

(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2019-519529

(P2019-519529A)

(43) 公表日 令和1年7月11日(2019.7.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28	4B064
C12N 15/62 (2006.01)	C12N 15/62 ZNAZ	4B065
C12N 15/63 (2006.01)	C12N 15/63 Z	4C084
C12N 15/13 (2006.01)	C12N 15/13	4C085
C07K 16/00 (2006.01)	C07K 16/00	4C086
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 37 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-561669 (P2018-561669)
 (86) (22) 出願日 平成29年5月26日 (2017.5.26)
 (85) 翻訳文提出日 平成31年1月7日 (2019.1.7)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/034691
 (87) 国際公開番号 W02017/205747
 (87) 国際公開日 平成29年11月30日 (2017.11.30)
 (31) 優先権主張番号 62/342,394
 (32) 優先日 平成28年5月27日 (2016.5.27)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 510002280
 アメリカ合衆国
 アメリカ合衆国 メリーランド州 208
 92-7660 ベトヘスダ エムエスシ
 ー7660 スイテ325 エクエクトイ
 ブ ボウレバルド 6011 ナショナル
 インスティテュート オブ ヘルス オ
 フィス オブ テクノロジー トランスフ
 ザー
 (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 鎌田 光宜

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 FLT3 特異的なキメラ抗原受容体及びそれを使用する方法

(57) 【要約】

本発明の実施形態によって、FLT3に特異的な抗原結合ドメイン、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を含む、キメラ抗原受容体 (CAR) が提供される。該CAR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分、及び医薬組成物が開示される。哺乳動物における増殖性疾患、例、がんの存在を検出する方法、及び哺乳動物における増殖性疾患、例、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】

F L T 3 に特異的な抗原結合ドメイン、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を含むキメラ抗原受容体 (C A R) であって、

(a) 該抗原結合ドメインが、配列番号 1 3 ~ 1 9 の配列を含む軽鎖可変領域を含むか；又は

(b) 該抗原結合ドメインが、配列番号 5 ~ 1 1 の配列を含む重鎖可変領域を含む、
C A R。

【請求項 2】

前記抗原結合ドメインが、配列番号 1 3 ~ 1 9 の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。

【請求項 3】

前記抗原結合ドメインが、配列番号 5 ~ 1 1 の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】

前記抗原結合ドメインが配列番号 1 2 のリンカー配列を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の C A R。

【請求項 5】

前記抗原結合ドメインが配列番号 5 ~ 1 9 を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の C A R。

【請求項 6】

前記膜貫通ドメインが C D 8 アミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の C A R。

【請求項 7】

前記膜貫通ドメインが、配列番号 2 5 の C D 8 ヒンジ配列及び配列番号 2 6 の膜貫通ドメイン配列を含む、C D 8 アミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の C A R。

【請求項 8】

前記細胞内 T 細胞シグナル伝達ドメインが、4 - 1 B B、C D 3 ゼータ又はその両方を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の C A R。

【請求項 9】

前記細胞内 T 細胞シグナル伝達ドメインが、配列番号 2 7 の 4 - 1 B B のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の C A R。

【請求項 10】

前記細胞内 T 細胞シグナル伝達ドメインが、配列番号 2 8 の C D 3 ゼータのアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の C A R。

【請求項 11】

前記 C A R が、配列番号 2 1 ~ 2 4 を含むスペーサーを更に含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の C A R。

【請求項 12】

前記 C A R が、配列番号 1、2、2 9 又は 3 0 の配列のいずれか 1 つを含む、請求項 1 に記載の C A R。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の 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 14】

前記ヌクレオチド配列のコドンが最適化されている、請求項 1 3 に記載の核酸。

【請求項 15】

請求項 1 3 又は 1 4 に記載の核酸を含む、組換え発現ベクター。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

前記組換え発現ベクターがレンチウイルスベクターである、請求項 15 に記載の組換え発現ベクター。

【請求項 17】

請求項 15 又は 16 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 18】

請求項 17 に記載の少なくとも 1 つの宿主細胞を含む、細胞集団。

【請求項 19】

請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の CAR に特異的に結合する、抗体又はその抗原結合部分。

【請求項 20】

請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の CAR、請求項 13 若しくは 14 に記載の核酸、請求項 15 若しくは 16 に記載の組換え発現ベクター、請求項 17 に記載の宿主細胞、請求項 18 に記載の細胞集団、又は請求項 19 に記載の抗体若しくはその抗原結合部分と、医薬的に許容される担体とを含む、医薬組成物。

【請求項 21】

がんの存在を検出する方法であって、以下：

(a) 1 以上の細胞を含む試料を、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の CAR、請求項 13 若しくは 14 に記載の核酸、請求項 15 若しくは 16 に記載の組換え発現ベクター、請求項 17 に記載の宿主細胞、請求項 18 に記載の細胞集団、請求項 19 に記載の抗体若しくはその抗原結合部分、又は請求項 20 に記載の医薬組成物と接触させ、それにより複合体を形成させること、及び

(b) 該複合体の検出が、がんの存在の指標である、複合体を検出することを含む、方法。

【請求項 22】

前記がんが、プレ B 細胞前駆体急性リンパ芽球性白血病又は急性骨髄性白血病である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

哺乳動物における、がんの治療又は予防において使用するための、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の CAR、請求項 13 若しくは 14 に記載の核酸、請求項 15 若しくは 16 に記載の組換え発現ベクター、請求項 17 に記載の宿主細胞、請求項 18 に記載の細胞集団、請求項 19 に記載の抗体若しくはその抗原結合部分、又は請求項 20 に記載の医薬組成物。

【請求項 24】

前記がんが、プレ B 細胞前駆体急性リンパ芽球性白血病又は急性骨髄性白血病である、請求項 23 に記載の 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。

【請求項 25】

請求項 21 又は 22 に記載の方法、或いは請求項 23 又は 24 の通り使用するための、請求項 23 若しくは 24 に記載の 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、又は医薬組成物であって、該方法が、哺乳動物に由来する生物学的試料において FLT3 の発現レベルを測定すること；及び、生物学的試料の FLT3 の発現レベルが、増殖性疾患を有していない対照の哺乳動物に由来する試料と比較して、増加しているかどうかを決定することを更に含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本特許出願は、2016年5月27日に出願された米国仮特許出願番号第62/342,394号（参照

10

20

30

40

50

によりその全体が本明細書に取り込まれる)についての利益を主張する。

【0002】

連邦によって支援された研究開発に関する陳述

本発明は、プロジェクト番号ZIA BC 011295の下、米国国立衛生研究所、米国国立がん研究所、がん研究センターの所内研究プログラムによる政府の支援を受けてなされた。

【0003】

電子的に提出された資料の参照による取り込み

本明細書と同時に提出され、以下の通り識別される、コンピューターで読み取り可能なヌクレオチド/アミノ酸の配列表は、参照により、その全体が本明細書に取り込まれる：2017年5月19日付け作成の「728591_ST25.txt」という名前の30,162バイトのASCII(テキスト)ファイル1件。

10

【背景技術】

【0004】

発明の背景

標準的な治療が次善的である白血病患者の集団が、なお存在する。例えば、乳児プレB細胞前駆体急性リンパ芽球性白血病(ALL)又は急性骨髄性白血病(AML)を有する患者は、それぞれ40%未満及び60%未満の生存率を有する。

従って、がんの追加的な治療に対する満たされていないニーズが存在する。

【発明の概要】

【0005】

発明の要旨

本発明の実施形態は、FLT3に特異的な抗原結合ドメイン、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を含むキメラ抗原受容体(CAR)を提供する。該CARは、4-1BB細胞内ドメイン、スペーサー、又はその両方を更に含み得る。

本発明の更なる実施形態は、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分、及び本発明のCARに関連する医薬組成物を提供する。

本発明の追加的な実施形態は、哺乳動物において、増殖性疾患、例、がんの存在を検出する方法、及び増殖性疾患、例、がんを治療又は予防する方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0006】

【図1】図1は、FLT3が、急性リンパ芽球性及び急性骨髄性の白血病細胞株上で発現していることを示す棒グラフである。

【図2】図2は、本発明の実施形態によるCARの略図である。

【図3】図3は、本発明の実施形態に従ってFLT3 CAR T細胞の形質導入のフローサイトメトリーグラフを示す。

【図4】図4は、FLT3ターゲティングキメラ抗原受容体を発現しているT細胞が、本発明の実施形態に従って、FLT3発現ALL細胞株と共培養した場合に、高レベルのインターフェロンガンマを分泌することを示す棒グラフである。

【図5】図5は、FLT3ターゲティングキメラ抗原受容体を発現しているT細胞が、本発明の実施形態に従って、FLT3発現ALL細胞株と共培養した場合に、高レベルのインターロイキン-2を分泌することを示す棒グラフである。

40

【図6】図6は、FLT3ターゲティングキメラ抗原受容体を発現しているT細胞が、本発明の実施形態に従って、FLT3発現AML細胞株と共培養した場合に、高レベルのインターフェロンガンマを分泌することを示す棒グラフである。

【図7】図7は、FLT3ターゲティングキメラ抗原受容体を発現しているT細胞が、本発明の実施形態に従って、FLT3発現AML細胞株と共培養した場合に、高レベルのインターロイキン-2を分泌することを示す棒グラフである。

【図8】図8は、FLT3ターゲティングCARを発現しているT細胞が、本発明の実施形態に従って、in vivoにおいて、FLT3発現ALLを低減させることが出来ることを示す画像を表す。

【図9】図9は、本発明の実施形態に従って、FLT3 CAR T細胞のin vivoにおける用量漸増

50

(10×10^6 細胞 (列「10」)、 5×10^6 細胞 (列「5」)又は 1×10^6 細胞 (列「1」))を示す画像を表す。

【図10】図10は、FLT3ターゲティングCARを発現しているT細胞が、本発明の実施形態に従って、*in vivo*においてFLT3を発現しているAMLの進行を遅延させることが出来ることを示す画像を表す。

【図11】図11は、FLT3ターゲティングCARを発現しているT細胞が、本発明の実施形態に従って、*in vivo*においてFLT3を発現しているAMLの進行を遅延させることが出来ることを示す画像を表す。

【発明を実施するための形態】

【0007】

10

発明の詳細な説明

ALLは、小児における一般的な腫瘍診断を代表する。殆んど全ての患者が治癒するように、小児ALLに対する最新の化学療法は実質的に進歩している。それにもかかわらず、ALLは、細胞毒性がある化学療法にもはや反応しない疾患の再発のために、又は最新の治療に対する治療抵抗性のために、小児における、がんによる死亡の一般的な原因のままである。更に、長期間の治療に誘発される死亡は、特に再発のリスクが高いと思われる患者においては、主要な問題点のままであり、従ってリスクに適合した現在のプロトコールの下、より強いレジメンを用いて治療される。成人においては、ALLは小児におけるよりも一般的でないが、成人ALLの予後は、標準的な細胞毒性のある化学療法を行った小児よりも悪い。小児型のレジメンにおける若い成人の治療によって転帰は改善するが、小児において達成されるレベルまで改善しない。

20

【0008】

リンパ系細胞上で発現した抗原をターゲティングするキメラ抗原受容体 (CAR)を発現するよう遺伝的に改変された、T細胞の養子細胞移植 (ADT又はACT)は、ALLを含むB細胞悪性腫瘍における強力な活性を示し、化学療法に抵抗性の患者における寛解をもたらしている。これらの試験の大多数において標的とされている表面タンパク質は、悪性及び非悪性B細胞の両方で発現しているCD19抗原である。しかしながら、幾つかの症例においてはCD19の発現が消失したために、全ての患者が寛解するわけではなく、再発が起こっている。CD19の消失はまた、CD19及びCD3を標的とする二重特異性の抗体ベースの剤を用いた治療の後にも観察されている。

30

【0009】

乳児ALL又はAMLを有する患者は、FMS様のチロシンキナーゼ3 (FLT3)を高レベルで発現する。FLT3はまた、Fms関連チロシンキナーゼ3、幹細胞チロシンキナーゼ1、FLサイトカイン受容体、CD135抗原、FLK-2、STK1及び胎児肝臓キナーゼ2としても知られる。FLT3は、AMLにおいて頻繁に変異しており、それによって経路の活性化が起こり、疾患の主要な原因となると考えられている。従って、FLT3の下方調節は、起こりそうにないエスケープ機構となる。更に、変異は受容体の細胞内ドメインにおいて見られ、そのため、FLT3 CARを発現している免疫細胞は、野生型及び変異型のFLT3の両方を標的とすることができ、それによって乳児ALL及びAMLの両方の幅広いターゲティングが可能となり、FLT3を過剰発現しているあらゆる白血病を標的とし得る。

40

【0010】

本発明の一実施形態は、FLT3に特異的な抗原結合ドメイン、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を含むキメラ抗原受容体 (CAR)を提供する。該CARは、4-1BB細胞内ドメイン、スペーサー又はその両方を更に含み得る。

【0011】

キメラ抗原受容体 (CAR)は、T細胞シグナル伝達ドメインに連結した、抗体の抗原結合ドメインを含む、人工的に構築したハイブリッドタンパク質又はポリペプチド (例、一本鎖可変フラグメント (scFv))である。CARの特徴としては、モノクローナル抗体の抗原結合特性を利用して、MHC非拘束性の様式で選択された標的に対する、T細胞の特異性及び反応性を向けなおす能力が挙げられる。MHC非拘束性の抗原認識によって、CARを発現してい

50

るT細胞に、抗原プロセッシングに依存せずに抗原を認識する能力が付与され、従って、腫瘍の主要なエスケープ機構をバイパスする。更に、T細胞において発現する場合、CARは好都合にも、内在的なT細胞受容体 (TCR) のアルファ鎖及びベータ鎖と二量体化しない。

【0012】

本明細書で使用される場合、表現「抗原特異性を有する」及び「抗原特異的な応答を誘発する」は、抗原に対するCARの結合が免疫応答を誘発するように、CARが抗原に特異的に結合できること及び抗原を免疫学的に認識できることを意味する。

【0013】

特定の理論又は機構に拘束されることはないが、FLT3に対する抗原特異的な応答を誘発することによって、本発明のCARは、以下：FLT3発現がん細胞をターゲティング及び破壊すること、がん細胞を低減又は排除すること、腫瘍の部位（複数可）への免疫細胞の浸潤を促進すること、並びに抗がん応答を促進/拡張することの1以上を提供すると考えられる。

10

【0014】

本発明の一実施形態は、抗体、例、NC7に基づく、FLT3に特異的な抗原結合ドメインを含むCARを提供する。NC7は、参照によりその全体が本明細書に取り込まれる、米国特許番号第8,071,099号に記載されている。scFvは、軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含む。本発明の実施形態においては、軽鎖及び重鎖は、例、以下の表1に列記した、軽鎖及び重鎖の配列の任意の好適な組合せを含み得る。

【0015】

一実施形態においては、CARは、多重特異的な抗原結合ドメインを有していても良い。例えば、CARは、FLT3及び少なくとも1つの他の標的、例、例えばALLについてのCD19若しくはCD22、又はAMLについてのCD33若しくはCD123等の白血病標的に特異的であっても良い。

20

【0016】

一実施形態においては、抗原結合ドメインはリンカーを含む。リンカーは、抗原結合ドメインの重鎖可変領域と軽鎖可変領域とを連結する。重鎖可変領域と軽鎖可変領域とを連結するために好適な任意のリンカーを、本発明の抗原結合ドメインにおいて使用しても良い。一実施形態においては、リンカーは、グリシン-セリンリンカードメインを含むか、それからなるか、又は本質的にそれからなる。好ましくは、抗原結合ドメインは、重鎖可変領域、軽鎖可変領域及びリンカーを含む、scFvを含む。本発明の実施形態においては、軽鎖、重鎖及びリンカーは、以下の表1に列記した軽鎖、重鎖及びリンカーの配列の任意の好適な組合せを含んでも良い。

30

【0017】

本発明の一実施形態においては、CARは、以下：

```

MLLVTSLLLCELPHPAFLIPEVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTAN
YAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCATFALFGFREQAFDIWGQGTTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGSDI
QMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSSSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED
LATYYCQQSYSTPFTFGPGTKVDIKSGTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLA
GTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNLQYN
ELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYD
ALHMQUALPPR (配列番号1)

```

40

の配列を含むか、それからなるか、又は本質的にそれからなる。

【0018】

本発明の別の実施形態においては、CARは、以下：

```

MLLVTSLLLCELPHPAFLIPEVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTAN
YAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCATFALFGFREQAFDIWGQGTTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGSDI
QMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSSSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED
LATYYCQQSYSTPFTFGPGTKVDIKSGLEDAEPKSPDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQP

```

50

REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
SCSMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDKPKTTTTAPRPPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPL
AGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNL
NELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRKGKGDGLYQGLSTATKDTY
DALHMQALPPR (配列番号2)

の配列を含むか、それからなるか、又は本質的にそれからなる。

【0019】

一実施形態においては、抗原結合ドメインは、リーダー/シグナル配列を含む。リーダー配列は、重鎖可変領域のアミノ末端に位置しても良い。リーダー配列は、任意の好適なリーダー配列を含んでも良い。本発明の実施形態においては、リーダー/シグナル配列は、以下の表1に列記した配列を含んでも良い。成熟した形態のT細胞においては、リーダー配列が存在しない場合がある。

10

【0020】

本発明の一実施形態においては、CARは膜貫通ドメインを含む。本発明の一実施形態においては、膜貫通ドメインはCD8を含む。CD8は、CD8 (CD8アルファ)ヒンジ及び膜貫通ドメインを含み得る。好ましい実施形態においては、CD8はヒトのである。CD8は、完全に満たないCD8を含んでも良い。本発明の実施形態においては、CD8は、以下の表1に列記した配列を含んでも良い。

【0021】

本発明の一実施形態においては、CARは、4-1BB (CD137)、CD3ゼータ ()、又はその両方を含む、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は、CD3ゼータ、4-1BB、又はその両方は、ヒトのである。4-1BBは、強力な共刺激シグナルをT細胞に伝達し、それによってTリンパ球の分化を促進し、長期間の生存を促進する。CD3は、TCRと会合してシグナルを生成し、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ (ITAM)を含む。一実施形態においては、CARは、4-1BBドメインを欠いている。別の実施形態においては、CARは、CD28ドメインを含む。CD28は、T細胞の共刺激において重要なT細胞マーカーである。4-1BB、CD28、CD3ゼータ、又はこれらのいずれかは、それぞれ完全に満たない4-1BB又はCD3ゼータを含んでも良い。本発明の実施形態においては、4-1BBは、以下の表1に列記した配列を含んでも良い。本発明の実施形態においては、CD3ゼータは、以下の表1に列記した配列を含んでも良い。

20

【0022】

本発明の一実施形態においては、CARはスペーサーを含む。スペーサーは、任意の上述のドメイン間にあっても良い。一実施形態においては、CARは、IgG重鎖定常ドメイン (CH2CH3) スペーサーを含む。更なる実施形態においては、スペーサーは、scFvと膜貫通ドメインとの間にあり得る。好ましい実施形態においては、スペーサー、例、CH2CH3の配列はヒトのである。本発明の実施形態においては、スペーサーは、以下の表1に列記した配列を含んでも良い。

30

本発明の実施形態は、以下の表1において提供された配列を含む。

【0023】

【表1】

配列	配列番号	区分	注釈
M	3		開始メチオニン
LLVTSLLLCCLPAPAFLLIP	4		シグナルペプチド： ヒトGM-CSF由来
EVQLVQSGAEVKKPGSSVKWSCKAS	5	scFv	重鎖：FR1
GGTFSSYAIS	6	scFv	重鎖：CDR1
WVRQAPGGGLEWMG	7	scFv	重鎖：FR2
GIIPIFGTANYAQKFOG	8	scFv	重鎖 CDR2
RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAT	9	scFv	重鎖：FR3
FALFGFREQAFDI	10	scFv	重鎖：J領域 (CDR3)
WGQGTITVTVSS	11	scFv	重鎖：FR4
GGGSGGGSGGGGS	12	scFv	リンカー
DIGMTQSFSSLSASVGRVITITC	13	scFv	軽鎖：FR1
RASQSISSYLN	14	scFv	軽鎖：CDR1
WYQQKPGKAPKLLIY	15	scFv	軽鎖：FR2
AASSLQS	16	scFv	軽鎖：CDR2
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDLATYYC	17	scFv	軽鎖：FR3
QQSYSTPFT	18	scFv	軽鎖：J領域 (CDR3)
FGPGTKVDIK	19	scFv	軽鎖：FR4
SG	20		ベクター設計のために 付加したアミノ酸
LEDP	21	スペーサー	
AEPKSPDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAK	22	スペーサー	CH2
QQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDI AVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFPSCVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK	23	スペーサー	CH3
KDPK	24	スペーサー	
TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACD	25	CD8	CD8 α ヒンジ
IYIWAFLAGTCGWL LLSLVITLYC	26	CD8	CD8 α 膜貫通ドメイン
KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEEDGCSCRFP EEEEGGCEL	27	4-1BB	細胞内ドメイン
RVKFSRSADAPAYKQGNQLYNELNLRREEYD VLDKRRGRDPENGGKPRKPNPQEGLYNELQKDK MAEA YSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSATAKD TYDALHMQUALPPR	28	CD3 ζ	細胞内ドメイン

10

20

30

40

【0024】

本発明の実施形態は、上記の表1に示された配列を含む、表2中の以下の配列を含む。

【0025】

【表 2】

名称	短い形態	長い形態
配列番号	1	2
表 1 の配列番号を 含む	3	3
	4	4
	5	5
	6	6
	7	7
	8	8
	9	9
	10	10
	11	11
	12	12
	13	13
	14	14
	15	15
	16	16
	17	17
	18	18
	19	19
	20	20
		21
		22
		23
		24
	25	25
	26	26
	27	27
	28	28

10

20

30

【 0 0 2 6 】

本発明の実施形態は、上記の表1に示された配列を含む、表3中の以下の配列を含み、
ここではシグナルペプチドは存在しない。

40

【 0 0 2 7 】

【表 3】

名称	短い形態	長い形態
配列番号	29	30
表 1 の配列番号を 含む	5	5
	6	6
	7	7
	8	8
	9	9
	10	10
	11	11
	12	12
	13	13
	14	14
	15	15
	16	16
	17	17
	18	18
	19	19
	20	20
		21
		22
		23
		24
25	25	
26	26	
27	27	
28	28	

10

20

30

40

50

【 0 0 2 8 】

本発明の範囲には、本明細書に記載された本発明のCARの機能的部分が含まれる。CARに言及する際に用いられる場合、用語「機能的部分」は、部分又はフラグメントが、それが部分であるCAR（親のCAR）の生物学的活性を保持する、本発明のCARの任意の部分又はフラグメントを指す。機能的部分は、例えば、親のCARと類似する程度、同じ程度、又はより高い程度に、標的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。親のCARに関して、機能的部分は、例えば、親CARの約10%、25%、30%、50%、68%、80%、90%、95%以上を含み得る。

【 0 0 2 9 】

機能的部分は、部分のアミノ末端若しくはカルボキシ末端、又はその両方の末端に、追加的なアミノ酸を含み得、その追加的なアミノ酸は親のCARのアミノ酸配列には見られない。望ましくは、追加のアミノ酸は、機能的部分の生物学的機能、例、標的細胞を認識し、がんを検出し、がんを治療又は予防する等、と干渉しない。より望ましくは、追加のアミノ酸は、親のCARの生物学的活性と比較して、その生物学的活性を増強する。

【 0 0 3 0 】

本発明の範囲には、本明細書に記載された本発明のCARの機能的変異体が含まれる。本明細書において用いられる場合、用語「機能的変異体」は、機能的変異体が、CAR（該機能的変異体はその変異体である）の生物学的活性を保持する、親のCARと実質的又は有意な配列同一性若しくは類似性を有する、CAR、ポリペプチド、又はタンパク質を指す。機能的変異体は、例えば、親のCARと類似する程度、同じ程度、又はより高い程度に標的細胞を認識する能力を保持する、本明細書に記載されたCAR（親のCAR）の変異体を包含する。親のCARに関して、機能的変異体は、例えば、親CARに対し、アミノ酸配列で、少なくとも約30%、50%、75%、80%、90%、98%以上同一であり得る。

【0031】

機能的変異体は、例えば、少なくとも1の保存的なアミノ酸置換を有する、親のCARのアミノ酸配列を含み得る。代替的に又は追加的に、機能的変異体は、少なくとも1の非保存的なアミノ酸置換を有する、親のCARのアミノ酸配列を含み得る。この場合においては、非保存的なアミノ酸置換が、機能的変異体の生物学的活性と干渉しないか、又はそれを阻害しないことが好ましい。非保存的なアミノ酸置換は、該機能的変異体の生物学的活性が、親のCARと比べて増強するよう、機能的変異体の生物学的活性を促進し得る。

【0032】

本発明のCARのアミノ酸置換は、好ましくは保存的なアミノ酸置換である。保存的なアミノ酸置換は、当該技術分野において公知であり、ある物理的及び/又は化学的性質を有する1つのアミノ酸が、同じ又は類似の化学的又は物理的性質を有する別のアミノ酸と交換されるアミノ酸置換が挙げられる。例えば、保存的なアミノ酸置換は、酸性/負電荷の極性アミノ酸を別の酸性/負電荷の極性アミノ酸（例、Asp又はGlu）に置換、非極性側鎖を有するアミノ酸を別の非極性側鎖を有するアミノ酸（例、Ala、Gly、Val、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Trp、Cys、Val等）に置換、塩基性/正電荷の極性アミノ酸を別の塩基性/正電荷の極性アミノ酸（例、Lys、His、Arg等）に置換、極性側鎖を有する電荷を持たないアミノ酸を別の極性側鎖を有する電荷を持たないアミノ酸（例、Asn、Gln、Ser、Thr、Tyr等）に置換、分枝側鎖を有するアミノ酸を別の分枝側鎖を有するアミノ酸（例、Ile、Thr及びVal）に置換、芳香族側鎖を有するアミノ酸を別の芳香族側鎖を有するアミノ酸（例、His、Phe、Trp及びTyr）に置換等であり得る。

【0033】

また、アミノ酸は、ベクターの設計に基づいて、配列に付加されるか、又はそれから除去されても良い。例えば、ベクターの設計のために付加されたアミノ酸（配列番号20）は、本明細書に記載された通り、例、表2、表3、又はその両方におけるCAR配列から除去され、CARから除去されても良い。

【0034】

CARは、他の構成要素、例、他のアミノ酸が、機能的変異体の生物学的活性を実質的に変更しないように、本明細書に記載された特定のアミノ酸配列又は配列から本質的になり得る。

【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）は任意の長さであり得、即ち、CAR（又はそれらの機能的部分若しくは機能的変異体）が、例、抗原に特異的に結合する能力、哺乳動物内で疾患細胞を検出する能力、又は哺乳動物において疾患を治療若しくは予防する能力、等、生物学的活性を保持するという条件で、任意の数のアミノ酸を含み得る。例えば、CARは、約50～約5000アミノ酸長であり、例えば50、70、75、100、125、150、175、200、300、400、500、600、700、800、900、1000以上のアミノ酸長であり得る。

【0036】

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以上の天然で生じたアミノ酸の代わりに、合成アミノ酸を含み得る。そのような合成アミノ酸は当該技術分野において公知であり、例えばアミノシクロヘキサンカルボン酸、ノルロイシン、 α -アミノ-n-デカン酸、ホモセリン、S-アセチルアミノメチル-システイン、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、 α -フェニルセリン、 β -ヒドロキシフェニルアラニン、フェニルグリシン、 β -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、 α -アミノシクロペンタンカルボン酸、 β -アミノシクロヘキサンカルボン酸、 α -アミノシクロヘプタンカルボン酸、 β -(2-アミノ-2-ノルボルナン)-カルボン酸、 β -ジアミノ酪酸、 β -ジアミノプロピオン酸、ホモフェニルアラニン、並びに β -tert-ブチルグリシンが挙げられる。

10

【0037】

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た）、又は酸付加塩へ変換及び/又は任意で二量体化若しくは重合化、又はコンジュゲート化（conjugated）し得る。

【0038】

本発明の実施形態のCAR（それらの機能的部分及び機能的変異体を含む）は、当該技術分野において公知である方法によって取得され得る。CARは、ポリペプチド又はタンパク質を作製する任意の好適な方法によって作製され得る。ポリペプチド及びタンパク質をde novo合成する好適な方法は、例えばChanら、Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis、Oxford University Press（Oxford、英国）、2000；Peptide and Protein Drug Analysis、Reid、R.編、Marcel Dekker社、2000；Epitope Mapping、Westwoodら編、Oxford University Press（Oxford、英国）、2001；及び米国特許第5,449,752号等の参考文献中に記載されている。また、ポリペプチド及びタンパク質は、標準的な組換え方法を使用し、本明細書に記載された核酸を使用して組換えによって生成し得る。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を参照のこと。更に、本発明のCAR（それらの機能的部分及び機能的変異体を含む）の幾つかは、例えば、植物、細菌、昆虫、哺乳動物、例、ラット、ヒト等のソースから単離及び/又は精製され得る。単離及び精製の方法は、当該技術分野において周知である。代替的に、本明細書に記載されたCAR（それらの機能的部分及び機能的変異体を含む）は、企業によって商業的に合成され得る。これに関連して、本発明のCARは、合成、組換え、単離及び/又は精製され得る。

20

30

【0039】

本発明の一実施形態は、本発明のCARのエピトープに特異的に結合する抗体又はその抗原結合部分を更に提供する。抗体は、当該技術分野において公知である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、IgA、IgD、IgE、IgG、IgM等のものであり得る。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、天然で生じた抗体、例、哺乳動物、例、マウス、ウサギ、ヤギ、ウマ、ニワトリ、ハムスター、ヒト等から単離及び/又は精製された抗体であり得る。代替的に、抗体は遺伝的に改変された抗体、例、ヒト化抗体又はキメラ抗体であり得る。抗体は、単量体又は多量体の形態であり得る。また、抗体は、本発明のCARの機能的部分に対して任意のレベルのアフィニティー又はアビディティーを有し得る。

40

【0040】

抗体が本発明のCARの任意の機能的部分に結合する能力をテストする方法は当該技術分野において公知であり、例えば、例、ラジオイムノアッセイ（RIA）、ELISA、ウェスタンブロット、免疫沈降及び競合阻害アッセイ等の、任意の抗体-抗原結合アッセイが挙げられる（例、Janewayら（以下）、米国特許出願公開第2002/0197266 A1号、及び米国特許番号7,338,929号を参照）。

【0041】

50

抗体を作製する好適な方法は当該技術分野において公知である。例えば、標準的なハイブリドーマ法は、例、Kohler and Milstein、Eur. J. Immunol., 5, 511-519 (1976)、Harlow and Lane (編) Antibodies : A Laboratory Manual, CSH Press (1988)、及びC.A. Janewayら (編) Immunobiology (第5版) Garland Publishing (New York, NY) (2001))に記載されている。代替的には、例えばEBVハイブリドーマ法 (Haskard and Archer、J. Immunol. Methods, 74(2), 361-67 (1984)、及びRoderら、Methods Enzymol., 121, 140-67 (1986))、並びにバクテリオファージベクター発現システム (例、Huseら、Science、246、1275-81 (1989)を参照)等の他の方法が当該技術分野において公知である。更に、非ヒト動物において抗体を生成する方法は、例、米国特許第5,545,806号、第5,569,825号及び第5,714,352号、米国特許出願公開番号第2002/0197266 A1号、並びに米国特許番号第7,338,929号に記載されている。

10

【0042】

更に、ファージディスプレイが、抗体を生成するために用いられ得る。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リーは、標準的な分子生物学及び組換えDNA技術 (例、Sambrookら(上記)、及びAusubelら(上記)を参照)を使って生成され得る。所望の特異性を伴う可変領域をコードするファージは、所望の抗原への特異的結合に関して選択され、完全又は部分的抗体は、選択された可変ドメインを含むように再構成される。再構成された抗体をコードする核酸配列は、ハイブリドーマ産生に用いられる骨髓腫細胞等、好適な細胞株へと導入され、その結果、モノクローナル抗体の特性を有する抗体が細胞によって分泌される (例、Janewayら(上記)、Huseら(上記)、及び米国特許第6,265,150号を参照)。

20

【0043】

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って生成され得る。そのような方法は、当該技術分野において公知であり、例えば、米国特許第5,545,806号及び第5,569,825号、並びにJanewayら(上記)において記載されている。

【0044】

ヒト化抗体を生成するための方法は、当該技術分野において周知であり、例えば、Janewayら(上記)、米国特許第5,225,539号、第5,585,089号及び第5,693,761号、欧州特許番号第0239400 B1号、並びに英国特許番号第2188638号において、詳細が記載されている。ヒト化抗体はまた、米国特許第5,639,641号、及びPedersenら、J. Mol. Biol., 235, 959-973 (1994)において記載された抗体リサーフェイシング(resurfacing)技術を使用して、生成され得る。

30

【0045】

本発明の一実施形態はまた、本明細書に記載される抗体のいずれかの抗原結合部分も提供する。抗原結合部分は、Fab、F(ab')₂、dsFv、sFv、ダイアボディ(diabodies)及びトリアボディ(triabodies)等、少なくとも1つの抗原結合部位を有する任意の部分であり得る。

【0046】

一本鎖の可変領域フラグメント(抗体フラグメント)は、慣用的な組換えDNAテクノロジー技術を用いて生成され得る(例、Janewayら(上記)参照)。同様に、ジスルフィド安定化可変領域フラグメントは、組換えDNA技術によって調製され得る(例、Reiterら、Protein Engineering, 7, 697-704 (1994)を参照)。しかしながら、本発明の抗体フラグメントは、これらの例示的な抗体フラグメントのタイプに限定されない。

40

【0047】

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、蛍光色素分子(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ダーゼ)、及び元素粒子(例、金粒子)等)を含むように修飾され得る。

【0048】

50

本発明の一実施形態によって、本明細書に記載されたCAR（それら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が更に提供される。本発明の核酸は、本明細書に記載されたリーダー配列、抗原結合ドメイン、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み得る。

【0049】

幾つかの実施形態においては、ヌクレオチド配列はコドンが最適化されている場合がある。特定の理論に拘束されることはないが、ヌクレオチド配列のコドンの最適化は、mRNA転写産物の翻訳効率を上昇させると考えられる。ヌクレオチド配列のコドンの最適化は、ネイティブのコドンを、同じアミノ酸をコードするが、細胞内でより容易に利用可能であるtRNAによって翻訳され得る別のコドンに置換することを含み得、従って、翻訳効率を上昇する。ヌクレオチド配列の最適化はまた、翻訳と干渉するmRNAの二次構造を低減し得、従って、翻訳効率を上昇する。

10

【0050】

本発明の一実施形態においては、核酸は、本発明のCARの抗原結合ドメインをコードする、コドンが最適化されたヌクレオチド配列を含み得る。本発明の別の実施形態においては、核酸は、明細書に記載されたCAR（それら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、コドンが最適化されたヌクレオチド配列を含み得る。

【0051】

本明細書において用いられる場合、「核酸」としては「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」及び「核酸分子」が挙げられ、一般的にDNA又はRNAのポリマーを意味し、一本鎖又は二本鎖であり得、合成され又は天然のソースから取得され（例、単離及び/又は精製され）得、天然、非天然又は改変ヌクレオチドを含み得、並びに天然の結合、非天然の結合又は未修飾オリゴヌクレオチドのヌクレオチド間で見いだされるホスホジエステル結合の代わりに、例えば、ホスホロアミダイト結合若しくはホスホロチオエート結合等の改変されたヌクレオチド間結合を含み得る。幾つかの実施形態においては、核酸は挿入、欠失、逆位及び/又は置換を何ら含まない。しかしながら、本明細書において検討されるように、幾つかの例においては、核酸が1以上の挿入、欠失、逆位及び/又は置換を含むことが好適であり得る。

20

【0052】

本発明の一実施形態の核酸は、組換え体であり得る。本明細書において用いられる場合、用語「組換え体」は、(i)生細胞内で複製され得る核酸分子に、天然又は合成の核酸セグメントを生細胞外で連結することによって構築される分子、又は(ii)上記(i)に記載されるものの複製によって生じる分子、を指す。本明細書の目的のためには、複製はin vitro複製又はin vivo複製であり得る。

30

【0053】

組換え核酸は、天然で生じない配列を有するか、又は組換えでなければ2つの配列が分離したセグメントの人工的な組合せによって作製される配列を有するものであり得る。この人工的な組合せは、化学的な合成によってか、又はより一般的には、例えば、例、Sambrookら(上記)に記載されたもの等の遺伝子工学技術による、核酸の単離されたセグメントの人工的な操作によって、しばしば達成される。核酸は、当技術分野で公知の手順を用いて、化学合成及び/又は酵素的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、天然で生じたヌクレオチド、又は分子の生物学的安定性を増加するよう、若しくはハイブリダイゼーション時に形成される二本鎖の物理的安定性を高めるように設計された様々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）を用い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、5-フルオロウラシル(5-fluorouracil)、5-ブロモウラシル(5-bromouracil)、5-クロロウラシル(5-chlorouracil)、5-ヨードウラシル(5-iodouracil)、ヒポキサンチン(hypoxanthine)、キサンチン(xanthine)、4-アセチルシトシン(4-acetylcytosine)、5-

40

50

カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル(5-(carboxyhydroxymethyl)uracil)、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン(5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouridine)、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル(5-carboxymethylaminomethyluracil)、ジヒドロウラシル(dihydrouracil)、β-D-ガラクトシルキューオシン(beta-D-galactosylqueosine)、イノシン(inosine)、N⁶-イソペンテニルアデニン(N⁶-isopentenyladenine)、1-メチルグアニン(1-methylguanidine)、1-メチルイノシン(1-methylinosine)、2,2-ジメチルグアニン(2,2-dimethylguanidine)、2-メチルアデニン(2-methyladenine)、2-メチルグアニン(2-methylguanidine)、3-メチルシトシン(3-methylcytosine)、5-メチルシトシン(5-methylcytosine)、N⁶-置換アデニン(N⁶-substituted adenine)、7-メチルグアニン(7-methylguanidine)、5-メチルアミノメチルウラシル(5-methylaminomethyluracil)、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル(5-methoxyaminomethyl-2-thiouracil)、β-D-マンノシルキューオシン(beta-D-mannosylqueosine)、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル(5'-methoxycarboxymethyluracil)、5-メトキシウラシル(5-methoxyuracil)、2-メチルチオ-N⁶-イソペンテニルアデニン(2-methylthio-N⁶-isopentenyladenine)、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)(uracil-5-oxyacetic acid (v))、ワイブトキソシン(wybutoxosine)、シュードウラシル(pseudouracil)、キューオシン(queosine)、2-チオシトシン(2-thiocytosine)、5-メチル-2-チオウラシル(5-methyl-2-thiouracil)、2-チオウラシル(2-thiouracil)、4-チオウラシル(4-thiouracil)、5-メチルウラシル(5-methyluracil)、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル(uracil-5-oxyacetic acid methylester)、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル(3-(3-amino-3-N-2-carboxypropyl)uracil)及び2,6-ジアミノプリン(2,6-diaminopurine)が挙げられるが、それらに限定されない。代替的に、1以上の本発明の核酸は、例えば、Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, 米国)等の企業から購入され得る。

【0054】

核酸は、CAR又はそれらの機能的部分若しくは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。代替的に、ヌクレオチド配列は、該配列のいずれかに縮退した(is degenerate to)ヌクレオチド配列、又は縮退配列の組合せを含み得る。

【0055】

本発明の一実施形態はまた、本明細書に記載された核酸のいずれかのヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列、又は本明細書に記載された核酸のいずれかのヌクレオチド配列にストリンジェント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を提供する。

【0056】

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な条件下でハイブリダイズし得る。「高ストリンジェンシーな条件」とは、ヌクレオチド配列が、非特異的なハイブリダイゼーションよりも強く検出できる量で、標的配列(本明細書に記載の核酸のいずれか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な条件には、ヌクレオチド配列と一致するほんの僅かな小さな領域(例えば、3~10塩基)を偶然有するランダム配列から、正確に相補的な配列を有するポリヌクレオチド又は散在する僅かなミスマッチを含むに過ぎないポリヌクレオチドを区別する条件が含まれる。そのような相補性の小領域は、14~17塩基又はそれ以上の完全長の相補体よりも容易に融解し、高ストリンジェンシーなハイブリダイゼーションによりそれらが容易に区別され得る。比較的、高ストリンジェンシーな条件には、例えば、例、約50~70の温度での、約0.02~0.1MのNaCl又はそれと同等なものによって提供される等の、低塩条件及び/又は高温条件が含まれる。そのような高ストリンジェンシーな条件は、ヌクレオチド配列と鑄型又は標的鎖との間のミスマッチがあれば、殆んど許容せず、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。ホルムアミド添加量を増加することにより、条件をよりストリンジェントにし得ることは一般的に理解されている。

【0057】

本発明はまた、本明細書に記載された核酸のいずれかに対して、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%同一であるヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。

【0058】

一実施形態においては、本発明の核酸は、組換え発現ベクターに組み込むことができる。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。本明細書の目的のためには、用語「組換え発現ベクター」は、コンストラクトが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、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ために十分な条件下でベクターを細胞と接触させるとき、宿主細胞によって、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、遺伝的に改変されたオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドのコンストラクトを意味する。本発明のベクターは全体として天然で生じるものではない。しかしながら、ベクターの部分は天然に生じ得る。本発明の組換え発現ベクターは、一本鎖又は二本鎖であり得、合成され又は天然のソースから部分的に取得され得、天然、非天然又は改変されたヌクレオチドを含み得る、DNA及びRNAを含むが、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。該組換え発現ベクターは、天然で生じるヌクレオチド間結合、天然で生じないヌクレオチド間結合、又はその両方の型の結合を含み得る。好ましくは、非天然で生じた又は改変された、ヌクレオチド又はヌクレオチド間結合は、ベクターの転写又は複製を妨害しない。

【0059】

一実施形態においては、本発明の組換え発現ベクターは、任意の好適な組換え発現ベクターであり得、任意の好適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用い得る。好適なベクターとしては、例えばプラスミド及びウイルス等の増殖及び増幅 (expansion) のため若しくは発現のため、又はその両方のために設計されたものが挙げられる。該ベクターは、pUCシリーズ (Fermentas Life Sciences, Glen Burine, MD)、pBluescriptシリーズ (Stratagene, LaJolla, CA)、pETシリーズ (Novagen, Madison, WI)、pGEXシリーズ (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) 及びpEXシリーズ (Clontech, Palo Alto, CA) からなる群から選択され得る。バクテリオファージベクター、例えば、GT10、GT11、ZapII (Stratagene)、EMBL4及びNM1149等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、レトロウイルスベクター又はレンチウイルスベクターであり得る。

【0060】

多くのトランスフェクション技術は、一般的に当該技術分野において公知である (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方法としては、リン酸カルシウム共沈殿 (例、Grahamら (上記)を参照)、培養細胞への直接のマイクロインジェクション (例、Capecchi、Cell、22:479-488 (1980)を参照)、電気穿孔法 (例、Shigekawaら、BioTechniques、6:742-751 (1988)を参照)、リポソーム媒介遺伝子導入 (例、Manninoら、BioTechniques、6:682-690 (1988)を参照)、脂質媒介形質導入 (例、Felgnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、84:7413-7417 (1987)を参照)、及び高速マイクロプロジェクトイル (microprojectile) を使用した核酸送達 (例、Kleinら、Nature、327:70-73 (1987)を参照) が挙げられる。

【0061】

一実施形態においては、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) に記載されている標準的な組換えDNA技術を用いて調製され得る。環状又は線状である発現ベクターのコンストラクトは、原核又は真核宿主細胞において機能的である複製システムを含むように調製され得る。複製システムは、例えばColE1、2 μ プラス

ミド、 、SV40、ウシパピローマウイルス等に由来し得る。

【0062】

組換え発現ベクターは、適宜、ベクターがDNAベースであるか、又は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（例、細菌、真菌、植物又は動物）の型に特異的な、例えば転写の、並びに翻訳の開始及び終止コドン等の、制御配列を含み得る。組換え発現ベクターは、クローニングを促進するために制限酵素認識部位を含み得る。

【0063】

組換え発現ベクターは、形質転換又はトランスフェクトした宿主細胞の選択を可能にする1以上のマーカー遺伝子を含み得る。マーカー遺伝子としては、殺生物剤耐性、例、抗生物質、重金属等に対する耐性、原栄養性を提供するための栄養要求性宿主における相補性等が挙げられる。本発明の発現ベクターにとって好適なマーカー遺伝子としては、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。

【0064】

組換え発現ベクターは、CAR（それら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、に相補的であるか若しくは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した、ネイティブ又は非ネイティブのプロモーターを含み得る。プロモーターの選択、例、強、弱、誘導性、組織特異性及び発生段階特異性は、当業者の通常の技術の範囲内である。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当業者の通常の技術の範囲内である。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、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、SV40プロモーター、RSV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に見出されるプロモーターであり得る。

【0065】

本発明の組換え発現ベクターは、一過性の発現のため、安定した発現のためのいずれか、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のため又は誘導的発現のために作製され得る。

【0066】

更に、組換え発現ベクターは自殺遺伝子を含むよう作製され得る。本明細書において用いられる場合、用語「自殺遺伝子」は、自殺遺伝子を発現する細胞を死滅させる遺伝子を指す。自殺遺伝子は、遺伝子を発現する細胞に、試薬、例えば、薬剤、に対する感受性を付与し、細胞がその試薬と接触若しくはそれに対して曝露される場合に細胞を死滅させる遺伝子であり得る。自殺遺伝子は、当該技術分野で公知であり（例えば、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)、Humana Press、2004を参照)、例えば、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（cytosine 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ゼが挙げられる。

【0067】

本発明の範囲には、本発明のCAR（それら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、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を合成する方法は、一般的に、当該技術分野において公知である（例えば、Hudecz、F.、Methods Mol. Biol. 298:209-223 (2005)、及びKirinら、Inorg Chem. 44(15):5405-5415 (2005)を参照）。本発明のCARは、例、がん細胞に毒性がある、毒素にコンジュゲート（conjugated）しても良い。

【0068】

本発明の一実施形態は、本明細書に記載された組換え発現ベクターのいずれかを含む宿主細胞をさらに提供する。本明細書において用いられる場合、用語「宿主細胞」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指す。宿主細胞は、真核細胞、例、

10

20

30

40

50

植物、動物、菌類若しくは藻類であり得、又は原核細胞、例、バクテリア又は原生動物であり得る。宿主細胞は、培養細胞又は初代細胞、すなわち生物、例、ヒトから直接単離し得る。宿主細胞は、付着細胞又は懸濁細胞、すなわち懸濁液中で増殖する細胞であり得る。好適な宿主細胞は当該技術分野で公知であり、例、DH5 大腸菌細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞、サルVERO細胞、COS細胞、HEK293細胞等が挙げられる。組換え発現ベクターを増幅又は複製する目的のために、宿主細胞は原核細胞、例、DH5 細胞であり得る。組換えCARを産生する目的のために、宿主細胞は哺乳動物細胞であり得る。宿主細胞はヒト細胞であり得る。宿主細胞は任意の細胞型であり得、任意の型の組織に由来し得、任意の発生段階であり得る一方、宿主細胞は末梢血リンパ球 (PBL) 又は末梢血単核細胞 (PBMC) であり得る。宿主細胞はT細胞であり得る。

10

【0069】

本明細書の目的のために、T細胞は、例えば培養T細胞、例、初代T細胞、又は培養T細胞株由来のT細胞、例、Jurkat、SupT1等、又は哺乳動物から得られたT細胞等の任意のT細胞であり得る。哺乳動物から得られる場合、T細胞は、血液、骨髄、リンパ節、胸腺又は他の組織若しくは体液を含むが、これらに限定されない多数のソース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細胞であり得る。T細胞はヒトから単離されたT細胞であり得る。T細胞は、 $CD4^+ / CD8^+$ 二重陽性T細胞、 $CD4^+$ ヘルパーT細胞、例、 Th_1 及び Th_2 細胞、 $CD8^+$ T細胞 (例、細胞傷害性T細胞)、腫瘍浸潤細胞、記憶T細胞、ナイーブT細胞等を含むが、これらに限定されない、任意の型のT細胞であり得、任意の発生段階のT細胞であり得る。T細胞は $CD8^+$ T細胞又は $CD4^+$ T細胞であり得る。

20

【0070】

一実施形態においては、本明細書に記載された通り、CARは、好適な非T細胞中において使用し得る。そのような細胞は、例、例えば、NK細胞、及び多能性幹細胞から生成されたT細胞様の細胞等の免疫エフェクター機能を有する細胞である。

【0071】

本発明の一実施形態によって、本明細書に記載された少なくとも1の宿主細胞を含む細胞集団がまた提供される。細胞集団は、少なくとも1の他の細胞、例、組換え発現ベクターのいずれも含まない宿主細胞 (例、T細胞)、又はT細胞以外の細胞、例、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、筋肉細胞、脳細胞等に加え、記載された組換え発現ベクターのいずれかを含む宿主細胞を含む、不均一な集団であり得る。代替的に、細胞集団は、集団が組換え発現ベクターを含む宿主細胞を主に含む (例、本質的にそれからなる)、実質的に均質な集団であり得る。集団はまた、集団の全ての細胞が組換え発現ベクターを含むように、集団の全ての細胞が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る、細胞のクローン集団であり得る。本発明の一実施形態においては、細胞集団は、本明細書に記載された組換え発現ベクターを含む宿主細胞を含むクローン集団である。

30

【0072】

CAR (それら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)、並びに抗体 (その抗原結合部分を含む) (これらの全ては、以後、「本発明の抗CAR材料」として集合的に言及される) は、単離及び/又は精製され得る。本明細書において用いられる場合、用語「単離された」は天然環境から取り出されていることを意味する。用語「精製された」又は「単離された」は完全な精製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) 宿主細胞の調製物は、宿主細胞が、体内における自然な環境での細胞よりも高純度なものである。そのような宿主細胞は、例えば、標準的な精製技術によって生成され得る。幾つかの実施形態においては、宿主細胞が、調製物の総細胞含有量の少なくとも約50%、例えば、少なくとも約70%となるように、宿主細胞の調製物が精製される。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%より高いものであり得、又は約100%であり得る。

40

【0073】

50

本発明のCAR材料は、例えば医薬組成物等の組成物に製剤化し得る。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、並びに医薬的に許容される担体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有する本発明の医薬組成物は、1超の本発明のCAR材料、例、CAR及び核酸、又は2以上の異なるCARを含み得る。代替的に、医薬組成物は、例えば、例、アスパラギナーゼ（asparaginase）、ブスルファン（busulfan）、カルボプラチン（carboplatin）、シスプラチン（cisplatin）、ダウノルピシン（daunorubicin）、ドキシソルピシン（doxorubicin）、フルオロウラシル（fluorouracil）、ゲムシタピン（gemcitabine）、ヒドロキシウレア（hydroxyurea）、メトトレキサート（methotrexate）、パクリタキセル（paclitaxel）、リツキシマブ（rituximab）、ビンブラスチン（vinblastine）、ビンクリスチン（vincristine）等の化学療法剤等の、他の医薬的な活性剤又は薬剤との組合せで、本発明のCAR材料を含み得る。好ましい実施形態においては、医薬組成物は、本発明の宿主細胞又はその集団を含む。

10

【0074】

本発明のCAR材料は、塩、例、医薬的に許容される塩の形態で提供され得る。好適な医薬的に許容される酸付加塩としては、例えば塩酸、臭化水素酸、リン酸、メタリン酸、硝酸及び硫酸等の鉱酸、並びに例えば、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、コハク酸及びアリアルスルホン酸、例えば、p-トルエンスルホン酸等の有機酸に由来するものが挙げられる。

20

【0075】

医薬組成物に関して、医薬的に許容される担体は従来から使用されるもののいずれかであり得、例えば溶解性及び活性剤（複数可）との反応性の欠如等の化学物理的考察、並びに投与の経路によってのみ制限される。本明細書に記載された医薬的に許容される担体、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、一般に容易に入手可能である。医薬的に許容される担体は、活性剤（複数可）に対して化学的に不活性なものと及び使用の条件下で有害な副作用又は毒性を有さないものであることが好ましい。

【0076】

担体の選択は、特定の本発明のCAR材料によって、及び本発明のCAR材料を投与するために用いられる特定の方法によって、ある程度決定される。従って、本発明の医薬組成物の様々な好適な製剤がある。防腐剤が使用され得る。好適な防腐剤としては、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得る。2以上の防腐剤の混合物が、任意で使用され得る。防腐剤又はその混合物は、典型的には、組成物全体の約0.0001重量%～約2重量%の量で存在する。

30

【0077】

好適な緩衝剤としては、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、並びに様々な他の酸及び塩が挙げられ得る。2以上の緩衝剤の混合物が、任意で使用され得る。緩衝剤又はその混合物は、典型的には、組成物全体の約0.001重量%～約4重量%の量で存在する。

40

【0078】

医薬製剤中の本発明のCAR材料の濃度は、選択した特定の投与様式に従って、例、約1重量%未満から、通常、約10重量%、又は少なくとも約10重量%で、約20重量%～約50重量%以上までで変動し得、主に液体の量や粘性によって選択され得る。

【0079】

投与可能な（例、非経口的に投与可能な）組成物を調製するための方法は、公知であるか、又は当業者にとって明らかなものであり、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins；第21版（2005年5月1日）においてより詳細に記載されている。

【0080】

50

経口、エアロゾル、非経口（例、皮下、静脈内、動脈内、筋肉内、皮内、腹腔内及びも膜下腔内）並びに局所投与のための以下の製剤は単なる例示的なものであり、決して限定的ではない。本発明のCAR材料を投与するために、1超の経路が使用され得、ある場合においては、特定の経路が、別の経路よりも迅速で、効果的な応答を提供し得る。

【0081】

経口投与に好適な製剤は、(a)例えば水、生理食塩水若しくはオレンジジュース等の希釈剤に溶解した、例えば有効量の本発明のCAR材料等の液体溶液；(b)所定量の有効成分を固体又は顆粒としてそれぞれ含むカプセル、サシェ（sachets）、錠剤、薬用キャンディー及びトローチ；(c)粉末；(d)適切な液体中の懸濁液；並びに(e)好適な乳濁液、を含み得るか、又はそれからなり得る。液体製剤としては、医薬的に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、例えば水及びアルコール類、例、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類等の希釈剤、が挙げられ得る。カプセル形態は、例えば、界面活性剤、滑沢剤、並びに例えばラクトース、スクロース、リン酸カルシウム及びトウモロコシデンプン等の不活性充填剤を含む、通常のハード又はソフトシェルゼラチンタイプのものであり得る。錠剤形態は、ラクトース、スクロース、マンニトール、トウモロコシデンプン、ジャガイモデンプン、アルギン酸、微晶質のセルロース、アカシア、ゼラチン、グアーガム、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、及び他の賦形剤、着色剤、希釈剤、緩衝剤、崩壊剤、湿潤剤、防腐剤、香味剤、並びに他の医薬学的に適合する賦形剤の1以上を含み得る。薬用キャンディー形態は、香味剤（通常はスクロース及びアカシア又はトラガカント）中に本発明のCAR材料を含み得、同様に、当該技術分野で公知の賦形剤を含むことに加えて、例えばゼラチン及びグリセリン、又はスクロース及びアカシア等の不活性基剤、乳濁液及びゲル等の中に本発明のCAR材料を含むトローチ剤を含み得る。

【0082】

非経口投与に好適な製剤としては、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤及び製剤を意図されたレシピエントの血液と等張にする溶質を含み得る、水性及び非水性の等張滅菌注射溶液、並びに懸濁化剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤及び防腐剤を含み得る水性及び非水性の滅菌懸濁液が挙げられる。本発明のCAR材料は、医薬的に許容される、例えば石鹼若しくは洗剤等の界面活性剤、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若しくはカルボキシメチルセルロース等の懸濁化剤、又は乳化剤及び他の医薬的アジュバントの添加あり又はなしで、水、生理食塩水、水性デキストロース及び関連する糖溶液を含む、例えば滅菌液又は混合液等、例えばエタノール、若しくはヘキサデシルアルコール等のアルコール、例えばプロピレングリコール若しくはポリエチレングリコール等のグリコール、ジメチルスルホキシド、グリセロール、例えば2,2-ジメチル-1,3-ジオキソラン-4-メタノール等のケタール、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、又はアセチル化された脂肪酸グリセリド等の医薬担体中の生理学的に許容される希釈剤中で投与され得る。

【0083】

非経口製剤において使用され得る油としては、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、ピーナッツ、大豆、ゴマ、綿実、トウモロコシ、オリーブ、ペトロラタム（petrolatum）及びミネラルが挙げられる。非経口製剤中での使用のために好適な脂肪酸としては、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は、好適な脂肪酸エステルの例である。

【0084】

非経口製剤中での使用のために好適な石鹼としては、脂肪族アルカリ金属塩、アンモニウム塩及びトリエタノールアミン塩が挙げられ、好適な界面活性剤としては、(a)陽イオン性界面活性剤、例えば、例、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等、(b)陰イオン性界面活性剤、例えば、例、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等、(c)非イオン性界面活性剤、例えば、例、脂肪族アミノオキシド、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・コポリマー等、(d)両性界面活性剤、例えば、例、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級アンモニウム塩等、並びに(e)それらの混合物が挙げられる。

【0085】

典型的には、非経口製剤は、例えば溶液中に約0.5重量%～約25重量%の本発明のCAR材料を含む。防腐剤及び緩衝剤が使用され得る。注射部位での炎症を最小限に抑えるか、又は排除するために、そのような組成物は、例えば約12～約17の親水性-親油性バランス (HLB) を有する、1以上の非イオン性界面活性剤を含み得る。そのような製剤における界面活性剤の量は、典型的には、例えば約5重量%～約15重量%の範囲である。好適な界面活性剤としては、例えばソルビタンモノオレート、及びプロピレンオキシド及びプロピレングリコールの縮合によって形成される疎水性塩基との、エチレンオキシドの高分子量付加物等のポリエチレングリコール・ソルビタン脂肪酸エステルが挙げられる。非経口製剤は、単位用量又は複数用量で、例えばアンプル及びバイアル等の密封容器中に存在し得、注射用として使用の直前に、滅菌液体賦形剤、例えば水の添加のみを必要とするフリーズドライ（凍結乾燥された）状態で保管され得る。即時注射溶液及び懸濁液は、以前に記載された種類の滅菌粉末、顆粒及び錠剤から調製され得る。

10

【0086】

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効果的な医薬的な担体の必要条件是当業者に周知である（例、Pharmaceutics and Pharmacy Practice, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, PA, Banker and Chalmers編、238-250頁(1982)、及びASHP Handbook on Injectable Drugs, Toissel（第4版）622-630頁(1986)を参照）。

20

【0087】

経皮薬剤放出に有用であるものを含む、局所製剤は当業者に周知であり、発明の実施形態の文脈において、皮膚への適用のために好適である。本発明のCAR材料単独で、又は他の好適な構成要素と組合せて、吸入により投与されるエアロゾル製剤を作製し得る。これらのエアロゾル製剤は、例えば、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素等の、加圧された許容可能な推進剤中に詰められ得る。それらはまた、例えばネブライザー（nebulizer）又はアトマイザー（atomizer）等の中で、非加圧製剤用医薬品として製剤化され得る。そのようなスプレー製剤はまた、粘膜に噴霧するために使用され得る。

30

【0088】

「有効量の」又は「治療有効量の」は、個体におけるがんを予防又は治療するために十分な用量を指す。治療又は予防用途に有効である量は、例えば、治療されている疾患又は病気のステージや深刻度、患者の年齢、体重及び一般的健康状態、並びに処方医師の判断に依存する。用量のサイズはまた、選択された活性、投与方法、投与のタイミングと頻度、特定の活性の投与に伴って起こり得る有害な任意の副作用の存在、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る。様々な疾患又は病気が、本発明のCAR材料を使用した投与の各々のラウンド又は様々なラウンドにおいて、恐らく複数回の投与を含む延長した治療が必要となる場合があることは、当業者によって理解される。例として、発明を限定することを意図することなく、本発明のCAR材料の用量は、1日につき、治療する対象の体重1kgあたり約0.001～約1000 mg、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。本発明の一実施形態においては、用量は、体重1kg当たり、本発明のCAR材料を発現している約 1×10^4 ～約 1×10^8 細胞であり得る。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100万細胞（1 mgの細胞/用量）であり得る。本発明のCAR材料がウイルス中にパッケージされた核酸である場合、ウイルスの例示的な用量は1 ng/用量であり得る。

40

【0089】

50

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、合理的な時間枠に亘り、対象又は動物における治療的又は予防的応答をもたらすために十分であるべきである。例えば、本発明のCAR材料の用量は、投与した時間から、約2時間以上、例、約12～約24時間以上の期間で、抗原に結合するか、又は疾患を検出、治療若しくは予防するために十分であるべきである。ある実施形態においては、期間は更に長くなる場合がある。用量は、特定の本発明のCAR材料の効能及び動物（例、ヒト）の状態、並びに治療される動物（例、ヒト）の体重によって決定される。

【0090】

本発明の目的のために、例えば、T細胞の様々な用量がそれぞれ与えられた1組の哺乳動物間で、哺乳動物にそのようなT細胞のある特定の用量が投与された場合に、標的細胞が溶解され及び/又はIFN-gが分泌される程度を比較することを含むアッセイが、哺乳動物に投与する開始用量を決定するために使用され得る。ある用量が投与された場合に標的細胞が溶解され及び/又はIFN-gが分泌される程度は、当該技術分野において公知の方法によってアッセイされ得る。

10

【0091】

上記（aforedescribed）の医薬組成物に加え、本発明のCAR材料は、例えばシクロデキストリン包接錯体等の包接錯体、又はリポソームとして製剤化され得る。リポソームは、本発明のCAR材料を特定の組織に向かわせるように働き得る。リポソームはまた、本発明のCAR材料の半減期を増加させるために使用し得る。例えば、Szokaら、Ann. Rev. Biophys. Bioeng.、9、467（1980）、並びに米国特許第4,235,871号、第4,501,728号、第4,837,028号及び第5,019,369号に記載されているように、リポソームを調製するための、多くの方法が利用可能である。

20

【0092】

本発明の実施形態の文脈において有用である送達システムとしては、本発明の組成物の送達が、治療される部位の感作の前に起こり、感作を起こすのに十分な時間であるように、徐放性、遅延放出性及び持続放出性送達系が挙げられ得る。本発明の組成物は、他の治療剤又は治療と共に使用され得る。そのようなシステムによって、本発明の組成物を繰り返し投与することを避けることができ、それにより対象及び医師に対する利便性が上昇し、本発明の実施形態のある組成物にとって特に好適であり得る。

【0093】

多くの種類の放出送達システムが利用でき、当業者に公知である。それらとしては、例えばポリ（ラクチド-グリコリド）、コポリオキサレート、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等のポリマーベースのシステムが挙げられる。ドラッグを含んでいる前述のポリマーのマイクロカプセルは、例えば、米国特許第5,075,109号において記載されている。送達システムとしては、例えばコレステロール等のステロール、コレステロールエステル、並びに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等の脂肪酸又は中性脂肪を含む脂質である非ポリマーシステム；ヒドロゲル放出システム；シラスティック（syllastic）システム；ペプチドベースのシステム；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；部分的に融合したインプラント；等がまた挙げられる。特定の例としては：(a) 活性組成物がマトリクス内部の形態で含まれる浸食システム、例えば米国特許第4,452,775号、第4,667,014号、第4,748,034号及び第5,239,660号に記載されたもの等、並びに(b) 活性のある構成要素がポリマーから調節された速度で浸透する拡散システム、例えば米国特許第3,832,253号及び第3,854,480号に記載されたもの等が挙げられるが、それらに限定されない。加えて、ポンプベースのハードウェアでの送達システムが使用され得、それらの幾つかは注入するために適合している。

30

40

【0094】

当業者は、本発明のCAR材料の治療又は予防効果が改変によって上昇するように、本発明のCAR材料が任意の数の方法で改変され得ることを容易に理解する。例えば、本発明のCAR材料は、結合成分を介して、標的の成分に直接又は間接のいずれかでコンジュゲートし

50

得る。化合物、例、本発明のCAR材料を、標的の成分にコンジュゲートする実務は当該技術分野において公知である。例えば、Wadwaら、J. Drug Targeting 3 : 111 (1995)及び米国特許第5,087,616号を参照のこと。

【0095】

本発明のCAR材料が、投与された身体に放出される様式が、時間及び体内の位置に関して調節されるよう、本発明のCAR材料はデポ (depot) 形態に改変され得る (例えば、米国特許第4,450,150号を参照)。本発明のCAR材料のデポ形態は、例えば、本発明のCAR材料と、例えばポリマー等の多孔質又は非多孔質材料とを含む、注入可能な組成物であり得、本発明のCAR材料は封入されているか、又は材料及び/若しくは非多孔質材料の分解によって拡散する。次いで、デポは体内の所望の位置に注入され、本発明のCAR材料は所定の速度でインプラントから放出される。

10

【0096】

本発明のCAR材料が、1以上の追加的な治療剤と共に投与される場合、1以上の追加的な治療剤が哺乳動物に共投与され得る。「共投与」は、本発明のCAR材料が1以上の追加的な治療剤の効果を促進し得るよう、又はその逆であるように、十分に近い時間で、1以上の追加的な治療剤と本発明のCAR材料とを投与すること意味する。これに関して、本発明のCAR材料が最初に投与され得、1以上の追加的な治療剤が二番目に投与され得るか、又はその逆である。代替的に、本発明のCAR材料と1以上の追加的な治療剤とが、同時に投与され得る。

【0097】

CAR材料と共に共投与され得る例示的な治療剤は、例えばIL-2等のT細胞に活性のあるサイトカインである。IL-2は本発明のCAR材料の治療効果を促進すると考えられる。特定の理論又は機構に拘束されることはないが、本発明のCARを発現している細胞の数のin vivoでの増加 (expansion) 及び/又はエフェクター機能を促進することによって、IL-2は治療を促進すると考えられる。他の例示的なサイトカインとしては、IL-7及びIL-15が挙げられる。本発明の方法の目的のために、宿主細胞又は細胞集団が哺乳動物に投与され、該細胞は、哺乳動物に対して同種異系又は自己である細胞であり得る。

20

【0098】

本発明のCAR材料は、哺乳動物における疾患を治療又は予防する方法において使用され得ると考えられる。特定の理論又は機構に拘束されることはないが、本発明のCARは、細胞によって発現される場合、CARが、該CARが特異的である抗原、例、FLT3を発現している細胞に対する免疫応答を媒介できるように、生物学的活性 (例、抗原 (例、FLT3) 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を治療又は予防する方法であって、哺乳動物におけるがんを治療又は予防するために有効な量で、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。

30

【0099】

本発明の一実施形態は、本発明のCAR材料を投与することに先立って、哺乳動物においてリンパ枯渇させることを更に含む。リンパ枯渇の例としては、非骨髄抑制性リンパ枯渇化学療法、骨髄抑制性リンパ枯渇化学療法、全身放射線照射等が挙げられるが、それらに限定されない。

40

【0100】

本発明の方法の目的のために、宿主細胞又は細胞集団が投与され、該細胞は、哺乳動物に対して同種異系又は自己である細胞であり得る。好ましくは、該細胞は哺乳動物に対して自己である。

【0101】

本明細書で言及される哺乳動物は、任意の哺乳動物であり得る。本明細書において用いられる場合、用語「哺乳動物」は、例えばマウス及びハムスター等のネズミ目の哺乳動物、並びに例えばウサギ等のウサギ目の哺乳動物を含むが、これらに限定されない任意の哺乳動物を含む。

50

乳動物を指す。哺乳動物はネコ科（ネコ）及びイヌ科（イヌ科）を含むネコ目由来であり得る。哺乳動物はウシ科（ウシ）及びイノシシ科（ブタ）を含むウシ目、又はウマ科（ウマ）を含むウマ目由来であり得る。哺乳動物は霊長目、セボイド目若しくはシモイド目（サル）又は類人目（ヒト及び類人猿）であり得る。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

【0102】

本発明の方法に関して、がんは、急性リンパ球性がん、急性骨髄性白血病（AML）、胞巣状横紋筋肉腫、膀胱がん（例、膀胱がん）、骨がん、脳がん（例、髄芽細胞種）、乳がん、肛門、肛門管又は肛門直腸のがん、目のがん、肝内胆管のがん、関節のがん、首、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、慢性骨髄がん、結腸がん、食道がん、子宮頸がん、線維肉腫、胃腸カルチノイド腫瘍、頭部及び頸部のがん（例、頭部と頸部扁平上皮がん）、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、非小細胞性肺がん及び肺腺がん）、リンパ腫、中皮腫、肥満細胞腫、メラノーマ、多発性骨髄腫、鼻咽頭がん、非ホジキンリンパ腫、Bリンパ球性慢性白血病、毛様細胞白血病、急性リンパ球性白血病（ALL）、及びパーキットリンパ腫、卵巣がん、膵臓がん、腹膜、大網及び腸間膜のがん、咽頭がん、前立腺がん、直腸がん、腎臓がん、皮膚がん、小腸がん、軟組織がん、固形腫瘍、滑膜肉腫、胃がん、精巣がん、甲状腺がん、及び子宮がんのいずれかを含む、任意のがんであり得る。好ましくは、がんは、FLT3の発現によって特徴付けられる。

【0103】

本明細書において用いられる場合、用語「治療」及び「予防」、並びにそれに由来する用語は、必ずしも100%又は完全な治療若しくは予防を意味しない。むしろ、当業者が潜在的な利益又は治療効果を有すると認識する、治療又は予防の様々な程度がある。これに関して、本発明の方法は、哺乳動物における、任意の量又は任意のレベルのがんの治療又は予防を提供し得る。更には、本発明の方法によって提供される治療又は予防は、治療又は予防されている、疾患、例、がんの1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。

【0104】

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であって、以下：(a)哺乳動物に由来する1以上の細胞を含む試料と、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、又は医薬組成物とを接触させ、それにより複合体を形成すること、並びに(b)該複合体の検出が哺乳動物におけるがんの存在を示す、複合体を検出すること、を含む方法を提供する。

【0105】

本発明の別の実施形態は、増殖性疾患を有する対象が、FLT3に特異的な抗原結合ドメインを含むキメラ抗原受容体を用いて治療するための候補であるかどうかを決定する方法であって、該方法が、対象に由来する生物学的な試料中においてFLT3の発現レベルを測定すること；及び増殖性疾患を有していない対象（対照）に由来する試料と比較して、生物学的試料のFLT3の発現レベルが増加しているかどうかを決定することを含む、方法を含む。

【0106】

試料は、任意の好適な方法、例、生検又は剖検によって取得し得る。生検は、個体から組織及び/又は細胞を回収することである。そのような回収は、回収された組織及び/又は細胞に対して実験を行うために、個体から組織及び/又は細胞を集収することであり得る。この実験は、個体がある状態又は疾患状態を有するか、及び/又はそれらを患っているかどうかを決定するための実験を含み得る。状態又は疾患は、例、がんであり得る。

【0107】

哺乳動物における増殖性疾患、例、がんの存在を検出する本発明の方法の一実施形態に関して、哺乳動物の細胞を含む試料は、全細胞、その溶解物、又は全細胞の溶解物の画分、例、核若しくは細胞質の画分、全タンパク質の画分、又は核酸の画分を含む試料であり得る。試料が全細胞を含む場合、該細胞は、哺乳動物の任意の細胞、例、血液細胞又は内

10

20

30

40

50

皮細胞を含む、任意の器官又は組織の細胞であり得る。

【0108】

接触は、哺乳動物に関して、*in vitro*又は*in vivo*で行われ得る。好ましくは、接触は*in vitro*である。

【0109】

また、複合体の検出は、当該技術分野において公知である任意の数の方法によって行われ得る。例えば、本明細書に記載された本発明のCAR、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、例、放射性同位元素、フルオロフォア（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、アルカリフォスファターゼ、セイヨウワサビ・ペルオキシダーゼ）及び元素粒子（例、金粒子）等の検出可能な標識を用いて標識され得る。

10

【0110】

標的細胞を認識する能力について、及び抗原特異性について、CARをテストする方法は当該技術分野において公知である。例えば、Clayら、*J. Immunol.*、163：507-513（1999）は、サイトカイン（例、インターフェロン- γ 、顆粒球/単球コロニー刺激因子（GM-CSF）、腫瘍壊死因子 α （TNF- α ）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。更に、CARの機能は、Zhaoら、*J. Immunol.*、174：4415-4423（2005）に記載されている通り、細胞の細胞傷害性を測定することによって評価し得る。

20

【0111】

本発明の別の実施形態は、哺乳動物における増殖性疾患、例、がんを治療又は予防するための、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の使用、及び/又は医薬組成物を提供する。がんは、本明細書に記載された、がんのいずれかであり得る。好ましくは、がんは、プレB細胞前駆体急性リンパ芽球性白血病又は急性骨髄性白血病である。

【0112】

上述のものは、実施形態の単なる例に過ぎないことに留意すべきである。他の例示的な実施形態は、本明細書の記述の全体から明らかである。これらの実施形態の各々が、本明細書で提供された他の実施形態との様々な組合せで使用され得ることもまた、当業者によって理解される。

30

【0113】

以下に、本発明のある態様を挙げる。

- 1．FLT3に特異的な抗原結合ドメイン、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を含む、キメラ抗原受容体（CAR）。
- 2．前記抗原結合ドメインが、配列番号13～19の配列を含む軽鎖可変領域を含む、態様1に記載のCAR。
- 3．前記抗原結合ドメインが、配列番号5～11の配列を含む重鎖可変領域を含む、態様1又は2に記載のCAR。
- 4．前記抗原結合ドメインが配列番号12のリンカー配列を含む、態様1～3のいずれか1つに記載のCAR。
- 5．前記抗原結合ドメインが配列番号5～19を含む、態様1～4のいずれか1つに記載のCAR。
- 6．前記膜貫通ドメインがCD8アミノ酸配列を含む、態様1～5のいずれか1つに記載のCAR。
- 7．前記膜貫通ドメインが、配列番号25のCD8 ヒンジ配列及び配列番号26の膜貫通ドメインの配列を含む、CD8アミノ酸配列を含む、態様1～6のいずれか1つに記載のCAR。
- 8．前記細胞内T細胞シグナル伝達ドメインが4-1BB、CD3ゼータ又はその両方を含む、態様1～7のいずれか1つに記載のCAR。
- 9．前記細胞内T細胞シグナル伝達ドメインが、配列番号27の4-1BBのアミノ酸配列を含む、態様1～8のいずれか1つに記載のCAR。

40

50

10．前記細胞内T細胞シグナル伝達ドメインが、配列番号28のCD3ゼータのアミノ酸配列を含む、態様1～9のいずれか1つに記載のCAR。

11．前記CARが、配列番号21～24を含むスペーサーを更に含む、態様1～10のいずれか1つに記載のCAR。

12．前記CARが、配列番号1、2、29又は30の配列のいずれか1つを含む、態様1に記載のCAR。

13．態様1～12のいずれか1つに記載のCARをコードするヌクレオチド配列を含む、核酸。

14．前記ヌクレオチド配列のコドンが最適化されている、態様13に記載の核酸。

15．態様13又は14に記載の核酸を含む、組換え発現ベクター。

16．前記組換え発現ベクターがレンチウイルスベクターである、態様15に記載の組換え発現ベクター。

17．態様15又は16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。

18．態様17に記載の少なくとも1つの宿主細胞を含む、細胞集団。

19．態様1～12のいずれか1つに記載のCARに特異的に結合する、抗体又はその抗原結合部分。

20．態様1～12のいずれか一つに記載のCAR、態様13若しくは14に記載の核酸、態様15若しくは16に記載の組換え発現ベクター、態様17に記載の宿主細胞、態様18に記載の細胞集団、又は態様19に記載の抗体若しくはその抗原結合部分と、医薬的に許容される担体とを含む、医薬組成物。

21．がんの存在を検出する方法であって、以下：

(a)1以上の細胞を含む試料を、態様1～12のいずれか一つに記載のCAR、態様13若しくは14に記載の核酸、態様15若しくは16に記載の組換え発現ベクター、態様17に記載の宿主細胞、態様18に記載の細胞集団、態様19に記載の抗体若しくはその抗原結合部分、又は態様20に記載の医薬組成物と接触させ、それにより複合体を形成させること、及び

(b)該複合体の検出が、がんの存在の指標である、複合体を検出することを含む、方法。

22．前記がんが、プレB細胞前駆体急性リンパ芽球性白血病又は急性骨髄性白血病である、態様21に記載の方法。

23．哺乳動物におけるがんの治療又は予防において使用するための、態様1～12のいずれか一つに記載のCAR、態様13若しくは14に記載の核酸、態様15若しくは16に記載の組換え発現ベクター、態様17に記載の宿主細胞、態様18に記載の細胞集団、態様19に記載の抗体若しくはその抗原結合部分、又は態様20に記載の医薬組成物。

24．前記がんが、プレB細胞前駆体急性リンパ芽球性白血病又は急性骨髄性白血病である、態様23に記載の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。

25．増殖性疾患を有する対象が、FLT3に特異的な抗原結合ドメインを含むキメラ抗原受容体を用いて治療するための候補であるかどうかを決定する方法であって、該方法が以下：対象に由来する生物学的試料においてFLT3の発現レベルを測定すること；及び生物学的試料のFLT3の発現レベルが、増殖性疾患を有しない対象（対照）に由来する試料と比較して、増加しているかどうかを決定することを含む、方法。

【0114】

以下の実施例は本発明について更に説明するが、もちろん、決して発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。

【実施例】

【0115】

実施例1

本実施例は、FLT3が、急性リンパ芽球性及び急性骨髄性の白血病の細胞株上で発現していることを実証する。

細胞毎のFLT3の受容体数を、BD Quantibriteビーズ（製造業者のプロトコール通り、BD

10

20

30

40

50

Biosciences ; San Jose, CA, 米国)及びフィコエリトリン(PE)で標識した抗ヒトCD135 (FLT3)抗体(eBioscience ; San Diego, CA, 米国 ; クローンBV10A4H2)を使用したフローサイトメトリーによって、様々な急性リンパ芽球性[NALM6 (DSMZ番号ACC 128)、HB11 ; 19 (Horsleyら、Genes Chromosomes Cancer、45:554-564 (2006))、KOPN-8 (DSMZ番号ACC 552)、SEM (DSMZ番号ACC 546)]及び急性骨髄性[MOLM13 (DSMZ番号ACC 554)、MOLM14 (DSMZ番号ACC 577)、MV4;11 (DSMZ番号ACC 102)、THP-1 (DSMZ番号ACC 16)]の白血病細胞株上で定量した。KOPN-8は、乳児ALLを有する患者に由来する細胞株である。DSMZは、ライプニッツ研究所 DSMZドイツ微生物細胞培養コレクション(DSMZ)(Braunschweig、ドイツ)である。

10%の熱非働化ウシ胎児血清(Omega Scientific ; Tarzana, CA, 米国)、100 U/mLのペニシリン、100 mg/mLのストレプトマイシン、及び2 mMのL-グルタミン(Invitrogen)を補充したRPMI 1640(Invitrogen ; Carlsbad, CA, 米国)培地を使用して、全ての細胞株を培養した。標識した試料は、BD LSR Fortessa (BD Biosciences)上でフローサイトメトリーによって分析し、FlowJoソフトウェア(FlowJo LLC, Ashland, OR, 米国)及びGraphPad Prism(GraphPadソフトウェア ; La Jolla, CA, 米国)を使用してデータ解析を行った。図1は結果を示す。

【0116】

実施例2

本実施例は、本発明の実施形態によるCARの生成について実証する。

FLT3 scFvをコードするアミノ酸配列をDNA配列に変換し、コドン最適化し、GeneArtTM遺伝子合成(ThermoFisher Scientific ; Waltham, MA, 米国)を使用して、コザック配列、ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)由来の膜局在化リーダー配列、5'NheI制限酵素部位及び3'BspEI制限酵素部位を伴って合成した。次いで、提供されたGene ArtTMベクターから、FLT3 scFV配列をサブクローニングし、標準的な分子クローニング技術を使用して、NheI及びBspEIクローニング部位を用いて、CD8ヒンジドメイン及び膜貫通ドメイン、4-1BBシグナル伝達ドメイン、並びにCD3ゼータドメインを含む、第三世代レンチウイルスプラスミドpELNS-19BBゼータに移した。図2は、CARの略図を示す(図の左側)。CARは配列番号1/29であった。リーダー配列は、最初はコードされており、細胞表面への輸送を促進する ; それは成熟形態では切除されるようである。

【0117】

レンチウイルス上清の生成 : 293T細胞(ATCC ; Manassas, VA, 米国 ; ATCC番号CRL-3216)を、第三世代レンチウイルスプラスミドを用いて一過的にトランスフェクトし、ウイルス上清を生成した。293T細胞を、ポリ-Dリジンでコートした15 cm組織培養プレート(Corning ; Tewksbury, MA, 米国)中、10%の熱非働化ウシ胎児血清(Omega Scientific)、100 U/mLのペニシリン、100 mg/mLのストレプトマイシン及び2mMのL-グルタミン(Invitrogen)を補充したDMEMにおいて、プレATINGし、16時間接着させた。その次の日、GFP又はFLT3 CARを含むプラスミド、pMDLg/pRRE及びpRSV-Revパッケージング、並びにpMD-Gエンベローププラスミドを、製造業者のプロトコール通りに、Lipofectamine 3000(Invitrogen)を使用して、293T細胞に脂質トランスフェクションした。トランスフェクション混合液を添加後、4~6時間で、トランスフェクション混合液を含む培地を捨て、新鮮な培地に置き換えた。トランスフェクション後、24、48及び72時間で、ウイルス上清を回収し、細胞を除去するために、1200 rpmで6分間、遠心分離し、使用するまで-80 で保存した。

【0118】

T細胞のソース : 健全なドナーに由来する浄化したヒトリンパ球を、実験用のT細胞のソースとして使用し、ヘルシンキ宣言によるインフォームドコンセントの後、NIH IRBが承認したプロトコールの下、NIH臨床センターの輸血医学科から取得した。製造業者のプロトコール通りに、リンパ球分離培地(Lonza ; Basel, スイス)を使用して、ドナーのリンパ球から赤血球細胞を取り除き、10%ジメチルスルホキシド(DMSO ; Sigma Aldrich ; St Louis, MO, 米国)を含む、熱非働化ウシ胎児血清(FBS ; Omega Scientific)中で凍結保存し、液体窒素中で保管した。

10

20

30

40

50

【 0 1 1 9 】

T細胞形質導入：浄化したリンパ球を解凍し、5%の熱非働化FBS (Omega Scientific)、100U/mLのペニシリン、100mg/mLのストレプトマイシン、15 mMのHEPES、及び2 mMのL-グルタミン (Invitrogen)、並びに40 IU/mlのIL-2を補充したAIM-V培地 (Invitrogen) からなる、T細胞増殖培地 (TCEM) 中で、3:1のビーズ：細胞比でDynabeads Human T-Expander CD3/CD28ビーズ (Invitrogen) と共に培養した。ウイルス上清を用いた形質導入に先立って、細胞を2日間培養した。200万のT細胞を、6ウェルプレートのウェル毎に、40 IU/mLのIL-2及び10 mg/mLの硫酸プロタミンを終濃度で含む、1 mlのTCEM+3 mlのウイルス上清中でプレティングした。T細胞の6ウェルプレートを、872gで2時間32 で遠心分離し、次いで、37 で終夜インキュベートした。その次の日、磁気ラックを使用して、Dynabeadsを除去し、T細胞を、300 IU/mLのIL2を含む新鮮なTCEM中、500,000細胞/mlで培養した。細胞を1ml当たり100万より少なく維持しながら、300 IU/mLのIL2を含むTCEM中で、T細胞を9日目まで培養し、T細胞形質導入をフローサイトメトリーにより測定した。

10

【 0 1 2 0 】

実施例3

本実施例は、本発明の実施形態による、FLT3 CAR T細胞の形質導入について実証する。

CARは配列番号1/29であった。リーダー配列は、最初はコードされており、細胞表面への輸送を促進する；それは成熟形態では切除されるようである。GFP及びFLT3 CARが形質導入されたT細胞の形質導入効率を、9日目のT細胞培養液において決定した。図3の左のパネルにおいて示した通り、LSR Fortessa (BD Biosciences) を使用したフローサイトメトリーにより、GFPが形質導入されたT細胞を、GFP陽性について分析した (87.8%陽性)。ビオチン化した、抗体のカッパ軽鎖のサブセットに結合する細菌タンパク質である、プロテインL (Genscript ; Piscataway, NJ, 米国) を使用して、FLT3 CARの発現を測定した。NC7ベースのFLT3 CARは、プロテインLに結合する配列であり、該CARの発現はストレプトアビジンPEを用いた染色によって測定し得る (図3の中央のパネル、77.1%陽性)。陰性対照として、ストレプトアビジンPE (二次) のみを用いてFLT3 CAR T細胞を染色した (図3の右のパネル、0%陽性)。FlowJo ソフトウェア (FlowJo LLC) を使用してデータ解析を行った。

20

【 0 1 2 1 】

実施例4

本実施例は、本発明の実施形態により、FLT3発現細胞株と共培養した場合に、FLT3ターゲティングキメラ抗原受容体を発現しているT細胞が、高レベルのサイトカインを分泌することについて実証する。

サイトカイン生成アッセイ：実施例1において決定したように、GFP又はCARを形質導入したT細胞を、FLT3の異なる発現を有する様々なALL及びAML細胞株と共培養した。実施例1において列記した急性リンパ芽球性及び急性骨髄性の白血病の株を標的の腫瘍細胞株として使用して、FLT3 CAR T細胞が、標的の認識及びCAR T細胞の活性化に应答して、インターフェロン-ガンマ (IFN-ガンマ) 及びインターロイキン-2 (IL-2) を生成する能力を測定した。CARは配列番号1/29であった。リーダー配列は、最初はコードされており、細胞表面への輸送を促進する；それは成熟形態では切除されるようである。96ウェルプレートのウェル毎に、T細胞 (100,000) 及び白血病細胞 (100,000) を、10%の熱非働化ウシ胎児血清 (Omega Scientific)、100 U/mLのペニシリン、100 mg/mLのストレプトマイシン及び2 mMのL-グルタミン (Invitrogen) を補充したRPMI 1640 (Invitrogen) 培地 (1ウェル当たり200 mL) 中で、16時間、共インキュベートした。次の日、プレートを、1200 rpmで6分間、遠心分離し、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) により分析するために、150 mLの上清を丁寧に採取した。IFN-ガンマについては、製造業者のプロトコール通り、ヒトIFN-ガンマ Quantikine ELISA (R&D systems ; Minneapolis, MN, 米国) で、Spectramax M5 マイクロプレートリーダー (Molecular Devices ; Sunnyvale, CA, 米国) で読み取った。IL-2については、製造業者のプロトコール通り、ヒトIL-2 Quantikine ELISA (R&D systems ; Minneapolis, MN) で、Spectramax M5 マイクロプレートリーダー (Molecular Devices) で読み

30

40

50

取った。次いで、GraphPad Prism (GraphPad ソフトウェア)を使用して、データをプロットした。図4~7は、結果を示す。

【 0 1 2 2 】

実施例5

本実施例は、本発明の実施形態により、FLT3ターゲティングCARを発現しているT細胞が、in vivoでFLT3を発現しているALLを低減できること、FLT3 CAR T細胞のin vivoでの用量漸増、及びFLT3ターゲティングCARを発現しているT細胞が、in vivoでFLT3を発現しているAMLの進行を遅らせることができることについて実証する。

NCIベセスダ動物管理使用委員会によって承認されたプロトコールの下、動物での研究を行った。100万のルシフェラーゼ陽性のALL又はAMLの細胞株を、NSGマウス (NOD scidガンマ、NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) (ジャクソン研究所; Bar Harbor, ME, 米国) に静脈 (IV) 注射し、ゼノジェンIVIS Luminaイメージングシステム (Caliper Life Sciences; Hopkinton, MA, 米国) を使用して、生物発光によって白血病の進行を観察した。10 10
1分間の3 mgのD-ルシフェリン (Caliper Life Sciences) を用いた腹腔内 (IP) 注射の後、白血病を有するNSGマウスを4分間画像化した。Living Imageソフトウェア (Caliper Life Sciences) を使用して、白血病を有する動物からの生物発光シグナル (光子/秒/cm²/sr) を分析した。以下に記載した通り、検出可能な量の白血病が観察される時に、GFP又はFLT3 CARを同日に形質導入したT細胞を注射し、週に2回、白血病の進行又は退縮を測定した。CARは配列番号1/29であった。リーダー配列は、最初はコードされており、細胞表面への輸送を促進する; それは成熟形態では切除されるようである。 20

SEM ALL細胞のIV注射: 7.5×10^6 のGFPを形質導入したT細胞 (67%形質導入) 又はFLT3-CARを形質導入したT細胞 (50%形質導入) を4日目 (検出可能な量の白血病が観察される時) に注射し、白血病の進行又は退縮が測定された。結果を図8に示す (分/最大の光子/秒/cm²/sr シグナル: $8.00e4/8.00e6$)。

SEM ALL細胞のIV注射: 10×10^6 のGFPを形質導入したT細胞、又は 10×10^6 、 5×10^6 若しくは 1×10^6 のFLT3 CARを形質導入したT細胞を14日目 (検出可能な量の白血病が観察される時) に注射し、白血病の進行又は退縮が測定された。結果を図9に示す (分/最大の光子/秒/cm²/sr シグナル: $5.00e4/8.00e6$)。

MOLM13 AML細胞のIV注射: 7×10^6 のGFPを形質導入したT細胞、又はFLT3 CARを形質導入したT細胞を6日目 (検出可能な量の白血病が観察される時) に注射し、白血病の進行又は退縮が測定された。結果を図10に示す (分/最大の光子/秒/cm²/sr シグナル: $5.00e4/8.00e6$)。 30

MOLM14 AML細胞のIV注射: 7×10^6 のGFPを形質導入したT細胞、又はFLT3 CARを形質導入したT細胞を6日目 (検出可能な量の白血病が観察される時) に注射し、白血病の進行又は退縮が測定された。結果を図11に示す (分/最大の光子/秒/cm²/sr シグナル: $5.00e4/8.00e6$)。

【 0 1 2 3 】

本明細書中で引用された刊行物、特許出願及び特許を含む全ての参考文献は、各参考文献が個別に且つ具体的に参照により本明細書中に組み入れられることが示され、本明細書中にその全体が記載されているのと同程度に、参照により本明細書に組み込まれる。 40

【 0 1 2 4 】

本発明を記載する文脈 (特に、以下の特許請求の範囲の文脈) における用語「a」及び「an」及び「the」及び「少なくとも1つ」並びに同様の指示対象の使用は、本明細書中で別段の指示がない限り、又は文脈によって明確に矛盾しない限り、単数及び複数形の両方を含むものとして解釈されるべきである。1以上の項目の列記が続く、用語「少なくとも1つ」の使用 (例えば、「A及びBの少なくとも1つ」) は、本明細書に別段の記載がない限り、又は文脈によって明確に矛盾しない限り、列記された項目から選択された1つの項目 (A又はB)、又は列記された項目の2以上の任意の組合せ (A及びB) を意味するものとして解釈されるべきである。「含む (comprising)」、「有する (having)」、「含む (including)」及び「含有する (containing)」という用語は、別段の記載がない限り、 50

制限のない用語 (open-ended terms) (即ち、「含むが、これに限定されない (including, but not limited to) 」を意味する) として解釈されるべきである。本明細書中の値の範囲の列挙は、本明細書中に別段の指示がない限り、単に範囲内の各別個の値を個別に指す簡略方法として役立つことを意図しており、本明細書において個々の値は、それぞれ個別に列挙されているかのように、個々の値は、明細書に取り込まれる。本明細書中に記載された全ての方法は、本明細書中で別段の指示がない限り、又は特に文脈によって明らかに矛盾しない限り、任意の適切な順序で実施し得る。本明細書で提供される任意の及び全ての例、又は例示的な言語 (例えば「等 (such as) 」) の使用は、単に本発明をよりよく説明することを意図しており、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。本明細書中のいかなる言葉も、本発明の実施に不可欠であるとして、特許請求されていない任意の要素を示すものと解釈されるべきではない。

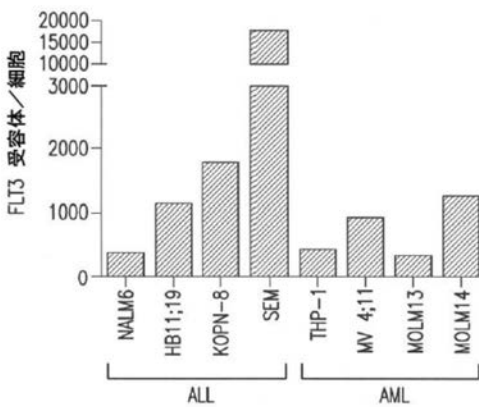
10

【 0 1 2 5 】

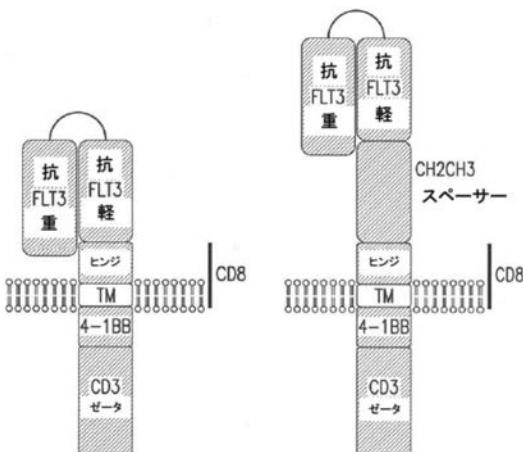
本発明を実施するための、本発明者が知るベストモードを含む、本発明の好ましい実施形態は、本明細書に記載される。これらの好ましい実施形態の変形は、前述の記載を読むことで当業者に明らかになり得る。本発明者らは、当業者がこのような変形を適宜使用することを予測し、本発明者らは本発明が本明細書に具体的に記載されたものとは別の方法で実施されることを意図する。従って、本発明は適用法によって許容されるように、本明細書に添付した特許請求の範囲に記載された主題の全ての改変及び均等物を含む。更に、本明細書中で別段の指示がない限り、又は特に文脈によって明らかに矛盾しない限り、それらの全ての可能な変形における上記要素の任意の組合せが本発明に包含される。

20

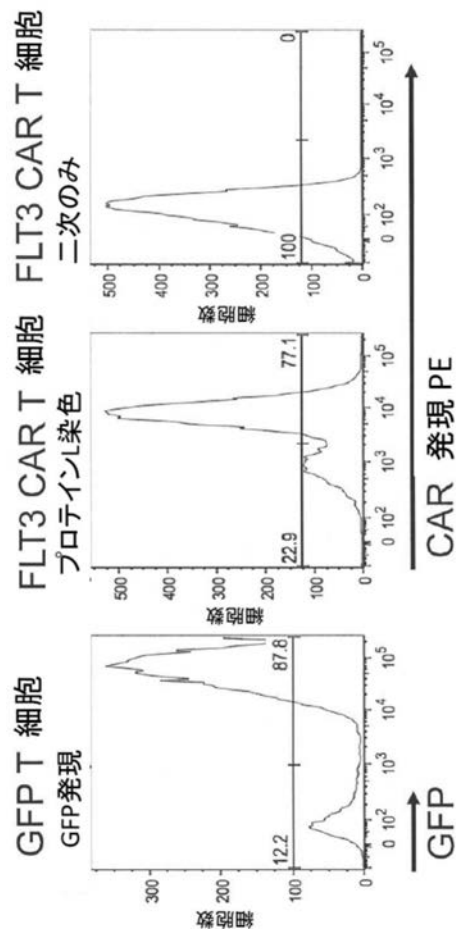
【 図 1 】



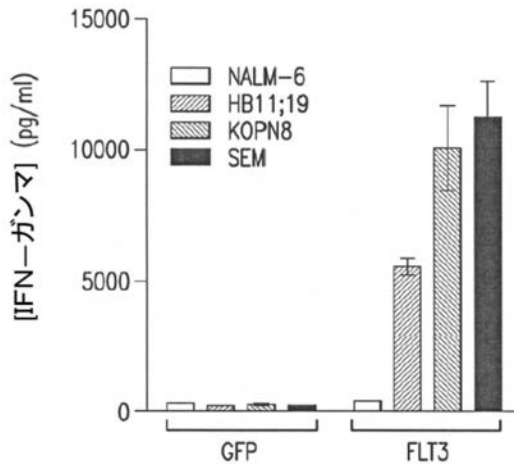
【 図 2 】



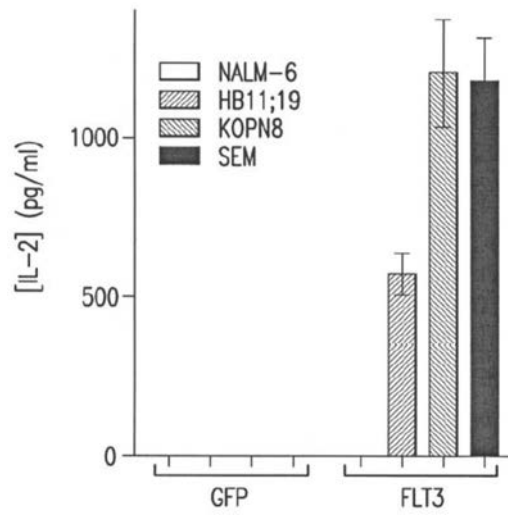
【 図 3 】



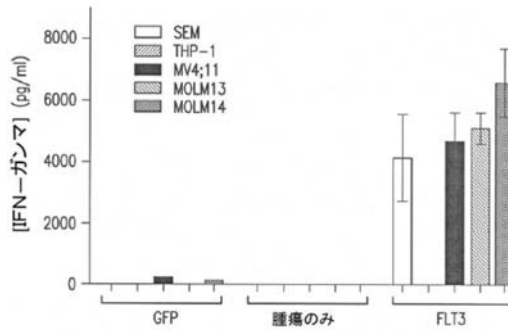
【 図 4 】



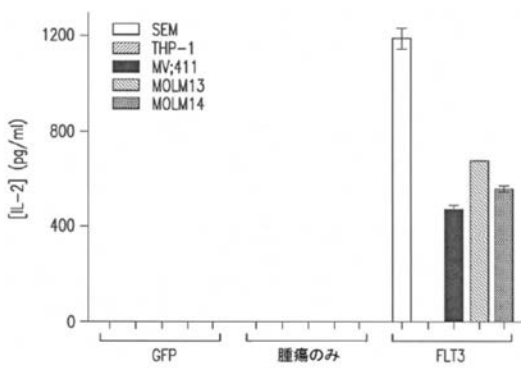
【 図 5 】



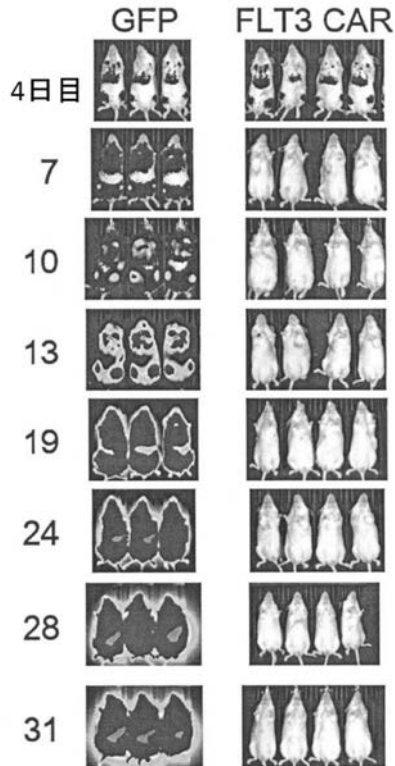
【 図 6 】



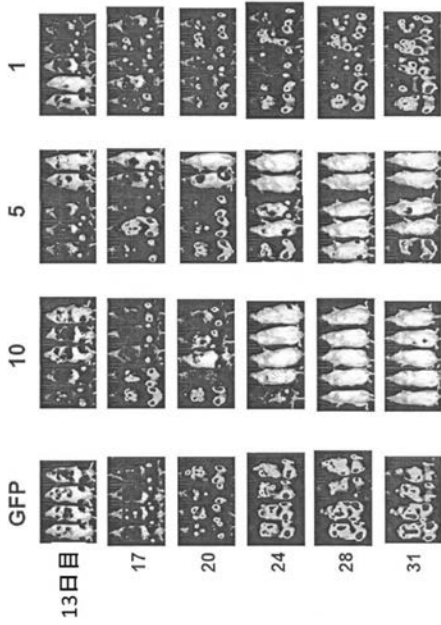
【 図 7 】



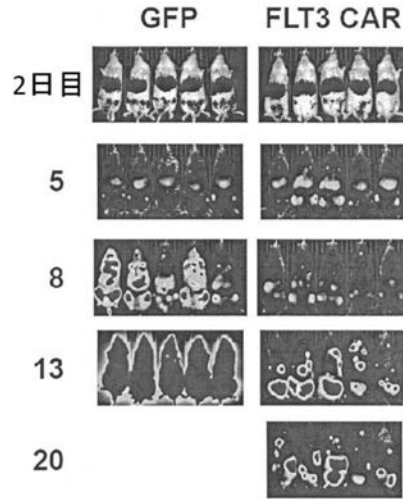
【 図 8 】



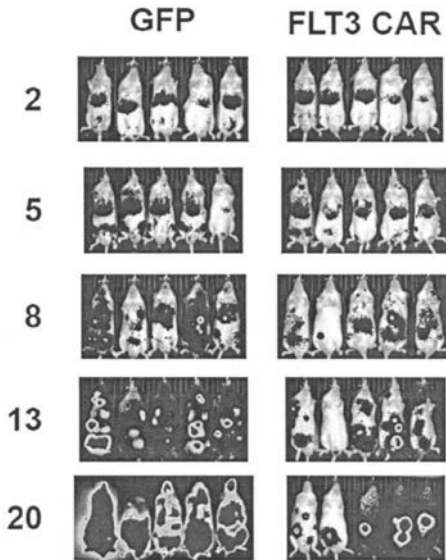
【 図 9 】



【 図 1 0 】



【 図 1 1 】



【配列表】

2019519529000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2017/034691

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 A61K38/00 A61K39/395 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K		
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		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2015/142675 A2 (NOVARTIS AG [CH]; UNIV PENNSYLVANIA [US]; LOEW ANDREAS [US]; MILONE MI) 24 September 2015 (2015-09-24) paragraph [0364]; figure all; example all; table all	1-25
Y	----- HANEEN SHALABI ET AL: "Beyond CD19: Opportunities for Future Development of Targeted Immunotherapy in Pediatric Relapsed-Refractory Acute Leukemia", FRONTIERS IN PEDIATRICS, vol. 3, 1 October 2015 (2015-10-01), XP055394040, DOI: 10.3389/fped.2015.00080 figure all; example all -----	1-25
<input 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 "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 27 July 2017		Date of mailing of the international search report 07/08/2017
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 Fellows, Edward

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2017/034691

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. forming part of the international application as filed:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2017/034691

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015142675 A2	24-09-2015	CN 106163547 A	23-11-2016
		EP 3119423 A2	25-01-2017
		JP 2017513818 A	01-06-2017
		WO 2015142675 A2	24-09-2015

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	4 C 0 8 7
C 1 2 N 15/867 (2006.01)	C 1 2 N 15/867	Z 4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/16	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/17	Z
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	
	C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 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, T J, 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, R O, 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, G T, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, 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, TZ

(74)代理人 100121212

弁理士 田村 弥栄子

(74)代理人 100174296

弁理士 當麻 博文

(74)代理人 100137729

弁理士 赤井 厚子

(74)代理人 100151301

弁理士 戸崎 富哉

(72)発明者 チェン、クリストファー ディー .

アメリカ合衆国、ヴァージニア州 2 2 0 4 3、フォールズ チャーチ、カートブリッジ ロード 2 2 9 6

(72)発明者 フライ、テリー ジェイ .

アメリカ合衆国、メリーランド州 2 0 8 1 6、ベセスダ、ボルティモア アヴェニュー 5 2 3 3

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01

4B065 AA94X AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44

4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 BA02 CA53 NA14 ZB261 ZB262 ZB271

ZB272

4C085 AA13 AA14 CC22 CC23 DD62 EE01

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 NA14 ZB26 ZB27

4C087 AA01 AA02 BB37 BB65 BC83 NA14 ZB26 ZB27

4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 DA76 EA28 FA74