

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017年11月16日(16.11.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/195749 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/09 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01) C12N 5/16 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 16/00 (2006.01)

田クリニック東京内 Tokyo (JP), 笹渡 繁巳 (SASAWATARI, Shigemi); 〒2220033 神奈川県横浜市港北区新横浜二丁目3番12号株式会社メディネット内 Kanagawa (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2017/017456

(74) 代理人: 特許業務法人三枝国際特許事務所 (SAEGUSA & PARTNERS); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜T N Kビル Osaka (JP).

(22) 国際出願日: 2017年5月9日(09.05.2017)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2016-095125 2016年5月11日(11.05.2016) JP

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, 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, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人: 国立大学法人大阪大学 (OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 Osaka (JP), 株式会社メディネット (MEDINET CO., LTD.) [JP/JP]; 〒2220033 神奈川県横浜市港北区新横浜二丁目3番12号 Kanagawa (JP).

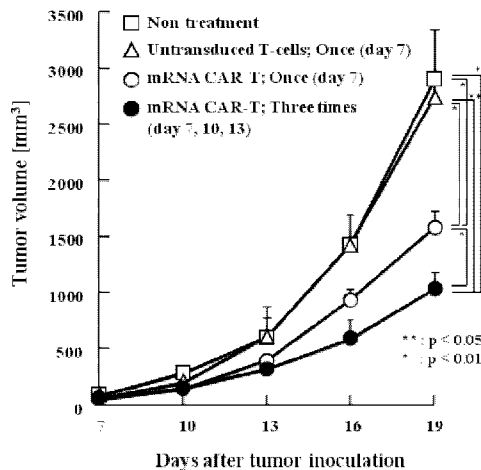
(72) 発明者: 中川 晋作 (NAKAGAWA, Shinsaku); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP), 岡田 直貴 (OKADA, Naoki); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP), 神垣 隆 (KAMIGAKI, Takashi); 〒1010062 東京都千代田区神田駿河台二丁目1番45号 ニュー駿河台ビル3階 瀬

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,

(54) Title: CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: キメラ抗原受容体、及びその利用

[図18]



(57) Abstract: Provided are a novel CAR, CAR T-cells, and the like which are effective in treating diseases such as cancer. This chimeric antigen receptor is selected from the group consisting of chimeric antigen receptors A-F. The CAR T-cells express said chimeric antigen receptor.

(57) 要約: 癌等の疾患の治療に有効な新たなCAR及びCAR-T細胞等を提供すること。キメラ抗原受容体A~Fから成る群より選択されるキメラ抗原受容体及びそれを発現するCAR-T細胞。

WO 2017/195749 A1

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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

- － 国際調査報告（条約第21条(3)）
- － 明細書の別個の部分として表した配列リスト
（規則5.2(a)）

明 細 書

発明の名称：キメラ抗原受容体、及びその利用

技術分野

[0001] キメラ抗原受容体、キメラ抗原受容体T細胞、及び抗体に関する技術が開示される。

背景技術

[0002] 免疫学の発展に伴って、がんに対する様々な免疫療法の開発が進められている。なかでも、がん細胞を正常細胞と識別して殺傷する能力を有するT細胞を患者に移入する養子免疫療法は、がんの転移・再発に対応しうる副作用の小さい治療戦略として期待されている。しかし、治療効果を発揮するのに十分な質および量のT細胞をがん患者から得ることは困難を伴い、これが本治療法の臨床応用を阻む原因のひとつである。この問題を克服するアプローチとして、近年、キメラ抗原受容体（CAR）遺伝子の導入によってがん細胞を攻撃できるT細胞を大量に調製し、このCAR発現T（CAR-T）細胞を細胞医薬として利用する養子免疫療法が注目されている。

[0003] 現在研究が進められているCAR-T細胞療法の標的疾患は造血系がんが多く、特にB細胞リンパ腫に対するCD19を標的としたCAR-T細胞療法は、臨床試験において従来の養子免疫療法では得られなかった著効を示したことが報告された。しかしながら、固形腫瘍に対するCAR-T細胞療法の有効性を示した臨床研究報告は少ない。これは、移入したCAR-T細胞が造血系腫瘍ではがん細胞と接触しやすいのに対して、固形腫瘍のがん細胞と直接接触するには血管外に浸潤し、さらに間質組織を通過する必要があるためと考えられる。血液がんの罹患率は全てのがん患者の5%未満であり、固形腫瘍はその他の癌種の多くを占める。よって、固形腫瘍に対するCAR-T細胞療法の開発が求められている。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1 : Kanagawa, N. et al., Cancer Gene Ther., 20(1): 57-64 (2013)

非特許文献2 : N Engl J Med. 2014 Oct 16;371(16):1507-17.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 上記のような現状の下、癌等の疾患の治療に有効な新たなCAR及びCAR-T細胞等を提供することを1つの課題とする。

課題を解決するための手段

[0006] 上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、特定のCDR配列を有するCAR及びCAR-T細胞を見出すに至った。斯かる知見に改良と検討を重ね、下記に代表される発明が提供される。

項1.

下記のいずれかのキメラ抗原受容体A～Fから成る群より選択されるキメラ抗原受容体：配列番号1のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、

配列番号2のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、及び配列番号3のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3、を含む重鎖可変領域、並びに／或いは

配列番号5のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、

配列番号6のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、及び配列番号7のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖CDR3、を含む軽鎖可変領域、

を含む、キメラ抗原受容体A；

配列番号21のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、

配列番号22のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、及び

配列番号23のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3、

を含む重鎖可変領域、並びに／或いは

配列番号 25 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖 CDR 1、
配列番号 26 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖 CDR 2、及
び

配列番号 27 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖 CDR 3、
を含む軽鎖可変領域、
を含む、キメラ抗原受容体 B；

配列番号 41 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR 1、
配列番号 42 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR 2、及
び

配列番号 43 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR 3、
を含む重鎖可変領域、並びに／或いは

配列番号 45 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖 CDR 1、
配列番号 46 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖 CDR 2、及
び

配列番号 47 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖 CDR 3、
を含む軽鎖可変領域、
を含む、キメラ抗原受容体 C；

配列番号 61 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR 1、
配列番号 62 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR 2、及
び

配列番号 63 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR 3、
を含む重鎖可変領域、並びに／或いは

配列番号 65 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖 CDR 1、
配列番号 66 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖 CDR 2、及
び

配列番号 67 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖 CDR 3、
を含む軽鎖可変領域、
を含む、キメラ抗原受容体 D；

配列番号 81 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR 1、
配列番号 82 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR 2、及
び

配列番号 83 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR 3、
を含む重鎖可変領域、並びに／或いは

配列番号 85 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖 CDR 1、
配列番号 86 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖 CDR 2、及
び

配列番号 87 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖 CDR 3、
を含む軽鎖可変領域、

を含む、キメラ抗原受容体 E；又は

配列番号 101 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR 1、
配列番号 102 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR 2、
及び

配列番号 103 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR 3、
を含む重鎖可変領域、並びに／或いは

配列番号 105 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖 CDR 1、
配列番号 106 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖 CDR 2、
及び

配列番号 107 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖 CDR 3、
を含む軽鎖可変領域、

を含む、キメラ抗原受容体 F。

項 2.

項 1 に記載のキメラ抗原受容体 A。

項 3.

項 1 又は 2 に記載のキメラ抗原受容体を有するキメラ抗原受容体 T 細胞又は
キメラ抗原受容体 NK 細胞。

項 4.

項 1 又は 2 に記載のキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド。

項 5 .

項 3 に記載のキメラ抗原受容体 T 細胞若しくはキメラ抗原受容体 N K 細胞を含む医薬組成物。

項 6 .

癌の治療又は予防用である、項 5 に記載の医薬組成物。

発明の効果

[0007] 癌（好ましくは、固形癌）の治療に有効な手段が提供される。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]キメラ抗原受容体 A が有する s c F V のアミノ酸配列が示される。実線の下線で示される領域は、軽鎖可変領域である。破線の下線で示される領域は重鎖可変領域である。下線のない領域はリンカーである。太字の大きなフォントで示される領域は、その下に示される通り、軽鎖及び重鎖の C D R 1 ~ 3 である。

[図2]キメラ抗原受容体 B が有する s c F V のアミノ酸配列が示される。実線の下線で示される領域は、軽鎖可変領域である。破線の下線で示される領域は重鎖可変領域である。下線のない領域はリンカーである。太字の大きなフォントで示される領域は、その下に示される通り、軽鎖及び重鎖の C D R 1 ~ 3 である。

[図3]キメラ抗原受容体 C が有する s c F V のアミノ酸配列が示される。実線の下線で示される領域は、軽鎖可変領域である。破線の下線で示される領域は重鎖可変領域である。下線のない領域はリンカーである。太字の大きなフォントで示される領域は、その下に示される通り、軽鎖及び重鎖の C D R 1 ~ 3 である。

[図4]キメラ抗原受容体 D が有する s c F V のアミノ酸配列が示される。実線の下線で示される領域は、軽鎖可変領域である。破線の下線で示される領域は重鎖可変領域である。下線のない領域はリンカーである。太字の大きなフォントで示される領域は、その下に示される通り、軽鎖及び重鎖の C D R 1

～3である。

[図5]キメラ抗原受容体Eが有するs c F Vのアミノ酸配列が示される。実線の下線で示される領域は、軽鎖可変領域である。破線の下線で示される領域は重鎖可変領域である。下線のない領域はリンカーである。太字の大きなフォントで示される領域は、その下に示される通り、軽鎖及び重鎖のCDR 1～3である。

[図6]キメラ抗原受容体Fが有するs c F Vのアミノ酸配列が示される。実線の下線で示される領域は、軽鎖可変領域である。破線の下線で示される領域は重鎖可変領域である。下線のない領域はリンカーである。太字の大きなフォントで示される領域は、その下に示される通り、軽鎖及び重鎖のCDR 1～3である。

[図7]キメラ抗原受容体Aが有するs c F Vのアミノ酸配列をコードする塩基配列が示される。実線の下線で示される領域は、軽鎖可変領域である。破線の下線で示される領域は重鎖可変領域である。下線のない領域はリンカーである。太字の大きなフォントで示される領域は、その下に示される通り、軽鎖及び重鎖のCDR 1～3である。

[図8]キメラ抗原受容体Bが有するs c F Vのアミノ酸配列をコードする塩基配列が示される。実線の下線で示される領域は、軽鎖可変領域である。破線の下線で示される領域は重鎖可変領域である。下線のない領域はリンカーである。太字の大きなフォントで示される領域は、その下に示される通り、軽鎖及び重鎖のCDR 1～3である。

[図9]キメラ抗原受容体Cが有するs c F Vのアミノ酸配列をコードする塩基配列が示される。実線の下線で示される領域は、軽鎖可変領域である。破線の下線で示される領域は重鎖可変領域である。下線のない領域はリンカーである。太字の大きなフォントで示される領域は、その下に示される通り、軽鎖及び重鎖のCDR 1～3である。

[図10]キメラ抗原受容体Dが有するs c F Vのアミノ酸配列をコードする塩基配列が示される。実線の下線で示される領域は、軽鎖可変領域である。破

線の下線で示される領域は重鎖可変領域である。下線のない領域はリンカーである。太字の大きなフォントで示される領域は、その下に示される通り、軽鎖及び重鎖のCDR1～3である。

[図11]キメラ抗原受容体Eが有するs c F Vのアミノ酸配列をコードする塩基配列が示される。実線の下線で示される領域は、軽鎖可変領域である。破線の下線で示される領域は重鎖可変領域である。下線のない領域はリンカーである。太字の大きなフォントで示される領域は、その下に示される通り、軽鎖及び重鎖のCDR1～3である。

[図12]キメラ抗原受容体Fが有するs c F Vのアミノ酸配列をコードする塩基配列が示される。実線の下線で示される領域は、軽鎖可変領域である。破線の下線で示される領域は重鎖可変領域である。下線のない領域はリンカーである。太字の大きなフォントで示される領域は、その下に示される通り、軽鎖及び重鎖のCDR1～3である。

[図13]pMXs-IG/CAR[mV-(h28)-h28-h3Z]の構築工程を示す。

[図14]pMXs-IG/CAR[hV-(h28)-h28-h3Z]の構築工程を示す。

[図15]pMXs-IG/CAR[mV-(h8 α)-h137-h3Z]の構築工程を示す。

[図16]pMXs-IG/CAR[hV-(h8 α)-h137-h3Z]の構築工程を示す。

[図17]各CARをコードするpMXs-IGベクターの構造を示す。

[図18]CAR-T細胞によるin-vivo抗腫瘍効果を測定した結果を示す。

発明を実施するための形態

[0009] 1. キメラ抗原受容体

キメラ抗原受容体(CAR)とは、モノクローナル抗体可変領域の軽鎖(VL)と重鎖(VH)を直列に結合させた単鎖抗体(s c F v)をN末端側に、T細胞受容体(TCR)と鎖をC末端側に持つキメラ蛋白である。CARを発現させたT細胞は、CAR-T細胞と呼ばれる。

[0010] キメラ抗原受容体A～Fが有するs c F V領域のアミノ酸配列及びそれをコードする塩基配列に付与した配列番号は下記表1に示す通りである。表内の数字は配列番号を意味する。AAはアミノ酸配列を意味する。Vは、可変

領域を意味する。s c F Vとはs c F V領域全体を意味する。

[0011] [表1]

CAR	AA										DNA									
	Light				Heavy				Linker	scFV	Light				Heavy				Linker	scFV
	CDR1	CDR2	CDR3	V	CDR1	CDR2	CDR3	V			CDR1	CDR2	CDR3	V	CDR1	CDR2	CDR3	V		
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
B	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
C	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
D	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
E	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
F	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120

[0012] キメラ抗原受容体Aは、配列番号1のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号2のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、配列番号3のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3、配列番号5のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号6のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、及び配列番号7のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖CDR3から成る群から選択される少なくとも一種のCDRを有することが好ましく、より好ましくは2種以上、より好ましくは3種以上、より好ましくは4種以上、より好ましくは5種以上、より好ましくは全てのCDRを有する。好適な一実施形態において、キメラ抗原受容体Aは、配列番号4のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域及び／又は配列番号8のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を有することが好ましい。好適な一実施形態において、キメラ抗原受容体Aは、配列番号10で示されるアミノ酸配列を有するs c F V構造を有することが好ましい。

[0013] 一実施形態において、キメラ抗原受容体Aの軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号4のアミノ酸配列と90%以上、好ましくは95%以上、好ましくは98%以上、好ましくは99%以上の同一性を有する。一実施形態において、キメラ抗原受容体Aの重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号8のアミノ酸配列と90%以上、好ましくは95%以上、好ましくは98%以上、好ましくは99%以上の同一性を有する。一実施形態において、キメラ抗原受容体Aは、配列番号10のアミノ酸配列と90%以上、好ましくは95%以上、好ましくは98

%以上、好ましくは99%以上の同一性を有する。一実施形態において、キメラ抗原受容体Aが有するリンカーのアミノ酸配列は、キメラ抗原受容体としての機能が維持される限り任意である。

[0014] キメラ抗原受容体Bは、配列番号21のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号22のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、配列番号23のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3、配列番号25のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号26のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、及び配列番号27のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖CDR3から成る群から選択される少なくとも一種のCDRを有することが好ましく、より好ましくは2種以上、より好ましくは3種以上、より好ましくは4種以上、より好ましくは5種以上、より好ましくは全てのCDRを有する。好適な一実施形態において、キメラ抗原受容体Bは、配列番号24のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域及び／又は配列番号28のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を有することが好ましい。好適な一実施形態において、キメラ抗原受容体Bは、配列番号30で示されるアミノ酸配列を有するscFV構造を有することが好ましい。

[0015] 一実施形態において、キメラ抗原受容体Bの軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号24のアミノ酸配列と90%以上、好ましくは95%以上、好ましくは98%以上、好ましくは99%以上の同一性を有する。一実施形態において、キメラ抗原受容体Bの重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号28のアミノ酸配列と90%以上、好ましくは95%以上、好ましくは98%以上、好ましくは99%以上の同一性を有する。一実施形態において、キメラ抗原受容体Bは、配列番号30のアミノ酸配列と90%以上、好ましくは95%以上、好ましくは98%以上、好ましくは99%以上の同一性を有する。一実施形態において、キメラ抗原受容体Bが有するリンカーのアミノ酸配列は、キメラ抗原受容体としての機能が維持される限り任意である。

[0016] キメラ抗原受容体Cは、配列番号41のアミノ酸配列を有するアミノ酸配

列を含む軽鎖CDR1、配列番号42のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、配列番号43のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3、配列番号45のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号46のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、及び配列番号47のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖CDR3から成る群から選択される少なくとも一種のCDRを有することが好ましく、より好ましくは2種以上、より好ましくは3種以上、より好ましくは4種以上、より好ましくは5種以上、より好ましくは全てのCDRを有する。好適な一実施形態において、キメラ抗原受容体Cは、配列番号44のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域及び／又は配列番号48のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を有することが好ましい。好適な一実施形態において、キメラ抗原受容体Cは、配列番号50で示されるアミノ酸配列を有するscFV構造を有することが好ましい。

[0017] 一実施形態において、キメラ抗原受容体Cの軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号44のアミノ酸配列と90%以上、好ましくは95%以上、好ましくは98%以上、好ましくは99%以上の同一性を有する。一実施形態において、キメラ抗原受容体Cの重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号48のアミノ酸配列と90%以上、好ましくは95%以上、好ましくは98%以上、好ましくは99%以上の同一性を有する。一実施形態において、キメラ抗原受容体Cは、配列番号50のアミノ酸配列と90%以上、好ましくは95%以上、好ましくは98%以上、好ましくは99%以上の同一性を有する。一実施形態において、キメラ抗原受容体Cが有するリンカーのアミノ酸配列は、キメラ抗原受容体としての機能が維持される限り任意である。

[0018] キメラ抗原受容体Dは、配列番号61のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号62のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、配列番号63のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3、配列番号65のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号66のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む

重鎖CDR2、及び配列番号67のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖CDR3から成る群から選択される少なくとも一種のCDRを有することが好ましく、より好ましくは2種以上、より好ましくは3種以上、より好ましくは4種以上、より好ましくは5種以上、より好ましくは全てのCDRを有する。好適な一実施形態において、キメラ抗原受容体Dは、配列番号64のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域及び／又は配列番号68のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を有することが好ましい。好適な一実施形態において、キメラ抗原受容体Dは、配列番号70で示されるアミノ酸配列を有するscFV構造を有することが好ましい。

[0019] 一実施形態において、キメラ抗原受容体Dの軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号64のアミノ酸配列と90%以上、好ましくは95%以上、好ましくは98%以上、好ましくは99%以上の同一性を有する。一実施形態において、キメラ抗原受容体Dの重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号68のアミノ酸配列と90%以上、好ましくは95%以上、好ましくは98%以上、好ましくは99%以上の同一性を有する。一実施形態において、キメラ抗原受容体Dは、配列番号70のアミノ酸配列と90%以上、好ましくは95%以上、好ましくは98%以上、好ましくは99%以上の同一性を有する。一実施形態において、キメラ抗原受容体Dが有するリンカーのアミノ酸配列は、キメラ抗原受容体としての機能が維持される限り任意である。

[0020] キメラ抗原受容体Eは、配列番号81のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号82のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、配列番号83のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3、配列番号85のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号86のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、及び配列番号87のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖CDR3から成る群から選択される少なくとも一種のCDRを有することが好ましく、より好ましくは2種以上、より好ましくは3種以上、より好ましくは4種以上、より好ましくは5種以上、より好ましくは全てのCD

Rを有する。好適な一実施形態において、キメラ抗原受容体Eは、配列番号84のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域及び／又は配列番号88のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を有することが好ましい。好適な一実施形態において、キメラ抗原受容体Eは、配列番号90で示されるアミノ酸配列を有するscFV構造を有することが好ましい。

[0021] 一実施形態において、キメラ抗原受容体Eの軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号84のアミノ酸配列と90%以上、好ましくは95%以上、好ましくは98%以上、好ましくは99%以上の同一性を有する。一実施形態において、キメラ抗原受容体Eの重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号88のアミノ酸配列と90%以上、好ましくは95%以上、好ましくは98%以上、好ましくは99%以上の同一性を有する。一実施形態において、キメラ抗原受容体Eは、配列番号90のアミノ酸配列と90%以上、好ましくは95%以上、好ましくは98%以上、好ましくは99%以上の同一性を有する。一実施形態において、キメラ抗原受容体Eが有するリンカーのアミノ酸配列は、キメラ抗原受容体としての機能が維持される限り任意である。

[0022] キメラ抗原受容体Fは、配列番号101のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号102のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、配列番号103のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3、配列番号105のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号106のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、及び配列番号107のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖CDR3から成る群から選択される少なくとも一種のCDRを有することが好ましく、より好ましくは2種以上、より好ましくは3種以上、より好ましくは4種以上、より好ましくは5種以上、より好ましくは全てのCDRを有する。好適な一実施形態において、キメラ抗原受容体Fは、配列番号104のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域及び／又は配列番号108のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を有することが好ましい。好適な一実施形態において、キメラ抗原受容体Fは、配列番号110で示され

るアミノ酸配列を有する s c F V 構造を有することが好ましい。

[0023] 一実施形態において、キメラ抗原受容体 F の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号 104 のアミノ酸配列と 90% 以上、好ましくは 95% 以上、好ましくは 98% 以上、好ましくは 99% 以上の同一性を有する。一実施形態において、キメラ抗原受容体 F の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号 108 のアミノ酸配列と 90% 以上、好ましくは 95% 以上、好ましくは 98% 以上、好ましくは 99% 以上の同一性を有する。一実施形態において、キメラ抗原受容体 F は、配列番号 110 のアミノ酸配列と 90% 以上、好ましくは 95% 以上、好ましくは 98% 以上、好ましくは 99% 以上の同一性を有する。一実施形態において、キメラ抗原受容体 F が有するリンカーのアミノ酸配列は、キメラ抗原受容体としての機能が維持される限り任意である。

[0024] アミノ酸の同一性は、市販の又はインターネットを通じて利用可能な解析ツール（例えば、FASTA、BLAST、PSI-BLAST、SSEARCH等のソフトウェア）を用いて計算することができる。例えば、BLAST検索に一般的に用いられる主な初期条件は、以下の通りである。即ち、Advanced BLAST 2.1において、プログラムにblastpを用い、Expect値を10、Filterは全てOFFにして、MatrixにBLOSUM62を用い、Gap existence cost、Per residue gap cost、及びLambda ratioをそれぞれ 11、1、0.85（デフォルト値）にして、他の各種パラメータもデフォルト値に設定して検索を行うことにより、アミノ酸配列の同一性の値（%）を算出することができる。

[0025] キメラ抗原受容体 A～C が有する s c F V（配列番号 10、30、及び 50 のアミノ酸配列）は、各々血管内皮増殖因子受容体（VEGFR2）を特異的に認識するモノクローナル抗体に由来する。VEGFR2 は、腫瘍新生血管で高発現している。キメラ抗原受容体 D～F が有する s c F V（配列番号 70、90、及び 110 のアミノ酸配列）は、各々血管内皮細胞特異的レセプター（Robo4）を特異的に認識するモノクローナル抗体に由来する。Robo4 は腫瘍血管特異的マーカーとしても知られている。よって、キメラ抗原受容体 A～F は、癌組織（腫瘍組織）を特異的に認識することがで

きる。

- [0026] キメラ抗原受容体 A～F は、その N 末端から順に、s c F v 領域、スペーサー配列、膜貫通ドメイン、共刺激因子の細胞内ドメイン、並びに T C R の細胞内ドメインが配置された構造を有することが好ましい。s c F v 領域と膜貫通ドメインとの間に設けられるスペーサー配列の長さ及びそれを構成するアミノ酸残基の種類は、キメラ抗原受容体の機能を阻害しない限り制限されない。例えば、スペーサー配列は、10 個～25 個程度のアミノ酸残基となるように設計することができる。
- [0027] 膜貫通ドメインの種類は、キメラ抗原受容体の機能を阻害しない限り制限されない。例えば、T 細胞等で発現する C D 2 8、C D 3 ζ、C D 4、C D 8 α 等を用いることができる。これらの膜貫通ドメインは、キメラ抗原受容体の機能を阻害しない限り、適宜変異が導入されていてもよい。
- [0028] 共刺激因子の細胞内ドメインは、T 細胞などが有する共刺激因子に由来する細胞内ドメインであればよく特に限定はされない。例えば、O X 4 0、4-1 B B、C D 2 7、C D 2 7 8 及び C D 2 8 等から成る群から選択される 1 種以上を適宜選択して使用することができる。これらの共刺激因子の細胞内ドメインは、キメラ抗原受容体の機能を阻害しない限り、適宜変異が導入されていてもよい。
- [0029] T C R の細胞内ドメインは、例えば、T C R ζ 鎖とも呼ばれる C D 3 など由来する細胞内ドメインであり得る。C D 3 は、キメラ抗原受容体の機能を阻害しない限り、適宜変異が導入されていてもよい。C D 3 に変異を導入する場合は、ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) が含まれるよう行うことが好ましい。
- [0030] 特定の s c F V を利用したキメラ抗原受容体及びそれを発現する C A R - T 細胞を製造する技術は公知である。例えば、非特許文献 1 及び 2 に開示される方法を利用してキメラ抗原受容体 A～F を製造することができる。
- [0031] 2. キメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド
キメラ抗原受容体 A をコードするポリヌクレオチドは、上述するキメラ抗

原受容体Aをコードする限り特に制限されない。一実施形態において、キメラ抗原受容体Aをコードするポリヌクレオチドは、配列番号11の塩基配列を有する軽鎖CDR1をコードする領域、配列番号12の塩基配列を有する軽鎖CDR2をコードする領域、配列番号13の塩基配列を有する軽鎖CDR3をコードする領域、配列番号15の塩基配列を有する重鎖CDR1をコードする領域、配列番号16の塩基配列を有する重鎖CDR2をコードする領域、及び配列番号17の塩基配列を有する重鎖CDR3をコードする領域から成る群から選択される少なくとも一種の領域を有することが好ましく、より好ましくは2種以上、より好ましくは3種以上、より好ましくは4種以上、より好ましくは5種以上、より好ましくは全ての領域を有する。好適な一実施形態において、キメラ抗原受容体Aをコードするポリヌクレオチドは、配列番号14の塩基配列を有する軽鎖可変領域をコードする領域及び／又は配列番号18の塩基配列を有する重鎖可変領域をコードする領域を有することが好ましい。好適な一実施形態において、キメラ抗原受容体Aをコードするポリヌクレオチドは、配列番号20の塩基配列を有することが好ましい。

[0032] 一実施形態において、キメラ抗原受容体Aをコードするポリヌクレオチドは、配列番号11～20の塩基配列と80%以上、好ましくは85%以上、好ましくは90%以上、好ましくは95%以上、好ましくは98%以上、好ましくは99%以上の同一性を有する塩基配列を有する。

[0033] キメラ抗原受容体Bをコードするポリヌクレオチドは、上述するキメラ抗原受容体Bをコードする限り特に制限されない。一実施形態において、キメラ抗原受容体Bをコードするポリヌクレオチドは、配列番号31の塩基配列を有する軽鎖CDR1をコードする領域、配列番号32の塩基配列を有する軽鎖CDR2をコードする領域、配列番号33の塩基配列を有する軽鎖CDR3をコードする領域、配列番号35の塩基配列を有する重鎖CDR1をコードする領域、配列番号36の塩基配列を有する重鎖CDR2をコードする領域、及び配列番号37の塩基配列を有する重鎖CDR3をコードする領域

から成る群から選択される少なくとも一種の領域を有することが好ましく、より好ましくは2種以上、より好ましくは3種以上、より好ましくは4種以上、より好ましくは5種以上、より好ましくは全ての領域を有する。好適な一実施形態において、キメラ抗原受容体Bをコードするポリヌクレオチドは、配列番号34の塩基配列を有する軽鎖可変領域をコードする領域及び／又は配列番号38の塩基配列を有する重鎖可変領域をコードする領域を有することが好ましい。好適な一実施形態において、キメラ抗原受容体Bをコードするポリヌクレオチドは、配列番号40の塩基配列を有することが好ましい。

[0034] 一実施形態において、キメラ抗原受容体Bをコードするポリヌクレオチドは、配列番号31～40の塩基配列と80%以上、好ましくは85%以上、好ましくは90%以上、好ましくは95%以上、好ましくは98%以上、好ましくは99%以上の同一性を有する塩基配列を有する。

[0035] キメラ抗原受容体Cをコードするポリヌクレオチドは、上述するキメラ抗原受容体Cをコードする限り特に制限されない。一実施形態において、キメラ抗原受容体Cをコードするポリヌクレオチドは、配列番号51の塩基配列を有する軽鎖CDR1をコードする領域、配列番号52の塩基配列を有する軽鎖CDR2をコードする領域、配列番号53の塩基配列を有する軽鎖CDR3をコードする領域、配列番号55の塩基配列を有する重鎖CDR1をコードする領域、配列番号56の塩基配列を有する重鎖CDR2をコードする領域、及び配列番号57の塩基配列を有する重鎖CDR3をコードする領域から成る群から選択される少なくとも一種の領域を有することが好ましく、より好ましくは2種以上、より好ましくは3種以上、より好ましくは4種以上、より好ましくは5種以上、より好ましくは全ての領域を有する。好適な一実施形態において、キメラ抗原受容体Cをコードするポリヌクレオチドは、配列番号54の塩基配列を有する軽鎖可変領域をコードする領域及び／又は配列番号58の塩基配列を有する重鎖可変領域をコードする領域を有することが好ましい。好適な一実施形態において、キメラ抗原受容体Cをコード

するポリヌクレオチドは、配列番号60の塩基配列を有することが好ましい。
。

[0036] 一実施形態において、キメラ抗原受容体Cをコードするポリヌクレオチドは、配列番号51～60の塩基配列と80%以上、好ましくは85%以上、好ましくは90%以上、好ましくは95%以上、好ましくは98%以上、好ましくは99%以上の同一性を有する塩基配列を有する。

[0037] キメラ抗原受容体Dをコードするポリヌクレオチドは、上述するキメラ抗原受容体Dをコードする限り特に制限されない。一実施形態において、キメラ抗原受容体Dをコードするポリヌクレオチドは、配列番号71の塩基配列を有する軽鎖CDR1をコードする領域、配列番号72の塩基配列を有する軽鎖CDR2をコードする領域、配列番号73の塩基配列を有する軽鎖CDR3をコードする領域、配列番号75の塩基配列を有する重鎖CDR1をコードする領域、配列番号76の塩基配列を有する重鎖CDR2をコードする領域、及び配列番号77の塩基配列を有する重鎖CDR3をコードする領域から成る群から選択される少なくとも一種の領域を有することが好ましく、より好ましくは2種以上、より好ましくは3種以上、より好ましくは4種以上、より好ましくは5種以上、より好ましくは全ての領域を有する。好適な一実施形態において、キメラ抗原受容体Dをコードするポリヌクレオチドは、配列番号74の塩基配列を有する軽鎖可変領域をコードする領域及び／又は配列番号78の塩基配列を有する重鎖可変領域をコードする領域を有することが好ましい。好適な一実施形態において、キメラ抗原受容体Dをコードするポリヌクレオチドは、配列番号80の塩基配列を有することが好ましい。
。

[0038] 一実施形態において、キメラ抗原受容体Dをコードするポリヌクレオチドは、配列番号71～80の塩基配列と80%以上、好ましくは85%以上、好ましくは90%以上、好ましくは95%以上、好ましくは98%以上、好ましくは99%以上の同一性を有する塩基配列を有する。

[0039] キメラ抗原受容体Eをコードするポリヌクレオチドは、上述するキメラ抗

原受容体Eをコードする限り特に制限されない。一実施形態において、キメラ抗原受容体Eをコードするポリヌクレオチドは、配列番号91の塩基配列を有する軽鎖CDR1をコードする領域、配列番号92の塩基配列を有する軽鎖CDR2をコードする領域、配列番号93の塩基配列を有する軽鎖CDR3をコードする領域、配列番号95の塩基配列を有する重鎖CDR1をコードする領域、配列番号96の塩基配列を有する重鎖CDR2をコードする領域、及び配列番号97の塩基配列を有する重鎖CDR3をコードする領域から成る群から選択される少なくとも一種の領域を有することが好ましく、より好ましくは2種以上、より好ましくは3種以上、より好ましくは4種以上、より好ましくは5種以上、より好ましくは全ての領域を有する。好適な一実施形態において、キメラ抗原受容体Eをコードするポリヌクレオチドは、配列番号94の塩基配列を有する軽鎖可変領域をコードする領域及び／又は配列番号98の塩基配列を有する重鎖可変領域をコードする領域を有することが好ましい。好適な一実施形態において、キメラ抗原受容体Eをコードするポリヌクレオチドは、配列番号100の塩基配列を有することが好ましい。

[0040] 一実施形態において、キメラ抗原受容体Eをコードするポリヌクレオチドは、配列番号91～100の塩基配列と80%以上、好ましくは85%以上、好ましくは90%以上、好ましくは95%以上、好ましくは98%以上、好ましくは99%以上の同一性を有する塩基配列を有する。

[0041] キメラ抗原受容体Fをコードするポリヌクレオチドは、上述するキメラ抗原受容体Fをコードする限り特に制限されない。一実施形態において、キメラ抗原受容体Fをコードするポリヌクレオチドは、配列番号111の塩基配列を有する軽鎖CDR1をコードする領域、配列番号112の塩基配列を有する軽鎖CDR2をコードする領域、配列番号113の塩基配列を有する軽鎖CDR3をコードする領域、配列番号115の塩基配列を有する重鎖CDR1をコードする領域、配列番号116の塩基配列を有する重鎖CDR2をコードする領域、及び配列番号117の塩基配列を有する重鎖CDR3をコ

ードする領域から成る群から選択される少なくとも一種の領域を有することが好ましく、より好ましくは2種以上、より好ましくは3種以上、より好ましくは4種以上、より好ましくは5種以上、より好ましくは全ての領域を有する。好適な一実施形態において、キメラ抗原受容体Fをコードするポリヌクレオチドは、配列番号114の塩基配列を有する軽鎖可変領域をコードする領域及び／又は配列番号118の塩基配列を有する重鎖可変領域をコードする領域を有することが好ましい。好適な一実施形態において、キメラ抗原受容体Fをコードするポリヌクレオチドは、配列番号120の塩基配列を有することが好ましい。

[0042] 一実施形態において、キメラ抗原受容体Fをコードするポリヌクレオチドは、配列番号111～120の塩基配列と80%以上、好ましくは85%以上、好ましくは90%以上、好ましくは95%以上、好ましくは98%以上、好ましくは99%以上の同一性を有する塩基配列を有する。

[0043] 塩基配列の同一性は、市販の又は電気通信回線（インターネット）を通じて利用可能な解析ツールを用いて算出することができる。例えば、具体的には、Advanced BLAST 2.1において、プログラムにblastnを用い、各種パラメータはデフォルト値に設定して検索を行うことにより、ヌクレオチド配列の相同性の値（%）を算出することができる。ポリヌクレオチドは、それを発現させるベクター又は細胞の種類に応じてコドン使用頻度が最適化されていてもよい。

[0044] ポリヌクレオチドの状態は特に限定されず、例えば、単離されたものであっても、ベクター内に組み込まれたものであってもよい。ベクターの種類及び用途は特に限定されない。例えば、ベクターは、プラスミドベクター、又はウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、又はレトロウイルス）であり得る。また、ベクターは、例えば、クローニング用ベクター又は発現用ベクターであり得る。発現用ベクターとしては、大腸菌、又は放線菌等の原核細胞用のベクター、或いは、酵母細胞、昆虫細胞、又は哺乳類細胞等の真核細胞用のベクターを挙げることができる。ポリヌクレオチドは、任意の修飾

が施されていてもよく、例えば、5'末端側に適宜シグナルペプチドをコードする塩基配列が付加されていてもよい。

[0045] ポリヌクレオチドは宿主細胞に取り込まれた状態であってもよい。宿主細胞がポリヌクレオチドを含む態様は特に限定されない。例えば、宿主細胞は、ベクターの形態でポリヌクレオチドを有してもよく、宿主細胞内のゲノムDNAにインテグレートされた形態でポリヌクレオチドを有してもよい。宿主細胞の種類は、任意であり特に制限されない。例えば、宿主細胞は、酵母細胞、昆虫細胞、及び哺乳類細胞などの真核細胞、並びに大腸菌、及び放線菌等の原核細胞であり得る。一実施形態において、宿主細胞は真核細胞（例えば、哺乳類、ヒト）であることが好ましく、例えば、T細胞、又はNK細胞等が好ましい。ポリヌクレオチドを含む宿主細胞は、例えば、任意の宿主細胞に該ポリヌクレオチド（例えば、ベクターの形態で）を導入して得ることができる。

[0046] 宿主細胞は、キメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドを発現していても良く、発現していない状態であってもよい。宿主細胞内でキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドが発現している場合、キメラ抗原受容体を構成するscFv領域は細胞の外側に露呈し、膜貫通ドメイン、共刺激因子、及びTCRの細胞内ドメインは細胞膜または細胞内に存在することが好ましい。

[0047] 3. CAR-T細胞

上述のキメラ抗原受容体A～Fのいずれかを発現するT細胞（CAR-T細胞）が提供される。キメラ抗原受容体を発現するT細胞等はscFv領域で抗原を認識した後、その認識シグナルを鎖を通じてT細胞等の内部に伝達する。scFv領域がそのエピトープを認識すると、膜貫通ドメイン、及び共刺激因子を介して細胞内にて細胞傷害活性を惹起させるシグナルを作動させ、これに連動して該細胞が同エピトープを発現する他の細胞または組織に対して攻撃または細胞傷害活性を発揮する。

[0048] このような機能を発揮する細胞がCTLである場合、キメラ抗原受容体T細胞

(CAR-T細胞)と呼ばれる。NK細胞などの細胞傷害活性を発揮する可能性を有する細胞もキメラ抗原受容体T細胞と同様に、scFv領域がそのエピトープと結合することにより、細胞傷害活性を発揮できる。従って、キメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞（特に、細胞傷害活性を有する宿主細胞）は、医薬組成物の有効成分として有用である。キメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞（例えば、CAR-T細胞）は、非特許文献1及び2等に記載される公知の方法を参考にして製造することができる。

[0049] このようなCAR-T細胞等は、癌組織（腫瘍組織）を特異的に認識するため、腫瘍等の治療又は予防に有用である。腫瘍の種類は特に制限されず、固形癌及び血液癌を含む。固形癌としては、例えば、肺癌、大腸癌、卵巣癌、乳癌、脳腫瘍、胃癌、肝癌、舌癌、甲状腺癌、腎臓癌、前立腺癌、子宮癌、骨肉腫、軟骨肉腫、及び横紋筋肉腫を挙げることができる。

[0050] 4. 医薬組成物

上記CAR-T細胞等を含む医薬組成物及びそれを利用した疾患の治療又は予防方法が提供される。医薬組成物中の上記CAR-T細胞の含有量は、対象とする疾患（例えば、固形癌）の種類、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、患者の年齢、及び患者の体重等を考慮して適宜設定することができる。例えば、医薬組成物中の抗体の含量は、医薬組成物全体を100重量部として0.001重量部～10重量部程度をすることができる。医薬組成物中の細胞の含有量は、例えば、1細胞/mL～10⁴細胞/mL程度とすることができる。

[0051] 医薬組成物の投与形態は、所望の効果が得られる限り特に制限されず、経口投与、及び非経口投与（例えば静脈注射、筋肉注射、皮下投与、直腸投与、経皮投与、局所投与）のいずれかの投与経路でヒトを含む哺乳類に投与することができる。有効成分は細胞であるため、好ましい投与形態は非経口投与であり、より好ましくは静脈注射である。経口投与および非経口投与のための剤形およびその製造方法は当業者に周知であり、本発明による抗体又は

細胞を、薬学的に許容される担体等と混合等することにより、常法に従って製造することができる。

[0052] 非経口投与のための剤型は、注射用製剤（例えば、点滴注射剤、静脈注射剤、筋肉注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤）、外用剤（例えば、軟膏剤、パップ剤、ローション剤）、坐剤吸入剤、眼剤、眼軟膏剤、点鼻剤、点耳剤、リポソーム剤等が挙げられる。例えば、注射用製剤は、抗体又は細胞を注射用蒸留水に溶解又は懸濁して調製し、必要に応じて溶解補助剤、緩衝剤、pH調整剤、等張化剤、無痛化剤、保存剤、及び安定化剤等を添加することができる。医薬組成物は、用時調製用の凍結乾燥製剤とすることもできる。

[0053] 医薬組成物は、疾患の治療又は予防に有効な他の薬剤を更に含有してもよい。また、医薬組成物は、必要に応じて殺菌剤、消炎剤、細胞賦活剤、ビタミン類、及びアミノ酸等の成分を配合することもできる。

[0054] 医薬組成物の製剤化に用いる担体には、当該技術分野において通常用いられる賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、矯味矯臭剤や、必要により安定化剤、乳化剤、吸収促進剤、界面活性剤、pH調整剤、防腐剤、抗酸化剤、増量剤、湿潤化剤、表面活性化剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、溶解補助剤、無痛化剤等を用いることができる。

[0055] 医薬組成物を用いて治療又は予防する疾患の種類は、その治療又は予防が達成できる限り特に限定されない。具体的な対象疾患として、例えば、腫瘍が挙げられる。腫瘍の種類は特に制限されず、固形癌及び血液癌を含む。固形癌としては、例えば、肺癌、大腸癌、卵巣癌、乳癌、脳腫瘍、胃癌、肝癌、舌癌、甲状腺癌、腎臓癌、前立腺癌、子宮癌、骨肉腫、軟骨肉腫、及び横紋筋肉腫を挙げることができる。

[0056] 医薬組成物の投与対象（被験体）は、例えば、上記疾患に罹患した動物または罹患する可能性がある動物である。「罹患する可能性がある」とは、例えば、後述する診断方法にて決定することができる。動物とは、例えば、哺乳類動物であり、好ましくはヒトである。

[0057] 医薬組成物の投与量は、例えば、投与経路、疾患の種類、症状の程度、患

者の年齢、性別、体重、疾患の重篤度、薬物動態および毒物学的特徴等の薬理学的知見、薬物送達系の利用の有無、並びに他の薬物の組合せの一部として投与されるか、など様々な因子を元に、臨床医師により決定することができる。医薬組成物の投与量は、例えば、有効成分が抗体である場合、一日当たりで、 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ (体重) $\sim 10\text{g}/\text{kg}$ (体重) 程度とすることができる。また、有効成分が細胞(VI)の場合、 10^4 細胞/kg (体重) $\sim 10^9$ 細胞/kg (体重) 程度とすることができる。医薬組成物の投与スケジュールも、その投与量と同様の要因を勘案して決定することができる。例えば、上記の1日当たりの投与量で、1日 \sim 1月に1回投与することができる。

実施例

[0058] 以下、実施例により本発明についてさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに制限されるものではない。

[0059] 1. pMXs-IG/CAR[hV-(h28)-h28-h3Z]の構築

Human CD3zeta chain cDNA及びHuman CD28 cDNAをOpen Biosystems社より購入し、hCD3zeta STD及びhCD28 HD-hCD28 TMD-hCD28 STDの遺伝子は表2に示すPrimerセット及びKOD Plus (TOYOBO, Inc) を用いて、hCD3zeta STDの5'末端とhCD28 HD-hCD28 TMD-hCD28 STDの3'末端が相同な塩基配列を持つように、それぞれをコードした遺伝子断片を作製した。次に、これらの遺伝子断片とKOD Plusを用いてassembly PCRを行い、上流にSac II、下流にNot Iの制限酵素サイトを有するhCD28 HD-hCD28 TMD-hCD28 STD とCD3zeta STDの遺伝子を連結させた遺伝子断片 (Insert 1) を作製した (図13)。anti-mVEGFR2 scFvを持ちplatelet-derived growth factor receptor (PDGFR) を膜貫通ドメインとするpMXs-IG/anti-mVEGFR2 scFvを、制限酵素Sac IIとNot Iにより切断し、DNA Ligation kit Ver. 2.1 (TAKARA BIO, Inc) を用いたライゲーション反応によりInsert 1を組み込むことでpMXs-IG/CAR[mV-(h28)-h28-h3Z]を構築した。

[0060]

[表2]

Target gene	Primer sequence (5' → 3')
hCD3ζ STD	(Forward) CCGGACTTGGCAGCCCTATCGCTCCACAGTGAGTTCCAGGAGCGGAG (配列番号121) (Reverse) CCAGCCCGCCGUCCTTACCCAGCGGCGCAGGGCCCTGCATG (配列番号122)
hCD28 HD-hCD28 TMD-hCD28 STD	(Forward) CCGGACCTTTCCG444ATGCGCGGGGATTGAAAGTTATGTAATCCCTCCCTTAC (配列番号123) (Reverse) GCGCCGATAGCCTCCGAAAG (配列番号124)
Anti-hVEGFR2 scFv	(Forward) GTACGGCCGACGCCCGGACATGTTCTCACCCAGTCTCCAGC (配列番号125) (Reverse) GACCTGGCAGCGCGCGCTTGTCAJCGTCAJCCCTTGAAGTCTGCTG (配列番号126)
hCD8α HD-hCD8α TMD-hCD137 STD	(Forward) AAACCGCGGAGGCCGACCCGACGAGCCAGCGG (配列番号127) (Reverse) TTTGGGCGCCCTTAGCGAGCGGGGACAGGGCCCT (配列番号128)

[0061] anti-hVEGFR2 scFvの遺伝子配列（配列番号20）を有するpET15b-mouse anti-hVEGFR2-scFv (aV2-95h) に対して、表2に示すPrimerセット及びKOD Plusを用いてPCRを行い、上流にSfi I及び下流にSac IIの制限酵素サイトを持つ遺伝子断片（Insert 2）を得た（図14）。pMXs-IG/CAR[mV-(h28)-h28-h3Z]を、制限酵素Sfi IとSac IIにより切断し、DNA Ligation kit Ver. 2.1を用いたライゲーション反応によりInsert 2を組み込むことでpMXs-IG/CAR[hV-(h28)-h28-h3Z]を構築した。

[0062] 2. pMXs-IG/CAR[hV-(h8 α)-h137-h3Z]の構築

hCD8 α HD及びTMDの遺伝子とCD137 STDの遺伝子を連結させた配列を有するプラスミド pCR4-TOP0/hCD8 α HD-TMD-hCD137-hCD3zetaと表2に示すPrimerセット及びKOD Plusを用いてPCRを行い、上流にSac II及び下流にNot Iの制限酵素サイトを持ち、hCD8 α HD及びTMDとCD137 STDをコードした遺伝子断片（Insert 3）を作製した（図15）。pMXs-IG/CAR[mV-(h28)-h28-h3Z]を制限酵素Sac IIとNot Iにより切断し、DNA Ligation kit Ver. 2.1を用いたライゲーション反応によりInsert 3を組み込むことでpMXs-IG/CAR[mV-(h8 α)-h137-h3Z]を構築した。

[0063] pMXs-IG/CAR[hV-(h28)-h28-h3Z]を制限酵素EcoR IとSac IIにより切断し、anti-hVEGFR2 scFvの遺伝子配列（配列番号20）を有する遺伝子断片（Insert 4）を得た（図16）。pMXs-IG/CAR[mV-(h8 α)-h137-h3Z]を制限酵素EcoR IとSac IIにより切断し、DNA Ligation kit Ver. 2.1を用いたライゲーション反応によりInsert 4を組み込むことでpMXs-IG/CAR[hV-(h8 α)-h137-h3Z]を構築した。

[0064] 図17に示すCAR[mV-(m28)-m28-m3Z]、CAR[mV-(h28)-h28-h3Z]、CAR[hV-(h28)-h28-h3Z]、CAR[mV-(h8 α)-h137-h3Z]、CAR[hV-(h8 α)-h137-h3Z]の遺伝子をコードしたプラスミドから表2に示すプライマー及びDNAポリメラーゼKOD plus (Toyobo, Inc) を用いてPCRを行い、T7 promoter sequence及びCAR遺伝子を含むDNA鋳型を作製し、mMESSAGE mMACHINE(R) T7 ULTRA Transcription Kit (Ambion, Inc) を用いて常法に従いmRNAを精製し、Nuclease Free Wat

er (Ambion, Inc) で懸濁後、 -20°C で保管した。このようにしてCAR-mRNAを得た。

[0065] 3. CAR-mRNAの導入

CD8+ T細胞をOpti-MEM (Life Technology, Inc) により懸濁、遠心、上清除去の操作を3回行い、血清に含有される蛋白等を完全に除去し、Opti-MEMを用いて 5.7×10^6 - 5.7×10^7 cells/mLに懸濁した。また、80 pg-4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ のCAR-mRNAを含んだNuclease Free Water 25 μL と細胞懸濁液175 μL を混合させ、エレクトロポレーションを行う直前に4 mmキュベット (BEX, Inc) へ200 μL を気泡が入らないように充填した。キュベット電極用チャンバー (CU500; Nepagene, Inc) へキュベットを差し込み、エレクトロポレーター (CUY21Pro-Vitro; Nepagene, Inc) を用いて電気抵抗を測定し異常がない事を確認した後、EPを行い、3時間後、6時間後、12時間後、24時間後、36時間後、48時間後、72時間後にFCMによってCAR発現強度を測定し、トリパンブルー色素排除法によって細胞生存率を測定した。

[0066] 4. in vivo 抗腫瘍効果

メラノーマB16BL6細胞 3×10^5 個をC57BL/6マウスの腹部皮内に移植し、腫瘍接種から7日後に腫瘍の長径が5.0~6.0 mm程度に達した時点で、CAR[mV-(m28)-m28-m3Z]を発現したマウスCAR-T細胞を 5×10^6 cells/500 $\mu\text{L}/\text{mouse}$ で単回投与、または2日おきに計2回の追加投与を行い、その後の経時的な腫瘍の長径及び短径を測定し、以下に示す式に従って腫瘍体積を算出した。また、無処置群とCAR-mRNAを導入していないCD8+ T細胞を投与する群を作製し、コントロールとした。マウスCAR-T細胞はRPMI1640に懸濁し投与した。腫瘍体積 (mm^3) = (腫瘍長径; mm) \times (腫瘍短径; mm) $^2 \times 0.5236$

[0067] 試験結果を図18に示す。CAR-T細胞を単回投与された担癌マウスでは、コントロール群と比較して有意に腫瘍の増殖が抑制され、さらに2回の追加投与を行うとより強い抗腫瘍効果が得られた。したがって、我々が作製したCAR-T細胞はCARの発現が一過性であるものの、単回投与するだけで有効性を発揮し、さらに複数回投与すれば十分に効果を示す細胞医薬になり得る可能性が

示唆された。

請求の範囲

- [請求項1] 下記のいずれかのキメラ抗原受容体A～Fから成る群より選択されるキメラ抗原受容体：配列番号1のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、
配列番号2のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、及び
配列番号3のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3、
、
を含む重鎖可変領域、並びに／或いは
配列番号5のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、
、
配列番号6のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、及び
配列番号7のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖CDR3、
、
を含む軽鎖可変領域、
を含む、キメラ抗原受容体A；
配列番号21のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、
配列番号22のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、及び
配列番号23のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3、
、
を含む重鎖可変領域、並びに／或いは
配列番号25のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、
配列番号26のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、及び

配列番号 27 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖 CDR 3、
を含む軽鎖可変領域、
を含む、キメラ抗原受容体 B ;
配列番号 41 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR 1、
配列番号 42 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR 2、及び
配列番号 43 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR 3、
を含む重鎖可変領域、並びに／或いは
配列番号 45 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖 CDR 1、
配列番号 46 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖 CDR 2、及び
配列番号 47 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖 CDR 3、
を含む軽鎖可変領域、
を含む、キメラ抗原受容体 C ;
配列番号 61 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR 1、
配列番号 62 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR 2、及び
配列番号 63 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR 3、
を含む重鎖可変領域、並びに／或いは
配列番号 65 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖 CDR 1、

配列番号 66 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖 CDR 2、及び

配列番号 67 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖 CDR 3、

を含む軽鎖可変領域、

を含む、キメラ抗原受容体 D；

配列番号 81 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR 1、

配列番号 82 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR 2、及び

配列番号 83 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR 3、

を含む重鎖可変領域、並びに／或いは

配列番号 85 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖 CDR 1、

配列番号 86 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖 CDR 2、及び

配列番号 87 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖 CDR 3、

を含む軽鎖可変領域、

を含む、キメラ抗原受容体 E；又は

配列番号 101 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR 1、

配列番号 102 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR 2、及び

配列番号 103 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR 3、

を含む重鎖可変領域、並びに／或いは

配列番号 105 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖 CD R 1、
配列番号 106 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖 CD R 2、及び
配列番号 107 のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖 CD R 3、
を含む軽鎖可変領域、
を含む、キメラ抗原受容体 F。

- [請求項2] 請求項 1 に記載のキメラ抗原受容体 A。
- [請求項3] 請求項 1 又は 2 に記載のキメラ抗原受容体を有するキメラ抗原受容体 T 細胞又はキメラ抗原受容体 NK 細胞。
- [請求項4] 請求項 1 又は 2 に記載のキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド。
- [請求項5] 請求項 3 に記載のキメラ抗原受容体 T 細胞若しくはキメラ抗原受容体 NK 細胞を含む医薬組成物。
- [請求項6] 癌の治療又は予防用である、請求項 5 に記載の医薬組成物。

[図1]

①Aka

DIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTC**SASSSVS** YMHWYQOKSG TSPKRWIYDT 50
CDR1
SKLASGVPAR FSGSGSGTSY SLTISSMEAE DAATYYC**QQW** **SSNPLT**FGAG 100
CDR2 CDR3
 TKLEIKRGGG GSGGGGSGGG GSQVQLQQSG AVLVRPGTSV KVSCKAS**GYA** 150
 FTN**FLIE**WVK QRPQGLEWI GVINPGNGVT NYNEK**FKG**KA TLTADKSSST 200
CDR1 CDR2
 AYMQLSLTS DDSAVYFCAR **SVLR**SFDYWG QGTTTLTVSSA AAHHHHHHHDY 250
CDR3
 KDDDDK__ (配列番号 1 0)

[図2]

②Akb

DIVMTQSPAT LSVTPGDRVS LSC**RASQ**NIS AYLHWYQOKS HESPRLLIKY 50
CDR1
ASQSISGIPS RFGSGSGSA FTLSINSVEP EDVGVYYC**QN** **GHSFPY**TFGG 100
CDR2 CDR3
 GTKLEIKRGG GSGGGGSGG GGSEVKLVQS GAELVRPGTS VKLSCKAS**GY** 150
 T**FTSY**WMHWV KQRPQGLEW IGAIY**PGNSD** **TSYNQ**KFKGK AKLTAVTSAS 200
CDR1 CDR2
 TAYMELSLT NEDSAVYYCT **REW**DYYAMDY WGQGTSVTVS s (配列番号 3 0)
CDR3

[図3]

③AKc

DIVMTQSQKF MSTSVGDRVS VT**CKASQ**NVG TNVAWYQOKP GQSPKALIYS 50
CDR1
ASYRYSGVPD RFTGSGSGTD FTLTISNVQS EDLAEYFC**QQ** **YNSYPW**TFGG 100
CDR2 CDR3
 GTKLELKRGG GSGGGGSGG GGSQVQVVES GGGLVKPGGS LKLSCAAS**GF** 150
 T**FSSY**AMSWV ROTPEKRLEW VATISSGGSY **TYYP**DSVKGR FTISRDN **AKN** 200
CDR1 CDR2
 TLYLQMSSLR SEDTAMYYCA **RQRR**DGSIWY FDVWGAGTTV TVSS (配列番号 5 0)
CDR3

[図4]

④ARa

DIVMTQSPAI MSASPGEKVT MTC**SASSSVS** YMHWYQQKSG TSPKRWIYDT 50

CDR1

SKLASGVPAR FSGSGSGTSY SLTISSMEAE DAATYYC**QQW** **SSNPPT**FGGG 100

CDR2

CDR3

TKLELKRGGG GSGGGGSGGG GSEVQLVESG GGLVKPGGSL KLSCAAS**GFT** 150

FSSYAMSWVR QTPEKRLEWV ATISSGGSYT YYPDSVKGRF TISRDNAKNT 200

CDR1

CDR2

LYLQMSLLRS EDTAMYYCAR **NDYGYDFDY**W GQGTTLTVSS (配列番号70)

CDR3

[図5]

⑤ARb

DIVMTQSPAI MSASPGEKVT ITC**SASSSVS** YMHWFQQKSG TSPKLWIYST 50

CDR1

SNLASGVPAR FSGSGSGTSY SLTISSMEAE DAATYYC**QQW** **SSNPPT**FGGG 100

CDR2

CDR3

TKLELKRGGG GSGGGGSGGG GSEVQLVESG GGLVKPGGSL KLSCAAS**GFT** 150

FSSYAMSWVR QTPEKRLEWV ATISSGGSYT YYPDSVKGRF TISRDNAKNN 200

CDR1

CDR2

LYLQMSLLKS EDTAMYYCAR **DSHYRSRGYY** FDYWGQGTTL TVSS (配列番号90)

CDR3

[図6]

⑥Arc

DIQMTQSHKF MSTSVGDRVS ITC**KASQDVG** TAVAWYQQKP GQSPKLLIYW 50

CDR1

ASTRHTGVPD RFTGSGSGTD FTLTISNVQS EDLADYFC**QQ** YSSYPYTFGG 100

CDR2

CDR3

GTKLELKRGG GSGGGGSGGG GGSQVQLQQS GAELVRPGTS VKISCKAS**GY** 150

TFTNYWLGWV KQRPBGLEW IGDYIPGGGY TNYNEKFKGK ATLTADTSSS 200

CDR1

CDR2

TAYMQLSSLT SEDSAVYFCA REGLRRGDYW GQGTTVTVSS (配列番号110)

CDR3

[図7]

AKa (anti-KDR_a)

1 GACATTG TTCACCCAGTC TCCAGCAATC ATGTCTGCAT CTCCAGGGGA
 51 GAAGGTCACC ATGACCTGCA GTGCCAGCTC **AAGTGTAAGT TACATGC**ACT
 101 GGTACCAGCA GAAGTCAGGC ACCTCCCCCA AAAGATGGAT ^{CDR-L1}TTAT**GACACA**
 151 **TCCA**ACTGG CTTCTGGAGT CCCTGCTCGC TTCAGTGGCA GTGGGTCTGG
 201 ^{CDR-L2}GACCTCTTAC TCTCTCACAA TCAGCAGCAT GGAGGCTGAA GATGCTGCCA
 251 CTTATTACTG **CCAGCAGTGG AGTAGTAACC CGCTCAC**GTT CGGTGCTGGG
 301 ACCAAGCTGG AAATAAAACG ^{CDR-L3}GGTGGTGGT GGATCCGGCG GCGGCGGCTC
 351 CGGTGGTGGT GGTTCACAGG TTCAACTGCA GCAGTCTGGA GCTGTTCTGG
 401 TAAGGCCTGG GACTTCAGTG AAGGTGTCCT GCAAGGCTTC **TGGATACGCC**
 451 **TTCACTAATT TCTTGATAGA GTGGGTAAAG CAGAGGCCTG GACAGGGCCT**
 501 TGAGTGGATT ^{CDR-H1}GGAGTGATTA ATCCTGGAAA TGGTGTACT **AACTACAATG**
 551 **AGAAGTTCAA GGGCAAGGCA ACACTGACTG ^{CDR-H2}CAGACAAATC CTCCAGCACT**
 601 GCCTACATGC AGCTCAGCAG CCTGACATCT GATGACTCTG CGGTCTATTT
 651 CTGTGCAAGA **TCGGTCCTAC GGTCCTTTGA CTACTGGGGC CAAGGCACCA**
 701 CTCTCACAGT CTCCTCAGCG ^{CDR-H3}GCCGCACACC ACCACCACCA CCACGACTAC
 751 AAGGATGACG ATGACAAG (配列番号 2 0)

[図8]

AKb (anti-KDR_b)

1 GACATCGTGA TGACCCAGAG CCCTGCCACC CTGAGCGTGA CCCCTGGCGA
 51 TAGAGTGTCC CTGAGCTGCA **GAGCCAGCCA GAACATCAGC GCCTACCTGC**
 101 ACTGGTATCA GCAGAAGTCC CACGAGAGCC ^{CDR-L1}CCAGACTGCT GATTAAGT**ACT**
 151 **GCCTCCAGA GCATCTCCGG CATCCCCAGC AGATTTTCCG GCTCTGGCAG**
 201 ^{CDR-L2}CGGCAGCGCC TTCACCCTGT CCATCAACAG CGTGGAACCC GAGGACGTGG
 251 GCGTGTACTA CTGCC**AGAAC GGCCACAGCT TCCCTTACAC CTT**CGGCGGA
 301 GGCACCAAGC TGGAAATCAA ^{CDR-L3}GAGAGGCGGC GGAGGATCTG GCGGAGGCGG
 351 AAGTGGCGGA GGGGATCTG **AAGTGAAGCT GGTGCAGTCT GGC**CGCGAGC
 401 TCGTGCGGCC TGGAAACAAGC GTGAAGCTGT CCTGCAAGGC CAGC**GGCTAC**
 451 **ACCTTACCA GCTACTGGAT GCAC**TGGGTC AAGCAGAGGC CAGGCCAGGG
 501 CCTGGAAATGG ^{CDR-H1}ATCGGCGCCA TCTACCCCGG CAACAGCGAC ACCTCCTACA
 551 **ACCAGAAGTT CAAGGGCAAG GCCAAGCTGA ^{CDR-H2}CCGCCGTGAC CTCTGCCAGC**
 601 ACCGCCTACA TGGAACTGAG CAGCCTGACC AACGAGGACA GCGCCGTGTA
 651 CTATTGCACC AGAGAGTGGG **ACTACTACGC CATGGACTAC TGGGGCCAGG**
 701 GCACCAGCGT GACCGTGTCA ^{CDR-H3}TCT (配列番号 4 0)

[図9]

AKc (anti-KDR_c)

1 GACATCGTGA TGACCCAGAG CCAGAAATTC ATGAGCACCA GCGTGGGCGA
 51 CCGGGTGTCC GTGACATGTA AAGCCAGCCA GAACGTGGGC ACCAACGTGG
 101 CCTGGTATCA GCAGAAGCCT GGCCAGAGCC^{CDR-L1} CCAAGGCCCT GATCTACAGC
 151 GCCAGCTACA GATACAGCGG CGTGCCCCGAC AGATTCACCG GCAGCGGCTC
 201 TGGCACCGAC TTCACCCTGA CCATCAGCAA CGTGCAGAGC GAGGACCTGG^{CDR-L2}
 251 CCGAGTACTT CTGCCAGCAG TACAACAGCT ACCCCTGGAC CTTGCGCGGA
 301 GGACCAAGC TGGAAGTCAA^{CDR-L3} GAGAGGCGGC GGAGGATCTG GCGGAGGCGG
 351 AAGTGGCGGA GGGGATCTC AGGTGCAGGT GGTGGAATCA GGGGCGGAC
 401 TCGTGAAACC TGGCGGCAGC CTGAAGCTGA GCTGTGCCGC CAGCGGCTTC
 451 ACCTTCAGCA GCTACGCCAT GAGCTGGGTG CGCCAGACCC CCGAGAAGAG
 501 ACTGGAATGG GTGGCCACAA TCAGCAGCGG CGGCAGCTAC ACCTACTACC^{CDR-H1}
 551 CCGATAGCGT GAAGGGCCGG TTCACCATCT^{CDR-H2} CCCGGGACAA CGCCAAGAAC
 601 ACCCTGTACC TGCAGATGAG CAGCCTGAGA AGCGAGGACA CCGCCATGTA
 651 CTACTGCGCC AGGCAGAGAA GGGACGGCAG CATCTGGTAC TTCGACGTGT
 701 GGGAGCCGG CACCACCGTG ACAGTGT^{CDR-H3} CT (配列番号60)

[図10]

AR4a (anti-ROBO4_a)

1 GATATTGTGA TGACCCAGTC TCCAGCAATC ATGTCTGCAT CTCCAGGGGA
 51 GAAGGTCACC ATGACCTGCA^{CDR-L1} GTGCCAGCTC AAGTGTAAGT TACATGCACT
 101 GGTACCAGCA GAAGTCAGGC ACCTCCCCCA AAAGATGGAT TTATGACACA
 151 TCCAAACTGG CTTCTGGAGT CCCTGCTCGC TTCAGTGGCA GTGGGTCTGG
 201 GACCTCTTAC TCTCTCACAA TCAGCAGCAT GGAGGCTGAA GATGCTGCCA^{CDR-L2}
 251 CTTATTACTG CCAGCAGTGG AGTAGTAACC CACCCACGTT CGGAGGGGGG
 301 ACCAAGCTGG AGCTGAAACG^{CDR-L3} GGTGGTGGT GGTAGCGGCG GCGGCGGCTC
 351 TGGTGGTGGT GGATCCGAAG TGCAACTGGT GGAGTCTGGG GGAGGCTTAG
 401 TGAAGCCTGG AGGGTCCCTG AAACCTCTCCT GTGCAGCCTC TGGATTCACT
 451 TTCAGTAGCT ATGCCATGTC TTGGGTTCGC CAGACTCCGG AGAAGAGGCT
 501 GGAGTGGGTC GCA^{CDR-H1} ACCATTA GTAGTGGTGG TAGTTACACC TACTATCCAG
 551 ACAGTGTGAA GGGGCGATTC ACCATCTCCA^{CDR-H2} GAGACAATGC CAAGAACACC
 601 CTGTACCTGC AAATGAGCAG TCTGAGGTCT GAGGACACGG CCATGTATTA
 651 CTGTGCAAGA AACGACTATG GCTACGACTT TGACTACTGG GGCCAAGGCA
 701 CCACTCTCAC AGTCTCCTC^{CDR-H3} (配列番号80)

[図11]

AR4b (anti-ROBO4_b)

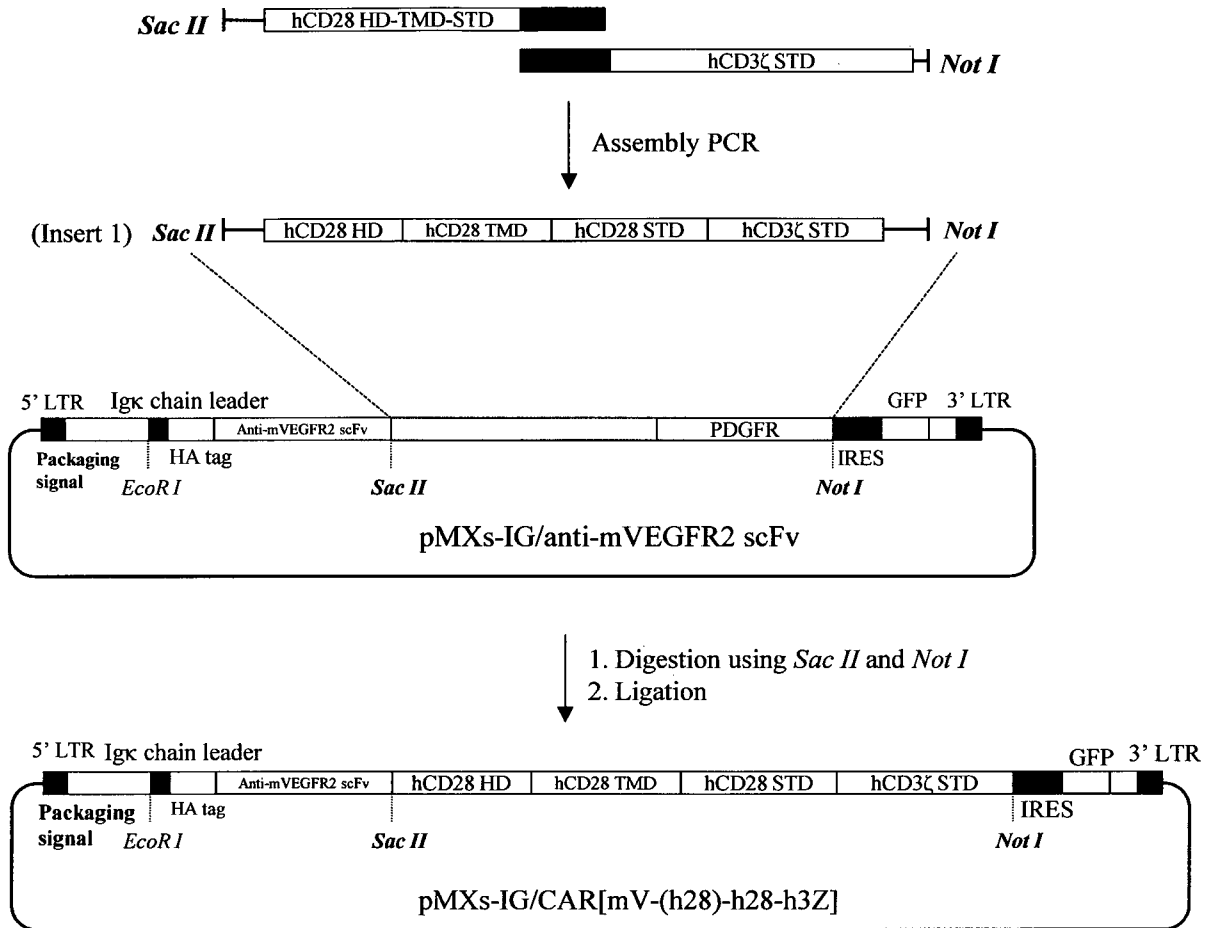
1 GACATCGTGA TGACCCAGAG CCCC GCCATC ATGTCTGCCA GCCCTGGCGA
 51 GAAAGTGACC ATCACCTGTA **GCGCCAGCAG CAGCGTGTCC TACATGCACT**
 101 GGTTCAGCA GAAGTCCGGC ACCAGCCCCA^{CDR-L1} AGCTGTGGAT CTAC**AGCACC**
 151 **AGCAACCTGG CCAGC**GGCGT GCCAGCCAGA TTTTCTGGCA GCGGCTCTGG
 201 ^{CDR-L2}CACCAGCTAC AGCCTGACCA TCAGCAGCAT GGAAGCCGAG GACGCCGCCA
 251 CCTACTACTG **CCAGCAGTGG TCCAGCAACC CCCCCACATT** TGGCGGAGGC
 301 ACCAAGCTGG ^{CDR-L3}AACTGAAGAG AGGCGGCGGA GGAAGCCGAG GCGGAGGATC
 351 TGGCGGAGGG GGATCTGAAG TGCAGCTGGT GGAATCTGGC GGCGGACTCG
 401 TGAAGCCTGG CGGCTCTCTG AAGCTGAGCT GTGCCGCCAG **CGGCTTCACC**
 451 **TTCAGCAGCT ACGCCATGAG CTGGGTGCGC CAGACCCCCG** AGAAGAGACT
 501 ^{CDR-H1}GGAATGGGTG GCC**ACAATCA GCAGCGGCGG CAGCTACACC TACTATCCCC**
 551 **ACAGCGTGAA GGGC**^{CDR-H2}CGGTTT ACCATCTCCC GGGACAACGC CAAGAACAAC
 601 CTGTACCTGC AGATGAGCAG CCTGAAGTCC GAGGATACCG CCATGTACTA
 651 TTGCGCCAGA **GACAGCCACT ACAGAAGCCG GGGCTACTAC TTCGACTACT**
 701 GGGGCCAGGG CACCACCCTG ^{CDR-H3}ACCGTGTTCAT CT (配列番号100)

[図12]

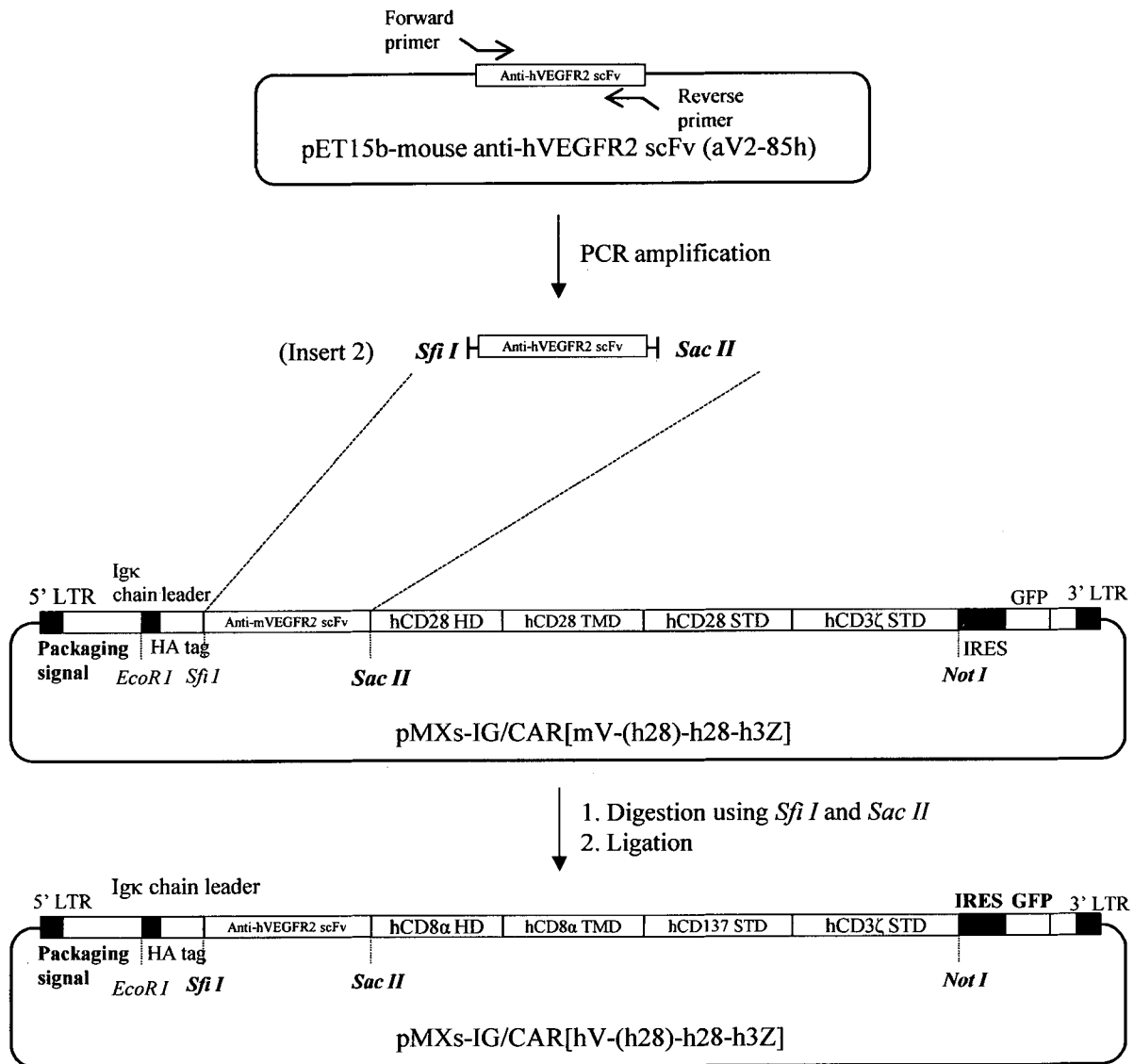
AR4c (anti-ROBO4_c)

1 GACATTCAGA TGACACAGTC TCACAAATTC ATGTCCACAT CAGTAGGAGA
 51 CAGGGTCAGC ATCACCTGCA **AGGCCAGTCA GGATGTGGGT ACTGCTGTAG**
 101 **CTGGTATCA ACAGAAACCA GGGCAATCTC^{CDR-L1} CTAAACTACT GATTTACTGG**
 151 **GCATCCACCC GGCACACTGG** AGTCCCTGAT CGCTTCACAG GCAGTGGATC
 201 ^{CDR-L2}TGGGACAGAT TTTACTCTCA CCATTAGCAA TGTGCAGTCT GAAGACTTGG
 251 CAGATTATTT CTGT**CAGCAA TATAGCAGCT ATCCGTACAC** GTTCGGAGGG
 301 GGGACCAAGC TGGAGCTGAA ^{CDR-L3}ACGGGGTGGT GGTGGTAGCG GCGGCGGCGG
 351 CTCTGGTGGT GGTGGATCCC AGGTTCAACT TCAGCAGTCT GGAGCTGAGC
 401 TGGTAAGGCC TGGGACTTCA GTGAAGATAT CCTGCAAGGC TTCT**GGCTAC**
 451 **ACCTTCACTA ACTACTGGCT AGGT**TGGGTA AAGCAGAGGC CTGGACATGG
 501 ^{CDR-H1}ACTTGAGTGG ATTGGAGATA **TTTACCCTGG AGGTGGTTAT ACTAACTACA**
 551 **ATGAGAAGTT CAAGGGCAAG** ^{CDR-H2}GCCACACTGA CTGCAGACAC ATCCTCCAGC
 601 ACTGCCTACA TGCAGCTCAG TAGCCTGACA TCTGAGGACT CTGCTGTCTA
 651 TTTCTGTGCA AGAGAGGGGT **TACGACGGGG TGACTIONTGG** GGCCAAGGCA
 701 CCACAGTCAC CGTCTCCTCA^{CDR-H3} (配列番号120)

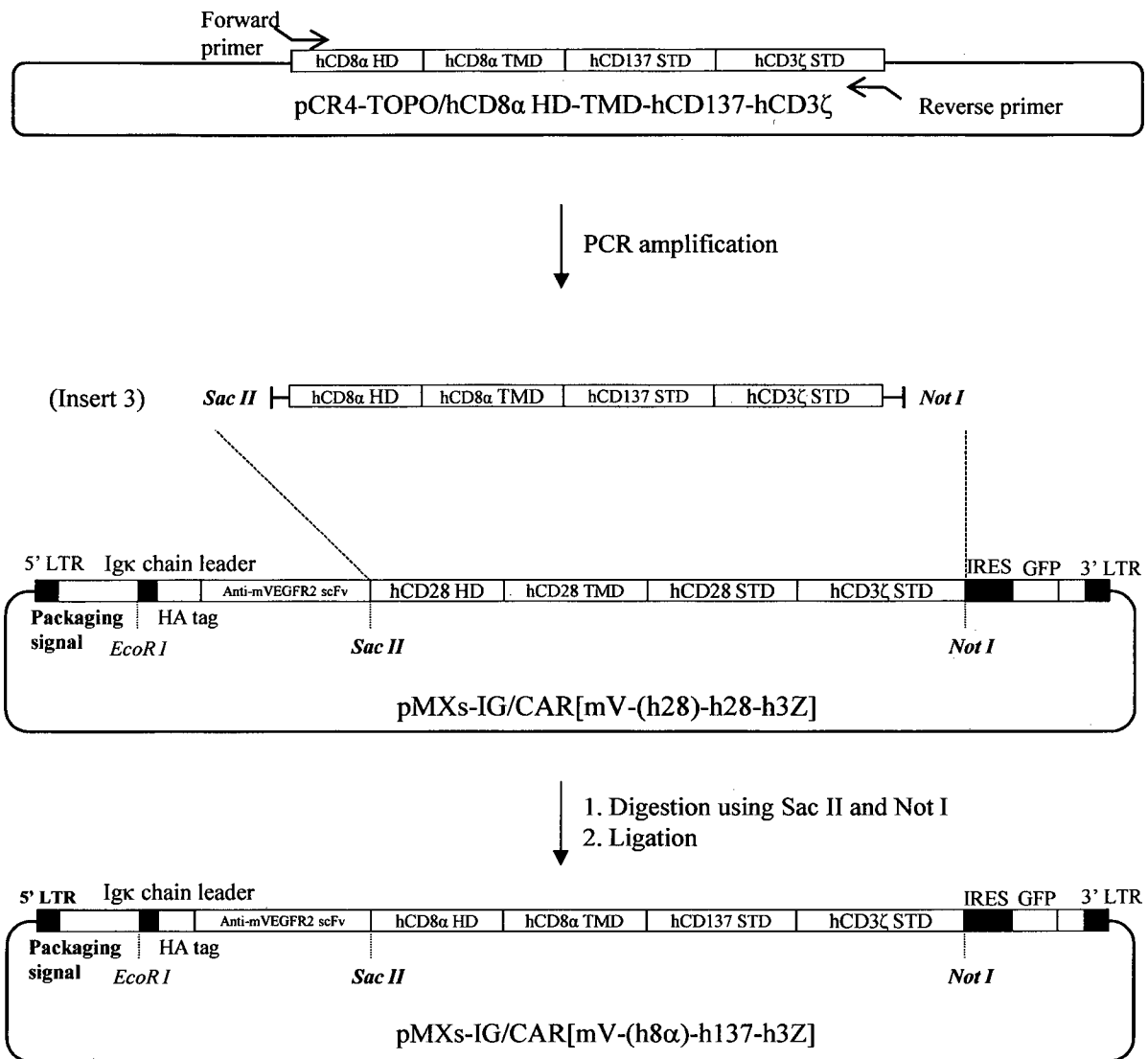
[図13]



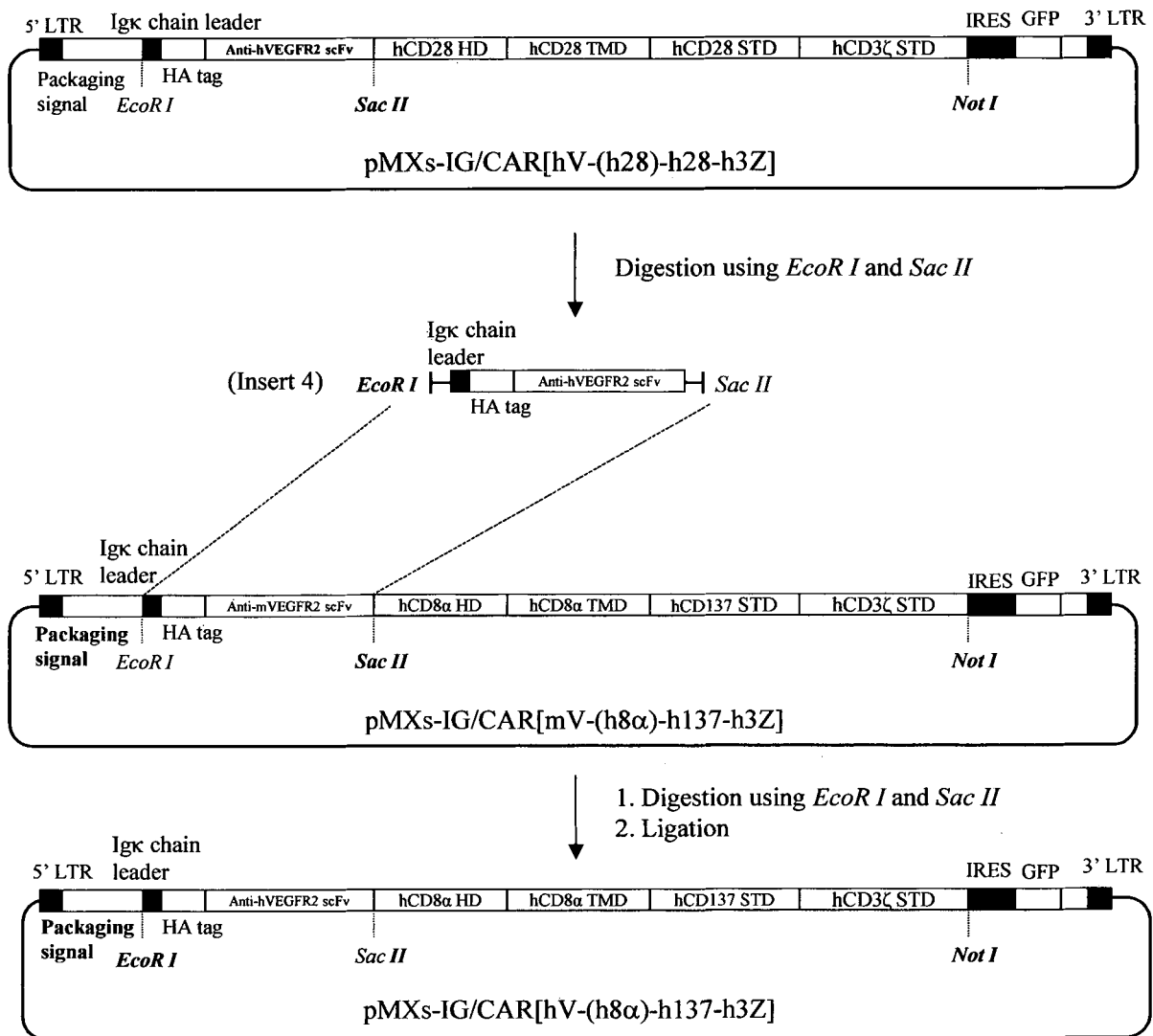
[図14]



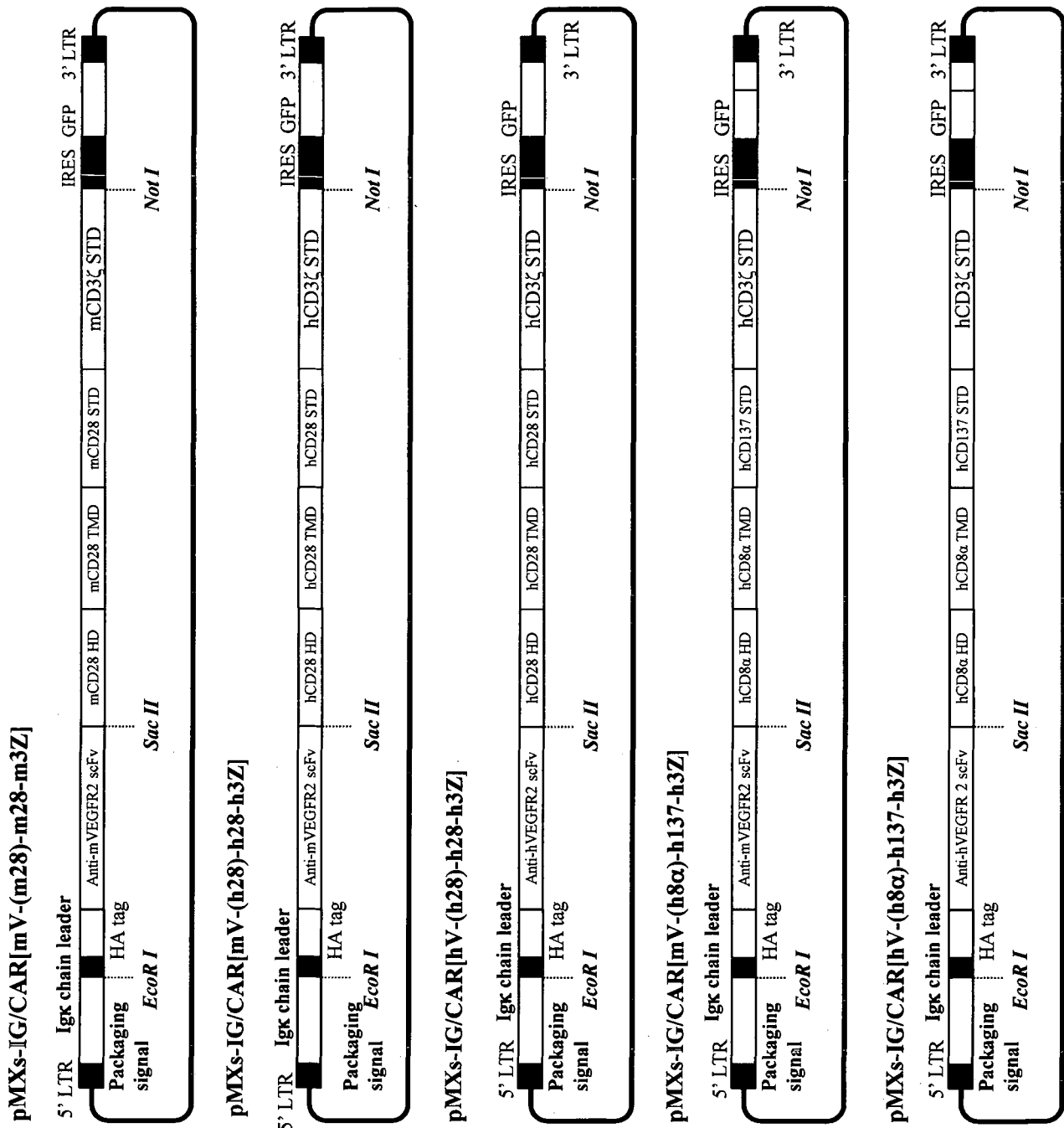
[図15]



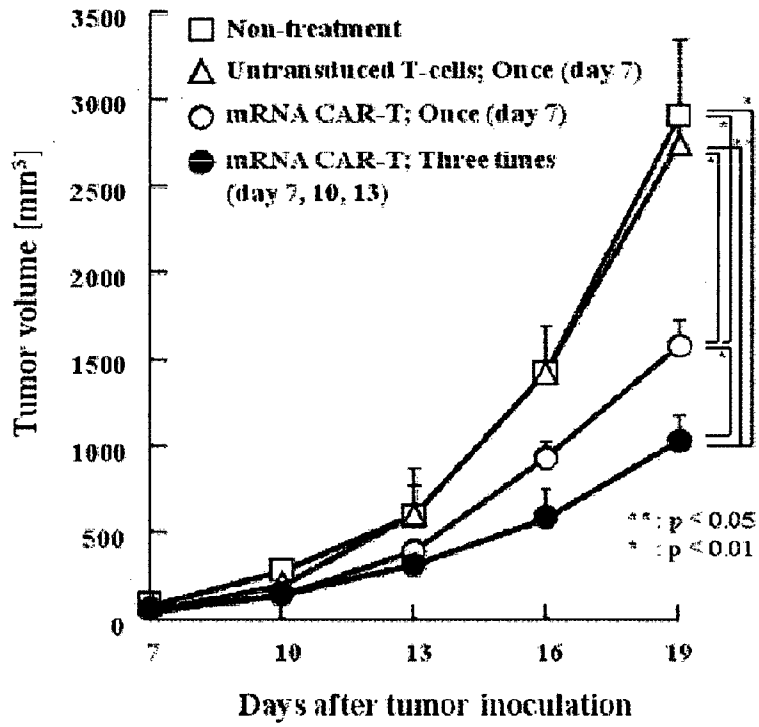
[図16]



[図17]



[図18]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/017456

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, A61K35/17(2015.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12N5/16(2006.01)i, C07K16/00(2006.01)n

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)

C12N15/09, A61K35/17, A61P35/00, C07K19/00, C12N5/16, C07K16/00

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KANAGAWA, N. et al., Tumor vessel-injuring ability improves antitumor effect of cytotoxic T lymphocytes in adoptive immunotherapy, Cancer Gene Therapy, 2013, Vol.20, pp.57-64, ISSN: 0929-1903, particularly, Abstract, Figure 1, p.58, left column, 2nd paragraph	1-6
Y		1-6
Y	JP 2013-506419 A (The United States of America), 28 February 2013 (28.02.2013), claims; examples 1 to 5, 10, 20 & WO 2011/041093 A1 claims; examples 1 to 5, 10, 20 & US 2012/0213783 A1 & EP 2483301 A1	1-6

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
19 July 2017 (19.07.17)

Date of mailing of the international search report
01 August 2017 (01.08.17)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/017456

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHINNASAMY, D. et al., Gene therapy using genetically modified lymphocytes targeting VEGFR-2 inhibits the growth of vascularized syngenic tumors in mice, The Journal of Clinical Investigation, 2010, Vol.120, No.11, pp.3953-3968, ISSN: 1558-8238, particularly, Abstract, p.3954, left column, l.13-26, p. 3958, left column, l.17 to right column, l.12, Figure 3-5	1-6
Y	KANAGAWA, N. et al., Tumor-targeting CTL expressing a single-chain Fv specific for VEGFR2, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010, Vol.394, pp.54-58, ISSN: 0006-291X, particularly, Abstract, p.55, left column, l.46 to right column, l.14	1-6
Y	YOSHIKAWA, M. et al., Robo4 is and effective tumor endothelial marker for antibody-drug conjugates based on the rapid isolation of the anti-Robo4 cell-internalizing antibody, BLOOD, 2013, Vol.121, No.14, pp.2804-2813, ISSN: 1528-0020, particularly, Abstract, Figure 2, 4-5, Table.1	1-6
P,X	INOO, K. et al., Immunological quality and performance of tumor vessel-targeting CAR-T cells prepared by mRNA-EP for clinical research, Molecular Therapy - Oncolytics, 2016.11, Vol. 3, #16024, ISSN: 2372-7705, particularly, p. 10, right column, l.1-17	1-6
P,X	CAWKWELL, L. et al., Engineering T cells for cancer therapy by expressing a chimeric antigen receptor (CAR) targeting the tumour endothelial marker ROBO4, Eur. J. Immunol., 2016.08, Vol.46, No.Suppl.1, pp.124-125, #15, ISSN: 1521-4141, Whole Document	1-6
A	Yozo NAKAZAWA, "Gene-modified T-cell Therapy Using Chimeric Antigen Receptor", The Shinshu Medical Journal, 2013, vol.61, no.4, pages 197 to 203, ISSN:1884-6580, entire text	1-6

With respect to the chimeric antigen receptor described in claim 1, there are found the wordings "a heavy-chain variable region containing light-chain CDR1 ..." and "a light-chain variable region containing heavy-chain CDR1 ...". From these wordings, the chimeric antigen receptor is unclear from the technical viewpoint as to what type of a heavy-chain variable region and what type of a light-chain variable region are contained therein.

However, in light of the statements in the description and drawings (particularly see "table 1"), it can be assumed on the reasonable basis that the above-mentioned wordings should be corrected to the wordings "a light-chain variable region containing light-chain CDR1 ..." and "a heavy-chain variable region containing a heavy-chain CDR1 ...", respectively. Therefore, the above-mentioned claims are not excluded from the claims to be examined.

This opinion may be also applied to claims 2-6 referring to claim 1.

The examiner has carried out search/examination with respect to said claims on the basis of claims 1-6 after such an expectable amendment.

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K35/17(2015.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12N5/16(2006.01)i, C07K16/00(2006.01)n</p>														
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12N15/09, A61K35/17, A61P35/00, C07K19/00, C12N5/16, C07K16/00</p>														
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2017年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2017年	日本国実用新案登録公報	1996-2017年	日本国登録実用新案公報	1994-2017年			
日本国実用新案公報	1922-1996年													
日本国公開実用新案公報	1971-2017年													
日本国実用新案登録公報	1996-2017年													
日本国登録実用新案公報	1994-2017年													
<p>国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq</p>														
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td rowspan="2">KANAGAWA, N. et al., Tumor vessel-injuring ability improves antitumor effect of cytotoxic T lymphocytes in adoptive immunotherapy, Cancer Gene Therapy, 2013, Vol.20, pp.57-64, ISSN: 0929-1903, 特に Abstract, Figure 1, p.58 左欄第2段落</td> <td>1-6</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>1-6</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>JP 2013-506419 A (アメリカ合衆国) 2013.02.28, 特許請求の範囲、実施例1-5、実施例10、実施例20 & WO 2011/041093 A1 Claims, Examples 1-5, 10, 20 & US 2012/0213783 A1 & EP 2483301 A1</td> <td>1-6</td> </tr> </tbody> </table>				引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	X	KANAGAWA, N. et al., Tumor vessel-injuring ability improves antitumor effect of cytotoxic T lymphocytes in adoptive immunotherapy, Cancer Gene Therapy, 2013, Vol.20, pp.57-64, ISSN: 0929-1903, 特に Abstract, Figure 1, p.58 左欄第2段落	1-6	Y	1-6	Y	JP 2013-506419 A (アメリカ合衆国) 2013.02.28, 特許請求の範囲、実施例1-5、実施例10、実施例20 & WO 2011/041093 A1 Claims, Examples 1-5, 10, 20 & US 2012/0213783 A1 & EP 2483301 A1	1-6
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号												
X	KANAGAWA, N. et al., Tumor vessel-injuring ability improves antitumor effect of cytotoxic T lymphocytes in adoptive immunotherapy, Cancer Gene Therapy, 2013, Vol.20, pp.57-64, ISSN: 0929-1903, 特に Abstract, Figure 1, p.58 左欄第2段落	1-6												
Y		1-6												
Y	JP 2013-506419 A (アメリカ合衆国) 2013.02.28, 特許請求の範囲、実施例1-5、実施例10、実施例20 & WO 2011/041093 A1 Claims, Examples 1-5, 10, 20 & US 2012/0213783 A1 & EP 2483301 A1	1-6												
<p>☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。</p>		<p>☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>												
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>		<p>の日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&」 同一パテントファミリー文献</p>												
<p>国際調査を完了した日</p> <p>19.07.2017</p>		<p>国際調査報告の発送日</p> <p>01.08.2017</p>												
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/J P)</p> <p>郵便番号100-8915</p> <p>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>		<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p>藤井 美穂</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3488</p>												
		4N	4434											

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	CHINNASAMY, D. et al., Gene therapy using genetically modified lymphocytes targeting VEGFR-2 inhibits the growth of vascularized syngenic tumors in mice, The Journal of Clinical Investigation, 2010, Vol.120, No.11, pp.3953-3968, ISSN: 1558-8238, 特に Abstract, p.3954 左欄 1.13-26, p.3958 左欄 1.17-右欄 1.12, Figure 3-5	1-6
Y	KANAGAWA, N. et al., Tumor-targeting CTL expressing a single-chain Fv specific for VEGFR2, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010, Vol.394, pp.54-58, ISSN: 0006-291X, 特に Abstract, p.55 左欄 1.46-右欄 1.14	1-6
Y	YOSHIKAWA, M. et al., Robo4 is an effective tumor endothelial marker for antibody-drug conjugates based on the rapid isolation of the anti-Robo4 cell-internalizing antibody, BLOOD, 2013, Vol.121, No.14, pp.2804-2813, ISSN: 1528-0020, 特に Abstract, Figure 2, 4-5, Table.1	1-6
P, X	INO, K. et al., Immunological quality and performance of tumor vessel-targeting CAR-T cells prepared by mRNA-EP for clinical research, Molecular Therapy - Oncolytics, 2016.11, Vol.3, #16024, ISSN: 2372-7705, 特に p.10 右欄 1.1-17	1-6
P, X	CAWKWELL, L. et al., Engineering T cells for cancer therapy by expressing a chimeric antigen receptor (CAR) targeting the tumour endothelial marker ROBO4, Eur. J. Immunol., 2016.08, Vol.46, No.Suppl.1, pp.124-125, #15, ISSN: 1521-4141, Whole Document	1-6
A	中沢洋三, キメラ抗原受容体 (CAR) を用いた遺伝子改変 T 細胞療法, 信州医誌, 2013, Vol.61, No.4, pp.197-203, ISSN: 1884-6580, 全文	1-6

請求項1のキメラ抗原受容体は、「軽鎖CDR1…を含む重鎖可変領域」、「重鎖CDR1…を含む軽鎖可変領域」との記載により、どのような重鎖可変領域、及び、軽鎖可変領域を含むものであるか、技術的に明確でない。しかしながら、明細書及び図面の記載を参酌すると（特に〔表1〕参照）、上記記載は、「軽鎖CDR1…を含む軽鎖可変領域」、「重鎖CDR1…を含む重鎖可変領域」と補正されることが合理的に予測できるので、上記請求項を除外対象とはしない。請求項1を引用する請求項2-6についても同様である。

審査官は、そのような予測される補正後の請求項1-6に基づき、当該請求項についての調査・審査を行った。