

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-527409

(P2021-527409A)

(43) 公表日 令和3年10月14日(2021. 10. 14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z	4 B 0 6 5
C O 7 K 16/30 (2006.01)	C O 7 K 16/30 Z N A	4 C O 8 7
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	4 H O 4 5
C O 7 K 14/705 (2006.01)	C O 7 K 14/705	
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 91 頁) 最終頁に続く		

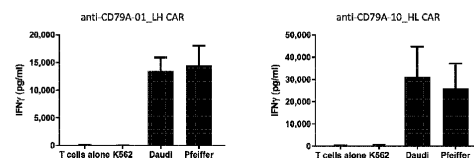
(21) 出願番号	特願2020-569179 (P2020-569179)	(71) 出願人	513167522
(86) (22) 出願日	令和1年6月14日 (2019. 6. 14)		ブルーバード バイオ, インコーポレイ
(85) 翻訳文提出日	令和3年2月4日 (2021. 2. 4)		テッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2019/037270		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
(87) 国際公開番号	W02019/241685		1 4 2, ケンブリッジ, ビニー スト
(87) 国際公開日	令和1年12月19日 (2019. 12. 19)		リート 60
(31) 優先権主張番号	62/685, 078	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成30年6月14日 (2018. 6. 14)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		(74) 代理人	100181674
			弁理士 飯田 貴敏
		(74) 代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 CD79Aキメラ抗原受容体

(57) 【要約】

本発明は、CD79Aを発現する癌の養子細胞療法のための改良された組成物を提供する。種々の実施形態では、a) ヒトCD79Aポリペプチドの1つもしくは複数のエピトープを結合させる抗CD79A抗体もしくはその抗原結合断片であって、配列番号1～配列番号3、配列番号9～配列番号11、もしくは配列番号17～配列番号19に記載されたCDRL1配列～CDRL3配列を備えた可変軽鎖配列、及び／もしくは配列番号4～配列番号6、配列番号12～配列番号14、もしくは配列番号20～配列番号22に記載されたCDRH1配列～CDRH3配列を備えた可変重鎖配列を含む、抗CD79A抗体もしくはその抗原結合断片を備えた細胞外ドメイン、b) 膜貫通ドメイン、c) 1つもしくは複数の細胞内共刺激シグナル伝達ドメイン、ならびに／またはd) 一次シグナル伝達ドメインを含む、キメラ抗原受容体(CAR)が提供されている。

FIGURE 1C



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) ヒト C D 7 9 A ポリペプチドの 1 つまたは複数のエピトープを結合させる抗 C D 7 9 A 抗体またはその抗原結合断片であって、前記抗 C D 7 9 A 抗体またはその抗原結合断片が、配列番号 1 ～配列番号 3、配列番号 9 ～配列番号 1 1、または配列番号 1 7 ～配列番号 1 9 に記載された C D R L 1 配列～C D R L 3 配列を備えた可変軽鎖配列と、配列番号 4 ～配列番号 6、配列番号 1 2 ～配列番号 1 4、または配列番号 2 0 ～配列番号 2 2 に記載された C D R H 1 配列～C D R H 3 配列を備えた可変重鎖配列とを含む、抗 C D 7 9 A 抗体またはその抗原結合断片を備えた細胞外ドメインと、

b) 膜貫通ドメインと、

c) 1 つまたは複数の細胞内共刺激シグナル伝達ドメインと、

d) 一次シグナル伝達ドメインと、

を含む、キメラ抗原受容体 (C A R) 。

10

【請求項 2】

前記ヒト C D 7 9 A ポリペプチドを結合させる前記抗 C D 7 9 A 抗体または抗原結合断片が、F a b ' 断片、F (a b ')₂ 断片、二重特異性 F a b 二量体 (F a b 2)、三重特異性 F a b 三量体 (F a b 3)、F v、一本鎖 F v タンパク質 (「s c F v」)、ビス s c F v (bis-scFv)、(s c F v)₂、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ジスルフィド安定化 F v タンパク質 (「d s F v」)、及び単一ドメイン抗体 (s d A b、ナノボディ) からなる群から選択される、請求項 1 に記載の C A R。

20

【請求項 3】

前記ヒト C D 7 9 A ポリペプチドを結合させる前記抗 C D 7 9 A または抗原結合断片が s c F v である、請求項 1 または請求項 2 に記載の C A R。

【請求項 4】

前記抗 C D 7 9 A 抗体またはその抗原結合断片が、配列番号 1 ～配列番号 3 のいずれか 1 つに記載された 1 つもしくは複数の軽鎖 C D R、及び／または配列番号 4 ～配列番号 6 のいずれか 1 つに記載された 1 つもしくは複数の重鎖 C D R を含む、請求項 1 から請求項 3 のいずれか 1 項に記載の C A R。

【請求項 5】

前記抗 C D 7 9 A 抗体またはその抗原結合断片が、配列番号 9 ～配列番号 1 1 のいずれか 1 つに記載された 1 つもしくは複数の軽鎖 C D R、及び／または配列番号 1 2 ～配列番号 1 4 のいずれか 1 つに記載された 1 つもしくは複数の重鎖 C D R を含む、請求項 1 から請求項 3 のいずれか 1 項に記載の C A R。

30

【請求項 6】

前記抗 C D 7 9 A 抗体またはその抗原結合断片が、配列番号 1 7 ～配列番号 1 9 のいずれか 1 つに記載された 1 つもしくは複数の軽鎖 C D R、及び／または配列番号 2 0 ～配列番号 2 2 のいずれか 1 つに記載された 1 つもしくは複数の重鎖 C D R を含む、請求項 1 から請求項 3 のいずれか 1 項に記載の C A R。

【請求項 7】

前記抗 C D 7 9 A 抗体またはその抗原結合断片が、配列番号 7、配列番号 1 5、もしくは配列番号 2 3 のいずれか 1 つに記載された可変軽鎖配列、及び／または配列番号 8、配列番号 1 6、もしくは配列番号 2 4 のいずれか 1 つに記載された可変重鎖配列を含む、請求項 1 から請求項 5 のいずれか 1 項に記載の C A R。

40

【請求項 8】

前記抗 C D 7 9 A 抗体またはその抗原結合断片が、配列番号 7 に記載された可変軽鎖配列、及び／または配列番号 8 に記載された可変重鎖配列を含む、請求項 1 から請求項 7 のいずれか 1 項に記載の C A R。

【請求項 9】

前記抗 C D 7 9 A 抗体またはその抗原結合断片が、配列番号 1 5 に記載された可変軽鎖配列、及び／または配列番号 1 6 に記載された可変重鎖配列を含む、請求項 1 から請求項

50

7のいずれか1項に記載のCAR。

【請求項10】

前記抗CD79A抗体またはその抗原結合断片が、配列番号23に記載された可変軽鎖配列、及び／または配列番号24に記載された可変重鎖配列を含む、請求項1から請求項7のいずれか1項に記載のCAR。

【請求項11】

前記膜貫通ドメインが、T細胞受容体のアルファ鎖またはベータ鎖、CD δ 、CD3 ϵ 、CD γ 、CD3 ζ 、CD4、CD5、CD8 α 、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD152、CD154、及びPD1からなる群から選択されるポリペプチドから単離されている、請求項1から請求項10のいずれか1項に記載のCAR。

10

【請求項12】

前記膜貫通ドメインが、CD8 α 、CD28、CD4、CD45、PD1、及びCD152からなる群から選択されるポリペプチドから単離されている、請求項1から請求項11のいずれか1項に記載のCAR。

【請求項13】

前記膜貫通ドメインがCD8 α から単離されている、請求項1から請求項12のいずれか1項に記載のCAR。

【請求項14】

前記1つまたは複数の共刺激シグナル伝達ドメインが、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54(ICAM)、CD83、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、CD278(ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C、SLP76、TRIM、及びZAP70からなる群から選択される共刺激分子から単離されている、請求項1から請求項13のいずれか1項に記載のCAR。

20

【請求項15】

前記1つまたは複数の共刺激シグナル伝達ドメインが、CD28、CD134、及びCD137からなる群から選択される共刺激分子から単離されている、請求項1から請求項14のいずれか1項に記載のCAR。

30

【請求項16】

前記1つまたは複数の共刺激シグナル伝達ドメインが、CD137から単離されている、請求項1から請求項15のいずれか1項に記載のCAR。

【請求項17】

前記一次シグナル伝達ドメインが、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD22、CD79A、CD79B、及びCD66dからなる群から選択されるポリペプチドから単離されている、請求項1から請求項16のいずれか1項に記載のCAR。

【請求項18】

前記一次シグナル伝達ドメインがCD3 ζ から単離されている、請求項1から請求項17のいずれか1項に記載のCAR。

40

【請求項19】

ヒンジ領域ポリペプチドをさらに含む、請求項1から請求項18のいずれか1項に記載のCAR。

【請求項20】

前記ヒンジ領域ポリペプチドがCD8 α のヒンジ領域を含む、請求項19に記載のCAR。

【請求項21】

スペーサー領域をさらに含む、請求項1から請求項20のいずれか1項に記載のCAR。

50

【請求項 22】

シグナルペプチドをさらに含む、請求項 1 から請求項 21 のいずれか 1 項に記載の C A R。

【請求項 23】

前記シグナルペプチドが、I g G 1 重鎖シグナルポリペプチド、C D 8 α シグナルポリペプチド、またはヒト G M - C S F 受容体アルファシグナルポリペプチドを含む、請求項 22 に記載の C A R。

【請求項 24】

配列番号 25 ～ 配列番号 30 のいずれか 1 つに記載されたアミノ酸配列を含む、請求項 1 から請求項 23 のいずれか 1 項に記載の C A R。

10

【請求項 25】

配列番号 25 に記載されたアミノ酸配列を含む、請求項 1 から請求項 24 のいずれか 1 項に記載の C A R。

【請求項 26】

配列番号 26 に記載されたアミノ酸配列を含む、請求項 1 から請求項 24 のいずれか 1 項に記載の C A R。

【請求項 27】

配列番号 27 に記載されたアミノ酸配列を含む、請求項 1 から請求項 24 のいずれか 1 項に記載の C A R。

【請求項 28】

20

配列番号 28 に記載されたアミノ酸配列を含む、請求項 1 から請求項 24 のいずれか 1 項に記載の C A R。

【請求項 29】

配列番号 29 に記載されたアミノ酸配列を含む、請求項 1 から請求項 24 のいずれか 1 項に記載の C A R。

【請求項 30】

配列番号 30 に記載されたアミノ酸配列を含む、請求項 1 から請求項 24 のいずれか 1 項に記載の C A R。

【請求項 31】

請求項 1 から請求項 30 のいずれか 1 項に記載の C A R のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

30

【請求項 32】

請求項 1 から請求項 31 のいずれか 1 項に記載の C A R をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 33】

配列番号 31 ～ 配列番号 36 のいずれか 1 つに記載の配列を含むポリヌクレオチド。

【請求項 34】

請求項 32 または請求項 33 のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 35】

前記ベクターが発現ベクターである、請求項 34 に記載のベクター。

40

【請求項 36】

前記ベクターがエピソームベクターである、請求項 34 または請求項 35 に記載のベクター。

【請求項 37】

前記ベクターがウイルสบекターである、請求項 34 から請求項 36 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 38】

前記ベクターがレトロウイルสบекターである、請求項 34 から請求項 37 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 39】

50

前記ベクターがレンチウイルスベクターである、請求項 34 から請求項 38 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 40】

前記ベクターが、ヒト免疫不全ウイルス 1 (H I V - 1)、ヒト免疫不全ウイルス 2 (H I V - 2)、ビスナ・マエディウイルス (V M V)、ヤギ関節炎脳炎ウイルス (C A E V)、ウマ伝染性貧血ウイルス (E I A V)、ネコ免疫不全ウイルス (F I V)、ウシ免疫不全ウイルス (B I V)、及びサル免疫不全ウイルス (S I V) から本質的になる群から選択されるレンチウイルスベクターである、請求項 34 から請求項 39 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 41】

10

左 (5') レトロウイルス L T R、プサイ (Ψ) パッケージングシグナル、セントラルポリプリントラクト/DNAフラップ (c P P T / F L A P)、レトロウイルス輸送エレメント、請求項 32 または請求項 33 に記載のポリヌクレオチドに作用可能に連結されているプロモーター、及び右 (3') レトロウイルス L T R を含む、請求項 34 から請求項 39 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 42】

異種ポリアデニル化配列をさらに含む、請求項 34 から請求項 41 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 43】

20

B 型肝炎ウイルス転写後調節エレメント (H P R E) またはウッドチャック転写後調節エレメント (W P R E) をさらに含む、請求項 34 から請求項 41 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 44】

前記 5' L T R のプロモーターが異種プロモーターと置換されている、請求項 41 から請求項 43 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 45】

前記異種プロモーターが、サイトメガロウイルス (C M V) プロモーター、ラウス肉腫ウイルス (R S V) プロモーター、またはシミアンウイルス 40 (S V 40) プロモーターである、請求項 44 に記載のベクター。

【請求項 46】

30

前記 5' L T R または 3' L T R がレンチウイルス L T R である、請求項 41 から請求項 45 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 47】

前記 3' L T R が 1 つまたは複数の修飾を含む、請求項 41 から請求項 46 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 48】

前記 3' L T R が 1 つまたは複数の欠失を含む、請求項 41 から請求項 47 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 49】

40

前記 3' L T R が自己不活型 (S I N) L T R である、請求項 41 から請求項 48 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 50】

請求項 32 または請求項 33 に記載のポリヌクレオチドに作用可能に連結されているプロモーターが、サイトメガロウイルス最初期遺伝子プロモーター (C M V)、伸長因子 1 アルファプロモーター (E F 1 - α)、ホスホグリセリン酸キナーゼ 1 プロモーター (P G K)、ユビキチン C プロモーター (U B Q - C)、サイトメガロウイルスエンハンサー/ニワトリベータアクチンプロモーター (C A G)、ポリオーマエンハンサー/単純ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター (M C 1)、ベータアクチンプロモーター (β - A C T)、シミアンウイルス 40 プロモーター (S V 40)、及び負の制御領域が欠失した骨髓増殖性肉腫ウイルスエンハンサーの d l 5 8 7 r e v プライマー結合部位置換 (M N D

50

）U3プロモーターからなる群から選択される、請求項41から請求項49のいずれか1項に記載のベクター。

【請求項51】

請求項34から請求項50のいずれか1項に記載のベクターを含む、免疫エフェクター細胞。

【請求項52】

前記免疫エフェクター細胞が、Tリンパ球、ナチュラルキラー（NK）細胞、及びNK T細胞からなる群から選択される、請求項51に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項53】

請求項51または請求項52に記載の免疫エフェクター細胞と、生理学的に許容される賦形剤とを含む、組成物。

10

【請求項54】

請求項1から請求項30のいずれか1項に記載のCARを含む免疫エフェクター細胞群を産生する方法であって、請求項32もしくは請求項33に記載のポリヌクレオチドまたは請求項34から請求項50のいずれか1項に記載のベクターを、免疫エフェクター細胞群に導入することを含む、方法。

【請求項55】

CD3を結合させる抗体及びCD28に結合する抗体と、前記免疫エフェクター細胞とを接触させることにより、前記細胞を刺激し、かつ前記細胞の増殖を誘導し、それにより免疫エフェクター細胞群を増殖させることをさらに含む、請求項54に記載の方法。

20

【請求項56】

前記免疫エフェクター細胞がT細胞、NK細胞、及び／またはNK T細胞を含む、請求項54に記載の方法。

【請求項57】

前記免疫エフェクター細胞がT細胞を含む、請求項56に記載の方法。

【請求項58】

対象においてCD79A発現癌細胞の細胞傷害性を増加させる方法であって、請求項53に記載の組成物を前記対象に投与することにおいて、前記投与前のCD79A発現癌細胞の細胞傷害性と比べて、CD79A発現癌細胞の細胞傷害性を増加させるのに十分な量の前記組成物を投与することを含む、方法。

30

【請求項59】

対象においてCD79A発現癌細胞の数を減少させる方法であって、請求項53に記載の組成物を前記対象に投与することにおいて、前記投与前のCD79A発現癌細胞の数と比べて、CD79A発現癌細胞の数を減少させるのに十分な量の前記組成物を投与することを含む、方法。

【請求項60】

癌の治療が必要な対象における癌の治療方法であって、請求項53に記載の組成物の治療有効量を前記対象に投与することを含む、方法。

【請求項61】

前記癌が液性癌である、請求項60に記載の方法。

40

【請求項62】

前記癌が血液悪性腫瘍である、請求項60または請求項61に記載の方法。

【請求項63】

前記癌が、非ホジキンリンパ腫、急性リンパ性白血病（ALL）、慢性リンパ性白血病（CLL）、ヘアリーセル白血病（HCL）、多発性骨髄腫（MM）、急性骨髄性白血病（AML）、または慢性骨髄性白血病（CML）である、請求項60から請求項62のいずれか1項に記載の方法。

【請求項64】

前記非ホジキンリンパ腫が、バーキットリンパ腫、小リンパ球性リンパ腫（SLL）、びまん性大B細胞リンパ腫（DLBCL）、濾胞性リンパ腫（FL）、マントル細胞リン

50

パ腫（MCL）、または辺縁層リンパ腫（MZL）である、請求項63に記載の方法。

【請求項65】

前記非ホジキンリンパ腫がびまん性大B細胞リンパ腫（DLBCL）である、請求項63に記載の方法。

【請求項66】

前記癌が、急性リンパ性白血病（ALL）、慢性リンパ性白血病（CLL）、ヘアリーセル白血病（HCL）、多発性骨髄腫（MM）、急性骨髄性白血病（AML）、または慢性骨髄性白血病（CML）である、請求項60から請求項62のいずれか1項に記載の方法。

【請求項67】

前記癌が、顕性多発性骨髄腫、くすぶり型多発性骨髄腫、形質細胞白血病、非分泌型骨髄腫、IgD骨髄腫、骨硬化性骨髄腫、孤立性骨形質細胞腫、及び髄外性形質細胞腫からなる群から選択される多発性骨髄腫（MM）である、請求項60から請求項62のいずれか1項に記載の方法。

【請求項68】

対象においてCD79Aを発現する癌に関連する1つまたは複数の症状を改善する方法であって、請求項53に記載の組成物を前記対象に投与することにおいて、CD79A発現癌細胞に関連する少なくとも1つの症状を改善するのに十分な量の前記組成物を投与することを含む、方法。

【請求項69】

前記改善される1つまたは複数の症状が、脱力、疲労、息切れ、易傷性及び易出血性、頻回感染、リンパ節腫大、腹部の膨張または痛み、骨痛または関節痛、骨折、予期しない体重減少、食欲不振、寝汗、持続性微熱、ならびに排尿減少からなる群から選択される、請求項68に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、米国特許法第119条（e）に基づき、2018年6月14日に出願された米国特許仮出願第62/685,078号の利益を主張するものであり、この仮出願はその全体が参照により本明細書に援用される。

【0002】

配列表に関する記述

本出願に関連する配列表は、紙の写しの代わりにテキストフォーマットで提供されており、参照により本明細書に援用される。配列表を含むテキストファイルの名称は、BLBD_100_01WO_ST25.txtである。テキストファイルは、サイズが64kBであり、2019年6月14日に作成され、明細書の提出と同時にEFS-Web経由で電子的に提出されている。

【0003】

本発明は、癌を治療するための改良された組成物及び方法に関する。より詳細には、本発明は、改良された抗CD79Aキメラ抗原受容体（CAR）と、遺伝子改変免疫エフェクター細胞と、CD79Aを発現する癌を効果的に治療するためのこれらの組成物の使用とに関するものである。

【背景技術】

【0004】

癌は、世界の至るところで深刻な健康問題となっている。2008年～2010年に算出した割合に基づけば、今日生まれた男女の中で40.76%の人が、一生のうちのどこかの時点で、癌の何らかの形態を有すると診断されることになる。50歳～69歳の間に癌になる割合は、女性の場合は15.30%であるのに対し、男性の場合は20.37%であると考えられる。米国では、現在生存している人のうち癌を患ったことがある男女の

10

20

30

40

50

数は、2010年1月1日の時点でおおよそ13,027,914人であり、男性6,078,974人、女性6,948,940人であった。2013年には、米国の1,660,290人の男女（男性854,790人、女性805,500人）がいずれかの部位に癌があると診断されており、580,350人の男女が癌で亡くなっていると推定される。Howlader et al. 2013を参照されたい。

【0005】

B細胞の悪性形質転換は癌の原因となっており、癌の例として、以下に限定されないが、リンパ腫、例えば、多発性骨髄腫及び非ホジキンリンパ腫などが挙げられる。非ホジキンリンパ腫（NH L）及び多発性骨髄腫（MM）などのB細胞悪性腫瘍を持つ患者の大多数は、癌の死亡率を大きく増加させている。各種治療形態に対するB細胞悪性腫瘍の応答は様々である。化学療法及び放射線療法を含めたB細胞悪性腫瘍の従来の治療方法は、有害な副作用があるために、限られた効用しか持たない。抗CD19、抗CD20、抗CD22、抗CD23、抗CD52、抗CD80、及び抗HLA-DRといった治療用抗体を用いた免疫療法も、限られた成果しか挙げられていない。その原因として、薬物動態プロファイルが良好ではなく、血清プロテアーゼ及び糸球体濾過による抗体の排除が速く、腫瘍部位への浸潤が十分ではなく、癌細胞における標的抗原の発現レベルも十分ではないことが挙げられる。キメラ抗原受容体（CAR）を発現する遺伝子改変細胞を使用するという試みも、限られた成果しかあげられていない。また、特定のCARで使用される特定の抗原結合ドメインがもたらす治療有効性を予測できない可能性もある。抗原結合ドメインの結合が強すぎる場合、CAR-T細胞は大量のサイトカイン放出を誘導し「サイトカインストーム」とみなされる致死的な免疫反応を引き起こす可能性があり、抗原結合ドメインの結合が弱すぎる場合、CAR-T細胞が癌細胞の除去に十分な治療有効性を示さない場合があるからである。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、養子細胞療法剤を作製するための改良ベクターと、それを用いる方法とを提供するものである。より詳細には、本発明は、抗CD79ACAR分子と、CD79Aを発現する癌の治療、予防、または改善における該分子の使用とを提供する。

【0007】

種々の実施形態では、a) ヒトCD79Aポリペプチドの1つもしくは複数のエピトープを結合させる抗CD79A抗体もしくはその抗原結合断片であって、配列番号1～配列番号3、配列番号9～配列番号11、もしくは配列番号17～配列番号19に記載されたCDRL1配列～CDRL3配列を備えた可変軽鎖配列、及び／もしくは配列番号4～配列番号6、配列番号12～配列番号14、もしくは配列番号20～配列番号22に記載されたCDRH1配列～CDRH3配列を備えた可変重鎖配列を含む、抗CD79A抗体もしくはその抗原結合断片を備えた細胞外ドメイン、b) 膜貫通ドメイン、c) 1つもしくは複数の細胞内共刺激シグナル伝達ドメイン、ならびに／またはd) 一次シグナル伝達ドメインを含む、キメラ抗原受容体（CAR）が提供されている。

【0008】

特定の実施形態では、ヒトCD79Aポリペプチドを結合させる抗CD79A抗体または抗原結合断片は、Fab'断片、F(ab')₂断片、二重特異性Fab二量体（Fab₂）、三重特異性Fab三量体（Fab₃）、Fv、一本鎖Fvタンパク質（「scFv」）、ビスscFv（bis-scFv）、（scFv）₂、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ジスルフィド安定化Fvタンパク質（「dsFv」）、及び単一ドメイン抗体（sdAb、ナノボディ）からなる群から選択される。

【0009】

特定の実施形態では、ヒトCD79Aポリペプチドを結合させる抗CD79A抗体または抗原結合断片はscFvである。

【0010】

特定の実施形態では、抗CD79A抗体またはその抗原結合断片は、配列番号1～配列番号3のいずれか1つに記載された1つもしくは複数の軽鎖CDR、及び／または配列番号4～配列番号6のいずれか1つに記載された1つもしくは複数の重鎖CDRを含む。

【0011】

いくつかの実施形態では、抗CD79A抗体またはその抗原結合断片は、配列番号9～配列番号11のいずれか1つに記載された1つもしくは複数の軽鎖CDR、及び／または配列番号12～配列番号14のいずれか1つに記載された1つもしくは複数の重鎖CDRを含む。

【0012】

いくつかの実施形態では、抗CD79A抗体またはその抗原結合断片は、配列番号17～配列番号19のいずれか1つに記載された1つもしくは複数の軽鎖CDR、及び／または配列番号20～配列番号22のいずれか1つに記載された1つもしくは複数の重鎖CDRを含む。

10

【0013】

いくつかの実施形態では、抗CD79A抗体またはその抗原結合断片は、配列番号7、配列番号15、もしくは配列番号23のいずれか1つに記載された可変軽鎖配列、及び／または配列番号8、配列番号16、もしくは配列番号24のいずれか1つに記載された可変重鎖配列を含む。

【0014】

特定の実施形態では、抗CD79A抗体またはその抗原結合断片は、配列番号7、配列番号15、もしくは配列番号23のいずれか1つに記載されたアミノ酸配列に対して、少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%のアミノ酸同一性を有する可変軽鎖配列、及び／または配列番号8、配列番号16、もしくは配列番号24のいずれか1つに記載されたアミノ酸配列に対して、少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%のアミノ酸同一性を有する可変重鎖配列を含む。

20

【0015】

さらなる実施形態では、抗CD79A抗体またはその抗原結合断片は、配列番号7に記載された可変軽鎖配列、及び／または配列番号8に記載された可変重鎖配列を含む。

30

【0016】

さらなる実施形態では、抗CD79A抗体またはその抗原結合断片は、配列番号15に記載された可変軽鎖配列、及び／または配列番号16に記載された可変重鎖配列を含む。

【0017】

さらなる実施形態では、抗CD79A抗体またはその抗原結合断片は、配列番号23に記載された可変軽鎖配列、及び／または配列番号24に記載された可変重鎖配列を含む。

【0018】

さらなる実施形態では、膜貫通ドメインは、T細胞受容体のアルファ鎖またはベータ鎖、CD8、CD3ε、CDγ、CD3ζ、CD4、CD5、CD8α、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD152、CD154、及びPD1からなる群から選択されるポリペプチド由来である。

40

【0019】

別の実施形態では、膜貫通ドメインは、CD8α、CD28、CD4、CD45、PD1、及びCD152からなる群から選択されるポリペプチド由来である。

【0020】

ある実施形態では、膜貫通ドメインはCD8α由来である。

【0021】

さらなる実施形態では、1つまたは複数の共刺激シグナル伝達ドメインは、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、

50

T L R 1 0、C A R D 1 1、C D 2、C D 7、C D 2 7、C D 2 8、C D 3 0、C D 4 0、C D 5 4 (I C A M)、C D 8 3、C D 1 3 4 (O X 4 0)、C D 1 3 7 (4 - 1 B B)、C D 2 7 8 (I C O S)、D A P 1 0、L A T、N K D 2 C、S L P 7 6、T R I M、及び Z A P 7 0 からなる群から選択される共刺激分子由来である。

【 0 0 2 2 】

特定の実施形態では、1つまたは複数の共刺激シグナル伝達ドメインは、C D 2 8、C D 1 3 4、及び C D 1 3 7 からなる群から選択される共刺激分子由来である。

【 0 0 2 3 】

ある実施形態では、1つまたは複数の共刺激シグナル伝達ドメインは C D 1 3 7 由来である。

10

【 0 0 2 4 】

特定の実施形態では、一次シグナル伝達ドメインは、F c R γ 、F c R β 、C D 3 γ 、C D 3 δ 、C D 3 ϵ 、C D 3 ζ 、C D 2 2、C D 7 9 A、C D 7 9 B、及び C D 6 6 d からなる群から選択されるポリペプチドから単離されている。

【 0 0 2 5 】

特定の実施形態では、一次シグナル伝達ドメインは C D 3 ζ から単離されている。

【 0 0 2 6 】

別の実施形態では、C A R はヒンジ領域ポリペプチドをさらに含む。

【 0 0 2 7 】

ある実施形態では、ヒンジ領域ポリペプチドは、C D 8 α のヒンジ領域を含む。

20

【 0 0 2 8 】

別の実施形態では、C A R はスパーサー領域をさらに含む。

【 0 0 2 9 】

さらなる実施形態では、C A R はシグナルペプチドをさらに含む。

【 0 0 3 0 】

特定の実施形態では、シグナルペプチドは、I g G 1 重鎖シグナルポリペプチド、C D 8 α シグナルポリペプチド、またはヒト G M - C S F 受容体アルファシグナルポリペプチドを含む。

【 0 0 3 1 】

特定の実施形態では、C A R は、配列番号 2 5 ~ 配列番号 3 0 のうちのいずれか 1 つに記載されたアミノ酸配列を含む。

30

【 0 0 3 2 】

特定の実施形態では、C A R は、配列番号 2 5 に記載されたアミノ酸配列を含む。

【 0 0 3 3 】

特定の実施形態では、C A R は、配列番号 2 6 に記載されたアミノ酸配列を含む。

【 0 0 3 4 】

特定の実施形態では、C A R は、配列番号 2 7 に記載されたアミノ酸配列を含む。

【 0 0 3 5 】

特定の実施形態では、C A R は、配列番号 2 8 に記載されたアミノ酸配列を含む。

【 0 0 3 6 】

特定の実施形態では、C A R は、配列番号 2 9 に記載されたアミノ酸配列を含む。

40

【 0 0 3 7 】

特定の実施形態では、C A R は、配列番号 3 0 に記載されたアミノ酸配列を含む。

【 0 0 3 8 】

種々の実施形態において、本明細書で考察されている C A R のアミノ酸配列を含むポリペプチドが提供されている。

【 0 0 3 9 】

種々の実施形態において、本明細書で考察されている C A R をコードするポリヌクレオチドが提供されている。

【 0 0 4 0 】

50

特定の実施形態では、本明細書で考察されているCARをコードするポリヌクレオチドは、配列番号31～配列番号36のうちのいずれか1つに記載された配列を含む。

【0041】

種々の実施形態において、本明細書で考察されているCARをコードするポリヌクレオチドを含むベクターが提供されている。

【0042】

特定の実施形態では、ベクターは発現ベクターである。

【0043】

特定の実施形態では、ベクターはエピソームベクターである。

【0044】

さらなる実施形態では、ベクターはウイルスベクターである。

【0045】

さらなる実施形態では、ベクターはレトロウイルスベクターである。

【0046】

特定の実施形態では、ベクターはレンチウイルスベクターである。

【0047】

さらなる実施形態では、レンチウイルスベクターは、ヒト免疫不全ウイルス1 (HIV-1)、ヒト免疫不全ウイルス2 (HIV-2)、ビスナ・マエディウイルス (VMV)、ヤギ関節炎脳炎ウイルス (CAEV)、ウマ伝染性貧血ウイルス (EIAV)、ネコ免疫不全ウイルス (FIV)、ウシ免疫不全ウイルス (BIV)、及びサル免疫不全ウイルス (SIV) から本質的になる群から選択される。

【0048】

特定の実施形態では、ベクターは、左 (5') レトロウイルスLTR、プサイ (Ψ) パッケージングシグナル、セントラルポリプリントラクト/DNAフラップ (cPPT/FLAP)、レトロウイルス輸送エレメント、前述のポリヌクレオチドに作用可能に連結されているプロモーター、及び右 (3') レトロウイルスLTRを含む。

【0049】

さらなる実施形態では、ベクターは異種ポリアデニル化配列をさらに含む。

【0050】

特定の実施形態では、ベクターは、B型肝炎ウイルス転写後調節エレメント (HPRE) またはウッドチャック転写後調節エレメント (WPRE) をさらに含む。

【0051】

さらなる実施形態では、5' LTRのプロモーターが異種プロモーターと置換されている。

【0052】

さらなる実施形態では、異種プロモーターは、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、ラウス肉腫ウイルス (RSV) プロモーター、またはシミアンウイルス40 (SV40) プロモーターである。

【0053】

ある実施形態では、5' LTRまたは3' LTRは、レンチウイルスLTRである。

【0054】

特定の実施形態では、3' LTRは1つまたは複数の修飾を含む。

【0055】

特定の実施形態では、3' LTRは1つまたは複数の欠失を含む。

【0056】

特定の実施形態では、3' LTRは自己不活型 (SIN) LTRである。

【0057】

特定の実施形態では、ポリアデニル化配列は、ウシ成長ホルモンポリアデニル化またはシグナルウサギβグロビンポリアデニル化配列である。

【0058】

10

20

30

40

50

さらなる実施形態では、ポリヌクレオチドは最適化されたコザック配列を含む。

【0059】

さらなる実施形態では、該ポリヌクレオチドに作用可能に連結されたプロモーターは、サイトメガロウイルス最初期遺伝子プロモーター（CMV）、伸長因子1アルファプロモーター（EF1- α ）、ホスホグリセリン酸キナーゼ1プロモーター（PGK）、ユビキチンCプロモーター（UBQ-C）、サイトメガロウイルスエンハンサー／ニワトリベータアクチンプロモーター（CAG）、ポリオーマエンハンサー／単純ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター（MC1）、ベータアクチンプロモーター（ β -ACT）、シミアンウイルス40プロモーター（SV40）、及び負の制御領域が欠失した骨髄増殖性肉腫ウイルスエンハンサーのd1587revプライマー結合部位置換（MND）プロモーターからなる群から選択される。

10

【0060】

種々の実施形態において、本明細書で考察されているCARをコードするベクターを含む免疫エフェクター細胞が提供されている。

【0061】

特定の実施形態では、免疫エフェクター細胞は、Tリンパ球、ナチュラルキラー（NK）細胞、及びNK T細胞からなる群から選択される。

【0062】

ある実施形態では、免疫エフェクター細胞は、本明細書で考察されているベクターで形質導入されており、PI3K経路の阻害剤の存在下で活性化かつ刺激される。これにより、PI3K経路の阻害剤の不在下で活性化かつ刺激された形質導入免疫エフェクター細胞の増殖と比べて、形質導入免疫エフェクター細胞の増殖が保持されることになる。

20

【0063】

特定の実施形態では、PI3K経路の阻害剤の存在下で活性化かつ刺激された免疫エフェクター細胞は、i) CD62L、CD127、CD197、及びCD38からなる群から選択される1つもしくは複数のマーカーの発現、または、ii) CD62L、CD127、CD197、及びCD38の全マーカーの発現を、PI3K経路の阻害剤の不在下で活性化かつ刺激された免疫エフェクター細胞と比べて増加させている。

【0064】

特定の実施形態では、PI3K経路の阻害剤の存在下で活性化かつ刺激された免疫エフェクター細胞は、i) CD62L、CD127、CD27、及びCD8からなる群から選択される1つもしくは複数のマーカーの発現、または、ii) CD62L、CD127、CD27、及びCD8の全マーカーの発現を、PI3K経路の阻害剤の不在下で活性化かつ刺激された免疫エフェクター細胞と比べて増加させている。

30

【0065】

一実施形態では、PI3K阻害剤はZSTK474である。

【0066】

種々の実施形態では、本明細書で考察されている免疫エフェクター細胞と、生理学的に許容される賦形剤とを含む組成物が提供されている。

【0067】

種々の実施形態では、本明細書で考察されているCARを含む免疫エフェクター細胞群を作製する方法であって、本明細書で考察されているCARをコードするベクターを、免疫エフェクター細胞群に導入することを含む方法が、提供されている。

40

【0068】

特定の実施形態では、方法は、CD3を結合させる抗体及びCD28に結合する抗体と免疫エフェクター細胞とを接触させることにより、該細胞を刺激し、かつ該細胞の増殖を誘導し、それにより免疫エフェクター細胞群を増殖させることをさらに含む。

【0069】

特定の実施形態では、免疫エフェクター細胞は、ベクターを導入する前に刺激され、かつ増殖を誘導される。

50

【0070】

さらなる実施形態では、免疫エフェクター細胞群はT細胞を含む。

【0071】

ある実施形態では、免疫エフェクター細胞群はNK細胞を含む。

【0072】

特定の実施形態では、細胞は、PI3K経路の阻害剤の存在下で活性化かつ刺激されており、これにより、PI3K経路の阻害剤の不在下で活性化かつ刺激された免疫エフェクター細胞の増殖と比べて、形質導入免疫エフェクター細胞の増殖が保持されることになる。

【0073】

ある実施形態では、PI3K経路の阻害剤の存在下で活性化かつ刺激された免疫エフェクター細胞は、i) CD62L、CD127、CD197、及びCD38からなる群から選択される1つもしくは複数のマーカーの発現、または、ii) CD62L、CD127、CD197、及びCD38の全マーカーの発現を、PI3K経路の阻害剤の不在下で活性化かつ刺激された免疫エフェクター細胞と比べて増加させている。

【0074】

特定の実施形態では、PI3K経路の阻害剤の存在下で活性化かつ刺激された免疫エフェクター細胞は、i) CD62L、CD127、CD27、及びCD8からなる群から選択される1つまたは複数のマーカーの発現、または、ii) CD62L、CD127、CD27、及びCD8の全マーカーの発現を、PI3K経路の阻害剤の不在下で活性化かつ刺激された免疫エフェクター細胞と比べて増加させている。

【0075】

一実施形態では、PI3K阻害剤はZSTK474である。

【0076】

種々の実施形態では、対象においてCD79Aを発現する癌細胞の細胞傷害性を増加させる方法が提供されており、該方法は、本明細書で考察されている組成物を該対象に投与することであって、投与前のCD79A発現癌細胞の細胞傷害性と比べて、CD79A発現癌細胞の細胞傷害性を増加させるのに十分な量の該組成物を投与すること、を含む。

【0077】

種々の実施形態では、対象においてCD79A発現癌細胞の数を減少させる方法が提供されており、該方法は、本明細書で考察されている組成物を該対象に投与することであって、投与前のCD79A発現癌細胞の数と比べてCD79A発現癌細胞の数を減少させるのに十分な量の該組成物を投与すること、を含む。

【0078】

種々の実施形態では、癌の治療が必要な対象における癌の治療方法であって、本明細書で考察されている組成物の治療有効量を該対象に投与することを含む方法が提供されている。

【0079】

特定の実施形態では、癌は液性癌である。

【0080】

ある実施形態では、癌は血液悪性腫瘍である。

【0081】

さらなる実施形態では、癌は、肺癌、乳癌、膵癌、卵巣癌、前立腺癌、副腎癌、黒色腫、子宮癌、精巣癌、もしくは膀胱癌、非ホジキンリンパ腫、急性リンパ性白血病(ALL)、慢性リンパ性白血病(CLL)、ヘアリーセル白血病(HCL)、多発性骨髄腫(MM)、急性骨髄性白血病(AML)、または慢性骨髄性白血病(CML)である。

【0082】

特定の実施形態では、非ホジキンリンパ腫は、小リンパ球性リンパ腫(SLL)、びまん性大B細胞リンパ腫(DLBCL)、濾胞性リンパ腫(FL)、マントル細胞リンパ腫(MCL)、または辺縁層リンパ腫(MZL)である。

【0083】

特定の実施形態では、癌は、急性リンパ性白血病（ALL）、慢性リンパ性白血病（CLL）、ヘアリーセル白血病（HCL）、多発性骨髄腫（MM）、急性骨髄性白血病（AML）、または慢性骨髄性白血病（CML）である。

【0084】

特定の実施形態では、癌はびまん性大B細胞リンパ腫（DLBCL）である。

【0085】

特定の実施形態では、癌は、顕性多発性骨髄腫、くすぶり型多発性骨髄腫、形質細胞白血病、非分泌型骨髄腫、IgD骨髄腫、骨硬化性骨髄腫、孤立性骨形質細胞腫、及び髄外性形質細胞腫からなる群から選択される多発性骨髄腫（MM）である。

10

【0086】

種々の実施形態では、対象においてCD79Aを発現する癌に関連する1つまたは複数の症状を改善する方法が提供されており、該方法は、本明細書で考察されている組成物を該対象に投与することであって、CD79A発現癌細胞に関連する少なくとも1つの症状を改善するのに十分な量の該組成物を投与することを含む。

【0087】

特定の実施形態では、改善される1つまたは複数の症状は、脱力、疲労、息切れ、易傷性及び易出血性、頻回感染、リンパ節腫大、腹部の膨張または痛み、骨痛または関節痛、骨折、予期しない体重減少、食欲不振、寝汗、持続性微熱、ならびに排尿減少からなる群から選択される。

20

【図面の簡単な説明】

【0088】

【図1A】標的細胞におけるCD79A発現と、CAR発現と、CD79A発現標的細胞の存在下での抗CD79ACAR-T細胞抗原依存性活性とを示す図である。A) Pfeiffer細胞及びDaudi細胞ではCD79Aの発現を示す一方、K562細胞では発現しないことを示すパネルである。B) フローサイトメトリーを用いて測定した、T細胞における代表的な抗CD79ACAR発現を示すパネルである。C) 標的細胞の不在下で共培養したか、またはK562細胞（CD79A-）、Daudi細胞（CD79A+、高発現）、もしくはPfeiffer細胞（CD79A+、低発現）と共に共培養した、抗CD79ACAR-T細胞のIFN γ 分泌を示すパネルである。

30

【図1B】同上。

【図1C】同上。

【図2A】標的細胞におけるCAR発現と、CD79A発現と、CD79A発現標的細胞の存在下での抗CD79ACAR-T細胞抗原依存性活性とを示す図である。A) Daudi細胞、NU-DUL-1細胞、SU-DHL-2細胞、及びPfeiffer細胞のCD79A受容体密度を示すパネルである。B) フローサイトメトリーを用いて測定した、T細胞における代表的な抗CD79ACAR発現を示すパネルである。C) 標的細胞の不在下で共培養したか、またはHu h7細胞（CD79A-）、Hu h7. CD79A細胞（CD79A+）、Daudi細胞（CD79A+）、NU-DUL-1（CD79A+）、SU-DHL-2（CD79A+）、もしくはPfeiffer細胞（CD79A+）と共に共培養した、抗CD79ACAR-T細胞のIFN γ 分泌を示すパネルである。

40

【図2B】同上。

【図2C】同上。

【発明を実施するための形態】

【0089】

配列の簡単な説明

配列番号1～配列番号24は、本明細書で考察されている抗CD79ACARの例示的な軽鎖CDR配列、重鎖CDR配列、可変ドメイン軽鎖、及び可変ドメイン重鎖のアミノ酸配列を示す。

50

配列番号 25～配列番号 30 は、例示的な抗 CD79A CAR のアミノ酸配列を示す。

配列番号 31～配列番号 36 は、例示的な抗 CD79A CAR の核酸配列を示す。

配列番号 37～配列番号 38 は、例示的なヒト CD79A ポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

配列番号 39～配列番号 49 は、種々のリンカーのアミノ酸配列を示す。

配列番号 50～配列番号 74 は、プロテアーゼの切断部位及び自己切断型ポリペプチドの切断部位のアミノ酸配列を示す。

【0090】

A. 概要

本発明は、CD79A を発現する癌を予防もしくは治療するための改良された組成物及び方法、または CD79A 発現癌に関連する少なくとも 1 つの症状を予防、治療、もしくは改善するための改良された組成物及び方法に関する。特定の実施形態では、本発明は、遺伝子改変免疫エフェクター細胞を用いた、CD79A を発現する癌の改良された養子細胞療法に関する。遺伝学的手法は、癌細胞の免疫認識を高めかつ排除を促進させる手段として有望である。将来性のある戦略の一つは、癌細胞に対する細胞傷害性をリダイレクトさせるキメラ抗原受容体 (CAR) を発現するように免疫エフェクター細胞の遺伝子組み換えを行うことである。

【0091】

本明細書で考察されている養子細胞療法の改良された組成物及び方法は、遺伝子改変免疫エフェクター細胞であって、容易に増殖でき、*in vivo* で長時間の持続性を示し、かつ CD79A (B 細胞抗原受容体複合体関連タンパク質アルファ鎖、膜結合型免疫グロブリン関連タンパク質 (MB1、MB-1)、表面 IgM 関連タンパク質、及び IgA (IGA) としても知られる) を発現する細胞に対して抗原依存性細胞傷害性を示す細胞を提供するものである。CD79A をコードするポリヌクレオチド配列の例として、以下に限定されないが、NM__001783.3、NM__021601.3、ENST00000221972 (uc002orv.3)、ENST00000597454 (uc060zdj.1)、ENST00000444740 (uc002oru.4)、Hs.631567、及び AK223371 が挙げられる。CD79A をコードするポリペプチド配列の例として、以下に限定されないが、P11912-1、P11912-2、ENSP00000400605、ENSP00000468922、ENSP00000221972、NP__001774.1、及び NP__067612.1 が挙げられる。

【0092】

CD79 は、2 つのタンパク質である、CD79A と CD79B とからなる。CD79A は染色体 19q13.2 にあり、約 47 kDa の 226 アミノ酸糖タンパク質をコードする。正確な分子量はグリコシル化の程度によって異なる。CD79B は染色体 17q23 にあり、約 37 kDa の 229 アミノ酸糖タンパク質をコードする。CD79A と CD79B は、エキソナーイントロン構造を共に持っており、両方とも Ig スーパーファミリー (SF) の単一 Ig ドメイン (CD79A の場合 111 残基 C 型、CD79B の場合 129 残基 V 型) を含んでいる。またそれぞれ、高度に保存された膜貫通ドメインと、顕著なアミノ酸の進化的保存性を示す 61 アミノ酸の細胞質側末端 (CD79A) または 48 アミノ酸の細胞質側末端 (CD79B) とを含んでいる。CD79A と CD79B は、初期段階の B 細胞前駆体により発現される。CD79A/B ヘテロダイマーは、どちらのタンパク質も前駆体の B 細胞系への関与に必須なものではないが、 μ 重鎖のない状態で初期 B 細胞前駆体の表面に見られるものである。成長の後期で、CD79A と CD79B は、B 細胞の表面で全アイソタイプの Ig と共に、成熟 BCR 複合体として共発現される。CD79 タンパク質は B 系統に特異的であり、B リンパ球新生を通して発現する。CD79A と CD79B とを、B 細胞性新生物、例えば、B 細胞株、B 細胞リンパ腫、及び一部の骨髄腫において、びまん性大 B 細胞リンパ腫 (DLBCL)、大半の前駆体 B 細胞性急性白血病などを特定するマーカーとして使用することができる。

【0093】

種々の実施形態では、抗CD79A抗体配列を含むCARは、極めて有効なものであり、ロバストに *in vivo* 増殖し、CD79A発現癌細胞を認識し、CD79A発現癌細胞に対する細胞傷害性活性を示す。

【0094】

一実施形態では、抗CD79A抗体または抗原結合断片と、膜貫通ドメインと、1つまたは複数の細胞内シグナル伝達ドメインとを含むCARが提供されている。

【0095】

一実施形態では、免疫エフェクター細胞は、CARを発現するように遺伝子改変されている。CARを発現するT細胞を、本明細書ではCAR-T細胞またはCAR改変T細胞と称する。

10

【0096】

種々の実施形態では、遺伝子改変免疫エフェクター細胞を、CD79A発現癌細胞を有する対象、例えば以下に限定されないが、液性腫瘍及び血液系腫瘍を有する対象に投与する。一実施形態では、抗CD79ACAR-T細胞を、DLBCLを有する対象に投与する。

【0097】

組み換え（すなわち改変）DNA、ペプチド、及びオリゴヌクレオチドの合成、イムノアッセイ、組織培養、形質転換（例えば、エレクトロポレーション、リポフェクション）、酵素反応、精製に関する技術、ならびに関連する技術及び手順については、概して、本明細書の全体を通して引用及び議論されている微生物学、分子生物学、生化学、分子遺伝学、細胞生物学、ウイルス学、及び免疫学の様々な一般文献及びより専門的な文献に記載されているように実施することができる。例えば、Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, 2008年7月に改訂)、*Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience, Glover, *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (IRL Press, Oxford Univ. Press USA, 1985)、*Current Protocols in Immunology* (編集: John E. Coligan, Ada

20

M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober 2001 John Wiley & Sons, NY, NY)、*Real-Time PCR: Current Technology and Applications*, Edited by Julie Logan, Kirstin Edwards and Nick Saunders,

30

2009, Caister Academic Press, Norfolk, UK、Anand, *Techniques for the Analysis of Complex Genomes*, (Academic Press, New York, 1992)、Guthrie and Fink, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology* (Academic Press, New York, 1991)、*Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, Ed., 1984)、*Nucleic Acid The Hybridization* (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1985)、*Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984)、*Animal Cell Culture* (R. Freshney, Ed., 1986)、Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984)、*Next-Generation Genome Sequencing* (Janitz, 2008 Wiley-VCH)、*PCR Protocols (Methods in Molecular Biology)* (Park, Ed., 3rd Edition, 2010 Humana Press)、*Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, 1986)、専門書 *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.)、*Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory)、Harlow and Lane, *Antibodies*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998)、*Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987)、*Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-IV (D. M. Weir and CC Blackwell, eds., 1986)、Roitt, *Essenti*

40

50

al Immunology, 6th Edition, (Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988)、Current Protocols in Immunology (Q. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach and W. Strober, eds., 1991)、Annual Review of Immunology、及びAdvances in Immunologyなどの学術雑誌の論文を参照されたい。

【0098】

B. 定義

本開示についてさらに詳細に述べる前に、本明細書で使用される特定の用語の定義を記載することは、本開示の理解を助けると考える。

【0099】

10

別段の定めがない限り、本明細書で使用する技術用語及び科学用語は全て、本発明が属する技術分野の当業者が一般的に理解するものと同一の意味を有する。本明細書に記載の方法及び材料と同様または同等の任意の方法及び材料を、特定の実施形態の実施または試験に使用することができるが、組成物、方法、及び材料の好ましい実施形態を本明細書に記載している。本開示では、以下の用語を下記のように定義する。補足的な定義については本開示全体を通して示している。

【0100】

冠詞の「a」、「an」、及び「the」は、本明細書で使用する場合、その冠詞の文法上の対象が1つであるかまたは2つ以上（すなわち、少なくとも1つまたは1つもしくは複数）であることを意味する。一例として、「an element」は、1つの要素、または1つもしくは複数の要素を意味する。

20

【0101】

選択接続詞（例えば「または」）が使用されている場合、代替物のうちの1つ、両方、または任意の組み合わせを意味すると理解すべきである。

【0102】

用語「及び／または」は、代替物のうちの1つまたは両方を意味すると理解すべきである。

【0103】

「約」または「およそ」という用語は、本明細書で使用する場合、分量、レベル、値、数、頻度、パーセント、寸法、サイズ、量、重量、または長さが、参照する分量、レベル、値、数、頻度、パーセント、寸法、サイズ、量、重量、または長さに対して15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、または1%程度変動していることを意味する。一実施形態では、「約」または「およそ」という用語は、参照する分量、レベル、値、数、頻度、パーセント、寸法、サイズ、量、重量、または長さの近傍±15%、±10%、±9%、±8%、±7%、±6%、±5%、±4%、±3%、±2%、または±1%の分量、レベル、値、数、頻度、パーセント、寸法、サイズ、量、重量、または長さの範囲を意味する。

30

【0104】

一実施形態では、範囲（例えば、1～5、約1～5、または約1～約5）は、その範囲によって包含される各数値を意味する。例えば、非限定的で単なる例示的な実施形態では、範囲「1～5」は、1、2、3、4、5、または1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、もしくは5.0、または1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、もしくは5.0と等価である。

40

【0105】

用語「およそ」は、本明細書で使用する場合、参照する分量、レベル、値、数、頻度、パーセント、寸法、サイズ、量、重量、または長さの80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の分

50

量、レベル、値、数、頻度、パーセント、寸法、サイズ、量、重量、または長さを意味する。一実施形態では、「実質的に同じ」は、参照する分量、レベル、値、数、頻度、パーセント、寸法、サイズ、量、重量、または長さとおよそ同一の作用、例えば同一の生理学的作用をもたらす、分量、レベル、値、数、頻度、パーセント、寸法、サイズ、量、重量、または長さを意味する。

【0106】

本明細書では、別途明記しない限り、「含む (comprise)」、「含む (comprises)」、及び「含んでいる (comprising)」という語は、記載されている工程もしくは要素または工程群もしくは要素群を含めるものであるが、任意の他の工程もしくは要素または工程群もしくは要素群を除外するものではないことを意味すると理解されるであろう。「からなる (consisting of)」は、この語句に続くもの全てを含み、かつそれらに限定されることを意味する。したがって、語句「からなる (consisting of)」は、列挙した要素が必要または必須であり、他のいかなる要素も存在し得ないことを示すものである。「本質的になる (consisting essentially of)」は、この語句に続いて列挙した任意の要素を含み、かつその列挙した要素に対して本開示で詳述する活性または作用を阻害したり付与したりすることがない他の要素に限定されることを意味する。したがって、語句「本質的になる (consisting essentially of)」は、列挙した要素は必要または必須であるが、列挙した要素の活性または作用に実質的に影響を与えるいかなる他の要素も存在しないことを示している。

【0107】

本明細書全体を通して、「一実施形態」、「ある実施形態」、「特定の実施形態」、「関連する実施形態」、「ある特定の実施形態」、「別の実施形態」、もしくは「さらなる実施形態」、またはこれらの組み合わせの記載は、実施形態に関連して説明されている特定の特性、構造、または特徴が、少なくとも1つの実施形態に含まれていることを意味する。したがって、本明細書の様々な箇所で見られる前述の語句は、必ずしも全てが同じ実施形態を参照しているというわけではない。さらに、特定の特性、構造、または特徴を、1つまたは複数の実施形態において任意の適切な様式で組み合わせることができる。また、一実施形態においてある特性を肯定的に記載することは、ある特定の実施形態において該特性を除外することの根拠となることも理解されたい。

【0108】

C. キメラ抗原受容体

種々の実施形態では、CD79A発現癌細胞に対して免疫エフェクター細胞の細胞傷害性をリダイレクトさせる、遺伝子操作された受容体が提供されている。これらの遺伝子操作された受容体は、本明細書においてキメラ抗原受容体 (CAR) と称されている。CARは、所望の抗原 (例えばCD79A) に対する抗体の特異性と、T細胞受容体活性化細胞内ドメインとを組み合わせ、特定の抗CD79A細胞免疫活性を示すキメラタンパク質を産生する分子である。用語「キメラ」は、本明細書で使用する場合、異なる供給源に由来する別々のタンパク質またはDNAの一部から構成されていることを示している。

【0109】

特性の実施形態では、CARは、CD79Aに結合する細胞外ドメイン (結合ドメインまたは抗原特異的結合ドメインとも称される) と、膜貫通ドメインと、細胞内シグナル伝達ドメインとを含む。CARの抗CD79A抗原結合ドメインが標的細胞表面のCD79Aと結合すると、CARがクラスター化し、CAR含有細胞に活性化刺激が送達される。CARの主な特徴は、免疫エフェクター細胞の特異性をリダイレクトし、それにより、増殖、サイトカイン産生、食作用、または主要組織適合性 (MHC) に関係なく標的抗原発現細胞の細胞死を媒介可能な分子の産生を誘発することができることであり、これは、モノクローナル抗体、溶解性リガンド、または細胞特異的共受容体の細胞特異的な標的化能を引き出すものである。

【0110】

種々の実施形態では、CARは、CD79A特異的結合ドメインを含む細胞外結合ドメ

インと、膜貫通ドメインと、1つまたは複数の細胞内共刺激シグナル伝達ドメイン及び／もしくは一次シグナル伝達ドメインとを含む。

【0111】

特定の実施形態では、CARは、抗CD79A抗体またはその抗原結合断片を含む細胞外結合ドメインと、1つまたは複数のヒンジドメインまたはスペーサドメインと、膜貫通ドメインと、1つまたは複数の細胞内共刺激シグナル伝達ドメイン及び／もしくは一次シグナル伝達ドメインとを含む。

【0112】

1. 結合ドメイン

特定の実施形態では、CARは、標的細胞、例えば癌細胞に発現したヒトCD79Aポリペプチドに特異的に結合する抗CD79A抗体またはその抗原結合断片を備えた、細胞外結合ドメインを含む。「結合ドメイン」、「細胞外ドメイン」、「細胞外結合ドメイン」、「抗原特異的結合ドメイン」、及び「細胞外抗原特異的結合ドメイン」という用語は、本明細書で使用する場合、交換可能に使用されており、目的の標的抗原、例えばCD79Aに特異的に結合することができるCARを提示するものである。結合ドメインは、天然、合成、半合成、または組み換え体の供給源に由来し得る。

【0113】

「特異的結合親和性」、または「特異的に結合する」、または「特異的に結合した」、または「特異的結合」、または「特異的に標的化する」という用語は、本明細書で使用する場合、抗CD79A抗体またはその抗原結合断片（またはそれらを含むCAR）が、バックグラウンドの結合よりも高い結合親和性で、CD79Aに結合することを示している。結合ドメイン（または結合ドメインを含むCAR、または結合ドメインを含む融合タンパク質）は、親和性または K_a （すなわち、単位が $1/M$ である特定の結合相互作用の平衡結合定数）が、例えば、約 $10^5 M^{-1}$ よりも大きいか、または約 $10^5 M^{-1}$ に等しい値でCD79Aと結合または会合する場合に、CD79Aポリペプチドに「特異的に結合する」ことになる。特定の実施形態では、結合ドメイン（または、その融合タンパク質）は、 K_a が約 $10^6 M^{-1}$ 、 $10^7 M^{-1}$ 、 $10^8 M^{-1}$ 、 $10^9 M^{-1}$ 、 $10^{10} M^{-1}$ 、 $10^{11} M^{-1}$ 、 $10^{12} M^{-1}$ 、または $10^{13} M^{-1}$ よりも大きいか、これらと等しい値で標的に結合する。「高い親和性」の結合ドメイン（またはその一本鎖融合タンパク質）は、 K_a が少なくとも $10^7 M^{-1}$ 、少なくとも $10^8 M^{-1}$ 、少なくとも $10^9 M^{-1}$ 、少なくとも $10^{10} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{11} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{12} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{13} M^{-1}$ 、またはそれ以上の値を持つ結合ドメインを意味する。

【0114】

あるいは、親和性は、単位が M である特定の結合相互作用の平衡解離定数（ K_d ）（例えば、 $10^{-5} M \sim 10^{-13} M$ 、またはそれ以下）として定義することもできる。本開示の結合ドメインポリペプチド及びCARタンパク質の持つ親和性は、従来技術を用いて容易に測定することができる。従来技術として、例えば、競合ELISA（酵素結合免疫測定法）、または標識したリガンドを用いるか、もしくはBiacore社製（米国ニュージャージー州ピスカタウェイ）Biacore T100などの表面プラズモン共鳴デバイス、もしくはCorning社製のEPICシステムもしくはPerkin Elmer社製のEnSpireなど光バイオセンサ技術を用いる、結合会合もしくは置換アッセイがある（例えば、Scatchard et al. (1949) Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660、及び米国特許第5, 283, 173号、同第5, 468, 614号、または同等の文献を参照されたい）。

【0115】

一実施形態では、特異的結合の親和性は、バックグラウンド結合よりも約2倍、バックグラウンド結合よりも約5倍、バックグラウンド結合よりも約10倍、バックグラウンド結合よりも約20倍、バックグラウンド結合よりも約50倍、バックグラウンド結合よりも約100倍、またはバックグラウンド結合よりも約1000倍以上高い。

【0116】

10

20

30

40

50

特定の実施形態では、C A Rの細胞外結合ドメインは、抗体またはその抗原結合断片を含む。「抗体」は、抗原決定基を含むペプチド、脂質、多糖、または核酸など（例えば、免疫細胞によって認識されるものなど）の抗原のエピトープを特異的に認識しかつ結合させる、少なくとも軽鎖または重鎖の免疫グロブリン可変領域を含む、ポリペプチドの結合剤を指す。「単離された抗体またはその抗原結合断片」は、天然の環境の成分から同定され、分離及び／または回収されたものである。

【0117】

「抗原（A g）」は、動物における抗体の産生またはT細胞応答を刺激することができる化合物、組成物、または物質を意味し、例えば、動物に注射または吸収される組成物（癌特異的タンパク質を含むものなど）を含む。抗原は、本開示の抗原などの異種抗原によって誘導される産物も含めた、特定の液性免疫または細胞性免疫の産生物と反応する。特定の実施形態では、標的抗原は、C D 7 9 Aポリペプチドのエピトープである。

【0118】

「エピトープ」または「抗原決定基」は、結合剤が結合する抗原の領域を意味する。エピトープは、隣接アミノ酸で構成され得るか、またはタンパク質の三次折り畳み構造により近接して隣り合う非隣接アミノ酸で構成され得る。隣接アミノ酸で構成されたエピトープは通例、変性溶媒に曝露された際にも構造を保持するのに対して、三次折り畳み構造により構成されたエピトープは通例、変性溶媒で処理した際にその構造を失う。エピトープは、特有の立体構造に、少なくとも3個、さらに一般的には少なくとも5個、約9個、または約8個～10個のアミノ酸を含むことが多い。

【0119】

抗体には、その抗原結合断片が含まれており、例えば、ラクダI g、I g N A R、F a b断片、F a b'断片、F（a b'）₂断片、二重特異性F a b二量体（F a b 2）、三重特異性F a b三量体（F a b 3）、F v、一本鎖F vタンパク質（「s c F v」）、ビスs c F v（bis-scFv）、（s c F v）₂、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ジスルフィド安定化F vタンパク質（「d s F v」）、及び単一ドメイン抗体（s d A b、ナノボディ）、ならびに抗原結合に関わる完全長抗体の一部などがある。この用語には、キメラ抗体（例えば、ヒト化マウス抗体）、ヘテロ結合抗体（二重特異性抗体など）、及びそれらの抗原結合断片などの遺伝子操作型も含まれる。Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL)、Kuby, J., Immunology, 3rd Ed., W. H. Freeman & Co., New York, 1997も参照されたい。

【0120】

完全抗体は、当業者に理解されるように、かつ本明細書のいずれかに記載されているように、2つの重鎖と2つの軽鎖とを含むものである。各重鎖は、1つの可変領域と、第1の定常領域、第2の定常領域、及び第3の定常領域とからなるのに対し、各軽鎖は、1つの可変領域と1つの定常領域とからなる。哺乳動物の重鎖は、 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、及び μ として分類されている。哺乳動物の軽鎖は、 λ または κ として分類されている。 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、及び μ の重鎖を含む免疫グロブリンは、免疫グロブリン（I g）A、I g D、I g E、I g G、及びI g Mとして分類されている。完全抗体は「Y字型」構造である。Y字型の幹の部分は、相互に結合した2つの重鎖の第2の定常領域及び第3の定常領域（ならびに、I g E及びI g Mについては第4の定常領域）からなり、ジスルフィド結合（鎖間）がヒンジ領域に形成されている。重鎖 λ 、 α 、及び δ は、3つのタンデム（一列に並んだ）I gドメインから構成される定常領域と、可撓性を持たせるヒンジ領域とを有し、重鎖 μ 及び ϵ は、4つの免疫グロブリンドメインから構成される定常領域を有する。第2の定常領域は「C H 2ドメイン」と称され、第3の定常領域は「C H 3ドメイン」と称されている。Y字型の各アームには、単一軽鎖の可変領域と定常領域とに結合している、単一重鎖の可変領域と第1の定常領域とが含まれている。軽鎖及び重鎖の可変領域は、抗原結合に関わっている。

【0121】

軽鎖及び重鎖の可変領域には、3つの超可変領域（「相補性決定領域」または「CDR」とも称される）に挟まれた「フレームワーク」領域が含まれている。CDRは、従来方法、例えば、Kabatらによる配列を用いて（Wu, TT and Kabat, E. A., J Exp Med. 132(2):211-50, (1970)、Borden, P. and Kabat E. A., PNAS, 84: 2440-2443 (1987)）（参照により本明細書に援用される、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991を参照）、またはChothiaらによる構造を用いて（Chothia, C. and Lesk, A.M., J Mol. Biol., 196(4): 901-917 (1987)、Chothia, C. et al, Nature, 342: 877 - 883 (1989)）、特徴付けられ、または特定され得る。

【0122】

10

軽鎖CDRを見つけるための判断材料の具体例は以下の通りである。CDR-L1は、およそ残基24から始まり、Cysを先頭にして、約10残基～17残基の長さで、Trp（通例、Trp-Tyr-Glnであるが、Trp-Leu-Gln、Trp-Phe-Gln、Trp-Tyr-Leuの場合もある）が続く。CDR-L2は、CDR-L1末端のおよそ16残基後から始まり、通例Ile-Tyrを先頭にするが、Val-Tyr、Ile-Lys、Ile-Pheを先頭にする場合もあり、7残基の長さである。CDR-L3は、CDR-L2末端のおよそ33残基後から始まり、Cysを先頭にして、7残基～11残基の長さで、Phe-Gly-XXX-Gly（配列番号76）（XXXは任意のアミノ酸である）が続く。

【0123】

20

重鎖CDRを見つけるための判断材料の具体例は以下の通りである。CDR-H1は、およそ残基26から始まり、Cys-XXX-XXX-XXX（配列番号77）を先頭にして、約10残基～12残基の長さで、Trp（通例、Trp-Valであるが、Trp-Ile、Trp-Alaの場合もある）が続く。CDR-H2は、CDR-H1末端のおよそ15残基後から始まり、通例Leu-Glu-Trp-Ile-Gly（配列番号78）またはいくつかの変異形を先頭にして、16残基～19塩基の長さで、Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Alaが続く。CDR-H3は、CDR-H2末端のおよそ33残基後から始まり、Cys-XXX-XXX（通例、Cys-Ala-Arg）を先頭にして、3残基～25残基の長さで、Trp-Gly-XXX-Gly（配列番号79）が続く。

30

一実施形態では、軽鎖CDR及び重鎖CDRは、Kabatの方法を用いて特定される。

【0124】

一実施形態では、軽鎖CDRならびに重鎖CDR2及び重鎖CDR3をKabatの方法を用いて特定し、重鎖CDR1をKabat法とChothia法の間に相当するAbM法を用いて特定する。例えば、Whitelegg N & Rees AR, Protein Eng. 2000 Dec;13(12):819-24、及びMethods Mol Biol. 2004;248:51-91を参照されたい。CDRを見つけるためのプログラムも一般に利用可能であり、例えばAbYsis (www.bioinf.org.uk/abysis/) などがある。

【0125】

種々の軽鎖または重鎖のフレームワーク領域の配列は、例えばヒトなどの種内では比較的保存されている。抗体のフレームワーク領域は、抗体の構成要素である軽鎖及び重鎖のフレームワーク領域を組み合わせたものであり、三次元空間でCDRを配置し、かつアライメントさせるものである。CDRは主に、抗原のエピトープに対する結合の役割を担っている。各鎖のCDRは通例、CDR1、CDR2、及びCDR3と称され、N末端から順に連続して番号を付けられており、一般に特有のCDRがある鎖によっても特定される。したがって、抗体重鎖の可変ドメインにあるCDRは、CDRH1、CDRH2、及びCDRH3と表記される一方、抗体軽鎖の可変ドメインにあるCDRは、CDRL1、CDRL2、及びCDRL3と表記される。異なる特異性（すなわち、種々の抗原に対して異なる結合部位）を持つ抗体は、異なるCDRを持つ。抗体毎にCDRは異なるが、CDR内の限られた数のアミノ酸位置のみが抗原結合に直接関与している。CDR内のこれら

40

50

の位置は特異性決定残基（S D R）と称されている。特定の実施形態で考察されている抗 C D 7 9 A C A R を構築するのに適した軽鎖 C D R の具体例として、以下に限定されないが、配列番号 1 ～配列番号 3、配列番号 9 ～配列番号 1 1、及び配列番号 1 7 ～配列番号 1 9 に記載された C D R 配列が挙げられる。特定の実施形態で考察されている抗 C D 7 9 A C A R を構築するのに適した重鎖 C D R の具体例として、以下に限定されないが、配列番号 4 ～配列番号 6、配列番号 1 2 ～配列番号 1 4、及び配列番号 2 0 ～配列番号 2 2 に記載された C D R 配列が挙げられる。

【0126】

「V_L」または「V L」は、免疫グロブリン軽鎖の可変領域を表し、抗体の可変領域である、F v、s c F v、d s F v、F a b、または本明細書に記載の他の抗体断片を含む。特定の実施形態で考察されている抗 C D 7 9 A C A R を構築するのに適した軽鎖可変領域の具体例として、以下に限定されないが、配列番号 7、配列番号 1 5、及び配列番号 2 3 に記載された軽鎖可変領域の配列が挙げられる。

10

【0127】

「V_H」または「V H」は、免疫グロブリン重鎖の可変領域を表し、抗体の可変領域である、F v、s c F v、d s F v、F a b、または本明細書に記載の他の抗体断片を含む。特定の実施形態で考察されている抗 C D 7 9 A C A R を構築するのに適した重鎖可変領域の具体例として、以下に限定されないが、配列番号 8、配列番号 1 6、及び配列番号 2 4 に記載された重鎖可変領域の配列が挙げられる。

20

【0128】

「モノクローナル抗体」は、B リンパ球の単一クローンから得られるか、または単一抗体の軽鎖及び重鎖の遺伝子をトランスフェクトした細胞から得られる抗体である。モノクローナル抗体は、当業者に公知の方法、例えば、骨髓腫細胞と免疫脾臓細胞との融合体からハイブリッド抗体形成細胞を作製することにより產生することができる。モノクローナル抗体にはヒト化モノクローナルが含まれる。

【0129】

「キメラ抗体」は、ヒトなどの 1 つの種由来のフレームワーク残基と、マウスなどの他の種由来の C D R（通例、抗原結合をもたらす部分）とを有するものである。特定の好ましい実施形態では、C A R は、キメラ抗体またはその抗原結合断片の抗原特異的結合ドメインを含む。

30

【0130】

好ましい実施形態では、抗体は、ヒト C D 7 9 A ポリペプチドに特異的に結合するヒト抗体（ヒトモノクローナル抗体など）またはその断片である。ヒト抗体は、上述したように、ヒト由来ファージディスプレイライブラリーから選択された F v クローン可変ドメイン配列と、既知のヒト定常ドメイン配列とを組み合わせることによって構築することができる。あるいは、ヒトモノクローナル抗体をハイブリドーマ法により作製してもよい。ヒトモノクローナル抗体の產生に適したヒト骨髓腫及びマウスーヒトヘテロ骨髓腫の細胞株について、例えば、by Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984)、Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)、及び Boerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991) に記載されている。さらに、トランスジェニック動物（例えば、マウス）を用いて、内因性免疫グロブリンを產生することなく、ヒト抗体の全レパートリーを產生することができる。例えば、Jakobovits et al., PNAS USA, 90: 2551 (1993)、Jakobovits et al., Nature, 362: 255 (1993)、Bruggermann et al., Year in Immunol., 7: 33 (1993) を参照されたい。遺伝子シャッフリングを用いて、非ヒト（例えば、げっ歯類抗体）由来のヒト抗体であって、元の非ヒト抗体と同様の親和性と特異性を持つ、ヒト抗体を得ることができる。（1993 年の 4 月 1 日に公開された国際出願 P C T 9 3 / 0 6 2 1 3 を参照）。従来の C D R 移植法による非ヒト抗体のヒト化とは異なり、本手法により、非ヒト由来の F R 残基も C D R 残基も持たない完全ヒト抗体が得られる。

40

50

【0131】

一実施形態では、CARは「ヒト化」抗体を含む。ヒト化抗体は、ヒトフレームワーク領域と、非ヒト（例えば、マウス、ラット、または合成）免疫グロブリンに由来する1つまたは複数のCDRとを含む、免疫グロブリンである。CDRを提供する非ヒト免疫グロブリンは「ドナー」と称され、フレームワークを提供するヒト免疫グロブリンは「アクセプター」と称される。一実施形態では、全てのCDRは、ヒト化免疫グロブリンではドナー免疫グロブリン由来である。定常領域を持つ必要はないが、持つ場合には、定常領域は、ヒト免疫グロブリンの定常領域と実質的に同一、すなわち少なくとも約85%~90%、例えば約95%以上同一でなければならない。したがって、ヒト化免疫グロブリンの全ての部分（CDRを除外する場合もある）は、天然のヒト免疫グロブリン配列の対応する部分と実質的に同一である。ヒト化抗体または他のモノクローナル抗体は、さらなる保存的アミノ酸置換を有する場合があるが、この置換は、抗原結合または他の免疫グロブリン機能に実質的に何ら影響を与えない。ヒト化抗体は、遺伝子操作により構築することができる（例えば、米国特許第5,585,089号を参照）。

10

【0132】

特定の実施形態では、抗CD79A抗体またはその抗原結合断片には、以下に限定されないが、ラクダIg（ラクダ科抗体（VHH））、IgNAR、Fab断片、Fab'断片、F(ab')₂断片、二重特異性Fab二量体（Fab₂）、三重特異性Fab三量体（Fab₃）、Fv、一本鎖Fvタンパク質（「scFv」）、ビスscFv（bis-scFv）、（scFv）₂、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ジスルフィド安定化Fvタンパク質（「dsFv」）、及び単一ドメイン抗体（sdAb、ナノボディ）が含まれる。

20

【0133】

本明細書で使用する「ラクダIg」または「ラクダ科VHH」は、重鎖抗体の中で最も小さいものとして知られる抗原結合単位を表す（Koch-Nolte, et al, FASEB J., 21: 3490-3498 (2007)）。「重鎖抗体」または「ラクダ科抗体」は、2つのVHドメインを含み、かつ軽鎖を含まない抗体を意味する（Riechmann L. et al, J. Immunol. Methods 231:25-38 (1999)、国際公開第94/04678号、国際公開第94/25591号、米国特許第6,005,079号）。

【0134】

「免疫グロブリン新抗原受容体」すなわち「IgNAR」は、1つの可変新抗原受容体（VNAR）ドメインと、5つの定常新抗原受容体（CNAR）ドメインとのホモダイマーからなるサメ免疫レパートリー由来の抗体のクラスを意味する。IgNARは、最も小さいものとして知られる免疫グロブリン系タンパク質骨格の例であり、安定性が高く、高効率の結合特性を持つ。IgNARの安定性が高いのは、（i）マウス抗体で見られる従来の抗体のVHドメイン及びVLドメインと比べて、帯電しかつ親和性表面が露出した残基の数がかかなり多いベースIg骨格と、（ii）相補性決定領域（CDR）ループの安定化構造特性、例えば、ループ内のジスルフィド架橋、及びループ内水素結合のパターンなどと、を持つことに起因すると考えられている。

30

【0135】

抗体のパパイン分解により、「Fab」断片と称される2つの同一の抗原結合断片であって、それぞれが単一の抗原結合部位を持つ断片と、高い結晶化能にちなんだ名称を持つ残りの「Fc」断片とを得る。ペプシン処理により、2つの抗原結合部位を持ち、かつ抗原を架橋可能なF(ab')₂断片を得る。

40

【0136】

「Fv」は、全抗原結合部位を含む最小の抗体断片である。一実施形態では、二本鎖Fv類は、堅固に非共有結合的に会合した、1つの重鎖可変ドメインと1つの軽鎖可変ドメインとの二量体からなる。一本鎖Fv（scFv）種は、1つの重鎖可変ドメインと1つの軽鎖可変ドメインとが可撓性ペプチドリンカーにより共有結合で連結し、その軽鎖及び重鎖が、二本鎖Fvの構造と類する「二量体」構造で会合できるものである。この構成で

50

は、各可変ドメインの3つの超可変領域（HVR）が相互作用して、VH-VL二量体の表面に抗原結合部位を画定している。全体として、6つのHVRがその抗体に抗原結合特異性を付与することになる。一方、単一の可変ドメイン（すなわち、抗原に特異的な3つのHVRのみを備えたFvの半分）であっても、全結合部位を用いるよりは親和性が低くなるものの、抗原を認識し結合させる能力を持つ。

【0137】

Fab断片は、重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメインとを含み、さらに軽鎖の定常ドメインと、重鎖の第1の定常ドメイン（CH1）とを含む。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域由来の1つまたは複数のシステインを含む重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端において、いくつかの残基が付加されているという点で、Fab断片とは異なっている。Fab'-SHは、本明細書では、定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を持つ場合のFab'を表す。F(ab')₂抗体断片は元来、Fab'断片の対であって、その間にヒンジシステインを持つ対として作製されたものである。抗体断片の他の化学的結合も公知である。二重特異性Fab二量体（Fab₂）は、2つのFab'断片を持ち、その各々が異なる抗原を結合させる。三重特異性Fab三量体（Fab₃）は、3つのFab'断片を持ち、その各々が異なる抗原を結合させる。

【0138】

用語「ダイアボディ」は、2つの抗原結合部位を持つ抗体断片を意味し、その断片は、同一のポリペプチド鎖において軽鎖可変ドメイン（VL）に連結された重鎖可変ドメイン（VH）を含む（VH-VL）。同一鎖の2つのドメインが対を形成できない程度に短いリンカーを用いることにより、ドメインは、別の鎖の相補的ドメインと対を形成せざるを得ず、2つの抗原結合部位が形成される。ダイアボディは、二価でも二重特異性でもよい。ダイアボディについては、例えば、欧州特許第404,097号、国際公開第1993/01161号、Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)、及びHollinger et al., PNAS USA 90: 6444-6448 (1993)にさらに詳細に記載されている。トリアボディ及びテトラボディについても、Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)に記載されている。

【0139】

「単一ドメイン抗体」、または「sdAb」、または「ナノボディ」は、抗体重鎖の可変領域（VHドメイン）、または抗体軽鎖の可変領域（VLドメイン）からなる抗体断片を意味する（Holt, L., et al, Trends in Biotechnology, 21(11): 484-490）。

【0140】

「一本鎖Fv」または「scFv」の抗体断片は、抗体のVHドメインとVLドメインとを含み、この2つのドメインは、単一ポリペプチド鎖であり、どちらかの向き（例えば、VL-VHまたはVH-VL）で構成されている。一般的に、scFvポリペプチドは、VHドメインとVLドメインとの間にポリペプチドリナーをさらに含み、これにより、scFvが抗原結合に適した構造を形成できるようになる。scFvの総説としては、例えば、Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 11 3, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315を参照されたい。

【0141】

好ましい実施形態では、抗CD79A抗原結合断片はscFvである。特定の実施形態では、scFvは、マウスscFv、ヒトscFv、またはヒト化scFvである。一本鎖抗体は、所望の標的に特異的なハイブリドーマのV領域遺伝子からクローニングされ得る。こうしたハイブリドーマの産生は常套的に行われている。可変領域重鎖（VH）と可変領域軽鎖（VL）とをクローニングするのに用いることができる手法については、例えば、Orlandi et al., PNAS, 1989; 86: 3833-3837に記載されている。

【0142】

種々の実施形態では、抗CD79A抗体またはその抗原結合断片は、配列番号1～配列

10

20

30

40

50

番号 3、配列番号 9～配列番号 11、もしくは配列番号 17～配列番号 19 に記載された C D R L 1 配列～C D R L 3 配列を備えた可変軽鎖配列、及び／または配列番号 4～配列番号 6、もしくは配列番号 12～配列番号 14 に記載された C D R H 1 配列～C D R H 3 配列を備えた可変重鎖配列を含む。いくつかの実施形態では、抗 C D 7 9 A 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 7、配列番号 15、もしくは配列番号 23 のいずれか 1 つに記載された可変軽鎖配列、及び／または配列番号 8、配列番号 16、もしくは配列番号 24 のいずれか 1 つに記載された可変重鎖配列を含む。

【0143】

特定の実施形態では、抗原特異的結合ドメインは、ヒト C D 7 9 A ポリペプチドに結合する s c F v である。

10

【0144】

C D 7 9 A 特異的結合ドメインの一例は、少なくとも 1 つのヒトフレームワーク領域を含む C D 7 9 A に特異的な免疫グロブリン可変領域である。「ヒトフレームワーク領域」は、ヒト免疫グロブリン可変領域の野生型（すなわち天然の）フレームワーク領域か、またはヒト免疫グロブリン可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸のうちの約 50 % 未満（例えば、好ましくは約 45 % 未満、40 % 未満、30 % 未満、25 % 未満、20 % 未満、15 % 未満、10 % 未満、5 % 未満、または 1 % 未満）が欠失または置換された（例えば、対応する位置で非ヒト免疫グロブリンフレームワーク領域の 1 つまたは複数のアミノ酸残基と置換された）改変フレームワーク領域、または非ヒト免疫グロブリン可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸のうちの約 50 % 未満（例えば、45 % 未満、40 % 未満、30 % 未満、25 % 未満、20 % 未満、15 % 未満、10 % 未満、または 5 % 未満）が欠失または置換された（例えば、露出した残基の位置で欠失または置換された、及び／または対応する位置でヒト免疫グロブリンフレームワーク領域の 1 つもしくは複数のアミノ酸残基と置換された）改変フレームワーク領域であって、その結果、一態様において免疫原性が減じた、フレームワーク領域を意味するものである。

20

【0145】

特定の実施形態では、ヒトフレームワーク領域は、ヒト免疫グロブリン可変領域の野生型フレームワーク領域である。他の特定の実施形態では、ヒトフレームワーク領域は、1 箇所、2 箇所、3 箇所、4 箇所、5 箇所、6 箇所、7 箇所、8 箇所、9 箇所、または 10 箇所以上でアミノ酸欠失またはアミノ酸置換を有する、ヒト免疫グロブリン可変領域の改変フレームワーク領域である。他の実施形態では、ヒトフレームワーク領域は、1 箇所、2 箇所、3 箇所、4 箇所、5 箇所、6 箇所、7 箇所、8 箇所、9 箇所、または 10 箇所以上でアミノ酸欠失またはアミノ酸置換を有する、非ヒト免疫グロブリン可変領域の改変フレームワーク領域である。

30

【0146】

特定の実施形態では、C D 7 9 A 特異的結合ドメインは、ヒト軽鎖 F R 1、ヒト重鎖 F R 1、ヒト軽鎖 F R 2、ヒト重鎖 F R 2、ヒト軽鎖 F R 3、ヒト重鎖 F R 3、ヒト軽鎖 F R 4、及びヒト重鎖 F R 4 から選択される、少なくとも 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、または 8 個のヒトフレームワーク領域（F R）を含む。

【0147】

C D 7 9 A 特異的結合ドメインに含まれ得るヒト F R はまた、本明細書で提供される例示的な F R の変異体を含み、該変異体では、例示的な F R の 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、またはそれ以上のアミノ酸が置換または欠失されている。

40

【0148】

特定の実施形態では、C D 7 9 A 特異的結合ドメインは、（a）ヒト軽鎖 F R 1、ヒト軽鎖 F R 2、ヒト軽鎖 F R 3、及びヒト軽鎖 F R 4 を含むヒト化軽鎖可変領域と、（b）ヒト重鎖 F R 1、ヒト重鎖 F R 2、ヒト重鎖 F R 3、及びヒト重鎖 F R 4 を含むヒト化重鎖可変領域とを含む。

【0149】

50

さらに、本明細書で提供されるCD79A特異的結合ドメインは、1個、2個、3個、4個、5個、または6個のCDRを含む。こうしたCDRは、軽鎖のCDRL1、CDRL2、及びCDRL3、ならびに重鎖のCDRH1、CDRH2、及びCDRH3から選択される、非ヒトCDRであっても改変非ヒトCDRであってもよい。特定の実施形態では、CD79A特異的結合ドメインは、(a)軽鎖CDRL1、軽鎖CDRL2、及び軽鎖CDRL3を含む軽鎖可変領域と、(b)重鎖CDRH1、重鎖CDRH2、及び重鎖CDRH3を含む重鎖可変領域とを含む。

【0150】

ある実施形態では、抗CD79A抗体またはその抗原結合断片は、配列番号1～配列番号3、配列番号9～配列番号11、もしくは配列番号17～配列番号19に記載のアミノ酸に対して、少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%のアミノ酸同一性を有する、CDRL1配列～CDRL3配列を備えた可変軽鎖配列、及び／または配列番号4～配列番号6、配列番号12～配列番号14、もしくは配列番号20～配列番号22に記載のアミノ酸に対して、少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%のアミノ酸同一性を有する、CDRH1配列～CDRH3配列を備えた可変重鎖配列を含む。

【0151】

一実施形態では、CD79A特異的結合ドメインは、配列番号1～配列番号3、配列番号9～配列番号11、配列番号17～配列番号19に記載された軽鎖CDR配列を含む。特定の実施形態では、CD79A特異的結合ドメインは、配列番号1～配列番号3、配列番号9～配列番号11、または配列番号17～配列番号19に記載された軽鎖CDR配列に対して、少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%のアミノ酸同一性を有する軽鎖CDR配列を含む。

【0152】

一実施形態では、CD79A特異的結合ドメインは、配列番号4～配列番号6、配列番号12～配列番号14、または配列番号20～配列番号22に記載された重鎖CDR配列を含む。特定の実施形態では、CD79A特異的結合ドメインは、配列番号4～配列番号6、配列番号12～配列番号14、または配列番号20～配列番号22に記載された重鎖CDR配列に対して、少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%のアミノ酸同一性を有する重鎖CDR配列を含む。

【0153】

特定の実施形態では、抗イディオタイプ抗体またはその抗原結合断片は、配列番号7、配列番号15、もしくは配列番号23のいずれか1つに記載されたアミノ酸配列に対して、少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%のアミノ酸同一性を有する可変軽鎖配列、及び／または配列番号8、配列番号16、もしくは配列番号24のいずれか1つに記載されたアミノ酸配列に対して、少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%のアミノ酸同一性を有する可変重鎖配列を含む。

【0154】

2. リンカー

特定の実施形態では、抗CD79ACARは、種々のドメイン間にリンカー残基を含み、リンカーは、例えば、分子の適正な空間及び構造を得るために付加されている。特定の実施形態では、リンカーは、可変領域連結配列である。「可変領域連結配列」は、VHドメインとVLドメインとを連結し、2つのサブ結合ドメインの相互作用に適合したスペーサー機能を付与するアミノ酸配列である。得られたポリペプチドは、同一の軽鎖可変領域

及び重鎖可変領域を含む抗体と同じ標的分子に対して、特異的結合親和性を保持している。特定の実施形態では、CARは、1個、2個、3個、4個、もしくは5個、またはそれ以上のリンカーを含む。特定の実施形態では、リンカーの長さは、約1個～約25個のアミノ酸、約5個～約20個のアミノ酸、もしくは約10個～約20個のアミノ酸、または任意のその間のアミノ酸の長さである。ある実施形態では、リンカーは、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、またはそれ以上のアミノ酸の長さである。

【0155】

リンカーの具体例として、グリシンポリマー ($(G)_n$ 、グリシン-セリンポリマー ($(G_{1-5}S_{1-5})_n$ (式中、 n は少なくとも1、2、3、4、または5の整数)、グリシン-アラニンポリマー、アラニン-セリンポリマー、及び当該技術分野で公知の他の可撓性リンカーが挙げられる。グリシンポリマー及びグリシン-セリンポリマーは構造が比較的不定形であることから、本明細書に記載のCARといった融合タンパク質のドメイン間において、中間的つなぎ鎖として機能することができる。グリシンは、アラニンに比べて有意に多くの $\Phi\Psi$ 空間にアクセスし、長い側鎖を持つ残基よりもはるかに制約が少ないものである (Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992)を参照)。特定の実施形態におけるCARの設計には、全体的または部分的に可撓性を持つリンカーが含まれる場合があり、したがって、リンカーが、可撓性リンカーと、可撓性の少ない構造を付与する1つまたは複数の部分とを備えて、所望のCAR構造が得られる場合があることを、当業者は認識するであろう。

【0156】

他のリンカーの例として、以下に限定されないが、下記のアミノ酸配列である、DGGGS (配列番号39)、TGEKP (配列番号40) (例えば、Liu et al., PNAS 5525-5530 (1997)を参照)、GGRR (配列番号41) (Pomerantz et al. 1995、上掲)、($GGGS$) $_n$ (式中、 n は1、2、3、4、または5) (配列番号42) (Kim et al., PNAS 93, 1156-1160 (1996))、EGKSSGSGSESKVD (配列番号43) (Chaudhary et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:1066-1070)、KESGSVSSSEQLAQFRSLD (配列番号44) (Bird et al., 1988, Science 242:423-426)、GGRRGGS (配列番号45)、LRQRDGERP (配列番号46)、LRQKDGGGSERP (配列番号47)、LRQKD($GGGS$) $_2$ ERP (配列番号48)が挙げられる。あるいは、可撓性リンカーを、DNA結合部位とそのペプチドとをモデル化することができるコンピュータープログラムを用いて (Desjarlais & Berg, PNAS 90:2256-2260 (1993), PNAS 91:11099-11103 (1994))、またはファージディスプレイ法を用いて、合理的に設計することができる。一実施形態では、リンカーは、以下のアミノ酸配列であるGSTSGSGKPGSGEGSTKG (配列番号49) (Cooper et al., Blood, 101(4): 1637-1644 (2003))を含む。

【0157】

3. スペーサードメイン

特定の実施形態では、抗CD79ACARの結合ドメインの後に、1つまたは複数の「スペーサードメイン」が続いており、このスペーサードメインは、抗原結合ドメインをエフェクター細胞表面から遠ざけて、適正な細胞/細胞接触、抗原結合、及び活性化を可能にする領域のことである (Patel et al., Gene Therapy, 1999; 6: 412-419)。ヒンジドメインは、天然、合成、半合成、または組み換え体の供給源に由来し得る。特定の実施形態では、スペーサードメインは、免疫グロブリンの一部であり、以下に限定されないが、1つまたは複数の重鎖定常領域、例えば、CH2及びCH3を含む。スペーサードメインは、天然の免疫グロブリンヒンジ領域または改変免疫グロブリンヒンジ領域のアミノ酸配列を含んでいてもよい。

【0158】

一実施形態では、スパーサードメインは、I g G 1、I g G 4、またはI g DのC H 2及びC H 3を含む。

【0159】

4. ヒンジドメイン

抗C D 7 9 A C A Rの結合ドメインの後には通例、1つまたは複数の「ヒンジドメイン」が続いており、このヒンジドメインは、抗原結合ドメインをエフェクター細胞表面から遠ざけて、適正な細胞／細胞接触、抗原結合、及び活性化を可能にするのに貢献するものである。抗C D 7 9 A C A Rは通例、結合ドメインと膜貫通（T M）ドメインとの間に1つまたは複数のヒンジドメインを含む。ヒンジドメインは、天然、合成、半合成、または組み換え体の供給源に由来し得る。ヒンジドメインは、天然の免疫グロブリンヒンジ領域または改変免疫グロブリンヒンジ領域のアミノ酸配列を含んでいてもよい。

10

【0160】

「改変ヒンジ領域」は、（a）最大30%のアミノ酸変化（例えば、最大25%、20%、15%、10%、または5%のアミノ酸置換または欠失）を持つ天然のヒンジ領域、（b）最大30%のアミノ酸変化（例えば、最大25%、20%、15%、10%、または5%のアミノ酸置換または欠失）を持つ長さが少なくとも10個のアミノ酸（例えば、少なくとも12個、13個、14個、または15個のアミノ酸）の天然ヒンジ領域の一部、または（c）コアヒンジ領域（長さ4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、もしくは15個、または少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、もしくは少なくとも15個のアミノ酸）を含む天然ヒンジ領域の一部を意味する。特定の実施形態では、天然の免疫グロブリンヒンジ領域の1つまたは複数のシステイン残基が、1つまたは複数の他のアミノ酸残基（例えば、1つまたは複数のセリン残基）で置換されている場合がある。あるいはまたは加えて、改変した免疫グロブリンヒンジ領域が、別のアミノ酸残基（例えば、セリン残基）で置換された野生型免疫グロブリンヒンジ領域のプロリン残基を持つ場合がある。

20

【0161】

本明細書に記載のC A Rにおける使用に適したヒンジドメインの例として、C D 8 α及びC D 4などのI型膜タンパク質の細胞外領域に由来するヒンジ領域が挙げられ、このヒンジ領域は、I型膜タンパク質の野生型ヒンジ領域であっても、改変されたものであってもよい。一実施形態では、ヒンジはP D - 1ヒンジまたはC D 1 5 2ヒンジであり、別の実施形態では、ヒンジドメインはC D 8 αヒンジ領域を含む。

30

【0162】

5. 膜貫通（T M）ドメイン

「膜貫通ドメイン」は、細胞外結合部と細胞内シグナル伝達ドメインとを融合して、C A Rを免疫エフェクター細胞の形質膜に固定させる、抗C D 7 9 A C A Rの一部である。T Mドメインは、天然、合成、半合成、または組み換え体の供給源に由来し得る。T Mドメインは、T細胞受容体のアルファ鎖またはベータ鎖、C D δ、C D 3 ε、C D γ、C D 3 ζ、C D 4、C D 5、C D 8 α、C D 9、C D 1 6、C D 2 2、C D 2 7、C D 2 8、C D 3 3、C D 3 7、C D 4 5、C D 6 4、C D 8 0、C D 8 6、C D 1 3 4、C D 1 3 7、C D 1 5 2、C D 1 5 4、及びP D 1のうちの少なくとも膜貫通領域由来であり得、すなわち該膜貫通領域を含み得る。特定の実施形態では、T Mドメインは合成されたものであり、ロイシン及びバリンなどの疎水性残基を主に含んでいる。

40

【0163】

一実施形態では、C A Rは、P D 1、C D 1 5 2、C D 2 8、またはC D 8 α由来のT Mドメインを含む。別の実施形態では、C A Rは、P D 1、C D 1 5 2、C D 2 8、またはC D 8 α由来のT Mドメインと、T MドメインをC A Rの細胞内シグナル伝達ドメインと連結している、長さが好ましくは1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、または10個のアミノ酸の短いオリゴリンカーまたはポリペプチドリinkerとを含

50

む。グリシン-セリン系リンカーは、特に好適なリンカーである。

【0164】

6. 細胞内シグナル伝達ドメイン

特定の実施形態では、抗CD79ACARは、1つまたは複数の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、抗CD79ACARがヒトCD79Aポリペプチドに実質的に結合しているというメッセージを、免疫エフェクター細胞の内部に伝達して、エフェクター細胞の機能を引き出すCARの一部を意味する。該機能として、例えば、活性化、サイトカイン産生、増殖活性及び細胞傷害性活性があり、例えば、CARが結合した標的細胞への細胞傷害性因子の放出、または細胞外CARドメインに対する抗原結合により誘発される他の細胞応答などがある。

10

【0165】

用語「エフェクター機能」は、免疫エフェクター細胞の特有の機能を意味する。T細胞のエフェクター機能は、例えば、細胞溶解活性もしくは補助、またはサイトカインの分泌を含めた活性を担うと考えられている。したがって、用語「細胞内シグナル伝達ドメイン」は、エフェクター機能シグナルを伝達し、細胞が特有の機能を果たすように誘導する、タンパク質の一部を意味する。細胞内シグナル伝達ドメイン全体を用いることもできるが、多くの場合、必ずしも全ドメインを用いる必要はない。細胞内シグナル伝達ドメインの切断部分を用いる場合、切断部分がエフェクター機能シグナルを伝達する限り、全ドメインの代わりに用いることができる。細胞内シグナル伝達ドメインという用語は、エフェクター機能シグナルを伝達するのに十分な細胞内シグナル伝達ドメインの任意の切断部分を含むことが意図されている。

20

【0166】

TCR単体から生成されるシグナルだけでは、T細胞を完全に活性化させるには不十分であり、二次シグナルまたは共刺激シグナルも必要となることが知られている。したがって、T細胞活性化は、細胞内シグナル伝達ドメインの以下の2つの異なるクラスである、TCR（例えば、TCR/CD3複合体）を介して抗原依存性一次活性化を惹起する一次シグナル伝達ドメインと、抗原非依存的に作用して二次シグナルまたは共刺激シグナルを発する共刺激シグナル伝達ドメインと、によって媒介されるとも言われている。好ましい実施形態では、CARは、1つまたは複数の「共刺激シグナル伝達ドメイン」と、「一次シグナル伝達ドメイン」とを備えた、細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

30

【0167】

一次シグナル伝達ドメインは、TCR複合体の一次活性化を、刺激するようにまたは阻害するように調節するものである。刺激するように作用する一次シグナル伝達ドメインには、免疫受容体チロシン系活性化モチーフ（ITAM）として知られるシグナル伝達モチーフが含まれていてもよい。

【0168】

特定の実施形態に有用な一次シグナル伝達ドメインを含むITAMの具体例として、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD22、CD79A、CD79B、及びCD66d由来のものが挙げられる。特定の好ましい実施形態では、抗CD79ACARは、CD3 ζ 一次シグナル伝達ドメインと、1つまたは複数の共刺激シグナル伝達ドメインとを含む。細胞内一次シグナル伝達ドメインと共刺激シグナル伝達ドメインは、膜貫通ドメインのカルボキシル末端に任意の順で一列に連結されていてもよい。

40

【0169】

特定の実施形態では、CARは、CAR受容体を発現するT細胞の効力及び増殖を増大させる、1つまたは複数の共刺激シグナル伝達ドメインを含む。「共刺激シグナル伝達ドメイン」または「共刺激ドメイン」という用語は、本明細書で使用する場合、共刺激分子の細胞内シグナル伝達ドメインを意味する。共刺激分子とは、抗原受容体またはFc受容体以外の細胞表面分子であり、抗原に結合した際にTリンパ球を効果的に活性化し、かつ機能させるために必要な、第2のシグナルを発する分子である。共刺激分子の具体例とし

50

て、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54 (ICAM)、CD83、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD278 (ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C、SLP76、TRIM、及びZAP70が挙げられる。一実施形態では、CARは、CD28、CD137、及びCD134からなる群から選択される1つまたは複数の共刺激シグナル伝達ドメインと、CD3ζの一次シグナル伝達ドメインとを含む。

【0170】

別の実施形態では、CARは、CD28及びCD137の共刺激シグナル伝達ドメインと、CD3ζ一次シグナル伝達ドメインとを含む。

10

【0171】

さらに別の実施形態では、CARは、CD28及びCD134の共刺激シグナル伝達ドメインと、CD3ζ一次シグナル伝達ドメインとを含む。

【0172】

一実施形態では、CARは、CD137及びCD134の共刺激シグナル伝達ドメインと、CD3ζ一次シグナル伝達ドメインとを含む。

【0173】

一実施形態では、CARは、CD137共刺激シグナル伝達ドメインと、CD3ζ一次シグナル伝達ドメインとを含む。

【0174】

一実施形態では、CARは、CD134共刺激シグナル伝達ドメインと、CD3ζ一次シグナル伝達ドメインとを含む。

20

【0175】

一実施形態では、CARは、CD28共刺激シグナル伝達ドメインと、CD3ζ一次シグナル伝達ドメインとを含む。

【0176】

特定の実施形態では、CARは、癌細胞に発現したCD79Aポリペプチドに特異的に結合する抗CD79A抗体またはその抗原結合断片を含む。

【0177】

一実施形態では、CARは、CD79Aポリペプチドを結合させる抗CD79A s c Fvと、T細胞受容体のアルファ鎖またはベータ鎖、CDδ、CD3ε、CDγ、CD3ζ、CD4、CD5、CD8α、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD152、CD154、AMN1、及びPD1からなる群から選択されるポリペプチド由来の膜貫通ドメインと、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54 (ICAM)、CD83、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD278 (ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C、SLP76、TRIM、及びZAP70からなる群から選択される共刺激分子由来の1つまたは複数の細胞内共刺激シグナル伝達ドメインと、FcRγ、FcRβ、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD3ζ、CD22、CD79A、CD79B、及びCD66dから選択される一次シグナル伝達ドメインと、を含む。

30

40

【0178】

一実施形態では、CARは、CD79Aポリペプチドを結合させる抗CD79A s c Fvと、IgG1ヒンジ/CH2/CH3、IgG4ヒンジ/CH2/CH3、PD1ヒンジ、CD152ヒンジ、及びCD8αヒンジからなる群から選択されるヒンジドメインと、T細胞受容体のアルファ鎖またはベータ鎖、CDδ、CD3ε、CDγ、CD3ζ、CD4、CD5、CD8α、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD152、CD154、AMN1、及びPD1からなる群から選択されるポリペプチド由来

50

の膜貫通ドメインと、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54 (ICAM)、CD83、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD278 (ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C、SLP76、TRIM、及びZAP70からなる群から選択される共刺激分子由来の1つまたは複数の細胞内共刺激シグナル伝達ドメインと、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD22、CD79A、CD79B、及びCD66dから選択される一次シグナル伝達ドメインと、を含む。

【0179】

一実施形態では、CARは、CD79Aポリペプチドを結合させる抗CD79A scFvと、IgG1ヒンジ/CH2/CH3、IgG4ヒンジ/CH2/CH3、PD1ヒンジ、CD152ヒンジ、及びCD8 α ヒンジからなる群から選択されるヒンジドメインと、T細胞受容体のアルファ鎖またはベータ鎖、CD δ 、CD3 ϵ 、CD γ 、CD3 ζ 、CD4、CD5、CD8 α 、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD152、CD154、AMN1、及びPD1からなる群から選択されるポリペプチド由来の膜貫通(TM)ドメインと、TMドメインをCARの細胞内シグナル伝達ドメインと連結する、長さが好ましくは1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、または10個のアミノ酸の短いオリゴリンカーまたはポリペプチドリinkerと、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54 (ICAM)、CD83、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD278 (ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C、SLP76、TRIM、及びZAP70からなる群から選択される共刺激分子由来の1つまたは複数の細胞内共刺激シグナル伝達ドメインと、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD22、CD79A、CD79B、及びCD66dから選択される一次シグナル伝達ドメインと、を含む。

【0180】

特定の実施形態では、CARは、CD79Aポリペプチドを結合させる抗CD79A scFvと、IgG1ヒンジ/CH2/CH3ポリペプチド及びCD8 α ポリペプチドを含むヒンジドメインと、約3個～約10個のアミノ酸のポリペプチドリinkerを含むCD8 α 膜貫通ドメインと、CD137細胞内共刺激シグナル伝達ドメインと、CD3 ζ 一次シグナル伝達ドメインとを含む。

【0181】

特定の実施形態では、CARは、CD79Aポリペプチドを結合させる抗CD79A scFvと、CD8 α ポリペプチドを含むヒンジドメインと、約3個～約10個のアミノ酸のポリペプチドリinkerを含むCD8 α 膜貫通ドメインと、CD134細胞内共刺激シグナル伝達ドメインと、CD3 ζ 一次シグナル伝達ドメインとを含む。

【0182】

特定の実施形態では、CARは、CD79Aポリペプチドを結合させる抗CD79A scFvと、CD8 α ポリペプチドを含むヒンジドメインと、約3個～約10個のアミノ酸のポリペプチドリinkerを含むCD8 α 膜貫通ドメインと、CD28細胞内共刺激シグナル伝達ドメインと、CD3 ζ 一次シグナル伝達ドメインとを含む。

【0183】

特定の実施形態で考察したCARを設計することにより、該CARを発現するT細胞において、未改変のT細胞または他のCARを発現するように改変したT細胞と比べて、増殖、長時間持続性、及び細胞傷害性が改良される。

【0184】

D. ポリペプチド

CARポリペプチド及びその断片などを含むがこれらに限定されない、種々ポリペプチ

ド、融合ポリペプチド、ポリペプチド変異体が、本明細書で検討されている。好ましい実施形態では、1つまたは複数のCARを含むポリペプチドが提供されている。特定の実施形態では、CARは、配列番号25～配列番号30のうちのいずれか1つに記載されたアミノ酸配列を含む抗CD79ACARである。

【0185】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」は、別段の指定がない限り、交換可能に用いられており、従来の意味に従って、すなわちアミノ酸の配列を意味するものとして用いられている。ポリペプチドは、特定の長さ限定されておらず、例えば、完全長ポリペプチドまたはポリペプチド断片を含む場合がある。ポリペプチドはまた、ポリペプチドの1つまたは複数の翻訳後修飾を含む場合があり、翻訳後修飾には、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、ならびに当該技術分野で公知の天然及び非天然の他の修飾などがある。種々の実施形態では、CARポリペプチドは、シグナル配列（またはリーダー配列）をタンパク質のN末端に含んでおり、これが翻訳時または翻訳後にタンパク質の導入を誘導する。特定の実施形態で考察されているCARに有用である適切なシグナル配列の具体例として、以下に限定されないが、IgG1重鎖シグナルポリペプチド、CD8 α シグナルポリペプチド、またはヒトGM-CSF受容体アルファポリペプチドが挙げられる。ポリペプチドは、様々な周知の組み換え手法及び／または合成手法のいずれかを用いて調製することができる。本明細書で考察されているポリペプチドは、本開示のCAR、または本明細書で考察されているCARの1つもしくは複数のアミノ酸が欠失、付加、及び／もしくは置換された配列を含む。

【0186】

「単離ポリペプチド」及び同様の表現は、本明細書で使用する場合、ペプチド分子またはポリペプチド分子を、細胞環境から及び細胞の他の成分と会合した状態から、*in vitro*で合成、単離及び／または精製したものを意味する。すなわち、このポリペプチドは*in vivo*の物質とは有意には会合していない。特定の実施形態では、単離ポリペプチドは、合成ポリペプチド、半合成ポリペプチド、または組み換え供給源から得られたポリペプチドもしくは該供給源由来のポリペプチドである。

【0187】

ポリペプチドは、「ポリペプチド変異体」を含む。ポリペプチド変異体は、1つまたは複数の置換、欠失、付加、及び／挿入を持つ点で天然ポリペプチドとは異なり得る。こうした変異体は、天然であっても、合成して作製されていてもよく、例えば、上述のポリペプチド配列の1つまたは複数の改変して作製されていてもよい。例えば、特定の実施形態では、CARポリペプチドの結合ドメイン、ヒンジドメイン、TMドメイン、共刺激シグナル伝達ドメイン、または一次シグナル伝達ドメインに、1つまたは複数の置換、欠失、付加、及び／または挿入を導入することにより、CARの結合親和性及び／または他の生物学的特性を向上させることが望ましい場合がある。特定の実施形態では、ポリペプチドは、本明細書で考察されている参照配列のいずれかに対して、少なくとも約65%、66%、67%、68%、69%、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%、86%、97%、98%、または99%のアミノ酸同一性を有するポリペプチドを含み、多くの場合、その変異体は参照配列の少なくとも1つの生物学的活性を保持している。特定の実施形態では、生物学的活性は結合親和性である。特定の実施形態では、生物学的活性は細胞溶解活性である。

【0188】

ポリペプチドは、「ポリペプチド断片」を含む。ポリペプチド断片は、天然または組み換え産生ポリペプチドのアミノ末端欠失、カルボキシル末端欠失、及び／または内部欠失もしくは置換を有する、単量体または多量体となり得るポリペプチドを意味する。生物学的に活性なポリペプチド断片の具体例には抗体断片が含まれる。用語「生物学的に活性な断片」または「最小の生物学的に活性な断片」という用語は、本明細書で使用する場合、

天然ポリペプチドの活性の少なくとも100%、少なくとも90%、少なくとも80%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも40%、少なくとも30%、少なくとも20%、少なくとも10%、または少なくとも5%を保持するポリペプチド断片を意味する。好ましい実施形態では、生物学的活性は、イディオタイプへの結合親和性のことである。特定の実施形態では、ポリペプチド断片には、長さが少なくとも5個～約500個のアミノ酸であるアミノ酸鎖が含まれ得る。特定の実施形態では、断片の長さは、少なくとも5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個、31個、32個、33個、34個、35個、36個、37個、38個、39個、40個、41個、42個、43個、44個、45個、46個、47個、48個、49個、50個、55個、60個、65個、70個、75個、80個、85個、90個、95個、100個、110個、150個、200個、250個、300個、350個、400個、または450個のアミノ酸であることは理解されるであろう。特に有用なポリペプチド断片には、抗原結合ドメインまたは抗体の断片を含めた機能ドメインが含まれる。抗CD79A抗体の場合、有用な断片には、以下に限定されないが、CDR領域、重鎖または軽鎖のCDR3領域、重鎖または軽鎖の可変領域、2つのCDRを含む抗体鎖または可変領域の一部などが含まれる。

10

【0189】

ポリペプチドの合成、精製、もしくは特定（例えば、poly-Hisなど）を行いやすくするために、またはポリペプチドの固体支持体への結合を強化するために、ポリペプチドは、インフレームで融合されていても、リンカーまたは他の配列とコンジュゲートされていてもよい。

20

【0190】

上述したように、特定の実施形態では、ポリペプチドを、アミノ酸の置換、欠失、トランケーション、及び挿入などの様々な方法で改変することができる。こうした操作方法は、当該技術分野で一般的に知られている。例えば、参照ポリペプチドのアミノ酸配列変異体を、DNAを変異させることにより調製することができる。変異誘発法及びヌクレオチド配列改変方法は、当該技術分野で周知である。例えば、Kunkel (1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 488-492)、Kunkelら (1987, Methods in Enzymol, 154: 367-382)、米国特許4, 873, 192号、Watson, J. D.ら (Molecular Biology of the Gene, Fourth Edition, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., 1987)、及び本明細書で引用した参考文献を参照されたい。目的タンパク質の生物学的活性に影響を与えない適正なアミノ酸置換の手引については、Dayhoffらのモデル ((1978)

30

Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.))に記載されている。

【0191】

特定の実施形態では、ポリペプチド変異体には、1つまたは複数の保存的置換が含まれる。「保存的置換」は、あるアミノ酸を同様の特性を持つ別のアミノ酸の代わりに用いるが、ペプチド化学分野の当業者が、ポリペプチドの二次構造及び疎水性親水性特性が実質的に変化しないと予測できる置換のことである。特定の実施形態で考察されているポリヌクレオチド及びポリペプチドの構造に修飾をすることもでき、それにより所望の特性を持つ変異体ポリペプチドまたは誘導体ポリペプチドをコードする機能性分子がさらに得られることになる。ポリペプチドのアミノ酸配列を改変して、同等ないし改良された変異体ポリペプチドを作製することが望ましい場合、当業者は、例えば、コードDNA配列のコドンのうちの1つまたは複数、例えば表1に従って変えることができる。

40

【表 1】

表 1 アミノ酸コドン

アミノ酸	1 文字 コード	3 文字 コード	コドン			
アラニン	A	Ala	GCA	GCC	GCG	GCU
システイン	C	Cys	UGC	UGU		
アスパラギン酸	D	Asp	GAC	GAU		
グルタミン酸	E	Glu	GAA	GAG		
フェニルアラニン	F	Phe	UUC	UUU		
グリシン	G	Gly	GGA	GGC	GGG	GGU
ヒスチジン	H	His	CAC	CAU		
イソロイシン	I	Iso	AUA	AUC	AUU	
リジン	K	Lys	AAA	AAG		
ロイシン	L	Leu	UUA	UUG	CUA	CUC
メチオニン	M	Met	AUG			
アスパラギン	N	Asn	AAC	AAU		
プロリン	P	Pro	CCA	CCC	CCG	CCU
グルタミン	Q	Gln	CAA	CAG		
アルギニン	R	Arg	AGA	AGG	CGA	CGC
セリン	S	Ser	AGC	AGU	UCA	UCC
スレオニン	T	Thr	ACA	ACC	ACG	ACU
バリン	V	Val	GUA	GUC	GUG	GUU
トリプトファン	W	Trp	UGG			
チロシン	Y	Tyr	UAC	UAU		

10

20

【0192】

生物学的活性を消失することなく、置換、挿入、または欠失できるアミノ酸残基を判定する方法については、DNASTAR、DNA Strider、Geneious、Mac Vector、またはVector NTIソフトウェアなどの当該技術分野で周知のコンピュータプログラムを用いて参照することができる。本明細書に開示されたタンパク質変異体のアミノ酸変化は、保存的なアミノ酸変化であること、すなわち、同様に帯電したアミノ酸または無電荷のアミノ酸の置換であることが好ましい。保存的なアミノ酸変化には、側鎖における類似するアミノ酸ファミリーのうちの1つの置換が含まれる。天然アミノ酸は通例、4つのファミリーである、酸性アミノ酸（アスパラギン酸、グルタミン酸）と、塩基性アミノ酸（リジン、アルギニン、ヒスチジン）と、無極性アミノ酸（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）と、非電荷極性アミノ酸（グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシン）とに分けられる。フェニルアラニン、トリプトファン、及びチロシンは、芳香族アミノ酸として共に分類される場合がある。ペプチドまたはタンパク質において、アミノ酸の適正な保存的置換は、当業者に知られており、得られる分子の生物学的活性を変えることなく行うことができる。一般的に、ポリペプチドの非必須領域における単一のアミノ酸置換が、生物学的活性を実質的に変えるものではないことは、当業者に認識されている（例えば、Watson et al. Molecular Biology of the Gene, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p.224を参照）。

30

40

【0193】

上記に概説したように、アミノ酸は、アミノ酸側鎖置換体の相対的な類似性、例えば、疎水性、親水性、電荷、サイズなどに基づいて置換され得る。

50

【0194】

ポリペプチド変異体には、グリコシル化型、他の分子との複合体、及び相互作用しない化学的部分との共有結合複合体（例えば、ペグ化分子）がさらに含まれる。共有結合変異体は、当該技術分野で知られているように、アミノ酸鎖内の基か、またはN末端残基もしくはC末端残基の基と、官能基とを結合させることにより調製することができる。変異体にはまた、対立遺伝子変異体、種変異体、及びムテインが含まれる。タンパク質の機能活性に影響を及ぼさない領域のトランケーション体または欠失体も変異体である。

【0195】

2つ以上のポリペプチドの発現が必要となる一実施形態では、それらをコードするポリヌクレオチド配列が、本明細書のいずれかで論じているIRES配列によって分離されていてもよい。別の実施形態では、2つ以上のポリペプチドを、1つまたは複数の自己切断型ポリペプチド配列を含む融合タンパク質として発現することができる。

【0196】

特定の実施形態で考察されているポリペプチドは、融合ポリペプチドを含む。好ましい実施形態では、融合ポリペプチド、及び融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、例えばCARが提供されている。融合ポリペプチド及び融合タンパク質は、少なくとも2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、もしくは10個、またはそれ以上のポリペプチドセグメントを備えたポリペプチドを意味する。融合ポリペプチドは通例、C末端からN末端に結合しているが、C末端からC末端に、N末端からN末端に、またはN末端からC末端に結合している場合もある。融合タンパク質のポリペプチドは、任意の順序であっても、特定の順序であってもよい。また、融合ポリペプチドまたは融合タンパク質は、融合ポリペプチドの所望の転写活性が保たれている限り、保存的に改変された変異体、多型変異体、対立遺伝子、突然変異体、部分配列、及び種間相同体を含んでいてもよい。融合ポリペプチドを、化学合成法により、もしくは2つの部分を化学的に結合させることにより作製することができ、または多くの場合、他の標準的な方法を用いて作製することもできる。融合ポリペプチドを含むライゲーションしたDNA配列は、本明細書のいずれかで論じている適正な転写制御エレメントまたは翻訳制御エレメントに作用可能に連結されている。

【0197】

一実施形態では、融合パートナーは、元の組み換えタンパク質よりも効率の高いタンパク質発現を補助する配列（発現エンハンサー）を含む。タンパク質の溶解性が増加するように、またはタンパク質が所望の細胞内区分に標的化されるように、または融合タンパク質が細胞膜を介して輸送されやすくなるように、他方の融合パートナーを選択することができる。

【0198】

融合ポリペプチドは、本明細書に記載のポリペプチドドメインの各々の間に、ポリペプチド切断シグナルをさらに含む場合がある。また、ポリペプチド切断部位を、任意のリンカーペプチド配列に入れることができる。ポリペプチド切断シグナルの例として、プロテアーゼ切断部位、ヌクレアーゼ切断部位（例えば、低頻度制限酵素認識部位、自己切断型リボザイム認識部位など）、及び自己切断型ウイルスオリゴペプチドなどのポリペプチド切断認識部位が挙げられる（deFelipe and Ryan, 2004. Traffic, 5(8); 616-26を参照）。

【0199】

適切なプロテアーゼ切断部位及び自己切断型ペプチドは当業者に知られている（例えば、Ryan et al., 1997. J. Gener. Virol. 78, 699-722、Scymczak et al. (2004) Nature Biotech. 5, 589-594を参照）。プロテアーゼ切断部位の例として、以下に限定されないが、ポティウイルスNIaプロテアーゼ（例えば、タバコエッチウイルスプロテアーゼ）、ポティウイルスHCプロテアーゼ、ポティウイルスP1（P35）プロテアーゼ、ピオウイルス（byovirus）NIaプロテアーゼ、ピオウイルスRNA-2コードプロテアーゼ、アフトウイルスLプロテアーゼ、エンテロウイルス2Aプロテアーゼ

、ライノウイルス 2 A プロテアーゼ、ピコルナ 3 C プロテアーゼ、コモウイルス 2 4 K プロテアーゼ、ネボウイルス 2 4 K プロテアーゼ、R T S V (イネツングロ球状ウイルス) 3 C 様プロテアーゼ、P Y V F (パースニップイエローフレックウイルス) 3 C 様プロテアーゼ、ヘパリン、トロニン、第 X a 因子、及びエンテロキナーゼが挙げられる。一実施形態においては、T E V (タバコエッチウイルス) プロテアーゼ切断部位が、高い切断ストリンジェンシーを持つために好ましいが、該切断部位の例として、例えば E X X Y X Q (G / S) (配列番号 5 0)、例えば E N L Y F Q G (配列番号 5 1) 及び E N L Y F Q S (配列番号 5 2) があり、X は任意のアミノ酸を示している (T E V による切断は、Q と G の間または Q と S の間で生じる)。

【0200】

10

特定の実施形態では、ポリペプチド切断シグナルは、ウイルス自己切断型ペプチドまたはリボソームスキッピング配列 (ribosomal skipping sequence) である。

【0201】

リボソームスキッピング配列の具体例として、以下に限定されないが、2 A または 2 A 様の部位、配列、またはドメインが挙げられる (Donnelly et al., 2001. J. Gen. Virol. 82:1027-1041)。特定の実施形態では、ウイルス 2 A ペプチドは、アフトウイルス 2 A ペプチド、ポティウイルス 2 A ペプチド、またはカルジオウイルス 2 A ペプチドである。

【0202】

一実施形態では、ウイルス 2 A ペプチドは、口蹄病ウイルス (F M D V) 2 A ペプチド、ウマ鼻炎 A ウイルス (E R A V) 2 A ペプチド、ゾーシアシグナ (Thosea asigna) ウイルス (T a V) 2 A ペプチド、ブタテッショウウイルス-1 (P T V-1) 2 A ペプチド、タイロウイルス 2 A ペプチド、及び脳心筋炎ウイルス 2 A ペプチドからなる群から選択される。

20

【0203】

2 A 部位の具体例を表 2 に示している。

【表 2】

配列番号 53	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP
配列番号 54	ATNFSLLKQAGDVEENPGP
配列番号 55	LLKQAGDVEENPGP
配列番号 56	GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP
配列番号 57	EGRGSLLTCGDVEENPGP
配列番号 58	LLTCGDVEENPGP
配列番号 59	GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP
配列番号 60	QCTNYALLKLAGDVESNPGP
配列番号 61	LLKLAGDVESNPGP
配列番号 62	GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
配列番号 63	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
配列番号 64	LLKLAGDVESNPGP
配列番号 65	LLNFDLLKLAGDVESNPGP
配列番号 66	TLNFDLLKLAGDVESNPGP
配列番号 67	LLKLAGDVESNPGP
配列番号 68	NFDLLKLAGDVESNPGP
配列番号 69	QLLNFDLLKLAGDVESNPGP
配列番号 70	APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
配列番号 71	VTELLYRMKRAETYCPRLAIHPTEARHKQKIVAPVKQT
配列番号 72	LNFDLLKLAGDVESNPGP
配列番号 73	LLAIHPTEARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
配列番号 74	EARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

10

20

【0204】

好ましい実施形態では、ポリペプチドは、抗CD79ACARポリペプチドを含む。

【0205】

30

E. ポリヌクレオチド

好ましい実施形態では、1つまたは複数のCARポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが提供されている。用語「ポリヌクレオチド」または「核酸」は、本明細書で使用する場合、デオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（RNA）、及びDNA/RNAハイブリッドを意味する。ポリヌクレオチドは、一本鎖であっても二本鎖であってもよく、また組み換え体でも、合成されたものでも、単離されたものでもよい。ポリヌクレオチドには、以下に限定されないが、プレメッセンジャーRNA（プレmRNA）、メッセンジャーRNA（mRNA）、ゲノムDNA（gDNA）、PCR増幅DNA、相補DNA（cDNA）、合成DNA、または組み換えDNAが含まれる。ポリヌクレオチドは、長さが少なくとも5、少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20、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100、少なくとも200、少なくとも300、少なくとも400、少なくとも500、少なくとも1000、少なくとも5000、少なくとも10000、もしくは少なくとも15000、またはそれ以上のヌクレオチド、及びその間の全ての長さのヌクレオチドの重合形態のことであり、リボヌクレオチドであってもデオキシリボヌクレオチドであってもよく、またはヌクレオチドのいずれか種の修飾形態であってもよい。本文脈において「その間の長さ」とは、明記した値の間にある任意の長さ、例えば、6、7、8、9など、101、102、103など、151、152、153など、201、202、203などを意味することは容易に理解されるであろう。特定の実施形態では、ポリヌクレオチドまたは変異体は、参照配列に対して、少なくともまたは約50%、55%、60%、65%、70%、71%、72

40

50

%、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%、または100%の配列同一性を有する。

【0206】

ポリヌクレオチドの具体例として、以下に限定されないが、配列番号31～配列番号36が挙げられ、及び配列番号1～配列番号30をコードするポリヌクレオチドが挙げられる。

【0207】

「単離ポリヌクレオチド」は、本明細書で使用する場合、天然状態で隣接している配列から精製されたポリヌクレオチド、例えば、DNA断片であって、該断片に通常隣接している配列から取り出された断片を意味する。特定の実施形態では、「単離ポリヌクレオチド」はまた、相補DNA(cDNA)、組み換えDNA、または天然では存在せず人工的に作製された他のポリヌクレオチドを意味する。特定の実施形態では、単離ポリヌクレオチドは、合成ポリヌクレオチド、半合成ポリヌクレオチド、または組み換え供給源から得られたポリヌクレオチドもしくは該供給源由来のポリヌクレオチドである。

【0208】

種々の実施形態において、ポリヌクレオチドは、本明細書で考察されているポリペプチドをコードするmRNAを含む。特定の実施形態では、mRNAは、キャップ、すなわち1つまたは複数のヌクレオチドと、ポリ(A)テールとを含む。

【0209】

特定の実施形態では、ポリヌクレオチドはコドン最適化されていてもよい。用語「コドン最適化」は、本明細書で使用する場合、ポリペプチドの発現、安定性、及び／または活性を増加させるために、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにおいて、コドン置換することを意味する。コドン最適化に影響を与える因子として、以下に限定されないが、(i) 2つ以上の生体間もしくは遺伝子間、もしくは総合的にまとめられたバイアス表(bias table)間のコドンバイアスの違い、(ii) 生体内、遺伝子内、もしくは遺伝子群内のコドンバイアスの程度の違い、(iii) コンテキストを含むコドンの系統論的な違い、(iv) デコードtRNAに基づくコドンの違い、(v) 全体におけるもしくはトリプレットの1位置におけるGC%に基づくコドンの違い、(vi) 参照配列、例えば天然配列に対する類似度の違い、(vii) コドン頻度カットオフの違い、(viii) DNA配列から転写されるmRNAの構造特性、(ix) コドン置換セットの設計に必要なDNA配列の機能に関する予備知識、(x) 各アミノ酸のコドンセットの系統論的な違い、及び／または(xi) 偽性翻訳開始部位の分離除去、のうちの1つまたは複数が挙げられる。

【0210】

用語「ポリヌクレオチド変異体」及び「変異体」ならびに同様の表現は、本明細書で使用する場合、参照ポリヌクレオチド配列と実質的に配列同一性を示すポリヌクレオチド、または下記に定義されるストリンジェントな条件下で参照配列とハイブリダイゼーションするポリヌクレオチドを意味する。これらの用語は、参照ポリヌクレオチドと比較して、1つもしくは複数のヌクレオチドが付加もしくは欠失されているか、または異なるヌクレオチドで置換されているポリヌクレオチドを含む。この点に関して当該技術分野で十分に理解されているのは、参照ポリヌクレオチドに対して、変異、付加、欠失、及び置換を含む特定の改変を行うことができ、改変ポリヌクレオチドは、参照ポリヌクレオチドの生物学的機能または活性を保持しているということである。

【0211】

ポリヌクレオチド変異体には、生物学的活性ポリペプチド断片または変異体をコードするポリヌクレオチド断片が含まれる。用語「ポリヌクレオチド断片」は、本明細書で使用する場合、天然ポリペプチドの活性の少なくとも100%、少なくとも90%、少なくとも80%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも40%

、少なくとも30%、少なくとも20%、少なくとも10%、または少なくとも5%を保持するポリペプチド変異体をコードする、長さが少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、またはそれ以上のヌクレオチドであるポリヌクレオチド断片を意味する。ポリヌクレオチド断片は、天然または組み換え産生ポリペプチドの1つまたは複数のアミノ酸におけるアミノ末端欠失、カルボキシル末端欠失、及び／または内部欠失もしくは置換を有するポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドを意味する。

10

【0212】

「50%同一の配列」などを例として含めた記述「配列同一性」は、本明細書で使用する場合、比較領域にわたって配列がヌクレオチド毎またはアミノ酸毎に同一である程度を意味する。したがって、「配列同一性パーセント」は、比較領域で最適にアライメントされた2つの配列を比較し、両方の配列において同一性の核酸基（例えば、A、T、C、G、I）または同一のアミノ酸残基（例えば、Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys、及びMet）となる位置の数を算出して、一致した位置の数を求め、その一致した位置の数を比較領域（すなわちウィンドウサイズ）全位置の数で割り、その結果に100を掛けて配列同一性の百分率を得ることによって算出することができる。本明細書に記載の参照配列のいずれかに対して少なくとも約50%、55%、60%、65%、66%、67%、68%、69%、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%、86%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するヌクレオチド及びポリペプチドも含まれ、多くの場合、ポリペプチド変異体は参照配列の少なくとも1つの生物学的活性を保持している。

20

30

【0213】

2つ以上のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの間の配列関係性を記述するのに用いる用語には、「参照配列」、「比較領域」、「配列同一性」、「配列同一性パーセント」、及び「実質的同一性」がある。「参照配列」の長さは、ヌクレオチド及びアミノ酸残基を含む単量体単位数が少なくとも12であるが、15～18であることが珍しくなく、少なくとも25であることが多い。2つのポリヌクレオチドは、それぞれ（1）2つのポリヌクレオチドの間で類似性のある配列（すなわち、完全ポリヌクレオチド配列の一部のみ）と、（2）2つのポリヌクレオチドの間で異なる配列とを含む場合があるため、2つ（以上）のポリヌクレオチド間の配列比較は、2つのポリヌクレオチドの配列の「比較領域」を比較して、配列類似性の局所的な領域を特定及び比較することによって行う。「比較領域」は、少なくとも6個の連続する位置、一般的には約50個～約100個、より一般的には約100個～約150個の連続する位置の概念的セグメントを指し、2つの配列を至適にアライメントした後に、配列を同一数の連続する位置の参照配列と比較する。2つの配列を至適にアライメントするために、比較領域は参照配列（付加も欠失も含んでいない配列）と比べて約20%以下の付加または欠失（すなわちギャップ）を含んでいてもよい。比較領域をアライメントするための配列の至適アライメントは、アルゴリズム（Genetics Computer Group（米国ウィスコンシン州マディソン、575 Science Drive）製のWisconsin Geneticsソフトウェアパッケージリリース7.0におけるGAP、BESTFIT、FASTA、及びTFASTA）のコンピューター処理により、または選択した種々の方法のいずれかを用いた分析及び最適アライメント（すなわち、比較領域で最高割合の相同性が得られるも

40

50

の)により行うことができる。また、例えば、Altschul et al., 1997, Nucl. Acid s Res. 25:3389に開示されているプログラムのB L A S Tファミリーを参照することもできる。配列分析の詳細な検討については、Ausubel et al., Current Protocols i n Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Chapter 15のUni t 19.3に記載されている。

【0214】

ポリヌクレオチドの方向について記載する用語には、5' (通例、遊離リン酸基を持つポリヌクレオチドの末端)及び3' (通例、遊離ヒドロキシル(OH)基を持つポリヌクレオチドの末端)が含まれる。ポリヌクレオチド配列は、5'から3'方向、または3'から5'方向にアノテーションされ得る。DNA及びmRNAについて、5'から3'方向の鎖は「センス」鎖、「プラス」鎖、または「コード」鎖と称されているが、これは、その配列が、プレメッセンジャー(プレmRNA)の配列と同一である(DNAのチミン(T)の部分がRNAではウラシル(U)になっていることを除く)からである。DNAとmRNAについて、相補的な3'から5'方向の鎖は、RNAポリメラーゼにより転写される鎖であり、「テンプレート」鎖、「アンチセンス」鎖、「マイナス」鎖、または「非コード」鎖と称されている。用語「逆方向」は、本明細書で使用する場合、3'から5'方向で書かれた5'から3'方向の配列、または5'から3'方向に書かれた3'から5'方向の配列を意味する。

【0215】

用語「相補」及び「相補性」という用語は、塩基対合則に関連付けられているポリヌクレオチド(すなわち、ヌクレオチド配列)を意味する。例えば、DNA配列5'AGTCATG3'の相補鎖は、3'TCAGTAC5'である。後者の配列は、左側に5'末端を持ち、右側に3'末端を持つ逆相補鎖の5'CATGACT3'と記載されることが多い。この逆相補鎖と同じ配列は回文配列と言われている。核酸塩基の一部のみが塩基対合則に従ってマッチングしている場合には、相補性は「部分的」になり得る。あるいは、核酸間に「完全」相補性または「全」相補性がある場合もある。

【0216】

また、当業者に理解されることは、遺伝コードの縮重があるために、本明細書に記載されているポリペプチドまたはその変異体の断片をコードするヌクレオチド配列が多数存在することである。これらのポリヌクレオチドの中には、任意の天然遺伝子のヌクレオチド配列との相同性を最小限にしか持たないものもある。しかしながら、コドン使用頻度が異なるために様々となるポリヌクレオチド、例えば、ヒト及び／または霊長類のコドン選択について最適化されているポリヌクレオチドが、特定の実施形態で特に考察されている。さらに、本明細書で提供されるポリヌクレオチド配列を含む遺伝子の対立遺伝子を使用することもできる。対立遺伝子は、1つまたは複数の変異、例えば、ヌクレオチドの欠失、付加、及び／または置換により改変された内因性遺伝子である。

【0217】

「核酸カセット」または「発現カセット」という用語は、本明細書で使用する場合、RNAを発現し、続いてポリペプチドを発現することができるベクター内の遺伝子配列を意味する。一実施形態では、核酸カセットは、目的の遺伝子、例えば、目的のポリヌクレオチドを含有する。別の実施形態では、核酸カセットは、1つまたは複数の発現制御配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、ポリ(A)配列、及び目的の遺伝子、例えば、目的のポリヌクレオチドを含有する。ベクターが、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、もしくは10個またはそれ以上の核酸カセットを含む場合もある。核酸カセットは、ベクター内で位置及び順序が定められており、カセット内の核酸が、RNAに転写され、必要な場合には、タンパク質またはポリペプチドに翻訳されるように、また形質転換された細胞の活性に必要な適正な翻訳後修飾を施されるように、さらには適正な細胞内領域への標的化または細胞外領域への分泌によって生物学的活性の適正な領域に移動するようになっている。カセットは、ベクター内への即時挿入に適した3'末端及び5'末端を有することが好ましく、例えば、各末端に制限エンドヌクレアーゼ部位を

有する。好ましい実施形態では、核酸カセットには、C D 7 9 Aを発現する癌細胞の細胞傷害性を増加させるのに用いられるキメラ抗原受容体の配列が含まれる。カセットは除去することができ、プラスミドまたはウイルスベクターに単一ユニットとして挿入することもできる。

【0218】

ポリヌクレオチドは、目的のポリヌクレオチドを含む。用語「目的のポリヌクレオチド」は、本明細書で使用する場合、ポリペプチド、ポリペプチド変異体、または融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを意味する。ベクターは、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、または10個の目的のポリヌクレオチドを含んでいてもよい。特定の実施形態では、目的のポリヌクレオチドは、疾患または障害の治療または10
予防において治療作用を付与するポリペプチドをコードする。目的のポリヌクレオチド、及び該ポリヌクレオチドからコードされるポリペプチドは、野生型ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと、その機能的変異体及び断片とを含む。特定の実施形態では、機能的変異体は、対応する野生型の参照ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列に対して、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%の同一性を持つ。特定の実施形態では、機能的変異体または断片は、対応する野生型ポリペプチドの生物学的活性の少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、または少なくとも90%を有する。

【0219】

本明細書で考察されているポリヌクレオチドは、そのコード配列の長さに関係なく、他のDNA配列と組み合わせられる場合があり、他のDNA配列には、本明細書のいずれかに開示されているか当該技術分野で知られている、プロモーター及び／またはエンハンサー、非翻訳領域(UTR)、シグナル配列、コザック配列、ポリアデニル化シグナル、付加的制限酵素部位、多重クロニング部位、内部リボソーム進入部位(IRES)、リコンビナーゼ認識部位(例えば、LoxP部位、FRT部位、及びAtt部位)、終止コドン、転写終止シグナル、及び自己切断型ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、エピトープタグなどがある。このため、全体の長さが大きく異なることがある。したがって、ほぼ全ての長さのポリヌクレオチド断片を特定の実施形態で使用することができ、全体の長さは、好ましくは、調製の簡便さ及び所定の組み換えDNAプロトコルでの使用によ20
って制限されると考えられる。

【0220】

ポリヌクレオチドは、当該技術分野で既知でありかつ適用できる十分確立された様々な技術のうちのいずれかを用いて、調製、操作、及び／または発現することができる。所望のポリペプチドを発現するために、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を適切なベクターに挿入することができる。

【0221】

ベクターの具体例として、以下に限定されないが、プラスミド、自己複製配列、及び転移因子が挙げられ、転移因子には、例えば、piggyBac、Sleeping Beauty、Mos1、Tc1/mariner、Tol2、mini-Tol2、Tc3、MuA、Himar I、Frog Prince、及びそれらの誘導體がある。40

【0222】

ベクターのさらなる具体例として、限定されるものではないが、プラスミド、ファージミド、コスミド、人工染色体(酵母人工染色体(YAC)、細菌人工染色体(BAC)、またはP1由来人工染色体(PAC)など)、バクテリオファージ(ラムダファージまたはM13ファージなど)、及び動物ウイルスが挙げられる。

【0223】

ベクターとして有用なウイルスの具体例として、限定されるものではないが、レトロウイルス(レンチウイルスを含む)、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス(例えば、単純ヘルペスウイルス)、ポックスウイルス、バキュロウイルス、パピローマウイルス、及びパポバウイルス(例えば、SV40)が挙げられる。50

【0224】

発現ベクターの具体例として、以下に限定されないが、哺乳動物細胞における発現用に p C l n e o ベクター (Promega社)、ならびに哺乳動物細胞におけるレンチウイルス媒介遺伝子導入及び発現用に p L e n t i 4 / V 5 - D E S T (商標)、p L e n t i 6 / V 5 - D E S T (商標)、及び p L e n t i 6 . 2 / V 5 - G W / l a c Z (Invitrogen社)が挙げられる。特定の実施形態では、本明細書に開示されているポリペプチドのコード配列は、哺乳動物細胞でポリペプチドを発現させるために、こうした発現ベクターにライゲーションされていてもよい。

【0225】

特定の実施形態では、ベクターはエピソーム性ベクターであるか、または染色体外に残るベクターである。用語「エピソーム性」は、本明細書で使用する場合、宿主の染色体DNAに組み込むことなく、かつ分裂宿主細胞から徐々に失われていくことなく、複製することができるベクター、つまり、染色体外またはエピソームで複製するベクターを意味している。

10

【0226】

発現ベクターに含まれる「調節エレメント」または「調節配列」は、ベクターの非翻訳領域にあり、転写及び翻訳を行うように宿主細胞のタンパク質と相互作用する、複製の起点、選択カセット、プロモーター、エンハンサー、翻訳開始シグナル(シャイン-ダルガルド配列またはコザック配列)イントロン、ポリアデニル化配列、5'及び3'非翻訳領域などである。こうしたエレメントは、その強さ及び特異性が様々であってもよい。使用するベクター系及び宿主によって、任意の数の適切な転写エレメント及び翻訳エレメント、例えば、遍在性プロモーター及び誘導性プロモーターなどを使用することができる。

20

【0227】

特定の実施形態では、ベクターは、発現ベクター及びウイルスベクターに限定されるものではなく、プロモーター及び/またはエンハンサーなどの外因性制御配列、内因性制御配列、または異種制御配列を含む。「内因性」制御配列は、ゲノムにおいて所定の遺伝子と天然の状態で連結された配列である。「外因性」制御配列は、遺伝子操作(すなわち、分子生物学的手法)により遺伝子の近位に置かれた配列であって、その遺伝子の転写が連結エンハンサー/プロモーターにより誘導される、配列である。「異種」制御配列は、遺伝子操作される細胞とは異なる種由来の外因性配列である。

30

【0228】

用語「プロモーター」は、本明細書で使用する場合、RNAポリメラーゼが結合するポリヌクレオチド(DNAまたはRNA)の認識部位を意味する。RNAポリメラーゼは、プロモーターと作用可能に連結したポリヌクレオチドを惹起し、転写させる。特定の実施形態では、哺乳動物細胞で作用可能なプロモーターには、転写が開始される部位から約25塩基~30塩基上流に位置するATに富む領域、及び/または転写開始部から70塩基~80塩基上流の別の配列であるCNCAAT領域(Nは任意のヌクレオチドであってもよい)が含まれる。

【0229】

用語「エンハンサー」は、転写を増強させることができ、ある例では、別の制御配列に対する方向とは無関係に機能することができる配列を含むDNAセグメントを意味する。エンハンサーは、プロモーター及び/または他のエンハンサーエレメントと協同的または付加的に作用することができる。用語「プロモーター/エンハンサー」は、プロモーターの機能とエンハンサーの機能の両方を付与することができる配列を含むDNAセグメントを意味する。

40

【0230】

用語「作用可能に連結」とは、近接した状態であり、記載された成分同士が意図したように機能できる関係にあることを意味する。一実施形態では、この用語は、核酸発現制御配列(プロモーター、及び/またはエンハンサーなど)と、第2のポリヌクレオチド配列、例えば、目的のポリヌクレオチドとの機能的連結であって、該発現制御配列が第2の配

50

列に相当する核酸の転写を誘導する、機能的連結を意味する。

【0231】

用語「構成的発現制御配列」は、本明細書で使用する場合、作用可能に連結した配列の転写を連続的または継続的に可能にする、プロモーター、エンハンサー、またはプロモーター／エンハンサーを意味する。構成的発現制御配列は、広範な種々の細胞種もしくは組織種における発現を可能にする「遍在性」プロモーター、エンハンサー、もしくはプロモーター／エンハンサーであっても、または限定された種々の細胞種もしくは組織種における発現を可能にする「細胞特異的」、「細胞種特異的」、「細胞系統特異的」、もしくは「組織特異的」なプロモーター、エンハンサー、もしくはプロモーター／エンハンサーであってもよい。

10

【0232】

特定の実施形態における使用に適した遍在性発現制御配列の例として、以下に限定されないが、サイトメガロウイルス (CMV) 最初期プロモーター、ウイルス性シミアンウイルス 40 (SV40) (例えば、初期または後期)、モロニー Maus 白血病ウイルス (MoMLV) LTR プロモーター、ラウス肉腫ウイルス (RSV) LTR、単純ヘルペスウイルス (HSV) (チミジンキナーゼ) プロモーター、ワクシニアウイルス由来の H5 プロモーター、P7.5 プロモーター及び P11 プロモーター、伸長因子 1 アルファ (EF1a) プロモーター、初期増殖応答 1 (EGR1)、フェリチン H (FerH)、フェリチン L (FerL)、グリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH)、真核生物翻訳開始因子 4A1 (EIF4A1)、熱ショック 70 kDa タンパク質 5 (HSPA5)、熱ショックタンパク質 90 kDa ベータ、メンバー 1 (HSP90B1)、熱ショックタンパク質 70 kDa (HSP70)、 β -キネシン (β -KIN)、ヒト ROSA26 遺伝子座 (Irions et al., Nature Biotechnology 25, 1477 - 1482 (2007))、ユビキチン C プロモーター (UBC)、ホスホグリセリン酸キナーゼ 1 (PGK) プロモーター、サイトメガロウイルスエンハンサー／ニワトリ β -アクチン (CAG) プロモーター、 β -アクチンプロモーター、ならびに負の制御領域が欠失した骨髓増殖性肉腫ウイルスエンハンサーの d1587rev プライマー結合部位置換 (MND) U3 プロモーター (Haas et al. Journal of Virology. 2003;77(17): 9439-9450) が挙げられる。

20

【0233】

一実施形態では、ベクターは MND U3 プロモーターを含む。

30

【0234】

一実施形態では、ベクターは、ヒト EF1a 遺伝子の第 1 のイントロンを備えた EF1a プロモーターを含む。

【0235】

一実施形態では、ベクターは、ヒト EF1a 遺伝子の第 1 のイントロンを欠く EF1a プロモーターを含む。

【0236】

特定の実施形態では、CAR を含むポリヌクレオチドを T 細胞特異的プロモーターから発現することが望ましい場合がある。

40

【0237】

「条件付き発現」は、本明細書で使用する場合、任意の種類の条件付き発現を意味してもよく、該発現には、以下に限定されないが、誘導性発現、抑制性発現、及び特定の生理学的状態、生物学的状態、または疾患状態などを有する細胞または組織における発現が含まれる。この定義は、細胞種特異的発現または組織特異的発現を除外することを意図するものではない。特定の実施形態では、目的のポリヌクレオチドの条件付き発現が用いられ、例えば、細胞、組織、生体などを、目的のポリヌクレオチドを発現させるか、または目的のポリヌクレオチドによってコードされるポリヌクレオチドの発現を増加または減少させる、処置または状態にさらすことにより、発現を制御する。

【0238】

50

誘導性プロモーター／系の具体例として、以下に限定されないが、グルココルチコイド受容体またはエストロゲン受容体をコードする遺伝子のプロモーターなどのステロイド誘導性プロモーター（対応ホルモンで処理することにより誘導可能）、メタロチオネインプロモーター（種々の重金属で処理することにより誘導可能）、MX-1プロモーター（インターフェロンにより誘導可能）、「GeneSwitch」ミフェプリストン調節可能系（Sirin et al., 2003, Gene, 323:67）、クミン酸誘導性遺伝子スイッチ（国際公開第2002/088346号）、テトラサイクリン依存性調節系などが挙げられる。

【0239】

部位特異的DNAリコンビナーゼを用いることによって、条件付き発現を行うことができる。特定の実施形態によると、ベクターには、部位特異的リコンビナーゼによって媒介される組み換えのための少なくとも1つ（典型的には2つ）の部位が含まれる。「リコンビナーゼ」または「部位特異的リコンビナーゼ」という用語は、本明細書で使用する場合、1個または複数個（例えば、2個、3個、4個、5個、7個、10個、12個、15個、20個、30個、50個など）の組み換え部位における組み換え反応に関与する、切除または組み込み用のタンパク質、酵素、補助因子、または関連タンパク質を含み、これらは、野生型タンパク質（Landy, Current Opinion in Biotechnology 3:699-707 (1993)を参照）、またはその変異体、誘導体（例えば、組み換えタンパク質配列またはその断片を含有する融合タンパク質など）、断片、及び多様体であってもよい。特定の実施形態での使用に適したリコンビナーゼの具体例として、以下に限定されないが、Cre、Int、IHF、Xis、Flp、Fis、Hin、Gin、ΦC31、Cin、Tn3リゾルバーゼ、TndX、XerC、XerD、TnpX、Hjc、Gin、SpCCE1、及びParAが挙げられる。

【0240】

ベクターは、種々の部位特異的リコンビナーゼのいずれかに対する1つまたは複数の組み換え部位を含む。部位特異的リコンビナーゼに対する標的部位は、ベクター（例えば、レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクター）の組み込みに必要な任意の部位以外の部分であることを理解されたい。「組み換え配列」、「組み換え部位」、または「部位特異的組み換え部位」という用語は、本明細書で使用する場合、リコンビナーゼが認識し、結合する特定の核酸配列を意味する。

【0241】

例えば、Creリコンビナーゼの1つの組み換え部位は、8塩基対コア配列に隣接した2つの13塩基対逆方向反復（リコンビナーゼ結合部位として作用）を含む34塩基対配列のloxPである（Sauer, B., Current Opinion in Biotechnology 5:521-527 (1994)の図1を参照）。他のloxP部位の例として、以下に限定されないが、lox511（Hoess et al., 1996; Bethke and Sauer, 1997）、lox5171（Lee and Saito, 1998）、lox2272（Lee and Saito, 1998）、m2（Langer et al., 2002）、lox71（Albert et al., 1995）、及びlox66（Albert et al., 1995）が挙げられる。

【0242】

FLPリコンビナーゼの適切な認識部位として、以下に限定されないが、FRT（McLeod, et al., 1996）、F1、F2、F3（Schlake and Bode, 1994）、F4、F5（Schlake and Bode, 1994）、FRT（LE）（Senecoff et al., 1988）、FRT（RE）（Senecoff et al., 1988）が挙げられる。

【0243】

認識配列の他の例には、リコンビナーゼ酵素λインテグラーゼ、例えばphic31により認識される、attB配列、attP配列、attL配列、及びattR配列がある。ΦC31SSRは、ヘテロタイプ部位であるattB（長さ34bp）とattP（長さ39bp）との間のみ、組み換えを媒介するものである（Groth et al., 2000）。attBとattPは、細菌ゲノム及びファージゲノムのファージインテグラーゼに対する付着部位に付けられた名称であり、それぞれ、ΦC31ホモダイマーにより結合して

いると考えられる不完全な逆方向反復を含んでいる (Groth et al., 2000)。産生部位の attL 及び attR は、さらなる ϕ C31 媒介組み換えに対して実質不活性であり (Belteki et al., 2003)、反応を不可逆にする。挿入の誘発に関しては、attB 含有 DNA をゲノム attP 部位に挿入するのは、attP 部位をゲノム attB 部位に挿入するよりも容易であることが分かっている (Thyagarajan et al., 2001; Belteki et al., 2003)。したがって、典型的な戦略では、相同組み換えにより、決められた遺伝子座に attP 含有「ドッキング部位」を配置し、続いて、これを別の attB 含有配列と組み合わせる挿入させる。

【0244】

「配列内リボソーム進入部位」または「IRES」は、本明細書で使用する場合、シストロン (タンパク質コード領域) の開始コドン (例えば、ATG) に配列内リボソームを直接的に進入させることで遺伝子のキャップ非依存的翻訳をもたらす、エレメントを意味する。例えば、Jackson et al., 1990. Trends Biochem Sci 15(12):477-83、及び Jackson and Kaminski. 1995. RNA 1(10):985-1000 を参照されたい。特定の実施形態では、ベクターは、1 つまたは複数のポリペプチドをコードする 1 つまたは複数の目的ポリヌクレオチドを含む。特定の実施形態では、複数のポリペプチドの各々を効率的に翻訳するために、ポリヌクレオチド配列を、1 つまたは複数の IRES 配列により、または自己切断型ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列により分離することができる。一実施形態では、本明細書で考察されているポリヌクレオチドで用いられる IRES は、EMCV IRES である。

【0245】

用語「コザック配列」は、本明細書で使用する場合、mRNA とリボソームの小サブユニットとの初期結合を強く促進しかつ翻訳を増やす、短いヌクレオチド配列を意味する。コンセンサスコザック配列は、(GCC)RCCATGG (配列番号 75) であり、R はプリン (A または G) である (Kozak, 1986. Cell. 44(2):283-92、及び Kozak, 1987. Nucleic Acids Res. 15(20):8125-48)。特定の実施形態では、ベクターは、コンセンサスコザック配列を有し、かつ所望のポリペプチド、例えば CAR をコードするポリヌクレオチドを含む。

【0246】

異種核酸転写の効果的な終結とポリアデニル化とを誘導するエレメントは、異種遺伝子発現を増加させる。転写終結シグナルは一般的に、ポリアデニル化シグナルの下流にある。特定の実施形態では、ベクターは、発現されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのポリアデニル化配列 3' を含む。本明細書で使用される「ポリA 部位」、「ポリA 配列」という用語は、RNA ポリメラーゼ II による新生 RNA 転写の終結とポリアデニル化とを誘導する DNA 配列を意味する。ポリアデニル化配列は、コード配列の 3' 末端にポリA テールを付加することにより、mRNA の安定性を増すことができ、ひいては翻訳効率を向上させる一因となる。切断及びポリアデニル化は、RNA のポリ (A) 配列によって誘導される。哺乳動物 pre-mRNA のコアポリ (A) 配列は、切断-ポリアデニル化部位に隣接する 2 つの認識エレメントを備える。典型的には、ほぼインバリエントな AAUAAA 六量体が、U 残基または GU 残基に富む可変性の高いエレメントの 20 ヌクレオチド ~ 50 ヌクレオチド 上流に置かれている。新生転写物の切断は、この 2 つのエレメント間で生じ、5' 切断産物に対して最大 250 個のアデノシンの付加を伴う。特定の実施形態では、コアポリ (A) 配列は理想的なポリA 配列 (例えば、AATAAA、ATTAATAA、AGTAATAA) である。特定の実施形態では、ポリ (A) 配列は、SV40 ポリA 配列、ウシ成長ホルモンポリA 配列 (BGHPA)、ウサギ β グロビンポリA 配列 (r β gpA)、それらの変異体、または当該技術分野で公知の他の適切な異種もしくは内因性のポリA 配列である。

【0247】

ある実施形態では、ポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドを保有する細胞は、誘導性自殺遺伝子を含めた自殺遺伝子を利用して、直接的な毒性を及ぼすリスク、及び/ま

10

20

30

40

50

たは制御不能に増殖するリスクを軽減する。特定の態様では、自殺遺伝子は、該ポリヌクレオチドまたは細胞を保有する宿主に対して免疫原性を持たない。使用可能な自殺遺伝子の特定の例は、カスパーゼ9、またはカスパーゼ8、またはシトシンデアミナーゼである。カスパーゼ9は、特有の二量体化化学的誘導因子（C I D）を用いて活性化され得る。

【0248】

特定の実施形態では、抗CD79ACARをコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドを、非ウイルスベクターまたはウイルスベクターを用いて細胞（例えば、免疫エフェクター細胞）に導入する。

【0249】

用語「ベクター」は、別の核酸分子を導入または輸送することができる核酸分子を意味するものとして本明細書で使用されている。導入される核酸は通例、ベクター核酸分子に連結、例えば挿入されている。ベクターは、細胞における自律増殖を誘導する配列を含んでいてもよく、宿主細胞DNAへの組み込みを可能にする配列を含んでいてもよい。特定の実施形態では、非ウイルスベクターを用いて、本明細書で考察されている1つまたは複数のポリヌクレオチドをT細胞に輸送する。一実施形態では、ベクターは、*in vitro*で合成されたか、または合成的に調製された、抗CD79ACARをコードするmRNAである。

【0250】

非ウイルスベクターの具体例として、以下に限定されないが、mRNA、プラスミド（例えば、DNAプラスミドまたはRNAプラスミド）、トランスポゾン、コスミド、及び細菌人工染色体が挙げられる。

【0251】

特定の実施形態で考察されているポリヌクレオチドの非ウイルス輸送の具体例として、以下に限定されないが、エレクトロポレーション、ソノポレーション、リポフェクション、マイクロインジェクション、微粒子銃、ビロソーム、リボソーム、免疫リボソーム、ナノ粒子、ポリカチオンまたは脂質・核酸複合体、裸DNA、人工ビリオン、DEAE-デキストラン媒介導入、遺伝子銃、及び熱ショックが挙げられる。

【0252】

特定の実施形態で考察されている、特定の実施形態での使用に適したポリヌクレオチド輸送システムの具体例として、以下に限定されないが、Amata Biosystems社、Maxcyte社、BTX Molecular Delivery Systems社、及びCopernicus Therapeutics社により提供されているものが挙げられる。リポフェクションの試薬は市販されている（例えば、Transfectam（商標）及びLipofectin（商標））。効果的なポリヌクレオチドの受容体認識リポフェクションに適したカチオン性脂質及び中性脂質については、文献で説明されている。例えば、Liu et al. (2003) Gene Therapy. 10:180-187、及びBalazs et al. (2011) Journal of Drug Delivery. 2011:1-12を参照されたい。抗体を標的にした、細菌由来の非生物ナノ細胞系の輸送も、特定の実施形態で考察されている。

【0253】

種々の実施形態では、ポリヌクレオチドは、所望のポリペプチドを過渡的に発現させるために細胞に導入されるmRNAである。「過渡的」は、本明細書で使用する場合、数時間、数日間、または数週間の間、導入されない導入遺伝子の発現を意味し、発現期間は、ゲノムに導入された場合、または細胞の適切なプラスミドレプリコンに挿入された場合のポリヌクレオチドの発現期間よりも短い期間となる。

【0254】

特定の実施形態では、ポリペプチドをコードするmRNAは*in vitro*で転写されたmRNAである。「*in vitro*で転写されたRNA」という用語は、本明細書で使用する場合、RNA、好ましくは*in vitro*で合成されたmRNAを意味する。*in vitro*で転写されたRNAは通例、*in vitro*転写ベクターから作製される。*in vitro*転写ベクターは、*in vitro*で転写されたRNAを作製するために使用されるテンプレートを含む。

【0255】

特定の実施形態では、mRNAは、5'キャップもしくは修飾5'キャップ及び／またはポリ(A)配列をさらに含んでもよい。5'キャップ(RNAキャップ、RNA 7-メチルグアノシンキャップ、またはRNA m7Gキャップとも称される)は、本明細書で使用する場合、転写開始直後に真核生物メッセンジャーRNAの「先端部」または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'キャップには、第1の転写ヌクレオチドに連結されており、かつリボソームにより認識され、リボヌクレアーゼから保護される末端基が含まれる。キャッピング部分を修飾して、例えば翻訳の安定性または効率といったmRNAの機能性を調節することができる。特定の実施形態では、mRNAは、約50個～約5000個のアデニンから構成されるポリ(A)配列を含む。一実施形態では、mRNAは、約100塩基～約1000塩基、約200塩基～約500塩基、または約300塩基～約400塩基のポリ(A)配列を含む。一実施形態では、mRNAは、約65塩基、約100塩基、約200塩基、約300塩基、約400塩基、約500塩基、約600塩基、約700塩基、約800塩基、約900塩基、または約1000以上の塩基のポリ(A)配列を含む。ポリ(A)配列を化学的にまたは触媒的に修飾して、局在性、翻訳安定性、または翻訳効率といったmRNAの機能性を調節することができる。

10

【0256】

特定の実施形態に考察されているポリヌクレオチドを含むウイルスベクターは、個々の患者に投与することによって、一般的には、以下に記載しているように、全身投与(例えば、静脈内注入、腹腔内注入、筋肉内注入、皮下注入、または頭蓋内注入)または局所投与によってin vivo送達することができる。あるいは、ベクターは、個々の患者から外植された細胞(例えば、動員末梢血液、リンパ球、骨髄穿刺液、組織生検など)または万能ドナー造血幹細胞といった細胞にex vivo送達することができ、その後、その細胞を患者に再移植をすることができる。

20

【0257】

一実施形態では、抗CD79ACARをコードするポリヌクレオチドを含むウイルスベクターを生体に直接投与して、細胞をin vivo形質導入する。あるいは裸DNAを投与することもできる。投与は、分子を血液または組織細胞と最大限接触させるために通常用いる経路のいずれかによって行い、例えば、以下に限定されないが、注射、注入、局所投与、及びエレクトロポレーションなどにより行う。こうした核酸を投与するのに適した方法は、利用可能でありかつ当業者に周知である。2つ以上経路を用いて特定の組成物を投与する場合があるが、多くの場合、ある特定の経路が別の経路よりも即時性が高くかつ高効率な反応をもたらすことになる。

30

【0258】

本明細書で考察されている特定の実施形態に使用するのに適したウイルスベクター系の具体例として、以下に限定されないが、アデノ随伴ウイルス(AAV)、レトロウイルス、単純ヘルペスウイルス、アデノウイルス、及びワクシニアウイルスのベクターが挙げられる。

【0259】

種々の実施形態では、抗CD79ACARをコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドを、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞に、該1つまたは複数のポリヌクレオチドを含めた組み換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)を用いて形質導入することによって組み込む。

40

【0260】

AAVは、小さいサイズ(約26nm)であり、主としてエピソーム性の複製欠損非エンベロープウイルスである。AAVは、分裂細胞と非分裂細胞の両方を感染することができ、そのゲノムを宿主細胞のゲノムに組み込むことができる。組み換えAAV(rAAV)は通例少なくとも、導入遺伝子及びその調節配列と、5'及び3'AAV逆方向末端反復(ITR)とから構成されている。ITR配列は長さが約145bpである。特定の実施形態では、rAAVは、ITRと、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV

50

5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、またはAAV10から単離されたカプシド配列とを含む。

【0261】

ある実施形態では、キメラ rAAV が用いられ、ITR 配列は 1 つの AAV セロタイプから単離されており、カプシド配列が異なる AAV セロタイプから単離されている。例えば、AAV2 由来の ITR 配列を有する rAAV と AAV6 由来のカプシド配列とを、AAV2 / AAV6 と称する。特定の実施形態では、rAAV ベクターは、AAV2 由来の ITR と、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、または AAV10 のうちのいずれか 1 つ由来のカプシドタンパク質とを含み得る。好ましい実施形態では、rAAV は、AAV2 由来の ITR 配列と、AAV6 由来のカプシド配列とを含む。好ましい実施形態では、rAAV は、AAV2 由来の ITR 配列と、AAV2 由来のカプシド配列とを含む。

10

【0262】

ある実施形態では、工学的方法及び選択方法を AAV カプシドに適用して、目的の細胞を形質導入しやすくすることができる。

【0263】

rAAV ベクターの構築物、その生成物、及びその精製物は、米国特許第 9, 169, 494 号、同第 9, 169, 492 号、同第 9, 012, 224 号、同第 8, 889, 641 号、同第 8, 809, 058 号、及び同第 8, 784, 799 号で開示されており、これらの各々は、その全体が参照により本明細書に援用されている。

20

【0264】

種々の実施形態では、抗 CD79ACAR をコードする 1 つまたは複数のポリヌクレオチドを、免疫エフェクター細胞に、該 1 つまたは複数のポリヌクレオチドを含むレトロウイルス（例えば、レンチウイルス）を用いて細胞の形質導入することによって組み込む。

【0265】

用語「レトロウイルス」は、本明細書で使用する場合、ゲノム RNA を直鎖二本鎖 DNA コピーに逆転写し、続いて、そのゲノム DNA を宿主ゲノムに共有結合的に組み込む RNA ウイルスを意味する。特定の実施形態での使用に適したレトロウイルスの具体例として、以下に限定されないが、モロニー Maus 白血病ウイルス (MoMuLV)、モロニー Maus 肉腫ウイルス (MoMSV)、ハーベイ Maus 肉腫ウイルス (HaMuSV)、マウス乳癌ウイルス (MuMTV)、テナガザル白血病ウイルス (GaLV)、ネコ白血病ウイルス (FLV)、スプーマウイルス、フレンド Maus 白血病ウイルス、マウス幹細胞ウイルス (MSCV)、及びラウス肉腫ウイルス (RSV)、ならびにレンチウイルスが挙げられる。

30

【0266】

用語「レンチウイルス」は、本明細書で使用する場合、複雑型レトロウイルス群（または属）を意味する。レンチウイルスの具体例として、以下に限定されないが、HIV（ヒト免疫不全ウイルス（HIV1 型及び HIV2 型を含む）、ビスナ・マエディウイルス (VMV)、ヤギ関節炎脳炎ウイルス (CAEV)、ウマ伝染性貧血ウイルス (EIAV)、ネコ免疫不全ウイルス (FIV)、ウシ免疫不全ウイルス (BIV)、及びサル免疫不全ウイルス (SIV) が挙げられる。一実施形態では、HIV ベースのベクター骨格（すなわち、HIV シス作用配列エレメント）が好適である。

40

【0267】

種々の実施形態では、本明細書で考察されているレンチウイルスベクターには、1 つまたは複数の LTR、及び以下の随伴要素である cPPT / FLAP、Psi (Ψ) パッケージングシグナル、輸送エレメント、ポリ (A) のうちの 1 つもしくは複数または全てが含まれており、任意選択的に、本明細書のいずれかに記載されている、WPRE または HPRE、インスレーター配列、選択可能マーカー、及び細胞自殺遺伝子が含まれていてもよい。

【0268】

50

特定の実施形態では、本明細書で考察されているレンチウイルスベクターは、組み込みレンチウイルス、非組み込みレンチウイルス、または組み込み欠損レンチウイルスであってもよい。用語「組み込み欠損レンチウイルス」または「IDL V」は、本明細書で使用する場合、ウイルスゲノムを宿主細胞のゲノムに組み込む能力を欠くインテグラーゼを有するレンチウイルスを意味する。組み込み不能なウイルスベクターについては、国際公開第2006/010834号に記載されており、この特許出願はその全体が参照により本明細書に援用されている。

【0269】

インテグラーゼ活性を減少させるのに適したHIV-1 pol 遺伝子の変異の例として、以下に限定されないが、H12N、H12C、H16C、H16V、S81R、D41A、K42A、H51A、Q53C、D55V、D64E、D64V、E69A、K71A、E85A、E87A、D116N、D116I、D116A、N120G、N120I、N120E、E152G、E152A、D35E、K156E、K156A、E157A、K159E、K159A、K160A、R166A、D167A、E170A、H171A、K173A、K186Q、K186T、K188T、E198A、R199c、R199T、R199A、D202A、K211A、Q214L、Q216L、Q221L、W235F、W235E、K236S、K236A、K246A、G247W、D253A、R262A、R263A、及びK264Hが挙げられる。

10

【0270】

一実施形態では、HIV-1 インテグラーゼ欠損 pol 遺伝子には、D64V、D116I、D116A、E152G、もしくはE152Aの変異か、D64V、D116I、及びE152Gの変異か、またはD64V、D116A、及びE152Aの変異が含まれる。

20

【0271】

一実施形態では、HIV-1 インテグラーゼ欠損 pol 遺伝子にはD64V変異が含まれる。

【0272】

用語「末端反復配列(LTR)」は、レトロウイルスDNAの末端に位置する塩基対のドメインであって、その天然配列構成では、直接反復配列であり、U3領域、R領域、及びU5領域を含有するドメインを意味する。

30

【0273】

「FLAPエレメント」または「cPPT/FLAP」という用語は、本明細書で使用する場合、その配列が、レトロウイルス(例えば、HIV-1またはHIV-2)のセントラルポリプリン配列とセントラル終止配列(cPPT及びCTS)とを含む核酸を意味する。好適なFLAPエレメントについては、米国特許第6,682,907号及びZennou, et al., 2000, Cell, 101:173に記載されている。別の実施形態では、レンチウイルスベクターには、cPPTエレメント及び/またはCTSエレメントにおいて1つまたは複数の変異を有するFLAPエレメントが含まれる。さらに別の実施形態では、レンチウイルスベクターには、cPPTエレメントまたはCTSエレメントが含まれる。さらに別の実施形態では、レンチウイルスベクターにはcPPTエレメントもCTSエレメントも含まれていない。

40

【0274】

「パッケージングシグナル」または「パッケージング配列」という用語は、本明細書で使用する場合、ウイルスRNAをウイルスカプシドまたはウイルス粒子に挿入するのに必要となる、レトロウイルスゲノム内のプサイ[Ψ]配列を意味する(例えば、Clever et al., 1995. J. of Virology, Vol. 69, No. 4; pp. 2101-2109を参照)。

【0275】

用語「輸送エレメント」は、細胞の核から細胞質へのRNA転写物の輸送を調節する、シス作用転写後調節エレメントを意味する。RNA輸送エレメントの例として、以下に限定されないが、ヒト免疫不全ウイルス(HIV) rev 応答エレメント(RRE)(例え

50

ば、Cullen et al., 1991. J. Virol. 65: 1053、及びCullen et al., 1991. Cell 58: 423を参照）、及びB型肝炎ウイルス転写後調節エレメント（HPRE）が挙げられる。

【0276】

特定の実施形態では、転写後調節エレメント、高効率ポリアデニル化部位、及び任意選択的に転写終止シグナルをウイルスベクターに組み込むことによって、ウイルスベクターにおける異種配列の発現を増加させる。様々な転写後調節エレメントが、タンパク質における異種核酸の発現を増加することができ、該調節エレメントには、例えば、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント（WPRE、Zufferey et al., 1999, J. Virol., 73:2886）、B型肝炎ウイルス含まれる転写後調節エレメント（HPRE）（Huang et al., Mol. Cell. Biol., 5:3864）、及び同類のもの（Liu et al., 1995, Genes Dev., 9:1766）がある。

【0277】

レンチウイルスベクターは、LTRを改変した結果として、いくつかの安全性強化部を含んでいることが好ましい。「自己不活型」（SIN）ベクターは複製欠損ベクターを指し、例えば、該ベクターでは、U3領域として知られる右（3'）LTRエンハンサープロモーター領域を改変（例えば、欠失または置換）して、最初のウイルス複製サイクル後のウイルス転写を妨げている。ウイルス粒子産生の間、ウイルスゲノムの転写を駆動するように5'LTRのU3領域を異種プロモーターで置換することによって、さらなる安全性強化部が得られる。使用することができる異種プロモーターの例として、例えば、ウイルス性シミアンウイルス40（SV40）（例えば、初期または後期）、サイトメガロウイルス（CMV）（例えば、最初期）、モロニーマウス白血病ウイルス（MoMLV）、ラウス肉腫ウイルス（RSV）、及び単純ヘルペスウイルス（HSV）（チミジンキナーゼ）のプロモーターが挙げられる。

【0278】

「シュードタイプ」または「シュードタイピング」という用語は、本明細書で使用する場合、好ましい特性を持つ別のウイルスのタンパク質と置換されたウイルスエンベロープタンパク質を有するウイルスを意味する。例えば、HIVを、水疱性口内炎ウイルスGタンパク質（VSV-G）エンベロープタンパク質でシュードタイプ化することができ、これにより、HIVが広範囲の細胞を感染できるようになる。一般的に、HIVエンベロープタンパク質（env遺伝子によりコードされるタンパク質）が、ウイルスをCD4⁺提示細胞に対して標的化するからである。

【0279】

特定の実施形態では、レンチウイルスベクターを既知の方法により作製する。例えば、Kutner et al., BMC Biotechnol. 2009;9:10. doi: 10.1186/1472-6750-9-10、Kutner et al. Nat. Protoc. 2009;4(4):495-505. doi: 10.1038/nprot.2009.22を参照されたい。

【0280】

本明細書で考察されている特定の実施形態によると、ウイルスベクター骨格配列のほとんどまたは全てがレンチウイルス（例えば、HIV-1）由来である。しかしながら、レトロウイルス配列及び／またはレンチウイルス配列の種々の供給源を使用することができ、レンチウイルス配列の中で、本明細書に記載の機能を遂行する導入ベクターの能力を損なうことなく、複数の置換及び改変が組み合わされる場合があることを理解されたい。さらに、種々のレンチウイルスベクターが当該技術分野で公知であり、Naldini et al., (1996a, 1996b, and 1998)、Zufferey et al., (1997)、Dull et al., 1998、米国特許第6,013,516号、同第5,994,136号を参照されたい。これらのベクターの多くを、本明細書で考察されているウイルスベクターまたは導入プラスミドを産生するように転用することができる。

【0281】

種々の実施形態では、抗CD79ACARをコードする1つまたは複数のポリヌクレオ

チドを、免疫エフェクター細胞に、該1つまたは複数のポリヌクレオチドを含むアデノウイルスを用いて形質導入することによって組み込む。

【0282】

アデノウイルスベースのベクターは、多くの細胞型において極めて高い形質導入効率をもたらすことができ、細胞分裂を必要としない。こうしたベクターを用いて、高い力価及び高いレベルの発現が得られている。このベクターは、比較的簡単な系で大量に作製することができる。アデノウイルスベクターのほとんどは操作されており、その結果、導入遺伝子が、AdE1a遺伝子、AdE1b遺伝子、及び／またはAdE3遺伝子の代わりに用いられ、続いて複製欠損ベクターが、in transで欠失遺伝子機能を提供するとヒト293細胞で増殖するようになっている。アデノウイルス(Ad)ベクターは、肝臓、腎臓、及び筋肉に見られる細胞などの非分裂の分化細胞を含めた複数種の組織にin vivoで形質導入することができる。Adベクターは通常、高い運搬能を持っている。

【0283】

現行の複製欠損アデノウイルスベクターの産生及び増殖には、293と称される特有のヘルパー細胞株を用いることができ、該細胞株は、Ad5DNA断片を用いてヒト胎児腎臓細胞から形質転換したものであり、かつE1タンパク質を恒常的に発現するものである(Graham et al., 1977)。E3領域はアデノウイルスゲノムには必須ではないため(Jones & Shenk, 1978)、現行のアデノウイルスベクターは、293細胞を利用することにより、E1領域、D3領域、またはその両方の領域に外来DNAを持つ(Graham & Prevec, 1991)。アデノウイルスベクターは、真核生物の遺伝子発現(Levrero et al., 1991; Gomez-Foix et al., 1992)及びワクチン開発(Grunhaus & Horwitz, 1992; Graham & Prevec, 1992)に用いられてきた。組み換えアデノウイルスを種々の組織に投与方法には、気管滴下注入(Rosenfeld et al., 1991、Rosenfeld et al., 1992)、筋肉注射(Ragot et al., 1993)、末梢静脈内注射(Herz & Gerard, 1993)、及び脳への定位接種(Le Gal La Salle et al., 1993)がある。臨床試験におけるAdベクターの使用例には、筋肉内注射による抗腫瘍免疫処置のためのポリヌクレオチド療法がある(Sterman et al., Hum. Gene Ther. 7:1083-9 (1998))。

【0284】

種々の実施形態では、抗CD79ACARをコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドを、該1つまたは複数のポリヌクレオチドを含む単純ヘルペスウイルス(例えば、HSV-1、HSV-2)を用いて免疫エフェクター細胞に形質導入することによって、細胞に組み込む。

【0285】

成熟HSVビリオンは、152kbの直鎖二本鎖DNA分子からなるウイルスゲノムを有するエンベロープ正二十面体カプシドから構成されている。一実施形態では、HSVベースのウイルスベクターは、1つまたは複数の必須HSV遺伝子または非必須HSV遺伝子を欠損している。一実施形態では、HSVベースのウイルスベクターは複製欠損性である。複製欠損HSVベクターのほとんどは、1つまたは複数の中間初期、初期、または後期のHSV遺伝子を排除する欠失を備えており、複製を妨げている。例えば、HSVベクターは、ICP4、ICP22、ICP27、ICP47、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される最初期遺伝子が欠失している場合がある。HSVベクターの利点は、長期DNA発現をもたらすことができる潜伏段階に進めることができること、及び最大25kbの外因性DNAインサートを組み込むことができる大型ウイルスDNAゲノムであることである。HSVベースのベクターについては、例えば、米国特許第5,837,532号、同第5,846,782号、及び同第5,804,413号、ならびに国際公開第91/02788号、同第96/04394号、同第98/15637号、及び同第99/06583号に記載されており、これらの特許文献の各々はその全体が参照により本明細書に援用される。

【0286】

F. 遺伝子改変細胞

種々の実施形態では、本明細書で考察されているC A Rを発現するように遺伝子改変された細胞であって、癌の治療に使用する細胞が提供されている。「遺伝子操作」または「遺伝子改変」という用語は、本明細書で使用する場合、D N A形態またはR N A形態の別の遺伝子材料を、細胞の全遺伝子材料に付加することを意味する。「遺伝子改変細胞」、「改変細胞」、及び「リダイレクト細胞」という用語は交換可能に使用される。用語「遺伝子療法」は、本明細書で使用する場合、D N A形態またはR N A形態の別の遺伝子材料を細胞の全遺伝子材料に導入し、遺伝子の発現を回復するか、修復するか、もしくは改変するか、または治療用ポリペプチド、例えばC A Rを発現させることを意味する。

【0287】

特定の実施形態では、本明細書で考察されている抗C D 7 9 A C A Rを免疫エフェクター細胞に導入しかつ発現させて、目的の標的抗原、例えばC D 7 9 Aポリペプチドに対する特異性をリダイレクトさせている。「免疫エフェクター細胞」は、1つまたは複数のエフェクター機能（例えば、細胞傷害性細胞の殺傷活性、サイトカインの分泌、A D C C及び／またはC D Cの誘導）を持つ免疫系の任意の細胞である。本明細書で考察されている免疫エフェクター細胞の例はTリンパ球であり、以下に限定されないが、細胞傷害性T細胞（C T L、C D 8 ⁺ T細胞）、T I L、及びヘルパーT細胞（H T L、C D 4 ⁺ T細胞）などがある。特定の実施形態では、細胞はα β T細胞を含む。特定の実施形態では、細胞はγ δ T細胞を含む。一実施形態では、免疫エフェクター細胞はナチュラルキラー（N K）細胞を含む。一実施形態では、免疫エフェクター細胞はナチュラルキラーT（N K T）細胞を含む。

【0288】

免疫エフェクター細胞は、自家性／自律性（「自己」）であっても、非自家性（「非自己」、例えば同種、同系、または異種）であってもよい。「自家」は、本明細書で使用する場合、同一対象由来の細胞を意味する。「同種」は、本明細書で使用する場合、対照の細胞に対して遺伝学的に異なる同一種類の細胞を意味する。「同系」は、本明細書で使用する場合、対照の細胞に対して遺伝学的に同一である異なる対象の細胞を意味する。「異種」は、本明細書で使用する場合、対照の細胞に対して異なる種類の細胞を意味する。好ましい実施形態では、細胞は同種である。

【0289】

特定の実施形態で考察されている抗C D 7 9 A C A Rと共に用いられる免疫エフェクター細胞の例には、Tリンパ球が含まれる。「T細胞」または「Tリンパ球」という用語は、当該技術分野で認知されており、胸腺細胞、未成熟Tリンパ球、成熟Tリンパ球、休止Tリンパ球、または活性化Tリンパ球を含むことを意図するものである。T細胞は、Tヘルパー（T h）細胞、例えば、Tヘルパー1（T h 1）細胞またはTヘルパー2（T h 2）細胞であってもよい。T細胞は、ヘルパーT細胞（H T L、C D 4 ⁺ T細胞）C D 4 ⁺ T細胞、細胞傷害性T細胞（C T L、C D 8 ⁺ T細胞）、C D 4 ⁺ C D 8 ⁺ T細胞、C D 4 ⁻ C D 8 ⁻ T細胞、または任意の他のT細胞サブセットであってもよい。特定の実施形態で使用するのに適したT細胞の他の例として、ナイーブT細胞（T N）、Tメモリー幹細胞（T S C M）、セントラルメモリーT細胞（T C M）、エフェクターメモリーT細胞（T E M）、及びエフェクターT細胞（T E F F）が挙げられる。

【0290】

当業者に理解されるように、免疫エフェクター細胞として、本明細書で考察されている抗C D 7 9 A C A Rと共に他の細胞を用いることもできる。特に、免疫エフェクター細胞には、N K細胞、N K T細胞、好中球、及びマクロファージも含まれる。また、免疫エフェクター細胞には、エフェクター細胞の前駆体も含まれ、こうした前駆体細胞は、i n v i v oまたはi n v i t r oで免疫エフェクター細胞に分化するように誘導され得る。したがって、特定の実施形態では、免疫エフェクター細胞には、臍帯血、骨髓、または動員末梢血液由来のC D 3 4 ⁺細胞群に含まれる造血幹細胞（H S C）などの免疫エフェクター細胞の前駆体が含まれ、対象に投与すると成熟免疫エフェクター細胞に分化するか

、または成熟免疫エフェクター細胞に分化するように *in vitro* で誘導され得る。

CD79A 特異的 CAR を含むように遺伝子操作された免疫エフェクター細胞は、本明細書で使用する場合、「CD79A 特異性リダイレクト免疫エフェクター細胞」と称されることがある。

【0291】

用語「CD34⁺細胞」は、本明細書で使用する場合、CD34 タンパク質を細胞表面で発現する細胞を意味する。「CD34」は、本明細書で使用する場合、一般的に細胞間接着因子として作用し、かつ T 細胞がリンパ節に入ることに関与する、細胞表面糖タンパク質（例えば、シアロムチンタンパク質）を意味する。CD34⁺細胞群は、造血幹細胞（HSC）を含み、患者に投与すると分化するものであり、T 細胞、NK 細胞、NK T 細胞、好中球、及び単球／マクロファージ系の細胞などの全造血系に関わっている。

10

【0292】

本明細書で考察されている抗 CD79A CAR を発現する免疫エフェクター細胞の作製方法については、特定の実施形態に記載されている。一実施形態では、該方法には、個体から単離した免疫エフェクター細胞をトランスフェクトするか、または形質導入することで、免疫エフェクター細胞に、本明細書で考察されている 1 つまたは複数の抗 CD79A CAR を発現させることが含まれる。特定の実施形態では、免疫エフェクター細胞は個体から単離され、*in vitro* でさらに操作をすることなく遺伝子改変される。こうした細胞を、個体に直接再投与することができる。さらなる実施形態では、免疫エフェクター細胞をまず活性化かつ刺激し、*in vitro* で増殖してから、抗 CD79A CAR を発現するように遺伝子改変する。この点に関して、免疫エフェクター細胞を、遺伝子改変する（すなわち、本明細書で考察されている抗 CD79A CAR を発現するように形質導入またはトランスフェクトする）前及び／または遺伝子改変した後に培養することができる。

20

【0293】

特定の実施形態では、本明細書に記載の免疫エフェクター細胞を *in vitro* で操作または遺伝子改変する前に、細胞の採取源を対象から得る。特定の実施形態では、CAR 改変免疫エフェクター細胞は T 細胞を含む。

【0294】

特定の実施形態では、PBMC は、本明細書で考察されている方法を用いて、抗 CD79A CAR を発現するように直接遺伝子改変されてもよい。ある実施形態では、PBMC を単離した後に、T リンパ球をさらに単離している。また、ある実施形態では、遺伝子改変及び／もしくは増殖の前または後のいずれかに、細胞傷害性 T リンパ球とヘルパー T リンパ球とを、ナイーブ T 細胞、メモリー T 細胞、及びエフェクター T 細胞の亜群に分類することができる。

30

【0295】

T 細胞などの免疫エフェクター細胞を、既知の方法を用いて単離した後に遺伝子改変することができるか、または、遺伝子改変する前に、免疫エフェクター細胞を *in vitro* で活性化かつ増殖（または、前駆体の場合には分化）することができる。特定の実施形態では、T 細胞などの免疫エフェクター細胞を、本明細書で考察されているキメラ抗原受容体を用いて遺伝子改変し（例えば、抗 CD79A CAR をコードする核酸を含むウイルスベクターで形質導入し）、続いて *in vitro* で活性化かつ増殖する。種々の実施形態では、例えば、米国特許第 6,352,694 号、同第 6,534,055 号、同第 6,905,680 号、同第 6,692,964 号、同第 5,858,358 号、同第 6,887,466 号、同第 6,905,681 号、同第 7,144,575 号、同第 7,067,318 号、同第 7,172,869 号、同第 7,232,566 号、同第 7,175,843 号、同第 5,883,223 号、同第 6,905,874 号、同第 6,797,514 号、同第 6,867,041 号、及び米国特許出願公開第 20060121005 号に記載されている方法を用いて、CAR を発現するように遺伝子改変する前または遺伝子改変した後に、T 細胞を活性化及び増殖してもよい。

40

50

【0296】

一実施形態では、CD34⁺細胞は、本明細書で考察されている核酸構築物を用いて形質導入される。特定の実施形態では、形質導入されたCD34⁺細胞は、対象に、通例では単離した細胞を採取した対象に投与された後、*in vivo*で成熟免疫エフェクター細胞に分化する。別の実施形態では、CD34⁺細胞は、本明細書に記載されているように、CARに曝露される前、またはCARで遺伝子改変された後に、以下のサイトカインである、Flt-3リガンド (FLT3)、幹細胞因子 (SCF)、巨核球増殖分化因子 (TPO)、IL-3、及びIL-6のうちの1つまたは複数を用いて、前述した方法に従って*in vitro*で刺激されてもよい (Asheuer et al., 2004; Imren, et al., 2004)。

10

【0297】

特定の実施形態では、癌の治療のための改変した免疫エフェクター細胞群には、本明細書で考察されているCARが含まれる。例えば、改変した免疫エフェクター細胞群は、本明細書に記載のB細胞悪性腫瘍を有すると診断された患者 (自家ドナー) から得た末梢血単核球 (PBMC) から調製される。PBMCは、CD4⁺、CD8⁺、またはCD4⁺及びCD8⁺となり得るTリンパ球の不均一な群を形成している。

【0298】

PBMCは、NK細胞またはNK T細胞などの他の細胞傷害性リンパ球も含む場合がある。特定の実施形態で考察されているCARのコード配列を持つ発現ベクターを、ヒトドナーT細胞群、NK細胞群、またはNK T細胞群に導入する。特定の実施形態では、発現ベクターを持つ形質導入T細胞を、フローサイトメトリーを用いて分類して、CD3陽性T細胞を単離することができ、続いてさらに増殖して、CARタンパク質発現T細胞の数を増やすことができ、また抗CD3抗体及び／もしくは抗CD28抗体ならびにIL-2、または本明細書のいずれかに記載の当該技術分野で公知の任意の方法を用いて細胞活性化を増強することができる。CARタンパク質T細胞を発現するT細胞を、保管用及び／またはヒト対象に使用するための調製用として、標準的な手順を用いて凍結保存する。一実施形態では、T細胞の*in vitro*形質導入、培養、及び／または増殖を、ウシ胎仔血清及びウシ胎児血清などの非ヒト動物由来産物を用いずに行う。PBMCの不均一な群が遺伝子改変されるため、得られる形質導入された細胞は、本明細書で考察されている抗CD79ACARを含む改変細胞の不均一な群となる。

20

30

【0299】

さらなる実施形態では、種々 (例えば、1個、2個、3個、4個、5個、またはそれ以上) の異なる発現ベクターの混合物を、免疫エフェクター細胞のドナー群を遺伝子改変するのに用いることができ、各ベクターは、本明細書で考察されている種々のキメラ抗原受容体タンパク質をコードする。得られた改変免疫エフェクター細胞は、2つ以上の異なるCARタンパク質を発現する改変細胞群により改変細胞の混合群を形成している。

【0300】

G. T細胞製造方法

種々の実施形態では、遺伝子改変T細胞を、CD3TCR複合体関連シグナルを刺激する薬剤と、T細胞の表面で共刺激分子を刺激するリガンドとを接触させることにより増殖させる。

40

【0301】

特定の実施形態では、PBMCまたは単離されたT細胞を、IL-2、IL-7、及び／またはIL-15などの適切なサイトカインを含む培地において、溶解性の抗CD3抗体及び抗CD28抗体、またはビーズもしくは他の表面に結合した抗体などの刺激性薬剤及び共刺激性薬剤と接触させる。

【0302】

特定の実施形態では、PBMCまたは単離されたT細胞を、IL-2、IL-7、及び／もしくはIL-15などの適切なサイトカイン、ならびに／またはPI3K/Akt/mTOR細胞シグナル伝達経路を調節する1つもしくは複数の薬剤を含む培地において、

50

溶解性の抗CD3抗体及び抗CD28抗体、またはビーズもしくは他の表面に結合した抗体などの刺激性薬剤及び共刺激性薬剤と接触させる。

【0303】

好ましい実施形態では、本明細書で考察されている方法で製造されたT細胞は、改良された養子免疫療法組成物を提供する。いかなる特定の理論に束縛されることも望まないが、本明細書で考察されている特定の実施形態の方法で製造されたT細胞組成物は、生存率の増加、相対的に分化しない傾向の増加、及び*in vivo*での持続性などの優れた特性を持つと考えられる。一実施形態では、T細胞の製造方法には、T細胞と、PI3K細胞シグナル伝達経路を調節する1つまたは複数の薬剤とを接触させることを含む。一実施形態では、T細胞の製造方法には、T細胞と、PI3K/Akt/mTOR細胞シグナル伝達経路を調節する1つまたは複数の薬剤とを接触させることを含む。種々の実施形態では、T細胞は任意の供給源から得ることができ、製造プロセスの活性化段階及び／または増殖段階の間に薬剤と接触させることができる。得られたT細胞組成物は、以下のバイオマーカーであるCD62L、CCR7、CD28、CD27、CD122、CD127、CD197、CD38、及びCD8のうちの1つまたは複数を増殖かつ発現することができる発生的に強力なT細胞に富む。一実施形態では、1つまたは複数のPI3K阻害剤で処理されたT細胞を含む細胞群には、以下のバイオマーカーである、CD62L、CD127、CD197、及びCD38のうちの1つもしくは複数、または全てを共発現するCD8⁺T細胞群が多く含まれている。

10

【0304】

一実施形態では、1つまたは複数のPI3K阻害剤で処理されたT細胞を含む細胞群には、以下のバイオマーカーである、CD62L、CD127、CD27、及びCD8のうちの1つもしくは複数、または全てを共発現するCD8⁺T細胞群が多く含まれている。

20

【0305】

一実施形態では、増殖レベルを保持し、かつ分化を減少させた改変T細胞を製造している。特定の実施形態では、1つまたは複数の刺激性シグナルとPI3K細胞シグナル伝達経路の阻害剤である薬剤との存在下で活性化しかつ増殖するようにT細胞を刺激することによって、T細胞を製造する。

【0306】

続いて、抗CD79ACARを発現するようにT細胞を改変することができる。一実施形態では、本明細書で考察されている抗CD79ACARを含むウイルスベクターでT細胞を形質導入することにより、T細胞を改変する。特定の実施形態では、PI3K細胞シグナル伝達経路の阻害剤の存在下で刺激及び活性化する前に、T細胞を改変する。別の実施形態では、PI3K細胞シグナル伝達経路の阻害剤の存在下で刺激及び活性化した後、T細胞を改変する。特定の実施形態では、PI3K細胞シグナル伝達経路の阻害剤の存在下で刺激及び活性化してから12時間、24時間、36時間、または48時間以内に、T細胞を改変する。

30

【0307】

T細胞を活性化させた後に、細胞を培養して増殖する。T細胞は、1回、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、もしくは10回、またはそれ以上の増殖サイクルで、少なくとも1日間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、もしくは7日間、少なくとも2週間、少なくとも1カ月間、2カ月間、3カ月間、4カ月間、5カ月間、もしくは6カ月間、またはそれ以上の間、培養することができる。

40

【0308】

種々の実施形態では、T細胞組成物を、PI3K/Akt/mTOR細胞シグナル伝達経路の1つまたは複数の阻害剤の存在下で製造する。阻害剤は、該経路において1つまたは複数の活性を標的にしても、単一の活性を標的にしてもよい。いかなる特定の理論に束縛されることも望まないが、製造プロセスの刺激段階、活性化段階、及び／または増殖段階の間に、PI3K経路の1つまたは複数の阻害剤で処理するか、または該阻害剤とT細胞を接触させることにより、優先的に幼若T細胞が増え、優れた治療用T細胞組成物が得

50

られると考えられる。

【0309】

特定の実施形態では、操作されたT細胞受容体を発現するT細胞の増殖を増やす方法が提供されている。こうした方法には、例えば、対象由来のT細胞の供給源を採取することと、PI3K経路の1つまたは複数の阻害剤がある状態でT細胞を刺激かつ活性化することと、抗CD79ACARを発現するようにT細胞を改変することと、T細胞を培養液中で増殖させることが含まれ得る。

【0310】

特定の実施形態では、以下のバイオマーカーである、CD62L、CCR7、CD28、CD27、CD122、CD127、CD197、CD38、及びCD8のうちの1つまたは複数を発現させるために濃縮されたT細胞群を産生する方法が考察されている。一実施形態では、幼若T細胞には、バイオマーカーCD62L、CD127、CD197、及びCD38のうちの1つもしくは複数、または全てが含まれる。

10

【0311】

一実施形態では、幼若T細胞には、バイオマーカーCD62L、CD127、CD27、及びCD8のうちの1つもしくは複数、または全てが含まれる。

【0312】

一実施形態では、CD57、CD244、CD160、PD-1、CTLA4、TIM3、及びLAG3を発現しない幼若T細胞が提供されている。本明細書のいずれかで論じているように、幼若T細胞バイオマーカーの発現レベルは、より分化したT細胞または免疫エフェクター細胞群のバイオマーカーの発現レベルと相関する。

20

【0313】

一実施形態では、本明細書で考察されているT細胞製造方法において、末梢血単核球(PBMC)をT細胞の供給源として用いる。PBMCは、CD4⁺、CD8⁺、またはCD4⁺及びCD8⁺となり得るTリンパ球の不均一な群を形成し、単球、B細胞、NK細胞、及びNKT細胞などの他の単核細胞を含み得る。特定の実施形態で考察されている操作されたTCRまたはCARをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを、ヒトドナーT細胞群、NK細胞群、またはNKT細胞群に導入する。特定の実施形態では、発現ベクターを持つ形質導入T細胞を、フローサイトメトリーを用いて分類して、CD3陽性T細胞を単離することができ、続いてさらに増殖して改変T細胞の数を増やすことができ、また抗CD3抗体及び／または抗CD28抗体、ならびにIL-2、IL-7及び／またはIL-15により細胞活性化を増強することができる。

30

【0314】

本明細書で考察されている製造方法には、ヒト対象に使用するための保管用及び／または調製用の改変T細胞の凍結保存法も含まれ得る。一実施形態では、CD79A発現細胞を標的にする、遺伝子改変マウスCARタンパク質、ヒトCARタンパク質、またはヒト化CARタンパク質を発現する免疫エフェクター細胞を保存する方法には、免疫エフェクター細胞を、解凍時に生存したままになるように凍結保存することが含まれる。CARタンパク質を発現する免疫エフェクター細胞の画分を、当該技術分野で公知の方法により冷凍保存して、CD79A発現癌細胞を持つ患者の将来の治療用としての細胞の継続的な供給源とすることができる。T細胞は、解凍時に生存したままになるように凍結保存される。必要な場合には、凍結保存された形質転換免疫エフェクター細胞を増やすために、解凍、成長、及び増殖させることができる。「凍結保存」は、本明細書で使用する場合、例えば(通例)77K、すなわち-196℃氷点下温度(液体窒素の沸点)まで冷却することによる細胞の保存を意味する。保存した細胞が、低温度で凍結されたり、室温まで温度上昇したりすることによって損傷するのを防ぐために、氷点下温度では凍結保護剤を用いることが多い。凍結保護剤及び最適な冷却速度により、細胞損傷から保護することができる。使用できる凍結保護剤として、以下に限定されないが、ジメチルスルホキシド(DMSO)(Lovelock and Bishop, Nature, 1959; 183: 1394-1395, Ashwood-Smith, Nature, 1961; 190: 1204-1205)、グリセロール、ポリビニルピロリジン(Rinfret,

40

50

Ann. N.Y. Acad. Sci., 1960; 85: 576)、及びポリエチレングリコール (Sloviter and Ravdin, Nature, 1962; 196: 48) が挙げられる。好ましい冷却速度は、1℃/分～3℃/分である。少なくとも2時間後に、T細胞は-80℃まで達し、長期保存用として、例えば長期低温保存容器に入った液体窒素(-196℃)内に直接入れることができる。

【0315】

1. T細胞

改良されたCAR-T細胞組成物の製造については、特定の実施形態に記載されている。CAR-T細胞産生用に用いるT細胞は、自家性/自律性(「自己」)であっても、非自家性(「非自己」、例えば同種、同系、または異種)であってもよい。好ましい実施形態では、T細胞を哺乳動物対象から得る。さらに好ましい実施形態では、T細胞を霊長類対象から得る。最も好ましい実施形態では、T細胞をヒト対象から得る。

【0316】

T細胞を種々の供給源から得ることができるが、供給源の例として、以下に限定されないが、末梢血単核球、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位由来組織、腹水、胸水、脾臓組織、及び腫瘍が挙げられる。特定の実施形態では、当業者に知られた任意の様々な技術、例えば、沈降法、例としてFICOLL(商標)分離などを用いて、対象より採取した血液単位からT細胞を得ることができる。一実施形態では、個体の循環血液由来の細胞を、アフエレーシス法によって得る。アフエレーシス産物は通例、T細胞、単球、顆粒球、B細胞、他の有核白血球、赤血球、及び血小板などのリンパ球を含有する。一実施形態では、アフエレーシス法により採取した細胞を洗浄して、血漿画分を除去し、続いて処理するために細胞を適正な緩衝液または培地に入れることができる。細胞をPBSで洗浄するか、またはカルシウムやマグネシウム、及び二価カチオンをほとんど含まない他の適正な溶液で洗浄することができる。当業者によって認識されるように、洗浄工程は、半自動式のフロースルー遠心分離を用いるなど、当該技術分野で公知の方法により行うことができる。例えば、Cobe 2991細胞処理装置、Baxter CytoMateなどがある。洗浄した後に、種々の生体適合性緩衝液、または緩衝液を含有するもしくは含有しない他の生理食塩水に細胞を再懸濁することができる。特定の実施形態では、アフエレーシス試料の中の好ましくない成分を、細胞を直接再懸濁した培地において除去することができる。

【0317】

特定の実施形態では、T細胞を含む細胞群、例えばPBMCを、本明細書で考察されている製造方法で用いる。他の実施形態では、T細胞の単離した群または精製した群を、本明細書で考察されている製造方法で用いる。例えば、PERCOLL(商標)勾配による遠心分離を用いて、赤血球を溶解しかつ単球を枯渇させることにより、末梢血単核球(PBMC)から細胞を単離することができる。ある実施形態では、PBMCを単離した後、活性化、増殖、及び/もしくは遺伝子改変前または後のいずれかに、細胞傷害性Tリンパ球とヘルパーTリンパ球とを、ナイーブT細胞、メモリーT細胞、及びエフェクターT細胞の亜群に分類することができる。

【0318】

特定の実施形態では、T細胞を含む細胞群、例えばPBMCを、本明細書で考察されている製造方法で用いる。他の実施形態では、T細胞の単離した群または精製した群を、本明細書で考察されている製造方法で用いる。例えば、PERCOLL(商標)勾配による遠心分離を用いて、赤血球を溶解しかつ単球を枯渇させることにより、末梢血単核球(PBMC)から細胞を単離することができる。ある実施形態では、PBMCを単離した後、活性化、増殖、及び/もしくは遺伝子改変前または後のいずれかに、細胞傷害性Tリンパ球とヘルパーTリンパ球とを、ナイーブT細胞、メモリーT細胞、及びエフェクターT細胞の亜群に分類することができる。

【0319】

特定の実施形態では、本明細書に考察されている方法を用いてCARを発現するように遺伝子改変されているが、正の選択も負の選択も受けていないPBMCから、免疫エフェ

10

20

30

40

50

クター細胞群を製造する。ある実施形態では、P B M Cを単離した後に、Tリンパ球をさらに単離する。また、ある実施形態では、遺伝子改変及び／または増殖の前または後のいずれかに、細胞傷害性Tリンパ球とヘルパーTリンパ球とを、ナイーブT細胞、メモリーT細胞、及びエフェクターT細胞の亜群に分類することができる。

【0320】

特定の実施形態では、以下のマーカーC D 3、C D 4、C D 8、C D 2 8、C D 4 5 R A、C D 4 5 R O、C D 6 2、C D 1 2 7、及びH L A－D Rのうちの1つまたは複数を発現するT細胞の特定の亜集団を、正の選択技術または負の選択技術によりさらに単離することができる。一実施形態では、i) C D 6 2 L、C C R 7、C D 2 8、C D 2 7、C D 1 2 2、C D 1 2 7、及びC D 1 9 7、i i) C D 6 2 L、C D 1 2 7、C D 1 9 7、及びC D 3 8、またはi i i) C D 6 2 L、C D 1 2 7、C D 2 7、及びC D 8からなる群から選択される1つまたは複数のマーカーを発現するT細胞の特定の亜集団を、正の選択技術または負の選択技術によりさらに単離する。種々の実施形態では、製造されるT細胞組成物は、以下のマーカーC D 5 7、C D 2 4 4、C D 1 6 0、P D－1、C T L A 4、T I M 3、及びL A G 3のうちの1つまたは複数を発現しないか、または実質的に発現しない。

10

【0321】

一実施形態では、i) C D 6 2 L、C D 1 2 7、C D 1 9 7、及びC D 3 8、またはi i) C D 6 2 L、C D 1 2 7、C D 2 7、及びC D 8からなる群から選択されるマーカーのうちの1つまたは複数の発現が、P I 3 K阻害剤を用いずに活性化かつ増殖されたT細胞群に比べて、少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも25倍、またはそれ以上増加する。一実施形態では、T細胞はC D 8⁺ T細胞を含む。

20

【0322】

一実施形態では、C D 5 7、C D 2 4 4、C D 1 6 0、P D－1、C T L A 4、T I M 3、及びL A G 3からなる群から選択されるマーカーのうちの1つまたは複数の発現が、P I 3 K阻害剤を用いて活性化かつ増殖されたT細胞群に比べて、少なくとも1/1.5、少なくとも1/2、少なくとも1/3、少なくとも1/4、少なくとも1/5、少なくとも1/6、少なくとも1/7、少なくとも1/8、少なくとも1/9、少なくとも1/10、少なくとも1/25、またはそれ以上に減少する。一実施形態では、T細胞はC D 8⁺ T細胞を含む。

30

【0323】

一実施形態では、本明細書で考察されている製造方法により、ナイーブT細胞または発生的に強力なT細胞の1つまたは複数のマーカーを含むC A R－T細胞の数が増加する。いかなる特定の理論に束縛されることも望まないが、本発明者らは、T細胞を含む細胞群を1つまたは複数のP I 3 K阻害剤で処理することにより、発生的に強力なT細胞の増殖が増え、現行のC A R－T細胞療法に比べて、よりロバストで効果的な養子C A R－T細胞免疫療法がもたらされると考えている。

【0324】

特定の実施形態で考察されている方法を用いて製造したT細胞における、増加したナイーブT細胞または発生的に強力なT細胞のマーカーの具体例として、以下に限定されないが、i) C D 6 2 L、C D 1 2 7、C D 1 9 7、及びC D 3 8、またはi i) C D 6 2 L、C D 1 2 7、C D 2 7、及びC D 8が挙げられる。特定の実施形態では、ナイーブT細胞は、以下のマーカーC D 5 7、C D 2 4 4、C D 1 6 0、P D－1、B T L A、C D 4 5 R A、C T L A 4、T I M 3、及びL A G 3のうちの1つまたは複数を発現しないか、または実質的に発現しない。

40

【0325】

T細胞に関して、本明細書で考察されている様々な増殖方法で得られたT細胞群は、使用する状況によっては、特定の様々な表現型特性を持つことがある。種々の実施形態では

50

、増殖したT細胞群には、以下の表現型マーカーであるCD62L、CD27、CD127、CD197、CD38、CD8、及びHLA-DRのうちの1つまたは複数が含まれる。

【0326】

一実施形態において、こうした表現型マーカーでは、CD62L、CD127、CD197、及びCD38のうちの1つもしくは複数、または全ての発現が増強されている。特定の実施形態では、CD62L、CD127、CD197、及びCD38を含めたナイーブT細胞の表現型マーカーの発現によって特徴付けられる、CD8⁺Tリンパ球を増殖する。

【0327】

一実施形態において、こうした表現型マーカーでは、CD62L、CD127、CD27、及びCD8のうちの1つもしくは複数、または全ての発現が増強されている。特定の実施形態では、CD62L、CD127、CD27、及びCD8を含めたナイーブT細胞の表現型マーカーの発現によって特徴付けられる、CD8⁺Tリンパ球を増殖する。

【0328】

特定の実施形態では、CD45RO、CD62L、CD127、CD197、及びCD38を含むセントラルメモリーT細胞の表現型マーカーの発現によって特徴付けられ、かつグランザイムBに対して陰性である、T細胞を増殖する。ある実施形態では、セントラルメモリーT細胞はCD45RO⁺T細胞、CD62L⁺T細胞、CD8⁺T細胞である。

【0329】

特定の実施形態では、CD62Lを含むナイーブCD4⁺細胞の表現型マーカーの発現によって特徴付けられ、かつCD45RA及び／またはCD45ROの発現に対して陰性である、CD4⁺Tリンパ球を増殖する。ある実施形態では、CD4⁺細胞は、CD62Lを含むセントラルメモリーCD4⁺細胞の表現型マーカーの発現によって特徴付けられ、かつCD45RO陽性である。ある実施形態では、エフェクターCD4⁺細胞はCD62L陽性かつCD45RO陰性である。

【0330】

特定の実施形態では、T細胞は、個体から単離され、活性化かつ刺激されて、*in vitro*で増殖してから、抗CD79ACARを発現するように遺伝子改変される。この点に関して、T細胞を、遺伝子改変する（すなわち、本明細書で考察されている抗CD79ACARを発現するように形質導入またはトランスフェクトする）前及び／または遺伝子改変した後に培養することができる。

【0331】

2. 活性化及び増殖

T細胞組成物の十分な治療用量を得るために、多くの場合、T細胞に1回または複数回のサイクルの刺激、活性化、及び／または増殖を受けさせる。一般的に以下の文献に記載された方法を用いて、T細胞を活性化及び増殖することができ、例えば、該方法は、米国特許第6,352,694号、同第6,534,055号、同第6,905,680号、同第6,692,964号、同第5,858,358号、同第6,887,466号、同第6,905,681号、同第7,144,575号、同第7,067,318号、同第7,172,869号、同第7,232,566号、同第7,175,843号、同第5,883,223号、同第6,905,874号、同第6,797,514号、及び同第6,867,041号に記載されており、これらの特許の各々はその全体が参照により本明細書に援用される。抗CD79ACARを発現するように改変されるT細胞を、T細胞を改変する前及び／または改変した後に活性化及び／または増殖することができる。さらに、T細胞を、活性化及び／または増殖の前か、その間か、及び／またはその後に、PI3K/Akt/mTOR細胞シグナル伝達経路を調節する1つまたは複数の薬剤と接触させてもよい。一実施形態では、本明細書で考察されている方法で製造されたT細胞を、1回、2回、3回、4回、もしくは5回、またはそれ以上のサイクルで活性化及び増殖し、

10

20

30

40

50

そのサイクルの各々が P I 3 K / A k t / m T O R 細胞シグナル伝達経路を調節する 1 つまたは複数の薬剤を含んでいてもよい。

【0332】

人工抗原提示細胞 (a A P C) は、天然の A P C を使用する場合と異なり、外因性サイトカインの添加を必要とすることなく、機能的ヒト C D 8 ⁺ T 細胞の e x v i v o 成長と長期増殖とを維持させる。特定の実施形態では、P B M C または単離された T 細胞を、I L - 2、I L - 7、及び／または I L - 1 5 などの適切なサイトカインを含む培地において、通例ビーズまたは他の表面に結合した抗 C D 3 抗体及び抗 C D 2 8 抗体などの刺激性薬剤及び共刺激性薬剤と接触させる。

【0333】

10

他の実施形態では、人工 A P C (a A P C) は、種々の共刺激分子及びサイトカインの安定性の高い発現及び分泌を誘導するように、K 5 6 2 細胞、U 9 3 7 細胞、7 2 1 . 2 2 1 細胞、T 2 細胞、及び C 1 R 細胞を操作することによって作製されている。特定の実施形態では、K 3 2 または U 3 2 の a A P C を用いて、a A P C 細胞表面における 1 つまたは複数の抗体ベースの刺激性分子の提示を誘導する。C D 1 3 7 L (4 - 1 B B L)、C D 1 3 4 L (O X 4 0 L)、及び／または C D 8 0 もしくは C D 8 6 を含むがこれらに限定されない種々の共刺激分子を発現する a A P C により、T 細胞群を増殖することができる。a A P C は、遺伝子改変 T 細胞を増殖し、かつ C D 8 ⁺ T 細胞での C D 2 8 発現を保持する、効果的なプラットフォームを提供するものである。国際公開第 0 3 / 0 5 7 1 7 1 号、米国特許出願公開第 2 0 0 3 / 0 1 4 7 8 6 9 号に記載されている a A P C につ

20

【0334】

一実施形態では、共刺激リガンドは、T 細胞の同種共刺激分子に特異的に結合する抗原提示細胞 (例えば、a A P C、樹状細胞、B 細胞など) に提示され、それにより、例えば、T C R / C D 3 複合体の結合によって付与される一次シグナルに加えて、所望の T 細胞応答を媒介するシグナルを付与する。適切な共刺激リガンドには、以下に限定されないが、C D 7、B 7 - 1 (C D 8 0)、B 7 - 2 (C D 8 6)、4 - 1 B B L、O X 4 0 L、誘導性共刺激リガンド (I C O S - L)、細胞間接着分子 (I C A M)、C D 3 0 L、C D 4 0、C D 7 0、C D 8 3、H L A - G、M I C A、M I C B、H V E M、リンホトキシンベータ受容体、I L T 3、I L T 4 と、T o l l リガンド受容体に結合するアゴニストまたは抗体と、B 7 - H 3 に特異的に結合するリガンドとが挙げられる。

30

【0335】

特定の実施形態では、共刺激リガンドは、T 細胞に提示される共刺激分子に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片を含み、以下に限定されないが、C D 2 7、C D 2 8、4 - 1 B B、O X 4 0、C D 3 0、C D 4 0、I C O S、リンパ球機能関連抗原 1 (L F A - 1)、C D 7、L I G H T、N K G 2 C、B 7 - H 3 と、C D 8 3 に特異的に結合するリガンドとを含む。

【0336】

適切な共刺激リガンドは、標的抗原をさらに含み、該抗原は、可溶型であってもよく、または改変 T 細胞で発現した改変 T C R または C A R を結合させる A P C もしくは a A P C で発現されてもよい。

40

【0337】

種々の実施形態では、本明細書で考察されている T 細胞の製造方法には、T 細胞を含む細胞群を活性化し、T 細胞群を増殖させることを含む。T 細胞の T C R / C D 3 複合体を介して、または C D 2 表面タンパク質の刺激を介して、一次刺激シグナルを与えることにより、かつ例えば C D 2 8 などのアクセサリ分子を介して二次共刺激シグナルを与えることにより、T 細胞を活性化することができる。

【0338】

T 細胞と、適切な C D 3 結合剤、例えば、C D 3 リガンドまたは抗 C D 3 モノクローナル抗体などとを接触させることにより、T C R / C D 3 複合体を刺激することができる。

50

C D 3 抗体の具体例として、以下に限定されないが、O K T 3、G 1 9 - 4、B C 3、及び 6 4 . 1 が挙げられる。

【 0 3 3 9 】

別の実施形態では、C D 2 結合剤を用いて、一次刺激シグナルを T 細胞に付与することができる。C D 2 結合剤の具体例として、以下に限定されないが、C D 2 リガンド及び抗 C D 2 抗体が挙げられ、例えば、T 1 1 . 1 抗体と組み合わせた T 1 1 . 3 抗体または T 1 1 . 2 抗体と組み合わせた T 1 1 . 3 抗体 (Meuer, S. C. et al. (1984) Cell 36:897-906)、及び 9 - 1 抗体と組み合わせた 9 . 6 抗体 (T I 1 . 1 と同じエピトープを認識するもの) (Yang, S. Y. et al. (1986) J. Immunol. 137:1097-1100) が挙げられる。上述した抗体のいずれかと同じエピトープに結合する他の抗体を使用することもできる。さらなる抗体または抗体の組み合わせを調製し、本明細書のいずれかに記載の標準的な方法により同定することができる。

10

【 0 3 4 0 】

T 細胞応答の誘導には、T C R / C D 3 複合体を介してまたは C D 2 を介して付与される一次刺激シグナルに加えて、第 2 の共刺激シグナルが必要になる。特定の実施形態では、C D 2 8 結合剤を用いて、共刺激シグナルを付与することができる。C D 2 8 結合剤の具体例として、以下に限定されないが、天然 C D 2 8 リガンド、例えば、C D 2 8 の天然リガンド (例として、B 7 - 1 (C D 8 0) 及び B 7 - 2 (C D 8 6) などのタンパク質 B 7 ファミリーのメンバー、ならびに C D 2 8 分子を架橋可能な抗 C D 2 8 モノクローナル抗体またはその断片、例えば、モノクローナル抗体 9 . 3、B - T 3、X R - C D 2 8、K O L T - 2、1 5 E 8、2 4 8 . 2 3 . 2、及び E X 5 . 3 D 1 0 など) が挙げられる。

20

【 0 3 4 1 】

一実施形態では、一次刺激シグナルを与える分子、例えば、T C R / C D 3 複合体を介してまたは C D 2 を介して刺激を与える分子と、共刺激分子とが、同一表面で結合している。

【 0 3 4 2 】

特定の実施形態では、刺激性シグナルと共刺激シグナルとを与える結合剤を細胞表面上に局在化させる。結合剤をコードする核酸を用いて、細胞を細胞表面での発現に適した形態でトランスフェクトもしくは形質導入することにより、または結合剤を細胞表面と結合させることにより、局在化させることができる。

30

【 0 3 4 3 】

別の実施形態では、一次刺激シグナルを与える分子、例えば、T C R / C D 3 複合体を介してまたは C D 2 を介して刺激を与える分子と、共刺激分子とが、抗原提示細胞に提示されている。

【 0 3 4 4 】

一実施形態では、一次刺激シグナルを与える分子、例えば、T C R / C D 3 複合体を介してまたは C D 2 を介して刺激を与える分子と、共刺激分子とが、別々の表面に与えられている。

【 0 3 4 5 】

特定の実施形態では、刺激性シグナルと共刺激シグナルとを与える結合剤のうちの一方が溶解性 (溶液で供給されるもの) であり、他方の薬剤は 1 つまたは複数の表面上に供給される。

40

【 0 3 4 6 】

特定の実施形態では、刺激性シグナルと共刺激シグナルとを与える結合剤は共に溶解形態で供給される (溶液で供給される)。

【 0 3 4 7 】

種々の実施形態では、本明細書で考察されている T 細胞の製造方法には、T 細胞を抗 C D 3 抗体及び抗 C D 2 8 抗体で活性化することが含まれる。

【 0 3 4 8 】

50

特定の実施形態で考察されている方法で製造したT細胞組成物には、P I 3 K細胞シグナル伝達経路を阻害する1つまたは複数の薬剤の存在下で活性化及び／または増殖されたT細胞が含まれる。抗C D 7 9 A C A Rを発現するように改変されるT細胞を、T細胞を改変する前及び／または改変した後に活性化及び増殖することができる。特定の実施形態では、T細胞群を活性化し、抗C D 7 9 A C A Rを発現するように改変してから、増殖するために培養する。

【0349】

一実施形態において、本明細書で考察されている方法で製造されたT細胞では、高い増殖ポテンシャルと自己複製能とを示すマーカーを発現するが、T細胞分化のマーカーを発現しないか、または実質的に検出不可能なT細胞分化のマーカーしか発現しない、T細胞の数が増加する。これらのT細胞をロバストな方法で繰り返し活性化かつ増殖して、改良された治療用T細胞組成物を提供することができる。

10

【0350】

一実施形態では、P I 3 K細胞シグナル伝達経路を阻害する1つまたは複数の薬剤の存在下で活性化かつ増殖されたT細胞群は、P I 3 K阻害剤を用いずに活性化かつ増殖されたT細胞群に比べて、少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも25倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも250倍、少なくとも500倍、少なくとも1000倍、またはそれ以上増殖する。

20

【0351】

一実施形態では、P I 3 K細胞シグナル伝達経路を阻害する1つまたは複数の薬剤の存在下で幼若T細胞が活性化かつ増殖されていることを示すマーカーの発現によって特徴付けられるT細胞群は、P I 3 K阻害剤を用いずに活性化かつ増殖されたT細胞群に比べて、少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも25倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも250倍、少なくとも500倍、少なくとも1000倍、またはそれ以上増殖する。

【0352】

一実施形態では、本明細書で考察されている方法により活性化されたT細胞を増殖することは、T細胞を含む細胞群を、数時間（約3時間）から約7日～約28日の間、またはその間の任意の1時間単位の整数値で表される時間の間、培養することをさらに含む。別の実施形態では、T細胞組成物を14日間培養することができる。特定の実施形態では、T細胞を約21日間培養する。別の実施形態では、T細胞組成物を約2日間～3日間培養する。また、T細胞の培養時間が60日以上になるように、刺激／活性化／増殖の複数サイクルが望ましい場合がある。

30

【0353】

特定の実施形態では、T細胞培養に適した条件には、適正な培地（例えば、Minimal Essential Media、またはRPMI Media 1640、またはX-vivo 15（Lonza製））、ならびに増殖及び生存能に必要な1つまたは複数の要素が含まれ、該要素には、以下に限定されないが、血清（例えば、ウシ胎仔血清またはヒト血清）、インターロイキン-2（IL-2）、インスリン、IFN- γ 、IL-4、IL-7、IL-21、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF β 、及びTNF- α 、または当業者に公知の細胞増殖に適した任意の他の添加剤などがある。

40

【0354】

細胞培地のさらなる具体例として、以下に限定されないが、RPMI 1640、Clicks、AIM-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-Vivo 15、及びX-Vivo 20、Optimiserが挙げられ、アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム、及びビタミンが添加されており、無血清であっても、適正な量の血清（または血漿）もしくは典型的な一連のホルモン、ならびに／またはT細胞を成長及び増殖させるのに十分

50

な量のサイトカインで補充されていてもよい。

【0355】

T細胞を増殖させるための他の添加剤の具体例として、以下に限定されないが、界面活性剤と、ピアスマネート (pimasmanate) と、H E P E Sなどのp H緩衝液と、Nーアセチル化ーシステイン及び2ーメルカプトエタノールなどの還元剤とが挙げられる。

【0356】

対象に注入される予定の細胞培養液の中ではなく、実験培養液の中にのみ、ペニシリン及びストレプトマイシンなどの抗生物質が含まれている。増殖を維持させるのに必要な条件下、例えば、適正な温度（例として37℃）及び雰囲気（例として空気+5%CO₂）下で、標的細胞を保持する。

【0357】

3. 薬剤

種々の実施形態では、T細胞とT細胞内のPI3K経路を調節する薬剤とを接触させることを含む、未分化T細胞または発生的に強力なT細胞を増殖するT細胞の製造方法が提供されている。種々の実施形態では、T細胞とT細胞内のPI3K/Akt/mTOR経路を調節する薬剤とを接触させることを含む、未分化T細胞または発生的に強力なT細胞を増殖するT細胞の製造方法が提供されている。細胞を、活性化及び増殖する前、活性化及び増殖している間、または活性化及び増殖した後に接触させることができる。T細胞組成物は、実質的に分化を増やすことなく増殖の複数サイクルを可能にするのに十分なT細胞の能力を保持している。

【0358】

「調節する」、「調節因子」、もしくは「調節剤」という用語、または類似の用語は、本明細書で使用する場合、細胞シグナル伝達経路に変化をもたらす薬剤の能力があるものを意味する。調節因子は、経路成分の量、活性を増加もしくは減少させることができるか、または細胞シグナル伝達経路の所望の作用もしくは出力を増加もしくは減少させることができる。一実施形態では、調節因子は阻害剤である。別の実施形態では、調節因子は活性化剤である。

【0359】

用語「薬剤」は、PI3K/Akt/mTOR経路の調節に使用される、化合物、少分子、例えば、小有機分子、核酸、ポリペプチド、またはそれらの断片、アイソフォーム、変異体、類似体、もしくは誘導体を意味する。

【0360】

「少分子」は、約5kD未満、約4kD未満、約3kD未満、約2kD未満、約1kD未満、または約0.5kD未満の分子量を持つ組成物を意味する。少分子には、核酸、ペプチド、ポリペプチド、ペプチド模倣薬、ペプトイド、炭水化物、脂質、それらの成分、または他の有機分子もしくは無機分子が含まれていてもよい。真菌、細菌、または藻類の抽出物などの化学混合物及び／または生物学的混合物のライブラリーが当該技術分野で公知であり、任意のアッセイを用いて該ライブラリーをスクリーニングすることができる。分子ライブラリーの合成方法の例は、以下の文献に記載されている (Carell et al., 1994a, Carell et al., 1994b, Cho et al., 1993, DeWitt et al., 1993, Gallop et al., 1994, Zuckermann et al., 1994)。

【0361】

「類似体」は、小有機化合物、ヌクレオチド、タンパク質、もしくはポリペプチド、または所望の活性を有する化合物と同等もしくは同一の活性または機能を有するが、好ましい実施形態の配列または構造と同等もしくは同一の配列または構造を必ずしも備える必要はない、小有機化合物、ヌクレオチド、タンパク質、ポリペプチドを意味するものである。

【0362】

「誘導体」は、アミノ酸残基の置換、欠失、もしくは付加の導入により改変された、親タンパク質もしくはポリペプチドのアミノ酸配列を含む化合物、タンパク質、もしくはポ

10

20

30

40

50

リペプチドを意味するか、またはヌクレオチドの置換、欠失、付加、もしくは変異の導入のいずれかにより改変された核酸もしくはヌクレオチドを意味する。誘導体の核酸、ヌクレオチド、タンパク質、またはポリペプチドは、親ポリペプチドと同等または同一の機能を持つ。

【0363】

種々の実施形態では、PI3K経路を調節する薬剤は、PI3K経路の成分を活性化する。「活性化剤」または「アゴニスト」は、PI3Kの1つまたは複数の活性を活性化する分子を含むがこれに限定されない、PI3K/Akt/mTOR経路の分子の1つまたは複数の活性を、促進、増加、または誘導させる薬剤を意味する。

【0364】

種々の実施形態では、PI3K経路を調節する薬剤は、PI3K経路の成分を阻害する。「阻害剤」または「アンタゴニスト」は、PI3Kの1つまたは複数の活性を阻害する分子を含むがこれに限定されない、PI3K/Akt/mTOR経路における分子の1つまたは複数の活性を、阻害、減少、または低減させる薬剤を意味する。一実施形態では、阻害剤は二重分子阻害剤である。特定の実施形態では、阻害剤は、同一の活性または実質的に同等な活性を持つ分子種を阻害することができる（汎阻害剤）か、または分子の活性化を特異的に阻害することができる（選択的または特異的阻害剤）。阻害は不可逆的であっても、可逆的であってもよい。

【0365】

一実施形態では、阻害剤のIC50は、少なくとも1 nM、少なくとも2 nM、少なくとも5 nM、少なくとも10 nM、少なくとも50 nM、少なくとも100 nM、少なくとも200 nM、少なくとも500 nM、少なくとも1 μM、少なくとも10 μM、少なくとも50 μM、または少なくとも100 μMである。IC50は、当該技術分野で公知の任意の従来技術を用いて算出することができる。例えば、IC50は、特定の酵素の活性を、検討中の阻害剤の濃度を変えて測定することにより算出できる。実験的に得られた酵素活性の値を、用いた阻害剤の濃度に対してプロットする。50%の酵素活性（いかなる阻害剤も用いない場合の活性と比較した場合）を示す阻害剤の濃度を「IC50」値とする。同様に、他の阻害濃度を、活性を適正に測定することによって定めることができる。

【0366】

種々の実施形態では、T細胞を、PI3K/Akt/mTOR経路の1つまたは複数の調節因子と、少なくとも1 nM、少なくとも2 nM、少なくとも5 nM、少なくとも10 nM、少なくとも50 nM、少なくとも100 nM、少なくとも200 nM、少なくとも500 nM、少なくとも1 μM、少なくとも10 μM、少なくとも50 μM、少なくとも100 μM、または少なくとも1 Mの濃度で接触させるか、処理するか、または培養する。

【0367】

特定の実施形態では、T細胞を、PI3K/Akt/mTOR経路の1つまたは複数の調節因子と、1回、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、もしくは10回、またはそれ以上の増殖サイクルで、少なくとも12時間、18時間、少なくとも1日間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、もしくは7日間、少なくとも2週間、少なくとも1カ月間、2カ月間、3カ月間、4カ月間、5カ月間、もしくは6カ月間、またはそれ以上接触させるか、処理するか、または培養することができる。

【0368】

ラパマイシン経路のホスファチジルイノシトール3キナーゼ/Akt/哺乳動物標的は、導管的な働きをして、成長因子シグナル伝達と、細胞の増殖、分化、代謝、及び生存とを結びつける。PI3Kは、高度に保存的された細胞内脂質キナーゼのファミリーである。クラスIAのPI3Kは、成長因子受容体チロシンキナーゼ（RTK）により、直接的に、またはアダプター分子のインスリン受容体基質ファミリーとの相互作用を介して、活性化される。この活性により、セリン/スレオニンキナーゼAktの制御因子である

10

20

30

40

50

ホスファチジル-イノシトール-3, 4, 5-三リン酸 (PIP3) が産生する。mTOR は、カノニカルPI3K経路により2つの異なる複合体を介して作用し、それぞれの複合体は固有の活性を付与する異なる結合パートナーにより特徴付けられている。mTORC1 (PRAS40、RAPTOR、及びmLST8/GβLと複合体化したmTOR) は、PI3K/Aktシグナル伝達の下流エフェクターとして作用し、成長因子シグナルとタンパク質翻訳、細胞成長、細胞増殖、及び細胞生存とをつなげる。mTORC2 (RICTOR、mSIN1、PROTOR、及びmLST8と複合体化したmTOR) はAktの上流活性化因子として作用する。

【0369】

PI3Kの成長因子受容体媒介活性化の際に、Aktが、プレクストリン相同ドメインとPIP3との相互作用を介して膜に漸加され、構成的活性型ホスホイノシチド依存性タンパク質キナーゼ1 (PKD1) により活性化ループを曝露し、スレオニン308 (Thr308) においてリン酸化する。最大限活性化させるために、Aktを、C末端疎水性モチーフのセリン473 (Ser473) において、mTORC2によりさらにリン酸化する。また、Akt活性の制御には、DNA-PK及びHSPが重要であることが分かっている。Aktは、TSC2の阻害性リン酸化によりmTORC1を活性化するが、TSC2は、TSC1と合わせて、mTORC1の正の制御因子であるRhebGTPアーゼを阻害することにより、mTORC1を負に制御するものである。mTORC1は、2つの十分明らかになっている基質であるp70S6K (以下S6K1と称する) と4E-BP1とを有し、この2つはタンパク質合成を大きく制御する。したがって、mTORC1は、PI3Kの重要な下流エフェクターであり、成長因子シグナル伝達とタンパク質翻訳及び細胞増殖とをつなげるものである。

【0370】

a. PI3K阻害剤

用語「PI3K阻害剤」は、本明細書で使用する場合、PI3Kに結合し、PI3Kの少なくとも1つの活性を阻害する核酸、ペプチド、化合物、または小有機分子を意味する。PI3Kタンパク質は、3つのクラスである、クラス1のPI3K、クラス2のPI3K、及びクラス3のPI3Kに分類することができる。クラス1のPI3Kは、4つのp110触媒サブユニット (p110α、p110β、p110δ、及びp110γ) のうちの1つと、調節サブユニットの2つのファミリーのうちの1つとからなるヘテロダイマーとして存在する。PI3K阻害剤は、好ましくはクラス1のPI3K阻害剤を対象にする。一実施形態では、PI3K阻害剤は、クラス1のPI3K阻害剤の1つまたは複数のアイソフォームに対する選択性 (すなわち、p110α、p110β、p110δ、及びp110γに対する選択性、またはp110α、p110β、p110δ、及びp110γのうちの1つもしくは複数に対する選択性) を示す。別の態様では、PI3K阻害剤は、アイソフォーム選択性を示さず、「汎PI3K阻害剤」とみなされる。一実施形態では、PI3K阻害剤は、PI3K触媒ドメインへの結合に対してATPと競合する。

【0371】

特定の実施形態では、PI3K阻害剤は、例えば、PI3Kと、PI3K/Akt/mTOR経路の別のタンパク質とを標的にすることができる。特定の実施形態では、mTORとPI3Kとを標的にするPI3K阻害剤を、mTOR阻害剤またはPI3K阻害剤と称する場合がある。PI3Kのみを標的にするPI3K阻害剤は、選択的PI3K阻害剤と称される場合がある。一実施形態では、選択的PI3K阻害剤は、PI3Kに対して、mTOR及び/またはこの経路の他のタンパク質に対する該阻害剤のIC50値よりも、少なくとも1/10、少なくとも1/20、少なくとも1/30、少なくとも1/50、少なくとも1/100、少なくとも1/1000、またはそれ以上低い50%阻害濃度を示す薬剤を指すものとして理解され得る。

【0372】

特定の実施形態では、典型的なPI3K阻害剤は、IC50 (活性の50%を阻害する濃度) が約200nM以下、好ましくは約100nM以下、さらにより好ましくは約60

nM以下、約25nM以下、約10nM以下、約5nM以下、約1nM以下、100μM以下、50μM以下、25μM以下、10μM以下、または1μM以下という値で、PI3Kを阻害する。一実施形態では、PI3K阻害剤は、IC50が約2nM～約100nM、より好ましくは約2nM～約50nM、さらにより好ましくは約2nM～約15nMという値でPI3Kを阻害する。

【0373】

特定の実施形態で考察されているT細胞製造方法で使用するのに適したPI3K阻害剤の具体例として、以下に限定されないが、BKM120（クラス1のPI3K阻害剤、Novartis社製）、XL147（クラス1のPI3K阻害剤、Exelixis社製）、（汎PI3K阻害剤、GlaxoSmithKline社製）、及びPX-866（クラス1のPI3K阻害剤、p110α、p110β、及びp110γのアイソフォーム、Oncothyreon社製）が挙げられる。 10

【0374】

選択的PI3K阻害剤の他の具体例としては、以下に限定されないが、BYL719、GSK2636771、TGX-221、AS25242、CAL-101、ZSTK474、及びIPI-145が挙げられる。

【0375】

さらに、汎PI3K阻害剤の具体例として、以下に限定されないが、BEZ235、LY294002、GSK1059615、TG100713、及びGDC-0941が挙げられる。 20

【0376】

好ましい実施形態では、PI3K阻害剤はZSTK474である。

【0377】

b. Akt阻害剤

用語「Akt阻害剤」は、本明細書で使用する場合、Aktの少なくとも1つの活性を阻害する核酸、ペプチド、化合物、または小有機分子を意味する。Akt阻害剤は、脂質系阻害剤（例えば、Aktが脂質膜に局在化することを阻止する、Aktのプレクストリン相同ドメインを標的にする阻害剤）、ATP競合阻害剤、及びアロステリック阻害剤などのいくつかのクラスに分類することができる。一実施形態では、Akt阻害剤は、Akt触媒部位に結合することにより作用する。特定の実施形態では、Akt阻害剤は、mTORなどの下流Akt標的のリン酸化を阻害することにより作用する。別の実施形態では、例えば、AktのDNA-PK活性化、AktのPDK-1活性化、及び／またはAktのmTORC2活性化を阻害することによって、Aktを活性化する入力シグナルを阻害することにより、Aktの活性を阻害する。 30

【0378】

Akt阻害剤は、Aktの3つのアイソフォームであるAkt1、Akt2、Akt3の全てを標的にすることができるが、アイソフォーム選択的であってもよく、Aktアイソフォームの1つまたは2つのみを標的にすることもできる。一実施形態では、Akt阻害剤は、Aktと、PI3K/Akt/mTOR経路の別のタンパク質とを標的にすることができる。Aktのみを標的にするAkt阻害剤は、選択的Akt阻害剤と称される場合がある。一実施形態では、選択的Akt阻害剤は、Aktに対して、この経路の他のタンパク質に対する該阻害剤のIC50値よりも、少なくとも1/10、少なくとも1/20、少なくとも1/30、少なくとも1/50、少なくとも1/100、少なくとも1/1000、またはそれ以上低い50%の阻害濃度を示す薬剤を指すものとして理解され得る。 40

【0379】

特定の実施形態では、典型的なAkt阻害剤は、IC50（活性の50%を阻害する濃度）が約200nM以下、好ましくは約100nM以下、さらにより好ましくは約60nM以下、約25nM以下、約10nM以下、約5nM以下、約1nM以下、100μM以下、50μM以下、25μM以下、10μM以下、または1μM以下という値で、Akt 50

を阻害する。一実施形態では、A k t 阻害剤は、I C 5 0 が約 2 n M ～ 約 1 0 0 n M、より好ましくは約 2 n M ～ 約 5 0 n M、さらにより好ましくは約 2 n M ～ 約 1 5 n M という値で A k t を阻害する。

【0380】

アウリスタチン系抗体薬剤コンジュゲートと組み合わせて使用する A k t 阻害剤の具体例として、例えば、ペリフォシン (Keryx社製)、M K 2 2 0 6 (Merck社製)、V Q D - 0 0 2 (VioQuest社製)、X L 4 1 8 (Exelixis社製)、G S K 6 9 0 6 9 3、G D C - 0 0 6 8、及び P X 3 1 6 (PROLX Pharmaceuticals社製) が挙げられる。

【0381】

選択的 A k t 1 阻害剤の非限定的な例は A - 6 7 4 5 6 3 である。

10

【0382】

選択的 A k t 2 阻害剤の非限定的な例は C C T 1 2 8 9 3 0 である。

【0383】

特定の実施形態では、A k t 阻害剤は、A k t の D N A - P K 活性化、A k t の P D K - 1 活性化、A k t の m T O R C 2 活性化、または A k t の H S P 活性化を阻害する。

【0384】

D N A - P K 阻害剤の具体例として、以下に限定されないが、N U 7 4 4 1、P I - 1 0 3、N U 7 0 2 6、P I K - 7 5、及び P P - 1 2 1 が挙げられる。

【0385】

c. m T O R 阻害剤

20

「m T O R 阻害剤」または「m T O R を阻害する薬剤」という用語は、m T O R タンパク質の少なくとも 1 つの活性、例えば、基質 (例として、p 7 0 S 6 キナーゼ 1、4 E - B P 1、A k t / P K B、及び e E F 2) のうちの少なくとも 1 つに対するセリン / スレオニンタンパク質キナーゼ活性を阻害する核酸、ペプチド、化合物、または小有機分子を意味する。m T O R 阻害剤は、m T O R C 1、m T O R C 2、または m T O R C 1 と m T O R C 2 の両方に直接結合し、これらを阻害することができる。

【0386】

m T O R C 1 及び / または m T O R C 2 の活性の阻害は、P I 3 K / A k t / m T O R 経路のシグナル伝達の減少により測定することができる。様々な読み出し情報を用いて、シグナル伝達経路の出力の低減を明らかにすることができる。いくつかの読み出し情報の非限定的な例として、(1) 残基 (5 4 7 3 及び T 3 0 8 を含むがこれらに限定されない残基) における A k t のリン酸化の減少、(2) A k t 基質 (例えば、F o x 0 1 / O 3 a T 2 4 / 3 2、G S K 3 a / β 、S 2 1 / 9、及び T S C 2 T 1 4 6 2 を含むがこれらに限定されない基質) のリン酸化の減少から明らかな A k t の活性化低減、(3) m T O R 下流のシグナル伝達分子 (例えば、リボソーム S 6 S 2 4 0 / 2 4 4、7 0 S 6 K T 3 8 9、及び 4 E B P 1 T 3 7 / 4 6) のリン酸化の減少、ならびに (4) 癌細胞の増殖の阻害が挙げられる。

30

【0387】

一実施形態では、m T O R 阻害剤は活性部位阻害剤である。m T O R の A T P 結合部位 (A T P 結合ポケットとも称される) に結合し、m T O R C 1 と m T O R C 2 の両方の触媒活性を阻害する m T O R 阻害剤がある。特定の実施形態で考察されている T 細胞製造方法で使用するのに適した活性部位阻害剤の 1 つのクラスは、P I 3 K と m T O R の両方を標的化しかつ直接阻害する二重特異性阻害剤である。二重特異性阻害剤は、m T O R と P I 3 K の両方の A T P 結合部位に結合する。こうした阻害剤の具体例として、以下に限定されないが、イミダゾキナゾリン類、ワートマニン、L Y 2 9 4 0 0 2、P I - 1 0 3 (Cayman Chemical社製)、S F 1 1 2 6 (Semafore社製)、B G T 2 2 6 (Novartis社製)、X L 7 6 5 (Exelixis社製)、及び N V P - B E Z 2 3 5 (Novartis社製) が挙げられる。

40

【0388】

特定の実施形態で考察されている方法での使用に適した m T O R 活性部位阻害剤の別の

50

クラスは、1つまたは複数のI型ホスファチジルイノシトール3キナーゼ（例えば、PI3キナーゼ α 、 β 、 γ 、または δ ）に対するmTORC1とmTORC2の活性を、選択的に阻害する。これらの活性部位阻害剤は、mTORの活性部位に結合するが、PI3Kには結合しない。こうした阻害剤の具体例として、以下に限定されないが、ピラゾロピリミジン類、Torin1 (Guertin and Sabatini)、PP242 (2-(4-アミノ-1-イソプロピル-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-3-イル)-1H-インドール-5-オール)、PP30、KU-0063794、WAY-600 (Wyeth社製)、WAY-687 (Wyeth社製)、WAY-354 (Wyeth社製)、及びAZD8055 (Liu et al., Nature Review, 8, 627-644, 2009)が挙げられる。

【0389】

一実施形態では、選択的mTOR阻害剤は、mTORC1及び／またはmTORC2に対して、1種、2種、3種、もしくはそれ以上のI型PI3キナーゼまたはI型PI3キナーゼの全てに対する該阻害剤の50%阻害濃度(IC50)よりも、少なくとも1/10、少なくとも1/20、少なくとも1/50、少なくとも1/100、少なくとも1/1000、またはそれ以上低いIC50を示す薬剤を意味する。

【0390】

mTOR阻害剤の別のクラスは、本明細書では「ラパログ」と称されている。用語「ラパログ」は、本明細書で使用する場合、mTORのFRBDメイン(FKBPラパマイシン結合ドメイン)に特異的に結合し、ラパマイシンと構造的に類似し、mTOR阻害特性を保持する化合物を意味する。ラパログという用語は、ラパマイシンを除外している。ラパログには、ラパマイシンのエステル類、エーテル類、オキシム類、ヒドラゾン類、及びヒドロキシルアミン類と、ラパマイシンコア構造の官能基が例えば還元または酸化により修飾されている化合物とが含まれる。こうした化合物の薬学的に許容される塩は、ラパマイシン誘導体ともみなされる。特定の実施形態で考察されている方法での使用に適したラパログの具体例として、限定されるものではないが、テムシロリムス(CC1779)、エベロリムス(RAD001)、デフォロリムス(AP23573)、AZD8055 (AstraZeneca社製)、及びOSI-027(OSI)が挙げられる。

【0391】

一実施形態では、薬剤はmTOR阻害剤ラパマイシン(シロリムス)である。

【0392】

特定の実施形態では、典型的なmTOR阻害剤は、IC50(活性の50%を阻害する濃度)が約200nM以下、好ましくは約100nM以下、さらにより好ましくは約60nM以下、約25nM以下、約10nM以下、約5nM以下、約1nM以下、100 μ M以下、50 μ M以下、25 μ M以下、10 μ M以下、または1 μ M以下という値で、mTORC1、mTORC2、またはmTORC1とmTORC2の両方を阻害する。一態様では、mTOR阻害剤は、IC50が約2nM～約100nM、より好ましくは約2nM～約50nM、さらにより好ましくは約2nM～約15nMという値で、mTORC1、mTORC2、またはmTORC1とmTORC2の両方を阻害する。

【0393】

一実施形態では、典型的なmTOR阻害剤は、IC50(活性の50%を阻害する濃度)が約200nM以下、好ましくは約100nM以下、さらにより好ましくは約60nM以下、約25nM以下、約10nM以下、約5nM以下、約1nM以下、100 μ M以下、50 μ M以下、25 μ M以下、10 μ M以下、または1 μ M以下という値で、PI3K及びmTORC1、PI3K及びmTORC2、またはmTORC1とmTORC2の両方及びPI3Kを阻害する。一態様では、mTOR阻害剤は、IC50が約2nM～約100nM、より好ましくは約2nM～約50nM、さらにより好ましくは約2nM～約15nMという値で、PI3K及びmTORC1、PI3K及びmTORC2、またはmTORC1とmTORC2の両方及びPI3Kを阻害する。

【0394】

特定の実施形態での使用に適したmTOR阻害剤のさらなる具体例として、以下に限定

10

20

30

40

50

されないが、A Z D 8 0 5 5、I N K 1 2 8、ラパマイシン、P F - 0 4 6 9 1 5 0 2、及びエベロリムスが挙げられる。

【0395】

m T O Rは、ウェスタンブロットでリン酸化特異抗体を用いて測定することで、生理学的基質タンパク質であるp 7 0 S 6 リボソームタンパク質キナーゼI (p 7 0 S 6 K 1) 及びe I F 4 E結合タンパク質1 (4 E B P 1) に対して、ロバストで特異的な触媒活性を示すことが分かっている。

【0396】

一実施形態では、P I 3 K / A k t / m T O R経路の阻害剤は、B I - D 1 8 7 0、H 8 9、P F - 4 7 0 8 6 7 1、F M K、及びA T 7 8 6 7からなる群から選択されるS 6 キナーゼ阻害剤である。

10

【0397】

H. 組成物及び製剤

本明細書で考察されている組成物は、本明細書に記載されているように、1つまたは複数のC A Rポリペプチド、ポリヌクレオチド、それらを含むベクター、遺伝子改変された免疫エフェクター細胞などを含み得る。組成物は、以下に限定されるものではないが、医薬組成物を含む。「医薬組成物」は、単体でまたは1つもしくは複数の他の治療法と組み合わせて細胞または動物に投与するための、薬学的に許容される溶液または生理学的に許容される溶液で製剤された組成物を意味する。当然のことながら必要な場合には、組成物を、他の薬剤、例えば、サイトカイン、成長因子、ホルモン、少分子、化学療法剤、プロドラッグ、薬剤、抗体、または他の様々な薬学的に活性な薬剤と組み合わせて投与することもできる。付加的な薬剤が、該組成物の持つ目的の療法を遂行する能力に悪影響を与えない場合には、該組成物に含まれ得る他の成分に対しては実質的にいかなる制限もない。

20

【0398】

本明細書で使用されている語句「薬学的に許容される」は、適切な医学的判断の範囲内であり、合理的な利益／リスク比に見合いつつ、過剰な毒性、刺激、アレルギー応答、または他の問題もしくは合併症を引き起こさずに、ヒト及び動物の組織と接触させて使用することに適した化合物、物質、組成物、及び／または剤形を意味する。

【0399】

「薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤」は、本明細書で使用する場合、限定されるものではないが、任意のアジュバント、担体、賦形剤、流動促進剤、甘味剤、希釈剤、保存剤、染料／着色剤、風味相乗剤、界面活性剤、湿潤剤、分散剤、懸濁剤、安定剤、等張剤、溶媒、界面活性剤、または乳化剤であって、ヒトまたは家畜への使用に適用可能であると米国食品医薬品局により認可されているものを含む。薬学的に許容される担体の例として、以下に限定されないが、ラクトース、グルコース、及びスクロースなどの糖類と、コーンスターチ及びジャガイモデンプンなどのデンプン類と、カルボキシルメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、及び酢酸セルロースなどのセルロース及びその誘導体と、トラガントと、麦芽と、セラチンと、タルクと、カカオバター、ワックス、動物及び植物の脂肪、パラフィン、シリコン、ベントナイト、ケイ酸、酸化亜鉛と、ピーナッツ油、綿実油、ベニバナ油、ゴマ油、オリーブ油、コーン油、及び大豆油などの油類と、プロピレングリコールなどのグリコール類と、グリセリン、ソルビトール、マニトール、及びポリエチレングリコールなどのポリオール類と、オレイン酸エチル及びラウリン酸エチルなどのエステル類と、寒天と、水酸化マグネシウム及び水酸化アルミニウムなどの緩衝剤と、アルギン酸と、発熱性物質を含まない水と、等張食塩水と、リンゲル液と、エチルアルコールと、リン酸緩衝液と、医薬製剤で用いられる任意の他の適合性のある物質とが挙げられる。

40

【0400】

特定の実施形態では、組成物は、本明細書で考察されているC A R発現免疫エフェクター細胞のある量を含む。用語「量」は、本明細書で使用する場合、有益なまたは所望の予防結果または治療結果（臨床結果を含む）が得られる、遺伝子改変された治療用細胞、例

50

えばT細胞の「有効量」または「有効な量」を意味する。

【0401】

「予防的有效量」は、所望の予防結果を得るのに有効な、遺伝子改変された治療用細胞の量を意味する。予防用量は、疾患の初期段階の前または初期段階で対象に用いられるため、予防的有效量は治療有効量よりも少ないのが典型的であるが、必ずしもそうとは限らない。

【0402】

遺伝子改変された治療用細胞の「治療有効量」は、個体の疾患段階、年齢、性別、及び体重、ならびに個体における所望の応答を引き出す幹細胞及び前駆体細胞の能力などの因子によって様々になり得る。また、治療有効量は、治療に有益な作用が、ウイルスまたは形質導入された治療用細胞の及ぼすいかなる毒性作用や有害作用をも上回る状態となる量である。用語「治療有効量」には、対象（例えば、患者）を治療するのに有効な量が含まれる。治療量を決める際、投与される組成物の正確な量は、個体の年齢、体重、腫瘍サイズ、感染または転移の程度、及び患者（対象）の病態を考慮して、医師により決定される。本明細書に記載のT細胞を含む医薬組成物は、体重1kg当たり 10^2 個～ 10^{10} 個、好ましくは体重1kg当たり 10^5 個～ 10^6 個、またはそれらの範囲内の全ての整数値を含む用量で投与されてもよい。細胞数は、組成物に含まれる細胞種に合わせた、組成物の主な使用法により異なる。本明細書に記載の使用の際には、細胞は通例、1リットル以下の容量であるが、500mL以下の容量、さらには250mL以下または100mL以下の容量でもよい。したがって、所望の細胞の密度は一般的に、 10^6 個の細胞/mLよりも大きくなり、通例、 10^7 個の細胞/mLよりも大きく、多くの場合 10^8 個の細胞/mL以上となる。免疫細胞の臨床的に意義ある数が複数の注入液に割り当てられるが、その数は 10^5 個、 10^6 個、 10^7 個、 10^8 個、 10^9 個、 10^{10} 個、 10^{11} 個、または 10^{12} 個の細胞に累積的に等しいか、またはそれを超えるものである。いくつかの態様では、全ての注入された細胞が特定の標的抗原にリダイレクトされるため、 10^6 個/キログラム（患者1人当たり 10^6 個～ 10^{11} 個）の範囲において、比較的少数の細胞を投与してもよい。CAR発現細胞組成物をこれらの範囲内の用量で複数回投与することができる。細胞は、療法を受けている患者と同種、同系、異種、または該患者の自家性であってもよい。必要に応じて、治療では、本明細書に記載のマイトジェン（例えば、PHA）もしくはリンホカイン、サイトカイン、及び／またはケモカイン（例えば、IFN- γ 、IL-2、IL-12、TNF- α 、IL-18、及びTNF- β 、GM-CSF、IL-4、IL-13、Flt3-L、RANTES、MIP1 α など）の投与を行って、免疫応答をさらに誘導させてもよい。

【0403】

本明細書に記載の活性化かつ増殖した細胞を含む組成物は、免疫不全者に生じる疾患の治療及び予防に使用することができる。特定の実施形態では、本明細書で考察されているCAR改変T細胞を含む組成物を、癌の治療に使用する。CAR改変T細胞は、単体で、または担体、希釈剤、賦形剤、及び／もしくはIL-2もしくは他のサイトカインもしくは細胞群などの他の成分と組み合わせた医薬組成物として投与され得る。特定の実施形態では、医薬組成物は、ある量の遺伝子改変T細胞を、1つまたは複数の薬学的または生理学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤と共に含んでいる。

【0404】

T細胞などのCAR発現免疫エフェクター細胞群を含む医薬組成物には、中性緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水などの緩衝液と、グルコース、マンノース、スクロース、またはデキストランなどの炭水化物と、タンパク質と、グリシンなどのポリペプチドまたはアミノ酸と、酸化防止剤と、EDTAまたはグルタチオンなどのキレート剤と、アジュバント（例えば、水酸化アルミニウム）と、保存剤とが含まれていてもよい。組成物は、好ましくは非経口投与用、例えば、血管内（静脈内または動脈内）投与、腹腔内投与、または筋肉内投与用に製剤化される。

【0405】

液体医薬組成物は、溶液であるか、懸濁液であるか、または他の形態であるかにかかわらず、注射用の水、食塩水（好ましくは生理食塩水、リンゲル溶液、等張食塩水）、固定油（溶媒または懸濁媒体として機能し得る合成モノグリセリドまたはジグリセリドなど）、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、または他の溶媒などの無菌希釈剤と、ベンジルアルコールまたはメチルメチルパラベンなどの抗菌剤と、アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化剤と、エチレンジアミン四酢酸などのキレート剤と、酢酸塩、クエン酸塩、またはリン酸塩などの緩衝液と、塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの浸透圧の調整剤と、のうちの1つまたは複数を含んでいてもよい。非経口製剤は、ガラス製またはプラスチック製のアンプル、ディスポーザブルシリンジ、または多人数用バイアルに封入され得る。注射用医薬組成物は好ましくは無菌である。

10

【0406】

一実施形態では、本明細書で考察されているT細胞組成物は、薬学的に許容される細胞培地で製剤化される。こうした組成物は、ヒト対象への投与に適している。特定の実施形態では、薬学的に許容される細胞培地は、無血清培地である。

【0407】

無血清培地は、血清含有培地よりもいくつかの有利な点があり、この有利な点は、組成物が単純でかつ詳細が明らかになっており、汚染の度合いが低く、感染病原体になり得る供給源がなく、低コストであることなどである。種々の実施形態では、無血清培地は動物質を含まず、任意選択的にタンパク質を含んでいなくてもよい。任意選択的に、培地は生物薬学的に許容される組み換えタンパク質であってもよい。「動物質を含まない」培地は、組成物が非動物源由来である培地を意味する。動物質を含まない培地において、組み換えタンパク質が天然の動物タンパク質の代わりに用いられ、栄養分は合成源、植物源、または微生物源から得ている。一方、「タンパク質を含まない」培地は、タンパク質を実質的に含まないものとして定義される。

20

【0408】

特定の組成物で用いられている血清を含まない培地の具体例として、以下に限定されないが、QBSF-60 (Quality Biological社製)、StemPro-34 (Life Technologies社製)、及びX-VIVO10が挙げられる。

【0409】

1つの好ましい実施形態では、本明細書で考察されている免疫エフェクター細胞を含む組成物は、PlasmaLyte Aを含む溶液で製剤化される。

30

【0410】

別の好ましい実施形態では、本明細書で考察されている免疫エフェクター細胞を含む組成物は、凍結保存培地を含む溶液で製剤化される。例えば、凍結保存剤を含む凍結保存培地を用いて、解凍後の細胞生存率を高く維持することができる。特定の組成物で用いられる凍結保存培地の具体例として、以下に限定されないが、CryoStor CS10、CryoStor CS5、及びCryoStor CS2が挙げられる。

【0411】

より好ましい実施形態では、本明細書で考察されている免疫エフェクター細胞を含む組成物は、50:50のPlasmaLyte AとCryoStor CS10とを含む溶液で製剤化される。

40

【0412】

特定の実施形態では、組成物は、CAR発現免疫エフェクター細胞の有効量を、単体で、または1つもしくは複数の治療剤と組み合わせた状態で含む。したがって、CAR発現免疫エフェクター細胞組成物を、単体で、または他の既知の癌治療、例えば、放射線療法、化学療法、移植、免疫療法、ホルモン療法、光線力学療法などと組み合わせて投与することができる。組成物を、抗生物質と組み合わせて投与することもできる。こうした治療剤は、当該技術分野において、本明細書に記載の特定の病状（例えば特定の癌など）に対する標準的な治療として受け入れられている。特定の実施形態で考察されている治療剤の例として、サイトカイン、成長因子、ステロイド類、NSAIDs、DMARDs、抗炎症

50

症剤、化学療法剤、放射線療法剤、治療用抗体、または他の活性剤及び補助剤が挙げられる。

【0413】

特定の実施形態では、本明細書に開示されているCAR発現免疫エフェクター細胞を含む組成物を、任意の数の化学療法剤と合わせて投与することができる。化学療法剤の具体例として、チオテパ、シクロホスファミド (CYTOXAN (商標)) などのアルキル化剤と、ブスルファン、インプロスルファン、及びピボスルファンなどのスルホン酸アルキルと、ベンゾドパ (benzodopa)、カルボコン、メツレドパ (meturedopa)、及びウレドパ (uredopa) などのアジリジン類と、アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド、及びトリメチルオロメラミン (trimethylolomelamine) レジュームを含めたエチレンイミン類及びメチルアメラミン類と、クロラムブシル、クロルナファジン、クロホスファミド (cholophosphamide)、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、塩酸メクロレタミンオキシド、メルファラン、ノベムビシン (novembichin)、フェネスステリン (phenesterine)、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタードなどのナイトロジェンマスタード類と、カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチンなどのニトロソ尿素類と、アクラシノマイシン類、アクチノマイシン、オースラマイシン (authramycin)、アザセリン、プレオマイシン類、カクチノマイシン、カリチアマイシン、カラビシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン類、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルビシン、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシン類、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン類、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン (potfiromycin)、ピューロマイシン、クエラマイシン (quelamycin)、ロドルビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシンなどの抗生物質と、メトトレキサート及び5-フルオロウラシル (5-FU) などの代謝拮抗剤と、デノブテリン、メトトレキサート、ブテロブテリン、トリメトトレキサートなどの葉酸類似体類と、フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンなどのプリン類似体と、アンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン、5-FUなどのピリミジン類似体と、カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンなどのアンドロゲン類と、アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなどの抗副腎剤 (anti-adrenal) と、フロリン酸 (frolinic acid) などの葉酸補充剤と、アセグラトンと、アルドホスファミド配糖体 (aldophosphamide glycoside) と、アミノレブリン酸と、アムサクリンと、ベストラブシル (bestrabucil) と、ビスアントレン (bisantrene) と、エダトラキセート (edatraxate) と、デフォファミン (defofamine) と、デメコルチンと、ジアジコン (diaziquone) と、エルホルミチン (elformithine) と、酢酸エリプチニウム (elliptinium acetate) と、エトグルシドと、硝酸ガリウムと、ヒドロキシウレアと、レンチナンと、ロニダミンと、ミトグアゾンと、ミトキサントロンと、モピダモールと、ニトラクリンと、ベントスタチンと、フェナメット (phenamet) と、ピラルビシンと、ポドフィリン酸 (podophyllinic acid) と、2-エチルヒドラジドと、プロカルバジンと、PSK (登録商標) と、ラゾキサント、シゾフィランと、スピロゲルマニウムと、テヌアゾン酸と、トリアジコンと、2, 2', 2''-トリクロロトリエチルアミンと、ウレタンと、ビンデシンと、ダカルバジンと、マンノムスチンと、ミトブロニトールと、ミトラクトールと、ピボプロマンと、ガシトシン (gacytosine) と、アラビノシド (「Ara-C」と)、シクロホスファミドと、チオテパと、タキソイド類、例えば、パクリタキセル (TAIXOL (登録商標)、ニュージャージー州プリンストンBristol-Myers Squibb Oncology, Princeton社) 及びドセタキセル (doxetaxel) (TAXOTERE (登録商標)、フランス国アントニーRhne-Poulenc Rorer社) と、クロラムブシルと、ゲムシタビンと、6-チオグアニンと、メルカプトプリンと、メトトレキサートと、シスプラチン及びカルボプラチン

10

20

30

40

50

などの白金類似体と、ビンブラスチンと、白金と、エトポシド（VP-16）と、イホスファミドと、マイトマイシンCと、ミトキサントロンと、ビンクリスチンと、ビノレルビンと、ナベルピンと、ノバントロンと、テニポシドと、ダウノマイシンと、アミノプテリンと、ゼローダと、イバンドロネートと、CPT-11と、トポイソメラーゼ阻害剤RFS2000と、ジフルオロメチルオルニチン（difluoromethylornithine）（DMFO）と、タルグレチン（商標）（ベキサロテン）、パンレチン（Panretin）（商標）（アリトレチノイン）などのレチノイン酸誘導体と、ONTAK（商標）（デニロイキンジフチトクス）と、エスペラミシン類と、カペシタビンと、上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体とが挙げられる。癌へのホルモン作用を制御または阻害するように機能する抗ホルモン剤がこの定義に含まれており、例えば、タモキシフェン、ラロキシフェン、4

（5）-イミダゾールを阻害するアロマターゼ、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY117018、オナプリストン、及びトレミフェン（フェアストン）などの抗エストロゲンと、例えば、フルタミド、ニルタミド、ビカルタミド、リュープロリド、及びゴセレリンなどの抗アンドロゲンと、上述のうちのいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体とがある。

10

【0414】

様々な他の治療剤を、本明細書に記載の組成物と併用して使用することができる。一実施形態では、CAR発現免疫エフェクター細胞を含む組成物を、抗炎症剤と共に投与する。抗炎症性剤または薬剤として、以下に限定されないが、ステロイド類及びグルココルチコイド類（例えば、ベタメタゾン、ブデソニド、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン酢酸エステル、ヒドロコルチゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、プレドニゾン、トリウムシノロンなど）、非ステロイド性抗炎症薬剤（NSAIDs）（例えば、アスピリン、イブプロフェン、ナプロキセン、メトトレキサート、スルファサラジン、レフルノミド、抗TNF薬、シクロホスファミド、及びミコフェノール酸など）が挙げられる。

20

【0415】

他のNSAIDsの例は、イブプロフェンと、ナプロキセンと、ナプロキセンナトリウムと、VIOXX（登録商標）（ロフェコキシブ）及びセレブレックス（登録商標）（セレコキシブ）などのCOX-2阻害剤と、シアル化物とからなる群から選択される。鎮痛剤の例は、アセトアミノフェン、オキシコドン、塩酸プロボキシフェンのトラマドールからなる群から選択される。グルココルチコイド類の例は、コルチゾン、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、またはプレドニゾンからなる群から選択される。生物学的応答調節剤の例として、細胞表面マーカー（例えば、CD4、CD5など）に対する分子と、例えば、TNFアンタゴニスト（例としてエタネルセプト（ENBREL）（登録商標））、アダリムマブ（HUMIRA（登録商標））、及びインフリキシマブ（REMICADE（登録商標））などのサイトカイン阻害剤と、ケモカイン阻害剤と、接着分子阻害剤とが挙げられる。生物学的応答調節剤には、モノクローナル抗体と分子の組み換え型とが含まれる。DMARDsの例として、アザチオプリン、シクロホスファミド、シクロスポリン、メトトレキサート、ペニシラミン、レフルノミド、スルファサラジン、ヒドロキシクロロキン、Gold（経口（オーラノフィン）及び筋肉内用）、及びミノサイクリンが挙げられる。

30

40

【0416】

特定の実施形態で考察されているCAR改変T細胞と併用するのに適した治療用抗体の具体例として、以下に限定されないが、アテゾリズマブ、アベルマブ、バビツキシマブ、ベバシズマブ（アバスチン）、ビバツズマブ（bivatuzumab）、ブリナツモマブ、コナツムマブ、クリゾチニブ、ダラツムマブ、デュリゴツマブ（duligotumab）、ダセツズマブ、ダロツズマブ、デュルバルマブ、エロツズマブ（HuLuc63）、ゲムツズマブ、イブリツモマブ、インダツキシマブ（indatuximab）、イノツズマブ、イピリムマブ、ロルボツズマブ（lorvotuzumab）、ルカツムマブ（lucatumumab）、ミラツズマブ、モキセツモマブ（moxetumomab）、ニボルマブ、オカラツズマブ（ocaratzumab）、オフアツムマブ、ペ

50

ムブロリズマブ、リツキシマブ、シルツキシマブ、テプロツムマブ、及びウブリツキシマブ (ublituximab) が挙げられる。

【0417】

特定の実施形態では、本明細書に記載の組成物をサイトカインと合わせて投与する。本明細書で使用される「サイトカイン」は、一方の細胞群により放出されるタンパク質であって、他方の細胞に対して細胞間媒介物質として作用するタンパク質の一般名称を意味する。こうしたサイトカインの例は、リンホカイン、モノカイン、及び一般的なポリペプチドホルモン類である。サイトカインの中には、ヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、及びウシ成長ホルモンなどの成長ホルモン類と、副甲状腺ホルモンと、チロキシント、インスリンと、プロインスリンと、リラキシント、プロリラキシント、卵胞刺激ホルモン (FSH)、甲状腺刺激ホルモン (TSH)、及び黄体ホルモン (LH) などの糖タンパク質ホルモン類と、肝成長因子と、線維芽細胞成長因子と、プロラクチンと、胎盤性ラクトゲンと、腫瘍壊死因子アルファ及び腫瘍壊死因子ベータと、ミューラー管抑制因子と、マウスゴナドトロピン関連ペプチドと、インヒビント、アクチビンと、血管内皮成長因子と、インテグリンと、トロンボポエチン (TPO) と、NGFベータなどの神経成長因子と、血小板成長因子と、TGFアルファ及びTGFベータなどのトランスフォーミング成長因子類 (TGF) と、インスリン様成長因子 I 及びインスリン様成長因子 II と、エリスロポエチン (EPO) と、骨誘導因子と、インターフェロンアルファ、インターフェロンベータ、及びインターフェロンガンマなどのインターフェロン類と、マクロファージ CSF (M-CSF)、顆粒球マクロファージ CSF (GM-CSF)、及び顆粒球 CSF (G-CSF) などのコロニー刺激因子 (CSF) と、IL-1、IL-1 アルファ、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-15 などのインターロイキン (IL) 類と、TNFアルファまたはTNFベータなどの腫瘍壊死因子と、LIF及びKiller Ligand (KL) を含む他のポリペプチド因子とが含まれる。サイトカインという用語は、本明細書で使用する場合、天然供給源由来または組み換え細胞培養由来のタンパク質と、天然配列サイトカインの生物学的活性同等物とを含む。

【0418】

特定の実施形態では、組成物は、本明細書で考察されているように、PI3K阻害剤の存在下で培養され、かつ以下のマーカーCD3、CD4、CD8、CD27、CD28、CD45RA、CD45RO、CD62L、CD127、及びHLA-DRのうちの1つまたは複数を発現する本明細書に記載のCAR-T細胞を含み、正の選択技術または負の選択技術によりさらに単離され得る。一実施形態では、組成物は、i) CD62L、CCR7、CD28、CD27、CD122、CD127、CD197、ii) CD62L、CD127、CD197、CD38、ならびにiii) CD62L、CD27、CD127、及びCD8からなる群から選択される1つまたは複数のマーカーを発現する、T細胞の特定の亜集団を含み、正の選択技術または負の選択技術によりさらに単離される。種々の実施形態では、組成物は、以下のマーカーCD57、CD244、CD160、PD-1、CTLA4、TIM3、及びLAG3のうちの1つまたは複数を発現しないか、または実質的に発現しない。

【0419】

一実施形態では、CD62L、CD127、CD197、及びCD38からなる群から選択されるマーカーのうちの1つまたは複数の発現が、PI3K阻害剤を用いずに活性化かつ増殖されたT細胞群に比べて、少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも25倍、またはそれ以上増加する。

【0420】

一実施形態では、CD62L、CD127、CD27、及びCD8からなる群から選択されるマーカーのうちの1つまたは複数の発現が、PI3K阻害剤を用いずに活性化かつ増殖されたT細胞群に比べて、少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、

少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも25倍、またはそれ以上増加する。

【0421】

一実施形態では、CD57、CD244、CD160、PD-1、CTLA4、TIM3、及びLAG3からなる群から選択されるマーカーのうちの1つまたは複数の発現が、PI3K阻害剤を用いて活性化かつ増殖されたT細胞群に比べて、少なくとも1/1.5、少なくとも1/2、少なくとも1/3、少なくとも1/4、少なくとも1/5、少なくとも1/6、少なくとも1/7、少なくとも1/8、少なくとも1/9、少なくとも1/10、少なくとも1/25、またはそれ以上に減少する。

【0422】

I. 標的細胞及び抗原

標的細胞（例えば、癌細胞）にリダイレクトされ、かつ標的細胞でCD79Aに結合する結合ドメインを有するCARを含む、遺伝子改変免疫エフェクター細胞が、特定の実施形態で提供されている。用語「癌」は通例、本明細書で使用する場合、異常細胞が際限なく分裂し、近くの組織に入り込むことができる疾患または病態のクラスを意味する。

【0423】

用語「悪性」は、本明細書で使用する場合、腫瘍細胞群が、制御不能な増殖（すなわち、正常限界を上回る分裂）、浸潤（すなわち、隣接する組織への侵入及び該組織の破壊）、及び転移（すなわち、リンパまたは血液を介した体内の他の部位への拡散）のうちの1つまたは複数を示す癌を意味する。用語「転移する」は、本明細書で使用する場合、癌が身体の一部から他の部位に広がることを意味する。広がった細胞により形成された腫瘍は、「転移腫瘍」または「転移」と称されている。転移腫瘍は、元の（一次）腫瘍の細胞と同様の細胞を含んでいる。

【0424】

「良性」または「非悪性」という用語は、本明細書で使用する場合、大きさは大きくなり得るが、体内の他の部位には広がることのない腫瘍を意味する。良性腫瘍は自己限定的であり、通例、浸潤も転移もしない。

【0425】

「癌細胞」は、癌性増殖または癌性組織の個々の細胞を意味する。癌細胞には、固形癌及び液性癌が含まれる。「腫瘍」または「腫瘍細胞」は、一般的に細胞の異常増殖により形成された腫脹または病変であって、良性、前癌性、または悪性であり得る腫脹または病変を意味する。多くの癌が腫瘍を形成するが、液体性癌、例えば白血病は、必ずしも腫瘍を形成するとは限らない。腫瘍を形成するこうした癌に関して、癌（細胞）と腫瘍（細胞）という用語は交換可能に用いられる。個体における腫瘍の量は「腫瘍量」であり、腫瘍の数、体積、または重量として測定され得るものである。

【0426】

用語「再発」は、改善または寛解の期間後の癌再発の診断または癌再発の症候及び兆候を意味する。

【0427】

「寛解」は「臨床的寛解」と称されることもあり、部分寛解と完全寛解とを含む。部分寛解では、全てではないが一部の癌の症候及び兆候がなくなっている。完全寛解では、全ての癌の症候及び兆候がなくなっているが、癌はまだ体内に残っている場合がある。

【0428】

「難治性」は、特定の治療剤を用いた療法に対して抵抗性のある癌であるか、または非応答性の癌を意味する。癌は、治療の初期から難治性である（すなわち、治療剤への最初の曝露に対して非応答性である）か、または最初の治療期間にわたって、もしくは後に続く治療期間の間に、治療剤への抵抗性をつけた結果として難治性となる場合がある。

【0429】

一実施形態では、標的細胞は、抗原、例えば他の正常（所望の）細胞表面では実質的に見られない標的抗原を発現する。

10

20

30

40

50

【0430】

一実施形態では、標的細胞は、造血細胞、リンパ球系細胞、または骨髄系細胞である。

【0431】

特定の実施形態では、標的細胞は、血液、リンパ組織、骨髄組織の一部である。

【0432】

特定の実施形態では、標的細胞は、CD79Aを発現する癌細胞または癌幹細胞である。

【0433】

特定の実施形態では、標的細胞は、CD79Aを発現する液性癌細胞または血液癌細胞である。

10

【0434】

特定の実施形態で考察されている組成物を用いて予防、治療、または改善され得る液性癌または血液癌の具体例として、以下に限定されないが、白血病、リンパ腫、及び多発性骨髄腫が挙げられる。

【0435】

特定の実施形態で考察されている抗CD79ACARにより標的化され得る細胞の具体例として、以下に限定されないが、急性リンパ性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、骨髄芽球性白血病、前骨髄球性白血病、骨髄単球性白血病、単球性白血病、赤白血病、ヘアリーセル白血病（HCL）、慢性リンパ性白血病（CLL）及び慢性骨髄性白血病（CML）、慢性骨髄単球性白血病（CMML）、ならびに真性多血症などの白血病の細胞が挙げられる。

20

【0436】

特定の実施形態で考察されている組成物及び方法により標的化され得る細胞の具体例として、以下に限定されないが、ホジキンリンパ腫、結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫、及び非ホジキンリンパ腫といったリンパ腫の細胞が挙げられ、非ホジキンリンパ腫には、以下に限定されないが、バーキットリンパ腫、小リンパ球性リンパ腫（SLL）、びまん性大B細胞リンパ腫（DLBCL）、濾胞性リンパ腫、免疫芽球性大細胞型リンパ腫、前駆Bリンパ芽球性リンパ腫、及びマントル細胞リンパ腫などのB細胞非ホジキンリンパ腫と、菌状息肉症、未分化大細胞リンパ腫、セザリー症候群、及び前駆Tリンパ芽球性リンパ腫などのT細胞非ホジキンリンパ腫とが含まれる。

30

【0437】

特定の実施形態で考察されている組成物及び方法により標的化され得る細胞の具体例として、以下に限定されないが、顕性多発性骨髄腫、くすぶり型多発性骨髄腫（MGUS）、形質細胞性白血病、非分泌型骨髄腫、IgD骨髄腫、骨硬化性骨髄腫、孤立性骨形質細胞腫、及び髄外性形質細胞腫が挙げられる。

【0438】

好ましい実施形態では、CD79A発現標的細胞はDLBCL癌細胞である。

【0439】

J. 治療方法

本明細書で考察されている遺伝子改変された免疫エフェクター細胞は、CD79Aを発現する癌の予防、治療、及び改善に使用するための、またはCD79A発現癌と関連する少なくとも1つの症状を予防、治療もしくは改善するための、改良された養子免疫療法を提供するものである。

40

【0440】

また種々の実施形態では、本明細書で考察されている遺伝子改変された免疫エフェクター細胞は、対象においてCD79A発現癌細胞の細胞傷害性を高めるのに使用するための、または対象においてCD79A発現癌細胞の数を減じるのに使用するための、改良された養子免疫療法を提供するものである。

【0441】

特定の実施形態では、一次免疫エフェクター細胞を本明細書に記載のCARで遺伝子改

50

変することにより、一次免疫エフェクター細胞の特異性を、CD79Aを発現する細胞、例えば癌細胞にリダイレクトする。種々の実施形態では、ウイルスベクターを用いて、CD79Aポリペプチドを結合させる抗CD79A抗原結合ドメインと、ヒンジドメインと、膜貫通(TM)ドメインと、該TMドメインとCARの細胞内シグナル伝達ドメインを連結する短いオリゴリンカーまたはポリペプチドリinkerと、1つまたは複数の細胞内共刺激シグナル伝達ドメインと、一次シグナル伝達ドメインを含むCARをコードする特定のポリヌクレオチドを用いて、免疫エフェクター細胞を遺伝子改変する。

【0442】

一実施形態では、CD79A発現癌細胞を標的化する抗CD79ACARを発現するようにT細胞を遺伝子改変し、CAR-T細胞を、必要とするレシピエントに注入する細胞療法の一つが提供されている。注入された細胞は、レシピエントの疾患原因細胞を死滅することができる。抗体療法とは異なり、CAR-T細胞は*in vivo*で自己複製することができ、癌療法を持続させることができる長期持続性をもたらす。

10

【0443】

一実施形態では、抗CD79ACAR-T細胞は、ロバストな*in vivo*でのT細胞増殖が可能であり、長時間残存することができる。別の実施形態では、抗CD79ACAR-T細胞は、任意のさらなる腫瘍形成または腫瘍増殖を阻止するように再活性化され得る、特定のメモリーT細胞または幹細胞メモリーT細胞へと変わる。

【0444】

特定の実施形態では、本明細書で考察されているCARを備えた免疫エフェクター細胞を含む組成物を、CD79A発現癌細胞または癌幹細胞に関連した病態の治療に使用する。

20

CARを含む免疫エフェクター細胞を用いて治療、予防、または改善され得る病態の具体例は、特定の実施形態で考察されている。

【0445】

特定の実施形態では、本明細書で考察されているCAR改変T細胞を含む組成物を、液性癌または血液癌の治療に使用する。

【0446】

特定の実施形態では、液性癌または血液癌は、白血病、リンパ腫、及び多発性骨髄腫からなる群から選択される。

30

【0447】

特定の実施形態では、液性癌または血液癌は、急性リンパ性白血病(ALL)、急性骨髄性白血病(AML)、骨髄芽球性白血病、前骨髄球性白血病、骨髄単球性白血病、単球性白血病、赤白血病、ヘアリーセル白血病(HCL)、慢性リンパ性白血病(CLL)及び慢性骨髄性白血病(CML)、慢性骨髄単球性白血病(CMML)、真性多血症、ホジキンリンパ腫、結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、小リンパ球性リンパ腫(SLL)、びまん性大B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、免疫芽球性大細胞型リンパ腫、前駆Bリンパ芽球性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、辺縁層リンパ腫、菌状息肉症、未分化大細胞リンパ腫、セザリー症候群、前駆Tリンパ芽球性リンパ腫、多発性骨髄腫、顕性多発性骨髄腫、くすぶり型多発性骨髄腫、形質細胞性白血病、非分泌型骨髄腫、IgD骨髄腫、骨硬化性骨髄腫、孤立性骨形質細胞腫、ならびに髄外性形質細胞腫からなる群から選択される。

40

【0448】

特定の実施形態では、液性癌または血液癌は、急性リンパ性白血病(ALL)、慢性リンパ性白血病(CLL)、ヘアリーセル白血病(HCL)、多発性骨髄腫(MM)、急性骨髄性白血病(AML)、または慢性骨髄性白血病(CML)からなる群から選択される。

【0449】

好ましい実施形態では、液性癌または血液癌はDLBCLである。

【0450】

50

好ましい実施形態では、液性癌または血液癌は再発性／難治性DLBCLである。

【0451】

特定の実施形態では、本明細書で考察されている抗CD79ACAR発現免疫エフェクター細胞、または該細胞を含む組成物の治療有効量を、それを必要とする患者に、単体で、または1つもしくは複数の治療剤と組み合わせて投与することを含む方法が提供されている。特定の実施形態では、CD79A発現癌細胞に関連する病態を発症するリスクのある患者の治療に、該細胞を用いる。したがって、特定の実施形態では、該CAR改変細胞の治療有効量を必要とする対象に投与することを含む、癌の少なくとも1つの症状の治療、または予防、または改善方法が本明細書で考察されている。

【0452】

「個体」及び「対象」という用語は、本明細書で使用する場合、交換可能に用いられることが多く、遺伝子療法ベクター、細胞ベース療法、及び本明細書のいずれかに記載の方法で治療することができる疾患、障害、または病態の症状を呈する任意の動物を意味する。好ましい実施形態では、対象は、遺伝子療法ベクター、細胞ベース療法、及び本明細書のいずれかに記載の方法で治療することができる癌に関連する疾患、障害、または病態の症状を呈する任意の動物を含む。好適な対象（例えば、患者）には、実験動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、またはモルモットなど）、家畜、及び飼育動物またはペット（ネコまたはイヌなど）が含まれる。非ヒト霊長類、及び好ましくはヒト患者も含まれる。典型的な対象として、CD79A発現癌（例えば、DLBCL）を有するか、CD79A発現癌を有すると診断されているか、またはCD79A発現癌を有するリスクのあるヒト患者が挙げられる。

【0453】

用語「患者」は、本明細書で使用する場合、遺伝子療法ベクター、細胞ベース療法、及び本明細書のいずれかに開示された方法で治療することができる特定の疾患、障害、または病態を持つと診断された対象を意味する。

【0454】

「治療」または「治療する」は、本明細書で使用する場合、疾患の症状もしくは病態または病状に対する任意の有益な作用または望ましい作用を含んでおり、処置する疾患または病態の1つまたは複数の測定可能なマーカーを最小限減少させることを含む場合もある。治療は、任意選択的に、疾患もしくは病態が軽減されること、または疾患もしくは病態の進行が遅れることを含む場合がある。「治療」は、疾患または病態またはその関連症候の完全な根絶または治癒を必ずしも意味するものではない。

【0455】

「予防する」、及び同様の語である「予防した」「予防している」といった用語は、本明細書で使用する場合、疾患もしくは病態の発症する可能性または再発する可能性を、防止、阻止、または低減する手段を示している。これらの用語はまた、疾患もしくは病態の発病もしくは再発を遅らせること、または疾患もしくは病態の症状の発症もしくは再発を遅らせることを意味する。「予防」及び同様の語は、本明細書で使用する場合、疾患もしくは病態の発病前または再発前に、疾患もしくは病態の程度、影響、症状、及び／または負荷を軽減することを含む。

【0456】

語句「少なくとも1つの症状を改善する」は、本明細書で使用する場合、対象が治療を受けている疾患または病態の1つまたは複数の症状を軽減することを意味する。特定の実施形態では、治療される疾患または病態は癌であり、そこで、改善される1つまたは複数の症状には、以下に限定されないが、脱力、疲労、息切れ、易傷性及び易出血性、頻回感染、リンパ節腫大、腹部の膨張または痛み（腹部臓器肥大に起因）、骨痛または関節痛、骨折、予期しない体重減少、食欲不振、寝汗、持続性微熱、ならびに排尿減少（腎臓機能障害に起因）が含まれる。

【0457】

「増大」、または「促進」、または「増加」、または「増殖」は、本明細書で考察され

10

20

30

40

50

ている組成物（例えば、CARをコードする遺伝子改変T細胞またはベクター）が、ビヒクルまたは対照分子／組成物により生じる生理学的応答に比べて、該応答の増大（すなわち下流作用）を生じさせるか、誘発するか、または引き起こすことができることを意味する。測定可能な生理学的応答には、当該技術分野及び本明細書における理解から明白であるものの中で、T細胞増殖の増加、活性化の増加、持続性の増加、及び／または癌細胞死滅能の増加などが含まれ得る。「増加」または「増大」した量は通例、「統計学的に有意な」量であり、ビヒクルまたは対照組成物により生じる応答に対して、1.1倍、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、またはそれ以上（例えば、500倍、1000倍）（これらの数値間かつ1を超える全ての整数及び小数点を含み、例えば1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8

10

【0458】

「減少」、または「低下」、または「減る」、または「低減」、または「軽減」は、通例、本明細書で考察されている組成物が、ビヒクルまたは対照分子組成物により生じる生理学的応答に比べて、該応答の低下（すなわち下流作用）を生じさせるか、誘発するか、または引き起こすことができることを意味する。「減少」または「低減」した量は通例、「統計学的に有意な」量であり、ビヒクルもしくは対照組成物により生じる応答（参照応答）または特定の細胞系統の応答に対して、 $1/1.1$ 、 $1/1.2$ 、 $1/1.5$ 、 $1/2$ 、 $1/3$ 、 $1/4$ 、 $1/5$ 、 $1/6$ 、 $1/7$ 、 $1/8$ 、 $1/9$ 、 $1/10$ 、 $1/15$ 、 $1/20$ 、 $1/30$ 、またはそれ以上（例えば、 $1/500$ 、 $1/1000$ ）（分母の値は、前記分母の数値間かつ1を超える全ての整数及び小数点を含み、例えば1.5、1.6、1.7、1.8なども含む）に減少した量を含み得る。

20

【0459】

「維持する」、または「持続する」、または「維持」、または「変化なし」、または「実質的な変化なし」、または「実質的な減少なし」は、通例、ビヒクルもしくは対照分子／組成物により生じる生理学的応答または特定の細胞系統の応答に比べて、本明細書で考察されている組成物が、細胞内で同様の応答（すなわち下流作用）を生じさせるか、誘発するか、または引き起こす性質を意味する。同様の応答は、参照応答とは実質的に異なっていないか、測定可能な違いが見られない応答である。

【0460】

一実施形態では、癌の治療を必要とする対象における癌の治療方法は、本明細書で考察されている遺伝子改変免疫エフェクター細胞を含む組成物の有効量、例えば治療有効量を投与することを含む。投与の量及び頻度は、患者の病態、患者の疾患の種類及び重症度などの因子により決定されるが、適正な投与量を臨床試験により決定することもできる。

30

【0461】

一実施形態では、対象に投与される組成物に含まれる免疫エフェクター細胞、例えばT細胞の量は、少なくとも 0.1×10^5 個の細胞、少なくとも 0.5×10^5 個の細胞、少なくとも 1×10^5 個の細胞、少なくとも 5×10^5 個の細胞、少なくとも 1×10^6 個の細胞、少なくとも 0.5×10^7 個の細胞、少なくとも 1×10^7 個の細胞、少なくとも 0.5×10^8 個の細胞、少なくとも 1×10^8 個の細胞、少なくとも 0.5×10^9 個の細胞、少なくとも 1×10^9 個の細胞、少なくとも 2×10^9 個の細胞、少なくとも 3×10^9 個の細胞、少なくとも 4×10^9 個の細胞、少なくとも 5×10^9 個の細胞、または少なくとも 1×10^{10} 個の細胞である。

40

【0462】

特定の実施形態では、約 1×10^7 個のT細胞～約 1×10^9 個のT細胞、約 2×10^7 個のT細胞～約 0.9×10^9 個のT細胞、約 3×10^7 個のT細胞～約 0.8×10^9 個のT細胞、約 4×10^7 個のT細胞～約 0.7×10^9 個のT細胞、約 5×10^7 個のT細胞～約 0.6×10^9 個のT細胞、または約 5×10^7 個のT細胞～約 0.5×10^9 個のT細胞を対象に投与する。

【0463】

50

一実施形態では、対象に投与される組成物に含まれる免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞の量は、体重1kg当たり少なくとも 0.1×10^4 個の細胞、体重1kg当たり少なくとも 0.5×10^4 個の細胞、体重1kg当たり少なくとも 1×10^4 個の細胞、体重1kg当たり少なくとも 5×10^4 個の細胞、体重1kg当たり少なくとも 1×10^5 個の細胞、体重1kg当たり少なくとも 0.5×10^6 個の細胞、体重1kg当たり少なくとも 1×10^6 個の細胞、体重1kg当たり少なくとも 0.5×10^7 個の細胞、体重1kg当たり少なくとも 1×10^7 個の細胞、体重1kg当たり少なくとも 0.5×10^8 個の細胞、体重1kg当たり少なくとも 1×10^8 個の細胞、体重1kg当たり少なくとも 2×10^8 個の細胞、体重1kg当たり少なくとも 3×10^8 個の細胞、体重1kg当たり少なくとも 4×10^8 個の細胞、体重1kg当たり少なくとも 5×10^8 個の細胞、または体重1kg当たり少なくとも 1×10^9 個の細胞である。

10

【0464】

特定の実施形態では、体重1kg当たり約 1×10^6 個のT細胞～体重1kg当たり約 1×10^8 個のT細胞、体重1kg当たり約 2×10^6 個のT細胞～体重1kg当たり約 0.9×10^8 個のT細胞、体重1kg当たり約 3×10^6 個のT細胞～体重1kg当たり約 0.8×10^8 個のT細胞、体重1kg当たり約 4×10^6 個のT細胞～体重1kg当たり約 0.7×10^8 個のT細胞、体重1kg当たり約 5×10^6 個のT細胞～体重1kg当たり約 0.6×10^8 個のT細胞、体重1kg当たり約 5×10^6 個のT細胞～体重1kg当たり約 0.5×10^8 個のT細胞を対象に投与する。

【0465】

20

所望の治療をもたらすために、本明細書で考察されている組成物の複数回投与が必要である場合があることを、当業者は理解するであろう。例えば、1週間、2週間、3週間、1カ月、2カ月、3カ月、4カ月、5カ月、6カ月、1年、2年、5年、10年、またはそれ以上の期間にわたり、1回、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、もしくは10回、またはそれ以上の回数で組成物を投与する場合がある。

【0466】

特定の実施形態では、活性化された免疫エフェクター細胞を対象に投与し、続いて血液を再び採取し（またはアフエレーシスを行い）、そこから得た免疫エフェクター細胞を活性化し、活性化かつ増殖された免疫エフェクター細胞を患者に再び注入することが好ましい場合がある。このプロセスを数週間毎に複数回行うことができる。特定の実施形態では、10cc～400ccの採取した血液から得た免疫エフェクター細胞を活性化することができる。特定の実施形態では、20cc、30cc、40cc、50cc、60cc、70cc、80cc、90cc、100cc、150cc、200cc、250cc、300cc、350cc、もしくは400cc、またはそれ以上の採取した血液から得られた免疫エフェクター細胞を活性化する。理論に束縛されないが、この複数回の採血／複数回の再注入プロトコルを用いることで、免疫エフェクター細胞のうちの特定の集団を選ぶことができる。

30

【0467】

本明細書で考察されている組成物の投与は、任意の従来からの方法で行うことができ、該方法には、例えば、エアロゾル吸入、注射、経口摂取、輸注、注入または移植などがある。好ましい実施形態では、組成物を非経口的に投与する。本明細書で使用される「非経口的投与」及び「非経口的に投与する」という語句は、腸内投与及び局所投与以外には、通例注射による投与様式を意味し、以下に限定されないが、血管内、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、関節内、眼窩内、腫瘍内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、嚢下、くも膜下、脊髄内、及び胸骨内への注射及び注入を含む。一実施形態では、本明細書で考察されている組成物を、腫瘍、リンパ節、または感染部位への直接注射により対象に投与する。

40

【0468】

一実施形態では、必要な対象に、組成物の有効量を投与して、対象のB細胞に関連する病態に対する細胞免疫応答を増加させる。免疫応答には、感染した細胞を死滅させること

50

ができる細胞傷害性T細胞、調節T細胞、及びヘルパーT細胞応答により媒介される細胞免疫応答が含まれ得る。B細胞を活性化させ、それにより抗体を産生させることができるヘルパーT細胞が主に媒介する液性免疫応答も誘導され得る。種々の技術を用いて、組成物により誘導される免疫応答の種類を分析することができ、これについては、当該技術分野では、例えば、Current Protocols in Immunology, Edited by: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober (2001) John Wiley & Sons, NY, N.Yに詳細に記載されている。

【0469】

T細胞の媒介で死滅に至らせる場合には、CARとリガンドとの結合がT細胞に対するCARシグナル伝達を惹起し、その結果、種々の機序により、標的細胞のアポトーシスを誘導できるタンパク質を産生するかまたは放出するようにT細胞を誘導する、様々なT細胞シグナル伝達経路が活性化される。こうしたT細胞媒介機序には、(以下に限定されないが、)細胞内細胞傷害性顆粒をT細胞から標的細胞に導入することと、標的細胞の死滅を直接的に(または他の死滅エフェクター細胞の動員を介して間接的に)誘導することができる炎症性サイトカインをT細胞が分泌することと、標的細胞上の同種の死受容体(例えば、Fas)に結合した後に標的細胞のアポトーシスを誘導するT細胞表面の死受容体リガンド(例えば、FasL)を上方制御することとが含まれる。

【0470】

一実施形態では、CD79A発現癌と診断された対象を治療する方法であって、CD79A発現癌と診断された対象から免疫エフェクター細胞を採取することと、該免疫エフェクター細胞を本明細書で考察されているCARをコードする核酸を含むベクターで遺伝子改変し、それにより改変した免疫エフェクター細胞群を産生することと、該改変した免疫エフェクター細胞群を同一対象に投与することを含む方法が提供されている。好ましい実施形態では、免疫エフェクター細胞はT細胞を含む。

【0471】

特定の実施形態では、対象における標的細胞群に対する免疫エフェクター細胞媒介免疫調節応答を刺激する方法であって、CAR分子をコードする核酸構築物を発現する免疫エフェクター細胞群を対象に投与する工程を含む方法が、提供されている。

【0472】

特定の実施形態で考察されている細胞組成物を投与する方法には、ex vivoで遺伝子改変した免疫エフェクター細胞を再導入するのに効果的な任意の方法が含まれており、該免疫エフェクター細胞は、対象においてCARを直接発現するものであるか、または免疫エフェクター細胞の遺伝子改変前駆体を再導入して、対象に導入した際にCARを発現する成熟免疫エフェクター細胞に分化するものである。1つの方法には、本明細書で考察されている核酸構築物を用いて末梢血T細胞をex vivoで形質導入することと、形質導入した細胞を対象に戻すこととが含まれる。

【0473】

本明細書において引用された全ての刊行物、特許出願、及び発行特許は、各個別の刊行物、特許出願及び発行特許が具体的かつ個別に参照により組み込まれると明記されているかのように、参照により本明細書に組み込まれる。

【0474】

上記の実施形態では、理解を明確にするための説明及び例を示して詳細に記載しているが、本明細書に考察されている教示を考慮すれば、添付の特許請求の範囲の趣旨または範囲を逸脱することなく、それに一定の変更及び修飾を加えることができることは当業者には容易に分かることであろう。以下の実施例は、例示のためだけに提供されており、限定のために提供されるものではない。当業者は、変更または改変しても実質的に同様の結果を与えることになる種々の重要ではないパラメータを容易に認識するであろう。

【実施例】

【0475】

実施例 1

10

20

30

40

50

抗CD79ACARの構築物

ヒト化抗CD79A scFv抗体を含むCARを、抗CD79A scFvに作用可能に連結されたMNDプロモーターと、CD8 α 由来のヒンジドメイン及び膜貫通ドメインと、CD137共刺激ドメインと、それらに続くCD3 ζ 鎖の細胞内シグナル伝達ドメインとを含有するように設計した。抗CD79ACARには、免疫エフェクター細胞の表面発現に適したCD8 α シグナルペプチド（SP）配列が含まれる。表3は、抗CD79ACARレンチウイルスベクターの様々なヌクレオチドセグメントの固有の特性、ジェンバンク参照番号、ソース名称、及び引用元を示す。CD79ACARポリペプチド配列の例を配列番号25～配列番号30に記載し、CD79ACARポリヌクレオチド配列の例を配列番号31～配列番号36に記載している。

【表 3 - 1】

表 3.

ヌクレオチド	固有の特性	ジェンバンク参照番号	ソース名称	引用元
1～185	pUC19 プラスミド骨格	受託番号 L09137.2 nt 1～185	pUC19	New England Biolabs
185～222	リンカー	該当なし	合成	該当なし
223～800	CMV	該当なし	pHCMV	(1994) PNAS 91: 9564-68
801～1136	R 配列、U5 配列、PBS 配列、及びパッケージ ング配列	受託番号 M19921.2 nt 454～789	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-4 3
1137～1139	gag 開始コドン (ATG) を終止コドン (TAG) に 変更	該当なし	合成	該当なし
1140～1240	HIV-1 gag 配列	受託番号 M19921.2 nt 793～893	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-4 3
1241～1243	HIV-1 gag 配列を第 2 の終止コドンに変更	該当なし	合成	該当なし
1244～1595	HIV-1 gag 配列	受託番号 M19921.2 nt 897～1248	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-4 3
1596～1992	HIV-1 pol cPPT/CTS	受託番号 M19921.2 nt 4745～5125	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-4 3
1993～2517	HIV-1、HXB3 env 領域 (RRE) を単離	受託番号 M14100.1 nt 1875～2399	PgTAT-CMV	Malim, M. H. Nature (1988) 335:181-183
2518～2693	HIV-1 env 配列 S/A	受託番号 M19921.2 nt 8290～8470	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-4 3
2694～2708	リンカー	該当なし	合成	該当なし
2709～3096	MNDU3	該当なし	rSPA.mPro.MN D	Haas et al. Journal of Virology. 2003;77(17): 9439-9450
3097～3125	リンカー	該当なし	合成	該当なし

10

20

30

40

【表 3 - 2】

ヌクレオチド	固有の特性	ジェンバンク参照番号	ソース名称	引用元
3126～3188	シグナルペプチド		合成	該当なし
可変	抗 CD79A scFv	該当なし	合成	該当なし
3927～3935	リンカー	該当なし	合成	該当なし
3936～4142	CD8a ヒンジ及び TM	受託番号 NM_001768	合成	Milone et al (2009) Mol Ther 17(8):1453-64
4143～4268	CD137(4-1BB)シグナル 伝達ドメイン	受託番号 NM_001561	合成	Milone et al (2009) Mol Ther 17(8):1453-64
4269～4607	CD3- ξ シグナル伝達ド メイン	受託番号 NM_000734	合成	Milone et al (2009) Mol Ther 17(8):1453-64
4608～4718	HIV-1 ppt 及び U3 の一 部	受託番号 M19921.2 nt 9005～9110	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-4 3
4719～4835	HIV-1 の U3(399bp 欠 失)及び R の一部	受託番号 M19921.2 nt 9511～9627	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-4 3
4836～4859	合成ポリ A	該当なし	合成	Levitt, N. Genes & Dev (1989) 3:1019-1025
4860～4878	リンカー	該当なし	合成	該当なし ¹
4879～7351	pUC19 骨格	受託番号 L09137.2 nt 2636～2686	pUC19	New England Biolabs (添付)

【0476】

実施例 2

ヒト抗 CD79A CAR-T 細胞の評価

CD79A に特異的なキメラ抗原受容体 (CAR) (例えば、配列番号 25、配列番号 27、配列番号 29、及び配列番号 30) を、CD79A 発現細胞に対する CAR 発現及び生物学的活性に関して評価した。

【0477】

標的抗原発現

1 つの実験では、K562 細胞、Pfeiffer 細胞、及び Daudi 標的細胞について、抗 CD79A 抗体を用いて CD79A 発現に関して調べた。これらの細胞を CD79A 抗体とインキュベートして、発現をフローサイトメトリーで評価した。CD79A は、その発現が K562 細胞では検出できず、Pfeiffer 細胞では中程度に発現されており、Daudi 細胞では高発現されていた。図 1A を参照されたい。

【0478】

別の実験では、CD79A発現を、抗CD79A抗体を用いて、Daudi標的細胞、NU-DUL-1標的細胞、SU-DHL-2標的細胞、及びPfeiffer標的細胞で測定した。これらの細胞をCD79A抗体とインキュベートして、発現をフローサイトメーターで評価した。CD79A発現は、前の結果と同様にDaudi細胞で最も高くなり、NU-DUL-1細胞、SU-DHL-2細胞、及びPfeiffer細胞の順に少なくなった。図2Aを参照されたい。

【0479】

抗CD79ACAR発現

大規模の臨床上の製造プロセスにそのまま拡張可能なシステムを用いて、CAR-T細胞を産生した。簡単に説明すると、末梢血単核球(PBMC)を、IL-2(CellGenix社製)と、CD3及びCD28に特異的な抗体(Miltenyi Biotec社製)とを含有する培地で培養した。培養開始1日後に、抗CD79ACARをコードするレンチウイルスを添加した。培養の全10日間、IL-2を含む新鮮な培地を添加することにより、抗CD79ACAR-T細胞を対数期に保持した。培養終了時に、抗CD79ACAR-T細胞の発現について、フローサイトメリーを用いて調べた。1つの実験では、抗CD79ACARを発現するレンチウイルスを用いて操作した一次ヒトT細胞を、ビオチンと結合しており、かつPE結合ストレプトアビジンで検出されるヤギ抗マウス(GaM)で染色した。図1Bを参照されたい。別の実験では、T細胞の抗CD79ACAR発現を、ヤギ抗マウス(GaM)染色を用いて評価し、溶解性CD79A抗原と抗CD79ACAR-T細胞との結合を、フィコエリトリン(PE)でラベル化したCD79A細胞外ドメイン-Fc融合タンパク質で染色することによって評価した。図2Bを参照されたい。これらの試薬で抗CD79ACARを発現したT細胞を特異的に特定した。

【0480】

抗原依存性抗CD79ACAR-T細胞活性

1つの実験では、CD79A陽性(Pfeiffer及びDaudi)細胞株及びCD79A陰性(K562)細胞株に対する抗CD79ACAR-T細胞の生物学的活性を、インターフェロンガンマ(IFN γ)放出アッセイを用いて評価した。抗CD79ACAR-T細胞を、標的細胞の不在下で共培養するか、またはK562細胞(CD79A-)、Pfeiffer細胞(CD79A-低発現)、及びDaudi細胞(CD79A-高発現)と24時間共培養した。抗CD79ACAR-T細胞は、CD79A陽性細胞株が存在する場合にのみIFN γ を放出した。図1Cを参照されたい。

【0481】

別の実験では、CD79A陽性(Huh7、CD79A、Daudi、NU-DUL-1、SU-DHL-2、及びPfeiffer)細胞株及びCD79A陰性(Huh7)細胞株に対する抗CD79ACAR-T細胞の生物学的活性を、インターフェロンガンマ(IFN γ)放出アッセイを用いて評価した。抗CD79ACAR-T細胞を、標的細胞の不在下(T細胞のみ)で共培養するか、またはHuh7細胞(CD79A-)、Huh7、CD79A細胞(CD79A+)、Daudi細胞(CD79A+)、NU-DUL-1(CD79A+)、SU-DHL-2(CD79A+)、もしくはPfeiffer細胞(CD79A+)と共培養した。図2Cを参照されたい。

【0482】

以下の特許請求の範囲では、使用される用語は一般的に、特許請求の範囲を明細書及び特許請求の範囲で開示されている特定の実施形態に限定するものとして解釈されるべきではなく、特許請求の範囲が権利を付与する均等物の全範囲を含めた全ての可能な実施形態を含むものとして解釈されるべきである。したがって、特許請求の範囲は本開示により限定されるものではない。

【 図 1 A 】

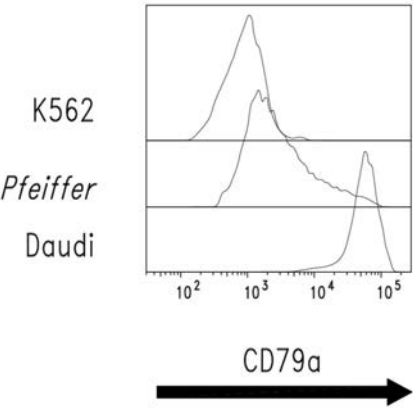


図 1 A

【 図 1 B 】

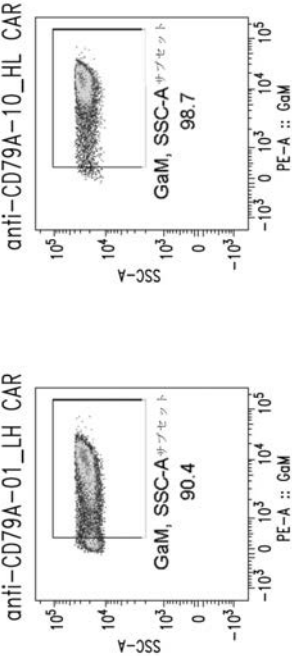


図 1 B

【 図 1 C 】

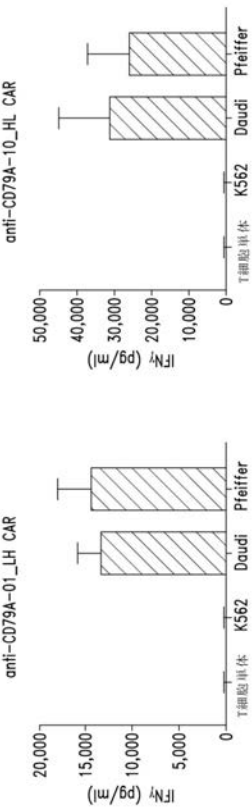


図 1 C

【 図 2 A 】

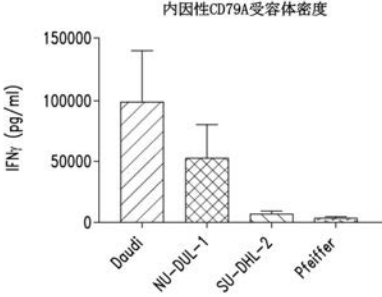


図 2 A

【図 2 B】

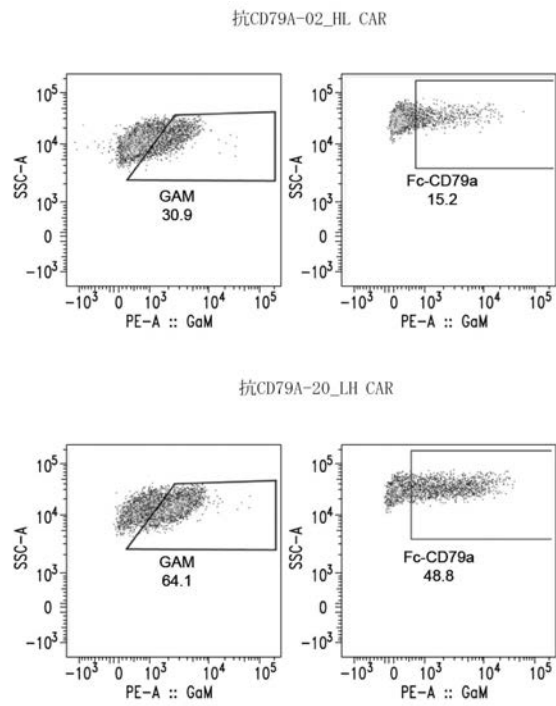


図 2 B

【図 2 C】

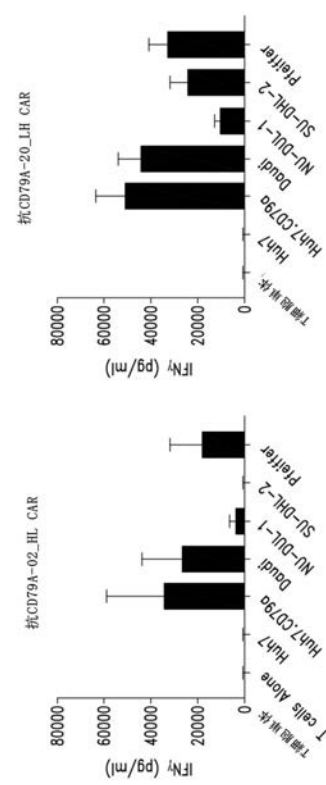


図 2 C

【配列表】

2021527409000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US19/37270

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - A61K 39/395, 39/44; C07K 16/28, 16/30, 14/705 (2019.01)

CPC - A61K 39/001129, 39/39558, 39/44; C07K 16/2896, 16/30, 14/70596

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2015/164759 A2 (BLUEBIRD BIO, INC.) 29 October 2015; page 2, lines 24-27; page 3, lines 8-18; page 12, line 7; page 14, lines 23-26; page 16, lines 25-33; page 17, lines 1-3; page 22, lines 3-10; claim 2	1-2, 3/1-2
A	WO 2017/009474 A1 (UCB BIOPHARMA SPRL) 19 January 2017; page 2, line 36 to page 3, line 13; page 12, lines 1-13; page 73, lines 5-12	1-2, 3/1-2
A	US 2012/0177664 A1 (YOKOSEKI, T et al.) 12 July 2012; paragraph [0319]	1-2, 3/1-2
A	US 2014/0294825 A1 (JN Biosciences LLC) 2 October 2014; paragraph [0157]	1-2, 3/1-2
A	WO 2017/027392 A1 (NOVARTIS AG, et al.) 16 February 2017; entire document	1-2, 3/1-2

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 October 2019 (23.10.2019)

Date of mailing of the international search report

08 NOV 2019

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Shane Thomas

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/37270

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 4-69
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

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

Groups I+, Claims 1-3; SEQ ID NO: 1 (CDRL1); SEQ ID NO: 2 (CDRL2); SEQ ID NO: 3 (CDRL3); SEQ ID NO: 4 (CDRH1); SEQ ID NO: 5 (CDRH2); SEQ ID NO: 5 (CDRH3) are directed toward a chimeric antigen receptor (CAR) comprising: an extracellular domain that comprises: a) an anti-CD79A antibody or antigen binding fragment thereof that binds one or more epitopes of a human CD79A polypeptide; b) a transmembrane domain; c) one or more intracellular co-stimulatory signaling domains; and d) a primary signaling domain.

---Continued on supplemental page---

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-3; SEQ ID NO: 1 (CDRL1); SEQ ID NO: 2 (CDRL2); SEQ ID NO: 3 (CDRL3); SEQ ID NO: 4 (CDRH1); SEQ ID NO: 5 (CDRH2); SEQ ID NO: 5 (CDRH3)

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/37270

-***-Continued from Box No. III: Observations where unity of invention is lacking-***-

The chimeric antigen receptor will be searched to the extent that it encompasses SEQ ID NO: 1 (first exemplary CDRL1); SEQ ID NO: 2 (first exemplary CDRL2); SEQ ID NO: 3 (first exemplary CDRL3); SEQ ID NO: 4 (first exemplary CDRH1); SEQ ID NO: 5 (first exemplary CDRH2); SEQ ID NO: 6 (first exemplary CDRH3). Applicant is invited to elect additional anti-CD79A antibody light and heavy chain variable region CDR sequence(s), with specified SEQ ID NO: for each, and available as an option within at least one searchable claim, to be searched. Additional anti-CD79A antibody light and heavy chain variable region CDR sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1-3 (each in-part) encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 1 (CDRL1); SEQ ID NO: 2 (CDRL2); SEQ ID NO: 3 (CDRL3); SEQ ID NO: 4 (CDRH1); SEQ ID NO: 5 (CDRH2); SEQ ID NO: 6 (CDRH3). Applicants must specify any searchable claims that encompass any additionally elected anti-CD79A antibody light and heavy chain variable region CDR sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be an anti-CD79A antibody encompassing SEQ ID NO: 9 (CDRL1); SEQ ID NO: 10 (CDRL2); SEQ ID NO: 11 (CDRL3); SEQ ID NO: 12 (CDRH1); SEQ ID NO: 13 (CDRH2); SEQ ID NO: 14 (CDRH3).

No technical features are shared between the antibody sequences of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features including: a chimeric antigen receptor (CAR) comprising: an extracellular domain that comprises: a) an anti-CD79A antibody or antigen binding fragment thereof that binds one or more epitopes of a human CD79A polypeptide, wherein the anti-CD79A antibody or antigen binding fragment thereof comprises a variable light chain sequence comprising CDRL1-CDRL3 sequences and a variable heavy chain sequence comprising CDRH1-CDRH3 sequences; b) a transmembrane domain; c) one or more intracellular co-stimulatory signaling domains; and d) a primary signaling domain; these shared technical features are previously disclosed by WO 2015/164759 A2 (BLUEBIRD BIO, INC.) (hereinafter 'Bluebird').

Bluebird discloses a chimeric antigen receptor (CAR) (claim 2) comprising: an extracellular domain (claim 2) that comprises: a) an anti-CD79A antibody or antigen binding fragment thereof that binds one or more epitopes of a human CD79A polypeptide (an anti-CD79A antibody or antigen binding fragment thereof that binds one or more epitopes of a human CD79A polypeptide; page 2, lines 24-27; page 3, lines 8-9; claim 2), wherein the anti-CD79A antibody or antigen binding fragment thereof comprises a variable light chain sequence comprising CDRL1-CDRL3 sequences (wherein the anti-CD79A antibody or antigen binding fragment thereof comprises a variable light chain sequence comprising CDRL1-CDRL3 sequences; page 14, lines 22-25; page 16, line 25 – page 17, line 3; page 22, lines 3-10) and a variable heavy chain sequence comprising CDRH1-CDRH3 sequences (a variable heavy chain sequence comprising CDRH1-CDRH3 sequences; page 14, lines 22-25; page 16, line 25 – page 17, line 3; page 22, lines 3-10); b) a transmembrane domain (claim 2); c) one or more intracellular co-stimulatory signaling domains (claim 2); and d) a primary signaling domain (claim 2).

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Bluebird reference, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13	(2006.01)	C 1 2 N	15/13	
C 1 2 N 15/12	(2006.01)	C 1 2 N	15/12	
C 1 2 N 15/63	(2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 N 15/86	(2006.01)	C 1 2 N	15/86	Z
C 1 2 N 15/867	(2006.01)	C 1 2 N	15/867	Z
C 1 2 N 15/11	(2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z
C 1 2 N 7/01	(2006.01)	C 1 2 N	7/01	
C 1 2 N 5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N 5/0783	(2010.01)	C 1 2 N	5/0783	
A 6 1 K 35/17	(2015.01)	A 6 1 K	35/17	A
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	

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 フリードマン, ケビン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 7 6, メルローズ, クローバー サークル 4

(72)発明者 パーキンス, モリー リード

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 8 6, ミルトン, ブラッドリー ロード 6 4

Fターム(参考) 4B065 AA94X AA94Y AA97X AB01 AC14 BA02 CA44

4C087 AA01 AA02 BB37 CA12 DA31 NA14 ZB26 ZB27

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA42 DA50 DA76 EA28

FA74