

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-513003
(P2024-513003A)

(43)公表日 令和6年3月21日(2024.3.21)

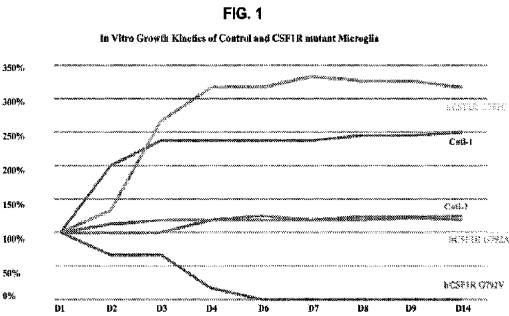
(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	4 B 0 6 5	
A 6 1 K	35/545 (2015.01)	A 6 1 K	35/545	4 C 0 8 4	
A 6 1 K	35/28 (2015.01)	A 6 1 K	35/28	4 C 0 8 7	
A 6 1 K	35/15 (2015.01)	A 6 1 K	35/15		
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全49頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2023-559849(P2023-559849)	(71)出願人	506115514
(86)(22)出願日	令和4年4月1日(2022.4.1)		ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシテ
(85)翻訳文提出日	令和5年11月27日(2023.11.27)		ィ オブ カリフォルニア
(86)国際出願番号	PCT/US2022/023139		The Regents of the U
(87)国際公開番号	WO2022/212897		niversity of Califo
(87)国際公開日	令和4年10月6日(2022.10.6)		rnia
(31)優先権主張番号	63/169,578		アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9
(32)優先日	令和3年4月1日(2021.4.1)		4 6 0 7 - 5 2 0 0, オークランド, フ
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		ランクリン ストリート 1 1 1 1, 1 2
			番 フロア
(31)優先権主張番号	63/236,951	(74)代理人	110000855
(32)優先日	令和3年8月25日(2021.8.25)		弁理士法人浅村特許事務所
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(72)発明者	ダフチャン、ハイク
			アメリカ合衆国 9 2 6 9 7 カリフォル
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA		ニア、アーバイン、グロス ホール 3 2
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 C S F 1 Rアンタゴニストに対する耐性を付与するための哺乳動物細胞の遺伝子改変

(57)【要約】

ミクログリア／単球は、「ニッチ」内に存在し、これにより、哺乳動物中枢神経系（CNS）内に存在するミクログリア／単球／マクロファージの総数が制限される。したがって、内因性ミクログリアと競合し、CNSニッチを部分的または完全に占有するミクログリア、単球およびマクロファージまたはそれらを生じさせる細胞を治療的に改変するのを助けることができる方法が必要とされている。本開示は、C S F 1 R阻害剤に対する応答に、内因性脳常在ミクログリアと比較して選択的利点を有する治療用ミクログリア、治療用単球または治療用マクロファージを特徴とする。具体的には、本開示で開発される治療用細胞は、内因性ミクログリアを死滅させるのに十分な所与の用量のC S F 1 R阻害剤では死滅しない。本明細書に記載される治療用細胞は、神経疾患を治療するために使用され得る。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

C S F 1 R アンタゴニストに対して示差的な耐性を示す改変ヒト細胞。

【請求項 2】

C S F 1 R アンタゴニストに対して示差的な耐性を示す改変 C S F 1 R タンパク質をコードする核酸を含む、請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 3】

C S F 1 R アンタゴニストに対して示差的な耐性を示す改変 C S F 1 R タンパク質をコードする核酸を含む改変ヒト細胞。

【請求項 4】

前記 C S F 1 R タンパク質に 1 つ以上の遺伝子改変を含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 5】

前記 1 つ以上の遺伝子改変が、C S F 1 R のアミノ酸配列の変化をもたらす、前記変化が、G 7 9 5、L 7 8 5、M 6 3 7、E 6 3 3 および V 6 4 7 から選択されるアミノ酸残基の置換を場合により含む、請求項 4 に記載の細胞。

【請求項 6】

前記 1 つ以上の遺伝子改変が、改変 A T P 結合ポケットをもたらす、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 7】

前記改変 A T P 結合ポケットが、減少した結合空間を有する、請求項 6 に記載の細胞。

【請求項 8】

前記改変 A T P 結合ポケットが、C S F 1 R アンタゴニストに結合することができない、請求項 7 に記載の細胞。

【請求項 9】

前記改変 A T P 結合ポケットが、A T P に結合することができる、請求項 6 に記載の細胞。

【請求項 10】

前記 C S F 1 R タンパク質の前記 1 つ以上の遺伝子改変が、前記 C S F 1 R タンパク質の A T P 結合活性を妨害しない、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 11】

前記 C S F 1 R タンパク質の前記 1 つ以上の遺伝子改変が、構成的に活性な C S F 1 R シグナル伝達を誘導しない、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 12】

前記改変 C S F 1 R タンパク質が、C S F 1 リガンドによって活性化される、請求項 11 に記載の細胞。

【請求項 13】

前記 C S F 1 リガンドが、前記改変 C S F 1 R タンパク質のリン酸化を誘導する、請求項 12 に記載の細胞。

【請求項 14】

前記改変 C S F 1 R タンパク質が、I L - 3 4 リガンドによって活性化される、請求項 11 に記載の細胞。

【請求項 15】

前記 I L - 3 4 リガンドが、前記改変 C S F 1 R タンパク質のリン酸化を誘導する、請求項 14 に記載の細胞。

【請求項 16】

前記 1 つ以上の遺伝子改変が、エキスピボで導入される、請求項 4 に記載の細胞。

【請求項 17】

前記 1 つ以上の遺伝子改変が、導入遺伝子をコードする核酸を前記細胞にトランスフェクトもしくは導入することによって、または標的とされるヌクレアーゼ、ニッカーゼもし

10

20

30

40

50

くは塩基編集エフェクターもしくはリボ核タンパク質複合体を形質導入もしくは導入することによって誘導される、請求項 4 に記載の細胞。

【請求項 18】

導入遺伝子をコードする前記核酸を細胞に導入することが、前記細胞をウイルスベクターと接触させることを含む、請求項 17 に記載の細胞。

【請求項 19】

改変 C S F 1 R タンパク質を含む前記細胞が、野生型 C S F 1 R タンパク質を含む細胞の遺伝子発現プロファイルを保持する、請求項 1 ～ 18 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 20】

別の遺伝子に 1 つ以上の改変をさらに含む、請求項 1 ～ 19 のいずれか一項に記載の細胞。

10

【請求項 21】

C S F 1 R を発現している、請求項 1 ～ 20 のいずれか一項に記載の改変ヒト細胞。

【請求項 22】

C S F 1 R を発現するように誘導および分化され、多能性幹細胞、造血幹細胞、エリスロミエロイド前駆細胞および造血前駆細胞からなる群から選択される、請求項 21 に記載の細胞。

【請求項 23】

C S F 1 R 発現細胞であり、ミクログリア、マクロファージ、単球または他の食細胞からなる群から選択される、請求項 22 に記載の細胞。

20

【請求項 24】

請求項 20 ～ 23 のいずれか一項に記載の C S F 1 R 発現細胞を含む組成物。

【請求項 25】

前記 C S F 1 R 発現細胞が C S F 1 R 発現細胞である、請求項 24 に記載の組成物。

【請求項 26】

複数の細胞を含み、前記細胞の少なくとも 0.1 %、少なくとも 1 %、少なくとも 5 %、少なくとも 10 %、少なくとも 20 %、少なくとも 30 %、少なくとも 40 %、少なくとも 50 %、少なくとも 60 %、少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 % または少なくとも 99 % が、C S F 1 R アンタゴニストに対して示差的な耐性を有する C S F 1 R 発現細胞である、請求項 25 に記載の組成物。

30

【請求項 27】

対象を治療する方法であって、

a) 前記対象の細胞内で C S F 1 R シグナルを阻害するのに十分な量で C S F 1 R アンタゴニストを前記対象に投与すること、および

b) 前記対象を、前記 C S F 1 R アンタゴニストに対して示差的な耐性を有する改変 C S F 1 R 発現細胞と接触させることを含む方法。

【請求項 28】

対象を治療する方法であって、

a) 前記対象を、C S F 1 R アンタゴニストに対して示差的な耐性を有する改変 C S F 1 R 発現細胞と接触させること、および

b) 前記対象の細胞内で C S F 1 R シグナルを阻害するのに十分な量で前記 C S F 1 R アンタゴニストを前記対象に投与することを含む方法。

40

【請求項 29】

前記 C S F 1 R 発現細胞が C S F 1 R 発現細胞である、請求項 27 および請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記 C S F 1 R アンタゴニストに対する前記示差的な耐性が、前記 C S F 1 R アンタゴニストに対する部分的な耐性または完全な耐性である、請求項 27 ～ 29 のいずれか一項

50

に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記改変 C S F 1 R 発現細胞が、野生型 C S F 1 R 発現細胞の遺伝子発現プロファイルを保持する、請求項 2 7 ～ 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記改変 C S F 1 R 発現細胞が、神経疾患を治療するか、治癒させるか、改善するか、予防するか、または緩和するのに有用な遺伝子産物または他の遺伝子改変を発現する、請求項 2 7 ～ 3 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記遺伝子産物が、前記 C S F 1 R 発現細胞によって普通ならば発現されない導入遺伝子である、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記 C S F 1 R アンタゴニストによって阻害される前記 C S F 1 R シグナルが、前記対象にとって内因性の C S F 1 R 発現細胞の増殖または生存である、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記 C S F 1 R アンタゴニストが、前記改変 C S F 1 R 発現細胞と比較して前記内因性 C S F 1 R 発現細胞の増殖および／または生存を減少させるのに十分な量で前記対象に投与される、請求項 2 7 ～ 3 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 6】

対象を治療する方法であって、
a) 前記対象を改変 C S F 1 R 発現細胞と接触させること、および
b) 前記改変 C S F 1 R 発現細胞と比較して、未改変 C S F 1 R 発現細胞の増殖または生存を示差的に変化させること
を含む方法。

【請求項 3 7】

前記改変 C S F 1 R 発現細胞が C S F 1 R 発現食細胞である、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記改変 C S F 1 R 発現細胞が、C S F 1 R アンタゴニストに対して部分的に耐性である、請求項 3 6 および請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記未改変 C S F 1 R 発現細胞の増殖または生存を示差的に変化させる工程が、前記改変 C S F 1 R 発現細胞と比較して前記未改変 C S F 1 R 発現細胞の増殖および／または生存を減少させるのに十分な量で前記 C S F 1 R アンタゴニストを前記対象に投与することを含む、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 4 0】

C S F 1 R アンタゴニストに対して示差的な耐性を示す改変 C S F 1 R タンパク質をコードする核酸組成物。

【請求項 4 1】

前記 C S F 1 R アンタゴニストに対する前記示差的な耐性が、前記 C S F 1 R アンタゴニストに対する部分的な耐性または完全な耐性である、請求項 4 0 に記載の組成物。

【請求項 4 2】

前記 C S F 1 R アンタゴニストに対する前記示差的な耐性が、前記 C S F 1 R アンタゴニストに対する増加した耐性である、請求項 4 0 に記載の組成物。

【請求項 4 3】

前記 C S F 1 R アンタゴニストに対する前記示差的な耐性が、前記 C S F 1 R アンタゴニストに対する低下した耐性である、請求項 4 0 に記載の組成物。

【請求項 4 4】

前記改変 C S F 1 R タンパク質が、1 つ以上の遺伝子改変を含む、請求項 4 0 ～ 4 3 の

10

20

30

40

50

いずれか一項に記載の組成物。

【請求項 45】

前記 1 つ以上の遺伝子改変が、C S F 1 R のアミノ酸配列の変化をもたらし、前記変化が、G 7 9 5、L 7 8 5、M 6 3 7、E 6 3 3 および V 6 4 7 から選択されるアミノ酸残基の置換を場合により含む、請求項 44 に記載の組成物。

【請求項 46】

前記 1 つ以上の遺伝子改変が、改変 A T P 結合ポケットをもたらす、請求項 44 に記載の組成物。

【請求項 47】

前記改変 A T P 結合ポケットが、減少した結合空間を有する、請求項 46 に記載の組成物。

【請求項 48】

前記改変 A T P 結合ポケットが、C S F 1 R アンタゴニストに結合することができない、請求項 47 に記載の組成物。

【請求項 49】

前記改変 A T P 結合ポケットが、A T P に結合することができる、請求項 46 に記載の組成物。

【請求項 50】

前記 C S F 1 R タンパク質の前記 1 つ以上の遺伝子改変が、前記 C S F 1 R タンパク質の A T P 結合活性を妨害しない、請求項 44 に記載の組成物。

【請求項 51】

前記 C S F 1 R タンパク質の前記 1 つ以上の遺伝子改変が、構成的に活性な C S F 1 R シグナル伝達を誘導しない、請求項 44 に記載の組成物。

【請求項 52】

前記改変 C S F 1 R タンパク質が、C S F 1 リガンドによって活性化される、請求項 51 に記載の組成物。

【請求項 53】

前記 C S F 1 リガンドが、前記改変 C S F 1 R タンパク質のリン酸化を誘導する、請求項 52 に記載の組成物。

【請求項 54】

前記改変 C S F 1 R タンパク質が、I L - 3 4 リガンドによって活性化される、請求項 51 に記載の組成物。

【請求項 55】

前記 I L - 3 4 リガンドが、前記改変 C S F 1 R タンパク質のリン酸化を誘導する、請求項 54 に記載の細胞。

【請求項 56】

発現制御配列に作動可能に連結された、請求項 40 ～ 55 のいずれか一項に記載の核酸組成物を含む発現ベクター。

【請求項 57】

培養細胞が、前記ポリペプチドを発現する、請求項 56 に記載のベクターによってトランスフェクトされた培養細胞、または前記細胞の子孫。

【請求項 58】

請求項 56 に記載のベクターに感染した内因性細胞であって、前記ポリペプチドを発現する内因性細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2021年4月1日に出願された米国仮出願第63／169,578号明細書および2021年8月25日に出願された米国仮出願第63／236,951号明細書

10

20

30

40

50

の利益を主張し、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表の参照

出願人は、規則13ter. 1(a)に従って提出され、「UCI 21.03 PCT Sequencing Listing-ST25」と題された、Annex C/ST. 25テキストファイルの形式で記録された情報が、出願時の国際出願の一部を形成するもの同一であると主張する。配列表の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0003】

本開示は、神経疾患を治療するための方法および組成物を特徴とする。特に、方法および組成物は、CSF1Rアンタゴニストに対する部分的または完全な耐性を有する細胞を特徴とする。

【背景技術】

【0004】

ほとんどすべてのヒト神経疾患およびヒト神経損傷は、脳の常在免疫細胞であるミクログリアの機能、遺伝子発現および活性化状態の障害または変化を伴う。場合によっては、ミクログリアの遺伝子変異が神経疾患の主な原因であるが、他の疾患では、ミクログリア遺伝子の多型が疾患を発症するリスクを増加させる。残念なことに、これらの疾患および損傷の多くに有効な治療法は、あるにしてもわずかなしい。

【0005】

ミクログリア、単球およびマクロファージは、「ニッチ」内に存在し、これにより、哺乳動物中枢神経系(CNS)内に存在するミクログリア、単球およびマクロファージの総数が制限され得る。したがって、内因性ミクログリアと競合し、CNSニッチを部分的または完全に占有するミクログリア、単球およびマクロファージまたはそれらを生じさせる細胞を治療的に改変するのを助けることができる方法が必要とされている。本開示の目的は、遺伝子改変されたヒトミクログリアまたは関連する単球システムもしくは前駆細胞を患者に移植するための手法を含む、ミクログリアに基づく治療薬を開発することである。

【発明の概要】

【0006】

本開示の目的は、神経疾患の治療のためのCSF1Rアンタゴニストに対する示差的な耐性(例えば、部分的な、完全な、増加させる、低下させる)を可能にする組成物および方法を提供することである。

【0007】

ミクログリアは、生存、増殖および自己再生のために2つのリガンド(CSF1およびIL-34)を介したCSF1Rシグナル伝達に依存している。様々なCSF1Rアンタゴニストを用いて哺乳動物モデルを処置すると、中枢神経系内のミクログリアの数が減少する。さらに、これらの化合物が除去されると、生存しているミクログリアが増殖し、ニッチを急速に再び満たす。加えて、マウスの脳に移植されたヒト幹細胞由来ミクログリアもCSF1R阻害に感受性であり、CSF1R阻害によって死滅することが見出されている(図11F、図11G、図11H、図11I、図11J)。

【0008】

内因性ミクログリアニッチと競合するために、治療用ミクログリア、治療用単球、治療用マクロファージまたはそれらの前駆細胞もしくは前駆体は、CSF1R阻害剤に対するそれらの応答に、内因性脳常在ミクログリアと比較して選択的利点を有する必要がある。具体的には、内因性ミクログリアを死滅させるのに十分な所与の用量のCSF1R阻害剤で死滅しない治療用細胞を開発する必要がある。場合によっては、この選択的利点は、さらに高い用量のCSF1R阻害剤が、治療用ミクログリア、治療用マクロファージ、治療用単球またはそれらの前駆細胞もしくは前駆体も、安全性の目的のために必要が生じた場合に死滅させることができるように部分的であるべきである。

【0009】

いくつかの実施形態では、本開示は、CSF1Rアンタゴニストに対して示差的な耐性を示す改変CSF1Rタンパク質（例えば、ヒトCSF1Rタンパク質）をコードする核酸を含む細胞（例えば、改変ヒト細胞）を特徴とする。他の実施形態では、本開示は、CSF1Rアンタゴニストに対して示差的な耐性を示す改変ヒト細胞を特徴とする。さらなる実施形態では、本開示は、CSF1Rアンタゴニストに対して示差的な耐性を示す改変CSF1Rタンパク質をコードする核酸を含む改変ヒト細胞を特徴とする。

【0010】

いくつかの実施形態では、本開示はまた、対象を治療する方法を特徴とし得る。いくつかの実施形態では、方法は、対象の細胞内でCSF1Rシグナルを阻害するのに十分な量でCSF1Rアンタゴニストを対象に投与すること、および対象を、CSF1Rアンタゴニストに対して示差的な耐性を有する改変CSF1R発現細胞（例えば、改変CSF1R発現食細胞）と接触させることを含み得る。他の実施形態では、方法は、対象を、CSF1Rアンタゴニストに対して示差的な耐性を有する改変CSF1R発現細胞（例えば、改変CSF1R発現食細胞）と接触させること、および対象の細胞内でCSF1Rシグナルを阻害するのに十分な量でCSF1Rアンタゴニストを対象に投与することを含み得る。

【0011】

さらなる実施形態では、本開示はまた、対象を治療する方法を特徴とする。方法は、対象を、改変CSF1R発現細胞（例えば、改変CSF1R発現食細胞）と接触させること、および改変CSF1R発現細胞（例えば、改変CSF1R発現食細胞）と比較して、未改変CSF1R発現細胞（例えば、改変CSF1R発現食細胞）の増殖または生存を示差的に変化させることを含む。

【0012】

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に記載のCSF1Rアンタゴニストに対して示差的な耐性を示す改変CSF1Rタンパク質をコードする核酸組成物およびベクターをさらに特徴とし得る。

【0013】

本開示の技術的特徴は、神経疾患の治療のための治療用ミクログリア、治療用マクロファージ、治療用単球またはそれらの前駆細胞もしくは前駆体を作製するための、CSF1Rアンタゴニストに対する示差的な耐性（例えば、部分的な、完全な、増加した、または低下した耐性）の使用を含む。本開示を何らかの理論または機構に限定することを望むものではないが、本開示の技術的特徴は、CSF1Rアンタゴニストに対する示差的な耐性（例えば、CSF1Rアンタゴニスト耐性）を有する多能性幹細胞からのミクログリア、単球、HSPC（造血幹細胞または前駆細胞）または原始マクロファージの生成を有利に提供すると考えられる。本明細書に記載されるように、何らかの形態の前処置または選択的利点を用いなければ、前述の細胞の移植は、中枢神経系（CNS）への部分的または限定的な生着のみを示す可能性が高い。本開示は、哺乳動物の脳内のミクログリア、マクロファージもしくは単球またはそれらの前駆細胞（HSPC、PMP）の治療的生着を顕著に促進する、ここで記載されている手法を開発する。現在知られている先行の参考文献または研究のいずれも、本発明の特有の発明的な技術的特徴を有しない。

【0014】

本開示の組成物および方法は、医療にCSF1Rアンタゴニストを使用するための現在のパラダイムからの大きな逸脱を表す。例えば、先行技術は、内因性ミクログリアを除去し、脳への骨髓由来単球および／または血液由来単球の侵入を促進するためのCSF1R阻害剤の使用を教示している。しかし、脳に浸潤する骨髓由来単球および／または血液由来単球は、浸潤後何カ月も経ってもミクログリアと機能的および転写的に異なるままである。さらに、骨髓由来単球および／または血液由来単球は、CSF1Rアンタゴニストに対してミクログリアと同じ感受性を有さず、これらの細胞がミクログリアではないことを実証している。これにより、神経疾患の治療のための改変CSF1Rタンパク質を含む治療用ミクログリア（例えば、ヒトミクログリア）の拡大増殖を促進する本開示から離れていることが教示される。

【0015】

さらに、ほとんどの主要な製薬会社は、いくつかの形態の癌を治療するためのCSF1Rアンタゴニスト化合物を開発している。しかし、内因性ミクログリアはCSF1Rアンタゴニストに対して極めて感受性であり、これらの化合物の用量を増大させると治療に回答して死滅する。これは、マウスの脳に移植されたヒト幹細胞由来ミクログリア（図11F、図11G、図11H、図11I、図11J）、および培養されたヒトミクログリア（図4A、図4B、図4C、図4Dおよび図4E）にも当てはまる。逆説的に、本開示は、移植されたミクログリア（例えば、移植された治療用ミクログリア；すなわち、改変CSF1Rタンパク質を含むミクログリア）の長期生着を改善するために、ミクログリアに対して毒性である化合物（例えば、CSF1Rアンタゴニスト）を利用する。本開示の方法は、通常はそのような生着に適していない確立されたミクログリアニッチに、移植されたミクログリア（例えば、移植された治療用ミクログリア；すなわち、改変CSF1Rタンパク質を含むミクログリア）の広範囲な生着を達成するという課題を解決する。

10

【0016】

さらに、本開示の技術的特徴は、驚くべき結果に寄与し、これらの変異に関連する転帰の予測不可能性を示す。例えば、提案された点変異のうちの2つは、阻害剤処理の24時間後に評価した場合、複数の漸増用量にわたって2つのCSF1R阻害剤（すなわち、CSF1Rアンタゴニスト）に対する完全な（100%）保護をもたらす（図4A、図4B、図4C、図4Dおよび図4E）。対照的に、第3の変異G795Vは、ミクログリアへのiPSCの分化の成功を妨げた（図1）。これらのデータは、CSF1Rに導入される特定のDNAおよび結果として生じるアミノ酸変化の重要性を実証し、いくつかの変化はCSF1R阻害剤（すなわち、CSF1Rアンタゴニスト）に対する所望の耐性を達成するが、他の変化は代わりにミクログリアの分化または生存の能力を損なう可能性があることを実証している。

20

【0017】

したがって、本開示は、ヒトミクログリア、ヒトマクロファージおよびヒト単球ならびに／またはそれらの前駆体細胞（HSPC、エリスロミエロイド前駆細胞（EMP）または原始マクロファージ前駆細胞（PMP））の競合的生着を促進する方法および組成物を特徴とする。細胞は、限定するものではないが、胚性幹細胞および人工多能性幹細胞（iPSC）を含む多能性幹細胞、骨髄由来造血幹細胞、臍帯血細胞、血液由来単球、胎児卵黄嚢マクロファージもしくは組織マクロファージ、成人組織由来マクロファージを含む様々な供給源から、またはミクログリア、HSPC、単球もしくはマクロファージへの別の細胞型の直接再プログラミングを介して得ることができる。さらに、本開示は、限定するものではないが、心臓、皮膚、肝臓、肺、腎臓、眼、前立腺および卵巣由来の細胞を含むCSF1R発現細胞の競合的生着を促進する方法および組成物を特徴とし得る。

30

【0018】

本明細書に記載されるいかなる特徴または特徴の組合せも、そのようないかなる組合せに含まれる特徴が、文脈、本明細書、および当業者の知識から明らかのように相互に矛盾しない限り、本開示の範囲内に含まれる。本開示のさらなる利点および態様は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲において明らかである。

40

【0019】

本開示の特徴および利点は、添付の図面に関連して提示される以下の詳細な説明の考察から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】対照ミクログリアおよびCSF1R変異体ミクログリアのインビトロ増殖速度を示す。同質遺伝子的iPSC由来造血前駆細胞をミクログリアに分化させ、細胞密度を最初の14日間使用した。2つの野生型同質遺伝子的対照株（Cntl-1およびCntl-2）は、iPSC-ミクログリアの増殖速度に、ある程度の変動性が予測されることを実証している。hCSF1R G795AおよびhCSF1R G785Cの両変異体は

50

、2つの対照株と同等の増殖速度を示す。対照的に、h C S F R G 7 9 4 V 変異体は、細胞密度の急速な低下を示し、分化の6日目を超えて残った生細胞はない。これらのデータは、アミノ酸置換の特定の選択が、C S F 1 R アンタゴニスト耐性も示すことができる生存ミクログリアの生成の成功にとって重要であることを実証している。

【0021】

【図2A】選択されたC S F 1 R 変異がトランスクリプトームシグネチャーにほとんど影響を及ぼさず、同時にP L X 5 6 2 2 に耐性を付与することを示す。

【図2B】選択されたC S F 1 R 変異がトランスクリプトームシグネチャーにほとんど影響を及ぼさず、同時にP L X 5 6 2 2 に耐性を付与することを示す。

【図2C】選択されたC S F 1 R 変異がトランスクリプトームシグネチャーにほとんど影響を及ぼさず、同時にP L X 5 6 2 2 に耐性を付与することを示す。

【図2D】選択されたC S F 1 R 変異がトランスクリプトームシグネチャーにほとんど影響を及ぼさず、同時にP L X 5 6 2 2 に耐性を付与することを示す。

【図2E】選択されたC S F 1 R 変異がトランスクリプトームシグネチャーにほとんど影響を及ぼさず、同時にP L X 5 6 2 2 に耐性を付与することを示す。

【図2F】選択されたC S F 1 R 変異がトランスクリプトームシグネチャーにほとんど影響を及ぼさず、同時にP L X 5 6 2 2 に耐性を付与することを示す。図2Aは、上位2,000個の遺伝子を使用した主成分分析により、データセット内の変動の主な原因がP L X 5 6 2 2 に対するW T 応答であることが明らかにされることを示す。図2Bおよび図2Cは、D M S O 処理されたM U T 1 (すなわち、G 7 9 5 A ; 図2B) またはM U T 2 (すなわち、G 7 9 5 C ; 図2C) とW T ミクログリアとの間のピアソン相関係数の線形回帰分析および計算により、完全トランスクリプトームと249個の遺伝子のコアミクログリア遺伝子シグネチャーとを調査した場合に、高度の一致が確認されたことを示す。図2D、図2Eおよび図2Fは、P L X 5 6 2 2 を用いたW T (図2D)、M U T 1 (すなわち、G 7 9 5 A ; 図2E) およびM U T 2 (すなわち、G 7 9 5 C ; 図2F) ミクログリアの24時間の処理が、D M S O 処理細胞と比較した場合に、W T 細胞 ($F D R \leq 0.05$; $\log_2(F C) \geq \pm 1$) 内で顕著なトランスクリプトーム変化を誘導したことを示す。しかし、M U T 1 およびM U T 2 の両株の処理は遺伝子発現を顕著に変化させることができず、これらの株がP L X 5 6 2 2 の効果に抵抗性であることが示唆された。

【0022】

【図3】C S F 1 R 変異体および対照x M G (ミクログリア) の距離マトリックスを示す。RNA-seq 発現数を正規化し、分散安定化変換を使用して変換した。ペアワイズユークリッド距離を全サンプル間で計算し、サンプルを距離によって階層的にクラスターリングした。これらのデータは、G 7 9 5 A 変異体ミクログリアのトランスクリプトームがW T C S F 1 R ミクログリアのトランスクリプトームと最も同等であることを実証している。

【0023】

【図4A】ヒト幹細胞由来ミクログリアもインビトロでC S F 1 R 阻害に感受性であり、C S F 1 R 阻害によって死滅することを示す。

【図4B】ヒト幹細胞由来ミクログリアもインビトロでC S F 1 R 阻害に感受性であり、C S F 1 R 阻害によって死滅することを示す。

【図4C】ヒト幹細胞由来ミクログリアもインビトロでC S F 1 R 阻害に感受性であり、C S F 1 R 阻害によって死滅することを示す。

【図4D】ヒト幹細胞由来ミクログリアもインビトロでC S F 1 R 阻害に感受性であり、C S F 1 R 阻害によって死滅することを示す。

【図4E】ヒト幹細胞由来ミクログリアもインビトロでC S F 1 R 阻害に感受性であり、C S F 1 R 阻害によって死滅することを示す。図4Aは、0.1% D M S O、250 nm P L X 3 3 9 7、500 nm P L X 3 3 9 7 および1 μ m P L X 3 3 9 7 を含む完全培地を用いた培養時に24時間にわたって画像化されたカスパーゼ3 / 7 レベルを示す。I n c u c y t e S 3 生細胞イメージャを用いて撮像された画像。図4Bは、0.1%

DMSO、250 nm PLX5622、500 nm PLX5622および1 μ m PLX5622を含む完全培地を用いた培養時に24時間にわたって画像化されたカスパーゼ3/7レベルを示す。Incucyte S3生細胞イメージャを用いて撮像された画像。図4Cは、0.1% DMSO、250 nm エディコチニブ (JNJ-40346527)、500 nm エディコチニブおよび1 μ m エディコチニブを含む完全培地を用いた培養時に24時間にわたって画像化されたカスパーゼ3/7レベルを示す。Incucyte S3生細胞イメージャを用いて撮像された画像。図4Dは、0.1% DMSO、250 nm BLZ945、500 nm BLZ945および1 μ m BLZ945を含む完全培地を用いた培養時に24時間にわたって画像化されたカスパーゼ3/7レベルを示す。Incucyte S3生細胞イメージャを用いて撮像された画像。図4Eは、PLX3397との培養時の24時間後の野生型ミクログリア、G795AミクログリアおよびG795Cミクログリアに関するカスパーゼ3/7蛍光活性の代表的な画像を示す。全パネルについて、6つの独立したウェルにおけるn=4の画像を定量した。平均値±SEMとして表されるデータ。

10

【0024】

【図5A】G795A iPSC由来ミクログリアがCSF1Rアンタゴニスト誘導性細胞死に耐性であることを示す。

【図5B】G795A iPSC由来ミクログリアがCSF1Rアンタゴニスト誘導性細胞死に耐性であることを示す。細胞はカスパーゼ媒介性アポトーシス以外のプロセスから死滅し得ることから、G795A変異がCSF1Rアンタゴニストによって誘導される任意の形態の細胞死に対してさらに広範囲な耐性を提供するかどうかを決定することが重要である。したがって、500 nM (図5A) もしくは1 μ M (図5B) のDMSOビヒクル対照、または4つのCSF1Rアンタゴニスト、PLX3397、PLX5622、エディコチニブおよびBLZ945のうちの1つを用いて、G795A iPSC-ミクログリアおよび野生型 (WT) iPSC-ミクログリアを24時間処理した。次いで、2色生存率/細胞傷害性アプローチ (Thermo L3224; LIVE/DEAD (商標) Viability/Cytotoxicity Kit) を使用して、生細胞対死細胞の割合を定量した。DMSOによる処理の24時間後に、死んだミクログリアはほとんど観察されない。対照的に、CSF1Rアンタゴニストによる処理は、野生型ミクログリアでは実質的な細胞死を誘導するが、G795Aミクログリアでは細胞死をほとんどまたは全く誘導しない。生細胞を円によって示す。

20

30

【0025】

【図6】PathScan (登録商標) Phospho-CSF-1R/M-CSF-R (panTyr) Sandwich ELISA Kit n=7によって検出されるように、48時間後の25 ng/mlのHuman Macrophage Colony Stimulating Factor (Peprotech #300-25) による、変異体CSF1Rを発現するミクログリアの処理が、CSF-1R/M-CSF-Rタンパク質のチロシンリン酸化を刺激することを示す。WTミクログリアと比較して、CSF1R G795Aを発現するミクログリアは同様にリン酸化するが、CSF1R G795Cを発現するミクログリアは上昇したレベルのリン酸化を示す。これらのデータは、G795AおよびG795CはともにCSF1Rアンタゴニストに対する耐性を付与するが、G795C変異はCSF1Rシグナル伝達の増強をもたらし得ることを示唆している。平均値±SEMとして表されるデータ。

40

【0026】

【図7A】CSF1Rアンタゴニストに結合したCSF1R受容体の結晶構造を示す。

【図7B】CSF1Rアンタゴニストに結合したCSF1R受容体の結晶構造を示す。

【図7C】CSF1Rアンタゴニストに結合したCSF1R受容体の結晶構造を示す。

【図7D】CSF1Rアンタゴニストに結合したCSF1R受容体の結晶構造を示す。図7Aは、PLX5622 CSF1Rアンタゴニストに結合したヒトCSF1R受容体を示し、図7Bは、PLX3397 CSF1Rアンタゴニストに結合したCSF1R受容体

50

を示す。結晶構造を調査して、同じ結合ポケットへのATPの正常な結合を損なわずに、CSF1Rアンタゴニストの結合を立体的に妨害し得るアミノ酸置換を予測した。ヒトCSF1Rに結合したCSF1RアンタゴニストPLX5622（図7A）またはPLX3397（図7B）の結晶構造は、以前に公開された。この公的に入手可能なデータを使用して、ATP結合ポケットを調査した。分子モデリングを通して、CSF1Rへの正常なATP結合を破壊せずに、PLX5622もしくはPLX3397または他のCSF1Rアンタゴニストの結合を損なう可能性が高い単一アミノ酸変化を予測した（図7C）。具体的には、このモデリングは、アラニン（A）、バリン（V）またはシステイン（C）のいずれかによるアミノ酸G795の置換が、ATPの正常な結合能力を破壊することなく、PLX5622および／またはPLX3397結合の立体障害を増加させることを示唆している。結合を防ぐ他の変異も調査することができた（図7D）。

10

【0027】

【図8】CSF1Rコード配列内の位置795で単一アミノ酸点変異をコードする同質遺伝子的ヒトiPSC細胞株の産生の成功を実証するDNAクロマトグラムを示す。この特定の場合では、CRISPRを介した遺伝子編集によって各株を生成した。ただし、限定するものではないが、TALEN、従来の相同組換え、ウイルス遺伝子送達または他のCRISPR変異体を含む様々な他の遺伝子編集方法によって、同様の変化を導入することができる。

【0028】

【図9A】選択されたCSF1R変異が、インビボでトランスクリプトームシグネチャーにほとんど影響を及ぼさないことを示す。

20

【図9B】選択されたCSF1R変異が、インビボでトランスクリプトームシグネチャーにほとんど影響を及ぼさないことを示す。

【図9C】選択されたCSF1R変異が、インビボでトランスクリプトームシグネチャーにほとんど影響を及ぼさないことを示す。

【図9D】選択されたCSF1R変異が、インビボでトランスクリプトームシグネチャーにほとんど影響を及ぼさないことを示す。

【図9E】選択されたCSF1R変異が、インビボでトランスクリプトームシグネチャーにほとんど影響を及ぼさないことを示す。図9Aは、上位2,000個の遺伝子を使用した主成分分析により、G795Aミクログリア、G795CミクログリアおよびWTミクログリア間の変動の主な原因が、CSF1R変異ではなく個々の動物に起因することが明らかにされることを示す。対照的に、G795Vを比較すると、この変異に基づく分離がいくらかあり、G795Vは、遺伝子発現を実質的に変化させることなくミクログリアの生成を可能にしない可能性があることがさらに示される。図9Bおよび図9Cは、G795A（図9B）またはG795C（図9C）とWTミクログリアとの間のピアソン相関係数の線形回帰分析および計算により、完全トランスクリプトームと190個の遺伝子のコアミクログリアシグネチャーとを調査した場合に、高度の一致が確認されたことを示す。図9Dおよび図9Eは、WT細胞と比較した場合に、MITRGマウスでは、移植2ヶ月後に外植されたヒトミクログリアのボルケーノプロットが、変異体細胞では最小の有意なトランスクリプトーム変化（ $FDR \leq 0.05$ ； $\log_2(FC) \geq \pm 1$ ）を示すことを示す。

30

40

【0029】

【図10A】G795A iPSC由来ミクログリアが、同質遺伝子的野生型iPSC由来ミクログリアのトランスクリプトームシグネチャーと高度に類似する、インビボでの異種移植後のトランスクリプトームシグネチャーを示すことを示す。

【図10B】G795A iPSC由来ミクログリアが、同質遺伝子的野生型iPSC由来ミクログリアのトランスクリプトームシグネチャーと高度に類似する、インビボでの異種移植後のトランスクリプトームシグネチャーを示すことを示す。異種移植適合性マウスに野生型（WT）ミクログリアまたはG795A iPSC-ミクログリアを生着させ、2ヶ月後、ヒト細胞を単離し、バルクRNA配列決定によって調査した。図10Aは、個

50

々のWT生着マウスおよびG795A生着マウスから単離されたxMGについて、検出された全遺伝子にわたる相関を示す。個々のマウスレシピエント間の差は、いくらかの変動性をもたらすが、WT xMGとG795 xMGとは高度に相関したままであり、 R^2 は0.80~0.95である。図10Bは、さらに選択されたミクログリア特異的遺伝子リストを使用して同様の比較を行ったことを示す。この比較は、同様に、野生型xMGとG795A xMGとの間の強い相関を明らかにし、 R^2 は0.78~0.97であった。以前のインビトロRNA配列決定分析と一致して、これらの結果は、G795A CSF1R変異がインビボ生着後のヒトミクログリアの基礎となるトランスクリプトームにほとんどまたは全く影響を及ぼさず、検出された分散の大部分が個々のマウスグラフトレシピエント間の差によるものであることを実証している。

10

【0030】

【図11A】G795A iPSC由来ミクログリアが、CSF1Rアゴニスト処置に耐性であり、成体哺乳動物脳内でのヒトミクログリアの強固な生着を可能にすることを示す。

【図11B】G795A iPSC由来ミクログリアが、CSF1Rアゴニスト処置に耐性であり、成体哺乳動物脳内でのヒトミクログリアの強固な生着を可能にすることを示す。

【図11C】G795A iPSC由来ミクログリアが、CSF1Rアゴニスト処置に耐性であり、成体哺乳動物脳内でのヒトミクログリアの強固な生着を可能にすることを示す。

20

【図11D】G795A iPSC由来ミクログリアが、CSF1Rアゴニスト処置に耐性であり、成体哺乳動物脳内でのヒトミクログリアの強固な生着を可能にすることを示す。

【図11E】G795A iPSC由来ミクログリアが、CSF1Rアゴニスト処置に耐性であり、成体哺乳動物脳内でのヒトミクログリアの強固な生着を可能にすることを示す。

【図11F】G795A iPSC由来ミクログリアが、CSF1Rアゴニスト処置に耐性であり、成体哺乳動物脳内でのヒトミクログリアの強固な生着を可能にすることを示す。

【図11G】G795A iPSC由来ミクログリアが、CSF1Rアゴニスト処置に耐性であり、成体哺乳動物脳内でのヒトミクログリアの強固な生着を可能にすることを示す。

30

【図11H】G795A iPSC由来ミクログリアが、CSF1Rアゴニスト処置に耐性であり、成体哺乳動物脳内でのヒトミクログリアの強固な生着を可能にすることを示す。

【図11I】G795A iPSC由来ミクログリアが、CSF1Rアゴニスト処置に耐性であり、成体哺乳動物脳内でのヒトミクログリアの強固な生着を可能にすることを示す。

【図11J】G795A iPSC由来ミクログリアが、CSF1Rアゴニスト処置に耐性であり、成体哺乳動物脳内でのヒトミクログリアの強固な生着を可能にすることを示す。異種移植適合性マウスに、2月齢で500,000個のiPSC由来ヒトミクログリア(xMG)の両側定位的海馬内注射を投与した。マウスに、ホモ接合性CSF1R耐性G795AヒトiPSC株または同質遺伝子の未変野生型ヒトiPSCから分化したxMGを投与した。マウスが4週齢の時点で、4週間にわたって、齧歯類固形飼料中600mg/kgのPLX3397を自由に摂取できるようにした。次いで、マウスを殺処分し、脳の半分を蛍光免疫組織化学的検査および共焦点顕微鏡法によって検査した。図11A~図11Eは、1ヶ月のPLX3397処置の過程にわたって、G795A xMGが増殖し、海馬および皮質内の初期注射部位から拡大増殖することを示す。ミクログリアをIBA-1によって標識し(図11Aおよび図11F)、ヒト特異的マーカーKu80(図11Bおよび図11G)を使用してヒトミクログリアの核を共標識し、Ki67(図11C

40

50

および図 1 1 H) を使用して、皮質および視床内の残りの非占有ニッチに向かって移動する増殖性ヒト x M G の「波面」を示す (矢印)。図 1 1 E は、図 1 1 D の四角で囲まれた領域の高倍率画像が、全 I B A 1 + ミクログリアが K u 8 0 を共発現することを実証することを示す。対照的に、野生型ヒト x M G では、P L X 3 3 9 7 処置の 1 ヶ月後に生存するのはほんの一握りである (図 1 1 F ~ 図 1 1 I)。例えば、図 1 1 J の矢印は、図 1 1 I に示される四角で囲まれた領域内の 4 つの生存 x M G のみを明らかにしている。

【 0 0 3 1 】

【図 1 2】成体 h C S F 1 マウスへの移植後の C S F 1 R - G 7 9 5 A ヒト i P S C - ミクログリア生着の定量を示す。完全に占有された成体ミクログリアニッチへの C S F 1 R - G 7 9 5 A i P S C - ミクログリアの移植 (C S F 1 R アンタゴニストによる処置を用いず) は、ミクログリアマーカー I B A 1 とヒト特異的核マーカー K u 8 0 (K u 8 0 + / I b a 1 +) との共局在化によって測定されるように、ヒトミクログリアの極めて限られた生着 (全ミクログリアの 5 ~ 1 0 %) を生じる。対照的に、C S F 1 R - G 7 9 5 A i P S C - ミクログリア移植の後に、P L X 3 3 9 7 含有マウス固形飼料 (食物中 6 0 0 m g / k g の P L X 3 3 9 7) を用いてマウスを 1 0 日間処置すると、ヒトミクログリアの割合はほぼ 2 5 % に増加する。K u 8 0 と I B A 1 との共発現によって証明されるように、P L X 3 3 9 7 処置 (食物中 6 0 0 m g / k g の P L X 3 3 9 7) の 3 0 日間後、脳内の全ミクログリアの 9 0 ~ 9 5 % がヒトである。C S F 1 R - G 7 9 5 A i P S C - ミクログリアを移植し、移植前、移植中または移植後のいずれかに C S F 1 R アンタゴニスト処置の濃度および持続時間を変化させることによって、ヒト i P S C - ミクログリア生着の程度を制御することができる。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 3 2 】

本明細書に記載されるすべての特徴および利点を提供しない実施形態を含め、本開示の実施形態を詳細に説明してきたが、特定の変形例および修正が当業者には明らかであろう。本開示は、具体的に開示された実施形態を超えて、他の代替もしくは追加の実施形態ならびに / または使用およびそれらの明白な修正および均等物に及ぶことが当業者によって理解されるであろう。さらに、多数の変形例が様々な程度に詳細に示され説明されているが、本開示の範囲内にある他の修正は、本開示に基づいて当業者には容易に明らかになるであろう。また、実施形態の特定の特徴および態様の様々な組合せまたは部分的組合せが行われてもよく、依然として本開示の範囲内に含まれると考えられる。したがって、本開示の様々な態様を形成するために、開示された実施形態の様々な特徴および態様を互いに組み合わせることができるか、または置き換えることができることを理解されたい。ひいては、本明細書に開示される本開示の範囲は、本明細書に記載される特定の開示された実施形態によって限定されるべきではないことが意図される。

【 0 0 3 3 】

本明細書で使用される場合、単数形「1つの (a)」, 「1つの (an)」および「その (the)」は、文脈が明らかにそうでないことを示さない限り、複数形も含むことが意図される。さらに、用語「含む (including)」, 「含む (includes)」, 「有する (having)」, 「有する (has)」, 「有する (with)」またはそれらの変形例が詳細な説明および / または特許請求の範囲のいずれかで使用される限り、そのような用語は、用語「備える (comprising)」と同様に包括的であることが意図される。

【 0 0 3 4 】

用語

【 0 0 3 5 】

本明細書で使用される場合、「C S F 1 R 発現細胞」は、C S F 1 R を発現する細胞、または C S F 1 R を発現するように誘導され得る細胞、または C S F 1 R を発現する細胞に分化する細胞を指し得る。C S F 1 R 発現細胞の非限定的な例には、限定するものではないが、ミクログリア、単球、H S P C (造血幹細胞または造血前駆細胞)、マクロファ

ージ、樹状細胞、ランゲルハンス細胞、クッパー細胞、ホフバウアー細胞、絨毛外栄養膜細胞、食細胞、または多能性幹細胞由来の原始マクロファージが含まれ得る。さらに、CSF1R発現細胞は、遺伝的手法または小分子手法のいずれかを介してiPSC、単球または線維芽細胞から直接再プログラミングされたミクログリアを指し得る。

【0036】

本明細書で使用される場合、「CSF1R発現食細胞」は、CSF1R受容体を発現し、食作用、すなわち、細胞がその原形質膜を使用して細胞外粒子または細菌、基質、タンパク質、脂質または凝集体を貪食し、次いで、この領域を内在化してファゴソームを形成するプロセスに関する能力を有する細胞を指し得る。CSF1R発現食細胞の非限定的な例には、限定するものではないが、ミクログリア、マクロファージ、単球、樹状細胞または他の食細胞が含まれ得る。いくつかの実施形態では、CSF1R発現食細胞はCSF1R発現細胞である。

10

【0037】

本明細書で使用される場合、「示差的な耐性」は、CSF1RアンタゴニストによるCSF1Rシグナルの阻害が、未改変細胞に観察されるものとは異なる用量応答関係、または応答の大きさを示す、改変細胞内で生じる状態を指し得る。他の実施形態では、示差的な耐性とは、改変CSF1R発現細胞と比較して、未改変CSF1R発現細胞の増殖または生存を変化させることを指し得る。いくつかの実施形態では、示差的な耐性は、CSF1Rアンタゴニストに対する部分的な、完全な、増加した、または低下した耐性を含み得る。

20

【0038】

本明細書で使用される場合、「CSF1Rシグナル阻害」は、リン酸化事象または脱リン酸化事象、遺伝子発現などのCSF1Rシグナル伝達カスケードの段階でCSF1Rアンタゴニストによって引き起こされる用量依存的低減を指し得る。

【0039】

本明細書で使用される場合、「部分的な耐性」は、増大した用量のCSF1Rアンタゴニストによって依然として破壊される改変細胞を指す。部分的な耐性は、結合定数(K_d)もしくはATPの増加、キナーゼ活性の低下、CSF1リガンドに対する結合親和性の低下、またはシグナル伝達の低下に起因し得る。

【0040】

本明細書で使用される場合、「完全な耐性」は、CSF1Rシグナル阻害がいかなる濃度のアンタゴニストでも決して起こらない改変細胞を指す。

30

【0041】

本明細書で使用される場合、「増加した耐性」は、CSF1Rシグナル阻害が、未改変細胞で観察されるものと比較して、増加した濃度のアンタゴニストで起こる改変細胞を指す。

【0042】

本明細書で使用される場合、「低下した耐性」は、CSF1Rシグナル阻害が、未改変細胞で観察されるものと比較して、低下した濃度の受容体アンタゴニストで起こる改変細胞を指す。

40

【0043】

本明細書で使用される場合、用語「対象」および「患者」は、区別なく使用される。本明細書で使用される場合、対象は、非霊長類（例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラット、マウスなど）または霊長類（例えば、サル、類人猿およびヒト）であり得る。特定の実施形態では、対象はヒトである。一実施形態では、対象は、本明細書に記載の疾患、障害または病態を有する哺乳動物（例えば、ヒト）である。別の実施形態では、対象は、本明細書に記載の疾患、障害または病態を発症するリスクがある哺乳動物（例えば、ヒト）である。ある特定の場合では、患者という用語は、医学的ケアを受けているヒト、または獣医学的ケアを受けている動物を指す。

【0044】

50

本明細書で使用される場合、用語「神経疾患」は、脳、ならびに身体および脊髄全体に見られる神経に影響を及ぼす損傷、外傷、障害または疾患を指す。

【0045】

本明細書で使用される用語「治療する (treat)」または「治療 (treatment)」または「治療する (treating)」は、治療的処置および予防的手段の両方を指し、その目的は、疾患（例えば、神経疾患）の発症を予防するかまたは遅らせること、例えば、障害の発現を遅らせること、または病態、疾患もしくは障害、例えば、不十分なもしくは望ましくない器官機能もしくは組織機能の特徴とするあらゆる障害の少なくとも1つの有害作用もしくは症状を低減することである。1つ以上の症状または臨床マーカーがその用語が本明細書で定義されているように低減する場合、治療は一般に「有効」である。あるいは、疾患の進行が低減または停止した場合、治療は「有効」である。すなわち、「治療」には、症状の改善または疾患のマーカーの低減だけでなく、治療の非存在下で予測される症状の停止または進行の遅延または悪化も含まれる。有益または望ましい臨床結果には、限定するものではないが、検出可能または検出不能を問わず、1つ以上の症状の緩和、疾患の程度の軽減、疾患の状態の安定化（例えば、悪化しない）、疾患の進行の遅延、疾患状態の改善または緩和、および寛解（部分的または全体的を問わず）が含まれる。「治療」はまた、治療を受けない場合に予測される生存期間と比較して、生存期間を延ばすことも意味し得る。「治療」はまた、疾患を改善すること、その合併症の重症度を軽減すること、それが現れるのを予防すること、それが再発するのを予防すること、それが悪化するのを単に予防すること、それに含まれる炎症反応を緩和すること、またはそのような治療努力が最終的に失敗したとしても、前述のいずれかに影響を及ぼす治療努力を含む。

10

20

【0046】

ここで図1～図12を参照すると、本開示は、神経変性疾患の治療のためのCSF1Rアンタゴニストに対して示差的な耐性を有する治療的に設計されたCSF1R発現細胞（例えば、治療用ミクログリア）を作製および使用するための方法および組成物を特徴とする。

【0047】

中枢神経系内の細胞は、「ニッチ」内に存在し得、これにより、哺乳動物CNS内に存在し得る細胞の総数が制限され得る。本開示は、CSF1R発現細胞（例えば、CSF1Rを発現する食細胞、HSPC、樹状細胞、エリスロミエロイド前駆細胞、ミクログリア、マクロファージまたは単球）を使用して、神経疾患および神経損傷の新しい治療法を開発することを目的とする。しかし、いくつかの疾患では、CNS内でのそのような細胞の生着および／または成熟は、既存の内因性ミクログリアの存在によって制限される可能性が高い。そのような適応症の場合、移植された哺乳動物細胞に選択的な生存または増殖の利点を提供することができる方法は、生着、したがって、治療活性を改善するであろう。重要なことに、そのような手法はまた、安全でなければならず、制御されない増殖を誘発してはならない。

30

【0048】

本開示は、CSF1Rを発現する細胞に分化する改変CSF1R発現細胞またはそれらの前駆細胞もしくは幹細胞を特徴とし、改変CSF1R発現細胞は、CSF1Rアンタゴニストに対して示差的な耐性を有する。人工多能性幹細胞 (iPSC) 由来の改変細胞、または造血幹細胞および造血前駆細胞 (HSPC) 由来の改変細胞の場合、未分化細胞に改変を導入し、場合により、改変をスクリーニングまたは選択し、改変細胞を単球系統またはマクロファージ系統などの細胞または細胞系統に分化させることを含み得る、本開示による改変細胞の作製方法も包含される。

40

【0049】

本開示は、CSF1Rアンタゴニストに対して示差的な耐性を示す細胞（例えば、ヒト細胞）を特徴とする。いくつかの実施形態では、本開示は、CSF1Rアンタゴニストに対して示差的な耐性を示す改変ヒト細胞を特徴とする。本開示はまた、CSF1Rアンタ

50

ゴニストに対して示差的な耐性を示す改変 C S F 1 R タンパク質をコードする核酸を含む細胞（例えば、ヒト細胞）を特徴とし得る。いくつかの実施形態では、本開示は、C S F 1 R アンタゴニストに対して示差的な耐性を示す改変 C S F 1 R タンパク質をコードする核酸を含む改変ヒト細胞を特徴とする。いくつかの実施形態では、本開示の細胞（例えば、ヒト細胞）は、C S F 1 R を発現し、C S F 1 R 発現細胞であり得る。他の実施形態では、本開示の細胞（例えば、ヒト細胞）は、C S F 1 R を発現するように誘導または分化され得る。

【0050】

本開示はまた、C S F 1 R を発現している、本明細書に記載の改変細胞を特徴とし得る。いくつかの実施形態では、本開示は、C S F 1 R を発現している、本明細書に記載の改変ヒト細胞を特徴とする。細胞は、C S F 1 R を発現するように誘導および／または分化され得、多能性幹細胞、造血幹細胞、エリスロミエロイド前駆細胞および造血前駆細胞からなる群から選択され得る。

10

【0051】

いくつかの実施形態では、C S F 1 R 発現細胞（例えば、C S F 1 R 発現ヒト）細胞には、限定するものではないがミクログリア、マクロファージ、単球または他の食細胞が含まれ得る。他の実施形態では、C S F 1 R を発現するように誘導または分化され得る細胞には、限定するものではないが、多能性幹細胞、造血幹細胞、エリスロミエロイド前駆細胞または造血前駆細胞が含まれ得る。いくつかの実施形態では、改変細胞（例えば、改変ヒト細胞）は、限定するものではないが、ミクログリア、単球、マクロファージ、造血前駆細胞（H P C）および造血幹細胞（H S C）、エリスロミエロイド前駆細胞（E M P）、原始マクロファージおよび原始マクロファージ前駆細胞（P M P）または臍帯血造血幹細胞を含む前駆体細胞である。

20

【0052】

いくつかの実施形態では、改変細胞は、C S F 1 R アンタゴニストに対して示差的に耐性である。いくつかの実施形態では、C S F 1 R アンタゴニストには、限定するものではないが、P L X 5 6 2 2、P L X 3 3 9 7（ベキシダルチニブ）、B L Z 9 4 5、K i 2 0 2 2 7、J N J - 4 0 3 4 6 5 2 7；J N J - 5 2 7（エディコチニブ）、c F M S 受容体阻害剤 I I、A Z 3 0 4、A R R Y - 3 8 2、Y M - 9 0 7 0 9、G W 2 5 8 0、P L X 1 0 8 - 0 1、P L X 7 4 8 6、P L X 6 4 7、A R R Y - 3 8 2、J N J - 4 0 3 4 6 5 2 7、エマクツズマブ（E m a c t u z u m a b）（R G 7 1 5 5）、A M G 8 2 0、I M C - C S 4（L Y 3 0 2 2 8 5 5）、M C S 1 1 0、B P R 1 R 0 2 4、A Z D 7 5 0 7、J T E - 9 5 2、J N J - 2 8 3 1 2 1 4 1、c - F M S - I N - 8 または C S F 1 R - I N - 2 2 が含まれ得る。

30

【0053】

他の実施形態では、C S F 1 R アンタゴニストには、その同族リガンド（例えば、C S F 1 または I L - 3 4）、基質または下流エフェクターとの C S F 1 R 相互作用を阻害する任意の化合物が含まれ得る。その同族リガンド、基質または下流エフェクターとの C S F 1 R 相互作用を阻害する化合物の非限定的な例には、限定するものではないが、C S F 1 R とホスホリパーゼ C ガンマ 2（P L C g 2）、脾臓チロシンキナーゼ（S y k）および G r b 2 / G a b 2 / S h p 2 複合体との間の相互作用を遮断する抗体または薬物が含まれる。いくつかの実施形態では、示差的な C S F 1 R アンタゴニスト耐性は、C S F 1 R の下流の遺伝子を改変することによって付与される。非限定的な例には、限定するものではないが、I N P P 5 D（S H I P 1）、T R E M 2、D A P 1 2、P L C G 2、P I 3 K、A K T、P K C、F I M P、J N K、A - S M a s e、脾臓チロシンキナーゼ（S y k）および G r b 2 / G a b 2 / S h p 2 複合体が挙げられ得る。他の実施形態では、部分的な C S F 1 R アンタゴニスト耐性は、C S F 1 R シグナル伝達のアゴニストまたはアンタゴニストを用いてミクログリアを前処理することによって付与される。さらなる実施形態では、C S F 1 R アンタゴニストには、A T P 結合部位（すなわち、A T P 結合ポケット）を遮断することによって C S F 1 R シグナル伝達を阻害する任意の化合物が含ま

40

50

れ得る。

【 0 0 5 4 】

表 1 は、野生型 C S F 1 R 配列、および改変 C S F 1 R アミノ酸配列（すなわち、本明細書に記載の改変 C S F 1 R タンパク質）の非限定的な例、ならびに本明細書に記載の改変 C S F 1 R タンパク質をコードする核酸配列の非限定的な例を示す。そのような核酸の例には、野生型核酸配列と比較して 1 つ以上のサイレントな、または保存された核酸置換を有するものが挙げられる。太字の核酸（N A）は、1 つ以上のサイレントな、または保存された核酸置換が配列に組み込まれ得る場所の例である。本明細書では、潜在的な核酸が強調されている。

【表 1 - 1】

概要	配列	配列 番号:
野生型 C S F 1 R (核酸)	atgggccccaggagttctgctgctcctgctggtggccacagcttggcatggtcaggggaatcccagtgatag agcccagtgctccctgagctggtcgtgaagccaggagcaacggtgaccttgcgatgtgtgggcaatggc agcgtggaatgggatggccccccatcacctcactggaccctgtactctgatggctccagcagcatcctca gcaccaacaacgctaccttccaaaacacggggacctatcgtgcactgagcctggagacccccctggg aggcagcgccgcatccacctctatgtcaagaccctgccccggccctggaacgtgctagcacaggag gtggtcgtgttcgaggaccaggacgcactactgccctgtctgtcacagacccgggtgctggaagcaggc gtctcgtggtgctgtgtcgtggccggccccctcatgcccacaccaactactccttctcgccctggcatgg cttcaccatccacagggccaagttcattcagagccaggactatcaatgcagtgccttgatgggtggcag gaagggtgatgtccatcagcatccggctgaaagtcagaaagtcattccaggggccccagccttgacac tggtgccctgcagagctggtgcggattcagggggaggctgcccagatcgtgtgtcagccagcagcgttg atgttaactttgatgtcttctccaacacaacaaccaagctcgcaatccctcaacaatctgacttcataa taaccgttaccaaaaagtcctgaccctcaacctcgatcaagtagattccaacatgccggcaactactcct gcgtggccagcaacgtgcagggcaagcactccacctccatgttcttccgggtggtagagagtgcctactt gaacttgagctctgagcagaaccicatccaggaggtagccgtgggggaggggctcaacctcaaagtc atggtggaggcctaccaggcctgcaagggtttaaactggacctaactggaccctttctgaccaccagcc tgagcccaagcttgctaatgtaccaccaaggacacatacaggcacaccttcacctctctgccccgc ctgaagccctctgaggctggccgctactccttctggccagaaaccaggagggtggagagctctgaag tttgagctcacctctgataccccccagaggtaagcgtcatatggacattcatcaacggctctggcaccctt ttgtgtgctgctctgggtacccccagcccaacgtgacatggctgcagtgcagtggccacactgataggt gtgataggcccaagtgctgcaggctcgggatgacccataccctgaggctcctgagccaggagcccttc acaaggtagcgggtcagagcctgctgactgtgagacctagagcacaaccaaactacgagtgag ggcccaacaacagcgtggggagtggtcctgggccttcatacccatctctgaggagccacacgcac ccccggaatgagttcctctcacaccagtggtggctgcctgcattcatgacctgtgctgctgctgct cctgctgctattgtacaagtataagcagaagcccaagtagccagggtccgctggaagatcatcgagagcta	1

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

	<p>tgagggaacagttatacttcatcgacccacgcagctgccttacaacgagaagtgggagttccccg gaacaacctgcagtttggaagacctcggagctggagccttgggaaggtggaggccacggcctt tggtctgggcaaggaggtgctgtcctgaagggtgctgtgaagatgctgaagtcacggcccatgctgat gagaaggaggccctcatgtccgagctgaagatcatgagccacctgggccagcacgagaacatcgtca acctctgggagcctgtaccatggaggccctgtactgtcatcacggagtagctgttctatggcgacctg ctcaacttctgcgaagggaaggctgaggccatgctgggacccagcctgagccccggccaggacccccg agggaggcgctgactataagaacatccacctcgagaagaaatgtccgaggagacagtggcttctcc agccagggtgtggacacctatgtggagatgaggcctgtctccacttctcaaatgactcctctctgagcaa gacctggacaaggaggtgacggccccctggagctccgggacctgtctacttctccagccaagtagc ccagggtcatggccttctcgtctcaagaattgcatccaccgggacgtggcagcgcgtaacgtgctgttg accaatggtcatgtggccaagattgggactctgggctggctaggacatcatgaatgactccaactac attgtcaagggaatgccccctgctgtgaagtggatggccccagagagcatcttactgtgtctacac gggtcagagcgacgtctgtctatggcatcctcctctgggagatcttctacttgggtgaatccctaccct ggcatcctggtgaacagcaagtctataaactggtgaaggatggataccaaatggcccagcctgatttg cccaaagaatatatacagcatatgcaggcctgctggccttggagcccaccacagacccaccttc cagcagatctgctcctctcaggagcagggccaagaggacaggagagagcgggactataccaatct gccgagcagcagcagaagcgggtggcagcggcagcagcagcagctgagctggaggaggagagctct agtgagcacctgacctgctgcgagcaaggggatacgcgccagccctgtgcagccaacaactatca gttctgctga</p>	10 20
野生型 CSF1R (アミノ酸)	<p>MGPGVLLLLLVATAWHGQGIPVIEPSVPELVVKPGATVTLRCVGNCSVEWD GPPSPHWTLYSDGSSSILSTNNATFQNTGTYRCTEPGDPLGSSAAIHLVVK DPAWPWNVLAEVVFEDQDALLPCLLTDPLVLEAGVSLVRVRGRPLMRHT NYSFSPWHGFTIHRAKFIQSQDYQCSALMGGKRVMSISIRLKVQKVI PGPP ALTLPVPAELVRIRGEAAQIVCSASSVDVNFDFLQHNNTKLAIPQQSDFHNN RYQKVLTLNLDOQDFQHAGNYSVASNVQGHSTSMFFRVVESAYLNLSS EQNLIQEVTVGEGNLKVMVEAYPGLQGFWNTYLGPFSOHQPEPKLANAT TKD TYRHTFTLSLPR LK PSEAGRYSFLARNPGGWRALTFELTLRYPPEVSV IWT FINGSGTLLCAASGY PQPNVTWLQCSGHTDRCD E AQVLQVWDDPYP EVL SQEPFHKVTVQSLLT VETLEHNQTYECRAHNSVSGSWAFIPISAGAH THPPDEF LFTP VVVACMSIMALLLLLLLLLLLYKYKQKPKYQVRWKIIESYEG NSYTFIDPTQLPYNEKWEFPRNNLQFGKTLGAGAFGKVVEATAFGLGKED AVLKVAVKMLKSTAHADKEALMSELKIMSHLGQHENIVNLLGACTHGGPV LVITEYCCYGDLLNFLRRKAEAMLGPSLSPGQDPEGGV DYKNIHLEKKYVR RDSGFSSQGVDTYVEMRPVSTSSNDSFSEQDLDKEDGRPLELRDLLHFS SQVAQGM AFLASKNCIHRDVAARNVLLTNGHVAKIGDFGLARDIMNDSNYI VKGNARLPVKWMAPESIFDCVYTVQSDVWSYGILLWEIFSLGLNPYPGILV NSKFYKLVK DGYQMAQPAFAPKNIYSIMQACWALEPTHRPTFQQICSFLOE</p>	2 30 40

10

20

30

40

50

	QAAEDRRERDYTNLPSSSRSGSGSSSELEEESSSEHLTCCEGGDIAQ PLLQPNNYQFC	
G 7 9 5 A C S F 1 R (核酸) ここで、 NNNは、 G C T、 G C C、 G C Aおよび G C Gを 含み得る。	atgggcccaggagttctgctgctcctgctggtggccacagcttggcatggtcagggaaatcccagtgatg agcccagtgctcctgagctggctgctgaagccaggagcaacggtagcttgcgatgtgtgggcaatggc agcgtggaatgggatggcccccatcacctcactggaccctgtactctgtaggtgccagcagcatcctca gcaccaacaacgctaccttccaaaacacgggggacctatcgctgacgtgagcctggagacccccctggg aggcagcgccgcatccacctctatgtcaaaagacctgcccggccctggaacgtgctagcacaggag gtggtgctgttcgaggaccaggagcactactgcccctgtctgtctacagaccgggtgtctggaagcaggc gtctgctggtgctgtgtgctgtggccggccctcatgcccacaccaactactcttctcgccttgccatgg cttcaccatccacaggggcaagttcattcagagccaggactatcaatgcagtgccttgatgggtggcag gaagggtgatgtccatcagcatccggctgaaagtgagaaagtcacccaggggccccagccttgacac tgggtgctgcagagctggtgctggattcgaggggaggctgccagatcgtgtgctcagccagcagcgttg atgtaactttgatgtcttctccaacacacacacaaagctcgcaatccctcaacaatctgactttcataa taaccgttaccaaaaagtcctgacccctcaacctcgatcaagtagattccaacatgcccggcaactactcct gctgaggccagcaacgtgcaggggcaagcactccacctccatgttctccgggtggtagagagtgctactt gaacttgagctctgagcagaaccitcatccaggaggtgacctggggggaggggctcaacctcaaagtc atggtggaggcctaccaggcctgcaaggttttaactggacctacctgggaccttttctgaccaccagcc tgagcccaagctgctaattgctaccaccaaggacacatacaggcacaccttaccctctctgccccgc ctgaagccctcagaggctggcgtactcctctctggccagaaacccaggaggtggagagctctgacg tttgagctcacccttcgataccccccagaggtaagcgctcatatggacattcatcaacggctctggcacccct ttgtgtgctgctctgggtacccccagcccaacgtgacatggcctgagtgagtgccacactgataggt gtgataggcccaagtgctgcaggctggtgatgaccataacctgaggtctgagccaggagcccttc acaagggtgacgggtgcagagcctgctgactgttgagacctagagcacaacaaacctacgagtgacag ggccccacaacagcgtggggagtgctcctgggccttataccatctctgaggagcccacacgcac ccccgatgagtctcttcacaccagtgtgtgctgctgcatgtccatcatggcctgtgctgctgctgct cctgctgctattgtacaagtataagcagaagcccaagttaccaggctccgtggaagatcatcgagagcta tgagggcaacagttatactttatcgacccccagcagctgacctacaacgagaagtgggagttccccg gaacaacctgcagtttgtaagacctcgagctggagcctttgggaagggtggaggccacggcctt tggctcgggcaaggaggatgtgtcctgaagggtggctgtgaagatgtgaagtcacaggcccatgctgat gagaaggaggccctcatgtccgagctgaagatcatgagccacctggggccagcagagaacatcgta accttctgggagcctgtaccatggaggccctgtactggtcatcacggagtagctgtgtatggcgacctg ctcaactttctgcaaggaaggctgaggccatgtcgggacccagcctgagccccggccaggacccccg agggaggcgtgactataagaacatccacctcgagaagaaatfatgccgagggacagtggtcttcc agccagggtgtggacacctatgtggagatgaggcctgtctccacttctcaaatgactcctctctgagcaa gacctggacaaggaggatggacggccccgtggagctccgggacctgtctcacttctccagccaagtagc ccagggcagtgccctcctgcttccaagaattgcatccacgggagctggcagcgctaacgtgctgttg accaatggctatgtggccaagattNNNgacttcgggctgctaggacatcatgaatgactccaacta	3

40

【表 1 - 4】

	cattgtcaagggaatgccgcctgctgtgaagtggatggccccagagagcatcttgactgtgtctaca cgggtcagagcgacgtctggtcctatggcatcctcctctgggagatcttctacttgggtgaatccctaccc tggcatcctggtgaacagcaagtctataaactggtgaaggatggataccaatggcccagcctgcattt gccccaaagaatatatacagcatcatgcaggcctgctgggccttgaggccccacccacagaccacctt ccagcagatctgctccttctcaggagcaggcccaaggagcaggagagagcgggactataccaat ctgccagcagcagcagaagcgggtggcagcggcagcagcagcagtgagctggaggaggagagct ctagtgcacctgacctgctgcgagcaaggggatacgccagccctgctgcagcccaacaactatc agttctgctga	
G 7 9 5 A C S F 1 R (アミノ酸)	MGPGVILLLLLVATAWHGQGIPVIEPSVPELVVKPGATVTLRCVGNNGSVEWD GPPSPHWTLYSDGSSSILSTNNATFQNTGTyrCTEPGDPLGGSAAIHLYVK DPARPWNVLAQEVVVFEDQDALLPCLLTDPVLEAGVSLVRVRGRPLMRHT NYSFSPWHGFTIHRAKFIQSQDYQCSALMGGRKVMSSISIRLKVQKVIPGPP ALTLVPAELVRIRGEAAQIVCSASSVDVNFDFVLQHNNTKLAIPQQSDFHNN RYQKVLTLNLQVDFQHAGNYSCVASNVQGHSTSMFFRVVESAYLNLSS EQNLIQEVTVGEGLNLKVMVEAYPGLQGFWNTYLGPFSDHQPEPKLANAT TKDtyRHFTFLSLPRLKPSEAGRYSFLARNPGGWRALTFELTLRYPEVSV IWTfINGSGTLLCAASGYQPQNVTLWQCSGHTDRCDQAQVLQVWDDPYP EVLSQEPFHKVTVQSLLTVETLEHNQTYECRAHNSVSGSGSWAFIPISAGAH THPPDEFLFTPVVVACMSIMALLLLLLLLLYKYKQPKYQVRWKIIESYEG NSYTFIDPTQLPYNEKWEFPRNNLQFGKTLGAGAFGKVVEATAFGLGKED AVLKAVKMLKSTAHADKEALMSELKIMSHLGQHENIVNLLGACTHGQPV LVITEYCCYGDLLNFLRRKAEAMLGSPSLSPGQDPEGGVDYKNIHLEKKYVR RDSGFSSQGVDTYVEMRPVSTSSNDSFSEQDLKEDGRPLELRDLLHFS SQVAQGMFLASKNCIHRDVAARNVLLTNGHVAKIADFGLARDIMNDSNYI VKGNARLPVKWMAPEsIFDCVYTVQSDVWSYGILLWEIFSLGLNPYPGILV NSKFYKLVKDGyQMAQPAFAPKNIYSIMQACWALEPthRPTfQQICsFLQE QAQEDRRERDYTNLPSSSRSGSGSSSSELEEESSEHLTCCEQGDIAQ PLLQPNNYQFC	4
G 7 9 5 C C S F 1 R (核酸) : ここで、 NNNは、 TGTおよび TGCを 含み得る。	atgggccaggagtctgctgctcctgctggtggccacagctggcatggtcagggaatcccagtgatag agcccagtgccctgagctggtcgtgaagccaggagcaacggtgacctgcatggtggtggaatggc agcgtggaatgggatggcccccatcacctcactggaccctgtactctgatggtccagcagcatcctca gcaccaacaacgctacctccaaaacacggggacctatcgtgcactgagcctggagacccctggg aggcagcgcgcgccatccacctctatgtcaaagaccctgccggccctggaacgtgctagcacaggag gtggtcgtgttcgaggaccaggacgcactactgcccgtctgtctcacagacccggtgctggaagcaggc gtctcgtggtgctgtgctgtggcggccctcatgcgcacaccaactactcctctgcacctggcatgg cttcaccatccacaggccaagttcattcagagccaggactatcaatgcagtgcctgatgggtggcag gaaggtgatgtccatcagcatccggctgaaagtcagaaagtcacccagggcccccagccttgacac	5

10

20

30

40

50

【表 1 - 5】

	<p> tgggtcctgcagagctgggtcggattcgaggggaggctgccagatcgtgtgctcagccagcagcgttg atgttaactttgatgtcttccccaacaacaaccaagctcgcaafccctcaacaatctgactttcataa taacgtttacaaaaagtcctgaccctcaacctcgatcaagtagattccaacatgcggcaactactcct gcggtgccagcaacgtgcagggcaagcactccacctcatgttctccgggtggtagagagtgccactt gaactgagctcctgagcagaacctcatccaggaggtagccgtgggggaggggtcaacctcaaagtc atggtggaggcctaccaggcctgcaaggtttaactggacctacctgggacctttctgaccaccagcc tgagcccaagcttgctaatgctaccaaccaaggacacatacaggcacaccttcacctctctgccccgc ctgaagccctctgaggctgcccgtactcctcctggccagaaccaggaggctggagagctctgacg ttgagctcaccctcgataccccccagaggttaagcgtcatatggacattcatcaacggctctggcaccct ttgtgtcgtcctctgggtacccccagcccaacgtgacatggctgctgagtgagtgccacactgataggt gfgatgaggcccaagtctgcaggctgggatgaccataccctgaggtcctgagccaggagcccttcc acaaggtagcggtagcagagcctgctgactgttgagaccttagagcacaaccaaactacgagtgcag ggcccaacacagcgtggggagtggtcctgggacctcataccatctctgcaggagcccacacgcatc ccccggtagtgctctcaccagtggtggtcgcctgcatgtccatcatggccttgctgctgctgctgct cctgtcgtattgtacaagtataagcagaagcccaagtagcaggtccgctggaagatcatcgagagcta tgagggaacagttatacttcatcgacccacgcagctgcctacaacgagaagtgagggttccccg gaacaacctgcagtttgtaagacctcggagctggagccttgggaaggtggtggaggccacggcctt tggctgggcaaggaggtgctgtcctgaagggtgctggaagatgctgaagtcacggcccatgctgat gagaaggaggccctcatgtccgagctgaagatcatgagccacctgggcccagcacgagaacatcgtca acctctggggagcctgtaccatggaggccctgtactggtcatcagcgagtactgttctatggcgacctg ctcaacttctgcgaagggaaggctgaggccatgtgggagccagcctgagccccggccaggaccccg agggaggcgtcgactataagaacatccacctcgagaagaaatatgtccgagggacagtggttctcc agccagggtgtggacacctatgtggagatgaggcctgtctccacttctcaaatgactcctctctgagcaa gacctggacaaggaggtgagcgccctggagctccgggacctgtcacttctccagccaagtagc ccagggtcatggccttctcgttccaagaattgcatacccggaagtgagcgcgtaacgtgctgttg accaatggtcatgtggccaagattNNNgacttcgggctggctaggagacatgaatgactccaacta cattgtcaagggaatgcccgctgctgtgaagtggtggccccagagagcatcttgactgtgtctaca cgggtcagagcgagctgtgtctatggcatcctcctctgggagatcttctacttggtgtaatccctacc tggcatcctggtgaacagcaagttctataaactggtgaaggatggataccaaatggcccagcctgattt gccccaaagaatatatacagcatcatgcaggcctgctggcctggagccccaccacagaccacctt ccagcagatctgtcctcctcagagcagggccaagaggacaggagagagcgggactataccaat ctgccgagcagcagcagaagcgtggcagcggcagcagcagtgagctggaggaggagagct ctagtgcagaccctgacgtgctgcgagcaagggtatcgccagccctgctgcagcccaacaactatc agttctgctga </p>	10
		20
		30
G 7 9 5 C C S F 1 R (アミノ酸)	<p> MGPGVLLLLLVATAWHGQGIPVIEPSVPELVVKPGATVTLRCVGNNGSVWD GPPSPHWTLYSDGSSSILSTNNATFQNTGTYRCTEPGDPLGGSAAIHLVVK DPARPWNVLAGEVVFEDQDALLPCLLTDPVLEAGVSLVRVRGRPLMRHT </p>	6

10

20

30

40

【表 1 - 7】

	acaaggtgacggtgcagagcctgctgactgttgagaccttagagcacaaccaaactacgagtgag ggcccacaacagcgtggggagtggtcctgggccttcatacccatctctgcaggagccacacgcaic ccccggtgagttcctctcacaccagtggtggtgcctgcatgtccatcatggccttgctgctgctgct cctgctgctattgtacaagataagcagaagcccaagtagccaggtccgctggaagatcatcgagagcta tgagggaacagttatacttcatcgacccacgcagctgccttacaacgagaagtgaggagtcccccg gaacaacctgcagtttgtaagacctcggagctggagcctttggaaggtggtggaggccacggcctt tggctcgggcaaggaggtgctgctgaagggtgctggaagatgctgaagtccacggcccatgctgat gagaaggaggccctcatgtccgagctgaagatcatgagccacctgggcccagcagcagagaacatgtca acctctgggagcctgtaccatggaggccctgtactggtcatcacggagtactgttctatggcgacctg ctcaactttctgcgaaggaggctgaggccatgctgggaccagcctgagccccggccaggaccccg agggaggcgtcgactataagaacatccacctcgagaagaaatgtccgcaggggacagtggtctctcc agccagggtgtggacacctatgtggagatgaggcctgtctccactcttcaaatgactccttctctgagca gacctggacaaggaggtggaacggccctggagctccgggacctgcttacttctccagccaagtagc ccagggtcatggccttctcgtctccaagaattgcatccaccgggacgtggcagcgcgtaacgtgctgtg accaatggtcatgtggccaagattNNNgacttcgggctggctaggggacatcatgaatgactccaacta cattgtcaagggaatgcccgcctgctgtgaagtggatggcccagagagcatcttgactgtgtctaca cggttcagagcgacgtcgtgctatggcatcctctctggtgagatcttctactgggctgaatccctacc tggcatcctggtgaacagcaagttctataaactggtgaaggatggataccaaatggcccagcctgcattt gccccaaagaatatatacagcatcatgcaggcctgctgggcttgaggccaccacagacccacctt ccagcagatctgctcctcctcaggagcaggcccaagaggacaggagagagcgggactataccaat ctgccgagcagcagcagaagcgggtggcagcggcagcagcagcagtgagctggaggaggagagct ctagtgcacctgacctgctgcgagcaaggggatatgccagccctgtgcagcccaacaactatc agttctgctga	10
C S F 1 R G 7 9 5 V (アミノ酸)	MGPGVLLLLLVATAWHGQGIPVIEPSVPELVVKPGATVTLRCVGNGSVEWD GPPSPHWTLYSDGSSSILSTNNATFQNTGTYRCTEPGDPLGSSAAIHLYVK DPARPWNVLAQEVVVFEDQDALLPCLLTDPLVLEAGVSLVRVRGRPLMRHT NYSFSPWHGFTIHRAKFIQSQDYQCSALMGGRKVMSSIRLKVQKVIPGPP ALTLVPAELVRIRGEAAQIVCSASSVDVNFDFLQHNNTKLAIPQQSDFHNN RYQKVLTNLNDQVDFQHAGNYSCVASNVQGHSTSMFFRVVESAYLNLSS EQNLQIEVTVGEGLNLKVMVEAYPGLQGFWNTYLGPFSHQPEPKLANAT TKDTRYHTFTLSLPRPKPSEAGRYSFLARNPGGWRAITFELTLRYPPEVSV IWTFINSGTLLCAASGYQPQNVTLQCSGHTDRCDEAQLQVWDDPYP EVLSQEPFHKVTVQSLTETLEHNQTYECRAHNSVSGSGSWAFIPISAGAH THPPDEFLLTPVVVACMSIMALLLLLLLLLLLYKYKQKPKYQVRWKIIESYEG NSYTFIDPTQLPYNEKWEFPRNNLQFGKTLGAGAFGKVVEATAFGLGKED AVLKVAVKMLKSTAHADKEALMSELKIMSHLGQHENIVNLLGACTHGGPV LVITEYCCYGDLLNFLRRKAEAMLGPSLSPGQDPEGGVVDYKNIHLEKKYVR	8

10

20

30

40

50

【表 1 - 8】

	RDSGFSSQGVDTYVEMRPVSTSSNDSFSEQDLKEDGRPLELRDLLHFS SQVAQGMAFLASKNCIHRDVAARNVLLTNGHVAKIVDFGLARDIMNDSNYI VKGNARLPVKWMAPEISIFDCVYTVQSDVWSYGILLWEIFSLGLNPYPGILV NSKFYKLVKDGYSMAQPAFAPKNIYSIMQACWALEPTHRPTFQQICSLQE QAQEDRRERDYTNLPSSSRSGSGSSSELEEESSSEHLTCCEQGDIAQ PLLQPNNYQFC	
--	---	--

10

【0055】

いくつかの実施形態では、細胞（例えば、改変ヒト細胞）は、CSF1R受容体（すなわち、CSF1Rタンパク質）に関する遺伝子に1つ以上の遺伝子改変を含む。いくつかの実施形態では、細胞（例えば、改変ヒト細胞）は、CSF1Rタンパク質（すなわち、CSF1R受容体）に1つ以上の遺伝子改変を含む。

【0056】

いくつかの実施形態では、CSF1R受容体（すなわち、CSF1Rタンパク質）の1つ以上の遺伝子改変は、構成的に活性なCSF1Rシグナル伝達を誘導しない。改変CSF1R受容体（すなわち、CSF1Rタンパク質）は、CSF1Rタンパク質のリガンドによって依然として活性化（例えば、リン酸化）され得る。いくつかの実施形態では、CSF1Rタンパク質のリガンドには、限定するものではないが、CSF1、IL-34、CSF1Rのアゴニストもしくは活性化抗体、またはそれらの組合せが含まれ得る。いくつかの実施形態では、改変CSF1Rタンパク質は、CSF1リガンドによって活性化される。いくつかの実施形態では、CSF1リガンドは、改変CSF1Rタンパク質のリン酸化を誘導する。他の実施形態では、改変CSF1Rタンパク質は、IL-34リガンドによって活性化される。いくつかの実施形態では、IL-34リガンドは、改変CSF1Rタンパク質のリン酸化を誘導する。

20

【0057】

いくつかの実施形態では、1つ以上の遺伝子改変は、改変ATP結合ポケットをもたらす。CSF1R受容体（すなわち、CSF1Rタンパク質）の改変ATP結合ポケットは、（野生型CSF1Rタンパク質と比較して）減少した結合空間（binding space）を有し得る。いくつかの実施形態では、改変ATP結合ポケットは、薬物（例えば、CSF1RアンタゴニストまたはCSF1Rアゴニスト）に結合することができない。他の実施形態では、改変ATP結合ポケットは、ATPに結合することができる。いくつかの実施形態では、CSF1R受容体の1つ以上の遺伝子改変は、CSF1Rタンパク質のATP結合活性を妨害しない。いくつかの実施形態では、CSF1R受容体の1つ以上の遺伝子改変は、薬物（例えば、CSF1RアンタゴニストまたはCSF1Rアゴニスト）が結合するためのポケットを欠くが、CSF1Rタンパク質の正常なATP結合活性を妨害しない。

30

【0058】

いくつかの実施形態では、1つ以上の遺伝子改変は点変異である。いくつかの実施形態では、1つ以上の遺伝子改変は、単一アミノ酸置換をもたらす。他の実施形態では、1つ以上の遺伝子改変は、単一アミノ酸挿入をもたらす。さらなる実施形態では、1つ以上の遺伝子改変は、単一アミノ酸欠失をもたらす。

40

【0059】

いくつかの実施形態では、1つ以上の遺伝子改変は、CSF1Rタンパク質のアミノ酸配列の変化をもたらす。アミノ酸配列の変化は、場合により、G795、L785、M637、E633およびV647から選択されるアミノ酸残基の置換を含み得る。いくつかの実施形態では、1つ以上の遺伝子改変は、アミノ酸置換をもたらす。いくつかの実施形態では、1つ以上の遺伝子改変は、単一アミノ酸置換をもたらす。単一アミノ酸点変異は

50

、G 7 9 5 A、G 7 9 5 VおよびG 7 9 5 Cからなる群から選択され得る。

【0060】

いくつかの実施形態では、CSF1R遺伝子は、改変細胞内のCSF1Rアンタゴニストに対する部分的または完全な耐性を付与するように改変される。いくつかの実施形態では、CSF1R遺伝子は、単一点変異によって改変される。他の実施形態では、CSF1R遺伝子の単一点変異は、限定するものではないが、位置G 7 9 5、L 7 8 5、M 6 3 7、E 6 3 3および／またはV 6 4 7に、これらの単一アミノ酸置換を含み得る。非限定的な例として、置換は、G 7 9 5 A、G 7 9 5 V、またはG 7 9 5 C、またはG 7 9 5 D、またはG 7 9 5 E、またはG 7 9 5 F、またはG 7 9 5 G、またはG 7 9 5 H、またはG 7 9 5 I、またはG 7 9 5 K、またはG 7 9 5 L、またはG 7 9 5 M、またはG 7 9 5 N、またはG 7 9 5 P、またはG 7 9 5 Q、またはG 7 9 5 RまたはG 7 9 5 S、またはG 7 9 5 T、またはG 7 9 5 W、またはG 7 9 5 Yを含み得る。

10

【0061】

いかなる理論または機構にも束縛されることを望むものではないが、これらの残基、またはATP結合部位に結合した小分子阻害剤と直接接触する任意の他のアミノ酸残基の置換は、それらの結合を変化させると予測される。わずかにさらに大きな官能基を含むアミノ酸置換：セリン；トレオニン；システイン；バリン；ロイシン；イソロイシン；およびメチオニンは、プレキシコン結合と衝突するがそれでもなおCSF1R機能のためのATP結合を可能にする嵩高い置換基を導入すると予測される。さらに大きなアミノ酸置換：フェニルアラニン、チロシン、リジン、アルギニンおよびトリプトファンは、阻害剤およびATPの両方と立体的に衝突し、それによって、正常なCSF1R機能を阻害すると予測される。対照的に、あまり嵩高くない側鎖を有するアミノ酸、例えば、グリシンまたはアラニンによる置換は、わずかに大きいまたは非相溶性の極性側鎖による立体障害に起因して天然配列によって弱く結合されるだけのアンタゴニスト種への結合を改善し得る。ひいては、当業者であれば、アロステリックなアンタゴニストの結合部位を定義するこれらおよび他の残基が本開示の目的に従って改変を受け得ることを理解するであろう。

20

【0062】

他の実施形態では、1つ以上の遺伝子改変は、CSF1Rタンパク質の複数のアミノ酸の変化をもたらす。いくつかの実施形態では、複数のアミノ酸の変化は、隣接するアミノ酸に対するものである。他の実施形態では、複数のアミノ酸の変化は、隣接していないアミノ酸に対するものである。

30

【0063】

いくつかの実施形態では、1つ以上の遺伝子改変（例えば、点変異）は、CSF1Rタンパク質（すなわち、CSF1R受容体）のATP結合ポケット内にある。他の実施形態では、1つ以上の遺伝子改変（例えば、点変異）は、CSF1Rタンパク質（すなわち、CSF1R受容体）のATP結合ポケットの外側にある。本開示をいかなる理論または機構にも限定することを望むものではないが、CSF1Rタンパク質のATP結合ポケットの外側の変異は、アロステリズムを介して作用してアンタゴニスト結合を阻害し得ると考えられる。

【0064】

いくつかの実施形態では、1つ以上の遺伝子改変は、エキスピボで導入される。他の実施形態では、1つ以上の遺伝子改変は、導入遺伝子をコードする核酸を細胞（例えば、ヒト細胞）にトランスフェクトまたは導入することによって誘導される。さらなる実施形態では、1つ以上の遺伝子改変は、標的とされるヌクレアーゼ、ニッカーゼまたは塩基編集エフェクター（base-editing effector）もしくはリボ核タンパク質複合体の形質導入または導入によって導入される。いくつかの実施形態では、導入遺伝子をコードする核酸を細胞に導入することは、細胞（例えば、ヒト細胞）をウイルスベクターと接触させることを含む。

40

【0065】

いくつかの実施形態では、CSF1R遺伝子の1つ以上の遺伝子改変（例えば、点変異

50

）は、限定するものではないが、C R I S P R - C a s ゲノム編集系、T A L E N ゲノム編集系および Z F N ゲノム編集系を含む、当技術分野で公知の部位特異的変異誘発方法またはランダム変異誘発方法によって生成される。代替的にまたは追加的に、改変 C S F 1 R 導入遺伝子は、例えば、裸の核酸などの D N A ベクターもしくは R N A ベクター、リポソーム、もしくは他のカプセル化された核酸ベクター、人工染色体、ならびに／またはレンチウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルスベクターなどのウイルスベクターによって細胞（例えば、ヒト細胞）に導入され得る。

【0066】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の改変 C S F 1 R タンパク質を含む細胞（例えば、ヒト細胞）は、野生型 C S F 1 R タンパク質を含む細胞（例えば、ヒト細胞）の遺伝子発現プロファイルを保持する。いくつかの実施形態では、改変 C S F 1 R タンパク質を含むインビトロ細胞（例えば、インビトロヒト細胞）は、野生型 C S F 1 R タンパク質を含むインビトロ細胞（例えば、インビトロヒト細胞）と同様の遺伝子発現プロファイルを有する。他の実施形態では、インビボで移植された、改変 C S F 1 R タンパク質を含む細胞（例えば、ヒト細胞）は、改変 C S F 1 R タンパク質を損なわない、移植された細胞（例えば、ヒト細胞）の類似の遺伝子発現プロファイルを有する。さらなる実施形態では、本明細書に記載の改変 C S F 1 R 発現細胞（例えば、C S F 1 R 発現食細胞）は、野生型 C S F 1 R 発現細胞（例えば、C S F 1 R 発現食細胞）の遺伝子発現プロファイルを保持する。

【0067】

本開示はまた、本明細書に記載の C S F 1 R 発現細胞を含む組成物を特徴とし得る。本開示はまた、本明細書に記載の C S F 1 R 発現食細胞を含む組成物を特徴とし得る。いくつかの実施形態では、組成物は、複数の細胞を含む。いくつかの実施形態では、複数の細胞の少なくとも 0.1%、少なくとも 1%、少なくとも 5%、少なくとも 10%、少なくとも 20%、少なくとも 30%、少なくとも 40%、少なくとも 50%、または少なくとも 60%、または少なくとも 70%、または少なくとも 80%、または少なくとも 90%、または少なくとも 99%、または少なくとも 99.5% は、C S F 1 R アンタゴニストに対して示差的な耐性を有する C S F 1 R 発現細胞である。他の実施形態では、複数の細胞の少なくとも 0.1%、少なくとも 1%、少なくとも 5%、少なくとも 10%、少なくとも 20%、少なくとも 30%、少なくとも 40%、少なくとも 50%、または少なくとも 60%、または少なくとも 70%、または少なくとも 80%、または少なくとも 90%、または少なくとも 99%、または少なくとも 99.5% は、C S F 1 R アンタゴニストに対して示差的な耐性を有する C S F 1 R 発現食細胞である。

【0068】

本開示は、対象を治療する方法を特徴とする。方法は、対象の細胞内で C S F 1 R シグナルを阻害するのに十分な量で C S F 1 R アンタゴニストを対象に投与すること、および対象を、C S F 1 R アンタゴニストに対して示差的な耐性を有する改変 C S F 1 R 発現細胞（例えば、改変 C S F 1 R 発現食細胞）と接触させることを含む。他の実施形態では、方法は、対象を、C S F 1 R アンタゴニストに対して示差的な耐性を有する改変 C S F 1 R 発現細胞（例えば、改変 C S F 1 R 発現食細胞）と接触させること、および対象の細胞内で C S F 1 R シグナルを阻害するのに十分な量で C S F 1 R アンタゴニストを対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、C S F 1 R アンタゴニストに対する示差的な耐性は、C S F 1 R アンタゴニストに対する部分的な耐性または完全な耐性である。

【0069】

本明細書に記載の改変 C S F 1 R 発現細胞（例えば、改変ヒト C S F 1 R 発現細胞）は、別の遺伝子（例えば、C S F 1 R 遺伝子の外側）に 1 つ以上の改変（例えば、1 つ以上の遺伝子改変をさらに含み得る。いくつかの実施形態では、改変 C S F 1 R 発現細胞（例えば、改変 C S F 1 R 発現食細胞）は、神経疾患を治療するか、治癒させるか、改善するか、予防するか、または緩和するのに有用な遺伝子産物を発現する。いくつかの実施形態では、遺伝子産物は、C S F 1 R 発現細胞（例えば、改変 C S F 1 R 発現食細胞）によ

て普通ならば発現されない。他の実施形態では、改変 C S F 1 R 発現細胞（例えば、改変 C S F 1 R 発現食細胞）は、神経疾患を治療するか、治癒させるか、改善するか、予防するか、または緩和するのに有用な他の遺伝子改変を発現する。他の実施形態では、他の遺伝子改変（C S F 1 R 遺伝子の外側）は、変異した遺伝子を修正して、その他の遺伝子の変異によって引き起こされる疾患を治療するために使用される。

【0070】

いくつかの実施形態では、C S F 1 R アンタゴニストによって阻害される C S F 1 R シグナルは、対象にとって内因性の C S F 1 R 発現細胞（例えば、C S F 1 R 発現食細胞）の増殖または生存である。他の実施形態では、C S F 1 R アンタゴニストは、改変 C S F 1 R 発現細胞（例えば、改変 C S F 1 R 発現食細胞）と比較して対象の内因性 C S F 1 R 発現細胞（例えば、C S F 1 R 発現食細胞）の増殖または生存を減少させるのに十分な量で対象に投与される。

10

【0071】

本開示はまた、対象を治療する方法を特徴とし得る。方法は、対象を、改変 C S F 1 R 発現細胞（例えば、改変 C S F 1 R 発現食細胞）と接触させること、および改変 C S F 1 R 発現細胞（例えば、改変 C S F 1 R 発現食細胞）と比較して、未改変 C S F 1 R 発現細胞（例えば、未改変 C S F 1 R 発現食細胞）の増殖または生存を示差的に変化させることを含み得る。いくつかの実施形態では、改変 C S F 1 R 発現細胞（例えば、改変 C S F 1 R 発現食細胞）は、C S F 1 R アンタゴニストに対して部分的に耐性である。いくつかの実施形態では、未改変 C S F 1 R 発現細胞（例えば、未改変 C S F 1 R 発現食細胞）の増殖または生存を示差的に変化させる工程は、改変 C S F 1 R 発現細胞（例えば、改変 C S F 1 R 発現食細胞）と比較して未改変 C S F 1 R 発現細胞（例えば、未改変 C S F 1 R 発現食細胞）の増殖または生存を減少させるのに十分な量で C S F 1 R アンタゴニストを対象に投与することを含む。

20

【0072】

本明細書に記載の方法は、対象の C N S 内の内因性 C S F 1 R 発現食細胞の約 0.1 %、または約 1 %、または約 5 %、または約 10 %、または約 20 %、または約 30 %、または約 40 %、または約 50 %、または約 60 %、または約 70 %、または約 80 %、または約 90 %、または約 99 %、または約 99.5 % を死滅させ得る。他の実施形態では、本明細書に記載の方法は、対象の C N S 内の内因性 C S F 1 R 発現食細胞をすべて死滅させ得る。

30

【0073】

本明細書に記載の方法は、対象の C N S 内の改変 C S F 1 R 発現食細胞の約 0.1 %、または約 1 %、または約 5 %、または約 10 %、または約 20 %、または約 30 %、または約 40 %、または約 50 %、または約 60 %、または約 70 %、または約 80 %、または約 90 %、または約 99 %、または約 99.5 % の生着をさらに可能にし得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、対象の C N S 内の改変 C S F 1 R 発現食細胞の完全な生着を可能にする。

【0074】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、対象を本開示の改変細胞またはベクターと接触させることによって神経疾患を治療すること、予防すること、緩和すること、または改善することに関する。いくつかの実施形態では、神経疾患は、神経系の疾患を含む。神経疾患の非限定的な例には、限定するものではないが、認知症、神経変性疾患、遺伝性疾患、脊髄損傷、外傷性脳損傷、化学物質または他の薬剤への曝露によって引き起こされるまたは悪化する疾患などが含まれ得る。

40

【0075】

本開示はまた、神経疾患を治療するための組成物であって、C S F 1 R アンタゴニストに対して示差的な（例えば、増加した、低下した、部分的な、または完全な）耐性を有する複数の改変細胞を含む組成物を特徴とし得る。いくつかの実施形態では、改変細胞は C S F 1 R 発現細胞である。

50

【0076】

本開示は、本明細書に記載のCSF1Rアンタゴニストに対して示差的な耐性を示す改変CSF1Rタンパク質をコードする核酸組成物およびベクターをさらに特徴とし得る。いくつかの実施形態では、核酸組成物およびベクターは、限定するものではないが、導入遺伝子、マーカーまたはレポーター遺伝子などを含むペイロードを含み得る。いくつかの実施形態では、発現ベクターは、発現制御配列に作動可能に連結された、本明細書に記載の核酸組成物を含む。

【0077】

いくつかの実施形態では、核酸組成物は、CSF1Rアンタゴニストに対して示差的な耐性を示す改変CSF1Rタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、CSF1Rアンタゴニストに対する示差的な耐性は、CSF1Rアンタゴニストに対する部分的な耐性、完全な耐性、増加した耐性、または低下した耐性である。

【0078】

他の実施形態では、核酸組成物は、1つ以上の遺伝子改変を含む改変CSF1Rタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の遺伝子改変は、G795A、G795V、G795C、L785、M637、E633およびV647からなる群から選択されるアミノ酸置換をもたらす。

【0079】

いくつかの実施形態では、本開示は、CSF1Rアンタゴニストに対して示差的な耐性を示す改変CSF1Rタンパク質を含む核酸組成物を含む発現ベクターを特徴とする。

【0080】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の発現ベクターは、培養細胞または内因性細胞を改変するために使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の発現ベクターは、培養細胞、または上記細胞の子孫がポリペプチドを発現するように、培養細胞をトランスフェクトするために使用される。他の実施形態では、本明細書に記載の発現ベクターは、核酸を形質導入することによって（例えば、ウイルスベクターに感染させてCSF1Rアンタゴニスト耐性細胞をインサイチュで作製することによって）内因性CSF1R発現細胞を改変するために使用される。

【0081】

本開示の方法および組成物は、本開示の変異を導入し、それによって、改変細胞を作製するように構成された改変細胞またはベクターまたはゲノム編集系（例えば、CRISPR-Cas系、TALEN系またはZFN系）が、疾患または障害の予防、緩和、改善または治療に使用されるヒト用途または獣医学用途に有利に使用され得る。一般に、これらの方法は、対象をそのような細胞を生成するように構成された改変細胞またはベクターまたはゲノム編集系と接触させる工程、および対象をCSF1Rアンタゴニストと接触させる工程を含む。

【0082】

まず、本開示の方法が好適であり得る対象に目を向けると、任意の対象がこれらの方法による治療の候補であり得るが、対象の天然細胞または内因性細胞と比較してCSF1Rアンタゴニストに対する示差的な応答を特徴とする、本開示の細胞と対象を接触させることによって予防、緩和、改善または治療され得る神経疾患などの疾患に罹患しているか、またはそれに罹患すると予測されるか、もしくはそれに罹患する傾向がある対象を治療することが有利であり得る。上記を限定するものではないが、本開示の方法による治療に適した神経疾患は、認知症、神経変性疾患、脱髄疾患、気分障害または人格障害、外傷性脳損傷、遺伝性疾患、悪性腫瘍または良性腫瘍、転移性腫瘍または転移性増殖などを含み得る。

【0083】

対象は、任意の好適な時点で、任意の好適な投与経路によって、例えば、限定するものではないが、静脈内、筋肉内、腹腔内、実質内、髄腔内、頭蓋内（intercranial）、骨間もしくは他の注射もしくは注入、経皮投与（ベクターの場合）によって、お

10

20

30

40

50

よび／または外科的埋込みもしくは外科的移植によって、本開示の改変細胞またはベクターと接触させられ得る。任意の好適な数の細胞、または任意の好適な力価のベクター、例えば、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 個などの細胞、および／または 10^{14} 、 10^{13} 、 10^{12} 、 10^{11} 、 10^{10} 、 10^9 個もしくはそれ以下のビリオンもしくはウイルスゲノムが投与され得る。改変細胞に関して、対象が接触させられる細胞は、対象自身の細胞に由来してもよい（自己細胞）、または別のドナーに由来してもよい（同種細胞）。

【0084】

当業者であれば、CSF1Rアンタゴニストに対する本開示の改変細胞の示差的な感受性は、CSF1Rアンタゴニストの存在下で最も明確に現れ得ることを理解するであろう。したがって、対象はCSF1Rアンタゴニストといつでも接触させられ得るが（例えば、限定するものではないが、本開示の改変細胞と対象を接触させる前の前処理または前処置として）、本開示のいくつかの実施形態は、対象を改変細胞もしくはベクターと接触させる工程と同時におよび／またはその後CSF1Rアンタゴニストを対象に投与することを含む。CSF1Rアンタゴニストは、連続的または不連続的に投与されてもよく、投与の開始または中止は、スケジュールされ得るかもしくは事前プログラムされ得るか、または対象からの生理学的読出し、例えば、バイオマーカー濃度、バイオマーカーもしくはその小分子活性成分もしくは代謝産物の血清濃度もしくは組織濃度、画像化シグナルもしくは徴候などに応答してもよい。

【0085】

1つの非限定的な例として、CSF1Rアンタゴニストに対する低下した感受性（すなわち、部分的または完全な耐性）を示す改変細胞の場合、上記CSF1Rアンタゴニストは、そのような細胞が占有するニッチ内の天然細胞の増殖または生存を減少させるために対象に投与され、それによって、改変細胞に選択的利点を付与し、場合により、CSF1Rアンタゴニストの非存在下で観察されるものと比較して、改変細胞の生着または他の挙動の速度を増加させてもよい。この投与は、対象を改変細胞またはベクターと接触させる工程の前に、それと同時に、またはその後開始されてもよく、場合により終了されてもよい。上記を限定するものではないが、改変細胞がミクログリア細胞またはミクログリア前駆細胞である場合、CSF1Rアンタゴニストは、改変ミクログリア系統細胞の移植前、移植と同時、および／または移植後に対象に投与されて、内因性ミクログリアの増殖および／または生存を制限し、それによって、普通ならば観察されるであろうよりも、改変ミクログリアの高度の生着および／または大きな空間分布をもたらし得る利点を改変ミクログリアに付与してもよい。

【0086】

代替的にまたは追加的に、本開示の改変細胞は、未改変細胞と比較して、CSF1Rアンタゴニストに対する増加した感受性を示し得る。この場合、CSF1Rアンタゴニストは、一般に（必ずしもそうとは限らないが）、対象を改変細胞と接触させる工程の前および最中は差し控えられ、代わりに、対象を改変細胞またはベクターと接触させた後に投与されて、例えば、治療過程の終了時に、生理学的もしくは薬理的測定からのシグナルに応答して、および／または有害事象、もしくは改変細胞を利用した治療介入の有効性の低下に応答して、改変細胞の増殖または生存を制限する。

【0087】

本開示の改変細胞は、場合により、同じタイプの天然細胞と比較して1つ以上の追加の改変を含む。これらの改変には、限定するものではないが、1つ以上の導入遺伝子、または変異を修正するか、もしくは遺伝子産物の発現を減少もしくは増加させる1つ以上の遺伝子改変が含まれ得る。上記を限定するものではないが、本開示は、CSF1Rアンタゴニストに対する感受性が低下したCSF1R対立遺伝子を発現するように操作されたミクログリア細胞、および酵素または結合タンパク質などの分泌導入遺伝子、アンチセンス、miRNAまたはsiRNAなどのRNA、キメラ抗原受容体などの細胞表面タンパク質、膜結合免疫グロブリンまたはその断片、アプタマーなどを含む。本開示はまた、実質的

に上記のような細胞を作製するベクターおよび方法、ならびに対象を治療するために細胞またはベクターを使用する、対象を治療する方法を含む。

【0088】

本開示を何らかの理論または機構に限定することを望むものではないが、CSF1Rアンタゴニストに対して示差的な耐性を有する現在特許請求されている細胞を実現するために、様々な方法を使用することができると考えられる。本明細書には、この目的を達成する非限定的な方法／例が記載されている。均等物または置換物は、本開示の範囲内である。

【0089】

例

【0090】

以下は、本発明の非限定的な例である。上記例は、本発明を限定することを決して意図するものではないことを理解されたい。均等物または置換物は、本発明の範囲内である。

【0091】

ヒトミクログリア、ヒトマクロファージおよびヒト単球ならびに／またはそれらの前駆体細胞（造血前駆細胞（HPC）および造血幹細胞（HSC）、エリスロミエロイド前駆細胞（EMP）または原始マクロファージ前駆細胞（PMP）の競合的生着を促進するために、いくつかの手法を独立してまたは組み合わせて使用することができる。1）同じ結合ポケットへのATPの正常な結合を損なわずに、CSF1Rアンタゴニストの結合を立体的に妨害し得るアミノ酸置換を予測するために、アンタゴニスト（PMID：31434879）に結合したCSF1R受容体の以前に公開された結晶構造を使用すること。2）PCRを介したランダム変異誘発を使用してアミノ酸変化を導入し、続いて、iPSCミクログリアをCSF1Rアンタゴニストに曝露し、次いで、生存変異体を配列決定して、CSF1Rアンタゴニストに対する耐性を付与するが、構成的に活性なCSF1Rシグナル伝達を同時に誘導しない変異を同定すること。3）CSF1Rの下流の遺伝子を改変すること、例えば、SHIP1（INPP5D）の発現を欠失または一過性に低下させてCSF1Rシグナル伝達を増強する。4）CSF1Rシグナル伝達のアゴニストが移植されているミクログリアを前処理することはまた、移植された細胞内のCSF1Rシグナル伝達を調節し、一過性に増加させて、CSF1Rアンタゴニスト処置に対する耐性を促進するために、siRNA遺伝子送達手法またはマイクロRNA遺伝子送達手法を使用することもできる。最初の2つの戦略に関連する追加の詳細およびデータを以下に示す。

【0092】

戦略1：同じ結合ポケットへのATPの正常な結合を損なわずに、CSF1Rアンタゴニストの結合を立体的に妨害し得るアミノ酸置換を予測するための、アンタゴニスト（PMID：31434879）に結合したCSF1R受容体の結晶構造。ヒトCSF1Rに結合したPLX5622の結晶構造を得、ATP結合ポケットを調査した（図7A）。分子モデリングを通して、CSF1Rへの正常なATP結合を破壊せずに、PLX5622もしくはPLX3397または他のCSF1Rアンタゴニストの結合を損なう可能性が高い単一アミノ酸変化が予測された。具体的には、このモデリングは、アラニン（A）、バリン（V）またはシステイン（C）のいずれかによるアミノ酸G795の置換が、ATPの正常な結合能力を破壊することなく、PLX5622および／またはPLX3397結合の立体障害を増加させることを示唆している（図7Aおよび図7B）。結合を防ぐ他の変異も調査することができた（図7D）。これらの単一アミノ酸置換の各々、すなわち、G795A、G795V、G795Cを有するヒトiPSCを生成するためにCRISPR標的化戦略を設計し、CRISPR標的化戦略は、これらの改変ヒトiPSC株を成功裏に産生した（編集された配列を示すサンガー配列決定クロマトグラムを図8に示す）。次いで、得られたiPSCをミクログリアに分化させ、様々な濃度のPLX3397またはPLX5622のいずれかに曝露した。ミクログリア細胞死（アポトーシス）を検出するために、カスパーゼ-3／7蛍光発生レポーターを使用した。図4Aは、PLX3397に応答した野生型（WT）未編集ヒトiPSC-ミクログリア対G795AおよびG7

10

20

30

40

50

95C CSF1R変異体株における細胞死の用量依存的誘導を示し、図4Bは、PLX5622に対する応答を示す。PLX化合物処理の24時間以内に、WTヒトミクログリアは、いずれかの化合物に応答して、アポトーシスの強固な用量依存的誘導を示す。対照的に、G795AおよびG795Cの両変異体株は、細胞死に対する完全な耐性を示す。図4Fは、PLX3397およびPLX5622の各用量にわたる細胞密度（位相差顕微鏡法、1列目）および蛍光カスパーゼ-3/7活性（2列目）の代表的な画像を提供した。

【0093】

結晶構造をさらに調査することにより、変異した場合にPLX5622および／またはPLX3397の結合の減少をもたらし得る他の位置も提示される。例には、L785、M637、E633およびV647（図4D）が挙げられる。これらの位置はいずれも、PLX5622および／またはPLX3397の結合部位に密接に接触しており、変異した場合に結合を防ぎ得る。

【0094】

戦略2：PCRを介したランダム変異誘発を使用してアミノ酸変化を導入し、続いて、iPS-ミクログリアをCSF1Rアンタゴニストに曝露し、次いで、生存変異体を配列決定して、CSF1Rアンタゴニストに対する耐性を付与するが、構成的に活性な、または抑制されたCSF1Rシグナル伝達を同時に誘導しない変異を同定する。CSF1R遺伝子にランダム変異を有するiPSC細胞株または単球細胞株のプールを生成する。次いで、このプールをミクログリアに分化させ、CSF1/IL-34中止またはCSF1Rアンタゴニスト処理のいずれかに応答して細胞の生存をモニタリングする。PCRおよび配列決定によって、これらの条件下でさらに長く生存する細胞を調査して、CSF1Rアンタゴニストに対する耐性を付与し得るCSF1R変異を同定する。次いで、カウンタースクリーニングを行って、過剰増殖、または増殖の顕著な喪失ももたらさないCSF1R変異を同定する。最適な変異が同定されたら、これらの変異を有するiPSC株を拡大増殖させ、これらの株に由来するミクログリアをキメラモデルにおいてインビボで調査して、インビボでのCSF1Rアンタゴニストに対する耐性を決定する。

【0095】

蛍光発生カスパーゼ3/7検出器（Essen BioScience）と24時間にわたる微速度撮影イメージングとを使用して、試験したCSF1R阻害剤の各々に対する耐性を定量した。WTミクログリアは、24時間のイメージングにわたって、DMSO対照処理と比較して、漸増濃度のPLX3397（MedChemExpress）、PLX5622（MedChemExpress）、エディコチニブおよびBLZ945に対して有意なレベルのカスパーゼの増加を示し、マクロファージコロニー刺激因子/コロニー刺激因子1受容体（CSF1R）の阻害に対する細胞死応答の増加が示された。一方、G795A iPSC-ミクログリアおよびG795C iPSC-ミクログリアは、DMSO対照処理と比較して、漸増濃度のPLX3397、PLX5622、エディコチニブまたはBLZ945のいずれかに対してカスパーゼレベルの有意な増加を示さなかった。これらの結果は、遺伝子改変されたCSF1受容体の結果としてのPLX処理に対する獲得耐性を示す（図4A、図4B、図4C、図4Dおよび図4Eを参照）。

【0096】

細胞死アッセイ：iPS-ミクログリアを96ウェルプレート当たり70K細胞（6ウェル/株/条件）で播種した。時間0に、Incucyte Caspase-3/7 Green Apoptosis Assay Reagent 1:1000を用いて全ミクログリアを処理した。記載された培地、すなわち、新鮮完全培地+0.1%DMSO、完全培地+250nM PLX3397、完全培地+500nM PLX3397、完全培地+1μM PLX3397、完全培地+250nM PLX5622、完全培地+500nM PLX5622、完全培地+1μM PLX5622、完全培地+250nM エディコチニブ、完全培地+500nM エディコチニブ、完全培地+1μM エディコチニブ、完全培地+250nM BLZ945、完全培地+500nM BLZ9

45、完全培地 + 1 μm BLZ 945 中で細胞を維持した。ウェル当たり4つの20×画像を24時間にわたって1時間ごとに収集した。Incucyte 2020Bソフトウェアを使用して、フェイズコンフルエンス (phase confluence) (視覚的にゲートアウトされたアポトーシス細胞) およびカスパーゼ3/7シグナル (緑色) のための画像マスクを生成した。グラフは、3つの株: WT、G795A、G795Cを備えた、フェイズコンフルエンスに対して正規化されたカスパーゼを示す (図4A、図4B、図4C、図4Dおよび図4Eを参照)。

【0097】

実施形態

【0098】

以下の実施形態は、例示のみを意図しており、決して限定するものではない。

【0099】

実施形態1: CSF1Rアンタゴニストに対して示差的な耐性を示す改変ヒト細胞。

【0100】

実施形態2: CSF1Rアンタゴニストに対して示差的な耐性を示す改変CSF1Rタンパク質をコードする核酸を含む、実施形態1の細胞。

【0101】

実施形態3: CSF1Rアンタゴニストに対して示差的な耐性を示す改変CSF1Rタンパク質をコードする核酸を含む改変ヒト細胞。

【0102】

実施形態4: CSF1Rタンパク質に1つ以上の遺伝子改変を含む、実施形態1~3のいずれか1つの細胞。

【0103】

実施形態5: 1つ以上の遺伝子改変が、CSF1Rのアミノ酸配列の変化をもたらし、変化が、G795、L785、M637、E633およびV647から選択されるアミノ酸残基の置換を場合により含む、実施形態4の細胞。

【0104】

実施形態6: 1つ以上の遺伝子改変が、改変ATP結合ポケットをもたらす、実施形態1~5のいずれか1つの細胞。

【0105】

実施形態7: 改変ATP結合ポケットが、減少した結合空間を有する、実施形態6の細胞。

【0106】

実施形態8: 改変ATP結合ポケットが、CSF1Rアンタゴニストに結合することができない、実施形態7の細胞。

【0107】

実施形態9: 改変ATP結合ポケットが、ATPに結合することができる、実施形態6の細胞。

【0108】

実施形態10: CSF1Rタンパク質の1つ以上の遺伝子改変が、CSF1Rタンパク質のATP結合活性を妨害しない、実施形態1~9のいずれか1つの細胞。

【0109】

実施形態11: CSF1Rタンパク質の1つ以上の遺伝子改変が、構成的に活性なCSF1Rシグナル伝達を誘導しない、実施形態1~10のいずれか1つの細胞。

【0110】

実施形態12: 改変CSF1Rタンパク質が、CSF1リガンドによって活性化される、実施形態11の細胞。

【0111】

実施形態13: CSF1リガンドが、改変CSF1Rタンパク質のリン酸化を誘導する、実施形態12の細胞。

10

20

30

40

50

【0112】

実施形態14：改変CSF1Rタンパク質が、IL-34リガンドによって活性化される、実施形態11の細胞。

【0113】

実施形態15：IL-34リガンドが、改変CSF1Rタンパク質のリン酸化を誘導する、実施形態14の細胞。

【0114】

実施形態16：1つ以上の遺伝子改変が、エキスピボで導入される、実施形態4の細胞。

【0115】

実施形態17：1つ以上の遺伝子改変が、導入遺伝子をコードする核酸を細胞にトランスフェクトもしくは導入することによって、または標的とされるヌクレアーゼ、ニックアーゼもしくは塩基編集エフェクターもしくはリボ核タンパク質複合体を形質導入もしくは導入することによって誘導される、実施形態4の細胞。

【0116】

実施形態18：導入遺伝子をコードする核酸を細胞に導入することが、細胞をウイルスベクターと接触させることを含む、実施形態17の細胞。

【0117】

実施形態19：改変CSF1Rタンパク質を含む細胞が、野生型CSF1Rタンパク質を含む細胞の遺伝子発現プロファイルを保持する、実施形態1～18のいずれか1つの細胞。

【0118】

実施形態20：別の遺伝子に1つ以上の改変をさらに含む、実施形態1～19のいずれか1つの細胞。

【0119】

実施形態21：CSF1Rを発現している、実施形態1～20のいずれか1つによる改変ヒト細胞。

【0120】

実施形態22：CSF1Rを発現するように誘導および分化され、多能性幹細胞、造血幹細胞、エリスロミエロイド前駆細胞および造血前駆細胞からなる群から選択される、実施形態21の細胞。

【0121】

実施形態23：CSF1R発現細胞であり、ミクログリア、マクロファージ、単球または他の食細胞からなる群から選択される、実施形態22の細胞。

【0122】

実施形態24：実施形態20～23のいずれか1つによるCSF1R発現細胞を含む組成物。

【0123】

実施形態25：CSF1R発現細胞がCSF1R発現細胞である、実施形態24の組成物。

【0124】

実施形態26：複数の細胞を含み、細胞の少なくとも0.1%、少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも99%が、CSF1Rアンタゴニストに対して示差的な耐性を有するCSF1R発現細胞である、実施形態25の組成物。

【0125】

実施形態27：対象を治療する方法であって、(a)対象の細胞内でCSF1Rシグナルを阻害するのに十分な量でCSF1Rアンタゴニストを対象に投与すること、および(b)対象を、CSF1Rアンタゴニストに対して示差的な耐性を有する改変CSF1R発

10

20

30

40

50

現細胞と接触させることを含む方法。

【0126】

実施形態28：対象を治療する方法であって、(a)対象を、CSF1Rアンタゴニストに対して示差的な耐性を有する改変CSF1R発現細胞と接触させること、および(b)対象の細胞内でCSF1Rシグナルを阻害するのに十分な量でCSF1Rアンタゴニストを対象に投与することを含む方法。

【0127】

実施形態29：CSF1R発現細胞がCSF1R発現細胞である、実施形態27および実施形態28の方法。

【0128】

実施形態30：CSF1Rアンタゴニストに対する示差的な耐性が、CSF1Rアンタゴニストに対する部分的な耐性または完全な耐性である、実施形態27～29のいずれか1つの方法。

【0129】

実施形態31：改変CSF1R発現細胞が、野生型CSF1R発現細胞の遺伝子発現プロファイルを保持する、実施形態27～30のいずれか1つの方法。

【0130】

実施形態32：改変CSF1R発現細胞が、神経疾患を治療するか、治癒させるか、改善するか、予防するか、または緩和するのに有用な遺伝子産物または他の遺伝子改変を発現する、実施形態27～31のいずれか1つの方法。

【0131】

実施形態33：遺伝子産物が、CSF1R発現細胞によって普通ならば発現されない導入遺伝子である、実施形態32の方法。

【0132】

実施形態34：CSF1Rアンタゴニストによって阻害されるCSF1Rシグナルが、対象にとって内因性のCSF1R発現細胞の増殖または生存である、実施形態33の方法。

【0133】

実施形態35：CSF1Rアンタゴニストが、改変CSF1R発現細胞と比較して内因性CSF1R発現細胞の増殖および／または生存を減少させるのに十分な量で対象に投与される、実施形態27～34のいずれか1つの方法。

【0134】

実施形態36：対象を治療する方法であって、(a)対象を改変CSF1R発現細胞と接触させること、および(b)改変CSF1R発現細胞と比較して、未改変CSF1R発現細胞の増殖または生存を示差的に変化させることを含む方法。

【0135】

実施形態37：改変CSF1R発現細胞がCSF1R発現食細胞である、実施形態36の方法。

【0136】

実施形態38：改変CSF1R発現細胞が、CSF1Rアンタゴニストに対して部分的に耐性である、実施形態36および実施形態37の方法。

【0137】

実施形態39：未改変CSF1R発現細胞の増殖または生存を示差的に変化させる工程が、改変CSF1R発現細胞と比較して未改変CSF1R発現細胞の増殖および／または生存を減少させるのに十分な量でCSF1Rアンタゴニストを対象に投与することを含む、実施形態36の方法。

【0138】

実施形態40：CSF1Rアンタゴニストに対して示差的な耐性を示す改変CSF1Rタンパク質をコードする核酸組成物。

【0139】

10

20

30

40

50

実施形態 41：CSF1R アンタゴニストに対する示差的な耐性が、CSF1R アンタゴニストに対する部分的な耐性または完全な耐性である、実施形態 40 の組成物。

【0140】

実施形態 42：CSF1R アンタゴニストに対する示差的な耐性が、CSF1R アンタゴニストに対する増加した耐性である、実施形態 40 の組成物。

【0141】

実施形態 43：CSF1R アンタゴニストに対する示差的な耐性が、CSF1R アンタゴニストに対する低下した耐性である、実施形態 40 の組成物。

【0142】

実施形態 44：改変 CSF1R タンパク質が、1 つ以上の遺伝子改変を含む、実施形態 40～43 のいずれか 1 つの組成物。

【0143】

実施形態 45：1 つ以上の遺伝子改変が、CSF1R のアミノ酸配列の変化をもたらす、変化が、G795、L785、M637、E633 および V647 から選択されるアミノ酸残基の置換を場合により含む、実施形態 44 の組成物。

【0144】

実施形態 46：1 つ以上の遺伝子改変が、改変 ATP 結合ポケットをもたらす、実施形態 44 の組成物。

【0145】

実施形態 47：改変 ATP 結合ポケットが、減少した結合空間を有する、実施形態 46 の組成物。

【0146】

実施形態 48：改変 ATP 結合ポケットが、CSF1R アンタゴニストに結合することができない、実施形態 47 の組成物。

【0147】

実施形態 49：改変 ATP 結合ポケットが、ATP に結合することができる、実施形態 46 の組成物。

【0148】

実施形態 50：CSF1R タンパク質の 1 つ以上の遺伝子改変が、CSF1R タンパク質の ATP 結合活性を妨害しない、実施形態 44 の組成物。

【0149】

実施形態 51：CSF1R タンパク質の 1 つ以上の遺伝子改変が、構成的に活性な CSF1R シグナル伝達を誘導しない、実施形態 44 の組成物。

【0150】

実施形態 52：改変 CSF1R タンパク質が、CSF1 リガンドによって活性化される、実施形態 51 の組成物。

【0151】

実施形態 53：CSF1 リガンドが、改変 CSF1R タンパク質のリン酸化を誘導する、実施形態 52 の組成物。

【0152】

実施形態 54：改変 CSF1R タンパク質が、IL-34 リガンドによって活性化される、実施形態 51 の組成物。

【0153】

実施形態 55：IL-34 リガンドが、改変 CSF1R タンパク質のリン酸化を誘導する、実施形態 54 の細胞。

【0154】

実施形態 56：発現制御配列に作動可能に連結された、実施形態 40～55 のいずれか 1 つの核酸組成物を含む発現ベクター。

【0155】

実施形態 57：培養細胞が、ポリペプチドを発現する、実施形態 56 のベクターによ

10

20

30

40

50

てトランスフェクトされた培養細胞、または上記細胞の子孫。

【0156】

実施形態58：実施形態56のベクターに感染した内因性細胞であって、ポリペプチドを発現する内因性細胞。

【0157】

本明細書で使用される場合、用語「約」は、参照された数の $\pm 20\%$ を指す。

【0158】

本開示の好ましい実施形態を示し、説明してきたが、添付の特許請求の範囲の範囲を超えない修正をそれに加えることができることは当業者には容易に明らかであろう。したがって、本開示の範囲は、特許請求の範囲によってのみ限定される。いくつかの実施形態では、本特許出願で提示される図は、角度、寸法の比率などを含め、縮尺通りに描かれている。いくつかの実施形態では、図は代表的なものにすぎず、特許請求の範囲は図の寸法によって限定されない。いくつかの実施形態では、語句「含む (comprising)」を使用して本明細書に記載される本開示の説明は、「から本質的になる (consisting essentially of)」または「からなる (consisting of)」と説明され得る実施形態を含み、したがって、語句「から本質的になる (consisting essentially of)」または「からなる (consisting of)」を使用して本開示の1つ以上の実施形態の特許請求するための書面による説明要件を満たす。

【配列表フリーテキスト】

【0159】

配列表3 <223>ここで、nnnはGCTである

配列表3 <223>ここで、nnnはGCCである

配列表3 <223>ここで、nnnはGCAである

配列表3 <223>ここで、nnnはGCGである

配列表5 <223>ここで、nnnはTGTである

配列表5 <223>ここで、nnnはTGCである

配列表7 <223>ここで、NNNはGTTである

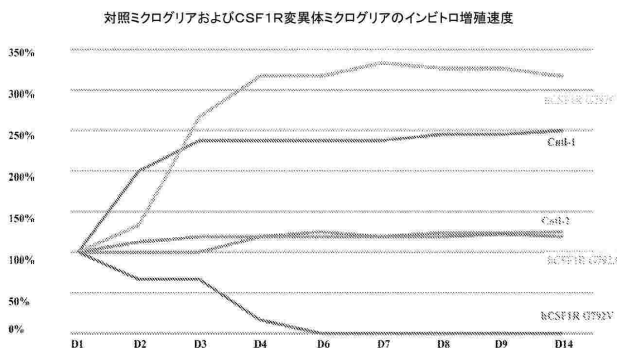
配列表7 <223>ここで、NNNはGTCである

配列表7 <223>ここで、NNNはGTAである

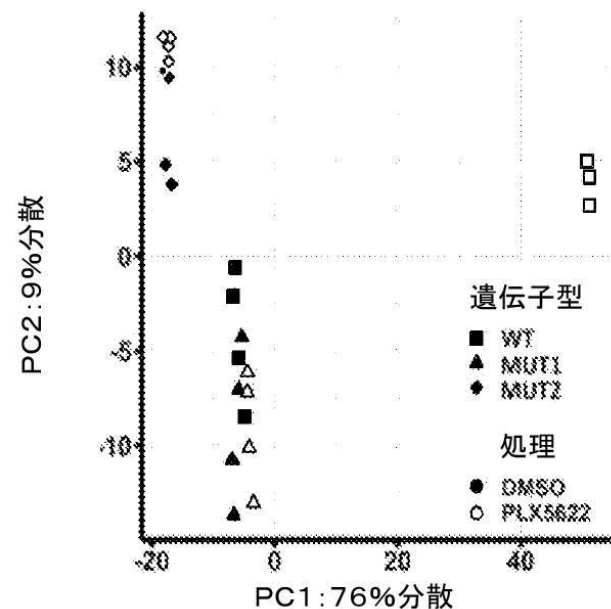
配列表7 <223>ここで、NNNはGTGである

【図面】

【図1】



【図2A】



10

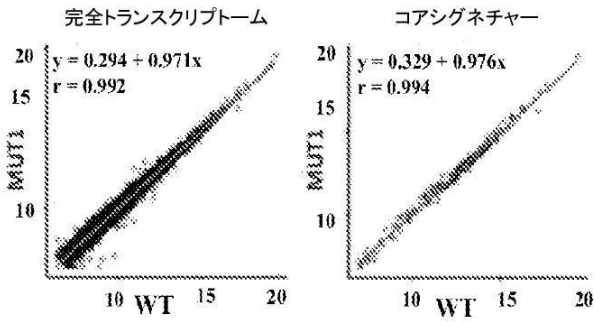
20

30

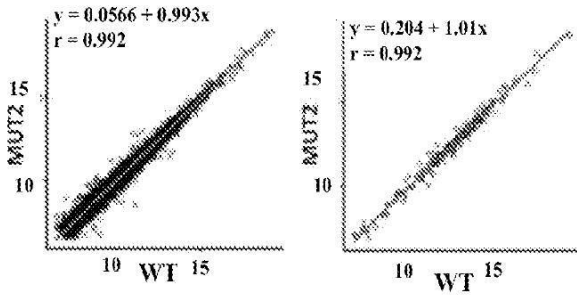
40

50

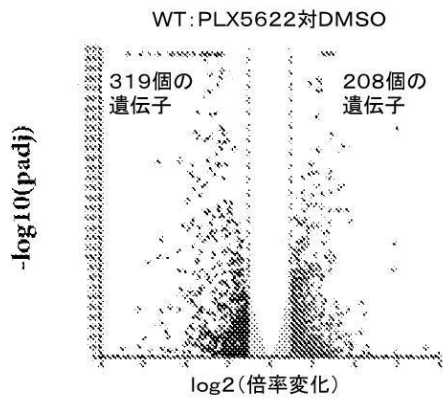
【図 2 B】



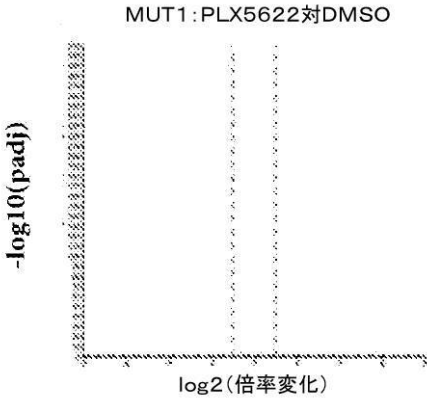
【図 2 C】



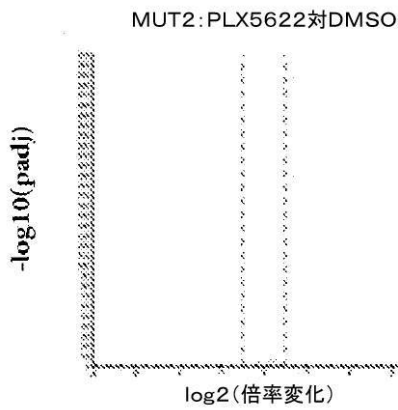
【図 2 D】



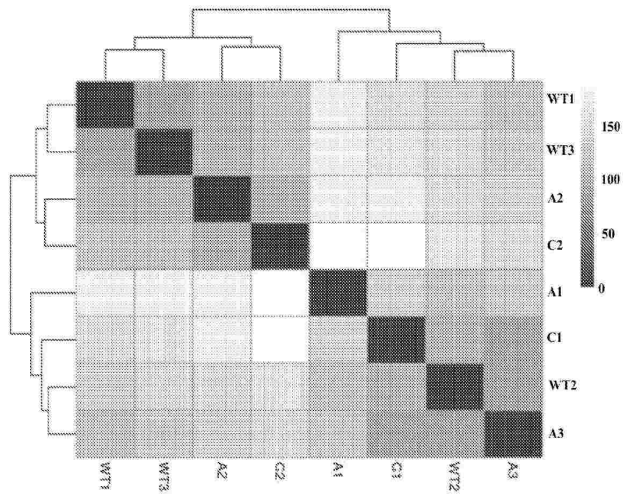
【図 2 E】



【図 2 F】



【図 3】



10

20

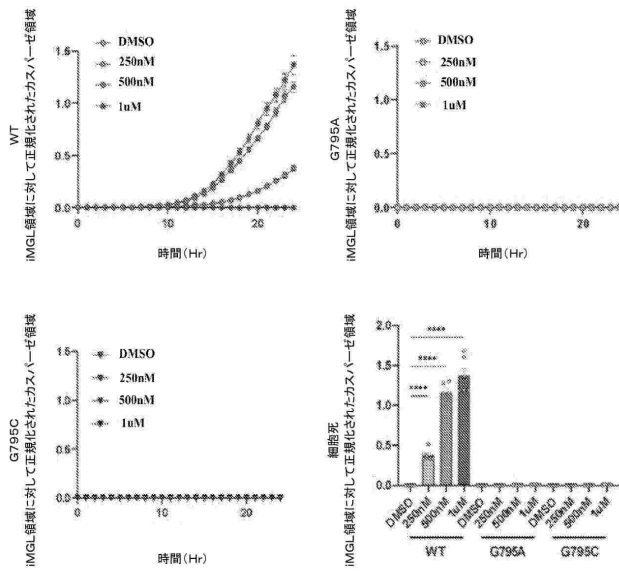
30

40

50

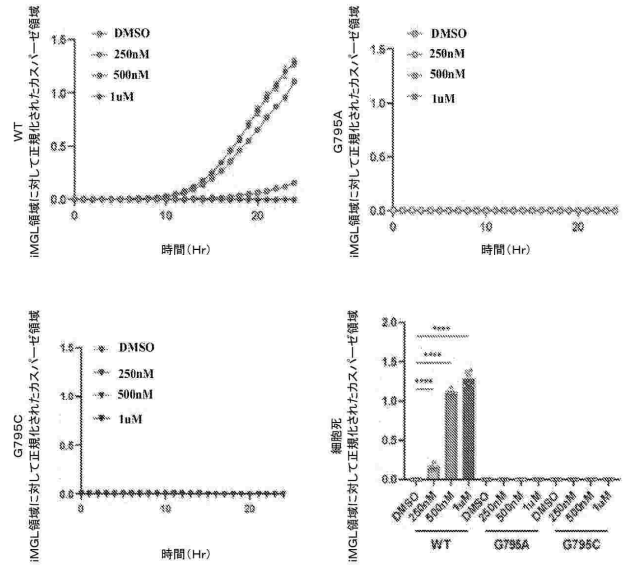
【図 4 A】

プレキシコン3397



【図 4 B】

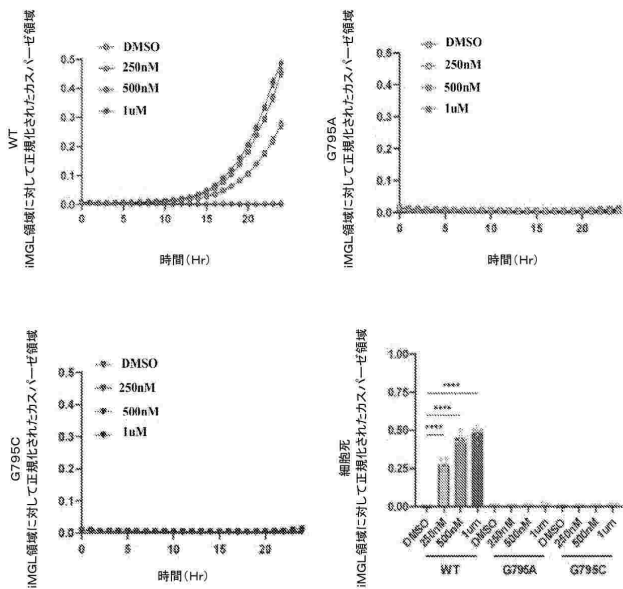
プレキシコン5622



10

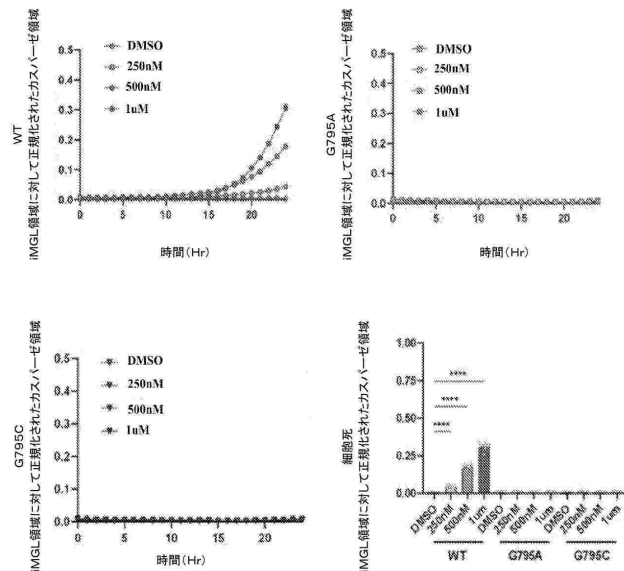
【図 4 C】

エディコテニブ



【図 4 D】

BLZ945



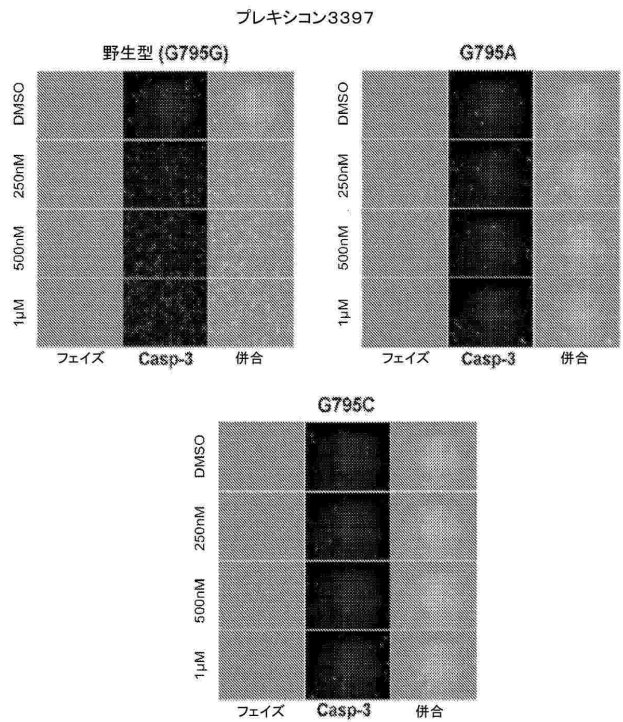
20

30

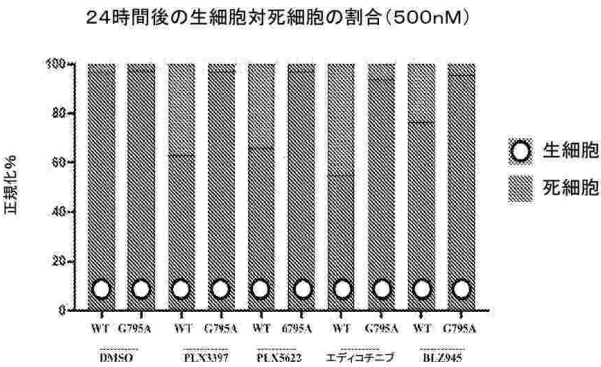
40

50

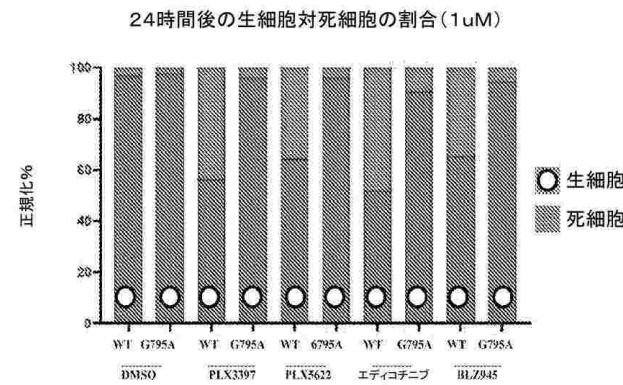
【 図 4 E 】



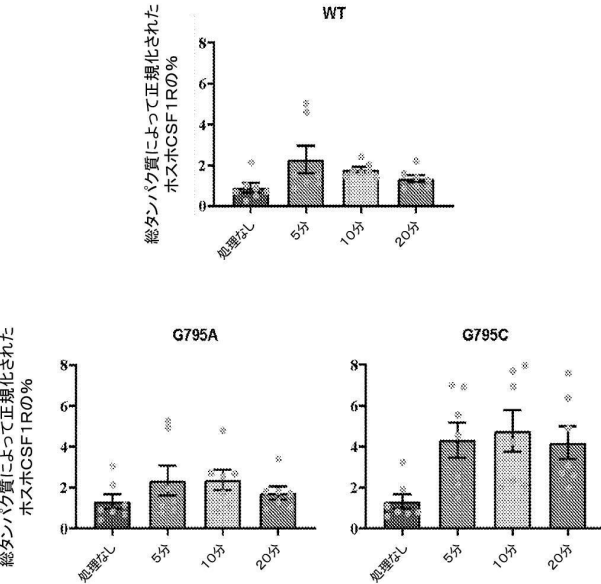
【 図 5 A 】



【 図 5 B 】



【 図 6 】



10

20

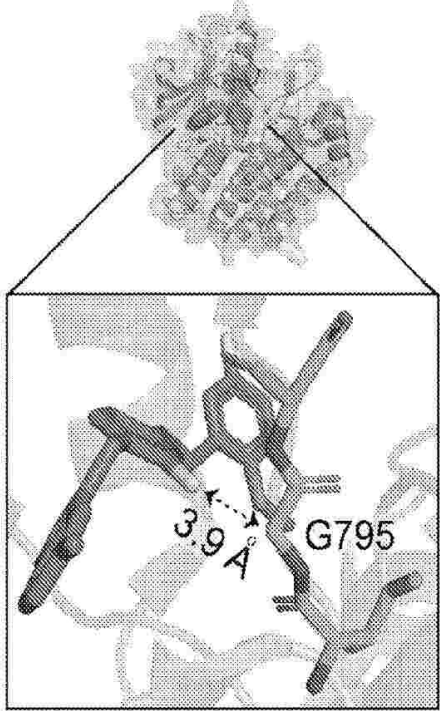
30

40

50

【図 7 A】

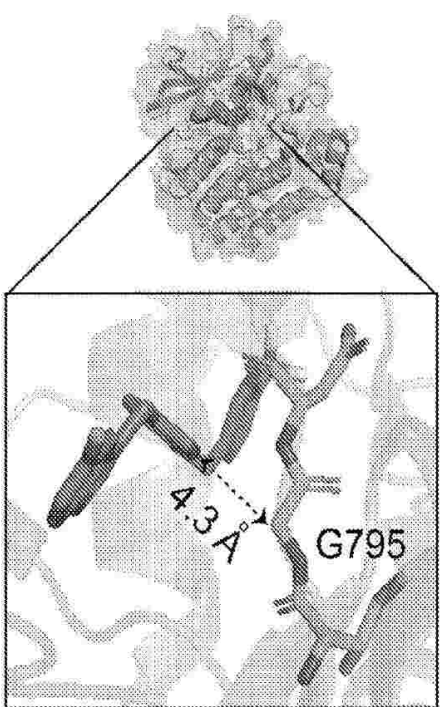
hCSF1R-PLX5622複合体



PDB 6N33
PLX5622

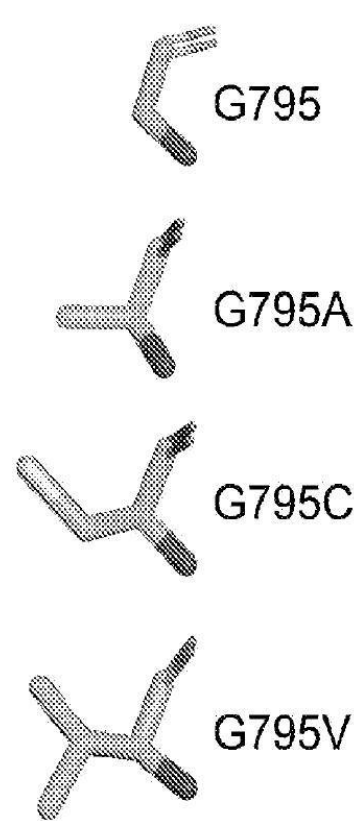
【図 7 B】

hCSF1R-PLX3397複合体

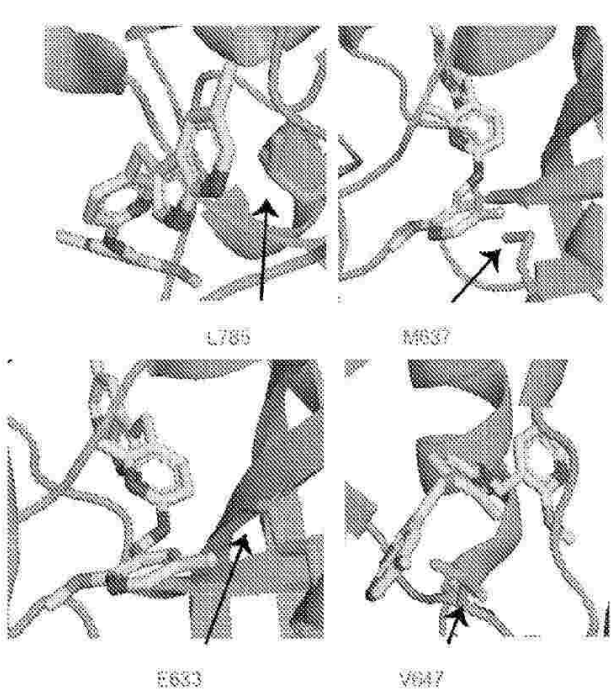


PDB 4R7H
PLX3397

【図 7 C】



【図 7 D】



10

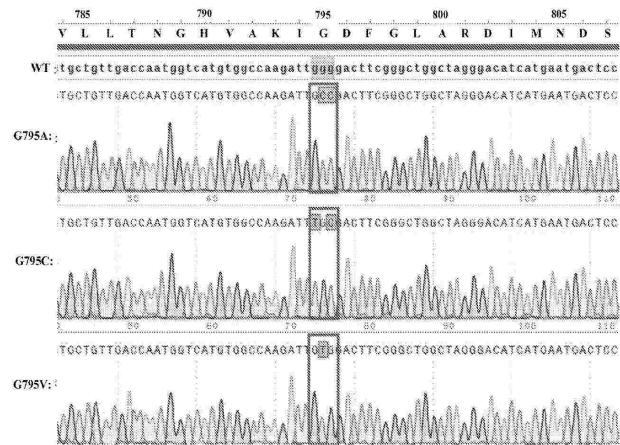
20

30

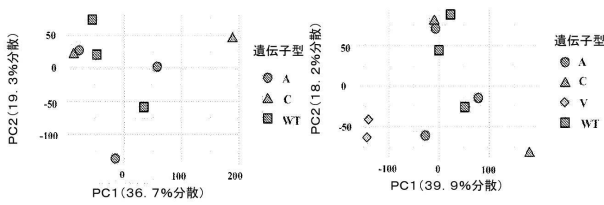
40

50

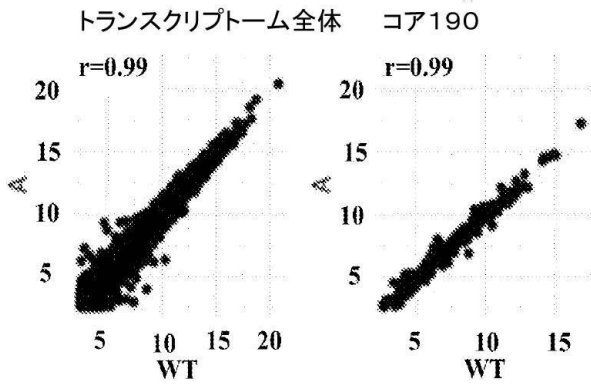
【図 8】



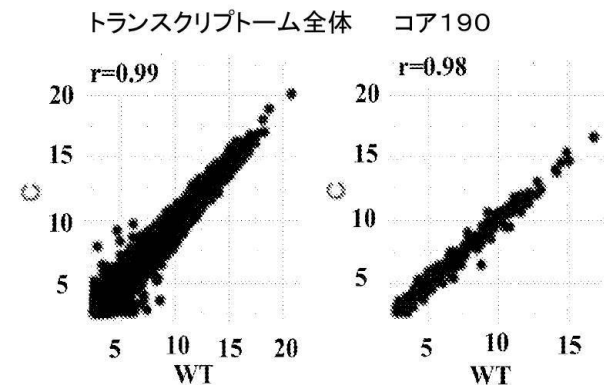
【図 9 A】



【図 9 B】



【図 9 C】



10

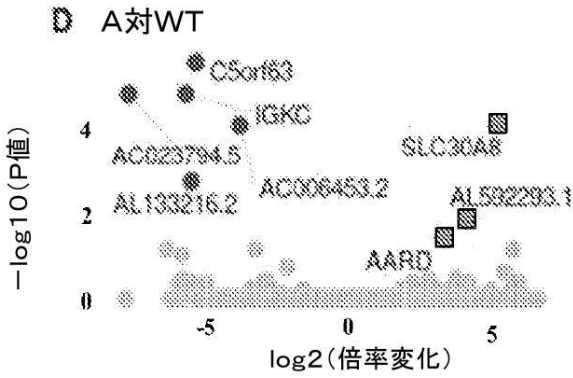
20

30

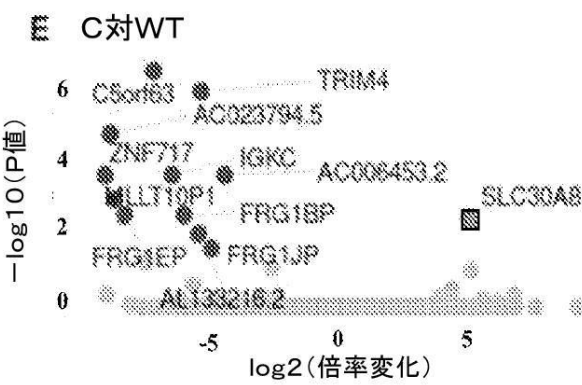
40

50

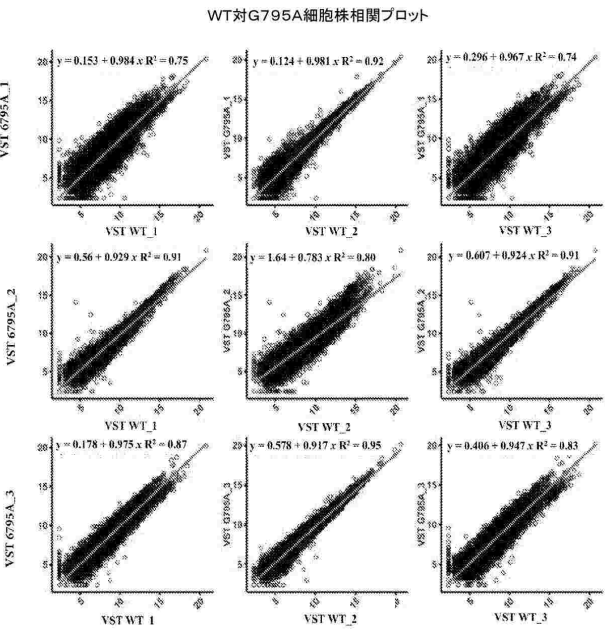
【図 9 D】



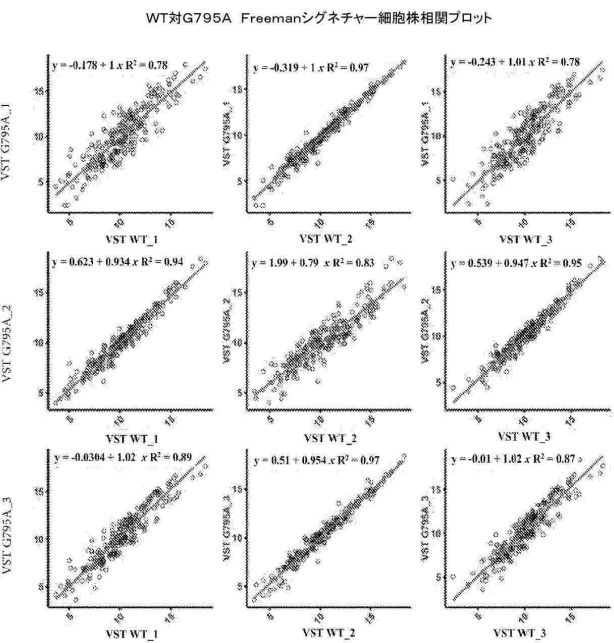
【図 9 E】



【図 10 A】



【図 10 B】



10

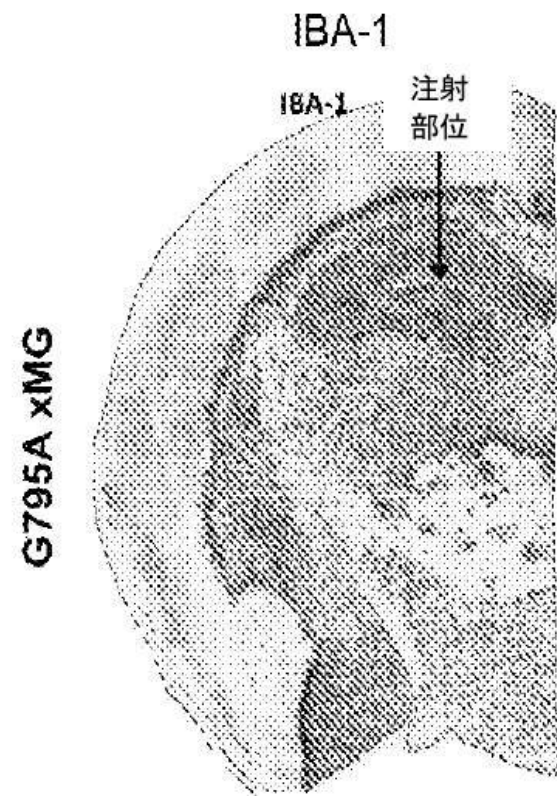
20

30

40

50

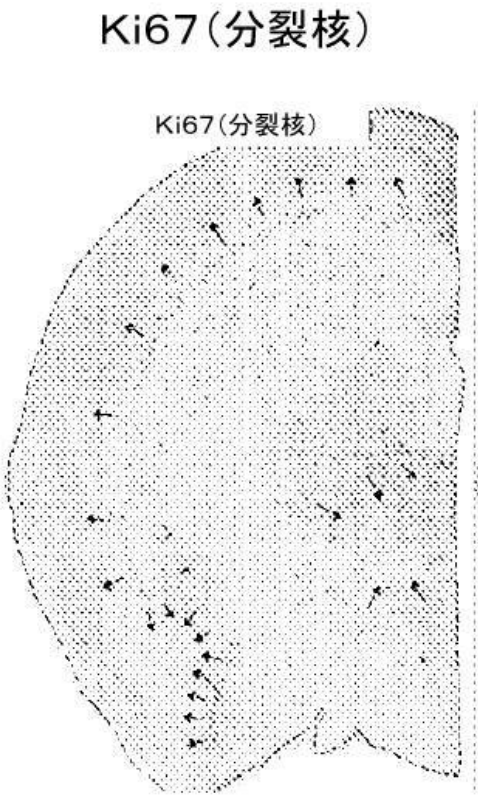
【図 1 1 A】



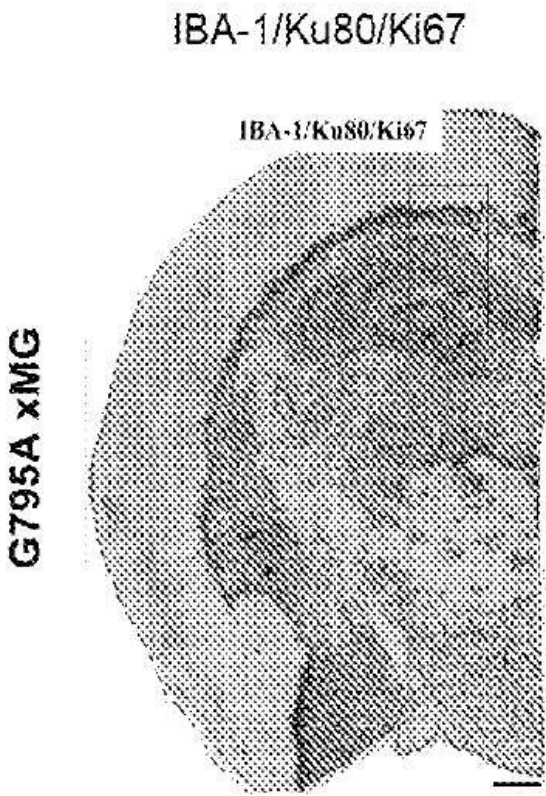
【図 1 1 B】



【図 1 1 C】



【図 1 1 D】



10

20

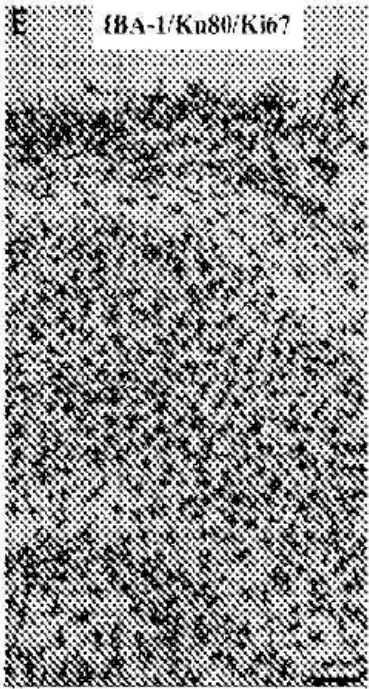
30

40

50

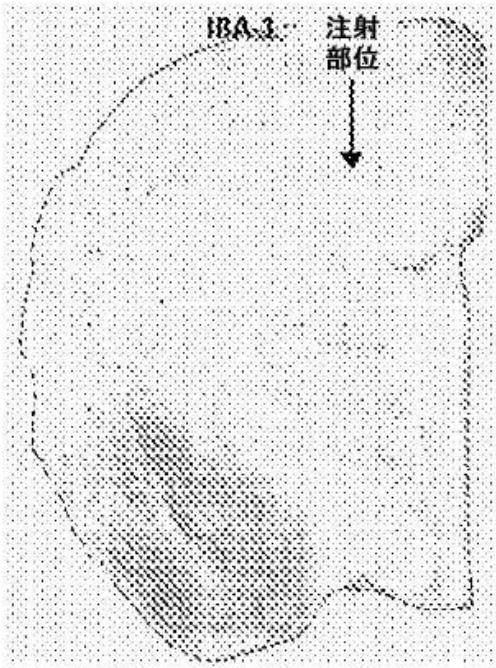
【図 1 1 E】

IBA-1/Ku80/Ki67



【図 1 1 F】

IBA-1



野生型xMG

10

20

【図 1 1 G】

ヒト核(Ku80)



【図 1 1 H】

Ki67(分裂核)

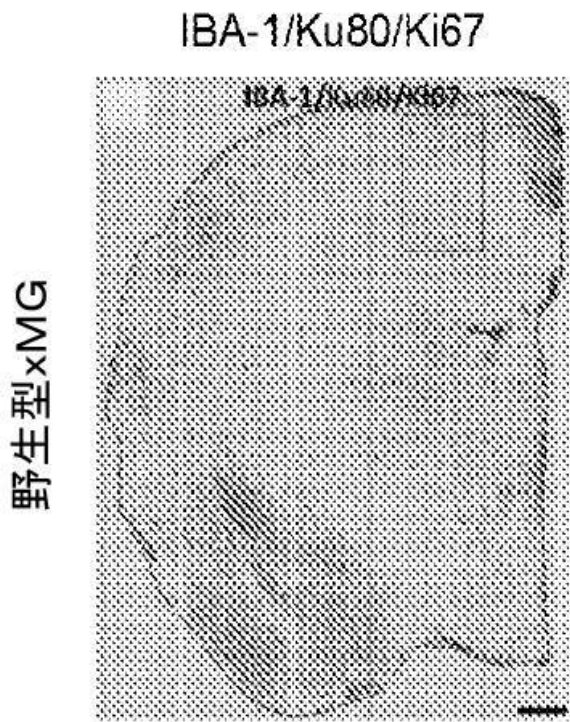


30

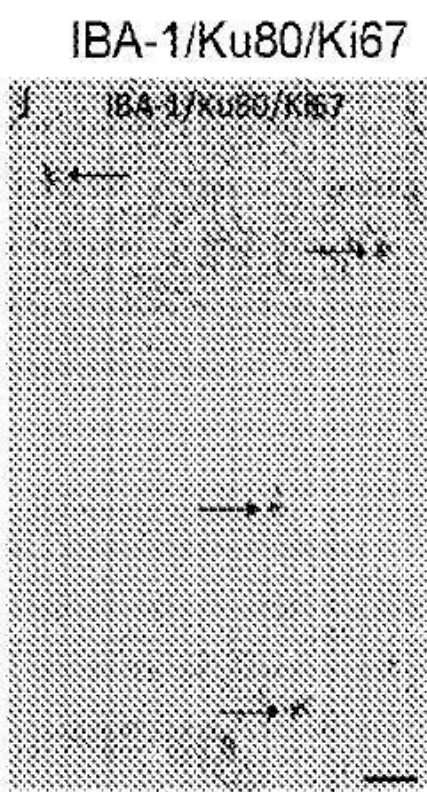
40

50

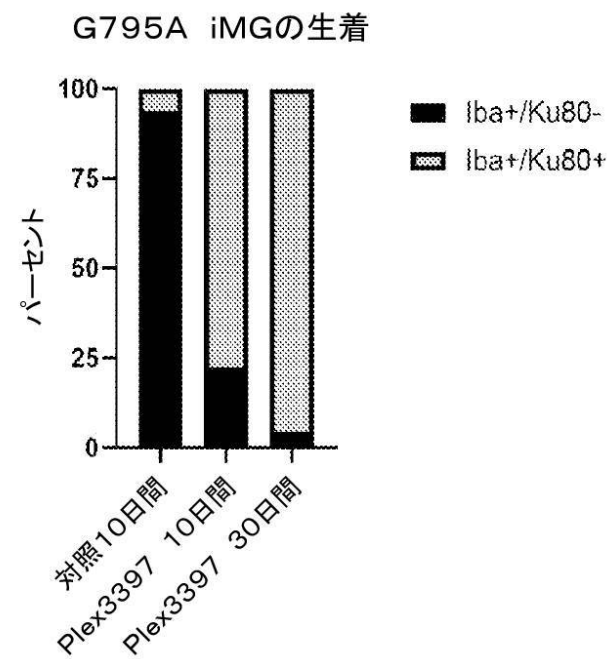
【図 1 1 I】



【図 1 1 J】



【図 1 2】



【配列表】

2024513003000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US22/23139

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - INV. C07H 21/04; C12N 15/113; A61K 48/00 (2022.01) ADD. A61K 39/12; A61K 39/395 (2022.01) CPC - INV. C07H 21/04; C12N 15/113; A61K 48/00 ADD. A61K 39/12; A61K 39/395; C07K 2317/76 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	WO 2020/033791 A1 (NOVOBRANTSEVA TATIANA I) 13 February 2020; page 2, lines 20-21; page 10, lines 29-30; page 12, lines 16-17; page 13 lines 6-7 and 22-24 and 28; page 18, lines 1-2; page 20, line 28; page 29, lines 6-8; page 52, line 19-20; page 53, lines 28-29; page 64, lines 11-12; page 79, line 7; page 106, lines 8-9; page 110, line 2; page 166, lines 6-10; page 163, lines 32-33; page 164, line 1; page 167, lines 15-16; page 188, line 13-14	1-5, 16-18, 27-28, 40-45. 51-55 — 48-50
Y	STANLEY, "CSF-1 Receptor Signaling in Myeloid Cells". Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. Web. 2014; page 2, figure 1a; page 7, left column, top and middle paragraph; DOI: 10.1101/cshperspect.a021857	48-50
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "I" 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 31 July 2022 (31.07.2022)		Date of mailing of the international search report AUG 30 2022
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US22/23139

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 6-15, 19-26, 29-35, 38, 56-58
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
---Please See Supplemental Page---

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-5, 16-18, 27-28, 40-55;
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US22/23139

Continued From Box No. III: Observations where unity of invention is lacking

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

Group I, claims 1-5, 16-18, 27-28, and 40-55 is directed to modified human cells exhibiting differential resistance to a CSF1R antagonist, a nucleic acid composition encoding a CSF1R protein exhibiting differential resistance to a CSF1R antagonist, and methods of treating a subject comprising administering said modified human cells and a CSF1R antagonist to the subject.

Group II, claims 36-37 and 39 is directed to a method of treating a subject involving differentially altering the proliferation or survival of unmodified vs. modified cells in the subject.

The inventions listed as Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Group I include modified human cells exhibiting differential resistance to a CSF1R antagonist, not present in Group II; and the special technical features of Group II include differentially altering the proliferation or survival of an unmodified CSF1R-expressing cell relative to a modified CSF1R-expressing cell, not present in Group I.

Groups I and II share the technical features including: a method of treating a subject comprising contacting the subject with modified CSF1R-expressing cells.

However, these shared technical features are previously disclosed by the publication entitled "Genetically modified macrophages accomplish targeted gene delivery to the inflamed brain in transgenic Parkin Q311X(A) mice: importance of administration routes" by Haney, et al. (hereinafter "Haney").

Haney discloses a method of treating a subject (systemically administered macrophages to deliver therapeutics; abstract) comprising contacting the subject with modified CSF1R-expressing cells (administering modified macrophages to a mouse model of Parkinson's disease, wherein macrophages are CSF1R-expressing cells as stipulated by the instant PCT application (paragraph [0035]); abstract).

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

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P 25/00 (2006.01)
 A 6 1 P 43/00 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 1 2 N 15/10 (2006.01)
 C 1 2 N 15/86 (2006.01)
 C 1 2 N 5/0786(2010.01)
 C 1 2 N 5/0789(2010.01)
 C 1 2 N 15/63 (2006.01)

A 6 1 P 25/00
 A 6 1 P 43/00 1 2 1
 C 1 2 N 5/10 Z N A
 C 1 2 N 15/10 2 0 0 Z
 C 1 2 N 15/86 Z
 C 1 2 N 5/0786
 C 1 2 N 5/0789
 C 1 2 N 15/63 Z

,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,D
 K,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),O
 A(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,B
 B,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,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,
 LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO
 ,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,Z
 M,ZW

0 0、ユニバーシティ オブ カリフォルニア、アーバイン

(72)発明者

ハッセルマン、ジョナサン

アメリカ合衆国 9 2 6 9 7 カリフォルニア、アーバイン、グロス ホール 3 2 0 0、ユニバー
 シティー オブ カリフォルニア、アーバイン

(72)発明者

ブラートン - ジョーンズ、マシュー

アメリカ合衆国 9 2 6 9 7 カリフォルニア、アーバイン、グロス ホール 3 0 1 4、ユニバー
 シティー オブ カリフォルニア

(72)発明者

チャダレビアン、ジャン、ポール

アメリカ合衆国 9 2 6 9 7 カリフォルニア、アーバイン、グロス ホール 3 2 0 0、ユニバー
 シティー オブ カリフォルニア、アーバイン

(72)発明者

スピテール、ロバート

アメリカ合衆国 9 2 6 1 7 カリフォルニア、アーバイン、ナチュラル サイエンシス ファースト
 2 2 1 6、ユニバーシティ オブ カリフォルニア、アーバイン

(72)発明者

ガンジー、スニール

アメリカ合衆国 9 2 6 1 7 - 4 5 5 0 カリフォルニア、アーバイン、クレシェイ リサーチ ビ
 ルディング 3 0 3、ユニバーシティ オブ カリフォルニア、アーバイン

(72)発明者

イングランド、ホイットニー

アメリカ合衆国 9 2 6 1 7 カリフォルニア、アーバイン、セオリー 1 0 1、ユニバーシティ
 オブ カリフォルニア、アーバイン

F ターム (参考)

4B065 AA93X AA94X AB01 AC14 AC20 BA02 CA24 CA44
 4C084 AA19 MA02 MA66 NA14 ZA01 ZC42 ZC75
 4C087 BB37 BB44 BB64 BB65 MA02 MA66 NA14 ZA01 ZC75