

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2025-508050

(P2025-508050A)

(43)公表日 令和7年3月21日(2025.3.21)

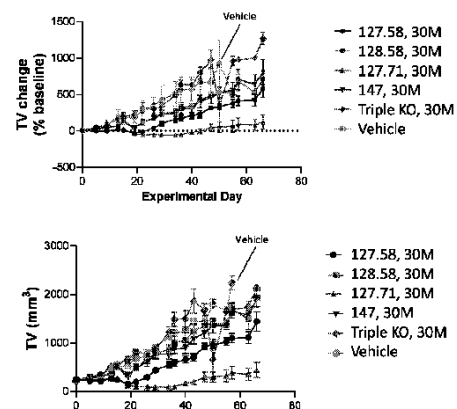
(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 1 0	
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全125頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-553353(P2024-553353)		(71)出願人	520438914	
(86)(22)出願日	令和5年3月6日(2023.3.6)			ンカルタ・インコーポレイテッド	
(85)翻訳文提出日	令和6年10月30日(2024.10.30)			N k a r t a , I n c .	
(86)国際出願番号	PCT/US2023/063795			アメリカ合衆国94080カリフォルニア州サウス・サンフランシスコ、ベテランズ・ブルバード1150	
(87)国際公開番号	WO2023/172879			518192998	
(87)国際公開日	令和5年9月14日(2023.9.14)		(71)出願人	クリスパー・セラピューティクス・アク	
(31)優先権主張番号	63/268,967			チェンゲゼルシャフト	
(32)優先日	令和4年3月7日(2022.3.7)			C R I S P R T h e r a p e u t i c s	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			A G	
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV		(74)代理人	100145403	
		最終頁に続く		弁理士 山尾 憲人	
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 C D 7 0 指向性がん免疫療法のための多重遺伝子編集細胞

(57)【要約】

本明細書に開示される方法および組成物のいくつかの実施形態は、キメラ抗原受容体(CAR)を発現するように操作され、および／または細胞免疫療法の潜在的な副作用を減少するように遺伝子修飾された免疫細胞に関する。いくつかの実施形態は、遺伝子およびそれらに対応するタンパク質の組み合わせの発現を減少させるか、実質的に減少させるか、または排除するための、ナチュラルキラー(NK)細胞などの免疫細胞に対する遺伝子修飾に関する。いくつかの実施形態では、1つの編集は、そうでなければCARによって自己標的化される原因となる免疫細胞によるマーカーの発現を減少させることであり、少なくとも2つの追加の遺伝子は、結果として生じる細胞の細胞傷害性および／または持続性を増大させるように編集する。いくつかの実施形態では、CARはCD70を標的とし、一部の実施形態では腎細胞がん腫の免疫療法に使用される。

Figure 46A



10

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

がん免疫療法のための遺伝子操作されたナチュラルキラー（NK）細胞集団であって、腫瘍結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含むキメラ抗原受容体（CAR）を発現するように操作された複数のNK細胞を含み、

腫瘍結合ドメインはCD70を標的とし、

腫瘍結合ドメインは、配列番号52、47、48、49、50、51、53、または54のうちの1つ以上と少なくとも約90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むscFvを含み、

NK細胞は、CD70タンパク質をコードする遺伝子の標的配列内にゲノム破壊を含み、標的配列は、配列番号180または177～179のうちのいずれか1つを含み、

NK細胞は、サイトカイン誘導性SH2含有（CIS）タンパク質をコードする遺伝子の標的配列内にゲノム破壊を含み、標的配列は配列番号191または186～190のうちのいずれか1つを含み、

NK細胞は、タンパク質をコードする遺伝子の標的配列内に少なくとも1つの追加のゲノム破壊を含み、ならびに

前記ゲノム破壊を含む遺伝子操作されたNK細胞は、前記ゲノム破壊を含まないNK細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す、遺伝子操作されたNK細胞集団。

【請求項 2】

追加のゲノム破壊が、Casitas B系列リンパ腫-b（Cbl-b）タンパク質をコードする遺伝子の標的配列でのゲノム破壊を含み、標的配列は、配列番号195、192、193、または194のうちのいずれか1つを含む、請求項1に記載の遺伝子操作されたNK細胞集団。

【請求項 3】

CD70タンパク質をコードする遺伝子の標的配列、CISタンパク質をコードする遺伝子の標的配列、および／またはCbl-bタンパク質をコードする遺伝子の標的配列内のゲノム破壊が、エンドヌクレアーゼ媒介インデルを含む、請求項2に記載の遺伝子操作されたNK細胞集団。

【請求項 4】

NK細胞が培養において拡大されたものである、請求項1に記載の遺伝子操作されたNK細胞集団。

【請求項 5】

複数のNK細胞が、配列番号177～195のうちの少なくとも3つを含む複数のタンパク質をコードする遺伝子標的配列内にゲノム破壊を含む、請求項1に記載の遺伝子操作されたNK細胞集団。

【請求項 6】

タンパク質をコードする遺伝子標的配列内のゲノム破壊の各々が、エンドヌクレアーゼ媒介インデルを含む、請求項5に記載の遺伝子操作されたNK細胞集団。

【請求項 7】

腫瘍結合ドメインが、重鎖可変領域（VH）および軽鎖可変領域（VL）を含み、VHがCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含み、VLがCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含み、

CDR-H1が、配列番号205、102、103、および110から選択される1つ以上の配列と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含み；

CDR-H2が、配列番号206、104、105、106、111、および225から選択される1つ以上の配列と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含み；

CDR-H3が、配列番号207、107、108、109、112、および226から選択される1つ以上の配列と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含み；

CDR-L1が、配列番号209、131、132、133、140、および204から

10

20

30

40

50

選択される1つ以上の配列と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含み；
CDR-L2が、配列番号210、134、135、136、141、および223から
選択される1つ以上の配列と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含み；および
CDR-L3が、配列番号211、137、138、139、142、および224から
選択される1つ以上の配列と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含む、請求項
1に記載の遺伝子操作されたNK細胞集団。

【請求項8】

腫瘍結合ドメインがVHを含み、VHが配列番号153、151、152および157
のアミノ酸配列のうちの1つ以上と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列
を含む、請求項1に記載の遺伝子操作されたNK細胞集団。

10

【請求項9】

腫瘍結合ドメインがVHを含み、VHが配列番号145、143、144、146およ
び149のポリヌクレオチドのうちの1つ以上と少なくとも95%の配列同一性を有する
配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる、請求項1に記載の遺伝子操作された
NK細胞集団。

【請求項10】

腫瘍結合ドメインがVLを含み、VLが配列番号156、154、155、および15
8のアミノ酸配列のうちの1つ以上と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配
列を含む、請求項1に記載の遺伝子操作されたNK細胞集団。

【請求項11】

腫瘍結合ドメインがVLを含み、VLが配列番号148、146、147、および15
0のポリヌクレオチドのうちの1つ以上と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を
含むポリヌクレオチドによってコードされる、請求項1に記載の遺伝子操作されたNK細胞
集団。

20

【請求項12】

腫瘍結合ドメインがVLおよびVHを含み、VLが配列番号156のアミノ酸配列と少
なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、VHが配列番号153のアミ
ノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1に記載
の遺伝子操作されたNK細胞集団。

【請求項13】

腫瘍結合ドメインがVLおよびVHを含み、VLが配列番号156のアミノ酸配列を含
み、VHが配列番号153のアミノ酸配列を含む、請求項12に記載の遺伝子操作された
NK細胞集団。

30

【請求項14】

腫瘍結合ドメインがVLおよびVHを含み、VLが配列番号155のアミノ酸配列と少
なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、VHが配列番号152のアミ
ノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1～6の
いずれか一項に記載の遺伝子操作されたNK細胞集団。

【請求項15】

腫瘍結合ドメインがVLおよびVHを含み、VLが配列番号157のアミノ酸配列と少
なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、VHが配列番号158のアミ
ノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1～6の
いずれか一項に記載の遺伝子操作されたNK細胞集団。

40

【請求項16】

腫瘍結合ドメインがscFvを含み、scFvが配列番号52、47～49、51、お
よび53～54のうちの1つ以上と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列
を含む、請求項1に記載の遺伝子操作されたNK細胞集団。

【請求項17】

腫瘍結合ドメインがscFvを含み、scFvが、配列番号50の配列を含むリンカー
によって連結されたVHおよびVLを含む、請求項1に記載の遺伝子操作されたNK細胞

50

集団。

【請求項 18】

腫瘍結合ドメインが、配列番号 52、51、および 53 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む s c F v を含む、請求項 1 に記載の遺伝子操作された NK 細胞集団。

【請求項 19】

腫瘍結合ドメインが一本鎖可変断片 (s c F v) を含み、s c F v が、配列番号 35、30～32、34、36 および 37 のポリヌクレオチドのうちの 1 つ以上と少なくとも 95 % の配列同一性を有する配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる、請求項 1 に記載の遺伝子操作された NK 細胞集団。

【請求項 20】

遺伝子操作されたナチュラルキラー (NK) 細胞集団であって、腫瘍結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含むキメラ抗原受容体 (CAR) を発現するように操作された複数の NK 細胞を含み、

腫瘍結合ドメインは CD70 を標的とし、

NK 細胞は、CD70 タンパク質をコードする遺伝子の標的配列内にゲノム破壊を含み、標的配列は配列番号 180 を含み、

NK 細胞は、サイトカイン誘導性 SH2 含有 (CIS) タンパク質をコードする遺伝子の標的配列内にゲノム破壊を含み、標的配列は配列番号 191 を含み、ならびに

NK 細胞は、CBLB タンパク質をコードする遺伝子の標的配列内にゲノム破壊を含み、標的配列は配列番号 195 を含む、遺伝子操作された NK 細胞集団。

【請求項 21】

腫瘍結合ドメインが、

それぞれ配列番号 205、206、および 207 の配列を含む CDR-H1、CDR-H2、および CDR-H3 を含む重鎖可変領域 (VH)；

それぞれ配列番号 209、210、および 211 の配列を含む CDR-L1、CDR-L2、および CDR-L3 を含む軽鎖可変領域 (VL)；ならびに

VH と VL の間に配列番号 50 の配列を含むリンカーを含む s c F v を含む、請求項 20 に記載の遺伝子操作された NK 細胞集団。

【請求項 22】

細胞傷害性シグナル伝達複合体が、OX40 サブドメインおよび CD3 ゼータサブドメインを含む、請求項 1～21 のいずれか一項に記載の遺伝子操作された NK 細胞集団。

【請求項 23】

OX40 サブドメインが配列番号 6 のアミノ酸配列を含む、請求項 22 に記載の遺伝子操作された NK 細胞集団。

【請求項 24】

OX40 サブドメインが、配列番号 5 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する配列によってコードされる、請求項 22 に記載の遺伝子操作された NK 細胞集団。

【請求項 25】

CD3 ゼータサブドメインが、配列番号 8 のアミノ酸配列を含む、請求項 22 に記載の遺伝子操作された NK 細胞集団。

【請求項 26】

CD3 ゼータサブドメインが、配列番号 7 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する配列によってコードされる、請求項 22 に記載の遺伝子操作された NK 細胞集団。

【請求項 27】

NK 細胞が、膜結合 IL-15 (mbIL15) を発現するように操作される、請求項 1～26 のいずれか一項に記載の遺伝子操作された NK 細胞集団。

【請求項 28】

mbIL15 が、CAR をコードするポリヌクレオチド上にバイシストロン性にコードされる、請求項 27 に記載の遺伝子操作された NK 細胞集団。

【請求項 29】

10

20

30

40

50

mbIL15が、配列番号213のアミノ酸配列を含む、請求項27または28に記載の遺伝子操作されたNK細胞集団。

【請求項30】

mbIL15が、配列番号27と少なくとも95%の配列同一性を有する配列によってコードされる、請求項27～29のいずれか一項に記載の遺伝子操作されたNK細胞集団。

【請求項31】

CARおよびmbIL15をコードするポリヌクレオチドが、配列番号38～46のポリヌクレオチドのうちの1つ以上と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含む、請求項27～30のいずれか一項に記載の遺伝子操作されたNK細胞集団。

【請求項32】

CARが、配列番号214～222のアミノ酸配列のうちの1つ以上と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1～31のいずれか一項に記載の遺伝子操作されたNK細胞集団。

【請求項33】

操作されたNK細胞が、CD70、CISH、およびCBLBで編集される、請求項1～32のいずれか一項に記載の遺伝子操作されたNK細胞集団。

【請求項34】

NK細胞が、配列番号180を含むCD70タンパク質遺伝子標的配列内にゲノム破壊を含み、

NK細胞が、配列番号191を含むCISタンパク質遺伝子標的配列内にゲノム破壊を含み、および

NK細胞が、配列番号195を含むCBLBタンパク質遺伝子標的配列内にゲノム破壊を含む、請求項1～13または16～19のいずれか一項に記載の遺伝子操作されたNK細胞集団。

【請求項35】

遺伝子操作されたNK細胞が、CD70、CISH、CBLB、および追加の標的遺伝子で編集される、請求項1～34のいずれか一項に記載の遺伝子操作されたNK細胞集団。

【請求項36】

CD70の発現が、CD70に関して編集されていないNK細胞と比較して実質的に減少し、CISの発現が、CISHに関して編集されていないNK細胞と比較して実質的に減少し、CBLBの発現が、CBLBに関して編集されていないNK細胞と比較して実質的に減少する、請求項34に記載の遺伝子操作されたNK細胞集団。

【請求項37】

NK細胞が、検出可能なレベルのCD70、CIS、またはCBLBタンパク質を発現しない、請求項34に記載の遺伝子操作されたNK細胞集団。

【請求項38】

ゲノム破壊を導入する遺伝子編集が、CRISPR-Casシステムを用いて行われる、請求項1～37のいずれか一項に記載の遺伝子操作されたNK細胞集団。

【請求項39】

CRISPR-Casシステムが、Cas9、Csn2、Cas4、Cpf1、C2c1、C2c3、Cas13a、Cas13b、Cas13c、CasX、CasY、およびそれらの組み合わせから選択されるCasを含む、請求項38に記載の遺伝子操作されたNK細胞集団。

【請求項40】

CasがCas9である、請求項38または39に記載の遺伝子操作されたNK細胞集団。

【請求項41】

腫瘍結合ドメインによって標的化されるCD70が固形腫瘍によって発現される、請求

10

20

30

40

50

項 1 ～ 4 0 のいずれか一項に記載の遺伝子操作された N K 細胞集団。

【請求項 4 2】

がん免疫療法のための遺伝子操作されたナチュラルキラー（N K）細胞集団であって、培養において拡大させた複数の N K 細胞を含み、

複数の N K 細胞は、腫瘍結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含むキメラ抗原受容体（C A R）を発現するように操作され、

腫瘍結合ドメインは C D 7 0 を標的とし、

N K 細胞は、配列番号 1 7 7 ～ 1 8 0 のいずれか 1 つを含む C D 7 0 タンパク質遺伝子標的配列内にゲノム破壊を含み、前記ゲノム破壊はエンドヌクレアーゼ媒介インデルを含み、

N K 細胞は、配列番号 1 8 6 ～ 1 9 1 のいずれか 1 つを含むサイトカイン誘導性 S H 2 含有タンパク質遺伝子標的配列内にゲノム破壊を含み、

N K 細胞は、遺伝子標的配列内に少なくとも 1 つの追加のゲノム破壊を含み、ならびに前記ゲノム破壊を含む遺伝子操作された N K 細胞は、前記ゲノム破壊を含まない N K 細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの 1 つ以上を示す、遺伝子操作された N K 細胞集団。

【請求項 4 3】

がん免疫療法のための遺伝子操作されたナチュラルキラー（N K）細胞集団であって、培養において拡大させた複数の N K 細胞を含み、

複数の N K 細胞は、腫瘍結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含むキメラ抗原受容体（C A R）を発現するように操作され、

腫瘍結合ドメインは C D 7 0 を標的とし、

N K 細胞は、培養において拡大させた編集されていない N K 細胞と比較して、C D 7 0 の発現レベルが減少するように遺伝子編集され、減少した C D 7 0 発現は、内因性 C D 7 0 遺伝子におけるゲノム破壊の導入を介して操作されていて、

N K 細胞は、編集されていない N K 細胞と比較して、C I S H 遺伝子によってコードされるサイトカイン誘導性 S H 2 含有（C I S）タンパク質の発現レベルが減少するように遺伝子編集され、減少した C I S 発現は、C I S H 遺伝子におけるゲノム破壊の導入を介して操作されていて、

遺伝子操作された N K 細胞は、天然レベルの C I S を発現する N K 細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの 1 つ以上を示し、ならびに

N K 細胞は、2 つ以上の追加の遺伝子においてゲノム破壊を導入して、前記遺伝子において編集されていない N K 細胞と比較して、前記 2 つ以上の追加の遺伝子によってコードされるタンパク質の発現を減少させるように遺伝子編集されている、遺伝子操作された N K 細胞集団。

【請求項 4 4】

対象におけるがんを処置する方法であって、請求項 1 ～ 4 3 のいずれか一項に記載の遺伝子操作された N K 細胞集団を対象に投与することを含む方法。

【請求項 4 5】

対象におけるがんを処置する方法であって、

対象に、遺伝子操作された N K 細胞集団を投与することを含み、

複数の N K 細胞は、腫瘍結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含むキメラ抗原受容体（C A R）を発現するように操作され、

腫瘍結合ドメインは C D 7 0 を標的とし、

N K 細胞は、配列番号 1 8 0 を含む C D 7 0 タンパク質遺伝子標的配列内にゲノム破壊を含み、

N K 細胞は、配列番号 1 9 1 を含むサイトカイン誘導性 S H 2 含有（C I S）タンパク質遺伝子標的配列内にゲノム破壊を含み、ならびに

N K 細胞は、配列番号 1 9 5 を含む C B L B タンパク質遺伝子標的配列内にゲノム破壊

10

20

30

40

50

を含む方法。

【請求項 4 6】

腫瘍結合ドメインが、

それぞれ配列番号 205、206、および 207 の配列を含む CDR-H1、CDR-H2、および CDR-H3 を含む重鎖可変領域 (VH)；

それぞれ配列番号 209、210、および 211 の配列を含む CDR-L1、CDR-L2、および CDR-L3 を含む軽鎖可変領域 (VL)；ならびに

VH と VL の間に配列番号 50 の配列を含むリンカーを含む scFv を含む、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 4 7】

がんが固形腫瘍を含む、請求項 44～46 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 8】

がんが腎細胞がん腫であるか、または腎細胞がん腫からの転移である、請求項 44～47 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 9】

がんが CD70 発現がんである、請求項 44～48 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 0】

がんの処置における、請求項 1～43 のいずれか一項に記載の遺伝子操作された NK 細胞集団の使用。

【請求項 5 1】

がんを処置するための薬剤の製造における、請求項 1～43 のいずれか一項に記載の遺伝子操作された NK 細胞集団の使用。

【請求項 5 2】

対象におけるがんを処置する方法であって、

対象に、培養において拡大させた複数の NK 細胞を含む、遺伝子操作された NK 細胞集団を投与することを含み、

複数の NK 細胞は、腫瘍結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含むキメラ抗原受容体 (CAR) を発現するように操作され、

腫瘍結合ドメインは CD70 を標的とし、

腫瘍結合ドメインは、配列番号 52、47、48、49、51、53 または 54 のうちの 1 つ以上と少なくとも約 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む scFv を含み、

NK 細胞は、配列番号 180 または 177～179 のうちのいずれか 1 つを含む CD70 タンパク質遺伝子標的配列内にゲノム破壊を含み、

NK 細胞は、配列番号 191 または 186～190 のうちのいずれか 1 つを含むサイトカイン誘導性 SH2 含有 (CIS) タンパク質遺伝子標的配列内にゲノム破壊を含み、ならびに

NK 細胞は、遺伝子標的配列内に少なくとも 1 つの追加のゲノム破壊を含み、

前記ゲノム破壊を含む遺伝子操作された NK 細胞は、前記ゲノム破壊を含まない NK 細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの 1 つ以上を示す、方法。

【請求項 5 3】

CD70 タンパク質遺伝子標的配列でのゲノム破壊が、エンドヌクレアーゼ媒介インデルを含む、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 5 4】

NK 細胞が、編集されていない NK 細胞と比較して、CBLB 遺伝子によってコードされる、減少したレベルの CBLB タンパク質を発現するようにさらに遺伝子編集される、請求項 52 または 53 に記載の方法。

【請求項 5 5】

腫瘍結合ドメインが重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、重鎖可変領域が CDR-

10

20

30

40

50

H 1、C D R－H 2、およびC D R－H 3を含み、軽鎖可変領域がC D R－L 1、C D R－L 2、およびC D R－L 3を含み、

C D R－H 1が、配列番号205、102、103、および110から選択される1つ以上の配列と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含み；

C D R－H 2が、配列番号206、104、105、106、111、および225から選択される1つ以上の配列と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含み；

C D R－H 3が、配列番号207、107、108、109、112、および226から選択される1つ以上の配列と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含み；

C D R－L 1が、配列番号209、131、132、133、140、および204から選択される1つ以上の配列と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含み；

C D R－L 2が、配列番号210、134、135、136、141、および223から選択される1つ以上の配列と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含み；ならびに

C D R－L 3が、配列番号211、137、138、139、142、および224から選択される1つ以上の配列と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含む、請求項52～54のいずれか一項に記載の方法。

【請求項56】

腫瘍結合ドメインがV Hを含み、V Hが配列番号151～153および157のアミノ酸配列のうちの1つ以上と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、腫瘍結合ドメインがV Lを含み、V Lが配列番号154～156および158のアミノ酸配列のうちの1つ以上と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項52～55のいずれか一項に記載の方法。

【請求項57】

腫瘍結合ドメインがV LおよびV Hを含み、V Lが配列番号156のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、V Hが配列番号153のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項52～55のいずれか一項に記載の方法。

【請求項58】

腫瘍結合ドメインがV LおよびV Hを含み、V Lが配列番号155のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、V Hが配列番号152のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項52～55のいずれか一項に記載の方法。

【請求項59】

腫瘍結合ドメインがV LおよびV Hを含み、V Lが配列番号157のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、V Hが配列番号158のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項52～55のいずれか一項に記載の方法。

【請求項60】

腫瘍結合ドメインがs c F vを含み、s c F vが配列番号52、47～49、51、または53～54のうちの1つ以上と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項52～59のいずれか一項に記載の方法。

【請求項61】

細胞傷害性シグナル伝達複合体が、O X 40サブドメインおよびC D 3ゼータサブドメインを含む、請求項52～60のいずれか一項に記載の方法。

【請求項62】

O X 40サブドメインが配列番号6の配列を含み、C D 3ゼータサブドメインが配列番号8の配列を含む、請求項61に記載の方法。

【請求項63】

O X 40サブドメインが配列番号5と少なくとも95%の配列同一性を有する配列によってコードされ、C D 3ゼータサブドメインが配列番号7と少なくとも95%の配列同一

10

20

30

40

50

性を有する配列によってコードされる、請求項 6 1 または 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 4】

NK細胞が、膜結合 IL-15 (mb IL 15) を発現するように操作される、請求項 5 2 ~ 6 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 5】

mb IL 15 が、CAR をコードするポリヌクレオチド上にバイシストロン性にコードされる、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

CAR および mb IL 15 をコードするポリヌクレオチドが、配列番号 3 8 ~ 4 6 のポリヌクレオチドのうちの 1 つ以上と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 7】

mb IL 15 が配列番号 2 1 3 のアミノ酸配列を含む、請求項 6 4 ~ 6 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 8】

mb IL 15 が、配列番号 2 7 と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する配列によってコードされる、請求項 6 4 ~ 6 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 9】

CAR が、配列番号 2 1 8、2 1 4 ~ 2 1 7、または 2 1 9 ~ 2 2 2 のアミノ酸配列のうちの 1 つ以上と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 5 2 ~ 6 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 0】

遺伝子編集が CRISPR-Cas システムを用いて行われ、Cas が Cas 9 酵素を含む、請求項 5 2 ~ 6 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 1】

抗 CD 7 0 キメラ抗原受容体 (CAR) であって、CAR が、抗 CD 7 0 結合ドメイン、OX 4 0 ドメイン、および CD 3 ゼータドメインを含み、

抗 CD 7 0 CAR は、配列番号 2 1 8、2 1 4 ~ 2 1 7、または 2 1 9 ~ 2 2 2 のアミノ酸配列のうちの 1 つ以上と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列、または標的細胞上の CD 7 0 への結合時に細胞傷害性シグナルを生成することができるその一部を含む抗 CD 7 0 CAR。

【請求項 7 2】

抗 CD 7 0 結合ドメインが、配列番号 5 2、4 7 ~ 4 9、5 1、および 5 3 ~ 5 4 から選択される任意の配列と少なくとも 9 5 %、9 9 %、または 1 0 0 % の配列同一性を有する scFv を含む、請求項 7 1 に記載の抗 CD 7 0 CAR。

【請求項 7 3】

請求項 7 1 または 7 2 に記載の抗 CD 7 0 CAR を含む細胞。

【請求項 7 4】

細胞が免疫細胞である、請求項 7 3 に記載の細胞。

【請求項 7 5】

細胞が NK 細胞である、請求項 7 3 または 7 4 に記載の細胞。

【請求項 7 6】

細胞が、配列番号 1 5 9 ~ 2 0 1 から選択される少なくとも 3 つのタンパク質をコードする遺伝子標的配列内に少なくとも 3 つのゲノム破壊を含む、請求項 7 3 ~ 7 5 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 7 7】

細胞が、配列番号 1 8 0、1 9 1、および 1 9 5 のタンパク質をコードする遺伝子標的配列内にゲノム破壊を含む、請求項 7 3 ~ 7 6 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 7 8】

請求項 7 1 もしくは 7 2 に記載の CAR、または請求項 7 3 ~ 7 7 のいずれか一項に記

10

20

30

40

50

載の細胞を対象に投与することを含む、対象におけるがんを処置する方法。

【請求項 7 9】

がんを処置するための、請求項 7 1 もしくは 7 2 に記載の抗 C D 7 0 C A R、または請求項 7 3 ～ 7 7 のいずれか一項に記載の細胞の使用。

【請求項 8 0】

がんを処置するための薬剤の製造における、請求項 7 1 もしくは 7 2 に記載の抗 C D 7 0 C A R、または請求項 7 3 ～ 7 6 のいずれか一項に記載の細胞の使用。

【請求項 8 1】

がんが C D 7 0 発現がんである、請求項 7 9 または請求項 8 0 に記載の使用。

【請求項 8 2】

がんが固形腫瘍を含む、請求項 7 9 または請求項 8 0 に記載の使用。

【請求項 8 3】

遺伝子操作された免疫細胞集団を生成する方法であって、
エンドヌクレアーゼと少なくとも 1 つの固有の g R N A を免疫細胞に導入して、少なくとも 1 つの遺伝子標的配列内にゲノム破壊を誘導すること、

エンドヌクレアーゼと少なくとも 1 つの追加の固有の g R N A を免疫細胞に導入して、追加の遺伝子標的配列内に追加のゲノム破壊を誘導すること、および

C D 7 0 を標的とする C A R をコードするウイルスベクターで免疫細胞に形質導入すること

を含む方法。

【請求項 8 4】

エンドヌクレアーゼおよび g R N A が細胞にエレクトロポレーションを行うことによって誘導される、請求項 8 3 に記載の方法。

【請求項 8 5】

細胞が N K 細胞を含む、請求項 8 3 または 8 4 に記載の方法。

【請求項 8 6】

一度に 3 つ以下の固有の g R N A が導入される、請求項 8 3 ～ 8 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 7】

一度に 2 つ以下の固有の g R N A が導入される、請求項 8 3 ～ 8 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 8】

細胞が、最初の導入の前に一定期間、培養において拡大される、請求項 8 3 ～ 8 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 9】

遺伝子操作された免疫細胞集団を生成する方法であって、
培養物中の免疫細胞を拡大すること、
エンドヌクレアーゼと 2 つ以下の固有の g R N A を免疫細胞に導入して、2 つの異なる遺伝子標的配列内でゲノム破壊を誘導すること、

追加の一定期間、細胞を培養すること、

追加のエンドヌクレアーゼと 2 つ以下の固有の g R N A を免疫細胞に導入して、2 つ以下の追加の遺伝子標的配列内に追加のゲノム破壊を誘導すること、および

C D 7 0 を標的とする C A R をコードするウイルスベクターで免疫細胞に形質導入すること

を含む方法。

【請求項 9 0】

エンドヌクレアーゼおよび g R N A が細胞にエレクトロポレーションを行うことによって誘導される、請求項 8 9 に記載の方法。

【請求項 9 1】

細胞が N K 細胞を含む、請求項 8 9 または 9 0 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 9 2】

追加の 1 種類の gRNA のみが第 2 の導入において使用される、請求項 8 9 ～ 9 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 3】

gRNA が CD70、CISH、および／または CBLB 遺伝子を標的とする、請求項 8 9 ～ 9 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 4】

タンパク質をコードする遺伝子内の標的配列内にゲノム破壊を含む操作されたナチュラルキラー細胞集団を含む医薬組成物であって、標的配列が配列番号 159 ～ 203 のうちの少なくとも 3 つを含む医薬組成物。

10

【請求項 9 5】

タンパク質をコードする遺伝子内の標的配列内にゲノム破壊を含む操作されたナチュラルキラー細胞集団を含む医薬組成物であって、標的配列が配列番号 177 ～ 195 のうちの少なくとも 3 つを含む医薬組成物。

【請求項 9 6】

タンパク質をコードする遺伝子内の標的配列内にゲノム破壊を含む操作されたナチュラルキラー細胞集団を含む医薬組成物であって、標的配列が配列番号 177 ～ 195 のうちの少なくとも 2 つを含み、

操作された NK 細胞は、配列番号 52、47 ～ 49、51、および 53 ～ 54 のうちの 1 つ以上と少なくとも約 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む scFv を含む CD70 を標的とする CAR を発現する医薬組成物。

20

【請求項 9 7】

操作されたナチュラルキラー細胞集団が、配列番号 180、191、および 195 の標的遺伝子配列内にゲノム破壊を含む、請求項 9 4 ～ 9 6 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 9 8】

前記ゲノム破壊の各々が、エンドヌクレアーゼ媒介インデルを含む、請求項 9 4 ～ 9 7 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は、2022 年 3 月 7 日に出願された米国仮特許出願第 63 / 268, 967 号の優先権の利益を主張し、各々の内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本明細書に開示されるいくつかの実施形態は、がん免疫療法のために遺伝子操作された細胞、特に標的細胞上にも存在する特定のマーカーの発現を減少させるように操作された細胞を含む方法および組成物に関する。いくつかの実施形態では、本開示は、キメラ抗原受容体を発現し、がん免疫療法において使用される場合に、有効性、持続性を増大し、および／または潜在的な副作用を減少する、1 つ以上のマーカーの発現を減少するように操作された細胞に関する。

40

【背景技術】

【0003】

種々のがんについて、およびがん性細胞を健常な細胞から特異的に区別するために用いることができるがん性細胞がどのような特性を有するかについてさらなる知識が得られるにつれて、がん性細胞の顕著な特徴を利用する治療薬が開発中である。操作された免疫細胞を用いる免疫療法は、がんを処置する 1 つのアプローチである。

【0004】

配列表ファイルの参照による資料の組み込み

本出願は、本出願と同時に提出される以下の XML ファイルに含まれる配列表を参照に

50

より組み込む：ファイル名：N K T . 0 8 6 W O _ S T 2 6 . x m l ; 2 0 2 3 年 3 月 4 日に作製され、サイズは 2 4 9 , 8 5 6 バイトである。

【発明の概要】

【0005】

免疫療法は、疾患の処置における新たな技術的進歩を提供し、免疫細胞は、疾患または損傷細胞を特異的に識別し反応する特定の標的化および／またはエフェクター分子を発現するように操作されている。これは、少なくとも部分的には、全ての細胞が影響を受ける化学療法などのより伝統的なアプローチとは対照的に、疾患または損傷細胞を特異的に標的化する可能性に起因する有望な進歩を示し、所望の転帰は、患者が生存するのに十分な健全な細胞が生存することである。1つの免疫療法アプローチは、目的の異常細胞の標的化された認識および破壊を達成するための免疫細胞におけるキメラ受容体の組換え発現である。

10

【0006】

したがって、本明細書には、がん免疫療法のための遺伝子操作されたナチュラルキラー（NK）細胞集団であって、腫瘍結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含むキメラ抗原受容体（CAR）を発現するように操作された複数のNK細胞を含み、腫瘍結合ドメインはCD70を標的とし、配列番号52、47、48、49、50、51、53または54のうちの1つ以上と少なくとも約85%、90%、95%、97%（またはそれ以上）の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むscFvを含み、NK細胞は、配列番号180または177～179のうちのいずれか1つを含むCD70タンパク質遺伝子標的配列内にゲノム破壊を含み、NK細胞はまた、配列番号191または186～190のうちのいずれか1つを含むサイトカイン誘導性SH2含有タンパク質遺伝子標的配列内にゲノム破壊を含み、NK細胞は、遺伝子標的配列内に少なくとも1つの追加のゲノム破壊を含み、前記ゲノム破壊を含む遺伝子操作されたNK細胞は、前記ゲノム破壊を含まないNK細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す、遺伝子操作されたNK細胞集団が提供される。いくつかの実施形態では、NK細胞は、培養において拡大されている。

20

【0007】

いくつかの実施形態では、NK細胞はまた、配列番号195、192、193、または194のうちのいずれか1つを含むCasitas B系列リンパ腫-b（Cbl-b）タンパク質をコードする遺伝子標的配列内にゲノム破壊を含む。いくつかの実施形態では、CD70タンパク質をコードする遺伝子の標的配列、CISタンパク質をコードする遺伝子の標的配列、および／またはCbl-bタンパク質をコードする遺伝子の標的配列内のゲノム破壊は、エンドヌクレアーゼ媒介インデルを含む。いくつかの実施形態では、複数のNK細胞は、配列番号177～195のうちの少なくとも3つを含む複数のタンパク質をコードする遺伝子標的配列内にゲノム破壊を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質をコードする遺伝子標的配列内のゲノム破壊は、エンドヌクレアーゼ媒介インデルを含む。

30

【0008】

また、がん免疫療法のための遺伝子操作されたNK細胞集団であって、培養において拡大された複数のNK細胞を含み、複数のNK細胞は、腫瘍結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含むCARを発現するように操作され、腫瘍結合ドメインがCD70を標的とし、NK細胞は、配列番号177～180のうちのいずれか1つを含むCD70タンパク質遺伝子標的配列内にゲノム破壊を含み、前記ゲノム破壊はエンドヌクレアーゼ媒介インデルを含み、NK細胞は、配列番号186～191のうちのいずれか1つを含むサイトカイン誘導性SH2含有タンパク質遺伝子標的配列内にゲノム破壊を含み、NK細胞は、遺伝子標的配列内に少なくとも1つの追加のゲノム破壊を含み、前記ゲノム破壊を含む遺伝子操作NK細胞は、前記ゲノム破壊を含まないNK細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持

40

50

続性のうちの1つ以上を示す、遺伝子操作されたNK細胞集団が提供される。

【0009】

さらに、いくつかの実施形態では、がん免疫療法のための遺伝子操作されたNK細胞集団であって、培養において拡大された複数のNK細胞を含み、複数のNK細胞は、腫瘍結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含むCARを発現するように遺伝子操作され、腫瘍結合ドメインはCD70を標的とし、NK細胞は、培養において拡大された編集されていないNK細胞と比較して、減少したレベルのCD70を発現するように遺伝子編集され、減少したCD70発現は、内因性CD70遺伝子におけるゲノム破壊の導入を介して操作され、NK細胞は、編集されていないNK細胞と比較して、CISH遺伝子によってコードされる、減少したレベルのサイトカイン誘導性SH2含有(CIS)タンパク質を発現するように遺伝子編集され、減少したCIS発現は、CISH遺伝子におけるゲノム破壊の導入を介して操作され、遺伝子操作されたNK細胞は、天然レベルのCISを発現するNK細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示し、NK細胞は、2つ以上の追加の遺伝子においてゲノム破壊を導入して、前記遺伝子において編集されていないNK細胞と比較して、前記2つ以上の追加の遺伝子によりコードされるタンパク質の発現を減少させるように遺伝子編集されている、遺伝子操作されたNK細胞集団が提供される。

10

【0010】

また、がん免疫療法のための遺伝子操作されたNK細胞集団であって、腫瘍結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含むCARを発現するように操作された複数のNK細胞を含み、腫瘍結合ドメインはCD70を標的とし、配列番号47～49または51～54のうちの1つ以上と少なくとも約85%、90%、95%、97%(またはそれ以上)の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むscFvを含み、複数のNK細胞は、配列番号177～195のうちの少なくとも3つを含む遺伝子標的配列内にゲノム破壊を含み、場合により、前記ゲノム破壊はエンドヌクレアーゼ媒介インデルを含む、遺伝子操作されたNK細胞集団が提供される。

20

【0011】

いくつかの実施形態では、対象におけるがんを処置する方法であって、培養において拡大され、腫瘍結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含むCARを発現するように操作された複数のNK細胞を含む、遺伝子操作された免疫細胞の集団を対象に投与することを含み、腫瘍結合ドメインは、CD70を標的とし、配列番号47～49または51～54のうちの1つ以上と少なくとも約85%、90%、95%、97%(またはそれ以上)の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むscFvを含み、NK細胞は、配列番号177～180のうちのいずれか1つを含むCD70タンパク質遺伝子標的配列内にゲノム破壊を含み、場合により、前記ゲノム破壊はエンドヌクレアーゼ媒介インデルを含み、NK細胞は、配列番号186～191のうちのいずれか1つを含むサイトカイン誘導性SH2含有タンパク質遺伝子標的配列内にゲノム破壊を含み、NK細胞は、遺伝子標的配列内に少なくとも1つの追加のゲノム破壊を含み、前記ゲノム破壊を含む遺伝子操作されたNK細胞は、前記ゲノム破壊を含まないNK細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す方法が提供される。

30

40

【0012】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合ドメインは、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、重鎖可変領域は、CDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含み、軽鎖可変領域は、CDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含み、CDR-H1は、配列番号205、102、103、および110から選択される1つ以上の配列と少なくとも約85%、90%、95%、97%(またはそれ以上)の配列同一性を有する配列を含み、CDR-H2は、配列番号206、104、105、106、および111から選択される1つ以上の配列と少なくとも約85%、90%、95%、97%(またはそれ以

50

上)の配列同一性を有する配列を含み、CDR-H3は、配列番号207、107、108、109、および112から選択される1つ以上の配列と少なくとも約85%、90%、95%、97%(またはそれ以上)の配列同一性を有する配列を含み、CDR-L1は、配列番号209、131、132、133、および140から選択される1つ以上の配列と少なくとも約85%、90%、95%、97%(またはそれ以上)の配列同一性を有する配列を含み、CDR-L2は、配列番号210、134、135、136、および141から選択される1つ以上の配列と少なくとも約85%、90%、95%、97%(またはそれ以上)の配列同一性を有する配列を含み、CDR-L3は、配列番号211、137、138、139、および142から選択される1つ以上の配列と少なくとも約85%、90%、95%、97%(またはそれ以上)の配列同一性を有する配列を含む。

10

【0013】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合ドメインはVHを含み、VHは、配列番号153、151、152および157のアミノ酸配列のうちの1つ以上と少なくとも約85%、90%、95%、97%(またはそれ以上)の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、腫瘍結合ドメインはVHを含み、VHは、配列番号145、143、144、146および149のポリヌクレオチドのうちの1つ以上と少なくとも約85%、90%、95%、97%(またはそれ以上)の配列同一性を有する配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる。一部の実施形態では、腫瘍結合ドメインはVLを含み、VLは、配列番号156、154、155および158のアミノ酸配列のうちの1つ以上に対して少なくとも約85%、90%、95%、97%(またはそれ以上)の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、腫瘍結合ドメインはVLを含み、VLは、配列番号148、146、147および150のポリヌクレオチドのうちの1つ以上と少なくとも約85%、90%、95%、97%(またはそれ以上)の配列同一性を有する配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる。

20

【0014】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合ドメインはVLおよびVHを含み、VLは、配列番号156のアミノ酸配列と少なくとも約85%、90%、95%、97%(またはそれ以上)の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、VHは、配列番号153のアミノ酸配列と少なくとも約85%、90%、95%、97%(またはそれ以上)の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、腫瘍結合ドメインはVLおよびVHを含み、VLは、配列番号155のアミノ酸配列と少なくとも約85%、90%、95%、97%(またはそれ以上)の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、VHは、配列番号152のアミノ酸配列と少なくとも約85%、90%、95%、97%(またはそれ以上)の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、腫瘍結合ドメインはVLおよびVHを含み、VLは、配列番号157のアミノ酸配列と少なくとも約85%、90%、95%、97%(またはそれ以上)の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、VHは、配列番号158のアミノ酸配列と少なくとも約85%、90%、95%、97%(またはそれ以上)の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

30

【0015】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合ドメインはscFvを含み、scFvは、配列番号52、47~49、51および53~54のうちの1つ以上と少なくとも約85%、90%、95%、97%(またはそれ以上)の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、腫瘍結合ドメインはscFvを含み、scFvは、配列番号50の配列を含むリンカーによって連結されたVHおよびVLを含む。一部の実施形態では、腫瘍結合ドメインは、配列番号52、51、および53のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むscFvを含む。一部の実施形態では、腫瘍結合ドメインは、一本鎖可変断片(scFv)を含み、scFvは、配列番号35、30~32、34、36、および37のポリヌクレオチドのうちの1つ以上と少なくとも約95%の配列同一性を有する配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる。

40

【0016】

50

また、遺伝子操作されたナチュラルキラー（NK）細胞集団であって、腫瘍結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含むキメラ抗原受容体（CAR）を発現するように操作された複数のNK細胞を含み、腫瘍結合ドメインはCD70を標的とし、NK細胞は、配列番号180を含むCD70タンパク質遺伝子標的内にゲノム破壊を含み、NK細胞はまた、配列番号191を含むサイトカイン誘導性SH2含有タンパク質遺伝子標的配列内にゲノム破壊を含み、NK細胞はまた、配列番号195を含むCBLBタンパク質遺伝子標的配列内にゲノム破壊を含み、遺伝子操作されたNK細胞集団が提供される。

【0017】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合ドメインはscFvを含み、scFvは、それぞれ配列番号205、206の配列を含むCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含む重鎖可変領域（VH）、それぞれ配列番号209、210、および211の配列を含むCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含む軽鎖可変領域（VL）、ならびにVHとVLの間に配列番号50の配列を含むリンカーを含む。

10

【0018】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合ドメインは、配列番号52、51、および53のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むscFvを含む。いくつかの実施形態では、腫瘍結合ドメインは、一本鎖可変断片（scFv）を含み、scFvは、配列番号35、30～32、34、36および37のポリヌクレオチドのうちの1つ以上と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる。

20

【0019】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合ドメインは、重鎖可変領域（VH）を含み、VHは、配列番号143～146および149のポリヌクレオチドのうちの1つ以上と少なくとも約85%、90%、95%、97%（またはそれ以上）の配列同一性を有する配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、腫瘍結合ドメインは、軽鎖可変領域（VL）を含み、VLは、配列番号146～148および150のポリヌクレオチドのうちの1つ以上と少なくとも約85%、90%、95%、97%（またはそれ以上）の配列同一性を有する配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる。

【0020】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合ドメインは、一本鎖可変断片（scFv）を含み、scFvは、配列番号30～32および34～37のポリヌクレオチドのうちの1つ以上と少なくとも約85%、90%、95%、97%（またはそれ以上）の配列同一性を有する配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる。

30

【0021】

いくつかの実施形態では、細胞傷害性シグナル伝達複合体は、OX40サブドメインおよびCD3ゼータサブドメインを含む。いくつかの実施形態では、OX40サブドメインは、配列番号6のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、OX40サブドメインは、配列番号5と少なくとも約85%、90%、95%、97%（またはそれ以上）の配列同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、CD3ゼータサブドメインは、配列番号8のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD3ゼータサブドメインは、配列番号7と少なくとも約85%、90%、95%、97%（またはそれ以上）の配列同一性を有する配列によってコードされる。

40

【0022】

いくつかの実施形態では、NK細胞は、膜結合IL-15（mbIL15）を発現するように操作される。いくつかの実施形態では、mbIL15は、CARをコードするポリヌクレオチド上にバイシストロン性にコードされる。いくつかの実施形態では、mbIL15は、配列番号213のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、mbIL15は、配列番号27と少なくとも約85%、90%、95%、97%（またはそれ以上）の配列同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、CARおよびmbIL15をコードするポリヌクレオチドは、配列番号38～46のポリヌクレオチド

50

のうちの1つ以上と少なくとも約85%、90%、95%、97%（またはそれ以上）の配列同一性を有する配列を含む。

【0023】

いくつかの実施形態では、CARは、配列番号214～222のアミノ酸配列のうちの1つ以上と少なくとも約85%、90%、95%、97%（またはそれ以上）の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0024】

いくつかの実施形態では、操作されたNK細胞は、CD70、CISH、およびCBLBで編集される。いくつかの実施形態では、操作されたNK細胞は、配列番号180を含むCD70タンパク質遺伝子標的配列内にゲノム破壊、配列番号191を含むCISタンパク質遺伝子標的配列内にゲノム破壊、および配列番号195を含むCBLBタンパク質遺伝子標的配列内にゲノム破壊を含む。

【0025】

いくつかの実施形態では、操作されたNK細胞は、CD70、CISH、CBLB、および追加の標的遺伝子で編集される。いくつかの実施形態では、CD70の発現は、CD70に関して編集されていないNK細胞と比較して実質的に減少し、CISの発現は、CISHに関して編集されていないNK細胞と比較して実質的に減少し、CBLBの発現は、CBLBに関して編集されていないNK細胞と比較して実質的に減少する。いくつかの実施形態では、NK細胞は、検出可能なレベルのCD70、CIS、またはCBLBタンパク質を発現しない。

【0026】

いくつかの実施形態では、ゲノム破壊を導入する遺伝子編集は、CRISPR-Casシステムを使用して行われる。いくつかの実施形態では、CRISPR-Casシステムは、Cas9、Csn2、Cas4、Cpf1、C2c1、C2c3、Cas13a、Cas13b、Cas13c、CasX、CasY、およびそれらの組み合わせから選択されるCasを含む。いくつかの実施形態では、CasはCas9である。

【0027】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合ドメインによって標的化されるCD70は、固形腫瘍によって発現される。

【0028】

また、本明細書には、がん免疫療法のための遺伝子操作されたナチュラルキラー（NK）細胞集団であって、培養において拡大された複数のNK細胞を含み、NK細胞は、腫瘍結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含むキメラ抗原受容体（CAR）を発現するように操作され、該腫瘍結合ドメインはCD70を標的とし、NK細胞は、配列番号180または177～180のうちのいずれか1つを含むCD70タンパク質遺伝子標的配列内にゲノム破壊を含み、前記ゲノム破壊はエンドヌクレアーゼ媒介インデルを含み、NK細胞はまた、配列番号186～191のうちのいずれか1つを含むサイトカイン誘導性SH2含有タンパク質遺伝子標的配列内にゲノム破壊を含み、NK細胞は、遺伝子標的配列内に少なくとも1つの追加のゲノム破壊を含み、前記ゲノム破壊を含む遺伝子操作されたNK細胞は、前記ゲノム破壊を含まないNK細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す、遺伝子操作されたNK細胞集団が提供される。

【0029】

また、本明細書には、がん免疫療法のための遺伝子操作されたナチュラルキラー（NK）細胞集団であって、培養において拡大された複数のNK細胞を含み、NK細胞は、腫瘍結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含むキメラ抗原受容体（CAR）を発現するように遺伝子操作され、腫瘍結合ドメインはCD70を標的とし、NK細胞は、培養において拡大された編集されていないNK細胞と比較して、減少したレベルのCD70を発現するように遺伝子編集され、減少したCD70発現は、内因性CD70遺伝子におけるゲノム破壊の導入を介して操作されており、NK細胞はまた、

編集されていないNK細胞と比較して、CISH遺伝子によってコードされる、減少したレベルのサイトカイン誘導性SH2含有(CIS)タンパク質を発現するように遺伝子編集され、減少したCIS発現は、CISH遺伝子におけるゲノム破壊の導入を介して操作されており、前記ゲノム破壊を含む遺伝子操作されたNK細胞は、天然レベルのCISを発現するNK細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示し、NK細胞は、2つ以上の追加の遺伝子においてゲノム破壊を導入して、前記遺伝子において編集されていないNK細胞と比較して、前記2つ以上の追加の遺伝子によってコードされるタンパク質の発現を減少させるように遺伝子編集されている、遺伝子操作されたNK細胞集団が提供される。

【0030】

10

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される細胞および方法は、腎細胞がん腫、または腎細胞がん腫からの転移の処置に使用される。さらに、本明細書には、がんの処置における、本明細書に開示される実施形態による遺伝子操作されたNK細胞の使用が提供される。いくつかの実施形態では、がんはCD70発現がんである。いくつかの実施形態では、がんは固形腫瘍を含む。また、本明細書には、本明細書に記載される免疫細胞を投与することによって、対象におけるがんを処置する方法が提供される。いくつかの実施形態では、投与は、がんを処置し、阻害し、または進行を予防する。さらに、がんを処置するための薬剤の製造における、本明細書に開示される実施形態による遺伝子操作されたNK細胞の使用が提供される。

【0031】

20

本明細書には、抗CD70 CARが提供され、CARは、抗CD70結合ドメイン、OX40ドメイン、およびCD3ゼータドメインを含み、抗CD70 CARは、配列番号218、214~217、もしくは219~222のアミノ酸配列のうちの1つ以上と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列、または標的細胞上のCD70への結合時に細胞傷害性シグナルを生成することができるその一部を含む。

【0032】

抗CD70キメラ抗原受容体(CAR)であって、CARは、抗CD70結合ドメイン、OX40ドメイン、およびCD3ゼータドメインを含み、抗CD70 CARは、配列番号64~72のアミノ酸配列のうちの1つ以上と少なくとも約85%、90%、95%、97%(またはそれ以上)の配列同一性を有するアミノ酸配列、または標的細胞上のCD70への結合時に細胞傷害性シグナルを生成することができるその一部を含む抗CD70 CAR。いくつかの実施形態では、抗CD70結合ドメインは、配列番号52、47~49、51、および53~54から選択されるいずれかの配列と少なくとも約85%、90%、95%、97%(またはそれ以上)の配列同一性を有するscFvを含む。

30

【0033】

また、本明細書には、このような抗CD70 CARを含む細胞が提供される。いくつかの実施形態では、細胞は免疫細胞である。いくつかの実施形態では、細胞はNK細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、配列番号159~201から選択される少なくとも3つの遺伝子標的配列内に少なくとも3つのゲノム破壊を含む。いくつかの実施形態では、細胞は、配列番号180、191、および195のタンパク質をコードする遺伝子標的配列内にゲノム破壊を含む。また、本明細書には、このようなCARまたはこのような細胞を投与することによって、対象におけるがんを処置する方法が提供される。がんを処置するための、またはがんを処置するための薬剤を製造するための、このような細胞またはこのようなCARの使用もまた提供される。

40

【0034】

さらなる追加の実施形態は、遺伝子操作された免疫細胞集団を生成する方法を提供し、エンドヌクレアーゼおよび少なくとも1つの固有のgRNAを免疫細胞に導入して、少なくとも1つの遺伝子標的配列内にゲノム破壊を誘導すること、エンドヌクレアーゼおよび少なくとも1つの追加の固有のgRNAを免疫細胞に導入して、追加の遺伝子標的配列内に追加のゲノム破壊を誘導すること、CD70を標的とするCARをコードするウイルス

50

ベクターで免疫細胞に形質導入することを含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼおよび gRNA は、細胞にエレクトロポレーションを行うことによって誘導される。いくつかの実施形態では、細胞は NK 細胞を含む。いくつかの実施形態では、3 つ以下の固有の gRNA が一度に導入される。いくつかの実施形態では、2 つ以下の固有の gRNA が一度に導入される。いくつかの実施形態では、細胞は、最初の導入の前に一定期間培養において拡大される。

【0035】

また、遺伝子操作された免疫細胞集団を生成する方法であって、培養において免疫細胞を拡大すること、エンドヌクレアーゼおよび 2 つ以下の固有の gRNA を免疫細胞に導入して、2 つの異なる遺伝子標的配列内にゲノム破壊を誘導すること、追加の一定期間、細胞を培養すること、追加のエンドヌクレアーゼおよび 2 つ以下の追加の固有の gRNA を免疫細胞に導入して、2 つ以下の追加の遺伝子標的配列内に追加のゲノム破壊を誘導すること、CD70 を標的とする CAR をコードするウイルスベクターで免疫細胞に形質導入することを含む方法が提供される。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼおよび gRNA は、細胞にエレクトロポレーションを行うことによって誘導される。いくつかの実施形態では、細胞は NK 細胞を含む。いくつかの実施形態では、第 2 の導入では、追加の 1 種類の gRNA のみが使用される。いくつかの実施形態では、gRNA は、CD70、CISH、または CBLB 遺伝子を標的とする。

【0036】

いくつかの実施形態では、配列番号 159 ~ 203 のうちの少なくとも 3 つを含む遺伝子標的配列内にゲノム破壊を含む、操作された NK 細胞集団を含む医薬組成物が提供され、前記ゲノム破壊は、場合により、エンドヌクレアーゼ媒介インデルを含む。

【0037】

いくつかの実施形態では、配列番号 177 ~ 195 のうちの少なくとも 3 つを含む遺伝子標的配列内にゲノム破壊を含む、操作されたナチュラルキラー細胞集団を含む医薬組成物が提供され、前記ゲノム破壊は、場合により、エンドヌクレアーゼ媒介インデルを含む。

【0038】

いくつかの実施形態では、配列番号 177 ~ 195 のうちの少なくとも 2 つを含む遺伝子標的配列内にゲノム破壊を含む操作されたナチュラルキラー細胞集団を含む医薬組成物が提供され、前記ゲノム破壊は、場合により、エンドヌクレアーゼ媒介インデルを含み、操作された NK 細胞は、配列番号 52、47 ~ 49、51、および 53 ~ 54 のうちの 1 つ以上と少なくとも約 85%、90%、95%、97%（またはそれ以上）の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む scFv を含む CD70 を標的とする CAR を発現する。いくつかの実施形態では、操作されたナチュラルキラー細胞は、配列番号 180、191、および 195 の標的遺伝子配列内にゲノム破壊を含む。提供される医薬組成物のいくつかの実施形態では、ゲノム破壊は、エンドヌクレアーゼ媒介インデルを含む。

【0039】

一部の実施形態は、本明細書に記載される免疫細胞を、必要とする対象に投与することを含む方法に関する。一部の実施形態では、対象はがんを有する。一部の実施形態では、投与は、がんを処置し、阻害し、またはその進行を妨げる。

【0040】

いくつかの実施形態は、がんの処置または予防における、遺伝子編集細胞、抗 CD70 scFv、抗 CD70 CAR、および／または本明細書に開示されるポリヌクレオチドもしくはアミノ酸配列の使用を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0041】

【図 1】図 1 は、腫瘍指向性キメラ抗原受容体の非限定的な模式図である。

【図 2】図 2 は、本開示による CD70 を標的とする CAR の非限定的な実施形態の種々の特性の要約データを示す。

10

20

30

40

50

【図 3】図 3 は、遺伝子編集された NK 細胞による CAR 発現の持続性に関する代表的なデータを示すデータである。

【図 4】図 4 は、経時的に培養物中に存在する遺伝子編集された NK 細胞のパーセンテージに関する代表的なデータを示す。

【図 5】図 5 は、遺伝子編集された NK 細胞の拡大能力に関する代表的なデータを示す。

【図 6】図 6 は、遺伝子編集された NK 細胞の生成および分析のためのプロセスフローの非限定的な実施形態の概略図である。

【図 7】図 7 A ~ 7 B は、2 人のドナー由来の NK 細胞における CD 70 発現をノックアウトするための遺伝子編集に関する代表的なフローサイトメトリーデータを示す図。

【図 8】図 8 A ~ 8 H は、CD 70 CAR の非限定的な実施形態による形質導入から 10 日後の、NK 細胞による減少した CD 70 発現の維持に関する代表的なフローサイトメトリーデータを示す。

【図 9】図 9 A ~ 9 H は、CD 70 CAR の非限定的な実施形態による形質導入から 14 日後の、NK 細胞による減少した CD 70 発現の維持に関する代表的なフローサイトメトリーデータを示す。

【図 10】図 10 A ~ 10 B は、CD 70 CAR の非限定的な実施形態による形質導入後の CD 70 発現をノックダウンするための遺伝子編集の効力に関する代表的な Tracking of Indels by Decomposition (TIDE) インデル分析データを示す図であり、10 A は第 1 のドナー由来のデータを示し、10 B は第 2 のドナー由来のデータを示す。図 10 C は、インターロイキン 2 (IL2) の非存在下で CD 70 CAR の非限定的な実施形態を発現する CD 70 / CISH KO NK 細胞の持続性に関する 2 つの異なるドナー由来のデータを示す。

【図 11】図 11 A ~ 11 D は、第 1 および第 2 のドナー由来の NK 細胞によって発現され、エレクトロポレーション (EP) 後の 14 日目 (それぞれ 11 A および 11 C) および 17 日目 (それぞれ 11 B および 11 D) に試験された、示された非限定的な抗 CD 70 CAR を用いた、低 CD 70 発現 Panc 05 腫瘍細胞に対する代表的なインビトロ (in vitro) 細胞傷害性データ (Bright-Glo (商標) アッセイ) を示す。

【図 12】図 12 A ~ 12 B は、第 1 のドナー (12 A) および第 2 のドナー (12 B) 由来の NK 細胞によって発現された、示された非限定的な抗 CD 70 CAR を使用した、低 CD 70 発現 Panc 05 腫瘍細胞に対する代表的なインビトロ細胞傷害性データ (Incucyte (登録商標) アッセイ) を示す。

【図 13】図 13 A ~ 13 B は、2 回の腫瘍細胞再チャレンジを使用し、第 1 のドナー (13 A) および第 2 のドナー (13 B) 由来の NK 細胞によって発現された、示された非限定的な抗 CD 70 CAR を使用した、中程度の CD 70 発現 ACHN 腫瘍細胞に対する代表的なインビトロ細胞傷害性データ (Incucyte (登録商標) アッセイ) を示す。

【図 14】図 14 A ~ 14 C は、1 回の腫瘍細胞再チャレンジを使用し、第 1 のドナー (14 A) および第 2 のドナー (14 C) 由来の NK 細胞によって発現された、示された非限定的な抗 CD 70 CAR を使用した、高 CD 70 発現 786-O 腫瘍細胞に対する代表的なインビトロ細胞傷害性データ (Incucyte (登録商標) アッセイ) を示す。図 14 B は、図 14 A の縦線の時点で収集した細胞傷害性に関するデータを示す。

【図 15】図 15 A ~ 15 D は、第 1 のドナー (15 A ~ 15 B) および第 2 のドナー (15 C ~ 15 D) について、エレクトロポレーション (EP) 後 1 の 0 日目および 14 日目における代表的な発現データ (CAR 陽性細胞のパーセンテージおよび平均蛍光強度 (例えば、発現密度) の両方として測定される) を示す。

【図 16】図 16 A ~ 16 E は、本明細書で提供される CD 70 指向性 CAR の非限定的な実施形態が、786-O 腎がん腫異種移植動物モデルにおいて抗腫瘍活性を示すことを実証する代表的なインビボ (in vivo) データを示す。

【図 17】図 17 A ~ 17 B は、本明細書で提供される CD 70 指向性 CAR の非限定的

10

20

30

40

50

な実施形態が、786-O腎がん腫異種移植片動物モデルにおいて抗腫瘍活性を示し(17A)、CAR陽性細胞が血流中に数週間持続的に存在することを示す代表的なインビボデータを示す。

【図18】図18A~18Bは、遺伝子編集プロトコルの種々の非限定的な実施形態の概略図である。図18Aは、遺伝子編集が静止細胞上で起こる0日目のアプローチを示す。図18Bは、遺伝子編集が活性化細胞上で起こる6日目のアプローチを示す。

【図19】図19A~19Bは、図18Aの0日目のアプローチを用いて遺伝子編集を行った後のタンパク質発現の減少を示す。図19Aは、CBLBタンパク質の減少を示す。図19Bは、CISタンパク質の減少を示す。

【図20】図20A~20Cは、経時的な培養中のCD70 CAR陽性の遺伝子編集された細胞の濃縮に関するデータを示す。図20Aは、編集後11日目におけるCD70 CAR陽性の遺伝子編集されたNK細胞のパーセンテージを示す。図20Bは、編集後21日目のCD70 CAR陽性の遺伝子編集されたNK細胞のパーセンテージを示す。図20Cは、編集後28日目のCD70 CAR陽性の遺伝子編集されたNK細胞のパーセンテージを示す。

【図21】図21A~21Cは、遺伝子編集された細胞の拡大に関するデータを示す。図21Aは、CD70 CARで形質導入する前の編集された細胞の倍数拡大を示す。図21Bは、CD70 CARで形質導入された後の遺伝子編集された細胞の倍数拡大を示す。図21Cは、編集後14日目のCD70 CARを発現する遺伝子編集されたNK細胞の倍数拡大を示す。図21D~21Eは、ドナー由来のNK細胞によって発現された、示された非限定的な抗CD70 CARを用いた、中程度のCD70を発現するACHN細胞(21D)および高発現786-O細胞(21E)に対する代表的なインビトロ細胞傷害性データ(IncuCyte(登録商標)アッセイ)を示す。図21F~21Gは、1回の腫瘍細胞再チャレンジを用い、ドナー由来のNK細胞によって発現された示された非限定的な抗CD70 CARを用いた、中程度のCD70発現ACHN細胞(21F)および高発現786-O細胞(21G)に対する代表的なインビトロ細胞傷害性データ(IncuCyte(登録商標)アッセイ)を示す。

【図22】図22A~22Fは、細胞傷害性データを示す。図22A~22Bは、ACHN腫瘍細胞の複数回チャレンジによるエレクトロポレーション(EP)後14日目の細胞傷害性データを示す。図22Aは、TGFベータ非存在下でのデータを示す。図22Bは、TGFベータ存在下でのデータを示す。図22C~22Dは、ACHN腫瘍細胞を複数回チャレンジした、エレクトロポレーション(EP)後21日目の細胞傷害性データを示す。図22Cは、TGFベータ非存在下でのデータを示す。図22Dは、TGFベータ存在下でのデータを示す。図22E~22Fは、ACHN腫瘍細胞を複数回チャレンジした、エレクトロポレーション(EP)後28日目の細胞傷害性データを示す。図22Eは、TGFベータ非存在下でのデータを示す。図22Fは、TGFベータ存在下でのデータを示す。

【図23】図23A~23Bは、図18Bの6日目のアプローチを用いて遺伝子編集を行った後のタンパク質発現の減少を示す図である。図23Aは、CBLBタンパク質の減少を示す。図23Bは、CISタンパク質の減少を示す。

【図24】図24A~24Bは、経時的な培養中のCD70 CAR陽性の遺伝子編集された細胞の濃縮に関するデータを示す。図24Aは、拡大後10日目におけるCD70 CAR陽性の遺伝子編集されたNK細胞のパーセンテージを示す。図24Bは、拡大後15日目におけるCD70 CAR陽性の遺伝子編集されたNK細胞のパーセンテージを示す。

【図25】25A~25Bは、ACHN腫瘍細胞の複数回チャレンジによる拡大14日目の細胞傷害性データを示す。図25Aは、TGFベータ非存在下でのデータを示す。図25Bは、TGFベータ存在下でのデータを示す。

【図26】図26A~26Bは、長期間のインビボ細胞傷害性データを示す。図26Aは、多重遺伝子編集されたNK細胞が(786-Oモデルにおいて)45日間にわたって対

10

20

30

40

50

照よりも効果的に腫瘍増殖を制御することが示されたデータを示す。図 26 B は、A-498 異種移植モデルを用いた同様のデータを示す。

【図 27】図 27 は、オフターゲット遺伝子編集の評価の概略を示す。

【図 28】図 28 は、オフターゲット遺伝子編集の非限定的な実施形態の概略ワークフローを示す。

【図 29】図 29 A は、示されたガイド RNA (gRNA) に対するオフターゲット部位の予測数、および部位にわたる次世代シーケンシング (NGS) 読み取りカバレッジの中央値に関するデータを示す。図 29 B は、示されたガイド RNA に対するオフターゲット部位の予測数、および部位にわたる NGS 読み取りカバレッジの中央値に関する追加データを示し、図 29 A に示される全てのデータを含む。

10

【図 30】図 30 A は、図 29 A に示される gRNA およびドナーに基づく、計算されたオンターゲット編集に関するデータ (TIDE およびハイブリッドキャプチャー分析による)、およびオフターゲット編集がないことを示すデータを示す。図 30 B は、図 29 B に示される gRNA およびドナーに基づく、計算されたオンターゲット編集に関するデータ (TIDE およびハイブリッドキャプチャー分析による)、およびオフターゲット編集がないことを示すデータを示す。

【図 31】図 31 は、編集後の染色体転座を評価するためのワークフローの非限定的な概略図を示す。

【図 32】図 32 は、2 人のドナーの CISH-15 gRNA を用いた単回および二重編集後のインデル頻度に関するデータを示す。

20

【図 33】図 33 A は、2 人のドナーの CISH-10 または CISH-15 gRNA を用いた単一編集後のインデル頻度に関するデータを示す。図 33 B は、図 33 A と比較した追加データを示す図であり、4 人のドナーにおいて示された gRNA を用いた単一編集後のインデル頻度に関する。

【図 34】図 34 は、2 人のドナーの CISH-10 または CISH-15 gRNA を用いた単回、二重、または三重編集後の CD70 インデル頻度に関するデータを示す。

【図 35】図 35 A ~ 35 G は、示された遺伝子編集後の 13 日目に第 1 のドナー由来の非形質導入 NK 細胞における CD70 発現に関するデータを示す。図 35 A はアイソタイプ対照を示す。図 35 B は、エレクトロポレーション (EP) 対照を示す。図 35 C は、CD70 遺伝子の編集を示す。図 35 D は、CD70 および CISH の編集を示す (CISH-15 gRNA を使用する)。図 35 E は、CD70 および CBLB の編集を示す。図 35 F は、CD70、CBLB、および CISH の編集を示す (CISH-15 gRNA を使用する)。図 35 G は、CD70 および CISH の編集を示す (CISH-10 gRNA を使用する)。

30

【図 36】図 36 A ~ 36 G は、示された遺伝子編集後の 13 日目に第 2 のドナー由来の非形質導入 NK 細胞における CD70 発現に関するデータを示す。図 36 A はアイソタイプ対照を示す。図 36 B は EP 対照を示す。図 36 C は、CD70 遺伝子の編集を示す。図 36 D は、CD70 および CISH の編集を示す (CISH-15 gRNA を使用する)。図 36 E は、CD70 および CBLB の編集を示す。図 36 F は、CD70、CBLB、および CISH の編集を示す (CISH-15 gRNA を使用する)。図 36 G は、CD70 および CISH の編集を示す (CISH-10 gRNA を使用する)。

40

【図 37】図 37 A ~ 37 B は、CBLB、および場合により、CISH (CISH-15 gRNA を使用する) の編集に関連するデータを示す。図 37 A は、第 1 のドナーにおける単一または二重編集後のインデル頻度に関するデータを示す。図 37 B は、第 2 のドナーにおける単一または二重編集後のインデル頻度に関するデータを示す。

【図 38】図 38 は、染色体転座を評価するための非限定的な実験計画に関する情報を示す。

【図 39】図 39 は、ある特定の非限定的な複数の遺伝子編集についてのインデル頻度に関するデータを示す。

【図 40】図 40 A ~ 40 B は、遺伝子編集アプローチの非限定的な実施形態を示す。図

50

40Aは、単一のエレクトロポレーション（EP）アプローチを示す。図40Bは、二重EPアプローチを示す。

【図41】図41A～41Cは、2回のエレクトロポレーション（EP）を使用した場合の遺伝子編集アプローチの非限定的な実施形態を示す。図41Aは、編集の第1の構成を示す。図41Bは、編集の第2の構成を示す。図41Cは、編集の第3の構成を示す。

【図42】図42は、1回のエレクトロポレーション（EP）アプローチ（3回同時編集）による染色体転座率に関するデータを示す。

【図43】図43は、示されたCISH gRNAを用いて、CD70とCISHの二重編集を達成するために行われた第1のエレクトロポレーション（EP）による染色体転座率に関するデータを示す。

【図44】図44は、CD70とCBLBに二重編集を達成するために行われた第1のエレクトロポレーション（EP）と、EP1／EP2アプローチの任意の構成による染色体転座率に関するデータを示す。

【図45】図45Aは、CARを発現しないCBLB／CISH／CD70 KO NK細胞（三重KO）または模擬エレクトロポレーションされCARを発現しないNK細胞（EPのみ）と比較して、示された非限定的な抗CD70 CARを発現するCBLB／CISH／CD70 KO NK細胞におけるCBLB、CISH、およびCD70のノックアウト効率に関するデータを示す。図45Bは、インターロイキン-2（IL2）の非存在下で、示された非限定的な抗CD70 CARを発現するCBLB／CISH／CD70 KO NK細胞の持続性に関するデータを示す。図45Cは、1：2または1：4のE：T比で標的細胞と培養した、示された非限定的な抗CD70 CARを発現するCBLB／CISH／CD70 KO NK細胞における活性化に関連する分子の発現に関するデータを示す。

【図46】図46Aは、示された非限定的な抗CD70 CARを発現するCISH／CBLB／CD70 NK細胞、CARを発現しないCISH／CBLB／CD70 KO NK細胞（三重KO）、またはビヒクルで処置された786-Oマウス腫瘍モデルにおける、ベースラインからの腫瘍容積（TV）の変化（上段パネル）および腫瘍体積（TV）（下段パネル）を示す。図46Bは、図46Aに示されたものと同じマウスにおける、示された非限定的な抗CD70 CARを発現するNK細胞の持続性を示す。

【発明を実施するための形態】

【0042】

本明細書に提供される方法および組成物の一部の実施形態は、免疫療法における使用のための操作された免疫細胞およびその組み合わせに関する。いくつかの実施形態では、操作された細胞は、例えば、細胞傷害性誘導性受容体複合体を発現するために、複数の方法で操作される。本明細書で使用される場合、用語「細胞傷害性受容体複合体」は、その通常の意味を与えられるものとし、（特に断らない限り）、キメラ抗原受容体（CAR）にも言及するものとする。いくつかの実施形態では、細胞は、さらに、非腫瘍組織および／または他の治療細胞に対する細胞の反応性の修飾を達成するように操作される。いくつかの実施形態では、ナチュラルキラー（NK）細胞はまた、例えば、CD70を発現する腫瘍細胞を標的化するなど、細胞傷害性誘導性受容体複合体（例えば、キメラ抗原受容体またはキメラ受容体）を発現するように操作される。いくつかの実施形態では、NK細胞は、そうでなければCARを発現するNK細胞の治療効果を阻害または制限する特定のマーカー／タンパク質を減少および／または排除するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、特定のマーカー／タンパク質は、NK細胞を操作および／または拡大するために行われる1つ以上のプロセスによって上方制御されるかまたは他には誘導される発現を有する。例えば、いくつかの実施形態では、培養においてNK細胞を拡大するプロセスは、NK細胞によるCD70発現を実質的に増加させる。CD70 CARが、拡大したNK細胞によって発現されるように操作される実施形態では、CARは、実際には、CD70を発現する腫瘍だけでなく、他に操作され、拡大されたNK細胞も同様に標的とする。したがって、例えば、いくつかの実施形態では、治療用NK細胞は、CD70を標的と

10

20

30

40

50

するCARを発現するように操作され、同様に、存在する場合、CARを発現するNK細胞による、腫瘍の、さらには治療用NK細胞の標的化を引き起こすNK細胞自体上のCD70発現をノックアウトするために遺伝子編集される。これは、他には、腫瘍の拡大およびがんの進行を可能にする自己限定的な治療効果を生じさせる。

【0043】

RNAガイドエンドヌクレアーゼに基づくゲノム編集技術であるCRISPR-Casは、精密な遺伝子編集のために広く使用されている。短いガイドRNA (gRNA) を用いることで、エンドヌクレアーゼ（その一例はCas9であるが、他にも多数存在する）を標的部位に誘導し、精密な遺伝子編集を行うことができる。gRNAは、エンドヌクレアーゼによる遺伝子編集の有効性および特異性を決定する。gRNAは、ゲノム中の特定の遺伝子座を標的とし、エンドヌクレアーゼをその部位に補充するようにカスタム設計される。補充されたエンドヌクレアーゼは、DNA修復経路を誘発する二本鎖DNA内部の特異的な二本鎖切断を誘導する。例えば、非相同末端結合経路を利用してフレームシフト突然変異（複数可）を導入し、遺伝子をノックアウトすることができる。相同指向性修復経路は、供給された鋳型DNAを用いて遺伝子置換または遺伝子ノックインのために利用することができる。CRISPR/Casゲノム編集は、細菌、植物、および哺乳動物を含む多くの系で広く研究されており、治療の可能性があると広く考えられている。しかしながら、gRNAに関連する大きな課題の1つは、オフターゲット効果の可能性である。例えば、gRNAと標的配列の間に3塩基を超えるミスマッチがある場合、gRNAはゲノム中の標的として意図されていない部位を標的化する（したがって、エンドヌクレアーゼを補充する）可能性がある。オフターゲット効果には、gRNAと相同性を有するゲノム部位での小さな挿入または欠失、さらに稀に染色体転座、逆位、欠失などの大規模なイベントが含まれる。このようなオフターゲット効果は、特にヒトの処置を意図した治療（例えば、細胞治療）において、潜在的な安全性の問題を引き起こす。したがって、ゲノムに対する所与の所望の編集に適したgRNAの同定は、高いオンターゲット編集効率を維持しながら、オフターゲット効果を最小化するために重要である。本明細書で提供される実施形態によれば、およびこれらの課題を克服するために、本明細書で提供されるgRNAは、高いオンターゲット編集効率および低いオフターゲット効果を示すことが実証されている。

【0044】

用語「抗がん効果」とは、限定されないが、腫瘍容量の低下、がん細胞数の低下、転移数の低下、平均寿命の増加、がん細胞増殖の低下、がん細胞生存の低下、および／またはがん性状態に関連する種々の生理学的症状の軽快を含む、種々の手段によって発現し得る生物学的効果を指す。

【0045】

細胞型

本明細書に提供される方法および組成物の一部の実施形態は、免疫細胞などの細胞を指す。例えば、NK細胞またはT細胞などの免疫細胞は、CD70指向性キメラ受容体などのキメラ受容体を含むように操作され得るか、または本明細書に記載されるように、上記キメラ受容体をコードする核酸を含むように操作され得る。さらに追加の実施形態は、NK細胞による1つ以上のマーカー／タンパク質の発現を減少、破壊、最小化および／または排除するための細胞（例えば、ドナーNK細胞）のさらなる遺伝子操作に関し、その結果、操作されたNK細胞の効力および／または持続性の増大がもたらされる。

【0046】

伝統的な抗がん療法は、外科的アプローチ、放射線療法、化学療法、またはこれらの方法の組み合わせに依存していた。研究によってある種のがんのメカニズムの一部についての理解が深まるにつれて、この知見は標的化されたがん治療法の開発に利用された。標的療法は、がん細胞、またはがんの増殖を支持する細胞（血管細胞など）に見出される特定の遺伝子またはタンパク質を標的とする特定の薬物を用いて、がん細胞の増殖を抑制または阻止するがん処置である。より最近では、遺伝子工学によって、免疫系の特定の側面を

利用してがんと戦うアプローチを開発することが可能になってきた。いくつかの場合では、患者自身の免疫細胞を修飾して、その患者のがんタイプを特異的に根絶する。以下により詳細に記載されるように、T細胞、ナチュラルキラー（NK細胞）、またはそれらの組み合わせなどの種々のタイプの免疫細胞を使用することができる。

【0047】

がん免疫療法を容易にするために、標的結合部分（例えば、リガンドの細胞外結合部、またはがん細胞により発現される腫瘍マーカー指向性キメラ受容体）および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含むキメラ抗原受容体（CAR）をコードするポリヌクレオチド、ポリペプチド、およびベクターが本明細書において提供される。例えば、一部の実施形態は、がんに対する免疫細胞の標的化を促進し、がん細胞における細胞傷害効果を発揮するために、例えば、腫瘍マーカー、例えば、CD70に対する指向性を有するキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、ポリペプチド、またはベクターを含む。また、このようなCARを発現する操作された免疫細胞（例えば、NK細胞および／またはT細胞）が提供される。がんを処置する方法、およびがん免疫療法のためのこのような細胞の他の使用もまた、本明細書に提供される。

10

【0048】

免疫療法のための操作された細胞

いくつかの実施形態では、免疫系の細胞は、腫瘍細胞などの標的細胞に対して増大した細胞傷害効果を有するように操作される。例えば、免疫系の細胞は、本明細書に記載されるように、腫瘍指向性キメラ受容体および／または腫瘍指向性CARを含むように操作され得る。いくつかの実施形態では、白血球（white blood cell）または白血球（leukocyte）は、それらの本来の機能は、異常な細胞の増殖および感染症に対して身体を防御することであるため使用される。ヒト免疫系において特定の役割を果たす種々のタイプの白血球が存在し、したがって、本明細書に開示される細胞の操作のための好ましい出発点である。白血球には、顆粒球および無顆粒球（それぞれ細胞質中の顆粒の存在または非存在）がある。顆粒球には、好塩基球、好酸球、好中球、および肥満細胞が含まれる。無顆粒球には、リンパ球および単球が含まれる。以下の細胞または他の、明細書に記載される細胞などの細胞は、キメラ抗原受容体、例えば、CD70指向性CAR、またはCARをコードする核酸を含むように操作することができる。いくつかの実施形態では、細胞は、膜結合インターロイキン15（mIL15）ドメインを共発現するように操作されてもよい。以下により詳細に検討されるように、いくつかの実施形態では、治療細胞を、さらに、遺伝的に修飾して、細胞傷害性および／または細胞の持続性を増大させる。いくつかの実施形態では、遺伝子修飾は、治療細胞の効力の減少または寿命の短縮を引き起こす腫瘍微小環境から発するシグナルに抵抗する細胞の能力を増大させる。

20

30

【0049】

免疫療法のための単球

単球は白血球の亜型である。単球は、マクロファージおよび骨髄系樹状細胞に分化することができる。単球は適応免疫系と関連しており、食作用、抗原提示、サイトカイン産生の主要な機能を担っている。食作用とは、細胞物質、または細胞全体を取り込んだ後、取り込まれた細胞物質を消化して破壊するプロセスである。いくつかの実施形態では、単球は、本明細書に開示されるように、1つ以上のさらなる操作された細胞と関連して使用される。本明細書に記載される方法および組成物の一部の実施形態は、腫瘍指向性CAR、または腫瘍指向性CARをコードする核酸を含む単球に関する。本明細書に開示される方法および組成物のいくつかの実施形態は、腫瘍マーカー、例えば、CD70を標的とし、場合により膜結合インターロイキン15（mIL15）ドメインを含むCARを発現するように操作された単球に関する。

40

【0050】

免疫療法のためのリンパ球

リンパ球は、白血球の他の一次サブタイプであり、T細胞（細胞媒介性、細胞傷害性適

50

応免疫)、ナチュラルキラー細胞(細胞媒介性、細胞傷害性先天性免疫)、およびB細胞(体液性、抗体駆動性適応免疫)を含む。B細胞は、本明細書に開示されるいくつかの実施形態に従って操作されるが、いくつかの実施形態はまた、操作されたT細胞または操作されたNK細胞(T細胞とNK細胞の混合物が、一部の実施形態では、同じドナー由来または異なるドナー由来のいずれかで使用される)に関連する。本明細書に開示される方法および組成物の一部の実施形態は、腫瘍マーカー、例えば、CD70を標的とし、場合により膜結合インターロイキン15(mbIL15)ドメインを含むCARを発現するように操作されたリンパ球に関する。

【0051】

免疫療法のためのT細胞

T細胞は、細胞表面上のT細胞受容体の存在に基づいて、他のリンパ球サブタイプ(例えば、B細胞またはNK細胞)と区別することができる。T細胞は、エフェクターT細胞、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、記憶T細胞、調節性T細胞、ナチュラルキラーT細胞、粘膜関連不変T細胞およびガンマデルタT細胞を含む種々のサブタイプに分けられる。一部の実施形態では、特異的サブタイプのT細胞を操作する。一部の実施形態では、T細胞サブタイプの混合プールを操作する。一部の実施形態では、本明細書に開示される細胞傷害性受容体複合体を発現するように操作されるT細胞タイプの特異的選択は存在しない。いくつかの実施形態では、サイトカイン刺激の使用などの特異的技術を使用して、特異的マーカープロファイルを有するT細胞の拡大/収集を増大させる。例えば、いくつかの実施形態では、特定のヒトT細胞、例えば、CD4+T細胞、CD8+T細胞の活性化は、刺激分子としてのCD3および/またはCD28の使用によって達成される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、細胞傷害性受容体複合体および/またはホーミング部分を発現するT細胞の治療上有効量を投与することを含む、がんまたは感染症を処置または予防する方法が提供される。いくつかの実施形態では、操作されたT細胞は自己細胞であり、一方、一部の実施形態では、T細胞は同種異系細胞である。本明細書に開示される方法および組成物のいくつかの実施形態は、腫瘍マーカー、例えば、CD70を標的とし場合により、膜結合型インターロイキン15(mbIL15)ドメインを含むCARを発現するように操作されたT細胞に関する。

【0052】

免疫療法のためのNK細胞

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、細胞傷害性受容体複合体および/またはホーミング部分を発現する治療上有効量のナチュラルキラー(NK)細胞を投与することを含む、がんまたは感染症を処置または予防する方法が提供される。いくつかの実施形態では、操作されたNK細胞は自家細胞であり、一方、いくつかの実施形態では、NK細胞は同種異系細胞である。いくつかの実施形態では、NK細胞の天然の細胞傷害性ポテンシャルが比較的高いため、NK細胞が好ましい。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される操作された細胞が、NK細胞の細胞傷害活性をさらに上方制御することができ、標的細胞(例えば、腫瘍または他の疾患細胞)に対してさらに効果的な活性をもたらすことが予想外に有益である。本明細書に記載される方法および組成物のいくつかの実施形態は、腫瘍マーカー、例えば、CD70を標的とし、場合により膜結合インターロイキン15(mbIL15)ドメインを含むCARを発現するように操作されたNK細胞に関する。いくつかの実施形態では、NK細胞は、CD70に結合するCARを発現するように操作される。一部の実施形態では、NK細胞は、膜結合型インターロイキン15(mbIL15)ドメインを発現するように操作される。一部の実施形態では、CARを発現するように操作されたNK細胞は、膜結合型インターロイキン15(mbIL15)ドメインも発現する(例えば、バイシストロン性に発現する)ように操作される。したがって、一部の実施形態では、NK細胞は、CARおよびmbIL15をバイシストロン性に発現するように操作される。

【0053】

いくつかの実施形態では、初代NK細胞が使用される。いくつかの実施形態では、初代

10

20

30

40

50

NK細胞は、末梢血単核細胞（PBMC）から単離される。

【0054】

いくつかの実施形態では、不死化NK細胞が使用され、本明細書に開示されるように、遺伝子編集および／または操作に供される。いくつかの実施形態では、NK細胞は、細胞株NK-92に由来する。NK-92細胞はNK細胞に由来するが、活性化受容体の大部分を保持しながら、正常なNK細胞によって示される主要な抑制性受容体を欠いている。インターフェロン-γ（IFNγ）、グランザイムB、および／またはパーフォリン産生の上方制御を可能にする、特定のさらなる阻害性受容体、例えば、SMAD3をサイレンシングするように操作されたNK-92細胞に関連して本明細書に記載されるNK-92細胞のいくつかの実施形態。NK-92細胞株に関するさらなる情報は、国際公開第1998/49268号および米国特許出願公開第2002/0068044号に開示され、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。NK-92細胞は、いくつかの実施形態では、本明細書に開示される他の細胞型のうちの1つ以上と組み合わせて使用される。例えば、一実施形態では、NK-92細胞は、本明細書に開示されるNK細胞と組み合わせて使用される。追加の実施形態では、NK-92細胞は、本明細書に開示されるT細胞と組み合わせて使用される。

【0055】

がん免疫療法のための造血幹細胞

一部の実施形態では、造血幹細胞（HSC）は、本明細書に開示される免疫療法の方法において使用される。いくつかの実施形態では、細胞は、ホーミング部分および／または細胞傷害性受容体複合体を発現するように操作される。HSCは、いくつかの実施形態では、長期間の血球産生のために生着するそれらの能力を利用するために使用され、例えば、がんの寛解と戦うために、標的化された抗がんエフェクター細胞の持続的な供給源をもたらし得る。いくつかの実施形態では、この継続的な産生は、例えば、腫瘍微小環境による他の細胞型のエネルギーまたは消耗を相殺するのを助ける。いくつかの実施形態では、同種異系HSCが使用されるが、一方、いくつかの実施形態では、自家HSCが使用される。いくつかの実施形態では、HSCは、本明細書に開示される1つ以上のさらなる操作された細胞型と組み合わせて使用される。本明細書に記載される方法および組成物の一部の実施形態は、腫瘍マーカー、例えば、CD70を標的とし、場合により、膜結合型インターロイキン15（mbIL15）ドメインを標的とするCARを発現するように操作された造血幹細胞などの幹細胞に関する。

【0056】

人工多能性幹細胞

一部の実施形態では、免疫細胞は多能性幹細胞（PSC）に由来（分化）する。一部の実施形態では、本明細書に開示される免疫療法の方法において、人工多能性幹細胞（iPSC）由来の免疫細胞（例えば、NK細胞）が使用される。iPSCを使用して、いくつかの実施形態では、限定されないが、同一の遺伝子修飾を選択された同一の部位に含むiPSCまたはより分化程度の低い細胞の分化を介して、1つまたはいくつかの遺伝子修飾を選択された部位に含む、CD34細胞、造血内皮細胞、HSC（造血幹細胞および造血前駆細胞）、造血性多能性前駆細胞、T細胞前駆細胞、NK細胞前駆細胞、T細胞、NK細胞、NK細胞、およびB細胞を含む非万能性細胞に分化し、誘導するそれらの能力を利用する。いくつかの実施形態では、iPSCは、iPSC由来のNKまたはT細胞を生成するために使用される。いくつかの実施形態では、細胞は、ホーミング部分および／または細胞傷害性受容体複合体を発現するように操作される。いくつかの実施形態では、iPSCは、本明細書に開示される1つ以上の追加の操作された細胞型と組み合わせて使用される。本明細書に記載される方法および組成物の一部の実施形態は、腫瘍マーカー、例えば、CD70を標的とするCAR、および場合により、膜結合型インターロイキン15（mbIL15）共刺激ドメインを発現するように操作された人工多能性幹細胞などの幹細胞に関する。

【0057】

免疫細胞の遺伝子編集

上記で検討したように、種々の細胞型を細胞免疫療法に利用することができる。さらに、以下により詳細に説明され、実施例において示されるように、遺伝的修飾は、これらの細胞に対して、それらの有効性（例えば、細胞傷害性）および／または持続性（例えば、活性寿命）のうちの1つ以上の側面を増大させるために行うことができる。

【0058】

いくつかの実施形態では、NK細胞の遺伝的操作を用いて、NK細胞の効力および／または持続性をさらに増大する。例えば、いくつかの実施形態では、種々のマーカー／タンパク質の発現は、遺伝子編集技術を介して、減少、実質的に減少、またはノックアウト（除去）される。実施形態に応じて、これには、CD70遺伝子によってコードされるCD70タンパク質、CISH遺伝子によってコードされるサイトカイン誘導性SH2含有（CIS）タンパク質、および／またはCBLB遺伝子によってコードされるCblがん原遺伝子B（CBLB）タンパク質のうちの1つ以上の発現を減少させるための遺伝子編集が含まれ得る。いくつかの実施形態では、発現の減少は、DNA切断の標的化導入、およびその後のDNA修復メカニズムを介して達成される。いくつかの実施形態では、DNAの二本鎖切断は、非相同末端接続（NHEJ）によって修復され、酵素は、切断を修復するために、DNA末端を互いに直接接続するために使用される。しかしながら、いくつかの実施形態では、二本鎖切断は、有利にはより正確である相同指向性修復（HDR）によって修復され、それによって、配列特異的切断および修復を可能にする。HDRは、二本鎖切断の隣接配列と相同である配列内の所望の遺伝因子（例えば、CD70、CBLBおよび／またはCISHなどの標的タンパク質のコード配列を破壊する挿入因子）を有するベクターなどの、切断点における欠損DNA配列の再生のための鋳型として相同配列を使用する。これは、DSBの部位に挿入される所望の変化（例えば、挿入）をもたらす。

【0059】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、種々の操作されたヌクレアーゼの1つ以上によって達成される。いくつかの実施形態では、制限酵素は、特に、二本鎖切断が複数の領域で所望される場合に使用される。いくつかの実施形態では、生物学処理されたヌクレアーゼが使用される。実施形態に応じて、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様ヌクレアーゼ（TALEN）、メガヌクレアーゼおよび／またはクラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（CRISPR/Cas9）システムのうちの1つ以上が、CD70、CBLB、および／またはCISHなどの1つ以上の標的タンパク質をコードする遺伝子を実質的に編集するために使用される。一部の実施形態では、CRISPR/Cas9システムは、CD70などの標的遺伝子を遺伝子編集するために使用される。一部の実施形態では、CRISPR/Cas9システムは、CISHなどの標的遺伝子を遺伝子編集するために使用される。一部の実施形態では、CRISPR/Cas9システムは、CBLBなどの標的遺伝子を遺伝子編集するために使用される。

【0060】

メガヌクレアーゼは、大きなDNA配列（14～40塩基対）を認識し、切断するそれらの能力によって特徴付けられる。いくつかの実施形態では、LAGLIDADGファミリー由来のメガヌクレアーゼが使用され、目的の標的タンパク質をコードする遺伝子における特異的部位などの固有の配列（複数可）を認識するメガヌクレアーゼ変異体を生成するために、突然変異誘発およびスクリーニングに供される。いくつかの実施形態では、2つ以上のメガヌクレアーゼまたはその機能断片を融合させて、CD70、CBLBおよび／またはCISHなどの目的の標的タンパク質をコードする遺伝子内の所望の標的配列を認識するハイブリッド酵素を作製する。

【0061】

メガヌクレアーゼとは対照的に、ZFNおよびTALENは、ジンクフィンガーまたは転写アクチベーター様エフェクター（TALE）などのペプチドを認識する特異的DNA配列に連結された非特異的DNA切断触媒ドメインに基づく機能を有する。有利には、Z

F NおよびT A L E Nは、このようにして、配列非依存的なD N Aの切断を可能にし、標的認識において高程度の配列特異性を有する。ジンクフィンガーモチーフは、転写因子において自然に機能して、転写のための特異的D N A配列を認識する。各フィンガーのC末端部分は、D N A配列の特異的認識に関与する。Z F Nによって認識される配列は比較的短い（例えば、約3塩基対）が、いくつかの実施形態では、認識部位が特徴付けられている2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上のジンクフィンガーの組み合わせが使用され、それにより、通常、C D 7 0、C B L Bおよび／またはC I S Hなどの、N K細胞によって発現される標的タンパク質をコードする遺伝子の一部などの特定の配列の標的化が可能になる。次に、組み合わせたZ F Nは、標的化されたD N A切断を誘導するために、F o k I（場合によりF o k Iヘテロ二量体）などのエンドヌクレアーゼの触媒ドメイン（複数可）と融合させる。C D 7 0またはC I S Hなどの目的の標的遺伝子を編集するためのZ F Nの使用に関する追加情報は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第9, 597, 357号に見出される。

10

20

30

40

50

【0062】

転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ（T A L E N）は、33または34アミノ酸反復のアレイを特徴とする特異的D N A結合タンパク質である。Z F Nと同様に、T A L E NはヌクレアーゼのD N A切断ドメインをT A L Eドメインに融合させたものであり、配列に依存しない二本鎖D N A切断の導入が可能になり、非常に正確な標的部位の認識を可能にする。T A L E Nは、標的部位に二本鎖切断を起こすことができ、これは誤りがちな非相同末端結合（N H E J）によって修復され、小さな挿入または欠失を導入することによって遺伝子破壊をもたらす。有利には、T A L E Nは、いくつかの実施形態では使用され、少なくとも部分的には、D N A結合におけるそれらのより高い特異性、減少したオフターゲット効果、およびD N A結合ドメインの構築の容易さに起因する。

【0063】

C R I S P R（クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート）は、細菌がウイルスに対する防御として使用する遺伝因子である。このリピートは、ウイルスゲノムに由来し、細菌ゲノムに組み込まれた短い配列である。C a s（C R I S P R関連タンパク質）は、これらの配列を処理し、一致するウイルスD N A配列を切断する。C a s遺伝子を含むプラスミドを真核細胞に導入し、C R I S P Rを特異的に構築することにより、真核生物ゲノムを任意の所望の位置で切断することができる。C R I S P Rに関する追加情報は、米国特許公開第2014/0068797号に見出すことができ、これは参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、N K細胞による天然C D 7 0発現は、C R I S P R／C a sシステムを用いてC D 7 0コード化遺伝子を標的化することによって破壊されるかまたは実質的に除去される。いくつかの実施形態では、N K細胞によって通常発現される1つ以上のさらなる標的タンパク質は、対応するコード遺伝子をC R I S P R／C a sシステムで標的化することによって破壊されるかまたは実質的に除去される。実施形態に依存して、C I S H遺伝子によってコードされるサイトカイン誘導性S H 2含有タンパク質、C B L B遺伝子によってコードされるC b lプロトオンコジーンBタンパク質、および／またはC D 7 0遺伝子の1つ以上は、C R I S P R／C a sシステムで標的化にされる。実施形態に応じて、クラス1またはクラス2 C a sが使用される。いくつかの実施形態では、クラス1 C a sが使用され、C a sタイプは、以下のタイプ：I、I A、I B、I C、I D、I E、I F、I U、I I I、I I I A、I I I B、I I I C、I I I D、I V、I V A、I V B、およびそれらの組み合わせから選択される。いくつかの実施形態では、C a sは、C a s 3、C a s 8 a、C a s 5、C a s 8 b、C a s 8 c、C a s 10 d、C s e 1、C s e 2、C s y 1、C s y 2、C s y 3、G S U 0054、C a s 10、C s m 2、C m r 5、C a s 10、C s x 11、C s x 10、C s f 1、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、クラス2 C a sが使用され、C a sタイプは、以下のタイプ：I I、I I A、I I B、I I C、V、V I、およびそれらの組み合わせから選択される。いくつかの実施形態では、C a sは、C a s 9、C s n 2、C a s 4、C p f 1、C 2 c 1、C 2 c 3、C a s

13a（以前はC2c2として公知である）、Cas13b、Cas13c、CasX、CasYおよびそれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、CasはCas9である。一部の実施形態では、クラス2 CasXが使用され、CasXはガイド核酸と複合体を形成することができ、複合体は標的DNAに結合することができ、標的DNAは非標的鎖および標的鎖を含む。一部の実施形態では、クラス2 CasYが使用され、CasYは標的核酸および／または標的核酸に関連するポリペプチドを結合および修飾することができる。

【0064】

本明細書において検討されるように、いくつかの実施形態では、NK細胞は、免疫療法のために使用される。本明細書で提供されるいくつかの実施形態では、NK細胞の遺伝子編集は、例えば、増大した増殖、増大した細胞傷害性、および／または増大した持続性などの種々の有益な特徴を細胞に付与する。本明細書で提供されるいくつかの実施形態では、NK細胞の遺伝子編集は、有利には、編集されたNK細胞に、腫瘍微小環境において生成される種々の阻害シグナルに抵抗および／または克服する能力を付与することができる。腫瘍は、免疫細胞の抗腫瘍効果を減少させることを意図する種々のシグナル伝達分子を生成することが公知である。以下により詳細に検討するように、いくつかの実施形態では、NK細胞の遺伝子編集は、NK細胞、T細胞、NKとT細胞の組み合わせ、または本明細書で提供される任意の編集／操作された免疫細胞におけるこの腫瘍微小環境抑制効果を制限する。

【0065】

以下に検討するように、いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、例えば、タンパク質をコードする基礎遺伝子を破壊することによって、標的タンパク質の発現を減少またはノックアウトするために採用される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、標的タンパク質の発現を約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約97%、約98%、約99%、約99%、またはそれ以上（列挙されたものの間の任意の量を含む）減少させることができる。いくつかの実施形態では、標的タンパク質の発現が検出できないように、遺伝子を完全にノックアウトする。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、標的タンパク質の発現を「ノックイン」または代わりに増大させるために使用される。いくつかの実施形態では、標的タンパク質の発現は、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約97%、約98%、約99%、またはそれ以上（列挙されたものの間の任意の量を含む）増大し得る。

【0066】

さらなる実施形態に従って、NK細胞（またはT細胞）機能の1つ以上の側面の他の調節因子は、遺伝子編集を介して調節される。種々のサイトカインは、免疫細胞に（上記のTGF-βと同様に）負または正のシグナルを与える。非限定的な例として、IL15は、本明細書に開示されるように、NK細胞の正の調節因子であり、NK細胞のホーミング、NK細胞の遊走、NK細胞の拡大／増殖、NK細胞の細胞傷害性、および／またはNK細胞の持続性のうちの1つ以上を増大させることができる。正常な生理的環境下でNK細胞を抑制するために、サイトカイン誘導性SH2含有タンパク質（CIS、CISH遺伝子によってコードされる）は、NK細胞におけるIL-15シグナル伝達の重要な負の調節因子として作用する。本明細書で検討されるように、IL15生物学が、限定されないが、とりわけ増殖／拡大、活性化、細胞傷害性、持続性、ホーミング、遊走などを含むNK細胞機能性の複数の側面に影響を与える。したがって、いくつかの実施態様によれば、CISHの編集は、複数の機能にわたってNK細胞の機能性を増大させ、より効果的で長期持続するNK細胞治療をもたらす。いくつかの実施形態では、CISの阻害剤が、操作されたNK細胞投与と併せて使用される。いくつかの実施形態では、CIS発現は、例えば、CRISPR-Cas編集の使用によって、CISH遺伝子の遺伝子編集を介してノックダウンまたはノックアウトされる。他の実施形態では、低分子干渉RNA、アンチセンスRNA、TALENまたはジンクフィンガーが使用される。一部の実施形態では

、T細胞におけるCIS発現は、遺伝子編集を介してノックダウンされる。

【0067】

いくつかの実施形態では、CISH遺伝子編集は、NK細胞に、標的部位にホーミングする増大した能力を付与する。いくつかの実施形態では、CISH遺伝子編集は、NK細胞に、例えば組織内で、例えば化学誘引物質に応答して、または忌避剤から離れて、遊走する増大した能力を付与する。いくつかの実施形態では、CISH遺伝子編集は、NK細胞に、活性化され、したがって、例えば、抗腫瘍効果を発揮する増大した能力を付与する。いくつかの実施形態では、CISH遺伝子編集は、NK細胞に、増大した増殖能力を付与し、いくつかの実施形態では、ドナー血液試料からのロバストなNK細胞数の生成を可能にする。さらに、このような実施形態では、CISHのために編集され、CARを発現するように操作されたNK細胞は、より容易に、ロバストに、および一貫して培養において拡大される。いくつかの実施形態では、CISH遺伝子編集は、NK細胞に、増大した細胞傷害性を付与する。いくつかの実施形態では、CISHの編集は、CARを発現する操作されたNK細胞および／または操作されたT細胞の細胞傷害効果を相乗的に増大させる。

10

【0068】

いくつかの実施形態では、CISH遺伝子編集は、広範な経路を活性化するかまたは阻害する。CISタンパク質は、例えば、JAK-STATシグナル伝達経路を阻害することにより、IL15シグナル伝達の負の調節因子である。これらの経路は、典型的には、IL15応答性遺伝子（CISHを含む）の転写をもたらす。いくつかの実施形態では、CISHのノックダウンは、JAK-STAT（例えば、JAK1-STAT5）シグナル伝達を脱阻害し、IL15応答性遺伝子の転写を増大させる。いくつかの実施形態では、CISHのノックアウトは、哺乳動物のラパマイシン標的（mTOR）を介したシグナル伝達の増大をもたらし、それに対応して、細胞代謝および呼吸に関する遺伝子の発現が増加する。いくつかの実施形態では、CISHのノックアウトは、IL15誘導性のIL-2R α （CD25）の発現であるが、IL-15R α またはIL-2/15R β ではない発現の増加、IL15および／またはIL2のNK細胞膜結合の増加、STAT-3および／またはSTAT-5のリン酸化の増加、Bcl-2などの抗アポトーシスタンパク質の発現の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、CISHノックアウトは、ミトコンドリア機能（例えば、電子伝達鎖および細胞呼吸）および細胞周期に関する選択された遺伝子のIL15誘導性情報制御をもたらす。したがって、いくつかの実施形態では、遺伝子編集によるCISHのノックアウトは、少なくとも部分的には代謝リプログラミングを介して、NK細胞の細胞傷害性および／または持続性を増大させる。いくつかの実施形態では、TXNIPなどの細胞代謝の負の調節因子は、CISHノックアウトに応答して下方制御される。いくつかの実施形態では、BIRC5（スルビビン）、TOP2A、CKS2、およびRACGAP1を含む細胞生存および増殖のためのプロモーターは、CISHノックアウト後に上方制御されるが、一方、TGFB1、ATM、およびPTCH1などの抗増殖性またはプロアポトーシス性タンパク質は下方制御される。いくつかの実施形態では、CISHノックアウトは、CXCL-10、IL2、TNF、IFN γ 、IL13、IL4、Jnk、PRF1、STAT5、PRKCQ、IL2受容体ベータ、SOCS2、MYD88、STAT3、STAT1、TBX21、LCK、JAK3、IL受容体、ABL1、IL9、STAT5A、STAT5B、Tcf7、PRDM1、および／またはOMESのうちの1つ以上を介してまたはそれを通じてシグナル伝達の状態を変更させる（例えば、活性化または不活性化する）。

20

30

40

【0069】

いくつかの実施形態では、CBLBの編集は、複数の機能性にわたってNK細胞の機能性を増大し、より効果的であり、長期に持続するNK細胞治療をもたらす。CBLBは、E3ユビキチンリガーゼであり、NK細胞活性化の負の調節因子である。CBLBは、NK細胞の脱顆粒と細胞傷害性を減少させる。CBLBの編集は、限定されないが、特に増殖、細胞傷害性、増加したIFN γ 産生を含む、NK細胞の機能性の複数の側面に影響を

50

与える。いくつかの実施形態では、C B L B の阻害剤は、操作された N K 細胞の投与とともに使用される。いくつかの実施形態では、C B L B 発現は、例えば、C R I S P R - C a s 編集の使用による C B L B 遺伝子の遺伝子編集によってノックダウンまたはノックアウトされる。他の実施形態では、低分子干渉 R N A 、アンチセンス R N A 、T A L E N またはジンクフィンガーが使用される。一部の実施形態では、T 細胞における C B L B 発現は、遺伝子編集によってノックダウンされる。

【0070】

いくつかの実施形態では、C B L B 遺伝子編集は、T A M 受容体 (T y r o - 3 、 A x l および M e r) を介する阻害に対する N K 細胞の耐性を増大する。いくつかの実施形態では、C B L B 遺伝子編集は、活性化される増大された能力を N K 細胞に付与し、したがって、例えば抗腫瘍効果を発揮する。いくつかの実施形態では、C B L B 遺伝子編集は、N K 細胞に増大された増殖能力を付与し、いくつかの実施形態では、ドナー血液試料からロバストな N K 細胞数を生成することができる。さらに、このような実施形態では、C B L B について編集され、C A R を発現するように操作された N K 細胞は、培養でより容易に、ロバストに、および一貫して拡大する。いくつかの実施形態では、C B L B 遺伝子編集は、N K 細胞に増大した細胞傷害性を付与する。いくつかの実施形態では、C B L B の編集は、C A R を発現する操作された N K 細胞および／または操作された T 細胞の細胞傷害効果を相乗的に増大する。

【0071】

いくつかの実施形態では、コードされるタンパク質の発現を減少させるために破壊されるか、ノックアウトされるか、または他の方法で改変される遺伝子は、C D 7 0 である。いくつかの実施形態では、C D 7 0 の発現は、N K 細胞において破壊され (例えば、ノックアウトされ)、これは、N K 細胞が天然に比較的高レベルの C D 7 0 を発現し、発現が天然レベルで維持された場合、抗 C D 7 0 C A R を発現する N K 細胞が、C D 7 0 発現腫瘍細胞だけでなく、他の N K 細胞 (天然の N K 細胞であるか、または C D 7 0 C A R を発現するものである) もまた標的とするためである。したがって、いくつかの実施形態では、抗 C D 7 0 C A R を発現する操作された N K 細胞が、C D 7 0 を発現する腫瘍だけでなく治療用 N K 細胞を標的としないように、遺伝子編集を用いて、N K 細胞による C D 7 0 発現をノックアウトする。いくつかの実施形態では、C D 7 0 の阻害剤は、操作された N K 細胞の投与と組み合わせて使用される。いくつかの実施形態では、C D 7 0 発現は、例えば、C R I S P R - C a s 編集の使用による C D 7 0 遺伝子の遺伝子編集によってノックダウンまたはノックアウトされる。他の実施形態では、低分子 R N A 、アンチセンス R N A 、T A L E N またはジンクフィンガーが使用される。一部の実施形態では、T 細胞における C D 7 0 発現は、遺伝子編集によってノックダウンされる。

【0072】

いくつかの実施形態では、免疫細胞の遺伝子編集はまた、編集された免疫細胞の拡大、持続性および／または細胞傷害性における予想外の増大を提供することができる。本明細書に開示されるように、操作された細胞 (例えば、C A R を発現する細胞) もまた編集され得、その組み合わせは、免疫療法のためのロバストな細胞を提供する。いくつかの実施形態では、編集は、予想外に改善された N K 細胞の拡大、持続性および／または細胞傷害性を可能にする。いくつかの実施形態では、N K 細胞における C I S H 発現のノックアウトは、N K 細胞における I L 1 5 媒介シグナル伝達の強力な負の調節因子を除去し、N K 細胞を脱阻害し、増大した N K 細胞ホーミング、N K 細胞遊走、N K 細胞の活性化、拡大、細胞傷害性および／または持続性のうちの 1 つ以上を可能にする。いくつかの実施形態では、N K 細胞における C B L B 発現のノックアウトは、T A M 媒介阻害に対する N K 細胞の耐性を増加させる。追加の実施形態では、抗 C D 7 0 C A R を発現する操作された N K 細胞が C D 7 0 発現腫瘍と同様に治療用 N K 細胞を標的としないように、N K 細胞において C D 7 0 がノックアウトされる。さらに、いくつかの実施形態では、編集は、他には抑制的な腫瘍微小環境における N K 細胞および／または T 細胞機能を増大させることができる。いくつかの実施形態では、C I S H 遺伝子編集は、外因的に提供される N o t c

10

20

30

40

50

h リガンドを必要とせずに、増大したNK細胞拡大、持続性および／または細胞傷害性をもたらす。

【0073】

細胞外ドメイン（腫瘍結合因子）

本明細書に記載される組成物および方法の一部の実施形態は、本明細書に記載されるように、腫瘍結合ドメイン（抗原結合タンパク質または抗原結合ドメインとも呼ばれる）を含む細胞外ドメインを含むキメラ抗原受容体に関する。腫瘍結合ドメインは、実施形態に依存して、例えば、CD70を標的化する。

【0074】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、抗体、抗体断片、scFv、Fv、Fab、(Fab')₂、単ドメイン抗体(SDAB)、vHもしくはvLドメイン、ラクダVHHドメイン、または非免疫グロブリン足場、例えば、DARPIN、アフィボディ、アフィリン、アドネクチン、アフィチン、レポボディ、フィノマー、アルファボディ、アビマー、アトリマー、センチリン、プロネクチン、アンチカリン、クニッツドメイン、アルマジロリピートタンパク質、自己抗原、受容体またはリガンドの野生型もしくは非野生型配列に由来するかまたはそれを含む。一部の実施形態では、腫瘍結合ドメインは、1を超える抗原結合ドメインを含む。

【0075】

抗原結合タンパク質

いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質が提供される。本明細書で使用される場合、用語「抗原結合タンパク質」は、その通常の意味が与えられるものとし、また、抗原に結合する抗原結合断片、および、適宜、抗原結合断片が抗原への抗原結合タンパク質の結合を促進する立体構造をとることを可能にする足場またはフレームワーク部分を含むタンパク質をも指すものとする。一部の実施形態では、抗原は、がん抗原（例えば、CD70）またはその断片である。一部の実施形態では、抗原結合断片は、抗原に結合する抗体由来の少なくとも1つのCDRを含む。一部の実施形態では、抗原結合断片は、抗原に結合する抗体の重鎖由来の、または抗原に結合する抗体の軽鎖由来の3つの全てのCDRを含む。さらに一部の実施形態では、抗原結合断片は、抗原に結合する抗体（重鎖由来の3つおよび軽鎖由来の3つ）由来の6つの全てのCDRを含む。いくつかの実施形態では、抗原結合断片は、抗原に結合する抗体由来の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのCDRを含み、いくつかの実施形態では、CDRは、重鎖および／または軽鎖CDRの任意の組み合わせであり得る。一部の実施形態における抗原結合断片は、抗体断片である。

【0076】

抗原結合タンパク質の非限定的な例としては、抗体、抗体断片（例えば、抗体の抗原結合断片）、抗体誘導体、および抗体類似体が挙げられる。さらなる具体的な例としては、限定されないが、一本鎖可変断片(scFv)、ナノボディ（例えば、ラクダ重鎖抗体のVHドメイン；VHH断片）、Fab断片、Fab'断片、F(ab')₂断片、Fv断片、Fd断片、および相補性決定領域(CDR)断片が挙げられる。これらの分子は、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、またはブタ、イヌ、またはラクダなどの任意の哺乳動物源に由来することができる。抗体断片は、無傷の（例えば、天然の）抗体と標的抗原の結合について競合し得、断片は、無傷の抗体の修飾（例えば、酵素的または化学的切断）または組換えDNA技術もしくはペプチド合成を用いてデノボ合成され得る。抗原結合タンパク質は、例えば、移植されたCDRまたはCDR誘導体を有する代替のタンパク質骨格または人工足場を含むことができる。このような足場は、限定されないが、例えば、抗原結合タンパク質の三次元構造を安定化するために導入された突然変異を含む抗体由来足場、ならびに、例えば、生体適合性ポリマーを含む完全に合成された足場を含む。さらに、ペプチド抗体模倣物（「PAM」）、ならびに足場としてフィブロネクチン成分を利用する抗体模倣物に基づく足場を使用することができる。

【0077】

一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、単一のポリペプチド鎖または複数のポリペプチド鎖に組み込まれた1つ以上の抗体断片を含む。例えば、抗原結合タンパク質は、限定されないが、ダイアボディ；細胞内抗体；ドメイン抗体（単一のV_LもしくはV_Hドメイン、またはペプチドリンカーによって接続された2つ以上のV_Hドメイン）；マキシボディ（maxibody）（Fc領域に融合した2つのscFv）；トリアボディ；テトラボディ；ミニボディ（CH3ドメインに融合したscFv）；ペプチボディ（Fc領域に結合した1つ以上のペプチド）；線状抗体（相補的な軽鎖ポリペプチドとともに1対の抗原結合領域を形成する1対のタンデムFdセグメント（V_H-CH1-V_H-CH1））；小モジュラー免疫医薬；および免疫グロブリン融合タンパク質（例えば、IgG-scFv、IgG-Fab、2scFv-IgG、4scFv-IgG、V_H-IgG、IgG-V_H、およびFab-scFv-Fc）を含むことができる。

10

【0078】

一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、免疫グロブリンの構造を有する。本明細書で使用される場合、用語「免疫グロブリン」は、その通常の意味が与えられ、また、四量体分子を指すものとし、各四量体は2つの同一のポリペプチド鎖対を含み、各対は1つの「軽」鎖（約25kDa）および1つの「重」鎖（約50～70kDa）を有する。各鎖のアミノ末端部分は、抗原認識に主に関与する約100～110個以上のアミノ酸の可変領域を含む。各鎖のカルボキシ末端部分は、エフェクター機能に主に関与する定常領域を画定する。

【0079】

20

軽鎖および重鎖内では、可変領域（V）および定常領域（C）は、約12個以上のアミノ酸の「J」領域によって連結され、重鎖はまた、約10個以上のアミノ酸の「D」領域を含む。各軽鎖／重鎖対の可変領域は、無傷の免疫グロブリンが2つの結合部位を有するように抗体結合部位を形成する。

【0080】

免疫グロブリン鎖は、相補性決定領域またはCDRとも呼ばれる3つの超可変領域によって接続された、比較的保存されたフレームワーク領域（FR）の同じ一般的構造を示す。N末端からC末端まで、軽鎖と重鎖の両方は、ドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3およびFR4を含む。

【0081】

30

ヒトの軽鎖はカッパ軽鎖およびラムダ軽鎖に分類される。抗体「軽鎖」とは、抗体分子中にそれらの天然に存在する立体構造で存在する2つのタイプのポリペプチド鎖のうちの小さい方を指す。カッパ（K）およびラムダ（λ）軽鎖は、2つの主要な抗体軽鎖アイソタイプを指す。軽鎖は、アミノ末端からカルボキシル末端まで、単一免疫グロブリン軽鎖可変領域（V_L）および単一免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン（C_L）を含むポリペプチドを含み得る。

【0082】

重鎖は、ミュー（μ）、デルタ（Δ）、ガンマ（γ）、アルファ（α）、およびイプシロン（ε）に分類され、抗体のアイソタイプをそれぞれIgM、IgD、IgG、IgA、IgEとして定義する。抗体「重鎖」とは、その天然に存在する立体構造で抗体分子中に存在する2つのタイプのポリペプチド鎖のうち、より大きいものを指し、通常、抗体が属するクラスを決定する。重鎖は、アミノ末端からカルボキシル末端に、単一免疫グロブリン重鎖可変領域（V_H）、免疫グロブリン重鎖定常ドメイン1（CH1）、免疫グロブリンヒンジ領域、免疫グロブリン重鎖定常ドメイン2（CH2）、免疫グロブリン重鎖定常ドメイン3（CH3）、および、適宜免疫グロブリン重鎖定常ドメイン4（CH4）を含むポリペプチドを含み得る。

40

【0083】

IgGクラスは、サブクラス、すなわち、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4にさらに分けられる。IgAクラスは、サブクラス、すなわちIgA1およびIgA2にさらに分けられる。IgMは、限定されないが、IgM1およびIgM2を含むサブ

50

クラスを有する。IgG、IgA、およびIgD抗体の重鎖は、3つのドメイン（CH1、CH2、およびCH3）を有し、IgMおよびIgE抗体の重鎖は、4つのドメイン（CH1、CH2、CH3、およびCH4）を有する。免疫グロブリン重鎖定常ドメインは、サブタイプを含む任意の免疫グロブリンアイソタイプ由来であり得る。抗体鎖は、CLドメインとCH1ドメイン間（例えば、軽鎖と重鎖間）、および抗体重鎖のヒンジ領域間のポリペプチド間ジスルフィド結合を介して互いに連結される。

【0084】

一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は抗体である。用語「抗体」は、本明細書で使用される場合、抗原と特異的に結合する免疫グロブリン分子に由来するタンパク質またはポリペプチド配列を指す。抗体は、モノクローナル、またはポリクローナル、多重または一本鎖、または無傷の免疫グロブリンであり得、天然供給源または組換え供給源に由来し得る。抗体は、免疫グロブリン分子の四量体であり得る。抗体は、「ヒト化」、「キメラ」または非ヒトであり得る。抗体は、任意のアイソタイプの無傷の免疫グロブリンを含み得、例えば、キメラ、ヒト化、ヒト、および二重特異性抗体を含む。無傷抗体は、一般的に、少なくとも2つの全長重鎖および2つの全長軽鎖を含む。抗体配列は、単一の種からのみ誘導することができ、または「キメラ」であり得、すなわち、抗体の異なる部分は、以下にさらに記載するように、2つの異なる種に由来することができる。他に指示がない限り、用語「抗体」はまた、2つの実質的に全長の重鎖および2つの実質的に全長の軽鎖を含む抗体を含むが、ただし、抗体が2つの全長の軽鎖および重鎖で構成される抗体と同じかまたは類似した結合および／または機能を保持することを条件とする。例えば、重鎖および／または軽鎖のN末端および／またはC末端における1、2、3、4または5個のアミノ酸残基の置換、挿入または欠失を有する抗体は定義に含まれるが、抗体が2つの全長重鎖および2つの全長軽鎖を含む抗体と同じかまたは類似した結合および／または機能を保持することを条件とする。抗体の例としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、二重特異性抗体、および合成抗体が挙げられる。一部の実施形態では、モノクローナルおよびポリクローナル抗体が提供される。本明細書で使用される場合、用語「ポリクローナル抗体」は、その通常の意味が与えられるものとし、また、組成および結合特異性において典型的に広く変化する抗体集団を指すものとする。本明細書で使用される場合、用語「モノクローナル抗体」（「mAb」）は、その通常の意味が与えられるものとし、また、同一の配列を有する抗体集団の1つ以上を指すものとする。モノクローナル抗体は、抗原上の特定のエピトープで抗原に結合する。

【0085】

いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、抗体の断片または抗原結合断片である。用語「抗体断片」は、抗原のエピトープと特異的に相互作用する（例えば、結合、立体障害、安定化／不安定化、空間分布により）能力を保持する抗体の少なくとも1つの部分を指す。抗体断片の例としては、限定されないが、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv断片、scFv抗体断片、ジスルフィド結合Fvs（sdFv）、VHおよびCHIドメインからなるFd断片、線状抗体、sdAb（vLまたはvHのいずれか）などの一重ドメイン抗体、ラクダVHHドメイン、ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む二価断片などの抗体断片から形成される多重特異性抗体、および抗体の単離されたCDRまたは他のエピトープ結合断片が挙げられる。抗原結合断片はまた、単一ドメイン抗体、マキシボディ、ミニボディ、ナノボディ、イントラボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、v-NARおよびbis-scFv（例えば、Hollinger and Hudson, Nature Biotechnology 23: 1126-1136, 2005を参照されたい）に組み込むことができる。抗原結合断片はまた、フィブロネクチンIII型（Fn3）などのポリペプチドに基づく足場に移植することもできる（例えば、フィブロネクチンポリペプチドミニボディを記載する米国特許第6,703,199号を参照されたい）。抗体断片は、がん抗原（例えば、CD70）への特異的抗原結合を付与するのに十分な免疫グロブリンの少なくとも1つのCDRを含むFab、Fab'、F(ab')₂、および／またはFv断片を含み得る。抗体断片は、組換えDNA技術によって、また

は無傷抗体の酵素的もしくは化学的切断によって生成され得る。

【0086】

いくつかの実施形態では、F a b断片が提供される。F a b断片は、V L、V H、C LおよびC H1ドメインを有する一価断片であり；F (a b')₂断片は、ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つのF a b断片を有する二価断片であり；F d断片は、V HおよびC H1ドメインを有し；F v断片は、抗体の単一アームのV LおよびV Hドメインを有し；ならびにd A b断片は、V Hドメイン、V Lドメイン、またはV HもしくはV Lドメインの抗原結合断片を有する。いくつかの実施形態では、これらの抗体断片は、単一ドメイン抗体、一本鎖抗体、マキシボディ、ミニボディ、体内抗体、イントラボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、v-N A Rおよびビス-s c F vに組み込むことができる。いくつかの実施形態では、抗体は、本明細書に記載されるように、少なくとも1つのC D Rを含む。

【0087】

本明細書には、いくつかの実施形態では、一本鎖可変断片も提供される。本明細書で 사용되는場合、用語「一本鎖可変断片」(「s c F v」)は、その通常の意味を与えられるものとし、また、リンカー(例えば、アミノ酸残基の合成配列)を介してV LおよびV H領域が接続されて連続タンパク質鎖を形成する融合タンパク質を指すものとし、リンカーは、タンパク質鎖がそれ自身で折り返し、一価抗原結合部位を形成するのに十分な長さである。明瞭にすることを目的として、他に指示がない限り、「一本鎖可変断片」は、本明細書中で定義される抗体または抗体断片ではない。ダイアボディは、2つのポリペプチド鎖を含む二価抗体であり、各ポリペプチド鎖は、同じ鎖上の2つのドメイン間の対合を減少させるかまたは許容しないように構成されたリンカーによって接続されたV HおよびV Lドメインを含み、したがって、各ドメインが別のポリペプチド鎖上の相補的ドメインと対合することを可能にする。いくつかの実施形態によれば、ダイアボディの2つのポリペプチド鎖が同一である場合、それらの対合から生じるダイアボディは、2つの同一の抗原結合部位を有する。異なる配列を有するポリペプチド鎖を用いて、2つの異なる抗原結合部位を有するダイアボディを作製することができる。同様に、トリボディおよびテトラボディは、それぞれ3つおよび4つのポリペプチド鎖を含む抗体であり、それぞれ、3つおよび4つの抗原結合部位を形成するが、これらは同じであるかまたは異なることができる。

【0088】

いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、1つ以上のC D Rを含む。本明細書で 사용되는場合、用語「C D R」は、その通常の意味を与えられるものとし、抗体可変配列内の相補性決定領域(「最小認識単位」または「超可変領域」とも呼ばれる)も指すものとする。C D Rは、抗原結合タンパク質が目的の特定の抗原に特異的に結合することを可能にする。3つの重鎖可変領域C D R(C D R-H 1、C D R-H 2およびC D R-H 3)および3つの軽鎖可変領域C D R(C D R-L 1、C D R-L 2およびC D R-L 3)がある。2つの鎖の各々におけるC D Rは、典型的には、フレームワーク領域によって整列され、標的タンパク質上の特定のエピトープまたはドメインに特異的に結合する構造を形成する。N末端からC末端に、天然に存在する軽鎖および重鎖可変領域はともに、典型的には、これらのエレメントの以下の順序：F W 1、C D R 1、F W 2、C D R 2、F W 3、C D R 3、F W 4に一致する。重鎖可変領域については、その順序は、典型的には、N末端からC末端にF W-H 1、C D R-H 1、F W-H 2、C D R-H 2、F W-H 3、C D R-H 3、およびF W-H 4である。軽鎖可変領域については、その順序は、典型的には、N末端からC末端にF W-L 1、C D R-L 1、F W-L 2、C D R-L 2、F W-L 3、C D R-L 3、F W-L 4である。これらのドメインの各々において位置を占めるアミノ酸に番号を付ける番号付けシステムが考案されている。この番号付けシステムは、Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (1987 and 1991, NIH, Bethesda, MD)またはChothia & Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., 1989, Nature 342:878-883に定義される。所定の

抗体の相補性決定領域（CDR）およびフレームワーク領域（FR）は、このシステムを用いて同定され得る。免疫グロブリン鎖中のアミノ酸の他の番号付けシステムには、IMGT（登録商標）（the international ImmunoGeneTics information system; Lefranc et al, Dev. Comp. Immunol. 29:185-203; 2005）、およびAHO（Honninger and Pluckthun, J. Mol. Biol. 309(3):657-670; 2001）が含まれる。本明細書に開示される結合ドメインは、これらのシステムのいずれかに従って定義されるCDRを利用することができる。1を超えるCDRを含有する任意の所与の実施形態について、CDRは、Kabatt、Chothia、extended、IMGT、Paratome、AbM、および／もしくは立体配座定義のいずれか、または上記のいずれかの組み合わせに従って定義することができる。任意のCDRは、別々にまたは可変ドメインのコンテキスト内で、これらの番号付けシステムのいずれかの下で、適宜、当業者によって解釈され得る。1つ以上のCDRを、共有結合的または非共有結合的に分子に組み込んで、それを抗原結合タンパク質とすることができる。

10

【0089】

いくつかの実施形態では、本明細書において提供される抗原結合タンパク質は、より大きなポリペプチド鎖の一部として1つ以上のCDR（複数可）を含む。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、1つ以上のCDR（複数可）を別のポリペプチド鎖に共有結合的に連結する。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質には、1つ以上のCDRが非共有結合的に組み込まれる。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、生体適合性フレームワーク構造に組み込まれた、本明細書に記載されるCDRの少なくとも1つを含み得る。いくつかの実施形態では、生体適合性フレームワーク構造は、局在化表面領域において抗原（例えば、CDR、可変領域など）に結合するアミノ酸の1つ以上の配列を提示することができる、立体構造的に安定な構造支持体、またはフレームワーク、または足場を形成するのに十分なポリペプチドまたはその一部を含む。このような構造は、天然に存在するポリペプチドもしくはポリペプチド「折り畳み」（構造モチーフ）であり得るか、または天然に存在するポリペプチドもしくは折り畳みに対して、アミノ酸の付加、欠失および／もしくは置換などの1つ以上の修飾を有し得る。実施形態に応じて、足場は、ヒト、非ヒト霊長類または他の哺乳動物、他の脊椎動物、無脊椎動物、植物、細菌もしくはウイルスなどの種々の異なる種（または1を超える種）のポリペプチドから誘導することができる。

20

30

【0090】

用語「コンセンサス配列」とは、配列に関して本明細書で使用される場合、配列群の各位置における許容されるアミノ酸の全ての異なる組み合わせを表す一般化された配列を指す。コンセンサス配列は、その単位（例えば、アミノ酸またはヌクレオチド）が、配列の大部分または全てにおいて同一である関連配列の保存領域、および配列間の相違を示す領域についての洞察を提供し得る。抗体の場合、CDRのコンセンサス配列は、抗原結合に重要であるかまたは不可欠でないアミノ酸を示すことができる。コンセンサス配列は、本明細書において提供される任意の配列で調製され得、コンセンサス配列から誘導される得られた種々の配列は、鋳型配列と同様の効果を有することが検証され得ることが想定される。

40

【0091】

一部の実施形態では、抗体またはその結合断片は、CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3の組み合わせを含み、これらのCDRの1つ以上がコンセンサス配列によって定義される。本明細書で提供されるコンセンサス配列は、本明細書で提供されるCDRのアラインメントに由来している。しかしながら、代替アラインメントを行うことができ（例えば、グローバルまたはローカルアラインメントを使用する、またはHidden Markov Models、シードガイドツリー、Needleman-Wunschアルゴリズム、またはSmith-Watermanアルゴリズムなどの異なるアルゴリズムを使用する）、このような代替的コンセンサス配列を導出することができることが想定される。

50

【0092】

実施形態に応じて、生体適合性フレームワーク構造は、免疫グロブリンドメイン以外のタンパク質足場または骨格に基づく。一部のこのような実施形態では、これらのフレームワーク構造は、フィブロネクチン、アンキリン、リポカリン、ネオカルジノスタチン、チトクロームb、CP1ジンクフィンガー、PST1、コイルドコイル、LACIED1、Zドメインおよび／またはテンダミスタドメインに基づく。

【0093】

本明細書で使用される場合、用語「キメラ抗体」は、その通常の意味を与えられるものとし、1つの抗体からの1つ以上の領域、および1つ以上の他の抗体からの1つ以上の領域を含む抗体をも指すものとする。例えば、本明細書で開示される、例えば、CD70を標的とする抗原結合タンパク質のフレームワーク領域は、ヒト抗体などの1つ以上の異なる抗体、またはヒト化抗体に由来することができる。キメラ抗体の1つの例において、重鎖および／または軽鎖の一部は、特定の種由来の抗体、または特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体と同一であるか、それに相同であるか、またはそれに由来するが、一方、鎖（複数可）の残りは、別の種由来の抗体、または別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体と同一であるか、それに相同であるか、またはそれに由来する。また、本明細書には、所望の生物学的活性を示すこのような抗体の断片も提供される。一部の実施形態では、本明細書に開示されるCARは、抗CD70結合ドメインを含む。

【0094】

一部の実施形態では、抗CD70結合ドメインは、リンカーによって結合されたVHおよびVLを含む。一部の実施形態では、抗CD70結合ドメインはscFvである。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるCARは、腫瘍抗原の結合因子としてscFvを含む。いくつかの実施形態では、scFvは、配列番号23～24、30～32、および／または34～37のうちの1つ以上と少なくとも約85%、約90%、約95%、またはそれ以上の配列同一性を有する配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、scFvは、配列番号23に示される配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる。一部の実施形態では、scFvは、配列番号24に示される配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、scFvは、配列番号30に示される配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、scFvは、配列番号31に示される配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、scFvは、配列番号32に示される配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、scFvは、配列番号34に示される配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、scFvは、配列番号35に示される配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、scFvは、配列番号36に示される配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、scFvは、配列番号37に示される配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、scFvは、配列番号25～26、47～49、および／または51～54のうちの1つ以上と少なくとも約85%、約90%、約95%、またはそれ以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、scFvは、配列番号25に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、scFvは、配列番号26に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、scFvは、配列番号47に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、scFvは、配列番号48に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、scFvは、配列番号49に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、scFvは、配列番号51に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、scFvは、配列番号52に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、scFvは、配列番号53に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、scFvは、配列番号54に示されるアミノ酸配列を含む。

【0095】

いくつかの実施形態では、種々のドメイン／サブドメインは、例えば、GS3リンカー

(配列番号 208) または GS2 リンカー (配列番号 15 および 16、それぞれヌクレオチドおよびタンパク質) が使用される (または GS_n リンカー) などのリンカーによって分離される。本明細書に開示される種々の実施形態に従って使用される他のリンカーには、限定されないが、配列番号 17、19、または 21 によってコードされるものが含まれる。いくつかの実施形態では、他のリンカーは、配列番号 18、20、または 22 のうちの 1 つのペプチド配列を含む。一部の実施形態では、リンカーは、配列番号 50 の配列を含む。これは、受容体複合体の発現、安定性、および／または機能性を増大させることができるポリヌクレオチドに沿って、受容体複合体の種々の成分部分を分離する可能性を提供する。

【0096】

細胞傷害性シグナル伝達複合体

本明細書に記載される組成物および方法の一部の実施形態は、細胞傷害性シグナル伝達複合体を含むキメラ抗原受容体 (例えば、CD70 に対する指向性を有する CAR) に関する。本明細書に開示されるように、いくつかの実施形態によれば、提供される細胞傷害性受容体複合体は、標的細胞の表面上のリガンドに結合する細胞外ドメイン (複数可) 上で細胞傷害性シグナル伝達カスケードを開始する 1 つ以上の膜貫通ドメインおよび／または細胞内ドメインを含む。

【0097】

いくつかの実施形態では、細胞傷害性シグナル伝達複合体は、少なくとも 1 つの膜貫通ドメイン、少なくとも 1 つの共刺激ドメイン、および／または少なくとも 1 つのシグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態では、1 を超える成分部分は、所定のドメインを構成する - 例えば、共刺激ドメインは 2 つのサブドメインを含むことができる。さらに、一部の実施形態では、ドメインは、複数の機能を果たすことができ、例えば、膜貫通ドメインは、シグナル伝達機能を提供するのに役立つことができる。

【0098】

膜貫通ドメイン

本明細書に記載される組成物および方法の一部の実施形態は、膜貫通ドメインを含むキメラ受容体 (例えば、腫瘍抗原指向性 CAR および／またはリガンド指向性キメラ受容体) に関する。膜貫通ドメインが採用されるいくつかの実施形態では、採用される膜貫通タンパク質の部分は、その正常な膜貫通ドメインの少なくとも一部を保持する。

【0099】

しかしながら、いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、T 細胞と NK 細胞の両方に通常発現される膜貫通糖タンパク質である CD8 の少なくとも一部を含む。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは CD8 α を含む。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、CD8 α 膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、CD8 α 膜貫通ドメインは、配列番号 3 の核酸配列を有する。いくつかの実施形態では、CD8 α 膜貫通ドメインは、切断または修飾されており、配列番号 3 の配列を有する CD8 α と少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95% の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、CD8 α 膜貫通ドメインは、配列番号 4 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD8 α 膜貫通ドメインは、切断または改変されており、配列番号 4 の配列を有する CD8 α と少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95% の配列同一性を有する。

【0100】

いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは「ヒンジ」ドメインに結合される。いくつかの実施形態では、CD8 α の「ヒンジ」ドメインは、配列番号 1 の核酸配列を有する。いくつかの実施形態では、CD8 α ヒンジは切断されるかまたは修飾され、配列番号 1 の配列を有する CD8 α と少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95% の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、CD8 α の「ヒンジ」は、配列番号 2 のアミノ酸配列を含む。一部の実施

10

20

30

40

50

形態では、CD8 α のヒンジは、配列番号2の配列と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%の配列同一性を有するように切断または修飾され得る。

【0101】

いくつかの実施形態では、CD8 α ヒンジおよびCD8 α 膜貫通ドメインは一緒に使用される（本明細書ではCD8ヒンジ／膜貫通複合体と呼ばれる）。いくつかの実施形態では、CD8ヒンジ／膜貫通複合体は、配列番号13の核酸配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、CD8ヒンジ／膜貫通複合体は切断されるかまたは修飾され、配列番号13の配列を有するCD8ヒンジ／膜貫通複合体と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、CD8ヒンジ／膜貫通複合体は、配列番号14のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD8ヒンジ／膜貫通複合ヒンジは切断されるかまたは修飾され、配列番号14の配列を有するCD8ヒンジ／膜貫通複合体と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%の配列同一性を有する。

10

【0102】

刺激ドメイン

本明細書に記載される組成物および方法の一部の実施形態は、刺激ドメインを含むキメラ抗原受容体に関する。種々の膜貫通ドメインおよびシグナル伝達ドメイン（ならびに膜貫通ドメイン／シグナル伝達ドメインの組み合わせ）に加えて、いくつかの実施形態では、追加の刺激分子が提供され得る。これらは、例えば、免疫細胞の活性をさらに増大させる特定の分子であり得る。サイトカインは、一部の実施形態において使用され得る。例えば、非限定的な例として、IL-2および／またはIL-15などの特定のインターロイキンが使用される。一部の実施形態では、治療のための免疫細胞は、分泌型のような分子を発現するように操作される。さらなる実施形態では、このような刺激ドメインは、自己分泌刺激分子として（または隣接する細胞へのパラクリン刺激因子としてさえも）作用する膜結合性であるように操作される。

20

【0103】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるNK細胞は、インターロイキン15（IL15、IL-15）を発現するように操作される。一部の実施形態では、IL15は、本明細書に開示されるCARのいずれか1つを含むコンストラクト上の別個のカセットから発現される。一部の実施形態では、IL15は、本明細書に開示されるCARのいずれか1つと同じカセットで発現され、場合により、切断部位、例えば、タンパク質分解切断部位またはT2A、P2A、E2A、もしくはF2A自己切断ペプチド切断部位によって分離される。一部の実施形態では、IL15は、膜結合IL15（mbIL15）である。一部の実施形態では、mbIL15は、ヒト天然IL15配列などの天然IL15配列、および少なくとも1つの膜貫通ドメインを含む。一部の実施形態では、天然IL15配列は、配列番号11と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%の配列同一性を有する配列によってコードされる。一部の実施形態では、天然IL15配列は、配列番号12と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%の配列同一性を有するペプチド配列を含む。一部の実施形態では、天然IL15配列は、配列番号12のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの膜貫通ドメインは、CD8膜貫通ドメインを含む。一部の実施形態では、mbIL15は、リーダー配列および／またはヒンジ配列などの追加の成分を含み得る。一部の実施形態では、リーダー配列はCD8リーダー配列である。一部の実施形態では、ヒンジ配列はCD8ヒンジ配列である。

30

40

【0104】

一部の実施形態では、腫瘍抗原指向性CARおよび／または腫瘍リガンド指向性キメラ受容体は、1つ以上の細胞質プロテアーゼ切断部位をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。このような部位は、細胞質プロテアーゼによって認識され、切断され、

50

ポリヌクレオチドによってコードされる受容体の種々の成分部分の分離（および別々の発現）をもたらすことができる。一部の実施形態では、腫瘍抗原指向性CARおよび／または腫瘍リガンド指向性キメラ受容体は、1つ以上の自己切断ペプチド、例えば、T2A切断部位、P2A切断部位、E2A切断部位、および／またはF2A切断部位をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。結果として、実施形態に応じて、操作された細胞傷害性受容体複合体の種々の構成部分は、単一のベクターまたは複数のベクターによりNK細胞またはT細胞にデリバリーされ得る。したがって、図に概略的に示されるように、コンストラクトは、単一のポリヌクレオチドによってコードされ得るが、切断部位も含み、そのため、コンストラクトの下流要素は、別個のタンパク質として細胞により発現される（IL-15を有する一部の実施形態における場合のように）。いくつかの実施形態では、T2A切断部位が使用される。いくつかの実施形態では、T2A切断部位は、配列番号9の核酸配列を有する。いくつかの実施形態では、T2A切断部位は、配列番号9の配列と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%の配列同一性を有するように切断されるかまたは修飾され得る。いくつかの実施形態では、T2A切断部位は、配列番号10のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、T2A切断部位は切断されるかまたは修飾され、配列番号10の配列を有するT2A切断部位と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%の配列同一性を有する。

10

20

30

40

50

【0105】

いくつかの実施形態では、NK細胞は、膜結合インターロイキン15（mbIL15）を発現するように操作される。このような実施形態では、NK上のmbIL15発現は、NK細胞の増殖および／または寿命を増大させることによって、操作されたNK細胞の細胞傷害効果を増大させる。いくつかの実施形態では、mbIL15はCARと同じポリヌクレオチドによってコードされるが、別のベクターも使用され得る。いくつかの実施形態では、mbIL15は、配列番号27の核酸配列を有する。いくつかの実施形態では、mbIL15は、配列番号27の配列と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%の配列同一性を有するように、切断または修飾することができる。いくつかの実施形態では、mbIL15は、配列番号28のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、mbIL15は、切断または修飾されており、配列番号28の配列を有するmbIL15と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、mbIL15は、配列番号213のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、mbIL15は切断または修飾され、配列番号213の配列を有するmbIL15と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%の配列同一性を有する。膜結合IL15配列は、PCT公開第2018/183385号および同第2020/056045号において探索され、それらの各々は、参照によりその全体が明示的に本明細書に組み込まれ、膜結合IL15配列に関連する。

【0106】

シグナル伝達ドメイン

本明細書に記載される組成物および方法の一部の実施形態は、シグナル伝達ドメインを含むキメラ受容体（例えば、腫瘍抗原指向性CARおよび／または腫瘍リガンド指向性キメラ受容体）に関する。例えば、本明細書に開示されるいくつかの実施形態に従って操作された免疫細胞は、CD3 T細胞受容体複合体（またはその断片）の少なくとも1つのサブユニットを含み得る。いくつかの実施形態では、シグナル伝達ドメインは、CD3ゼータサブユニットを含む。いくつかの実施形態では、CD3ゼータは、配列番号7の核酸配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、CD3ゼータは、配列番号7の配列を有するCD3ゼータと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%の配列同一性を有するように切断さ

れるかまたは修飾され得る。いくつかの実施形態では、CD3ゼータドメインは、配列番号8のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD3ゼータドメインは切断されるかまたは修飾され、配列番号8の配列を有するCD3ゼータドメインと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%の配列同一性を有する。

【0107】

いくつかの実施形態では、予期せぬ増大したシグナル伝達は、その活性が相乗的に作用する複数のシグナル伝達ドメインの使用によって達成される。例えば、いくつかの実施形態では、シグナル伝達ドメインは、OX40ドメインをさらに含む。いくつかの実施形態では、OX40ドメインは、細胞内シグナル伝達ドメインである。いくつかの実施形態では、OX40細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号5の核酸配列を有する。いくつかの実施形態では、OX40細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号5の配列を有するOX40と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%の配列同一性を有するように切断されるかまたは修飾され得る。いくつかの実施形態では、OX40細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号6のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、OX40細胞内シグナル伝達ドメインは切断されるかまたは修飾され、配列番号6の配列を有するOX40細胞内シグナル伝達ドメインと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、OX40は、コンストラクトにおける唯一の膜貫通／シグナル伝達ドメインとして使用されるが、いくつかの実施形態では、OX40は、1つ以上の他のドメインとともに使用することができる。例えば、いくつかの実施形態では、OX40およびCD3ゼータの組み合わせが使用される。さらなる例として、いくつかの実施形態では、CD28、OX40、4-1BB、および／またはCD3ゼータの組み合わせが使用される。

【0108】

キメラ抗原受容体コンストラクト

いくつかの実施形態では、キメラ抗原受容体の一般的な構造とともに、種々の細胞傷害性受容体複合体（細胞傷害性受容体とも呼ばれる）が本明細書において提供される。図1は、CD70指向性CARの概略図を示す。CARaは、CARの非限定的な実施形態の概略図である。CARbは、CARをコードするポリヌクレオチド、ならびに任意のT2AおよびmbIL15の概略図である。また、図1は、CD70を標的とする2つの非限定的なポリヌクレオチドコンストラクトNK71およびNK72を記述する（任意のT2AおよびmbIL15を含む）。

【0109】

図に示されるように、CARをコードするポリヌクレオチドのいくつかの実施形態は、抗腫瘍結合因子、CD8aヒンジドメイン、CD8a膜貫通ドメイン、OX40ドメイン、CD3ζドメイン（CD3ζ ITAMドメインなど）、2A切断部位、および／または膜結合IL-15ドメイン（ただし、上記のように、一部の実施形態では可溶性IL-15が使用される）を含む。いくつかの実施形態では、結合および活性化機能は、別々のドメインによって行われるように操作される。いくつかの実施形態では、キメラ抗原受容体コンストラクトの一般的な構造は、ヒンジおよび／または膜貫通ドメインを含む。一部の実施形態では、これらは、単一のドメインによって達成され得るか、またはいくつかの実施形態では、複数のサブドメインが使用され得る。受容体複合体は、標的細胞へのホーミング部分の結合後にシグナルを伝達し、最終的に標的細胞における細胞傷害効果をもたらすシグナル伝達ドメインをさらに含む。いくつかの実施形態では、複合体は、共刺激ドメインをさらに含み、いくつかの実施形態では、相乗的に作用して、シグナル伝達ドメインの機能を増大させる。NK細胞および／またはT細胞などの免疫細胞におけるこれらの複合体の発現は、所定の腫瘍マーカーを発現するがん性細胞などの特定の標的細胞の標的化および破壊を可能にする。このような受容体複合体の一部は、標的細胞の表面上のCD70に結合し、操作された細胞を活性化する抗CD70部分、またはCD70結合部分を含

む細胞外ドメインを含む。CD3ゼータITAMサブドメインは、シグナル伝達ドメインとして協調して作用し得る。IL-15ドメイン、例えば、mbIL-15ドメインは、刺激ドメインとして作用し得る。IL-15ドメイン、例えば、mbIL-15ドメインは、それを発現する免疫細胞（例えば、NKまたはT細胞）を、標的腫瘍細胞に対して特に有効にすることができる。mbIL-15ドメインなどのIL-15ドメインは、いくつかの実施形態に従って、別個のコンストラクトにコードされ得ることが承認される。さらに、各成分は、1つ以上の別々の構成要素にコードされ得る。

【0110】

一部の実施形態では、抗CD70結合ドメインが本明細書に開示される。一部の実施形態では、抗CD70結合ドメインはscFvである。これらの抗CD70結合ドメインは、CD70に対して特異的であり、および／または優先的にCD70に結合する。本明細書に開示される抗CD70結合ドメインは、本明細書に開示されるキメラ抗原受容体コンストラクトのいずれか1つに組み込むことができる。本明細書に開示される抗CD70結合ドメインは、さらに、別個にまたは抗CD70 CAR内で、細胞によって発現され得る。

10

【0111】

一部の実施形態では、抗CD70結合ドメインは、配列番号23および／もしくは配列番号24のいずれかの配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはそれ以上、または前述のパーセンテージのうちの任意の2つによって定義される範囲で、同一であるかまたはそれに由来するポリヌクレオチド配列を含む。

20

【0112】

一部の実施形態では、抗CD70結合ドメインは、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む。一部の実施形態では、重鎖可変領域は、CDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含み、軽鎖可変領域は、CDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含む。一部の実施形態では、CDR-H1は、配列番号102～103または110から選択される配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%、または100%の配列同一性を有する配列を含み；CDR-H2は、配列番号104～106または111から選択される配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%、または100%の配列同一性を有する配列を含み；CDR-H3は、配列番号107～109または112から選択される配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%、または100%の配列同一性を有する配列を含み；CDR-L1は、配列番号131～133または140から選択される配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%、または100%の配列同一性を有する配列を含み；CDR-L2は、配列番号134～136または141から選択される配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%、または100%の配列同一性を有する配列を含み；CDR-L3は、配列番号137～139または142から選択される配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%、または100%の配列同一性を有する配列を含む。

30

【0113】

抗CD70結合ドメインの一部の実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号151～153および157から選択される任意の配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、軽鎖可変領域は、配列番号154～156および158から選択される任意の配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

40

【0114】

抗CD70結合ドメインの一部の実施形態では、1) 重鎖可変領域は、配列番号151内のCDR-H1、CDR-H2、CDR-H3を含み、軽鎖可変領域は、配列番号154内のCDR-L1、CDR-L2、CDR-L3を含み；2) 重鎖可変領域は、配列番

50

号152内のCDR-H1、CDR-H2、CDR-H3を含み、軽鎖可変領域は、配列番号155内のCDR-L1、CDR-L2、CDR-L3を含み；3）重鎖可変領域は、配列番号153内のCDR-H1、CDR-H2、CDR-H3を含み、軽鎖可変領域は、配列番号156内のCDR-L1、CDR-L2、CDR-L3を含む；4）重鎖可変領域は、配列番号157内のCDR-H1、CDR-H2、CDR-H3を含み、軽鎖可変領域は、配列番号158内のCDR-L1、CDR-L2、CDR-L3を含む。CD70を標的とする他の軽鎖可変領域、重鎖可変領域、scFvおよびCARは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2022/0002424号に見出すことができる。

【0115】

抗CD70結合ドメインの一部の実施形態では、1）重鎖可変領域は配列番号151を含み、軽鎖可変領域は配列番号154を含み；2）重鎖可変領域は配列番号152を含み、軽鎖可変領域は配列番号155を含み；3）重鎖可変領域は配列番号153を含み、軽鎖可変領域は配列番号156を含み；または4）重鎖可変領域は配列番号157を含み、軽鎖可変領域は配列番号158を含む。

【0116】

抗CD70結合ドメインの一部の実施形態では、重鎖可変領域および／または軽鎖可変領域はフレームワークを含む。一部の実施形態では、重鎖可変領域は、FW-H1、FW-H2、FW-H3、およびFW-H4を含む。一部の実施形態では、重鎖可変領域は、N末端からC末端にFW-H1、CDR-H1、FW-H2、CDR-H2、FW-H3、CDR-H3、およびFW-H4の順序を含む。一部の実施形態では、軽鎖可変領域は、FW-L1、FW-L2、FW-L3、およびFW-L4を含む。一部の実施形態では、軽鎖可変領域は、N末端からC末端にFW-L1、CDR-L1、FW-L2、CDR-L2、FW-L3、CDR-L3、FW-L4の順序を含む。一部の実施形態では、FW-H1は、配列番号73～76から選択される配列と少なくとも95%、99%、または100%の配列同一性を有する配列を含み、FW-H2は、配列番号77～80から選択される配列と少なくとも95%、99%、または100%の配列同一性を有する配列を含み、FW-H3は、配列番号81～96から選択される配列と少なくとも95%、99%、または100%の配列同一性を有する配列を含み、FW-H4は、配列番号97～101から選択される配列と少なくとも95%、99%、または100%の配列同一性を有する配列を含み、FW-L1は、配列番号113～116から選択される配列と少なくとも95%、99%、または100%の配列同一性を有する配列を含み、FW-L2は、配列番号117～120から選択される配列と少なくとも95%、99%、または100%の配列同一性を有する配列を含み、FW-L3は、配列番号121～124から選択される配列と少なくとも95%、99%、または100%の配列同一性を有する配列を含み、FW-L4は、配列番号125～130から選択される配列と少なくとも95%、99%、または100%の配列同一性を有する配列を含む。

【0117】

抗CD70結合ドメインの一部の実施形態では、重鎖可変ドメインは、配列番号143～145および149から選択される任意の配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%、または100%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる。

【0118】

抗CD70結合ドメインの一部の実施形態では、軽鎖可変ドメインは、配列番号146～148および150から選択される任意の配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%、または100%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる。

【0119】

一部の実施形態では、抗CD70結合ドメインは、抗体、Fab'断片、F(ab')₂断片、またはscFvである。

10

20

30

40

50

【0120】

いくつかの実施形態では、抗CD70結合ドメインは、配列番号30～32または34～37のうちの1つ以上の配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上、または前述のパーセンテージの任意の2つによって定義される範囲で同一である配列を含むポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、抗CD70結合ドメインは、配列番号47～49または51～54のうちの1つ以上と少なくとも約85%、約90%、約95%、またはそれ以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0121】

一部の実施形態では、抗CD70結合ドメインは、CDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含む重鎖可変領域（VH）を含む。一部の実施形態では、CDR-H1は、配列番号102、103、110、または205に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CDR-H2は、配列番号104、105、106、111、206、または225に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CDR-H3は、配列番号107、108、109、112、207、または226に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VHは、それぞれ配列番号205、206、および207に示されるアミノ酸配列を含むCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含む。一部の実施形態では、VHは、それぞれ配列番号110、111、および112に示されるアミノ酸配列を含むCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含む。一部の実施形態では、VHは、それぞれ配列番号205、225、および226に示されるアミノ酸配列を含むCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含む。一部の実施形態では、VHは、配列番号151、152、153、または157に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VHは、配列番号151に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VHは、配列番号152に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VHは、配列番号153に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VHは、配列番号157に示されるアミノ酸配列を含む。

【0122】

一部の実施形態では、抗CD70結合ドメインは、CDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含む軽鎖可変領域（VL）を含む。一部の実施形態では、CDR-L1は、配列番号131、132、133、140、204、または209に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CDR-L2は、配列番号134、135、136、141、210、または223に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CDR-L3は、配列番号137、138、139、142、211、または224に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VLは、それぞれ配列番号209、210、および211に示されるアミノ酸配列を含むCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含む。一部の実施形態では、VLは、それぞれ配列番号140、141、および142に示されるアミノ酸配列を含むCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含む。一部の実施形態では、VLは、それぞれ配列番号204、223、および224に示されるアミノ酸配列を含むCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含む。一部の実施形態では、VLは、配列番号154、155、156、または158に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VLは、配列番号154に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VLは、配列番号155に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VLは、配列番号156に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VLは、配列番号158に示されるアミノ酸配列を含む。

【0123】

一部の実施形態では、VHは、それぞれ配列番号205、206、および207に示されるアミノ酸配列を含むCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含み；VLは、それぞれ配列番号209、210、および211に示されるアミノ酸配列を含むCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含む。一部の実施形態では、VHは、配

10

20

30

40

50

列番号 153 に示されるアミノ酸配列を含み、V L は、配列番号 156 に示されるアミノ酸配列を含む。

【0124】

一部の実施形態では、V H は、配列番号 110、111、および 112 にそれぞれ示されるアミノ酸配列を含む C D R-H1、C D R-H2、および C D R-H3 を含み；V L は、配列番号 140、141、および 142 にそれぞれ示されるアミノ酸配列を含む C D R-L1、C D R-L2、および C D R-L3 を含む。一部の実施形態では、V H は、配列番号 157 に示されるアミノ酸配列を含み、V L は配列番号 158 に示されるアミノ酸配列を含む。

【0125】

一部の実施形態では、V H は、それぞれ配列番号 205、225、および 226 に示されるアミノ酸配列を含む C D R-H1、C D R-H2、および C D R-H3 を含み；V L は、それぞれ配列番号 204、223、および 224 に示されるアミノ酸配列を含む C D R-L1、C D R-L2、および C D R-L3 を含む。一部の実施形態では、V H は、配列番号 152 に示されるアミノ酸配列を含み、V L は、配列番号 155 に示されるアミノ酸配列を含む。

【0126】

一部の実施形態では、抗 C D 70 結合ドメインは、リンカーによって結合された V H および V L を含む。一部の実施形態では、抗 C D 70 結合ドメインは s c F v である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される C A R は、腫瘍抗原に対する結合因子として s c F v を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、配列番号 50 または 208 のアミノ酸配列を含む。

【0127】

いくつかの実施形態では、s c F v は、配列番号 25～26、47～49、および／または 51～54 のうちの 1 つ以上と少なくとも約 85 %、約 90 %、約 95 %、またはそれ以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、s c F v は、配列番号 25 に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、s c F v は、配列番号 26 に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、s c F v は、配列番号 47 に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、s c F v は、配列番号 48 に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、s c F v は、配列番号 49 に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、s c F v は、配列番号 51 に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、s c F v は、配列番号 52 に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、s c F v は、配列番号 53 に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、s c F v は、配列番号 54 に示されるアミノ酸配列を含む。

【0128】

また、本明細書には、C A R が開示される。一部の実施形態では、C A R は抗 C D 70 C A R である。一部の実施形態では、C A R は、本明細書に開示される抗 C D 70 結合ドメインの 1 つ以上を含む。

【0129】

一部の実施形態では、C A R は、O X 40 サブドメインおよび C D 3 ゼータサブドメインをさらに含む。いくつかの実施形態では、O X 40 サブドメインは、配列番号 5 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、O X 40 サブドメインは、配列番号 6 と少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 99 %、または少なくとも 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、O X 40 サブドメインは、配列番号 6 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、C D 3 ゼータサブドメインは、配列番号 7 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、C D 3 ゼータサブドメインは、配列番号 8 と少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 99 %、または少なくとも 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、C D 3 ゼータサブドメインは、配列番号

8のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、mbIL15は、配列番号27と少なくとも95%の配列同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、mbIL15は、配列番号213のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、配列番号30～32および／または34～37の1つ以上、OX40サブドメインをコードするポリヌクレオチド、CD3ゼータサブドメインをコードするポリヌクレオチド、ならびにmbIL15をコードするポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド内で5'から3'の方向に配列される。

【0130】

いくつかの実施形態では、抗CD70 CARが提供され、配列番号40～46のうちの1つ以上の配列またはその一部（例えば、mbIL15配列および／または自己切断ペプチド配列を除く部分）と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上、または前述のパーセンテージの任意の2つによって定義される範囲で同一であるポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、CARは、配列番号55～63のうちの1つ以上の配列、またはその一部（例えば、mbIL15配列および／または自己切断ペプチド配列を除いた部分）と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはそれ以上、または前述のパーセンテージのうちの任意の2つによって定義される範囲で同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CARは、配列番号64～72のうちの1つ以上の配列、またはその一部と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはそれ以上、または前述のパーセンテージのうちの任意の2つによって定義される範囲で同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CARは、配列番号214～222のいずれか1つの配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはそれ以上、または前述のパーセンテージの任意の2つによって定義される範囲で同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CARは、配列番号214～222のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含む。

【0131】

一部の実施形態では、抗CD70結合ドメイン／CD8αヒンジ／CD8α膜貫通ドメイン／OX40／CD3ゼータキメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図1、CD70 CARaを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、抗CD70結合ドメイン、CD8αヒンジ、CD8α膜貫通ドメイン、OX40ドメイン、およびCD3ゼータドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、mbIL15をさらにコードする（図1、CD70 CARbを参照されたい）。いくつかの実施形態では、この抗CD70結合ドメインは、scFvを含む。いくつかの実施形態では、抗CD70 scFvは、配列番号30～32または34～37のいずれか1つによる配列を有する核酸分子によってコードされる。いくつかの実施形態では、抗CD70 scFvは、配列番号30～32または34～37のうちのいずれか1つと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性、相同性、および／または機能的同等性を共有する核酸配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、scFvは、配列番号47～49または51～54のうちのいずれか1つと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性、相同性、および／または機能的同等性を有するアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、抗CD70 CARは、配列番号38～46のうちのいずれか1つまたはその一部（例えば、mbIL15配列および／もしくは自己切断ペプチド配列を除く部分）と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少

なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性、相同性、および／または機能的同等性を共有する核酸配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、抗 CD70 CAR は、配列番号 55～63 のうちのいずれか 1 つまたはその一部（例えば、mbIL15 配列および／または自己開裂ペプチド配列を除いた部分）と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗 CD70 CAR は、配列番号 64～72 のうちのいずれか 1 つまたはその一部と、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性、相同性、および／または機能的同等性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗 CD70 CAR は、配列番号 214～222 のうちのいずれか 1 つまたはその一部と、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性、相同性、および／または機能的同等性を有するアミノ酸配列を含む。

10

20

30

40

50

【0132】

いくつかの実施形態では、抗 CD70 scFv／CD8a ヒンジ／CD8a 膜貫通ドメイン／OX40／CD3 ゼータキメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図 1、NK71 を参照されたい）。ポリヌクレオチドは、配列番号 23 と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、または少なくとも約 99% の配列同一性、相同性、および／または機能的同等性を共有する核酸配列によってコードされる抗 CD70 scFv を含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、mbIL15 をさらにコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 25 と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性、相同性、および／または機能的同等性を共有する scFv をコードする。

【0133】

いくつかの実施形態では、抗 CD70 scFv／CD8a ヒンジ／CD8a 膜貫通ドメイン／OX40／CD3 ゼータキメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図 1、NK72 を参照されたい）。ポリヌクレオチドは、配列番号 24 と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、または少なくとも約 99% の配列同一性、相同性、および／または機能的同等性を共有する核酸配列によってコードされる抗 CD70 scFv を含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、mbIL15 をさらにコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 26 と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、または少なくとも約 99% の配列同一性、相同性、および／または機能的同等性を共有する scFv をコードする。しかしながら、いくつかの実施形態では、本明細書に開示される抗 CD70 CAR は、配列番号 25 または 26 の scFv を含まない。

【0134】

また、本明細書には、本明細書に記載される抗 CD70 CAR のいずれかを発現するナチュラルキラー（NK）細胞が提供される。一部の実施形態では、CAR は、配列番号 214～222 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CAR は、配列番号 214 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CAR は、配列番号 215 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CAR は、配列番号 216 のアミノ酸配列

を含む。一部の実施形態では、CARは、配列番号217のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CARは、配列番号218のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CARは、配列番号219のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CARは、配列番号220のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CARは、配列番号221のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CARは、配列番号222のアミノ酸配列を含む。

【0135】

いくつかの実施形態では、がん免疫療法のための遺伝子操作されたナチュラルキラー細胞集団が提供される。一部の実施形態では、集団は、培養において拡大された複数のNK細胞を含む。一部の実施形態では、複数のNK細胞の少なくとも一部は、腫瘍結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含むキメラ抗原受容体を発現するように操作される。一部の実施形態では、腫瘍結合ドメインは、CD70を標的とし、配列番号23または24と少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる。一部の実施形態では、腫瘍結合ドメインは、CD70を標的とし、配列番号25または26と少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0136】

一部の実施形態では、NK細胞は、培養において拡大された、編集されていないNK細胞と比較して、減少したレベルのCD70を発現するように遺伝子編集される。一部の実施形態では、減少したCD70発現は、内因性CD70遺伝子の編集を介して操作された。一部の実施形態では、NK細胞は、操作されていないNK細胞と比較して、CISH遺伝子によってコードされる、減少したレベルのCISタンパク質を発現するようにさらに遺伝子編集される。一部の実施形態では、減少したCIS発現は、CISH遺伝子の編集を介して操作された。一部の実施形態では、遺伝子操作されたNK細胞は、天然レベルのCISを発現するNK細胞と比較して、増大した増殖能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す。一部の実施形態では、NK細胞は、減少したレベルのCD70タンパク質を発現するようにさらに遺伝子編集される。一部の実施形態では、減少したCD70発現は、前記CD70をコードする遺伝子の編集を介して達成された。一部の実施形態では、遺伝子操作されたNK細胞は、天然レベルのCD70を発現するNK細胞と比較して、増大した増殖能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す。一部の実施形態では、NK細胞は、減少したレベルのCBLBタンパク質を発現するようにさらに遺伝子編集される。一部の実施形態では、減少したCBLB発現は、前記CBLBタンパク質をコードする遺伝子の編集を介して達成された。一部の実施形態では、遺伝子操作されたNK細胞は、天然レベルのCBLBタンパク質を発現するNK細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す。

【0137】

一部の実施形態では、腫瘍結合ドメインは、CD70を標的とし、配列番号30~32または34~37と少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる。一部の実施形態では、腫瘍結合ドメインは、CD70を標的とし、配列番号47~49または51~54と少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、NK細胞は、培養において拡大された編集されていないNK細胞と比較して、減少したレベルのCD70を発現するように遺伝子編集される。一部の実施形態では、減少したCD70発現は、内因性CD70遺伝子の編集を介して操作された。一部の実施形態では、NK細胞は、操作されていないNK細胞と比較して減少したレベルの、CISH遺伝子によってコードされるCISタンパク質を発現するように、さらに遺伝子編集される。一部の実施形態では、減少したCIS発現は、CISH遺伝子の編集を介して操作された。一部の実施形態では、遺伝子操作されたNK細胞は、

胞は、天然レベルのCISを発現するNK細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す。一部の実施形態では、NK細胞は、さらに、減少したレベルのCD70タンパク質を発現するように遺伝子編集される。一部の実施形態では、減少したCD70発現は、上記CD70をコードする遺伝子の編集を介して達成された。一部の実施形態では、遺伝子操作されたNK細胞は、天然レベルのCD70を発現するNK細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す。一部の実施形態では、NK細胞は、減少したレベルのCBLBタンパク質を発現するようにさらに遺伝子編集される。一部の実施形態では、減少したCBLB発現は、前記CBLBタンパク質をコードする遺伝子の編集を介して達成された。一部の実施形態では、遺伝子操作されたNK細胞は、天然レベルのCBLBタンパク質を発現するNK細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す。

10

【0138】

本明細書に開示される抗CD70結合ドメインのいずれか1つ、および／または本明細書に開示されるCARのいずれか1つを含む細胞もまた本明細書に開示される。一部の実施形態では、細胞は免疫細胞である。一部の実施形態では、細胞はNK細胞またはT細胞である。一部の実施形態では、細胞は、操作されていない細胞と比較して、減少したレベルのCISH、CBLB、CD70、またはそれらの任意の組み合わせを発現するように遺伝子編集される。一部の実施形態では、細胞は、配列番号159～201と少なくとも95%の配列同一性を有する1つ以上のガイドRNAで遺伝子編集される。一部の実施形態では、細胞は、CD70遺伝子の標的配列内にゲノム破壊を含み、標的配列は、配列番号177～180のいずれか1つから選択される。一部の実施形態では、細胞は、CISH遺伝子の標的配列内にゲノム破壊を含み、標的配列は、配列番号181～191のいずれか1つから選択される。一部の実施形態では、細胞は、CBLB遺伝子の標的配列内にゲノム破壊を含み、標的配列は、配列番号192～195のいずれか1つから選択される。一部の実施形態では、細胞は、CD70遺伝子の標的配列内にゲノム破壊を含み、標的配列は、配列番号177～180のいずれか1つから選択され；CISH遺伝子の標的配列内にゲノム破壊を含み、標的配列は、配列番号181～191のいずれか1つから選択され；およびCBLB遺伝子の標的配列内にゲノム破壊を含み、標的配列は、配列番号192～195のいずれか1つから選択される。一部の実施形態では、細胞は、配列番号180の標的配列内にゲノム破壊；配列番号191の標的配列内にゲノム破壊；および配列番号195の標的配列内にゲノム破壊を含む。

20

30

【0139】

特に反対の指示がない限り、デオキシリボヌクレオチドを用いて記載されているガイドRNA (gRNA) について提供されている配列は、標的DNA配列 (gRNAが結合する対応する非標的DNA配列に相補的である) を指し、実際に使用されるRNAガイドも参照するものとみなされるべきである (例えば、リボヌクレオチドを採用するものとみなし、リボヌクレオチドウラシルがデオキシリボヌクレオチドチミンの代わりに使用され、または逆にチミンがウラシルの代わりに使用され、RNAまたはDNA配列のいずれかを記載する場合、両方がアデニンに相補的な塩基対である)。言い換えれば、表1における特定のgRNAについて提供される配列は、gRNA配列がチミンの代わりにウラシルを含むことを除いて、実際に使用されるgRNA配列と同一である。例えば、配列TCACCAAGCCCGCGACCAATGGG (配列番号202) を有するgRNAはまた、以下の配列UCACCAAGCCCGCGACCA AUGGG (配列番号203) を指し、または配列UCACCAAGCCCGCGACCA AUGGG (配列番号203) を有するgRNAはまた、以下の配列TCACCAAGCCCGCGACCAATGGG (配列番号202) を指すものとする。さらに、特定のgRNA配列が結合する非標的DNA配列は、特定のgRNAの配列に相補的である。例えば、TCACCAAGCCCGCGACCAATGGG (配列番号202) の提供される配列を有するgRNAは、AGTG

40

50

G T T C G G G C G C T G G T T A C C C (配列番号 2 1 2) の非標的 D N A 配列に結合する。この状況では、非標的 D N A 配列に相補的な対応する標的 D N A 配列は、T C A C C A A G C C C G C G A C C A A T G G G (配列番号 2 0 2) である。

【 0 1 4 0 】

表 1 は、示された標的遺伝子を編集するために使用される g R N A の非限定的なリストを提供する。列挙されたこれらの g R N A と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、または少なくとも約 9 9 % の配列同一性を有する g R N A はまた、本開示の範囲内である。

10

【 0 1 4 1 】

20

30

40

50

【表 1】

表 1. 例示的なガイド RNA 配列

配列 番号	標的	名称	配列
159	SMAD3	SMAD3 ガイド RNA 1	CCGATCGTGAAGCGCCTGCT
160	SMAD3	SMAD3 ガイド RNA 2	CGAGAAGGCGGTCAAGAGCC
161	SMAD3	SMAD3 ガイド RNA 3	CTTGGTGTGACGTTCTGCG
162	MAPKAPK3	MAPKAPK ガイド RNA 1	CTCTGCTGTTTCACCATCCA
163	MAPKAPK3	MAPKAPK ガイド RNA 2	CCCGGCTTGGGCGGTGCTCC
164	MAPKAPK3	MAPKAPK ガイド RNA 3	CGACTACCAGTTGTCCAAGC
165	CEACAM1	CEACAM1 ガイド RNA 1	GACTGAGTTATTGGCGTGGC
166	CEACAM1	CEACAM1 ガイド RNA 2	GAATGTTCCATTGATAAGCC
167	CEACAM1	CEACAM1 ガイド RNA 3	GAGAGGCTGAGGTTTGCCCC
168	DDIT4	DDIT4 ガイド RNA 1	CCTCACCATGCCTAGCCTTT
169	DDIT4	DDIT4 ガイド RNA 2	CGATCTGGGGTGGGAGTTCG
170	DDIT4	DDIT4 ガイド RNA 3	GTTTGACCGCTCCACGAGCC
171	TGFBR2	TGFBR2-1	CCCCTACCATGACTTTATTC
172	TGFBR2	TGFBR2-2	ATTGCACTCATCAGAGCTAC
173	TGFBR2	TGFBR2-3	AGTCATGGTAGGGGAGCTTG
174	TGFBR2	TGFBR2-4	TGCTGGCGATACGCGTCCAC
175	TGFBR2	TGFBR2-5	GTGAGCAATCCCCCGGGCGA
176	TGFBR2	TGFBR2-6	AACGTGCGGTGGGATCGTGC
177	CD70	CD70-1	TCACCAAGCCCGCGACCAATGGG
178	CD70	CD70-2	GCTTTGGTCCCATTGGTCGCGGG
179	CD70	CD70 -3	ACCCTCCTCCGGCATCGCCGCGG
180	CD70	CD70-4	GCTTTGGTCCCATTGGTCGC
181	CISH	CISH-1	CTCACCAGATTCCCGAAGGT
182	CISH	CISH-2	CCGCCTTGTCATCAACCGTC
183	CISH	CISH-3	TCTGCGTTCAGGGGTAAGCG
184	CISH	CISH-4	GCGCTTACCCCTGAACGCAG
185	CISH	CISH-5	CGCAGAGGACCATGTCCCCG
186	CISH	CISH-9	AGATTCCCGAAGGTAGGAGA
187	CISH	CISH-10	CTGGTATTGGGGTTCCATTA
188	CISH	CISH-12	TACTCAATGCGTACATTGGT
189	CISH	CISH-13	ATACTCAATGCGTACATTGG
190	CISH	CISH-14	TCCGAAAGGCCAGGATGCG
191	CISH	CISH-15	CTTGTCCAGGCCACGCATCC
192	E3 ユビキチン-タン パク質リガーゼ CBL-B	CBLB-1	TAATCTGGTGGACCTCATGAAGG

10

20

30

40

50

193	E3 ユビキチン-タンパク質リガーゼ CBL-B	CBLB-2	TCGGTTGGCAAACGTCCGAAAGG
194	E3 ユビキチン-タンパク質リガーゼ CBL-B	CBLB-3	AGCAAGCTGCCGCAGATCGCAGG
195	E3 ユビキチン-タンパク質リガーゼ CBL-B	CBLB-4	AGCAAGCTGCCGCAGATCGC
196	NKG2A	NKG2A-1	GGAGCTGATGGTAAATCTGC
197	NKG2A	NKG2A-2	TTGAAGGTTTAATTCCGCAT
198	NKG2A	NKG2A -3	AACAACATCGTTACCACAG
199	アデノシン受容体 2	A2AR -1	CGAGGAGCCCATGATGGGCA
200	アデノシン受容体 2	A2AR -2	GGGCAATGTGCTGGTGTGCT
201	アデノシン受容体 2	A2AR -3	CAGTGACACCACAAAGTAGT

10

【 0 1 4 2 】

処置方法、投与、および用量

20

いくつかの実施形態は、本明細書に開示されているように、キメラ抗原受容体および／または活性化キメラ受容体を含む細胞または免疫細胞を用いて、がんを処置し、軽快させ、阻害し、または予防する方法に関する。一部の実施形態では、方法は、がんを処置または予防することを含む。一部の実施形態では、方法は、本明細書に記載されるように、腫瘍指向性キメラ抗原受容体および／または腫瘍指向性キメラ受容体を発現する、治療上有効量の免疫細胞を投与することを含む。このように処置され得るがんのタイプの例は、本明細書に記載される。

【 0 1 4 3 】

対象におけるがんを処置する方法が、本明細書において開示される。一部の実施形態では、本方法は、本明細書に開示される抗 C D 7 0 結合ドメインのいずれか 1 つ、本明細書に開示される C A R のいずれか 1 つ、または本明細書に開示される細胞のいずれか 1 つ、またはそれらのいずれかの組み合わせを対象に投与することを含む。

30

【 0 1 4 4 】

また、本明細書に開示される抗 C D 7 0 結合ドメインのいずれか 1 つ、本明細書に開示される C A R のいずれか 1 つ、本明細書に開示される細胞のいずれか 1 つ、またはがんの処置のためのそれらの任意の組み合わせの使用が本明細書に開示される。また、本明細書に開示される抗 C D 7 0 結合ドメインのいずれか 1 つ、本明細書に開示される C A R のいずれか 1 つ、本明細書に開示される細胞のいずれか 1 つ、またはがんの処置のための薬剤の製造におけるそれらの任意の組み合わせの使用が本明細書に開示される。

【 0 1 4 5 】

40

特定の実施形態では、本明細書に記載される遺伝子操作された細胞（複数可）を用いた対象の処置は、以下の効果のうちの 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、またはそれ以上を達成し、例えば、（i）疾患またはそれに関連する症状の重症度の減少または軽快；（ii）疾患に関連する症状の持続期間の減少；（iii）疾患またはそれに関連する症状の進行に対する保護；（iv）疾患またはそれに関連する症状の退行；（v）疾患に関連する症状の発生または発症に対する保護；（vi）疾患に関連する症状の再発に対する保護；（vii）対象の入院の減少；（viii）入院期間の減少；（ix）疾患を有する対象の生存の増加；（x）疾患に関連する症状の数の減少；（xi）別の治療法の予防効果または治療効果の強化、改善、補足、補完、または増強が含まれる。これらの比較の各々は、例えば、本明細書に開示されるコンストラクトを発現しない細胞を用いた、疾患に対する細胞

50

ベースの免疫療法を含む、疾患に対する異なる療法に対するものである。

【0146】

投与は、限定されないが、静脈内、動脈内、皮下、筋肉内、肝内、腹腔内、および／または患部組織への局所デリバリーなどの種々の経路によることができる。NK細胞および／またはT細胞などの免疫細胞の用量は、所定の対象について、それらの体重、疾患タイプおよび状態、ならびに処置の所望の攻撃性に基づいて容易に決定することができるが、実施形態に応じて、約 10^5 細胞/kg～約 10^{12} 細胞/kg（例えば、 10^5 ～ 10^7 、 10^7 ～ 10^{10} 、 10^{10} ～ 10^{12} 、およびその中の重複範囲）の範囲である。一実施形態では、用量漸増レジメンが使用される。いくつかの実施形態では、NKおよび／またはT細胞などの様々な免疫細胞が、例えば、約 1×10^6 細胞/kg～約 1×10^8 細胞/kgの間で投与される。いくつかの実施形態では、NK細胞および／またはT細胞などの免疫細胞の範囲、例えば、約 300×10^6 細胞～約 10×10^9 細胞の範囲で投与する。いくつかの実施形態では、NK細胞などの免疫細胞の範囲、例えば、約 1×10^6 細胞/kg～約 1×10^8 細胞/kgの範囲で投与する。いくつかの実施形態では、NK細胞などの免疫細胞の範囲、例えば、約 300×10^6 細胞～約 10×10^9 細胞の範囲で投与する。一部の実施形態では、約 300×10^6 個のNK細胞が投与される。一部の実施形態では、約 1×10^9 個のNK細胞が投与される。一部の実施形態では、約 1.5×10^9 個のNK細胞が投与される。

10

【0147】

実施形態に応じて、種々のタイプのがんを治療することができる。いくつかの実施形態では、がんはCD70発現がんである。

20

【0148】

いくつかの実施形態では、肝細胞がん腫が処置される。本明細書において提供されるさらなる実施形態は、がんの以下の非制限的な例の処置または予防を含み、限定されないが、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、副腎皮質がん腫、カポジ肉腫、リンパ腫、胃腸がん、虫垂がん、中枢神経系がん、基底細胞がん、胆管がん、膀胱がん、骨がん、脳腫瘍（限定されないが、例えば、星状細胞腫、脊髄腫瘍、脳幹神経膠腫、神経膠芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣芽腫、上衣腫、髄芽腫、髄芽腫）、乳がん、気管支腫瘍、パーキットリンパ腫、頸部がん、結腸がん、慢性リンパ性白血病（CLL）、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性骨髄増殖性疾患、乳管がん、子宮内膜がん、食道がん、胃がん、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、有毛細胞白血病、腎細胞がん、白血病、口腔がん、鼻咽頭がん、肝臓がん、肺がん（限定されないが、例えば、非小細胞肺がん（NSCLC）および小細胞肺がん）、脾臓がん、腸がん、リンパ腫、黒色腫、眼がん、卵巣がん、脾臓がん、前立腺がん、下垂体がん、子宮がん、および膣がんが含まれる。

30

【0149】

一部の実施形態では、また、本明細書には、配列番号1～203（または配列番号1～203の2つ以上の組み合わせ）のそれぞれの核酸配列またはアミノ酸配列と比較して、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%（およびその範囲）の配列同一性および／または相同性を有し、それぞれの配列番号1～203（または配列番号1～203の2つ以上の組み合わせ）と比較して、限定されないが、（i）増大した増殖、（ii）増大した活性化、（iii）核酸およびアミノ酸配列によってコードされる受容体を有するNK細胞が結合するリガンドを提示する細胞に対する増大した細胞傷害活性、（iv）増大した腫瘍または感染部位へのホーミング、（v）減少したオフターゲット細胞傷害効果、（vi）増大した免疫刺激性サイトカインおよびケモカイン（限定されないが、IFN γ 、TNF α 、IL-22、CCL3、CCL4、およびCCL5を含む）の増大した分泌、（vii）さらなる先天性および適応免疫応答を刺激する増大した能力、および（viii）それらの組み合わせを含む機能のうちの1つ以上を示す核酸配列またはアミノ酸配列もまた提供される。

40

【0150】

一部の実施形態では、また、本明細書には、配列番号1～226（または配列番号1～

50

226の2つ以上の組み合わせ)のそれぞれの核酸配列またはアミノ酸配列と比較して、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%(およびその範囲)の配列同一性および/または相同性を有し、それぞれの配列番号1~226(または配列番号1~226の2つ以上の組み合わせ)と比較して、限定されないが、(i)増大した増殖、(ii)増大した活性化、(iii)核酸およびアミノ酸配列によってコードされる受容体を有するNK細胞が結合するリガンドを提示する細胞に対する増大した細胞傷害活性、(iv)増大した腫瘍または感染部位へのホーミング、(v)減少したオフターゲット細胞傷害効果、(vi)増大した免疫刺激性サイトカインおよびケモカイン(限定されないが、IFN γ 、TNF α 、IL-22、CCL3、CCL4、およびCCL5を含む)の分泌、(vii)さらなる先天性および適応免疫応答を刺激する増大した能力、および(viii)それらの組み合わせを含む機能のうちの1つ以上も示す核酸配列またはアミノ酸配列もまた提供される。

10

【0151】

さらに、いくつかの実施形態では、核酸コードの縮重を主要因としながら、本明細書に開示される核酸のいずれかに対応するアミノ酸配列が提供される。さらに、本明細書に明示的に開示されたものとは異なるが、機能的類似性または同等性を有する配列(核酸またはアミノ酸のいずれか)もまた、本開示の範囲内で企図される。上記には、突然変異、切断、置換、または他のタイプの修飾が含まれる。

【0152】

いくつかの実施形態では、開示された細胞傷害性受容体複合体をコードするポリヌクレオチドはmRNAである。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドはDNAである。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、細胞傷害性受容体複合体の発現のために少なくとも1つの調節エレメントに作動可能に連結される。

20

【0153】

さらに、いくつかの実施形態によれば、本明細書において提供されるポリヌクレオチドのいずれかをコードするポリヌクレオチドを含むベクターが提供され、細胞傷害性受容体複合体の発現のために、ポリヌクレオチドが少なくとも1つの調節エレメントに作動可能に連結されてもよいベクターが提供される。いくつかの実施形態では、ベクターはレトロウイルスである。

【0154】

さらに、本明細書では、本明細書に開示されるポリヌクレオチド、ベクター、または細胞傷害性受容体複合体を含む、操作された免疫細胞(例えば、NKおよび/またはT細胞)が提供される。さらに、本明細書では、操作された免疫細胞(例えば、NK細胞および/または操作されたT細胞)の混合物を含む組成物が提供され、各集団は、本明細書に開示されるポリヌクレオチド、ベクター、または細胞傷害性受容体複合体を含む。さらに、本明細書には、操作された免疫細胞(例えば、NK細胞および/または遺伝子操作されたT細胞)の混合物を含む組成物が提供され、各集団は、本明細書において開示されるポリヌクレオチド、ベクター、または細胞傷害性受容体複合体を含み、T細胞集団は、g ν H Dおよび/またはH ν Dを減少/除去するために遺伝子修飾されている。一部の実施形態では、NK細胞およびT細胞は、同じドナー由来である。一部の実施形態では、NK細胞およびT細胞は、異なるドナー由来である。いくつかの実施形態では、1つ以上の増大した機能または特徴を編集された細胞に付与するために、1つ以上の遺伝子が編集される(例えば、ノックアウトまたはノックインされる)。例えば、いくつかの実施形態では、CISタンパク質を、CISHを編集することによって実質的に減少させ、それは、NK細胞増殖、細胞傷害性および/または持続性の増大をもたらす。

30

40

【0155】

NK細胞および/またはT細胞などの免疫細胞の用量は、所定の対象について、それらの体重、疾患タイプおよび状態、ならびに処置の所望の攻撃性に基づいて容易に決定することができるが、実施形態に応じて、約 10^5 細胞/kg~約 10^{12} 細胞/kg(例えば、 10^5 ~ 10^7 、 10^7 ~ 10^{10} 、 10^{10} ~ 10^{12} 、およびその中の重複範囲)

50

の範囲である。一実施形態では、用量漸増レジメンが使用される。いくつかの実施形態では、様々なNK細胞が、例えば、約 1×10^6 細胞/kg～約 1×10^8 細胞/kgの間で投与される。実施形態に応じて、種々のタイプのがんまたは感染症を処置することができる。

【0156】

がんの種類

本明細書に記載される組成物および方法の一部の実施形態は、腫瘍指向性キメラ抗原受容体および／または腫瘍指向性キメラ受容体を含む免疫細胞を、がんを有する患者に投与することに関する。本明細書で提供される種々の実施形態には、固形腫瘍と懸濁腫瘍（suspension tumor）の両方を含む、以下のがんの非限定的な例の処置または予防が含まれる。がんの例としては、限定されないが、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、副腎皮質がん腫、カポジ肉腫、リンパ腫、胃腸がん、虫垂がん、中枢神経系がん、基底細胞がん、胆管がん、膀胱がん、骨がん、脳腫瘍（限定されないが、例えば、星状細胞腫、脊髄腫瘍、脳幹神経膠腫、頭蓋咽頭腫、上衣芽腫、上衣腫、髄芽腫、髄芽腫）、乳がん、気管支腫瘍、バーキットリンパ腫、頸部がん、結腸がん、慢性リンパ性白血病（CLL）、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性骨髄増殖性疾患、乳管がん、子宮内膜がん、食道がん、胃がん、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、有毛細胞白血病、腎細胞がん、白血病、口腔がん、鼻咽頭がん、肝臓がん、肺がん（限定されないが、例えば、非小細胞肺がん（NSCLC）および小細胞肺がん）、脾臓がん、腸がん、リンパ腫、黒色腫、眼がん、卵巣がん、脾臓がん、前立腺がん、下垂体がん、子宮がん、および膣がんが挙げられる。いくつかの実施形態では、がんは固形腫瘍を含む。一部の実施形態では、がんは食道がんである。一部の実施形態では、がんは頭頸部がんである。一部の実施形態では、がんは肺がんである。一部の実施形態では、がんは肝臓がんである。一部の実施形態では、がんは大腸がんである。一部の実施形態では、がんは膀胱がんである。一部の実施形態では、がんは子宮頸がんである。一部の実施形態では、がんは子宮内膜がんである。一部の実施形態では、がんは卵巣がんである。一部の実施形態では、がんは子宮がんである。一部の実施形態では、がんは黒色腫である。

【0157】

がん標的

本明細書に記載される組成物および方法のいくつかの実施形態は、がん抗原を標的化するキメラ受容体を含む免疫細胞に関する。標的抗原の非限定的な例には、CD70、CD5、CD19；CD123；CD22；CD30；CD171；CS1（CD2サブセット1、CRACC、SLAMF7、CD319、および19A24とも呼ばれる）；TNF受容体ファミリーメンバーB細胞成熟（BCMA）；CD38；DLL3；Gタンパク質共役受容体クラスCグループ5、メンバーD（GPRC5D）；上皮細胞増殖因子受容体（EGFR）CD138；前立腺特異的膜抗原（PSMA）；チロシンキナーゼ3（FLT3）のようなFms；KREMEN2（クリングル含有膜貫通タンパク質2）、ALPPL2、クラウジン4、クラウジン6、C型レクチン様分子-1（CLL-1またはCLECL1）；CD33；上皮細胞増殖因子受容体変異体III（EGFRviii）；ガングリオシドG2（GD2）；ガングリオシドGD3（aNeu5Ac（2-8）aNeu5Ac（2-3）bDGalp（1-4）bDGlcpl（1-1）Cer）；）；Tn抗原（（TnAg）または（GalNAca-Ser/Thr））；前立腺特異的膜抗原（PSMA）；受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体1（ROR1）；チロシンキナーゼ3（FLT3）のようなFms；腫瘍関連糖タンパク質72（TAG72）；CD38；CD44v6；造血前駆細胞ではなく急性白血病またはリンパ腫で発現するグリコシル化CD43エピトープ、非造血がんが発現するグリコシル化CD43エピトープ、がん胎児性抗原（CEA）；上皮細胞接着分子（EPCAM）；B7H3（CD276）；KIT（CD117）；インターロイキン-13受容体サブユニットアルファ-2（IL-13Ra2またはCD213A2）；メソテリン；インターロイキン11受容体アルファ（IL-11Ra）；前立腺幹細胞抗原（PSCA）；プロテアーゼセリン21（テ

スチシンまたはPRSS21) ; 血管内皮増殖因子受容体2 (VEGFR2) ; ルイス (Y) 抗原 ; CD24 ; 血小板由来増殖因子受容体ベータ (PDGFR-ベータ) ; ステージ特異的胎児抗原-4 (SSEA-4) ; CD20 ; 葉酸受容体アルファ (FRAまたはFR1) ; 葉酸受容体ベータ (FRb) ; 受容体チロシンプロテインキナーゼERBB2 (Her2/neu) ; ムチン1、細胞表面関連 (MUC1) ; 上皮細胞増殖因子受容体 (EGFR) ; 神経細胞接着分子 (NCAM) ; プロスターゼ ; 前立腺酸性ホスファターゼ (PAP) ; 伸長因子2突然変異 (ELF2M) ; エフリンB2 ; 線維芽細胞活性化タンパク質アルファ (FAP) ; インスリン様増殖因子1受容体 (IGF-I受容体) 、炭酸脱水酵素IX (CAIX) ; プロテアソーム (プロソーム、マクロパイン) サブユニット、ベータ型、9 (LMP2) ; 糖タンパク質100 (gp100) ; ブレークポイントクラスター領域 (BCR) とアベルソンマウス白血病ウイルスがん遺伝子ホモログ1 (Abl) (bcr-abl) からなるオンコジーン融合タンパク質 ; チロシナーゼ ; エフリンA型受容体2 (EphA2) ; シアリルルイス接着分子 (sLe) ; ガングリオシドGM3 (aNeu5Ac (2-3) bDCLalp (l-4) bDGLcp (l-l) Cer) ; トランスグルタミナーゼ5 (TGS5) ; 高分子量黒色腫関連抗原 (HMWMAA) ; o-アセチル-GD2ガングリオシド (OAcGD2) ; 腫瘍内皮マーカー1 (TEM1/CD248) ; 腫瘍内皮マーカー7関連 (TEM7R) ; クラウジン6 (CLDN6) ; 甲状腺刺激ホルモン受容体 (TSHR) ; Gタンパク質共役受容体クラスCグループ5、メンバーD (GPRC5D) ; 染色体Xオープンリーディングフレーム61 (CXORF61) ; CD97 ; CD179a ; 未分化リンパ腫キナーゼ (ALK) ; ポリシアル酸 ; 胎盤特異的1 (PLAC1) ; globOHグリコセラミド (GlobOH) の六糖部分 ; 乳腺分化抗原 (NY-BR-1) ; ウロプラキン2 (UPK2) ; A型肝炎ウイルス細胞受容体1 (HAVCR1) ; アドレナリン受容体ベータ3 (ADRB3) ; パネキシン3 (PANX3) ; Gタンパク質共役受容体20 (GPR20) ; リンパ球抗原6複合体、遺伝子座K9 (LY6K) ; 嗅覚受容体51E2 (OR51E2) ; TCRガンマ代替リーディングフレームタンパク質 (TARP) ; ウィルムス腫瘍タンパク質 (WT1) ; がん/精巣抗原1 (NY-ESO-1) ; がん/精巣抗原2 (LAGE-1a) ; 黒色腫関連抗原1 (MAGE-A1) ; 染色体12pに位置するETS転座変異体遺伝子6 (ETV6-AML) ; 精子タンパク質17 (SPA17) ; X抗原ファミリー、メンバー1A (XAGE1) ; アンジオポエチン結合細胞表面受容体2 (Tie2) ; メラノーマがん精巣抗原-1 (MAD-CT-1) ; メラノーマがん精巣抗原-2 (MAD-CT-2) ; Fos関連抗原1 ; 腫瘍タンパク質p53 (p53) ; p53突然変異体 ; プロステイン ; スルビビン ; テロメラゼ ; 前立腺がん腫瘍抗原-1 (PCTA-1またはガレクチン8) 、T細胞1によって認識されるメラノーマ抗原 (MelanAまたはMART1) ; ラット肉腫 (Ras) 突然変異体 ; ヒトテロメラゼ ; 逆転写酵素 (hTERT) ; 肉腫転座ブレークポイント ; アポトーシスのメラノーマ阻害剤 (ML-IAP) ; ERG (膜貫通型プロテアーゼ、セリン2 (TMPRSS2) ETS融合遺伝子) ; N-アセチルグルコサミニル-トランスフェラーゼV (NA17) ; ペアードボックスタンパク質Pax-3 (PAX3) ; アンドロゲン受容体 ; サイクリンB1 ; v-mycトリ骨髄細胞腫ウイルス性オンコジーン神経芽細胞腫由来ホモログ (MYCN) ; RasホモログファミリーメンバーC (RhoC) ; チロシナーゼ関連タンパク質2 (TRP-2) ; シトクロムP450 IB1 (CYP1B1) ; CCTC結合因子 (ジンクフィンガータンパク質) 様 (BORISまたはBrother of the Regulator of Imprinted Sites) 、T細胞3によって認識される扁平上皮がん抗原 (SART3) ; ペアードボックスタンパク質Pax-5 (PAX5) ; プロアクロシン結合タンパク質sp32 (OY-TES1) ; リンパ球特異的タンパク質チロシンキナーゼ (LCK) ; キナーゼアンカータンパク質4 (AKAP-4) ; 滑膜肉腫、Xブレークポイント2 (SSX2) ; 終末糖化産物受容体 (RAGE-1) ; 腎ユビキタス1 (RU1) ; 腎ユビキタス2 (RU2) ; レグマイン ; ヒトパピローマウイルスE6 (HPV E6) ; ヒトパピローマウイルスE7 (HPV E7) ; 腸カルボキシルエステラーゼ

10

20

30

40

50

；熱ショックタンパク質70-2突然変異 (mut hsp70-2)；CD79a；CD79b；CD72；白血球関連免疫グロブリン様受容体1 (LAIR1)；IgA受容体のFc断片 (FCARまたはCD89)；白血球免疫グロブリン様受容体サブファミリーAメンバー2 (LILRA2)；CD300分子様ファミリーメンバーf (CD300LF)；C型レクチンドメインファミリー12メンバーA (CLEC12A)；骨髄間質細胞抗原2 (BST2)；EGF様モジュール含有ムチン様ホルモン受容体様2 (EMR2)；リンパ球抗原75 (LY75)；グリピカン-3 (GPC3)；Fc受容体様5 (FCRL5)；免疫グロブリンラムダ様ポリペプチド1 (IGLL1)、MPL、ビオチン、c-MYCエピトープTag、CD34、LAMP1、TROP2、GFRアルファ4、CDH17、CDH6、NYBR1、CDH19、CD200R、Slea (CA19.9；シアリルルイス抗原)；フコシル-GM1、PTK7、gpNMB、CDH1-CD324、DLL3、CD276/B7H3、IL11Ra、IL13Ra2、CD179b-IGLL1、TCRガンマデルタ、NKG2D、CD32 (FCGR2A)、Tnag、Tim1-/HVCr1、CSF2RA (GM-CSFR-アルファ)、TGFベータR2、Lewis Ag、TCR-ベータ鎖、TCR-ベータ2鎖、TCR-ガンマ鎖、TCR-デルタ鎖、FITC、黄体形成ホルモン受容体 (LHR)、卵胞刺激ホルモン受容体 (FSHR)、ゴナドトロピンホルモン受容体 (CGHRまたはGR)、CCR4、GD3、SLAMF6、SLAMF4、HIV1エンベロープ糖タンパク質、HTLV1-Tax、CMV pp65、EBV-EBNA3c、KSHV K8.1、KSHV-gH、インフルエンザAヘマグルチニン (HA)、GAD、PDL1、グアニル酸シクラーゼ C (GCC)、デスモグレイン3 (Dsg3)に対する自己抗体、デスモグレイン1 (Dsg1)に対する自己抗体、HLA、HLA-A、HLA-A2、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ、HLA-DR、HLA-G、IgE、CD99、Ras G12V、組織因子1 (TF1)、AFP、GPRC5D、クラウジン8.2 (CLD18A2またはCLDN18A.2)、P-糖タンパク質、STEAP1、Liv1、ネクチン-4、Cripito、gpA33、BST1/CD157、低コンダクタンスクロライドチャネル、およびTNT 抗体によって認識される抗原が含まれる。

10

20

30

40

50

【0158】

非限定的な実施形態

本明細書において提供される実施形態の中には以下がある：

1. がん免疫療法のための遺伝子操作されたナチュラルキラー (NK) 細胞集団であって、腫瘍結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含むキメラ抗原受容体 (CAR) を発現するように操作された複数のNK細胞を含み、

腫瘍結合ドメインはCD70を標的とし、

腫瘍結合ドメインは、配列番号47～49または51～54のうちの1つ以上と少なくとも約90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むscFvを含み、

NK細胞は、配列番号177～180のうちのいずれか1つを含むCD70タンパク質遺伝子標的配列内にゲノム破壊を含み、場合により、前記ゲノム破壊は、エンドヌクレアーゼ媒介インデルを含み、

NK細胞は、配列番号186～191のうちのいずれか1つを含むサイトカイン誘導性SH2含有タンパク質遺伝子標的配列内にゲノム破壊を含み、

NK細胞は、遺伝子標的配列内に少なくとも1つの追加のゲノム破壊を含み、

前記ゲノム破壊を含む遺伝子操作されたNK細胞は、前記ゲノム破壊を含まないNK細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す、遺伝子操作されたNK細胞集団。

2. NK細胞が培養において拡大されている、実施形態1に記載のNK細胞集団。

3. がん免疫療法のための遺伝子操作されたナチュラルキラー (NK) 細胞集団であって、培養において拡大させた複数のNK細胞を含み、

複数のNK細胞が、腫瘍結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝

達複合体を含むキメラ抗原受容体（CAR）を発現するように操作され、

腫瘍結合ドメインがCD70を標的とし、

NK細胞が、配列番号177～180のうちのいずれか1つを含むCD70タンパク質遺伝子標的配列内にゲノム破壊を含み、前記ゲノム破壊は、エンドヌクレアーゼ媒介インデルを含み、

NK細胞が、配列番号186～191のうちのいずれか1つを含むサイトカイン誘導性SH2含有タンパク質遺伝子標的配列内にゲノム破壊を含み、

NK細胞が、遺伝子標的配列内に少なくとも1つの追加のゲノム破壊を含み、

前記ゲノム破壊を含む遺伝子操作されたNK細胞が、前記ゲノム破壊を含まないNK細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す、遺伝子操作されたNK細胞集団。

4. がん免疫療法のための遺伝子操作されたナチュラルキラー（NK）細胞集団であって、培養において拡大させた複数のNK細胞を含み、

複数のNK細胞が、腫瘍結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含むキメラ抗原受容体（CAR）を発現するように操作され、

腫瘍結合ドメインがCD70を標的とし、

NK細胞が、培養において拡大されている編集されていないNK細胞と比較して、減少したレベルのCD70を発現するように遺伝子編集されており、減少したCD70発現は、内因性CD70遺伝子におけるゲノム破壊の導入を介して操作され、

NK細胞が、編集されていないNK細胞と比較して、減少したレベルの、CISH遺伝子によってコードされるサイトカイン誘導性SH2含有（CIS）タンパク質を発現するように遺伝子編集されており、減少したCIS発現は、CISH遺伝子におけるゲノム破壊の導入を介して操作されており、

遺伝子操作されたNK細胞が、天然レベルのCISを発現するNK細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示し、

NK細胞が、2つ以上の追加の遺伝子においてゲノム破壊を導入して、前記遺伝子において編集されていないNK細胞と比較して、前記2つ以上の追加の遺伝子によってコードされるタンパク質の発現を減少させるように遺伝子編集されている、遺伝子操作されたNK細胞集団。

5. がん免疫療法のための遺伝子操作されたナチュラルキラー（NK）細胞集団であって、腫瘍結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含むキメラ抗原受容体（CAR）を発現するように操作された複数のNK細胞を含み、

腫瘍結合ドメインがCD70を標的とし、

腫瘍結合ドメインが、配列番号47～49または51～54のうちの1つ以上と少なくとも約90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むscFvを含み、

複数のNK細胞が、配列番号177～195のうちの少なくとも3つを含む遺伝子標的配列内にゲノム破壊を含み、場合により、前記ゲノム破壊はエンドヌクレアーゼ媒介インデルを含む、遺伝子操作されたNK細胞集団。

6. 腫瘍結合ドメインが重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、重鎖可変領域がCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含み、軽鎖可変領域がCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含み、

CDR-H1が、配列番号102、103、および110から選択される1つ以上の配列と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含み；

CDR-H2が、配列番号104、105、106、および111から選択される1つ以上の配列と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含み；

CDR-H3が、配列番号107、108、109、および112から選択される1つ以上の配列と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含み；

CDR-L1が、配列番号131、132、133、および140から選択される1つ以上の配列と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含み；

C D R - L 2 が、配列番号 1 3 4、1 3 5、1 3 6、および 1 4 1 から選択される 1 つ以上の配列と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する配列を含み；

C D R - L 3 が、配列番号 1 3 7、1 3 8、1 3 9、および 1 4 2 から選択される 1 つ以上の配列と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する配列を含む、実施形態 1 ~ 5 のいずれか 1 つに記載の遺伝子操作された N K 細胞集団。

7. 腫瘍結合ドメインが V H を含み、V H が配列番号 1 5 1 ~ 1 5 3 および 1 5 7 のアミノ酸配列のうちの 1 つ以上と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 1 ~ 6 のいずれか 1 つに記載の遺伝子操作された N K 細胞集団。

8. 腫瘍結合ドメインが V L を含み、V L が配列番号 1 5 4 ~ 1 5 6 および 1 5 8 のアミノ酸配列のうちの 1 つ以上と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 1 ~ 7 のいずれか 1 つに記載の遺伝子操作された N K 細胞集団。

9. 腫瘍結合ドメインが V L および V H を含み、V L が配列番号 1 5 6 のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、V H が配列番号 1 5 3 のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 1 ~ 8 のいずれか 1 つに記載の遺伝子操作された N K 細胞集団。

10. 腫瘍結合ドメインが V L および V H を含み、V L が配列番号 1 5 5 のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、V H が配列番号 1 5 2 のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 1 ~ 8 のいずれか 1 つに記載の遺伝子操作された N K 細胞集団。

11. 腫瘍結合ドメインが V L および V H を含み、V L が配列番号 1 5 7 のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、V H が配列番号 1 5 8 のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 1 ~ 8 のいずれか 1 つに記載の遺伝子操作された N K 細胞集団。

12. 腫瘍結合ドメインが s c F v を含み、s c F v が配列番号 4 7 ~ 4 9 および 5 1 ~ 5 4 のうちの 1 つ以上と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 1 ~ 11 のいずれか 1 つに記載の遺伝子操作された N K 細胞集団。

13. 腫瘍結合ドメインが重鎖可変領域 (V H) を含み、V H が、配列番号 1 4 3 ~ 1 4 6 および 1 4 9 のポリヌクレオチドのうちの 1 つ以上と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる、実施形態 1 ~ 12 のいずれか 1 つに記載の遺伝子操作された N K 細胞集団。

14. 腫瘍結合ドメインが軽鎖可変領域 (V L) を含み、V L が配列番号 1 4 6 ~ 1 4 8 および 1 5 0 のポリヌクレオチドのうちの 1 つ以上と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる、実施形態 1 ~ 13 のいずれか 1 つに記載の遺伝子操作された N K 細胞集団。

15. 腫瘍結合ドメインが、一本鎖可変断片 (s c F v) を含み、s c F v が、配列番号 3 0 ~ 3 2 および 3 4 ~ 3 7 のポリヌクレオチドのうちの 1 つ以上と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる、実施形態 1 ~ 14 のいずれか 1 つに記載の遺伝子操作された N K 細胞集団。

16. 細胞傷害性シグナル伝達複合体が、O X 4 0 サブドメインおよび C D 3 ゼータサブドメインを含む、実施形態 1 ~ 15 のいずれか 1 つに記載の遺伝子操作された N K 細胞集団。

17. O X 4 0 サブドメインが、配列番号 5 と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する配列によってコードされる、実施形態 16 に記載の遺伝子操作された N K 細胞集団。

18. C D 3 ゼータサブドメインが、配列番号 7 と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する配列によってコードされる、実施形態 16 ~ 17 のいずれか 1 つに記載の遺伝子操作された N K 細胞集団。

19. N K 細胞が、膜結合 I L - 1 5 (m b I L 1 5) を発現するように操作される、実施形態 1 ~ 18 のいずれか 1 つに記載の遺伝子操作された N K 細胞集団。

20. m b I L 1 5 が、C A R をコードするポリヌクレオチド上にバイシストロン性にコードされる、実施形態 19 に記載の遺伝子操作された N K 細胞集団。

10

20

30

40

50

21. m b I L 1 5 が、配列番号 2 7 と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する配列によってコードされる、実施形態 1 9 または 2 0 のいずれか 1 つに記載の遺伝子操作された N K 細胞集団。

22. C A R および m b I L 1 5 をコードするポリヌクレオチドが、配列番号 3 8 ~ 4 6 のポリヌクレオチドのうちの 1 つ以上と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する配列を含む、実施形態 2 0 または 2 1 のいずれか 1 つに記載の遺伝子操作された N K 細胞集団。

23. C A R が、配列番号 6 4 ~ 7 2 のアミノ酸配列のうちの 1 つ以上と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 1 ~ 2 2 のいずれか 1 つに記載の遺伝子操作された N K 細胞集団。

24. 操作された N K 細胞が、C D 7 0、C I S H、および C B L B で編集される、実施形態 1 ~ 2 3 のいずれか 1 つに記載の遺伝子操作された N K 細胞集団。

25. 操作された N K 細胞が、C D 7 0、C I S H、C B L B、および追加の標的遺伝子で編集される、実施形態 1 ~ 2 4 のいずれか 1 つに記載の遺伝子操作された N K 細胞集団。

26. C D 7 0 に関して編集されていない N K 細胞と比較して C D 7 0 の発現が実質的に減少し、C I S H に関して編集されていない N K 細胞と比較して C I S の発現が実質的に減少し、C B L B に関して編集されていない N K 細胞と比較して C B L B の発現が実質的に減少する、実施形態 2 5 に記載の遺伝子操作された N K 細胞集団。

27. N K 細胞が、検出可能なレベルの C D 7 0、C I S、または C B L B タンパク質を発現しない、実施形態 2 5 または 2 6 に記載の遺伝子操作された N K 細胞集団。

28. ゲノム破壊を導入する遺伝子編集が、C R I S P R - C a s システムを用いて行われる、実施形態 1 ~ 2 7 のいずれか 1 つに記載の遺伝子操作された N K 細胞集団。

29. C R I S P R - C a s システムが、C a s 9、C s n 2、C a s 4、C p f 1、C 2 c 1、C 2 c 3、C a s 1 3 a、C a s 1 3 b、C a s 1 3 c、C a s X、C a s Y、およびそれらの組み合わせから選択される C a s を含む、実施形態 2 8 に記載の遺伝子操作された N K 細胞集団。

30. C a s が C a s 9 である、実施形態 2 8 または 2 9 に記載の遺伝子操作された N K 細胞集団。

31. 先行する実施形態のいずれか 1 つに記載の遺伝子操作された N K 細胞集団を対象に投与することを含む、対象におけるがんを処置する方法。

32. がんが腎細胞がん腫であるか、または腎細胞がん腫からの転移である、実施形態 3 1 に記載の方法。

33. がんの処置における、実施形態 1 ~ 3 0 のいずれか 1 つに記載の遺伝子操作された N K 細胞集団の使用。

34. がんを処置するための薬剤の製造における、実施形態 1 ~ 3 0 のいずれか 1 つに記載の遺伝子操作された N K 細胞集団の使用。

35. 対象におけるがんを処置する方法であって、

対象に、培養において拡大された複数の N K 細胞集団を含む遺伝子操作された N K 細胞集団を投与することを含み、

複数の N K 細胞は、腫瘍結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含むキメラ抗原受容体 (C A R) を発現するように操作され、

腫瘍結合ドメインは C D 7 0 を標的とし、

腫瘍結合ドメインは、配列番号 4 7 ~ 4 9 または 5 1 ~ 5 4 のうちの 1 つ以上と少なくとも約 9 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む s c F v を含み、

N K 細胞は、配列番号 1 7 7 ~ 1 8 0 のうちのいずれか 1 つを含む C D 7 0 タンパク質遺伝子標的配列内にゲノム破壊を含み、場合により、前記ゲノム破壊はエンドヌクレアーゼ媒介インデルを含み、

N K 細胞は、配列番号 1 8 6 ~ 1 9 1 のうちのいずれか 1 つを含むサイトカイン誘導性 S H 2 含有タンパク質遺伝子標的配列内にゲノム破壊を含み、

N K 細胞は、遺伝子標的配列内に少なくとも 1 つの追加のゲノム破壊を含み、

10

20

30

40

50

前記ゲノム破壊を含む遺伝子操作されたNK細胞は、前記ゲノム破壊を含まないNK細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す、方法。

36. NK細胞が、編集されていないNK細胞と比較して、CBLB遺伝子によってコードされる、減少したレベルのCBLBタンパク質を発現するようにさらに遺伝子編集される、実施形態35に記載の方法。

37. 腫瘍結合ドメインが重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、重鎖可変領域がCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含み、軽鎖可変領域がCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含み、

CDR-H1が、配列番号102、103、および110から選択される1つ以上の配列と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含み；

CDR-H2が、配列番号104、105、106、および111から選択される1つ以上の配列と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含み；

CDR-H3が、配列番号107、108、109、および112から選択される1つ以上の配列と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含み；

CDR-L1が、配列番号131、132、133、および140から選択される1つ以上の配列と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含み；

CDR-L2が、配列番号134、135、136、および141から選択される1つ以上の配列と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含み；

CDR-L3が、配列番号137、138、139、および142から選択される1つ以上の配列と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含む、実施形態35または36に記載の方法。

38. 腫瘍結合ドメインがVHを含み、VHが配列番号151~153および157のアミノ酸配列のうちの1つ以上と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、腫瘍結合ドメインがVLを含み、VLが配列番号154~156および158のアミノ酸配列のうちの1つ以上と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態35~37のうちのいずれか1つに記載の方法。

39. 腫瘍結合ドメインがVLおよびVHを含み、VLが配列番号156のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、VHが配列番号153のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態35~38のうちのいずれか1つに記載の方法。

40. 腫瘍結合ドメインがVLおよびVHを含み、VLが配列番号155のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、VHが配列番号152のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態35~38のうちのいずれか1つに記載の方法。

41. 腫瘍結合ドメインがVLおよびVHを含み、VLが配列番号157のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、VHが配列番号158のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態35~38のうちのいずれか1つに記載の方法。

42. 腫瘍結合ドメインがscFvを含み、scFvが配列番号47~49および51~54のうちの1つ以上と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態35~41のうちのいずれか1つに記載の方法。

43. 細胞傷害性シグナル伝達複合体が、OX40サブドメインおよびCD3ゼータサブドメインを含む、実施形態35~42のうちのいずれか1つに記載の方法。

44. OX40サブドメインが、配列番号5と少なくとも95%の配列同一性を有する配列によってコードされ、CD3ゼータサブドメインが、配列番号7と少なくとも95%の配列同一性を有する配列によってコードされる、実施形態43に記載の方法。

45. NK細胞が、膜結合IL-15 (mbIL15)を発現するように操作される、実施形態35~44のうちのいずれか1つに記載の方法。

46. mbIL15が、CARをコードするポリヌクレオチド上にバイシストロン性に

10

20

30

40

50

コードされる、実施形態 45 に記載の方法。

47. CAR および mbIL15 をコードするポリヌクレオチドが、配列番号 38 ~ 46 のポリヌクレオチドのうちの 1 つ以上と少なくとも 95 % の配列同一性を有する配列を含む、実施形態 46 に記載の方法。

48. mbIL15 が、配列番号 27 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する配列によってコードされる、実施形態 45 ~ 47 のうちのいずれか 1 つに記載の方法。

49. CAR が、配列番号 64 ~ 72 のアミノ酸配列のうちの 1 つ以上と少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 35 ~ 48 のうちのいずれか 1 つに記載の方法。

50. 遺伝子編集が CRISPR-Cas システムを用いて行われ、Cas が Cas9 酵素を含む、実施形態 35 ~ 49 のうちのいずれか 1 つに記載の方法。

51. 抗 CD70 結合ドメイン、OX40 ドメイン、および CD3 ゼータドメインを含む抗 CD70 キメラ抗原受容体 (CAR) であって、

抗 CD70 CAR は、配列番号 64 ~ 72 のアミノ酸配列のうちの 1 つ以上と少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列、または標的細胞上の CD70 への結合時に細胞傷害性シグナルを生成することができるその一部を含む抗 CD70 CAR。

52. 抗 CD70 結合ドメイン、OX40 ドメイン、および CD3 ゼータドメインを含む抗 CD70 キメラ抗原受容体 (CAR) であって、

抗 CD70 CAR は、配列番号 64 ~ 72 のアミノ酸配列のうちの 1 つ以上と少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列、または標的細胞上の CD70 への結合時に細胞傷害性シグナルを生成することができるその一部を含む抗 CD70 CAR。

53. 抗 CD70 結合ドメインが、配列番号 47 ~ 49 および 51 ~ 54 から選択されるいずれかの配列と少なくとも 95 %、99 %、または 100 % の配列同一性を有する scFv を含む、実施形態 51 または 52 に記載の抗 CD70 CAR。

54. 実施形態 51 ~ 53 のいずれか 1 つに記載の抗 CD70 CAR を含む細胞。

55. 細胞が免疫細胞である、実施形態 54 に記載の細胞。

56. 細胞が NK 細胞である、実施形態 54 または 55 に記載の細胞。

57. 細胞が、配列番号 159 ~ 201 から選択される少なくとも 3 つの遺伝子標的配列内に少なくとも 3 つのゲノム破壊を含む、実施形態 54 ~ 56 のいずれか 1 つに記載の細胞。

58. 実施形態 51 ~ 53 のいずれか 1 つに記載の CAR、または実施形態 54 ~ 56 のいずれか 1 つに記載の細胞を対象に投与することを含む、対象におけるがんを処置する方法。

59. がんを処置するための、実施形態 51 ~ 53 のいずれか 1 つに記載の抗 CD70 CAR、または実施形態 54 ~ 56 のいずれか 1 つに記載の細胞の使用。

60. がんを処置するための薬剤の製造における、実施形態 51 ~ 53 のいずれか 1 つに記載の抗 CD70 CAR、または実施形態 54 ~ 56 のいずれか 1 つに記載の細胞の使用。

61. 遺伝子操作された免疫細胞集団を生成する方法であって、

エンドヌクレアーゼおよび少なくとも 1 つの固有の gRNA を免疫細胞に導入して、少なくとも 1 つの遺伝子標的配列内にゲノム破壊を誘導すること、

エンドヌクレアーゼおよび少なくとも 1 つの追加の固有の gRNA を免疫細胞に導入して、追加の遺伝子標的配列内に追加のゲノム破壊を誘導すること、ならびに

CD70 を標的とする CAR をコードするウイルスベクターで免疫細胞に形質導入することを含む方法。

62. エンドヌクレアーゼおよび gRNA が、細胞にエレクトロポレーションを行うことによって誘導される、実施形態 61 に記載の方法。

63. 細胞が NK 細胞を含む、実施形態 61 または 62 に記載の方法。

64. 一度に 3 つ以下の固有の gRNA が導入される、実施形態 61 ~ 63 のいずれか

10

20

30

40

50

1つに記載の方法。

65. 一度に2つ以下の固有のgRNAが導入される、実施形態61～64のいずれか1つに記載の方法。

66. 最初の導入前の一定期間、細胞を培養において拡大させる、実施形態61～65のいずれか1つに記載の方法。

67. 遺伝子操作された免疫細胞集団を生成する方法であって、

培養において免疫細胞を拡大すること、

エンドヌクレアーゼおよび2つ以下の固有のgRNAを免疫細胞に導入して、2つの異なる遺伝子標的配列内にゲノム破壊を誘導すること、

細胞を追加の一定期間培養すること、

追加のエンドヌクレアーゼおよび2つ以下の固有のgRNAを免疫細胞に導入して、2つ以下の追加の遺伝子標的配列内に追加のゲノム破壊を誘導すること、ならびに

CD70を標的とするCARをコードするウイルスベクターで免疫細胞に形質導入すること

を含む方法。

68. エンドヌクレアーゼおよびgRNAが、細胞にエレクトロポレーションを行うことによって誘導される、実施形態67に記載の方法。

69. 細胞がNK細胞を含む、実施形態67または68に記載の方法。

70. 追加の1種類のgRNAのみが、第2の導入において使用される、実施形態61～69のいずれか1つに記載の方法。

71. gRNAがCD70、CISH、またはCBLB遺伝子を標的とする、実施形態61～70のいずれか1つに記載の方法。

72. 配列番号159～203のうちの少なくとも3つを含む遺伝子標的配列内にゲノム破壊を含む、操作されたナチュラルキラー細胞集団を含む医薬組成物であって、前記ゲノム破壊は、場合により、エンドヌクレアーゼ媒介インデルを含む医薬組成物。

73. 配列番号177～195のうちの少なくとも3つを含む遺伝子標的配列内にゲノム破壊を含む、操作されたナチュラルキラー細胞集団を含む医薬組成物であって、前記ゲノム破壊は、場合により、エンドヌクレアーゼ媒介インデルを含む医薬組成物。

74. 配列番号177～195のうちの少なくとも2つを含む遺伝子標的配列内にゲノム破壊を含む、操作されたナチュラルキラー細胞集団を含む医薬組成物であって、前記ゲノム破壊は、場合により、エンドヌクレアーゼ媒介インデルを含み、

操作されたNK細胞は、配列番号47～49および51～54のうちの1つ以上と少なくとも約90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むscFvを含むCD70を標的とするCARを発現する医薬組成物。

75. 前記ゲノム破壊が、エンドヌクレアーゼ媒介インデルを含む、実施形態72～74のいずれか1つに記載の医薬組成物。

【実施例】

【0159】

以下は、下記に開示する実施例において使用した実験方法および材料に関する非限定的な記載である。

[実施例1]

【0160】

CD70結合因子のスクリーニング

種々のCD70結合因子のスクリーニングを行い、結合因子の選択された特徴を特徴付け、多重遺伝子編集に関連するさらなる実験プロトコルに進むための種々の閾値を満たすかどうかを決定した(表E1)。図2は、インビトロアッセイにおける腫瘍増殖を阻害する能力、およびNK細胞に、この実施例ではCD70を標的とするCARコンストラクトをコードするレトロウイルスベクターで形質導入するプロセスの15日目における、結合因子を組み込んだCARの発現の耐久性または持続性という観点から、ある特定の結合因子の特徴を概説する。「128シリーズ」コンストラクトは、vH-GS3リンカー

10

20

30

40

50

v L フォーマットの s c F v を採用する。「127 シリーズ」は、v L - リンカー - v H フォーマットを採用し、リンカーは、配列番号 50 のリンカー（配列番号 33 と少なくとも 80 % の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされる）と少なくとも 80 % の配列同一性を有する代替リンカーである。「129 シリーズ」は、C A R をコードするポリヌクレオチド上にバイシストロン性にコードされるが、別々に発現される m b I L 15 において選択された突然変異を有する。この突然変異は、1 つ以上のシステイン残基を、例えば、セリン残基またはアラニン残基に変更させるヒンジ配列の突然変異を含む。様々な C D 70 結合因子は、追加の数値識別子、この実験では 58 結合因子または 71 結合因子のいずれかによって示される。まとめると、2 つの数字は、結合因子同定および構造を示す。換言すると、N K 128 . 58 は、v H - G S 3 リンカー - v L フォーマットを使用する s c F v 番号 58 を採用する。本明細書で検討されるように、様々な膜貫通ドメインおよびシグナル伝達ドメインが使用され得る。本明細書で提供される C A R コンストラクトのこれらの非限定的な実施形態は、C D 8 アルファヒンジおよび膜貫通ドメイン、O X 40 共刺激ドメインおよび C D 3 ゼータシグナル伝達ドメインを採用する。

10

【0161】

【表2】

表 E1. 非限定的 CD70 結合剤 (配列番号)

結合剤	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3	VH	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3	VL	リンカー	scFv
127.58	205	225	226	152	204	223	224	155	50	51
127.71	205	206	207	153	209	210	211	156	50	52
128.58	205	225	226	152	204	223	224	155	208	48
128.71	205	206	207	153	209	210	211	156	208	49
146	110	111	112	157	140	141	142	158	50	53
147	110	111	112	157	140	141	142	158	208	54

20

【0162】

図2に示されるように、これは4人のドナー由来の操作されたNK細胞からの複製データであり、細胞はまた、NK細胞上のCD70発現を減少させるように編集され（例えば、フラトリンドを回避するため）、さらにCISH発現をロックアウトするように編集される。細胞傷害性データの主な傾向は、127および128シリーズのCARが、所与のドナーの細胞内で比較的一貫した腫瘍増殖抑制を示したことである。予想されたように、腫瘍増殖を阻害する能力は、エフェクター：標的（E：T）比が1：2の場合、E：T比が1：4の場合と比較して大きかった。129シリーズのCARは、腫瘍増殖の阻害という点ではあまりロバストでないようであった。エレクトロポレーション（EP）後の15日目でも、各CARはNK細胞集団のほとんどに発現していた（CAR（D15）%で測定した）。多少のばらつきはあるものの、CD70 CAR陽性細胞の中で、強度（例えば、細胞によって発現されたCD70 CARの数）は比較的高かった。

30

40

【0163】

図3は、数週間にわたるCAR発現の持続性に関する代表的なデータを示す。「71」CARを発現するコンストラクトは、少なくとも最初の3週間にわたって高い持続性を有するようであるが、これらのデータは、選択されたCARコンストラクトの各々が、数週間にわたってNK細胞によって良好に発現されることを示す点で重要である。同様の傾向は、他の2人のドナーの対応するデータでも見られた（示していない）。図4は、EP後5週間の培養物中に存在する全NK細胞数に関するデータを示す。これらのデータは、NK細胞によって発現されたCARコンストラクトにかかわらず、細胞数にほとんど変動がないことを示しており、どのCARもNK細胞の生存に特に悪影響を及ぼさないことを意味する。同様にして、図5は、発現されるCARにかかわらず、培養開始後15日間にお

50

けるNK細胞集団の増殖能力のばらつきが限定的であることを示すデータである。

【0164】

58結合因子および71結合因子をさらに特徴付けるために、結合因子は、完全IgG1としてフォーマットされ、ヒト初代上皮細胞への結合をフローサイトメトリーによって評価した。初代上皮細胞タイプには、気管支、腎臓、膵臓、胃、肝臓、脾臓、食道、結腸、小腸、および肺胞細胞が含まれた。陽性対照として、CD70発現細胞株への結合も評価した。いずれの結合因子も、試験したヒト上皮細胞には結合しなかったが、CD70発現細胞株には結合した（データを示していない）。

【0165】

まとめると、これらのデータは、抗CD70 CARコンストラクトを、遺伝子編集されたNK細胞によって安定的に発現させることができ、腫瘍の増殖を制御することができ、増殖およびNK細胞集団数に対する阻害効果を限定的としたことを実証した。

【実施例2】

【0166】

選択されたCD70 CARを発現する遺伝子編集されたNK細胞のさらなる特徴付け二重遺伝子編集され、選択されたCD70を標的とするCARを発現するように操作されたNK細胞をさらに評価するために、追加のインビトロ実験を行った。この一連の実験において、試験されたコンストラクトは、NK128.58、NK128.71、NK127.58、NK127.71、NK146およびNK147であり、後者の2つは、それぞれ、NK127およびNK128シリーズと同じscFvアーキテクチャを採用している。NK細胞はまた、それぞれCISHおよびCD70タンパク質発現を減少させるために、CISHとCD70の両方で編集される。図6は、遺伝子編集され、CARを発現するNK細胞の産生および評価の非限定的な概略図を示す。

【0167】

図7A～7Bは、遺伝子編集後6日目の2人のドナー（ドナー512、上段；ドナー548、下段）由来のNK細胞によるCD70発現に関連するフローサイトメトリーデータを示す。図7Aは、CD56発現（NK細胞の有病率を表す）データを示し、遺伝子編集プロセス（例えば、エレクトロポレーションおよびCISH/CD70 gRNAの導入）がNK細胞数の減少を引き起こさないことを確認する。図7Bは、EP対照と比較して、CISH/CD70 gRNAおよびエンドヌクレアーゼの導入がCD70発現の実質的な減少をもたらすことを示す（右欄）。図8A～8Hは、遺伝子編集された細胞に示された抗CD70 CARコンストラクトをコードするウイルスベクターで形質導入した後、10日目のCD70発現に関するデータを示す。図8Gに示されるように、CD70/CISH編集は、（図8HのEP対照と比較して）NK細胞によるCD70発現の程度を減少させる。図8A～8Fの各々は、最小限のCD70発現を示す（図8Gにおける形質導入されていないが遺伝子編集された細胞と比較しても減少する）。この減少は、示されたCARコンストラクトの各々が機能的に有効であることを示し、ほぼゼロに近いCD70発現は、なおもある程度のCD70を発現している残りの遺伝子編集されたNK細胞に対するフラトリサイドを反映する。少なくとも、残存するCD70発現NK細胞に対して指向される細胞傷害性に関して、各CD70 CARコンストラクトは、それらの有効性において類似しているようである。図9A～9Hは、14日目に収集された対応するデータを示し、CD70 CARが発現された各群において、CD70発現細胞は再び本質的に排除された。同様の10日目と14日目のデータが、第2のドナーについても得られた（示していない）。

【0168】

図10A～10Bは、2人のドナーの各々についてのTIDEインデル分析を示す（それぞれ10A/10B）。これらのデータは、遺伝子編集効率が10日目で約70～85%であり、14日目の分析では少なくとも約90%の効率になる傾向があることを示す。

【0169】

さらなる実験において、同じ2人のドナー由来のNK細胞は、0日目にCD70および

C I S H 標的化 g R N A を用いたエレクトロポレーションにより C D 7 0 および C I S H についてノックアウトし、例示的な C D 7 0 C A R の 1 つを発現するように操作された。C D 7 0 および C I S H をノックアウトしたが、C A R を発現していない N K 細胞（二重 K O）または模擬エレクトロポレーションされた細胞（E P のみ）を対照とした。I L - 2 非存在下での細胞の持続性は、5 週間にわたる培養で評価された。1 2 7 シリーズおよび 1 2 8 シリーズの C A R を発現する細胞は、I L - 2 非存在下で持続性の増加を示した（図 1 0 C）。

【0170】

遺伝子編集された C A R 発現 N K 細胞の細胞傷害性の評価に目を向けると、低レベルの C D 7 0 を発現する P a n c 0 5 細胞に対する種々の C A R コンストラクトの I C ₅₀ を決定するために、B r i g h t - G l o（商標）分析が実施された。図 1 1 A および 1 1 C は、遺伝子編集後 1 4 日目にそれぞれ第 1 と第 2 のドナーから収集したデータを示す。この時点で、C A R を発現する細胞集団の各々は、C A R を発現しない C I S H 編集された N K 細胞（E P C I S H）よりも増大した細胞傷害性を示した。1 2 7 . 5 8、1 2 7 . 7 1 および 1 2 8 . 5 8 の C A R 発現 N K 細胞は、N K 1 2 8 . 7 1 などの他の C A R 発現 N K 細胞と比較して、やや強力であった。1 7 日目に同じドナーの細胞傷害性プロファイルを評価した場合、様々な C D 7 0 C A R 発現細胞は、やや一貫した性能を示した（図 1 1 B および 1 1 D）。重要なことに、標的細胞が低レベルの C D 7 0 を発現しているにもかかわらず、試験した各グループが腫瘍細胞を効果的に排除した。

【0171】

図 1 2 A ～ 1 2 B は、N K 細胞および標的細胞（P a n c 0 5）が 1 : 2 の比で存在する場合に、2 つの異なるドナーから 1 日 I n c u C y t e（登録商標）アッセイで収集された細胞傷害性データを示す。示されるように、各実験グループは対照と比較して腫瘍細胞数（P a n c 0 5）を減少させ、N K 1 2 7 . 5 8 および N K 1 2 7 . 7 1 コンストラクトが最も効果的であるように見えた。

【0172】

中程度の量の C D 7 0 を発現する A C H N 腫瘍細胞に対する C D 7 0 C A R 発現遺伝子編集 N K 細胞の有効性を評価するために、追加の実験を行った。それぞれ 2 人の異なるドナーからデータを収集した図 1 3 A および 1 3 B に示されるように、最初の共培養後に 2 回の再チャレンジがあった。ここでの E : T 比は 1 : 2 であり、P a n c 0 5 細胞を用いた B r i g h t - G l o（商標）アッセイと同様に、C D 7 0 C A R を発現する各グループは対照よりも A C H N 腫瘍細胞数をより大きな程度で減少させ、1 2 7 . 7 1 コンストラクトが最も強力であるように見えた。

【0173】

別のアッセイは、7 8 6 - O 腫瘍細胞（高レベルの C D 7 0）を用いて、最初の共培養と 1 回の再チャレンジで行われた。実験終了時、各コンストラクトは同様の細胞傷害性を示すように見えた（それぞれ 2 つの異なるドナーからの図 1 4 A および 1 4 C を参照されたい）。中間時点（1 4 A の縦線、約 3 日）で評価が行われ、結果として腫瘍細胞集団は第 1 のドナーの図 1 4 B に示されるヒストグラムに記述された。この中間時点で、各 C D 7 0 C A R は、C A R を発現していない C I S H 編集 N K 細胞（C I S H E P）および模擬エレクトロポレーション N K 細胞（E P）よりも高い細胞傷害性を示した。この中間時点では、N K 1 2 7 および 1 2 8 シリーズのコンストラクトがより強力であった。

【0174】

図 1 5 A ～ 1 5 D は、平均蛍光強度（M F I）による、C A R を発現する N K 細胞のパーセンテージ（それぞれ 1 5 A および 1 5 C）およびこれらの陽性細胞による発現密度（それぞれ 1 5 B および 1 5 D）に関する 2 つの異なるドナーからのデータを示す。これらのデータは、各 C A R コンストラクトが所与のドナー細胞群内で比較的一貫して発現したことを示す。1 2 7 シリーズ（1 2 7 . 7 1）は、両方のドナー間でわずかに高発現しているようであった。注目すべきことに、N K 1 2 7 . 7 1 コンストラクトが他のコンストラクトよりも高密度に発現しているようであり、これは、C D 7 0 の高発現、中発現、ま

たは低発現の腫瘍株に対して、このコンストラクトを発現するNK細胞の細胞傷害性が明らかに増大していることを説明し得る。まとめると、これらのインビトロデータは、CD70 CARの発現が、少なくとも2つの標的（例えば、CISHおよびCD70）の遺伝子編集と併せて、治療細胞に対する増大した細胞傷害性および持続性をNK細胞に付与することを実証する。いくつかの実施形態では、このアプローチは、CISHおよびCD70に加えて、CBLB、TGFB β 2、および／またはアデノシン受容体などの少なくとも1つの付加的な遺伝子の編集によってさらに促進され、NK細胞にさらなる増大した効力および／または持続性を付与する。

[実施例3]

【0175】

実施例3－選択されたCD70 CARのインビボ特性付け

上記で検討したインビトロデータを拡大させ、遺伝子編集されたCD70 CAR発現細胞の有効性を評価するために、いくつかのインビボ実験を行った。腎細胞がん腫異種移植モデルを用いて、NK細胞投与の5日前に、786-O腎細胞がん腫細胞をマウスに注射した。単回用量の2,000万個のNK細胞（CD70およびCISHで遺伝子編集され、CD70 CARを発現する）を0日目に注射した。図16A～16Eは、示されたCD70 CARを発現し、遺伝子編集されたNK細胞の腫瘍増殖制御能を評価する代表的なインビボデータを示す。この実験において使用されるCD70を標的とするCARは、示されたコンストラクトの接尾辞（例えば、「.71」、「.58」、または「.17」）に基づいて、本明細書で提供される他のものと同じVH、VL、およびリンカー配列を共有するが、これらの特定のコンストラクトは、代替の生成プラスミド（「102」コンストラクトの接頭辞で示される）を用いて製造された。図16Aおよび16Bは対照データを示し、図16Cおよび16Eは先行実験で評価されたCD70 CARコンストラクトを示す。これらの図から注目されるように、CD70 CARの存在は細胞傷害性を増大し、編集CISHは細胞傷害効果をさらに増大する。同様の傾向は、A498異種移植モデルを用いた対応する実験において検出された（データを示していない）。

【0176】

786-O腎細胞がん腫異種移植モデルを用いて、複数回用量のインビボ試験も行われた。1000万個の786-O細胞は、NK細胞の投与3日前に注射された。遺伝子編集されたCD70 CAR発現NK細胞を2回用量投与した：0日目に3000万個、および7日目に3000万個のNK細胞。図17A～17Bは、腫瘍量（17A）およびCAR陽性NK細胞の持続性を示す。しかし、127.58群（26日目には測定されなかった）では、各群ともNK細胞の総個体数のほぼ75%に近づいた。各群とも、測定時間の経過とともにそのパーセンテージが増加していることから、NK細胞への編集によって、編集された細胞の寿命が延びたことが分かる（腫瘍量の制御によって、細胞の機能性が経時的に示される）。まとめると、これらのデータは、CD70 CARの発現が、NK細胞に増大した細胞傷害性を付与し、これらの細胞のゲノムの編集、例えば、CISH編集が、細胞傷害性を増大し、例えば、CD70をノックダウンすることによって治療内細胞集団のフラトリサイドを減少させることを示す。本明細書で提供されるように、CISHおよびCD70に加えて、CBLB、TGFB β 2、および／またはアデノシン受容体などの他の遺伝子に対する追加の編集は、NK細胞にさらに増大した効力および／または持続性を付与する。

[実施例4]

【0177】

CD70 CAR発現NK細胞における多重遺伝子編集の評価

上記で検討したように、いくつかの実施形態では、免疫細胞（例えば、NK細胞）は、例えば、複数の標的遺伝子の発現をノックダウンまたはノックアウトするように編集され

10

20

30

40

50

る（「多重遺伝子編集」）。いくつかの実施形態では、NK細胞などの免疫細胞は、CD70発現を減少させ、実質的に減少させ、および／または排除するように編集され、CD70を標的とするCARを発現するように操作される。いくつかの実施形態では、免疫細胞はまた、場合により、CISH発現を減少させ、実質的に減少させ、および／または排除するために編集される。いくつかの実施形態では、免疫細胞はまた、場合により、Casitas B系列リンパ腫-b（Cbl-b）発現を減少させ、実質的に減少させ、および／または排除するように編集される。

【0178】

遺伝子編集は、実施形態に応じて異なる時点で行うことができる。図18A～18Bは、細胞産生プロセスの非限定的な例を示す。図18Aは、0日目のEPアプローチを示し、遺伝子編集は、静止NK細胞において0日目に行われる。次に、ウイルス形質導入が約7日後（編集された細胞の拡大後）に行われ、インビトロおよびインビボ評価が示されるようにスケジュールされる。対照的に、図18Bは、6日目のEPアプローチを示し、NK細胞が最初に拡大され（したがって活性化され）、遺伝子編集がCD70 CARによるウイルス形質導入の1日前に行われる。

【0179】

0日目および6日目の多重遺伝子編集アプローチを試験するための実験群を表E2に示す。

【0180】

【表3】

表E2.0日目および6日目の多重編集の実験群

	群 (gRNA 配列)
1	EP のみ
2	CD70 KO (例えば、配列番号 180)
3	CD70 KO (例えば、配列番号 180) + CISH KO (例えば、配列番号 191)
4	CD70 KO (例えば、配列番号 180) + CBLB KO (例えば、配列番号 195)
5	CD70 KO (例えば、配列番号 180) + CISH KO (例えば、配列番号 191) + CBLB KO (例えば、配列番号 195)

【0181】

遺伝子編集された細胞のサブセットは、6日目に表現型的に特徴付けられた。表E3および図19A～19Bに示されるように、編集された遺伝子は、タンパク質レベルとゲノムレベルの両方において首尾よく破壊された。

【0182】

【表 4】

表 E3.0 日目のエレクトロポレーションを用いた発現およびインデルの概略

		表面 FACS 表現型 (11 日目)	TIDE/NGS インデル (6 日目)		
	群	CD70%	CD70	CISH	CBLB
1	EP のみ	66.2%	-	-	-
2	CD70 KO	16.9%	81.1%	-	-
3	CD70+CISH KO	17.2%	76.5%	68.9%	-
4	CD70+CBLB KO	29.4%	-	-	87.8%
5	CD70+CISH+ CBLB KO	30.1%	75.1%	67.0%	81.0%

10

【0183】

表 E3 に示されるように、編集群における CD70 の表面発現は、群に応じて、約 70 ～ 85 % 減少した (EP 後 11 日目に測定した)。EP の 6 日後、TIDE インデル分析は、CD70 について約 75 ～ 82 %、CISH について約 67 ～ 68 %、CBLB について約 80 ～ 88 % のインデル頻度を示した。図 19 A のウェスタンブロットのレーン 1 ～ 4 に示されるように、CBLB タンパク質の発現は、分析群 4 (CD70 / CBLB KO) および 5 (CD70 / CISH / CBLB KO) では、群 1 (CD70 KO) および 2 (CD70 / CISH KO) における CBLB タンパク質の発現と比較して減少した。同様に、図 19 B のレーン 1、2 および 4 において示されるように、CIS タンパク質発現は、群 1 (CD70 KO) における CIS タンパク質発現と比較して、群 2 (CD70 / CISH KO) および 4 (CD70 / CISH / CBLB KO) において減少した。CD70 CAR の発現は、CAR を発現する NK 細胞を、培養において経時的に富化された。図 20 A ～ 20 C に示されるように、CD70 CAR 陽性であった培養物のパーセンテージは、11 日目 (20 A) から 21 日目 (20 B)、さらには 28 日目 (20 C) まで増加した。結果としての 28 日目の培養物は、ほぼ 100 % CD70 CAR 陽性であった。

20

30

【0184】

種々の編集の組み合わせの評価は、編集された NK 細胞の培養における拡大能力に関して行われた。図 21 A は、形質導入前の倍数拡大に関して、示された編集の組み合わせのデータを示す。多少のばらつきはあるものの、各処置群は概ね同様の拡大を示した。図 21 B は、形質導入後の各処置群の拡大程度を示す。拡大の減少は、形質導入プロトコールに対する不応性の可能性があることに留意されたい。しかしながら、14 日目には全体的な倍数拡大 (21 C) は回復し、CD70 への単一編集群では約 1000 倍、二重および三重編集群では約 650 倍であった。注目すべきは、(2 つではなく) 3 つの遺伝子を編集した場合、拡大可能性に実質的な悪影響がないように見えることである。

40

【0185】

異なる非限定的 CD70 CAR を発現する三重編集 NK 細胞の機能性は、ACHN 細胞および 786-O 細胞 (それぞれ中レベルおよび高 CD70 発現) を用いて、1:2 の E:T 比でインビトロ IncuCyte (登録商標) 細胞傷害性アッセイによって行われた。図 21 D ～ E に示されるように、各実験群は、対照 (EP) と比較して、ACHN および 786-O 細胞をそれぞれ減少させた。同様のアッセイは、1:4 の E:T 比とし、最初の共培養から 5 日目に提供される腫瘍の再チャレンジを 1 回行った。図 21 F ～ G に示されるように、CD70 CAR を発現する各群は、それぞれ ACHN および 786-O 腫瘍細胞数を対照 (EP) よりも大きく減少させ、127.71 CAR が最も強力であった。

50

【0186】

操作され編集された細胞の機能性を評価するために、ACHN細胞（中レベルのCD70発現）を1：4のE：T比で用い、編集後14日目から2回の再チャレンジを行うインビトロ細胞傷害性アッセイをさらに行った。図22Bに示されるように、CD70／CISH編集群は、CD70のみ編集群と比較して、実質的に増大した細胞傷害性を示した。さらに、新鮮な腫瘍細胞による2回の再チャレンジにもかかわらず、CD70／CISH／CBLBへの三重編集は、他の群と比較して有意に大きな細胞傷害性を付与した。図22Aの条件はTGFベータの非存在下であったが、細胞傷害性を阻害するTGFベータの存在下でも、CD70／CISH／CBLBへの三重編集は実験群の中で最も実質的な細胞傷害性を示した。編集後21日目から評価を始めると、同様のパターンが図22C～22Dに示される。編集後28日目に評価を開始しても、三重編集NK細胞（CD70／CISH／CBLB）は、3日間の再チャレンジ（22E）にもかかわらず、またTGFベータ存在下（22F）にもかかわらず、依然として腫瘍増殖のロバストな制御を示す。これらのデータは、三重編集が効力および持続性の実質的な増大を引き起こすことを示す。

【0187】

表E2に並べたのと同じ実験群を用いて、6日目のEPアプローチを用いて実験を行った（図18Bを参照されたい）。10日目（拡大から、編集後4日目、形質導入後3日目）に評価したところ、遺伝子編集は、タンパク質レベルおよびゲノムレベルでの発現を首尾よく破壊した。

【0188】

【表5】

表E4. 6日目のエレクトロポレーションを用いた発現およびインデルの概略

	群 (gRNA 配列)	表面 FACS 表現型	TIDE/NGS インデル		
		CD70%	CD70	CISH	CBLB
1	EP のみ	63.0%	-	-	-
2	CD70 KO (例えば、配列番号 180)	2.45%	86.5%	-	-
3	CD70 KO (例えば、配列番号 180) + CISH KO (例えば、配列番号 191)	2.94%	85.3%	94.8%	-
4	CD70 (例えば、配列番号 180) + CBLB KO (例えば、配列番号 195)	2.84%	-	-	79.4%
5	CD70 KO (例えば、配列番号 180) + CISH (例えば、配列番号 191) + CBLB KO (例えば、配列番号 195)	3.10%	80.7%	89.3%	72.3%

【0189】

表E4に示されるように、編集群におけるCD70の表面発現は約95%以上減少した。TIDEインデル分析は、CD70について約80～87%、CISHについて約90～95%、CBLBについて約70～80%のインデル頻度を示した。図23Aのウェスタンブロットにおけるレーン1～3に示されるように、CBLBタンパク質発現は、分析群2（CD70／CBLB KO）および3（CD70／CISH／CBLB KO）では、群1（CD70／CISH KO）におけるCBLBタンパク質発現と比較して減少した。同様に、図23Bのレーン1～3において示されるように、CISタンパク質発現は減少した（群2（CD70／CBLB KO）および群4（CD70／CISH／CBLB KO）を参照されたい）。CD70 CARの発現は、CARを発現するNK細胞を、培養において経時的に富化させた。図24A～24Bに示されるように、培養物中のCD70 CAR陽性であった細胞のパーセンテージは、10日目（図24A）で約80%であり、15日目（図24B）では90%以上に増加した。0日目のEPアプローチを

用いて示されたデータと同様に、6日目のEP細胞群、特に三重編集（CD70／CISH／CBLB）は、TGFベータ存在下（図25B）でさえも、ACHN細胞に対して有意な細胞傷害性を示した（図25A）。この増大した細胞傷害性はインビトロの設定に限定されず、2つの異種移植モデルを用いて種々の処置群の有効性を評価した。786-O（高いCD70発現）異種移植モデルで示されるように、三重編集（CD70／CISH／CBLB）CD70 CAR発現NK細胞は、約45日間にわたって腫瘍体積の増加が最も少なかった（図26A）。同様に、A-498異種移植片（これも高いCD70発現）では、三重編集（CD70／CISH／CBLB）CD70 CAR発現NK細胞は腫瘍体積の大幅な増加を防ぎ、特に実験終了時には腫瘍はなく、瘢痕組織のみとなった（図26B）。まとめると、これらのインビトロおよびインビボデータは、多重編集が培養におけるNK細胞の増殖能力に悪影響を及ぼさないこと、およびCD70／CISH／CBLBなどの三重編集が、CD70 CARを発現するように操作されたNK細胞の細胞傷害性および持続性を増大するのに特に効果的であることを示す。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書には、がん治療を増大するために、内因性のCD70、CISHおよびCBLBを減少または排除するように編集されたCD70 CAR発現NK細胞が提供される。

10

[実施例5]

【0190】

オフターゲット遺伝子編集分析

上述した三重編集は、NK細胞の細胞傷害性および持続性を増大するのに予想外に効果的であることを示したが、例示的なgRNAを用いて起こり得るオフターゲット編集を評価するために、追加の研究が行われた。

20

【0191】

図27は、ハイブリッドキャプチャーによるオフターゲット編集の分析の概略図を示す。一連のプロンプが生成され、各オフターゲットの可能性のある部位にわたってタイリングされる。プロンプシグナルに基づいて、標的化される領域は濃縮され、配列決定される。インデルを含む読み取り配列の総数が計算され、各オフターゲットの可能性のある部位の総読み取り数で割る。編集された試料のインデルの頻度（ドナーと合致した対照の総読み取り数に対する）が0.2%より大きい場合、追加の統計分析が行われる。例えば、対照試料および処理試料を比較するために、対応のある片側T検定が実行され、P<0.05の部位がオフターゲット編集であることを確認する。図28は、非限定的なオフターゲット分析プロセスフローを示す。図29Aは、本明細書で提供される選択されたgRNAについて、可能性のあるオフターゲット部位および推定NGS読み取りカバレッジに関する情報を示す。図29Bは、選択されたgRNAについて、より多くのドナーのための追加データとともに、図29Aにおいて提供された以前のデータの概要を示す。示されているように、NGS分析のQC基準は、5000を超える読み取りのカバレッジ中央値であり、全ての試料がCISH-13 gRNAの1反復以外を上回っている。

30

【0192】

図30Aおよび30Bは、それぞれ図29Aおよび29Bに示される選択されたgRNAについてのオフターゲット分析の結果を示す。TIDE分析またはハイブリッドキャプチャーのいずれかで計算しても、計算されたオンターゲット編集率は各gRNAについて一貫していた。示されるように、0.2%のインデル上限を超えたため、より詳細な統計的比較が必要となったのはただ1つの試料（CISH-10 gRNA）であった。しかしながら、その分析でさえもオフターゲット編集は確認されなかった。したがって、これらのデータは、遺伝子編集のためのgRNAのこれらの非限定的な実施形態の正確性および特異性を確認する。

40

[実施例6]

【0193】

多重遺伝子編集されたNK細胞の分析

図31は、多重遺伝子編集の影響を評価するための実験試料を作製するための非限定的

50

なプロセスフローを示す。編集された細胞は、6日目のEPアプローチを用いて生成され、したがって、6日間の拡大後に編集される。試料はEP後に分割され、サブセットはオフターゲット分析に使用され、サブセットはCD70 CAR候補で形質導入され、機能試験に供される。

【0194】

図32は、2セットのドナーNK細胞におけるCISH-15 gRNAのTIDE分析を要約する。データから分かるように、インデル頻度は、2番目の編集を含むことによって悪影響を受けなかった（上記で検討された2番目および3番目の編集で見られたようである）。図33Aは、CISH-10対CISH-15 gRNAのインデル頻度の比較を示す。4人の異なるドナー由来の追加のgRNAのインデル頻度を図33Bに示す。図34は、2人のドナーのCD70のインデル頻度を表したものである。図35A～35Gは、示された編集コンテキスト（非形質導入細胞）におけるCD70発現の程度を示す。これらのデータから分かるように、単一編集（例えば、CD70のみ）またはCD70とCISH（35D）、CBLB（35E）、もしくはその両方（35F）の組み合わせのいずれであっても、多重編集の存在は、フローサイトメトリーによって測定される個々の編集の有効性を減少させない。対応するデータを別のドナーについて図36A～36Gに示す。これらの傾向は、2人のドナーについて図37Aおよび37Bに概説されるインデルの頻度分析によって確認される。これらのデータは、第2の編集が第1の編集を低減させないか（37A）または増大するようである（37B）ことを示す。全体として、各遺伝子の減少した発現は比較的一貫しており、多重遺伝子編集が実行可能で効果的であることが確認される。

[実施例7]

【0195】

多重編集されたNK細胞における染色体転座の分析および最適化

先行する実施例のように複数の遺伝子編集がなされた場合、複数個所の二本鎖切断が染色体の転座を可能にする危険がある。図31の非限定的なプロセスフローに従い、編集された細胞は6日目のEPアプローチを用いて生成され、したがって、6日間の拡大後に編集される。図38は、染色体転座の可能性を評価するための一連の実験グループの概要を示す。図39は、各意図された編集の組み合わせにおけるオンターゲット編集のパーセンテージを示し、各々が望ましい閾値である80%を大きく上回っている。オンターゲット編集の重要性は、転座のリスクをより正確に評価する能力にある（例えば、オフターゲット切断が減少すれば、「遊離」染色体物質の数が減少するはずである）。さらに、転座の可能性は、編集サイクルが何回使用され得るかに影響する。単一編集サイクルで2つのgRNAを使用すると、結果的に4種をもたらす可能性がある。例えば、gRNAがエンドヌクレアーゼを標的として9番染色体を切断し、第2のgRNAがエンドヌクレアーゼをガイドとして11番染色体を切断した場合、結果として9A、9B、11A、および11Bの4つの染色体断片が生じる。転座が起これば、9A～11Bの組み合わせ、9B～11Bの組み合わせ、9A～11Aの組み合わせ、および9A～11Bの組み合わせとなり得る。単一編集サイクルで3つのgRNAを使用する場合、結果として6つの染色体断片ができ、それが12種類の異なる種に結合（転座）する可能性がある。臨床製品および安全性のためには、転座を最小限に抑えることが目標である。上記で検討したCD70/CISH/CBLBの組み合わせのような三重編集を行うために、図40A～40Bに模式的に示される2つの一般的なアプローチが考えられる（図には示していないが、3つの異なる編集イベントという別の選択肢もある）。図40Aは、三重編集を達成するための単一のエレクトロポレーションイベントを示す。このアプローチにおける転座の総数は、その単一の編集イベントから生じる数である。図40Bは、2つの編集イベント（EP1およびEP2）が、企図された三重編集（ここではCD70/CISH/CBLB）の全体を達成するために使用される代替アプローチを示す。この文脈における可能な転座の合計は、第1および第2の編集イベントで生じる転座の合計である。したがって、いくつかの実施形態では、編集の組み合わせは、例えば、所与の編集イベントで組み合わせて使用さ

れる gRNA に基づいて、転座の確率を減少させるように選択される。

【0196】

図41A～41Cは、三重編集、ここではCD70／CISH／CBLBを達成するために可能な編集スキーマの非限定的な組み合わせを示したものである。図41Aは、CD70およびCISHに対する第1の（二重）編集（例えば、配列番号191によって与えられるCISH-15 gRNA配列を使用する）、およびCBLBに対する第2の編集（例えば、配列番号195によって与えられるCBLB gRNA配列を使用する）を採用する。図41Bは、CD70に対する第1（単回）編集（例えば、配列番号180によって与えられるCD70 gRNA配列を使用する）、およびCISHおよびCBLBに対する第2（二重）編集を示す。図41Cは、CD70およびCBLBに対する第1の（二重）編集およびCISHに対する第2の編集を示す。また、例えば、上記で列挙された第1の編集と第2の編集が逆の順序で行われる編集構造も提供される。

10

【0197】

図40Aのスキーマに従い、三重編集、ここではCD70／CISH／CBLBを達成するために1回のエレクトロポレーションを行った。結果として検出された転座率は8.5%であり（図42を参照されたい）、これは<4～6%の所望の許容範囲を超えている。しかしながら、異なる遺伝子が編集される一部の実施形態では、許容可能な転座率が達成される。結果は、CISHとCBLBの両方が同じ染色体上にあるため、転座の確率が高くなったためと考えられる（例えば、二本鎖切断と「遊離」染色体断片の相対的な局在による）。

20

【0198】

CD70およびCISH編集の組み合わせで行われた（CISH-10またはCISH-15 gRNAのいずれかを使用する）を用いて、二重編集スキーマを設定した（最初の編集のみを試験した）。図43に示されるように、CISH-10 gRNA（配列番号187により与えられる配列を有する）を用いた転座率は所望の閾値を超えたが、CISH-15 gRNA（CD70用gRNAとの組み合わせ）は、約4.4%の許容可能な低い転座率をもたらした。さらに、転座イベントを減少させることを期待して、CD70とCBLBの組み合わせを単一編集イベントで試験した。これらのデータは、図44に示されるように、2%未満（試験した限りでは1.6%）の非常に望ましい転座頻度を示す。CD70およびCBLBを編集した場合、この相対的に低いパーセンテージのイベントであれば、第2の編集（CISHへの編集）だけでは、1回の切断による転座イベントは、発生するとしてもより少ない結果をもたらすことが予想される。したがって、図44に示されるように、実施形態に応じて、二重編集を最初に行うことも、または二番目に行うことも可能である。単一編集は、発生するとしても、転座イベントをほとんど生成しないと予想されるが、いくつかの実施形態では、転座イベントの総数は、例えば、編集イベント間の時間を最適化（例えば、増加）することによって、さらに減少させることができる。いくつかの実施形態では、EP1およびEP2は、約12時間、約24時間、約36時間、約48時間、約3日、約4日、約5日、約6日、または約7日（または列挙されたこれらの時間の間の任意の時間）離間される。いくつかの実施形態では、編集イベントの間に7日以上が経過する。全体として考慮すると、これらのデータは、三重編集、例えば、CD70／CISH／CBLBを達成するための多重遺伝子編集が、十分に低い転座率および有効量の遺伝子発現減少、ならびに細胞傷害性CARの発現で達成され、高度に細胞傷害性の細胞集団をもたらすことができることを示している。いくつかの実施形態によれば、CD70 CARを発現する集団は、CD70、CISH、およびCBLBで編集され、高活性であり、持続的な操作され編集されたおよび細胞集団を生成する。いくつかの実施形態では、細胞はNK細胞を含む。

30

40

[実施例8]

【0199】

多重遺伝子編集されたNK細胞のインビボ分析

CD70、CISH、およびCBLBをノックアウトしたCD70 CAR発現NK細胞

50

胞 (CD70 / CISH / CBLB KO) をノックアウト効率、インビトロでのサイトカイン分泌および持続性、ならびにインビボでの有効性および持続性について分析した。

【0200】

簡単に述べると、本明細書に記載される例示的なCD70、CISH-15、およびCBLB gRNA配列 (例えば、それぞれ配列番号180、191、および195) を用いて、NK細胞をCD70、CISH、およびCBLBについてノックアウトし、続いて127.58、128.58、127.71、または147 CD70を標的とするCARを発現するように操作した。各遺伝子のノックアウト効率は、異なるCD70 CARを発現するNK細胞において、エレクトロポレーションの10日および15日後で評価した。CD70、CISH、CBLBの各々について、ノックアウト効率は、異なるCARコンストラクト間で同様であった (図45A)。さらに、エレクトロポレーションの15日後までに、CD70、CISH、およびCBLBの各々のノックアウト効率は、CARを発現しない三重ノックアウト細胞 (三重KO) とCARを発現する三重ノックアウト細胞の間で同等であった (図45A)。例示的なCD70 CARを発現するように操作した三重KO NK細胞は、IL-2非存在下、インビトロでそれらの持続性について評価された。CARを発現しない三重KO NK細胞 (三重KO) または模擬エレクトロポレーションされた細胞 (EPのみ) を対照として用いた。図45Bに示されるように、127および128シリーズのCARを発現する細胞は、最大の持続性を示す傾向があった。例示的なCD70 CARを発現するCD70 / CISH / CBLB KO NK細胞は、786-O標的細胞と1:2 (暗いバー) または1:4 (明るいバー) のE:T比で共培養され、NK細胞活性化を示す分子の分泌を分析した (図45C)。127および128シリーズのCAR、特に127.71 CARを発現する細胞は、活性化に関連する分子をより多く分泌する傾向があった。

10

20

【0201】

1000万個の786-O腫瘍細胞を-5日目にNOD scidガンマ (NSG) マウスに注射し、生着させた。0日目に、マウスに単回用量の 30×10^6 個のCD70 CAR NK細胞 (CD70 / CISH / CBLB KO、例えば、それぞれ配列番号180、191、および195) を注射した。腫瘍体積およびNK細胞の持続性を約70日目まで評価した。対照として、CD70 / CISH / CBLBをノックアウトしたが、CARを発現しないNK細胞 (三重KO) またはビヒクルのみを同数マウスに注射した。図46A-Bに示されるように、127.71 CARを発現するNK細胞は、それぞれより大きな腫瘍体積 (TV) 制御とインビボ持続性を示した。

30

【0202】

上記に開示された実施形態の特定の特徴および態様の種々の組み合わせまたはサブ組み合わせを作製することができ、さらに、1つ以上の発明の範囲内に入ることができると企図される。さらに、実施形態に関連する任意の特定の特徴、態様、方法、性質、特性、品質、属性、要素などの本明細書における開示は、本明細書に記載する他の全ての実施形態において使用することができる。したがって、開示された実施形態の種々の特徴および態様は、開示された発明の種々のモードを形成するために、互いに組み合わせることができるかまたは互いに置き換えることができることを理解するべきである。したがって、本明細書に開示される本発明の範囲は、上記された特定の開示された実施形態によって制限されるべきではないことが意図される。さらに、本発明は種々の修飾、および代替形態に感受性が高いが、その具体例を図面に示し、本明細書において詳細に説明する。しかしながら、本発明は、開示された特定の形態または方法に限定されるものではなく、逆に、本発明は、記載された種々の実施形態および添付の請求の範囲の精神および範囲内に入る全ての修飾、均等物および代替物をカバーするものであることが理解されるべきである。本明細書に開示される任意の方法は、示される順序で行われる必要はない。本明細書に開示される方法は、実施者によって取られる特定の行為を含むが、しかしながら、それらは、明示的にまたは黙示的に、それらの行為の第三者の指示を含むこともできる。さらに、本開示の特徴または態様がマーカッシュ群に関して記載される場合、当業者は、本開示がまた

40

50

それによってマーカッシュ群の任意の個々のメンバーまたはメンバーのサブグループに関しても記載されていることを認識する。

【0203】

本明細書に開示される範囲はまた、任意のおよび全ての重複、サブ範囲、およびそれらの組み合わせを包含する。「最大 (up to)」、「少なくとも」、「より大きい」、「より少ない」、「間」などの用語は、示された数字を含む。「約」または「ほぼ」などの用語の前にある数字は、示された数字を含む。例えば、「約 90 %」は、「90 %」を含む。一部の実施形態では、少なくとも 95 % の配列同一性または相同性は、参照配列に対する 96 %、97 %、98 %、99 %、および 100 % の配列同一性または相同性を含む。さらに、配列がヌクレオチドまたはアミノ酸配列を「含む」として開示される場合、このような参照文献はまた、他に指示がない限り、配列が、示された配列「を含む」、「からなる」、または「から本質的になる」ことを含むものとする。本明細書で使用される任意のタイトルまたは小見出しは、組織目的であり、本明細書に開示される実施形態の範囲を制限するために使用されるべきではない。

10

【0204】

本明細書に引用された全ての参考文献は、限定されないが、公開および未公開の出願、特許、および参考文献を含み、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれ、本明細書の一部を構成する。参照によって組み込まれた刊行物および特許または特許出願が明細書に含まれる開示に矛盾する限りにおいて、明細書は、このような矛盾する資料に取って代わり、および／または優先することを意図している。

20

【0205】

配列

いくつかの実施形態では、核酸コードの縮重を主要因としながら、本明細書に開示される核酸のいずれかに対応するアミノ酸配列（および／または添付の配列表に含まれる）が提供される。さらに、本明細書に明示的に開示される配列（および／または添付の配列リストに含まれる）とは異なるが、機能的類似性または同等性を有する配列（核酸またはアミノ酸のいずれか）もまた本開示の範囲内で企図される。上記には、突然変異体、切断、置換、コドン最適化、または他のタイプの修飾が含まれる。

【0206】

本明細書に記載されるいくつかの実施形態に従って、配列のいずれかを使用することができるか、または本明細書に開示される配列（および／または添付の配列表に含まれる）のいずれかの切断または突然変異形態を使用することができ、任意の組み合わせでを使用することができる。タグまたは他の検出可能な配列（例えば、Flag タグ）などの識別子を含む本明細書に提供される配列はまた、このようなタグまたは他の検出可能な配列がないもの（例えば、列挙された配列から Flag タグが除かれたもの）も本明細書に提供される。電子形式の配列表を本明細書に提出する。配列表に提供された配列の一部は、天然に存在する配列を含む、他の配列の天然に存在しない断片または部分であることにより、人工配列として指定される場合がある。配列表に提供された配列の一部は、ヒト化抗体配列などの、異なる起源由来の配列の組み合わせであることを理由に、人工配列として指定される場合がある。

30

40

【0207】

50

【表 6】

配列番号	配列	説明
1	accacgaogccagcgccgacccaccaacacggcgcccaccatcgctgcagcccc tgtccctgcgcccagaggcgctgcggccagcgggggggcgagtgacacgagggg gctggacttcgctgtgat	CD8 アルファ ヒンジ
2	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD	CD8a ヒンジ
3	atctacatcgggcgccctggcgggactgtgggtccttclctctgacaggttatcacc	CD8 TM
4	IYIWAPLAGTCGVLLSLVIT	CD8 TM
5	cggagggaccagaggctgccccgatgccacaagccccctggggaggcagtttcg gacccccatccaagaggagcaggccgacgccactccaccctggccaagatc	OX40
6	RRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI	OX40
7	agagtgaagttcagcaggagcgagacgcccccgctaccagcaggccagaaccag ctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgtttggacaagagacgtg gccccgacccctgagatgggggaaagccgagaaggaagaacctcaggaaggcctgt acaatgaactgcagaaagataagatggcgaggccctacagtgaagattggatgaaggc gagcgccggaggggcaaggggcacgatggccttaccagggtctcagtacagccaccaa ggacacctacgacgccttcacatgcaggccctgccccctgc	CD3 ゼータ
8	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 ゼータ
9	ggctctggcgagggaaggggttcctgctacttgcggcgacgtcgaagagaatcccggtc cg	T2A
10	GSGEGRGSLTTCGDVEENPGP	T2A
11	aactgggtcaacgtgattagcgatttgaagaaaatcaggacattacagtctatgcatt gacgtctacactgtatactgagagtgatgiacacccgtcctgtaaggtaacggccatgaatg ctttcttctggagctccaggtcatcagcttggagctggggacgcaagcatccacgatacgtt gaaaacctcatcctcttgcgaacaactctctcatctaattgaaacgttacagagagtggtg tgtaaggagtcgaagagttggaagaaaaaacatcaaagaatttctcaatcctcgttca catagtgcgaatgtcatiaacacgtcc	天然 IL15
12	NWNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLEL QVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEK NIKEFLQSFVHIVQMFINTS	天然 IL15
13	actaccacaccgccccgaggccacctacgcggcaccgactatcgccagtaacccctc tctctgcgccccgaggctgcccgcctgcggctggtggggcggtccacaccggggcctgg attttgcgtgcgatatacatctgggcacctcttgcggcacctgcggagtgctgtctctca ctcgttattacgtgtactgc	CD8 ヒンジ /TM
14	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI YIWAPLAGTCGVLLSLVIT	CD8 ヒンジ /TM
15	ggcgggtggctcgtgggtggcggcagc	リンカー
16	GGGGSGGGGS	リンカー
17	ggccaggccggctccggaggaggagatcc	リンカー
18	GQAGSGGGGS	リンカー

10

20

30

40

50

配列番号	配列	説明
19	ggccaggccggc	リンカー
20	GQAG	リンカー
21	ggcggcggcggtagcggtggcggtccgga	リンカー
22	GGGSGGGSG	リンカー
23	cagggtcacctgaaggagctggtcctgtgctggtagaaacccacagagaccctcacgctga cctgcaccgtctctgggtctcactcagtaaatgctagaatgggtgtgacctggatccgtcagcc ccagggaaggccctggagtggtgtgcacacatttttcgaatgacgaaaaatcctacagta catctctgaagagcaggctcaccatctccaaggacactccaaaaccagggtggtcctacc atgaccaacatggaccctgtggacacagccacataattactgtgcacggatacgagattacta tgacattagtagttatgactactggggccagggaaccctggtcagcgtctcctcaggcgg tggtggtctggtgggtggcgagcggcggtgggtgctctgacatccagatgacccagtcctc catctgccatgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcactgtcgggcgagtcaggac attagcaattatttagcctggtttcagcagaaccagggaagtcctaaagcgctgatctat gtctgcatccagtttgcaaagtgggtcccatcaaggttcagcggcagtgatcggggacag agttcactctcacaatcagcagcctgtgctgaagatttgcaacttactgtctacagctta atagtttccggtcactttggcggagggaaccaagggtggagatcaac	抗 CD70 scFv
24	gaagtgcagctgtccagagcggagccgaagtgaagaagcctggcgagagcctgaagat cagctgcaagggctcagggttacggattcacaagttatggataggttgggtgcgagatgc ctggttaagggactggaatggatgggtatcattcatccgatgtagcgacaccaatacag ccaagctttcaggggccagggtcacaatcagcgtgacaagagcatcagcaccgctacctt cagtggtcgtctctgaaggccagcgacaccgcaatgtactactgtgcctctagctatttcgtg gctgtggggaggctattttagactatggggccaagglacactggtcaccgtcagcagcggc gggtgtggctctggtgtggcgagcggcggtgtgtgctgagctccagagcgtgctga cccagctcctagcgcaagcggcaccctggacagcgtgtgacaattagctgtagcggatc aagctcaaacattggctcaaattatgtgaattggtatcagcaattgcccggtacagcacca aactgctcatattaggagattatcaacgacctagcggagtgctgatcgttttagcggtagcaa aagcggcaccagcgcatcactggcaatttcaggcctgcgtagcgaagatgaggcggatta ttactgtgctacccgcgacgattcggtatctgggtctgtcgttttggcaccgggtacaaaactgac cgtgctg	抗 CD70 scFv
25	QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLSNARMGVTWIRQPPGK ALEWLAHIFSNDEKSYSTSLKSRLTISKDTSKTQVVLMTNMDPVD TATYYCARIRDYYDISSYYDYWGQGLVSVSSGGGGSGGGGSG GGGSDIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWFQQKP GKVPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLLPEDFATY YCLQLNSFPFTFGGGTKVEIN	抗 CD70 scFv
26	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYGFTSYWIGWVRQMPGKG LEWMGIHPDDSDTKYSPSFQQQVTISADKSISTAYLQWSSLKASD TAMYYCASSYLRGLWGGYFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSELQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVNWY QQLPGTAPKLLIYGDYQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSE DEADYYCATRDDSLSGSVVFGTGTGLTVL	抗 CD70 scFv

10

20

30

40

50

配列番号	配列	説明
27	atggccctcccagtaactgccctcttttgcctcgcactccttctcatgccgtcgcccaa ctgggtcaacgtgattagcgattgaagaaatcgaggacctatagctatgcatattgac gtactactgtatactgagagtgatgacacccgtcctgtaaggtaacggccatgaaatgctt ctctggagctccaggtcatcagctggagctggggacgcaagcatccacgatacgggtga aaacctcatcatccttgcgaacaactctctcatctaataggaacgttacagagagtggtgt aaggagtgcaagagtggaagaaaaacatcaagaatttctcaatccttgcgtcacat agtgc aaatgttcattaacacgtccactaccacacccgccccgaggccacctacgcccga ccgactatcgccagtcacccctctctcgccccgaggcttgcggcctcgcgctggtgg ggcggtccacacccggggcctgatttgcgtgcgatatatacatctgggcacctcttgcgg cacctgcggagtgctgctctctcactcgttattacgctgtactgc	膜結合ヒト IL15 (mbIL15)
28	MALPVTALLPLALLHAARPNNVVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYT ESDVHPSCKV TAMKCFLELQVISLESGDASIHDVTENLIILANNSL SSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSTTTPAP RPPTPARTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPL AGTCGVLLLSLVITLYC	膜結合ヒト IL15 (mbIL15)
29	DYKDDDDK	Flag タグ
30	cagggtgcagctggtgcagctcggggctgagggaagaagcctggggcctcagtgagggtt cctgcaaggcatctggatacaccttcaccgattactatagcactgggtgcgacaggccct ggacaagggtgctgagtggaatgaataatcaaccctaatagtggtggaacaaattacgca cagaagttccagggcagagtcacatgaccagggaacgctccacgagcacagtctacat ggagctgagcagcctgagatcaggacacggccgtgtattactgtgctagagatttaggt gtatgctgctgcagatggcatggtgtctggggccaagggaacattggtcacctctctcagg tggaggcgggtcaggcggagggtgctcggcggtggcgatcgacatccagatgacca gtcctcatcctcctgctgcatctgtaggagacagagtcaccatcactgcccggcaagtca gagcattagcagctatttaattggtatcagcagaaccagggaagcccctaagctcctg atctatgacgcattcaatttggccaccgggtcccatcaagggtcagtggtgagtggtggtg acagatttcaactctcaccatcagcagctcgaacctgaagatttgaacttactactgtcaac agagtgatagttcacctctcacttccggccaagggaacagggtggagatcaaa	抗 CD70 scFv
31	cagggtgcagctggtgcagctcggggctgagggaagaagcctggggcctcagtgagggtt cctgcaaggcatctggatacaccttcaccagctacgacattaattgggtgcgacaggccct ggacaagggtgctgagtggaatggagtgatcaaccctaagtggtgaggtacaagctacgca cagaagttccagggcagagtcacatgaccagggaacgctccacgagcacagtctacat ggagctgagcagcctgagatcaggacacggccgtgtattactgtgctagatattctggcta tgattgggtgttgaactactggggccaagggaacctgtcaccgtctcctcagggtgaggcg gttcaggcggagggtgctcggcggtggcgatcgacatccagatgaccagctcctac ctcctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcactgcccggcaagtcagggtcattg gcagctggttagctggtatcagcagaaccagggaagcccctaagctcctgactatgct gcatccacattgcaaaagtggttcccatcaagggtcagtggtgagtgatcgggacagatt cacctcaccatcagcagctcgaacctgaagatttgaacttactactgtcaacagagttac agtaccccttggacttccggccctgggaccaagtggtgatatcaaa	抗 CD70 scFv
32	cagggtgcagctggtgcagctcggggctgagggaagaagcctggggcctcagtgagggtt cctgcaaggcatctggatacaccttcaccagctacgacatcaattgggtgcgacaggccct	抗 CD70 scFv

10

20

30

40

50

配列番号	配列	説明
	ggacaagggctgagtggaaggagtcacagccctagtggtggaacaagctacgca cagaagttccaggcagagtcacatgaccagggaacagtcacagcagcagctacat ggagctgagcagcctgagatctgaggacacggccgtgtattactgtgctagatactacggc ggcaaccccgaaaggggtgactctgatctctggggccgtggcaccctggctactgtctcctca ggtgaggcgggttcaggcggagtggtctctggcgggtggcggatcggacatccagatgacc cagctccatccctcctgtctgcatctgtaggagacagagtcacatcactgcccgggcaagt cagagcattggaattggttagcctggtatcagcagaaccagggaagcccctaagctc ctgatctatgacgcatccgatttggaaaccgggggtcccatcaagggtcagtggcagtggtatc gggacagatttcactctcaccatcagcagctctgcaacctgaagatttgcactactactgtc aacagagttacactacccttggcgttcggccaagggaaccaagggtggaatcaaa	
33	ggcagaccagcggcagcggcaagcccggtccggagagggcagcaccagggc	リンカー
34	gacatccagatgaccagtcctccctcctctgtctgcatctgtaggagacagagtcacatc acttgcgggcaagtcagggcattggcagctggttagcttggtatcagcagaaccaggga aagcccctaagctcctgatctatgctgcatccacattgcaaagtggggtcccatcaagggtca gtggcagtggtatctgggacagatttcactctcaccatcagcagctctgcaacctgaagatttgc aacttactactgtcaacagagttacagtacccttggacttctggccctgggaccaagtggga tatcaaggcagcaccagcggcagcggcaagcccggtccggagagggcagcaccaa gggccagggtgagctggtgcatctggggctgagggtgaagaagcctggggcctcagtgaa ggtttctgcaaggcatctggatacaccttcaccagctacgacattaattgggtgagcagaggc ccctggacaagggcttgatggatgggagtgatcaacctagtggtggaggtacaagctac gcacagaagttccagggcagagtcacatgaccagggaacagtcacagcagcagctta catggagctgagcagcctgagatctgaggacacggccgtgtattactgtgctagatattctgg ctatgattgggtgttactactggggccaagggaacctgggtcaccgtctcctca	抗 CD70 scFv
35	gacatccagatgaccagtcctccctcctctgtctgcatctgtaggagacagagtcacatc acttgcgggcaagtcagagcattggaattggttagcctggtatcagcagaaccaggga aagcccctaagctcctgatctatgacgcatccgatttggaaaccgggggtcccatcaagggtc agtggcagtggtatctgggacagatttcactctcaccatcagcagctctgcaacctgaagattt gcaacttactactgtcaacagagttacactacccttggacgttccggccaagggaaccaagg ggaaatcaaggcagcaccagcggcagcggcaagcccggtccggagagggcagca ccaagggccagggtcagctggtgcatctggggctgagggtgaagaagcctggggcctca gtgaagggttctgcaaggcatctggatacaccttcaccagctacgacatcaattgggtgca caggccccctggacaagggcttgatggatgggagtcacagccctagtggtggtggaaca agctacgcacagaagttccagggcagagtcacatgaccagggaacagtcacagcagca cagctacatggagctgagcagcctgagatctgaggacacggccgtgtattactgtgctaga tactacggcgggcaacccgaagggtggtactctgctctggggccgtggcaccctggtca ctgtctcctca	抗 CD70 scFv
36	gacatagttatgacccaatcccagatagtttggcggttctctgggcgagagggaacgatt aatgtcgcgcacaaagagcgtttcaacgagcggatattctttatgcatgtgtaccagcaaa aaccgggacaaccgggaagctgctgactcttggcttcaaatcttgatctgggtgccc gaccgatttctggtagtgaagcggaaactgactttagctcagatcagtttactgcaggct gaggatgtagcgttctatttgcagcacagtagagaagtccttggaccttcggtcaagg cacgaaagtagaaattaaaggcagcaccagcggcagcggcaagcccggtccgggaga	抗 CD70 scFv

10

20

30

40

50

配列番号	配列	説明
	gggcagcaccaggccaggtccagttggtgcaaagcggggcgagggtgaaaaacc cggcgcttccgtgaagggtcctgtaaggcgtccggttatacgttacgaactacgggatga attgggttcgccaagcgcggggcagggactgaaatggatgggtggataaatcctaca ccggcgaaactacatacgcgcgacttttaaggcgagtcactatgacgcgcgatacca gcataccaccgcatacatggagctgtccgactccggtcagacgacacgggtgtctactatt gtgctcgggactatggcgattatggcatggactactgggtcagggtagcactgtaacagtta gtagt	
37	cagggtccagttggtgcaaagcggggcgagggtgaaaaaccggcgcttccgtgaagg gtcctgtaaggcgtccggttatacgttacgaactacgggatgaattgggttcgccaagcgc ggggcagggactgaaatggatgggtggataaatcctacacggcgaaactacatacgc ccgacgcttttaaggcgagtcactatgacgcgcgataccagcatatccaccgcatacat ggagctgtccgactccggtcagacgacacggctgtctactattgtctcgggactatggcg attatggcatggactactgggtcagggtagcactgtaacagttagtagtgggtggaggcgtt cagggcgagggtgctctggcggtggcgatcggacatagttatgacccaatccccagata gtttggcggttctctggcgagagggcaacgattaattgtcgcgcatcaaagagcgtttcaa cgagcggatattctttatgcatgtgtaccagcaaaacccggacaacggcgaagctgctg atctactggcttcaaatctgagctcgggtgccggaccgattttctggtagtgaagcggaa ctgacttaacgctacagatcagttcactgcaggctgaggatgtagcgtctattatgacagca cagtagagaagtcctcggactcgtcaaggcacgaaagtagaataaaa	抗 CD70 scFv
38	atggccttaccagtgaccgccttgcctcgcgctggccttgctgctccacgcgcgacaggcgc gactcaaaagacgatgacgataaaaggcgggtggctcgtggtggcgatcccagggtg cagctggtgacgtctgggctgagggtgaagaagcctggggcctcagtgagggttctgca aggcatctggatacaccttcaccgattactatgactggtgacagggccctgggacaa gggcttgatggatgggaataatcaaccctaatagtggtggaacaaattacgcacagaagt tcaggggcagagtcaccatgaccagggacacgtccacgagcacagtcctacatggagctg agcagcctgagatctgaggacacggccgtgtattactgtgctagagattttagtggtatgctg ctgcagatggcatggatgtctggggccaagggaacatgggtcaccgtctctcagggtgaggc gggtcaggcggagggtgctcgtgggtggcgatcggacatccagatgaccagctcctcat cctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcacatcacttgcgggcaagtcagagcatt agcagctatitaaattggtatcagcagaacacgggaaagcccctaagctcctgatctatga cgcatccaattggccaccgggtcccatcaagggtcagtggtgagtggtggacagattt cactctcaccatcagcagctgtcaacctgaagattttgcaacttactctgtcaacagagtgat agttcacctctcacttgcgccaagggaaccaagggtggagatcaaaaccacgacgcccagcg ccgcgccaccaaacccggcgccacatcgcgtgcagcccctgtccctgcgcccaga ggcgtgccggccagcggcggggggcgagtgacacagggggctggacttcgctgtg atatctacatcgtggcgcccttggccgggacttggtgggtccttctcctgtcactggttatcacc ctttactgccggagggaccagaggctgccccccgatgccacaagcccctggggggagg cagtttccggacccccatccaaggaggagcagccgacgcccactccaacctggccaagat cagagtgaagttcagcaggagcgacgacgcccccggtaccagcaggggcagaacca gctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtagatgttttgacaagagacgt ggccgggacccctgagatggggggaaagccgagaaggagaaccctcaggaaggcctg tacaatgaactgcagaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaagg	抗 CD70 CAR

10

20

30

40

配列番号	配列	説明
	cgagcgccggaggggcaaggggcacgatggccttaccaggtctcagtacagccacca aggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgccccctcgcgctcggcgaggga gggggttccctgcttacttgcggcgacgtcgaagagaatcccggtccgatggccctcccagta actgcccctctttgccccctcgactccttctcatgcccgtcgccccaaactgggtcaacgtgatt agcgatttgaagaaaatcgaggaccttatacagtctatgcattgacgtacactgtatactg agagtgtgtacacccgtcctgtaaggtaacggccatgaaatgcttctctggagctccagg tcacgactgtggagctggggacgcaagcatccacgatacgggtgaaaacctcatcatcctg cgaacaactctctcatctaattggaacgttacagagagtggtgtaaggagtggaaga gttgaagaaaaaacaalcaagaatttctcaatcctcgttcacatagtcaaatgttcatt aacacgtccactaccacaccgccccgaggccacctacgcccgcacgactatcgccag tcaacccctctctcgccccgaggcttgcggcctcgcgctggtgggcggtccacacc ggggcctgatttgcgtgcgatatatacatctgggcacctcttgcggcacctgcggagtgct gcttctcactcgttattacgctgtactgctaa	
39	atggccttaccagtgacgccttgcctcgccgtggccttgcctccacgcccaggccg gactacaagacgatgacgataaaggcgggtgggtcctggtgggtggcggtaccagggtg cagctgggtcagctcggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaagtttctgca aggcatctggatacaccttaccagctacgacattaattgggtgcgacaggccctggaca agggctgagtggtggagtgatcaaccctagtggtggaggtacaagctacgcacagaa gttccagggcagagtcacatgaccaggacacgtccacgagcacagtctacatggagct gagcagcctgagatctgaggacacggccgtgtattactgtctagatattcggctatgattgg gtgtttgactactggggccaagggaacctgtcaccgtctcctcaggtggaggcggttcagg cggaggtggctctggcggtggcgatcggaacatccagatgaccagctcctatcctcctgt ctgcatctgtaggagacagagtcacatcacttgcgggcaagtcagggcattggcagctg gttagcttggtatcagcagaaaccagggaagccctaaagctcctgatctatgctgcatcca cattgcaaagtggttccatcaagggtcagtggcagtgatcgggacagatttactctca ccatcagcagctcgaacctgaagatttgaacttactactgtcaacagattacagtaacc cttggaacttcggccccgggaccaagtggtatcaaaaaccagcgcagcgccgcccgc caccaacacccgcccaccatcgctgcagcccctgtccctgcgcccagaggcggtgcc ggccagcggcgggggcgagtgacacgaggggctggactcgcctgtgatctata tcgggcgcccctggccgggacttggggctctcctgtcactggtatcaccttactgcc ggaggggacagaggctgcccccgatgcccacaagccccgggggaggcagttccgg acccccatccaagaggagcaggccgacgcccactccacctggccaagatcagagtgga agttcagcaggagcgcagacgcccccggtaccagcaggccagaaccagctcataac gagctcaatctaggacgaagagaggagtagatgtttggacaagagacgtggcgggac cctgagatggggggaagccgagaaggaagaacctcagggaaggcctgtacaatgaac tgcaaaaagataagatggcgaggcctacagtgagattggatgaaggcgagcgccg gaggggcaaggggcacgatggccttaccagggctcagtacagccaccaaggacacct acgacgcccttcacatgcaggccctgccccctcgcggtcctggcgagggaagggtccct gcttacttgcggcgacgtcgaagagaatcccggtccgatggccctccagtaactgcccctc tttggcccctcgactccttctatgcgctcgccccaaactgggtcaacgtgattagcgtttga agaaaatcgaggaccttatacagtctatgcattgacgctacactgtatactgagagtgatg acaccgctcctgtaaggtaacggccatgaaatgcttctctggagctccagggtacagcttg	抗 CD70 CAR

10

20

30

40

50

配列番号	配列	説明
	gagtcggggacgcaagcatccacgatacgggtgaaaacctcatcatccttgcaacaact ctctcatcctaattgaaacgttacagagagtggtglaaggagtgcaagagtggaaga aaaaaacatcaaagaatttctcaatccttcgtcacatagtgcaaatgttcattaacacgtcc actaccacacccgccccgaggccacctacgcggcaccgactatcgccagtaaacccctc tctctgccccgaggctgccccgctgccccggtggtggggcggtccacacccggggcctgg atttgcgtgcatatatacatctgggcacctctgccccgacctgaggagtgcttctctca ctcgttattacgctgtactgctaa	
40	atggccttaccagtgaccgccttgcctcgtccgctggccttgcctcaccgccccaggccg gactcaaaagacgatgacgataaaggcggtgggtctctggtggcggaaccagggtg cagctggtgcagctcgggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtttctgca aggcatctggatacacctcaccagctacgacatcaattgggtgacagggccctggaca agggctgagtggtggagtcacgacctagtggtggaacaagctacgcacagaa gttccagggcagagtcacctgaccagggaacgtccacgagcacagctacatggagct gagcagcctgagatctgaggacacggccgtgtattactgtctagatactacggcggaac ccgaagggtggtactctgatctctgggccccggtggcaccctggtcactgtctcctagggtga ggcggtcaggcgagggtgctctggcggtggcgatcggaatccagatgacccagctc catctccctgtctgcatctgaggagacagagtcacctcacttgcgggcaagtacagagc attggaattggttagcctggtatcagcagaaccagggaagccctaagctctgactca tgacgcatccgatttgaaccgggtcccatcaagggtcagtggtgagctgggaca gatttactctcaccatcagcagctctgcaacctgaagatttgcacttactactgcaacaga gttactactaccccttgagcttggccaagggaacagggtggaatcaaacacgacgc cagcgccgccccaccaacacggcgccccaccatcgctgcagccccctgtccctgccc ccagaggcggtgccccgagcgcgggggcgagtgacacaggggggtggaacttgc cctgtgatatctacatctggcgcccttggccccgactgtgggtccttctcctgactggtta tcacctttactgcggagggaaccagaggctgcccccgatgcccacaagccccctgggg gaggcagtttcgggacccccatcaagaggagcaggccgacgcccactccacctggcc aagatcagagtgagttcagcaggagcgacgcccccgctaccagcaggggcaga accagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtagatgttttgacaagag acgtgccccggaccctgagatggggggaagccgagaaggaagaacctcaggaagg cctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcgaggcctacagtgaattgggatgaa aggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggccttaccagggtctcagtacagcca ccaaggacacctacgacgccccctcacatgcaggccctgccccctcgggctctggcgagg gaagggggtccctgcttacttgcggcgacgtcgaagagaatccgggtccgatggccctccc agtaactgcccccttttgcacctccttcttcatgccgtcgccccaaactgggtcaacg tgattagcagtttgaagaaatcgaggaccttatacagctctatgcatattgacgctacactgta tactgagagtgatgtacacccgtcctgtaaggtaacggccatgaaatgcttctctgagctc caggctcatcagcttgagctggggacgcaagcatccacgatacgggtgaaaacctcatcat ccttgcgaacaactctctcatctaatggaaacgttacagagtggtgtaaggagtcg aagagttggaagaaaaaacatcaaagaatttctcaatccttctcacatagtgcaaatgt tcattaacacgtccactaccacccccggaggccacctacgcggcaccgactatcg ccagtcacccccctctctgcccccgaggctgccccgctgccccggtggggcggtccac	抗 CD70 CAR

10

20

30

40

50

配列番号	配列	説明
	accoggggctggattttgctgcatatatacatctgggacacctctgcccgcacctgcgga gtgctgcttctcactcgttattacgctgtactgctaa	
41	atggccttaccagtgaccgccttgctcctgcccgtggccttgctgctccacgcgcagggccg gacatccagatgacccagctccatcctcctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatc acttgccgggcaagtcagggcattggcagctggttagctggtatcagcagaaaccagggga aagcccttaagctcctgatctatgctgcatccacattgcaaagtgggtcccatcaagggttca gtggcagtggtatcgggacagatttcaactctcaccatcagcagctgcaacctgaagatttgc aacttactactgtcaacagagttacagtaccccttggacttctggccctgggaccaaagtggga tatcaaggcagcaccagcggcagcggcaagcccggtccggagaggggagcaccacaa ggggcagggtgagctggtgagctggtgggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtga ggtttctgcaaggcatcggatcaccttaccagctacgacattaattgggtgagacaggc ccctggacaagggtctgagtgatgggagtgatcaaccctagtggtgaggtacaagctac gcacagaagtccagggcagagtcaccatgaccagggaacgtccacgagcacagctta catggagctgagcagcctgagatctgaggacacggccgtgtattactgtgctagatattctgg ctatgattgggtgttgaactactggggccaagggaacctgttaccgtctcctcagcggccgc aaccacgacgcagcgcggccggaacacacggcgcccacatcgctgcagcccc ctgtccctgcgcccagaggcgtgcccggccagcggcgggggcgagtgacacgagggg ggctggacttgcctgtatatacatctgggccccttggccgggacttggtgggtccttctc ctgtcactggttatcacccttactgcggagggaaccagaggctgcccccgatgccacaa gccccctggggaggcagtttccggacccccatccaaggaggagcagcggcagccccact ccacctggccaagatcagagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtaccag cagggccagacacagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtgatgatt ttggacaagagacgtggccgggaccctgagatggggggaagccgagaagggaagaac cctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtga gattgggagtaaaggcgagcgcggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtc tcagtacagccaccaaggacacclacgacgcccttcacatgcaggccctgccccctcgcg gctctggcagggaagggttccctgcttacttgcggcgacgtcgaagagaatccgggtcc gatggccctccagtaactgcccctctttgccccctgcactccttctcatgcgctgccccca actgggtcaacgtgattagcgatttgaagaaaatcaggaccttatacagtctatgcatttg acgtacactgtatactgagagtgatgtacaccgctcctgtaaggtaacggccatgaaatgc tttcttctggagctccaggatcagcttggagtctggggacgcaagcatccagatacgggtt aaaaacctcatcatccttgcgaacaactctctctcatctaattggaacgttacagagagtggt gtaaggagtgcaagagtggaagaaaaaaacatcaagaatttcttcaatccttctgtcac atagtcaaatgttcattaacacgtccactaccacccccggaggccacctaagccgg cacgactatcgccagtcacccctctctctgccccggaggcttgcggcctgcccgtggt ggggcggtccacacccggggtggttttgcgtgcatatatacatctgggacacctctgccc ggcacctgaggagtgtgcttctcactcgttattacgctgtactgc	抗 CD70 CAR
42	atggccttaccagtgaccgccttgctcctgcccgtggccttgctgctccacgcgcagggccg gacatccagatgacccagctccatcctcctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatc acttgccgggcaagtcagagcattggaattggttagccttggtatcagcagaaaccagggga aagcccttaagctcctgatctatgacgcatccgatttggaaacgggggtcccatcaagggtc agtggcagtggtatcgggacagatttcaactctcaccatcagcagctgcaacctgaagattt	抗 CD70 CAR

10

20

30

40

50

配列番号	配列	説明
	gcaacttactactgtcaacagagttacactaccccttggacgttcggccaagggaccaaggt ggaaatcaaaggcagcaccagcggcagcggcaagcccggctccggagagggcagca ccaagggccaggtgcagctggcagctcgtgggctgaggtgaagaagcctggggcctca gtgaaggtttcctgcaaggcatctggatacaccttcaccagctacgacatcaattgggtgcga cagggccctggacaagggcttggatggatgggagtcacagccctagtggtggtgaaca agctacgcacagaagttccaggcagagtcacatgaaccagggaacgtccacgagca cagctctacatggagctgagcagccctgagatctgaggacacggcgtgtattactgtgctaga tactacggcggcaaccccgaagggtggacttcgatctctggggcgtggcacccctgtgca ctgtctcctcagcggccgcaaccacgacgcccagcgcggcggccaccaacacggcgccc accatcgctgcgagcccctgtccctgcgcccagaggcgtgcggccagcggcgggggg cgagtgacacgagggggctggacttcgctgtgatactacatctgggcgcccctggcgg ggactgtggggtcctctcctgtactgttatcaccccttactgcggagggaaccagaggct gcccccgatgccacaagccccctgggggaggcagtttcggacccccatccaaggagg agcaggccgacgcccactccacccctggccaagatcagagtgaagttcagcaggagcgca gacgcccccggtaccagcaggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacg aagagaggagtagatgtttggacaagagacgtggccgggacccctgagatgggggaa agccgagaagggaagaacccctcagggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagat ggcggaggcctacagttagatgggatgaaggcgagcggcggaggggcaaggggca cgtatggccttaccagggtctcagtagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatg caggccctgcgccctcggcgtctggcggagggaagggttcctccttactgtcggcgacgt cgaagagaatcccggtccgatggccctccagfaactgcctcctttgcccctcgactcctt cttcatgcccgtcgcaccaactgggtcaacgtgattagcgatttgaagaaaatcgaggacctt atacagctatgcatattgacgtacactgtatactgagagtgtatgacaccgctcctgaagg taaoggccatgaaatgcttctctggagctccagggtcatcagcttgagctcgggacgcaa gcatccagatagcgttgaacacatcatccttgcgaacaaactctctcatctaaggaa acgttacagagagtggtgtaaggagtgcaagagtggaagaaaaaacatcaagaa tttcttaacctctcgttcacatagtgcaaatgttcattaacagtcactaccacacccgcccc gaggccacatcgcggcaccgactatcgccagtaacccctctctcgcgccccgaggct tgccggcctgcggctggtggggcggtccacacccggggcctggattttgctgcgatatata catctgggcacctcttgcggcacctgcggagtgctgcttctcactcgttattacgctgtactg c	10 20 30
43	atggccttaccagtgaccgccttgcctcctgcggctggccttgcgtctccacgcccaggccg gacatagttatgaccaatcccagatagtttggcggtttctctgggcgagagggaacgatt aatgtcgcgcatcaaagagcgttcaacgagcggatattctttatgcatgtgtagcagcaaa aaccggacaaccgcccgaagctgctgatctactggcttcaaatctgagctgggtgccc gaccgatttctggtagtgaagcggaaactgacttacgctcagcatcagttcactgcaggct gaggatgtagcggctatttattgccagcacagtagagaagtcacctggaccttgcgtaagg cacgaaagtagaaattaaaggcagcaccagcggcagcggcaagcccggtccggaga gggcagcaccaagggccaggctcagttggtgcaagcggggcgaggtaaaaaacc cggcgtctccgtgaagggtcctgtaaggcgtccggttatacgttcacgaactacgggatga attgggttcgccaagcgcggggcagggactgaaatggatgggtggataaatacctaca ccggcgaacctacatacgcgcgacgttttaaggcgagtcactatgacgcgcgatacca	抗 CD70 CAR 40

10

20

30

40

50

配列番号	配列	説明
	gcataccacgcatacatggagctgtcccgactccggtcagacgacacggctgtctactatt gtgctcgggactatggcgattatggcatggactactggggcagggtagcactgtaacagtta gtagtgccggccgcaaccacgacgccagcgcgcggccaccaacacggcgcccaccat cgcgtcgcagccccctgtccctgcgccagaggcgtgccggccagcggcggggggcgca gtgcacacgaggggctggacttcgctgtgatatctacatctgggcgccttgccgggac ttgtggggctctctcgtcactggttatcaccccttactgccggagggaccagaggctgcc cccgatgccacaagccccctggggaggcagtttccggacccccatccaaggaggca ggccgacgcgccatccaccctggccaagatcagagtgaaagtcagcaggagcgcagacg ccccgcgtaaccagcaggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaaga gaggagtagcgtgtttggacaagagacgtggcgggacccctgagatgggggaaagcc gagaaggaagaacccctcagggaaggcctgtacaatgaatgcagaagaagataagatggcg gaggcctacagtagatgggagaaaggcgagcgcggaggggcaaggggcacgatg gcccttaccagggtctcagtagacgcccaaggacacctacgacgccttcacatgcaggc cctgccccctcgcggctcggcgagggaagggggtccctgtacttctcggcgacgtcgaag agaatcccggtccgatggccctccagtaactgcctcctttgccccctgcactccttctcat gccgtcgcgcccaactgggtcaacgtgattagcgtattgaagaaatcgaggacctataca gtctatgcatattgacgtacactgtatactgagagtgatgtacaccgctcgttaagtaacg gccatgaaatgctttcttgagctccaggctacagcttggagctcgggacgcaagcatc cacgatacgggtgaaaacctcatcatccttgcgaacaaactctctcatctaatgaaacgtta cagagagtggggtgaaggagtgcaagagttggaagaaaaaacatcaagaatttctc aatcctcgttcacatagtgcaaatgttcattacaacgtccactaccacccccggaggc caactacgcccgcaccgactatcgccagtcacccctctctcgcgccccgaggctgccc gcctgcggctgtggggcggtccacacccgggctggatttgcgtgcgatatatacatctg ggacaccttgcggcacctcgggagtgctgcttctctcactcgttattacgtgtactgc	10
44	atggccttaccagtgaccgccttgcctcgcgcgtggcctgtcgtccacgcgcggcaggccg cagggtgcagctggtgcatgtcggggctgagggtgaagaagcctggggcctcagtgaaagttt cctgaaggcatctggtatataccttaccagctacgacattaattgggtgcagaggccct ggacaagggtgctgagtggtggagtgatcaaccctagtggtggaggtacaagctacgca cagaagttccagggcagagtcaccatgaccagggaacgctccagagcacagctacat ggagctgagcagcctgagatctgaggacaagccgtgtattactgtctagatattctggcta tgattgggtgttactactggggccaagggaacctgggtcacctgtcctcagggtgaggcg gttcaggcggagggtgctcgtggcgtggcgatcgacatccagatgacccagctcctatc ctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgcgggcaagtcagggcattg gcagctggttagctgtatcagcagaaacagggaagccctaaagctcctgctatctatgct gcatccacattgcaagtggtgccatcaagggtcagtggtgagtgatctgggacagattt cactctcaccatcagcagctgcaacctgaagatttgcacctaactctgtcaacagagttac agtacccttggacttgcgcctgggaccaaagtgatatacaaaacacgacgcccagcgc cgcgaccaccaacacgggcgcaccacatcgcgtcgagccctgtccctgcgcccagag gcgtgccggccagcggcgggggcgagtgacacgagggggctggacttgcgcctgtga tatctacatctggcgcccttggcgggactgtgggtctctcctgtcactgttatcacct ttactgccggagggaaccagaggctgcccccgatgccacaagccctgggggaggca gtttccggacccccatccaaggaggcaggccgacgcccactccacctggccaagatca	抗 CD70 CAR 30 40

10

20

30

40

40

40

配列番号	配列	説明
	gccagtcacccctctctctgcgccccgaggtctgcggcctgcggctggtggggcgggtcc acaccggggcctggattttgcgtgcgatatatacatctgggcacctctgcggcacctgcg gagtgctgcttctcactcgtattacgtgtactgc	
47	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYMHWRQAPGQ GLEWMGIINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDTAVYYCARDFSVYAAADGMDVWGQGLVTVSSGGGGSGG GGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWY QQKPGKAPKLLIYDASNLATGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED FATYYCQQSDSSPLTFGQGTKVEIK	抗 CD70 scFv
48	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYDINWRQAPGQG LEWMGVINPSSGGTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRS EDTAVYYCARYSGYDWWFDYWQGLVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIGSWLAWYQQKP GKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQSYSTPWTFGPGTKVDIK	抗 CD70 scFv
49	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYDINWRQAPGQG LEWMGVISPSGGTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRS EDTAVYYCARYYGGNPEGWYFDLWGRGLTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIGNWLAWYQ QKPGKAPKLLIYDASLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDF ATYYCQQSYTTPWTFGQGTKVEIK	抗 CD70 scFv
50	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	リンカー
51	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIGSWLAWYQQKPGKAP KLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ SYSTPWTFGPGTKVDIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLVQSGA EVKKPGASVKVSKASGYTFTSYDINWRQAPGQGLEWMGVINP SGGGTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCA RYSGYDWWFDYWQGLVTVSS	抗 CD70 scFv
52	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIGNWLAWYQQKPGKAP KLLIYDASLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ SYTTPWTFGQGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLVQSGA EVKKPGASVKVSKASGYTFTSYDINWRQAPGQGLEWMGVISP SGGGTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCA RYYGGNPEGWYFDLWGRGLVTVSS	抗 CD70 scFv
53	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSFMHWYQQKP GQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVY YCQHSREVPWTFGQGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQL VQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYGMNWRQAPGQGLK WMGWINTYTGEPTYADAFKGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSD TAVYYCARDYGDYGM DYWGQGTITVTVSS	抗 CD70 scFv
54	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYGMNWRQAPGQ GLKWMGWINTYTGEPTYADAFKGRVTMTRDTSISTAYMELSRLR	抗 CD70 scFv

10

20

30

40

50

配列番号	配列	説明
	SDDTAVYYCARYGDDYGMDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSFMHWY QQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQHSREVPWTFGQGTKVEIK	
55	MALPVTALLPLALLHAARPDYKDDDDKGGGGSGGGGSQVQLV QSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTDYMHWRQAPGQGLEW MGIINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCARDFSVYAAADGMDVWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGG GGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSSSYLNWYQQKPGK APKLLIYDASNLATGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQSDSSPLTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPEAC RPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLSLVITLYCRRDQ RLPPDAHKKPPGGGSRFTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPA YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQ EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGGHDGLYQGLSTATKD TYDALHMQALPPRGSGEGRGSLTCDGVEENPGPMALPVTALL PLALLHAARPNNWNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSC VTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTES GCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINSTTTTPAPRPPTPAPTIA SQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLL SLVITLYC	抗 CD70 CAR
56	MALPVTALLPLALLHAARPDYKDDDDKGGGGSGGGGSQVQLV QSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTSYDINWRQAPGQGLEWM GVINPSGGGTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCARYSGYDWVFDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGS DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGGISWLAWYQQKPGKAP KLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ SYSTPWTFGPGTKVDIKTTTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPEACRP AAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLSLVITLYCRRDQRL PPDAHKKPPGGGSRFTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQ QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTY DALHMQALPPRGSGEGRGSLTCDGVEENPGPMALPVTALLPL ALLHAARPNNWNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCVT AMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGC KECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINSTTTTPAPRPPTPAPTASQ PLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLSLV ITLYC	抗 CD70 CAR
57	MALPVTALLPLALLHAARPDYKDDDDKGGGGSGGGGSQVQLV QSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTSYDINWRQAPGQGLEWM GVISPSGGGTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCARYYGGNPEGWYFDLWGRGTLTVSSGGGGSGGGGSGG	抗 CD70 CAR

10

20

30

40

50

配列番号	配列	説明
	GGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSIGNWLAWYQQKPG KAPKLLIYDASDLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQSYTTPWTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA CRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRRD QRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAP AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATK DTYDALHMQALPPRGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPMALPVTALL LPLALLHAARNPWNVNISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSC KVTAMKCFLELQVISLESGDASIHTVENLIILANNSLSSNGNVTE SGCKECEELEEKNIFEFLQSFVHIVQMFINTSTTTPAPRPPTPAPT ASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLL LSLVITLYC	
58	MALPVTALLLPLALLHAARPDQMTQSPSSLSASVGDRVITICRA SQGIGSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPWTFGPGTKVDIKGSTSGSG KPGSGEGSTKGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTSYD INWVRQAPQGQLEWMGVINPSGGGTSYAQKFQGRVTMTTRDTST STVYMELSSLRSEDTAVYYCARYSGYDWWFDYWGQGLTVTVSSA AATTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA CDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRRDQRLPPDAHKKPPGGGSFR TPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY SEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSG EGRGSLLTCGDVEENPGPMALPVTALLLPLALLHAARNPWNVI SDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLE SGDASIHTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIFEFL QSFVHIVQMFINTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG GAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	抗 CD70 CAR
59	MALPVTALLLPLALLHAARPDQMTQSPSSLSASVGDRVITICRA SQSIGNWLAWYQQKPGKAPKLLIYDASDLETGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPWTFGQGTKVEIKGSTSGSG KPGSGEGSTKGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTSYD INWVRQAPQGQLEWMGVISPSGGGTSYAQKFQGRVTMTTRDTST STVYMELSSLRSEDTAVYYCARYYGGNPEGWYFDLWGRGTLVTV SSAAATTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL DFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRRDQRLPPDAHKKPPGGG SFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN LGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA EAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR GSGEGRGSLLTCGDVEENPGPMALPVTALLLPLALLHAARNPWN VNISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVIS	抗 CD70 CAR

10

20

30

40

50

配列番号	配列	説明
	LESGDASIHTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKE FLQSFVHVIVQMFINTSTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAA GGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	
60	MALPVTALLPLALLLHAARPDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRA SKSVSTSGYSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGS GSGTDFTLTISLQAEADVAVYYCQHSREVPWTFGQGTKVEIKGST SGSGKPGSGEGSTKGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT FTNYGMNWVRQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYADAFKGRVTMT RDTISISTAYMELSRLSDDTAVYYCARYDGYGMDYWGQGTIVT VSSAAATTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG LDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRRDQRLPPDAHKKPPGG GSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL NLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP RGSGEGRGSLTTCGDVEENPGMALPVTALLPLALLLHAARPN WWNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCVKVTAMKCFLELQ VISLESGDASIHTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKN IKEFLQSFVHVIVQMFINTSTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACR PAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	抗 CD70 CAR
61	MALPVTALLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA SGYTFTSYDINWVRQAPGQGLEWMGVINPSGGGTSYAQKFQGR VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARYSGYDWWFDYWG QGTLTVTSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDV TITCRASQGIGSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPWTFGPGTKVDIKTTT PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYW APLAGTCGVLLLSLVITLYCRRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEE QADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGEGRG SLLTCGDVEENPGMALPVTALLPLALLLHAARPNWWNVISDLKK IEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCVKVTAMKCFLELQVISLESGDAS IHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHI VQMFINTSTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	抗 CD70 CAR
62	MALPVTALLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA SGYTFTSYDINWVRQAPGQGLEWMGVISPSGGGTSYAQKFQGR VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARYYGGNPEGWYFDL WGRGTLTVTSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVG DRVTITCRASQSIGNWVLAQYQQKPGKAPKLLIYDASDLETGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYTTPWTFGQGTKVEI KTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC	抗 CD70 CAR

10

20

30

40

50

配列番号	配列	説明
	DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRT PIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS EIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGE GRGSLLTCGDVEENPGPMALPVTALLPLALLHAARNWVNVIS DLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEEKNIKEFLQ SFVHIVQMFINTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	
63	MALPVTALLPLALLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA SGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYADAFKGR VTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARDYGDYGM DYWGQ GTTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATI NCRASKSVSTSGYSFMHWYQQKPGQPPKLLIYASNLESGVPDR FSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHSREVPWTFGQGTKVEI KTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRT PIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS EIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGE GRGSLLTCGDVEENPGPMALPVTALLPLALLHAARNWVNVIS DLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEEKNIKEFLQ SFVHIVQMFINTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	抗 CD70 CAR
64	MALPVTALLPLALLHAARPDYKDDDDKGGGGSGGGGSQVQLV QSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYMHVWRQAPGQGLEW MGIINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTA VYYCARDFSVYAAADGMDVWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGG GGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGK APKLLIYDASNLATGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQSDSSPLTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC RPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRRDQ RLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPA YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKD TYDALHMQALPPR	抗 CD70 CAR
65	MALPVTALLPLALLHAARPDYKDDDDKGGGGSGGGGSQVQLV QSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQGLEWM GVINPSSGGGTSY AQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTA VYYCARYSGYDWFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGS DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIGSWLAWYQQKPGKAP	抗 CD70 CAR

10

20

30

40

50

配列番号	配列	説明
	KLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ SYSTPWTFPGTKVDIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP AAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRRDQRL PPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQ QQQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTY DALHMQALPPR	
66	MALPVTALLPLALLHAARPDYKDDDDKGGGGSGGGGSQVQLV QSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYDINWVRQAPGQGLEWM GVISPSGGGTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCARYYGGNPEGWYFDLWGRGTLTVSSGGGGSGGGSGG GGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSIGNWLAWYQQKPG KAPKLLIYDASDLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQSYTTPWTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA CRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRRD QRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAP AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATK DTYDALHMQALPPR	抗 CD70 CAR
67	MALPVTALLPLALLHAARPDYKDDDDKGGGGSGGGGSQVQLV QSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYDINWVRQAPGQGLEWM GVISPSGGGTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCARYYGGNPEGWYFDLWGRGTLTVSSGGGGSGGGSGG GGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSIGNWLAWYQQKPG KAPKLLIYDASDLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQSYTTPWTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA CRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRRD QRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAP AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATK DTYDALHMQALPPR	抗 CD70 CAR
68	MALPVTALLPLALLHAARPDYKDDDDKGGGGSGGGGSQVQLV QSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYDINWVRQAPGQGLEWM GVISPSGGGTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCARYYGGNPEGWYFDLWGRGTLTVSSGGGGSGGGSGG GGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSIGNWLAWYQQKPG KAPKLLIYDASDLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQSYTTPWTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA CRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRRD QRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAP AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATK DTYDALHMQALPPR	抗 CD70 CAR

10

20

30

40

50

配列番号	配列	説明
69	MALPVTALLPLALLHAARPDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRA SKSVSTSGYSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGS GSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHSREVPWTFGQGTKVEIKGST SGSGKPGSGEGSTKGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT FTNYGMNWRQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYADAFKGRVTMT RDTISISTAYMELSRLSDDTAVYYCARDYGDYGM DYWGQTTVT VSSAAATTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG LDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRRDQRLPPDAH KPPGG GSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL NLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP R	抗 CD70 CAR
70	MALPVTALLPLALLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA SGYTFTSYDINWRQAPGQGLEWMGVINPSGGGTSYAQKFQGR VTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARYSGYDWWFDYWG QGTLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASV GDRV TITCRASQGIGSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPWTFGPGTKVDIKTTT PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYW APLAGTCGVLLLSLVITLYCRRDQRLPPDAH KPPGGGSGFRTPIQEE QADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD VL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	抗 CD70 CAR
71	MALPVTALLPLALLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA SGYTFTSYDINWRQAPGQGLEWMGVISPSGGGTSYAQKFQGR VTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARYYGGNPEGWYFDL WGRGTLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASV G DRV TITCRASQSIGNWLAWYQQKPGKAPKLLIYDASDLETGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPWTFGQGTKVEI KTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC DIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRRDQRLPPDAH KPPGGGSGFRT PIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR EEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS EIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	抗 CD70 CAR
72	MALPVTALLPLALLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA SGYTFTNYGMNWRQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYADAFKGR VTMTRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARDYGDYGM DYWGQ GTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATI NCRASKSVSTSGYSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDR FSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHSREVPWTFGQGTKVEI KTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC DIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRRDQRLPPDAH KPPGGGSGFRT	抗 CD70 CAR

10

20

30

40

50

配列番号	配列	説明
	PIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS EIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	
73	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG	FW-H1_1
74	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG	FW-H1_2
75	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FW-H1_3
76	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG	FW-H1_4
77	WVRQAPGQGLEWM	FW-H2_1
78	WVRQAPGQGLEWV	FW-H2_2
79	WVRQAPGKGLEWV	FW-H2_3
80	WVRQAPGQGLEWI	FW-H2_4
81	QKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYY	FW-H3_1
82	QRFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYY	FW-H3_2
83	HKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYY	FW-H3_3
84	QKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYY	FW-H3_4
85	LKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYY	FW-H3_5
86	QNFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYY	FW-H3_6
87	QMFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYY	FW-H3_7
88	QEFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYY	FW-H3_8
89	EEFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYY	FW-H3_9
90	QTFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYY	FW-H3_10
91	QSFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYY	FW-H3_11
92	DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY	FW-H3_12
93	QNLQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYY	FW-H3_13
94	PKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYY	FW-H3_14
95	DSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYY	FW-H3_15
96	DKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYY	FW-H3_16
97	GQGTLLTVSS	FW-H4_1
98	GRGTLTVSS	FW-H4_2
99	GQGTTTVSS	FW-H4_3
100	GQGTMTVSS	FW-H4_4
101	GKGTTTVSS	FW-H4_5
102	YTFTDYMH	CDR-H1
103	YTFTSYDIN	CDR-H1
104	GIINPNSGGTNYA	CDR-H2
105	GVINPSGGGTSYA	CDR-H2
106	GVISPSGGGTSYA	CDR-H2
107	CARDFSVYAAADGMDVW	CDR-H3
108	CARYSGYDWVFDYW	CDR-H3
109	CARYYGGNPEGWYFDLW	CDR-H3
110	NYGMN	CDR-H1

10

20

30

40

50

配列番号	配列	説明
111	WINTYTGEPTYADAFKG	CDR-H2
112	GDYGMDY	CDR-H3
113	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	FW-L1_1
114	DIVMTQSPSLSPVTPGEPASISC	FW-L1_2
115	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	FW-L1_3
116	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC	FW-L1_4
117	WYQQKPGKAPKLLIY	FW-L2_1
118	WYLQKPGQSPQLLIY	FW-L2_2
119	WYQQKPGQAPRLLIY	FW-L2_3
120	WYQQKPGQPPLLIY	FW-L2_4
121	GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY	FW-L3_1
122	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY	FW-L3_2
123	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYY	FW-L3_3
124	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYY	FW-L3_4
125	GQGTRLEIK	FW-L4_1
126	GQGTKLEIK	FW-L4_2
127	GQGTKVEIK	FW-L4_3
128	GGGTKVEIK	FW-L4_4
129	GPGTKVDIK	FW-L4_5
130	GGGTKLEIK	FW-L4_6
131	RASQSISSYLN	CDR-L1
132	RASQGIGSWLA	CDR-L1
133	RASQSIGNWLA	CDR-L1
134	DASNLAT	CDR-L2
135	AASTLQS	CDR-L2
136	DASDLET	CDR-L2
137	CQQSDSSPLTF	CDR-L3
138	CQQSYSTPWTF	CDR-L3
139	CQQSYTTPWTF	CDR-L3
140	RASKSVSTSGYSFMH	CDR-L1
141	LASNLES	CDR-L2
142	QHSREVPWT	CDR-L3
143	cagggtgcagctgggtcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaagttt cctgcaaggcatctggatacaccttcaccgattactatgcactgggtgcgacaggcccct ggacaagggctgagtggtgggaataatcaaccctaatagtggtggaacaaattacgca cagaagttccagggcagagtcaccatgaccagggaacacgtccacgagcacagttcatat ggagctgagcagcctgagatctgaggacacggccgtgtattactgtgctagagatttttagt gtatgctgctgcagatggcatggtgtctggggccaagggaacattgggtaccgtctctca	抗 CD70 VH
144	cagggtgcagctgggtcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaagttt cctgcaaggcatctggatacaccttcaccagctacgacattaattgggtgcgacaggcccct ggacaagggctgagtggtggagtgatcaaccctagtgggtgaggtacaagctacgca	抗 CD70 VH

10

20

30

40

50

配列番号	配列	説明
	cagaagttccagggcagagtcacatgaccagggacacgtccacgagcacagttacat ggagctgagcagcctgagatctgaggacacggccgtgtattactgtgctagatattctggcta tgattgggtgttgactactggggccaagggacccctggtaaccgtctcctca	
145	cagggtcagctgggtcagctctggggctgagggaagaagcctggggcctcagtaagggtt cctgcaaggcatctggatacaccttcaccagctacgacatcaattgggtgcgacagggccct ggacaagggcctgagtgatgggagtcacagccctagtggtggaacaagctacgca cagaagttccagggcagagtcacatgaccagggacacgtccacgagcacagttacat ggagctgagcagcctgagatctgaggacacggccgtgtattactgtgctagatactacggc ggcaacccccaaggggtggtactctgactctggggccgtggcacccctggtaactgtctcctca	抗 CD70 VH
146	gacatccagatgaccagctcctcctcctctgtctgcatctgtaggagacagagtcacatc actgcccgggcaagtcagagcattgacagctatttaattgggtatcagcagaaaccagggga aagccctaaagctcctgactatgacgcatccaattggccacgggggtcccatcaagggtca gtggcagtggtatctgggacagatttcactctcaccatcagcagctgcaacctgaagattttgc aaacttactactgtcaacagagtgatagttcacctctcacttctcgccaagggaccaaggtgga gatcaaaa	抗 CD70 VL
147	gacatccagatgaccagctcctcctcctctgtctgcatctgtaggagacagagtcacatc actgcccgggcaagtcagggcattggcagctggttagcttggtatcagcagaaaccagggga aagccctaaagctcctgactatgctgcatccacattgcaaagtggggtcccatcaagggtca gtggcagtggtatctgggacagatttcactctcaccatcagcagctgcaacctgaagattttgc aaacttactactgtcaacagagttacagtacccttggacttctggccctgggaccaaggtgga tatcaaaa	抗 CD70 VL
148	gacatccagatgaccagctcctcctcctctgtctgcatctgtaggagacagagtcacatc actgcccgggcaagtcagagcattggaaattggttagcctggtatcagcagaaaccagggga aagccctaaagctcctgactatgacgcatcgaatttggaaaccgggggtcccatcaagggtc agtggcagtggtatctgggacagatttcactctcaccatcagcagctgcaacctgaagatttt gcaacttactactgtcaacagagttacactaccccttggacgttctggccaagggaccaaggt ggaaatcaaaa	抗 CD70 VL
149	cagggtcagttggtgcaaagcggggcgagggtgaaaaaacccggcgcttccgtgaaggt gtcctgtaaggcgctcgggttatacgttcacgaactacgggatgaattgggttcccaagcgcc ggggcagggactgaaatggatgggtggataaatacctacacggcgcaacctacatacgc ccgacgcttttaagggcgagtcactatgacgcgcgataccagcatatccaccgcatacat ggagctgtcccgaactccgggtcagacgacacggcgtgtactactgtgctcgggactatggcg attatggcatggactactgggtcagggtaacagtagtagt	抗 CD70 VH
150	gacatagttatgacccaatcccagatagtttggcggttctctggcgagagggcaacgati aattgtcgcgcatcaaagagcggttcaacgagcggatattctttatgcattggtaccagcaaa aaccoggacaaccggcgaagctgctgactcttggttcaaatcttgagtcgggtgccc gacgattttctggtagtggaagcggaactgactttacgctcagatcagttcactgcaggct gagtagtagcggtctattattgccagcacagtagagaagtccttgacacttccgtcaagg cacgaaagtagaattaaa	抗 CD70 VL
151	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDYYMHWRQAPGQ GLEWMGIINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDTAVYYCARDFSVYAAADGMDVWGQGLTVTVSS	抗 CD70 VH

10

20

30

40

50

配列番号	配列	説明
152	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYDINWVRQAPGQG LEWMGVINPSGGGTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRS EDTAVYYCARYSGYDWWFDYWGQGLTVTVSS	抗 CD70 VH
153	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYDINWVRQAPGQG LEWMGVISPSGGGTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRS EDTAVYYCARYYGGNPEGWYFDLWGRGLTVTVSS	抗 CD70 VH
154	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPK LLIYDASNLATGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQS DSSPLTFGQGTKVEIK	抗 CD70 VL
155	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIGSWLAWYQQKPGKAP KLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ SYSTPWTFGPGTKVDIK	抗 CD70 VL
156	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIGNWLAWYQQKPGKAP KLLIYDASDLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ SYTTPWTFGQGTKVEIK	抗 CD70 VL
157	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYGMNWRQAPGQ GLKWMGWINTYTGEPTYADAFKGRVTMTRDTSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCARDYGDYGM DYWGQGT TVTVSS	抗 CD70 VH
158	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSFMHWYQQKP GQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVY YCQHSREVPWTFGQGTKVEIK	抗 CD70 VL
159	ccgatcgtgaagcgctgct	SMAD3 gRNA
160	cgagaaggcggtaagagcc	SMAD3 gRNA
161	cttggtgtgacgttcg	SMAD3 gRNA
162	ctctgctgttcacatcca	MAPKAPK gRNA
163	cccgcttggtgctcc	MAPKAPK gRNA
164	cgactaccagttccaagc	MAPKAPK gRNA
165	gactgagttatggcgtggc	CEACAM1 gRNA
166	gaatgttcattgataagcc	CEACAM1 gRNA
167	gagaggctgaggtttgcccc	CEACAM1 gRNA
168	cctcaccatgcctagcctt	DDIT4 gRNA
169	cgatctgggtgggagttcg	DDIT4 gRNA
170	gtttgaccgctccacgagcc	DDIT4 gRNA

10

20

30

40

50

配列番号	配列	説明
171	ccctaccatgactttattc	TGFR2 gRNA
172	attgcactcatcagagctac	TGFR2 gRNA
173	agtcattgtagggagcttg	TGFR2 gRNA
174	tgctggcgatcgctccac	TGFR2 gRNA
175	gtgagcaatccccggcgga	TGFR2 gRNA
176	aacgtgcggtggatcgctgc	TGFR2 gRNA
177	tcaccaagcccgacccaatggg	CD70 gRNA
178	gcttggccattggtcgctgg	CD70 gRNA
179	accctctccgcatcgccgctg	CD70 gRNA
180	gcttggccattggtcgctgc	CD70 gRNA
181	ctcaccagattccgaaggt	CISH gRNA
182	ccgcctgtcatcaaccgtc	CISH gRNA
183	tctgcgttcagggtaagcg	CISH gRNA
184	gcgcttaccctgaacgcag	CISH gRNA
185	cgagaggacatgtccccg	CISH gRNA
186	agattccgaaggtaggaga	CISH gRNA
187	ctggtattgggttcatta	CISH gRNA
188	tactcaatgcgtacattgt	CISH gRNA
189	atactcaatgcgtacattgg	CISH gRNA
190	tccggaaggccaggatgctg	CISH gRNA
191	ctgtccaggccacgcaccc	CISH gRNA
192	taatctggtggacctcatgaagg	CBLB gRNA
193	tcggttgcaaacgtccgaaagg	CBLB gRNA
194	agcaagctgccgcagatcgagg	CBLB gRNA
195	agcaagctgccgcagatcgc	CBLB gRNA
196	ggagctgatggtaaatctgc	NKG2A gRNA
197	ttgaagggttaattccgcat	NKG2A gRNA
198	aacaactatcgttaccacag	NKG2A gRNA
199	cgaggagcccatgatgggca	A2AR gRNA
200	gggcaatgtctggtgtgct	A2AR gRNA
201	cagtgcaccacaaagtagt	A2AR gRNA
202	tcaccaagcccgacccaatggg	模擬 gRNA

10

20

30

40

50

配列番号	配列	説明
203	ucaccaagcccgcgaccaauggg	模擬 gRNA
204	QGIGSW	CDR-L3
205	GYTFTSYD	CDR-H1
206	ISPSGGGT	CDR-H2
207	ARYYGGNPEGWYFDL	CDR-H3
208	GGGGSGGGGSGGGGS	リンカー
209	VINPSGGGTSYAQKFQGSIGNW	CDR-L1
210	YSGYDWWFDYDA	CDR-L2
211	QQSYTTPWT	CDR-L3
212	agtgggtcgggctggtaccc	標的配列
213	NWNVNISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLEL QVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEK NIKEFLQSFVHIVQMFINTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC RPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	膜結合ヒト IL15 (mbIL15)
214	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYMHVWRQAPGQ GLEWMGIINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDTAVYYCARDFSVYAAADGMDVWQGGLTVVSSGGGGSGG GGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSSSYLNWY QQKPGKAPKLLIYDASNLATGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED FATYYCQSDSSPLTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITL YCRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSR SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPK RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQG LSTATKDTYDALHMQALPPR	抗 CD70 CAR
215	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYDINWVRQAPGQG LEWMGVINPSGGGTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLR EDTAVYYCARYSGYDWWFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIGSWLAWYQQKP GKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQSYSTPWTFGPGTKVDIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRR DQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADA PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQALPPR	抗 CD70 CAR
216	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYDINWVRQAPGQG LEWMGVISPSGGGTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLR EDTAVYYCARYYGGNPEGWYFDLWGRGTLTVSSGGGGSGGG GSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIGNWLAWYQ QKPGKAPKLLIYDASDLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDF	抗 CD70 CAR

10

20

30

40

50

配列番号	配列	説明
	ATYYCQSSYTTTPWTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL RPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLY CRRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRS ADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGL STATKDTYDALHMQALPPR	
217	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIGSWLAWYQQKPGKAP KLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ SYSTPWTFGPGTKVDIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLVQSGA EVKKPGASVKVSKASGYFTSYDINWVRQAPGQGLEWMGVINP SGGGTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCA RYSGYDWWFDYWGGQTLTVSSAAATTPAPRPPTPAPTIASQPL SLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVIT LYCRRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFS RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQALPPR	抗 CD70 CAR
218	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIGNWLAWYQQKPGKAP KLLIYASDLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ SYTTPWTFGQGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLVQSGA EVKKPGASVKVSKASGYFTSYDINWVRQAPGQGLEWMGVISP SGGGTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCA RYYGGNPEGWYFDLWGRGTLTVSSAAATTPAPRPPTPAPTIA SQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLL SLVITLYCRRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIR VKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHD GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	抗 CD70 CAR
219	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSFMHWYQQKP GQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YCQHSREVPWTFGQGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQL VQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTNYGMNWVRQAPGQGLK WMGWINTYTGPTYADAFKGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDD TAVYYCARDYGDYGM DYWGQTTVTVSSAAATTPAPRPPTPAP TASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGV LLSLVITLYCRRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAK IRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	抗 CD70 CAR
220	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTSYDINWVRQAPGQG LEWMGVINPSGGGTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRS EDTAVYYCARYSGYDWWFDYWGGQTLTVSSGGGGSGGGGGSG	抗 CD70 CAR

10

20

30

40

50

配列番号	配列	説明
	GGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGIGSWLAWYQQKP GKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQSYSTPWTFGPGTKVDIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRR DQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADA PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQALPPR	
221	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYDINWVRQAPGQG LEWMGVISPSGGGTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRS EDTAVYYCARYYGGNPEGWYFDLWGRGLTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSIGNWLAWYQ QKPGKAPKLLIYDASDLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDF ATYYCQQSYTTPWTFGQGTKEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL RPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLY CRRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRS ADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGL STATKDTYDALHMQALPPR	抗 CD70 CAR
222	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYGMNWRQAPGQ GLKWMGWINTYTGEPTYADAFKGRVTMTRDTSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCARDYGDYGM DYWGQGT TVTVSSGGGGSGGGGGSG GGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSFMHWY QQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAED VAVYYCQHSREVPWTFGQGTKEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPL SLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVIT LYCRRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFS RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQALPPR	抗 CD70 CAR
223	AA	CDR-L2
224	QQSYSTPWT	CDR-L3
225	INPSGGGT	CDR-H2
226	ARYSGYDWWFDY	CDR-H3

10

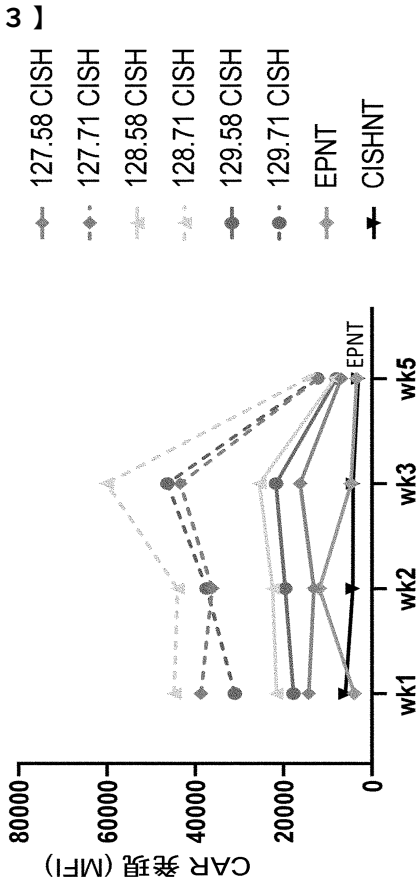
20

30

40

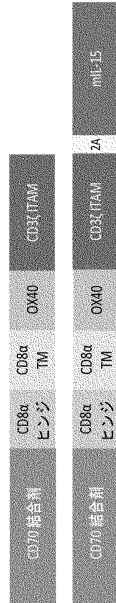
50

NK ドナー454 の持続性



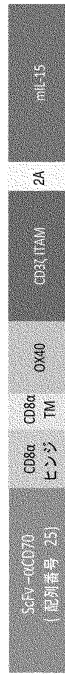
【図 3】

CD70 CARa
CD70 CARb

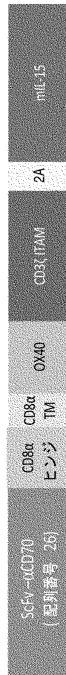


【図 面】
【図 1】

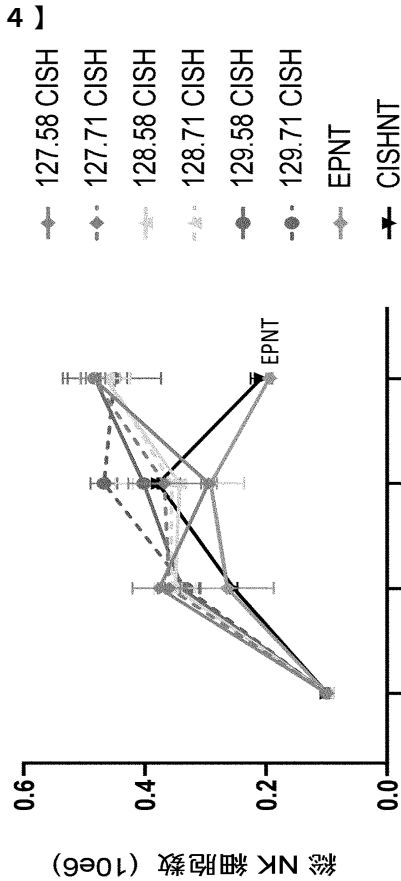
NK71



NK72



NK ドナー454 の細胞数



【図 4】

結合剤	腫瘍増殖抑制率		CAR 表現	
	786-O (E:T=1:2)	786-O (E:T=1:4)	%CAR (D15) (D15)	MFI (D15)
Dnr 454 (mol 1)	127.58 64%	127.71 63%	85.3 % 30%	11636 33769
127.58	128.58 49%	128.71 69%	88.8 % 29%	21170 41934
128.58	129.58 18%	129.71 42%	92.4 % 17%	18346 35517

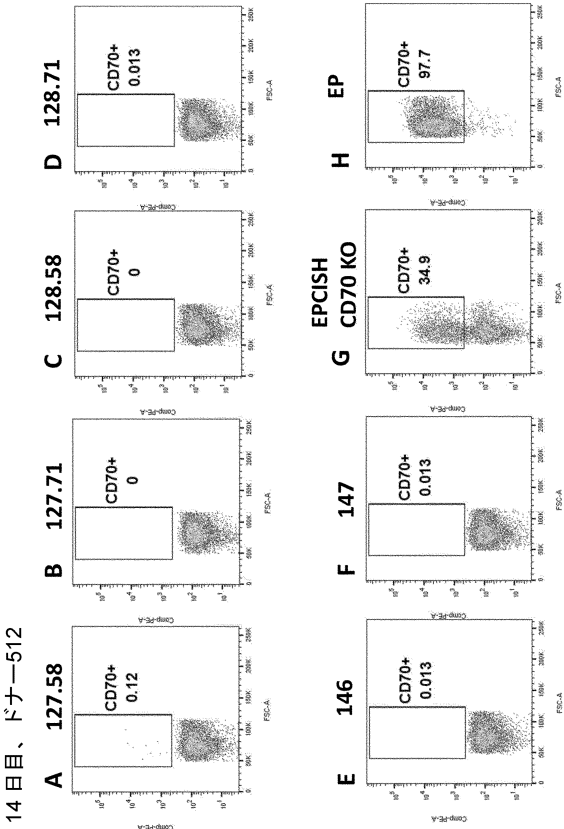
【図 2】

結合剤	腫瘍増殖抑制率				CAR 表現	
	786-O (E:T=1:2) 3日目	786-O (E:T=1:4) 3日目	ACHN (E:T=1:2) 3日目	ACHN (E:T=1:4) 3日目	%CAR (D15) (D15)	MFI (D15)
Dnr 512* (mol 1.7)	127.58 76%	127.71 79%	128.58 69%	128.71 78%	72.9 % 76%	23099 36680
127.58	129.58 75%	129.71 81%	20925 65.2 %	29693 59.9 %	70.6 % 45.2 %	24373 27878

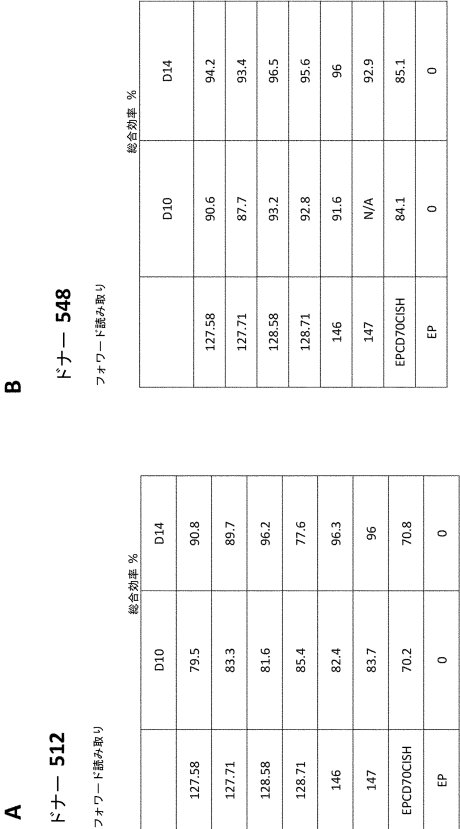
結合剤	腫瘍増殖抑制率		CAR 表現	
	786-O (E:T=1:2)	786-O (E:T=1:4)	%CAR (D15) (D15)	MFI (D15)
Dnr 548 (MOI 1)	127.58 49%	127.71 43%	91.7 % 93.5 %	17276 38692
127.58	128.58 64%	128.71 39%	91.9 % 91.2 %	29963 52137
128.58	129.58 10%	129.71 0%	78.6 % 71.8 %	18565 36831

結合剤	腫瘍増殖抑制率		CAR 表現	
	786-O (E:T=1:2)	786-O (E:T=1:4)	%CAR (D15) (D15)	MFI (D15)
Dnr 558 (MOI 1)	127.58 26%	127.71 40%	70.6 % 79.0 %	12345 32932
127.58	128.58 19%	128.71 29%	75.8 % 80.3 %	21173 42187
128.58	129.58 14%	129.71 15%	88.5 % 69.9 %	26950 37246

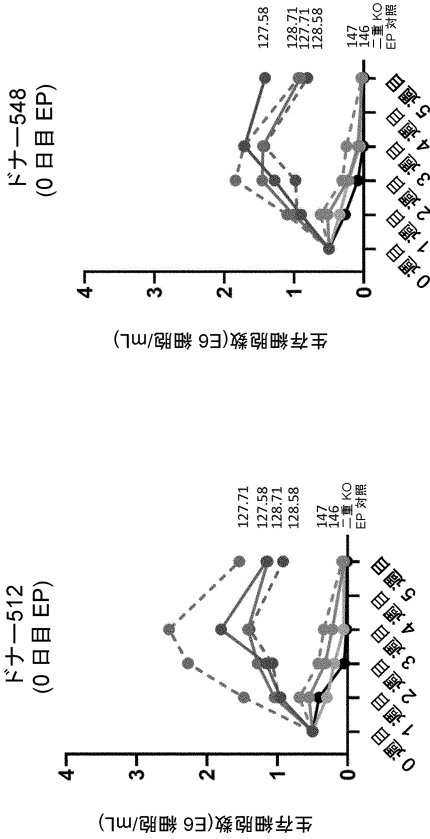
【図 9 A - 9 H】



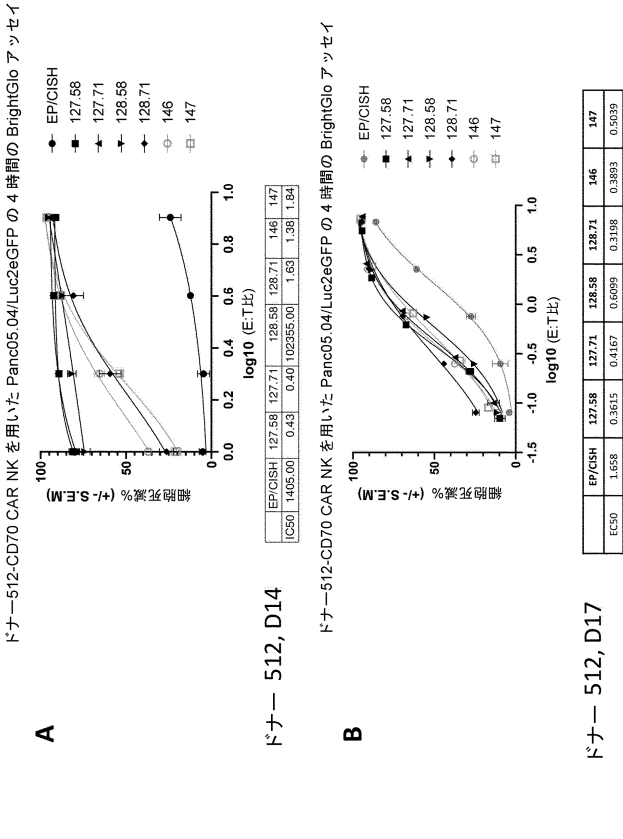
【図 10 A - 10 B】



【図 10 C】



【図 11 A - 11 B】



10

20

30

40

50

10

20

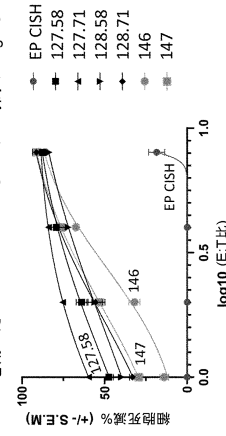
30

40

50

【図 1 1 C - 1 1 D】

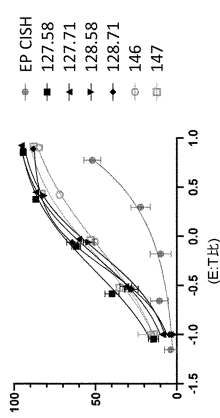
ドナー548-CD70 CAR NK を用いた Panc05.04/Luc2eGFP の 4 時間の BrightGlo アッセイ



	EP CISH	127.58	127.71	128.58	128.71	146	147
EC50	8.11	1.08	0.62	1.6	1.74	2.73	1.91

ドナー 548, D14

ドナー548-CD70 CAR NK を用いた Panc05.04/Luc2eGFP の 4 時間の BrightGlo アッセイ



	EP CISH	127.58	127.71	128.58	128.71	146	147
EC50	66925	0.4459	0.6384	0.7079	0.4779	0.8279	0.6263

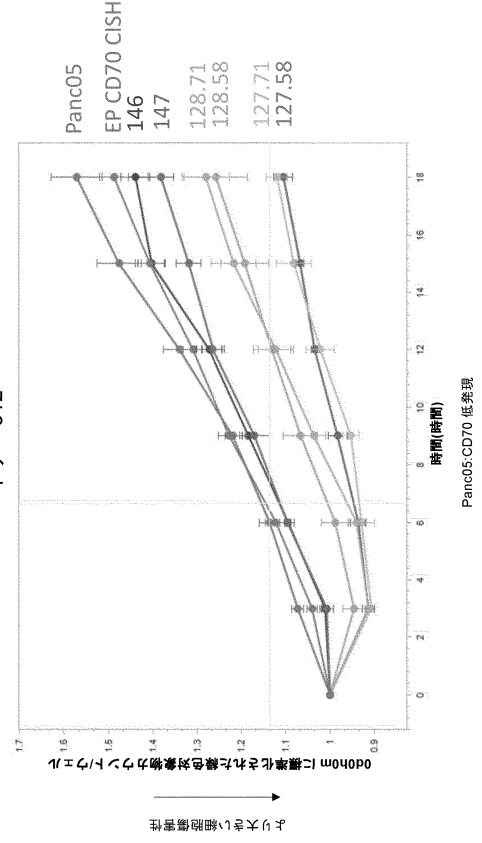
ドナー 548, D17

【図 1 2 A】

Panc05 インビトロ細胞傷害性:IncuCyte アッセイ

E:T= 1:2

ドナー512

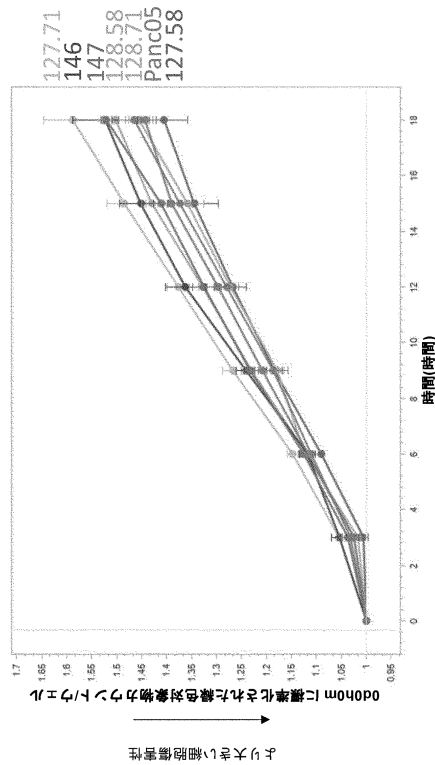


【図 1 2 B】

Panc05 インビトロ細胞傷害性:IncuCyte アッセイ

E:T= 1:2

ドナー548



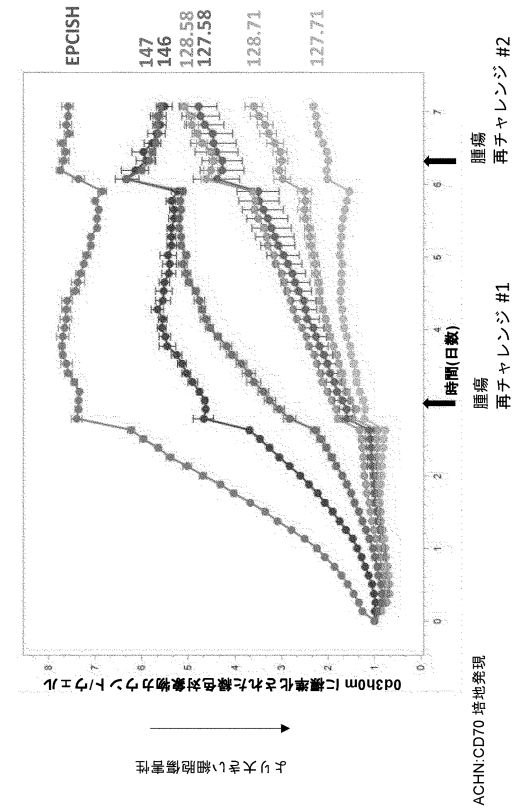
Panc05:CD70 低発現

【図 1 3 A】

ACHN インビトロ細胞傷害性:IncuCyte アッセイ

E:T= 1:2

ドナー512



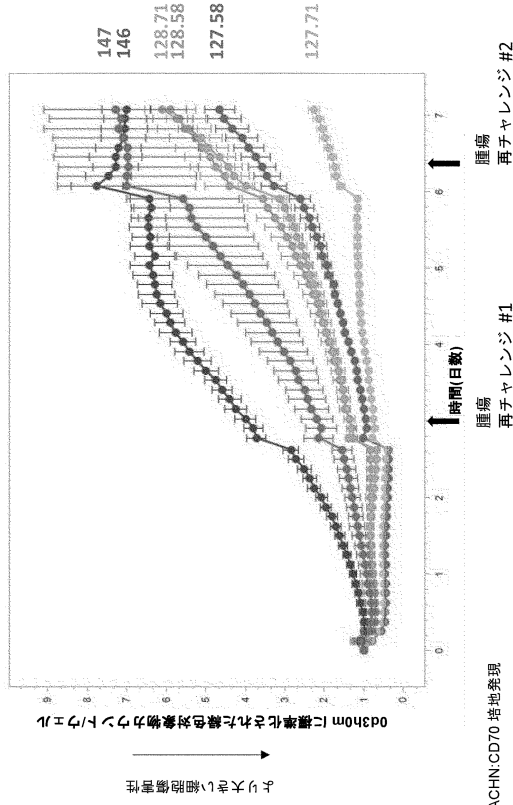
ACHN:CD70 高発現

【図 1 3 B】

ACHN インビトロ細胞傷害性:IncuCyte アッセイ

E:T= 1:2

ドナー-548

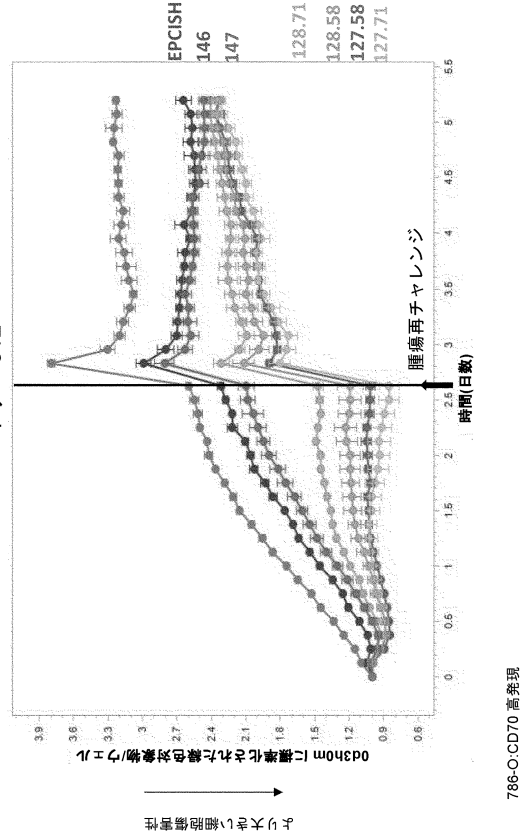


【図 1 4 A】

786-O インビトロ細胞傷害性:IncuCyte アッセイ

E:T= 1:2

ドナー-512

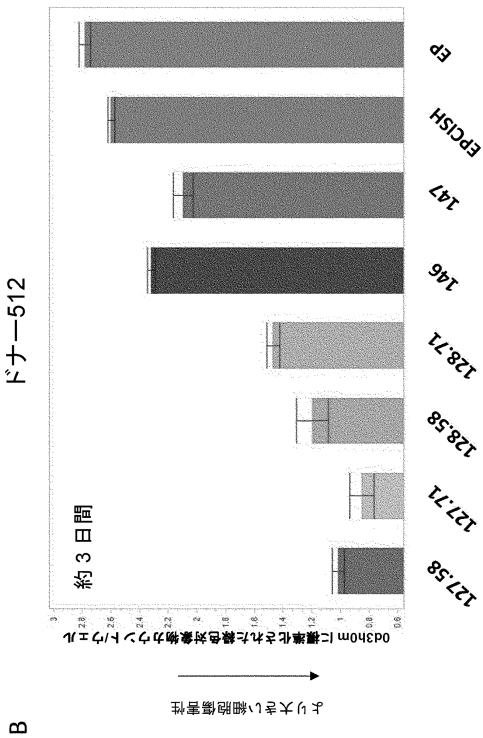


【図 1 4 B】

786-O インビトロ細胞傷害性:IncuCyte アッセイ

E:T= 1:2

ドナー-512

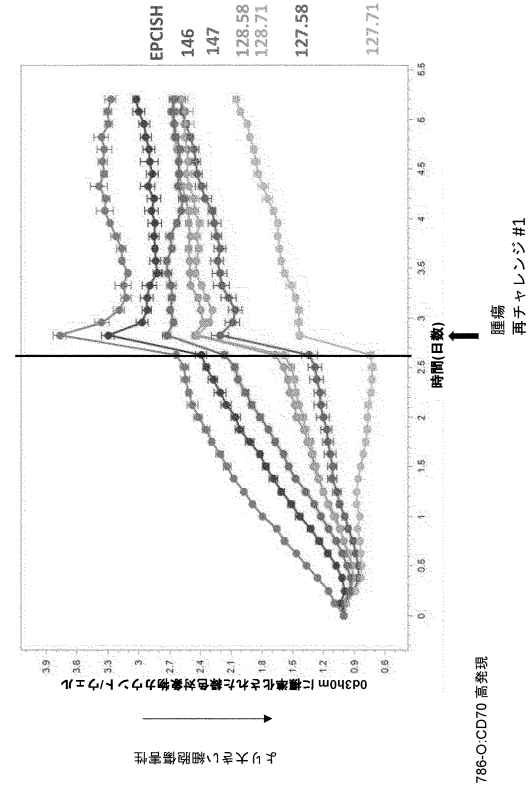


【図 1 4 C】

786-O インビトロ細胞傷害性:IncuCyte アッセイ

E:T= 1:2

ドナー-548



10

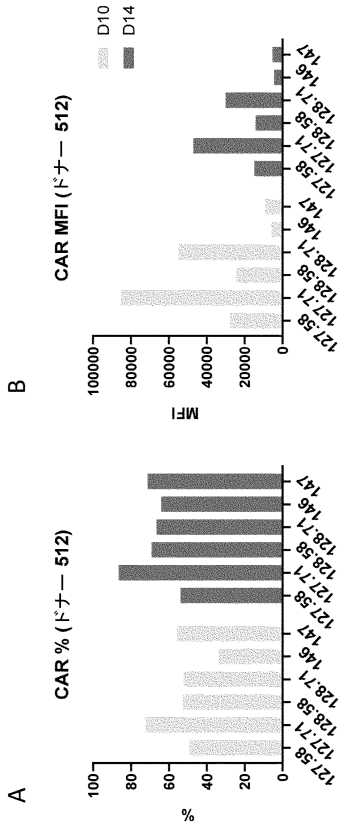
20

30

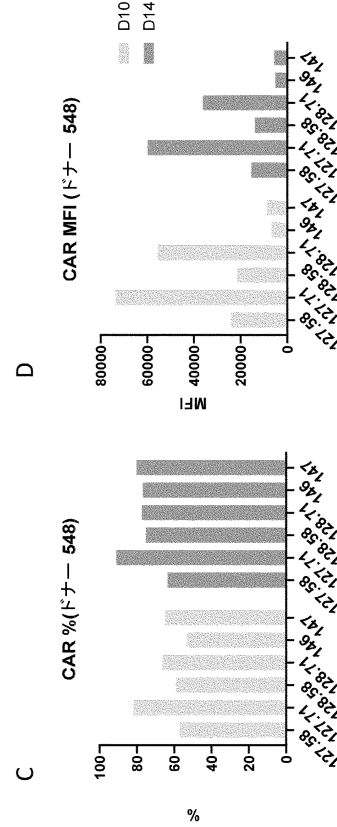
40

50

【図 15 A - 15 B】



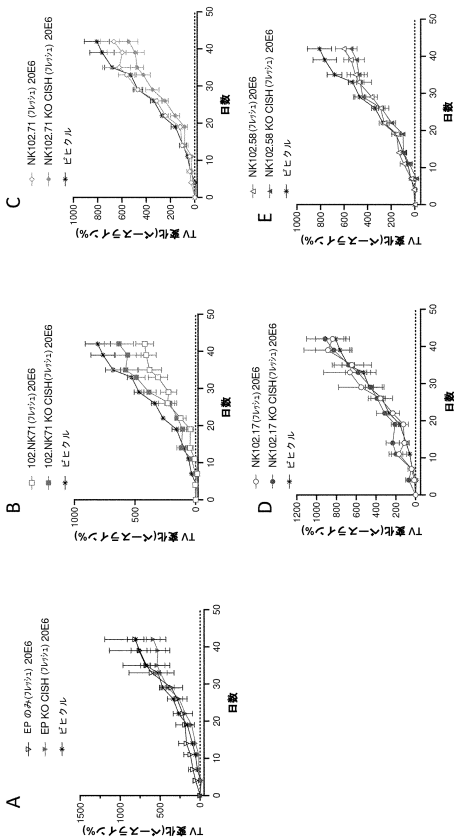
【図 15 C - 15 D】



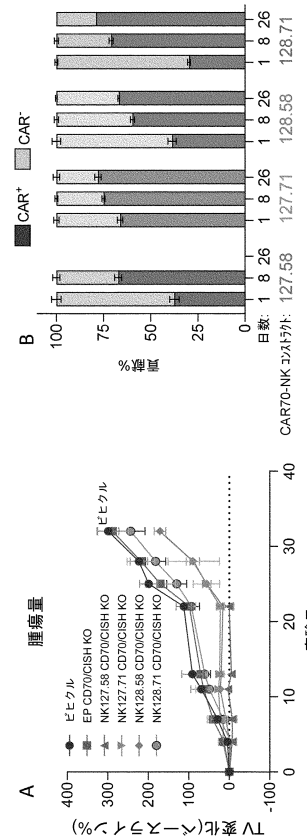
10

20

【図 16 A - 16 E】



【図 17 A - 17 B】

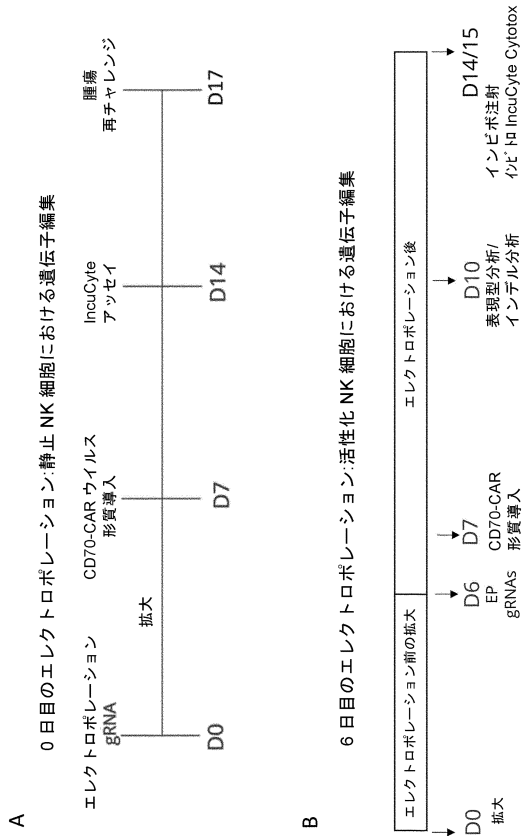


30

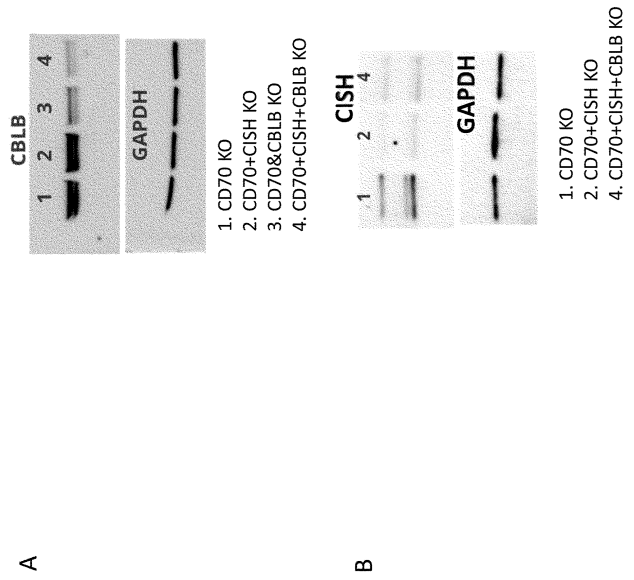
40

50

【図 18 A - 18 B】



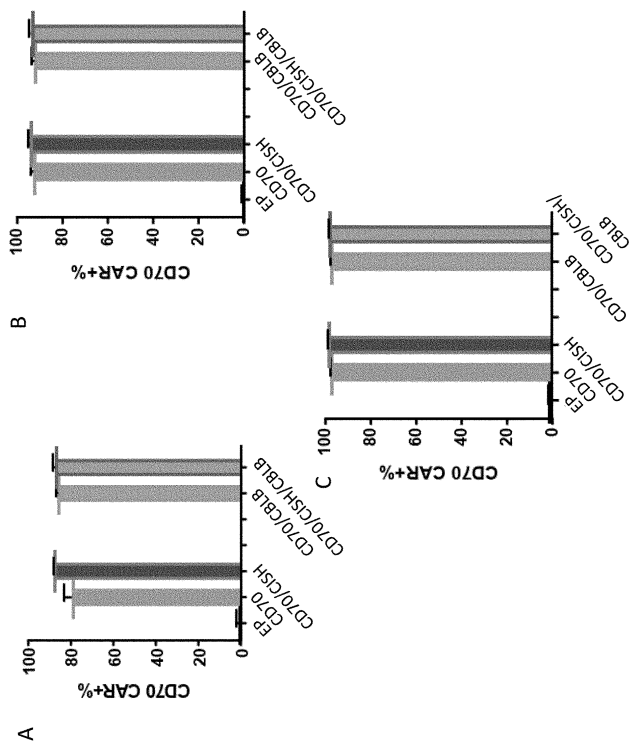
【図 19 A - 19 B】



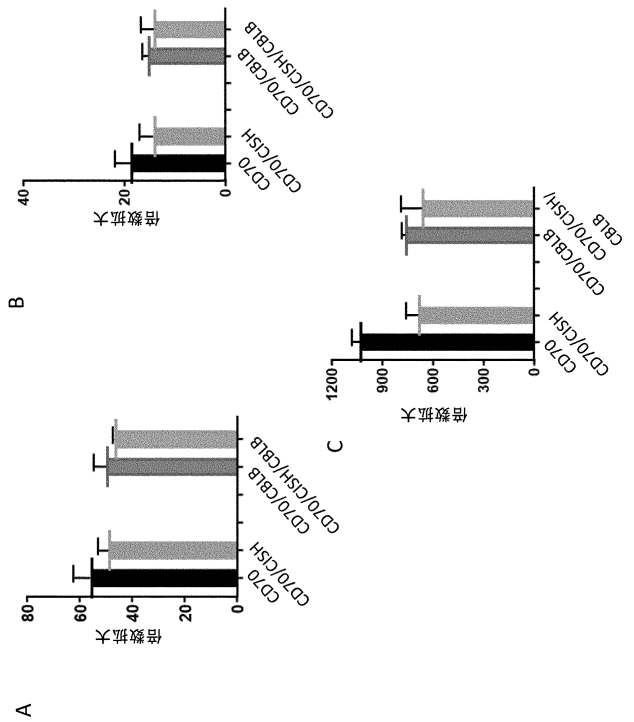
10

20

【図 20 A - 20 C】



【図 21 A - 21 C】

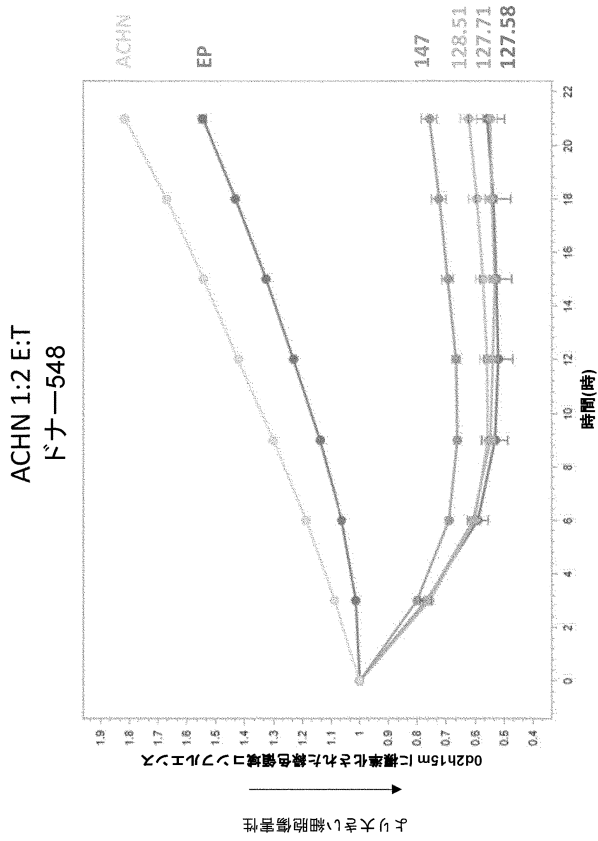


30

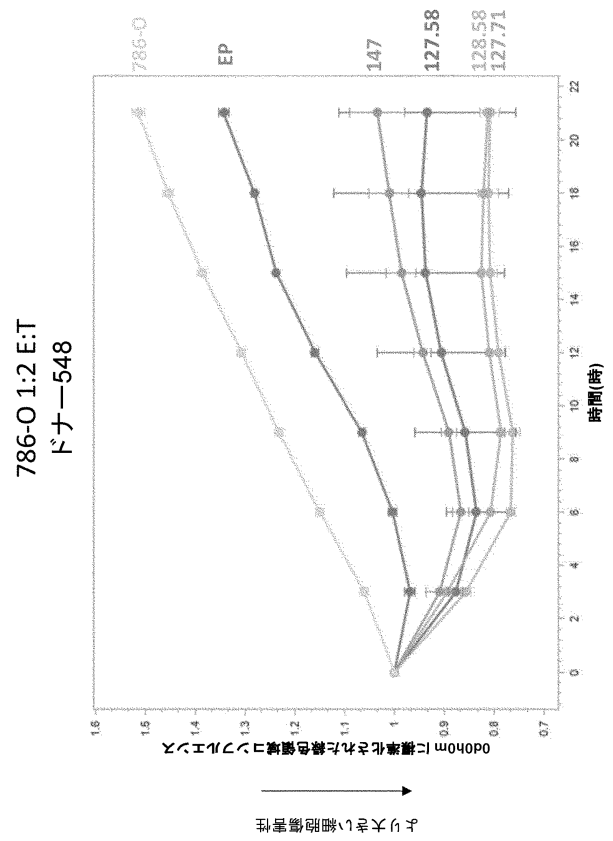
40

50

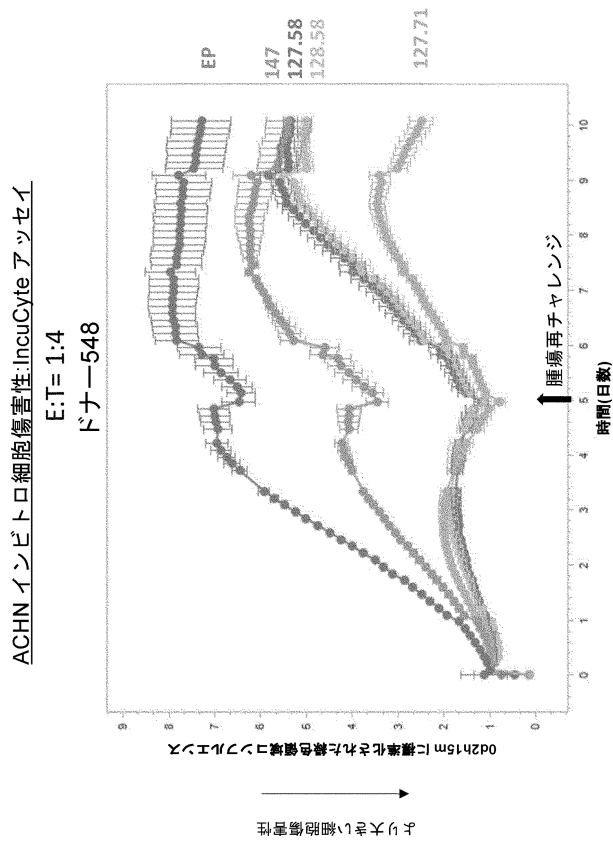
【図 2 1 D】



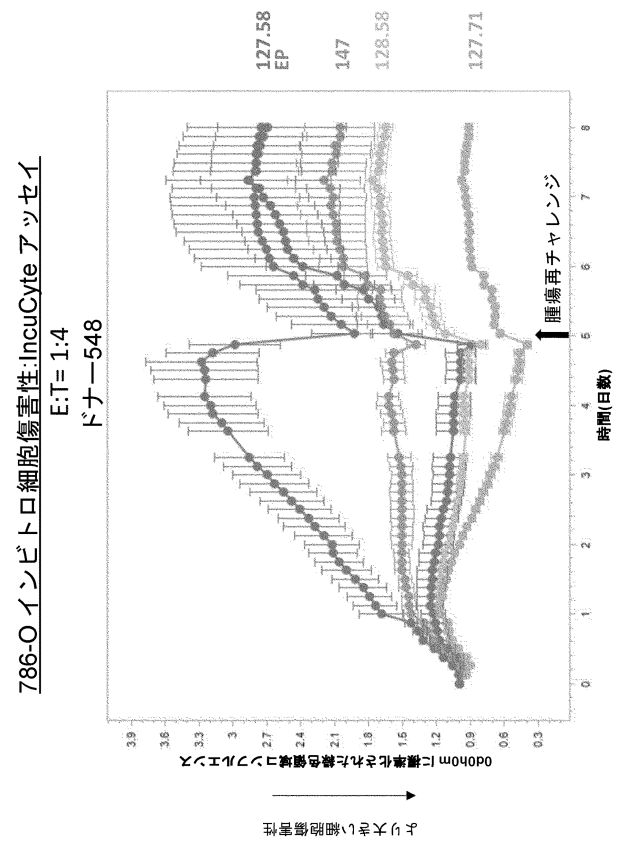
【図 2 1 E】



【図 2 1 F】



【図 2 1 G】



10

20

30

40

50

10

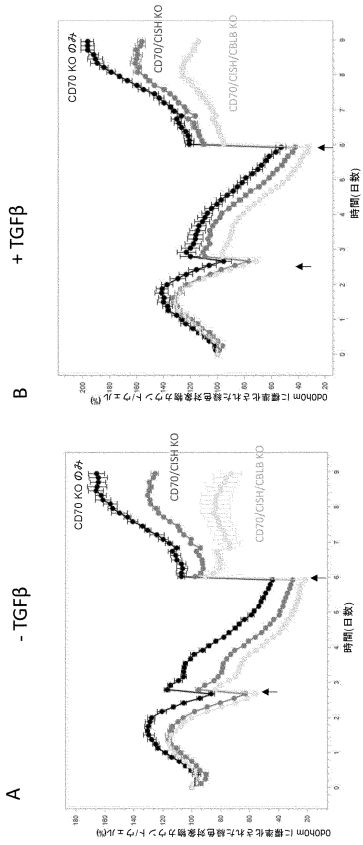
20

30

40

50

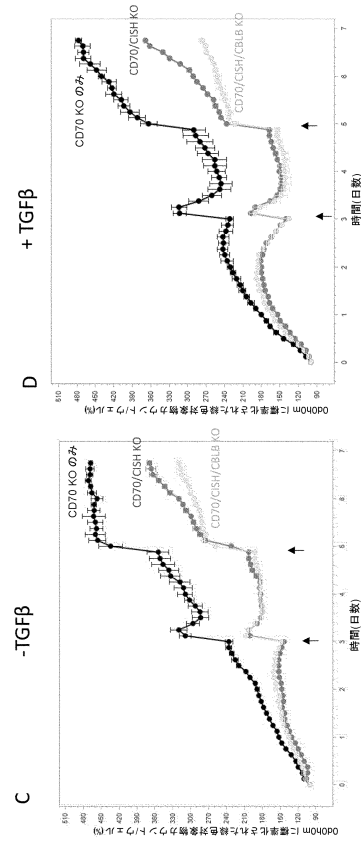
【図 2 2 A - 2 2 B】



14 日目; ACHN, E:T 1:4

↑ = 腫瘍再チャレンジ

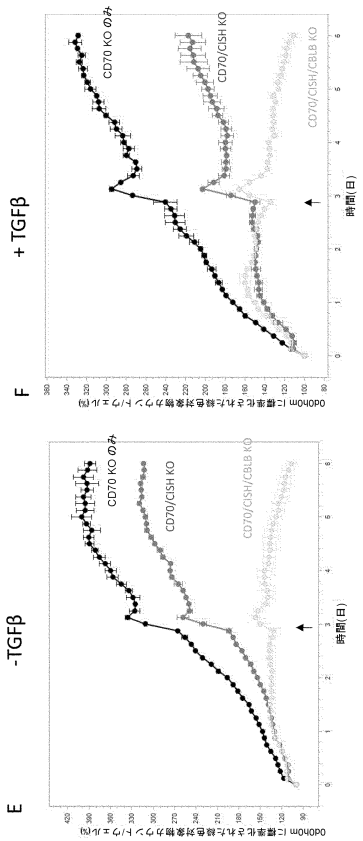
【図 2 2 C - 2 2 D】



21 日目; ACHN, E:T 1:4

↑ = 腫瘍再チャレンジ

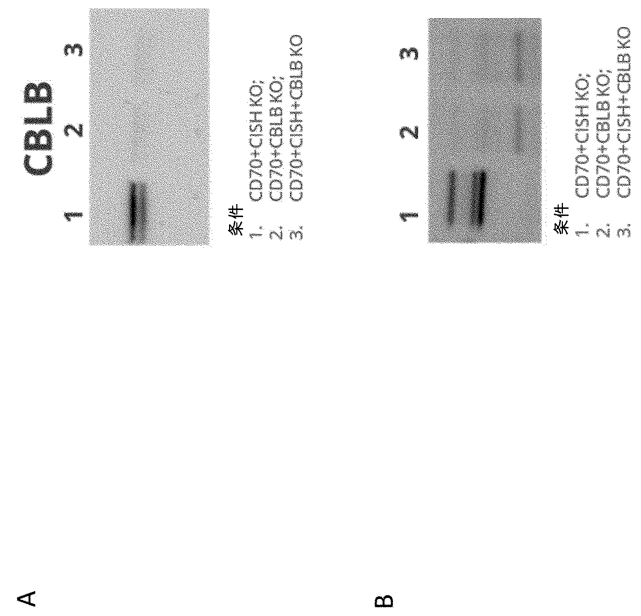
【図 2 2 E - 2 2 F】



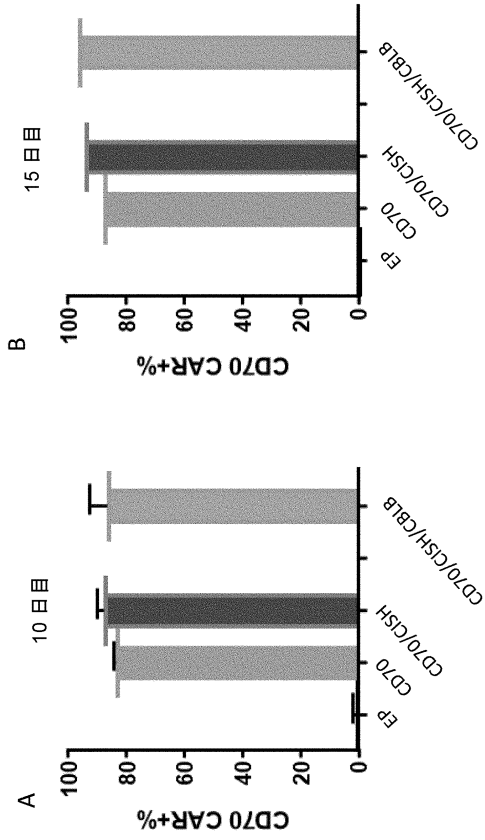
28 日目; ACHN, E:T 1:4

↑ = 腫瘍再チャレンジ

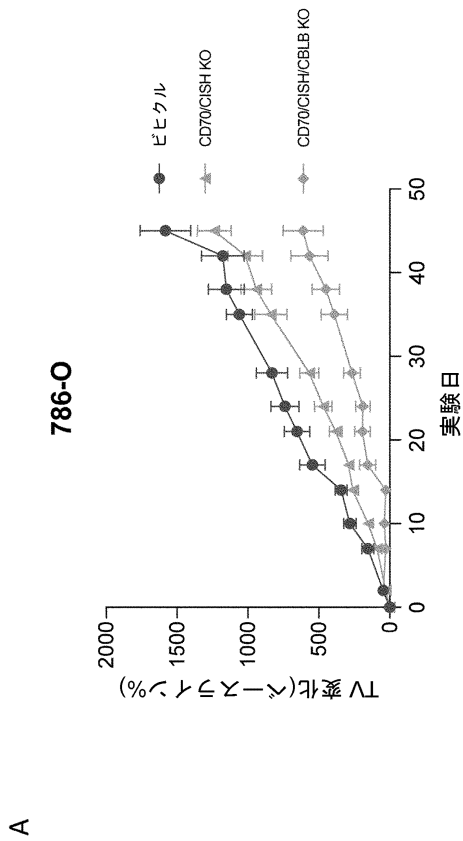
【図 2 3 A - 2 3 B】



【図 2 4 A - 2 4 B】

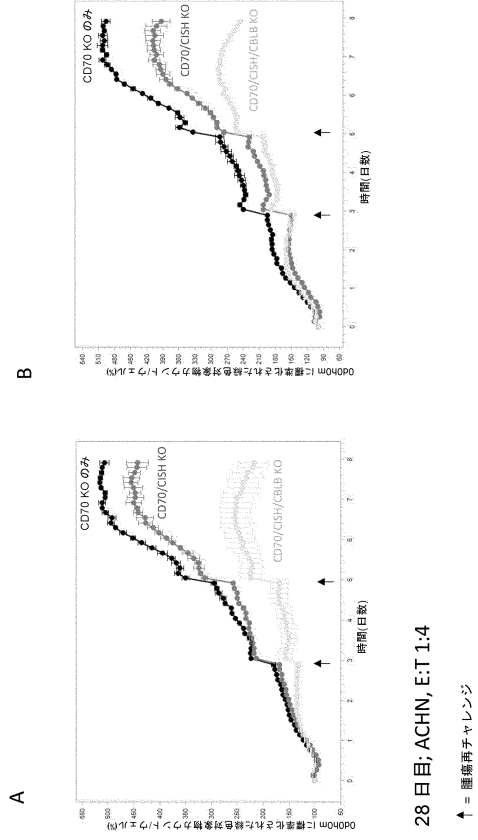


【図 2 6 A】

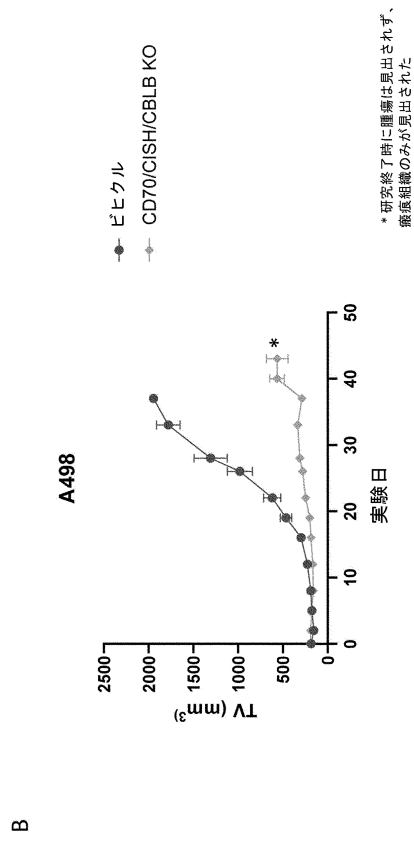


CD70 KO は全処置群に含まれる

【図 2 5 A - 2 5 B】

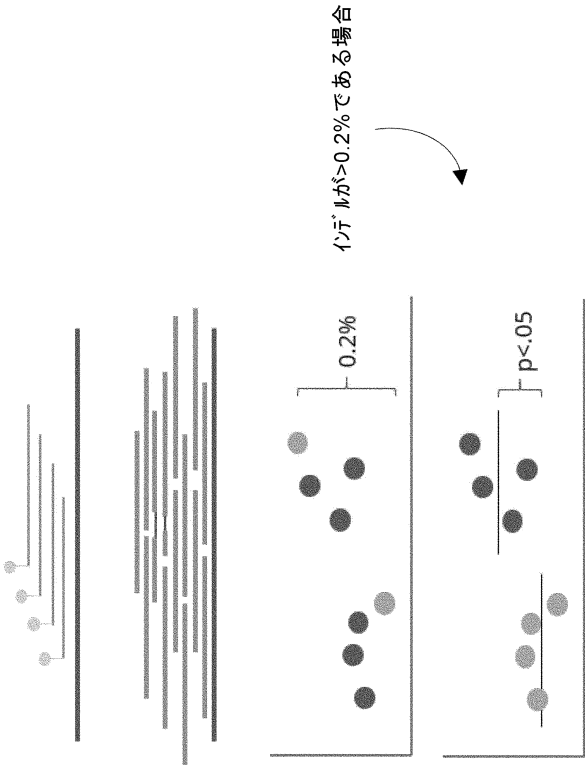


【図 2 6 B】

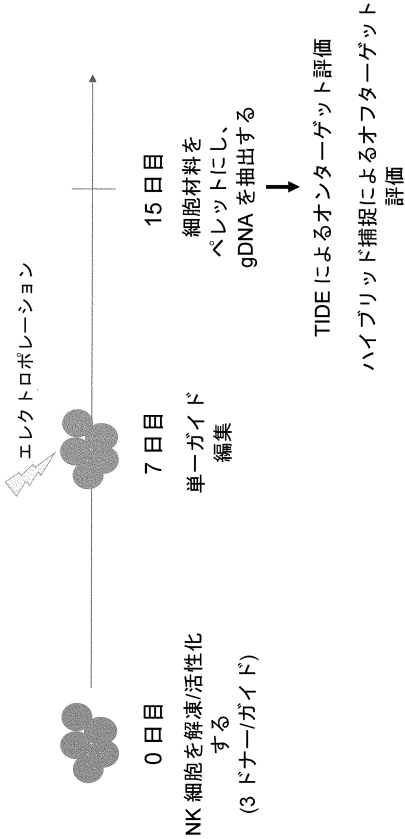


CD70 KO は全処置群に含まれる

【図 27】



【図 28】



【図 29 A】

ガイド名称 (配列)	試験された NKドナー数	オフターゲット候補部位数 (相同性に基づく検索)	部位間のNGS読み取りカバレッジの 中央値 (x1000)
CBLB (配列番号195)	2	120	9.6, 10.0
CISH-10 (配列番号187)	2	208	7.0, 7.5
CISH-12 (配列番号188)	3	122	7.5, 8.3, 9.9
CISH-13 (配列番号189)	3	133	2.6, 6.7, 6.9
CISH-15 (配列番号191)	3	293	8.9, 9.4, 9.5

QC 基準:カバレッジ中央値>5,000 読み取り

【図 29 B】

ガイド名称 (配列)	試験された NKドナー数	オフターゲット候補部位数 (相同性に基づく検索)	部位間のNGS読み取りカバレッジの 中央値 (x1000)
CD70 (配列番号180)	3	119	14.7, 15.2, 15.8
CBLB (配列番号195)	4	120	9.6, 10.0, 13.7, 15.1
CISH9 (配列番号186)	3	379	12.5, 14.0, 14.7
CISH10 (配列番号187)	3	208	7.0, 7.5, 10.6
CISH12 (配列番号188)	3	122	7.5, 8.3, 9.9
CISH13 (配列番号189)	3	133	2.6, 6.7, 6.9
CISH15 (配列番号189)	4	293	8.9, 9.4, 9.5, 15.0

QC 基準:カバレッジ中央値>5,000 読み取り

【図 3 0 A】

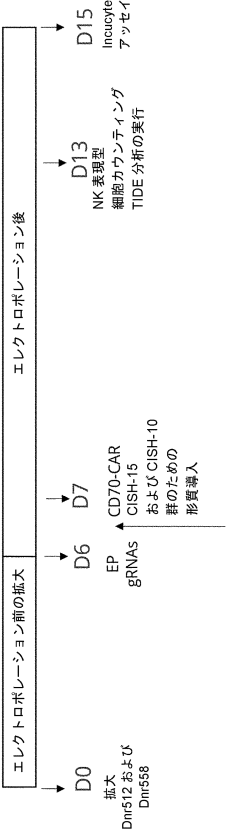
ガイド名称 (配列)	平均オンターゲット 編集% (TIDE)	平均オンターゲット 編集% (ハイブリット補正)	相同性から予測される オフターゲット部位	インデル率が<0.2% 増加した部位 (編集処理なし)	確認した オフターゲット
CBLB (配列番号 195)	73	73	120	0	0
CISH-10 (配列番号 187)	94	98	208	1	0
CISH-12 (配列番号 188)	73	82	122	0	0
CISH-13 (配列番号 189)	84	91	133	0	0
CISH-15 (配列番号 191)	63	69	293	0	0

オンターゲット率は TIDE と
ハイブリット補正の間で一貫している

【図 3 0 B】

ガイド名称 (配列)	平均オンターゲット 編集% (TIDE)	平均オンターゲット 編集% (ハイブリット補正)	相同性から予測される オフターゲット部位	インデル率が<0.2% 増加した部位 (編集処理なし)	確認した オフターゲット
CD70 (配列番号 180)	89	90	119	1	0
CBLB (配列番号 195)	82	81	120	1	0
CISH-9 (配列番号 186)	92	92	379	7	3
CISH-10 (配列番号 187)	95	98	208	1	0
CISH-12 (配列番号 188)	73	82	122	0	0
CISH-13 (配列番号 189)	84	91	133	0	0
CISH-15 (配列番号 191)	71	75	293	0	0

【図 3 1】



- 1) オフターゲット分析
2) 機能試験用の CD70 CAR 形質導入
のために分割した EP 後の試料

【図 3 2】

ドナー	gRNA	行われた編集	インデル 頻度 (%)
512	N/A	EP	0
512	CISH-15	CISH	79.4
512	CISH-15	CISH/CBLB	80.3
558	N/A	EP	0
558	CISH-15	CISH	65.8
558	CISH-15	CISH/CBLB	66.7

* すべては非形質転換 NK 細胞由来

【図 3 3 A】

CISH-10 および CISH-15 TIDE の概略			
ドナー	gRNA (配列)	行われた編集	インデル 頻度 (%)
512	N/A	EP	0
512	CISH-15 (配列番号 191)	CISH	79.4
512	CISH-10 (配列番号 187)	CISH	90.9
558	N/A	EP	0
558	CISH-15 (配列番号 191)	CISH	65.8
558	CISH-10 (配列番号 187)	CISH	88.7

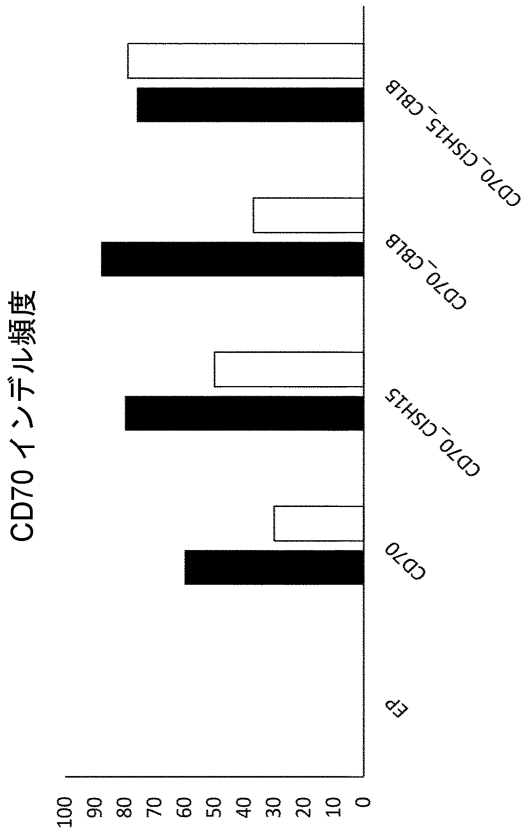
* すべては非形質転換 NK 細胞由来

【図 3 3 B】

ドナー	gRNA (配列)	インデル頻度 (%)
2	CISH-12 (配列番号 188)	83.86
3	CISH-12 (配列番号 188)	82.43
4	CISH-12 (配列番号 188)	79.58
2	CISH-13 (配列番号 189)	95.85
3	CISH-13 (配列番号 189)	86.37
4	CISH-13 (配列番号 189)	91.21
1	CISH-15 (配列番号 191)	92.41
2	CISH-15 (配列番号 191)	72.98
3	CISH-15 (配列番号 191)	66.42
4	CISH-15 (配列番号 191)	66.19

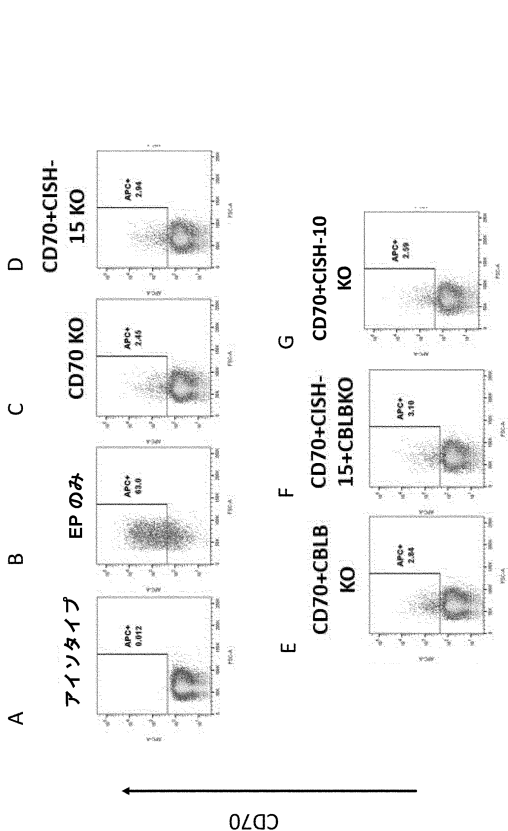
ドナー	gRNA (配列)	インデル頻度 (%)
1	CD70 (配列番号 180)	89.85
3	CD70 (配列番号 180)	91.05
4	CD70 (配列番号 180)	88.71
1	CBLB (配列番号 195)	88.23
2	CBLB (配列番号 195)	88.89
3	CBLB (配列番号 195)	71.73
4	CBLB (配列番号 195)	74.76
1	CISH-9 (配列番号 186)	95.17
3	CISH-9 (配列番号 186)	94.89
4	CISH-9 (配列番号 186)	85.22
1	CISH-10 (配列番号 187)	97.15
2	CISH-10 (配列番号 187)	98.52
4	CISH-10 (配列番号 187)	97.73

【図 3 4】



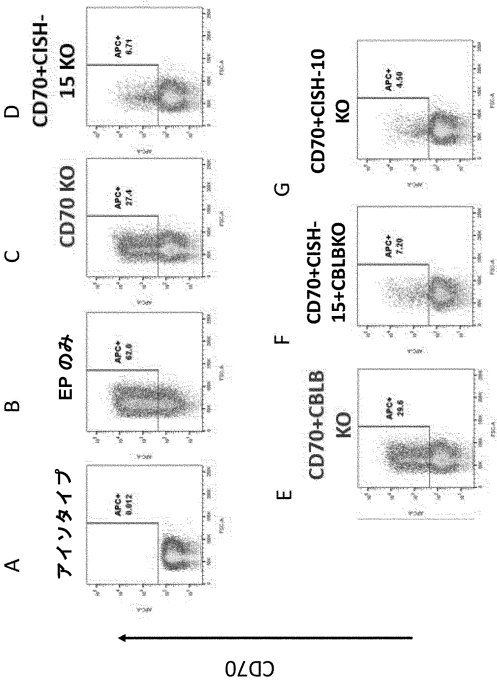
■ Dnr512 □ Dnr558

【図 3 5 A - 3 5 G】



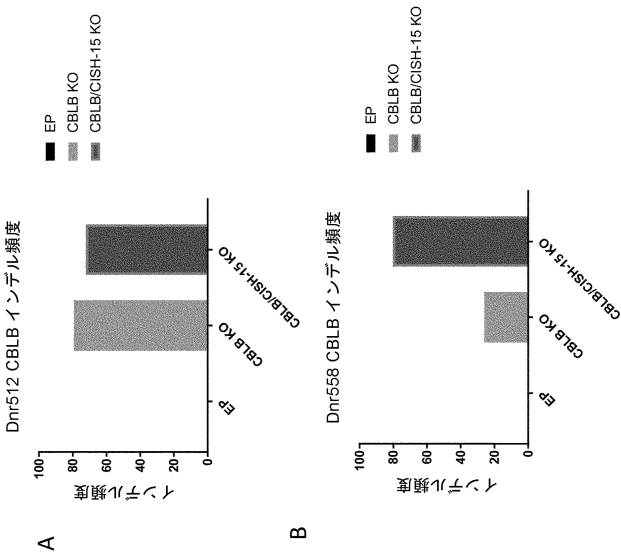
Dnr512 CD70 非形質導入 13 日目

【図 3 6 A - 3 6 G】



Dnr558 CD70 非形質導入 13日目

【図 3 7 A - 3 7 B】

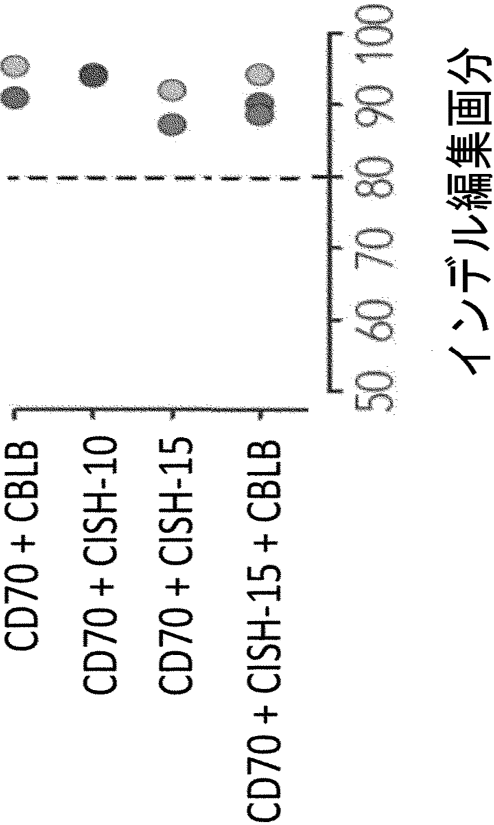


【図 3 8】

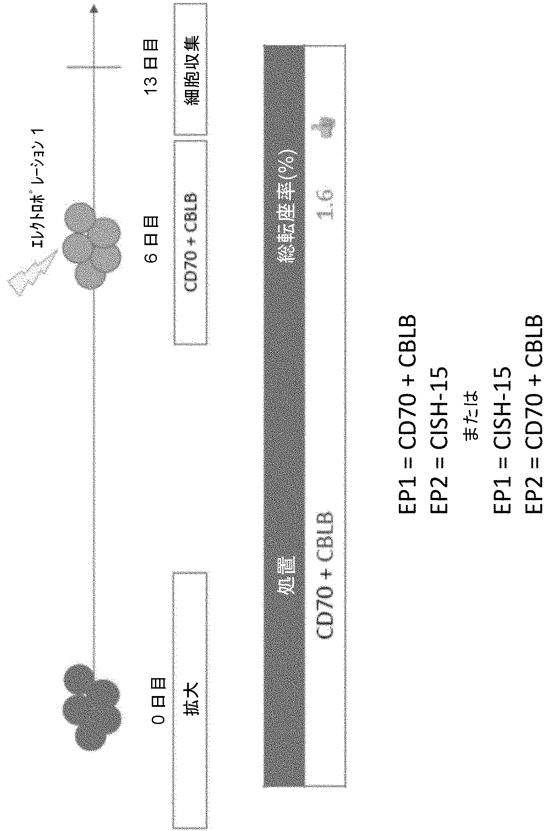
処置	複製	出力
EP	2	対照
CD70	2	対照
CD70 + CBLB	4	2 切断部位
CD70 + CISH-10	4	2 切断部位
CD70 + CISH-15	4	2 切断部位
CD70 + CISH-15 + CBLB	4	3 切断部位

転座を最小限にするための編集構成を決定するために使用するデータ

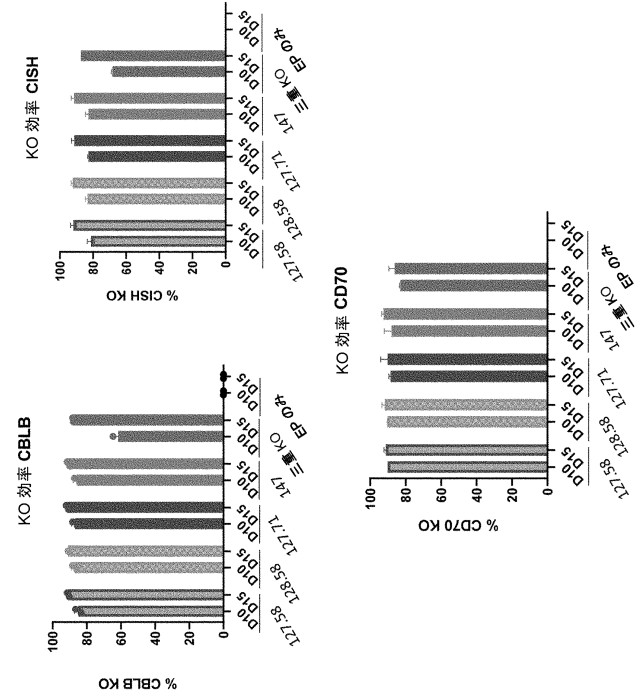
【図 3 9】



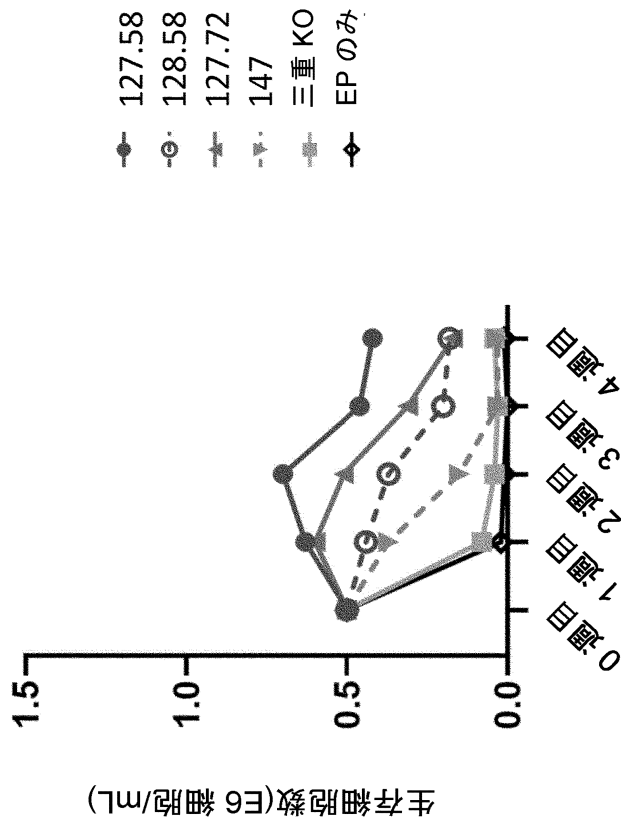
【図 4 4】



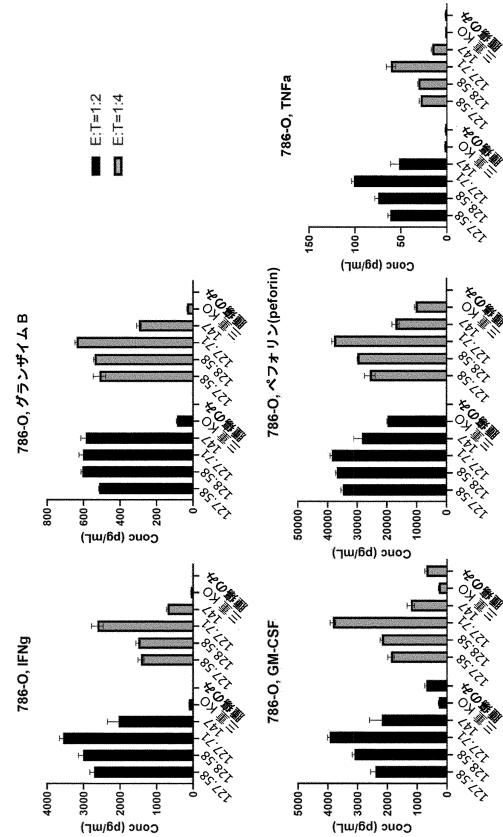
【図 4 5 A】



【図 4 5 B】



【図 4 5 C】



10

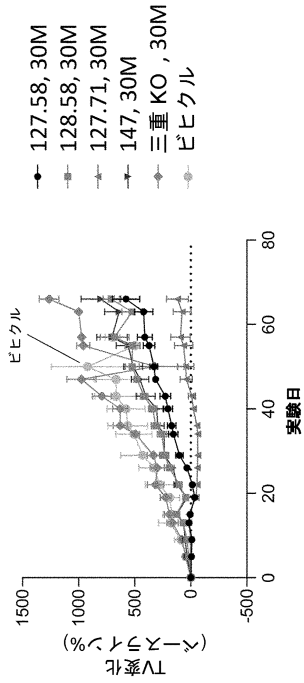
20

30

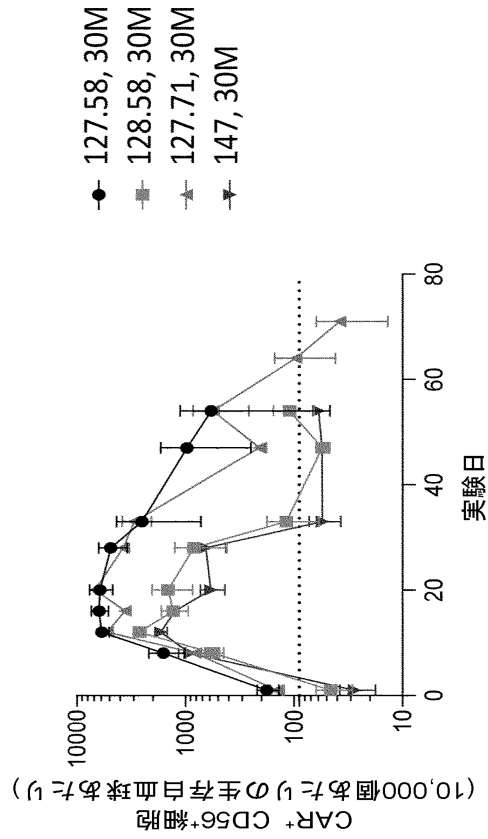
40

50

【図 4 6 A】



【図 4 6 B】



【配列表】

2025508050000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US23/63795

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC - INV. C07K 16/28; A61K 39/00; A61P 35/00; C07K 14/705; C12N 15/90 (2023.01) ADD. CPC - INV. C07K 16/2875; A61K 39/001102; A61K 39/001138; A61P 35/00; C07K 14/7051; C07K 14/70578; C07K 16/28; C12N 15/907 ADD. C07K 2317/622; C07K 2319/02; C07K 2319/03; C12N 2310/20; C12N 2800/80 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y --- A	US 2022/0002424 A1 (NIKARTA INC.) 06 January 2022; Abstract; Paragraphs [0006]-[0008], [0075], [0091], [0171], [0315], [0320], [0329], [0334], [0335], [0342], [0403]; Table 1; Figure 29F	43, 83-85, and 89-91 --- 20, 42, 45, 94-95, 97/94-95 --- 1-13, 16-19, 21, 46, 52-54, 71-74, 96 and 97/96
Y --- A	US 2003/0022311 A1 (DUNNINGTON DAMIEN D) 30 January 2003; Paragraph [0010]	20, 42, 45, 94-95, and 97/94-95 --- 1-13, 16-19, 52-54, 96, 97/96
Y --- A	WO 2021/108455 A1 (KSQ-THERAPEUTICS INC.) 03 June 2021; Paragraph [0348]	20, 45, 94-95, and 97/94-95 --- 96, 97/96
A	US 2020/0102379 A1 (ALEXION PHARMACEUTICALS INC.) 02 April 2020; Paragraph [0005]	1-13, 16-19, 52-54, 96, 97/96
A	WO 2021/157601 A1 (NATIONAL UNIV CORPORATION TOKAI NATIONAL HIGHER EDUCATION AND RESEARCH SYSTEM et al.) 12 August 2021	21 and 46
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 07 June 2023 (07.06.2023)		Date of mailing of the international search report OCT 18 2023
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US23/63795

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2022/0033505 A1 (JANSSEN BIOTECH INC.) 03 February 2022; Paragraph [0436]	21 and 46
A	US 11,166,985 B2 (CRISPR THERAPEUTICS AG) 09 November 2021; Table 24	71-74
A	BRUDNO, JN ET AL. "Safety and feasibility of anti-CD19 CAR T cells with fully-human binding domains in patients with B-cell lymphoma" pages 270-280. Nature Medicine. Vol. 26, No. 2. January 2021; Page 21; DOI: 10.1038/s41591-019-0737-3	71-74

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US23/63795

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US23/63795

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 22-41, 44, 47-51, 55-70, 75-82, 86-88, 92-93, 98
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Groups I+, claims 1-21, 42-43, 45-46, 52-54, 71-74, 83-85, 89-91, and 94-97, SEQ ID No: 52 (scFv aa sequence), SEQ ID No: 35 (scFv nucleotide sequence), SEQ ID No: 180 (CD70 target sequence), SEQ ID No: 191 (CIS target sequence), SEQ ID No: 195 (Cbl-b target sequence), SEQ ID Nos: 205-207 & 209-211 (CDR aa sequences), SEQ ID Nos: 153 & 156 (VH & VL aa sequences), SEQ ID Nos: 145 & 148 (VH & VL nucleotide sequences), SEQ ID No: 218 (anti-CD70 CAR aa sequence).

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US23/63795

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

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

Groups I+, claims 1-21, 42-43, 45-46, 52-54, 71-74, 83-85, 89-91, and 94-97, SEQ ID No: 52 (scFv aa sequence), SEQ ID No: 35 (scFv nucleotide sequence), SEQ ID No: 180 (CD70 target sequence), SEQ ID No: 191 (CIS target sequence), SEQ ID No: 185 (Cbl-b target sequence), SEQ ID Nos: 205-207 & 209-211 (CDR aa sequences), SEQ ID Nos: 153 & 156 (VH & VL aa sequences), SEQ ID Nos: 145 & 148 (VH & VL nucleotide sequences), SEQ ID No: 218 (anti-CD70 CAR aa sequence), are directed to populations of engineered NK cells expressing an anti-CD70 CAR, methods of use thereof for treating cancer in a subject, methods of production thereof, an anti-CD70 chimeric antigen receptor, and pharmaceutical compositions comprising such a population of cells.

The cells, methods, CARs, and compositions of Claims 1-2 (each in-part), 3-4, 5 (in-part), 6, 7-11 (each in-part), 12-13, 16 (in-part), 17, 18-19 (each in-part), 20-21, 42 (in-part), 43, 45-46, 52 (in-part), 53-54, 71-72 (each in-part), 73-74, 83-85, 89-91, 94-96 (each in-part), and 97 are believed to encompass the first named invention of Groups I+ and are the claims that will be searched to the extent that they comprise: an scFv encompassing SEQ ID No: 52 (first exemplary scFv aa sequence) comprising SEQ ID Nos: 205-207 & 209-211 (first exemplary CDR aa sequences) and SEQ ID Nos: 153 & 156 (first exemplary VH & VL aa sequences), encoded by SEQ ID No: 35 (first exemplary scFv nucleotide sequence) and SEQ ID Nos: 145 & 148 (first exemplary VH & VL nucleotide sequences); target sequences encompassing SEQ ID No: 180 (first exemplary CD70 target sequence), SEQ ID No: 191 (first exemplary CIS target sequence), and SEQ ID No: 185 (first exemplary Cbl-b target sequence); and an anti-CD70 CAR encompassing SEQ ID No: 218 (anti-CD70 CAR aa sequence). This first named invention of Group I+ has been selected to encompass the first species of each of the genera found in claims 1-2, 7-11, 19, and 71 based on the guidance set forth in section 10.54 of the PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines.

Applicant is invited to elect additional amino acid and nucleic acid sequences for each component, with specified SEQ ID NO: for each, or with specified substitution(s) at specified site(s) of a SEQ ID NO: such that the sequence of each elected species is fully specified (i.e. no optional or variable residues or substituents), and where available as an option within at least one searchable claim, to be searched. Additional sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be SEQ ID No: 47 (scFv aa sequence), SEQ ID No: 30 (scFv nucleotide sequence), SEQ ID No: 177 (CD70 target sequence), SEQ ID No: 186 (CIS target sequence), SEQ ID No: 192 (Cbl-b target sequence), SEQ ID Nos: 102, 104, 107, 131, 134, & 137 (CDR aa sequences), SEQ ID Nos: 151 & 154 (VH & VL aa sequences), SEQ ID Nos: 143 & 146 (VH & VL nucleotide sequences), SEQ ID No: 214 (anti-CD70 CAR aa sequence).

No technical features are shared between the amino acid and nucleotide sequences of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P	35/04	(2006.01)	A 6 1 P	35/04
A 6 1 K	40/15	(2025.01)	A 6 1 K	40/15
A 6 1 K	40/31	(2025.01)	A 6 1 K	40/31
A 6 1 K	40/42	(2025.01)	A 6 1 K	40/42

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(74)代理人 100221545

弁理士 白江 雄介

(72)発明者 コッホ, エリザベス エヌ

スイス、ツェーハー 6 3 0 0 ツーク、バーラーシュトラッセ 1 4、ファオ 8

(72)発明者 ウサディ, ジェイコブ

スイス、ツェーハー 6 3 0 0 ツーク、バーラーシュトラッセ 1 4、ファオ 8

(72)発明者 スリパックディヴォン, パリン

スイス、ツェーハー 6 3 0 0 ツーク、バーラーシュトラッセ 1 4、ファオ 8

(72)発明者 トレイガー, ジェイムズ バーナビー

アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州サウス・サンフランシスコ、ベテランズ・ブルバード 1 1 5 0

(72)発明者 チャン, アイバン

アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州サウス・サンフランシスコ、ベテランズ・ブルバード 1 1 5 0

(72)発明者 グオ, チャオ

アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州サウス・サンフランシスコ、ベテランズ・ブルバード 1 1 5 0

(72)発明者 グオ ブーレン, ルシュアン

アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州サウス・サンフランシスコ、ベテランズ・ブルバード 1 1 5 0

(72)発明者 ラゼティック, アレクサンドラ ライダ リアナ

アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州サウス・サンフランシスコ、ベテランズ・ブルバード 1 1 5 0

(72)発明者 ディクエアント, メアリーリー

スイス、ツェーハー 6 3 0 0 ツーク、バーラーシュトラッセ 1 4、ファオ 8

(72)発明者 ウォルドナー, ハンスピーター

スイス、ツェーハー 6 3 0 0 ツーク、バーラーシュトラッセ 1 4、ファオ 8

(72)発明者 グオ, チャンガン

スイス、ツェーハー 6 3 0 0 ツーク、バーラーシュトラッセ 1 4、ファオ 8

(72)発明者 マシラマニー, チャンディラセガラン

スイス、ツェーハー 6 3 0 0 ツーク、バーラーシュトラッセ 1 4、ファオ 8

(72)発明者 シエ, ミンホン

アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州サウス・サンフランシスコ、ベテランズ・ブルバード 1 1 5 0

F ターム (参考) 4B065 AA94X AB01 BA02 BA03 CA24 CA44