

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7594439号
(P7594439)

(45)発行日 令和6年12月4日(2024.12.4)

(24)登録日 令和6年11月26日(2024.11.26)

(51)国際特許分類			F I		
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K	19/00	Z N A
C 0 7 K	14/74	(2006.01)	C 0 7 K	14/74	
C 1 2 N	15/62	(2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 N	15/12	(2006.01)	C 1 2 N	15/12	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
請求項の数 26 (全121頁)					
(21)出願番号 特願2020-544370(P2020-544370)			(73)特許権者 520159536		
(86)(22)出願日 平成30年11月10日(2018.11.10)			ジュラ バイオ, インコーポレイテッド		
(65)公表番号 特表2021-502122(P2021-502122 A)			アメリカ合衆国, マサチューセッツ州		
(43)公表日 令和3年1月28日(2021.1.28)			0 2 1 4 3, サマービル, 4 9 5 コロ		
(86)国際出願番号 PCT/US2018/060227			(74)代理人 100114775		
(87)国際公開番号 WO2019/094847			弁理士 高岡 亮一		
(87)国際公開日 令和1年5月16日(2019.5.16)			(74)代理人 100121511		
審査請求日 令和3年11月9日(2021.11.9)			弁理士 小田 直		
(31)優先権主張番号 62/584,449			(74)代理人 100202751		
(32)優先日 平成29年11月10日(2017.11.10)			弁理士 岩堀 明代		
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)			(74)代理人 100208580		
			弁理士 三好 玲奈		
			(74)代理人 100191086		
			弁理士 高橋 香元		
最終頁に続く					

(54)【発明の名称】 主要組織適合複合体ベースのキメラ受容体および自己免疫疾患を治療するためのその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

主要組織適合複合体（MHC）ベースのキメラ受容体であって、
（i）第1のMHCクラスIIのアルファ鎖の細胞外ドメインを含む、第1のポリペプチド、および
（ii）第2のMHCクラスIIのベータ鎖の細胞外ドメインを含む、第2のポリペプチド
を含み、
前記第1のポリペプチドまたは前記第2のポリペプチドのいずれかに抗原ペプチドが融合しており、
前記第1のポリペプチドまたは前記第2のポリペプチドの両方ではなくいずれかが、細胞質シグナル伝達ドメインをさらに含む、
MHCベースのキメラ受容体。

【請求項2】

前記第1のポリペプチドおよび／または前記第2のポリペプチドが、少なくとも1つの共刺激ドメインをさらに含む、請求項1に記載のMHCベースのキメラ受容体。

【請求項3】

前記少なくとも1つの共刺激ドメインが、4-1BBからの共刺激ドメイン、CD28からの共刺激ドメイン、またはその組合せである、請求項2に記載のMHCベースのキメラ受容体。

【請求項 4】

前記抗原ペプチドと前記抗原ペプチドに融合した MHC クラス II の細胞外ドメインとの間に位置するヒンジドメインをさらに含む、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の MHC ベースのキメラ受容体。

【請求項 5】

前記細胞質シグナル伝達ドメインが CD3 ζ の細胞質シグナル伝達ドメインである、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の MHC ベースのキメラ受容体。

【請求項 6】

前記抗原ペプチドが、ミエリン塩基性タンパク質 (MBP)、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 (MOG)、プロテオリピドタンパク質 (PLP)、インスリン、グルタミン酸デカルボキシラーゼ、または表 1 に記載されるものからの抗原ペプチドである、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の MHC ベースのキメラ受容体。

【請求項 7】

前記第 1 の MHC クラス II が HLA-DRA*1010 である；および／または
前記第 2 の MHC クラス II が HLA-DRB1*1501 である、
請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の MHC ベースのキメラ受容体。

【請求項 8】

請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の MHC ベースのキメラ受容体をコードする、核酸または核酸セット。

【請求項 9】

前記核酸または核酸セットがウイルスベクター中に位置する、請求項 8 に記載の核酸または核酸セット。

【請求項 10】

請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の MHC ベースのキメラ受容体を発現する、遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 11】

T 細胞である、請求項 10 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 12】

以下の特徴：

- (a) 内因性 T 細胞受容体 (TCR) の活性が抑制される；
- (b) 内因性 TCR のアルファ鎖、内因性 TCR のベータ鎖、またはその両方が、内因性 TCR の表面発現を阻害するように変異または欠失している；
- (c) 内因性 CD52 の発現が阻害される；
- (d) 自殺遺伝子、マーカー遺伝子をさらに発現する；または
- (e) 以下の特徴のうちの 1 つ以上を示すようにさらに改変もしくは操作されている：
 - (I) リンパ節への送達および保持、
 - (II) VAP-1、L-セレクチン、CCR7、またはその組合せを過剰発現する、
 - (III) 三次リンパ節または異所性リンパ節への送達および保持のための 1 つまたは複数の表面分子を発現する、
 - (IV) 内因性スフィンゴシン-1-リン酸受容体 1 の発現が阻害されている、
 - (V) IL6ST ノックアウト、IL6R ノックアウト、またはその両方を有する、
 - (VI) ケモカイン受容体を発現または過剰発現する、
 - (VII) 接着受容体を発現または過剰発現する、および
 - (VIII) PD-1 シグナル伝達の遮断を示す；

のうちの 1 つ以上を含む、請求項 11 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 13】

前記自殺遺伝子が RQR8 である、および／または
前記マーカー遺伝子が蛍光タンパク質遺伝子である、
請求項 12 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 14】

前記ケモカイン受容体が、炎症組織への病的細胞の遊走に關与する、

前記接着受容体が、炎症領域への病的な免疫細胞のトラフィッキングに關与する、および／または

P D - 1 シグナル伝達の遮断が、P D - 1 ノックアウト、P D - L 1 ノックアウト、またはその組合せによるものである、

請求項 1 2 または 1 3 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 5】

前記ケモカイン受容体が、C C R 5、C X C R 3、C C R 4、C C R 3、C C R 6、C X C R 3、C X C R 4、C X C R 5、またはその組合せを含む、または

前記接着受容体が、V L A - 4、 $\alpha_4\beta_1$ 、 $\alpha_4\beta_7$ 、 $\alpha_L\beta_2$ 、またはその組合せを含む、

請求項 1 4 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 6】

前記免疫細胞は、C D 2 5 + である制御性 T 細胞である、または

前記免疫細胞は、細胞傷害性 T 細胞である細胞傷害性リンパ球である、

請求項 1 0 ～ 1 5 のいずれか 1 項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 7】

前記制御性 T 細胞は、末梢血単核細胞から単離された C D 2 5 + + C D 4 5 R + T 細胞に由来する；

前記細胞傷害性 T 細胞は、末梢血単核細胞から単離された C D 8 + T 細胞に由来する；

前記制御性 T 細胞は、C D 2 5 をコードする導入遺伝子を含む；および／または

前記制御性 T 細胞は、F o x P 3 をコードする導入遺伝子を含む；

請求項 1 6 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 8】

前記制御性 T 細胞または前記細胞傷害性 T 細胞が、C D 1 9 に特異的なキメラ受容体、C S - 1 に特異的なキメラ受容体、またはその両方をさらに発現する；

前記制御性 T 細胞または前記細胞傷害性 T 細胞が、C C R 6、C X C R 5、P D - 1、またはその組合せをさらに発現する；あるいは

前記制御性 T 細胞または前記細胞傷害性 T 細胞が、自己抗原に特異的な抗体を提示する、および／または抗炎症性サイトカインを分泌する、

請求項 1 7 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 9】

前記制御性 T 細胞または前記細胞傷害性 T 細胞が、表 1 に列記される自己抗原である前記自己抗原を提示する、請求項 1 8 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 2 0】

前記自己抗原が M O G である、請求項 1 9 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 2 1】

前記制御性 T 細胞または前記細胞傷害性 T 細胞が、I L - 3 5、I L - 1 0、および／または T G F - β を含む、前記抗炎症性サイトカインを分泌する、請求項 1 8 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 2 2】

対象において自己免疫疾患を治療するのに使用するための、請求項 1 0 ～ 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 2 3】

前記自己免疫疾患が多発性硬化症である、請求項 2 2 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 2 4】

前記対象が、C D 5 2 に特異的な抗体を含む療法を受けている、または

前記対象が、多発性硬化症を有するかそのリスクがある、ヒト患者であり、前記遺伝子改変免疫細胞が、請求項 1 6 ～ 2 1 のいずれか 1 項に記載される制御性 T 細胞または細胞傷害性 T 細胞である、

10

20

30

40

50

請求項 2 3 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 2 5】

対象において自己免疫疾患を治療するのに使用するための、請求項 1 6 ～ 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子改変免疫細胞であって、

(A) 前記対象が、早期ステージ MS を有するヒト患者であり、前記制御性 T 細胞または細胞傷害性 T 細胞が、前記 MHC ベースのキメラ受容体を発現し、かつ以下の遺伝子改変：

- (i) PD-L1 および／または PD-1 ノックアウト、
- (ii) CCR6 および／または CXCR5 の表面発現、
- (iii) MOG に特異的な抗体またはその抗原結合断片の表面提示、ならびに
- (iv) CD19 を標的化するキメラ受容体の表面発現

の 1 つまたは複数を有する；

(B) 前記対象が、再発寛解性 MS または早期ステージ進行性を有するヒト患者であり、前記制御性 T 細胞または細胞傷害性 T 細胞が、前記 MHC ベースのキメラ受容体を発現し、かつ以下の改変：

- (i) CD19 を標的化するキメラ受容体の表面発現、および
- (ii) CXCR5 の表面発現

の 1 つまたは複数を有する；

(C) 前記対象が、再発寛解性 MS または早期ステージ進行性を有するヒト患者であり、前記制御性 T 細胞または細胞傷害性 T 細胞が、前記 MHC ベースのキメラ受容体を発現し、かつ以下の改変：

- (i) MOG に特異的な抗体またはその抗原結合断片の表面提示、および
- (ii) CCR6 の表面発現

の 1 つまたは複数を有する；あるいは

(D) 前記対象が、慢性進行性形態の MS を有するヒト患者であり、前記制御性 T 細胞または細胞傷害性 T 細胞が、前記 MHC ベースのキメラ受容体を発現し、かつ以下の改変：

- (i) CS-1 を標的化するキメラ受容体の表面発現、ならびに
- (ii) CXCR4 および／または CXCR3 を標的化する作用物質の表面発現

の 1 つまたは複数を有する、

遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 2 6】

対象において自己免疫疾患を治療するのに使用するための、請求項 1 6 ～ 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子改変免疫細胞であって、前記制御性 T 細胞および前記細胞傷害性 T 細胞の両方を含む、遺伝子改変免疫細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2017 年 11 月 10 日に出願された米国仮出願第 62 / 584, 449 号の出願日の利益を主張する。この参照出願の内容全体は参照することにより本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

自己免疫疾患は、自己抗原に対する異常な免疫応答により特徴付けられ、組織の損傷または破壊に繋がる。多発性硬化症 (multiple sclerosis; MS) は、中枢神経系の自己免疫疾患であり、活性化された自己反応性 T 細胞が血液脳関門に侵入し、ミエリン破壊および軸索喪失に繋がる炎症応答を開始させる。MS の病因、その発症および進行と関連付けられる機序、ならびにそのアウトカムは決定は解明されないままであるが、全ての利用可能な証拠は、MS に関与する病的な免疫細胞を特異的に標的化する療法は、利用可能な療法に対して向上した治療アウトカムを有することを示唆する。Reinhard et al., Proceed

10

20

30

40

50

ings of the National Academy of Sciences, 101(suppl 2):14599-14606; 2004。
この戦略は、関節リウマチを含む類似の機序を有する他の免疫障害に拡張され得る。Carol et al., Nature Reviews Immunology, 2(2):85-95, 2002。

【0003】

ヒトにおいてヒト白血球（HLA）として公知の主要組織適合複合体（MHC）は、外来作用物質を認識するために免疫系にとって必須の細胞表面タンパク質のセットである。MHC複合体は病原体に由来する抗原に結合し、それをT細胞に提示し、次にT細胞が活性化され、外来抗原を提示する細胞の除去に繋がる。MHC複合体はまた、インタクトな、および一部の場合にはミスフォールディングした、宿主由来タンパク質をB細胞に提示し、それにより、自己免疫障害に特徴的な自己抗体応答を誘導することがある。Jiang et al., International immunology, 25(4):235-246 (2013)、およびBusch et al., The EMBO journal, 15(2):418, (1996)。

【発明の概要】

【0004】

態様では、本開示は、主要組織適合複合体（MHC）ベースのキメラ受容体（CAR）であって、（i）自己免疫疾患に関与する抗原からの抗原ペプチドに共役したMHC分子の細胞外ドメイン、および（ii）細胞質シグナル伝達ドメイン、少なくとも1つの共刺激ドメイン、またはその組合せを含む、MHCベースのCARを特徴とする。MHCベースのCARは、（i）と（ii）との間に位置するヒンジドメインをさらに含んでもよい。抗原ペプチドは自己免疫障害に依存し、ミエリン塩基性タンパク質（MBP）、プロテオリピドタンパク質（PLP）、インスリン、グルタミン酸デカルボキシラーゼ、または表1に記載されるような追加の例示的な自己抗原からのものであってもよい。

【0005】

一部の例では、MHCベースのキメラ受容体は、少なくとも1つの共刺激ドメインを含み、少なくとも1つの共刺激ドメインは、4-1BB（CD137）からの共刺激ドメイン、CD28からの共刺激ドメイン、またはその組合せであってもよい。他の例では、本明細書に記載されるようなMHCベースのキメラ受容体は、細胞質シグナル伝達ドメインを含まなくてもよい。代替的または追加的に、MHC-CARは、CD3ζの細胞質シグナル伝達ドメインを含む。

【0006】

一部の実施形態では、MHC-CAR中のMHC分子は、クラスI MHC、例えば、ヒトクラスI MHCである。一部の事例では、キメラ受容体の細胞外ドメインは、抗原ペプチドに融合したクラスI MHCのアルファ鎖の細胞外ドメインを含む。例えば、キメラ受容体は、（i）クラスI MHC分子の細胞外ドメイン、および（ii）細胞質ドメイン、少なくとも1つの共刺激ドメイン、またはその組合せを含む融合ポリペプチドであってもよい。一例では、キメラ受容体は融合ポリペプチドであり、融合ポリペプチドは、N末端からC末端へ、シグナルペプチド、第1のペプチドリンカー、抗原ペプチド、第2のペプチドリンカー、マクログロブリンの細胞外ドメイン、第3のペプチドリンカー、クラスI MHC分子、膜貫通ドメイン、少なくとも1つの共刺激ドメイン、およびCD3ζを含む。

【0007】

他の実施形態では、本明細書に記載されるようなMHCベースのキメラ受容体は、クラスII MHC（例えば、ヒトMHC II）またはその部分を含む。そのようなキメラ受容体は、第1のMHCクラスIIの細胞外ドメインを含む第1のポリペプチド、および第2のMHCクラスIIのベータ鎖の細胞外ドメインを含む第2のポリペプチドを含んでもよく、かつ、抗原ペプチドは、第1のポリペプチドまたは第2のポリペプチドのいずれかに融合しており、かつ、第1のポリペプチドまたは第2のポリペプチドのいずれかは、細胞質シグナル伝達ドメイン、少なくとも1つの共刺激ドメイン、またはその組合せをさらに含む。一部の例では、キメラ受容体は、（i）第1のMHCクラスII分子のアルファ鎖の細胞外ドメイン、（ii）第2のMHCクラスII分子のベータ鎖の細胞外ドメイン

、(i i i) 抗原ペプチド、および(i v) 細胞質シグナル伝達ドメイン、少なくとも1つの共刺激ドメイン、またはその組合せを含む融合ポリペプチドであり得る。一部の例では、抗原タンパク質は、MHCクラスIIに連結されていなくてもよく、かつ、代わりに、代替的なシグナルペプチド(例えば、CD150からのもの、すなわち、MDPKGLLSLTFLFLSLAFG(配列番号:388))を有する別々の融合ポリペプチドとして発現されてもよい。一部の例では、第1のMHCクラスIIはHLA-DRA*1010である。代替的または追加的に、第2のMHCクラスIIはHLA-DRB1*1501である。

【0008】

別の態様では、本開示は、核酸または核酸セットであって、全体として本明細書に記載されるMHCベースのキメラ受容体のいずれかをコードする、核酸または核酸セットを特徴とする。一部の事例では、核酸または核酸セットは、1つまたは複数のベクター、例えば、ウイルスベクター中に位置し得る。

【0009】

さらに、本開示は、遺伝子改変免疫細胞(例えば、T細胞)であって、本明細書に記載されるMHCベースのキメラ受容体のいずれかを発現する、遺伝子改変免疫細胞(例えば、T細胞)を提供する。一部の事例では、内因性T細胞受容体(TCR)の活性は抑制され得、該抑制は、内因性TCRのアルファ鎖、内因性TCRのベータ鎖、または両方を突然変異または欠失させて内因性TCRの表面発現を阻害することにより達成されてもよい。代替的または追加的に、内因性CD52の発現は阻害され得る。

【0010】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるような遺伝子改変免疫細胞は、自殺遺伝子(例えば、RQR8)、マーカー遺伝子(例えば、GFP)、または両方をさらに発現してもよい。必要な場合、免疫細胞は、リンパ節または三次リンパ臓器への送達および保持のためにさらに改変され得る。例えば、免疫細胞は、VAP-1、L-セレクチン、CCR7、CXCR5、またはその組合せを過剰発現するようにさらに操作され得る。一部の事例では、内因性スフィンゴシン-1-リン酸受容体1の発現は、遺伝子改変免疫細胞中で阻害され得る。

【0011】

一部の実施形態では、免疫細胞は、例えば、CCR6(例えば、Th17細胞の部位へ)、CXCR3もしくはCXCR4(例えば、血漿細胞の部位へ)などのケモカイン受容体を使用して、または膜連結型抗原標的化抗体を通じて、炎症の部位に移行するように操作され得る。代替的または追加的に、遺伝子改変免疫細胞は、PD-1シグナル伝達の遮断を結果としてもたらす遺伝子改変をさらに含んでもよい。必要があり、かつ障害が特に重篤な場合、MHC-CAR細胞はまた、バースタンダーB細胞(CD19もしくはCD20-CARを用いる)または血漿細胞(CS1-CARおよび/もしくはCS1ノックアウトを用いる)を除去または不活性化する(inactive)ように設計され得る。

【0012】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるような遺伝子改変免疫細胞は制御性T細胞であってもよく、制御性T細胞は、CD25+、および任意選択的にCD4+であり得る。一部の事例では、制御性T細胞は、末梢血単核細胞または臍帯血から単離されたCD25++CD45R+ T細胞に由来し得る。他の事例では、制御性T細胞は、CD25をコードする導入遺伝子を含んでもよい。本明細書に開示される任意のTreg細胞は、CD19に特異的なキメラ受容体、CS-1に特異的なキメラ受容体、または両方をさらに発現してもよい。代替的または追加的に、制御性T細胞は、CCR6、CXCR5、PD-1、またはその組合せをさらに発現してもよい。一部の例では、制御性T細胞は、MOGに特異的な抗体を提示してもよい。

【0013】

さらに別の態様では、本開示は、自己免疫疾患(例えば、多発性硬化症)を有する対象において自己反応性免疫細胞を抑制する方法を提供する。方法は、対象に有効量の本明細

10

20

30

40

50

書に記載されるような遺伝子改変免疫細胞を投与することを含んでもよく、該遺伝子改変免疫細胞はT細胞であり得る。

【0014】

一部の実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は自己細胞である。他の実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は同種細胞である。任意の遺伝子改変免疫細胞が対象のリンパ節に投与されてもよい。一部の事例では、対象は、CD52に特異的な抗体を含む療法を受けている。

【0015】

一部の実施形態では、対象は、多発性硬化症を有するまたはそのリスクがあるヒト患者であり、かつ、遺伝子改変T細胞は、本明細書に記載されるようなTreg細胞または細胞傷害性リンパ球（CTL）である。

【0016】

一部の例では、ヒト患者は早期ステージMS患者であり、かつ、Treg細胞は、MHC-CARを発現し、かつ以下の遺伝子改変：（i）PD-L1および／またはPD-1ノックアウト、（ii）CCR6および／またはCXCR5の表面発現、（iii）MOGに特異的な抗体またはその抗原結合断片の表面提示、ならびに（iv）CD19を標的化するキメラ受容体の表面発現の1つまたは複数を有する。一部の例では、患者は、同じ種類の改変を有する細胞傷害性CTLを用いて最初に、同時に、または交互に治療されてもよい。

【0017】

一部の例では、ヒト患者は、再発寛解性MSまたは早期ステージ進行性MSを有し、かつ、Treg細胞は、MHC-CARを発現し、かつ以下の改変：（i）MOGに特異的な抗体または抗原結合断片の表面提示、および（ii）CCR6の表面発現の1つまたは複数を有する。一部の例では、患者は、同じ種類の改変を有する細胞傷害性CTLを用いて最初に、同時に、または交互に治療されてもよい。

【0018】

一部の例では、ヒト患者は、再発寛解性MSまたは早期ステージ進行性MSを有し、かつ、Treg細胞は、MHC-CARを発現し、かつ以下の改変：（i）CD19を標的化するキメラ受容体の表面発現、および（ii）CXCR5の表面発現の1つまたは複数を有する。一部の例では、患者は、同じ改変を有するCTLを用いて最初に、同時に、または交互に治療されてもよい。

【0019】

一部の例では、ヒト患者は、慢性進行性形態のMSを有し、かつ、Treg細胞は、MHC-CARを発現し、かつ以下の改変：（i）CS-1を標的化するキメラ受容体の表面発現、ならびに（ii）作用物質CXCR4、CCR6、および／またはCXCR5の表面発現の1つまたは複数を有する。一部の例では、患者は、同じ改変を有するCTLを用いて最初に、同時に、または交互に治療されてもよい。

【0020】

一部の実施形態では、対象は、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、若年性特発性関節炎（若年性特発性関節炎としても公知）、シェーグレン症候群、全身性硬化症、強直性脊椎炎、1型糖尿病、自己免疫性甲状腺疾患（グレーブス病および橋本病）、多発性硬化症、重症筋無力症、炎症性腸疾患（クローン病または潰瘍性大腸炎）、乾癬、または表1に記載される疾患を有するまたはそのリスクがあるヒト患者であり、かつ、遺伝子改変T細胞は、本明細書に記載されるようなTreg細胞および／またはCTLである。

【0021】

一部の例では、ヒト患者は、本明細書に記載される任意の自己免疫障害（例えば、表1に列記されるもの）の早期ステージ患者であり、かつ、Treg細胞は、MHC-CARを発現し、かつ以下の遺伝子改変：（i）PD-L1および／またはPD-1ノックアウト、（ii）CCR6および／またはCXCR5の表面発現、（iii）その自己免疫障害について表1において自己抗原として記載される関連するタンパク質に特異的な抗体またはその抗原結合断片の表面提示、ならびに（iv）CD19を標的化するキメラ受容体

10

20

30

40

50

の表面発現の1つまたは複数を有する。一部の例では、患者は、同じ改変を有するCTLを用いて最初に、同時に、または交互に治療されてもよい。

【0022】

一部の例では、ヒト患者は、本明細書に記載されるような任意の自己免疫障害（例えば、表1に列記されるもの）の中等度に重篤な病態を有し、かつ、Treg細胞は、MHC-CARを発現し、かつ以下の改変：（i）その自己免疫障害について表1において自己抗原として記載される関連するタンパク質に特異的な抗体または抗原結合断片の表面提示、および（ii）CCR6の表面発現の1つまたは複数を有する。一部の例では、患者は、同じ改変を有するCTLを用いて最初に、同時に、または交互に治療されてもよい。

【0023】

一部の例では、ヒト患者は、本明細書に記載されるような任意の自己免疫障害（例えば、表1に列記されるもの）の中等度に重篤な病態を有し、かつ、Treg細胞は、MHC-CARを発現し、かつ以下の改変：（i）CD19を標的化するキメラ受容体の表面発現、および（ii）CXCR5の表面発現の1つまたは複数を有する。一部の例では、患者は、同じ改変を有するCTLを用いて最初に、同時に、または交互に治療されてもよい。

【0024】

一部の例では、ヒト患者は、本明細書に記載される任意の自己免疫障害（例えば、表1に列記されるもの）の重篤な病態を有し、かつ、Treg細胞は、MHC-CARを発現し、かつ以下の改変：（i）CS-1を標的化するキメラ受容体の表面発現、ならびに（ii）CXCR4、CCR6、および／またはCXCR5を標的化する作用物質の表面発現の1つまたは複数を有する。一部の例では、患者は、同じ改変を有するCTLを用いて最初に、同時に、または交互に治療されてもよい。

【0025】

自己免疫疾患の治療において使用するための医薬組成物、Treg細胞などの本明細書に記載されるような遺伝子改変免疫細胞発現MHC-CARおよび薬学的に許容される担体を含む組成物、ならびに標的自己免疫疾患の治療において使用するための医薬の製造のためのそのような遺伝子改変免疫細胞の使用もまた本開示の範囲内である。

【0026】

本発明の1つまたは複数の実施形態の詳細は、以下の記載に示される。本発明の他の特徴または利点は、以下の図面およびいくつかの実施形態の詳細な説明、そしてまた添付の特許請求の範囲から明らかとなる。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】図1は、抗原特異的T細胞受容体（TCR）の発現のためのレンチウイルス発現ベクターの例示的な設計の概略図である。mRNAおよびマルチシストロン性mRNAの設計は類似である。

【図2】図2は、多発性硬化症（MS）に関与する病的なT細胞を標的化するためのミエリン塩基性タンパク質（MBP）ペプチドとの共役として指し示されるようなMHC-CARの様々な設計を発現するMHC-CAR T細胞の概略図である。任意選択的に、MHC-CAR T細胞は、内因性TCRおよび／またはCD52がノックアウトされていてもよい。MHC-CAR T細胞は、細胞表面上にRQR8をさらに発現してもよい。

【図3】図3は、様々なMHC-CARコンストラクトのための例示的な設計の概略図である。例示的なMHC-CARコンストラクトは、2つのサブユニット：リーダー配列、DRA*1010ドメイン、および細胞質ドメインを含有するα鎖、ならびにHLA-DRB1*1501からのリーダー配列、MBPからのペプチド、およびHLA-DRB1*1501からのドメインを含むβ鎖を有してもよい。mRNAを作製するために使用されるDNAは、単鎖を含有するか、またはマルチシストロン性でありかつオルソゴナル2A配列により分離されている。RQR8およびeBFP（またはGFP）は、細胞対照および標識化の両方のために使用される。

【図4】図4は、eBFP（もしくはGFP）またはRQR8をさらに含んでもよい、M

10

20

30

40

50

B P ペプチドを含有する様々な M H C - C A R コンストラクトのための発現カセットの例示的な設計の概略図である。

【図 5】図 5 は、M H C - C A R ならびに任意選択的に e B F P および／または R Q R 8 などの標識タンパク質のためのレンチウイルス発現コンストラクトの例示的な設計の概略図である。そのような発現カセットは、1つのレンチウイルスパッケージ中に含めるために十分に小さい。

【図 6】図 6 は、タグ付加のための多数の部位を含んでもよい、M H C - C A R の例示的な設計の概略図である。部位 1 は、ナীব H L A - D R が発現されないか、または C I E I T A 編集に起因する場合のための H L A - D R 抗体結合部位である。部位 2 および 3 は、ポリヒスチジンタグモチーフのための潜在的な挿入部位である。部位 4 および 5 はそれぞれ R Q R および R Q R 8 を表す。

10

【図 7】図 7 は、抗原ペプチドに連結された M H C クラス I I 部分の例示的な設計の概略図である。「N」はポリペプチドの N 末端を指す。黒丸のドットは抗原ペプチドを指す。

【図 8 A】図 8 A および図 8 B は、M H C クラス I の例示的なコンストラクトの概略図である。図 8 A は、抗原ペプチドに連結された M H C クラス I 部分の例示的な設計を示す。

「N」はポリペプチドの N 末端を指す。黒丸のドットは抗原ペプチドを指す。

【図 8 B】図 8 B は、M H C クラス I C A R コンストラクトのための例示的な発現カセットを示す。

【図 9】図 9 は、M H C - C A R を構築するためおよびサイトカインの共発現の考慮のための例示的な共刺激ドメインおよびその組合せを示す。

20

【図 10 - 1】図 10 は、M H C クラス I およびクラス I I の両方の成分を含有する複数鎖 M H C - C A R コンストラクトを含む、例示的な一本鎖および複数鎖 M H C クラス I およびクラス I I M H C - C A R コンストラクトを示す。

【図 10 - 2】同上。

【図 11】図 11 は、C a s 9 をコードする m R N A (「C a s 9 単独」) または C a s 9 をコードする m R N A (「C a s 9 単独」) および T 細胞受容体アルファドメイン (T R A C) をコードする遺伝子を標的化する s g R N A (「C a s 9 + T R A C g R N A」) をトランスフェクトした初代ヒト刺激 C D 3 + T 細胞 (T C E L L - 0 0 2 8) 上の C D 3 発現を示すプロットである。

【図 12】図 12 は、殺傷アッセイにおける相対的な細胞生存を示すプロットである。コンストラクト 1、コンストラクト 2、またはコンストラクト 1 および 2 の両方をトランスフェクトした H E K - 2 9 3 細胞を培地単独、リツキシマブ、補体、またはリツキシマブおよび補体の両方とインキュベートした。

30

【発明を実施するための形態】

【0028】

自己反応性 T 細胞 (例えば、多発性硬化症に関与するミエリン成分についてのもの) は、正常な個体中に存在する。疾患誘導の決定因子の大部分は、これらの自己反応性 T 細胞が自己免疫患者 (例えば、M S 患者) において誘発された場合に起こる免疫応答のクラスにある。病的な自己反応性 T 細胞の生成は、特定の主要組織適合複合体 (M H C) および非 M H C 遺伝子の両方に好都合であり、個体が反応するタンパク質配列および免疫応答のクラスを決定する。

40

【0029】

免疫攻撃が開始自己抗原 (例えば、M S におけるミエリン抗原) に対して始まると、他の自己抗原への反応性の拡大が起こり、すなわち、T 細胞が 1 つの自己抗原 (例えば、M S における脳タンパク質) を攻撃する場合、他の構造物が損傷し、それらは、「エピトープ拡大」と呼ばれるプロセスにおいて、追加の T 細胞を増感して他の標的を攻撃することがあり、これは、全ての自己免疫障害に共有され、かつ一般に疾患応答に共通するプロセスである。

【0030】

B 細胞は、初期の自己反応性の攻撃により引き起こされる早期疾患病変、例えば、活性

50

MS 病変における免疫反応の通常成分である。B 細胞の蓄積は、詰め込まれた凝集物または異所性の B 細胞濾胞として起こる。Serafini et al., Brain Pathol. 14: 164-144 (2004); Wekerle, Autoimmunity, 50:1, 57-60 (2017); および Probstel, et al., International journal of molecular sciences, 16(7), pp.16576-16592 (2015)。MS において、B 細胞は、RR、SP、および P ステージの MS 患者の脳および脊髄において見出されることが報告された。直接的または間接的のいずれかで B 細胞を標的化する治療処置は、MS などの自己免疫疾患の治療において有益であることが証明されている。Wekerle, 2017。

【0031】

CD4+ T 細胞および CD8+ T 細胞の両方が MS 病変において存在し、疾患発症において中心的役割を果たすと考えられている。ミエリン反応性 (MBP、PLP、および MOG) CD4 および CD8 細胞の頻度の増加が健常対照と比較して MS 患者において見出される。Cao, et al., Sci. Transl. Med. 7 (287), 287ra74 (2014); Martin, et al., J. Exp. Med. 173 (Jan 1, 1991); Ota, et al., Nature 346, 183 (Jul 12, 1990); Pette, et al., Neurology 40, 1770 (1990); および Raddassi, et al., J. Immunol. 187, 1039 (2011)。

【0032】

IFN-γ を産生する Th1 細胞および Th17 細胞は独特に病原性である。Th1 細胞の発生に有利に働く因子が MS 患者において上昇しており、そしてまたウイルス感染により誘発される：ガンマインターフェロン；IL-12。免疫系に影響しかつ MS を助けるほぼ全ての治療において、ほぼ全てが Th1 応答を減少させ、Th2 および Th3 応答を増加させる。Th17 細胞は組織炎症の部位に存在し、自己免疫／慢性炎症状態に関与する。Th17 産生 CD4 および CD8 細胞は、患者の病変、血液、および CSF において増加している。[Tzartos 2008; Matusevicius 1999; Bruchlacher-Waldert 2009]。Th17 細胞上の CCR6 および CD161 は、炎症組織へのホーミング分子であると推定されている [Cosmi, 2008]。

【0033】

Th17 細胞はまた、全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus)、関節リウマチ、若年性特発性関節炎 (若年性特発性関節炎としても公知)、シェーグレン症候群、全身性硬化症、強直性脊椎炎、1 型糖尿病、自己免疫性甲状腺疾患 (グレーブス病および橋本病)、重症筋無力症、炎症性腸疾患 (クローン病または潰瘍性大腸炎)、および乾癬などの多数の他の自己免疫疾患に関与する。Tabarkiewicz et al., Archivum immunologiae et therapiae experimentalis, 63(6):435-449 (2015)。

【0034】

自己免疫疾患に対するあらゆる治療の究極的目標は、病理の完全な抑制である。多発性硬化症および他の自己免疫障害の場合、病的なリンパ球 (B 細胞および T 細胞の両方、ならびに必要な場合、非常に重篤な症例について血漿細胞) は、疾患経過を停止させるために除去または制御されることが期待され、疾患進行の異なるステージにおける介入は異なる細胞標的、およびしたがって治療用細胞を必要とする。

【0035】

自己反応性 T 細胞などの自己反応性免疫細胞を標的化するための主要組織適合複合体 (MHC) ベースのキメラ受容体 (MHC-CAR) が本明細書に開示される。本明細書に記載されるような MHC-CAR は、1 つまたは複数の MHC ポリペプチドまたはその細胞外ドメインおよび 1 つまたは複数の細胞シグナル伝達ドメイン、例えば、細胞質シグナル伝達ドメイン (例えば、CD3 ζ からのもの)、少なくとも 1 つの共刺激ドメイン (例えば、4-1BB もしくは CD28 からのもの)、または両方を含む。MHC-CAR は、自己抗原または自己免疫応答の誘発において自己抗原を模倣する外来抗原からの抗原ペプチドをさらに含んでもよい。MHC-CAR をコードする核酸、それを有するベクター、ならびに MHC-CAR を発現する T 細胞およびナチュラルキラー (NK) 細胞などの遺伝子操作された免疫細胞もまた本明細書にある。そのような遺伝子操作された免疫細胞

10

20

30

40

50

は、自己反応性免疫細胞を標的化し、それにより、自己反応性免疫細胞を伴う自己免疫疾患の治療において利益を得るために使用され得る。

【0036】

本明細書に開示されるようなMHCベースのキメラ受容体を発現する遺伝子改変制御性T (Treg) 細胞もまた本明細書に開示される。そのようなTreg細胞は、T細胞および／またはB細胞表面マーカーを標的化するキメラ受容体（複数可）の他に、例えば、特定の組織部位（例えば、リンパ節もしくは炎症部位）を標的化するためまたは免疫応答をモジュレート（例えば、チェックポイントモジュレーション）するための追加の遺伝子操作を用いてさらに改変されてもよい。遺伝子改変Treg細胞は、標的疾患の早期ステージにおいて病原性を阻害するため、疾患の中期ステージ（例えば、再発性もしくは寛解性MS）において疾患進行を制御するため、または、疾患の後期ステージ（例えば、慢性進行性MS）において、例えば病的なCD8+ T細胞の細胞傷害性の誘導を介して、病理を抑制するために使用されてもよい。

【0037】

I. 主要組織適合複合体（MHC）ベースのキメラ受容体（MHC-CAR）

本明細書に記載されるMHCベースのキメラ受容体（MHC-CAR）は、抗原ペプチド（例えば、ミスフォールディングしたもの）に共役したMHC部分、および細胞質シグナル伝達ドメイン（例えば、CD3ζのもの）、1つもしくは複数の共刺激ドメイン（例えば、4-1BBもしくはCD28のもの）、またはその組合せであり得る少なくとも1つの細胞シグナル伝達部分を含む。一部の事例では、抗原ペプチドは、MHC-CARの融合ポリペプチドの部分であり得る。他の事例では、抗原ペプチドは、MHC-CARと融合ポリペプチドを形成せずにMHC-CARと複合体を形成する。本明細書において使用される場合、「共役した」という用語は、少なくとも2つの成分が、共有結合を介してまたは非共有結合性相互作用を介して、物理的に会合していることを意味する。

【0038】

一部の例では、MHC-CARは、MHC部分、抗原ペプチド、および少なくとも1つの細胞シグナル伝達部分を含む単一の融合ポリペプチドであり得る。そのような単一の融合ポリペプチドは、好適な免疫細胞中で発現された場合に内因性細胞膜タンパク質（例えば、β-ミクログロブリン）と複合体を形成してもよい。

【0039】

他の例では、本明細書に記載されるMHC-CARは、抗原ペプチドを含む1つのポリペプチドを含む、複数鎖タンパク質複合体、例えば、ヘテロ二量体であってもよい。一部の事例では、抗原ペプチドまたはポリペプチドは、別々のポリペプチドとして発現されてもよく、該別々のポリペプチドは、MHC成分と複合体（例えば、三量体）を形成してもよい。抗原ポリペプチドは、MHCに結合するミスフォールディングした抗原タンパク質であり得る。任意選択的に、MHC-CARはヒンジドメインをさらに含んでもよく、ヒンジドメインは、抗原ペプチドおよび／もしくはMHC部分、N末端のシグナルペプチド、ならびに／または1つもしくは複数のタグ付加部位、例えば、ヒスチジンタンパク質タグおよび／もしくは殺傷スイッチ部位として追加的に作用するRQRドメインに隣接してもよい。

【0040】

(i) MHC-CARの成分

(a) MHC部分

本明細書に開示されるMHC-CARコンストラクトはMHC部分を含み、MHC部分は、1つまたは複数のMHCポリペプチドまたはその細胞外ドメインを含んでもよい。MHC部分は、好適な供給源、例えば、ヒトまたは非ヒト哺乳動物（例えば、サル、マウス、ラット、ウサギ、ブタなど）に由来してもよい。一部の事例では、MHC部分は、ヒトMHC分子（HLAとしても公知）からのものである。一部の事例では、他の細胞からの分子（TCRまたはBCR）と相互作用するドメインは、ヒトMHC分子からのものである。主に2つのクラスのMHC分子、MHCクラスI分子およびMHCクラスII分子が

あり、これらの両方は、本明細書に記載されるMHC-CARを構築するために使用され得る。様々な種（例えば、ヒト、非ヒト霊長動物、イヌ科動物、魚、オビッド（ovids）、ウシ科動物、ウマ科動物、イノシシ科動物、ネズミ科動物、およびガルス属動物）のMHCクラスIおよびクラスII分子の配列が公的な遺伝子データセット、例えば、EMBL-EBIにより提供されるIPD-MHCデータベースおよびIMGT/HLAデータベースならびに米国国立生物工学情報センター（NCBI）により提供されるdbMHCデータベースから入手可能である。

【0041】

MHCクラスI分子は、アルファ鎖およびβ-ミクログロブリンを含有するヘテロ二量体である。アルファ鎖の細胞外ドメインは、3つのサブドメイン、α1、α2、およびα3を含む。一部の実施形態では、MHC部分は、MHCクラスI分子のアルファ鎖、またはその細胞外ドメイン、例えば、α1ドメイン、α2ドメイン、α3ドメイン、もしくはその組合せを含んでもよい。MHCクラスI分子は、ヒトHLA-A分子、ヒトHLA-B分子、またはヒトHLA-C分子であってもよい。一部の事例では、MHCクラスI分子のアルファ鎖は、β-ミクログロブリンと融合して、単鎖融合タンパク質を生じてよい。一部の例では、MHCクラスI部分はHLA-A3からのものであり、これはPLPペプチドと併用され得る。Honma et al., J. Neuroimmunol. 73:7-14 (1997)。他の例では、MHCクラスIはHLA-A2からのものであり、これは同じPLPペプチドおよびTAXなどのウイルスペプチドの提示と共に使用され得る。TAXは、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス（system lupus erythematosus）、およびシェーグレン症候群などの疾患に関与する、ヒト神経タンパク質の分子模倣物であるタンパク質taxまたはp40（Genbankアクセッション番号BAB20130.1）およびHTLV-1ウイルスからのものである。Garboczi, et al. The Journal of Immunology, 157(12):5403-5410, 1996. Quaresma, et al., 2015. Viruses, 8(1):5 2015。クラスIタンパク質およびペプチドは、重鎖の位置84における不変チロシンのアラニンによる置換など、よりロバスタなペプチドローディングを可能とするための改変を追加的に含有してもよく、または代替的に、ジスルフィドトラップを作製するためにペプチド-β2mリンカーの第2の位置が置換され得るように位置84のチロシンはシステインにより置換され得る。Hansen et al. Trends in immunology, 31(10):363 (2010)。

【0042】

MHCクラスI分子と同様、MHCクラスII分子もまた、2つの相同ペプチド、α鎖およびβ鎖からなるヘテロ二量体である。α鎖およびβ鎖のそれぞれの細胞外ドメインは、2つのサブドメインα1/α2、およびβ1/β2を含有する。MHCクラスII分子がMHC-CARを構築するために使用される場合、MHC部分は、2つのサブユニットを含んでもよく、1つはα鎖またはその部分、例えば、その細胞外ドメイン（例えば、α1、α2、または両方）を含み、他方はβ鎖またはその部分、例えば、その細胞外ドメイン（例えば、β1、β2、または両方）を含む。他の細胞種と相互作用する領域のみが使用される場合（すなわち、α1およびβ1）、ミニMHCのフォールディングを増進するために特定のアミノ酸改変が必要とされることがある；シェード領域を有するミニ配列およびBirnbaum et al.を参照。MHCクラスII分子は、ヒトHLA-DP分子、ヒトHLA-DM分子、ヒトHLA-DOA分子、ヒトHLA-DOB分子、ヒトHLA-DQ分子、またはヒトHLA-DR分子であってもよい。一部の例では、MHCクラスII分子はヒトHLA-DR分子、例えば、HLA-DR*1501である。

【0043】

(b) 抗原ペプチド

本明細書に記載されるMHC-CARの抗原ペプチドは、自己免疫疾患に関与する病原性免疫細胞（例えば、自己反応性T細胞またはB細胞）により認識可能な抗原ペプチドである。好適なMHC分子により提示される場合、そのような抗原ペプチドは、病原性T細胞の抗原特異的T細胞受容体と相互作用して、下流の免疫応答に繋がる。

【0044】

一部の事例では、特定の抗原ペプチドは、当該技術分野において公知の方法を使用して、MS患者などの特定の自己免疫疾患患者のために設計され得る。NetMHCのようなプログラムは、患者MHCに特異的な抗原ペプチドの個別化された設計を可能とし、個別化されたがんワクチンを開発するために使用されている。Hacohen et al., *Cancer immunology research*, 1(1):11-15 (2013)。自己免疫障害のための個別化されたCAR TおよびTreg療法もまた本開示の範囲内である。非常に強いMHC関連性を有する障害（例えば、MS）について、個別化された療法を利用して、疾患の異なるステージにある大きい患者クラスを治療することができる。最近の研究はまた、自己免疫障害に關与するクラスII MHCおよび特にHLAは、プロセシングされたペプチドだけでなく抗原タンパク質全体を提示し得ることを実証している。Jiang et al., *International immunology*, 25(4):235-246, (2013)。これらのMHC-タンパク質複合体は、適切にフォールディングしたタンパク質に結合しない抗体の他に、特定の自己免疫障害を有する者に特異的な自己抗体を含む、自己免疫障害における自己抗体産生を誘導するようである。本発明者らは、MHC-CAR中の抗原タンパク質の提示は、多くの激しい試みにもかかわらずタンパク質へのその特異性が解明されていないオリゴクローナルバンドを生じさせるMSにおけるものなどの、自己免疫特異的B細胞を除去または不活性化させる特定の経路を提供できるものとする。Owens et al., *Annals of neurology*, 65(60):639-649, 2009; Chastre et al., *New England Journal of Medicine*, 374(15):1495-1496, 2016; Housley et al., *Clinical Immunology*, 161(1):51-58, 2015; Larman et al., 2013. *Journal of autoimmunity*, 43:1-9, 2013。抗原タンパク質がMHCに結合しない場合、その特定のMHC-CARは発現されないが、TregまたはCTLとしてそれは依然としてその他の特徴に依存しておよび異なる特異性を有するMHC-CAR TおよびTreg細胞の患者特異的集団の部分として免疫応答の調節におけるバイスタンダーの役割を果たすことができる。

【0045】

本発明において使用される抗原ペプチドは、自己免疫疾患に關与する自己抗原、例えば、多発性硬化症に關与するミエリン塩基性タンパク質(MBP)、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(MOG)、およびプロテオリピドタンパク質(PLP)、I型糖尿病に關与するインスリンおよびグルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD)、関節リウマチ(RA)に關与するトリプターゼ、ならびに以下の表1に含まれるタンパク質の断片であってもよい。代替的に、抗原ペプチドは、自己免疫疾患に關与する自己抗原に高度に相同的なウイルスまたは細菌タンパク質などの病原体タンパク質の断片であり得る。そのような抗原ペプチドはまた、病原性T細胞を標的化し得る。必要な場合、抗原ペプチドは、別々に発現されて本明細書に記載されるMHC-CARのMHC部分に直接的に結合し得る（典型的にミスフォールディングした）抗原タンパク質またはタンパク質断片であり得る。天然の状態（MHC-CARのMHC部分ではなくMHCに結合している）において、そのような抗原タンパク質/MHC複合体は、病原性B細胞を刺激して自己抗体を産生させる。関節リウマチにおけるIgGHまたはリウマトイド因子(Jin et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(10):3787-3792, 2014)、抗リン脂質症候群(Tanimura et al., *Blood*, 125(18):2835-2844, 2015)および再発性流産(Tanimura et al., *Placenta*, 46:108, 2016)におけるβ2-糖タンパク質I、自己免疫性肺胞蛋白症におけるGM-CSF(Hamano et al., *ALVEOLAR MACROPHAGE BIOLOGY* B32:A3147-A3147, 2016)、白斑におけるチロシナーゼ(Arase et al., *Journal of Dermatological Science*, 84(1):e87, 2016)、ならびに顕微鏡的多発血管炎におけるミエロペルオキシダーゼ(Hiwa et al., *Arthritis & Rheumatology*, 69(10):2069-2080, 2017)などのタンパク質について、ミスフォールディングしたバリアント/HLA複合体のHLA媒介性の表面提示、および一部の場合には自己抗体結合が起こり得る。

【0046】

本明細書に記載されるMHC-CARにおいて使用するための抗原ペプチドは、20個

までのアミノ酸残基、抗原タンパク質の細胞外ドメイン、または全長抗原タンパク質を含有してもよい。MHCクラスⅠ部分と併用される場合、抗原ペプチドは、8～10アミノ酸の長さであってもよい。そのような抗原ペプチドは、MHCクラスⅠ分子のペプチド結合部位に良好にフィットする。MHCクラスⅠ部分と併用される抗原ペプチドはより長くてもよく、例えば、抗原タンパク質の15～24アミノ酸残基または全長までを含有し、その理由は、MHCクラスⅠ分子の抗原結合溝は両方の末端において開いているが、クラスⅠ分子上の対応する抗原結合溝は各末端において通常閉じているからである。自己免疫障害に関与するMHCクラスⅠ分子の開いた抗原結合溝はまた、インタクトな（但し、例えば、ミスフォールディングした）抗原タンパク質またはスプライスバリエントを頻繁に提示し得る。Jiang et al., International immunology, 25(4):235-246, 2013.

10

【0047】

一部の例では、ヒトMBPの断片は、本明細書に記載されるMHC-CARを構築するために使用される。ヒトMBPの例示的なアミノ酸配列を以下に提供する：

MASQKRPSQRHGSKYLATASTMDHARHGFLPRHRDTGILD
SIGRFFGGDRGAPKRGSGKVPWLKPGRSPLPSHARSQPGL
CNMYKDSHHPARTAHYGS L P Q K S H G R T Q D E N P V V H F F K N I
V T P R T P P P S Q G K G R G L S L S R F S W G A E G Q R P G F G Y G G R A S D
Y K S A H K G F K G V D A Q G T L S K I F K L G G R D S R S G S P M A R R H H H
HHH（配列番号：1）

【0048】

20

例示的なMBP抗原ペプチドとしては以下が挙げられるがこれらに限定されない：

GSKYLATASTMDHARHGFLPRHRDTGILDSIGRFFGGDRG
（配列番号：2）、KYLATASTMDHARHGFLPRH（配列番号：3）、AT
ASTMDHARHGFLPRHRDTGIL（配列番号：4）、RDTGILDSIG
RFFGGDRGAP（配列番号：5）、IGRFFGGDRGAPKRGSGKDSH
HPARTAHY（配列番号：6）、APKRGSGKDSHHAARTAHY（配列番
号：7）、GSGKDSHHPARTAHYGS L P Q（配列番号：8）、HHPART
AHYGS L P Q K S H G R（配列番号：9）、HAARTAHYGS L P Q K S Q G H
R（配列番号：10）、S L P Q K S H G R T Q D E N P V V H F（配列番号：11）、
P Q D E N P V V H F F K N I V T P R T P（配列番号：12）、T Q D E N P V V H F
F K N I V T P R T P（配列番号：13）、Q D E N P V V H F F K N I V T P R T P（
配列番号：14）、D E N P V V H F F K N I V T P R T P P（配列番号：15）、E N
P V V H F F K N I V T P R（配列番号：16）、E N P V V H F F K N I V T P R T P
（配列番号：17）、E N P V V H F F K N I V T P（配列番号：18）、N P V V H F
F K N I V T P R T P P P S Q（配列番号：19）、V V H F F K N I V T P R T（配列
番号：20）、V V H F F K N I V T P R T P P P S Q G K（配列番号：21）、K N I
V T P R T P P P S Q G K G R G L（配列番号：22）、P S Q G K G R G L S L S R F
S W G A E（配列番号：23）、G K G R G L S L S R F S W G A E G Q R P（配列番号
：24）、L S R F S W G A E G Q R P G F G Y G G（配列番号：25）、Q R P G F G
Y G G R A S D Y K S A H K（配列番号：26）、A S D Y K S A H K G F K G V D A Q
G T（配列番号：27）、F K G V D A Q G T L S K I F K L G G R（配列番号：28）
、V D A Q G T L S K I F K L G G R D S R S（配列番号：29）、およびS K I F K L
G G R D S R S G S P M A R R（配列番号：30）。

30

40

【0049】

配列番号：15のMBP抗原ペプチドをコードする例示的な核酸配列を以下に提供する：

GATGAGAAATCCCGTGGTTCA T T T T T T T A A G A A C A T C G T C A
C A C C G C G C A C C C C A C C T G（配列番号：411）

【0050】

特定の例としては、MBP13-32、MBP89-101、MBP83-99、MBP111-129、またはMBP146-170が挙げられる。

50

【0051】

ヒトミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質、プロテオリピドタンパク質、およびミエリン結合糖タンパク質の例示的なアミノ酸配列を以下に提供する：

>CAA52617. 1ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 [ホモサピエンス]
 MASLSRPSLPSCCLCSFLLLLLLQVSSSYAGQFRVIGPRHP
 IRALVGDEVELPCRISPGKNATGMEVGWYRPPFSRVVHLY
 RNGKDQDGDQAPEYRGRTELLKDAIGEGKVTLRIRNVRF
 DEG GFT CFFRDHSYQEEAAMELKVEDPFYWVSPGVLVLLA
 VLPVLLLLQITVGLVFLCLQYRLRGKLR AEIENLHRTFDPH
 FLRVPCWKITL FVI V PVLGPLVALI ICYNWLHRRLAGQFL
 EELRNPF (配列番号：31)

10

【0052】

例示的なMOG抗原ペプチドとしては、MOG1-20またはMOG35-55が挙げられる。

>AAA60117. 1プロテオリピドタンパク質 [ホモサピエンス]

【化1】

MGLLECCARCLVGAPFASLVATGLCFFGVALFCGCGHEALTG
TEKLIETYFSKNYQDYEYLINVIHAFQYVIYGTASFFFLYGA
 LLLAEGFYTTGAVRQIFGDYKTTICGKGLSATVTGGQKGRGS
 RGQHQAHS�ERVCTCLGKWLGHDPK FVGITYALT VVWLLVFA
 CSAVPVYIYFNTWTTTCQSIAFPSKTSASIGSLCADARMYGVL
 PWNAFP GKVC GSNLLSICKTAEFQMTFHLFIAAFVGAAATLV
 SLLTFMIAATYNFAVLKLMGRGTKF (配列番号：32)

20

【0053】

PLPの例示的な抗原断片を下線および太字としている。他の例としては、PLP139-151(4)またはPLP178-191が挙げられる。

>AAH93045. 1ミエリン結合糖タンパク質 [ホモサピエンス]

MIFLTALPLFWIMISASRGGHWGAWMPSSISAFEGTCVSI
 PCRFD F PDEL RPAVVHGVWYFNSPYPKNYPPVVFKSRTQV
 VHESFQGRSRL LGDLGLRNCTLLLSNVSPELGGKY YFRGD
 LGGYNQYTFSEHSVLDIVNTPNIVVPPEVVAGTEVEVSCM
 VPDNCPELRPELSWLGHEGLGEP AVLGR LREDEGTWVQVS
 LLHFVPTREANGHRLGCQASFPNTTLQFEGYASMDVKYPP
 VIVEMNSSVEAIEGSHVSL LCGADSNPPPLLTWMRDGTVL
 REAVAESLLLEEEVTPAEDGVYACLAENAYGQDNRTVGL
 SVMYAPWKPTVNGTMVAVEGETV S ILCSTQSNPDPI LTIF
 KEKQILSTVIYESELQLELPAVSPEDDGEYWCVAENQYGG
 RATAFNLSVEFAPVLLLESHCAAARDTVQCLCVVKSNPEP
 SVA FELPSRNVTVNESEREFVYSERSGLVLT S I L T L R G Q A
 QAPPRVICTARNLYGAKSLELPFQGAHRLMWAKIGPVGAV
 VAFAILIAIVCYITQTRRKKNVTESPSFSAGDNPPVLFSS
 DFRISGAPEKYESKEVSTLESH (配列番号：33)

30

40

【0054】

以下の表1は、他の自己免疫疾患と関連付けられる追加の例示的な自己抗原を提供する。

表1. 様々な自己免疫障害の自己抗原

【表 1】

自己抗原	GenBankアクセッション番号	関連する自己免疫疾患
ドーパクロムトートメララーゼ	AAH28311. 1	円形脱毛症
黒色腫抗原gp100	AAC60634. 1	円形脱毛症
メラノサイトタンパク質Pmel	NP_001186983. 1	円形脱毛症
メラノサイト刺激ホルモン受容体	NP_002377. 4	円形脱毛症
トリコヒアリン	AAA65582. 1	円形脱毛症
チロシン3-モノオキシゲナーゼ	NP_954986. 2	円形脱毛症
アミロイドベータA4タンパク質	NP_000475. 1	アルツハイマー病
血管作動性腸管ポリペプチド受容体1	NP_004615. 2	強直性脊椎炎
潜伏性膜タンパク質2	CAA57360. 1	強直性脊椎炎
ニトロゲナーゼ鉄タンパク質	ART03999. 1	強直性脊椎炎
アグリカンコアタンパク質	NP_001126. 3	強直性脊椎炎
ベータ-2-糖タンパク質1	NP_000033. 2	抗リン脂質症候群
Mタンパク質前駆体	AAA26918. 1	抗リン脂質症候群
大テグメントタンパク質	ACL51127. 1	抗リン脂質症候群
ステロイド21-ヒドロキシラーゼ	NP_000491. 4	自己免疫性副腎炎
ステロイド17-アルファ-ヒドロキシラーゼ/17,20リアーゼ	NP_000093. 1	自己免疫性副腎炎

10

20

30

40

50

カリウム輸送ATPアーゼアルファ鎖	AAB50172.1	自己免疫性胃炎
カリウム輸送ATPアーゼベータ鎖	AAA35987.1	自己免疫性胃炎
シトクロムP450 2D6	ABB77909.1	自己免疫性肝炎
ゲノムポリプロテイン	S35630	自己免疫性肝炎
O-ホスホセリル-tRNA (Sec) セレニウム トランスフェラーゼ	NP_058651.3	自己免疫性肝炎
アシアロ糖タンパク質受容体	AAB58308.1	自己免疫性肝炎
グルタチオンS-トランスフェラーゼ	CAA48637.1	自己免疫性肝炎
サイトケラチン8	AAB18966.1	自己免疫性肝炎
Mタンパク質	AAA26918.1	自己免疫性心筋炎
ミオシン-7	NP_000248.2	自己免疫性心筋炎
心臓ミオシン軽鎖1	AAF91089.1	自己免疫性心筋炎
心臓ミオシン軽鎖2	AAA91832.1	自己免疫性心筋炎
心臓アクチン	NP_005150.1	自己免疫性心筋炎
トロポニンI	AC14461.1	自己免疫性心筋炎
甲状腺ペルオキシダーゼ	AAA61217.2	自己免疫性甲状腺炎
チロトロピン受容体	AAB23390.2	自己免疫性甲状腺炎
サイログロブリン	NP_003226.4	自己免疫性甲状腺炎
S-アレスチン	NP_000532.2	自己免疫性ぶどう膜炎 (Autoimmune uvelitis)
LAMP2	AAB67314.1	自己免疫性血管炎
ミエロペルオキシダーゼ	AAA59863.1	自己免疫性血管炎
ミエロブラスチン	NP_002768.3	自己免疫性血管炎
アルファ-グリアジン	AFX69628.1	セリアック病
タンパク質-グルタミンガンマ-グルタ ミルトランスフェラーゼ2	NP_004604.2	セリアック病
75kガンマセカリン	ADP95479.1	セリアック病
ガンマ1ホルディン	AFM77738.1	セリアック病
アベニン-3様	ADA62372.1	セリアック病
グリコシルトランスフェラーゼ	ANR93567.1	クローン病
60kDa熱ショックタンパク質、ミトコン ドリア	NP_002147.2	クローン病
膜貫通タンパク質UO-44D	NP_002147.2	クローン病
GM-CSF	AAA52578.1	クローン病
スクラーゼ-イソマルターゼ、腸	NP_001032.2	クローン病
グルタチオンペルオキシダーゼ2	NP_002074.2	クローン病
60kDaシヤペロニン2	ARX70571.1	クローン病
膵臓分泌糖タンパク質2	NP_001493.2	クローン病
60kDaシヤペロニン2	OMH58317.1	クローン病

10

20

30

40

50

細胞骨格結合タンパク質5	EAW67976.1	クローン病
AhpC	ETZ42359.1	クローン病
ロイコトリエンB4受容体2	NP_062813.2	クローン病
クロモドメイン-ヘリカーゼ-DNA結合タンパク質4	NP_001264.2	皮膚筋炎
クロモドメイン-ヘリカーゼ-DNA結合タンパク質3	NP_001005273.1	皮膚筋炎
ベータ-1アドレナリン作動性受容体	NP_000675.1	拡張型(Dilated)心筋症
ムスカリン性アセチルコリン受容体M2	NP_001006633.1	拡張型心筋症
コラーゲンアルファ-3(IV)鎖	CAA56335.1	グッドパスチャー症候群
チロトロピン受容体	AAB23390.2	グレーブス病
甲状腺ペルオキシダーゼ	AAA61217.2	グレーブス病
サイログロブリン	CAA29104.1	グレーブス病
グルタミン酸デカルボキシラーゼ2	NP_000809.1	グレーブス病
TSHRタンパク質	AAI27629.1	グレーブス病
甲状腺ペルオキシダーゼ	AAA61217.2	橋本甲状腺炎
チログロビン	CAA29104.1	橋本甲状腺炎
甲状腺刺激ホルモン受容体	AAI41971.1	橋本甲状腺炎
インスリン	AAA59172.1	低血糖症(Hypoglycemia)
インスリン受容体	AAA59452.1	低血糖症
インテグリンベータ-3	NP_000203.2	免疫性血小板減少性紫斑病
インテグリンアルファ-IIb	NP_000410.2	免疫性血小板減少性紫斑病
血小板糖タンパク質Ibアルファ鎖	NP_000164.5	免疫性血小板減少性紫斑病
血小板糖タンパク質IIIa	AAA52600.1	免疫性血小板減少性紫斑病
トロンボポエチン	AAB03393.1	免疫性血小板減少性紫斑病
インスリン受容体	AAA59452.1	インスリン抵抗性糖尿病
ホスホリパーゼA2	NP_000919.1	膜性腎炎
ミエリン塩基性タンパク質	AAC41944.1	多発性硬化症
ミエリンプロテオリピドタンパク質	AAA59565.1	多発性硬化症
ミエリン-オリゴデンドロサイト糖タンパク質	CAA52617.1	多発性硬化症
エプスタイン-バー核抗原1	Q1HVF7.1	多発性硬化症
DNAポリメラーゼ触媒サブユニット	AMD82168.1	多発性硬化症
2',3'-環状ヌクレオチド3'-ホスホジエステラーゼ	AAB24298.2	多発性硬化症
オリゴデンドロサイト-ミエリン糖タン	AAA59970.1	多発性硬化症

10

20

30

40

50

パク質		
アクアポリン-4	AAH22286.1	多発性硬化症
アクチン、細胞質1	NP_001092.1	多発性硬化症
トランスポザーゼ、ミューテーターフ ァミリータンパク質	EUA40098.1	多発性硬化症
E4遺伝子産物	YP_002640224.1	多発性硬化症
タンパク質BOLF1	AIE89051.1	多発性硬化症
ミエリン結合糖タンパク質	AAH93045.1	多発性硬化症
トランスアルドラーゼ	NP_006746.1	多発性硬化症
潜在的トランスポザーゼ	CCP46656.1	多発性硬化症
クローディン-11	NP_005593.2	多発性硬化症
インターフェロンベータ	AAC41702.1	多発性硬化症
アルファ-クリスタリンB鎖	ACA05949.1	多発性硬化症
アポリポタンパク質E	AAB59518.1	多発性硬化症
エプスタイン-バー核抗原6	AAA45895.1	多発性硬化症
トランス活性化因子タンパク質BZLF1	BAP94413.1	多発性硬化症
ヘマグルチニン	ALB07770.1	多発性硬化症
タンパク質S100-B	NP_006263.1	多発性硬化症
DNAポリメラーゼ触媒サブユニット	SCL76875.1	多発性硬化症
トリパータイトターミナーゼサブユニ ットUL15	SCL76864.1	多発性硬化症
グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロ ゲナーゼ	CAA25833.1	多発性硬化症
アルファ-エノラーゼ	CAA34360.1	多発性硬化症
ニューロフィラメント軽ポリペプチド	NP_006149.2	多発性硬化症
コネキシン43	AAA52131.1	多発性硬化症
ニューロフィラメントミディアムポリ ペプチド	NP_005373.2	多発性硬化症
POTEアンキリンドメインファミリーメ ンバーI	NP_001264335.1	多発性硬化症
60kDa熱ショックタンパク質、ミトコン ドリア	NP_002147.2	多発性硬化症
エプスタイン-バー核抗原3	BAP94411.1	多発性硬化症
推定HTLV-1関連内因性配列	CAA34646.1	多発性硬化症
グリア線維性酸性タンパク質	AAB22581.1	多発性硬化症
ホスホマンノムターゼ/ホスホグルコム ターゼ	OPA62825.1	多発性硬化症
マイナーキャプシドタンパク質L2	P36745.1	多発性硬化症
N-アセチルムラモイル-L-アラニンアミ ダーゼCw1H	KIX84070.1	多発性硬化症

10

20

30

40

50

ATP感受性内向き整流カリウムチャネル10	NP_002232.2	多発性硬化症
mRNA核外輸送因子ICP27ホモログ	YP_401659.1	多発性硬化症
アセチルコリン受容体サブユニットアルファ	NP_001034612.1	重症筋無力症
アセチルコリン受容体サブユニットガンマ	NP_005190.4	重症筋無力症
アセチルコリン受容体サブユニットデルタ	NP_000742.1	重症筋無力症
アセチルコリン受容体サブユニットイプシロン	NP_000071.1	重症筋無力症
ムスカリン性受容体	AAB95158.1	重症筋無力症-MUSC
アクアポリン4	AAH22286.1	視神経脊髄炎
アルファ-シヌクレイン	NP_000336.1	パーキンソン病
DNAポリメラーゼプロセシビティ因子	SB007788.1	パーキンソン病
デスモグレイン-3	NP_001935.2	天疱瘡 (Phemphigus)
コラーゲンアルファ-1 (XVII) 鎖	NP_000485.3	天疱瘡
デスモグレイン-1	NP_001933.2	天疱瘡
グルタミン酸デカルボキシラーゼ2	NP_000809.1	前糖尿病
60kDa熱ショックタンパク質、ミトコンドリア	NP_002147.2	前糖尿病
インスリン	AAA59172.1	前糖尿病
インスリン、アイソフォーム2	NP_001035835.1	前糖尿病
膵島細胞抗原	NP_002837.1	前糖尿病
ビルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体のジヒドロリポイルリジン残基アセチルトランスフェラーゼ成分	NP_001922.2	原発性胆汁性胆管炎
ビルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体のジヒドロリポイルリジン残基アセチルトランスフェラーゼ成分	OAF98393.1	原発性胆汁性胆管炎
2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ複合体のジヒドロリポイルリジン残基スクシニルトランスフェラーゼ成分	WP_032229692.1	原発性胆汁性胆管炎
グリコーゲンホスホリラーゼ	AAC18079.1	原発性胆汁性胆管炎
核膜孔糖タンパク質210	NP_079199.2	原発性胆汁性胆管炎
サルコシンデヒドロゲナーゼ	AAD32214.1	原発性胆汁性胆管炎
亜硫酸オキシダーゼ	AAA74886.1	原発性胆汁性胆管炎
トランスグルタミナーゼ	BAA14329.1	原発性胆汁性胆管炎
核自己抗原Sp-100	NP_001073860.1	原発性胆汁性胆管炎

10

20

30

40

50

2-オキシグルタル酸デヒドロゲナーゼ複合体のジヒドロリポイルリジン残基スクシニルトランスフェラーゼ成分、ミトコンドリア	NP_001924.2	原発性胆汁性胆管炎
核膜孔p62	AAA59990.1	原発性胆汁性胆管炎
Mタンパク質前駆体	AAA26918.1	乾癬
ケラチン、I型細胞骨格16	NP_005548.2	乾癬
ケラチン、I型細胞骨格17	NP_000413.1	乾癬
ADAMTS様タンパク質5	NP_998769.2	乾癬
転写活性化因子	AHF70996.1	乾癬性関節炎
フィブリノーゲンアルファ鎖	AAI01936.1	乾癬性関節炎
ビメンチン	NP_003371.2	乾癬性関節炎
ネブリン関連アンカータンパク質	AI26408.1	乾癬性関節炎
Mタンパク質	CAM31002.1	リウマチ熱
ミオシン-2	NP_060004.3	リウマチ熱
フィブリノーゲンベータ鎖	AAI06761.1	関節リウマチ
ビメンチン	NP_003371.2	関節リウマチ
リウマトイド因子 (IgG)	AAH73766.1	関節リウマチ
グルコース-6-リン酸イソメラーゼ	ARJ36701.1	関節リウマチ
コラーゲンアルファ-1 (II) 鎖	NP_001835.3	関節リウマチ
フィブリノーゲンアルファ鎖	AAI01936.1	関節リウマチ
アルファ-エノラーゼ	CAA34360.1	関節リウマチ
トリプターゼ前駆体	AAA86934.1	関節リウマチ
フィラグリン	NP_002007.1	関節リウマチ
アグリカンコアタンパク質	NP_001126.3	関節リウマチ
小核リボ核タンパク質Sm D1	NP_008869.1	関節リウマチ
リボソームタンパク質L23a	AAB17510.1	関節リウマチ
60kDaシャペロニン2	OMH58317.1	関節リウマチ
トランス活性化因子タンパク質BZLF1	BAP94413.1	関節リウマチ
エプスタイン-バー核抗原1	YP_401677.1	関節リウマチ
シャペロンタンパク質DnaJ	EDV64758.1	関節リウマチ
60kDa熱ショックタンパク質、ミトコンドリア	NP_002147.2	関節リウマチ
キチナーゼ-3様タンパク質1	NP_001267.2	関節リウマチ
mRNA核外輸送因子ICP27ホモログ	YP_401659.1	関節リウマチ
アレスチン	AAC50992.1	関節リウマチ、虹彩炎
タンパク質BOLF1	AIE89051.1	関節リウマチ、若年性
60kDa熱ショックタンパク質、ミトコンドリア	NP_002147.2	関節リウマチ、若年性

10

20

30

40

50

主要DNA結合タンパク質	BAX36606.1	関節リウマチ、若年性
ケラチン、II型細胞骨格3	NP_476429.2	関節リウマチ、若年性
フィブリリン1	BAD16739.1	関節リウマチ、若年性
テネイシン前駆体	NP_002151.2	関節リウマチ、若年性
ストロメリシン-1プロプレタンパク質	NP_002413.1	関節リウマチ、若年性
間質コラゲナーゼ	NP_002412.1	関節リウマチ、若年性
OspA	CAA32579.1	関節リウマチ、ライム
インテグリンアルファ-L	NP_002200.2	関節リウマチ、ライム
DNAトポイソメラーゼ1	NP_003277.1	強皮症/全身性硬化症
ヒストンH3様セントロメアタンパク質A	NP_001800.1	強皮症/全身性硬化症
小核リボ核タンパク質Sm D1	NP_008869.1	強皮症/全身性硬化症
主要セントロメア自己抗原B	NP_001801.1	強皮症/全身性硬化症
E3ユビキチン-タンパク質リガーゼ TRIM21	NP_003132.2	強皮症/全身性硬化症
エプスタイン-バー核抗原1	YP_401677.1	強皮症/全身性硬化症
U11/U12 snRNP	Q6IEG0	強皮症/全身性硬化症
rRNA 2' -O-メチルトランスフェラーゼ フィブリラリン	NP_001427.2	強皮症/全身性硬化症
リボヌクレアーゼPタンパク質サブユニットp25	NP_060263.2	強皮症/全身性硬化症
60kDa SS-A/Roリボ核タンパク質	NP_001166995.1	シェーグレン症候群
ループスLaタンパク質	NP_003133.1	シェーグレン症候群
E3ユビキチン-タンパク質リガーゼ TRIM21	NP_003132.2	シェーグレン症候群
ムスカリン性アセチルコリン受容体M3	NP_000731.1	シェーグレン症候群
小核リボ核タンパク質Sm D1	NP_008869.1	シェーグレン症候群
U1小核リボ核タンパク質A	NP_004587.1	シェーグレン症候群
推定HTLV-1関連内因性配列	CAA34646.1	シェーグレン症候群
カルレチクリン	AAB51176.1	シェーグレン症候群
スペクトリンアルファ鎖、非赤血球1	NP_001123910.1	シェーグレン症候群
ベーターチューブリン	AAB59507.1	シドナム舞踏病
ドパミン受容体1	NP_000785.1	シドナム舞踏病
ドパミン受容体2	NP_000786.1	シドナム舞踏病
60kDa SS-A/Roリボ核タンパク質	NP_001166995.1	全身性エリテマトーデス (Systemic lupus erythematosis)
小核リボ核タンパク質Sm D1	NP_008869.1	全身性エリテマトーデス

10

20

30

40

50

U1小核リボ核タンパク質70kDa	NP_003080.2	全身性エリテマトーデス
ナチュラルキラー群タンパク質2-A	AAC17488.1	全身性エリテマトーデス
小核リボ核タンパク質結合タンパク質BおよびB'	NP_937859.1	全身性エリテマトーデス
小核リボ核タンパク質結合タンパク質N	NP_001336393.1	全身性エリテマトーデス
E3ユビキチン-タンパク質リガーゼ TRIM21	NP_003132.2	全身性エリテマトーデス
エプスタイン-バー核抗原1	YP_401677.1	全身性エリテマトーデス
U1小核リボ核タンパク質C	NP_003084.1	全身性エリテマトーデス
NHP2様タンパク質1	NP_001003796	全身性エリテマトーデス
60S酸性リボソームタンパク質P2	XP_805182.1	全身性エリテマトーデス
ヒストンH1.4	NP_005312.1	全身性エリテマトーデス
グルタミン酸デカルボキシラーゼ2	NP_000809.1	1型糖尿病
インスリン	AAA59172.1	1型糖尿病
膵島細胞抗原	NP_002837.1	1型糖尿病
グルコース-6-ホスファターゼ2	NP_066999.1	1型糖尿病
60kDa熱ショックタンパク質、ミトコンドリア	AAH02676.1	1型糖尿病
亜鉛トランスポーター2	AAP44332.1	1型糖尿病
インスリン、アイソフォーム2	NP_001035835.1	1型糖尿病
ゲノムポリプロテイン	AAX23962.1	1型糖尿病
膵島アミロイドポリペプチド	NP_000406.1	1型糖尿病
ヘマグルチニン	ALB07770.1	1型糖尿病
膵島アミロイドポリペプチド	NP_000406.1	2型糖尿病
亜鉛トランスポーター8	AAP44332.1	2型糖尿病
膵臓分泌糖タンパク質2	NP_001493.2	潰瘍性大腸炎
GM-CSF	AAA52578.1	潰瘍性大腸炎
ミエロプラスチン	NP_002768.3	潰瘍性大腸炎
VII型コラーゲン	AAA96439.1	潰瘍性大腸炎
メラノサイトタンパク質PMEL	NP_001186983.1	白斑
メラニン濃縮ホルモン受容体1	NP_005288.3	白斑
チロシン3-モノオキシゲナーゼ	NP_954986.2	白斑
チロシナーゼ	NP_000363.1	白斑
L-ドーパクロムトートメラーゼ	NP_001913.2	白斑
TrpC1	NP_001238774.1	白斑
ミエロプラスチン	NP_002768.3	ウェゲナー肉芽腫症
コラーゲンアルファ-1(II)鎖	NP_001835.3	ウェゲナー肉芽腫症

10

20

30

40

【0055】

以下の表2は、一般的に自己免疫障害と関連付けられるHLAおよびクラスを提供するが、例示的な場合において、HLAまたはHLAの部分は患者特異的であり、障害を患う患者の高分解能配列または血清学的同等物に由来する。

【0056】

表2. 一般的に自己免疫疾患と関連付けられるHLAの種類およびクラス

50

【表 2】

一般的なHLAクラスII血清型	一般的なクラスIIバリエーション	一般的なHLAクラスI血清型	一般的なクラスIバリエーション	関連付けられる自己免疫疾患
DR4(例えば、DRB1*04);およびDR5(例えば、DRB1*11およびDRB1*12)	DRB1*04:01; DRB1*11; および DRB1*11:04	A2(例えば、A*02)	A*02; A*02:01; および B*07:02	円形脱毛症
		A2		アルツハイマー病
		B27(例えば、B*2701-2759); B40(例えば、B*40); B27-B40;および B7(例えば、B*07)	B*27:02; B*27:05; B*40:01; B*52;および B*38	強直性脊椎炎
DR7(例えば、DRB1*0701-0705); DR4;DR5;および DR12(例えば、DRB1*1201-3およびDRB1*1206)	DRB1*09; DRB1*09:01; DRB1*04; DRB1*04:05; および DRB1*14			抗リン脂質症候群
DR17(例えば、DRB1*0301およびDRB1*0304);DR4; DR4/DR3; DQ2(例えば、DQB1*02);および DQ8(例えば、DQB1*0302)	DRB1*03:01; DRB1*04;および DRB1*04:04			自己免疫性副腎炎
DR2(例えば、DRB1*15およびDRB1 DR4;DR5; DR2/DR4;および DR4/DR5				自己免疫性胃炎

10

20

30

40

50

	DRB1*03:01; DRB3*01:01; DRB1*04:01; DRB1*04:05; DRB1*07;および DRB1*13:01			自己免疫性肝炎
DR7;DR4; DR11 (例えば、 DRB1*1101- DRB1*1110); DR3 (例えば、 DRB1*03);および DR11-DQ7.5	DRB1*04:09; DRB1*07;および DRB1*04			自己免疫性心筋炎
		B27; A29 (例えば、 A*29);および B51 (例えば、 B*51)	A*29:02; および B*57:01	自己免疫性ぶどう膜炎
DQ2;DQ8; DR12-DQ7.5;および DR7-DQ2.2	DQA1*05:01/D QB1*02:01; DQA1*03/DQB1 *03:02;および DQA1*0505/DQ BA1*0301			セリアック病
DR1 (例えば、 DRB1*01);およびDR3	DRB1*07; DRB1*01:03; DRB1*0301; DRB1*0302;お よび DRB3*0301/DR B1*1302	B27		クローン病
	DRB1*0301;お よび DRB1*0302			皮膚筋炎
DR4	DRB1*0302			拡張型心筋症
DR2		B8 (例えば、 B*08)		グッドパスチャー症候群
DR17;DR52 (例えば、 DRB3*);およびDR7	DRB1*03:01; DRB1*04:01; DRB3*01;およ び DRB3*0202			グレーブス病

10

20

30

40

50

DR3;およびDR5				橋本甲状腺炎
DR4				免疫性血小板減少性紫斑病
DR3;DR4;およびDR3/DR4				インスリン抵抗性糖尿病
DR3	DRB1*01:02			膜性腎炎
DR2;DR15(例えば、DRB1*1505-5およびDRB1*1507);およびDR53(DRB4*)	DRB1*15:01; DRB1*15:01/D RB1*15:01; DRB1*15:01/D RB5*01:01; DRB1*15; DRB5*01:01; DPw2; DRB1*04:01; DRB1*04:04; DPA1*01:03/D PB1*02:01; DPA1*01:03/D PB1*04:01; DQA1*01:02/D QB1*05:02; DQB1*06;および DQB1*06:02	A3(A*03);およびB7		多発性硬化症
DR17;DR3;およびDR7	DRB1*03:01			重症筋無力症
DR14-DQ5				重症筋無力症-MUSC
DR3				視神経脊髄炎
DR患者特異的				パーキンソン病
DR4;およびDR6	DRB1*01:01; および DRB1*04:02			天疱瘡
DR3;DR4;およびDR3/DR4	DRB1*03:01;D RB1*04:01;および DRB1*03:01/* 04:01			前糖尿病
DR8(例えば、DRB1*0801-*0807およびDRB1*0810-*0812)	DRB1*0801;および DRB1*0803			原発性胆汁性胆管炎
DR7	DRB1*0102	B27;およびCw6(C*06:02)		乾癬

10

20

30

40

50

		よびC*06:05)		乾癬性関節炎
		B16(例えば、 B38および B39); B17(例えば、 B57および B58);B27; B39(例えば、 B*39);および Cw6		
DR7				リウマチ熱
DR4;DR4- DQ8;DR1;DR12;およ び DR18(例えば、 DRB1*0302および DRB1*0303)	DRB1*01:01; DRB1*01:02; DRB1*04:01; DRB1*04:02; DRB1*04:03; DRB1*04:04; DRB1*04:05; DRB1*04:06; DRB1*04:07; DRB1*04:08; DRB1*04:09; DRB1*04:10; DRB1*04:11; DRB1*04:12; DRB1*04:13; 上記について ホモ接合;; DRB1*01:01/* 04:04;および DRB1*01:01/* 04:01			関節リウマチ
DR4;DR5; DR14(例えば、 DRB1*1401-*1408お よびDRB1*1410- *1408);およびDR15	DRB1*04:01; DRB1*04:04; DRB1*04:05; DRB1*14:02; および DRB1*12:01			関節リウマチ、若年性
DR5;およびDR11	DRB1*04:01; DRB1*10:01; および DRB1*11:02			関節リウマチ、ライム
DR11;およびDR8	DRB1*11:04			関節リウマチ、小関節(若年 性)

10

20

30

40

50

DR5	DRB1*12:01	B35		関節リウマチ、虹彩炎
DR5	DQB1*05:01; DRB1*11; DRB1*11:04; DRB1*15:02; DRB1*13:02; DRB1*04:06;			強皮症/全身性硬化症
	DRB1*03 DRB1*15; DRB1*03:01/D RB1*15:01			シェーグレン症候群
DR1		B49(例えば、 B*49)		シドナム舞蹈病
DR11;およびDR53- DR7	DRB1*03:01; DRB1*15:01; DRB1*04:02; DRB1*04:03; DRB1*04:06; DRB1*11:01; および DRB3*03:01			全身性エリテマトーデス
DR3	DRB1*03:02; DRB1*04; DRB1*04:01; DRB1*04:02; DRB1*04:05; DRB1*03:01; および DRB1*03:01/D RB1*04:01			1型糖尿病
DR4				2型糖尿病
DR1	DRB1*01:03; および DRB1*15:02	B27		潰瘍性大腸炎
	DRB1*07:01		A*02:01	白斑
	DPB1*04			ウェゲナー肉芽腫症

【0057】

一部の実施形態では、本発明において使用される抗原ペプチドは、HLA-DR*1501、例えば、GADペプチドTYEIPVFLFYVTLKKMR（配列番号：34）（I型糖尿病に関与する）、上記に列記されるMBPペプチド、以下のMPPペプチド（MSに関与する）LLECCARCLVGAPFASLVATGLCFFGVALFC（配列番号：35）、LVGAPFASLVATGLCFFGVA（配列番号：36）、FGVALFCGCEVEALTGTEKLIETYFSKNYQD（配列番号：37）、LFCGCGHEALTGTEKLIETY（配列番号：38）、TGTEKLIETYFSKNYQDY EY（配列番号：39）、TGTEKLIETYFSKNYQDY EYL（配列番号：40）、YFSKNYQDY EYLINVIHAFQYVIYGTASFFFL（配列番号：41）、GTASFFFLYGALLLAYGFYTTGAVRQIFGDYK（配列番号：42）、LYGALLLAEGFYTTGAVRQI（配列番号：43）、FYTTGAVRQIFGDYKTTICG（配列番号：44）、AVRQIFGDYKTTICGKGLSATV（配列番号：45）、RQIFGDYKTTICGKGLSATVTGGQKGRGSRGQ（配列番号：46）、KGLSATVTGGQKGRGYRGQH（配列番号：47）、QKGRGSRGQHQAHSLE RV

CH (配列番号: 48)、KGRGSRGQHQAHS LERVCHCLGCWLGH PDKFV (配列番号: 49)、LGHPDKFVGITYALT VVWLLVFACSA VPVYIY (配列番号: 50)、SAVPVYIYFNTWTTTCQSIAAPCKT SASIGTLC (配列番号: 51)、AVPVYIYFNTWTTTCQSIAFP (配列番号: 52)、WTTTCQSIAFP SKT SASIGSL (配列番号: 53)、SASIGTLCADARMYGVL PWN AFFGKVC GSNLL (配列番号: 54)、KVC GSNLLSICKTAEFQMTFHLFIAAFVGAAA (配列番号: 55)、AAFGVGA AATLVSL LTFMIAATYNFAVLKLMGR (配列番号: 56)、MIAATYNFAVLKLMGRGRTKF (配列番号: 57)、およびMAA TYNFAVLKLMGRFTKF (配列番号: 58) と関連付けられる。

10

【0058】

一部の実施形態では、抗原ペプチドまたは抗原ポリペプチドは患者特異的であり、患者のMHCについて設計される。例えば、医師は、自己免疫障害を有する患者を診断し、疾患の重篤度を決定することができる。患者のクラスI (HLA-A、B、およびC) およびII (HLA-DR、DQ、DP) 領域を型別することができ、型別は現在では、DNAシーケンシングを使用し、参照データベース (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>) との比較を用いて高分解能で行うことができる。自己免疫関与の最も強い証拠を有する患者のクラスIおよびII MHCは、障害について同定され得る。特定の自己免疫障害と関連付けられることが既知のものを参照として使用することができる。例えば、表1および表2を参照。最も強い証拠ベースの抗原が障害 (iedb.org/) および表1について同定される。患者自己免疫関与MHCに結合することが期待される個別化されたペプチド (cbs.dtu.dk/services/NetMHC/ または cbs.dtu.dk/services/NetMHCII/) およびタンパク質標的 (クラスIIについて) のセットが同定され得る。

20

【0059】

病原性免疫細胞の標的化を可能とするために、個別化されたMHC-CARレンチウイルスまたはmRNAが患者のために調製され得る。個別化されたレンチウイルスは、追加の治療法、病原性細胞との所望の相互作用、所望の位置への経路制御 (病原性の炎症性もしくは炎症生成細胞との相互作用のため)、またはサイトカインの分泌 (炎症を低減するため) との併用治療を可能とするために受容体または細胞改変と組み合わせることができる自己または同種T細胞 (CTLおよび/またはTreg) を調製するために使用される。

30

【0060】

(c) 共刺激シグナル伝達ドメイン

多くの免疫細胞は、細胞増殖、分化および生存を促進する他に、細胞のエフェクター機能を活性化させるために、抗原特異的シグナルの刺激に加えて共刺激を必要とする。本明細書に記載されるMHC-CARは、1つまたは複数の共刺激シグナル伝達ドメインを含んでもよい。「共刺激シグナル伝達ドメイン」という用語は、本明細書において使用される場合、細胞内のシグナル伝達を媒介してエフェクター機能などの免疫応答を誘導するタンパク質の少なくとも一部分を指す。本明細書に記載されるMHC-CARの共刺激シグナル伝達ドメインは、シグナルを伝達し、T細胞、NK細胞、マクロファージ、好中球、または好酸球などの免疫細胞により媒介される応答をモジュレートする共刺激タンパク質からの細胞質シグナル伝達ドメインであり得る。

40

【0061】

宿主細胞 (例えば、免疫細胞) 中の共刺激シグナル伝達ドメインの活性化は、サイトカインの産生および分泌、貪食特性、増殖、分化、生存、ならびに/または細胞傷害性を増加または減少させるように細胞を誘導してもよい。任意の共刺激分子の共刺激シグナル伝達ドメインは、本明細書に記載されるMHC-CARにおいて使用するために適合性であってもよい。キメラ受容体において使用するための共刺激シグナル伝達ドメインの例は、B7/C D28ファミリーのメンバー (例えば、B7-1/C D80、B7-2/C D86、B7-H1/P D-L1、B7-H2、C D28、C TLA-4、I COS/C D278、またはP D-1) ; TNFスーパーファミリーのメンバー (例えば、4-1BB/

50

TNFSF9／CD137、4-1BBリガンド／TNFSF9、CD40／TNFRSF5、CD40リガンド／TNFSF5、DR3／TNFRSF25、OX40／TNFRSF4、OX40リガンド／TNFSF4、またはTNF-α（例えば、特定の薬物分子の存在下でのみ共刺激が誘導されることを可能とするFRB、およびFKBFなどの他の分子（但し、ここでは、特有のヘテロ二量体MHC-CARとの関連）が挙げられるがこれらに限定されない共刺激タンパク質の細胞質シグナル伝達ドメインであり得る。Wu et al., Science, 350(6258):aab4077, 2015。一部の実施形態では、共刺激タンパク質の任意の細胞質シグナル伝達ドメインが、不活性バイスタンダーB細胞（例えば、CD19もしくはCD20-CARを用いる）または血漿細胞（例えば、CS1-CARおよび／もしくはCS1ノックアウトを用いる）を標的化する受容体において使用されてもよい。

10

【0062】

一部の事例では、MHC-CARは、組合せ（例えば、2つまたは3つ）の共刺激ドメインを含んでもよく、これらの共刺激ドメインは、同じ共刺激受容体からのものまたは異なる共刺激受容体からのものであってもよい。例としては、CD28+4-1BB、CD28+FRB、CD28+FKBF、または4-1BB+FRBが挙げられる。図9も参照。一部の例では、MHC-CARは、CD28からの共刺激ドメイン、4-1BBからの共刺激ドメイン、または両方を含む。一部の実施形態では、共刺激ドメインは、短いリンカーにより先行される。例えば、クラスII MHC-CARについて短いリンカーはTS（すなわち、MHC内部リンカー）であってもよく、クラスI MHC-CARにつ

20

【0063】

一部の事例では、本明細書に記載されるMHC-CARコンストラクトは、共刺激ドメインを含まなくてもよい。代替的に、それは非伝統的の要素を含んでもよく、該要素は、TALENヌクレアーゼ、活性化因子、またはリプレッサーなどであり、これらは現在では、再コードまたは非反復含有TALドメインを使用して臨床応用可能なレンチウイルス形態で実施されてもよく、Notchに由来する膜ドメインを通じて単鎖MHC-CARに連結される。

【0064】

本明細書に記載されるMHC-CARにおいて使用するための例示的な共刺激ドメインとしては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：

30

41BB細胞内ドメイン：KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS
CRFP E E E E G G C E L（配列番号：59）

41BB_e細胞内ドメイン：p_gKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE
DGCSCRFP E E E E G G C E L a h a（配列番号：60）

CD28細胞内ドメイン：RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKH
YQPYAPPRDFAAYRS（配列番号：61）

CD28_e細胞内ドメイン：p_gRSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRK
HYQPYAPPRDFAAYRS a h a（配列番号：62）

FRB：EMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMER
GPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQA
WDLYYHVFRRI（配列番号：63）

40

リンカーを有するFBP

(GSSS)₄-EMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMER
GPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRI-(GSSS)₃（配列番号：64）

FKRB

GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKFDSSR
DRNKPFFKFM LGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDY
AYGATGHPGIIPPHATLVFDVELL KLE（配列番号：65）

50

リンカーを有するFKBP

(GSSS)₄-GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLED
GKKFDSSSRDRNKPFFKFM LGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRA
KL TISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE-(GSS
S)₃ (配列番号: 66)

【0065】

(d) 細胞質シグナル伝達ドメイン

本明細書に記載されるキメラ受容体を構築するために、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ(ITAM)を含む任意の細胞質シグナル伝達ドメインが使用され得る。「ITAM」は、本明細書において使用される場合、多くの免疫細胞中で発現されるシグナル伝達分子のテイル部分に一般に存在する保存されたタンパク質モチーフである。モチーフは、6~8アミノ酸により分離されたアミノ酸配列YxxL/Iの2つのリピートを含んでもよく、各xは独立して、保存されたモチーフYxxL/Ix(6~8)YxxL/Iを生成する任意のアミノ酸である。一部の例では、ITAMを含む細胞質シグナル伝達ドメインは、CD3ζのものである。一部の例では、MHC-CARは、共刺激ドメインを含まず、かつ、細胞質シグナル伝達ドメインは短いリンカーにより先行されている。例えば、クラスII MHC-CARについて、短いリンカーはTS(すなわち、MHC内部リンカー)であってもよい。例えば、クラスI MHC-CARについて、短いリンカーはPGであってもよい。一部の例では、リンカーは、AHAであるか、または存在しなくてもよく、これは共刺激ドメインがシグナル伝達ドメインの前に存在するある特定の事例などである。

【0066】

一部の実施形態では、MHC-CARは、細胞質シグナル伝達ドメイン、例えば、CD3ζのものを含まなくてもよい。そのようなCD3ζ非含有MHC-CARは、標的細胞に対する抑制効果を有し、または標的細胞の死を誘導する。Moisini, et al., The Journal of Immunology, 180(5), pp.3601-3611。

【0067】

CD3ζからの例示的な細胞質シグナル伝達ドメインを以下に提供する:

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEELNLGRREEYDVL DKRRG
RDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER
RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (配列番号: 67)

【0068】

CD3ζからの細胞質シグナル伝達ドメインをコードする例示的な核酸配列を以下に提供する:

AGAGTAAAGTTTTCCCGAAGTGCGGACGCTCCCGCGTATC
AGCAAGGTCAAACAGCTTTACAACGAAGCTGAAGTTGGG
ACGACGCGAAGAGTACGATGTTCTTGATAAGCGGAGAGGG
CGCGATCCCGAAATGGGGGGAAAGCCTCGGAGGAAGAACC
CACAAGAAGGCCTTTATAATGAAGCTGCAGAAGGACAAGAT
GGCGGAGGCGTATTCGAAATAGGCATGAAGGGGTGAACGG
AGGAGAGGAAAGGGACATGACGGGACTTTATCAAGGATTGT
CTACCGCAACTAAAGACACCTATGACGCGTTGCACATGCA
GGCTCTCCCTCCGAGA (配列番号: 410)
CGGGTCAAATTTAGCAGATCCGCTGACGCACCGGCCTACC
AGCAGGGCCAGAACCAACTCTACAACGAGCTGAATCTCGG
CCGACGGGAAGAGTATGACGTA CT CGACAAGCGGAGAGGT
CGAGACCTTGAGATGGGCGGTAAACCGAGACGGAAAAATC
CCCAAGAGGGTCTTTATAATGAAGCTCCAGAAGGATAAGAT
GGCTGAAGCCTATTCTGAGATAGGGATGAAAGGCGAGCGG
CGGAGGGGTAAAGGGCCATGATGGCCTTTACCAGGGACTCT

CCACGGCAACCAAAGATACTTACGACGCCCTTCACATGCA
AGCCCTCCCGCCACGC (配列番号：422)

【0069】

(e) 追加の成分

本明細書に記載されるMHC-CARは、以下の成分：ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、シグナル（リーダー）ペプチド、およびペプチドリンカーの1つまたは複数を任意選択的にさらに含んでもよい。

【0070】

一部の事例では、抗原ペプチドは、結果として得られるMHC-CARの免疫標的化活性を増進するためおよび／またはMHC-TCR複合体への標的細胞による抗体応答を低減するためにヒンジペプチドに連結されてもよい。一部の例では、ヒンジペプチドを含有するMHC-CARは、細胞質ドメインを含まなくてもよい（例えば、CD3ζドメインを含まない）。ヒンジペプチドを含有するMHC-CARコンストラクトはまた、MHCクラスI部分を含んでもよい。ヒンジドメインは、約10～100アミノ酸、例えば、15～75アミノ酸、20～50アミノ酸、または30～60アミノ酸を含有してもよい。一部の実施形態では、ヒンジドメインは、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、または75アミノ酸の長さであってもよい。

【0071】

一部の例では、以下のペプチドリンカーがクラスI MHC-CARにおいて使用される：

MHCIリンカー1：GGGGS GGGGS GGGGS (配列番号：68)

MHCIリンカー2：GGGGGGSGGSGGSGG (配列番号：69)

MHCIリンカー3：GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS (配列番号：70)

MHCIリンカー4：GGGGS GGGGS GGGGS (配列番号：68)

【0072】

クラスII MHC-CARのための例示的なペプチドリンカーは、GSGSGSGS (MHCIリンカー1；配列番号：72)、GGGGSGGGGS GGGGS (MHCIリンカーII；配列番号：68)、GGGGSGGGGS GGS (配列番号：400)、またはMHCIリンカーとして本明細書に記載されるもの（すなわち、MHCIリンカー1～4）であり得る。クラスII MHC-CARのための例示的なプレペプチドリンカーは、ASもしくはGSまたはASもしくはGSのいずれかの1もしくは2コピーであり得る。

【0073】

配列番号：400により提供されるペプチドリンカーをコードする例示的な核酸配列を以下に提供する。

GGGGGAGGCGGATCTGGCGGAGGCGGGAGTGGAGGCTCA (配列番号：401)

【0074】

本明細書に記載されるMHC-CARにおいて使用するためのヒンジペプチドは、天然に存在する受容体に由来してもよい。ヒンジドメインを含むことが当該技術分野において公知の任意のタンパク質のヒンジドメインは、本明細書に記載されるキメラ受容体において使用するために適合性である。一部の実施形態では、ヒンジドメインは、CD8αのヒンジドメインの部分、例えば、CD8αのヒンジドメインの少なくとも15（例えば、20、25、30、35、または40）個の連続するアミノ酸を含有する断片である。代替的に、それは合成ペプチドであってもよい。

【0075】

例示的なヒンジドメインとしては、IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT (配列番号：73)、およびIWAPLAGICVALLSLIITLI (配列番号：74)

10

20

30

40

50

）が挙げられる。追加の例を以下に提供する：

FKBP / FRB-CD8 ヒンジ：

【化 2】

*GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSSRDR
NKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKL TISPDYAYGA
TGHPGIIIPPHATLVFDVELLKLEEAAREAAAREAAAREAAA
RGRVAI LWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAM
MERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQ
AWDLYYHVFRRI TTTTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPA
AGGAVHTRGLDFACD (配列番号：75)*

10

GS 短ヒンジ：GGGGSGGGSGGGGS (配列番号：68)

GS 長ヒンジ：GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG (配列番号：76)

H2-Kb ヒンジ：LRWEPPPSTVSNM (配列番号：77)

HLA-A2 ヒンジ：LRWEPSSQPTIPI (配列番号：78)

HLA-A3 ヒンジ：LRWELSSQPTIPI (配列番号：79)

DAP10 ヒンジ：QTTPGERSSLP AFYPGTSGSCSGCGSLSLP (配列番号：80)

リンカーを有する DAP10 ヒンジ：(GSSS)₄QTTPGERSSLP AFYPGTSGSCSGCGSLSLP (配列番号：81)

20

DAP12 ヒンジ：LRPVQAQAQSDCSCSTVSP (配列番号：82)

リンカーを有する DAP12 ヒンジ：(GSSS)₄LRPVQAQAQSDCSCSTVSP (配列番号：83)

FcIgGIIIIa ヒンジ：GLAVSTISSFFPPGYQ (配列番号：84)

CD8α ヒンジ：TTTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (配列番号：85)

IgG L ヒンジ：

EPKSPDKTHTCTPPCPAPPVAGPSVFLFPKPKD TLM IART
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号：86)

30

DRA*0101 ヒンジ：EFDAPSPLPETTE (配列番号：87)

DRB1*1501 ヒンジ：VEWRARSESAQSK (配列番号：88)

【0076】

DRA*0101 ヒンジをコードする例示的な核酸配列を以下に提供する。

GAGTTCGACGCCCATCACCGCTTCCAGAAACGACTGAA (配列番号：417)

40

【0077】

DRB1*1501 ヒンジをコードする例示的な核酸配列を以下に提供する。

GTTGAGTGGAGGGCGCGGT CAGAGAGCGCACAAATCTAAA (配列番号：404)

【0078】

一部の実施形態では、本明細書に記載される MHC-CAR コンストラクトは、膜貫通ドメインをさらに含む。MHC-CAR において使用するための任意の膜貫通ドメインは、当該技術分野において公知の任意の形態であり得る。本明細書において使用される場合、「膜貫通ドメイン」は、細胞膜、好ましくは真核細胞膜中で熱力学的に安定な任意のタンパク質構造を指す。本発明において使用されるキメラ受容体において使用するために適

50

合性の膜貫通ドメインは、天然に存在するタンパク質から得られたものであってもよい。代替的に、それは、合成の、天然に存在しないタンパク質セグメント、例えば、細胞膜中で熱力学的に安定な疎水性のタンパク質セグメントであり得る。

【0079】

膜貫通ドメインは、膜貫通ドメインの三次元構造に基づいて分類される。例えば、膜貫通ドメインは、アルファヘリックス、1つより多くのアルファヘリックスの複合体、ベータバレル、または細胞のリン脂質二重層を貫通することができる任意の他の安定な構造を形成してもよい。さらには、膜貫通ドメインは、追加的または代替的に、膜貫通ドメインが膜を貫通する回数およびタンパク質の配向を含む、膜貫通ドメインのトポロジーに基づいて分類されてもよい。例えば、1回膜貫通タンパク質は細胞膜を1回貫通し、複数回貫通膜タンパク質は細胞膜を少なくとも2回（例えば、2、3、4、5、6、7またはより多くの回数）貫通する。

10

【0080】

膜タンパク質は、細胞の内側および外側に対するそれらの末端および膜貫通セグメント（複数可）のトポロジーに依存してI型、II型またはIII型として定義され得る。I型膜タンパク質は単一の膜貫通領域を有し、タンパク質のN末端が細胞の脂質二重層の細胞外側に存在し、かつタンパク質のC末端が細胞質側に存在するように配向している。II型膜タンパク質もまた単一の膜貫通領域を有するが、タンパク質のC末端が細胞の脂質二重層の細胞外側に存在し、かつタンパク質のN末端が細胞質側に存在するように配向している。III型膜タンパク質は複数の膜貫通セグメントを有し、膜貫通セグメントの数ならびにN末端およびC末端の位置に基づいてさらに下位分類されることがある。

20

【0081】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるMHC-CARの膜貫通ドメインは、I型1回膜貫通タンパク質、例えば、CD8 α 、CD8 β 、4-1BB/CD137、またはCD28に由来する。複数回貫通膜タンパク質からの膜貫通ドメインもまた、本明細書に記載されるキメラ受容体において使用するために適合性のあることがある。複数回貫通膜タンパク質は、複合体（少なくとも2、3、4、5、6、7もしくはより多くの）アルファヘリックスまたはベータシート構造を含んでもよい。好ましくは、複数回貫通膜タンパク質のN末端およびC末端は、脂質二重層の対向する側に存在し、例えば、タンパク質のN末端は脂質二重層の細胞質側に存在し、かつタンパク質のC末端は細胞外側に存在する。複数回貫通膜タンパク質からの1または複数のヘリックス通過を本明細書に記載されるキメラ受容体バリエーションを構築するために使用することができる。

30

【0082】

本明細書に記載されるMHC-CARコンストラクトの構築において使用するための例示的な膜貫通ドメインを以下に提供する：

CD8 α 膜貫通ドメイン：IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC（配列番号：89）

HLA-A2膜貫通ドメイン：VGIIAGLVLF GAVITGAVVA AVMW（配列番号：90）

HLA-A3膜貫通ドメイン：VGIIAGLVLL GAVITGAVVA AVMW（配列番号：91）

40

CD3ゼータ膜貫通ドメイン：LCYLLDGILFIYGVILTALFL（配列番号：92）

DR*1501膜貫通ドメイン：MLSGVGGFVLGLLFLGAGLFI（配列番号：93）

DR*1501e膜貫通ドメイン：MLSGVGGFVLGLLFLGAGLFIYFRNQ（配列番号：94）

DRA*0101膜貫通ドメイン：NVVCALGLTVGLVGIIIGTIFI（配列番号：416）

DRA*0101e膜貫通ドメイン：NVVCALGLTVGLVGIIIGTIFI

50

K G L (配列番号：418)

【0083】

D R * 1 5 0 1 e 膜貫通ドメインをコードする例示的な核酸配列を以下に提供する：
A T G C T G T C A G G A G T A G G C G G A T T T G T A C T C G G A C T C C T C T
T T T T G G G C G C T G G G T T G T T T A T C T A C T T T A G A A A C C A A (配
列番号：406)

【0084】

D R A * 0 1 0 1 e 膜貫通ドメインをコードする例示的な核酸配列を以下に提供する：
A A C G T T G T C T G C G C T C T T G G C C T G A C A G T G G G C C T G G T A G
G C A T T A T T A T C G G G A C C A T C T T T A T C A T C A A A G G T T T G (配
列番号：419)

N o t c h 膜貫通ドメイン：

I L D Y S F T G G A G R D I P P P Q I E E A C E L P E C Q V D A G N K V C N L Q
C N N H A C G W D G G D C S L N F N D P W K N C T Q S L Q C W K Y F S D G H C D
S Q C N S A G C L F D G F D C Q L T E G Q C N P L Y D Q Y C K D H F S D G H C D
Q G C N S A E C E W D G L D C A E H V P E R L A A G T L V L V V L L P P D Q L R
N N S F H F L R E L S H V L H T N V V F K R D A Q G Q Q M I F P Y Y G H E E E L
R K H P I K R S T V G W A T S S L L P G T S G G R Q R R E L D P M D I R G S I V
Y L E I D N R Q C V Q S S S Q C F Q S A T D V A A F L G A L A S L G S L N I P Y
K I E A V K S E P V E P P L P S Q L H L M Y V A A A A F V L L F F V G C G V L L
S R K R R R (配列番号：95)

N o t c h 2 膜貫通ドメイン：

P C V G S N P C Y N Q G T C E P T S E N P F Y R C L C P A K F N G L L C H I L D
Y S F T G G A G R D I P P P Q I E E A C E L P E C Q V D A G N K V C N L Q C N N
H A C G W D G G D C S L N F N D P W K N C T Q S L Q C W K Y F S D G H C D S Q C
N S A G C L F D G F D C Q L T E G Q C N P L Y D Q Y C K D H F S D G H C D Q G C
N S A E C E W D G L D C A E H V P E R L A A G T L V L V V L L P P D Q L R N N S
F H F L R E L S H V L H T N V V F K R D A Q G Q Q M I F P Y Y G H E E E L R K H
P I K R S T V G W A T S S L L P G T S G G R Q R R E L D P M D I R G S I V Y L E
I D N R Q C V Q S S S Q C F Q S A T D V A A F L G A L A S L G S L N I P Y K I E
A V K S E P V E P P L P S Q L H L M Y V A A A A F V L L F F V G C G V L L S R K
R R R (配列番号：96)

【0085】

一部の実施形態では、M H C - C A R はまた、ポリペプチドのN末端においてシグナル
ペプチド（シグナル配列またはリーダーペプチドとしても公知）を含んでもよい。一般に
、シグナル配列は、細胞中の所望の部位にポリペプチドを標的化するペプチド配列である
。一部の実施形態では、シグナル配列は、M H C - C A R を細胞の分泌経路に標的化し、
脂質二重層へのM H C - C A R の組込みおよびアンカリングを可能とする。本明細書に記
載されるキメラ受容体において使用するために適合性の、天然に存在するタンパク質のシ
グナル配列または合成の天然に存在しないシグナル配列を含むシグナル配列は当業者に明
らかであろう。一部の実施形態では、C D 8 α からのシグナル配列である。一部の実施形
態では、シグナル配列はC D 2 8 からのものである（例えば、M L R L L L A L N L F P
S I Q V T G (配列番号：97)）。

【0086】

例示的なシグナルペプチドとしては、ベータ-2-ミクログロブリンシグナルペプチド
（例えば、M S R S V A L A V L A L L S L S G L E A (配列番号：98)）、H L A
A 3 シグナルペプチド（例えば、M A V M A P R T L L L L L S G A L A L T Q T W A (配
列番号：99)、または）、D R A * 0 1 0 1 シグナルペプチド（例えば、M A I S G
V P V L G F F I I A V L M S A Q E S W A (配列番号：100)）、D R B 1 * 1 5 0
1 シグナルペプチド（例えば、M V C L K L P G G S C M T A L T V T L M V L S S P L

AL（配列番号：101））、およびDRB5シグナルペプチド（例えば、MVCLKLPGGSYMAKLTVTLMVLSSPLALA（配列番号：102））が挙げられるがこれらに限定されない。例示的なシグナルペプチドには、AS、GS、ASAS、GSGSなどの柔軟なプレペプチドリンカーが後続してもよい。一部の実施形態では、柔軟なプレペプチドリンカーは、シグナルペプチドがクラスIIであり、かつ導入されるペプチドが後続する場合に使用される。本明細書に記載されるMHC-CARをコードする任意のコンストラクトは、上記のプレペプチドリンカーのいずれかをコードする核酸配列を含んでもよく、例えば、ASは核酸配列GCATCTによりコードされてもよく、TSは核酸配列ACAAGTによりコードされてもよい。

【0087】

ベクター2-ミクログロブリンシグナルペプチドをコードする例示的な核酸配列を以下に提供する：

ATGGGTATGCTTGAAGCTCCCGGGCGGGTCCTGCATGACCGCTCTCACTGTTACTCTTATGGTCCCTTAGTTTACCGCTTGCCCTG（配列番号：397）

ATGGCAATATCTGGTGTTCTCTGTCCTCGGGTTTTTTTATCATAGCCGTACTGATGTCAGCACAGGAATCATGGGCG（配列番号：414）

【0088】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるMHC-CARは、本明細書に記載されるような他の成分の間の1つまたは複数のペプチドリンカーを含んでもよい。例としては、 $(Gly_xSer)_n$ リンカー（ x および n は独立して、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、またはより大きいものを含む、3～12の整数であり得る）が挙げられる。一部の例では、ペプチドリンカーは $(Gly_4Ser)_n$ （配列番号：103）（ n は3～20の整数であり得る）であり得る。特定の例としては、 $(Gly_4Ser)_3$ （配列番号：68）、 $(Gly_4Ser)_6$ （配列番号：69）、 $(Gly_4Ser)_9$ （配列番号：76）、 $(Gly_4Ser)_{12}$ （配列番号：105）、および $(Gly_4Ser)_{15}$ （配列番号：106）が挙げられる。

【0089】

(ii) MHC-CARの構成

本明細書に記載される1つまたは複数の成分を含む本明細書に開示されるMHC-CARコンストラクトは、任意の好適なフォーマットで構成されていてもよい。例示的なMHCクラスIIコンストラクトおよびMHCクラスIIコンストラクトを図7および図8に提供する。

【0090】

本明細書に記載されるようなMHCクラスII部分を含有するMHC-CARコンストラクトは、MHCクラスII部分、抗原ペプチド、およびシグナル伝達ドメイン（例えば、共刺激ドメイン、細胞質シグナル伝達ドメイン、またはその組合せ）、ならびに任意選択的に本明細書に記載される追加の成分の1つまたは複数を含む単一の融合ポリペプチドであってもよい。例えば、図8を参照。一部の例では、MHCクラスII CARコンストラクトは、抗原ペプチドに隣接するヒンジドメインを含有する。MHCクラスII CARは、 $\beta 2$ -ミクログロブリン（b2m）を含有しなくてもよい。細胞表面上に発現される場合、そのようなMHC-CARは、内因性のb2mとヘテロ二量体を形成してもよい。代替的に、MHCクラスII CARはまた、b2mを含んでもよく、b2mは、アルファ鎖と融合して単一のポリペプチドを生じてもよい。一部の事例では、MHCクラスII CARは、2つのサブユニットを含有してもよく、1つはアルファ鎖またはその部分（例えば、細胞外ドメイン）を含んでもよく、かつ、他方はb2mまたはその部分（例えば、細胞外ドメイン）を含んでもよい。一部の例では、抗原ペプチドはアルファ鎖に融合していてもよい。他の例では、抗原ペプチドはb2mに融合していてもよい。任意選択的に、MHCクラスII CARは、2つの成分の間にペプチドリンカーを含有してもよい。一例を図8

10

20

30

40

50

Bに提供する。

【0091】

一部の例では、MHC-CARは、クラスI分子またはその部分、例えば、HLA A3またはHLA A2、およびクラスI分子による提示のために好適な抗原ペプチド（例えば、PLP断片KLIEITYFSK（配列番号：107）またはTAX断片LLFGYPVYV（配列番号：108））を含む。任意選択的に、MHC-CARはb2mをさらに含んでもよい。代替的に、b2m分子は、クラスI MHC-CARとは別々に発現されてもよい。クラスI分子およびb2m配列の例を以下に提供する：

HLA A2：

GSHSMRYFFFTSVSRPGRGEP RFI AVGYVDDTQFVRFDSDA
ASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETR KVKAHSQTHRVDLGT
LRGYYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGS DWRFLRGYHQAAYDG
KDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYL
EGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEAT
LRCWALS FYP AEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPAGDGT
FQKWA AVVVP SGQE QRYTCHVQHEGLPKPLT（配列番号：109）

10

HLA A3：

GSHSMRYFFFTSVSRPGRGEP RFI AVGYVDDTQFVRFDSDA
ASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDQETRN VKAQSQTDRVDLGT
LRGYYNQSEAGSHTIQIMYGCDVGS DGRFLRGYRQDAYDG
KDYIALNEDLRSWTAADMAAQITKRKWEAAHEAEQLRAYL
DGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDPPKTHMTHHPI SDHEAT
LRCWALGFYP AEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPAGDGT
FQKWA AVVVP SGEE QRYTCHVQHEGLPKPLT（配列番号：110）

20

上記についての微小拡張：LRWE（配列番号：111）

H-2K^bアルファ3ドメイン（下線／斜体）を有するHLA A2

【化3】

GSHSMRYFFFTSVSRPGRGEP RFI AVGYVDDTQFVRFDSDAAS
QRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETR KVKAHSQTHRVDLGT LRGY
YNQSEAGSHTVQRMYGCDVGS DWRFLRGYHQAAYDG KDYIAL
KEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGT CVEWL
RRYLENGKETLQRT DSPKAHVTHHSR PEDKVT LRCWALGFYP
ADITLTWQLNGEELIQDMELVETRPAGDGT FQKWA SVVVPLG
KEQYYTCHVYHQGLPEPLT（配列番号：112）

30

H-2K^bアルファ3ドメイン（下線／斜体）を有するHLA A3

【化4】

GSHSMRYFFFTSVSRPGRGEP RFI AVGYVDDTQFVRFDSDAAS
QRMEPRAPWIEQEGPEYWDQETRN VKAQSQTDRVDLGT LRGY
YNQSEAGSHTIQIMYGCDVGS DGRFLRGYRQDAYDG KDYIAL
NEDLRSWTAADMAAQITKRKWEAAHEAEQLRAYLDGT CVEWL
RRYLENGKETLQRT DSPKAHVTHHSR PEDKVT LRCWALGFYP
ADITLTWQLNGEELIQDMELVETRPAGDGT FQKWA SVVVPLG
KEQYYTCHVYHQGLPEPLT（配列番号：113）

40

上記についての微小拡張：LRWE（配列番号：111）

ベータ-2-ミクログロブリン（ヒト）：

IQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLL
KNGERIEKVEHSDLSFSKDW SFYLLYYTEFTPT EKDEYAC
RVNHVTLSQPKIVKWDRDM（配列番号：114）

50

ベーター 2 - ミクログロブリン (マウス) :

I Q K T P Q I Q V Y S R H P P E N G K P N I L N C Y V T Q F H P P H I E I Q M L
K N G K K I P K V E M S D M S F S K D W S F Y I L A H T E F T P T E T D T Y A C
R V K H A S M A E P K T V Y W D R D M (配列番号 : 1 1 5)
【 0 0 9 2 】

図 7 は、MHC クラス II CAR コンストラクトの多数の例示的な設計を提供する。典型的に、MHC クラス II CAR コンストラクトは 2 つのサブユニットを含有し、1 つはアルファ鎖またはその部分 (例えば、細胞外ドメイン) を含み、かつ他方はベータ鎖またはその部分 (例えば、細胞外ドメイン) を含む。抗原ペプチドは、アルファ鎖またはベータ鎖のいずれかに融合され得る。一部の事例では、MHC クラス II CAR はまた、単一の融合ポリペプチドのフォーマットであり得、該フォーマットでは、アルファ鎖およびベータ鎖は融合して単一のポリペプチドを形成する。MHC クラス II CAR のアルファ鎖およびベータ鎖は同じ MHC クラス II 分子に由来してもよい。代替的に、それらは異なる MHC クラス II 分子からのものであってもよい。例えば、MHC クラス II CAR は、HLA DRA * 1 0 1 0 からのアルファ鎖および HLA DRB 1 * 1 5 0 1 からのベータ鎖を含有してもよく、それは MBP ペプチドなどの抗原ペプチドと融合していてもよい。

【 0 0 9 3 】

一部の例では、MHC - CAR は、クラス II 分子またはその部分、例えば、DRB 1 * 1 5 0 1 または DRA * 0 1 0 1、およびクラス II 分子による提示のために好適な抗原ペプチド (例えば、MBP 断片 DENP V V H F F K N I V T P R T P P (配列番号 : 1 5)) を含む。クラス II 分子配列の例を以下に提供する ;

DRB 1 * 1 5 0 1 :

G D T R P R F L W Q P K R E C H F F N G T E R V R F L D R Y F Y N Q E E S V R F
D S D V G E F R A V T E L G R P D A E Y W N S Q K D I L E Q A R A A V D T Y C R
H N Y G V V E S F T V Q R R V Q P K V T V Y P S K T Q P L Q H H N L L V C S V S
G F Y P G S I E V R W F L N G Q E E K A G M V S T G L I Q N G D W T F Q T L V M
L E T V P R S G E V Y T C Q V E H P S V T S P L T (配列番号 : 1 1 7)

DRA * 0 1 0 1

I K E E H V I I Q A E S Y L N P D Q S G E F M F D F D G D E I F H V D M A K K E
T V W R L E E F G R F A S F E A Q G A L A N I A V D K A N L E I M T K R S N Y T
P I T N V P P E V T V L T N S P V E L R E P N V L I C F I D K F T P P V V N V T
W L R N G K P V T T G V S E T V F L P R E D H L F R K F H Y L P F L P S T E D V
Y D C R V E H W G L D E P L L K H W (配列番号 : 1 1 8)

DRB 1 * 1 5 0 1 ヒト / IA - D ベータマウス (突然変異残基を太字および下線としている)

【 化 5 】

I K E E H V I I Q A E S Y L N P D Q S G E F M F D F D G D E I F H V D M A K K E T V
W R L E E F G R F A S F E A Q G A L A N I A V D K A N L E I M T K R S N Y T P I E E
T E V P T S L R R L E Q P N V A I S L S R T E A L N H H N T L V C S V T D F Y P A K
I K V R W F R N G Q E E T V G V S S T Q L I R N G D W T F Q V L V M L E M T P H Q G
E V Y T C H V E H P S L K S P I T (配列番号 : 1 1 9)

DRA * 0 1 0 1 ヒト / IA - D アルファマウス (突然変異残基を太字および下線としている)

10

20

30

40

50

【化6】

I KEEHV I I Q A E S Y L N P D Q S G E F K F D F D G D E I F H V D M A K K E T V
W R L E E F G R F A S F E A Q G A L A N I A V D K A N L E I M T K R S N Y T P I A T
N E A P Q A T V F P K S P V L L G Q P H T L I C F V D N I F P P V I N I T W L R N S
K S V T D G V Y E T S F L V N R D H S F H K L S Y L T F I P S D D D I Y D C K V E H
W G L E E P V L K H W E P E I (配列番号: 120)

DR-2 ベータ ミニ (突然変異残基を太字および下線としている)

【化7】

R P R F L W Q S K R E C H F F N G T E R V R F L D R Y F Y N Q E E S V R F D S D V G
E F R A V T E L G R P D A E Y W N S Q K D I L E Q A R A A V D T Y C R H N Y G V V E
S F T V Q R (配列番号: 121)

10

DR-2 アルファ ミニ

【化8】

I KEEHV I I Q A E S Y L N P D Q S G E F K F D F D G D E I F H V D M A K K E T V
W R L E E F G R F A S F E A Q G A L A N I A V D K A N L E I M T K R S N Y T P I (配
列番号: 122)

DRB1*1501をコードする例示的な核酸配列を以下に提供する:

20

G G A G A C A C A A G A C C C C G A T T C T T G T G G C A G C C C A A A A G G G
A G T G C C A T T T T T T C A A T G G G A C G G A A C G A G T T C G C T T C C T
T G A T C G G T A C T T T T A C A A C C A A G A A G A G A G T G T A C G G T T C
G A C T C A G A T G T C G G C G A G T T C C G A G C G G T T A C G G A A T T G G
G G C G A C C T G A C G C G G A G T A C T G G A A C T C C C A A A A G G A T A T
T T T G G A G C A G G C A C G A G C A G C T G T G G A C A C C T A T T G T C G A
C A T A A T T A T G G T G T G G T G G A A T C C T T T A C A G T T C A G C G G C
G G G T G C A A C C T A A A G T G A C C G T G T A T C C A T C T A A A A C G C A
A C C C C T C C A A C A C C A T A A C C T C C T G G T G T G T T C C G T A A G C
G G C T T C T A T C C C G G G T C A A T T G A G G T C A G G T G G T T C C T C A
A C G G T C A G G A G G A G A A G G C C G G A A T G G T A A G T A C T G G T C T
T A T C C A G A A C G G A G A C T G G A C C T T C C A A A C T T T G G T A A T G
T T G G A A A C G G T G C C G C G A T C C G G G G A G G T G T A T A C A T G C C
A A G T T G A A C A C C C G A G T G T T A C G A G C C C C C T G A C G (配列番号
: 402)

30

DRA*0101をコードする例示的な核酸配列を以下に提供する:

A T A A A A G A A G A G C A C G T G A T A A T A C A G G C G G A G T T T T A T T
T G A A C C C G G A C C A G A G C G G T G A G T T C A T G T T C G A T T T T G A
T G G C G A C G A G A T A T T T C A C G T T G A C A T G G C A A A A A A G G A A
A C G G T G T G G A G A C T T G A G G A G T T T G G A C G A T T C G C A T C A T
T T G A G G C A C A A G G A G C A C T C G C C A A T A T C G C G G T G G A C A A
G G C C A A C C T G G A G A T C A T G A C A A A A C G C T C C A A T T A T A C G
C C T A T C A C T A A T G T G C C C C C T G A G G T T A C T G T G C T C A C A A
A T T C T C C C G T A G A A C T T A G G G A A C C T A A C G T C C T C A T A T G
T T T C A T C G A C A A G T T C A C T C C T C C G G T G G T C A A T G T A A C G
T G G C T T C G G A A T G G T A A G C C G G T C A C C A C G G G T G T C T C A G
A G A C C G T A T T T C T G C C C A G A G A A G A C C A C C T C T T C C G C A A
A T T T C A T T A C C T T C C C T T T C T T C C T T C A A C G G A A G A C G T T
T A C G A C T G C A G G G T C G A A C A T T G G G G G C T T G A C G A G C C A C
T T C T C A A G C A T T G G (配列番号: 415)

40

50

【0094】

本明細書に記載される任意のMHCクラスIおよびMHCクラスIIコンストラクトは、1つまたは複数のシグナル伝達ドメインおよび任意選択的に追加の成分の1つまたは複数にさらに融合され得る。一部の事例では、本明細書に記載されるMHC-CARコンストラクトはシグナル伝達ドメインを含まない。

【0095】

好ましくは、本明細書に記載されるようなMHC-CARは、マッチしたMHC部分および抗原ペプチド、例えば、天然の状態において抗原ペプチドまたは相同アナログを提示するMHC分子を含有する。一部の事例では、本明細書に記載されるMHC-CARは、HLA DRB1*1501からのアルファ鎖またはベータ鎖およびこのHLAアレルと関連付けられる抗原ペプチド、例えば、本明細書に記載されるMBPペプチドおよび他のものを含有してもよい。自己免疫疾患に関与する抗原ペプチドと特定のHLAアレルとの間の関連は当該技術分野において周知であり、または常用の実施、例えば、ライブラリースクリーニングを介して同定され得る。

【0096】

1つの例示的なMHC-CARは、以下のフォーミュラを有してもよい（+/-は、特定の成分は任意選択的であることを意味する）：

【0097】

単鎖（MHCクラスIまたはII+ペプチド）（+/-ヒンジ）+単鎖CD28/4-1BB（+/-ジロイシンモチーフ）（+/-CD3ゼータ）。（以前に記載されたように追加の短いペプチドリンカーを成分間に付加することができる。）

【0098】

他の例示的なMHC-CAR設計（単鎖および複数鎖）を図10に示す。複数鎖コンストラクトの場合、1つまたは複数の短ヒンジを使用してMHC-CARの発現の成功を増進してもよい。さらに、構造の部分をマウスドメインからの保存されたドメインと置換して交差反応性を予防することが望ましいことがある。なお、一部の場合には、内部ドメインは鎖の1つにのみ取り付けられてもよい。

【0099】

MHC-CAR結合（MBPを提示する）TCRのアミノ酸配列を以下に提供する：
TCRアルファMBP：

METLLGVSLVILWLQLARVNSQQGEEDPQALSIQEGENAT
MNC SYKTSINN LQWYRQNSGRGLVHLILIRSNEREKHSGR
LRVTLDTSKKSSSLITASRAADTASYFCATAAVGGFKTI
FGAGTRLFVKANIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFD
SQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKS
DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTN
LNFQNL SVIGFRILLKVAGFNLLMTLRLWSS（配列番号：123）

TCRベータMBP

MLLLLLLLGLAGSGLGAVVSQHPSWVISKSGT SVKIECRS
LDFQATTMFWYRQFPKQSLMLMATSNEGSKATYEQGV EKD
KFLINHASLT LTSTLT VTS AHPEDSSFYIC SARDLTSGANN
EQFFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKA
TLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQP
ALNDSRYSLSRLRV SATFWQNPRNHFR CQVQFYGLSEND
EWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATI
LYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRG（配列番号；124）

TCRアルファクラスI

mamllgasvl ilwlqp dwvn sqqkndd

10

20

30

40

50

QQVKQNSPSSLVQEGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPA
EGPTFLISSISKDNADGRFTVFLNKSAKHLHLHIVPSQ
PGDSAVYFCAAMEGAQKLVFGQGTRLTINPNIQNPDPVY
QLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVL
DMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPS
PESS

Cdvklve ksfetdtlnln fqnlsvigfr illllkvagfn
llmtlr lwss (配列番号: 125)

TCRベータクラスI:

msigllccaa lsl llwagpv

NAGVTQT PKFQVLKTGQSM TLQCAQDMNHEYMSWYRQDPG
MGLRLIHYSVGAGITDQGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLLS
AAPSQTSVYFCASSYPGGGFYEQYFGPGTRLTVTEDLKNV
FPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWW
VNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYALSSRLRVSATF
WQDPRNHFR CQVQFYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAW
GRAD

cgftse syqqgvlsat ilyeillgka tlyavlvsal v
lmamvkrkd srg (配列番号: 126)

【0100】

例示的なCD19標的化CARコンストラクトのアミノ酸配列を以下に提供する（なお、これらの設計は、cd28ドメインにより置換されてもよい4-1BBドメインを含有する）:

4G7-CARバージョン1:

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGPELIKPGASVK
MSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTK
YNEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARG
TYYYGSRVFDYWGGQTTLTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSDIV
MTQAAPSIPTVTPGESVSVISCRSSSKSLLNSNGNGSGSGTAF
TLRISRVEAEDVG VYYCMQHLEYPFTAGTKLELKRSDPTT
TPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF
ACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQ
PFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAP
AYQQGQNQLYNEELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRR
KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDGLYQ
GLSTATKDTYDALHMQALPPR (配列番号: 127)

4G7-CARバージョン2:

METDTLLLWV LLLWVPGSTG EVQLQQSGPE LIKPGASV
KM SCKASGYTFT SYVMHWVKQK PGQGLEWIGY INPYN
DGTKY NEKFKGKATL TSDKSSSTAY MELSSLTSED SA
VYYCARGT YYYGSRVFDY WGGQTTLTVS SGGGGSGGGGG
SGGGGSDIVM TQAAPSIPTVTPGESVSVISCR SSKSLLNS
NG NTYLYWFLQR PGQSPQLLIY RMSNLASGVP DRFSG
SGSGT AFTLRISRVE AEDVG VYYCM QHLEYPFTFG AG
TKLELKRSDPTTTPAPRP PTPAPTIASQ PLSLRPEACR
PAAGGAVHTR GLDFACDIYI WAPLAGTCGV LLLSLVIT
LY CKRGRKKLLY IFKQPFMRPV QTTQEEDGCS CRFPE
EEEGG CELRVKFSRS ADAPAYQQGQ NQLYNEELNLG RR
EEYDVLDK

RRGRDPEMGG KPRRKNPQEG LYNELQKDKM AEAYSEIG

10

20

30

40

50

M K G E R R R G K G H D G L Y Q G L S T A T K D T Y D A L H M Q A L P P R

(配列番号：128)

【0101】

例示的なCD19標的化CARコンストラクトの核酸配列を以下に提供する。

4G7-CARバージョン2

a t g g a g a c a g a c a c t c t t c t c c t t t g g g t c t t g c t g c t g t
g g g t t c c c g g a a g c a c a g g a g a a g t a c a g t t g c a a c a g t c
t g g g c c a g a a c t c a t c a a a c c c g g a g c t t c t g t a a a a t g
t c a t g c a a a g c t a g t g g a t a t a c a t t t a c t t c t t a c g t g a
t g c a c t g g g t a a a a c a g a a a c c t g g t c a g g g g c t t g a g t g
g a t c g g g t a c a t t a a c c c a t a t a a t g a c g g c a c c a a a t a t
a a c g a g a a a t t c a a g g g a a a g g c t a c g c t t a c a t c a g a t a
a g t c c a g t a g c a c c g c t t a t a t g g a a c t t a g c a g c c t t a c
t t c c g a a g a t t c c g c g g t g t a t t a c t g c g c g a g a g g g a c t
t a c t a c t a c g g g a g t c g a g t a t t c g a t t a t t g g g g t c a a g
g c a c g a c g c t c a c g g t g a g c t c a g g t g g t g g a g g g t c t g g
g g g t g g c g g c a g t g g t g g g g g g g g c t c a g a c a t c g t g a t g
a c c c a g g c a g c a c c t t c t a t c c c g g t a a c c c c a g g c g a g t
c t g t a t c t a t c a g t t g t c g g t c c a g c a a g t c t c t t c t c a a
c a g t a a t g g c a a t a c a t a t c t t t a c t g g t t c c t c c a a a g g
c c t g g g c a a a g t c c t c a a c t t c t t a t a t a t c g g a t g t c c a
a t c t t g c g a g t g g c g t a c c c g a c a g g t t t t c a g g g t c t g g
g a g c g g a a c a g c t t t t a c g t t g a g a a t a t c c a g g g t a g a a
g c t g a g g a c g t c g g t g t a t a t t a t t g c a t g c a a c a t c t c g
a a t a c c c c t t t a c c t t c g g c g c t g g t a c a a a g c t c g a a t t
g a a a c g c a g c g a t c c a a c c a c g a c g c c a g c g c c a c g a c c a
c c t a c g c c c g c t c c a a c t a t t g c c t c c c a g c c c c t g a g t c
t t c g g c c a g a a g c g t g t a g a c c t g c t g c c g g c g g g g c c g t
t c a t a c g c g g g g c c t t g a c t t t g c a t g t g a t a t c t a t a t a
t g g g c t c c t t t g g c g g g a a c t t g c g g a g t g c t t c t t t t g t
c a c t c g t g a t a a c g t t g t a t t g t a a a a g g g g t c g a a a g a a
a c t c c t c t a t a t a t t t a a g c a g c c c t t t a t g a g g c c c g t g
c a a a c a a c a c a a g a a g a g g a c g g a t g c t c t t g t c g a t t c c
c g g a a g a g g a g g a g g g g g g g t g t g a g c t t a g g g t c a a g t t
t t c t c g c t c t g c c g a c g c g c c a g c c t a t c a a c a g g g c c a a
a a c c a g c t g t a t a a c g a a c t c a a c c t c g g g c g c c g g g a a g
a g t a t g a c g t c c t t g a c a a a c g g c g c g g t c g c g a c c c t g a
a a t g g g t g g a a a a c c g a g g c g a a a g a a c c c c c a g g a g g g a
c t t t a c a a c g a a t t g c a a a a a g a c a a g a t g g c c g a a g c c t
a t t c c g a a a t t g g a a t g a a a g g c g a g c g g a g a c g a g g t a a
g g g g c a t g a c g g c c t g t a t c a a g g g c t c t c t a c g g c c a c g
a a g g a t a c t t a c g a c g c c c t t c a t a t g c a a g c t c t t c c a c
c a c g g (配列番号：390)

【0102】

MHC-CAR1部分B (MHC-DRB CAR)-HLA DRB1*1501 (シグナルペプチド)、MBPペプチド、HLA DRB1*1501 (外側、ヒンジ、膜貫通) CD3ζ (細胞質シグナル伝達ドメイン) を含有するMHC-CAR1を以下に提供する：

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

10

20

30

40

50

NGTERVRFLLDRYFYNQEEESVRFDSADVGEFRAVTELG RPD A
EYWNSQKDI LEQARA AVDTYCRHNYGVVESFTVQRRVQPK
VTVPYPSKTQPLQHNNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFLNGQEE
KAGMVSTGLIQNGDWTFTQLVMLETVPRSGEVYTCQVEHP
SVTSPLTVEWRARSESAQSKMLS GVG G FVLGLLFLGAGLF
IYFRNQTSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE LNLGRREEY
DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS
EIGMKGERRRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
(配列番号：412)

【0103】

MHC-CAR1部分B (MHC-DRB CAR)-HLA DRB1*1501 (シグナルペプチド)、MBPペプチド、HLA DRB1*1501 (外側、ヒンジ、膜貫通) CD3ζ (細胞質シグナル伝達ドメイン) を含有するMHC-CAR1をコードする例示的な核酸配列を以下に提供する：

ATGGTATGCTTGAAGCTCCCGGGCGGGTCCTGCATGACCG
CTCTCACTGTTACTCTTATGGTCCCTTAGTTCAACCGCTTGC
CCTGGCATCTGATGAGAATCCCGTGGTTCA TTTTTTTTAAAG
AACATCGTCAACCCGCGCACCCACCTGGGGGAGGCGGAT
CTGGCGGAGGCGGGAGTGGAGGCTCAGGAGACACAAGACC
CCGATTCTTGTGGCAGCCCAAAGGGAGTGCCATTTTTTTC
AATGGGACGGAACGAGTTCGCTTCCCTTGATCGGTACTTTT
ACAACCAAGAAGAGAGTGTACGGTTCGACTCAGATGTCGG
CGAGTTC CGAGCGGTACGGAATTGGGGCGACCTGACGCG
GAGTACTGGAACCTCCCAAAGGATATTTTGGAGCAGGCAC
GAGCAGCTGTGGACACCTATTGTTCGACATAATTATGGTGT
GGTGG AATCCTTTACAGTTCAGCGGCGGGTGCAACCTAAA
GTGACCGTGTATCCATCTAAAACGCAACCCCTCCAACACC
ATAACCTCCTGGTGTGTTCCGTAAGCGGCTTCTATCCCGG
GTCAATTGAGGTGAGGTGGTTCCTCAACGGTCAAGGAGGAG
AAGGCCGGAATGGTAAGTACTGGTCTTATCCAGAACGGAG
ACTGGACCTTCCAACCTTTGGTAATGTTGGAAACGGTGCC
GCGATCCGGGGAGGTGTATACATGCCAAGTTGAACACCCG
AGTGTTACGAGCCCCCTGACGGTTGAGTGGAGGGCGCGGT
CAGAGAGCGCACAAATCTAAAATGCTGTCAGGAGTAGGCGG
ATTTGTACTCGGACTCCTCTTTTTTGGGCGCTGGGGTTGTTT
ATCTACTTTTAGAAACCAACAAGTAGAGTAAAGTTTTTCCC
GAAGTGCGGACGCTCCCGCGTATCAGCAAGGTCAAAAACCA
GCTTTACAACGAACCTGAACCTTGGGACGACGCGAAGAGTAC
GATGTTCTTGATAAGCGGAGAGGGCGCGATCCCGAAATGG
GGGGAAAGCCTCGGAGGAAGAACCACAAGAAGGCCTTTA
TAATGAACCTGCAGAAGGACAAGATGGCGGAGGCGTATTCC
GAAATAGGCATGAAGGGTGAACGGAGGAGGAAAGGGAC
ATGACGGACTTTATCAAGGATTGTCTACCGCAACTAAAGA
CACCTATGACGCGTTGCACATGCAGGCTCTCCCTCCGAGA
(配列番号：413)

【0104】

MHC-CAR1部分A (MHC-DRA CAR) HLA-DRA*1010 (シグナルペプチド、外側、ヒンジ、膜貫通)、CD3ζ (細胞質シグナル伝達ドメイン) を含有するMHC-CARを以下に提供する：

MAISGVPVLGFFIIAVLMSAQESWAIKEEHV I IQAEFYLN

10

20

30

40

50

PDQSGEFMFDFDGD E I F H V D M A K K E T V W R L E E F G R F A S F E
A Q G A L A N I A V D K A N L E I M T K R S N Y T P I T N V P P E V T V L T N S
P V E L R E P N V L I C F I D K F T P P V V N V T W L R N G K P V T T G V S E T
V F L P R E D H L F R K F H Y L P F L P S T E D V Y D C R V E H W G L D E P L L
K H W E F D A P S P L P E T T E N V V C A L G L T V G L V G I I I G T I F I I K
G L T S R V K F S R S A D A P A Y Q Q G Q N Q L Y N E L N L G R R E E Y D V L D
K R R G R D P E M G G K P R R K N P Q E G L Y N E L Q K D K M A E A Y S E I G M
K G E R R R G K G H D G L Y Q G L S T A T K D T Y D A L H M Q A L P P R (配列番号：423)

【0105】

MHC-CAR1部分A (MHC-DRA CAR) HLA-DRA*1010 (シグナルペプチド、外側、ヒンジ、膜貫通)、CD3ζ (細胞質シグナル伝達ドメイン) をコードする例示的な核酸配列を以下に提供する：

A T G G C A A T A T C T G G T G T T C C T G T C C T C G G G T T T T T T A T C A
T A G C C G T A C T G A T G T C A G C A C A G G A A T C A T G G G C G A T A A A
A G A A G A G C A C G T G A T A A T A C A G G C G G A G T T T T A T T T G A A C
C C G G A C C A G A G C G G T G A G T T C A T G T T C G A T T T T G A T G G C G
A C G A G A T A T T T C A C G T T G A C A T G G C A A A A A G G A A A C G G T
G T G G A G A C T T G A G G A G T T T G G A C G A T T C G C A T C A T T T G A G
G C A C A A G G A G C A C T C G C C A A T A T C G C G G T G G A C A A G G C C A
A C C T G G A G A T C A T G A C A A A A C G C T C C A A T T A T A C G C C T A T
C A C T A A T G T G C C C C C T G A G G T T A C T G T G C T C A C A A A T T C T
C C C G T A G A A C T T A G G G A A C C T A A C G T C C T C A T A T G T T T C A
T C G A C A A G T T C A C T C C T C C G G T G G T C A A T G T A A C G T G G C T
T C G G A A T G G T A A G C C G G T C A C C A C G G G T G T C T C A G A G A C C
G T A T T T C T G C C C A G A G A A G A C C A C C T C T T C C G C A A A T T T C
A T T A C C T T C C C T T T C T T C C T T C A A C G G A A G A C G T T T A C G A
C T G C A G G G T C G A A C A T T G G G G G C T T G A C G A G C C A C T T C T C
A A G C A T T G G G A G T T C G A C G C C C C A T C A C C G C T T C C A G A A A
C G A C T G A A A A C G T T G T C T G C G C T C T T G G C C T G A C A G T G G G
C C T G G T A G G C A T T A T T A T C G G G A C C A T C T T T A T C A T C A A A
G G T T T G A C T T C C C G G G T C A A A T T T A G C A G A T C C G C T G A C G
C A C C G G C C T A C C A G C A G G G C C A G A A C C A A C T C T A C A A C G A
G C T G A A T C T C G G C C G A C G G G A A G A G T A T G A C G T A C T C G A C
A A G C G G A G A G G T C G A G A C C C T G A G A T G G G C G G T A A A C C G A
G A C G G A A A A A T C C C C A A G A G G G T C T T T A T A A T G A A C T C C A
G A A G G A T A A G A T G G C T G A A G C C T A T T C T G A G A T A G G G A T G
A A A G G C G A G C G G C G G A G G G G T A A G G G C C A T G A T G G C C T T T
A C C A G G G A C T C T C C A C G G C A A C C A A G A T A C T T A C G A C G C
C C T T C A C A T G C A A G C C C T C C C G C C A C G C (配列番号：424)

【0106】

コンストラクト1 (CD19 CARおよびCCR6領域) を以下に提供する：

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

10

20

30

40

50

WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPV
QTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQ
NQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTAT
KDTYDALHMQALPPRGSSSGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPM
SGESMNFSDVFDSEEDYFVSVNTSYYSVDSEMLLCSLQEV
RQFSRLFVPIAYSILCVFGLLGNILVVITFAFYKKARSMT
DVYLLNMAIADILFVLTLPFWAVSHATGAWVFSNATCKLL
KGIYAINFNCGMLLLTCISMDDRYIAIVQATKSFRRLRSRTL
PRSKIICLVVWGLSVIISSTFVFNQKYNTQGS D VCEPKY
QTVSEPIRWKLLMLGLELLFGFFIPLMFMIFCYTFIVKTL
VQAQNSKRHKAI R V I I A V V L V F L A C Q I P H N M V L L V T A A N L
GKMNRSCQSEKLI G Y T K T V T E V L A F L H C C L N P V L Y A F I G Q
KFRNYFLKILKDLWCVR R K Y K S S G F S C A G R Y S E N I S R Q T S
ETADNDNASSFTM (配列番号：425)

【0107】

コンストラクト1 (CD19 CAR、CCR6、GFP領域) を以下に提供する：

METDTLLLLWVLLLLWVPGSTGEVQLQQSGPELIKPGASVKM
SCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTTY
NEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARGT
YYYGSRVFDYWGGQTTLTVSSGGGGSGGGGGSGGGGGSDIVM
TQAAPSIPVTPGESVSISCRSSKSLNSNGNTYLYWFLQR
PGQSPQLLIYRMSNLAGSV PDRFSGSGSGTAFTLRISRVE
AEDVGVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLELKRSDPTTTPAPRP
PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI
WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPV
QTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQ
NQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTAT
KDTYDALHMQALPPRGSSSGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPM
SGESMNFSDVFDSEEDYFVSVNTSYYSVDSEMLLCSLQEV
RQFSRLFVPIAYSILCVFGLLGNILVVITFAFYKKARSMT
DVYLLNMAIADILFVLTLPFWAVSHATGAWVFSNATCKLL
KGIYAINFNCGMLLLTCISMDDRYIAIVQATKSFRRLRSRTL
PRSKIICLVVWGLSVIISSTFVFNQKYNTQGS D VCEPKY
QTVSEPIRWKLLMLGLELLFGFFIPLMFMIFCYTFIVKTL
VQAQNSKRHKAI R V I I A V V L V F L A C Q I P H N M V L L V T A A N L
GKMNRSCQSEKLI G Y T K T V T E V L A F L H C C L N P V L Y A F I G Q
KFRNYFLKILKDLWCVR R K Y K S S G F S C A G R Y S E N I S R Q T S
ETADNDNASSFTMGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPVSKGE
ELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT L K
FICTTGKLPVPWPTLVTTLT Y G V Q C F S R Y P D H M K Q H D F F K
SAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRA EVKFEGDTLVNRIEL
KGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKANF
KIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQS
ALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK (配列番号：429)

【0108】

コンストラクト1 (CD19 CAR、CCR6、GFP領域) をコードする例示的な
核酸配列を以下に提供する：

10

20

30

40

50

a t g g a g a c a g a c a c t c t t c t c c t t t g g g t c t t g c t g c t g t
g g g t t c c c g g a a g c a c a g g a g a a g t a c a g t t g c a a c a g t c
t g g g c c a g a a c t c a t c a a a c c c g g a g c t t c t g t a a a a a t g
t c a t g c a a a g c t a g t g g a t a t a c a t t t a c t t c t t a c g t g a
t g c a c t g g g t a a a a c a g a a a c c t g g t c a g g g g c t t g a g t g
g a t c g g g t a c a t t a a c c c a t a t a a t g a c g g c a c c a a a t a t
a a c g a g a a a t t c a a g g g a a a g g c t a c g c t t a c a t c a g a t a
a g t c c a g t a g c a c c g c t t a t a t g g a a c t t a g c a g c c t t a c
t t c c g a a g a t t c c g c g g t g t a t t a c t g c g c g a g a g g g a c t
t a c t a c t a c g g g a g t c g a g t a t t c g a t t a t t g g g g t c a a g
g c a c g a c g c t c a c g g t g a g c t c a g g t g g t g g a g g g t c t g g
g g g t g g c g g c a g t g g t g g g g g g g c t c a g a c a t c g t g a t g
a c c c a g g c a g c a c c t t c t a t c c c g g t a a c c c c a g g c g a g t
c t g t a t c t a t c a g t t g t c g g t c c a g c a a g t c t c t t c t c a a
c a g t a a t g g c a a t a c a t a t c t t t a c t g g t t c c t c c a a a g g
c c t g g g c a a a g t c c t c a a c t t c t t a t a t a t c g g a t g t c c a
a t c t t g c g a g t g g c g t a c c c g a c a g g t t t t c a g g g t c t g g
g a g c g g a a c a g c t t t t a c g t t g a g a a t a t c c a g g g t a g a a
g c t g a g g a c g t c g g t g t a t a t t a t t g c a t g c a a c a t c t c g
a a t a c c c c t t t a c c t t c g g c g c t g g t a c a a a g c t c g a a t t
g a a a c g c a g c g a t c c a a c c a c g a c g c c a g c g c c a c g a c c a
c c t a c g c c c g c t c c a a c t a t t g c c t c c c a g c c c c t g a g t c
t t c g g c c a g a a g c g t g t a g a c c t g c t g c c g g c g g g g c c g t
t c a t a c g c g g g g c c t t g a c t t t g c a t g t g a t a t c t a t a t a
t g g g c t c c t t t g g c g g g a a c t t g c g g a g t g c t t c t t t t g t
c a c t c g t g a t a a c g t t g t a t t g t a a a a g g g g t c g a a a g a a
a c t c c t c t a t a t a t t t a a g c a g c c c t t t a t g a g g c c c g t g
c a a a c a a c a c a a g a a g a g g a c g g a t g c t c t t g t c g a t t c c
c g g a a g a g g a g g a g g g g g g t g t g a g c t t a g g g t c a a g t t
t t c t c g c t c t g c c g a c g c g c c a g c c t a t c a a c a g g g c c a a
a a c c a g c t g t a t a a c g a a c t c a a c c t c g g g c g c c g g g a a g
a g t a t g a c g t c c t t g a c a a a c g g c g c g g t c g c g a c c c t g a
a a t g g g t g g a a a a c c g a g g c g a a a g a a c c c c c a g g a g g g a
c t t t a c a a c g a a t t g c a a a a a g a c a a g a t g g c c g a a g c c t
a t t c c g a a a t t g g a a t g a a a g g c g a g c g g a g a c g a g g t a a
g g g g c a t g a c g g c c t g t a t c a a g g g c t c t c t a c g g c c a c g
a a g g a t a c t t a c g a c g c c c t t c a t a t g c a a g c t c t t c c a c
c a c g g g g t t c g a g c g g c a g t g g a g a g g g c a g a g g a a g t c t
g c t a a c a t g c g g t g a c g t c g a g g a g a a t c c t g g c c c a a t g
a g t g g g g a a a g t a t g a a c t t c a g c g a t g t a t t t g a c t c c t
c c g a a g a t t a c t t t g t a t c t g t g a a t a c g a g c t a t t a c t c
c g t c g a t a g t g a a a t g c t g c t c t g t a g t c t c c a a g a a g t c
c g c c a a t t c a g t c g c c t c t t c g t t c c c a t c g c g t a c t c c c
t t a t t t g t g t t t t t g g c c t t c t g g g t a a c a t c c t g g t t g t
a a t c a c a t t c g c t t t c t a t a a a a a a g c t c g g a g t a t g a c t
g a t g t t t a c c t t c t t a a c a t g g c t a t a g c g g a c a t t c t t t
t t g t g c t t a c t c t c c c a t t c t g g g c t g t g a g c c a t g c a a c
a g g g g c g t g g g t t t t t t c a a a t g c c a c a t g t a a g c t g c t t
a a a g g g a t c t a t g c a a t a a a c t t c a a t t g c g g g a t g c t c c
t g c t g a c a t g c a t c a g t a t g g a t c g a t a c a t a g c t a t a g t

10

20

30

40

50

acaggcgactaagtccttcgcctgcatcccgcaacactg
cctaggagcaaaattatttgccctcggtcgtaatgggggctct
cagtgatcatctctccagtaacgtttgtctttaaccagaa
atatatacacacagggttctgatgtatgtgaaccaaagtat
cagacagtgagtgaaaccaataacgggtggaagtttgcttatgt
tggggcttgaggctgcttttttggggtttttcatcccaactgat
gttcatgatttttctgttatatacattttatgttaagacccttg
gttcaggcgcaaaatagcaagagacataaggccaattcga
tcatcatcttgccgtgggtgttggtccttcttgccctgtcagat
cccccataaataatgggttctgtctcggtcacccgcccgttaacttg
ggtaagatgaatcgatcttggtcagtcaggagaagttgatcg
gatacacccaaaactgtgacagaagtgcctggcccttcccttca
ctgtttgtctgaaccagggttttggtatgtcttttataggacag
aagttttcgaaaattacttcttgaaaatccttcaagggaacctct
gggtgtgttctgaagggaagtacaaagagctctggcctttagtgtg
cgctggggcgctacagtgagaaataataatcccgggcagaccctc
gagactgctgataatgacaaacgcaagtctcttctactatgg
gatccggcgcaacaaaacttctctctgtgaaacaaaggccgg
agatgtcgaagagaatcctgggaccgggtgagcaaggggcgag
gagctgttctaccgggggtgggtgcccattctgggtcgagctgg
acggcgacgtaaaacggccacaagtctcagcgtgtctggcgga
ggggcgaggggcgatgccaccctacggccaagctgacccctgaag
ttcatcttgcaaccaccggccaagctgccccgtgccctggccca
ccctctgtgacccaccctgacccctacggcggtgcagtgccttcag
ccgctaccgccgaccacatgaagcagcacgacttcttcaag
tccgccaatgcccgaggctacgtctcaggagcgcacccatct
tcttcaaggacgacggcaactacaaagaccgcgcccgaagg
gaagttcgaaggcgacaccctgggtgaaccgcatacgagctg
aaggggcatcgacttcaagggaaggacggccaacatcctggggc
acaagctggagtagaactacaaacagccacaacgtctatat
catggccgacaaagcagaagaacggcatcaaggcgaaacttc
aagatccgccacaaacatcgaggacggcagcgtgcagctcg
ccgaccactaccagcagaacaccccccattcggcgacggccc
cgtgctgctgcccgaacaacactacccctgagcaccacagtc
gccctgagcaaaagaccccacaacgagaaagcgcgatacactgg
tccctgctggagttcgtgacccgcccgggatacactctcgg
catggacgagctgtacaagtaaa (配列番号：430)

【0109】

コンストラクト2 MHC CAR領域 (MHC-CAR1部分B、MHC-CAR1部分A領域)を以下に提供する：

MVCLKLPGGSCMTALTVTLMVLSSPLALASDENPVVHFFK
NIVTPRTPPPGGGGSGGGGSGGSGDTRPRFLWQPKRECHFF
NGTERVRFLDRYFYNQEE SVRFDSDVGEFRAVTELG RPD
EYWNSQKDILEQARA AVDTYCRHNYGVVESFTVQRRVQPK
VTVPYPSKTQPLQHNNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFLNGQEE
KAGMVSTGLIQNGDWT FQTLVMLETVPRSGEVYTCQVEHP
SVTSPLTVEWRARSESAQSKMLS GVG G FVLGLLFLGAGLF
IYFRNQTSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY
DVL DKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS
EIGMKGERRRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

GSSGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPMASGVPVLGFFIIAV
LMSAQESWAIKEEHVIIQAEFYLNPDQSGEFMFDFDGDEI
FHVDMAKKETVWRLEEFGRFASF EAQGALANIAVDKANLE
IMTKRSNYTPITNVPPEVTVLTNSPVELREP NVLICFIDK
FTPPVVNVVTWLRNGKPVTTGVSETVFLPREDH LFRKFHYL
PFLPSTEDVYDCRVEHWGLDEPLLKHWEFDAPSPLPETTE
NVVCALGLTVGLVGIIIGTIFI IKGLTSRVKFSRSADAPA
YQQGQNQLYNE LNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRK
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDGLYQG
LSTATKDTYDALHMQALPPR (配列番号：431)

10

【0110】

コンストラクト2 MHC CAR領域 (MHC-CAR1部分B、MHC-CAR1部分A) をコードする例示的な核酸配列を以下に提供する：

atgggtatgcttgaa gctcccg ggcgggtcc tgc atgac cg
ctctc actgttactctt atgggtcc ttagttcac ccgcttg c
cctgg gcatctgatg aga atcccg tgggttc attttttt taag
aacatc gtcacac ccgcgcac cccac ctggggg aggcggat
ctggcg gaggcg gggag tggagg ctcagg agacacaa gacc
ccgat tcttgtggc agcccaa aagg gagg tgc cattttttt c
aatgg gga cggaa cga gtttcgc tttcc ttgatc ggtactttt
acaac caa gaa gagg agtg tacc ggttc gactc agatgtc gg
cgag tttcc gagg cgggttac ggaatt ggggc gacctgac gcg
gagta ctggaa ctccc aaaa agga taatttt ggagc aggcac
gagc agctgtggac acc taattgtc gacataa ttatgg tgt
ggtgg aaatcc tttac agttc agcggc ggggtg caacc taaa
gtgac ccgtgtatcc atctaaa acgc aaaccc ctcca accc
ataa cctcc tgggtgtgtt ccgt aagg cggcttct atccc gg
gtcaa attga ggtc aggtgg ttcctc aaagg ttag gagg ag
aagg ccg gaattgg taag tacc tgggtctt atcc aga accgg ag
actgg acccttcca aaacttt gggtaatgtt ggaa accggtgc c
gcgat ccgggg gagg tgtatata catgcca agttga accccg
agtg ttac gagg cccctg acgggttg agtg gagg ggcgc ggt
cagag agcgc caaatct aaaa atgctgtc aggag taggc gg
attttgt actc ggactcc tctttttt gggcgc tgggtt gttt
atct acttttag aaac caaa caagt agag taagg ttttcc c
gaagtgc ggaac gctccc gcgtatc agca aggtcaaaa acca
gc tttta caac gaactga aactt ggga cgcgc gaag agtac
gatgttctt gataa gcgg agagg gcgc gatccc gaaa atgg
gggg gaaag cctc ggagg gaagaa cccaca agaagg cc tttta
taaat gaactgc aga agga caag atggc ggagg cgta tttc
gaaat aggc atga aggg tgaac ggagg agagg aagg gac
atgac ggaacttt atca agga ttgtct accgc aaactaa aga
cacc tatgac gcgttg cac atgcagg cttctccc tccg aga
ggttc gagc ggc agtgg agagg gcag agga agtctgtc taa
catgc ggtgac gtc gag gaga aatcc tggccc aatgg caat
atct ggtgttctt gtcctc ggggtttttt atcata gccgta
ctgatgtc agcac agga atcatgg gcgataaaa agaa gac
acgtg ataata cagg cggag tttttat tttga acccc ggacc ca
gagc ggtg agttcatgtt cgattttt gatggc gacg agata
tttca cgttg acatggc aaaaaa agga aacgg tgtgg agac

20

30

40

50

ttgaggagtttggacgatttcgcatactttgaggcacaagg
agcactcgcacaataatcgcgggtggacaaaggccaacctggag
atcatgacaaaacgctccaattatacgcctatacactaatg
tgccccctgagggttaactgtgtgtcacaataattctcccgtaga
acttaggggaacctaacgtctctcatatgtttcatcgaacaag
ttcactcctccgggtgggtcaatgttaacgtggcttccgggaatg
gtaagccgggtcacccacgggtgtctcagagaccgtatttct
gcccagagaaagaccacctcttccgcaaatttcattacctt
ccctttcttcttcaacgggaagacgtttacgactgcaggg
tcgaacattggggggcttggacgagccacttctcaagcattg
ggagttcgaacgccccatcacccgcttccagaaacgactgaa
aacgttgtcttgccgtcttggccctgacagtgggacctggtag
gcattattatcggggaccatcttttatcatcaaaagggtttgac
ttcccgggtcaaaatttagcagatccgctgacgcaaccggcc
taccagcaggggccagaaccacaactctacaacgagctgaatc
tcgggccgacgggaagagtagacgtactcgacaaagcggag
agggtcgagacccctgagatgggcccgtaaaaccgagacggaaa
aatccccaagagggtctttataaatgaactccagaaggata
agatggctgaagccctattctgagatagggaatgaaaggcga
gcggcgaggagggttaaggggccatgatggccctttaccaggga
ctctccacggcaaccaaaagatacttacgacgccccttcaca
tgcaagccctcccggccacgc (配列番号：71)

【0111】

コンストラクト2殺傷スイッチおよびMHC CAR領域 (RQR8、MHC-CAR
1部分B、MHC-CAR1部分A領域) を以下に提供する：

MGTSLLCWMALCLLGADHADACPYSNPSLCSGGGGGSELPT
QGTFSNVSTNVSPAKPTTTACPYSNPSLCSGGGGGSPAPRP
PTPAPTIIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI
WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVVRS
SGQCTNYALLKL AGDVESNP GPPTGMVCLKLPGGSCMTAL
TVTLMVLSSPLALASDENPVVHFFKNIVTPRTPPGGGGSG
GGGSGGSGDTRPRFLWQPKRECHFFNGTERVRFLDRYFYN
QEESVRFDSDVGEFRAVTELG RPD AEYWNSQKDILEQARA
AVDTYCRHNYGVVESFTVQRRVQPKVTVYPSKTQPLQHNN
LLVCSVSGFYPGSIEVRWFLNGQEEKAGMVSTGLIQNGDW
TFQTLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWRARSE
SAQSKMLSGVGGFVLGLLFLGAGLFIYFRNQTSRVKFSRS
ADAPAYQQGQNQLYNE LNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGG
KPRRKNPQEGLYNE LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGK GHD
GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSSSGSGEGRGSLLTC
GDVEENPGPMAISGVPVLGFFIIA V LMSAQESWAIKEEHV
IIQAEFYLNPDQSGEFMFDFDGD E I FHVDMAKKETVWRLE
EFGRFASF EAQ GALANI AVDKANLEIMTKRSNYTPITNVP
PEVTVLTNSPVELREPNVLICFIDKFTPPVVNVVTWLRNGK
PVT TGVS ETVFLPRE D H LFRKFHYLPFLPSTEDVYDCRVE
HWGLDEPL LKHWEFDAPSPLPETTEN V VCA LGLTVGLVGI
IIGTIFI I KGLTSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE LNLG
RREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE LQKDKM
AEAYSEIGMKGERRRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ
ALPPR (配列番号：211)

10

20

30

40

50

【0112】

コンストラクト2 殺傷スイッチおよびMHC CAR領域（RQR8、MHC-CAR 1部分B、MHC-CAR 1部分A領域）をコードする例示的な核酸配列を以下に提供する：

```
atggggtaccttcactgttgtgtgctgggatggcactttgtctttt
tggggtgcccgatcatgctgatgcatgtccgtactccaatccc
tagccctgtgtctccggggggggagggaagtgaactccctacac
cagggaaccccttctctaattgtctccaccaacgtctcccttg
caaaaaccgacccacacagccttgccctatatagtaaaccttc
cctctgtagtggagggggggggttcacccctgtctccacgcccct
cctaccccccgcccaacgatcgcgctcacaaaccgctcagctc
ttaggcccggaagcctgtaggccagcggctggcgggtgcgggt
tcatacgcgggggattggattttgtccctgcgacattttacatt
tggggctccgcctggccgggtaccttgttggggtatttgctgttgt
ctctttgtttattacgcctttatttgcaatcacagggaacaggcg
acgagtatgcaaatgcccgcggcccgctcgtgagatctgggg
tccgggccaaatgtactaactacgcctttgttgaaactcgcctg
gcgatgttgaaagtaaaccccggtccctccaacagggtatggt
atgcttgaaagctcccggggcgggtccctgcattgaccgctctc
actgtttactctttatggtcccttagtttcaccgcttgccctgg
catctgatgagaaatcccgtgggttcattttttttaagaaacat
cgtcacaccgcgcacccccacccctggggggaggcgggattctggc
ggaggcggggagggtggaggctcaggagacacaaaggaccccgat
tctttgtggcagcccaaaaggggagggtgccatttttttcaaatgg
gacgggaacgagttcgccttccttgatcgggtaccttttacaac
caagaaaggagggtgtacgggttcgacctcagatgtcggcgaggt
tccgagcgggttacgggaattggggcgaccctgacgcgggagta
ctgggaactcccacaaagggtatttttgaggcaggcaccgagca
gctgttggaacacctaattgtcgaacataattatgggtgtgggtgg
aatcccttttacagtttcagcggcggggtgcaaccctaaagtgac
cgtgtatcccatctaaaacgcacaacccctccaacacccataaac
ctcctgggtgtgttccgtaagcggcttctatatcccggggtcaa
ttgagggtcagggtgggttcctcaacgggtcaggagggaaggc
cgggaatgggtaagtactgggtcttataccagaacgggagacctgg
accttccaaaactttgggtaatgttgtggaacgggtgccgcgat
ccgggggagggtgtatacatgccaagttgaaacacccgagtggt
tacgagcccccctgacgggttgagtgaggggcgcggtcagag
agcgcaccaatctaaaaatgctgtctcaggagtaggcgggatttg
tactcggactccctcttttttgggcgcttggggttgttttatcta
cttttagaaaaccacaaacaaagttagagtaaaagttttcccgaaagt
gcgggacgctcccgcgtatcagcaagggtcaaaaaccagctttt
acaaacgaactgaacttggggacgacgcgaaggagtacgatgt
tctttgataaagcgggaggaggcgcgatcccgaaaatggggggga
aagcctcgggagggaagaaacccacaaaggacccctttataatg
aactgcagaaaggacaaagatggcgaggaggcggtattccgaaat
aggcatgaagggtgaacgggaggagagggaagggaacatgac
ggacttttatcaagggttgtctaccgcacactaaagacacct
atgacgcggttgcacatgcaggcctctccctcccgaggagggttc
gagcggcgagtggagaggggcaggagggaagtctgctaacatgc
ggtgacgtcgaaggagaatcctggccccaatggcacaatatctg
```

10

20

30

40

50

g t g t t c c t g t c c t c g g g t t t t t a t c a t a g c c g t a c t g a t
g t c a g c a c a g g a a t c a t g g g c g a t a a a g a a g a g c a c g t g
a t a a t a c a g g c g g a g t t t t a t t t g a a c c c g g a c c a g a g c g
g t g a g t t c a t g t t c g a t t t t g a t g g c g a c g a g a t a t t t c a
c g t t g a c a t g g c a a a a a g g a a a c g g t g t g g a g a c t t g a g
g a g t t t g g a c g a t t c g c a t c a t t t g a g g c a c a a g g a g c a c
t c g c c a a t a t c g c g g t g g a c a a g g c c a a c c t g g a g a t c a t
g a c a a a a c g c t c c a a t t a t a c g c c t a t c a c t a a t g t g c c c
c c t g a g g t t a c t g t g c t c a c a a a t t c t c c c g t a g a a c t t a
g g g a a c c t a a c g t c c t c a t a t g t t t c a t c g a c a a g t t c a c
t c c t c c g g t g g t c a a t g t a a c g t g g c t t c g g a a t g g t a a g
c c g g t c a c c a c g g g t g t c t c a g a g a c c g t a t t t c t g c c c a
g a g a a g a c c a c c t c t t c c g c a a a t t t c a t t a c c t t c c c t t
t c t t c c t t c a a c g g a a g a c g t t t a c g a c t g c a g g g t c g a a
c a t t g g g g g c t t g a c g a g c c a c t t t c t c a a g c a t t g g g a g t
t c g a c g c c c c a t c a c c g c t t c c a g a a a c g a c t g a a a a c g t
t g t c t g c g c t c t t g g c c t g a c a g t g g g c c t g g t a g g c a t t
a t t a t c g g g a c c a t c t t t a t c a t c a a a g g t t t g a c t t c c c
g g g t c a a a t t t a g c a g a t c c g c t g a c g c a c c g g c c t a c c a
g c a g g g c c a g a a c c a a c t c t a c a a c g a g c t g a a t c t c g g c
c g a c g g g a a g a g t a t g a c g t a c t c g a c a a g c g g a g a g g t c
g a g a c c c t g a g a t g g g c g g t a a a c c g a g a c g g a a a a a t c c
c c a a g a g g g t c t t t a t a a t g a a c t c c a g a a g g a t a a g a t g
g c t g a a g c c t a t t c t g a g a t a g g g a t g a a a g g c g a g c g g c
g g a g g g g t a a g g g c c a t g a t g g c c t t t a c c a g g g a c t c t c
c a c g g c a a c c a a a g a t a c t t a c g a c g c c c t t c a c a t g c a a
g c c c t c c c g c c a c g c (配列番号：403)

【0113】

コンストラクト2 (RQR8、MHC-CAR1部分B、MHC-CAR1部分A、GFP領域)を以下に提供する。

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

HWGLDEPL LKHWEFDAPSP LPETTENVVCA LGLTVGLVGI
IIGTIFI I KGLTSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE LNLG
RREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM
AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ
ALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPVSKGEELFTGVVP
ILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFICTTGKL
PVPWPTLVTTLT YGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYV
QERTIFFKDDGNYKTRA EVKFEGDTLVNRIELKGI DFKED
GNILGHKLEYNYN SHNVYIMADKQKNGIKANFKIRHNIED
GSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNE
KRDHMLVLL E FVTAAGITLGMDELYK* (配列番号：405)

10

【0114】

コンストラクト2 (RQR8、MHC-CAR1部分B、MHC-CAR1部分A、GFP領域) をコードする例示的な核酸配列を以下に提供する：

atgggtacttctactgttgtgtgctggatggcactttgtcttt
tgggtgccgatcatgctgatgcatgtccgtactccaatcc
tagcctgtgtctccggggggggaggaggatgaactccctaca
cagggaaccttctctaatgtctccaccaacgtctccctg
caaaaaccgaccacacacagcttgccctatatagtaacccctt
cctctgttagtgagggggggggttccacctgtctccacgccc
cctacccccgcgcacacgatcgcggtcacacccgctcagtc
ttaggcccggaagcctgtaggccagcggctggcgggtgcggt
tcatacgcgggggattggattttgcttgcgacatttacatt
tgggcttccgcttgcccggtactttgtgggggtattgtgtgt
ctcttgtttattacgctttattgcaatcacagggaacaggcg
acgagtatgcaaatgcccgcggcccgctcgtgagatctggg
tccgggccaatgtactaacctacgctttgttgaaactcgcgtg
gcgatgttgaaagttaaccccggtccctccaacagggtatggt
atgcttgaagctcccggggcggggtccctgcatgaccgctctc
actgtttactcttatgtgtccttagttcacccgcttgccctgg
catctgatgagaaatcccgtgggttcatttttttaagaaat
cgtcacacccgcgcacccccacctggggggaggcggatctggc
ggaggcggggagtggaggctcaggagacacaaagaccccgat
tcttgttgccagcccaaaaggggagtggcatttttttcaatgg
gacgggaacgagttcgccttcttgatcgggtactttttacaac
caagaagagagagtgtacgggttcgactcagatgtcggcgagt
tccgagcgggttacgggaattggggcgaccctgacgcggagta
ctgggaactcccacaaaggatatttttgaggcaggcacgagca
gctgttggaacacctattgtcgacataattatgggtgtgggtgg
aatccctttacagttcagcggcggggtgcaacctaaagtga
cgtgtatccatctaaaacgcgaacccctccaacacccataac
ctccttggtgtgttccgttaagcggcttctatcccggggtcaa
ttgagggtcagggtgggttccctcaacgggtcaggagggaaggc
cgggaatgggtaagtactgggtcttatccagaacgggagactgg
accttccaaaactttgggtaatgttggaaacgggtgcccgcgat
ccgggggagggtgtatcatgccaagttagaacacccgagtggt
tacgagcccccctgacgggttgagtgaggggcgcggtcagag
agcgcacacaaatctaaaatgctgttcaggagtaggcgggatttg
tactcggactcctctttttggggcgctgggttggtttatctta
cttttagaaaaccaaacaagttagagtaaaagttttcccgaagt

20

30

40

50

g c g g a c g c t c c c g c g t a t c a g c a a g g t c a a a a c c a g c t t t
a c a a c g a a c t g a a c t t g g g a c g a c g c g a a g a g t a c g a t g t
t c t t g a t a a g c g g a g a g g g c g c g a t c c c g a a a t g g g g g g a
a a g c c t c g g a g g a a g a a c c c a c a a g a a g g c c t t t a t a a t g
a a c t g c a g a a g g a c a a g a t g g c g g a g g c g t a t t c c g a a a t
a g g c a t g a a g g g t g a a c g g a g g a g a g g a a a g g g a c a t g a c
g g a c t t t a t c a a g g a t t g t c t a c c g c a a c t a a a g a c a c c t
a t g a c g c g t t g c a c a t g c a g g c t c t c c c t c c g a g a g g t t c
g a g c g g c a g t g g a g a g g g c a g a g g a a g t c t g c t a a c a t g c
g g t g a c g t c g a g g a g a a t c c t g g c c c a a t g g c a a t a t c t g
g t g t t c c t g t c c t c g g g t t t t t t a t c a t a g c c g t a c t g a t
g t c a g c a c a g g a a t c a t g g g c g a t a a a a g a a g a g c a c g t g
a t a a t a c a g g c g g a g t t t t a t t t g a a c c c g g a c c a g a g c g
g t g a g t t c a t g t t c g a t t t t g a t g g c g a c g a g a t a t t t c a
c g t t g a c a t g g c a a a a a a g g a a a c g g t g t g g a g a c t t g a g
g a g t t t g g a c g a t t c g c a t c a t t t g a g g c a c a a g g a g c a c
t c g c c a a t a t c g c g g t g g a c a a g g c c a a c c t g g a g a t c a t
g a c a a a a c g c t c c a a t t a t a c g c c t a t c a c t a a t g t g c c c
c c t g a g g t t a c t g t g c t c a c a a a t t c t c c c g t a g a a c t t a
g g g a a c c t a a c g t c c t c a t a t g t t t c a t c g a c a a g t t c a c
t c c t c c g g t g g t c a a t g t a a c g t g g c t t c g g a a t g g t a a g
c c g g t c a c c a c g g g t g t c t c a g a g a c c g t a t t t c t g c c c a
g a g a a g a c c a c c t c t t c c g c a a a t t t c a t t a c c t t c c c t t
t c t t c c t t c a a c g g a a g a c g t t t a c g a c t g c a g g g t c g a a
c a t t g g g g g c t t g a c g a g c c a c t t c t c a a g c a t t g g g a g t
t c g a c g c c c c a t c a c c g c t t c c a g a a a c g a c t g a a a a c g t
t g t c t g c g c t c t t g g c c t g a c a g t g g g c c t g g t a g g c a t t
a t t a t c g g g a c c a t c t t t a t c a t c a a a g g t t t g a c t t c c c
g g g t c a a a t t t a g c a g a t c c g c t g a c g c a c c g g c c t a c c a
g c a g g g c c a g a a c c a a c t c t a c a a c g a g c t g a a t c t c g g c
c g a c g g g a a g a g t a t g a c g t a c t c g a c a a g c g g a g a g g t c
g a g a c c c t g a g a t g g g c g g t a a a c c g a g a c g g a a a a a t c c
c c a a g a g g g t c t t t a t a a t g a a c t c c a g a a g g a t a a g a t g
g c t g a a g c c t a t t c t g a g a t a g g g a t g a a a g g c g a g c g g c
g g a g g g g t a a g g g c c a t g a t g g c c t t t a c c a g g g a c t c t c
c a c g g c a a c c a a a g a t a c t t a c g a c g c c c t t c a c a t g c a a
g c c c t c c c g c c a c g c g g a t c c g g c g c a a c a a a c t t c t c t c
t g c t g a a a c a a g c c g g a g a t g t c g a a g a g a a t c c t g g a c c
g g t g a g c a a g g g c g a g g a g c t g t t c a c c g g g g t g g t g c c c
a t c c t g g t c g a g c t g g a c g g c g a c g t a a a c g g c c a c a a g t
t c a g c g t g t c t g g c g a g g g c g a g g g c g a t g c c a c c t a c g g
c a a g c t g a c c c t g a a g t t c a t c t g c a c c a c c g g c a a g c t g
c c c g t g c c c t g g c c c a c c c t c g t g a c c a c c c t g a c c t a c g
g c g t g c a g t g c t t c a g c c g c t a c c c c g a c c a c a t g a a g c a
g c a c g a c t t c t t c a a g t c c g c c a t g c c c g a a g g c t a c g t c
c a g g a g c g c a c c a t c t t c t t c a a g g a c g a c g g c a a c t a c a
a g a c c c g c g c c g a g g t g a a g t t c g a g g g c g a c a c c c t g g t
g a a c c g c a t c g a g c t g a a g g g c a t c g a c t t c a a g g a g g a c
g g c a a c a t c c t g g g g c a c a a g c t g g a g t a c a a c t a c a a c a
g c c a c a a c g t c t a t a t c a t g g c c g a c a a g c a g a a g a a c g g

10

20

30

40

50

c a t c a a g g c g a a c t t c a a g a t c c g c c a c a a c a t c g a g g a c
g g c a g c g t g c a g c t c g c c g a c c a c t a c c a g c a g a a c a c c c
c c a t c g g c g a c g g c c c c g t g c t g c t g c c c g a c a a c c a c t a
c c t g a g c a c c c a g t c c g c c c t g a g c a a a g a c c c c a a c g a g
a a g c g c g a t c a c a t g g t c c t g c t g g a g t t c g t g a c c g c c g
c c g g g a t c a c t c t c g g c a t g g a c g a g c t g t a c a a g t a a ` (
配列番号：409)

【0115】

例示的なCS-1標的化CARコンストラクトのアミノ酸配列を以下に提供する（なお、これらの設計は、CD28ドメインにより置換されてもよい4-1BBを含有する）：

抗CS1-CAR-v1 (Luc63-V1 CAR)：

M A L P V T A L L L P L A L L L H A A R P E V K L L E S G G G L V Q P G G S L K
L S C A A S G F D F S R Y W M S W V R Q A P G K G L E W I G E I N P D S S T I N
Y T P S L K D K F I I S R D N A K N T L Y L Q M S K V R S E D T A L Y Y C A R P
D G N Y W Y F D V W G A G T T V T V S S G G G G S G G G G S G G G G S D I V M T
Q S H K F M S T S V G D R V S I T C K A S Q D V G I A V A W Y Q Q K P G Q S P K
L L I Y W A S T R H T G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S N V Q S E D L A D
Y F C Q Q Y S S Y P Y T F G G G T K L E I K G L A V S T I S S F F P P G Y Q K R
G R K K L L Y I F K Q P F M R P V Q T T Q E E D G C S C R F P E E E E G G C E L
R V K F S R S A D A P A Y Q Q G Q N Q L Y N E L N L G R R E E Y D V L D K R R G
R D P E M G G K P R R K N P Q E G L Y N E L Q K D K M A E A Y S E I G M K G E R
R R G K G H D G L Y Q G L S T A T K D T Y D A L H M Q A L P P R (配列番号：129)

抗CS1-CAR-v2 (Luc63-V2 CAR)：

M A L P V T A L L L P L A L L L H A A R P E V K L L E S G G G L V Q P G G S L K
L S C A A S G F D F S R Y W M S W V R Q A P G K G L E W I G E I N P D S S T I N
Y T P S L K D K F I I S R D N A K N T L Y L Q M S K V R S E D T A L Y Y C A R P
D G N Y W Y F D V W G A G T T V T V S S G G G G S G G G G S G G G G S D I V M T
Q S H K F M S T S V G D R V S I T C K A S Q D V G I A V A W Y Q Q K P G Q S P K
L L I Y W A S T R H T G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S N V Q S E D L A D
Y F C Q Q Y S S Y P Y T F G G G T K L E I K T T T P A P R P P T P A P T I A S Q
P L S L R P E A C R P A A G G A V H T R G L D F A C D I Y I W A P L A G T C G V
L L L S L V I T L Y C K R G R K K L L Y I F K Q P F M R P V Q T T Q E E D G C S
C R F P E E E E G G C E L R V K F S R S A D A P A Y Q Q G Q N Q L Y N E L N L G
R R E E Y D V L D K R R G R D P E M G G K P R R K N P Q E G L Y N E L Q K D K M
A E A Y S E I G M K G E R R R G K G H D G L Y Q G L S T A T K D T Y D A L H M Q
A L P P R (配列番号：130)

抗CS1-CAR-v3 (Luc63-V3 CAR)：

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

10

20

30

40

50

HYTQKSLSLSPGKKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG
CSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN
LGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKD
KMAEAYSEIGMKGERRRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALH
MQALPPR (配列番号: 131)

抗CS1-CAR-v4 (Luc90-V1 CAR):

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLQQPGAELVRPGASVK
LSCKASGYSFTTYWMNWVKQRPGQGLEWIGMIHPSDSETR
LNQKFQDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCARS
TMIATRAMDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGGSDIVM
TQSQKSMSTSVGDRVSITCKASQDVITGVAWYQQKPGQSP
KLLIYSASYRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISNVQAEDLA
VYYCQQHYSTPLTFGAGTKLELKGAVSTISSFFPPGYQK
RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE
LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR
GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE
RRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (配列番号: 1
32)

抗CS1-CAR-v5 (Luc90-V2 CAR):

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLQQPGAELVRPGASVK
LSCKASGYSFTTYWMNWVKQRPGQGLEWIGMIHPSDSETR
LNQKFQDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCARS
TMIATRAMDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGGSDIVM
TQSQKSMSTSVGDRVSITCKASQDVITGVAWYQQKPGQSP
KLLIYSASYRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISNVQAEDLA
VYYCQQHYSTPLTFGAGTKLELKTTPAPRPPTPAPTIAS
QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCG
VLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC
SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL
GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK
MAEAYSEIGMKGERRRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALH
MQALPPR (配列番号: 133)

抗CS1-CAR-v6 (Luc90-V3 CAR):

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLQQPGAELVRPGASVK
LSCKASGYSFTTYWMNWVKQRPGQGLEWIGMIHPSDSETR
LNQKFQDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCARS
TMIATRAMDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGGSDIVM
TQSQKSMSTSVGDRVSITCKASQDVITGVAWYQQKPGQSP
KLLIYSASYRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISNVQAEDLA
VYYCQQHYSTPLTFGAGTKLELKEPKSPDKTHTCPPCPAP
PVAGPSVFLFPKPKDTLMIAARTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALH
NHYTQKSLSLSPGKKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED
GCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL
NLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK
DKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDAL
HMQALPPR (配列番号: 134)

10

20

30

40

50

抗CA1-CAR-v7 (Luc34-V1 CAR) :

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQQSGAELARPGASVK
LSCKASGYTFTSYWMQWVKQRPGQGLEWIGAIYPGDGDTR
YTQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSSLASEDSAVYYCARG
KVYYGSSNPFAFWGQGTTLVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSDIQ
MTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASDHINNWLAWYQQKPGNA
PRL LISGATSLETGVPSRFSGSGSGKDYTLSITSLQTEDV
ATYYCQQYWSTPWTFGGGTKLEIKGLAVSTISSFFPPGYQ
KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGC
ELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKR
RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG
ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (配列番号:
135)

10

抗CS1-CAR-v8 (Luc34-V2 CAR) :

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQQSGAELARPGASVK
LSCKASGYTFTSYWMQWVKQRPGQGLEWIGAIYPGDGDTR
YTQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSSLASEDSAVYYCARG
KVYYGSSNPFAFWGQGTTLVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSDIQ
MTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASDHINNWLAWYQQKPGNA
PRL LISGATSLETGVPSRFSGSGSGKDYTLSITSLQTEDV
ATYYCQQYWSTPWTFGGGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIA
SQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTC
GVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG
CSCRFP EEEEGGC ELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE LNL
LGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKD
KMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALH
MQALPPR (配列番号: 136)

20

抗CS1-CAR-v9 (Luc34-V3 CAR) :

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQQSGAELARPGASVK
LSCKASGYTFTSYWMQWVKQRPGQGLEWIGAIYPGDGDTR
YTQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSSLASEDSAVYYCARG
KVYYGSSNPFAFWGQGTTLVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSDIQ
MTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASDHINNWLAWYQQKPGNA
PRL LISGATSLETGVPSRFSGSGSGKDYTLSITSLQTEDV
ATYYCQQYWSTPWTFGGGTKLEIKEPKSPDKTHTCPPCPA
PPVAGPSVFLFPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL P
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGKKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE
DGCSCRFP EEEEGGC ELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE
LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ
KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDA
LHMQALPPR (配列番号: 137)

30

40

抗CS1-CAR-v10 (LucX1-V1 CAR)

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQQSGPELVKPGASVK
ISCKASGYAFSSSWMNWVKQRPGQGLEWIGRIYPGDGDTK
YNGKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSSLTSVDSAVYFCARS
TMIAATGAMDYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGGSETTV

50

TQSPASLSMAIGEKVTIRCITSTDDIDDDMNWYQQKPGEP
KLLISEGNTLRPGVPSRFSSSGYGTDVFVFTIENMLSE
DVA
DYYCLQSDNLP LTFGGGKLEIKGLAVSTISSFFPPGYQ
RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE
LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL
DKRR
GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE
RRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (配列番号: 138)

抗CS1-CAR-v11 (LucX1-V2 CAR)

MALPVTALLPLALLLHAARPQVQLQQSGAELARPGASVK
LSCKASGYTFTSYWMQWVKQRPGQGLEWIGAIYPGDGDT
R
YTQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLSASEDSAVYYCARG
KVYYGSNPFAYWGQGT LVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSDIQ
MTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASDHINNWLAWYQQKPGNA
PRL LISGATSLETGVP SRFSGSGSGKD YTLSITSLQTEDV
ATYYCQQYWSTPWTFGGGKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIA
SQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTC
GVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG
CSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL
GRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK
MAEAYSEIGMKGERRRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALH
MQALPPR (配列番号: 139)

抗CS1-CAR-v12 (LucX1-V3 CAR) :

MALPVTALLPLALLLHAARPQVQLQQSGPELVKPGASVK
ISCKASGYAFSSSWMNWVKQRPGQGLEWIGRIYPGDGDTK
YNGKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLT SVDSAVYFCARS
TMIATGAMDYWGQGT SVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSETTV
TQSPASLSMAIGEKVTIRCITSTDDIDDDMNWYQQKPGEP
KLLISEGNTLRPGVPSRFSSSGYGTDVFVFTIENMLSE
DVA
DYYCLQSDNLP LTFGGGKLEIKEPKSPDKTHTCPPCPAP
PVAGPSVFLFPKPKDTLM IARTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGKKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED
GCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL
NLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK
DKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALH
MQALPPR (配列番号: 140)

抗CS1-CAR-v13 (LucX2-V1 CAR) :

MALPVTALLPLALLLHAARPQVQLQQSGPELVKPGASVK
ISCKASGYAFSSSWMNWVKQRPGQGLEWIGRIYPGDGDTK
YNGKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLT SVDSAVYFCARS
TMIATGAMDYWGQGT SVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMT
QSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPK
LLIYSASYRYTGVPDRFTGSGSGTDFFTISSVQAEDLAV
YYCQQHYSTPPYTFGGGKLEIKGLAVSTISSFFPPGYQK
RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCCRFPEEEEGGCELR
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRG

10

20

30

40

50

RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER
RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (配列番号: 141)

抗CS1-CAR-v14 (LucX2-V2 CAR):

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQQSGPELVKPGASVK
ISCKASGYAFSSSWMNWVKQRPQGGLIEWIGRIYPGDGDTK
YNGKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSDSAVYFCARS
TMIATGAMDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSDIVM
TQSHKFMSTSVGDRVSI TCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSP
KLLIYSASYRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLA
VYYCQQHYSTPPYTFGGGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIA
SQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFADIYIWAPLAGTCG
VLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC
SCRFP EEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL
GRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK
MAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM
QALPPR (配列番号: 142)

抗CS1-CAR-v15 (LucX2-V3 CAR):

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQQSGPELVKPGASVK
ISCKASGYAFSSSWMNWVKQRPQGGLIEWIGRIYPGDGDTK
YNGKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSDSAVYFCARS
TMIATGAMDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSDIVM
TQSHKFMSTSVGDRVSI TCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSP
KLLIYSASYRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLA
VYYCQQHYSTPPYTFGGGTKLEIKEPKSPDKTHTCPPCPA
PPVAGPSVFLFPKPKDTLMIARTPEVCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGKKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED
GCSCRFP EEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL
NLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK
DKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL
HMQALPPR (配列番号: 143)

【0116】

(iii) MHC-CARの調製

本明細書に記載される任意のMHC-CARコンストラクトは、組換え技術などの常用の方法により調製され得る。本発明におけるキメラ受容体を調製する方法は、MHC-CARコンストラクト（単一のポリペプチドまたは2つのサブユニットを含む）をコードするまたは全体としてコードする核酸または核酸セットの生成を伴う。一部の実施形態では、核酸はまた、MHC-CARの2つのサブユニットのためのコーディング配列の間、またはMHC-CARのためのコーディング配列と宿主細胞中でMHC-CARと共発現される他の遺伝子のためのコーディング配列との間において自己切断性ペプチド（例えば、P2A、T2A、またはE2Aペプチド）をコードする（以下の議論を参照）。

【0117】

MHC-CARの各成分の配列は、常用の技術、例えば、当該技術分野において公知の様々な供給源のいずれか1つからのPCR増幅を介して得られてもよい。一部の実施形態では、MHC-CARの成分の1つまたは複数の配列は、ヒト細胞から得られる。代替的に、MHC-CARの1つまたは複数の成分の配列は合成され得る。各成分（例えば、ド

10

20

30

40

50

メイン)の配列は、PCR増幅またはライゲーションなどの方法を使用して、直接的または間接的に(例えば、ペプチドリンカーをコードする核酸配列を使用して)連結されて、MHC-CARをコードする核酸配列を形成し得る。代替的に、MHC-CARをコードする核酸は合成されてもよい。一部の実施形態では、核酸はDNAである。他の実施形態では、核酸はRNAである。

【0118】

任意のMHC-CARタンパク質、それをコードする核酸、およびその核酸を有する発現ベクターは全て本開示の範囲内であり、薬学的に許容される担体と混合されて医薬組成物を形成することができ、これもまた本開示の範囲内である。「許容される」は、担体が、組成物の活性成分(例えば、核酸、ベクター、細胞、または治療的抗体)と適合性であり、かつ組成物(複数可)が投与される対象に負の影響を与えないことを意味する。本発明の方法において使用される任意の医薬組成物は、凍結乾燥形態または水溶液の形態で薬学的に許容される担体、賦形剤、または安定化剤を含み得る。

10

【0119】

緩衝液を含む薬学的に許容される担体は当該技術分野において周知であり、リン酸、クエン酸、および他の有機酸；アスコルビン酸およびメチオニンを含む酸化防止剤；防腐剤；低分子量ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリンなどのタンパク質；アミノ酸；疎水性ポリマー；単糖；二糖；および他の炭水化物；金属錯体；ならびに／または非イオン性界面活性剤を含んでもよい。例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hooverを参照。

20

【0120】

II. MHC-CARを発現する遺伝子操作された免疫細胞

(i) MHC-CAR発現免疫細胞

本明細書に記載されるMHC-CARを発現する免疫細胞は、MHC／ペプチド-TCRのエンゲージメントを介して自己免疫疾患に関与する病原性細胞(例えば、自己反応性T細胞)を認識できる細胞の特定の集団を提供する。MHC-CARのMHCペプチド部分と病原性細胞上のコグネイトTCRとの間の相互作用は、MHC-CARのシグナル伝達ドメイン(複数可)を介してMHC-CAR発現免疫細胞を活性化させて(任意選択的に免疫細胞の細胞膜シグナル伝達分子を局在化させることによる)、MHC-CAR発現免疫細胞の増殖および／またはエフェクター機能に繋がり、次にそれが病原性細胞を除去する。免疫細胞は、T細胞、NK細胞、マクロファージ、好中球、好酸球、またはその任意の組合せであり得る。一部の実施形態では、免疫細胞はT細胞である。一部の実施形態では、免疫細胞はNK細胞である。特定の例は以下の実施例において提供される。

30

【0121】

免疫細胞の集団は、末梢血単核細胞(PBMC)、骨髓、組織、例えば、脾臓、リンパ節、胸腺、腫瘍組織、または確立された細胞株などの任意の供給源から得られ得る。所望の免疫細胞の種類を得るために好適な供給源は当業者に明らかである。一部の実施形態では、免疫細胞の集団はPBMCに由来する。所望の免疫細胞の種類(例えば、T細胞、NK細胞、マクロファージ、好中球、好酸球、またはその任意の組合せ)は、細胞を刺激分子と共にインキュベートすることにより得られる細胞の集団内で拡大増殖されてもよく、例えば、抗CD3および抗CD28抗体がT細胞の拡大増殖のために使用されてもよい。

40

【0122】

本明細書に記載される任意のMHC-CARコンストラクトを発現する免疫細胞を構築するために、キメラ受容体コンストラクトの安定または一過性発現用の発現ベクターは、本明細書に記載されるような従来法を介して構築されて、免疫宿主細胞に導入されてもよい。例えば、MHC-CARをコードする核酸は、好適なプロモーターに作動可能に連結されたウイルスベクター(例えば、レンチウイルスベクター)などの好適な発現ベクター中にクローニングされてもよい。核酸およびベクターを制限酵素と好適な条件下で接触させて、互いにペア形成することができ、かつリガーゼを用いて連結され得る各分子上の相

50

補的な末端を作製してもよい。代替的に、合成核酸リンカーは、キメラ受容体をコードする核酸の末端にライゲートされ得る。合成リンカーは、ベクター中の特定の制限部位に対応する核酸配列を含有してもよい。発現ベクター／プラスミド／ウイルスベクターの選択は、キメラ受容体の発現のための宿主細胞の種類に依存するが、真核細胞中での組み込みおよび複製のために好適であるべきである。

【0123】

本明細書に記載されるMHC-CARコンストラクトの発現のために様々なプロモーターを使用することができ、該プロモーターとしては、サイトメガロウイルス(CMV)中初期プロモーター、ウイルスLTR、例えば、ラウス肉腫ウイルスLTR、HIV-LTR、HTLV-1 LTR、シミアンウイルス40(SV40)初期プロモーター、単純ヘルペスウイルスプロモーターが挙げられるがこれらに限定されない。キメラ受容体の発現のための追加のプロモーターとしては、免疫細胞中で構成的に活性な任意のプロモーターが挙げられる。代替的に、発現が免疫細胞内でモジュレートされ得るように、任意の調節可能なプロモーターが使用されてもよい。

【0124】

さらに、ベクターは、例えば、以下の一部または全てを含有してもよい：選択マーカー遺伝子、例えば、宿主細胞中での安定または一過性トランスフェクタントの選択のためのネオマイシン遺伝子；高レベルの転写のためのヒトCMVの最初期遺伝子からのエンハンサー／プロモーター配列；mRNAの安定性のためのSV40からの転写終結およびRNAプロセッシングシグナル；適切なエピソーム複製のためのSV40ポリオーマ複製起点およびColE1；内部リボソーム結合部位(IRES)、汎用マルチクロニングサイト；センスおよびアンチセンスRNAの*in vitro*転写のためのT7およびSP6 RNAプロモーター；誘発された時に、ベクターを有する細胞の死を引き起こす「自殺スイッチ」または「自殺遺伝子」（例えば、HSVチミジンキナーゼ、iCasp9などの誘導性カスパーゼ）、ならびにMHC-CARの発現を評価するためのレポーター遺伝子。

【0125】

一部の実施形態では、本開示において使用するためのマーカー／選別／自殺分子は、リツキシマブを用いる殺傷のためおよび／またはQBENDを用いる選別のために使用され得る。Philip et al., Blood 124(8):1277-87; 2014)。一例はRQR8であり、これはリツキシマブミトームおよびQBEND-10エピトームを含有する。例示的な配列を以下に提供する：

MGTSLLCWMALCLLGADHADACPYSNPSLCSGGGGGSELPT
QGTF SNVSTNVSPAKPTTTACPYSNPSLCSGGGGGSPAPPP
TPAPTIIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIW
APLAGTCGVLLLSLVITLTYCNHRNRRRVCKCPRPVV (配列番号：144)

MGTSLLCWMALCLLGADHADACPYSNPSLCSGGGGGSELPT
QGTF SNVSTNVSPAKPTTTACPYSNPSLCSGGGGGSPAPRP
PTPAPTIIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI
WAPLAGTCGVLLLSLVITLTYCNHRNRRRVCKCPRPVV (配列番号：394)

【0126】

RQR8をコードする例示的な核酸配列を以下に提供する。

ATGGGTACTTCACTGTTGTGCTGGATGGCACTTTGTCTTT
TGGGTGCGGATCATGCTGATGCATGTCCGTACTCCAATCC
TAGCCTGTGCTCCGGGGGGGGAGGGAGTGAACCTCCCTACA
CAGGGAACCTTCTCTAATGTCTCCACCAACGTCTCCCTG
CAAAACCGACCAACAACAGCTTGCCCTATAGTAACCTTTC
CCTCTGTAGTGGAGGGGGGGGTTTCACTGCTCCACGCCCT
CCTACCCCGCGCCAACGATCGCGTCAACAACCGCTCAGTC

T T A G G C C G G A A G C C T G T A G G C C A G C G G C T G G C G G T G C G G T
T C A T A C G C G G G G A T T G G A T T T T G C C T G C G A C A T T T A C A T T
T G G G C T C C G C T G G C C G G T A C T T G T G G G G T A T T G C T G T T G T
C T C T T G T T A T T A C G C T T T A T T G C A A T C A C A G G A A C A G G C G
A C G A G T A T G C A A A T G C C C G C G G C C C G T C G T G (配列番号：395)
【0127】

別の例では、以下の例示的なRQR配列タグを本明細書に開示されるようなMHC-CARコンストラクトに取り付けることができる：

【化9】

ACPYSNPSLCSGGGGS ELPTQGTFSNVSTNVSPAKPTTTACP
YSNPSLCSGGGGS (配列番号：145)

10

太字の断片はリツキシマブミトープ (rituximab minotope) であり、下線／斜体の断片はQBEND-10エピトープである。

【0128】

導入遺伝子を含むベクターを製造するための好適なベクターおよび方法は、当該技術分野において周知かつ利用可能である。本明細書に記載されるMHC-CARコンストラクトをコードする核酸配列を含む任意のベクターもまた本開示の範囲内である。そのようなベクターは、好適な方法により宿主免疫細胞に送達されてもよい。免疫細胞にベクターを送達する方法は当該技術分野において周知であり、DNAエレクトロポレーション、RNAエレクトロポレーション、トランスフェクション試薬、例えば、リポソーム、またはウイルス形質導入を含んでもよい。一部の実施形態では、MHC-CARの発現のためのベクターは、ウイルス形質導入により宿主細胞に送達される。送達のための例示的なウイルス法としては、組換えレトロウイルス（例えば、PCT国際公開第WO90/07936号パンフレット、同第WO94/03622号パンフレット、同第WO93/25698号パンフレット、同第WO93/25234号パンフレット、同第WO93/11230号パンフレット、同第WO93/10218号パンフレット、同第WO91/02805号パンフレット、米国特許第5,219,740号明細書および同第4,777,127号明細書、GB特許第2,200,651号明細書、およびEP特許第0345242号明細書を参照）、アルファウイルスベクター、およびアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター（例えば、PCT国際公開第WO94/12649号パンフレット、同第WO93/03769号パンフレット、同第WO93/19191号パンフレット、同第WO94/28938号パンフレット、同第WO95/11984号パンフレットおよび同第WO95/00655号パンフレットを参照）が挙げられるがこれらに限定されない。一部の実施形態では、キメラ受容体の発現のためのベクターはレトロウイルスである。一部の実施形態では、キメラ受容体の発現のためのベクターはレンチウイルスである。

20

30

【0129】

キメラ受容体をコードするベクターがウイルスベクターを使用して宿主細胞に導入される例では、免疫細胞に感染することができかつベクターを有するウイルス粒子は、当該技術分野において公知の任意の方法により製造されてもよく、例えば、PCT出願第WO1991/002805A2号パンフレット、同第WO1998/009271A1号パンフレット、および米国特許第6,194,191号明細書において見出すことができる。ウイルス粒子は細胞培養上清から回収され、ウイルス粒子を免疫細胞と接触させる前に分離および／または精製されてもよい。

40

【0130】

宿主細胞への本明細書において提供される任意のMHC-CARをコードするベクターの導入後に、細胞は、キメラ受容体の発現を可能とする条件下で培養される。MHC-CARをコードする核酸が調節可能なプロモーターにより調節される例では、宿主細胞は、調節可能なプロモーターが活性化される条件において培養される。一部の実施形態では、プロモーターは誘導性プロモーターであり、かつ、免疫細胞は、誘導分子の存在下または

50

誘導分子が産生される条件において培養される。MHC-CARが発現されるかどうかの決定は当業者に明らかであり、任意の公知の方法、例えば、定量的逆転写酵素PCR (qRT-PCR) によるキメラ受容体コーディングmRNAの検出またはウエスタンブロッティング、蛍光顕微鏡法、およびフローサイトメトリーを含む方法によるキメラ受容体タンパク質の検出により評価されてもよい。以下の実施例も参照。代替的に、MHC-CARの発現は、免疫細胞が対象に投与された後に *in vivo* で起こってもよい。

【0131】

代替的に、本明細書に開示される任意の免疫細胞中でのMHC-CARコンストラクトの発現は、MHC-CARコンストラクトをコードするRNA分子を導入することにより達成され得る。そのようなRNA分子は、*in vitro* 転写または化学合成により調製され得る。RNA分子は次に、例えばエレクトロポレーションにより、免疫細胞（例えば、T細胞、NK細胞、マクロファージ、好中球、好酸球、またはその任意の組合せ）などの好適な宿主細胞に導入され得る。例えば、RNA分子は、Rabinovich et al., Human Gene Therapy, 17:1027-1035およびWO 2013/040557号パンフレットに記載される方法にしたがって合成され、宿主免疫細胞に導入され得る。

【0132】

本明細書に記載される任意のMHC-CARを発現する宿主免疫細胞を調製する方法は、宿主免疫細胞を *ex vivo* で拡大増殖することを含んでもよい。宿主免疫細胞を拡大増殖することは、MHC-CARを発現する細胞の数の増加を結果としてもたらす任意の方法、例えば、宿主細胞が増幅することを可能とすることまたは宿主細胞を刺激して増幅させることを伴ってもよい。宿主細胞の拡大増殖を刺激する方法は、キメラ受容体の発現のために使用される宿主細胞の種類に依存し、当業者に明らかである。一部の実施形態では、本明細書に記載される任意のMHC-CARを発現する宿主免疫細胞は、対象への投与の前に *ex vivo* で拡大増殖され得る。

【0133】

(ii) 追加の遺伝子改変

1つまたは複数の追加の遺伝子改変は、MHC-CARコンストラクション (MHC-CAR construction) のトランスフェクションの前、同時、または後に宿主免疫細胞に導入され得る。例えば、1つまたは複数のマーカーおよび／または自殺遺伝子が宿主免疫細胞に導入されてもよい。例としては、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、強化型青色蛍光タンパク質 (eBFP)、およびRQR8 (CD34およびCD20からの標的エピトープを組み合わせたT細胞用の小型マーカー／自殺遺伝子。Philip et al., Blood 124(8):1277-87; 2014) などのRQR遺伝子が挙げられる。そのようなマーカー／自殺遺伝子は、MHC-CAR成分を用いて1つの発現カセット中で構築されてもよい。

【0134】

GFPのアミノ酸配列の例を以下に提供する：

VSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYG
KLTTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLT YGVQCFSRYPDHMKQ
HDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRA EVKFEGDTLV
NRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNG
IKANFKIRHNI EDGSVQLADHYQNTPIGDGPVLLPDNHY
LSTQSALSKDPNEKRDMVLLLEFVTAAGITLGMDELYK (配
列番号：427)

【0135】

GFPをコードする核酸配列の例を以下に提供する：

gtgagcaaggcgaggagctgttccacggggtgggtgccca
tccttggtcgaagctggacggcgacgtaaacggccacaagt
cagcgtgtcttgaggcgaggcgaggcgatgccaccctacggc
aagctgacccctgaagttctatctgcacccacggcgaagctgc
ccgtgccctggccccctcgtgacccacctgacctacgg

c g t g c a g t g c t t c a g c c g c t a c c c c g a c c a c a t g a a g c a g
c a c g a c t t c t t c a a g t c c g c c a t g c c c g a a g g c t a c g t c c
a g g a g c g c a c c a t c t t c t t c a a g g a c g a c g g c a a c t a c a a
g a c c c g c g c c g a g g t g a a g t t c g a g g g c g a c a c c c t g g t g
a a c c g c a t c g a g c t g a a g g g c a t c g a c t t c a a g g a g g a c g
g c a a c a t c c t g g g g c a c a a g c t g g a g t a c a a c t a c a a c a g
c c a c a a c g t c t a t a t c a t g g c c g a c a a g c a g a a g a a c g g c
a t c a a g g c g a a c t t c a a g a t c c g c c a c a a c a t c g a g g a c g
g c a g c g t g c a g c t c g c c g a c c a c t a c c a g c a g a a c a c c c c
c a t c g g c g a c g g c c c c g t g c t g c t g c c c g a c a a c c a c t a c
c t g a g c a c c c a g t c c g c c c t g a g c a a a g a c c c c a a c g a g a
a g c g c g a t c a c a t g g t c c t g c t g g a g t t c g t g a c c g c c g c
c g g g a t c a c t c t c g g c a t g g a c g a g c t g t a c a a g t a a (配列
番号: 428)

【0136】

一部の事例では、内因性TCR（アルファ鎖、ベータ鎖、または両方）は、宿主免疫細胞が内因性TCRを発現しないように破壊され得る。内因性TCRの欠損は、望ましくないT細胞活性化を回避し得る。代替的または追加的に、ある特定の細胞表面受容体はノックアウトされ得る。そのような表面受容体は、疾患治療用の標的受容体、例えば、MS治療のための標的であるCD52であってもよい。MHC-CAR免疫細胞からのそのような標的受容体のノックアウトは、標的受容体に特異的な治療剤（例えば、アレムツズマブなどの抗CD52抗体）とのMHC-CAR免疫細胞の併用を可能とする。

【0137】

一部の実施形態では、宿主免疫細胞は、特定の臓器または組織、例えば、リンパ節、三次リンパ臓器、または炎症の部位における保持を増進するために合成の表面タンパク質を用いて改変されてもよい。そうすることは、血液脳関門の通過または末梢血を通じた免疫細胞の自由な移行に起因する致死的なオフターゲット効果を最小化しながら、改変された免疫細胞が標的病原性細胞に接近することを可能とする。T細胞分化経路の早期の細胞（例えば、ナイーブ、幹細胞メモリー、およびセントラルメモリーT細胞）は、自由にリンパ節に移行する。分化が進むにつれて、ほとんどのエフェクターT細胞はリンパ節を離れる。病的な免疫細胞もまた、炎症の部位に移行して蓄積し得る。活性化CAR-T細胞による治療は、それらが望ましくない標的と反応する場合に多数の望ましくない効果を有する。心臓組織との相互作用は心臓タンパク質に対して致死的であり得、脳の通過は致死的な脳浮腫に繋がり得る。最近、CD19 CAR T療法を使用するがんのための全身性治療におけるよりも低用量のCAR T療法を使用する脳のがん膠芽腫（glioblastoma）の治療において進展が為された。Brown et al., New England Journal of Medicine, 375(26):2561-2569, 2016。炎症の解消は、病的な環境を保護的な環境に変える可能性を有する。Gagliani et al., Nature, 523(7559):221-225, 2015。

【0138】

免疫細胞へのリンパ節保持タンパク質の1つまたは複数の導入は、リンパ節中での免疫細胞の保持を増進することができ、免疫細胞は依然として標的病原性細胞へのアクセスを有するが、上述の望ましくない効果は有意に低減され得る。ナイーブリンパ球は高内皮小静脈（HEV）を介してリンパ節に入る。したがって、HEVアンカリングおよび／またはエントリーに関与するタンパク質の発現または過剰発現は、免疫細胞がリンパ節に入ることを促進し得る。例示的なリンパ節保持タンパク質としては、CCR7（ケモカイン受容体）、MECA79（末梢リンパ節アドレシン）、血管接着タンパク質-1（VAP-1）およびCD62（セレクチン、細胞接着分子のファミリー）が挙げられるがこれらに限定されない。Azzi et al., Blood 124(4):476-477, 2016; Streeter et al., J. Cell. Biol. 107:1853-186; 1988; Michie et al., Amer. J. Path. 143:1688-1698; 1993; Berg et al., J. Cell. Biol. 114:343-349; 1991; Berg et al., Nature 366:695-

698; 1993 ; および Hemmerich et al., J. Exp. Med. 180:2219-2226; 1994。代替的に、胸腺およびリンパ臓器からのリンパ球排出に関与するタンパク質（例えば、スフィンゴシン-1-リン酸受容体-1 または S1P）をコードする遺伝子は免疫細胞からノックアウトされ得る。

【0139】

炎症の部位へのトラフィックを促進するケモカイン受容体および接着受容体はまた、免疫疾患を拡大させる病原性細胞と MHC-CAR 免疫細胞を接触させ得る。[Barreiro et al., Cardiovascular research, 86(2):174-182, 2010] 表3 および表4 を参照。炎症を拡大させる免疫細胞の局在化に関与する受容体としては、三次リンパ臓器（CXCL13、CCL19、CCL20、CCL21 が発現される）に局在化される受容体（すなわち、CXCR5、CCR7、CCR6）が挙げられる。

10

【0140】

他の臓器／組織、例えば、脳／CNS、骨髄、膵臓、腸、肝臓、肺、脾臓、および／または胸腺の標的化に関与するタンパク質をコードする1つまたは複数の遺伝子は、免疫細胞に導入または免疫細胞からノックアウトされてもよい。

【0141】

治療用細胞中でのウイルス誘導性または一過性RNA媒介性発現（場合により内因性遺伝子のノックアウトと組み合わせられる）により、遺伝子（表3 および表4 における遺伝子）は、Treg もしくはCTL細胞のいずれかを所望の位置に経路制御するためまたは所望の細胞を処置／除去するために使用されてもよい。Barreiro, et al. Cardiovascular research, 86(2):174-182, 2010。mRNA トランスフェクションが利用される場合、それは1週間のケモカインまたは接着受容体の発現を可能とし得る。Wang and Riviere. Molecular Therapy-Oncolytics, 3:16015 2016。

20

【0142】

表3．ケモカイン受容体および天然の状況

30

40

50

【表 3】

受容体	典型的な発現場所	GenBankアクセッション番号	リガンド
CXCR1	好中球	AAV21515.1	CXCL8、CXCL6
CXCR2	好中球	NP_001548.1	CXCL1、2、3、4、5、7
CXCR3	T細胞および一部のB細胞	NP_001495.1	CXCL9、10、11
CXCR4	ほとんどの成熟したおよび未熟な造血細胞	CAA12166.1	CXCL12
CXCR5	B細胞およびTfh細胞	NP_001707.1	CXCL13
CXCR6	炎症応答性T細胞であるが弱い走化性	NP_006555.1	CXCL16
CXCR7	メモリーB細胞、T細胞	NP_064707.1	CXCL12
CCR1	末梢リンパ球、メモリーT細胞	NP_001286.1	CCL4、CCL5、CCL6、CCL14、CCL15、CCL16、CCL23
CCR2	単球、活性化メモリーT細胞、B細胞、好	AAA19119.1	CCL11、CCL26、CCL7、CCL13、CCL15、CCL24

10

20

30

40

50

	塩基球		& CCL5、CCL28
CCR3	アレルギー性反応において役割を果たす、BおよびT細胞を粘液へ、好酸球、好塩基球	NP_001828.1	CCL11、CCL26、CCL7、CCL13、CCL15、CCL24、CCL5
CCR4	Th2リンパ球、樹状細胞	NP_005499.1	CCL3、CCL5、CCL17、CCL22
CCR5	末梢血樹状細胞、CD34+造血前駆細胞、活性化/メモリーTh1	NP_000570.1	CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL11、CCL13、CCL14、CCL16
CCR6	不活性化メモリーT細胞、樹状細胞、Th17；活性化T細胞において下方調節される	AAC51124.1	CCL20
CCR7	HEVを越えてリンパ節のT細胞ゾーンへのB、T、および樹状細胞のトラフィッキング	AAH35343.1	CCL19、CCL21
CCR8	Th2細胞、胸腺、リンパ節、脾臓、脳、単球	NP_005192.1	CCL1、CCL16
CCR9	胸腺、腸	NP_112477.1	CCL25
CCR10	皮膚、粘液層、制御性T細胞	NP_057686.2	CCL27、CCL28
XCR1		NP_005274.1	XCL1、XCL2
CX3CR1		NP_001164642.1	CX3CL1

10

20

30

【0143】

AAC51124.1により提供されるCCR6のアミノ酸配列を以下に示す：
 MSGESMNFSDVFDSSDYFVSVNTSYYSVDSEMLLCSLQE
 VRQFSRLFVPIAYSILCVFGLLGNIILVVITFAFYKKARSM
 TDVYLLNMAIADILFVLTLPFWAVSHATGAWVFSNATCKL
 LKGIYAINFNCGMLLLTCISMTRYIAIVQATKSFRLRSRT
 LPRSKIICLVVWGLSVIISSTFVFNQKYNTQGS DVC EPK
 YQTVSEPIRWKLLMLGLELLFGFFIPLMFMIFCYTFIVKT
 LVQAQNSKRHKAIRVIIAVVLVFLACQIPHNMVLLVTAAN
 LGKMNRSCQSEKLI GYTKTVTEVLAF LHCCLNPVLYAFIG
 QKFRNYFLKILKDLWCVR RKYKSSGFSCAGRYSENISRQT
 SETADNDNASSFTM（配列番号：391）

40

【0144】

CCR6の例示的な核酸配列を以下に示す。
 atgagtg ggg gaa agtat gaacttc agcgatgtatttgact

50

c c t c c g a a g a t t a c t t t g t a t c t g t g a a t a c g a g c t a t t a
c t c c g t c g a t a g t g a a a t g c t g c t c t g t a g t c t c c a a g a a
g t c c g c c a a t t c a g t c g c c t c t t c g t t c c c a t c g c g t a c t
c c c t t a t t t g t g t t t t t g g c c t t c t g g g t a a c a t c c t g g t
t g t a a t c a c a t t c g c t t t c t a t a a a a a a g c t c g g a g t a t g
a c t g a t g t t t a c c t t c t t a a c a t g g c t a t a g c g g a c a t t c
t t t t t g t g c t t a c t c t c c c a t t c t g g g c t g t g a g c c a t g c
a a c a g g g g c g t g g g t t t t t t c a a a t g c c a c a t g t a a g c t g
c t t a a a g g g a t c t a t g c a a t a a a c t t c a a t t g c g g g a t g c
t c c t g c t g a c a t g c a t c a g t a t g g a t c g a t a c a t a g c t a t
a g t a c a g g c g a c t a a g t c c t t c g c c t g c g a t c c c g c a c a
c t g c c t a g g a g c a a a a t t a t t t g c c t c g t c g t a t g g g g g c
t c t c a g t g a t c a t c t c c t c c a g t a c g t t t g t c t t t a a c c a
g a a a t a t a a c a c a c a g g g t t c t g a t g t a t g t g a a c c a a a g
t a t c a g a c a g t g a g t g a a c c a a t a c g g t g g a a g t t g c t t a
t g t t g g g c t t g g a g c t g c t t t t t g g g t t t t t c a t c c c a c t
g a t g t t c a t g a t t t t c t g t t a t a c a t t t a t t g t t a a g a c c
t t g g t t c a g g c g c a a a a t a g c a a g a g a c a t a a g g c a a t t c
g a g t c a t c a t t g c c g t g g t g t t g g t c t t c t t g g c c t g t c a
g a t c c c c c a t a a t a t g g t t c t g c t c g t c a c c g c c g c t a a c
t t g g g t a a g a t g a a t c g a t c t t g t c a g t c c g a g a a g t t g a
t c g g a t a c a c c a a a a c t g t g a c a g a a g t g c t g g c c t t c c t
t c a c t g t t g t c t g a a c c c a g t t t t g t a t g c t t t t a t a g g a
c a g a a g t t t t c g a a a t t a c t t c t t g a a a a t c c t c a a g g a c c
t c t g g t g t g t t c g a a g g a a g t a c a a g a g c t c t g g c t t t a g
t t g c g c t g g g c g c t a c a g t g a g a a t a t a t c c c g g c a g a c c
t c c g a g a c t g c t g a t a a t g a c a a c g c a a g t t c c t t c a c t a
t g (配列番号：392)

10

20

A T G A G C G G G G A A T C A A T G A A T T T C A G C G A T G T T T T C G A C T
C C A G T G A A G A T T A T T T T G T G T C A G T C A A T A C T T C A T A T T A
C T C A G T T G A T T C T G A G A T G T T A C T G T G C T C C T T G C A G G A G
G T C A G G C A G T T C T C C A G G C T A T T T G T A C C G A T T G C C T A C T
C C T T G A T C T G T G T C T T T G G C C T C C T G G G G A A T A T T C T G G T
G G T G A T C A C C T T T G C T T T T T A T A A G A A G G C C A G G T C T A T G
A C A G A C G T C T A T C T C T T G A A C A T G G C C A T T G C A G A C A T C C
T C T T T G T T C T T A C T C T C C C A T T C T G G G C A G T G A G T C A T G C
C A C T G G T G C G T G G G T T T T C A G C A A T G C C A C G T G C A A G T T G
C T A A A A G G C A T C T A T G C C A T C A A C T T T A A C T G C G G G A T G C
T G C T C C T G A C T T G C A T T A G C A T G G A C C G G T A C A T C G C C A T
T G T A C A G G C G A C T A A G T C A T T C C G G C T C C G A T C C A G A A C A
C T A C C G C G C A C G A A A A T C A T C T G C C T T G T T G T G T G G G G G C
T G T C A G T C A T C A T C T C C A G C T C A A C T T T T G T C T T C A A C C A
A A A A T A C A A C A C C C A A G G C A G C G A T G T C T G T G A A C C C A A G
T A C C A G A C T G T C T C G G A G C C C A T C A G G T G G A A G C T G C T G A
T G T T G G G G C T T G A G C T A C T C T T T G G T T T C T T T A T C C C T T T
G A T G T T C A T G A T A T T T T G T T A C A C G T T C A T T G T C A A A A C C
T T G G T G C A A G C T C A G A A T T C T A A A A G G C A C A A A G C C A T C C
G T G T A A T C A T A G C T G T G G T G C T T G T G T T T C T G G C T T G T C A
G A T T C C T C A T A A C A T G G T C C T G C T T G T G A C G G C T G C A A A T
T T G G G T A A A A T G A A C C G A T C C T G C C A G A G C G A A A A G C T A A

30

40

50

TTGGCTATACGAAAACTGTCACAGAAGTCCTGGCTTTCTCT
 GCACTGCTGCCTGAACCCTGTGCTCTACGCTTTTATTGGG
 CAGAAGTTTCAGAAACTACTTTCTGAAGATCTTGAAGGACC
 TGTGGTGTGTGAGAAGGAAGTACAAGTCCTCAGGCTTCTC
 CTGTGCCGGGAGGTACTCAGAAAACATTTCTCGGCAGACC
 AGTGAGACCGCAGATAACGACAATGCGTCGTCCTTCACTA
 TG (配列番号：393)

【0145】

表4．接着受容体および天然の状況

【表4】

受容体	典型的な発現場所	アクセッション番号	リガンド
VLA-1または $\alpha_1\beta_1$	多くの細胞種	NP_852478.1、AAH20057.1	コラーゲン、ラ ミニン
VLA-2または $\alpha_2\beta_1$	多くの細胞種	NP_002194.2、AAH20057.1	コラーゲン、ラ ミニン
VLA-3または $\alpha_3\beta_1$	多くの細胞種	AAI50191.1、AAH20057.1	ラミニン-5
VLA-4または $\alpha_4\beta_1$	造血細胞	NP_000876.3、AAH20057.1	フィブロネクチ ンおよびプロテ イナーゼ
VLA-5または $\alpha_5\beta_1$	多くの細胞種	NP_002196.4、AAH20057.1	フィブロネクチ ン、VCAM-1
VLA-6または $\alpha_6\beta_1$	多くの細胞種	AAI36456.1、AAH20057.1	ラミニン
$\alpha_4\beta_7$	腸	NP_000876.3、 NP_000880.1	MADCAM1

$\alpha_7\beta_1$	筋肉	AAQ89241.1、AAH20057.1	ラミニン
$\alpha_L\beta_2$	Tリンパ球	NP_002200.2、NP_000202.3	I-CAM1、I-CAM2
MAC-1または $\alpha_M\beta_2$	好中球および単球	AAB24821.1、NP_000202.3	I-CAM1
$\alpha_{IIb}\beta_3$	血小板	AAI26443.1、AAI27668.1	フィブリノーゲン、フィブロンネクチン
$\alpha_v\beta_1$	メラノサイト	AAA61631.1、AAH20057.1	ビトロネクチン、フィブリノーゲン
$\alpha_v\beta_3$	活性化内皮細胞	AAA61631.1、AAI27668.1	ビトロネクチン、フィブロンネクチン、フィブリノーゲン、オステオポンチン、Cyr61、チロキシン、テトラック
$\alpha_v\beta_5$	上皮細胞および線維芽細胞	AAA61631.1、NP_002204.2	ビトロネクチン
$\alpha_v\beta_6$	肺、乳腺	AAA61631.1、NP_000879.2	フィブリノネクチンおよびTGF- β 1、3
$\alpha_v\beta_8$	神経組織	AAA61631.1、NP_002205.1	フィブリノネクチンおよびTGF- β 1、3
$\alpha_6\beta_4$	上皮細胞	AAA61631.1、CAB61345.1	ラミニン

【0146】

代替的または追加的に、免疫細胞機能、例えば、増殖、細胞傷害性などを増進し得る遺伝子もまた、免疫細胞に導入または免疫細胞からノックアウトされ得る。例としては、TNF/TNFR2過剰発現（短い寿命であるがより効果的なCD8⁺T細胞のため）、gld（FasL突然変異体；リンパ球増殖のため；CTLはFas-FasL経路を介して殺傷しない）；lpr（Fas突然変異体；FasLの上方調節のため - FasL媒介性アポトーシスに耐性の標的細胞）；グランザイムB*の欠損（標的細胞における核内アポトーシス変化の遅延）；グランザイムAおよびB*の欠損（標的細胞における核内アポトーシス変化の遅延）；パーフォリンの欠損（顆粒媒介性アポトーシスの完全な非存在）；パーフォリンおよびFasLの欠損（欠陥のある顆粒媒介性およびFas媒介性アポトーシス）；カテプシンC（ジペプチジル-ペプチダーゼI）の欠損（活性グランザイムおよび一部の造血セリンプロテアーゼを産生しない）；FAS（CD95）の過小発現；ならびに／またはFASLの過剰発現が挙げられる。

【0147】

以下の表5は、MHC-CAR⁺T細胞の追加の遺伝子改変または本明細書に記載される併用治療およびそれから生じる付随する利点を列記する。

【0148】

表5．遺伝子改変または併用治療およびその利益

10

20

30

40

50

【表 5】

遺伝子改変	利点
- TCRノックアウト - CIITA欠失(内因性MHCクラスII発現を除去するため) - CS-1 (CD319) 欠失(T細胞上に存在する)	MHC-CAR中のペプチド-MHCへの親和性を有する天然CD8 ⁺ T細胞によるMHC-CAR T細胞の二卵性殺傷を低減し、それにより、MHC-CAR T細胞の寿命を延長する。(遺伝子改変がない場合、MHC-CAR T細胞は依然として細胞傷害性かつ効果的であるが、短い寿命を有する。)
- Fas欠失、任意選択的にFasL過剰発現の組み合わせられ得る - PD-1欠失、任意選択的にPD-L1および/またはPD-L2過剰発現と組み合わせられ得る - CS-1 CAR (CS-1に特異的な細胞外ドメインを有する従来のCARコンストラクト)の共発現 - CD19 CAR (CD19に特異的な細胞外ドメインを有する従来のCARコンストラクト)の共発現	CD8細胞傷害性T細胞、抗原提示細胞 (APC)、および/またはB細胞を除去する活性を増進する
- PD-L1過剰発現、任意選択的にPD-1欠失と組み合わせられてもよい - PD-L1 + CTLA4-Ig、任意選択的にPD-1欠失と組み合わせられてもよい - FasL過剰発現、任意選択的にFas欠失と組み合わせられてもよい - ガレクチン9発現、任意選択的にTim-3欠失と組み合わせられてもよい - CS-1欠失 (CS-1 CARが二卵性殺傷を低減するために使用される場合) - MHC-CAR中にヒンジを含む	他の免疫細胞によるMHC-CAR T細胞除去のレベルを低減する； ヒンジを含めることは、例えば、細胞TCRがCD4またはCD8へのエンゲージメントの能力を減少させることにより、細胞TCRによる殺傷を減少/予防することがある
- 同種細胞が使用される場合のTCRノックアウト (細胞は非編集細胞を除去するために選別され得る)	移植片対宿主病のリスクを低減する
- MHC-CARを発現するTreg細胞 - PD-1および/またはPD-L1ノックアウト	目的のペプチド-MHCへの液性応答 (例えば、抗体応答)、特にB細胞応答を低減する

10

20

30

40

50

- CXCR5発現	
- IL-35発現	
- サイトカイン産生B細胞(例えば、CD10を標的化する)および/または他の活性化免疫細胞(例えば、CS-1を標的化する)を標的化する阻害剤(例えば、抗体)	炎症を低減しかつ/または寛容原性環境を増進する
- 関連する臓器に方向付けるため(Schall et al., Nature Reviews Immunology, 11(5):355-363, 2011)または関連する細胞種(例、B細胞についてCXCR5、Th17についてCCR6)と相互作用するための妥当なケモカイン受容体発現	炎症または抗原提示または抗原標的化環境への経路制御
- CD8ヒンジ、膜貫通ドメイン、ならびに任意選択の刺激および共刺激ドメイン(Tregについてのみ)を含有する抗原標的化抗体scFv(例えば、抗MOG抗体)。関連抗体配列(表1における抗原標的のサブセットについて)は、質量分析を使用して市販のヒト標的化モノクローナルパリアントのシーケンシングから生成され得る。Tran et al. Scientific reports, 6:31730, 2016。	
- 遺伝学的にコードされた殺傷スイッチ	サイトカインクライシスを低減する

10

20

【0149】

一部の実施形態では、PD遮断に繋がる遺伝子改変は、本明細書に記載されるようなMHC-CARを発現する免疫細胞に導入され得る。そのような改変としては、PD-1ノックアウト、PD-L1もしくはL2過剰発現、またはPD-L1ノックアウトの1つまたは複数が挙げられる。PD遮断は、免疫阻害剤(例えば、CTLA-4、TIM-3、LAG3、TIGIT、IDO、もしくはアルギナーゼ、もしくはCTLA-4Ig分泌物のノックアウト)、免疫刺激剤(例えば、抗OX40、抗CD137、IL-2、TLRリガンド、もしくはSTING)、および/またはキナーゼ阻害剤(例えば、Braf阻害剤もしくはMEK阻害剤)と組み合わせられてもよい。

30

【0150】

以下の表6は、PD遮断、免疫阻害剤、細胞死受容体、免疫刺激剤、toll様受容体、キナーゼ阻害、マスター調節因子、サイトカインシグナリング、細胞相互作用の低減、および薬物相互作用関連の編集のための例示的な遺伝子改変を提供する。表はまた、T細胞におけるCas9を使用するガイドRNA用の標的配列の他に、発現/過剰発現のために使用され得る配列のGenBankアクセッション番号を提供する。gRNAを使用するゲノム編集は、所望のgRNAを含有するレンチウイルス(LentiCRISPRv2)およびStreptococcus pyogenes Cas9ヌクレアーゼの形質導入を通じて行われる。これは、プロトコールにおけるTALEN RNAの送達に対する代替として行われ得る。Sanjana, et al. Nature methods, 11(8):783-784, 2014。

40

【0151】

表6. 遺伝子改変のための例示的な遺伝子および対応するCas9媒介性編集

50

【表 6】

PD遮断関連の編集	Genbankアクセッション番号	Cas9標的化のためのゲノム配列 (gRNA)
プログラム細胞死タンパク質 1 (PDCD1)	NP_005009.2	TGACGTTACCTCGTGC GGCC (配列番号: 146)、 CACGAAGCTCTCCGATGTGT (配列番号: 147)、 GCGTGACTTCCACATGAGCG (配列番号: 148)、 TTGGAAGTGGCCGGCTGGCC (配列番号: 149)、 GTGGCATACTCCGTCTGCTC (配列番号: 150)、 GATGAGGTGCCCATTCGCT (配列番号: 151)、
プログラム細胞死1リガンド 1 (CD274)	NP_005009.2	TACCGCTGCATGATCAGCTA (配列番号: 152)、 AGCTACTATGCTGAACCTTC (配列番号: 153)、 GGATGACCAATTCAGCTGTA (配列番号: 154)、 ACCCCAAGGCCGAAGTCATC (配列番号: 155)、 TCTTTATATTCATGACCTAC (配列番号: 156)、 ACCGTTCAGCAAATGCCAGT (配列番号: 157)
免疫阻害剤関連の編集	Genbankアクセッション番号	Cas9標的化のためのゲノム配列
細胞傷害性Tリンパ球タンパク質 4 (CTLA4)	NP_005205.2	GTACCCACCGCCATACTACC (配列番号: 158)、 TTGCCTATGCCCAGGTAGTA (配列番号: 159)、 CCTTGCGCGCTGAAATCCA (配列番号: 160)、 ACCCCGAACTAACTGCTGCA (配列番号: 161)、 ACATAGACCCCTGTTGTAAG (配列番号: 162)、 ATCCTTGCAGCAGTTAGTTC (配列番号: 163)

10

20

30

40

50

		号:163)
CTLA4-Ig(オレンシア)	APZ76727.1	
セリン/スレオニンプロテインホ スファターゼ2A触媒サブユニッ トアルファアイソフォーム (PPP2CA)	NP_002706.1	ACATCGAACCTCTTGACAGT(配列番 号:164)、 TACAGCTCACCTTCTCGCAG(配列番号 165):、 GGTATATCTCCTCGAGGAGC(配列番 号:166)、 TACACTGCTTGTAGCTCTTA(配列番 号:167)、 GAGCTCTAGACACCAACGTG(配列番 号:168)、 CAAGCAGCTGTCCGAGTCCC(配列番 号:169)
セリン/スレオニンプロテインホ スファターゼ2A触媒サブユニッ トベータアイソフォーム (PPP2CB)	CAA31183.1	AATGTGTAGCCAGCACCACG(配列番 号:170)、 GAAGTTCCTGTAAACGATCC(配列番 号:171)、 TACATACCTCCATTACAAGC(配列番 号:172)、 CCATCTACTAAAGCTGTAAG(配列番 号:173)、 CTCAATATTGTAATGCGTTC(配列番 号:174)、 CTCTCCATCCATAGACACAC(配列番 号:175)
タンパク質チロシンホスファタ ーゼ、非受容体6型(PTPN6)	AAA35963.1	TAAGACCTACATGCCAGCC(配列番 号:176)、 GAAGAAGTGCACCAGCGTC(配列番 号:177)、 GTCAGCCGCATTACCCCTCG(配列番 号:178)、 CTGCCAGAAGTCATTGACCG(配列番 号:179)、 CCCAGCCGTACTATGCCACG(配列番 号:180)、 GCCGCTGCCCTTCCAGACGC(配列番 号:181)
チロシン-プロテインホスファタ	AAD00904.1	GTAGCTGGAATCCTCATCAG(配列番

10

20

30

40

50

一ゼ非受容体22型 (PTPN22)		号:182)、 CAAAACCTATCCTACAACCTG (配列番号:183)、 TTAGGGAGTTTATGGACCCA (配列番号:184)、 CTCAGCCACAGTTGTAGGAT (配列番号:185)、 TCACTGTACCTTAATGAAGT (配列番号:186)、 TCCTTTATCTACAACCCTCC (配列番号:187)
リンパ球活性化遺伝子3タンパク質 (LAG3)	CAA36243.3	TCCATAGGTGCCCAACGCTC (配列番号:188)、 GTTCCGGAACCAATGCACAG (配列番号:189)、 GCGAGAAGTCCCCGCGCTGC (配列番号:190)、 TGACCCCTGCTCTTCGCAGA (配列番号:191)、 CGCCGGCGAGTACCGCGCCG (配列番号:192)、 TGGGCGGTCAGGGCGGCTGA (配列番号:193)
A型肝炎ウイルス細胞受容体2 (Tim3、HAVCR2)	AAM19100.1	CTAAATGGGGATTTCGCAA (配列番号:194)、 ATCCCCATTAGCCAGTATC (配列番号:195)、 GTGAAGTCTCTCTGCCGAGT (配列番号:196)、 AGGTCACCCCTGCACCGACT (配列番号:197)、 CTTACTGTTAGATTTATATC (配列番号:198)、 TATAGCAGAGACACAGACAC (配列番号:199)
BおよびTリンパ球アテニュエーター (BTLA)	AAP44003.1	GTGACTTGGTGCAAGCTCAA (配列番号:200)、 TCTGCTTGCCATTCGTCCT (配列番号:201)、 CTGTTAGCACAGTATTTAC (配列番号:202)、

10

20

30

40

50

		CCAAAGGAAGTAAACGATAC (配列番号: 203)、 ATGTTCCAGATGTCCAGATA (配列番号: 204)、 CTTCTTCTTAATCCCATATC (配列番号: 205)
CD160抗原 (CD160)	AAC72302. 1	AGTTTAGTCGCGTTCCTTCC (配列番号: 206)、 CACTGTGCAACGGTGTGACT (配列番号: 207)、 GGATGTCCACAATTGCCAGC (配列番号: 208)、 AACTGAGAGTGCCTTCATTA (配列番号: 209)、 GACAGGGAACACTACACAGTGA (配列番号: 210)、 GACAGGGAACACTACACAGTGA (配列番号: 210)、 ATTGTGGACATCCAGTCTGG (配列番号: 212)
IgおよびITIMドメインを有するT細胞免疫受容体 (TIGIT)	BAC04973. 1	TCGCTGACCGTGAACGATAC (配列番号: 213)、 TGGGGCCACTCGATCCTTGA (配列番号: 214)、 GCAGATGACCACCAGCGTCG (配列番号: 215)、 TCAGGCCTTACCTGAGGCGA (配列番号: 216)、 CATCTGCACAGCAGTCATCG (配列番号: 217)、 ATTGAAGTAGTCATGCAGCT (配列番号: 218)
T細胞表面タンパク質タクタイル (CD96)	AAA36662. 1	AGGCACAGTAGAAGCCGTAT (配列番号: 219)、 GCTGTCTATCATCCCCAATA (配列番号: 220)、 ACTTACCACCGACCATGCAT (配列番号: 221)
細胞傷害性および制御性T細胞分子 (CRTAM)	AAC80267. 1	CACACTTTAGAGTGAGCGTC (配列番号: 222)、

10

20

30

40

50

		CTCCAGTGGCTGACCCCTC (配列番号: 223)、 CCACAGCAGCCCACCACTAC (配列番号: 224)
白血球関連免疫グロブリン様受容体1 (LAIR1)	AF013249.1	TTATAATAGATGCAGCGATA (配列番号: 225)、 TCATTGTGACTGTTGTCCGA (配列番号: 226)、 GCCAGGCACCGTGATCCCC (配列番号: 227)
シアル酸結合Ig様レクチン7 (SIGLEC7)	AF170485.1	CATCCTTATCCCCGGTACCC (配列番号: 228)、 CAGAGAGTTCTGAGCTCGAC (配列番号: 229)、 AGTGTGCTGGGGGCGGTCTG (配列番号: 230)
シアル酸結合Ig様レクチン9 (SIGLEC9)	AF135027.1	GACGATGCAGAGTTCCGTGA (配列番号: 231)、 ACTCACAGGACACGTTGAGA (配列番号: 232)、 TACCCTGGCCCAGTAGTTCA (配列番号: 233)
ナチュラルキラー細胞受容体2B4 (CD244)	AF105261.1	ACCTTCGTCTGTATGCTGTT (配列番号: 234)、 ACCAAACAGCATACAGACGA (配列番号: 235)、 CTACTCTATGATCCAGTCCC (配列番号: 236)
細胞死受容体および経路の編集		
腫瘍壊死因子リガンドスーパーファミリーメンバー10 (TRAIL)	AAC50332.1	ACTCCGTCAGCTCGTTAGAA (配列番号: 237)、 GTTCACTCTCTTCGTCAT (配列番号: 238)、 AGAGTAGCAGCTCACATAAC (配列番号: 239)
腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー10B (TNFRSF10B)	AF018657.1	TTCCAGAGCTCACAACGACC (配列番号: 240)、 ATAGTCCTGTCCATATTTGC (配列番号: 241)

10

20

30

40

50

		号:241)、 AGATACTCACGATCTCATTG (配列番号:242)
腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー 10A (TNFRSF10A)	AAC51226.1	AGGTCAAGGATTGTACGCCC (配列番号:243)、 GAAGTCCCTGCACCACGACC (配列番号:244)、 TTTGGTTGTTCCGTTGCTGT (配列番号:245)
カスパーゼ-8 (CASP8)	CAA66853.1	TGATCGACCCCTCCGCCAGAA (配列番号:246)、 GGGTCGATCATCTATTAATA (配列番号:247)、 TCCTTTGCGGAATGTAGTCC (配列番号:248)
カスパーゼ-10 (CASP10)	AAC50644.1	CTATGTATCCTTTCCGCATG (配列番号:249)、 TCTTCTGCCGTATGATATAG (配列番号:250)、 GTGAGACATGATCTCCCGAA (配列番号:251)
カスパーゼ-3 (CASP3)	AAA65015.1	ATGTCGATGCAGCAAACCTC (配列番号:252)、 ATTATACATAAACCCATCTC (配列番号:253)、 AATGGACTCTGGAATATCCC (配列番号:254)
カスパーゼ-6 (CASP6)	AAC50168.1	ATAGAGACAATCTTACCCGC (配列番号:255)、 AAGATTGTCTCTATCTGCGC (配列番号:256)、 AAATGTGATTGCCTTCGCCA (配列番号:257)
カスパーゼ-7 (CASP7)	AAC50303.1	CGTTTGTACCGTCCCTCTTC (配列番号:258)、 TGCGATCCATCAAGACCACC (配列番号:259)、 TTGATATTTAGGCTTGCCGA (配列番号:260)

10

20

30

40

50

FAS関連デスドメインタンパク質 (FADD)	AAA86517.1	AGTCGTCGACGCGCCGACG (配列番号:261)、 AGCGGCCCATCAGGACGCTT (配列番号:262)、 GCGGCGCGTCGACGACTTCG (配列番号:263)
腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー6 (FAS)	AAA63174.1	GTGTAACATACCTGGAGGAC (配列番号:264)、 TACATCTGCACTTGGTATTC (配列番号:265)、 CTAAAACTTACTTGGTGCAA (配列番号:266)
IDO	AAA36081.1	TCTCAACTCTTTCTCGAAGC (配列番号:267)、 CTGCCTGATCTCATAGAGTC (配列番号:268)、 CAGATACTTACTCATAAGTC (配列番号:269)
アルギナーゼEIF2AK4	AAH09350.2	CGCTGAGAAATGACTGCACG (配列番号:270)、 CATATACTTCTTCACCAGTT (配列番号:271)、 ATGTACTCACACATCTGGAT (配列番号:272)
免疫刺激剤の編集		
OX40 (TRAF2)	BAA14259.1	ACCGAATGTCCCGCGTGCAA (配列番号:273)、 GCCTTTGCACGCGGGACATT (配列番号:274)、 GGGGACCCCTGAAAGAATACG (配列番号:275)
CD137 (TNFRSF9)	TNFRSF9	CCTGCGCTGGAGAACTATT (配列番号:276)、 CCTTGTAGTAACTGCCCAGC (配列番号:277)、 CATAGTAGCCACTCTGTTGC (配列番号:278)
IL2	CAA25292.1	CAATATCAACGTAATAGTTC (配列番号:279)

10

20

30

40

50

		号:279)、 GACTTAGTGCAATGCAAGAC (配列番号:280)、 GATATTGCTGATTAAGTCCC (配列番号:281)
インターフェロン遺伝子刺激因子タンパク質 (STINGまたはTMEM173)	ACI46648.1	GCGGGCCGACCGCATTTGGG (配列番号:282)、 CATATTACATCGGATATCTG (配列番号:283)、 ACTCTTCTGCCGGAAGTTG (配列番号:284)
ToI1様受容体の編集		
TLR1	AAC34137.1	TTATAGAGGAACCTACTAA (配列番号:285)、 TTGTGGGCACCTTACTGAGT (配列番号:286)、 CGAACACATCGCTGACAACT (配列番号:287)
TLR2	AAC34377.1	GTAAACGTTTCCACTTTACC (配列番号:288)、 TTCCCGCTGAGCCTCGTCCA (配列番号:289)、 TATCTAATTTATCGTCTTCC (配列番号:290)
TLR3	AAC34134.1	TTCGGAGCATCAGTCGTTGA (配列番号:291)、 TTCAACGACTGATGCTCCGA (配列番号:292)、 CATGCACTCTGTTTGCGAAG (配列番号:293)
TLR4	AAC80227.1	TTCTCCCAGAACCAACGA (配列番号:294)、 GATGATGTCTGCCTCGCGCC (配列番号:295)、 ATGCCCCATCTTCAATTGTC (配列番号:296)
TLR5	AAC34376.1	TATTCGGCCATCAAAGGAGC (配列番号:297)、

10

20

30

40

50

		GACTAAGCCTCAACTCCAAC (配列番号:298)、 TATACAAGCTATTAGCTGCG (配列番号:299)
TLR6	BAA78631.1	GAACATACATCGCTGAGCTTC (配列番号:300)、 GCCATCCTATTGTGAGTTTC (配列番号:301)、 TGTCTCCAATTTAACTAACG (配列番号:302)
TLR7	AAF60188.1	AAGGAATAGTCACCTCCGTA (配列番号:303)、 AATGGGGCATTATAACAACG (配列番号:304)、 GGTGAGGTTCTGGTGTTTCG (配列番号:305)
TLR8	AAF64061.1	GTGCAGCAATCGTCGACTAC (配列番号:306)、 AATCCCGGTATACAATCAAA (配列番号:307)、 CTCGAGTTGCTTGACTTACG (配列番号:308)
TLR9	AAF72189.1	GGCTCACGGCTATTCGGCCG (配列番号:309)、 GCGTCTCCGTGACAATTACC (配列番号:310)、 CCGACAGGTCCACGTAGCGC (配列番号:311)
TLR10	AAK26744.1	CCCACATTACGCCTATCCT (配列番号:312)、 TAACATTAATAGCAGCTCGA (配列番号:313)、 GACCCAGCCACAACGACAC (配列番号:314)
キナーゼ阻害の編集		
セリン/スレオニンプロテインキナーゼB-raf (BRAF)	AAA35609.2	CCCCACCAAATTTGTCCAAT (配列番号:315)、 GAGGCCCTATTGGACAAATT (配列番号:316)

10

20

30

40

50

		号:316)、 GTTGCTCCGTGCCACATCTG (配列番号:317)
二重特異性マイトジェン活性化 プロテインキナーゼキナーゼ 1 (MAP2KまたはMEK)	AAA36318.1	CCATACTTACTCCGCAGAGC (配列番号:318)、 TATGGTGCGTTCTACAGCGA (配列番号:319)、 CCCGACGGCTCTGCAGTTAA (配列番号:320)
マスター調節因子の編集		
FoxP3	AAG53607.1	
サイトカインシグナルの編集 (これらの編集の1つまたは両方の 目標は、内因性 (endogenous) IL-6に起因する治 療的TregのTh17細胞への変換を 予防または最小化することである。 Gagliani et al. Nature, 523(7559):221-225 2015. Korn et al. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105(47):18460- 18465, 2008.		
インターロイキン-6受容体サブ ユニットアルファ (IL6R)	CAA31312.1	TCGGTGCAGCTCCACGACTC (配列番号:321)、 AACTATTCATGCTACCGGGC (配列番号:322)、 CGTGGTGCAGCTTCGTGCCC (配列番号:323)
インターロイキン-6受容体サブ ユニットベータ (IL6STまたは GP130)	AAA59155.1	AGATGCCTCAACTTGGAGCC (配列番号:324)、 TTTGAGTTGCATTGTGAACG (配列番号:325)、 ATTCGCTGTATGAAGGAAGA (配列番号:326)

10

20

30

40

50

細胞相互作用低減性の編集		
TCRアルファ (好ましいtalen編集を参照)		
TCRベータ (好ましいtalen編集を参照)		
CIITA	CAA52354.1	TTCCTACACAATGCGTTGCC (配列番号:327)、 GATATTGGCATAAGCCTCCC (配列番号:328)、 TCAACTGCGACCAGTTCAGC (配列番号:329)
B7-1 (CD80)	AAA36045.1	TCGTATGTGCCCTCGTCAGA (配列番号:330)、 GAGTGAATCAGACCTTCAAC (配列番号:331)、 TATGGCCCGAGTACAAGAAC (配列番号:332)
B7-2 (CD86)	AAB03814.1	GTAACCGTGTATAGATGAGC (配列番号:333)、 ATACTCGATAGTTGAATTCT (配列番号:334)、 CATCAGATCTTTCAGGTATA (配列番号:335)
b2m	AAA51811.1	ACTCACGCTGGATAGCCTCC (配列番号:336)、 GAGTAGCGCGAGCACAGCTA (配列番号:337)、 CAGTAAGTCAACTTCAATGT (配列番号:338)
UL18	CAA68399.1	
PDL2	AAK31105.1	
FasL	AAC50071.1	GGTTGTTGCAAGATTGACCC (配列番号:339)、 GAGGAACTCTAAGTATCCCC (配列番号:340)、 TCTGGTTGCCTTGGTAGGAT (配列番号:341)

10

20

30

40

50

		号:341)
パーフォリン (PRF1)	CAA31612. 1	CGCAGCCACAAGTTCGTGCC (配列番号:342)、 GGAGCTGGGTGGCCGCATAT (配列番号:343)、 CCCGAACAGCAGGTCGTAA (配列番号:344)
ガレクチン9 (LGALS9)	AA88922. 1	
PVT/CD155	AAA36461. 1	
薬物相互作用関連の編集		
CD52	CAA44323. 1	CTCTTACCTGTACCATAACC (配列番号:345)、 AATGCCTCCGCTTATGTTGC (配列番号:346)、 TGGCATTGGCCACGAAGAAA (配列番号:347)
トシリズマブ様重鎖 (scfvについて)	BAJ21229. 1	
トシリズマブ様軽鎖 (scfvについて)	BAJ21230. 1	
インテグリンアルファ-4 (ITGA4)	CAA34852. 1	CGACTACTTCGGTAGTATGC (配列番号:348)、 CAGCATACTACCGAAGTAGT (配列番号:349)、 GTGTTTGTGTACATCAACTC (配列番号:350)

【 0 1 5 2 】

以下の表は、T A L E N 編集用の標的配列の他にタンパク質配列を提供する。

表 7 . 主に T A L E N 媒介性の編集

【表 7】

CS1編集関連	配列またはGenbankアクセッション番号
CS1	NP_067004. 3
CS1v1TALEN標的	tgacttccagagag caatatggct ggttcccaaa catgcctca (配列番号:351)
CS1v1左TALEN標的	tgacttccagagagcaa (配列番号:352)
CS1v1左TALENタンパク質	MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKMAPKKRKRVGIHGVPAAVDLRTLGYSQLQKEI

10

20

30

40

50

	KPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTVAVKYQDMIAALPEATHEA IVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPLQLDTGQLLKIAGRGGVTAVEAVHAWRN ALTGAPLNLTPQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIG GKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLT PEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQR LLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASH DGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHG LTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETV QRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIA SNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQA HGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGRPALESIVAQLSRDPALAALTNDHLV ALACLGGRPALDAVKKGLPHAPALIKRTNRRIPERTSHRVAGSQLVKSELEKKSE LRHKLKYPHEYIELIEIARNSTQDRILEMKVMEFFMKVYGYRGKHLGGSRKPDGA IYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPIGQADEMQRYVEENQTRNKHINPNEWVKVY PSSVTEFKFLFVSGHFKGNYKAQLTRLNHTNCNGAVLSVEELLIGGEMIKAGTLT LEEVRKFNNGEINFRS (配列番号:353)	10
CS1v1右TALEN標的	aacatgcctc accctca (配列番号:354)	
CS1v1右TALENタンパク質	MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKMAPKKRKGVIHGVPAAVDLRTLGYSSQQQEKI KPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTVAVKYQDMIAALPEATHEA IVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPLQLDTGQLLKIAGRGGVTAVEAVHAWRN ALTGAPLNLTPQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIG GKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLT PEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQR LLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASN NGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHG LTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETV QRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIA SNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQA HGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGRPALESIVAQLSRDPALAALTNDHLV ALACLGGRPALDAVKKGLPHAPALIKRTNRRIPERTSHRVAGSQLVKSELEKKSE LRHKLKYPHEYIELIEIARNSTQDRILEMKVMEFFMKVYGYRGKHLGGSRKPDGA IYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPIGQADEMQRYVEENQTRNKHINPNEWVKVY PSSVTEFKFLFVSGHFKGNYKAQLTRLNHTNCNGAVLSVEELLIGGEMIKAGTLT LEEVRKFNNGEINFRS (配列番号:355)	20 30
CS1v2 TALEN標的	ttccagagag caatatggct ggttccccaa catgcctcac cctcateta (配 列番号:356)	
CS1v2左TALEN標的	ttccagagag caatatg (配列番号:357)	

30

CS1v3左TALENタンパク質	MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKMAPKKRKGIVHGPAAVDLRTLGYSSQQQKEI KPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTVAVKYQDMI AALPEATHEA IVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPQLDTGQLLKI AKRGVTA VEAVHAWRN ALTGAPLNLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNG GKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLT PEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQR LLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASN GGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHG LTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETV QRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIA SNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQA HGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGRPAALESIVAQLSRDPALAAALNDHLV ALACLGGRPALDAVKKGLPHAPALIKRTNRRIPERTSHRVAGSQLVKSELEKKSE LRHKLKYPHEYIELIEIARNSTQDRILEMKVMEFFMKVGYRGKHLGGSRKPDGA IYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPIGQADEMQRYVEENQTRNKHINPNEWVKVY PSSVTEFKFLFVSGHFKGNYKAQLTRLNHI TNCNGAVLSVEELLIGGEMIKAGTLT LEEVRKFNNGEINFRS (配列番号:363)	10
CS1v3右TALEN標的	cctcttgtca ccataca (配列番号:364)	
CS1v3右TALENタンパク質	MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKMAPKKRKGIVHGPAAVDLRTLGYSSQQQKEI KPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTVAVKYQDMI AALPEATHEA IVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPQLDTGQLLKI AKRGVTA VEAVHAWRN ALTGAPLNLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNG GKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLT PEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQR LLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASN GGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHG LTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETV QRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIA SNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQA HGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGRPAALESIVAQLSRDPALAAALNDHLV ALACLGGRPALDAVKKGLPHAPALIKRTNRRIPERTSHRVAGSQLVKSELEKKSE LRHKLKYPHEYIELIEIARNSTQDRILEMKVMEFFMKVGYRGKHLGGSRKPDGA IYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPIGQADEMQRYVEENQTRNKHINPNEWVKVY PSSVTEFKFLFVSGHFKGNYKAQLTRLNHI TNCNGAVLSVEELLIGGEMIKAGTLT LEEVRKFNNGEINFRS (配列番号:365)	20 30
CIITA編集関連	配列またはGenbankアクセッション番号	
CIITA	NP_001273331.1	

30

	LEEVRKFNNGEINFRS (配列番号:370)
CD52編集関連	配列またはGenbankアクセス番号
CD52	NP_001794.2
CD52標的	TTCCTCCTACTCACCATcagcctcctggttatGGTACAGGTAAGAGCAA (配列番号:371)
CD52左標的	TTCCTCCTACTCACCAT (配列番号:372)
CD52左タンパク質	MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKMAPKKRKRKVG IHGVPAAVDLRTLGYSSQQQKEI KPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTVAVKYQDMIAALPEATHEA IVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPLQLDTGQLLKI AKRGGVTAVEAVHAWRN ALTGAPLNLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDG GKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLT PEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQR LLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASN GGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHG LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETV QRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIA SNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQA HGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGRPALESIVAQLSRPDPALAALTNDHLV ALACLGGRPALDAVKKGLPHAPALIKRTNRRIPERTSHRVAGSQLVKSELEEKKSE LRHKLKYPHEYIELIEIARNSTQDRILEMKVMEFFMKVYGYRGKHLGGSRKPDGA IYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPIGQADEMQRYVEENQTRNKHINPNEWWKVY PSSVTEFKFLFVSGHFKGNYKAQLTRLNHI TNCGAVLSVEELLIGGEMIKAGTLT LEEVRKFNNGEINFRS (配列番号:373)
CD52右標的	GGTACAGGTAAGAGCAA (配列番号:374)
CD52右タンパク質	MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKMAPKKRKRKVG IHGVPAAVDLRTLGYSSQQQKEI KPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTVAVKYQDMIAALPEATHEA IVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPLQLDTGQLLKI AKRGGVTAVEAVHAWRN ALTGAPLNLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNG GKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLT PEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQR LLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASN GGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHG LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETV QRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIA SNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQA HGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGRPALESIVAQLSRPDPALAALTNDHLV

10

20

30

40

50

	ALACLGGRPALDAVKKGLPHAPALIKRTNRRIPERTSHRVAGSQLVKSELEEKKE LRHKLKYPHEYIELIEIARNSTQDRILEMKVMEFFMKVYGYRGKHLGGSRKPDGA IYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPIGQADEMQRYVEENQTRNKHINPNEWKVY PSSVTEFKFLFVSGHFKGNYKAQLTRLNHI TNCGAVLSVEELLIGGEMIKAGTLT LEEVRKFNNGEINFRS (配列番号: 375)
TRAC編集関連	配列またはGenbankアクセス番号
TRAC	CAA26435. 1
TRAC TALEN標的	TTGTCCCACAGATATCCagaacctgacctgCCGTGTACCAGCTGAGA (配列番号: 376)
TRAC左TALEN標的	TTGTCCCACAGATATCC (配列番号: 377)
TRAC左タンパク質	MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKMAPKKRKGIVHGVPAAVDLRTLGYSSQQQKEI KPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTAVKYQDMIAALPEATHEA IVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPQLDTGQLLKI AKRGVTAVEAVHAWRN ALTGAPLNLTPQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNG GKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLT PEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQR LLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASN IGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG LTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETV QRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIA SNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQA HGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGRPALIESIVAQLSRPDPALAALTNHDLV ALACLGGRPALDAVKKGLPHAPALIKRTNRRIPERTSHRVAGSQLVKSELEEKKE LRHKLKYPHEYIELIEIARNSTQDRILEMKVMEFFMKVYGYRGKHLGGSRKPDGA IYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPIGQADEMQRYVEENQTRNKHINPNEWKVY PSSVTEFKFLFVSGHFKGNYKAQLTRLNHI TNCGAVLSVEELLIGGEMIKAGTLT LEEVRKFNNGEINFRS (配列番号: 378)
TRAC右TALEN標的	CCGTGTACCAGCTGAGA (配列番号: 379)
TRAC TALEN右	MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKMAPKKRKGIVHGVPAAVDLRTLGYSSQQQKEI KPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTAVKYQDMIAALPEATHEA IVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPQLDTGQLLKI AKRGVTAVEAVHAWRN ALTGAPLNLTPQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNG GKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLT PEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQR LLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASN GGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHG LTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETV

10

20

30

40

50

[illegible]

	HGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAI ASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQ AHGLTPQQVVAIASNNGGGRPALESIVAQLSRPDPALAALTNDHLVALACLGGRPAL DAVKKGLGDPISRSQVLKSELEKKSELRHKLKYPHEYIELIEIARNSTQDRILE MKVMEFFMKVYGYRGKHLGGSRKPDGAIYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPIGQ ADEMQRYVEENQTRNKHINPNEWKVPSSVTEFKFLFVSGHFKGNYKAQLTRLNH ITNCNGAVLSVEELLIGGEMIKAGTLTLEEVRRKFNGEINFAAD (配列番 号:383)
--	---

10

【0153】

(iii) 例示的な遺伝子改変アプローチ

任意の従来の遺伝子改変アプローチを使用して、本明細書に記載されるような方式で免疫細胞を遺伝子改変することができる。一部の実施形態では、遺伝子改変は、ゲノム編集を使用して行われる。「ゲノム編集」は、生物の任意のタンパク質コーディングまたは非コーディングヌクレオチド配列を含むゲノムを改変して標的遺伝子の発現をノックアウトする方法を指す。一般に、ゲノム編集方法は、例えば標的化されるヌクレオチド配列において、ゲノムの核酸を切断することができるエンドヌクレアーゼの使用を伴う。ゲノム中の二本鎖切断の修復が修復されて突然変異が導入されてもよく、かつ／または外因性核酸が標的化される部位に挿入されてもよい。

20

【0154】

ゲノム編集方法は、一般に、標的核酸中の二本鎖切断の生成に関与するエンドヌクレアーゼの種類に基づいて分類される。これらの方法としては、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、転写活性化因子様エフェクターベースヌクレアーゼ (TALEN)、メガヌクレアーゼ、およびCRISPR/Casシステムの使用が挙げられる。

【0155】

一部の事例では、本明細書に記載されるような免疫細胞の遺伝子改変は、当該技術分野において公知のTALEN技術を使用して行われる。TALENは、操作された制限酵素であり、所望の標的DNA分子に特異的に結合して切断することができる。TALENは、典型的に、DNA切断ドメインに融合した転写活性化因子様エフェクター (TALE) DNA結合ドメインを含有する。DNA結合ドメインは、位置12および13において異なる2アミノ酸RVD (リピート可変ジペプチドモチーフ) を有する高度に保存された33~34アミノ酸配列を含有してもよい。RVDモチーフは核酸配列への結合特異性を決定し、所望のDNA配列に特異的に結合するように当業者に公知の方法にしたがって操作され得る (例えば、Juillerat, et al. (January 2015). Scientific reports, 5; Miller et.al. (February 2011). Nature Biotechnology 29 (2): 143-8; Zhang et.al. (February 2011). Nature Biotechnology 29 (2): 149-53; Geißler, et al., Boch, (2011), PLoS ONE 6 (5): e19509; Boch (February 2011). Nature Biotechnology 29 (2): 135-6; Boch, et.al. (December 2009). Science 326 (5959): 1509-12; およびMoscou et al, (December 2009). Science 326 (5959): 1501を参照。DNA切断ドメインは、多くの異なる細胞種において活性のFokIエンドヌクレアーゼに由来してもよい。FokIドメインは二量体として機能し、適切な配向および間隔で標的ゲノム中の部位のための特有のDNA結合ドメインを有する2つのコンストラクトを必要とする。TALE DNA結合ドメインとFokI切断ドメインとの間のアミノ酸残基数および2つの個々のTALEN結合部位の間の塩基数の両方が、高レベルの活性を達成するための重要なパラメーターのようである。Miller et al. (2011) Nature Biotech. 29: 143-8。

30

40

【0156】

目的の標的遺伝子 (例えば、TCR、CD52、MHC、および本明細書に記載される

50

他のもの) 中の配列に特異的な T A L E N は、モジュール成分を使用する様々なスキームを含む当該技術分野において公知の任意の方法を使用して構築され得る。Zhang et al. (2011) Nature Biotech. 29: 149-53 ; Geibler et al. (2011) PLoS ONE 6: e19509。
【0157】

目的の標的遺伝子に特異的な T A L E N は、二本鎖切断 (D S B) を生成するために細胞内で使用され得る。修復機構が非相同末端結合を介して切断を不適切に修復する場合、突然変異が切断部位において導入され得る。例えば、不適切な修復はフレームシフト突然変異を導入することがある。代替的に、所望の配列を有する外来 DNA 分子は、T A L E N と共に細胞に導入され得る。外来 DNA の配列および染色体配列に依存して、このプロセスは、欠陥を訂正するためまたは DNA 断片を目的の標的遺伝子に導入するため、またはそのような欠陥を内因性遺伝子に導入し、したがって標的遺伝子の発現を減少させるために使用され得る。

【0158】

一部の事例では、本明細書に (herin) 記載されるような免疫細胞の遺伝子改変は、当該技術分野において公知のような C R I S P R 技術 (C R I S P R / C a s システム) を使用して行われる。そのような改変は欠失を含んでもよく、または、目的の標的遺伝子中の配列の突然変異は、C R I S P R - C a s システムを使用して構築され得、C l u s t e r e d R e g u l a r l y I n t e r s p a c e d S h o r t P a l i n d r o m i c R e p e a t s (C R I S P R) - C a s システムは、操作された、天然に存在しない C R I S P R - C a s システムである。本開示は、目的の標的遺伝子中の標的配列とハイブリダイズする C R I S P R / C a s システムを利用し、C R I S P R C a s システムは、C a s エンドヌクレアーゼおよび操作された c r R N A / t r a c r R N A (またはシングलगайд RNA (「s g R N A」)) を含む。一部の実施形態では、C R I S P R / C a s システムは、c r R N A を含み、かつ t r a c r R N A 配列を含まない。C R I S P R / C a s 複合体は、系列特異的なタンパク質ポリヌクレオチドに結合してタンパク質ポリヌクレオチドの切断を可能とし、それにより、ポリヌクレオチドを改変することができる。

【0159】

本開示の C R I S P R C a s システムは、目的の標的遺伝子内の目的の領域、該遺伝子内もしくは該遺伝子に隣接する目的の領域、例えば、リーダー配列、トレイラー配列もしくはイントロンなど、またはコーディング領域の上流もしくは下流のいずれかの非転写領域内の目的の領域に結合しかつ／または該領域を切断してもよい。本開示において使用されるガイド RNA (g R N A) は、g R N A がゲノム中の予め決定された切断部位 (標的部位) に C a s 酵素 - g R N A 複合体の結合を方向付けるように設計されてもよい。切断部位は、未知の配列の領域、または S N P、ヌクレオチド挿入、ヌクレオチド欠失、組換えなどを含有する領域を含有する断片を放出するように選択されてもよい。遺伝子領域の切断は、C a s 酵素により標的配列の位置において 1 つまたは 2 つの鎖を切断することを含んでもよい。一実施形態では、そのような切断は、標的遺伝子の転写の減少を結果としてもたらし得る。別の実施形態では、切断は、外因性鋳型ポリヌクレオチドを用いる相同組換えにより切断された標的ポリヌクレオチドを修復することをさらに含み得、修復は、標的ポリヌクレオチドの 1 つまたは複数のヌクレオチドの挿入、欠失、または置換を結果としてもたらす。

【0160】

「g R N A」、「ガイド RNA」および「C R I S P R ガイド配列」という用語は全体を通じて交換可能に使用されることがあり、C R I S P R / C a s システムの C a s D N A 結合タンパク質の特異性を決定する配列を含む核酸を指す。g R N A は、宿主細胞のゲノム中の標的核酸配列にハイブリダイズする (部分的または完全に相補的である)。標的核酸にハイブリダイズする g R N A またはその部分は、15 ~ 25 ヌクレオチド、18 ~ 22 ヌクレオチド、または 19 ~ 21 ヌクレオチドの長さであってもよい。一部の実施形態では、標的核酸にハイブリダイズする g R N A 配列は、15、16、17、18、1

9、20、21、22、23、24、または25ヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、標的核酸にハイブリダイズするgRNA配列は、10〜30、または15〜25ヌクレオチドの長さである。

【0161】

標的核酸に結合する配列に加えて、一部の実施形態では、gRNAはまた、スキファールド配列を含む。標的核酸に相補的な配列およびスキファールド配列の両方をコードするgRNAの発現は、標的核酸への結合（ハイブリダイズ）および標的核酸へのエンドヌクレアーゼの局在化の両方という二重の機能を有し、部位特異的なCRISPR活性を結果としてもたらすことがある。一部の実施形態では、そのようなキメラgRNAは、シングルガイドRNA（sgRNA）と称されることがある。

10

【0162】

本明細書において使用される場合、tracrRNAとも称される「スキファールド配列」は、相補的なgRNA配列に結合（ハイブリダイズ）した標的核酸にCasエンドヌクレアーゼを局在化させる核酸配列を指す。少なくとも1つのステムループ構造を含み、かつエンドヌクレアーゼを局在化させる任意のスキファールド配列が、本明細書に記載される遺伝子エレメントおよびベクターにおいて使用されてもよい。例示的なスキファールド配列は当業者に明らかであり、例えば、Jinek, et al. Science (2012) 337(6096):816-821、Ran, et al. Nature Protocols (2013) 8:2281-2308、PCT出願第WO2014/093694号パンフレット、およびPCT出願第WO2013/176772号パンフレットに見出すことができる。一部の実施形態では、CRISPR-CasシステムはtracrRNA配列を含まない。

20

【0163】

一部の実施形態では、gRNA配列はスキファールド配列を含まず、かつ、スキファールド配列は別々の転写物として発現される。そのような実施形態では、gRNA配列は、スキファールド配列の部分に相補的であり、かつスキファールド配列に結合（ハイブリダイズ）してエンドヌクレアーゼを標的核酸に局在化させる追加の配列をさらに含む。

【0164】

一部の実施形態では、gRNA配列は、標的核酸に少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または少なくとも100%相補的である（米国特許第8,697,359号明細書も参照；該文献は、標的ポリヌクレオチド配列とのgRNA配列の相補性の教示について参照することにより組み込まれる）。CRISPRガイド配列と標的核酸の3'末端付近の標的核酸との間のミスマッチはヌクレアーゼ切断活性を無効にする場合があることが実証されている（Upadhyay, et al. Genes Genome Genetics (2013) 3(12):2233-2238）。一部の実施形態では、gRNA配列は、標的核酸の3'末端（例えば、標的核酸の3'末端の最後の5、6、7、8、9、または10ヌクレオチド）に少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または少なくとも100%相補的である。

30

【0165】

T細胞受容体アルファ定常（TRAC）遺伝子を標的化する、修飾sgRNAおよび非修飾sgRNAの両方を含む、例示的なsgRNA配列が本明細書において提供される。当業者に明らかなように、sgRNA配列の選択は、予測されるオンターゲットおよび／またはオフターゲット結合部位の数などの要因に依存することがある。一部の実施形態では、sgRNA配列は、潜在的なオンターゲット部位を最大化しかつ潜在的なオフターゲット部位を最小化するように選択される。

40

【0166】

一部の実施形態では、Casエンドヌクレアーゼは、Cas9ヌクレアーゼ（もしくはそのバリエーション）またはCpf1ヌクレアーゼ（もしくはそのバリエーション）である。Cas9エンドヌクレアーゼは、標的核酸の二本鎖DNAを切断して平滑末端を結果としても

50

たらず一方、C p f 1ヌクレアーゼを用いた切断は、核酸の付着末端を結果としてもたらず。

【0167】

一般に、標的核酸は、3'側または5'側においてプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)により隣接されており、PAMは、エンドヌクレアーゼと相互作用し、標的核酸に対するエンドヌクレアーゼ活性の標的化にさらに関与することがある。標的核酸に隣接するPAM配列は、エンドヌクレアーゼおよびエンドヌクレアーゼの由来となる供給源に依存すると一般に考えられている。例えば、*Streptococcus pyogenes*に由来するCas9エンドヌクレアーゼについてPAM配列はNGGであるが、PAM配列NAGおよびNGAはより低い効率で認識されることがある。*Staphylococcus aureus*に由来するCas9エンドヌクレアーゼについてPAM配列はNNGRRTである。*Neisseria meningitidis*に由来するCas9エンドヌクレアーゼについてPAM配列はNNNNGATTである。*Streptococcus thermophilus*に由来するCas9エンドヌクレアーゼ、StlCas9 dSt3Cas9、PAM配列はそれぞれNNAGAAWおよびNGGNGである。*Treponema denticola*に由来するCas9エンドヌクレアーゼについてPAM配列はNAAACである。一部の実施形態では、CasエンドヌクレアーゼはCpf1ヌクレアーゼである。Cas9エンドヌクレアーゼとは対照的に、Cpf1エンドヌクレアーゼは、一般に、tracrRNA配列を必要とせず、標的核酸の5'末端に位置するPAM配列を認識する。Cpf1ヌクレアーゼについてPAM配列はTTTNである。一部の実施形態では、CasエンドヌクレアーゼはMAD7(*Eubacterium rectale*からのCpf1ヌクレアーゼとも称される)であり、かつ、PAM配列はYTTTNである。

【0168】

一部の実施形態では、細胞を遺伝子操作することはまた、Casエンドヌクレアーゼ、またはそれをコードする核酸配列(例えば、CasエンドヌクレアーゼをコードするmRNA)を細胞に導入することを含む。一部の実施形態では、CasエンドヌクレアーゼおよびgRNAをコードする核酸は、同じ核酸(例えば、ベクター)上で提供される。一部の実施形態では、CasエンドヌクレアーゼおよびgRNAをコードする核酸は、異なる核酸(例えば、異なるベクター)上で提供される。一部の実施形態では、Casエンドヌクレアーゼは、CasエンドヌクレアーゼをコードするmRNAとして提供され、かつ、gRNAは修飾gRNA分子として提供される。代替的または追加的に、Casエンドヌクレアーゼは、タンパク質の形態で提供または細胞に導入されてもよい。

【0169】

一部の実施形態では、CasエンドヌクレアーゼはCas9酵素またはそのバリエーションである。一部の実施形態では、Cas9エンドヌクレアーゼは、*Streptococcus pyogenes*、*Staphylococcus aureus*、*Neisseria meningitidis*、*Streptococcus thermophilus*、または*Treponema denticola*に由来する。一部の実施形態では、Casエンドヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列は、宿主細胞中での発現のために最適化されたコドンであってもよい。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼはCas9ホモログまたはオルソログである。

【0170】

一部の実施形態では、Cas9エンドヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列は、タンパク質の活性を変化させるためにさらに改変されている。一部の実施形態では、Cas9エンドヌクレアーゼは、エンドヌクレアーゼの1つまたは複数の触媒性残基(residues)を不活化するように改変されている。一部の実施形態では、Cas9エンドヌクレアーゼは、エンドヌクレアーゼの触媒性残基の1つを不活化するように改変されており、「ニックアーゼ」または「Cas9n」と称される。Cas9ニックアーゼエンドヌクレアーゼは、標的核酸の1つのDNA鎖を切断する。一部の実施形態では、本明細書に記載される方

法は、2つの別個の切断反応を伴い、1つのCas9ニッカーゼは、標的核酸の1つのDNA鎖を切断するように方向付けられ、かつ、Cas9ニッカーゼは、標的核酸の第2のDNA鎖を切断するように方向付けられる。

【0171】

(iv) MHC-CAR制御性T細胞(Treg)

本明細書に開示される任意のMHC-CAR発現T細胞は制御性T細胞(Treg)であり得、Tregは、濾胞性制御性細胞の免疫モジュレーション活性を模倣するものであってもよい。本明細書において使用される場合、サプレッサーT細胞としても公知である制御性T細胞またはTreg細胞は、免疫系をモジュレートし、自己抗原への寛容を維持し、かつ／または自己免疫疾患を予防するT細胞の亜集団を指す。Treg細胞は免疫抑制因子として機能して、自己免疫疾患に関与する病的なCD4+および／またはCD8+細胞などのエフェクターT細胞の誘導および／または増殖を抑制または下方調節する。

10

【0172】

本明細書に開示される遺伝子改変Treg細胞は、天然にTreg細胞と関連付けられるバイオマーカーの1つまたは複数、例えば、CD4、FOXP3、CD25、CD45R(例えば、CD45RAもしくはCD45RO)、またはその組合せを発現する。Treg細胞は、好適なドナー(例えば、治療に供されるヒト患者)から単離された末梢血単核細胞(PBMC)を使用して調製されてもよい(該PBMCに由来してもよい)。PBMCからTreg細胞の亜集団を単離する方法は当該技術分野において周知であり、例えば、細胞選別である。好適なMHC-CARコンストラクトの他に、他の遺伝子改変(例えば、本明細書に記載されるもの)のための発現ベクターは、本明細書に記載されるような方法、または当該技術分野において公知の他の方法を介してTreg亜集団に導入され得る。代替的に、遺伝子改変Treg細胞は、CD25をコードする導入遺伝子および／または他のTreg細胞マーカーを好適なT細胞に導入することにより調製されてもよく、該T細胞は、MHC-CARおよび任意選択的に本明細書に記載されるような他の遺伝子改変のための発現カセットを導入するようにさらに改変され得る。

20

【0173】

一部の実施形態では、遺伝子改変Treg細胞は、特定の種類の病的細胞(例えば、CD4+細胞もしくはCD8+細胞)を標的化する(例えば、表面発現もしくは表面結合)分子を提示するようにかつ／または特定の組織部位(例えば、リンパ節もしくは炎症部位)を標的化する分子を提示するようにさらに改変されてもよい。

30

【0174】

一部の例では、遺伝子改変Treg細胞は、B細胞表面マーカー、例えば、CD19に特異的な単鎖抗体(scFv)などの細胞外ドメインを含むキメラ受容体(CAR)をさらに発現する。代替的または追加的に、Treg細胞は、T細胞表面マーカー、例えば、CS-1に特異的な細胞外ドメイン(例えば、scFv)を含むキメラ受容体をさらに発現してもよい。そのようなキメラ受容体は、単一のタンパク質上に一緒に天然に見出されない組合せで細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞質ドメイン(例えば、共刺激ドメイン、細胞質シグナル伝達ドメイン、例えば、CD3ζ、またはその組合せ)を含む細胞表面受容体であり得る。

40

【0175】

Treg細胞はさらに、リンパ節および／もしくは胚中心を標的化する分子、例えば、CXCR5を提示してもよく、かつ／または、炎症部位を標的化する分子、例えば、CCR6を提示してもよい。胚中心B細胞(GCB細胞)を標的化することは、専門家されたヘルパーT細胞サブセット、CXCR5highPD-1highT濾胞性ヘルパー(TFH)細胞により、少なくとも部分的に、媒介されてもよい。Foxp3+Tregは、Bcl6の発現およびB細胞とのSAP媒介性相互作用を介してTFHリプレッサーとなるように転向され得る。結果として生じる濾胞性制御性T細胞(TFR)は、TFH細胞およびTreg細胞の両方の特徴を共有し、胚中心に局在化し、かつTFH細胞集団および胚中心のサイズをin vivoにおいて調節することが期待される。

50

【0176】

さらに、本明細書に開示される T r e g 細胞は、本明細書に記載されるような追加の遺伝子改変の1つまたは複数、例えば、チェックポイント分子ノックアウトを含んでもよい。

【0177】

B細胞またはT細胞特異的CARを発現するT r e g細胞は、自己免疫疾患に関与する病的なB細胞および／またはT細胞を標的化してもよい。例えば、本明細書に記載されるような遺伝子改変T r e g細胞は、濾胞性制御性細胞に類似の機能を呈することが期待され、例えば、B細胞、T細胞、および／または樹状細胞を標的化し、それにより、例えば、B細胞刺激を下方調節し、胚中心の活性化を阻害し得る抑制性サイトカインを分泌し（G C B細胞（例えば、I l - 1 0 およびT G F - β）、T f h（M H C C A Rを通じて）およびG C）B（例えば、C D 1 9 C A Rを通じて）の細胞溶解を誘導し、かつ／または、G C B細胞もしくはT濾胞性ヘルパー（T f h）細胞へのシグナル伝達を機械的に妨害する（例えば、G C BおよびM H C ペプチドT f hへの結合を通じて）。代替的または追加的に、T r e g細胞は、ヘルパーT細胞、B細胞、および／もしくは抗原提示細胞の両方へのエンゲージメント、または一部の事例では、エンゲージメントを物理的に遮断することが可能であってもよい。

【0178】

I I I . 免疫療法におけるM H C - C A Rを発現する免疫細胞の応用

本明細書に記載されるM H C - C A R（それを含むコーディング核酸またはベクター）を発現する宿主免疫細胞は、M S、I型糖尿病、ループス、関節リウマチなどの自己免疫疾患に関与する病原性細胞の標的化および除去のために有用である。一部の実施形態では、対象は哺乳動物、例えば、ヒト、サル、マウス、ウサギ、または家畜哺乳動物である。一部の実施形態では、対象はヒト、例えば、自己免疫疾患（例えば、M S）を有する、有することが疑われる、またはそのリスクがあるヒト患者である。

【0179】

M H C - C A R 発現免疫細胞は、薬学的に許容される担体と混合されて医薬組成物を形成することができ、該医薬組成物もまた本開示の範囲内である。本明細書に記載される方法を行うために、本明細書に記載される任意のM H C - C A R コンストラクトを発現する有効量の免疫細胞は、治療を必要とする対象に投与され得る。免疫細胞は、対象にとって自己のものであってもよく、すなわち、免疫細胞は、治療を必要とする対象から得られ、M H C - C A R コンストラクトの発現のために遺伝子操作されかつ任意選択的に本明細書に記載されるような追加の遺伝子改変の1つまたは複数を含むし、そして次に同じ対象に投与される。対象への自己細胞の投与は、非自己細胞の投与と比較して免疫細胞の拒絶の低減を結果としてもたらすことがある。代替的に、免疫細胞は同種細胞であり、すなわち、細胞は、第1の対象から得られ、M H C - C A R コンストラクトの発現のために遺伝子操作され、第1の対象とは異なるが同じ種の第2の対象に投与される。例えば、同種免疫細胞は、ヒトドナーに由来して、ドナーとは異なるヒトレシピエントに投与されてもよい。

【0180】

一部の実施形態では、免疫細胞は、標的免疫疾患のための治療剤、例えば、M S を治療するためのアレムツズマブと併用される。そのような免疫療法は、免疫療法が対象において有用と考えられる標的免疫疾患の症状を治療し、軽減し、または低減するために使用される。

【0181】

M H C - C A R 免疫療法の有効性は、当該技術分野において公知の任意の方法により評価されてもよく、熟練した医療専門家に明らかである。例えば、免疫療法の有効性は、対象の生存および／または対象における疾患症状の低減により評価されてもよい。

【0182】

一部の実施形態では、本明細書に開示される任意のM H C - C A Rを発現する免疫細胞は、自己免疫疾患のための治療剤を用いて治療されたまたは治療されている対象に投与される。本明細書に開示されるM H C - C A Rのいずれか1つを発現する免疫細胞は、治療

剤と併用投与されてもよい。例えば、免疫細胞は、治療剤と同時にヒト対象に投与されてもよい。代替的に、免疫細胞は、治療剤を伴う治療の過程の間にヒト対象に投与されてもよい。一部の例では、免疫細胞および治療剤は、少なくとも4時間の間隔、例えば、少なくとも12時間の間隔、少なくとも1日の間隔、少なくとも3日の間隔、少なくとも1週間の間隔、少なくとも2週間の間隔、または少なくとも1ヶ月の間隔でヒト対象に投与され得る。

【0183】

本明細書に開示される方法を実施するために、MHC-CARを発現する有効量の免疫細胞またはその組成物は、静脈内投与などの好適な経路を介して治療を必要とする対象（例えば、ヒトMS患者）に投与され得る。MHC-CARを発現する任意の免疫細胞またはその組成物は、有効量で対象に投与されてもよい。本明細書において使用される場合、有効量は、投与により対象に治療効果を付与する各々の剤（例えば、MHC-CARを発現する免疫細胞またはその組成物）の量を指す。本明細書に記載される細胞または組成物の量が治療効果を達成したかどうかの決定は当業者に明らかである。当業者により認識されるように、有効量は、治療されている特定の状態、状態の重篤度、年齢、身体条件、身長、性別および体重を含む個々の患者のパラメーター、治療の継続時間、同時的な療法（存在する場合）の性質、特定の投与経路ならびに医療従事者の知識および専門技術内の同様の要因に依存して変動する。一部の実施形態では、有効量は、対象における任意の疾患または障害の症状を軽減し、緩和し、寛解させ、改善し、低減し、または進行を遅延させる。一部の実施形態では、対象はヒトである。一部の実施形態では、対象はヒトがん患者である。

【0184】

一部の実施形態では、対象は、自己免疫疾患を患うヒト患者であり、自己免疫疾患は、正常な身体部分を攻撃する異常な免疫応答により特徴付けられる。自己免疫疾患の例としては、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、若年性特発性関節炎（若年性特発性関節炎としても公知）、シェーグレン症候群、全身性硬化症、強直性脊椎炎、1型糖尿病、自己免疫性甲状腺疾患（グレーブス病および橋本病）、多発性硬化症 重症筋無力症、炎症性腸疾患（クローン病もしくは潰瘍性大腸炎）、乾癬、または表1に記載される疾患が挙げられる。

【0185】

一般に、自己免疫疾患が影響され得る、免疫カスケードにおける多数のステージがある。本明細書に開示される方法が含む編集の組合せにより可能となる介入の連続体がある。例えば、MHC-CARに加えて、表面分子の別個のセットを提示するTreg細胞は、異なるステージの自己免疫疾患を治療するために使用され得る。

【0186】

MSを含む多くの免疫障害の早期ステージにおいて、調節機構における解明されていない障害が存在しかつ／または寛容誘導がMSにおいて存在し、T細胞による神経系に対する繰返しの攻撃が始まる。好適なMHC-CARおよび抗CD19 CAR（任意選択的に本明細書に記載されるような他の遺伝子改変を伴う）を発現するTreg細胞は、介入のために使用されてもよい。

【0187】

自己反応性Treg細胞の利点は、「バイスタンダー」抑制因子として作用して、罹患した組織により局所的に発現されるコグネイト抗原に応答して部位特異的な方式で炎症を減弱させる能力である。制御性T細胞の誘導（自己抗原による）は、様々な自己抗原がある場合であっても（または開始／一次）自己抗原が未知の場合でも、疾患進行を抑制し得る。Tregは、比較的自由に移行して、T細胞およびB細胞を阻害し、かつ炎症性環境に戻ることを予防し得る。これらの自己反応性Tregは、バイスタンダー抑制因子として作用して、罹患した組織により局所的に発現されるコグネイト抗原に応答して部位特異的な方式で炎症を減弱させる能力において有利である。

【0188】

したがって、遺伝子改変 T r e g 細胞は、自己反応性 T r e g 細胞の抑制機能を模倣するように設計されてもよい。そのような T r e g 細胞は、例えば、P D - L 1 / P D - 1 をノックアウトし、C C R 6 および / または M O G を標的化する s c F v を提示して炎症の部位への経路制御を行い、好適な M H C - C A R および / または抗 C D 1 9 - C A R を発現する

ように改変されてもよい。代替的に、T r e g 細胞は、例えば、P D - L 1 / P D - 1 をノックアウトし、C X C R 5 を提示して胚中心および / または異所性リンパ節への経路制御を行い、好適な M H C - C A R および / または抗 C D 1 9 - C A R を発現するように改変されてもよい。T r e g 細胞のこれらの種類は、炎症の部位において病原性細胞と相互作用

し、病原性相互作用を遮断し、かつ / または炎症性環境を緩和してもよい。それらは、早期疾患ステージにおいて（病原性を阻害するため）または細胞傷害性療法の後（炎症性環境に戻ることを予防するため）に使用され得る。

【0189】

再発寛解性 M S （中期ステージ）は天然に自己調節され、これらの天然の調節機構を増大させる治療は、疾患プロセスの制御を助ける。疾患治療の成功において、T h 1 細胞から T h 2 および T h 3 細胞へのシフト、ならびに他の制御性細胞の出現がある。このステージにおいて、治療標的は、病原性 B 細胞および病原性 T 細胞の両方を含む。そのような中期ステージ疾患を治療するための T r e g 細胞は、本明細書に記載されるような好適な M H C - C A R 、および B 細胞を標的化する（例えば、抗 C D 1 9 C A R ）または C D 8 + 細胞などの T 細胞を標的化する追加の C A R を発現してもよい。T r e g 細胞は、C X C R 5 をさらに提示してもよく、または C X C R 5 標的化を含まなくてもよい。抗 C D 1 9 C A R を発現する T r e g 細胞は、胚中心において B 細胞を除去するために使用されてもよい。

【0190】

M S が再発寛解性形態から慢性進行性形態（後期ステージ）に変化する場合、T 細胞は慢性活性化の状態に入り、変性プロセスが起こる。細胞傷害性 C D 8 + T 細胞に対する積極的治療は、十分に細胞傷害性である C A R 増強（CAR augmentation）を必要とする。この時点において、治療は、主に T r e g 細胞により推進されるものから M H C - C A R C D 8 + T 細胞およびさらには M H C - C A R C S - 1 細胞により推進されるものにシフトしてもよい。究極的目標は同じままであり、バイスタンダー効果により増進される細胞傷害性を通じて病理を抑制することである。この疾患ステージにおける使用のための遺伝子操作された T 細胞は、好適な M H C - C A R 、および疾患の後期ステージに関与する病的な T 細胞、例えば、C D 8 + T 細胞を標的化する追加の C A R を発現してもよい。一部の例では、追加の C A R は、C S - 1 （S L A M F 7 としても公知）を標的化してもよく、C S - 1 は、C D 8 + T 細胞上に発現される糖タンパク質である。C S 1 は、C D 8 + T 細胞および血漿細胞を標的化および殺傷するために使用され得る有望な抗原である。C S 1 - C A R T 細胞は、より多くの I F N - ガンマの他に I L - 2 を分泌し、より高レベルの活性化マーカー C D 6 9 を発現し、脱顆粒のためのより高い能力を有し、かつ増進された細胞傷害性を示す。抗 C S 1 C A R は C D 8 + T 細胞を標的化する。遺伝子改変 T 細胞は、C X C R 4 などの血漿細胞の骨髄標的化、および C X C R 3 を用いた炎症組織への標的化のための分子をさらに提示してもよい。

【0191】

Hiepe et al., Nature Reviews Rheumatology, 7(3):170-178, 2011。例としては、ループスにおける血漿細胞の標的化が挙げられる。

【0192】

I V . 治療的使用のためのキット

本開示はまた、自己免疫における自己反応性 T 細胞などの病原性免疫細胞の抑制において使用するための M H C - C A R 発現免疫細胞の使用のためのキットを提供する。そのようなキットは、本明細書に記載されるものなど）の M A R - C A R を発現する免疫細胞、

10

20

30

40

50

および薬学的に許容される担体を含む組成物を含む1つまたは複数の容器を含んでもよい。

【0193】

一部の実施形態では、キットは、本明細書に記載される任意の方法において使用するための指示を含み得る。含まれる指示は、治療を必要とする対象、例えば、MS患者へのMHC-CAR発現免疫細胞の投与の説明を含み得る。キットは、対象が治療を必要としているかどうかの同定に基づく治療のための好適な対象の選択の説明をさらに含んでもよい。一部の実施形態では、指示は、治療を必要としている対象への免疫細胞の投与の説明を含む。

【0194】

本明細書に記載されるMHC-CARを発現する免疫細胞の使用に関する指示は、一般に、意図する治療のための投与量、投与スケジュール、および投与経路に関する情報を含む。容器は、単位用量、バルクパッケージ（例えば、複数用量パッケージ）または単位用量未満であってもよい。本開示のキット中に供給される指示は、典型的に、ラベルまたはパッケージ挿入物上の書面による指示である。ラベルまたはパッケージ挿入物は、医薬組成物は、対象における発症を治療し、遅延させ、かつ／または疾患もしくは障害を軽減するために使用されることを指し示す。

【0195】

本明細書において提供されるキットは、好適な包装中にある。好適な包装としては、バイアル、ボトル、ジャー、および柔軟性包装などが挙げられるがこれらに限定されない。特定のデバイスと組み合わせた使用のための包装もまた想定される。キットは無菌アクセスポートを有してもよい（例えば、容器は、皮下注射針により貫通可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグまたはバイアルであってもよい）。容器もまた、無菌アクセスポートを有してもよい。医薬組成物中の少なくとも1つの活性剤は、本明細書に記載されるようなMHC-CARを発現する免疫細胞である。

【0196】

キットは、任意選択的に、緩衝液および判断情報などの追加の成分を提供してもよい。通常、キットは、容器および容器上または容器に付随したラベルまたはパッケージ挿入物（複数可）を含む。一部の実施形態では、本開示は、上記されるキットの内容物を含む製造物を提供する。

【0197】

さらなる説明なしに、当業者は、上記の記載に基づいて、本発明をその最も完全な程度まで利用できると考えられる。以下の特定の実施形態は、したがって、単に説明的なものであると解されるべきであり、いかなる意味でも本開示の残りの部分の限定として解されるべきではない。本明細書において参照される全ての刊行物は、本明細書において参照される目的または主題のために参照することにより組み込まれる。

【実施例】

【0198】

以下の実施例は、治療的T細胞をMSに関与するミエリン塩基性タンパク質（MBP）特異的Tリンパ球に対して選択的に向け直すためにキメラ受容体を利用する細胞性免疫療法の開発に焦点を当てる[16]。このプログラムの結果は、病的な自己特異的Tリンパ球に対抗できる向け直された治療的T細胞のさらなる開発をサポートすることができ、かつ、MSにおける治療標的としてのヒト化されたMBP-DR2キメラ受容体を詳細に検証する[29]。

【0199】

実施例1：ミエリン塩基性タンパク質に特異的な改変T細胞の構築

MBPロード主要組織適合複合体-キメラ抗原受容体（MHC-CAR）を標的化する抗原特異的T細胞受容体（TCR）のためのコンストラクトをアッセイ用のTCRノックアウトを有する細胞への再導入のために設計する。TCRコンストラクトの設計は、刊行された構造を有する抗原特異的TCRおよびヒト細胞株において検証されたTCR発現コンストラクトに基づく[17、46、51、52]。標識化のために緑色蛍光タンパク質

(eGFP) またはルシフェラーゼを遺伝学的にコードさせる [28]。TCR コンストラクトおよびレポーター遺伝子を含む例示的なレンチウイルス発現ベクターを図 1 に提供する。

【0200】

いくつかの細胞株を TCR 発現および活性を試験するために選択し、該細胞株には、Jurkat E6-1 (TCR を発現する対照株)、Jurkat J. RT3-T3.5 (TCR β を欠いた株)、SupT1 (損傷した TCR α を有する株)、および初代ヒト T 細胞 (TCR クロノタイプの多様な集団を含有する) が含まれる。

【0201】

Jurkat E6-1 細胞は、末梢血からの確立されたヒト T リンパ球細胞株である。それは、TCR を発現する対照細胞株として使用される [15、18]。

【0202】

Jurkat RT3-T3.5 は、TCR β 鎖の発現を不可能にする突然変異に起因して TCR β を欠いている。それはまた、表面 CD3 を発現せずかつ T 細胞受容体 α 、 β ヘテロ二量体を産生しない。それは、したがって、T 細胞受容体遺伝子移入を検証するために使用される [1、6、21、49]。

【0203】

SupT1 は、複数の T 系列マーカーを発現するヒトリンパ芽球株であり、非機能的な受容体をコードし、TCR α を発現しないため使用される [49]。

【0204】

PMBc 由来初代ヒト T 細胞は、TCR クロノタイプの多様なレパートリーを含有する。

【0205】

図 1 に示されるような抗原特異的 TCR を含有するレンチウイルスベクターを使用して、少なくとも 1 つの TCR 鎖を欠いたがん細胞株への形質導入を行った後、蛍光活性化細胞選別 (FACS) を使用して発現について評価する。抗原特異的 TCR を含有するがん細胞株において、マウス研究におけるその使用を可能とする安定発現の成功にしたがってルシフェラーゼを細胞株に加える。

【0206】

mRNA、マルチシストロン性 mRNA、およびレンチウイルス形質導入のための TCR コンストラクトは、遺伝学的にコードされた eGFP および抗 TCR または抗 CD3 抗体を用いる標識化に基づくスクリーニングを介して直接的に進行する [3、19]。

【0207】

実施例 2：MHC ベースのキメラ受容体 (MHC-CAR) の構築およびそれを発現する T 細胞

(i) MHC-CAR コンストラクトの設計

MBP 84-102 エピトープをヒト白血球抗原 HLA DR2 に遺伝学的に関連付ける養子細胞療法用の受容体を生成し、これはキメラ細胞内シグナル伝達ドメインを組み込んでいるかまたは欠いている [29]。抗原-主要組織適合複合体 (Ag-MHC) ドメインは受容体として働き、MBP 特異的標的細胞の TCR に結合する。Ag-MHC-CAR は、CD3- ζ (すなわち、第一世代シグナル伝達ドメイン) を有する前臨床マウスモデルにおいて検証されており、[9、25] において提供される方法論にしたがって、ヒトにおける有効性のために追加の共刺激シグナル伝達ドメイン (すなわち、第二または第三世代シグナル伝達ドメイン) と任意選択的に組み合わせてもよい。MHC-CAR の様々な設計の概略図を図 2 に提供する。

【0208】

MHC-CAR を HLA-DR の構造に基づいて設計し、様々な内部細胞質共刺激ドメインと組み合わせる。MHC-CAR は、2 つのサブユニット：(i) リーダー配列、DRA*1010 ドメイン、および細胞質ドメインを含有する α 鎖、ならびに (ii) リーダー配列 (HLA-DRB1*1501 から)、ペプチド (ミエリン塩基性タンパク質からの DENPVVHF FKNIVTPRTPP (配列番号：15))、ドメイン (HLA

10

20

30

40

50

－DRB1*1501から)、および細胞質シグナルドメイン、例えば、CD3ζを含有するβ鎖を有する[29]。図3。mRNAを作製するために使用されるDNAは、単鎖(図4において一実施形態として示される)を含有するか、またはマルチストロン性でありかつ図5に示されるようにオルソゴナル2A配列により分離されているかのいずれかである。遺伝学的にコードされるeBFPまたはRQR8を細胞標識化のためまたは枯渴のための機構を提供するために細胞に導入する[4、5、37、40]。図3および図5。
【0209】

図6に示されるように、設計されたMHC-CARは、タグ付加のための多数の部位を有する。部位1は、天然のHLA-DRがCIITA編集に起因して発現されない場合のためのHLA-DR抗体結合部位である[26、38]。部位2および3は、ポリヒスチジンタグモチーフのための潜在的な挿入部位である[24]。部位4および5は、それぞれRQRおよびRQR8を表す[37]。多発性硬化症は血液脳関門透過性に影響することが示されているため、治療的MHC-CARの安全性を増進するために、遺伝学的にコードされるRQRは、重篤なMSの治療において適応外使用されるキメラモノクローナル抗体治療であるリツキシマブの投与によりMHC-CAR T細胞の急速な枯渴を可能とする[42]。

【0210】

(ii) MHC-CARを発現するT細胞株の構築

以下において議論する多数の細胞株は、MHC-CARコンストラクトを試験するためを選択される。臨床転換可能なプロトコルを確立するためにアッセイを次にヒトT細胞において継続する。

【0211】

K56細胞はクラスIおよびクラスII MHCを欠いており、抗体を使用するHLA-DR発現のタグなし検証を可能とする(HLA-DRはMHC-CARの成分である)[45]。発現アッセイは、フローサイトメトリーを使用するRQR8発現と比べたMHC-CAR発現の評価を可能とし、同じレンチウイルスコンストラクトは次にPMBc由来T細胞において使用される[23]。

【0212】

KM-H2は、HLA-DR陽性対照株として使用され得るヒトホジキンリンパ腫株である[34、44]。上記のように、Jurkat E6-1は、CIITAの送達によりHLA-DRを条件付きで発現し、CIITAノックアウトが使用される場合にCIITA TALENを評価するために使用され得る[33]。

【0213】

加えて、初代ヒトT細胞が使用され得る。PMBc由来初代ヒトT細胞を全血から精製および濃縮した後、活性化させる。形質導入を濃縮の後に行う。細胞を組換えヒトインターロイキン-2(および/またはIL-7および/またはIL-15)とインキュベートする[7、12、43]。前臨床研究および予期される治療的過程に基づいて、所望の細胞種は、幹細胞メモリーTSCM、セントラルメモリーTCM、およびナイーブ細胞TNの分子的小および機能的特徴を有するCD8+ T細胞である[11、22、32、35]。抗体染色は、細胞のイムノタイピングを可能とする[27]。

【0214】

シグナル伝達ドメイン(CD3ζ、41BB、CD28)の並べ替えを含む初期コンストラクトをK562細胞においてmRNA、マルチストロン性mRNA、およびレンチウイルス戦略を使用して発現させる。細胞株がMHCクラスIおよびIIを欠くことにより、成功裡に用いられた戦略[29]にしたがって、HLA-DR抗体を使用するMHC-CAR発現のタグなしの検証が可能となる。治療的T細胞を含むより臨床的に関連する細胞株における発現効率の定量化はコンストラクトに依存し、遺伝学的にコードされる蛍光レポーター(BFP)またはRQR部位、ポリヒスチジン(HIS)-タグ、もしくはMHC-CAR(TALENを使用してCIITAが不活性化される場合、HLA-DR抗体を用いる)の抗体染色を使用して測定される。標識化部位を図6に指し示す。潜在的

10

20

30

40

50

な治療ベクターとしてのMHC-CAR送達率を試験するために、BFPをコンストラクトから除去し、枯渇制御を提供するためにRQRを保持する。臨床的に関連するコンストラクトの発現率を編集後の抗体染色を使用して測定する。

【0215】

転写活性化因子様エフェクター技術(TALEN)もまた、MHC-CARを発現するT細胞を調製するために使用することができる。ヒトT細胞株を活性化させ、TALENをトランスフェクトし、MHC-CARをトランスフェクトまたは形質導入する。それらを次に染色し、フローサイトメトリーにより解析してTALEN遺伝子不活性化およびMHC-CAR発現を評価する。

【0216】

所望の細胞株におけるコンストラクトの発現が検証されたら、ヒトT細胞株へのTALEN形質導入(上記のようにTCRaおよびCD52またはCIIITA)を行う。TALENを活性化ヒトT細胞株に導入した後、評価のためにMHC-CARを同じT細胞株に導入する。ヒトT細胞の改変をこの順序で行うことで、天然のTCRに起因するMHC改変細胞の偶然的同胞殺傷を予防することができる[10]。TALEN編集MHC-CAR T細胞の活性が確認される。

【0217】

(iii) 転写活性化因子様エフェクター(TALEN)を介するMHC-CAR発現T細胞の改変

ヒトT細胞を選択して、TALENによるTCRa、およびCD52またはCIIITA遺伝子の不活性化を確認した後、TALENを使用して、MHC-CARと組み合わせて評価を行う。転写活性化因子様エフェクター(TALEN)は、配列特異的な方式でDNAに結合する。DNA結合ドメインは、特異的なヌクレオチド認識を付与する異なる2アミノ酸RVD(リピート可変ジペプチドモチーフ)を有する高度に保存された33~34アミノ酸配列を含有する[23、31]。

【0218】

TCRのα鎖およびβ鎖のいずれかの突然変異は、表面TCR発現の阻害のために充分である[15、36]。TALENを使用して、望ましくない転座を通じた増殖上の利点を導入することなく治療用細胞における2つの遺伝子の発現を阻害する[39][47]。移植片対宿主病(GvHD)を予防し、かつ同種療法の生成を可能とするために、TCR発現はTRAC標的化TALENを通じて阻害される[15、39、47]。

【0219】

アレムツズマブ適合性のためにCD52の欠失を行うことができる。アレムツズマブは、ヒト化された抗CD52 IgG1モノクローナル抗体であり、循環性TおよびBリンパ球を標的化して枯渇させる[41]。アレムツズマブは、重篤発症MSにおけるレスキュー療法またはファーストライン薬物として使用することができる[50]、ヒト患者集団において併用投与される。TALENノックアウトは、MHC-CARを患者における同時治療と適合性にする[14、39]。さらに、MHC-CARにおけるHLA-DRの特徴付けのためにCIIITAの欠失を行うことができる。CIIITAは、HLAクラスIIプロモーターの転写活性のために必須のタンパク質コーディング遺伝子である[26]。ノックアウトは、MHC-CAR発現の特徴付けのために抗体を使用するHLA-DRの直接的な測定を可能とする[38、53]。CD52発現の阻害は、多発性硬化症のためにFDAに承認された治療であるレムトラダR(アレムツズマブ)との同時治療を可能とする[42]。アレムツズマブはまた、CAR T療法の生着を補助するリンパ枯渇/リンパ抑制剤として使用される[39]。TRACおよびCD52標的化TALENを用いて改変されたCAR T細胞療法は現在、臨床試験において試験されている[38、40、43]。

【0220】

CD52の代わりにMHCクラスIIトランスアクチベーター(CIIITA)を不活化するTALENは、CIIITAの不活性化として、HLA-DR発現を阻害することが期

10

20

30

40

50

待され [26] [38]、したがって、HLA-DR 抗体染色による MHC-CAR 含有細胞の直接的な同定を可能とする。

【0221】

検証される TALEN (TRAC: TTGTCCACAGATATCCagaaacctgacctgCCGTGTACCAGCTGAGA (配列番号: 376)、CD52: TTCCTCCTACTCACCATcagacctctggttatGGTACAGGTAAGAGCAA (配列番号: 371)、CIITA: TTCCTCCTCAGGCAGCTCacagtggtgccaccaTGAGATTGGGGCCCCCTA (配列番号: 366)) は Celllectis から得られ、または以前に検証された部位を標的化するために設計される [38、43]。

10

【0222】

ヒト T 細胞を活性化させ、3つの異なる TALEN のバリエーションをコードする mRNA をエレクトロポレートする: TCR-アルファ定常鎖、CD52、および CIITA。細胞を抗 CD3 または抗 TCR (TCR-アルファ定常鎖)、抗 CD52 (CD52)、または抗 HLA-DR (CIITA) を用いて表面染色した後、フローサイトメトリーにより解析する。

【0223】

TALEN 発現アッセイにおいて、不活性標的遺伝子に対する以前に検証された TALEN の能力を再検証する [39]。転座研究およびオフターゲット研究を再び行い、いくつかの全ゲノム配列により結果を確認する。GUIDE-seq を全ゲノムシーケンシングの代替として使用してオンおよびオフターゲット編集を確認することができる [8]。

20

【0224】

以下の内因性遺伝子の 1 つまたは複数 (one of more) を編集して他の細胞との相互作用を低減する: TCR (TCR アルファまたはベータ鎖を通じて; 望まない細胞への標的化を低減するため)、CIITA (MHC クラス II 遺伝子の発現を調節する; 欠失を試験する (taster) ための標的細胞)、B7-1 (CD80) および / または B7-2 (CD86) ノックアウト、ならびに NK G2D リガンドまたは UL18 と共に b2m (MHC クラス I 遺伝子の発現を調節する)。

【0225】

さらに、以下の遺伝子の 1 つまたは複数を経編集して、相互作用する細胞の機能を改変することができる: PD-L1 + / - CTLA4-Ig 過剰発現; PD-L1 / 2 過剰発現 + / - PD-1 ノックアウト; FasL 過剰発現 + / - Fas ノックアウト; ガレクチン 9 過剰発現 + / - TIM3 ノックアウト; および / または PVT / CD155 過剰発現 + / - TIGIT ノックアウト。PD-1、Fas、TIM3、TIGIT における欠陥は、患者に自己免疫の素因を与える。一部の薬物は機能を回復させ得る (例えば、Tim3、グラチラマー酢酸塩および IFN-ベータ)。自己免疫疾患を患う患者からの自己細胞が利用される場合、それらは、CTL および Treg 機能に影響を及ぼす欠陥性遺伝子の患者特異的な補正を必要とすることがある。それらの個人的な突然変異セットはまた、CTL または Treg 細胞が最も治療的に関連するかどうか、および自己細胞または同種細胞のいずれかが使用される場合に何らかの細胞改変が効果的であるかどうかを決定することがある。

30

40

【0226】

さらに、以下の編集は、細胞の位置および / または機能を改変することがある (例えば、より濾胞性制御性細胞様とするため):

- MHC-CAR- (FOX3P) - (CS1 または CD19 CAR) / (CS-1 CAR のために必要とされる CS-1 ノックアウト)
- MHC-CAR- (FOX3P) - (CCR7 または CXCR5)

【0227】

さらに、以下の編集は、自己免疫疾患のための併用療法 (例えば、MS 特異的療法) を可能とし得る。

50

- ー RQRタグ：操作されたT細胞は、リツキシマブ（殺傷スイッチ）を用いて除去され得る。新たに承認された抗CD20抗体Ocrevusのためのタグが生成され得る。
- ー ラパマイシンスイッチ：患者がラパマイシン（タクロリムス）を用いて治療される場合にのみ不活性／活性のCAR
- ー CD52ノックアウト：存在する免疫細胞の数を減少させるためのレムトラダ（アレムツズマブ）を用いる事前治療を可能とする
- ー VLA-4ノックアウト：病原性免疫細胞を末梢に移動させるためにタイサブリを用いて治療し得るが、操作された細胞はそこに留まることを強いられる（脳脊髄にスタックした細胞として確立されたMSを有する患者にとって理想的でないことがあるが、VLA-4の同時のmRNA発現はそれらの位置への一時的な接近を提供し得る）
- ー 操作されたT細胞からのIL-6抗体（トシリズマブ（Tocilizumab））の分泌：操作されたT細胞が脳および脊髄に接近しないとないが、BBBに起因してこの薬物は該位置に接近できない場合に役立つ

【0228】

実施例3：MHC-CAR活性の調査

(i) MHC-CARを発現する初代T細胞の調製

初代T細胞は、以下のように調製され得る。T細胞を末梢血単核細胞から単離し（EasySep Human T Cell Enrichment Kit、Stemcell Technologies）、（X-VIVO 15培地、Lonza；20mg/mlのIL-2、Miltenyi；5%のヒトAB血清、Seralab）を用いて活性化させる（Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28、Life Technologies）。MBP抗原ペプチドを含有する好適なMHC-CARコンストラクトを従来の方法を使用して初代T細胞に導入する。MHC-CARコンストラクトの表面発現をFACSおよび抗体染色により検証する。

【0229】

(ii) in vitroでのMHC-CAR活性試験

コンストラクトのトラフィッキングおよび発現（mRNA、マルチシストロン性mRNA、レンチウイルスを用いる）が検証されたら、活性試験をin vitroで実行する。全ての試験を異なるエフェクター：標的（E：F）細胞濃度において実行する。in vitro試験は、MHC-CARシグナル伝達ドメインおよびT細胞サブセットの初期評価を提供する。

【0230】

(iii) IL-2産生によるシグナル伝達ドメインの評価

エレクトロポレーションの24時間後に、MHC-CARを用いて一過的に操作されたヒトT細胞をプレート結合HLA-DR抗体を用いて刺激して、MHC-CAR（様々なシグナル伝達ドメインを含有する）が機能的かどうかを決定する。IL-2産生をStemCell IL-2 ELISAキットを使用して24時間後に測定する。この試験は、バリエーションを再操作または放棄すべきかどうかに関する迅速なアッセイを提供する [29]。

【0231】

(iv) 増殖アッセイを通じたMHC-CAR細胞および病原性TCR細胞の相互作用

TCRを一過的に発現する標的細胞株をエレクトロポレーションの24時間後にTCR発現について磁気的に選別し、照射を行って、抗原特異的TCRとのMHC-CARのエンゲージメントがT細胞を含有するMHC-CARの増殖を刺激するかどうかを試験する。代替的に、TCRを安定に発現する標的細胞株に照射を行う。（+/-抗原特異的）TCRを提示する照射された細胞をCFSE標識MHC-CAR細胞とインキュベートし、異なるT：E比での培養後に増殖を測定する [30]。

【0232】

(v) 脱顆粒アッセイ

CAR T細胞をRQR上のエピトープ（使用される標的細胞上で発現されていない）

10

20

30

40

50

またはT細胞マーカーの代わりにe B F Pを通じて標識する。一過性または安定発現（一過性発現の例を記載する）を有する細胞株についてアッセイを行う。エレクトロポレーションの24時間後に、R Q R 8またはB F Pのいずれかを有するM H C - C A RヒトT細胞を標的（抗原特異的T C R S u p T 1もしくはJ u r k a t）または対照（+ / - T C R J u r k a tもしくはT C R - S u p T 1）細胞と6時間共培養する。一過性発現（および後に安定発現）の標的細胞に抗原特異的T C Rをエレクトロポレートし、エレクトロポレーション後にC D 3磁気ビーズを用いて選別する。R Q R +またはB F P + M H C - C A R T細胞（抗リツキシマブ抗体、Q B E n d 1 0抗体を用いて同定される）をフローサイトメトリーにより解析して、表面上の脱顆粒マーカーC D 1 0 7 aの発現を検出する [2] 。

10

【 0 2 3 3 】

（ v i ） サイトカイン分泌アッセイ

一過性または安定発現（一過性発現を記載する）を有する細胞株についてアッセイを行う。M H C - C A Rを一過的に発現するヒトT細胞をエレクトロポレーションの24時間後に標的細胞との共培養後のサイトカイン分泌について評価する。M H C - C A Rを一過的に発現するヒトT細胞を標的（抗原特異的T C R含有J u r k a tもしくはS u p T 1細胞）または対照（+ / - 非抗原特異的J u r k a tもしくはS u p T 1）細胞と24時間共培養する。抗原特異的T C Rを次にアッセイ前の照射により殺傷する。上清を回収し、T H 1 / T H 2 c y t o k i n e c y t o m e t r i c b e a d a r r a y k i tを使用して解析してT細胞により産生されるサイトカインを定量化する [1 3] 。

20

【 0 2 3 4 】

（ v i i ） I F N γ 放出アッセイ

様々なレベルのM H C - C A R発現細胞を、トランスフェクションの24時間後に照射したT C R T細胞とインキュベートする。共培養物を24時間維持する。インキュベーションおよび遠心分離後、上清をE L I S AによるI F N γ 検出を用いて試験する。

【 0 2 3 5 】

（ v i i i ） 細胞傷害性アッセイ

T C R T細胞を治療的M H C - C A Rの他に対照細胞とインキュベートする。M H C - C A R T細胞との共培養の前に標的および対照細胞を蛍光細胞内色素（C F S EまたはC e l l T r a c e V i o l e t）を用いて標識する。共培養物を4時間インキュベートする。このインキュベーション期間後、細胞を固定可能生存色素（fixable viability dye）を用いて標識し、フローサイトメトリーにより解析する。各細胞集団（標的または陰性対照）の生存を決定し、特異的細胞溶解のパーセンテージを算出する。細胞傷害性アッセイを形質導入の48時間後に実行する。

30

【 0 2 3 6 】

（ i x ） 阻害アッセイ

P B M Cを、M H C - C A Rコンストラクトを発現する照射またはミトマイシン処理した操作されたT細胞と共培養する。対照として、P B M Cを、M H C - C A Rコンストラクトを発現しない照射またはミトマイシン処理した操作されたT細胞と共培養する。7日後、ヒト患者ドナーAからの細胞増殖をX T T比色アッセイまたはC F S E希釈（F A C S分析）により測定する。細胞増殖が対照において観察されるが、操作されたT細胞が、分泌されるF Pを発現する場合、細胞増殖は期待されないか、または限られた細胞増殖が期待される。この実験からの結果は、M H C - C A R発現T細胞がF Pを発現する場合にアロ反応性T細胞の増殖は阻害されることを示すことを目的とする。

40

【 0 2 3 7 】

（ x ） 増殖

抗原特異的T C RとのM H C - C A RのエンゲージメントがM H C - C A R含有T細胞の増殖を刺激するかどうかを試験するために、T C Rを一過的に発現する標的細胞株をエ

50

レクトロポレーションの24時間後にTCR発現について磁気的に選別し、照射を行う。代替的に、TCRを安定に発現する標的細胞株に照射を行う。(+/−抗原特異的)TCRを提示する照射された細胞をCFSE標識MHC-CAR細胞とインキュベートし、異なるT:E比での培養後に増殖を測定する。

【0238】

(xi) *in vivo* 試験

マウスT細胞中のMHC-CAR(マウスおよびヒトMHCを有する)は、多発性硬化症についてのマウスモデルである実験的アレルギー性脳脊髄炎において治療効果を以前に示している[25、29]。ここで我々は、ヒト細胞中のMHC-CARがヒトT細胞株中のヒトTCRを標的化できるかどうかを、以前のCAR T前臨床研究におけるものと類似の*in vivo*マウスモデルを使用して試験する[39]。*in vivo*試験は、MHC-CARシグナル伝達ドメインおよびT細胞サブセットのさらなる評価を可能とする。

【0239】

図7に示されるように、MHC-CAR T細胞の*in vivo*活性をマウス異種移植モデルにおいて検証することができる。

【0240】

免疫不全(Immunodeficient)NOGマウスの静脈内にMS異種移植マウスモデルとして抗原特異的TCR-ルシフェラーゼ発現T細胞を注射する。マウスに次に、腫瘍細胞株を用いる注射の2または7日後に、異なる用量において試験される静脈内用量のMHC-CAR T細胞を与える。CARレンチウイルスベクターを形質導入されないT細胞を用いる静脈注射は、対照として働く。異なる動物におけるTCR-ルシフェラーゼ発現細胞の拡大増殖を追跡するために、T細胞注射の日(D0)、T細胞注射後のD7、14、21、28および40において生物発光シグナルを決定する[39]。

【0241】

ここに示すものと類似のバックグラウンド改変(天然のTCRを不活化しかつ移植片対宿主を最小化するためのTALEN、CD52を不活化しかつアレムツズマブとの同時の治療を可能とするためのTALEN、および枯渴を可能とするためのRQR8)を有するCAR T細胞はマウスモデルにおいて以前に検証されており、今回UCART19臨床試験において使用される[39]。

【0242】

(xii) 殺傷スイッチの検証

形質導入T細胞を25%の乳仔ウサギ補体(AbD Serotec)に4時間、医薬的補体(リツキシマブ、タイサブリ、またはアレムツズマブ)を含めてまたは含めずに曝露して、補体依存性細胞傷害性(CDC)媒介性感受性を調べる。Miltenyi CD34磁気ビーズ選択形質導入RQR8 T細胞を同様に処理されたQ8形質導入T細胞の集団に対して比較してCDC媒介性欠失の特異性を実証する。CDCアッセイパラメーターのさらなる調査は、12.5、25、50、および100mg/mLの医薬的補体とインキュベートされたRQR8形質導入T細胞を使用する経時/用量滴定アッセイおよび1~120分の範囲内の時点評価を通じて達成された。

【0243】

実施例4:MHC-CARを発現する制御性T細胞(Treg)

多発性硬化症および他の自己免疫疾患に関与する病的なTリンパ球を抗原特異的に標的化する療法は、抗原非特異的な療法と比較して向上した治療指数を有することが期待される。この実施例は、治療的T細胞をMSに関与するミエリン塩基性タンパク質特異的Tリンパ球に対して選択的に向け直すためにキメラ抗原受容体を使用する例示的な細胞性免疫療法を提供する。

【0244】

Treg細胞の選別、形質導入、および拡大増殖

CD4+ T細胞をRosetteSep(STEMCELL Technologies

10

20

30

40

50

s) を介してPMB Cから単離し、CD 25+細胞について濃縮した後(M i l t e n y i B i o t e c)、FACSにより生CD 4+CD 45RO-CD 45RA+CD 25+T r e gおよびCD 4+CD 45RO-CD 45RA+CD 25-対照T細胞に選別する。選別したT細胞を、T r e gまたは非r e g対照Tについてそれぞれ1, 000U/ m lまたは100U/ m lのIL-2中のαCD 3 mAbをロードした人工APC (a A P C) を用いて刺激する。1日後、細胞にレンチウイルスを用いて形質導入する。7日目に、ΔNGFR+細胞を磁気選択(M i l t e n y i B i o t e c)を用いて精製した後、上記のようなa A P Cを用いて再刺激し、6~7日間拡大増殖させた。

【0245】

フローサイトメトリー:

表現型解析のために、細胞を固定可能生存色素(FVD)(65-0865-14および65-0866-14、eBioscience)を用いて染色し、表面マーカーについて固定/透過処理の前にFOXP3/Transcription Factor Staining Buffer Set(eBioscience)を用いて染色した後、細胞内タンパク質について染色を行った。サイトカイン産生の解析のために、細胞をブレフェルジンA(10μg/ml)の存在下で10ng/mlのPMAおよび500ng/mlのイオノマイシン(全てSigma-Aldrich)を用いて4時間刺激した。試料をフローサイトメトリーにより解析した。

【0246】

顕微鏡法:

PBMCをPKH26またはPKH67(Sigma-Aldrich、PKH26GL-1KTおよびPKH67GL-1KT)を用いて標識し、Tregを細胞増殖色素(CPD)eFluor450(eBiosciences、65-0842-85)を用いて標識した後、製造者の一般的3Dゲルプロトコールにしたがって1×DMEMおよび10%のFCSから構成される1.5%のラットテイルコラーゲンI型の3Dゲル(Ibidi)中に懸濁する。細胞懸濁液をピペットで採ってμ-Slide Chemotaxis 3Dに入れ、Leica TCS SP8共焦点顕微鏡上で35℃および5%のCO₂の加湿インキュベーター(Tokai Hit)中で30分間重合させる。外チャンバーを1×DMEMで満たし、×10/0.30対物レンズを使用して2分毎に3時間画像を記録する。eFluor450、PKH67、およびPKH26を405nm、488nm、および561nmにおいて励起し、蛍光発光をそれぞれ415~470nm、495~525nm、および570~650nmにおいて収集する。CAR-Tregと標的または対照細胞のいずれかとの間の相互作用の数を20分毎に定量化する。動かない細胞は解析から除外した。視野当たりの各標識細胞種の総数は、ImageJ(imagej.nih.gov/ij/)におけるanalyze particles機能を使用して計数することができる。

【0247】

Treg特異的脱メチル化領域(TSDR)の解析

安定なFoxp3のTreg安定発現は、Foxp3遺伝子座内のTSDRの選択的な脱メチル化と関連付けられる。安定発現について試験するために、凍結T細胞ペレットからのDNAをDNeasy Blood and Tissue Kit(QIAGEN)を用いて単離し、EZ Direct Kit(Zymo Research)を用いてバイサルファイト変換した。BisDNAのPCRをHuman FOXP3 Kit(EpiGen DX)を用いて行い、PyroMark buffer(QIAGEN)を使用するパイロシークエンシングのために調製した後、Biotage PyroMark Q96 MD pyrosequencer(QIAGEN)でアッセイした。結果をPyro Q-CpG software(Biotage)を用いて算出した。

【0248】

サイトカイン産生

サイトカイン産生を測定するために、T細胞株をK562細胞(1のK562:2のT

10

20

30

40

50

細胞)を用いて48時間刺激する。上清を回収し、サイトカイン濃度をHuman Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (BD Biosciences)により決定し、解析した。

【0249】

MHC CAR特異的増殖の抑制

標的に特異的なTregはCD4+ T細胞増殖を抑制することもできたかどうかを試験するために、MHC CAR特異的CD4+ Tクローンを単離する。エプスタインバーウイルス形質転換Bリンパ芽球様(B lymphablastoid)細胞株にレンチウイルスを使用してMHC-CARを形質導入した。EBV細胞株を終夜生育し、150 Gyで照射し、CAR発現Tregまたは従来のT細胞の非存在下または存在下でCPD標識MHC CAR特異的CD4+ Tクローンと共培養した。増殖を4日後に決定し、MHC CAR特異的クローンの抑制のパーセンテージを以下のように増殖のパーセンテージを使用して算出する： $(100 - [(増殖MHC CAR + 試験の\%) / (増殖MHC CAR単独の\%)] \times 100)$ 。

【0250】

コンストラクトのトラフィックおよび発現(mRNA、マルチシストロン性mRNA、および/またはレンチウイルスを用いる)が検証されたら、活性試験をin vitroで始める。全ての試験を異なるエフェクター：標的(E:F)細胞濃度において実行する。in vitro試験は、MHC-CARシグナル伝達ドメインおよびT細胞サブセットの初期評価を提供することが期待される。

【0251】

T細胞におけるケモカインおよび接着受容体の一過性またはレンチウイルス発現

モノ/ポリシストロン性mRNAのエレクトロポレーションまたはレンチウイルス形質導入後に受容体をヒトT細胞において発現させる。受容体の発現をフローサイトメトリーを使用して解析する。要約すると、抗CD3/CD28コートビーズおよびIL2を用いて数日(3~5)予備活性化させた 5×10^6 個のT細胞をcytoporation buffer T中に再懸濁し、45 µgのmRNAをエレクトロポレートした。エレクトロポレーションの24時間後、複数鎖CARをコードするポリシストロン性mRNAを使用して操作されたヒトT細胞を固定可能生存色素eFluor-780およびPE共役ヤギ抗マウスIgG F(ab')₂断片特異的を用いて標識し、フローサイトメトリーにより解析した。代替的に、受容体をレンチウイルス中にベクター化し、発現させ、同様に解析した。

【0252】

in vitro走化性アッセイ

形質導入T細胞を以前に記載された通りに走化性アッセイにおいて使用した[Burkle et al., Blood, 110(9):3316-3325, 2007; Wu and Hwang, Journal of immunology, 168(10):5096, 2002.; Singh et al., Journal of immunology, 180(1):214-221, 2008.; Ryu et al., Molecules and Cells, 39.12:898-908, 2016.]。細胞(培地中の約20,000細胞、100万細胞、 5×10^6 /mL)を5 µm孔径フィルターの上部に2連で置いた一方、ケモカインありおよびなしの培地を下チャンバーに入れた。37 °Cでの30分、1 h、3 h、5 h、24 h後、プレートの底に落ちた移動細胞を以下の通りに処理した：

【0253】

A. 4×対物レンズを使用して撮影した。2つのウェルのそれぞれからの3つのランダムな視野をImage Pro Plus(Media Cybernetics, Silver Spring, MD)を使用して計数した。3つの独立した実験を行ったところ類似の結果であった。

【0254】

B. 400 µLの細胞懸濁液をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中の 4×10^{-7} MのFITC標識ファロイジン、0.5 mg/mLの1-アルファーリゾホスファチジルコリン

10

20

30

40

50

(共にSigma、St Louis、MO)、および7%のホルムアルデヒドを含有する100 μ Lの溶液に加えた。固定した細胞をFACS Caliburでフローサイトメトリーにより解析し、ケモカインの添加前の試料の平均相対傾向に対して全ての時点をプロットする。

【0255】

C. 下チャンバー中の細胞をCountess II FL (Thermo Fisher Scientific、USA) を使用して計数し、または450 nmにおけるO.D. 値をVersamax microplate reader (Molecular Devices) を使用して測定した。

【0256】

実施例5：HEK293細胞中でのMHCベースのキメラ受容体(MHC-CAR)の発現

MHC-CARをコードするコンストラクトを実施例2に議論したように構築し、HEK293細胞中での発現について評価した。簡潔に述べれば、コンストラクト1は、EF1アルファ短プロモーター、CD19 CAR (4G7-CAR)、CCR6、およびGFPを含み(配列番号：426により提供される)；コンストラクト2は、EF1アルファ短プロモーター、RQR8、MHC-CAR1部分B MHC-CAR1部分A、およびGFPを含む(配列番号：409により提供される)。

【0257】

コンストラクト1、2、または培地対照(非トランスフェクト)をHEK293細胞にトランスフェクトし、培養した。細胞をGFP発現に基づいて顕微鏡法により発現について評価した。GF陽性細胞の集団が、コンストラクト1またはコンストラクト2をトランスフェクトし群において観察された。細胞をフローサイトメトリーによりコンストラクトによりコードされる成分の発現についても評価した。表8および表9。

【0258】

コンストラクト1の発現

CCR6の検出のために、細胞をAPC (17-1969-42、eBioscience) に共役した抗CCR6モノクローナル抗体とインキュベートし、CD19の検出のために、細胞をビオチン化CD19 (Acro CD9-H8259、Acro Biosystems) の後にストレプトアビジン-PE (405203、BioLegend (登録商標)) とインキュベートした。

【0259】

表8：コンストラクト1の発現

【表8】

CCR6発現	FITC (GFP)	APC (CCR6)	PE (CD19)
非染色	71.9	0.1	17.4
CCR6	71.3	81.9	16.9
CD19発現	FITC (GFP)	APC (CCR6)	PE (CD19)
非染色	71.9	0.1	17.4
CD19	71.3	0.1	33.3
ストレプトアビジン-PEのみ	71.5	0.1	18.5

【0260】

コンストラクト2の発現

RQR8中に含まれるエピトープからのCD34発現の検出のために、細胞を抗CD34 APC共役モノクローナル抗体とインキュベートし、MHC-CAR発現の検出のために、細胞を抗HLA-DR抗体とインキュベートした。

【0261】

表 9：コンストラクト 2 の発現

【表 9】

GFP発現	FITC (GFP)	APC (CD34)	PE
非染色	62.3	0.1	2.4
RQR発現	FITC (GFP)	APC (CD34)	PE
非染色	62.3	0.0	2.4
CD34	61.8	58.0	2.5
MHC CAR発現	FITC (GFP)	APC (CD34)	PE
非染色	62.3	0.0	2.4
HLA-DR	63.9	98.1	2.1

10

【0262】

コンストラクト 1 の核酸配列（配列番号：426）

a t g g a g a c a g a c a c t c t t c t c c t t t g g g t c t t g c t g c t g t
g g g t t c c c g g a a g c a c a g g a g a a g t a c a g t t g c a a c a g t c
t g g g c c a g a a c t c a t c a a a c c c g g a g c t t c t g t a a a a t g
t c a t g c a a a g c t a g t g g a t a t a c a t t t a c t t c t t a c g t g a
t g c a c t g g g t a a a c a g a a a c c t g g t c a g g g g c t t g a g t g
g a t c g g g t a c a t t a a c c c a t a t a a t g a c g g c a c c a a a t a t
a a c g a g a a a t t c a a g g g a a a g g c t a c g c t t a c a t c a g a t a
a g t c c a g t a g c a c c g c t t a t a t g g a a c t t a g c a g c c t t a c
t t c c g a a g a t t c c g c g g t g t a t t a c t g c g c g a g a g g g a c t
t a c t a c t a c g g g a g t c g a g t a t t c g a t t a t t g g g g t c a a g
g c a c g a c g c t c a c g g t g a g c t c a g g t g g t g g a g g g t c t g g
g g g t g g c g g c a g t g g t g g g g g g g c t c a g a c a t c g t g a t g
a c c c a g g c a g c a c c t t c t a t c c c g g t a a c c c c a g g c g a g t
c t g t a t c t a t c a g t t g t c g g t c c a g c a a g t c t c t t c t c a a
c a g t a a t g g c a a t a c a t a t c t t t a c t g g t t c c t c c a a a g g
c c t g g g c a a a g t c c t c a a c t t c t t a t a t a t c g g a t g t c c a
a t c t t g c g a g t g g c g t a c c c g a c a g g t t t t c a g g g t c t g g
g a g c g g a a c a g c t t t t a c g t t g a g a a t a t c c a g g g t a g a a
g c t g a g g a c g t c g g t g t a t a t t a t t g c a t g c a a c a t c t c g
a a t a c c c c t t t a c c t t c g g c g c t g g t a c a a a g c t c g a a t t
g a a a c g c a g c g a t c c a a c c a c g a c g c c a g c g c c a c g a c c a
c c t a c g c c c g c t c c a a c t a t t g c c t c c c a g c c c c t g a g t c
t t c g g c c a g a a g c g t g t a g a c c t g c t g c c g g c g g g g c c g t
t c a t a c g c g g g g c c t t g a c t t t g c a t g t g a t a t c t a t a t a
t g g g c t c c t t t g g c g g g a a c t t g c g g a g t g c t t c t t t t g t
c a c t c g t g a t a a c g t t g t a t t g t a a a a g g g g t c g a a a g a a
a c t c c t c t a t a t a t t t a a g c a g c c c t t t a t g a g g c c c g t g
c a a a c a a c a c a a g a a g a g g a c g g a t g c t c t t g t c g a t t c c
c g g a a g a g g a g g a g g g g g g t g t g a g c t t a g g g t c a a g t t
t t c t c g c t c t g c c g a c g c g c c a g c c t a t c a a c a g g g c c a a
a a c c a g c t g t a t a a c g a a c t c a a c c t c g g g c g c c g g g a a g
a g t a t g a c g t c c t t g a c a a a c g g c g c g g t c g c g a c c c t g a
a a t g g g t g g a a a a c c g a g g c g a a a g a a c c c c c a g g a g g g a
c t t t a c a a c g a a t t g c a a a a a g a c a a g a t g g c c g a a g c c t
a t t c c g a a a t t g g a a t g a a a g g c g a g c g g a g a c g a g g t a a

20

30

40

50

g g g g c a t g a c g g c c t g t a t c a a g g g c t c t c t a c g g c c a c g
a a g g a t a c t t a c g a c g c c c t t c a t a t g c a a g c t c t t c c a c
c a c g g g g t t c g a g c g g c a g t g g a g a g g g c a g a g g a a g t c t
g c t a a c a t g c g g t g a c g t c g a g g a g a a t c c t g g c c c a a t g
a g t g g g g a a a g t a t g a a c t t c a g c g a t g t a t t t g a c t c c t
c c g a a g a t t a c t t t g t a t c t g t g a a t a c g a g c t a t t a c t c
c g t c g a t a g t g a a a t g c t g c t c t g t a g t c t c c a a g a a g t c
c g c c a a t t c a g t c g c c t c t t c g t t c c c a t c g c g t a c t c c c
t t a t t t g t g t t t t t g g c c t t c t g g g t a a c a t c c t g g t t g t
a a t c a c a t t c g c t t t c t a t a a a a a a g c t c g g a g t a t g a c t
g a t g t t t a c c t t c t t a a c a t g g c t a t a g c g g a c a t t c t t t
t t g t g c t t a c t c t c c c a t t c t g g g c t g t g a g c c a t g c a a c
a g g g g c g t g g g t t t t t t c a a a t g c c a c a t g t a a g c t g c t t
a a a g g g a t c t a t g c a a t a a a c t t c a a t t g c g g g a t g c t c c
t g c t g a c a t g c a t c a g t a t g g a t c g a t a c a t a g c t a t a g t
a c a g g c g a c t a a g t c c t t c c g c c t g c g a t c c c g c a c a c t g
c c t a g g a g c a a a a t t a t t t g c c t c g t c g t a t g g g g g c t c t
c a g t g a t c a t c t c c t c c a g t a c g t t t g t c t t t a a c c a g a a
a t a t a a c a c a c a g g g t t c t g a t g t a t g t g a a c c a a a g t a t
c a g a c a g t g a g t g a a c c a a t a c g g t g g a a g t t g c t t a t g t
t g g g c t t g g a g c t g c t t t t t g g g t t t t t c a t c c c a c t g a t
g t t c a t g a t t t t c t g t t a t a c a t t t a t t g t t a a g a c c t t g
g t t c a g g c g c a a a a t a g c a a g a g a c a t a a g g c a a t t c g a g
t c a t c a t t g c c g t g g t g t t g g t c t t c t t g g c c t g t c a g a t
c c c c c a t a a t a t g g t t c t g c t c g t c a c c g c c g c t a a c t t g
g g t a a g a t g a a t c g a t c t t g t c a g t c c g a g a a g t t g a t c g
g a t a c a c c a a a a c t g t g a c a g a a g t g c t g g c c t t c c t t c a
c t g t t g t c t g a a c c c a g t t t t g t a t g c t t t t a t a g g a c a g
a a g t t t c g a a a t t a c t t c t t g a a a a t c c t c a a g g a c c t c t
g g t g t g t t c g a a g g a a g t a c a a g a g c t c t g g c t t t a g t t g
c g c t g g g c g c t a c a g t g a g a a t a t a t c c c g g c a g a c c t c c
g a g a c t g c t g a t a a t g a c a a c g c a a g t t c c t t c a c t a t g (

配列番号：426)

コンストラクト2の核酸配列(配列番号：409)

10

20

30

40

50

【化 10】

atgggtacttcaactgttctgtctggatgggaacttctgtcttctgggtgcccgaatcatgctgatgcatgctcgtactcc
aatcctagcctgtgtctccggggggggaggtgaaactccctacacagggaaccttctctaatgtctccaccaac
gtctccctctgcaaaacccgaccacacacagcttgcctctatagtaaccttccctctgtagtggaggggggggttca
cctgctccacgcctctctaccccccgcacacgatcgctccacacccgctcagttcttagggcgggaagcctgtagg
ccagcggctggcgggtgctgttccatccgctgggaatggatcttgcctgcgacatttaccttgggtccgctggcc
ggtaacttctgggggtatgtgtgtgtctcttctgttattacgctttattgcaatccacagggaacaggcgagtatgc
aaatgcccgcggcccgctcgtgagatctgggtccggccaaatgtaactaaactacgcttctgttgaaactcgtggcgt
gttgaaagttaaccccggtcctccacacaggtatggtatgcttgaagctccgggggggtcctgcatgacccgtctc
actgttactcttattgttctcttagtccacccgcttgccttggcatctgatgagaatcccggtgggttcatTTTTTaaag
aacatcgtccacacccgcaccccaacccgtggggaggcggatctggcggaggcgggagtgagggtcaggagacaca
agaccccgattcttctggcagcccaaaaggagtgccatttttcaatgggacgggaacaggttcgcttccctgtat
cggtaacttctacaaacaaagagagtgtaacggttcgactcagatgtcggcgaggtcccgagcgggttaacggaattg
ggcgacacctgaacggcggagtactggactcccaaaaggatattttggagcaggcagcagcagctgtggacacctat
tgtcgacataatttatggtgtgttggaatcctttacagttcagcggcgggtgcaacctaaagtgaacgtgtatcca
tctaaaaacgcaacccctccacacccataaacctcctggtgtgtctcgttaagcggcttctatccccgggtcaattgag
gtcaggtgggttctcacaacgtcaggagaggaaggcgggaatggtaagtactgttcttccagaacgggagactgg
accttccaaaacttggtaattgttggaacgggtgcccgcgtccggggagggtgtatacatgccaagtggaaaccccg
agtgttaacgagccctcgtacggttgagtgaggcggcggctcagagagcgcacaaatctaaaatgctgttcaggagta
ggcggatttctgactcggactcctctcttctgggucgtgggtgttctatctacatttagaaaccaaacaagtagagta
aagtttcccgaaagtgcggacgctcccgcttatcagcaaggcacaacacagctttacaacgaaactgaacttggga
cgacgcgaagagtaacgtgttcttgataagcggagagggcgcgtatcccgaaatggggggaagcctcggaggaag
aacccacaaagagggccttataatgaactgcagaaggacaaagatggcggaggcgttatccgaaacaggcctgaag
ggtgaacggagggagaggaagggacatgacggactttatcaaggatgtctacccgcaactaaagacacctatgac
gcgttgacatgacaggtctcctcccgagaggttcgagcggcagtgagagggcagaggaaggtctgttaacatgc
ggtgaacgcaggaggaatctggcccaatggcaatatctgggtgttctgtcctcgggtttttatcatagccgtta
ctgatgtcagcaacggaatcatgggcgataaaagaagagcactgtataatacagcggaggttttattttgaaacccg
gaccagagcgggtgaggtcatgttctgatttttgatggcgaacagatatttccagttgacatggcaaaaaaggaaacg
gtgtggagacttgaggaggttggacgattcgcacatatttgaggcacaaggagcactcggcaatatcggcgtggac
aagycacaacctgggagatcatgacaaaaacgctccaattatacgcctatcactaatgtgccccctgagggttactgtg
ctcacaattctcctcgtagaacttagggaaacctaacgtcctcatatgtttcatcgacaagttcactcctccggtg
gtcaatgttaacgtggcttccggaatggtaagcgggtccacacgggtgtctcagagacgggtatttctgcccagagaa
gaccacctcttccgcaatttctattaccttccctttcttcttcaacgggaagacgtttacgactgacgggtcgaac
cattgggggcttgacgagccacttctcaagcatttgggagttcgacgccccatcacgcgttccagaaaacgactgaa
aacgttgtctgcgctctcttgctgacagtggtcctggtaggcattattatcgggaacctctttatcatcaaaaggt
ttgaactcccggtcacaatttagcagatccgctgacgcacccgacctacagcagggccagaaaccaactctacaac
gagctgaatctcggccgacgggaagagtatgacgtactcgacaacgggagaggtcgagacccctgagatgggcgt
aaaacgagacgggaataatcccaagaggggtcttataatgaactccagaaaggataagatggctgaagcctattct
gagatagggttgaaaggcagcggcgagggttaaggcccatgatggcctttaaagggaactctccacgggcaacc
aaagatacttaacgacgccttccatgcaagccctcccgccacggggtccggcgcaacaactctctctctgctg
aaacaaagccggagatgtcgaaagagaatcctggacgggtgagcaaggcggagggagctgttcaacgggggtgggtgccc
atcctggtcgagagtgagcggcgacgttaaacggccacaagttcagcgtgtcttgagggggcgaggggcgtatgccaac
tacggcaagctgacccctgaagttcatctgcaccacccggcaagctgcccgtgcccgtgcccacccctcgtgaccacc
ctgaacctacggcgtgacgtgttccagccgctacccgacacacatgaagcagcagacttcttcaagtccgccaatg
cccgaagggtacgtccaggagcgcacacatcttcttcaaggacgacggcactcaagaccccgccgaggtgaaag
ttcgagggcgacacccctgggtgaacccgcatcgagctgaagggtcagacttcaaggaggaacggcaacatcctgggg
cacaagctggagtagaactacacacagccacaaagctctatactatggccgacaagcagaagaaacgggcatcaaggcg
aacttcaagatccgcacacaacacgaggaacggcagcgtgacgtccgcgacacactacagcagaaacaccccaatc
ggcgacggcccggtgctgctgcccgaacacactacctgagcaccagtcggccctgagcaaaagaccccaacgag
aagcgcgatacactgggtcctgctggagttcgtgacccgcgcgggatacactctcggcatggacgagctgtacaag
taa` (配列番号409)

10

20

30

40

【0263】

実施例6：CD3の発現

CD3の発現を評価して、T細胞受容体アルファ定常（TRAC）遺伝子を標的化するCRISPR法の有効性を決定した。簡潔に述べれば、TRAC遺伝子を標的化するsgRNAを、フォワードプライマー（5'-AGCGCTCTCGTACAGAGTTGG-3'（配列番号：385））およびリバースプライマー（5'-AAAAAAGCACCGACTCGGTGCC-3'（配列番号：386））を使用して標的部位を増幅することにより生成した。

【0264】

50

非修飾 sgRNA は、核酸配列：

5' - GAG AAU CAA AAU CGG UGA AUG UUU UAG AGC
UAG AAA UAG CAA GUU AAA AUA AGG CUA GUC CGU
UAU CAA CUU GAA AAA GUG GCA CCG AGU CGG UGC
UUU U - 3 (配列番号：384)

により提供される。

【0265】

修飾 sgRNA は、核酸配列：

5' - 2' OMe (G (ps) A (ps) G (ps)) AAU CAA AAU CGG U
GA AUG UUU UAG AGC UAG AAA UAG CAA GUU AAA
AUA AGG CUA GUC CGU UAU CAA CUU GAA AAA GUG
GCA CCG AGU CGG UGC 2' OMe (U (ps) U (ps) U (ps) U
- 3' (配列番号：387)

により提供される。2' OMe = 2' O) - メチル RNA および ps = ホスホロチオエート。

【0266】

初代ヒト刺激 CD3+ T 細胞に Cas9 をコードする mRNA (Cas9 単独) または Cas9 をコードする mRNA および TRAC 遺伝子を標的化する sgRNA の両方をトランスフェクトした。トランスフェクションの7日後、CD3 の発現をフローサイトメトリーにより評価した。細胞を 1 : 100 の希釈の抗 CD3 - APC 抗体 (クローン OK T3 ; BioLegend (登録商標) 商品番号 317318) とインキュベートした。図 11 に示すように、Cas9 をコードする mRNA および TRAC 遺伝子を標的化する sgRNA のトランスフェクションは、CD3 発現の大幅な低減を結果としてもたらした。

【0267】

実施例 7 : 殺傷スイッチの検証

例示的なコンストラクト 2 においてコードされる RQR8 殺傷スイッチの有効性を細胞生存アッセイを使用して評価した。簡潔に述べれば、HEK 細胞に培地単独、コンストラクト 1 (配列番号 : X)、コンストラクト 2 (リツキシマブ媒介性 RQR8 殺傷スイッチをコードする ; 配列番号 : X)、またはコンストラクト 1 およびコンストラクト 2 の両方をトランスフェクトした。トランスフェクトされた HEK293 細胞を回収し、計数し、 1×10^6 細胞 / mL で再懸濁した。300 μ L の細胞懸濁液を 48 ウェル組織培養プレートの 4 つのウェルのそれぞれに移した。100 μ L の完全培地および 4 μ L のリツキシマブを第 2 のウェルに加え、100 μ L の新たに調製した乳仔ウサギ補体および 4 μ L のリツキシマブを第 4 のウェルに加えた。プレートを 2、4、または 24 時間インキュベートした。1 μ L の冷却したアネキシン V 緩衝液 (150 mM の NaCl、10 mM の HEPES、10 mM の CaCl) を加えることによりアッセイを終了させた後、試料を 3 mL のアネキシン V 緩衝液を含有する事前調製したフローサイトメトリーチューブに移した。

【0268】

試料を遠心分離により回収し、任意の残留緩衝液をペーパータオルで吸い取った。試料を次に 1 μ L のアネキシン V APC を用いて染色し、ボルテックスし、やわらかな光下に 15 分間置いた。試料を次にアネキシン V 緩衝液を用いて洗浄し、緩衝液 1 mL 当たり 5 μ L のヨウ化プロピジウム (propidium iodide) を添加し、最終懸濁の直後にフローサイトメトリーを行うまで氷上に置いた。

【0269】

GFP 陽性細胞のパーセンテージを定量化して、RQR8 殺傷スイッチにより誘導される殺傷を定量化した。図 12 に示すように、補体単独とのインキュベーションは、一部の細胞死を結果としてもたらしたが、生存のこの低減は全ての細胞群において観察された。細胞死は、リツキシマブと補体との組合せの存在でコンストラクト 2 またはコンストラクト 1 および 2 の両方を発現する細胞中で観察され、特異的 RQR8 媒介性細胞死を指し示した。

【0270】

参考文献

- [1] Corlien et al., International journal of cancer, 99(1):7-13, 2002.
- [2] Betts et la., Methods in cell biology, 75:497-512, 2004.
- [3] Birnbaum et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the U nited States of America, 111(49):17576, 2014.
- [4] Boissel et al., Nucleic acids research, 42(4):2591-2601, 2014.
- [5] Cai et al., Blood, 128(22):4039, 2016.
- [6] Chung et al., Proceedings of the National Academy of Sciences, 92(9):3712-3716, 1995.
- [7] Cieri et al., Blood, 121(4):573-584, 2013.
- [8] Corrigan-Curay et al., Molecular Therapy, 23(5):796-806, 2015.
- [9] Dotti et al., Immunological reviews, 257(1):107-126, 2014.
- [10] WO2015121454
- [11] Farber et al., Nature Reviews Immunology, 14(1):24-35, 2014.
- [12] US20170183413
- [13] Galetto. Publication No. EP3137498 A1, 2017.
- [14] US20140120905
- [15] Galetto et al., Molecular Therapy-Methods & Clinical Development, 1:14021, 2014.
- [16] Goebels et a., Brain, 123(3):508-518, 2000.
- [17] Hahn et al., Nature immunology, 6(5):490-496, 2005.
- [18] Hall et al., International Immunology, 3(4):359-368, 1991.
- [19] Hart et al., Gene Therapy, 15:625-631, 2008.
- [20] Hohlfeld et al., Proceedings of the National Academy of Sciences, 101(su ppl 2):14599-14606, 2004.
- [21] Holst et al., Nature Protocols Electronic Edition, 1(1):406, 2006.
- [22] Jensen et al., Immunological reviews, 257(1):127-144, 2014.
- [23] Juillerat et al., Scientific reports, 5:8150, 2015.
- [24] Justesen et al., Immunome research, 5(1):2, 2009.
- [25] Jyothi et al., Nature biotechnology, 20(12):1215-1220, 2002.
- [26] Mach et al., Immunological reviews, 138(1):207-221, 1994.
- [27] Maecker et al., Nature Reviews Immunology, 12(3):191-200, 2012.
- [28] Mamonkin et al., Blood, 126(8):983-992, 2015.
- [29] Moisini et al., The Journal of Immunology, 180(5):3601-3611, 2008.
- [30] Morris et al., Science translational medicine, 7(272):272ra10-272ra10, 2015.
- [31] Moscou et al., Science, 326(5959):1501-1501, 2009.
- [32] Mueller et al., Nature reviews Immunology, 16(2):79-89, 2016.
- [33] Nagarajan et al., The Journal of Immunology, 168(4):1780-1786, 2002.
- [34] Nagy et al., Nature medicine, 8(8):801-807, 2002.
- [35] Ophir et al., Blood, 121(7):1220-1228, 2013.
- [36] Osborn et al., Molecular therapy, 24(3):570-581, 2016.
- [37] Philip et al., Blood, 124(8):1277-1287, 2014.
- [38] US20170016025
- [39] Poirot et al., Cancer research, 75(18):3853-3864, 2015.
- [40] Qasim et al., Science translational medicine, 9(374):eaaj2013, 2017.
- [41] Ruck et al., International journal of molecular sciences, 16(7):16414-16439, 2015.
- [42] Salzer et al., Neurology, 87(20):2074-2081, 2016.

10

20

30

40

50

- [43] Smith et al., US Patent App. 14/018,021, 2013.
- [44] Steidl et al., Nature, 471(7338):377-381, 2011.
- [45] Suhoski et al., Molecular Therapy, 15(5):981-988, 2007.
- [46] Taylor et al., Cell, 169(1):108-119, 2017.
- [47] Valton et al., Molecular Therapy, 23(9):1507-1518, 2015.
- [48] Vanderlugt et al., Nature Reviews Immunology, 2(2):85-95, 2002.
- [49] Walchli et al., PloS one, 6(11):e27930, 2011.
- [50] Wingerchuk et al., Mayo Clinic Proceedings, 89:225-240, 2014.
- [51] Yang et al., Gene Therapy, 15(21):1411-1423, 2008.
- [52] Yang, Journal of Immunotherapy, 31(9):830, 2008.
- [53] Zhou et al., Immunology, 122(4):476-485, 2007.
- Jiang et al., International immunology, 25(4):235-246, 2013.
- Busch et al., The EMBO journal, 15(2):418, 1996.
- Akalin et al., Molecular Therapy, 17:S25, 2009.
- Jin et al., Proceedings of the National Academy of Sciences, 111(10):3787-3792, 2014.
- Tanimura et al., Blood, 125(18):2835-2844, 2015.
- Hamano et al., Alveolar Macrophage Biology B32:A3147-A3147, 2016.
- Arase et al., Journal of Dermatological Science, 84(1):e87, 2016.
- Tanimura et al., Placenta, 46:108, 2016.
- Hiwa et al., Arthritis & Rheumatology, 69(10):2069-2080, 2017.
- Hansen et al. Trends in immunology, 31(10):363, 2010.
- Hacohen et al., Cancer immunology research, 1(1):11-15, 2013.
- Owens et al., Annals of neurology, 65(6):639-649, 2009.
- Chastre et al., New England Journal of Medicine, 374(15):1495-1496, 2016.
- Housley et al., Clinical Immunology, 161(1):51-58, 2015.
- Larman et al., 2013. Journal of autoimmunity, 43:1-9, 2013.
- Wu et al., Science, 350(6258):aab4077, 2015
- Tran et al. Scientific reports, 6:31730, 2016
- Schall et al., Nature Reviews Immunology, 11(5):355-363, 2011.
- Tabarkiewicz et al., Archivum immunologiae et therapiarum experimentalis, 63(6):435-449, 2015.
- Brown et al., New England Journal of Medicine, 375(26):2561-2569, 2016.
- Gagliani et al., Nature, 523(7559):221-225, 2015.
- Barreiro, et al. Cardiovascular research, 86(2):174-182, 2010
- Wang and Riviere. Molecular Therapy-Oncolytics, 3:16015 2016.
- Burkle et al., Blood, 110(9):3316-3325, 2007.
- Wu and Hwang, Journal of immunology, 168(10):5096, 2002.
- Singh et al., Journal of immunology, 180(1):214-221, 2008.
- Ryu et al., Molecules and Cells, 39.12:898-908, 2016.
- Hiepe et al., Nature Reviews Rheumatology, 7(3):170-178, 2011
- Garboczi, et al. The Journal of Immunology, 157(12):5403-5410, 1996.
- Quaresma, et al., 2015. Viruses, 8(1):5 2015.
- Sanjana, et al. Nature methods, 11(8):783-784, 2014.
- Korn et al. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105(47):18460-18465, 2008.

【 0 2 7 1 】

他の実施形態

本明細書に開示される特徴の全てを任意の組合せで組み合わせてもよい。本明細書に開示される各特徴は、同じ、同等の、または類似の目的を果たす代替的な特徴により置換さ

れてもよい。したがって、別段の明示的な記載がなければ、開示される各特徴は、同等または類似の特徴の包括的シリーズの例に過ぎない。

【 0 2 7 2 】

上記の記載から、当業者は、本発明の必須の特徴を容易に把握することができ、その精神および範囲から離れることなく、本発明の様々な変更および改良を行って、それを様々な用法および条件に適合させることができる。したがって、他の実施形態もまた特許請求の範囲内である。

10

20

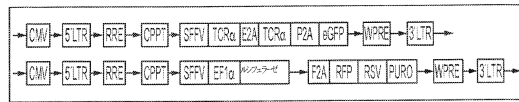
30

40

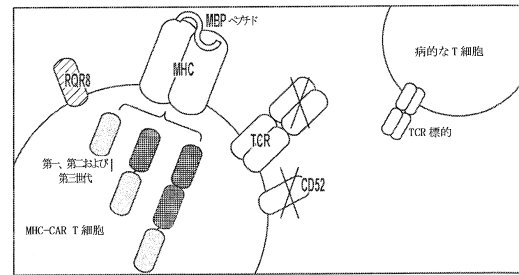
50

【図面】

【図 1】

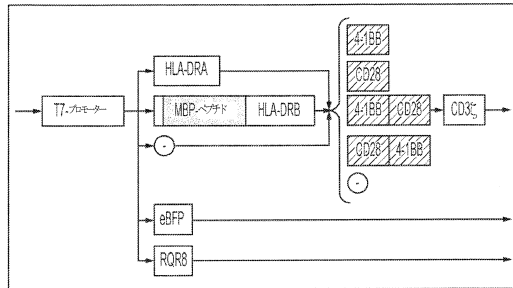


【図 2】

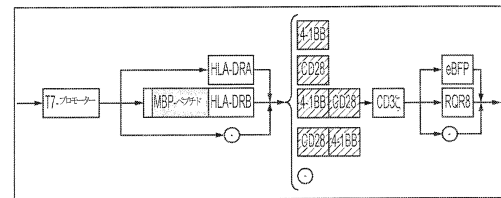


10

【図 3】

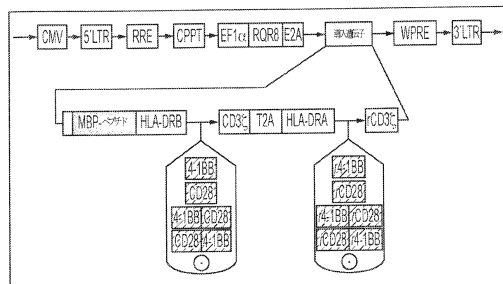


【図 4】

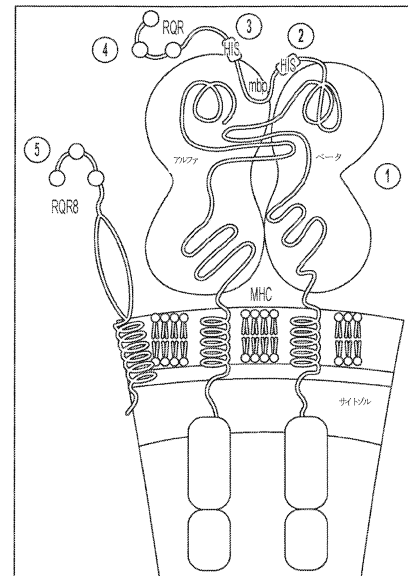


20

【図 5】



【図 6】

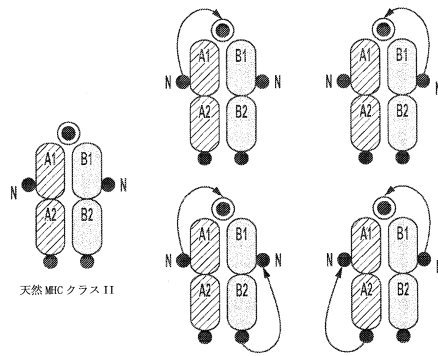


30

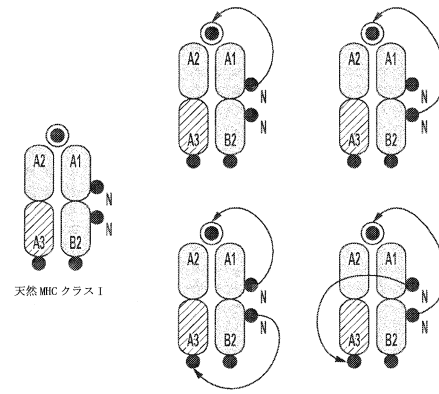
40

50

【図 7】

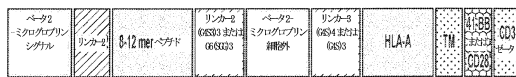


【図 8 A】

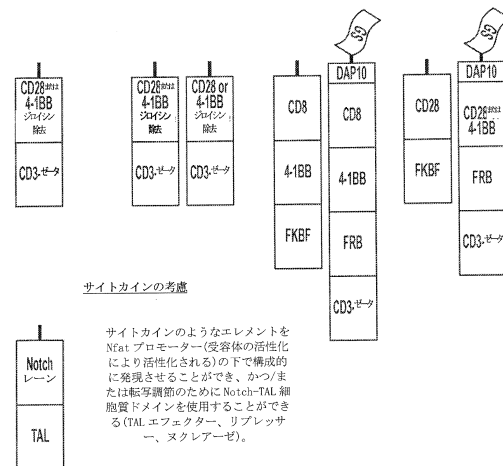


【図 8 B】

MHC クラス I の例示的コンストラクト



【図 9】



10

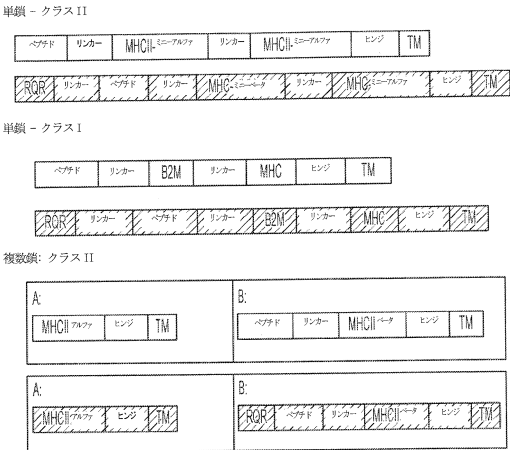
20

30

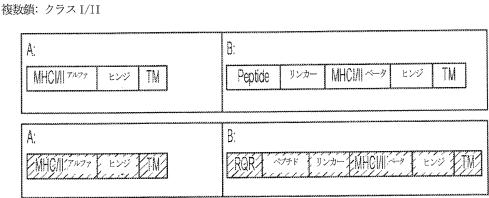
40

50

【図 10-1】



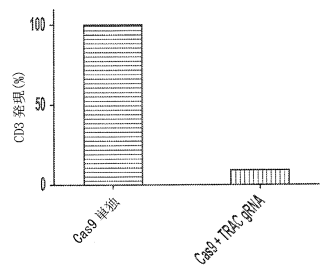
【図 10-2】



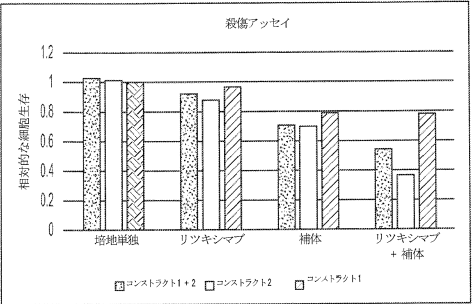
10

20

【図 11】



【図 12】



30

40

50

【配列表】
0007594439000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(72)発明者 ノーヴィル, ジュリー

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 02143, サマービル, 495 コロンビア ストリート

(72)発明者 ウッド, エリザベス

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 02143, サマービル, 495 コロンビア ストリート

審査官 小倉 梢

(56)参考文献 J. Immunol., 2008年, Vol. 180, p. 3601-3611

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2009年, Vol. 106, p. 3360-3365

Blood, 2012年, Vol. 119, p. 3940-3950

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C07K 19/00

C07K 14/00 - 14/825

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

UniProt/GeneSeq