

(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2014-534207

(P2014-534207A)

(43) 公表日 平成26年12月18日(2014.12.18)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00	Z N A 4 B 0 2 4
C07K 14/705 (2006.01)	C07K 14/705	4 B 0 6 3
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28	4 B 0 6 5
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00	A 4 C 0 8 4
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4 C 0 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 46 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-537287 (P2014-537287)	(71) 出願人	510002280 アメリカ合衆国
(86) (22) 出願日	平成24年10月19日 (2012.10.19)		メリーランド州 208 92-7660 ベトヘスダ エムエスシ
(85) 翻訳文提出日	平成26年6月6日 (2014.6.6)		-7660 スイテ325 エクエクトイ
(86) 國際出願番号	PCT/US2012/061025		ブ ボウレバルド 6011 ナショナル
(87) 國際公開番号	W02013/059593		インスティテュート オブ ヘルス オ
(87) 國際公開日	平成25年4月25日 (2013.4.25)		フィス オブ テクノロジー トランスフ
(31) 優先権主張番号	61/549,516		アー
(32) 優先日	平成23年10月20日 (2011.10.20)	(74) 代理人	100080791 弁理士 高島 一
(33) 優先権主張国	米国(US)	(74) 代理人	100125070 弁理士 土井 京子
		(74) 代理人	100136629 弁理士 鎌田 光宣

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗CD22キメラ抗原受容体

(57) 【要約】

本開示は、a) H A 2 2 の抗原結合領域、膜貫通ドメイン、及び細胞内 T 細胞シグナル伝達ドメイン；又は b) B L 2 2 の抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、並びに C D 2 8 及び / 又は C D 1 3 7 の細胞内 T 細胞シグナル伝達ドメイン、を含むキメラ抗原受容体 (C A R) を提供する。 C A R に関連する、核酸、組換え発現ベクター、宿主細胞、細胞集団、抗体又はその抗原結合部位、及び医薬組成物が開示される。 哺乳動物におけるがんの存在を検出する方法、及び哺乳動物におけるがんを治療又は予防する方法もまた開示される。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) H A 2 2 の抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞内 T 細胞シグナル伝達ドメイン；又は、

b) B L 2 2 の抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、並びに i) C D 2 8 及び / 若しくは i i) C D 1 3 7 を含む細胞内 T 細胞シグナル伝達ドメイン、
を含むキメラ抗原受容体 (C A R)。

【請求項 2】

抗原結合ドメインが、配列番号 1 又は 2 を含むアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む
、請求項 1 に記載の C A R。

10

【請求項 3】

抗原結合ドメインが、配列番号 3 又は 4 を含むアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む
、請求項 1 又は 2 に記載の C A R。

【請求項 4】

抗原結合ドメインが、配列番号 5 又は 6 を含むアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 3 のい
ずれか 1 項に記載の C A R。

【請求項 5】

配列番号 7 を含むリーダー配列をさらに含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の C
A R。

20

【請求項 6】

免疫グロブリンドメインをさらに含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の C A R。

【請求項 7】

免疫グロブリンドメインが、配列番号 8 、 9 又は 3 6 を含むアミノ酸配列を含む、請求
項 6 に記載の C A R。

【請求項 8】

膜貫通ドメインが i) C D 8 及び / 又は i i) C D 2 8 を含む、請求項 1 ~ 7 のい
ずれか 1 項に記載の C A R。

【請求項 9】

膜貫通ドメインが、(a) 配列番号 1 0 若しくは 3 3 を含む C D 8 アミノ酸配列、及び
/ 又は (b) 配列番号 1 1 を含む C D 2 8 アミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 8 のい
ずれか 1 項に記載の C A R。

30

【請求項 1 0】

細胞内 T 細胞シグナル伝達ドメインが、i) C D 2 8 、 i i) C D 1 3 7 、及び i i i
) C D 3 のうち 1 つ以上を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の C A R。

【請求項 1 1】

細胞内 T 細胞シグナル伝達ドメインが、配列番号 1 2 を含む C D 2 8 アミノ酸配列を含
む、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の C A R。

【請求項 1 2】

細胞内 T 細胞シグナル伝達ドメインが、配列番号 1 3 又は 3 4 を含む C D 1 3 7 アミノ
酸配列を含む、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の C A R。

40

【請求項 1 3】

細胞内 T 細胞シグナル伝達ドメインが、配列番号 1 4 又は 3 5 を含む C D 3 アミノ酸
配列を含む、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の C A R。

【請求項 1 4】

配列番号 1 5 ~ 2 0 及び 3 2 のいずれか 1 つを含むアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 1
0 のいずれか 1 項に記載の C A R。

【請求項 1 5】

請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の C A R をコードするヌクレオチド配列を含む核
酸。

【請求項 1 6】

50

配列番号 21～23 及び 38 からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項 15 に記載の核酸。

【請求項 17】

配列番号 24～25 及び 39 からなる群より選択されるヌクレオチド配列をさらに含む、請求項 16 に記載の核酸。

【請求項 18】

請求項 15～17 のいずれか 1 項に記載の核酸を含む組換え発現ベクター。

【請求項 19】

請求項 18 に記載の組換え発現ベクターを含む、単離された宿主細胞。

【請求項 20】

請求項 19 に記載の宿主細胞を少なくとも 1 つ含む、細胞集団。

10

【請求項 21】

請求項 1～14 のいずれか 1 項に記載の CAR と特異的に結合する、抗体又はその抗原結合部分。

【請求項 22】

請求項 1～14 のいずれか 1 項に記載の CAR、請求項 15～17 のいずれか 1 項に記載の核酸、請求項 18 に記載の組換え発現ベクター、請求項 19 に記載の宿主細胞、請求項 20 に記載の細胞集団、又は請求項 21 に記載の抗体若しくはその抗原結合部分と、医薬上許容される担体とを含む、医薬組成物。

【請求項 23】

(a) 哺乳動物由来の 1 つ以上の細胞を含むサンプルを、請求項 1～14 のいずれか 1 項に記載の CAR、請求項 15～17 のいずれか 1 項に記載の核酸、請求項 18 に記載の組換え発現ベクター、請求項 19 に記載の宿主細胞、請求項 20 に記載の細胞集団、又は請求項 21 に記載の抗体若しくはその抗原結合部分と接触させることによって、複合体を形成する工程、及び

(b) 複合体を検出する工程であって、該複合体の検出が哺乳動物におけるがんの存在を示す工程、

を含む哺乳動物におけるがんの存在を検出する方法。

【請求項 24】

請求項 1～14 のいずれか 1 項に記載の CAR、請求項 15～17 のいずれか 1 項に記載の核酸、請求項 18 に記載の組換え発現ベクター、請求項 19 に記載の宿主細胞、請求項 20 に記載の細胞集団、請求項 21 に記載の抗体若しくはその抗原結合部分、又は請求項 22 に記載の医薬組成物を、哺乳動物においてがんを治療又は予防するのに有効な量で投与することを含む、哺乳動物におけるがんの治療又は予防方法。

30

【請求項 25】

哺乳動物におけるがんの治療又は予防に使用するための、請求項 1～14 のいずれか 1 項に記載の CAR、請求項 15～17 のいずれか 1 項に記載の核酸、請求項 18 に記載の組換え発現ベクター、請求項 19 に記載の宿主細胞、請求項 20 に記載の細胞集団、請求項 21 に記載の抗体若しくはその抗原結合部分、又は請求項 22 に記載の医薬組成物。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本特許出願は、2011年10月20日出願の米国仮特許出願第 61/549,516 号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）の利益を主張する。

【0002】

電子提出された物件の参照による組み込み

本明細書と同時提出される以下：

69,127 バイトの ASCII (テキスト) ファイル 1 件、名称「711021_ST」

50

25. t x t」2012年10月18日作成、

と特定される、コンピューターで可読なスクレオチド／アミノ酸の配列表が、本明細書中、参照によりその全体が組み込まれる。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

がんは、公衆衛生上の問題である。化学療法などの治療法の進歩にも関わらず、血液系悪性腫瘍 (hematological malignancies) を含む多くのがんの予後は、不良であり得る。例えば、2000年にアメリカ合衆国では、非ホジキンリンパ腫 (non-Hodgkin's lymphoma) 及び白血病に起因して45,000例超の死亡が予想されたと見積もられている (Greenlees, C A Cancer J. Clin., 50: 7-33 (2000))。従って、がん、特に血液系悪性腫瘍に対して、満たされていない更なる治療のニーズが存在する。

10

【発明の概要】

【0004】

発明の簡単な要旨

本発明は、a) H A 2 2 の抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞内T細胞シグナル伝達ドメイン；又はb) B L 2 2 の抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、並びにi) C D 2 8 及び／若しくはii) C D 1 3 7 を含む細胞内T細胞シグナル伝達ドメイン、を含むキメラ抗原受容体 (CAR) を提供する。

20

【0005】

本発明の更なる実施形態は、本発明のCARに関連する、関連の核酸、組換え発現ベクター、宿主細胞、細胞集団、抗体又はその抗原結合部位、及び医薬組成物を提供する。

【0006】

本発明の更なる実施形態は、哺乳動物におけるがんの存在を検出する方法、及び哺乳動物におけるがんの治療又は予防方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0007】

図面の各図の簡単な説明

【図1】図1は、以下のCAR: H A 2 2 - 第二世代バージョン1 (; 黒四角、配列番号15)、H A 2 2 - 第三世代 (; 白四角、配列番号16)、B L 2 2 - 第二世代バージョン1 (; 黒丸、配列番号19)、B L 2 2 - 第三世代 (; 白丸、配列番号20)、H A 2 2 - S H - 第二世代バージョン1 (上向き黒三角；黒三角、配列番号17)、H A 2 2 - S H - 第三世代 (; 白三角、配列番号18)、m o c k 導入 (形質導入されていない、X)、又はC D 1 9 特異的CAR (*) のうちの一種を形質導入されたエフェクターヒトT細胞による、⁵¹Crで標識されたターゲット白血病細胞の溶解 (%) (%) lysis) を、様々なエフェクターとターゲットの比 (E : T比) において示すグラフである。X軸にE : T比を、Y軸にターゲットの溶解 (%) を示す。該図は、SEM細胞株の直接分析を示し、試験した他の細胞株で見られる溶解特性を代表する。

30

【図2】図2A～2Bは、三種の異なる第二世代バージョン1 抗C D 2 2 CAR構築物 : H A 2 2 - C H 2 C H 3 (; 四角、配列番号15)、B L 2 2 - C H 2 C H 3 (上向き黒三角；三角、配列番号19)、又はH A 2 2 - S H (短い免疫グロブリン定常ドメイン配列；X、配列番号17) のうちの一種を形質導入されたエフェクター細胞による、ターゲット白血病細胞株 (KOPN8 (A) 又はNALM6 (B)) の溶解 (%) を、様々なE : T比において示すグラフである。抗C D 1 9 CAR (; ひし形) は、コントロールとして含めた。Y軸はターゲット細胞の溶解 (%) を指す。X軸は、実施例4に記載されるようにそれぞれ個別のCAR構築物の形質導入率によって正規化したE : T比を示す。線は、Excel (Microsoft) の対数曲線のあてはめ (Log curve fitting) を用いて描いた。

40

【図3】図3A～3Bは、三種の異なる第二世代バージョン1 抗C D 2 2 CAR構築物

50

: H A 2 2 - C H 2 C H 3 (; 四角、配列番号 1 5)、B L 2 2 - C H 2 C H 3 (上向き黒三角 ; 三角、配列番号 1 9)、又は H A 2 2 - S H (短い免疫グロブリン定常ドメイン配列、X、配列番号 1 7) のうちの一種を形質導入されたエフェクター細胞による、ターゲット白血病細胞株 (R E H (A) 又は S E M (B)) の溶解 (%) を、様々な E : T 比において示すグラフである。抗 C D 1 9 C A R (; ひし形) はコントロールとして含めた。Y 軸はターゲット細胞の溶解 (%) を指す。X 軸は、実施例 4 に記載されるようにそれぞれ個別の C A R 構築物の形質導入率によって正規化した E : T 比を示す。線は、E x c e l (M i c r o s o f t) の対数曲線のあてはめを用いて描いた。

【図 4】図 4 は、様々な C A R 構築物 : H A 第二 (配列番号 1 5) ; H A 第三 (配列番号 1 6) ; H A S H 第二 (配列番号 1 7) ; 又は H A S H 第三 (配列番号 1 8) のうちの一種を発現するレトロウイルスベクターを形質導入されたエフェクター T 細胞による、ターゲット細胞株 (K 5 6 2 (濃い灰色) 、 R E H (黒) 、 S E M (白) 又は N A L M 6 (薄い灰色)) の溶解 (%) を示すグラフである。X 軸には、試験したトランスフェクトされた細胞集団のそれぞれを記載する。M o c k : 他の群のように活性化され培養されたが、C A R ベクターを含むレトロウイルス上清 (s / n) に曝露されなかつた T 細胞 (形質導入されていない) 。抗 C D 1 9 抗原は、コントロールとして使用した。

【図 5】図 5 A 及び 5 B は、形質導入されていないエフェクター T 細胞 (A 、「 m o c k 」) 、又は第二世代バージョン 1 H A S H 2 2 C A R (配列番号 1 7) (B 、「 H A S H 2 8 z 」) を形質導入されたエフェクター T 細胞による、 C D 2 2 を発現するターゲット白血病細胞株 (R E H (ひし形) 、 S E M (四角) 、 N A L M 6 (三角) 、 K O P N 8 (X) 、 D a u d i (丸) 、 R a j i (|)) 又は C D 2 2 陰性コントロールターゲット細胞株 (K 5 6 2 (*)) の溶解 (%) を、様々な E : T 比において示すグラフである。

【図 6】図 6 A ~ 6 D は、形質導入されていないエフェクター T 細胞 (三角、「 m o c k 」) 、又は第二世代バージョン 1 H A 2 2 C A R (丸、 H A 2 2 2 8 z 、配列番号 1 5) 若しくは第二世代バージョン 1 B L 2 2 C A R (四角、 B L 2 2 2 8 z 、配列番号 1 9) を形質導入されたエフェクター細胞による、 C D 2 2 を発現するターゲット白血病細胞株 (R E H (A) 、 S E M (B) 、 N A L M - 6 (C) 又は K O P N - 8 (D)) の溶解 (%) を、様々な E : T 比において示すグラフである。図 6 E ~ 6 H は、形質導入されていないエフェクター T 細胞 (三角、「 m o c k 」) 、又は第三世代 H A 2 2 C A R (丸、 H A 2 2 2 8 B B z 、配列番号 1 6) 若しくは第三世代 B L 2 2 C A R (四角、 B L 2 2 2 8 B B z 、配列番号 2 0) を形質導入されたエフェクター細胞による、 C D 2 2 を発現するターゲット白血病細胞株 (R E H (E) 、 S E M (F) 、 N A L M - 6 (G) 又は K O P N - 8 (H)) の溶解 (%) を、様々な E : T 比において示すグラフである。図 6 I ~ 6 L は、形質導入されていないエフェクター T 細胞 (三角、「 m o c k 」) 、又は C H 2 C H 3 ドメインを伴った (丸、 H A 2 2 2 8 z 、配列番号 1 5) 若しくは伴わない (四角、 H A S H 2 2 2 8 z 、配列番号 1 7) 第二世代バージョン 1 H A 2 2 C A R を形質導入されたエフェクター細胞による、 C D 2 2 を発現するターゲット白血病細胞株 (R E H (I) 、 S E M (J) 、 N A L M - 6 (K) 又は K O P N - 8 (L)) の溶解 (%) を、様々な E : T 比において示すグラフである。

【図 7】図 7 A は、30日の期間にわたり計測した、ルシフェラーゼ (白血病細胞にトランスフェクトし、マウスに注入した) とルシフェリン (マウスに注入した) との反応により生じた生物発光シグナル (光子 / s / c m² / s r) を示すグラフである。コントロール T 細胞 (「 m o c k 」 、形質導入されていない、下向き黒三角) 、又は H A S H 2 2 C A R - 第二世代バージョン 1 (配列番号 1 7 、黒四角) 、 H A S H 2 2 C A R - 第三世代 (配列番号 1 8 、上向き黒三角) 若しくは H A 2 2 S H - C A R - 第二世代バージョン 2 (配列番号 3 2 、白四角) を形質導入された T 細胞で、マウスを処理した。光子 / s / c m² / s r 値が高くなればなるほど、より大きな全身腫瘍組織量を指す。図 7 B は、30日間にわたり、コントロール T 細胞 (「 m o c k 」 、形質導入されていない、丸) 、又は H A S H 2 2 C A R - 第二世代バージョン 1 (配列番号 1 7 、四角) 、 H A S H 2 2 C A R - 第三世代 (配列番号 1 8 、) 若しくは H A 2 2 S H 第二世代バージョン 2

10

20

30

40

50

(配列番号32、)を形質導入されたT細胞で処理したマウスの生存(%)を示すグラフである(Mock対HA22SH28z、P=0.001; mock対HA22SH28BBz、P=0.004; mock対HA22SHBBz、p=0.001; HA22SH28Z対HA22SH28BBz、p=0.03、HA22SH28z対HA22SHBBz、非有意)。

【図8】図8A～8Dは、ターゲット細胞(РЕH(A)、SEM(B)、NALM-6(C)又はKOPN-8(D))と共に培養した際の、HA2228z(配列番号15)、HA2228BBz(配列番号16)、BL2228z(配列番号19)、BL2228BBz(配列番号20)、HASH2228z(配列番号17)又はHASH2228BBz(配列番号18)のうちの一種を形質導入されたエフェクター細胞における、実施例4に記載されるように計算した、溶解単位を示すグラフである。

【図9】図9A～9Cは、白血病細胞株(NALM6-GL(低CD22))(A)、Raji(高CD22)(B)又はK562(CD22陰性)(C)と共に培養した際に、以下のCAR:抗CD19、HASH22-第二世代バージョン1(HA22SH-28Z)、HASH22-第二世代バージョン2(HA22SH-BBZ)若しくはHASH22-第三世代(HA22SH-28BBZ)のうちの一種を形質導入された、又は形質導入されていない(mock)T細胞が分泌するインターフェロン(IFN)- γ の量(pg/ml)を示すグラフである。図9D～9Fは、白血病細胞株(NALM6-GL(低CD22))(A)、Raji(高CD22)(B)又はK562(CD22陰性)(C)と共に培養した際に、以下のCAR:抗CD19、HASH22-第二世代バージョン1、HASH22-第二世代バージョン2若しくはHASH22-第三世代のうちの一種を形質導入された、又は形質導入されていない(mock)、T細胞により分泌されるインターロイキン(IL)-2の量(pg/ml)を示すグラフである。図9G～9Iは、白血病細胞株(NALM6-GL(低CD22))(A)、Raji(高CD22)(B)又はK562(CD22陰性)(C)と共に培養した際に、以下のCAR:抗CD19、HASH22-第二世代バージョン1、HASH22-第二世代バージョン2若しくはHASH22-第三世代のうちの一種を形質導入された、又は形質導入されていない(mock)T細胞が分泌する腫瘍壊死因子(TNF)- α の量(pg/ml)を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0008】

発明の詳細な説明

本発明の一実施形態は、a) HA22の抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞内T細胞シグナル伝達ドメイン；又はb) BL22の抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、並びにi) CD28及び/若しくはii) CD137を含む細胞内T細胞シグナル伝達ドメイン、を含むキメラ抗原受容体(CAR)を提供する。

【0009】

キメラ抗原受容体(CAR)は、T細胞シグナル伝達ドメインと結合した抗体の抗原結合ドメイン(例、一本鎖可変断片(scfv))を含む、人工的に構築されたハイブリッドタンパク質又はポリペプチドである。CARの特徴は、モノクローナル抗体の抗原結合能力をいかし、MHC非拘束性の方法で、選択されたターゲットに対するT細胞の反応性と特異性を再指示(redirect)する能力を含む。MHC非拘束性抗原認識は、CARを発現するT細胞に抗原処理とは独立に抗原を認識する能力を与え、したがって腫瘍回避の主要な機構を迂回する。さらに、T細胞に発現させた場合、有利なことに、CARは、内在のT細胞受容体(TCR)のアルファ及びベータ鎖と二量体化しない。

【0010】

本明細書で使用する場合、用語「抗原特異性を有する」及び「抗原特異的応答をひきおこす」とは、CARと抗原との結合が免疫応答をひきおこすように、CARが抗原に特異的に結合し、抗原を免疫学的に認識し得ることを意味する。

【0011】

10

20

30

40

50

本発明のCARは、CD22に対する抗原特異性を有する。CD22は、系統が制限された(lineage-restricted)B細胞の抗原で、免疫グロブリン(Ig)スーパーファミリーに所属する。CD22は、60~70%のB細胞リンパ腫及び白血病(例、B細胞慢性リンパ性白血病、有毛細胞白血病、急性リンパ性白血病(ALL)及びバーキットリンパ腫)において発現し、B細胞発生の初期段階の細胞表面、又は幹細胞には存在しない(Vaickusら, Crit. Rev. Oncol. / Hematol., 11: 267-297 (1991); Bangら, Clin. Cancer Res., 11: 1545-50 (2005))。

【0012】

特定の理論又はメカニズムに束縛されるものではないが、CD22に対する抗原特異的応答をひき起こすことによって、本発明のCARは以下のうち1つ以上を提供すると考えられる: CD22を発現するがん細胞をターゲットとし破壊する、がん細胞を減少させる又は排除する、腫瘍部位へ免疫細胞の浸潤を促進する、及び抗がん応答を増強する/拡大させる。B細胞発生の初期段階又は幹細胞ではCD22を発現していないため、有利なことに、本発明のCARは、幹細胞及び/又は発生初期段階のB細胞をターゲットとし/破壊することを実質的に避けることが予期される。

【0013】

本発明は、免疫毒素HA22又はBL22の抗原結合ドメインを含むCARを提供する。免疫毒素BL22及びHA22は、バクテリア毒素と融合させたCD22特異的scFvを含む治療剤である。該免疫毒素は、がん細胞の表面に結合し、がん細胞を殺す。BL22は、シュードモナス(*Pseudomonas*)エンドトキシンAの38-kD切断型と融合させた、ジスルフィド安定化された抗CD22抗体の一本鎖可変断片(*chain variable fragment*) (dsFv) RFB4を含む(Bangら, Clin. Cancer Res., 11: 1545-50 (2005))。HA22(CAT8015、モキセツモマブ・パストックス(moxetumomab pasudotox))は、変異の入った、BL22の高親和性バージョンである(Hoら, J. Biol. Chem., 280(1): 607-17 (2005))。

【0014】

HA22及びBL22の抗原結合ドメインは、特異的にCD22と結合する。HA22及びBL22の抗原結合ドメインの適切な配列は、例えば、米国特許第7,541,034号; 7,355,012号; 及び7,982,011号(これらは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に開示されている。これに関して、本発明の好ましい実施形態は、HA22若しくはBL22抗原結合ドメインの一本鎖可変断片(scFv)を含むか、HA22若しくはBL22抗原結合ドメインの一本鎖可変断片(scFv)からなるか、又は本質的にHA22若しくはBL22抗原結合ドメインの一本鎖可変断片(scFv)からなる抗原結合ドメインを含むCARを提供する。

【0015】

HA22及びBL22の抗原結合ドメインそれぞれは、軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含む。HA22又はBL22の軽鎖可変領域は、配列番号1若しくは2それぞれを含んでよく、配列番号1若しくは2それからなってよく、又は本質的に配列番号1若しくは2それからなってよい。HA22又はBL22の重鎖可変領域は、配列番号3若しくは4それぞれを含み得、配列番号3若しくは4それからなり得、又は本質的に配列番号3若しくは4それからなり得る。従って、本発明の一実施形態において、抗原結合ドメインは、配列番号1若しくは2を含む軽鎖可変領域、及び/又は配列番号3若しくは4を含む重鎖可変領域を含む。

【0016】

本発明の一実施形態において、軽鎖可変領域及び重鎖可変領域は、リンカーにより結合されてよい。リンカーは、任意の適切なアミノ酸配列を含んでよい。本発明の一実施形態において、リンカーは、配列番号37を含んでよく、配列番号37からなってよく、又は本質的に配列番号37からなってよい。

10

20

30

40

50

【0017】

一実施形態において、抗原結合ドメインは、軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含んでよい。これに関して、H A 2 2 又はB L 2 2 の抗原結合ドメイン（各々が、軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含む）は、それぞれ配列番号 5 若しくは 6 を含むか、配列番号 5 若しくは 6 からなるか、又は本質的に配列番号 5 若しくは 6 からなる。

【0018】

一実施形態において、抗原結合ドメインは、リーダー配列を含む。リーダー配列は、軽鎖可変領域のアミノ末端に位置してよい。リーダー配列は、任意の適切なリーダー配列を含んでよい。一実施形態において、リーダー配列は、ヒト顆粒球単球コロニー刺激因子（G M - C S F ）受容体配列である。これに関して、抗原結合ドメインは、配列番号 7 を含むか、配列番号 7 からなるか、又は本質的に配列番号 7 からなるリーダー配列を含む。本発明の一実施形態において、リーダー配列は細胞表面におけるC A R の発現を促進し得る一方、発現したC A R においてリーダー配列の存在は、C A R が機能するために必須ではない。本発明の一実施形態において、細胞表面上でのC A R の発現に際し、リーダー配列はC A R から切り離されてよい。従って、本発明の一実施形態において、C A R はリーダー配列を欠く。

10

【0019】

一実施形態において、C A R は免疫グロブリンドメインを含む。好ましくは、その免疫グロブリンドメインは、ヒトの免疫グロブリン配列である。一実施形態において、免疫グロブリンドメインは、免疫グロブリンC H 2 及びC H 3 免疫グロブリンG（I g G 1 ）ドメイン配列（C H 2 C H 3 ）を含む。これに関して、C A R は、配列番号 8 を含むか、配列番号 8 からなるか、又は本質的に配列番号 8 からなる免疫グロブリンドメインを含む。本発明の一実施形態において、免疫グロブリンドメインは、短い免疫グロブリン定常ドメイン配列を含んでもよい。これに関して、C A R は、配列番号 9 若しくは 3 6 を含むか、配列番号 9 若しくは 3 6 からなるか、又は本質的に配列番号 9 若しくは 3 6 からなる免疫グロブリンドメインを含む。特定の理論に束縛されるものではないが、C H 2 C H 3 ドメインは、s c F v の結合モチーフをC A R 発現細胞の細胞膜から離れた場所へと伸ばし、かつ、野生型のT C R のサイズとドメイン構造をより正確に模倣し得ると考えられる。

20

【0020】

本発明の一実施形態において、C A R は膜貫通ドメインを含む。本発明の一実施形態において、膜貫通ドメインは、i) C D 8 及び / 又は i i) C D 2 8 を含む。好ましい実施形態において、C D 8 及びC D 2 8 は、ヒトのものである。C D 8 又はC D 2 8 は、全長に満たないC D 8 又はC D 2 8 それぞれを含んでよい。これに関して、C A R は、a) 配列番号 1 0 若しくは 3 3 を含むか、配列番号 1 0 若しくは 3 3 からなるか又は本質的に配列番号 1 0 若しくは 3 3 からなるC D 8 膜貫通ドメイン、及び / 又はb) 配列番号 1 1 を含むか、配列番号 1 1 からなるか、又は本質的に配列番号 1 1 からなるC D 2 8 膜貫通ドメインを含む。

30

【0021】

本発明の一実施形態において、C A R は、i) C D 2 8 、i i) C D 1 3 7 、及び i i i) C D 3 ゼータ（ ζ ）のうちの1つ以上を含む細胞内T細胞シグナル伝達ドメインを含む。好ましい実施形態において、C D 2 8 、C D 1 3 7 及びC D 3 のうちの1つ以上は、ヒトのものである。C D 2 8 は、T細胞共刺激に重要な、T細胞マーカーである。4 - 1 B B としても知られているC D 1 3 7 は、T細胞への強力な共刺激シグナルを伝達し、分化を促進させ、かつTリンパ球の長期生存を増強する。C D 3 は、T C R と関連してシグナルを生じ、免疫受容体チロシン活性化モチーフ（I T A M s ）を含む。C D 2 8 、C D 1 3 7 及びC D 3 のうちの1つ以上は、それぞれ、全長に満たないC D 2 8 、C D 1 3 7 又はC D 3 を含んでよい。これに関して、細胞内T細胞シグナル伝達ドメインは、配列番号 1 2 を含むか、配列番号 1 2 からなるか、又は本質的に配列番号 1 2 からなるC D 2 8 アミノ酸配列；配列番号 1 3 若しくは 3 4 を含むか、配列番号 1 3 若しくは 3 4 からなるか、又は本質的に配列番号 1 3 若しくは 3 4 からなるC D 1 3 7 アミノ酸配列；

40

50

及び／又は配列番号 1 4 若しくは 3 5 を含むか、配列番号 1 4 若しくは 3 5 からなるか、又は本質的に配列番号 1 4 若しくは 3 5 からなる C D 3 アミノ酸配列、のうちの 1 つ以上を含む。

【 0 0 2 2 】

本発明の一実施形態において、C A R は、C D 2 8 を含む膜貫通ドメイン、並びに C D 2 8 及び C D 3 を含む細胞内 T 細胞シグナル伝達ドメインを含む。これに関して、C A R は、配列番号 1 1 、 1 2 及び 1 4 のそれぞれを含んでよい。好ましくは、C A R は、 a) 配列番号 1 、 3 、 8 、 1 1 、 1 2 及び 1 4 のそれぞれ； b) 配列番号 2 、 4 、 8 、 1 1 、 1 2 及び 1 4 のそれぞれ；又は c) 配列番号 1 、 3 、 9 、 1 1 、 1 2 及び 1 4 のそれぞれを含む。

10

【 0 0 2 3 】

本発明の一実施形態において、C A R は、C D 8 を含む膜貫通ドメイン、並びに C D 2 8 、 C D 1 3 7 及び C D 3 を含む細胞内 T 細胞シグナル伝達ドメインを含む。これに関して、C A R は、配列番号 1 0 、 1 2 、 1 3 及び 1 4 のそれぞれを含んでよい。好ましくは、C A R は、 a) 配列番号 1 、 3 、 8 、 1 0 、 1 2 、 1 3 及び 1 4 のそれぞれ； b) 配列番号 2 、 4 、 8 、 1 0 、 1 2 、 1 3 及び 1 4 のそれぞれ；又は c) 配列番号 1 、 3 、 9 、 1 0 、 1 2 、 1 3 及び 1 4 のそれぞれを含む。

【 0 0 2 4 】

本発明の一実施形態において、C A R は、C D 8 を含む膜貫通ドメイン、並びに C D 1 3 7 及び C D 3 を含む細胞内 T 細胞シグナル伝達ドメインを含む。これに関して、C A R は、配列番号 3 3 ～ 3 5 のそれぞれを含んでよい。好ましくは、C A R は、配列番号 1 、 3 及び 3 3 ～ 3 6 のそれぞれを含む。

20

【 0 0 2 5 】

本発明の更なる実施形態は、表 1 に記載のアミノ酸配列のいずれかを含むか、該アミノ酸配列のいずれかからなるか、又は本質的に該アミノ酸配列のいずれかからなる C A R を提供する。

【 0 0 2 6 】

【表1】

配列番号	抗原結合ドメイン	更なる構成要素	
配列番号15 (HA22 CAR-第二世代バージョン1)	HA22	-CH2CH3 -CD28膜貫通ドメイン -CD28及びCD3ζ細胞内T細胞シグナル伝達ドメイン	10
配列番号16 (HA22 CAR-第三世代)	HA22	-CH2CH3 -CD8膜貫通ドメイン -CD28、CD137及びCD3ζ細胞内T細胞シグナル伝達ドメイン	
配列番号17 (HASH22 CAR-第二世代バージョン1)	HA22	-短い免疫グロブリン定常ドメイン配列 -CD28膜貫通ドメイン -CD28及びCD3ζ細胞内T細胞シグナル伝達ドメイン	
配列番号18 (HASH22 CAR-第三世代)	HA22	-短い免疫グロブリン定常ドメイン配列 -CD8膜貫通ドメイン -CD28、CD137及びCD3ζ細胞内T細胞シグナル伝達ドメイン	20
配列番号19 (BL22 CAR-第二世代バージョン1)	BL22	-CH2CH3 -CD28膜貫通ドメイン -CD28及びCD3ζ細胞内T細胞シグナル伝達ドメイン	30
配列番号20 (BL22 CAR-第三世代)	BL22	-CH2CH3 -CD8膜貫通ドメイン -CD28、CD137及びCD3ζ細胞内T細胞シグナル伝達ドメイン	
配列番号32 (HASH22 CAR-第二世代バージョン2)	HA22	-CD8膜貫通ドメイン -CD137及びCD3ζ細胞内T細胞シグナル伝達ドメイン	40

【0027】

本発明の範囲には、本明細書に記載の本発明のCARの機能的部分が含まれる。CARに関して使用される場合、用語「機能的部分」は、本発明のCARの任意の部分又は任意の断片であって、その部分又は断片がCAR（その部分又は断片はこれの一部である）（親CAR）の生物活性を保持するものをいう。機能的部分は、例えば、親CARに対して、類似の程度、同程度又はより高い程度に、ターゲット細胞を認識する能力、又は疾患を検出、治療、若しくは予防する能力を保持するCARの部分を含む。親CARに関連して、機能的部分は、親CARの例えば約10%、25%、30%、50%、68%、80%、90%、95%又はそれ以上を含み得る。

【0028】

機能的部分は、当該部分のアミノ末端若しくはカルボキシ末端又は両端に、更なるアミノ酸であって、親CARのアミノ酸配列には見られないものを含み得る。望ましくは、更なるアミノ酸は、機能的部分の生物学的機能（例えば、ターゲット細胞を認識し、がんを検出し、がんを治療し又は予防する等のこと）を妨害しない。さらに望ましくは、更なるアミノ酸が、親CARの生物活性と比較して、その生物活性を増強する。

【0029】

本発明の範囲には、本明細書に記載の、本発明のCARの機能的変異体が含まれる。本明細書に使用される用語「機能的変異体」は、親CARと実質的な又は顕著な配列同一性又は類似性を有する、CAR、ポリペプチド、又はタンパク質であって、当該機能的変異体がCAR（当該機能的変異体はこれの変異体である）の生物活性を保持するものをいう。機能的変異体は、例えば、親CARと、類似の程度に、同程度に、又はより高い程度にターゲット細胞を認識する能力を保持する、本明細書に記載のCAR（親CAR）の変異体を含む。親CARに関して、機能的変異体は、親CARに対してアミノ酸配列において、例えば、少なくとも約30%、約50%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%又はそれ以上同一であり得る。

10

【0030】

機能的変異体は、例えば、少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を伴う親CARのアミノ酸配列を含み得る。或いは又はさらに、機能的変異体は、少なくとも1つの非保存的アミノ酸置換を伴う親CARのアミノ酸配列を含み得る。この場合、非保存的アミノ酸置換が、機能的変異体の生物活性を妨害又は阻害しないことが好ましい。非保存的アミノ酸置換は、親CARと比較して機能的変異体の生物活性が増大するように、機能的変異体の生物活性を増強してよい。

20

【0031】

本発明のCARのアミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換であることが好ましい。保存的アミノ酸置換は、当該分野で公知であり、特定の物理的及び/又は化学的特性を有する1つのアミノ酸が、同じ又は類似の化学的又は物理的特性を有する別のアミノ酸と交換されるアミノ酸置換が含まれる。例えば、保存的アミノ酸置換は、酸性アミノ酸/負に帯電した極性アミノ酸の、別の酸性アミノ酸/負に帯電した極性アミノ酸での置換（例、Asp又はGlu）、非極性側鎖を有するアミノ酸の、非極性側鎖を有する別のアミノ酸での置換（例、Ala、Gly、Val、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Trp、Cys、Valなど）、塩基性アミノ酸/正に帯電した極性アミノ酸の、別の塩基性アミノ酸/正に帯電した極性アミノ酸での置換（例、Lys、His、Argなど）、極性側鎖を有する非荷電アミノ酸の、極性側鎖を有する別の非荷電アミノ酸での置換（例、Asn、Gln、Ser、Thr、Tyrなど）、ベータ分枝した側鎖を伴うアミノ酸の、ベータ分枝した側鎖を伴う別のアミノ酸での置換（例、Ile、Thr、及びVal）、芳香族の側鎖を伴うアミノ酸の、芳香族の側鎖を伴う別のアミノ酸での置換（例、His、Phe、Trp、及びTyr）などであり得る。

30

【0032】

CARは、他の構成要素（例えば他のアミノ酸）が機能的変異体の生物活性を物質的に変化させないように、本明細書に記載の特定のアミノ酸配列（単数）又は配列（複数）から本質的になり得る。

40

【0033】

本発明の実施形態のCAR（機能的部分及び機能的変異体を含む）は、CAR（又はその機能的部分若しくはその機能的変異体）が生物活性（例えば、抗原に特異的に結合する、哺乳動物において疾患細胞を検出する、又は哺乳動物において疾患を治療若しくは予防するなどの能力）を保持するならば、任意の長さのものであり得、言い換えれば、任意の数のアミノ酸を含み得る。例えば、CARは、50、70、75、100、125、150、175、200、300、400、500、600、700、800、900、100

50

00又はそれ以上のアミノ酸長など、約50～約5000のアミノ酸長であり得る。

【0034】

本発明の実施形態のCAR(本発明の機能的部分及び機能的変異体を含む)は、1つ以上の自然に存在するアミノ酸の代わりに合成アミノ酸を含み得る。かかる合成アミノ酸は、当該分野で公知であり、例えば、アミノシクロヘキサンカルボン酸、ノルロイシン、-アミノn-デカン酸、ホモセリン、S-アセチルアミノメチル-システィン、トランス-3-及びトランス-4-ヒドロキシプロリン、4-アミノフェニルアラニン、4-ニトロフェニルアラニン、4-クロロフェニルアラニン、4-カルボキシフェニルアラニン、-フェニルセリン-ヒドロキシフェニルアラニン、フェニルグリシン、-ナフチルアラニン、シクロヘキシルアラニン、シクロヘキシルグリシン、インドリン-2-カルボン酸、1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸、アミノマロン酸、アミノマロン酸モノアミド、N'-ベンジル-N'-メチル-リジン、N',N'-ジベンジル-リジン、6-ヒドロキシリジン、オルニチン、-アミノシクロヘプタンカルボン酸、-アミノシクロヘキサンカルボン酸、-アミノシクロヘプタンカルボン酸、-(2-アミノ-2-ノルボルナン)-カルボン酸、-ジアミノ酪酸、-ジアミノプロピオン酸、ホモフェニルアラニン及び-tert-ブチルグリシンが挙げられる。

【0035】

本発明の実施形態のCAR(機能的部分及び機能的変異体を含む)は、グリコシル化、アミド化、カルボキシル化、リン酸化、エステル化、N-アシル化、環化(例えばジスルフィド架橋を介して)、又は酸付加塩に変換され、かつ/或いは任意選択で二量体化若しくは重合化、又はコンジュゲート化され得る。

【0036】

本発明の実施形態のCAR(その機能的部分及び機能的変異体を含む)は、当該分野で公知の方法で得ることができる。CARは、ポリペプチド又はタンパク質を作製する任意の適切な方法によって作製されてよい。ポリペプチド及びタンパク質を新規(de novo)合成する適切な方法は、例えば以下の参考文献に記載されている:Chanら, *From Solid Phase Peptide Synthesis*, Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2000; Peptide and Protein Drug Analysis, Reid, R., Marcel Dekker, Inc., 2000; Epitope Mapping, Westwoodら編, Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2001;及び米国特許第5,449,752号。また、ポリペプチド及びタンパク質は、標準的な組換え法を使用して、本明細書に記載の核酸を使用して組換え產生され得る。例えば、Sambrookら, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第3版, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 2001;及びAusubelら, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994を参照。さらに、本発明のCAR(その機能的部分及び機能的変異体を含む)のあるものは、植物、細菌、昆虫、哺乳動物(例えば、ラット、ヒトなど)などの供給源から、単離及び/又は精製され得る。単離及び精製の方法は当該分野で周知である。或いは、本明細書に記載のCAR(その機能的部分及び機能的変異体を含む)は、Synpep(Dublin, CA)、Peptide Technologies Corp.(Gaithersburg, MD)及びMultiple Peptide Systems(San Diego, CA)などの企業によって商業的に合成され得る。これに関して、本発明のCARは、合成、組換え、単離及び/又は精製され得る。

【0037】

本発明の一実施形態はさらに、本発明のCARのエピトープに特異的に結合する、抗体

10

20

30

40

50

又はその抗原結合部分を提供する。抗体は、当該分野で公知の任意の型の免疫グロブリンであり得る。例えば、抗体は、任意のアイソタイプ（例えば、IgA、IgD、IgE、IgG、IgMなど）のものであり得る。抗体は、モノクローナル又はポリクローナルであり得る。抗体は、天然に存在する抗体、例えば、哺乳動物（例えば、マウス、ウサギ、ヤギ、ウマ、ニワトリ、ハムスター、ヒトなど）から単離及び/又は精製された抗体であり得る。或いは、抗体は、遺伝子改変された抗体、例えば、ヒト化抗体又はキメラ抗体であり得る。抗体は、モノマー形態でもポリマー形態でもあり得る。また、抗体は、本発明のCARの機能的部分に対し、任意のレベルの親和性又は結合活性を有し得る。

【0038】

本発明のCARの任意の機能的部分に結合する能力について抗体を試験する方法は、当該分野で公知であり、任意の抗体-抗原結合アッセイ、例えば、ラジオイムノアッセイ（RIA）、ELISA、ウエスタンプロット、免疫沈降及び競合阻害アッセイ（例えば、Janewayら（下記）及び米国特許出願公開2002/0197266A1を参照）などが挙げられる。

【0039】

抗体の製造に適切な方法は、当該分野で公知である。例えば、標準的なハイブリドーマ法は、例えば、Koehler及びMilstein, Eur. J. Immunol., 5, 511-519 (1976)、Harlow及びLane（編）, Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press (1988)、並びにC.A.Janeway（編）, Immunobiology, 第5版, Garland Publishing, New York, NY (2001)）に記載されている。或いは、他の方法が当該分野で公知である（例えば、EBV-ハイブリドーマ法（Haskard及びArcher, J. Immunol. Methods, 74 (2), 361-67 (1984)）、並びにRoderら, Methods Enzymol., 121, 140-67 (1986)）、及びバクテリオファージベクター発現系（例えば、Huseら, Science, 246, 1275-81 (1989)を参照）。さらに、非ヒト動物において抗体を産生する方法が、例えば、米国特許第5,545,806号、同第5,569,825号及び同第5,714,352号、並びに米国特許出願公開2002/0197266A1に記載されている。

【0040】

さらにファージディスプレイが、抗体を産生するために使用され得る。これに関して、抗体の抗原結合可変（V）ドメインをコードするファージライブライアリが、標準的な分子生物学技術及び組換えDNA技術を使用して産出され得る（例えば、Sambrookら（上記）及びAusubelら（上記）を参照）。所望の特異性を有する可変領域をコードするファージが、所望の抗原への特異的結合について選択され、選択された可変ドメインを含む完全又は部分抗体が再構成される。再構成された抗体をコードする核酸配列は、適切な細胞株（例えば、ハイブリドーマ産生に使用される骨髄腫細胞）中に導入され、その結果、モノクローナル抗体の特徴を有する抗体がこの細胞によって分泌される（例えば、Janewayら（上記）、Huseら（上記）及び米国特許第6,265,150号を参照）。

【0041】

抗体は、特定の重鎖及び軽鎖免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニックであるトランスジェニックマウスにより産生され得る。かかる方法は当該分野で公知であり、例えば、米国特許第5,545,806号及び同第5,569,825号、並びにJaneway（上記）に記載されている。

【0042】

ヒト化抗体を産生する方法は当該分野で周知であり、例えば、Janeway（上記）、米国特許第5,225,539号、同第5,585,089号及び同第5,693,761号、欧州特許0239400B1、並びに英国特許第2188638号に詳細に記載されている。ヒト化抗体はまた、米国特許第5,639,641号及びPedersen

10

20

30

40

50

nら, J. Mol. Biol., 235, 959 - 973 (1994) に記載された抗体リサーフェシング (resurfacing) 技術を使用して生成され得る。

【0043】

本発明の一実施形態はまた、本明細書に記載の任意の抗体の抗原結合部分を提供する。抗原結合部分は、少なくとも1つの抗原結合部位を有する任意の部分 (例えば、F_{ab}、F(ab')₂、d_sFv、sFv、ダイアボディ (diabody) 及びトリアボディ (triabody)) であり得る。

【0044】

一本鎖可変領域断片 (sFv) 抗体断片 (これは、合成ペプチドを介して抗体軽鎖の可変 (V) ドメインに連結された抗体重鎖のVドメインを含む、切断型F_{ab}断片である) は、慣用的な組換えDNA技術の技術を使用して生成され得る (例えば、Janewayら (上記) を参照)。同様に、ジスルフィド安定化可変領域断片 (d_sFv) は、組換えDNA技術によって調製され得る (例えば、Reiterら, Protein Engineering, 7, 697 - 704 (1994) を参照)。しかし、本発明の抗体断片は、これらの例示的な抗体断片の型に限定されない。

10

【0045】

また、抗体又はその抗原結合部分は、検出可能な標識 (例えば、放射性同位体、フルオロフォア (例えば、フルオレセインイソチオシアネート (FITC)、フィコエリトリン (PE))、酵素 (例えば、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ) 及び元素粒子 (例えば、金粒子) など) を含むように改変され得る。

20

【0046】

本発明の一実施形態はさらに、本明細書に記載のCAR (その機能的部分及び機能的変異体を含む) のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。本発明の核酸は、本明細書に記載の、リーダー配列、抗原結合ドメイン、免疫グロブリンドメイン、膜貫通ドメイン及び / 又は細胞内T細胞シグナル伝達ドメインのいずれかをコードするヌクレオチド配列を含んでよい。

20

【0047】

本発明の一実施形態は、リーダー配列、BL22又はHA22の抗原結合ドメイン (軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含む)、及びCH2CH3をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。これに関して、核酸は、配列番号21若しくは22のそれぞれを含んでよく、配列番号21若しくは22のそれそれからなってよく、又は本質的に配列番号21若しくは22のそれそれからなってよい。本発明の別の実施形態は、リーダー配列、HA22の抗原結合ドメイン (軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含む)、及び短い免疫グロブリン定常ドメイン配列をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。これに関して、核酸は、配列番号23若しくは38を含んでよく、配列番号23若しくは38からなってよく、又は本質的に配列番号23若しくは38からなってよい。

30

【0048】

本発明の核酸は、本明細書に記載の細胞内T細胞シグナル伝達ドメイン及び / 又は膜貫通ドメインのいずれかをコードするヌクレオチド配列を含んでよい。本発明の一実施形態は、CD28を含む膜貫通ドメイン、CD28を含む細胞内T細胞シグナル伝達ドメイン及びCD3 を含む細胞内T細胞シグナル伝達ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。これに関して、核酸は、配列番号24を含んでよく、配列番号24からなってよく、又は本質的に配列番号24からなってよい。本発明の別の実施形態は、CD8を含む膜貫通ドメイン、CD28を含む細胞内T細胞シグナル伝達ドメイン、CD137を含む細胞内T細胞シグナル伝達ドメイン、及びCD3 を含む細胞内T細胞シグナル伝達ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。これに関して、核酸は、配列番号25を含んでよく、配列番号25からなってよく、又は本質的に配列番号25からなってよい。本発明の更に別の実施形態は、CD8を含む膜貫通ドメイン、CD137を含む細胞内T細胞シグナル伝達ドメイン、及びCD3 を含む細胞内T細胞シグナル伝達ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。これに関して

40

50

50

、核酸は、配列番号39を含んでよく、配列番号39からなってよく、又は本質的に配列番号39からなってよい。

【0049】

本発明の好ましい実施形態として、核酸は、リーダー配列、BL22又はHA22の抗原結合ドメイン（軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含む）、CH2CH3、CD28を含む膜貫通ドメイン、CD28を含む細胞内T細胞シグナル伝達ドメイン、及びCD3を含む細胞内T細胞シグナル伝達ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む。これに関して、核酸は、配列番号21及び24の両方若しくは配列番号22及び24の両方を含んでよく、配列番号21及び24の両方若しくは配列番号22及び24の両方からなってよく、又は本質的に配列番号21及び24の両方若しくは配列番号22及び24の両方からなってよい。

10

【0050】

別の好ましい実施形態として、核酸は、リーダー配列、HA22の抗原結合ドメイン（軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含む）、短い免疫グロブリン定常ドメイン配列、CD28を含む膜貫通ドメイン、CD28を含む細胞内T細胞シグナル伝達ドメイン、及びCD3を含む細胞内T細胞シグナル伝達ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む。これに関して、核酸は、配列番号23及び24の両方を含んでよく、配列番号23及び24の両方からなってよく、又は本質的に配列番号23及び24の両方からなってよい。

20

【0051】

本発明の好ましい実施形態として、核酸は、リーダー配列、BL22又はHA22の抗原結合ドメイン（軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含む）、CH2CH3、CD8を含む膜貫通ドメイン、CD28を含む細胞内T細胞シグナル伝達ドメイン、CD137を含む細胞内T細胞シグナル伝達ドメイン、及びCD3を含む細胞内T細胞シグナル伝達ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む。これに関して、核酸は、配列番号21及び25の両方若しくは配列番号22及び25の両方を含んでよく、配列番号21及び25の両方若しくは配列番号22及び25の両方からなってよく、又は本質的に配列番号21及び25の両方若しくは配列番号22及び25の両方からなってよい。

20

【0052】

別の好ましい実施形態として、核酸は、リーダー配列、HA22の抗原結合ドメイン（軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含む）、短い免疫グロブリン定常ドメイン配列、CD8を含む膜貫通ドメイン、CD28を含む細胞内T細胞シグナル伝達ドメイン、CD137を含む細胞内T細胞シグナル伝達ドメイン、及びCD3を含む細胞内T細胞シグナル伝達ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む。これに関して、核酸は、配列番号23及び25の両方を含んでよく、配列番号23及び25の両方からなってよく、又は本質的に配列番号23及び25の両方からなってよい。

30

【0053】

更に別の好ましい実施形態として、核酸は、リーダー配列、HA22の抗原結合ドメイン（軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含む）、短い免疫グロブリン定常ドメイン配列、CD8を含む膜貫通ドメイン、CD137を含む細胞内T細胞シグナル伝達ドメイン、及びCD3を含む細胞内T細胞シグナル伝達ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む。これに関して、核酸は、配列番号38及び39の両方を含んでよく、配列番号38及び39の両方からなってよく、又は本質的に配列番号38及び39の両方からなってよい。

40

【0054】

本明細書で使用する場合、「核酸」は、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」及び「核酸分子」を含み、一般にDNA又はRNAの重合体を意味し、これは一本鎖の又は二本鎖の、合成された又は自然の供給源から得た（例、単離された及び/又は精製された）ものであり得、天然、非天然、又は変更されたヌクレオチドを含み得、修飾されていないオリゴヌクレオチドのヌクレオチド間に見いだされるホスホジエステル結合の代わりに、天然、非天然、又は変更されたヌクレオチド間結合（ホスホアミダート（phosphoramidate）結合又はホスホチオエート結合など）を含み得る。いく

50

つかの実施形態において、核酸は、挿入、欠失、逆位及び／又は置換を何れも含まない。しかし、本明細書で議論するように、ある場合には、核酸が1つ以上の挿入、欠失、逆位及び／又は置換を含むことが適切であるかもしだい。いくつかの実施形態において、核酸は、CARの機能に影響を与える、宿主細胞による核酸の発現時に翻訳されてもされなくともよく、更なるアミノ酸配列をコードしてよい(例、配列番号31)。

【0055】

本発明の一実施形態の核酸は組換えであってよい。本明細書で使用する場合、用語「組換え」とは、(i)天然若しくは合成の核酸セグメントを、生きた細胞内で複製できる核酸分子に連結することにより、生きた細胞の外側で構築された分子、又は(ii)上記(i)に記載した分子の複製から生じる分子をいう。本明細書の目的のために、複製は、in vitro複製又はin vivo複製であり得る。

10

【0056】

組換え核酸は、天然に存在しない配列を有するものであっても、配列が分離していたであろう2つのセグメントの人工的な組み合わせによって製造された配列を有するものであってよい。この人工的な組み合わせは、化学合成によって達成される場合が多く、又はより一般的には、例えば、Sambrookら(上記)に記載されたような遺伝子改変技術による、核酸の単離されたセグメントの人工的な改変によって達成される。核酸は、当該分野で公知の手順を使用して、化学合成及び／又は酵素ライゲーション反応に基づいて構築され得る。例えば、Sambrookら(上記)及びAusubelら(上記)を参照。例えば、核酸は、天然に存在するヌクレオチド、又は分子の生物学的安定性を増加させるように若しくはハイブリダイゼーションの際に形成される二重鎖の物理的安定性を増加させるように設計された多様な修飾ヌクレオチド(例えば、ホスホロチオエート誘導体及びアクリジン置換ヌクレオチド)を使用して、化学的に合成され得る。核酸を生成するために使用され得る修飾ヌクレオチドの例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない:5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、-D-ガラクトシリューオシン(-D-galactosylqueosine)、イノシン、N⁶-イソペニテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N⁶-置換アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、-D-マンノシリルキューイン(-D-mannosylqueosine)、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N⁶-イソペニテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、ワイプトキソシン(wybutoxosine)、シュードウラシル(pseudouracil)、キューイン(queosine)、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロビル)ウラシル及び2,6-ジアミノプリン。或いは、本発明の核酸の1つ以上は、Macromolecular Resources(Fort Collins, CO)及びSynthegen(Houston, TX)などの企業から購入できる。

20

【0057】

核酸は、CAR又はCARの機能的部分又はCARの機能的変異体のいずれかをコードする、任意の単離又は精製されたヌクレオチド配列を含み得る。或いは、ヌクレオチド配列は、該配列のいずれかに縮重するヌクレオチド配列、又は縮重配列の組み合わせを含み得る。

30

【0058】

本発明の一実施形態は、本明細書に記載のいずれかの核酸のヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列、又は本明細書に記載のいずれかの核酸のヌクレオチド配列に

40

50

対しストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む、単離又は精製された核酸も提供する。

【0059】

ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列は、高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズしてよい。「高ストリンジェンシー条件」とは、ヌクレオチド配列が、非特異的ハイブリダイゼーションよりも検出可能に強い量でターゲット配列（本明細書に記載のいずれかの核酸のヌクレオチド配列）に特異的にハイブリダイズすることを意味する。高ストリンジェンシー条件には、正確に相補的な配列を有するポリヌクレオチド、又は数個の散らばったミスマッチのみを含むポリヌクレオチドを、ヌクレオチド配列にマッチした数塩基の小領域（例えば3～10塩基）を偶然有するランダム配列から識別する条件が含まれる。かかる相補的な小領域は、14～17又はそれ以上の塩基の全長相補体よりも容易に融解され、高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーションにより、それらを容易に識別できる。比較的高ストリンジェンシーの条件には、例えば、低塩及び/又は高温条件（例えば、約0.02～0.1MのNaCl又は等価物、約50～70の温度により提供される）が含まれる。かかる高ストリンジェンシー条件は、存在したとしても、ヌクレオチド配列とテンプレート鎖又はターゲット鎖との間のミスマッチをほとんど許容せず、本発明のCARのいずれかの発現を検出するのに特に適している。条件は、増加量のホルムアミドの添加によって、よりストリンジェントになり得ることが一般に理解される。

10

【0060】

本発明は、また、本明細書に記載の核酸のいずれかに対して同一性が少なくとも約70%以上（例、約80%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%）であるヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。

20

【0061】

一実施形態において、本発明の核酸は、組換え発現ベクター中に組み込まれ得る。これに関して、本発明の一実施形態は、本発明の核酸のいずれかを含む組換え発現ベクターを提供する。本明細書中の目的のために、用語「組換え発現ベクター」とは、宿主細胞によるmRNA、タンパク質、ポリペプチド又はペプチドの発現を可能にする遺伝子改変オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド構築物を意味し、ここで、構築物は、mRNA、タンパク質、ポリペプチド又はペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、ベクターは、細胞内でmRNA、タンパク質、ポリペプチド又はペプチドを発現させるのに十分な条件下で細胞と接触させられる。本発明のベクターは、全体としては天然に存在するものではない。しかし、ベクターの一部は天然に存在するものであり得る。本発明の組換え発現ベクターは、DNA及びRNA（一本鎖又は二本鎖であり得、合成されるか又は一部を天然供給源から得ることができ、天然、非天然又は変更されたヌクレオチドを含み得る）が挙げられるがそれらに限定されない任意の型のヌクレオチドを含み得る。組換え発現ベクターは、天然に存在するヌクレオチド間結合若しくは天然に存在しないヌクレオチド間結合、又は両方の型の結合を含み得る。好ましくは、天然に存在しない又は変更されたヌクレオチド又はヌクレオチド間結合は、ベクターの転写も複製も妨害しない。

30

【0062】

一実施形態において、本発明の組換え発現ベクターは、任意の適切な組換え発現ベクターであり得、任意の適切な宿主細胞を形質転換又はトランスフェクトするために使用され得る。適切なベクターとしては、増殖（propagation）及び増大（expansion）のため若しくは発現のため、又はそれら両方のために設計されたベクター（例えば、プラスミド及びウイルス）が挙げられる。ベクターは、以下からなる群より選択され得る：pUCシリーズ（Fermentas Life Sciences, Glen Burnie, MD）、pBluescriptシリーズ（Stratagene, La Jolla, CA）、pETシリーズ（Novagen, Madison, WI）、pGEXシリーズ（Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden

40

50

) 及び pEX シリーズ (Clontech, Palo Alto, CA)。バクテリオファージベクター (例えば、GT10、GT11、ZapII (Stratagene)、EMBL4 及び NM1149) もまた使用され得る。植物発現ベクターの例としては、pBI01、pBI101.2、pBI101.3、pBI121 及び pBIN19 (Clontech) が挙げられる。動物発現ベクターの例としては、pEUK-C1、pMAM 及び pMAMneo (Clontech) が挙げられる。組換え発現ベクターは、ウイルスベクター (例えば、レトロウイルスベクター) であつてよい。

【0063】

多くのトランスフェクションの技法が当該技術分野において一般に公知である (例、Grahamら, *Virology*, 52:456-467 (1973); Sambrookら, 上記; Davisら, *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier (1986); 及び Chuら, *Gene*, 13:97 (1981) を参照)。トランスフェクションの方法としては、リン酸カルシウム共沈殿法 (例、Grahamら, 上記を参照)、培養細胞への直接マイクロインジェクション (例、Capecchi, *Cell*, 22:479-488 (1980) を参照)、エレクトロポーレーション (例、Shigekawaら, *Biotechniques*, 6:742-751 (1988) を参照)、リポソームを介した遺伝子導入 (例、Manninoら, *Biotechniques*, 6:682-690 (1988) を参照)、脂質を介した形質導入 (例、Felgnerら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:7413-7417 (1987) を参照)、及び高速ミクロ射出粒子を用いる核酸送達 (例、Kleinら, *Nature*, 327:70-73 (1987) を参照) が挙げられる。

【0064】

一実施形態において、本発明の組換え発現ベクターは、例えば Sambrookら (上記) 及び Ausubelら (上記) に記載された、標準的な組換えDNA技術を使用して調製できる。環状又は線状の発現ベクターの構築物は、原核生物又は真核生物の宿主細胞において機能的な複製系を含むように調製され得る。複製系は、例えば、ColE1、2μプラスミド、SV40、ウシパピローマウイルスなどに由来し得る。

【0065】

組換え発現ベクターは、必要に応じて、そのベクターがDNAベースであるかRNAベースであるかを考慮して、ベクターが導入される宿主細胞の型 (例えば、細菌、真菌、植物又は動物) に特異的な調節配列 (例えば、転写及び翻訳の開始及び終止コドン) を含んでよい。終始コドンを含む配列の例としては、配列番号29及び30が挙げられる。組換え発現ベクターは、クローニングを容易にするための制限酵素認識部位を含んでよい。制限酵素認識部位を含む配列の例として、配列番号26~28が挙げられる。

【0066】

組換え発現ベクターは、形質転換又はトランスフェクトされた宿主細胞の選択を可能にする1つ以上のマーカー遺伝子を含み得る。マーカー遺伝子には、殺生物剤耐性 (例えば、抗生素質、重金属などに対する耐性)、栄養要求性宿主における原栄養を提供する補完などが挙げられる。本発明の発現ベクターに適切なマーカー遺伝子には、例えば、ネオマイシン / G418 耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ヒスチジノール耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子及びアンピシリン耐性遺伝子が挙げられる。

【0067】

組換え発現ベクターは、CAR (その機能的部分及び機能的変異体を含む) をコードするヌクレオチド配列又はCARをコードするヌクレオチド配列と相補的であるか若しくはそれにハイブリダイズするヌクレオチド配列に作動可能に連結された、天然又は非天然のプロモーターを含み得る。プロモーター (例えば、強い、弱い、誘導性、組織特異的及び発生特異的) の選択は、当業者の技術範囲内である。同様に、ヌクレオチド配列とプロモーターとの組み合わせもまた、当業者の技術範囲内である。プロモーターは、非ウイルスプロモーター又はウイルスプロモーター (例えば、サイトメガロウイルス (CMV) プロ

10

20

30

40

40

50

モーター、S V 4 0 プロモーター、R S V プロモーター、又はマウス幹細胞ウイルスの長い末端反復配列中に見出されるプロモーター) であり得る。

【 0 0 6 8 】

本発明の組換え発現ベクターは、一過性の発現のため、安定な発現のため、又はその両方のために設計され得る。また、組換え発現ベクターは、構成的発現又は誘導性発現のために製造され得る。

【 0 0 6 9 】

さらに、組換え発現ベクターは、自殺遺伝子を含むように製造され得る。本明細書中で使用する場合、用語「自殺遺伝子」とは、その自殺遺伝子を発現する細胞を死に至らしめる遺伝子をいう。自殺遺伝子は、その遺伝子が発現される細胞に対し薬剤(例えれば薬物) に対する感受性を付与し、細胞がその薬剤と接触したとき又はその薬剤に曝露されたときに細胞を死に至らしめる遺伝子であり得る。自殺遺伝子は当該分野で公知であり(例えれば、*Suicide Gene Therapy: Methods and Reviews*, Springer, Caroline J. (Cancer Research UK Centre for Cancer Therapeutics at the Institute of Cancer Research, Sutton, Surrey, UK), Humania Press, 2004 を参照) 、例えれば、単純ヘルペスウイルス(HSV) チミジンキナーゼ(TK) 遺伝子、シトシンデアミナーゼ(deaminase) 、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ及びニトロレダクターが挙げられる。

【 0 0 7 0 】

本発明の範囲内には、本発明のC A R (その機能的部分又は変異体のいずれかを含む) 、核酸、組換え発現ベクター、宿主細胞、宿主細胞集団、又は抗体若しくはその抗原結合部分のいずれかを含むコンジュゲート(例えれば、バイオコンジュゲート) が含まれる。コンジュゲート及びコンジュゲートの合成方法は一般に、当該分野で公知である(例えれば、*Hudecz, F., Methods Mol. Biol. 298: 209 - 223 (2005)* 及び *Kirinら, Inorg. Chem. 44 (15): 5405 - 5415 (2005)* を参照) 。

【 0 0 7 1 】

本発明の一実施形態はさらに、本明細書に記載の組換え発現ベクターのいずれかを含む宿主細胞を提供する。本明細書中で使用する場合、用語「宿主細胞」とは、本発明の組換え発現ベクターを含み得る任意の型の細胞をいう。宿主細胞は、真核生物細胞(例えれば、植物、動物、真菌又は藻類) であり得、或いは原核生物細胞(例えれば、細菌又は原生生物) であり得る。宿主細胞は、培養細胞又は初代細胞(即ち、ヒトなどの生物から直接単離された) であり得る。宿主細胞は、接着細胞又は浮遊細胞(即ち、懸濁物中で増殖する細胞) であり得る。適切な宿主細胞は当該分野で公知であり、例えれば、D H 5 E . c o l i 細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞、サルV E R O 細胞、C O S 細胞、H E K 2 9 3 細胞などが挙げられる。組換え発現ベクターを増幅又は複製する目的のために、宿主細胞はD H 5 細胞などの原核生物細胞であってよい。組換えC A R を産生する目的のために、宿主細胞は哺乳動物細胞であってよい。宿主細胞はヒト細胞であってよい。宿主細胞は任意の細胞型のものであり得、任意の組織型に由来し得、任意の発生段階のものであり得るが、宿主細胞は、末梢血リンパ球(P B L) 又は末梢血単核球(P M B C) であってよい。宿主細胞はT 細胞であってよい。

【 0 0 7 2 】

本明細書中の目的のために、T 細胞は、任意のT 細胞(例えれば培養T 細胞(例えれば初代T 細胞) 若しくは培養T 細胞株(例えれば、J u r k a t 、S u p T 1 など) 由来のT 細胞、又は哺乳動物から得られたT 細胞) であり得る。哺乳動物から得られる場合、T 細胞は、多数の供給源(血液、骨髄、リンパ節、胸腺又は他の組織若しくは体液) が挙げられるが、これらに限定されない) から得ることができる。T 細胞はまた、濃縮又は精製され得る。T 細胞はヒトT 細胞であってよい。T 細胞は、ヒトから単離されたT 細胞であってよい。T 細胞は、任意の型のT 細胞であり得、任意の発生段階のものであり得る(C D 4⁺ /

10

20

30

40

50

CD8⁺二重ポジティブT細胞、CD4⁺ヘルパーT細胞（例えば、Th₁及びTh₂細胞）、CD8⁺T細胞（例えば、細胞傷害性T細胞）、腫瘍浸潤細胞、メモリーT細胞、ナイーブT細胞などが含まれるが、これらに限定されない）。T細胞は、CD8⁺T細胞又はCD4⁺T細胞であつてよい。

【0073】

本発明の一実施形態は、本明細書に記載の少なくとも1つの宿主細胞を含む細胞集団も提供する。細胞集団は、少なくとも1つの他の細胞（例えば、記載された組換え発現ベクターをいずれも含まない宿主細胞（例えばT細胞）又はT細胞以外の細胞（例えば、B細胞、マクロファージ、好中球、赤血球、肝細胞、内皮細胞、上皮細胞、筋細胞、脳細胞など））に加えて、この組換え発現ベクターのいずれかを含む宿主細胞を含む、不均質な集団であり得る。或いは、細胞集団は、実質的に均質な集団であり得、このとき、集団は、組換え発現ベクターを含む宿主細胞を主に含む（例えば、組換え発現ベクターを含む宿主細胞から本質的になる）。集団は細胞のクローン集団でもあり得、このとき、集団の全ての細胞は、組換え発現ベクターを含む単一の宿主細胞のクローンであり、その結果、集団の全ての細胞が組換え発現ベクターを含む。本発明の一実施形態において、細胞集団は、本明細書に記載の組換え発現ベクターを含むクローン集団である。

10

【0074】

CAR（その機能的部分及び変異体を含む）、核酸、組換え発現ベクター、宿主細胞（その集団を含む）及び抗体（その抗原結合部分を含む）（これらは全て、本明細書中以下、集合的に「本発明のCAR材料」と呼ぶ）は、単離及び／又は精製され得る。本明細書中で使用する場合、用語「単離された」とは、その天然の環境から取り出されたことを意味する。用語「精製された」又は「単離された」は、絶対的な純度又は単離を必要としない。むしろ、相対的な用語として意図される。従って、例えば、精製された（又は単離された）宿主細胞調製物は、宿主細胞が身体内のその天然の環境中の細胞よりも純粋である調製物である。かかる宿主細胞は、例えば、標準的な精製技術によって生成され得る。いくつかの実施形態において、宿主細胞の調製物は、その調製物の総細胞含量の少なくとも約50%、例えば少なくとも約70%を宿主細胞が占めるように、精製される。例えば、純度は、少なくとも約50%であり得、約60%、約70%若しくは約80%より高くてもよく、又は約100%であり得る。

20

【0075】

本発明のCAR材料は、医薬組成物などの組成物へと製剤化され得る。これに関して、本発明の一実施形態は、CAR、機能的部分、機能的変異体、核酸、発現ベクター、宿主細胞（その集団を含む）及び抗体（その抗原結合部分を含む）のいずれかと、医薬上許容される担体とを含む、医薬組成物を提供する。本発明のCAR材料のいずれかを含む本発明の医薬組成物は、1種より多い本発明のCAR材料（例えば、CAR及び核酸）又は2種以上の異なるCARを含み得る。或いは、医薬組成物は、他の医薬上活性な薬剤又は薬物（例えば、化学療法剤、例：アスパラギナーゼ、ブスルファン、カルボプラチニン、シスプラチニン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、フルオロウラシル、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、メトトレキサート、パクリタキセル、リツキシマブ、ビンプラスチニン、ビンクリスチニンなど）と組み合わせて、本発明のCAR材料を含み得る。好ましい実施形態において、医薬組成物は、本発明の宿主細胞又はその集団を含む。

30

【0076】

本発明のCAR材料は、塩（例えば、医薬上許容される塩）の形態で提供され得る。適切な医薬上許容される酸付加塩には、鉱酸（例えば、塩酸、臭化水素酸、リン酸、メタリニン酸、硝酸及び硫酸）由来の塩、及び有機酸（例えば、酒石酸、酢酸、クエン酸、リンゴ酸、乳酸、フマル酸、安息香酸、グリコール酸、グルコン酸、コハク酸、及びp-トルエンスルホン酸などのアリールスルホン酸）由来の塩が含まれる。

40

【0077】

医薬組成物に関して、医薬上許容される担体は、従来使用される担体のいずれかであり得、化学・物理的考慮事項（例えば、溶解度、及び活性薬剤に対する反応性の欠如）及び

50

投与経路のみによって限定される。本明細書に記載の医薬上許容される担体（例えば、ビヒクル、アジュバント、賦形剤及び希釈剤）は、当業者に周知であり、公に容易に入手可能である。医薬上許容される担体は、活性薬剤に対し化学的に不活性な担体及び使用条件下で有害な副作用も毒性もない担体であることが好ましい。

【0078】

担体の選択は、本発明の特定のCAR材料によって、及び本発明のCAR材料を投与するためには使用される特定の方法によって、一部決定されよう。従って、本発明の医薬組成物の適切な製剤は多様である。保存剤が使用されてよい。適切な保存剤としては、例えば、メチルパラベン、プロピルパラベン、安息香酸ナトリウム及び塩化ベンザルコニウムが挙げられてよい。2種以上の保存剤の混合物が、任意選択で使用されてよい。保存剤又はその混合物は、典型的には、総組成物の約0.0001重量%～約2重量%の量で存在する。

10

【0079】

適切な緩衝剤としては、例えば、クエン酸、クエン酸ナトリウム、リン酸、リン酸カリウム並びに種々の他の酸及び塩が挙げられ得る。2種以上の緩衝剤の混合物が、任意選択で使用されてもよい。緩衝剤又はその混合物は、典型的には、総組成物の約0.001重量%～約4重量%の量で存在する。

【0080】

医薬製剤中の本発明のCAR材料の濃度は、例えば、約1重量%未満、通常約10重量%又は少なくとも約10重量%から、約20重量%～約50重量%以上まで変動し得、選択される特定の投与様式に従って、流体の体積及び粘度によって主に選択され得る。

20

【0081】

投与可能な（例えば、非経口投与可能な）組成物を調製するための方法は、当業者に公知又は明らかであり、例えば以下においてより詳細に記載されている：Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 第21版（2005年5月1日）。

10

【0082】

経口、エアロゾル、非経口（例えば、皮下、静脈内、動脈内、筋内、皮内、腹腔内（interperitoneal）及び髄腔内）及び局所投与のための以下の製剤は、単なる例示であり、何ら限定ではない。本発明のCAR材料を投与するために1より多い経路が使用され得、ある場合には、特定の経路が、別の経路よりも迅速且つ有効な応答を提供し得る。

30

【0083】

経口投与に適切な製剤は、以下を含むか又は以下からなり得る：（a）希釈剤（例えば、水、生理食塩水又はオレンジジュース）中に溶解させた有効量の本発明のCAR材料などの、液体溶液；（b）カプセル、サシェ剤（sachet）、錠剤、ロゼンジ及びトローチ（それぞれ、固体又は顆粒として所定量の活性成分を含む）；（c）粉末；（d）適切な液体中の懸濁物；及び（e）適切な乳濁物。液体製剤は、医薬上許容される界面活性剤の添加あり又はなしのいずれかの、水及びアルコール（例えば、エタノール、ベンジルアルコール及びポリエチレンアルコール）などの希釈剤を含み得る。カプセル形態は、例えば、界面活性剤、滑沢剤及び不活性フィラー（例えば、ラクトース、スクロース、リン酸カルシウム及びコーンスター）を含む、通常の硬ゼラチン型及び軟ゼラチン型のものであり得る。錠剤形態は、以下の1つ以上を含み得る：ラクトース、スクロース、マンニトール、コーンスター、ジャガイモデンプン、アルギン酸、結晶セルロース、アラビアゴム、ゼラチン、グーガム、コロイド状二酸化ケイ素、クロスカルメロースナトリウム、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸亜鉛、ステアリン酸、並びに他の賦形剤、着色剤、希釈剤、緩衝剤、崩壊剤、加湿剤、保存剤、香味料及び他の薬理学的に適合性の賦形剤。ロゼンジ形態は、香料（通常、スクロース及びアラビアゴム又はトラガント）中に本発明のCAR材料を含み得、不活性基剤（例えば、

40

50

ゼラチン及びグリセリン、又はスクロース及びアラビアゴム)中に本発明のC A R材料を含む香錠(p a s t i l l e)、乳濁物、ゲルなど(当該分野で公知のかかる賦形剤を加えて含む)も同様である。

【0084】

非経口投与に適切な製剤には、水性及び非水性の等張無菌注射溶液(抗酸化剤、緩衝液、静菌剤、及び製剤を意図したレシピエントの血液と等張にする溶質を含み得る)並びに水性及び非水性の無菌懸濁物(懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤及び保存剤を含み得る)が挙げられる。本発明のC A R材料は、医薬上許容される界面活性剤(例えば、石鹼又は洗剤)、懸濁剤(例えば、ペクチン、カルボマー、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース又はカルボキシメチルセルロース)又は乳化剤及び他の医薬的アジュvantの添加あり又はなしの、医薬的担体(例えば、無菌の液体又は液体混合物(水、生理食塩水、水性デキストロース及び関連の糖溶液、アルコール(例えば、エタノール又はヘキサデシルアルコール)、グリコール(例えば、プロピレングリコール又はポリエチレングリコール)、ジメチルスルホキシド、グリセロール、ケタール(例えば、2,2-ジメチル-1,3-ジオキソラン-4-メタノール)、エーテル、ポリ(エチレングリコール)400、油、脂肪酸、脂肪酸エステル若しくはグリセリド、又はアセチル化脂肪酸グリセリドを含む)中の生理学的に許容される希釈剤中で投与され得る。

10

【0085】

非経口製剤で使用され得る油には、石油、動物油、植物油又は合成油が挙げられる。油の具体的な例としては、落花生油、大豆油、ゴマ油、綿実油、コーン油、オリーブ油、ペトロラタム及び鉛油が挙げられる。非経口製剤での使用に適切な脂肪酸には、オレイン酸、ステアリン酸及びイソステアリン酸が挙げられる。オレイン酸エチル及びミリスチン酸イソプロピルが、適切な脂肪酸エステルの例である。

20

【0086】

非経口製剤での使用に適切な石鹼には、脂肪酸のアルカリ金属、アンモニウム及びトリエタノールアミン塩が挙げられ、適切な洗剤には以下が挙げられる:(a)カチオン性洗剤(例えば、ジメチルジアルキルアンモニウムハライド及びアルキルピリジニウムハライド)、(b)アニオン性洗剤(例えば、アルキル、アリール及びオレフィンスルホン酸塩、アルキル、オレフィン、エーテル及びモノグリセリド硫酸塩及びスルホコハク酸塩)、(c)非イオン性洗剤(例えば、脂肪アミンオキシド、脂肪酸アルカノールアミド及びポリオキシエチレンポリプロピレンコポリマー)、(d)両性洗剤(例えば、アルキル-アミノプロピオン酸塩及び2-アルキル-イミダゾリン第4級アンモニウム塩)、並びに(e)それらの混合物。

30

【0087】

非経口製剤は典型的に、例えば、溶液中に約0.5重量%~約25重量%の本発明のC A R材料を含むであろう。保存剤及び緩衝液を使用してよい。注射部位での刺激を最小化又は排除するために、かかる組成物は、例えば、約12~約17の親水性-親油性バランス(H L B)を有する1つ以上の非イオン性界面活性剤を含んでよい。かかる製剤中の界面活性剤の量は、典型的には、例えば、約5重量%~約15重量%の範囲であろう。適切な界面活性剤としては、ポリエチレングリコールソルビタン脂肪酸エステル(例えば、ソルビタンモノオレエート)、及びプロピレンオキシドとプロピレングリコールとの縮合によって形成される、疎水性塩基とエチレンオキシドとの高分子量付加物が挙げられる。非経口製剤は、単一用量又は複数用量の密封容器(例えば、アンプル及びバイアル)中に提示され得、使用直前の無菌液体賦形剤(例えば注射用水)の添加のみを必要とするフリーズドライ(凍結乾燥)状態で保存され得る。即時注射溶液及び懸濁物は、以前に記載された種類の無菌の粉末、顆粒及び錠剤から調製できる。

40

【0088】

注射可能な製剤は、本発明の一実施形態に従う。注射可能な組成物のための有効な医薬的担体の要件は、当業者に周知である(例えば、Pharmaceutics and Pharmacy Practice, J. B. Lippincott Company

50

, Philadelphia, PA, Banker 及び Chalmers 編, 238-250 頁 (1982)、及び ASHP Handbook on Injectable Drugs, Toissel, 第4版, 622-630 頁 (1986) を参照)。

【0089】

局所製剤 (経皮薬物放出に有用なものを含む) は、当業者に周知であり、本発明の実施形態の皮膚への適用に関して適切である。本発明の CAR 材料は、単独で又は他の適切な成分と組み合わせて、吸入を介して投与されるエアロゾル製剤にされ得る。これらのエアロゾル製剤は、加圧された許容可能な噴霧剤 (例えば、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素など) 中に入れられ得る。これらはまた、例えばネブライザー又はアトマイザー中の非加圧製剤のための医薬として製剤化されてよい。かかるスプレー製剤は、粘膜にスプレーするために使用されてもよい。

10

【0090】

「有効量」又は「治療に有効な量」とは、個体におけるがんを予防又は治療するのに適切な用量をいう。治療的使用又は予防的使用に有効な量は、例えば、治療される疾患又は障害の病期及び重篤度、患者の年齢、体重及び全般的健康状態、並びに処方医師の判断に依存するであろう。用量のサイズもまた、選択された活性剤、投与方法、投与のタイミング及び頻度、特定の活性剤の投与に伴い得る任意の有害な副作用の存在、性質及び程度、並びに所望の生理学的効果によって決定されよう。種々の疾患又は障害が、おそらく投与の各ラウンド又は様々なラウンドで本発明の CAR 材料を使用する、複数の投与を含む長期治療を必要とし得ることが、当業者に理解されよう。本発明の限定を意図しない例として、本発明の CAR 材料の用量は、約 0.001 ~ 約 1000 mg / 治療される対象の体重 kg / 日、約 0.01 ~ 約 10 mg / kg 体重 / 日、約 0.01 mg ~ 約 1 mg / kg 体重 / 日であり得る。本発明の CAR 材料が宿主細胞である場合、宿主細胞の例示的な用量は最低で百万細胞 (1 mg 細胞 / 用量) であってよい。本発明の CAR 材料がウイルス中にパッケージングされた核酸である場合、ウイルスの例示的な用量は 1 ng 細胞 / 用量であってよい。

20

【0091】

本発明の目的のために、投与される本発明の CAR 材料の量又は用量は、合理的な時間枠にわたって対象又は動物において治療応答又は予防応答をもたらすのに十分でなければならない。例えば、本発明の CAR 材料の用量は、投与時点から約 2 時間以上の期間 (例えば、約 12 時間 ~ 約 24 時間又はそれ以上) において、抗原に結合するため、又は疾患を検出、治療若しくは予防するために、十分でなければならない。特定の実施形態において、この期間はさらに長くてもよい。用量は、本発明の特定の CAR 材料の効力及び動物 (例えば、ヒト) の状態、並びに治療する動物 (例えば、ヒト) の体重によって決定されるであろう。

30

【0092】

本発明の目的のために、例えば、本発明の CAR を発現する T 細胞の所与の用量を哺乳動物に投与した際に、かかる T 細胞によってターゲット細胞が溶解される及び / 又は IFN - γ が分泌される程度を、種々の用量の T 細胞をそれぞれ与えた哺乳動物のセット間で比較することを含むアッセイが、哺乳動物に投与される出発用量を決定するために使用され得る。特定の用量の投与の際にターゲット細胞が溶解される及び / 又は IFN - γ が分泌される程度は、当該分野で公知の方法によってアッセイできる。

40

【0093】

上記医薬組成物に加えて、本発明の CAR 材料は、包接錯体 (例えば、シクロデキストリン包接錯体) 又はリポソームとして製剤化され得る。リポソームは、特定の組織に本発明の CAR 材料をターゲット化するために機能し得る。リポソームは、本発明の CAR 材料の半減期を増加させるためにも使用され得る。例えば、Szokala, Ann. Rev. Biophys. Biophys., 9, 467 (1980) 並びに米国特許第 4,235,871 号、同第 4,501,728 号、同第 4,837,028 号及び同第 5,019,369 号に記載されるように、リポソームを調製するための多くの方法が利用可能で

50

ある。

【0094】

本発明の実施形態に関連して有用な送達系には、本発明の組成物の送達が、治療される部位の感作の前に及び感作を引き起こすのに十分な時間で生じるような、時限放出 (time-released)、遅延放出 (delayed release) 及び徐放 (sustained release) 送達系が挙げられてよい。本発明の組成物は、他の治療剤又は療法と合わせて使用され得る。かかる系は、本発明の組成物の反復投与を回避することにより、対象及び医師の利便性を向上させることができ、本発明の特定の組成物実施形態に特に適切なものであってよい。

【0095】

多くの型の放出送達系が利用可能であり、当業者に公知である。これらには、ポリ(ラクチド-グリコリド)、コポリオキサラート (copolyoxalate)、ポリカプロラクトン、ポリエステルアミド、ポリオルトエステル、ポリヒドロキシ酪酸及びポリ無水物などの、ポリマーベースの系が挙げられる。上記ポリマーの薬物含有マイクロカプセルは、例えば米国特許第5,075,109号に記載されている。送達系には、ステロール(例えば、コレステロール、コレステロールエステル)及び脂肪酸又は中性脂肪(例えば、モノグリセリド、ジグリセリド及びトリグリセリド)を含む脂質; ヒドロゲル放出系; シラスティック (silastic) 系; ペプチドベースの系; ワックスコーティング; 従来の結合剤及び賦形剤を使用した圧縮錠剤; 部分融合移植物 (partially fused implant) などの、非ポリマー系も含まれる。具体例としては以下が挙げられるがこれらに限定されない: (a) 米国特許第4,452,775号、同第4,667,014号、同第4,748,034号及び同第5,239,660号に記載されるような、活性組成物がマトリックス内にある形態で含まれる、侵食性 (erosional) の系、及び (b) 米国特許第3,832,253号及び同第3,854,480号に記載されるような、活性成分が制御された速度でポリマーから浸透する拡散系。さらに、ポンプベースのハードウェア送達系も使用され得、そのうちいくつかは、移植のために適合している。

【0096】

当業者は、本発明の本発明のCAR材料が、本発明のCAR材料の治療効力又は予防効力を改変によって増加させるために、多数の方法で改変され得ることを容易に理解するであろう。例えば、本発明のCAR材料は、直接的又は架橋を介して間接的にかのいずれかで、ターゲット化部分にコンジュゲート化され得る。化合物(例えば、本発明のCAR材料)をターゲット化部分にコンジュゲート化する実務は、当該分野で公知である。例えば、Wadwala, J. Drug Targeting 3:111 (1995) 及び米国特許第5,087,616号を参照。

【0097】

或いは、本発明のCAR材料は、デポー (depot) 形態に改変され得、その結果、投与される身体中に本発明のCAR材料が放出される様式は、時間及び身体内の位置に関して制御される(例えば、米国特許第4,450,150号を参照)。本発明のCAR材料のデポー形態は、例えば、本発明のCAR材料及び多孔性又は非多孔性の材料(例えばポリマー)を含む移植可能な組成物であって、本発明のCAR材料が、材料に封入されるか又は材料を通して拡散され、及び/又は非多孔性材料の分解によって拡散されるものであり得る。次いでデポーは、身体内の所望の位置に移植され、本発明のCAR材料が、所定の速度で移植物から放出される。

【0098】

本発明のCAR材料を1種以上の更なる治療剤と共に投与する場合、1種以上の更なる治療剤は、哺乳動物に共投与され得る。「共投与 (coadministration)」とは、本発明のCAR材料が1種以上の更なる治療剤の効果を増強でき、また1種以上の更なる治療剤が本発明のCAR材料の効果を増強できるように十分に近接した時間で、1種以上の更なる治療剤及び本発明のCAR材料を投与することを意味する。これに関して

10

20

30

40

50

、本発明のCAR材料が最初に投与されかつ1種以上の更なる治療剤が2番目に投与され得、1種以上の更なる治療剤が最初に投与され且つ本発明のCAR材料が2番目に投与され得る。或いは、本発明のCAR材料及び1種以上の更なる治療剤は、同時に投与され得る。CAR材料と共に投与され得る例示的な治療剤は、IL-2である。IL-2は、本発明のCAR材料の治療効果を増強すると考えられる。宿主細胞又は細胞集団が哺乳動物に投与される本発明の方法の目的のために、細胞は哺乳動物に対して同種又は自己の細胞であり得る。

【0099】

本発明の医薬組成物、CAR、核酸、組換え発現ベクター、宿主細胞又は細胞集団は、哺乳動物における疾患を治療又は予防する方法で使用され得ることが企図される。特定の理論又はメカニズムに束縛されないが、本発明のCARは、細胞により発現された場合に、CARが特異性を有する抗原（例えば、CD22）を発現する細胞に対して免疫応答を媒介できるように、生物活性（例えば、抗原（例としてCD22）を認識する能力）を有する。これに関して、本発明の一実施形態は、哺乳動物におけるがんの治療又は予防方法であって、哺乳動物におけるがんを治療又は予防するのに有効な量で、本発明のCAR、核酸、組換え発現ベクター、宿主細胞、細胞集団、抗体及び／若しくはその抗原結合部分、並びに／又は医薬組成物を哺乳動物に投与することを含む方法を提供する。

10

【0100】

本発明の一実施形態は、本発明のCAR材料を投与する前に哺乳動物をリンパ枯渇させる（lymphodeplete）ことをさらに含む。リンパ枯渇法（lymphodepletion）の例としては、骨髄非破壊的なリンパ枯渇化学療法（nonmyeloablative lymphodepleting chemotherapy）、骨髄破壊的なリンパ枯渇化学療法（myeloablative lymphodepleting chemotherapy）、全身照射法等が挙げられるが、これらに限定されなくてもよい。

20

【0101】

宿主細胞又は細胞集団が投与される本発明の方法の目的のために、細胞は、哺乳動物に対して同種又は自己の細胞であり得る。好ましくは、細胞は、哺乳動物に対して自己性である。

30

【0102】

本明細書中で言及する哺乳動物は任意の哺乳動物であり得る。本明細書中で使用する場合、用語「哺乳動物」とは、任意の哺乳動物をいい、Rodentia目の哺乳動物（例えば、マウス及びハムスター）並びにLogomorpha目の哺乳動物（例えばウサギ）が挙げられるが、これらに限定されない。哺乳動物は、Carnivora目（Felines（ネコ）及びCanines（イヌ）を含む）由来であってよい。哺乳動物は、Artiodactyla目（Bovines（ウシ）及びSwines（ブタ）を含む）由来又はPerissodactyla目（Equines（ウマ）を含む）由来であってよい。哺乳動物は、Primates目、Ceboids目若しくはSimoids目（サル）又はAnthropoids目（ヒト及び類人猿）のものであってよい。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

40

【0103】

本発明の方法に関して、がんは、以下のいずれかを含む任意のがんであり得る：急性リンパ球性がん、急性骨髄性白血病、胞巣状横紋筋肉腫、膀胱がん（bladder cancer）（例、膀胱癌（bladder carcinoma））、骨がん、脳がん（例、髓芽細胞腫）、乳がん、肛門、肛門管又は肛門直腸（anorectum）のがん、眼のがん、肝内胆管のがん、関節のがん、頸部、胆嚢又は胸膜のがん、鼻、鼻腔又は中耳のがん、口腔のがん、外陰部のがん、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性がん、結腸がん、食道がん、子宮頸がん、線維肉腫、消化管カルチノイド腫瘍、頭頸部がん（例、頭頸部扁平上皮癌）、ホジキンリンパ腫、下咽頭がん、腎臓がん、喉頭がん、白血病、液性腫瘍、肝臓がん、肺がん（例、非小細胞肺癌）、リンパ腫、悪性中皮腫、肥満細胞腫、黒色腫

50

、多発性骨髄腫、鼻咽頭がん、非ホジキンリンパ腫、B細胞慢性リンパ性白血病、有毛細胞白血病、急性リンパ性白血病（A L L）、及びバーキットリンパ腫、卵巣がん、膵臓がん、腹膜、網及び腸間膜のがん、咽頭がん、前立腺がん、直腸がん、腎がん、皮膚がん、小腸がん、軟組織がん、固形腫瘍、胃がん、精巣がん、甲状腺がん、並びに尿管がん。好ましくは、がんは、血液系悪性腫瘍（例、白血病又はリンパ腫、例としてホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、慢性リンパ性白血病、急性リンパ性がん、急性骨髄性白血病、B細胞慢性リンパ性白血病、有毛細胞白血病、急性リンパ性白血病（A L L）、及びバーキットリンパ腫が挙げられるが、これらに限定されない）である。好ましくは、がんはC D 2 2 の発現によって特徴づけられる。

【0104】

用語「治療」及び「予防」並びにそれらの派生語は、本明細書中で使用する場合、100%又は完全な治療又は予防を必ずしも意味しない。むしろ、当業者が潜在的な有益効果又は治療効果を有すると認識する、変動する程度の治療又は予防が存在する。これに関して、本発明の方法は、哺乳動物中のがんの任意のレベルの治療又は予防の任意の量を提供し得る。さらに、本発明の方法が提供する治療又は予防は、治療又は予防される疾患（例えばがん）の1つ以上の状態又は症状の治療又は予防を含み得る。また、本明細書の目的のために、「予防」は、疾患又はその症状若しくは状態の発症を遅延させることを含み得る。

【0105】

本発明の別の実施形態は、本発明のCAR、核酸、組換え発現ベクター、宿主細胞、細胞集団、抗体若しくはその抗原結合部分、又は医薬組成物の、哺乳動物におけるがんの治療又は予防のための使用を提供する。

【0106】

本発明の別の実施形態は、哺乳動物におけるがんの存在を検出する方法を提供し、この方法は以下を含む：（a）哺乳動物由来の1つ以上の細胞を含むサンプルを、本発明のCAR、核酸、組換え発現ベクター、宿主細胞、細胞集団、抗体及び／又はその抗原結合部分と接触させることによって、複合体を形成する工程、及び（b）複合体を検出する工程であって、該複合体の検出が哺乳動物におけるがんの存在を示す、工程。

【0107】

サンプルは、任意の適切な方法（例えば、生体検査又は死体解剖）により得てもよい。生体検査は、個体からの組織及び／又は細胞の除去である。かかる除去は、除去された組織及び／又は細胞で実験を行うために、個体から組織及び／又は細胞を集めためであってもよい。この実験は、個体が特定の状態又は病状（disease-state）を有している及び／又は患っているかどうかを決定するための実験を含んでもよい。状態又は疾患（disease）は、例えばがんでもよい。

【0108】

本発明の哺乳動物におけるがんの存在の検出方法の実施形態に関して、哺乳動物の細胞を含むサンプルは、全細胞、その溶解物又は全細胞溶解物の画分（fraction）（例えば、核又は細胞質画分、全タンパク質画分又は核酸画分）を含むサンプルであり得る。サンプルが全細胞を含む場合、細胞は、哺乳動物の任意の細胞（血液細胞又は内皮細胞を含む、任意の組織又は器官の細胞）であり得る。

【0109】

本発明の検出方法の目的のために、接触は、哺乳動物に関してin vitro又はin vivoで行うことができる。好ましくは、接触はin vitroである。

【0110】

また、複合体の検出は、当該技術分野で公知の、任意の数の方法を通して起こり得る。例えば、本明細書中に記載の、本発明のTCR、ポリペプチド、タンパク質、核酸、組換え発現ベクター、宿主細胞、細胞集団、又は抗体若しくはその抗原結合部分は、例えば、放射性同位体、蛍光色素（例、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、フィコエリトリン（PE））、酵素（例、アルカリホスファターゼ、セイヨウワサビペルオキシ

10

20

30

40

50

ダーゼ)、及び元素粒子(例、金粒子)等の検出可能な標識で標識され得る。

【0111】

ターゲット細胞を認識する能力及び抗原特異性についてCARを試験する方法は、当該分野で公知である。例えば、Clayら、J. Immunol., 163:507-513(1999)は、サイトカイン(例えば、インターフェロン-、顆粒球/単球コロニー刺激因子(GM-CSF)、腫瘍壞死因子 α (TNF-)又はインターロイキン2(IL-2))の放出を測定する方法を教示している。さらに、CAR機能は、Zhaoら、J. Immunol., 174:4415-4423(2005)に記載されるように、細胞毒性(cellular cytotoxicity)の測定によって評価できる。

【0112】

以下の実施例は、本発明をさらに説明するが、その範囲を限定するものであると決して解釈すべきではないことは当然である。

【実施例】

【0113】

実施例1

この実施例により、抗CD22-CARの合成、PBMCへの抗CD22-CARの形質導入、及び形質導入されたPBMCの表面のCAR発現の解析を実証する。

【0114】

コドン最適化アルゴリズム(Mr. Gene GmbH, Regensburg, Germany)を用いて、CARをコードする配列を合成し、上述の表1に示すように、第二世代バージョン1(CD28膜貫通ドメイン及び細胞内T細胞シグナル伝達ドメイン、並びにCD3-鎖細胞内T細胞シグナル伝達ドメイン)；第二世代バージョン2(CD137及びCD3-の細胞内T細胞シグナル伝達ドメインと結合したCD8膜貫通ドメイン)又は第三世代(CD28、CD137及びCD3-の細胞内T細胞シグナル伝達ドメインと結合したCD8膜貫通ドメイン)の配列をコードする「目的」ベクターに、記載されるように(Zhaoら、J. Immunol., 183(9):5563-74(2009))、サブクローニングした。

【0115】

293GP細胞へCARレトロウイルスベクター及びRD114ウイルス被膜糖タンパク質をコードするプラスミドをトランスフェクトし、48~72時間後に培養上清(s/n)を集めることにより、レトロウイルスベクターの上清を作製した。培養上清は凍結するか、又は即座に使用し、Y.Zhaoら、J. Immunol., 183:5563(2009)に以前記載されるように、連続した2日間にわたる「培養皿上の」方法(ベクターを含むs/nの希釈物にあらかじめ曝露させたレトロネクチン(Takara Bio Inc., Shiga, Japan)をコートした培養皿上での、リンパ球培養)を用いてOKT3及びIL-2により活性化したヒトPBMCに形質導入した。本研究において、恒久的産生細胞株由来のCD19特異的CARを含むレトロウイルスのs/n(Kochenderferら、Blood, 116:4099(2010))も使用した。

【0116】

形質導入されたT細胞でのCARの発現をフローサイトメトリーにより決定した。CH2CH3をコードしないCARを検出するために、形質導入されたT細胞をCD22-Fc(R&D Systems, Minneapolis, MN)とともにインキュベートし、続いてヒトIgG-Fcに特異的なFITC-F(ab')₂(Jackson Immunoresearch, West Grove, PA)とともにインキュベートした。CH2CH3ドメインによってCARを発現する細胞を検出するために、ヤギの抗ヒトIgG(H&L)を用いた。HA22SH CARは、CH2CH3の代わりに短い免疫グロブリン定常ドメイン配列を発現する。CD19特異的CARは、Ig領域を含まず、プロテインLを用いて検出した。ビオチン化プロテインL(50ng/ul, Thermo Scientific, Waltham, MA)を結合させ、細胞を洗浄し、その後、SA-FITC(4ug/ml, BD Biosciences, Franklin

10

20

30

40

50

Lakes, NJ) を用いて検出した。レトロウイルスベクターを含む二種類の上清希釈物を使用した(1:4及び1:8)。対照用に、CD19-CARベクターのs/nもまた評価した。フローサイトメトリー実験により、形質導入されたT細胞における、表1に記載したCAR群中のCARの発現を確認した。

【0117】

実施例2

本実施例は、白血病細胞株でのCD22及びCD19抗原の発現を実証する。

【0118】

QUANTITY-BRITTE PEビーズ(BD Biosciences)並びにPE-標識された抗CD19及び抗CD22抗体(表2)を用い、ヒト白血病細胞株(REH、SEM、NALM-6、KOPN-8、Daudi、Raji及びK562)の細胞表面におけるCD19及びCD22の発現レベルを評価した。「細胞あたりの受容体数」は、示したそれぞれの細胞株の、細胞あたりの分子のおよその絶対数を指す。データは、製造業者の指示書に従い、CELL QUESTソフトウェア(BD)データ解析ツールを用いて、細胞あたりの結合した抗体(ABC)を決定することにより計算した。

10

【0119】

【表2】

白血病細胞株	細胞あたりの受容体数
REH CD19	15,100
SEM CD19	50,800
NALM-6 CD19	50,500
KOPN-8 CD19	60,800
Daudi CD19	15,000
Raji CD19	50,000
K562 CD19	<100
REH CD22	7,000
SEM CD22	7,000
NALM-6 CD22	8,000
KOPN-8 CD22	15,300
Daudi CD22	8,000
Raji CD22	60,800
K562 CD22	<200

20

30

30

【0120】

実施例3

本実施例は、in vitroにおいてシグナリングモチーフ及びCH2CH3がCAR活性へ及ぼす影響を実証する。

40

【0121】

第二世代又は第三世代CAR構築物が溶解活性の増加をもたらしたか否かを決定するために、白血病細胞株を⁵¹Crで標識し、CTLアッセイにおいてターゲットとして使用した。エフェクター細胞は、以下のCAR:HA22-第二世代(配列番号15)、HA22-第三世代(配列番号16)、BL22-第二世代(配列番号19)、BL22-第三世代(配列番号20)、HA22-SH-第二世代(配列番号17)、HA22-SH-第三世代(配列番号18)、mock導入(形質導入されていない)及びCD19特異的CAR、のうちの一種が形質導入されたヒトT細胞であった。エフェクター細胞は、ターゲット細胞と様々なエフェクター:ターゲット(E:T)比で共培養した。結果を図1

50

及び図 6 A ~ 6 L に示す。図 1 及び図 6 A ~ 6 H に示すように、第二世代 CAR は、第三世代 CAR と比較して優れた溶解活性を実証した。更に、図 6 I ~ 6 L に示すように、 Ig G 1 由来の CH2CH3 の付加は、in vitro のアッセイで CAR の機能に影響を及ぼさない。

【0122】

実施例 4

本実施例は、異なる CAR 構築物を分析する場合、溶解単位を使用して形質導入効率を正規化できることを実証する。

【0123】

各々の CAR の形質導入効率を正規化するために、エフェクター T 細胞の CAR 発現割合を分析した。次いで、ウェルあたりのエフェクターの実数に対して、E : T 比を補正した（すなわち、形質導入率が 50 % の場合、E : T 比を 10 : 1 から 5 : 1 へと減少させる）。補正した E : T 比と溶解（%）とのプロットを、次いで作成した。1 溶解単位を、10 : 1 の E : T 比においてターゲット細胞が 30 % 溶解するものとして定義した。この機能的な「単位」の定義により、比較される形質導入されたエフェクター細胞集団のそれにおける、溶解活性の量が定量化される。溶解単位は、構築物間の形質導入効率の差異に対して正規化した E : T 比を表す。図 8 A ~ 8 D は、細胞株 REH、SEM、NALM-6 又は KOPN-8 に関して、CAR HA22 28Bz (配列番号 15) ; CAR HA22 28Bz (配列番号 16) ; CAR BL22 28Bz (配列番号 19) ; CAR BL22 28Bz (配列番号 20) ; CAR HASH22 28Bz (配列番号 17) ; 又は CAR HASH22 28Bz (配列番号 18) の溶解活性を示す。

10

20

30

40

50

【0124】

実施例 5

本実施例は、HA22 及び BL22 をベースとした抗 CD22 CAR の溶解活性を実証する。

【0125】

CD22 に対する親和性の違いが CAR の溶解活性の差異を生み出すか否かを決定するために、実施例 2 に記載の 4 種の白血病細胞株 : KOPN8 (図 2 A)、NALM6 (図 2 B)、REH (図 3 A) 及び SEM (図 3 B) をターゲットとして用いて、⁵¹Cr 放出 CTL アッセイにより、HA22 及び BL22 の scFv 配列をコードする CAR を比較した。3 種の異なる第二世代バージョン 1 抗 CD22 CAR 構築物 : HA22-CH2CH3 (配列番号 15)、BL22-CH2CH3 (配列番号 19) 及び HA22-SH (短い免疫グロブリン定常ドメイン配列) (配列番号 17) を比較した。高活性抗 CD19 CAR はコントロールとして含めた。実施例 4 に記載したとおり、各々個別の CAR 構築物の形質導入率により E : T 比を正規化し、それによって溶解値を直接比較可能であった。図 2 A に示すように、細胞株 KOPN8 は、scFv 親和性に基づく溶解活性の違いをはっきりと実証した。1 : 1 を超える全ての割合に対して個別の E : T 比をスチューデント T 検定 (対応のない、両側) により比較した場合、BL22 活性は、HA22 ($p < 0.04$) 又は HASH ($p < 0.005$) よりも有意に低かった。本実施例により、数種の白血病細胞株において CAR 構築物を用いた場合、高親和性 scFV がより効率的なターゲット細胞の溶解を生じさせること、かつ、この違いは CD22 発現レベルと関連しないようであることが実証された。

【0126】

実施例 6

本実施例は、HA22 をベースとした抗 CD22 CAR の溶解活性を実証する。

【0127】

トリニパ球を OKT3 及び IL-2 で二日間活性化させ、空のベクター (mock) 又は以下の CAR 構築物を発現するレトロウイルスベクターを形質導入した : HA22 (第二世代バージョン 1) (配列番号 15)、HA22 (第三世代) (配列番号 16)、抗 CD19 CAR、HASH22 (第二世代バージョン 1、短い免疫グロブリン定常ドメイ

50

ン配列）（配列番号17）又はH A S H 2 2（第三世代、短い免疫グロブリン定常ドメイン配列）（配列番号18）。その後、形質導入された細胞が、C D 2 2を発現する白血病細胞株、R E H、S E M及びN A L M 6を溶解する能力を試験した（8時間の⁵Cr放出アッセイ）（図4）。これらの三種の細胞株は、C D 1 9抗原も発現していた。エフェクター：ターゲットの比は、30：1であった。K 5 6 2細胞株は、抗原陰性コントロールとして含めた。K 5 6 2細胞株は、抗原陰性コントロールとして含めた。図4に示すように、抗C D 2 2 C A Rは、白血病細胞株R E H、S E M及びN A L M 6を効果的に溶解させた。

【0128】

実施例7

10

本実施例は、第二世代バージョン1 H A S H 2 2 C A Rの溶解活性を実証する。

【0129】

第二世代 H A S H 2 2 C A R（配列番号17）をコードするヌクレオチド配列を用いて、レトロウイルスベクターを含む上清を作製した。当該上清を用いてヒトTリンパ球に形質導入し、形質導入されたTリンパ球が、C D 2 2抗原を産生する細胞株を溶解する能力を試験した。

【0130】

Tリンパ球をO K T 3及びI L - 2で二日間活性化させ、レトロウイルスC A Rベクターを含む上清を用いて形質導入し、続いて、C D 2 2を発現する白血病細胞株（R E H、S E M、N A L M 6、K O P N 8、D a u d i、R a j i）及びC D 2 2陰性コントロール細胞株（K 5 6 2）を溶解する能力を試験した。コントロール（M o c k）として、T細胞を、同様の方法で活性化及び培養したが、C A Rベクターを含むレトロウイルス上清に曝露しなかった（形質導入されていない）。

20

【0131】

結果を図5A及び5Bに示す。コントロール細胞では、腫瘍ターゲットの溶解は、ほとんど観察されなかった（図5A）。H A S H 2 2 C A Rを形質導入された細胞では、R E H、S E M及びK O P N 8細胞株の溶解が観察された（図5B）。

【0132】

実施例8

30

本実施例は、H A 2 2をベースとしたC A Rを形質導入された細胞が、i n v i v oで疾患の進行を遅延させ、生存を延長させることを実証する。

【0133】

ルシフェラーゼを発現するよう操作したC D 2 2陽性ヒト白血病（0.5×10⁶のN A L M 6 - G L（ルシフェラーゼをトランスフェクトしたN A M L 6））を、免疫不全マウスN S G（N O D s c i d g a m m a）へ0日目（d a y 0）に注入した。3日目に、1×10⁷のコントロールT細胞（「m o c k」、形質導入されていない）、又はH A S H 2 2 C A R - 第二世代バージョン1（配列番号17）、H A S H 2 2 C A R - 第三世代（配列番号18）若しくはH A S H 2 2 C A R - 第二世代バージョン2（配列番号32）を形質導入させた1×10⁷個のT細胞を用いて、マウスを処理した。X e n o g e n I V I S装置を用いた生物発光イメージングにより、全身腫瘍組織量を30日の期間にわたって計測した。D - ルシフェリン3mg（C a l i p e r L i f e S c i e n c e s, I n c.）をマウスに腹腔内注入（i . p .）し、注入4分後、麻酔をかけられたマウスを露光時間30秒で撮影した。各マウスあたりの生物発光シグナルを光子/s/cm²/srとして解析するために、L I V I N G I M A G Eソフトウェアを使用した。K a p l a n - M e i e rプロットを図7Aに示す。

40

【0134】

図7Aに示すように、3日目では、全てのマウスが同程度の疾患を有した。H A S H 2 2 C A R - 第二世代バージョン1（配列番号17）、H A S H 2 2 C A R - 第三世代（配列番号18）又はH A S H 2 2 C A R - 第二世代バージョン2（配列番号32）を形質導入されたT細胞で処理したマウスは、コントロール細胞で処理したマウスと比較して

50

、マウスの全身腫瘍組織量が減少した。

【0135】

マウスの生存を30日間計測し、ログランク（マンテル・コックス）解析を用いて生存統計値を計算して、生存結果を図7Bに示す。図7Bに示すように、H A S H 2 2 C A R - 第二世代バージョン1（配列番号17）、H A S H 2 2 C A R - 第三世代（配列番号18）又はH A S H 2 2 C A R - 第二世代バージョン2（配列番号32）を形質導入されたT細胞で処理したマウスは、コントロール細胞で処理したマウスと比較して、生存期間が延長することを実証した。

【0136】

刊行物、特許出願及び特許を含む、本明細書中に引用した全ての参考文献は、それぞれの参考文献が参照によって組み込まれることが個々に且つ具体的に示されているのと同程度かつその全体が本明細書中に記載されているのと同程度まで、参照によって本明細書中に組み込まれる。

10

【0137】

本発明の説明に関して（特に、以下の特許請求の範囲に関して）、用語「a」及び「a n」及び「t h e」並びに同様の指示対象の使用は、本明細書中に特記しないか文脈と明らかに矛盾しない限り、単数形及び複数形の両方をカバーすると解釈すべきである。用語「含む（c o m p r i s i n g）」、「有する（h a v i n g）」、「含む（i n c l u d i n g）」及び「含む（c o n t a i n i n g）」は、特記しない限り、オーブンエンドの用語（即ち、「～を含むがそれらに限定されない」を意味する）と解釈すべきである。本明細書中の値の範囲の記述は、本明細書中に特記しない限り、その範囲内に入る各個別の値に個々に言及する省略方法として働くことのみを意図しており、各個別の値は、それが本明細書中に個々に記述されているかのように本明細書中に組み込まれる。本明細書中に記載される全ての方法は、本明細書中に特記しない又は文脈と明らかに矛盾しない限り、任意の適切な順序で実施できる。本明細書中に提供される任意の及び全ての例又は例示的用語（例えば、「など（s u c h a s）」）の使用は、本発明をよりよく説明することのみを意図しており、特段特許請求されない限り、本発明の範囲に限定を課すものではない。本明細書中の全ての用語は、特許請求されていない任意の要素を本発明の実施に必須のものとして示していると解釈すべきではない。

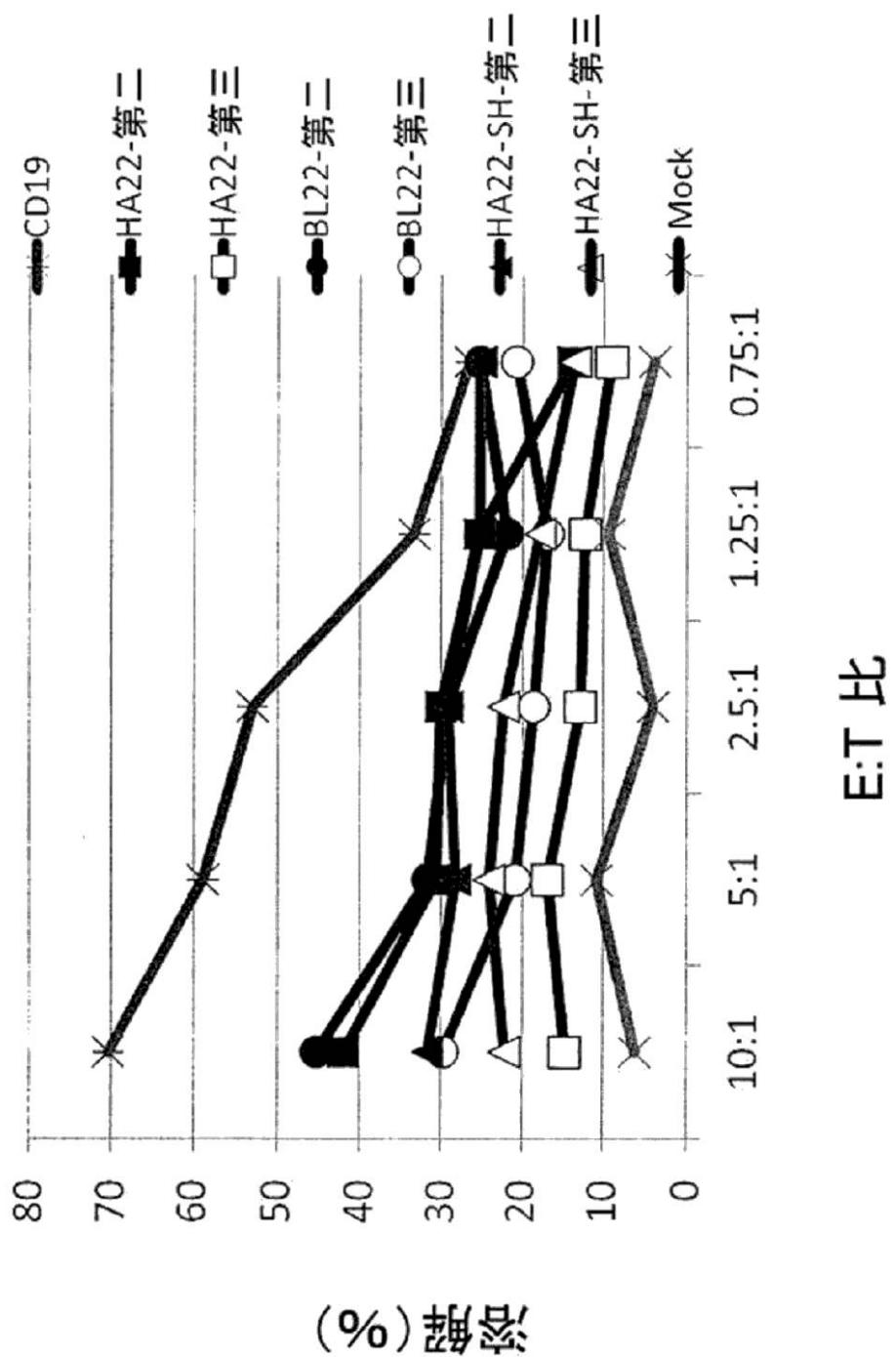
20

【0138】

30

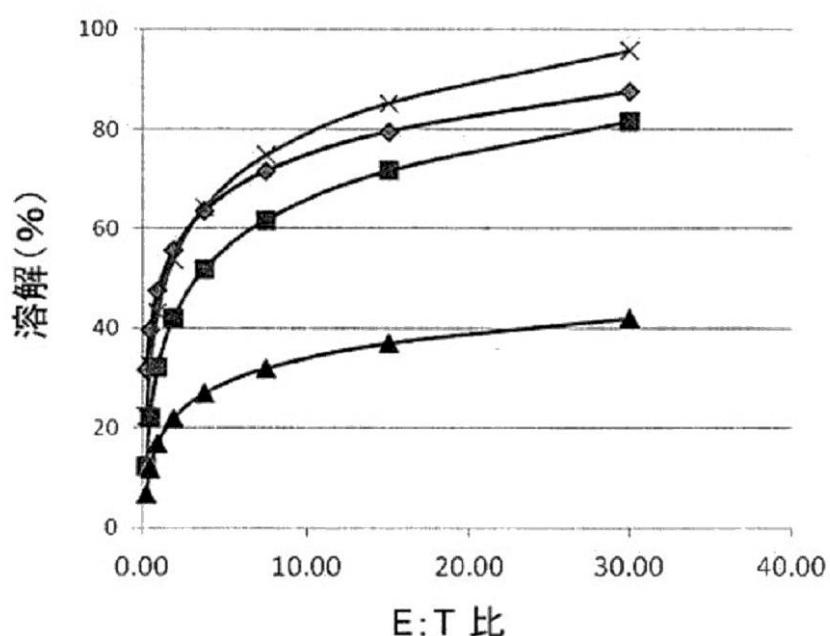
発明を実施するための発明者が知る最良の形態を含む、本発明の好ましい実施形態が本明細書中に記載されている。これらの好ましい実施形態のバリエーションは、上述の説明を読めば当業者に明らかとなり得る。本発明者らは、当業者がかかるバリエーションを適宜使用することを予期しており、本発明者らは、本明細書中に具体的に記載されたのとは異なる方法で本発明が実施されることを意図している。従って、本発明は、適用法によって許容されるとおり、本明細書中に添付した特許請求の範囲に記載される対象の全ての変更及び等価物を含む。さらに、その全ての可能なバリエーションでの上記要素の任意の組み合わせが、本明細書中に特記しない又は文脈と明らかに矛盾しない限り、本発明によって含まれる。

【図1】

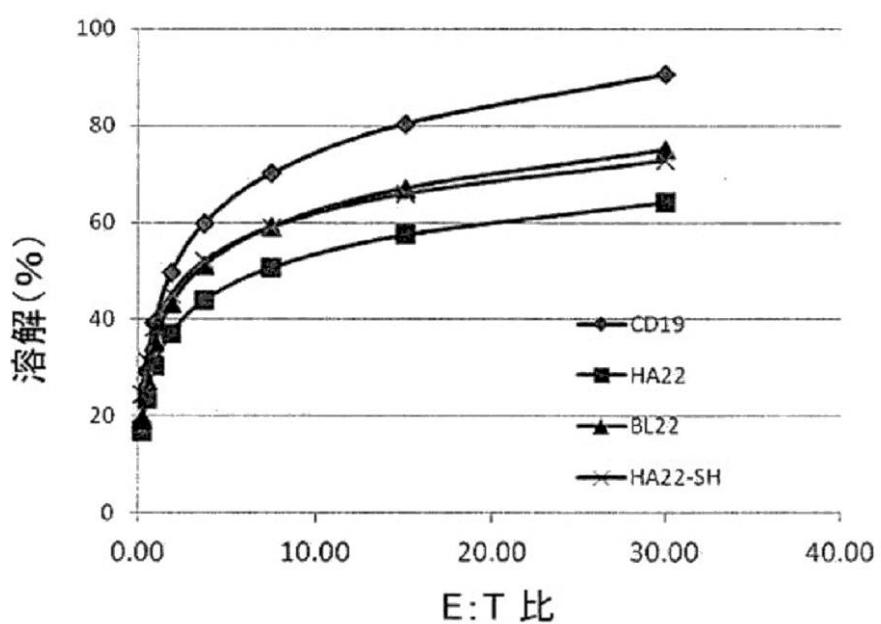


【図2】

A.

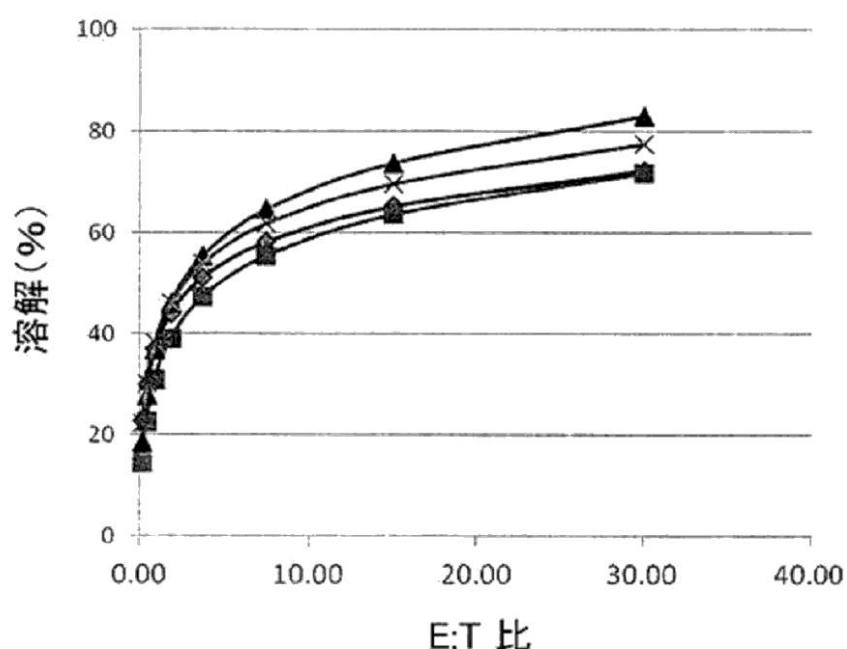


B.

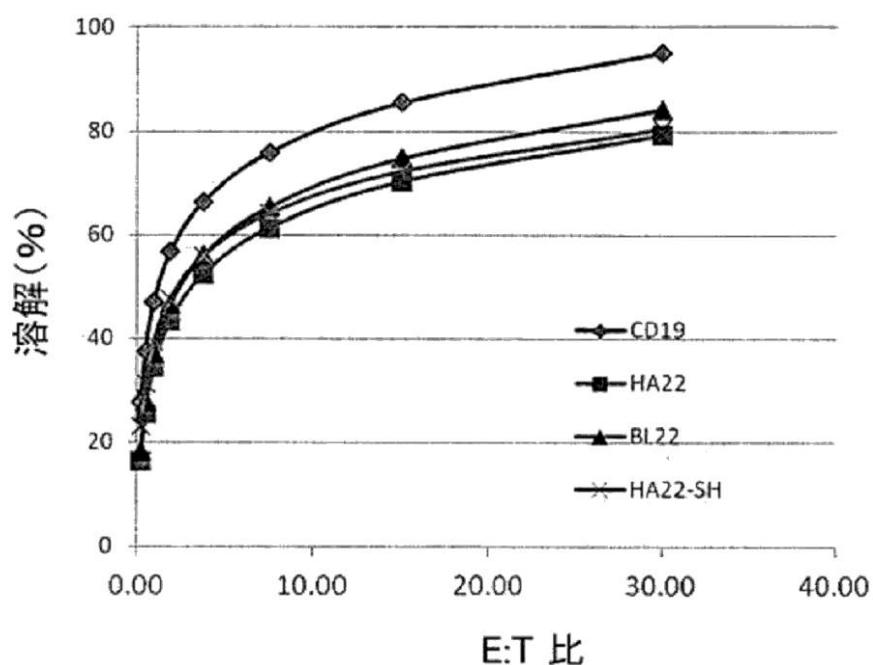


【図3】

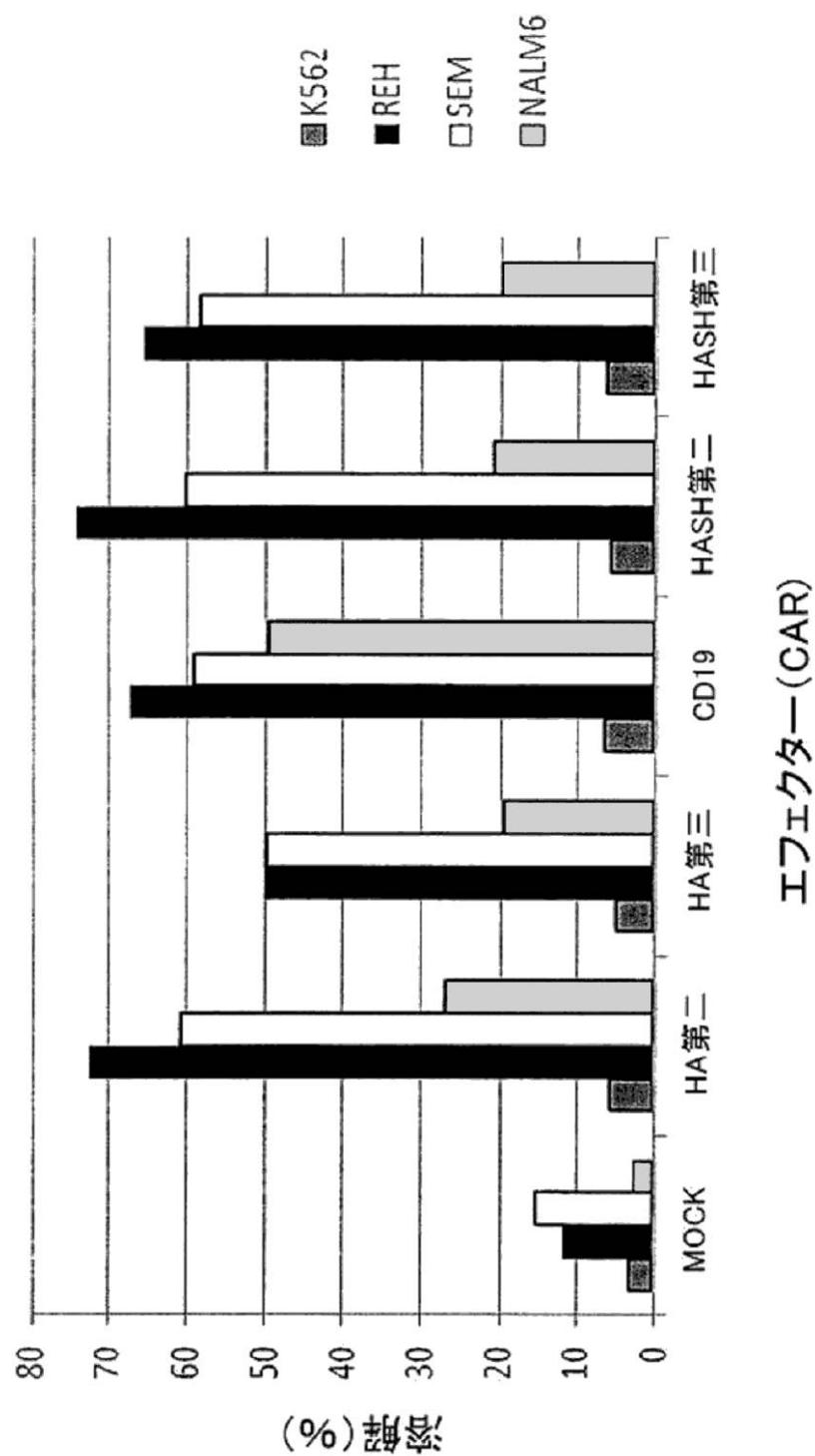
A.



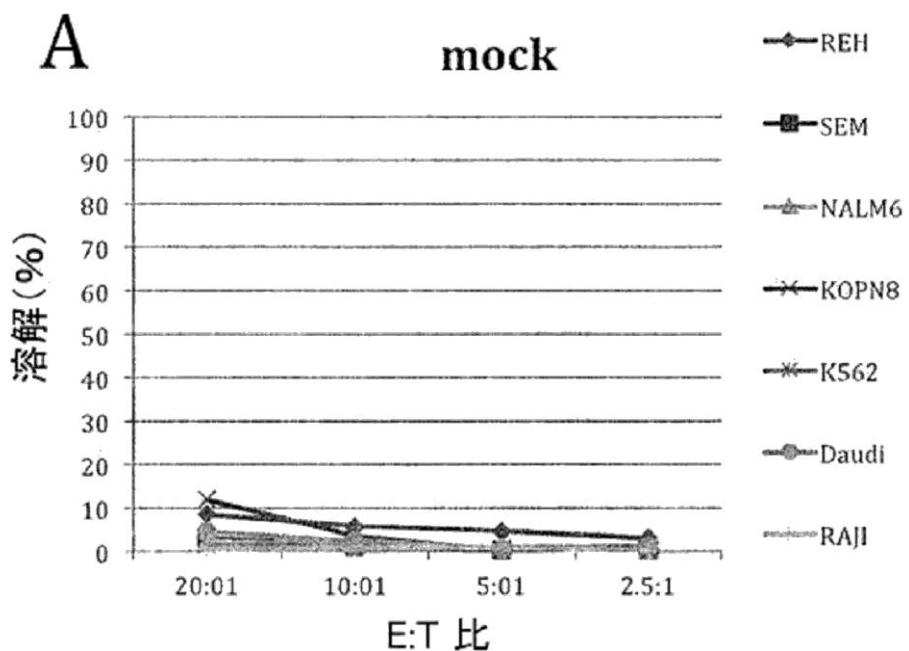
B.



【図4】



【図5】



B

HASH 28z

溶解(%)

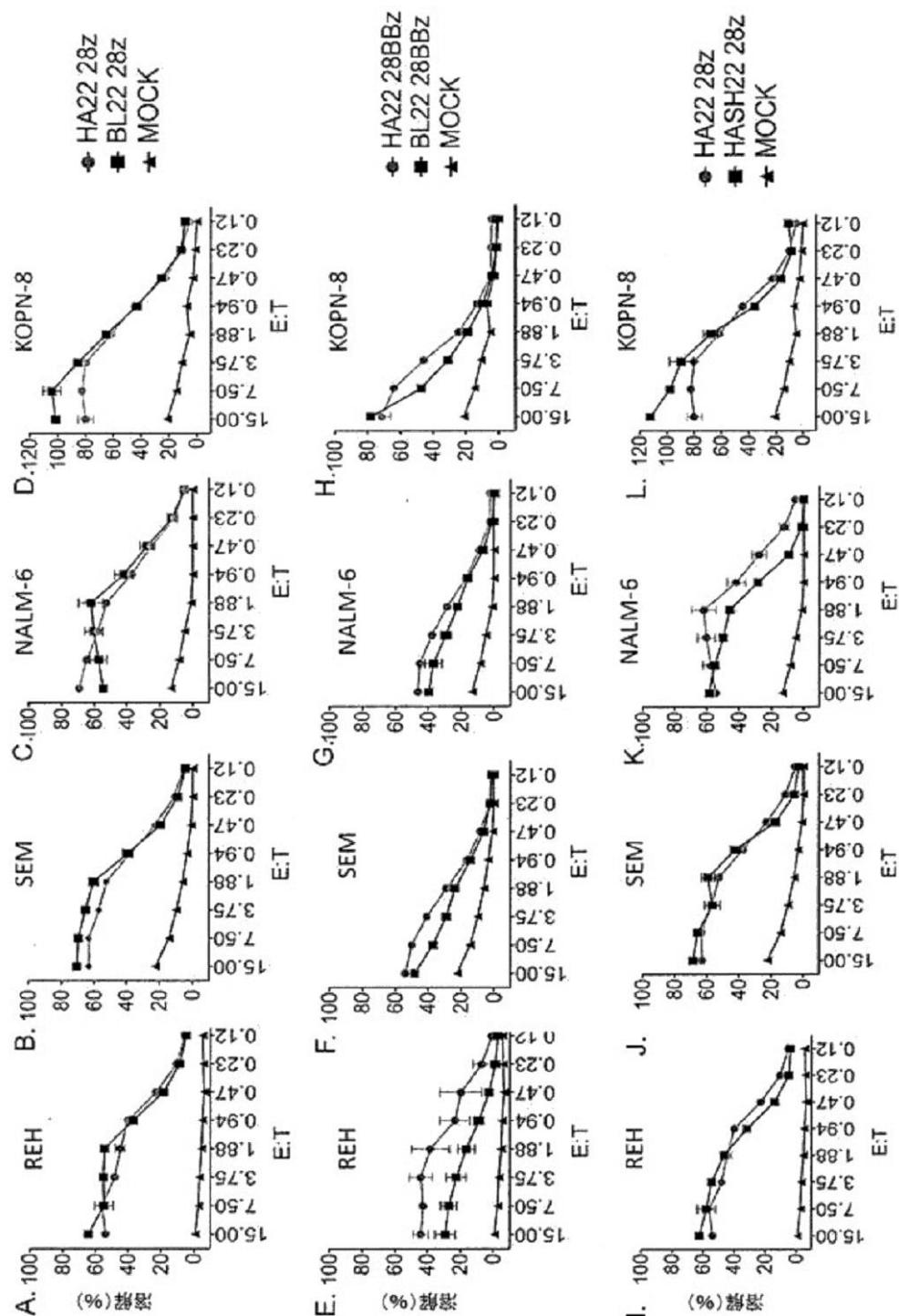
E:T 比

Legend:

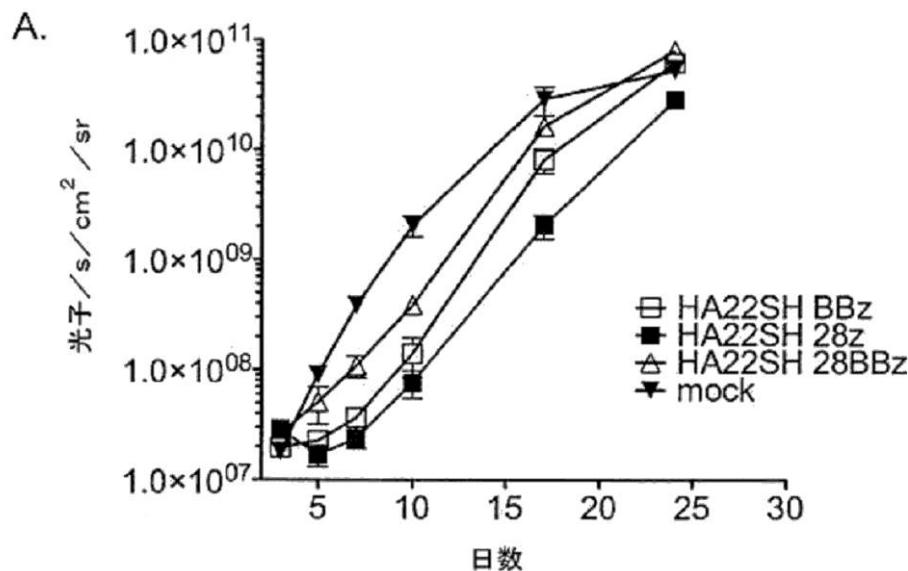
- REH (diamond)
- SEM (square)
- NALM6 (triangle)
- KOPN8 (cross)
- K562 (asterisk)
- Daudi (circle)
- RAJI (inverted triangle)

E:T 比	REH	SEM	NALM6	KOPN8	K562	Daudi	RAJI
20:01	45	35	15	50	0	15	0
10:01	38	32	12	38	0	12	0
5:01	28	25	8	28	0	8	0
2.5:1	15	15	5	15	0	5	0

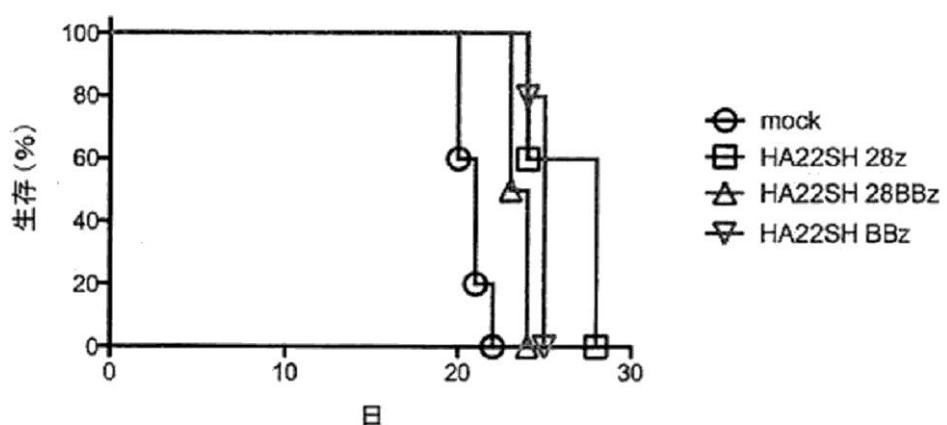
【図 6】



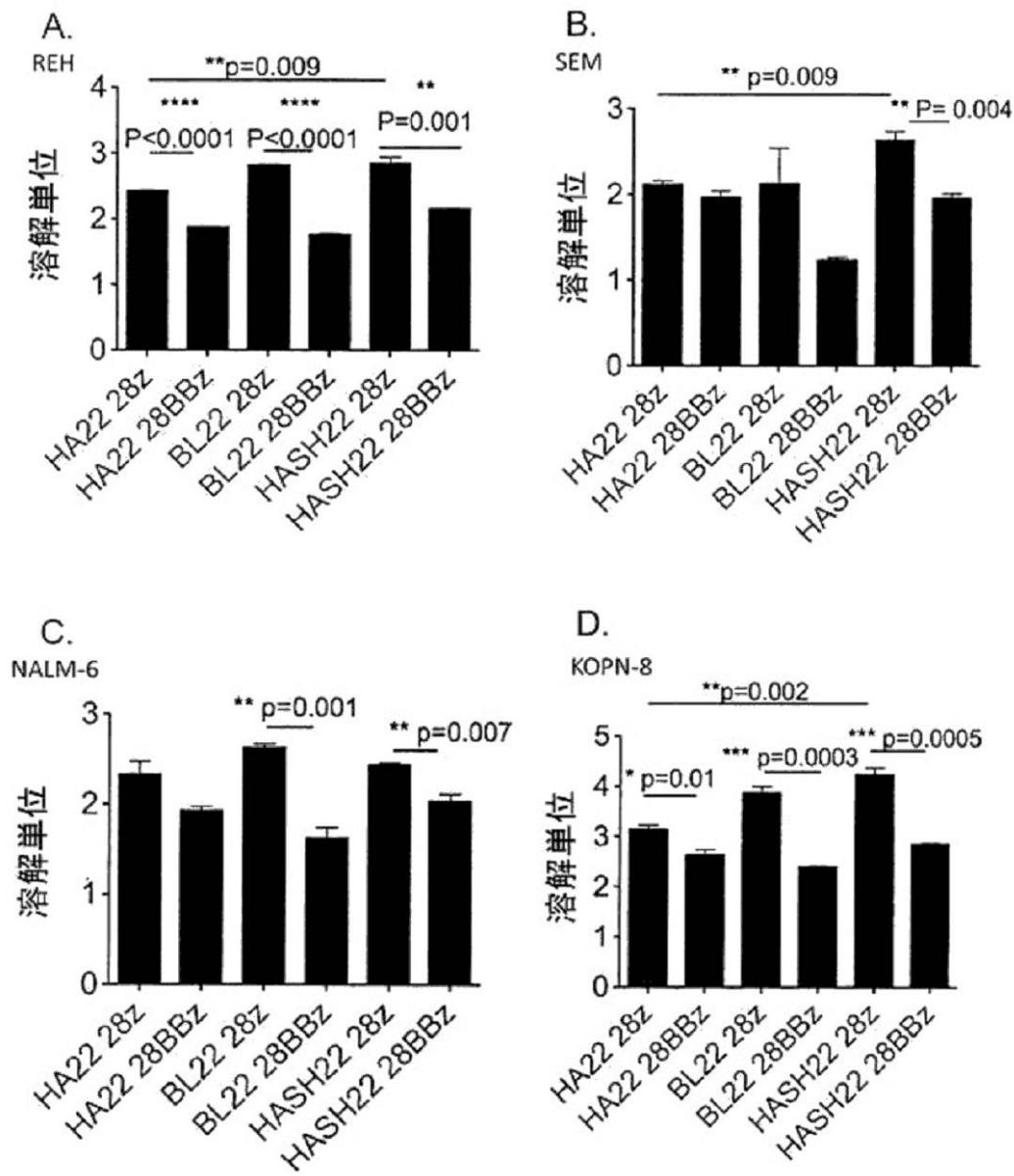
【図7】



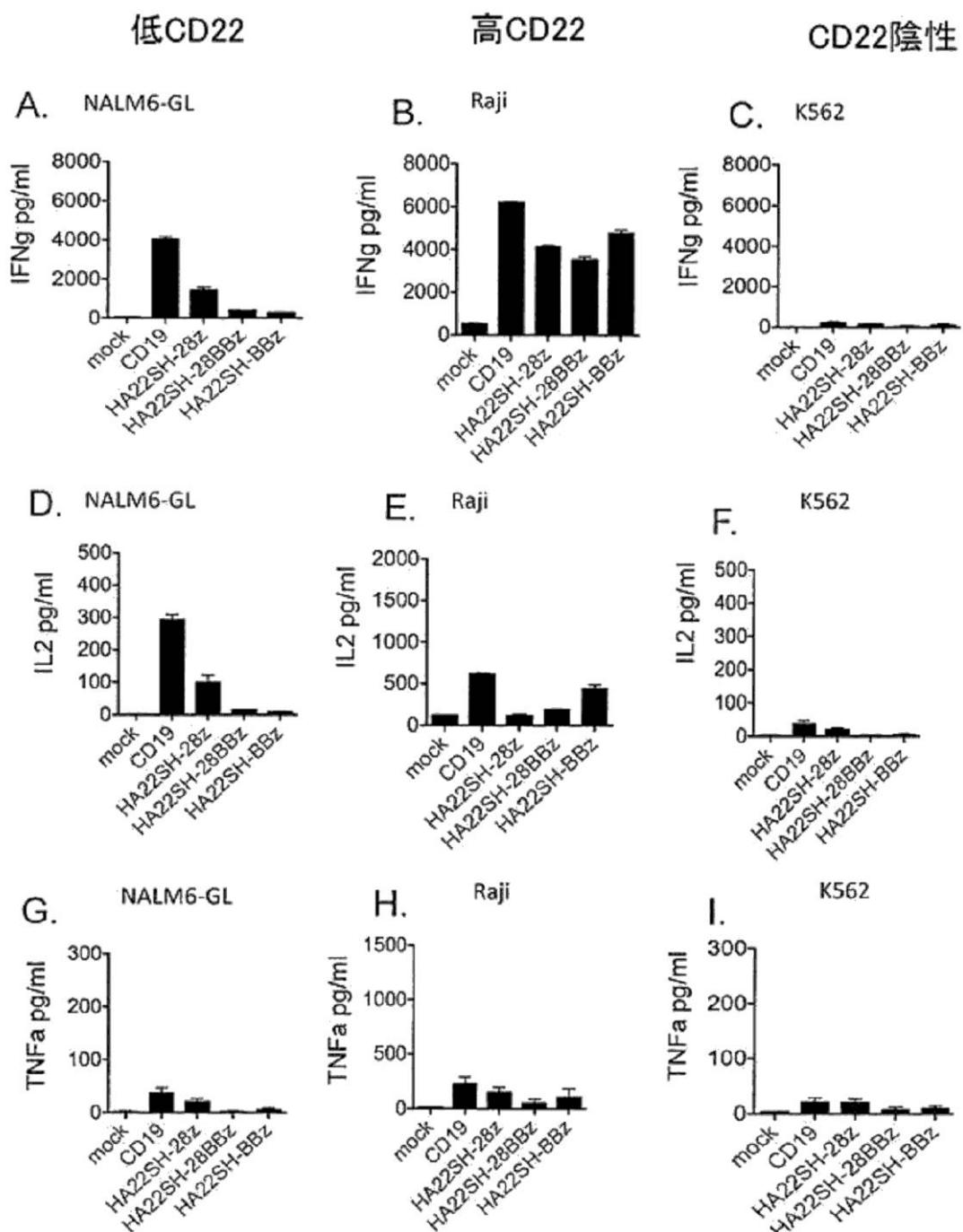
B.



【図8】



【図9】



【配列表】

2014534207000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2012/061025									
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K19/00 C12N5/0783 A61K35/14 A61P35/02 ADD. C07K16/28 C07K16/30 C07K14/705											
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC											
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K C12N A61K A61P											
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched											
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search											
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Category*</th> <th style="width: 80%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width: 10%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>JAMES SCOTT T ET AL: "Antigen sensitivity of CD22-specific chimeric TCR is modulated by target epitope distance from the cell membrane", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 180, no. 10, 1 May 2008 (2008-05-01), pages 7028-7038, XP002679899, ISSN: 0022-1767</td> <td>1-7,10, 15,18-25</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>whole document, especially the Abstract and Figure 1A ----- -/-</td> <td>8,9, 11-14, 16,17</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	JAMES SCOTT T ET AL: "Antigen sensitivity of CD22-specific chimeric TCR is modulated by target epitope distance from the cell membrane", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 180, no. 10, 1 May 2008 (2008-05-01), pages 7028-7038, XP002679899, ISSN: 0022-1767	1-7,10, 15,18-25	Y	whole document, especially the Abstract and Figure 1A ----- -/-	8,9, 11-14, 16,17
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
X	JAMES SCOTT T ET AL: "Antigen sensitivity of CD22-specific chimeric TCR is modulated by target epitope distance from the cell membrane", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 180, no. 10, 1 May 2008 (2008-05-01), pages 7028-7038, XP002679899, ISSN: 0022-1767	1-7,10, 15,18-25									
Y	whole document, especially the Abstract and Figure 1A ----- -/-	8,9, 11-14, 16,17									
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.									
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed											
Date of the actual completion of the international search 11 January 2013		Date of mailing of the international search report 25/01/2013									
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Luyten, Kattie									

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2012/061025

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2011/041093 A1 (US HEALTH [US]; ROSENBERG STEVEN A [US]; CHINNASAMY DHANALAKSHMI [US]) 7 April 2011 (2011-04-07) whole document, especially Tables 1 and 2; SEQ ID NOS 3 and 10-21 -----	1-25
Y	PARK JAE H ET AL: "Adoptive immunotherapy for B-cell malignancies with autologous chimeric antigen receptor modified tumor targeted T cells.", DISCOVERY MEDICINE APR 2010, 30 March 2010 (2010-03-30), XP002690051, ISSN: 1944-7930 Retrieved from the Internet: URL: http://www.discoverymedicine.com/Jae-H-Park/2010/03/30/adoptive-immunotherapy-for-b-cell-malignancies-with-autologous-chimeric-antigen-receptor-modified-tumor-targeted-t-cells/ [retrieved on 2013-01-19] whole document, especially Figure 1; Tables 1a, 1b, 2a, 2b; page 3, lines 8-10 from the bottom -----	1-25
Y	DAVID MARC DAVIES ET AL: "Adoptive T-cell Immunotherapy of Cancer Using Chimeric Antigen Receptor-Grafted T Cells", ARCHIVUM IMMUNOLOGIAE ET THERAPIAE EXPERIMENTALIS, vol. 58, no. 3, 6 April 2010 (2010-04-06), pages 165-178, XP055048882, ISSN: 0004-069X, DOI: 10.1007/s00005-010-0074-1 whole document, especially Figure 2; Table 1; page 169, section "The Signalling Domain" -----	1-25
Y	SADELAIN M ET AL: "The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors", CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY, ELSEVIER, OXFORD, GB, vol. 21, no. 2, 1 April 2009 (2009-04-01), pages 215-223, XP026058399, ISSN: 0952-7915, DOI: 10.1016/j.co.2009.02.009 [retrieved on 2009-03-25] whole document, especially Tables 1 and 2 -----	1-25
Y, P	WO 2012/079000 A1 (UNIV PENNSYLVANIA [US]; JUNE CARL H [US]; LEVINE BRUCE L [US]; PORTER) 14 June 2012 (2012-06-14) claims 12, 19-20; figure 1A; example 2; table 5; sequence 24 -----	1-25 -/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2012/061025

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	<p>Waleed Haso, et al.: "Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B cell precursor acute lymphoblastic leukemia", Blood, 14 December 2012 (2012-12-14), XP055048750, ISSN: 1528-0020, DOI: 10.1182/blood-2012-06-438002 Retrieved from the Internet: URL:http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/early/2012/12/14/blood-2012-06-438002.long [retrieved on 2013-01-07] the whole document</p> <p>-----</p>	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) [April 2005]

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2012/061025

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011041093	A1 07-04-2011	AU 2010301042 A1	19-04-2012
		CA 2776143 A1	07-04-2011
		EP 2483301 A1	08-08-2012
		US 2012213783 A1	23-08-2012
		WO 2011041093 A1	07-04-2011
WO 2012079000	A1 14-06-2012	NONE	

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 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 6
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 7
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1	4 H 0 4 5
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 K 35/12 (2006.01)	A 6 1 K 35/12	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	A
	G 0 1 N 33/53	D

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,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,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,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,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,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC

(74)代理人 100121212

弁理士 田村 弥栄子

(74)代理人 100122688

弁理士 山本 健二

(74)代理人 100117743

弁理士 村田 美由紀

(74)代理人 100163658

弁理士 小池 順造

(74)代理人 100174296

弁理士 當麻 博文

(72)発明者 オレンタス、リマス ジェイ.

アメリカ合衆国、メリーランド州 20815、チェヴィー チェイス、フレイマン ドライヴ
8560、アパートメント 102

(72)発明者 マックカル、クリスタル エル.

アメリカ合衆国、メリーランド州 20814、ベセスタ、バーリング ロード 5405

(72)発明者 パスタン、イラ エイチ.

アメリカ合衆国、メリーランド州 20854、ポートマック、ビール マウンテン ロード 11
710

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA61 CA01 CA07 CA09 CA11 CA20 DA01 DA02

DA05 DA11 EA04 GA11 HA01 HA11

4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ02 QQ03 QQ08 QQ42 QQ52 QR32

QR35 QR48 QR55 QR62 QS25 QS32 QX01

4B065 AA01X AA57X AA87X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA01 CA24 CA44

CA46

4C084	AA02	AA13	BA44	CA18	DA45	MA01	NA14	ZB262	ZB272	
4C085	AA13	AA14	BB01	EE01						
4C086	AA01	AA02	AA03	EA16	MA02	MA05	NA14	ZB26	ZB27	
4C087	AA01	AA02	BB63	BC83	CA12	MA01	NA14	ZB26	ZB27	
4H045	AA11	AA20	AA30	BA10	BA41	CA40	DA50	DA75	EA20	EA50

FA74

专利名称(译)	抗CD22嵌合抗原受体		
公开(公告)号	JP2014534207A	公开(公告)日	2014-12-18
申请号	JP2014537287	申请日	2012-10-19
[标]申请(专利权)人(译)	美国政府		
申请(专利权)人(译)	美国		
[标]发明人	オレンタスリマスジェイ マックカルクリスタルエル パスタンイラエイチ		
发明人	オレンタス、リマス ジェイ. マックカル、クリスタル エル. パスタン、イラ エイチ.		
IPC分类号	C07K19/00 C07K14/705 C07K16/28 C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12Q1/68 A61K38/00 A61K48/00 A61K31/7088 A61K35/76 A61K35/12 A61K39/395 A61P35/00 A61P35/02 G01N33/574 G01N33/53		
CPC分类号	C07K14/705 A61K38/00 C07K14/70517 C07K14/70521 C07K14/70596 C07K16/00 C07K16/2803 C07K16/2818 C07K16/2896 C07K16/3061 C07K2319/03 C07K2319/74 G01N33/57492		
FI分类号	C07K19/00.ZNA C07K14/705 C07K16/28 C12N15/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12Q1/68.A A61K37/02 A61K48/00 A61K31/7088 A61K35/76 A61K35/12 A61K39/395.N A61K39/395. D A61P35/00 A61P35/02 G01N33/574.A G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024 /CA20 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063 /QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS32 4B063/QX01 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084 /AA02 4C084/AA13 4C084/BA44 4C084/CA18 4C084/DA45 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZB262 4C084/ZB272 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB01 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086 /AA03 4C086/EA16 4C086/MA02 4C086/MA05 4C086/NA14 4C086/ZB26 4C086/ZB27 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB63 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/MA01 4C087/NA14 4C087/ZB26 4C087 /ZB27 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	高島肇 山本健二 当麻博文		
优先权	61/549516 2011-10-20 US		
其他公开文献	JP6267644B2 JP2014534207A5		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)			

本公开涉及药物组合物，其包含：a) HA 22的抗原结合区，跨膜结构域和细胞内T细胞信号传导结构域；或b) 抗原结合结构域，BL22的跨膜结构域和CD28的细胞内T细胞信号和/或嵌合抗原受体（CAR），其包含转导结构域。公开了与CAR相关的核酸，重组表达载体，宿主细胞，细胞群，抗体或其抗原结合位点，以及药物组合物。还公开了检测哺乳动物中癌症存在的方法和治疗或预防哺乳动物癌症的方法。【选择图】无

(P2014-53420)
(43) 公表日 平成26年12月18日 (2014.12.)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00	ZNA 4B024
C07K 14/705 (2006.01)	C07K 14/705	4B063
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28	4B065
C12N 15/00 (2006.01)	C12N 15/00	A 4C084
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4C085
	審査請求 未請求 予偽審査請求 未請求 (全 46 頁)	最終頁に
(21) 出願番号	特願2014-537287 (P2014-537287)	(71) 出願人 510002280
(36) (22) 出願日	平成24年10月19日 (2012.10.19)	アメリカ合衆国
(35) 翻訳文提出日	平成26年8月6日 (2014.8.6)	アメリカ合衆国 メリーランド州 2092-7660 ベトペスダ エムエス
(36) 国際出願番号	PCT/US2012/061025	-7660 スイチ325 エクエクト
(37) 国際公開番号	W02013/039583	ブ ボウレバール 6011 ナショナ
(37) 国際公開日	平成25年4月25日 (2013.4.25)	インスティテュート オブ ヘルス
(31) 優先権主張番号	61/548,516	フィス オブ テクノロジー トランス
(32) 優先日	平成23年10月20日 (2011.10.20)	マー
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人 100080791
		弁理士 高島 一
		(74) 代理人 100125070
		弁理士 土井 京子
		(74) 代理人 100136629
		弁理士 鍾田 光宣
		最終頁に