

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7017506号

(P7017506)

(45)発行日 令和4年2月8日(2022.2.8)

(24)登録日 令和4年1月31日(2022.1.31)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 5/0789(2010.01)

C 1 2 N 5/0789

C 1 2 N 15/63 (2006.01)

C 1 2 N 15/63

Z Z N A

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 0 7 K 19/00

C 0 7 K 16/00 (2006.01)

C 0 7 K 16/00

請求項の数 27 (全72頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-519382(P2018-519382)

(86)(22)出願日 平成28年10月17日(2016.10.17)

(65)公表番号 特表2018-531260(P2018-531260
A)

(43)公表日 平成30年10月25日(2018.10.25)

(86)国際出願番号 PCT/US2016/057339

(87)国際公開番号 WO2017/066760

(87)国際公開日 平成29年4月20日(2017.4.20)

審査請求日 令和1年10月16日(2019.10.16)

(31)優先権主張番号 62/242,685

(32)優先日 平成27年10月16日(2015.10.16)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 306018457

ザ・トラスティーズ・オブ・コロンビア

・ユニバーシティ・イン・ザ・シティ・

オブ・ニューヨーク

アメリカ合衆国、ニューヨーク州 1 0

0 2 7、ニューヨーク、ウェスト 1 1

6 番 ストリート 5 3 5、ロー メモリ

アル ライブラリ 4 1 2

(74)代理人 100114188

弁理士 小野 誠

(74)代理人 100119253

弁理士 金山 賢教

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(74)代理人 100129713

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 系統特異的抗原の阻害のための組成物および方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

C D 3 3 を欠くように遺伝子工学処理されたヒト造血幹細胞であって、キメラ抗原受容体
を含まない、遺伝子工学処理されたヒト造血幹細胞。

【請求項 2】

C D 3 3 をコードする内因性遺伝子のすべて又は一部が削除される、請求項 1 に記載の遺
伝子工学処理されたヒト造血幹細胞。

【請求項 3】

自然発生の造血幹細胞における C D 3 3 発現量の 4 0 % 未満の C D 3 3 発現量を有する、
請求項 1 又は 2 に記載の遺伝子工学処理されたヒト造血幹細胞。

【請求項 4】

前記 C D 3 3 が、C R I S P R - C a s 9 システムを用いて処理される、請求項 1 ～ 3 の
いずれか一項に記載の遺伝子工学処理されたヒト造血幹細胞。

【請求項 5】

前記 C R I S P R - C a s 9 システムにより、前記 C D 3 3 をコードする内因性遺伝子の
コード又は非コード領域において前記内因性遺伝子が切断されている、請求項 4 に記載の
遺伝子工学処理されたヒト造血幹細胞。

【請求項 6】

前記 C R I S P R - C a s 9 システムにより、前記 C D 3 3 をコードする内因性遺伝子の
コード又は非コード領域において 1 つ以上のヌクレオチドの挿入、欠失、及び／又は置換

が生じる、請求項 4 に記載の遺伝子工学処理されたヒト造血幹細胞。

【請求項 7】

請求項 1 に記載のヒト造血幹細胞を含む、遺伝子工学処理されたヒト造血細胞集団。

【請求項 8】

骨髓系前駆細胞、リンパ系前駆細胞、骨髓細胞、リンパ系細胞、及びそれらの任意の組み合わせよりなる群から選択されるヒト造血細胞をさらに含む、請求項 7 に記載の遺伝子工学処理されたヒト造血細胞集団。

【請求項 9】

請求項 7 に記載の遺伝子工学処理されたヒト造血細胞集団を調製する方法であって、CD33 をコードする内因性遺伝子のコード又は非コード領域とハイブリダイズする少なくとも 1 つのガイド核酸を含む CRISPR-Cas9 システムをヒト造血細胞に導入することを含み、前記 CRISPR-Cas9 システムにより前記内因性遺伝子が切断される、該方法。

10

【請求項 10】

治療に用いるための、請求項 7 に記載の遺伝子工学処理されたヒト造血細胞集団。

【請求項 11】

造血器悪性腫瘍を治療又は予防する方法に用いるための、請求項 7 に記載の遺伝子工学処理されたヒト造血細胞集団。

【請求項 12】

有効量の CD33 を標的とする作用物質と組み合わせて用いるための、請求項 11 に記載の遺伝子工学処理されたヒト造血細胞集団。

20

【請求項 13】

前記作用物質が、モノクローナル抗体、完全なヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、二重特異的抗体、又は F(ab')₂ フラグメントから選択される抗体又は抗体断片である、請求項 12 に記載の遺伝子工学処理されたヒト造血細胞集団。

【請求項 14】

前記作用物質が、抗原結合フラグメントを含むキメラ受容体を発現する免疫細胞である、請求項 13 に記載の遺伝子工学処理されたヒト造血細胞集団。

【請求項 15】

前記キメラ受容体を発現する免疫細胞が、T 細胞である、請求項 14 に記載の遺伝子工学処理されたヒト造血細胞集団。

30

【請求項 16】

前記造血器悪性腫瘍が、ホジキンリンパ腫である、請求項 11～15 のいずれか一項に記載の遺伝子工学処理されたヒト造血細胞集団。

【請求項 17】

自然発生の造血幹細胞における CD33 発現量の 30% 未満の CD33 発現量を有する、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の遺伝子工学処理されたヒト造血幹細胞。

【請求項 18】

自然発生の造血幹細胞における CD33 発現量の 20% 未満の CD33 発現量を有する、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の遺伝子工学処理されたヒト造血幹細胞。

40

【請求項 19】

自然発生の造血幹細胞における CD33 発現量の 10% 未満の CD33 発現量を有する、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の遺伝子工学処理されたヒト造血幹細胞。

【請求項 20】

自然発生の造血幹細胞における CD33 発現量の 5% 未満の CD33 発現量を有する、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の遺伝子工学処理されたヒト造血幹細胞。

【請求項 21】

前記造血器悪性腫瘍が、非ホジキンリンパ腫である、請求項 11～15 のいずれか一項に記載の遺伝子工学処理されたヒト造血細胞集団。

【請求項 22】

50

前記造血器悪性腫瘍が、白血病である、請求項 1 1 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の遺伝子工学処理されたヒト造血細胞集団。

【請求項 2 3】

前記造血器悪性腫瘍が、急性骨髄性白血病である、請求項 1 1 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の遺伝子工学処理されたヒト造血細胞集団。

【請求項 2 4】

前記造血器悪性腫瘍が、慢性骨髄性白血病である、請求項 1 1 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の遺伝子工学処理されたヒト造血細胞集団。

【請求項 2 5】

前記造血器悪性腫瘍が、急性リンパ芽球性白血病である、請求項 1 1 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の遺伝子工学処理されたヒト造血細胞集団。

10

【請求項 2 6】

前記造血器悪性腫瘍が、慢性リンパ芽球性白血病である、請求項 1 1 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の遺伝子工学処理されたヒト造血細胞集団。

【請求項 2 7】

前記造血器悪性腫瘍が、多発性骨髄腫である、請求項 1 1 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の遺伝子工学処理されたヒト造血細胞集団。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

20

関連案件の相互参照

本出願は、2 0 1 5 年 1 0 月 1 6 日出願、米国特許仮出願第 6 2 / 2 4 2 , 6 8 5 号の優先権を U . S . C . § 1 1 9 に基づき主張し、その全体が参考として本明細書に援用される。

【背景技術】

【0 0 0 2】

数十年の試みにも関わらず、癌に対する治療的な免疫学的療法は達成することが非常に困難であり、基本的なベースは抗体または T 細胞（T 細胞受容体を介した）のいずれかによる抗原認識能力である（Cousin-Frankel, Science (2013) 342:1432）。抗体をベースとした免疫療法は癌に対して、標的抗原が腫瘍細胞で正常細胞と比べて上方調節されている場合（例えば、Her-2 増殖性乳癌における Her-2）、あるいは腫瘍細胞が抗体または抗体毒素共役体によって認識される抗原を発現する場合（例えば、CD20 に対するリツキシマブ）、広範に使用されている（Baselga, Annals Oncology (2001) 12:S35）。抗体をベースとした免疫療法を用いた臨床試験が、限定された数の癌タイプにおける改善された患者生存を示しているが（通常、標準的な化学療法と併用されたとき）、これらの効果はしばしば重大な安全性および効能の問題を伴う（Cousin-Frankel Cancer, Science (2013) 342:1432）。

30

【0 0 0 3】

癌に対する効果的な T 細胞療法は、臨床的に達成することがさらに困難である（Schmitt, Hum. Gene Ther. (2009) 20(11):1240）。癌に対する効果的な T 細胞療法は、癌細胞上の抗原に対して高い親和性結合を有する T 細胞に依存する。キメラ抗原受容体 T 細胞（CAR T 細胞）は広く使用されており、細胞上の抗原を高い親和性と特異性の両方で認識し、ペプチドを「提示する」HLA 抗原などの補助認識分子を必要としない。CAR T 細胞の T 細胞受容体は、抗原結合性重鎖および軽鎖と「交換」されており、従って、HLA 補助分子の必要性が除かれる。組換え CAR T 受容体は、標的抗原への CAR T 受容体の結合によって T 細胞の活性化をもたらすシグナル領域に融合される。

40

【0 0 0 4】

CAR T 細胞の臨床的使用は、狭い範囲の細胞表面抗原を標的とすることに限定されて

50

おり、癌の治療における改善された新規方法の必要性をさらに裏付ける。特に、新規方法は、治療の現標準である強い化学療法を受けることができない高齢患者における転帰が、5～10ヶ月のみの中央生存で、非常に乏しいままである急性骨髄性白血病（AML）などの疾患のために必要である（Dohnerら, NEJM（2015）373：1136）。

【0005】

腫瘍細胞上の系統特異的細胞表面抗原の特定クラスを標的にする癌免疫療法に対する新規方法が本明細書で開示される。CAR T細胞治療がまた、系統特異的細胞表面抗原を欠如している改変細胞集団の注入または再注入による非腫瘍細胞の交換と組み合わせられる。腫瘍の再発は、CAR T細胞によりインビボで患者の監視を維持することによって防止または低下される。

10

【発明の概要】

【0006】

本開示は、系統特異的細胞表面抗原を結合する抗原結合フラグメントを含む作用物質（例えば、CD33を標的にするキメラ受容体を発現する免疫細胞）が、系統特異的細胞表面抗原を発現する細胞の細胞死を選択的にもたらすが、一方、抗原を欠く細胞（例えば、遺伝子工学処理された造血細胞）はこれによって生じる細胞死を逃れるという発見に、少なくとも部分的に基づいている。このような発見に基づき、系統特異的細胞表面抗原を標的にする作用物質、例えば、CD33を標的にするCAR-T細胞と、系統特異的細胞抗原（例えば、CD33）を欠く造血細胞との組み合わせを含む免疫療法が、造血器悪性腫瘍の有効な治療方法をもたらすことが期待されている。

20

【0007】

本開示の一つの態様は造血器悪性腫瘍を治療するための方法を提供し、本方法はこの方法を必要とする被験体に、（i）系統特異的細胞表面抗原を標的とする作用物質の効果的な量、ここで作用物質は系統特異的細胞表面抗原を結合する抗原結合フラグメントを含み、および（ii）系統特異的細胞表面抗原を欠く造血細胞の集団、を投与することを含む。いくつかの実施形態では、作用物質は系統特異的細胞表面抗原を結合する抗原結合フラグメントを含むキメラ受容体を発現する免疫細胞（例えば、T細胞）であってよい。いくつかの実施形態では、免疫細胞、造血細胞、またはこの両方は、同種異系または自家である。いくつかの実施形態では、造血細胞は造血幹細胞（例えば、CD34⁺/CD33⁻HSC）である。いくつかの実施形態では、造血幹細胞は骨髄細胞または末梢血単核細胞（PBMC）から得ることができる。

30

【0008】

いくつかの実施形態では、抗原結合フラグメントは2型系統特異的細胞表面抗原（例えば、CD33）である系統特異的細胞表面抗原を結合する。いくつかの実施形態では、抗原結合フラグメントは1型系統特異的細胞表面抗原（例えば、CD19）である系統特異的細胞表面抗原を結合する。

【0009】

いくつかの実施形態では、キメラ受容体における抗原結合フラグメントは、ヒトCD33またはCD19などのヒトタンパク質であり得る系統特異的細胞表面抗原を特異的に結合する単鎖抗体フラグメント（scFv）である。いくつかの実施形態では、scFvはヒトCD33に結合し、SEQ ID NO：12中のものと同じ相補的決定領域（CDR）を有する重鎖可変領域、およびSEQ ID NO：13中のものと同じCDRを有する軽鎖可変領域を含む。一つの例では、scFvはSEQ ID NO：12のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域およびSEQ ID NO：13のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む。

40

【0010】

キメラ受容体はさらに、（a）ヒンジ領域、（b）膜貫通領域、（c）少なくとも1つの共刺激領域、（d）細胞質シグナル伝達領域、または（e）これらの組み合わせを含み得る。いくつかの実施形態では、キメラ受容体は少なくとも1つの共刺激シグナル伝達領域

50

を含み、それはCD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1（LFA-1）、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、GITR、HVEM、またはこれらの組み合わせの共刺激受容体由来であってよい。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの共刺激シグナル伝達領域は、CD28のシグナル伝達領域およびICOSのシグナル伝達領域を含むハイブリッド共刺激領域である。一つの例では、少なくとも1つの共刺激シグナル伝達領域はCD28由来であり、キメラ受容体は4-1BBまたはICOS由来の第二共刺激シグナル伝達領域をさらに含む。

【0011】

いくつかの実施形態では、キメラ受容体は、CD3ζ由来である細胞質シグナル伝達領域を含む。いくつかの実施形態では、キメラ受容体は、CD8αまたはCD28α由来であるヒンジ領域を含む。いくつかの実施形態では、キメラ受容体抗体は、CD8、CD28、またはICOS由来である膜貫通領域を含む。

【0012】

いくつかの実施形態では、キメラ受容体は、N端からC端へと、(i) 系統特異的細胞表面抗原（例えば、CD33またはCD19）に結合するscFv、CD8α由来ヒンジ領域、CD8由来膜貫通領域、4-1BB由来共刺激領域、およびCD3ζ由来細胞質シグナル伝達領域、(ii) 系統特異的細胞表面抗原（例えば、CD33またはCD19）に結合するscFv、CD8α由来ヒンジ領域、CD28由来膜貫通領域、CD28由来共刺激領域、およびCD3ζ由来細胞質シグナル伝達領域、または(iii) 系統特異的細胞表面抗原（例えば、CD33またはCD19）に結合するscFv、CD8α由来ヒンジ領域、CD28由来膜貫通領域、CD28由来第一共刺激領域、4-1BB由来第二共刺激領域、およびCD3ζ由来細胞質シグナル伝達領域を含む。

【0013】

本明細書で説明される方法のいずれかでは、被験体はホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、白血病、または多発性骨髄腫を有し得る。いくつかの例では、被験体は急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病、または慢性リンパ芽球性白血病である白血病を有する。

【0014】

別の態様では、本開示は本明細書で説明されるキメラ受容体のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。キメラ受容体は、CD33を結合する抗原結合フラグメント、膜貫通領域、およびCD3ζ由来細胞質シグナル伝達領域などの細胞質シグナル伝達領域を含み得る。抗原結合フラグメント（例えば、scFvフラグメント）は、SEQ ID NO: 12中のものと同じCDRを有する重鎖可変領域、およびSEQ ID NO: 13中のものと同じCDRを有する軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、scFvは、SEQ ID NO: 12のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、およびSEQ ID NO: 13のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む。

【0015】

本開示の他の態様は、本明細書で示される核酸のいずれかを含むベクターを提供する。本明細書で説明される核酸によってコードされるキメラ受容体およびこのようなキメラ受容体を発現する免疫細胞（例えば、T細胞）もまた本開示の範囲内である。いくつかの実施形態では、免疫細胞は造血器悪性腫瘍を有する患者から得ることができる。

【0016】

本開示の別の態様は、遺伝子工学処理前には造血細胞に存在する系統特異的細胞表面抗原（例えば、CD33、CD19）を欠く、遺伝子工学処理された造血細胞（例えば、HSC）を提供する。いくつかの実施形態では、系統特異的細胞表面抗原をコードする内因性遺伝子のすべてまたは一部が、例えばゲノム編集（例えば、ジnkフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写活性化因子様エファクターベースヌクレアーゼ（TALEN）、またはCRISPR-Cas系を含む）によって除去される。いくつかの実施形態では、系統特異的細胞表面抗原はCD33であり、CD33の免疫グロブリン定常（IgC）領域の

10

20

30

40

50

一部が除去される。いくつかの実施形態では、造血細胞は造血幹細胞（例えば、CD34⁺/CD33⁻細胞）である。

【0017】

いくつかの実施形態では、造血幹細胞は骨髓細胞または末梢血単核細胞（PBMC）から得ることができる。

【0018】

本明細書で説明される系統特異的細胞表面抗原を欠く細胞を産生する方法もまた本明細書で提供される。本方法は細胞を用意すること、および細胞中に（i）系統特異的細胞表面抗原（例えば、CD33、CD19）をコードするヌクレオチド配列の一部にハイブリダイズするCRISPR-Cas系ガイドRNA（gRNA）のヌクレオチド配列を含む核酸、および（ii）Casエンドヌクレアーゼ（例えば、Cas9またはCpf1）を導入することを含む。CRISPR-Cas系gRNAのヌクレオチド配列を含む核酸およびCasヌクレアーゼは、例えば、同じ核酸または異なる核酸にコードされる、あるいは前形成されたりボヌクレオタンパク質複合体として細胞中に導入され得る。いくつかの実施形態では、gRNAがハイブリダイズするヌクレオチド配列の一部は18～22個のヌクレオチドからなる。いくつかの例では、gRNAはSEQ ID NO: 11またはNO: 28～31のヌクレオチド配列を含む。

【0019】

いくつかの実施形態では、細胞は造血幹細胞（例えば、CD34⁺）などの造血細胞である。

【0020】

（i）系統特異的細胞表面抗原を標的とし、系統特異的な細胞表面抗原を結合する抗原結合フラグメントを含む作用物質を含む免疫細胞、および（ii）系統特異的細胞表面抗原を欠く造血細胞（例えば、造血幹細胞）の集団、を含むキットも本開示の範囲内である。いくつかの実施形態では、系統特異的な細胞表面抗原を標的にする作用物質はキメラ細胞を発現する免疫細胞であり、それは系統特異的細胞表面抗原を結合する抗原結合フラグメントを含む。

【0021】

さらに、本開示は、造血器悪性腫瘍を治療する使用のために系統特異的表面抗原を標的にする免疫細胞のいずれか、および／または系統特異的細胞表面抗原を欠く造血細胞のいずれかを含む医薬組成物、ならびに造血器悪性腫瘍を治療する使用のための医薬品を製造するための当該免疫細胞および造血細胞の使用を提供する。

【0022】

本開示の1つ以上の実施形態の詳細が下の説明で示される。本開示の他の特徴または利点は、いくつかの実施形態の詳細な説明および添付の請求からも明らかである。

【0023】

次の図は本明細書の一部をなし、本開示の特定の態様をさらに実証するために含まれ、それは本明細書で提示される具体的な実施形態の詳細な説明とともにこれらの図の1つ以上を参考にしてよりよく理解できる。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】 0型、1型、2型、および3型系統特異的抗原の例示的な説明を示す図である。

【図2】 0型系統特異的細胞表面抗原であるCD307を標的にするキメラ受容体を発現する免疫細胞を図式的に示す図である。CD307を発現する多発性骨髓腫（MM）細胞、さらに形質細胞などのCD307を発現する他の細胞が、抗CD307キメラ受容体を発現する免疫細胞によって標的にされる。

【図3】 2型系統特異的細胞表面抗原であるCD33を標的とするキメラ受容体を発現する免疫細胞を図式的に示す図である。急性骨髄性白血病（AML）細胞はCD33を発現する。ヒト造血幹細胞（HSC）はCD33を欠くように遺伝子工学処理され、従って抗CD33キメラ受容体を発現する免疫細胞によって認識されない。HSCは骨髓細胞を増

10

20

30

40

50

加させることができる。

【図4】CRISPR/Cas系を用いたゲノム編集を図式的に示す図である。sgRNAは系統特異的細胞表面抗原のエクソンの一部にハイブリダイズし、Cas9エンドヌクレアーゼがプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）配列（5'-NGG-3'）の上流を切断する。配列は、上から下へ、SEQ ID NO: 45および46に相当する。

【図5】CD33を破壊するためのCRISPR/Cas9系を用いたゲノム編集方法を図式的に示す図である。Cas9タンパク質をコードするPX458ベクターおよびCD33を標的にするガイドRNAを、ヒト白血病細胞株であるK562細胞中に核導入した。フローサイトメトリーを、細胞へのCas9およびガイドRNAの送達前（上図）および送達後（下図）に抗CD33抗体を用いて細胞集団で実施した。ゲノム編集は遺伝子のコード領域の欠失および細胞表面からのCD33の著しい低下をもたらした。

10

【図6】CD45RAを破壊するためのCRISPR/Cas9系を用いたゲノム編集方法を図式的に示す図である。Cas9タンパク質をコードするPX458ベクターおよびCD45RAを標的にするガイドRNAを、TIB-67細胞肉腫マウスマクロファージ様細胞中に核導入した。フローサイトメトリーを、細胞へのCas9およびガイドRNAの送達前（上図）および送達後（下図）に抗CD45RA抗体を用いて細胞集団で実施した。ゲノム編集は遺伝子のコード領域の欠失および細胞表面からのCD45RAの著しい低下をもたらした。

【図7】CD33を標的とする抗原結合フラグメントを含む例示的なキメラ受容体の概要を示す図である。A：抗CD33 scFv、ヒンジ領域、膜貫通領域、共刺激領域、およびシグナル伝達領域を含む、CD33を標的とする包括的なキメラ受容体。B：抗CD33 scFv、CD8由来ヒンジ領域、CD8由来膜貫通領域、ならびにCD28およびCD3ζ由来細胞内領域を含む、CD33を標的とするキメラ受容体。C：抗CD33 scFv、CD8由来ヒンジ領域、CD8由来膜貫通領域、ならびにICOS（またはCD27、4-1BB、またはOX-40）およびCD3ζ由来細胞内領域を含む、CD33を標的とするキメラ受容体。D：抗CD33 scFv、CD8由来ヒンジ領域、CD8由来膜貫通領域、ならびにOX-40、CD28、およびCD3ζ由来細胞内領域を含む、CD33を標的とするキメラ受容体。

20

【図8】免疫毒素を図式的に示す図である。

【図9】空ベクターまたは抗CD33キメラ受容体をコードするベクターによって形質導入されたK562で発現される抗CD33キメラ受容体の発現を示す図である。A：CD3ζを認識する一次抗体を用いたウェスタンブロット。表は試験したキメラ受容体それぞれの推定される分子量を示す。B：抗CD33キメラ受容体で陽性に染色される細胞集団の増加を示すフローサイトメトリー分析。

30

【図10】CD33に結合する抗CD33キメラ受容体を示す図である。A：ボンソー染色したタンパク質ゲル。レーン1、3、5：CD33分子。レーン2、4、6：CD33分子+APC共役体。B：CD3ζを認識する一次抗体を用いたウェスタンブロット。レーン1、3、および5はCD33分子と共インキュベーションされたキメラ受容体を含み、レーン2、4、および6はCD33-APC共役体化と共インキュベーションされたキメラ受容体を含む。C：抗CD33キメラ受容体を発現してCD33を結合する細胞集団の増加を示すフローサイトメトリー分析。

40

【図11】表示のキメラ受容体を発現するNK92細胞によるK562細胞の細胞毒性を示す。A：空HIVz sGベクターと比較したCART1およびCART2。B：空HIVz sGベクターと比較したCART3。

【図12】表示のキメラ受容体を発現するNK92細胞によるCD33を欠くK562細胞の細胞毒性（y軸で細胞毒性パーセントとして表示）を示す。A：CD33標的化CRISPR/Cas9試薬で前処理されたK562細胞の未分類集団。B：CD33を欠くK562細胞の単独クローン。棒グラフは左から右に、空HIVz sGベクター、CART1、CART2、およびCART3に相当する。

【図13】一次T細胞集団のフローサイトメトリー分析を示す図である。A：T細胞マー

50

カーC4⁺、CD8⁺、または両CD4⁺CD8⁺の発現に基づいた細胞の分類。B：一次T細胞の表示した集団におけるCD33の相対的発現。

【図14】表示のキメラ受容体を発現する一次T細胞によるK562細胞の細胞毒性。A：CD4⁺T細胞、B：CD4⁺/CD8⁺（CD4/8）およびCD8⁺（CD8）。

【図15】CRISPR/Cas9系および2つの異なるgRNAを用いたK652細胞におけるCD33編集のフローサイトメトリー分析を示す図である（Crispr3、右上図、およびCrispr5、右下図）。

【図16】CD33を欠くK562細胞が正常な細胞増殖および赤血球形成分化を示すことを示す図である。A：表示の細胞集団の+50μMヘミンの1日目のフローサイトメトリー分析。B：表示の細胞集団の9日目のフローサイトメトリー分析。C：MTT細胞増殖アッセイ。

【図17】CRISPR/Cas9系および2つの異なるgRNAを用いたヒトCD34⁺細胞におけるCD33編集のフローサイトメトリー分析を示す図である（crispr3、左下図、およびcrispr5、右下図）。A：CRISPR/Cas9系を用いたヒトCD34⁺細胞におけるCD33編集のフローサイトメトリー分析。B：crispr3。C：crispr5。

【図18】ヒトCD34⁺/CD33⁻細胞のコロニー形成をヒトCD34⁺/CD33⁺と比較して示す図である。棒グラフは左から右に、レンチウイルス未感染、空ベクターコントロール、crispr1、crispr3、およびcrispr5に相当する。

【発明を実施するための形態】

【0025】

癌細胞の細胞表面に存在する抗原を標的にする癌免疫療法は、被験体の発達および／または生存に必要とされるか大いに関与する正常な非癌細胞の表面にも標的抗原が存在するとき、特に困難である。これらの抗原を標的化することは、癌細胞に加えてこのような細胞に対する免疫療法の細胞毒性効果のために、被験体において有害な効果をもたらし得る。

【0026】

本明細書で説明される方法、核酸、および細胞は、癌細胞だけでなく、被験体の発達および／または生存に重要な細胞にも存在する抗原（例えば、1型または2型抗原）を標的することを可能にする。本方法は、（1）標的系統特異的細胞表面抗原を有する細胞の数を、当該抗原を標的とする作用物質を用いて低下させること、および（2）抗原を提示しそのため作用物質の投与によって殺され得る正常細胞（例えば、非癌細胞）の、系統特異的細胞表面抗原を欠く造血細胞との置換を含む。本明細書で説明される方法は、対象の系統特異的細胞表面抗原を発現する癌細胞を含む標的細胞の監視を維持でき、そしてまた、被験体の発達および／または生存に重要であり得る系統特異的抗原を発現する非癌細胞集団を維持できる。

【0027】

従って、造血器悪性腫瘍を治療するために、CD33またはCD19などの系統特異的細胞表面抗原を標的にする抗原結合フラグメントを含むキメラ受容体を発現する免疫細胞、および系統特異的細胞表面抗原を欠く造血幹細胞（HSC）などの造血細胞の共使用が本明細書で説明される。また、キメラ受容体、これをコードする核酸、これを含むベクター、およびそのようなキメラ受容体を発現する免疫細胞（例えば、T細胞）が本明細書で提供される。本開示はまた、本明細書で説明されるような系統特異的抗原を欠く遺伝子工学処理された造血細胞、ならびにその作製方法（例えば、ゲノム編集方法）を提供する。

【0028】

定義

用語「被験体」、「個体」、および「患者」は交換可能に使用され、脊椎動物、好ましくはヒトなどの哺乳動物を指す。哺乳動物は、限定されないが、ヒト霊長類、非ヒト霊長類、あるいはネズミ、ウシ、ウマ、イヌまたはネコ種を含む。本開示の文脈では、用語「被験体」はまた、インビトロまたは体外で培養できる、あるいはインビボで操作できる組織または細胞を包含する。用語「被験体」は、用語「生物」と交換可能に使用され得る。

【0029】

用語「ポリヌクレオチド」、「ヌクレオチド」、「ヌクレオチド配列」、「核酸」、および「オリゴヌクレオチド」は交換可能に使用される。これらは、任意の長さのデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド、あるいはこれらのアナログであるヌクレオチドの重合型を指す。ポリヌクレオチドの例は、限定されないが、遺伝子または遺伝子フラグメントのコードまたは非コード領域、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA (mRNA)、トランスファーRNA、リボソームRNA、短干渉RNA (siRNA)、短ヘアピンRNA (shRNA)、マイクロRNA (miRNA)、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分枝ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の分離されたDNA、任意の配列の分離されたRNA、核酸プローブ、およびプライマーを含む。ポリヌクレオチド内の1つ以上のヌクレオチドはさらに改変されてよい。ヌクレオチドの配列は非ヌクレオチド成分によって中断され得る。ポリヌクレオチドはまた、標識物質との共役体化によってなど、重合化後に修飾され得る。

10

【0030】

用語「ハイブリダイゼーション」は、1つ以上のポリヌクレオチドが反応して、ヌクレオチド残基の塩基間の水素結合によって安定化される複合体を形成する反応を指す。水素結合は、ワトソンクリック塩基対形成、フーグスティーン結合、またはいずれかの他の配列特異的様式によって生じ得る。複合体は、二本鎖構造を形成する2本のストランド、複数ストランド複合体を形成する3本以上のストランド、単一自己ハイブリダイゼーションストランド、またはこれらのいずれかの組み合わせを含み得る。ハイブリダイゼーション反応は、PCRの開始、または酵素によるポリヌクレオチドの切断などの、さらに広範な工程におけるステップを構成し得る。所定の配列とハイブリダイズできる配列は、所定配列の「相補体」と呼ばれる。

20

【0031】

用語「組換え発現ベクター」は、構築体がmRNA、タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、かつベクターが細胞内で発現されるmRNA、タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドを有するのに十分な条件下で細胞と接触される場合に、宿主細胞によるmRNA、タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドの発現を可能にする遺伝子改変されたオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド構築体を意味する。本開示のベクターは総じて自然発生的ではない。ベクターの一部は自然発生であってよい。本開示の非自然発生組換え発現ベクターは、ヌクレオチドのいずれかのタイプを含んでよく、限定されないが、DNAおよびRNAを含み、それは一本鎖または二本鎖であってよく、合成されるか一部は自然源から得られ、かつ天然の、非天然の、または変異したヌクレオチドを含んでよい。

30

【0032】

本明細書で使用される「トランスフェクション」、「形質転換」、または「形質導入」は、物理的または化学的方法による宿主細胞中への1つ以上の外因性ポリヌクレオチドの導入を指す。

【0033】

「抗体」、「抗体のフラグメント」、「抗体フラグメント」、「抗体の機能的フラグメント」、または「抗原結合部分」は交換可能に使用され、特定抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体の1つ以上のフラグメントまたは部分を意味する (Holligerら, Nat. Biotech. (2005) 23 (9): 1126)。本抗体は抗体および／またはそのフラグメントであり得る。抗体フラグメントはFab、F(ab')₂、scFv、ジスルフィド結合Fv、Fc、または変異体、および／または混合物を含む。抗体は、キメラ、ヒト化、単鎖、または二重特異的であり得る。すべての抗体アイソタイプが本開示によって包含され、IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMを含む。適切なIgGサブタイプはIgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4を含む。抗体軽鎖または重鎖可変領域は、相補性決定領域 (CDR) と呼ばれる3つの超可変領域によって中断されるフレームワークからなる。本抗体または抗原結合部分のCDRは、非ヒトのまた

40

50

はヒトの起源からであってよい。本発明の抗体または抗原結合部分のフレームワークは、ヒト、ヒト化、非ヒト（例えば、ヒトにおける抗原性を低下するように改変されたネズミフレームワーク）、または合成フレームワーク（例えば、共通配列）であってよい。

【0034】

本抗体または抗原結合部分は、約 10^{-7} M未満、約 10^{-8} M未満、約 10^{-9} M未満、約 10^{-10} M未満、約 10^{-11} M未満、または約 10^{-12} M未満の解離定数（ K_D ）で特異的に結合できる。本開示による抗体の親和性は、従来技術を用いて容易に測定できる（Scatchardら，Ann. N. Y. Acad. Sci. (1949) 51:660、および米国特許第5,283,173号、第5,468,614号、または同等文献）。

【0035】

用語「キメラ受容体」、「キメラ抗原受容体」、またはこれに代えて「CAR」は、全体を通して交換可能に使用され、少なくとも細胞外抗原結合領域、膜貫通領域、および下記で定められる刺激分子由来の機能的シグナル伝達領域を含む細胞質シグナル伝達領域（本明細書では「細胞内シグナル伝達領域」ともいう）を含む組換えポリペプチド構築体を指す。Leeら，Clin. Cancer Res. (2012) 18(10):2780、Jensenら，Immunol Rev. (2014) 257(1):127、www.cancer.gov/about-cancer/treatment/research/car-t-cells。一つの実施形態では、刺激分子はT細胞受容体複合体と関連するゼータ鎖である。一つの態様では、細胞質シグナル伝達領域は、下記で定められる少なくとも1つの共刺激分子由来の1つ以上の機能的シグナル伝達領域をさらに含む。共刺激分子はまた、4-1BB（例えば、CD137）、CD27、および／またはCD28、またはこれら分子のフラグメントであり得る。別の態様では、CARは、細胞外抗原認識領域、膜貫通領域、および刺激分子由来の機能的シグナル伝達領域を含む細胞内シグナル伝達領域を含む、キメラ融合タンパク質を含む。CARは、細胞外抗原認識領域、膜貫通領域、ならびに共刺激分子由来の機能的シグナル伝達領域および刺激分子由来の機能的シグナル伝達領域を含む細胞内シグナル伝達領域を含む、キメラ融合タンパク質を含む。あるいは、CARは、細胞外抗原認識領域、膜貫通領域、ならびに1つ以上の共刺激分子由来の2つの機能的シグナル伝達領域および刺激分子由来の機能的シグナル領域を含む細胞内シグナル伝達領域を含む、キメラ融合タンパク質を含む。CARはまた、細胞外抗原認識領域、膜貫通領域、ならびに1つ以上の共刺激分子由来の少なくとも2つの機能的シグナル領域および刺激分子由来の機能的シグナル伝達領域を含む、キメラ融合タンパク質を含む。核酸配列によってコードされるCARの抗原認識部分は、いずれかの系統特異的な抗原結合抗体フラグメントを含んでよい。抗体フラグメントは、1つ以上のCDR、可変領域（またはこの一部）、定常領域（またはこの一部）、または上記のいずれかの組み合わせを含んでよい。

【0036】

用語「シグナル伝達領域」は、細胞内で情報を伝達することにより、第二メッセンジャーを生じることにより、またはこのようなメッセンジャーに応答することによりエフェクターとして機能して、定められたシグナル伝達経路を介して細胞活性を調節するように作用するタンパク質の機能的部分を指す。

【0037】

用語「ゼータ」またはこれに代えて「ゼータ鎖」、「CD3-ゼータ」、または「TCR-ゼータ」は、GenBank登録番号NP_932170、NP_000725、またはXP_011508447で示されるタンパク質、または非ヒト種、例えば、マウス、げっ歯類、モンキー、サルなどに由来する同等の残基として定められ、「ゼータ刺激領域」またはこれに代えて「CD3-ゼータ刺激領域」、あるいは「TCR-ゼータ刺激領域」は、T細胞活性化のために必要な初期シグナルを機能的に伝達するのに適しているゼータ鎖の細胞質領域由来のアミノ酸残基として定められる。

【0038】

用語「遺伝子工学処理された」または「遺伝子改変された」は、遺伝子工学技術によって、例えばゲノム編集によって操作される細胞を指す。すなわち、細胞はこの細胞に本来発生しない異種配列を含む。一般的に、異種配列はベクター系、またはリボソームを含む細胞に核酸分子を導入するための他の手段を介して導入される。異種核酸分子は細胞のゲノムに統合され得、あるいはプラスミドの形態などで染色体外に存在し得る。本用語はまた、遺伝子工学処理され分離されたCARポリペプチドを細胞中に導入する実施形態も含む。

【0039】

用語「自家」は、同一個体中に後に再導入される、同一個体由来の任意の材料を指す。

【0040】

用語「同種異系」は、材料が導入される個体と同一種の異なる動物由来の任意の材料を指す。2つ以上の個体は、1つ以上の遺伝子座の遺伝子が同一でないとき、互いに同種異系であるといわれる。

【0041】

用語「細胞系統」は、共通祖先を有し、識別可能な細胞の同一タイプから特定の識別可能／機能性細胞へと発達している細胞を指す。本明細書で使用される細胞系統は、限定されないが、呼吸器、前立腺、乳房、腎臓、腸、神経、骨格、血管、肝臓、造血、筋肉または心臓の細胞系統を含む。

【0042】

用語「阻害」は、系統特異的抗原の遺伝子発現または機能に関連して使用されるとき、系統特異的抗原の遺伝子発現の量または機能における低下を指し、ここで阻害は遺伝子発現または機能に対する干渉の結果である。阻害は完全であり得、その場合は検出可能な発現または機能がなく、または阻害は部分的であり得る。部分的阻害はほとんど完全な阻害からほとんど阻害がない範囲であってよい。特定の標的細胞を排除することによって、CAR T細胞は特定の細胞系統の全発現を効果的に阻害し得る。

【0043】

「系統特異的抗原を欠く」造血細胞などの細胞は、それらの自然発生する相対物、例えば、同じタイプの内因性造血細胞と比べて系統特異的抗原の著しく低下した発現量を有する細胞、または系統特異的抗原を発現しない、すなわち、FACSなどの定型的測定によって検出できない細胞を指す。いくつかの例では、「抗原を欠く」細胞の系統特異的抗原の発現量は、自然発生する相対物の同一系統特異的抗原の発現量の約40%未満（例えば、30%、20%、15%、10%、5%、またはそれより低い）であってよい。本明細書で使用されるとき、用語「約」は特定の値±5%を指す。例えば、約40%の発現量は、35~45%の間のいずれかの発現量を含み得る。

【0044】

系統特異的細胞表面抗原を標的にする作用物質

本開示の態様は、例えば標的癌細胞上の、系統特異的細胞表面抗原を標的とする作用物質を提供する。このような作用物質は、系統特異的細胞表面抗原を結合し標的にする抗原結合フラグメントを含み得る。いくつかの例では、抗原結合フラグメントは系統特異的抗原に特異的に結合する単鎖抗体（scFv）であってよい。

【0045】

A. 系統特異的細胞表面抗原

本明細書で使用されるとき、用語「系統特異的細胞表面抗原」および「細胞表面系統特異的抗原」は交換可能に使用され得、細胞の表面に十分存在し、細胞系統の1種類以上の集団と関連する任意の抗原を指す。例えば、抗原は細胞系統の1種類以上の集団に存在し得、他の細胞集団の細胞表面には不在で（または低下した量で）あり得る。

【0046】

一般的に、系統特異的細胞表面抗原は、抗原および／または抗原を提示する細胞集団がホスト生物の生存および／または発達に必要とされるかどうかなどの多くの要因に基づいて分類できる。系統特異的抗原の例示的なタイプのまとめを下表1に示す。図1も参照する。

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1. 系統特異的抗原の分類

系統特異的抗原のタイプ	系統特異的抗原の特徴
0型	a) 抗原は生物の生存のために必要とされる かつ b) 0型抗原を有する細胞型は生物の生存のために必要とされるが、腫瘍または腫瘍関連ウイルスに独特ではない。
1型	a) 抗原は生物の生存のために必要とされない かつ b) 1型抗原を有する細胞型は生物の生存のために必要とされない
2型	a) 抗原は生物の生存のために必要とされない かつ b) 2型抗原を有する細胞型は生物の生存のために必要とされる
3型	a) 抗原は生物の生存のために必要とされない かつ b) 抗原を有する細胞型は生物の生存のために必要とされない c) 抗原は腫瘍または腫瘍関連ウイルスに独特である 例は、EBV感染した腫瘍細胞（上咽頭癌腫およびバーキットリンパ腫）を含む、EBV感染細胞におけるLMP-2抗原である

10

20

30

【0047】

表1および図1に示すように、0型系統特異的細胞表面抗原は組織恒常性および生存のために必要であり、0型系統特異的細胞表面抗原を有する細胞型も被験体の生存のために必要であり得る。このため、恒常性および生存における0型系統特異的細胞表面抗原、または0型系統特異的細胞表面抗原を有する細胞の重要性を考えると、このような抗原またはこのような抗原を有する細胞の阻害または除去は被験体の生存に有害であり得るため、この範疇の抗原を標的にすることは、従来のCAR-T細胞免疫療法を用いては困難であり得る。結果として、系統特異的細胞表面抗原（0型系統特異的抗原など）および／または

40

【0048】

0型抗原に反し、1型細胞表面系統特異的抗原および1型細胞表面系統特異的抗原を有する細胞は、被験体の組織恒常性または生存のために必要とされない。1型細胞表面系統特異的抗原を標的にすることは、被験体に有害な結果をもたらす可能性がない。例えば、正常形質細胞および多発性骨髄腫（MM）細胞の両方で特異的に発現される1型抗原であるCD307を標的にするように工学処理されたCAR-T細胞は、両細胞型の除去をもたらす（図2）（Elkinsら, Mol Cancer Ther. 10:2222 (20

50

12))。しかし、形質細胞系統は生物の生存のために犠牲にしてもよい、CD307 および他の1型系統特異的抗原は、CAR T細胞をベースとした免疫療法に適している抗原である。1型クラスの系統特異的抗原は、卵巣、精巣、前立腺、乳房、子宮内膜、および脾臓を含む幅広い様々な異なる組織で発現され得る。いくつかの実施形態では、作用物質は1型抗原である細胞表面系統特異的抗原を標的にする。

【0049】

2型抗原を標的にすることは、1型抗原と比べて著しい困難さを示す。2型抗原は、(1) 抗原は生物の生存のために重要でない(すなわち、生存のために必要とされない)、および(2) 抗原を有する細胞系統は生物の生存のために欠くことができない(すなわち、特定の細胞系統が生存のために必要とされる)ことによって特徴付けられる。例えば、CD33は正常骨髄細胞ならびに急性骨髄性白血病(AML)細胞の両方で発現される2型抗原である(Dohnerら, NEJM 373:1136 (2015))。結果として、CD33抗原を標的にするように工学処理されたCAR T細胞は、正常細胞ならびにAML細胞の両方の死滅をもたらし得、これは被験体の生存と両立し得ない(図3)。いくつかの実施形態では、作用物質は2型抗原である細胞表面系統特異的抗原を標的にする。

【0050】

幅広く様々な抗原が本開示の方法および組成物によって標的にされ得る。これらの抗原に対するモノクローナル抗体は、市販品を購入でき、または前述のように、対象抗原による動物の免疫に続く標準的なモノクローナル抗体方法論、例えば、Kohler and Milstein, Nature (1975) 256:495の標準的な体細胞ハイブリダイゼーション技術を含む、標準的な方法を用いて作製され得る。抗体または抗体をコードする核酸は、いずれかの標準的なDNAまたはタンパク質シーケンシング技術を用いて配列決定され得る。

【0051】

いくつかの実施形態では、本明細書で説明される方法および細胞を用いて標的にされる細胞表面系統特異的抗原は、白血球または白血球のサブ集団の細胞表面系統特異的抗原である。いくつかの実施形態では、細胞表面系統特異的抗原は骨髄細胞と関連する抗原である。いくつかの実施形態では、細胞表面系統特異的抗原は分化抗原群(CD)である。CD抗原の例は、限定されないが、CD1a、CD1b、CD1c、CD1d、CD1e、CD2、CD3、CD3d、CD3e、CD3g、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8a、CD8b、CD9、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD11d、CDw12、CD13、CD14、CD15、CD16、CD16b、CD17、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD26、CD27、CD28、CD29、CD30、CD31、CD32a、CD32b、CD32c、CD33、CD34、CD35、CD36、CD37、CD38、CD39、CD40、CD41、CD42a、CD42b、CD42c、CD42d、CD43、CD44、CD45、CD45RA、CD45RB、CD45RC、CD45RO、CD46、CD47、CD48、CD49a、CD49b、CD49c、CD49d、CD49e、CD49f、CD50、CD51、CD52、CD53、CD54、CD55、CD56、CD57、CD58、CD59、CD60a、CD61、CD62E、CD62L、CD62P、CD63、CD64a、CD65、CD65s、CD66a、CD66b、CD66c、CD66F、CD68、CD69、CD70、CD71、CD72、CD73、CD74、CD75、CD75S、CD77、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85A、CD85C、CD85D、CD85E、CD85F、CD85G、CD85H、CD85I、CD85J、CD85K、CD86、CD87、CD88、CD89、CD90、CD91、CD92、CD93、CD94、CD95、CD96、CD97、CD98、CD99、CD99R、CD100、CD101、CD102、CD103、CD104、CD105、CD106、CD107a、CD107b、CD108、CD109、CD110、CD111、CD112、CD113、CD114、CD115、CD116、CD117、CD118

、CD119、CD120a、CD120b、CD121a、CD121b、CD121a、CD121b、CD122、CD123、CD124、CD125、CD126、CD127、CD129、CD130、CD131、CD132、CD133、CD134、CD135、CD136、CD137、CD138、CD139、CD140a、CD140b、CD141、CD142、CD143、CD144、CDw145、CD146、CD147、CD148、CD150、CD152、CD152、CD153、CD154、CD155、CD156a、CD156b、CD156c、CD157、CD158b1、CD158b2、CD158d、CD158e1/e2、CD158f、CD158g、CD158h、CD158i、CD158j、CD158k、CD159a、CD159c、CD160、CD161、CD163、CD164、CD165、CD166、CD167a、CD168、CD169、CD170、CD171、CD172a、CD172b、CD172g、CD173、CD174、CD175、CD175s、CD176、CD177、CD178、CD179a、CD179b、CD180、CD181、CD182、CD183、CD184、CD185、CD186、CD191、CD192、CD193、CD194、CD195、CD196、CD197、CDw198、CDw199、CD200、CD201、CD202b、CD203c、CD204、CD205、CD206、CD207、CD208、CD209、CD210a、CDw210b、CD212、CD213a1、CD213a2、CD215、CD217、CD218a、CD218b、CD220、CD221、CD222、CD223、CD224、CD225、CD226、CD227、CD228、CD229、CD230、CD231、CD232、CD233、CD234、CD235a、CD235b、CD236、CD236R、CD238、CD239、CD240、CD241、CD242、CD243、CD244、CD245、CD246、CD247、CD248、CD249、CD252、CD253、CD254、CD256、CD257、CD258、CD261、CD262、CD263、CD264、CD265、CD266、CD267、CD268、CD269、CD270、CD271、CD272、CD273、CD274、CD275、CD276、CD277、CD278、CD279、CD280、CD281、CD282、CD283、CD284、CD286、CD288、CD289、CD290、CD292、CDw293、CD294、CD295、CD296、CD297、CD298、CD299、CD300a、CD300c、CD300e、CD301、CD302、CD303、CD304、CD305、306、CD307a、CD307b、CD307c、CD307d、CD307e、CD309、CD312、CD314、CD315、CD316、CD317、CD318、CD319、CD320、CD321、CD322、CD324、CD325、CD326、CD327、CD328、CD329、CD331、CD332、CD333、CD334、CD335、CD336、CD337、CD338、CD339、CD340、CD344、CD349、CD350、CD351、CD352、CD353、CD354、CD355、CD357、CD358、CD359、CD360、CD361、CD362、およびCD363を含む。www.bdbiosciences.com/documents/BD_Reagents_CDMarkerHuman_Poster.pdfを参照する。

【0052】

いくつかの実施形態では、細胞表面系統特異的抗原はCD19、CD20、CD11、CD123、CD56、CD34、CD14、CD33、CD66b、CD41、CD61、CD62、CD235a、CD146、CD326、LMP2、CD22、CD52、CD10、CD3/TCR、CD79/BCR、およびCD26である。いくつかの実施形態では、細胞表面系統特異的抗原はCD33またはCD19である。

【0053】

これに代えて、または追加で、細胞表面系統特異的抗原は癌抗原、例えば、癌細胞に差次的に存在する細胞表面系統特異的抗原であり得る。いくつかの実施形態では、癌抗原は組織または細胞系統に特異的な抗原である。癌の特定タイプと関連する細胞表面系統特異的

10

20

30

40

50

抗原の例は、限定されないが、CD20、CD22（非ホジキンリンパ腫、B細胞リンパ腫、慢性リンパ性白血病（CLL））、CD52（B細胞CLL）、CD33（急性骨髄性白血病（AML））、CD10（gp100）（共通（前駆B細胞）急性リンパ性白血病および悪性骨髄腫）、CD3／T細胞受容体（TCR）（T細胞リンパ腫および白血病）、CD79／B細胞受容体（BCR）（B細胞リンパ腫および白血病）、CD26（上皮性およびリンパ性悪性腫瘍）、ヒトリンパ球抗原（HLA）－DR、HLA－DP、およびHLA－DQ（リンパ性悪性腫瘍）、RCAS1（婦人科癌、胆管腺癌、および膵臓の管状腺癌）、ならびに前立腺特異的膜抗原を含む。いくつかの実施形態では、細胞表面抗原CD33はAML細胞と関連する。

【0054】

B．抗原結合フラグメント

任意の抗体またはその抗原結合フラグメントを、本明細書で説明される系統特異的細胞表面抗原を標的にする作用物質を構築するために使用できる。このような抗体または抗原結合フラグメントは、従来法、例えば、ハイブリドーマ技術または組換え技術によって調製できる。

【0055】

例えば、対象の系統特異的抗原に特異的な抗体は、従来のハイブリドーマ技術によって作製できる。KLHなどのキャリアタンパク質に連結され得る系統特異的抗原を使用して、この複合体に結合する抗体を作製するために宿主動物を免疫できる。宿主動物の免疫接種の経路または計画は、本明細書でさらに説明されるように、抗体刺激および産生のために確立された従来技術に一般的に従う。マウス抗体、ヒト化抗体、およびヒト抗体の産生のための一般的技術は従来技術で知られており、本明細書で説明される。ヒトを含む任意の哺乳動物被験体またはそれに由来する抗体産生細胞を、ヒトを含む哺乳動物のハイブリドーマ細胞株の産生のための土台となるように操作できることが考えられる。一般的に、宿主動物を、本明細書で説明されるようなものを含むある量の免疫原で腹腔内、筋肉内、経口、皮下、足底内、および／または皮内に接種する。

【0056】

ハイブリドーマは、Kohler, B. and Milstein, C. (1975) Nature 256: 495-497の、またはBuck, D. W. ら, In Vitro, 18: 377-381 (1982) によって改良された一般的な体細胞ハイブリドーマ技術を用いて、リンパ球および不死化骨髄腫細胞から調製できる。利用可能な骨髄腫株は、限定されないが、X63-Ag8.653および米国カリフォルニア州サンディエゴのソーク研究所細胞頒布センター（Salk Institute, Cell Distribution Center）から入手されるものを含み、ハイブリダイゼーションに使用され得る。一般的に、本技術は、ポリエチレングリコールなどの融合誘起剤、または従来技術の当業者に良く知られている電気的方法によって、骨髄腫細胞とリンパ球を融合することを含む。融合後に、細胞を融合メディウムから分離してヒポキサンチン－アミノプテリン－チミジン（HAT）培地などの選択増殖培地中で増殖させて、ハイブリダイズされていない親細胞を取り除く。血清が添加されたまたは無添加の本明細書で開示される培地のいずれかを、モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを培養するために使用できる。細胞融合技術の別の選択肢として、EBV不死化B細胞を使用して本明細書で説明されるTCR様モノクローナル抗体を産生し得る。ハイブリドーマを拡張しおよび必要に応じてサブクローニングし、上清を従来の免疫アッセイ方法（例えば、ラジオイムノアッセイ、酵素イムノアッセイ、または蛍光イムノアッセイ）によって抗免疫原活性について測定する。

【0057】

抗体源として使用され得るハイブリドーマは、系統特異的抗原に結合できるモノクローナル抗体を産生する親ハイブリドーマの子孫細胞であるすべての派生物を包含する。このような抗体を産生するハイブリドーマは、既知の方法を用いてインビトロまたはインビボで増殖され得る。モノクローナル抗体は、必要に応じて、硫酸アンモニウム沈殿法、ゲル電

10

20

30

40

50

気泳動、透析、クロマトグラフィー、および限外ろ過などの従来の免疫グロブリン精製法によって、培養培地または体液から分離され得る。不要な活性が存在する場合、例えば、調製物を、固相に付着された免疫原からなる吸着剤上を通し、所望の抗体を免疫原から溶出または放出させることによって、取り除くことができる。免疫される種において免疫原性であるタンパク質、例えば、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、またはダイズトリプシンインヒビターに、二官能基または誘導体化剤、例えば、マレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル（システイン残基を介した共役体化）、N-ヒドロキシスクシンイミド（リジン残基による）、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、SOCl₂、またはR₁N=C=N RであってRおよびR₁が独立したアルキル基を用いて共役体化された標的アミノ酸配列を含む標的抗原またはフラグメントでの宿主細胞の免疫は、抗体の集団（例えば、モノクローナル抗体）を生じることができる。

10

【0058】

必要に応じて、対象の抗体（例えば、ハイブリドーマによって産生された）は配列決定され得、ポリヌクレオチド配列は発現または伝播用のベクター中に次いでクローニングされ得る。対象の抗体をコードする配列は宿主細胞中でベクターに維持され得、かつ宿主細胞は次いで将来の使用のために拡張され凍結され得る。あるいは、ポリヌクレオチド配列は、抗体を「ヒト化する」ためあるいは抗体の親和性（親和性成熟）または他の特性を改善するための遺伝子操作に使用され得る。例えば、抗体が臨床試験またはヒトにおける治療で使用される場合、定常領域をより類似したヒト定常領域に工学処理して免疫応答を回避し得る。抗体配列を遺伝子操作して系統特異的抗原に対する高い親和性を得ることは望ましいことであり得る。1つ以上のポリヌクレオチド変更を抗体に実施して、かつ標的抗原に対するその結合特異性をなお維持できることは、従来技術の当業者に明らかであろう。

20

【0059】

他の実施形態では、完全なヒト抗体を、特定のヒト免疫グロブリンタンパク質を発現するように工学処理されている市販マウスを用いて得ることができる。より望ましい（例えば、完全なヒト抗体）またはより頑強な免疫応答を生じるように設計された遺伝子導入動物もまた、ヒト化抗体またはヒト抗体の産生のために使用され得る。このような技術の例は、Amgen, Inc.（フリーモント，カリフォルニア州）のXenomouse（登録商標）ならびにMedarex, Inc.（プリンストン，ニュージャージー州）のHuMAb-Mouse（登録商標）およびTC Mouse（登録商標）である。別の選択肢では、抗体はファージディスプレイまたは酵母技術による組換えによって作製され得る。例えば、米国特許第5,565,332号、第5,580,717号、第5,733,743号、および第6,265,150号、ならびにWinterら，（1994）Annu. Rev. Immunol. 12: 433-455を参照する。あるいは、ファージディスプレイ技術（McCaffertyら，（1990）Nature 348: 552-553）を使用して、非免疫ドナー由来の免疫グロブリン可変（V）領域遺伝子レパートリーからインビトロでヒト抗体および抗体フラグメントを産生できる。

30

【0060】

インタクト抗体（全長抗体）の抗原結合フラグメントは、定型化された方法によって調製できる。例えば、F(ab')₂フラグメントは抗体分子のペプシン消化によって産生でき、FabはF(ab')₂フラグメントのジスルフィド結合を還元することによって生じることができる。

40

【0061】

ヒト化抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、および二重特異的抗体などの遺伝子工学処理された抗体は、例えば従来の組換え技術によって産生できる。一つの例では、標的抗原に特異的なモノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の方法を用いて容易に分離および配列決定できる（例えば、モノクローナル抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを用いることによって）。ハイブリドーマ細胞

50

はこのようなDNAの好ましい供給源として役立つ。一度分離されると、DNAは1種類以上の発現ベクター中に配置され得、これは次いで大腸菌細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、または他の形では免疫グロブリンタンパク質を産生しない骨髓腫細胞などの宿主細胞中にトランスフェクションされて、組換え宿主細胞中でモノクローナル抗体の合成を得る。例えば、PCT公開番号WO87/04462を参照する。DNAを次いで、例えば、相同なネズミ配列の代わりにヒト重鎖および軽鎖定常領域をコードする配列で置換することによって、Morrissonら、(1984) Proc. Nat. Acad. Sci. 81:6851、または免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列のすべてまたは一部を共有結合させることによって、改変できる。この方法では、「キメラ」または「ハイブリッド」抗体などの遺伝子工学処理された抗体は、標的抗原の結合特異性を有するものとして作製できる。

10

【0062】

「キメラ抗体」の産生のために開発された技術は従来技術で良く知られている。例えば、Morrissonら(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851、Neubergerら(1984) Nature 312, 604、およびTakedaら(1984) Nature 314:452を参照する。

【0063】

ヒト化抗体を構築するための方法は従来技術で良く知られている。例えば、Queenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:10029-10033 (1989)を参照する。一つの例では、親非ヒト抗体のVHおよびVLの可変領域を、従来技術で知られている方法による三次元分子モデル化分析に供する。次に、正確なCDR構造の形成に重要であると予測されるフレームワークアミノ酸残基を、同じ分子モデル化分析を用いて特定する。並行して、親非ヒト抗体と相同であるアミノ酸配列を有するヒトHVおよびHL鎖を、検索質問として親VHおよびVL配列を用いていずれかの抗体遺伝子データベースから特定する。ヒトVHおよびVLアクセプター遺伝子を次いで選択する。

20

【0064】

選択されたヒトアクセプター遺伝子内のCDR領域を、親非ヒト抗体由来のCDR領域またはその機能的変異体で置換できる。必要に応じて、CDR領域との相互作用において重要であると予測される親鎖のフレームワーク領域内の残基を使用して、ヒトアクセプター遺伝子中の相当する残基と置換できる。

30

【0065】

単鎖抗体は組換え技術を介して、重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列および軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を連結することによって作製できる。好ましくは、フレキシブルリンカーが2つの可変領域の間に組み込まれる。あるいは、単鎖抗体の産生のために報告されている技術（米国特許第4,946,778号および第4,704,692号）を、ファージまたは酵母scFvライブラリーを作製するために適応でき、系統特異的抗原に特異的なscFvクローンを定型的な手順に従ってライブラリーから特定できる。陽性クローンをさらなるスクリーニングに供して、系統特異的抗原を結合するものを特定できる。

【0066】

いくつかの例では、対象の系統特異的抗原はCD33であり、抗原結合フラグメントはCD33、例えば、ヒトCD33を特異的に結合する。抗ヒトCD33抗体の例示的な重鎖可変領域および軽鎖可変領域のアミノ酸および核酸配列を下記に示す。CDR配列をアミノ酸配列中で太字と下線で示す。

40

50

【化 1】

抗CD33重鎖可変領域のアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 12)

QVQLQQPGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYYIHWIKQTP
GQGLEWVGVIYPGNDDISYNQKFQGKATLTADKSSTTAYMQ
LSSLTSEDSAVYYCAREEVRLRYFDVWGQGTTVTVSS

【化 2】

10

抗CD33重鎖可変領域の核酸配列 (SEQ ID NO: 2)

CAGGTGCAGCTGCAGCAGCCCCGGCGCCGAGGTGGTGAAGCC
CGGCGCCAGCGTGAAGATGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACA
CCTTCACCAGCTACTACATCCACTGGATCAAGCAGACCCCC
GGCCAGGGCCTGGAGTGGGTGGGCGTGATCTACCCCGGCCAA
CGACGACATCAGCTACAACCAGAAGTTCCAGGGCAAGGCCA
CCCTGACCGCGCGACAAGAGCAGCACCCACCGCCTACATGCAG
CTGAGCAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCCGTGTACTIONT
CGCCAGGGAGGTGAGGCTGAGGTACTTCGACGTGTGGGGCC
AGGGCACCCACCGTGACCGTGAGCAGC

20

【化 3】

抗CD33軽鎖可変領域のアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 13)

EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKKSSQSVFFSSSQKNYLAW
YQQIPGQSPRLLIYWASTRESGVDPDRFTGSGSGTDFTLTIS
SVQPEDLAIIYCHHQYLSSRTTFGQGTKLEIKR

30

【化 4】

抗CD33重鎖可変領域の核酸配列 (SEQ ID NO: 1)

GAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCCGGCAGCCTGGCCGTGAG
CCCCGGCGAGAGGGTGACCATGAGCTGCAAGAGCAGCCAGA
GCGTGTTCTTCAGCAGCAGCCAGAAGAACTACCTGGCCTGG
TACCAGCAGATCCCCGGCCAGAGCCCCAGGCTGCTGATCTA
CTGGGCCAGCACCCAGGGAGAGCGGCGTGCCCGACAGGTTCA
CCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGC
AGCGTGACGCCCGAGGACCTGGCCATCTACTACTGCCACCA
GTACCTGAGCAGCAGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGG
AGATCAAGAGG

40

50

【0067】

本明細書で説明されるCD33を標的にする作用物質を構築する上で使用する抗CD33抗体結合フラグメントは、SEQ ID NO:12およびSEQ ID NO:13と同じの重鎖および／または軽鎖CDRを含み得る。このような抗体は1つ以上のフレームワーク領域にアミノ酸残基変異を含み得る。いくつかの例では、抗CD33抗体フラグメントは、SEQ ID NO:12と少なくとも70%配列同一性（例えば、75%、80%、85%、90%、95%、またはそれを超える）を共有する重鎖可変領域を含み得、および／またはSEQ ID NO:13と少なくとも70%配列同一性（例えば、75%、80%、85%、90%、95%、またはそれを超える）を共有する軽鎖可変領域を含み得る。

10

【0068】

2つのアミノ酸配列の「パーセント同一性」は、Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68, 1990の、改良されたKarlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77, 1993のアルゴリズムを用いて決定される。このようなアルゴリズムは、Altschulら, J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990のNBLASTおよびXBLASTプログラム（バージョン2.0）に組み込まれている。BLASTタンパク質検索をXBLASTプログラム、スコア=50、ワード長=3で実施して、本開示のタンパク質分子と相同的なアミノ酸配列を得ることができる。2つの配列の間にギャップが存在する場合、ギャップ化BLASTをAltschulら, Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402, 1997で報告されているように使用できる。BLASTおよびギャップ化BLASTプログラムを使用する場合、各プログラム（例えば、XBLASTおよびNBLAST）のデフォルトパラメータを使用できる。

20

【0069】

C. キメラ受容体を発現する免疫細胞

いくつかの実施形態では、本明細書で説明される系統特異的細胞表面抗原を標的にする作用物質は、系統特異的抗原（例えば、CD33またはCD19）に結合できる抗原結合フラグメント（例えば、単鎖抗体）を含むキメラ受容体を発現する免疫細胞である。キメラ受容体の抗原結合フラグメントによる、細胞表面上の系統特異的抗原を有する標的細胞（例えば、癌細胞）の認識は、キメラ受容体のシグナル伝達領域（例えば、共刺激シグナル伝達領域および／または細胞質シグナル伝達領域）に活性化シグナルを伝達し、これはキメラ受容体を発現する免疫細胞中でエフェクター機能を活性化し得る。

30

【0070】

本明細書で使用されるとき、キメラ受容体はホスト細胞の表面で発現され得、かつ細胞表面系統特異的抗原に結合する抗原結合フラグメントを含む、非自然発生分子を指す。一般的に、キメラ受容体は、異なる分子由来である少なくとも2つの領域を含む。本明細書で説明される抗原結合フラグメントに加え、キメラ受容体はヒンジ領域、膜貫通領域、少なくとも1つの共刺激領域、および細胞質シグナル伝達領域の1つ以上をさらに含み得る。いくつかの実施形態では、キメラ受容体は、N端からC端へと、細胞表面系統特異的抗原に結合する抗原結合フラグメント、ヒンジ領域、膜貫通領域、および細胞質シグナル伝達領域を含む。いくつかの実施形態では、キメラ受容体は少なくとも1つの共刺激領域をさらに含む。

40

【0071】

いくつかの実施形態では、本明細書で説明されるキメラ受容体はヒンジ領域を含み、これは抗原結合フラグメントと膜貫通領域の間に位置し得る。ヒンジ領域は一般的にタンパク質の2つの領域の間で認められ、タンパク質の可撓性および領域の1つまたは両方の相互の動きを可能にし得る。このような可撓性およびキメラ受容体の別領域に対する抗原結合フラグメントの動きをもたらす、任意のアミノ酸配列を使用できる。

【0072】

50

ヒンジ領域は約10～200個のアミノ酸、例えば、15～150個のアミノ酸、20～100個のアミノ酸、または30～60個のアミノ酸を含み得る。いくつかの実施形態では、ヒンジ領域は、長さが10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、または200個のアミノ酸であり得る。

【0073】

いくつかの実施形態では、ヒンジ領域は自然発生タンパク質のヒンジ領域である。ヒンジ領域を含むことが従来技術で知られているいずれかのタンパク質のヒンジ領域は、本明細書で説明されるキメラ受容体における使用に適合する。いくつかの実施形態では、ヒンジ領域は自然発生タンパク質のヒンジ領域の少なくとも一部であり、キメラ受容体に可撓性を付与する。いくつかの実施形態では、ヒンジ領域はCD8 α またはCD28 α のものである。いくつかの実施形態では、ヒンジ領域はCD8 α のヒンジ領域の一部であり、例えば、CD8 α またはCD28 α のヒンジ領域の少なくとも15個（例えば、20、25、30、35、または40個）の連続したアミノ酸を含むフラグメントである。

【0074】

IgG、IgA、IgM、IgE、またはIgD抗体などの抗体のヒンジ領域もまた、本明細書で説明されるキメラ受容体における使用に適合する。いくつかの実施形態では、ヒンジ領域は抗体の定常領域CH1とCH2をつなぐヒンジ領域である。いくつかの実施形態では、ヒンジ領域は抗体のものであり、抗体のヒンジ領域および抗体の1つ以上の定常領域を含む。いくつかの実施形態では、ヒンジ領域は抗体のヒンジ領域および抗体のCH3定常領域を含む。いくつかの実施形態では、ヒンジ領域は抗体のヒンジ領域および抗体のCH2およびCH3定常領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体はIgG、IgA、IgM、IgE、またはIgD抗体である。いくつかの実施形態では、抗体はIgG抗体である。いくつかの実施形態では、抗体はIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4抗体である。いくつかの実施形態では、ヒンジ領域はIgG1抗体のヒンジ領域ならびにCH2およびCH3定常領域を含む。いくつかの実施形態では、ヒンジ領域はIgG1抗体のヒンジ領域およびCH3定常領域を含む。

【0075】

非自然発生ペプチドであるヒンジ領域を含むキメラ受容体も本開示の範囲内である。いくつかの実施形態では、Fc受容体の細胞外リガンド結合領域のC端と膜貫通領域のN端の間のヒンジ領域は、(GlyxSer) n リンカーなどのペプチドリinkerであり、ここでxおよびnは独立して3、4、5、6、7、8、9、10、11、12を含む3～12、またはそれを超える整数であってよい。

【0076】

本明細書で説明されるキメラ受容体のヒンジ領域で使用され得るさらなるペプチドリinkerは、従来技術で知られている。Wriggersら、Current Trends in Peptide Science (2005) 80 (6) : 736-746、およびPCT公開WO2012/088461を参照する。

【0077】

いくつかの実施形態では、本明細書で説明されるキメラ受容体は膜貫通領域を含み得る。キメラ受容体における使用のための膜貫通領域は、従来技術で知られているいずれかの形態であってよい。本明細書で使用されるとき、「膜貫通領域」は細胞膜、好ましくは真核細胞膜で熱力学的に安定である任意のタンパク質構造を指す。本明細書で使用されるキメラ受容体における使用に適合する膜貫通領域は、自然発生タンパク質から得ることができる。あるいは、膜貫通領域は合成の、非自然発生タンパク質セグメント、例えば、細胞膜中で熱力学的に安定である疎水性タンパク質セグメントであり得る。

【0078】

膜貫通領域は、膜貫通領域が膜を横断する通過回数およびタンパク質の配向を含む、膜貫

10

20

30

40

50

通領域の位相に基づいて分類される。例えば、単回通過膜タンパク質は細胞膜を1回横断し、多回通過膜タンパク質は細胞膜を少なくとも2回（例えば、2、3、4、5、6、7回またはそれより多い回数）横断する。いくつかの実施形態では、膜貫通領域は単回通過膜貫通領域である。いくつかの実施形態では、膜貫通領域は、キメラ受容体のN端が細胞の細胞外側に、キメラ受容体のC端が細胞の細胞内側に向いている単回通過膜貫通領域である。いくつかの実施形態では、膜貫通領域は単回通過膜貫通タンパク質から得られる。いくつかの実施形態では、膜貫通領域はCD8αのものである。いくつかの実施形態では、膜貫通領域はCD28のものである。いくつかの実施形態では、膜貫通領域はICOSのものである。

【0079】

いくつかの実施形態では、本明細書で説明されるキメラ受容体は、1つ以上の共刺激シグナル伝達領域を含む。用語「共刺激シグナル伝達領域」は、本明細書で使用されるとき、細胞内シグナル伝達を仲介してエフェクター機能などの免疫応答を誘発するタンパク質の少なくとも一部を指す。本明細書で説明されるキメラ受容体の共刺激シグナル伝達領域は、共刺激タンパク質由来の細胞質シグナル伝達領域であってよく、これはシグナルを伝達してT細胞、NK細胞、マクロファージ、好中球、または好酸球などの免疫細胞によって仲介される応答を調節する。

【0080】

いくつかの実施形態では、キメラ受容体は1つより多い（少なくとも2つ、3つ、4つ、またはそれより多い）の共刺激シグナル伝達領域を含む。いくつかの実施形態では、キメラ受容体は異なる共刺激タンパク質から得られる1つより多い共刺激シグナル伝達領域を含む。いくつかの実施形態では、キメラ受容体は共刺激シグナル伝達領域を含まない。

【0081】

一般的に、多くの免疫細胞は、細胞増殖、分化および生存を促進するために、ならびに細胞のエフェクター機能を活性化するために、抗原特異的シグナルの刺激に加えて、共刺激を必要とする。宿主細胞（例えば、免疫細胞）中の共刺激シグナル伝達領域の活性化は、細胞がサイトカインの産生および分泌、マクロファージ特性、増殖、分化、生存、および／または細胞毒性を増加または低下するのを誘発し得る。任意の共刺激タンパク質の共刺激シグナル伝達領域は、本明細書で説明されるキメラ受容体における使用に適合し得る。共刺激シグナル伝達領域のタイプは、キメラ受容体が発現される免疫細胞のタイプ（例えば、一次T細胞、T細胞株、NK細胞株）および所望の免疫エフェクター機能（例えば、細胞毒性）などの要因に基づいて選択される。キメラ受容体における使用のための共刺激シグナル伝達領域の例は、共刺激タンパク質の細胞質シグナル伝達領域であってよく、限定されないが、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、Cd40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1（LFA-1）、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3を含む。いくつかの実施形態では、共刺激領域は4-1BB、CD28、またはICOS由来である。いくつかの実施形態では、共刺激領域はCD28由来であり、キメラ受容体は4-1BBまたはICOS由来の第二共刺激領域を含む。

【0082】

いくつかの実施形態では、共刺激領域は1つを超える共刺激領域または1つを超える共刺激領域の部分を含む融合領域である。いくつかの実施形態では、共刺激領域はCD28およびICOS由来の共刺激領域の融合である。

【0083】

いくつかの実施形態では、本明細書で説明されるキメラ受容体は細胞質シグナル伝達領域を含む。任意の細胞質シグナル伝達領域を本明細書で説明されるキメラ受容体に使用できる。一般的に、細胞質シグナル伝達領域は、細胞外リガンド結合領域とそのリガンドの相互作用などのシグナルを伝えて、細胞のエフェクター機能（例えば、細胞毒性）を誘発するなどの細胞応答を刺激する。

【0084】

従来技術の当業者に明らかなように、T細胞活性化に含まれる因子は細胞質シグナル伝達

10

20

30

40

50

領域の免疫受容体チロシン活性化モチーフ（ITAM）のリン酸化である。従来技術で知られている任意のITAM含有領域を使用して、本明細書で説明されるキメラ受容体を構築し得る。一般的に、ITAMモチーフは6～8個のアミノ酸で分離されるアミノ酸配列YxxL/Iの2つの反復を含み、ここで各xは独立して任意のアミノ酸であり、保存モチーフYxxL/Ix（6～8）YxxL/Iを生じ得る。いくつかの実施形態では、細胞質シグナル伝達領域はCD3ζ由来である。

【0085】

例示的なキメラ受容体を次の表2および3に示す。

【表2】

表2：キメラ受容体の例示的な構成要素

キメラ受容体構成要素	アミノ酸配列
抗原結合フラグメント	軽鎖- GSTSSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 14)-重鎖
CD28共刺激領域	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWVLVVVG GVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHQ PYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO: 6)
ICOS共刺激領域（太字）、ICOS膜貫通領域（イタリック体）、およびICOSの細胞外領域の一部（下線）	LSIFDPPPFKVTLTGGYLHIYESQLCCQLKFWLPIGCAAFVVCILG <i>CILICWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTL</i> (SEQ ID NO: 7)
ICOS共刺激領域	CWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTL (SEQ ID NO: 47)
ヒンジ領域（イタリック体）およびCD28由来の膜貫通領域（太字）を含むCD28/ICOS キメラ（ICOS部分を下線で示す）	<i>IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWVLVVVG</i> <i>GVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMFMRVNTAKKSRLTD</i> <u><i>VTL</i></u> (SEQ ID NO: 8)
CD3ζ細胞質シグナル伝達領域	RVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGG KPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGDGLYQGL STATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 15)

【0086】

キメラ受容体の構築のための例示的な構成要素の核酸配列を次に示す。

CD28細胞内シグナル伝達領域-DNA-ヒト (SEQ ID NO: 3)

ATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGA
AGAGCAATGGAACCATTTATCCATGTGAAAGGGAAACACCT
TTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTT
TGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATA
GCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTTATTTTCTGGGTGAG
GAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGA CTACATGAAC
ATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCCCACCCGCAAGCATTACC
AGCCCTATGCCCCACCAACGCGACTTTCGCAAGCCTATCGCTC
CAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTAC
CAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAG
GACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTTGGACAAGAGACGTGG
CCGGGACCCCTGAGATGGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAAC
CCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGA
TGGCGGAGGCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCG
CCGGAGGGGCAAGGGGCAACGATGGCCTTTACCAGGGTCTC
AGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGC
AGGCCCTGCCCCCTCGC

ICOS細胞内シグナル伝達領域-DNA-ヒト (SEQ ID NO: 4)

CTATCAATTTTTGATCCTCCTCCTTTTAAAGTAACTCTTA
CAGGAGGATATTTGCATATTTATGAATCACAACTTTGTTG

CCAGCTGAAGTTCTGGTTACCCATAGGATGTGCAGCCTTT
 GTTGTAGTCTGCATTTTGGGATGCATACTTATTTGTTGGC
 TTACAAAAAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAA
 CGGTGAATACATGTTTCATGAGAGCAGTGAACACAGCCAAA
 AAATCTAGACTCACAGATGTGACCCCTAAGAGTGAAGTTCA
 GCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGGCCAGAA
 CCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAG
 TACGATGTTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGA
 TGGGGGGGAAAGCCGAGAAAGGAAGAACCCCTCAGGAAGGCCCT
 GTACAATGAACCTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCCTAC
 AGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGGCAAGG
 GGCACGATGGCCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAA
 GGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCT
 CGC

10

CD28／ICOS共刺激シグナル伝達領域－DNA－ヒト（SEQ ID NO：5）

ATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGA
 AGAGCAATGGAACCATTTATCCATGTGAAAGGGAAACACCT
 TTGTCCAAGTCCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTT
 TGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATA
 GCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTTATTTTCTGGGTGAG
 GAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGTTTC
 ATGAGAGCAGTGAACACAGCCAAAAAATCTAGACTCACAG
 ATGTGACCCCTAAGAGTGAAGTTTCAGCAGGAGCGCAGACGC
 CCCC GCGTACCAGCAGGGGCCAGAAC CAGCTCTATAACGAG
 CTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTTGGACA
 AGAGACGTGGCCGGGACCCCTGAGATGGGGGGGAAAGCCGAG
 AAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACCTGCAG
 AAAGATAAGATGGCGGAGGGCCTACAGTGAGATTGGGGATGA
 AAGGCGAGCGCCGGAGGGGGCAAGGGGACGATGGCCCTTTA
 CCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCC
 CTTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

20

30

【0087】

いくつかの実施形態では、核酸はCD33に結合する抗原結合フラグメントをコードし、SEQ ID NO：12中のCDRと同一のCDRを有する重鎖可変領域およびSEQ ID NO：13中のCDRと同一のCDRを有する軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、抗原結合フラグメントはSEQ ID NO：12によって示される重鎖可変領域およびSEQ ID NO：13によって示される軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、キメラ受容体は少なくとも膜貫通領域および細胞質シグナル伝達領域をさらに含む。いくつかの実施形態では、キメラ受容体はヒンジ領域および／または共刺激シグナル伝達領域をさらに含む。

40

【0088】

表3は本明細書で説明される例示的なキメラ受容体を示す。例示的な構築体はN端からC端へと、抗原結合フラグメント、膜貫通領域、および細胞質シグナル伝達領域を有する。いくつかの例では、キメラ受容体は抗原結合フラグメントと膜貫通領域の間に位置するヒンジ領域をさらに含む。いくつかの例では、キメラ受容体は1つ以上の共刺激領域をさらに含み、それは膜貫通領域と細胞質シグナル伝達領域の間に位置し得る。

50

【表 3】

表 3：例示的なキメラ受容体

構築体	ベク タ ー	抗原結合フ ラグメント 特異性	ヒン ジ 領域	膜貫通領域	シグナル伝 達領域 1	シグナル伝 達領域 2	シグナル伝 達領域 3
CART1 (SEQ ID NO: 20)	HIV _{ZS} -G fp	CD33	CD8 α	CD8	4-1BB	CD3 ζ	なし
CART2 (SEQ ID NO: 21)	HIV _{ZS} -G fp	CD33	CD8 α	CD28	CD28	CD3 ζ	なし
CART3 (SEQ ID NO: 22)	HIV _{ZS} -G fp	CD33	CD8 α	CD28	CD28	4-1BB	CD3 ζ
CART8 (SEQ ID NO: 23)	HIV _{ZS} -G fp	CD33	CD8 α	ICOS	ICOS	4-1BB	CD3 ζ
<i>CART4dual</i> (SEQ ID NO: 24)	HIV _{ZS} -d T	CD19	CD8 α	CD28	CD3 ζ	-	-
<i>CART5dual</i> (SEQ ID NO: 25)	HIV _{ZS} -G fp	CD33	CD8 α	CD28	CD28	-	-
CART6 (SEQ ID NO: 26)	HIV _{ZS} -d T	CD19	CD8 α	CD28	CD28	CD3 ζ	-
CART7 (SEQ ID NO: 27)	HIV _{ZS} -G fp	CD33	CD28hge	CD28	CD28	CD3 ζ	-

【0089】

上表 3 でリスト化された例示的なキメラ受容体のアミノ酸配列を次に示す。

CART1 アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 20)

MWLQSLLLLGTVACSI SEIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSC
KSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPRL LIYWASTRESG
VPDRFTGSGSGTDFTLT ISSSVQPEDLAIYYCHQYLS SRTF
GQG TKLEIKRGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLQQPGA EVV
KPGASVKMSCKASGYTFTSY IHWIKQTPGQG LEWVGVIY
PGNDDISYNQKFQ GKATLTADKSS TTA YMQLSSSLTSEDSA
VYYCAREVRLRYFDVWGQGTTVT VSSALSNSIMYFSHFVP
VFLPAKPTTTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEASRPAAGG
AVHTRGLDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITKRGRKKLLYIF
KQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSAD
APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDP EMGGKP
RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRRGK GHDGL
YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

CART2 アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 21)

MWLQSLLLLGTVACSI SEIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSC
KSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPRL LIYWASTRESG
VPDRFTGSGSGTDFTLT ISSSVQPEDLAIYYCHQYLS SRTF
GQG TKLEIKRGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLQQPGA EVV
KPGASVKMSCKASGYTFTSY IHWIKQTPGQG LEWVGVIY
PGNDDISYNQKFQ GKATLTADKSS TTA YMQLSSSLTSEDSA
VYYCAREVRLRYFDVWGQGTTVT VSSALSNSIMYFSHFVP
VFLPAKPTTTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEASRPAAGGA

VHTRGLDKPFWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVRSKR
SRL LHS DY MN MTPRRPGPTRKH YQPYAPPRDFAAYRSRVK
FSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDP
EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG
KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

CART3 アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 22)

MWLQSLLLLLGTVACSI SEIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSC
KSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPRL LIYWASTRESG
VPDRFTGSGSGTDFTLT ISSVQPEDLAIYYCHQYLS SRTF
GQGTKLEIKRGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLQQPGA EVV
KPGASVKMSCKASGYTFTSY YIHWIKQTPGQGLEWVGVIY
PGNDDISYNQKFQ GKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSA
VYYCAREVRLRYFDVWGQGT TTVTVSSALSNSIMYFSHFVP
VFLPAKPTTTTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEASRPAAGG
AVHTRGLDKPFWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVRSK
RSRL LHS DY MN MTPRRPGPTRKH YQPYAPPRDFAAYRSKR
GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGR
RDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER
RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

20

CART8 アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 23)

MWLQSLLLLLGTVACSI SEIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSC
KSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPRL LIYWASTRESG
VPDRFTGSGSGTDFTLT ISSVQPEDLAIYYCHQYLS SRTF
GQGTKLEIKRGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLQQPGA EVV
KPGASVKMSCKASGYTFTSY YIHWIKQTPGQGLEWVGVIY
PGNDDISYNQKFQ GKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSA
VYYCAREVRLRYFDVWGQGT TTVTVSSALSNSIMYFSHFVP
VFLPAKPTTTTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEASRPAAGG
AVHTRGLDFWLPIGCAAFVVVCILGCILICWLTKKKYSSS
VHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTLTKRGRKKLLYIFK
QPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADA
PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDP EMGGKPR
RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDGLY
QGLSTATKDTYDALHMQALPPR

30

CART4 dual アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 24)

MWLQSLLLLLGTVACSI SIQMTQTSSLSASLGDRV TISCR
ASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSG
SGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGG TKL
EIGSTSGSGKPGSGEGSTKGLQESGPGLVAPSQSLSVTCT
VSGVSLPDYGVSWIRQP PRKGLEWLGVWIGSETTYNSAL
KSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYY YGG
SYAMDYWGQGT SVTVSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTT
PAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEASRPAAGG AVHTRGLDKP
FWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVRVKFSRSADAPAY
QQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDP EMGGKPRRKN
PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDGLYQGL
STATKDTYDALHMQALPPR

40

CART5 dual アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 25)

MWLQSLLLLLGTVACSI SEIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSC

50

KSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPRLLIYWASTRESG
VPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYCHQYLSSTRTF
GQGTKLEIKRGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLQQPGAEEV
KPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGVIY
PGNDDISYNQKFQGKATLTADKSSSTTAYMQLSSSLTSEDSA
VYYCAREVRLRYFDVWGQGTTVTVSSALSNSIMYFSHFVP
VFLPAKPTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEASRPAAGG
AVHTRGLDKPFWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVRSK
RSRL LHS DYM NMT PRR PG P TR KHY QPY APP R D F AAY RS

CART6 アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 26)

MWLQSL L L L L G T V A C S I S I Q M T Q T T S S L S A S L G D R V T I S C R
A S Q D I S K Y L N W Y Q Q K P D G T V K L L I Y H T S R L H S G V P S R F S G
S G S G T D Y S L T I S N L E Q E D I A T Y F C Q Q G N T L P Y T F G G G T K L
E I G S T S G S G K P G S G E G S T K G L Q E S G P G L V A P S Q S L S V T C T
V S G V S L P D Y G V S W I R Q P P R K G L E W L G V I W G S E T T Y Y N S A L
K S R L T I I K D N S K S Q V F L K M N S L Q T D D T A I Y Y C A K H Y Y Y G G
S Y A M D Y W G Q G T S V T V S A L S N S I M Y F S H F V P V F L P A K P T T T
P A P R P P T P A P T I A S Q P L S L R P E A S R P A A G G A V H T R G L D K P
F W V L V V V G G V L A C Y S L L V T V A F I I F W V R S K R S R L L H S D Y M
N M T P R R P G P T R K H Y Q P Y A P P R D F A A Y R S R V K F S R S A D A P A
Y Q Q G Q N Q L Y N E L N L G R R E E Y D V L D K R R G R D P E M G G K P R R K
N P Q E G L Y N E L Q K D K M A E A Y S E I G M K G E R R R G K G H D G L Y Q G
L S T A T K D T Y D A L H M Q A L P P R

CART7 アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 27)

MWLQSL L L L L G T V A C S I S E I V L T Q S P G S L A V S P G E R V T M S C
KSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPRLLIYWASTRESG
VPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYCHQYLSSTRTF
GQGTKLEIKRGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLQQPGAEEV
KPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGVIY
PGNDDISYNQKFQGKATLTADKSSSTTAYMQLSSSLTSEDSA
VYYCAREVRLRYFDVWGQGTTVTVSSIEVMYPPPYLDNEK
SNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWVLVVVGGLACYS
LLVTVAFIIFWVRSKRSRL LHS DYM NMT PRR PG P TR KHY Q
PY APP R D F A A Y R S R V K F S R S A D A P A Y Q Q G Q N Q L Y N E L N L G
R R E E Y D V L D K R R G R D P E M G G K P R R K N P Q E G L Y N E L Q K D K M
A E A Y S E I G M G E R R R G K G H D G L Y Q G L S T A T K D T Y D A L H M Q A
L P P R

【0090】

上表3でリスト化された例示的なキメラ受容体の核酸配列を次に示す。

CART1 核酸配列 (SEQ ID NO: 38)

GGTGTCTGTGAGCGGCGCTGAACCTGGCCACCATGTGGCTG
CAGTCTCTGTGCTGCTGGGCGACCGTGGCCTGTAGCATCA
GCGAGATCGTGTGCTGACCCAGAGCCCTGGCTCTCTGGCTGT
GTCTCCTGGCGAGCGCGTGACCATGAGCTGCAAGAGCAGC
CAGAGCGTGTTCTTCAGCAGCTCCCAGAAAGAACTACCTGG
CCTGGTATCAGCAGATCCCCGGCCAGAGCCCCAGACTGCT
GATCTACTGGGCGCAGCACCCAGAGAAAGCGGCGTGCCCGAT
AGATTCAACCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCCTGA
CAATCAGCAGCGTGACAGCCCGAGGACCTGGCCATCTACTA
CTGCCACCCAGTACCTGAGCAGCCGGACCTTTGGCCAGGGC

ACCAAGCTGGAAATCAAGCGGGGCGAGCACAAAGCGGGCAGCG
GAAAGCCTGGATCTGGCGAGGGCTCTACCAAGGGGCCAGGT
GCAGCTGCAGCAGCCTGGCGCCGAAGTCGTGAAACCTGGC
GCCTCCGTGAAGATGTCCTGCAAGGCCAGCGGGCTACACCT
TCACCAGCTACTACATCCA CTGGATCAAGCAGACCCCTGG
ACAGGGCCTGGAAATGGGTGGGAGTGATCTACCCCGGCAAC
GACGACATCAGCTACAACCAGAAAGTTCCAGGGGCAAGGCCA
CCCTGACCGCCGACAAGTCTAGCACCAACCGCCTACATGCA
GCTGTCCAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCCGTGTA CTAC
TGCGCCAGAGAAAGTGCGGCTGCGGTA CTTCGATGTGTGGG
GCCAGGGGAACCACCGTGACCGTGCTAGCGCCCTGAGCAA
CAGCATCATGTACTTTCAGCCACTTTCGTGCCCGTGTTTCTG
CCCGCCAAGCCTACCACAACCCCTGCCCTAGACCTCCTA
CCCCAGCCCCCTACAATCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAG
GCCCGAGGGCTTCTAGACCAGCTGCTGGCGGAGCCGTGCAC
ACCAGAGGGCCTGGATATCTACATCTGGGGCCCCACTGGCCG
GCACCTGTGGCGTGCTGCTGCTGTCTCTCGTGATCACCAA
GAGAGGGCCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTCAAGCAGCCC
TTCATGCGGGCCCGTGCGAGACCACCCAGGAAGAGGGACGGCT
GTAGCTGCCGGTTCCCCGAGGAAGAAGAAGGGGGCTGCGA
GCTGAGAGTGAAGTTCAGCAGAAAGCGCCGACGCCCTGCC
TATCAGCAGGGGCCAGAAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACC
TGGGGCAGACGGGAAGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAG
AGGCAGGGGACCCCTGAGATGGGGCGGCAAGCCCAGACGGAAAG
AACCCTCAGGAAGGCCTGTATAACGAACCTGCAGAAAGACA
AGATGGCCGAGGCCTACTCCGAGATCGGAATGAAGGGCGA
GCGGAGAAGAGGGCAAGGGGCCACGATGGACTGTACCAGGGC
CTGAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCCCTGCACA
TGCAGGCCCTGCCCCCCCAGATGAAATTCAATCGACGTTAAC
TATTCTAG

10

20

30

CART2 核酸配列 (SEQ ID NO: 39)

GGTGTCTGTGAGCGGGCCGCTGAACTGGCCACCATGTGGCTG
CAGTCTCTGTGCTGCTGGGGCACCGTGGCCTGTAGCATCA
GCGAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGGCTCTCTGGCTGT
GTCTCCTGGCGAGCGCGTGACCATGAGCTGCAAGAGCAGC
CAGAGCGTGTTCTTCAGCAGCTCCCAGAAAGAACTACCTGG
CCTGGTATCAGCAGATCCCCGGGCCAGAGCCCCAGACTGCT
GATCTACTGGGGCCAGCACCAAGAGAAAGCGGCGTGCCCGAT
AGATTCAACGGCAGCGGCTCTGGGCACCGACTTCAACCTGA
CAATCAGCAGCGTGACAGCCCGAGGACCTGGCCATCTACTA
CTGCCACCAAGTACCTGAGCAGCCGGACCTTTGGCCAGGGC
ACCAAGCTGGAAATCAAGCGGGGCGAGCACAAAGCGGGCAGCG
GAAAGCCTGGATCTGGCGAGGGGCTCTACCAAGGGGCCAGGT
GCAGCTGCAGCAGCCTGGCGCCGAAGTCGTGAAACCTGGC
GCCTCCGTGAAGATGTCCTGCAAGGCCAGCGGGCTACACCT
TCACCAGCTACTACATCCA CTGGATCAAGCAGACCCCTGG
ACAGGGCCTGGAAATGGGTGGGAGTGATCTACCCCGGCAAC
GACGACATCAGCTACAACCAGAAAGTTCCAGGGGCAAGGCCA
CCCTGACCGCCGACAAGTCTAGCACCAACCGCCTACATGCA
GCTGTCCAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCCGTGTA CTAC

40

50

TGCGCCAGAGAAAGTGCGGGCTGCGGGTACTTCGATGTGTGGG
GCCAGGGAACCAACCGTGACCGTGCTGCCCTGAGCAACAG
CATCATGTACTTTCAGCCACTTTCGTGCCCGTGTTTCTGCC
GCCAAGCCTACCAACAACCCCTGCCCTAGACCTCCTACCC
CAGCCCCCTACAATCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAGGCC
CGAGGGCTTCTAGACCAGCTGCTGGCGGAGCCGTGCACACC
AGAGGACTGGACAAGCCCTTCTGGGTGCTGGTGGTCTGTGG
GCGGAGTGCTGGCCTGTTACAGCCTGCTCGTGACAGTGGC
CTTCATCATCTTTTGGGTGCGCAGCAAGCGGTCTAGACTG
CTGCACAGCGACTACATGAACATGACCCCCAGAAAGGCCAG
GCCCCACCCGGAAGCACTATCAGCCTTACGCCCTCCTCAG
AGACTTCGCCGCTACCGGTCCAGAGTGAAGTTTCAGCAGA
AGCGCCGACGCCCTGCTATCAGCAGGGGCCAGAACAGC
TGTAACAACGAGCTGAACCTGGGCGAGACGGGAAGAGTACGA
CGTGCTGGACAAGAGAAGAGGCGGGACCCCTGAGATGGGC
GGCAAGCCCAGACGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTATA
ACGAACCTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACTCCGA
GATCGGCATGAAGGGCGAACGGCGGAGAGGCAAGGGACAC
GATGGACTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACA
CCTATGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCCAGATG
AAATTTCATCGACGTTAACTATTCTAG

10

20

CART3 核酸配列 (SEQ ID NO: 40)

GGTGTCGTGAGCGGGCCGCTGAACCTGGCCACCATGTGGCTG
CAGTCTCTGCTGCTGCTGGGCAACCGTGCCCTGTAGCATCA
GCGAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGGCTCTCTGGCTGT
GTCTCCTGGCGAGCGCGTGACCATGAGCTGCAAGAGCAGC
CAGAGCGTGTTCTTTCAGCAGCTCCCAGAAAGAACTACCTGG
CCTGGGTATCAGCAGATCCCCGGCCAGAGCCCCAGACTGCT
GATCTACTGGGCCAGCACCCAGAGAAAGCGGCGTGCCCGAT
AGATTACCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTTCACCCCTGA
CAATCAGCAGCGTGACAGCCCGAGGACCTGGCCATCTACTA
CTGCCACCAGTACCTGAGCAGCCGGACCTTTGGCCAGGGC
ACCAAGCTGGAAATCAAGCGGGGCGAGCACAAAGCGGCAGCG
GAAAGCCTGGATCTGGCGAGGGCTCTACCAAGGGGCCAGGT
GCAGCTGCAGCAGCCTGGCGGCCGAAGTCGTGAAACCTGGC
GCCTCCGTGAAGATGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCT
TCACCAGCTACTACATCCACTGGATCAAGCAGACCCCTGG
ACAGGGCCTGGAATGGGTGGGAGTGATCTACCCCGGCAAC
GACGACATCAGCTACAACCAGAAAGTTCCAGGGCAAGGCCA
CCCTGACCGCCGACAAGTCTAGCACCAACCGCCTACATGCA
GCTGTCCAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTAC
TGCGCCAGAGAAAGTGCGGGCTGCGGGTACTTCGATGTGTGGG
GCCAGGGAACCAACCGTGACCGTGCTAGCGCCCTGAGCAA
CAGCATCATGTACTTTCAGCCACTTTCGTGCCCGTGTTTCTG
CCCGCCAAGCCTACCAACAACCCCTGCCCTAGACCTCCTA
CCCCAGCCCCCTACAATCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAG
GCCCCGAGGGCTTCTAGACCAGCTGCTGGCGGAGCCGTGCAC
ACCAGAGGACTGGACAAGCCCTTCTGGGTGCTGGTGGTCTG
TGGGCGGAGTGCTGGCCTGTTACAGCCTGCTCGTGACAGT
GGCCTTCATCATCTTTTGGGTGCGCAGCAAGCGGTCTAGA

30

40

50

CTGCTGCACAGCGACTACATGAACATGACCCCCAGAAAGGC
CAGGCCCCACCCGGAAGCACTATCAGCCTTACGCCCTCC
CAGAGACTTTCGCCGCTACAGATCCAAGAGAGGCCGGAAG
AAGCTGCTGTACATCTTCAAGCAGCCCTTCATGCGGCCCG
TGCAGACCACCCAGGAAGAGGACGGCTGTAGCTGCCGGTT
CCCCGAGGAAGAAGAAGGGGGCTGCGAGCTGAGAGTGAAG
TTCAGCAGAAGCGCCGACGCCCTGCTATCAGCAGGGCC
AGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGACGGGA
AGAGTACGACGTGCTGGACAAGAGAAGAGGCCGGGACCT
GAGATGGGCGGCAAGCCCAGACGGAAAGAACCTCAGGAAG
GCCTGTATAACGAACCTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGC
CTACTCCGAGATCGGAATGAAGGGCGAGCGGCGGAGAGGC
AAGGGACACGATGGACTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCCA
CCAAGGACACCTATGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCC
CCCCAGATGAAATTTCATCGACGTTAACTATTCTAG

CART4dual 核酸配列 (SEQ ID NO: 41)

GGTGTCTGTGAGCGGCGCTGAACTGGCCACCATGTGGCTG
CAGTCTCTGTCTGTCTGGGCAACCGTGGCCTGCAGCATCA
GCATCCAGATGACCCAGACCAACAGCAGCCTGAGCGCCAG
CCTGGGCGATAGAGTGACCATCAGCTGCAGAGCCAGCCAG
GACATCAGCAAGTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCCG
ACGGCACCGTGAAAGCTGTCTGATCTACCACACCAGCAGACT
GCACAGCGGCGTGCCCTCTAGATTTTCCGGCAGCGGCTCC
GGCACCGACTACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAACAGG
AAGATATCGCTACCTACTTCTGTTCAGCAAGGCAACACCT
GCCCTACACCTTCGGCGGAGGCAACCAAGCTGGAAATCGGC
AGCACAAGCGGCTCTGGCAAGCCTGGATCTGGCGAGGGCT
CTACCAAGGGCCTGCAGGAATCTGGCCCTGGACTGGTGGC
CCCTAGCCAGAGCCTGTCTGTGACCTGTACCCTGTCTCCGGC
GTGTCCCTGCTGCTGACTATGGCGTGTCTCTGGATCAGACAGC
CCCCCAGAAAGGGCCTGGAATGGCTGGGAGTGATCTGGGG
CAGCGAGACAACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGTCCCGG
CTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAGGTGTTCC
TGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATCTA
CTACTGCGCCAAGCACTACTACTACGGCGGCAGCTACGCC
ATGGACTACTGGGGCCAGGGGACAAGCGTGACCGTGCTCTG
CCCTGAGCAACAGCATCATGTACTTTCAGCCACTTCGTGCC
CGTGTTTCTGCCCGCCAAGCCTACCAACAACCCCTGCCCT
AGACCTCCTACCCAGCCCTACAATCGCCAGCCAGCCTC
TGTCTCTGAGGCCCGAGGCTTCTAGACCAGCTGCTGGCGG
AGCCGTGCAACACAGAGGACTGGACAAGCCCTTCTGGGTG
CTGGTGGTCTGTGGGCGGAGTGCTGGCCTGTTATAGCCTGC
TCGTGACAGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTGCGCGTGAA
GTTTCAGCCGCGAGCGCCGATGCCCTGCTATCAGCAGGGA
CAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGACGGG
AAGAGTACGACGTGCTGGACAAGAGAAGAGGCCGGGACCC
TGAGATGGGCGGCAAGCCCAGAAAGAAAGAACCCCCAGGAA
GGCCTGTATAACGAACCTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGG
CCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAACGGCGGAGAGG
CAAGGGCCACGATGGACTGTATCAGGGCCTGAGCACCGCC

10

20

30

40

50

ACCAAGGACACCTATGACGCCCTGCACATGCAGGCTCTGC
CCCCTCGCTGAAATTCATCGACGTTAACTATTCTAG

CART5 dual 核酸配列 (SEQ ID NO: 42)

GGTGTCTGTGAGCGGCCGCTGAACTGGCCACCATGTGGCTG
CAGTCTCTGCTGCTGCTGGGCAACCGTGGCCTGTAGCATCA
GCGAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGGCTCTCTGGCTGT
GTCTCCTGGCGAGCGCGTGACCATGAGCTGCAAGAGCAGC
CAGAGCGTGTTCTTCAGCAGCTCCCAGAAGAACTACCTGG
CCTGGTATCAGCAGATCCCCGGGCCAGAGCCCCAGACTGCT
GATCTACTGGGCCAGCACCCAGAGAAAGCGGCGTGCCCGAT
AGATTCAACCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCAACCTGA
CAATCAGCAGCGTGACAGCCCGAGGACCTGGCCATCTACTA
CTGCCACCAGTACCTGAGCAGCCGGACCTTTGGCCAGGGC
ACCAAGCTGGAAATCAAGCGGGGCGAGCACAAGCGGCAGCG
GAAAGCCTGGATCTGGCGAGGGCTCTACCAAGGGGCCAGGT
GCAGCTGCAGCAGCCTGGCGGCCGAAGTCGTGAAACCTGGC
GCCTCCGTGAAGATGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCT
TCACCAGCTACTACATCCACTGGATCAAGCAGACCCCTGG
ACAGGGCCTGGAATGGGTGGGAGTGATCTACCCCGGCAAC
GACGACATCAGCTACAACCAGAAGTTCCAGGGCAAGGCCA
CCCTGACCGCCGACAAGTCTAGCACCAACCGCCTACATGCA
GCTGTCCAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTAC
TGCGCCAGAGAAAGTGCGGCTGCGGTACTTCGATGTGTGGG
GCCAGGGGAACCAACCGTGACCGTGCTCTAGCGCCCTGAGCAA
CAGCATCATGTACTTTCAGCCACTTTCGTGCCCGTGTTTCTG
CCCGCCAAGCCTACCACAACCCCTGCCCTAGACCTCCTA
CCCCAGCCCCCTACAATCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAG
GCCCGAGGGCTTCTAGACCAGCTGCTGGCGGAGCCGTGCAC
ACCAGAGGACTGGACAAGCCCTTCTGGGTGCTGGTGGTTCG
TGGGCGGAGTGCTGGCCTGTTACAGCCTGCTCGTGACAGT
GGCCTTCATCATCTTTTGGGTGCGCAGCAAGCGGTCTAGA
CTGCTGCACAGCGACTACATGAACATGACCCCCAGAAGGC
CAGGCCCCACCCGGAAGCACTATCAGCCTTACGCCCTCC
CAGAGACTTTCGCCGCTACAGAAGCTGAAATTCATCGACG
TTAACTATTCTAG

CART6 核酸配列 (SEQ ID NO: 43)

GGTGTCTGTGAGCGGCCGCTGAACTGGCCACCATGTGGCTG
CAGTCTCTGCTGCTGCTGGGCAACCGTGGCCTGCAGCATCA
GCATCCAGATGACCCAGACCAACAGCAGCCTGAGCGCCAG
CCTGGGCGGATAGAGTGACCATCAGCTGCAGAGCCAGCCAG
GACATCAGCAAGTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCCG
ACGGCACCCGTGAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCAGACT
GCACAGCGGCGTGCCCTCTAGATTTTCCGGCAGCGGCTCC
GGCACCGACTACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAACAGG
AAGATATCGCTACCTACTTCTGTGAGCAAGGCAACACCCT
GCCCTACACCTTTCGGCGGAGGCAACCAAGCTGGAAATCGGC
AGCACAAGCGGCTCTGGCAAGCCTGGATCTGGCGAGGGCT
CTACCAAGGGCCTGCAGGAATCTGGCCCTGGACTGGTGGC
CCCTAGCCAGAGCCTGTCTGTGACCTGTACCGTGTCGGC
GTGTCCCTGCCTGACTATGGCGTGTCCTGGATCAGACAGC

10

20

30

40

50

CCCCCAGAAAGGGCCTGGAATGGCTGGGAGTGATCTGGGG
CAGCGAGACAACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGTCCCGG
CTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAGGTGTTCC
TGAAGATGAACAGCCTGCGAGACCGACGACACCGCCATCTA
CTACTGCGCCAAGCACTACTACTACGGCGGCAGCTACGCC
ATGGACTACTGGGGGCCAGGGGCACAAGCGTGACCCTGTCTG
CCCTGAGCAACAGCATCATGTACTTTCAGCCACTTCGTGCC
CGTGTTTCTGCCCCGCCAAGCCTACCACAACCCCTGCCCT
AGACCTCCTACCCCAAGCCCCCTACAATCGCCAGCCAGCCTC
TGTCTCTGAGGCCCGAGGGCTTCTAGACCAGCTGCTGGCGG
AGCCGTGACACACCAGAGGACTGGACAAGCCCTTCTGGGTG
CTGGTGGTCTGTGGGCGGAGTGCTGGCCTGTTATAGCCTGC
TCGTGACAGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTGCGCAGCAA
GCGGAGCCGGCTGCTGCACTCCGACTACATGAACATGACC
CCCAGACGGCCAGGCCCCACCCGGAAACACTATCAGCCTT
ACGCCCTCCTCCAGAGACTTCGCCCGCCTACCGGTCCAGAGT
GAAGTTCAGCAGATCCGCCGACGCCCTGCTATCAGCAG
GGACAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCGAGC
GGGAAGAGTACGACGTGCTGGACAAGAGAAGAGGGCCGGGA
CCCTGAGATGGGCGGCAAGCCCCAGAAAGAAAGAACCCCAAG
GAAGGCCTGTATAACGAACCTGCAGAAAGACAAGATGGCCG
AGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAACGGCGGAG
AGGCAAGGGGCCACGATGGACTGTATCAGGGCCTGAGCACC
GCCACCAAGGACACCTATGACGCCCTGCACATGCAGGCTC
TGCCCCCTCGCTGAAATTTCATCGACGTTAACTATTCTAG
CART7 核酸配列 (SEQ ID NO: 44)

GGTGTCTGTGAGCGGCCGCTGAACTGGCCACCATGTGGCTG
CAGTCTCTGCTGCTGCTGGGGCACCGTGGCCTGTAGCATCA
GCGAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGGCTCTCTGGCTGT
GTCTCCTGGCGAGCGCGTGACCATGAGCTGCAAGAGCAGC
CAGAGCGTGTTCTTCAGCAGCTCCCAAGAACTACCTGG
CCTGGTATCAGCAGATCCCCGGGCCAGAGCCCCAGACTGCT
GATCTACTGGGGCCAGCACCCAGAGAAAGCGGCGTGCCCGAT
AGATTCAACCGGCAGCGGCTCTGGGCACCGACTTCAACCTGA
CAATCAGCAGCGTGCGAGCCCGAGGACCTGGCCATCTACTA
CTGCCACCCAGTACCTGAGCAGCCGGACCTTTGGCCAGGGC
ACCAAGCTGGAAATCAAGCGGGGGCAGCACAAAGCGGCAGCG
GAAAGCCTGGATCTGGCGAGGGGCTCTACCAAGGGGCCAGGT
GCAGCTGCGAGCAGCCTGGCGGCCGAAGTCGTGAAACCTGGC
GCCTCCGTGAAGATGTCCTGCAAGGGCCAGCGGCTACACCT
TCACCAAGCTACTACATCCAATGGATCAAGCAGACCCCTGG
ACAGGGCCTGGAAATGGGTGGGAGTGATCTACCCCGGGCAAC
GACGACATCAGCTACAACCAAGAGTTCCAGGGCAAGGCCA
CCCTGACCGCCGACAAGTCTAGCACCAACCGCCTACATGCA
GCTGTCCAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTAC
TGCGCCAGAGAAGTGCGGCTGCGGTACTTTCGATGTGTGGG
GCCAGGGGAACCAACCGTGACCGTGTCAGCATCGAAGTGAT
GTACCCCCCTCCCTACCTGGACAACGAGAAGTCCAACGGC
ACCATCATCCACGTGAAGGGCAAGCACCTGTGCCCAAGCC
CTCTGTTTCTGCCCCCTAGCAAGCCCTTCTGGGTGCTGGT

10

20

30

40

50

GGTCGTGGGCGGAGTGCTGGCCTGTTACAGCCTGCTCGTGA
ACAGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTGCGCAGCAAGCGGT
CTAGACTGCTGCACAGCGACTACATGAACATGACCCCCAG
AAGGCCAGGCCCCACCCGGAAGCACTATCAGCCTTACGCC
CCTCCCAAGAGACTTCGCCCGCCTACCGGTCCAGAGTGAAGT
TCAGCAGAAGCGCCGACGCCCTGCTTATCAGCAGGGCCA
GAACCAAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGACGGGAA
GAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGCAGGGACCCTG
AGATGGGCGGCAAGCCCCAGACGGGAAGAACCCTCAGGAAGG
CCTGTATAACGAACCTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCC
TACTCCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGAAGAGGCA
AGGGCCACGATGGACTGTACCAAGGGCCTGAGCACCGCCAC
CAAGGACACCTATGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCC
CCCAGATGAAATTTCATCGACGTTAACTATTCTAG

【0091】

本明細書で説明されるキメラ受容体のいずれかは、組換え技術などの定型的方法によって調製できる。本明細書におけるキメラ受容体を調製するための方法は、抗原結合フラグメント、ならびに任意にヒンジ領域、膜貫通領域、少なくとも1つの共刺激シグナル伝達領域、および細胞質シグナル伝達領域を含む、キメラ受容体のそれぞれの領域を含むポリペプチドをコードする核酸の作製を含む。いくつかの実施形態では、キメラ受容体の構成要素のそれぞれをコードする核酸は、組換え技術を用いて互いに連結される。

【0092】

キメラ受容体の構成要素それぞれの配列は、定型的な技術、例えば、従来技術で知られている様々な供給源のいずれか1つからPCR増幅によって得ることができる。いくつかの実施形態では、キメラ受容体の構成要素の1つ以上の配列はヒト細胞から得られる。あるいは、キメラ受容体の1つ以上の構成要素は合成できる。それぞれの構成要素の配列（例えば、領域）を、PCR増幅またはライゲーションなどの方法を用いて、直接的にまたは間接的に（例えば、ペプチドリinkerをコードする核酸を用いて）連結してキメラ受容体をコードする核酸配列を形成できる。あるいは、キメラ受容体をコードする核酸は合成され得る。いくつかの実施形態では、核酸はDNAである。他の実施形態では、核酸はRNAである。

【0093】

構成要素それぞれの配列を連結する前または後における、キメラ受容体の1つ以上の構成要素（例えば、抗原結合フラグメントなど）内の1つ以上の残基の変異。いくつかの実施形態では、キメラ受容体の構成要素における1つ以上の変異が、標的に対する構成要素（例えば、標的抗原に対する抗原結合フラグメント）の親和性を調節する（増加するまたは低下する）および／または構成要素の活性を調節するために作製され得る。

【0094】

本明細書で説明されるキメラ受容体のいずれかは、従来技術によって発現のため適切な免疫細胞中に導入できる。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、一次T細胞またはT細胞株などのT細胞である。あるいは、免疫細胞は、確立されたNK細胞株（例えば、NK-92細胞）などのNK細胞であってよい。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、CD8（CD8+）またはCD8およびCD4（CD8+/CD4+）を発現するT細胞である。いくつかの実施形態では、T細胞は、確立されたT細胞株のT細胞、例えば、293T細胞またはジャークット細胞である。

【0095】

一次T細胞は、末梢血単核細胞（PBMC）、骨髓、脾臓などの組織、リンパ節、胸腺、または腫瘍組織などの任意の供給源から得ることができる。所望される免疫細胞型を得るのに適した供給源は、従来技術の当業者に明らかであろう。いくつかの実施形態では、免疫細胞集団は、患者から得られる骨髓またはPBMC由来などの、造血器悪性腫瘍を有す

10

20

30

40

50

るヒト患者由来である。いくつかの実施形態では、免疫細胞集団は健常ドナー由来である。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、キメラ受容体を発現する免疫細胞が後に投与される被験体から得られる。そこから細胞を得た同一被験体に投与される免疫細胞は、自家細胞と呼ばれ、一方、細胞が投与される被験体ではない被験体から得られる免疫細胞は、同種異系細胞と呼ばれる。

【0096】

所望される宿主細胞のタイプは、細胞を刺激分子と共培養することによって得られる細胞集団内で増殖され得、例えば、抗CD3および抗CD28抗体がT細胞の増殖のために使用され得る。

【0097】

本明細書で説明されるキメラ受容体構築体のいずれかを発現する免疫細胞を構築するために、キメラ受容体の安定的または一時的な発現のためのベクターを本明細書で説明される従来方法によって構築し、免疫宿主細胞中に導入し得る。例えば、キメラ受容体をコードする核酸は、適切なプロモーターに操作可能な連結状態にあるウイルスベクターなどの、適切な発現ベクター中にクローニングされ得る。核酸およびベクターを適切な条件下で制限酵素と接触させて、互いに対を形成しリガーゼでつなぐ得る各分子上の相補端を生じ得る。あるいは、合成核酸リンカーを、キメラ受容体をコードする核酸の末端にライゲートできる。合成リンカーはベクター中の特定の制限部位に相当する核酸配列を含み得る。発現ベクター／プラスミド／ウイルスベクターの選択は、キメラ受容体発現のための宿主細胞のタイプに依存するが、真核細胞中での統合および複製に適しているべきである。

【0098】

様々なプロモーターを本明細書で説明されるキメラ受容体の発現のために使用でき、限定されないが、サイトメガロウイルス（CMV）中初期プロモーター、ウイルスLTRでラウス肉腫LTR、HIV-LTR、HTLV-1 LTR、モロニー Maus 白血病ウイルス（MMLV）LTR、骨髄増殖性肉腫ウイルス（MPSV）LTR、脾限局巣形成ウイルス（SFFV）LTRなど、サルウイルス40（SV40）中初期プロモーター、単純ヘルペス tkウイルスプロモーター、EF1- α イントロンを含有するまたは含有しない伸長因子1- α （EF1- α ）プロモーターを含む。キメラ受容体の発現用の追加プロモーターは、免疫細胞での任意の構成的に活性なプロモーターを含む。あるいは、その発現が免疫細胞内で調節され得るような、任意の調節可能プロモーターが使用され得る。

【0099】

さらに、ベクターは、例えば、以下の：宿主細胞における安定なまたは一時的な形質移入体の選択のためのネオマイシン遺伝子などの選択可能マーカー遺伝子；高量転写のためのヒトCMV中初期遺伝子由来のエンハンサー／プロモーター配列；mRNA安定性のためのSV40由来の転写終結およびRNA処理シグナル； α -グロビンまたは β -グロビンのような高発現される遺伝子由来のmRNA安定性および転写のための5'-および3'-非翻訳領域；複製のSV40ポリオーマ起点および適切なエピソーム複製のためColE1；内部リボソーム結合部位（IRES）、多用途複数クローニング部位；センスおよびアンチセンスRNAのインビトロ転写のためのT7およびSP6 RNAプロモーター；誘発されたときにベクターを有する細胞に死を生じる「自殺スイッチ」または「自殺遺伝子」（例えば、HSVチミジンキナーゼ、iCasp9などの誘導性カスパーゼ）、ならびにキメラ受容体の発現を評価するためのレポーター遺伝子のいくつかまたはすべてを含み得る。後述のセクションVIを参照する。適切なベクターおよび導入遺伝子を含むベクターを作製するための方法は、従来技術で良く知られており利用可能である。キメラ受容体の発現のためのベクターの調製の例は、例えば、US2014/0106449に見出され、その全体が参考によって本明細書に組み込まれている。

【0100】

いくつかの実施形態では、キメラ受容体構築体またはそのキメラ受容体をコードする核酸はDNA分子である。いくつかの実施形態では、キメラ受容体構築体またはそのキメラ受容体をコードする核酸はDNAベクターであり、免疫細胞にエレクトロポレーションされ

10

20

30

40

50

得る（例えば、T i l l r a , B l o o d (2 0 1 2) 1 1 9 (1 7) : 3 9 4 0 - 3 9 5 0 を参照する）。いくつかの実施形態では、キメラ受容体をコードする核酸はmRNA分子であり、これは免疫細胞にエレクトロポレーションされ得る。

【0101】

本明細書で説明されるキメラ受容体構築体をコードする核酸配列を含むベクターのいずれかもまた、本開示の範囲内である。このようなベクターは適切な方法によって宿主免疫細胞などの宿主細胞中に送達され得る。ベクターを免疫細胞に送達する方法は、従来技術で良く知られており、DNA、RNA、またはトランスポゾンエレクトロポレーション、DNA、RNA、またはトランスポゾンを送達するリポソームまたはナノ粒子などのトランスフェクション試薬；機械的変形によるDNA、RNA、またはトランスポゾンあるいはタンパク質の送達（例えば、S h a r e i r a , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A (2 0 1 3) 1 1 0 (6) : 2 0 8 2 - 2 0 8 7 を参照）；あるいはウイルス形質導入を含む。いくつかの実施形態では、キメラ受容体の発現のためのベクターは、ウイルス形質導入によって宿主細胞に送達される。送達のための例示的なウイルス法は、限定されないが、組換えレトロウイルス（例えば、P C T 公開番号W O 9 0 / 0 7 9 3 6 、W O 9 4 / 0 3 6 2 2 、W O 9 3 / 2 5 6 9 8 、W O 9 3 / 2 5 2 3 4 、W O 9 3 / 1 1 2 3 0 、W O 9 3 / 1 0 2 1 8 、W O 9 1 / 0 2 8 0 5 、米国特許第5, 219, 740号および第4, 777, 127号、GB特許第2, 200, 651号、および欧州特許第0345242号を参照）、アリファウイルスをベースとするベクター、およびアデノ関連ウイルス（AAV）ベクター（例えば、P C T 公開番号W O 9 4 / 1 2 6 4 9 、W O 9 3 / 0 3 7 6 9 、W O 9 3 / 1 9 1 9 1 、W O 9 4 / 2 8 9 3 8 、W O 9 5 / 1 1 9 8 4 およびW O 9 5 / 0 0 6 5 5 を参照）を含む。いくつかの実施形態では、キメラ受容体の発現用ベクターはレトロウイルスである。いくつかの実施形態では、キメラ受容体の発現用ベクターはレンチウイルスである。いくつかの実施形態では、キメラ受容体の発現用ベクターはアデノ関連ウイルスである。

【0102】

キメラ受容体をコードするベクターがウイルスベクターを用いて宿主細胞に導入される例では、免疫細胞に感染できベクターを運ぶウイルス粒子が、従来技術で知られており、例えば、P C T 出願番号W O 1 9 9 1 / 0 0 2 8 0 5 A 2 、W O 1 9 9 8 / 0 0 9 2 7 1 A 1 、および米国特許第6, 194, 191号に見出される任意の方法によって産生され得る。ウイルス粒子は細胞培養上清から収集され、ウイルス粒子を免疫細胞と接触させる前に分離されおよび／または精製され得る。

【0103】

本明細書で説明されるキメラ受容体のいずれかを発現する宿主細胞を調製する方法は、生体外で免疫細胞を活性化することおよび／または増加することを含み得る。宿主細胞を活性化することは、細胞がエファクター機能（例えば、細胞毒性）を実施できる活性化状態へと宿主細胞を刺激することを意味する。宿主細胞を活性化する方法は、キメラ受容体の発現のために使用される宿主細胞のタイプに依存する。宿主細胞を拡張することは、キメラ受容体を発現する細胞数の増加をもたらす任意の方法を含み得、例えば、宿主細胞を増殖させる、または宿主細胞を刺激して増殖させる。宿主細胞の拡張を刺激するための方法は、キメラ受容体の発現のために使用される宿主細胞のタイプに依存し、従来技術の当業者には明らかであろう。いくつかの実施形態では、本明細書で説明されるキメラ受容体のいずれかを発現する宿主細胞は、被験体への投与前に体外で活性化および／または拡張される。

【0104】

いくつかの実施形態では、細胞表面系統特異的抗原を標的にする作用物質は抗体－薬剤共役体（ADC）である。従来技術の当業者に明らかなように、用語「抗体－薬剤共役体」は「免疫毒素」と交換可能に使用でき、毒素または薬剤分子に共役体化された抗体（または、その抗原結合フラグメント）を含む融合分子を指す。相当する抗原への抗体の結合は、その細胞表面（例えば、標的細胞）に抗原を提示する細胞への毒素または薬剤分子の送

達を可能にし、これによって標的細胞の死をもたらす。

【0105】

いくつかの実施形態では、作用物質は抗体－薬剤共役体である。いくつかの実施形態では、抗体－薬剤共役体は抗原結合フラグメントおよび標的細胞中で細胞毒性を誘発する毒素または薬剤を含む。いくつかの実施形態では、抗体－薬剤共役体は2型抗原を標的にする。いくつかの実施形態では、抗体－薬剤共役体はCD33またはCD19を標的にする。

【0106】

いくつかの実施形態では、抗体－薬剤共役体の抗原結合フラグメントは、SEQ ID NO: 12によって示される重鎖可変領域と同一の重鎖CDR、およびSEQ ID NO: 13によって示される軽鎖可変領域と同一の軽鎖CDRを有する。いくつかの実施形態では、抗体－薬剤共役体の抗原結合フラグメントは、SEQ ID NO: 12によって示される重鎖可変領域、およびSEQ ID NO: 13によって示される軽鎖可変領域を有する。

10

【0107】

抗体－薬剤共役体における使用に適合する毒素または薬剤は、従来技術で良く知られており、従来技術の当業者に明らかであろう。Petersら, Biosci. Rep. (2015) 35 (4): e00225を参照する。いくつかの実施形態では、抗体－薬剤共役体は抗体と薬剤分子を付着するリンカー（例えば、切断可能なリンカーなどのペプチドリンカー）をさらに含み得る。

【0108】

本明細書で説明されるADCは、本明細書で説明される併用療法が実施される被験体に継続治療として使用され得る。

20

【0109】

系統特異的細胞表面抗原を欠く造血細胞

本開示はまた、系統特異的細胞表面抗原を欠くように遺伝子改変されているHSCなどの造血細胞を提供する。いくつかの実施形態では、造血細胞は造血幹細胞である。造血幹細胞（HSC）は、骨髄およびリンパ系の前駆細胞の両方を上昇させることができ、これらはそれぞれ骨髄細胞（例えば、単球、マクロファージ、好中球、好塩基球、樹状細胞、赤血球、血小板など）およびリンパ系細胞（例えば、T細胞、B細胞、NK細胞）をさらに上昇させる。HSCは、HSCの特定および／または分離のために使用できる細胞表面マーカーCD34（例えば、CD34⁺）の発現、および細胞系統への関与と関連する細胞表面マーカーが存在しないことによって特徴付けられる。

30

【0110】

いくつかの実施形態では、HSCは哺乳動物被験体などの被験体から得られる。いくつかの実施形態では、哺乳動物被験体は非ヒト霊長類、げっ歯類（例えば、マウスまたはラット）、ウシ、ブタ、ウマ、または愛玩動物である。いくつかの実施形態では、HSCは造血器悪性腫瘍を有するヒト患者などの、ヒト患者から得られる。いくつかの実施形態では、HSCは健康ドナーから得られる。いくつかの実施形態では、HSCはキメラ受容体を発現する免疫細胞が後に投与される被験体から得られる。そこから細胞が得られた同一被験体に投与されるHSCは自家細胞と呼ばれ、一方、細胞が投与される被験体ではない被験体から得られるHSCは同種異系細胞と呼ばれる。

40

【0111】

HSCは従来技術で知られている標準的手段を用いていずれかの適切な供給源から得ることができる。いくつかの実施形態では、HSCは骨髄サンプルまたは血液サンプルなどの被験体由来のサンプルから得られる。これに代えて、または追加で、HSCは臍帯から得ることができる。いくつかの実施形態では、HSCは骨髄または末梢血単核細胞（PBMC）から得られる。一般的に、骨髄細胞は被験体の腸骨稜、大腿骨、脛骨、脊柱骨、肋骨または他の骨髄腔から得ることができる。骨髄は患者から採取して、従来技術で知られている様々な分離および洗浄方法によって分離され得る。骨髄細胞の分離のための例示的な方法は以下のステップ：a) 骨髄サンプルの抽出、b) 骨髄懸濁液の3分画での遠心分離

50

ならびに中間分画およびバフィーコートの収集、c) ステップ (b) からのバフィーコート分画を分離溶液、一般的には Ficoll (登録商標) 中であらう 1 回遠心分離し、骨髓細胞を含む中間分画を収集する、d) 再注入可能な骨髓細胞の回収のためにステップ (c) からの収集した分画の洗浄、を含む。

【0112】

HSC は一般的には骨髓に存在するが、末梢血液から HSC を収集するために、動員剤を投与することによって循環血液中に動員できる。いくつかの実施形態では、HSC が採取される被験体は、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) などの動員剤を投与される。動員剤を用いる動員によって収集される HSC の数は、動員剤を使用せずに得られる細胞の数より一般的には多い。

10

【0113】

いくつかの実施形態では、サンプルは被験体から得られ、所望の細胞タイプ (例えば、CD34⁺/CD33⁻細胞) が次いで豊富化される。例えば、PBMC および/または CD34⁺造血細胞は本明細書で説明されるように血液から分離できる。細胞はまた、他の細胞から、例えば、所望の細胞タイプの細胞表面のエピトープに結合する抗体での分離および/または活性化によって分離できる。使用できる別の方法は、受容体関与による細胞活性化を伴わずに特定細胞型を選択的に豊富化するために細胞表面マーカーに対する抗体を用いるネガティブ選択を含む。

【0114】

HSC 集団は、HSC を遺伝子工学処理して系統特異的細胞表面抗原を欠如させる前または後に拡張できる。細胞は、幹細胞因子 (SCF)、Flt-3 リガンド (Flt3L)、トロンボポイエチン (TPO)、インターロイキン 3 (IL-3)、またはインターロイキン 6 (IL-6) などの 1 種類以上のサイトカインを含有する拡張培地を含む条件下で培養され得る。細胞は約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25 日またはいずれかの必要な範囲の間、拡張され得る。いくつかの実施形態では、HSC は被験体から得られたサンプルからの所望の細胞集団 (例えば、CD34⁺/CD33⁻) の分離後かつ遺伝子工学処理前に拡張される。いくつかの実施形態では、HSC は遺伝子工学処理後に拡張され、これによって遺伝子改変を受けて系統特異的細胞表面抗原を欠く細胞を選択的に拡張する。いくつかの実施形態では、遺伝子改変の後で所望の特性 (例えば、表現型または遺伝型) を有する一つの細胞 (「一つのクローン」) またはいくつかの細胞が選択され独立して拡張され得る。

20

30

【0115】

いくつかの実施形態では、造血細胞は遺伝子改変されて細胞表面系統特異的抗原を欠く。いくつかの実施形態では、造血細胞は遺伝子改変されて、作用物質によって標的化される同一細胞表面系統特異的抗原を欠く。本明細書で使用されるとき、造血細胞が、遺伝子改変された造血細胞と同一タイプの自然発生する造血細胞 (例えば、CD34 などの同一細胞表面マーカーの存在によって特徴付けられる) と比べて細胞表面系統特異的抗原の著しく低下した発現を有する場合、造血細胞は細胞表面系統特異的抗原を欠いているとみなされる。いくつかの実施形態では、造血細胞は細胞表面系統特異的抗原の検出可能な発現を有さない。細胞表面系統特異的抗原の発現量は従来技術で知られている任意の手段によって評価できる。例えば、細胞表面系統特異的抗原の発現量は、抗原特異的抗体を用いて抗原を検出することによって評価できる (例えば、フローサイトメトリー法、ウェスタンブロットティング)。

40

【0116】

いくつかの実施形態では、遺伝子改変された造血細胞上の細胞表面系統特異的抗原の発現は、自然発生する造血細胞上の細胞表面系統特異的抗原の発現と比べられる。いくつかの実施形態では、遺伝子工学処理は、自然発生造血細胞上の細胞表面系統特異的抗原の発現と比べて、少なくとも約 50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% の細胞表面系統特異的抗

50

原の発現量における低下をもたらす。

【0117】

いくつかの実施形態では、造血細胞は細胞表面系統特異的抗原をコードする全内因性遺伝子を欠く。いくつかの実施形態では、細胞表面系統特異的抗原をコードする全内因性遺伝子が除去されている。いくつかの実施形態では、造血細胞は細胞表面系統特異的抗原をコードする内因性遺伝子の一部を含む。いくつかの実施形態では、造血細胞は細胞表面系統特異的抗原の一部（例えば、切り詰められたタンパク質）を発現する。他の実施形態では、細胞表面系統特異的抗原をコードする内因性遺伝子の一部が除去されている。いくつかの実施形態では、細胞表面系統特異的抗原をコードする遺伝子の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%またはそれより多くが除去されている。

10

【0118】

従来技術の当業者によって認識されるように、細胞表面系統特異的抗原をコードするヌクレオチド配列の一部は、除去されている、または1つ以上の非コード配列であり得、そのため造血細胞は抗原を欠く（例えば、著しく低下した抗原の発現を有する）。

【0119】

いくつかの実施形態では、細胞表面系統特異的抗原はCD33である。CD33の予測される構造は、2つの免疫グロブリン領域であるIgV領域およびIgC2領域を含む。いくつかの実施形態では、CD33の免疫グロブリンC領域の一部が除去される。

【0120】

細胞表面系統特異的抗原を欠く、HSCなどの遺伝子工学処理された造血細胞のいずれかは、定型的な方法によりまたは本明細書で説明される方法によって調製できる。いくつかの実施形態では、遺伝子工学処理はゲノム編集を用いて実施される。本明細書で使用されるとき、「ゲノム編集」は、生物の、任意のタンパク質コードまたは非コードヌクレオチド配列を含む、ゲノムを改変して標的遺伝子の発現を破壊する方法を指す。一般的に、ゲノム編集法は、ゲノムの核酸を、例えば標的とされるヌクレオチド配列で切断できるエンドヌクレアーゼの使用を含む。ゲノム中の二本鎖切断の修復は変異を導入して修復され得、および／または外来の核酸が標的化部位に挿入され得る。

20

【0121】

ゲノム編集法は一般的に、標的核酸中で二本鎖切断を生じることに関与するエンドヌクレアーゼのタイプに基づいて分類される。これらの方法は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写活性化因子様エフェクターをベースとしたヌクレアーゼ（TALEN）、メガヌクレアーゼ、およびCRISPR/Cas系の使用を含む。

30

【0122】

本開示の一つの態様では、改変された正常細胞集団による腫瘍細胞の置換は、系統特異的抗原が改変される正常細胞を用いて実施される。このような改変は、CRISPR-Cas9系を用いる任意の系統特異的抗原の枯渇または阻害を含み得、ここでクラスター化規則的配置の短回文配列反復（CRISPR）Cas9系は工学処理された非自然発生CRISPR-Cas9系である。（図4）。

【0123】

CRISPR-Cas系は、限定されないが、細菌、ヒト、ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュおよび植物を含む様々な生物のゲノムを編集するためにうまく使用されている。例えば、Jiangら、Nature Biotechnology（2013）31（3）：233、Qiら、Cell（2013）5：1173、DiCarloら、Nucleic Acids Res.（2013）7：4336、Hwangら、Nat. Biotechnol（2013），3：227）、Gratzら、Genetics（2013）194：1029、Congら、Science（2013）6121：819、Maliら、Science（2013）6121：823、ChoらNat. Biotechnol（2013）3：230、およびJiangら、Nucleic Acids Research（2013）41（20）：e188を参照する。

40

【0124】

50

本開示は系統特異的抗原ポリヌクレオチド中の標的配列とハイブリダイズするCRISPR/Cas9系を利用し、ここでCRISPR/Cas9系はCas9ヌクレアーゼおよび工学処理されたcrRNA/tracrRNA（または単鎖ガイドRNA）を含む。CRISPR/Cas9複合体は系統特異的抗原ポリヌクレオチドに結合でき、抗原ポリヌクレオチドの切断を可能にし、これによってポリヌクレオチドを改変する。

【0125】

本開示のCRISPR/Cas系は、コードまたは非コード領域中の細胞表面系統特異的抗原内で、遺伝子内またはその付近で、例えばリーダー配列、トレーラ配列、またはイントロンなど、あるいは非転写化領域内で、コード領域の上流または下流のいずれかにおいて、対象の領域に結合する／または対象の領域を切断し得る。本開示で使用されるガイドRNA（gRNA）は、gRNAがゲノム中の所定の切断部位（標的部位）へのCas9-gRNA複合体の結合を指示するように設計され得る。切断部位は、未知配列領域を、またはSNP、ヌクレオチド挿入、ヌクレオチド欠失、再配列などを含む領域を含むフラグメントを放出するように選択され得る。

10

【0126】

遺伝子領域の切断は、Cas酵素によって標的配列の位置で一本鎖または二本鎖を切断することを含み得る。一つの実施形態では、このような切断は、標的遺伝子の転写の低下をもたらし得る。別の実施形態では、切断は外来の鋳型ポリヌクレオチドを用いた相同組換えによって、切断された標的ポリヌクレオチドを修復することをさらに含み、ここで修復は、標的ポリヌクレオチドの1つ以上のヌクレオチドの挿入、欠失、または置換を生じる。

20

【0127】

用語「gRNA」、「ガイドRNA」、および「CRISPRガイド配列」は全体を通して交換可能に使用され得、CRISPR/Cas系のCas-DNA結合タンパク質の特異性を決定する配列を含む核酸を指す。gRNAは宿主細胞のゲノム中の標的核酸配列に（相補的、部分的、または完全に）ハイブリダイズする。標的核酸にハイブリダイズするgRNAまたはその一部は、長さが15～25個のヌクレオチド、18～22個のヌクレオチド、または19～21個のヌクレオチドであり得る。いくつかの実施形態では、標的核酸にハイブリダイズするgRNA配列は、長さが15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25個のヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、標的核酸配列にハイブリダイズするgRNA配列は、長さが10～30個、または15～25個のヌクレオチドである。

30

【0128】

標的核酸に結合する配列に加え、いくつかの実施形態では、gRNAはスキャホルド配列も含む。標的核酸に相補的な配列およびスキャホルド配列の両方をコードするgRNAの発現は、標的核酸に結合する（ハイブリダイズする）機能および標的核酸にエンドヌクレアーゼを補充する機能の二重機能を有し、これは部位特異的なCRISPR活性を生じ得る。いくつかの実施形態では、このようなキメラgRNAは一本鎖ガイドRNA（sgRNA）と呼ばれる。

【0129】

本明細書で使用されるとき、「スキャホルド配列」はtracrRNAとも呼ばれ、相補的gRNA配列に結合された（ハイブリダイズした）標的核酸にCasエンドヌクレアーゼを補充する核酸配列を指す。少なくとも1つのステムループ構造を含み、エンドヌクレアーゼを補充する任意のスキャホルド配列は、本明細書で説明される遺伝子エレメントおよびベクターで使用され得る。例示的なスキャホルド配列は、従来技術の当業者に明らかであり、例えば、Jinekら、Science（2012）337（6096）：816-821、Ranら、Nature Protocols（2013）8：2281-2308、PCT出願番号WO2014/093694、およびPCT出願番号WO2013/176772に見出される。

40

【0130】

いくつかの実施形態では、gRNA配列はスキャホルド配列を含まず、スキャホルド配列

50

は別の転写として発現される。このような実施形態では、gRNA配列は、スキャホールド配列の一部に相補的であり、かつスキャホールド配列に結合（ハイブリダイズ）し標的核酸にエンドヌクレアーゼを補充するように機能する追加の配列をさらに含む。

【0131】

いくつかの実施形態では、gRNA配列は標的核酸に少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または少なくとも100%相補的である（標的ポリヌクレオチド配列とのgRNA配列の相補性の教示のために参考によって組み込まれる米国特許第8,697,359号を参照する）。CRISPRガイド配列と標的核酸の3'端付近の標的核酸との間のミスマッチはヌクレアーゼ切断活性を消失し得ることが実証されている（Upadhyayら, Genes Genome Genetics (2013) 3 (12): 2233-2238）。いくつかの実施形態では、gRNA配列は標的核酸の3'端（例えば、標的核酸の3'端の最後の5、6、7、8、9、または10個のヌクレオチド）に少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または少なくとも100%相補的である。

【0132】

標的核酸は、エンドヌクレアーゼと相互作用し標的核酸にエンドヌクレアーゼ活性を標的化することにさらに関与し得るプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）に3'端で隣接される。一般的に、標的核酸配列に隣接するPAM配列は、エンドヌクレアーゼおよびエンドヌクレアーゼが由来する起源に依存する。例えば、A群溶血レンサ球菌由来であるCas9エンドヌクレアーゼでは、PAM配列はNGGである。黄色ブドウ球菌由来のCas9エンドヌクレアーゼでは、PAM配列はNNGRRTである。髄膜炎菌を由来であるCas9エンドヌクレアーゼでは、PAM配列はNNNNGATTである。スタフィロコックス・サーモフィルス由来のCas9エンドヌクレアーゼでは、PAM配列はNNAAGA Aである。トレポネマ・デンティコーラ由来のCas9エンドヌクレアーゼでは、PAM配列はNAAAACである。Cpf1ヌクレアーゼでは、PAM配列はTTNである。

【0133】

いくつかの実施形態では、細胞を遺伝子工学処理することは、Casエンドヌクレアーゼを細胞中に導入することを含む。いくつかの実施形態では、CasエンドヌクレアーゼおよびgRNAをコードする核酸は、同一核酸（例えば、ベクター）上で提供される。いくつかの実施形態では、CasエンドヌクレアーゼおよびgRNAをコードする核酸は異なる核酸（例えば、異なるベクター）上で提供される。これに代えて、または追加で、Casエンドヌクレアーゼは細胞中にタンパク質形態で提供または導入され得る。

【0134】

いくつかの実施形態では、CasエンドヌクレアーゼはCas9酵素またはその変異体である。いくつかの実施形態では、Cas9エンドヌクレアーゼはA群溶血レンサ球菌、黄色ブドウ球菌、髄膜炎菌、スタフィロコックス・サーモフィルス、またはトレポネマ・デンティコーラ由来である。いくつかの実施形態では、Casエンドヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列は、宿主細胞中での発現のためにコドン最適化され得る。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼはCas9ホモログまたはオルソログである。

【0135】

いくつかの実施形態では、Cas9エンドヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列はタンパク質の活性を変えるためにさらに改変される。いくつかの実施形態では、Cas9エンドヌクレアーゼは触媒的に不活性なCas9である。例えば、dCas9は触媒的に活性な残基（D10およびH840）の変異を含み、ヌクレアーゼ活性を有さない。これに代えて、または追加で、Cas9エンドヌクレアーゼは別のタンパク質またはその一部に融合され得る。いくつかの実施形態では、dCas9はKRAB領域などのリプレッサー領域に融合される。いくつかの実施形態では、このようなdCas9融合タンパク質は、多重遺伝子抑制（例えば、CRISPR干渉（CRISPRi））のために本明細書で説明される構築体で使用される。いくつかの実施形態では、dCas9はVP64または

10

20

30

40

50

VPRなどのアクチベーター領域に融合される。いくつかの実施形態では、このようなdCas9融合タンパク質は、遺伝子活性化（例えば、CRISPR活性化（CRISPRa））のために本明細書で説明される構築体で使用される。いくつかの実施形態では、dCas9はヒストンデメチラーゼ領域またはヒストンアセチルトランスフェラーゼ領域などのエピジェネティック調節領域に融合される。いくつかの実施形態では、dCas9はLSD1またはp300、あるいはこれらの一部に融合される。いくつかの実施形態では、dCas9融合はCRISPRをベースとするエピジェネティック調節のために使用される。いくつかの実施形態では、dCas9またはCas9はFokIヌクレアーゼ領域に融合される。いくつかの実施形態では、FokIヌクレアーゼ領域に融合されたCas9またはdCas9は、ゲノム編集のために使用される。いくつかの実施形態では、Cas9またはdCas9は蛍光タンパク質（例えば、GFP、RFP、mCherryなど）に融合される。いくつかの実施形態では、蛍光タンパク質に融合されたCas9／dCas9タンパク質は、ゲノム遺伝子座の標識および／または可視化、あるいはCasエンドヌクレアーゼを発現する細胞を特定するために使用される。

【0136】

これに代えて、または追加で、CasエンドヌクレアーゼはCpf1ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、宿主細胞はプレボテラ種またはフランシセラ種由来のCpf1ヌクレアーゼを発現する。いくつかの実施形態では、Cpf1ヌクレアーゼをコードするヌクレアーゼ配列は、宿主細胞における発現のためにコドン最適化され得る。

【0137】

いくつかの実施形態では、本開示はCRISPR／Cas9系を用いる造血細胞中の細胞表面系統特異的抗原を阻害するための組成物および方法を提供し、ここでガイドRNA配列は細胞表面系統特異的抗原をコードするヌクレオチド配列にハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、細胞表面系統特異的抗原はCD33であり、gRNAはCD33をコードするヌクレオチド配列の一部にハイブリダイズする（図5）。CD33を標的にするgRNAの例が表4で示されるが、CD33にハイブリダイズし本明細書で説明される方法で使用する追加のgRNAが開発され得る。

【0138】

表4はCD33の一部にハイブリダイズする、またはハイブリダイズすることが予測される例示的なガイドRNA配列を示す。

【表4】

表4：CD33を標的にするガイドRNA配列

名称	ガイド配列	ガイド位置	スコア
hCD33-IgC1 本明細書での “Crispr 1”	ACCTGTCAGGTGAAGTTCGC TGG (SEQ ID NO: 11)	Chr19:+51729270	87
hCD33-IgC3 本明細書での “Crispr 3”	TGGCCGGGTTCTAGAGTGCC AGG (SEQ ID NO: 28)	Chr19:-51729087	82
hCD33-IgC5 本明細書での “Crispr 5”	GGCCGGGTTCTAGAGTGCCA GGG (SEQ ID NO: 29)	Chr19:-51729086	81
hCD33 gRNA	CACCGAGGAGTGAGTAGTCC TGG (SEQ ID NO: 30)		
hCD33 gRNA	TCCAGCGAACTTCACCTGAC AGG (SEQ ID NO: 31)		

【0139】

いくつかの実施形態では、HSC、特に同種異系HSCをさらに遺伝子工学処理して移植

片対宿主効果を低下することが望まれ得る。例えば、再発したAMLの標準療法は造血幹細胞移植（HSC T）である。しかしHSC Tの成功を制限する要因の少なくとも1つは、移植片対宿主病（GVHD）であり、これには細胞表面分子CD45の発現が関与している。例えば、Van Besie, Hematology Am. Soc. Hematol Educ Program (2013) 56、Mawad Curr. Hematol. Malign. Rep. (2013) 8 (2) : 132を参照する。CD45 RAおよびCD45 ROはCD45のアイソフォームである（赤血球以外のすべての造血細胞で認められる）。Tリンパ球では、CD45 RAはナイーブ細胞上で発現され、一方、CD45 ROは記憶細胞上で発現される。CD45 RA T細胞は、HSC Tによるレシピエント特異的抗原に対して反応性である可能性が高く、GVHDをもたらす。このため、移植拒絶またはGVHDの可能性も低減する効率的で安全なAML治療が依然として必要とされている。CD45を有する細胞は生存のために必要とされるが抗原はCRISPRを用いて幹細胞から除去され得るため、CD45は1型系統抗原である。

10

【0140】

HSC Tに続くGVHDの進行に起因して合併症が生じることを考慮し、本開示はCD45 RAを標的にする組成物および方法も提供する。このような組成物および方法は、GVHDの発生または広がりを予防および／または低下することを意図される。

【0141】

このため、GVHDの場合、患者の治療は以下のステップ：（1）患者に治療上効果的な量のT細胞を投与することであって、ここでT細胞はCD45 RA系統特異的抗原を標的にするキメラ抗原受容体（CAR）をコードする核酸配列を含む、および（2）患者に造血幹細胞を注入することであって、ここで造血細胞はCD45 RA系統特異的抗原の発現を低下させている、を含み得る。

20

【0142】

さらに、本開示はCD33およびCD45 RA系統特異的抗原の組み合わせ阻害のための組成物および方法を提供する。このような治療処方計画は以下のステップ：（1）患者に治療上効果的な量のT細胞を投与することであって、ここでT細胞はCD33およびCD45 RA系統特異的抗原を標的にするキメラ抗原受容体（CAR）をコードする核酸配列を含む、および（2）患者に自家または同種異系のどちらかで造血幹細胞を注入または再注入することであって、ここで造血細胞はCD33およびCD45 RA系統特異的抗原の発現を低下させている、を含み得る。

30

【0143】

いくつかの実施形態では、細胞表面系統特異的抗原CD45 RAはまた、CRISPR/Cas9系を用いて造血細胞中で除去または阻害される。いくつかの実施形態では、gRNA配列はCD45 RAをコードするヌクレオチド配列の一部にハイブリダイズする（図6）。CD45 RAを標的にするgRNAの例を表5に示すが、CD45 RAにハイブリダイズして本明細書で説明される方法で使用できる追加のgRNAが開発され得る。

【0144】

表5はヒトCD45のエクソン4またはエクソン5にハイブリダイズする、またはハイブリダイズすることが予測される例示的なガイドRNA配列を示す。

40

【表 5】

表 5 : C D 4 5 を標的にするガイドRNA配列

hCD45 標的	ガイドRNA
エクソン4	CCAAAGAGTCCGGGGATACT TGG (SEQ ID NO: 9)
	CCAAGTATCCCCGGACTCTT TGG (SEQ ID NO: 32)
	AGCATTATCCAAAGAGTCCG GGG (SEQ ID NO: 33)
	ACTTGGGTGGAAGTATTGTC TGG (SEQ ID NO: 34)
エクソン5	GTTGAGTTTTGCATTGGCGG CGG (SEQ ID NO: 10)
	GTCTGCGAGTCTGCGTGCGT GGG (SEQ ID NO: 35)
	CGTCTGCGAGTCTGCGTGCG TGG (SEQ ID NO: 36)
	GCGAGTCTGCGTGCGTGGGA AGG (SEQ ID NO: 37)

10

【0145】

本明細書において、細胞表面系統特異的抗原を欠く細胞を産生する方法も提供され、細胞を用意することおよびゲノム編集のためにCRISPR/Cas系の構成要素を細胞中に導入することを含む。いくつかの実施形態では、系統特異的細胞表面抗原をコードするヌクレオチド配列の一部にハイブリダイズする、またはハイブリダイズすることが予測されるCRISPR/CasガイドRNA (gRNA)を含む核酸が、細胞中に導入される。いくつかの実施形態では、gRNAはベクターで細胞中に導入される。いくつかの実施形態では、Casエンドヌクレアーゼが細胞中に導入される。いくつかの実施形態では、Casエンドヌクレアーゼは、Casエンドヌクレアーゼをコードする核酸として細胞中に導入される。いくつかの実施形態では、gRNAおよびCasエンドヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列は、同一核酸（例えば、同一ベクター）で細胞中に導入される。いくつかの実施形態では、Casエンドヌクレアーゼは、タンパク質の形態で細胞中に導入される。いくつかの実施形態では、CasエンドヌクレアーゼおよびgRNAはインビトロで前形成され、複合体として細胞中に導入される。

20

【0146】

本開示はCRISPR/Cas9複合体の1つ以上の構成要素をコードできる、工学処理された非自然発生ベクターおよびベクター系をさらに提供し、ここでベクターは、(i) 系統特異的抗原配列にハイブリダイズする(CRISPR)-Cas系ガイドRNA、および(ii) Cas9エンドヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを含む。

30

【0147】

本開示のベクターは、哺乳動物発現ベクターを用いて哺乳動物細胞中で1つ以上の配列の発現を誘導できる。哺乳動物発現ベクターの例は、pCDM8 (Seed, Nature (1987) 329: 840)、およびpMT2PC (Kaufmanら, EMBO J. (1987) 6: 187)を含む。哺乳動物細胞が使用される場合、発現ベクターのコントロール機能は、一般的には1つ以上の制御エレメントによってもたらされる。例えば、一般的に使用されるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス、サルウイルス40、ならびに本明細書で開示される、および従来技術で知られている他のもの由来である。原核細胞および真核細胞の両方に適した他の発現系について、Sambrookら, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (分子クローニング: 実験室マニュアル). 2nd eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989、第16章と第17章、を参照する。

40

【0148】

本開示のベクターは、特定の細胞タイプにおいて優先的に核酸の発現を指示できる（例えば、組織特異的制御エレメントが核酸を発現するために使用される）。このような制御エレメントは、組織特異的または細胞特異的であり得るプロモーターを含む。用語「組織特

50

異的」はプロモーターに適用されるとき、対象のヌクレオチド配列の選択的発現を特定タイプの組織（例えば、種子）に指示でき、異なるタイプの組織では対象の同一ヌクレオチド配列の発現を相対的に欠くプロモーターを指す。用語「細胞型特異的」はプロモーターに適用されるとき、対象のヌクレオチド配列の選択的発現を特定の細胞型に指示でき、同一組織内の異なる型の細胞では対象の同一ヌクレオチド配列の発現を相対的に欠くプロモーターを指す。用語「細胞型特異的」はプロモーターに適用されるとき、単一組織内の領域で対象のヌクレオチド配列の選択的発現を促進できるプロモーターも意味する。プロモーターの細胞型特異性は、従来技術で良く知られた方法、例えば、免疫組織化学染色を用いて評価され得る。

【0149】

従来のウイルスおよび非ウイルスに基づいた遺伝子移入方法を使用して、CRISPR/Cas9をコードする核酸を哺乳動物細胞または標的組織に導入できる。このよう方法を使用して、CRISPR-Cas系の構成要素をコードする核酸を培養で細胞、または宿主生物に投与できる。非ウイルス送達系はDNAプラスミド、RNA（例えば、本明細書で説明されるベクターの転写物）、ネイキッド核酸、および送達ベヒクルと複合体化された核酸を含む。ウイルスベクター送達系は、DNAおよびRNAウイルスを含み、これらは細胞への送達後にエピソームゲノムまたは統合されたゲノムのいずれかを有する。遺伝子療法手順の見直しについて。

【0150】

ウイルスベクターは患者に直接的に投与され得る（インビボ）か、それらはインビトロまたは体外で細胞を操作するために使用でき、ここで改変された細胞が患者に投与され得る。一つの実施形態では、本開示は、限定されないが、遺伝子移送のためにレトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルスおよび単純ヘルペスウイルスを含むウイルスをベースとした系を利用する。さらに、本開示は、レトロウイルスまたはレンチウイルスなどの、宿主ゲノム中で統合が可能なベクターを提供する。好ましくは本開示のCRISPR-Cas系の発現のために使用されるベクターはレンチウイルスベクターである。

【0151】

一つの実施形態では、本開示はCRISPR-Casをコードする1つ以上のベクターを真核細胞中に導入することを提供する。細胞は癌細胞であってよい。あるいは、細胞は造血幹細胞などの造血細胞である。幹細胞の例は、多能性、複数能性および単能性幹細胞を含む。多能性幹細胞の例は、胚幹細胞、胚性生殖細胞、胚性癌細胞および誘導多能性幹細胞（iPSC）を含む。好ましい実施形態では、本開示はCRISPR-Cas9を造血幹細胞中に導入することを含む。

【0152】

本開示のベクターは、被験体における真核細胞に送達される。CRISPR-Cas9系を介した真核細胞の改変は、細胞培養で実施でき、ここで本方法は改変前に被験体から真核細胞を分離することを含む。いくつかの実施形態では、本方法は当該真核細胞および／またはそれから派生した細胞を被験体に戻すことをさらに含む。

【0153】

併用療法

本明細書で説明されるように、細胞表面系統特異的抗原に結合する抗原結合フラグメントを含む作用物質は、細胞表面系統特異的抗原を欠く造血細胞と併せて患者に投与され得る。本明細書で使用されるとき、「被験体」、「個体」、および「患者」は交換可能に使用され、脊椎動物、好ましくはヒトなどの哺乳動物を指す。哺乳動物は、限定されないが、ヒト霊長類、非ヒト霊長類、あるいはネズミ、ウシ、ウマ、イヌまたはネコ種を含む。いくつかの実施形態では、被験体は造血器悪性腫瘍を有するヒト患者である。

【0154】

いくつかの実施形態では、作用物質および／または造血細胞は医薬品として許容可能な担体と混合されて医薬組成物を形成し得、これもまた本開示の範囲内である。

10

20

30

40

50

【0155】

本明細書で説明される方法を実施するため、細胞表面系統特異的抗原に結合する抗原結合フラグメントを含む作用物質の効果的な量と、造血細胞の効果的な量とを、治療を必要とする被験体に併用投与できる。本明細書で使用されるとき、用語「効果的な量」は用語「治療上効果的な量」と交換可能で使用され得、それを必要とする被験体への投与で所望の活性をもたらすのに十分な作用物質、細胞集団、または医薬組成物（例えば、作用物質および／または造血細胞を含む組成物）の量を指す。本開示の文脈では、用語「効果的な量」は、本開示の方法によって治療される障害の出現を遅延する、進行を停止する、少なくとも1つの症状を軽減または緩和するのに十分である、化合物、細胞集団、または医薬組成物の量を指す。有効成分の組み合わせが投与される場合、組み合わせの効果的な量は、個別に投与される場合の効果的な量である各成分の量を含み得る、または含み得ないことに留意すべきである。

10

【0156】

効果的な量は、従来技術の当業者によって認識されるように、治療される特定の症状、症状の重篤度、個別患者の年齢、身体的状態、サイズ、性別および体重を含むパラメータ、治療期間、併用療法（実施される場合）の性質、投与の特定経路ならびに医療関係者の知識および見解における要因などに依存して変化する。いくつかの実施形態では、効果的な量は被験体におけるいずれかの疾患または障害の症状を緩和し、軽減し、回復し、改善し、低減し、または進行を遅延する。いくつかの実施形態では、被験体はヒトである。いくつかの実施形態では、被験体は造血器悪性腫瘍を有するヒト患者である。

20

【0157】

本明細書で説明されるとき、キメラ受容体を発現する造血細胞および／または免疫細胞は、被験体に対して自家であり得、すなわち、細胞が治療を必要とする被験体から得られ、細胞表面系統特異的抗原の発現またはキメラ受容体構築体の発現を欠くように遺伝子工学処理され、次いで同一被験体に投与される。被験体への自家細胞の投与は、非自家細胞の投与と比べて、ホスト細胞の拒絶低下をもたらし得る。あるいは、ホスト細胞は同種異系細胞であり、すなわち、細胞が第一の被験体から得られ、細胞表面系統特異的抗原の発現またはキメラ受容体構築体の発現を欠くように遺伝子工学処理され、そして第一被験体とは異なるが同種である第二の被験体に投与される。例えば、同種異系免疫細胞はヒトドナー由来であり得、このドナーとは異なるヒトレシピエントに投与される。

30

【0158】

いくつかの実施形態では、免疫細胞および／または造血細胞は同種異系細胞であり、移植片対宿主病を低下するようにさらに遺伝子工学処理されている。例えば、本明細書で説明されるように、造血幹細胞はCD45RAの発現が低下しているように遺伝子工学処理され得る（例えば、ゲノム編集を用いて）。

【0159】

いくつかの実施形態では、本明細書で説明されるキメラ受容体のいずれかを発現する免疫細胞は、被験体に標的細胞（例えば、癌細胞）の数を少なくとも20%、例えば、50%、80%、100%、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍またはそれより多く低下するのに効果的な量で投与される。

40

【0160】

哺乳動物（例えば、ヒト）に投与される細胞、すなわち免疫細胞または造血細胞の一般的な量は、例えば、100万～1000億個の細胞の範囲であってよいが、この例示的な範囲を下回るまたは超える量も本開示の範囲内である。例えば、細胞の1日用量は、約100万～約500億個の細胞（例えば、約500万個、約2500万個、約5億個、約10億個、約50億個、約200億個、約300億個、約400億個、または上記の値のいずれか2つによって定められる範囲）、好ましくは約1000万～約1000億個（例えば、約2000万個、約3000万個、約4000万個、約6000万個、約7000万個、約8000万個、約9000万個、約100億個、約250億個、約500億個、約750億個、約900億個、または上記の値のいずれか2つによって定められる範囲）、よ

50

り好ましくは約1億～約500億個（例えば、約1億2000万個、約2億5000万個、約3億5000万個、約4億5000万個、約6億5000万個、約8億個、約9億個、約30億個、約300億個、約450億個、または上記の値のいずれか2つによって定められる範囲）であってよい。

【0161】

一つの実施形態では、キメラ受容体（例えば、キメラ受容体をコードする核酸）は、免疫細胞中に導入され、被験体（例えば、ヒト患者）はキメラ受容体を発現する免疫細胞の初回投与または用量を受ける。作用物質（例えば、キメラ受容体を発現する免疫細胞）の1回以上のその後の投与は、前回の投与後、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、または2日の間隔で患者になされ得る。作用物質の1回を超える用量は、被験体に作用物質の投与を週あたり、例えば、2回、3回、4回、またはそれより多く投与できる。被験体は、週あたり1回を超える作用物質（例えば、キメラ受容体を発現する免疫細胞）の投与、続いて作用物質の投与のない1週、そして最後に1回を超える作用物質の追加投与（例えば、キメラ受容体を発現する免疫細胞の週あたり1回を超える投与）を受け得る。キメラ受容体を発現する免疫細胞は、1日おきに週あたり3回投与を2、3、4、5、6、7、8、またはそれより多い週の間投与され得る。

10

【0162】

本開示の文脈では、本明細書で列举される疾患症状のいずれかに関する限りにおいて、用語「治療する」、「治療」、および同様の用語は、このような症状と関連する少なくとも1つの徴候を緩和または軽減する、あるいはこのような症状の進行を遅延または逆転させることを意味する。本開示の意味合いでは、用語「治療する」は発症（すなわち、疾患の臨床所見前の期間）を停止、遅延する、および／または疾患を発症または悪化するリスクを低下することも意味する。例えば、癌との関連では、用語「治療する」は、患者の腫瘍負荷を排除または低下する、あるいは転移を防止、遅延、または阻害することなどを意味し得る。

20

【0163】

いくつかの実施形態では、細胞表面系統特異的抗原を結合する抗原結合フラグメントを含む作用物質および細胞表面系統特異的抗原を欠く造血細胞集団。従って、このような治療方法では、作用物質は細胞表面系統特異的抗原を発現する標的細胞を標的として殺すために認識（結合）する。抗原を欠く造血細胞は、作用物質によって標的にされる細胞型の再増殖を可能にする。いくつかの実施形態では、患者の治療は以下のステップ：（1）細胞表面系統特異的抗原を標的にする作用物質の治療上効果的な量を患者に投与すること、および（2）自家または同種異系のいずれかの造血幹細胞を患者に注入または再注入することであって、ここで造血細胞は低減された系統特異的な疾患関連抗原の発現を有する、を含んでよい。いくつかの実施形態では、患者の治療は以下のステップ：（1）キメラ受容体を発現する免疫細胞の治療上効果的な量を患者に投与することであって、ここで免疫細胞は細胞表面系統特異的な疾患関連抗原を結合するキメラ受容体をコードする核酸配列を含む、および（2）自家または同種異系のいずれかの造血細胞（例えば、造血幹細胞）を患者に注入または再注入することであって、ここで造血細胞は低減された系統特異的な疾患関連抗原の発現を有する、を含んでよい。

30

【0164】

細胞表面系統特異的抗原を結合する抗原結合フラグメントを含む作用物質および細胞表面系統特異的抗原を欠く造血細胞集団を用いる治療方法の効能は、従来技術で知られており習熟した医療専門家に明らかであるいずれかの方法によって評価され得る。例えば、治療の効能は、被験体の生存、または被験体あるいはその組織またはサンプル中の癌負荷によって評価され得る。いくつかの実施形態では、治療の効能は、細胞の特定の集団または系統に属する細胞の数を定量することによって評価される。いくつかの実施形態では、治療の効能は細胞表面系統特異的抗原を提示する細胞の数を定量することによって評価される。

40

【0165】

いくつかの実施形態では、細胞表面系統特異的抗原に結合する抗原結合フラグメントを含

50

む作用物質および造血細胞集団が同時に投与される。

【0166】

いくつかの実施形態では、細胞表面系統特異的抗原を結合する抗原結合フラグメントを含む作用物質（例えば、本明細書で説明されるキメラ受容体を発現する免疫細胞）は、造血細胞の投与前に投与される。いくつかの実施形態では、細胞表面系統特異的抗原を結合する抗原結合フラグメントを含む作用物質（例えば、本明細書で説明されるキメラ受容体を発現する免疫細胞）は、造血細胞の投与の少なくとも約1日、2日、3日、4日、5日、6日、1週、2週、3週、4週、5週、6週、7週、8週、9週、10週、11週、12週、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月またはそれより前に投与される。

【0167】

いくつかの実施形態では、造血細胞は、細胞表面系統特異的抗原を結合する抗原結合フラグメントを含む作用物質（例えば、本明細書で説明されるキメラ受容体を発現する免疫細胞）の前に投与される。いくつかの実施形態では、造血細胞集団は、細胞表面系統特異的抗原に結合する抗原結合フラグメントを含む作用物質の投与の少なくとも約1日、2日、3日、4日、5日、6日、1週、2週、3週、4週、5週、6週、7週、8週、9週、10週、11週、12週、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月またはそれより前に投与される。

【0168】

いくつかの実施形態では、細胞表面系統特異的抗原を標的にする作用物質および造血細胞集団は実質的に同時に投与される。いくつかの実施形態では、細胞表面系統特異的抗原を標的にする作用物質が投与され、患者はある期間評価され、その後に造血細胞集団が投与される。いくつかの実施形態では、造血細胞集団が投与され、患者はある期間評価され、その後に細胞表面系統特異的抗原を標的にする作用物質が投与される。

【0169】

作用物質および／または造血細胞集団の複数回投与（例えば、用量）も本開示の範囲内である。いくつかの実施形態では、作用物質および／または造血細胞集団は被験者に一回投与される。いくつかの実施形態では、作用物質および／または造血細胞集団は1回を超えて（例えば、少なくとも2、3、4、5回、またはそれより多い回数）被験体に投与される。いくつかの実施形態では、作用物質および／または造血細胞集団は定期的に、例えば6ヶ月ごとに、被験体に投与される。

【0170】

いくつかの実施形態では、被験体は造血器悪性腫瘍を有するヒト被験体である。本明細書で使用されるとき、造血器悪性腫瘍は、造血細胞（例えば、前駆体および幹細胞を含む血液細胞）を含む悪性の異常を指す。造血器悪性腫瘍の例は、限定されないが、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、白血病、または多発性骨髄腫を含む。白血病は、急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病または慢性リンパ芽球性白血病、および慢性リンパ性白血病を含む。

【0171】

いくつかの実施形態では、白血病は急性骨髄性白血病（AML）である。AMLは、主要な分化および増殖制御経路を中断させる漸進的に獲得された重大な遺伝子変化を有する形質転換された細胞を起源とする、異質でクローン性の新生物疾患として特徴付けられる（Dohnerら，NEJM，（2015）373：1136）。CD33糖タンパク質は大多数の骨髄性白血病細胞で、ならびに正常骨髄および単球前駆体で発現され、AML療法の魅力的な標的であると考えられている（Laszloら，Blood Rev．（2014）28（4）：143－53）。抗CD33モノクローナル抗体をベースとした治療法を用いた臨床試験は、標準的な化学療法と併用されたときにAML患者のサブセットにおける生存の改善を示しているが、これらの効果は安全性および効能の問題も伴った。

【0172】

AML細胞を標的にすることが目的とされた他の試みは、AMLにおいて選択的にCD33を標的にするキメラ抗原受容体（CAR）を発現するT細胞の作製を含んでいる。Buckleyら，Curr．Hematol．Malign．Rep．（2）：65（201

10

20

30

40

50

5)。しかし、データは限定的であり、患者を治療することにおいてこの方法がどれほど効果的か（すべての標的化細胞が除去されるかどうか）不確かである。さらに、骨髓系統細胞は生命に必須であるため、被験体から骨髓系統細胞を枯渇させることは、患者の生存に有害な効果を有し得る。本開示は、少なくとも部分的に、AML治療と関連するこのような問題を解決することを目的とする。

【0173】

これに代えて、または追加で、本明細書で説明される方法は、限定されないが、肺癌、耳、鼻、および咽頭癌、結腸癌、メラノーマ、膵臓癌、乳癌、前立腺癌、乳癌、卵巣癌、基底細胞癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌、乳癌、子宮頸癌、絨毛癌、結腸直腸癌、結合組織癌、消化器系癌、子宮内膜癌、食道癌、眼の癌、頭頸部癌、胃癌、上皮内新生物、腎臓癌、咽頭癌、肝臓癌、線維腫、神経芽細胞腫、口腔癌（例えば、唇、舌、口、および咽頭）、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、直腸癌、腎臓癌、呼吸器系の癌、肉腫、皮膚癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮癌、泌尿器系の癌、ならびに他の癌腫および肉腫を含む、非造血性癌を治療するために使用され得る。

【0174】

癌腫は上皮起源の癌である。本開示の方法による治療が意図される癌腫は、限定されないが、腺房癌腫、小葉癌腫、濾胞状腺癌腫（腺囊胞癌腫、腺筋上皮腫、篩状癌腫および円柱腫とも呼ばれる）、腺腫性癌腫、腺癌腫、副腎皮質癌腫、肺胞癌腫、肺胞細胞癌腫（気管支肺癌腫、肺胞細胞腫瘍および肺腺腫症とも呼ばれる）、基底細胞癌腫（basal cell carcinoma）、基底細胞癌腫（carcinoma basocellulare）（バサローマ、またはバシローマ、および毛母癌腫とも呼ばれる）、類基底細胞癌腫、基底有棘細胞癌腫、乳癌腫、細気管支肺胞癌腫、細気管支癌腫、気管支原性癌腫、大脳様癌腫、胆管細胞癌腫（胆管癌腫および胆管性癌腫とも呼ばれる）、絨毛癌腫、膠質癌腫、面皰癌腫、小体癌腫、篩状癌腫、鑑状癌腫、皮膚癌腫、円柱癌腫、円柱細胞癌腫、腺管癌腫、緻密癌腫、胎児性癌腫、脳様癌腫、眼球上癌腫、類表皮癌腫、上皮アデノイド癌腫、外向性癌腫、潰瘍癌腫、ゼラチン状癌腫、膠様癌腫、巨細胞癌腫、巨大細胞癌腫、腺性癌腫、顆粒膜細胞癌腫、毛母癌腫、血液様癌腫、肝細胞癌腫（肝臓癌腫、悪性肝臓癌腫および肝癌腫とも呼ばれる）、ヒュルトレ細胞癌腫、硝子様癌腫、副腎様癌腫、乳児胎児性癌腫、上皮内癌腫、表皮内癌腫、上皮内癌腫、クルムベッヘル癌腫、クルチツキー細胞癌腫、レンズ状癌腫（lenticular carcinoma）、レンズ状癌腫（carcinoma lenticularis）、脂肪腺癌腫、リンパ上皮癌腫、乳腺炎性癌腫、髄様癌腫（carcinoma medullare）、髄様癌腫（medullary carcinoma）、黒色癌腫（carcinoma melanodes）、黒色癌腫（melanotic carcinoma）、粘液性癌腫、粘液分泌性癌腫、粘細胞性癌腫（carcinoma mucocellulare）、粘表皮癌腫、粘液癌腫（carcinoma mucosum）、粘液癌腫（mucous carcinoma）、粘液腫様癌腫、鼻咽頭癌腫、燕麦細胞癌腫、骨化性癌腫、類骨癌腫、卵巣癌腫、乳頭癌腫、門脈周囲癌腫、前浸潤癌腫、前立腺癌腫、腎臓の腎細胞癌腫（腎臓腺癌腫およびハイパーネホロイドとも呼ばれる）、保存細胞癌腫、肉腫様癌腫、シュナイダー癌腫、硬性癌腫、陰嚢癌腫、印環細胞癌腫、単純癌腫、小細胞癌腫、ソラノイド癌腫、球状細胞精巣癌腫、紡錘細胞癌腫、海綿様癌腫、扁平上皮癌腫（squamous carcinoma）、扁平上皮癌腫（squamous cell carcinoma）、紐癌腫、毛細管拡張性癌腫（carcinoma telangiectaticum）、毛細管拡張性癌腫（carcinoma telangiectodes）、移行上皮癌腫、結節性癌腫（carcinoma tuberosum）、結節性癌腫（tuberos carcinoma）、疣状癌腫、絨毛癌腫を含む。好ましい実施形態では、本開示の方法は、乳房、子宮頸部、卵巣、前立腺、肺、結腸または直腸、膵臓、胃あるいは腎臓の癌を有する被験体を治療するために使用される。

【0175】

肉腫は骨および軟組織に生じる間葉性新生物である。異なる型の肉腫が認められており、

これらは脂肪肉腫（粘液様脂肪肉腫および多形性脂肪肉腫など）、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、悪性末梢神経鞘腫瘍（悪性神経鞘腫、神経線維肉腫、または神経原性肉腫とも呼ばれる）、ユーイング腫瘍（骨のユーイング肉腫、骨外（すなわち、非骨）ユーイング肉腫、および原始神経外胚性腫瘍（PNET）を含む）、滑膜肉腫、管肉腫、血管肉腫、リンパ管肉腫、カボジ肉腫、血管内皮腫、線維肉腫、類腱腫（侵襲性線維腫症とも呼ばれる）、隆起性皮膚線維肉腫（DFSP）、悪性線維性組織球腫（MFH）、血管外皮細胞腫、悪性間葉腫、胞状軟部肉腫、類上皮肉腫、明細胞肉腫、線維形成性小円形細胞腫瘍、消化管間質腫瘍（GIST）（GI間質肉腫としても知られている）、骨肉腫（骨原性肉腫としても知られている）－骨格および骨外、ならびに軟骨肉腫を含む。

【0176】

いくつかの実施形態では、治療される癌は難治性癌であってよい。「難治性癌」は、本明細書で使用されるとき、処方される標準治療に対して耐性である癌である。これらの癌は、最初は治療に応答性であるように見え（そして再発する）、または治療に完全に非応答性であり得る。一般的な標準治療は、癌のタイプ、および被験体における進行度合いに応じて変わる。それは化学療法、または手術、または放射線照射、あるいはこれらの併用であり得る。従来技術の当業者は、このような標準治療を承知している。難治性癌が本開示に従って治療される被験体は、従って、これらの癌について別の治療を既に受けている可能性がある。あるいは、癌が難治性である可能性がある場合（例えば、癌細胞の分析または被験体の病歴から考慮して）、被験体は別の治療を以前に受けていない可能性がある。難治性癌の例は、限定されないが、白血病、メラノーマ、腎細胞癌腫、結腸癌、肝臓癌（肝癌）、膵臓癌、非ホジキンリンパ腫および肺癌を含む。

【0177】

本明細書で説明されるキメラ受容体を発現する免疫細胞のいずれかは、医薬組成物として、医薬品として許容可能な担体または賦形剤中で投与され得る。

【0178】

本開示の組成物および／または細胞と関連して使用されるフレーズ「医薬品として許容可能な」は、哺乳動物（例えば、ヒト）に投与される場合、生理学的に耐容性であり、不都合な反応を一般的に生じないような組成物の分子実体または他の原料を指す。好ましくは、本明細書で使用されるとき、用語「医薬品として許容可能な」は、哺乳動物、より好ましくはヒトで使用するために、連邦または州政府の規制当局によって承認されている、あるいは米国薬局方または他の一般的に認められている薬局方にリスト化されていることを意味する。「許容可能な」は、担体が組成物の有効成分（例えば、核酸、ベクター、細胞、または治療用抗体）と適合性であり、組成物が投与される被検体に負の影響を及ぼさないことを意味する。本方法で使用する医薬組成物および／または細胞のいずれも、医薬品として許容可能な担体、賦形剤、または安定化剤を、凍結乾燥製剤または水性溶液の剤形で含み得る。

【0179】

緩衝剤を含む、医薬品として許容可能な担体は従来技術で良く知られており、リン酸、クエン酸、および他の有機酸；アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤；保存剤；低分子量ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリンなどのタンパク質；アミノ酸；疎水性ポリマー；モノサッカライド；ジサッカライド；他の炭水化物；金属錯体；および／または非イオン性界面活性剤を含み得る。例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy（薬学の科学および実践）20th Ed.（2000）Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hooverを参照する。

【0180】

治療使用のためのキット

細胞表面系統特異的抗原を欠く造血細胞集団と組み合わせた細胞表面系統特異的抗原を標的にする作用物質の使用のためのキットも本開示の範囲内である。このようなキットは、細胞表面系統特異的抗原を結合する抗原結合フラグメントを含む任意の作用物質（例えば

10

20

30

40

50

、本明細書で説明されるキメラ受容体を発現する免疫細胞）および医薬品として許容可能な担体を含む第一医薬組成物と、細胞表面系統特異的抗原を欠く造血細胞（例えば、造血幹細胞）集団および医薬品として許容可能な担体を含む第二医薬組成物とを含む、1つ以上の容器を含み得る。

【0181】

いくつかの実施形態では、キットは本明細書で説明される方法のいずれかでの使用のための取扱説明書を含んでよい。含まれる取扱説明書は、被験体における意図された活性を達成するための被験体への第一および第二医薬組成物の投与の説明を含み得る。キットは、被験体が本治療を必要とするかどうか特定することに基づき、治療に適した被験体の選択についての説明をさらに含む。いくつかの実施形態では、取扱説明書は本治療を必要とする被検体に第一および第二医薬組成物を投与することの説明を含む。

10

【0182】

本明細書で説明される細胞表面系統特異的抗原を標的にする作用物質ならびに第一および第二医薬組成物の使用に関する取扱説明書は、意図された治療のための投与量、投与計画、および投与経路についての情報を一般的に含む。容器は単位用量、大量包装（例えば、複数回用量包装）または下位単位用量であり得る。本開示のキットに添付される取扱説明書は、一般的にはラベルまたは包装インサートに記載された説明である。ラベルまたは包装インサートは、医薬組成物が被験体における疾患または障害を治療する、発症を遅延する、および／または緩和するために使用されることを示す。

20

【0183】

本明細書で提供されるキットは、適切なパッケージング中にある。適切なパッケージングは、限定されないが、バイアル、ボトル、ジャー、フレキシブルパッケージングなどを含む。吸入器、鼻腔投与デバイス、または注入容器などの特定のデバイスと併せて使用するための包装もまた考えられる。キットは無菌アクセスポートを有し得る（例えば、容器は皮下注射針によって穿刺可能な栓を有する静脈用溶液バッグまたはバイアルであり得る）。容器も無菌アクセスポートを有し得る。医薬組成物における少なくとも1種類の有効成分は、本明細書で説明されるキメラ受容体変異体である。

【0184】

キットは任意に緩衝剤などの追加成分および判断情報を提供し得る。通常、キットは容器上にまたは容器と関連してラベルまたは包装インサートを含む。いくつかの実施形態では、本開示は上記キットの内容物を含む製品を提供する。

30

【0185】

一般的技術

本開示の実施は、他に指示がない限り、従来技術の範囲内である分子生物学（組換え技術を含む）、微生物学、細胞生物学、生物化学、および免疫学の標準的技術を使用する。このような技術は文献で十分に説明されており、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*（分子クローニング：実験室マニュアル）、second edition（Sambrookら、1989）Cold Spring Harbor Press、*Oligonucleotide Synthesis*（オリゴヌクレオチド合成）（M. J. Gait, ed. 1984）、*Methods in Molecular Biology*（分子生物学における方法）、Humana Press、*Cell Biology: A Laboratory Notebook*（細胞生物学：実験室ノートブック）（J. E. Cellis, ed., 1989）Academic Press、*Animal Cell Culture*（動物細胞培養）（R. I. Freshney, ed. 1987）、*Introduction to Cell and Tissue Culture*（細胞および組織培養入門）（J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998）Plenum Press、*Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures*（細胞および組織培養：実験室手順）（A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell, eds. 1993-8）J. Wiley and Sons、*Methods*

40

50

in Enzymology (酵素学における方法) (Academic Press, Inc.)、Handbook of Experimental Immunology (実験免疫学ハンドブック) (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.)、Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (哺乳動物細胞のための遺伝子導入ベクター) (J. M. Miller and M. P. Calos, eds., 1987)、Current Protocols in Molecular Biology (分子生物学における最新プロトコル) (F. M. Ausubelら, eds., 1987)、PCR: The Polymerase Chain Reaction (PCR: ポリメラーゼ連鎖反応) (Mullisら, eds., 1994)、Current Protocols in Immunology (免疫学における最新プロトコル) (J. E. Coliganら, eds., 1991)、Short Protocols in Molecular Biology (分子生物学における簡単プロトコル) (Wiley and Sons, 1999)、Immunobiology (免疫学) (C. A. Janeway and P. Travers, 1997)、Antibodies (抗体) (P. Finch, 1997)、Antibodies: a practice approach (抗体: 実践的方法) (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989)、Monoclonal antibodies: a practical approach (モノクローナル抗体: 実践的方法) (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000)、Using antibodies: a laboratory manual (抗体の利用: 実験室マニュアル) (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999)、The Antibodies (抗体) (M. Zanetti and J. D. Capra, eds. Harwood Academic Publishers, 1995)、DNA Cloning: A practical Approach (DNAクローニング: 実践的方法), Volumes I and II (D. N. Glover ed. 1985)、Nucleic Acid Hybridization (核酸ハイブリダイゼーション) (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1985)、Transcription and Translation (転写および翻訳) (B. D. Hames & S. J. Higgins, eds. (1984))、Animal Cell Culture (動物細胞培養) (R. I. Freshney, ed. (1986))、Immobilized Cells and Enzymes (固定化細胞および酵素) (IRL Press, (1986))、およびB. Perbal, A practical Guide To Molecular Cloning (分子クローニングへの実践ガイド) (1984) F. M. Ausubelら (eds.) が挙げられる。

【0186】

さらに詳細がなくとも、従来技術の当業者は、前述に基づき、本開示をその最大限の範囲まで利用できると思われる。従って、後述の具体的な実施形態は、単に説明として構成され、いかなるものであれ、本開示の他の部分を制限するものではない。本明細書に引用されるすべての刊行物は、本明細書において参照される目的または主題のために参考によって組み込まれる。

【0187】

例1: ヒト白血病細胞株におけるCD33のインビトロ除去

インビトロでCD33を標的とするCRS PR-Cas9系の能力を試験するため、ヒト白血病細胞K-562をNeon (登録商標) (Termo Fisher Scientific) を用いて、Cas9-GFP (PX458、S. ピオゲネス) およびGNNPAM配列を含むガイドRNAで共トランスフェクションし (図4)、ここでガイドRNAはhCD33ゲノム配列を標的にするように設計された。トランスフェクションの48時間後に、Cas9を発現する細胞をGFPのFACS分類を用いて特定し分離した。細

10

20

30

40

50

胞を次いで96時間インキュベーションし、フローサイトメトリーによってCD33発現を試験した(図5)。抗CD33抗体を用いたフローサイトメトリープロットは、Cas9ベクターおよびガイドRNAの送達前(上グラフ)および後(下グラフ)のK-562細胞によるCD33発現を示す。図5に示すように、トランスフェクション後、細胞の98%がCD33発現を欠いた。

【0188】

この例は、ヒト白血病細胞におけるCRISPR-Cas9系を用いるCD33の効率的な除去を実証する。

【0189】

例2：ヒト白血病細胞株におけるCD45のインビトロ除去

CRISPR-Cas9系を使用してインビトロでCD45RAを標的にした。簡単に説明すると、TIB-67細網肉腫マウスマクロファージ様細胞をNeon(登録商標)試薬(Termo Fisher Scientific)を用いて、Cas9-GFP(PX458、S.ピオゲネス)およびhCD45RAゲノム配列を標的にするCRISPRsgRNA(「NGG」PAM配列を含む)で共トランスフェクションした。トランスフェクションの48時間後に、CRISPR-Cas9系を発現する細胞をGFPのFACS分類を用いて特定して分離した。細胞を次いで96時間インキュベーションし、CD45RA発現を試験した(図6)。抗CD45RA抗体を用いたフローサイトメトリープロットは、Cas9ベクターおよびガイドRNAの送達前(上グラフ)および後(下グラフ)のCD45RA発現を示す。

【0190】

白血病細胞においてCD33発現がうまく低下された例1と同様に、本例の結果はCRISPR-Cas9系を用いるCD45RAの効率的な標的化を示す。

【0191】

例3：急性骨髄性白血病(AML)における細胞表面系統特異的CD33の標的化

本例はAMLにおけるCD33抗原の標的化を包含する。本例の具体的なステップを表6に概説する。

【表6】

表6：実験計画の概要

I. 自家CD33標的化(CAR) T-細胞療法	1. 抗CD33 CAR構築体の作製 2. 患者からのCD8 ⁺ T細胞の分離 3. 抗CD33 CAR T細胞の調製 4. 患者へのCD33 CAR T細胞の再注入
II. CD34 ⁺ CD33 ⁻ 細胞を用いる自家造血幹細胞移植	1. 造血幹細胞の分離 2. CD33を標的にするCRISPR-Cas9プラスミド 3. CRISPR-CAS 系によるCD34 ⁺ CD33 ⁻ 細胞の作製 4. 患者へのCD34 ⁺ CD33 ⁻ 細胞の再注入
III. 毒素に付着された抗CD33抗体(免疫毒素)による患者の継続的治療	

【0192】

I. CD33標的化キメラ抗原受容体(CAR) T細胞療法

A. 抗CD33 CAR構築体の作製

本明細書で説明されるCD33を標的にするキメラ抗原受容体は、5'から3'への順で、pHIV-ZsGreenレンチウイルス骨格(www.addgene.org/18121/)、ペプチドシグナル、CD33scFv、ヒンジ、CD28分子の膜貫通領域、CD28の細胞内領域、およびTCR-ζ分子のシグナル伝達領域を含む。

【0193】

最初に、ペプチドシグナル、抗CD33軽鎖（SEQ ID NO：1）、フレキシブルリンカーおよび抗CD33重鎖（SEQ ID NO：2）をpHIV-Zs greenのEcoRI部位に、任意にコザック配列とともにクローニングする。

【0194】

軽鎖－リンカー－重鎖－ヒンジーCD28／ICOS－CD3ζの基本的構造を有する、CD33を結合する例示的なキメラ受容体の核酸構造を下記に示す。

パート1：軽鎖－リンカー－重鎖（SEQ ID NO：16）：コザック開始部位を太字で示す。ペプチドシグナルL1をイタリック体で示す。抗CD33軽鎖および重鎖を太字のイタリック体で示し、リンカーによって分けられる。

【化5】

g g t g t c g t g a g c g g c c g c t g a a c t g G C C A C C A T G G A C A T G A
 G G G T C C C T G C T C A G C T C C T G G G G C T C C T G C T G C T C T G G C T C
 T C A G G T G C C A G A T G T G A G A T C G T G C T G A C C C A G A G C C C C G G
 C A G C C T G G C C G T G A G C C C C G G C A A G A G G G T G A C C A T G A G C T
 G C A A G A G C A G C C A G A G C G T G T T C T T C A G C A G C A G C C A G A A G
 A A C T A C C T G G C C T G G T A C C A G C A G A T C C C C G G C C A G A G C C C
 C A G G C T G C T G A T C T A C T G G G C C A G C A C C A G G G A G A G C G G C G
 T G C C C G A C A G G T T C A C C G G C A G C G G C A G C G G C A G C G G C A C C
 G A C T T C A C C C T G A C C A T C A G C A G C G T G C A G C C C G A G G A C C T
 G G C C A T C T A C T A C T G C C A C C A G T A C C T G A G C A G C A G G A C C T
 T C G G C C A G G G C A C C A A G C T G G A G A T C A A G A G G G G C A G C A C C
 A G C G G C A G C G G C A A G C C C G G C A G C G G C G A G G G C A G C A C C A A
 G G G C C A G G T G C A G C T G C A G C A G C C C G G C G C C G A G G T G G T G A
 A G C C C G G C G C C A G C G T G A A G A T G A G C T G C A A G G C C A G C G G C
 T A C A C C T T C A C C A G C T A C T A C A T C C A C T G G A T C A A G C A G A C
 C C C C G G C C A G G G C C T G G A G T G G G T G G G C G T G A T C T A C C C C G
 G C A A C G A C G A C A T C A G C T A C A A C C A G A A G T T C C A G G G C A A G
 G C C A C C C T G A C C G C C G A C A A G A G C A G C A C C A C C G C C T A C A T
 G C A G C T G A G C A G C C T G A C C A G C G A G G A C A G C G C C G T G T A C T
 A C T G C G C C A G G G A G G T G A G G C T G A G G T A C T T C G A C G T G T G G
 G G C C A G G G C A C C A C C G T G A C C G T G A G C A G C

パート2：ヒンジーCD28／ICOS－CD3ζ NotI制限酵素認識部位を大文字で示す。翻訳停止部位を太字で示す。BamHI制限切断部位を下線で示す。

10

20

30

40

50

【化 6】

CD28 共刺激領域 (SEQ ID NO: 17)

GCGGCCGCAa t t g a a g t t a t g t a t c c t c c t c c t t a c c t a g a
 c a a t g a g a a g a g c a a t g g a a c c a t t a t c c a t g t g a a a g g g a
 a a c a c c t t t g t c c a a g t c c c c t a t t t c c c g g a c c t t c t a a g
 c c c t t t t g g g t g c t g g t g g t g g t t g g t g g a g t c c t g g c t t g
 c t a t a g c t t g c t a g t a a c a g t g g c c t t t a t t a t t t t c t g g g
 t g a g g a g t a a g a g g a g c a g g c t c c t g c a c a g t g a c t a c a t g
 a a c a t g a c t c c c c g c c c g c c c c g g g c c c A c c c g c a a g c a t t a
 c c a g c c c t a t g c c c c a c c a c g c g a c t t c g c a g c c t a t c g c t
 c c a g a g t g a a g t t c a g c a g g a g c g c a g a c g c c c c c g c g t a c
 c a g c a g g g c c a g a a c c a g c t c t a t a a c g a g c t c a a t c t a g g
 a c g a a g a g a g g a g t a c g a t g t t t t g g a c a a g a g a c g t g g c c
 g g g a c c c t g a g a t g g g g g a a a g c c g a g a a g g a a g a a c c c t
 c a g g a a g g c c t g t a c a a t g a a c t g c a g a a a g a t a a g a t g g c
 g g a g g c c t a c a g t g a g a t t g g g a t g a a a g g c g a g c g c c g g a
 g g g g c a a g g g g c a c g a t g g c c t t t a c c a g g g t c t c a g t a c a
 g c c a c c a a g g a c a c c t a c g a c g c c c t t c a c a t g c a g g c c c t
 g c c c c c t c g c T A A c g c c c c t c t c c c t c c c c c c c c c c t a a

10

20

【化 7】

ICOS 共刺激領域 (SEQ ID NO: 18)

GCGGCCGCAc t a t c a a t t t t t t g a t c c t c c t c c t t t t t a a a g t
 a a c t c t t a c a g g a g g a t a t t t t g c a t a t t t a t g a a t c a c a a c
 t t t g t t g c c a g c t g a a g t t c t g g t t a c c c a t a g g a t g t g c a
 g c c t t t g t t g t a g t c t g c a t t t t g g g a t g c a t a c t t a t t t g
 t t g g c t t a c a a a a a g a a g t a t t c a t c c a g t g t g c a c g a c c
 c t a a c g g t g a a t a c a t g t t c a t g a g a g c a g t g a a c a c a g c c
 a a a a a a t c t a g a c t c a c a g a t g t g a c c c t a a g a g t g a a g t t
 c a g c a g g a g c g c a g a c g c c c c c g c g t a c c a g c a g g g c c a g a
 a c c a g c t c t a t a a c g a g c t c a a t c t a g g a c g a a g a g a g g a g
 t a c g a t g t t t t g g a c a a g a g a c g t g g c c g g g a c c c t g a g a t
 g g g g g g a a a g c c g a g a a g g a a g a a c c c t c a g g a a g g c c t g t
 a c a a t g a a c t g c a g a a a g a t a a g a t g g c g g a g g c c t a c a g t
 g a g a t t g g g a t g a a a g g c g a g c g c c g g a g g g g c a a g g g g c a
 c g a t g g c c t t t a c c a g g g t c t c a g t a c a g c c a c c a a g g a c a
 c c t a c g a c g c c c t t c a c a t g c a g g c c c t g c c c c c t c g c T A A
 c g c c c c t c t c c c t c c c c c c c c c c t a a

30

40

50

【化 8】

融合（ハイブリッド）CD28およびICOS共刺激領域（SEQ ID NO: 19）

GCGGCCGCAattgaagttaatgtatccctccctctaccctagaa
 caatgagaaagagcaatggaaacattatccatgtgaaaggga
 aacacccctttgtccaaagtccctattttcccggaaccttctaag
 cccctttttgggtgtctgggtgggtgggtgggtggagtccttggttg
 ctatagctttgtctagtataacagtggccctttattattttctggg
 tgaaggagtaagaggagcaggtccctgacacagtgaactacatg
 ttcaatgagagcagtgaaacacagcccaaaaaatctagacctaac
 agatgtgacccctaagagtgaagtccaagcaggagcgacagacg
 ccccgcggtacacagcagggtccagaaaccagctctataaacgag
 ctcaatctaggaacgaagagagaggtacgatgttttggaacaa
 gagaacgtggccgggaacccctgagatgggggggaaagccgagaa
 ggaaagaaacccctcagggaaggtctgtacaaatgaaactgcagaaa
 gataagatggcggaggtccctacagtgaagattgggatgaaagg
 cgagcggccggagggggcaagggggcacgatggccctttaaccagg
 gtctcagtagacacccaccaaaggacacctaagacggcccttcaac
 atgcagggccctgtcccccctcgcTAAcggccctctccctccccc
 ccccccctaaa

10

20

【0195】

次のステップでは、ヒンジ領域、CD28領域（SEQ ID NO: 3）、およびTCR- ζ の細胞質構成要素をpHIV-ZsGreen（既にペプチドシグナルおよびCD33scFvを含む）のNotIおよびBmHI部位にクローニングする。あるいは、CD28領域はICOS領域（SEQ ID NO: 4）で置換できる。

【0196】

CD28およびICOS領域に加えて、CD28およびICOS細胞内シグナル伝達領域のフラグメントを含む融合領域を工学処理して（SEQ ID NO: 5）、追加のキメラ受容体を作製するために使用する。このような構成では、キメラ受容体は抗原結合フラグメント、抗CD33軽鎖可変領域、リンカー、抗CD33重鎖可変領域、CD28／ICOSハイブリッド領域（CD28の膜貫通領域を含む）、およびTCR- ζ 分子のシグナル伝達領域を含む。

30

【0197】

キメラ受容体を作製するために使用され得る構成要素の例示的なアミノ酸配列が本明細書で提供され、CD28領域（SEQ ID NO: 6）、ICOS領域（SEQ ID NO: 7）、CD28／ICOSハイブリッド領域（SEQ ID NO: 8）、およびTCR- ζ などが本明細書で示される。あるいは、キメラ受容体が同様に作製され得る（セクションB）。

【0198】

B. 抗CD33 CAR構築体の作製のための代替法

例示的なキメラ受容体の概略を図7、パネルA～Dに示す。キメラ受容体は、細胞外CD8ヒンジ領域、膜貫通および細胞質シグナル伝達領域、ならびにCD3 ζ シグナル鎖に連結された、CD33抗原を認識する細胞外ヒト化scFvを用いて作製される（図7、パネルB）。抗CD33キメラ受容体をコードするDNAは、ヒト化scFvを用いることによって作製される（Essandra, J Intern Med. (2013) 273 (2): 166）。代替物は、CD28またはCD28／OX1またはCD28／4-1-BBハイブリッドの代わりにOX-1または4-1-BBを含むCAR T細胞を含む（図7、パネルCおよびD）。

40

【0199】

50

抗CD33scFv配列を作製するために、前述の抗CD33抗体の可変領域の重鎖および軽鎖のコード領域（SEQ ID NO：1および2）を、特異的プライマーによって増幅し、細胞での発現用にpHIV-Zsgreenベクター中にクローニングする。標的抗原に対するscFv（単鎖可変フラグメント）の結合強度を評価するため、scFvをHek293T細胞で発現させる。この目的のため、ベクター（コード領域を含むpHIV-Zsgreen）で大腸菌Top10Fを形質転換しプラスミドを調製する。scFv抗体をコードする得られた発現ベクターをHek293T細胞中にトランスフェクションによって導入する。トランスフェクションした細胞を5日間培養した後、上清を取り出して、抗体を精製する。

【0200】

得られる抗体は、従来技術で知られているプロトコルによるフレームワーク置換を用いてヒト化できる。例えば、BioAtla（サンディエゴ）によって提供されるプロトコルを参照し、ここでは鑄型抗体に由来する合成CDRをコードするフラグメントライブラリーを、機能的に発現された抗体由来の生殖系列配列に限定されたヒトフレームワークのプールからのヒトフレームワーク領域をコードするフラグメントに連結する（bioatla.com/applications/express-humanization/）。

【0201】

抗原結合親和性を改善するために親和性成熟を実施し得る。これはファージ提示法などの、従来技術で知られている一般的な技術を用いて実施できる（Schier R., J. Mol. Biol. (1996), 263:551）。変異体はそれらの生物学的活性（例えば、結合親和性）について、例えばBiacore分析を用いてスクリーニングされてよい。改変の優れた候補であり得る超可変領域残基を特定するために、アラニンスキャン変異を実施して、抗原結合に著しく関与する超可変領域残基を特定できる。さらに、抗体の親和性を改善するために、上記の組み合わせライブラリーを使用できる（Rajpalら, PNAS (2005) 102 (24):8466）。あるいは、BioAtlaが抗体の迅速で効率的な親和性変異のためのプラットフォームを開発しており、これを抗体の最適化の目的のために使用してもよい（bioatla.com/applications/functional-maturation/）。

【0202】

C. CAR構築体の組み立て

次に、抗CD33scFvを細胞外CD8ヒンジ領域、膜貫通および細胞質CD28シグナル伝達領域、ならびにCD3ζシグナル伝達鎖に連結する。簡単に説明すると、抗CD33scFv配列に特異的なプライマーを使用して前述のようにscFvを増幅する。完全なヒトCD8コード配列を有するプラスミド（pUN1-CD8）（www.invivogen.com/puno-cd8a）を使用して、CD8ヒンジおよび膜貫通領域（アミノ酸135～205位）を増幅する。CD3ζフラグメントを、完全なヒトCD3ζコード配列を有するInvivogenプラスミドpORF9-hCD247a（http://www.invivogen.com/PDF/pORF9-hCD247a_10E26v06.pdf）から増幅する。最後に、CD28（アミノ酸153～220位、CD28の膜貫通およびシグナル伝達領域に相当する）を、活性化T細胞からトリゾール法によって収集したRNAを用いて作製されたcDNAから増幅する。抗CD33-scFv-CD8-ヒンジ+膜貫通-CD28-CD3ζを含むフラグメントを、スプライス重複伸長（SOE）PCRを用いて組み立てる。得られるPCRフラグメントを次いでpELPSレンチウイルスベクター中にクローニングする。pELPSは第三世代レンチウイルスベクターpRRL-SIN-CMV-eGFP-WPREの派生物であり、ここでCMVプロモーターがEF-1αプロモーターで交換され、HIVの中央ポリプリントラクトがプロモーターの5'に挿入された（Miloneら, Mol Ther. (2009) (8):1453, Porterら, NEJM (2011) (8):725）。すべての構築体はシーケンシングによって検証される。

10

20

30

40

50

【0203】

あるいは、CD28領域の代わりにICOS、CD27、41BB、またはOX-40シグナル伝達領域を含むCARを作製し、T細胞中に導入してCD33陽性細胞を根絶する能力について試験する（図7、パネルC）。「第三世代」キメラ受容体の作製も考えられ（図7、パネルD）、これはCD3z-CD28-41BBまたはCD3z-CD28-OX40などの複数のシグナル伝達領域を組み合わせて、さらに能力を高める（Sadelainら, Cancer Discov. (2013) 4:388）。

【0204】

D. 抗CD33CAR T細胞調製

一次ヒトCD8⁺T細胞を、免疫磁性分離（Miltenyi Biotec）によって患者の末梢血液から分離する。T細胞を完全培地（10%熱不活性化FBS、100U/mLペニシリン、100μg/mLストレプトマイシン硫酸塩、10mMのHEPESを補充したRPMI1640）中で培養し、既に報告されているように（Levineら, J. Immunol. (1997) 159(12):5921）抗CD3および抗CD28mAbでコートされたビーズ（Invitrogen）によって刺激する。

【0205】

パッケージング細胞株を使用してウイルスベクターを作製し、それは標的細胞に形質導入でき抗CD33キメラ受容体を含む。レンチウイルス粒子を作製するために、本例のセクション（1）で作製されたCARを、不死化正常胎児腎293Tパッケージング細胞中に一緒にトランスフェクションする。細胞を10%FBS、100U/mLペニシリン、および100μg/mLストレプトマイシンを含む高グルコースDMEMで培養する。トランスフェクションの48~72時間後に、上清を収集し、組換えレンチウイルスをFBS無添加DMEM中で濃縮する。一次CD8⁺T細胞を次いでポリブレンの存在下で、約5~10の感染多重度（MOI）で形質導入する。ヒト組換えIL-2（R&D Systems）を1日おきに加える（50IU/mL）。T細胞を、刺激後約14日間培養する。ヒト一次T細胞の形質導入効率を、ZsGreenレポーター遺伝子（Clontech, マウンテンビュー、カリフォルニア州）の発現によって評価する。

【0206】

E. 患者へのCAR T細胞の注入

患者への抗CD33CAR T細胞のインビボ注入前に、細胞をリン酸緩衝化生理食塩水で洗浄し濃縮した。閉じた無菌系を備えるHaemonetics CellSaver（Haemonetics Corporation, ブレインツリー、マサチューセッツ州）などのセルプロセッサーを、製剤化前に洗浄および濃縮ステップのために使用する。抗CD33キメラ受容体を発現する最終T細胞を、ヒト血清アルブミンを補充した無菌生理食塩水100mLに製剤化する。最後に、患者は1~3日間かけてT細胞を1~10×10⁷個/kgで注入される（Maudeら, NEJM (2014) 371(16):1507）。注入される抗CD33キメラ受容体を発現するT細胞の数は、癌患者の状態、患者の年齢、前治療などの多くの要因に依存する。

【0207】

さらに、本明細書では、AML患者においてCD33を標的にするキメラ受容体に加えて、CD45RAを標的にするキメラ受容体を発現する免疫細胞も考えられる。これは2つの異なる方法：1）抗CD33キメラ受容体を発現する免疫細胞および抗CD47RAキメラ受容体を発現する免疫細胞を別々に作製すること、および患者に両タイプの免疫細胞を別々に注入すること、または2）CD33およびCD45RAの両方を同時に標的にする免疫細胞を作製すること、によって達成できる（Kakarlaら, Cancer (2014) 151(2014)）。

【0208】

II. CD34⁺CD33⁻細胞を用いる自家造血幹細胞移植（HSCT）

患者からの幹細胞分離、前処置レジメン、ならびに幹細胞の患者への注入に関するプロトコルは、患者の年齢、症状、治療歴、および治療が実施される施設に大きく依存して変動

10

20

30

40

50

することが理解される。そのため、後述のプロトコルは単なる例であり、従来技術の当業者によって定期的な最適化がなされる。

【0209】

A. 抗CD33CAR T細胞の養子移入に続く末梢血幹細胞(PBSC)動員を用いる造血幹細胞の分離

AML患者を、顆粒球コロニー形成因子(G-CSF)の1日あたり10mg/kgの静脈投与によって刺激する。CD34⁺細胞陽性選択を、免疫磁性ビーズおよび免疫磁性豊富化デバイスを用いて実施する。CD34⁺細胞の 2×10^6 個/kg体重の最小量が、Fenwall CS 3000+細胞セパレーターを用いて収集されることが予期される(Parkら, Bone Marrow Transplantation (2003) 32:889)。

10

【0210】

B. 患者の前処置レジメン

自家末梢血幹細胞移植(PBSCT)のための前処置レジメンを、エトポシド(VP-16)+シクロホスファミド(CY)+全身放射線照射(TBI)を用いて実施する。簡単に説明すると、処方計画は、単回投与として26時間にわたる1.8g/m²静脈内一定注入(c.i.v)でのエトポシド(VP-16)、続いて3日間の2時間にわたる一日あたり静脈内60mg/kg体重でのシクロホスファミド(CY)、続いて次の3日間の一日あたり300cGyでの全身放射線照射(TBI)からなる。

【0211】

20

用量を計算するため、理想体重または実際の体重のいずれか小さい方を使用する。前述されたように、癌患者の状態、患者の年齢、前治療、ならびに処置が実施される施設のタイプなどの要因は、正確な前処置レジメンを決定するときにすべて考慮される。

【0212】

C. CD33を標的にするCRISPR-Cas9系のプラスミド構築

インサートCas9およびプロマイシン耐性を含むレンチCRISPRv2をAddgene(プラスミド#52961)から得る(Sanjanaら, Nat Methods (2014) (8):783)。単鎖ガイドRNA(sgRNA)CD33ガイド配列をクローニングするため、レンチCRISPRv2をFastDigest BsmBIおよびFastAP(Fermentas)によって37℃、2時間で切断し脱リン酸化する。CD33を標的にするgRNAをcrispr.mit.eduのオンライン最適化設計ツールを用いて設計する。あるいは、gRNAは図12に示す配列を有する(SEQ ID NO:11)。CD33 gRNAオリゴヌクレオチドは、Integrated DNA Technologies(IDT)から得られ、ポリヌクレオチドキナーゼ(Fermentas)を用いて37℃で30分間リン酸化し、95℃で5分間の加熱および1.5℃/分で25℃までの冷却によってアニーリングする。T7リガーゼを使用してオリゴヌクレオチドをアニーリングし、その後アニーリングしたオリゴヌクレオチドをゲル精製したベクター(Qiagen)中に25℃で5分間ライゲートする。得られるプラスミドを次いでエンドトキシンフリーmidiprepキット(Qiagen)を用いて増幅できる(Sanjanaら, Nat Methods (2014) (8):783)。

30

40

【0213】

あるいは、2つのベクター系を既に報告されているプロトコル(Mandalら, Cell Stem Cell (2014) 15(5):643)に従って使用し得る(gRNAおよびCasが別々のベクターから発現される場合)。ここで、Mandalらは非ウイルスベクターから発現されるCRISPR-Cas系を用いてヒト造血幹細胞中の遺伝子の効率的な除去を達成した。

【0214】

簡単に説明すると、C端SV40核局在化シグナルを含むヒトコドン最適化Cas9遺伝子を、2A-GFPを有するCAG発現プラスミドにクローニングする。対象のCD33

50

配列を切断するように Cas 9 を指示するため、ガイド RNA (gRNA (SEQ ID NO: 11)) はヒト U6 ポリメラーゼ III プロモーターを含むプラスミドから別々に発現される。gRNA 配列オリゴヌクレオチドは、Integrated DNA Technologies (IDT) から得られ、アニーリングして、BbsI 制限部位を用いてプラスミド中に導入する。ヒト U6 プロモーターでの「G」塩基の転写開始の必要条件、ならびに PAM (プロトスペーサー隣接モチーフ) の必要条件のため、ゲノム標的は GN20GGヌクレオチド配列を含む。

【0215】

患者に CD33 枯渇造血幹細胞 HSC を注入することに加えて、患者が続いて CD45RA 枯渇 HSC を注入されるプロトコルが進められる。あるいは、本発明者らは CRISPR-Cas 9 系を用いて CD34+CD33-CD45RA-細胞を作製して、CD33 および CD45RA 遺伝子の両方を同時に低減する。CD45RA および CD33 のための例示的なガイド RNA 配列を表 4 および 5 に示す。

【0216】

D. CD34+CD33-細胞を作製するための CD34+細胞 HSC のトランスフェクション

新たに分離した末梢血由来 CD34+細胞 (ステップ 4 より) を、細胞培養グレードの Stem Cell Factor (SCF) 300 ng/mL、FLT3-L 300 ng/mL、トロンボポイエチン (TPO) 100 ng/mL、および IL-3 60 ng/mL の存在下で、血清フリー CellGro SCGM 培地中で細胞 1×10^6 個/mL で接種する。前刺激の 24 時間後、CD34+HSC を Cas 9 および CD33 gRNA を含むレンチ CRISPRv2 で、Amaxa Human CD34 cell Nucleofector kit (U-008) (#VPA-1003) を用いてトランスフェクションする (Mandalra, Cell Stem Cell (2014) 15 (5): 643)。トランスフェクションの 24~48 時間後に、CD34+CD33-細胞を 1.2 μ g/mL プロマイシンによって選択する。プロマイシン選択後に、CD34+CD33-細胞をプロマイシンフリー培地中で 2、3 日間維持する。

【0217】

E. 患者への CD34+CD33-細胞の再注入

CRISPR-Cas 9-CD33 で体外でトランスフェクションされた CD34+細胞 (CD34+CD33-細胞) を直ちに、標準的な血液投与セットをフィルターなしで用いて、ヒックマンカテーテルを通して再注入する (Hacein-Bey Abina ら, JAMA (2015) 313 (15): 1550)。

【0218】

一般的に、上記概要の治療プロトコルを受けた患者は、循環性芽球および血球減少の再出現についてモニタリングされる。さらに、特定患者における AML の潜在的なメカニズムに応じて、治療の達成は、情報をもたらす分子または細胞遺伝学的マーカーの再出現、あるいは情報をもたらすフローサイトメトリーパターンを試験することによってモニタリングされる。例えば、フィラデルフィア染色体陽性 AML における BCR-ABL シグナルの再出現は、BCR (染色体 22 上) および ABL (染色体 9 上) に対するプローブによる蛍光インシットハイブリダイゼーション (FISH) を用いて検出される。

【0219】

CRISPR-Cas 9 系を介した CD33 除去の達成を評価するため、末梢血 CD34+細胞を患者から分離して (移植後)、CD33 発現を、例えば、フローサイトメトリー、ウェスタンブロッティング、または免疫組織化学を用いて評価する。

【0220】

本明細書で説明されるように、本例で報告される HSC T は自家または同種異系のいずれかであってよく、両手段とも適切であり本開示で説明される方法に取り入れることができる。

【0221】

10

20

30

40

50

III. 随意のステップ：毒素に付着されたCD33抗体による患者の継続治療

A. CD33免疫毒素ゲムツズマブオゾガマイシン（GO）による患者の治療

患者を、2週間隔てた2回投与で2時間静脈注入として9mg/m²の抗CD33抗体ゲムツズマブオゾガマイシン（GO）で治療する（Larsonら, Cancer（2005）, 104（7）：1442-52）。GOは、細胞増殖阻害剤カリケアマイシンと共役体化されたCD33に対するヒト化モノクローナル抗体からなる（図8）。

【0222】

あるいは、抗CD33抗体は、ジフテリア毒素、緑膿菌外毒素A（PE）、またはリシン毒素鎖（RTA）などの異なる毒素と共役体され得、作製できる（Wayneら, Blood（2014）123（16）：2470）。同様に、抗CD45RA抗体を毒素にコンジュゲートし、治療処方計画に含み得る。

【0223】

例4：抗CD33キメラ受容体を発現するT細胞およびNK細胞株はCD33を発現する標的細胞の細胞死を誘発する

CD33へのキメラ受容体の結合

CD33を結合するキメラ受容体（例えば、CART1、CART2、CART3）を従来の組換えDNA技術を用いて作製し、pHIV-Zs greenベクター（Addgene, ケンブリッジ, マサチューセッツ州）中に挿入した。キメラ受容体を含むベクターを使用してレンチウイルス粒子を作製し、これを異なる細胞型、例えばT細胞株（例えば、293T細胞）およびNK細胞株（例えば、NK92細胞）を形質導入するために使用した。キメラ受容体の発現をウェスタンブロッティング（図9、パネルA）およびフローサイトメトリー（図9、パネルB）によって検出した。

【0224】

キメラ受容体を発現する細胞を蛍光活性化細胞ソーティング（FACS）によって選択し、CD33を結合するこれらの能力を評価した。簡単に説明すると、キメラ受容体を発現する293T細胞の溶解物を、CD33またはCD33-アロフィコシアニン（APC）共役体と共インキュベーションした。サンプルをタンパク質電気泳動にかけ、ボンソータンパク質染色で染色する（図10、パネルA）か、またはメンブランに移し抗CD33二次抗体によって探査した（図10、パネルB）。どちらの場合も、キメラ受容体とそれらの標的CD33の間で結合する。

【0225】

キメラ受容体を発現するK562細胞も、プローブとしてCD33を用いるフローサイトメトリーによってCD33への結合について評価した（図10、パネルC）。キメラ受容体（CART1、CART2、またはCART3）の発現が陽性である細胞の数およびCD33結合が、空ベクターコントロールを含む細胞と比べて増加し、キメラ受容体がCD33に結合することを示した。

【0226】

キメラ受容体を発現する細胞によって誘発される細胞毒性

キメラ受容体を発現するNK-92細胞を、細胞表面にCD33を提示する標的細胞（例えば、K562細胞はCD33+であるヒト慢性骨髄性白血病株である）の細胞毒性を誘発する能力について機能的に特徴付けした。細胞毒性アッセイを実施するため、エフェクター細胞（NK-92細胞などの免疫細胞）を、キメラ受容体をコードするレンチウイルス粒子で感染させて増殖させた。感染数日後に、キメラ受容体を発現する細胞を、FACS分析を用いて、キメラ受容体コードベクターによってもコードされる蛍光マーカー（例えば、GFP+、またはRed+）を選別することによって選択した。キメラ受容体を発現する選択された細胞を1週間増殖させた。感染14日後に、標的細胞（標的細胞表面系統特異的抗原であるCD33を発現する細胞）をカルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル（CFSE）で染色することおよび標的細胞およびキメラ受容体を発現する細胞の両方を計数することを含む細胞毒性アッセイを実施した。異なる比率の標的細胞とキメラ受容体を発現する細胞を、丸底96ウェルプレート中で4.5時間共インキュベ

10

20

30

40

50

ションし、その後に7-アミノアクチノマイシンD (7-AAD)を加えて非生存細胞を染色した。フローサイトメトリーを実施して、生存および非生存の標的細胞集団を数えた。図11のパネルAおよびBに示すように、キメラ受容体CART1、CART2、またはCART3を発現するNK92細胞は、評価した細胞比率それぞれで、標的K562細胞の相当量の細胞死を誘発した。

【0227】

K562細胞の細胞死がCD33へのキメラ受容体の特異的標的化に依存したことを決定するため、K562細胞をCRISPR/Cas系を用いてCD33を欠くよう遺伝子工学処理した。簡単に説明すると、ヒトコドン最適化Cas9エンドヌクレアーゼおよびCD33のIgC領域の一部を標的にするgRNAをK562細胞で発現させ、CD33欠損K562細胞集団を得た。細胞を増殖させキメラ受容体を発現するNK92細胞と共インキュベーションし、細胞毒性アッセイを前述のように実施した。図12のパネルAに示すように、プールしたCD33欠損K562細胞は、キメラ受容体を発現するNK92細胞と共インキュベーションすることによって細胞死のわずかな低下を示した。しかし、CD33欠損K562細胞の単一クローンを分離して増殖させ、細胞毒性アッセイを実施するために使用した場合、細胞毒性のさらに顕著な低下が認められた(図12、パネルB)。

【0228】

一次T細胞におけるキメラ受容体の発現

一次T細胞集団を、ドナーから得られたPMBCからCD4+、CD8+、またはCD4+/CD8+細胞を陽性によって選択するFACSを用いて分離し、高純度集団を得た(図13、パネルAおよびB)。一次T細胞集団(CD4+、CD8+、またはCD4+/CD8+細胞)のそれぞれを、キメラ受容体(例えば、CART1およびCART8)を含むレンチウイルスベクターで形質導入し、得られたキメラ受容体を発現する一次T細胞を使用して前述のように細胞毒性アッセイを実施した。キメラ受容体を発現するCD4+T細胞集団とK562細胞(1000個の標的K562細胞)の共インキュベーションは、K562細胞の細胞毒性をもたらさなかった(図14、パネルA)。これに反し、キメラ受容体を発現するCD8+またはCD4+/CD8+細胞のいずれか、および1000個の標的K562細胞を用いた細胞毒性アッセイでは、CD8+またはCD4+/CD8+細胞は、K562細胞の細胞死を低い細胞比率で誘発できた(図14、パネルB)。

【0229】

ヒト造血幹細胞の遺伝子工学処理

いくつかのgRNAを、CD33のIgC領域にハイブリダイズするように設計した(例えば、表4、SEQ ID NO:11または28~31を参照)。gRNAのそれぞれはK562細胞中でCas9エンドヌクレアーゼとともに発現された。CD33の発現をフローサイトメトリーで評価した(図15)。Crispr3(SEQ ID NO:28)およびCrispr5(SEQ ID NO:29)について示すように、CD33を発現するコントロール細胞と比べて、CD33標的化CRISPR/Cas系を発現する細胞でCD33の顕著な低下が認められた。

【0230】

CD33欠如造血幹細胞を、増殖、赤血球形成分化、およびコロニー形成を含む、様々な特性についても評価した。簡単に説明すると、CD33欠損造血幹細胞およびコントロール細胞を、ヘミンに細胞を暴露することによって分化するよう誘導し、赤血球前駆体のマーカーであるCD71を、フローサイトメトリーによって異なる時点で評価した(図16、パネルAおよびB)。CD33欠損造血幹細胞は赤血球形成分化を起こし、フローサイトメトリープロファイルはコントロール細胞(CD33+)と類似しているように見えた。細胞をMTTアッセイにも供して、CD33欠損造血幹細胞の代謝活性を測定した。図16のパネルCに示すように、CD33欠損造血幹細胞は、コントロールと同等にふるまった。最後に、増殖および細胞コロニーを形成する細胞の能力を顕微鏡コロニー形成アッセイによって観察した。再度、CD33欠損造血幹細胞は、コントロール細胞と同様の程度にコロニーを形成できた(図18)。これらの結果は、CD33の一部のCRISPR

10

20

30

40

50

／C a s 除去が増殖、分化、またはコロニー形成する細胞の能力に顕著な影響を及ぼさないことを示す。

【0231】

他の実施形態

本明細書で開示される特徴のすべては、任意の組み合わせで併用され得る。本明細書で開示されるそれぞれの特徴は、同一、同等、または類似の目的をもたらす代替えの特徴によって交換され得る。このため、他に明確な記載がない限り、開示されるそれぞれの特徴は、包括的な一連の同等または類似の特徴の例にすぎない。

【0232】

上の記載から、従来技術の当業者は本開示の本質的な特徴を容易に確認することができ、この精神および範囲から逸脱せずに、本開示の様々な変更および改良を実施して、様々な使用および条件にこれを適応することができる。そのため、他の実施形態も本請求内である。

10

【0233】

均等物

いくつかの発明の実施形態が本明細書で説明され例証されており、従来技術の当業者は本明細書で説明される機能を実施する、および／または結果および／または1つ以上の利点を得るために、様々な他の手段および構造を容易に想像するが、このような変更および／または改善のそれぞれは本明細書で説明される発明の実施形態の範囲内であると考えられる。より一般的には、従来技術の当業者は、本明細書で説明されるすべてのパラメータ、寸法、材料、および構成は例示的であることが意味され、実際のパラメータ、寸法、材料、および／または構成は具体的な適用、または本発明の教示が使用される適用に依存することを容易に認識するであろう。従来技術の当業者は、定型的な実験以外を用いて、本明細書で説明される具体的な本発明の実施形態との多くの均等物を認識し、あるいは確認することができる。従って、前述の実施形態は例としてのみ提示され、添付の請求およびこの均等物の範囲内では、本発明の実施形態は具体的に説明されて請求される以外で実施され得る。本開示の発明による実施形態は、本明細書で説明されるそれぞれの個別の特徴、システム、物品、材料、キット、および／または方法に関するものである。さらに、このような特徴、システム、物品、材料、キット、および／または方法の2つ以上の任意の組み合わせは、このような特徴、システム、物品、材料、キット、および／または方法が相互に不整合でない場合、本開示の発明の範囲内に含まれる。

20

30

【0234】

本明細書で定められて使用されるすべての定義は、定められた用語の辞書による定義、参考によって組み込まれている文書における定義、および／または通常の意味を網羅して管理すると理解されるべきである。

【0235】

本明細書で開示されるすべての参考文献、特許、および特許出願は、それぞれが引用される主題に関連して参考によって組み込まれ、いくつかの場合には、文書全体が包含され得る。

【0236】

不定冠詞「1つの(a, an)」は、本明細書および請求で使用されるとき、明確に反する指示がない限り、「少なくとも1つ」を意味すると理解されるべきである。

40

【0237】

フレーズ「および／または」は、本明細書および請求で使用されるとき、このように結合された構成要素の「どちらかまたは両方」、すなわち、ある場合には結合されて存在し、他の場合には分離して存在する構成要素を意味すると理解されるべきである。「および／または」によって示される複数の構成要素は、同一形態、すなわち、このように結合された構成要素の「1つ以上」と考えられるべきである。他の構成要素は、具体的に特定されるこれらの構成要素と関連するまたは無関連であるかにかかわらず、句「および／または」によって具体的に特定される構成要素以外で任意に存在し得る。このため、非限定例と

50

して、「Aおよび／またはB」による意味は、「含む」のような制限のない用語と併せて使用されるとき、一つの実施形態ではAのみ（任意にB以外の構成要素を含む）、別の実施形態ではBのみ（任意にA以外の構成要素を含む）を意味し、さらに別の実施形態ではAおよびBの両方（任意に他の構成要素を含む）、などを意味することができる。

【0238】

本明細書および本請求において使用されるとき、「または」は前述の「および／または」と同じ意味を有すると理解されるべきである。例えば、リストにおける項目を分けるとき、「または」または「および／または」は包含的であると解釈されるべきであり、すなわち、少なくとも1つの包含だが、多数またはリストの構成要素の少なくとも1つ、任意に追加のリスト外の項目も含む。これに反して明確に示される1つだけの項目、「の1つのみ」または「のまさに1つ」、あるいは本請求で使用されるとき「からなる」などは、多数またはリストの構成要素の厳密に1つの構成要素の包含を意味する。一般的に、本明細書で使用される「または」は、「どちらか」、「の1つ」、「の1つのみ」、または「のまさに1つ」のような排他的な用語が先行するとき、排他的な選択肢（すなわち、「1つまたは他の1つだが、両方ではない」）を示すとだけ解釈されるべきである。「基本的にかからなる」は、本請求で使用されるとき、特許法の分野で使用されるその通常の意味を有する。

【0239】

本明細書および本請求で使用されるとき、フレーズ「少なくとも1つ」は、1つ以上の構成要素の1つのリストの参照において、構成要素のリストにおける構成要素のいずれか1つ以上から選択される少なくとも1つの構成要素を意味するが、構成要素のリスト内に具体的に列挙されるそれぞれおよびすべての構成要素の少なくとも1つを必ずしも含まず、構成要素のリストの構成要素の任意の組み合わせを除外しない。この定義は、フレーズ「少なくとも1つ」が意味する構成要素のリスト内で具体的に特定される構成要素以外で構成要素が任意に存在し得ることも可能であり、具体的に特定されるこれらの構成要素と関連するまたは無関連であるかに関わらない。そのため、非限定的な例として、「AおよびBの少なくとも1つ」（または、同義として「AまたはBの少なくとも1つ」、または同義として「Aおよび／またはBの少なくとも1つ」）は、一つの実施形態ではBの存在なしで（任意にB以外の構成要素を含む）、任意に1つを超えて含む少なくとも1つであるA、別の実施形態ではAの存在なしで（任意にA以外の構成要素を含む）、任意に1つを超えて含む少なくとも1つであるB、さらに別の実施形態では、任意に1つを超えて含む少なくとも1つであるA、および任意に1つを超えて含む少なくとも1つであるB（および任意に他の構成要素）、などを意味する。

【0240】

反する明確に指示がない限り、1つを超えるステップまたは行動を含む本明細書において請求されるいずれかの方法において、本方法のステップまたは行動の順序は必ずしも引用される方法のステップまたは行動の順序に限定されないことも理解されるべきである。

10

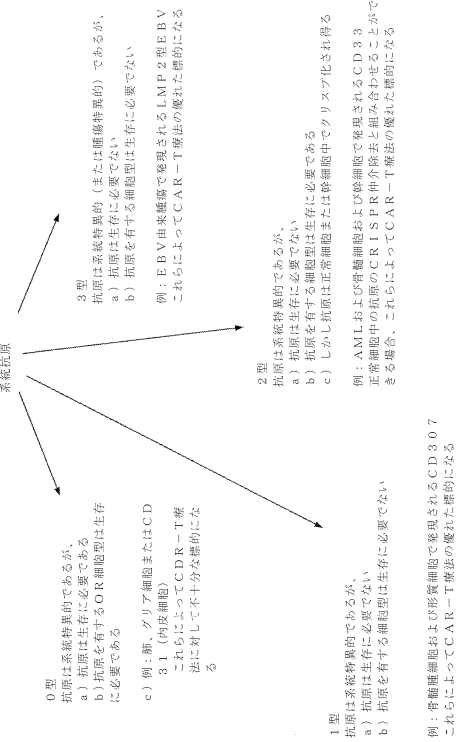
20

30

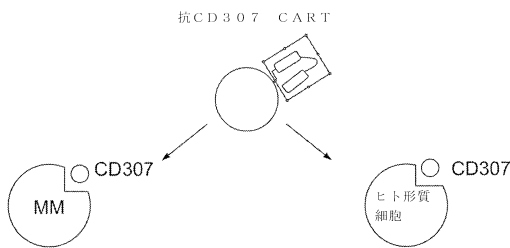
40

50

【図面】
【図 1】



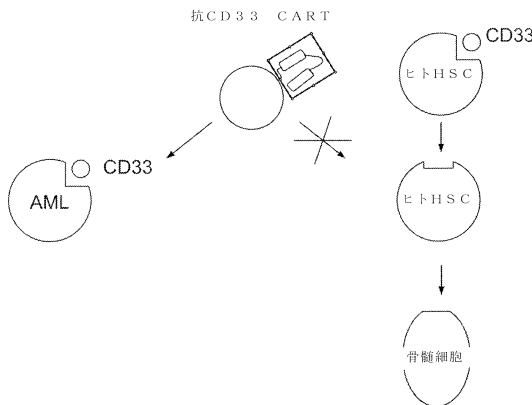
【図 2】



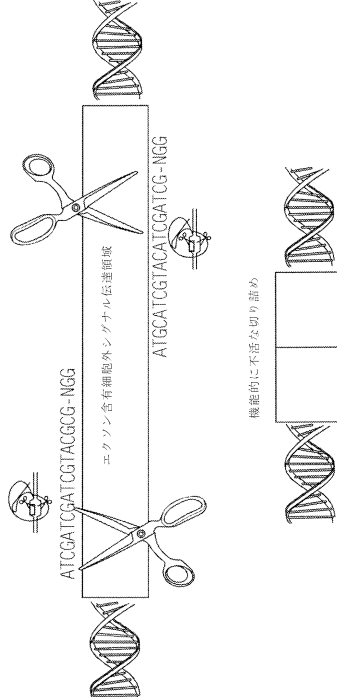
10

20

【図 3】



【図 4】

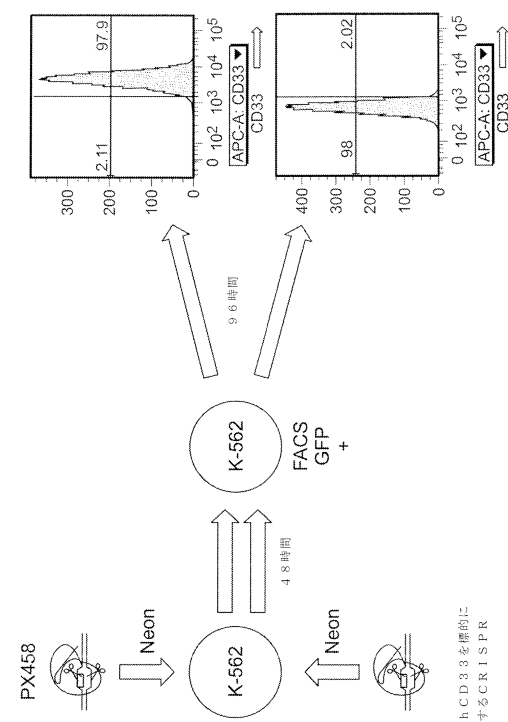


30

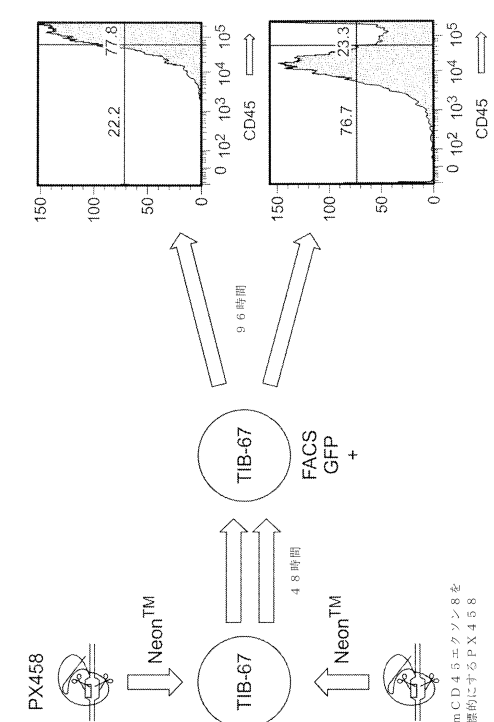
40

50

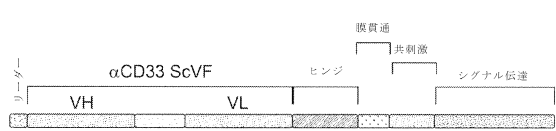
【図 5】



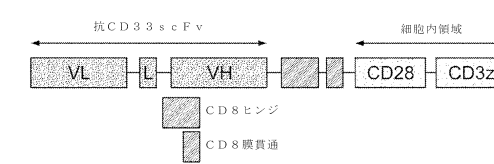
【図 6】



【図 7 A】



【図 7 B】



10

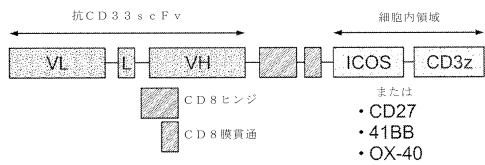
20

30

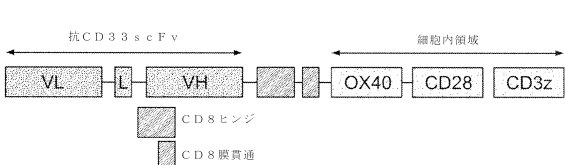
40

50

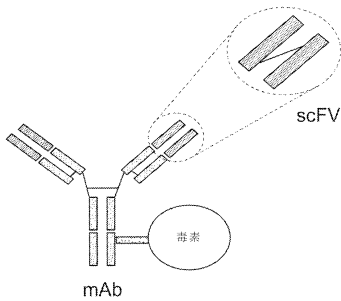
【図 7 C】



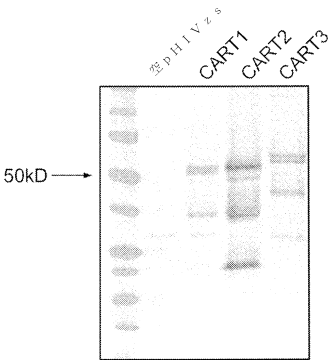
【図 7 D】



【図 8】



【図 9 A】



抗CD3TCR α 抗体で染色
エピトープ：C端CD3 α

構築体	MW kDa
CART1	55.3AAAA
CART2	56.3
CART3	61

10

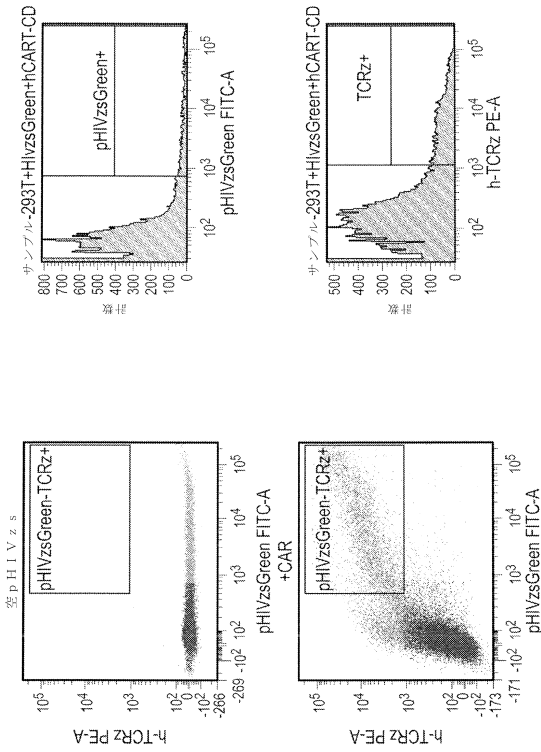
20

30

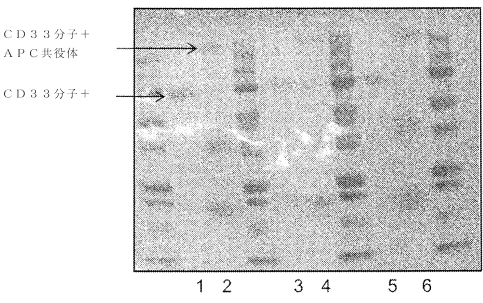
40

50

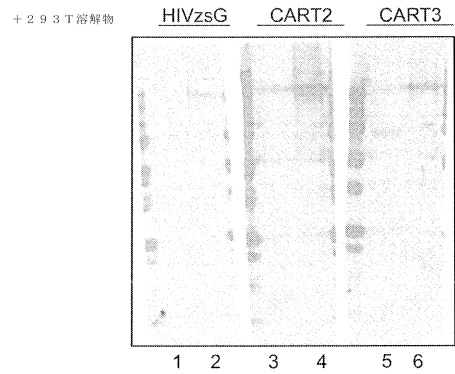
【図 9 B】



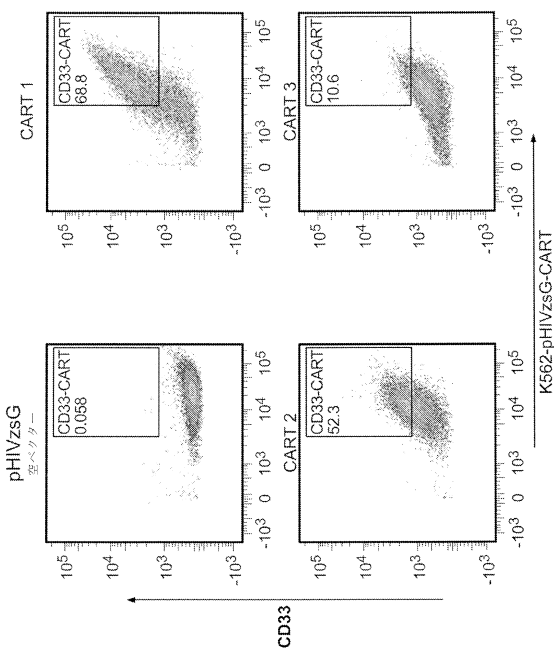
【図 10 A】



【図 10 B】



【図 10 C】



10

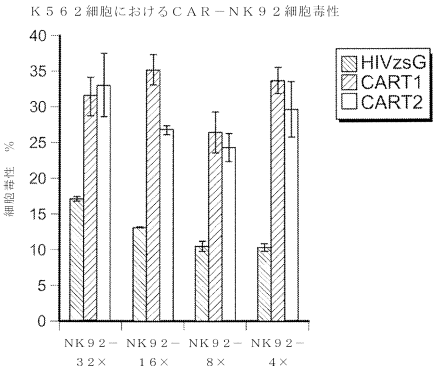
20

30

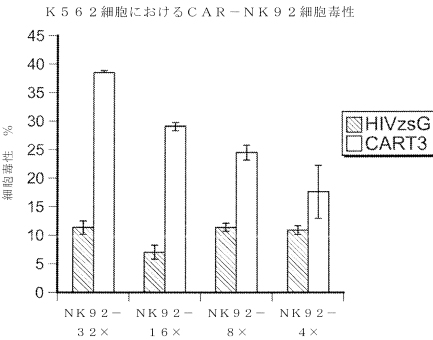
40

50

【図 1 1 A】

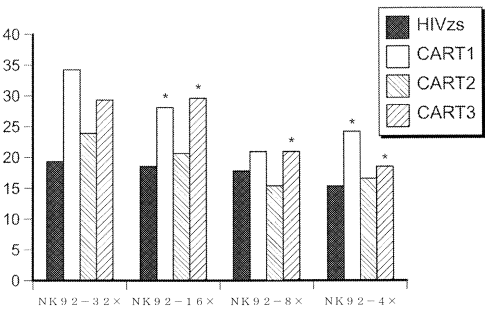


【図 1 1 B】

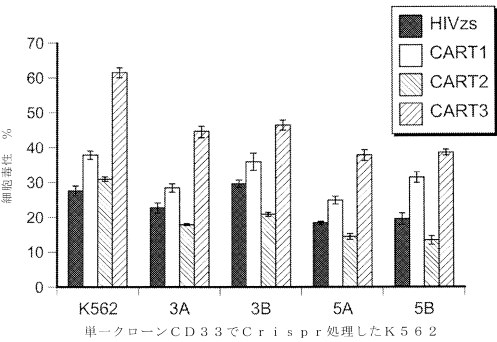


10

【図 1 2 A】



【図 1 2 B】



20

30

40

50

【図 1 3】

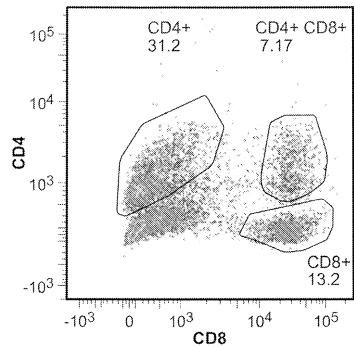


図 1 3 A

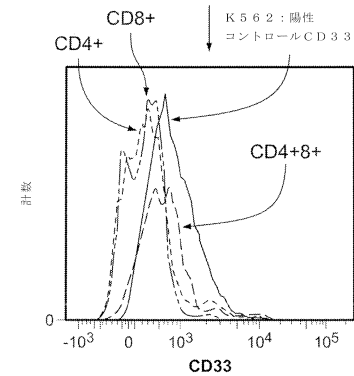
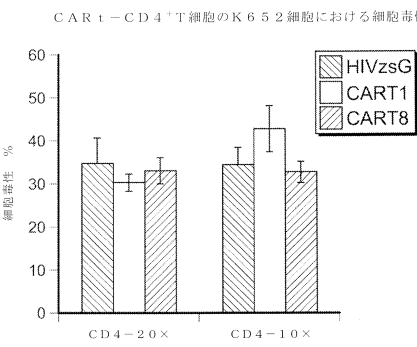


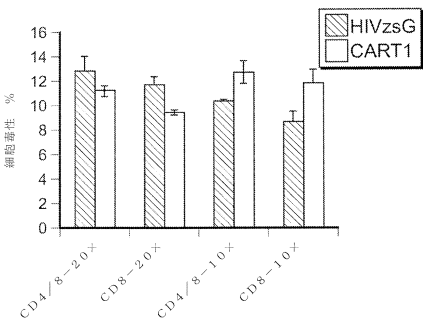
図 1 3 B

【図 1 4 A】

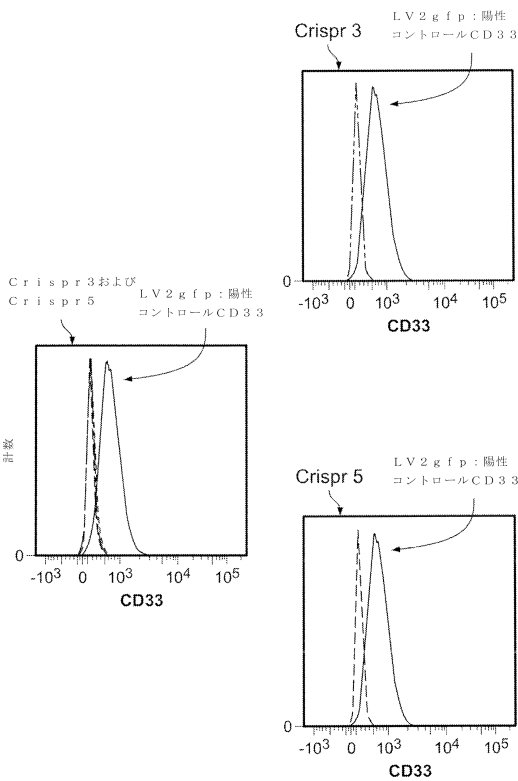


10

【図 1 4 B】



【図 1 5】

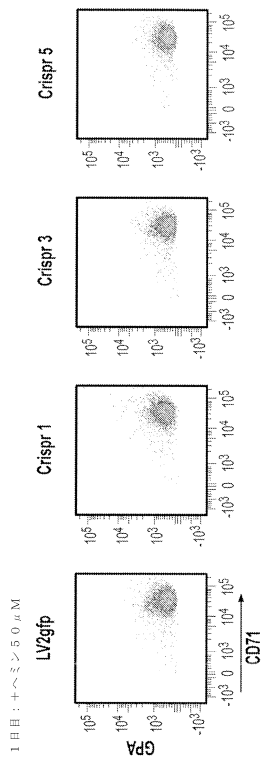


30

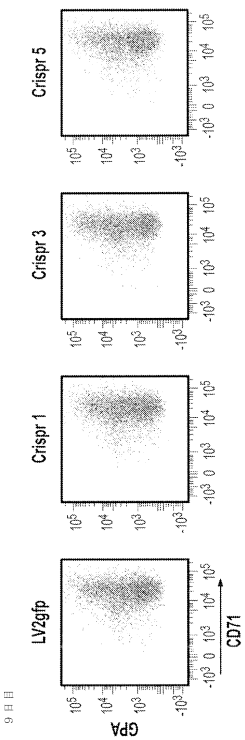
40

50

【図 1 6 A】



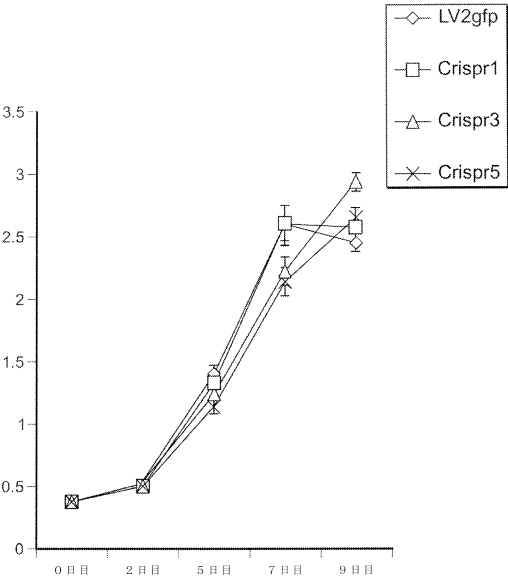
【図 1 6 B】



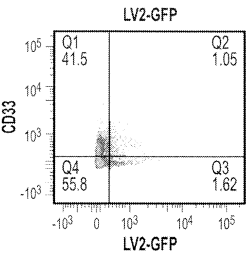
10

20

【図 1 6 C】



【図 1 7 A】

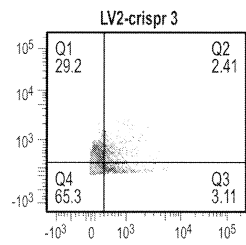


30

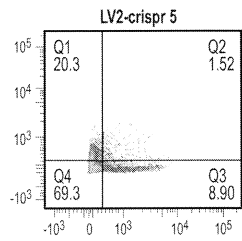
40

50

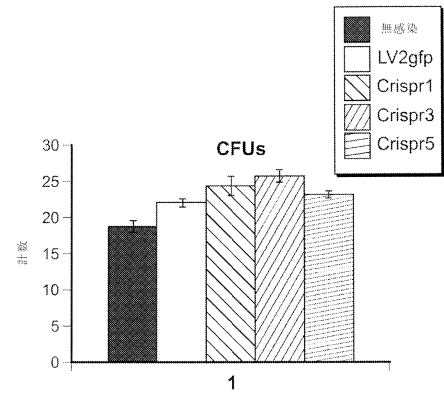
【図 1 7 B】



【図 1 7 C】



【図 1 8】



【配列表】

0007017506000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 1 0
A 6 1 K	35/28	(2015.01)	A 6 1 K	35/28	
A 6 1 K	35/14	(2015.01)	A 6 1 K	35/14	Z
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 K	35/17	(2015.01)	A 6 1 K	35/17	Z

弁理士 重森 一輝

(74)代理人 100137213

弁理士 安藤 健司

(74)代理人 100143823

弁理士 市川 英彦

(74)代理人 100151448

弁理士 青木 孝博

(74)代理人 100183519

弁理士 櫻田 芳恵

(74)代理人 100196483

弁理士 川崎 洋祐

(74)代理人 100203035

弁理士 五味淵 琢也

(74)代理人 100185959

弁理士 今藤 敏和

(74)代理人 100160749

弁理士 飯野 陽一

(74)代理人 100160255

弁理士 市川 祐輔

(74)代理人 100202267

弁理士 森山 正浩

(74)代理人 100146318

弁理士 岩瀬 吉和

(74)代理人 100127812

弁理士 城山 康文

(72)発明者 ムクヘルジー, シドハーサ

アメリカ合衆国, ニューヨーク州 1 0 0 3 2, ニューヨーク, 7 0 1 ウエスト 1 6 8 番 ストリート, コロンビア ユニバーシティ メディカル センター内

(72)発明者 ボロト, フローレンス

アメリカ合衆国, ニューヨーク州 1 0 0 3 2, ニューヨーク, 7 0 1 ウエスト 1 6 8 番 ストリート, コロンビア ユニバーシティ メディカル センター内

(72)発明者 マームッド アリ, アブデュラ

アメリカ合衆国, ニューヨーク州 1 0 0 3 2, ニューヨーク, 7 0 1 ウエスト 1 6 8 番 ストリート, コロンビア ユニバーシティ メディカル センター内

審査官 佐久 敬

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 5 / 0 9 0 2 2 9 (WO, A 1)

国際公開第 9 3 / 0 2 5 2 1 6 (WO, A 1)

Leukemia (2015) Vol.29, pp.1637-1647

Blood Cancer Journal (2014) Vol.4, e218(pp.1-10)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N

A 6 1 K

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)