

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7542441号  
(P7542441)

(45)発行日 令和6年8月30日(2024.8.30)

(24)登録日 令和6年8月22日(2024.8.22)

(51)国際特許分類	F I		
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	Z N A	
C 1 2 N 5/0783(2010.01)	C 1 2 N 5/0783		
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28		
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00		

請求項の数 23 (全163頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2020-563430(P2020-563430)	(73)特許権者	518370079
(86)(22)出願日	令和1年5月10日(2019.5.10)		クリスパー セラピューティクス アクチ
(65)公表番号	特表2021-522820(P2021-522820		エンゲゼルシャフト
	A)		スイス国, 6 3 0 0 ツーク, バーラー
(43)公表日	令和3年9月2日(2021.9.2)		シュトラッセ 1 4
(86)国際出願番号	PCT/IB2019/000500	(74)代理人	100099759
(87)国際公開番号	WO2019/215500		弁理士 青木 篤
(87)国際公開日	令和1年11月14日(2019.11.14)	(74)代理人	100123582
審査請求日	令和4年5月10日(2022.5.10)		弁理士 三橋 真二
(31)優先権主張番号	62/756,643	(74)代理人	100092624
(32)優先日	平成30年11月7日(2018.11.7)		弁理士 鶴田 準一
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100114018
			弁理士 南山 知広
(31)優先権主張番号	62/670,417	(74)代理人	100117019
(32)優先日	平成30年5月11日(2018.5.11)		弁理士 渡辺 陽一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 癌を治療するための方法及び組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

操作されたT細胞又はその集団であって、前記操作されたT細胞が：

- ( i ) 破壊された T R A C 遺伝子；
- ( i i ) 破壊された 2 M 遺伝子；
- ( i i i ) 破壊された C D 7 0 遺伝子；及び
- ( i v ) C D 7 0 に結合するキメラ抗原受容体 ( C A R ) をコードする核酸を含む、操作されたT細胞又はその集団。

【請求項 2】

前記破壊された T R A C 遺伝子が、前記 C A R をコードする前記核酸を含む、請求項 1 に記載の操作されたT細胞又はその集団。 10

【請求項 3】

前記 C A R が、抗 C D 7 0 抗体を含む外部ドメインを含む、請求項 1 又は 2 に記載の操作されたT細胞又はその集団。

【請求項 4】

前記外部ドメインが、抗 C D 7 0 s c F v を含む、請求項 3 に記載の操作されたT細胞又はその集団。

【請求項 5】

前記抗 C D 7 0 s c F v が、参照抗体と同じ V H C D R 及び同じ V L C D R を含み、前記参照抗体が、配列番号 5 1 として記載される V H 及び配列番号 5 2 として記載され 20

る V L を含む、請求項 4 に記載の操作された T 細胞又はその集団。

【請求項 6】

前記抗 C D 7 0 s c F v が、それぞれ配列番号 5 1 及び 5 2 において記載されるアミノ酸配列を含む V H 及び V L 鎖を含む、請求項 5 に記載の操作された T 細胞又はその集団。

【請求項 7】

前記抗 C D 7 0 s c F v が、配列番号 4 8 又は 5 0 のアミノ酸配列を含む、請求項 6 に記載の操作された T 細胞又はその集団。

【請求項 8】

前記抗 C D 7 0 s c F v が、配列番号 5 0 のアミノ酸配列を含む、請求項 7 に記載の操作された T 細胞又はその集団。

10

【請求項 9】

前記 C A R が、C D 2 8 又は 4 1 B B 共刺激ドメインを含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の操作された T 細胞又はその集団。

【請求項 10】

前記 C A R が、C D 3 シグナル伝達ドメインを含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の操作された T 細胞又はその集団。

【請求項 11】

前記 C A R が、C D 8 膜貫通ドメインを含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の操作された T 細胞又はその集団。

【請求項 12】

前記操作された T 細胞が：  
 ( i ) 破壊された T R A C 遺伝子；  
 ( i i ) 破壊された 2 M 遺伝子；  
 ( i i i ) 破壊された C D 7 0 遺伝子；及び  
 ( i v ) ( a ) 抗 C D 7 0 s c F v を含む外部ドメイン、( b ) C D 8 膜貫通ドメイン、及び ( c ) 4 1 B B 共刺激ドメイン及び C D 3 シグナル伝達ドメインを含む内部ドメインを含む C A R をコードする核酸  
 を含む、請求項 4 ~ 11 のいずれか一項に記載の操作された T 細胞又はその集団。

20

【請求項 13】

前記 T R A C 遺伝子は、未改変の T 細胞と比較して欠失を含んでいる、請求項 2 ~ 12 のいずれか一項に記載の操作された T 細胞又はその集団。

30

【請求項 14】

前記欠失が、15 ~ 30 塩基対である、請求項 13 に記載の操作された T 細胞又はその集団。

【請求項 15】

前記欠失が、20 塩基対である、請求項 13 に記載の操作された T 細胞又はその集団。

【請求項 16】

前記欠失が、配列番号 86 を含む、請求項 13 に記載の操作された T 細胞又はその集団。

【請求項 17】

前記破壊された T R A C 遺伝子が、前記 C A R をコードする核酸を含み、前記 C A R が配列番号 46 に記載されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 に記載の操作された T 細胞又はその集団。

40

【請求項 18】

前記 C A R をコードする核酸が、配列番号 45 と少なくとも 90 % 同一である、請求項 17 に記載の操作された T 細胞又はその集団。

【請求項 19】

前記 C A R をコードする核酸が、配列番号 45 に記載される核酸配列を含む、請求項 18 に記載の操作された T 細胞又はその集団。

【請求項 20】

前記破壊された T R A C 遺伝子が、配列番号 44 に記載される核酸配列を含む、請求項

50

2 に記載の操作された T 細胞又はその集団。

【請求項 2 1】

前記操作された T 細胞が、破壊されたプログラム細胞死 - 1 ( P D - 1 ) 遺伝子を含む、請求項 1 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の操作された T 細胞又はその集団。

【請求項 2 2】

配列番号 9 ~ 1 4 のいずれか 1 つから選択される少なくとも 1 つのヌクレオチド配列を含む前記破壊された 2 M 遺伝子を含む、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の操作された T 細胞又はその集団。

【請求項 2 3】

前記操作された T 細胞の集団が、配列番号 1 2 9 ~ 1 3 4 のいずれか 1 つから選択される少なくとも 1 つのヌクレオチド配列を含む、前記破壊された C D 7 0 遺伝子を含む、請求項 1 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の操作された T 細胞又はその集団。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願

本出願は、2 0 1 8 年 5 月 1 1 日に提出された米国仮特許出願第 6 2 / 6 7 0 , 4 1 7 号；2 0 1 8 年 7 月 2 0 日に提出された米国仮特許出願第 6 2 / 7 0 1 , 3 4 0 号；2 0 1 8 年 1 1 月 7 日に提出された米国仮特許出願第 6 2 / 7 5 6 , 6 4 3 号；2 0 1 8 年 1 1 月 3 0 日に提出された米国仮特許出願第 6 2 / 7 7 3 , 6 5 8 号；及び 2 0 1 9 年 3 月 2 9 日に提出された米国仮特許出願第 6 2 / 8 2 6 , 6 0 0 号の利益を主張する。上で参照した特許出願の全内容は、この参照により本明細書に組み込まれる。

20

【背景技術】

【0 0 0 2】

キメラ抗原受容体 ( C A R ) T 細胞療法は、遺伝的に改変された T 細胞を使用して、癌細胞をより特異的に且つ効率的に標的化し且つ死滅させる。T 細胞が血液から回収された後、細胞は、それらの表面上に C A R を含むように操作される。C A R は、C R I S P R / C a s 9 遺伝子編集技術を使用して T 細胞に導入され得る。これらの異質遺伝子型の C A R T 細胞が患者に注射されるとき、受容体は、T 細胞が癌細胞を死滅させることを可能にする。

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 3】

いくつかの態様では、本開示は、操作された免疫細胞 (例えば、T 細胞) 及び内在性の C D 7 0 発現を破壊する (ノックアウト C D 7 0 ) C R I S P R / C a s 9 遺伝子編集技術を使用して編集された免疫細胞を生成する方法を提供する。

【0 0 0 4】

本開示のいくつかの態様では、C D 7 0 遺伝子の破壊を含む操作された免疫細胞 (例えば、T 細胞) を提供する。いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、破壊された C D 7 0 遺伝子及び C A R をコードする核酸を含む異質遺伝子型の T 細胞である。いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、C A R をコードする核酸の挿入によって破壊された T R A C 遺伝子、破壊された 2 M 遺伝子、及び破壊された C D 7 0 遺伝子を含む異質遺伝子型の T 細胞である。いくつかの実施形態では、T 細胞は、ヒト T 細胞である。いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞 (例えば、T 細胞) は、破壊された T R A C 遺伝子、破壊された B 2 M 遺伝子、破壊された C D 7 0 遺伝子、及び C A R をコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、破壊された T R A C 遺伝子は、C A R をコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞 (例えば、T 細胞) はさらに、破壊された P D - 1 遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、C A R をコードする核酸は、腫瘍抗原 (例えば、B C M A、C D 1 9、C D 3 3 又は C D 7 0 ) を標的化する。

40

【0 0 0 5】

50

いくつかの態様では、提供される操作された免疫細胞（例えば、T細胞）は、早期枯渇の予防、CAR T細胞増殖の増強、及び癌細胞死滅の効率の増大を含むT細胞機能の向上を示す。いくつかの態様では、提供される操作された免疫細胞（例えば、T細胞）は、未編集のT細胞又はCD70を発現する編集されたT細胞と比較して、継続性の安定した細胞増殖を示し、且つ細胞傷害性及びサイトカイン（例えば、IL-2及び/又はIFN-ガンマ）分泌の増加を示す。

【0006】

いくつかの態様では、本開示は、破壊されたCD70遺伝子及びCD70に結合しないCARをコードする核酸を含む操作されたT細胞を提供する。いくつかの態様では、操作されたT細胞は、破壊されたT細胞受容体アルファ定常領域（TRAC）遺伝子を含む。いくつかの態様では、破壊されたTRAC遺伝子は、CD70に結合しないCARをコードする核酸を含む。いくつかの態様では、操作されたT細胞は、破壊されたベータ-2-ミクログロブリン（ $\beta$ 2M）遺伝子を含む。

10

【0007】

いくつかの態様では、本開示は、(i)破壊されたTRAC遺伝子；(ii)破壊されたB2M遺伝子；(iii)破壊されたCD70遺伝子；及び(iv)CD70に結合しないCARをコードする核酸を含む操作されたT細胞を提供する。

【0008】

いくつかの態様では、本開示は、操作されたT細胞を含む細胞の集団であって、操作されたT細胞が、破壊されたCD70遺伝子及びCD70に結合しないCARをコードする核酸を含む細胞の集団を提供する。

20

【0009】

いくつかの態様では、細胞の集団中の操作されたT細胞は、破壊されたT細胞受容体アルファ定常領域（TRAC）遺伝子を含む。いくつかの態様では、破壊されたTRAC遺伝子は、CD70に結合しないCARをコードする核酸を含む。いくつかの態様では、細胞の集団中の操作されたT細胞は、破壊されたベータ-2-ミクログロブリン（ $\beta$ 2M）遺伝子を含む。

【0010】

いくつかの態様では、本開示は、操作されたT細胞を含む細胞の集団であって、操作されたT細胞が、(i)破壊されたTRAC遺伝子；(ii)破壊されたB2M遺伝子；(iii)破壊されたCD70遺伝子；及び(iv)CD70に結合しないCARをコードする核酸を含む細胞の集団を提供する。

30

【0011】

前述の又は関連する態様のいずれかにおいて、CARは、i-B細胞成熟抗原（BCMA）に結合する外部ドメインを含む。いくつかの態様では、外部ドメインは、抗BCMA抗体を含む。いくつかの態様では、外部ドメインは、抗BCMA一本鎖可変断片（scFv）を含む。いくつかの態様では、抗BCMA scFvは、可変重（VH）鎖相補性決定領域（CDR）及び参照抗体と同じ可変軽（VL）鎖CDRを含み、参照抗体は、配列番号60として記載されるVH及び配列番号61として記載されるVLを含む。いくつかの態様では、抗BCMA scFvは、それぞれ配列番号60及び61において記載されるアミノ酸配列を含むVH及びVL鎖を含む。いくつかの態様では、抗BCMA scFvは、配列番号59のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、抗BCMA scFvは、配列番号57と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされる。

40

【0012】

前述の又は関連する態様のいずれかにおいて、抗BCMA scFvは、配列番号59のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗BCMA scFvは、配列番号60のアミノ酸配列を含むVHを含む。いくつかの実施形態では、抗BCMA scFvは、配列番号61のアミノ酸配列を含むVLを含む。いくつかの実施形態では、抗BCMA scFvは、(i)配列番号80、配列番号82、及び/若しくは配列番号84又は(ii)

50

i) 配列番号 81、配列番号 83、若しくは配列番号 85 の CDR アミノ酸配列を含む V<sub>H</sub> を含み；且つ/又は抗 B C M A s c F v は、(i) 配列番号 74、配列番号 76、及び/又は配列番号 78 の CDR アミノ酸配列を含む V<sub>L</sub> 配列を含む。

【0013】

前述の又は関連する態様のいずれかにおいて、CAR は、CD33 に結合する外部ドメインを含む。いくつかの場合、外部ドメインは、抗 CD33 抗体を含む。いくつかの態様では、外部ドメインは、抗 CD33 s c F v を含む。いくつかの態様では、抗 CD33 s c F v は、参照抗体と同じ V<sub>H</sub> CDR 及び同じ V<sub>L</sub> 鎖 CDR を含み、参照抗体は、配列番号 140 として記載される V<sub>H</sub> 及び配列番号 141 として記載される V<sub>L</sub> を含む。いくつかの態様では、抗 CD33 s c F v は、それぞれ配列番号 140 及び 141 において記載されるアミノ酸配列を含む V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> 鎖を含む。いくつかの態様では、抗 CD33 s c F v は、配列番号 137 のアミノ酸配列を含む。

10

【0014】

前述の又は関連する態様のいずれかにおいて、CAR は、CD19 に結合する外部ドメインを含む。いくつかの態様では、外部ドメインは、抗 CD19 抗体を含む。いくつかの態様では、外部ドメインは、抗 CD19 s c F v を含む。いくつかの態様では、抗 CD19 s c F v は、参照抗体と同じ V<sub>H</sub> CDR 及び同じ V<sub>L</sub> 鎖 CDR を含み、参照抗体は、配列番号 152 として記載される V<sub>H</sub> 及び配列番号 153 として記載される V<sub>L</sub> を含む。いくつかの態様では、抗 CD19 s c F v は、それぞれ配列番号 152 及び 153 において記載されるアミノ酸配列を含む V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> 鎖を含む。いくつかの態様では、抗 CD19 s c F v は、配列番号 151 のアミノ酸配列を含む。

20

【0015】

いくつかの態様では、本開示は、(i) 破壊された T R A C 遺伝子；(ii) 破壊された B 2 M 遺伝子；(iii) 破壊された C D 7 0 遺伝子；及び(iv) C D 7 0 に結合する CAR をコードする核酸を含む操作された T 細胞を提供する。いくつかの態様では、破壊された T R A C 遺伝子は、CAR をコードする核酸を含む。

【0016】

いくつかの態様では、本開示は、操作された T 細胞を含む細胞の集団であって、操作された T 細胞が、(i) 破壊された T R A C 遺伝子；(ii) 破壊された B 2 M 遺伝子；(iii) 破壊された C D 7 0 遺伝子；及び(iv) C D 7 0 に結合する CAR をコードする核酸を含む細胞の集団を提供する。

30

【0017】

いくつかの態様では、本開示は、操作された T 細胞を含む細胞の集団であって、操作された T 細胞が、

- (i) 破壊された T R A C 遺伝子；
- (ii) 破壊された 2 M 遺伝子；
- (iii) 破壊された C D 7 0 遺伝子
- (iv) (a) 抗 C D 7 0 s c F v を含む外部ドメイン、(b) C D 8 膜貫通ドメイン、及び(c) 4 1 B B 共刺激ドメイン及び C D 3 z シグナル伝達ドメインを含む内部ドメインを含む CAR をコードする核酸を含む細胞の集団を提供する。

40

【0018】

前述の又は関連する態様のいずれかにおいて、CD70 に結合する CAR は、抗 CD70 抗体を含む外部ドメインを含む。いくつかの態様では、CAR は、抗 CD70 s c F v を含む外部ドメインを含む。いくつかの態様では、抗 CD70 s c F v は、参照抗体と同じ V<sub>H</sub> CDR 及び同じ V<sub>L</sub> CDR を含み、参照抗体は、配列番号 51 として記載される V<sub>H</sub> 及び配列番号 52 として記載される V<sub>L</sub> を含む。いくつかの態様では、抗 CD70 s c F v は、それぞれ配列番号 51 及び 52 において記載されるアミノ酸配列を含む V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> 鎖を含む。いくつかの態様では、抗 CD70 s c F v は、配列番号 48 又は 50 のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、抗 CD70 s c F v は、配列番号 50 のアミノ酸配列を含む。

50

## 【 0 0 1 9 】

前述の又は関連する態様のいずれかにおいて、抗CD70 s c F vは、配列番号51のアミノ酸配列を含むV Hを含む。いくつかの実施形態では、抗CD70 s c F vは、配列番号52のアミノ酸配列を含むV Lを含む。いくつかの実施形態では、抗CD70 s c F vは、( i )配列番号68、配列番号70、及び/若しくは配列番号72又は( i i )配列番号69、配列番号71、及び/若しくは配列番号73のCDRアミノ酸配列を含むV Hを含み；且つ/又は抗CD70 s c F vは、( i )配列番号62、配列番号64、及び/若しくは配列番号66又は( i i )配列番号配列番号63、配列番号65、及び/若しくは配列番号67のCDRアミノ酸配列を含むV L配列を含む。

## 【 0 0 2 0 】

前述の又は関連する態様のいずれかにおいて、C A Rは、CD28又は41BB共刺激ドメインを含む。前述の又は関連する態様のいずれかにおいて、C A Rは、CD3シグナル伝達ドメインを含む。前述の又は関連する態様のいずれかにおいて、C A Rは、CD8膜貫通ドメインを含む。

## 【 0 0 2 1 】

前述の又は関連する態様のいずれかにおいて、未改変T細胞と比較してT R A C遺伝子の欠失がある。いくつかの態様では、欠失は、15～30塩基対である。いくつかの態様では、欠失は、20塩基対である。いくつかの態様では、欠失は、配列番号86を含む。いくつかの態様では、欠失は、配列番号86である。

## 【 0 0 2 2 】

いくつかの態様では、本開示は、破壊されたCD70遺伝子及びCD70に結合するC A Rをコードする核酸を含む操作されたT細胞を提供し、C A Rは、配列番号46に記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、本開示は、破壊されたCD70遺伝子、及びCD70に結合するC A Rをコードする核酸を含む操作されたT細胞を提供し、核酸配列は、配列番号45と少なくとも90%同一である。いくつかの態様では、本開示は、破壊されたCD70遺伝子、及びCD70に結合するC A Rをコードする核酸を含む操作されたT細胞を提供し、核酸配列は、配列番号45である。

## 【 0 0 2 3 】

いくつかの実施形態では、CD70遺伝子は、C R I S P R / C a s 9遺伝子編集によって破壊される。いくつかの実施形態では、T R A C遺伝子は、C R I S P R / C a s 9遺伝子編集によって破壊される。いくつかの実施形態では、B2M遺伝子は、C R I S P R / C a s 9遺伝子編集によって破壊される。いくつかの実施形態では、P D - 1遺伝子は、C R I S P R / C a s 9遺伝子編集によって破壊される。

## 【 0 0 2 4 】

いくつかの態様では、本開示は、  
 ( i )破壊されたT R A C遺伝子であって、破壊されたT R A C遺伝子が、配列番号46に記載されるアミノ酸配列を含むC A Rをコードする核酸を含む破壊されたT R A C遺伝子；  
 ( i i )破壊されたB2M遺伝子；及び  
 ( i i i )破壊されたCD70遺伝子を含む操作されたT細胞を提供する。いくつかの実施形態では、C A Rをコードする核酸は、配列番号45と少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一の配列を含む。

## 【 0 0 2 5 】

他の態様では、本開示は、  
 ( i )破壊されたT R A C遺伝子であって、破壊されたT R A C遺伝子が、C A Rをコードする核酸を含み、核酸配列が、配列番号45と少なくとも90%同一である破壊されたT R A C遺伝子；  
 ( i i )破壊されたB2M遺伝子；及び  
 ( i i i )破壊されたCD70遺伝子を含む操作されたT細胞を提供する。いくつかの実

10

20

30

40

50

施形態では、破壊された T R A C 遺伝子は、配列番号 4 5 又は配列番号 4 4 に記載されるヌクレオチド配列を含むドナー配列を含む。

【 0 0 2 6 】

いくつかの態様では、本開示は、

- ( i ) 配列番号 4 4 と少なくとも 9 0 % 同一の核酸配列を含む破壊された T R A C 遺伝子；
- ( i i ) 破壊された B 2 M 遺伝子；及び
- ( i i i ) 破壊された C D 7 0 遺伝子を含む操作された T 細胞を提供する。

【 0 0 2 7 】

いくつかの態様では、本開示は、

- ( i ) 配列番号 4 4 の核酸配列を含む破壊された T R A C 遺伝子；
- ( i i ) 破壊された B 2 M 遺伝子；及び
- ( i i i ) 破壊された C D 7 0 遺伝子を含む操作された T 細胞を提供する。

10

【 0 0 2 8 】

前述の又は関連する態様のいずれかにおいて、操作された T 細胞は、破壊された P D - 1 遺伝子を含む。いくつかの態様では、操作された免疫細胞は、C A R をコードする核酸の挿入によって破壊された T R A C 遺伝子、破壊された 2 M 遺伝子、及び破壊された P D - 1 遺伝子を含む異質遺伝子型の T 細胞である。いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞（例えば、T 細胞）はさらに、破壊された C D 7 0 遺伝子を含む。

【 0 0 2 9 】

前述の又は関連する態様のいずれかにおいて、操作された T 細胞は、標的細胞であって、標的細胞が、C A R に特異的な抗原を発現する標的細胞による 5 回の再チャレンジの後に細胞傷害性を維持する。いくつかの態様では、操作された T 細胞は、標的細胞による 1 0 回の再チャレンジの後に細胞傷害性を維持する。いくつかの態様では、標的細胞は、癌細胞である。いくつかの態様では、標的細胞は、血液癌又は固形腫瘍の癌細胞である。

20

【 0 0 3 0 】

前述の又は関連する態様のいずれかにおいて、操作された T 細胞又は細胞の集団は、配列番号 5 7 のアミノ酸配列を含む C A R を含む。いくつかの態様では、C A R は、配列番号 5 6 と少なくとも 9 0 % の同一性を有する核酸配列によってコードされる。

【 0 0 3 1 】

前述の又は関連する態様のいずれかにおいて、操作された T 細胞又は細胞の集団は、配列番号 1 3 9 のアミノ酸配列を含む C A R を含む。いくつかの態様では、C A R は、配列番号 1 3 6 と少なくとも 9 0 % の同一性を有する核酸配列によってコードされる。

30

【 0 0 3 2 】

前述の又は関連する態様のいずれかにおいて、操作された T 細胞又は細胞の集団は、配列番号 1 4 9 のアミノ酸配列を含む C A R を含む。いくつかの態様では、C A R は、配列番号 1 4 8 と少なくとも 9 0 % の同一性を有する核酸配列によってコードされる。

【 0 0 3 3 】

前述の又は関連する態様のいずれかにおいて、操作された T 細胞又は細胞の集団は、配列番号 4 6 のアミノ酸配列を含む C A R を含む。いくつかの態様では、C A R は、配列番号 4 5 と少なくとも 9 0 % の同一性を有する核酸配列によってコードされる。

40

【 0 0 3 4 】

本開示の他の態様は、本明細書に記載される操作された免疫細胞（例えば、T 細胞）のいずれかを含む細胞の集団を提供する。いくつかの実施形態では、細胞の集団は、C A R をコードする核酸の挿入によって破壊された T R A C 遺伝子、破壊された 2 M 遺伝子、及び破壊された C D 7 0 遺伝子を含む T 細胞を含む。いくつかの実施形態では、細胞の集団は、破壊された T R A C 遺伝子、破壊された B 2 M 遺伝子、破壊された C D 7 0 遺伝子、及び C A R をコードする核酸を含む T 細胞を含む。いくつかの実施形態では、細胞の集団は、破壊された T R A C 遺伝子を含む T 細胞を含み、破壊された T R A C 遺伝子は、C A R をコードする核酸、破壊された B 2 M 遺伝子、及び破壊された C D 7 0 遺伝子を含む。

【 0 0 3 5 】

50

いくつかの態様では、本開示は、操作されたT細胞を含む細胞の集団であって、操作されたT細胞が、

(i) 破壊されたTRAC遺伝子であって、破壊されたTRAC遺伝子が、(a) 抗CD70抗原結合断片を含む外部ドメイン、(b) CD8膜貫通ドメイン、及び(c) 41BB共刺激ドメイン及びCD3 $\zeta$ シグナル伝達ドメインを含む内部ドメインを含むCARをコードする核酸を含む破壊されたTRAC遺伝子；

(ii) 破壊されたベータ-2-ミクログロブリン(B2M)遺伝子；及び

(iii) 破壊されたCD70遺伝子を含む細胞の集団を提供する。

【0036】

いくつかの態様では、本開示は、操作されたT細胞を含む細胞の集団であって、操作されたT細胞が、

(i) 破壊されたTRAC遺伝子であって、破壊されたTRAC遺伝子が、配列番号46に記載されるアミノ酸配列を含むCARをコードする核酸を含む破壊されたTRAC遺伝子；

(ii) 破壊された2M遺伝子；及び

(iii) 破壊されたCD70遺伝子を含む細胞の集団を提供する。

【0037】

他の態様では、本開示は、操作されたT細胞を含む細胞の集団であって、操作されたT細胞が、

(i) 破壊されたTRAC遺伝子であって、破壊されたTRAC遺伝子が、CARをコードする核酸を含み、核酸配列が、配列番号45と少なくとも90%同一である破壊されたTRAC遺伝子；

(ii) 破壊された2M遺伝子；及び

(iii) 破壊されたCD70遺伝子を含む細胞の集団を提供する。いくつかの態様では、破壊されたTRAC遺伝子は、配列番号45に記載される核酸配列を含む。

【0038】

いくつかの態様では、本開示は、操作されたT細胞を含む細胞の集団であって、操作されたT細胞が、

(i) 配列番号44と少なくとも90%同一の核酸配列を含む破壊されたTRAC遺伝子；

(ii) 破壊された2M遺伝子；及び

(iii) 破壊されたCD70遺伝子を含む細胞の集団を提供する。いくつかの態様では、破壊されたTRAC遺伝子は、配列番号44に記載される核酸配列を含む。

【0039】

いくつかの実施形態では、CARは、CD3 $\zeta$ シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、CARは、CD8膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、CARは、CD28又は41BB共刺激ドメインを含む。

【0040】

細胞の集団の前述の又は関連する態様のいずれかにおいて、破壊された2M遺伝子は、配列番号9~14のいずれか1つから選択される少なくとも1つのヌクレオチド配列を含む。細胞の集団の前述の又は関連する態様のいずれかにおいて、破壊されたCD70遺伝子は、配列番号129~134のいずれか1つから選択される少なくとも1つのヌクレオチド配列を含む。

【0041】

いくつかの実施形態では、TRAC遺伝子は、配列番号45のヌクレオチド配列を含み、且つ/又は抗CD70 CARをコードする核酸は、配列番号45のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、TRAC遺伝子は、配列番号45のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、TRAC遺伝子は、配列番号44のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、TRAC遺伝子は、配列番号56のヌクレオチド配列を含み、且つ/又は抗BCMA CARをコードする核酸は、配列番号56のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、TRAC遺伝子は、配列番号56のヌクレオチ

10

20

30

40

50

ド配列を含む。いくつかの実施形態では、T R A C 遺伝子は、配列番号 5 5 のヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 4 2 】

いくつかの実施形態では、T R A C 遺伝子は、配列番号 1 5 6 のヌクレオチド配列を含み、且つ / 又は抗 C D 1 9 C A R をコードする核酸は、配列番号 1 4 8 のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、T R A C 遺伝子は、配列番号 1 4 8 のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、T R A C 遺伝子は、配列番号 1 5 6 のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、T R A C 遺伝子は、配列番号 1 3 5 のヌクレオチド配列を含み、且つ / 又は抗 C D 3 3 C A R をコードする核酸は、配列番号 1 3 6 のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、T R A C 遺伝子は、配列番号 1 3 6 のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、T R A C 遺伝子は、配列番号 1 3 5 のヌクレオチド配列を含む。

10

【 0 0 4 3 】

前述の態様のいずれかにおいて、操作された T 細胞は、対照 T 細胞であって、対照 T 細胞が内在性 C D 7 0 タンパク質を発現する対照 T 細胞と比較して、( a ) 細胞増殖能の増大を示すか；

( b ) 細胞溶解の増大を示すか；

( c ) 細胞枯渇の減少を示すか；

( d ) サイトカイン依存性増殖を維持するか；

( e ) サイトカイン分泌の増大を示すか；又は

( f ) ( a ) ~ ( e ) の任意の組合せ

を示す。

20

【 0 0 4 4 】

いくつかの実施形態では、操作された T 細胞の少なくとも 5 0 %、任意選択により 5 0 % ~ 6 5 % は、検出可能なレベルの T C R 表面タンパク質を発現せず、検出可能なレベルの 2 M 表面タンパク質を発現せず、検出可能なレベルの C D 7 0 表面タンパク質を発現せず、且つ / 又は検出可能なレベルの C A R を発現する。

【 0 0 4 5 】

いくつかの実施形態では、操作された T 細胞の少なくとも 9 0 %、任意選択により 9 0 ~ 1 0 0 % は、検出可能なレベルの T C R 表面タンパク質を発現しない。いくつかの実施形態では、操作された T 細胞の 9 9 . 5 % より多くは、検出可能なレベルの T C R 表面タンパク質を発現しない。

30

【 0 0 4 6 】

いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞（例えば、T 細胞）の少なくとも 6 0 %、任意選択により 6 0 ~ 7 5 % は、検出可能なレベルの 2 M 表面タンパク質を発現しない。

【 0 0 4 7 】

いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞（例えば、T 細胞）の少なくとも 8 0 %、任意選択により 8 0 ~ 1 0 0 % は、検出可能なレベルの C D 7 0 表面タンパク質を発現しない。

40

【 0 0 4 8 】

いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞（例えば、T 細胞）の少なくとも 8 0 %、任意選択により 8 0 % ~ 9 5 % は、検出可能なレベルの C A R（例えば、抗 C D 7 0 C A R 又は抗 B C M A C A R）を発現する。

【 0 0 4 9 】

いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞（例えば、T 細胞）はさらに、破壊された P D - 1 遺伝子を含む。

【 0 0 5 0 】

いくつかの実施形態では、操作された T 細胞の少なくとも 5 0 %、任意選択により 5 0 % ~ 7 0 % は、検出可能なレベルの T C R 表面タンパク質を発現せず、検出可能なレベル

50

の 2 M 表面タンパク質を発現せず、検出可能なレベルの P D 1 表面タンパク質を発現せず、検出可能なレベルの C D 7 0 表面タンパク質を発現せず、且つ / 又は検出可能なレベルの C A R を発現する。

【 0 0 5 1 】

いくつかの態様では、本開示は、操作された T 細胞を生成するための方法であって、

( a ) T 細胞に

R N A 誘導型ヌクレアーゼ、

C D 7 0 遺伝子を標的化する g R N A、及び

C A R をコードする核酸を含むドナー鋳型を含むベクターを送達すること；並びに

( b ) 破壊された C D 7 0 遺伝子を含み且つ C A R を発現する操作された T 細胞を生成することを  
含む方法を提供する。 10

【 0 0 5 2 】

いくつかの態様では、方法はさらに、T細胞に T R A C 遺伝子を標的化する g R N A を送達することを含み；操作された T 細胞はさらに、破壊された T R A C 遺伝子を含む。いくつかの態様では、C A R をコードする核酸は、T R A C 遺伝子に対する左及び右の相同性アームと隣接し；且つ操作された T 細胞は、T R A C 遺伝子中に C A R をコードする核酸を含む。いくつかの態様では、方法はさらに、T細胞に 2 M 遺伝子を標的化する g R N A を送達することを含み；操作された T 細胞はさらに、破壊された 2 M 遺伝子を含む。

【 0 0 5 3 】

本明細書ではまた、操作された T 細胞を生成するための方法であって、( a ) T 細胞に R N A 誘導型ヌクレアーゼ、T R A C 遺伝子を標的化する g R N A、2 M 遺伝子を標的化する g R N A、C D 7 0 遺伝子を標的化する g R N A、及び C A R をコードする核酸を含むドナー鋳型を含むベクターを送達すること（任意選択により、C A R をコードする核酸は、T R A C 遺伝子座位に対する左及び右の相同性アームと隣接する）、及び ( b ) 操作された T 細胞を生成することを含む方法が提供される。 20

【 0 0 5 4 】

いくつかの実施形態では、R N A 誘導型ヌクレアーゼは、C a s 9 ヌクレアーゼ、任意選択によりストレプトコッカス・ピオゲネス ( S t r e p t o c o c c u s p y o g e n e s ) C a s 9 ヌクレアーゼである。他の R N A 誘導型ヌクレアーゼが使用されてもよく、下に記載される。 30

【 0 0 5 5 】

いくつかの実施形態では、T R A C 遺伝子を標的化する g R N A は、配列番号 9 8 のヌクレオチド配列を含むか又は配列番号 1 1 8 のヌクレオチド配列を標的化し、且つ任意選択により、T R A C 遺伝子を標的化する g R N A は、配列番号 3 0 のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、2 M 遺伝子を標的化する g R N A は、配列番号 9 9 のヌクレオチド配列を含むか又は配列番号 1 1 9 のヌクレオチド配列を標的化し、且つ任意選択により、2 M 遺伝子を標的化する g R N A は、配列番号 3 1 のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、C D 7 0 遺伝子を標的化する g R N A は、配列番号 9 4 若しくは 9 5 のヌクレオチド配列を含むか又は配列番号 1 1 4 若しくは 1 1 5 のヌクレオチド配列を標的化し、且つ任意選択により、C D 7 0 遺伝子を標的化する g R N A は、配列番号 2 6 又は 2 7 のヌクレオチド配列を含む。 40

【 0 0 5 6 】

前述の態様のいずれかにおいて、R N A 誘導型ヌクレアーゼ及び g R N A は、リボ核タンパク質 ( r i b o n u c l e o r o t e i n ) 粒子 ( R N P ) 中で複合体を形成する。

【 0 0 5 7 】

いくつかの実施形態では、方法はさらに、T細胞に P D - 1 遺伝子を標的化する g R N A を送達することを含む。

【 0 0 5 8 】

いくつかの実施形態では、P D - 1 遺伝子を標的化する g R N A は、配列番号 1 0 0 のヌクレオチド配列を含むか又は配列番号 1 2 0 のヌクレオチド配列を標的化し、且つ任意 50

選択により、PD-1遺伝子を標的化するgRNAは、配列番号32のヌクレオチド配列を含む。

【0059】

いくつかの態様では、本開示は、標的細胞に対する免疫療法のための操作されたT細胞を生成するための方法であって、

(a) T細胞中のCD70遺伝子を破壊すること、及び

(b) 標的細胞上で発現される抗原(抗原は、CD70ではない)に結合するCARを発現させることを含む方法を提供する。いくつかの態様では、標的細胞は、癌細胞である。いくつかの態様では、方法は、エキスピゴである。いくつかの態様では、方法はさらに、T細胞中のTRAC遺伝子を破壊することを含むことを含む。いくつかの態様では、方法はさらに、T細胞中の2M遺伝子を破壊することを含む。いくつかの態様では、CARは、破壊されたTRAC遺伝子中の核酸によってコードされる。いくつかの態様では、CARは、本明細書に記載されるCARのいずれか1つである。

10

【0060】

いくつかの態様では、本開示は、本明細書に記載される方法のいずれか1つによって生成される操作されたT細胞の集団を提供する。

【0061】

いくつかの態様では、本開示は、T細胞の増殖を増大させる方法であって、T細胞中のCD70遺伝子を破壊することを含む方法を提供する。いくつかの態様では、本開示は、T細胞の枯渇を減少させる方法であって、T細胞中のCD70遺伝子を破壊することを含む方法を提供する。前述の態様のいずれかにおいて、CD70遺伝子は、CRISPR/Cas遺伝子編集によって破壊される。いくつかの態様では、方法はさらに、T細胞中のTRAC遺伝子、2M遺伝子、又はTRAC及び2M遺伝子の両方を破壊することを含む。いくつかの態様では、TRAC遺伝子、2M遺伝子又はTRAC及び2M遺伝子の両方は、CRISPR/Cas遺伝子編集によって破壊される。

20

【0062】

いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号46のアミノ酸配列を含むCARをコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号57のアミノ酸配列を含むCARをコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号149のアミノ酸配列を含むCARをコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号139のアミノ酸配列を含むCARをコードする核酸を含む。

30

【0063】

いくつかの態様では、本開示は、対象に本明細書に記載される細胞又は操作されたT細胞の集団を投与するための方法を提供する。いくつかの態様では、操作されたT細胞は、操作されたヒトT細胞である。いくつかの態様では、対象は、癌を有する。いくつかの態様では、癌は、CD70、BMCA、CD19、CD33又はこれらの組合せを発現する。いくつかの態様では、細胞の集団は、癌を治療するのに有効な量で対象に投与される。いくつかの態様では、癌は、固形悪性腫瘍又は血液悪性腫瘍である。いくつかの態様では、固形悪性腫瘍は、卵巣腫瘍、膵臓腫瘍、腎臓腫瘍、肺腫瘍、及び腸腫瘍からなる群から選択される。いくつかの態様では、細胞の集団は、対象における腫瘍の体積を減少させるのに有効な量で対象に投与される。

40

【0064】

いくつかの態様では、本開示は、対象における癌を治療するための方法であって、対象に本明細書に記載される細胞又は操作されたT細胞の集団を投与することを含む方法を提供する。

【0065】

いくつかの態様では、本開示は、対象における癌を治療するための方法であって、操作されたT細胞であって、破壊されたCD70遺伝子及びCARをコードする核酸を含む操作されたT細胞を含む細胞の集団を患者に投与し、それにより対象における癌を治療することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、CARは、CD70に結合する。

50

いくつかの実施形態では、CARは、CD70に結合しない。

【0066】

他の態様では、本開示は、対象における癌を治療するための方法であって、操作されたT細胞を含む細胞の集団であって、操作されたT細胞が、

- (i) 破壊されたTRAC遺伝子；
- (ii) 破壊されたB2M遺伝子；
- (iii) 破壊されたCD70遺伝子；及び
- (iv) CARをコードする核酸を含む細胞の集団を患者に投与し、それにより対象における癌を治療することを含む方法を提供する。

【0067】

さらに他の態様では、本開示は、対象における癌を治療するための方法であって、操作されたT細胞を含む細胞の集団であって、操作されたT細胞が、

- (i) 破壊されたTRAC遺伝子；
- (ii) 破壊されたB2M遺伝子；
- (iii) 破壊されたCD70遺伝子；及び
- (iv) (a) 抗CD70抗原結合断片を含む外部ドメイン、(b) CD8膜貫通ドメイン、及び(c) 41BB共刺激ドメイン及びCD3ζシグナル伝達ドメインを含む内部ドメインを含むCARをコードする核酸を含む細胞の集団を患者に投与し、それにより対象における癌を治療することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、CARは、配列番号46のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CARをコードする核酸は、配列番号45のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、破壊されたTRAC遺伝子は、配列番号45又は配列番号44のヌクレオチド配列を含む。

【0068】

いくつかの態様では、本開示は、対象における癌を治療する方法であって、操作されたT細胞を含む細胞の集団であって、操作されたT細胞が、

- (i) 破壊されたTRAC遺伝子であって、破壊されたTRAC遺伝子が、配列番号46に記載されるアミノ酸配列を含むCARをコードする核酸を含む破壊されたTRAC遺伝子；
- (ii) 破壊されたB2M遺伝子；及び
- (iii) 破壊されたCD70遺伝子を含む細胞の集団を対象に投与し、それにより対象における癌を治療することを含む方法を提供する。

【0069】

いくつかの態様では、本開示は、対象における癌を治療する方法であって、操作されたT細胞を含む細胞の集団であって、操作されたT細胞が、

- (i) 破壊されたTRAC遺伝子であって、破壊されたTRAC遺伝子が、CARをコードする核酸を含み、核酸配列が、配列番号45と少なくとも90%同一である破壊されたTRAC遺伝子；
- (ii) 破壊されたB2M遺伝子；及び
- (iii) 破壊されたCD70遺伝子を含む細胞の集団を対象に投与し、それにより対象における癌を治療することを含む方法を提供する。いくつかの態様では、破壊されたTRAC遺伝子は、配列番号45に記載される核酸配列を含む。

【0070】

いくつかの態様では、本開示は、対象における癌を治療する方法であって、操作されたT細胞を含む細胞の集団であって、操作されたT細胞が、

- (i) 配列番号44と少なくとも90%同一の核酸配列を含む破壊されたTRAC遺伝子；
- (ii) 破壊されたB2M遺伝子；及び
- (iii) 破壊されたCD70遺伝子を含む細胞の集団を対象に投与し、それにより対象における癌を治療することを含む方法を提供する。いくつかの態様では、破壊されたTRAC遺伝子は、配列番号44に記載される核酸配列を含む。

【0071】

10

20

30

40

50

前述の又は関連する態様のいずれかにおいて、操作されたT細胞は、操作されたヒトT細胞である。いくつかの実施形態では、操作されたT細胞は、操作された異質遺伝子型のT細胞である。

【図面の簡単な説明】

【0072】

【図1】TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>（四重ノックアウト）T細胞における非常に効率的な多重遺伝子編集を示すグラフを含む。

【図2】多重遺伝子編集された細胞の間で同様の増殖を示すグラフを含む。

【図3】TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup>（すなわち、3X KO（CD70）、CD70 CAR<sup>+</sup>）T細胞における効率的な多重遺伝子編集を示すグラフを含む。

10

【図4】CD4<sup>+</sup>及びCD8<sup>+</sup>T細胞の正常な集団が、TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup>T細胞集団の間で維持されることを示すグラフを含む。

【図5】TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup>T細胞における効率的な多重遺伝子編集を示すグラフを含む。

【図6】CD4<sup>+</sup>及びCD8<sup>+</sup>T細胞の正常な集団が、TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup>（すなわち、4X KO、CD70 CAR<sup>+</sup>）T細胞集団の間で維持されることを示すグラフを含む。

【図7A】多重遺伝子編集による抗BCMA CAR<sup>+</sup>T細胞の特徴付けに関連するデータを示すグラフを含む。二重ノックアウトTRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/抗BCMA CAR<sup>+</sup>T細胞及び四重ノックアウトTRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗BCMA CAR<sup>+</sup>T細胞は、TRAC及び2M（図7A）、PD-1及びCD70（図7B）、並びにBCMA CAR（図7C）発現について染色された。抗BCMA CARは、二重及び四重ノックアウトCAR<sup>+</sup>T細胞の両方においておよそ80%で発現された。

20

【図7B】（同上）

【図7C】（同上）

【図8】3週間にわたって2X KO（TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>）抗CD33 CAR<sup>+</sup>T細胞と比較した3X KO（TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>）抗CD33 CAR<sup>+</sup>T細胞におけるCD4<sup>+</sup>細胞の減少の阻止を示すフローサイトメトリープロットを含む。

【図9】CD70 KOが、2週間にわたって抗CD33 CAR<sup>+</sup>T細胞において細胞増殖を増強したことを示すグラフを含む。生存細胞の総数は、3X KO（TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>）及び2X KO（TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>）抗CD33 CAR<sup>+</sup>T細胞において定量化された。

30

【図10】CD70 KOが、2週間にわたって抗CD19 CAR<sup>+</sup>T細胞において細胞増殖を増強したことを示すグラフを含む。生存細胞の総数は、3X KO（TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>）及び2X KO（TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>）抗CD33 CAR<sup>+</sup>T細胞において定量化された。

【図11】CD70 KOが、抗BCMA CAR<sup>+</sup>T細胞における細胞増殖を増強し、且つBCMA CAR<sup>+</sup>細胞増殖に対するPD1 KOの有害な作用をレスキューしたことを示すグラフを含む。生存細胞の総数は、4X KO（TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/PD1<sup>-</sup>）、3X KO（CD70）（TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>）、3X KO（PD1）（TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD1<sup>-</sup>）及び2X KO（TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>）抗CD33 CAR<sup>+</sup>T細胞において定量化された。

40

【図12】CD70 KOが、抗BCMA CAR<sup>+</sup>T細胞における細胞増殖を増強し、且つBCMA CAR<sup>+</sup>細胞増殖に対するPD1 KOの有害な作用をレスキューしたことを示すグラフを含む。生存細胞の総数は、4X KO（TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/PD1<sup>-</sup>）、3X KO（CD70）（TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>）、3X KO（PD1）（TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD1<sup>-</sup>）及び2X KO（TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>）抗CD33 CAR<sup>+</sup>T細胞において定量化された。抗BCMA CAR<sup>+</sup>T細胞は、図11に示されるCAR<sup>+</sup>T細胞と異なるドナーT細胞に由来した。

50

【図13】2X KO (TRAC<sup>-</sup> / B2M<sup>-</sup>) 抗BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞及び3X KO (TRAC<sup>-</sup> / B2M<sup>-</sup> / CD70<sup>-</sup>) 抗BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞における抗原暴露に起因するアポトーシス性の細胞死の比較を示すグラフを含む。CAR<sup>+</sup> T細胞は、プレート結合BCMA抗原に24時間暴露され、24時間毎の再チャレンジを伴い、アポトーシスは、フローサイトメトリーによって各抗原チャレンジの後に評価された。抗原チャレンジに起因するアポトーシスの誘導は、それらが無いものと比較して、CD70 KOを有する抗BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞において低かった。

【図14】2X KO (TRAC<sup>-</sup> / B2M<sup>-</sup>) 抗BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞及び3X KO (TRAC<sup>-</sup> / B2M<sup>-</sup> / CD70<sup>-</sup>) 抗BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞における抗原暴露後のCAR<sup>+</sup> T細胞増殖の比較を示すグラフを含む。CAR<sup>+</sup> T細胞は、プレート結合BCMA抗原に24時間暴露され、24時間毎の再チャレンジを伴い、細胞増殖は、各抗原チャレンジの後に評価され、0時間での細胞数に標準化された。抗原チャレンジ後の細胞数の増殖は、それらが無いものと比較して、CD70 KOを有する抗BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞において高かった。

10

【図15】TRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / CD70<sup>-</sup> / 抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞における強い細胞増殖を示すグラフを含む。生存細胞の総数は、3X KO (TRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / CD70<sup>-</sup>) 及び2X KO (TRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup>) 抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞において定量化された。3X KO細胞は、CD70 sgRNA T7又はT8のいずれかにより生成された。

【図16】TRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / PD1<sup>-</sup> / CD70<sup>-</sup> / 抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞における強い細胞増殖を示すグラフを含む。生存細胞の総数は、4X KO (TRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / PD1<sup>-</sup> / CD70<sup>-</sup>)、3X KO (TRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / PD1<sup>-</sup>) 及び2X KO (TRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup>) 抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞において定量化された。

20

【図17】抗CD19 CAR<sup>+</sup> T細胞 (TRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / CD70<sup>-</sup> / 抗CD19 CAR<sup>+</sup> 又は TRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / 抗CD19 CAR<sup>+</sup> T細胞) によるNa1m6 (上部パネル) 細胞及びRaji (下部パネル) 細胞の両方の強い細胞の死滅を示すグラフを含む。

【図18】抗CD33 CAR<sup>+</sup> T細胞 (TRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / CD70<sup>-</sup> / 抗CD33 CAR<sup>+</sup> 又は TRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / 抗CD33 CAR<sup>+</sup> T細胞) によるMV411細胞の強い細胞の死滅を示すグラフを含む。

30

【図19】2X KO (TRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup>) 抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞と比較した3X KO (TRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / CD70<sup>-</sup>) 抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞によるA498細胞の強い細胞の死滅を示すグラフを含む。

【図20】MV411標的細胞によるチャレンジの後の3X KO (TRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / CD70<sup>-</sup>) 又は2X KO (TRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup>) 抗CD33 CAR<sup>+</sup> T細胞の細胞増殖を示すグラフを含む。

【図21】Na1m6標的細胞によるチャレンジの後の3X KO (TRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / CD70<sup>-</sup>) 又は2X KO (TRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup>) 抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞の細胞増殖を示すグラフを含む。

40

【図22A】連続的な再チャレンジの後の抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞によるA498細胞の死滅を示すグラフを含む。4X KO (TRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / CD70<sup>-</sup> / PD1<sup>-</sup>)、3X KO (CD70) (TRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / CD70<sup>-</sup>)、3X KO (PD1) (TRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / PD1<sup>-</sup>) 及び2X KO (TRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup>) 抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞が利用された。3X KO (CD70)、CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞、及び4X KO、CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞が、最も効果的であった。

【図22B】連続的な再チャレンジの後の抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞によるACHN細胞の死滅を示すグラフを含む。図22Aと同じ細胞が利用された。3X KO (CD70)、CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞及び4X KO、CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞が、最も効果的であった。

50

【図23A】様々なエフェクター：標的比での抗CD70 CAR T細胞によるACHN細胞の死滅を示すグラフを含む。4X KO (TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/PD1<sup>-</sup>)、3X KO (CD70) (TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>)、3X KO (PD1) (TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD1<sup>-</sup>)及び2X KO (TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>)抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞が利用された。3X KO (CD70)、CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞及び4X KO、CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞が、複数回の連続的な再チャレンジの後に優れたキラーであった。

【図23B】8回の再チャレンジの後の図23Aに由来する細胞におけるLAG3 (左)及びPD1 (右)発現を示すグラフを含む。

【図24A-B】PD-1及びCD70のノックアウトが、多発性骨髄腫細胞株 (MM.1S) による連続的な再チャレンジを介して測定されるとおり、抗BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞の細胞を死滅させる活性を増強することを示すグラフを含む。二重ノックアウト (2X KO (TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>)抗BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞 (丸) は、およそ4回の再チャレンジの後にMM.1S細胞に対してそれらの効力を失い始めたが、四重ノックアウト (4X KO (TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/PD1<sup>-</sup>)抗BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞 (四角) は、10回の再チャレンジの後にMM.1S細胞の100%を死滅させることができた (図24A)。これと一致して、四重ノックアウト抗BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞は、10回の再チャレンジの後に標的細胞に应答してIFN-gを分泌し続けたが、二重ノックアウト抗BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞は、3回目の再チャレンジの後にIFN-g分泌の減少を示した (図24B)。四重ノックアウト抗BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞はまた、標的細胞への暴露に应答して二重ノックアウト抗BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞より高い増殖を示した (図24C)。

【図24C】 (同上)

【図25A】二重ノックアウト (2X KO) TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞及び三重ノックアウト (3X KO (PD1) TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞と比較して、四重ノックアウト (4X KO) TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞及び三重ノックアウト (3X KO (CD70)) TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞を使用するA498 PD-L1腎臓癌細胞 (PD-L1を過剰発現する) における最も高い細胞死滅活性を示すグラフを含む。2:1のCAR T細胞:A498-PD-L1細胞比が、図25Aにおいて使用され、1:1のCAR T細胞:A498-PD-L1細胞比が、図25Bにおいて使用され、且つ0.5:1のCAR T細胞:A498-PD-L1細胞比が、図25Cにおいて使用された。

【図25B】 (同上)

【図25C】 (同上)

【図26A】四重ノックアウト (4X KO) TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞は、三重ノックアウト (3X KO (CD70) TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞、二重ノックアウト (2X KO) TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞及び三重ノックアウト (3X KO (PD1) TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞と比較して、最も高いレベルのサイトカインIFN-ガンマ (図26A) 及びIL-2 (図26B) を分泌する。1:1のCAR T細胞:A498-PD-L1細胞比が使用された。

【図26B】 (同上)

【図27A】2X KO (TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>)、CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞; 3X KO (PD-1) (TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD1<sup>-</sup>)、CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞; 3X KO (CD70) (TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>)、CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞; 又は4X KO (PD-1、CD70) (TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD1<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>)、CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞に暴露された皮下A498腎細胞癌モデルにおける腫瘍体積の減少を評価するために設計された実験からの結果を示すグラフを含む。

【図27B】皮下A498腎細胞癌再チャレンジモデルにおける腫瘍増殖の予防を評価す

10

20

30

40

50

るために設計された実験からの結果を示すグラフを含む。図27Aからのマウスが、25日目にA498腫瘍細胞で再チャレンジされ、腫瘍体積が経時的に評価された。

【図27C】3X KO (CD70) (TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>)、CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞；4X KO (PD-1、CD70) (TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD1<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>)、CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞；2X KO (TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>)、CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞；又は3X KO (PD-1) (TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD1<sup>-</sup>)、CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞に暴露された皮下A498腎細胞癌モデル (CAR-T注射時に約150mm<sup>3</sup>の大型の腫瘍)における腫瘍体積の減少を評価するために設計された実験からの結果を示すグラフを含む。

【図28A】2X KO (TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>)、BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞；3X KO (PD-1) (TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD1<sup>-</sup>)、BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞；3X KO (CD70) (TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>)、BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞；又は4X KO (PD-1、CD70) (TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD1<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>)、BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞に暴露された皮下MM.1Sモデルにおける腫瘍体積の減少を示すグラフを含む。

【図28B】腫瘍細胞再チャレンジ後の皮下MM.1Sにおける腫瘍体積の減少を示すグラフを含む。図28Aからのマウスが、45日目にMM.1S細胞の2回目の接種で再チャレンジされ、腫瘍体積が経時的に評価された。

【図29】投与の1週間後 (右のグラフ)、2週間後 (中央のグラフ)、及び3週間後 (左のグラフ)のヒトCD45<sup>+</sup> 2X KO (TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>)、BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞；ヒトCD45<sup>+</sup> 3X KO (PD-1) (TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD1<sup>-</sup>)、BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞；ヒトCD45<sup>+</sup> 3X KO (CD70) (TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>)、BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞；及びヒトCD45<sup>+</sup> 4X KO (PD-1、CD70) (TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD1<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>)、BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞の数を示すグラフを含む。

【図30】 $1 \times 10^5$ 、 $3 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、又は $3 \times 10^6$ 細胞/マウスの用量でTRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/抗BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞 (2X KO、BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞)；TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD1<sup>-</sup>/抗BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞 (3X KO (PD-1)、BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞)；TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞 (3X KO (CD70)、BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞)；又はTRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD1<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞 (4X KO (PD-1、CD70)、BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞)に暴露された皮下RPMI-8226腫瘍異種移植モデルにおける腫瘍体積の減少を評価するために設計された実験からの結果を示すグラフを含む。

【図31】TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞が、サイトカイン依存性増殖を維持することを示すグラフを含む。

【図32】TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞におけるサイトカイン依存性増殖を示す。

【図33】4X KO (TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>)、BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞が、サイトカイン依存性を維持することを示すグラフを含む。

【図34】24時間様々な比でA498腎臓癌細胞と共培養した場合、2X KO (TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>)抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞と比較して、3X KO (TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>)抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞によるサイトカイン (IL-2) 放出の増強を示すグラフを含む。

【図35】TCR<sup>+</sup> T細胞と比較して、抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞 (2X KO (TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>)、CD70 CAR<sup>+</sup>)；3X KO (PD-1) (TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>)、CD70 CAR<sup>+</sup>)；及び4X KO (TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>) (CD70 CAR<sup>+</sup>)によるA498細胞の強い細胞の死滅を示すグラフを含む。T細胞は、24時間様々な比でA498細胞と共培養され、細胞溶解のパーセンテージが測定された。

10

20

30

40

50

【図36】二重ノックアウトTRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup>(すなわち、2X KO、CD70 CAR<sup>+</sup>) T細胞及び三重ノックアウトTRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup>(すなわち、3X KO(PD-1)、CD70 CAR<sup>+</sup>) T細胞と比較して、四重ノックアウトTRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞(4X KO、CD70 CAR<sup>+</sup>)及び三重ノックアウトTRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞(3X KO(CD70)、CD70 CAR<sup>+</sup>)を使用するA498腎臓癌細胞において最も高い細胞死滅活性を示すグラフを含む。0.25:1のCAR T細胞:A498細胞比が使用された。A498細胞の細胞溶解のパーセンテージは、共培養の24時間後に測定された。

【図37A】四重ノックアウトTRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞(4X KO、CD70 CAR<sup>+</sup>)及び三重ノックアウトTRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞(3X KO(CD70)、CD70 CAR<sup>+</sup>)が、二重ノックアウトTRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞(2X KO、CD70 CAR<sup>+</sup>)及び三重ノックアウトTRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞(3X KO(PD-1)、CD70 CAR<sup>+</sup>)と比較して、最も高いレベルのサイトカインIFN-ガンマ(図37A)及びIL-2(図37B)を分泌することを示すグラフを含む。0.25:1のCAR T細胞:A498細胞比が使用された。IFN-ガンマ及びIL-2分泌は、共培養の24時間後に測定された。

【図37B】(同上)

【図38】抗CD70 CAR T細胞(3X KO(CD70)(TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>)、CD70 CAR<sup>+</sup>; 3X KO(PD-1)(TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD1<sup>-</sup>)、CD70 CAR<sup>+</sup>; 及び4X KO(TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>)、CD70 CAR<sup>+</sup>)においてCD70をノックアウトすることにより、内在性CD70を発現する抗CD70 CAR T細胞(2X KO(TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>)CD70 CAR<sup>+</sup>)と比較して、CD4<sup>+</sup> T細胞におけるPD-1発現のレベルが減少したことを示すグラフを含む。

【図39A】抗CD70 CAR T細胞(3X KO(CD70)(TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>)、CD70 CAR<sup>+</sup>; 3X KO(PD-1)(TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD1<sup>-</sup>)、CD70 CAR<sup>+</sup>; 及び4X KO(TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>)、CD70 CAR<sup>+</sup>)においてCD70をノックアウトすることにより、内在性CD70を発現する抗CD70 CAR T細胞(2X KO(TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>)CD70 CAR<sup>+</sup>)と比較して、CD8<sup>+</sup> T細胞(図39A)及びCD4<sup>+</sup> T細胞(図39B)における枯渇マーカーLAG3のレベルが減少したことを示すグラフを含む。

【図39B】(同上)

【図40A】5種の異なる癌細胞株における相対的なCD70発現(左パネル)及び3種の異なる癌細胞株における相対的なCD70発現(右パネル)を示すグラフを含む。

【図40B】9種の異なる癌細胞株における相対的なCD70発現を示すグラフを含む。

【図40C】二重ノックアウトTRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞(2X KO、CD70 CAR<sup>+</sup>)及び三重ノックアウトTRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞(3X KO(PD-1)、CD70 CAR<sup>+</sup>)と比較して、四重ノックアウトTRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞(4X KO、CD70 CAR<sup>+</sup>)及び三重ノックアウトTRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞(3X KO(CD70)、CD70 CAR<sup>+</sup>)を使用するACHN(ATCC(登録商標)CRL-1611(商標))腎臓癌細胞(低いレベルのCD70を発現する)において最も高い細胞死滅活性を示すグラフを含む。0.5:1のCAR T細胞:ACHN細胞比が、図40Cにおいて使用され、且つ0.25:1のCAR T細胞:ACHN細胞比が、図40Dにおいて使用された。

【図40D】(同上)

10

20

30

40

50

【図40E】様々なレベルのCD70発現（4：1、1：1、又は0.25：1 エフェクター：標的細胞比）による追加の固形腫瘍株に対して四重ノックアウトTRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞（図40E）及び三重ノックアウトTRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞（図40F）を使用して細胞死滅活性を示すグラフを含む。

【図40F】（同上）

【図40G】24時間又は96時間の共培養期間の後の固形腫瘍細胞株に対して三重ノックアウトTRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞を使用して細胞死滅活性を示すグラフを含む。

【図40H】様々なエフェクター：標的比でCD70欠損慢性骨髄性白血病（K562）細胞（図40H）、CD70発現多発性骨髄腫（MM.1S）細胞（図40I）及びCD70発現T細胞リンパ腫（HuT78）細胞（図40J）に対して三重ノックアウトTRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞（3KO（CD70）、CD70 CAR<sup>+</sup>）を使用して細胞死滅活性を示すグラフを含む。

【図40I】（同上）

【図40J】（同上）

【図41A】四重ノックアウトTRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞（4X KO、CD70 CAR<sup>+</sup>）及び三重ノックアウトTRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞（3X KO（CD70）、CD70 CAR<sup>+</sup>）が、二重ノックアウトTRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞（2X KO、CD70 CAR<sup>+</sup>）及び三重ノックアウトTRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞（3X KO（PD-1）、CD70 CAR<sup>+</sup>）と比較して、最も高いレベルのサイトカインIFN-ガンマ（図41A）及びIL-2（図41B）を分泌することを示すグラフを含む。0.25：1のCAR T細胞：ACHN細胞比が使用された。

【図41B】（同上）

【図42A】3X KO（TRAC<sup>-</sup>/B2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>）抗CD70 CAR T細胞に暴露されたヒト卵巣腫瘍異種移植モデル（例えば、SKOV-3腫瘍細胞）における腫瘍体積の減少を評価するために設計された実験からの結果を示すグラフを含む。

【図42B】3X KO（TRAC<sup>-</sup>/B2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>）抗CD70 CAR T細胞に暴露されたヒト非小細胞肺腫瘍異種移植モデル（例えば、NCI-H1975腫瘍細胞）における腫瘍体積の減少を評価するために設計された実験からの結果を示すグラフを含む。

【図42C】3X KO（TRAC<sup>-</sup>/B2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>）抗CD70 CAR T細胞に暴露されたヒト膵臓腫瘍異種移植モデル（例えば、Hs766T腫瘍細胞）における腫瘍体積の減少を評価するために設計された実験からの結果を示すグラフを含む。

【図42D】3X KO（TRAC<sup>-</sup>/B2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>）抗CD70 CAR T細胞に暴露されたヒトT細胞リンパ腫異種移植モデル（例えば、HuT78腫瘍細胞）における腫瘍体積の減少を評価するために設計された実験からの結果を示すグラフを含む。個々のマウスの腫瘍体積（左）及び平均腫瘍体積（右）が示される。

【発明を実施するための形態】

【0073】

本開示は、抗原標的化部分（例えば、CAR）を発現するように操作された免疫細胞においてCD70遺伝子を破壊することが、抗腫瘍効果を含む免疫に基づく療法に重要ないくつかの特徴を増強するという発見に少なくとも部分的に基づく。特に、そのような操作された免疫細胞は、長期間増強された抗腫瘍効果をもたらす増殖の延長及びインビボでの持続を含む予想外の優れた特徴を示した。注目すべきことに、これらの予想外の特徴は、BCMA、CD19、CD33及びCD70を含む様々な抗原に特異的な標的化部分により実証された。

【0074】

10

20

30

40

50

本明細書で実証されるとおり、CD70 遺伝子を破壊することは、インビトロでの癌細胞によるチャレンジの繰り返しの後に抗原標的化部分を発現するように操作された免疫細胞の細胞傷害性の維持をもたらした。理論に束縛されるものではないが、細胞傷害性のこの維持は、CD70 遺伝子を破壊することが、枯渇に耐性の操作された免疫細胞を産生することを示し、より長く生存する細胞をもたらし得る。

【0075】

抗原標的化部分を発現するように操作された免疫細胞においてCD70 遺伝子を破壊することは、大型腫瘍に対する抗腫瘍効果を増強し、且つ耐久性のある抗癌記憶応答を誘導したことも見出された。特に、抗癌記憶応答は、再チャレンジ時に腫瘍増殖を防いだ。さらに、CD70 遺伝子を破壊することは、操作された免疫細胞と標的細胞の比較的低い比で抗原標的化部分を発現するように操作された免疫細胞の細胞傷害性の増強をもたらし、低用量の操作された免疫細胞の潜在的な有効性を示すことが実証された。

10

【0076】

CD70 遺伝子の破壊が、操作された免疫細胞の細胞増殖及びインビボでの持続を増強することも示された。理論に束縛されるものではないが、本明細書に記載される操作された免疫細胞の優れた特徴は、より一貫した細胞集団、より多くの細胞分裂を生き延びる細胞の能力による大規模な産生、及び操作された細胞を産生するのに必要なより少ない開始細胞を可能にすると考えられる。そのような特徴はまた、臨床現場において有益であると判明し得る。例えば、増殖の増大及び枯渇の減少は、1用量当たりの有効性の増大及びより少ない用量で有効性を得る能力を示す。

20

【0077】

抗原標的化部分を発現するように操作された免疫細胞においてCD70 遺伝子を破壊することは、高度に免疫抑制性の分子、すなわち、PD-L1 を発現する癌細胞に対する細胞傷害性を維持することも実証された。理論に束縛されるものではないが、癌細胞上で発現されるPD-L1 に結合したときに免疫細胞上で発現されるPD-1 の内的な負のシグナルは、CD70 を破壊することによって克服されると考えられる。

【0078】

したがって、本明細書では、有効性及び持続の増大を伴う操作された免疫細胞の使用を含む、BCMA<sup>+</sup>、CD19<sup>+</sup>、CD33<sup>+</sup>、及びCD70<sup>+</sup> 悪性腫瘍などの癌の治療のための方法及び組成物（例えば、細胞組成物）が提供される。

30

【0079】

#### CD70 遺伝子編集

表面抗原分類70 (CD70) は、腫瘍壊死因子スーパーファミリーのメンバーであり、且つその発現は、活性化T及びBリンパ球及び成熟樹状細胞に限定される。CD70 は、そのリガンドであるCD27との相互作用を通して、腫瘍細胞及び制御性T細胞の生存に関係づけられる。CD70 及びその受容体であるCD27は、T細胞（活性化及びTreg）、及びB細胞を含む複数の細胞型における免疫機能において複数の役割を有する。これらの細胞型の全てにおいてCD70 がどのように機能してアポトーシスなどの機能を制御しているのかは正確には不明であり、相反する役割を示す論文がある。例えば、CD70 は、抗原負荷に依存してT細胞のアポトーシス又は生存を誘導することが報告されている (Wensveen, F., et al. J. Immunol, Vol 188: 4256-4267, 2012)。

40

【0080】

CAR T細胞は、効果的な免疫療法であることがわかってきているが、様々な課題が残ったままである。例えば、CAR T細胞は、インビボにおいて経時的に枯渇し、且つ無効になる。製造に関しては、患者に投与するのに十分な細胞を産生するために著しく時間がかかる。これらの制約に対処するために、本開示は、内在性のCD70 発現を破壊するが、同時に抗原標的化部分（例えば、scFv）を発現するように操作されたCAR T細胞を提供する。

【0081】

50

驚くべきことに、本開示は、CD70遺伝子を破壊することにより、抗原がCAR T中のscFvにより標的化されているにもかかわらず、CAR Tの活力及び機能の増大（例えば、増殖の延長、枯渇の減少）を可能にすることを示す。このことは、CD33及びCD70などのT細胞上で発現される抗原にさえ適用され、ここで、破壊されたCD70遺伝子の効果は、兄弟殺しが予想される場合でさえCAR T機能を保持する。すなわち、これらのCD70ノックアウト細胞（例えば、ここで、CD70遺伝子は、CRISPR/Cas9遺伝子編集技術を使用して編集された）は、CARの挿入とは独立して、未変更のT細胞（又はCD70を発現する編集されたT細胞）と比較して、継続性の安定した細胞増殖を示し、且つ比較的低いレベルのLAG3などの枯渇マーカーを発現する。本開示のCAR T細胞は、CAR T細胞を癌細胞に誘導する癌抗原に特異的に結合する任意の抗体（完全抗体及び抗体断片を含む）又は他の分子（例えば、受容体又はリガンド）を含み得る。いくつかの実施形態では、抗体は、抗CD70抗体（例えば、抗CD70scFv）である。他の実施形態では、抗体は、抗CD19抗体（例えば、抗CD19scFv）である。さらに他の実施形態では、抗体は、抗BCMA抗体（例えば、抗BCMAscFv）である。他の実施形態では、抗体は、抗CD33抗体（例えば、抗CD33scFv）である。他の癌抗原が、本開示によって包含される。

#### 【0082】

遺伝子破壊は、遺伝子編集（例えば、1つ以上のヌクレオチドを挿入するか又は欠失させるCRISPR/Cas遺伝子編集を使用する）を介する遺伝子改変を包含することが理解されるはずである。いくつかの実施形態では、破壊された遺伝子は、機能性タンパク質をコードしない遺伝子である。いくつかの実施形態では、破壊された遺伝子を含む細胞は、遺伝子によってコードされる検出可能なレベル（例えば、抗体によって、例えば、フローサイトメトリーによって）のタンパク質を、（例えば、細胞表面で）発現しない。検出可能なレベルのタンパク質を発現しない細胞は、ノックアウト細胞と呼ばれ得る。例えば、CD70遺伝子編集を有する細胞は、CD70タンパク質が、CD70タンパク質に特異的に結合する抗体を使用して細胞表面で検出できない場合、CD70ノックアウト細胞とみなされ得る。

#### 【0083】

本明細書では、いくつかの実施形態において、一定のパーセンテージの細胞が編集されて（例えば、CD70遺伝子が編集される）、特定の遺伝子及び/又はタンパク質を発現しない一定のパーセンテージの細胞をもたらす細胞の集団が提供される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集された細胞の集団のうちの少なくとも50%（例えば、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、又は85%）の細胞は、CD70ノックアウト細胞である。いくつかの実施形態では、集団のうちの少なくとも50%の細胞（例えば、T細胞）が、検出可能なレベルのCD70タンパク質を発現しない。いくつかの実施形態では、遺伝子編集された細胞の集団のうちの少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、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%、又は少なくとも95%の細胞は、CD70ノックアウト細胞であってもよい。

#### 【0084】

いくつかの実施形態では、集団のうちの10%、15%、20%、25%、30%、35%又は40%の操作されたT細胞は、検出可能なレベルのCD70表面タンパク質を発現しない。いくつかの実施形態では、検出可能なレベルのCD70表面タンパク質を発現しない操作されたT細胞のパーセントは、経時的に増加する。したがって、いくつかの実施形態では、操作されたT細胞の集団のうちの少なくとも50%の操作されたT細胞は、検出可能なレベルのCD70表面タンパク質を発現しない。例えば、集団のうちの少なくとも55%、少なくとも60%、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%、又は少なくとも95%の操作されたT細胞は、検出可能なレベルのCD70表面タンパク質を発現しない場合がある。いくつかの実施形態では、集団のうちの50%~100%、50%~90%、50%~80%、50%~

10

20

30

40

50

70%、50%～60%、60%～100%、60%～90%、60%～80%、60%～70%、70%～100%、70%～90%、70%～80%、80%～100%、80%～90%、又は90%～100%の操作されたT細胞は、検出可能なレベルのCD70表面タンパク質を発現しない。

#### 【0085】

CD70遺伝子におけるゲノム改変（例えば、破壊、例えば、欠失、挿入、置換）をもたらす本明細書で提供されるとおりに使用され得る改変及び未改変のCD70 gRNA配列の非限定的な例は、表5において列挙される（例えば、配列番号23～29及び33～39）。他のgRNA配列は、19番染色体上に位置するCD70遺伝子配列を使用し

10

#### 【0086】

いくつかの実施形態では、RNA誘導型ヌクレアーゼ（例えば、Cas9ヌクレアーゼなどのCasヌクレアーゼ）を含有するリボ核タンパク質粒子（RNP）及びCD70遺伝子（又は任意の他の目的の遺伝子）を標的化するgRNAが、T細胞（例えば、一次T細胞）に送達される。他の実施形態では、RNA誘導型ヌクレアーゼ及びgRNAは、T細胞に別々に送達される。リボ核タンパク質粒子（RNP）は単に、gRNAと予め複合体を形成した/複合体を形成した（結合した）RNA誘導型ヌクレアーゼ（例えば、Cas9）である。

20

#### 【0087】

いくつかの実施形態では、CD70遺伝子を標的化するgRNAは、配列番号33～39を含むgRNAのいずれか1つなどであるが、これに限定されない合成的に改変されたgRNAである。いくつかの実施形態では、CD70遺伝子を標的化するgRNAは、配列番号23～29を含むgRNAのいずれか1つなどであるが、これに限定されない合成的に改変されていないgRNAである。

#### 【0088】

いくつかの実施形態では、CD70ゲノム領域を標的化するgRNA及びRNA誘導型ヌクレアーゼは、CD70遺伝子における二重鎖切断をもたらす。切断の修復は、CD70遺伝子においてインデルをもたらす、ここで、CD70遺伝子配列は、配列番号129～134からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含み得る。

30

#### 【0089】

##### 多重遺伝子編集

本開示の操作されたT細胞は、いくつかの実施形態において、例えば、2つ以上の遺伝子における2つ以上の破壊された遺伝子（例えば、2つ以上の遺伝子編集）を含む。例えば、操作されたT細胞は、破壊されたCD70遺伝子、破壊されたT細胞受容体アルファ鎖定常領域（TRAC）遺伝子、破壊されたベータ-2-ミクログロブリン（2M）遺伝子、破壊されたプログラム細胞死-1（PD-1又はPDCD1）遺伝子、又は前述の破壊された遺伝子の2つ以上の任意の組合せを含み得る。いくつかの実施形態では、操作されたT細胞は、破壊されたTRAC遺伝子、破壊された2M遺伝子、及び破壊されたCD70遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、操作されたT細胞は、破壊されたTRAC遺伝子、破壊された2M遺伝子、及び破壊されたPD-1遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、操作されたT細胞は、破壊されたTRAC遺伝子、破壊された2M遺伝子、破壊されたCD70遺伝子及び破壊されたPD-1遺伝子を含む。

40

#### 【0090】

##### TRAC遺伝子編集

いくつかの実施形態では、操作されたT細胞は、破壊されたTRAC遺伝子を含む。この破壊は、TCRの機能喪失をもたらす、且つ操作されたT細胞に同種移植への非アロ反

50

応性及び適合性を与え、移植片対宿主疾患のリスクを最小化する。いくつかの実施形態では、内在性の T R A C 遺伝子の発現は、移植片対宿主反応を予防するために除去される。

【 0 0 9 1 】

いくつかの実施形態では、T R A C 遺伝子発現における破壊は、キメラ抗原受容体 ( C A R ) を ( 例えば、アデノ随伴ウイルス ( A A V ) ベクター及びドナー鑄型を使用して ) T R A C 遺伝子にノックインすることによってもたらされる。いくつかの実施形態では、T R A C 遺伝子発現における破壊は、T R A C ゲノム領域を標的化するヌクレアーゼ及び g R N A によりもたらされる。いくつかの実施形態では、T R A C 遺伝子におけるゲノム欠失は、H D R によってもたらされ、ここで、キメラ抗原受容体 ( C A R ) は、T R A C 遺伝子のセグメントを ( 例えば、アデノ随伴ウイルス ( A A V ) ベクター及びドナー鑄型を使用して ) 置き換える。いくつかの実施形態では、T R A C 遺伝子発現における破壊は、T R A C ゲノム領域を標的化するヌクレアーゼ及び g R N A、及びキメラ抗原受容体 ( C A R ) を T R A C 遺伝子にノックインすることによりもたらされる。

10

【 0 0 9 2 】

T R A C 遺伝子においてゲノムをもたらず本明細書で提供されるとおりに使用され得る改変及び未改変の T R A C g R N A 配列の非限定的な例は、表 7 において列挙される ( 例えば、配列番号 3 0 及び 4 0 )。また、参照により本明細書に組み込まれる、2 0 1 8 年 5 月 1 1 日に出版された国際出願番号 P C T / U S 2 0 1 8 / 0 3 2 3 3 4 号明細書も参照されたい。他の g R N A 配列は、1 4 番染色体上に位置する T R A C 遺伝子配列を使用して設計され得る ( G R C h 3 8 : 1 4 番染色体 : 2 2 , 5 4 7 , 5 0 6 ~ 2 2 , 5 5 2 , 1 5 4 ; . E n s e m b l ; E N S G 0 0 0 0 0 2 7 7 7 3 4 )。いくつかの実施形態では、T R A C ゲノム領域を標的化する g R N A 及び R N A 誘導型ヌクレアーゼは、m R N A 又はタンパク質の発現を破壊する T R A C 遺伝子におけるインデルをもたらず T R A C ゲノム領域における切断をもたらず。

20

【 0 0 9 3 】

いくつかの実施形態では、集団のうちの少なくとも 5 0 % の操作された T 細胞は、検出可能なレベルの T 細胞受容体 ( T C R ) 表面タンパク質を発現しない。例えば、集団のうちの少なくとも 5 5 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、又は少なくとも 9 5 % の操作された T 細胞は、検出可能なレベルの T C R 表面タンパク質を発現しない場合がある。いくつかの実施形態では、集団のうちの 5 0 % ~ 1 0 0 %、5 0 % ~ 9 0 %、5 0 % ~ 8 0 %、5 0 % ~ 7 0 %、5 0 % ~ 6 0 %、6 0 % ~ 1 0 0 %、6 0 % ~ 9 0 %、6 0 % ~ 8 0 %、6 0 % ~ 7 0 %、7 0 % ~ 1 0 0 %、7 0 % ~ 9 0 %、7 0 % ~ 8 0 %、8 0 % ~ 1 0 0 %、8 0 % ~ 9 0 %、又は 9 0 % ~ 1 0 0 % の操作された T 細胞は、検出可能なレベルの T C R 表面タンパク質を発現しない。

30

【 0 0 9 4 】

いくつかの実施形態では、R N A 誘導型ヌクレアーゼ ( 例えば、C a s 9 ヌクレアーゼなどの C a s ヌクレアーゼ ) を含有するリボ核タンパク質粒子 ( R N P ) 及び T R A C 遺伝子 ( 又は任意の他の目的の遺伝子 ) を標的化する g R N A が、T 細胞 ( 例えば、一次 T 細胞 ) に送達される。他の実施形態では、R N A 誘導型ヌクレアーゼ及び g R N A は、T 細胞に別々に送達される。リボ核タンパク質粒子 ( R N P ) は単に、g R N A と予め複合体を形成した / 複合体を形成した R N A 誘導型ヌクレアーゼ ( 例えば、C a s 9 ) である。

40

【 0 0 9 5 】

いくつかの実施形態では、T R A C ゲノム領域を標的化する g R N A 及び R N A 誘導型ヌクレアーゼは、以下の表 1 における配列から選択されるヌクレオチド配列を含む T R A C 遺伝子においてインデルをもたらず。

【 0 0 9 6 】

50

## 【表 1】

表 1.

配列	配列番号
AAGAGCAACAAATCTGACT	1
ΛAGAGCAACAGTGCTGTGCCTGGAGCAACAAATCTGACT AAGAGCAACAAATCTGACT	2
AAGAGCAACAGTGCTGGAGCAACAAATCTGACT AAGAGCAACAAATCTGACT	3
AAGAGCAACAGTGCTGGAGCAACAAATCTGACT AAGAGCAACAAATCTGACT	4
AAGAGCAACAGTGCTGACTAAGAGCAACAAATCTGACT	5
AAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACT AAGAGCAACAAATCTGACT	6
AAGAGCAACAGTGCTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACT AAGAGCAACAAATCTGACT	7
AAGAGCAACAGTGCTGTGTGCCTGGAGCAACAAATCTGACT AAGAGCAACAAATCTGACT	8

10

20

## 【0097】

いくつかの実施形態では、操作されたT細胞は、未変更のT細胞と比較してTRAC遺伝子の欠失を含む。いくつかの実施形態では、操作されたT細胞は、未変更のT細胞と比較してTRAC遺伝子において15～30塩基対の欠失を含む。いくつかの実施形態では、操作されたT細胞は、未変更のT細胞と比較して、TRAC遺伝子において15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30の欠失を含む。いくつかの実施形態では、操作されたT細胞は、未変更のT細胞と比較してTRAC遺伝子において30塩基対より多い欠失を含む。いくつかの実施形態では、操作されたT細胞は、未変更のT細胞と比較してTRAC遺伝子において20塩基対の欠失を含む。いくつかの実施形態では、操作されたT細胞は、未変更のT細胞と比較してTRAC遺伝子において配列番号86の欠失を含む。いくつかの実施形態では、操作されたT細胞は、未変更のT細胞と比較してTRAC遺伝子において配列番号86を含む欠失を含む。いくつかの実施形態では、操作されたT細胞は、未変更のT細胞と比較してTRAC遺伝子において配列番号118の欠失を含む。いくつかの実施形態では、操作されたT細胞は、未変更のT細胞と比較してTRAC遺伝子において配列番号118を含む欠失を含む。

30

## 【0098】

## 2M遺伝子編集

いくつかの実施形態では、操作されたT細胞は、破壊された2M遺伝子を含む。2Mは、MHC I複合体の共通の(不変の)構成要素である。遺伝子編集によってその発現を破壊することは、宿主対治療用異質遺伝子型T細胞反応を予防することになり、異質遺伝子型T細胞の持続の増大をもたらす。いくつかの実施形態では、内在性の2M遺伝子の発現は、宿主対移植片反応を予防するために除去される。

40

## 【0099】

2M遺伝子においてゲノム欠失をもたらす本明細書で提供されるとおりに使用され得る改変及び未変更の2M gRNA配列の非限定的な例は、表7において列挙される(例えば、配列番号31及び41)。また、参照により本明細書に組み込まれる、2018年5月11日に出願された国際出願番号PCT/US2018/032334号明細書も参照されたい。他のgRNA配列は、15番染色体上に位置する2M遺伝子配列を使用して設計され得る(GRCh38の座標:15番染色体:44,711,477-44,

50

718, 877; Ensemble: ENSG00000166710)。

【0100】

いくつかの実施形態では、2 Mゲノム領域を標的化するgRNA及びRNA誘導型ヌクレアーゼは、mRNA又はタンパク質の発現を破壊する2 M遺伝子におけるインデルをもたらす2 Mゲノム領域における切断をもたらす。

【0101】

いくつかの実施形態では、集団のうちの少なくとも50%の操作されたT細胞は、検出可能なレベルの2 M表面タンパク質を発現しない。例えば、集団のうちの少なくとも55%、少なくとも60%、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%、又は少なくとも95%の操作されたT細胞は、検出可能なレベルの2 M表面タンパク質を発現しない場合がある。いくつかの実施形態では、集団のうちの50%~100%、50%~90%、50%~80%、50%~70%、50%~60%、60%~100%、60%~90%、60%~80%、60%~70%、70%~100%、70%~90%、70%~80%、80%~100%、80%~90%、又は90%~100%の操作されたT細胞は、検出可能なレベルの2 M表面タンパク質を発現しない。

10

【0102】

いくつかの実施形態では、細胞の集団のうちの50%未満の操作されたT細胞は、検出可能なレベルの2 M表面タンパク質を発現する。いくつかの実施形態では、細胞の集団のうちの30%未満の操作されたT細胞は、検出可能なレベルの2 M表面タンパク質を発現する。例えば、細胞の集団のうちの50%未満、30%未満、25%未満、20%未満、15%未満、10%未満、又は5%未満の操作されたT細胞は、検出可能なレベルの2 M表面タンパク質を発現する。いくつかの実施形態では、細胞の集団のうちの40%~30%、40%~20%、40%~10%、40%~5%、30%~20%、30%~10%、30%~5%、20%~10%、20%~5%、又は10%~5%の操作されたT細胞は、検出可能なレベルの2 M表面タンパク質を発現する。

20

【0103】

いくつかの実施形態では、RNA誘導型ヌクレアーゼ(例えば、Cas9ヌクレアーゼなどのCasヌクレアーゼ)を含有するリボ核タンパク質粒子(RNP)及びB2M遺伝子(又は任意の他の目的の遺伝子)を標的化するgRNAが、T細胞(例えば、一次T細胞)に送達される。他の実施形態では、RNA誘導型ヌクレアーゼ及びgRNAは、T細胞に別々に送達される。リボ核タンパク質粒子(RNP)は単に、gRNAと予め複合体を形成した/複合体を形成したRNA誘導型ヌクレアーゼ(例えば、Cas9)である。

30

【0104】

いくつかの実施形態では、編集された2 M遺伝子は、以下の表2における配列から選択されるヌクレオチド配列を含む。

【0105】

40

50

## 【表 2】

表 2.

配列	配列番号
CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGCCTGGA GGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT	9
CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGCCTGGAG GCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT	10
CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGGAGGCT ATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT	11
CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGGATAGC CTGGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT	12
CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCTCT ACCCTCCCGCT	13
CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGTGGCCT GGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT	14

10

## 【0106】

## PD - 1 遺伝子編集

PD - 1 は、活性化 T 細胞において下方制御される免疫チェックポイント分子であり、T 細胞の応答を弱めるか又は止める働きをする。遺伝子編集によって PD - 1 を破壊すれば、より多くの持続的且つ / 又は強力な治療的 T 細胞応答をもたらし、且つ / 又は対象における免疫抑制を低減できるであろう。いくつかの実施形態では、操作された T 細胞は、破壊された PD - 1 遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、内在性の PD - 1 遺伝子の発現は、本開示の CAR T 細胞の抗腫瘍効果を増強するために除去される。

20

## 【0107】

PD - 1 遺伝子においてゲノム欠失をもたらす本明細書で提供されるとおりに使用される改変及び未改変の PD - 1 gRNA 配列の非限定的な例は、表 5 において列挙される（例えば、配列番号 32 及び 42）。また、参照により本明細書に組み込まれる、2018 年 5 月 11 日に出版された国際出願番号 PCT / US 2018 / 032334 号明細書も参照されたい。他の gRNA 配列は、2 番染色体上に位置する PD - 1 遺伝子配列を使用して設計され得る（GRCh38 の座標：2 番染色体：241,849,881 ~ 241,858,908；Ensembl：ENSG00000188389）。

30

## 【0108】

いくつかの実施形態では、PD - 1 ゲノム領域を標的化する gRNA 及び RNA 誘導型ヌクレアーゼは、PD - 1 mRNA 又はタンパク質の発現を破壊する PD - 1 遺伝子におけるインデルをもたらす TRAC ゲノム領域における切断をもたらす。

## 【0109】

いくつかの実施形態では、集団のうちの少なくとも 50% の操作された T 細胞は、検出可能なレベルの PD - 1 表面タンパク質を発現しない。例えば、集団のうちの少なくとも 55%、少なくとも 60%、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%、又は少なくとも 95% の操作された T 細胞は、検出可能なレベルの PD - 1 表面タンパク質を発現しない場合がある。いくつかの実施形態では、集団のうちの 50% ~ 100%、50% ~ 90%、50% ~ 80%、50% ~ 70%、50% ~ 60%、60% ~ 100%、60% ~ 90%、60% ~ 80%、60% ~ 70%、70% ~ 100%、70% ~ 90%、70% ~ 80%、80% ~ 100%、80% ~ 90%、又は 90% ~ 100% の操作された T 細胞は、検出可能なレベルの PD - 1 表面タンパク質を発現しない。

40

## 【0110】

50

いくつかの実施形態では、RNA誘導型ヌクレアーゼ（例えば、Cas9ヌクレアーゼなどのCasヌクレアーゼ）を含有するリボ核タンパク質粒子（RNP）及びPD-1遺伝子（又は任意の他の目的の遺伝子）を標的化するgRNAが、T細胞（例えば、一次T細胞）に送達される。他の実施形態では、RNA誘導型ヌクレアーゼ及びgRNAは、T細胞に別々に送達される。リボ核タンパク質粒子（RNP）は単に、gRNAと予め複合体を形成した／複合体を形成したRNA誘導型ヌクレアーゼ（例えば、Cas9）である。

【0111】

細胞表現型

いくつかの実施形態では、細胞の集団内の1つ以上の遺伝子編集は、細胞の増殖能、細胞の枯渇、細胞の生存能、細胞溶解能（例えば、サイトカイン産生及び／又は放出を増加させる）、又はこれらの任意の組合せにおける変化と関連する表現型をもたらす。

10

【0112】

いくつかの実施形態では、集団の操作されたT細胞は、抗CD70 scFv外部ドメインを含むCARを含む。いくつかの実施形態では、集団の操作されたT細胞は、抗BCMA scFv外部ドメインを含むCARを含む。いくつかの実施形態では、集団の操作されたT細胞は、抗CD19 scFv外部ドメインを含むCARを含む。いくつかの実施形態では、集団の操作されたT細胞は、抗CD33 scFv外部ドメインを含むCARを含む。前述の操作されたT細胞のいずれかは、以下の遺伝子の1つ以上における破壊も含み得る：TRAC、2M、PD-1、及び／又はCD70（例えば、TRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / CD70<sup>-</sup> ; TRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / PD-1<sup>-</sup> ; 又はTRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / PD-1<sup>-</sup> / CD70<sup>-</sup>）。

20

【0113】

いくつかの実施形態では、本開示の操作されたT細胞は、対照細胞と比較して細胞増殖能の増大を示す。いくつかの実施形態では、本開示の操作されたT細胞は、対照T細胞と比較して、少なくとも20%高い細胞増殖能を示す。例えば、操作されたT細胞（例えば、TRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / CD70<sup>-</sup> ; TRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / PD-1<sup>-</sup> ; 又はTRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / PD-1<sup>-</sup> / CD70<sup>-</sup> ; CARを伴うか又は伴わない）は、対照T細胞と比較して、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、又は少なくとも90%高い細胞増殖能を示し得る。いくつかの実施形態では、本開示の操作されたT細胞は、対照T細胞と比較して、20%~100%、20%~90%、20%~80%、20%~70%、20%~60%、20%~50%、30%~100%、30%~90%、30%~80%、30%~70%、30%~60%、30%~50%、40%~100%、40%~90%、40%~80%、40%~70%、40%~60%、40%~50%、50%~100%、50%~90%、50%~80%、50%~70%、又は50%~60%高い細胞増殖能を示す。細胞増殖を測定する方法は、当業者に知られており、本明細書に記載される。

30

【0114】

いくつかの実施形態では、本開示の操作されたT細胞は、対照T細胞と比較して、枯渇の減少を示す。例えば、操作されたT細胞は、対照T細胞と比較して、LAG3（又は他の枯渇マーカー）のレベルの低減を示し得る。いくつかの実施形態では、LAG3発現のレベルは、対照T細胞と比較して、少なくとも20%低減される。例えば、LAG3発現のレベルは、対照T細胞と比較して、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、又は少なくとも90%低減され得る。いくつかの実施形態では、LAG3発現のレベルは、対照T細胞と比較して、20%~100%、20%~90%、20%~80%、20%~70%、20%~60%、20%~50%、30%~100%、30%~90%、30%~80%、30%~70%、30%~60%、30%~50%、40%~1

40

50

00%、40%～90%、40%～80%、40%～70%、40%～60%、40%～50%、50%～100%、50%～90%、50%～80%、50%～70%、又は50%～60%低減される。いくつかの実施形態では、枯渴の減少は、TIGIT、PD-1、LAG-3又はこれらの組合せを含む枯渴マーカーの表面発現の減少を測定することによって決定される。表面発現を測定するための方法は、当業者に知られており、本明細書に記載される。

【0115】

いくつかの実施形態では、本開示の操作されたT細胞は、対照細胞と比較して、細胞生存能の増大を示す。いくつかの実施形態では、本開示の操作されたT細胞は、対照細胞と比較して、細胞生存能において少なくとも20%の増大を示す。例えば、本開示の操作されたT細胞は、対照細胞と比較して、細胞生存能において少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、又は少なくとも90%の増大を示し得る。いくつかの実施形態では、本開示の操作されたT細胞は、対照細胞と比較して、細胞生存能において20%～100%、20%～90%、20%～80%、20%～70%、20%～60%、20%～50%、30%～100%、30%～90%、30%～80%、30%～70%、30%～60%、30%～50%、40%～100%、40%～90%、40%～80%、40%～70%、40%～60%、40%～50%、50%～100%、50%～90%、50%～80%、50%～70%、又は50%～60%の増大を示す。細胞生存能を測定する方法は、当業者に知られており、本明細書に記載される。

10

20

【0116】

いくつかの実施形態では、本開示の操作されたT細胞は、対照細胞と比較して、細胞溶解能の増大を示す。いくつかの実施形態では、本開示の操作されたT細胞は、対照細胞と比較して、細胞溶解能において少なくとも20%の増大(少なくとも20%多く標的細胞を死滅させる)を示す。例えば、本開示の操作されたT細胞は、対照細胞と比較して、細胞溶解能において少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、又は少なくとも90%の増大を示し得る。いくつかの実施形態では、本開示の操作されたT細胞は、対照細胞と比較して、細胞溶解能において20%～100%、20%～90%、20%～80%、20%～70%、20%～60%、20%～50%、30%～100%、30%～90%、30%～80%、30%～70%、30%～60%、30%～50%、40%～100%、40%～90%、40%～80%、40%～70%、40%～60%、40%～50%、50%～100%、50%～90%、50%～80%、50%～70%、又は50%～60%の増大を示す。

30

【0117】

いくつかの実施形態では、本開示の操作されたT細胞は、対照細胞と比較して、サイトカイン分泌の増加を示す。例えば、いくつかの実施形態では、操作されたT細胞によって分泌されるサイトカイン(例えば、IL-2及び/又はIFN-ガンマ)のレベルは、対照T細胞によって分泌されるサイトカインのレベルより少なくとも2倍(例えば、少なくとも3倍、少なくとも4倍、又は少なくとも5倍)高い。

40

【0118】

対照T細胞は、いくつかの実施形態において、内在性のCD70タンパク質(T細胞によって通常発現されるCD70)を発現する操作されたT細胞(例えば、遺伝子編集されたT細胞)である。いくつかの実施形態では、対照T細胞は、内在性のCD70タンパク質を発現する操作されたT細胞であり、且つCAR(例えば、抗CD70 CAR又は抗BCMA CAR)をコードする核酸の挿入によって破壊されたTRAC遺伝子、破壊された2M遺伝子、破壊されたPD-1遺伝子、又は前述の破壊された遺伝子の任意の組合せを含む。いくつかの実施形態では、対照T細胞は、未編集のT細胞である。

50

【0119】

驚くべきことに、本開示の多重遺伝子編集されたCAR T細胞（例えば、TRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / PD-1<sup>-</sup> / CD70<sup>-</sup>細胞）は、癌細胞による複数回のチャレンジ（再チャレンジとも呼ばれる）の後に細胞傷害性（癌細胞を死滅させる能力）を維持する。いくつかの実施形態では、操作されたT細胞は、標的細胞による少なくとも1回の再チャレンジの後に細胞傷害性を維持し、標的細胞は、CAR T細胞によって認識される抗原を発現する。いくつかの実施形態では、操作されたT細胞は、標的細胞による少なくとも2回の再チャレンジの後に細胞傷害性を維持し、標的細胞は、CAR T細胞によって認識される抗原を発現する。いくつかの実施形態では、操作されたT細胞は、癌細胞による少なくとも1回の再チャレンジの後に細胞傷害性を維持する。いくつかの実施形態では、操作されたT細胞は、癌細胞による少なくとも2回の再チャレンジの後に細胞傷害性を維持する。いくつかの実施形態では、操作されたT細胞は、標的細胞による1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10回の再チャレンジの後に細胞傷害性を維持し、標的細胞は、CAR T細胞によって認識される抗原を発現する。いくつかの実施形態では、操作されたT細胞は、標的細胞による2、3、4、5、6、7、8、9、又は10回の再チャレンジの後に細胞傷害性を維持し、標的細胞は、CAR T細胞によって認識される抗原を発現する。いくつかの実施形態では、操作されたT細胞は、癌細胞による2、3、4、5、6、7、8、9、又は10回の再チャレンジの後に細胞傷害性を維持する。いくつかの実施形態では、操作されたT細胞は、標的細胞による10回以上の再チャレンジの後に細胞傷害性を維持し、標的細胞は、CAR T細胞によって認識される抗原を発現する。いくつかの実施形態では、操作されたT細胞は、癌細胞による10回以上の再チャレンジの後に細胞傷害性を維持する。いくつかの実施形態では、操作されたT細胞は、CD70に特異的なCARを発現し、且つ標的細胞（例えば、癌細胞）は、CD70を発現する。いくつかの実施形態では、操作されたT細胞は、CD19に特異的なCARを発現し、且つ標的細胞（例えば、癌細胞）は、CD19を発現する。いくつかの実施形態では、操作されたT細胞は、CD33に特異的なCARを発現し、且つ標的細胞（例えば、癌細胞）は、CD33を発現する。いくつかの実施形態では、操作されたT細胞は、BCMAに特異的なCARを発現し、且つ標的細胞（例えば、癌細胞）は、BCMAを発現する。

10

20

【0120】

遺伝子編集方法

遺伝子編集（ゲノム編集を含む）は、ヌクレオチド/核酸が、標的化された細胞のゲノム中などのDNA配列中に挿入され、欠失され、且つ/又は置換される一種の遺伝子操作である。標的化された遺伝子編集により、標的化された細胞のゲノム中（例えば、標的化された遺伝子又は標的化されたDNA配列中）の予め選択された部位での挿入、欠失、及び/又は置換が可能になる。内在性の遺伝子の配列が、例えば、ヌクレオチド/核酸の欠失、挿入又は置換によって編集されるとき、影響を受けた配列を含む内在性の遺伝子は、配列改変のためにノックアウト又はノックダウンされ得る。したがって、標的化された編集は、内在性の遺伝子発現を破壊するために使用され得る。「標的化された組込み」は、挿入部位での内在性の配列の欠失の有無にかかわらず、1つ以上の外来性の配列の挿入を含むプロセスを指す。標的化された組込みは、外来性の配列を含有するドナー鋳型が存在する場合、標的化された遺伝子編集から生じ得る。本明細書で使用する場合、「破壊された遺伝子」は、内在性の遺伝子と比較して、内在性の遺伝子から機能性タンパク質の発現が減少又は阻害されるような挿入、欠失又は置換を含む遺伝子を指す。本明細書で使用する場合、「遺伝子を破壊すること」は、内在性の遺伝子中で、内在性の遺伝子から機能性タンパク質の発現が減少又は阻害されるような少なくとも1つのヌクレオチド/核酸を挿入するか、欠失させるか又は置換する方法を指す。遺伝子を破壊する方法は、当業者に知られており、本明細書に記載される。

30

40

【0121】

標的化された編集は、ヌクレアーゼ非依存的な手法、又はヌクレアーゼ依存的な手法のいずれかを介して達成され得る。ヌクレアーゼ非依存的な標的化された編集手法において

50

、相同組換えは、宿主細胞の酵素機構を介して内在性の配列に導入されることになる外来性のポリヌクレオチドに隣接する相同配列によって誘導される。外来性のポリヌクレオチドは、内在性の配列中においてヌクレオチドの欠失、挿入又は置換を導入し得る。

#### 【0122】

或いは、ヌクレアーゼ依存的な手法は、特異的なレアカuttingヌクレアーゼ（例えば、エンドヌクレアーゼ）による二重鎖切断（DSB）の特異的な導入を介して比較的高い頻度を有して標的化された編集を達成できる。このようなヌクレアーゼ依存的な標的化された編集はまた、DNA修復機構、例えば、DSBに应答して生じる非相同末端連結（NHEJ）を利用する。NHEJによるDNA修復は、少数の内在性のヌクレオチドのランダムな挿入又は欠失（インデル）を引き起こす場合が多い。NHEJに媒介される修復とは反対に、修復はまた、相同組換え修復（HDR）によって生じる場合がある。一對の相同性アームに隣接する外来性の遺伝子材料を含有するドナー鋳型が存在するとき、外来性の遺伝子材料は、外来性の遺伝子材料の標的化された組込みをもたらすHDRによってゲノムに導入され得る。

10

#### 【0123】

特異的且つ標的化されたDSBを導入できる利用可能なエンドヌクレアーゼとしては、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、及びRNA誘導型CRISPR/Cas9ヌクレアーゼ（CRISPR/Cas9；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関連9）が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、phiC31及びBxb1インテグラーゼを利用するDICE（二重インテグラーゼカセット交換）システムも、標的化された組込みのために使用され得る。

20

#### 【0124】

ZFNは、1つ以上のジンクフィンガーを介して配列特異的な様式でDNAに結合するポリペプチドドメインであるジンクフィンガーDNA結合ドメイン（ZFBD）に融合されたヌクレアーゼを含む標的化ヌクレアーゼである。ジンクフィンガーは、構造が亜鉛イオンの配位を介して安定化されるジンクフィンガー結合ドメイン内の約30アミノ酸のドメインである。ジンクフィンガーの例としては、C2H2ジンクフィンガー、C3Hジンクフィンガー、及びC4ジンクフィンガーが挙げられるが、これらに限定されない。設計されたジンクフィンガードメインは、設計/組成物が主に、合理的な基準、例えば、既存のZFP設計及び結合データの情報を保管するデータベース中の情報を処理するための置換規則及びコンピューター処理されたアルゴリズムの適用からもたらされる、天然には存在しないドメインである。例えば、米国特許第6,140,081号明細書；同第6,453,242号明細書；及び同第6,534,261号明細書を参照されたい；国際公開第98/53058号パンフレット；国際公開第98/53059号パンフレット；国際公開第98/53060号パンフレット；国際公開第02/016536号パンフレット及び国際公開第03/016496号パンフレットも参照されたい。選択されたジンクフィンガードメインは、生成が主に、ファージディスプレイ、相互作用トラップ又はハイブリッド選択などの実験的なプロセスからもたらされる、天然には存在しないドメインである。ZFNは、米国特許第7,888,121号明細書及び米国特許第7,972,854号明細書においてより詳細に記載される。ZFNの最も認知されている例は、FokIヌクレアーゼとジンクフィンガーDNA結合ドメインの融合物である。

30

40

#### 【0125】

TALENは、TALエフェクターDNA結合ドメインに融合されたヌクレアーゼを含む標的化ヌクレアーゼである。「転写活性化因子様エフェクターDNA結合ドメイン」、「TALエフェクターDNA結合ドメイン」、又は「TALE DNA結合ドメイン」は、TALエフェクタータンパク質のDNAへの結合に関与するTALエフェクタータンパク質のポリペプチドドメインである。TALエフェクタータンパク質は、キサントモナス（*Xanthomonas*）属の植物病原体によって感染中に分泌される。これらのタンパク質は、植物細胞の核に入り、それらのDNA結合ドメインを介してエフェクター特異

50

的なDNA配列に結合し、且つそれらの転写活性化ドメインを介してこれらの配列で遺伝子転写を活性化する。TALエフェクターDNA結合ドメインの特異性は、2アミノ酸残基からなる可変領域(RVD)と呼ばれる選択された反復位置で多型を含むエフェクターにより可変の数の不完全な34アミノ酸反復に依存する。TALENは、米国特許出願公開第2011/0145940号明細書においてより詳細に記載される。当該技術分野におけるTALENの最も認知された例は、TALエフェクターDNA結合ドメインに対するFokIヌクレアーゼの融合ポリペプチドである。

#### 【0126】

本明細書に提供されるとおりの使用に好適な標的化ヌクレアーゼのさらなる例としては、個別に使用されようと、組み合わせて使用されようと、Bxb1、phiC31、R4、PhiBT1、及びW / SPBc / TP901-1が挙げられるが、これらに限定されない。

10

#### 【0127】

標的化ヌクレアーゼの他の非限定的な例としては、天然に存在するヌクレアーゼ及び組換えヌクレアーゼ、例えば、CRISPR/Cas9、制限エンドヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼホーミングエンドヌクレアーゼなどが挙げられる。

#### 【0128】

##### CRISPR - Cas9 遺伝子編集

CRISPR - Cas9システムは、遺伝子編集のために使用されるRNA誘導型DNA標的化プラットフォームとして転用されてきた原核生物において天然に存在する防御機構である。それは、DNAの切断を標的化するDNAヌクレアーゼCas9、並びに2つの非コードRNAであるcrisprRNA (crRNA) 及びトランス活性化RNA (tracrRNA) に依拠する。CRISPR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の略称であり、例えば、原核生物を感染させたか又は攻撃したウイルスによって、細胞に以前に暴露した外来DNAと類似性を有するDNAの断片(スペーサーDNA)を含有する細菌及び古細菌のゲノムにおいて見出されるDNA配列のファミリーである。DNAのこれらの断片が原核生物によって使用されて、例えば、引き続く攻撃の間に同様のウイルスからの再導入時に同様の外来DNAを検出し、且つ破壊する。CRISPR座位の転写により、スペーサー配列を含むRNA分子の形成がもたらされ、これが、外来の外来性DNAを認識し、且つ切断できるCas (CRISPR関連)タンパク質と相互作用し、且つ標的化する。CRISPR/Casシステムのいくつかの種類及びクラスが記載されている(例えば、Koonin et al., (2017) Curr Opin Microbiol 37:67-78を参照のこと)。

20

30

#### 【0129】

crRNAは、通常標的DNA中の20ヌクレオチド(nt)配列とワトソン-クリック塩基対を介してCRISPR - Cas9複合体の配列認識及び特異性を促進する。crRNA中の5' 20ntの配列の変化は、特定の座位へのCRISPR - Cas9複合体の標的化を可能にする。CRISPR - Cas9複合体は単に、標的配列が、プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)と呼ばれる特定の短いDNAモチーフ(配列NGGを有する)に続いている場合、crRNA、シングルガイドRNA (sgRNA)の最初の20ntに一致する配列を含有するDNA配列に結合する。

40

#### 【0130】

TracrRNAは、crRNAの3'末端とハイブリダイズしてRNA二重鎖構造を形成し、Cas9エンドヌクレアーゼによって結合されて触媒活性のあるCRISPR - Cas9複合体を形成し、続いてこれにより標的DNAを切断できる。

#### 【0131】

CRISPR - Cas9複合体が標的部位でDNAに結合すると、Cas9酵素内の2つの独立したヌクレアーゼドメインがそれぞれPAM部位の上流のDNA鎖の一方を切断し、DNAの両鎖が塩基対(平滑末端)で終結する二本鎖切断(DSB)を残す。

#### 【0132】

50

CRISPR-Cas9複合体が特定の標的部位でDNAに結合し、部位特異的なDSBが形成された後、次の鍵となるステップはDSBの修復である。細胞は、DSBを修復するために2つの主要なDNA修復経路を使用する：非相同末端連結（NHEJ）及び相同組換え修復（HDR）。

【0133】

NHEJは、非分裂細胞を含む大多数の細胞型において高度に活性であるように見える堅固な修復機構である。NHEJは誤りがちであり、多くの場合、DSBの部位にて1～数百のヌクレオチド間で除去又は付加をもたらす場合があるが、そのような改変は通常< 20 ntである。得られた挿入及び欠失（インデル）は、遺伝子のコード又は非コード領域を破壊する場合がある。代わりに、HDRは、内在的又は外因的に提供される長い一続きの相同性ドナーDNAを使用して、高い忠実度を有してDSBを修復する。HDRは、分裂細胞においてのみ活性であり、大部分の細胞型において相対的に低い頻度で生じる。本開示の多くの実施形態では、NHEJが、修復オペラントとして利用される。

10

【0134】

いくつかの実施形態では、Cas9（CRISPR関連タンパク質9）エンドヌクレアーゼは、ストレプトコッカス・ピオゲネス（*Streptococcus pyogenes*）に由来するが、他のCas9ホモログが使用されてもよい。本明細書に提供されるとおり、野生型Cas9が使用されてもよいし、Cas9の改変されたバージョンが使用されてもよい（例えば、Cas9の発展させたバージョン、又はCas9オルソログ若しくは変異体）ことが理解されるはずである。いくつかの実施形態では、Cas9は、Cpf1（クラスII CRISPR/Casシステム）などの別のRNA誘導型エンドヌクレアーゼと置き換えられてもよい。

20

【0135】

いくつかの実施形態では、CRISPR/Casシステムは、I型、II型、又はIII型のシステムに由来する構成要素を含む。CRISPR/Cas座位に関する最新の分類スキームは、I～V又はVI型を有するクラス1及びクラス2 CRISPR/Casシステムを定義する（Makarova et al., (2015) Nat Rev Microbiol, 13(11): 722-36; Shmakov et al., (2015) Mol Cell, 60: 385-397）。クラス2 CRISPR/Casシステムは、単一のタンパク質エフェクターを有する。II型、V型、及びVI型のCasタンパク質は、「クラス2 Casヌクレアーゼ」と本明細書で呼ばれる単一タンパク質のRNA誘導型エンドヌクレアーゼである。クラス2 Casヌクレアーゼとしては、例えば、Cas9、Cpf1、C2c1、C2c2、及びC2c3タンパク質が挙げられる。Cpf1ヌクレアーゼ（Zetsche et al., (2015) Cell 163: 1-13）は、Cas9のホモログであり、RuvC様ヌクレアーゼドメインを含有する。

30

【0136】

いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、III型CRISPR/Casシステムに由来する（例えば、CRISPR/Cas9システムに由来するCas9タンパク質）。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、クラス2 CRISPR/Casシステムに由来する（Cas9タンパク質又はCpf1タンパク質などの単一タンパク質Casヌクレアーゼ）。タンパク質のCas9及びCpf1ファミリーは、DNAエンドヌクレアーゼを有する酵素であり、それらは、本明細書にさらに記載されるとおり、適切なガイドRNAを設計することによって所望の核酸標的を切断するように誘導され得る。

40

【0137】

いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、2つ以上のヌクレアーゼドメインを含んでもよい。例えば、Cas9ヌクレアーゼは、少なくとも1つのRuvC様ヌクレアーゼドメイン（例えば、Cpf1）及び少なくとも1つのHNH様ヌクレアーゼドメイン（例えば、Cas9）を含んでもよい。いくつかの実施形態では、Cas9ヌクレアーゼは、標的配列においてDSBを導入する。いくつかの実施形態では、Cas9ヌクレアーゼは、ただ1つの機能性ヌクレアーゼドメインを含有するように改変される。例えば、C

50

a s 9ヌクレアーゼは、ヌクレアーゼドメインの1つが、変異されるか又は完全に若しくは部分的に欠失されて、その核酸切断活性が低減するように改変される。いくつかの実施形態では、C a s 9ヌクレアーゼは、機能性R u v C様ヌクレアーゼドメインを含有しないように改変される。他の実施形態では、C a s 9ヌクレアーゼは、機能性H N H様ヌクレアーゼドメインを含有しないように改変される。ヌクレアーゼドメインのただ1つが機能的であるいくつかの実施形態において、C a s 9ヌクレアーゼは、一本鎖切断（「ニック」）を標的配列に導入できるニッカーゼである。いくつかの実施形態では、C a s 9ヌクレアーゼのヌクレアーゼドメイン内の保存されたアミノ酸は、ヌクレアーゼ活性を低減又は改変するために置換される。いくつかの実施形態では、C a sヌクレアーゼニッカーゼは、R u v C様ヌクレアーゼドメイン中においてアミノ酸置換を含む。R u v C様ヌクレアーゼドメイン中における例示的なアミノ酸置換は、D 1 0 Aを含む（S . ピオゲネス（S . p y o g e n e s ）C a s 9ヌクレアーゼに基づく）。いくつかの実施形態では、ニッカーゼは、H N H様ヌクレアーゼドメイン中においてアミノ酸置換を含む。H N H様ヌクレアーゼドメイン中における例示的なアミノ酸置換は、E 7 6 2 A、H 8 4 0 A、N 8 6 3 A、H 9 8 3 A、及びD 9 8 6 Aを含む（S . ピオゲネス（S . p y o g e n e s ）C a s 9ヌクレアーゼに基づく）。

#### 【0138】

いくつかの実施形態では、C a sヌクレアーゼは、I型C R I S P R / C a sシステムに由来する。いくつかの実施形態では、C a sヌクレアーゼは、I型C R I S P R / C a sシステムのカスケード複合体の構成要素である。例えば、C a sヌクレアーゼは、C a s 3ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、C a sヌクレアーゼは、I I I型C R I S P R / C a sシステムに由来する。いくつかの実施形態では、C a sヌクレアーゼは、I V型C R I S P R / C a sシステムに由来する。いくつかの実施形態では、C a sヌクレアーゼは、V型C R I S P R / C a sシステムに由来する。いくつかの実施形態では、C a sヌクレアーゼは、V I型C R I S P R / C a sシステムに由来する。

#### 【0139】

##### ガイドRNA

本開示は、会合したポリペプチド（例えば、部位特異的ポリペプチド）の標的核酸内の特定の標的配列に対する活性を誘導できるゲノム標的化核酸を提供する。ゲノム標的化核酸は、RNAであり得る。ゲノム標的化RNAは、本明細書で「ガイドRNA」又は「g RNA」と呼ばれる。ガイドRNAは、目的の標的核酸配列、及びC R I S P R反復配列にハイブリダイズする少なくとも1つのスペーサー配列を含む。I I型システムにおいて、g RNAはまた、t r a c r RNA配列と呼ばれる第2のRNAを含む。I I型g RNAにおいて、C R I S P R反復配列及びt r a c r RNA配列は、互いにハイブリダイズして、二重鎖を形成する。V型g RNAにおいて、c r RNAが、二重鎖を形成する。両方のシステムにおいて、二重鎖は、部位特異的ポリペプチドに結合し、その結果、ガイドRNA及び部位特異的ポリペプチドは、複合体を形成する。いくつかの実施形態では、ゲノム標的化核酸は、その部位特異的ポリペプチドとの会合により、複合体に標的的特異性をもたらす。したがって、ゲノム標的化核酸は、部位特異的ポリペプチドの活性を誘導する。

#### 【0140】

当業者によって理解されるとおり、各ガイドRNAは、そのゲノム標的配列に相補的なスペーサー配列を含むように設計される。J i n e k e t a l . , S c i e n c e , 3 3 7 , 8 1 6 - 8 2 1 ( 2 0 1 2 ) 及びD e l t c h e v a e t a l . , N a t u r e , 4 7 1 , 6 0 2 - 6 0 7 ( 2 0 1 1 ) を参照されたい。

#### 【0141】

いくつかの実施形態では、ゲノム標的化核酸（例えば、g RNA）は、二重分子ガイドRNAである。いくつかの実施形態では、ゲノム標的化核酸（例えば、g RNA）は、単一分子ガイドRNAである。

#### 【0142】

二重分子ガイドRNAは、RNAの二本鎖を含む。第1の鎖は、5'から3'方向におい

10

20

30

40

50



実例として、CRISPR/Cas/Cpf1システムにおいて使用されるガイドRNA、又は他のより小さいRNAは、下に説明され且つ当該技術分野において記載されるとおり、化学的手段によって容易に合成され得る。化学合成法が拡大し続けている一方で、ポリヌクレオチドの長さが百数十ヌクレオチドを超えて大幅に長くなると、高速液体クロマトグラフィー（HPLC、PAGEなどのゲルの使用を回避する）などの方法によるそのようなRNAの精製は、より難しくなる傾向がある。比較的長いRNAを生成するために使用される1つの手法は、ともに連結される2つ以上の分子を生成することである。Cas9又はCpf1エンドヌクレアーゼをコードするものなどのはるかに長いRNAは、より容易に酵素的に生成される。当該技術分野において記載されるとおり、様々な種類のRNA修飾、例えば、安定性を増強し、自然免疫応答の可能性若しくは程度を低減し、且つ/又は他の特質を増強する修飾が、RNAの化学合成及び/若しくは酵素的生成の間又は後に導入され得る。

10

## 【0150】

いくつかの実施形態では、インデル頻度（編集頻度）は、非常に効率的なgRNA分子を同定するために使用され得るTIDE分析を使用して決定され得る。いくつかの実施形態では、非常に効率的なgRNAは、80%より高い遺伝子編集頻度をもたらす。例えば、gRNAは、それが、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は100%の遺伝子編集頻度をもたらす場合、非常に効率的であるとみなされる。

## 【0151】

いくつかの実施形態では、遺伝子破壊は、2つのガイドRNAを使用するゲノム配列の欠失によって発生し得る。細胞においてゲノム欠失をもたらす（例えば、細胞において遺伝子をノックアウトする）CRISPR-Cas遺伝子編集技術を使用する方法が知られている（Bauer DE et al. Vis. Exp. 2015; 95; e52118）。

20

## 【0152】

## スペーサー配列

いくつかの実施形態では、gRNAは、スペーサー配列を含む。スペーサー配列は、目的の標的核酸の標的配列（例えば、ゲノム標的配列などのDNA標的配列）を定義する配列（例えば、20個のヌクレオチド配列）である。いくつかの実施形態では、スペーサー配列は、15～30個のヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、スペーサー配列は、15、16、17、18、19、29、21、22、23、24、25、26、27、28、29、又は30個のヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、スペーサー配列は、20個のヌクレオチドである。

30

## 【0153】

「標的配列」は、PAM配列に隣接し、RNA誘導型ヌクレアーゼ（例えば、Cas9）によって改変される配列である。「標的核酸」は、二重鎖分子である：一方の鎖は、標的配列を含み、「PAM鎖」と呼ばれ、また他方の相補鎖は、「非PAM鎖」と呼ばれる。当業者は、gRNAスペーサー配列が、目的の標的核酸の非PAM鎖において位置する標的配列の逆相補鎖にハイブリダイズすることを認識している。したがって、gRNAスペーサー配列は、標的配列のRNA等価物である。例えば、標的配列が、5'-AGAGCAACAGTGCTGTGGCC-3'（配列番号86）である場合、gRNAスペーサー配列は、5'-AGAGCAACAGUGCUGUGGCC-3'（配列番号98）である。gRNAのスペーサーは、ハイブリダイゼーション（すなわち、塩基対形成）を介して配列特異的な様式で目的の標的核酸と相互作用する。したがって、スペーサーのヌクレオチド配列は、目的の標的核酸の標的配列に依存して変化する。

40

## 【0154】

本明細書のCRISPR/Casシステムにおいて、スペーサー配列は、システムにおいて使用されるCas9酵素のPAMの5'に位置する標的核酸の領域にハイブリダイズするように設計される。スペーサーは、標的配列と完全に一致してもよいし、ミスマッチを

50



ジューゲートは、Goodchild, Bioconjugate Chemistry, vol. 1 (3), 165-187 (1990)において概説される。

【0160】

本発明のある種の実施形態はまた、本明細書に記載されるgRNAをコードする核酸、例えばベクターを提供する。いくつかの実施形態では、核酸は、DNA分子である。他の実施形態では、核酸は、RNA分子である。いくつかの実施形態では、核酸は、crRNAをコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、crRNAをコードするヌクレオチド配列は、天然に存在するCRISPR/Casシステムに由来する反復配列の全て又は一部に隣接するスペーサーを含む。いくつかの実施形態では、核酸は、tracrRNAをコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、crRNA及びtracrRNAは、2つの別々の核酸によってコードされる。他の実施形態では、crRNA及びtracrRNAは、単一の核酸によってコードされる。いくつかの実施形態では、crRNA及びtracrRNAは、単一の核酸の逆鎖によってコードされる。他の実施形態では、crRNA及びtracrRNAは、単一の核酸の同じ鎖によってコードされる。

10

【0161】

いくつかの実施形態では、本開示によって提供されるgRNAは、当該技術分野において記載される任意の手段によって化学的に合成される(例えば、国際公開第2005/01248号パンフレットを参照のこと)。化学合成法が拡大し続けている一方で、ポリヌクレオチドの長さが百数十ヌクレオチドを超えて大幅に長くなると、高速液体クロマトグラフィー(HPLC、PAGEなどのゲルの使用を回避する)などの方法によるそのようなRNAの精製は、より難しくなる傾向がある。比較的長いRNAを生成するために使用される1つの手法は、ともに連結される2つ以上の分子を生成することである。

20

【0162】

いくつかの実施形態では、本開示によって提供されるgRNAは、酵素的な方法(例えば、インビトロ転写、IVT)によって合成される。

【0163】

当該技術分野において記載されるとおり、様々な種類のRNA修飾、例えば、安定性を増強し、自然免疫応答の可能性若しくは程度を低減し、且つ/又は他の特質を増強する修飾が、RNAの化学合成及び/若しくは酵素的生成の間又は後に導入され得る。

30

【0164】

ある種の実施形態では、2つ以上のガイドRNAが、CRISPR/Casヌクレアーゼシステムにより使用され得る。各ガイドRNAは、CRISPR/Casシステムが2つ以上の標的核酸を切断するように、異なる標的化配列を含有し得る。いくつかの実施形態では、1つ以上のガイドRNAは、Cas9 RNP複合体内部での活性又は安定性などの同じ又は異なる特性を有し得る。2つ以上のガイドRNAが使用される場合、各ガイドRNAは、同じ又は異なるベクター上にコードされ得る。2つ以上のガイドRNAの発現を駆動するために使用されるプロモーターは、同じであるか又は異なる。

【0165】

ガイドRNAは、crRNAの標的化配列(例えば、スペーサー配列)を介して目的の任意の配列を標的化し得る。いくつかの実施形態では、ガイドRNAの標的化配列と標的核酸分子上の標的配列の間の相補性の程度は、約60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、又は100%である。いくつかの実施形態では、ガイドRNAの標的化配列及び標的核酸分子上の標的配列は、100%相補的である。他の実施形態では、ガイドRNAの標的化配列及び標的核酸分子上の標的配列は、少なくとも1個のミスマッチを含有し得る。例えば、ガイドRNAの標的化配列及び標的核酸分子上の標的配列は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個のミスマッチを含有し得る。いくつかの実施形態では、ガイドRNAの標的化配列及び標的核酸分子上の標的配列は、1~6個のミスマッチを含有し得る。いくつかの実施形態では、ガイドRNAの標的化配列及び標的核酸分子上の標的配列は、5又は6個のミスマッチ

40

50

を含有し得る。

【0166】

標的化配列の長さは、CRISPR/Cas9システム及び使用される構成要素に依存し得る。例えば、異なる細菌種に由来する異なるCas9タンパク質は、可変の最適な標的化配列の長さを有する。したがって、標的化配列は、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、又は50を超えるヌクレオチド長を含み得る。いくつかの実施形態では、標的化配列は、18~24ヌクレオチド長を含み得る。いくつかの実施形態では、標的化配列は、19~21ヌクレオチド長を含み得る。いくつかの実施形態では、標的化配列は、20ヌクレオチド長を含み得る。

10

【0167】

本開示のいくつかの実施形態では、CRISPR/Casヌクレアーゼシステムは、少なくとも1個のガイドRNAを含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNA及びCasタンパク質は、リボ核タンパク質(RNP)、例えば、CRISPR/Cas複合体を形成し得る。ガイドRNAは、Casタンパク質を標的核酸分子(例えば、ゲノムDNA分子)上の標的配列に誘導し得るが、ここで、Casタンパク質は、標的核酸を切断する。いくつかの実施形態では、CRISPR/Cas複合体は、Cpf1/ガイドRNA複合体である。いくつかの実施形態では、CRISPR複合体は、I型CRISPR/Cas9複合体である。いくつかの実施形態では、Casタンパク質は、Cas9タンパク質である。いくつかの実施形態では、CRISPR/Cas9複合体は、Cas9/ガイドRNA複合体である。

20

【0168】

ガイドRNA及びヌクレアーゼの送達

いくつかの実施形態では、gRNA及びRNA誘導型ヌクレアーゼは、同時に又は逐次的に、別々に細胞に送達される。いくつかの実施形態では、gRNA及びRNA誘導型ヌクレアーゼは、細胞と一緒に送達される。いくつかの実施形態では、gRNA及びRNA誘導型ヌクレアーゼは、ともに予め複合体を形成して、リボ核タンパク質(RNP)を形成する。

【0169】

RNPは、少なくともそれらが、核酸が豊富な細胞環境中での乱雑な相互作用のリスクを最小化し、且つRNAを分解から保護するため、遺伝子編集に有用である。RNPを形成するための方法は、当該技術分野において知られている。いくつかの実施形態では、RNA誘導型ヌクレアーゼ(例えば、Cas9ヌクレアーゼなどのCasヌクレアーゼ)及び目的の遺伝子を標的化するgRNAを含有するRNPが、細胞(例えば、T細胞)に送達される。いくつかの実施形態では、RNPは、エレクトロポレーションによってT細胞に送達される。

30

【0170】

本明細書で使用する場合、「TRAC標的化RNP」は、RNA誘導型ヌクレアーゼと予め複合体を形成したTRAC遺伝子を標的化するgRNAを指す。本明細書で使用する場合、「2M標的化RNP」は、RNA誘導型ヌクレアーゼと予め複合体を形成した2M遺伝子を標的化するgRNAを指す。本明細書で使用する場合、「CD70標的化RNP」は、RNA誘導型ヌクレアーゼと予め複合体を形成したCD70遺伝子を標的化するgRNAを指す。本明細書で使用する場合、「PD-1標的化RNP」は、RNA誘導型ヌクレアーゼと予め複合体を形成したPD-1遺伝子を標的化するgRNAを指す。

40

【0171】

いくつかの実施形態では、TRAC標的化RNPが、細胞に送達される。いくつかの実施形態では、2M標的化RNPが、細胞に送達される。いくつかの実施形態では、CD70標的化RNPが、細胞に送達される。いくつかの実施形態では、PD-1標的化RNPが、細胞に送達される。

【0172】

50

いくつかの実施形態では、2つ以上のRNPが、細胞に送達される。いくつかの実施形態では、2つ以上のRNPが、細胞に別々に送達される。いくつかの実施形態では、2つ以上のRNPが、細胞に同時に送達される。いくつかの実施形態では、以下のRNPの少なくとも1つが、細胞に送達される：

(i) TRAC 標的化RNP；

(ii) 2M 標的化RNP；

(iii) CD70 標的化RNP；又は

(iv) PD-1 標的化RNP。いくつかの実施形態では、以下のRNPの少なくとも2つが、細胞に送達される：

(i) TRAC 標的化RNP；

(ii) 2M 標的化RNP；

(iii) CD70 標的化RNP；又は

(iv) PD-1 標的化RNP。

【0173】

いくつかの実施形態では、RNA誘導型ヌクレアーゼは、RNA誘導型ヌクレアーゼを発現するDNAベクター、RNA誘導型ヌクレアーゼをコードするRNA、又はタンパク質において細胞に送達される。いくつかの実施形態では、遺伝子を標的化するgRNAは、RNA、又はgRNAを発現するDNAベクターとして細胞に送達される。

【0174】

RNA誘導型ヌクレアーゼ、gRNA、及び/又はRNPの送達は、直接的な注射又は既知の方法、例えば、エレクトロポレーション又は化学的トランスフェクションを使用する細胞トランスフェクションを介するものであり得る。他の細胞トランスフェクション法が使用されてもよい。

【0175】

キメラ抗原受容体(CAR)T細胞

キメラ抗原受容体は、腫瘍細胞によって発現される抗原を認識し、それに結合するように操作された人工の免疫細胞受容体を指す。一般に、CARは、T細胞のために設計され、T細胞受容体(TCR)複合体のシグナル伝達ドメイン及び抗原認識ドメイン(例えば、抗体の一本鎖断片(scFv)又は他の抗体断片)のキメラである(Enblad et al., Human Gene Therapy, 2015; 26(8): 498-505)。CARを発現するT細胞は、CAR T細胞と呼ばれる。CARは、MHCに制限されない様式で選択された標的に対するT細胞の特異性及び反応性を再指示する能力を有する。MHCに制限されない抗原認識は、CARを発現するT細胞に抗原プロセッシングに非依存的な抗原を認識する能力を与え、それにより腫瘍エスケープの主要な機構をバイパスする。さらに、T細胞において発現されるとき、CARは、内在性のT細胞受容体(TCR)アルファ及びベータ鎖と有利に二量体化しない。CARは、それらが結合する抗原によって参照される場合が多い。例えば、「CD19 CAR」、「CD70 CAR」、「CD33 CAR」及び「BCMA CAR」は、それぞれCD19、CD70、CD33又はBCMAに特異的に結合する抗原結合ドメインを含むCARである。したがって、このような用語は、抗CD19 CAR、抗CD70 CAR、抗CD33 CAR及び抗BCMA CARと互換的である。抗原に特異的に結合するCARが、いずれかの用語法により参照され得ることは当業者によって理解されるであろう。

【0176】

4つの世代のCARが存在し、その各々は異なる構成要素を含有する。第一世代のCARは、抗体に由来するscFvをヒンジ及び膜貫通ドメインを介してT細胞受容体のCD3ゼータ(又はz)細胞内シグナル伝達ドメインに連結する。第二世代のCARは、追加のドメイン、例えば、CD28、4-1BB(41BB)、又はICOSを組み込んで、共刺激シグナルを供給する。第三世代のCARは、TCR CD3 鎖に融合した2つの共刺激ドメインを含有する。第三世代の共刺激ドメインは、例えば、CD3、CD27、CD28、4-1BB、ICOS、又はOX40の組合せを含み得る。CARは、い

10

20

30

40

50

くつかの実施形態において、一本鎖可変断片 ( s c F v ) に一般に由来する外部ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメイン、並びに C D 3 Z 及び / 若しくは共刺激分子に由来する 1 つ ( 第一世代 )、2 つ ( 第二世代 )、又は 3 つ ( 第三世代 ) のシグナル伝達ドメインを有する内部ドメインを含有する ( M a u d e e t a l . , B l o o d . 2 0 1 5 ; 1 2 5 ( 2 6 ) : 4 0 1 7 - 4 0 2 3 ; K a k a r l a a n d G o t t s c h a l k , C a n c e r J . 2 0 1 4 ; 2 0 ( 2 ) : 1 5 1 - 1 5 5 ) 。

【 0 1 7 7 】

C A R は通常、それらの機能特性が異なる。T 細胞受容体の C D 3 シグナル伝達ドメインは、結合される場合、T 細胞の増殖を活性化し、且つ誘導することになるが、アネルギーを引き起こし得る ( 身体の防御機構による反応の欠如、末梢リンパ球寛容の直接的な誘導をもたらす ) 。リンパ球は、それらが特定の抗原に应答できない場合、アネルギー性であるとみなされる。第二世代の C A R における共刺激ドメインの付加は、改変 T 細胞の複製能及び持続を向上させた。同様の抗腫瘍効果は、C D 2 8 又は 4 - 1 B B C A R によりインビトロで観察されるが、前臨床インビボ研究は、4 - 1 B B C A R が、優れた増殖及び / 又は持続をもたらし得ることを示唆する。臨床試験は、これらの第二世代の C A R の両方が、インビボで実質的な T 細胞増殖を誘導できることを示唆するが、4 - 1 B B 共刺激ドメインを含有する C A R は、より長く持続するように見える。第三世代の C A R は、効力を増強する複数のシグナル伝達ドメイン ( 共刺激 ) を組み合わせる。

10

【 0 1 7 8 】

いくつかの実施形態では、キメラ抗原受容体は、第一世代の C A R である。他の実施形態では、キメラ抗原受容体は、第二世代の C A R である。さらに他の実施形態では、キメラ抗原受容体は、第三世代の C A R である。

20

【 0 1 7 9 】

C A R は、いくつかの実施形態において、抗原結合ドメイン ( 例えば、s c F v などの抗体 )、膜貫通ドメイン、及び細胞質 ( 内 ) ドメインを含む細胞外 ( 外部 ) ドメインを含む。

【 0 1 8 0 】

外部ドメイン

外部ドメインは、細胞外の体液に曝される C A R の領域であり、且ついくつかの実施形態において、抗原結合ドメイン、並びに任意選択によりシグナルペプチド、スペーサドメイン、及び / 又はヒンジドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、短いリンカーペプチドと連結した免疫グロブリンの V L 及び V H を含む一本鎖可変断片 ( s c F v ) である。リンカーは、いくつかの実施形態において、可動性のために一続きのグリシン及びセリン並びに可溶性を加えるための一続きのグルタミン酸及びリジンとともに親水性残基を含む。一本鎖可変断片 ( s c F v ) は、実際には抗体の断片ではないが、代わりに 1 0 ~ 約 2 5 個のアミノ酸の短いリンカーペプチドと連結した免疫グロブリンの重 ( V H ) 及び軽鎖 ( V L ) の可変領域の融合タンパク質である。リンカーは通常、可動性のためにグリシン、及び溶解性のためにセリン又はスレオニンを豊富に含み、V H の N 末端を V L の C 末端に連結するか又はその逆のいずれかであり得る。このタンパク質は、定常領域の除去及びリンカーの導入にもかかわらず、元の免疫グロブリンの特異性を保持する。いくつかの実施形態では、本開示の s c F v は、ヒト化されている。他の実施形態では、s c F v は、完全ヒトである。さらに他の実施形態では、s c F v は、( 例えば、マウス及びヒト配列の ) キメラである。

30

40

【 0 1 8 1 】

いくつかの実施形態では、s c F v は、抗 C D 7 0 s c F v である ( C D 7 0 に特異的に結合する ) 。本明細書に提供されるとおりに使用され得る抗 C D 7 0 s c F v タンパク質の非限定的な例は、配列番号 4 8 又は配列番号 5 0 のアミノ酸配列を含み得る。

【 0 1 8 2 】

いくつかの実施形態では、s c F v は、抗 B C M A s c F v である ( B C M A に特異的に結合する ) 。本明細書に提供されるとおりに使用され得る抗 B C M A s c F v タン

50

パク質の非限定的な例は、配列番号 59 のアミノ酸配列を含み得る。

【0183】

いくつかの実施形態では、s c F v は、抗 C D 1 9 s c F v である ( C D 1 9 に特異的に結合する)。本明細書に提供されるとおりに使用され得る抗 C D 1 9 s c F v タンパク質の非限定的な例は、配列番号 151 のアミノ酸配列を含み得る。

【0184】

いくつかの実施形態では、s c F v は、抗 C D 3 3 s c F v である ( C D 3 3 に特異的に結合する)。本明細書に提供されるとおりに使用され得る抗 C D 3 3 s c F v タンパク質の非限定的な例は、配列番号 137 のアミノ酸配列を含み得る。

【0185】

他の s c F v タンパク質が使用されてもよい。

【0186】

シグナルペプチドは、C A R 結合の抗原特異性を増強し得る。シグナルペプチドは、C D 8 などであるがこれに限定されない抗体、及び G S T 又は F L A G などであるがこれらに限定されないエピトープタグに由来し得る。シグナルペプチドの例としては、M L L L V T S L L L C E L P H P A F L L I P (配列番号 88) 及び M A L P V T A L L L P L A L L L H A A R P (配列番号 89) が挙げられる。他のシグナルペプチドが使用されてもよい。

【0187】

いくつかの実施形態では、スペーサドメイン又はヒンジドメインは、C A R の細胞外ドメイン (抗原結合ドメインを含む) と膜貫通ドメインの間、又は C A R の細胞質内ドメインと膜貫通ドメインの間に位置する。スペーサドメインは、膜貫通ドメインをポリペプチド鎖中の細胞外ドメイン及び/又は細胞質内ドメインに連結するのに機能する任意のオリゴペプチド又はポリペプチドである。ヒンジドメインは、C A R、若しくはそのドメインに可動性をもたらすか、又は C A R、若しくはそのドメインの立体障害を妨げるのに機能する任意のオリゴペプチド又はポリペプチドである。いくつかの実施形態では、スペーサドメイン又はヒンジドメインは、最大で 300 個のアミノ酸 (例えば、10 ~ 100 個のアミノ酸、又は 5 ~ 20 個のアミノ酸) を含み得る。いくつかの実施形態では、1 つ以上のドメインが、C A R の他の領域に含まれてもよい。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、C D 8 ヒンジドメインである。他のヒンジドメインが使用されてもよい。

【0188】

膜貫通ドメイン

膜貫通ドメインは、膜をまたがる疎水性アルファヘリックスである。膜貫通ドメインは、C A R の安定性をもたらす。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるとおりの C A R の膜貫通ドメインは、C D 8 膜貫通ドメインである。他の実施形態では、膜貫通ドメインは、C D 2 8 膜貫通ドメインである。さらに他の実施形態では、膜貫通ドメインは、C D 8 及び C D 2 8 膜貫通ドメインのキメラである。他の膜貫通ドメインが、本明細書に提供されるとおりに使用されてもよい。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、C D 8 a 膜貫通ドメインである：

【化 2】

FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG

AVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNR (配列番号 90)

他の膜貫通ドメインが使用されてもよい。

【0189】

いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、アミノ酸配列：I Y I W A P L A G T C G V L L L S L V I T L Y (配列番号 126) を含む C D 8 a 膜貫通ドメインである。

【0190】

10

20

30

40

50

内部ドメイン

内部ドメインは、受容体の機能的な末端である。抗原認識の後、受容体クラスター及びシグナルは、細胞に伝達される。最も一般的に使用される内部ドメインの構成要素は、CD3-ゼータであり、これは、3つの免疫受容活性化チロシンモチーフ（ITAM）を含有する。これは、抗原が結合された後に活性化シグナルをT細胞に伝達する。多くの場合、CD3-ゼータは、十分に能力のある活性化シグナルをもたらさない場合があり、したがって、共刺激シグナル伝達が使用される。例えば、CD28及び/又は4-1BBが、CD3-ゼータ（CD3）とともに使用されて、増殖/生存シグナルを伝達し得る。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるとおりのCARの共刺激分子は、CD28共刺激分子である。他の実施形態では、共刺激分子は、4-1BB共刺激分子である。いくつかの実施形態では、CARは、CD3及びCD28を含む。他の実施形態では、CARは、CD3-ゼータ及び4-1BBを含む。さらに他の実施形態では、CARは、CD3、CD28、及び4-1BBを含む。表4は、本明細書で使用され得る4-1BB、CD28及びCD3-ゼータに由来するシグナル伝達ドメインの例を提供する。

10

【0191】

【表4】

表4.

名称	配列	配列番号
4-1BB	AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAAACAACCATT TATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCT GCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG	18
	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	19
CD28	TCAAAGCGGAGTAGGTTGTTGCATTCCGATTACATGAATATGACT CCTCGCCGGCCTGGGCCGACAAGAAAACATTACCAACCCTATGC CCCCCACGAGACTTCGCTGCGTACAGGTCC	121
	SKRSRLLIISDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	20
CD3-ゼータ	CGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCATATCAGCA AGGACAGAATCAGCTGTATAACGAACTGAATTTGGGACGCCGCG AGGAGTATGACGTGCTTGATAAACGCCGGGGGAGAGACCCGGAA ATGGGGGGTAAACCCCGAAGAAAGAATCCCCAAGAAGGACTCTA CAATGAACTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTCAGAAA TAGGTATGAAGGGCGAACGACGACGGGGAAAAGGTCACGATGG CCTCTACCAAGGGTTGAGTACGGCAACCAAAGATACGTACGATG CACTGCATATGCAGGCCCTGCCTCCAGA	21
	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEJ.NL.GRREFYDVL.DKRRGRDPFM GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDL YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	22

20

30

【0192】

癌抗原

CD70

いくつかの実施形態では、本開示のT細胞は、CD70を標的化するように設計されたキメラ抗原受容体（CAR）により操作される。CD70は、T細胞の増殖及び生存に関与する共刺激受容体であるCD27についてのリガンドとして最初に同定された。CD70は、ウイルス感染中の流入領域リンパ節において少ないパーセンテージの活性化T細胞及び抗原提示細胞上においてのみ見出される。明細胞腎臓癌、乳癌、胃癌、卵巣癌、神経膠芽腫、及び血液悪性腫瘍などの固形癌を含むがこれらに限定されない多くのヒト腫瘍もまた、CD70を発現する。正常組織におけるその限定的な発現パターン及び多くの癌における過剰発現のために、CD70は、魅力的な治療標的である。

40

【0193】

50

したがって、いくつかの実施形態では、本開示のT細胞は、抗CD70抗体（例えば、抗CD70 s c F v）を含む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、抗CD70抗体は、配列番号47又は49の配列によってコードされる抗CD70 s c F vである。いくつかの実施形態では、抗CD70抗体は、配列番号48又は50の配列を含む抗CD70 s c F vである。いくつかの実施形態では、抗CD70抗体は、配列番号51の配列を含むVHを含む抗CD70 s c F vである。いくつかの実施形態では、抗CD70抗体は、配列番号52の配列を含むVLを含む抗CD70 s c F vである。いくつかの実施形態では、抗CD70抗体を含むCARは、配列番号45の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抗体を含むCARは、配列番号46の配列を含む。

10

## 【0194】

いくつかの実施形態では、抗CD70抗体は、配列番号47又は49と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされる抗CD70 s c F vである。いくつかの実施形態では、抗CD70抗体は、配列番号48又は50と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む抗CD70 s c F vである。いくつかの実施形態では、抗CD70抗体は、配列番号51と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むVHを含む抗CD70 s c F vである。いくつかの実施形態では、抗CD70抗体は、配列番号52と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むVLを含む抗CD70 s c F vである。いくつかの実施形態では、抗CD70抗体を含むCARは、配列番号45と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有する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抗体を含むCARは、配列番号46と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

20

30

## 【0195】

## BCMA

いくつかの実施形態では、本開示のT細胞は、BCMAを標的化するように設計されたCARにより操作される。B細胞成熟抗原（BCMA、CD269）は、腫瘍壊死因子受容体（TNF）スーパーファミリーのメンバーである。BCMAは、B細胞活性化因子（BAFF）及び増殖誘導リガンド（APRIL）に結合する。非悪性細胞の中で、BCMAは、形質細胞及び成熟B細胞のサブセットによって主に発現される。BCMAは、多発性骨髄腫細胞及び非ホジキンリンパ腫を含むB系列細胞によって選択的に発現され、したがって、BCMAもまた、魅力的な治療標的である。

40

## 【0196】

したがって、いくつかの実施形態では、本開示のT細胞は、抗BCMA抗体（例えば、抗BCMA s c F v）を含む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、抗BCMA抗体は、配列番号58の配列によってコードされる抗BCMA s c F vである。いくつかの実施形態では、抗BCMA抗体は、配列番号59の配列を含む抗BCMA s c F vである。いくつかの実施形態では、抗BCMA抗体は、配列番号60の配列を含むVHを含む抗BCMA s c F vである。いくつかの実施形態では、抗BCM

50

A抗体は、配列番号61の配列を含むVLを含む抗BCMA s c F vである。いくつかの実施形態では、抗BCMA抗体を含むCARは、配列番号56の配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、抗BCMA抗体を含むCARは、配列番号57の配列を含む。

【0197】

いくつかの実施形態では、抗BCMA抗体は、配列番号58と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされる抗BCMA s c F vである。いくつかの実施形態では、抗BCMA抗体は、配列番号59と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む抗BCMA s c F vである。いくつかの実施形態では、抗BCMA抗体は、配列番号60と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むVHを含む抗BCMA s c F vである。いくつかの実施形態では、抗BCMA抗体は、配列番号61と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むVLを含む抗BCMA s c F vである。いくつかの実施形態では、抗BCMA抗体を含むCARは、配列番号56と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有する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BCMA抗体を含むCARは、配列番号57と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0198】

CD19

いくつかの実施形態では、本開示のT細胞は、CD19を標的化するように設計されたCARにより操作される。表面抗原分類19(CD19)は、白血病前駆細胞上で検出可能な抗原決定基である。ヒト及びマウスのアミノ酸及び核酸配列は、GenBank、UniProt及びSwiss-Protなどの公的データベースにおいて見出すことができる。例えば、ヒトCD19のアミノ酸配列は、UniProt/Swiss-Prot受入番号P15391として見出すことができ、ヒトCD19のヌクレオチド配列のコード化は、受入番号NM-001178098で見出すことができる。CD19は、例えば、急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ球白血病及び非ホジキンリンパ腫を含む大部分のB細胞系癌上で発現される。それはまた、B細胞前駆体の早期のマーカーである。例えば、Nicholson et al. Mol. Immun. 34(16-17):1157-1165(1997)を参照されたい。

【0199】

したがって、いくつかの実施形態では、本開示のT細胞は、抗CD19抗体(例えば、抗CD19 s c F v)を含む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、抗CD19抗体は、配列番号150の配列によってコードされる抗CD19 s c F vである。いくつかの実施形態では、抗CD19抗体は、配列番号151の配列を含む抗CD19 s c F vである。いくつかの実施形態では、抗CD19抗体は、配列番号152の配列を含むVHを含む抗CD19 s c F vである。いくつかの実施形態では、抗CD19抗体は、配列番号153の配列を含むVLを含む抗CD19 s c F vである。いくつかの実施形態では、抗CD19抗体を含むCARは、配列番号148の配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、抗CD19抗体を含むCARは、配列番号1

10

20

30

40

50

49の配列を含む。

【0200】

いくつかの実施形態では、抗CD19抗体は、配列番号150と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされる抗CD19 scFvである。いくつかの実施形態では、抗CD19抗体は、配列番号151と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む抗CD19 scFvである。いくつかの実施形態では、抗CD19抗体は、配列番号152と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むVHを含む抗CD19 scFvである。いくつかの実施形態では、抗CD19抗体は、配列番号153と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むVLを含む抗CD19 scFvである。いくつかの実施形態では、抗CD19抗体を含むCARは、配列番号148と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有する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、抗CD19抗体を含むCARは、配列番号149と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0201】

CD33

いくつかの実施形態では、本開示のT細胞は、CD33を標的化するように設計されたCARにより操作される。Siglec3としても知られるCD33は、シアル酸に結合することが知られる骨髄系列の細胞上で発現される膜貫通受容体である。CD33は、癌細胞（例えば、急性骨髄性白血病）において発現されるため、CD33は、これらの悪性腫瘍を標的化するための細胞表面マーカーとなると考えられる。

【0202】

したがって、いくつかの実施形態では、本開示のT細胞は、抗CD33抗体（例えば、抗CD33 scFv）を含む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、抗CD33抗体は、配列番号138の配列によってコードされる抗CD33 scFvである。いくつかの実施形態では、抗CD33抗体は、配列番号137の配列を含む抗CD33 scFvである。いくつかの実施形態では、抗CD33抗体は、配列番号140の配列を含むVHを含む抗CD19 scFvである。いくつかの実施形態では、抗CD33抗体は、配列番号141の配列を含むVLを含む抗CD33 scFvである。いくつかの実施形態では、抗CD33抗体を含むCARは、配列番号136の配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、抗CD33抗体を含むCARは、配列番号139の配列を含む。

【0203】

いくつかの実施形態では、抗CD33抗体は、配列番号138と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされる抗CD33 scFvである。いくつかの実施形態では、抗CD33抗体は、配列番号137と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ

10

20

30

40

50

酸配列を含む抗CD33 scFvである。いくつかの実施形態では、抗CD33抗体は、配列番号140と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むVHを含む抗CD19 scFvである。いくつかの実施形態では、抗CD33抗体は、配列番号141と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むVLを含む抗CD33 scFvである。いくつかの実施形態では、抗CD33抗体を含むCARは、配列番号136と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有する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CD33抗体を含むCARは、配列番号139と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

#### 【0204】

##### 抗体

抗体（複数の形態において互換的に使用される）は、免疫グロブリン分子の可変領域に位置する少なくとも1つの抗原認識部位を介して炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質、ポリペプチドなどの標的に特異的に結合できる免疫グロブリン分子である。本明細書で使用する場合、用語「抗体」は、インタクトな（すなわち、全長）モノクローナル抗体だけでなく、抗原結合断片（Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv）、一本鎖可変断片（scFv）、その変異体、抗体部分を含む融合タンパク質、ヒト化抗体、キメラ抗体、ダイアボディ、直鎖状抗体、一本鎖抗体、単ドメイン抗体（例えば、ラクダ又はラマV<sub>H</sub>H抗体）、多重特異性抗体（例えば、二重特性抗体）並びに抗体のグリコシル化バリエーション、抗体のアミノ酸配列バリエーション、及び共有結合的に修飾された抗体を含む、要求される特異性の抗原認識部位を含む免疫グロブリン分子の任意の他の修飾された配置も包含する。

#### 【0205】

典型的な抗体分子は、通常、抗原結合に關与する重鎖可変領域（VH）及び軽鎖可変領域（VL）を含む。抗原結合に關与するこれらの領域/残基は、当該技術分野において知られる方法によって参照抗体（例えば、本明細書に記載される抗CD70抗体又は抗BCMA抗体）のVH/VL配列のアミノ酸配列から同定され得る。VH及びVL領域は、「フレームワーク領域」（「FR」）として知られる、より保存されている領域が挿入された、「相補性決定領域」（「CDR」）として知られる超可変領域にさらに細分することができる。各VH及びVLは通常、次の順でアミノ末端からカルボキシ末端に整列した、3つのCDR及び4つのFRで構成される：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。フレームワーク領域及びCDRの範囲は、当該技術分野において知られる方法論を使用して、例えば、全てが当該技術分野においてよく知られるKabata定義、Chothia定義、AbM定義、及び/又はcontact定義によって、正確に同定され得る。本明細書で使用する場合、CDRは、当該技術分野において知られる任意の方法によって定義されるCDRを指し得る。同じCDRを有する2つの抗体は、2つの抗体が、同じ方法によって決定された当該CDRの同じアミノ酸配列を有することを意味する。例えば、Kabata, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, Chothia et al., (1989) Nature 342: 877; Chothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917, Al-lazikani et al (1997) J. Molec. Biol. 273: 9

27-948; 及び Almagro, J. Mol. Recognit. 17: 132-143 (2004) を参照されたい。hgmp.mrc.ac.uk 及び bioinf.org.uk/abs も参照されたい。

【0206】

いくつかの実施形態では、抗体は、抗CD70 scFv、抗BCMA scFv、抗CD19 scFv 又は抗CD33 scFv などの scFv である。抗体は、IgD、IgE、IgG、IgA、又はIgM (又はそのサブクラス) などの任意のクラスの抗体を含み、且つ抗体は、いずれかの特定のクラスのものである必要はない。重鎖の定常ドメインの抗体アミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンは、各種クラスに割り当てられ得る。免疫グロブリンには5つの主要なクラス: IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMがあり、これらのいくつかはさらに、サブクラス(アイソタイプ)、例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 及びIgA2 に分けられ得る。免疫グロブリンの各種クラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれアルファ、デルタ、イプシロン、ガンマ、及びミューと呼ばれる。免疫グロブリンの各種クラスのサブユニット構造及び三次元配置は、よく知られている。

10

【0207】

本明細書に提供されるとおりに使用されることになる抗体は、マウス、ラット、ヒト、又は任意の他の起源(キメラ抗体又はヒト化抗体を含む)であり得る。いくつかの例において、抗体は、免疫学的に不活性である、例えば、補体に媒介される溶解を誘発しないか、又は抗体依存性細胞傷害(ADCC)を刺激しない定常領域などの改変された定常領域を含む。

20

【0208】

いくつかの実施形態では、本開示の抗体は、ヒト化抗体である。ヒト化抗体は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含有する特定のキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、又はその抗原結合断片である非ヒト(例えば、マウス)抗体の形態を指す。大部分において、ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域(CDR)の残基が、所望の特異性、親和性及び能力を有するマウス、ラット、又はウサギなどの非ヒト種(ドナー抗体)のCDR由来の残基により置き換えられたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基により置き換えられる。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されたCDR又はフレームワーク配列にも見出されないが、抗体性能をさらに洗練させ、且つ最適化するために含まれる残基を含んでもよい。一般に、ヒト化抗体は、全て又は実質的に全てのCDR領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全て又は実質的に全てのFR領域がヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインを実質的に全て含むことになる。最適なヒト化抗体はまた、免疫グロブリン定常領域又はドメイン(Fc)、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域又はドメイン(Fc)の少なくとも一部も含むことになる。ヒト化抗体の他の形態は、元の抗体からの1つ以上のCDRに「由来する」1つ以上のCDRとも呼ばれる、元の抗体に関して改変された1つ以上のCDR(1、2、3、4、5、又は6つ)を有する。ヒト化抗体はまた、親和性成熟を伴う場合がある。

30

40

【0209】

いくつかの実施形態では、本開示の抗体は、ヒト抗体由来の重鎖定常領域及び軽鎖定常領域を含み得るキメラ抗体である。キメラ抗体は、第1の種に由来する可変領域又は可変領域の部分及び第2の種に由来する定常領域を有する抗体を指す。通常、これらのキメラ抗体において、軽鎖及び重鎖の両方の可変領域は、哺乳動物(例えば、マウス、ウサギ、及びラットなどの非ヒト哺乳動物)の1つの種に由来する抗体の可変領域を模倣するが、定常部分は、ヒトなどの別の哺乳動物に由来する抗体における配列と相同である。いくつかの実施形態では、アミノ酸改変は、可変領域及び/又は定常領域においてなされ得る。

【0210】

いくつかの実施形態では、本開示の抗体は、ヒトCD70、ヒトBCMA、ヒトCD1

50

9又はヒトCD33などの標的抗原に特異的に結合する。標的又はエピトープに「特異的に結合する」抗体は、当該技術分野でよく理解される用語であり、そのような特異的な結合を決定する方法もまた、当該技術分野でよく知られている。分子は、それが、代替の標的よりも、特定の標的抗原とより頻繁に、より迅速に、より長い持続時間で、且つ/又はより高い親和性で反応又は会合する場合、「特異的な結合」を示すと言われる。抗体は、それが、他の基質に結合するよりも、より高い親和性、結合活性で、より迅速に、且つ/又はより長い持続時間で結合する場合、標的抗原に「特異的に結合する」。例えば、CD70、BCMA、CD19又はCD33エピトープに特異的に(又は優先的に)結合する抗体は、それが、他のCD70、BCMA、CD19若しくはCD33エピトープ又は非CD70、非BCMA、非CD19若しくは非CD33エピトープに結合するよりも、より高い親和性、結合活性で、より迅速に、且つ/又はより長い持続時間でこのCD70、BCMA、CD19又はCD33エピトープに結合する抗体である。それはまた、例えば、第1の標的抗原に特異的に結合する抗体が、第2の標的抗原に特異的に又は優先的に結合する場合もあるし、結合しない場合もあるというこの定義を読むことによって理解される。そのため、「特異的な結合」又は「優先的な結合」は、必ずしも排他的結合を(含むことはできるが)必要とするものではない。一般に、必ずしもそうではないが、結合への参照は、優先的な結合を意味する。

**【0211】**

いくつかの実施形態では、抗体とCD70の間の平衡解離定数( $K_D$ )は、100 pM ~ 1  $\mu$ Mである。いくつかの実施形態では、抗体とCD70の間の $K_D$ は、1 nM ~ 100 nMである。

**【0212】**

いくつかの実施形態では、抗体とBCMAの間の平衡解離定数( $K_D$ )は、100 pM ~ 1  $\mu$ Mである。いくつかの実施形態では、抗体とBCMAの間の $K_D$ は、1 nM ~ 100 nMである。

**【0213】**

いくつかの実施形態では、抗体とCD19の間の平衡解離定数( $K_D$ )は、100 pM ~ 1  $\mu$ Mである。いくつかの実施形態では、抗体とCD19の間の $K_D$ は、1 nM ~ 100 nMである。

**【0214】**

いくつかの実施形態では、抗体とCD33の間の平衡解離定数( $K_D$ )は、100 pM ~ 1  $\mu$ Mである。いくつかの実施形態では、抗体とCD33の間の $K_D$ は、1 nM ~ 100 nMである。

**【0215】**

本明細書に開示されるとおりの例示的な抗体のいずれかの機能的バリエーションもまた本開示の範囲内である。機能的バリエーションは、参照抗体を基準としてVH及び/若しくはVL、又はVH CDRの1つ以上及び/若しくはVL CDRの1つ以上において1つ以上のアミノ酸残基の変異を含有し得るが、参照抗体と実質的に同様の結合活性及び生物学的活性(例えば、実質的に同様の結合親和性、結合特異性、阻害活性、抗腫瘍活性、又はこれらの組合せ)を保持している。

**【0216】**

いくつかの例において、本明細書で開示される抗体は、抗体A(VH:配列番号51; VL:配列番号52)又は抗体B(VH:配列番号60; VL:配列番号61)などの参照抗体のVH CDR1、VH CDR2、VH CDR3と比較して、10個以下のアミノ酸変異(例えば、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1個以下のアミノ酸変異)を合わせて含有するVH CDR1、VH CDR2、及びVH CDR3を含む。「合わせて」は、3つのVH CDRの全てにおけるアミノ酸変異の総数が、既定の範囲内であることを意味する。或いは又は加えて、抗体は、参照抗体のVL CDR1、VL CDR2、及びVL CDR3と比較して、10個以下のアミノ酸変異(例えば、9、8、7、6、5、4、3、2又は1個以下のアミノ酸変異)を合わせて含有するVL CDR1、VL

10

20

30

40

50

CDR 2、及びVL CDR 3を含み得る。

【0217】

いくつかの例において、本明細書で開示される抗体は、少なくとも1つが、抗体A (VH: 配列番号51; VL: 配列番号52) 又は抗体B (VH: 配列番号60; VL: 配列番号61) などの参照抗体の対応物のVH CDRと同程度に、5個以下のアミノ酸変異 (例えば、4、3、2、又は1個以下のアミノ酸変異) を含有するVH CDR 1、VH CDR 2、及びVH CDR 3を含み得る。特定の例において、抗体は、抗体A (VH: 配列番号51; VL: 配列番号52) 又は抗体B (VH: 配列番号60; VL: 配列番号61) などの参照抗体のVH CDR 3と同程度に、5個以下のアミノ酸変異 (例えば、4、3、2、又は1個以下のアミノ酸変異) を含有するVH CDR 3を含む。或いは又は加えて、抗体は、少なくとも1つが、参照抗体の対応物のVL CDRと同程度に、5個以下のアミノ酸変異 (例えば、4、3、2、又は1個以下のアミノ酸変異) を含有するVL CDR 1、VL CDR 2、及びVL CDR 3を含み得る。特定の例において、抗体は、参照抗体のVL CDR 3と同程度に、5個以下のアミノ酸変異 (例えば、4、3、2、又は1個以下のアミノ酸変異) を含有するVL CDR 3を含む。

10

【0218】

場合によっては、アミノ酸残基の変異は、保存的なアミノ酸残基置換であり得る。本明細書で使用する場合、「保存的なアミノ酸置換」は、アミノ酸置換がなされるタンパク質の相対的な電荷又はサイズの特徴を変えないアミノ酸置換を指す。バリエーションは、そのような方法をまとめた参考文献、例えば、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, 又は *Current Protocols in Molecular Biology*, F. M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New Yorkに見出されるような、当業者に知られるポリペプチド配列を改変するための方法に従って作製され得る。アミノ酸の保存的置換は、以下の群内のアミノ酸の中でなされる置換を含む: (a) A G、S; (b) R K、H; (c) N Q、H; (d) D E、N; (e) C S、A; (f) Q N; (g) E D、Q; (h) G A; (i) H N、Q; (j) I L、V; (k) L I、V; (l) K R、H; (m) M L、I、Y; (n) F Y、M、L; (o) P A; (p) S T; (q) T S; (r) W Y、F; (s) Y W、F; 及び (t) V I、L。

20

30

【0219】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される抗体は、抗体A (VH: 配列番号51; VL: 配列番号52) 又は抗体B (VH: 配列番号60; VL: 配列番号61) などの参照抗体のVH CDRと合わせて少なくとも80% (例えば、85%、90%、95%、又は98%) 同一のVH CDRを含み得る。或いは又は加えて、抗体は、参照抗体のVL CDRと合わせて少なくとも80% (例えば、85%、90%、95%、又は98%) 同一のVL CDRを含み得る。いくつかの実施形態では、抗体は、抗体A (VH: 配列番号51; VL: 配列番号52) 若しくは抗体B (VH: 配列番号60; VL: 配列番号61) などの参照抗体のVHと少なくとも80% (例えば、85%、90%、95%、又は98%) 同一のVH及び/又は参照抗体のVLと少なくとも80% (例えば、85%、90%、95%、又は98%) 同一のVLを含み得る。

40

【0220】

いくつかの実施形態では、抗CD70抗体 (例えば、抗CD70 scFv) は、それぞれ配列番号51及び52に記載されるアミノ酸配列を含むVH及びVLを含む。いくつかの実施形態では、抗CD70抗体 (例えば、抗CD70 scFv) は、配列番号51に記載されるVHの3つのCDR (CDR 1、CDR 2及びCDR 2)、並びに配列番号52に記載されるVLの3つのCDR (CDR 1、CDR 2及びCDR 3) を含む。いくつかの実施形態では、抗CD70抗体 (例えば、抗CD70 scFv) は、配列番号5

50

1 に記載される V H の 3 つの C D R ( C D R 1、C D R 2 及び C D R 2 )、並びに配列番号 5 2 に記載される V L の 3 つの C D R ( C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 ) を含み、C D R は、K a b a t に従って決定される。いくつかの実施形態では、抗 C D 7 0 抗体 (例えば、抗 C D 7 0 s c F v ) は、配列番号 5 1 に記載される V H の 3 つの C D R ( C D R 1、C D R 2 及び C D R 2 )、並びに配列番号 5 2 に記載される V L の 3 つの C D R ( C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 ) を含み、C D R は、C h o t h i a に従って決定される。いくつかの実施形態では、抗 C D 7 0 抗体 (例えば、抗 C D 7 0 s c F v ) は、配列番号 5 1 に記載される V H の 3 つの C D R ( C D R 1、C D R 2 及び C D R 2 )、並びに配列番号 5 2 に記載される V L の 3 つの C D R ( C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 ) を含み、C D R は、A b M に従って決定される。いくつかの実施形態では、抗 C D 7 0 抗体 (例えば、抗 C D 7 0 s c F v ) は、それぞれ配列番号 6 8、7 0 及び 7 2 に記載される重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、並びに配列番号 6 2、6 4 及び 6 6 に記載される軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列を含む。いくつかの実施形態では、抗 C D 7 0 抗体 (例えば、抗 C D 7 0 s c F v ) は、それぞれ配列番号 6 9、7 1 及び 7 3 に記載される重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、並びに配列番号 6 3、6 5 及び 6 7 に記載される軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列を含む。いくつかの実施形態では、抗 C D 7 0 抗体は、配列番号 5 0 に記載されるアミノ酸配列を含む抗 C D 7 0 s c F v である。いくつかの実施形態では、抗 C D 7 0 抗体は、配列番号 4 9 に記載されるヌクレオチド配列によってコードされる抗 C D 7 0 s c F v である。いくつかの実施形態では、抗 C D 7 0 抗体は、配列番号 4 8 に記載されるアミノ酸配列を含む抗 C D 7 0 s c F v である。いくつかの実施形態では、抗 C D 7 0 抗体は、配列番号 4 7 に記載されるヌクレオチド配列によってコードされる抗 C D 7 0 s c F v である。

#### 【 0 2 2 1 】

いくつかの実施形態では、抗 B C M A 抗体 (例えば、抗 B C M A s c F v ) は、それぞれ配列番号 6 0 及び 6 1 に記載されるアミノ酸配列を含む V H 及び V L を含む。いくつかの実施形態では、抗 B C M A 抗体 (例えば、抗 B C M A s c F v ) は、配列番号 6 0 に記載される V H の 3 つの C D R ( C D R 1、C D R 2 及び C D R 2 )、並びに配列番号 6 1 に記載される V L の 3 つの C D R ( C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 ) を含む。いくつかの実施形態では、抗 B C M A 抗体 (例えば、抗 B C M A s c F v ) は、配列番号 6 0 に記載される V H の 3 つの C D R ( C D R 1、C D R 2 及び C D R 2 )、並びに配列番号 6 1 に記載される V L の 3 つの C D R ( C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 ) を含み、C D R は、K a b a t に従って決定される。いくつかの実施形態では、抗 B C M A 抗体 (例えば、抗 B C M A s c F v ) は、配列番号 6 0 に記載される V H の 3 つの C D R ( C D R 1、C D R 2 及び C D R 2 )、並びに配列番号 6 1 に記載される V L の 3 つの C D R ( C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 ) を含み、C D R は、C h o t h i a に従って決定される。いくつかの実施形態では、抗 B C M A 抗体 (例えば、抗 B C M A s c F v ) は、配列番号 6 0 に記載される V H の 3 つの C D R ( C D R 1、C D R 2 及び C D R 2 )、並びに配列番号 6 1 に記載される V L の 3 つの C D R ( C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 ) を含み、C D R は、A b M に従って決定される。いくつかの実施形態では、抗 B C M A 抗体 (例えば、抗 B C M A s c F v ) は、それぞれ配列番号 8 0、8 2 及び 8 4 に記載される重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、並びに配列番号 7 4、7 6 及び 7 8 に記載される軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列を含む。いくつかの実施形態では、抗 B C M A 抗体 (例えば、抗 B C M A s c F v ) は、それぞれ配列番号 8 1、8 3 及び 8 5 に記載される重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、並びに配列番号 7 5、7 7 及び 7 9 に記載される軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列を含む。いくつかの実施形態では、抗 B C M A 抗体は、配列番号 5 9 に記載されるアミノ酸配列を含む抗 B C M A s c F v である。いくつかの実施形態では、抗 B C M A 抗体は、配列番号 5 8 に記載されるヌクレオチド配列によってコードされる抗 B C M A s c F v である。

#### 【 0 2 2 2 】

いくつかの実施形態では、抗 C D 1 9 抗体 (例えば、抗 C D 1 9 s c F v ) は、それ

ぞれ配列番号152及び153に記載されるアミノ酸配列を含むVH及びVLを含む。いくつかの実施形態では、抗CD19抗体（例えば、抗CD19 scFv）は、配列番号152に記載されるVHの3つのCDR（CDR1、CDR2及びCDR2）、並びに配列番号153に記載されるVLの3つのCDR（CDR1、CDR2及びCDR3）を含む。いくつかの実施形態では、抗CD19抗体（例えば、抗CD19 scFv）は、配列番号152に記載されるVHの3つのCDR（CDR1、CDR2及びCDR2）、並びに配列番号153に記載されるVLの3つのCDR（CDR1、CDR2及びCDR3）を含み、CDRは、Kabatに従って決定される。いくつかの実施形態では、抗CD19抗体（例えば、抗CD19 scFv）は、配列番号152に記載されるVHの3つのCDR（CDR1、CDR2及びCDR2）、並びに配列番号153に記載されるVLの3つのCDR（CDR1、CDR2及びCDR3）を含み、CDRは、Chothiaに従って決定される。いくつかの実施形態では、抗CD19抗体（例えば、抗CD19 scFv）は、配列番号152に記載されるVHの3つのCDR（CDR1、CDR2及びCDR2）、並びに配列番号153に記載されるVLの3つのCDR（CDR1、CDR2及びCDR3）を含み、CDRは、AbMに従って決定される。いくつかの実施形態では、抗CD19抗体（例えば、抗CD19 scFv）は、それぞれ配列番号169、170及び171に記載される重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列、並びにそれぞれ配列番号166、167及び168に記載される軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含む。いくつかの実施形態では、抗CD19抗体（例えば、抗CD19 scFv）は、それぞれ配列番号175、176及び177に記載される重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列、並びにそれぞれ配列番号172、173及び174に記載される軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含む。いくつかの実施形態では、抗CD19抗体は、配列番号151に記載されるアミノ酸配列を含む抗CD19 scFvである。いくつかの実施形態では、抗CD19抗体は、配列番号150に記載されるヌクレオチド配列によってコードされる抗CD19 scFvである。

#### 【0223】

いくつかの実施形態では、抗CD33抗体（例えば、抗CD33 scFv）は、それぞれ配列番号140及び141に記載されるアミノ酸配列を含むVH及びVLを含む。いくつかの実施形態では、抗CD33抗体（例えば、抗CD33 scFv）は、配列番号140に記載されるVHの3つのCDR（CDR1、CDR2及びCDR2）、並びに配列番号141に記載されるVLの3つのCDR（CDR1、CDR2及びCDR3）を含む。いくつかの実施形態では、抗CD33抗体（例えば、抗CD33 scFv）は、配列番号140に記載されるVHの3つのCDR（CDR1、CDR2及びCDR2）、並びに配列番号141に記載されるVLの3つのCDR（CDR1、CDR2及びCDR3）を含み、CDRは、Kabatに従って決定される。いくつかの実施形態では、抗CD33抗体（例えば、抗CD33 scFv）は、配列番号140に記載されるVHの3つのCDR（CDR1、CDR2及びCDR2）、並びに配列番号141に記載されるVLの3つのCDR（CDR1、CDR2及びCDR3）を含み、CDRは、Chothiaに従って決定される。いくつかの実施形態では、抗CD33抗体（例えば、抗CD33 scFv）は、配列番号140に記載されるVHの3つのCDR（CDR1、CDR2及びCDR2）、並びに配列番号141に記載されるVLの3つのCDR（CDR1、CDR2及びCDR3）を含み、CDRは、AbMに従って決定される。いくつかの実施形態では、抗CD33抗体（例えば、抗CD33 scFv）は、それぞれ配列番号142、143及び144に記載される重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列、並びに配列番号145、146及び147に記載される軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含む。いくつかの実施形態では、抗CD33抗体（例えば、抗CD33 scFv）は、それぞれ配列番号178、179及び180に記載される重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列、並びに配列番号145、146及び147に記載される軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含む。いくつかの実施形態では、抗CD33抗体は、配列番号137に記載されるアミノ酸配列を含む抗CD33 scFvである。いくつかの実施形態で

10

20

30

40

50

は、抗CD33抗体は、配列番号138に記載されるヌクレオチド配列によってコードされる抗CD33 scFvである。

【0224】

抗原標的化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、本明細書に記載される操作されたT細胞は、腫瘍抗原標的化CARを含む。いくつかの実施形態では、腫瘍抗原は、通常、全く発現されない場合があるか、又は低レベルでのみ発現される場合がある非腫瘍細胞より腫瘍細胞においてより高レベルで発現されるタンパク質などの免疫原性分子を参照させる「腫瘍関連抗原」である。いくつかの実施形態では、腫瘍を内部に持つ宿主の免疫系によって認識される腫瘍関連構造は、腫瘍関連抗原と呼ばれる。いくつかの実施形態では、腫瘍関連抗原は、大部分の腫瘍によって広範に発現される場合、普遍的な腫瘍抗原である。いくつかの実施形態では、腫瘍関連抗原は、分化抗原、変異性抗原、過剰発現された細胞抗原又はウイルス抗原である。いくつかの実施形態では、腫瘍抗原は、腫瘍細胞に固有のタンパク質などの免疫原性分子を指す「腫瘍特異抗原」又は「TSA」である。腫瘍特異抗原は、腫瘍細胞において排他的に発現される。いくつかの実施形態では、腫瘍抗原は、CD70ではない。

10

【0225】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作されたT細胞は、非CD70標的化CAR（例えば、CD70に結合しないCAR）を含む。

【0226】

CD19 CAR

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作されたT細胞は、CD19 CAR、抗CD19 CAR又は抗CD19 CAR T細胞とも本明細書で呼ばれるCD19標的化CARを含む。いくつかの実施形態では、抗CD19 CARは、(i)抗CD19抗原結合ドメインを含む外部ドメイン、(ii)膜貫通ドメイン、及び(iii)少なくとも1つの共刺激ドメインを含む内部ドメインを含む。

20

【0227】

いくつかの実施形態では、抗CD19 CARは、(i)抗CD19抗原結合ドメインを含む外部ドメイン、(ii)CD8膜貫通ドメイン、並びに(iii)CD28又は41BB共刺激ドメイン、及びCD3-ゼータシグナル伝達ドメインを含む内部ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗CD19 CARは、(i)抗CD19抗原結合ドメインを含む外部ドメイン、(ii)CD8膜貫通ドメイン、並びに(iii)CD28共刺激ドメイン及びCD3-ゼータシグナル伝達ドメインを含む内部ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗CD19 CARは、(i)抗CD19抗原結合ドメインを含む外部ドメイン、(ii)CD8膜貫通ドメイン、並びに(iii)41BB共刺激ドメイン及びCD3-ゼータシグナル伝達ドメインを含む内部ドメインを含む。

30

【0228】

いくつかの実施形態では、抗CD19 CARは、(i)抗CD19抗原結合ドメインを含む外部ドメイン、(ii)配列番号126に記載されるアミノ酸配列を含むCD8膜貫通ドメイン、並びに(iii)配列番号20に記載されるアミノ酸配列を含むCD28共刺激ドメイン及び配列番号22に記載されるアミノ酸配列を含むCD3-ゼータシグナル伝達ドメインを含む内部ドメインを含む。

40

【0229】

いくつかの実施形態では、抗CD19 CARは、(i)配列番号151に記載されるアミノ酸配列を含む抗CD19 scFvを含む外部ドメイン、(ii)配列番号126に記載されるアミノ酸配列を含むCD8膜貫通ドメイン、並びに(iii)配列番号20に記載されるアミノ酸配列を含むCD28共刺激ドメイン及び配列番号22に記載されるアミノ酸配列を含むCD3-ゼータシグナル伝達ドメインを含む内部ドメインを含む。

【0230】

いくつかの実施形態では、抗CD19 CARは、(i)それぞれ配列番号152及び153に記載されるアミノ酸配列を含む可変重鎖及び軽鎖領域を含む抗CD19 scF

50

vを含む外部ドメイン、(ii)配列番号126に記載されるアミノ酸配列を含むCD8膜貫通ドメイン、並びに(iii)配列番号20に記載されるアミノ酸配列を含むCD28共刺激ドメイン及び配列番号22に記載されるアミノ酸配列を含むCD3-ゼータシグナル伝達ドメインを含む内部ドメインを含む。

【0231】

いくつかの実施形態では、抗CD19 CARは、配列番号149に記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗CD19 CARは、配列番号148に記載されるヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの態様では、抗CD19 CARは、配列番号148に記載されるヌクレオチド配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされる。

10

【0232】

CD33 CAR

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作されたT細胞は、CD33 CAR、抗CD33 CAR又は抗CD33 CAR T細胞とも本明細書で呼ばれるCD33標的化CARを含む。いくつかの実施形態では、抗CD33 CARは、(i)抗CD33抗原結合ドメインを含む外部ドメイン、(ii)膜貫通ドメイン、及び(iii)少なくとも1つの共刺激ドメインを含む内部ドメインを含む。

【0233】

いくつかの実施形態では、抗CD33 CARは、(i)抗CD33抗原結合ドメインを含む外部ドメイン、(ii)CD8膜貫通ドメイン、並びに(iii)CD28又は41BB共刺激ドメイン、及びCD3-ゼータシグナル伝達ドメインを含む内部ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗CD33 CARは、(i)抗CD33抗原結合ドメインを含む外部ドメイン、(ii)CD8膜貫通ドメイン、並びに(iii)CD28共刺激ドメイン及びCD3-ゼータシグナル伝達ドメインを含む内部ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗CD33 CARは、(i)抗CD33抗原結合ドメインを含む外部ドメイン、(ii)CD8膜貫通ドメイン、並びに(iii)41BB共刺激ドメイン及びCD3-ゼータシグナル伝達ドメインを含む内部ドメインを含む。

20

【0234】

いくつかの実施形態では、抗CD33 CARは、(i)抗CD33抗原結合ドメインを含む外部ドメイン、(ii)配列番号126に記載されるアミノ酸配列を含むCD8膜貫通ドメイン、並びに(iii)配列番号19に記載されるアミノ酸配列を含む41BB共刺激ドメイン及び配列番号22に記載されるアミノ酸配列を含むCD3-ゼータシグナル伝達ドメインを含む内部ドメインを含む。

30

【0235】

いくつかの実施形態では、抗CD33 CARは、(i)配列番号137に記載されるアミノ酸配列を含む抗CD33 scFvを含む外部ドメイン、(ii)配列番号126に記載されるアミノ酸配列を含むCD8膜貫通ドメイン、並びに(iii)配列番号19に記載されるアミノ酸配列を含む41BB共刺激ドメイン及び配列番号22に記載されるアミノ酸配列を含むCD3-ゼータシグナル伝達ドメインを含む内部ドメインを含む。

40

【0236】

いくつかの実施形態では、抗CD33 CARは、(i)それぞれ配列番号140及び141に記載されるアミノ酸配列を含む可変重鎖及び軽鎖領域を含む抗CD33 scFvを含む外部ドメイン、(ii)配列番号126に記載されるアミノ酸配列を含むCD8膜貫通ドメイン、並びに(iii)配列番号19に記載されるアミノ酸配列を含む41BB共刺激ドメイン及び配列番号22に記載されるアミノ酸配列を含むCD3-ゼータシグナル伝達ドメインを含む内部ドメインを含む。

【0237】

いくつかの実施形態では、抗CD33 CARは、配列番号139に記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗CD33 CARは、配列番号136に記載

50

されるヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの態様では、抗CD33 CARは、配列番号136に記載されるヌクレオチド配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされる。

【0238】

BCMA CAR

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作されたT細胞は、BCMA CAR、抗BCMA CAR又は抗BCMA CAR T細胞とも本明細書で呼ばれるBCMA標的化CARを含む。いくつかの実施形態では、抗BCMA CARは、(i)抗BCMA抗原結合ドメインを含む外部ドメイン、(ii)膜貫通ドメイン、及び(iii)少なくとも1つの共刺激ドメインを含む内部ドメインを含む。

10

【0239】

いくつかの実施形態では、抗BCMA CARは、(i)抗BCMA抗原結合ドメインを含む外部ドメイン、(ii)CD8膜貫通ドメイン、並びに(iii)CD28又は41BB共刺激ドメイン、及びCD3-ゼータシグナル伝達ドメインを含む内部ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗BCMA CARは、(i)抗BCMA抗原結合ドメインを含む外部ドメイン、(ii)CD8膜貫通ドメイン、並びに(iii)CD28共刺激ドメイン及びCD3-ゼータシグナル伝達ドメインを含む内部ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗BCMA CARは、(i)抗BCMA抗原結合ドメインを含む外部ドメイン、(ii)CD8膜貫通ドメイン、並びに(iii)41BB共刺激ドメイン及びCD3-ゼータシグナル伝達ドメインを含む内部ドメインを含む。

20

【0240】

いくつかの実施形態では、抗BCMA CARは、(i)抗BCMA抗原結合ドメインを含む外部ドメイン、(ii)配列番号126に記載されるアミノ酸配列を含むCD8膜貫通ドメイン、並びに(iii)配列番号19に記載されるアミノ酸配列を含む41BB共刺激ドメイン及び配列番号22に記載されるアミノ酸配列を含むCD3-ゼータシグナル伝達ドメインを含む内部ドメインを含む。

【0241】

いくつかの実施形態では、抗BCMA CARは、(i)配列番号59に記載されるアミノ酸配列を含む抗BCMA scFvを含む外部ドメイン、(ii)配列番号126に記載されるアミノ酸配列を含むCD8膜貫通ドメイン、並びに(iii)配列番号19に記載されるアミノ酸配列を含む41BB共刺激ドメイン及び配列番号22に記載されるアミノ酸配列を含むCD3-ゼータシグナル伝達ドメインを含む内部ドメインを含む。

30

【0242】

いくつかの実施形態では、抗BCMA CARは、(i)それぞれ配列番号60及び61に記載されるアミノ酸配列を含む可変重鎖及び軽鎖領域を含む抗BCMA scFvを含む外部ドメイン、(ii)配列番号126に記載されるアミノ酸配列を含むCD8膜貫通ドメイン、並びに(iii)配列番号19に記載されるアミノ酸配列を含む41BB共刺激ドメイン及び配列番号22に記載されるアミノ酸配列を含むCD3-ゼータシグナル伝達ドメインを含む内部ドメインを含む。

40

【0243】

いくつかの実施形態では、抗BCMA CARは、配列番号57に記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗BCMA CARは、配列番号56に記載されるヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの態様では、抗BCMA CARは、配列番号56に記載されるヌクレオチド配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされる。

【0244】

CD70 CAR

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作されたT細胞は、CD70 CAR

50

R、抗CD70 CAR又は抗CD70 CAR T細胞とも本明細書で呼ばれるCD70標的化CARを含む。いくつかの実施形態では、抗CD70 CARは、(i)抗CD70抗原結合ドメインを含む外部ドメイン、(ii)膜貫通ドメイン、及び(iii)少なくとも1つの共刺激ドメインを含む内部ドメインを含む。

【0245】

いくつかの実施形態では、抗CD70 CARは、(i)抗CD70抗原結合ドメインを含む外部ドメイン、(ii)CD8膜貫通ドメイン、並びに(iii)CD28又は41BB共刺激ドメイン、及びCD3-ゼータシグナル伝達ドメインを含む内部ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗CD70 CARは、(i)抗CD70抗原結合ドメインを含む外部ドメイン、(ii)CD8膜貫通ドメイン、並びに(iii)CD28共刺激ドメイン及びCD3-ゼータシグナル伝達ドメインを含む内部ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗CD70 CARは、(i)抗CD70抗原結合ドメインを含む外部ドメイン、(ii)CD8膜貫通ドメイン、並びに(iii)41BB共刺激ドメイン及びCD3-ゼータシグナル伝達ドメインを含む内部ドメインを含む。

10

【0246】

いくつかの実施形態では、抗CD70 CARは、(i)抗CD70抗原結合ドメインを含む外部ドメイン、(ii)配列番号126に記載されるアミノ酸配列を含むCD8膜貫通ドメイン、並びに(iii)配列番号19に記載されるアミノ酸配列を含む41BB共刺激ドメイン及び配列番号22に記載されるアミノ酸配列を含むCD3-ゼータシグナル伝達ドメインを含む内部ドメインを含む。

20

【0247】

いくつかの実施形態では、抗CD70 CARは、(i)配列番号50に記載されるアミノ酸配列を含む抗CD70 scFvを含む外部ドメイン、(ii)配列番号126に記載されるアミノ酸配列を含むCD8膜貫通ドメイン、並びに(iii)配列番号19に記載されるアミノ酸配列を含む41BB共刺激ドメイン及び配列番号22に記載されるアミノ酸配列を含むCD3-ゼータシグナル伝達ドメインを含む内部ドメインを含む。

【0248】

いくつかの実施形態では、抗CD70 CARは、(i)それぞれ配列番号51及び52に記載されるアミノ酸配列を含む可変重鎖及び軽鎖領域を含む抗CD70 scFvを含む外部ドメイン、(ii)配列番号126に記載されるアミノ酸配列を含むCD8膜貫通ドメイン、並びに(iii)配列番号19に記載されるアミノ酸配列を含む41BB共刺激ドメイン及び配列番号22に記載されるアミノ酸配列を含むCD3-ゼータシグナル伝達ドメインを含む内部ドメインを含む。

30

【0249】

いくつかの実施形態では、抗CD70 CARは、配列番号46に記載され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45に記載されるヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの態様では、抗CD70 CARは、配列番号45に記載されるヌクレオチド配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされる。

40

【0250】

キメラ抗原受容体コンストラクトの発現  
ドナー鑄型

CARをコードする核酸は、ドナー鑄型と本明細書で呼ばれる(ドナーポリヌクレオチドとも呼ばれる)ものを含むT細胞に送達され得る。ドナー鑄型は、目的のゲノム位置で効率的なHDRを可能にする2つの相同な領域に隣接したCARをコードする核酸などの非相同配列を含有し得る。或いは、ドナー鑄型は、DNA中の標的化された位置と相同な領域を有しない場合があり、標的部位での切断後のNHEJ依存的末端連結によって組み込まれ得る。

【0251】

50

ドナー鑄型は、一本鎖及び/又は二重鎖のDNA又はRNAであってもよく、直鎖状又は環状形態で細胞に導入され得る。直鎖状形態で導入される場合、ドナー配列の末端は、当業者に知られる方法によって（例えば、エキソヌクレアーゼ分解から）保護され得る。例えば、1つ以上のジデオキシヌクレオチド残基が、直鎖状分子の3'末端に付加され、且つ/又は自己相補的オリゴヌクレオチドが、一方又は両方の末端に連結される。例えば、Chang et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 4959 - 4963; Nehls et al., (1996) Science 272: 886 - 889を参照されたい。外来性のポリヌクレオチドを分解から保護するための追加の方法としては、末端アミノ基の付加、並びに、例えば、ホスホロチオエート、ホスホロアミダート、及びO-メチルリボース又はデオキシリボース残基などの修飾されたヌクレオチド間結合の使用が挙げられるが、これらに限定されない。

10

## 【0252】

ドナー鑄型は、例えば、複製開始点、プロモーター及び抗生物質耐性をコードする遺伝子などの追加の配列を有するベクター分子の一部として細胞に導入され得る。さらに、ドナー鑄型は、裸の核酸として、リボソーム又はポロクサマーなどの薬剤と複合体を形成した核酸として導入され得るか、又はウイルス（例えば、アデノウイルス、AAV、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス及びインテグラーゼ欠損レンチウイルス（IDLV））によって送達され得る。

## 【0253】

ドナー鑄型は、いくつかの実施形態において、その発現が、組込み部位の内在性プロモーター、すなわち、ドナーが挿入される内在性遺伝子の発現を駆動するプロモーターによって駆動されるように挿入される。しかしながら、いくつかの実施形態では、ドナー鑄型は、外来性プロモーター及び/又はエンハンサー、例えば、構成的プロモーター、誘導性プロモーター、又は組織特異的プロモーターを含む。いくつかの実施形態では、内在性プロモーターは、配列番号123の配列を含むEF1プロモーターである。他のプロモーターが使用されてもよい。

20

## 【0254】

さらに、外来性配列はまた、転写又は翻訳制御配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、インスレーター、配列内リボソーム進入部位、2Aペプチドをコードする配列及び/又はポリアデニル化シグナルを含み得る。

30

## 【0255】

いくつかの実施形態では、ドナー鑄型は、配列番号44と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は98%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、ドナー鑄型は、配列番号44のヌクレオチド配列を含む。

## 【0256】

いくつかの実施形態では、ドナー鑄型は、配列番号55と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は98%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、ドナー鑄型は、配列番号55のヌクレオチド配列を含む。

40

## 【0257】

いくつかの実施形態では、ドナー鑄型は、配列番号135と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は98%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、ドナー鑄型は、配列番号135のヌクレオチド配列を含む。

## 【0258】

いくつかの実施形態では、ドナー鑄型は、配列番号156と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は98%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、ドナー鑄型は、配列番号156のヌクレオチド配列を含む。

50

【 0 2 5 9 】

他の方法

いくつかの実施形態では、CARをコードする核酸は、当業者に知られる方法によって操作された細胞に導入される。例えば、CARは、ベクターによって操作された細胞に導入され得る。当該技術分野において知られる様々な異なる方法を使用して、本明細書で開示される核酸又は発現ベクターのいずれかを免疫エフェクター細胞に導入することができる。核酸を細胞に導入するための方法の非限定的な例としては、リポフェクション、トランスフェクション（例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、高度に分岐した有機化合物を使用するトランスフェクション、カチオン性ポリマーを使用するトランスフェクション、 dendリマー系トランスフェクション、光学的トランスフェクション、粒子系トランスフェクション（例えば、ナノ粒子トランスフェクション）、又はリポソーム（例えば、カチオン性リポソーム）を使用するトランスフェクション）、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、セルスキージング、ソノポレーション、プロトプラスト融合、インペールフェクション、水力学的送達、遺伝子銃、マグネトフェクション、ウイルストランスフェクション、及びヌクレオフェクションが挙げられる。

10

【 0 2 6 0 】

送達方法及びコンストラクト

ヌクレアーゼ及び/又はドナー鑄型は、プラスミドベクター、DNA小環、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ポックスウイルスベクター；ヘルペスウイルスベクター及びアデノ関連ウイルスベクター、及びその組合せを含むが、これらに限定されないベクター系を使用して送達され得る。

20

【 0 2 6 1 】

従来のウイルス及び非ウイルス系遺伝子導入方法を使用して、細胞（例えば、T細胞）においてヌクレアーゼをコードする核酸及びドナー鑄型を導入することができる。非ウイルスベクター送達系としては、DNAプラスミド、DNA小環、裸の核酸、及びリポソーム又はポロキサマーなどの送達媒体と複合体を形成した核酸が挙げられる。ウイルスベクター送達系としては、細胞に送達された後にエピソーム又は組込みゲノムのいずれかを有するDNA及びRNAウイルスが挙げられる。

【 0 2 6 2 】

核酸の非ウイルス送達の方法としては、エレクトロポレーション、リポフェクション、マイクロインジェクション、遺伝子銃、ピロソーム、リポソーム、イムノリポソーム、ポリカチオン又は脂質：核酸コンジュゲート、裸のDNA、裸のRNA、キャップ付きRNA、人工ピリオン、及び薬剤で増強されたDNAの取込みが挙げられる。例えば、ソニトロン 2000システム（Rich-Mar）を使用するソノポレーションもまた、核酸の送達のために使用され得る。いくつかの具体例が、下に提供される。

30

【 0 2 6 3 】

アデノ随伴ウイルス送達

CARコンストラクトをコードするドナー核酸は、アデノ随伴ウイルス（AAV）を使用して細胞に送達され得る。AAVは、宿主ゲノムに部位特異的に組込み、したがって、CARなどの導入遺伝子を送達できる小型のウイルスである。逆位末端配列（ITR）は、AAVゲノム及び/又は目的の導入遺伝子に隣接して存在し、複製開始点として機能する。また、AAVゲノムには、転写されたときにAAVゲノムをカプセル化して標的細胞に送達するためのカプシドを形成するrepタンパク質及びcapタンパク質も存在する。これらのカプシド上の表面受容体は、AAVの血清型を付与し、カプシドが主にどの標的臓器に結合するかを決定し、したがって、AAVが最も効率的に感染することになる細胞を決定する。現在知られているヒトAAVの血清型は12種類である。いくつかの実施形態では、AAVは、AAV血清型6（AAV6）である。

40

【 0 2 6 4 】

アデノ随伴ウイルスは、いくつかの理由のために遺伝子療法に最も頻繁に使用されるウイルスの1つである。第一に、AAVは、ヒトを含む哺乳動物への投与時に免疫応答を誘

50

発しない。第二に、AAVは、特に適切なAAV血清型を選択することを考慮するとき、標的細胞に効率的に送達される。最後に、AAVは、ゲノムが組込みを伴わずに宿主細胞において存続できるため、分裂細胞及び非分裂細胞の両方に感染する能力を有する。この形質により、それらが遺伝子療法の理想的な候補となる。

#### 【0265】

相同組換え修復(HDR)

CARをコードするドナー核酸は、相同組換え修復(HDR)によって標的遺伝子座位に挿入される。標的部位でのDNAの両方の鎖が、CRISPR Cas9酵素によって切断される。次に、HDRが発生して、二重鎖切断(DSB)を修復し、ドナーDNAを挿入する。これが正しく発生するために、ドナー配列は、標的遺伝子のDSB部位を取り囲む配列に相補的な隣接している残基(以下、「相同性アーム」)を有するように設計される。これらの相同性アームは、DSB修復のための鋳型として機能し、本質的に誤りのない機構であるHDRを可能にする。相同組換え修復(HDR)の割合は、変異部位と切断部位の間の距離の関数であり、そのため、重複している配列又は近くの標的を選択することが重要である。鋳型は、相同領域に隣接した余分な配列を含んでもよいし、ゲノム配列と異なる配列を含有してもよく、したがって、配列編集が可能になる。

10

#### 【0266】

標的遺伝子は、対象において免疫応答と関連する場合があります。ここで、標的遺伝子の少なくとも一部を持続的に欠失させることが、免疫応答を調節することになる。例えば、CAR T細胞を生成するために、標的遺伝子は、TCR 定常領域(TRA C)であり得る。TRA Cの破壊は、内在性TCRの機能の喪失をもたらす。

20

#### 【0267】

いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、セーフハーバー座位にある。

#### 【0268】

操作されたT細胞

本開示の操作された(遺伝子編集された)CAR T細胞は、自己由来(「自己」)の又は非自己由来(「非自己」、例えば、異質遺伝子型、同一遺伝子又は異種間)であり得る。「自己由来」は、同じ対象からの細胞を指す。「異質遺伝子型」は、対象と同じ種であるが、対象中の細胞と遺伝的に異なる細胞を指す。いくつかの実施形態では、T細胞は、哺乳動物から得られる。いくつかの実施形態では、T細胞は、ヒトから得られる。

30

#### 【0269】

T細胞は、末梢血単核球、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺排出、感染部位由来の組織、腹水、胸水、脾臓組織、及び腫瘍を含むが、これらに限定されないいくつかの供給源から得ることができる。ある種の実施形態では、T細胞は、遠心沈降、例えば、FICOLL(商標)分離などの当業者に知られる任意の数の技術を使用して対象から回収される血液の単位から得ることができる。

#### 【0270】

いくつかの実施形態では、T細胞の単離された集団が使用される。いくつかの実施形態では、末梢血単核球(PBMC)の単離の後、細胞傷害性及びヘルパーTリンパ球の両方が、活性化、増殖、及び/又は遺伝的改変の前又は後のいずれかでナイーブ、メモリー、及びエフェクターT細胞亜集団に分別され得る。

40

#### 【0271】

以下の細胞表面マーカー：TCR $\alpha\beta$ 、CD3、CD4、CD8、CD27、CD28、CD38、CD45RA、CD45RO、CD62L、CD127、CD122、CD95、CD197、CCR7、KLRG1、MCH-Iタンパク質及び/又はMCH-Iタンパク質の1つ以上を発現するT細胞の特定の亜集団がさらに、陽性又は陰性選択手法によって単離され得る。いくつかの実施形態では、TCR $\alpha\beta$ 、CD4及び/又はCD8からなる群から選択されるマーカーの1つ以上を発現するT細胞の特定の亜集団はさらに、陽性又は陰性選択手法によって単離され得る。いくつかの実施形態では、操作されたT細胞集団は、以下のマーカー：CD70、CD57、CD244、CD160、PD-

50

1、CTLA4、H3、及びLAG3の1つ以上を発現しないか又は実質的に発現しない。いくつかの実施形態では、T細胞の亜集団は、遺伝子操作の前及び/又は遺伝子操作の後に陽性又は陰性選択によって単離され得る。

【0272】

いくつかの実施形態では、T細胞の単離された集団は、CD3+、CD4+、CD8+、又はその組合せを含むが、これらに限定されないマーカーの1つ以上を発現する。いくつかの実施形態では、T細胞は、ドナー、又は対象から単離され、遺伝子編集を受ける前に、最初に活性化され、インビトロで増殖するように刺激される。

【0273】

T細胞組成物の十分な治療用量を実現するために、T細胞は、1回以上の刺激、活性化及び/又は増殖にかけられる場合が多い。T細胞は、一般に、例えば、米国特許第6,352,694号明細書；同第6,534,055号明細書；同第6,905,680号明細書；同第6,692,964号明細書；同第5,858,358号明細書；同第6,887,466号明細書；同第6,905,681号明細書；同第7,144,575号明細書；同第7,067,318号明細書；同第7,172,869号明細書；同第7,232,566号明細書；同第7,175,843号明細書；同第5,883,223号明細書；同第6,905,874号明細書；同第6,797,514号明細書；及び同第6,867,041号明細書において記載されるとおりの方法を使用して、活性化及び増殖され得る。いくつかの実施形態では、T細胞は、ゲノム編集組成物のT細胞への導入の前に約1日～約4日、約1日～約3日、約1日～約2日、約2日～約3日、約2日～約4日、約3日～約4日、又は約1日、約2日、約3日、若しくは約4日間活性化及び増殖される。

10

20

【0274】

いくつかの実施形態では、T細胞は、ゲノム編集組成物のT細胞への導入の前に約4時間、約6時間、約12時間、約18時間、約24時間、約36時間、約48時間、約60時間、又は約72時間活性化及び増殖される。

【0275】

いくつかの実施形態では、T細胞は、遺伝子編集組成物がT細胞に導入されると同時に活性化される。本明細書に記載される遺伝子編集方法のいずれかによって生成されるT細胞集団又は単離されたT細胞もまた、本開示の範囲内である。

30

【0276】

いくつかの実施形態では、本明細書では、破壊されたCD70遺伝子及びキメラ抗原受容体(CAR)、例えば、本明細書に記載されるものをコードする核酸を含む、遺伝的に操作されたT細胞を含むT細胞の集団が提供される。いくつかの実施形態では、CARは、病的な細胞上で発現される抗原に結合する。いくつかの実施形態では、CARは、CD70に結合する。他かの実施形態では、CARは、CD70に結合しない。このようなT細胞集団はさらに、以下の遺伝子編集：破壊された内在性プログラム細胞死-1(PD-1)遺伝子、破壊された内在性T細胞受容体アルファ鎖定常領域(TRAC)遺伝子、及び破壊された内在性ベータ-2-ミクログロブリン(β2M)遺伝子の1つ以上を有する遺伝的に操作されたT細胞を含み得る。いくつかの例において、CARをコードする核酸は、TRAC座位に挿入され得る。

40

【0277】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示されるT細胞の集団は、破壊されたCD70遺伝子及び病的な細胞上で発現される抗原に結合するキメラ抗原受容体(CAR)をコードする核酸を含む、遺伝的に操作されたT細胞を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で開示されるT細胞の集団は、破壊されたCD70遺伝子及びキメラ抗原受容体(CAR)をコードする核酸を含む、遺伝的に操作されたT細胞を含み、ここで、CARは、CD70に結合する。他の実施形態では、本明細書で開示されるT細胞の集団は、破壊されたCD70遺伝子及びCARをコードする核酸を含む遺伝的に操作されたT細胞を含み、ここで、CARは、CD70遺伝子に結合しない。いくつかの実施形態では、本明細書で

50

開示される T 細胞の集団は、破壊された CD 70 遺伝子及び病的な細胞上で発現される抗原に結合するキメラ抗原受容体 (CAR) をコードする核酸を含み、且つ破壊された PD 1 遺伝子をさらに含む、遺伝的に操作された T 細胞を含む。いくつかの実施形態では、CAR は、CD 70 に結合する。いくつかの実施形態では、CAR は、CD 70 に結合しない。いくつかの態様では、CAR は、CD 19 に結合する。いくつかの実施形態では、CAR は、CD 33 に結合する。いくつかの態様では、CAR は、BCMA に結合する。すぐ上に記載された操作された T 細胞のいずれかはさらに、破壊された T 細胞受容体アルファ鎖定常領域 (TRAC) 遺伝子及び/又は破壊されたベータ - 2 - ミクログロブリン (2M) 遺伝子を含み得る。

【0278】

特定の例において、本明細書では、破壊された CD 70 遺伝子、破壊された T 細胞受容体アルファ鎖定常領域 (TRAC) 遺伝子、破壊されたベータ - 2 - ミクログロブリン (2M) 遺伝子、キメラ抗原受容体 (CAR)、例えば、本明細書に記載される抗 BCMA CAR、抗 CD 19 CAR、抗 CD 33 CAR、又は抗 CD 70 CAR をコードする核酸、及び任意選択により破壊されたプログラム細胞死 - 1 (PD - 1) 遺伝子を含む、遺伝的に操作された T 細胞を含む T 細胞の集団が提供される。本明細書で開示される操作された T 細胞のいずれかは、天然の (破壊されていない) HLA 遺伝子を含有し得る。

【0279】

いくつかの例において、T 細胞の集団の少なくとも 50% (例えば、60%、70%、80%、90%、又は 95%) は、本明細書で開示されるとおりの CAR を発現し、且つ検出可能なレベルの表面 CD 70 を発現しない。このような細胞はさらに、検出可能なレベルの表面 TCR、検出可能なレベルの表面 2M、及び/又は検出可能なレベルの表面 PD - 1 を発現しない特徴を持ち得る。例えば、T 細胞の集団の少なくとも 50% (例えば、60%、70%、80%、90%、又は 95%) は、本明細書で開示されるとおりの CAR を発現し、且つ検出可能なレベルの表面 CD 70、検出可能なレベルの表面 TCR、及び検出可能なレベルの表面 2M を発現しない。いくつかの場合において、T 細胞の集団の少なくとも 50% (例えば、60%、70%、80%、90%、又は 95%) は、本明細書で開示されるとおりの CAR を発現し、且つ検出可能なレベルの表面 CD 70、検出可能なレベルの表面 TCR、検出可能なレベルの表面 2M、及び検出可能なレベルの PD - 1 を発現しない。

【0280】

本明細書に記載されるとおりの CAR を発現し、且つ検出可能なレベルの表面 CD 70 を発現しない単離された細胞もまた、本開示の範囲内である。このような単離された細胞は、検出可能なレベルの表面 TCR、検出可能なレベルの 2M、及び/又は検出可能なレベルの表面 PD - 1 を発現しない場合がある。いくつかの例において、単離された細胞は、TRAC 座位に挿入される CAR をコードする核酸を含む。

【0281】

また、本明細書では、RNA 誘導型ヌクレアーゼ、例えば、本明細書に記載されるもの (例えば、Cas9 ヌクレアーゼ)、及び CD 70 遺伝子を標的化するガイド RNA (gRNA) (例えば、本明細書に記載されるもの) を含む操作された T 細胞を含む操作された T 細胞の集団が提供される。いくつかの場合において、T 細胞集団における T 細胞の少なくとも 50% (例えば、60%、70%、80%、90%、又は 95%) は、RNA 誘導型ヌクレアーゼ及び CD 70 遺伝子を標的化する gRNA を含む。このような操作された T 細胞集団はさらに、PD - 1 遺伝子を標的化する gRNA、TRAC 遺伝子を標的化する gRNA、2M 遺伝子を標的化する gRNA、及び/又は任意選択により TRAC 遺伝子座位に対して左及び右の相同性アームと隣接する CAR (例えば、本明細書に記載されるもの) をコードするヌクレオチド配列を含むドナー鋳型を含む核酸 (例えば、ベクター) を含む操作された T 細胞を含み得る。いくつかの例において、T 細胞集団における T 細胞の少なくとも 50% (例えば、60%、70%、80%、90%、又は 95%) は、RNA 誘導型ヌクレアーゼ、CD 70 遺伝子を標的化する gRNA、及び CAR をコー

10

20

30

40

50

ドする核酸を含む。CARをコードする核酸がさらに、TRAC遺伝子座位に対して左及び右の相同性アームを含むとき、T細胞はまた、TRAC遺伝子を標的化するgRNAを含み得る。加えて、T細胞はさらに、PD-1遺伝子を標的化するgRNA、2M遺伝子を標的化するgRNA、又はその組合せを含み得る。

【0282】

また、RNA誘導型ヌクレアーゼ、CD70遺伝子を標的化するgRNA、並びに任意選択によりPD-1遺伝子を標的化するgRNA、TRAC遺伝子を標的化するgRNA、2M遺伝子を標的化するgRNA、及びCAR（例えば、本明細書に記載されるもの）をコードするヌクレオチド配列を含むドナー鋳型を含む核酸（例えば、ベクター）のうちの一つ以上を含む単離された操作されたT細胞も、本開示の範囲内である。CARをコードするヌクレオチド配列は、TRAC遺伝子座位に対する左及び右の相同性アームと隣接し得る。

10

【0283】

CAR-T細胞の生成

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作されたT細胞は、細胞のゲノムを改変することによって生成される。いくつかの実施形態では、標的遺伝子中の部位での二重鎖切断(DSB)が誘導される。いくつかの実施形態では、DSBは、一つ以上の内在性のDNA修復経路を使用して修復される。いくつかの実施形態では、DNA修復経路は、相同配列を必要としない（例えば、非相同末端連結経路又はNHEJ経路）。いくつかの実施形態では、修復経路は、相同配列を必要とする（例えば、相同組換え経路又はHDR経路）。

20

【0284】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作されたT細胞は、エンドヌクレアーゼ、及び一つ以上の非コードRNAとしてのCRISPR-Cas9によりDSBを誘導すること、並びにHDR及び本明細書に記載されるドナーポリヌクレオチド鋳型を使用してDSBを修復することによって生成される。

【0285】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作されたT細胞は、TRACである標的遺伝子の配列に相補的なgRNAを使用して生成される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作されたT細胞は、配列番号98に記載される配列を含むTRAC gRNAスパーサーを使用して生成される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作されたT細胞は、配列番号30に記載される配列を含むTRAC gRNAを使用して生成される。いくつかの実施形態では、配列番号98に記載される配列を含むTRAC gRNAは、配列番号118に記載されるTRAC配列を標的化する。いくつかの実施形態では、配列番号30に記載される配列を含むTRAC gRNAは、配列番号118に記載されるTRAC配列を標的化する。

30

【0286】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作されたT細胞は、配列番号108に記載される配列を含むTRAC gRNAスパーサーを使用して生成される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作されたT細胞は、配列番号40に記載される配列を含むTRAC gRNAを使用して生成される。いくつかの実施形態では、配列番号108に記載される配列を含むTRAC gRNAは、配列番号118に記載されるTRAC配列を標的化する。いくつかの実施形態では、配列番号40に記載される配列を含むTRAC gRNAは、配列番号118に記載されるTRAC配列を標的化する。

40

【0287】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作されたT細胞は、2Mである標的遺伝子の配列に相補的なgRNAを使用して生成される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作されたT細胞は、配列番号99に記載される配列を含む2M gRNAスパーサーを使用して生成される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作されたT細胞は、配列番号31に記載される配列を含む2M gRNAを使用

50

して生成される。いくつかの実施形態では、配列番号 99 に記載される配列を含む 2 M g R N A は、配列番号 119 に記載される 2 M 配列を標的化する。いくつかの実施形態では、配列番号 31 に記載される配列を含む 2 M g R N A は、配列番号 119 に記載される 2 M 配列を標的化する。

**【0288】**

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作された T 細胞は、配列番号 109 に記載される配列を含む 2 M g R N A スペーサーを使用して生成される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作された T 細胞は、配列番号 41 に記載される配列を含む 2 M g R N A を使用して生成される。いくつかの実施形態では、配列番号 109 に記載される配列を含む 2 M g R N A は、配列番号 119 に記載される 2 M 配列を標的化する。いくつかの実施形態では、配列番号 41 に記載される配列を含む 2 M g R N A は、配列番号 119 に記載される 2 M 配列を標的化する。

10

**【0289】**

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作された T 細胞は、CD70 である標的遺伝子の配列に相補的な g R N A を使用して生成される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作された T 細胞は、配列番号 94 に記載される配列を含む CD70 g R N A スペーサーを使用して生成される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作された T 細胞は、配列番号 26 に記載される配列を含む CD70 g R N A を使用して生成される。いくつかの実施形態では、配列番号 94 に記載される配列を含む CD70 g R N A は、配列番号 114 に記載される CD70 配列を標的化する。いくつかの実施形態では、配列番号 26 に記載される配列を含む CD70 g R N A は、配列番号 114 に記載される CD70 配列を標的化する。

20

**【0290】**

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作された T 細胞は、配列番号 104 に記載される配列を含む CD70 g R N A スペーサーを使用して生成される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作された T 細胞は、配列番号 36 に記載される配列を含む CD70 g R N A を使用して生成される。いくつかの実施形態では、配列番号 104 に記載される配列を含む CD70 g R N A は、配列番号 114 に記載される CD70 配列を標的化する。いくつかの実施形態では、配列番号 36 に記載される配列を含む CD70 g R N A は、配列番号 114 に記載される CD70 配列を標的化する。

30

**【0291】**

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作された T 細胞は、CD70 である標的遺伝子の配列に相補的な g R N A を使用して生成される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作された T 細胞は、配列番号 95 に記載される配列を含む CD70 g R N A スペーサーを使用して生成される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作された T 細胞は、配列番号 27 に記載される配列を含む CD70 g R N A を使用して生成される。いくつかの実施形態では、配列番号 95 に記載される配列を含む CD70 g R N A は、配列番号 115 に記載される CD70 配列を標的化する。いくつかの実施形態では、配列番号 27 に記載される配列を含む CD70 g R N A は、配列番号 115 に記載される CD70 配列を標的化する。

40

**【0292】**

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作された T 細胞は、配列番号 105 に記載される配列を含む CD70 g R N A スペーサーを使用して生成される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作された T 細胞は、配列番号 37 に記載される配列を含む CD70 g R N A を使用して生成される。いくつかの実施形態では、配列番号 105 に記載される配列を含む CD70 g R N A は、配列番号 115 に記載される CD70 配列を標的化する。いくつかの実施形態では、配列番号 37 に記載される配列を含む CD70 g R N A は、配列番号 115 に記載される CD70 配列を標的化する。

**【0293】**

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作された T 細胞は、PD-1 である

50

標的遺伝子の配列に相補的な gRNA を使用して生成される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作された T 細胞は、配列番号 100 に記載される配列を含む PD-1 gRNA スペーサーを使用して生成される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作された T 細胞は、配列番号 32 に記載される配列を含む PD-1 gRNA を使用して生成される。いくつかの実施形態では、配列番号 100 に記載される配列を含む PD-1 gRNA は、配列番号 120 に記載される 2M 配列を標的化する。いくつかの実施形態では、配列番号 32 に記載される配列を含む PD-1 gRNA は、配列番号 120 に記載される PD-1 配列を標的化する。

#### 【0294】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作された T 細胞は、配列番号 110 に記載される配列を含む PD-1 gRNA スペーサーを使用して生成される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作された T 細胞は、配列番号 42 に記載される配列を含む PD-1 gRNA を使用して生成される。いくつかの実施形態では、配列番号 110 に記載される配列を含む PD-1 gRNA は、配列番号 120 に記載される PD-1 配列を標的化する。いくつかの実施形態では、配列番号 42 に記載される配列を含む PD-1 gRNA は、配列番号 120 に記載される PD-1 配列を標的化する。

#### 【0295】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作された T 細胞は、配列番号 98 に記載される配列を含む TRAC gRNA、配列番号 99 に記載される配列を含む 2M gRNA、配列番号 94 若しくは 95 に記載される配列を含む CD70 gRNA、並びに / 又は配列番号 100 に記載される配列を含む PD-1 gRNA を使用して生成される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作された T 細胞は、配列番号 108 に記載される配列を含む TRAC gRNA、配列番号 109 に記載される配列を含む 2M gRNA、配列番号 104 若しくは 105 に記載される配列を含む CD70 gRNA、並びに / 又は配列番号 110 に記載される配列を含む PD-1 gRNA を使用して生成される。

#### 【0296】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作された T 細胞は、配列番号 30 に記載される配列を含む TRAC gRNA、配列番号 31 に記載される配列を含む 2M gRNA、配列番号 26 若しくは 27 に記載される配列を含む CD70 gRNA、並びに / 又は配列番号 32 に記載される配列を含む PD-1 gRNA を使用して生成される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作された T 細胞は、配列番号 40 に記載される配列を含む TRAC gRNA、配列番号 41 に記載される配列を含む 2M gRNA、配列番号 36 若しくは 27 に記載される配列を含む CD70 gRNA、並びに / 又は配列番号 42 に記載される配列を含む PD-1 gRNA を使用して生成される。

#### 【0297】

いくつかの実施形態では、操作された T 細胞は、CAR をコードする核酸である非相同配列を含むドナー鋳型を使用して生成される。いくつかの実施形態では、ドナー鋳型は、TRAC である標的遺伝子における配列に対応する相同性アームで構成される。いくつかの実施形態では、ドナー鋳型の 5' 相同性アーム (左相同性アーム) は、配列番号 122 に記載される配列を含む。いくつかの実施形態では、ドナー鋳型の 3' 相同性アームは、配列番号 125 に記載される配列を含む。

#### 【0298】

いくつかの実施形態では、外来性プロモーターは、配列番号 123 に記載される配列を含む EF1a プロモーターである。いくつかの実施形態では、ドナー鋳型は、配列番号 135 に記載される配列を含む。いくつかの実施形態では、ドナー鋳型は、配列番号 156 に記載される配列を含む。いくつかの実施形態では、ドナー鋳型は、配列番号 44 に記載される配列を含む。いくつかの実施形態では、ドナー鋳型は、配列番号 55 に記載される配列を含む。

#### 【0299】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、gRNA、ヌクレアーゼ、及びドナー鋳型をコードするポリヌクレオチドは、従来のウイルス及び非ウイルスに基づく遺伝子導入方法を使用して細胞（例えば、T細胞）に導入される。

【0300】

いくつかの実施形態では、gRNA、sgRNA、ヌクレアーゼをコードするmRNA、又はドナー鋳型などのポリヌクレオチドは、非ウイルスベクター送達系を使用して細胞に送達される。非ウイルスベクター送達系の例としては、DNAプラスミド、DNA小環、裸の核酸、リボソーム、リボ核タンパク質粒子（RNP）又はポロクサマーが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、非ウイルスベクター送達系を使用してポリヌクレオチドを細胞に導入する方法としては、エレクトロポレーション、リポ

10

【0301】

いくつかの実施形態では、gRNA、sgRNA、ヌクレアーゼをコードするmRNA、又はドナー鋳型などのポリヌクレオチドは、ウイルスベクター送達系を使用して細胞に送達される。ウイルスベクター送達系の例としては、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、及びアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターが挙げられるが、これらに限定されない。

【0302】

いくつかの実施形態では、CARコンストラクトをコードするドナー鋳型は、1つ以上のポリヌクレオチドとして細胞に送達される。いくつかの実施形態では、CARコンストラクトをコードするドナー鋳型は、ウイルス送達媒体によって送達される。いくつかの実施形態では、ウイルス送達媒体は、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターである。

20

【0303】

いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼ（例えば、Cas9）は、ポリペプチドとして細胞に送達される。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼ（例えば、Cas9）は、ゲノム標的化核酸（例えば、gRNA、sgRNA）と別々に細胞に送達される。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼ（例えば、Cas9）は、1つ以上のゲノム標的化ポリヌクレオチド（例えば、gRNA、sgRNA）との複合体として細胞に送達される。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼ又は予め複合体を形成したエンドヌクレアーゼは、ナノ粒子、リボソーム、リボ核タンパク質、正に荷電したペプチド、小分子RNAコンジュゲート、アプタマー-RNAキメラ、又はRNA-融合タンパク質複合体を含むが、これらに限定されない非ウイルス送達媒体によって送達される。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼポリペプチド又は予め複合体を形成したエンドヌクレアーゼポリペプチドを細胞に導入する方法としては、エレクトロポレーション、リポ

30

【0304】

いくつかの実施形態では、Cas9ポリペプチドは、1つ以上のsgRNAと予め複合体を形成して、リボ核タンパク質粒子（RNP）を形成する。いくつかの実施形態では、Cas9/sgRNA RNPは、脂質ナノ粒子を使用して製剤化される。いくつかの実施形態では、ドナー鋳型は、AAVベクターを使用して製剤化される。いくつかの実施形態では、製剤化されたCas9/sgRNA RNPの細胞への送達は、細胞のエレクトロポレーションによって実施される。いくつかの実施形態では、AAVベクターとして製剤化されるドナー鋳型は、エレクトロポレーションの前に送達される。いくつかの実施形態では、AAVベクターとして製剤化されたドナー鋳型は、エレクトロポレーション中に送達される。いくつかの実施形態では、AAVベクターとして製剤化されたドナー鋳型は、エレクトロポレーション後に送達される。

40

【0305】

50

いくつかの実施形態では、CRISPR/Cas9 エンドヌクレアーゼを使用して実施される遺伝子編集は、破壊されたTRAC 遺伝子を有する操作されたT細胞をもたらす。いくつかの実施形態では、TRAC 遺伝子の破壊は、TRAC 遺伝子産物の発現の消失又は減少をもたらす。いくつかの実施形態では、TRAC 遺伝子の破壊は、コードされる遺伝子産物の転写及び翻訳を破壊するか又は阻害する。いくつかの実施形態では、TRAC 遺伝子の破壊は、TRAC 遺伝子産物の発現の消失又は減少をもたらす。いくつかの実施形態では、TRAC 遺伝子の発現の消失又は減少は、TCRの機能の喪失を伴う。いくつかの実施形態では、TCR機能の喪失は、同種移植に好適な(すなわち、GvHDを引き起こすリスクを最小化する)操作されたT細胞をもたらす。いくつかの実施形態では、TRAC 遺伝子の破壊は、(例えば、AAVベクター及びドナー鑄型を使用して)CARにおいてTRAC 遺伝子にロックインすることによって生成される。いくつかの実施形態では、TRAC 遺伝子発現における破壊は、TRACゲノム領域を標的化し、且つCARにおいてCAR 遺伝子にロックインするgRNAによって生成される。いくつかの実施形態では、ロックインCARは、DSBの部位を取り囲むTRACの配列に対応する相同性アームを有するドナー鑄型によって提供される。

10

## 【0306】

いくつかの実施形態では、CRISPR/Cas9 エンドヌクレアーゼを使用して実施される遺伝子編集は、破壊された2M 遺伝子を有する操作されたT細胞をもたらす。いくつかの実施形態では、B2Mゲノム領域を標的化するgRNAは、コードされる遺伝子産物の転写及び翻訳を破壊するか又は阻害する2M 遺伝子におけるインデルを生成する。いくつかの実施形態では、2M 遺伝子の破壊は、2Mポリペプチドの発現の消失又は減少をもたらす。いくつかの実施形態では、B2Mポリペプチドの発現の消失又は減少は、MHC I複合体の機能の喪失を伴う。いくつかの実施形態では、MHC I機能の喪失は、同種移植に好適な(すなわち、宿主対異質遺伝子型T細胞応答のリスクを最小化する)操作されたT細胞をもたらす。いくつかの実施形態では、MHC I機能の喪失は、異質遺伝子型レシピエントにおいて操作されたT細胞の持続の増大をもたらす。

20

## 【0307】

いくつかの実施形態では、CRISPR/Cas9 エンドヌクレアーゼを使用して実施される遺伝子編集は、破壊されたCD70 遺伝子を有する操作されたT細胞をもたらす。いくつかの実施形態では、CD70ゲノム領域を標的化するgRNAは、コードされる遺伝子産物の転写及び翻訳を破壊するか又は阻害するCD70 遺伝子におけるインデルを生成する。いくつかの実施形態では、CD70 遺伝子の破壊は、CD70ポリペプチドの発現の消失又は減少をもたらす。いくつかの実施形態では、CD70ポリペプチドの発現の消失又は減少は、細胞増殖の増強、インビボでの持続の増強、枯渇の減少、及び/又は抗腫瘍効果の増強を伴う。

30

## 【0308】

いくつかの実施形態では、CRISPR/Cas9 エンドヌクレアーゼを使用して実施される遺伝子編集は、破壊されたPD-1 遺伝子を有する操作されたT細胞をもたらす。いくつかの実施形態では、PD-1ゲノム領域を標的化するgRNAは、コードされる遺伝子産物の転写及び翻訳を破壊するか又は阻害するPD-1 遺伝子におけるインデルを生成する。いくつかの実施形態では、PD-1 遺伝子の破壊は、PD-1ポリペプチドの発現の消失又は減少をもたらす。

40

## 【0309】

## 方法及び組成物

本明細書では、いくつかの実施形態において、癌を治療するための方法が提供される。本明細書に提供されるとおりに治療され得る癌の非限定的な例としては、多発性骨髄腫、白血病(例えば、T細胞白血病、B細胞急性リンパ性白血病(B-ALL)、及び/又は慢性リンパ性白血病(C-CLL))、リンパ腫(例えば、B細胞非ホジキンリンパ腫(B-NHL)、ホジキンリンパ腫、及び/又はT細胞リンパ腫)、及び/又は明細胞腎細胞癌(ccRCC)が挙げられる。いくつかの実施形態では、方法は、本開示のCAR

50

T細胞（例えば、抗BCMA、抗CD19、抗CD33及び/又は抗CD70 CAR T細胞）を、多発性骨髄腫、白血病、又はリンパ腫を有する対象に送達することを含む。本明細書に提供されるとおりに治療され得る癌（例えば、固形腫瘍）の他の非限定的な例としては、膵臓癌、胃癌、卵巣癌、子宮頸癌、乳癌、腎臓癌、甲状腺癌、上咽頭癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、神経膠芽腫、及び/又は黒色腫が挙げられる。

#### 【0310】

CD70はまた、血液腫瘍及び癌腫上で検出されてきた。正常組織におけるCD70の限定的な発現パターン及び様々な悪性腫瘍におけるその広範な発現は、それを抗体に基づく療法のための魅力的な標的にする。しかしながら、CD70<sup>+</sup>癌を標的化するCAR T細胞療法の使用は、T細胞におけるCD70発現のために潜在的に問題になる。潜在的な問題に対処するために、本開示はまた、内在性のCD70発現を破壊するが、同時に抗CD70結合部分（例えば、抗CD70 scFv）を発現するように操作されたCAR T細胞を提供する。

10

#### 【0311】

いくつかの実施形態では、癌は、CD70<sup>+</sup>癌である。他の実施形態では、癌は、BCMA<sup>+</sup>癌である。いくつかの実施形態では、癌は、CD19<sup>+</sup>癌である。いくつかの実施形態では、癌は、CD33<sup>+</sup>癌である。他の癌抗原を発現する他の癌は、本開示の操作されたCD70ノックアウトCAR T細胞を使用して治療され得ることが理解されるはずである。

#### 【0312】

方法は、いくつかの実施形態において、対象（例えば、CD70<sup>+</sup>癌、BCMA<sup>+</sup>癌、CD19<sup>+</sup>癌又はCD33<sup>+</sup>癌を有する患者）に本明細書に提供されるとおりのCAR T細胞の集団を投与することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、対象にCD70遺伝子ノックアウトを含むCAR T細胞の集団を投与することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、対象にCD70遺伝子ノックアウト及びPD1遺伝子ノックアウトを含むCAR T細胞の集団を投与することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、細胞を対象に移植することを含む。この移植工程は、当該技術分野において知られるいずれかの移植の方法を使用して達成され得る。例えば、操作された細胞は、対象の血液に直接的に注射されてもよいし、別の方法で対象に投与されてもよい。

20

#### 【0313】

本明細書で実証されるとおり、CD70遺伝子ノックアウトを含むCAR T細胞は、増殖の延長及びインビボでの持続の増大を示す。いくつかの実施形態では、CD70遺伝子ノックアウトを含むCAR T細胞は、内在性のCD70を発現するCAR T細胞と比較して、抗腫瘍効果の増大を示す。いくつかの実施形態では、CD70遺伝子ノックアウトを含むCAR T細胞は、内在性のCD70を発現するCAR T細胞と比較して、固形腫瘍における抗腫瘍効果の増大を示す。理論に束縛されるものではないが、CD70遺伝子ノックアウトを含むCAR T細胞のインビボでの持続の増大は、固形腫瘍における増殖を可能にし、したがって、内在性のCD70を発現するCAR T細胞と比較して、そのような腫瘍における抗腫瘍効果の増強をもたらし得る。

30

#### 【0314】

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に記載されるCAR T細胞を有する固形腫瘍を治療するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に記載される抗CD70 CAR T細胞を有する固形腫瘍を治療するための方法を提供する。

40

#### 【0315】

投与する工程は、所望の効果がもたらされるように、腫瘍などの所望の部位での導入細胞の少なくとも部分的な局在をもたらす方法又は経路による、対象への細胞、例えば、操作されたT細胞の配置（例えば、移植）を含み得る。操作されたT細胞は、移植された細胞又は細胞の構成要素の少なくとも一部が生存したままである対象における所望の位置への送達をもたらす任意の適切な経路によって投与され得る。対象への投与後の細胞の生存

50

期間は、数時間、例えば、24時間という短い期間、数日、数年もの間、或いは対象の寿命、すなわち、長期の生着であり得る。例えば、本明細書に記載されるいくつかの態様において、有効量の操作されたT細胞は、腹腔内又は静脈内経路などの全身性の投与経路を介して投与される。

【0316】

対象は、診断、治療、又は療法の望まれる任意の対象であり得る。いくつかの実施形態では、対象は哺乳動物である。いくつかの実施形態では、対象はヒトである。

【0317】

ドナーは、治療されている対象ではない個体である。ドナーは、患者ではない個体である。いくつかの実施形態では、ドナーは、治療されている癌を有しないか又は有すると疑われていない個体である。いくつかの実施形態では、複数のドナー、例えば、2以上のドナーが使用される。

10

【0318】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法に従って投与されている操作されたT細胞集団は、1つ以上のドナーから得られた異質遺伝子型のT細胞を含む。異質遺伝子型は、1つ以上の座位での遺伝子がレシピエント（例えば、対象）と同一ではない細胞、細胞集団、又は同じ種の1つ以上の異なるドナーから得られた細胞を含む生体試料を指す。例えば、対象に投与されている操作されたT細胞集団は、1以上の血縁ではないドナー、又は1以上の同一ではない同胞に由来し得る。いくつかの実施形態では、遺伝的に同一のドナー（例えば、同一の双子）から得られたものなど、同一遺伝子の細胞集団が使用され得る。いくつかの実施形態では、細胞は、自己細胞である；すなわち、操作されたT細胞は、対象から得られるか又は単離され、同じ対象に投与される、すなわち、ドナー及びレシピエントが同じである。

20

【0319】

有効量は、医学的状態（例えば、癌）の少なくとも1つ以上の徴候又は症状を予防するか又は軽減するのに必要な操作されたT細胞の集団の量を指し、所望の効果をもたらす、例えば、医学的状態を有する対象を治療する組成物の十分な量に関する。有効量はまた、疾患の症状の発症を予防するか若しくは遅らせるか、疾患の症状の経過を変えるか（例えば、疾患の症状の進行を遅くすることに限定されない）、又は疾患の症状を逆転させるのに十分な量を含む。任意の所与の場合に関して、適切な有効量は、当業者によって通常の実験を用いて決定され得ることが理解される。

30

【0320】

本明細書に記載される様々な態様における使用に関して、有効量の細胞（例えば、操作されたT細胞）は、少なくとも $10^2$ 細胞、少なくとも $5 \times 10^2$ 細胞、少なくとも $10^3$ 細胞、少なくとも $5 \times 10^3$ 細胞、少なくとも $10^4$ 細胞、少なくとも $5 \times 10^4$ 細胞、少なくとも $10^5$ 細胞、少なくとも $2 \times 10^5$ 細胞、少なくとも $3 \times 10^5$ 細胞、少なくとも $4 \times 10^5$ 細胞、少なくとも $5 \times 10^5$ 細胞、少なくとも $6 \times 10^5$ 細胞、少なくとも $7 \times 10^5$ 細胞、少なくとも $8 \times 10^5$ 細胞、少なくとも $9 \times 10^5$ 細胞、少なくとも $1 \times 10^6$ 細胞、少なくとも $2 \times 10^6$ 細胞、少なくとも $3 \times 10^6$ 細胞、少なくとも $4 \times 10^6$ 細胞、少なくとも $5 \times 10^6$ 細胞、少なくとも $6 \times 10^6$ 細胞、少なくとも $7 \times 10^6$ 細胞、少なくとも $8 \times 10^6$ 細胞、少なくとも $9 \times 10^6$ 細胞、又はその複合を含む。細胞は、1つ以上のドナーに由来するか、又は自己の供給源から得られる。本明細書に記載されるいくつかの例において、細胞は、必要とする対象への投与の前に培養において増殖される。

40

【0321】

投与の様式は、注射、注入、点眼、又は経口摂取を含む。注射としては、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、脳室内、関節内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節腔内、被膜下、くも膜下、脊髄内、脳脊髄内、及び胸骨内注射及び注入が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、経路は、静脈内である。

【0322】

いくつかの実施形態では、操作されたT細胞は、全身的に投与され、これは、標的部位

50

、組織、又は臓器に直接的ではなく、対象の循環系に入り、それにより代謝及び他の同様の過程にかけられるような細胞の集団の投与を指す。

#### 【0323】

医学的状態の治療のための組成物を含む治療の有効性は、熟達した臨床医によって判定され得る。治療は、一例ではあるが、任意の1つ又は全ての徴候又は症状の機能的標的のレベルが有利な様式で変えられる（例えば、少なくとも10%増加する）、又は疾患（例えば、癌）の他の臨床的に認められている症状又はマーカーが改善又は緩和される場合、「有効な治療」とみなされる。有効性はまた、入院又は医学的介入の必要性によって評価されるとおり、対象が悪化しないことによって測定され得る（例えば、疾患の進行が止まるか、又は少なくとも遅くなる）。これらの指標を測定する方法は、当業者に知られており、且つ/又は本明細書に記載される。治療は、対象における疾患の任意の治療を含み、且つ（1）疾患を阻害すること、例えば、症状の進行を止めるか、又は遅くすること；又は（2）疾患を軽減すること、例えば、症状の退行をもたらすこと；及び（3）症状の発症の可能性を予防するか又は減少させることを含む。

10

#### 【0324】

併用療法もまた、本開示により包含される。例えば、CD70及び/又はCD27抗体を使用して、CAR T細胞上のCD70及び/又はCD27に結合し、且つ/又はその活性を調節でき、且つ枯渇の減少、CAR T細胞増殖の増強及び癌細胞の死滅の有効性の増大を促進できる。したがって、CD70及び/又はCD27抗体を、当該技術分野において知られる任意のCAR T細胞とともに投与して、CAR T細胞の機能を向上させることができる。例えば、本明細書に提供される操作されたT細胞のいずれかが、抗CD70抗体、抗CD27抗体、又は抗CD70抗体及び抗CD27抗体の組合せと組み合わせ投与されてもよい。いくつかの実施形態では、TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞（例えば、抗CD70 CAR又は抗BCMA CAR）が、抗CD70及び/又は抗CD27抗体と組み合わせ投与される。いくつかの実施形態では、TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞（例えば、抗CD70 CAR又は抗BCMA CAR）が、抗CD70及び/又は抗CD27抗体と組み合わせ投与される。いくつかの実施形態では、TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞（例えば、抗CD70 CAR又は抗BCMA CAR）が、抗CD70及び/又は抗CD27抗体と組み合わせ投与される。いくつかの実施形態では、TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞（例えば、抗CD70 CAR又は抗BCMA CAR）が、抗CD70及び/又は抗CD27抗体と組み合わせ投与される。いくつかの実施形態では、組み合わせ投与される抗体は、バルリルマブであってもよい。

20

30

#### 【0325】

いくつかの実施形態では、本開示は、T細胞の枯渇を減少させる方法であって、T細胞中のCD70遺伝子を破壊することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、T細胞の増殖を増大させる方法であって、T細胞中のCD70遺伝子を破壊することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、T細胞の細胞障害性を増大させる方法であって、T細胞中のCD70遺伝子を破壊することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、T細胞における免疫チェックポイント（例えば、PD-1）の阻害効果を克服する方法であって、T細胞中のCD70遺伝子を破壊することを含む方法を提供する。

40

#### 【0326】

他の実施形態

本開示は、以下の実施形態に関する。この節全体にわたって、実施形態という用語は、順序の前の「E」として省略される。例えば、E1は、実施形態1に等しい。

#### 【0327】

E1．破壊されたCD70遺伝子、破壊されたプログラム細胞死-1（PD-1）遺伝子、及びキメラ抗原受容体（CAR）をコードする核酸を含む操作されたT細胞。

#### 【0328】

50

E 2 . 破壊された C D 7 0 遺伝子及び C D 7 0 に結合するキメラ抗原受容体 ( C A R ) をコードする核酸を含む操作された T 細胞。

【 0 3 2 9 】

E 3 . 破壊された C D 7 0 遺伝子及び C D 7 0 に結合しないキメラ抗原受容体 ( C A R ) をコードする核酸を含む操作された T 細胞。

【 0 3 3 0 】

E 4 . 破壊された P D - 1 遺伝子をさらに含む、実施形態 2 又は 3 の操作された T 細胞。

【 0 3 3 1 】

E 5 . 破壊された T 細胞受容体アルファ鎖定常領域 ( T R A C ) 遺伝子をさらに含む、実施形態 1 ~ 4 のいずれか 1 つの操作された T 細胞。

【 0 3 3 2 】

E 6 . 破壊されたベータ - 2 - ミクログロブリン ( 2 M ) 遺伝子をさらに含む、実施形態 1 ~ 5 のいずれか 1 つの操作された T 細胞。

【 0 3 3 3 】

E 7 . 操作された T 細胞であって、  
破壊された T 細胞受容体アルファ鎖定常領域 ( T R A C ) 遺伝子 ;  
破壊されたベータ - 2 - ミクログロブリン ( 2 M ) 遺伝子 ;  
破壊された C D 7 0 遺伝子 ; 及び  
キメラ抗原受容体 ( C A R ) をコードする核酸を含む、操作された T 細胞。

【 0 3 3 4 】

E 8 . C A R をコードする核酸が、 T R A C 遺伝子に挿入される、実施形態 7 の操作された T 細胞。

【 0 3 3 5 】

E 9 . 破壊された P D - 1 遺伝子をさらに含む、実施形態 7 又は 8 の操作された T 細胞。

【 0 3 3 6 】

E 1 0 . C A R が、抗 C D 7 0 抗体を含む外部ドメインを含み、任意選択により、抗 C D 7 0 抗体が、抗 C D 7 0 一本鎖可変断片 ( s c F v ) である、実施形態 1 ~ 9 のいずれか 1 つの操作された T 細胞。

【 0 3 3 7 】

E 1 1 . 抗 C D 7 0 s c F v が、参照抗体と同じ重鎖可変領域 ( V H ) 相補性決定領域 ( C D R ) 及び同じ軽鎖可変領域 ( V L ) C D R を含み、参照抗体が、配列番号 5 1 として記載される V H 及び配列番号 5 2 として記載される V L を含む、実施形態 1 0 の操作された T 細胞。

【 0 3 3 8 】

E 1 2 . 抗 C D 7 0 s c F v が、参照抗体と同じ V H 及び V L 鎖を含む、実施形態 1 1 の操作された T 細胞。

【 0 3 3 9 】

E 1 3 . 抗 C D 7 0 s c F v が、配列番号 4 8 又は 5 0 のアミノ酸配列を含む、実施形態 1 1 の操作された T 細胞。

【 0 3 4 0 】

E 1 4 . 抗 C D 7 0 s c F v が、配列番号 5 0 のアミノ酸配列を含む、実施形態 1 1 の操作された T 細胞。

【 0 3 4 1 】

E 1 5 . C A R が、抗 B C M A 抗体を含む外部ドメインを含み、任意選択により、抗 B C M A 抗体が、抗 B C M A 一本鎖可変断片 ( s c F v ) である、実施形態 1 ~ 9 のいずれか 1 つの操作された T 細胞。

【 0 3 4 2 】

E 1 6 . 抗 B C M A s c F v が、参照抗体と同じ V H 相補性決定領域 ( C D R ) 及び同じ V L C D R を含み、参照抗体が、配列番号 6 0 として記載される V H 及び配列番号 6 1 として記載される V L を含む、実施形態 1 5 の操作された T 細胞。

10

20

30

40

50

## 【 0 3 4 3 】

E 1 7 . 抗 B C M A s c F v が、参照抗体と同じ V H 及び V L 鎖を含む、実施形態 1 6 の操作された T 細胞。

## 【 0 3 4 4 】

E 1 8 . 抗 B C M A s c F v が、配列番号 5 9 のアミノ酸配列を含む、実施形態 1 6 の操作された T 細胞。

## 【 0 3 4 5 】

E 1 9 . C A R が、C D 2 8 又は 4 1 B B 共刺激ドメイン及び任意選択により C D 3 シグナル伝達ドメインを含む、実施形態 1 ~ 1 8 のいずれか 1 つの操作された T 細胞。

## 【 0 3 4 6 】

E 2 0 . T R A C 遺伝子が、配列番号 4 4 又は 5 5 のヌクレオチド配列を含み、且つ / 又は C A R をコードする核酸が、配列番号 4 5 又は 5 6 のヌクレオチド配列を含む、実施形態 5 ~ 1 9 のいずれか 1 つの操作された T 細胞。

## 【 0 3 4 7 】

E 2 1 . 破壊された 2 M 遺伝子が、配列番号 9 ~ 1 4 のいずれか 1 つから選択される遺伝子の少なくとも 1 つのヌクレオチド配列を含む、実施形態 6 ~ 2 0 のいずれか 1 つの操作された T 細胞。

## 【 0 3 4 8 】

E 2 2 . 操作された T 細胞が、癌細胞による 5 回の再チャレンジ後に細胞傷害性を維持する、実施形態 1 ~ 2 1 のいずれか 1 つの操作された T 細胞。

## 【 0 3 4 9 】

E 2 3 . 操作された T 細胞が、癌細胞による 1 0 回の再チャレンジ後に細胞傷害性を維持する、実施形態 2 2 の操作された T 細胞。

## 【 0 3 5 0 】

E 2 4 . 破壊された C D 7 0 遺伝子、破壊されたプログラム細胞死 - 1 ( P D - 1 ) 遺伝子、及びキメラ抗原受容体 ( C A R ) をコードする核酸を含む操作された T 細胞を含む細胞の集団。

## 【 0 3 5 1 】

E 2 5 . 破壊された C D 7 0 遺伝子、及び C D 7 0 に結合するキメラ抗原受容体 ( C A R ) をコードする核酸を含む操作された T 細胞を含む細胞の集団。

## 【 0 3 5 2 】

E 2 6 . 破壊された C D 7 0 遺伝子及び C D 7 0 に結合しないキメラ抗原受容体 ( C A R ) をコードする核酸を含む操作された T 細胞を含む細胞の集団。

## 【 0 3 5 3 】

E 2 7 . 破壊されたプログラム細胞死 - 1 ( P D - 1 ) 遺伝子をさらに含む、実施形態 2 5 又は 2 6 の細胞の集団。

## 【 0 3 5 4 】

E 2 8 . 破壊された T 細胞受容体アルファ鎖定常領域 ( T R A C ) 遺伝子をさらに含む、実施形態 2 4 ~ 2 7 のいずれか 1 つの細胞の集団。

## 【 0 3 5 5 】

E 2 9 . 破壊されたベータ - 2 - ミクログロブリン ( 2 M ) 遺伝子をさらに含む、実施形態 2 4 ~ 2 8 のいずれか 1 つの細胞の集団。

## 【 0 3 5 6 】

E 3 0 . 細胞の集団であって、  
破壊された T 細胞受容体アルファ鎖定常領域 ( T R A C ) 遺伝子 ;  
破壊されたベータ - 2 - ミクログロブリン ( 2 M ) 遺伝子 ;  
破壊された C D 7 0 遺伝子 ; 及び  
キメラ抗原受容体 ( C A R ) をコードする核酸を含む操作された T 細胞を含む、細胞の集団。

## 【 0 3 5 7 】

10

20

30

40

50

E 3 1 . C A R をコードする核酸が、T R A C 遺伝子に挿入される、実施形態 3 0 の細胞の集団。

【 0 3 5 8 】

E 3 2 . 操作された T 細胞がさらに、破壊されたプログラム細胞死 - 1 ( P D - 1 ) 遺伝子を含む、実施形態 3 0 又は 3 1 の細胞の集団。

【 0 3 5 9 】

E 3 3 . C A R が、抗 C D 7 0 抗体を含む外部ドメインを含み、任意選択により、抗 C D 7 0 抗体が、抗 C D 7 0 一本鎖可変断片 ( s c F v ) である、実施形態 2 4 又は 2 7 ~ 3 2 のいずれか 1 つの細胞の集団。

【 0 3 6 0 】

E 3 4 . 抗 C D 7 0 s c F v が、参照抗体と同じ V H 相補性決定領域 ( C D R ) 及び同じ V L C D R を含み、参照抗体が、配列番号 5 1 として記載される V H 及び配列番号 5 2 として記載される V L を含む、実施形態 3 3 の細胞の集団。

【 0 3 6 1 】

E 3 5 . 抗 C D 7 0 s c F v が、参照抗体と同じ V H 及び V L 鎖を含む、実施形態 3 4 の細胞の集団。

【 0 3 6 2 】

E 3 6 . 抗 C D 7 0 s c F v が、配列番号 4 8 又は 5 0 のアミノ酸配列を含む、実施形態 3 5 の細胞の集団。

【 0 3 6 3 】

E 3 7 . 抗 C D 7 0 s c F v が、配列番号 5 0 のアミノ酸配列を含む、実施形態 3 5 の細胞の集団。

【 0 3 6 4 】

E 3 8 . C A R が、抗 B C M A 抗体を含む外部ドメインを含み、任意選択により、抗 B C M A 抗体が、抗 B C M A 一本鎖可変断片 ( s c F v ) である、実施形態 2 4 ~ 3 2 のいずれか 1 つの細胞の集団。

【 0 3 6 5 】

E 3 9 . 抗 B C M A s c F v が、参照抗体と同じ V H 相補性決定領域 ( C D R ) 及び同じ V L C D R を含み、参照抗体が、配列番号 6 0 として記載される V H 及び配列番号 6 1 として記載される V L を含む、実施形態 3 8 の細胞の集団。

【 0 3 6 6 】

E 4 0 . 抗 B C M A s c F v が、参照抗体と同じ V H 及び V L 鎖を含む、実施形態 3 9 の細胞の集団。

【 0 3 6 7 】

E 4 1 . 抗 B C M A s c F v が、配列番号 5 9 のアミノ酸配列を含む、実施形態 3 9 の細胞の集団。

【 0 3 6 8 】

E 4 2 . T R A C 遺伝子が、配列番号 4 4 又は 5 5 のヌクレオチド配列を含み、且つ / 又は C A R をコードする核酸が、配列番号 4 5 又は 5 6 のヌクレオチド配列を含む、実施形態 2 8 ~ 4 1 のいずれか 1 つの細胞の集団。

【 0 3 6 9 】

E 4 3 . 破壊された 2 M 遺伝子が、配列番号 9 ~ 1 4 のいずれか 1 つから選択される遺伝子の少なくとも 1 つのヌクレオチド配列を含む、実施形態 2 9 ~ 4 2 のいずれか 1 つの細胞の集団。

【 0 3 7 0 】

E 4 4 . 操作された T 細胞の少なくとも 5 0 % が、検出可能なレベルの T C R 表面タンパク質を発現せず、検出可能なレベルの 2 M 表面タンパク質を発現せず、検出可能なレベルの C D 7 0 表面タンパク質を発現せず、検出可能なレベルの P D - 1 表面タンパク質を発現せず、且つ / 又は検出可能なレベルの C A R を発現する、実施形態 2 4 ~ 4 3 のいずれか 1 つの細胞の集団。

10

20

30

40

50

## 【0371】

E45. 操作されたT細胞の50%~70%が、検出可能なレベルのTCR表面タンパク質を発現せず、検出可能なレベルのCD28表面タンパク質を発現せず、検出可能なレベルのCD70表面タンパク質を発現せず、検出可能なレベルのPD-1表面タンパク質を発現せず、且つ/又は検出可能なレベルのCARを発現する、実施形態44の細胞の集団。

## 【0372】

E46. 操作されたT細胞の少なくとも90%、任意選択により90~100%が、検出可能なレベルのTCR表面タンパク質を発現しない、実施形態28~45のいずれか1つの細胞の集団。

## 【0373】

E47. 操作されたT細胞の少なくとも60%、任意選択により60~75%が、検出可能なレベルのCD28表面タンパク質を発現しない、実施形態29~46のいずれか1つの細胞の集団。

## 【0374】

E48. 操作されたT細胞の少なくとも80%、任意選択により80~100%が、検出可能なレベルのCD70表面タンパク質を発現しない、実施形態24~47のいずれか1つの細胞の集団。

## 【0375】

E49. 操作されたT細胞の少なくとも80%、任意選択により80~95%が、検出可能なレベルのCARを発現する、実施形態1~48のいずれか1つの細胞の集団。

## 【0376】

E50. 操作されたT細胞が、対照T細胞と比較して少なくとも20%高い細胞増殖能を示す、実施形態24~49のいずれか1つの細胞の集団。

## 【0377】

E51. 操作されたT細胞が、対照T細胞と比較して少なくとも20%高い細胞溶解能を示す、実施形態24~50のいずれか1つの細胞の集団。

## 【0378】

E52. 操作されたT細胞によって分泌されるサイトカインのレベルが、対照T細胞によって分泌されるサイトカインのレベルより少なくとも2倍高い、実施形態24~51のいずれか1つの細胞の集団。

## 【0379】

E53. 操作されたT細胞が、対照T細胞と比較して細胞枯渇の減少を示す、実施形態24~52のいずれか1つの集団。

## 【0380】

E54. 操作されたT細胞が、対照T細胞と比較してLAG3のレベルの低減を示す、実施形態53の細胞の集団。

## 【0381】

E55. 対照T細胞が、内在性のCD70タンパク質を発現する操作されたT細胞である、実施形態54のいずれか1つの細胞の集団。

## 【0382】

E56. 操作されたT細胞が、サイトカイン依存性の増殖を維持する、実施形態24~55のいずれか1つの細胞の集団。

## 【0383】

E57. 操作されたT細胞が、癌細胞による5回の再チャレンジ後に細胞傷害性を維持する、実施形態24~56のいずれか1つの細胞の集団。

## 【0384】

E58. 操作されたT細胞が、癌細胞による10回の再チャレンジ後に細胞傷害性を維持する、実施形態47の細胞の集団。

## 【0385】

E59. 対象に実施形態24~58のいずれか1つの細胞の集団を投与することを含む

10

20

30

40

50

方法。

【0386】

E60．操作されたT細胞が、操作されたヒトT細胞である、実施形態59の方法。

【0387】

E61．対象が、癌を有する、実施形態59又は60の方法。

【0388】

E62．癌が、CD70及び/又はBCMAを発現する、実施形態61の方法。

【0389】

E63．細胞の集団が、癌を治療するのに有効な量で対象に投与される、実施形態59～62のいずれか1つの方法。

10

【0390】

E64．癌が、固形悪性腫瘍又は血液悪性腫瘍である、実施形態59～63のいずれか1つの方法。

【0391】

E65．固形悪性腫瘍が、卵巣腫瘍、脾臓腫瘍、腎臓腫瘍、肺腫瘍、及び腸腫瘍からなる群から選択される、実施形態64の方法。

【0392】

E66．細胞の集団が、対象における腫瘍の体積を減少させるのに有効な量で対象に投与される、実施形態63の方法。

【0393】

E67．操作されたT細胞を生成するための方法であって、

(a) T細胞に

RNA誘導型ヌクレアーゼ、

CD70遺伝子を標的化するgRNA、及び

CARをコードする核酸を含むドナー鋳型を含むベクターを送達すること；並びに

(b) 破壊されたCD70遺伝子を含み且つCARを発現する操作されたT細胞を生成することを含む方法。

20

【0394】

E68．工程(a)においてT細胞にPD-1遺伝子を標的化するgRNAを送達することをさらに含み；工程(b)の操作されたT細胞がさらに、破壊されたPD-1遺伝子を含む、実施形態67の方法。

30

【0395】

E69．工程(a)においてT細胞にTRAC遺伝子を標的化するgRNAを送達することをさらに含み；工程(b)操作されたT細胞がさらに、破壊されたTRAC遺伝子を含む、実施形態67又は実施形態68の方法。

【0396】

E70．CARをコードする核酸が、TRAC遺伝子座位に対する左及び右の相同性アームと隣接し；且つ工程(b)の操作されたT細胞が、TRAC遺伝子座位中に挿入されたCARをコードする核酸を含む、実施形態69の方法。

【0397】

E71．工程(a)においてT細胞に2M遺伝子を標的化するgRNAを送達することをさらに含み；工程(b)の操作されたT細胞がさらに、破壊された2M遺伝子を含む、実施形態67～70のいずれか1つの方法。

40

【0398】

E72．操作されたT細胞を生成するための方法であって、

(a) T細胞に

RNA誘導型ヌクレアーゼ、

TRAC遺伝子を標的化するgRNA、

2M遺伝子を標的化するgRNA、

CD70遺伝子を標的化するgRNA、及び

50

CARをコードする核酸を含むドナー鋳型を含むベクターを送達すること；並びに  
(b)操作されたT細胞を生成することを含む方法。

【0399】

E73．CARをコードする核酸が、TRAC遺伝子座位に対する左及び右の相同性アームと隣接する、実施形態72の方法。

【0400】

E74．T細胞にPD-1遺伝子を標的化するgRNAを送達することをさらに含む、実施形態72又は73の方法。

【0401】

E75．RNA誘導型ヌクレアーゼが、Cas9ヌクレアーゼ、任意選択によりS.ピオゲネス(S. pyogenes)Cas9ヌクレアーゼである、実施形態67~74のいずれか1つの方法。

10

【0402】

E76．TRAC遺伝子を標的化するgRNAが、配列番号98のヌクレオチド配列を含むか又は配列番号118のヌクレオチド配列を標的化し、且つ任意選択により、TRAC遺伝子を標的化するgRNAが、配列番号30のヌクレオチド配列を含む、実施形態69~75のいずれか1つの方法。

【0403】

E77．2M遺伝子を標的化するgRNAが、配列番号99のヌクレオチド配列を含むか又は配列番号119のヌクレオチド配列を標的化し、且つ任意選択により、2M遺伝子を標的化するgRNAが、配列番号31のヌクレオチド配列を含む、実施形態71~76のいずれか1つの方法。

20

【0404】

E78．CD70遺伝子を標的化するgRNAが、配列番号94又は95のヌクレオチド配列を含むか又は配列番号114又は115のヌクレオチド配列を標的化し、且つ任意選択により、CD70遺伝子を標的化するgRNAが、配列番号26又は27のヌクレオチド配列を含む、実施形態67~77のいずれか1つの方法。

【0405】

E79．PD-1遺伝子を標的化するgRNAが、配列番号100のヌクレオチド配列を含むか又は配列番号120のヌクレオチド配列を標的化し、且つ任意選択により、PD-1遺伝子を標的化するgRNAが、配列番号32のヌクレオチド配列を含む、実施形態68~71及び74~78のいずれか1つの方法。

30

【0406】

E80．CARが、抗CD70抗体を含む外部ドメインを含み、任意選択により、抗CD70抗体が、抗CD70一本鎖可変断片(scFv)である、実施形態67~79のいずれか1つの方法。

【0407】

E81．抗CD70 scFvが、参照抗体と同じVH相補性決定領域(CDR)及び同じVL CDRを含み、参照抗体が、配列番号51として記載されるVH及び配列番号52として記載されるVLを含む、実施形態80の方法。

40

【0408】

E82．抗CD70 scFvが、参照抗体と同じVH及びVL鎖を含む、実施形態81の方法。

【0409】

E83．抗CD70 scFvが、配列番号48又は50のアミノ酸配列を含む、実施形態81の方法。

【0410】

E84．抗CD70 scFvが、配列番号50のアミノ酸配列を含む、実施形態81の方法。

【0411】

50

E 8 5 . C A R が、抗 B C M A 抗体を含む外部ドメインを含み、任意選択により、抗 B C M A 抗体が、抗 B C M A 一本鎖可変断片 ( s c F v ) である、実施形態 6 7 ~ 7 9 のいずれか 1 つの方法。

【 0 4 1 2 】

E 8 6 . 抗 B C M A s c F v が、参照抗体と同じ V H 相補性決定領域 ( C D R ) 及び同じ V L C D R を含み、参照抗体が、配列番号 6 0 として記載される V H 及び配列番号 6 1 として記載される V L を含む、実施形態 8 5 の方法。

【 0 4 1 3 】

E 8 7 . 抗 B C M A s c F v が、参照抗体と同じ V H 及び V L 鎖を含む、実施形態 8 6 の方法。

【 0 4 1 4 】

E 8 8 . 抗 B C M A s c F v が、配列番号 5 9 のアミノ酸配列を含む、実施形態 8 6 の方法。

【 0 4 1 5 】

E 8 9 . C A R がさらに、C D 2 8 又は 4 1 B B 共刺激ドメイン及び任意選択により C D 3 z シグナル伝達ドメインを含む、実施形態 6 7 ~ 8 8 のいずれか 1 つの方法。

【 0 4 1 6 】

E 9 0 . ベクターが、配列番号 4 6 のアミノ酸配列を含む C A R をコードする核酸を含む、実施形態 7 2 の方法。

【 0 4 1 7 】

E 9 1 . ベクターが、配列番号 5 7 のアミノ酸配列を含む C A R をコードする核酸を含む、実施形態 7 2 の方法。

【 0 4 1 8 】

E 9 2 . R N A 誘導型ヌクレアーゼ及び C D 7 0 遺伝子を標的化する g R N A を含む操作された T 細胞であって、任意選択により、C D 7 0 遺伝子を標的化する g R N A が、配列番号 9 4 又は 9 5 のヌクレオチド配列を含むか又は配列番号 1 1 4 又は 1 1 5 のヌクレオチド配列を標的化し、且つ任意選択により、C D 7 0 遺伝子を標的化する g R N A が、配列番号 2 6 又は 2 7 のヌクレオチド配列を含む操作された T 細胞。

【 0 4 1 9 】

E 9 3 . P D - 1 遺伝子を標的化する g R N A をさらに含む実施形態 9 2 の操作された T 細胞であって、任意選択により、P D - 1 遺伝子を標的化する g R N A が、配列番号 1 0 0 のヌクレオチド配列を含むか又は配列番号 1 2 0 のヌクレオチド配列を標的化し、且つ任意選択により、P D - 1 遺伝子を標的化する g R N A が、配列番号 3 2 のヌクレオチド配列を含む操作された T 細胞。

【 0 4 2 0 】

E 9 4 . T R A C 遺伝子を標的化する g R N A をさらに含む実施形態 9 2 又は 9 3 の操作された T 細胞であって、任意選択により、T R A C 遺伝子を標的化する g R N A が、配列番号 9 8 のヌクレオチド配列を含むか又は配列番号 1 1 8 のヌクレオチド配列を標的化し、且つ任意選択により、T R A C 遺伝子を標的化する g R N A が、配列番号 3 0 のヌクレオチド配列を含む操作された T 細胞。

【 0 4 2 1 】

E 9 5 . 2 M 遺伝子を標的化する g R N A をさらに含む実施形態 9 2 ~ 9 4 のいずれか 1 つの操作された T 細胞であって、任意選択により、2 M 遺伝子を標的化する g R N A が、配列番号 9 9 のヌクレオチド配列を含むか又は配列番号 1 1 9 のヌクレオチド配列を標的化し、且つ任意選択により、2 M 遺伝子を標的化する g R N A が、配列番号 3 1 のヌクレオチド配列を含む操作された T 細胞。

【 0 4 2 2 】

E 9 6 . R N A 誘導型ヌクレアーゼが、C a s 9 ヌクレアーゼ、任意選択により S . ピオゲネス ( S . p y o g e n e s ) C a s 9 ヌクレアーゼである、実施形態 9 2 ~ 9 5 のいずれか 1 つの操作された T 細胞。

10

20

30

40

50

## 【0423】

E97. CARをコードする核酸を含むドナー鑄型を含むベクターをさらに含む実施形態92~96のいずれか1つの操作されたT細胞であって、任意選択により、CARをコードする核酸が、TRAC遺伝子座位に対する左及び右の相同性アームと隣接する操作されたT細胞。

## 【0424】

E98. CARが、抗CD70抗体を含む外部ドメインを含み、任意選択により、抗CD70抗体が、抗CD70一本鎖可変断片(scFv)である、実施形態97の操作されたT細胞。

## 【0425】

E99. 抗CD70 scFvが、参照抗体と同じVH相補性決定領域(CDR)及び同じVL CDRを含み、参照抗体が、配列番号51として記載されるVH及び配列番号52として記載されるVLを含む、実施形態98の操作されたT細胞。

## 【0426】

E100. 抗CD70 scFvが、参照抗体と同じVH及びVL鎖を含む、実施形態99の操作されたT細胞。

## 【0427】

E101. 抗CD70 scFvが、配列番号48又は50のアミノ酸配列を含む、実施形態99の操作されたT細胞。

## 【0428】

E102. 抗CD70 scFvが、配列番号50のアミノ酸配列を含む、実施形態99の操作されたT細胞。

## 【0429】

E103. CARが、抗BCMA抗体を含む外部ドメインを含み、任意選択により、抗BCMA抗体が、抗BCMA一本鎖可変断片(scFv)である、実施形態97の操作されたT細胞。

## 【0430】

E104. 抗BCMA scFvが、参照抗体と同じVH相補性決定領域(CDR)及び同じVL CDRを含み、参照抗体が、配列番号60として記載されるVH及び配列番号61として記載されるVLを含む、実施形態103の操作されたT細胞。

## 【0431】

E105. 抗BCMA scFvが、参照抗体と同じVH及びVL鎖を含む、実施形態104の操作されたT細胞。

## 【0432】

E106. 抗BCMA scFvが、配列番号59のアミノ酸配列を含む、実施形態104の操作されたT細胞。

## 【0433】

E107. ベクターが、配列番号46又は57のアミノ酸配列を含むCARをコードする核酸を含む、実施形態97の操作されたT細胞。

## 【0434】

E108. 増殖を増大させるか又はT細胞の枯渇を減少させる方法であって、T細胞中のCD70遺伝子を破壊することを含む方法。

## 【0435】

E109. T細胞においてプログラム細胞死-1(PD-1)遺伝子、T細胞受容体アルファ鎖定常領域(TRAC)遺伝子、及びベータ-2-ミクログロブリン(β2M)遺伝子からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子を破壊することをさらに含む、実施形態108の方法。

## 【0436】

E110. T細胞においてキメラ抗原受容体(CAR)をコードする核酸を発現させることをさらに含む、実施形態108~109のいずれか1つの方法。

10

20

30

40

50

## 【0437】

E111. CD70 遺伝子が、CRISPR/Cas 遺伝子編集によって破壊される、実施形態108～110のいずれか1つの方法。

## 【0438】

E112. PD-1、TRAC、及び/又は 2M 遺伝子が、CRISPR/Cas 遺伝子編集によって破壊される、実施形態110～111のいずれか1つの方法。

## 【0439】

E113. 対象における癌を治療するための方法であって、操作されたT細胞であって、破壊されたCD70 遺伝子及びCARをコードする核酸を含む操作されたT細胞を含む細胞の集団を患者に投与し、それにより対象における癌を治療することを含む方法。

10

## 【0440】

E114. CARが、CD70 に結合する、実施形態113の方法。

## 【0441】

E115. CARが、CD70 に結合しない、実施形態113の方法。

## 【0442】

E116. 操作されたT細胞がさらに、破壊されたTRAC 遺伝子を含む、実施形態113～115のいずれか1つの方法。

## 【0443】

E117. 操作されたT細胞がさらに、破壊されたB2M 遺伝子を含む、実施形態113～116のいずれか1つの方法。

20

## 【0444】

E118. 操作されたT細胞がさらに、破壊されたPD-1 遺伝子を含む、実施形態113～116のいずれか1つの方法。

## 【0445】

E119. 対象における癌を治療するための方法であって、操作されたT細胞を含む細胞の集団であって、操作されたT細胞が、

(i) 破壊されたTRAC 遺伝子；

(ii) 破壊されたB2M 遺伝子；

(iii) 破壊されたCD70 遺伝子；及び

(iv) CARをコードする核酸を含む細胞の集団を患者に投与し、

それにより対象における癌を治療することを含む方法。

30

## 【0446】

E120. CARが、(a) 抗CD70 抗原結合断片を含む外部ドメイン、(b) CD8 膜貫通ドメイン、及び(c) 41BB 共刺激ドメイン及びCD3z 共刺激ドメインを含む内部ドメインを含む、実施形態113～114及び116～119のいずれか1つの方法。

## 【0447】

E121. 破壊されたTRAC 遺伝子が、CARをコードする核酸を含む、実施形態119又は120の方法。

## 【0448】

E122. 抗CD70 抗体が、抗CD70 scFvである、実施形態120～121のいずれか1つの方法。

40

## 【0449】

E123. 抗CD70 scFvが、参照抗体と同じ重鎖可変領域(VH) 相補性決定領域(CDR) 及び同じ軽鎖可変領域(VL) CDRを含み、参照抗体が、配列番号51として記載されるVH及び配列番号52として記載されるVLを含む、実施形態122の方法。

## 【0450】

E124. 抗CD70 scFvが、参照抗体と同じVH及びVL鎖を含む、実施形態123の方法。

50

## 【0451】

E125 . 抗CD70 scFvが、配列番号48又は50のアミノ酸配列を含む、実施形態122の方法。

## 【0452】

E126 . 抗CD70 scFvが、配列番号50のアミノ酸配列を含む、実施形態122の方法。

## 【0453】

E127 . CARが、抗BCMA抗体を含む外部ドメインを含み、任意選択により、抗BCMA抗体が、抗BCMA一本鎖可変断片(scFv)である、実施形態113及び115~118のいずれか1つの方法。

10

## 【0454】

E128 . 抗BCMA scFvが、参照抗体と同じVH相補性決定領域(CDR)及び同じVL CDRを含み、参照抗体が、配列番号60として記載されるVH及び配列番号61として記載されるVLを含む、実施形態127の方法。

## 【0455】

E129 . 抗BCMA scFvが、参照抗体と同じVH及びVL鎖を含む、実施形態128の方法。

## 【0456】

E130 . 抗BCMA scFvが、配列番号59のアミノ酸配列を含む、実施形態127の方法。

20

## 【0457】

E131 . 操作されたT細胞が、操作されたヒトT細胞である、実施形態113~130のいずれか1つの方法。

## 【0458】

E132 . 癌が、CD70及び/又はBCMAを発現する、実施形態113~131のいずれか1つの方法。

## 【0459】

E133 . 細胞の集団が、癌を治療するのに有効な量で対象に投与される、実施形態113~132のいずれか1つの方法。

## 【0460】

E134 . 癌が、固形悪性腫瘍又は血液悪性腫瘍である、実施形態113~133のいずれか1つの方法。

30

## 【0461】

E135 . 固形悪性腫瘍が、卵巣腫瘍、膵臓腫瘍、腎臓腫瘍、肺腫瘍、及び腸腫瘍からなる群から選択される、実施形態134の方法。

## 【0462】

E136 . 操作されたT細胞を含む細胞の集団であって、操作されたT細胞が、

(i) 破壊されたTRAC遺伝子；

(ii) 破壊されたベータ-2-ミクログロブリン(B2M)遺伝子；

(iii) 破壊されたCD70遺伝子

(iv) (a) 抗CD70抗原結合断片を含む外部ドメイン、(b) CD8膜貫通ドメイン、及び(c) 41BB共刺激ドメイン及びCD3z共刺激ドメインを含む内部ドメインを含むCARをコードする核酸を含む細胞の集団。

40

## 【0463】

E137 . 破壊されたTRAC遺伝子が、CARをコードする核酸を含む、実施形態136の細胞の集団。

## 【0464】

E138 . 操作されたT細胞が、ヒトT細胞である、実施形態136~137のいずれか1つの細胞の集団。

## 【0465】

50

E 1 3 9 . 操作された T 細胞であって、

( i ) 破壊された T R A C 遺伝子であって、破壊された T R A C 遺伝子が、配列番号 4 6 に記載されるアミノ酸配列を含む C A R をコードする核酸を含む破壊された T R A C 遺伝子；

( i i ) 破壊された B 2 M 遺伝子；及び

( i i i ) 破壊された C D 7 0 遺伝子を含む、操作された T 細胞。

【 0 4 6 6 】

E 1 4 0 . C A R をコードする核酸が、配列番号 4 5 と少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 % 同一の配列を含む、実施形態 1 3 9 の操作された T 細胞。

【 0 4 6 7 】

E 1 4 1 . 操作された T 細胞であって、

( i ) 破壊された T R A C 遺伝子であって、破壊された T R A C 遺伝子が、C A R をコードする核酸を含み、核酸配列が、配列番号 4 5 と少なくとも 9 0 % 同一である破壊された T R A C 遺伝子；

( i i ) 破壊された B 2 M 遺伝子；及び

( i i i ) 破壊された C D 7 0 遺伝子を含む、操作された T 細胞。

【 0 4 6 8 】

E 1 4 2 . 破壊された T R A C 遺伝子が、配列番号 4 5 又は配列番号 4 4 に記載されるヌクレオチド配列を含むドナー配列を含む、実施形態 1 3 9 ~ 1 4 1 のいずれか 1 つの操作された T 細胞。

【 0 4 6 9 】

E 1 4 3 . 操作された T 細胞であって、

( i ) 配列番号 4 4 の核酸配列を含む破壊された T R A C 遺伝子；

( i i ) 破壊された B 2 M 遺伝子；及び

( i i i ) 破壊された C D 7 0 遺伝子を含む、操作された T 細胞。

【 0 4 7 0 】

E 1 4 4 . T 細胞が、ヒト T 細胞である、実施形態 1 3 9 ~ 1 4 3 のいずれか 1 つの操作された T 細胞。

【実施例】

【 0 4 7 1 】

実施例 1 . T 細胞における C a s 9 : s g R N A R N P による C D 7 0 の効率的なノックアウト

この実施例は、エクスピボで C R I S P R / C a s 9 遺伝子編集を使用して一次ヒト T 細胞における C D 7 0 遺伝子の効率的な編集を記載する。第 1 の 3 つのタンパク質をコードするエクソンを含有する C D 7 0 遺伝子のゲノムセグメントは、g R N A 設計ソフトウェアにおける入力として使用された。ゲノムセグメントはまた、隣接するスプライス部位アクセプター/ドナー配列を含んだ。所望の g R N A は、C D 7 0 のアミノ酸配列を破壊し、アウトオブフレーム/機能喪失アレル(「C D 7 0 ノックアウト」アレルと呼ばれる)をもたらす、コード配列における挿入又は欠失を引き起こすことになるものであった。C D 7 0 遺伝子を標的化するインシリコで同定された g R N A スペーサー配列中の 7 つ全てが合成され、g R N A は、表 5 において示されるとおり、特異的に修飾された。表 5 における g R N A は 2 ' - O - メチルホスホロチオエート修飾で修飾されたが、未修飾 g R N A、又は他の修飾を有する g R N A が使用されてもよい。また、この参照により全体として本明細書に組み込まれる、2 0 1 8 年 5 月 1 1 日に出願された P C T / I B 2 0 1 8 / 0 0 1 6 1 9 号を参照されたい。

【 0 4 7 2 】

10

20

30

40

50

【表 5 - 1】

表 5. CD70 gRNA 配列/標的配列

gRNA 配列		
名称	未改変配列	改変配列
CD70 sgRNA (E1_T1)	UCACCAAGCCCCGCGACCAAUg uuuuagagcuagaaaagcaaguuaaaaua aggcuaguccguuaacaacuugaaaaagug gcaccgagucggugcUUUU (配列番号 23)	U*C*A*CCAAGCCCCGCGACCA AUguuuuagagcuagaaaagcaaguuaa aauaaggcuaguccguuaacaacuugaaaa aguggcaccgagucggugcU*U*U*U (配列番号 33)
CD70 sgRNA (E1_T1) スペーサー	UCACCAAGCCCCGCGACCAAU (配列番号 91)	U*C*A*CCAAGCCCCGCGACCA AU (配列番号 101)
CD70 sgRNA (E1_T3)	AUCACCAAGCCCCGCGACCAAg uuuuagagcuagaaaagcaaguuaaaaua aggcuaguccguuaacaacuugaaaaagug gcaccgagucggugcUUUU (配列番号 24)	A*U*C*ACCAAGCCCCGCGACC AAguuuuagagcuagaaaagcaaguuaa aauaaggcuaguccguuaacaacuugaaaa aguggcaccgagucggugcU*U*U*U (配列番号 34)
CD70 sgRNA (E1_T3) スペーサー	AUCACCAAGCCCCGCGACCAA (配列番号 92)	A*U*C*ACCAAGCCCCGCGACC AA (配列番号 102)
CD70 sgRNA (E1_T4)	CGGUGCGGCGCAGGCCCUAU guuuuagagcuagaaaagcaaguuaaaau aaggcuaguccguuaacaacuugaaaaagu ggcaccgagucggugcUUUU (配列番号 25)	C*G*G*UGCGGCGCAGGCCCU AUguuuuagagcuagaaaagcaaguuaa aauaaggcuaguccguuaacaacuugaaaa aguggcaccgagucggugcU*U*U*U (配列番号 35)
CD70 sgRNA (E1_T4) スペーサー	CGGUGCGGCGCAGGCCCUAU (配列番号 93)	C*G*G*UGCGGCGCAGGCCCU AU (配列番号 103)
T7とも呼ばれる CD70 sgRNA (E1_T7);	GCUUUGGUCCCAUUGGUCGC guuuuagagcuagaaaagcaaguuaaaau aaggcuaguccguuaacaacuugaaaaagu ggcaccgagucggugcUUUU (配列番号 26)	G*C*U*UUGGUCCCAUUGGUC GCguuuuagagcuagaaaagcaaguuaa aauaaggcuaguccguuaacaacuugaaaa aguggcaccgagucggugcU*U*U*U (配列番号 36)
CD70 sgRNA (E1_T7) スペーサー	GCUUUGGUCCCAUUGGUCGC (配列番号 94)	G*C*U*UUGGUCCCAUUGGUC GC (配列番号 104)
T8とも呼ばれる CD70 sgRNA (E1_T8);	GCCCGCAGGACGCACCCAUA uuuuagagcuagaaaagcaaguuaaaaua aggcuaguccguuaacaacuugaaaaagug gcaccgagucggugcUUUU (配列番号 27)	G*C*C*CGCAGGACGCACCCA UAguuuuagagcuagaaaagcaaguuaa aauaaggcuaguccguuaacaacuugaaaa aguggcaccgagucggugcU*U*U*U (配列番号 37)
CD70 sgRNA (E1_T8) スペーサー	GCCCGCAGGACGCACCCAUA (配列番号 95)	G*C*C*CGCAGGACGCACCCA UA (配列番号 105)
CD70 sgRNA (E1_T10)	GUGCAUCCAGCGCUUCGCAc uuuuagagcuagaaaagcaaguuaaaaua aggcuaguccguuaacaacuugaaaaagug gcaccgagucggugcUUUU (配列番号 28)	G*U*G*CAUCCAGCGCUUCGC ACguuuuagagcuagaaaagcaaguuaa aauaaggcuaguccguuaacaacuugaaaa aguggcaccgagucggugcU*U*U*U (配列番号 38)
CD70 sgRNA (E1_T10) スペーサー	GUGCAUCCAGCGCUUCGCA C (配列番号 96)	G*U*G*CAUCCAGCGCUUCGC AC (配列番号 106)
CD70 sgRNA (E3_T1)	CAGCUACGUAUCCAUCGUGA guuuuagagcuagaaaagcaaguuaaaau aaggcuaguccguuaacaacuugaaaaagu ggcaccgagucggugcUUUU (配列番号 29)	C*A*G*CUACGUAUCCAUCGU GAguuuuagagcuagaaaagcaaguuaa aauaaggcuaguccguuaacaacuugaaaa aguggcaccgagucggugcU*U*U*U (配列番号 39)
CD70 sgRNA (E3_T1) スペーサー	CAGCUACGUAUCCAUCGUGA (配列番号 97)	C*A*G*CUACGUAUCCAUCGU GA (配列番号 107)

10

20

30

40

【 0 4 7 3 】

【表 5 - 2】

標的配列	
名称	標的配列 (PAM)
CD70 sgRNA (E1_T1)	TCACCAAGCCC GCGACCAAT (GGG) (配列番号 111)
CD70 sgRNA (E1_T3)	ATCACCAAGCCC GCGACCAA (TGG) (配列番号 112)
CD70 sgRNA (E1_T4)	CGGTGCGGCGCAGGCCCTAT (GGG) (配列番号 113)
CD70 sgRNA (E1_T7)	GCTTTGGTCCCATTGGTTCG (GGG) (配列番号 114)
CD70 sgRNA (E1_T8)	GCCCGCAGGACGCACCCATA (GGG) (配列番号 115)
CD70 sgRNA (E1_T10)	GTGCATCCAGCGCTTCGCAC (AGG) (配列番号 116)
CD70 sgRNA (E3_T1)	CAGCTACGTATCCATCGTGA (TGG) (配列番号 117)
TRAC sgRNA	AGAGCAACAGTGCTGTGGCC (TGG) (配列番号 118)
β2M sgRNA	GCTACTCTCTTTCTGGCC (TGG) (配列番号 119)
PD-1 sgRNA	CTGCAGCTTCTCCAACACAT (CGG) (配列番号 120)

\*: 2'-O-メチルホスホロチオエート残基

10

20

## 【0474】

一次ヒトT細胞は、Cas9ヌクレアーゼ及びCD70遺伝子(表5の配列)を標的化する合成的に修飾されたsgRNAを含有するリボ核タンパク質粒子(RNP)又は対照(Cas9なし、sgRNAなし)でトランスフェクト(電気穿孔)された。トランスフェクションの4~6日後、細胞は、(1)インデル頻度を評価するためにTIDE分析にかけられ、(2)細胞表面でのCD70発現レベルを評価するためにフローサイトメトリー(一次抗体:FITC抗ヒトCD70抗体、クローン113~16、Biolegend)によって処理された。

## 【0475】

7種のsgRNAは、表6に示されるとおり、TIDE分析によって測定可能なデータをもたらした。4種のsgRNA配列は、80%を超えるタンパク質発現ノックダウンで85%を超えるインデルパーセンテージ(編集頻度)を得たが(配列番号23、26、27及び29)、これは、非常に効率的な遺伝子編集を示している。表6におけるデータは、1種のドナーからのものである。試験試料当たりの(蛍光強度の中央値(MFI)によって評価された)CD70タンパク質発現のレベルは、対照細胞に存在するCD70タンパク質発現のレベルに標準化された。

30

## 【0476】

40

50

## 【表 6】

表 6. 遺伝子編集された T 細胞における CD70 gRNA 配列、切断効率、及び CD70 表面タンパク質発現

gRNA 名称	gRNA スペーサー配列	インデル %	R <sup>2</sup>	タンパク質発現 ノックアウト%
CD70 EXON1_T1 (E1_T1)	UCACCAAGCCCCGCGACCAAU (配列番号 91)	89.3%	0.97	84.8%
CD70 EXON1_T3 (E1_T3)	AUCACCAAGCCCCGCGACCAA (配列番号 92)	65.2%	0.93	84.0%
CD70 EXON1_T4 (E1_T4)	CGGUGCGGCGCAGGCCCUAU (配列番号 93)	81.6%	0.83	87.5%
CD70 EXON1_T7 (E1_T7)	GCUUUGGUCCCAUUGGUCGC (配列番号 94)	<b>97.8%</b>	0.98	<b>87.7%</b>
CD70 EXON1_T8 (E1_T8)	GCCCCGAGGACGCACCCAUA (配列番号 95)	<b>90.1%</b>	0.94	<b>88.1%</b>
CD70 EXON1_T10 (E1_T10)	GUGCAUCCAGCGCUUCGCAC (配列番号 96)	28.3%	0.30	83.9%
CD70 EXON3_T1 (E3_T1)	CAGCUACGUAUCCAUCGUGA (配列番号 97)	85.6%	0.93	87.2%

## 【0477】

T 細胞におけるオンターゲットインデルプロファイルの分析

オンターゲットアンプリコン分析は、CD70 遺伝子：

GCTTTGGTCCCATTTGGTCGC (配列番号 160；PAM 配列番号 114 を有する標的配列) を標的化する T7 ガイド (配列番号 26；配列番号 36) を使用する遺伝子編集の後に CD70 座位で実施された。

## 【0478】

遺伝子編集の後、オンターゲットアンプリコン分析は、TRAC- / 2M- / CD70- / 抗 CD70 CAR+ 細胞 (実施例 3 に記載されるとおりに生成される) における CD70 座位の周囲で実施された。

## 【0479】

最初の PCR は、KAPA HiFi PCR キット (Kapa Biosystems、Wilmington、MA) を使用して実施された。100 ng の入力 gDNA は、10 uM の各プライマーと組み合わせられた。CD70\_F 及び CD70\_R プライマーが、CD70 座位を増幅するように対にされた (表 7)。

## 【0480】

## 【表 7】

表 7. CD70 アンプリコンライブラリー作製のためのプライマー

CD70_F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGccccaacttttccatctcaactcaccccaagtg (配列番号 127)
CD70_R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGccctctctgcgctagcgga (配列番号 128)

## 【0481】

TRAC- / 2M- / 抗 CD70 CAR+ T 細胞を生成する CRISPR / Cas9 遺伝子編集後の T 細胞の集団における CD70 座位の分析は、特定のインデル頻度をもたらし、CD70 座位で編集された遺伝子配列をもたらす (表 8；ダッシュとしての欠失及び太字の挿入)。編集された細胞の 2 つの細胞集団は、2 つの異なるドナー T 細胞 (1 及び 2) から生成された。各ドナーからの編集された T 細胞の集団は、反復実験：1A / 1B 及び 2A / 2B において分析された。

【 0 4 8 2 】

【 表 8 】

表 8.

配列番号	遺伝子編集された配列	1A	1B	2A	2B	平均	標準偏差
129	CACACCACGAGGCAGATCACCAAGCCCGCG-- CAATGGGACCAAAGCAGCCCGCAGGACG	10.4 %	11.1 %	14.4 %	14.8 %	12.7 %	0.022
130	CACACCACGAGGCAGATCACCAAGCCCGCG AACCAATGGGACCAAAGCAGCCCGCAGGAC G	8.7%	10.0 %	11.3 %	11.1 %	10.3 %	0.012
131	CACACCACGAGGCAGATC----- ACCAATGGGACCAAAGCAGCCCGCAGGACG	8.2%	7.8%	7.1%	6.8%	7.5%	0.006
132	CACACCACGAGGCAGATCACCAAGCCCGCG- CCAATGGGACCAAAGCAGCCCGCAGGACG	3.9%	4.5%	4.2%	4.3%	4.2%	0.002
133	CACACCACGAGGCAGATCACCAAGCCCGC- ACCAATGGGACCAAAGCAGCCCGCAGGACG	2.2%	2.5%	2.4%	2.6%	2.4%	0.002
134	CACACCACGAGGCAGATCACCA----- -----AGCCCGCAGGACG	2.9%	2.3%	2.0%	2.0%	2.3%	0.004

10

【 0 4 8 3 】

実施例 2 . 多重遺伝子ノックアウトを有する T 細胞の生成

20

この実施例は、2、3つ又は4つの遺伝子の発現を同時に欠くヒト T 細胞を生成する C R I S P R / C a s 9 遺伝子編集技術の使用を記載する。具体的には、T 細胞受容体 ( T C R ) 遺伝子 ( T C R アルファ定常 ( T R A C ) 領域において編集された遺伝子)、2 - ミクログロブリン ( 2 M ) 遺伝子、表面抗原分類 7 0 ( C D 7 0 ) 遺伝子及び / 又はプログラム細胞死 1 ( P D - 1 又は P D 1 ) 遺伝子が、列挙された遺伝子の 2 つ以上において T 細胞欠損を生成する C R I S P R / C a s 9 遺伝子編集によって編集された。以下の略称が、簡潔さ及び明確さのために図において使用される :

- 2 X KO : T R A C - / 2 M -
- 3 X KO ( P D - 1 ) : T R A C - / 2 M - / P D - 1 -
- 3 X KO ( C D 7 0 ) : T R A C - / 2 M - / C D 7 0 -
- 4 X KO : T R A C - / 2 M - / P D - 1 - / C D 7 0 -

30

【 0 4 8 4 】

活性化された一次ヒト T 細胞は、C a s 9 : g R N A R N P 複合体で電気穿孔された。ヌクレオフェクション混合物は、Nucleofector ( 商標 ) 溶液、 $5 \times 10^6$  細胞、 $1 \mu\text{M}$  C a s 9 及び  $5 \mu\text{M}$  g R N A ( H e n d e l e t a l . , N a t B i o t e c h n o l . 2 0 1 5 ; 3 3 ( 9 ) : 9 8 5 - 9 8 9 , P M I D : 2 6 1 2 1 4 1 5 において記載される ) を含有した。二重ノックアウト T 細胞 ( 2 X KO ) の生成のために、細胞は、各々が上に示される濃度で C a s 9 タンパク質並びに以下の s g R N A : T R A C ( 配列番号 4 0 ) 及び 2 M ( 配列番号 4 1 ) の 1 つを含有する 2 つの異なる R N P 複合体で電気穿孔された。三重ノックアウト T 細胞 ( 3 X KO ) の生成のために、細胞は、各々が上に示される濃度で C a s タンパク質並びに以下の s g R N A : ( a ) T R A C ( 配列番号 4 0 )、2 M ( 配列番号 4 1 )、及び P D - 1 ( 配列番号 4 2 ) ; 又は上に示される濃度で ( b ) T R A C ( 配列番号 4 0 )、2 M ( 配列番号 4 1 )、及び C D 7 0 ( 配列番号 3 6 又は 3 7 ) の 1 つを含有する R N A 複合体である 3 つの異なる R N P 複合体で電気穿孔された。四重ノックアウト T 細胞 ( 4 X KO ) の生成のために、細胞は、各々が上に示される濃度で C a s 9 タンパク質並びに以下の s g R N A : T R A C ( 配列番号 4 0 )、2 M ( 配列番号 4 1 )、P D - 1 ( 配列番号 4 2 )、及び C D 7 0 ( 配列番号 3 6 又は 3 7 ) の 1 つを含有する R N A 複合体である 4 つの異なる R N P 複合体で電気穿孔された。g R N A の未改変のバージョン ( 又は他の改変バージョン ) もまた使用され得る ( 例えば、配列番号 3 0、3 1、3 2、2 6、及び / 又は 2 7 )。表 5

40

50

及び 9 における配列。

【 0 4 8 5 】

【 表 9 】

表 9. gRNA 配列/標的配列

名称	未改変配列	改変配列
TRAC sgRNA	AGAGCAACAGUGCUGUGGCC guuuuagagcuagaaaagcaaguuaaaau aaggcuaguccguuaucaacuugaaaaagu ggcaccgagucggugcUUUU (配列番号 30)	A*G*A*GCAACAGUGCUGUGG CCguuuuagagcuagaaaagcaaguuaa aauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaa aguggcaccgagucggugcU*U*U*U (配列番号 40)
TRAC sgRNA スパーサー	AGAGCAACAGUGCUGUGGCC (配列番号 98)	A*G*A*GCAACAGUGCUGUGG CC (配列番号 108)
β2M sgRNA	GCUACUCUCUCUUUCUGGCCg uuuuagagcuagaaaagcaaguuaaaau aggcuaguccguuaucaacuugaaaaagug gcaccgagucggugcUUUU (配列番号 31)	G*C*U*ACUCUCUCUUUCUGG CCguuuuagagcuagaaaagcaaguuaa aauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaa aguggcaccgagucggugcU*U*U*U (配列番号 41)
β2M sgRNA スパーサー	GCUACUCUCUCUUUCUGGCC (配列番号 99)	G*C*U*ACUCUCUCUUUCUGG CC (配列番号 109)
PD-1 sgRNA	CUGCAGCUUCUCCAACACAUG uuuuagagcuagaaaagcaaguuaaaau aggcuaguccguuaucaacuugaaaaagug gcaccgagucggugcUUUU (配列番号 32)	C*U*G*CAGCUUCUCCAACAC AUuuuuuagagcuagaaaagcaaguuaa aauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaa aguggcaccgagucggugcU*U*U*U (配列番号 42)
PD-1 sgRNA スパーサー	CUGCAGCUUCUCCAACACA (配列番号 100)	C*U*G*CAGCUUCUCCAACAC AU (配列番号 110)

10

20

【 0 4 8 6 】

エレクトロポレーションの約 1 週間後、細胞は、未処理のままであるか又は酢酸ミリスチン酸ホルボール (PMA) / イオノマイシンで一晩処理された。翌日、細胞をフローサイトメトリーのために処理して (例えば、Kalaitzidis *et al.*, *J Clin Invest* 2017; 127(4): 1405-1413)、編集された細胞集団の細胞表面で TRAC、β2M、PD-1、及び CD70 発現レベルを評価した。以下の一次抗体が使用された (表 10) :

30

【 0 4 8 7 】

【 表 10 】

表 10. 抗体

抗体	クローン	蛍光	カタログ #	希釈度	1 つ 当たり
TCR	BW242/412	PE	130-091-236 (Miltenyi)	1:100	1 μL
β2M	2M2	PE-Cy7	316318 (Biolegend)	1:100	1 μL
PD-1	EH12.2H7	PE	329906 (Biolegend)	1:100	1 μL
CD70	113-16	FITC	355105 (Biolegend)	1:100	1 μL

40

【 0 4 8 8 】

表 11 及び 12 は、非常に効率的な多重遺伝子編集を示す。二重ノックアウト細胞 (2 X KO; TRAC<sup>-/-</sup> / β2M<sup>-/-</sup>) に関して、生存細胞の 83% が、TCR 及び β2M の発現を欠いた (表 11; 3 X KO (PD1))。三重ノックアウト細胞に関して、生存細胞の 70% が、TCR、β2M、及び PD-1 の発現を欠き (表 11); 且つ生存細胞の

50

80%が、TCR、 $\beta 2M$ 、及び使用されるCD70 gRNAに無関係にCD70の発現を欠いた(表12)。四重ノックアウト細胞(4X KO)に関して、生存細胞の78%が、TCR、 $\beta 2M$ 、PD-1、及びCD70の発現を欠いた(図1)。

【0489】

【表11】

表 11. 2KO 及び 3KO (PD1)細胞集団において発現を欠く生存細胞の%

	TRAC KO	$\beta 2M$ KO	PD1 KO	2 KO	3 KO (PD1)
2KO	98%	85%	NA	83%	NA
3 KO (PD1)	98%	73%	99%	NA	70%

10

【0490】

【表12】

表 12. 3KO (CD70)細胞集団において発現を欠く生存細胞の%

	TRAC KO	$\beta 2M$ KO	CD70 KO	3KO (CD70)
3KO (CD70) (I7)	99%	79%	99%	80%
3KO (CD70) (T8)	99%	82%	99%	80%

20

【0491】

T細胞における三重及び四重遺伝子編集が細胞の増殖に影響するかどうかを評価するため、細胞数を、二重、三重、及び四重遺伝子編集されたT細胞(未編集のT細胞が、対照として使用された)の間で編集後2週間にわたって数え上げた。5 x 10<sup>6</sup>細胞が生成され、T細胞の各遺伝子型について蒔かれた。

30

【0492】

図2に示されるとおり、細胞増殖(拡大)は、エレクトロポレーション後の期間の試験にわたって継続した。同様の細胞増殖は、生存細胞の数によって示されるとおり、二重( $\beta 2M^- / TRAC^-$ )、三重( $\beta 2M^- / TRAC^- / PD-1^-$ 、又は $\beta 2M^- / TRAC^- / CD70^-$ )、及び四重( $\beta 2M^- / TRAC^- / PD-1^- / CD70^-$ )ノックアウトT細胞の間で観察された。これらのデータは、多重遺伝子編集(最大で三重及び四重、CD70及びPD-1遺伝子を有する)が、T細胞増殖によって測定されるとおりT細胞の活力に影響を及ぼさないことを示唆する。

40

【0493】

実施例3 . CD70及び/又はPD1を欠くCAR T細胞の生成  
多重ノックアウトを有する抗CD70 CAR T細胞の生成

この実施例は、TCR遺伝子、 $\beta 2M$ 遺伝子、CD70遺伝子及び/又はPD1遺伝子の発現を欠き、且つCD70を標的化するキメラ抗原受容体(CAR)を発現する異質遺伝子型ヒトT細胞の産生を記載する。これらの細胞は、図においてTCR<sup>-</sup>/  $\beta 2M^- / CD70^- / 抗CD70 CAR^+$ 又は3X KO(CD70) CD70<sup>-</sup> CAR<sup>+</sup>; TCR<sup>-</sup>/  $\beta 2M^- / PD1^- / 抗CD70 CAR^+$ 又は3X KO(PD1) CD70 C

50

AR<sup>+</sup>; TCR<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / PD1<sup>-</sup> / CD70<sup>-</sup> / 抗CD70 CAR<sup>+</sup>又は4X KO CD70 CAR<sup>+</sup>と呼ばれる。

【0494】

配列番号43のヌクレオチド配列を含む(配列番号46のアミノ酸配列を含む抗CD70 CARをコードする、配列番号44におけるドナー鑄型を含む)組換えアデノ随伴アデノウイルスベクター、血清型6(AAV6)(MOI 50,000)が、Cas9:sgRNA RNP(1μM Cas9, 5μM sgRNA)とともに活性化異質遺伝子型ヒトT細胞に送達された。以下のsgRNAが使用された:TRAC(配列番号40)、2M(配列番号41)、CD70(配列番号36又は37)及びPD1(配列番号42)。sgRNAの未変更のバージョン(又は他の変更バージョン)もまた使用され得る(例えば、配列番号30、31、32、26、及び/又は27)。エレクトロポレーションの約1週間後、細胞をフローサイトメトリーのために処理して、編集された細胞集団の細胞表面でのTRAC、2M、CD70、及びPD1発現レベルを評価した。以下の一次抗体が使用された(表13):

10

【0495】

【表13】

表13. 抗体

抗体	クローン	蛍光	カタログ #	希釈度
TCR	BW242/412	PE	130-091-236 (Miltenyi)	1:100
β2M	2M2	PE-Cy7	316318 (Biolegend)	1:100
CD70	113-16	FITC	355105 (Biolegend)	1:100
PD-1	EH12.2H7	PE	329906 (Biolegend)	1:100

20

【0496】

T細胞比率アッセイ次に、CD4<sup>+</sup>及びCD8<sup>+</sup>細胞の比率が、以下の抗体(表14)を使用するフローサイトメトリーによって、編集されたT細胞集団において評価された。

【0497】

【表14】

表14. 抗体

抗体	クローン	蛍光	カタログ #	希釈度
CD4	RPA-T4	BV510	300545 (Biolegend)	1:100
CD8	SK1	BV605	344741 (Biolegend)	1:100

30

【0498】

高効率の遺伝子編集及びCAR発現は、編集された抗CD70 CAR T細胞集団において達成された。加えて、編集は、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T細胞集団を不利に変化させなかった。図3は、三重ロックアウトCAR T細胞における非常に効率的な遺伝子編集及び抗CD70 CAR発現を示す。55%を超える生存細胞が、TCR、2M、及びCD70の発現を欠き、抗CD70 CARも発現した。図4は、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T細胞サブセットの正常な比率が、TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup>細胞において維持されたことを示し、これは、これらの多重遺伝子編集が、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T細胞サブセットの比率によって測定されるとおり、T細胞の生態に影響を及ぼさないことを示唆している。

40

【0499】

図5は、四重ロックアウトCAR T細胞における非常に効率的な遺伝子編集及び抗C

50

D70 CAR発現を示す。60%を超える生存細胞が、TCR、2M、PD-1、及びCD70の発現を欠き、抗CD70 CARを発現した。図6は、CD4/CD8 T細胞サブセットの正常な比率が、TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup>細胞において維持されたことを示し、これは、これらの多重遺伝子編集が、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T細胞サブセットの比率によって測定されるとおり、T細胞の生態に影響を及ぼさないことを示唆している。

#### 【0500】

多重ロックアウトを有する抗BCMA CAR T細胞の生成

この実施例は、TCR遺伝子、2M遺伝子、PD-1遺伝子、及び/又はCD70遺伝子の発現を欠き、且つB細胞成熟抗原(BCMA)を標的化するキメラ抗原受容体(CAR)も発現する異質遺伝子型ヒトT細胞の産生を記載する。

10

#### 【0501】

配列番号54のヌクレオチド配列を含む(配列番号57のアミノ酸配列を含む抗BCMA CARをコードする、配列番号55におけるドナー鑄型を含む)組換えアデノ随伴アデノウイルスベクター、血清型6(AAV6)が、Cas9:gRNA RNP(1 μM Cas9、及び5 μM gRNA)とともに活性化異質遺伝子型ヒトT細胞に送達された。以下のgRNAが使用された: TRAC(配列番号40)、2M(配列番号41)、PD-1(配列番号42)、及びCD70(配列番号36又は37)。gRNAの未改変のバージョン(又は他の改変バージョン)もまた使用され得る(例えば、配列番号30、31、32、26、及び/又は27)。エレクトロポレーションの約1週間後、細胞を、抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞について上記のとおりフローサイトメトリーのために処理したが、以下の相違を有した。抗BCMA CAR発現は、ビオチン化組換えヒトBCMA(ACROS Cat#BC7-H82F0)を使用して検出された。次に、二重及び四重ロックアウト抗BCMA CAR<sup>+</sup>細胞が、本明細書に記載されるとおり特徴付けされた。

20

#### 【0502】

図7A~7Bは、TRAC遺伝子、2M遺伝子、CD70遺伝子及びPD-1遺伝子の非常に効率的な遺伝子編集を示す。図7Cは、二重ロックアウト及び四重ロックアウト細胞における抗BCMA CAR<sup>+</sup>細胞の高い発現を示す。

#### 【0503】

多重ロックアウトを有する抗CD19 CAR T細胞の生成

CD19を標的化するキメラ抗原受容体(CAR)を発現し、且つTCR遺伝子、2M遺伝子、及び任意選択によりCD70遺伝子の発現を欠く、異質遺伝子型ヒトT細胞が生成された。

30

#### 【0504】

異質遺伝子型T細胞を生成するため、活性化一次ヒトT細胞を、Cas9:gRNA RNP複合体で電気穿孔し、TRAC座位と相同性を有する抗CD19 CARドナー鑄型を含有するアデノ随伴アデノウイルスベクター(AAV)で感染させた。配列番号155のヌクレオチド配列を含む(配列番号149のアミノ酸配列を含む抗CD19 CARをコードする、配列番号156におけるドナー鑄型を含む)組換えAAV血清型6(AAV6)が、Cas9:sgRNA RNP(1 μM Cas9、5 μM gRNA)とともに活性化ヒトT細胞に送達された。以下のsgRNAを使用して、対応する遺伝子をロックアウトした: TRAC(配列番号40)、2M(配列番号41)、CD70(配列番号36)。gRNAの未改変のバージョン(又は他の改変バージョン)もまた使用され得る(例えば、配列番号30、21又は27)。エレクトロポレーションの約1週間後、細胞を、抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞について上記のとおりフローサイトメトリーのために処理したが、以下の相違を有した。抗CD19 CAR発現は、ビオチン化組換えヒトCD19(ACROBIO SYSTEMS INC; CD9-H825)を使用して検出された。次に、CD70欠損抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞が、本明細書に記載されるとおり特徴付けされた。

40

50

## 【0505】

多重ノックアウトを有する抗CD33 CAR T細胞の生成

CD33を標的化するキメラ抗原受容体(CAR)を発現し、且つT細胞受容体(TCR)遺伝子(TCRアルファ定常(TRAC)領域において編集された遺伝子)、2-ミクログロブリン(2M)遺伝子、及び任意選択によりCD70遺伝子の発現を欠く、異質遺伝子型ヒトT細胞が生成された。

## 【0506】

異質遺伝子型T細胞を生成するため、活性化一次ヒトT細胞を、Cas9:gRNA RNP複合体で電気穿孔し、TRAC座位と相同性を有する抗CD33 CARDナー鑄型を含有するアデノ随伴アデノウイルスベクター(AAV)で感染させた。配列番号87のヌクレオチド配列を含む(配列番号139のアミノ酸配列を含む抗CD33 CARをコードする、配列番号135におけるドナー鑄型を含む)組換えAAV血清型6(AAV6)が、Cas9:sgRNA RNP(1µM Cas9、5µM gRNA)とともに活性化ヒトT細胞に送達された。以下のsgRNAを使用して、対応する遺伝子をノックアウトした:TRAC(配列番号40)、2M(配列番号41)、CD70(配列番号36)。gRNAの未改変のバージョン(又は他の改変バージョン)もまた使用され得る(例えば、配列番号30、21又は27)。

## 【0507】

TCR+ T細胞(RNPなし)及びTRAC-/2M-T細胞(CARを有しないTCR及び2M欠損細胞)の集団が、対照としての使用のために同様に生成された。エレクトロポレーションの約1週間後、細胞を、抗CD70 CAR+ T細胞について上記のとおりフローサイトメトリーのために処理したが、以下の相違を有した。抗CD33 CAR発現は、ビオチン化組換えヒトCD33を使用して検出された(データは示さず)。次に、CD70ノックアウト抗CD33 CAR+ T細胞が、本明細書に記載されるとおりに特徴付けされた。

## 【0508】

CD70ノックアウトを有する抗CD33 CAR T細胞におけるCD4/CD8細胞集団の特徴付け

CD33は、T細胞上で発現され得るが、培養されたCD4細胞上においてCD8細胞より高いレベルで観察される。抗CD33 CAR-T細胞を生成する経過中、CD4細胞は、兄弟殺しのために実質的に減少する。図8に示されるとおり、インタクトなCD70を有する抗CD33 CAR-T細胞培養物は、3週間の培養期間にわたってCD4+細胞において97%の減少を示したが、破壊されたCD70を有する細胞の培養物は、この時間経過にわたってわずか61%の減少を示した。したがって、CD70遺伝子を破壊することは、抗CD33 CAR-T細胞培養物において観察される兄弟殺しを減少させるように見える。理論に束縛されるものではないが、この効果は、CD70/CD27相互作用によって増強され得る免疫刺激機能を介して生じる可能性があり、CD70の遺伝子破壊は、悪性腫瘍における治療効果により最適であり得るよりバランスのとれたCD4/CD8比をもたらす。

## 【0509】

実施例4:CD70 KOは細胞増殖を増進させる

インビトロでの抗CD33 CAR T細胞の細胞増殖に対するCD70 KOの効果

サイトカイン含有培地(IL-2+IL-7)において細胞の増殖する能力を評価するため、抗CD33 CAR T細胞が利用された。具体的には、二重ノックアウト(TRAC-/B2M-)又は三重ノックアウト(TRAC-/B2M-/CD70-)を含む5×10<sup>6</sup>個の総抗CD33 CAR T細胞が、実施例3に記載されるとおりに生成され、蒔かれ、10mL体積のサイトカイン含有培地中で増殖させられた。1週間後に細胞が計数された。次に、前の培養由来の5×10<sup>6</sup>細胞が、10mL体積(新鮮なサイトカイン含有培地)に再び蒔かれ、1週間後、細胞の総数が数え上げられた。CD70遺伝子における破壊を含有する異質遺伝子型抗CD33 CAR-T細胞は、第1週及び第2週の再

10

20

30

40

50

播種においてより高いレベルまで増殖した(図9)。これらのデータは、CD70ノックアウトが、培養においてより高い細胞収量をもたらすことを示す。

#### 【0510】

インビトロでの抗CD19 CAR T細胞の細胞増殖に対するCD70 KOの効果

サイトカイン含有培地(IL-2+IL-7)において細胞の増殖する能力をさらに評価するため、抗CD19 CAR T細胞が利用された。具体的には、二重ノックアウト(TRAC-/B2M-)又は三重ノックアウト(TRAC-/B2M-/CD70-)を含む $5 \times 10^6$ 個の総抗CD19 CAR T細胞が、実施例3に記載されるとおりに生成され、蒔かれ、10 mL体積のサイトカイン含有培地中で増殖させられた。1週間後に細胞が計数された。次に、前の培養由来の $5 \times 10^6$ 細胞が、10 mL体積(新鮮なサイトカイン含有培地)に再び蒔かれ、1週間後、細胞の総数が数え上げられた。CD70遺伝子における破壊を含有する異質遺伝子型抗CD19 CAR-T細胞は、CD70遺伝子破壊を伴わない対照細胞と比較して、第1週及び第2週の再播種においてより高いレベルまで増殖した(図10)。これらのデータは、CD70ノックアウトが、培養においてより高い細胞収量をもたらすことを示す。

10

#### 【0511】

インビトロでの抗BCMA CAR T細胞のサイトカインに駆動される増殖及びアポトーシスに対するCD70 KOの効果

サイトカインに駆動される増殖。細胞増殖に対するCD70及び/又はPD1ノックアウトの効果の評価するため、抗BCMA CAR T細胞が利用された。抗BCMA CAR T細胞は、実施例3に記載されるとおりに生成された。以下の編集されたT細胞の群が生成された：

20

TRAC-/B2M-/抗BCMA CAR+ (対照; 2 KO、BCMA CAR+)

TRAC-/B2M-/CD70-/抗BCMA CAR+ (3 KO (CD70)、BCMA CAR+)

TRAC-/B2M-/PD1-/抗BCMA CAR+ (3 KO (PD1)、BCMA CAR+)

TRAC-/B2M-/CD70-/PD1-/抗BCMA CAR+ (4 KO、BCMA CAR+)

#### 【0512】

30

編集された細胞は、CD3+B2M+細胞の磁性的枯渇によってTRAC-/B2M-細胞について濃縮された。簡潔には、細胞は、抗CD3ビオチン(Biolegend Cat#300404)抗2Mビオチン(Biolegend Cat#316308)抗体により、それぞれ100 µl体積中 $1 \times 10^6$ 細胞当たり0.5 µgにて4で15分間標識され、洗浄され、ストレプトアビジン標識磁性マイクロビーズ(Miltenyi Biotech、130-048-101)とともに4で15分間インキュベートされた。細胞は、緩衝液中で再懸濁され、製造業者のプロトコルに従ってLSカラム(Miltenyi Biotech、130-042-401)に通された。IL-2/IL-7に駆動されるT細胞増殖に対するCD70又はPD1の効果を決定的に、編集されたT細胞(1E6細胞/ml)は、増殖培地(5%ヒトAB血清(HP1022、Valley Biomedical)が添加されたX-vivo培地(04-744、Lonza)、50 ng/ml IL-2(rhIL-2; 130-097-745、Miltenyi Biotech)及び10 ng/ml IL-7(rhIL-7; Cellgenix 001410-050)中で最大4週間培養された。指定された日に、細胞は計数され、適切な培養皿中において1.5E6細胞/mlで新鮮な培地に再播種された。

40

#### 【0513】

図11及び12は、CD70のノックアウトが、CD70が十分にある対照(すなわち、内在性CD70を含む抗BCMA CAR T細胞)と比較して、インビトロで抗BCMA CAR T細胞のIL-2/IL-7に駆動される増殖を増進させたことを示す。図1

50

1はまた、CD70遺伝子が損なわれていない場合、このドナーからのT細胞が17日後に有意に減少しているように見える場合さえ、CD70 KOが、抗BCMA CAR T細胞の活力及び増殖能を増進できることを示す(ドナー2(図12)と比較して、ドナー1(図11)の減少した細胞数によって示されるとおり)。T細胞の活力を維持するこの特性(CD70遺伝子のKOによって可能になる)は、収量及び一貫性を増大させる製造時の増殖の拡大、患者における潜在的により少ない用量を可能にする枯渇した/活力のないT細胞のレスキュー、並びにより堅牢な応答、T細胞の活力に対してより有害であり得るが、T細胞活性の抑制を克服することなど他の利点を有する他のKO(例えば、PD1 KO)との組合せを含むCAR Tの開発の多くの側面に広範に適用可能である。図11及び12に示されるとおり、単独でPD1遺伝子を欠失させることは、CAR T細胞の増殖に対する利益を示さないが、CD70 KOと組み合わせた場合、相乗効果を示す。

10

#### 【0514】

アポトーシス。抗原に対する暴露後の抗BCMA CAR+ T細胞のアポトーシス性の細胞死に対するCD70 KOの効果は、抗原再チャレンジアッセイにおいて評価された。簡潔には、抗原暴露を達成するために、抗BCMA CAR+ T細胞が、プレートに接着した組換えBCMAタンパク質に暴露された。接着した抗原を有するプレートは、24ウェルプレートを1xPBS(1µg/ml; ビオチン化ヒトBCMAタンパク質、ACRO Biosystems)中の組換えBCMAタンパク質により4で一晚コーティングし、続いて未結合の抗原を洗い流すことによって作製された。洗浄後、抗原結合プレートは、CD70ノックアウトを有するか又は有しないいずれかの抗BCMA CAR+ T細胞をチャレンジするために使用された。2X KO(TRAC-/B2M-)抗BCMA CAR+ T細胞及び3X KO(TRAC-/B2M-/CD70-)抗BCMA CAR+ T細胞(1x10<sup>6</sup>細胞/ml)が、IL-2(rhIL-2; 130-097-745、Miltenyi Biotech)が添加された増殖培地(X-vivo培地(04-744、Lonza)、5%ヒトAB血清(HP1022、Valley Biomedical)中においてプレート結合組換えBCMAタンパク質(1µg/ml)に24時間暴露された。次に、細胞は洗浄され、計数され、合計3回の連続した再チャレンジ(24時間、48時間、及び72時間)のために24時間毎に新鮮なプレート結合抗原で再チャレンジ(1x10<sup>6</sup>細胞/ml)された。各再チャレンジの最後に、一定分量の細胞を洗浄し、アネキシンV結合緩衝液(BioLegend)中においてヨウ化プロピジウムとともに蛍光色素がコンジュゲートされたアネキシンVにより室温で15分間染色した。次に、細胞は、洗浄され、フローサイトメトリーによる分析のためにアネキシンV結合緩衝液中で再懸濁された。各時点で細胞が計数され、1ml当たりの細胞数が導き出された。各時点での増殖率の計算のために、0時点での最初の増殖率が1に設定された。全ての他の時点に関する増殖率は、各時点での1ml当たりの細胞数に前の時点に関する1ml当たりの増殖率を掛けることによって計算された。例えば、72時間での増殖率は、72時間での1ml当たりの細胞数に48時間での1ml当たりの増殖率を掛けることによって計算された。

20

30

#### 【0515】

図13は、CD70(CD70 KO)の欠失が、第2(48時間)及び第3(72時間)の再チャレンジ後のアポトーシス細胞のパーセンテージにおける減少によって示されるとおり、アポトーシスから抗BCMA CAR+ T細胞をレスキューすることを実証している。さらに、抗BCMA CAR+ T細胞におけるCD70発現の欠如は、抗原暴露に应答する抗BCMA CAR+ T細胞の増殖を驚くほど増強する(図14)。

40

#### 【0516】

インビトロでの抗CD70 CAR T細胞の細胞増殖に対するCD70 KOの効果  
CAR T細胞においてCD70遺伝子を破壊することの影響をさらに評価するため、抗CD70 CAR T細胞が、実施例3に記載されるとおりに生成された。具体的には、3X KO(TRAC-/2M-/CD70-)抗CD70 CAR T細胞が、異なるgRNA(T7(配列番号36及びT8(配列番号37))を使用して生成された。エレ

50

クトロポレーションの後、細胞増殖が、生存細胞を計数することによって実施例 2 に記載されるとおりに評価された。図 15 は、三重ノックアウト TRAC<sup>-</sup>/ 2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/T7 又は T8 gRNA のいずれかで生成された抗 CD70 CAR<sup>+</sup> T 細胞は、二重ノックアウト TRAC<sup>-</sup>/ 2M<sup>-</sup>/抗 CD70 CAR<sup>+</sup> T 細胞と比較して高い細胞増殖を示した。これらのデータは、CD70 遺伝子をノックアウトすることが、抗 CD70 CAR<sup>+</sup> T 細胞に細胞増殖の優位性をもたらすことを示唆する。

#### 【0517】

細胞増殖はまた、四重ノックアウト TRAC<sup>-</sup>/ 2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗 CD70 CAR<sup>+</sup> T 細胞において評価された。これらの細胞は、三重ノックアウト TRAC<sup>-</sup>/ 2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>/抗 CD70 CAR<sup>+</sup> T 細胞及び二重ノックアウト TRAC<sup>-</sup>/ 2M<sup>-</sup>/抗 CD70 CAR<sup>+</sup> T 細胞と比較して、より高い増殖を示した (図 16)。

#### 【0518】

実施例 5 . CD70 KO は、インビトロで CAR T 細胞の耐久性及び効力を増大させる。CD70 ノックアウトを有する抗 CD19 CAR T 細胞の細胞を死滅させる機能

実施例 3 に記載されるとおりの編集された抗 CD19 CAR T 細胞の作製の後、CAR T 細胞の機能活性を、フローサイトメトリーに基づく細胞障害性アッセイを使用して検証した。抗 CD19 CAR T 細胞 (TRAC<sup>-</sup>/ 2M<sup>-</sup>/CD19 CAR<sup>+</sup> 及び TRAC<sup>-</sup>/ 2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/CD19 CAR<sup>+</sup>) は、2 つの CD19 発現癌細胞株 (標的細胞) : Nalm6 (ATCC cr13273) 又は Raji (ATCC ccl-86) の 1 つと共培養された。標的細胞は、5 μM efluor670 (eBiosciences) で標識され、洗浄され、TRAC<sup>-</sup>/ 2M<sup>-</sup>/抗 CD19 CAR<sup>+</sup>、又は TRAC<sup>-</sup>/ 2M<sup>-</sup>/ 2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗 CD19 CAR<sup>+</sup> との様々な比 (0.01、0.05、0.1、0.5、1:1 T 細胞:標的細胞) での共培養物中においてインキュベートされた。標的細胞は、96 ウェル、U 底プレートにおいてウェル当たり 50,000 細胞で播種された。共培養物は、一晩インキュベートされた。インキュベーションの後、ウェルは洗浄され、培地は、5 mg/mL DAPI (Molecular Probes) の 1:500 希釈物を含有する 200 μL の培地で置き換えられた。次に、25 μL の CountBright ビーズ (Life Technologies) が、各ウェルに加えられ、細胞培養物が、フローサイトメトリーによって細胞生存率について分析された (すなわち、生存細胞は DAPI 染色について陰性である)。

#### 【0519】

次に、標的細胞 (例えば、Nalm6 又は Raji 細胞) の細胞溶解パーセントが、以下の式を使用して決定された:

細胞溶解パーセント = (1 - ((試験試料における標的細胞の総数) ÷ (対照試料における標的細胞の総数))) × 100;

式中、試験試料は、1) TRAC<sup>-</sup>/ 2M<sup>-</sup>/CD19 CAR<sup>+</sup> T 細胞 又は 2) TRAC<sup>-</sup>/ 2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/CD19 CAR<sup>+</sup> T 細胞と共培養された標的細胞 (例えば、Nalm6 又は Raji 細胞) であり; 且つ

対照試料は、共培養されていない単独の標的細胞であった。

#### 【0520】

CD70 遺伝子の破壊は、低い CAR<sup>-</sup> T と標的の比率で Raji 細胞株に対する抗 CD19 CAR<sup>-</sup> T 細胞の細胞溶解活性の増強をもたらした (図 17、下のパネル)。CD70 の破壊は、Nalm6 細胞株に対して抗 CD19 CAR<sup>-</sup> T 活性を増強しなかった (図 17、上のパネル)。注目すべきことに、Nalm6 細胞株は、これらの CAR<sup>-</sup> T 細胞により溶解することが比較的容易であり (Nalm6 に関して 0.1:1 CAR<sup>-</sup> T 細胞と標的比で > 80% 溶解対 Raji に関して野生型細胞に関してこの比で 0%)、Nalm6 細胞に対するこのアッセイにおいて、CD70 枯渇による結果として得られる有効性の増大の欠如を説明していると考えられる。Raji 細胞株に対して CD70 の喪失により付与される活性の増大は、困難な腫瘍環境において、特に、CAR<sup>-</sup> T と腫瘍

10

20

30

40

50

の比率が低い場合、CD70の喪失が、腫瘍細胞を根絶する際にCAR T細胞への実質的な利益を有し得ることを示す。

#### 【0521】

CD70ノックアウトを有する抗CD33 CAR T細胞の細胞を死滅させる機能

実施例3に記載されるとおりの編集された抗CD33 CAR T細胞の作製の後、CAR T細胞の機能活性を、フローサイトメトリーに基づく細胞障害性アッセイを使用して検証した。抗CD33 CAR T細胞 (TRAC- / 2M- / CD33 CAR+ 及び TRAC- / 2M- / CD70- / CD33 CAR+) 又は対照T細胞 (RNPなし) は、CD33発現癌細胞株MV4-11 (ATCC CRL-9591) とともに共培養された。標的細胞は、5 μM e f l u o r 6 7 0 (e B i o s c i e n c e s) で標識され、洗浄され、TRAC- / B2M- / 抗CD33 CAR+、TRAC- / 2M- / 2M- / CD70- / 抗CD33 CAR+、又は対照との様々な比 (0.01 : 1、0.03 : 1、0.06 : 1、0.125 : 1、0.25 : 1、0.5 : 1、又は1 : 1 T細胞 : 標的細胞) での共培養物中においてインキュベートされた。標的細胞は、96ウェル、U底プレートにおいてウェル当たり50,000細胞で播種された。共培養物は、一晚インキュベートされた。48時間後、ウェルは洗浄され、培地は、5 mg / mL DAPI (M o l e c u l a r P r o b e s) の1 : 500希釈物を含有する200 μLの培地で置き換えられた。次に、25 μLのCountBrightビーズ (L i f e T e c h n o l o g i e s) が、各ウェルに加えられ、細胞培養物が、フローサイトメトリーによって細胞生存率について分析された (すなわち、生存細胞はDAPI染色について陰性である)。

#### 【0522】

次に、標的細胞 (例えば、MV4-11) の細胞溶解パーセントが、以下の式を使用して決定された :

細胞溶解パーセント =  $(1 - ((\text{試験試料における標的細胞の総数}) \div (\text{対照試料における標的細胞の総数})) \times 100$  ;

式中、試験試料は、1) TRAC- / 2M- / CD33 CAR+ T細胞 ; 又は2) TRAC- / 2M- / CD70- / CD33 CAR+ T細胞と共培養された標的細胞 (例えば、MV4-11細胞) であり、且つ

対照試料は、共培養されていない単独の標的細胞であった。

#### 【0523】

抗CD33 CAR T細胞の両方の集団は、効率的にMV4-11細胞を死滅させ、0.5 CAR T細胞 : MV4-11細胞の比率でほぼ100%の細胞の死滅に達したが、TRAC- / B2M- / CD70- / CD33 CAR+ T細胞は、より低いCAR Tと癌細胞の比率でより高い細胞の死滅を実証した (図18)。これらのデータは、追加のCD70ノックアウトを有する異質遺伝子型の抗CD33 CAR T細胞が、より低いCAR T細胞と標的細胞の比率でより効果的であることを実証している。

#### 【0524】

CD70ノックアウトを有する抗CD70 CAR T細胞の細胞を死滅させる機能

細胞死滅アッセイを使用して、TRAC- / 2M- / CD70- / 抗CD70 CAR+細胞及びTRAC- / 2M- / PD-1- / CD70- / 抗CD70 CAR+細胞のCD70+接着腎細胞癌 (RCC) 由来細胞株 (A498細胞) を死滅させる能力を評価した。接着細胞を、ウェル当たり50,000細胞で96ウェル中に播種し、37 °Cで一晩置いた。翌日、編集された抗CD70 CAR T細胞を、指定の比率で標的細胞を含有するウェルに加えた。指定されたインキュベーション期間の後、CAR T細胞を、吸引によって培養物から除去し、100 μLのCell titer - Glo (P r o m e g a) をプレートの各ウェルに加えて、残留している生存細胞の数を評価した。次に、ウェル当たりの放出された光の量を、プレートリーダーを使用して定量化した。細胞は、24時間の共インキュベーション後にRCC由来細胞の強力な細胞の死滅を示した (図19)。抗CD70 CAR T細胞は、CD70がノックアウトされた場合により高い効力を示

したが、これは、低いT細胞：A498比（1：1及び0.5：1）で明白に目に見え、ここで、細胞溶解は、TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup>については90%を超えたままであるが、TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup>については細胞溶解が90%未満に落ちる。このことは、CD70遺伝子をノックアウトすることが、抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞により高い細胞死滅の能力をもたらすことを示唆する。

#### 【0525】

実施例6．インビトロでのCD70欠損CAR T細胞の再チャレンジ

CD70ノックアウトは、連続的な再チャレンジ時に抗CD33 CAR<sup>+</sup> Tによる細胞の死滅を増進する

抗原発現細胞（例えば：標的細胞）によるチャレンジ及び再チャレンジ後に細胞の増殖する能力を評価するため、抗CD33 CAR<sup>+</sup> T細胞が、実施例3において記載されるとおりに生成され、且つ利用された。具体的には、合計 $5 \times 10^6$ 個のT細胞が、 $5 \times 10^6$ 個の照射された標的細胞（MV-4-11）の存在下で蒔かれ、10mL体積において増殖させられた。1週間後、細胞は計数され、続いて、前の培養物からの $5 \times 10^6$ 細胞が、新鮮な一定分量の $5 \times 10^6$ 個の照射された標的細胞とともに10mL体積において再度蒔かれ、1週間後に細胞の総数が数え上げられた。この工程が示されるとおりに繰り返され、各再チャレンジは $5 \times 10^6$ 細胞で開始された。生存細胞の数は、実施例2において示されるとおりに計数された。CD70遺伝子における破壊を含有する異質遺伝子型抗CD33 CAR<sup>-</sup> T細胞は、MV-4-11細胞による2回のチャレンジの後の第2週においてより高いレベルまで増殖した（図20）。これらのデータは、CD70が、抗原発現細胞の存在下でT細胞増殖を制限でき、その減少が、抗原刺激後により高い細胞増殖をもたらすことができることを示す。

#### 【0526】

CD70ノックアウトは、連続的な再チャレンジ時に抗CD19 CAR<sup>+</sup> Tによる細胞の死滅を増進する

抗原発現細胞（例えば：標的細胞）によるチャレンジ及び再チャレンジ後に細胞の増殖する能力をさらに評価するため、抗CD19 CAR<sup>+</sup> T細胞が、実施例3において記載されるとおりに生成され、且つ利用された。具体的には、合計 $5 \times 10^6$ 個のT細胞が、 $5 \times 10^6$ 個の照射された標的細胞（Na1m6）の存在下で蒔かれ、10mL体積において増殖させられた。1週間後、細胞は計数され、続いて、前の培養物からの $5 \times 10^6$ 細胞が、新鮮な一定分量の $5 \times 10^6$ 個の照射された標的細胞とともに10mL体積において再度蒔かれ、1週間後に細胞の総数が数え上げられた。この工程が示されるとおりに繰り返され、各再チャレンジは $5 \times 10^6$ 細胞で開始された。生存細胞の数は、実施例2において示されるとおりに計数された。CD70遺伝子における破壊を含有する異質遺伝子型抗CD19 CAR<sup>-</sup> T細胞は、最初の2回のチャレンジ中に同様の量まで増殖した。しかしながら、3回のチャレンジで、CD70遺伝子における破壊を含有する異質遺伝子型抗CD19 CAR<sup>-</sup> T細胞は、Na1m6細胞による3回目のチャレンジにおいてより高いレベルまで増殖した（図21）。これらのデータは、CD70の存在が、抗原発現細胞の存在下でT細胞増殖を制限でき、その減少が、繰り返された抗原刺激後により高い細胞増殖をもたらすことができることを示す。

#### 【0527】

CD70、又はPD-1とCD70のノックアウトは、連続的な再チャレンジ時に抗CD70 CAR<sup>+</sup> Tによる細胞の死滅を維持する

上で生成された抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞は、CD70+腎臓癌細胞株A498で連続的に再チャレンジされ、それらのCD70+腎臓癌細胞株A498又はACHNを死滅させる能力について評価された。

#### 【0528】

A498細胞は、T25フラスコ中に蒔かれ、2つ（TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>）、3つ（TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>）若しくは（TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>）、又は4つ（TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>）のgRNA編集のいずれかを

含有する  $10 \times 10^6$  個の抗 CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞とともに 2 : 1 (T細胞対 A498) の比で混合された。

【0529】

各チャレンジの2日又は3日後、細胞は計数され、洗浄され、新鮮なT細胞培地中で再懸濁され、1個のA498細胞当たり2個の抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞の同じ比(2 : 1、CAR<sup>+</sup> T細胞 : 標的)で翌日に再チャレンジされた。CD70<sup>+</sup> A498細胞による抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞のチャレンジは、13回繰り返された。A498細胞に対するそれぞれの暴露の後の3~4日後(及び次の再チャレンジの前)、一定分量の培養物を採取し、2 : 1 (CAR<sup>+</sup> T細胞 : 標的細胞)の比でA498又はACHN標的細胞を死滅させるCAR<sup>+</sup> T細胞の能力について分析した。細胞の死滅は、Cell titer - glo (Promega) を使用して測定された。A498による最初のチャレンジの前、2X KO (TRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup>)、3X KO (TRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / CD70<sup>-</sup>)、3X KO (TRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / PD-1<sup>-</sup>)、及び4X KO (TRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / PD-1<sup>-</sup> / CD70<sup>-</sup>) を有する抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞はそれぞれ、100%に近づくA498細胞の標的細胞死滅を示した。しかしながら、チャレンジ9までに、2X KO (TRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup>) 及び3X KO (TRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / PD-1<sup>-</sup>) 抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞は、A498細胞の標的細胞死滅を40%未満に誘導したが、3X KO (TRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / CD70<sup>-</sup>) 及び4X KO (TRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / PD-1<sup>-</sup> / CD70<sup>-</sup>) 抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞は、60%を超える標的細胞の死滅を示した(図22A)。3X KO (TRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / CD70<sup>-</sup>) 及び4X KO (TRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / PD-1<sup>-</sup> / CD70<sup>-</sup>) 抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞に関する標的細胞の死滅は、A498細胞による13回の再チャレンジ後でさえ60%を超えたままであり、これらのCAR<sup>+</sup> T細胞が枯渇に耐性であると実証している。

【0530】

抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞はまた、A498腎癌細胞による連続的な再チャレンジの後に2 : 1 (T細胞対ACHN)の比でACHN細胞を死滅させるそれらの能力について評価された(図22B)。A498による最初のチャレンジの前に、二重ロックアウトTRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / 抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞、三重ロックアウトTRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / PD-1<sup>-</sup> 抗CD70 CAR<sup>+</sup> T、三重ロックアウトTRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / CD70<sup>-</sup> / 抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞及び四重ロックアウトTRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / PD-1<sup>-</sup> / CD70<sup>-</sup> / 抗CD70 CAR<sup>+</sup> Tはそれぞれ、62%、47%、73%及び81%を超える死滅の効率を示した。

【0531】

チャレンジ5の後、三重ロックアウトTRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / CD70<sup>-</sup> / 抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞及び四重ロックアウトTRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / PD-1<sup>-</sup> / CD70<sup>-</sup> / 抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞は依然として、2 : 1 (T細胞対ACHN)の比で55%を超えるACHN細胞を効率的に死滅させたが、二重ロックアウトTRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / 抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞及び三重ロックアウトTRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / PD-1<sup>-</sup> / 抗CD70 CAR<sup>+</sup> Tによる細胞死滅は、11%未満のACHN細胞に落ちた。この傾向は継続したが、二重ロックアウトTRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / 抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞及び三重ロックアウトTRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / PD-1<sup>-</sup> / 抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞は、10回の再チャレンジを超えて生存できなかった。対照的に、三重ロックアウトTRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / CD70<sup>-</sup> / 抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞及び四重ロックアウトTRAC<sup>-</sup> / 2M<sup>-</sup> / PD-1<sup>-</sup> / CD70<sup>-</sup> / 抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞は、培養物中で増殖し続け、且つ2回の再チャレンジの後に2 : 1 (T細胞対ACHN)の比で30%を超えるACHN細胞を死滅させ続けた。

【0532】

データは、4x KO、CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞及び3x KO (CD70)、CD70 CAR<sup>+</sup>細胞が、2X KO、CD70 CAR<sup>+</sup> T又は3X KO (PD1)、CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞より強力であることを実証している。加えて、3X (CD70) K

O及び4 X KOは、T細胞枯渇を防ぐ。

【0533】

5回の再チャレンジの後、細胞は、癌細胞を死滅させるそれらの能力について評価された。驚くべきことに、3 KO及び4 KO抗CD70 CAR+ T細胞は、複数回の癌細胞チャレンジの後でさえ、癌細胞を死滅させる際に非常に有効なままであった(図23A)。ACHN細胞に対する抗CD70 CAR+ T細胞の細胞死滅効果は、1:1、0.5:1、及び0.25:1の減少したエフェクター対標的細胞比でさえ再現性がある。(図23A)。

【0534】

CAR T治療時の長期間の利益を確実にするため、CAR T細胞は、CAR-Tに媒介される細胞の死滅から癌細胞が脱出する可能性を除外するために、長期間にわたってそれらの標的細胞を同定し、且つ根絶することができるべきである。インピトロでの再チャレンジアッセイは、複数のサイクルのCAR-T細胞活性化にわたる標的細胞とCAR-T細胞の反復性の遭遇を模倣する。これらのデータは、二重ノックアウトTRAC- / 2M- / 抗CD70 CAR+ T細胞及び三重ノックアウトTRAC- / 2M- / PD-1- / 抗CD70 CAR+ T細胞と比較して、それらの標的細胞を死滅させる能力の低減を示すことなく、腎臓癌細胞による複数回のチャレンジを持続する際の三重ノックアウトTRAC- / 2M- / CD70- / 抗CD70 CAR+ T細胞及び四重ノックアウトTRAC- / 2M- / PD-1- / CD70- / 抗CD70 CAR+ T細胞の優位性を実証している。

【0535】

枯渇及び活性化マーカーはまた、再チャレンジ後の抗CD70 CAR+ T細胞においてフローサイトメトリーによって測定された。8回のチャレンジの後、三重(TRAC- / 2M- / CD70-)及び四重(TRAC- / 2M- / PD1- / CD70-) KO抗CD70 CAR+ T細胞は、それらの高い細胞死滅活性のレベルと一致して、二重(TRAC- / 2M-)及び四重(TRAC- / 2M- / PD1- / CD70-) KO抗CD70 CAR+ T細胞より高い活性化マーカーLAG3の発現を示した。三重(TRAC- / 2M- / CD70-)抗CD70 CAR+ T細胞(三重(TRAC- / 2M- / PD1-))及び四重(TRAC- / 2M- / PD1- / CD70-) KO抗CD70 CAR+ T細胞と同様)において、二重(TRAC- / 2M-)抗CD70 CAR+ T細胞と比較して、PD1の発現が低いことが観察されたが、これは、CD70をノックアウトすることが、抗CD70 CAR+ T細胞における枯渇マーカーPD1発現の下方制御に効果を及ぼすことを示唆している。(図23B)。

【0536】

PD-1及びCD70のノックアウトは、連続的な再チャレンジ時に抗BCMA CAR+ Tによる細胞の死滅を維持する

実施例3に記載されるとおりに生成される抗BCMA CAR+ T細胞は、連続的に再チャレンジされ、且つBCMA+多発性骨髄腫細胞株MM.1S(ATCC CRL-2974)を死滅させるそれらの能力について評価された。CAR結合を介する連続的なT細胞活性化時にサイトカインを分泌する能力もまた、各再チャレンジの後に測定された。MM.1S細胞は、5µM eFlour670で標識され、2つ(TRAC- / 2M-)又は4つ((TRAC- / 2M- / PD-1- / CD70-))のgRNA編集のいずれかを含む1 x 10<sup>6</sup>個の抗BCMA CAR+ T細胞を有する6ウェルの組織培養皿において2:1(MM.1S対T細胞)の比で混合された。MM.1S細胞に対する暴露の1日後、一定分量の培養物を採取し、CAR-T細胞による標的細胞の死滅及びIFN-g分泌の両方について分析した。サイトカイン放出を測定するため、T細胞及び標的細胞を、指定の比で24時間共インキュベートした。上清培地を、製造業者の指示書(RD Systems)に従って新しいプレート上でのIL-2又はIFN ELISA(RD Systems)における使用のために回収した。細胞の死滅を定量するため、細胞は洗浄され、培地は、5mg/mL DAPI(Molecular Probes)の1:5

10

20

30

40

50

00希釈物を含む200 $\mu$ Lの培地で置き換えられた(死/瀕死細胞を数上げるため)。最後に、25mLのCountBrightビーズ(Life Technologies)を、各ウェルに加えた。次に、細胞は、フローサイトメトリーによって処理された。

1)細胞/mL = ((生存標的細胞イベントの数) / (ビーズイベントの数))  $\times$  ((ロットの割り当てられたビーズカウント(ビーズ/50 $\mu$ L)) / (試料の体積))

2)合計の標的細胞は、細胞/mLに細胞の総体積を掛けることによって計算された。

3)次に、細胞溶解のパーセントが、以下の式:

%細胞溶解 = (1 - ((試験試料中の標的細胞の総数) / (対照試料中の標的細胞の総数)))  $\times$  100

により計算された。

#### 【0537】

各チャレンジの2日又は3日後、細胞は計数され、洗浄され、新鮮なT細胞培地中で再懸濁され、2つのeFlour670で標識されたMM.1S細胞当たり1つの抗BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞の同じ比で再チャレンジされた。BCMA<sup>+</sup> MM.1S細胞による抗BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞のチャレンジは、連続的に10回繰り返された。MM.1S細胞による任意のチャレンジの前に、2X KO (TRAC<sup>-</sup>/B2M<sup>-</sup>)又は4X KO (TRAC<sup>-</sup>/B2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>)抗BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞のいずれかとMM.1S細胞の共インキュベーションが、標的細胞の完全な死滅をもたらした。

#### 【0538】

さらに、2X KO及び4X KO抗BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞の両方によるIFN $\gamma$ 産生は同様であった。しかしながら、MM.1S細胞による4回目の再チャレンジの後、2X KO抗BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞による標的細胞の死滅及びIFN $\gamma$ 産生は、4X KO抗BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞により誘導されるものと比較して減少した。8回目の再チャレンジまで、標的細胞の死滅は、2X KO抗BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞についてはほんのおよそ20%であったが、4X KO抗BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞によるIFN $\gamma$ 及び標的細胞の死滅の両方は、MM.1S細胞によるいずれかのチャレンジの前に見られるものに匹敵したままであった(図24A~24B)。加えて、四重ノックアウト抗BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞は、標的細胞に対する暴露に反応してより高い増殖を示した(図24C)。

#### 【0539】

CAR<sup>+</sup> T治療時の長期間の利益を確実にするため、CAR<sup>+</sup> T細胞は、CAR<sup>-</sup> Tに媒介される細胞の死滅から癌細胞が脱出する可能性を除外するために、長期間にわたってこれらの標的細胞を同定し、且つ根絶することができるべきである。インビトロでの再チャレンジアッセイは、複数のサイクルのCAR<sup>-</sup> T細胞活性化にわたる標的細胞とCAR<sup>-</sup> T細胞の反復性の遭遇を模倣し、したがって、二重ノックアウトTRAC<sup>-</sup>/B2M<sup>-</sup>/抗BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞と比較して、細胞を死滅させる能力の低減を示すことなく、標的細胞による複数回のチャレンジを持続する際の4XノックアウトTRAC<sup>-</sup>/B2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞の優位性を実証している(図24A~24C)。

#### 【0540】

実施例7. CD70 KOは、過剰な阻害分子の課題を克服する

多重ノックアウト抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞のA498-PD-L1腎癌細胞への効果の比較

細胞死滅アッセイ。多重に遺伝子編集された抗CD70 CAR<sup>+</sup>細胞のPD-L1を過剰発現するA498腎癌細胞を死滅させる能力は、本明細書に記載される細胞死滅アッセイを使用して判定された。PD-L1(CD274)を過剰発現する細胞を作製するため、A498細胞を、PD-L1 cDNA及びピューロマイシン耐性遺伝子をコードするレンチウイルス(Genecopia)で感染させた。ピューロマイシンによる選択の後、細胞を抗PD-L1抗体で染色して、PD-L1の発現を評価した。PD-L1

10

20

30

40

50

を発現するA498細胞は、A498-PD-L1とも呼ばれ、記載される機能アッセイにおいて使用された。

【0541】

TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup>(2X KO、CD70 CAR<sup>+</sup>)、TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup>(3X KO(PD-1)、CD70 CAR<sup>+</sup>)、TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup>(3X KO(CD70)、CD70 CAR<sup>+</sup>)及びTRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup>(4X KO、CD70 CAR<sup>+</sup>) T細胞を、2:1(図25A)、1:1(図25B)、又は0.5:1(図25C)のCAR T細胞:A498-PD-L1標的細胞比でA498-PD-L1細胞とともにインキュベートした。CD70ノックアウト細胞は、24時間の共インキュベーション後にRCC由来細胞の強力な細胞の死滅を示した(図25A~25C)。PD1単独のノックアウトを有する細胞は、PD-L1過剰発現の存在下で細胞を効率的に溶解しなかった。しかしながら、CD70ノックアウトは、PD1ノックアウトをレスキューすることができ、増強された細胞溶解が、CD70 KO及びPD1 KOを有するCAR T細胞において観察された。これらのデータは、これらのCAR-T細胞の表面上でのCD70の消失が、PD-L1などの腫瘍細胞により発現される高度に免疫抑制性の分子の存在下でさえこれらの機能を増強することを実証している。

10

【0542】

サイトカイン放出アッセイ。サイトカイン放出アッセイは、本明細書に記載されるとおりに実施された。1:1の比(CAR T細胞:A948-PD-L1標的細胞)での24時間の共インキュベーション後にA948-PD-L1細胞の存在下で共培養された場合の二重ノックアウト、三重ノックアウト、及び四重ノックアウト抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞のIL-2及びIFN-gを産生する能力は、ELISAアッセイを使用して評価された。細胞共培養物の上清に由来するIL-2及びIFN-gが測定された。四重ノックアウトTRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞は、A948-PD-L1細胞と培養されたときに最も高いレベルのIFN-g(図26A)及びIL-2(図26B)を分泌した。これらのデータは、CD70のノックアウトが、PD-L1などの腫瘍細胞により発現される高度に免疫抑制性の分子の存在下でさえCAR-T細胞のサイトカイン分泌を増強することを実証している。CAR-T細胞におけるPD-1のノックアウトと合わせたCD70のノックアウトはさらに、その効果を増強する。理論に束縛されるものではないが、抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞においてCD70をノックアウトすることは、他の細胞ノックアウト(例えば、PD1)の有害な表現型をレスキューできると考えられる。これらのデータは、CAR T細胞においてCD70をノックアウトすることが、高度に免疫抑制性の状況において標的細胞の死滅及びCAR T機能を増強することを実証している。

20

30

【0543】

実施例8. CD70ノックアウトはインビボ有効性を向上させる

抗CD70 CAR T細胞におけるCD70及びPD1ノックアウトの有効性: NOGマウスにおける皮下腎細胞癌腫瘍異種移植モデル

40

小型の腫瘍モデルにおける治療

高レベルのCD70を発現する腎癌細胞を除去するCD70 CARを発現するT細胞の能力は、マウスにおける皮下腎細胞癌(A498)腫瘍異種移植モデルを使用してインビボで評価された。

【0544】

CRISPR/Cas9及びAAV6を、上のおりに使用して(例えば、実施例3を参照のこと)、CD70を標的化するCARコンストラクト(配列番号45;配列番号46)を使用してTRAC座位からの同時の発現を伴ってTCR、2M、CD70及び/又はPD1の発現を欠くヒトT細胞を作製した。この実施例において、活性化T細胞はまず、TRAC(配列番号40)、2M(配列番号41)、PD1(配列番号42)、及

50

びCD70（配列番号36又は37）を標的化するsgRNAを含有する2、3、又は4種の異なるCas9:sgRNA RNP複合体により電気穿孔された。TRAC座位でのDNA二重鎖切断は、キメラ抗原受容体カセット（遺伝子発現に関する-/+調節エレメント）に隣接するTRAC座位に対して右及び左の相同性アームを含有するドナー鑄型（配列番号44；配列番号45）（配列番号45のアミノ酸配列を含む抗CD70 CARをコードする）を含むAAV6に送達されるDNA鑄型による相同組換え修復によって修復された。

【0545】

結果として得られる改変T細胞は、2X KO (TRAC - / 2M -)、3X KO (TRAC - / 2M - / PD1 - 又はTRAC - / 2M - / CD70 -) 及び4X KO (TRAC - / 2M - / PD1 - / CD70 -) 抗CD70 CAR+ (41BB共刺激ドメインを有する) T細胞である。CD70+腎癌細胞株によって引き起こされる疾患を回復させるこれらの抗CD70 CAR+ T細胞の能力は、Translational Drug Development, LLC (Scottsdale, AZ) によって利用される方法を使用して、NOGマウスにおいて評価された。簡潔には、12頭の5~8週齢雌、CIEA NOG (NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>I12rg<sup>tm1Sug</sup>/JicTac) マウスは、試験の開始の5~7日前に病原体を含まない条件下で維持された、換気されたマイクロアイソレーターケージにおいて個別に飼育された。マウスは、右後側腹部において5x10<sup>6</sup>個のA498腎癌細胞/マウスの皮下接種を受けた。平均腫瘍サイズが、25~75mm<sup>3</sup> (約50mm<sup>3</sup>の標的) に達したとき、マウスはさらに、表15に示されるとおりの5つの治療群に分けられた。1日目、治療群2~5は、表15に従って、単回の200µlの静注投与量の抗CD70 CAR+ T細胞を受容した。

【0546】

【表15】

表 15. 治療群

群	CAR-T	Δ498細胞	T細胞治療 (i.v.)	N
1	なし	5x10 <sup>6</sup> 細胞/マウス	なし	5
2	2X KO, 抗CD70 CAR+ T細胞	5x10 <sup>6</sup> 細胞/マウス	1x10 <sup>7</sup> 細胞/マウス	5
3	3X KO (PD1), 抗CD70 CAR+ T細胞	5x10 <sup>6</sup> 細胞/マウス	1x10 <sup>7</sup> 細胞/マウス	5
4	3X KO (CD70), 抗CD70 CAR+ T細胞	5x10 <sup>6</sup> 細胞/マウス	1x10 <sup>7</sup> 細胞/マウス	5
5	4X KO (CD70, PD1), 抗CD70 CAR+ T細胞	5x10 <sup>6</sup> 細胞/マウス	1x10 <sup>7</sup> 細胞/マウス	5

【0547】

腫瘍体積は、治療開始日から週に2回測定された。91日目までの試験の期間中において、5日目までに、抗CD70 CAR T細胞の4種全ての治療は、腫瘍体積の減少を示し始め、22日目までに、抗CD70 CAR T細胞の4種全てが、CD70+腎臓癌腫瘍を完全に除去した（図27A）。これらのデータは、4種全ての抗CD70 CAR T細胞が、インビボでCD70+腎臓癌腫瘍を退行させることができることを実証している。

【0548】

再チャレンジ後の抗CD70 CAR T細胞の活性を試験するため、生存しているマウスの左後側腹部の皮下において、25日目に5x10<sup>6</sup>個のA498腎癌細胞/マウスを接種した。（表16）。持続性の有効性は、46日目以降から評価された。結果は、図27Bにおいて示される。56日目において、2X、CD70 CAR+ T細胞で治療された5頭のマウスのうちの5頭が、再チャレンジ後に腫瘍の再増殖を示し、3X (PD1)、CD70 CAR+ T細胞で治療された5頭のマウスのうちの4頭が、再チャレンジ後に腫瘍の再増殖を示し、4X (CD70、PD1)、CD70 CAR+ T細胞で治療された5頭のマウスのうちの2頭が、再チャレンジ後に腫瘍の再増殖を示したが、3X (C

D70)、CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞で治療されたマウスは、再チャレンジ後に腫瘍の再増殖を示さなかった。この傾向は継続したが、70日目において、3X(PD1)、CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞で治療された5頭のマウスのうちの4頭は、再チャレンジ後に腫瘍の再増殖を示し、4X(CD70、PD1)、CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞で治療された5頭のマウスのうちの4頭は、再チャレンジ後に腫瘍の再増殖を示したが、3X(CD70)、CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞で治療されたマウスのうちの1頭だけは、再チャレンジ後の34日目に現れ始めた小規模な腫瘍の再増殖を示した。91日目からも、3X(CD70)、CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞で治療された5頭のマウスのうちの1頭だけが、腫瘍の再増殖を示し始めたが、これは、TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞が、腫瘍細胞への再曝露後のより高いインピボでの有効性を保持することを示している。

10

【0549】

【表16】

表 16. 未治療マウス又は CD70 CAR T 細胞で治療されたマウスにおける再チャレンジ腫瘍のサイズ

CAR T 治療	対象	CAR T 細胞の投与後の日における腫瘍体積 (mm <sup>3</sup> )				
		77日目	81日目	84日目	88日目	91日目
2KO, CD70 CAR T	1	1044	1265	1853	1927	2150
	2	653	927	1040	1123	1256
	3	899	1267	1603	1678	2167
	4	701	1287	1672	1817	2490
	5	689	1146	1423	1525	1901
3KO (PD1), CD70 CAR T	1	385	692	983	1172	1369
	2	0	0	0	0	0
	3	566	738	1030	1537	1740
	4	712	1111	1337	1482	1832
	5	632	778	1017	1129	1289
3KO (CD70), CD70 CAR T	1	0	0	0	0	0
	2	34	56	75	104	135
	3	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0
4KO, CD70 CAR T	1	66	91	182	215	304
	2	56	85	119	126	155
	3	0	0	0	0	0
	4	76	175	218	256	316
	5	35	30	51	58	63
治療なし	1	567	1263	1673	1751	2020
	2	882	1214	1535	1609	2047
	3	1158	1304	1676	1924	2389
	4	295	391	667	789	1078
	5	707	1213	1676	1766	2056

20

30

40

【0550】

大型の腫瘍モデルにおける治療

より大型の腎細胞癌腫瘍に対する抗CD70 CAR T細胞のインピボでの有効性が調査された。上のとおり、CRISPR/Cas9及びAAV6を使用して、CD70を標的化するCARコンストラクト(配列番号45)を使用してTRAC座位からの同時の発現を伴ってTCR、2M、CD70及び/又はPD1の発現を欠くヒトT細胞を作製し

50

た。この実施例において、活性化T細胞はまず、TRAC（配列番号40）、2M（配列番号41）、PD1（配列番号42）、及びCD70（配列番号36又は37）を標的化するsgRNAを含有する2、3、又は4種の異なるCas9:sgRNA RNP複合体により電気穿孔された。TRAC座位でのDNA二重鎖切断は、キメラ抗原受容体カセット（遺伝子発現に関する-/+調節エレメント）に隣接するTRAC座位に対して右及び左の相同性アームを含有するAAV6に送達されるDNA鋳型（配列番号43）（配列番号5のアミノ酸配列を含む抗CD70 CARをコードする）による相同組換え修復によって修復された。

【0551】

結果として得られる改変T細胞は、2X KO（TRAC- / 2M-）、3X KO（TRAC- / 2M- / PD1- 又はTRAC- / 2M- / CD70-）及び4X KO（TRAC- / 2M- / PD1- / CD70-）抗CD70 CAR+（41BB共刺激ドメインを有する）T細胞である。CD70+腎癌細胞株によって引き起こされる疾患を回復させるこれらの抗CD70 CAR+ T細胞の能力は、Translational Drug Development, LLC（Scottsdale, AZ）によって利用される方法を使用して、NOGマウスにおいて評価された。簡潔には、12頭の5~8週齢雌マウス、CIEA NOG（NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>I12rgtm1Sug/JicTac）は、試験の開始の5~7日前に病原体を含まない条件下で維持された、換気されたマイクロアイソレーターケージにおいて個別に飼育された。マウスは、5x10<sup>6</sup>個のA498腎癌細胞/マウスの皮下接種を受けた。平均腫瘍サイズが、125~175mm<sup>3</sup>（約150mm<sup>3</sup>の標的）に達したとき、マウスはさらに、表17に示されるとおりの5つの治療群に分けられた。1日目、治療群2~5は、表17に従って、単回の200µlの静注投与量の抗CD70 CAR+ T細胞を受容した。

【0552】

【表17】

表 17. 治療群

群	CAR-T	A498細胞	T細胞治療 (i.v.)	N
1	なし	5x10 <sup>6</sup> 細胞/マウス	なし	5
2	2X KO, CD70 CAR+ T細胞	5x10 <sup>6</sup> 細胞/マウス	1x10 <sup>7</sup> 細胞/マウス	5
3	3X KO (PD1), CD70 CAR+ T細胞	5x10 <sup>6</sup> 細胞/マウス	1x10 <sup>7</sup> 細胞/マウス	4
4	3X KO (CD70,) CD70 CAR+ T細胞	5x10 <sup>6</sup> 細胞/マウス	1x10 <sup>7</sup> 細胞/マウス	5
5	4X KO (CD70, PD1), CD70 CAR+ T細胞	5x10 <sup>6</sup> 細胞/マウス	1x10 <sup>7</sup> 細胞/マウス	5

【0553】

腫瘍体積は、治療開始日から週に2回測定された。4日目の治療までに、3X KO（TRAC- / 2M- / CD70-）抗CD70 CAR+ T細胞及び4X KO（TRAC- / 2M- / PD1- / CD70-）抗CD70 CAR+ T細胞のみが、腫瘍体積における減少を示し始めた（図27C）。対照的に、2X KO（TRAC- / 2M-）抗CD70 CAR+ T細胞又は3X KO（TRAC- / 2M- / PD1-）抗CD70 CAR+ T細胞で治療された動物についての腫瘍増殖は、治療しない群と同様であった。23日目の治療までに、3X KO（TRAC- / 2M- / CD70-）抗CD70 CAR+ T細胞は、インピボでCD70+腎臓癌腫瘍を完全に除去した。23日目の治療までに、4X KO（TRAC- / 2M- / PD1- / CD70-）抗CD70 CAR+ T細胞に应答した腫瘍の除去は、ほぼ完全であり、5頭のマウスのうちの4頭が、インピボで検出可能な腎臓癌腫瘍を示さなかった。

【0554】

これらのデータは、3X KO（TRAC- / 2M- / CD70-）抗CD70 CA

R + T細胞及び4X KO (TRAC - / 2M - / PD1 - / CD70 - ) 抗CD70 CAR+ T細胞が、インビボで大型のCD70 + 腎臓癌腫瘍を著しく退行させることができることを示す。

【0555】

PD1、CD70、及びCD70ノックアウトを伴うPD1の文脈における抗BCMA CARに関するインビボ腫瘍モデル

NOGマウスにおける皮下MM . 1S腫瘍異種移植モデルに対するTRAC - / 2M - / 抗BCMA (4 - 1BB共刺激) CAR+ T細胞、TRAC - / 2M - / PD - 1 - / 抗BCMA (4 - 1BB共刺激)、TRAC - / 2M - / CD70 - / 抗BCMA (4 - 1BB共刺激)、及びTRAC - / 2M - / PD - 1 - / CD70 - / 抗BCMA (4 - 1BB共刺激) CAR+ T細胞の有効性が評価された。簡潔には、25頭の5 ~ 8週齢雌、CIEA NOG (NOD . Cg - Prkdc<sup>scid</sup> I12rg<sup>tm1Su8</sup> / JicTac) マウスは、試験の開始の5 ~ 7日前に病原体を含まない条件下で維持された、換気されたマイクロアイソレーターケージにおいて個別に飼育された。1日目において、25頭のマウスは、50%マトリゲル/マウス中にある5 x 10<sup>6</sup>個のMM . 1S細胞の右側腹部における皮下接種を受けた。平均腫瘍体積が、75と125 mm<sup>3</sup>の間に達したとき、マウスは、5つの治療群 (N = 5) に分けられ、表18に示されるとおりの約50%の抗BCMA CAR+ T細胞を含むT細胞集団を投与された。

10

【0556】

【表18】

20

表 18. 投与

群	CART細胞	注射されたT細胞の数	抗BCMA CAR+ T細胞	N
1	N/A	N/A	N/A	5
2	TRAC-β2M-/抗BCMA	1x10 <sup>7</sup> 細胞/マウス	5x10 <sup>6</sup> (500万)	5
3	TRAC-β2M-/PD-1-/抗BCMA	1x10 <sup>7</sup> 細胞/マウス	5x10 <sup>6</sup> (500万)	5
4	TRAC-β2M-/CD70-/抗BCMA	1x10 <sup>7</sup> 細胞/マウス	5x10 <sup>6</sup> (500万)	5
5	TRAC-β2M-/PD-1-/CD70-/抗BCMA	1x10 <sup>7</sup> 細胞/マウス	5x10 <sup>6</sup> (500万)	5

30

【0557】

腫瘍体積及び体重は、週に2回測定され、個々のマウスは、それらの腫瘍体積が 2000 mm<sup>3</sup>に達したときに安楽死させられた。

【0558】

16日目までに、全ての治療群は、開始の体積からの腫瘍退縮を示したが、対照群における動物は、平均して1500 mm<sup>3</sup>より大きい腫瘍を有した。27日目までに、対照群における全ての動物は、2000 mm<sup>3</sup>の腫瘍体積の終点に達したが、全ての治療群は、20 mm<sup>3</sup>未満の平均腫瘍体積を有した (図28A)。45日目において、治療群 (群2 ~ 5) からの全てのマウスはさらに、2回目の腫瘍チャレンジ (再チャレンジ) にかかれた。マウスは、50%マトリゲル/マウス中にある5 x 10<sup>6</sup>個のMM . 1S細胞の左側腹部における2回目の皮下接種を受けた。対照マウスの新たな群が登録され (N = 5)、また、左側腹部において50%マトリゲル/マウス中にある5 x 10<sup>6</sup>個のMM . 1S細胞の接種を受けた。

40

【0559】

全てのマウスは、最初の右側腹部腫瘍及び左側腹部における再チャレンジ腫瘍の両方に

50

において腫瘍増殖についてモニターされた。全ての治療群は、大部分の対象における最初の右側腹部腫瘍における腫瘍増殖を順調に阻害した（図28A；表19）。腫瘍増殖は、77日目までの実験期間の腫瘍再チャレンジの前及び後の両方での全ての治療によって阻害された。TRAC- / 2M- / CD70- / PD1- / 抗BCMA CAR<sup>+</sup> Tで治療されたただ1つの対象が、最初の癌細胞チャレンジから腫瘍増殖を示した（表19）。

#### 【0560】

驚くべきことに、左側腹部における再チャレンジの後の腫瘍増殖もまた、再チャレンジの日（45日目）から77日目までの全ての治療群によって著しく阻害された（図28B；表19）。これらのデータは、CAR<sup>+</sup> T細胞がインピボで持続して初期の腫瘍増殖を阻害し、さらに追加の癌細胞による再チャレンジ後には、これらのマウスにさらなるCAR<sup>-</sup> T細胞が送達されなかったにもかかわらず、新たな腫瘍の増殖を阻害することを実証している。例えば、TRAC- / 2M- / 抗BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞の集団で最初に治療された4頭のマウスのうちの3頭、TRAC- / 2M- / CD70- / 抗BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞で最初に治療された5頭のマウスのうちの3頭、及びTRAC- / 2M- / PD1- / 抗BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞で最初に治療された5頭のマウスのうちの3頭は、新たな癌細胞に対する2回目のチャレンジ（再チャレンジ）にもかかわらず新たな腫瘍増殖を示さなかった。これらのデータは、予想に反して、抗BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞が、インピボで長期間、例えば、注射後少なくとも77日目まで持続でき、腫瘍細胞増殖を阻害し、且つインピボで長期間腫瘍体積を減少させるそれらの能力を保持することを実証している。これらの驚くべき結果は、そのようなTRAC- / 2M- / 抗BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞の使用が、インピボで優れた長期間の抗癌効果を達成することになることを示している。

#### 【0561】

ヒトCD45<sup>+</sup>細胞は、製造業者のプロトコルに従ってBD Trucountチューブを使用してマウス血液から定量化され、且つBrilliant Violet 786コンジュゲート抗ヒトCD45（Biolegend Cat# 368528）を使用して検出された。全ての群は、1週目に100個のhuCD45<sup>+</sup>細胞/μl未満の値を示した。投与の2週間後、全ての群における循環しているCD45<sup>+</sup>の数は、3週目までに前の1週目の値に落ちる前にピークになった（図29）。45日目の再チャレンジ時において、抗BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞で治療された対象は、癌の再チャレンジ後に循環しているCAR<sup>-</sup> T細胞のその後の増殖を伴わずに腫瘍増殖を除去するか又は阻害することができた。これらのデータはさらに、予想に反して、抗BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞が、インピボで長期間、例えば、注射後少なくとも77日目まで持続でき、腫瘍細胞増殖を阻害し、且つインピボで長期間腫瘍体積を減少させるそれらの能力を保持することを実証している。これらの驚くべき結果は、TRAC- / 2M- / 抗BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞、TRAC- / 2M- / CD70- / 抗BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞及びTRAC- / 2M- / PD1- / 抗BCMA CAR<sup>+</sup> T細胞の使用が、インピボで優れた長期間の抗癌効果を達成することになることを示している。

#### 【0562】

10

20

30

40

50

【表 19】

表 19. 未治療マウス又は抗 BCMA CAR T 細胞で治療されたマウスにおける腫瘍のサイズ

治療	マウス	45 日目の腫瘍体積 (mm <sup>3</sup> )	77 日目の腫瘍体積 (mm <sup>3</sup> )	
		右側腹部	右側腹部	左側腹部
治療なし	1	TS	TS	TS
	2	TS	TS	TS
	3	TS	TS	TS
	4	TS	TS	TS
	5	TS	TS	TS
TRAC-/β2M-/ 抗 BCMA	1	0	0 (59 日目での MS)	0 (59 日目での MS)
	2	0	0	0
	3	0	0	0
	4	0	0	297
	5	16 日目での FD-T	16 日目での FD-T	16 日目での FD-T
TRAC-/β2M- /PD1-/抗 BCMA	1	0	0	1820
	2	0	0	0
	3	0	0	487
	4	0	0	0
	5	0	0	0
TRAC-/β2M- /CD70-/抗 BCMA	1	10	0	0
	2	0	0	0
	3	0	0 (77 日目での TS)	2349 (77 日目での TS)
	4	0	0	0
	5	0	0	258
TRAC-/β2M- /PD1-/CD70-/ 抗 BCMA	1	0	0	1157
	2	0	0	1842
	3	0	0	1664
	4	0	0	0
	5	89	1583 (73 日目での TS)	1560 (73 日目での TS)

TS=腫瘍体積に起因する屠殺; MS=瀕死による屠殺; FD-T=死体として見つかった動物

## 【0563】

CD70 ノックアウトの文脈における抗 BCMA CAR についてのインビボ腫瘍モデル: 中程度の CAR T 投与に対する CD70 KO の効果  
 CD70 ノックアウトを伴うもの及び伴わないものの両方のいくつかの抗 BCMA CAR<sup>+</sup> T 細胞遺伝子型の有効性は、NOG マウスにおける皮下 RPMI-8226 腫瘍異種移植モデルに対して評価された。簡潔には、85 頭の 5 ~ 8 週齢雌、CIEA NOG (NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>I12rgtm1Sug/JicTac) マウスは、試験の開始の 5 ~ 7 日前に病原体を含まない条件下で維持された、換気されたマイクロアイソレーターケージにおいて個別に飼育された。1 目において、マウスは、10 × 10<sup>6</sup> 個

の R P M I - 8 2 2 6 細胞の皮下接種を受けた。R P M I - 8 2 2 6 細胞による摂取の 1 0 日後、マウスは、1 7 種の治療群 ( N = 5 ) に分けられ、表 2 0 に示されるとおりの約 8 0 % の抗 B C M A C A R + T 細胞を含む T 細胞集団を投与された。

【 0 5 6 4 】

【表 2 0 】

表 20.

群	抗 BCMA CAR+ T 細胞	注射された T 細胞の数	抗 BCMA CAR+ T 細胞	N
1	N/A	N/A	N/A	5
2	TRAC- $\beta$ 2M-/抗 BCMA	3x10 <sup>6</sup> 細胞/ マウス	2.4 x10 <sup>6</sup> (240 万)	5
3	TRAC- $\beta$ 2M-/抗 BCMA	1x10 <sup>6</sup> 細胞/ マウス	8 x10 <sup>5</sup> (80 万)	5
4	TRAC- $\beta$ 2M-/抗 BCMA	3x10 <sup>5</sup> 細胞/ マウス	2.4 x10 <sup>5</sup> (24 万)	5
5	TRAC- $\beta$ 2M-/抗 BCMA	1x10 <sup>5</sup> 細胞/ マウス	8 x10 <sup>4</sup> (8 万)	5
6	TRAC- $\beta$ 2M-/PD1-/抗 BCMA	3x10 <sup>6</sup> 細胞/ マウス	2.4 x10 <sup>6</sup> (240 万)	5
7	TRAC- $\beta$ 2M-/PD1-/抗 BCMA	1x10 <sup>6</sup> 細胞/ マウス	8 x10 <sup>5</sup> (80 万)	5
8	TRAC- $\beta$ 2M-/PD1-/抗 BCMA	3x10 <sup>5</sup> 細胞/ マウス	2.4 x10 <sup>5</sup> (24 万)	5
9	TRAC- $\beta$ 2M-/PD1-/抗 BCMA	1x10 <sup>5</sup> 細胞/ マウス	8 x10 <sup>4</sup> (8 万)	5
10	TRAC- $\beta$ 2M-/CD70-/抗 BCMA	3x10 <sup>6</sup> 細胞/ マウス	2.4 x10 <sup>6</sup> (240 万)	5
11	TRAC- $\beta$ 2M-/CD70-/抗 BCMA	1x10 <sup>6</sup> 細胞/ マウス	8 x10 <sup>5</sup> (80 万)	5
12	TRAC- $\beta$ 2M-/CD70-/抗 BCMA	3x10 <sup>5</sup> 細胞/ マウス	2.4 x10 <sup>5</sup> (24 万)	5
13	TRAC- $\beta$ 2M-/CD70-/抗 BCMA	1x10 <sup>5</sup> 細胞/ マウス	8 x10 <sup>4</sup> (8 万)	5
14	TRAC- $\beta$ 2M-/PD1-/CD70-/抗 BCMA	3x10 <sup>6</sup> 細胞/ マウス	2.4 x10 <sup>6</sup> (240 万)	5
15	TRAC- $\beta$ 2M-/PD1-/CD70-/抗 BCMA	1x10 <sup>6</sup> 細胞/ マウス	8 x10 <sup>5</sup> (80 万)	5
16	TRAC- $\beta$ 2M-/PD1-/CD70-/抗 BCMA	3x10 <sup>5</sup> 細胞/ マウス	2.4 x10 <sup>5</sup> (24 万)	5
17	TRAC- $\beta$ 2M-/PD1-/CD70-/抗 BCMA	1x10 <sup>5</sup> 細胞/ マウス	8 x10 <sup>4</sup> (8 万)	5

【 0 5 6 5 】

腫瘍体積及び体重は、週に 2 回測定され、個々のマウスは、腫瘍体積が 2 0 0 0 mm<sup>3</sup> であったときに安楽死させられた。2 2 日までに、データは、1 0 0 , 0 0 0 細胞で投与された任意の抗 B C M A C A R T 細胞遺伝子型と比較して、より高い用量の抗 B C M A C A R T T 細胞 ( 1 x 1 0 <sup>5</sup> ~ 3 x 1 0 <sup>6</sup> 細胞用量 ) に応答して腫瘍体積における統計的に有意な減少を示す ( 群 5 、 9 、 1 3 及び 1 7 ) ( 図 3 0 ; 表 2 1 ) 。

【 0 5 6 6 】

10

20

30

40

50

36日目において、 $3 \times 10^5$ 細胞の中程度の用量で投与されたTRAC- / 2M- / CD70- / 抗BCMA CAR+ T細胞は、CD70 KOを伴わない抗BCMA CAR+ T細胞（例えば、TRAC- / 2M- / 抗BCMA CAR+ T細胞、TRAC- / 2M- / PD1- / 抗BCMA CAR+ T細胞、又はTRAC- / 2M- / PD1- / CD70- / 抗BCMA CAR+ T細胞）より腫瘍体積を減少させることに対してより大きい効果を示した。 $1 \times 10^6$ 個以上の全ての抗BCMA CAR+ T細胞のより高い用量の全て（図30；100万、300万）は、腫瘍体積の完全な退縮を示した。この傾向は、試験の57日目からも継続した。

【0567】

これらの結果は、CD70の活性を阻害すること（例えば、CD70をロックアウトすることによる）は、インビボでCAR+ T細胞の有効性及び効力を増加させる。この効果は、抗CD70 CARの存在に依存しない。

【0568】

【表21-1】

表 21.

群	治療	抗 BCMA CAR+ T細胞/ 1用量	36日目の腫瘍体積 (mm <sup>3</sup> )					57日目の腫瘍体積 (mm <sup>3</sup> )				
1	治療なし	N/A	220	220	186	173	278	179 0	179 4	938	205 5	202 9
2	TRAC- /β2M-/抗 BCMA	2.4 x10 <sup>6</sup> (240 万)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3		8 x10 <sup>5</sup> (80万)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4		2.4 x10 <sup>5</sup> (24万)	65	65	77	56	0	516	441	257	97	337
5		8 x10 <sup>4</sup> (8万)	264	264	386	276	185	239 1	228 3	205 8	214 7	235 9
6		2.4 x10 <sup>6</sup> (240 万)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	TRAC- /β2M- /PD1-/抗 BCMA	8 x10 <sup>5</sup> (80万)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8		2.4 x10 <sup>5</sup> (24万)	135	135	59	57	28	764	518	280	181	79

【0569】

10

20

30

40

50

【表 2 1 - 2】

9		$8 \times 10^4$ (8万)	261	261	265	287	312	153 2	155 7	221 8	201 0	209 8
10		$2.4 \times 10^6$ (240万)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	TRAC- / $\beta$ 2M- / $CD70$ -/ 抗 BCMA	$8 \times 10^5$ (80万)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12		$2.4 \times 10^5$ (24万)	47	47	0	0	0	526	58	47	0	0
13		$8 \times 10^4$ (8万)	292	292	267	313	235	207 5	212 7	209 6	136 5	235 4
14		$2.4 \times 10^6$ (240万)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	TRAC- / $\beta$ 2M- / $PD1$ - / $CD70$ -/ 抗 BCMA	$8 \times 10^5$ (80万)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16		$2.4 \times 10^5$ (24万)	100	100	91	19	20	478	576	82	131	289
17		$8 \times 10^4$ (8万)	310	310	319	345	451	152 8	216 0	284 3	255 7	149 9

10

20

## 【0570】

実施例9．多重ノックアウトCAR T細胞は、サイトカイン依存性を保持する

30

サイトカイン依存性。遺伝子編集が、制御されない細胞増殖などの有害な特性を有する細胞を生成し得る望まれないオフターゲット編集をもたらしたかどうかを判定するため、サイトカイン及び/又は血清の非存在下で増殖する遺伝子編集されたCAR T細胞の能力が評価された。

## 【0571】

抗CD70 CAR T細胞：サイトカイン及び/又は血清の非存在下で増殖するTRAC<sup>-</sup>/ $\beta$ 2M<sup>-</sup>/ $CD70$ <sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup>細胞の能力が評価された。 $5 \times 10^6$ 個のTRAC<sup>-</sup>/ $\beta$ 2M<sup>-</sup>/ $CD70$ <sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup>細胞が、細胞生産の約2週間後に蒔かれた(0日目)。生存細胞の数は、完全培地、サイトカイン(IL-2及びIL-7)を伴わない5%ヒト血清、又は血清及びサイトカインを欠く基本培地のいずれかにおいて蒔いた7日及び14日後に数え上げられた。サイトカインを欠いた培養物において蒔かれた細胞は14日目に検出されなかったが、これは、ゲノム編集によるいずれかの潜在的なオフターゲット効果が、細胞に対して増殖因子非依存性の成長/増殖を誘導しなかったことを示唆している(図31)。細胞は、サイトカインの存在下(サイトカインを含有する完全培地)でのみ増殖し、血清单独の存在下では増殖しなかった。したがって、インビボでは、サイトカイン、増殖因子又は抗原刺激の非存在下では、任意のオフターゲットゲノム編集のために細胞は増殖しない可能性がある。

40

## 【0572】

サイトカイン及び/又は血清の非存在下で増殖するTRAC<sup>-</sup>/ $\beta$ 2M<sup>-</sup>/ $CD70$ <sup>-</sup>/ $PD1$ <sup>-</sup>抗CD70 CAR<sup>+</sup>細胞の能力もまた評価された。 $2 \times 10^6$ 細胞が、細胞生産

50

の約2週間後に蒔かれた(0日目)。生存細胞の数は、完全培地、サイトカイン(IL-2及びIL-7)を伴わない5%ヒト血清、又は血清及びサイトカインを欠く基本培地のいずれかにおいて蒔いた26日後まで数え上げられた。サイトカインを欠いた培養物において蒔かれた細胞は26日目に検出されなかったが、これは、ゲノム編集によるいずれかの潜在的なオフターゲット効果が、細胞に対して増殖因子非依存性の成長/増殖を誘導しなかったことを示唆している(図32)。細胞は、サイトカインの存在下(サイトカインを含有する完全培地)でのみ増殖し、血清単独の存在下では増殖しなかった。したがって、ゲノム編集は、細胞がサイトカイン、増殖因子又は抗原刺激の非存在下で増殖することを可能にする任意の有害事象を誘導しなかった。

【0573】

抗BCMA CAR+ T細胞：サイトカイン及び/又は血清の非存在下で増殖するTRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>抗BCMA CAR+細胞の能力が評価された。TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>/抗BCMA CAR+細胞はまた、4XKO、BCMA CAR+細胞とも呼ばれる。1×10<sup>6</sup>個の4XKO、BCMA CAR+細胞が、実施例6において記載される10回の再チャレンジ後に蒔かれた。生存細胞の数は、完全培地、サイトカイン(IL-2及びIL-7)を伴わない5%ヒト血清、又は血清及びサイトカインを欠く基本培地のいずれかにおいて蒔いた7日及び14日後に数え上げられた。サイトカインを欠いた培養物において蒔かれた細胞は13日目に検出されなかったが、これは、ゲノム編集によるいずれかの潜在的なオフターゲット効果が、細胞に対して増殖因子非依存性の成長/増殖を誘導しなかったことを示唆している(図33)。細胞は、サイトカインの存在下(サイトカインを含有する完全培地)でのみ増殖し、血清単独の存在下では増殖しなかった。したがって、インビボにおいて、細胞は、制御されない様式で増殖しない可能性がある。

【0574】

他のCAR T細胞：本明細書で例示される抗CD33 CAR+ T細胞及び抗CD19 CAR+ T細胞が、サイトカインの存在下でのみ増殖し、且つ血清単独の存在下で増殖しないことが以前に示されている。したがって、インビボにおいて、これらの細胞は、制御されない様式で増殖しない可能性がある。

【0575】

サイトカイン放出アッセイ。サイトカイン放出を測定するため、T細胞及び標的細胞を、指定の比で24時間共インキュベートした。上清培地を、製造業者の指示書(RD Systems)に従って新しいプレート上でのIL-2又はIFN ELISA(RD Systems)における使用のために回収した。

【0576】

A498細胞の存在下で共培養されたときにインターロイキン-2(IL-2)を産生するTRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR+細胞の能力は、ELISAアッセイを使用して分析された。三重ノックアウトTRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR+ T細胞及び二重ノックアウトTRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/抗CD70 CAR+ T細胞の両方が、高レベルのIL-2を分泌した。際だったことに、TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR+細胞は、A498細胞と培養されたときにTRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/抗CD70 CAR+細胞より高いレベルのIL-2を分泌した(図34)。これらの結果は、CD70遺伝子をノックアウトすることが、抗CD70 CAR+ T細胞により多くのIL-2を分泌する優位性をもたらすことを示唆する。

【0577】

実施例10. A498腎癌細胞における抗CD70 CAR+ T細胞に対する多重ノックアウトの効果

抗CD70 CAR+ T細胞の機能に対する多重ノックアウトの効果  
細胞死滅アッセイ。A498腎癌細胞を死滅させる多重遺伝子編集の能力は、上記の細胞死滅アッセイを使用して判定された。簡潔には、TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/抗CD70 CAR+(2XKO、CD70 CAR+)、TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>/抗CD70

10

20

30

40

50

CAR<sup>+</sup> (3X KO (PD-1)、CD70 CAR<sup>+</sup>)、TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> (3X KO (CD70)、CD70 CAR<sup>+</sup>)及びTRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> (4X KO、CD70 CAR<sup>+</sup>)細胞を、様々なCAR T細胞：A498標的細胞比でCD70<sup>+</sup>接着RCC由来細胞株 (A498細胞)とインキュベートした。

#### 【0578】

TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup>細胞は、24時間の共インキュベーション後にRCC由来細胞の強力な細胞の死滅を示した (図35)。四重TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> Tは、二重ノックアウトTRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞より高い能力を実証した (0.5:1及び0.25:1の低いT細胞:A498比で見える)。結果は、CD70及びPD-1遺伝子の両方をノックアウトすることが、抗CD70 CAR<sup>+</sup>細胞により高い細胞死滅の能力を与えたことを実証している。

10

#### 【0579】

遺伝子編集された細胞はまた、0.24:1のCAR T細胞:A948標的細胞比での24時間の共インキュベーション後にRCC由来細胞の強力な細胞死滅を示した。(図36)。具体的には、三重ノックアウトTRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞及び四重ノックアウトTRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞は、二重ノックアウトTRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞又は三重ノックアウトTRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞より高い能力を実証した。これらのデータは、抗CD70 CARの文脈におけるCD70のノックアウトが、抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞の細胞を死滅させる能力を向上させたことを示す。

20

#### 【0580】

サイトカイン放出アッセイ。サイトカイン放出アッセイは、上記のとおり実施された。0.25:1の比 (CAR T細胞:A498標的細胞)での24時間の共インキュベーション後にA498細胞の存在下で共培養された場合の二重ノックアウト、三重ノックアウト、及び四重ノックアウト抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞のIL-2及びインターフェロンガンマ (IFN-ガンマ (IFN-g))を産生する能力は、ELISAアッセイを使用して評価された。細胞共培養物の上清に由来するIL-2及びIFN-gが測定された。三重ノックアウトTRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞及び四重ノックアウトTRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞は、A498細胞と培養されたときに最も高いレベルのIFN-g (図37A)及びIL-2 (図37B)を分泌した。

30

#### 【0581】

枯渇マーカー発現に対するCD70ノックアウトの効果

枯渇マーカーPD-1及びLAG3のレベルは、上の実施例において使用されるTRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> (2X KO、CD70 CAR<sup>+</sup>)、TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> (3X KO (PD-1)、CD70 CAR<sup>+</sup>)、TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> (3X KO (CD70)、CD70 CAR<sup>+</sup>)及びTRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> (4X KO、CD70 CAR<sup>+</sup>) T細胞に対して評価された。CD4<sup>+</sup> T細胞は、PD-1発現 (図38)について評価され、CD8<sup>+</sup> T細胞及びCD4<sup>+</sup> T細胞の両方が、フローサイトメトリーによってLAG3発現 (それぞれ図39A及び39B)について評価された。

40

#### 【0582】

データは、CD70 KOが、CAR T細胞における枯渇マーカー発現を減少させることを実証している。図38におけるデータは、PD-1発現が、PD-1がノックアウトされたときに予想通りに減少され、且つCD70がノックアウトされたときにも減少され

50

ることを示す。

【0583】

図39A及び39Bにおけるデータは、CD70をノックアウトすることが、CD4及びCD8細胞におけるLAG3発現マーカーを減少させることを示す。

【0584】

データは、CD70をノックアウトすることが、特に、CD8<sup>+</sup>及びCD4<sup>+</sup>遺伝子が編集されたCAR<sup>+</sup>T細胞の集団の潜在的な枯渇を減少させて、より良好な治療をもたらすことができたことを実証する。

【0585】

実施例11. CD70 KOは、複数の細胞型における細胞の死滅を増進する

10

様々な癌細胞株におけるCD70発現。相対的なCD70発現を様々な癌細胞株において測定して、様々な癌型を死滅させる抗CD70 CAR<sup>+</sup>T細胞の能力をさらに評価した。CD70発現は、Alexa Fluor 647抗ヒトCD70抗体(BioLegend Cat.No.355115)を使用するFACS分析によって測定された。図40A(左のグラフ)は、他の腎臓癌細胞株A498、786-O、cacki-1及びCaki-2と比較した、FACSによって測定されるとおりのACHN細胞における相対的なCD70の発現を示す。さらに、非腎臓癌細胞株は、Alexa Fluor 647抗ヒトCD70抗体(BioLegend Cat.No.355115; 図40A、右のパネル)又は図40BにおけるFITC抗ヒトCD70抗体(BioLegend Cat.No.355105)のいずれかを使用するFACS分析(表22、図40A及び図40B)によってCD70発現について評価された。SNU-1(腸癌細胞)は、A498と同様の高レベルのCD70発現を示した(図40A、右のパネル)。SKOV-3(卵巣)、HuT78(リンパ腫)、NCI-H1975(肺)及びHs-766T(膵臓)細胞株は、ACHNと同様であるか又はより高いが、A498より低いCD70発現のレベルを示した(表22、図40B)。

20

【0586】

【表22】

表22.

細胞株	癌の種類	相対的 CD70 発現
A498	腎癌	高
ACHN	腎臓(転移に由来する)	中-低
SK-OV-3	卵巣腺癌	中
NCI-H1975	肺腺癌(NSCLC)	中
Calu-1	肺癌	低
DU 145	前立腺癌	低
SNU-1	胃癌	高
Hs 766T	膵癌	中
MJ	T細胞リンパ腫	高
HuT78	T細胞リンパ腫	中
HuT102	T細胞リンパ腫	中
PANC-1	膵癌	低
U937	AML	発現なし
K562	慢性骨髄性白血病	発現なし(陰性対照)

30

40

【0587】

細胞死滅アッセイ。多重に遺伝子編集された抗CD70 CAR<sup>+</sup>細胞のACHN腎癌細胞を死滅させる能力は、上記の細胞死滅アッセイを使用して判定された。TRAC<sup>-</sup>/2M<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup>(2X KO、CD70 CAR<sup>+</sup>)、TRAC<sup>-</sup>/2M

50

- / PD - 1<sup>-</sup> / 抗 CD 70 CAR<sup>+</sup> ( 3 X KO ( PD - 1 )、CD 70 CAR<sup>+</sup> )、TRAC<sup>-</sup> / 2 M<sup>-</sup> / CD 70<sup>-</sup> / 抗 CD 70 CAR<sup>+</sup> ( 3 X KO ( CD 70 )、CD 70 CAR<sup>+</sup> ) 及び TRAC<sup>-</sup> / 2 M<sup>-</sup> / PD - 1<sup>-</sup> / CD 70<sup>-</sup> / 抗 CD 70 CAR<sup>+</sup> ( 4 X KO、CD 70 CAR<sup>+</sup> ) 細胞は、0.5 : 1 ( 図 4 0 C ) 及び 0.25 : 1 ( 図 4 0 D ) の CAR<sup>+</sup> T 細胞 : ACHN 標的細胞比で低レベルの CD 70 抗原を発現する接着 RCC 由来細胞株 ( ACHN 細胞 ) とともにインキュベートされた ( 図 4 0 A は、他の腎臓癌細胞株 A 4 9 8、7 8 6 - O、c a c k i - 1、及び C a k i - 2 と比較した、FACS によって測定されるとおりの ACHN 細胞における相対的な CD 70 の発現を示す )。遺伝子編集された細胞は、24 時間の共インキュベーション後に RCC 由来細胞の強力な細胞の死滅を示した ( 図 4 0 C 及び 4 0 D )。細胞は、PD - 1 がノックアウトされた場合、CD 70 がノックアウトされた場合、より高い効力を示し、さらに、PD - 1 及び CD 70 の両方がノックアウトされた場合にわずかに高い効力を示した。結論として、PD - 1 若しくは CD 70 又は PD - 1 及び CD 70 の両方を合わせたノックアウトは、ACHN 細胞における抗 CD 70 CAR<sup>+</sup> 細胞の細胞を死滅させる能力を向上させる。

10

## 【 0 5 8 8 】

ACHN 細胞は、中程度から低レベルまでの CD 70 を発現することが見出されたが、それらは、驚くべきことに、3 X KO ( PD - 1 )、CD 70 CAR<sup>+</sup> T 細胞、3 X KO ( CD 70 )、CD 70 CAR<sup>+</sup> T 細胞、及び 4 X KO CD 70 CAR<sup>+</sup> T 細胞により死滅しやすかった ( 図 4 0 C 及び 4 0 D )。これは、高い CD 70 発現が、抗 CD 70 CAR<sup>+</sup> を発現する遺伝子編集された T 細胞による標的細胞の効率的な死滅に必要なではないことを示す。さらに、SNU - 1、SK - OV - 3、NCI - H 1 9 7 5 及び HS - 7 6 6 T 細胞株の CD 70 発現レベルが ACHN と同様であるか又はそれ以上であることが判明したという状況から、抗 CD 70 CAR<sup>+</sup> T 細胞は、これらの癌細胞型を死滅させるのにも特に効率的であることが予想された。実際に、TRAC<sup>-</sup> / 2 M<sup>-</sup> / PD - 1<sup>-</sup> / CD 70<sup>-</sup> / 抗 CD 70 CAR<sup>+</sup> ( 4 X KO、CD 70 CAR<sup>+</sup> ) 及び TRAC<sup>-</sup> / 2 M<sup>-</sup> / CD 70<sup>-</sup> / 抗 CD 70 CAR<sup>+</sup> ( 3 X KO ( CD 70 )、CD 70 CAR<sup>+</sup> ) は、驚くべきことに、ほんの 24 時間の共培養の後に多数の固形腫瘍細胞株の強力な細胞死滅を示したことが見出された ( 図 4 0 E は、4 X KO CAR<sup>+</sup> T 細胞による死滅を示し、図 4 0 F は、3 X KO CAR<sup>+</sup> T 細胞による死滅を示す )。3 X KO、CD 70 CAR<sup>+</sup> 及び 4 X KO、CD 70 CAR<sup>+</sup> T 細胞の両方が、4 : 1 のエフェクター : 標的細胞比で腎臓、膵臓、及び卵巣腫瘍細胞 ( A 4 9 8、ACHN、SK - OV - 3、及び HS - 7 6 6 T ) を > 6 0 % 死滅させ、1 : 1 のエフェクター : 標的細胞比で > 5 0 % を死滅させた。中程度から低い CD 70 発現を有した癌細胞株 ( NCI - H 1 9 7 5、Calu - 1 及び DU 1 4 5 ) の細胞の死滅は、共培養の 24 時間以内で 4 : 1 のエフェクター : 標的細胞比で > 3 0 % の死滅を有して依然として効率的であった ( 図 4 0 E 及び 4 0 F )。3 X KO 又は 4 X KO、CD 70 CAR<sup>+</sup> T 細胞のいずれかに対するより長い暴露 ( すなわち、96 時間 ) は、全ての細胞型、特に、SKOV - 3、HS - 7 6 6 T、及び NCI - H 1 9 7 5 細胞全体にわたって癌細胞死滅の増加をもたらし、死滅は、1 : 1 のエフェクター : 標的細胞比で > 8 0 % であった ( 図 4 0 G )。

20

30

40

## 【 0 5 8 9 】

SNU - 1 細胞の死滅は、視覚的な評価によって評価された。CAR<sup>+</sup> T 細胞への長い暴露後の標的細胞の死滅もまた、SNU - 1 癌細胞についての顕微鏡観察によって評価された。SNU - 1 細胞は、6 ウェルプレートにおいて 1 ウェル当たり 100 万細胞の密度で蒔かれ、3 X KO ( CD 70 )、抗 CD 70 CAR<sup>+</sup> T 細胞と 4 : 1 のエフェクター : 標的比で混合された。共培養物は、6 日間インキュベートされ、生存癌細胞の存在が顕微鏡観察によって評価された。全ての胃癌標的細胞 ( SNU - 1 ) は、対照ウェルと比較して、TRAC<sup>-</sup> / 2 M<sup>-</sup> / CD 70<sup>-</sup> / 抗 CD 70 CAR<sup>+</sup> T 細胞を含有するウェルにおいて除去されたが、これは、癌細胞が、長期間の共培養により抗 CD 70 C

50

AR<sup>+</sup> T細胞によって完全に除去されたことを示している。

【0590】

CD70発現細胞を選択的に死滅させる抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞の能力が判定された。フローサイトメトリーアッセイを設計して、3X KO (CD70) (TRAC<sup>-</sup>/B2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>) 抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞によって、癌細胞懸濁液株 (例えば、「標的細胞」と呼ばれるK562、MM.1S及びHuT78癌細胞) の死滅を試験した。使用された標的細胞株のうちの2つは、CD70発現癌細胞 (例えば、MM.1S及びHuT78) であったが、陰性対照癌細胞として使用された3つ目は、CD70発現を欠く (例えば、K562)。TRAC<sup>-</sup>/B2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞は、CD70発現MM.1S若しくはHuT78細胞株又はCD70陰性K562細胞株のいずれかと共培養された。標的細胞は、5 μM e f l u o r 6 7 0 ( e B i o s c i e n c e s ) で標識され、洗浄され、96ウェルU底プレートにおいて1ウェル当たり50,000標的細胞の密度で播種された。標的細胞は、様々な比 (0.5:1、1:1、2:1及び4:1 CAR<sup>+</sup> T細胞対標的細胞) でTRAC<sup>-</sup>/B2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞と共培養され、一晚インキュベートされた。標的細胞の死滅は、24時間の共培養後に判定された。細胞は洗浄され、5 mg/mL DAPI (M o l e c u l a r P r o b e s ) の1:500希釈物を含む200 μLの培地が各ウェルに加えられた (死/瀕死細胞を数え上げるため)。次に、細胞は、フローサイトメトリーによって分析され、残留している生存標的細胞の量が定量化された。

10

【0591】

図40H、図40I、及び図40Jは、TRAC<sup>-</sup>/B2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞による選択的な標的細胞の死滅を実証している。3X KO (CD70) CAR<sup>+</sup> T細胞との24時間の共培養は、0.5:1の低いCAR<sup>+</sup> T細胞とCD70発現標的細胞比でさえ、T細胞リンパ腫細胞 (HuT78) のほぼ完全な死滅をもたらした (図40J)。同様に、24時間の共培養は、試験された全てのCAR<sup>+</sup> T細胞と標的細胞の比で多発性骨髄腫細胞 (MM.1S) のほぼ完全な死滅をもたらした (図40I)。標的細胞の死滅は、TRAC<sup>-</sup>/B2M<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞が、試験されたいずれのエフェクター: 標的細胞比でも対照試料 (例えば、癌細胞単独又はRNP T細胞を伴わない共培養物) のレベルを上回るCD70欠損K562細胞の死滅を誘導しなかったという点で選択的であることが見出された (図40H)。

20

30

【0592】

サイトカイン放出アッセイ。サイトカイン放出アッセイは、上記のとおり実施された。0.25:1の比 (CAR<sup>+</sup> T細胞: ACHN標的細胞) での24時間の共インキュベーション後にACHN細胞の存在下で共培養された場合の二重ロックアウト、三重ロックアウト、及び四重ロックアウト抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞のIL-2及びIFN-γを産生する能力は、ELISAアッセイを使用して評価された。細胞共培養物の上清に由来するIL-2及びIFN-γが測定された。三重ロックアウトTRAC<sup>-</sup>/B2M<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞及び四重ロックアウトTRAC<sup>-</sup>/B2M<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>/CD70<sup>-</sup>/抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞は、ACHN細胞と培養されたときに最も高いレベルのIFN-γ (図41) 及びIL-2 (図41B) を分泌した。結論として、CD70又はPD-1及びCD70の両方を合わせたロックアウトは、ACHN細胞における抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞の細胞を死滅させる能力を向上させる。

40

【0593】

実施例12. 抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞におけるCD70 KOの有効性: NOGマウスにおける腫瘍異種移植モデル

卵巣腫瘍モデルにおける治療

中程度のレベルのCD70を発現する卵巣腺癌細胞を除去する抗CD70 CAR<sup>+</sup> T細胞の能力は、マウスにおける皮下卵巣癌 (SKOV-3) 腫瘍異種移植モデルを使用してインビボで評価された。

【0594】

50

CRISPR/Cas9及びAAV6を、上のとおりを使用して（例えば、実施例3を参照のこと）、CD70を標的化するCARコンストラクト（配列番号45；配列番号46）を使用してTRAC座位からの同時の発現を伴ってTCR、2M、CD70の発現を欠くヒトT細胞を作製した。この実施例において、活性化T細胞はまず、TRAC（配列番号40）、2M（配列番号41）、及びCD70（配列番号36又は37）を標的化するsgRNAを含有する3種の異なるCas9：sgRNA RNP複合体により電気穿孔された。TRAC座位でのDNA二重鎖切断は、キメラ抗原受容体カセット（遺伝子発現に関する-/+調節エレメント）に隣接するTRAC座位に対して右及び左の相同性アームを含有するドナー鋳型（配列番号44；配列番号45）（配列番号45のアミノ酸配列を含む抗CD70 CARをコードする）を含むAAV6に送達されるDNA鋳型による相同組換え修復によって修復された。

10

【0595】

得られた改変T細胞は、3X KO (TRAC- / 2M- / CD70-) 抗CD70 CAR+ T細胞である。CD70+ 卵巣癌細胞株によって引き起こされる疾患を回復させるこれらの抗CD70 CAR+ T細胞の能力は、Translational Drug Development, LLC (Scottsdale, AZ) によって利用される方法を使用して、NOGマウスにおいて評価された。簡潔には、12頭の5~8週齢雌、CIEA NOG (NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>I12rg<sup>tm1Sug</sup>/JicTac) マウスは、試験の開始の5~7日前に病原体を含まない条件下で維持された、換気されたマイクロアイソレーターケージにおいて個別に飼育された。マウスは、右後側腹部において5x10<sup>6</sup>個のSKOV-3 卵巣癌細胞/マウスの皮下接種を受けた。平均腫瘍サイズが、25~75 mm<sup>3</sup> (約50 mm<sup>3</sup>の標的) に達したとき、マウスはさらに、表23に示されるとおりの2つの治療群に分けられた。1日目、治療群2は、表23に従って、単回の200 µlの静注投与量の抗CD70 CAR+ T細胞を受容した。

20

【0596】

【表23】

表 23. 治療群

群	CAR-T	SKOV-3 細胞	T細胞治療 (i.v.)	N
1	なし	5x10 <sup>6</sup> 細胞/マウス	なし	5
2	3X KO (CD70,) 抗 CD70 CAR+ T細胞	5x10 <sup>6</sup> 細胞/マウス	1x10 <sup>7</sup> 細胞/マウス	5

30

【0597】

腫瘍体積は、治療開始日から週に2回測定された。注射後9日目までに、抗CD70 CART細胞で治療された腫瘍は、未治療の動物における腫瘍と比較して、腫瘍体積の減少を示し始めた。注射後17日目までに、抗CD70 CAR T細胞で治療されたマウスにおけるCD70+ 卵巣癌腫瘍は、完全に除去された。腫瘍増殖のこの完全退縮は、注射後44日間を通して治療された動物において維持され、その後、抗CD70 CART細胞で治療された5頭のマウスのうちの4頭は、最後の観察(69日目)まで腫瘍がないままであった(図42A)。これらのデータは、3X KO (TRAC- / 2M- / CD70-) 抗CD70 CAR+細胞が、ヒト卵巣腫瘍を治療するのにインビボで非常に強力であることを実証している。

40

【0598】

非小細胞肺癌 (NSCLC) 腫瘍モデルにおける治療

中程度のレベルのCD70を発現する肺腺癌細胞を除去するCD70 CARを発現するT細胞の能力は、マウスにおける皮下肺癌 (NCI-H1975) 腫瘍異種移植モデルを使用してインビボで評価された。

【0599】

50

CRISPR/Cas9及びAAV6を、上のおりに使用して（例えば、実施例3を参照のこと）、CD70を標的化するCARコンストラクト（配列番号43；配列番号44）を使用してTRAC座位からの同時の発現を伴ってTCR、2M、CD70の発現を欠くヒトT細胞を作製した。この実施例において、活性化T細胞はまず、TRAC（配列番号40）、2M（配列番号41）、及びCD70（配列番号36又は37）を標的化するsgRNAを含有する3種の異なるCas9：sgRNA RNP複合体により電気穿孔された。TRAC座位でのDNA二重鎖切断は、キメラ抗原受容体カセット（遺伝子発現に関する-/+調節エレメント）に隣接するTRAC座位に対して右及び左の相同性アームを含有するAAV6に送達されるDNA鋳型（配列番号43；配列番号44）（配列番号45のアミノ酸配列を含む抗CD70 CARをコードする）による相同組換え修復によって修復された。

10

【0600】

得られた改変T細胞は、3X KO（TRAC- / 2M- / CD70-）抗CD70 CAR+（41BB共刺激ドメインを有する）T細胞である。CD70+肺癌細胞株によって引き起こされる疾患を回復させるこれらの抗CD70 CAR+ T細胞の能力は、Translational Drug Development, LLC（Scottsdale, AZ）によって利用される方法を使用して、NOGマウスにおいて評価された。簡潔には、12頭の5～8週齢雌、CIEA NOG（NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>I12rg<sup>tm1Sug</sup>/JicTac）マウスは、試験の開始の5～7日前に病原体を含まない条件下で維持された、換気されたマイクロアイソレーターケージにおいて個別に飼育された。マウスは、右後側腹部において5×10<sup>6</sup>個のNCI-H1975肺癌細胞/マウスの皮下接種を受けた。平均腫瘍サイズが、25～75mm<sup>3</sup>（約50mm<sup>3</sup>の標的）に達したとき、マウスはさらに、表24に示されるとおりの2つの治療群に分けられた。1日目、治療群2は、表24に従って、単回の200μlの静注投与量の抗CD70 CAR+ T細胞を受容した。

20

【0601】

【表24】

表 24. 治療群

群	CAR-T	NCI-H1975 細胞	T細胞治療 (i.v.)	N
1	なし	5x10 <sup>6</sup> 細胞/マウス	なし	5
2	3X KO (CD70,) 抗 CD70 CAR+ T細胞	5x10 <sup>6</sup> 細胞/マウス	1x10 <sup>7</sup> 細胞/マウス	5

30

【0602】

腫瘍体積は、治療開始日から週に2回測定された。注射後12日目までに、抗CD70 CAR T細胞で治療された腫瘍は、未治療の動物における腫瘍と比較して、腫瘍体積の減少を示し始めた。治療された動物における腫瘍のこの完全退縮は、注射後33日間を通して継続する。抗CD70 CAR T細胞による治療は、注射後40日目までの間、確立されたH1975肺癌異種移植片に対して強力な活性をもたらした（<100mm<sup>3</sup>の腫瘍サイズを有する40日目までの全てのマウスにおいて、腫瘍再増殖が抑制された）が、その後、腫瘍が増殖し始めた。（図42B）。これらのデータは、3X KO（TRAC- / 2M- / CD70-）抗CD70 CAR+細胞が、インビボでヒトCD70+肺癌腫瘍に対して強力な活性を有することを実証している。

40

【0603】

膵臓腫瘍モデルにおける治療

中程度のレベルのCD70を発現する膵臓癌細胞を除去するCD70 CARを発現するT細胞の能力は、マウスにおける皮下膵臓癌（Hs 766T）腫瘍異種移植モデルを使用してインビボで評価された。

50

【0604】

CRISPR/Cas9及びAAV6を、上のとおりを使用して（例えば、実施例3を参照のこと）、CD70を標的化するCARコンストラクト（配列番号43；配列番号44）を使用してTRAC座位からの同時の発現を伴ってTCR、2M、CD70の発現を欠くヒトT細胞を作製した。この実施例において、活性化T細胞はまず、TRAC（配列番号40）、2M（配列番号41）、及びCD70（配列番号36又は37）を標的化するsgRNAを含有する3種の異なるCas9：sgRNA RNP複合体により電気穿孔された。TRAC座位でのDNA二重鎖切断は、キメラ抗原受容体カセット（遺伝子発現に関する-/+調節エレメント）に隣接するTRAC座位に対して右及び左の相同性アームを含有するAAV6に送達されるDNA鋳型（配列番号43；配列番号44）（配列番号45のアミノ酸配列を含む抗CD70 CARをコードする）による相同組換え修復によって修復された。

10

【0605】

得られた改変T細胞は、3X KO (TRAC- / 2M- / CD70-) 抗CD70 CAR+ T細胞である。CD70+膵臓癌細胞株によって引き起こされる疾患を回復させるこれらの抗CD70 CAR+ T細胞の能力は、Translational Drug Development, LLC (Scottsdale, AZ) によって利用される方法を使用して、NOGマウスにおいて評価された。簡潔には、12頭の5~8週齢雌、CIEA NOG (NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>I12rg<sup>tm1Sug</sup>/JicTac) マウスは、試験の開始の5~7日前に病原体を含まない条件下で維持された、換気されたマイクロアイソレーターケージにおいて個別に飼育された。マウスは、右後側腹部において5x10<sup>6</sup>個のHs766T膵臓癌細胞の皮下接種を受けた。平均腫瘍サイズが、25~75mm<sup>3</sup>（約50mm<sup>3</sup>の標的）に達したとき、マウスはさらに、表25に示されるとおりの2つの治療群に分けられた。1日目、治療群2は、表25に従って、単回の200µlの静注投与量の抗CD70 CAR+ T細胞を受容した。

20

【0606】

【表25】

表 25. 治療群

群	CAR-T	Hs766T 細胞	T細胞治療 (i.v.)	N
1	なし	5x10 <sup>6</sup> 細胞/マウス	なし	5
2	3X KO (CD70,) 抗CD70 CAR+ T細胞	5x10 <sup>6</sup> 細胞/マウス	1x10 <sup>7</sup> 細胞/マウス	5

30

【0607】

腫瘍体積は、治療開始日から週に2回測定された。注射後15日目までに、抗CD70 CAR T細胞で治療された腫瘍は、全ての未治療の動物において腫瘍体積の減少を示し始めた。抗CD70 CAR+ T細胞による治療は、試験された全てのマウスにおいてCD70+膵臓癌腫瘍のサイズを効率的に減少させ（<37mm<sup>3</sup>）、試験の期間（67日まで）にさらなる増殖の形跡を有しなかった（図42C）。これらのデータは、3X KO (TRAC- / 2M- / CD70-) 抗CD70 CAR+細胞が、確立されたHs766T膵臓癌異種移植片に対する強力な活性及び治療開始後60日を超える耐久性のある応答を有してインビゴでヒトCD70+膵臓癌腫瘍の退縮を誘導することを実証している。

40

【0608】

皮膚T細胞リンパ腫腫瘍異種移植モデルにおける治療

T細胞リンパ腫を除去する抗CD70 CARを発現するT細胞の能力は、マウスにおける皮下T細胞リンパ腫 (Hu T78) 腫瘍異種移植モデルを使用してインビゴで評価された。

50

【0609】

CRISPR/Cas9及びAAV6を、上のとおりを使用して（例えば、実施例3を参照のこと）、CD70を標的化するCARコンストラクト（配列番号43；配列番号44）を使用してTRAC座位からの同時の発現を伴ってTCR、2M、CD70の発現を欠くヒトT細胞を作製した。この実施例において、活性化T細胞はまず、TRAC（配列番号40）、2M（配列番号41）、及びCD70（配列番号36又は37）を標的化するsgRNAを含有する3種の異なるCas9：sgRNA RNP複合体により電気穿孔された。TRAC座位でのDNA二重鎖切断は、キメラ抗原受容体カセット（遺伝子発現に関する-/+調節エレメント）に隣接するTRAC座位に対して右及び左の相同性アームを含有するAAV6に送達されるDNA鋳型（配列番号43；配列番号44）（配列番号45のアミノ酸配列を含む抗CD70 CARをコードする）による相同組換え修復によって修復された。

10

【0610】

得られた改変T細胞は、3X KO (TRAC - / 2M - / CD70 - ) 抗CD70 CAR+ T細胞である。CD70+ T細胞リンパ腫細胞株によって引き起こされる疾患を回復させるこれらの抗CD70 CAR+ T細胞の能力は、Translational Drug Development, LLC (Scottsdale, AZ) によって利用される方法を使用して、NOGマウスにおいて評価された。簡潔には、12頭の5~8週齢雌、CIEA NOG (NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>I12rgtm1Sug/JicTac) マウスは、試験の開始の5~7日前に病原体を含まない条件下で維持された、換気されたマイクロアイソレーターケージにおいて個別に飼育された。マウスは、右後側腹部において3x10<sup>6</sup>個のHuT78 T細胞リンパ腫細胞の皮下接種を受けた。平均腫瘍サイズが、25~75 mm<sup>3</sup> (約50 mm<sup>3</sup>の標的) に達したとき、マウスはさらに、表26に示されるとおりの2つの治療群に分けられた。1日目、治療群2は、表26に従って、単回の200 µlの静注投与量の抗CD70 CAR+ T細胞を受容した。

20

【0611】

【表26】

表 26. 治療群

群	CAR-T	HuT78 細胞	T細胞治療 (i.v.)	N
1	なし	3x10 <sup>6</sup> 細胞/マウス	なし	5
2	3X KO (CD70,) 抗 CD70 CAR+ T細胞	3x10 <sup>6</sup> 細胞/マウス	1x10 <sup>7</sup> 細胞/マウス	4

30

【0612】

腫瘍体積は、治療開始日から週に2回測定された。注射後12日目までに、抗CD70 CART細胞で治療された腫瘍は、全ての未治療の動物において腫瘍体積の減少を示し始めた。抗CD70 CAR+ T細胞による治療は、15日目に試験された全てのマウスにおいてCD70+ T細胞リンパ腫腫瘍のサイズを効率的に減少させた（図42C）。これらのデータは、3X KO (TRAC - / 2M - / CD70 - ) 抗CD70 CAR+ 細胞が、確立されたHuT78 T細胞リンパ腫異種移植片に対する強力な活性を有してインビボでヒトCD70+ T細胞リンパ腫腫瘍の退縮を誘導することを実証している。

40

【0613】



【表 2 7 - 2】

19	4-1BB アミノ酸 配列	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL
20	CD28 アミノ酸 配列	SKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
21	CD3-z ヌクレオチド 配列	CGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCATATCAGCAAG GACAGAATCAGCTGTATAACGAACTGAATTTGGGACGCCGCGAGGA GTATGACGTGCTTGATAAACGCCGGGGGAGAGACCCGGAATGGGG GGTAAACCCCGAAGAAAGAATCCCAAGAAGGACTCTACAATGAAC TCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTCAGAAATAGGTATGAA GGGCGAACGACGACGGGGAAAAGGTCACGATGGCCTCTACCAAGG GTTGAGTACGGCAACCAAAGATACGTACGATGCACTGCATATGCAG GCCCTGCCTCCCAGA
22	CD3-z アミノ酸 配列	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGG KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGYQGLS TATKDTYDALHMQALPPR
23	CD70 sgRNA (E1_T1)	UCACCAAGCCCGCGACCAAUguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaauaggcuag uccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcUUUU
24	CD70 sgRNA (E1_T3)	AUCACCAAGCCCGCGACCAAUguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaauaggcuag uccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcUUUU
25	CD70 sgRNA (E1_T4)	CGGUGCGGCGCAGGCCCUUguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaauaggcuag uccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcUUUU
26	CD70 sgRNA (E1_T7)	GCUUUGGUCCCAUUGGUCGCguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaauaggcuag uccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcUUUU
27	CD70 sgRNA (E1_T8)	GCCCGCAGGACGCACCCAAUguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaauaggcuag uccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcUUUU
28	CD70 sgRNA (E1_T10)	GUGCAUCCAGCGCUUCGCACguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaauaggcuag uccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcUUUU
29	CD70 sgRNA (E3_T1)	CAGCUACGUAUCCAUCGUGAguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaauaggcuag uccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcUUUU
30	TRAC sgRNA	AGAGCAACAGUGCUGUGGCCguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaauaggcuag uccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcUUUU
31	β2M sgRNA	GCUACUCUCUCUUUCUGGCCguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaauaggcuag uccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcUUUU
32	PD-1 sgRNA	CUGCAGCUUCUCCAACACUguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaauaggcuag uccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcUUUU
33	CD70 sgRNA (E1_T1)	U*C*A*CCAAGCCCGCGACCAAUguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaauaggc uaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcU*U*U*U
34	CD70 sgRNA (E1_T3)	A*U*C*ACCAAGCCCGCGACCAAUguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaauaggc uaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcU*U*U*U

10

20

30

40

【 0 6 1 5 】

【表 2 7 - 3】

35	CD70 sgRNA (E1_T4)	C*G*G*UGCGGCGCAGGCCCUAUuuuuagagcuagaaauagcaaguuuuuuuuagggc uaguccguuuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcU*U*U*U
36	CD70 sgRNA (E1_T7)	G*C*U*UUGGUCCCAUUGGUCCGcuuuuagagcuagaaauagcaaguuuuuuuuagggc uaguccguuuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcU*U*U*U
37	CD70 sgRNA (E1_T8)	G*C*C*CGCAGGACGCACCCAUAUuuuuagagcuagaaauagcaaguuuuuuuuagggc uaguccguuuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcU*U*U*U
38	CD70 sgRNA (E1_T10)	G*U*C*CAUCCAGCGCUUCGCACguuuuagagcuagaaauagcaaguuuuuuuuagggc uaguccguuuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcU*U*U*U
39	CD70 sgRNA (E3_T1)	C*A*G*CUACGUAUCCAUCGUGAGuuuuuagagcuagaaauagcaaguuuuuuuuagggc uaguccguuuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcU*U*U*U
40	TRAC sgRNA	A*C*A*GCAACAGUGCUGUGGCCuuuuuagagcuagaaauagcaaguuuuuuuuagggc cuaguccguuuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcU*U*U*U
41	β2M sgRNA	G*C*U*ACUCUCUCUUUCUGGCCuuuuuagagcuagaaauagcaaguuuuuuuuagggc uaguccguuuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcU*U*U*U
42	PD-1 sgRNA	C*U*G*CAGCUUCUCCAACACAUuuuuuagagcuagaaauagcaaguuuuuuuuagggc uaguccguuuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcU*U*U*U
43	CD70 rAAV  (41BBを 伴う CD70B scFV)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGC GTCGGGCGACCTTTGGTCCCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCG CAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCCCTGCGGCCGC ACGCGTGAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTATAT CGAGTAAACGGTAGTGTGGGGCTTAGACGCAGGTGTTCTGATTTAT AGTTCAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGAT AGATTTCCCAACTTAATGCCAACATACCATAAACCTCCCATTCTGCT AATGCCCAGCCTAAGTTGGGGAGACCACTCCAGATTCCAAGATGTA CAGTTTGCTTTGCTGGGCCTTTTTCCCATGCCCTGCCTTTACTCTGCCA GAGTTATATTGCTGGGGTTTTGAAGAAGATCCTATTAAATAAAAAGA ATAAGCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTTCCAGGTTTCCTTGAGTG GCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGAAATCATGGCCCTCTT GGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCAC GAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACC GTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTGTCCATCACTGGCAT CTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGT CCTAACCTGATCCTCTTGTCCACAGATATCCAGAACCCTGACCCT GCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAATCCAGTGACAAAGTCTGTCT GCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAATGTGTACAAAAGTAAG GATTCTGATGTATATACAGACAAAACCTGTGCTAGACATGAGGT CTATGGACTTCAGGCTCCGGTGCCTGTCAGTGGGCAGAGCGCAT CGCCACAGTCCCGGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCCGGCAATTGAAC CGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAACCTGGGAAAAGTGATGTC GTGTAAGTGGCTCCGCTTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATAT AAGTGCAGTAGTCCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCG CCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCTCCGCGGGCCCTGGCCT CTTTACGGGTTATGGCCCTTGGCTGCTTGAATTACTTCCACTGGCT GCAGTACGTGATTTCTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGG GAGAGTTCGAGGCCCTTGCCTTAAGGAGCCCTTCGCCTCGTGCTTG AGTTGAGGCCCTGGCCTGGGGCGCTGGGGCCGCCCGTGCGAATCTGG TGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTTCGATAAGTCTCTAGCCATT TAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAG

10

20

30

40

【 0 6 1 6 】

50

【表 2 7 - 4】

	<p>TCTTGTA AATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTG  GGGCCGCGGGCGGGCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTT  GGCGAGGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGG  GTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCG  CGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCCGGTCGGCACC  AGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGG  AGCTCAAAATGGAGGACGCGGGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAG  TCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTCCCGTCTCAGCCGTCGTTT  ATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCAGGCACCTCGATTAG  TTCTCGAGCTTTGGAGTACGTCGCTTTAGGTTGGGGGAGGGGTT  TTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTT  AGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTTCTCCTTGGAAATTTGCCCTTTT  GAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAG  TTTTTTCTTCCATTTCAAGGTGTCGTGACCACCATGGCGCTTCCGGTG  ACAGCACTGCTCCTCCCTTGGCGCTGTTGCTCCACGCAGCAAGGCC  GCAGGTCCAGTTGGTGCAAAGCGGGGCGGAGGTGAAAAAACCCGG  CGCTTCCGTGAAGGTGTCCTGTAAGGCGTCCGGTTATACGTTACGA  ACTACGGGATGAAATGGGTTCGCCAAGCGCCGGGGCAGGGACTGAA  ATGGATGGGGTGGATAAATACCTACACCGGCAACCTACATACGCC  GACGCTTTTAAAGGGCGAGTCACTATGACGCGCGATACCAGCATAT  CCACCGCATAACATGGAGCTGTCCCGACTCCGGTCAGACGACACGG  TGTCTACTATTGTGCTCGGGACTATGGCGATTATGGCATGGACTACT  GGGGTCAGGGTACGACTGTAACAGTTAGTAGTGGTGGAGGCGGCAG  TGGCGGGGGGGGAAGCGGAGGAGGGGGTTCTGGTGACATAGTTATG  ACCCAATCCCCAGATAGTTGGCGGTTTCTCTGGGCGAGAGGGCAA  CGATTAATTGTCGCGCATCAAAGAGCGTTTCAACGAGCGGATATTCT  TTTATGCATTGGTACCAAGCAAAAACCCGGACAACCGCCGAAGCTGC  TGATCTACTTGGCTTCAAATCTTGAGTCTGGGGTGCCGGACCGATTT  TCTGGTAGTGAAGCGGAACCTGACTTTACGCTCACGATCAGTTCACT  GCAGGCTGAGGATGTAGCGGTCTATTATTGCCAGCACAGTAGAGAA  GTCCCCGGACCTTCGGTCAAGGCACGAAAAGTAGAAAATAAAAGTG  TGCTGCCTTTGTCCCGGTATTTCTCCAGCCAAACCGACCACT  CCCGCCCCGCGCCCTCCGACACCCGCTCCACCATCGCCTCTCAACC  TCTTAGTCTTCGCCCCGAGGCATGCCGACCCGCCCGGGGGTGCTG  TTCATACGAGGGGCTTGGACTTCGCTTGTGATATTTACATTTGGGCT  CCGTTGGCGGGTACGTGCGGGCTCCTTTTGTGTCACCTCGTTATTACT  TTGTAATGTAATCACAGGAATCGCAAACGGGGCAGAAAGAAAC1CC  TGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAA  GAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGA  GGATGTGAACCTGCGAGTGAAGTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGG  CATATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAACGAACTGAATTTGGG  ACGCCGCGAGGAGTATGACGTGCTTGATAAACCGCCGGGGGAGAGAC  CCGAAAATGGGGGIAAAACCCCGAAGAAAAGAAATCCCCAAGAAGGA  CTCTACAATGAACTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTCAG  AAATAGGTATGAAGGGCGAACGACGACGGGAAAAGGTCACGATG  GCCTTACCAAGGGTTGAGTACGGCAACCAAAGATACGTACGATGC  ACTGCATATGCAGGCCCTGCCTCCAGATAATAATAAAATCGCTATC  CATCGAAGATGGATGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGGAGCAACAAAT  CTGACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAA  GACACCTTCTCCCAGCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGC  AGGCTGTTTCTTGCTTACGGAATGGCCAGGTTCTGCCAGAGCTCT  GGTCAATGATGTCTAAAACCTCTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATC  CATTGCCACAAAACCCCTTTTTACTAAGAAAACAGTGAGCCTTGT  CTGGCAGTCCAGAGAATGACACGGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAA  GGTGGCAGGAGAGGGCAGTGGCCAGCCTCAGTCTCTCCAACCTGA  GTTCTGCTGCCTGCCTTTGCTCAGACTGTTTGGCCCTTACTGCTCT</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p> <p>40</p>
--	---	---

【 0 6 1 7 】



【表 2 7 - 6】

		<p>TCAGGTGTCGTGACCACCATGGCGCTTCCGGTGACAGCACTGCTCCT  CCCCTTGGCGCTGTTGCTCCACGCAGCAAGGCCGAGGTCCAGTTGG  TGCAAAGCGGGGCGGAGGTGAAAAAACCCGGCGCTTCCGTGAAGGT  GTCCTGTAAGGCGTCCGGTTATACGTTACGAACTACGGGATGAATT  GGGTTTCGCCAAGCGCCGGGCAGGGACTGAAATGGATGGGGTGGAT  AAATACCTACACCGGCGAACCTACATACGCCGACGCTTTTAAAGGG  CGAGTCACTATGACGCGGATACCAGCATATCCACCGCATACATGG  AGCTGTCCCAGCTCCGGTCAGACGACACGGCTGTCTACTATTGTGCT  CGGGACTATGGCGATTATGGCATGGACTACTGGGGTCAGGGTACGA  CTGTAACAGTTAGTAGTGGTGGAGGCGGCAGTGGCGGGGGGGGAAG  CGGAGGAGGGGTTCTGGTGACATAGTTATGACCCAATCCCCAGAT  AGTTTGGCGGTTTCTCTGGGCGAGAGGGCAACGATTAATTGTCCGCG  ATCAAAGAGCGTTTCAACGAGCGGATATTCCTTTATGCATTGGTACC  AGCAAAAACCCGGACAACCCGCCGAAGCTGCTGATCTACTTGGCTTC  AAATCTTGAGTCTGGGGTCCCGACCGATTTTCTGGTAGTGGAAGCG  GAACTGACTTTACGCTCACGATCAGTTCAGTGCAGGCTGAGGATGTA  GCGGTCTATTATTGCCAGCACAGTAGAGAAGTCCCTGGACCTTCGG  TCAAGGCACGAAAGTAGAAATTTAAAGTGCTGCTGCCTTTGTCCCG  GTATTTCTCCAGCCAAACCGACCAGACTCCCGCCCCGCGCCCTCC  GACACCCGCTCCCACCATCGCCTCTCAACCTCTTAGTCTTCGCCCG  AGGCATGCCGACCCGCCCGGGGGTGTGTTTCATACGAGGGGCTT  GGACTTCGCTTGTGATATTTACATTTGGGCTCCGTTGGCGGGTACGT  GCGGGCTCCTTTTGTGTCACTCGTTATTACTTTGTATTGTAATCACA  GGAATCGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACA  ACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGT  AGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGCGAG  TGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCATATCAGCAAGGACA  GAATCAGCTGTATAACGAACTGAATTTGGGACGCCGCGAGGAGTAT  GACGTGCTTGATAAACGCCGGGGGAGAGACCCGGAAATGGGGGGTA  AACCCCGAAGAAAGAATCCCCAAGAAGGACTCTACAATGAACTCCA  GAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTCAGAAATAGGTATGAAGGGC  GAACGACGACGGGGAAAAGGTCACGATGGCCCTACCAAGGGTGA  GTACGGCAACCAAAGATACGTACGATGCACTGCATATGCAGGCCCT  GCCTCCCAGATAATAATAAAATCGCTATCCATCGAAGATGGATGTGT  GTTGGTTTTTGTGTGTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAA  ACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGC  CCAGTAAGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGCAGGCTGTTTCTTGGTTC  AGGAATGGCCAGGTTCTGCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAA  ACTCCTCTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATFGCCACCAAAACCC  TCTTTTACTAAGAAAACAGTGAGCCTTGTCTGGCAGTCCAGAGAAT  GACACGGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGCA  CGTGGCCCAGCCTCAGTCTTCCAAGTGGTTCCTGCCTGCCTGCCTT  TGCTCAGACTGTTTGGCCCTTACTGCTCTTCTAGGCCTCATTCTAAGC  CCCTTCTCCAAGTTGCCCTCTCTTATTCTCTCTCTGCCCCAAAAAT  CTTTCCAGCTACTAAGTCACTCAGTCTCACGCAGTCACTCATAACCCA  CCAATCACTGATTGTGCCGGCACATGAATGCACCAGGTGTTGAAGTG  GAGGAATTAAGAGTCAAGATGAGGGGTGTGCCAGAGGAAGCACC  ATTCTAGTTGGGGAGCCCATCTGTCAGCTGGGAAAAAGTCCAAATA  ACTTCAGATTGGAATGTGTTTTAACTCAGGGTTGAGAAAACAGCTAC  CTTCAGGACAAAAGTCAAGGAAGGGCTCTCTGAAGAAATGCTACTT  GAAGATACCAGCCCTACCAAGGGCAGGGAGAGGACCTATAGAGGG  CTGGGACAGGAGCTCAATGAGAAAAGG</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p>
45	CD70 CAR ヌクレオチド 配列	<p>ATGGCGCTTCCGGTGACAGCACTGCTCCTCCCCTTGGCGCTGTTGCT  CCACGCAGCAAGGCCGAGGTCCAGTTGGTGCAAAGCGGGGCGGAG  GTGAAAAAACCCGGCGCTTCCGTGAAGGTGCTCTGTAAGGCGTCCG</p>	40

【表 27 - 7】

	(41BBを伴う CD70B scFV)	<p>GTTATACGTTACACGAACACGGGATGAATTGGGTTTCGCCAAGCGCCG  GGGCAGGGACTGAAATGGATGGGGTGGATAAATACCTACACCGGCG  AACCTACATACGCCGACGCTTTTAAAGGGCGAGTCACTATGACGCG  CGATACCAGCATATCCACCCATACATGGAGCTGTCCCGACTCCGGT  CAGACGACACGGCTGTCTACTATTGTGCTCGGGACTATGGCGATTAT  GGCATGGACTACTGGGGTCAGGGTACGACTGTAACAGTTAGTAGTG  GTGGAGGCGGCAGTGGCGGGGGGGGAAGCGGAGGAGGGGGTTCTG  GTGACATAGTTATGACCCAATCCCCAGATAGTTTGGCGGTTTCTCTG  GGCGAGAGGGCAACGATTAATTGTGCGGCATCAAAGAGCGTTTCAA  CGAGCGGATATTCTTTTATGCATTGGTACCAGCAAAAACCCGGACAA  CCGCCGAAGCTGCTGATCTACTTGGCTTCAAATCTTGAGTCTGGGGT  GCCCGACCGATTTTCTGGTAGTGGAAAGCGGAACTGACTTTACGCTCA  CGATCAGTTCACTGCAGGCTGAGGATGTAGCGGTCTATTATTGCCAG  CACAGTAGAGAAGTCCCCTGGACCTTCGGTCAAGGCACGAAAAGTAG  AAATTTAAAGTGTCTGCTGCCTTTGTCCCAGTATTTCTCCAGCCAAA  CCGACCACGACTCCCGCCCGCGCCCTCCGACACCCGCTCCCACCAT  CGCCTCTCAACCTCTTAGTCTTCGCCCGAGGCATGCCGACCCGCCG  CCGGGGGTGCTGTTTACATACGAGGGGCTTGGACTTCGCTTGTGATATT  TACATTTGGGCTCCGTGGCGGGTACGTGCGGGCTCCTTTGTGTGTC  ACTCGTTATTACTTTGTATTGTAATCACAGGAATCGCAAACGGGGCA  GAAAGAACTCCTGTATATATTTCAAACACCATTTATGAGACCAGTA  CAAATACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAG  AAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGCGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGC  AGACGCTCCGGCATATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAACGAA  CTGAATTTGGGACGCCCGGAGGAGTATGACGTGCTTGATAAACGCC  GGGGGAGAGACCCGAAATGGGGGGTAAACCCCGAAGAAAGAATC  CCCAAGAAGGACTCTACAATGAACTCCAGAAGGATAAGATGGCGGA  GGCCTACTCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAACGACGACGGGGAAA  AGGTCACGATGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTACGGCAACCAAAGAT  ACGTACGATGCACTGCATATGCAGGCCCTGCCTCCAGATAA</p>	10
46	CD70 CAR アミノ酸 配列  (41BBを伴う CD70B scFV)	<p>MALPVTALLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG  YTFTNYGMNWVRQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYADAFKGRVTMT  RDTISISTAYMELSRLSDDTAVYYCARDYGDYGMDYWGQTTVTVSS  GGGGSGGGSGGGSGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSG  YFMMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVDRPSGSGSGTDFLTISLQ  AEDVAVYYCQHSREVPWTFGQGTKVEIKSAAAFVPLPAKPTTTPAP  RPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAFLAGTC  GVLLLSLVITLYCNHRNRKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCR  FPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK  RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK  GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR</p>	30
47	CD70A scFv ヌクレオチド 配列	<p>GATATAGTTATGACCCAATCACCCGATAGTCTTGGCGGTAAGCCTGGG  GGAGCGAGCAACAATAAACTGTGCGGCATCAAAATCCGTCAGTACA  AGCGGGTATTTCATTCATGCACTGCTATCAACAGAAAACCCGGTCAGCC  ACCCAAGTCTCTGATTTATCTTGGCTCTAATCTTGAGTCCGGCGTCCC  AGACCGGTTTTCCGGCTCCGGGAGCGGCACGGATTTACTCTTACTA  TTTCTAGCCCTCAGGCCGAAGATGTGGCGGTATACTACTGCCAGCAT  TCAAGGGAAGTTCCTTGGACGTTCCGGTCAGGGCACGAAAGTGGAAA  TTAAAGGCGGGGGGGGATCCGCGCGGGGGAGGGTCTGGAGGAGGTG  GCAGTGGTCAGGTCCAACCTGGTGCAGTCCGGGGCAGAGGTAAGAAA  ACCCGCGCGTCTGTTAAGGTTTCATGCAAGGCCAGTGGATATACTT  TCACCAATTACGGAATGAACTGGGTGAGGCAGGCCCTGGTCAAGG  CCTGAAATGGATGGGATGGATAAACACGTACACCGGTGAACCTACC  TATGCCGATGCCTTAAGGGTCCGGTTACGATGACGAGAGACACCTC</p>	40

【 0 6 2 0 】

【表 2 7 - 8】

		CATATCAACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGATTGAGGAGTGACGAT ACGGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGACTACGGCGATTATGGCATGG ATTACTGGGGCCAGGGCACTACAGTAACCGTTCCAGC	
48	CD70A scFv アミノ酸配列 (リンカーは 下線が 引かれる)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSFMHWYQQKPGQPP KLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHSREV PWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGSGGGSGQVQLVQSGAEVKKPGASV KVSKASGYFTFTNYGMNWVRQAPGQGLKWMGWINTYTGPEPTADAF KGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARDYGDYGM DYWGQ GTTVTVSS	10
49	CD70B scFv ヌクレオチド 配列	CAGGTCCAGTTGGTGCAAAGCGGGGCGGAGGTGAAAAAACC CGGCG CTTCCGTGAAGGTGCTCTGTAAGGCGTCCGGTTATACGTTACGAAC TACGGGATGAATTGGGTTCCGCAAGCGCCGGGGCAGGGACTGAAAT GGATGGGGTGGATAAATACCTACACCGGCGAACCTACATACGCCGA CGCTTTTAAAGGGCGAGTCACTATGACGCGGATACCAGCATATCCA CCGCATACATGGAGCTGTCGCGACTCCGGTCAGACGACACGGCTGTC TACTATTGTGCTCGGACTATGGCGATTATGGCATGGACTACTGGGG TCAGGGTACGACTGTAACAGTTAGTAGTGGTGGAGGCGGCAGTGGC GGGGGGGAAGCGGAGGAGGGGGTCTGGTGACATAGTTATGACCC AATCCCAGATAGTTGGCGGTTCTCTGGGCGAGAGGGCAACGATT AATTGTCGCGCATCAAAGAGCGTTTCAACGAGCGGATATTCTTTTAT GCATTGGTACCAGCAAAAACCCGGACAACCGCCGAAGCTGCTGATC TACTTGGCTTCAAATCTTGAGTCTGGGGTGCCGACCGATTTCTGG TAGTGGAAAGCGGAACTGACTTTACGCTCACGATCAGTTCACTGCAGG CTGAGGATGTAGCGGTCTATTATGCCAGCACAGTAGAGAAGTCCCC TGGACCTTCGGTCAAGGCACGAAAGTAGAAAATTTAAA	20
50	CD70B scFv アミノ酸配列 (リンカーは 下線が 引かれる)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFTNYGMNWVRQAPGQGLK WMGWINTYTGPEPTADAFKGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAV YYCARDYGDYGM DYWGQTTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGDIVMT QSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSFMHWYQQKPGQPPKLLIYL ASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHSREV PWTFGQGTKVEIK	
51	CD70 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFTNYGMNWVRQAPGQGLK WMGWINTYTGPEPTADAFKGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAV YYCARDYGDYGM DYWGQTTVTVSS	
52	CD70 VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSFMHWYQQKPGQPP KLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHSREV PWTFGQGTKVEIK	30
53	リンカー	GGGGSGGGSGGGSGG	
54	BCMA rAAV	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGC GTCCGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCG CAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGC ACGCGTGAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTATAT CGAGTAAACGGTAGTGTGGGGCTTAGACGCAGGTGTTCTGATTTAT AGTTCAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCTGGTAATGTGAT AGATTTCCCAACTTAATGCCAACATAACCATAAACCTCCCATCTGCT AATGCCAGCCTAAGTTGGGGAGACCCTCCAGATTCCAAGATGTA CAGTTTGCTTTGCTGGGCCTTTTTCCCATGCCTTACTCTGCCA GAGTTATATTGCTGGGGTTTTGAAGAAGATCCTATTAATAAAAAGAA TAAGCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTTCAAGTTTCTTGAGTGG	40

【 0 6 2 1】

【表 2 7 - 9】

		<p>CAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGG          CCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGA          GCAGCTGGTTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACCGT          GACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTGTCCATCACTGGCATCT          GGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCC          TAACCCTGATCCTCTTGTCCACAGATATCCAGAACCCTGACCCTGC          CGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCC          TATTCACCGATTTTGATTTCTCAAACAAATGTGTACAAAAGTAAGGAT          TCTGATGTGTATATCACAGACAAAACCTGTGCTAGACATGAGGTCTAT          GGACTTCAGGCTCCCGTGGCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCC          CACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTGGCAATTGAACCGGT          GCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGT          ACTGGCTCCGCCTTTTTCCCAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGT          GCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCCGAACGGGTTTGGCCGCC          AACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTCCCGCGGGCTGGCCTCTTTA          CGGGTTATGGCCCTTGCCTGCCTTGAATTACTTCCACTGGCTGCAAT          ACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGT          TCGAGGCCCTTGCCTTAAGGAGCCCTTCGCTCGTGTGAGTTGA          GGCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCTGCCAATCTGGTGGCAC          CTTCCGCGCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAAT          TTTTGATGACCTGCTGCGACCGCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTA          AATGCGGGCAAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGC          GGGCGGCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTCCGGCAGG          CGGGGCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTC          AAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCTCGCGCCGCCGTGTATC          GCCCCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCCGGACCAGTTGCGT          GAGCGGAAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAA          ATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCAACCACA          CAAAGGAAAAGGGCCTTCCGTCCCTAGCCGTCGCTTCATGTGACTC          CACGGAGTACCGGGCGCCGTCACAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCT          TTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTTATGCGATG          GAGTTTCCCCACACIGAGTGGGTTGGAGACTGAAAGTTAGGCCAGCTT          GGCACCTGATGTAATTCCTTGGAAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGAT          CTTGGTTCAATCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTTC          CATTTCAGGTGTCTGACCACCATGGCGCTTCCGGTGACAGCACTGC          TCCTCCCCTTGGCGCTGTTGCTCCACGCAGCAAGGCCGAGGTGCAG          CTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGCTCAAGAAGCCCGGAGCCTCCGTGA          AAGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCAACACCCTGACCAACTACGTGAT          CCACTGGGTGAGACAAGCCCCCGGCCAAAGGCTGGAGTGGATGGGC          TACATCCTGCCCTACAACGACCTGACCAAGTACAGCCAGAAGTTCCA          GGGCAGGGTGACCATCACCAGGGATAAGAGCGCCTCCACCGCCTAT          ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGGAGCGAGGACACCGCTGTGTACTACT          GTACAAGGTGGGACTGGGACGGCTTCTTGACCCCTGGGGCCAGGG          CACAACAGTTGACCGTTCAGCAGCGGGCGGGAGGCAGCGGGCGGGG          CGGCAGCGGGCGGAGGCGGAAGCGAAATCGTGATGACCCAGAGCCCC          GCCACACTGAGCGTGAGCCCTGGCGAGAGGGCCAGCATCTCCTGCA          GGGTAGCCAAAAGCCTGGTGCACAGCAACGGCAACACCCACCTGCA          CTGGTACCAGCAGAGACCCGACAGGCTCCAGGCTGCTGATCTAC          AGCGTGAGCAACAGGTTCTCCGAGGTGCCAGGTTTAGCGGCA          GCGGAAGCGGCACCGACTTTACCTGACCATCAGCAGCGTGGAGTC          CGAGGACTTCGCCGTGTATTACTGCAGCCAGACCAGCCACATCCCTT          ACACCTTCGGCGGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAAGTGTCTGTGC          CTTTGTCCCGTATTTCTCCAGCCAAACCGACCAGACTCCCGCCC          CGCGCCCTCCGACACCCGCTCCACCATCGCTCTCAACCTCTTAGT          CTTCCGCCCGAGGCATGCCGACCCGCCCGGGGGTGTGTTCAATAC          GAGGGCTTGGACTTCGCTTGTGATATTTACATTTGGGCTCCGTTGG</p>	
			10
			20
			30
			40

【 0 6 2 2】

10

20

30

40

50

【表 2 7 - 1 0】

		<p>CGGGTACGTGCGGGCGTCCTTTTGTGTGTCACCTCGTTATTACTTTGTATT  GTAATCACAGGAATCGCAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATAT  ATTCAAACAACCATTTATGAGACCCAGTACAACTACTCAAGAGGGAA  GATGGCTGTAGCTGCCGATTTCAGAAAGAAGAAGGAGGATGTG  AACTGCCGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCATATCA  GCAAGGACAGAATCAGCTGTATAACGAACTGAATTTGGGACGCCGC  GAGGAGTATGACGTGCTTGATAAACGCCGGGGGAGAGACCCGGAAA  TGGGGGGTAAACCCCGAAGAAAGAATCCCCAAGAAGGACTCTACAA  TGAACTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTCAGAAATAGGT  ATGAAGGGCGAACGACGACGGGGAAAAGGTCACGATGGCCTCTACC  AAGGGTTGAGTACGGCAACCAAAAGATACGTACGATGCACTGCATAT  GCAGGCCCTGCCTCCAGATAATAATAAAAATCGCTATCCATCGAAG  ATGGATGTGTGTTGTTTTTTGTGTGTGGAGCAACAAATCTGACTTT  GCATGTGCAAACGCCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTT  CTTCCCGAGCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGCAGGCTGTT  TCCTTGCTCAGGAATGGCCAGGTTCTGCCAGAGCTCTGGTCAATG  ATGTCTAAAACCTCCTCTGATTGGTGGTCTCGGCCCTTATCCATTGCCAC  CAAAACCCCTCTTTTACTAAGAAAACAGTGGCCTTGTCTGGCAGTC  CAGAGAATGACACGGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAGG  AGAGGGCACGTGGCCAGCCTCAGTCTCTCCAAGTGAAGTTCTGCTT  GCCTGCCTTTGCTCAGACTGTTTTGCCCTTACTGCTCTTCTAGGCCCT  ATTCTAAGCCCCTTCTCCAAGTTGCCTCTCCTTATTTCTCCCTGTCTG  CCAAAAAATCTTTCCAGCTACTAAGTCAGTCTCACGCAGTCACTC  ATTAACCCACCAATCACTGATTGTGCCGGCACATGAATGCACCAGGT  GTTGAAGTGGAGGAATTAAGAAAGTCAGATGAGGGGTGTGCCAGAG  GAAGCACCATTCTAGTTGGGGGAGCCCATCTGTGAGCTGGGAAAAG  TCCAAATAACTTCAGATTGGAATGTGTTTTAACTCAGGGTTGAGAAA  ACAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAGGGAAAGGGCTCTCTGAAGAAA  TGCTACTTGAAGATACCAGCCCTACCAAGGGCAGGGAGAGGACCCT  ATAGAGGGCTGGGACAGGAGCTCAATGAGAAAAGGTAACCACGTGGC  GACCGAGGCTGCAGCGTCTGCTCCCTAGGAACCCCTAGTGATGGA  GTGGCCACICCCICICIGCCGCGTICGICCGICACIGAGGCCGGGC  GACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGCCTCAGT  GAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG</p>	<p>10</p> <p>20</p>
55	BCMA RHA ~ LHA	<p>GAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTATATCGAGTA  AACGGTAGTGCTGGGGCTTAGACGCAGGTGTTCTGATTTATAGTTCA  AAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGATAGATTT  CCCAACTTAATGCCAACATACCATAAACCTCCCAATCTGCTAATGCC  CAGCCTAAGTTGGGGAGACCCTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTG  CTTTGCTGGGCCTTTTTCCCATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTTAT  ATTGCTGGGGTTTTGAAGAAGATCCTATTAATAAAAAGAATAAGCA  GTATTAATAAGTAGCCCTGCATTTTCAGGTTTCCCTGAGTGGCAGGCC  AGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGGCCAAGA  TTGATAGCTTGTGCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCT  GGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACCCGTGACTTG  CCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTGTCCATCACTGGCATCTGGACTC  CAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGGAAAATGAGATCATGTCTTAACCC  TGATCCTCTTGTCCACAGATATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTA  CCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCA  CCGATTTTGATTCTCAAACAATGTGTACAAAAGTAAGGATTCTGAT  GTGTATATCACAGACAAAACCTGTGCTAGACATGAGGTTCTATGGACTT  CAGGCTCCGGTCCCGTCACTGAGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGT  CCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCCGCAATTGAACCGGTGCCTAG  AGAAGGTGGCGGGGGTAAACTGGGAAAAGTGTGCTGCTGACTGGC  TCCGCCTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTA</p>	<p>30</p> <p>40</p>

【表 2 7 - 1 1】

	<p>           GTGCGCGTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACA            GGTAAGTGCCGTGTGTGGTCCCGCGGGCTGGCCTCTTTACGGGTT            ATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACTGGCTGCAGTACGTGA            TTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGG            CCTTGGCCTTAAGGAGCCCTTCGCCTCGTGCTTGAAGTTGAGGCCGTG            GCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGC            GCCTGTCTCGCTGCTTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGA            TGACCTGCTGCGACGCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGC            GGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCCGGTTTTTGGGGCCCGGGGGC            GCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTCCGCGAGGCGGGG            CCTGCGAGCGGGCCACCGAGAATCGGACGGGGTAGTCTCAAGCT            GGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCC            GCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGTCCGGCACAGTTGCGTGACCG            GAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAAATGGA            GGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAATCACCCACACAAA            GGAAAAGGGCCTTCCGTCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACG            GAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTG            GAGTACGTCGTCTTATAGGTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGT            TTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCA            CTTGATGTAATTCCTTGGAAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTG            GTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCATT            TCAGGTGTGCTGACCACCATGGCGCTTCCGGTGACAGCACTGCTCCT            CCCCTTGGCGCTGTGCTCCACGCAGCAAGGCCGAGGTGCAGCTGG            TGCAGAGCGGAGCCGAGCTCAAGAAGCCCCGAGCCTCCGTGAAGGT            GAGCTGCAAGGCCAGCGGCAACACCCTGACCAACTACGTGATCCAC            TGGGTGAGACAAGCCCCCGGCCAAAGGCTGGAGTGGATGGGTACA            TCCTGCCCTACAACGACCTGACCAAGTACAGCCAGAAAGTTCCAGGG            CAGGGTGACCATCACCAGGGATAAGAGCGCCTCCACCGCCTATATG            GAGCTGAGCAGCCTGAGGAGCGAGGACACCGCTGTGTACTACTGTA            CAAGGTGGGACTGGGACGGCTTCTTTGACCCCTGGGGCCAGGGCAC            AACAGTGACCGTCAGCAGCGGCGGCGGAGGACGCGGCGGCGGGC            CAGCGCGGAGGCGGAAGCGAAAICGIGATGACCCAGAGCCCGCC            ACCTGAGCGTGAGCCCTGGCGAGAGGGCCAGCATCTCCTGCAGGG            CTAGCCAAAGCCTGGTGCACAGCAACGGCAACACCCACCTGCACTG            GTACCAGCAGAGACCCGGACAGGCTCCAGGCTGCTGATCTACAGC            GTGAGCAACAGGTTCTCCGAGGTGCCAGGTTTAGCGGCACCG            GAAGCGGCACCGACTTACCCGACCATCAGCAGCGTGGAGTCCGA            GGACTTCGCCGTGTACTGTCAGCCAGACCAGCCACATCCCTTACA            CCTTCCGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAAAGTGTGCTGCTGCTTT            GTCCCGGTATTTCTCCAGCCAAACCGACCAGACTCCCGCCCCGGC            CCCTCCGACACCCGCTCCACCATCGCCTCTCAACCTCTTAGTCTTCG            CCCCAGGCATGCCGACCCGCCCGGGGGTGTGTTTCATACGAGG            GGCTTGGACTTCGCTTGTGATATTTACATTTGGGCTCCGTTGGCGGG            TACGTGGCGGCTCTTTTGTGTCACCTCGTATTAATTTGTATTTGIAA            TCACAGGAATCGCAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTC            AAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATG            GCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAAC            GCGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCATATCAGCAA            GGACAGAATCAGCTGTATAACGAACTGAATTTGGGACGCCGCGAGG            AGTATGACGTGCTTGATAAACGCCGGGGGAGAGACCCGAAATGGG            GGGTAAACCCCGAAGAAAGAATCCCCAAGAAGGACTCTACAATGAA            CTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTCAGAAATAGGTATGA            AGGGCGAACGACGACGGGGAAAAGGTCAGATGGCCTCTACCAAG            GGTTGAGTACGGCAACCAAAGATACGTACGATGCACTGCATATGCA            GGCCCTGCCTCCAGATAATAATAAAATCGCTATCCATCGAAGATGG            ATGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCAT         </p>
--	--

10

20

30

40

【 0 6 2 4】

【表 27 - 12】

		GTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTC CCCAGCCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGCAGGCTGTTTCCT TGCTTCAGGAATGGCCAGGTTCTGCCAGAGCTCTGGTCAATGATGT CTAAAACCTCTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCACCAA AACCTCTTTTACTAAGAAAACAGTGAGCCTTGTCTGGCAGTCCAG AGAATGACACGGGAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGA GGGCACGTGGCCCAGCCTCAGTCTCTCCAAGTTCCTGCCTGCC TGCTTTGCTCAGACTGTTTGCCCTTACTGCTCTTCTAGGCCTCATI CTAAGCCCCCTTCCAAGTTGCCTCTCCTTATTTCTCCCTGTCTGCCA AAAAATCTTTCCAGCTCACTAAGTCAGTCTCACGCAGTCACTCATT AACCCACCAATCACTGATTGTGCCGGCACATGAATGCACCAGGTGTT GAAGTGGAGGAATTAAGAGTCAGATGAGGGGTGTGCCAGAGGA AGCACCATTCTAGTTGGGGGAGCCCATCTGTGAGCTGGGAAAAGTC CAAATAACTTCAGATTGGAATGTGTTTTAACTCAGGGTTGAGAAAAC AGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAGGGAAGGGCTCTCTGAAGAAAATG CTACTGAAGATACCAGCCCTACCAAGGGCAGGGAGAGGACCCTAT AGAGGCCTGGGACAGGAGCTCAATGAGAAAAGG	10
56	BCMA CAR ヌクレオチド 配列	ATGGCGCTTCCGGTGACAGCACTGCTCCTCCCCTTGGCGCTGTGCT CCACGCAGCAAGGCCCGCAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAG CTCAAGAAGCCCGGAGCCTCCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCG GCAAACACCTGACCACTACGTGATCCACTGGGTGAGACAAAGCCCC CGGCCAAAGGCTGGAGTGGATGGGCTACATCCTGCCCTACAACGAC CTGACCAAGTACAGCCAGAAGTTCAGGGCAGGGTGACCATCACC GGGATAAGAGCGCCTCCACCGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAG GAGCGAGGACACCGCTGTGTACTACTGTACAAGGTGGGACTGGGAC GGCTTCTTTGACCCTGGGGCCAGGGCAACAACAGTGACCGTCAAGCA GCGGCGGCGGAGGCAGCGGCGGCGGCGCAGCGGCGGAGGCGGAA GCGAAATCGTGATGACCCAGAGCCCCGCCACACTGAGCGTGAGCCC TGGCGAGAGGGCCAGCATCTCCTGCAGGGCTAGCCAAAGCCTGGTG CACAGCAACGGCAACACCCACCTGCACTGGTACCAGCAGAGACCCG GACAGGCTCCCAGGCTGCTGATCTACAGCGTGAGCAACAGGTTCTCC GAGGTGCCTGCCAGGTTTAGCGGCAGCGGAAGCGGCACCGACTT CCCTGACCATCAGCAGCGTGGAGTCCGAGGACTTCGCCGTGATTAC TGCAGCCAGACCAGCCACATCCCTTACACCTTCGGCGGGCGGCACCA AGCTGGAGATCAAAAGTGCTGCTGCCTTTGTCCCGGTATTTCTCCCA GCCAAACCGACCACGACTCCCGCCCCGCGCCTCCGACACCCGCTCC CACCATCGCCTCTCAACTCTTAGTCTTCGCCCCGAGGCATGCCGAC CCGCCCGGGGGGTGCTGTTTCATACGAGGGGCTTGGACTTCGCTTGT GATATTTACATTTGGGCTCCGTTGGCGGGTACGTGCGGCGTCCCTTT GTTGTCACTCGTATTACTTTGTATTGTAATCAGGAAATCGC GGGCGAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTATGAG ACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTT CCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGCGAGTGAAGTTTTCCC GAAGCGCAGACGCCTCCGGCATATCAGCAAGGACAGAAACAGCTGTA TAACGAACTGAATTTGGGACGCCGCGAGGAGTATGACGTGCTTGAT AAACGCCGGGGGAGAGACCCGGAAATGGGGGGTAAACCCCGAAGA AAGAATCCCCAAGAAGGACTCTACAATGAACTCCAGAAGGATAAGA TGCGGAGGCGCTACTCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAACGACGACG GGGAAAAGGTCACGATGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTACGGCAACC AAAGATACGTACGATGCACTGCATATGCAGGCCCTGCTCCCAGA	20 30
57	BCMA CAR アミノ酸 配列	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAELK KPGASVKVSKASGN TLTNYVIHWVRQAPGQRLEWMGYILPYNDLTKYSQK FQGRVTITRDKS ASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRWDWDGFFDPWGQGTITVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERASISCRASQSLVHSNGNTHL	40

【0625】

【表 2 7 - 1 3】

		IIWYQQRPGQAPRLLIYSVSNRFSEVPARFSGSGSGTDFLTISSVESEDF AVYYCSQTSHPYTFGGGTKLEIKSAAAFVVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPA PTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAFLAGTCGVLLLS LVITLYCNHRNRKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPPEEEE GGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVLDRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGDGL YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	
58	BCMA scFv ヌクレオチド 配列	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGCTCAAGAAGCCCGGAG CCTCCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCAACACCCTGACCAA CTACGTGATCCACTGGGTGAGACAAGCCCCCGGCCAAAGGCTGGAG TGGATGGGCTACATCCTGCCCTACAACGACCTGACCAAGTACAGCC AGAAGTTCAGGGCAGGGTGACCATCACCAGGGATAAGAGCGCCTC CACCGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGGAGCGAGGACACCGCT GTGTACTACTGTACAAGGTGGGACTGGGACGGCTTCTTTGACCCCTG GGGCCAGGGCACAAACAGTGACCGTCAGCAGCGGCGCGGAGGCAG CGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGAGGCGGAAGCGAAATCGTGATGAC CCAGAGCCCCGCCACACTGAGCGTGAGCCCTGGCGAGAGGGCCAGC ATCTCCTGCAGGGCTAGCCAAAGCCTGGTGCACAGCAACGGCAACA CCCACCTGCACTGGTACCAGCAGAGACCCGGACAGGCTCCCAGGCT GCTGATCTACAGCGTGAGCAACAGGTTCTCCGAGGTGCCTGCCAGGT TTAGCGGCAGCGGAAGCGGCACCGACTTTACCCTGACCATCAGCAG CGTGGAGTCCGAGGACTTCGCCGTGATTACTGCAGCCAGACCAGCC ACATCCCTTACACCTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAA	10
59	BCMA scFvアミノ酸 配列 (リンカーは 下線が引かれる)	QVQLVQSGAELKKPGASVKVSKASGNTLTNYVIHWVRQAPGQRLEW MGYILPYNDLTKYSQKFQGRVTITRDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYY CTRWDWDGFFDPWGQGTITVTVSS <u>GGGGSGGGGSGGGG</u> SEIVMTQSPA TI.SVSPGERASISCRASQSLVHNSGNTHLHWYQQRPGQAPRLIYYSVSN RFSEVPARFSGSGSGTDFLTISSVESEDFAVYYCSQTSHPYTFGGGTKL EIK	20
60	BCMA VH	QVQLVQSGAELKKPGASVKVSKASGNTLTNYVIHWVRQAPGQRLEW MGYILPYNDLTKYSQKFQGRVTITRDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYY CTRWDWDGFFDPWGQGTITVTVSS	
61	BCMA VL	EIVMTQSPATLSVSPGERASISCRASQSLVHNSGNTHLHWYQQRPGQAP RLLIYSVSNRFSEVPARFSGSGSGTDFLTISSVESEDFAVYYCSQTSHP YTFGGGTKLEIK	
62	CD70 VL CDR1 (Kabat)	RASKSVSTSGYSFMH	30
63	CD70 VL CDR1 (Chothia)	<u>SKSVSTSGYSF</u>	
64	CD70 VL CDR2 (Kabat)	LASNLES	
65	CD70 VL CDR2 (Chothia)	LAS	
66	CD70 VL CDR3 (Kabat)	QHSREVPWT	
67	CD70 VL CDR3	SREVPW	40

【 0 6 2 6】

【表 2 7 - 1 4】

	(Chothia)		
68	CD70 VH CDR1 (Kabat)	NYGMN	
69	CD70 VH CDR1 (Chothia)	GYTFTNYGMN	
70	CD70 VH CDR2 (Kabat)	WINTYTGEPTYADAFKG	
71	CD70 VH CDR2 (Chothia)	NTYTGE	10
72	CD70 VH CDR3 (Kabat)	DYGDYGMDY	
73	CD70 VH CDR3 (Chothia)	CARDYGDYGMDYWG	
74	BCMA VL CDR1 (Kabat)	RASQSLVHSNGNTHLH	
75	BCMA VL CDR1 (Chothia)	RASQSLVHSNGNTHLH	
76	BCMA VL CDR2 (Kabat)	SVSNR	20
77	BCMA VL CDR2 (Chothia)	SVSNR	
78	BCMA VL CDR3 (Kabat)	SQTSHIPYT	
79	BCMA VL CDR3 (Chothia)	SQTSHIPYT	
80	BCMA VH CDR1 (Kabat)	NYVIII	
81	BCMA VH CDR1 (Chothia)	GNTLTNY	30
82	BCMA VH CDR2 (Kabat)	YILPYNDLTKYSQKFQG	
83	BCMA VH CDR2 (Chothia)	LPYNDL	
84	BCMA VH CDR3 (Kabat)	WDWDGFFDP	
85	BCMA VH CDR3 (Chothia)	WDWDGFFDP	40

【 0 6 2 7】

【表 27 - 15】

86	TRAC 標的配列	AGAGCAACAGTGCTGTGGCC
87	抗CD33 CAR rAAV	<p>CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGC  GTCGGGGCAGCTTTGGTTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCG  CAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGC  ACGCGTGAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTATAT  CGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGACGCAGGTGTTCTGATTTAT  AGTTCAAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGAT  AGATTTCCCAACTTAATGCCAACATACCATAAACCTCCCATTCTGCT  AATGCCAGCCTAAGTTGGGGAGACCACTCCAGATTCCAAGATGTA  CAGTTTGCTTTGCTGGGCCTTTTTCCCATGCCTGCCTTTACTCTGCCA  GAGTTATATTGCTGGGGTTTTGAAGAAGATCCTATTAATAAAAAGAA  TAAGCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTTTCAGGTTTCCTTGAGTGG  CAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGG  CCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCAGGA  GCAGCTGGTTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACCGT  GACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTGTCCATCACTGGCATCT  GGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCC  TAACCTGATCCTCTTGTCCCACAGATATCCAGAACCCTGACCCTGC  CGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCC  TATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGTACAAAGTAAGGAT  TCTGATGTGTATATCACAGACAAA AACTGTGCTAGACATGAGGTCTAT  GGACTTCAGgctccgggtgccgctcagtgaggcagagcgcacatgccccacagtccecgagaagttgggg  ggaggggtcggcaattgaaaccgggtgctagagaagtgccgcggggtaaacgggaaagtatgctgctgact  ggctccgcttttccgaggggtgggggagaaccgtatataagtcagtagtcgctgtaacgttcttttcgcaac  gggttggccagcaaacacaggttaagtgccgtgtgtgttcccgccggccctggcctctttacgggttatggccctt  gctgcttgaattactccactggctcagtagctgattcttgatcccgagcttcgggttggaaagtgggtgggaga  gttcgagccctgcttaagggagcccttcgctcgtgcttgaagtgaggccctggcctggcgctggggccgccc  gctgagcaatctggtggcaccctcgcgctgctccttctgataagctcttagccatttaaaattttgatgacct  gctgcgacgctttttctggcaagatagcttgaatgcggccaagatctgcacactggtatltcggtttttgggg  cccgggcgccgacggggcccggtcgtcccagcgcacatgttcggcgagcgggggcctgcgagcgcggcc  accgagaateggacgggggtatgtctcaagctggccggcctgctgtgctgctgcccgcgcccgcgctgtatcg  ccccccctggggcgaaggtgcccggctggcaccagttgctgagcggaaaatggccgcttcccggcc  ctgctgcagggagctcaaaatggagacggcgctcgggagagcggcggtgagtcaccacacaaaagg  aaaaggcccttccgctcagccgctgctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagct  tagttctcagcttttggagtagctgctttaggttgggggaggggttttatgcyatggagtttcccactcagctgag  gggtggagactgaagttaggccagcttggcacttgatgaattctccttgaattgccccttttggattggatttgg  ttcattcgaagcctcagacagtggttcaaaagtttttctccattcaggtgctggaCCACCATGGCGCT  TCCGGTGACAGCACTGCTCCTCCCCCTTGGCGCTGTTGCTCCACGCAG  CAGTCCCTGGGAACGAGTCACTATGAGCTGCAAAATCCAGTCAAGT  GTTTTTTTCTCAAGTAGCCAGAAGA AACTACCTCGCATGGTACCAACA  AATACCGGGCAATCTCCCCGCTTGCTTATATACTGGGCAAGTACCC  GCGAATCCGGCGTACCGGATCGAATCACGGGATCTGGGT CAGGTAC  TGATTTCACTTTGACTATCAGCTCTGTTACGCCGTGAAGATTTGGCAAT  TTACTACTGTACCAATACTTGAGTAGCCGAACCTTTCCGGCCAGGGCA  CGAAGCTCGAAATCAAGGGCGGAGGGGGAGGTTCTGGTGGGGGGC  GTTCTGGCGGTGGAGGAAGCCAAGTACAGTTGCAACAGCCAGGGGC  GGAGGTGCTAAAACCTGGGGCGTCTGTCAAGATGAGCTGTAAAGCA  AGTGGATACACCTTACCTCTACTATATACATTGGATTAAAGCAAAC  TCCGGGTCAGGGGCTGGAATGGGTTGGCGTTATATACCCCGGGAAC  GATGATATATCATAACAACAAAAATTCAAGGCAAGGCGACTGTGA  CTGCCGATAAGAGTAGCACAAACAGCTTACATGCAGCTTTCTTCCCTG  ACCAGCGAAGATTCAGCAGTTTACTACTGCGCTCGGGAAGTGGCGCT  GCGATACTTTGATGTCCTGGGGTCAAGGAACTACAGTTACTGTATCAA</p>

10

20

30

40

【 0 6 2 8 】

【表 27 - 16】

		GCAGTGCTGCTGCCTTTGTCCCGGTATTTCTCCAGCCAAACCGACC ACGACTCCC GCCCGCGCCCTCCGACACCCGCTCCCACCATCGCCTC TCAACCTCTTAGCTTCGCCCGGAGGCATGCCGACCCGCCCGGGG GTGCTGTTCCATACGAGGGGCTTGGACTTCGCTTGTGATATTTACATTT GGGCTCCGTTGGCGGGTACGTGCGGCGTCCTTTTGTTGTCACTCGTT ATTACTTTGTATTGTAATCACAGGAATCGCAAACGGGGCAGAAAAG AACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACT ACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTCCAGAAGAAGAAG AAGGAGGATGTGAACTGCGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGC TCCGGCATATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAACGAACTGAAT TTGGGACGCCGCGAGGAGTATGACGTGCTTGATAAACGCCGGGGGA GAGACCCGAAATGGGGGTAAACCCCGAAGAAAGAATCCCCAAG AAGGACTCTACAATGAACTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTA CTCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAACGACGACGGGGAAAAGGTCA CGATGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTACGGCAACCAAAGATACGTAC GATGCACTGCATATGCAGGCCCTGCCCTCCAGATAATAATAAAATCG CTATCCATCGAAGATGGATGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGGAGCAA CAAATCTGACTTTGCAATGTGCAAACGCCCTTCAACAACAGCATTATTC CAGAAGACACCTTCTTCCCGAGCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTGCC TTCGCAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTCTGCCAGA GCTCTGGTCAATGATGTCTAAACTCCTCTGATTGGTGGTCTCGGCC TTATCCATTGCCACCAAAACCCTCTTTTTACTAAGAAACAGTGAGCC TTGTTCTGGCAGTCCAGAGAATGACACGGGAAAAAAGCAGATGAAG AGAAGGTGGCAGGAGAGGGCACCTGGCCAGCCTCAGTCTCTCCAA CTGAGTTCTGCTGCCTGCCTTTGCTCAGACTGTTTGGCCCTTACTG CTCTTCTAGGCCTATTCTAAGCCCTTCTCCAAGTTGCCTCTCCTTA TTTTCTCCCTGTCTGCCAAAAAATCTTTCCAGCTCACTAAGTCACT CACGCAGTCACTCATTAACCCACCAATCACTGATTGTGCCGGCACAT GAATGCACCAGGTGTTGAAGTGGAGGAATTAAGGATCAGATGAGG GGTGTGCCAGAGGAAGCACCATTCTAGTTGGGGGAGCCCATCTGT CAGCTGGGAAAAGTCAAATAACTTCAAGATTGGAATGTGTTTTAAGT CAGGGTGGAGAAAACAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAGGGAAGGG CTCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATACCAGCCCTACCAAGGGCA GGGAGAGGACCCTATAGAGGCCTGGGACAGGAGCTCAATGAGAAA GGTAACCACGTGCGGACCGAGGCTGCAGCGTCGTCCTCCCTAGGAA CCCCTAGTGATGGAGTTGGCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCT CACTGAGGCCGGCGACCAAAAGGTCGCCGACGCCCGGGCTTTGCC CGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	10
88	シグナル ペプチド	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP	
89	シグナル ペプチド	MALPVTALLLPLALLHAARP	30
90	CD8a 膜貫通 ドメイン	FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNR	
91	CD70 sgRNA (E1_T1) スペーサー	UCACCAAGCCCCGCGACCAAU	
92	CD70 sgRNA (E1_T3) スペーサー	AUCACCAAGCCCCGCGACCAA	
93	CD70 sgRNA	CGGUGCGGCGCAGGCCCUAU	40

【表 27 - 17】

	(E1_T4) スベーター		
94	CD70 sgRNA (E1_T7) スベーター	GCUUUGGUCCCAUUGGUCGC	
95	CD70 sgRNA (E1_T8) スベーター	GCCCGCAGGACGCACCCAUA	
96	CD70 sgRNA (E1_T10) スベーター	GUGCAUCCAGCGCUUCGCAC	10
97	CD70 sgRNA (E3_T1) スベーター	CAGCUACGUAUCCAUCGUGA	
98	TRAC スベーター	AGAGCAACAGUGCUGUGGCC	
99	β2M sgRNA スベーター	GCUACUCUCUCUUUCUGGCC	
100	PD-1 sgRNA スベーター	CUGCAGCUUCUCCAACACAU	
101	CD70 sgRNA (E1_T3) スベーター	U*C*A*CCAAGCCC GCGACCAAU	20
102	CD70 sgRNA (E1_T4) スベーター	A*U*C*ACCAAGCCC GCGACCAA	
103	CD70 sgRNA (E1_T7) スベーター	C*G*G*UGCGGCGCAGGCCCUAU	
104	CD70 sgRNA (E1_T8) スベーター	G*C*U*UUGGUCCCAUUGGUCGC	30
105	CD70 sgRNA (E1_T10) スベーター	G*C*C*CGCAGGACGCACCCAUA	
106	CD70 sgRNA (E3_T10) スベーター	G*U*G*CAUCCAGCGCUUCGCAC	
107	CD70 sgRNA (E1_T3) スベーター	C*A*G*CUACGUAUCCAUCGUGA	
108	TRAC スベーター	A*G*A*GCAACAGUGCUGUGGCC	40

【 0 6 3 0 】

【表 27 - 18】

109	β2M sgRNA スパーサー	G*C*U*ACUCUCUCUUUCUGGCC	
110	PD-1 sgRNA スパーサー	C*U*G*CAGCUUCUCCAACACAU	
111	PAMを有する CD70 sgRNA (E1_T1)	TCACCAAGCCC <u>CGGACCAATGGG</u>	
112	PAMを有する CD70 sgRNA (E1_T3)	ATCACCAAGCCC <u>CGGACCAATGG</u>	10
113	PAMを有する CD70 sgRNA (E1_T4)	CGGTGCGGCGCAGGCCCTATGGG	
114	PAMを有する CD70 sgRNA (E1_T7)	GCTTTGGTCCCATTGGTCGCGGG	
115	PAMを有する CD70 sgRNA (E1_T8)	GCCCGCAGGACGCACCCATAGGG	
116	PAMを有する CD70 sgRNA (E1_T10)	GTGCATCCAGCGCTTCGCACAGG	20
117	PAMを有する CD70 sgRNA (E3_T1)	CAGCTACGTATCCATCGTGATGG	
118	PAMを有する TRAC sgRNA	AGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGG	
119	PAMを有する β2M sgRNA	GCTACTCTCTCTTCTGGCCTGG	
120	PAMを有する PD-1 sgRNA	CTGCAGCTTCTCCAACACATCGG	30
121	CD28 ヌクレオチド 配列	TCAAAGCGGAGTAGGTTGTTGCATTCCGATTACATGAATATGACTCC TCGCCGGCCTGGGCCGACAAGAAAACATTACCAACCCTATGCCCC CCACGAGACTTCGCTGCGGTACAGGTCC	
122	TRAC- LHA	GAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTATATCGAGTA AACGGTAGTGTCTGGGGCTTAGACGCAGGTGTTCTGATTTATAGTTCA AAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGATAGATTT CCCAACTTAATGCCAACATACCATAAACCTCCCATTCTGCTAATGCC CAGCCTAAGTTGGGGAGACCCTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTG CTTTGCTGGGCCTTTTCCCATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTTAT ATTGCTGGGGTTTGAAGAAGATCCATGTTAAAATAAAAAGAATAAGCA GTATTATTAAGTAGCCCTGCATTTCAAGTTTCCCTTGAGTGGCAGGCC AGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGGCCAAGA	40

【0631】



【表 27 - 20】

		CCAAGGGCAGGGAGAGGACCCCTATAGAGGCCTGGGACAGGAGCTC AATGAGAAAGG	
126	CD8a 膜貫通	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY	
127	CD70 フォワード プライマー	TCGTCCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGACAGccccaactttccatctcaactca ccccaagtg	
128	CD70 リバー プライマー	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGACAGccccctctgctagcgga	10
129	CD70インデル	CACACCACGAGGCAGATCACCAAGCCCCGCG— CAATGGGACCAAAGCAGCCCCGAGGACG	
130	CD70インデル	CACACCACGAGGCAGATCACCAAGCCCCGCGAACCAATGGGACCAAA GCAGCCCCGAGGACG	
131	CD70インデル	CACACCACGAGGCAGATC----- ACCAATGGGACCAAAGCAGCCCCGAGGACG	
132	CD70インデル	CACACCACGAGGCAGATCACCAAGCCCCGCG- CCAATGGGACCAAAGCAGCCCCGAGGACG	
133	CD70インデル	CACACCACGAGGCAGATCACCAAGCCCCGCG- ACCAATGGGACCAAAGCAGCCCCGAGGACG	20
134	CD70インデル	CACACCACGAGGCAGATCACCA----- AGCCCCGAGGACG	
135	抗CD33 CAR ドナー LHA~RHA 41BB 共刺激	GAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTATATCGAGT AAACGGTAGTGTCTGGGGCTTAGACGCAGGTGTTCTGATTTATAGTTC AAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGATAGAT TTCCTCAACTTAATGCCAACATACCATAAACCTCCCATTCTGCTAATG CCCAGCCTAAGTTGGGGAGACCCTCCAGATTCCAAGATGTACAGT TTGCTTTGCTGGGCCTTTTCCCATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGAGT TATATTGCTGGGGTTTGAAGAAGATCCTATTAATAAAAAGAATAA GCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTTTCAGGTTTCTCTGAGTGGCAG GCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGGCC AAGATTGATAGCTTGTGCTTGCCTGTCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGC AGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGA CTTGGCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTTGTCCTACATGCGCATCTGG ACTCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCCCTA ACCCTGATCCTCTTGTCCACAGATATCCAGAACCCTGACCCTGCCG TGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTA TTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGTACAAAGTAAGGATTCT TGATGTGTATATCACAGACAAAACCTGTGCTAGACATGAGGTTCTATG GACTTCAggctccggtgccgtcagtgaggcagagcgcacatcgcccacagtcgccgagaagtggggg gaggggtcggcaattgaaccggtgcctagagaagtgggcgggggtaactgggaaagtgatgctgtfactg gctcgcctttttcccgagggtggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgectgaacgtttcttttgcacg ggtttgcggcagaacacagtaagtgcctgtgtgtgttccggggcctggcctctttacgggttatggcccttg cgtgccttgaattactccactgctgcagtagctgattcttgatcccagctcgggttggaaagtgggggagag ttcgaggccttgccttaaggagcccccttcgctcgtgcttgagttgagcctggcctgggcgctggggccg gcgtgcgaatctgtggcaccctcgcctcgtcctgctccttcgataagtctctagccattttaaattttgatgacc tctgcgacgctttttctggcaagatagtctgtaaatggggccaagatctgcacactggtatttcggttttggg ggc caccgagaatcgagggggtagctcaagctggccggcctgctggtgcttgcctcgcggcggcggcggcggcggc	30 40

【0633】

10

20

30

40

50

【表 2 7 - 2 1】

	<p>gccccgccctggcggcgaaggctggccggctggcaccagtgctgagcggaaagatggccctccgg  ccctgctcaggagctcaaaatggaggacgcggcgtcgggagagcggcggggagtcaccacacaaa  ggaaaaggcccttcctcctcagccgtcctcatgactccacggagtaccgggcgccgtccaggcacctc  gattagtcicgagctttggagtagctcgtcttaggtggggggagggtttatcgatggagtttccccacct  gagtgggtggagactgaagttagccagctggcacttgatgaattccttggaaattgccccttttgattggat  ctgggtcattctcaagcctcagacagtggttcaagtttttctccattcaggtgctgaCCACCATGG  CGCTTCCGGTGACAGCACTGCTCCTCCCCTTGGCGCTGTTGCTCCAC  GCAGCAAGGCCGGAAATCGTCCTCACACAATCCCCGGGGAGCCTCG  CAGTCAGTCCTGGGGAACGAGTCACTATGAGCTGCAAAATCCAGTCA  GAGTGTTTTTTCTCAAGTAGCCAGAAGAAGTACCTCGCATGGTACC  AACAAATACCGGGCAATCTCCCCGCTTGCTTATATACTGGGCAAGT  ACCCGCGAATCCGGCGTACCGGATCGATTACGGGATCTGGGTACG  GACTGATTTCACTTTGACTATCAGCTCTGTTCAGCCTGAAGATTTG  GCAATTTACTACTGTCACCAATACTTGAGTAGCCGAACCTTTCGGCCA  GGGCACGAAGCTCGAAATCAAGGGCGGAGGGGAGGTTCTGGTGG  GGCGGTTCTGGCGGTGGAGGAAGCCAAGTACAGTTGCAACAGCCA  GGGGCGGAGGTCGTAACCTGGGGCGTCTGTCAAGATGAGCTGTA  AAGCAAGTGGATACACCTTCACTCTACTATATACATTGGAITAAG  CAAATCCGGGTCAGGGGCTGGAATGGGTTGGCGTTATATAACCCG  GGAACGATGATATATACATAACCAAAAAATTCAGGCAAGGCGAC  TCTGACTGCCGATAAGAGTAGCACACAGCTTACATGCAGCTTTCTT  CCCTGACCAGCGAAGATTCAGCAGTTACTACTGCGCTCGGGAAGT  GCGCTGCGATACTTTGATGTCTGGGGTCAAGGAACTACAGTTACTG  TATCAAGCAGTGCTGCTGCCTTTGTCCCCGATTTCTCCCAGCCAAA  CCGACCAGACTCCCCCCCCGCGCCCTCCGACACCCGCTCCCACCAT  CGCCTTCAACCTTATAGTCTTCGCCCCGAGGCATGCCGACCCGCGC  CCGGGGTGTGTTCATACGAGGGGCTTGGACTTCGCTTGTGATATT  TACATTTGGGCTCCGTTGGCGGGTACGTGCGGGCTCCTTTTGTGTC  ACTCGTTATTACTTTGTATTGTAATCACAGGAATCGCAAACGGGGCA  GAAAGAACTCCTGTATATATCAACAACCATTTATGAGACCAGT  ACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTCCAGAA  GAAGAAGAAGGAGGAATGGAACIGCGAGTGAAGTITTCGCCAAGCG  CAGACGCTCCGGCATAACAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAACGA  ACTGAATTTGGGACGCCGAGGAGTATGACGTGCTTGATAAACGC  CGGGGGAGAGACCCGGAAATGGGGGGTAAACCCCGAAGAAAGAAAT  CCCCAAGAAGGACTCTACAATGAACTCCAGAAGGATAAGATGGCGG  AGGCTACTCAGAAATAGGTAATGAAGGGCGAACGACGACGGGGAA  AAGGTCACGATGGCCTTACCAAGGGTTGAGTACGGCAACCAAAAG  TACGTACGATGCACFGCATATGCAGGCCCTGCCCTCCAGATAATAAT  AAAATCGCTATCCATCGAAGATGGATGTGTGTTGGTTTTTGTGTGT  GGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAAACGCCTTCAACAACAG  CATTATCCAGAAGACACCTTCTTCCCAGCCCAGGTAAGGGCAGCT  TTGGTGCCCTTCGACGGCTGTTTCCTTGCTTCAAGGAATGGCCAGGTC  TGCCCAGAGCCTGGTCAATGATGTCIAAAAATCCCTCTGATTTGGTGG  TCTCGGCCTTATCCATTGCCACCAAAACCCTCTTTTACTAAGAAAC  AGTGAGCCTTGTCTGGCAGTCCAGAGAAATGACACGGGAAAAAAGC  AGATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCCAGCCTCAG  TCTCCTCAACTGAGTTCTGCTGCCTGCCTTGGCTCAGACTGTTTGC  CCCTTACTGCTCTTCTAGGCCTCATTCTAAGCCCTTCTCCAAGTTGC  CTCTCCTTATTTCTUCCTGTCTGCCAAAAAATCTTTCCAGCTCACTA  AGTCAGTCTCACGAGTCACTCATTAACCCACCAATCACTGATTGTG  CCGGCACATGAATGCACCAGGTGTTGAAGTGGAGGAATTAATAAAGT  CAGATGAGGGGTGTGCCAGAGGAAGCACCATTCTAGTTGGGGGAG  CCCATCTGTCAGCTGGGAAAAGTCCAAATAACTTCAGATTGGAATG  TGTTTTAACTCAGGGTTGAGAAAACAGCTACCTTCAGGACAAAAGT  CAGGGAAGGGCTCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATACCAGCCCT</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p> <p>40</p>
--	---	---

【 0 6 3 4】



【表 2 7 - 2 3】

		TATCATACAACCAAAAATTTCAAGGCAAGGCGACTCTGACTGCCGA TAAGAGTAGCACAAACAGCTTACATGCAGCTTTCTTCCCTGACCAGCG AAGATTCAGCAGTTTACTACTGCGCTCGGGAAGTGCGCCTGCGATA CTTGATGTCTGGGGTCAAGGAACTACAGTTACTGTATCAAGC	
139	抗CD33 CAR 41BB 共刺激	MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQS VFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPRLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDF TLTISSVQPEDLAIYYCHQYLSRRTFGQGTKLEIKGGGGGGGGGGGGGG GSQVQLQQPGAEEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLE WVGVIYPGNDDISYNQKFQKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVY YCAREVRLRYFDVWGQGTITVTVSSAAAFVVPVFLPAKPTTTPAPRPPTP APTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLL LSLVITLYCNHRNRKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE EEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	10
140	抗CD33 抗体 VH CDRは 下線が引かれ、 太字である	QVQLQQPGAEEVVKPGASVKMSCKASGYTFT <b>SYIHWIKQTPGQGLEW</b> V <b>GIYPGNDDISYNQKFQKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVY</b> CARE <b>VRLRYFDV</b> WGQGTITVTVSS	
141	抗CD33 抗体 VL CDRは 下線が引かれ、 太字である	EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCK <b>SSQVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQS</b> PRLLIY <b>WASTRESGVPDRFTGSGSGTDF</b> TLTISSVQPEDLAIYYC <b>HOYLS</b> <b>SRTFGQGTKLEIK</b>	20
142	抗CD33 抗体 VH CDR1 (Kabat)	<u>SYIHWIKQTPGQGLEW</u>	
143	抗CD33 抗体 VH CDR2 (Kabat)	<u>VIYPGNDDISYNQKFQK</u>	30
144	抗CD33 抗体 VH CDR3 (Kabat)	<u>EVRLRYFDV</u>	
145	抗CD33 抗体 VL CDR1 (Kabat 及び Chothia)	<u>KSSQVFFSSSQKNYLA</u>	
146	抗CD33 抗体	<u>WASTRES</u>	40

【 0 6 3 6】



【表 27 - 25】

150	抗CD19 scFv	GATATTCAGATGACTCAGACCACCAGTAGCTTGTCTGCCTCACTGGGAGACCCGAGTAACAATCTCCTGCAGGGCAAGTCAAGACATTAGCAAA TACCTCAATTGGTACCAGCAGAAGCCCGACCGAACGGTAAAACTCC TCATCTATCATAACGTCGAAGGTTGCATTCCGGAGTACCGTCACGATTT TCAGGTTCTGGGAGCGGAAGTACTGACTATTCCCTTGACTATTTCAAACCT CGAGCAGGAGGACATTGCGACATATTTTTGTCAAACAAGGTAATACC CTCCCTTACACTTTCCGGAGGAGGAACCAAACTCGAAATTACCGGGTCC CACCAGTGGCTCTGGGAAGCCTGGCAGTGGAGAAGGTTCCACTAAA GGCGAGGTGAAGCTCCAGGAGAGCGGCCCGGTCTCGTTGCCCCCA GTCAAAGCCTCTCTGTAACGTGCACAGTGAGTGGTGTATCATTGCCT GATTATGGCGTCTCCTGGATAAAGGCAGCCCCCGCAAAGGGTCTTG AATGGCTTGGGGTAATATGGGGCTCAGAGACAACGTATTATAACTC CGCTCTCAAAGTCTGCTGACGATAATAAAAGATAACTCCAAGAGT CAAGTTTTCTTAAATGAACAGTTTTGCAGACTGACGATACCGCTAT ATATTATTGTGCTAAACATTATTAACGCGGTAGTTACGCGATGG ATTATTGGGGGCAGGGGACTTCTGTACAGTCAGTAGT	10
151	CD19 scFv アミノ酸配列 リンカーは 下線が 引かれる	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIY HTSRLHSGVPSRFSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFG GGTKLEIT <u>GSTSGSGKPGSGEGSTK</u> GEVVKLQESGPLVAPSQSLSVTCTV SGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTHKDN SKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSS	
152	抗CD19 VH	EVKLQESGPLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLG VIWGSETTYNSALKSRLTHKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKH YYYGGSYAMDYWGQTSVTVSS	20
153	抗CD19 VL	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIY HTSRLHSGVPSRFSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFG GGTKLEIT	
154	抗CD19 scFv リンカー	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	
155	抗CD19 CAR rAAV	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGC GTCCGGCGACCTTTGGTCCGCCCGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCG CAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCTGCCGGCCG ACGCGTGAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTATAT CGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGACGCAGGTGTTCTGATTTAT AGTTCAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGAT AGATTTCCCAACTTAATGCCAACATAACCATAAACCTCCCATTCTGCT AATGCCAGCCTAAGTTGGGGAGACCCTCCAGATTCCAAGATGTA CAGTTTGCTTTGCTGGGCCTTTTCCCATGCCTGCCTTTACTCTGCCA GAGTTATATTGCTGGGGTTTTGAAGAAGATCCTATTAATAAAAAGAA TAAGCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTTAGGTTTCTTGAGTGG CAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGG CCAAGATTGATAGCTTGTGCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGA GCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACCGT GACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTGTCCATCACTGGCATCT GGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCC TAACCCTGATCCTCTGTGCCACAGATATCCAGAACCCTGACCCTGC CGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCC TATTCACCGATTTGATTTCTCAAACAAATGTGTACAAAGTAAGGAT TCTGATGTGTATATCACAGACAAAAGTGTGCTAGACATGAGGTCTAT GGACTTCAGGCTCCGGTGCCTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCC CACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTGGCAATTGAACCGGT GCCTAGAGAAGGTGGCGGGGTAAGTGGGAAAGTATGTCGTG	30 40

【 0 6 3 8 】

10

20

30

40

50

【表 27 - 26】

	<p>ACTGGCTCCGCCTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGT  GCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAG  AACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTCCCGCGGGCTGGCCTCTTA  CGGGTTATGGCCCTTGCCTGCTTGAATTACTTCCACTGGCTGCAAT  ACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGT  TCGAGGCCTTGCCTTAAGGAGCCCTTCGCCTCGTGTGAGTTGA  GGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCCGCGTGCGAATCTGGTGGCAC  CTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAAAT  TTTTGATGACCTGTGCGACGCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGT  AATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCCGTTTTTGGGGCCGC  GGCGGGCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTCCGGCGAGG  CGGGGCTGCGAGCGGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTC  AAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCGTGTATC  GCCCGCCCTGGGCGGAAGGCTGGCCCGGTCCGGCACCAGTTGCGT  GAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAA  ATGGAGGACCGCGCCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGGTCAACCACA  CAAAGGAAAAGGGCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTC  CACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCT  TTTGGAGTACGTCTTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTTATGCGATG  GAGTTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTT  GGCACTTGATGTAATTCCTTGGAAATTTGCCCTTTTGGATTGGAT  CTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTCAAAGTTTTTTCTTC  CATTTCAGGTGTCGTGACCACCATGCTTCTTTTGGTTACGTCTCTGTT  GCTTTGCGAACTTCTCATCCAGCGTTCCTGCTGATCCCCGATATTCA  GATGACTCAGACCACCAGTAGCTTGTCTGCCTCACTGGGAGACCGA  GTAACAATCTCCTGCAGGGCAAGTCAAGACATTAGCAAATACCTCA  ATTGGTACCAGCAGAAGCCCGACGGAACGGTAAAACCTCCTCATCTA  TCATACGTCAAGGTTGCATTCCGGAGTACCGTCACGATTTTCAGGTT  CTGGGAGCGGAAGTACTATTCTTACTGACTATTTCAAACCTCGAGCAG  GAGGACATTGCGACATATTTTGTCAACAAGGTAATACCCTCCCTTA  CACTTTCCGGAGGAGGAACCAAACCTCGAAATTACCGGGTCCACCAGT  GGCTCTGGGAAGCCTGGCAGTGGAGAAGGTTCACCTAAAGGGCAGG  TGAAGCTCCAGGAGAGCGGGCCCGGTCTCGTTGCCCCAGTCAAAG  CCTCTCTGTAACGTGCACAGTGAAGTGGTGTATCATTGCCTGATTATG  GCGTCTCCTGGATAAAGGCAGCCCCCGGAAAGGGTCTTGAATGGCT  GGGTAATATGGGGCTCAGAGACAACGTATTATAACTCCGCTCTCA  AAAGTCGCTTGACGATAATAAAAAGATAACTCCAAGAGTCAAGTTTT  CCTTAAAATGAACAGTTTGCAGACTGACGATACCGCTATATATTATT  GTGCTAAACATTATTACTACGGCGGTAGTTACGGCATGGATTATTGG  GGGCAGGGGACTTCTGTACAGTCAGTGTGCTGCTGCCTTTGTCCC  GGTATTTCTCCAGCCAAACCGACCACGACTCCCGCCCCGCGCCCTC  CGACACCCGCTCCCAACCATCGCTCTCAACCTCTTAGTCTTCGCCCC  GAGGCATGCCGACCCCGCCCGGGGGTGTGTTTCATACGAGGGCCT  TGGACTTCGCTTGTGATAATTTACATTTGGGCTCCGTTGGCGGGTACG  TGCGGGCTCCTTTTGTGTCACTCGTTATTACTTTGTATTGTAATCAC  AGGAATCGCTCAAAGCGGAGTAGGTTGTTGCATTCCGATTACATGA  ATATGACTCCTCGCCGGCCTGGGCCGACAAGAAAACATTACCAACC  CTATGCCCCCCCACGAGACTTCGCTGCGTACAGGTCCCGAGTGAAGT  TTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCATAATCAGCAAGGACAGAATCA  GCTGTATAACGAACTGAATTTGGGACGCTGCGAGGAGTATGACGTG  CTTGATAAACCGCCGGGGGAGAGACCCGGAATGGGGGGTAAACCCC  GAAGAAAAGAAATCCCAAGAAGGACTCTACAATGAACTCCAGAAGGA  TAAGATGGCGGAGGCCTACTCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAACGA  CGACGGGGAAAAGGTCACGATGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTACGG  CAACCAAAGATAACGTACGATGCACTGCATATGCAGGCCCTGCCTCCC  AGATAATAATAAAAATCGCTATCCATCGAAGATGGATGTGTGTTGTT</p>
--	---

10

20

30

40

【 0 6 3 9 】



【表 27 - 28】

	<p>GAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGA  GGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGTAGTCACCCACACAAA  GGAAAAGGGCCTTTCCTGCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACG  GAGTACCGGGCGCCGTCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTG  GAGTACGTCGCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGT  TTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCA  CTTGATGTAATTCTCCTTGGAAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTG  GTTTATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATT  TCAGGTGTGCTGACCACCATGCTTCTTTTGGTTACGTTCTGTTGCTT  TGCGAATTCCATCCAGCGTTCTTGTGCTGATCCCCGATATTCAGAT  GACTCAGACCACCAGTAGCTTGTCTGCCTCACTGGGAGACCGAGTA  ACAATCTCCTGCAGGGCAAGTCAAGACATTAGCAAATACCTCAATT  GGTACCAGCAGAAGCCCCGACGGAACGGTAAAACCTCCTCATCTATCA  TACGTCAAGGTTGCATTCGGGAGTACCGTACAGATTTTCAGGTTCTG  GGAGCGGAACTGACTATTCCTTGACTATTTCAAACCTCGAGCAGGAG  GACATTGCGACATATTTTGTCAACAAGGTAATACCCTCCCTTACAC  TTTCGGAGGAGGAACCAAACCTCGAAATTACCGGGTCCACCAGTGGC  TCTGGGAAGCCTGGCAGTGGAGAAGGTTCCACTAAAGCGAGGTGA  AGCTCCAGGAGAGCGGCCCGGCTCTCGTTGCCCCAGTCAAAGCCTC  TCTGTAACGTGCACAGTGTGGTGTATCATTGCCTGATTATGGCGT  CTCCTGGATAAGGCAGCCCCCGGAAAGGGTCTGAATGGCTTGGG  GTAATATGGGGCTCAGAGACAACGTATTATAACTCCGCTCTCAAAA  GTGCTTGACGATAATAAAAAGATAACTCCAAGAGTCAAGTTTTCTT  AAAATGAACAGTTTGCAGACTGACGATACCGCTATATATTATTGTGC  TAAACATTACTACGGCGGTAGTTACGCGATGGATTATTGGGGGG  AGGGGACTTCTGTACAGTCAAGTCAAGTGTGCTGCTGCTTTGTCCCGTA  TTTCTCCAGCCAAACCGACACGACTCCCCCGCCCGCCCTCCGAC  ACCCGCTCCCACCATCGCCTCTCAACCTTTAGTCTTCGCCCGAGG  CATGCCGACCCGCCCGGGGGTGTGTTTCATACGAGGGGCTTGG  CTTCGCTTGTGATATTTACATTTGGGCTCCGTTGGCGGGTACGTGCG  GCGTCTTTTGTGTCACTCGTTATTACTTTGTATTGTAATCACAGGA  ATCGTCAAAGCGGAGTAGGTTGTGCTATTCGATACATGAATAIG  ACTCCTCGCCGGCCTGGGCGGACAAGAAAACATTACCAACCTATG  CCCCCCCACGAGACTTCGCTGCGTACAGGTCCCGAGTGAAGTTTTCC  CGAAGCGCAGACGCTCCGGCATATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGT  ATAACGAAGTGAATTTGGGACGCCCGAGGAGTATGACGTGCTTGA  TAAACGCCGGGGGAGAGACCCGGAATGGGGGGTAAACCCCGAAG  AAAGAATCCCCAAGAAGGACTCTACAATGAACTCCAGAAGGATAAG  ATGGCGGAGGCCTACTCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAACGACGAC  GGGGAAAAGGTACGATGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTACGGCAAC  CAAAGATACGTACGATGCACTGCATATGCAGGCCCTGCCTCCAGAT  AATAATAAAATCGCTATCCATCGAAGATGGATGTGTGTTGGTTTTT  GTGTGTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCTTCAAC  AACAGCATTAATCCAGAAGACACCTTCTTCCCAGCCCAGGTAAGGG  CAGCTTTGGTGCCTTCGACGGCTGTTTCTTGTCTCAGGAATGGCCA  GGTTCTGCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAAACCTCCTCTGATT  GGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCACCAAAAACCTCTTTTTACTAA  GAAACAGTGAGCCTTGTCTGGCAGTCCAGAGAATGACACGGGAAA  AAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCACG  CTCAGTCTCTCAACTGAGTTCTGCTGCTGCTGCTTTGCTCAGACTG  TTTGCCCTTACTGCTTCTTAGGCCATCTAAGCCCTTCTCCAA  GTTGCTCTCCTTATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAAATCTTTCCAGCT  CACTAAGTCAGTCTCACGCAGTCACTCATTAAACCCACCAATCACTGA  TTGTGCCGGCACATGAATGCACCAGGTGTTGAAGTGGAGGAATTA  AAAGTCAGATGAGGGGTGTGCCAGAGGAAGCACCATTCTAGTTGG  GGGAGCCCATCTGTCAGCTGGGAAAAGTCAAATAACTTCAGATTG</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
--	--	---

【0641】

【表 2 7 - 2 9】

		GAATGTGTTTTAACTCAGGGTTGAGAAAACAGCTACCTTCAGGACA AAAGTCAGGGAAGGGCTCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATACCA GCCCTACCAAGGGCAGGGAGAGGACCCTATAGAGGCCTGGGACAGG AGCTCAATGAGAAAAGG	
157	CD70 sgRNA (E1_T1)	TCACCAAGCCC GCGACCAAT	
158	CD70 sgRNA (E1_T3)	ATCACCAAGCCC GCGACCAA	
159	CD70 sgRNA (E1_T4)	CGGTGC GCGCAGGCCCTAT	10
160	CD70 sgRNA (E1_T7)	GCTTTGGTCCCATTGGTCGC	
161	CD70 sgRNA (E1_T8)	GCCCGCAGGACGCACCCATA	
162	CD70 sgRNA (E1_T10)	GTGCATCCAGCGCTTCGCAC	
163	CD70 sgRNA (E3_T1)	CAGCTACGTATCCATCGTGA	
164	$\beta$ 2M sgRNA	GCTACTCTCTCTTCTGGCC	20
165	PD-1 sgRNA	CTGCAGCTTCTCCAACACAT	
166	抗CD19 VL CDR1 (Kabat)	RASQDISKYLN	
167	抗CD19 VL CDR2 (Kabat)	HTSRLHS	
168	抗CD19 VL CDR3 (Kabat)	QQGNTLPYT	
169	抗CD19 VH CDR1 (Kabat)	DYGVS	30
170	抗CD19 VH CDR2 (Kabat)	VIWGSETTYNSALKS	
171	抗CD19 VH CDR3 (Kabat)	HYYYGGSYAMDY	
172	抗CD19 VL CDR1 (Chothia)	RASQDISKYLN	40

【 0 6 4 2 】

【表 2 7 - 3 0】

173	抗CD19 VL CDR2 (Chothia)	HTSRLHS	
174	抗CD19 VL CDR3 (Chothia)	QQGNTLPYT	
175	抗CD19 VH CDR1 (Chothia)	GVSLPDY	10
176	抗CD19 VH CDR2 (Chothia)	WGSET	
177	抗CD19 VH CDR3 (Chothia)	HYYYGGSYAMDY	
178	抗CD33 VH CDR1 (Chothia)	GYTFTSY	
179	抗CD33 VH CDR2 (Chothia)	YPGNDD	20
180	抗CD33 VH CDR3 (Chothia)	EVRLRYFDV	

## 【0643】

本明細書で開示される全ての参考文献、特許及び特許出願は、それぞれが引用されている主題に関して参照により組み込まれており、場合によっては文書の全体を包含する場合がある。

30

## 【0644】

本明細書及び特許請求の範囲において使用される不定冠詞「a」及び「an」は、反対に明確に示されない限り、「少なくとも1つ」を意味するものと理解されるべきである。

## 【0645】

また、反対に明確に示されない限り、2つ以上の工程又は行為を含む本明細書で請求される任意の方法において、方法の工程又は行為の順序は、必ずしも方法の工程又は行為が列挙される順序に限定されないことが理解されるべきである。

## 【0646】

特許請求の範囲及び上記明細書において、「含む (comprising)」、「含む (including)」、「保有する」、「有する」、「含有する」、「関与する」、「保持する」、「構成する」などの全ての移行句は、オープンエンド、すなわち、以下を含むがこれらに限定されないことを意味するものと理解される。「からなる」及び「本質的にからなる」という移行句のみが、United States Patent Office Manual of Patent Examining Procedures 2111.03に規定されるとおり、それぞれクローズド又はセミクローズド移行句となるものとする。

40

## 【0647】

数値に先行する「約」及び「実質的に」という用語は、列挙された数値の±10%を意味する。

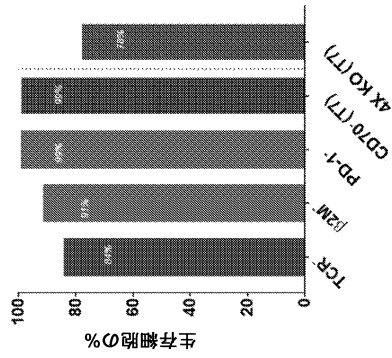
50

【 0 6 4 8 】

値の範囲が提供される場合、範囲の上限と下限の間の各値は、本明細書において具体的に企図され、記載される。

【 図 面 】

【 図 1 】



【 図 2 】

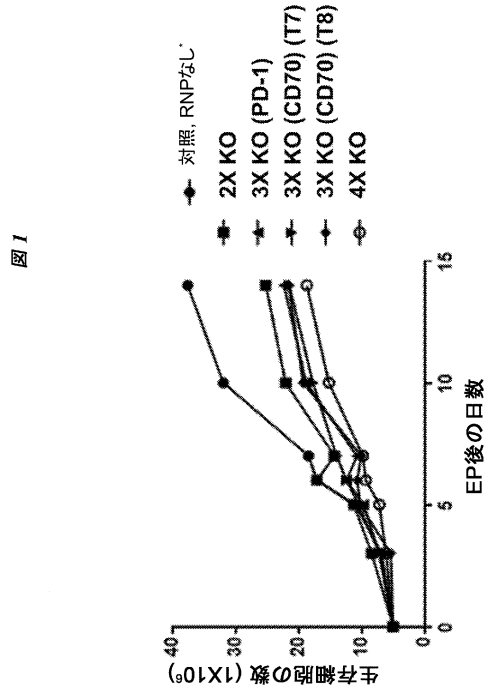


図 1

図 2

【 図 3 】

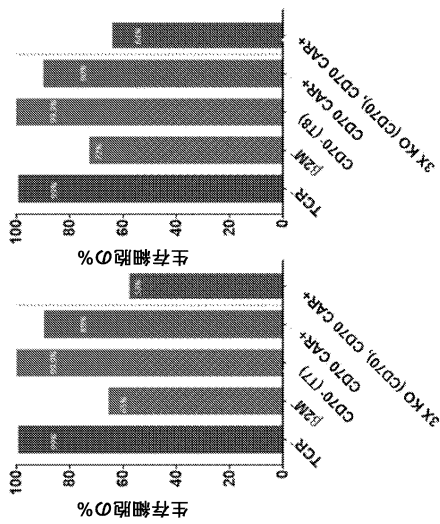


図 3

【 図 4 】

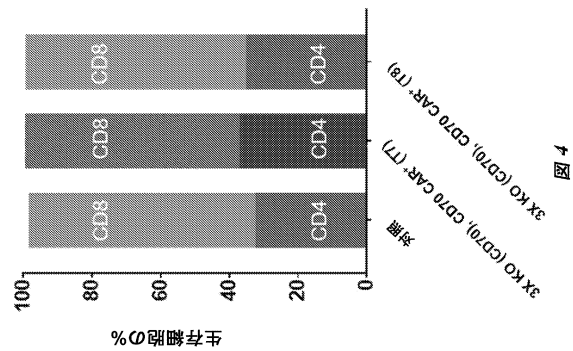


図 4

10

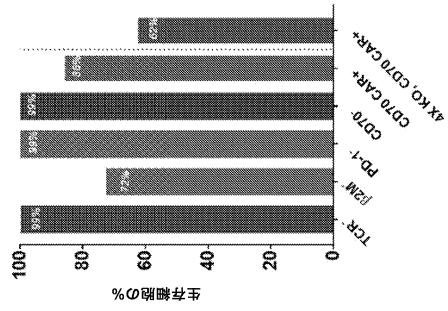
20

30

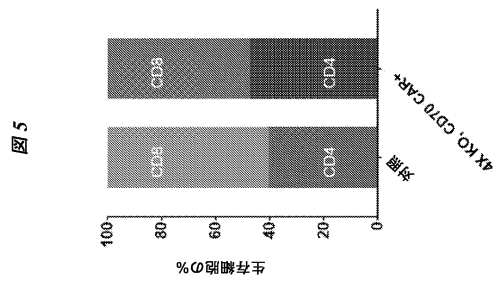
40

50

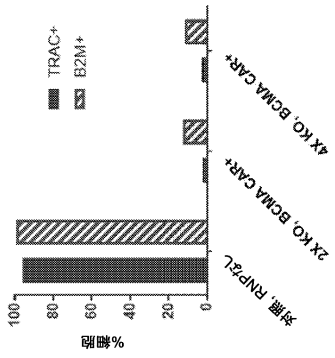
【 図 5 】



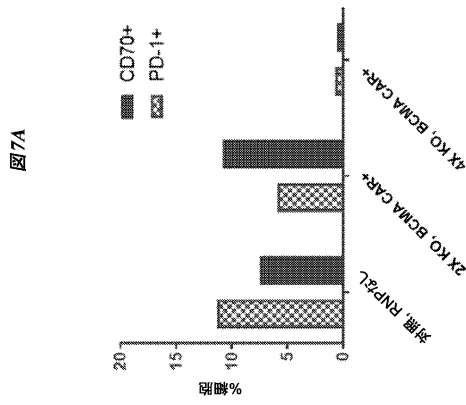
【 図 6 】



【 図 7 A 】



【 図 7 B 】



10

20

30

40

50

【 図 7 C 】

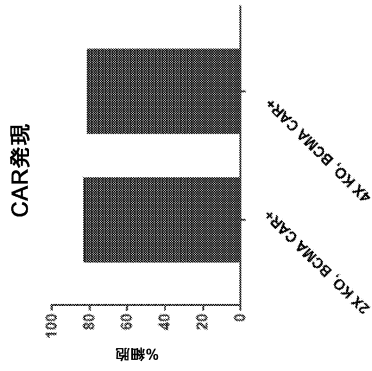


図 7C

【 図 8 】

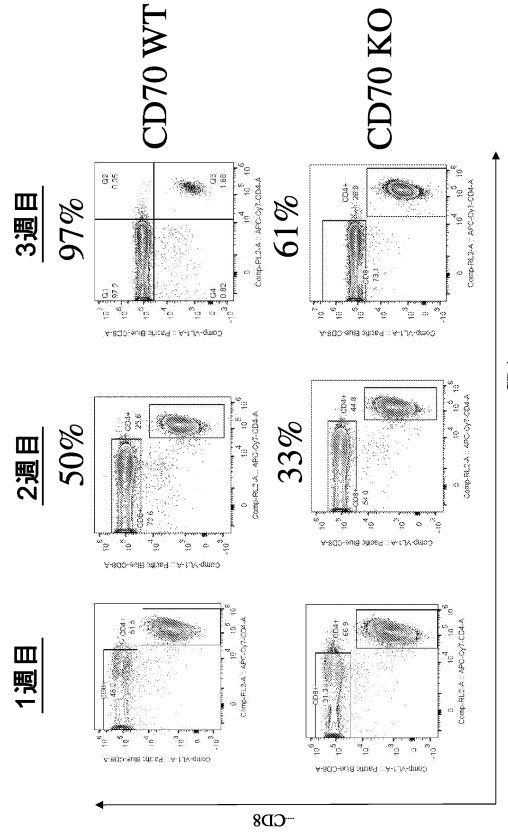


図 8

【 図 9 】

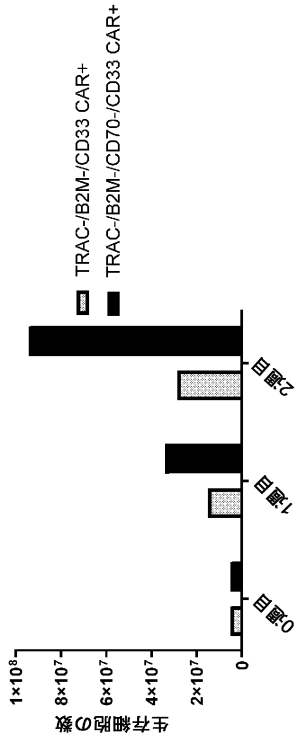


図 9

【 図 10 】

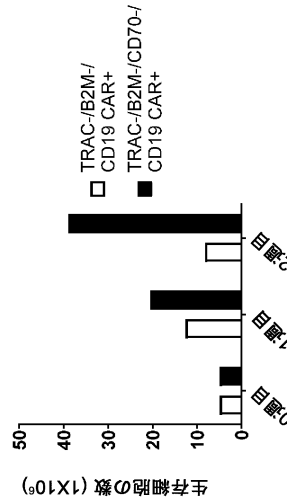


図 10

10

20

30

40

50

【図 1 1】

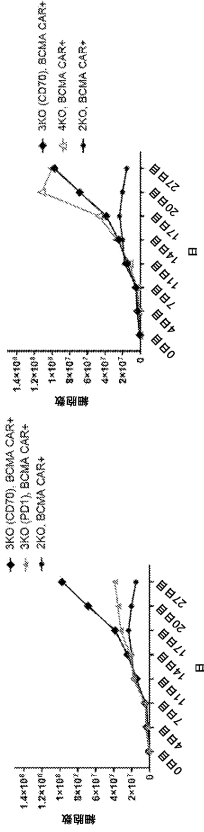


図 11

【図 1 2】

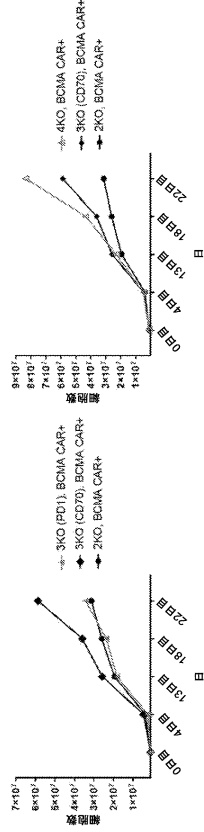


図 12

【図 1 3】

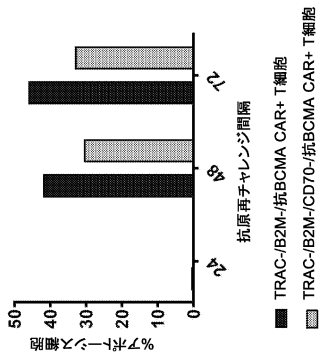


図 13

【図 1 4】

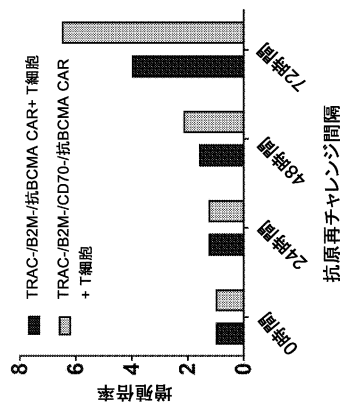


図 14

10

20

30

40

50

【 図 15 】

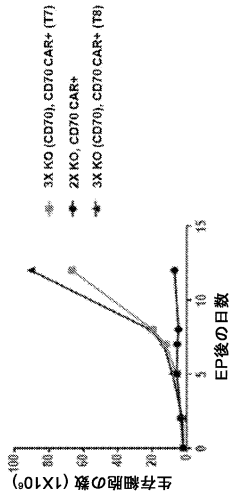


図 15

【 図 16 】

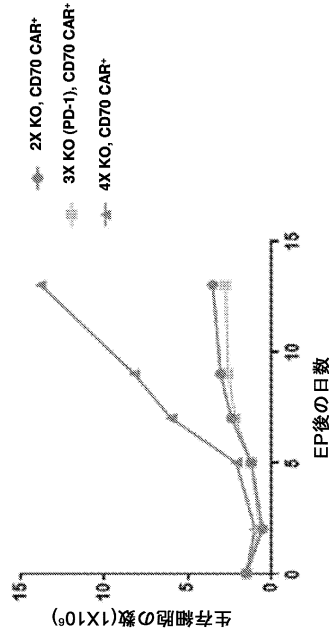


図 16

【 図 17 】

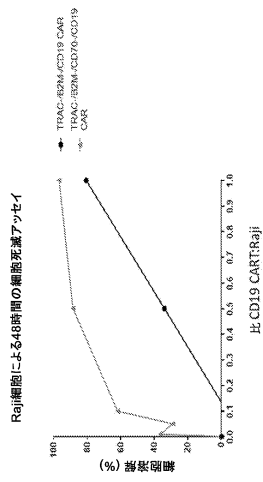
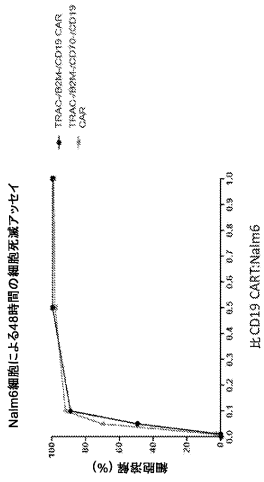


図 17

【 図 18 】

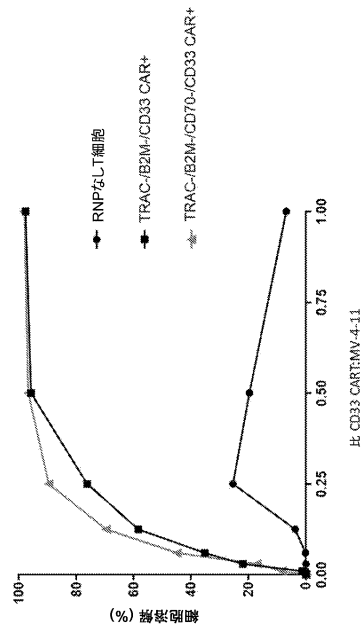


図 18

10

20

30

40

50

【 図 19 】

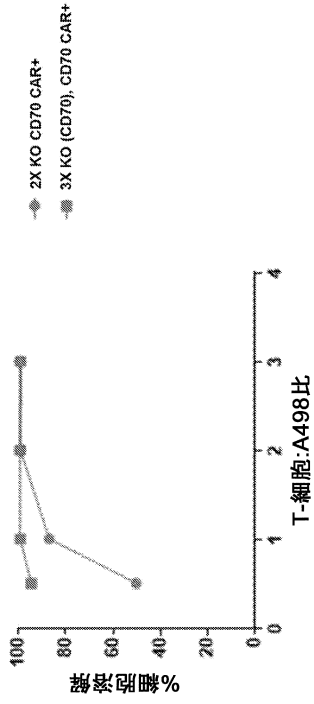


図 19

【 図 20 】

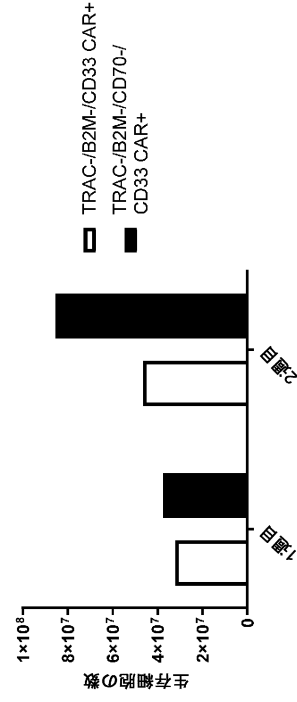


図 20

【 図 21 】

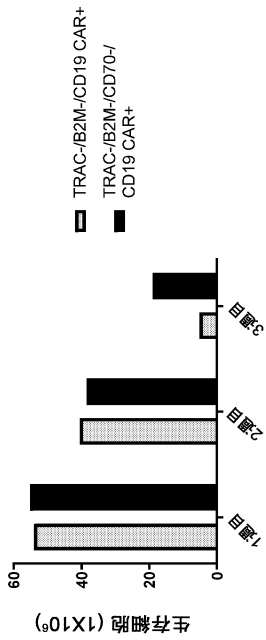


図 21

【 図 22 A 】

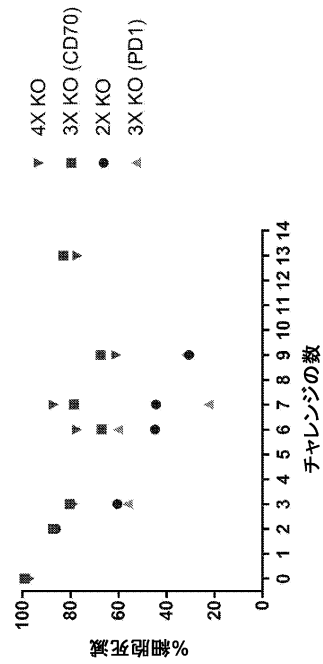


図 22A

10

20

30

40

50

【 図 2 2 B 】

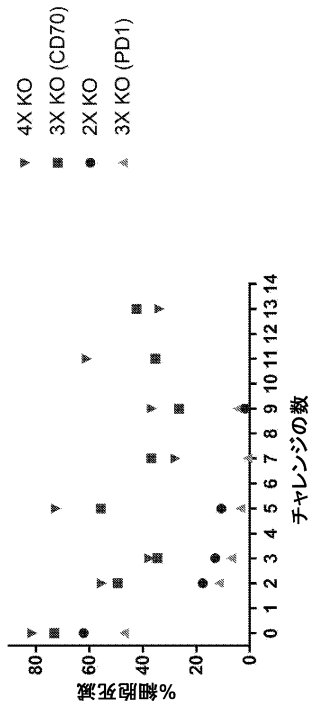


図 22B

【 図 2 3 A 】

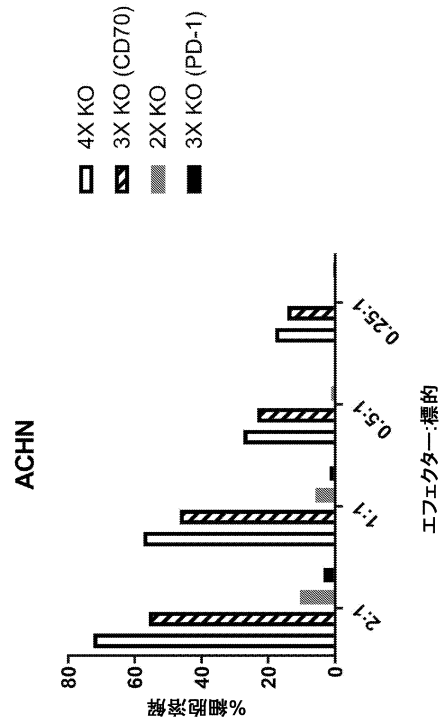


図 23A

【 図 2 3 B 】

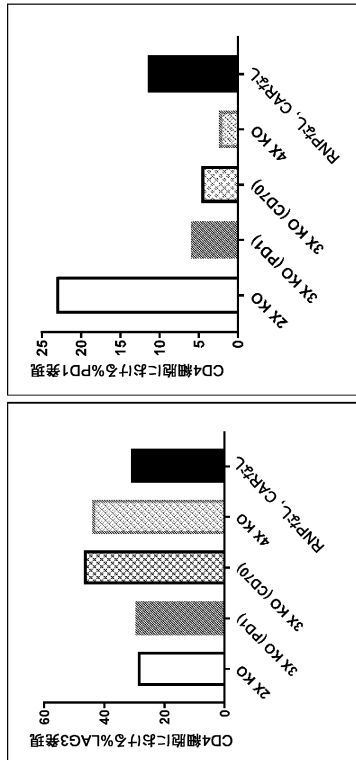


図 23B

【 図 2 4 A - B 】

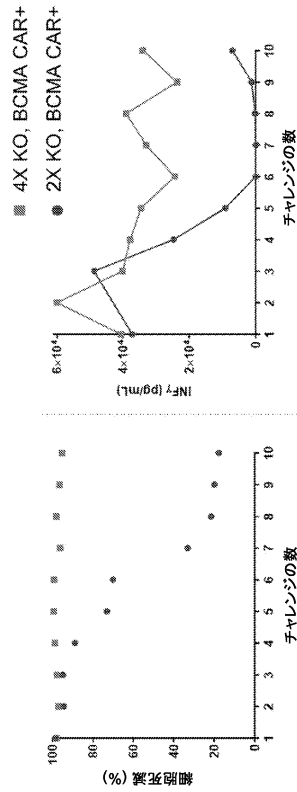


図 24B

図 24A

【 2 4 C 】

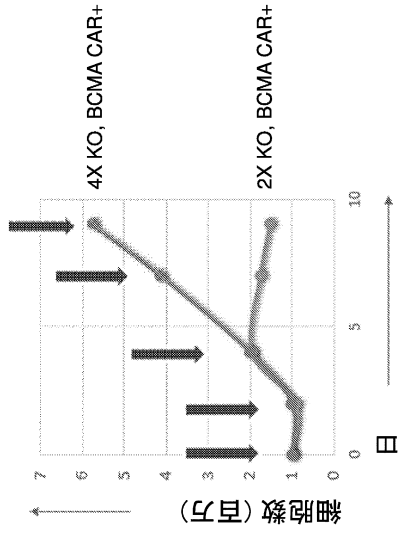


图 24C

【 2 5 A 】

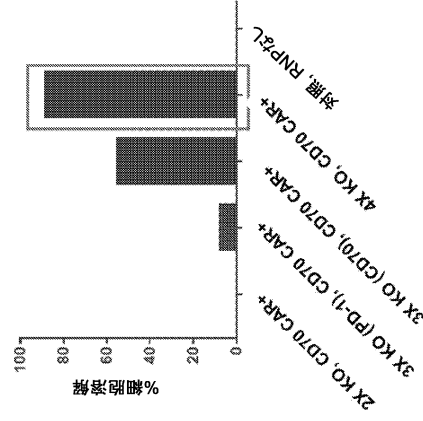


图 25A

10

20

【 2 5 B 】

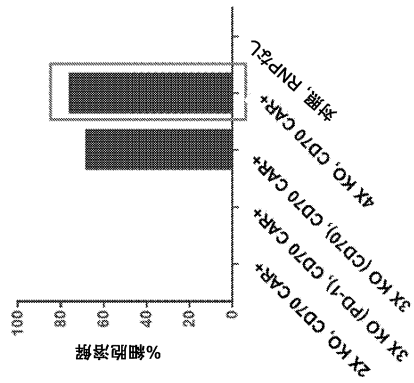


图 25B

【 2 5 C 】

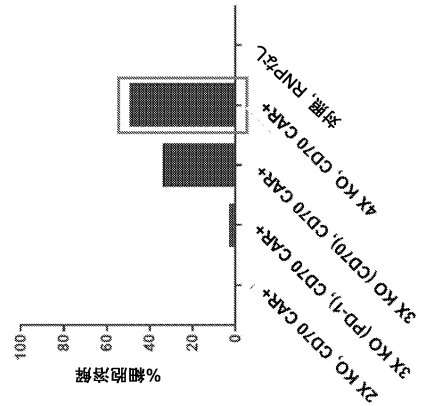


图 25C

30

40

50



【 図 27 C 】

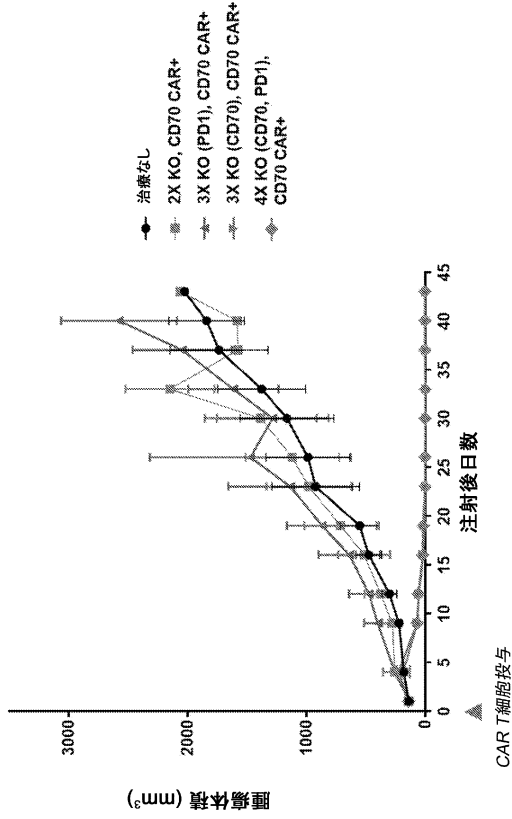


図 27C

【 図 28 A 】

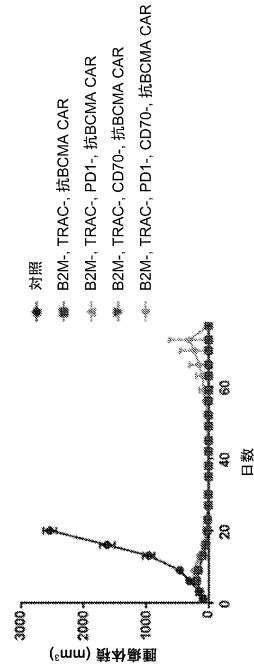


図 28A

【 図 28 B 】

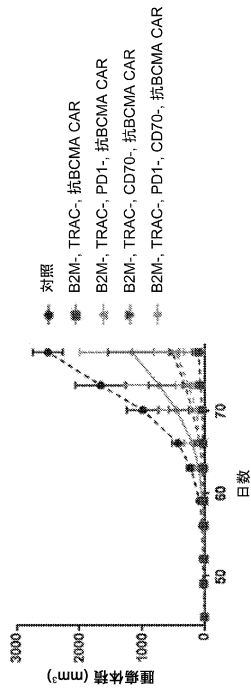


図 28B

【 図 29 】

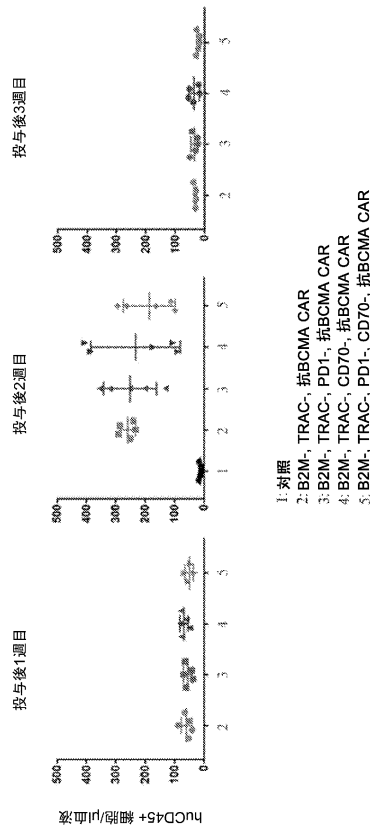


図 29

10

20

30

40

50

【 図 3 0 】

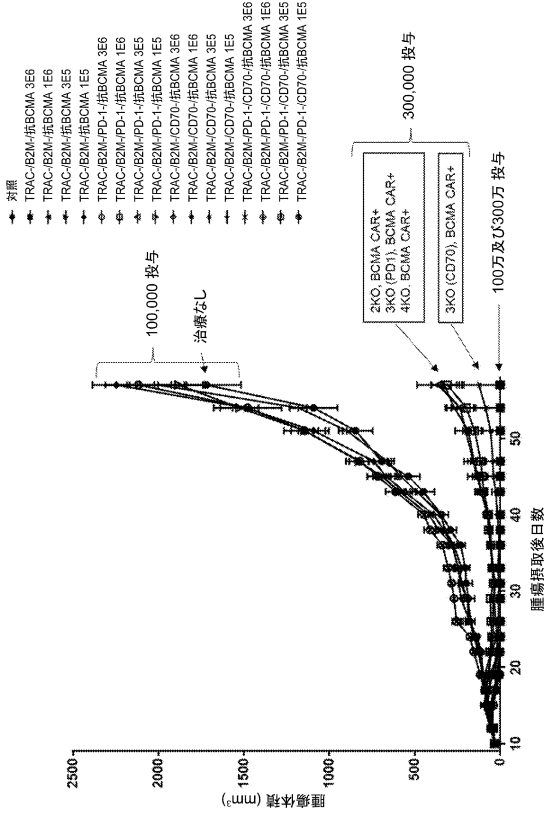


図 30

【 図 3 1 】

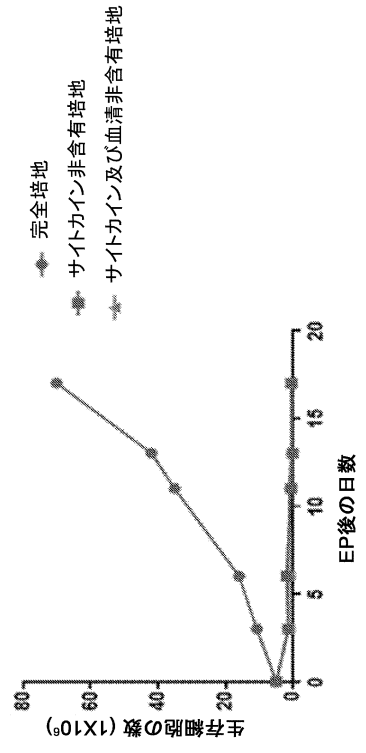


図 31

【 図 3 2 】

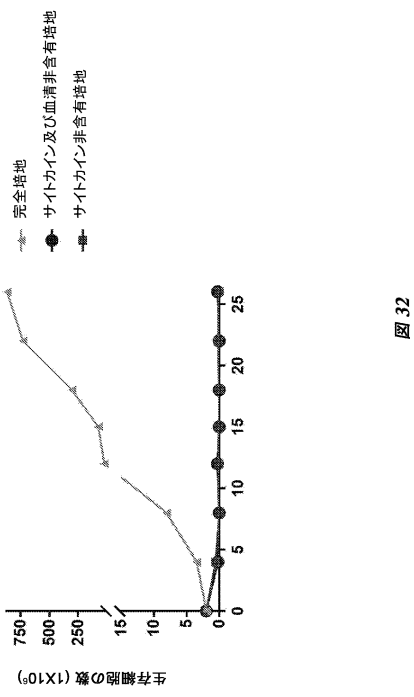


図 32

【 図 3 3 】

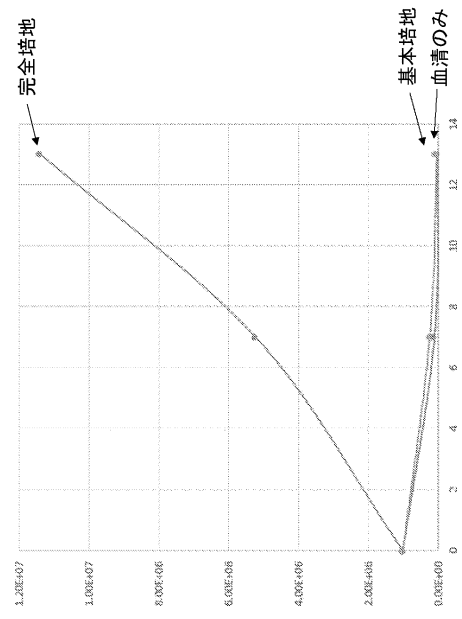


図 33

10

20

30

40

50

【 図 3 4 】

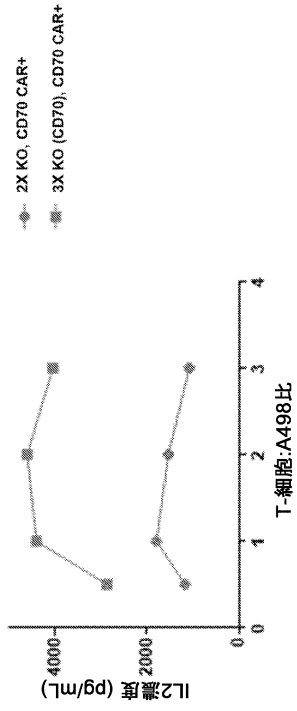


図 34

【 図 3 5 】

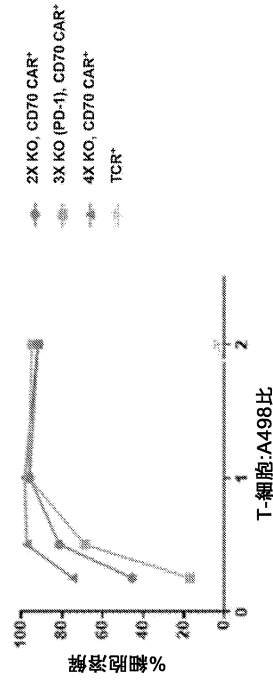


図 35

【 図 3 6 】

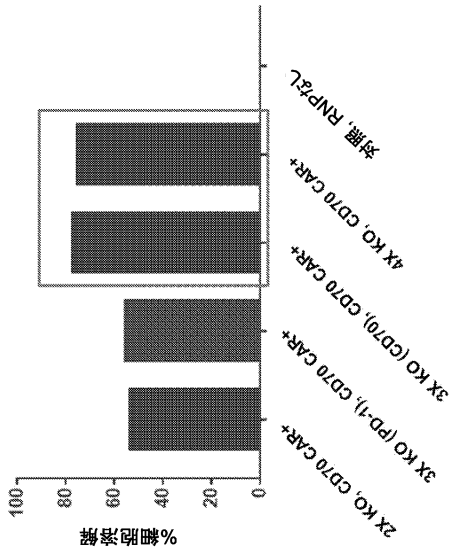


図 36

【 図 3 7 A 】

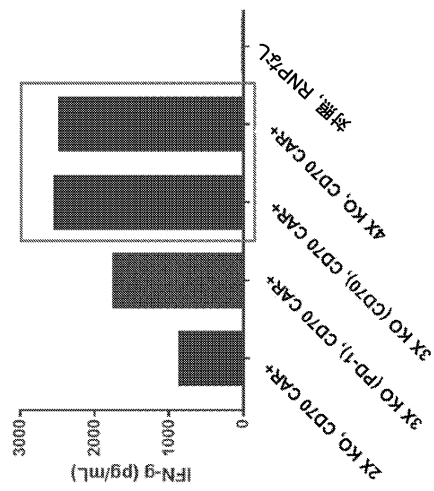


図 37A

10

20

30

40

50

【 3 7 B 】

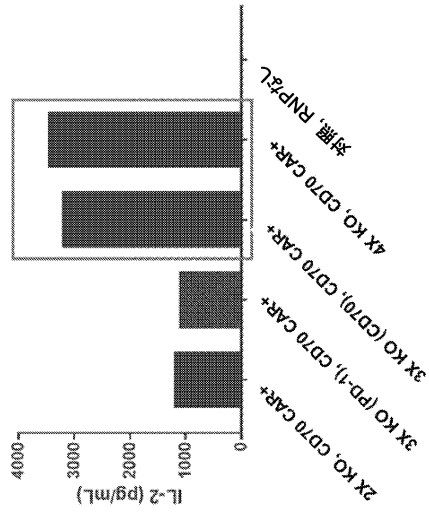


图 37B

【 3 8 】

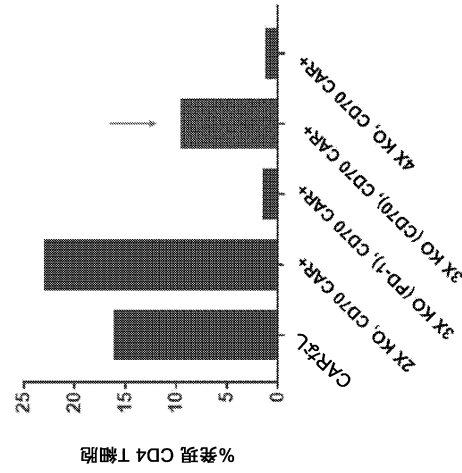


图 38

10

20

【 3 9 A 】

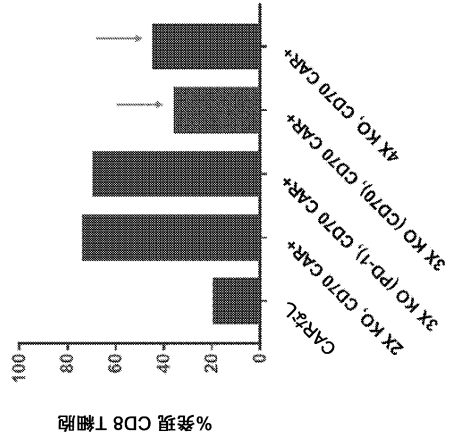


图 39A

【 3 9 B 】

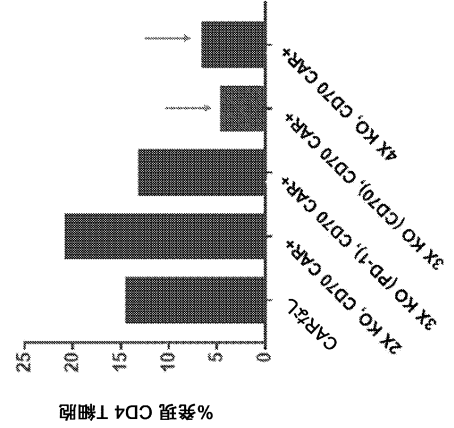


图 39B

30

40

50

【 40A 】

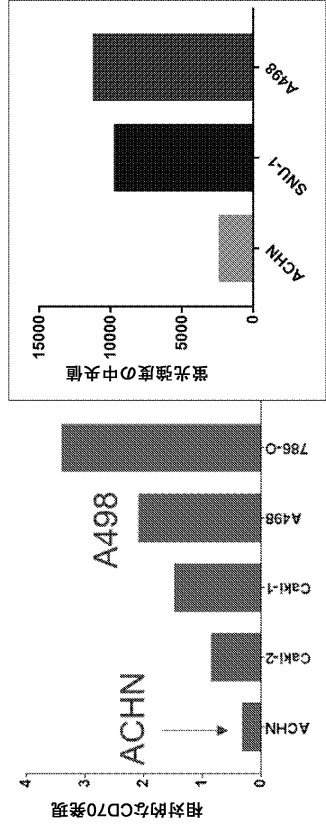


図 40A

【 40B 】

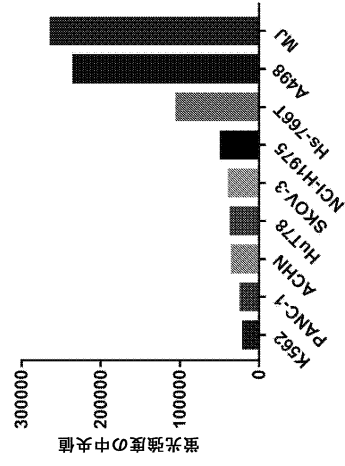


図 40B

【 40C 】

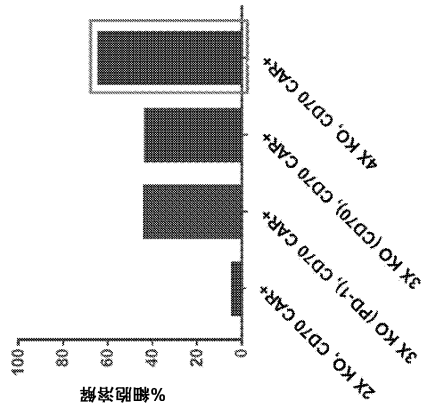


図 40C

【 40D 】

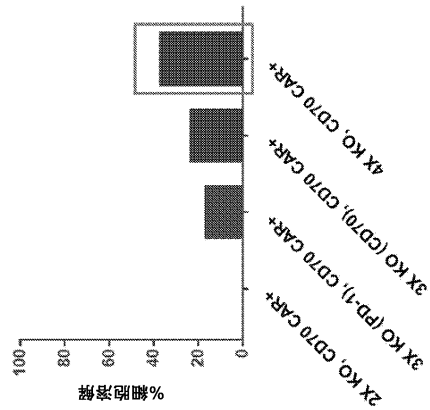


図 40D

10

20

30

40

50

【 40E 】

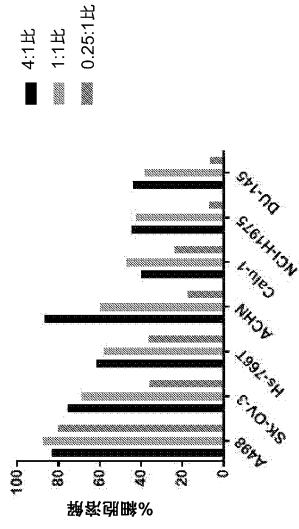


図 40E

【 40F 】

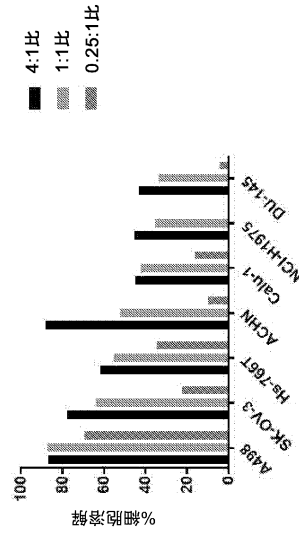


図 40F

10

20

【 40G 】

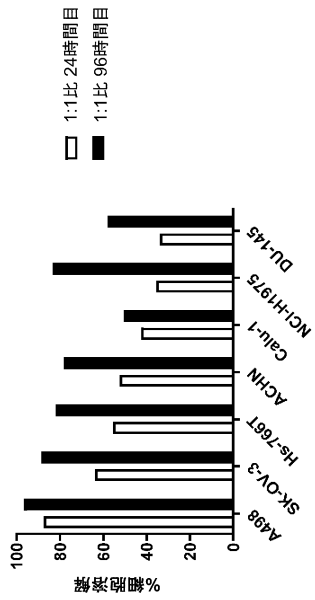


図 40G

【 40H 】

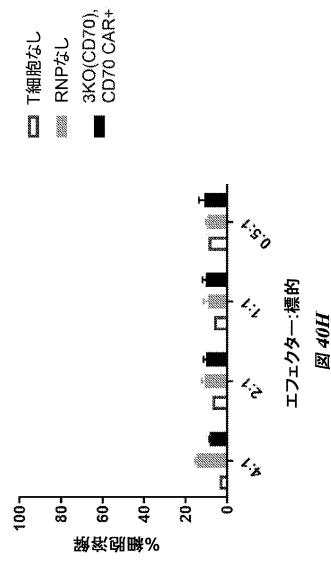


図 40H

30

40

50

【 40 I 】

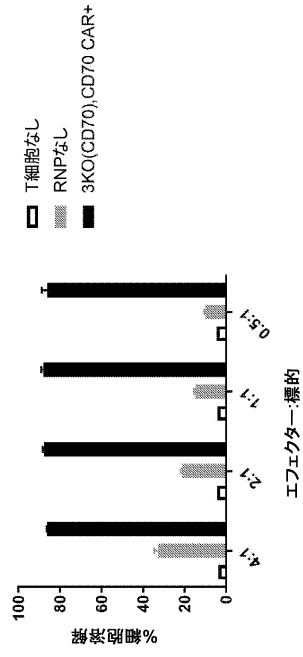


図 40I

【 40 J 】

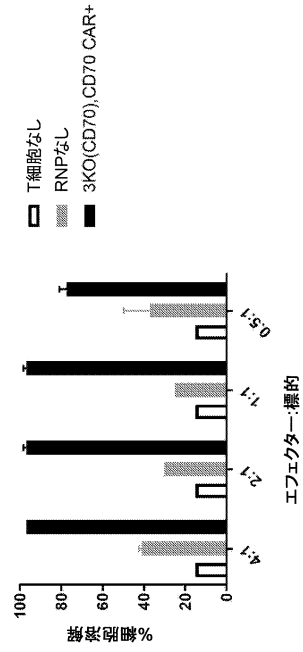


図 40J

10

20

【 41 A 】

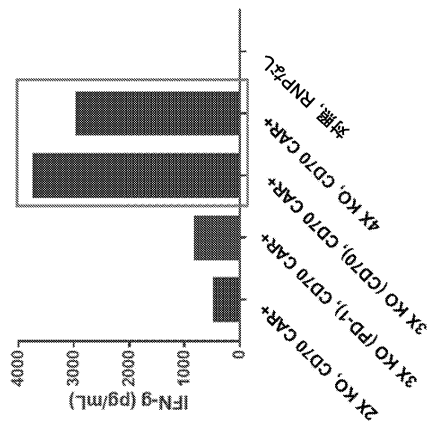


図 41A

【 41 B 】

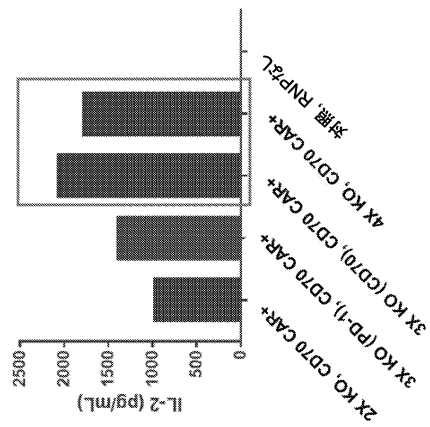


図 41B

30

40

50

【 図 4 2 A 】

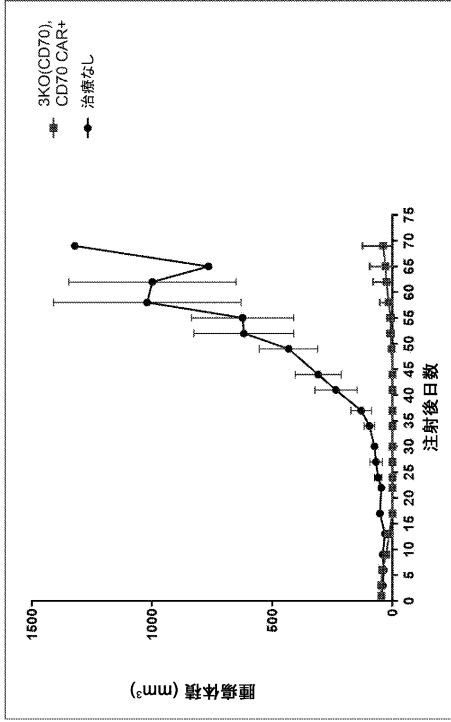


図 42A

【 図 4 2 B 】

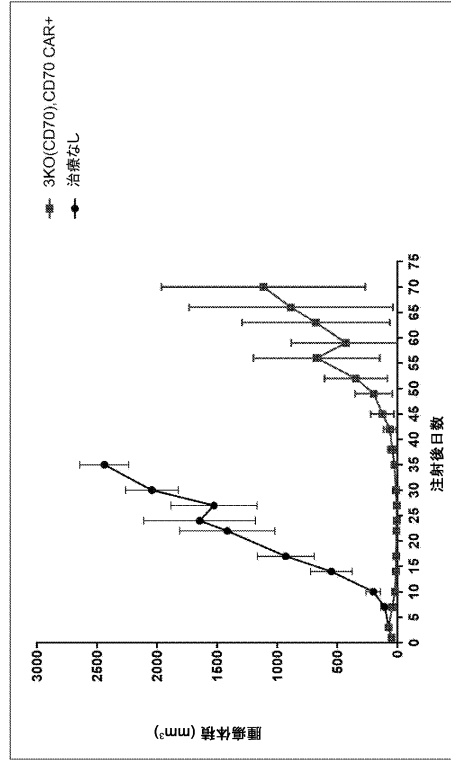


図 42B

【 図 4 2 C 】

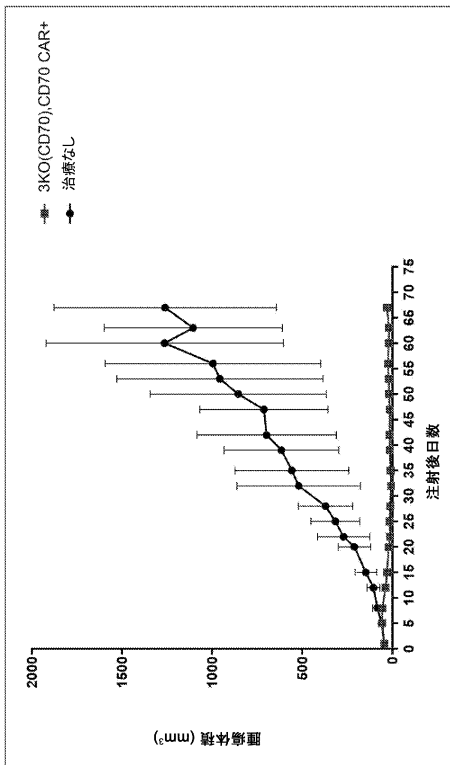


図 42C

【 図 4 2 D 】

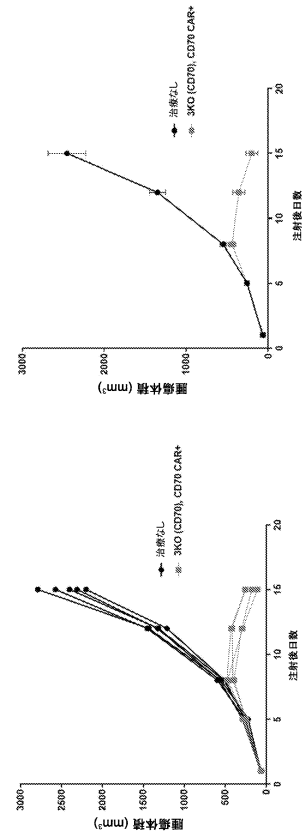


図 42D

10

20

30

40

50

【配列表】

0007542441000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

C 0 7 K	14/725 (2006.01)	C 0 7 K	14/725	
C 0 7 K	14/705 (2006.01)	C 0 7 K	14/705	
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 1 0

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/701,340

(32)優先日 平成30年7月20日(2018.7.20)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/773,658

(32)優先日 平成30年11月30日(2018.11.30)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/826,600

(32)優先日 平成31年3月29日(2019.3.29)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

## 前置審査

(74)代理人 100108903

弁理士 中村 和広

(72)発明者 ジョナサン アレクサンダー テレット

アメリカ合衆国, マサチューセッツ 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, メイン ストリート 6 1 0

(72)発明者 デメトリオス カライツィディス

アメリカ合衆国, マサチューセッツ 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, メイン ストリート 6 1 0

(72)発明者 メアリー - リ デケアン

アメリカ合衆国, マサチューセッツ 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, メイン ストリート 6 1 0

(72)発明者 ジンカル サミール パダリア

アメリカ合衆国, マサチューセッツ 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, メイン ストリート 6 1 0

審査官 鳥居 敬司

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 7 / 1 8 2 6 0 8 ( W O , A 1 )

特表 2 0 1 4 - 5 0 4 1 4 8 ( J P , A )

Immunity, 2013, Vol.38, pp.53-65

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 5 / 0 0 - 5 / 2 8

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

U n i P r o t / G e n e S e q