

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7620374号
(P7620374)

(45)発行日 令和7年1月23日(2025.1.23)

(24)登録日 令和7年1月15日(2025.1.15)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	35/17 (2025.01)	A 6 1 K	35/17
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395
		N	
		請求項の数 19 (全73頁) 最終頁に続く	
(21)出願番号	特願2021-536031(P2021-536031)	(73)特許権者	500429103
(86)(22)出願日	令和1年12月19日(2019.12.19)		ザ トラストィーズ オブ ザ ユニバーシ
(65)公表番号	特表2022-515194(P2022-515194		ティ オブ ペンシルバニア
	A)		アメリカ合衆国 1 9 1 0 4 ペンシルベ
(43)公表日	令和4年2月17日(2022.2.17)		ニア州 フィラデルフィア シビック セ
(86)国際出願番号	PCT/US2019/067613		ンター ブールバード 3 6 0 0 ナインス
(87)国際公開番号	WO2020/132327		フロア
(87)国際公開日	令和2年6月25日(2020.6.25)	(74)代理人	100102978
審査請求日	令和4年12月16日(2022.12.16)		弁理士 清水 初志
(31)優先権主張番号	62/782,131	(74)代理人	100160923
(32)優先日	平成30年12月19日(2018.12.19)		弁理士 山口 裕孝
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
		(74)代理人	100142929
			弁理士 井上 隆一
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 T細胞リンパ腫およびT細胞白血病に対するCD2／5／7ノックアウト抗CD2／5／7キメラ抗原受容体T細胞の使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

T細胞の集団を含む、薬学的組成物であって、該集団が、キメラ抗原受容体（CAR）を含む第1のT細胞集団、および変異した内在性CD5遺伝子を含む第2のT細胞集団を含み、かつ、前記キメラ抗原受容体が、CD5に結合する抗原結合ドメインを含む、薬学的組成物。

【請求項2】

前記変異した内在性CD5遺伝子が、CD5のエクソン2に変異を含む、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項3】

前記変異した内在性CD5遺伝子が、エクソン2の欠失を含む、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項4】

前記変異した内在性CD5遺伝子を含む細胞集団が、内在性CD5タンパク質の発現が低下している、請求項1～3のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項5】

前記抗原結合ドメインが、SEQ ID NO: 83～88、および95～100からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域（CDR）を含む、請求項1～4のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項6】

前記抗原結合ドメインが、重鎖可変領域（VH）および軽鎖可変領域（VL）を含み、かつ、該VHが、SEQ ID NO: 75のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、該VLが、SEQ ID NO: 76のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1～4のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項7】

前記VHが、SEQ ID NO: 75のアミノ酸配列と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、前記VLが、SEQ ID NO: 76のアミノ酸配列と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項6記載の薬学的組成物。

【請求項8】

前記VHが、SEQ ID NO: 75のアミノ酸配列を含み、前記VLが、SEQ ID NO: 76のアミノ酸配列を含む、請求項7記載の薬学的組成物。

10

【請求項9】

前記抗原結合ドメインが、SEQ ID NO: 73、74、79、80、91、および92からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むsvFvを含む、請求項1～4のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項10】

前記抗原結合ドメインが、SEQ ID NO: 74のアミノ酸配列を含むscFvを含む、請求項9記載の薬学的組成物。

【請求項11】

前記CARが、SEQ ID NO: 71、72、77、78、89、および90からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1～4のいずれか一項記載の薬学的組成物。

20

【請求項12】

前記CARが、SEQ ID NO: 72のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1～4のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項13】

前記CARが、SEQ ID NO: 72のアミノ酸配列を含む、請求項1～4のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項14】

医薬として使用するための、請求項1～13のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項15】

30

対象におけるがんを処置する方法において使用するための、請求項1～13のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項16】

がんが、T細胞リンパ腫またはT細胞白血病である、請求項15記載の薬学的組成物。

【請求項17】

前記がんが、T細胞リンパ腫である、請求項15記載の薬学的組成物。

【請求項18】

がんが、急性骨髄性白血病（AML）、T細胞性急性リンパ芽球性白血病（T-ALL）、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、または慢性リンパ性白血病（CLL）である、請求項15記載の薬学的組成物。

40

【請求項19】

対象におけるがんを処置するためのキメラ抗原受容体を含むT細胞の効力を増強する方法において使用するための、請求項1～13のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる2018年12月19日に出願された米国仮特許出願第62/782,131号に基づく、35 U.S.C. § 119(e)による優先権を有する。

50

【背景技術】

【0002】

発明の背景

T細胞リンパ腫およびT細胞白血病は、T細胞前駆細胞または分化T細胞に由来する侵襲性の新生物である。成熟T細胞リンパ腫または末梢性T細胞リンパ腫は、全ての非ホジキンリンパ腫の10%~15%、または米国内の年間およそ7,000~10,000例を占める。T細胞リンパ腫およびT細胞白血病は、予後不良であり、利用可能な処置がほとんど存在しない。キメラ抗原受容体T細胞（CAR）治療は、B細胞性新生物に対する効力を示したが、大部分の標的抗原が正常細胞と悪性細胞との間で共有されており、CAR T細胞の兄弟殺しをもたらすため、CAR T細胞の成功をT細胞悪性腫瘍へ拡張することは困難である。

10

【0003】

T細胞リンパ腫およびT細胞白血病を処置するための組成物および方法、ならびにCAR T細胞の兄弟殺しを排除する方法が、必要とされている。本発明は、この必要性を解決する。

【発明の概要】

【0004】

本明細書に記載されるように、本発明は、CD2、CD5、またはCD7を標的とするCAR T細胞、およびCD2、CD5、またはCD7がノックアウトされている改変細胞を利用する組成物および方法に関する。

【0005】

1つの局面において、本発明は、それを必要とする対象においてがんを処置する方法を含む。本法は、抗原結合ドメインと膜貫通ドメインと細胞内ドメインとを含むキメラ抗原受容体（CAR）を含む第1の改変細胞を対象へ投与する工程、および内在性CD5遺伝子がノックアウトされている第2の改変細胞を対象へ投与する工程を含む。

20

【0006】

もう1つの局面において、本発明は、それを必要とする対象においてがんを処置する方法を含む。本法は、CD2に結合することができる抗原結合ドメインと膜貫通ドメインと細胞内ドメインとを含むキメラ抗原受容体（CAR）を含む第1の改変細胞を対象へ投与する工程、および内在性CD2遺伝子がノックアウトされている第2の改変細胞を対象へ投与する工程を含む。

【0007】

さらにもう1つの局面において、本発明は、それを必要とする対象においてがんを処置する方法を含む。本法は、CD5に結合することができる抗原結合ドメインと膜貫通ドメインと細胞内ドメインとを含むCARを含む第1の改変細胞を対象へ投与する工程、および内在性CD5遺伝子がノックアウトされている第2の改変細胞を対象へ投与する工程を含む。

30

【0008】

さらにもう1つの局面において、本発明は、CD7に結合することができる抗原結合ドメインと膜貫通ドメインと細胞内ドメインとを含むCARを含む第1の改変細胞を対象へ投与する工程、および内在性CD7遺伝子がノックアウトされている第2の改変細胞を対象へ投与する工程を含む、それを必要とする対象においてがんを処置する方法を含む。

【0009】

本発明のもう1つの局面は、CD2に結合することができる抗原結合ドメインと膜貫通ドメインと細胞内ドメインとを含むCARを含む核酸を含む。

40

【0010】

本発明のさらにもう1つの局面は、CD5に結合することができる抗原結合ドメインと膜貫通ドメインと細胞内ドメインとを含むCARを含む核酸を含む。

【0011】

本発明のさらにもう1つの局面は、本明細書中に開示された核酸のいずれかを含むベクターを含む。

【0012】

もう1つの局面において、本発明は、本明細書中に開示された核酸のいずれかまたは本

50

明細書中に開示されたベクターのいずれかを含む細胞を含む。

【0013】

さらにもう1つの局面において、本発明は、CD2を標的とする抗原結合ドメインと膜貫通ドメインと細胞内ドメインとを含むキメラ抗原受容体（CAR）を含む第1の改変細胞、および内在性CD2遺伝子がノックアウトされている第2の改変細胞を含む、組成物を含む。

【0014】

さらにもう1つの局面において、本発明は、CD5を標的とする抗原結合ドメインと膜貫通ドメインと細胞内ドメインとを含むキメラ抗原受容体（CAR）を含む第1の改変細胞、および内在性CD5遺伝子がノックアウトされている第2の改変細胞を含む、組成物を含む。

【0015】

もう1つの局面において、本発明は、CD7を標的とする抗原結合ドメインと膜貫通ドメインと細胞内ドメインとを含むキメラ抗原受容体（CAR）を含む第1の改変細胞、および内在性CD7遺伝子がノックアウトされている第2の改変細胞を含む、組成物を含む。

【0016】

本発明のもう1つの局面は、抗原結合ドメインと膜貫通ドメインと細胞内ドメインとを含むキメラ抗原受容体（CAR）を含む第1の改変細胞、および内在性CD5遺伝子がノックアウトされている第2の改変細胞を含む、組成物を含む。

【0017】

本発明の前記の局面または任意の他の局面の様々な態様において、内在性遺伝子は、CRISPR法を用いてノックアウトされている。ある態様において、CRISPR法は、CRISPR/Cas9法である。ある態様において、CRISPR/Cas9法は、SEQ ID NO:23のヌクレオチド配列を含むsgRNAを利用する。ある態様において、CRISPR/Cas9法は、SEQ ID NO:22～24からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むsgRNAを利用する。

【0018】

ある態様において、CARの抗原結合ドメインは、CD5、CD19、CD2、CD7、腫瘍特異抗原（TSA）、腫瘍関連抗原（TAA）、グリオーマ関連抗原、癌胎児抗原（CEA）、 β -ヒト絨毛性ゴナドトロピン、 α フェトプロテイン（AFP）、レクチン反応性AFP、サイログロブリン、RAGE-1、MN-CA IX、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、RU1、RU2（AS）、腸カルボキシシルエステラーゼ、mut hsp70-2、M-CSF、プロスターゼ（prostase）、前立腺特異抗原（PSA）、PAP、NY-ESO-1、LAGE-1a、p53、プロステイン（prostein）、PSMA、Her2/neu、サバイビン、テロメラーゼ、前立腺癌腫瘍抗原-1（PCTA-1）、MAGE、ELF2M、好中球エラスターゼ、エフリンB2、CD22、インスリン増殖因子（IGF）-I、IGF-II、IGF-I受容体、メソテリン、MART-1/メラニンA（MART-I）、gp100（Pmel 17）、チロシナーゼ、TRP-1、TRP-2、MAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15、Ras、BCR-ABL、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、EBVA、HPV抗原E6、HPV抗原E7、TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、RAGE、NY-ESO、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、PSA、TAG-72、CA 19-9、CA 72-4、CAM 17.1、NuMa、K-ras、 β カテニン、CDK4、Mum-1、p 15、p 16、43-9F、5T4、791Tgp72、 α -フェトプロテイン、 β -HCG、BCA225、BTAA、CA 125、CA 15-3、CA 27.29、BCAA、CA 195、CA 242、CA-50、CAM43、CD68、P1、CO-029、FGF-5、G250、Ga733、EpCAM、HTgp-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB/70K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90、Mac-2結合タンパク質、シクロフィリンC関連タンパク質、TAAL6、TAG72、TLP、およびTPSからなる群より選択される抗原と結合することができる。

【0019】

ある態様において、CARの抗原結合ドメインは、SEQ ID NO:31～36、43～48、53～58、65～70、83～88、および95～100からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域（CDR）を含む。ある態様において、CARの抗原結合ドメインは、SEQ ID NO:31～36、43～48、53～58、および65～70からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域（CDR）を含む。ある態様において、CARの抗原結合ドメインは、

10

20

30

40

50

SEQ ID NO:83～88および95～100からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域（CDR）を含む。

【0020】

ある態様において、CARの抗原結合ドメインは、SEQ ID NO:29、41、51、63、75、81、および93からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。ある態様において、CARの抗原結合ドメインは、SEQ ID NO:30、42、52、64、76、82、および94からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0021】

ある態様において、CARの抗原結合ドメインは、SEQ ID NO:29、41、51、および63からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。ある態様において、CARの抗原結合ドメインは、SEQ ID NO:30、42、52、および64からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

10

【0022】

ある態様において、CARの抗原結合ドメインは、SEQ ID NO:75、81、および93からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。ある態様において、CARの抗原結合ドメインは、SEQ ID NO:76、82、および94からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0023】

ある態様において、CARの抗原結合ドメインは、SEQ ID NO:27、28、39、40、50、61、62、73、74、79、80、91、および92からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むscFvを含む。ある態様において、CARの抗原結合ドメインは、SEQ ID NO:27、28、39、40、50、61、および62からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むscFvを含む。ある態様において、CARの抗原結合ドメインは、SEQ ID NO:73、74、79、80、91、および92からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むscFvを含む。

20

【0024】

ある態様において、CARは、SEQ ID NO:25、26、37、38、49、59、60、71、72、77、78、89、および90からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。ある態様において、CARは、SEQ ID NO:25、26、37、38、49、59、および60からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。ある態様において、CARは、SEQ ID NO:71、72、77、78、89、および90からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。

30

【0025】

ある態様において、CARは、SEQ ID NO:1～13からなる群より選択される核酸配列によってコードされる。ある態様において、CARは、SEQ ID NO:1～7からなる群より選択される核酸配列によってコードされる。ある態様において、CARは、SEQ ID NO:8～13からなる群より選択される核酸配列によってコードされる。

【0026】

ある態様において、CARは、自殺遺伝子をさらに含む。ある態様において、自殺遺伝子は、iCaspase9である。

【0027】

ある態様において、第1および第2の改変細胞はT細胞である。

40

【0028】

ある態様において、がんは、T細胞リンパ腫またはT細胞白血病を含む。ある態様において、がんは、急性骨髄性白血病（AML）、T細胞性急性リンパ芽球性白血病（T-ALL）、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、および慢性リンパ性白血病（CLL）からなる群より選択される。

【0029】

ある態様において、組成物は、薬学的に許容される担体を含む。

[本発明1001]

以下の工程を含む、それを必要とする対象においてがんを処置する方法：

抗原結合ドメインと膜貫通ドメインと細胞内ドメインとを含むキメラ抗原受容体（CAR

50

）を含む第1の改変細胞を該対象へ投与する工程、および

内在性CD5遺伝子がノックアウトされている第2の改変細胞を該対象へ投与する工程。

[本発明1002]

内在性CD5遺伝子が、CRISPR法を使用してノックアウトされている、本発明1001の方法。

[本発明1003]

CRISPR法がCRISPR/Cas9法である、本発明1002の方法。

[本発明1004]

CRISPR/Cas9法が、SEQ ID NO:23のヌクレオチド配列を含むsgRNAを利用する、本発明1003の方法。

[本発明1005]

CARの抗原結合ドメインが、CD5、CD19、CD2、CD7、腫瘍特異抗原（TSA）、腫瘍関連抗原（TAA）、グリオーマ関連抗原、癌胎児抗原（CEA）、 β -ヒト絨毛性ゴナドトロピン、 α フェトプロテイン（AFP）、レクチン反応性AFP、サイログロブリン、RAGE-1、MN-CA IX、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、RU1、RU2（AS）、腸カルボキシエステラーゼ、mut hsp70-2、M-CSF、プロスターゼ（prostase）、前立腺特異抗原（PSA）、PAP、NY-ESO-1、LAGE-1a、p53、プロステイン（prostein）、PSMA、Her2/neu、サバイビン、テロメラーゼ、前立腺癌腫瘍抗原-1（PCTA-1）、MAGE、ELF2M、好中球エラスターゼ、エフリンB2、CD22、インスリン増殖因子（IGF）-I、IGF-II、IGF-I受容体、メソテリン、MART-1/メラニンA（MART-I）、gp100（Pmel 17）、チロシナーゼ、TRP-1、TRP-2、MAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15、Ras、BCR-ABL、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、EBVA、HPV抗原E6、HPV抗原E7、TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、RAGE、NY-ESO、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、PSA、TAG-72、CA 19-9、CA 72-4、CAM 17.1、NuMa、K-ras、 β -カテニン、CDK4、Mum-1、p 15、p 16、43-9F、5T4、791Tgp72、 α -フェトプロテイン、 β -HCG、BCA225、BTAA、CA 125、CA 15-3、CA 27.29、BCAA、CA 195、CA 242、CA-50、CAM43、CD68、P1、CO-029、FGF-5、G250、Ga733、EpCAM、HTgp-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB/70K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90、Mac-2結合タンパク質、シクロフィリンC関連タンパク質、TAAL6、TAG72、TLP、およびTPSからなる群より選択される抗原と結合することができる、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1006]

CARの抗原結合ドメインが、SEQ ID NO:31~36、43~48、53~58、65~70、83~88、および95~100からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域（CDR）を含む、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1007]

CARの抗原結合ドメインが、SEQ ID NO:29、41、51、63、75、81、および93からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1008]

CARの抗原結合ドメインが、SEQ ID NO:30、42、52、64、76、82、および94からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1009]

CARの抗原結合ドメインが、SEQ ID NO:27、28、39、40、50、61、62、73、74、79、80、91、および92からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むscFvを含む、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1010]

CARが、SEQ ID NO:25、26、37、38、49、59、60、71、72、77、78、89、および90からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、前記本発明のいずれかの方法。

10

20

30

40

50

[本発明1011]

CARが、SEQ ID NO:1～13からなる群より選択される核酸配列によってコードされる、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1012]

CARが自殺遺伝子をさらに含む、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1013]

自殺遺伝子がiCaspase9である、本発明1012の方法。

[本発明1014]

第1および第2の改変細胞がT細胞である、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1015]

がんがT細胞リンパ腫またはT細胞白血病を含む、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1016]

がんが、急性骨髄性白血病（AML）、T細胞性急性リンパ芽球性白血病（T-ALL）、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、および慢性リンパ性白血病（CLL）からなる群より選択される、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1017]

以下の工程を含む、それを必要とする対象においてがんを処置する方法：

CD2に結合することができる抗原結合ドメインと膜貫通ドメインと細胞内ドメインとを含むキメラ抗原受容体（CAR）を含む第1の改変細胞を該対象へ投与する工程、および内在性CD2遺伝子がノックアウトされている第2の改変細胞を該対象へ投与する工程。

[本発明1018]

CARの抗原結合ドメインが、SEQ ID NO:31～36、43～48、53～58、および65～70からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域（CDR）を含む、本発明1017の方法。

[本発明1019]

CARの抗原結合ドメインが、SEQ ID NO:29、41、51、および63からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、本発明1018の方法。

[本発明1020]

CARの抗原結合ドメインが、SEQ ID NO:30、42、52、および64からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、本発明1017～1019のいずれかの方法。

[本発明1021]

CARの抗原結合ドメインが、SEQ ID NO:27、28、39、40、50、61、および62からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むscFvを含む、本発明1018の方法。

[本発明1022]

CARが、SEQ ID NO:25、26、37、38、49、59、および60からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、本発明1018の方法。

[本発明1023]

CARが、SEQ ID NO:1～7からなる群より選択される核酸配列によってコードされる、本発明1018の方法。

[本発明1024]

以下の工程を含む、それを必要とする対象においてがんを処置する方法：

CD5に結合することができる抗原結合ドメインと膜貫通ドメインと細胞内ドメインとを含むCARを含む第1の改変細胞を該対象へ投与する工程、および内在性CD5遺伝子がノックアウトされている第2の改変細胞を該対象へ投与する工程。

[本発明1025]

CARの抗原結合ドメインが、SEQ ID NO:83～88および95～100からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域（CDR）を含む、本発明1024の方法。

[本発明1026]

CARの抗原結合ドメインが、SEQ ID NO:75、81、および93からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、本発明1024の方法。

10

20

30

40

50

[本発明1027]

CARの抗原結合ドメインが、SEQ ID NO:76、82、および94からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、本発明1024の方法。

[本発明1028]

CARの抗原結合ドメインが、SEQ ID NO:73、74、79、80、91、および92からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むscFvを含む、本発明1024の方法。

[本発明1029]

CARが、SEQ ID NO:71、72、77、78、89、および90からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、本発明1024の方法。

[本発明1030]

CARが、SEQ ID NO:8～13からなる群より選択される核酸配列によってコードされる、本発明1018の方法。

[本発明1031]

以下の工程を含む、それを必要とする対象においてがんを処置する方法：
CD7に結合することができる抗原結合ドメインと膜貫通ドメインと細胞内ドメインとを含むCARを含む第1の改変細胞を該対象へ投与する工程、および
内在性CD7遺伝子がノックアウトされている第2の改変細胞を該対象へ投与する工程。

[本発明1032]

第1および第2の改変細胞がT細胞である、本発明1017～1031のいずれかの方法。

[本発明1033]

がんがT細胞リンパ腫またはT細胞白血病を含む、本発明1017～1032のいずれかの方法。

[本発明1034]

がんが急性骨髄性白血病（AML）、T細胞性急性リンパ芽球性白血病（T-ALL）、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、および慢性リンパ性白血病（CLL）からなる群より選択される、本発明1017～1032のいずれかの方法。

[本発明1035]

内在性遺伝子が、CRISPR/Cas9法を使用してノックアウトされている、本発明1017～1034のいずれかの方法。

[本発明1036]

CRISPR/Cas9法が、SEQ ID NO:22～24からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むsgRNAを利用する、本発明1035の方法。

[本発明1037]

CARが自殺遺伝子をさらに含む、本発明1017～1036のいずれかの方法。

[本発明1038]

自殺遺伝子がiCaspase9である、本発明1037の方法。

[本発明1039]

CD2に結合することができる抗原結合ドメインと膜貫通ドメインと細胞内ドメインとを含むCARを含む核酸。

[本発明1040]

抗原結合ドメインが、SEQ ID NO:31～36、43～48、53～58、および65～70からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域（CDR）を含む、本発明1039の核酸。

[本発明1041]

抗原結合ドメインが、SEQ ID NO:29、41、51、および63からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、本発明1039の核酸。

[本発明1042]

抗原結合ドメインが、SEQ ID NO:30、42、52、および64からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、本発明1039の核酸。

[本発明1043]

CARの抗原結合ドメインが、SEQ ID NO:27、28、39、40、50、61、および62からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むscFvを含む、本発明1039の核酸。

[本発明1044]

CARが、SEQ ID NO:25、26、37、38、49、59、および60からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、本発明1039の核酸。

[本発明1045]

CARが、SEQ ID NO:1～7からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされる、本発明1039の核酸。

[本発明1046]

CD5に結合することができる抗原結合ドメインと膜貫通ドメインと細胞内ドメインとを含むCARを含む核酸。

[本発明1047]

抗原結合ドメインが、SEQ ID NO:83～88および95～100からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域（CDR）を含む、本発明1046の核酸。

[本発明1048]

抗原結合ドメインが、SEQ ID NO:75、81、および93からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、本発明1046の核酸。

[本発明1049]

抗原結合ドメインが、SEQ ID NO:76、82、および94からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、本発明1046の核酸。

[本発明1050]

CARの抗原結合ドメインが、SEQ ID NO:73、74、79、80、91、および92からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むscFvを含む、本発明1046の核酸。

[本発明1051]

CARが、SEQ ID NO:71、72、77、78、89、および90からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、本発明1046の核酸。

[本発明1052]

CARが、SEQ ID NO:8～13からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされる、本発明1046の核酸。

[本発明1053]

本発明1039～1052のいずれかの核酸を含むベクター。

[本発明1054]

本発明1039～1052のいずれかの核酸または本発明1053のベクターを含む、細胞。

[本発明1055]

CD2を標的とする抗原結合ドメインと膜貫通ドメインと細胞内ドメインとを含むキメラ抗原受容体（CAR）を含む第1の改変細胞、および内在性CD2遺伝子がノックアウトされている第2の改変細胞を含む、組成物。

[本発明1056]

CD5を標的とする抗原結合ドメインと膜貫通ドメインと細胞内ドメインとを含むキメラ抗原受容体（CAR）を含む第1の改変細胞、および内在性CD5遺伝子がノックアウトされている第2の改変細胞を含む、組成物。

[本発明1057]

CD7を標的とする抗原結合ドメインと膜貫通ドメインと細胞内ドメインとを含むキメラ抗原受容体（CAR）を含む第1の改変細胞、および内在性CD7遺伝子がノックアウトされている第2の改変細胞を含む、組成物。

[本発明1058]

抗原結合ドメインと膜貫通ドメインと細胞内ドメインとを含むキメラ抗原受容体（CAR）を含む第1の改変細胞、および内在性CD5遺伝子がノックアウトされている第2の改変細胞を含む、組成物。

[本発明1059]

10

20

30

40

50

抗原結合ドメインが、CD5、CD19、CD2、CD7、腫瘍特異抗原（TSA）、腫瘍関連抗原（TAA）、グリオーマ関連抗原、癌胎児抗原（CEA）、 β -ヒト絨毛性ゴナドトロピン、 α フェトプロテイン（AFP）、レクチン反応性AFP、サイログロブリン、RAGE-1、MN-C A IX、ヒトテロメラゼ逆転写酵素、RU1、RU2（AS）、腸カルボキシエステラーゼ、mut hsp70-2、M-CSF、プロスターゼ、前立腺特異抗原（PSA）、PAP、NY-ESO-1、LAGE-1a、p53、プロステイン、PSMA、Her2/neu、サバイビン、テロメラゼ、前立腺癌腫瘍抗原-1（PCTA-1）、MAGE、ELF2M、好中球エラスターゼ、エフリンB2、CD 22、インスリン増殖因子（IGF）-I、IGF-II、IGF-I受容体、メソテリン、MART-1/メラニンA（MART-I）、gp100（Pmel 17）、チロシナーゼ、TRP-1、TRP-2、MAGE-1、M AGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15、Ras、BCR-ABL、E2A-PRL、H4-RET、IG H-IGK、MYL-RAR、EBVA、HPV抗原E6、HPV抗原E7、TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、RAGE、NY-ESO、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、PSA、TAG-72、CA 19-9、CA 72-4、CAM 17.1、NuMa、K-ras、 β -カテニン、CDK4、Mum-1、p 15、p 16、43-9F、5T4、791Tgp72、 α -フェトプロテイン、 β -HCG、B CA225、BTAA、CA 125、CA 15-3、CA 27.29、BCAA、CA 195、CA 242、CA-50、CAM43、CD68、P1、CO-029、FGF-5、G250、Ga733、EpCAM、HTgp-175、M 344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB/70K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-9 0、Mac-2結合タンパク質、シクロフィリンC関連タンパク質、TAAL6、TAG72、TLP、およびTPSからなる群より選択される抗原と結合することができる、本発明1058の組成物。

10

20

[本発明1060]

本発明1055～1059のいずれかの組成物および薬学的に許容される担体。

[本発明1061]

CARが、SEQ ID NO:1～13からなる群より選択される核酸配列によってコードされる、本発明1055～1060のいずれかの組成物。

[本発明1062]

CARが、SEQ ID NO:25、26、37、38、49、59、60、71、72、77、78、89、および90からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、本発明1055～1060のいずれかの組成物。

【図面の簡単な説明】

30

【0030】

本発明の具体的な態様の以下の詳細な説明は、添付の図面と併せて参照された時、よりよく理解されるであろう。本発明を例示するため、図面には例示的な態様が表示される。しかしながら、本発明は、図面に示された態様の正確な配置および手段に限定されないことが理解されるべきである。

【0031】

【図1】T細胞性新生物のためのCART治療に関する現在の問題を示す模式図である。

【図2】(i) 腫瘍標的が遺伝子編集を使用して正常T細胞から除去され、それによって、製造中の兄弟殺しを回避し；(ii) CARTによる死滅によって影響を受けないT細胞免疫を提供するため、T細胞標的がノックアウト（KO）されている正常T細胞を含む第2のT細胞生成物が、抗T細胞性新生物CARTと共注入される、革新的戦略の開発を示す模式図である。

40

【図3】T細胞傷害を引き起こすことなく、T細胞リンパ腫を標的とするための新規アプローチを示す模式図である。抗T-NHL（またはT-ALL）CART（CART2/5/7のいずれか、例えば、CART2）およびCD2/5/7ノックアウト正常T細胞を含む二面免疫治療が使用される。CARTは、腫瘍細胞を破壊するが、正常T細胞も死滅させる。CD2/5/7（またはその他の腫瘍標的）KO正常T細胞の注入は、CART細胞が枯渇するまで、CART抵抗性T細胞免疫を提供する。

【図4】本明細書において使用される抗CD2 CAR構築物および抗CD5 CAR構築物を示す。全ての構築物が、レンチウイルスpTRPE 4-1BB CD3ζ骨格を有する。

50

【図5】T細胞におけるCAR形質導入効率を示す。高い親和性（#17）、中程度の親和性（#34）、低い親和性（#9）を有する単鎖可変断片（scFv）を使用して、6つの異なるCAR構築物を生成した。T細胞を抗CD3/CD28ビーズ（Dynabeads）によって活性化し、24時間後に、レンチウイルスベクターを3のMOIで添加した。6日目にDynabeadsを除去した。平均体積が350fl未満になった時、CAR細胞を凍結させた。CAR発現（ヤギ抗マウスFab抗体）を6日目に試験した。

【図6】CD5（またはCD2またはCD7）KO製造プロセスおよびCRISPR-Cas9 KO効率を示す。

【図7】いくつかのCAR群の拡大曲線を示す。CD2 KOなしでは、CAR2細胞は拡大しない。KOによって、CAR2およびCAR5は、約5〜8集団倍加に達した。

【図8】CD5のCRISPR-Cas9 KOなしで、CD5平均蛍光強度（MFI）は、対照T細胞と比較して、CAR5において10倍低かったが、CD2のような他の汎T細胞マーカーには変化がなかったことを示す。

【図9】CAR2およびCAR5の拡大曲線を示す。T細胞濃度はCoulter Counterを使用して測定された。

【図10】6つの異なるCAR2構築物が、ルシフェラーゼ+Jurkat細胞（T細胞白血病細胞株）との共培養によって、インビトロでチャレンジされた実験からの結果を示す。24時間目に、発光の相対的な低下として、全死滅を測定した。C3029、C3030、およびC3043のみが、抗腫瘍効果を示した。

【図11】6つの異なるCAR5構築物が、ルシフェラーゼ+Jurkat細胞（T細胞白血病細胞株）との共培養によって、インビトロでチャレンジされた実験からの結果を示す。24時間目に、発光の相対的な低下として、全死滅を測定した。全てのCAR5構築物が、類似した抗腫瘍効果を示した。

【図12】CAR2およびCAR5のインビボ効力を示す。NSGマウスにルシフェラーゼ+Jurkat細胞を移植し、7日目に、対照T細胞またはCAR2もしくはCAR5（ 1×10^6 ）を受容するよう、マウスをランダム化した。マウスをIVIS Xenogen Spectrumを使用して毎週画像化し、LivingImageソフトウェアによって分析した。CAR2 C3043およびCAR5 C3054が、最も効果的であった。

【図13】Jurkat細胞を、異なるCAR5構築物（標的とされたエピトープおよび親和性が左に示される）ならびにGFP-NFATレポーターによって形質導入し、次いで、CD5+腫瘍細胞（または対照）と24時間共培養した実験からの結果を示す。リードCAR5（C3054）は、増加したNFAT活性化を示した。

【図14】Jurkat細胞を、異なるCAR2構築物およびGFP-NFATレポーターによって形質導入し、次いで、CD2+腫瘍細胞（または対照）と24時間共培養した実験からの結果を示す。リードCAR2（C3043）は、増加したNFAT活性化を示した。

【図15】皮膚T細胞リンパ腫に対するCAR2およびCAR5の活性を示す。24時間死滅アッセイの結果を示す。CAR2細胞は、初代セザリー細胞（白血病性皮膚T細胞リンパ腫）およびHHセザリー細胞株に対して活性である。CAR5も、HH細胞に対して活性であった。

【図16】CAR2およびCAR5が、正常T細胞（自己（上）および同種（下））を認識し、それらを死滅させることができるという所見を示す。

【図17】CAR標的の除去が、正常T細胞をCARによる死滅から防御するという所見を示す。CD5 KOは、CAR5による死滅に対して抵抗性であるが、WT正常T細胞はそうでない。正常休止T細胞は、CAR2（上）およびCAR5（下）によって認識され、死滅させられる。CRISPR-Cas9を使用した正常T細胞からのCD2またはCD5の効率的なKOは、それぞれ、CAR2またはCAR5による死滅に対する抵抗性をもたらす。

【図18】CD2KOおよびCD5KOの正常T細胞生成物中にCMV特異的T細胞が存在するという所見を示す。CD2 KOおよびCD5 KOの正常T細胞は、CMVペプチドを認識し、サイトカインを産生する能力を維持している。（HLA-A-02:01-CMV PP65 NLVPMVATVペプチド；SEQ ID NO:101）；CETPペプチドへの4h曝露後のICS。CMV-ペプチド

10

20

30

40

50

パルスAPCとの2次培養後)。

【図19】二重特異性CAR T細胞の開発を示す。P2A配列によって連結されたCAR5 (C3054) およびCAR2 (C3043) を含む2つのレンチウイルス構築物を生成した。遺伝子発現はEF1 α プロモーターによって駆動される。CAR5構築物は、4-1BB共刺激ドメインおよびCD3 ζ シグナル伝達ドメインを有する。

【図20A】図20A～20Bは、二重KO CART細胞を示す。フローサイトメトリーによって示されたような、正常T細胞におけるCD2およびCD5の両方の効率的なノックアウト。

【図20B】図20Aの説明を参照されたい。

【図21】CD5 KO CART5はインビボでCD5+CART5より効果的であるという所見を示す。CD5 KOは、CART5の抗腫瘍効力を増加させる。NSGマウスを使用したJurkat T-ALL異種移植モデルにおいて、CD5 KO CART5 (2 $\times$ 10⁶細胞/マウス) は、長期にわたる完全な応答、およびWT CART5と比較して、より長い生存をもたらす。

【図22】CD5 KO CART19はインビボでCD5+CART19より効果的であるという所見を示す。CD5 KOは、CART19の抗腫瘍効力を増加させる。NALM6 B-ALL異種移植モデルにおいて、CD5 KO CART19は、WT CART19と比較して、著しく高い腫瘍コントロールを有する。

【図23】図23A～23Bは、CART5およびCART2はAMLの20%を標的とすることができるという所見を示す。図23Aは、AMLにおけるCD2発現を示す。図23Bは、24時間死滅アッセイからの結果を示す。CART2細胞は、CD2+AML細胞と共培養され、24時間目に有意な死滅を示した

【図24】CART5はCLLおよびMCLの100%を標的とすることができるという所見を示す。結果は、CART5細胞がCD5+MCL細胞株 (Jeko-1およびMino) を認識し、死滅させることができることを示す細胞傷害アッセイからのものである。

【図25】T細胞においてCD7をノックアウトするためのsgRNAの開発 (上) およびCD7に対する6つのCAR構築物の生成を示す。

【図26】本明細書において使用されたCasp9-CAR5レンチウイルス構築物を示す。CAR5 (C3054)、P2A配列、次いで、iCaspase9自殺遺伝子 (iC9) を含むか、またはiC9-P2A-C3054を含む、2つのレンチウイルス構築物を生成した。遺伝子発現は、EF1 α プロモーターによって駆動される。CAR5構築物は、4-1BB共刺激ドメインおよびCD3 ζ シグナル伝達ドメインを有する。

【発明を実施するための形態】

【0032】

詳細な説明

定義

他に定義されない限り、本明細書において用いられる全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書において記述された方法および材料と類似または同等の任意の方法および材料を本発明の試験の実践において用いることができるが、好ましい材料および方法が本明細書において記述される。本発明を記述および主張するうえで、以下の専門用語が用いられる。

【0033】

本明細書において用いられる専門用語は、特定の態様のみを説明するためのものであり、限定することを意図するものではないことも理解されたい。

【0034】

「1つの(a)」および「1つの(an)」という冠詞は本明細書において、その冠詞の文法的目的語の1つまたは2つ以上(すなわち、少なくとも1つ)をいうように用いられる。例として、「1つの(an)要素」は、1つの要素または2つ以上の要素を意味する。

【0035】

量、時間的持続時間などのような測定可能な値をいう場合に本明細書において用いられる「約」は、規定値から $\pm 20\%$ または $\pm 10\%$ 、より好ましくは $\pm 5\%$ 、さらにより好ましくは $\pm 1\%$ 、なおより好ましくは $\pm 0.1\%$ のバラツキを包含するよう意図されるが、これは

10

20

30

40

50

そのようなバラツキが、開示された方法を実施するのに適切なためである。

【0036】

本明細書において用いられる「活性化」は、検出可能な細胞増殖を誘導するのに十分に刺激されたT細胞の状態をいう。活性化はまた、誘発されたサイトカイン産生および検出可能なエフェクター機能に関連しうる。「活性化T細胞」という用語は、とりわけ、細胞分裂をしているT細胞をいう。

【0037】

本明細書において用いられる「抗体」という用語は、抗原と特異的に結合する免疫グロブリン分子をいう。抗体は、天然供給源または組み換え供給源に由来する無傷の免疫グロブリンであってもよく、無傷の免疫グロブリンの免疫反応性部分であってもよい。抗体は、典型的には、免疫グロブリン分子の四量体である。本発明における抗体は、例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、Fv、FabおよびF(ab')₂、ならびに一本鎖抗体(scFv)およびヒト化抗体を含む、種々の形態で存在しうる(Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426)。

【0038】

「抗体断片」という用語は、無傷の抗体の一部分をいい、無傷の抗体の抗原決定可変領域をいう。抗体断片の例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂およびFv断片、直鎖状抗体、scFv抗体、ならびに抗体断片から形成される多重特異性抗体が挙げられるが、これらに限定されることはない。

【0039】

本明細書において用いられる「抗体重鎖」は、天然に存在する立体配座にある全抗体分子中に存在する2つのタイプのポリペプチド鎖のうち大きい方をいう。

【0040】

本明細書において用いられる「抗体軽鎖」は、天然に存在する立体配座にある全抗体分子中に存在する2つのタイプのポリペプチド鎖のうち小さい方をいう。κおよびλ軽鎖は、2つの主要な抗体軽鎖アイソタイプをいう。

【0041】

本明細書において用いられる用語「合成抗体」とは、例えば、本明細書において記述されるバクテリオファージによって発現される抗体のような、組み換えDNA技術を用いて作製される抗体を意味する。この用語はまた、抗体タンパク質またはその抗体を規定するアミノ酸配列を発現する抗体コードDNA分子の合成によって作製された抗体であって、そのDNA配列またはアミノ酸配列が、利用可能でかつ当技術分野において周知であるDNA配列またはアミノ酸配列の合成技術を用いて得られた抗体も意味するとみなされるべきである。

【0042】

本明細書において用いられる「抗原」または「Ag」という用語は、免疫応答を誘発する分子と定義される。この免疫応答には、抗体産生、または特異的免疫適格細胞の活性化のいずれかまたは両方が含まれうる。当業者は、事実上、全てのタンパク質またはペプチドを含む任意の高分子が抗原として働きうることを理解するであろう。さらに、抗原は、組み換えDNAまたはゲノムDNAに由来することができる。当業者は、免疫応答を惹起するタンパク質をコードするヌクレオチド配列または部分ヌクレオチド配列を含む任意のDNAが、それゆえ、本明細書においてその用語が用いられる通りの「抗原」をコードすることを理解するであろう。さらに、当業者は、抗原が遺伝子の完全長ヌクレオチド配列のみによってコードされる必要はないことを理解するであろう。本発明が、2つ以上の遺伝子の部分ヌクレオチド配列の使用を含むが、これに限定されないこと、およびこれらのヌクレオチド配列が、所望の免疫応答を誘発するために様々な組み合わせで配置されることは容易に明らかである。さらに、当業者は、抗原が「遺伝子」によってコードされる必要は全くないことを理解するであろう。抗原が生体サンプルから作製され、合成されまたは由来し

10

20

30

40

50

うることは容易に明らかである。そのような生体サンプルは、組織サンプル、腫瘍サンプル、細胞または生体液を含むことができるが、これらに限定されることはない。

【0043】

本明細書において用いられる場合、「自己」という用語は、後にその個体に再び導入される、同じ個体に由来する任意の材料をいうよう意図される。

【0044】

「同種」とは、同じ種の異なる動物に由来する任意の物質をいう。

【0045】

「異種」とは、異なる種の動物に由来する任意の物質をいう。

【0046】

「キメラ抗原受容体」または「CAR」という用語は、本明細書において使用されるように、免疫エフェクター細胞において発現され、抗原に特異的に結合するよう、改変された人工T細胞受容体をさす。CARは、養子細胞移入によって、治療として使用され得る。T細胞が患者から取り出され、特定の型の抗原に対して特異的な受容体を発現するよう、修飾される。いくつかの態様において、CARは、選択された標的、例えば、B細胞表面受容体に対する特異性を有する。CARは、細胞内活性化ドメイン、膜貫通ドメイン、および腫瘍関連抗原結合領域を含む細胞外ドメインも含み得る。いくつかの局面において、CARは、CD3と膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインと融合した、抗B細胞結合ドメインを含む細胞外ドメインを含む。

【0047】

「切断」という用語は、核酸分子の骨格などにおける共有結合の破壊、またはペプチド結合の加水分解のことを指す。切断は、ホスホジエステル結合の酵素的または化学的加水分解を非限定的に含む種々の方法によって開始させることができる。一本鎖切断および二本鎖切断の両方が可能である。二本鎖切断は2つの異なる一本鎖切断イベントの結果として起こりうる。DNA切断は、平滑末端または付着末端のいずれかの生成をもたらす。ある態様においては、切断された二本鎖DNAのターゲティングのために融合ポリペプチドを用いることができる。

【0048】

本明細書において用いられる場合、「保存的配列改変」という用語は、アミノ酸配列を含む抗体の結合特性に有意に影響または変化を与えないアミノ酸改変をいうよう意図される。そのような保存的改変には、アミノ酸置換、付加および欠失が含まれる。改変は、部位特異的突然変異誘発およびPCR媒介突然変異誘発のような、当技術分野において公知の標準的な技法によって、本発明の抗体に導入することができる。保存的アミノ酸置換は、アミノ酸残基が、類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられているものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野において定義されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖を有するアミノ酸(例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖を有するアミノ酸(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン)、非極性側鎖を有するアミノ酸(例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン)、β分枝側鎖を有するアミノ酸(例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン)および芳香族側鎖を有するアミノ酸(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)が含まれる。したがって、抗体のCDR領域内の1つまたは複数のアミノ酸残基を、同じ側鎖ファミリー由来の他のアミノ酸残基で置き換えることができ、この変化した抗体は、本明細書において記述される機能的アッセイ法を用い抗原結合能について試験することができる。

【0049】

「共刺激リガンド」には、この用語が本明細書において用いられる場合、T細胞上の同族の共刺激分子と特異的に結合し、それにより、例えば、ペプチドが負荷されたMHC分子のTCR/CD3複合体への結合によって与えられる一次シグナルに加えて、増殖、活性化、分

10

20

30

40

50

化などを含むが、これらに限定されない、T細胞応答を媒介するシグナルを与える、抗原提示細胞(例えば、aAPC、樹状細胞、B細胞など)上の分子が含まれる。共刺激リガンドは、CD7、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、誘導性共刺激リガンド(ICOS-L)、細胞内接着分子(ICAM)、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、MICB、HVEM、リンホトキシンβ受容体、3/TR6、ILT3、ILT4、HVEM、Tollリガンド受容体に結合するアゴニストまたは抗体、およびB7-H3と特異的に結合するリガンドを含むことができるが、これらに限定されることはない。共刺激リガンドはまた、とりわけ、限定されるものではないが、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3のようなT細胞上に存在する共刺激分子と特異的に結合する抗体、およびCD83と特異的に結合するリガンドも包含する。

10

【0050】

「共刺激分子」は、共刺激リガンドと特異的に結合し、それにより、限定されるものではないが、増殖のような、T細胞による共刺激応答を媒介する、T細胞上の同族の結合パートナーをいう。共刺激分子は、MHCクラスI分子、BTLAおよびTollリガンド受容体を含むが、これらに限定されることはない。

【0051】

本明細書において用いられる「共刺激シグナル」は、TCR/CD3ライゲーシンのような、一次シグナルとの組み合わせで、T細胞増殖、および/または鍵となる分子のアップレギュレーションもしくはダウンレギュレーションを導くシグナルをいう。

20

【0052】

「疾患」は、動物が恒常性を維持できず、疾患が改善されなければその動物の健康が悪化し続ける、動物の健康状態である。対照的に、動物における「障害」は、その動物が恒常性を維持できるが、その動物の健康状態が障害のない場合よりも好ましくない健康状態である。未処置のまま放置されても、障害が必ずしも動物の健康状態のさらなる低下を引き起こすとは限らない。

【0053】

本明細書で使用される「ダウンレギュレーション」という用語は、1つまたは複数の遺伝子発現の低下または消失の事を指す。

【0054】

「有効量」または「治療的有效量」は、本明細書において互換的に用いられ、特定の生物学的結果を達成するのに有効な、または治療的もしくは予防的利益をもたらす、本明細書において記述される化合物、製剤、材料もしくは組成物の量のことを指す。そのような結果には、当技術分野において適当な任意の手段によって判定されるような抗腫瘍活性が含まれるが、これに限定されることはない。

30

【0055】

「コードする」とは、定義されたヌクレオチド(すなわち、rRNA、tRNAおよびmRNA)配列または定義されたアミノ酸配列のいずれかを有する、生物学的過程において他の重合体および高分子の合成のための鋳型として働く、遺伝子、cDNAまたはmRNAのような、ポリヌクレオチドにおける特定のヌクレオチド配列の固有の特性ならびにそれに起因する生物学的特性をいう。したがって、遺伝子は、その遺伝子に対応するmRNAの転写および翻訳によって細胞または他の生体系においてタンパク質が産生される場合、タンパク質をコードする。mRNA配列と同一であり通常は配列表に示されるヌクレオチド配列であるコード鎖も、遺伝子またはcDNAの転写のための鋳型として用いられる非コード鎖とともに、タンパク質、またはその遺伝子もしくはcDNAの他の産物をコードするということができる。

40

【0056】

本明細書において用いられる場合、「内在性」とは、生物、細胞、組織もしくは系の内部に由来するか、またはそれらの内部で産生される、任意の材料をいう。

【0057】

50

本明細書において用いられる場合、「外因性」という用語は、生物、細胞、組織もしくは系の外部から導入されるか、またはそれらの外部で産生される、任意の材料をいう。

【0058】

本明細書において用いられる「拡大する」という用語は、T細胞の数の増加のように、数が増加することをいう。1つの態様において、エクスピボで拡大したT細胞は、培養物中に当初存在している数と比べて数が増加する。別の態様において、エクスピボで拡大したT細胞は、培養物中の他の細胞型と比べて数が増加する。本明細書において用いられる「エクスピボ」という用語は、生物(例えば、ヒト)から取り出され、生物の外側で(例えば、培養皿、試験管、またはバイオリアクタ中で)増殖された細胞をいう。

【0059】

本明細書において用いられる「発現」という用語は、そのプロモーターによって駆動される特定のヌクレオチド配列の転写および/または翻訳と定義される。

【0060】

「発現ベクター」とは、発現されるヌクレオチド配列に機能的に連結された発現制御配列を含む組み換えポリヌクレオチドを含むベクターをいう。発現ベクターは、発現のために十分なシス作用性エレメントを含む;発現のための他のエレメントは宿主細胞によって、またはインビトロ発現系において供給されうる。発現ベクターには、組み換えポリヌクレオチドを組み入れたコスミド、プラスミド(例えば、裸のもの、またはリボソーム中に含まれるもの)ならびにウイルス(例えば、センダイウイルス、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス)のような、当技術分野において公知の全てのものが含まれる。

【0061】

本明細書において用いられる「相同性」とは、2つの重合体分子間の、例えば、2つのDNA分子もしくは2つのRNA分子のような、2つの核酸分子間の、または2つのポリペプチド分子間のサブユニット配列同一性をいう。2つの分子の両方におけるサブユニット位置が同じ単量体サブユニットによって占められている場合;例えば、2つのDNA分子の各々における位置がアデニンによって占められているなら、それらはその位置で相同である。2つの配列間の相同性は、一致しているまたは相同である位置の数の一次関数である;例えば、2つの配列における位置の半分(例えば、10サブユニット長の重合体における5つの位置)が相同であるなら、2つの配列は50%相同であり;位置の90%(例えば、10中9)が一致しているまたは相同であるなら、2つの配列は90%相同である。

【0062】

非ヒト(例えば、マウス)抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含んだキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはその断片(Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂または抗体の他の抗原結合部分配列のような)である。ほとんどの場合、ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域(CDR)由来の残基が、所望の特異性、親和性および能力を有するマウス、ラットまたはウサギのような非ヒト種(ドナー抗体)のCDR由来の残基によって置き換えられている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)残基が、対応する非ヒト残基によって置き換えられる。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、持ち込まれたCDRまたはフレームワーク配列にも見出されない残基を含むことができる。これらの改変は、抗体性能をさらに改良かつ最適化するためになされる。一般に、ヒト化抗体は、CDR領域の全てまたは実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、かつFR領域の全てまたは実質的に全てがヒト免疫グロブリン配列のものである、少なくとも1つの、および典型的には2つの、可変ドメインの実質的に全てを含む。また、ヒト化抗体は、最適には、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部分、典型的にはヒト免疫グロブリンのそれを含む。さらなる詳細については、Jones et al., Nature, 321: 522-525, 1986; Reichmann et al., Nature, 332: 323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596, 1992を参照されたい。

【0063】

「完全ヒト」とは、分子全体がヒト由来であるか、または抗体のヒト形態と同一のアミノ酸配列からなる、抗体のような、免疫グロブリンをいう。

【0064】

本明細書において用いられる「同一性」とは、2つのポリペプチド分子間のような、2つの重合体分子間の、特に2つのアミノ酸分子間のサブユニット配列同一性をいう。2つのアミノ酸配列が同じ位置に同じ残基を有する場合；例えば、2つのポリペプチド分子の各々における位置がアルギニンによって占められているなら、それらはその位置で同一である。2つのアミノ酸配列がアライメントにおいて同じ位置に同じ残基を有する程度または同一性は、百分率として表現されることが多い。2つのアミノ酸配列間の同一性は、一致しているまたは同一である位置の数の一次関数である；例えば、2つの配列における位置の半分（例えば、10アミノ酸長の重合体における5つの位置）が同一であるなら、2つの配列は50%同一であり；位置の90%（例えば、10中9）が一致しているまたは同一であるなら、2つのアミノ酸配列は90%同一である。

10

【0065】

本明細書において用いられる「免疫グロブリン」または「Ig」という用語は、抗体として機能するタンパク質のクラスと定義される。B細胞によって発現される抗体は、BCR（B細胞受容体）または抗原受容体といわれることもある。このタンパク質のクラスに含まれる5つの成員は、IgA、IgG、IgM、IgDおよびIgEである。IgAは、唾液、涙液、母乳、消化管分泌物、ならびに気道および泌尿生殖路の粘液分泌物のような、身体分泌物中に存在する主要な抗体である。IgGは、最も一般的な循環血中抗体である。IgMは、ほとんどの対象で一次免疫応答において産生される主要な免疫グロブリンである。これは凝集反応、補体固定および他の抗体応答において最も効率的な免疫グロブリンであり、細菌およびウイルスに対する防御において重要である。IgDは抗体機能が判明していない免疫グロブリンであるが、抗原受容体として働いている可能性がある。IgEは、アレルゲンに対する曝露時に肥満細胞および好塩基球からのメディエータの放出を引き起こすことによって即時型過敏症を媒介する免疫グロブリンである。

20

【0066】

本明細書において用いられる「免疫応答」という用語は、リンパ球が抗原分子を異物と同定し、抗体の形成を誘導し、および/またはリンパ球を活性化して抗原を除去する場合に起きる抗原に対する細胞応答と定義される。

30

【0067】

「免疫学的に有効な量」または「治療量」が示されている場合、投与される本発明の組成物の正確な量は、患者（対象）の年齢、体重、腫瘍サイズ、感染または転移の程度、および状態における個体差を考慮して、医師または研究者により決定され得る。

【0068】

本明細書において用いられる場合、「説明材料（instructional material）」は、本発明の組成物および方法の有用性を伝えるために使用できる刊行物、記録、略図または他の任意の表現媒体を含む。本発明のキットの説明材料は、例えば、本発明の核酸、ペプチドおよび/もしくは組成物を含む容器に添付されてもよく、または核酸、ペプチドおよび/もしくは組成物を含む容器と一緒に出荷されてもよい。あるいは、説明材料および化合物がレシピエントによって共同的に用いられることを意図して、説明材料は容器とは別に出荷されてもよい。

40

【0069】

「単離された」とは、天然の状態から変えられたまたは取り出されたことを意味する。例えば、生きている動物に天然に存在する核酸またはペプチドは「単離されて」いないが、その天然状態の共存物質から部分的にまたは完全に分離された同じ核酸またはペプチドは「単離されて」いる。単離された核酸またはタンパク質は、実質的に精製された形態で存在することができ、または例えば、宿主細胞のような、非天然環境で存在することができる。

【0070】

50

本明細書で使用される「ノックダウン」という用語は、1つまたは複数の遺伝子の遺伝子発現の低下のことを指す。

【0071】

本明細書で使用される「ノックアウト」という用語は、1つまたは複数の遺伝子の遺伝子発現の消失のことを指す。

【0072】

本明細書において用いられる「レンチウイルス」とは、レトロウイルス科(Retroviridae)ファミリーの属をいう。レンチウイルスは、非分裂細胞に感染できるという点で、レトロウイルスの中でも独特である；それらはかなりの量の遺伝情報を宿主細胞のDNA中に送達することができるため、それらは遺伝子送達ベクターの最も効率的な方法の1つである。HIV、SIVおよびFIVは全て、レンチウイルスの例である。レンチウイルスに由来するベクターは、インビボで有意なレベルの遺伝子移入を達成するための手段を与える。

10

【0073】

本明細書で使用される「制限された毒性」という用語は、インビボまたはインビトロのいずれにおいても、健康な細胞、非腫瘍細胞、非疾患細胞、非標的細胞、またはそのような細胞の集団に対して、実質的に負の生物学的効果、抗腫瘍効果、および実質的に陰性の生理的症状を有さないことが明らかになっている、本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、細胞、および/または抗体のことを指す。

【0074】

本明細書において用いられる用語「改変された」とは、本発明の分子または細胞の変化した状態または構造を意味する。分子は化学的に、構造的に、および機能的になど、多くの方法で改変されうる。細胞は、核酸の導入によって改変されうる。

20

【0075】

本明細書において用いられる用語「調節する」とは、処置もしくは化合物の非存在下での対象における応答のレベルと比較して、および/または他の点では同一であるが処置を受けていない対象における応答のレベルと比較して、対象における応答のレベルの検出可能な増加または減少を媒介することを意味する。この用語は対象、好ましくはヒトにおいて、天然のシグナルもしくは応答をかく乱させ、および/またはそれに影響を与え、それにより有益な治療応答を媒介することを包含する。

【0076】

本発明の文脈において、一般的に存在する核酸塩基に関する以下の略語が用いられる。「A」はアデノシンをいい、「C」はシトシンをいい、「G」はグアノシンをいい、「T」はチミジンをいい、および「U」はウリジンをいう。

30

【0077】

特別の定めのない限り、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」は、互いの縮重型である、かつ同じアミノ酸配列をコードする全てのヌクレオチド配列を含む。RNAまたはタンパク質をコードするヌクレオチド配列という語句はまた、タンパク質をコードするヌクレオチド配列が、型によっては、イントロンを含みうる程度までイントロンを含みうる。

【0078】

「機能的に連結された」という用語は、調節配列と異種核酸配列との間の、後者の発現を結果的にもたらず、機能的連結をいう。例えば、第1の核酸配列が第2の核酸配列との機能的関係の下で配置されている場合、第1の核酸配列は第2の核酸配列と機能的に連結されている。例えば、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響を与えるなら、プロモーターはコード配列に機能的に連結されている。一般に、機能的に連結されたDNA配列は連続的であり、2つのタンパク質コード領域をつなぎ合わせるが必要な場合、同じ読み枠の中にある。

40

【0079】

「過剰発現された」腫瘍抗原または腫瘍抗原の「過剰発現」という用語は、患者の特定の組織または臓器の内部にある固形腫瘍のような疾患領域からの細胞における腫瘍抗原の

50

発現が、その組織または臓器からの正常細胞における発現のレベルと比べて異常なレベルであることを示すよう意図される。腫瘍抗原の過剰発現によって特徴付けられる固形腫瘍または血液悪性腫瘍を有する患者は、当技術分野において公知の標準的なアッセイ法によって判定することができる。

【0080】

免疫原性組成物の「非経口」投与には、例えば、皮下(s.c.)、静脈内(i.v.)、筋肉内(i.m.)もしくは胸骨内注射、または輸注法が含まれる。

【0081】

本明細書において用いられる「ポリヌクレオチド」という用語は、ヌクレオチドの鎖と定義される。さらに、核酸はヌクレオチドの重合体である。したがって、本明細書において用いられる核酸およびポリヌクレオチドは互換的である。当業者は、核酸がポリヌクレオチドであり、それらは単量体「ヌクレオチド」に加水分解されうるという一般知識を有する。単量体ヌクレオチドは、ヌクレオシドに加水分解されうる。本明細書において用いられる場合、ポリヌクレオチドには、非限定的に、組み換え手段、すなわち通常のクローニング技術およびPCR(商標)などを用いた組み換えライブラリーまたは細胞ゲノムからの核酸配列のクローニングを含む、当技術分野において利用可能な任意の手段により、ならびに合成手段により得られる全ての核酸配列が含まれるが、これらに限定されることはない。

【0082】

本明細書において用いられる場合、「ペプチド」、「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は互換的に用いられ、ペプチド結合によって共有結合されたアミノ酸残基で構成される化合物をいう。タンパク質またはペプチドは、少なくとも2つのアミノ酸を含まなくてはならず、タンパク質またはペプチドの配列を構成しうるアミノ酸の最大数に制限はない。ポリペプチドには、ペプチド結合によって相互につなが合わされた2つまたはそれ以上のアミノ酸を含む任意のペプチドまたはタンパク質が含まれる。本明細書において用いられる場合、この用語は、例えば、当技術分野において一般的にはペプチド、オリゴペプチドおよびオリゴマーともいわれる短鎖と、当技術分野において一般にタンパク質といわれる長鎖の両方をいい、そのなかには多くのタイプがある。「ポリペプチド」には、とりわけ、例えば、生物学的に活性な断片、実質的に相同なポリペプチド、オリゴペプチド、ホモ二量体、ヘテロ二量体、ポリペプチドの変種、修飾ポリペプチド、誘導体、類似体、融合タンパク質が含まれる。ポリペプチドには、天然ペプチド、組み換えペプチド、合成ペプチド、またはそれらの組み合わせが含まれる。

【0083】

本明細書において用いられる「プロモーター」という用語は、ポリヌクレオチド配列の特異的転写を開始させるために必要な、細胞の合成機構または導入された合成機構によって認識されるDNA配列と定義される。

【0084】

「シグナル伝達経路」は、細胞のある部分から細胞の別の部分へのシグナルの伝達において役割を果たす種々のシグナル伝達分子間の生化学的關係をいう。「細胞表面受容体」という語句は、シグナルを受け取り、細胞の原形質膜を越えてシグナルを伝達しうる分子および分子の複合体を含む。

【0085】

抗体に関して本明細書において用いられる用語「特異的に結合する」とは、特異的抗原を認識するが、サンプル中の他の分子を実質的に認識または結合しない抗体を意味する。例えば、1つの種由来の抗原に特異的に結合する抗体が、1つまたは複数の種由来のその抗原に結合してもよい。しかし、そのような異種間反応性はそれ自体で、特異的としての抗体の分類を変化させることはない。別の例において、抗原に特異的に結合する抗体が、その抗原の異なる対立遺伝子型に結合してもよい。しかし、そのような交差反応性はそれ自体で、特異的としての抗体の分類を変化させることはない。場合によっては、「特異的結合」または「特異的に結合する」という用語を、抗体、タンパク質またはペプチドと第2

10

20

30

40

50

の化学種との相互作用に関連して用い、相互作用が化学種上の特定の構造(例えば、抗原決定基またはエпитープ)の存在に依存することを意味してもよい; 例えば、抗体は、タンパク質全体ではなく特定のタンパク質構造を認識し、それに結合する。抗体がエпитープ「A」に特異的であるなら、エпитープAを含む分子(または遊離した、標識されていないA)の存在は、標識された「A」およびその抗体を含む反応において、その抗体に結合した標識されたAの量を減らすであろう。

【0086】

「刺激」という用語は、刺激分子(例えば、TCR/CD3複合体)がその同族リガンドと結合し、それによって、限定されるものではないが、TCR/CD3複合体を介するシグナル伝達のような、シグナル伝達事象を媒介することにより誘導される、一次応答を意味する。刺激は、TGF- β のダウンレギュレーション、および/または細胞骨格構造の再編成などのような、ある特定の分子の発現の変化を媒介することができる。

10

【0087】

「刺激分子」とは、この用語が本明細書において用いられる場合、抗原提示細胞上に存在する同族刺激リガンドと特異的に結合する、T細胞上の分子を意味する。

【0088】

本明細書において用いられる「刺激リガンド」は、抗原提示細胞(例えば、aAPC、樹状細胞、B細胞など)上に存在する場合、T細胞上の同族結合パートナー(本明細書において「刺激分子」といわれる)と特異的に結合し、それによって活性化、免疫応答の開始、増殖などを含むが、これらに限定されない、T細胞による一次応答を媒介することのできるリガンドを意味する。刺激リガンドは当技術分野において周知であり、とりわけ、ペプチドが負荷されたMHCクラスI分子、抗CD3抗体、スーパーアゴニスト抗CD28抗体およびスーパーアゴニスト抗CD2抗体を包含する。

20

【0089】

「対象」という用語は、免疫応答が誘発されうる生物(例えば、哺乳動物)を含むよう意図される。本明細書において用いられる「対象」または「患者」は、ヒトまたは非ヒト哺乳動物でありうる。非ヒト哺乳動物には、例えば、ヒツジ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコおよびネズミ哺乳動物のような、家畜およびペットが含まれる。好ましくは、対象はヒトである。

【0090】

本明細書において用いられる場合、「実質的に精製された」細胞は、他の細胞型を本質的に含まない細胞である。また、実質的に精製された細胞とは、その天然の状態において通常結び付いている他の細胞型から分離された細胞をいう。ある例では、実質的に精製された細胞の集団とは、均質な細胞集団をいう。他の例では、この用語は、単に、天然の状態において通常結び付いている細胞から分離された細胞をいう。いくつかの態様において、細胞はインビトロで培養される。他の態様において、細胞はインビトロで培養されない。

30

【0091】

「標的部位」または「標的配列」とは、結合が起きるのに十分な条件の下で結合分子が特異的に結合しうる核酸の一部分を規定するゲノム核酸配列をいう。

【0092】

本明細書において用いられる場合、「T細胞受容体」または「TCR」という用語は、抗原の提示に応答してT細胞の活性化に関与する膜タンパク質の複合体をいう。TCRは、主要組織適合遺伝子複合体分子に結合した抗原を認識する役割を担う。TCRは、アルファ(α)およびベータ(β)鎖のヘテロ二量体から構成されるが、一部の細胞ではTCRはガンマおよびデルタ(γ/δ)鎖からなる。TCRは、構造的に類似しているが、異なる解剖学的位置および機能を有する α/β および γ/δ 形態で存在しうる。各鎖は、2つの細胞外ドメイン、つまり可変ドメインおよび定常ドメインから構成される。いくつかの態様において、TCRは、TCRを含む任意の細胞(例えば、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、記憶T細胞、調節性T細胞、ナチュラルキラーT細胞、および $\gamma\delta$ T細胞を含む)上で改変されうる。

40

【0093】

50

本明細書において用いられる「治療的」という用語は、処置および/または予防を意味する。治療効果は、疾患状態の抑制、寛解または根絶によって得られる。

【0094】

本明細書において用いられる「トランスフェクションされた」または「形質転換された」または「形質導入された」という用語は、外因性核酸が宿主細胞に移入または導入される過程をいう。「トランスフェクションされた」または「形質転換された」または「形質導入された」細胞は、外因性核酸でトランスフェクションされた、形質転換された、または形質導入されたものである。この細胞には初代対象細胞およびその子孫が含まれる。

【0095】

疾患を「処置する」とは、この用語が本明細書において用いられる場合、対象が被っている疾患または障害の少なくとも1つの徴候または症状の頻度または重症度を低減することを意味する。

【0096】

本明細書において用いられる「転写制御下」または「機能的に連結された」という語句は、RNAポリメラーゼによる転写の開始およびポリヌクレオチドの発現を制御するためにプロモーターがポリヌクレオチドに関して正しい位置および方向にあることを意味する。

【0097】

「ベクター」は、単離された核酸を含み、かつ単離された核酸を細胞の内部に送達するために使用できる組成物である。直鎖状ポリヌクレオチド、イオン性または両親媒性化合物と結び付いたポリヌクレオチド、プラスミドおよびウイルスを含むが、これらに限定されない、多数のベクターが当技術分野において公知である。したがって、「ベクター」という用語は、自律的に複製するプラスミドまたはウイルスを含む。この用語はまた、例えばポリリジン化合物、リポソームなどのような、細胞内への核酸の移入を容易にする非プラスミド性および非ウイルス性の化合物を含むと解釈されるべきである。ウイルスベクターの例としては、センダイウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターなどが挙げられるが、これらに限定されることはない。

【0098】

範囲: 本開示の全体を通じて、本発明のさまざまな局面を範囲の形式で提示することができる。範囲の形式の記述は、単に簡便にするためのものであり、本発明の範囲に対する柔軟性のない制限と解釈されるべきではないことが理解されるべきである。したがって、範囲の記述は、可能な全ての部分範囲およびその範囲内の個々の数値を具体的に開示したものとみなされるべきである。例えば、1~6のような範囲の記述は、1~3、1~4、1~5、2~4、2~6、3~6などのような部分範囲、ならびにその範囲内の個々の数字、例えば、1、2、2.7、3、4、5、5.3および6を具体的に開示したものとみなされるべきである。これは、範囲の幅に関係なく適用される。

【0099】

説明

本開示は、T細胞性新生物を標的とする3つのキメラ抗原受容体(CAR)、および健常T細胞の兄弟殺しを防止する方法を記載する。T細胞リンパ腫およびT細胞白血病は、T細胞前駆細胞または分化T細胞に由来する侵襲性の新生物である。成熟T細胞リンパ腫または末梢性T細胞リンパ腫は、全ての非ホジキンリンパ腫の10%~15%、または米国内の年間およそ7,000~10,000例を占める。T細胞リンパ腫およびT細胞白血病は予後不良であり、利用可能な処置がほとんど存在しない。CART治療は、B細胞性新生物に対する効力を示しているが、大部分の標的抗原が正常細胞と悪性細胞との間で共有されており、CAR T細胞の兄弟殺しをもたらすため、キメラ抗原受容体(CAR) T細胞の成功をT細胞悪性腫瘍に拡張することは、現在のところ、困難である。本発明においては、CRISPR-Cas編集を使用して、健常T細胞から標的抗原を除去し、CART細胞治療からそれらを防御し、T細胞コンパートメントの排除に起因する潜在的に致命的な免疫抑制を排除する。

【0100】

ある態様において、CARは、T細胞抗原CD2、CD5、およびCD7を標的とする。ある態様において、健常T細胞における標的CD2、CD5、またはCD7のCRISPR-Casノックアウトは、製造およびその後のCART治療の間の健常T細胞の死滅を防止する。

【0101】

処置の方法

本発明は、それを必要とする対象において、T細胞リンパ腫またはT細胞白血病を処置する方法を含む。もう1つの局面において、本発明は、それを必要とする対象においてCAR T細胞の兄弟殺しを防止する方法を含む。

【0102】

ある態様において、本法は、CD2を標的とする抗原結合ドメインと膜貫通ドメインと細胞内ドメインとを含むキメラ抗原受容体（CAR）を含む第1の改変細胞を対象へ投与する工程、および内在性CD2遺伝子がノックアウトされている第2の改変細胞を対象へ投与する工程を含む。

10

【0103】

ある態様において、本法は、CD5を標的とする抗原結合ドメインと膜貫通ドメインと細胞内ドメインとを含むCARを含む第1の改変細胞を対象へ投与する工程、および内在性CD5遺伝子がノックアウトされている第2の改変細胞を対象へ投与する工程を含む。

【0104】

ある態様において、本法は、CD7を標的とする抗原結合ドメインと膜貫通ドメインと細胞内ドメインとを含むCARを含む第1の改変細胞を対象へ投与する工程、および内在性CD7遺伝子がノックアウトされている第2の改変細胞を対象へ投与する工程を含む。

20

【0105】

ある態様において、本法は、抗原結合ドメインと膜貫通ドメインと細胞内ドメインとを含むキメラ抗原受容体（CAR）を含む第1の改変細胞を対象へ投与する工程、および内在性CD5遺伝子がノックアウトされている第2の改変細胞を対象へ投与する工程を含む。

【0106】

ある態様において、本法は、キメラ抗原受容体（CAR）を含む改変細胞を対象へ投与する工程を含み、ここで、CARは抗原結合ドメインと膜貫通ドメインと細胞内ドメインとを含み、かつ内在性CD5遺伝子は細胞においてノックアウトされている。

【0107】

本明細書に開示される方法の様々な態様において、対象は、本明細書に開示されるCARのうちの任意のものを投与され得る。CARは、当業者に公知の任意の腫瘍関連抗原（TAA）または腫瘍特異抗原（TSA）に対して特異的であり得る。

30

【0108】

ある態様において、CARは、SEQ ID NO:31~36、43~48、53~58、65~70、83~88、および95~100からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域（CDR）を含む。ある態様において、CARは、SEQ ID NO:29、41、51、63、75、81、および93からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、ならびに/またはSEQ ID NO:30、42、52、64、76、82、および94からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗原結合ドメインを含む。ある態様において、CARは、SEQ ID NO:27、28、39、40、50、61、62、73、74、79、80、91、および92からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むscFvを含む。

40

【0109】

ある態様において、対象は、SEQ ID NO:1~13のいずれか1つによってコードされる核酸配列を含むCARを投与される。ある態様において、CARは、SEQ ID NO:25、26、37、38、49、59、60、71、72、77、78、89、および90からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。

【0110】

ある態様において、第1およびまたは第2の改変細胞は、T細胞である。ある態様において、がんは、T細胞リンパ腫またはT細胞白血病を含む。本発明の組成物および方法によっ

50

て処置され得るがんの型には、非ホジキンリンパ腫およびその亜型、例えば、末梢性T細胞リンパ腫（PTCL）、血管免疫芽球性T細胞リンパ腫（AITL）、未分化リンパ腫キナーゼ（ALK）陰性未分化大細胞リンパ腫（ALCL、ALK-）、ナチュラルキラー/T細胞リンパ腫（NKTCL）、成人T細胞白血病/リンパ腫（ATLL）、ALCL ALK+、腸症型T細胞リンパ腫、肝脾T細胞リンパ腫、皮下脂肪織炎様リンパ腫、ならびに未分類のPTCLが含まれるが、これらに限定されるわけではない。

【0111】

ある態様において、内在性遺伝子（例えば、CD2、CD5、およびCD7）は、CRISPR/Cas9法を使用してノックアウトされる。ある態様において、CRISPR/Cas9法は、CD2、CD5、および/またはCD7を標的とするsgRNAを利用する。ある態様において、sgRNAは、SEQ ID NO:22~24からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

10

【0112】

ある態様において、本発明のCARは、自殺遺伝子をさらに含む。自殺遺伝子の1つの非限定的な例は、誘導性カスパーゼ9遺伝子（iCaspase9、iCasp9、またはiC9）である。iCaspase9自殺遺伝子系は、ヒトカスパーゼ9と改変ヒトFK結合タンパク質との融合に基づいており、低分子薬物（例えば、AP1903）を使用した条件的二量体化を可能にする。合成二量体化薬に曝された時、iCaspase9が活性化され、この構築物を発現する細胞（例えば、CAR T細胞）の迅速なアポトーシスをもたらす（Zhou et al.(2015)Methods Mol Biol.1317:87-105）。自殺遺伝子の別の例は、HSV-tk遺伝子である（Bordignon et al.(1995)Human Gene Therapy,vol.6,no.6,pp 813-819）。HSV-tk遺伝子は、CAR T細胞において共発現され得、発現された時、非毒性プロドラッグGCVをGCV三リン酸に変換し、DNA複製の停止による細胞死をもたらす。

20

【0113】

組成物

本発明の1つの局面は、CD2を標的とする抗原結合ドメインと膜貫通ドメインと細胞内ドメインとを含むキメラ抗原受容体（CAR）を含む第1の改変細胞、および内在性CD2遺伝子がノックアウトされている第2の改変細胞を含む、組成物を含む。

【0114】

本発明のもう1つの局面は、CD5を標的とする抗原結合ドメインと膜貫通ドメインと細胞内ドメインとを含むCARを含む第1の改変細胞、および内在性CD5遺伝子がノックアウトされている第2の改変細胞を含む、組成物を含む。

30

【0115】

本発明のさらにもう1つの局面は、CD7を標的とする抗原結合ドメインと膜貫通ドメインと細胞内ドメインとを含むCARを含む第1の改変細胞、および内在性CD7遺伝子がノックアウトされている第2の改変細胞を含む、組成物を含む。

【0116】

ある態様において、CARは、SEQ ID NO:1~13からなる群より選択される核酸配列によってコードされる。ある態様において、内在性遺伝子は、CRISPR/Cas系を使用してノックアウトされる。ある態様において、CRISPR/Cas9系は、SEQ ID NO:22~24からなる群より選択される核酸配列を含むgRNAを含む。

40

【0117】

本発明は、本発明の組成物および薬学的に許容される担体をさらに含む。

【0118】

キメラ抗原受容体（CAR）

本発明は、抗原結合ドメインと膜貫通ドメインと細胞内ドメインとを含むキメラ抗原受容体（CAR）を提供する。ある態様において、本発明は、CD2に結合することができる抗原結合ドメインと膜貫通ドメインと細胞内ドメインとを含むCARを含む。

【0119】

抗原結合ドメイン

1つの態様において、本発明のCARは、抗原結合ドメインとも呼ばれる標的特異的結合

50

要素を含む。抗原結合ドメインの選択は、標的細胞の表面を定義するリガンドの型および数に依存する。例えば、抗原結合ドメインは、特定の疾患状態（例えば、T細胞リンパ腫またはT細胞白血病）に関連した標的細胞上の細胞表面マーカーとして作用するリガンドを認識するよう選択され得る。

【0120】

1つの態様において、本発明のCARは、腫瘍抗原を標的とするよう改変され得る。本明細書に記述される抗原は、例として含まれるに過ぎない。リストは排他的なものではなく、さらなる例が当業者には容易に明白であろう。腫瘍抗原は、免疫応答、具体的には、T細胞媒介性免疫応答を誘発する腫瘍細胞によって産生されるタンパク質である。本発明の抗原結合ドメインの選択は、処置すべきがんの特定の型に依存する。腫瘍抗原は、当技術分野において周知であり、例えば、グリオーマ関連抗原、癌胎児抗原（CEA）、 β -ヒト絨毛性ゴナドトロピン、 α フェトプロテイン（AFP）、レクチン反応性AFP、サイログロブリン、RAGE-1、MN-CA IX、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、RU1、RU2（AS）、腸カルボキシエステラーゼ、mut hsp70-2、M-CSF、プロスターゼ、前立腺特異抗原（PSA）、PAP、NY-ESO-1、LAGE-1a、p53、プロステイン、PSMA、Her2/neu、サバイビンおよびテロメラーゼ、前立腺癌腫瘍抗原-1（PCTA-1）、MAGE、ELF2M、好中球エラスターゼ、エフリンB2、CD22、インスリン増殖因子（IGF）-I、IGF-II、IGF-I受容体、ならびにメソテリンを含む。

【0121】

本発明において言及される腫瘍抗原の型は、腫瘍特異抗原（TSA）または腫瘍関連抗原（TAA）であってもよい。TSAは、腫瘍細胞に独特であり、体内の他の細胞には存在しない。TAA関連抗原は、腫瘍細胞に独特ではなく、抗原に対する免疫寛容の状態を誘導することができない条件の下で、正常細胞においても発現される。腫瘍における抗原の発現は、免疫系が抗原に応答することを可能にする条件の下で起こり得る。TAAは、免疫系が未熟であり、応答することができない胎児発生期に、正常細胞において発現される抗原であってもよいし、または極めて低いレベルで正常細胞に通常存在するが、腫瘍細胞においては、はるかに高いレベルで発現される抗原であってもよい。

【0122】

TSA抗原またはTAA抗原の非限定的な例には、以下のものが含まれる：分化抗原、例えば、MART-1/メラニンA（MART-1）、gp100（Pmel 17）、チロシナーゼ、TRP-1、TRP-2、および腫瘍特異的多系統抗原、例えば、MAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15；過剰発現された胎児抗原、例えば、CEA；過剰発現されたがん遺伝子および変異型腫瘍抑制遺伝子、例えば、p53、Ras、HER-2/neu；染色体転座に起因する独特な腫瘍抗原、例えば、BCR-ABL、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR；ならびにウイルス抗原、例えば、エプスタイン・バーウイルス抗原EBVAおよびヒトパピローマウイルス（HPV）抗原E6およびE7。他の大型のタンパク質ベースの抗原には、TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、RAGE、NY-ESO、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、PSA、TAG-72、CA 19-9、CA 72-4、CAM 17.1、NuMa、K-ras、 β -カテニン、CDK4、Mum-1、p 15、p 16、43-9F、5T4、791Tgp72、 α -フェトプロテイン、 β HCG、BCA225、BTAA、CA 125、CA 15-3、CA 27.29、BCAA、CA 195、CA 242、CA-50、CAM43、CD68/P1、CO-029、FGF-5、G250、Ga733、EpCAM、HTgp-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB/70K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90、Mac-2結合タンパク質、シクロフィリンC関連タンパク質、TAAL6、TAG72、TLP、およびTPSが含まれる。

【0123】

標的とされる所望の抗原に依って、本発明のCARは、所望の抗原標的に対して特異的な適切な抗原結合ドメインを含むよう、改変され得る。例えば、CD2が標的とされる所望の抗原である場合、CD2に対する抗体を、本発明のCARに組み入れるための抗原結合ドメインとして使用することができる。

【0124】

ある態様において、CARの抗原結合ドメインは、CD2を標的とする。ある態様において、CARの抗原結合ドメインは、CD5を標的とする。ある態様において、CARの抗原結合ドメインは、CD7を標的とする。

【0125】

いくつかの態様において、本発明のCAR内の抗原結合ドメインは、抗CD2 scFVである。いくつかの態様において、本発明のCAR内の抗原結合ドメインは、抗CD5 scFVである。いくつかの態様において、本発明のCAR内の抗原結合ドメインは、抗CD7 scFVである。いくつかの態様において、抗原結合ドメインは、抗CD2抗体である。いくつかの態様において、抗原結合ドメインは、抗CD5抗体である。いくつかの態様において、抗原結合ドメインは、抗CD7抗体である。

10

【0126】

ある態様において、抗原結合ドメインは、3つの重鎖相補性決定領域（HCDR）を含む重鎖可変領域、および3つの軽鎖相補性決定領域（LCDR）を含む軽鎖可変領域を含む。

【0127】

ある態様において、本発明は、CD2に結合することができる抗原結合ドメインを含むCARを含み、ここで、抗原結合ドメインは、SEQ ID NO:31、32、33、34、35、36、43、44、45、46、47、48、53、54、55、56、57、58、65、66、67、68、69、または70のいずれか1つのアミノ酸配列を含む相補性決定領域（CDR）を含む。

【0128】

ある態様において、CARは、CD2に結合することができる抗原結合ドメインを含み、ここで、HCDR1は、SEQ ID NO:31のアミノ酸配列を含み、HCDR2は、SEQ ID NO:32のアミノ酸配列を含み、HCDR3は、SEQ ID NO:33のアミノ酸配列を含み、LCDR1は、SEQ ID NO:34のアミノ酸配列を含み、LCDR2は、SEQ ID NO:35のアミノ酸配列を含み、LCDR3は、SEQ ID NO:36のアミノ酸配列を含む。

20

【0129】

ある態様において、CARは、CD2に結合することができる抗原結合ドメインを含み、ここで、HCDR1は、SEQ ID NO:43のアミノ酸配列を含み、HCDR2は、SEQ ID NO:44のアミノ酸配列を含み、HCDR3は、SEQ ID NO:45のアミノ酸配列を含み、LCDR1は、SEQ ID NO:46のアミノ酸配列を含み、LCDR2は、SEQ ID NO:47のアミノ酸配列を含み、LCDR3は、SEQ ID NO:48のアミノ酸配列を含む。

30

【0130】

ある態様において、CARは、CD2に結合することができる抗原結合ドメインを含み、ここで、HCDR1は、SEQ ID NO:65のアミノ酸配列を含み、HCDR2は、SEQ ID NO:66のアミノ酸配列を含み、HCDR3は、SEQ ID NO:67のアミノ酸配列を含み、LCDR1は、SEQ ID NO:68のアミノ酸配列を含み、LCDR2は、SEQ ID NO:69のアミノ酸配列を含み、LCDR3は、SEQ ID NO:70のアミノ酸配列を含む。

【0131】

ある態様において、CARは、CD2に結合することができる抗原結合ドメインを含み、ここで、抗原結合ドメインは、SEQ ID NO:29のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および/またはSEQ ID NO:30のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。ある態様において、抗原結合ドメインは、SEQ ID NO:41のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および/またはSEQ ID NO:42のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。ある態様において、抗原結合ドメインは、SEQ ID NO:51のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および/またはSEQ ID NO:52のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。ある態様において、抗原結合ドメインは、SEQ ID NO:63のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および/またはSEQ ID NO:64のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

40

【0132】

ある態様において、CARは、CD2に結合することができる抗原結合ドメインを含み、ここで、抗原結合ドメインは、SEQ ID NO:27、28、39、40、50、61、または62のいずれか1つに記載のアミノ酸配列を含むscFvである。

50

【0133】

ある態様において、本発明は、CD5に結合することができる抗原結合ドメインを含むCARを含み、ここで、抗原結合ドメインは、SEQ ID NO:83、84、85、86、87、88、95、96、97、98、99、または100のいずれか1つのアミノ酸配列を含む相補性決定領域（CDR）を含む。

【0134】

ある態様において、CARは、CD5に結合することができる抗原結合ドメインを含み、ここで、HCDR1は、SEQ ID NO:83のアミノ酸配列を含み、HCDR2は、SEQ ID NO:84のアミノ酸配列を含み、HCDR3は、SEQ ID NO:85のアミノ酸配列を含み、LCDR1は、SEQ ID NO:86のアミノ酸配列を含み、LCDR2は、SEQ ID NO:87のアミノ酸配列を含み、LCDR3は、SEQ ID NO:88のアミノ酸配列を含む。

10

【0135】

ある態様において、CARは、CD5に結合することができる抗原結合ドメインを含み、ここで、HCDR1は、SEQ ID NO:95のアミノ酸配列を含み、HCDR2は、SEQ ID NO:96のアミノ酸配列を含み、HCDR3は、SEQ ID NO:97のアミノ酸配列を含み、LCDR1は、SEQ ID NO:98のアミノ酸配列を含み、LCDR2は、SEQ ID NO:99のアミノ酸配列を含み、LCDR3は、SEQ ID NO:100のアミノ酸配列を含む。

【0136】

ある態様において、CARは、CD5に結合することができる抗原結合ドメインを含み、ここで、抗原結合ドメインは、SEQ ID NO:75のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および/またはSEQ ID NO:76のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。ある態様において、重鎖可変領域は、SEQ ID NO:81のアミノ酸配列を含み、かつ/または軽鎖可変領域は、SEQ ID NO:82のアミノ酸配列を含む。ある態様において、重鎖可変領域は、SEQ ID NO:93のアミノ酸配列を含み、かつ/または軽鎖可変領域は、SEQ ID NO:94のアミノ酸配列を含む。

20

【0137】

ある態様において、CARは、CD5に結合することができる抗原結合ドメインを含み、抗原結合ドメインは、SEQ ID NO:73、74、79、80、91、または92のいずれか1つに記載のアミノ酸配列を含むscFvである。

【0138】

抗原結合ドメイン配列の許容される変動は、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様において、抗原結合ドメインは、SEQ ID NO:27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、50、51、52、53、54、55、56、57、58、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、73、74、75、76、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、91、92、93、94、95、96、97、98、99、または100に記載のアミノ酸配列のいずれかとの少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

30

40

【0139】

膜貫通ドメイン

膜貫通ドメインに関して、CARは、CARの細胞外ドメインと融合した膜貫通ドメインを含むよう、設計され得る。1つの態様において、CAR内のドメインのうちの1つに天然に関連している膜貫通ドメインが使用される。いくつかの事例において、膜貫通ドメインは、受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小にするため、そのようなドメインが、同一のまたは異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインに結合することを回避するため、選択されてもよいし、またはアミノ酸置換によって修飾されてもよい。

【0140】

50

膜貫通ドメインは、天然の起源に由来してもよいし、または合成の起源に由来してもよい。起源が天然である場合、ドメインは、任意の膜結合型タンパク質または膜貫通型タンパク質に由来し得る。本発明において特に有用な膜貫通領域は、T細胞受容体の α 鎖、 β 鎖、または ζ 鎖、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154に由来する（即ち、それらの膜貫通領域を少なくとも含む）ものであり得る。あるいは、膜貫通ドメインは、合成であってもよく、そのケースにおいて、それは、ロイシンおよびバリンのような疎水性残基を主として含む。好ましくは、フェニルアラニン、トリプトファン、およびバリンのトリプレットが、合成膜貫通ドメインの各末端に見出される。任意で、好ましくは、2~10アミノ酸長の、短いオリゴペプチドまたはポリペプチドのリンカーが、CARの膜貫通ドメインと細胞質シグナル伝達ドメインとの間の連結を形成していてもよい。グリシン-セリンダブレットは、特に適当なリンカーを提供する。

10

【0141】

1つの態様において、本発明のCAR内の膜貫通ドメインは、CD8膜貫通ドメインである。1つの態様において、CD8膜貫通ドメインは、SEQ ID NO:14の核酸配列を含む。1つの態様において、CD8膜貫通ドメインは、SEQ ID NO:15のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む。もう1つの態様において、CD8膜貫通ドメインは、SEQ ID NO:15のアミノ酸配列を含む。

【0142】

いくつかの事例において、本発明のCARの膜貫通ドメインは、CD8 α ヒンジ領域を含む。1つの態様において、CD8ヒンジドメインは、SEQ ID NO:16の核酸配列を含む。1つの態様において、CD8ヒンジドメインは、SEQ ID NO:17のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む。もう1つの態様において、CD8ヒンジドメインは、SEQ ID NO:17のアミノ酸配列を含む。

20

【0143】

CARの抗原結合ドメインと膜貫通ドメインとの間、またはCARの細胞内ドメインと膜貫通ドメインとの間には、スパーサードメインが組み入れられていてもよい。本明細書において使用されるように、「スパーサードメイン」という用語は、一般に、膜貫通ドメインを、ポリペプチド鎖内の細胞外ドメインまたは細胞質ドメインのいずれかと連結するために機能する任意のオリゴペプチドまたはポリペプチドを意味する。スパーサードメインは、300までのアミノ酸、好ましくは、10~100のアミノ酸、最も好ましくは、25~50のアミノ酸を含むことができる。

30

【0144】

細胞内ドメイン

本発明のCARの細胞内ドメインまたは細胞質ドメインは、CARが置かれた免疫細胞の通常のエフェクター機能のうちの少なくとも1つの活性化を担う。「エフェクター機能」という用語は、細胞の特殊な機能をさす。T細胞のエフェクター機能は、例えば、細胞溶解活性、またはサイトカインの分泌を含むヘルパー活性であり得る。従って、「細胞内ドメイン」という用語は、エフェクター機能シグナルを伝達し、細胞に特殊な機能を実行するよう指図するタンパク質の部分を意味する。通常、細胞内ドメイン全体が利用され得るが、多くのケースにおいて、鎖全体を使用する必要はない。細胞内ドメインの短縮された一部分が使用される限りにおいて、そのような短縮された一部分は、エフェクター機能シグナルを伝達する限り、完全な鎖の代わりに使用され得る。従って、細胞内ドメインという用語には、エフェクター機能シグナルを伝達するために十分な、細胞内ドメインの短縮された一部分が含まれるものとする。

40

【0145】

本発明のCARにおいて使用するための細胞内ドメインの好ましい例には、抗原受容体エンゲージメント後にシグナル伝達を開始するために協調して作用するT細胞受容体（TCR）および共受容体の細胞質配列が含まれ、同一の機能的能力を有するこれらの配列の誘導体またはバリエーションおよび合成配列も含まれる。

50

【0146】

TCRを通して生成されるシグナルは、単独では、T細胞の完全な活性化のために不十分であり、二次シグナルまたは共刺激シグナルも必要とされることが公知である。従って、T細胞活性化は、2つの異なるクラスの細胞質シグナル伝達配列：TCRを通して抗原依存的な一次活性化を開始するもの（一次細胞質シグナル伝達配列）、および二次シグナルまたは共刺激シグナルを提供するため、抗原非依存的に作用するもの（二次細胞質シグナル伝達配列）によって媒介されることができる。

【0147】

一次細胞質シグナル伝達配列は、刺激的に、または阻害的に、TCR複合体の一次活性化を制御する。刺激的に作用する一次細胞質シグナル伝達配列は、免疫受容活性化チロシンモチーフまたはITAMとして公知のシグナル伝達モチーフを含有し得る。

【0148】

本発明において特に有用である一次細胞質シグナル伝達配列を含有するITAMの例には、TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、およびCD66dに由来するものが含まれる。本発明のCAR内の細胞質シグナル伝達分子は、CD3 ζ 由来の細胞質シグナル伝達配列を含むことが、特に好ましい。

【0149】

好ましい態様において、CARの細胞内ドメインは、単独で、または本発明のCARに関して有用な他の所望の細胞内ドメインと組み合わせて、CD3 ζ シグナル伝達ドメインを含むよう、設計され得る。例えば、CARの細胞内ドメインは、CD3 ζ 鎖の一部分および共刺激シグナル伝達領域を含み得る。共刺激シグナル伝達領域とは、共刺激分子の細胞内ドメインを含むCARの一部分をさす。共刺激分子とは、抗原に対するリンパ球の効率的な応答のために必要とされる、抗原受容体またはそれらのリガンド以外の細胞表面分子である。そのような分子の例には、CD27、CD28、4-1BB（CD137）、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1（LFA-1）、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、およびCD83と特異的に結合するリガンド等が含まれるが、これらに限定されるわけではない。従って、本発明は、主に、共刺激シグナル伝達要素として4-1BBを用いて例示されるが、その他の共刺激要素も、本発明の範囲内である。

【0150】

本発明のCARの細胞質シグナル伝達部分内の細胞質シグナル伝達配列は、ランダムな順序または指定された順序で相互に連結されていてよい。任意で、好ましくは、2~10アミノ酸長の、短いオリゴペプチドまたはポリペプチドのリンカーが、連結を形成していてもよい。グリシン-セリンダブレットは、特に適当なリンカーを提供する。

【0151】

1つの態様において、細胞内ドメインは、CD3 ζ のシグナルドメインおよびCD28のシグナル伝達ドメインを含むよう、設計される。もう1つの態様において、細胞内ドメインは、CD3 ζ のシグナル伝達ドメインおよび4-1BBのシグナル伝達ドメインを含むよう、設計される。さらにもう1つの態様において、細胞内ドメインは、CD3 ζ のシグナル伝達ドメインならびにCD28および4-1BBのシグナル伝達ドメインを含むよう、設計される。

【0152】

1つの態様において、本発明のCAR内の細胞内ドメインは、4-1BBのシグナル伝達ドメインおよびCD3 ζ のシグナル伝達ドメインを含むよう、設計され、ここで、4-1BBのシグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO:18に記載の核酸配列を含み、CD3 ζ のシグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO:19に記載の核酸配列を含む。

【0153】

1つの態様において、本発明のCAR内の細胞内ドメインは、4-1BBのシグナル伝達ドメインおよびCD3 ζ のシグナル伝達ドメインを含むよう、設計され、ここで、4-1BBのシグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO:20のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含み、CD3 ζ のシグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO:21のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む。

【0154】

1つの態様において、本発明のCAR内の細胞内ドメインは、4-1BBのシグナル伝達ドメインおよびCD3ζのシグナル伝達ドメインを含むよう、設計され、ここで、4-1BBのシグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO:20に記載のアミノ酸配列を含み、CD3ζのシグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO:21に記載のアミノ酸配列を含む。

【0155】

1つの態様において、抗CD2 CARは、SEQ ID NO:25、26、37、38、49、59、または60のいずれか1つに記載のアミノ酸配列を含む。1つの態様において、抗CD2 CARは、SEQ ID NO:1～7からなる群より選択される核酸配列によってコードされる。1つの態様において、抗CD5 CARは、SEQ ID NO:71、72、77、78、89、または90のいずれか1つに記載のアミノ酸配列を含む。1つの態様において、抗CD5 CARは、SEQ ID NO:8～13からなる群より選択される核酸配列によってコードされる。

【0156】

CAR配列の許容される変動は、当業者に公知である。例えば、いくつかの態様において、CARは、SEQ ID NO:25、26、37、38、49、59、60、71、72、77、78、89、または90のいずれかに記載のアミノ酸配列のいずれかとの少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、CARは、SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、または13のいずれかに記載の核酸配列との少なくとも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81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる。

【0157】

本発明は、CAR、CARをコードする核酸、CARをコードする核酸を含むベクター、CARを含む細胞、CARをコードする核酸を含む細胞、およびCARをコードする核酸を含むベクターを含む細胞の、いずれか1つを含むと解釈されるべきである。

【0158】

CD2-MEDI507H2L-3028 CAR (SEQ ID NO: 1)

ggatccCAAGTCCAACCTGGTGCAATCAGGCGCAGAAGTCCAACGACCGGGGGCCAG
TGTTAAAGTGTCTTGTAAGCCTCCGGGTACATTTTACTGAGTACTATATGTACT
GGGTCAGACAGGCCCCAGGGCAAGGTTTGGAACCTGTCGGACGCATAGATCCCG
AAGACGGTTCTATAGATTACGTTGAGAAGTTCAAAAAGAAAGTCACACTTACTG
CGGACACATCTAGTAGCACCGCATATATGGAACCTGAGCAGTCTCACCTCAGACG
ACACCGCAGTGTACTATTGCGCTCGCGGAAAGTTTAACTATAGGTTTCGCGTACTG
GGGACAGGGGACACTGGTGACTGTTAGCAGCggtggcggagggagcggcggtggaggaagcggag
gcggaggttcGACGTTGTGATGACGCAAAGTCCCCCGTCACTCCTTGTTACTCTCGGC
CAGCCAGCGTCTATCTCTTGCCGGTCAAGCCAGAGCTTGCTCCACTCTAGTGGTA
ACACGTATTTGAACTGGTTGCTGCAAAGGCCTGGACAATCTCCTCAGCCCCTGAT
CTATTTGGTTAGCAAACCTGGAAAGTGGTGTTCAGACAGATTTTCAGGGTCTGGA
TCAGGCACTGATTTCACTCTGAAGATCTCCGGGGTAGAGGCCGAGGACGTGGGA
GTCTATTACTGCATGCAGTTTACTCACTATCCTTATACCTTTGGTCAAGGGACGA
AACTGGAGATCAAAtccgga

10

CD2-OKT11H2L-3029 CAR (SEQ ID NO: 2)

ggatccCAAGTTCAGCTTCAGCAACCAGGTGCTGAATTGGTCCGCCCTGGAACCTAGC
GTTAAACTGTCTTGTAAGGCATCCGGTTATACGTTTACAAGTTATTGGATGCACT
GGATTAAGCAAAGGCCCGAACAAGGCCTTGAATGGATTGGGAGAATTGATCCCT
ACGATAGCGAGACACACTACAATGAAAAATTTAAAGATAAGGCCATCCTCAGCG
TAGATAAGAGCAGTTCTACCGCATACATACAGCTCTCAAGCCTGACGTCAGATG

20

30

40

50

ACTCAGCCGTTTATTATTGCTCAAGGCGGGACGCTAAATACGACGGCTATGCGCT
TGACTIONTGGGGACAAGGCACCACTTTGACAGTCTCCAGTggtggcggaggagcggcgg
ggaggaagcggaggcggagggttcGATATAGTTATGACGCAAGCAGCACCCCTCTGTACCTGT
GACACCGGGTGAATCCGTTAGTATCTCATGCCGCTCTTCTAAAACCCTCTTGCAT
TCTAACGGCAATACATATTTGTATTGGTTCCTTCAACGACCAGGACAATCACCGC
AAGTGCTTATTTATAGGATGTCTAACTTGGCTAGTGGGGTGCCAAATAGGTTTACG
TGGGTCTGGATCTGAGACAACTTTCACGTTGAGAATAAGTAGGGTGGAAGCTGA
AGACGTCGGTATATACTACTGTATGCAGCATTGGAGTACCCTTACACTTTCGGG
GGAGGTACTAAGCTCGAAATTAAAtccgga

CD2-OKT11L2H-3030 CAR (SEQ ID NO: 3)

ggatccGATATAGTTATGACGCAAGCAGCACCCCTCTGTACCTGTGACACCGGGTGAA
TCCGTTAGTATCTCATGCCGCTCTTCTAAAACCCTCTTGCATTCTAACGGCAATAC
ATATTTGTATTGGTTCCTTCAACGACCAGGACAATCACCGCAAGTGCTTATTTAT
AGGATGTCTAACTTGGCTAGTGGGGTGCCAAATAGGTTTACGTTGAGTGGGTCTGGATCTG
AGACAACTTTCACGTTGAGAATAAGTAGGGTGGAAGCTGAAGACGTCGGTATAT
ACTACTGTATGCAGCATTGGAGTACCCTTACACTTTCGGGGGAGGTACTAAGCT
CGAAATTAAAggtggcggaggagcggcgggtggaggaagcggaggcggagggttcCAAGTTCAGCTTCA
GCAACCAGGTGCTGAATTGGTCCGCCCTGGAAGTAGCGTTAACTGTCTTGTAAAG
GCATCCGGTTATACGTTTACAAGTTATTGGATGCACTGGATTAAGCAAAGGCCCG
AACAAAGGCCTTGAATGGATTGGGAGAATTGATCCCTACGATAGCGAGACACACT
ACAATGAAAAATTTAAAGATAAGGCCATCCTCAGCGTAGATAAGAGCAGTTCTA
CCGCATACATACAGCTCTCAAGCCTGACGTCAGATGACTCAGCCGTTTATTATTG
CTCAAGGCGGGACGCTAAATACGACGGCTATGCGCTTGACTACTGGGGACAAGG
CACCACCTTTGACAGTCTCCAGTtccgga

CD2-T11-2-H2L-3031 CAR (SEQ ID NO: 4)

ggatccCAAGTTCAATTGCAGCAACCGGGTGCCGAGTTGGTAAGGCCCGGTGCGTC
AGTCAAACCTTAGTTGTAAAGCTAGTGGGTACACTTTTACTACGTTCTGGATGAAT
TGGGTGAAGCAACGACCAGGCCAAGGTCTGGAATGGATCGGCATGATTGACCCG
TCTGACTCAGAAGCTCATTACAACCAGATGTTCAAGGACAAGGCGACTCTGACT
GTTGATAAAAGCTCAAGCACCGCCTACATGCAGCTCAGTAGCCTCACATCCGAG
GATTCCGCAGTGTACTATTGCGCGAGGGGACGAGGGTATGATGACGGCGATGCG
ATGGACTATTGGGGACAGGGGACCAGCGTAACAGTCAGTAGTggtggcggaggagcgg
cgggtggaggaagcggaggcggagggttcGATATAGTTATGACCCAGTCTCCCGCCTCTCTGGCC
GTTAGCTTGGGACAACGCGCTACCATCTCTTACCGAGCGTCTAAGTCCGTCAGTA
CAAGCGGTTATAGTTACATGCACTGGAACCAGCAAAAGCCCGGACAACCTCCGA
GACTCCTGATTTATTTGGTCTCTAACCTTGAGTCAGGTGTCCCAGCCAGATTCTCC
GGCTCTGGAAGCGGCACTGACTTTACATTGAACATTCACCCCGTGGAGGAGGAA
GACGCTGCTACCTACTATTGCATGCAATTCACGCACTATCCCTACACATTCGGGG
GGGGCACGAAATTGGAAATCAAAtccgga

CD2-TS2-18.1.1-H2L-3032 CAR (SEQ ID NO: 5)

ggatccGAGGTTCAGCTTGAGGAGAGTGGGGGAGGTTTGGTAATGCCAGGTGGGTC
TTTGAAACTCAGTTGCGCGGCGTCAGGCTTCGCATTTTCCTCCTACGATATGTCCT
GGGTCAGACAGACACCCGAGAAGCGGCTGGAATGGGTGCTTACATTTCCGGGG

10

20

30

40

50

GAGGATTCACGTACTACCCGGATACAGTAAAGGGGAGATTTACTCTGAGCCGGG
ACAACGCTAAGAATACCCTCTATCTCCAGATGTCCTCTTTGAAGAGTGAAGACAC
AGCGATGTATTACTGTGCGAGACAAGGGGCCAATTGGGAGCTGGTTTACTGGGG
CCAGGGGACGACATTGACGGTTTCTAGCggtggcggaggagcggcggtggaggaagcggaggcgg
aggttccGACATTGTAATGACACAATCACCTGCTACACTTAGCGTGACTCCAGGTGA
TCGGGTATTCCTGAGCTGCCGCGCATCACAAAGTATATCCGACTTCCTGCACTGG
TATCAGCAGAAATCTCACGAAAGTCCCAGGCTGCTGATTAAATACGCTTCCCAG
AGTATTAGTGGTATCCCCTCACGATTTTCTGGCAGCGGGAGCGGTAGTGAATTCA
CTCTTTCTATAAACTCCGTCGAGCCAGAAGACGTGGGGGTGTATCTTTGCCAAAA
TGGACACAATTTTCCACCAACCTTTGGTGGGGGCACCAAACCTCGAAATAAAGtccg
ga

10

CD2-TS2-18.1.1-L2H-3033 CAR (SEQ ID NO: 6)

ggatccGACATTGTAATGACACAATCACCTGCTACACTTAGCGTGACTCCAGGTGAT
CGGGTATTCCTGAGCTGCCGCGCATCACAAAGTATATCCGACTTCCTGCACTGGT
ATCAGCAGAAATCTCACGAAAGTCCCAGGCTGCTGATTAAATACGCTTCCCAGA
GTATTAGTGGTATCCCCTCACGATTTTCTGGCAGCGGGAGCGGTAGTGAATTCA
TCTTTCTATAAACTCCGTCGAGCCAGAAGACGTGGGGGTGTATCTTTGCCAAAAT
GGACACAATTTTCCACCAACCTTTGGTGGGGGCACCAAACCTCGAAATAAAGggtgg
cggaggagcggcggtggaggaagcggaggcggaggttccGAGGTTGAGCTTGAGGAGAGTGGGGGA
GGTTTGGTAATGCCAGGTGGGTCTTTGAAACTCAGTTGCGCGGCGTCAGGCTTCG
CATTTTCCTCCTACGATATGTCCTGGGTCAGACAGACACCCGAGAAGCGGCTGG
AATGGGTCGCTTACATTTCCGGGGGAGGATTCACGTACTACCCGGATACAGTAA
AGGGGAGATTTACTCTGAGCCGGGACAACGCTAAGAATACCCTCTATCTCCAGA
TGTCCTCTTTGAAGAGTGAAGACACAGCGATGTATTACTGTGCGAGACAAGGGG
CCAATTGGGAGCTGGTTTACTGGGGCCAGGGGACGACATTGACGGTTTCTAGCtcc
gga

20

CD2-MEDI507L2H-3043 CAR (SEQ ID NO: 7)

ggatccGACGTTGTGATGACGCAAAGTCCCCCGTCACTCCTTGTTACTCTCGGCCAG
CCAGCGTCTATCTCTTGCCGGTCAAGCCAGAGCTTGCTCCACTCTAGTGGTAACA
CGTATTTGAACTGGTTGCTGCAAAGGCCTGGACAATCTCCTCAGCCCCCTGATCTA
TTTGGTTAGCAAACCTGGAAAGTGGTGTTCAGACAGATTTTCAGGGTCTGGATCA
GGCACTGATTTCACTCTGAAGATCTCCGGGGTAGAGGCCGAGGACGTGGGAGTC
TATTACTGCATGCAGTTTACTCACTATCCTTATACCTTTGGTCAAGGGACGAAAC
TGGAGATCAAAggtggcggaggagcggcggtggaggaagcggaggcggaggttccCAAGTCCAACCTGG
TGCAATCAGGCGCAGAAGTCCAACGACCGGGGGCCAGTGTTAAAGTGTCTTGTA
AAGCCTCCGGGTACATTTTTACTGAGTACTATATGTACTGGGTCAGACAGGCCCC
AGGGCAAGGTTTGGAACCTTGTCGGACGCATAGATCCCGAAGACGGTTCTATAGA
TTACGTTGAGAAGTTCAAAAAGAAAGTCACACTTACTGCGGACACATCTAGTAG
CACCGCATATATGGAACCTGAGCAGTCTCACCTCAGACGACACCGCAGTGTACTA
TTGCGCTCGCGGAAAGTTTAACTATAGGTTTCGCGTACTGGGGACAGGGGACACT
GGTGA CTGTTAGCAGCtccgga

30

CD5-17L2H-3045 CAR (SEQ ID NO: 8)

40

50

ggatccAACATTGTACTGACGCAAAGCCCCTCATCTTTGTCTGAGTCACTCGGCGGC
 AAAGTAACCATCACATGCAAGGCCAGTCAAGACATCAATAAATATATTGCTTGG
 TATCAGTATAAACCCGGCAAGGGGCCGCGACTGCTGATTCACTACACGAGTACC
 TTGCAACCGGGCATTCCGAGCCGATTTAGTGGCAGTGGCTCAGGTCCGCGATTACT
 CATTCTCAATAAGTAATCTCGAACCAGGAAGACATAGCTACTTATTATTGCTTGCA
 GTACGATAATTTGTGGACCTTCGGGGGTGGTACAAAGTTGGAAATAAAGggtggcgg
 agggagcggcgggtggaggaagcggagggcggaggtccGAGGTCCAACCTCGTAGAATCAGGTCCCGG
 ATTGGTGAACCATCCCAGAGCCTCTCTATTACATGCACGGTCTCTGGATTAGT
 CTGACCAATTACGATGTGCATTGGGTGCGCCAGTCTCCCGGCAAGGGGTTGGAA
 TGGCTTGGCGTTATATGGAACTACGGAAATACAGACTATAACGCCGCGTTTATCT
 CTCGGCTGAGTATACGGAAAGACAGTAGTAAATCCCAGGTCTTTTTTACGATGTC
 ATCCCTGCAAACGCCAGATACCGCAATATATTACTGCGCCAGGAACACGGTGA
 TGGTTATTATAATTGGTACTTCGATGTGTGGGGTACTGGCACTACAGTCACAGTA
 TCTTCAtctaga

10

CD5-9H2L-3048 CAR (SEQ ID NO: 9)

ggatcc CAG GTC CAG CTG AAA GAA AGC GGT CCA GAG CTG GAA AAA CCC
 GGT GCG AGC GTC AAA ATA TCA TGT AAA GCA AGC GGG TAT TCA TTC ACC
 GCG TAC TCT ATG AAC TGG GTT AAG CAA AAC AAC GGT ATG TCC TTG GAG
 TGG ATA GGG TCT ATC GAC CCG TAT TAT GGG GAC ACA AAA TAC GCG CAG
 AAA TTC AAG GGG AAG GCC ACC CTG ACC GTA GAT AAA GCT AGT TCT ACT
 GCG TAC TTG CAA CTG AAA AGC CTC ACT TCT GAG GAC TCT GCC GTC TAC
 TAC TGT GCT CGG CGA ATG ATA ACG ACG GGG GAC TGG TAT TTC GAT GTT
 TGG GGT ACA GGG ACT ACG GTG ACT GTC AGT
 AGCggtggcggagggagcggcgggtggaggaagcggagggcggaggtcc CAT ATC GTC TTG ACT CAA
 TCA CCT AGT TCT TTG TCT GCG TCC CTT GGC GAC CGA GTC ACC ATA TCT
 TGC AGA GCG TCA CAG GAC ATT TCA ACG TAC CTC AAC TGG TAT CAG CAA
 AAA CCG GAC GGG ACT GTC AAG CTC TTG ATC TTC TAC ACT TCC AGA CTC
 CAC GCC GGG GTG CCA AGC AGA TTT AGT GGC TCT GGC AGC GGG ACA CAC
 CAT AGT CTT ACA ATC AGC AAT CTT GAG CAA GAA GAC ATA GCC ACG TAT
 TTC TGC CAG CAA GGT AAC TCA CTT CCG TTC ACG TTT GGT AGT GGC ACC
 AAA CTG GAG ATA AAA tccgga

20

CD5-9L2H-3049 CAR (SEQ ID NO: 10)

Ggatcc CAT ATC GTC TTG ACT CAA TCA CCT AGT TCT TTG TCT GCG TCC CTT
 GGC GAC CGA GTC ACC ATA TCT TGC AGA GCG TCA CAG GAC ATT TCA ACG
 TAC CTC AAC TGG TAT CAG CAA AAA CCG GAC GGG ACT GTC AAG CTC TTG
 ATC TTC TAC ACT TCC AGA CTC CAC GCC GGG GTG CCA AGC AGA TTT AGT
 GGC TCT GGC AGC GGG ACA CAC CAT AGT CTT ACA ATC AGC AAT CTT GAG
 CAA GAA GAC ATA GCC ACG TAT TTC TGC CAG CAA GGT AAC TCA CTT CCG
 TTC ACG TTT GGT AGT GGC ACC AAA CTG GAG ATA AAA
 ggtggcggagggagcggcgggtggaggaagcggagggcggaggtcc CAG GTC CAG CTG AAA GAA AGC
 GGT CCA GAG CTG GAA AAA CCC GGT GCG AGC GTC AAA ATA TCA TGT AAA
 GCA AGC GGG TAT TCA TTC ACC GCG TAC TCT ATG AAC TGG GTT AAG CAA
 AAC AAC GGT ATG TCC TTG GAG TGG ATA GGG TCT ATC GAC CCG TAT TAT
 GGG GAC ACA AAA TAC GCG CAG AAA TTC AAG GGG AAG GCC ACC CTG ACC

30

40

50

GTA GAT AAA GCT AGT TCT ACT GCG TAC TTG CAA CTG AAA AGC CTC ACT
TCT GAG GAC TCT GCC GTC TAC TAC TGT GCT CGG CGA ATG ATA ACG ACG
GGG GAC TGG TAT TTC GAT GTT TGG GGT ACA GGG ACT ACG GTG ACT GTC
AGT AGC tccgga

CD5-34H2L-3052 CAR (SEQ ID NO: 11)

ggatccGAGGTAAACTCGTGGAGAGCGGTGCCGAAGTGGTGCTTC
CGTTAAACTCAGTTGTGCCGCGTCAGGATTAAACATAAAAGATTACTACATTCAC
TGGGTCAAACAGCGCCCGGAGCAGGGGCTTGAATGGATCGGGTGGATTGATCCT
GAAAACGGGCGCACCGAATATGCTCCCAAGTTCCAGGGCAAAGCTACTATGACC
GCTGACACCTCTAGTAACACTGCCTACCTGCAGTTGAGCTCTCTTACGTCTGAGG
ATACCGCTGTGTACTACTGTAATAACGGAAATTATGTACGACACTATTACTTCGA
CTACTGGGGGCGAGGGCACTACTGTGACTGTATCTAGCggtggcggaggagcggcggtggagg
aagcggaggcggaggttccGATTGGCTCACACAATCCCCTGCAATCCTGAGTGCATCTCCA
GGCGAGAAAGTAAGTATGACTTGCAGAGCTATAAGCTCTGTGTCTTACATGCACT
GGTATCAGCAGAAGCCAGGTTCTTCCCCGAAGCCGTGGATATATGCTACAAGCA
ATTTGGCATCCGGTGTTCGCCCGCGGTTTAAAGTGGCTCCGGTTCTGGGACAAGTTA
CTCCCTCACGATCAGCAGGGTTGAAGCCGAGGACGCTGCCACTTACTATTGCCA
ACAGTGGTCAAGTAACCCAGGACTTTCGGGGGAGGAACTAACTTGAAATCAA
Atctaga

10

CD5-34L2H-3053 CAR (SEQ ID NO: 12)

Ggatcc GAT TGG CTC ACA CAA TCC CCT GCA ATC CTG AGT GCA TCT CCA GGC
GAG AAA GTA ACT ATG ACT TGC AGA GCT ATA AGC TCT GTG TCC TAC ATG
CAC TGG TAT CAG CAG AAG CCA GGT TCT TCC CCG AAG CCG TGG ATA TAT
GCT ACA AGC AAT TTG GCA TCC GGT GTT CCC GCC CGG TTT AGT GGC TCC
GGT TCT GGG ACA AGT TAC TCC CTC ACG ATC AGC AGG GTT GAA GCC GAG
GAC GCT GCC ACT TAC TAT TGC CAA CAG TGG TCA AGT AAC CCC AGG ACT
TTC GGG GGA GGA ACT AAA CTT GAA ATC AAA
Ggtggcggaggagcggcggtggagggaagcggaggcggaggttcc GAG GTT AAA CTC GTG GAG AGC
GGT GCC GAA CTC GTC CGA AGT GGT GCT TCC GTT AAA CTC AGT TGT GCC
GCG TCA GGA TTT AAC ATA AAA GAT TAC TAC ATT CAC TGG GTC AAA CAG
CGC CCG GAG CAG GGG CTT GAA TGG ATC GGG TGG ATT GAT CCT GAA AAC
GGG CGC ACC GAA TAT GCT CCC AAG TTC CAG GGC AAA GCT ACT ATG ACC
GCT GAC ACC TCT AGT AAC ACT GCC TAC CTG CAG TTG AGC TCT CTT ACG
TCT GAG GAT ACC GCT GTG TAC TAC TGT AAT AAC GGA AAT TAT GTA CGA
CAC TAT TAC TTC GAC TAC TGG GGG CAG GGC ACT ACT GTG ACT GTA TCT
AGC tCTAGA

20

30

CD5-17H2L-3054 CAR (SEQ ID NO: 13)

ggatccGAGGTCCAACCTCGTAGAATCAGGTCCCGGATTGGTGCAACCATCCCAGAG
CCTCTCTATTACATGCACGGTCTCTGGATTTAGTCTGACCAATTACGATGTGCATT
GGGTGCGCCAGTCTCCCGGCAAGGGGTTGGAATGGCTTGGCGTTATATGGAAGT
ACGGAATACAGACTATAACGCCGCGTTTATCTCTCGGCTGAGTATACGGAAG
ACAGTAGTAAATCCCAGGTCTTTTTTACGATGTCATCCCTGCAAACGCCAGATAC
CGCAATATATTACTGCGCCAGGAACACGGTGATGGTTATTATAATTGGTACTTC

40

GATGTGTGGGGTACTGGCACTACAGTCACAGTATCTTCAggtggcggaggagcggcggtgg
aggaagcggaggcggaggtccAACATTGTACTGACGCAAAGCCCCTCATCTTTGTCTGAGT
CACTCGGCGGCAAAGTAACCATCACATGCAAGGCCAGTCAAGACATCAATAAAT
ATATTGCTTGGTATCAGTATAAACCCGGCAAGGGGGCCGCGACTGCTGATTCTACTA
CACGAGTACCTTGCAACCGGGCATTCCGAGCCGATTTAGTGGCAGTGGCTCAGG
TCGCGATTACTCATTCTCAATAAGTAATCTCGAACCGGAAGACATAGCTACTTAT
TATTGCTTGCAGTACGATAATTTGTGGACCTTCGGGGGTGGTACAAAGTTGGAAA
TAAAGtctaga

CD8 膜貫通ドメイン核酸配列 (SEQ ID NO: 14):

atctacatct gggcgccctt ggcggggact tgtggggtcc ttctctgtc actggttatc
accctttact gc

10

CD8 膜貫通ドメインアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 15):

IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC

CD8 ヒンジドメイン核酸配列 (SEQ ID NO: 16):

accacgacgc cagcgccgcg accaccaaca ccggcgccca ccatcgcgtc gcagccctg
tccttgccgc cagagcggtg ccggccagcg gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg
gacttcgcct gtgat

CD8 ヒンジドメインアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 17):

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

20

4-1BB 核酸配列 (SEQ ID NO: 18)

aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacaac catttatgag accagtacaa
actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttcag aagaagaaga aggaggatgt
gaactg

CD3ζ 核酸配列 (SEQ ID NO: 19)

agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtaca agcagggcca gaaccagctc
tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg ttttgacaa gagacgtggc
cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat
gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc
cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc
tacgacgcc ttacatgca gccctgccc cctgc

4-1BB アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 20):

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCEL

30

CD3ζ アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 21):

RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQ
EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL
PPR

CD2-MEDI507H2L-3028 CAR アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 25)

MALPVTALLLPLALLLHAARPGSQVQLVQSGAEVQRPGASVKVSKASGYIFTEYY
MYWVRQAPGQGLELVGRIDPEDGSIDYVEKFKKKVTLTADTSSSTAYMELSSLTSD
DTAVYYCARGKFNRYFAYWGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGSDVVMVTQSPPSL
LVTLGQPASISCRSSQSLLHSSGNTYLNWLLQRPQGSPQLIYLVSKLESGVPDRFSGS

40

GS GTDFTLKISGVEAEDVG VYYCMQFTHYPYTFGQGTKLEIKSGTTTPAPRPPTPAPT
IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRG
RKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQN
QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE
IGMKGERRRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

CD2-MEDI507L2H-3043 CAR アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 26)

MALPVTALLLPLALLLHAARPGSDVVM TQSPPSLLVTLGQPASISCRSSQSLLHSSGN
TYLNLWLLQRPGQSPQPLIYLVSKLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDVG VYY
CMQFTHYPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVQRP GASVKV
SCKASGYIFTEYYMYWVRQAPGQGLELVGRIDPEDGSIDYVEKFKKKVTLTADTSSS
TAYMELSSLTSDDTAVYYCARGKFNYRFAYWGQGT LVTVSSSGTTTPAPRPPTPAPT
IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRG
RKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQN
QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE
IGMKGERRRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

CD2-MEDI507H2L-3028 scFv アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 27)

GSQVQLVQSGAEVQRP GASVKV SCKASGYIFTEYYMYWVRQAPGQGLELVGRIDPE
DGSIDYVEKFKKKVTLTADTSSSTAYMELSSLTSDDTAVYYCARGKFNYRFAYWGQ
GTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDVVM TQSPPSLLVTLGQPASISCRSSQSLLHSSG
NTYLNWLLQRPGQSPQPLIYLVSKLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDVG VY
YCMQFTHYPYTFGQGTKLEIKSG

20

CD2-MEDI507L2H-3043 scFv アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 28)

GSDVVM TQSPPSLLVTLGQPASISCRSSQSLLHSSGNTYLNWLLQRPGQSPQPLIYLV
SKLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDVG VYYCMQFTHYPYTFGQGTKLEIKG
GGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVQRP GASVKV SCKASGYIFTEYYMYWVRQAP
GQGLELVGRIDPEDGSIDYVEKFKKKVTLTADTSSSTAYMELSSLTSDDTAVYYCAR
GKFNYRFAYWGQGT LVTVSSSG

CD2-MEDI507 VH アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 29)

QVQLVQSGAEVQRP GASVKV SCKASGYIFTEYYMYWVRQAPGQGLELVGRIDPED
GSIDYVEKFKKKVTLTADTSSSTAYMELSSLTSDDTAVYYCARGKFNYRFAYWGQ
TLVTVSS

30

CD2-MEDI507 VL アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 30)

DVVM TQSPPSLLVTLGQPASISCRSSQSLLHSSGNTYLNWLLQRPGQSPQPLIYLVSK
LESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDVG VYYCMQFTHYPYTFGQGTKLEIK

CD2-MEDI507 HCDR1 (SEQ ID NO: 31)

EYYMY

CD2-MEDI507 HCDR2 (SEQ ID NO: 32)

RIDPEDGSIDYVEKFKK

40

CD2-MEDI507 HCDR3 (SEQ ID NO: 33)
GKFNYRFAY

CD2-MEDI507 LCDR1 (SEQ ID NO: 34)
RSSQSLLHSSGNTYLN

CD2-MEDI507 LCDR2 (SEQ ID NO: 35)
LVSKLES

CD2-MEDI507 LCDR3 (SEQ ID NO: 36)
MQFTHYPYT

10

CD2-OKT11H2L-3029 CAR アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 37)
MALPVTALLLPLALLLHAARPGSQVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCKASGYTFTSYW
MHWIKQRPEQGLEWIGRIDPYDSETHYNEKFKDKAILSVDKSSSTAYIQLSSLTSDDS
AVYYCSRDAKYDGYALDYWGQGTTLTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQAAP
SVPVTPGESVSISCRSSKTLHNSGNTYLYWFLQRPQGSPQVLIYRMSNLSAGVPNRF
SGSGSETTFTLRISRVEAEDVGIYYCMQHLEYPYTFGGGKLEIKSGTTTPAPRPPTPA
PTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCK
RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQG
QNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA
YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

20

CD2-OKT11L2H-3030 CAR アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 38)
MALPVTALLLPLALLLHAARPGSDIVMTQAAPSVPVTPGESVSISCRSSKTLHNSGN
TYLYWFLQRPQGSPQVLIYRMSNLSAGVPNRFSGSGSETTFTLRISRVEAEDVGIYYC
MQHLEYPYTFGGGKLEIKGGGSGGGGSGGGGSGVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCK
KASGYTFTSYWMHWIKQRPEQGLEWIGRIDPYDSETHYNEKFKDKAILSVDKSSSTA
YIQLSSLTSDDSAVYYCSRDAKYDGYALDYWGQGTTLTVSSSGTTTPAPRPPTPAP
TIAEQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKR
GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGG
NQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY
SEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

30

CD2-OKT11H2L-3029 scFv アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 39)
GSQVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCKASGYTFTSYWMHWIKQRPEQGLEWIGRIDPY
DSETHYNEKFKDKAILSVDKSSSTAYIQLSSLTSDDSAVYYCSRDAKYDGYALDY
WGQGTTLTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQAAPSVPVTPGESVSISCRSSKTLH
SNGNTYLYWFLQRPQGSPQVLIYRMSNLSAGVPNRFSGSGSETTFTLRISRVEAEDV
GIYYCMQHLEYPYTFGGGKLEIKSG

CD2-OKT11L2H-3030 scFv アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 40)
GSDIVMTQAAPSVPVTPGESVSISCRSSKTLHNSGNTYLYWFLQRPQGSPQVLIYRM
SNLSAGVPNRFSGSGSETTFTLRISRVEAEDVGIYYCMQHLEYPYTFGGGKLEIKGG
GGSGGGGSGGGGSGVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCKASGYTFTSYWMHWIKQRPE

40

QGLEWIGRIDPYDSETHYNEKFKDKAILSVDKSSSTAYIQLSSLTSDDSAVYYCSR RD
AKYDGYALDYWGQGTTLTVSSSG

CD2-OKT11 VH アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 41)

QVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCKASGYTFTSYWMHWIKQRPEQGLEWIGRIDPYDS
ETHYNEKFKDKAILSVDKSSSTAYIQLSSLTSDDSAVYYCSRDAKYDGYALDYWG
QGTTLTVSS

CD2-OKT11 VL アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 42)

DIVMTQAAPSVPTPGESVSISCRSSKTLLHSNGNTYLYWFLQRPQGSPQVLIYRMSN
LASGVPNRFSGSGSETTFLRISRVEAEDVGIIYCMQHLEYPYTFGGGKLEIK

10

CD2-OKT11 HCDR1 (SEQ ID NO: 43)

SYWMH

CD2-OKT11 HCDR2 (SEQ ID NO: 44)

RIDPYDSETHYNEKFKD

CD2-OKT11 HCDR3 (SEQ ID NO: 45)

RNAKYDGYALDY

CD2-OKT11 LCDR1 (SEQ ID NO: 46)

RSSKTLLHSNGNTYLY

20

CD2-OKT11 LCDR2 (SEQ ID NO: 47)

RMSNLAS

CD2-OKT11 LCDR3 (SEQ ID NO: 48)

MQHLEYPYT

CD2-T11-2-H2L-3031 CAR アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 49)

MALPVTALLLPLALLLHAARPGSQVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTTFW
MNWVKQRPQGQGLEWIGMIDPSDSEAHYNQMFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTS
EDSAVYYCARGRGYDDGDAMDYWGQGTSTVTSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQ
SPASLAVSLGQRATISYRASKSVSTSGYSYMHWNQKPGQPPRLIYLVSNLESGVP
ARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCMQFTHYPYTFGGGKLEIKSGTTTPAPRP
PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLSLVITL
YCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY
KQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM
AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

30

CD2-T11-2-H2L-3031 scFv アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 50)

GSQVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTTFWMNWVKQRPQGQGLEWIGMIDP
SDSEAHYNQMFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGRGYDDGDAM
DYWGQGTSTVTSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPASLAVSLGQRATISYRASKS

40

VSTSGYSYMHWNQKPGQPPRLLIYLVSNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEE
DAATYYCMQFTHYPYTFGGGTKLEIKSG

CD2-T11-2-H2L-3031 VH アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 51)

QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTTFWMNWVKQRPQGQLEWIGMIDPSD
SEAHYNQMFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGRGYDDGDAMD
YWGQGTSTVTVSS

CD2-T11-2-H2L-3031 VL アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 52)

DIVMTQSPASLAVSLGQRATISYRASKSVSTSGYSYMHWNQKPGQPPRLLIYLVSN
LESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCMQFTHYPYTFGGGTKLEIK

10

CD2-T11-2 HCDR1 (SEQ ID NO: 53)

TFWMN

CD2-T11-2 HCDR2 (SEQ ID NO: 54)

MIDPSDSEAHYNQMFKD

CD2-T11-2 HCDR3 (SEQ ID NO: 55)

GRGYDDGDAMDY

CD2-T11-2 LCDR1 (SEQ ID NO: 56)

RASKSVSTSGYSYMH

20

CD2-T11-2 LCDR2 (SEQ ID NO: 57)

LVSNLES

CD2-T11-2 LCDR3 (SEQ ID NO: 58)

MQFTHYPYT

CD2-TS2-18.1.1-H2L-3032 CAR アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 59)

MALPVTALLLPLALLLHAARPGSEVQLEESGGGLVMPGGSLKLSCAASGFAFSSYD
MSWVRQTPEKRLEWVAYISGGGFTYYPDTVKGFTLSRDNAKNTLYLQMSSLKSE
DTAMYYCARQGANWELVYWGGTTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPAT
LSVTPGDRVFLSCRASQSISDFLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSISGIPSRFSGSGSGSD
FTLSINSVEPEDVGYYLCQNGHNFPTFGGGGTKLEIKSGTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS
LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLY
IFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNEL
NLGRREEYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE
RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

30

CD2-TS2-18.1.1-L2H-3033 CAR アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 60)

MALPVTALLLPLALLLHAARPGSDIVMTQSPATLSVTPGDRVFLSCRASQSISDFLHW
YQQKSHESPRLLIKYASQSISGIPSRFSGSGSGSDFTLSINSVEPEDVGYYLCQNGHNF
PPTFGGGGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLEESGGGLVMPGGSLKLSCAASGFA
FSSYDMSWVRQTPEKRLEWVAYISGGGFTYYPDTVKGFTLSRDNAKNTLYLQMSS

40

LKSEDTAMYYCARQGANWELVYWGQGTTLTVSSSGTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL
RPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYI
FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNEL
NLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE
RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

CD2-TS2-18.1.1-H2L-3032 scFv アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 61)

GSEVQLEESGGGLVMPGGSLKLSCAASGFAFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVAYISGG
GFTYYPDTVKGRTLSRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARQGANWELVYWG
QGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIVMTQSPATLSVTPGDRVFLSCRASQSISDFL
HWYQQKSHESPRLLIKYASQSISGIPSRFSGSGSGSDFTLSINSVEPEDVGVYLCQNGH
NFPPTFGGGTKLEIKSG

10

CD2-TS2-18.1.1-L2H-3033 scFv アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 62)

GSDIVMTQSPATLSVTPGDRVFLSCRASQSISDFLHWYQKSHESPRLLIKYASQSISG
IPSRFSGSGSGSDFTLSINSVEPEDVGVYLCQNGHNFPPTFGGGTKLEIKGGGGSGGG
GSGGGGSEVQLEESGGGLVMPGGSLKLSCAASGFAFSSYDMSWVRQTPEKRLEWV
AYISGGGFTYYPDTVKGRTLSRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARQGANWE
LVYWGQGTTLTVSSSG

CD2-TS2-18.1.1 VH アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 63)

EVQLEESGGGLVMPGGSLKLSCAASGFAFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVAYISGGGF
TYYPDTVKGRTLSRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARQGANWELVYWGQG
TTLTVSS

20

CD2-TS2-18.1.1 VL アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 64)

DIVMTQSPATLSVTPGDRVFLSCRASQSISDFLHWYQKSHESPRLLIKYASQSISGIP
SRFSGSGSGSDFTLSINSVEPEDVGVYLCQNGHNFPPTFGGGTKLEIK

CD2-TS2-18.1.1 HCDR1 (SEQ ID NO: 65)

SYDMS

CD2-TS2-18.1.1 HCDR2 (SEQ ID NO: 66)

YISGGGFTYYPDTVKG

30

CD2-TS2-18.1.1 HCDR3 (SEQ ID NO: 67)

QGANWELVY

CD2-TS2-18.1.1 LCDR1 (SEQ ID NO: 68)

RASQSISDFLH

CD2-TS2-18.1.1 LCDR2 (SEQ ID NO: 69)

YASQSIS

CD2-TS2-18.1.1 LCDR3 (SEQ ID NO: 70)

QNGHNFPPT

40

CD5-17L2H-3045 CAR アミノ酸配列 (SEQ ID NO:71)

MALPVTALLLPLALLLHAARPGSNIVLTQSPSSLSSESLGGKVTITCKASQDINKYIAW
YQYKPGKGPRLLIHYTSTLQPGIPSRFSGSGSGRDIYSFISINLEPEDIATYYCLQYDNL
WTFGGGTTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLT
NYDVHWVRQSPGKGLEWLGVIWNYGNTDYNAAFISRLSIRKDSSKSQVFFTMSSSLQ
TPDTAIYYCARNHGDGYYNWYFDVWGTGTTVTVSSSRITTPAPRPPTPAPTIASQPL
SLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCHMKRGRK
KLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELTSRVKFSRSADAPAYQQGQN
QLYNELNLGRREEYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE
IGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

CD5-17H2L-3054 CAR アミノ酸配列 (SEQ ID NO:72)

MALPVTALLLPLALLLHAARPGSEVQLVESGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYDVH
WVRQSPGKGLEWLGVIWNYGNTDYNAAFISRLSIRKDSSKSQVFFTMSSSLQTPDTAI
YYCARNHGDGYYNWYFDVWGTGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
SESLGGKVTITCKASQDINKYIAWYQYKPGKGPRLLIHYTSTLQPGIPSRFSGSGSGR
DIYSFISINLEPEDIATYYCLQYDNLWTFGGGTTKLEIKSRITTPAPRPPTPAPTIASQPLS
LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCHMKRGRKK
LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELTSRVKFSRSADAPAYQQGQNQ
LYNELNLGRREEYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI
GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

20

CD5-17L2H-3045 scFv アミノ酸配列 (SEQ ID NO:73)

NIVLTQSPSSLSSESLGGKVTITCKASQDINKYIAWYQYKPGKGPRLLIHYTSTLQPGIP
SRFSGSGSGRDIYSFISINLEPEDIATYYCLQYDNLWTFGGGTTKLEIKGGGGSGGGGSG
GGGGSEVQLVESGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYDVHWVRQSPGKGLEWLGVI
WNYGNTDYNAAFISRLSIRKDSSKSQVFFTMSSSLQTPDTAIYYCARNHGDGYYNWY
FDVWGTGTTVTVSS

CD5-17H2L-3054 scFv アミノ酸配列 (SEQ ID NO:74)

EVQLVESGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYDVHWVRQSPGKGLEWLGVIWNYGN
TDYNAAFISRLSIRKDSSKSQVFFTMSSSLQTPDTAIYYCARNHGDGYYNWYFDVWG
TGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
SNIVLTQSPSSLSSESLGGKVTITCKASQDINKYIA
WYQYKPGKGPRLLIHYTSTLQPGIPSRFSGSGSGRDIYSFISINLEPEDIATYYCLQYDN
LWTFGGGTTKLEIK

30

CD5-17 VH アミノ酸配列 (SEQ ID NO:75)

EVQLVESGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYDVHWVRQSPGKGLEWLGVIWNYGN
TDYNAAFISRLSIRKDSSKSQVFFTMSSSLQTPDTAIYYCARNHGDGYYNWYFDVWG
TGTTVTVSS

CD5-17 VL アミノ酸配列 (SEQ ID NO:76)

NIVLTQSPSSLSSESLGGKVTITCKASQDINKYIAWYQYKPGKGPRLLIHYTSTLQPGIP
SRFSGSGSGRDIYSFISINLEPEDIATYYCLQYDNLWTFGGGTTKLEIK

CD5-9H2L-3048 CAR アミノ酸配列 (SEQ ID NO:77)

40

50

MALPVTALLLPLALLLHAARPGSQVQLKESGPELEKPGASVKISCKASGYSTAYSM
NWVKQNNGMSLEWIGSIDPYYGDTKYAQKFKGKATLTVDKASSTAYLQLKSLTSE
DSAVYYCARRMITTGDWYFDVWGTGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSHIVLTQSP
SSLSASLGDRVTISCRASQDISTYLNWYQQKPDGTVKLLIFYTSRLHAGVPSRFSGS
SGTHHSLTISNLEQEDIATYFCQQGNSLPFTFGSGTKLEIKSGTTTPAPRPPTPAPTIA
QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRK
KLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQL
YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG
MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

CD5-9L2H-3049 CAR アミノ酸配列 (SEQ ID NO:78)

10

MALPVTALLLPLALLLHAARPGSHIVLTQSPSSLSASLGDRVTISCRASQDISTYLNW
YQQKPDGTVKLLIFYTSRLHAGVPSRFSGS GSGTHHSLTISNLEQEDIATYFCQQGNS
LPFTFGSGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGVQLKESGPELEKPGASVKISCKASGYSF
TAYSMNWVKQNNGMSLEWIGSIDPYYGDTKYAQKFKGKATLTVDKASSTAYLQLK
SLTSEDSAVYYCARRMITTGDWYFDVWGTGTTVTVSSSGTTTPAPRPPTPAPTIA
LQSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKL
LYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYN
ELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK
GERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

CD5-9H2L-3048 scFv アミノ酸配列 (SEQ ID NO:79)

20

GSQVQLKESGPELEKPGASVKISCKASGYSTAYSMNWVKQNNGMSLEWIGSIDPY
YGDTKYAQKFKGKATLTVDKASSTAYLQLKSLTSEDSAVYYCARRMITTGDWYFD
VWGTGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSHIVLTQSPSSLSASLGDRVTISCRASQDIS
TYLNWYQQKPDGTVKLLIFYTSRLHAGVPSRFSGS GSGTHHSLTISNLEQEDIATYFCQ
QGNSLPFTFGSGTKLEIKSG

CD5-9L2H-3049 scFv アミノ酸配列 (SEQ ID NO:80)

HIVLTQSPSSLSASLGDRVTISCRASQDISTYLNWYQQKPDGTVKLLIFYTSRLHAGV
PSRFSGS GSGTHHSLTISNLEQEDIATYFCQQGNSLPFTFGSGTKLEIKGGGGSGGGGS
GGGGSQVQLKESGPELEKPGASVKISCKASGYSTAYSMNWVKQNNGMSLEWIGSI
DPYYGDTKYAQKFKGKATLTVDKASSTAYLQLKSLTSEDSAVYYCARRMITTGDW
YFDVWGTGTTVTVSS

30

CD5-9 VH アミノ酸配列 (SEQ ID NO:81)

QVQLKESGPELEKPGASVKISCKASGYSTAYSMNWVKQNNGMSLEWIGSIDPYYG
DTKYAQKFKGKATLTVDKASSTAYLQLKSLTSEDSAVYYCARRMITTGDWYFDVW
GTGTTVTVSS

CD5-9 VL アミノ酸配列 (SEQ ID NO:82)

HIVLTQSPSSLSASLGDRVTISCRASQDISTYLNWYQQKPDGTVKLLIFYTSRLHAGV
PSRFSGS GSGTHHSLTISNLEQEDIATYFCQQGNSLPFTFGSGTKLEIK

CD5-9 HCDR1 (SEQ ID NO:83)

AYSMN

40

CD5-9 HCDR2 (SEQ ID NO:84)
SIDPYYGDTKYAQKFKG

CD5-9 HCDR3 (SEQ ID NO:85)
RMITTGDWYFDV

CD5-9 LCDR1 (SEQ ID NO:86)
RASQDISTYLN

CD5-9 LCDR2 (SEQ ID NO:87)
YTSRLHA

10

CD5-9 LCDR3 (SEQ ID NO:88)
QQGNSLPFT

CD5-34H2L-3052 CAR アミノ酸配列 (SEQ ID NO:89)

MALPVTALLLPLALLLHAARPGSEVKLVESGAELVRSGASVKLSAASGFNIKDYI
HWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGRTHEYAPKFQGKATMTADTSSNTAYLQLSSLTSED
TAVYYCNNGNYVRHYFDYWGGQTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDWLTQSPAI
LSASPGEKVTMTCRAISSVSYMHYQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGS
TSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSSNPRTFGGGTKLEIKSRTTTPAPRPPTPAPTIA
SLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLSLVITLYCHMKRGR
KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELTSRVKFSRSADAPAYQQGQ
NQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY
SEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

20

CD5-34L2H-3053 CAR アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 90)

MALPVTALLLPLALLLHAARPGSDWLTQSPAILASPGEKVTMTCRAISSVSYMH
YQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQW
SNPRTFGGGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVKLVESGAELVRSGASVKLSAASG
FNIDYIHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGRTHEYAPKFQGKATMTADTSSNTAYLQ
LSSLTSED TAVYYCNNGNYVRHYFDYWGGQTTVTVSSSRTTTPAPRPPTPAPTIA
QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLSLVITLYCHMKRG
RKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELTSRVKFSRSADAPAYQQG
QNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA
YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

30

CD5-34H2L-3052 scFv アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 91)

EVKLVESGAELVRSGASVKLSAASGFNIKDYIHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENG
RTEYAPKFQGKATMTADTSSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCNNGNYVRHYFDYW
GGQTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDWLTQSPAILASPGEKVTMTCRAISSVSYMH
YQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQ
WSSNPRTFGGGTKLEIK

CD5-34L2H-3053 scFv アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 92)

40

DWLTQSPAILSASPGEKVTMTCTRAISSVSYMHWYQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVP
ARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSSNPRTFGGGTKLEIKGGGGSGGGG
SGGGGSEVKLVESGAELVRSGASVKLSAASGFNIKDYIHWVKQRPEQGLEWIGW
IDPENGRTEYAPKFQGKATMTADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCNNGNYVRHYY
FDYWGQGTTTVTVSS

CD5-34 VH アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 93)

EVKLVESGAELVRSGASVKLSAASGFNIKDYIHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGRTEYAPKFQGKATMTADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCNNGNYVRHYYFDYWGQGTTTVTVSS

10

CD5-34 VL アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 94)

DWLTQSPAILSASPGEKVTMTCTRAISSVSYMHWYQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVP
ARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSSNPRTFGGGTKLEIKSR

CD5-34 HCDR1 (SEQ ID NO: 95)

DYIHW

CD5-34 HCDR2 (SEQ ID NO: 96)

WIDPENGRTEYAPKFQG

20

CD5-34 HCDR3 (SEQ ID NO: 97)

GNYYVRHYYFDY

CD5-34 LCDR1 (SEQ ID NO: 98)

RAISSVSYMH

CD5-34 LCDR2 (SEQ ID NO: 99)

ATSNLAS

CD5-34 LCDR3 (SEQ ID NO: 100)

QQWSSNPRT

30

【 0 1 5 9 】

CRISPR/Cas

本発明のある態様は、CRISPR/Cas系によって修飾された細胞を含む。CRISPR/Cas系には、CRISPR/Cas9系およびCRISPR/Cpf1系が含まれるが、これらに限定されるわけではない。ある態様において、本発明は、CRISPR/Cas9系を使用して修飾された細胞を含む。ある態様において、修飾は、内在性遺伝子、例えば、CD2、CD5、またはCD7のノックアウトまたは変異を含む。

【 0 1 6 0 】

CRISPR/Cas9系は、標的的特異的な遺伝子変更を誘導するための簡単かつ効率的な系である。Cas9タンパク質による標的認識は、ガイドRNA (gRNAまたはsgRNA) 内の「シード」配列、およびgRNA結合領域の上流にあるプロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) 配列を含有する保存されたトリヌクレオチドを必要とする。従って、CRISPR/Cas9系は、(293T細胞のような) 細胞株、初代細胞、およびCAR T細胞において使用するため、gRNAを再設計することによって、事実上任意のDNA配列を切断するよう、改変され得る。CRISPR/Cas系は、単一のCas9タンパク質を2つ以上のgRNAと共発現させることによって、複数のゲノム遺伝子座を同時に標的とすることができるため、この系は、多重遺伝子編集または標的遺伝子の相乗的な活性化のために独特に適している。

40

【 0 1 6 1 】

50

遺伝子発現を阻害するために使用されるCRISPR/Cas系の一例であるCRISPRiは、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる米国公開番号US2014/0068797に記載されている。CRISPRiは、フレームシフト変異をもたらすため、エラープローン修復経路を誘発するDNA二本鎖切断を導入するため、RNA誘導型Cas9エンドヌクレアーゼを利用する永久的な遺伝子破壊を誘導する。触媒活性を失ったCas9は、エンドヌクレアーゼ活性を欠く。ガイドRNAと共発現された時、転写伸長、RNAポリメラーゼ結合、または転写因子結合に特異的に干渉するDNA認識複合体が生成される。このCRISPRi系は、標的遺伝子の発現を効率的に抑止する。

【0162】

CRISPR/Casによる遺伝子破壊は、標的遺伝子に特異的なガイド核酸配列およびCasエンドヌクレアーゼが細胞に導入され、Casエンドヌクレアーゼが標的遺伝子に二本鎖切断を導入することを可能にする複合体を形成した時に起こる。ある態様において、CRISPR系は、限定されるわけではないが、pAd5F35-CRISPRベクターのような発現ベクターを含む。他の態様において、Cas発現ベクターは、Cas9エンドヌクレアーゼの発現を誘導する。Cpf1、T7、Cas3、Cas8a、Cas8b、Cas10d、Cse1、Csy1、Csn2、Cas4、Cas10、Csm2、Cmr5、Fok1、当技術分野において公知のその他のヌクレアーゼ、およびそれらの任意の組み合わせを含むが、これらに限定されるわけではない、他のエンドヌクレアーゼも使用され得る。

【0163】

ある態様において、Cas発現ベクターの誘導は、Cas発現ベクター内の誘導性プロモーターを活性化する薬剤に細胞を曝すことを含む。そのような態様において、Cas発現ベクターは、抗生物質（例えば、テトラサイクリンまたはテトラサイクリンの誘導体、例えば、ドキシサイクリン）への曝露によって誘導可能であるもののような誘導性プロモーターを含む。しかしながら、他の誘導性プロモーターが使用されてもよいことが理解されるべきである。誘導剤は、誘導性プロモーターの誘導をもたらす選択的な条件（例えば、薬剤、例えば、抗生物質への曝露）であってもよい。これはCas発現ベクターの発現をもたらす。

【0164】

ガイド核酸配列は、ある遺伝子に対して特異的であり、Casエンドヌクレアーゼによって誘導される二本鎖切断のため、その遺伝子を標的とする。ガイド核酸配列の配列は、その遺伝子の遺伝子座内にあり得る。1つの態様において、ガイド核酸配列は、少なくとも10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40ヌクレオチド長、またはそれ以上である。

【0165】

ガイド核酸配列は、任意の遺伝子、例えば、CD2、CD5、CD7に特異的であり得る。ガイド核酸配列は、RNA配列、DNA配列、それらの組み合わせ（RNA-DNA組み合わせ配列）、または合成ヌクレオチドを含む配列を含む。ガイド核酸配列は、単一分子または二重分子であり得る。1つの態様において、ガイド核酸配列は、単一のガイドRNAを含む。

【0166】

CRISPR複合体の形成に関して、「標的配列」とは、標的配列とガイド配列との間のハイブリダイゼーションがCRISPR複合体の形成を促進するよう、ガイド配列がいくつかの相補性を有するよう設計された配列をさす。ハイブリダイゼーションを引き起こし、CRISPR複合体の形成を促進するために十分な相補性が存在する限り、完全な相補性は必ずしも必要とされない。標的配列は、DNAまたはRNAのポリヌクレオチドのような任意のポリヌクレオチドを含み得る。ある態様において、標的配列は、細胞の核または細胞質に位置する。他の態様において、標的配列は、真核細胞のオルガネラ、例えば、ミトコンドリアまたは核にあってよい。典型的には、内在性CRISPR系に関して、（標的配列とハイブリダイズし、1つまたは複数のCasタンパク質と複合体化したガイド配列を含む）CRISPR複合体の形成は、標的配列またはその近く（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50またはそれ以上の塩基対内）における一方または両方の鎖の切断をもたらす。

標的配列と同様に、機能性であるために十分である限り、完全な相補性は必要とされないと考えられる。ある態様において、tracr配列は、最適に整列化された時、tracrメイト配列の長さに沿って、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%の配列相補性を有する。

【0167】

他の態様において、CRISPR系の要素の発現が、1つまたは複数の標的部位におけるCRISPR複合体の形成を指図するよう、CRISPR系の1つまたは複数の要素の発現を駆動する1つまたは複数のベクターが、宿主細胞に導入される。例えば、Cas酵素、tracrメイト配列に連結されたガイド配列、およびtracr配列は、各々、別々のベクター上の別々の制御要素に機能的に連結されていてよい。あるいは、同一のまたは異なる制御要素から発現される要素のうちの2つ以上が、単一のベクターにおいて組み合わせられ、1つまたは複数の付加的なベクターが、第1のベクターに含まれないCRISPR系の任意の成分を提供してもよい。単一のベクターにおいて組み合わせられたCRISPR系要素は、任意の適当な方向で配置され得、例えば、1つの要素が第2の要素に対して5'（「上流」）または3'（「下流」）に位置付けられてよい。1つの要素のコード配列は、第2の要素のコード配列の同一のまたは反対の鎖上に位置付けられてよく、同一のまたは反対の方向に方向付けられてよい。ある態様において、単一のプロモーターが、CRISPR酵素をコードする転写物、ならびにガイド配列、（任意で、ガイド配列に機能的に連結された）tracrメイト配列、および1つまたは複数のイントロン配列内に埋め込まれたtracr配列（例えば、各々異なるイントロンに埋め込まれたもの、2つ以上が少なくとも1つのイントロンに埋め込まれたもの、または全てが単一のイントロンに埋め込まれたもの）のうちの1つまたは複数の発現を駆動する。

【0168】

ある態様において、CRISPR酵素は、1つまたは複数の異種タンパク質ドメイン（例えば、CRISPR酵素に加えて、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、もしくはそれ以上のまたは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、もしくはそれ以上を上回る、ドメイン）を含む融合タンパク質の一部である。CRISPR酵素融合タンパク質は、付加的なタンパク質配列を含んでいてよく、任意で、2つのドメインの間にリンカー配列を含んでいてもよい。CRISPR酵素と融合させられ得るタンパク質ドメインの例には、非限定的に、エピトープタグ、レポーター遺伝子配列、ならびに以下の活性のうちの1つまたは複数を含むタンパク質ドメインが含まれる：メチラーゼ活性、脱メチル化酵素活性、転写活性化活性、転写抑制活性、転写放出因子活性、ヒストン修飾活性、RNA切断活性、および核酸結合活性。CRISPR酵素を含む融合タンパク質の一部を形成し得る付加的なドメインは、参照により本明細書に組み入れられるUS20110059502に記載されている。ある態様において、タグ付きCRISPR酵素が、標的配列の位置を同定するために使用される。

【0169】

核酸を哺乳動物細胞または標的組織に導入するため、従来のウイルスベースおよび非ウイルスベースの遺伝子移入法が使用され得る。そのような方法は、CRISPR系の成分をコードする核酸を、培養細胞または宿主生物へ投与するために使用され得る。非ウイルスベクター送達系には、DNAプラスミド、RNA（例えば、本明細書に記載されたベクターの転写物）、裸の核酸、およびリボソームのような送達媒体と複合体化された核酸が含まれる。CRISPR/Cas9のための別の送達モードは、Cas9-ガイドRNAリボ核タンパク質（RNP）複合体の形態の、RNAと精製されたCas9タンパク質との組み合わせを含む（Lin et al., 2014, ELife 3:e04766）。ウイルスベクター送達系には、細胞への送達後に、エピソームとしてのゲノムまたは組み込まれたゲノムのいずれかを有する、DNAウイルスおよびRNAウイルスが含まれる（Anderson, 1992, Science 256:808-813; および Yu et al., 1994, Gene Therapy, 1:13-26）。

【0170】

ある態様において、CRISPR/Casは、II型CRISPR/Cas系に由来する。他の態様において、CRISPR/Cas系は、Cas9タンパク質に由来する。Cas9タンパク質は、化膿性連鎖球菌（*Streptococcus pyogenes*）、ストレプトコッカス・サーモフィルス（*Streptococcus*

us thermophilus)、またはその他の種に由来し得る。ある態様において、Cas9には、spCas9、Cpf1、CasY、CasX、またはsaCas9が含まれ得る。

【0171】

一般に、CRISPR/Casタンパク質は、少なくとも1つのRNA認識ドメインおよび/またはRNA結合ドメインを含む。RNA認識ドメインおよび/またはRNA結合ドメインは、ガイドRNAと相互作用する。CRISPR/Casタンパク質は、ヌクレアーゼドメイン（即ち、DNaseドメインまたはRNaseドメイン）、DNA結合ドメイン、ヘリカーゼドメイン、RNaseドメイン、タンパク質間相互作用ドメイン、二量体化ドメイン、およびその他のドメインも含み得る。CRISPR/Casタンパク質は、核酸の結合親和性および/または特異性を増加させ、酵素活性を変更し、かつ/またはタンパク質の別の特性を変化させるため、修飾され得る。ある態様において、融合タンパク質のCRISPR/Cas様タンパク質は、野生型Cas9タンパク質またはその断片に由来し得る。他の態様において、CRISPR/Casは、改変Cas9タンパク質に由来し得る。例えば、Cas9タンパク質のアミノ酸配列は、タンパク質の1つまたは複数の特性（例えば、ヌクレアーゼ活性、親和性、安定性等）を変更するため、修飾され得る。あるいは、修飾されたCas9タンパク質が野生型Cas9タンパク質より小さくなるよう、RNAによって誘導される切断に関与しないCas9タンパク質のドメインが、タンパク質から排除されてもよい。一般に、Cas9タンパク質は、少なくとも2つのヌクレアーゼ（即ち、DNase）ドメインを含む。例えば、Cas9タンパク質は、RuvC様ヌクレアーゼドメインおよびHNH様ヌクレアーゼドメインを含み得る。RuvCドメインおよびHNHドメインは、DNA内に二本鎖切断を作成するため、単一の鎖を切断するため、共に機能する（Jinek et al., 2012, Science, 337:816-821）。ある態様において、Cas9由来タンパク質は、1つの機能性ヌクレアーゼドメイン（RuvC様またはHNH様のヌクレアーゼドメインのいずれか）のみを含有するよう、修飾され得る。例えば、Cas9由来タンパク質は、ヌクレアーゼドメインのうちの1つが欠失または変異し、機能性でなくなる（即ち、ヌクレアーゼ活性が存在しなくなる）よう、修飾され得る。ヌクレアーゼドメインのうちの1つが不活性であるいくつかの態様において、Cas9由来タンパク質は、二本鎖核酸にニックを導入することができるが（そのようなタンパク質は「ニッカーゼ」と呼ばれる）、二本鎖DNAを切断することはできない。前記の態様のいずれかにおいて、ヌクレアーゼドメインのいずれかまたは全てが、部位特異的変異誘発、PCRにより媒介される変異誘発、および完全遺伝子合成、ならびに当技術分野において公知のその他の方法のような周知の方法を使用して、1つまたは複数の欠失変異、挿入変異、および/または置換変異によって不活化されてもよい。

【0172】

1つの非限定的な態様において、ベクターは、CRISPR系の発現を駆動する。本発明において有用である適当なベクターは、当技術分野に豊富に存在する。使用されるベクターは、複製のために適当であり、任意で、真核細胞における組み込みのために適当である。典型的なベクターは、転写および翻訳のターミネーター、開始配列、ならびに所望の核酸配列の発現の制御のために有用なプロモーターを含有する。本発明のベクターは、核酸の標準的な遺伝子送達プロトコルのためにも使用され得る。遺伝子送達の方法は、当技術分野において公知である（その全体が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,399,346号、第5,580,859号、および第5,589,466号）。

【0173】

さらに、ベクターは、ウイルスベクターの形態で細胞に提供され得る。ウイルスベクターテクノロジーは、当技術分野において周知であり、例えば、Sambrook et al. (4th Edition, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 2012) ならびにその他のウイルス学および分子生物学のマニュアルに記載されている。ベクターとして有用なウイルスには、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、シンドビスウイルス、ガンマレトロウイルス、およびレンチウイルスが含まれるが、これらに限定されるわけではない。一般に、適当なベクターは、少なくとも1つの生物において機能性の複製開始点、プロモーター配列、便利な制

限エンドヌクレアーゼ部位、および1つまたは複数の選択可能なマーカーを含有する（例えば、WO 01/96584；WO 01/29058；および米国特許第6,326,193号）。

【0174】

核酸の導入

細胞に核酸を導入する方法には、物理的方法、生物学的方法および化学的方法が含まれる。RNAのような、ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための物理的方法には、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、粒子衝撃、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションなどが含まれる。エレクトロポレーション(Amaxa Nucleofector-II (Amaxa Biosystems, Cologne, Germany))、(ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.)またはGene Pulser II (BioRad, Denver, Colo.)、Multiporator (Eppendorf, Hamburg Germany)を含む市販の方法を用いて、RNAを標的細胞に導入することができる。リポフェクションを用いたカチオン性リポソーム媒介トランスフェクションを用いて、ポリマーカプセル化を用いて、ペプチド媒介トランスフェクションを用いて、または「遺伝子銃」のような微粒子銃粒子送達系を用いて、RNAを細胞に導入することもできる(例えば、Nishikawa, et al. Hum Gene Ther., 12(8):861-70 (2001)を参照のこと)。

【0175】

関心対象のポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための生物学的方法には、DNAおよびRNAベクターの使用が含まれる。ウイルスベクター、および特にレトロウイルスベクターは、哺乳動物、例えば、ヒト細胞に遺伝子を挿入するための最も広く使われている方法となっている。他のウイルスベクターは、レンチウイルス、ポックスウイルス、単純ヘルペスウイルスI、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスなどに由来する。例えば、米国特許第5,350,674号および同第5,585,362号を参照されたい。

【0176】

ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための化学的手段には、巨大分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズのような、コロイド分散系、ならびに水中油型乳剤、ミセル、混合ミセルおよびリポソームを含めて脂質に基づく系が含まれる。インビトロおよびインビボでの送達媒体として用いるための例示的なコロイド系は、リポソーム(例えば、人工膜小胞)である。

【0177】

使用に適した脂質は、商業的供給源から得ることができる。例えば、ジミリスチルホスファチジルコリン(「DMPC」)は、Sigma, St. Louis, MOから得ることができ；リン酸ジセチル(「DCP」)は、K & K Laboratories (Plainview, NY)から得ることができ；コレステロール(「Choi」)は、Calbiochem-Behringから得ることができ；ジミリスチルホスファチジルグリセロール(「DMPG」)および他の脂質は、Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL)から得られうる。クロロホルムまたはクロロホルム/メタノール中の脂質のストック溶液は、約-20℃で保存することができる。クロロホルムはメタノールよりも容易に蒸発するので、唯一の溶媒として用いられる。「リポソーム」は、密閉された脂質二重層または凝集体の生成によって形成される種々の単層状および多層状脂質媒体を包含する一般用語である。リポソームは、リン脂質二重層膜および内部水性媒体を有する小胞構造を有すると特徴付けることができる。多層状リポソームは、水性媒体によって分離された複数の脂質層を有する。それらは、リン脂質を過剰の水溶液に懸濁させると、自発的に形成される。脂質成分は閉鎖構造の形成前に自己再構成を受け、脂質二重層の間に水および溶解溶質を閉じ込める(Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5: 505-10)。しかしながら、通常の小胞構造とは溶液中で異なる構造を有する組成物も包含される。例えば、脂質は、ミセル構造をとり、または脂質分子の不均一な凝集体として単に存在する。リポフェクトアミン-核酸複合体も企図される。

【0178】

外因性核酸を宿主細胞に導入するために、またはその他の方法で本発明の阻害剤に細胞を曝露するために用いられる方法にかかわらず、宿主細胞における核酸の存在を確認する

10

20

30

40

50

ために、種々のアッセイ法が実施されうる。そのようなアッセイ法には、例えば、サザンおよびノザンブロッティング、RT-PCRおよびPCRのような、当業者に周知の「分子生物学的」アッセイ法；例えば、免疫学的手段(ELISAおよびウエスタンブロット)によって、または本発明の範囲に入る薬剤を同定するための本明細書において記述されるアッセイ法によって、特定のペプチドの存在または非存在を検出するような「生化学的」アッセイ法が含まれる。

【0179】

さらに、核酸を、拡大したT細胞の形質導入、拡大したT細胞のトランスフェクション、および拡大したT細胞のエレクトロポレーションなどの任意の手段によって導入することができる。1つの核酸を1つの方法によって導入し、T細胞に導入しようとするもう1つの核酸を異なる方法によって導入してもよい。

【0180】

RNA

1つの態様において、T細胞に導入される核酸はRNAである。別の態様において、RNAは、インビトロで転写されたRNAまたは合成RNAを含むmRNAである。RNAは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)生成された鋳型を用いたインビトロ転写によって産生される。任意の供給源由来の関心対象のDNAは、適切なプライマーおよびRNAポリメラーゼを用いてインビトロmRNA合成のための鋳型にPCRによって直接変換することができる。DNA供給源は、例えば、ゲノムDNA、プラスミドDNA、ファージDNA、cDNA、合成DNA配列または任意の他の適切なDNA供給源であることができる。インビトロ転写のための所望の鋳型は、キメラ膜タンパク質である。例として、鋳型は、抗体、抗体の断片または抗体の一部をコードする。別の例として、鋳型は、抗CD3のような、抗体の一本鎖可変ドメインを含む細胞外ドメイン、および共刺激分子の細胞内ドメインを含む。1つの態様において、RNAキメラ膜タンパク質の鋳型は、共刺激分子に対する抗体に由来する抗原結合ドメインを含む細胞外ドメインと、CD28および4-1BBの細胞内ドメインの一部分に由来する細胞内ドメインとを含むキメラ膜タンパク質をコードする。

【0181】

PCRを用いてインビトロでのmRNA転写のための鋳型を作製することができ、これが次いで、細胞に導入される。PCRを実施するための方法は、当技術分野において周知である。PCRで用いるためのプライマーは、PCRの鋳型として用いられるDNAの領域に実質的に相補的な領域を有するようにデザインされる。本明細書において用いられる「実質的に相補的」とは、プライマー配列中の塩基の大部分または全部が相補的であるか、または1つもしくは複数の塩基が非相補的である、もしくはミスマッチであるヌクレオチドの配列をいう。実質的に相補的な配列は、PCRに用いられるアニーリング条件の下で、意図されたDNA標的とアニールまたはハイブリダイズすることができる。プライマーは、DNA鋳型の任意の部分に実質的に相補的であるようにデザインすることができる。例えば、プライマーは、5'および3' UTRを含む、細胞内で通常転写される遺伝子の部分(読み取り枠)を増幅するようにデザインすることができる。プライマーは、関心対象の特定ドメインをコードする遺伝子の一部分を増幅するようにデザインすることもできる。1つの態様において、プライマーは、5'および3' UTRの全部または一部分を含むヒトcDNAのコード領域を増幅するようにデザインされる。PCRに有用なプライマーは、当技術分野において周知である合成方法によって作製される。「フォワードプライマー」は、増幅されるDNA配列の上流にあるDNA鋳型上のヌクレオチドと実質的に相補的なヌクレオチドの領域を含むプライマーである。「上流」とは、コード鎖に対して増幅されるDNA配列の、5'側の位置をいうように本明細書において用いられる。「リバープライマー」は、増幅されるDNA配列の下流にある二本鎖DNA鋳型と実質的に相補的なヌクレオチドの領域を含むプライマーである。「下流」とは、コード鎖に対して増幅されるDNA配列の、3'側の位置をいうように本明細書において用いられる。

【0182】

RNAの安定性および/または翻訳効率を促進する能力を有する化学構造が用いられても

よい。RNAは、好ましくは5'および3' UTRを有する。1つの態様において、5' UTRは長さが0~3000ヌクレオチドである。コード領域に付加される5'および3' UTR配列の長さは、UTRの異なる領域にアニールするPCRのためのプライマーをデザインすることを含むが、これに限定されない、異なる方法によって変化させることができる。この手法を用いて、当業者は、転写されたRNAのトランスフェクション後に最適な翻訳効率を達成するために必要とされる5'および3' UTRの長さを変えることができる。

【0183】

5'および3' UTRは関心対象の遺伝子の、天然に存在する内在性5'および3' UTRであることができる。あるいは、関心対象の遺伝子に対して内在性ではないUTR配列を、フォワードプライマーおよびリバースプライマーにUTR配列を組み入れることによって、または10
鋳型の他の任意の改変によって付加することができる。関心対象の遺伝子に対して内在性ではないUTR配列の使用は、RNAの安定性および/または翻訳効率を変化させるのに有用であることができる。例えば、3' UTR配列中のAUに富むエレメントはmRNAの安定性を低下させうることが知られている。それゆえ、当技術分野において周知であるUTRの特性に基づいて転写されたRNAの安定性を増加させるように、3' UTRを選択またはデザインすることができる。

【0184】

1つの態様において、5' UTRは、内在性遺伝子のコザック(Kozak)配列を含むことができる。あるいは、関心対象の遺伝子に対して内在性ではない5' UTRが上記のようにPCRによって付加される場合、コンセンサスコザック配列は、5' UTR配列を付加することによって再デザインすることができる。コザック配列は、いくつかのRNA転写産物の翻訳効率を高めることができるが、効率的な翻訳を可能にするために全てのRNAに必要とされるようではない。多くのmRNAに対してのコザック配列の必要性は、当技術分野において公知である。他の態様において、5' UTRは、そのRNAゲノムが細胞内で安定なRNAウイルスに由来することができる。他の態様において、mRNAのエキソヌクレアーゼ分解を妨げるために、様々なヌクレオチド類似体を3'または5' UTRにおいて用いることができる。

【0185】

遺伝子クローニングを必要とせずにDNA鋳型からRNAの合成を可能にするために、転写のプロモーターはDNA鋳型に対して、転写される配列の上流に付け加えられるべきである。RNAポリメラーゼのプロモーターとして機能する配列がフォワードプライマーの5'末端に付加される場合、RNAポリメラーゼプロモーターは、転写される読み取り枠の上流でPCR産物に組み入れられるようになる。1つの態様において、プロモーターは、本明細書の他の箇所に記述されるように、T7ポリメラーゼプロモーターである。他の有用なプロモーターには、T3およびSP6 RNAポリメラーゼプロモーターが含まれるが、これらに限定されることはない。T7、T3およびSP6プロモーターのコンセンサスヌクレオチド配列は、当技術分野において公知である。

【0186】

1つの態様において、mRNAは、リボソーム結合、細胞内でのmRNAの翻訳開始および安定性を決定する5'末端のキャップおよび3'ポリ(A)尾部の両方を有する。環状DNA鋳型、例えば、プラスミドDNAでは、RNAポリメラーゼは真核細胞での発現には適さない長い鎖状体の生成物を産生する。3' UTRの末端で線状化されたプラスミドDNAの転写は、転写後にポリアデニル化されても真核生物のトランスフェクションにおいて効果的ではない正常なサイズのmRNAをもたらす。

【0187】

直鎖状DNA鋳型上で、ファージT7 RNAポリメラーゼは鋳型の最後の塩基を越えて転写産物の3'末端を伸長させることができる(Schenborn and Mierendorf, Nuc Acids Res., 13:6223-36 (1985); Nacheva and Berzal-Herranz, Eur. J. Biochem., 270:1485-65 (2003))。

【0188】

DNA鋳型へのポリA/Tストレッチの組み込みの従来の方法は、分子クローニングである

10

20

30

40

50

。しかしながら、プラスミドDNAに組み込まれたポリA/T配列は、プラスミドの不安定性を引き起こすことがあり、その理由は、細菌細胞から得られたプラスミドDNA鑄型が、欠失および他の異常で高度に損なわれていることが多いためである。これにより、クローニング手順は面倒で時間がかかるだけでなく、信頼できないことも多い。それが、クローニングなしにポリA/T 3'ストレッチを有するDNA鑄型の構築を可能にする方法が非常に望ましいという理由である。

【0189】

転写DNA鑄型のポリA/Tセグメントは、100T尾部(サイズは50~5000 Tであることができる)のようなポリT尾部を含むリバースプライマーを用いることによってPCR中に、またはDNAライゲーションもしくはインビトロ組み換えを含むが、これらに限定されない、任意の他の方法によってPCR後に産生することができる。ポリ(A)尾部はまた、RNAに安定性を与え、RNAの分解を低減させる。一般に、ポリ(A)尾部の長さは、転写されたRNAの安定性と正の相関がある。1つの態様において、ポリ(A)尾部は、100~5000個のアデノシンである。

【0190】

RNAのポリ(A)尾部は、大腸菌(*E. coli*)ポリAポリメラーゼ(E-PAP)のような、ポリ(A)ポリメラーゼを用いてインビトロ転写後にさらに伸長することができる。1つの態様において、ポリ(A)尾部の長さを100ヌクレオチドから300~400ヌクレオチドに増加させると、RNAの翻訳効率が約2倍増加する。さらに、異なる化学基の3'末端への結合は、mRNA安定性を増加させることができる。そのような結合は改変された/人工のヌクレオチド、アダプターおよび他の化合物を含むことができる。例えば、ATP類似体は、ポリ(A)ポリメラーゼを用いてポリ(A)尾部に組み入れることができる。ATP類似体はRNAの安定性をさらに増すことができる。

【0191】

5'キャップもRNA分子に安定性をもたらす。好ましい態様において、本明細書において開示される方法により産生されるRNAは、5'キャップを含む。5'キャップは、当技術分野において知られ、本明細書において記述されている技法を用いて提供される(Cougot, et al., *Trends in Biochem. Sci.*, 29:436-444 (2001); Stepinski, et al., *RNA*, 7:146-155 (2001); Elango, et al., *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 330:958-966 (2005))。

【0192】

本明細書において開示される方法によって産生されるRNAは、内部リボソーム侵入部位(IRES)配列を含むこともできる。IRES配列は、mRNAとのキャップ非依存性リボソーム結合を開始させ、翻訳の開始を容易にする任意のウイルス配列、染色体配列または人為的にデザインされた配列でありうる。糖、ペプチド、脂質、タンパク質、酸化防止剤、および界面活性剤のような細胞透過性および生存性を促進する因子を含有できる、細胞エレクトロポレーションに適した任意の溶質を含めることができる。

【0193】

いくつかの態様において、RNA、例えばインビトロで転写されたRNAが、細胞中にエレクトロポレーションされる。

【0194】

開示された方法は、遺伝子操作されたT細胞が標的がん細胞を殺傷する能力の評価を含めて、がん、幹細胞、急性および慢性感染症ならびに自己免疫疾患の分野において、基礎研究および療法におけるT細胞活性の調節に適用することができる。

【0195】

本方法はまた、例えば、プロモーターまたは投入RNAの量を変化させることにより、広範囲にわたって発現レベルを制御する能力を提供し、発現レベルを個別に調節することを可能にする。さらに、PCRに基づくmRNA産生の技法は、異なる構造およびそれらのドメインの組み合わせを有するmRNAのデザインを非常に容易にする。

【0196】

本発明のRNAトランスフェクション方法の1つの利点は、RNAトランスフェクションが本質的に一過性で、ベクター不含であることである。RNA導入遺伝子は、いかなる追加のウイルス配列も必要とせずに最小の発現カセットとして、リンパ球に送達され、簡単なインビトロでの細胞活性化後にその中で発現されることができる。これらの条件下では、宿主細胞ゲノムへの導入遺伝子の組み込みは起こる可能性が低い。RNAのトランスフェクションの効率およびリンパ球集団全体を均一に改変する能力のため、細胞のクローニングは必要ではない。

【0197】

インビトロで転写されたRNA (IVT-RNA)を用いたT細胞の遺伝的改変では、2つの異なる戦略を利用し、そのどちらも様々な動物モデルにおいて逐次的に試験されている。リポ

10

【0198】

いくつかのIVTベクターは、文献において公知であり、これはインビトロ転写のための鋳型として標準化された様式で利用され、安定化されたRNA転写産物が産生されるように遺伝子操作されている。現在、当技術分野において用いられているプロトコールは、以下の構造: RNA転写を可能にする5' RNAポリメラーゼプロモーター、その後に非翻訳領域(UTR)が3'側および/または5'側のいずれかで隣接した関心対象の遺伝子、ならびに50~70個のAヌクレオチドを含む3'ポリアデニルカセットを有するプラスミドベクターに基づく

20

【0199】

RNAは、より伝統的なプラスミドまたはウイルス手法に比べていくつかの利点を有する。RNA供給源からの遺伝子発現は転写を必要とせず、タンパク質産物はトランスフェクション後に迅速に産生される。さらに、RNAは核ではなく、細胞質に接近しさえすればよい

30

【0200】

別の局面において、RNA構築体はエレクトロポレーションによって細胞に送達される。例えば、米国特許第2004/0014645号、米国特許第2005/0052630A1号、米国特許第2005/0070841A1号、米国特許第2004/0059285A1号、米国特許第2004/0092907A1号に教示されているように哺乳動物細胞への核酸構築体のエレクトロポレーションの製剤および方法論を参照されたい。任意の既知の細胞型のエレクトロポレーションに必要な電場強度を含む様々なパラメータは、関連する研究文献ならびに当技術分野における多数の特許および出願において一般的に知られている。例えば、米国特許第6,678,556号、米国特許第7,171,264号、および米国特許第7,173,116号を参照されたい。エレクトロポレーションの治療的適用のための装置は、例えばMedPulser(商標) DNAエレクトロポレーション治療システム(DNA Electroporation Therapy System) (Inovio/Genetronics, San Diego, Calif.)のように市販されており、米国特許第6,567,694号; 米国特許第6,516,223号、米国特許第5,993,434号、米国特許第6,181,964号、米国特許第6,241,701号、および米国特許第6,233,482号のような特許に記述されており; エレクトロポレーションは、例えば米国特許第20070128708A1号に記述されているようにインビトロでの細胞のトランスフェクションのために用いることもできる。エレクトロポレーションは、インビトロで細胞に核酸を送達するために利用することもできる。したがって、当業者

40

50

に公知の多くの利用可能な装置およびエレクトロポレーションシステムのいずれかを利用する発現構築体を含めて核酸の細胞へのエレクトロポレーション介在性の投与は、関心対象のRNAを標的細胞に送達するための素晴らしい新たな手段となる。

【0201】

T細胞の供給源

特定の態様において、T細胞の供給源が対象から得られる。対象の非限定的な例としては、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ラット、およびそれらのトランスジェニック種が挙げられる。好ましくは、対象はヒトである。T細胞は、末梢血単核細胞、骨髓、リンパ節組織、脾臓組織、臍帯および腫瘍を含む、いくつかの供給源から得ることができる。ある特定の態様において、当技術分野において利用可能な任意の数のT細胞株が用いられる。ある特定の態様において、T細胞は、フィコール(Ficoll)分離のような、当業者に公知の任意の数の技法を用いて、対象から収集された血液の単位から得ることができる。1つの態様において、個体の循環血液からの細胞は、アフエーシスまたは白血球除去輸血によって得られる。アフエーシス生成物は、典型的には、T細胞、単球、顆粒球、B細胞、他の有核白血球、赤血球および血小板を含めて、リンパ球を含む。アフエーシスによって収集された細胞を洗浄して、血漿画分を除去し、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)のような、適切な緩衝液もしくは培地またはその後の加工処理段階のため、カルシウムを欠くかつマグネシウムを欠きうるか、もしくは全部ではないが多くの二価陽イオンを欠きうる洗浄溶液の中に細胞を配してもよい。洗浄後、細胞は、例えば、Ca不含、Mg不含PBSのような、種々の生体適合性緩衝液に再懸濁されうる。あるいは、アフエーシスサンプルの望ましくない成分が除去され、細胞は培地に直接再懸濁されうる。

【0202】

別の態様において、T細胞は、赤血球を溶解し、例えばパーコール(PERCOLL)(商標)勾配を通じた遠心分離によって単球を枯渇させることにより、末梢血から単離される。あるいは、T細胞は臍帯から単離することができる。いずれにせよ、T細胞の特定の亜集団は、陽性または陰性選択技法によってさらに単離することができる。

【0203】

このように単離された臍帯血単核細胞は、CD34、CD8、CD14、CD19およびCD56を含むが、これらに限定されない、特定の抗原を発現する細胞を枯渇させることができる。これらの細胞の枯渇は、単離された抗体、腹水のような、抗体を含む生体サンプル、物理的支持体に結合した抗体、および細胞結合抗体を用いて達成することができる。

【0204】

陰性選択によるT細胞集団の濃縮は、陰性選択細胞に特有の表面マーカーに向けられた抗体の組み合わせを用いて達成することができる。好ましい方法は、陰性選択された細胞上に存在する細胞表面マーカーに向けられたモノクローナル抗体のカクテルを用いる陰性磁気免疫接着またはフローサイトメトリーによる細胞選別および/または選択である。例えば、陰性選択によりCD4+細胞を濃縮するために、モノクローナル抗体カクテルは、典型的には、CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR、およびCD8に対する抗体を含む。

【0205】

陽性または陰性選択による所望の細胞集団の単離のため、細胞および表面(例えば、ビーズのような粒子)の濃度を変えることができる。ある特定の態様において、細胞およびビーズの最大の接触を確実にするために、ビーズおよび細胞と一緒に混合される体積を有意に減少させる(すなわち、細胞の濃度を増加させる)ことが望ましい場合がある。例えば、1つの態様において、20億個の細胞/mlの濃度が用いられる。1つの態様において、10億個の細胞/mlの濃度が用いられる。さらなる態様において、1億個超の細胞/mlが用いられる。さらなる態様において、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、または5000万個の細胞/mlの細胞濃度が用いられる。さらに別の態様において、7500、8000、8500、9000、9500万、または1億個の細胞/mlの細胞濃度が用いられる。さらなる態様において、1億2500万または1億5000万個の細胞/mlの濃度を用いることができる。高濃度を用いることで、細胞収量、細胞活性化、および細胞拡大の増加をもたらすこ

とができる。

【0206】

T細胞は、単球除去段階を必要としない、洗浄段階の後に凍結することもできる。理論によって束縛されることを望むわけではないが、凍結およびその後の解凍段階は、顆粒球およびある程度は単球を細胞集団中で除去することにより、いっそう均一な生成物を提供する。血漿および血小板を除去する洗浄段階の後、細胞は凍結用溶液中に懸濁されうる。多くの凍結用溶液およびパラメータが当技術分野において公知であり、この文脈において有用であるが、非限定的な例において、1つの方法は、20% DMSOおよび8%ヒト血清アルブミンを含有するPBS、または他の適当な細胞凍結用培地を用いることを伴う。次に、細胞を毎分1℃の割合で-80℃まで凍結させ、液体窒素貯蔵タンクの気相中に貯蔵する。制御凍結の他の方法、ならびに-20℃でまたは液体窒素中での瞬時の無制御凍結が用いられうる。

10

【0207】

1つの態様において、T細胞の集団は、末梢血単核細胞、臍帯血細胞、精製されたT細胞集団、およびT細胞株のような細胞内に含まれる。別の態様において、末梢血単核細胞は、T細胞の集団を含む。さらに別の態様において、精製されたT細胞は、T細胞の集団を含む。

【0208】

T細胞の拡大

特定の態様において、本明細書に開示されるT細胞は、約10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍、2000倍、3000倍、4000倍、5000倍、6000倍、7000倍、8000倍、9000倍、10,000倍、100,000倍、1,000,000倍、10,000,000倍、またはそれを上回って、ならびにそれらの間のいずれかおよびすべての全体的および部分的な整数倍に増やすことができる。1つの態様において、T細胞は約20倍～約50倍の範囲で拡大される。

20

【0209】

培養後に、T細胞を培養装置内にて細胞培地中で、ある期間にわたって、または細胞が最適な継代のために集密もしくは高い細胞密度に達するまでインキュベートし、その後に別の培養装置への継代を行う。培養装置は、インビトロで細胞を培養するために一般的に用いられる任意の培養装置であってよい。好ましくは、細胞を別の培養装置に継代する前の集密のレベルは70%またはそれを上回る。より好ましくは、集密のレベルは90%またはそれを上回る。期間は、インビトロでの細胞の培養に適する任意の時間であってよい。T細胞培地の入れ替えは、T細胞の培養中にどの時点に行ってもよい。好ましくは、T細胞培地を約2～3日毎に入れ替える。続いてT細胞を培養装置から採取し、その上でT細胞を直ちに用いるか、または後に用いるための貯蔵のために凍結保存することができる。1つの態様において、本発明は、拡大したT細胞を凍結保存する段階を含む。凍結保存されたT細胞は、T細胞に核酸を導入する前に解凍される。

30

【0210】

別の態様において、本方法は、T細胞を単離する段階およびT細胞を拡大する段階を含む。別の態様において、本発明は、拡大の前にT細胞を凍結保存する段階をさらに含む。さらに別の態様において、凍結保存されたT細胞は、キメラ膜タンパク質をコードするRNAによるエレクトロポレーションのために解凍される。

40

【0211】

細胞のエクスピボでの拡大のためのもう1つの手順は、米国特許第5,199,942号に記載されている（これは参照により本明細書に組み入れられる）。米国特許第5,199,942号に記載されたような拡大を別の選択肢としてもよく、または本明細書に記載の他の拡大方法に加えてもよい。手短に述べると、T細胞のエクスピボ培養および拡大は、米国特許第5,199,942号に記載されたものなどの細胞増殖因子の添加、または他の因子、例えばflt3-L、IL-1、IL-3およびc-kitリガンドなどの添加を含む。1つの態様において、T細胞を拡大

50

する段階は、T細胞を、flt3-L、IL-1、IL-3およびc-kitリガンドからなる群より選択される因子とともに培養する段階を含む。

【0212】

本明細書において記述される培養段階(本明細書において記述される作用物質との接触またはエレクトロポレーション後)は、非常に短くてもよく、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22または23時間など、24時間未満であってもよい。本明細書においてさらに記述される培養段階(本明細書において記述される作用物質との接触)は、もっと長くてもよく、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14またはそれ以上の日数であってもよい。

【0213】

培養細胞を記述するために、様々な用語が用いられる。細胞培養は、一般に、生物から採取され、制御された条件下で増殖された細胞をいう。初代細胞培養は、生物から直接採取された、かつ最初の継代培養前の、細胞、組織または臓器の培養である。細胞は、細胞増殖および/または分裂を促進する条件の下で増殖培地に入れられた場合、培養で拡大され、より大きな細胞集団をもたらす。細胞が培養で拡大される場合、細胞増殖の速度は、典型的には、倍加時間としても知られる、細胞が倍になるのに必要な時間量によって測定される。

【0214】

継代培養の各回は、継代といわれる。細胞が継代培養される場合、その細胞は継代されたといわれる。特定の細胞集団、または細胞株は、継代された回数によって言及されるか、または特徴付けられることもある。例えば、10回継代された培養細胞集団は、P10培養といわれうる。初代培養、すなわち、組織からの細胞単離後の最初の培養はP0に指定される。最初の継代培養の後に、細胞は二次培養(P1または継代1)として記述される。第2の継代培養後、細胞は三次培養(P2または継代2)となる、など。継代中に多くの集団倍加が存在しうることが当業者によって理解されよう; それゆえ培養の集団倍加数は継代数よりも多い。継代間の期間中の細胞の拡大(すなわち、集団倍加の数)は、播種密度、基質、培地および継代間の時間を含むが、これらに限定されない、多くの因子に依存する。

【0215】

1つの状態において、細胞は数時間(約3時間)~約14日間、またはその間の任意の時間単位の整数値の間、培養されうる。T細胞培養に適切な条件には、血清(例えば、ウシ胎仔血清もしくはヒト血清)、インターロイキン-2 (IL-2)、インスリン、IFN- γ 、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF- β およびTNF- α 、または当業者に公知の細胞増殖のための任意の他の添加剤を含む、増殖および生存に必要な因子を含有しうる適切な培地(例えば、最小必須培地もしくはRPMI培地1640または、X-vivo 15, (Lonza))が含まれる。細胞増殖のための他の添加剤には、界面活性剤、プラスマネート、ならびにN-アセチル-システインおよび2-メルカプトエタノールのような還元剤が含まれるが、これらに限定されることはない。培地は、RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-Vivo 15、およびX-Vivo 20、Optimizerにアミノ酸、ピルビン酸ナトリウムおよびビタミンを添加したものであって、無血清であるか、適切な量の血清(もしくは血漿)もしくは規定のホルモン群、ならびに/またはT細胞の増殖および拡大に十分な量のサイトカインを補充したかのいずれかのものを含むことができる。抗生物質、例えば、ペニシリンおよびストレプトマイシンは、実験的培養物にのみ含まれ、対象に注入しようとする細胞の培養物には含まれない。標的細胞は、増殖を支持するのに必要な条件、例えば、適切な温度(例えば、37°C)および雰囲気(例えば、空気に加えて5% CO₂)の下で維持される。

【0216】

T細胞を培養するために用いられる培地は、T細胞を共刺激できる作用物質を含みうる。例えば、CD3を刺激できる作用物質はCD3に対する抗体であり、CD28を刺激できる作用物質はCD28に対する抗体である。これは、本明細書において開示されるデータによって実証されるように、本明細書において開示される方法によって単離された細胞は、約10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、4

10

20

30

40

50

00倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍、2000倍、3000倍、4000倍、5000倍、6000倍、7000倍、8000倍、9000倍、10,000倍、100,000倍、1,000,000倍、10,000,000倍、またはそれ以上拡大されうるからである。1つの態様において、T細胞は、エレクトロポレーションを受けた集団を培養することにより約20倍～約50倍、またはそれ以上の範囲内で拡大する。

【0217】

1つの態様において、T細胞を拡大する方法は、さらなる適用のために拡大されたT細胞を単離する段階をさらに含むことができる。別の態様において、拡大する方法は、培養する段階に先立って拡大されたT細胞の、引き続いてのエレクトロポレーションをさらに含むことができる。引き続いてのエレクトロポレーションは、核酸を用いて、拡大されたT細胞に形質導入を行うこと、拡大されたT細胞にトランスフェクションを行うこと、または拡大されたT細胞にエレクトロポレーションを行うことなど、拡大されたT細胞集団に、作用物質をコードする核酸を導入することを含むことができ、該作用物質が、T細胞をさらに刺激する。作用物質は、さらなる拡大、エフェクター機能、または別のT細胞機能を刺激するなどして、T細胞を刺激しうる。

【0218】

薬学的組成物

本発明の薬学的組成物は、1つまたは複数の薬学的にまたは生理学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤と組み合わせて、本明細書に記載される改変細胞または改変細胞集団を含み得る。そのような組成物は、中性緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水等のような緩衝液；グルコース、マンノース、ショ糖、またはデキストラン、マンニトールのような炭水化物；タンパク質；ポリペプチドまたはグリシンのようなアミノ酸；抗酸化剤；EDTAまたはグルタチオンのようなキレート剤；アジュバント（例えば、水酸化アルミニウム）；および保存剤を含み得る。本発明の組成物は、好ましくは、静脈内投与用に製剤化される。

【0219】

本発明の薬学的組成物は、処置（または防止）される疾患に適切な様式で投与されてよい。適切な投薬量は、臨床試験によって決定され得るが、投与の量および頻度は、患者の状態、ならびに患者の疾患の型および重症度のような要因によって決定される。

【0220】

投与される本発明の細胞は、治療を受けている対象に対して自己、同種、または異種であり得る。

【0221】

本発明の細胞は、適切な前臨床および臨床の実験および試験において決定される投薬量および経路および時点で投与され得る。細胞組成物は、これらの範囲内の投薬量で複数回投与されてもよい。本発明の細胞の投与は、当業者によって決定されるような、所望の疾患または状態を処置するために有用な他の方法と組み合わせられてもよい。

【0222】

本明細書に記載される改変T細胞を含む薬学的組成物は、 $10^4 \sim 10^9$ 細胞/kg体重、いくつかの事例において、 $10^5 \sim 10^6$ 細胞/kg体重（これらの範囲内の全ての整数値を含む）の投薬量で投与され得ると一般に言えるかもしれない。T細胞組成物は、これらの投薬量で複数回投与されてもよい。細胞は、免疫治療において一般的に公知の注入技術を使用することによって投与されてよい（例えば、Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988を参照すること）。特定の患者のための最適な投薬量および処置計画は、疾患の兆候について患者をモニタリングし、それに応じて処置を調整することによって、医学分野の当業者によって容易に決定され得る。

【0223】

本発明の改変細胞の投与は、当業者に公知の任意の簡便な様式で行われうる。本発明の細胞はエアロゾル吸入、注射、摂取、輸血、植込みまたは移植により対象に投与されうる。本明細書において記述される組成物は患者へ経動脈的に、皮下に、皮内に、腫瘍内に、

リンパ節内に(intranodally)、髄内に、筋肉内に、静脈内(i.v.)注射により、または腹腔内に投与されうる。他の例では、本発明の細胞は、対象における炎症部位、対象における局所疾患部位、リンパ節、臓器、腫瘍などに直接注射される。

【0224】

本発明において有用な方法および組成物は、実施例に記載の特定の製剤に限定されないことが理解されるべきである。以下の実施例は当業者に、本発明の、細胞を作製および使用する方法、拡大および培養方法、ならびに治療方法の完全な開示かつ記述を提供するために記載されており、本発明者らがその発明とみなすものの範囲を限定することを意図するものではない。

【0225】

本発明の実践には、別段の指示がない限り、分子生物学(組み換え技法を含む)、微生物学、細胞生物学、生化学および免疫学の従来技法が利用され、それらは十分に当業者の認識範囲内である。そのような技法は、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」, fourth edition (Sambrook, 2012); 「Oligonucleotide Synthesis」 (Gait, 1984); 「Culture of Animal Cells」 (Freshney, 2010); 「Methods in Enzymology」 「Handbook of Experimental Immunology」 (Weir, 1997); 「Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells」 (Miller and Calos, 1987); 「Short Protocols in Molecular Biology」 (Ausubel, 2002); 「Polymerase Chain Reaction: Principles, Applications and Troubleshooting」, (Babar, 2011); 「Current Protocols in Immunology」 (Coligan, 2002)のような、文献のなかで十分に説明されている。これらの技法は、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの産生に適用可能であり、したがって、本発明の形成(making)および実践において考慮されうる。特定の態様に特に有用な技法は、以下の項で論じられる。

【実施例】

【0226】

実験的实施例

以下の実施例を参照しながら、本発明を以下に説明する。これらの実施例は、例示を目的として提供されるに過ぎず、本発明は、これらの実施例に限定されず、本明細書中に提供される教示の結果として明らかな全ての変動を包含する。

【0227】

これらの実験において利用された材料および方法を以下に説明する。

標的	gRNA ID	DNA seq	位置	鎖	配列	PAM	On
CD2	#8	Ex3	116760612	-	ACAGCTGACAGGCTCGACAC (SEQ ID NO: 22)	TGG	63.4
CD5	#4	Ex2-In2	61115090	+	CGGCTCAGCTGGTATGACCC (SEQ ID NO: 23)	AGG	66.7
CD7	#85	Ex2	670	-	GGAGCAGGTGATGTTGACGG (SEQ ID NO: 24)	AGG	74.9

【0228】

CD2、CD5、またはCD7を標的とするためのsgRNA（例えば、それぞれ、SEQ ID NO: 22~24）を設計し、GeneArt Precision sgRNA合成キットを使用して合成した。Cas9発現プラスミド(pGEM-Cas9)を増幅し、直鎖化した。Cas9 RNAを、mMessage mMachine T7 Ultraキットを使用して合成した。CRISPR編集をJurkat細胞において実施し：CD2/CD5/CD7 sgRNAおよびCas9を、エレクトロポレーションによってJurkat細胞にトランスフェクトした。Jurkat細胞におけるCD2/CD5/CD7の発現を、フローサイトメトリーによって検出し、最も効果的なCD2/CD5/CD7 sgRNAを決定した。次いで、最も効率的なCD2/CD5/CD7 sgRNAを使用して、初代ヒトT細胞においてCRISPR編集を実施した。選択されたsgRNAおよびCas9 RNAを、初代ヒトT細胞にエレクトロポレーションした。ノックアウト/編集効率をバリデートするため、初代ヒトT細胞におけるCD2/CD5/

CD7の発現を、フローサイトメトリーによって検出した。

【0229】

具体的には、新鮮なCD4/CD8 T細胞を得、0日目にdynabeadsと共にインキュベートした。4日目に、細胞からビーズを除去し、Cas9およびsgRNAによってエレクトロポレーションした。条件培地（TCM（X-vivo15、ヒト血清5%、グルタミン）、IL-7 10ng/ml、およびIL-15 10ng/ml）を細胞に添加した。6日目に、細胞をCARレンチウイルスによって形質導入した。9日目に、CAR発現を査定した。細胞を0.8e6/mlまで培養し、体積が300fl未満になった時に凍結させた（図22）。

【0230】

CAR構築物： 全ての構築物が、レンチウイルスpTRPE 4-1BB CD3ζ骨格を使用して生成された。OKT11 CARおよびTS2/18.1.1 CARは、ATCCから購入されたハイブリドーマ（それぞれ、ATCC（登録商標）CRL-8027（商標）およびATCC（登録商標）HB-195（商標））から生成された抗体に由来するscFvを使用して構築された。T11-2 CARは、Ellis Reinherzから受容したハイブリドーマから生成された抗体に由来するscFvを使用して構築された。全てのCD5 CARが、WO2010/022737 A1において公開された抗体配列に由来するscFvを使用して構築され、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0231】

実験の結果を以下に説明する。

【0232】

実施例1：T細胞傷害を引き起こすことなくT細胞リンパ腫およびT細胞白血病を標的とするための新規のアプローチ

T細胞リンパ腫およびT細胞白血病は、全体的に極めて予後不良であり、これらの患者のために利用可能な治療オプションはほとんど存在しない。キメラ抗原受容体T細胞（CART）免疫治療は、CD19+B細胞性非ホジキンリンパ腫（B-NHL）において先例のない結果をもたらした。本明細書において、別の成功した「CART19様」生成物が、T-NHLを標的にするため、設計された。CD19はT-NHLにおいて発現されないため、CD2、CD5、CD7、およびその他のような付加的な標的を、CART治療のために評価した。しかしながら、これらの標的は、全て、正常T細胞によっても発現され、許容されない臨床毒性（T細胞形成不全-免疫不全）をもたらす（図1）。本発明において、正常T細胞をCARTによる死滅に対して抵抗性になるよう編集することによって、T細胞リンパ腫の処置のための安全かつ効果的なCART戦略が開発された（図2）。CART標的（CD2、CD5、CD7）を正常T細胞から一時的に除去し、それによって、CARTによって媒介される死滅および免疫不全を回避した時、T細胞リンパ腫およびT細胞白血病に対するCART治療は、実施可能である（図2）。

【0233】

実施例2：抗CD5 CAR T細胞（CART5）およびCD5ノックアウト（KO）正常T細胞

抗CD5 CAR T細胞（CART5）およびCD5ノックアウト（KO）正常T細胞を含む二面免疫治療が、本明細書に開示される（図3）。CART5は、T細胞リンパ腫（例えば、T-NHL）細胞またはT細胞白血病細胞を破壊するが、正常T細胞も死滅させる。CD5 KO正常T細胞の注入は、いくつかのケースにおいて、自殺遺伝子（例えば、iCasp9、CD20/リツキシマブ、またはその他）を使用して、CART5細胞が枯渇させられるまで、CART抵抗性T細胞免疫を提供する。

【0234】

CD5は、T-NHL細胞において高度に発現されており、T細胞および少数のB細胞サブセット以外の他の組織においては発現されないため、T-NHL標的として選択された。異なる親和性を有する単鎖可変断片（scFv）（それぞれ、高い親和性、中程度の親和性、低い親和性を有する#17、#34、#9（Klitgaard JL, et al. (2013) British Journal of haematology 163:182-93））を使用して、6つの抗CD5 CAR構築物を生成し、T細胞において発現させた（図4～5）。興味深いことに、CD5発現は対照T細胞と比較して低かったが（

図8)、CD5はCART細胞の100%において発現されているにも関わらず (Mamonkin M, et.al.(2015)Blood 126:983-92)、抗CD5 CARTは、CART5細胞を製造するため、CD5のノックアウトを必要としなかった。CD5のCRISPR-Cas9 KOなしで、CD5の平均蛍光強度 (MFI) は、対照T細胞と比較してCART5において10倍低かったが、CD2のような別のT細胞マーカーには変化がなかった (図8)。

【0235】

異なるCART5構築物のインビトロおよびインビボの活性を比較した。高親和性scFv #17に由来する構築物C3054は、最高のインビボ死滅を示した。Jurkat細胞を、異なるCAR5構築物 (図13、標的とされたエピトープおよび親和性が左に示される) ならびにGFP-NFATレポーターによって形質導入し、次いで、CD5+腫瘍細胞 (または対照) と24時間共培養した。リードCART5 (C3054) は、増加したNFAT活性化を示す (図13)。

【0236】

リード抗CD5 CARTを自殺系を使用して実装し、その機能をインビトロおよびインビボで試験した。特定の理論によって拘束されることは望まないが、CD5の除去 (CRISPR-Cas9 KO) は、CART5上のCAR5とCD5の間のシス表面相互作用の可能性を排除することによって、CART5抗腫瘍効果をさらに増加させる。

【0237】

リードCART5生成物への自殺系の挿入: リード候補CART5 (C3054) 生成物を、自殺系を発現するよう改変する (図26)。CAR5および誘導性カスパーゼ9自殺系の両方をコードするP2A 2シストロンベクター (Di Stasi A, et al.(2011)365:1673-83) (iCART5) を開発した。最も効率的なものを定義するため、両方の方向、CAR5-P2A-iCasp9 およびiCasp9-P2A-CAR5 (図26) をクローニングする (安全のため、より高い%二重発現細胞およびより低い%CAR5+iCasp9-)。iCART5は、臨床グレードの化合物リミデュシド (AP1903、Bellicum Pharmaceuticals) を使用して効率的に排除される。

【0238】

iCART5のインビトロ試験: 新しく生成されたiCART5を、有効性 (インビトロのルシフェラーゼベースの死滅)、ならびに抗原刺激 (CD5+Jurkat T白血病細胞) 時の表現型/機能 (フローサイトメトリー表現型、Luminexアッセイによる30プレックスサイトカイン分析、CFSE増殖、およびCD107a脱顆粒) を確認するため、WT CART5と比較する。重要なことに、インビトロの枯渇は、iCART5を異なる濃度のリミデュシド (0、0.03、0.3、3、10nM) と共培養し、15分目、30分目、ならびに2、6、12、および24時間目に死滅をチェックすることによって試験される。iCART5は、初代CFSE標識セザリー細胞を使用した確立された死滅アッセイを使用して、初代T-NHL細胞に対しても試験される。

【0239】

iCART5のインビボ試験: [クリックビートルグリーン (CBG) +T白血病細胞株Jurkat細胞株およびクリックビートルレッド (CBR) +iCART5を使用した] インビボ異種移植モデル (Ruella M, et al.(2016)J Clin Invest) を、リミデュシド (50ug/マウス23) の、インビボでiCART5対WT CART5を枯渇させる能力を試験するため、使用する。NOD SCID γ 欠損マウス (NSG) マウス (1群あたり8匹) に、 2×10^6 CART5細胞/マウスを注射する。腫瘍負荷を生物発光 (CBG) として経時的に査定し、複数の時点 (時間/日) で、フローサイトメトリーによってT細胞表現型を研究し、生物発光 (CBR) によって拡大を研究する。マウスは、生存および再発のモニタリングのため、長期 (3~4ヶ月) にわたり維持される。ヒトT-NHL異種移植モデルは、初代セザリー細胞をi.v.注射することによって以前に確立された。このモデルは、抗腫瘍および枯渇の両方の効率についてiCART5を試験するため、使用される。

【0240】

CART5におけるCD5 KOの役割の評価: 予備データは、CD5 CART5がインビボでWT CART5より効果的であることを証明した。CRISPR-Cas9を使用して、CART5細胞においてCD5をノックアウトする。CRISPR-Cas9 CART拡大プロトコルは、以前に最適化された。CART5の生存率、抗原によって駆動される増殖 (CFSE標識を使用)、サイトカイン

10

20

30

40

50

産生（30プレックスLuminexによる）、脱顆粒（フローサイトメトリーによるCD107a 査定）、細胞傷害（ルシフェラーゼベース）、および表現型（メモリーサブセット、Th1/Th2）を試験することによって、インビトロで野生型CART5をCD5 KO CART5と比較する。細胞株（例えば、Jurkat）および初代試料の両方を標的として使用する。10日目および14日目に末梢血中の拡大および表現型をモニタリングすることによって、Jurkatを保持するNSGマウスにおいて、CD5 KO対WT CART5（ 1×10^6 細胞/マウス）のインビボ比較を実施する。

【0241】

CD5 KOによるCART5機能の増強のメカニズム： CD5KOがCART5活性を改善することが立証されたため、メカニズムを理解するための付加的な研究を実施する。(i) CART5細胞上のCAR5およびCD5の局在を分析するための共焦点イメージング；(ii) CAR5がシスでCD5に結合することを立証するための単一分子イメージング（ONI nanoimager）；(iii) CD5エピトープが（CAR5によって）マスクされるため、CART5がCAR5+Jurkatを死滅させることができないことを示すための、CD5+JurkatにおけるCAR5の発現；および(iv) CD5はT細胞活性化に対して阻害的な役割を有するため、CD5の存在下または非存在下でのCART5活性化を研究する（ホスホフローサイトメトリー）。

【0242】

T細胞形成不全を回避するためのCART抵抗性正常T細胞の生成： 腫瘍T細胞および正常T細胞は、両方とも、類似したレベルのCD5を発現するため、CART5はそれらを区別することができない。CART抗腫瘍活性中の免疫を確実にするため、抗T-NHL CARTと同時に注入するためのCART抵抗性正常T細胞を開発する。正常T細胞においてCD5をノックアウトし、それによって、それらをCART5に対して不可視にするため、CRISPR-Cas9遺伝子編集が使用される。最適化されたCART拡大プロトコルを使用して、正常T細胞におけるCD5のおよそ95%をKOすることができる高度に効率的なCRISPR-Cas9 gRNA（#4）が生成された。データは、CD5 KO T細胞は、CART5に対して抵抗性であったが、WT T細胞（CD5+）は、24時間以内に強力に死滅させられたことを示している。

【0243】

CD5 KO正常T細胞の製造： CD5 KO正常T細胞は、Lonza 4D Nucleofectorを使用してCas9タンパク質（ThermoFisher v2）と共にエレクトロポレーションされる高度に効率的なgRNA（#4）を使用して開発される。CRISPR-Cas9 KOを1日目に実施し、次いで、遺伝子編集を増加させるため、細胞を30°Cで2日間培養し、次いで、抗CD3/CD28 Dynabeads（ビーズ::1 T細胞）によって活性化し、300fl未満の細胞体積に達するまで拡大させる。

【0244】

CD5 KO正常T細胞のiCART5による死滅に対する抵抗性のインビトロ評価： CD5 KO正常T細胞のCART5に対する抵抗性は、死滅アッセイ（標的T細胞のCFSE標識）を実施することによってインビトロで試験される。予備的な結果は、CD5 KOが抵抗性を付与することを示した。3つの付加的なT細胞ドナーが試験される。

【0245】

自己異種移植モデルにおけるCD5 KO正常T細胞のiCART5に対する抵抗性のインビボ評価： NSGマウス（8マウス/群）に、ルシフェラーゼ+CD5 KO正常T細胞またはWTを移植し、2日後に自己iCART5を注射する。CD5 ko正常T細胞およびWT正常T細胞に対するiCART5の効果を、生物発光によって査定する。WT T細胞がiCART5（発光）によって完全に排除されたら、iCART5を枯渇させるため、リミデュシドを投与する。次いで、正常T細胞が宿主において再増殖し得ることを証明するため、WT T細胞を再注射する。CARTの拡大を査定するため、毎週、マウスからの採血を行う。

【0246】

正常T細胞機能に対するCD5 KOの役割の評価： T細胞エフェクター機能を注意深く研究することによって、正常T細胞におけるCD5 KOの役割を調査する。TCR特異的刺激（抗CD3/CD28ビーズ）の後、CD5KO T細胞対WTのサイトカイン産生（30プレックスLumi

10

20

30

40

50

nex)、増殖(CFSE)、および活性化を測定する。一般的な感染に曝された時に、CD5 KO T細胞が、WTと同様に増殖し、産生するか否かも試験する。

【0247】

臨床的に使用するための最適なCD5KO正常T細胞用量の定義： インシリコアプローチならびに実験的アプローチ(感染性病原体に特異的なTCRのTCR配列決定およびテトラマー染色)の両方を使用して、最も一般的な感染に対する十分なT細胞免疫を確実にするため、再発性または難治性(r/r) T-NHL患者に注入される細胞の最小数を、定義する。

【0248】

進行T細胞リンパ腫を有する患者のための第1相パイロット臨床試験におけるiCART5およびCD5 KO正常T細胞の同時注入の試験： Investigation New Drug (IND) パッケージを開発し、FDAに提出する。患者において抗T-NHL CARTアプローチを試験するため、第1相臨床試験を開始する。INDパッケージは、予備的な結果、および本明細書に記載される実験からのさらなるデータに基づく。

【0249】

臨床試験実施計画デザイン： 第1相臨床試験には、3+3治験実施計画デザインを使用して処置されるr/r T-NHLを有する患者が含まれる。単一のアフェレーシスから、濃縮されたT細胞を使用して、2つの生成物を生成する： #1.CRISPR-Cas9 CD5 KO正常T細胞および#2.iCART5。注入される最初の生成物は、KO正常T細胞であり、翌日、iCART5が注入される。患者の第1のコホートは、リンパ球枯渇[シクロホスファミド(60mg/kg×2日)およびフルダラビン(25mg/m²×5日)]ならびに生成物#1を受容する。用量規制毒性(DLT)が観察されない場合、コホート2は、リンパ球枯渇、生成物#1、および3日間にわたる1~5×10⁷の全iCART5(生成物#2)(全用量の10%、30%、60%)を受容する。1~5×10⁷という全CART5は、B-NHL8におけるCART19実験に基づく、最適以下の用量である。コホート2においてDLTが観察されない場合、コホート3は、リンパ球枯渇、生成物#1、および1~5×10⁸の全CART5(完全用量)を受容する。コホート#1からの患者は、最初の4週間以内に毒性が観察されない場合に、コホート#2に進むことが許可される。可能性のある長期T細胞傷害を防止するため、腫瘍クリアランス(および6ヶ月目における最大値)に基づき、二量体化剤リミデュシド(NCT02744287)を使用して、iCART5細胞を枯渇させる。

【0250】

INDパッケージの準備およびFDAへの提出： 臨床グレードの製造の最適化を、Clinical Vaccine and Cell Production Facility (CVPF)と共同で実施する。全ての記載された前臨床実験の結果を、臨床試験実施計画と共に、IND申請に適合する形式に整える。IND準備のための広範なサポートが、CCIおよびACCにおいて利用可能である。

【0251】

患者の登録および処置： INDの提出および全ての規制当局から承認が成功した後、University of Pennsylvaniaのリンパ腫プログラム(Lymphoma Program)(Director: Dr.Stephen Schuster; Scientific Director: Dr.Marco Ruella)において第1相試験を開始する。リンパ腫プログラムは、初期研究管理の広範な経験を有する専用の臨床研究ユニット(CRU)を有する。Dr.Ruellaが、この試験の治験責任医師(Principal Investigator)であり、Dr.Carl Juneが、科学的治験実施計画アドバイザー(Scientific Protocol Advisor)である。2つの生成物の製造は、CVPFにおいて実施される。

【0252】

関連研究： CART拡大(qPCRおよびフローサイトメトリー)、CART表現型(CyTOF)、CART遺伝子発現プロファイリング(GEP)(NanoString、単一細胞RNAseq、10X Genomics)、ならびに血清中のサイトカインレベル(Luminex、30プレックスアレイ)を試験するため、患者試料(末梢血)を、複数の時点(アフェレーシス、-1、0、7、14、28、60、90日目)で分析する。利用可能である時には、処置前および処置後の腫瘍生検材料に対して付加的な研究を実施する(RNAseqおよび腫瘍微小環境のHyperion分析)。

。

10

20

30

40

50

【0253】

この試験は、毒性を回避しながら、T細胞非ホジキンリンパ腫を処置するための革新的な免疫治療アプローチを表すため、新規の併用免疫治療の開発における重大なマイルストーンとなるであろう。抗CD5 CAR T細胞は、腫瘍T細胞を死滅させるが、類似したCD5発現のため、正常T細胞も必然的に死滅させる。しかしながら、本明細書に記載される戦略には、CD5がノックアウトされている正常T細胞の同時注入が含まれ、それによって、CAR T5抗腫瘍活性中のT細胞による免疫学的防御を確実にする。次いで、長期の正常な免疫学的再構成を確実にするため、CAR T5細胞は、自殺系を使用して枯渇させられる。これは、T-NHLのための最初のCAR試験のうちの1つであり、毒性問題を解決する二面アプローチを含む唯一の試験である。T-NHLは極めて予後不良であり、利用可能な能動免疫治療が現在のところ存在しない。従って、そのような革新的な戦略の開発は、血液学および免疫治療の領域における垂直的進歩を表す。第1相試験の臨床結果および相関研究の所見に基づき、抗原喪失逃避を回避するため、複数の標的を同時に標的とするため、この戦略を実施することもできるし（例えば、CAR T5+CAR T7）、またはCARによって媒介される死滅を増強することができる低分子と、CARを組み合わせることもできる。

10

【0254】

実施例3：抗CD2 CAR T細胞（CAR T2）およびCD2ノックアウト（KO）正常T細胞

抗CD2 CAR T細胞（CAR T2）およびCD2ノックアウト（KO）正常T細胞を含む二面免疫治療アプローチが、本明細書に開示される（図3）。CAR T2は、T細胞リンパ腫（例えば、T-NHL）またはT細胞白血病細胞を破壊するが、正常T細胞も死滅させる。CD2 KO正常T細胞の注入は、いくつかのケースにおいては、自殺遺伝子（例えば、iCasp9）を使用することによって、CAR T2細胞が枯渇させられるまで、CAR抵抗性T細胞免疫を提供する。

20

【0255】

CRISPR/Cas9系を使用してCD2遺伝子（およびCD5）をノックアウトするため、ガイドRNAを設計した。CD2は、T細胞集団の78%において効果的にノックアウトされた。第2世代の抗CD2 CARおよび抗CD5 CAR（それぞれ、CAR T2およびCAR T5）を生成した（図4）。ノックアウトされた細胞（CD2KOおよびCD5KO）を、対応するCAR細胞（それぞれ、CAR T2およびCAR T5）と共にインキュベートし、刺激し、集団倍加を測定した（図7）。gRNAを含有しないモックエレクトロポレーション細胞を、比較のための対照として使用した。CD2 KOなしでは、CAR T2細胞は拡大しなかった（図7）。KOによって、CAR T2およびCAR T5は、約5〜8集団倍加に達する（図7）。

30

【0256】

Jurkat細胞を、異なるCAR2構築物およびGFP-NFATレポーターによって形質導入し、次いで、CD2+腫瘍細胞（または対照）と24時間共培養した。リードCAR T2（C3043）は、増加したNFAT活性化を示す（図14）。

【0257】

CAR T2拡大プロトコルを最適化した。CAR T2細胞およびCAR T5細胞は、CD2KO細胞またはCD5 KO細胞と共にインキュベートされた時、18日まで拡大し続けた（図9）。

【0258】

実施例4：CAR T2およびCAR T5の試験

図6は、CD5（またはCD2またはCD7）KO製造プロセスおよびCRISPR-Cas9 KO効率を示す。

【0259】

6つの異なるCAR2構築物および6つのCAR5構築物を、ルシフェラーゼ+Jurkat細胞（T細胞白血病細胞株）との共培養によって、インビトロでチャレンジした。24時間目に、発光の相対的な低下として、全死滅を測定した。CAR T2については、#3029、#3030、および#3043のみが、抗腫瘍効果を示す（図10）。CAR T5については、全ての構築物が、抗腫瘍効果を示した（図11）。リードCAR候補（CAR T2 C3043およびCAR T5 C3054）を選択し、試験した。CD2またはCD5のノックアウトのCAR機能に対する効果を試験

40

50

した。CART2およびCART5に対して抵抗性のT細胞は、成功裏に生成された（正常T細胞においてCD5およびCD2がノックアウトされた）。

【0260】

皮膚T細胞リンパ腫に対するCART2およびCART5の活性を試験した。24時間死滅アッセイを実施した。CART2細胞は、初代セザリー細胞（白血病皮膚T細胞リンパ腫）およびHHセザリー細胞株に対して活性であった（図15）。CART5も、HH細胞に対して活性であった（図15）。

【0261】

CART2およびCART5のインビボ効力を測定した。NSGマウスに、ルシフェラーゼ+Jurkat細胞を移植し、7日目に、対照T細胞またはCART2もしくはCART5（ 1×10^6 ）を受容するよう、マウスをランダム化した。マウスを、IVIS Xenogen Spectrumを使用して毎週画像化し、LivingImageソフトウェアによって分析した。CART2 C3043およびCART5 C3054が、最も効果的であった（図12）。

【0262】

CART2およびCART5は、正常T細胞（自己および同種）を認識し、それらを死滅させることが証明された（図16）。

【0263】

CAR標的の除去が、正常T細胞をCARTによる死滅から防御することも証明された（図17）。CD5 KO T細胞は、CART5による死滅に対して抵抗性であったが、WT正常T細胞はそうでなかった。正常休止T細胞は、CART2（図17、上）およびCART5（図17、下）によって認識され、死滅させられる。CRISPR-Cas9を使用した正常T細胞からのCD2またはCD5の効率的なKOは、それぞれ、CART2またはCART5による死滅に対する抵抗性をもたらした（図17）。

【0264】

CD2KOおよびCD5KOの正常T細胞生成物中には、CMV特異的T細胞が存在した（図18）。CD2およびCD5 KO正常T細胞は、CMVペプチドを認識し、サイトカインを産生する能力を維持していた（図18；HLA-A-02:01-CMV PP65 NLVPMVATVデキストラマー（SEQ ID NO:101）；CETFペプチドへの4時間の曝露後のICS。CMV-ペプチドパルスAPCとの二次培養後）。

【0265】

実施例5：抗CD7 CAR T細胞（CART7）およびCD7ノックアウト（KO）正常T細胞

抗CD7 CAR T細胞（CART7）およびCD7ノックアウト（KO）正常T細胞を含む二面免疫治療アプローチが、本明細書に開示される。CART7は、T細胞リンパ腫（例えば、T-NHL）またはT細胞白血病細胞を破壊するが、正常T細胞も死滅させる。CD7 KO正常T細胞の注入は、いくつかのケースにおいて、自殺遺伝子（例えば、iCasp9）を使用することによって、CART7細胞が枯渇させられるまで、CART抵抗性T細胞免疫を提供する。

【0266】

CRISPR/Cas9系を使用してCD7遺伝子をノックアウトするため、ガイドRNAを設計した。CD7は、T細胞集団の79%において効果的にノックアウトされた（図25）。6つの抗CD7 CARが生成された（図25）。

【0267】

実施例6：二重特異性CAR T細胞

P2A配列によって連結されたCAR5（C3054）およびCAR2（C3043）を含む2つのレンチウイルス構築物を生成した（図19）。遺伝子発現はEF1 α プロモーターによって駆動された。CAR5構築物は、4-1BB共刺激ドメインおよびCD3 ζ シグナル伝達ドメインを有する。正常T細胞におけるCD2およびCD5の両方の効率的なノックアウトが証明された（図20A~20B）。

【0268】

実施例6：CD5 KOはCART免疫治療を増強する

CD5 KO CART5は、インビボでCD5+CART5より効果的であることが証明された。CD5

10

20

30

40

50

KOは、CART5の抗腫瘍効果を増加させた（図21）。NSGマウスを使用したJurkat T-ALL異種移植モデルにおいて、CD5 KO CART5（ 2×10^6 細胞/マウス）は、完全な長期応答、およびWT CART5と比較して、より長い生存をもたらす（図21）。

【0269】

CD5 KO CART19も、インビボでCD5+CART19より効果的であった。CD5 KOは、CART19の抗腫瘍効力を増加させた（図22）。NALM6 B-ALL異種移植モデルにおいて、CD5 KO CART19は、WT CART19と比較して、著しく高い腫瘍コントロールを示した（図22）。

【0270】

CART5およびCART2は、AMLの20%を標的とすることもできた。CART2細胞は、CD2+AML細胞と共培養され、24時間目に有意な死滅を示した（図23A～23B）。

【0271】

CART5は、CLLおよびMCLの100%も標的とした。細胞傷害アッセイを実施したところ、CART5細胞は、CD5+MCL細胞株（Jeko-1およびMino）を認識し、死滅させることができることが証明された（図24）。

【0272】

これらのデータは、CD5をノックアウトすることによって、抗CD5 CARによって処置した時、または、驚くべきことに、異なるCAR T細胞（例えば、CD19 CART細胞）によって処置した時、CART治療が増強されることを証明している。

【0273】

他の態様

本明細書における変数の任意の定義における要素のリストの記載は、リストされた要素のうちの任意の単一の要素または組み合わせ（または部分的組み合わせ）としてのその変数の定義を含む。本明細書における態様の記載には、単一の態様としてのその態様、または任意の他の態様もしくはそれらの一部分と組み合わせられたその態様が含まれる。

【0274】

本明細書中に引用された各々の全ての特許、特許出願、および刊行物の開示が、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。具体的な態様を参照しながら本発明を開示したが、本発明の他の態様および変動が、本発明の真の本旨および範囲から逸脱することなく、当業者によって考案され得ることは明白である。添付の特許請求の範囲は、全てのそのような態様および等価な変動を含んで解釈されるものとする。

10

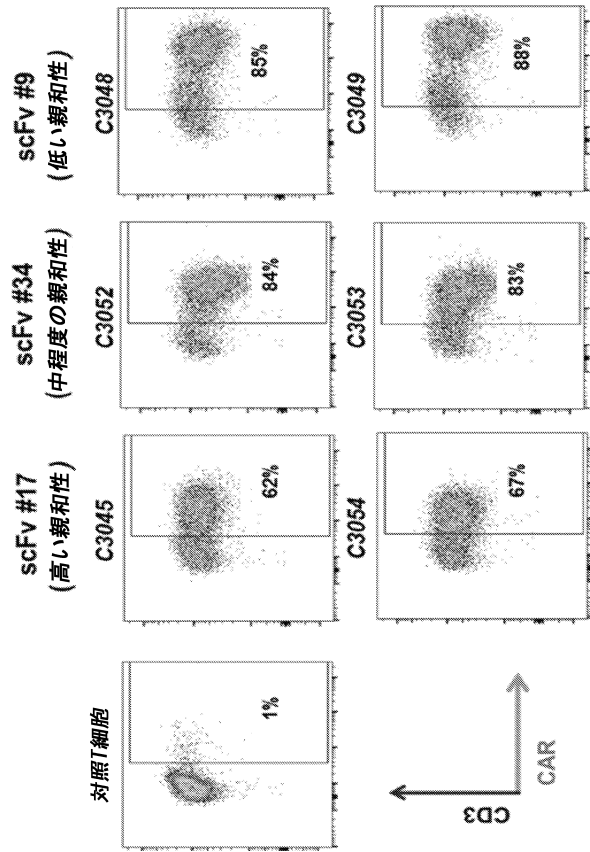
20

30

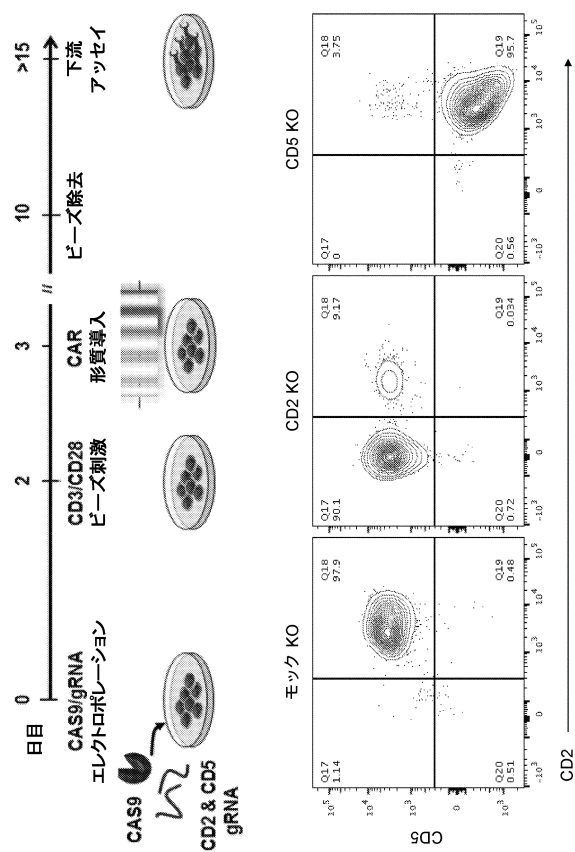
40

50

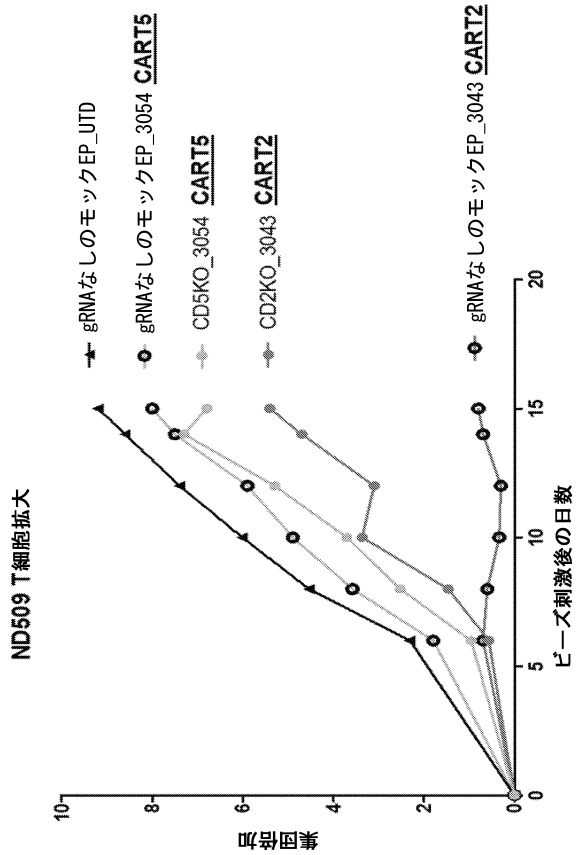
【図 5】



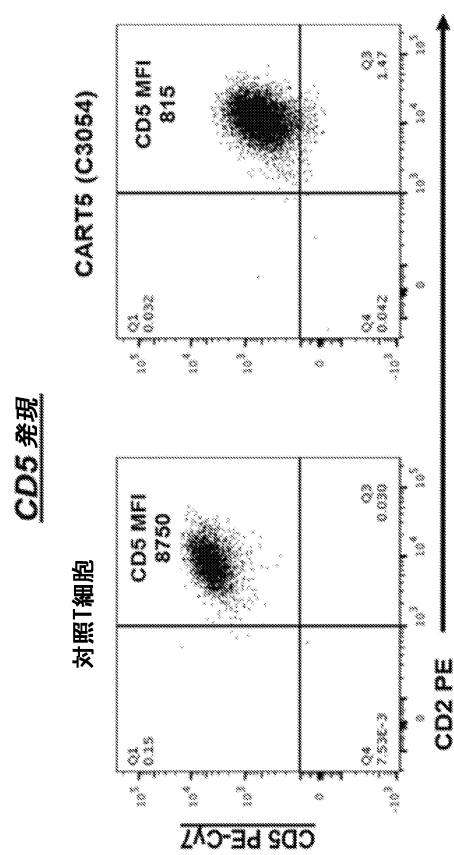
【図 6】



【図 7】

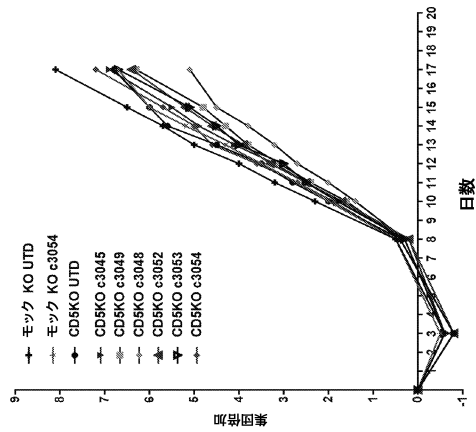


【図 8】

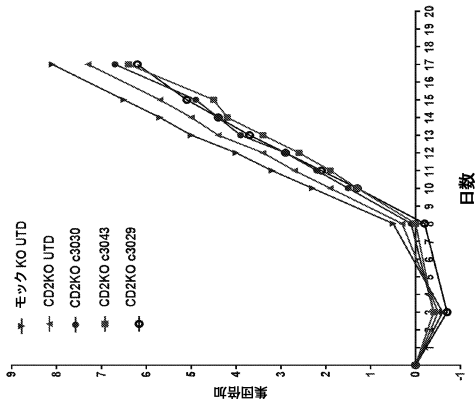


【図 9】

CART5

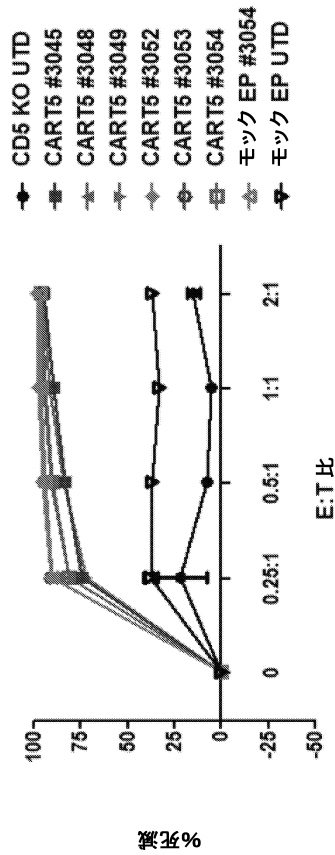


CART2



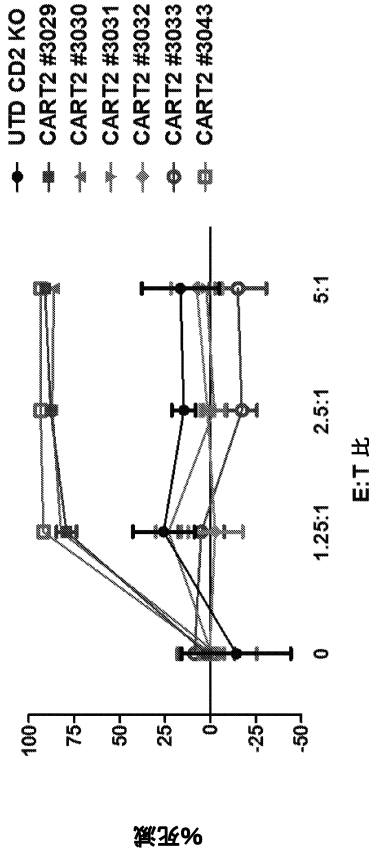
【図 11】

24時間の死滅



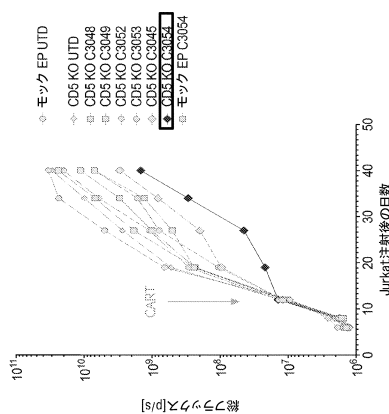
【図 10】

24時間の死滅

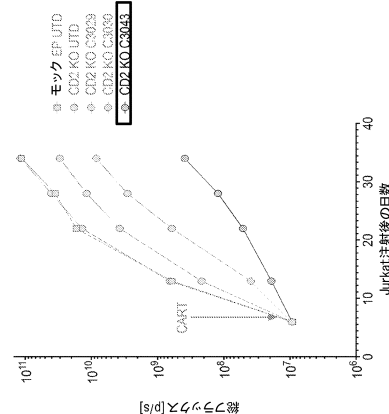


【図 12】

CART5



CART2



10

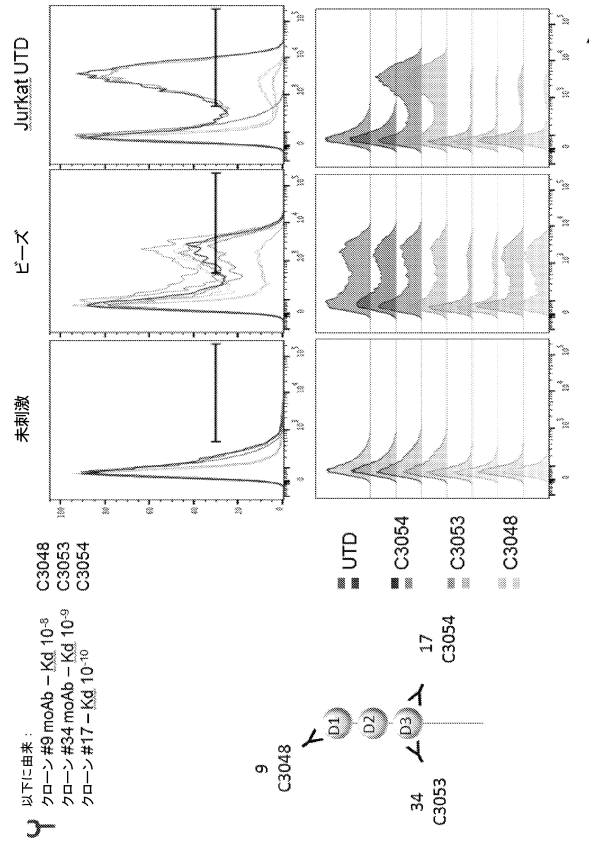
20

30

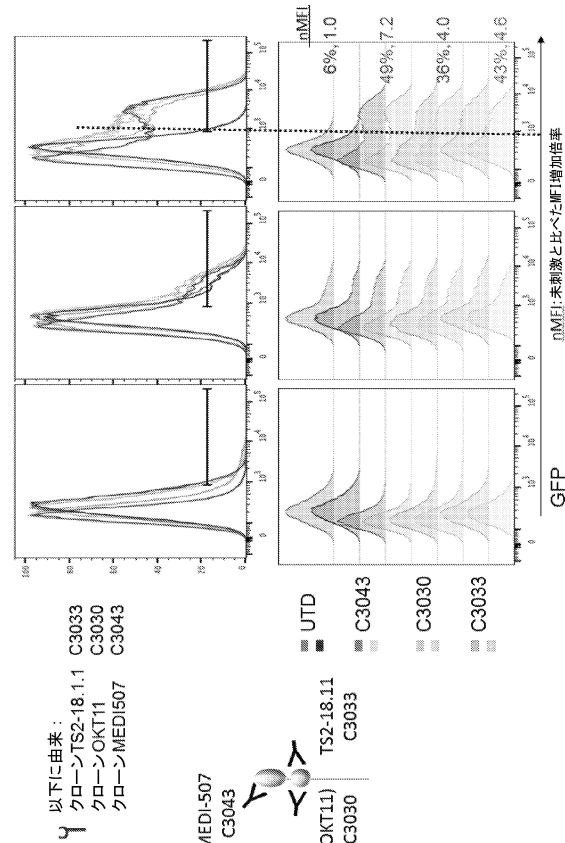
40

50

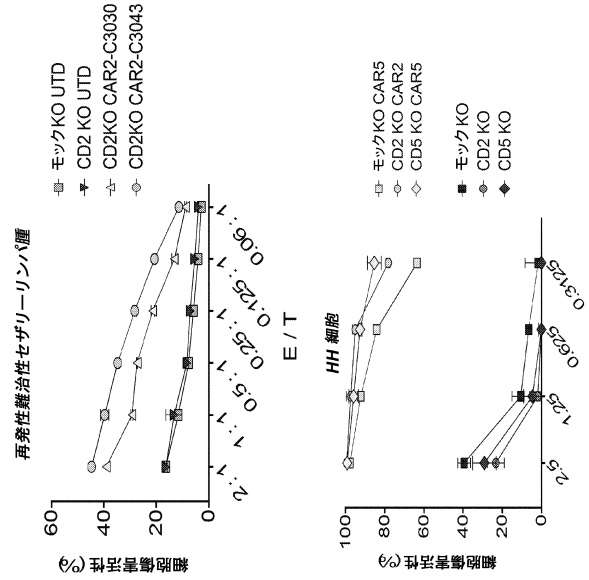
【図 1 3】



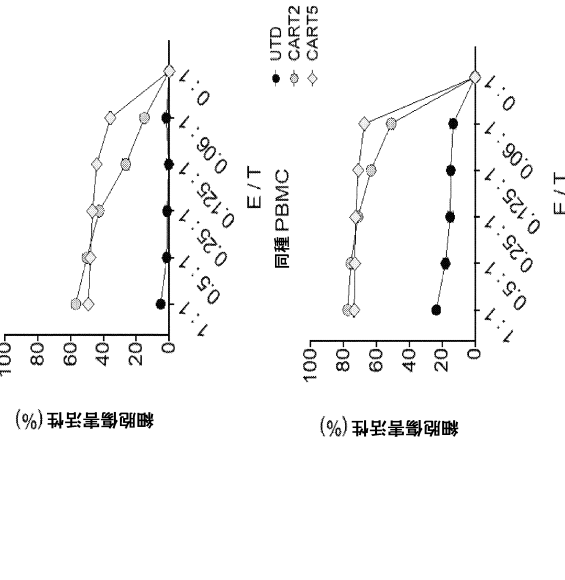
【図 1 4】



【図 1 5】



【図 1 6】



10

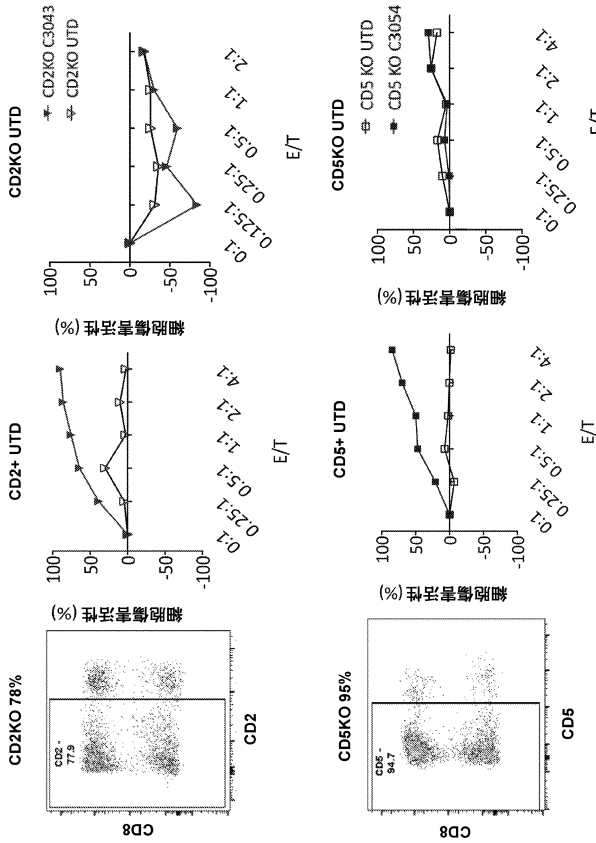
20

30

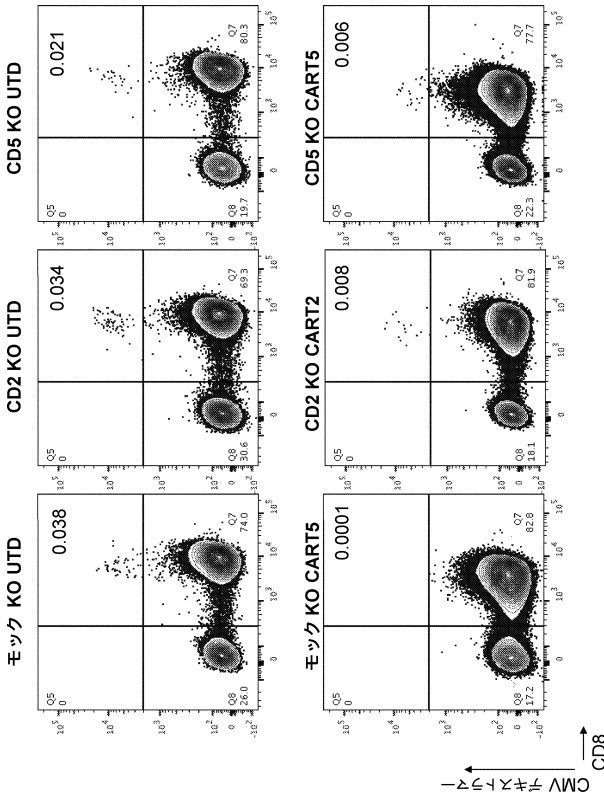
40

50

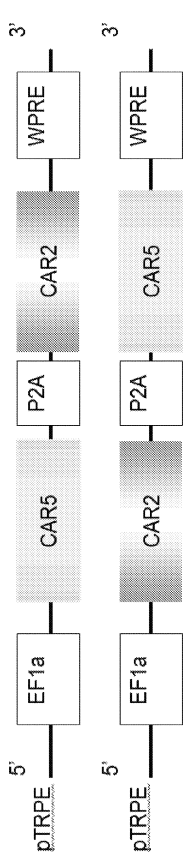
【図 17】



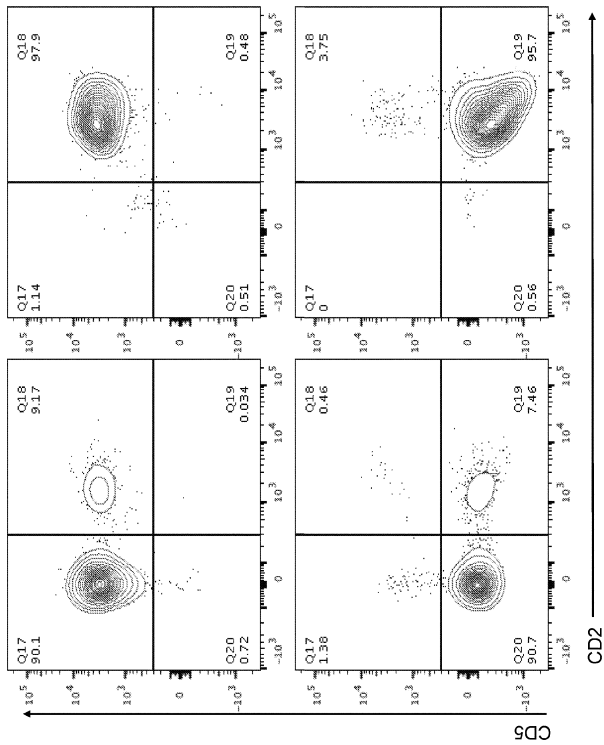
【図 18】



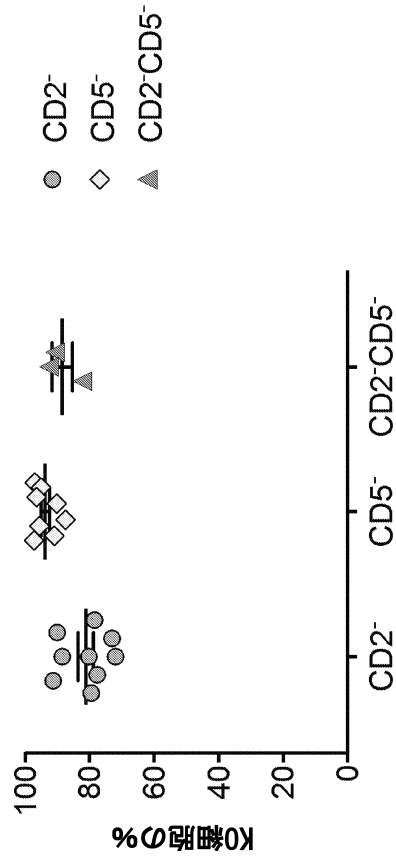
【図 19】



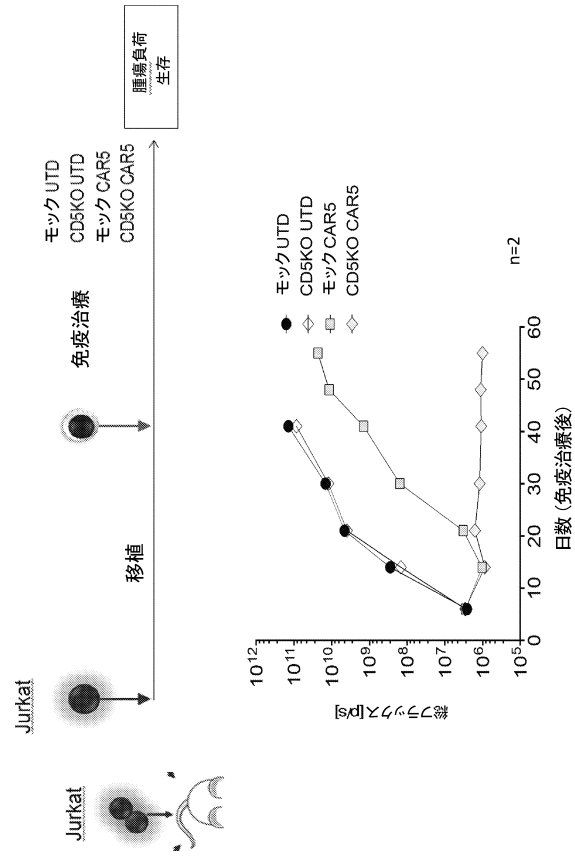
【図 20 A】



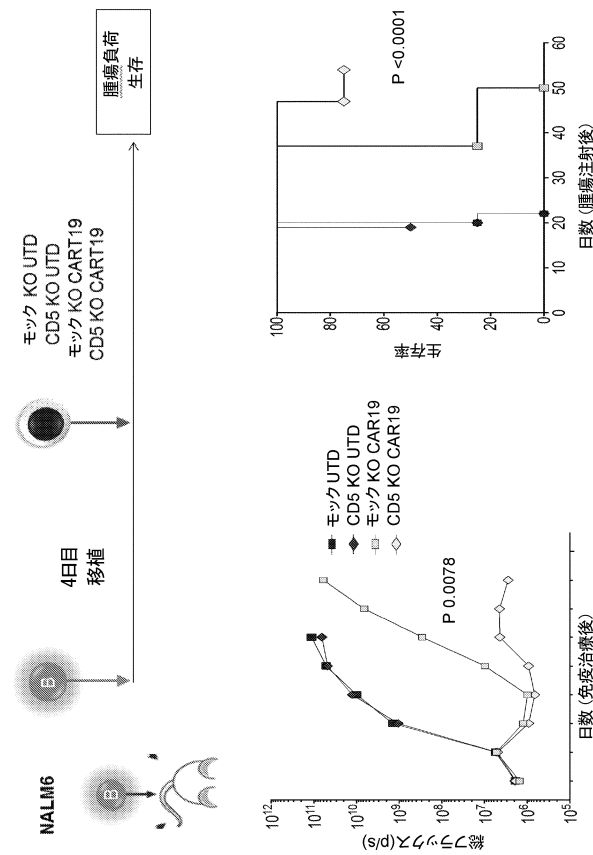
【図 20 B】



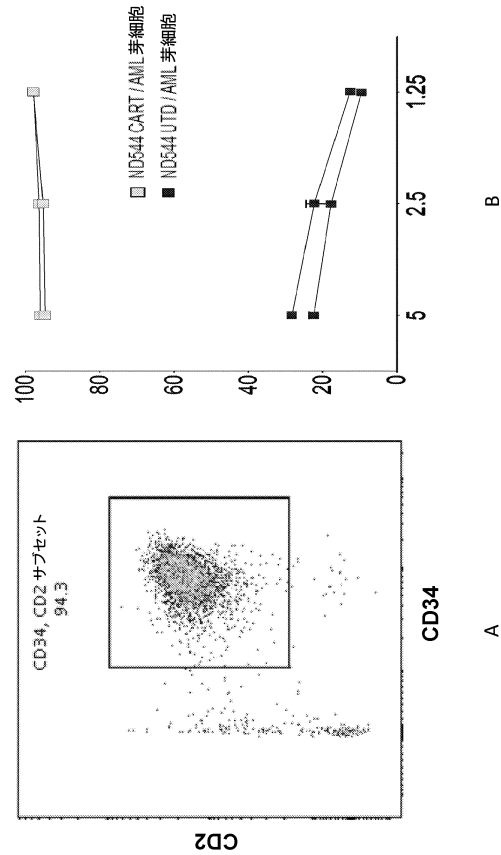
【図 21】



【図 22】



【図 23】



10

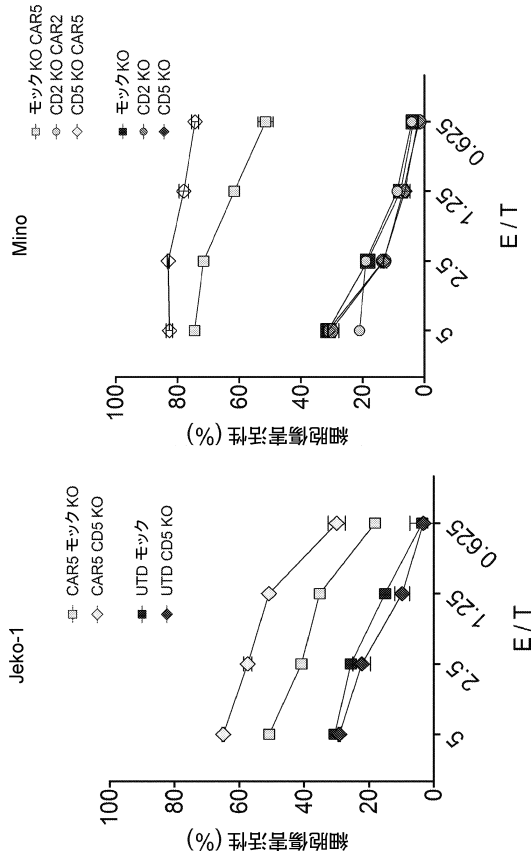
20

30

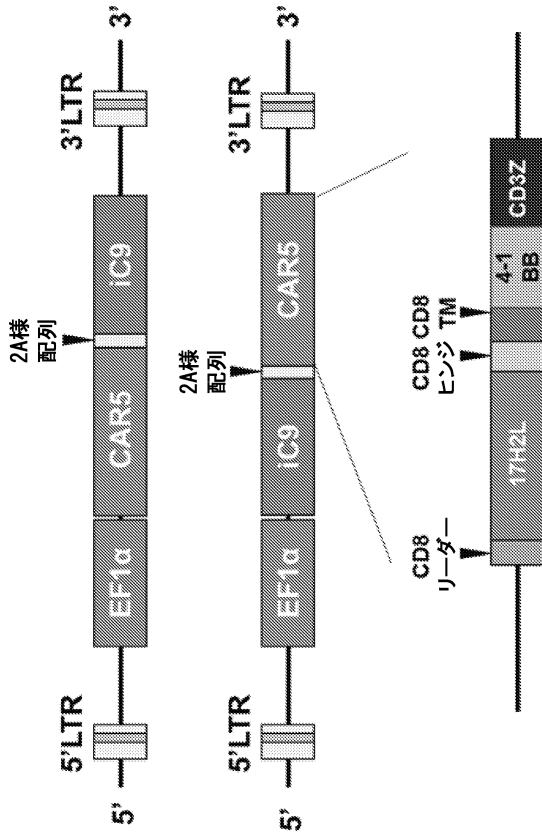
40

50

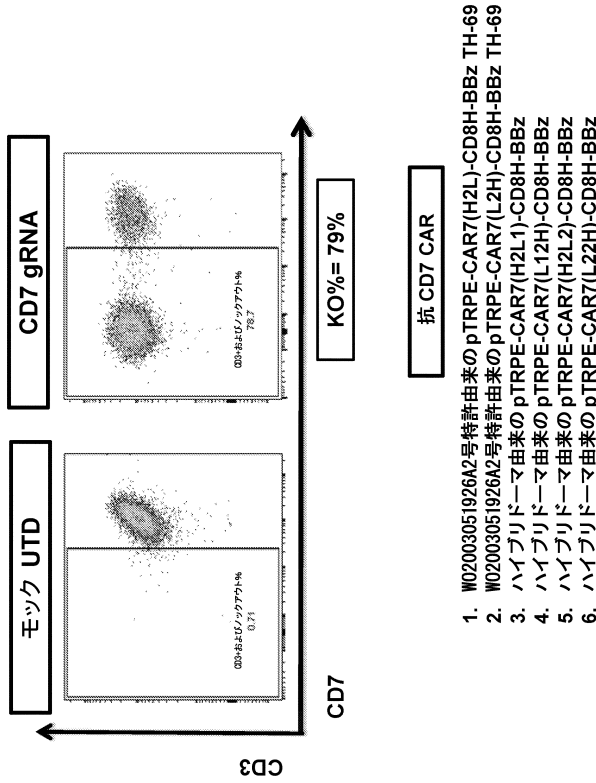
【図 2 4】



【図 2 6】



【図 2 5】



10

20

30

40

50

【配列表】
0007620374000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 P 43/00 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 0 7 K 14/725 (2006.01)
 C 0 7 K 16/28 (2006.01)
 C 0 7 K 19/00 (2006.01)
 C 1 2 N 15/12 (2006.01)
 C 1 2 N 15/13 (2006.01)
 C 1 2 N 15/62 (2006.01)
 C 1 2 N 15/09 (2006.01)
 C 0 7 K 14/47 (2006.01)
 C 1 2 N 15/63 (2006.01)

F I

A 6 1 K 39/395 T
 A 6 1 P 43/00 1 2 1
 C 1 2 N 5/10 Z N A
 C 0 7 K 14/725
 C 0 7 K 16/28
 C 0 7 K 19/00
 C 1 2 N 15/12
 C 1 2 N 15/13
 C 1 2 N 15/62 Z
 C 1 2 N 15/09 1 1 0
 C 0 7 K 14/47
 C 1 2 N 15/63 Z

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ルエラ マルコ

アメリカ合衆国 1 9 0 0 3 ペンシルベニア州 アードモア クリケット アベニュー 7 3 0

(72)発明者 ギル ザール

アメリカ合衆国 1 9 1 2 3 ペンシルベニア州 フィラデルフィア ポプラー ストリート 4 3 8

(72)発明者 ジューン カール エイチ.

アメリカ合衆国 1 9 0 6 6 ペンシルベニア州 メリオン ステーション ベアード ロード 4 0 9

(72)発明者 ポージー エイヴリー ディー.

アメリカ合衆国 1 9 1 0 6 ペンシルベニア州 フィラデルフィア マーケット ストリート 3 1 9
 アpartment 2

(72)発明者 パウエル ダニエル ジェイ.

アメリカ合衆国 1 9 0 0 4 ペンシルベニア州 ベラ カヌイド アバーデール ロード 3 6

審査官 濱田 光浩

(56)参考文献 Oncoimmunology, 2017年, Vol. 7, No. 3, e1407898, doi: 10.1080/2162402X.2017.1407898.

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

A 6 1 K 3 5 / 1 7

C 1 2 N 1 5 / 1 2

A 6 1 P 3 5 / 0 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)