度を有する、多発性骨髄腫でのMRD検出のためのEuroFlow標準操作手順(又は検証済みの同等の方法)を使用した、骨髓穿刺液でのNGF‡による表現型的に異常なクローン形質細胞の不存在
シーケンシングMRD-陰性	骨髓穿刺液でのNGSによるクローン形質細胞の不存在。ここで、クローンの存在は、10 ⁵ 個の有核細胞§につき1つ以上の最小感度を有する、LymphoSiGHTプラットフォーム(又は検証済みの同等の方法)を使用した骨髓穿刺液のDNA配列決定後、得られた2つ未満の同一のシーケンシングリードとして定義される
造影+MRD-陰性	NGF又はNGSによって定義されるMRD陰性に加えて、ベースライン又は先行するPET/CTで検出されたトレーサー取り込みの増加の全ての領域の消失、又はより少ない縦隔血液プールSUVへの減少、又は周囲の正常組織よりも少ない減少¶
標準IMWG応答基準	
ストリンジェントな完全応答	以下に定義する完全応答に加えて、正常なFLC比**及び免疫組織化学による骨髓生検でのクローン細胞の不存在(100個以上の形質細胞を計数した後、それぞれκ及びλ患者につきκ/λ比≤4:1又は≥1:2)††
完全応答	血清及び尿に対する負の免疫固定及び骨髓穿刺液中の軟部組織形質細胞腫及び5%未満の形質細胞の消失
非常に良い部分的応答	血清及び尿のMタンパク質は免疫固定法によって検出可能であるが、電気泳動では検出できないか、又は、血清Mタンパク質の90%以上の減少+尿Mタンパク質レベルが100mg/24時間未満
部分的応答	血清Mタンパク質の50%以上の減少+24時間の尿Mタンパク質の減少が90%以上又は24時間あたり200mg未満 血清及び尿のMタンパク質が測定不能である場合は、Mタンパク質基準の代わりに、関与するFLCレベルと関与しないFLCレベルの差が50%以上減少することを要する。 血清及び尿のMタンパク質が測定不能であり、無血清光アッセイも測定不能な場合、ベースラインの骨髓形質細胞のパーセンテージが30%以上であれば、Mタンパク質の代わりに形質細胞が50%以上減少することを要する。これらの基準に加えて、ベースラインに存在する場合、軟部組織形質細胞腫のサイズ(SPD)§§が50%以上縮小することも要する
最小限の応答	血清Mタンパク質の25%以上49%以下の減少、及び24時間尿Mタンパク質の50~89%の減少。上記の基準に加えて、ベースラインに存在する場合、軟部組織形質細胞腫のサイズ(SPD)§§が50%以上縮小することも要する
安定した疾患	応答の指標としての使用は推奨されない。疾患の安定性は、腫瘍増殖停止時間の推定値を提供することによって最もよく説明される。完全応答、非常に良好な部分的応答、部分的応答、最小限の応答、又は進行性疾患の基準を満たさない

【0531】

10

20

30

40

50

【表 5 0】

進行性疾患Ⅲ、Ⅳ	以下の基準のいずれか1つ以上: 以下の基準の1つ以上で、確認された最低応答値から25%の増加: 血清Mタンパク質(絶対増加は0.5 g/dL以上でなければならない); 最も低いM成分が5g/dL以上の場合、血清Mタンパク質の1g/dL以上の増加; 尿Mタンパク質(絶対増加は200 mg/24時間以上でなければならない); 測定可能な血清及び尿のMタンパク質レベルがない患者では、関与するFLCレベルと関与しないFLCレベルの差(絶対増加は10 mg/dL超でなければならない); 測定可能な血清及び尿のMタンパク質レベルがなく、測定可能な関与するFLCレベルがない患者では、ベースライン状態にかかわらず骨髓形質細胞のパーセンテージ(絶対増加は10%以上でなければならない); 新しい病変の出現、1つを超える病変のSPD§§の最下点から50%以上の増加、又は短軸で1cm超の過去病変の最長直径で50%以上の増加。 これが唯一の疾患の尺度である場合、循環形質細胞の50%以上の増加(最低200細胞/μL)	10
臨床的再発	臨床的再発は、以下の基準の1つ以上を要する: 基礎となるクローン形質細胞増殖性障害に関連する疾患及び/又は末端器官機能障害(CRAB特性)の増加の直接的な指標。腫瘍増殖停止時間又は無増悪生存期間の計算には使用されないが、任意選択により報告できるものとして、又は臨床診療における使用のために、列挙されている。 新しい軟部組織形質細胞腫又は骨病変の発生(骨粗鬆症性骨折は進行を構成しない); 既存の形質細胞腫又は骨病変のサイズの明確な増加。明確な増加は、測定可能な病変のSPD§§によって連続的に測定された50%(及び1cm以上)の増加として定義される。 高カルシウム血症(>11 mg/dL); 治療又は他の非骨髓腫関連状態とは関係のない2g/dL以上のヘモグロビンの減少; 治療開始から2mg/dL以上の、骨髓腫に起因し得る血清クレアチニンの上昇; 血清パラプロテインに関連する高粘度	20

【 0 5 3 2】

30

40

50

【表 5 1】

完全応答からの再発(エンドポイントが無病生存期間である場合にのみ使用される)	以下の基準のいずれか1つ以上: 免疫固定又は電気泳動による血清又は尿のMタンパク質の再出現; 骨髄における5%以上の形質細胞の発生; その他の任意の進行の兆候の出現(すなわち、新しい形質細胞腫、溶解性骨病変、又は高カルシウム血症、上記参照)
MRD陰性からの再発(エンドポイントが無病生存期間である場合にのみ使用)	以下の基準のいずれか1つ以上: MRD陰性状態の喪失(NGF又はNGSでのクローン形質細胞のエピデンス、又は骨髄腫の再発に関する陽性造影検査); 免疫固定又は電気泳動による血清又は尿のMタンパク質の再出現; 骨髄における5%以上のクローン形質細胞の発生; その他の任意の進行の兆候の出現(すなわち、新しい形質細胞腫、溶解性骨病変、又は高カルシウム血症)
MRD評価では、最初の骨髄穿刺液をMRDに送る必要があり(形態についてではない)、このサンプルは1回の吸引で最小2 mL(十分な細胞を得るため)、血液希釈を避けるため最大4~5 mLの量で採取する必要がある。IMWG=国際骨髄腫ワーキンググループ。MRD=最小残存病変。NGF=次世代フロー。NGS=次世代シーケンシング。FLC=遊離軽鎖。Mタンパク質=骨髄腫タンパク質。SPD=測定された病変の最大垂直直径の積の合計。CRAB特性=カルシウムの上昇、腎不全、貧血、溶解性骨病変。FCM=フローサイトメトリー。SUV_{max}=標準化された最大取り込み値。MFC=マルチパラメーターフローサイトメトリー。¹⁸F-FDG PET=¹⁸F-フルオロデオキシグルコースPET。ASCT=自家幹細胞移植。 *全ての応答カテゴリーは、新しい治療を開始する前にいつでも2回連続して評価する必要がある。MRDの場合、2つの連続した評価の必要はないが、各処置段階後のMRDに関する情報が推奨される(例えば、導入、高用量療法/ASCT、強化、維持の後)。MRD試験は、完全応答が疑われるときにのみ開始する必要がある。	

10

20

【 0 5 3 3 】

30

40

50

【表 5 2】

X線検査が実施された場合、全てのカテゴリーの応答及びMRDは、進行性又は新しい骨病変の既知のエビデンスを要しない。ただし、造影MRD陰性の状態が報告された場合、FDG PETの要件を除いて、これらの応答要件を満たすためのX線検査は要しない。†報告された場合の持続的MRD陰性は、使用された方法にも注釈を付ける必要がある(例えば、持続的フローMRD-陰性、持続的シーケンシングMRD-陰性)。‡骨髄MFCはNGFガイドラインに従う必要がある(Paiva B, Gutierrez NC, Rosinol L, et al, Blood 2012; 119:687-91)。リファレンスNGF法は、8色・2チューブアプローチであり、広く検証されている。2チューブアプローチは、より多くの細胞を取得するため、信頼性、一貫性、及び感度を向上させる。8色法は世界中で広く利用可能であり、NGF法はすでに世界中の多くのフローラボで採用されている。完全な8色法は、抗体の凍結乾燥混合物を使用するのが最も効率的であり、エラー、時間、及びコストを削減する。500万個の細胞を評価する必要がある。採用されたFCM法は、 10^5 個の形質細胞のうち少なくとも1つの検出感度を備えている必要がある。§骨髄穿刺液のDNAシーケンシングアッセイでは、LymphoSiGHIT(Sequentia)などの検証済みのアッセイを使用する必要がある。¶Zamagni及び共同研究者(Zamagni E, Nanni C, Mancuso K, et al, Clin Cancer Res 2015; 21:4384-90)、並びに専門家パネル(IMPetUs; Italian Myeloma criteria for PET Use) (Usmani SZ, Mitchell A, Waheed S, et al, Blood 2013; 121:1819-23; Nanni C, Zamagni E, Versari A, et al, Eur J Nucl Med Mol Imaging 2015; 43:414-21.)によって使用される基準。ベースライン陽性病変は、CTによって特定され、少なくとも2つの連続したスライスに存在する、基礎病変を伴い又は伴わず、骨内への取り込みが増加した限局性領域の存在によって特定された。あるいは、サイズが1cm超の溶骨性CT領域内のSUVmax=2.5、又はサイズが1cm以下の溶骨性CT領域内のSUVmax=1.5が陽性と見なされた。MRD陰性がMFC又はNGSによって決定されると、造影を実施する必要がある。||多発性骨髄腫の国際統一応答基準から導かれた(Durie BG, Harousseau JL, Miguel JS, et al, Leukemia 2006; 20:1467-73)。Rajkumar及び共同研究者によって導かれた微小応答の定義及び説明(Rajkumar SV, Harousseau JL, Durie B, et al, Blood 2011; 117:4691-95)。疾患を測定する唯一の方法が血清FLCレベルによる場合、完全応答は、先に列挙した完全応答基準に加えて、0.26~1.65の正常FLC比として定義できる。そのような患者の非常に良好な部分的応答には、関与するFLCレベルと関与しないFLCレベルの差が90%以上減少することを要する。全ての応答カテゴリーは、新しい治療を開始する前にいつでも2回連続して評価する必要がある、X線検査が実施された場合、全てのカテゴリーはまた、進行性又は新しい骨病変又は髄外形質細胞腫の既知のエビデンスを要しない。これらの応答要件を満たすためのX線検査は要しない。骨髄の評価を確認する必要はない。安定した疾患を除く各カテゴリーは、確認試験が実施されるまで未確認と見なされる。最初の試験の日付は、応答の期間などの時間依存性の結果を評価するための応答の日付と見なされる。**血清FLCレベル又はFLC比に関連する臨床使用に関する全ての推奨事項は、検証済みのFreelite試験(Binding Site, Birmingham, UK)で得られた結果に基づく。††免疫組織化学におけるクローン細胞の存在/不存在は、 κ/λ 比に基づく。免疫組織化学による異常な κ/λ 比は、分析のために最低100個の形質細胞を要する。異常なクローンの存在を反映する異常な比率は、4:1超又は1:2未満の κ/λ である。‡‡特に、免疫系のオリゴクローナル再構成に関連することが多い従来の完全応答を達成した患者の状況では、処置後の異なるモノクローナルタンパク質の出現に特別な注意を払う必要がある。これらのバンドは、典型的には、経時的に消失し、一部の研究ではより良い結果に関連付けられている。また、モノクローナル抗体を投与されている患者におけるモノクローナルIgG κ の出現は、治療用抗体とは区別される必要がある。§§形質細胞腫の測定は、PET/CTのCT部分、又はMRIスキャン、又は該当する場合は専用のCTスキャンから行われる必要がある。皮膚の関与のみを有する患者の場合、皮膚病変は定規で測定する必要がある。腫瘍サイズの測定はSPDによって決定される。¶¶以前に完全応答を達成したと分類された患者における陽性免疫固定のみでは、進行とはみなされない。腫瘍増殖停止時間及び無増悪生存期間を計算する目的で、完全応答を達成し、MRD陰性である患者は、進行性疾患について列挙されている基準を使用して評価する必要がある。完全応答からの再発又はMRDからの再発の基準は、無病生存期間を計算する場合にのみ使用する必要がある。|| 値が医師の裁量による偽の結果であると思われる場合(例えば、検査エラーの可能性)、最低値を決定する際にその値は考慮されない。

【0 5 3 4】

多発性骨髄腫及び関連疾患の標準処置には、化学療法、幹細胞移植(自己又は同種異系)、放射線療法及び他の薬物療法が含まれる。頻繁に使用される抗骨髄腫薬には、アルキル化剤(例えば、ベンダムスチン、シクロホスファミド、メルファラン)、プロテアソーム阻害剤(例えば、ボルテゾミブ)、コルチコステロイド(例えば、デキサメタゾン、プレドニゾン)、免疫調節剤(例えば、サリドマイド、レナリドマイド、Revlimid(登録商標))又はそれらの任意の組み合わせが含まれる。ビスホスホネート薬は、骨量減少を防ぐために、頻繁に標準的な抗MM処置と組み合わせても投与される。65~70歳を超える患者は、幹細胞移植の候補になる可能性が低い。いくつかの場合、二重自己幹細胞

胞移植は、最初の移植に対する反応が最適以下の60歳未満の患者にとっての選択肢である。本発明の組成物及び方法は、多発性骨髄腫に対して現在処方されている処置のいずれかと組み合わせて投与され得る。

【0535】

BCMAに関連する疾患又は障害の別の例は、ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫である (Chiu et al., Blood. 2007, 109 (2) : 729-39 ; He et al., J Immunol. 2004, 172 (5) : 3268-79 を参照されたい)。

【0536】

ホジキン病としても知られるホジキンリンパ腫 (HL) は、白血球又はリンパ球に由来するリンパ系の癌である。リンパ腫を構成する異常細胞は、リード・シュテルンベルグ細胞と呼ばれる。ホジキンリンパ腫では、癌は、あるリンパ節群から別のリンパ節群に広がる。ホジキンリンパ腫は、リード・シュテルンベルグ細胞の形態及びリード・シュテルンベルグ胞周辺の細胞組成 (リンパ節生検で測定) に基づいて、4つの病理学的サブタイプ : 結節性硬化性HL、混合細胞性サブタイプ、リンパ球豊富型又はリンパ球優位型、リンパ球枯渇型に下位分類できる。いくつかのホジキンリンパ腫は、結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫である可能性もあり、特定されていない可能性もある。ホジキンリンパ腫の症状及び徴候は、首、腋窩又は鼠径部のリンパ節の無痛性の腫れ、発熱、寝汗、体重減少、疲労、そう痒又は腹痛が含まれる。

【0537】

非ホジキンリンパ腫 (NHL) は、ホジキンリンパ腫以外の任意の種類のリンパ腫を含む多様な血液癌の群を含む。非ホジキンリンパ腫のサブタイプは、主に細胞形態、染色体異常及び表面マーカーによって分類される。NHLサブタイプ (又はNHL関連癌) は、限定されないが、バーキットリンパ腫、B細胞慢性リンパ性白血病 (B-CLL)、B細胞前リンパ球性白血病 (B-PLL)、慢性リンパ性白血病 (CLL)、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫 (DLBCL) (例えば、血管内大細胞型B細胞リンパ腫及び原発性縦隔B細胞リンパ腫)、濾胞性リンパ腫 (例えば、濾胞中心リンパ腫、濾胞性小開裂細胞)、有毛細胞白血病、高悪性度B細胞リンパ腫 (バーキット様)、リンパ形質細胞性リンパ腫 (ワルデンシュトレームマクログロブリン血症)、マントル細胞リンパ腫、辺縁帯B細胞リンパ腫 (例えば、節外性辺縁帯B細胞リンパ腫又は粘膜関連リンパ組織 (MALT) リンパ腫、節性辺縁帯B細胞リンパ腫、脾臓辺縁帯B細胞リンパ腫)、形質細胞腫／骨髄腫、前駆Bリンパ芽球性白血病／リンパ腫 (PB-LBL／L)、原発性中枢神経系 (CNS) リンパ腫、原発性眼内リンパ腫、小リンパ球性リンパ腫 (SLL) などのB細胞リンパ腫 ; 並びに限定されないが、未分化大細胞リンパ腫 (ALCL)、成人T細胞リンパ腫／白血病 (例えば、くすぶり型、慢性、急性及びリンパ腫性)、血管中心性リンパ腫、血管免疫芽球性T細胞リンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫 (菌状息肉腫、セザリー症候群など)、節外ナチュラルキラー／T細胞リンパ腫 (鼻型)、腸疾患型腸T細胞リンパ腫、大顆粒リンパ球性白血病、前駆Tリンパ芽球性リンパ腫／白血病 (T-LBL／L)、T細胞慢性リンパ性白血病／前リンパ球性白血病 (T-CLL／PLL) 及び不特定型末梢T細胞リンパ腫などのT細胞リンパ腫を含む。ホジキンリンパ腫の症状及び徴候は、首、腋窩又は鼠径部のリンパ節の無痛性の腫れ、発熱、寝汗、体重減少、疲労、そう痒、腹痛、咳又は胸痛が含まれる。

【0538】

病期分類は、ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫の両方について同じであり、体内の癌細胞の広がり の程度を指す。ステージIでは、リンパ腫細胞は、1つのリンパ節群に存在する。ステージIIでは、リンパ腫細胞は、少なくとも2つのリンパ節群に存在するが、両方の群は、横隔膜の同じ側又は組織又は臓器の一部及び横隔膜の同じ側にあるその臓器の近くのリンパ節に存在する。ステージIIIでは、リンパ腫細胞は、横隔膜の両側のリンパ節又はこれらのリンパ節群の近くの組織又は臓器の一部又は脾臓に存在する。ステージIVでは、リンパ腫細胞が少なくとも1つの臓器又は組織のいくつかの部分に見

られるか、又はリンパ腫細胞が横隔膜の反対側の臓器及びリンパ節に見られる。ローマ数字の病期分類の指定に加えて、病期は、A、B、E及びSの文字で表すこともでき、ここで、Aは、症状を有しない患者を指し、Bは、症状を有する患者を指し、Eは、リンパ系外の組織にリンパ腫が見られる患者を指し、Sは、脾臓にリンパ腫が見られる患者を指す。
【0539】

ホジキンリンパ腫は、通常、放射線療法、化学療法又は造血幹細胞移植で処置される。非ホジキンリンパ腫の最も一般的な療法は、R-CHOPであり、これは、4つの異なる化学療法（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン及びプレニゾロン）及びリツキシマブ（Rituxan（登録商標））からなる。NHLの処置に一般的に使用される他の療法には、他の化学療法剤、放射線療法、幹細胞移植（自己又は同種異系骨髄移植）又は免疫療法などの生物学的療法が含まれる。生物学的治療剤の他の例には、リツキシマブ（Rituxan（登録商標））、トシツモマブ（Bexxar（登録商標））、エブラツズマブ（LymphoCide（登録商標））及びアレムツズマブ（MabCampath（登録商標））が含まれるが、これらに限定されない。本発明の組成物及び方法は、ホジキンリンパ腫又は非ホジキンリンパ腫に対して現在処方されている処置のいずれかと組み合わせて投与され得る。

【0540】

BCMAの発現は、リンパ形質細胞性リンパ腫（LPL）としても知られるワルデンシュトレームマクログロブリン血症（WM）にも関連している。（Elsawa et al., Blood. 2006, 107（7）：2882-8を参照されたい）。ワルデンシュトレームマクログロブリン血症は、以前には多発性骨髄腫に関連していると考えられていたが、最近では非ホジキンリンパ腫のサブタイプとして分類されている。WMは、無制御のB細胞リンパ球増殖を特徴とし、貧血及び過剰量のパラプロテイン又は免疫グロブリンM（IgM）の産生を引き起こし、これは、血液濃度を高め、過粘稠度症候群を引き起こす。WMの他の症状又は徴候には、発熱、寝汗、疲労、貧血、体重減少、リンパ節腫脹若しくは脾腫、かすみ目、めまい、鼻血、歯茎の出血、異常な打撲傷、腎機能障害若しくは不全、アミロイドーシス又は末梢神経障害が含まれる。

【0541】

WMの標準処置は、特にリツキシマブ（Rituxan（登録商標））による化学療法からなる。クロラムブシル（Leukeran（登録商標））、シクロホスファミド（Neosar（登録商標））、フルダラビン（Fludara（登録商標））、クラドリビン（Leustatin（登録商標））、ビンクリスチン及び／又はサリドマイドなどの他の化学療法薬を組み合わせる使用することができる。プレドニゾンなどのコルチコステロイドも化学療法と組み合わせる投与することができる。プラズマフェレーシス又は血漿交換は、血液からパラプロテインを除去することによっていくつかの症状を緩和するために、患者の処置全体を通して一般的に使用される。いくつかの場合、幹細胞移植は、一部の患者にとっての選択肢である。

【0542】

BCMAに関連する疾患又は障害の別の例は、脳腫瘍である。具体的には、BCMAの発現は、星状細胞腫又は神経膠芽腫と関連付けられている（Deshayes et al., Oncogene. 2004, 23（17）：3005-12, Pelekanou et al., PLoS One. 2013, 8（12）：e83250を参照されたい）。星状細胞腫は、脳内のグリア細胞の一種である星状細胞から発生する腫瘍である。神経膠芽腫（多形神経膠芽腫又はGBMとしても知られる）は、星状細胞腫の最も悪性の形態であり、脳腫瘍の最も進行した病期（IV期）と考えられている。神経膠芽腫には、2つの変種：巨大細胞膠芽腫及び神経膠肉腫がある。他の星状細胞腫には、若年性毛様細胞性星状細胞腫（JPA）、線維性星状細胞腫、多形性黄色星状細胞腫（PXA）、胚芽異形成性神経上皮腫瘍（DNET）及び未分化星状細胞腫（AA）が含まれる。

【0543】

神経膠芽腫又は星状細胞腫に関連する症状又は徴候には、脳内圧の上昇、頭痛、発作、

記憶喪失、行動の変化、体の片側の動き又は感覚の喪失、言語機能障害、認知障害、視覚障害、悪心、嘔吐及び腕又は脚の脱力が含まれる。

【0544】

腫瘍の外科的除去（又は切除）は、正常な周囲の脳への損傷を与えることなく又は最小限の損傷で可能な限り多くの神経膠腫を除去するための標準処置である。放射線療法及び／又は化学療法は、手術後、残っている癌細胞又は衛星病巣からの再発性疾患を抑制及び遅らせるためによく使用される。放射線療法には、全脳放射線療法（従来の外部ビーム放射線）、標的化三次元原体放射線療法及び標的化放射性核種が含まれる。神経膠芽腫の処置に一般的に使用される化学療法剤には、テモゾロミド、ゲフィチニブ又はエルロチニブ及びシスプラチンが含まれる。ペバシズマブ（Avastin（登録商標））などの血管新生阻害剤も化学療法及び／又は放射線療法と組み合わせて一般的に使用される。

10

【0545】

支持的処置はまた、神経学的症状を緩和し、神経学的機能を改善するために頻繁に使用され、本明細書に記載の癌療法のいずれかと組み合わせて投与される。主な支持剤には、抗けいれん薬及びコルチコステロイドが含まれる。従って、本発明の組成物及び方法は、神経膠芽腫又は星状細胞腫を処置するための標準処置又は支持的処置のいずれかと組み合わせて使用され得る。

【0546】

BCMA発現に関連する非癌関連疾患及び障害も、本明細書に開示される組成物及び方法によって処置することができる。BCMAの発現に関連する非癌関連疾患及び障害の例には、ウイルス感染症；例えば、HIV、真菌感染症、例えばクリプトコッカス・ネオフォルマンズ（*C. neoformans*）；過敏性腸疾患；潰瘍性大腸炎及び粘膜免疫に関連する障害が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0547】

本発明のCAR修飾免疫エフェクター細胞、（例えば、T細胞又はNK細胞）を、単独で或いは希釈剤及び／若しくはIL-2又は他のサイトカイン若しくは細胞集団などの他の成分と組み合わせて医薬組成物として投与し得る。

【0548】

本発明は、癌を処置するための組成物及び方法を提供する。一態様において、癌は、血液癌であり、血液癌が白血病又はリンパ腫であるものを含むが、これらに限定されない。一態様において、本発明のCAR発現細胞（例えば、CAR-T細胞又はCAR発現NK細胞）を使用して、これらに限定されないが、例えば、これらに限定されないが、例えばB細胞急性リンパ性白血病（「BALL」）、T細胞急性リンパ性白血病（「TALL」）、急性リンパ性白血病（ALL）を含む急性白血病；これらに限定されないが、例えば慢性骨髄性白血病（CML）、慢性リンパ球性白血病（CLL）を含む1つ以上の慢性白血病；これらに限定されないが、例えばB細胞前リンパ球性白血病、芽球性形質細胞様樹状細胞の新生物、バーキットリンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、ヘアリーセル白血病、小細胞型又は大細胞型濾胞性リンパ腫、悪性のリンパ増殖性状態、MALTリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、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）を併せ持つ血液学的な状態の多様な集合体である「前白血病状態」などを含む更なる血液癌又は血液学的状態などの癌及び悪性腫瘍を処置し得る。更に、BCMAの発現と関連する疾患は、例えば、非定型及び／又は非古典的な癌、悪性腫瘍、前癌状態又はBCMAを発現する増殖性疾患を含むが、これらに限定されない。

30

40

【0549】

実施形態において、本明細書に記載の組成物は、形質細胞増殖性障害、例えば無症候性骨髄腫（くすぶり型多発性骨髄腫又は無痛性骨髄腫）、意義不明の単クローン性高ガンマグロブリン血症（MGUS）、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、形質細胞腫（例えば、形質細胞異常増殖症、孤立性骨髄腫、孤立性形質細胞腫、髄外形質細胞腫及び

50

多発性形質細胞腫）、全身性アミロイド軽鎖アミロイドーシス及びP O E M S症候群（クrou・深瀬症候群、高月病及びP E P症候群としても知られる）を含むが、これらに限定されない疾患を処置するために使用することができる。

【0550】

実施形態において、本明細書に記載の組成物は、癌、例えば本明細書に記載の癌、例えば前立腺癌（例えば、去勢抵抗性若しくは治療抵抗性の前立腺癌又は転移性前立腺癌）、脾臓癌又は肺癌を含むが、これらに限定されない疾患を処置するために使用することができる。

【0551】

本発明は、B C M A発現細胞集団の増殖を阻害するか又はそれを減少させる方法も提供し、本方法は、B M C A発現細胞を含む細胞集団を、B C M A発現細胞に結合する本発明の抗B C M A C A R発現細胞（例えば、B C M A C A R T細胞又はB C M A C A R発現N K細胞）と接触させることを含む。特定の態様において、本発明は、B C M Aを発現する癌細胞の集団の増殖を阻害するか又はそれを減少させる方法を提供し、本方法は、B C M A発現癌細胞集団を、B C M A発現細胞に結合する本発明の抗B C M A C A R発現細胞（例えば、B C M A C A R T細胞又はB C M A C A R発現N K細胞）と接触させることを含む。一態様において、本発明は、B C M Aを発現する癌細胞の集団の増殖を阻害するか又はそれを減少させる方法を提供し、本方法は、B M C A発現癌細胞集団を、B C M A発現細胞に結合する本発明の抗B C M A C A R発現細胞（例えば、B C M A C A R T細胞又はB C M A C A R発現N K細胞）と接触させることを含む。特定の態様において、本発明の抗B C M A C A R発現細胞（例えば、B C M A C A R T細胞又はB C M A C A R発現N K細胞）は、細胞及び／又は癌細胞の含量、数、量又はパーセンテージを、陰性対照と比較して、骨髓性白血病又はB C M A発現細胞と関連する別の癌を有する対象又は動物モデルで少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも65%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも95%又は少なくとも99%減少させる。一態様において、対象は、ヒトである。

【0552】

本発明は、B C M A発現細胞に関連する疾患（例えば、B C M Aを発現する血液癌又は非定型癌）を予防、処置及び／又は管理する方法も提供し、本方法は、B C M A発現細胞に結合する本発明の抗B C M A C A R発現細胞（例えば、B C M A C A R T細胞又はB C M A C A R発現N K細胞）を、必要とする対象に投与することを含む。一態様において、対象は、ヒトである。B C M A発現細胞に関連する障害の非限定的な例には、ウイルス又は真菌感染症及び粘膜免疫に関連する障害が含まれる。

【0553】

本発明は、B C M A発現細胞に関連する疾患を予防、処置及び／又は管理する方法も提供し、本方法は、B C M A発現細胞に結合する本発明の抗B C M A C A R発現細胞（例えば、B C M A C A R T細胞又はB C M A C A R発現N K細胞）を、必要とする対象に投与することを含む。一態様において、対象は、ヒトである。

【0554】

本発明は、B C M A発現細胞に関連する癌の再発を予防する方法を提供し、本方法は、B C M A発現細胞に結合する本発明の抗B C M A C A R発現細胞（例えば、B C M A C A R T細胞又はB C M A C A R発現N K細胞）を、それを必要とする対象に投与することを含む。一態様において、方法は、それを必要とする対象に、B C M A発現細胞と結合する有効量の本明細書に記載の抗B C M A C A R発現細胞（例えば、B C M A C A R T細胞又はB C M A C A R発現N K細胞）を有効量の別の治療と組み合わせて投与することを含む。

【0555】

組み合わせ療法

本明細書に記載のC A R発現細胞は、他の公知の薬剤及び療法と組み合わせて使用され得る。

10

20

30

40

50

【0556】

本明細書に記載のCAR発現細胞及び少なくとも1つの更なる治療剤を同時に、同じ又は別の組成物で又は逐次的に投与できる。逐次投与について、本明細書に記載のCAR発現細胞をまず投与し得、更なる薬剤を次に投与し得るか、又は投与の順番が逆であり得る。

【0557】

CAR治療及び／又は他の治療剤、方法又はモダリティを活動性障害の期間又は寛解又は低活動性疾患の期間に投与できる。CAR治療を他の処置の処置前、処置と同時、処置後又は障害の寛解中に投与できる。

【0558】

組み合わせて投与するとき、CAR治療及び更なる薬剤（例えば、第2又は第三の薬剤）又は全てを、個々に、例えば単剤療法として使用する各薬剤の量又は投与より高い、低い又は同じ量又は用量で投与できる。一実施形態において、CAR治療、更なる薬剤（例えば、第2又は第三薬剤）又は全ての投与される量又は用量は、個々に、例えば単剤療法として使用する各薬剤の量又は用量より低い（例えば、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%又は少なくとも50%）。他の実施形態において、所望の効果（例えば、癌の処置）を生じるCAR治療、更なる薬剤（例えば、第2又は第三薬剤）又は全ての投与される量又は用量は、同じ治療効果を達成するのに必要である、個々に、例えば単剤療法として使用する各薬剤の量又は用量より低い（例えば、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%又は少なくとも50%低い）。

【0559】

更なる態様において、本明細書に記載のCAR発現細胞は、処置レジメンにおいて、手術、化学療法、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、FK506などの免疫抑制剤、抗体又はCAMPATH、抗CD3抗体などの他の免疫除去剤若しくは他の抗体療法、サイトキシン、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、サイトカイン及び照射、Izumoto et al. 2008 J Neurosurg 108:963-971に記載されるものなどのペプチドワクチンと組み合わせ使用され得る。

【0560】

ある例において、本発明の化合物を他の抗癌剤、抗アレルギー剤、制吐剤（又は制吐剤）、鎮痛剤、細胞保護剤及びこれらの組み合わせなどの他の治療剤と組み合わせる。

【0561】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の第1のCAR発現細胞、例えば本明細書に記載のBCMA CAR発現細胞は、第2のCAR発現細胞と組み合わせ使用され得る。いくつかの実施形態において、第2のCAR発現細胞は、異なる抗BCMA結合ドメイン、例えば第1のCAR発現細胞によって発現されるCARの抗BCMA結合ドメインと異なる、本明細書に記載の抗BCMA結合ドメインを有するCARを発現する。いくつかの実施形態において、第2のCAR発現細胞は、BCMA以外の抗原（例えば、CD19、CD20、CS-1、カップ軽鎖、CD139、ルイスY抗原又はCD38）を標的とする抗原結合ドメインを含むCARを発現する。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の第1のCAR発現細胞、例えば本明細書に記載のBCMA CAR発現細胞は、CD19 CARを含む第2のCAR発現細胞と組み合わせ使用される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載のBCMA CAR発現細胞は、本明細書に記載のBCMA関連癌、例えば多発性骨髄腫を処置するために、CD19 CAR発現細胞と組み合わせ使用される。いくつかの実施形態において、多発性骨髄腫は、CD19陰性であり、例えばCD19陰性表現型を有する腫瘍性形質細胞の大部分（例えば、少なくとも98%、99%、99.5%、99.9%又は99.95%）を有し、これは、例えばフローサイトメトリー、RT-PCR又はフローサイトメトリー及びRT-PCRの両方で検出される。CD19 CARは、CD19陰性多発性骨髄腫に対しても有効である。理論に拘束されることを望まないが、CD19 CARは、本明細書に記載のアッセイの検

10

20

30

40

50

出閾値を下回るレベルのCD19を発現する細胞を標的とすることにより又は腫瘍性細胞をサポートする非腫瘍性細胞を標的とすることにより、腫瘍性細胞の小さいが重要なCD19陽性集団に作用し得る。実施形態において、CD19 CARは、B細胞、例えばB制御性B細胞を除去することができる。

【0562】

例えば、いくつかの実施形態において、本明細書に記載の第1のCAR発現細胞、例えばBCMA CAR発現細胞及び本明細書に記載の第2のCAR発現細胞、例えばCD19 CAR発現細胞は、同じ組成物中に調製され、同時に投与される。別の実施形態において、本明細書に記載の第1のCAR発現細胞、例えばBCMA CAR発現細胞及び本明細書に記載の第2のCAR発現細胞、例えばCD19 CAR発現細胞は、別個の組成物中に調製され、別個の組成物は同時に又は連続して投与される。BCMA CAR発現細胞と第2のCAR発現細胞を別個の組成物中に調製する場合、BCMA CAR発現細胞を最初に投与でき、第2のCAR発現細胞を2番目に投与できるか、又は投与の順番を逆にできる。

10

【0563】

いくつかの実施形態において、CD19 CARは、CD19 CAR、例えば2014年3月15日に出版された国際公開第2014/153270号パンフレット（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載のヒト化CD19 CAR又はそれと少なくとも95%、例えば95~99%同一の配列である。いくつかの実施形態において、CD19 CAR構築物は、PCT国際公開第2012/079000号パンフレット（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に提供されるCAR19構築物又はそれと少なくとも95%、例えば95~99%同一の配列である。いくつかの実施形態において、抗CD19結合ドメインは、国際公開第2012/079000号パンフレットに記載のscFv又はそれと少なくとも95%、例えば95~99%同一の配列である。

20

【0564】

実施形態において、第1のCAR発現細胞が対象に投与され、第2のCAR発現細胞が対象に投与される。実施形態において、第1のCAR発現細胞は、CD27共刺激ドメイン及びCD3ゼータ（変異型又は野生型）一次シグナル伝達ドメインを含むCAR（例えば、BCMA又はCD19 CAR）を含む。実施形態において、第2のCAR発現細胞は、4-1BB共刺激ドメイン及びCD3ゼータ（変異型又は野生型）一次シグナル伝達ドメインを含むCAR（例えば、BCMA CAR）を含む。理論に拘束されることを望まないが、実施形態において、第1のCAR発現細胞は、第2のCAR発現細胞よりも毒性が低く、腫瘍を減量するために使用することができる。

30

【0565】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞を化学療法剤と組み合わせて使用できる。例示的な化学療法剤は、アントラサイクリン（例えば、ドキソルビシン（例えば、リポソームドキソルビシン））、ビンカアルカロイド（例えば、ビンブラスチン、ピンクリスチン、ビンデシン、ビノレルビン）、アルキル化剤（例えば、シクロホスファミド、ダカルバジン、メルファラン、イホスファミド、テモゾロミド）、免疫細胞抗体（例えば、アレムツズマブ、ゲムツズマブ、リツキシマブ、トシツモマブ）、代謝拮抗剤（例えば、葉酸アンタゴニスト、ピリミジン類似体、プリン類似体及びアデノシンデアミナーゼ阻害剤（例えば、フルダラビン））、mTOR阻害剤、TNFRグルココルチコイド誘発TNFR関連タンパク質（GITR）アゴニスト、プロテアソーム阻害剤（例えば、アクラシノマイシンA、グリオトキシン又はボルテゾミブ）、サリドマイド又はサリドマイド誘導体（例えば、レナリドマイド）などの免疫調節剤を含む。

40

【0566】

併用療法における使用が企図される一般的化学療法剤は、アナストロゾール（アリミデックス（登録商標））、ピカルタミド（カソデックス（登録商標））、硫酸プレオマイシン（Blenoxane（登録商標））、ブスルファン（マイレラン（登録商標））、ブスルファン注（ブスルフェクス（登録商標））、カペシタビン（ゼローダ（登録商標））

50

、N4-ペントキシカルボニル-5-デオキシ-5-フルオロシチジン、カルボプラチン（パラプラチン（登録商標））、カルムスチン（BiCNU（登録商標））、クロラムブシル（リユーケラン（登録商標））、シスプラチン（Platinol（登録商標））、クラドリビン（ロイスタチン（登録商標））、シクロホスファミド（シトキサン（登録商標））又はNeosar（登録商標））、シタラビン、シトシンアラビノシド（Cytosar-U（登録商標））、シタラビンリポソーム注射（DepoCyt（登録商標））、ダカルバジン（DTIC-Dome（登録商標））、ダクチノマイシン（アクチノマイシンD、Cosmegen）、塩酸ダウノルビシン（Cerubidine（登録商標））、クエン酸ダウノルビシンリポソーム注射（DaunoXome（登録商標））、デキサメサゾン、ドセタキセル（タキソテール（登録商標））、塩酸ドキシソルビシン（アドリアマイシン（登録商標））、Rubex（登録商標）、エトポシド（ベプシド（登録商標））、リン酸フルダラビン（フルダラ（登録商標））、5-フルオロウラシル（アドルシル（登録商標））、エフデックス（登録商標）、フルタミド（Eulexin（登録商標））、テザシチビン、ゲムシタビン（ジフルオロデオキシシチジン）、ヒドロキシ尿素（ハイドレア（登録商標））、イダルビシン（イダマイシン（登録商標））、イホスファミド（IFEX（登録商標））、イリノテカン（Campotosar（登録商標））、L-アスパラギナーゼ（ELSPAR（登録商標））、ロイコボリンカルシウム、メルファラン（アルケラン（登録商標））、6-メルカプトプリン（ピュリネソール（登録商標））、メトトレキサート（Folex（登録商標））、ミトキサントロン（ノバントロン（登録商標））、マイロターグ、パクリタキセル（タキソール（登録商標））、phoenix（イットリウム90/MX-DTPA）、ペントスタチン、ポリフェプロザン20とカルムスチンインプラント（グリアデル（登録商標））、クエン酸タモキシフェン（ノルバデックス（登録商標））、テニポシド（Vumon（登録商標））、6-チオグアニン、チオテパ、チラパザミン（Tirazone（登録商標））、注射用塩酸トポテカン（ハイカムチン（登録商標））、ビンブラスチン（Velban（登録商標））、ピンクリスチン（オンコビン（登録商標））及びビノレルビン（ナベルビン（登録商標））を含む。

【0567】

本発明の化合物との組み合わせのための特に興味深い抗癌剤は、アントラサイクリン；アルキル化剤；代謝拮抗剤；カルシウム依存性ホスファターゼカルシニューリン又はp70S6キナーゼFK506）を阻害する又はp70S6キナーゼを阻害する薬剤；mTOR阻害剤；免疫調節剤；アントラサイクリン；ピンカアルカロイド；プロテオソーム阻害剤；GITRアゴニストタンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤；CDK4キナーゼ阻害剤；BTK阻害剤；MKNキナーゼ阻害剤；DGKキナーゼ阻害剤；又は腫瘍溶解性ウイルスを含む。

【0568】

例示的なアルキル化剤は、窒素マスタード、エチレンイミン誘導体、アルキルスルホネート、ニトロソウレア類及びトリアゼン）：ウラシルマスタード（アミノウラシルマスタード（登録商標）、Chlorethaminacil（登録商標）、Demethyldopan（登録商標）、Desmethyldopan（登録商標）、Haemantamine（登録商標）、Nordopan（登録商標）、Uracil nitrogen mustard（登録商標）、Uracillost（登録商標）、Uracilmostaza（登録商標）、ウラムスチン（登録商標）、ウラムスチン（登録商標）、クロルメチン（Mustargen（登録商標））、シクロホスファミド（シトキサン（登録商標）、Neosar（登録商標）、Clafen（登録商標）、エンドキサン（登録商標）、Procytox（登録商標）、Revimmune（商標））、イホスファミド（Mitoxana（登録商標））、メルファラン（アルケラン（登録商標））、クロラムブシル（リユーケラン（登録商標））、ピポブロマン（Amedel（登録商標）、Vercyte（登録商標））、トリエチレンメラミン（ヘメル（登録商標）、Hexalen（登録商標）、Hexastat（登録商標））、トリエチレンチオホスホロアミン、テモゾロミド（テモダール（登録商標））、チオテパ（Thioplex（登

10

20

30

40

50

録商標))、ブスルファン(Busilvex(登録商標)、マイレラン(登録商標))、カルムスチン(BicNU(登録商標))、ロムスチン(CeeNU(登録商標))、ストレプトゾシン(Zanosar(登録商標))及びダカルバジン(DTIC-Dome(登録商標))を含むが、これらに限定されない。アルキル化剤の更なる例は、オキサリプラチン(エロキサチン(登録商標))；テモゾロミド(テモダール(登録商標)及びテモダール(登録商標))；ダクチノマイシン(別名アクチノマイシン-D、Cosmegen(登録商標))；メルファラン(別名L-PAM、L-サルコリシン及びフェニルアラニンマスタード、アルケラン(登録商標))；アルトレタミン(別名ヘキサメチルメラミン(HMM)、Hexalen(登録商標))；カルムスチン(BicNU(登録商標))；ベンダムスチン(Treanda(登録商標))；ブスルファン(ブスルフェクス(登録商標)及びマイレラン(登録商標))；カルボプラチン(パラプラチン(登録商標))；ロムスチン(別名CCNU、CeeNU(登録商標))；シスプラチン(別名CDDP、Platinol(登録商標)及びPlatinol(登録商標)-AQ)；クロラムブシル(リューケラン(登録商標))；シクロホスファミド(シトキサン(登録商標)及びNeosar(登録商標))；ダカルバジン(別名DTIC、DIC及びイミダゾールカルボキサミド、DTIC-Dome(登録商標))；アルトレタミン(別名ヘキサメチルメラミン(HMM)、Hexalen(登録商標))；イホスファミド(IfeX(登録商標))；Prednumustine；プロカルバジン(Matulane(登録商標))；メクロレタミン(別名窒素マスタード、ムスチン及び塩酸メクロロエタミン、Mustargen(登録商標))；ストレプトゾシン(Zanosar(登録商標))；チオテパ(別名チオホスホアミド、TESPA及びTSPA、Thioplex(登録商標))；シクロホスファミド(エンドキサン(登録商標)、シトキサン(登録商標)、Neosar(登録商標)、Procyttox(登録商標)、Revimmune(登録商標))；及びベンダムスチンHCl(Treanda(登録商標))を含むが、これらに限定されない。

【0569】

例示的なmTOR阻害剤は、例えば、テムシロリムス；リダフォロリムス（以前はデフェロリムスとして既知、(1R, 2R, 4S)-4-[(2R)-2-[(1R, 9S, 12S, 15R, 16E, 18R, 19R, 21R, 23S, 24E, 26E, 28Z, 30S, 32S, 35R)-1, 18-ジヒドロキシ-19, 30-ジメトキシ-15, 17, 21, 23, 29, 35-ヘキサメチル-2, 3, 10, 14, 20-ペンタオキソ-11, 36-ジオキサ-4-アザトリシクロ[30.3.1.0^{4,9}]ヘキサトリアコンタ-16, 24, 26, 28-テトラエン-12-イル]プロピル]-2-メトキシシクロヘキシルジメチルホスフィネート、AP23573及びMK8669としても知られ、国際公開第03/064383号パンフレットに記載)；エベロリムス(アフィニール(登録商標)又はRAD001)；ラパマイシン(AY22989、シロリムス(登録商標))；シマピモド(CAS 164301-51-3)；エムシロリムス、(5-{2, 4-ビス[(3S)-3-メチルモルホリン-4-イル]ピリド[2, 3-d]ピリミジン-7-イル}-2-メトキシフェニル)メタノール(AZD8055)；2-アミノ-8-[トランス-4-(2-ヒドロキシエトキシ)シクロヘキシル]-6-(6-メトキシ-3-ピリジニル)-4-メチル-ピリド[2, 3-d]ピリミジン-7(8H)-オン(PF04691502、CAS 1013101-36-4)；及びN²-[1, 4-ジオキサ-4-[[4-(4-オキソ-8-フェニル-4H-1-ベンゾピラン-2-イル)モルホリニウム-4-イル]メトキシ]ブチル]-L-アルギニルグリシル-L-α-アスパルチル-L-セリン-(配列番号285)、分子内塩(SF1126、CAS 936487-67-1)及びXL765を含む。

【0570】

例示的な免疫調節剤は、例えば、アフツズマブ(Roche(登録商標)から入手可能)；ペグフィルグラスチム(Neulasta(登録商標))；レナリドマイド(CC-5013、レブリミド(登録商標))；サリドマイド(サロミド(登録商標))、アクチ

10

20

30

40

50

ミド (CC4047) ; 及び I R X - 2 (インターロイキン1、インターロイキン2 及びインターフェロン γ を含むヒトサイトカイン混合物、CAS 951209-71-5、I R X T h e r a p e u t i c s から入手可能)を含む。

【0571】

例示的なアントラサイクリンは、例えば、ドキシソルピシン (アドリアマイシン (登録商標) 及び Rubex (登録商標)) ; ブレオマイシン (lenoxane (登録商標)) ; ダウノルピシン (塩酸ダウノルピシン、ダウノマイシン及び塩酸ルビドマイシン、Cerubidine (登録商標)) ; ダウノルピシンリポソーム (クエン酸ダウノルピシンリポソーム、DaunoXome (登録商標)) ; ミトキサントロン (DHAD、ノバン トロン (登録商標)) ; エピルピシン (Ellence (商標)) ; イダルピシン (イダマイシン (登録商標)、イダマイシン PFS (登録商標)) ; マイトマイシン C (ムタマイシン (登録商標)) ; ゲルダナマイシン ; ハービマイシン ; ラビドマイシン ; 及びデスアセチルラビドマイシンを含む。

【0572】

例示的なピンカアルカロイドは、例えば、酒石酸ビンORELピン (ナベルピン (登録商標))、ピンクリスチン (オンコピン (登録商標)) 及びビンデシン (Eldisine (登録商標)) ; ビンブラスチン (別名硫酸ビンブラスチン、ピンカロイコブラスチン及び VLB、Alkabane-AQ (登録商標) 及び Velban (登録商標)) ; 及びビンORELピン (ナベルピン (登録商標))を含む。

【0573】

例示的なプロテオソーム阻害剤は、ボルテゾミブ (ベルケイド (登録商標)) ; カーフィルゾミブ (PX-171-007、(S)-4-メチル-N-((S)-1-((S)-4-メチル-1-((R)-2-メチルオキシラン-2-イル)-1-オキソペンタン-2-イル)アミノ)-1-オキソ-3-フェニルプロパン-2-イル)-2-((S)-2-(2-モルホリノアセトアミド)-4-フェニルブタンアミド)-ペンタンアミド) ; マリゾミブ (NPI-0052) ; イキサゾミブクエン酸エステル (MLN-9708) ; デランゾミブ (CEP-18770) ; 及び O-メチル-N-[(2-メチル-5-チアゾリル)カルボニル]-L-セリル-O-メチル-N-[(1S)-2-[(2R)-2-メチル-2-オキシラニル]-2-オキソ-1-(フェニルメチル)エチル]-L-セリンアミド (ONX-0912)を含む。

【0574】

実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞をフルダラビン、シクロホスファミド及び／又はリツキシマブと組み合わせて対象に投与する。実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞をフルダラビン、シクロホスファミド及びリツキシマブ (FCR) と組み合わせて対象に投与する。実施形態において、対象は、CLLを有する。例えば、対象は、染色体17の短腕に欠失を有する (例えば、白血病性細胞における del (17p))。他の例において、対象は、del (17p)を有しない。実施形態において、対象は、免疫グロブリン重鎖可変領域 (IGHV) 遺伝子に変異を含む白血病性細胞を含む。他の実施形態において、対象は、免疫グロブリン重鎖可変領域 (IGHV) 遺伝子に変異を含む白血病性細胞を含まない。実施形態において、フルダラビンを約 10 ~ 50 mg / m² (例えば、約 10 ~ 15、15 ~ 20、20 ~ 25、25 ~ 30、30 ~ 35、35 ~ 40、40 ~ 45 又は 45 ~ 50 mg / m²) の用量で例えば静脈内に投与する。実施形態において、シクロホスファミドを約 200 ~ 300 mg / m² (例えば、約 200 ~ 225、225 ~ 250、250 ~ 275 又は 275 ~ 300 mg / m²) の用量で例えば静脈内に投与する。実施形態において、リツキシマブを約 400 ~ 600 mg / m² (例えば、400 ~ 450、450 ~ 500、500 ~ 550 又は 550 ~ 600 mg / m²) の用量で例えば静脈内に投与する。

【0575】

実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞をベンダムスチン及びリツキシマブと組み合わせて対象に投与する。実施形態において、対象は、CLLを有する。例えば

10

20

30

40

50

、対象は、染色体17の短腕に欠失を有する（例えば、白血病性細胞におけるdel(17p)）。他の例において、対象は、del(17p)を有しない。実施形態において、対象は、免疫グロブリン重鎖可変領域(IgV_H)遺伝子に変異を含む白血病性細胞を含む。他の実施形態において、対象は、免疫グロブリン重鎖可変領域(IgV_H)遺伝子に変異を含む白血病性細胞を含まない。実施形態において、ベンダムスチンを約70～110mg/m²（例えば、70～80、80～90、90～100又は100～110mg/m²）の用量で例えば静脈内に投与する。実施形態において、リツキシマブを約400～600mg/m²（例えば、400～450、450～500、500～550又は550～600mg/m²）の用量で例えば静脈内に投与する。

【0576】

実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞をリツキシマブ、シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン及び／又はコルチコステロイド（例えば、プレドニゾン）と組み合わせて対象に投与する。実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞をリツキシマブ、シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン及びプレドニゾン(R-CHOP)と組み合わせて対象に投与する。実施形態において、対象は、びまん性大B細胞リンパ腫(DLBCL)を有する。実施形態において、対象は、巨大腫瘤がない限局したステージのDLBCL（例えば、7cm未満のサイズ／直径の腫瘤を含む）を有する。実施形態において、対象は、R-CHOPと組み合わせて放射線で処置される。例えば、対象に、R-CHOP（例えば、1～6サイクル、例えば1、2、3、4、5又は6サイクルのR-CHOP）、続いて放射線を投与する。ある場合、対象に、放射線後、R-CHOP（例えば、1～6サイクル、例えば1、2、3、4、5又は6サイクルのR-CHOP）を投与する。

【0577】

実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞をエトポシド、プレドニゾン、ビンクリスチン、シクロホスファミド、ドキソルビシン及び／又はリツキシマブと組み合わせて対象に投与する。実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞をエトポシド、プレドニゾン、ビンクリスチン、シクロホスファミド、ドキソルビシン及びリツキシマブ(EPOCH-R)と組み合わせて対象に投与する。実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞を用量調節EPOCH-R(DA-EPOCH-R)と組み合わせて対象に投与する。実施形態において、対象は、B細胞リンパ腫、例えばMy_c再配列侵襲性B細胞リンパ腫を有する。

【0578】

実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞をリツキシマブ及び／又はレナリドマイドと組み合わせて対象に投与する。レナリドマイド((RS)-3-(4-アミノ-1-オキソ-1,3-ジヒドロ-2H-イソインドール-2-イル)ピペリジン-2,6-ジオン)は、免疫調節剤である。実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞をリツキシマブ及びレナリドマイドと組み合わせて対象に投与する。実施形態において、対象は、濾胞性リンパ腫(FL)又はマントル細胞リンパ腫(MCL)を有する。実施形態において、対象は、FLを有し、癌治療剤で先に処置されていない。実施形態において、レナリドマイドを約10～20mg（例えば、10～15mg又は15～20mg）の用量で例えば連日投与する。実施形態において、リツキシマブを約350～550mg/m²（例えば、350～375、375～400、400～425、425～450、450～475又は475～500mg/m²）の用量で例えば静脈内投与する。

【0579】

実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞をブレンツキシマブと組み合わせて対象に投与する。ブレンツキシマブは、抗CD30抗体及びモノメチルオーリスタチンEの抗体-薬物コンジュゲートである。実施形態において、対象は、ホジキンリンパ腫(HL)、例えば再発性又は難治性HLを有する。実施形態において、対象は、CD30+HLを含む。実施形態において、対象は、自己幹細胞移植(ASCT)を受けている。実施形態において、対象は、ASCTを受けていない。実施形態において、ブレンツキシマ

10

20

30

40

50

ブを約 $1 \sim 3 \text{ mg/kg}$ (例えば、約 $1 \sim 1.5 \text{ mg/kg}$ 、 $1.5 \sim 2 \text{ mg/kg}$ 、 $2 \sim 2.5 \text{ mg/kg}$ 又は $2.5 \sim 3 \text{ mg/kg}$) で例えば静脈内に例えば3週間毎に投与する。

【0580】

実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞をブレンツキシマブ及びダカルバジン又はブレンツキシマブとベンダムスチンとの組み合わせと組み合わせて対象に投与する。ダカルバジンは、化学名5-(3,3-ジメチル-1-トリアゼニル)イミダゾール-4-カルボキサミドを有するアルキル化剤である。ベンダムスチンは、化学名4-[5-[ビス(2-クロロエチル)アミノ]-1-メチルベンズイミダゾール-2-イル]ブタン酸を有するアルキル化剤である。実施形態において、対象は、ホジキンリンパ腫(HL)を有する。実施形態において、対象は、癌治療剤で先に処置されていない。実施形態において、対象は、少なくとも60歳、例えば60歳、65歳、70歳、75歳、80歳、85歳又はそれを超える。実施形態において、ダカルバジンを約 $300 \sim 450 \text{ mg/m}^2$ (例えば、約 $300 \sim 325 \text{ mg/m}^2$ 、 $325 \sim 350 \text{ mg/m}^2$ 、 $350 \sim 375 \text{ mg/m}^2$ 、 $375 \sim 400 \text{ mg/m}^2$ 、 $400 \sim 425 \text{ mg/m}^2$ 又は $425 \sim 450 \text{ mg/m}^2$) の用量で例えば静脈内に投与する。実施形態において、ベンダムスチンを約 $75 \sim 125 \text{ mg/m}^2$ (例えば、 $75 \sim 100 \text{ mg/m}^2$ 又は $100 \sim 125 \text{ mg/m}^2$ 、例えば約 90 mg/m^2) の用量で例えば静脈内に投与する。実施形態において、ブレンツキシマブを約 $1 \sim 3 \text{ mg/kg}$ (例えば、約 $1 \sim 1.5 \text{ mg/kg}$ 、 $1.5 \sim 2 \text{ mg/kg}$ 、 $2 \sim 2.5 \text{ mg/kg}$ 又は $2.5 \sim 3 \text{ mg/kg}$) で例えば静脈内に例えば3週間毎に投与する。

【0581】

一実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞を対象にCD20阻害剤、例えば抗CD20抗体(例えば、抗CD20単又は二特異的抗体)又はそのフラグメントと組み合わせて投与する。例示的な抗CD20抗体は、リツキシマブ、オファツムマブ、オクレリズマブ、ベルツズマブ、オビヌツズマブ、TRU-015(Trubion Pharmaceuticals)、オカラツズマブ及びPro131921(Genentech)を含むが、これらに限定されない。例えば、Lim et al. Haematologica. 95. 1 (2010): 135-43を参照されたい。

【0582】

一実施形態において、抗CD20抗体は、リツキシマブを含む。リツキシマブは、例えば、www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/103705s5311lbl.pdfに記載のように、CD20に結合し、CD20発現細胞の細胞溶解を起こすキメラマウス/ヒトモノクローナル抗体IgG1カップパである。実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞をリツキシマブと組み合わせて対象に投与する。実施形態において、対象は、CLL又はSLLを有する。

【0583】

一実施形態において、リツキシマブを静脈内に例えば静脈内点滴として投与する。例えば、各点滴は、約 $500 \sim 2000 \text{ mg}$ (例えば、約 $500 \sim 550 \text{ mg}$ 、 $550 \sim 600 \text{ mg}$ 、 $600 \sim 650 \text{ mg}$ 、 $650 \sim 700 \text{ mg}$ 、 $700 \sim 750 \text{ mg}$ 、 $750 \sim 800 \text{ mg}$ 、 $800 \sim 850 \text{ mg}$ 、 $850 \sim 900 \text{ mg}$ 、 $900 \sim 950 \text{ mg}$ 、 $950 \sim 1000 \text{ mg}$ 、 $1000 \sim 1100 \text{ mg}$ 、 $1100 \sim 1200 \text{ mg}$ 、 $1200 \sim 1300 \text{ mg}$ 、 $1300 \sim 1400 \text{ mg}$ 、 $1400 \sim 1500 \text{ mg}$ 、 $1500 \sim 1600 \text{ mg}$ 、 $1600 \sim 1700 \text{ mg}$ 、 $1700 \sim 1800 \text{ mg}$ 、 $1800 \sim 1900 \text{ mg}$ 又は $1900 \sim 2000 \text{ mg}$) のリツキシマブを提供する。一実施形態において、リツキシマブを $150 \text{ mg/m}^2 \sim 750 \text{ mg/m}^2$ 、例えば約 $150 \sim 175 \text{ mg/m}^2$ 、 $175 \sim 200 \text{ mg/m}^2$ 、 $200 \sim 225 \text{ mg/m}^2$ 、 $225 \sim 250 \text{ mg/m}^2$ 、 $250 \sim 300 \text{ mg/m}^2$ 、 $300 \sim 325 \text{ mg/m}^2$ 、 $325 \sim 350 \text{ mg/m}^2$ 、 $350 \sim 375 \text{ mg/m}^2$ 、 $375 \sim 400 \text{ mg/m}^2$ 、 $400 \sim 425 \text{ mg/m}^2$ 、 $425 \sim 450 \text{ mg/m}^2$ 、 450

～475mg/m²、475～500mg/m²、500～525mg/m²、525～550mg/m²、550～575mg/m²、575～600mg/m²、600～625mg/m²、625～650mg/m²、650～675mg/m²又は675～700mg/m²の用量で投与し、ここで、m²は、対象の体表面積を示す。一実施形態において、リツキシマブを少なくとも4日、例えば4日、7日、14日、21日、28日、35日又はそれを超える投薬間隔で投与する。例えば、リツキシマブを少なくとも0.5週間、例えば0.5週間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間又はそれを超える投薬間隔で投与する。一実施形態において、リツキシマブを一定期間、例えば少なくとも2週間、例えば少なくとも2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間、11週間、12週間、13週間、14週間、15週間、16週間、17週間、18週間、19週間、20週間又はそれより長く、本明細書に記載の用量及び投薬間隔で投与する。例えば、リツキシマブを本明細書に記載の用量及び投薬間隔で1処置サイクル当たり計少なくとも4回の投与で投与する（例えば、1処置サイクル当たり少なくとも4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16回又はそれを超える投与）。

【0584】

一実施形態において、抗CD20抗体は、オフアツムマブを含む。オフアツムマブは、分子量約149kDaを有する抗CD20 IgG1κヒトモノクローナル抗体である。例えば、オフアツムマブは、トランスジェニックマウス及びハイブリドーマ技術を使用して産生し、組み換えマウス細胞株（NS0）から発現及び精製する。例えば、www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/125326lbl.pdf；及びClinical Trial Identifier number NCT01363128、NCT01515176、NCT01626352及びNCT01397591を参照されたい。実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞をオフアツムマブと組み合わせて対象に投与する。実施形態において、対象は、CLL又はSLLを有する。

【0585】

一実施形態において、オフアツムマブを静脈内点滴として投与する。例えば、各点滴は、約150～3000mg（例えば、約150～200mg、200～250mg、250～300mg、300～350mg、350～400mg、400～450mg、450～500mg、500～550mg、550～600mg、600～650mg、650～700mg、700～750mg、750～800mg、800～850mg、850～900mg、900～950mg、950～1000mg、1000～1200mg、1200～1400mg、1400～1600mg、1600～1800mg、1800～2000mg、2000～2200mg、2200～2400mg、2400～2600mg、2600～2800mg又は2800～3000mg）のオフアツムマブを投与する。実施形態において、オフアツムマブを約300mgの出発用量、続いて2000mg、例えば約11用量で例えば24週間投与する。一実施形態において、オフアツムマブを少なくとも4日、例えば4日、7日、14日、21日、28日、35日又はそれを超える投薬間隔で投与する。例えば、オフアツムマブを少なくとも1週間、例えば1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間、11週間、12週間、24週間、26週間、28週間、20週間、22週間、24週間、26週間、28週間、30週間又はそれを超える投薬間隔で投与する。一実施形態において、オフアツムマブを一定期間、例えば少なくとも1週間、例えば1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間、11週間、12週間、13週間、14週間、15週間、16週間、17週間、18週間、19週間、20週間、22週間、24週間、26週間、28週間、30週間、40週間、50週間、60週間若しくはそれを超えるか、又は1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月、12ヶ月若しくはそれを超えるか、又は1年、2年、3年、4年、5年若しくはそれを超えて、本明細書に記載の用量及び投薬間隔で投与す

10

20

30

40

50

る。例えば、オフアツムマブを1処置サイクル当たり計少なくとも2用量において本明細書に記載の用量及び投薬間隔で投与する（例えば、1処置サイクル当たり少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、18、20又はそれを超える用量）。

【0586】

ある場合、抗CD20抗体は、オクレリズマブを含む。オクレリズマブは、例えば、Clinical Trials Identifier Nos. NCT00077870、NCT01412333、NCT00779220、NCT00673920、NCT01194570及びKappos et al. Lancet. 19. 378 (2011) : 1779-87に記載のようなヒト化抗CD20モノクローナル抗体である。

10

【0587】

ある場合、抗CD20抗体は、ベルツズマブを含む。ベルツズマブは、CD20に対するヒト化モノクローナル抗体である。例えば、Clinical Trial Identifier No. NCT00547066、NCT00546793、NCT01101581及びGoldenberg et al. Leuk Lymphoma. 51 (5) (2010) : 747-55を参照されたい。

【0588】

ある場合、抗CD20抗体は、GA101を含む。GA101（オビヌツズマブ又はRO5072759とも称する）は、ヒト化及び糖鎖改変抗CD20モノクローナル抗体である。例えば、Robak. Curr. Opin. Investig. Drugs. 10. 6 (2009) : 588-96 ; Clinical Trial Identifier Numbers : NCT01995669、NCT01889797、NCT02229422及びNCT01414205 ; 並びにwww.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/125486s000lbl.pdfを参照されたい。

20

【0589】

ある場合、抗CD20抗体は、AME-133vを含む。AME-133v（LY2469298又はオカラツズマブとも称する）は、リツキシマブと比較してFcγRIIIa受容体に対する親和性が増加し、抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性が増強された、CD20に対するヒト化IgG1モノクローナル抗体である。例えば、Robak et al. BioDrugs 25. 1 (2011) : 13-25 ; 及びForero-Torres et al. Clin Cancer Res. 18. 5 (2012) : 1395-403を参照されたい。

30

【0590】

ある場合、抗CD20抗体は、PRO131921を含む。PRO131921は、リツキシマブと比較してFcγRIIIaへの結合が良好であり、ADCCが増強されるように操作されたヒト化抗CD20モノクローナル抗体である。例えば、Robak et al. BioDrugs 25. 1 (2011) : 13-25 ; 及びCasulo et al. Clin Immunol. 154. 1 (2014) : 37-46 ; 及びClinical Trial Identifier No. NCT00452127を参照されたい。

40

【0591】

ある場合、抗CD20抗体は、TRU-015を含む。TRU-015は、CD20に対する抗体のドメイン由来の抗CD20融合タンパク質である。TRU-015は、モノクローナル抗体より小さいが、Fc介在エフェクター機能を保持する。例えば、Robak et al. BioDrugs 25. 1 (2011) : 13-25を参照されたい。TRU-015は、ヒトIgG1ヒンジ、CH2及びCH3ドメインに連結した抗CD20一本鎖可変フラグメント（scFv）を含むが、CH1及びCLドメインを欠く。

【0592】

一実施形態において、本明細書に記載の抗CD20抗体を治療剤、例えば本明細書に記

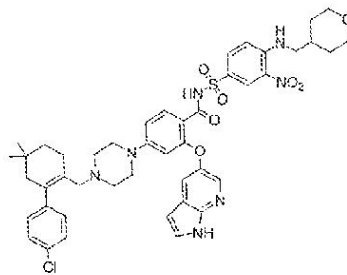
50

載の化学療法剤（例えば、シトキサン、フルダラビン、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤、デメチル化剤、ペプチドワクチン、抗腫瘍抗生物質、チロシンキナーゼ阻害剤、アルキル化剤、抗微小管又は有糸分裂阻害剤）、抗アレルギー剤、制吐剤（又は制吐剤）、鎮痛剤又は細胞保護的薬剤にコンジュゲート又は他の方法で結合する。

【0593】

実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞をB細胞リンパ腫2（BCL-2）阻害剤（例えば、ABT-199又はGDC-0199とも称されるベネトクラクス）及び／又はリツキシマブと組み合わせて対象に投与する。実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞をベネトクラクス及びリツキシマブと組み合わせて対象に投与する。ベネトクラクスは、抗アポトーシスタンパク質、BCL-2を阻害する小分子である。ベネトクラクス（4-（4-（{2-（4-クロロフェニル）-4,4-ジメチルシクロhex-1-エン-1-イル}メチル）ピペラジーン-1-イル）-N-（{3-ニトロ-4-[(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルメチル)アミノ]フェニル}スルホニル)-2-（1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-5-イルオキシ）ベンズアミド）の構造を下に示す。

【化10】



【0594】

実施形態において、対象は、CLLを有する。実施形態において、対象は、再発したCLLを有し、例えば、対象は、先に癌治療を投与されている。実施形態において、ベネトクラクスを約15～600mg（例えば、15～20mg、20～50mg、50～75mg、75～100mg、100～200mg、200～300mg、300～400mg、400～500mg又は500～600mg）で例えば連日投与する。実施形態において、リツキシマブを約350～550mg/m²（例えば、350～375mg/m²、375～400mg/m²、400～425mg/m²、425～450mg/m²、450～475mg/m²又は475～500mg/m²）で例えば静脈内に例えば毎月投与する。

【0595】

理論に拘束されるものではないが、いくつかの癌において、B細胞（例えば、B制御性細胞）がT細胞を抑制し得ると考えられる。更に、オキシプラチンとB細胞枯渇剤との組み合わせは、対象における腫瘍サイズを縮小し、且つ／又は腫瘍を排除し得ると考えられる。いくつかの実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞（例えば、BCMA CAR）は、B細胞枯渇剤（例えば、CD19 CAR発現細胞、CD20 CAR発現細胞、リツキシマブ、オクレリズマブ、エブラツズマブ又はベリムマブ）及びオキシプラチンと組み合わせて投与される。実施形態において、癌細胞は、CD19陰性若しくはCD19陽性又はBCMA陰性若しくはBCMA陽性であり得る。実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞（例えば、BCMA CAR）は、癌、例えば本明細書に記載の癌、例えば固形癌、例えば前立腺癌、膀胱癌又は肺癌を処置するためのB細胞枯渇剤及びオキシプラチンと組み合わせて投与される。

【0596】

実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞（例えば、BCMA CAR）は、対象におけるB細胞（例えば、形質細胞様の表現型を有するB細胞、例えばBCMA、

CD19及び／又はCD20を発現するもの)を枯渇させ得る。実施形態において、B細胞は、CD19陰性若しくはCD19陽性又はBCMA陰性若しくはBCMA陽性であり得る。いくつかの実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞(例えば、BCMA CAR)は、オキシプラチンと組み合わせて投与される。実施形態において、オキシプラチンと組み合わせて投与される本明細書に記載のCAR発現細胞は、癌、例えば固形癌、例えば前立腺癌、膵臓癌又は肺癌を処置するために使用される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞は、腫瘍溶解性ウイルスと組み合わせて投与される。実施形態において、腫瘍溶解性ウイルスは、癌細胞内で選択的に複製し、その死を誘発するか又は増殖を遅延することができる。ある場合、腫瘍溶解性ウイルスは、非癌細胞に効果を有しないか又は効果が最小である。腫瘍溶解性ウイルスは、腫瘍溶解性アデノウイルス、腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルス、腫瘍溶解性レトロウイルス、腫瘍溶解性パルボウイルス、腫瘍溶解性ワクシニアウイルス、腫瘍溶解性シンドビスウイルス、腫瘍溶解性インフルエンザウイルス又は腫瘍溶解性RNAウイルス(例えば、腫瘍溶解性レオウイルス、腫瘍溶解性ニューカッスル病ウイルス(NDV)、腫瘍溶解性麻疹ウイルス又は腫瘍溶解性水疱性口内炎ウイルス(VSV))を含むが、これらに限定されない。

【0597】

一実施形態において、腫瘍溶解性ウイルスは、その全体が参照により本明細書に援用される米国特許出願公開第2010/0178684A1号明細書に記載のウイルス、例えば組み換え腫瘍溶解性ウイルスである。一実施形態において、組み換え腫瘍溶解性ウイルスは、例えば、その全体が参照により本明細書に援用される米国特許出願公開第2010/0178684A1号明細書に記載のような、免疫又は炎症性応答の阻害剤をコードする核酸配列(例えば、異種核酸配列)を含む。実施形態において、組み換え腫瘍溶解性ウイルス、例えば腫瘍溶解性NDVは、アポトーシス促進性タンパク質(例えば、アポプチン)、サイトカイン(例えば、GM-CSF、インターフェロン-γ、インターロイキン-2(IL-2)、腫瘍壊死因子-α)、免疫グロブリン(例えば、ED-Bフィブロネクチンに対する抗体)、腫瘍関連抗原、二特異性アダプタータンパク質(例えば、NDV HNタンパク質及びCD3又はCD28などのT細胞共刺激性受容体に対する二特異性抗体又は抗体フラグメント；又はヒトIL-2及びNDV HNタンパク質に対する一本鎖抗体の融合タンパク質)を含む。例えば、参照によりその全体が本明細書に援用されるZamarin et al. Future Microbiol. 7.3 (2012): 347-67を参照されたい。一実施形態において、腫瘍溶解性ウイルスは、参照によりそれぞれその全体が本明細書に援用される米国特許第8591881B2号明細書、米国特許出願公開第2012/0122185A1号明細書又は米国特許出願公開第2014/0271677A1号明細書に記載のキメラ腫瘍溶解性NDVである。

【0598】

一実施形態において、腫瘍溶解性ウイルスは、排他的に癌細胞において複製するよう設計された条件的複製アデノウイルス(CRAD)である。例えば、Alemany et al. Nature Biotechnol. 18 (2000): 723-27を参照されたい。一実施形態において、腫瘍溶解性アデノウイルスは、その全体が参照により本明細書に援用されるAlemany et al. の725ページの表1に記載のものを含む。

【0599】

例示的な腫瘍溶解性ウイルスは、次のものを含むが、これらに限定されない。
B群腫瘍溶解性アデノウイルス(ColoAd1)(PsiOxus Therapeutics Ltd.)(例えば、Clinical Trial Identifier: NCT02053220を参照されたい)；
顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)を含むアデノウイルスであるONCOS-102(以前はCGTG-102と呼ばれた)(Oncos Therapeutics)(例えば、Clinical Trial Identifier: NCT01598129を参照されたい)；
ヒトPH20ヒアルロニダーゼをコードする遺伝的に改変された腫瘍溶解性ヒトアデノウ

10

20

30

40

50

イルスであるVCN-01 (VCN Biosciences, S. L.) (例えば、Clinical Trial Identifiers: NCT02045602及びNCT02045589を参照されたい) ;

網膜芽細胞腫／E2F経路の脱制御を伴い癌細胞で選択的に複製するように改変されている野生型ヒトアデノウイルス血清型5 (Had5) 由来のウイルスである条件的複製アデノウイルスICOVIR-5 (Institut Catala d'Oncologia) (例えば、Clinical Trial Identifier: NCT01864759を参照されたい) ;

ICOVIR5、腫瘍溶解性アデノウイルスで感染させた骨髄由来自己間葉性幹細胞 (MSC) を含むCelyvir (Hospital Infantil Universitario Nino Jesus, Madrid, Spain/Ramon Alemany) (例えば、Clinical Trial Identifier: NCT01844661を参照されたい) ;

ヒトE2F-1プロモーターが必須E1aウイルス遺伝子の発現を駆動し、それによりRb経路欠損腫瘍細胞に対するウイルス複製及び細胞毒性を制限する、条件複製腫瘍溶解性血清型5アデノウイルス (Ad5) であるCG0070 (Cold Genesys, Inc.) (例えば、Clinical Trial Identifier: NCT02143804を参照されたい) ; 又は

網膜芽細胞腫 (Rb) 経路欠損細胞で選択的に複製し、ある種のRGD結合インテグリンをより効率的に発現する細胞に感染するように操作されているアデノウイルスであるDNX-2401 (以前はデルター-24-RGDと称された) (Clinica Universidad de Navarra, Universidad de Navarra/DNAtrix, Inc.) (例えば、Clinical Trial Identifier: NCT01956734を参照されたい) 。

【0600】

一実施形態において、本明細書に記載の腫瘍溶解性ウイルスを注射、例えば皮下、動脈内、静脈内、筋肉内、髄腔内又は腹腔内注射により投与する。実施形態において、本明細書に記載の腫瘍溶解性ウイルスを腫瘍内、経皮、経粘膜、経口、鼻腔内又は肺投与により投与する。

【0601】

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、当技術分野で知られ、例えばCD25枯渇、シクロホスファミド投与、GITR機能改変を含む。理論に拘束されることを望まないが、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。いくつかの実施形態において、本発明に記載の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を標的とし、且つ／又はGITR機能を調節する分子と組み合わせて対象に投与される。実施形態において、本明細書に記載のCARを発現する細胞を対象にシクロホスファミドと組み合わせて投与する。一部の実施形態において、GITR結合分子及び／又はGITR機能を調節する分子 (例えば、GITRアゴニスト及び／又はTreg枯渇GITR抗体) をCAR発現細胞の前に投与する。例えば、一部の実施形態において、GITRアゴニストを細胞のアフエ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対象に投与する。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対象に投与する。一部の実施形態において、対象は、癌 (例えば、固形癌又は多発性骨髄腫、ALL若しくは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、多発性骨髄腫を有する。実施形態において

10

20

30

40

50

、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G I T R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G I T R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、欧州特許第1866339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のような抗G I T R抗体など、例えばG I T R融合タンパク質及び抗G I T R抗体（例えば、二価抗G I T R抗体）を含む。

【0602】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載のC A R発現細胞をm T O R阻害剤、例えば本明細書に記載のm T O R阻害剤、例えばエベロリムスなどのラパログと組み合わせて対象に投与する。いくつかの実施形態において、m T O R阻害剤をC A R発現細胞の前に投与する。例えば、いくつかの実施形態において、m T O R阻害剤を細胞のアフェレーシス前に投与できる。

【0603】

一部の実施形態において、本明細書に記載のC A R発現細胞をG I T Rアゴニスト、例えば本明細書に記載のG I T Rアゴニストと組み合わせて対象に投与する。一部の実施形態において、G I T RアゴニストをC A R発現細胞の前に投与する。例えば、一部の実施形態において、G I T Rアゴニストを細胞のアフェレーシス前に投与できる。

【0604】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載のC A R発現細胞をタンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤、例えば本明細書に記載のタンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤と組み合わせて対象に投与する。いくつかの実施形態において、タンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤は、S H P-1阻害剤、例えばスチボグルコン酸ナトリウムなど、例えば本明細書に記載のS H P-1阻害剤である。いくつかの実施形態において、タンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤は、S H P-2阻害剤である。

【0605】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載のC A R発現細胞をキナーゼ阻害剤と組み合わせて使用できる。いくつかの実施形態において、キナーゼ阻害剤は、C D K 4阻害剤、例えば本明細書に記載のC D K 4阻害剤、例えば6-アセチル-8-シクロペンチル-5-メチル-2-(5-ピペラジン-1-イル-ピリジン-2-イルアミノ)-8-H-ピリド[2, 3-d]ピリミジン-7-オン、ヒドロクロライド（パルボシクリブ又はP D 0 3 3 2 9 9 1とも呼ばれる）など、例えばC D K 4/6阻害剤である。いくつかの実施形態において、キナーゼ阻害剤は、B T K阻害剤、例えばイブルチニブなど、例えば本明細書に記載のB T K阻害剤である。いくつかの実施形態において、キナーゼ阻害剤は、m T O R阻害剤、例えばラパマイシン、ラパマイシン類似体、O S I-027など、例えば本明細書に記載のm T O R阻害剤である。m T O R阻害剤は、例えば、m T O R C 1阻害剤及び/又はm T O R C 2阻害剤、例えば本明細書に記載のm T O R C 1阻害剤及び/又はm T O R C 2阻害剤であり得る。いくつかの実施形態において、キナーゼ阻害剤は、M N K阻害剤、例えば4-アミノ-5-(4-フルオロアニリノ)-ピラゾロ[3, 4-d]ピリミジンなど、例えば本明細書に記載のM N K阻害剤である。M N K阻害剤は、例えば、M N K 1 a、M N K 1 b、M N K 2 a及び/又はM N K 2 b阻害剤であり得る。い

10

20

30

40

50

くつかの実施形態において、キナーゼ阻害剤は、例えば、PF-04695102など、本明細書に記載のデュアルPI3K/mTOR阻害剤である。いくつかの実施形態において、キナーゼ阻害剤は、DGK阻害剤、例えばDGKinh1 (D5919) 又はDGKinh2 (D5794) など、例えば本明細書に記載のDGK阻害剤である。

【0606】

一部の実施形態において、キナーゼ阻害剤は、アロイシンA；フラボピリドール又はHMR-1275、2- (2-クロロフェニル) -5, 7-ジヒドロキシ-8- [(3S, 4R) -3-ヒドロキシ-1-メチル-4-ペリジニル] -4-クロメノン；クリゾチニブ (PF-02341066；2- (2-クロロフェニル) -5, 7-ジヒドロキシ-8- [(2R, 3S) -2- (ヒドロキシメチル) -1-メチル-3-ピロリジニル] -4H-1-ベンゾピラン-4-オン、ヒドロクロライド (P276-00)；1-メチル-5- [[2- [5- (トリフルオロメチル) -1H-イミダゾール-2-イル] -4-ピリジニル] オキシ] -N- [4- (トリフルオロメチル) フェニル] -1H-ベンズイミダゾール-2-アミン (RAF265)；インジスラム (E7070)；ロスコビチン (CYC202)；パルボシクリブ (PD0332991)；ジナシクリブ (SCH727965)；N- [5- [[(5-tert-ブチルオキサゾール-2-イル) メチル] チオ] チアゾール-2-イル] ピペリジン-4-カルボキサミド (BMS 387032)；4- [[9-クロロ-7- (2, 6-ジフルオロフェニル) -5H-ピリミド [5, 4-d] [2] ベンズアゼピン-2-イル] アミノ] -安息香酸 (MLN8054)；5- [3- (4, 6-ジフルオロ-1H-ベンズイミダゾール-2-イル) -1H-インダゾール-5-イル] -N-エチル-4-メチル-3-ピリジンメタンアミン (AG-024322)；4- (2, 6-ジクロロベンゾイルアミノ) -1H-ピラゾール-3-カルボン酸N- (ピペリジン-4-イル) アミド (AT7519)；4- [2-メチル-1- (1-メチルエチル) -1H-イミダゾール-5-イル] -N- [4- (メチルスルホニル) フェニル] -2-ピリミジンアミン (AZD5438)；及びXL281 (BMS908662) から選択されるCDK4阻害剤である。

【0607】

一部の実施形態において、キナーゼ阻害剤は、CDK4阻害剤、例えばパルボシクリブ (PD0332991) であり、パルボシクリブを一定期間にわたり1日約50mg、60mg、70mg、75mg、80mg、90mg、100mg、105mg、110mg、115mg、120mg、125mg、130mg、135mg (例えば、75mg、100mg又は125mg) の用量で例えば28日サイクルの14~21日間連日又は21日サイクルの7~12日間連日投与する。一部の実施形態において、1サイクル、2サイクル、3サイクル、4サイクル、5サイクル、6サイクル、7サイクル、8サイクル、9サイクル、10サイクル、11サイクル、12サイクル又はそれを超えるパルボシクリブを投与する。

【0608】

実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞をサイクリン依存性キナーゼ (CDK) 4又は6阻害剤、例えば本明細書に記載のCDK4阻害剤又はCDK6阻害剤と組み合わせて対象に投与する。実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞をCDK4/6阻害剤 (例えば、CDK4及びCDK6の両方を標的とする阻害剤)、例えば本明細書に記載のCDK4/6阻害剤と組み合わせて対象に投与する。一実施形態において、対象は、MCLを有する。MCLは、現在利用可能な治療にはほとんど応答せず、即ち本質的に不治の侵襲性癌である。MCLの多くの症例において、サイクリンD1 (CDK4/6のレギュレーター) がMCL細胞で発現される (例えば、免疫グロブリン及びサイクリンD1遺伝子が関与する染色体転座のため)。そのため、理論に拘束されないが、MCL細胞は、高特異性 (即ち正常免疫細胞に対する最小限の影響) でCDK4/6阻害に高度に感受性であると考えられる。CDK4/6阻害剤単独でMCLの処置にいくぶん有効性を有しているが、部分的寛解のみが達成され、高再発率である。例示的なCDK4/6阻害剤は、LEE011 (リボシクリブ) であり、その構造を下に示す。

10

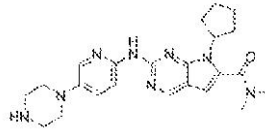
20

30

40

50

【化 1 1】



【0 6 0 9】

理論に拘束されないが、本明細書に記載の C A R 発現細胞及び C D K 4 / 6 阻害剤（例えば、L E E 0 1 1 又は他の本明細書に記載の C D K 4 / 6 阻害剤）の投与は、例えば、C D K 4 / 6 阻害剤単独と比較して高い応答性、例えば高い寛解率及び／又は低い再発率を達成すると考えられる。

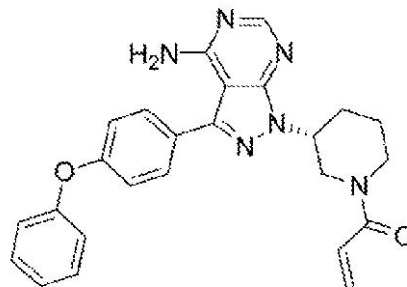
【0 6 1 0】

いくつかの実施形態において、キナーゼ阻害剤は、イブルチニブ（P C I - 3 2 7 6 5）；G D C - 0 8 3 4；R N - 4 8 6；C G I - 5 6 0；C G I - 1 7 6 4；H M - 7 1 2 2 4；C C - 2 9 2；O N O - 4 0 5 9；C N X - 7 7 4；及び L F M - A 1 3 から選択される B T K 阻害剤である。好ましい実施形態において、B T K 阻害剤は、インターロイキン-2-誘導性キナーゼ（I T K）のキナーゼ活性を低減又は阻害せず、G D C - 0 8 3 4；R N - 4 8 6；C G I - 5 6 0；C G I - 1 7 6 4；H M - 7 1 2 2 4；C C - 2 9 2；O N O - 4 0 5 9；C N X - 7 7 4；及び L F M - A 1 3 から選択される。

【0 6 1 1】

いくつかの実施形態において、キナーゼ阻害剤は、B T K 阻害剤、例えばイブルチニブ（P C I - 3 2 7 6 5）である。実施形態において、本明細書に記載の C A R 発現細胞を B T K 阻害剤（例えば、イブルチニブ）と組み合わせて対象に投与する。実施形態において、本明細書に記載の C A R 発現細胞をイブルチニブ（P C I - 3 2 7 6 5 と称す）と組み合わせて対象に投与する。イブルチニブ（1 - [（3 R）- 3 - [4 - アミノ - 3 - （4 - フェノキシフェニル）- 1 H - ピラゾロ [3, 4 - d] ピリミジン - 1 - イル] ピペリジン - 1 - イル] プロパ - 2 - エン - 1 - オン）の構造を以下に示す。

【化 1 2】



【0 6 1 2】

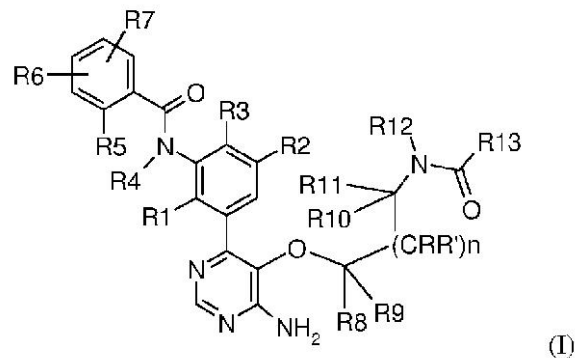
実施形態において、対象は、C L L、マンツル細胞リンパ腫（M C L）又は小リンパ球性リンパ腫（S L L）を有する。例えば、対象は、染色体 1 7 の短腕に欠失を有する（例えば、白血病性細胞における d e l（1 7 p））。他の例において、対象は、d e l（1 7 p）を有しない。実施形態において、対象は、再発した C L L 又は S L L を有し、例えば、対象は、先に癌治療を投与されている（例えば、先に 1、2、3 又は 4 つの事前の癌治療を投与されている）。実施形態において、対象は、難治性 C L L 又は S L L を有する。他の実施形態において、対象は、濾胞性リンパ腫、例えば再発性又は難治性濾胞性リンパ腫を有する。いくつかの実施形態において、イブルチニブを約 3 0 0 ~ 6 0 0 m g / 日（例えば、約 3 0 0 ~ 3 5 0、3 5 0 ~ 4 0 0、4 0 0 ~ 4 5 0、4 5 0 ~ 5 0 0、5 0 0 ~ 5 5 0 又は 5 5 0 ~ 6 0 0 m g / 日、例えば約 4 2 0 m g / 日又は約 5 6 0 m g / 日

）の用量で例えば経口により投与する。実施形態において、イブルチニブを約 250mg、300mg、350mg、400mg、420mg、440mg、460mg、480mg、500mg、520mg、540mg、560mg、580mg、600mg（例えば、250mg、420mg又は560mg）の用量で連日一定期間、例えば21日サイクルで連日又は28日サイクルで連日投与する。いくつかの実施形態において、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12サイクル又はそれを超えるイブルチニブを投与する。一実施形態において、イブルチニブをリツキシマブと組み合わせて投与する。例えば、Burger et al. (2013) Ibrutinib In Combination With Rituximab (iR) Is Well Tolerated and Induces a High Rate Of Durable Remissions In Patients With High-Risk Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) : New, Updated Results Of a Phase II Trial In 40 Patients, Abstract 675 presented at 55th ASH Annual Meeting and Exposition, New Orleans, LA 7-10 Decを参照されたい。理論にされるものではないが、イブルチニブの添加はT細胞増殖性応答を増強し、T細胞をTヘルパー-2 (Th2) からTヘルパー-1 (Th1) 表現型にシフトさせ得ると考えられる。Th1及びTh2は、ヘルパーT細胞の表現型であり、Th1とTh2で異なる免疫応答経路を指向する。Th1表現型は、例えば、細胞内病原体／ウイルス又は癌性細胞などの細胞を死傷するための、炎症誘発性応答又は自己免疫性応答永続化と関連する。Th2表現型は、好酸球蓄積及び抗炎症性応答と関連する。

【0613】

本明細書における方法、使用及び組成物の一実施形態において、BTK阻害剤は、参照によりその全体を本明細書に組み込まれる国際公開第2015/079417号パンフレットに記載のBTK阻害剤である。例えば、一実施形態において、BTK阻害剤は、式(I)の化合物又はその薬学的に許容される塩である。

【化13】



（式中、

R1は水素、任意選択によりヒドロキシで置換され得るC1-C6アルキルであり；

R2は水素又はハロゲンであり；

R3は水素又はハロゲンであり；

R4は水素であり、

R5は水素又はハロゲンであり；

又はR4とR5は互いに結合し、結合、-CH₂-、-CH₂-CH₂-、-CH=CH-、-CH=CH-CH₂-；-CH₂-CH=CH-；又は-CH₂-CH₂-CH₂-を意味し；

R6及びR7は互いに独立してH、任意選択によりヒドロキシで置換され得るC1-C6アルキル、任意選択によりハロゲン又はヒドロキシ又はハロゲンで置換され得るC3-C6シクロアルキルを表し；

R 8、R 9、R、R'、R 10及びR 11は互いに独立してH又は任意選択によりC 1－C 6アルコキシで置換され得るC 1－C 6アルキルを表すか；又はR 8、R 9、R、R'、R 10及びR 11の任意の2個は、それらが結合している炭素原子と一体となって3～6員飽和炭素環式環を形成し得；

R 12は水素又は任意選択によりハロゲン若しくはC 1－C 6アルコキシで置換され得るC 1－C 6アルキルであり；

又はR 12とR 8、R 9、R、R'、R 10又はR 11のいずれか1つは、それらが結合している原子と一体となって、4員、5員、6員又は7員アザシクロ環を形成し得、その環は、任意選択によりハロゲン、シアノ、ヒドロキシル、C 1－C 6アルキル又はC 1－C 6アルコキシで置換され得；

nは0又は1であり；

R 13は任意選択によりC 1－C 6アルキルで置換され得るC 2－C 6アルケニル、C 1－C 6アルコキシ又は任意選択によりC 1－C 6アルキル若しくはC 1－C 6アルコキシで置換され得るN、N－ジ－C 1－C 6アルキルアミノC 2－C 6アルキニル；又は任意選択によりC 1－C 6アルキルで置換され得るC 2－C 6アルキレニルオキシドである）。

【0614】

いくつかの実施形態において、式IのBTK阻害剤は、N－（3－（5－（（1－アクリロイルアゼチジン－3－イル）オキシ）－6－アミノピリミジン－4－イル）－5－フルオロ－2－メチルフェニル）－4－シクロプロピル－2－フルオロベンズアミド；（E）－N－（3－（6－アミノ－5－（（1－（ブタ－2－エノイル）アゼチジン－3－イル）オキシ）ピリミジン－4－イル）－5－フルオロ－2－メチルフェニル）－4－シクロプロピル－2－フルオロベンズアミド；N－（3－（6－アミノ－5－（（1－プロピオロイルアゼチジン－3－イル）オキシ）ピリミジン－4－イル）－5－フルオロ－2－メチルフェニル）－4－シクロプロピル－2－フルオロベンズアミド；N－（3－（6－アミノ－5－（（1－（ブタ－2－イノイル）アゼチジン－3－イル）オキシ）ピリミジン－4－イル）－5－フルオロ－2－メチルフェニル）－4－シクロプロピル－2－フルオロベンズアミド；N－（3－（5－（（1－アクリロイルピペリジン－4－イル）オキシ）－6－アミノピリミジン－4－イル）－5－フルオロ－2－メチルフェニル）－4－シクロプロピル－2－フルオロベンズアミド；N－（3－（6－アミノ－5－（2－（N－メチルアクリルアミド）エトキシ）ピリミジン－4－イル）－5－フルオロ－2－メチルフェニル）－4－シクロプロピル－2－フルオロベンズアミド；（E）－N－（3－（6－アミノ－5－（2－（N－メチルブタ－2－エンアミド）エトキシ）ピリミジン－4－イル）－5－フルオロ－2－メチルフェニル）－4－シクロプロピル－2－フルオロベンズアミド；N－（3－（6－アミノ－5－（2－（N－メチルプロピオールアミド）エトキシ）ピリミジン－4－イル）－5－フルオロ－2－メチルフェニル）－4－シクロプロピル－2－フルオロベンズアミド；（E）－N－（3－（6－アミノ－5－（2－（4－メトキシ－N－メチルブタ－2－エンアミド）エトキシ）ピリミジン－4－イル）－5－フルオロ－2－メチルフェニル）－4－シクロプロピル－2－フルオロベンズアミド；N－（3－（6－アミノ－5－（2－（N－メチルブタ－2－インアミド）エトキシ）ピリミジン－4－イル）－5－フルオロ－2－メチルフェニル）－4－シクロプロピル－2－フルオロベンズアミド；N－（2－（（4－アミノ－6－（3－（4－シクロプロピル－2－フルオロベンズアミド）－5－フルオロ－2－メチルフェニル）ピリミジン－5－イル）オキシ）エチル）－N－メチルオキシラン－2－カルボキサミド；N－（2－（（4－アミノ－6－（3－（6－シクロプロピル－8－フルオロ－1－オキソイソキノリン－2（1H）－イル）フェニル）ピリミジン－5－イル）オキシ）エチル）－N－メチルアクリルアミド；N－（3－（5－（2－アクリルアミドエトキシ）－6－アミノピリミジン－4－イル）－5－フルオロ－2－メチルフェニル）－4－シクロプロピル－2－フルオロベンズアミド；N－（3－（6－アミノ－5－（2－（N－エチルアクリルアミド）エトキシ）ピリミジン－4－イル）－5－フルオロ－2－メチルフェニル）－4－シクロプロピル－2－フルオロベンズアミド；N－（3－（6－アミノ－5－（2－（N－（2

10

20

30

40

50

-フルオロエチル) アクリルアミド) エトキシ) ピリミジン-4-イル) -5-フルオロ
 -2-メチルフェニル) -4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド; N-(3-
 (5-(1-アクリルアミドシクロプロピル) メトキシ) -6-アミノピリミジン-4-
 -イル) -5-フルオロ-2-メチルフェニル) -4-シクロプロピル-2-フルオロベ
 ンズアミド; (S)-N-(3-(5-(2-アクリルアミドプロポキシ) -6-アミノ
 ピリミジン-4-イル) -5-フルオロ-2-メチルフェニル) -4-シクロプロピル-
 2-フルオロベンズアミド; (S)-N-(3-(6-アミノ-5-(2-(ブタ-2-
 インアミド) プロポキシ) ピリミジン-4-イル) -5-フルオロ-2-メチルフェニル
) -4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド; (S)-N-(3-(6-アミノ
 -5-(2-(N-メチルアクリルアミド) プロポキシ) ピリミジン-4-イル) -5-
 フルオロ-2-メチルフェニル) -4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド; (S)-
 N-(3-(6-アミノ-5-(2-(N-メチルブタ-2-インアミド) プロポ
 キシ) ピリミジン-4-イル) -5-フルオロ-2-メチルフェニル) -4-シクロプロ
 ピル-2-フルオロベンズアミド; N-(3-(6-アミノ-5-(3-(N-メチルア
 クリルアミド) プロポキシ) ピリミジン-4-イル) -5-フルオロ-2-メチルフェニ
 ル) -4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド; (S)-N-(3-(5-(1-
 アクリロイルピロリジン-2-イル) メトキシ) -6-アミノピリミジン-4-イル
) -5-フルオロ-2-メチルフェニル) -4-シクロプロピル-2-フルオロベンズア
 ミド; (S)-N-(3-(6-アミノ-5-(1-(ブタ-2-イノイル) ピロリジ
 ン-2-イル) メトキシ) ピリミジン-4-イル) -5-フルオロ-2-メチルフェニル
) -4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド; (S)-2-(3-(5-(1-
 アクリロイルピロリジン-2-イル) メトキシ) -6-アミノピリミジン-4-イル)
 -5-フルオロ-2-(ヒドロキシメチル) フェニル) -6-シクロプロピル-3, 4-
 ジヒドロイソキノリン-1(2H)-オン; N-(2-(4-アミノ-6-(3-(6-
 シクロプロピル-1-オキソ-3, 4-ジヒドロイソキノリン-2(1H)-イル) -
 5-フルオロ-2-(ヒドロキシメチル) フェニル) ピリミジン-5-イル) オキシ) エ
 チル) -N-メチルアクリルアミド; N-(3-(5-(2-(2S, 4R)-1-アクリ
 ロイル-4-メトキシピロリジン-2-イル) メトキシ) -6-アミノピリミジン-4-
 -イル) -5-フルオロ-2-メチルフェニル) -4-シクロプロピル-2-フルオロベン
 ズアミド; N-(3-(6-アミノ-5-(2-(2S, 4R)-1-(ブタ-2-イノイル)
 -4-メトキシピロリジン-2-イル) メトキシ) ピリミジン-4-イル) -5-フル
 オロ-2-メチルフェニル) -4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド; 2-
 (3-(5-(2-(2S, 4R)-1-アクリロイル-4-メトキシピロリジン-2-イ
 ル) メトキシ) -6-アミノピリミジン-4-イル) -5-フルオロ-2-(ヒドロキシ
 メチル) フェニル) -6-シクロプロピル-3, 4-ジヒドロイソキノリン-1(2H)
 -オン; N-(3-(5-(2-(2S, 4S)-1-アクリロイル-4-メトキシピロリ
 ジン-2-イル) メトキシ) -6-アミノピリミジン-4-イル) -5-フルオロ-2-
 メチルフェニル) -4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド; N-(3-(6-
 アミノ-5-(2-(2S, 4S)-1-(ブタ-2-イノイル) -4-メトキシピロリジ
 ン-2-イル) メトキシ) ピリミジン-4-イル) -5-フルオロ-2-メチルフェニル
) -4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド; N-(3-(5-(2-(2S, 4
 R)-1-アクリロイル-4-フルオロピロリジン-2-イル) メトキシ) -6-アミノ
 ピリミジン-4-イル) -5-フルオロ-2-メチルフェニル) -4-シクロプロピル-
 2-フルオロベンズアミド; N-(3-(6-アミノ-5-(2-(2S, 4R)-1-(
 ブタ-2-イノイル) -4-フルオロピロリジン-2-イル) メトキシ) ピリミジン-4-
 -イル) -5-フルオロ-2-メチルフェニル) -4-シクロプロピル-2-フルオロベ
 ンズアミド; (S)-N-(3-(5-(1-アクリロイルアゼチジン-2-イル) メ
 トキシ) -6-アミノピリミジン-4-イル) -5-フルオロ-2-メチルフェニル) -
 4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド; (S)-N-(3-(6-アミノ-5-
 -(1-プロピオイルアゼチジン-2-イル) メトキシ) ピリミジン-4-イル) -

10

20

30

40

50

5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド;
 ; (S)-2-(3-(5-(1-アクリロイルアゼチジン-2-イル)メトキシ)-
 6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-(ヒドロキシメチル)フェニル
)-6-シクロプロピル-3,4-ジヒドロイソキノリン-1(2H)-オン;
 (R)-N-(3-(5-(1-アクリロイルアゼチジン-2-イル)メトキシ)-6-アミノ
 ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-
 2-フルオロベンズアミド;
 (R)-N-(3-(5-(1-アクリロイルピペリジン-3-イル)メトキシ)-6-アミノ
 ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-
 2-フルオロベンズアミド;
 N-(3-(5-(2R,3S)-1-アクリロイル-3-メトキシピロリジン-2-イル)メトキシ)-
 6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロ
 プロピル-2-フルオロベンズアミド;
 N-(3-(5-(2S,4R)-1-アクリロイル-4-シアノピロリジン-2-イル)メトキシ)-
 6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロ
 プロピル-2-フルオロベンズアミド;
 又はN-(3-(5-(2S,4S)-1-アクリロイル-4-シアノピロリジン-2-イル)メトキシ)-
 6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロ
 プロピル-2-フルオロベンズアミドから選択される。

【0615】

特に断らない限り、上記式IのBTK阻害剤で使用した化学的用語は、参照によりその
 全体を本明細書に組み込まれる国際公開第2015/079417号パンフレットに示す
 意味に従い使用する。

【0616】

一部の実施形態において、キナーゼ阻害剤は、テムシロリムス;リダフォロリムス(1
 R,2R,4S)-4-[(2R)-2-[(1R,9S,12S,15R,16E,1
 8R,19R,21R,23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-
 1,18-ジヒドロキシ-19,30-ジメトキシ-15,17,21,23,29,3
 5-ヘキサメチル-2,3,10,14,20-ペンタオキソ-11,36-ジオキサ-
 4-アザトリシクロ[30.3.1.0^{4,9}]ヘキサトリアコンター-16,24,26,
 28-テトラエン-12-イル]プロピル]-2-メトキシシクロヘキシルジメチルホス
 フィネート、AP23573及びMK8669としても知られる;
 エベロリムス(RAD001);ラパマイシン(AY22989);セマピモド;
 (5-{2,4-ビス[(3S)-3-メチルモルホリン-4-イル]ピリド[2,3-d]ピリミジン-7-イル}
 -2-メトキシフェニル)メタノール(AZD8055);2-アミノ-8-[トランス
 -4-(2-ヒドロキシエトキシ)シクロヘキシル]-6-(6-メトキシ-3-ピリジ
 ニル)-4-メチル-ピリド[2,3-d]ピリミジン-7(8H)-オン(PF046
 91502);及びN²-[1,4-ジオキソ-4-[[4-(4-オキソ-8-フェニ
 ル-4H-1-ベンゾピラン-2-イル)モルホリニウム-4-イル]メトキシ]ブチル
]-L-アルギニルグリシル-L-α-アスパルチル-L-セリン-(配列番号285)、
 分子内塩(SF1126);及びXL765から選択されるmTOR阻害剤である。

【0617】

一部の実施形態において、キナーゼ阻害剤は、mTOR阻害剤、例えばラパマイシンで
 あり、ラパマイシンを約3mg、4mg、5mg、6mg、7mg、8mg、9mg、1
 0mg(例えば、6mg)の用量で連日、一定期間、例えば21日サイクルで連日又は2
 8日サイクルで連日投与する。一部の実施形態において、1サイクル、2サイクル、3サ
 イクル、4サイクル、5サイクル、6サイクル、7サイクル、8サイクル、9サイクル、
 10サイクル、11サイクル、12サイクル又はそれを超えるラパマイシンを投与する。
 一部の実施形態において、キナーゼ阻害剤は、mTOR阻害剤、例えばエベロリムスであ
 り、エベロリムスを一定期間にわたり1日約2mg、2.5mg、3mg、4mg、5m
 g、6mg、7mg、8mg、9mg、10mg、11mg、12mg、13mg、14
 mg、15mg(例えば、10mg)の用量において例えば28日サイクルで連日投与す

10

20

30

40

50

る。一部の実施形態において、1 サイクル、2 サイクル、3 サイクル、4 サイクル、5 サイクル、6 サイクル、7 サイクル、8 サイクル、9 サイクル、10 サイクル、11 サイクル、12 サイクル又はそれを超えるエベロリムスを投与する。

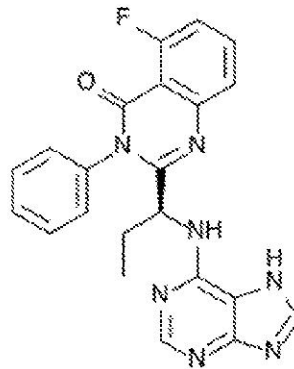
【0618】

一部の実施形態において、キナーゼ阻害剤は、CGP052088；4-アミノ-3-(p-フルオロフェニルアミノ)-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン(CGP57380)；セルコスポラミド；ETC-1780445~2；及び4-アミノ-5-(4-フルオロアニリノ)-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジンから選択されるMNK阻害剤である。

【0619】

実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞をホスホイノシチド3-キナーゼ(PI3K)阻害剤(例えば、本明細書に記載のPI3K阻害剤、例えばイデラリシブ又はドゥベリシブ)及び／又はリツキシマブと組み合わせて対象に投与する。実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞をイデラリシブ及びリツキシマブと組み合わせて対象に投与する。実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞をドゥベリシブ及びリツキシマブと組み合わせて対象に投与する。イデラリシブ(GS-1101又はCALL-101とも呼ばれる；Gilead)は、PI3Kのデルタアイソフォームを遮断する小分子である。イデラリシブ(5-フルオロ-3-フェニル-2-[(1S)-1-(7H-プリン-6-イルアミノ)プロピル]-4(3H)-キナゾリノン)の構造を以下に示す。

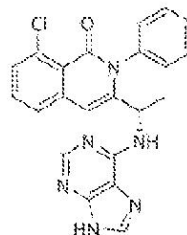
【化14】



【0620】

デュベリシブ(IPI-145とも呼ばれる；Infinity Pharmaceuticals and Abbvie)は、PI3K- δ 、 γ を遮断する小分子である。一実施形態において、デュベリシブ(8-クロロ-2-フェニル-3-[(1S)-1-(9H-プリン-6-イルアミノ)エチル]-1(2H)-イソキノリノン)の構造を以下に示す。

【化15】



【0621】

実施形態において、対象は、CLLを有する。実施形態において、対象は、再発したC

LLを有し、例えば、対象は、先に癌治療を投与されている（例えば、先に抗CD20抗体を投与されているか又は先にイブルチニブを投与されている）。例えば、対象は、染色体17の短腕に欠失を有する（例えば、白血病性細胞におけるdel(17p)）。他の例において、対象は、del(17p)を有しない。実施形態において、対象は、免疫グロブリン重鎖可変領域(IgV_H)遺伝子に変異を含む白血病性細胞を含む。他の実施形態において、対象は、免疫グロブリン重鎖可変領域(IgV_H)に変異を含む白血病性細胞を含まない。実施形態において、対象は、染色体11の長腕に欠失を有する（del(11q)）。他の実施形態において、対象は、del(11q)を有しない。実施形態において、イデラリシブを約100～400mg（例えば、100～125mg、125～150mg、150～175mg、175～200mg、200～225mg、225～250mg、250～275mg、275～300mg、325～350mg、350～375mg又は375～400mg）で例えばBID投与する。実施形態において、ドゥベリシブを約15～100mg（例えば、約15～25、25～50、50～75又は75～100mg）で例えば1日2回投与する。実施形態において、リツキシマブを約350～550mg/m²（例えば、350～375mg/m²、375～400mg/m²、400～425mg/m²、425～450mg/m²、450～475mg/m²又は475～500mg/m²）で例えば静脈内投与する。

【0622】

実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞を未分化リンパ腫キナーゼ(ALK)阻害剤と組み合わせて対象に投与する。例示的なALKキナーゼは、クリゾチニブ(Pfizer)、セリチニブ(Novartis)、アレクチニブ(中外)、ブリガチニブ(AP26113とも呼ばれる; Ariad)、エントレクチニブ(Ignyta)、PF-06463922(Pfizer)、TSR-011(Tesaro)（例えば、Clinical Trial Identifier No. NCT02048488を参照されたい）、CEP-37440(Teva)及びX-396(Xcovery)を含む。一実施形態において、対象は、固形癌、例えば本明細書に記載の固形癌、例えば肺癌を有する。

【0623】

クリゾチニブの化学名は、3-[(1R)-1-(2,6-ジクロロ-3-フルオロフェニル)エトキシ]-5-(1-ピペリジン-4-イルピラゾール-4-イル)ピリジン-2-アミンである。セリチニブの化学名は、5-クロロ-N²-[2-イソプロポキシ-5-メチル-4-(4-ピペリジニル)フェニル]-N⁴-[2-(イソプロピルスルホニル)フェニル]-2,4-ピリミジンジアミンである。アレクチニブの化学名は、9-エチル-6,6-ジメチル-8-(4-モルホリノピペリジン-1-イル)-11-オキソ-6,11-ジヒドロ-5H-ベンゾ[b]カルバゾール-3-カルボニトリルである。ブリガチニブの化学名は、5-クロロ-N²-{4-[4-(ジメチルアミノ)-1-ピペリジニル]-2-メトキシフェニル}-N⁴-[2-(ジメチルホスホリル)フェニル]-2,4-ピリミジンジアミンである。エントレクチニブの化学名は、N-(5-(3,5-ジフルオロベンジル)-1H-インダゾール-3-イル)-4-(4-メチルピペラジン-1-イル)-2-((テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)アミノ)ベンズアミドである。PF-06463922の化学名は、(10R)-7-アミノ-12-フルオロ-2,10,16-トリメチル-15-オキソ-10,15,16,17-テトラヒドロ-2H-8,4-(メテノ)ピラゾロ[4,3-h][2,5,11]-ベンズオキサジアザシクロテトラデシン-3-カルボニトリルである。CEP-37440の化学名は、(S)-2-((5-クロロ-2-((6-(4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-1-イル)-1-メトキシ-6,7,8,9-テトラヒドロ-5H-ベンゾ[7]アヌレン-2-イル)アミノ)ピリミジン-4-イル)アミノ)-N-メチルベンズアミドである。X-396の化学名は、(R)-6-アミノ-5-(1-(2,6-ジクロロ-3-フルオロフェニル)エトキシ)-N-(4-(4-メチルピペラジン-1-カルボニル)フェニル)ピリダジン-3-カルボキサミドである。

【0624】

いくつかの実施形態において、キナーゼ阻害剤は、2-アミノ-8-[trans-4-(2-ヒドロキシエトキシ)シクロヘキシル]-6-(6-メトキシ-3-ピリジニル)-4-メチル-ピリド[2,3-d]ピリミジン-7(8H)-オン(PF-04691502); N-[4-[4-(ジメチルアミノ)-1-ピペリジニル]カルボニル]フェニル]-N'-[4-(4,6-ジ-4-モルホリニル-1,3,5-トリアジン-2-イル)フェニル]尿素(PF-05212384、PKI-587); 2-メチル-2-{4-[3-メチル-2-オキソ-8-(キノリン-3-イル)-2,3-ジヒドロ-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル]フェニル}プロパンニトリル(BEZ-235); アピトリシブ(GDC-0980、RG7422); 2,4-ジフルオロ-N-{2-(メチルオキシ)-5-[4-(4-ピリダジニル)-6-キノリニル]-3-ピリジニル}ベンゼンスルホンアミド(GSK2126458); 8-(6-メトキシピリジン-3-イル)-3-メチル-1-(4-(ピペラジン-1-イル)-3-(トリフルオロメチル)フェニル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-2(3H)-オンマレイン酸(NVP-BGT226); 3-[4-(4-モルホリニルピリド[3',2':4,5]フロ[3,2-d]ピリミジン-2-イル]フェノール(PI-103); 5-(9-イソプロピル-8-メチル-2-モルホリノ-9H-プリン-6-イル)ピリミジン-2-アミン(VS-5584、SB2343); 及びN-[2-[(3,5-ジメトキシフェニル)アミノ]キノキサリン-3-イル]-4-[(4-メチル-3-メトキシフェニル)カルボニル]アミノフェニルスルホンアミド(XL765)から選択されるデュアルホスファチジルイノシトール3-キナーゼ(PI3K)及びmTOR阻害剤である。

【0625】

カルシウム依存的ホスファターゼカルシニューリンを阻害する(シクロスポリン及びFK506)又は増殖因子誘発シグナル伝達に重要であるp70S6キナーゼを阻害する薬物(ラパマイシン)(Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Brierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993)も使用できる。更なる態様において、本発明の細胞組成物を、骨髓移植、フルダラビンなどの化学療法剤、体外照射療法(XRT)、シクロホスファミド及び/又はOKT3又はCAMPATHなどの抗体を使用するT細胞除去療法と組み合わせて(例えば、その前に、それと同時に又はその後)患者に投与し得る。一態様において、本発明の細胞組成物を、CD20と反応する薬剤、例えばリツキサンなどのB細胞除去療法後に投与する。例えば、一部の実施形態において、対象を高用量化学療法剤と続く末梢血幹細胞移植の標準的処置に付す。一実施形態において、移植後、対象は、本発明の増殖した免疫細胞の注入を受ける。更なる実施形態において、増殖細胞を手術前又は後に投与する。

【0626】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞をビホスホネート、例えばパミドロネート(Aredia(登録商標)); ゾレドロロン酸又はゾレドロネート(Zometa(登録商標)、Zomera(登録商標)、Aclasta(登録商標)又はReclast(登録商標)); アレンドロネート(Fosamax(登録商標)); リセドロネート(Actonel(登録商標)); イバンドロネート(Boniva(登録商標)); クロドロネート(Bonefos(登録商標)); エチドロネート(Didronel(登録商標)); チルドロネート(Skelid(登録商標)); パミドロネート(Aredia(登録商標)); ネリドロネート(Nerixia(登録商標)); ストロンチウムラネレート(Strontium ranelate)(Protelos(登録商標)又はProtos(登録商標)); 及びテリパラチド(Forteo(登録商標))と組み合わせて対象に投与する。

【0627】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞をコルチコステロイド

10

20

30

40

50

、例えばデキサメサゾン（例えば、Decadron（登録商標））、ベクロメタゾン（例えば、Becloment（登録商標））、ヒドロコルチゾン（コルチゾン、ヒドロコルチゾンナトリウムスクシネート、ヒドロコルチゾンナトリウムホスフェートとしても知られ、商品名Ala-Cort（登録商標）、ヒドロコルチゾンホスフェート、Solucortef（登録商標）、Hydrocort Acetate（登録商標）及びLanacort（登録商標）として販売）、プレドニゾン（商品名Delta-Cortel（登録商標）、Orapred（登録商標）、Pediapred（登録商標）及びPrelone（登録商標）として販売）、プレドニゾン（商品名Deltasone（登録商標）、Liquid Red（登録商標）、Meticorten（登録商標）及びOrasone（登録商標）として販売）、メチルプレドニゾン（6-メチルプレドニゾン、メチルプレドニゾンアセテート、メチルプレドニゾンナトリウムスクシネートとしても知られ、商品名Duralone（登録商標）、Medralone（登録商標）、Medrol（登録商標）、M-Prednisol（登録商標）及びSol-Medrol（登録商標）として販売）；ジフェンヒドラミン（例えば、Benadryl（登録商標））、ヒドロキシジン及びシプロヘプタジンなどの抗ヒスタミン剤；及びベータアドレナリン受容体アゴニスト、アルブテロール（例えば、Proventil（登録商標））及びテルブタリン（Brethine（登録商標））などの気管支拡張剤と組み合わせて対象に投与する。

【0628】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞を免疫調節剤、例えばアフツズマブ（Roche（登録商標）から入手可能）；ペグフィルグラスチム（Neulasta（登録商標））；レナリドマイド（CC-5013、レブリミド（登録商標））；サリドマイド（Thalomid（登録商標））、actimid（CC4047）；及びIRX-2（インターロイキン1、インターロイキン2及びインターフェロン γ を含むヒトサイトカイン混合物、CAS 951209-71-5、IRX Therapeuticsから入手可能）と組み合わせて対象に投与する。

【0629】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞をプロテアソーム阻害剤、例えばボルテゾミブ（Velcade（登録商標））；クエン酸イキサゾミブ（MLN9708、CAS 1201902-80-8）；ダノプレビル（RG7227、CAS 850876-88-9）；イキサゾミブ（MLN2238、CAS 1072833-77-2）；及び（S）-N-[(フェニルメトキシ)カルボニル]-L-ロイシル-N-(1-ホルミル-3-メチルブチル)-L-ロイシニアミド（MG-132、CAS 133407-82-6）と組み合わせて対象に投与する。

【0630】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞を血管内皮増殖因子（VEGF）受容体、例えばベバシズマブ（Avastin（登録商標））、アキシチニブ（Inlyta（登録商標））；ブリバニブアラニネート（BMS-582664、（S）-（（R）-1-（4-（4-フルオロ-2-メチル-1H-インドール-5-イルオキシ）-5-メチルピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-6-イルオキシ）プロパン-2-イル）2-アミノプロパノエート）；ソラフェニブ（Nexavar（登録商標））；パゾパニブ（Votrient（登録商標））；リンゴ酸スニチニブ（Sutent（登録商標））；セディラニブ（AZD2171、CAS 288383-20-1）；Vargatef（BIBF1120、CAS 928326-83-4）；フォレチニブ（GSK1363089）；テラチニブ（BAY57-9352、CAS 332012-40-5）；アパチニブ（YN968D1、CAS 811803-05-1）；イマチニブ（Gleevec（登録商標））；ポナチニブ（AP24534、CAS 943319-70-8）；チボザニブ（AV951、CAS 475108-18-0）；レゴラフェニブ（BAY73-4506、CAS 755037-03-7）；パタラニブ二塩酸塩（PTK787、CAS 212141-51-0）；ブリバニブ（B

10

20

30

40

50

MS-540215、CAS 649735-46-6) ; バンデタニブ (Caprelsa (登録商標) 又は AZD6474) ; モテサニブニリン酸塩 (AMG706、CAS 857876-30-3、N-(2,3-ジヒドロ-3,3-ジメチル-1H-インドール-6-イル)-2-[(4-ピリジニルメチル) アミノ]-3-ピリジニルカルボキサミド、PCT国際公開第02/066470号パンフレットに記載) ; ドビチニブニ乳酸塩 (TKI258、CAS 852433-84-2) ; リンファニブ (ABT869、CAS 796967-16-3) ; カボザンチニブ (XL184、CAS 849217-68-1) ; レスタウルチニブ (CAS 111358-88-4) ; N-[5-[[5-(1,1-ジメチルエチル)-2-オキサゾリル] メチル] チオ]-2-チアゾリル]-4-ピペリジニルカルボキサミド (BMS38703、CAS 345627-80-7) ; (3R,4R)-4-アミノ-1-((4-(3-メトキシフェニル) アミノ) ピロロ [2,1-f] [1,2,4] トリアジン-5-イル) メチル) ピペリジン-3-オール (BMS690514) ; N-(3,4-ジクロロ-2-フルオロフェニル)-6-メトキシ-7-[[(3 α ,5 β ,6 α)-オクタヒドロ-2-メチルシクロペンタ [c] ピロール-5-イル] メトキシ]-4-キナゾリンアミン (XL647、CAS 781613-23-8) ; 4-メチル-3-[[1-メチル-6-(3-ピリジニル)-1H-ピラゾロ [3,4-d] ピリミジン-4-イル] アミノ]-N-[3-(トリフルオロメチル) フェニル]-ベンズアミド (BHG712、CAS 940310-85-0) ; 及びアフリベルセプト (Eylea (登録商標)) と組み合わせて対象に投与する。

10

20

【0631】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞をCD20抗体又はそのコンジュゲート、例えばリツキシマブ (Riuxan (登録商標) 及び MabThera (登録商標)) ; 及びトシツモマブ (Bexxar (登録商標)) ; 及びオファツムマブ (Arzerra (登録商標))、イブリツモマブチウキセタン (Zevalin (登録商標)) ; 及びトシツモマブと組み合わせて対象に投与する。

【0632】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞を抗けいれん薬、例えば抗けいれん薬 (抗てんかん薬又は抗発作薬) : アルデヒド、例えばパラアルデヒド ; 芳香族アリルアルコール、例えばスチリペンツール (Diacomit (登録商標)) ; バルビツレート、例えばフェノバルビタール (Luminal (登録商標))、メチルフェノバルビタール (Mebaral (登録商標))、バルベキサクロン (Maliasin (登録商標))、ベンゾジアゼピン、例えばクロバザム (Onfi (登録商標))、クロナゼパム (Klonopin (登録商標))、クロラゼパート (Tranxene (登録商標) 及び Novo-Clopate (登録商標))、ジアゼパム (Valium (登録商標))、Lembrol (登録商標)、Diastat (登録商標)、ミダゾラム (Versed (登録商標))、ロラゼパム (Ativan (登録商標) 及び Orfidal (登録商標))、ニトラゼパム (Alodorm (登録商標))、Arem (登録商標)、Insoma (登録商標)、テマゼパム (restoril (登録商標))、Normison (登録商標)、ニメツエパム (Erimin (登録商標))、臭化物、例えば臭化カリウム ; カルバメート、例えばフェルバメート (Felbatol (登録商標)) ; カルボキサミド、例えばカルバマゼピン (Tegretol (登録商標))、Equetro (登録商標)、オキシカルバゼピン (Trileptal (登録商標))、Oxcarb (登録商標)、酢酸エスリカルバゼピン (Aptiom (登録商標)) ; 脂肪酸、例えばバルプロエート (バルプロ酸、バルプロ酸ナトリウム、ジバルプロエックスナトリウム)、ピガバトリン (Sabril (登録商標))、プロガビド (Gabren (登録商標))、チアガビン (Gabitril (登録商標)) ; フルクトース誘導体、例えばトピラメート (Topamax (登録商標)) ; GABA類似体、例えばガバペンチン (Neurontin (登録商標))、プレガバリン (Lyrica (登録商標)) ; ヒダントイン、例えばエトトイン (Peganone (登録商標))、フェニトイン (Dila

30

40

50

ntin (登録商標))、メフェニトイン (Mesantoin (登録商標))、フォスフェニトイン (Cerebyx (登録商標)、Prodilantin (登録商標))；オキサゾリジンジオン、例えばパラメタジオン (Paradione (登録商標))、トリメタジオン (Tridione (登録商標))；プロピオネート、例えばベクラミド (Choracoon (登録商標)、Hibicon (登録商標)、Posedrine (登録商標))；ピリミジンジオン、例えばプリミドン (Mysoline (登録商標))；ピロリジン、例えばブリバラセタム、レベチラセタム、セレトラセタム (Keppra (登録商標))；スクシンイミド、例えばエトスクシミド (Zarontin (登録商標))、フェンスクシミド (Milontin (登録商標))、メスクシミド (Celontin (登録商標)、Petinutin (登録商標))；スルホンアミド、例えばアセタゾラミド (Diamox (登録商標))、スルチアム (Ospolot (登録商標))、メタゾラミド (Neptazane (登録商標))、ゾニサミド (Zonegran (登録商標))；トリアジン、例えばラモトリジン (Lamictal (登録商標))；尿素、例えばフェネツリド、フェナセミド (フェヌロン (登録商標))；バルプロイルアミド (バルプロ酸のアミド誘導体)、例えばバルプロミド (Depamide (登録商標))、バルノクタミド；AMPA受容体アンタゴニスト、例えばペランパネル (Fycampa (登録商標))と組み合わせて対象に投与する。

【0633】

実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞をインドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ (IDO) 阻害剤と組み合わせて対象に投与する。IDOは、アミノ酸、L-トリプトファンのキヌレニンへの分解を触媒する酵素である。多くの癌、例えば前立腺癌、結腸直腸癌、膵臓癌、子宮頸癌、胃癌、卵巣癌、頭部癌及び肺癌がIDOを過発現する。pDC、マクロファージ及び樹状細胞 (DC) がIDOを発現できる。理論に拘束されないが、L-トリプトファンの減少 (例えば、IDOによる触媒) は、T細胞アネルギー及びアポトーシスの誘発による免疫抑制性環境をもたらすと考えられる。そのため、理論に拘束されないが、IDO阻害剤は、例えば、CAR発現免疫細胞の抑制又は死を減少させることにより、本明細書に記載のCAR発現細胞の効果を增強できると考えられる。実施形態において、対象は、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、頭部癌又は肺癌を有する。例示的なIDO阻害剤は、1-メチルトリプトファン、インドキシモド (NewLink Genetics) (例えば、Clinical Trial Identifier Nos. NCT01191216；NCT01792050を参照されたい) 及びINCB024360 (Incyte Corp.) (例えば、Clinical Trial Identifier Nos. NCT01604889；NCT01685255を参照されたい) を含むが、これらに限定されない。

【0634】

実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞を骨髄由来サプレッサー細胞 (MDSC) のモジュレーターと組み合わせて対象に投与する。MDSCは、末梢及び多くの固形腫瘍の腫瘍部位に蓄積する。これらの細胞は、T細胞応答を抑制し、それによりCAR発現細胞療法の効果を障害する。理論にされるものではないが、MDSCモジュレーター投与は、本明細書に記載のCAR発現細胞の効果を增強すると考えられる。一実施形態において、対象は、固形腫瘍、例えば本明細書に記載の固形腫瘍、例えば神経膠芽腫を有する。例示的なMDSCのモジュレーターは、MCS110及びBLZ945を含むが、これらに限定されない。MCS110は、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) に対するモノクローナル抗体 (mAb) である。例えば、Clinical Trial Identifier No. NCT00757757を参照されたい。BLZ945は、コロニー刺激因子1受容体 (CSF1R) の小分子阻害剤である。例えば、Pyonteck et al. Nat. Med. 19 (2013) : 1264-72を参照されたい。BLZ945の構造を下に示す。

10

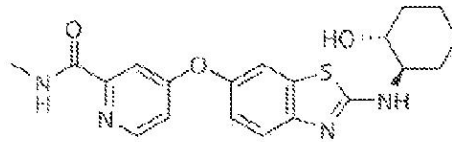
20

30

40

50

【化 16】



【0635】

実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞をCD19 CAR T細胞（例えば、CTL019、例えば参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2012/079000号パンフレットに記載のもの）と組み合わせて対象に投与する。実施形態において、対象は、急性骨髄性白血病（AML）、例えばCD19陽性AML又はCD19陰性AMLを有する。実施形態において、対象は、CD19+リンパ腫、例えばCD19+非ホジキンリンパ腫（NHL）、CD19+FL又はCD19+DLBCLを有する。実施形態において、対象は、再発性又は難治性CD19+リンパ腫を有する。実施形態において、リンパ球枯渇性化学療法剤をCD19 CAR T細胞の投与前に、それと同時に又はその後に投与（例えば、注入）する。一例において、リンパ球枯渇性化学療法剤をCD19 CAR T細胞の投与前に対象に投与する。例えば、リンパ球枯渇性化学療法剤は、CD19 CAR T細胞注入の1～4日（例えば、1日、2日、3日又は4日）前に終わる。実施形態において、複数用量のCD19 CAR T細胞を例えば本明細書に記載のように投与する。例えば、単一用量は、約 5×10^8 個のCD19 CAR T細胞を含む。実施形態において、リンパ球枯渇性化学療法剤を、本明細書に記載のCAR発現細胞、例えば非CD19 CAR発現細胞の投与（例えば、注入）前に、それと同時に又はその後に対象に投与する。実施形態において、CD19 CAR Tを、非CD19 CAR発現細胞、例えば本明細書に記載の非CD19 CAR発現細胞の投与（例えば、注入）前に、それと同時に又はその後に対象に投与する。

【0636】

一実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞を、BCMAの発現と関係する疾患、例えば本明細書に記載の癌の処置のために、CD19 CAR発現細胞、例えば参照により本明細書に援用される国際公開第2012/079000号パンフレットに記載のような例えばCTL019と組み合わせて対象に投与する。理論に拘束されないが、CAR発現細胞と組み合わせたCD19 CAR発現細胞の投与は、初期細胞系統癌細胞、例えば癌幹細胞を標的とすることにより、免疫応答を調節することにより、制御性B細胞を枯渇することにより及び／又は腫瘍微小環境を改善することにより、本明細書に記載のCAR発現細胞の効果を改善すると考えられる。例えば、CD19 CAR発現細胞は、初期細胞系統マーカー、例えば癌幹細胞及びCD19発現細胞を発現する癌細胞を標的とするのに対し、本明細書に記載のCAR発現細胞は、後期細胞系統マーカー、例えばBCMAを発現する癌細胞を標的とする。この前処理アプローチは、本明細書に記載のCAR発現細胞の効果を改善できる。このような実施形態において、CD19 CAR発現細胞を、本明細書に記載のCAR発現細胞の投与（例えば、注入）前に、それと同時に又はその後に投与する。

【0637】

実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞は、CD19を標的とするCAR、例えばCD19 CARも発現する。一実施形態において、本明細書に記載のCARを発現する細胞及びCD19 CARを、本明細書に記載の癌、例えばAMLの処置のために対象に投与する。一実施形態において、一方又は両方のCAR分子の配置は、初代細胞内シグナル伝達ドメイン及び共刺激性シグナル伝達ドメインを含む。別の実施形態において、一方又は両方のCAR分子の配置は、初代細胞内シグナル伝達ドメイン及び2つ以上、例えば2つ、3つ、4つ若しくは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。このような実施形態において、本明細書に記載のCAR分子及びCD19 CARは、同一若しくは異なる初代細胞内シグナル伝達ドメイン、同一若しくは異なる共刺激性シグナル伝達ドメイン又は同数若しくは異なる数の共刺激性シグナル伝達ドメインを有し得る。代わりに、本明細書に記載のCAR及びCD19 CARは、スプリットCARとして配置され、そこで、CAR分子の一方は、抗原結合ドメイン及び共刺激ドメイン（例えば、4-1BB）を含み、他のCAR分子は、抗原結合ドメイン及び初代細胞内シグナル伝達ドメイン（例えば、CD3ゼータ）を含む。

【0638】

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受容体アルファ（IL-15Ra）ポリペプチド又は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、例えばhetIL-15（Admune Therapeutics, LLC）と組み合わせて対象に投与する。hetIL-15は、IL-15及びIL-15Raのヘテロ二量体非共有複合体である。hetIL-15は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第8,124,084号明細書、米国特許出願公開第2012/0177598号明細書、米国特許出願公開第2009/0082299号明細書、米国特許出願公開第2012/0141413号明細書及び米国特許出願公開第2011/0081311号明細書に記載されている。実施形態において、het-IL-15を皮下投与する。実施形態において、対象は、癌、例えば固形癌、例えば黒色腫又は結腸癌を有する。実施形態において、対象は、転移癌を有する。

【0639】

いくつかの実施形態において、対象は、CAR発現細胞の投与に関連する副作用を低減又は緩和する薬剤を投与することができる。CAR発現細胞の投与に付随する副作用は、CRS及びマクロファージ活性化症候群（MAS）とも呼ばれる血液貪食リンパ組織球増多症（HLH）を含むが、これらに限定されない。CRSの症状は、高熱、悪心、一過性低血圧、低酸素症などを含む。CRSは、発熱、疲労、食欲不振、筋肉痛、関節痛、悪心、嘔吐、頭痛などの臨床的体質的徴候及び症状を含み得る。CRSは、発疹などの臨床皮膚徴候及び症状を含み得る。CRSは、悪心、嘔吐及び下痢などの臨床的消化器徴候及び症状を含み得る。CRSは、頻呼吸及び低酸素血症などの臨床的呼吸器徴候及び症状を含み得る。CRSは、頻脈、脈圧の増大、低血圧、心拍出量の増加（早期）及び心拍出量の低下（後期）などの臨床的心血管徴候及び症状を含み得る。CRSは、凝固兆候及びd-二量体増加、出血の有無にかかわらず低フィブリノーゲン血などの症状を含み得る。CRSは、高窒素血症などの臨床腎徴候及び症状を含み得る。CRSは、高トランスアミナーゼ血症及び高ビリルビン血症などの臨床肝徴候及び症状を含み得る。CRSは、頭痛、精神状態の変化、混乱、せん妄、単語発見困難又はフランク失語、幻覚、振戦、ジメトリア、異常歩行、発作などの臨床的神経徴候及び症状を含み得る。

【0640】

従って、本明細書に記載の方法は、対象に本明細書に記載のCAR発現細胞を投与し、更にCAR発現細胞処置に由来する可溶性因子のレベル増加を管理する1つ以上の薬剤の投与を含み得る。いくつかの実施形態において、対象で増加し得る可溶性因子は、IFN- γ 、TNF α 、IL-2及びIL-6の1つ以上である。一実施形態において、対象において増加する因子は、IL-1、GM-CSF、IL-10、IL-8、IL-5及びフラクタルカインの1つ以上である。従って、これらの副作用を処置するために投与する薬剤は、これらの可溶性因子の1つ以上を中和する薬剤であり得る。いくつかの実施形態において、これらの可溶性形態の1つ以上を中和する薬剤は、抗体又は抗体フラグメントである。このような薬剤の例は、ステロイド（例えば、コルチコステロイド）、TNF α 阻害剤及びIL-6阻害剤を含むが、これらに限定されない。TNF α 阻害剤の例は、インフリキシマブ、アダリムマブ、セルトリズマブペゴール及びゴリムマブなどの抗TNF α 抗体分子である。TNF α 阻害剤の別の例は、エタネルセプトなどの融合タンパク質である。小分子TNF α 阻害剤は、キサンチン誘導体（例えば、ペントキシフィリン）及び

ブプロピオンを含むが、これらに限定されない。IL-6 阻害剤の例は、トシリズマブ (toc)、サリルマブ、エルシリモマブ、CNTO 328、ALD518/BMS-945429、CNTO 136、CPSI-2364、CDP6038、VX30、ARGX-109、FE301 及び FM101 などの抗 IL-6 抗体分子である。いくつかの実施形態において、抗 IL-6 抗体分子は、トシリズマブである。IL-1R ベースの阻害剤の例は、アナキンラである。

【0641】

一実施形態において、対象にとりわけ例えばメチルプレドニゾロン、ヒドロコルチゾンなどのコルチコステロイドを投与する。

【0642】

一実施形態において、対象に例えばノルエピネフリン、ドーパミン、フェニレフリン、エピネフリン、バソプレシン又はこれらの組み合わせなどの昇圧剤を投与する。

【0643】

一実施形態において、対象に解熱剤を投与できる。一実施形態において、対象に鎮痛剤を投与できる。

【0644】

いくつかの実施形態において、BCMA CAR 発現細胞の脳への輸送を防止する薬剤、例えばナタリズマブ (TYSABRI (登録商標)) を対象に投与することができる。BCMA 発現、例えばそのスプライス変異体は、脳のいくつかの部分、例えば小脳又は延髄で検出されている。特定の理論に拘束されるものではないが、BCMA CAR 発現細胞の脳への輸送を防止することは、BCMA CAR 発現細胞が BCMA 発現脳組織と相互作用すること又はそれに作用することを防止するために好ましい。

【0645】

いくつかの実施形態において、対象に、CAR 発現細胞の活性を増強する薬剤を投与できる。例えば、いくつかの実施形態において、薬剤は、阻害分子を阻害する薬剤であり得、例えば、薬剤は、チェックポイント阻害剤である。阻害分子、例えばプログラム細胞死 1 (PD1) は、いくつかの実施形態において、CAR 発現細胞が免疫エフェクター応答を開始する能力を減少させ得る。阻害分子の例は、PD1、PD-L1、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 TGFR ベータを含む。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のような阻害性核酸、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 発現細胞の阻害分子の発現を阻害できる。一実施形態において、阻害剤は、shRNA である。一実施形態において、阻害分子は、CAR 発現細胞内で阻害される。これらの実施形態において、阻害分子の発現を阻害する dsRNA 分子を CAR の成分、例えば成分全部をコードする核酸と連結する。実施形態において、本明細書に記載の CAR 発現細胞は、阻害分子の阻害剤と組み合わせて、例えばチェックポイント阻害剤と組み合わせて、例えば PD1 及び/又は PD-L1 の阻害剤と組み合わせて投与される。実施形態において、本明細書に記載の CAR 発現細胞は、PD1 の阻害剤と組み合わせて投与される。実施形態において、本明細書に記載の CAR 発現細胞は、PD-L1 の阻害剤と組み合わせて投与される。

【0646】

一実施形態において、T 細胞機能を調節又は制御、例えば阻害する分子の発現を阻害する dsRNA 分子をコードする核酸分子を、T 細胞機能を調節又は制御、例えば阻害する分子の発現を阻害する dsRNA 分子が発現、例えば CAR 発現細胞内で発現されるよう

10

20

30

40

50

に、プロモーター、例えばH1又はU6駆動プロモーターに操作可能に連結する。例えば、Tiscornia G., "Development of Lentiviral Vectors Expressing siRNA," Chapter 3, in Gene Transfer: Delivery and Expression of DNA and RNA (eds. Friedmann and Rossi) を参照されたい。Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2007; Brummelkamp TR, et al. (2002) Science 296:550-553; Miyagishi M, et al. (2002) Nat. Biotechnol. 19:497-500。一実施形態において、T細胞機能を調節又は制御、例えば阻害する分子の発現を阻害するdsRNA分子をコードする核酸分子は、CARの成分、例えば要素の全てをコードする核酸分子を含む同じベクター、例えばレンチウイルスベクター上に存在する。このような実施形態において、T細胞機能を調節又は制御、例えば阻害する分子の発現を阻害するdsRNA分子をコードする核酸分子は、CARの成分、例えば要素の全てをコードする核酸において5'又は3'に位置するベクター、例えばレンチウイルスベクターに位置する。T細胞機能を調節又は制御、例えば阻害する分子の発現を阻害するdsRNA分子をコードする核酸分子は、CARの成分、例えば要素の全てをコードする核酸と同一又は異なる方向で転写され得る。一実施形態において、T細胞機能を調節又は制御、例えば阻害する分子の発現を阻害するdsRNA分子をコードする核酸分子は、CARの成分、例えば要素の全てをコードする核酸分子を含むベクター以外のベクターに存在する。一実施形態において、T細胞機能を調節又は制御、例えば阻害する分子の発現を阻害するdsRNA分子をコードする核酸分子は、CAR発現細胞内で一過性に発現される。一実施形態において、T細胞機能を調節又は制御、例えば阻害する分子の発現を阻害するdsRNA分子をコードする核酸分子は、CAR発現細胞のゲノムに安定に統合される。

【0647】

T細胞機能を調節又は制御、例えば阻害する分子の発現の阻害に有用なdsRNA分子の例であり、ここで、T細胞機能を調節又は制御、例えば阻害する分子がPD-1であるものを下に提供する。

【0648】

いくつかの実施形態において、阻害シグナルの阻害剤は、例えば、阻害分子と結合する抗体又は抗体フラグメントであり得る。例えば、薬剤は、PD1、PD-L1、PD-L2又はCTLA4に結合する抗体又は抗体フラグメントであり得る（例えば、イピリムマブ（MDX-010及びMDX-101とも称し、Yervoy（登録商標）として市販；Bristol-Myers Squibb；トレメリムマブ（Pfizerから入手可能なIgG2モノクローナル抗体、以前にはチシリムマブ、CP-675,206として既知。）。一実施形態において、薬剤は、TIM3に結合する抗体又は抗体フラグメントである。一実施形態において、薬剤は、LAG3に結合する抗体又は抗体フラグメントである。実施形態において、CAR発現細胞の活性を増強する薬剤、例えば阻害分子の阻害剤を同種異系CAR、例えば同種異系本明細書に記載のCARと組み合わせて投与する（例えば、本明細書における同種異系CARに記載）。

【0649】

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 e

10

20

30

40

50

t 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。PD1、PD-L1及びPD-L2の抗体、抗体フラグメント及び他の阻害剤は、当技術分野で入手可能であり、本発明のCARと組み合わせて使用され得る。例えば、ニボルマブ(BMS-936558又はMDX1106とも称す; Bristol-Myers Squibb)は、PD1を特異的に遮断する完全ヒトIgG4モノクローナル抗体である。PD1に特異的に結合するニボルマブ(クローン5C4)及び他のヒトモノクローナル抗体は、米国特許第8,008,449号明細書及び国際公開第2006/121168号パンフレットに開示されている。ピジリズマブ(CT-011; Cure Tech)は、PD1に結合するヒト化IgG1kモノクローナル抗体である。ピジリズマブ及び他のヒト化抗PD1モノクローナル抗体は、国際公開第2009/101611号パンフレットに開示されている。ペンブロリズマブ(以前にはランブロリズマブとして知られ、MK03475とも称される; Merck)は、PD1に結合するヒト化IgG4モノクローナル抗体である。ペンブロリズマブ及び他のヒト化抗PD1抗体は、米国特許第8,354,509号及び国際公開第2009/114335号パンフレットに開示される。MED14736(Medimmune)は、PD-L1と結合し、リガンドとPD1の相互作用を阻害するヒトモノクローナル抗体である。MDPL3280A(Genentech/Roche)は、PD-L1に結合するヒトFc最適化IgG1モノクローナル抗体である。PD-L1に対するMDPL3280A及び他のヒトモノクローナル抗体は、米国特許第7,943,743号明細書及び米国特許出願公開第20120039906号明細書に開示されている。他の抗PD-L1結合剤は、YW243.55.S70(重鎖及び軽鎖可変領域は、国際公開第2010/077634号パンフレットの配列番号20及び21に示される)及びMDX-1105(別名BMS-936559及び例えば、国際公開第2007/005874号パンフレットに開示される抗PD-L1結合剤)を含む。AMP-224(B7-DCIg; Amplimmune; 例えば、国際公開第2010/027827号パンフレット及び国際公開第2011/066342号パンフレットに開示)は、PD1とB7-H1の相互作用を遮断するPD-L2 Fc融合可溶性受容体である。他の抗PD1抗体は、とりわけ、AMP 514(Amplimmune)、例えば米国特許第8,609,089号明細書、米国特許出願公開第2010028330号明細書及び/又は米国特許出願公開第20120114649号明細書に開示の抗PD1抗体を含む。

【0650】

TIM3(T細胞免疫グロブリン-3)も、特にIFN- γ 分泌CD4+Tヘルパー1及びCD8+T細胞毒性1細胞において、T細胞機能を負に制御し、T細胞疲弊に重要な役割を有する。TIM3とそのリガンド、例えばガレクチン-9(Gal9)、ホスファチジルセリン(PS)及びHMGB1の相互作用の阻害は免疫応答を高め得る。TIM3及びそのリガンドの抗体、抗体フラグメント及び他の阻害剤は、当技術分野で利用可能であり、本明細書に記載のCD19又はBCMA CARと組み合わせて使用し得る。例えば、TIM3を標的とする抗体、抗体フラグメント、小分子又はペプチド阻害剤は、そのリガンドとの相互作用を阻害するためにTIM3のIgVドメインに結合する。TIM3を阻害する抗体及びペプチドは、国際公開第2013/006490号パンフレット及び米国特許出願公開第20100247521号明細書に開示されている。他の抗TIM3抗体は、RMT3-23のヒト化バージョン(Ngiow et al., 2011, Cancer Res, 71:3540-3551に開示)及びクローン8B.2C12(Monney et al., 2002, Nature, 415:536-541に開示)を含む。TIM3及びPD-1を阻害する二特異性抗体は米国特許出願公開第20130156774号明細書に開示されている。

【0651】

他の実施形態において、CAR発現細胞の活性を増強する薬剤は、CEACAM阻害剤

(例えば、CEACAM-1、CEACAM-3及び／又はCEACAM-5阻害剤)である。いくつかの実施形態において、CEACAMの阻害剤は、抗CEACAM抗体分子である。例示的な抗CEACAM-1抗体は、国際公開第2010/125571号パンフレット、国際公開第2013/082366号パンフレット、国際公開第2014/059251号パンフレット及び国際公開第2014/022332号パンフレットに記載され、例えばモノクローナル抗体34B1、26H7及び5F4；又は例えば米国特許出願公開第2004/0047858号明細書、米国特許第7,132,255号明細書及び国際公開第99/052552号パンフレットに記載のようなその組み換え形態である。他の実施形態において、抗CEACAM抗体は、例えば、Zheng et al. PLoS One. 2010 Sep 2; 5(9). pii: e12529 (DOI: 10: 1371/journal.pone.0021146)に記載のようにCEACAM-5と結合するか、又は例えば国際公開第2013/054331号パンフレット及び米国特許出願公開第2014/0271618号明細書に記載のようにCEACAM-1及びCEACAM-5と交差反応する。

【0652】

理論に拘束されることを望まないが、CEACAM-1及びCEACAM-5などの癌胎児性抗原細胞接着分子(CEACAM)は、少なくとも部分的に抗腫瘍免疫応答の阻害を媒介すると考えられる(例えば、Markel et al. J Immunol. 2002 Mar 15; 168(6): 2803-10; Markel et al. J Immunol. 2006 Nov 1; 177(9): 6062-71; Markel et al. Immunology. 2009 Feb; 126(2): 186-200; Markel et al. Cancer Immunol Immunother. 2010 Feb; 59(2): 215-30; Ortenberg et al. Mol Cancer Ther. 2012 Jun; 11(6): 1300-10; Stern et al. J Immunol. 2005 Jun 1; 174(11): 6692-701; Zheng et al. PLoS One. 2010 Sep 2; 5(9). pii: e12529を参照されたい)。例えば、CEACAM-1は、TIM-3のヘテロ親和性リガンドとして且つTIM-3媒介T細胞耐受性及び疲弊に役割を有するとして記載されている(例えば、国際公開第2014/022332号パンフレット; Huang, et al. (2014) Nature doi: 10.1038/nature13848を参照されたい)。実施形態において、CEACAM-1及びTIM-3の共遮断は、異種移植結腸直腸癌モデルにおいて抗腫瘍免疫応答を増強することが示されている(例えば、国際公開第2014/022332号パンフレット; Huang, et al. (2014)、上掲を参照されたい)。他の実施形態において、CEACAM-1及びPD-1の共遮断は、例えば、国際公開第2014/059251号パンフレットに記載されるようにT細胞耐受性を減少させる。そのため、CEACAM阻害剤を、本明細書に記載の他の免疫調節剤(例えば、抗PD-1及び／又は抗TIM-3阻害剤)と使用して、癌、例えば黒色腫、肺癌(例えば、NSCLC)、膀胱癌、結腸癌、卵巣癌及び本明細書に記載の他の癌に対する免疫応答を増強させ得る。

【0653】

LAG-3(リンパ球活性化遺伝子-3又はCD223)は、CD8+T細胞疲弊に役割を有することが示されている、活性化T細胞及びB細胞に発現される細胞表面分子である。LAG3及びそのリガンドの抗体、抗体フラグメント及び他の阻害剤は、当技術分野で利用可能であり、本明細書に記載のCD19又はBCMA CARと組み合わせて使用し得る。例えば、BMS-986016(Bristol-Myers Squibb)は、LAG3を標的とするモノクローナル抗体である。IMP701(Immutep)は、アンタゴニストLAG-3抗体であり、IMP731(Immutep及びGlaxoSmithKline)は、枯渴性LAG-3抗体である。他のLAG-3阻害剤は、LAG3の可溶性部分とMHCクラスII分子のIgの組み換え融合タンパク質であり、抗原提示細胞(APC)を活性化するIMP321(Immutep)を含む。他の抗体は

10

20

30

40

50

、例えば、国際公開第2010/019570号パンフレットに開示されている。

【0654】

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、例えば、第1のドメイン及び第2のドメインを含む融合タンパク質であり得、第1のドメインは、阻害分子又はそのフラグメントであり、第2のドメインは、陽性シグナルに関連するポリペプチド、例えば本明細書に記載の細胞内シグナル伝達ドメインを含むポリペプチドである。一実施形態において、陽性シグナルと結合するポリペプチドは、CD28、CD27、ICOSの共刺激ドメイン、例えばCD28、CD27及び／又はICOSの細胞内シグナル伝達ドメイン及び／又は例えば本明細書に記載の例えばCD3ゼータの一次シグナル伝達ドメインを含み得る。いくつかの実施形態において、融合タンパク質は、CARを発現するのと同じ細胞により発現される。別の実施形態において、融合タンパク質は、抗BCMA CARを発現しない細胞、例えばT細胞又はNK細胞により発現される。

10

【0655】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞の活性を増強する薬剤は、miR-17-92である。

【0656】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載のCARの活性を増強する薬剤は、サイトカインである。サイトカインは、T細胞増殖、分化、生存及び恒常性に関連する重要な機能を有する。本明細書に記載のCAR発現細胞を受ける対象に投与できるサイトカインは、IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15、IL-18及びIL-21又はこれらの組み合わせを含む。好ましい実施形態において、投与するサイトカインは、IL-7、IL-15又はIL-21又はこれらの組み合わせである。サイトカインを、1日1回又は1日1回を超えて、例えば1日2回、1日3回又は1日4回投与できる。サイトカインを、1日を超えて投与でき、例えばサイトカインを2日、3日、4日、5日、6日、1週間、2週間、3週間又は4週間投与する。例えば、サイトカインを1日1回、7日間投与する。

20

【0657】

実施形態において、サイトカインをCAR発現T細胞と組み合わせて投与する。サイトカインをCAR発現T細胞と同時に又は一緒に投与でき、例えば同じ日に投与する。サイトカインをCAR発現T細胞と同じ医薬組成物に製剤するか、又は別の医薬組成物に製剤し得る。代替的に、サイトカインをCAR発現T細胞の投与後間もなく、例えばCAR発現T細胞投与1日、2日、3日、4日、5日、6日又は7日後に投与し得る。1日を超える投薬レジメンでサイトカインを投与する実施形態において、サイトカイン投薬レジメンの1日目は、CAR発現T細胞の投与と同じ日であり得るか、又はサイトカイン投薬レジメンの1日目は、CAR発現T細胞の投与1日、2日、3日、4日、5日、6日又は7日後であり得る。いくつかの実施形態において、1日目にCAR発現T細胞を対象に投与し、2日目にサイトカインを1日1回、翌7日間投与する。好ましい実施形態において、CAR発現T細胞と組み合わせて投与するサイトカインは、IL-7、IL-15又はIL-21である。

30

【0658】

他の実施形態において、サイトカインを、CAR発現細胞の投与から一定期間後、例えばCAR発現細胞の投与から少なくとも2週間、3週間、4週間、6週間、8週間、10週間、12週間、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月又は1年又はそれを超えて後に投与する。いくつかの実施形態において、サイトカインを、CAR発現細胞に対する対象の応答の評価後に投与する。例えば、対象に本明細書に記載の用量及びレジメンに従い、CAR発現細胞を投与する。CAR発現細胞治療に対する対象の応答を、腫瘍増殖阻止、循環腫瘍細胞減少又は腫瘍退縮を含む、本明細書に記載の方法のいずれかを使用して、CAR発現細胞の投与2週間、3週間、4週間、6週間、8週間、10週間、12週間、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月又は1年又はそれを超えて後に評価する。CAR発現細胞治療に対して十

40

50

分な応答を示さない対象にサイトカインを投与し得る。CAR発現細胞治療に対して応答が最適以下である対象へのサイトカインの投与は、CAR発現細胞有効性又は抗癌活性を改善する。好ましい実施形態において、CAR発現細胞の投与後に投与するサイトカインは、IL-7である。

【0659】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載のBCMA CAR T細胞は、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤と組み合わせて使用することができる。本明細書に記載の方法は、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えばRAD001などのラパログを含むアロステリックmTOR阻害剤を使用する。低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与（例えば、それ自体、免疫系を完全に抑制するには不十分であるが、免疫機能の改善に十分である用量）は、対象における免疫エフェクター細胞、例えばT細胞又はCAR発現細胞の性能を最適化できる。mTOR阻害を測定する方法、用量、処置レジメン及び適当な医薬組成物は、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2015/01240036号明細書に記載される。BCMA CAR T細胞をmTOR阻害剤と組み合わせる方法については、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第20160046724号明細書の段落[0826]～[0861]を参照されたい。

【0660】

CAR有効性又は試料適性を評価するための方法及びバイオマーカー

別の態様において、本発明は、対象（例えば、癌を有する対象、例えば血液癌）におけるCAR発現細胞療法（例えば、BCMA CAR治療）の有効性又はCAR治療（例えば、BCMA CAR治療）のための試料（例えば、アフェレーシス試料）の適性を評価又はモニタリングする方法に関する。方法は、CAR治療又は試料適性に対する有効性の値を得ることを含み、ここで、前記値は、CAR発現細胞療法の有効性又は適性の指標である。

【0661】

実施形態において、CAR療法に対する有効性の値又はサンプルの適合性は、以下の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ又はそれを超える（全て）の尺度を含む：

(i) サンプル（例えば、アフェレーシスサンプル又は製造されたCAR発現細胞産物サンプル）中の休止T_{EFF}細胞、休止T_{REG}細胞、より若いT細胞（例えば、より若いCD4若しくはCD8細胞又はガンマ/デルタT細胞）若しくは初期メモリーT細胞又はそれらの組み合わせの1つ、2つ、3つ又はそれを超える数（例えば、全て）のレベル又は活性；

(ii) サンプル（例えば、アフェレーシスサンプル又は製造されたCAR発現細胞産物サンプル）中の活性化T_{EFF}細胞、活性化T_{REG}細胞、より古いT細胞（例えば、より古いCD4若しくはCD8細胞）若しくは後期メモリーT細胞又はそれらの組み合わせの1つ、2つ、3つ又はそれを超える数（例えば、全て）のレベル又は活性；

(iii) サンプル（例えば、アフェレーシスサンプル又は製造されたCAR発現細胞産物サンプル）中の免疫細胞枯渇マーカー、例えば1つ、2つ又はそれを超える数の免疫チェックポイント阻害剤（例えば、PD-1、PD-L1、TIM-3及び/又はLAG-3）のレベル又は活性。いくつかの実施形態において、免疫細胞は、枯渇した表現型を有し、例えば少なくとも2つの枯渇マーカーを共発現し、例えばPD-1及びTIM-3を共発現する。他の実施形態において、免疫細胞は、枯渇した表現型を有し、例えば少なくとも2つの枯渇マーカーを共発現し、例えばPD-1及びLAG-3を共発現する；

(iv) サンプル（例えば、アフェレーシスサンプル又は製造されたCAR発現細胞産物サンプル）中の、例えばCD4+又はCD8+T細胞集団における、CD27及び/又はCD45RO-（例えば、CD27+CD45RO-）免疫エフェクター細胞のレベル又は活性；

(v) CCL20、IL-17a及び/又はIL-6、PD-1、PD-L1、LAG-3、TIM-3、CD57、CD27、CD122、CD62L、KLRG1から選択される1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、10個、20個又はそれを超える数のバイオマーカー

10

20

30

40

50

一のレベル又は活性；

(v i) C A R 発現細胞産物サンプル、例えば B C M A 発現細胞産物サンプルにおける、サイトカインレベル又は活性（例えば、サイトカインレパートリーの質）；又は

(v i i) 製造された C A R 発現細胞産物サンプルにおける C A R 発現細胞の形質導入効率。

【0662】

本明細書に開示される方法のいずれかのいくつかの実施形態において、C A R 発現細胞療法は、複数（例えば、集団）の C A R 発現免疫エフェクター細胞、例えば複数（例えば、集団）の T 細胞又は N K 細胞又はそれらの組み合わせを含む。一実施形態において、C A R 発現細胞療法は、B C M A C A R 療法である。

10

【0663】

本明細書に開示される方法のいずれかのいくつかの実施形態において、(i) ~ (v i i) の1つ以上の尺度は、対象から取得されたアフレーシスサンプルから得られる。アフレーシスサンプルは、注入又は再注入の前に評価できる。

【0664】

本明細書に開示される方法のいずれかのいくつかの実施形態において、(i) ~ (v i i) の1つ以上の尺度は、製造された C A R 発現細胞産物サンプル、例えば B C M A C A R 発現細胞産物サンプルから得られる。製造された C A R 発現細胞産物は、注入又は再注入前に評価することができる。

【0665】

本明細書に開示される方法のいずれかのいくつかの実施形態において、対象は、C A R 発現細胞療法を受ける前、受けている間又は受けた後に評価される。

20

【0666】

本明細書に開示される方法のいずれかのいくつかの実施形態において、(i) ~ (v i i) の1つ以上の尺度は、遺伝子発現、フローサイトメトリー又はタンパク質発現の1つ以上のプロファイルを評価する。

【0667】

本明細書に開示される方法のいずれかのいくつかの実施形態において、方法は、(i) ~ (v i i) の1つ以上の尺度に基づいて、対象を応答者、非応答者、再発者又は非再発者として認識することを更に含む。

30

【0668】

本明細書に開示される方法のいずれかのいくつかの実施形態において、応答者（例えば、完全応答者）は、非応答者と比較して、G Z M K、P P F 1 B P 2 又はナイーブ T 細胞の1つ、2つ又はそれを超える数（全て）の、より高いレベル又は活性を有するか又はそれを有すると認識される。

【0669】

本明細書に開示される方法のいずれかのいくつかの実施形態において、非応答者は、応答者と比較して、I L 2 2、I L - 2 R A、I L - 2 1、I R F 8、I L 8、C C L 1 7、C C L 2 2、エフェクター T 細胞又は制御性 T 細胞の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ又はそれを超える数（例えば、全て）のより高いレベル又は活性を有するか又は有すると認識される。

40

【0670】

一実施形態において、再発者は、非再発者と比較して、以下の遺伝子：M I R 1 9 9 A 1、M I R 1 2 0 3、u c 0 2 1 o v p、I T M 2 C 及び H L A - D Q B 1 の1つ以上（例えば、2つ、3つ、4つ又は全て）の発現レベルの増加及び／又は非再発者と比較して、以下の遺伝子：P P I A L 4 D、T T T Y 1 0、T X L N G 2 P、M I R 4 6 5 0 - 1、K D M 5 D、U S P 9 Y、P R K Y、R P S 4 Y 2、R P S 4 Y 1、N C R N A 0 0 1 8 5、S U L T 1 E 1 及び E I F 1 A Y の1つ以上（例えば、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10個、11個又は全て）の発現レベルの減少を有するか又はそれを有すると認識される患者である。

50

【0671】

本明細書に開示される方法のいずれかのいくつかの実施形態において、完全応答者は、参照値、例えばCD8+T細胞の非応答者のパーセンテージと比較して、より大きい、例えば統計的に有意に大きいパーセンテージのCD8+T細胞を有するか又はそれを有すると認識される。

【0672】

本明細書に開示される方法のいずれかのいくつかの実施形態において、完全応答者は、参照値、例えば非応答者のCD27+CD45RO-免疫エフェクター細胞数と比較して、例えばCD8+集団において、より大きいパーセンテージのCD27+CD45RO-免疫エフェクター細胞を有するか又はそれを有すると認識される。

10

【0673】

本明細書に開示される方法のいずれかのいくつかの実施形態において、完全応答者又は部分的応答者は、参照値、例えばCD4+T細胞の非応答者のパーセンテージと比較して、より大きい、例えば統計的に有意に大きいパーセンテージのCD4+T細胞を有するか又はそれを有すると認識される。

【0674】

本明細書に開示される方法のいずれかのいくつかの実施形態において、完全応答者は、参照値、例えば非応答者の休止TEFF細胞、休止TREG細胞、より若いT細胞（例えば、より若いCD4若しくはCD8細胞）又は初期メモリーT細胞数と比較して、より大きいパーセンテージの休止TEFF細胞、休止TREG細胞、より若いT細胞（例えば、より若いCD4若しくはCD8細胞又はガンマ/デルタT細胞）若しくは初期メモリーT細胞又はそれらの組み合わせの1つ、2つ、3つ又はそれを超える数（例えば、全て）を有するか又はそれを有すると認識される。

20

【0675】

本明細書に開示される方法のいずれかのいくつかの実施形態において、非応答者は、参照値、例えば応答者の活性化TEFF細胞、活性化TREG細胞、より古いT細胞（例えば、より古いCD4若しくはCD8細胞）又は後期メモリーT細胞数と比較して、より大きいパーセンテージの活性化TEFF細胞、活性化TREG細胞、より古いT細胞（例えば、より古いCD4若しくはCD8細胞）若しくは後期メモリーT細胞又はそれらの組み合わせの1つ、2つ、3つ又はそれを超える数（例えば、全て）を有するか又はそれを有すると認識される。

30

【0676】

本明細書に開示される方法のいずれかのいくつかの実施形態において、非応答者は、より大きいパーセンテージの免疫細胞枯渇マーカー、例えば1つ、2つ又はそれを超える数の免疫チェックポイント阻害剤（例えば、PD-1、PD-L1、TIM-3及び/又はLAG-3）を有するか又はそれを有すると認識される。いくつかの実施形態において、非応答者は、応答者からのPD-1又はLAG-3を発現する免疫エフェクター細胞のパーセンテージと比較して、より大きいパーセンテージのPD-1、PD-L1又はLAG-3を発現する免疫エフェクター細胞（例えば、CD4+T細胞及び/又はCD8+T細胞）（例えば、CAR発現CD4+細胞及び/又はCD8+T細胞）を有するか又はそれを有すると認識される。

40

【0677】

いくつかの実施形態において、非応答者は、より大きいパーセンテージの、枯渇した表現型を有する免疫細胞、例えば少なくとも2つの枯渇マーカーを共発現する、例えばPD-1、PD-L1及び/又はTIM-3を共発現する免疫細胞を有するか又はそれを有すると認識される。他の実施形態において、非応答者は、より大きいパーセンテージの、枯渇した表現型を有する免疫細胞、例えば少なくとも2つの枯渇マーカーを共発現する、例えばPD-1及びLAG-3を共発現する免疫細胞を有するか又はそれを有すると認識される。

【0678】

50

本明細書に開示される方法のいずれかのいくつかの実施形態において、非応答者は、CAR発現細胞療法に対する応答者（例えば、完全応答者）と比較して、CAR発現細胞集団（例えば、BCMACAR+細胞集団）における、より大きいパーセンテージのPD-1/PD-L1+LAG-3+細胞を有するか又はそれを有すると認識される。

【0679】

本明細書に開示される方法のいずれかのいくつかの実施形態において、部分的応答者は、CAR発現細胞集団（例えば、BCMACAR+細胞集団）において、応答者より高いパーセンテージのPD-1/PD-L1+LAG-3+細胞を有するか又はそれを有すると認識される。

【0680】

本明細書に開示される方法のいずれかのいくつかの実施形態において、非応答者は、PD1/PD-L1+CAR+の表現型の枯渇及びCAR発現細胞集団（例えば、BCMACAR+細胞集団）におけるLAG3の共発現を有するか又はそれを有すると認識される。

【0681】

本明細書に開示される方法のいずれかのいくつかの実施形態において、非応答者は、応答者（例えば、完全応答者）と比較して、CAR発現細胞集団（例えば、BCMACAR+細胞集団）における、より大きいパーセンテージのPD-1/PD-L1+TIM-3+細胞を有するか又はそれを有すると認識される。

【0682】

本明細書に開示される方法のいずれかのいくつかの実施形態において、部分的応答者は、CAR発現細胞集団（例えば、BCMACAR+細胞集団）において、応答者より高いパーセンテージのPD-1/PD-L1+TIM-3+細胞を有するか又はそれを有すると認識される。

【0683】

本明細書に開示される方法のいずれかのいくつかの実施形態において、アフエーシスサンプル中のCD8+CD27+CD45RO-T細胞の存在は、CAR発現細胞療法（例えば、BCMACAR療法）に対する対象の応答の正の予測因子である。

【0684】

本明細書に開示される方法のいずれかのいくつかの実施形態において、アフエーシスサンプル中のPD1+CAR+及びLAG3+又はTIM3+T細胞の高いパーセンテージは、CAR発現細胞療法（例えば、BCMACAR療法）に対する対象の応答の予後不良の予測因子である。

【0685】

本明細書に開示される方法のいずれかのいくつかの実施形態において、応答者（例えば、完全又は部分的応答者）は、以下のプロファイルの1つ、2つ、3つ又はそれを超える数（又は全て）を有する：

（i）参照値、例えば非応答者のCD27+免疫エフェクター細胞数と比較して、より大きい数のCD27+免疫エフェクター細胞を有する；

（ii）（i）は、参照値、例えば非応答者のCD8+T細胞数と比較して、より大きい数のCD8+T細胞を有する；

（iii）参照値、例えば1つ以上のチェックポイント阻害剤を発現する非応答者の細胞数と比較して、より小さい数の、例えばPD-1、PD-L1、LAG-3、TIM-3若しくはKLRG-1又はそれらの組み合わせから選択される1つ以上のチェックポイント阻害剤を有する；又は

（iv）参照値、例えば休止TEFF細胞、休止TREG細胞、ナイーブCD4細胞、未刺激のメモリー細胞又は初期メモリーT細胞の非応答者数と比較して、より大きい数の、1つ、2つ、3つ、4つ又はそれを超える数（全て）の休止TEFF細胞、休止TREG細胞、ナイーブCD4細胞、未刺激のメモリー細胞若しくは初期メモリーT細胞又はそれらの組み合わせを有する。

【0686】

10

20

30

40

50

本明細書に開示される方法のいずれかのいくつかの実施形態において、(v i)のサイトカインレベル又は活性は、サイトカインCCL20/MIP3a、IL17A、IL6、GM-CSF、IFN γ 、IL10、IL13、IL2、IL21、IL4、IL5、IL9、TNF α 又はそれらの組み合わせの1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ又はそれを超える数(又は全て)から選択される。サイトカインは、IL-17a、CCL20、IL2、IL6又はTNF α の1つ、2つ、3つ、4つ又はそれを超える数(全て)から選択することができる。いくつかの実施形態において、サイトカインのレベル又は活性の増加は、IL-17a及びCCL20の一方又は両方から選択され、応答性の増加又は再発の減少を示す。

【0687】

本明細書に開示される方法のいずれかのいくつかの実施形態において、(v i i)における15%以上の形質導入効率は、応答性の増加又は再発の減少を示す。

【0688】

本明細書に開示される方法のいずれかのいくつかの実施形態において、(v i i)における15%未満の形質導入効率は、応答性の減少又は再発の増加を示す。

【0689】

実施形態において、本明細書の方法によって認識された応答者、非応答者、再発者又は非再発者は、臨床基準に従って更に評価することができる。例えば、完全応答者は、疾患(例えば、癌)を有するか又はそれを有する対象として認識され、処置に対する完全応答、例えば完全寛解を示す。完全応答は、本明細書に記載されるように、例えばNCCN Guidelines(登録商標)又はCheson et al., J Clin Oncol 17:1244(1999)及びCheson et al., "Revised Response Criteria for Malignant Lymphoma", J Clin Oncol 25:579-586(2007)(これらは、両方とも参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)を使用して認識され得る。部分的応答者は、疾患(例えば、癌)を有するか又はそれを有する対象として識別され、処置に対する部分的応答、例えば部分的寛解を示す。部分的応答は、例えば、NCCN Guidelines(登録商標)又は本明細書に記載されているようなCheson基準を使用して同定され得る。非応答者は、疾患(例えば、癌)を有するか又はそれを有する対象として識別され、処置に応答を示さず、例えば、患者は、安定した疾患又は進行性の疾患を有する。非応答者は、例えば、NCCN Guidelines(登録商標)又は本明細書に記載されているようなCheson基準を使用して同定され得る。

【0690】

代替的に又は本明細書に開示される方法と組み合わせて、前記値に応答して、以下の1つ、2つ、3つ、4つ又はそれを超える数を実施する：

CAR発現細胞療法を例えば応答者又は非再発者に投与すること；

CAR発現細胞療法の変更された投与量を投与したこと；

CAR発現細胞療法のスケジュール又は時間経過を変更すること；

CAR発現細胞療法と組み合わせた更なる薬剤、例えば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例えば非応答者又は部分的応答者に投与すること；

CAR発現細胞療法による処置前に、対象におけるより若いT細胞の数を増加させる療法を非応答者又は部分的応答者に投与すること；

CAR発現細胞療法の製造プロセスを変更すること、例えばCARをコードする核酸を導入する前により若いT細胞を濃縮すること又は形質導入効率を、例えば非応答者又は部分的応答者として認識された対象について高めること；

代替療法を例えば非応答者又は部分的応答者又は再発者に対して投与すること；又は

対象が非応答者又は再発者であるか又はそう認識された場合、TREG細胞集団及び／又はTREG遺伝子シグネチャーを例えばCD25枯渇、シクロホスファミド、抗GITR抗体又はそれらの組み合わせの投与の1つ以上によって減少させること。

10

20

30

40

50

【0691】

特定の実施形態において、対象は、抗G I T R抗体で前処置される。特定の実施形態において、対象は、注入又は再注入前に抗G I T R抗体で処置される。

【0692】

バイオポリマー送達方法

一実施形態において、本明細書に開示する1つ以上のC A R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、生体適合性（例えば、炎症性若しく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若しくは合成である生分解性ポリマーを含む。

10

【0693】

適当なバイオポリマーの例は、寒天、アガロース、アルギン酸、アルギン酸／リン酸カルシウムセメント（C P C）、 β -ガラクトシダーゼ（ β -G A L）、（1, 2, 3, 4, 6-ペンタアセチル α -D-ガラクトース）、セルロース、キチン、キトサン、コラーゲン、エラスチン、ゼラチン、ヒアルロン酸コラーゲン、ヒドロキシアパタイト、ポリ（3-ヒドロキシブチレート- α -3-ヒドロキシヘキサノエート）（P H B H H x）、ポリ（ラクチド）、ポリ（カプロラクトン）（P C L）、ポリ（ラクチド- α - ϵ -グリコリド）（P L G）、ポリエチレンオキシド（P E O）、ポリ（乳酸- α - ϵ -グリコール酸）（P L G A）、ポリプロピレンオキシド（P P O）、ポリビニルアルコール（P V A）、絹、大豆タンパク質及び大豆タンパク質単離体の、単独で又は任意の他のポリマー組成物とのあらゆる濃度及びあらゆる比での混合物を含むが、これらに限定されない。バイオポリマーは、接着又は遊走促進分子、例えばリンパ球のコラーゲン受容体に結合するコラーゲン模倣ペプチド及び／又は送達する細胞の送達、増殖又は機能、例えば抗癌活性を増強する刺激分子で増強又は改変され得る。バイオポリマー足場は、注射可能な例えばゲル又は半固体又は固体組成物であり得る。

20

【0694】

一実施形態において、本明細書に記載のC A R発現細胞を、対象への送達前にバイオポリマー足場上に播種する。実施形態において、バイオポリマー足場は、例えば、足場のバイオポリマーに取り込まれた又はコンジュゲートされた、更に本明細書に記載の1つ以上の更なる治療剤（例えば、別のC A R発現細胞、抗体又は小分子）又はC A R発現細胞の活性を増強する薬剤を含む。実施形態において、バイオポリマー足場を例えば腫瘍内に注射するか、又は腫瘍若しくは抗腫瘍効果を仲介するのに十分に腫瘍に近位に外科的にインプラントする。バイオポリマー組成物及びその送達のための方法の更なる例は、Stephan et al., Nature Biotechnology, 2015, 33: 97-101; 及び国際公開第2014/110591号パンフレットに記載される。

30

【0695】

医薬組成物及び処置

本発明の医薬組成物は、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る。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。本発明の組成物は、1つの態様において静脈内投与用に製剤される。

40

【0696】

本発明の医薬組成物を、処置する（又は予防する）疾患に適する方法で投与し得る。投与の量及び頻度は、患者の状態及び患者の疾患のタイプ及び重症度などの因子により決定されるが、適切な用量は、臨床試験により決定され得る。

【0697】

50

一部の実施形態において、医薬組成物は、例えば、エンドトキシン、マイコプラズマ、複製可能レンチウイルス（RCL）、p24、VSV-G核酸、HIV gag、残留抗CD3／抗CD28被覆ビーズ、マウス抗体、貯留ヒト血清、ウシ血清アルブミン、ウシ血清、培養培地要素、ベクターパッケージング細胞又はプラスミド成分、細菌及び真菌からなる群から選択される汚染物が実質的になく、例えば検出可能なレベルで存在しない。一部の実施形態において、細菌は、アルカリゲネス・フェカリス（*Alcaligenes faecalis*）、カンジダ・アルビカンス（*Candida albicans*）、エシェリキア・コリ（*Escherichia coli*）、ヘモフィルス・インフルエンザ（*Haemophilus influenza*）、ナイセリア・メニンギティデイス（*Neisseria meningitides*）、シュードモナス・エルジノーサ（*Pseudomonas aeruginosa*）、スタフィロコッカス・アウレウス（*Staphylococcus aureus*）、ストレプトコッカス・ニューモニア（*Streptococcus pneumonia*）及びストレプトコッカス・ピオゲネス（*Streptococcus pyogenes*）A群からなる群から選択される少なくとも1つである。

【0698】

「免疫学的に有効量」、「抗腫瘍有効量」、「腫瘍阻害有効量」又は「治療量」が示されるとき、本発明の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）。

【0699】

一態様において、活性化T細胞を対象に投与し、続いて血液を採り（又はアフエーシスを実施し）、本発明に従ってそれからのT細胞を活性化し、これらの活性化し、且つ増殖させたT細胞を患者に再注入することが望ましいことがある。この過程を数週間毎に複数回実施できる。一態様において、T細胞を、10cc～400ccの採血した血液から活性化できる。一態様において、T細胞を、20cc、30cc、40cc、50cc、60cc、70cc、80cc、90cc又は100ccの採血した血液から活性化する。

【0700】

対象組成物の投与は、エアロゾル吸入、注射、摂取、輸注、留置又は移植を含む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を患者に経動脈的に、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投与し得る。1つの態様において、本発明のCAR発現細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）組成物を患者に皮内又は皮下注射により投与する。1つの態様において、本発明のT細胞組成物をi.v.注射により投与する。CAR発現細胞（例えば、T細胞又は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。

【0701】

特定の例示的態様において、対象は、白血球を採取し、エクスピボで富化又は枯渇させて、目的の細胞、例えば免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）を選択及び／又は単離する白血球除去を受け得る。これらの免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）単離体を当技術分野で知られる方法により増殖させ、1つ以上の本発明のCAR構築物が導入され、それにより本発明のCAR発現細胞（例えば、CAR T細胞又はCAR発現NK細胞）が創製されるように処理し得る。処置を必要とする対象を、その後、高用量の化学療法剤と続く末梢血幹細胞移植の標準的処置に付し得る。一態様において、移植後又は移植と同時に、対象は、増殖させた本発明のCAR発現細胞（例えば、CAR T細胞又はNK細胞）の注入を受ける。更なる態様において、増殖細胞を手術

前又は後に投与する。

【0702】

実施形態において、リンパ枯渇は、例えば、本明細書に記載のCAR（例えば、本明細書に記載のBCMA結合CAR）を発現する1つ以上の細胞を投与する前に対象に対して実施される。実施形態において、リンパ枯渇は、メルファラン、サイトキサン、シクロホスファミド及びフルダラビンの1つ以上を投与することを含む。

【0703】

患者に投与すべき上記処置の用量は、処置する状態の正確な性質及び処置のレシピエントにより変わる。ヒト投与のためのスケールリングは、当技術分野で認識されている習慣に従って実施できる。CAMPATHの用量は、例えば、概して成人患者に1～約100mgの範囲であり、通常、連日で1～30日の期間にわたって投与する。好ましい1日用量は、1～10mg/日であるが、いくつかの例において最大40mg/日までの高用量を使用し得る（米国特許6,120,766号明細書に記載）。

【0704】

いくつかの実施形態において、CARは、例えば、インビトロ転写を使用して免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）に導入され、対象（例えば、ヒト）は、本発明のCAR免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）の初期投与と、その後の本発明のCAR免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）の1回以上の投与とを受け、ここで、その後の1回以上の投与は、先の投与後、15日、例えば14日、13日、12日、11日、10日、9日、8日、7日、6日、5日、4日、3日又は2日以内に行う。いくつかの実施形態において、本発明のCAR免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）の1回を超える投与を対象（例えば、ヒト）に1週間あたりで行い、例えば本発明のCAR免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）を1週間あたり2回、3回又は4回投与する。いくつかの実施形態において、対象（例えば、ヒト対象）は、CAR免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）の1週間あたり1回を超える投与を受け（例えば、1週間当たり2回、3回又は4回投与）（本明細書ではサイクルとも称される）、続いて1週間、CAR免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）を投与されず、その後、CAR免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）の1回以上の更なる投与（例えば、1週間あたりでCAR免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）の1回を超える投与）を対象に投与する。別の実施形態において、対象（例えば、ヒト対象）は、CAR免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）の1回を超えるサイクルを受け、各サイクル間の期間は、10日、9日、8日、7日、6日、5日、4日又は3日より短い。いくつかの実施形態において、CAR免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）を隔日で1週間あたり3回投与する。いくつかの実施形態において、本発明のCAR免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）は、少なくとも2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間又はそれを超えて投与される。

【0705】

一態様において、BCMA CAR発現細胞（例えば、BCMA CART又はBCMA CAR発現NK細胞）は、レンチウイルスなどのレンチウイルスウイルスベクターを使用して産生される。この方法で産生したCAR発現細胞（例えば、CART又はCAR発現NK細胞）は、安定なCAR発現を有する。

【0706】

一態様において、CAR発現細胞、例えばCARTを、ガンマレトロウイルスベクター、例えば本明細書に記載のガンマレトロウイルスベクターなどのウイルスベクターを使用して産生する。これらのベクターを使用して産生されたCARTは、安定なCAR発現を有し得る。

【0707】

一態様において、CAR発現細胞（例えば、CART又はCAR発現NK細胞）は、形質導入4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日

10

20

30

40

50

、15日後、CARベクターを一過性に発現する。CARの一過性発現は、RNA CARベクター送達により行われ得る。一態様において、CAR RNAをエレクトロポレーションによって細胞（例えば、T細胞又はNK細胞）に形質導入する。

【0708】

一過性に発現するCAR発現細胞（例えば、CART又はCAR発現NK細胞）（特にマウスscFv担持CAR発現細胞（例えば、CART又はCAR発現NK細胞）を伴う）を使用して処置される患者で生じ得る可能性のある問題は、複数処置後のアナフィラキシーである。

【0709】

この理論に拘束されることを望まないが、このようなアナフィラキシー応答は、液性抗CAR応答を発達させる患者、即ち抗IgEアイソタイプを有する抗CAR抗体が原因であると考えられる。細胞を産生する患者の抗体は、抗原への暴露の10～14日の中断があるとき、IgGアイソタイプ（これはアナフィラキシーを生じない）からIgEアイソタイプへのクラススイッチを受けると考えられる。

【0710】

患者が一過性CAR治療（例えば、RNA形質導入により完成されたものなど）中に抗CAR抗体応答を産生する高リスクにある場合、CAR発現細胞（例えば、CART細胞又はCAR発現NK細胞）注入中断は、10～14日を超えて継続してはならない。

【実施例】

【0711】

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。従って、本発明は、決して次の実施例に限定されると解釈してはならず、むしろ本明細書に提供する教示の結果として明らかとなる任意且つ全ての変形形態を含むと解釈すべきである。

【0712】

更に記載しなくとも、当業者は、前の記載及び次の説明的実施例を使用して、本発明の化合物を製造及び利用し、本願発明方法を実施できると考える。次の作業実施例は、本発明の多様な態様を特に示すものであり、本開示を限定するものと解釈されるべきでない。

【0713】

実施例1：ヒトBCMA CARのインビトロ特性評価

完全ヒト単鎖可変フラグメント（scFv）のセットは、CD3ゼータ鎖及び4-1BB刺激分子を伴うレンチウイルスCAR発現ベクターにクローン化された：R1B6、R1F2、R1G5、PI61、B61-10、B61-02、Hy03及びHy52。構築物は、最初に自動細胞レポーターアッセイを使用してスクリーニングされ、その後、初代T細胞での発現並びにBCMA発現（「BCMA+」又は「BCMA陽性」）標的に対するエフェクターT細胞応答（「BCMA CART」又は「BCMA CAR T細胞」）の量及び質に基づいて最適なクローンが選択された。エフェクターT細胞の応答には、細胞の拡大、増殖、倍増、サイトカイン産生及び標的細胞の死滅又は細胞溶解活性（脱顆粒）が含まれるが、これらに限定されない。

【0714】

BCMA CARレンチウイルスの生成

レンチウイルス導入ベクターをコードする上記の全てのscFvを使用して、VSVgシュードタイプレンチウイルス粒子にパッケージされたゲノム材料を産生した。CARをコードするレンチウイルス導入ベクターDNAを、リポフェクタミン試薬と組み合わせて3つのパッケージング成分VSVg、gag/pol及びrevと混合して、Lentix-293T細胞（Clontech）をトランスフェクトし、その12～18時間後に培地を交換した。培地交換の30時間後、培地を収集し、ろ過し、-80℃で保存した。

【0715】

自動システムを使用したBCMA CAR JNL及びJNLスクリーニングレポーターアッセイ

10

20

30

40

50

レポーターアッセイでは、BCMA CARをコードするレンチウイルスを、HEK 293細胞で2つの異なる細胞密度（40,000細胞（1×H293）又は80,000細胞（2×H293））で、96ウェルプレートで自動化された小規模な方法で生成し、ここで、トランスフェクションの48時間後にウイルスを含有する上清を回収し、Jurkat T細胞レポーター細胞株の形質導入のために、凍結せず新鮮に使用した。Jurkat NFATルシフェラーゼ（JNL）レポーター細胞株は、急性T細胞白血病株Jurkatに基づく。この株は、活性化T細胞の核因子（NFAT）応答エレメントの制御下でルシフェラーゼを発現するように修飾された。BCMA CARによる形質導入では、10,000 JNL細胞／ウェルの96ウェルプレートに、50 µlの新鮮な45 µmろ過ウイルス含有上清を形質導入した。標的細胞と共培養する前にプレートを5日間培養した。

10

【0716】

JNL細胞を活性化するBCMA CARの機能的能力を評価するために、それらを異なるエフェクター対標的細胞比（E：T比）で標的癌細胞と共培養し、ルシフェラーゼ発現を定量化することによってそれらの活性化を読み取った。scFvベースのCAR R1B6、R1F2、R1G5、PI61、B61-10、B61-02、Hy03及びHy52が評価された。CD19 JNL CAR細胞を標的特異的対照として使用し、標的細胞を含まない培地のみを陰性対照として機能した。

【0717】

上記の5日間形質導入されたJNL CAR細胞は、BCMA陽性多発性骨髄腫（MM）細胞株KMS11又は急性リンパ性白血病細胞株であるNALM6と共培養され、BCMA陰性対照として機能した。残りのJNL CAR T細胞は、フローサイトメトリーによってBCMA CAR発現について評価された。共培養は、エフェクターと標的（E：T）の比を4：1、2：1、1：1及び0.5：1で、384ウェルプレートに設定し、24時間インキュベートし、その後、活性化されたJNL CAR T細胞によるルシフェラーゼの発現は、Bright-Glo（商標）ルシフェラーゼアッセイシステム（Promega, Madison, WI）によって定量化された。各ウェルから放出された光（発光）の量は、それぞれのCARによるJNL活性化の直接読み取りであった。JNL細胞は、発光レベルがUTD細胞の2倍以上である場合に活性化されたと見なされた。BCMA+KMS11細胞株は、R1B6、R1F2、R1G5、PI61、B61-10、B61-02、Hy03及びHy52を発現するJNL細胞の活性化をもたらした（図1A及び1C）。BCMA CARのいずれも、BCMA陰性系統NALM6による活性化を示さなかった（図1E及び1F）。標的細胞を含まない培地のみでは、試験したCAR形質導入JNLは、いずれも活性化しなかった（図1G及び1H）。FACS分析は、形質導入されたJNLにおけるBCMA-CAR発現が様々な程度で検出されたことを示した。CAR%は、一般に、最も活性なJNL CARTにおけるKMS11細胞によるJNL活性化と正の相関がある（図1B及び1D）。

20

30

【0718】

BCMA CAR T細胞の生成

以下の8つのCARが初代T細胞におけるCARの発現、安定性及び有効性の分析のために選択された：R1B6、R1F2、R1G5、PI61、B61-10、B61-02、Hy03及びHy52。BCMA CAR T細胞は、CD3+T細胞のネガティブ選択によってT細胞（CD4+及びCD8+リンパ球）が得られた健康なアフレーシスされたドナーからの血液から出発して生成された。これらの細胞は、T細胞培地（RPMI 1640、10%熱不活化ウシ胎児血清（FCS）、2mM L-グルタミン、1xペニシリン／ストレプトマイシン、100 µM非必須アミノ酸、1mMピルビン酸ナトリウム、10mM HEPES及び55 µM 2-メルカプトエタノール）中、1：3（T細胞対ビーズ）の比率でのCD3／CD28ビーズ（Dynabeads（登録商標）Human T-Expander CD3／CD28、Thermo Fisher Scientific）の添加によって活性化された。T細胞は、37℃、5%CO₂で、24ウェル

40

50

プレートの1ウェルあたり1mLの培地中、 0.5×10^6 個のT細胞で培養した。24時間後、T細胞がプラスティングしているとき、T細胞に感染多重度(MOI)5でBCMA CARウイルスを形質導入した。T細胞は対数増殖パターンで分裂し始め、これを1mLあたりの細胞数を測定することによってモニターし、T細胞を2日ごとに新鮮な培地で希釈し、ビーズを取り除き、9日目に更なる分析のために回収した。T細胞のアリコート染色して、FACS Fortessa (BD)で5日目及び9日目にフローサイトメトリーによってCAR発現を測定した。全てのBCMA CAR T細胞は、研究グレード(即ち臨床グレードでない)の製造条件下で産生された。

【0719】

BCMA-CAR表面発現及びその安定性は、rBCMA_Fc-AF647染色細胞のフローサイトメトリー分析を使用して5日目及び9日目にCAR%及びMFI(平均蛍光強度)を測定することによって評価された(図2及び表17)。9日目の最終産物におけるBCMA CARの発現は、構築物ごとに異なり、18%から42.4%の範囲であり、MFIは、672~5238の範囲である。PALLAS由来のクローンR1F2、R1B6及びR1G5並びにハイブリドーマクローンHy03からの構築物は、5日目から9日目まで約30%~50%のCARの損失を示す一方、PI61、B61-10及び-02並びにHy52は、CAR発現のパーセンテージに関して比較的安定しているが、全てのCAR構築物は5日目から9日目までMFIの減少を示し、これは、恐らく、9日目の休止段階でのT細胞のサイズがより小さかったためである。CAR T細胞培養物の細胞数は、非形質導入T細胞(「UTD」)と比較した場合、細胞が正常に増殖する能力に対するBCMA CARを担持するヒトscFvの検出可能な負の効果がないことを示した。

【0720】

【表53】

表 17. CAR 発現の分析

CAR 構築物	力価	T細胞のCAR%		T細胞上のCAR MFI	
		5 日目	9 日目	5 日目	9 日目
R1B6	2.68E+08	40.0	27.4	24,420	2,367
R1F2	3.60E+08	48.8	22.7	4,716	672
R1G5	2.27E+08	52.0	30.7	29,113	5,238
PI61	1.71E+08	47.4	42.3	24,360	2,099
B61-10	7.06E+07	41.1	30.3	27,298	3,288
B61-02	8.16E+07	33.5	23.6	29,113	3,471
Hy03	4.96E+07	33.7	18.1	9,463	929
Hy52	7.03E+07	35.1	36.1	33,694	2,859

【0721】

BCMA CARリダイレクトT細胞の機能性の評価

BCMA CAR-T細胞の機能的能力を評価するために、BCMA陽性及び陰性の癌株との共培養を設定した。CAR-T細胞を解凍し、計数し、標的細胞と共培養して、それらの死滅能力及びサイトカインの分泌を読み取った。BCMA CARクローンR1B6、R1F2、R1G5、B61-02、B61-10、PI61、Hy03及びHy52が試験された。非形質導入T細胞(UTD)は、非標的化T細胞対照として使用した。

【0722】

CART細胞の死滅は、CART細胞をKMS11-Luc及びNALM6-Luc標的細胞と、異なるE:T比で20時間共培養することによって実施された。CAR T細胞集団は、プレティング前にCAR陽性細胞の同等のパーセンテージに正規化された。サイトカインIFN γ は、Meso Scale Discovery (MSD; Gaithersburg, MD)を使用して、エフェクター対標的比2.5:1での、標的細胞とCAR-T細胞の20時間の共培養物からの上清で測定され、各サイトカインについて

の結果は、既知の基準を使用して pg/ml で計算された。全てのアッセイは、ドナー細胞の単一の供給源から繰り返して実施された。死滅データは、全ての BCMA CAR クローンが KMS11 癌細胞を効果的に死滅させることを示している（図 3 A）。対照標的細胞 NALM6 は、これらの BCMA 特異的 CAR のいずれによっても死滅されなかった（図 3 B）。KMS11 と培養された場合に IFN- γ を産生するこれらの CAR の能力も試験した（図 3 C）。BCMA CAR R1F2、R1G5 及び PI61 により、IFN- γ が最も多く産生された。対照 NALM6 細胞への曝露後に BCMA CART によって産生されたサイトカインのレベルは、低く（図 3 C）、これは、BCMA CAR による非特異的な活性化がないことを示している。

【0723】

10

結論

新しい BCMA 結合 scFv は、CAR T 細胞との関連で試験した。8 つの CAR が JNL レポーターアッセイ及び初代 T 細胞でアッセイされた：R1B6、R1F2、R1G5、B61-02、B61-10、PI61、Hy03 及び Hy52。8 つの CAR-T 細胞全てが標的的特異的な死滅を示した。R1F2、R1G5 又は PI61 を発現する T 細胞は、標的細胞の存在下で最高量の IFN- γ を産生した。全体として、初代 T 細胞への BCMA CAR の導入は、抗 BCMA CAR 反応性を誘導したが、オフターゲットの機能を誘導しなかった。

【0724】

20

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。

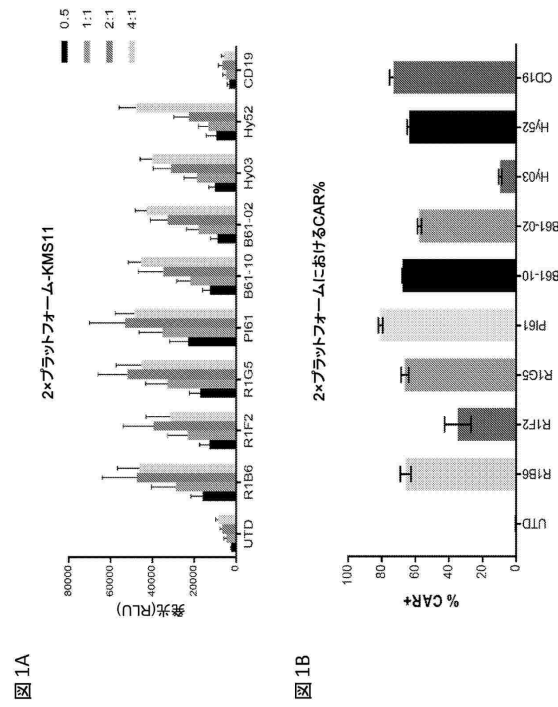
30

40

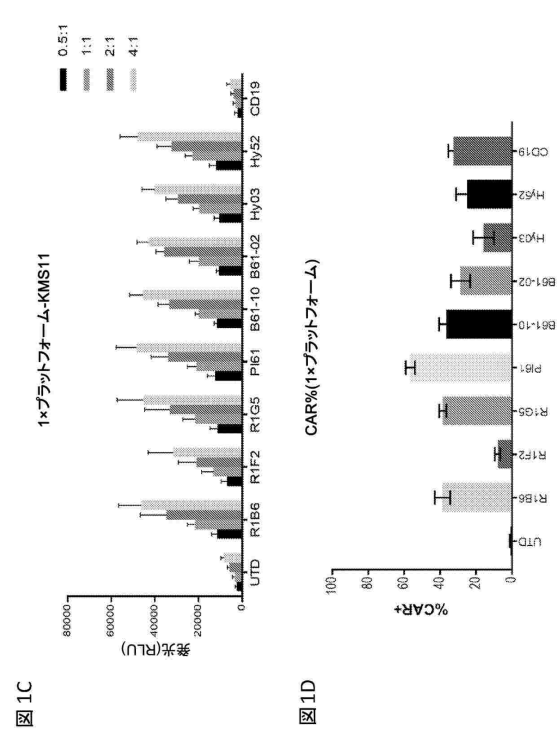
50

【図面】

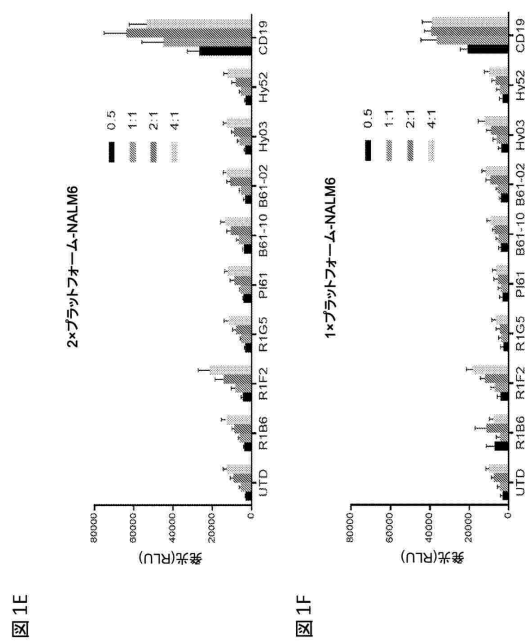
【図 1 - 1】



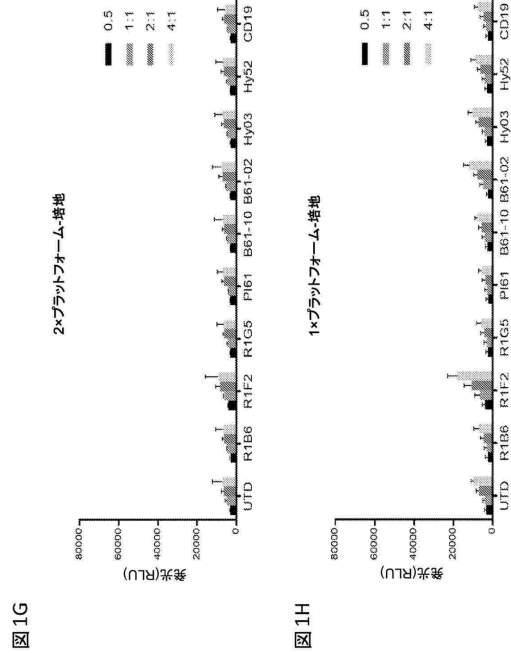
【図 1 - 2】



【図 1 - 3】



【図 1 - 4】



10

20

30

40

50

【図 2】

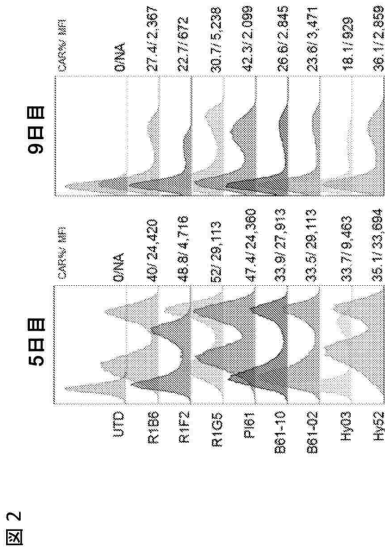


図 2

【図 3 - 1】

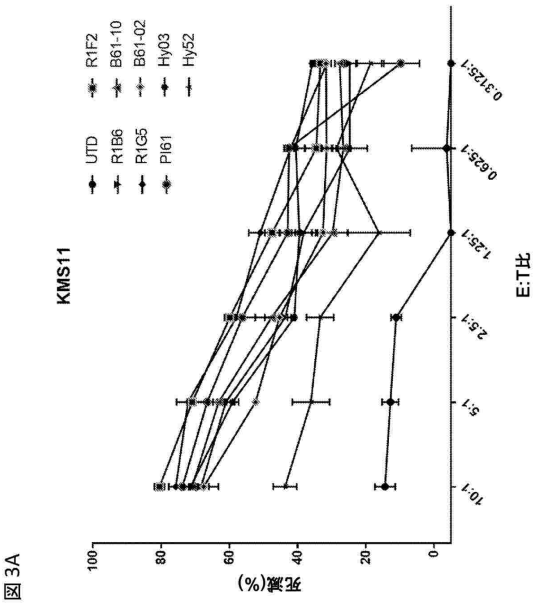


図 3A

【図 3 - 2】

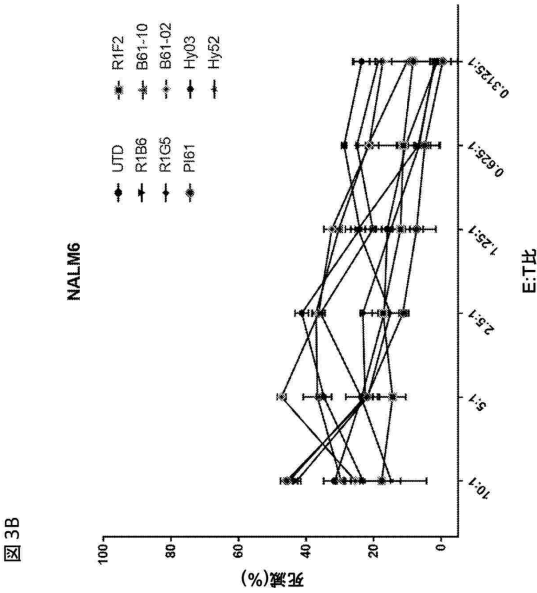


図 3B

【図 3 - 3】

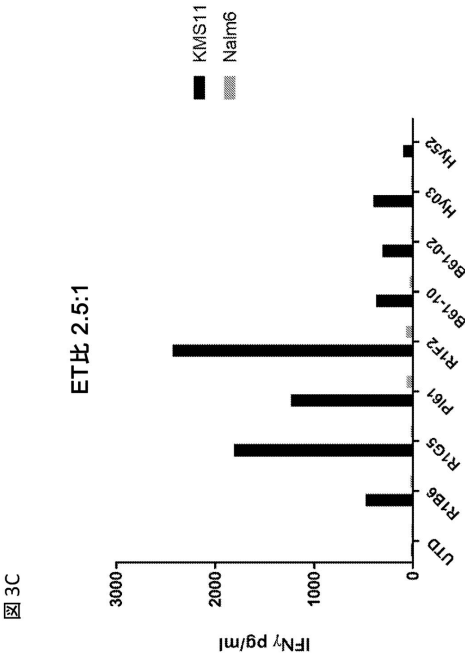


図 3C

10

20

30

40

50

【配列表】
0007438988000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	15/867 (2006.01)	C 1 2 N	15/867	Z
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 K	38/20 (2006.01)	A 6 1 K	38/20	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	
C 1 2 N	5/0783(2010.01)	C 1 2 N	5/0783	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28	
C 0 7 K	14/54 (2006.01)	C 0 7 K	14/54	

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

早期審査対象出願

・アベニュー 2 5 0 番

(72)発明者 ルウ・ホアン

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 2 5 0 番

(72)発明者 コニー・ホン

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 2 5 0 番

(72)発明者 ジョン・ブランケンシップ

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 2 5 0 番

(72)発明者 ブライアン・ホルムバーグ

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 2 5 0 番

(72)発明者 ジャン・チョンホイ

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 2 5 0 番

(72)発明者 デシウ・ブー

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 2 5 0 番

審査官 斉藤 貴子

(56)参考文献

特表 2 0 1 7 - 5 2 7 2 7 1 (J P, A)

特表 2 0 1 7 - 5 3 7 9 2 5 (J P, A)

特表 2 0 1 8 - 5 1 2 1 5 3 (J P, A)

特表 2 0 1 5 - 5 1 3 9 2 0 (J P, A)

特表 2 0 1 7 - 5 3 8 7 1 0 (J P, A)

国際公開第 2 0 1 7 / 1 3 0 2 2 3 (W O, A 2)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N

C 0 7 K

A 6 1 K

A 6 1 P

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

U n i P r o t / G e n e S e q