

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

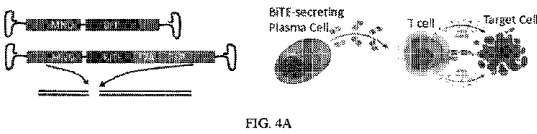
(11)公表番号
特表2025-520225
(P2025-520225A)

(43)公表日 令和7年7月2日(2025.7.2)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 1 0	4 B 0 6 5
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		Z N A 4 C 0 8 7
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 H 0 4 5
C 1 2 N	15/11 (2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z	
C 1 2 N	15/867(2006.01)	C 1 2 N	15/867	Z	
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全76頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-568439(P2024-568439)			(71)出願人	515045617
(86)(22)出願日	令和5年5月9日(2023.5.9)				シアトル チルドレンズ ホスピタル デ
(85)翻訳文提出日	令和7年1月20日(2025.1.20)				ィー／ビー／エイ シアトル チルドレン
(86)国際出願番号	PCT/US2023/066760				ズ リサーチ インスティテュート
(87)国際公開番号	WO2023/225447				アメリカ合衆国 9 8 1 0 1 ワシントン
(87)国際公開日	令和5年11月23日(2023.11.23)				州, シアトル, ナインス アベニュー
(31)優先権主張番号	63/343,537				1 9 0 0
(32)優先日	令和4年5月18日(2022.5.18)				1 9 0 0 Ninth Ave. Sea
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				ttle, WA 9 8 1 0 1 U. S.
(31)優先権主張番号	63/498,202			(74)代理人	100188499
(32)優先日	令和5年4月25日(2023.4.25)				弁理士 勝又 政徳
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			(74)代理人	100127568
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ				弁理士 酒井 善典
			最終頁に続く	(74)代理人	100171402
					最終頁に続く

(54)【発明の名称】 多重特異性結合剤の製造および／または送達

(57)【要約】
本明細書において提供される方法および組成物のいくつかの実施形態は、二重特異性T細胞エンゲージャー（BTCE）を発現する細胞の調製方法、および特定の治療におけるこのような細胞の使用に関する。いくつかの実施形態において、前記細胞は、B細胞または前駆B細胞である。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

二重特異性 T 細胞エンゲージャー（BTCE）を発現するように細胞を改変するためのシステムであって、

（a）細胞のゲノム座位に発現カセットを挿入することができるヌクレアーゼまたは該ヌクレアーゼをコードする核酸；および

（b）二重特異性 T 細胞エンゲージャー（BTCE）をコードする発現カセットを含む相同組換え修復（HDR）用鋳型をコードする第 1 のポリヌクレオチドを含む、システム。

【請求項 2】

前記細胞をさらに含み、該細胞が B 細胞または前駆 B 細胞である、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 3】

前記細胞が、造血幹細胞、ヒト胚性幹細胞、人工多能性幹細胞（iPSC）、ナイーブ B 細胞、メモリー B 細胞、形質芽球および形質細胞から選択される、請求項 2 に記載のシステム。

【請求項 4】

前記ヌクレアーゼが Cas ヌクレアーゼであり、該ヌクレアーゼが、Cas9 ヌクレアーゼであってもよい、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 5】

ガイド RNA（gRNA）をコードする第 2 のポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 6】

第 2 のポリヌクレオチドが、配列番号 1～27 のいずれか 1 つに示されるヌクレオチド配列を含む、請求項 5 に記載のシステム。

【請求項 7】

前記座位が、B 細胞以外の細胞と比較して B 細胞に高発現される内因性遺伝子を含む、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 8】

前記座位が、B 細胞において不活性な内因性遺伝子を含む、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 9】

前記座位が、CCR5 遺伝子、JCHAIN 遺伝子、IGHM 座位（E-mu；hg38 ゲノム；chr 14：105856225-105863200 としても知られている）、CD19 遺伝子および IGHG1 遺伝子から選択される、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 10】

前記 BTCE が、T 細胞抗原に特異的に結合することができる第 1 のポリペプチドと、腫瘍抗原に特異的に結合することができる第 2 のポリペプチドとを含む、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 11】

前記 T 細胞抗原が CD3 である、請求項 10 に記載のシステム。

【請求項 12】

前記腫瘍抗原が、CD33、CD19、CD326（EpCAM）、神経グリア細胞抗原 2（NG2）、HER2、上皮成長因子受容体（EGFR）、CD66e、エフリン A 型受容体 2（EphA2）、CD21、FLT3、gp100、PDL1 および CD22 から選択される、請求項 10 または 11 に記載のシステム。

【請求項 13】

前記 BTCE が、AMG 330、ブリナツモマブ、solitomab または テベンタフスプである、請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 14】

前記発現カセットがプロモーターをさらに含む、請求項 1 ～ 13 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 15】

前記プロモーターが構成的プロモーターである、請求項 14 に記載のシステム。

【請求項 16】

前記プロモーターが誘導型プロモーターである、請求項 14 に記載のシステム。

【請求項 17】

前記プロモーターが、MNDプロモーター、IgVHプロモーター、EF-1 α プロモーターまたはIgHG1プロモーターである、請求項 14 ～ 16 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 18】

前記発現カセットが、

(i) エンハンサー；

(ii) シグナル配列をコードするポリヌクレオチド；

(iii) IGHV遺伝子もしくはIGHG1遺伝子に由来する5' UTRを含むポリヌクレオチド；

(iv) IGHV遺伝子もしくはIGHG1遺伝子に由来する3' UTRを含むポリヌクレオチド；
および／または

(v) 遍在性クロマチンオープニングエレメント (UCOE)

をさらに含み、

前記エンハンサーが、E μ エンハンサーまたはSLC3A2エンハンサーであってもよく、

前記シグナル配列が、IgHVのシグナル配列またはIgHG1のシグナル配列であってもよい、
請求項 1 ～ 17 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 19】

第1のポリヌクレオチドが、前記座位に相同な核酸をさらに含み、前記座位に相同な該核酸が、約200～1500ヌクレオチド長の連続したヌクレオチドを含んでいてもよい、請求項 1 ～ 18 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 20】

第1のポリヌクレオチドがベクターに含まれる、請求項 1 ～ 19 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 21】

前記ベクターがウイルスベクターである、請求項 20 に記載のシステム。

【請求項 22】

前記ウイルスベクターが、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターまたはレンチウイルスベクターである、請求項 21 に記載のシステム。

【請求項 23】

前記AAVベクターがAAV6ベクターである、請求項 22 に記載のシステム。

【請求項 24】

前記細胞が哺乳動物細胞であり、ヒト細胞であってもよい、請求項 1 ～ 23 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 25】

前記細胞がエクスピボの細胞である、請求項 1 ～ 24 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 26】

前記細胞が、対象に由来する自家細胞である、請求項 1 ～ 25 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 27】

前記細胞が、対象と同種の細胞である、請求項 1 ～ 25 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 28】

10

20

30

40

50

前記細胞が、前記BTCEが特異的に結合することができる内因性タンパク質の発現を欠失している、請求項1～27のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項29】

二重特異性T細胞エンゲージャー（BTCE）を発現するように細胞を改変する方法であって、

（a）請求項2～28のいずれか1項に記載のシステムを得る工程；および

（b）前記システムに含まれるヌクレアーゼまたは該ヌクレアーゼをコードする核酸と、前記システムに含まれる第1のポリヌクレオチドを細胞に導入することにより、改変細胞を得る工程を含む、方法。

10

【請求項30】

前記工程（b）の前に、前記細胞を活性化する工程をさらに含み、該活性化工程が、オリゴマー化CD40リガンド（CD40L）、CpGおよび／またはIL-21に前記細胞を接触させることを含んでいてもよい、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

前記工程（b）が、前記ヌクレアーゼとgRNAを含むリボ核タンパク質（RNP）に前記細胞を接触させることを含む、請求項29または30に記載の方法。

【請求項32】

（c）前記細胞を分化誘導する工程をさらに含む、請求項29～31のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項33】

請求項29～32のいずれか1項に記載の方法により改変された細胞。

【請求項34】

二重特異性T細胞エンゲージャー（BTCE）を発現するようにゲノム座位が遺伝子改変された細胞。

【請求項35】

B細胞または前駆B細胞である、請求項34に記載の細胞。

【請求項36】

造血幹細胞、ヒト胚性幹細胞、人工多能性幹細胞（iPSC）、ナイーブB細胞、メモリーB細胞、形質芽球および形質細胞から選択される、請求項35に記載の細胞。

30

【請求項37】

前記座位が、B細胞以外の細胞と比較してB細胞に高発現される内因性遺伝子を含む、請求項33～36のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項38】

前記座位が、B細胞において不活性な内因性遺伝子を含む、請求項33～36のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項39】

前記座位が、CCR5遺伝子、JCHAIN遺伝子、IGHM座位（E-mu；hg38ゲノム；chr14：105856225-105863200としても知られている）、CD19遺伝子およびIGHG1遺伝子から選択される、請求項33～38のいずれか1項に記載の細胞。

40

【請求項40】

前記BTCEが、T細胞抗原に特異的に結合することができる第1のポリペプチドと、腫瘍抗原に特異的に結合することができる第2のポリペプチドとを含む、請求項33～39のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項41】

前記T細胞抗原がCD3である、請求項40に記載の細胞。

【請求項42】

前記腫瘍抗原が、CD33、CD19、CD326（EpCAM）、神経グリア細胞抗原2（NG2）、HER2、上皮成長因子受容体（EGFR）、CD66e、エフリンA型受容体2（EphA2）、CD21、FLT3、gp100、PDL1およびCD22から選択される、請求項40または

50

4 1 に記載の細胞。

【請求項 4 3】

前記 BTCE が、AMG 330、ブリナツモマブ、solitomab または テベンタフスプである、請求項 3 3 ～ 4 2 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【請求項 4 4】

前記 ゲノム座位が、前記 BTCE をコードする第 1 の核酸を含む発現カセットを挿入することにより改変されている、請求項 3 3 ～ 4 3 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【請求項 4 5】

第 1 の核酸が、前記座位の内因性プロモーターに作動可能に連結されている、請求項 4 4 に記載の細胞。

【請求項 4 6】

前記発現カセットが、第 1 の核酸に作動可能に連結されたプロモーターをさらに含む、請求項 4 4 に記載の細胞。

【請求項 4 7】

前記プロモーターが構成的プロモーターである、請求項 4 6 に記載の細胞。

【請求項 4 8】

前記プロモーターが誘導型プロモーターである、請求項 4 6 に記載の細胞。

【請求項 4 9】

前記プロモーターが、MND プロモーター、IgVH プロモーター、EF-1 α プロモーターまたは IgHG1 プロモーターである、請求項 4 6 ～ 4 8 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【請求項 5 0】

前記発現カセットが、

(i) エンハンサー；

(ii) シグナル配列をコードするポリヌクレオチド；

(iii) IGHV 遺伝子もしくは IGHG1 遺伝子に由来する 5' UTR を含むポリヌクレオチド；

(iv) IGHV 遺伝子もしくは IGHG1 遺伝子に由来する 3' UTR を含むポリヌクレオチド；および／または

(v) 遍在性クロマチンオープニングエレメント (UCOE)

をさらに含み、

前記エンハンサーが、E μ エンハンサーまたは SLC3A2 エンハンサーであってもよく、

前記シグナル配列が、IGHV のシグナル配列または IgHG1 のシグナル配列であってもよい、

請求項 4 4 ～ 4 9 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【請求項 5 1】

哺乳動物細胞であり、ヒト細胞であってもよい、請求項 3 4 ～ 5 0 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【請求項 5 2】

エクスピボの細胞である、請求項 3 4 ～ 5 1 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【請求項 5 3】

対象に由来する自家細胞である、請求項 3 4 ～ 5 2 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【請求項 5 4】

対象と同種の細胞である、請求項 3 4 ～ 5 2 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【請求項 5 5】

請求項 3 3 ～ 5 4 のいずれか 1 項に記載の細胞を含む医薬組成物。

【請求項 5 6】

対象において障害を治療、緩和または抑制する方法であって、

請求項 3 3 ～ 5 4 のいずれか 1 項に記載の細胞を対象に投与する工程を含む、方法。

【請求項 5 7】

前記細胞が単回投与により投与され、単回のボース投与により投与されてもよい、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 58】

前記障害が、がんを含む、請求項 56 または 57 に記載の方法。

【請求項 59】

前記 BTCE が、前記がんにより発現された腫瘍抗原に特異的に結合することができる、請求項 56 ～ 58 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 60】

前記がんが、固形腫瘍および白血病から選択される、請求項 56 ～ 59 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 61】

前記がんが、急性リンパ芽球性白血病 (ALL)、急性骨髄性白血病 (AML)、乳がん、胃がん、悪性黒色腫、大腸がん、結腸直腸がん、頭頸部がん、胃がん、前立腺がん、卵巣がん、肺がん、および膵臓がんから選択される、請求項 56 ～ 60 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 62】

前記対象がヒトである、請求項 56 ～ 61 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 63】

医薬品としての、例えば、対象における障害または疾患の治療用、緩和用または抑制用の医薬品としての、請求項 33 ～ 54 のいずれか 1 項に記載の細胞の使用。

【請求項 64】

対象における障害の治療用、緩和用または抑制用の医薬品の調製における、請求項 33 ～ 54 のいずれか 1 項に記載の細胞の使用。

【請求項 65】

前記細胞が単回投与により投与され、単回のボース投与により投与されてもよい、請求項 63 または 64 に記載の使用。

【請求項 66】

前記障害が、がんを含む、請求項 63 ～ 65 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 67】

二重特異性 T 細胞エンゲージャー (BTCE) が、前記がんにより発現された腫瘍抗原に特異的に結合することができる、請求項 63 ～ 66 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 68】

前記がんが、固形腫瘍および白血病から選択される、請求項 63 ～ 67 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 69】

前記がんが、急性リンパ芽球性白血病 (ALL)、急性骨髄性白血病 (AML)、乳がん、胃がん、悪性黒色腫、大腸がん、結腸直腸がん、頭頸部がん、胃がん、前立腺がん、卵巣がん、肺がん、および膵臓がんから選択される、請求項 63 ～ 68 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 70】

前記対象がヒトである、請求項 63 ～ 69 のいずれか 1 項に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2023 年 4 月 25 日に提出された「多重特異性結合剤の製造および／または送達」という名称の米国仮特許出願第 63/498202 号、および 2022 年 5 月 18 日に提出された「多重特異性結合剤の製造および／または送達」という名称の米国仮特許出願第 63/343537 号の優先権を主張するものであり、これらの出願は引用によりその全体が本明細書に援用される。

10

20

30

40

50

【0002】

配列表の参照

本願は電子形式の配列表とともに出願されたものである。この配列表は、SCRI416W OSEQLISTというファイル名で2023年5月8日に作成された約97,869バイトのファイルとして提供されたものである。この電子形式の配列表に記載の情報は、引用によりその全体が本明細書に援用される。

【0003】

本明細書において提供される方法および組成物のいくつかの実施形態は、二重特異性T細胞エンゲージャー（BTCE）を発現する細胞の調製方法、および特定の治療におけるこのような細胞の使用に関する。いくつかの実施形態において、前記細胞は、B細胞または前駆B細胞である。

10

【背景技術】

【0004】

二重特異性抗体は、2種の抗原上に存在することが多い2種のエピトープを標的とし、「次世代抗体治療を担う重要な要素」とであると述べられている。例えば、Wang et al., Antibodies 8:43, 2019を参照されたい。様々なフォーマットの二重特異性抗体が開発されている。二重特異性抗体の市販品の開発は、「製造が非常に困難」であることから「難航」していると報告されている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

20

【0005】

本明細書において提供される方法および組成物のいくつかの実施形態は、二重特異性T細胞エンゲージャー（BTCE）を発現するように細胞を改変するためのシステムであって、

（a）細胞のゲノムの座位に発現カセットを挿入することができるヌクレアーゼまたは該ヌクレアーゼをコードする核酸；および

（b）二重特異性T細胞エンゲージャー（BTCE）をコードする発現カセットを含む相同組換え修復（HDR）用鋳型をコードする第1のポリヌクレオチドを含むシステムを含む。

30

【0006】

いくつかの実施形態は、前記細胞をさらに含み、該細胞はB細胞または前駆B細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は、造血幹細胞、ヒト胚性幹細胞、人工多能性幹細胞（iPSC）、ナイーブB細胞、メモリーB細胞、形質芽球および形質細胞から選択される。

【0007】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレアーゼはCasヌクレアーゼであり、該ヌクレアーゼは、Cas9ヌクレアーゼであってもよい。

【0008】

いくつかの実施形態は、ガイドRNA（gRNA）をコードする第2のポリヌクレオチドをさらに含む。いくつかの実施形態において、第2のポリヌクレオチドは、配列番号1～27のいずれか1つに示されるヌクレオチド配列に対応するDNA配列またはRNA配列を含む。

40

【0009】

いくつかの実施形態において、前記座位は、B細胞以外の細胞と比較してB細胞に高発現される内因性遺伝子を含む。いくつかの実施形態において、前記座位は、B細胞において不活性な内因性遺伝子を含む。いくつかの実施形態において、前記座位は、CCR5遺伝子、JCHAIN遺伝子、IGHM座位（E-mu；hg38ゲノム；chr14：105856225-105863200としても知られている）、CD19遺伝子およびIGHG1遺伝子から選択される。

【0010】

いくつかの実施形態において、前記BTCEは、T細胞抗原に特異的に結合することがで

50

きる第1のポリペプチドと、腫瘍抗原に特異的に結合することができる第2のポリペプチドとを含む。いくつかの実施形態において、前記T細胞抗原はCD3である。いくつかの実施形態において、前記腫瘍抗原は、CD33、CD19、CD326 (EpCAM)、神経グリア細胞抗原2 (NG2)、HER2、上皮成長因子受容体 (EGFR)、CD66e、エフリンA型受容体2 (EphA2)、CD21、FLT3、gp100、PDL1およびCD22から選択される。いくつかの実施形態において、前記BTCEは、AMG 330、ブリナツモマブ、solitomabまたはテベンタフスプである。

【0011】

いくつかの実施形態において、前記発現カセットはプロモーターをさらに含む。いくつかの実施形態において、前記プロモーターは、構成的プロモーターである。いくつかの実施形態において、前記プロモーターは誘導型プロモーターである。いくつかの実施形態において、前記プロモーターは、MNDプロモーター、IgVHプロモーター、EF-1 α プロモーターまたはIgHG1プロモーターである。

10

【0012】

いくつかの実施形態において、前記発現カセットは、

- (i) エンハンサー；
- (ii) シグナル配列をコードするポリヌクレオチド；
- (iii) IGHV遺伝子もしくはIGHG1遺伝子に由来する5' UTRを含むポリヌクレオチド；

20

(iv) IGHV遺伝子もしくはIGHG1遺伝子に由来する3' UTRを含むポリヌクレオチド；および／または

- (v) 遍在性クロマチンオープニングエレメント (UCOE)

をさらに含み、

前記エンハンサーは、E μ エンハンサーまたはSLC3A2エンハンサーであってもよく、

前記シグナル配列は、IgHVのシグナル配列またはIgHG1のシグナル配列であってもよい。

【0013】

いくつかの実施形態において、第1のポリヌクレオチドは、前記座位に相同な核酸をさらに含み、前記座位に相同な該核酸は、約200～1500ヌクレオチド長の連続したヌクレオチドを含んでいてもよい。

30

【0014】

いくつかの実施形態において、第1のポリヌクレオチドはベクターに含まれる。いくつかの実施形態において、前記ベクターは、ウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、前記ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターまたはレンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、前記AAVベクターは、AAV6ベクターである。

【0015】

いくつかの実施形態において、前記細胞は哺乳動物細胞であり、ヒト細胞であってもよい。いくつかの実施形態において、前記細胞はエクスピボの細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は、対象から得られた自家細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は、対象と同種の細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は、前記BTCEが特異的に結合することができる内因性タンパク質の発現を欠失している。

40

【0016】

いくつかの実施形態は、二重特異性T細胞エンゲージャー (BTCE) を発現するように細胞を改変する方法であって、

- (a) 請求項2～28のいずれか1項に記載のシステムを得る工程；および

(b) 前記システムに含まれるヌクレアーゼまたは該ヌクレアーゼをコードする核酸と、前記システムに含まれる第1のポリヌクレオチドを細胞に導入することにより、改変細胞を得る工程

を含む方法を含む。

50

【0017】

いくつかの実施形態は、前記工程（b）の前に、前記細胞を活性化する工程をさらに含み、該活性化工程は、オリゴマー化CD40リガンド（CD40L）、CpGおよび／またはIL-21に前記細胞を接触させることを含んでいてもよい。

【0018】

いくつかの実施形態において、前記工程（b）は、前記ヌクレアーゼとgRNAを含むリボ核タンパク質（RNP）に前記細胞を接触させることを含む。

【0019】

いくつかの実施形態は、（c）前記細胞を分化誘導する工程をさらに含む。

【0020】

いくつかの実施形態は、前記方法のいずれか1つにより改変された細胞を含む。

【0021】

いくつかの実施形態は、二重特異性T細胞エンゲージャー（BTCE）を発現するようにゲノム座位が遺伝子改変された細胞を含む。

【0022】

いくつかの実施形態において、前記細胞は、B細胞または前駆B細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は、造血幹細胞、ヒト胚性幹細胞、人工多能性幹細胞（iPSC）、ナイーブB細胞、メモリーB細胞、形質芽球および形質細胞から選択される。

【0023】

いくつかの実施形態において、前記座位は、B細胞以外の細胞と比較してB細胞に高発現される内因性遺伝子を含む。いくつかの実施形態において、前記座位は、B細胞において不活性な内因性遺伝子を含む。いくつかの実施形態において、前記座位は、CCR5遺伝子、JCHAIN遺伝子、IGHM座位（E-mu；hg38ゲノム；chr14：105856225-105863200としても知られている）、CD19遺伝子およびIGHG1遺伝子から選択される。

【0024】

いくつかの実施形態において、前記BTCEは、T細胞抗原に特異的に結合することができる第1のポリペプチドと、腫瘍抗原に特異的に結合することができる第2のポリペプチドとを含む。いくつかの実施形態において、前記T細胞抗原はCD3である。いくつかの実施形態において、前記腫瘍抗原は、CD33、CD19、CD326（EpCAM）、神経-グリア細胞抗原2（NG2）、HER2、上皮成長因子受容体（EGFR）、CD66e、エフリンA型受容体2（EphA2）、CD21、FLT3、gp100、PDL1およびCD22から選択される。いくつかの実施形態において、前記BTCEは、AMG 330、ブリナツモマブ、solitomabまたはテベントアプスである。

【0025】

いくつかの実施形態において、前記ゲノム座位は、前記BTCEをコードする第1の核酸を含む発現カセットを挿入することにより改変される。

【0026】

いくつかの実施形態において、第1の核酸は、前記座位の内因性プロモーターに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態において、前記発現カセットは、第1の核酸に作動可能に連結されたプロモーターをさらに含む。いくつかの実施形態において、前記プロモーターは構成的プロモーターである。いくつかの実施形態において、前記プロモーターは誘導型プロモーターである。いくつかの実施形態において、前記プロモーターは、MNDプロモーター、IgVHプロモーター、EF-1αプロモーターまたはIGHG1プロモーターである。

【0027】

いくつかの実施形態において、前記発現カセットは、

（i）エンハンサー；

（ii）シグナル配列をコードするポリヌクレオチド；

（iii）IGHV遺伝子もしくはIGHG1遺伝子に由来する5' UTRを含むポリヌクレオチド

；

10

20

30

40

50

(iv) IGHV遺伝子もしくはIGHG1遺伝子に由来する3'UTRを含むポリヌクレオチド；および／または

(v) 遍在性クロマチンオープニングエレメント (UCOE)

をさらに含み、

前記エンハンサーは、E μ エンハンサーまたはSLC3A2エンハンサーであってもよく、

前記シグナル配列は、IgHVのシグナル配列またはIGHG1のシグナル配列であってもよい。

【0028】

いくつかの実施形態において、前記細胞は哺乳動物細胞であり、ヒト細胞であってもよい。いくつかの実施形態において、前記細胞はエクスピボの細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は、対象から得られた自家細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は、対象と同種の細胞である。

10

【0029】

いくつかの実施形態は、前記細胞のいずれか1つを含む医薬組成物を含む。

【0030】

いくつかの実施形態は、対象において障害を治療、緩和または抑制する方法であって、請求項33～54のいずれか1項に記載の細胞を対象に投与する工程を含む方法を含む。いくつかの実施形態において、前記細胞は単回投与により投与され、単回のボラス投与により投与されてもよい。いくつかの実施形態において、前記障害はがんを含む。いくつかの実施形態において、前記BTCEは、前記がんによって発現された腫瘍抗原に特異的に結合することができる。いくつかの実施形態において、前記がんは、固形腫瘍および白血病から選択される。いくつかの実施形態において、前記がんは、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、急性骨髄性白血病(AML)、乳がん、胃がん、悪性黒色腫、大腸がん、結腸直腸がん、頭頸部がん、胃がん、前立腺がん、卵巣がん、肺がん、および膵臓がんから選択される。いくつかの実施形態において、前記対象はヒトである。

20

【0031】

いくつかの実施形態は、医薬品としての、例えば、対象における障害または疾患の治療用、緩和用または抑制用の医薬品としての、前記細胞のいずれか1つの使用を含む。

【0032】

いくつかの実施形態は、対象における障害の治療用、緩和用または抑制用の医薬品の調製における、前記細胞のいずれか1つの使用を含む。

30

【0033】

いくつかの実施形態において、前記細胞は単回投与により投与され、単回のボラス投与により投与されてもよい。いくつかの実施形態において、前記障害はがんを含む。いくつかの実施形態において、前記BTCEは、前記がんによって発現された腫瘍抗原に特異的に結合することができる。いくつかの実施形態において、前記がんは、固形腫瘍および白血病から選択される。いくつかの実施形態において、前記がんは、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、急性骨髄性白血病(AML)、乳がん、胃がん、悪性黒色腫、大腸がん、結腸直腸がん、頭頸部がん、胃がん、前立腺がん、卵巣がん、肺がん、および膵臓がんから選択される。いくつかの実施形態において、前記対象はヒトである。

40

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1A】NSGマウスとNSG-huCD34マウスから摘出した脾臓の切片のヘマトキシリン・エオシン染色によりNSG-huCD34マウスの特性評価を行った顕微鏡写真を示す。

【0035】

【図1B】NSG-huCD34マウスから得た脾臓の脾臓フローサイトメトリーのFACS分析を示す。

【0036】

【図1C】NSG-huCD34マウスとNSGマウスの末梢血血清中において測定した形質細胞由来サイトカインを示すグラフを示す。

50

【0037】

【図2A】初代ヒトB細胞の遺伝子編集によりルシフェラーゼを発現する形質細胞を作製するために使用したインビトロでのタイムラインを示す。

【0038】

【図2B】ルシフェラーゼベクターで編集した初代B細胞、またはベクターで編集していない初代B細胞において相同組換え修復により編集されたアレルの頻度を示すグラフを示す。

【0039】

【図2C】遺伝子編集の11日後における生細胞の形質細胞染色（CD138+CD38+）のFACS分析を示す。

【0040】

【図2D】形質細胞のIgG染色のフローサイトメトリー分析のグラフを示す。

【0041】

【図3A】NSGマウスまたはNSG-huCD34マウスに、遺伝子編集した形質細胞（PC）またはPBS対照を投与したインビボ研究のタイムラインを示す。

【0042】

【図3B】ffluc-PCの生着が示された、バルク形質細胞を移植したNSGマウスおよびNSG-huCD34マウスの発光画像を示す。

【0043】

【図3C】ヒト化マウスにおいて生着と持続性の改善が示された、ffluc-PCを移植したNSGマウスおよびNSG-huCD34マウスの平均輝度のグラフを示す。

【0044】

【図3D】ffLuc-PCを移植したNSG-huCD34マウスから摘出した脾臓の免疫組織学的検査用の顕微鏡写真を示す。矢印はffLuc+CD138+細胞を示す。

【0045】

【図3E】バルク形質細胞を移植したNSGマウスおよびNSG-huCD34マウスの血清IgGの力価を示すグラフを示す。

【0046】

【図3F】遺伝子編集したPCを移植したマウスにおいてIgG+細胞が示された、形質細胞（CD138+、CD38+、hCD45+）の細胞内IgMと細胞内IgGのフローサイトメトリープロットを示す。

【0047】

【図3G】NSG-huCD34マウスの骨髄において検出された、BFPを発現するように編集されたPCのFACS分析を示す。

【0048】

【図3H】バルク細胞または濃縮細胞におけるIgG+形質細胞の割合を示すグラフを示す。

【0049】

【図3I】IgG濃度の経時変化を示すグラフを示す。

【0050】

【図4A】BiTEを分泌する形質細胞の作製に使用したカセットの模式図を示す。

【0051】

【図4B】遺伝子編集されたPCの代表的なFACS分析を示す。

【0052】

【図4C】活性化T細胞のFACS分析を示す。

【0053】

【図4D】BiTE-PC（BTCE-PC）またはBFP-PCから得た上清の存在下におけるK562-CD19+細胞の殺傷を示すグラフを示す。

【0054】

【図5A】IGHG1ゲノム座位の模式図を示し、エクソン1、エクソン2、エクソン3お

10

20

30

40

50

よびエクソン 4（黒色のボックス）を示す。sgRNAの標的部位を示しており、これには、エクソン 1 の TH16、TH22、TH27、TH28；エクソン 2 の TH26；およびエクソン 4 の TH21 が含まれる。

【0055】

【図 5 B】FACS 分析を示す。上パネルは、TH26 sgRNA を含む RNP で処理した細胞において、B 細胞中の IGHG+ 細胞の割合が約 90% 減少したことを示す。下パネルは、IGHG1 座位において GFP が発現されるように組換えた B 細胞中の GFP+ 細胞の割合を示す。

【0056】

【図 6 A】様々な発現カセットの挿入部位を示した E μ ゲノム座位の模式図と、各発現カセットを含む様々なベクターの一例の模式図を示す。各発現カセットには、約 450 ヌクレオチド長の 5' 相同アーム (HA)；IgVH プロモーター (IgVH_P)；BiTE の抗 CD3 ポリペプチド部分をコードする核酸 (α CD3)；リンカーをコードする核酸 (G4S)；BiTE の抗 CD19 ポリペプチド部分をコードする核酸 (α CD19)；BiTE の抗 CD33 ポリペプチド部分をコードする核酸 (α CD33)；P2A リボソームスキップ配列 (2A)；緑色蛍光タンパク質 (GFP) をコードする核酸；ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節因子 (WPRE)；および約 450 ヌクレオチド長の 3' 相同アーム (HA) が含まれているか、これらの一部が含まれている。

【0057】

【図 6 B】図 6 A の各コンストラクトを導入した場合の、GFP を発現する生細胞の割合を示すグラフを示す。(1) 1 番目の列は、GFP レポーター遺伝子のみを含む発現カセットで編集した細胞を示す。(2) 2 番目の列は、BiTE の抗 CD19 ポリペプチド部分をコードする核酸を含む発現カセットで編集した細胞を示す。(3) 3 番目の列は、BiTE の抗 CD33 ポリペプチド部分をコードする核酸を含む発現カセットで編集した細胞を示す。(4) 4 番目の列は、未編集細胞を示す。

【0058】

【図 7】活性化 T 細胞の割合 (左パネル)、生細胞中の単球の割合 (中央のパネル)、および生細胞中の B 細胞の割合 (右パネル) をそれぞれ示すグラフを示す。各グラフの左の棒は、BiTE の抗 CD19 ポリペプチド部分 (CD19 BiTE) をコードする核酸を含む発現カセットで編集した細胞に関する。各グラフの中央の棒は、BiTE の抗 CD33 ポリペプチド部分 (CD33 BiTE) をコードする核酸を含む発現カセットで編集した細胞に関する。各グラフの右の棒は、GFP レポーター遺伝子 (GFP) のみを含む発現カセットで編集した細胞を示す。

【0059】

【図 8 A】各発現カセットを含むベクターの一例の模式図を示す。コンストラクト 1 とコンストラクト 2 は、CCR5 座位への送達用の相同アームを有していた。コンストラクト 3 とコンストラクト 4 は、E μ 座位への送達用の相同アームを有していた。コンストラクト 2 とコンストラクト 4 は、MND プロモーターの下流に蛍光マーカー (コンストラクト 2 では BFP、コンストラクト 4 では GFP) を発現する陰性対照であった。コンストラクト 1 およびコンストラクト 3 は、MND プロモーターの下流かつ GFP に対してシスの位置にブリナツモマブ BiTE を発現するものであった。

【0060】

【図 8 B】コンストラクト (1) およびコンストラクト (2) によるエクソン 3 への挿入部位を示した CCR5 ゲノム座位の模式図を示す。

【0061】

【図 8 C】コンストラクト (1)、コンストラクト (2)、コンストラクト (3) またはコンストラクト (4) で CCR5 座位または E μ (Mu) 座位を編集した細胞の FACS 分析を示す。強調表示した囲み枠は、ブリナツモマブの非存在下での蛍光レポーターの発現を示す。

【0062】

【図 8 D】ブリナツモマブの下流で発現された蛍光レポーターの発現を、強調表示した

10

20

30

40

50

み枠で示した図8CのFACS分析を示す。

【0063】

【図8E】BFP鑄型によりHDRイベントが生じたアレルの頻度がBFP+細胞を定量した割合と同程度であったことが示されたFACS分析を示す。

【0064】

【図9A】分泌されたブリナツモマブの定量に使用した方法の模式図を示す。

【0065】

【図9B】高濃度のBiTEもしくは高濃度のBiTEとともにインキュベートした細胞、またはBiTEなしでインキュベートした細胞のFACS分析を示す。

【0066】

【図9C】2つの反復実験における様々なBiTE濃度でのCD19-細胞に対するCD19+標的細胞の比率を示したグラフを示す。

【0067】

【図9D】高濃度のBiTEもしくは高濃度のBiTEとともにインキュベートした細胞、またはBiTEなしでインキュベートした細胞のFACS分析を示す。

【0068】

【図9E】2つの反復実験における様々なBiTE濃度での活性化T細胞の割合を示したグラフを示す。

【0069】

【図9F】2つの反復実験における様々なBiTE濃度での活性化T細胞の割合を示したグラフを示す。

【0070】

【図9G】2つの反復実験において、CCR5_BFP（最も左側の1組目の2列）、CCR5_BiTE（2組目の2列）、Mu_GFP（3組目の2列）、またはMu_BiTE（最も右側の4組目の2列）で編集した細胞を使用した場合の活性化T細胞の割合を示した棒グラフを示す。

【0071】

【図10A】4つの異なる座位においてGFPまたはブリナツモマブ_2A_GFPを発現させることを目的として、AAVベクターにクローニングした各HDR鑄型の模式図を示す。

【0072】

【図10B】コンストラクト（1）およびコンストラクト（2）によるエクソン3への挿入部位を示したCCR5ゲノム座位の模式図を示す。

【0073】

【図10C】各コンストラクトで編集した細胞のHDRレベルのFACS分析を示す。

【0074】

【図10D】各コンストラクトで編集した細胞のHDRレベルのFACS分析を示す。

【0075】

【図11A】GFPおよび／またはBiTEを発現するように編集したB細胞のFACS分析を示す。組換え細胞集団におけるCD19レベルとCD38レベルを定量した。

【0076】

【図11B】各コンストラクトで編集した細胞を使用した場合のT細胞活性化の割合を示した棒グラフを示す。BFPコンストラクト（1番目の棒）、BFP CD19KOコンストラクト（2番目の棒）、CCR5 BiTEコンストラクト（3番目の棒）、CCR5 BiTE CD19KOコンストラクト（4番目の棒）、MuE BiTEコンストラクト（5番目の棒）、およびMuE BiTE CD19KOコンストラクト（6番目の棒）を示す。

【0077】

【図12A】ブリナツモマブ（試験用）またはGFP（対照用）を発現するようにB細胞を遺伝子改変したアッセイを示す。この改変B細胞を、ルシフェラーゼを発現するように改変したRaji細胞（CD19+B細胞リンパ腫）および自家T細胞と混合した。この細胞混合物を免疫不全マウス（NSG）の脇腹に移植した。

10

20

30

40

50

【0078】

【図12B】IVIS装置で撮影した発光（マウスに示された青色の円形部分）の写真を示す。

【0079】

【図12C】IVIS装置で撮影した発光（マウスに示された青色の円形部分）の写真を示す。

【0080】

【図13A-13K】ゲノムを組換えた初代ヒトB細胞が、座位依存的に機能性 α CD19-BiTEを分泌したことを示す。図13Aは、CRISPR Cas9とAAV6によりDNA修復鑄型を送達した相同組換え修復（HDR）により、CCR5遺伝子座位においてBFP導入遺伝子または α CD19BiTE.T2A.GFP導入遺伝子が発現されるように初代B細胞を編集した際の模式図を示す。5日後に、ゲノムDNAと、細胞と、上清を回収した。図13Bは、ddPCRで測定したCCR5座位における導入遺伝子の組み込みを、HDRが生じたアレルの頻度として示したグラフを示す。図13Cは、組換えB細胞の代表的なフローサイトメトリープロットを作製するため、かつ生細胞における導入遺伝子の陽性率を定量するためのフローサイトメトリー分析を示す。図13Dは、ddPCRとフローサイトメトリーから計算した組換え比率を示す。図13Eは、B細胞において、抗体に関連する別の座位をGFPまたはBiTE.T2A.GFPで編集した際の模式図を示す。図13Fは、BiTE.T2A.GFPで編集したB細胞の代表的なフローサイトメトリー分析を示す。図13Gは、編集された細胞の割合とGFPの平均蛍光強度の定量結果のグラフを示す。図13Hは、編集したB細胞から得た上清を、標的K562細胞（CD19+）と参照K562細胞（CD19-）とCD8+T細胞の混合物とともに48時間インキュベートした際の模式図を示す。細胞を回収し、フローサイトメトリーで分析した。図13Iは、CD19+K562細胞の特異的溶解を示すグラフを示す。図13Iは、T細胞の活性化（CD3+細胞中のCD69+CD137+細胞の割合）の定量結果のグラフを示す。図13Kは、活性化されたT細胞の割合から上清中のBiTE濃度を逆算した結果のグラフを示す。5つの独立した実験において、3人を超える生物学的に別個のドナーから得たデータを示している。エラーバーはSEMを示す。（図13D、図13Fおよび図13H~13J）対応のある一元配置分散分析の実施後に、ダネットの事後検定を行った。

【0081】

【図14A-14J】異なる種類のBiTEをそれぞれ分泌するように組換えたヒト形質細胞が特異的な抗標的有効性を有していたことを示す。図14Aは、PBMCから初代ヒトB細胞を濃縮し、活性化増殖培地中で2日間培養し、GFP導入遺伝子、 α CD19BiTE.T2A.GFP導入遺伝子または α CD33BiTE.T2A.GFP導入遺伝子を発現するように編集した際の模式図を示す。編集した細胞は、増殖培地中で5日間培養した後、3日かけて形質細胞に分化させた。導入遺伝子の組み込みと発現は、フローサイトメトリーで確認した。図14Bは、GFP蛍光レポーターの代表的なフローサイトメトリープロットを示す。図14Cは、GFP蛍光レポーターの定量結果のグラフを示す。図14Dは、編集した形質細胞から得た上清の存在下において、PBMCと自家CD8+T細胞を48時間培養した際の模式図を示す。図14Eは、フローサイトメトリーで定量したT細胞の活性化（CD3+細胞中のCD69+CD137+細胞の割合）を示すグラフを示す。図14Fは、フローサイトメトリーで定量した生細胞中のB細胞（IgM+）の割合を示す。図14Gは、フローサイトメトリーで定量した、48時間の共培養の終了時におけるPBMC培養物の生細胞中の単球（CD14+）の割合を示す。図14Hは、T細胞の活性化（CD8+細胞中のCD69+CD137+細胞の割合）を示す。図14Iは、白血病細胞殺傷アッセイにおけるNAML-6細胞（CD19+）の頻度を示す。図14Jは、白血病細胞殺傷アッセイにおけるMOLM-14細胞（CD33+）の頻度を示す。3つの独立した実験において、4人を超える生物学的に別個のドナーから得たデータを示し、対応のある一元配置分散分析の実施後に、ダネットの事後検定を行った。

【0082】

【図15A-15I】CD19をノックアウトすることによって、 α CD19-BiTE細胞の自己標的化が阻止され、初代ヒトB細胞からの α CD19-BiTEの発現が増加したことを示す

。この初代ヒトB細胞はPBMCから濃縮した後、活性化培地中で2日間培養し、MuE座位においてGFPまたは α CD19BiTE.T2A.GFPを発現するように組換えた。図15Aは、編集した細胞をさらに5日間増殖させた後、自家T細胞とインキュベートした際の模式図を示す。図15Bは、24時間後に、GFP+CD20+B細胞の割合をフローサイトメトリーで測定した結果のグラフを示す。B細胞の組換え時に、CD19に特異的なCRISPRガイドをさらに加えて、MuE座位の組換えと同時にCD19をノックアウトした。図15Cは、細胞表面のCD19の発現を染色することによってCD19のノックアウトの成功を調べたフローサイトメトリー分析を示す。図15Dは、図15Cに示した実験で得たCD19+細胞の割合を定量した結果のグラフである。図15Eは、CD19KO細胞を様々な数のT細胞と24時間インキュベートした後、導入遺伝子が陽性の細胞の割合をフローサイトメトリーで定量することによって、CD19KO細胞において α CD19BiTEによる自己標的化が発生していないことが確認されたグラフを示す。図15Fは、B細胞に対するT細胞の比率を9とした場合のデータを合わせたグラフを示す。この実験では、編集したB細胞を3日間かけて形質細胞にさらに分化させた後、 α CD19BiTEを発現するように編集したCD19KO形質細胞およびWT形質細胞から上清を回収し、各上清を、T細胞とK562 CD19+細胞とK562 CD19-細胞の混合物とともに48時間インキュベートした。図15Gは、CD19+K562細胞の特異的溶解を定量した結果のグラフを示す。図15Hは、T細胞の活性化（CD3+細胞中のCD69+CD137+細胞の割合）を定量した結果のグラフを示す。図15Iは、組換え α CD19BiTEの標準曲線を使用して、 α CD19BiTEの濃度を内挿したグラフを示す。4人の生物学的に別個のドナーから得たデータを示している。対応のある二元配置分散分析を行った（図15B、図15E）。対応のある一元配置分散分析の実施後に、ダネットの事後検定を行った（図15F）。対応のあるスチューデントのt検定を行った（図15G～15I）。

10

20

30

40

【0083】

【図16A～16E】BiTEを分泌するように組換えた形質細胞がインビボにおいて抗腫瘍作用を示したことを示す。図16Aは、GFPまたは α CD19 BiTEを発現するCD19KO組換え形質細胞と、自家T細胞と、Raji-ホタルルシフェラーゼ細胞を、NSGマウスの右脇腹に皮下注射した際の模式図を示す。図16Bは、対照マウスにおいて、9日目以降に飽和状態に達するまで、インビボイメージング試験の生物発光により測定したRaji腫瘍の増殖を示す。図16C（左パネル）は、各マウスの腫瘍の生物発光を経時的に定量したグラフを示す。図16C（右パネル）は、660,000フラックスでベースライン補正した曲線下面積の分析を示す。図16Dは、スキーマに従って、GFPまたは α CD19 BiTEを発現するCD19KO組換え形質細胞をNSGマウスに静脈内注射した後、ヒトB-ALL PDX NL482b-ホタルルシフェラーゼ細胞を静脈内注射し、次に自家T細胞を後眼窩注射した際の模式図を示す。図16Eは、対照マウスにおいて、17日目以降に飽和状態に達するまでインビボイメージング試験で観察したPDX B-ALL細胞の播種性増殖を示す。図16Fは、各マウスにおいて、総生物発光フラックスにより経時的に定量した腫瘍の増殖を示すグラフを示す。図16Gは、1,000,000フラックスでベースライン補正して曲線下面積分析を行ったことを示すグラフを示す。図16A～16Cは、2つの独立した実験（n=16）において4人の別個のドナーから得たデータであり、対応のある二元配置分散分析により検定した。図16D～16Gは、1人の生物学的ドナー（n=15）から得たデータであり、対応のない一元配置分散分析の実施後に、シダックの事後検定を行った。

【0084】

【図17A～17D】ゲノム組換えB細胞の作製と、この組換えB細胞の形質細胞への分化に関する追加データを示す。図17Aは、ヒトPBMCからB細胞を濃縮し、活性化培地中で2日間培養した際の模式図を示す。次に、相同組換え修復によりB細胞を組換えた。組換えた細胞をさらに5日間増殖させた。図13に示した実験のみに関して、増殖させた組換えB細胞を回収して、ddPCRおよびフローサイトメトリーを実施し、上清を回収して殺傷アッセイを行った。次に、サイトカインを添加して組換えB細胞を 1×10^6 個/mLの密度で培養することにより分化誘導して形質細胞を発生させた。図17Bは、相同組換え修復によりCCR5遺伝子に導入遺伝子が直接組み込まれたことを示す模式図を示す。組

50

み込まれたアレルと参照用アレルをddPCRで測定し、図13Bに示したHDR頻度の計算に使用した。図17Cは、7日目の編集したB細胞中のGFP細胞の割合およびGFPのMFI値を測定するための、ゲーティングによるフローサイトメトリー分析を示す。フローサイトメトリーデータは、まず、SSCAとFSCAでゲートをかけてリンパ球を検出した。次に、リンパ球から生細胞をゲートした。図17Dは、図17Cから引き続いて、生きたリンパ球から単一細胞をゲートして、GFPの発現を分析し、シングレットの生細胞からGFP+細胞の割合を計算し（左パネル）、GFP+細胞から平均蛍光指数（右パネル）を計算した際のグラフを示す。

【0085】

【図18A-18B】組換えBiTEの用量に依存的なT細胞の活性化と、K562細胞の殺傷を示す。この実験では、様々な濃度の組換え α CD19BiTEを、標的K562細胞（GFP+：CD19+）と参照K562細胞（BFP+：CD19-）とCD8+T細胞の混合物とともに48時間培養した。次に、細胞を回収してフローサイトメトリーで分析した。図18Aは、48時間後のK562細胞殺傷アッセイのフローサイトメトリー用のゲート方法を示す。T細胞の活性化は、CD69+CD137+の生きたCD8+細胞の割合として定義した。特異的溶解は、BFP+：CD19-細胞に対するGFP+：CD19+細胞の比率を、同じ小分け試料の培地のみでの対照に対して正規化して計算した。図18Bは、各実験に標準曲線を内挿したグラフを示す。次に、これらの標準曲線を使用して、図13Jに示した α CD19BiTEの分泌濃度を逆算した。

【0086】

【図19A-19E】10日目まで分化誘導した細胞が導入遺伝子の発現を維持し、形質細胞の表現型マーカーを発現したことを示す。組換えCD19 BiTE α CD33 BiTEは、用量依存的に標的細胞を排除する。ヒトPBMCからB細胞を濃縮し、活性化培地中で2日間培養した。次に、相同組換え修復によりB細胞を組換えて、GFP導入遺伝子または α CD19BiTE.T2A.GFP導入遺伝子もしくは α CD33BiTE.T2A.GFP導入遺伝子を発現させた。組換え細胞をさらに5日間増殖させ、サイトカインを添加して組換えB細胞を 1×10^6 個/mLの密度でさらに3日間培養することにより分化誘導して、形質細胞を発生させた。組換え形質細胞を回収してフローサイトメトリーを実施し、上清を回収して細胞殺傷アッセイを行った。図19Aは、細胞表現型のフローサイトメトリー分析用のゲート方法を示す。図19Bは、シングレットの生きたリンパ球の形質細胞表現型（CD38+ CD138+）を定量したグラフを示す。図19Cは、10日目のバルク細胞またはCD38+CD138+形質細胞サブセットにおける導入遺伝子陽性率を定量した代表的なフローサイトメトリー分析を示す。組換え α CD19 BiTEまたは組換え α CD33 BiTEの存在下においてPBMCと自家CD8+T細胞を48時間培養した。図19Dは、細胞を回収し、ゲートをかけて分析したフローサイトメトリー分析を示す。図19Eは、細胞の頻度を定量し、 α CD19 BiTEまたは α CD33 BiTEの濃度に対してプロットしたグラフを示す。標準曲線は、T細胞活性化データに基づいて4パラメーターロジスティック曲線により内挿した。

【0087】

【図20A-20B】 α CD19 BiTE組換え形質細胞のCD19表面染色が低かったことを示す。PBMCから初代ヒトB細胞を濃縮し、活性化培地中で2日間培養し、MuE座位においてGFPまたは α CD19BiTE.T2A.GFPを発現するように組換えた。次に、組換え細胞を増殖させた後、さらに8日間かけて形質細胞に分化させた。図20Aは、10日目の組換え細胞においてCD19の発現を分析するためのゲート方法を示す。図20Bは、組換え細胞においてCD19の平均蛍光強度を定量したグラフを示す。

【0088】

【図21】B細胞自己殺傷アッセイ用のゲート方法を示す。PBMCから初代ヒトB細胞を濃縮し、活性化培地中で2日間培養し、CD19のノックアウトの存在下または非存在下で、MuE座位においてGFPまたは α CD19BiTE.T2A.GFPを発現するように組換えた。編集した細胞をさらに5日間増殖させた後、自家T細胞とインキュベートした。24時間後に、図に示すゲート方法に従ったフローサイトメトリーにより、編集したB細胞の割合を

測定した。

【0089】

【図22A-22C】CD19KOが、BiTE組換えB細胞から形質細胞への分化に影響を及ぼさなかったことを示す。PBMCから初代ヒトB細胞を濃縮し、活性化培地中で2日間培養し、CD19のノックアウトの存在下または非存在下で、MuE座位においてGFPまたはaCD19BiTE.T2A.GFPを発現するように組換えた。編集した細胞をさらに5日間増殖させた後、形質細胞に分化させた。図22Aは、細胞生存率のグラフを示す。図22Bは、細胞数のグラフを示す。図22Cは、細胞の細胞表面マーカーを染色し、形質細胞（CD38++CD138+）および形質芽球（CD38+CD138-）として定量したグラフを示す。

【0090】

【図23A-23B】インビボにおいてBiTE形質細胞によりT細胞の増殖とCD19+細胞の排除が誘導されたことを示す。NL428b腫瘍を接種した15日後に末梢血を採取し、34日後に脾臓と骨髓を摘出した。赤血球を溶解し、残った細胞のマウス細胞表面マーカーおよびヒト細胞表面マーカーを染色した。図23Aは、細胞の割合の測定用のゲート方法を示す。図23Bは、シングレットの生細胞中のCD3+細胞の割合を示すグラフを示す。図23Cは、シングレットのCD45+生細胞中のCD19+の割合を示すグラフを示す。対応のない一元配置分散分析で検定した。

【発明を実施するための形態】

【0091】

本明細書において提供される方法および組成物のいくつかの実施形態は、二重特異性T細胞エンゲージャー（BTCE）を発現する細胞の調製方法、および特定の治療におけるこのような細胞の使用に関する。いくつかの実施形態において、前記細胞は、B細胞または前駆B細胞である。本明細書において、「BTCE」および「BiTE」は同じ意味で使用され、二重特異性T細胞エンゲージャーを意味する。

【0092】

がん細胞を殺傷するために細胞傷害性T細胞を動員する免疫療法（例えば、BTCEなど）は、B細胞性急性リンパ芽球性白血病（B-ALL）患者の生存率の向上に大きな役割を果たしている¹⁻³。「ビーリンサイト」の名称で市販されているブリナツモマブは、2014年に再発性難治性B-ALLの治療用にFDAにより承認されたCD3/CD19 BTCEである^{4, 5}。現在、ブリナツモマブは、様々な形態でB-ALLの治療に使用されており、特に、移植の橋渡し治療としての第一選択療法、コンソリデーション療法、および化学療法レジメンの低毒性代替治療として使用されている⁶。しかし、ブリナツモマブやその他のBTCEは、半減期が短いことから、高用量の連続点滴を長期間必要とする。ブリナツモマブの半減期は2.11時間である⁷。治療濃度を維持し、投与に関連する合併症を回避するためには、28日間の連続した毎日の点滴を4サイクル実施した後、14日間の休薬によりブリナツモマブを投与することによって、微小残存病変陽性のB-ALLを治療する⁵。しかし、このような集中的な投薬計画は、患者に対して負担が重く、特に通院が困難な患者にとっては大きな負担となる^{8,9}。

【0093】

生物学的製剤の半減期を直接延長させるために数種類の方法が開発されており¹⁰、このような製剤として、低分子、結晶化可能な断片ドメインまたはアルブミン結合モチーフと複合体を形成させたものが挙げられる。半減期が延長された複合体は、BTCEにも適用されているが¹¹、このようなBTCE融合体が効果的であるのか、あるいは複数回の連続した高用量の点滴の必要性を回避できるものであるのかは不透明なままである。生物学的製剤の半減期に関する問題を軽減するための別の方法として、長命の組換え細胞治療を使用してタンパク質を送達する方法がある。組換え形質細胞（ePC）の使用がこれまでに検討されており、組換え形質細胞は、抗病原体抗体¹²⁻¹⁶、免疫チェックポイント阻害剤¹⁷、サイトカイン¹⁸、タンパク質欠損症関連タンパク質¹⁹などの生物学的製剤の安定な製造のための概念実証研究に利用されている細胞療法モダリティの1種である。形質細胞は、その驚異的な寿命²⁰（11~200年であると推定されている²¹）と高い分泌能（1秒間

10

20

30

40

50

に最大で10,000個のIgG分子を分泌する^{22,23})から、長期間にわたる生物学的製剤の送達に比類なく適している。さらに、エクスピボで作製されたePCは内在性の形質細胞とよく似ており、hIL6ヒト化マウスにおいて1年を超えて治療上意義のある濃度のIgGを安定に分泌することができる¹⁸。本明細書に開示するように、形質細胞^{24,25}およびePC¹⁸は、B-ALL前駆細胞が常在すると考えられる²⁶骨髄やその他の組織の微小環境に選択的に局在することから、ePCは、B-ALLにおいてBTCEを腫瘍部位に局所送達できるという利点もあると予測される。

【0094】

本明細書に開示されたいいくつかの実施形態は、BTCEを大量に産生するePCを作製するための相同組換え修復方法を含む。本明細書に開示された知見から、BTCEを分泌するePCは、細胞株、初代細胞および患者由来のB-ALL異種移植片に対するT細胞による殺傷を促進できることが示された。いくつかの実施形態は、B-ALLにおいてブリナツモマブをヒトに安定に送達するための、ePCの使用；ならびに半減期が短い場合、または局所送達によりオンターゲットな有害作用を低下させることができる場合に、生物学的製剤を送達するための、ePCプラットフォームの使用を含む。

【0095】

BTCEは、その種類によっては、対象において急速に排除されることから、対象におけるBTCEの半減期は短くなることがある。BTCEは、従来、その治療濃度を維持するため、長期間の複数回投与および／または持続静脈内点滴によって対象に投与されている（例えば、Zhu M, et al., (2016) Clin Pharmacokinet. 55:1271-88；およびSingh K, et al., (2021) Journal for ImmunoTherapy of Cancer 9:e003679. doi: 10.1136/jitc-2021-003679を参照されたい）。したがって、BTCEに関連する治療は改良を行う必要がある。

【0096】

二重特異性抗体は、2種の抗原上に存在することの多い2種のエピトープを標的とし、「次世代抗体治療を担う重要な要素」であると述べられている。例えば、Wang et al., Antibodies 8:43, 2019を参照されたい。様々なフォーマットの二重特異性抗体が開発されている。二重特異性抗体の市販品の開発は、「製造が非常に困難」であることから「難航」していると報告されている。

【0097】

本明細書で提供されるいくつかの実施形態は、二重特異性抗体および／またはその他の多重特異性結合剤（様々なフォーマットの多重特異性結合剤）の作製および／または送達に関連する特定の課題は、二重特異性抗体および／またはその他の多重特異性結合剤を発現することができる移植可能なヒト細胞集団（特に、移植可能なヒト形質細胞集団）の開発により克服することができるという洞察に関する。

【0098】

様々なフォーマットの二重特異性抗体薬剤が開発されており、具体的には、(i) 二重特異性IgG (BsIgG)、(ii) 追加の抗原結合部分が付加されたIgG、(iii) BsAb断片、(iv) 二重特異性融合タンパク質、および(v) BsAb複合体という5種類の構造に分類される。例えば、Spiess et al. (2015) Mol. Immunol. 67:95-106を参照されたい。二重特異性抗体フォーマットの一例として、BTCEが挙げられ、これは、T細胞上のCD3を標的とするscFv（例えば、単一のポリペプチドとして発現されたもの）が、目的の抗原（例えば、腫瘍細胞上に存在する表面抗原）を標的とするscFvに連結されたものである。例えば、Mack et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci USA 92:7021を参照されたい。ブリナツモマブは、BTCE抗体の一例であり、B細胞悪性腫瘍の治療において目覚ましい有効性が達成されている。例えば、Zhou et al., (2021) Biomarker Res 9:38を参照されたい。BTCE治療の改良された方法を早急に提供する必要があり、特に、BTCE治療では常に応答が乏しい固形腫瘍用のBTCE治療を改良する必要がある。効果的なBTCE治療の達成に関する具体的な課題として、抗原の喪失および免疫抑制因子が挙げられ、例えば、免疫チェックポイントのアップレギュレーションが挙げられる。

【0099】

本明細書で提供されるいくつかの実施形態は、多重特異性結合剤を発現する組換え細胞集団ならびに／またはT細胞のターゲティングにより恩恵を受ける細胞および／もしくは組織上の抗原を発現する組換え細胞集団を、これを必要とする対象に投与することにより多重特異性結合剤治療を送達するための改良された方法に関し、前記治療として、具体的にはBTCE治療が挙げられ、前記組換え細胞集団は、例えば、組換え哺乳動物細胞集団、特に組換えヒト細胞集団であり、前記多重特異性結合剤は、例えば、目的のBTCE剤であり、前記対象は、例えば、がんを有する対象、例えば、前記多重特異性結合剤が標的とする抗原を発現する腫瘍、またはこのような抗原を発現することが判明している腫瘍を有する対象である。

10

【0100】

本明細書において述べるように、組換え形質細胞集団は、例えば、哺乳動物、例えばヒトなどの対象に、BTCE剤などの多重特異性結合剤を効果的に送達することができる。

【0101】

本明細書で提供されるいくつかの実施形態は、米国特許公開第2018/0282692号（この文献は引用によりその全体が本明細書に援用される）などに記載の、組換え形質細胞集団を提供するための態様を含む。

【0102】

いくつかの実施形態において、例えば、米国特許公開第2016/0289637号、米国特許公開第2019/0352614号、米国特許公開第20210198344号およびWO 2022/006309（これらの文献はいずれも引用によりその全体が本明細書に明示的に援用される）に記載されているような技術を使用して、哺乳動物細胞集団（例えばヒト細胞集団）を組換えることにより、多重特異性結合剤（例えば、BTCE剤）を発現させてもよい。

20

【0103】

いくつかの実施形態において、多重特異性結合剤（例えばBTCE剤）をコードするコンストラクト、および／または多重特異性結合剤を発現するか、多重特異性結合剤を発現することができる組換え細胞集団は、レシピエント哺乳動物に投与および／または移植した後に、本明細書に記載の移植を受けたマウスモデルにおいて評価する場合、例えば、前記哺乳動物における多重特異性結合剤の発現（例えば、長期的な発現）に関して特性を評価してもよい。さらに、いくつかの実施形態において、そのようなコンストラクトおよび／または細胞集団は、本明細書に記載の移植を受けたマウスモデルにおいて評価する場合、前記哺乳動物における腫瘍の大きさの減少、および／または健康障害の1つ以上のマーカーの減少に関して特性が評価される。

30

【0104】

本明細書において提供される方法および組成物のいくつかの実施形態は、BTCE剤を発現する移植可能な組換え哺乳動物形質細胞集団を含む。いくつかの実施形態において、前記細胞集団は、哺乳動物に投与した場合、該哺乳動物における前記BTCE剤の発現に関して特性が評価される。いくつかの実施形態において、前記細胞集団は、前記BTCE剤の抗原標的を発現する腫瘍を有する哺乳動物に投与した場合、そのような投与の非存在下と比較して、腫瘍の抑制もしくは治療の成功および／または前記哺乳動物の健康状態の改善に関して特性が評価される。本明細書において提供される方法および組成物のいくつかの実施形態は、抗原を発現する腫瘍を抑制または治療する方法であって、抗原を発現する腫瘍を有する哺乳動物に、前記細胞集団のいずれか1つを投与する工程を含む方法を含む。本明細書において提供される方法および組成物のいくつかの実施形態は、BTCE剤をコードするコンストラクトであって、該コンストラクトが導入された組換え哺乳動物細胞からBTCE剤を発現させるためのコンストラクトを含む。

40

【0105】

定義

本明細書において、「B細胞」または「Bリンパ球」は、本明細書を参照すれば、一般的な通常の意味を有し、例えば、リンパ球サブタイプの白血球の一種が挙げられるが、こ

50

れに限定されない。B細胞は、T細胞やナチュラルキラー細胞などのリンパ球とは異なり、その細胞膜上にB細胞受容体を発現する。B細胞受容体により、B細胞が特定の抗原に結合することが可能になり、それにより抗体産生応答が開始される。B細胞は造血幹細胞から発生する。本明細書において述べるように、B細胞として、前駆B細胞、幹細胞、初期プロB細胞、後期プロB細胞、大型プレB細胞、小型プレB細胞、未熟B細胞、T1 B細胞、T2 B細胞、辺縁帯B細胞、成熟B細胞、ナイーブB細胞、いずれかのB細胞集団を出発材料として派生した活性化B細胞、形質芽球（短命）細胞、GC B細胞、メモリーB細胞、長命形質細胞および／もしくは短命形質細胞、ならびに／または状況に応じたこれらの任意の混合物もしくは組み合わせが挙げられる。

【0106】

本明細書において、「前駆B細胞」には、B細胞が由来する細胞が含まれる。B細胞は、T細胞と同様に、骨髄から発生するリンパ系細胞であり、成熟するまで骨髄中に存在することがある。本明細書の実施形態で述べるB細胞には、幹細胞、初期プロB細胞、後期プロB細胞、大型プレB細胞、小型プレB細胞、未熟B細胞、T1 B細胞、T2 B細胞、辺縁帯B細胞、成熟B細胞、ナイーブB細胞、形質芽球（短命）細胞、GC B細胞、メモリーB細胞、形質芽球細胞および／または長命形質細胞が含まれる。巨大分子、タンパク質、ペプチドなどの分子を発現する形質細胞のいくつかの実施形態において、この形質細胞はB細胞に由来するものである。いくつかの実施形態において、B細胞はメモリーB細胞である。いくつかの実施形態において、B細胞は、幹細胞、初期プロB細胞、後期プロB細胞、大型プレB細胞、小型プレB細胞、未熟B細胞、T1 B細胞、T2 B細胞、辺縁帯B細胞、成熟B細胞、ナイーブB細胞、形質芽球（短命）細胞、GC B細胞、メモリーB細胞、形質芽球細胞または長命形質細胞である。いくつかの実施形態において、B細胞は、前駆B細胞を含み、この前駆B細胞として、例えば、造血幹細胞（HSC）、多能性前駆細胞（MPP）細胞、リンパ系前駆細胞（CLP）細胞、ナイーブB細胞、GC B細胞、形質芽球、初期プロB細胞、後期プロB細胞、大型プレB細胞、小型プレB細胞、未熟B細胞、T1 B細胞、T2 B細胞、辺縁帯B細胞、成熟B細胞および／またはメモリーB細胞が挙げられる。いくつかの実施形態において、前記巨大分子はプロドラッグである。

【0107】

本明細書において、「メモリーB細胞」は、本明細書に照らせば、一般的な通常の意味を有し、例えば、初感染後に胚中心に形成されるB細胞のサブタイプであり、再感染の際に、より強力かつ加速された抗体媒介免疫応答の誘導に重要な役割を果たすものが挙げられるが、これに限定されない。Bリンパ球は、メモリー細胞を形成し、このメモリー細胞は、病原体を記憶して、同じ病原体に再感染した際に抗体を産生する。巨大分子、タンパク質、ペプチドなどの分子を発現する形質細胞のいくつかの実施形態において、この形質細胞はB細胞に由来するものである。いくつかの実施形態において、B細胞はメモリーB細胞である。いくつかの実施形態において、前記巨大分子はプロドラッグである。

【0108】

本明細書において、「ナイーブB細胞」は、本明細書に照らせば、一般的な通常の意味を有し、例えば、抗原に暴露されていないB細胞が挙げられるが、これに限定されない。ナイーブB細胞は、抗原に暴露されるとメモリーB細胞になる。巨大分子、タンパク質、ペプチドなどの分子を発現する形質細胞のいくつかの実施形態において、この形質細胞はB細胞に由来するものである。いくつかの実施形態において、B細胞はメモリーB細胞である。いくつかの実施形態において、前記巨大分子はプロドラッグである。本明細書において、「末梢血単核細胞（PBNC）」は、丸い核を有する末梢血細胞である。末梢血単核細胞は、リンパ球（T細胞、B細胞、NK細胞）および単球からなる。一方、赤血球および血小板は核を持たず、好中球、好塩基球および好酸球は分葉核を有する。本明細書に記載の実施形態において、B細胞は対象に由来するものであるか、または対象と同種の末梢血単核細胞である。いくつかの実施形態において、B細胞は、血液由来のヒトB細胞である。

【0109】

本明細書において、「形質細胞」は、形質B細胞、プラズマ細胞、プラズマ細胞またはエフェクターB細胞とも呼ばれる。「形質細胞」は、本明細書に照らせば、一般的な通常の意味を有し、例えば、血漿系およびリンパ系によって輸送され、抗体を分泌する白血球が挙げられるが、これに限定されない。

【0110】

本明細書において、「前駆形質細胞」は、未熟形質細胞として発生する場合がある。形質細胞系統の最も未熟な血液細胞は、形質芽球と呼ばれ、形質芽球は、完全に分化した成熟形質細胞に分化することができる。形質芽球はB細胞より多量の抗体を分泌することができるが、その量は形質細胞よりも少ない。いくつかの実施形態において、分子を発現する形質細胞の作製方法が提供される。いくつかの実施形態において、形質細胞は前駆形質細胞である。いくつかの実施形態において、前駆形質細胞は形質芽球である。

10

【0111】

「ゲノム編集」は、本明細書に照らせば、一般的な通常の意味を有し、例えば、生物のゲノムにおいてDNAを挿入、欠失または置換する遺伝子工学的方法を含むプロセスが挙げられるが、これに限定されない。遺伝子を編集することは、遺伝子編集としても知られている。本明細書に記載のいくつかの実施形態において、巨大分子などの分子を発現する形質細胞またはその前駆細胞を作製する方法であって、B細胞またはその前駆細胞に少なくとも1回のゲノム編集を行うことを含む方法を提供する。ゲノムの編集方法は、細胞のゲノムへの核酸の挿入、欠失または置換を含んでいてもよいが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、この方法を実施するためにヌクレアーゼを使用する。いくつかの実施形態において、前記ヌクレアーゼは、人工ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、前記方法は、二本鎖切断を誘導して、非相同末端結合（NHEJ）または相同組換え（HR）による修復を行う工程を含む。いくつかの実施形態において、前記ゲノム編集工程は、一本鎖核酸の導入によって行われる。いくつかの実施形態において、前記少なくとも1回のゲノム編集は、一本鎖DNAオリゴヌクレオチドまたは組換えアデノ随伴ウイルスの候補遺伝子座への相同組換えを行うために、B細胞の細胞周期を回すことをさらに含む。いくつかの実施形態において、タンパク質を発現させるための前記B細胞のゲノム編集は、ウイルスの組み込みを行わずに実施される。いくつかの実施形態において、特定の領域を切断するために2回目のゲノム編集を行う。いくつかの実施形態において、薬剤によって活性化することができる増殖促進因子を発現させるために3回目のゲノム編集を行う。本明細書に記載のいくつかの実施形態において、前記ゲノム編集は、非病原性AAVによる標的相同組換え編集によって行われる。

20

30

【0112】

ゲノム編集は、RNAおよびタンパク質のトランスフェクションによって行うこともできる。例えば、CRISPR/Casシステムを一部変更してゲノム編集に利用することができる。この技術では、合成ガイドRNA（gRNA）と複合体を形成させたCasヌクレアーゼを細胞に送達する必要があるが、これによって、細胞のゲノムを特定の位置で切断して、既存の遺伝子を除去し、かつ／または既存の遺伝子に新たな遺伝子を付加することができる。CRISPR/Casおよびこれに関連したプログラム可能なエンドヌクレアーゼシステムは、生物医学研究の重要なゲノム編集ツールとして急速な発展を遂げており、遺伝子破壊および／または遺伝子ターゲティングにおいて使用できることが様々な培養細胞系およびモデル生物系において実証されている。本明細書に記載のCRISPR/Casシステムの実施形態のいくつかにおいて、Casヌクレアーゼは、Cas1、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8またはCas9を含む。

40

【0113】

CRISPR/Casシステムの基本的なコンポーネントには、標的遺伝子、プロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）、ガイドRNAおよびCasエンドヌクレアーゼが含まれる。CRISPR/Casを使用してゲノム編集を行う際の重要な点の1つとして、様々な種類の細胞にガイドRNAを効率よく送達できるシステムが必要であることが挙げられる。このようなシステムは、例えば、核酸としてインビトロで作製されたガイドRNA（インビトロ転写ま

50

たは化学合成により作製されたガイドRNA)を送達することを含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、前記核酸は、修飾塩基を組み込むことによってヌクレアーゼ耐性を付与することができる。

【0114】

CRISPR-Casシステムは2種類に分類される。クラス1のCRISPR-Casシステムでは、複数のCasタンパク質からなる複合体が外来核酸を分解する。クラス2のCRISPR-Casシステムでは、単一の大型Casタンパク質が外来核酸を分解する。35種のファミリーに分類される93種のcas遺伝子が存在する。35種のファミリーのうち11種はcasコアを形成し、これにはCAS1~CAS9タンパク質ファミリーが含まれる。本明細書で述べるように、Casには、Cas1、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8またはCas9が含まれる。

10

【0115】

遺伝子編集は、ヌクレアーゼを使用しない新たな遺伝子編集プラットフォームによって行ってもよい。これまでに新たなAAVファミリーがヒト造血幹細胞から単離されている。これらの非病原性AAVは、健常者の体内に自然に存在し、固有の遺伝子編集特性および遺伝子移入特性を持つことがある。この技術は、AAVによる標的相同組換え編集(AmE NDRTM)とも呼ばれる。この方法は、細胞が正確性の高いDNA修復を確実に行うための自然の生物学的機構を利用した相同組換えである。

【0116】

AAVによる標的相同組換え編集は、ゲノムの特定の領域に特異的な「アーム」と呼ばれる相同配列を設計することから開始され、AAVが細胞に投与されると、DNAを永久的に書き換えることができる。本明細書に記載のいくつかの実施形態において、前記遺伝子編集は、非病原性AAVによる標的相同組換え編集によって行われる。新たなAAVゲノムの同定は、Smithらによって報告されている(Mol Ther. 2014 Sep; 22(9): 1625-1634; この文献は引用によりその全体が本明細書に援用される)。Smithらによって報告された新たなAAVは、造血幹細胞のゲノム操作に使用可能な新たな種類の遺伝子ベクターである。さらに、これらのベクターは、標的となる組織および細胞への遺伝子送達能を大きく拡大できる可能性があり、広く蔓延しているAAV2に対する既存の免疫を回避できることから、遺伝子移入が難しい細胞などにも遺伝子を送達できる可能性がある。いくつかの実施形態において、前記遺伝子編集は、造血細胞に自然に存在する非病原性のAAVを用いて行われ、特に、Smithらによって報告されている非病原性のAAVを用いた標的相同組換え編集によって行われる。

20

30

【0117】

「人工ヌクレアーゼ」は、本明細書に照らせば、一般的な通常の意味を有し、例えば、DNA配列を特異的に認識し、二本鎖切断を導入することによって効率的にゲノムを編集することができるハイブリッド酵素として人工的に合成された酵素が挙げられるが、これに限定されない。メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、およびCRISPR-Casシステムという4種のファミリーがあるが、これらに限定されない。

【0118】

「メガヌクレアーゼ」は、本明細書に照らせば、一般的な通常の意味を有し、例えば、大きな認識部位(12~40塩基対の二本鎖DNA配列)を特徴とするエンドデオキシリボヌクレアーゼが挙げられるが、これに限定されない。巨大分子などの分子を発現する形質細胞またはその前駆細胞を作製する前記方法の実施形態のいくつかにおいて、この方法は、(a) B細胞を単離する工程、(b) 前記B細胞を発達させる工程、(c) ウイルスの組み込みを行わずに、前記B細胞の1回目のゲノム編集を行って、タンパク質を発現させる工程、(d) 前記B細胞を増殖させる工程、および任意の工程として、工程(c)または(d)の後に、(e) 前記B細胞を分化させる工程を含み、これらの工程によって、タンパク質を発現する形質細胞が得られる。いくつかの実施形態において、1回目のゲノム編集は、RNAおよびタンパク質のトランスフェクションによって行われる。いくつかの

40

50

実施形態において、前記ヌクレアーゼはメガヌクレアーゼである。

【0119】

「ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）」は、本明細書に照らせば、一般的な通常の意味を有し、例えば、ジンクフィンガーDNA結合ドメインをDNA切断ドメインに融合させることによって得られる人工制限酵素が挙げられるが、これに限定されない。ジンクフィンガードメインは、所望とする特定のDNA配列を標的とするように組換えることができ、これによって、ジンクフィンガーヌクレアーゼが、複雑なゲノム内のユニークな配列を標的とすることが可能となる。巨大分子などの分子を発現する形質細胞を作製する前記方法の実施形態のいくつかにおいて、この方法は、（a）B細胞を単離する工程、（b）前記B細胞を発達させる工程、（c）ウイルスの組み込みを行わずに、前記B細胞の1回目のゲノム編集を行って、タンパク質を発現させる工程、（d）前記B細胞を増殖させる工程、および任意の工程として、工程（c）または（d）の後に、（e）前記B細胞を分化させる工程を含み、これらの工程によって、タンパク質を発現する形質細胞が得られる。いくつかの実施形態において、前記1回目のゲノム編集は、RNAおよびタンパク質のトランスフェクションによって行われる。いくつかの実施形態において、前記ヌクレアーゼはジンクフィンガーヌクレアーゼである。

10

【0120】

「転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）」は、本明細書に照らせば、一般的な通常の意味を有し、例えば、特定のDNA配列または特定のDNA部位を切断するように組換えることが可能な制限酵素が挙げられるが、これに限定されない。TALENは、TALエフェクターDNA結合ドメインを、DNA切断ドメイン（DNA鎖を切断するヌクレアーゼ）に融合することによって作製される。転写活性化因子様エフェクター（TALE）は、所望のDNA配列に結合するように組換えることができることから、ヌクレアーゼと組み合わせることによって、特定の位置でDNAを切断することができる。したがって、この制限酵素は、ゲノム編集への使用またはインサイチューでのゲノム編集を目的として細胞に導入することができ、この技術は、人工ヌクレアーゼを使用したゲノム編集技術として知られている。TALENの使用は当業者に公知である。本明細書に記載のいくつかの実施形態において、巨大分子などの分子を発現する形質細胞またはその前駆細胞を作製する方法であって、B細胞またはその前駆細胞に少なくとも1回のゲノム編集を行うことを含む方法を提供する。ゲノムの編集方法は、細胞のゲノムへの核酸の挿入、欠失または置換を含んでいてもよいが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、この方法を実施するためにヌクレアーゼを使用する。いくつかの実施形態において、前記ヌクレアーゼは、人工ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、前記方法は、二本鎖切断を誘導して、非相同末端結合（NHEJ）または相同組換え（HR）による修復を行う工程を含む。いくつかの実施形態において、前記方法は、1回目のゲノム編集またはゲノム編集を含む。いくつかの実施形態において、前記1回目のゲノム編集は、B細胞の少なくとも1つの遺伝子座を標的とするヌクレアーゼを送達する工程を含む。いくつかの実施形態において、前記少なくとも1つの遺伝子座は、JCHAIN、IGKC、IGMC、PON3、PRG2、FKBP11、SDC1、SLPI、DERL3、EDEM1、LY6C2、CRELD2、REXO2、PDIA4、PRDM1、CARD11、CCR5またはSDF2L1を含む。いくつかの実施形態において、前記ヌクレアーゼは、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、ホーミングエンドヌクレアーゼ（HE）、TALENとHEの融合タンパク質（megaTAL）、またはclustered regularly interspersed short palindromic repeat（CRISPR）DNAを標的とする合成ガイドRNAとCasヌクレアーゼの複合体である。いくつかの実施形態において、前記Casヌクレアーゼは、Cas1、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8またはCas9を含む。いくつかの実施形態において、前記1回目のゲノム編集は、候補遺伝子座において相同組換えを行うためのドナー鋳型として機能する組換えアデノ随伴ウイルスベクターを用いてB細胞への形質導入を行う工程を含む。いくつかの実施形態において、前記組換えアデノ随伴ウイルスベクターは、一本鎖、二本鎖または自己相補型である。

20

30

40

50

【0121】

本明細書において、「分化」は、ある種類の細胞から別の種類の細胞への変化を意味する。B細胞は、B細胞のサイトカイン受容体に結合したT細胞由来サイトカインへの暴露により分化することができるが、これに限定されない。例えば、CD40Lは、B細胞表面受容体であるCD40に結合することによって、B細胞の活性化に必要な刺激因子として機能することができ、これによっても分化に影響を及ぼすことができる。本明細書に記載の別の方法において、B細胞は、活性化・増殖工程、形質芽球への分化誘導工程、および形質細胞への分化誘導工程を含む3つの工程からなる培養系で分化誘導される。いくつかの実施形態において、活性化・増殖工程は、MCD40L (CD40三量体)、CpG、IL-2、IL-10および／またはIL-15の任意の組み合わせの存在下で行われる。いくつかの実施形態において、形質芽球への分化誘導工程は、IL-2、IL-6、IL-10および／またはIL-15の任意の組み合わせの存在下で行われる。いくつかの実施形態において、形質細胞への分化誘導工程は、IL-6、IL-15、APRILおよび／またはIFN α の任意の組み合わせの存在下で行われる。

10

【0122】

特定の方法

本明細書において提供される方法および組成物のいくつかの実施形態は、二重特異性T細胞エンゲージャー (BTCE) を発現するように細胞を改変する方法を含む。本明細書において提供される特定の実施形態に有用な方法の例は、米国特許公開第2018/0282692号に開示されている (この文献は参照によりその全体が本明細書に援用される)。いくつかの実施形態において、前記細胞はB細胞または前駆B細胞である。いくつかの実施形態において、前記B細胞または前記前駆B細胞は、造血幹細胞、ヒト胚性幹細胞、人工多能性幹細胞 (iPSC)、ナイーブB細胞、メモリーB細胞、形質芽球または形質細胞である。このような実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は、初代B細胞または初代前駆B細胞である。

20

【0123】

いくつかの実施形態において、BTCEを発現するように細胞を遺伝子改変する。例えば、BTCEをコードする発現カセットを挿入することにより、細胞のゲノムを改変することができる。いくつかの実施形態において、前記挿入は、前記ゲノムのランダムな位置に起こってもよい。いくつかの実施形態において、前記挿入は、前記ゲノムの選択された位置に標的化される。いくつかの実施形態は、相同組換え修復 (HDR) の使用を含む。このような実施形態のいくつかは、ゲノムの選択された位置に発現カセットを挿入することができるエンドヌクレアーゼを含んでもよい。そのようなエンドヌクレアーゼの例として、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、ホーミングエンドヌクレアーゼ (HE)、およびTALEN-HEタンパク質 (megaTAL) とCRISPR/Casシステムの組み合わせが挙げられる。いくつかの実施形態において、前記CRISPR/Casシステムは、Casヌクレアーゼと、ゲノムの特定の座位を標的するように構成されたガイドRNA (gRNA) とを含み、Casヌクレアーゼとして、例えば、Cas1、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8またはCas9が挙げられる。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼはCas9である。

30

40

【0124】

いくつかの実施形態において、前記発現カセットは、BTCEをコードする核酸を含む。いくつかの実施形態において、前記発現カセットは、BTCEをコードする核酸に作動可能に連結されたプロモーターをさらに含む。プロモーターの例として、MNDプロモーター、EF-1 α プロモーターまたはIgHG1プロモーターが挙げられる。いくつかの実施形態において、前記発現カセットは、エンハンサー因子および／またはポリアデニル化配列をさらに含む。

【0125】

本明細書において提供される、BTCEを発現するように細胞を改変する方法のいくつかの実施形態は、

50

(a) B細胞のゲノム座位に発現カセットを挿入することができるヌクレアーゼまたは該ヌクレアーゼをコードする核酸と、二重特異性T細胞エンゲージャー(BTCE)をコードする発現カセットを含む相同組換え修復(HDR)用鋳型をコードする第1のポリヌクレオチドとを得る工程；および

(b) 前記ヌクレアーゼまたは該ヌクレアーゼをコードする前記核酸と、第1のポリヌクレオチドを前記B細胞に導入することにより、改変細胞を得る工程を含む。

いくつかの実施形態において、前記B細胞は、工程(b)の前に活性化される。このような実施形態のいくつかにおいて、この活性化は、オリゴマー化CD40リガンド(CD40L)、CpGおよび／またはIL-21に、前記B細胞を接触させることを含んでいてもよく、オリゴマー化CD40リガンドとしては、例えば、連結された2つのCD40L三量体を含むオリゴマー化CD40Lが挙げられる。このような実施形態のいくつかは、オリゴマー化CD40Lを含む培養培地中で前記B細胞を第1の期間にわたり維持することを含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、第1の期間は、1～30日間、1～25日間、5～20日間、または7～20日間である。いくつかの実施形態において、前記工程(b)は、前記ヌクレアーゼとgRNAを含むリボ核タンパク質(RNP)に前記B細胞を接触させることを含む。

【0126】

いくつかの実施形態は、(c)前記細胞を分化誘導する工程をさらに含む。いくつかの実施形態において、工程(c)は、形質芽球への分化誘導工程、および／または形質細胞への分化誘導工程を含む。このような実施形態のいくつかにおいて、前記分化誘導は、オリゴマー化CD40L、CpGオリゴデオキシヌクレオチド、IL-2、IL-10およびIL-15の任意の組み合わせの存在下で行われる。このような実施形態のいくつかにおいて、形質芽球への分化誘導工程は、IL-2、IL-6、IL-10およびIL-15の任意の組み合わせの存在下で行われる。このような実施形態のいくつかにおいて、形質細胞への分化誘導工程は、IL-6、IL-15、APRILおよびIFN α の任意の組み合わせの存在下で行われる。いくつかの実施形態において、工程(c)は、(i)前記編集された細胞を、IL-2、IL-6、IL-10およびIL-15と第2の期間にわたり接触させる工程を含む。いくつかの実施形態において、第2の期間は、1～30日間、1～20日間、1～15日間、1～10日間、1～5日間、または1～3日間である。いくつかの実施形態は、(ii)前記編集された細胞を、IL-6、IL-15およびIFN α と第3の期間にわたり接触させる工程をさらに含む。いくつかの実施形態において、第3の期間は、1～30日間、1～20日間、1～15日間、1～10日間、1～5日間、または1～3日間である。いくつかの実施形態において、工程(i)の後に工程(ii)を行う。本明細書において提供される方法および組成物の実施形態に有用な方法の例は、Jordan M., et al. (2009) Blood 114: 5173-5181に開示されている(この文献は引用によりその全体が本明細書に援用される)。

【0127】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレアーゼはCasヌクレアーゼであり、例えば、Cas9ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態は、ガイドRNA(gRNA)をコードする第2のポリヌクレオチドをさらに含む。いくつかの実施形態において、第2のポリヌクレオチドは、配列番号1～27のいずれか1つに示されるヌクレオチド配列に対応するDNA配列またはRNA配列を含む。

【0128】

いくつかの実施形態において、前記座位は、B細胞以外の細胞と比較してB細胞に高発現される内因性遺伝子を含む。いくつかの実施形態において、前記座位は、B細胞において不活性な内因性遺伝子を含む。いくつかの実施形態において、前記座位は、CCR5遺伝子、JCHAIN遺伝子、IGHM座位(E-mu; hg38ゲノム; chr14:105856225-105863200としても知られている)、CD19遺伝子およびIGHG1遺伝子から選択される。

【0129】

いくつかの実施形態において、前記BTCEは、T細胞抗原に特異的に結合することがで

きる第1のポリペプチドと、腫瘍抗原に特異的に結合することができる第2のポリペプチドとを含む。いくつかの実施形態において、前記T細胞抗原はCD3である。いくつかの実施形態において、前記腫瘍抗原は、CD33、CD19、CD326 (EpCAM)、神経グリア細胞抗原2 (NG2)、HER2、上皮成長因子受容体 (EGFR)、CD66e、エフリンA型受容体2 (EphA2)、CD21、FLT3、gp100、PDL1およびCD22から選択される。いくつかの実施形態において、前記BTCEは、AMG 330、ブリナツモマブ、solitomabまたはテベンタフスプである。

【0130】

いくつかの実施形態において、前記発現カセットは、前記BTCEをコードする核酸に作動可能に連結されたプロモーターをさらに含む。いくつかの実施形態において、前記プロモーターは、構成的プロモーターである。いくつかの実施形態において、前記プロモーターは誘導型プロモーターである。いくつかの実施形態において、前記プロモーターは、MNDプロモーター、IgVHプロモーター、EF-1 α プロモーターまたはIgHG1プロモーターである。

10

いくつかの実施形態において、前記発現カセットは、

(i) エンハンサー；

(ii) シグナル配列をコードするポリヌクレオチド；

(iii) IGHV遺伝子もしくはIGHG1遺伝子に由来する5' UTRを含むポリヌクレオチド；

20

(iv) IGHV遺伝子もしくはIGHG1遺伝子に由来する3' UTRを含むポリヌクレオチド；および／または

(v) 遍在性クロマチンオープニングエレメント (UCOE)

をさらに含み、

前記エンハンサーは、E μ エンハンサーまたはSLC3A2エンハンサーであってもよく、

前記シグナル配列は、IgHVのシグナル配列またはIgHG1のシグナル配列であってもよい。

いくつかの実施形態において、第1のポリヌクレオチドは、前記座位に相同な核酸をさらに含み、前記座位に相同な該核酸は、約200～1500ヌクレオチド長の連続したヌクレオチドを含んでいてもよい。

【0131】

30

いくつかの実施形態において、第1のポリヌクレオチドはベクターに含まれる。いくつかの実施形態において、前記ベクターは、ウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、前記ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターまたはレンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、前記AAVベクターは、AAV6ベクターである。

【0132】

いくつかの実施形態において、前記細胞は哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞はヒト細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞はエクスピボの細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞はインビトロの細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は、対象から得られた自家細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は、対象と同種の細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は、前記BTCEが特異的に結合することができる内因性タンパク質の発現を欠失している。例えば、前記細胞は、BTCEに結合することができるリガンドを欠失するように改変することができる。このような実施形態のいくつかは、前記細胞へのBTCEの結合を抑制または阻止することにより、該細胞の殺傷を抑制するのに有用であってもよい。

40

【0133】

特定の組成物およびシステム

本明細書において提供される方法および組成物のいくつかの実施形態は、BTCEを発現するように細胞を改変するシステムに関する。このような実施形態のいくつかは、

(a) 細胞のゲノム座位に発現カセットを挿入することができるヌクレアーゼまたは該

50

ヌクレアーゼをコードする核酸；および

(b) 二重特異性 T 細胞エンゲージャー (BTCE) をコードする発現カセットを含む相同組換え修復 (HDR) 用鋳型をコードする第 1 のポリヌクレオチドを含む。

【0134】

いくつかの実施形態は、前記細胞をさらに含み、該細胞は B 細胞または前駆 B 細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は、造血幹細胞、ヒト胚性幹細胞、人工多能性幹細胞 (iPSC)、ナイーブ B 細胞、メモリー B 細胞、形質芽球および形質細胞から選択される。

【0135】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレアーゼは Cas ヌクレアーゼであり、該ヌクレアーゼは、Cas9 ヌクレアーゼであってもよい。いくつかの実施形態は、ガイド RNA (gRNA) をコードする第 2 のポリヌクレオチドをさらに含む。いくつかの実施形態において、第 2 のポリヌクレオチドは、配列番号 1~27 のいずれか 1 つに示されるヌクレオチド配列に対応する DNA 配列または RNA 配列を含む。

【0136】

いくつかの実施形態において、前記座位は、B 細胞以外の細胞と比較して B 細胞に高発現される内因性遺伝子を含む。いくつかの実施形態において、前記座位は、B 細胞において不活性な内因性遺伝子を含む。いくつかの実施形態において、前記座位は、CCR5 遺伝子、JCHAIN 遺伝子、IGHM 座位 (E-mu; hg38 ゲノム; chr14:105856225-105863200 としても知られている)、CD19 遺伝子および IGHG1 遺伝子から選択される。

【0137】

いくつかの実施形態において、前記 BTCE は、T 細胞抗原に特異的に結合することができる第 1 のポリペプチドと、腫瘍抗原に特異的に結合することができる第 2 のポリペプチドとを含む。いくつかの実施形態において、前記 T 細胞抗原は CD3 である。いくつかの実施形態において、前記腫瘍抗原は、CD33、CD19、CD326 (EpCAM)、神経-グリア細胞抗原 2 (NG2)、HER2、上皮成長因子受容体 (EGFR)、CD66e、エフリン A 型受容体 2 (EphA2)、CD21、FLT3、gp100、PDL1 および CD22 から選択される。いくつかの実施形態において、前記 BTCE は、AMG 330、プリナツモマブ、solitomab または テベンタフスブ である。

【0138】

いくつかの実施形態において、前記発現カセットは、前記 BTCE をコードする核酸に作動可能に連結されたプロモーターをさらに含む。いくつかの実施形態において、前記プロモーターは、構成的プロモーターである。いくつかの実施形態において、前記プロモーターは誘導型プロモーターである。いくつかの実施形態において、前記プロモーターは、MND プロモーター、IgVH プロモーター、EF-1 α プロモーターまたは IgHG1 プロモーターである。

いくつかの実施形態において、前記発現カセットは、

(i) エンハンサー；

(ii) シグナル配列をコードするポリヌクレオチド；

(iii) IGHV 遺伝子もしくは IGHG1 遺伝子に由来する 5' UTR を含むポリヌクレオチド；

(iv) IGHV 遺伝子もしくは IGHG1 遺伝子に由来する 3' UTR を含むポリヌクレオチド；および／または

(v) 遍在性クロマチンオープニングエレメント (UCOE)

をさらに含み、

前記エンハンサーは、E μ エンハンサーまたは SLC3A2 エンハンサーであってもよく、

前記シグナル配列は、IgHV のシグナル配列または IgHG1 のシグナル配列であってもよい。

【0139】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、第1のポリヌクレオチドは、前記座位に相同な核酸をさらに含み、前記座位に相同な該核酸は、約200～1500ヌクレオチド長の連続したヌクレオチドを含んでいてもよい。

【0140】

いくつかの実施形態において、第1のポリヌクレオチドはベクターに含まれる。いくつかの実施形態において、前記ベクターは、ウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、前記ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターまたはレンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、前記AAVベクターは、AAV6ベクターである。

【0141】

いくつかの実施形態において、前記細胞は哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞はヒト細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞はエクスピボの細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は、対象から得られた自家細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は、対象と同種の細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は、前記BTCEが特異的に結合することができる内因性タンパク質の発現を欠失している。

【0142】

本明細書において提供される方法および組成物のいくつかの実施形態は、本明細書において提供される方法のいずれか1つにより調製された細胞を含む。

【0143】

本明細書において提供される方法および組成物のいくつかの実施形態は、BTCEを発現するようにゲノム座位が遺伝子改変された細胞を含む。いくつかの実施形態において、前記細胞は、B細胞または前駆B細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は、造血幹細胞、ヒト胚性幹細胞、人工多能性幹細胞（iPSC）、ナイーブB細胞、メモリーB細胞、形質芽球および形質細胞から選択される。

【0144】

いくつかの実施形態において、前記座位は、B細胞以外の細胞と比較してB細胞に高発現される内因性遺伝子を含む。いくつかの実施形態において、前記座位は、B細胞において不活性な内因性遺伝子を含む。いくつかの実施形態において、前記座位は、CCR5遺伝子、JCHAIN遺伝子、IGHM座位（E-mu；hg38ゲノム；chr14：105856225-105863200としても知られている）、CD19遺伝子およびIGHG1遺伝子から選択される。

【0145】

いくつかの実施形態において、前記BTCEは、T細胞抗原に特異的に結合することができる第1のポリペプチドと、腫瘍抗原に特異的に結合することができる第2のポリペプチドとを含む。いくつかの実施形態において、前記T細胞抗原はCD3である。いくつかの実施形態において、前記腫瘍抗原は、CD33、CD19、CD326（EpCAM）、神経グリア細胞抗原2（NG2）、HER2、上皮成長因子受容体（EGFR）、CD66e、エフリンA型受容体2（EphA2）、CD21、FLT3、gp100、PDL1およびCD22から選択される。いくつかの実施形態において、前記BTCEは、AMG 330、ブリナツモマブ、solitomabまたはテベンタフスブである。

【0146】

いくつかの実施形態において、前記ゲノム座位は、前記BTCEをコードする第1の核酸を含む発現カセットを挿入することにより改変される。いくつかの実施形態において、第1の核酸は、前記座位の内因性プロモーターに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態において、前記発現カセットは、第1の核酸に作動可能に連結されたプロモーターをさらに含む。いくつかの実施形態において、前記プロモーターは構成的プロモーターである。いくつかの実施形態において、前記プロモーターは誘導型プロモーターである。いくつかの実施形態において、前記プロモーターは、MNDプロモーター、IgVHプロモーター、EF-1αプロモーターまたはIgHG1プロモーターである。

いくつかの実施形態において、前記発現カセットは、

10

20

30

40

50

- (i) エンハンサー；
- (ii) シグナル配列をコードするポリヌクレオチド；
- (iii) IGHV遺伝子もしくはIGHG1遺伝子に由来する5' UTRを含むポリヌクレオチド；

(iv) IGHV遺伝子もしくはIGHG1遺伝子に由来する3' UTRを含むポリヌクレオチド；および／または

- (v) 遍在性クロマチンオープニングエレメント (UCOE)

をさらに含み、

前記エンハンサーは、E μ エンハンサーまたはSLC3A2エンハンサーであってもよく、前記シグナル配列は、IgHVのシグナル配列またはIgHG1のシグナル配列であってもよい。

10

【0147】

いくつかの実施形態において、前記細胞は哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞はヒト細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞はエクスピボの細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は、対象から得られた自家細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は、対象と同種の細胞である。

【0148】

いくつかの実施形態は、本明細書において提供される細胞のいずれか1つと、薬学的に許容される添加剤とを含む医薬組成物を含む。いくつかの実施形態において、前記医薬組成物は、養子細胞移入としての投与用に構成されている。いくつかの実施形態において、前記医薬組成物は、固形腫瘍などへのがん部位での注射による投与用に構成されている。

20

【0149】

特定の治療方法

本明細書において提供される方法および組成物のいくつかの実施形態は、対象において障害を治療、緩和または抑制する方法を含む。いくつかの実施形態において、前記対象は哺乳動物である。いくつかの実施形態において、前記対象はヒトである。

【0150】

そのような実施形態のいくつかは、BTCEを発現する細胞を対象に投与する工程を含む。いくつかの実施形態において、前記細胞は、BTCEを発現するように遺伝子改変された細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は、B細胞または前駆B細胞である。いくつかの実施形態において、前記B細胞または前記前駆B細胞は、造血幹細胞、ヒト胚性幹細胞、人工多能性幹細胞 (iPSC)、ナイーブB細胞、メモリーB細胞、形質芽球または形質細胞である。このような実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は、初代B細胞または初代前駆B細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞はヒト細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は、対象から得られた自家細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は、対象と同種の細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は、本明細書において提供される方法のいずれか1つによって調製される。いくつかの実施形態において、前記細胞は、前記BTCEが特異的に結合することができる内因性タンパク質の発現を欠失している。

30

40

【0151】

いくつかの実施形態において、前記BTCEは、T細胞抗原に特異的に結合することができる第1のポリペプチドと、腫瘍抗原に特異的に結合することができる第2のポリペプチドとを含む。いくつかの実施形態において、前記T細胞抗原はCD3である。いくつかの実施形態において、前記腫瘍抗原は、CD33、CD19、CD326 (EpCAM)、神経グリア細胞抗原2 (NG2)、HER2、上皮成長因子受容体 (EGFR)、CD66e、エフリンA型受容体2 (EphA2)、CD21、FLT3、gp100、PDL1およびCD22から選択される。いくつかの実施形態において、前記BTCEは、AMG 330、ブリナツモマブ、solitomabまたはテベントフスブである。

【0152】

50

いくつかの実施形態において、前記疾患は、がんまたは炎症性疾患である。いくつかの実施形態において、前記がんは、固形腫瘍または白血病である。いくつかの実施形態において、前記がんは、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、眼がん、乳がん、胃がん、悪性黒色腫、大腸がん、結腸直腸がん、頭頸部がん、胃がん、前立腺がん、卵巣がん、肺がん、または膵臓がんである。

【0153】

いくつかの実施形態において、前記がんは腫瘍抗原を含む。いくつかの実施形態において、前記腫瘍抗原は、CD33、CD19、CD326（EpCAM）、神経グリア細胞抗原2（NG2）、HER2、上皮成長因子受容体（EGFR）、CD66e、エフリンA型受容体2（EphA2）、CD21、FLT3、gp100、PDL1またはCD22である。

10

【0154】

いくつかの実施形態において、前記腫瘍抗原はCD33であり、前記BTCEはAMG 330である。このような実施形態のいくつかにおいて、前記がんは、CD33+腫瘍細胞を含む。このような実施形態のいくつかにおいて、前記がんは急性骨髄性白血病（AML）であり、例えば、再発性／難治性AMLである。

【0155】

いくつかの実施形態において、前記腫瘍抗原はCD19であり、前記BTCEはブリナツモマブである。このような実施形態のいくつかにおいて、前記がんは、CD19+腫瘍細胞を含む。このような実施形態のいくつかにおいて、前記がんは急性リンパ芽球性白血病（ALL）であり、例えば、再発性／難治性ALLである。

20

【0156】

いくつかの実施形態において、前記腫瘍抗原はCD326（EpCAM）であり、前記BTCEはsolitomabである。このような実施形態のいくつかにおいて、前記がんはCD326+腫瘍細胞を含む。このような実施形態のいくつかにおいて、前記がんは消化器がんまたは肺がんである。

【0157】

いくつかの実施形態において、前記腫瘍抗原はgp100/HLA-A*02:01複合体であり、前記BTCEはテベンタフスプである。このような実施形態のいくつかにおいて、前記がんは、gp100/HLA-A*02:01複合体が陽性の腫瘍細胞を含む。このような実施形態のいくつかにおいて、前記がんは眼がんであり、例えば、ぶどう膜悪性黒色腫である。

30

【0158】

BTCEは、その種類によっては、対象において急速に排除されることから、対象におけるBTCEの半減期は短くなることがある。BTCEは、従来、その治療濃度を維持するため、長期間の複数回投与および／または持続静脈内点滴によって対象に投与されている（例えば、Zhu M, et al., (2016) Clin Pharmacokinet. 55:1271-88；およびSingh K, et al., (2021) Journal for ImmunoTherapy of Cancer 9:e003679, doi: 10.1136/jitc-2021-003679を参照されたい）。先行技術による方法とは異なり、本明細書において提供される治療方法は、BTCEを発現する細胞を、低減された投与回数または制限された投与回数で対象に投与することを含む。例えば、BTCEを発現する細胞を、1回、2回以下、3回以下、4回以下、または5回以下の回数で対象に投与することができる。いくつかの実施形態において、BTCEを発現する細胞を単回投与で対象に投与することができる。いくつかの実施形態において、その治療濃度を維持するために持続静脈内点滴が行われる先行技術による方法とは異なり、BTCEを発現する細胞は短期間で投与される。例えば、BTCEを発現する細胞は、1時間未満、30分未満、20分未満、10分未満または5分未満で投与することができる。

40

【0159】

本明細書において提供される方法および組成物の特定の実施形態において有用な、Eμ遺伝子、IGHG1遺伝子、CCR5遺伝子、JCHAIN遺伝子、CD19遺伝子などの遺伝子用のsgRNAのヌクレオチド配列の例を以下の表1に挙げる。

50

【表 1】

配列番号	核酸／特徴	ヌクレオチド配列
配列番号 1	Emu_sgRNA	GTCTCAGGAGCGGTGTCTGT
配列番号 2	IGHG1_sgRNA_1; エクソン 2 (RJ178))	TGAGTTTTGTCACAAGATTT
配列番号 3	IGHG1_sgRNA_2; エクソン 2 (RJ180)	GTGAGTTTTGTCACAAGATT
配列番号 4	IGHG1_sgRNA_3; エクソン 2 (RJ176)	CACACATGCCCACCGTGCCC
配列番号 5	IGHG1_sgRNA_4; エクソン 3 (RJ182)	CACCACGCATGTGACCTCAG
配列番号 6	IGHG1_sgRNA_5; エクソン 3 (RJ183)	CCACCACGCATGTGACCTCA
配列番号 7	IGHG1_sgRNA_6; エクソン 3 (RJ185)	AGGACACCCTCATGATCTCC
配列番号 8	IGHG1_sgRNA_7; エクソン 3 (RJ186)	GGAAGACTGACGGTCCCCC
配列番号 9	IGHG1_sgRNA_8; エクソン 3 (RJ200)	ATGGTTTTCTCGATGGGGGC
配列番号 10	IGHG1_sgRNA_9; エクソン 3 (RJ201)	GAGCAGTACAACAGCACGTA
配列番号 11	IGHG1_sgRNA_10; エクソン 1 (RJ173)	GCTCTTGGAGGAGGGTGCCA
配列番号 12	IGHG1_sgRNA_11; エクソン 1 (RJ174)	GTGCCAGGGGAAGACCGAT
配列番号 13	IGHG1_sgRNA_12; エクソン 4 (RJ191)	GTGCAGAGCCTCATGCATCA
配列番号 14	IGHG1_sgRNA_13; エクソン 4 (RJ192)	CTCATGCTCCGTGATGCATG
配列番号 15	IGHG1_sgRNA_14; エクソン 4 (RJ193)	TCACCGTGACAAGAGCAGG
配列番号 16	IGHG1_sgRNA_15; エクソン 4 (RJ194)	TTTGGAGATGGTTTTCTCGA
配列番号 17	IGHG1_sgRNA_16; エクソン 4 (RJ195)	AGCCTGACCTGCCTGGTCAA
配列番号 18	IGHG1_sgRNA_17; エクソン 4 (RJ196)	GGTCAGGCTGACCTGGTTCT
配列番号 19	IGHG1_sgRNA_18; エクソン 4 (RJ197)	GTACACCCTGCCCCCATCCC
配列番号 20	IGHG1_sgRNA_19; エクソン 4 (RJ198)	CCAGGCAGGTCAGGCTGACC
配列番号 21	IGHG1_sgRNA_20; エクソン 4 (RJ199)	GGGGGCAGGGTGTACACCTG
配列番号 22	CCR5_sgRNA; (RJ69)	CAATGTGTCAACTCTTGACA
配列番号 23	JCHAIN_sgRNA; (RJ94)	AAGAACCATTTGCTTTTCTG
配列番号 24	CD19_sgRNA_1; (RJ255)	CCTCGGGCCTGACTTCCATG
配列番号 25	CD19_sgRNA_2; RJ253	CCTCGGGCCTGACTTCCATG
配列番号 26	CD19_sgRNA_3; RJ254	GGAACCTCTAGTGGTGAAGG
配列番号 27	CD19_sgRNA_4; RJ256	TTCACCACTAGAGGTTCTC
配列番号 28	IGHG1_sgRNA_10; エクソン 1 (sgYH_02)	TTGTCCACCTTGGTGTTGCT

10

20

30

40

【 0 1 6 0 】

本明細書において提供される方法および組成物の特定の実施形態において有用な、特定の HDR 鑄型と組み合わせて使用される特定の座位用の相同アームのヌクレオチド配列の例を以下の表 2 に挙げる。

【表 2】

配列番号	核酸／特徴	ヌクレオチド配列
配列番号 29	Emu_HA_L; Emu_sgRNA の左アーム	TGTGACGCCCCGAGACAGAAGGTCTCTGGGTGGCTGGGTTT TTGTGGGGTGAGGATGGACATTCTGCCATTGTGATTACTACTA CTACTACTACATGGACGTCTGGGGCAAAGGGACCACGGTCAC CGTCTCCTCAGGTAAGAATGGCCACTCTAGGGCCTTTGTTTT CTGCTACTGCCTGTGGGGTTTCCTGAGCATTGCAGGTTGGTC CTCGGGGCATGTTCCGAGGGGACCTGGGCGGACTGGCCAG GAGGGGATGGGCACTGGGGTGCCTTGAGGATCTGGGAGCCT CTGTGGATTTCCGATGCCTTTGGAAAATGGGACTCAGGTTG GGTGCCTCTGATGGAGTAACTGAGCCTGGGGGCTTGGGGAG CCACATTTGGACGAGATGCCTGAACAAACCAGGGGTCTTAGT GATGGCTGAGGAATGTGTCTCAGGAGCGGTGTCT
配列番号 30	Emu_HA_R; Emu_sgRNA の右アーム	GTAGGACTGCAAGATCGCTGCACAGCAGCGAATCGTGAAATA TTTTCTTTAGAATTATGAGGTGCGCTGTGTGTCAACCTGCATC TTAAATTCCTTTATTGGCTGGAAAGAGAACTGTCGGAGTGGGTG AATCCAGCCAGGAGGGACGCGTAGCCCCGGTCTTGATGAGA GCAGGGTTGGGGGCAGGGGTAGCCCAGAAACGGTGGCTGC CGTCCTGACAGGGGCTTAGGGAGGCTCCAGGACCTCAGTGC CTTGAAGCTGGTTTCCATGAGAAAAGGATTGTTTATCTTAGGA GGCATGCTTACTGTTAAAAGACAGGATATGTTTGAAGTGGCTT CTGAGAAAAATGGTTAAGAAAATTATGACTTAAAAATGTGAGAG ATTTTCAAGTATATTAATTTTTTTAACTGTCCAAGTATTTGAAATT CTTATCATTTGATTAACACCCATG
配列番号 31	CCR5_HA_L; RJ69 の 左アーム	TCAAGTGTCAAGTCCAATCTATGACATCAATTATTATACATCGG AGCCCTGCCAAAAAATCAATGTGAAGCAAATCGCAGCCCGCC TCCTGCCTCCGCTCTACTCACTGGTGTTTCATCTTTGGTTTTGT GGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTGATAAACTGCAAAAG GCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTCAACCTGGCCAT CTCTGACCTGTTTTTCTTCTTACTGTCCCCTTCTGGGCTCAC TATGCTGCCGCCAGTGGGACTTTGGAAATACAATGTGTCAA C
配列番号 32	CCR5_HA_R; RJ69 の 右アーム	CTCTATTTTATAGGCTTCTTCTCTGGAATCTTCTTCATCATCCTC CTGACAATCGATAGGTACCTGGCTGTGCTCCATGCTGTGTTTG CTTTAAAAGCCAGGACGGTCACCTTTGGGGTGGTGACAAGTG TGATCACTTGGGTGGTGGCTGTGTTTGCCTCTCTCCCAGGAA TCATCTTTACCAGATCTCAAAAAGAAGGTCTTCATTACACCTG CAGCTCTCATTTTCCATACAGTCAGTATCAATTCTGGAAGAATT TCCAGACATTAAAGATAGTCATCTTGGGGCTGGTCCTGCCG
配列番号 33	IGHG1_HA_L; RJ178 (TH26) の左アーム	TGGGCTCTGCAGAGAGAAGATTGGGAGTACTGGAATCTGGG AGGAGAGAAGGTGTCCGAGCTGAGGGAGTGGAGAGTTTGGC CTTTGGGGTGGGCTTAGGTCAGGGGCAGGGTCCTCCCGGAT

10

20

30

40

50

配列番号	核酸／特徴	ヌクレオチド配列
		ATGGCTCTTGGCAGGTCTGAGCCCAGCACCTGCCCCCTTTGTG TGCAGGGCCTGGGTTAGGGGCACCTAGCCTGTGCCTGCCCA GAGCCTGGGGAAAAAGCCAGAAGACCCTCTCCCTGAGCATG AGTGGGGCGGGCAGAGGCCTCCGGGTGAAGAGGCAGACGG GGCCTGCCT
配列番号 34	IGHG1_HA_R; RJ178 (TH26) の右アーム	ATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGGTAA GCCAGCCCAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGG TGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGG GTGCTGACACGTCCACCTCCATCTCTTCCTCAGCACCTGAAC TCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCA AGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCG TGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC AACTGGTACG
配列番号 35	JCHAIN_HA_L; RJ94 の 左アーム	TTTATATAGTGTAATGCAAAATAAAAAATGATTGTATCAAATTATG GTTTTATTTGGATGCTTTGCAAGAAAATACTTAAATGTGAGTC ATACATTTTTCCAGTTCAGCATTAACTTCAGACTTCAACCAC AGTTGTGATTGTTTTAGTTTGTAGCTGCCTGGAGTGTTATTT TAAGAAAGCAGAAGCACCATCATTTGCACACTCCTTATAGATC ACACACCTTAACCCTGACTTTTTTTGCTCCAGTTTTTCAGAAG AAGTGAAGTCAAGATGAAGAACCATTTGCTTTT
配列番号 36	JCHAIN_HA_R; RJ94 の 右アーム	AGTCCTGGCGGTTTTTATTAAGGCTGTTCATGTGAAAGGTATG TGATATTTAGAAAATGATCCCAGATCAAAGGAAAAATATAGGAC AGATCTGTTTTTCAGTTTTAAACATTTATGCCTATGCTTTGGTT GGCCAGTTAGCCAGCTACTTTTTCTAACATGCTTTCATCTTTC TATGGCAGTTGTCTTTACATAGATAAGACTCTTTTTATTCTTTT TCTCTTATCTTACTTACTTGTTTGCCTACTACAAACTAGAGAATA AGAAATTAGCTAACTACAGATAGTCCTGC
配列番号 37	CD19_HA_L; RJ255 の 左アーム	CAAATAAACACACAAGATCATTTCCCGTGGTAGTGAGAGCTGG GATGAAAATAAAACAGCGTGGCAGGGAGGAGGCAAGTGTTGT GAGTCTGGAGGGTTCTTGAGAATGGGGCCTGAGGCGTGAC CACCGCCTTCTCTCTGGGGGGACTGCCTGCCGCCCCCGCA GACACCCATGGTTGAGTGCCCTCCAGGCCCTGCCTGCCCC AGCATCCCCGCGCGAAGCTGGGTGCCCCGGAGAGTCTGAC CACCATGCCACCTCCTCGCCTCCTCTTCTCCTCCTCTTCCTC ACCCCATCGAACAGAGAAACAGGAGAATATGGGCCAAACAG GATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAG AACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCT
配列番号 38	CD19_HA_R; RJ255 の 右アーム	GGAAGTCAGGCCCCGAGGAACCTCTAGTGGTGAAGGTGGAAG GTATGTCCAAAGGGCAGAAAGGGAAGGGATTGAGGCTGGAA ACTTGAGTTGTGGCTGGGTGTCCTTGGCTGAGTAACTTACCC TCTCTGAGCCTCCATTTCTTATTTGTAATAATCAGGAAAGGGT

10

20

30

40

50

配列番号	核酸／特徴	ヌクレオチド配列
		TGGAAGGACTCTGCCGGCTCCTCCACTCCCAGCTTTTGGAGT CCTCTGCTCTATAACCTGGTGTGAGGAGTCGGGGGGGCTTGG AGGTCCCCCCCACCCATGCCACACCTCTCTCCCTCTCTCTC CACAGAGGGA
配列番号 39	IGHG1_HA_L; TH16 の 左アーム	GCATGAGCCGTCCCTGAGGTGGCACCGATGGCCAGAGCTGA GGCCAAGCTAGAGGCCCTGGACTGTGCTGACTCCCGGCAGA CACAGAGCGCTGACCTGGCTGCCGAGCCCCGCCTCCTAGGC TGCAGGGGTGCCTGCAGAAGGGCACACAGGGCCACCGGT CCTGCAAGCTTTCTGGGGCAGGCCGGGCCTGACCTTGGCTT TGGGGCAGGGGTGGGCTAAGGTGACGCAGGTGGCGCCAG CCAGGCGCACACCCAATGCCCGTGAGCCCAGACACTGGACG CTGAACCTCGCGGACAGTTAAGAAGCCAGGGGCCTCTGCGC CCTGGGCCCAGCTCTGTCCCACACCGCGGTACATGGCACC ACCTCTCTTGACAGCTCCACCAAGGGGCCCATCG
配列番号 40	IGHG1_HA_R; TH16 の 右アーム	GGTGAAGAGGCAGACGGGGCCTGCCTTGCTGCCCTGGACT GGGGCTGCATAGCCGGGATGCGTCCAGGCAGGAGCGCTGA GCCTGGCTTCCAGCAGACACCCTCCCTCCCTGTGCTGGCCT CTCACCAACTTTCTTGTCACCTTGGTGTTGCTGGGCTTGTG ATTCACGTTGCAGATGTAGGTCTGGGTGCCCAAGCTGCTGGA GGGCACGGTCACCACGCTGCTGAGGGAGTAGAGTCCTGAGG ACTGTAGGACAGCCGGGAAGGTGTGCACGCCGCTGGTCAGG GCGCCTGAGTTCCACGACACCGTCACCGGTTGCGGGAAGTA GTCCTTGACCAGGCAGCCAGGGCTGCTGTGCCCCCAGAGG TGCTCTTGAGAGAGGGTGCCAGGGGGAAGAC
配列番号 41	IGHG1_HA_L; TH21 の 左アーム	AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC CCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGTGG GACCCGTGGGGTGCGAGGGCCACATGGACAGAGGCCGGCT CGGCCACCCCTCTGCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAACCT CTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAG CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAACA AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAAAGT
配列番号 42	IGHG1_HA_R; TH21 の 右アーム	AGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTG TCTCCGGGTAAATGAGTGCCACGGCCGGCAAGCCCCCGCTC CCCAGGCTCTCGGGGTGCGCGGAGGATGCTTGGCACGTACC CCGTGTACATACTTCCCAGGCACCCAGCATGGAAATAAAGCA CCCAGCGCTTCCCTGGGCCCCTGCGAGACTGTGATGGTTCT TTCCACGGGTCAGGCCGAGTCTGAGGCCTGAGTGGCATGAG

10

20

30

40

50

配列番号	核酸／特徴	ヌクレオチド配列
		GGAGGCAGAGTGGGTCCCCTGTCCCCACACTGGCCCAGG CTGTGCAGGTGTGCCTGGGCCGCTAGGGTGGGGCTCAGC CAGGGGCTGCCCTCGGCAGGGTGGGGGATT
配列番号 43	IGHG1_HA_L; TH22 の 左アーム	CGCACACCCAATGCCCGTGAGCCCAGACACTGGACGCTGAA CCTCGCGGACAGTTAAGAACCCAGGGGCCTCTGCGCCCTGG GCCAGCTCTGTCCCACACCGCGGTACATGGCACCACCTC TCTTGCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGG CACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCAGCCCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGT GTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCT TCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCA GCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACC TACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGT
配列番号 44	IGHG1_HA_R; TH22 の 右アーム	AATACTAAGGTGGACAAGAAAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAG GGAGGGAGGGTGTCTGCTGGAAGCCAGGCTCAGCGCTCCT GCCTGGACGCATCCCGGCTATGCAGCCCCAGTCCAGGGCAG CAAGGCAGGCCCCGTCTGCCTCTTACCCGAGGCCTCTGC CCGCCCCACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGCTTTTTT CCCAGGCTCTGGGCAGGCACAGGCTAGGTGCCCTAACCCA GGCCCTGCACACAAAGGGGCAGGTGCTGGGCTCAGACCTG CCAAGAGCCATATCCGGGAGGACCCTGCCCTGACCTAAGC CCACCCCAAAGGCCAAACTCTCCACTCCCTCAGCTCGGACA CCTTCTCTCCTCCCAGATTCCAGTAACTCCC
配列番号 45	IGHG1_HA_L; TH27 の 左アーム	CTGAGGTGGCACCGATGGCCAGAGCTGAGGCCAAGCTAGAG GCCCTGGACTGTGCTGACTCCCGGCAGACACAGAGCGCTGA CCTGGCTGCCGAGCCCCGCTCCTAGGCTGCAGGGGTGCCT GCAGAAGGGCACACAGGGCCACCGGTCCTGCAAGCTTTCT GGGGCAGGCCGGGCCTGACCTTGGCTTTGGGGCAGGGGGT GGGCTAAGGTGACGCAGGTGGCGCCAGCCAGGCGCACACC CAATGCCCCGTGAGCCCAGACACTGGACGCTGAACCTCGCGG ACAGTTAAGAACCCAGGGGCCTCTGCGCCCTGGGCCAGCT CTGTCCCACACCGCGGTACATGGCACACCTCTCTTGCAGC CTCCACCAAGGGCCCCATCG
配列番号 46	IGHG1_HA_R; TH27 の 右アーム	CACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCAGCCCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGT GTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCT TCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCA GCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACC TACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG GACAAGAAAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGG TGTCTGCTGGAAGCCAGGCTCAGCGCTCCTGCCTGGACGCA

10

20

30

40

50

配列番号	核酸／特徴	ヌクレオチド配列
		TCCCGGCTATGCAGCCCCAGTCCAGGGCAGCAAGGCAGGCC CCGTCTGCCTCTTCACCCGGAGGCCTCTGCCCCGCGGTCTA GAGCATGGCTACGTAGAT
配列番号 47	IGHG1_HA_L; TH28 の 左アーム	CCGCCTCCTAGGCTGCAGGGGTGCCTGCAGAAGGGCACCAC AGGGCCACCGGTCCTGCAAGCTTTCTGGGGCAGGCCGGGC CTGACCTTGGCTTTGGGGCAGGGGGTGGGCTAAGGTGACGC AGGTGGCGCCAGCCAGGCGCACACCCAATGCCCCTGAGCC CAGACACTGGACGCTGAACCTCGCGGACAGTTAAGAACCCA GGGGCCTCTGCGCCCTGGGCCCAGCTCTGTCCCACACCGC GGTCACATGGCACCACCTCTTTGCAGCCTCCACCAAGGGC CCATCG
配列番号 48	IGHG1_HA_R; TH28 の 右アーム	GGTGAAGAGGCAGACGGGGCCTGCCTTGCTGCCCTGGACT GGGGCTGCATAGCCGGGATGCGTCCAGGCAGGAGCGCTGA GCCTGGCTTCCAGCAGACACCCTCCCTCCCTGTGCTGGCCT CTCACCAACTTTCTTGTCCACCTTGGTGTTGCTGGGCTTGTG ATTCACGTTGCAGATGTAGGTCTGGGTGCCCAAGCTGCTGGA GGGCACGGTCACCACGCTGCTGAGGGAGTAGAGTCCTGAGG ACTGTAGGACAGCCGGGAAGGTGTGCACGCCGCTGGTCAGG GCGCCTGAGTTCCACGACACCGTCACCGGTTCTGGGGAAGTA GTCCTTGACCAGGCAGCCCAGGGCTGCTGTGCCCCCAGAGG TGCTCTTGGAGGAGGGTG

10

20

【 0 1 6 1 】

本明細書において提供される方法および組成物の特定の実施形態において有用な特定のヌクレオチド配列の例を以下の表 3 に挙げる。

30

40

50

【表 3】

配列番号	核酸／特徴	ヌクレオチド配列
配列番号 49	BTCE ブリナツモマブ	GACATTCAGCTTACGCAGAGCCCCGCGTCTCTTGCAGTGAG CCTTGGTCAACGGGCGACAATCTCTTGCAAGGCTAGTCAATC TGTA GACTATGACGGAGATT CATATTTGAACTGGTATCAGCAA ATCCCGGGCCAACCGCCTAAATTGCTCATATACGACGCATCT AACCTGGTCAGCGGGATTCCCCCGCGCTTTCCGGGTCCGG TTCCGGGACAGATTTCAACCCTGAACATCCATCCCGTCGAAAA GGTTGATGCGGCCACTTACCATTGCCAACAGTCCACTGAAGA CCCCTGGACATTCGGTGGGGGAACTAAGCTCGAAATAAAGA GTGGCGGGGGTTCCGGGGGTGGCGGGAGTGGTGGTGGCG GAAGTCAAGTCCAATTGCAGCAATCCGGTGCTGAACTCGTCC GACCCGGGTCTTCCGTAAAAATTAGCTGCAAGGCGAGCGGC TACGCTTTCTCCTCTTATTGGATGAATTGGGTAAAGCAGCGG CCAGGACAGGGACTTGAGTGGATAGGCCAAATATGGCCTGG GGATGGTGACACGAATTACAACGGTAAGTTCAAGGGGAAAAG CTACACTCACGGCGGACGAGAGTTCAAGCACGGCGTATATG CAGCTCTCATCACTCGCATCAGAAGATAGTGCAGTTTACTTCT GTGCGCGAAGAGAGACAACAACCTGTTGGGCGCTATTACTATG CGATGGACTATTGGGGCCAGGGGACTACAGTTACGGTCTCA TCTGGGGGAGGCGGAAGCGACATAAAGCTACAGCAAAGTG TGCAGAGCTTGCGCGGCCGGGTGCCTCTGTAAAGATGAGTT GCAAGACATCCGGATATACTTTCACCAGGTACACAATGCATT GGGTAAACAGAGACCCGGACAGGGGTGGAATGGATTGGT TACATAAATCCCTCCAGGGTTATACTAATACTACAATCAGAAAT TCAAAGACAAAGCAACCTTGACTACGGACAAAAGCTCAAGCA CTGCGTATATGCAACTTTCAAGCCTTACAAGCGAAGATTGAG CGGTGTA CTATTGTGCACGCTATTACGACGATCACTACTGTC TGGACTACTGGGGGCAAGGTACTACGCTGACCGTCAGCTCC GTGGAGGGGGTTCTGGTGGGAGTGGTGGAAGCGGCGGAA GTGGTGGAGTGGACGATATACAGTTGACGCAAAGCCCAGCG ATCATGTCTGCTTCTCCTGGAGAAAAGGTTACGATGACATGC AGAGCTAGTAGCTCTGTCA GTTATATGAATTGGTATCAGCAG AAAAGCGGGACGAGTCCGAAACGGTGGATATATGATACCTCC AAAGTAGCCTCTGGAGTACCGTACCGATTTTCTGGAAGCGGC TCAGGA ACTAGCTACTCCCTTACGATAAGCAGTATGGAGGCA GAAGACGCTGCCACATATTACTGTCAACAGTGGTCCAGCAAC CCCCTTACATTTGGTGCTGGTACGAAGTTGGAGTTGAAGCAT CATCATCATCACCAC
配列番号 50	BTCE AMG-330	ATGCAGGTTCAACTCGTTCAGAGTGGTGCCGAGGTTAAAAAA CCGGGGGAATCCGTCAAAGTAAGCTGCAAGGCATCCGGGT TACGTTTACGAACTACGGGATGAACTGGGTCAAGCAAGCGCC CGGGCAAGGCTTGAATGGATGGGCTGGATCAACACCTACA

10

20

30

40

50

配列番号	核酸／特徴	ヌクレオチド配列
		CAGGTGAGCCGACCTACGCTGATAAGTTCCAAGGACGAGTA ACGATGACAACGGATACGTCAACATCAACGGCCTATATGGAG ATACGAAACTTGGGTGGGGACGACACAGCAGTCTACTATTGC GCTAGGTGGAGCTGGTCTGATGGCTACTACGTATACTTCGAT TACTGGGGTCAAGGCACCTCCGTACGGTCTCTTCCGGGGG TGGGGGTTCAGGAGGAGGGGGCTCCGGGGGTGGTGGATCA GATATTGTGATGACTCAGTCCCCAGATTCAATTGACCGTCTCA CTGGGAGAACGGACTACGATAAATTGTAAATCTAGCCAAAGT GTACTTGATTCTTCAACGAATAAAAAATTCTCTTGCCTGGTACC AACAGAAACCCGGTCAACCCCCGAACTCCTCTTGTCTGGG CGTCCACACGGGAATCTGGTATCCCGGATCGGTTCAAGTGGC TCAGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTACAATCGATAGTCCC CAGCCTGAGGACTCAGCGACCTACTACTGTCAGCAGTCCGC GCACTTTCCAATTACGTTTGGCCAGGGTACGAGGCTCGAGAT CAAAAGCGGAGGTGGGGGTAGCGAGGTGCAGTTGGTGGAG TCTGGAGGCGGCCTCGTTCAACCCGGTGGGTCATTGAACTT TCATGTGCTGCGTCCGGATTTACTTTTAACAAGTACGCTATGA ATTGGGTGCGACAAGCACCGGGTAAAGGGCTGGAATGGGTG GCACGGATAAGGTCTAAATAACAATAATTATGCTACGTACTATG CAGATAGTGTAAGGATAGGTTTACAATAAGTAGGGACGATA GTAAAAATACTGCGTATCTGCAGATGAATAATTTGAAAACAGA GGATACAGCGGTCTACTACTGTGTTAGGCATGGGAATTTCCG CAATTCTTACATATCTTATTGGGCGTATTGGGGACAAGGCAC ACTTGTAAGTGTGAGTACGGTGGAGGTGGTAGCGGAGGCG GCGGGAGTGGAGGTGGGGGATCACAACGGTTGTGACTCAG GAACCAAGCCTTACAGTCTCTCCAGGAGGCACCGTAACACTG ACTTGCGGGCTCAAGTACTGGTGCCGTAAGTCTGGCAATTAT CCTAACTGGGTCCAGCAGAAACCAGGTGAGGCACCCCGGGG ACTGATAGGCGGCACAAAGTTTCTGGCACCGGGCACCCCG CACGCTTTTCTGGATCACTTCTCGGAGGCAAAGCAGCCCTCA CCTTGAGCGGCGTACAACCAGAAGACGAGGCTGAATACTATT GCGTTCTTTGGTACAGTAACCGATGGGTTTTCTGGAGGGGGTA CGAAACTCACAGTGCTTCATCACCACCATCACCAC
配列番号 51	プロモーター MND	GAACAGAGAAACAGGAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGT GGTAAGCAGTTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGTTG GAACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCA GTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAG ATGCGGTCCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATG TTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTA TTTGAACATAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTGCGCG CTTCTGCTCCCCGAGCTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTG AACCGTCAGATC

10

20

30

40

50

配列番号	核酸／特徴	ヌクレオチド配列
配列番号 52	プロモーター lgh1-69	GTAATCTTTAGGCCAATAAAATGTGGGTTACAGTGAGGAGT GCATCCTGGGGTTGGGGTTTGTCTGCAGCGGGAAGAGCGC TGTGCACAGAAAGCTTAGAAATGGGGCAAGAGATGCTTTTCC TCAGGCAGGATTTAGGGCTTGGTCTCTCAGCATCCCACACTT GTACAGCTGATGTGGCATCTGTGTTTTCTTCTCATCCTAGAT CAGGCTTTGAGCTGTGAAATACCCTGCCTCATGCATATGCAA ATAACCTGAGGTCTTCTGAGATAAATATAGATATATTGGTGCC CTGAG
配列番号 53	プロモーター minP	ACTAGAGGGTATATAATGGAAGCTCGACTTCCAGCTTGGCAA TCCGGTACTGTA
配列番号 54	エンハンサー Emu	ATGCGGGACTGCGTTTTGACCATCATAAATCAAGTTTATTTTT TTAATTAATTGAGCGAAGCTGGAAGCAGATGATGAATTAGAG TCAAGATGGCTGCATGGGGTCTCCGGCACCCACAGCAGGT GGCAGGAAGCAGGTCACCGCGAGAGTCTATTTTAGGAAGCA AAAAAACACAATTGGTAAATTTATCACTTCTGGTTGTGAAGAG GTGGTTTTGCCAGGCCAGATCTGAAAGTGCTCTACTGAGC AAACAACACCTGGACAATTTGCGTTTCTAAAATAAGGCGAG GCTGACCGAAACTGAAAAGGCTTTTTTTAACTATCTGAATTC ATTTCCAATCTT
配列番号 55	エンハンサー SLC3A2_5	GGTCCAATTCACAAGAACCAGAAGGATGATGTCGCTCAGACT GACTTGCTGCAGATCGACCCCAATTTTGGCTCCAAGGAAGAT TTTGACAGTCTCTTGCAATCGGCTAAAAAAAAGAGTGGGTAT CCTGGGGTTCCAAGGAAACAGCTAGAAAGGA
配列番号 56	エンハンサー SLC3A2_3	ACCGAGGTGGATATGAAGGAGGTGGAGCTGAATGAGTTAGA GCCCCGAGAAGCAGCCGATGAACGCGGCGTCTGGGGCGGCC ATGTCCCTGGCGGGAGCCGAGAAGAATGGTCTGGTGAAGAT CAAGGTGGCGGAAGACGAGGCGGAGGCGGCA
配列番号 57	5' UTR lgh1-69_utr	GGTGATGAGCTGTGCTCCCAGGGGCTTCTTCAGAGGAGGAA TGTGGTTGTTATGTGATGCT
配列番号 58	調節配列_シグ ナル配列 lgh1-69_エクソ ン1_イントロ ン_エクソン2	ATGGA CTGGACCTGGAGGTTCTCTTTGTGGTGGCAGCAGC TACAGGTAAGGGGCTTCCTAGTCCTAAGGCTGAGGAAGGGA TCCTGGTTTAGTTAAAGAGGATTTTATTCACCCCTGTGTCCTC TCCACAGGTGTCCAGTCC
配列番号 59	5' UTR lghv3-49_utr	AGCTCTGGGAGAGGAGCCCCAGCCGTGAGATTCCCAGGAGT TTCCA CTGGTGATCAGCACTGAACACAGACCACCAACC
配列番号 60	調節配列_シグ ナル配列	ATGGAGTTTGGGCTTAGCTGGGTTTTCTTGTGCTATTTTAA AAGGTAATTCATGGTGTACTAGAGATACTGAGTGTGAGGGGA

10

20

30

40

50

配列番号	核酸／特徴	ヌクレオチド配列
	Ighv3-49_エクソン1_イントロン_エクソン2	CATGAGTGGTAGAAACAGTGGATATGTGTGGCAGTTTCTGACCTTGGTGTCTGTGTTTGCAGGTGTCCAATGT
配列番号61	3' UTR IGHG1_utr	GTGCCACGGCCGGCAAGCCCCGCTCCCCAGGCTCTCGGGGTCGCGCGAGGATGCTTGGCACGTACCCCGTGACATACTTCCCAGGCACCCAGCATGGAATAAAGCACCCAGCGCTTCCCTGGGCCCCCTGCGA
配列番号62	SV40 ポリ A	TGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGAGATGTGGGAGGTTTTTAAAGC
配列番号63	WPRE	CCACGGAATTGTCAGTGCCCCAACAGCCGAGCCCCGTGCCAGCAGCGGGCAAGGCAGGCGGCGATGAGTTCCGCCGTGGCAAGAACTAACCAGGATTTATACAAGGAGGAGAAAATGAAAGCCATACGGGAAGCAATAGCATGATACAAAGGCATTAAAGCAGCGTATCCACATAGCGTAAAAGGAGCAACATAGTTAAGAATACCAGTCAATCTTTCACAAATTTTGTAAATCCAGAGGTTGATTATC
配列番号64	P2A	AGGGCAAAGAGGGGATCAGGAGCTACGAATTTTCTTTATTAACAACAGCAGGAGATGTTGAGGAGAATCCCGGACCG
配列番号65	レポーター GFP	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCTATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAAGTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACC CGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAATTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCA GCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA
配列番号66	シグナル ペプチド	ATGGCTACCGGCAGCAGAACAAGCCTGCTGCTCGCTTTTGGACTGCTCTGTCTCCCCTGGTTGCAAGAAGGCAGCGCC

10

20

30

40

【実施例】

【0162】

実施例1ーヒト化マウスにおいて抗がん生物学的製剤を分泌させるための形質細胞の組換え

ゲノム工学の進歩によって、治療用タンパク質を大量に分泌する形質細胞（PC）の作製が可能になった。しかし、非組換えヒト形質細胞および組換えヒト形質細胞のインビボでのモデル化は、NSGマウスなどの免疫不全マウスモデルに形質細胞を養子移入しても短期間の調査しか実施できないという大きな制限事項がある。免疫不全マウスモデルにおいてヒト形質細胞を試験することは難しく、これは、ヒトの骨髄間質細胞や骨髄系細胞に

50

より提供される重要な因子が不在であることが一因であり、例えば、種間の交差反応性が存在しないことがその理由として挙げられる。本実施例では、ヒトCD34+末梢血造血幹細胞の移植によりヒト化した免疫不全マウス（NSG-huCD34）では、ゲノム組換えヒト形質細胞の生着能が向上するという仮説を検証した。さらに、この方法は、ヒト宿主の骨髓中の常在細胞（骨髓系細胞およびリンパ球）とヒト形質細胞の間での重要な相互作用の解明に役立つと予測された。この概念と一致して、遺伝子編集した自家形質細胞は、NSG対照マウスよりもNSG-huCD34マウスにおいてより効率的に生着した。また、遺伝子編集した形質細胞は、NSG-huCD34マウスにおいて非常に高い濃度の抗体を分泌し（80日間にわたって） $100\mu\text{g/mL}$ ）、別のリンパ系コンパートメントにも生着した。さらに、ルシフェラーゼを用いたインビボでのイメージング、エクスピボでのフローサイトメトリー分析、および組織病理検査を行ったところ、遺伝子編集した形質細胞が、移入後2日以内に骨髓および脾臓に遊走して、そこに局在し、これらの部位に保持されることが明らかになった。以上をまとめると、これらのデータから、NSG-huCD34マウスにヒト自家造血細胞を移植することによって、長命の遺伝子組換えヒト形質細胞の生態をインビボで研究可能な堅牢なモデルを確立できたことが示された。

10

20

30

40

50

【0163】

NSG-huCD34マウスの特性評価として、NSGマウスとNSG-huCD34マウスから摘出した脾臓の切片のヘマトキシリン・エオシン染色（図1A）、NSG-huCD34マウスから得た脾臓からのフローサイトメトリー（図1B）、およびNSG-huCD34マウスとNSGマウスの末梢血血清中における形質細胞由来サイトカインの測定（図1C）を行った。

【0164】

インビトロでの実験タイムラインに従って、初代ヒトB細胞を遺伝子編集し、インビトロで分化させることにより、ルシフェラーゼを発現する初代形質細胞を作製した（図2A）。ルシフェラーゼベクターで編集した初代B細胞、またはベクターで編集していない初代B細胞において、相同組換え修復により編集されたアレルの頻度を測定した（図2B）。遺伝子編集の11日後に、生細胞の形質細胞染色（CD138+CD38+）（図2C）と、形質細胞のIgG染色（図2D）のフローサイトメトリー分析を行った。

【0165】

NSGマウスまたはNSG-huCD34マウスに、遺伝子編集した形質細胞（PC）またはPBS対照を投与したインビボ研究のタイムラインに従って、遺伝子編集したヒト形質細胞のNSG-huCD34マウスへの移植を行った（図3A）。バルク形質細胞を移植したNSGマウスおよびNSG-huCD34マウスの発光画像から、ffluc-PCの生着が示された（図3B）。ffluc-PCを移植したNSGマウスおよびNSG-huCD34マウスの平均輝度からは、ヒト化マウスにおいて生着と持続性の改善が示された（図3C）。ffLuc-PCを移植したNSG-huCD34マウスから摘出した脾臓の免疫組織学的検査を行った（図3D）。バルク形質細胞を移植したNSGマウスおよびNSG-huCD34マウスの血清IgG力価を測定した（図3E）。形質細胞（CD138+、CD38+、hCD45+）の細胞内IgMと細胞内IgGのフローサイトメトリープロットからは、遺伝子編集したPCを移植したマウスにおいてIgG+細胞が示された（図3F）。BFPを発現するように編集されたPCが、NSG-huCD34マウスの骨髓において検出された（図3G）。 6×10^6 個の遺伝子編集したバルク細胞または 1×10^6 個の濃縮したffLuc形質細胞を、NSGマウスおよびNSG-huCD34マウスに移植した。バルク群と濃縮群のいずれでも、骨髓においてIgG+PCの生着が示され（図3H）、同程度のIgG力価が示された（図3I）。二重特異性T細胞エンゲージャー（BiTEすなわちBTCE）を分泌する形質細胞を作製した（図4A）。この遺伝子編集したPCのフローサイトメトリー分析を行った（図4B）。T細胞とK562細胞とK652-CD19+GFP細胞を、PCから得た上清とともに培養した（図4C）。BiTE-PCまたはBFP-PCから得た上清の存在下において、T細胞の活性化（図4C）とK562-CD19+細胞の殺傷（図4D）を測定した。

【0166】

発光により少なくともPCを追跡したところ、相同組換え修復により遺伝子編集した上記のヒト自家形質細胞は、NSG-huCD34レシピエントマウスの骨髓に移動し、フローサ

イトメトリーで確認されたPCの表現型を維持していた。

【0167】

また、相同組換え修復により遺伝子編集したヒト自家形質細胞は、ヒト化マウスにおいて100日間にわたり少なくとも安定な輝度が示されことから、NSGレシピエントマウスよりもNSG-huCD34レシピエントマウスに効率的に生着した。

【0168】

形質細胞を移植したNSG-huCD34マウスでは、高力価のIgGが維持される。3匹のマウスにおいてIgG力価は50 µg/mLを超え、安定なまま100日間維持された。

【数1】

$$\text{移植した形質細胞の数} = \frac{(1 \times 10^8 \text{ pg/mL} \times 0.693 \times 2.2 \text{ mL})}{6.6 \text{ 日間} \times 100 \text{ pg/個} \cdot \text{日}} \approx 254,000 \text{ 個}$$

10

【0169】

遺伝子編集された形質細胞により、形質細胞1個あたり約62 pg/個・日の抗CD19 BiTEすなわち抗CD19 BTCEが産生されたことが観察された。

【0170】

実施例2-IGHG1座位の編集

IGHG1のエクソン1、エクソン2およびエクソン4の様々な位置を標的とするように複数のsgRNAを設計した。各sgRNAに対してAAVベースの相同組換え修復(HDR)コンストラクトを構築した。このHDRコンストラクトは、GFPLレポーター遺伝子に連結されたMNDプロモーターを含んでおり、適切な相同アームの間に配置されていた。各sgRNAの標的部位をIGHG1ゲノムの構造上にプロットしたものを図5Aに示す。各sgRNAと各修復鋳型の相同アームの配列を以下の表4に示す。

20

【表4】

標的 部位	sgRNA	sgRNAの ヌクレオチド配列	左アームの ヌクレオチド配列	右アームの ヌクレオチド配列
TH16	sg174	配列番号 12	配列番号 39	配列番号 40
TH21	sg193	配列番号 15	配列番号 41	配列番号 42
TH22	sgYH_02	配列番号 28	配列番号 43	配列番号 44
TH26	sg178	配列番号 2	配列番号 33	配列番号 34
TH27	sg173	配列番号 11	配列番号 45	配列番号 46
TH28	sg173	配列番号 11	配列番号 47	配列番号 48

30

【0171】

米国特許公開第2018/0282692号(この文献は引用によりその全体が本明細書に明示的に援用される)に記載の方法と実質的に同様の方法を使用して、各sgRNAと各HDRコンストラクトを用いてB細胞を編集した。

【0172】

簡単に述べると、ネガティブ選択により末梢血単核細胞(PBMC)からB細胞を単離し、オリゴマー化CD40L、CpGおよびIL21を含むサイトカインカクテルを使用してB細胞を活性化した。B細胞を活性化した後、以下のように編集を行った。すなわち、各sgRNAとCas9タンパク質を含むリボ核タンパク質粒子を細胞にトランスフェクトした後、HDRコンストラクトを含むAAV6ベクターをB細胞に導入した。遺伝子編集後、細胞を活

40

50

性化培地中で5日間増殖させ、分化培地への交換を2段階で行った。フローサイトメトリ分析を行って、IGHG1のノックアウト効率を測定した。図5B（上パネル）に示すように、TH26 sgRNAを含むRNPで処理した細胞では、B細胞中のIGHG+細胞の割合が約90%減少したことが観察された。IGHG1座位においてGFPを発現するように組換えたB細胞中のGFP+細胞の割合を測定した（図5B、下パネル）。生細胞については、GFPの割合（%）と平均蛍光強度（MFI）を測定し、sgRNA/HDRコンストラクトの各セットによるHDR率を、10～15%のGFP+細胞が概して観察されたsgRNA（TH22）において観察されたHDR率に対して正規化した。正規化したGFP陽性細胞の割合を以下の表5に示す。正規化したGFPのMFI値を以下の表6に示す。

【表5】

10

対象	各標的部位を編集した際の正規化した GFP 陽性細胞の割合(%)					
	TH16	TH21	TH22	TH26	TH27	TH28
S1	0.74	1.54	1.00	1.77	0.56	0.63
S2	0.95	1.54	1.00			
S3	1.03	1.30	1.00	1.53	0.94	1.20

【表6】

20

対象	各標的部位を編集した際の正規化した GFP の MFI 値					
	TH16	TH21	TH22	TH26	TH27	TH28
S1	1.02	5.71	1.00	0.84	0.55	0.45
S2	0.86	4.80	1.00			
S3	0.93	6.05	1.00	1.03	0.75	0.67

【0173】

30

本実験では、4番目のエクソン（TH21）と2番目のエクソン（TH26）を標的とした場合に、形質導入率が高くなり、MFI値が高くなった。

【0174】

実施例3－BTCEのインビトロ発現

抗CD19 BTCE（ブリナツモマブ）をコードする発現ベクターまたは抗CD33 BTCE（AMG-330）をコードする発現ベクターを、293T細胞にトランスフェクトした。上清を回収し、ウエスタンブロット分析と質量分析によりBTCEの発現を定量した。予想されたとおり、いずれのBTCEでも、ウエスタンブロット上で50KDaのタンパク質バンドが生成され、予想された配列にマッピングされたペプチドが産生された。

40

【0175】

実施例4－Eμ座位の編集

Eμ座位にブリナツモマブ（抗CD19）またはAMG-330（抗CD33）を送達するため、AAVベースのHDR修復鋳型を構築した。

【表7】

sgRNA	ヌクレオチド配列
Eμ sgRNA	配列番号 1

50

【0176】

各BTCEの相対的な編集率を調べるため、米国特許公開第2018/0282692号（この文献は引用によりその全体が本明細書に明示的に援用される）に記載の方法と実質的に同様の上記方法を使用して、B細胞を組換えた。生きたB細胞全体に対する割合として、GFP細胞の割合とGFPのMFI値を定量した（図6B）。

【0177】

実施例5－BTCEを発現するB細胞のインビトロ活性

各BTCEの効果を分析するため、各BTCEを発現する細胞から得た上清を、エフェクターT細胞とCD33+単球とCD19+B細胞を含む自家PBMCとインキュベートした。48時間のインキュベーション後、T細胞の活性化（CD3+T細胞中のCD69+CD137+細胞）、CD33+単球の殺傷、およびCD19+B細胞の殺傷を測定することによって、各BTCEの効果を定量した（図7）。図7において、左側の棒はCD19BiTEに関し、中央の棒はCD33BiTEに関し、右の棒はGFPに関する。予想されたとおり、いずれのBTCEもT細胞の活性化を増加させた（左パネル）。さらに、AMG330を産生するB細胞から得た上清を添加してインキュベートした細胞では、CD33+細胞の減少が観察され（中央のパネルの中央の棒）、プリナツモマブを産生するB細胞から得た上清を添加してインキュベートした細胞では、CD19+細胞の減少が観察された（右パネルの左の棒）。これらのデータから、B細胞により分泌された2種類のBTCEの有効性が示された。

【0178】

実施例6－Eμ座位およびCCR5座位の編集

図8Aに示すように、各HDR鑄型をAAVベクターにクローニングした。コンストラクト1とコンストラクト2は、CCR5座位への送達用の相同アームを有していた。コンストラクト3とコンストラクト4は、Eμ座位への送達用の相同アームを有していた。コンストラクト2とコンストラクト4は、MNDプロモーターの下流に蛍光マーカー（コンストラクト2ではBFP、コンストラクト4ではGFP）を発現する陰性対照であった。コンストラクト1およびコンストラクト3は、MNDプロモーターの下流かつGFPに対してシスの位置にプリナツモマブBTCEを発現するものであった。いずれの場合も、HDRに成功すれば、蛍光レポーターが発現され、自研究室のデジタルドロップレットPCRアッセイを使用して定量が可能であると予測された。

【0179】

コンストラクト1、コンストラクト2、コンストラクト3またはコンストラクト4を用いてB細胞を組換えた。図8Bは、CCR5座位の編集に使用した各コンストラクトを示す。使用したsgRNA配列を以下の表8に示す。

【表8】

sgRNA	ヌクレオチド配列
Eμ sgRNA	配列番号 1
CCR5 sgRNA	配列番号 22

【0180】

B細胞を組換えた後、このB細胞を分析して、遺伝子編集の程度と蛍光レポーターの発現を調べた。蛍光レポーターの発現はFACS分析を使用して定量した。図8Cに示すように、強調表示した囲み枠は、プリナツモマブの非存在下での蛍光レポーターの発現を示す。蛍光レポーターの平均蛍光強度は、Mu座位でもCCR5座位でも同程度であった。また、図8Dに示すように、強調表示した囲み枠は、プリナツモマブの下流で発現された蛍光レポーターの発現を示す。細胞全体に対する割合および平均蛍光強度として検出したGFPは、CCR5座位への遺伝子編集送達よりもEμ座位への遺伝子編集送達において大幅に高くなった。

【0181】

別の検討において、B細胞を単離し、CCR5座位に各コンストラクトを送達した場合の、ブリナツモマブ（抗CD19 BTCE）を発現するように編集したB細胞と、AMG-330（抗CD33 BTCE）を発現するように編集したB細胞と、BFPを発現するように編集したB細胞を比較した。先に述べた検討と同様に、BFP陽性細胞の割合とBFPの平均蛍光強度は、各BTCEの下流で発現させたGFPよりも高くなった。この不完全な遺伝子編集が発現に起因するものであるのか、それともHDRの欠陥に起因するものであるのかを調べるため、ゲノムへの組込みの程度をデジタルドロップレットPCRで定量した。例えば、Hung, K.L. et al, (2018) Molecular Therapy, 26:456-467を参照されたい（この文献は引用によりその全体が本明細書に明示的に援用される）。

【0182】

10

図8Eに示すように、BFP鑄型によりHDRイベントが生じたアレルの頻度は、BFP+細胞を定量した割合と同程度であった（例えば、アレル頻度14.5%に対してBFP+細胞の割合は11.2%であった；平均で約1.34倍の差）。これに対して、2種類のBTCE鑄型のそれぞれによりHDRイベントが生じたアレルの頻度は、予想された程度より有意に低かった（例えば、アレル頻度8.6%に対してGFP+細胞の割合は2.79%であった；平均で約3.45倍の差）。これらのデータから、BTCE遺伝子はCCR5座位において特に効率的に発現されないことが示された。

【0183】

実施例7－発現されたブリナツモマブの定量

図9Aは、分泌されたブリナツモマブの定量に使用した方法の模式図である。このアッセイでは、BTCEまたは溶媒含有培地を、T細胞と、BFPを発現するがCD19は発現しない参照細胞株（K562；BFP+CD19-）と、GFPとCD19を発現する標的細胞株（K562；GFP+CD19+）とともにインキュベートした。得られた混合物を一晩インキュベートした。インキュベーション後、T細胞の活性化（CD69とCD137の発現）と、T細胞による殺傷（参照細胞（BFP+）に対する標的細胞（GFP+）の比率の変化）を測定することによって、BTCEの活性を定量した。

20

【0184】

さらに、様々な濃度の組換えブリナツモマブと上記3種の細胞をインキュベーションした後に、標的細胞の殺傷を定量することによって（GFPとBFPの比較）、組換えブリナツモマブを使用した滴定曲線を作製した。FACS分析を実施した（図9B）。図9Cに示すように、ブリナツモマブの濃度を上昇させると、GFP+標的細胞の割合が減少することが示され、再現性も認められた。

30

【0185】

様々な濃度のブリナツモマブと上記3種の細胞をインキュベートした後に、T細胞の活性化を定量した。FACS分析を実施した（図9D）。図9Eに示すように、ブリナツモマブの濃度を上昇させると、CD137とCD69を共発現するCD3+T細胞の割合が増加することが示され、高い再現性も認められた。

【0186】

T細胞活性化・標的細胞殺傷アッセイを使用して上清の定量試験を行った。図9Fに示すように、B細胞の上清により誘導されたT細胞の活性化を、各試料に対してプロットした。並行した試験において、組換えブリナツモマブを用いて作製した標準曲線を使用してデータの解釈を行った。E- μ （Mu）座位へのHDR鑄型の組み込みによって、CCR5座位への組み込みよりも大幅に高い濃度のブリナツモマブが分泌された（図9G）。

40

【0187】

実施例8－CCR5座位、IGHG1座位およびE μ 座位の編集

4つの異なる座位においてGFPまたはブリナツモマブ_2A_GFPを発現させることを目的として、各HDR鑄型をAAVベクターにクローニングした（図10A）。CCR5遺伝子については、エクソンへの挿入を標的とした（図10B）。

【0188】

MNDプロモーターに連結されたGFPと相同アームを含むコンストラクト2を用いて、

50

上記の方法によりB細胞を編集した。次に、FACS分析を実施した。図10Cに示すように、GFPを発現するコンストラクト2によるグラフに示した座位へのHDRを測定した。これらのデータから、編集された細胞の割合が、CCR5座位と2つの抗体座位（IGHG1およびE- μ ）において同程度であったことが示された。さらに、各抗体座位を編集した細胞において、GFPの平均蛍光強度が増加したことも示された（図10Cのヒストグラムと、その右側に示した定量値を参照されたい）。さらに、すべての座位において編集率が同程度であったことにも注目されたい。モノクローナル抗体座位ではGFPのMFI値がわずかに増加した（過去の実験でのJCHAIN座位の結果と類似していた）。E μ 座位では2つのピークが観察される。

【0189】

MNDプロモーターに連結されたBTCEがGFPに対してシスに配置され、かつ相同アームを含むコンストラクト1またはプロモーターに連結されたGFPを含むコンストラクトを用いて、上記の方法によりB細胞を編集した。次に、FACS分析を実施した。図10Dに示すように、ブリナツモマブとGFPを発現するコンストラクト1によるグラフに示した座位へのHDRを測定した。これらのデータから、編集された細胞の割合が、2つの抗体座位（IGHG1およびE- μ ）の編集において約5倍に達したことが示された。さらに、各抗体座位を編集した細胞において、GFPの平均蛍光強度が顕著に増加したことも示された（図10Dの灰色のヒストグラムと、右側に示した定量値を参照されたい）。また、各結合剤をコードするコンストラクトのHDRは、GFPのみの場合よりも効率が低かったことにも注目されたい。HDR率は約10～15%であった。IGHG1座位において最も良好な発現が得られた。ブリナツモマブの分泌は、IGHG1座位とE μ 座位で同程度であった。JCHAIN座位でのデータ（データ示さず）は、CCR5座位でのデータとほぼ同様であった。T細胞活性化アッセイを実施して、B細胞により産生されたブリナツモマブの量を定量したところ、各抗体座位が編集された細胞において、ブリナツモマブの量が約8倍になったことが判明した。

【0190】

実施例9ーブリナツモマブを発現するB細胞におけるCD19不活性化の効果

GFPおよび／またはBTCEを発現するようにB細胞を編集した。フローサイトメトリー分析により、組換え細胞集団におけるCD19およびCD38（形質細胞マーカー）を定量した。CD19をノックアウトしても、CD19の細胞表面発現は消失せず、B細胞から形質細胞への分化にも大きな影響は認められなかった（図11AのCD38染色を参照されたい）。上清を単離し、上記と同様にして、CD19+K562細胞とCD19-K562細胞とT細胞とともにインキュベートした。B細胞の上清中でのブリナツモマブの活性を測定するため、この共培養物におけるT細胞の活性化を定量した（図11B）。CD19をノックアウトしても、編集されたB細胞によるブリナツモマブの産生に大きな影響は認められなかった。

【0191】

細胞においてCD19を不活性化することにより、CD19を共発現する組換えB細胞による同士討ちを阻止できると考えられる。

【0192】

実施例10ーブリナツモマブを発現するB細胞のインビボ活性

ブリナツモマブ（試験用）またはGFP（対照用）を発現するようにB細胞を遺伝子改変した。この改変B細胞を、ルシフェラーゼを発現するように改変したRaji細胞（CD19+B細胞リンパ腫）および自家T細胞と混合した。この細胞混合物を免疫不全マウス（NSG）の脇腹に移植した（図12A）。移植後に、IVIS装置で発光（マウスに示された青色の円形部分）を測定することによって、インビボでの腫瘍の増殖を測定した。ブリナツモマブを産生するB細胞を移植したマウスでは、CD19+腫瘍細胞が排除されたことから、BTCEを産生するB細胞のインビボでの有効性が示された（図12B）。

【0193】

別の検討において、約12週齢のNSGマウスに100万個のヒトCD34細胞を移植することによって、ヒト化免疫不全マウスを作製した。移植したヒト免疫細胞は、このマウスの

10

20

30

40

50

体内でさらに8週間かけて分化させることによって、CD34細胞から、単球、その他の骨髄系細胞、B細胞および一部のT細胞を含む様々なヒトリンパ球に分化することが認められた。宿主由来のT細胞はBTCEと相互作用して、Raji腫瘍細胞に対する細胞傷害性応答を誘導できると予想された。

【0194】

ブリナツモマブ（試験用）またはGFP（対照用）を発現するB細胞を、ルシフェラーゼを発現するRaji細胞と混合した。この細胞混合物を上記のヒト化免疫不全マウスに移植した。ブリナツモマブを分泌するB細胞を移植したマウスでは、GFPを発現するB細胞を移植したマウスと比較して、腫瘍の増殖が大幅に減少した（図12C）。

【0195】

実施例11—組換え形質細胞は二重特異性T細胞エンゲージャーを分泌し、インビボにおいて患者由来の白血病を抑制する

二重特異性T細胞エンゲージャー（BTCE）は、ヒト血液悪性腫瘍の管理用および治療用のツールとして重要である。しかし、BTCEは血清半減期が短く、腫瘍部位以外の部位に対してオンターゲット毒性を有することから、一般的には使用されていない。ゲノム工学の進歩によって、治療用タンパク質を大量に分泌するヒト形質細胞の作製が可能になった。このような組換え細胞は、ヒト化マウスモデルにおいて長期間にわたるインビボ移植が可能である。組換え形質細胞（ePC）をがん治療に臨床応用する次の段階として、ヒト形質細胞によりBTCEを発現させて、これを分泌させるための特定の実施形態を本実施例において述べる。本明細書に開示するように、抗CD19 BTCE（ブリナツモマブ）または抗CD33 BTCE（AMG 330）を発現するように組換えたヒト形質細胞は、インビトロにおいて、T細胞の活性化と、T細胞によるがん細胞株と初代ヒト細胞の直接殺傷を誘導することができた。さらに、脇腹に移植した腫瘍細胞に隣接する部位に局所送達したBTCE-ePCによって、インビボでの腫瘍の根絶が誘導された。さらに、抗CD19-BTCEを分泌するePCとT細胞を移植した免疫不全マウスでは、急性リンパ芽球性白血病患者由来のCD19⁺異種移植片のインビボでの増殖が阻止された。これらの知見から、白血病、リンパ腫およびその他のがんの治療に、耐久性のあるBTCEの局所送達システムとして、ePCを使用できることが裏付けられた。

【0196】

CRISPR Cas9を用いた相同組換え修復により組換えたヒト初代B細胞は機能性BTCEを分泌する

BTCE遺伝子発現カセットをB細胞に組み込むため、AAVベースの相同組換え修復（HDR）鑄型を改良し、この鑄型を使用して、B細胞のセーフハーバー遺伝子CCR5に導入遺伝子を送達した¹⁹。CCR5を標的とするこのHDR鑄型は、GFPに対してシスに配置された抗CD19 BTCEブリナツモマブの送達用またはBFPの送達用として設計した。既報による確立されたB細胞編集用のプロトコール¹⁹に従って、末梢血単核細胞（PBMC）から初代ヒトB細胞を単離し、サイトカインカクテルを用いて2日間培養することにより増殖させた。このサイトカインカクテルは、オリゴマー化CD40リガンド、CpG、インターロイキン2（IL-2）、IL-10およびIL-15を含み、（増殖培地中の）初代B細胞を活性化させる作用がある。次に、活性化されたB細胞に、CCR5座位内の配列を標的とするガイドRNAを含むCas9リボ核タンパク質複合体（RNP）をトランスフェクトした後、上記のAAVベクターで形質導入することにより遺伝子編集を開始させた。分析を行う前に、組換えたB細胞を増殖培地中でさらに5日間培養した（図13A、図17A）。デジタルドロッププレートPCR（ddPCR）で評価したところ、HDRによる組み込み率は、BTCEを含むベクターにおいてわずかに低くなったことが判明した（図13B、図17）。しかし、組み込み率が同程度であるにもかかわらず、蛍光レポーターを発現する細胞の割合は、BTCEを含む設計を使用して編集した細胞において大きく減少し、その結果、組み込み率に対する蛍光レポーター標識の比率が大きく低下した（図13C～13D）。

【0197】

B細胞または形質細胞に天然に発現される座位に導入遺伝子の組み込みをターゲティン

グすることにより、BTCE導入遺伝子の発現を増加させることができるという仮説を立てた。これを踏まえ、B細胞において高発現されているIGHG1座位、JCHAIN座位、および重鎖エンハンサーに近接する12 μ領域への導入遺伝子カセットの送達用に、3種のAAVベースの修復鋳型の設計をさらに追加で構築した（修復アームおよびsgRNAは既報の文献12に記載されている；すべてのベクターの全体的な模式図については図13Eを参照されたい）。すべての座位に対して同じプロモーター（ウイルスプロモーターであるMND²⁷）を使用した。これらの抗体関連座位に蛍光レポーターGFPを送達すると、CCR5座位での発現と比べて、B細胞中のGFPの割合とGFPの平均蛍光強度が様々な程度で増加したことが観察された（図17C～17D）。BTCEの組み込みはすべての座位で検出されたが、シスに配置されたGFPは、CCR5座位での発現と比べて、各抗体座位での平均蛍光強度に有意な増加が観察された（図13F～13G）。

10

【0198】

B細胞により産生される抗CD19 BTCEの機能性を調べるため、インビトロ殺傷アッセイを構築した。簡単に述べると、レンチウイルスを使用して、K562標的細胞にCD19とGFPを安定に形質導入し、K562参照細胞にはBFPを安定に形質導入した。CD19-BFP+参照細胞とCD19+GFP+標的細胞とPBMC由来CD8+T細胞の混合物を、組換え抗CD19 BTCEまたは組換え細胞由来上清とともにインキュベートした（図13H）。48時間後に、フローサイトメトリーにより、T細胞の活性化の程度（CD39+CD137+の割合）と、CD19+標的細胞の特異的溶解（BFP K562細胞に対するGFPの比率）を定量した（図18A）。組換え抗CD19 BTCEによって、T細胞の活性化とCD19特異的溶解の用量依存的な増加が誘導された（図18B）。また、抗CD19 BTCEを発現するように組換えたB細胞から得た上清によって、強力なT細胞の活性化とCD19+細胞に特異的な溶解が誘導されたが、GFPを発現するように組換えたB細胞から得た上清では、このようなT細胞の活性化やCD19+細胞の特異的な溶解は観察されなかった（図13I～13J）。T細胞活性化アッセイを用いて、組換えBTCEのデータから標準曲線を作製し、この標準曲線を使用して、組換えB細胞から上清中に高濃度の抗CD19 BTCEが産生されたことを見出した（図13K）。これらの知見から、初代ヒトB細胞を様々な座位において組換えて、機能性抗CD19 BTCEを強力に発現させることができることが示された。

20

【0199】

BTCEを発現するように組換えた形質細胞は、インビトロにおいて一般的な白血病標的抗原に対して強力な有効性を示す

30

エクスピボで分化させたヒト形質細胞が、不均質な初代ヒト細胞集団内において、抗原発現細胞を特異的な標的とするBTCEを産生できるかどうかを調べた。Eμ座位を標的とした抗CD19 BTCE（αCD19）と同様の設計を使用して、抗CD33 BTCE（αCD33）の送達用の修復鋳型をさらに追加で構築した（図14A）。HDRにより各BTCEとGFP対照をB細胞にそれぞれ導入し、既報に従って各細胞をePCに分化させた（図17A）¹⁹。遺伝子編集と分化後に、すべてのベクターとドナーの組み合わせにおいて検出可能な導入遺伝子の発現が観察された（図14B～14C）。形質細胞分化マーカーであるCD38とCD138の発現において、ドナーに依存した差異が観察されたが（図19B）、BTCEを導入しても、形質細胞への分化に影響は認められなかった（形質細胞はCD38++CD138+として定義した；図19A～19B）。以上のデータから、形質細胞は、BTCEを発現するように組換えることができることが示された。

40

【0200】

PBMC殺傷アッセイを使用して、ePCにより分泌されたBTCEの機能性を評価した。このアッセイでは、CD19を発現するB細胞亜集団とCD33を発現する骨髄系細胞亜集団を含む自家PBMCを、エフェクターCD8+T細胞と共培養した。細胞の殺傷を誘導するため、組換えBTCEまたはePC由来上清を添加した（図13D）。各BTCEを添加した48時間後に、フローサイトメトリーにより標的細胞の数とその表現型を定量した（図19D）。予想されたとおり、組換えαCD19 BTCEは、用量依存的にIgM+B細胞の減少を誘導し、組換えαCD33 BTCEは、用量依存的にCD14+CD33+単球の減少を誘導したことが判明

50

した（図19E）。一方、 α CD19-ePCから得た上清と α CD33-ePCから得た上清は、GFP-ePCから得た上清よりも高いT細胞活性化を誘導したことが判明した（図14F）。さらに、 α CD19-ePCから得られた上清は、IgM+標的B細胞を特異的に殺傷し（図14G）、 α CD33-ePCから得られた上清は、CD33+CD14+標的単球を特異的に殺傷した（図14H）。同様に、白血病殺傷アッセイにおいて、フローサイトメトリーにより、T細胞の活性化（CD8+細胞中のCD69+CD137+細胞の割合）（図14H）；NAML-6（CD19+）の頻度（図14I）；およびMOLM-14（CD33+）の頻度（図14J）を定量した。これらのデータから、BTCEを産生するePCは、インビトロにおいて、白血病標的を発現する細胞に対して特異的なT細胞標的化を誘導できることが示された。

【0201】

自律的に発現される抗原が除去されるように組換えた形質細胞では、自己標的化が阻止され、BTCEの発現が増強される

T細胞抗原を認識するように組換えたCAR T細胞は、自身が存在する細胞産物に含まれるその他のCAR T細胞を殺傷することがあり、その結果、抗がん活性が低下する^{28,29}。 α CD19-ePCはCD19を発現することから、T細胞に遭遇すると、同様に自己標的化が誘導される可能性があるという仮説を立てた（図20）。自己標的化の程度を評価するため、GFP-ePCまたは α CD19-ePCを自家T細胞とインキュベートした（図15A）。24時間後に、 α CD19-ePCの割合をフローサイトメトリーで定量した。多数のT細胞を用いてアッセイを開始すると、 α CD19-ePCの割合が減少したが、GFP-ePCの割合は減少しなかったことから（図15B、図21）、CD19に特異的な自己標的化が、BTCEを分泌するePCに影響を及ぼしている可能性が示唆された。

【0202】

CD19を除去することによって、BTCEにより誘導された自己標的化を阻止できるかどうかを調べた。CD19をノックアウトするため、CD19を標的とするRNPと μ 指向性 α CD19 BTCE編集試薬を共送達した。CD19を標的とするRNPを添加することによって、CD19+形質細胞の割合が85%を上回って減少した（図15C～15D）。CD19をノックアウトしても、インビトロにおける編集されたB細胞の形質芽球または形質細胞への分化に明らかな影響は認められなかった（図22）。これらのCD19ノックアウト α CD19-ePCをT細胞に暴露させ、アッセイ開始時のT細胞数を増加させても、GFPの割合に差は観察されなかった（図15E～15F）。これらのデータから、CD19のノックアウトにより、自己標的化による殺傷から α CD19-ePCが保護されたことが示唆された。

【0203】

CD19の自己発現に関する別の問題点として、組換え細胞から産生された α CD19 BTCEがCD19に結合することにより、組換え細胞から放出される α CD19 BTCEが少なくなると考えられるということが挙げられる。この問題点を踏まえ、CD19をノックアウトすることにより、上清中で検出される α CD19 BTCEの濃度が高くなるかどうかを調べた。CD19のノックアウトにより生じた遊離のBTCEを評価するため、K562細胞殺傷アッセイにおいて、CD19 RNPによる同時組み換えの存在下または非存在下において、BTCE ePC由来の上清を評価した（図13E）。CD19KO α CD19-ePC由来の上清では、CD19 WT α CD19-ePC由来の上清と比較して、T細胞の活性化が増強され、特異的溶解が増強され、 α CD19 BTCEの濃度が増加したことが判明した（図15G～15I）。以上の結果から、CD19をノックアウトすることによって、T細胞による自己標的化が阻止され、 α CD19 BTCE濃度が大幅に上昇することが示された。

【0204】

BTCEを発現するように組換えた形質細胞は、インビボにおいて抗腫瘍作用を発揮する

BTCEを分泌するePCがインビボで機能性を維持するのかどうかを調べるため、B細胞白血病の脇腹モデルを使用した。NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ-c (NSG) 免疫不全マウスに、CD19+ホタルルシフェラーゼRaji細胞と、自家T細胞と、GFPまたは α CD19 BTCEを発現するCD19KO ePCとを皮下注射した（図16A）。ルシフェラーゼ発現Raji細胞は、すべての群において同様に生着したことが確認された（1日目の時点、

10

20

30

40

50

図16C～16D)。後の時点において、 α CD19-ePCを投与したマウスでは、GFP-ePCを投与したマウスと比べて腫瘍量が減少した(図16B～16C)。BTCE群では、50%を上回るマウスにおいて5日以内に腫瘍の大きさを反映する発光レベルが、バックグラウンドより低下した(図16B～16C)。これらの知見から、 α CD19-ePCは、インビボにおいて強力な局所的抗腫瘍応答を促進できることが示された。

【0205】

ブリナツモマブは、化学療法後の移植までの橋渡し治療として、微小残存病変を有するB-ALL患者に処方される³⁰⁻³⁵。リンパ球除去療法を行った後にB-ALL患者において観察される状態を模擬するため、腫瘍とT細胞を送達する前にBTCE-ePCを送達するモデルを以下のように構築した。NSGマウスに、CD19KO GFP-ePCまたはCD19KO α CD19-ePCを静脈内注射した。翌日に、フィラデルフィア様B-ALL患者由来の浸潤性異種移植片モデル(NL482B; IL7Rの機能獲得変異、SH2B3欠失)から得たルシフェラーゼ発現細胞を静脈内注射した^{36,37}。さらに、B-ALL移植の翌日および3日後に、ePCと同系のエフェクターT細胞を後眼窩注射した(図16D)。GFP対照マウスにおいて発光シグナルが飽和に達するまで腫瘍の増殖をモニターした(図16E～16F)。 α CD19-ePCを投与したマウスでは、対照群と比較して腫瘍がほぼ完全に抑制され、腫瘍量が有意に減少した(図16F～16G)。また、腫瘍移植の15日後には、 α CD19-ePC処置群の末梢血は、GFP対照群と比較してT細胞の頻度が高い傾向が観察され、インビボにおいてBTCEによりT細胞の増殖が誘導されたことの一貫性が認められた(図23B)。さらに、腫瘍移入の34日後に 殺した際、 α CD19-ePC処置群では、対照群と比較して脾臓および骨髄のCD19+細胞が大幅に減少した(図23C)。BTCE-ePCは、B-ALL患者における橋渡し治療としてのブリナツモマブの臨床使用を機能的に模擬するモデルにおいて、患者由来の白血病の播種を阻止することができた。

【0206】

ePCは、治療用タンパク質の送達用のモダリティとして近年注目を集めている。本明細書では、BTCEを産生させるためのePCの使用を開示している。HDRを利用することによって、初代ヒトB細胞の活性な複数の座位において複数のBTCEを高発現させることができた。BTCEを発現するように組換えたB細胞は、CD19またはCD33を発現する初代ヒト細胞の殺傷を媒介する形質細胞に分化誘導できることが示された。標的抗原であるCD19をノックアウトすることによって、ePCによる α CD19 BTCEの分泌が増強され、自己標的化が阻止された。さらに、BTCE ePCは、移植したリンパ腫細胞株と、B-ALL患者におけるBTCE治療を反映する患者由来の播種性白血病異種移植片モデルとに対して、T細胞依存性の強力な抗腫瘍応答を誘導できることが示された。

【0207】

B-ALL患者の標準治療では、最初にリンパ球除去化学療法を実施し、その後、不応性疾患のリスクが高い患者にはコンソリデーション治療と移植が行われる³⁸。リンパ球除去療法では循環B細胞が除去されるが、遺伝性のリスク因子と組み合わせさせて、残ったB細胞^{39,40}やePC産物の形質転換を加速させる別の遺伝的異常が導入される恐れがある。B-ALLレシピエントに対する別の安全性の懸念として、リンパ球除去療法の実施後に、EBV反応性T細胞が除去される可能性があり、その結果、残存するレシピエントB細胞またはePC産物からのEBV誘発性リンパ増殖症が発症するリスクが増加する恐れがある⁴¹。このような理由から、B-ALLの治療に有用な α CD19-ePC産物は、EBV陰性の同種ドナーから得た細胞から作製することができる。この安全性の懸念を軽減することに加えて、同種ドナーの使用には、以下の2つの重要な利点がある。第1の利点として、複数のレシピエントでの使用を目的として、製造性に基づいて同種ドナーを優先することにより、過酷な治療に晒されたB-ALL患者に対して、その他の細胞療法モダリティにおいて見られるような製造に関する懸念を克服することができる可能性がある⁴²。第2の利点として、造血幹細胞移植への橋渡し治療としての同種のBTCE細胞産物は、骨髄移植片に由来する同種T細胞^{43,44}を利用することにより、宿主による排除に関して安全性の利点を確保できる可能性がある。

10

20

30

40

50

【0208】

白血病、リンパ腫または骨髄腫の治療にePCを使用する際に生じうる障壁として、臨床的に利用可能な生物学的製剤の多くが標的とする細胞表面マーカー（例えば、CD19、CD20、CD38およびBCMA）の発現がePC¹⁸に保持されていることから、ePCの自己標的化が起こりうる事が挙げられる。実際に、本明細書において開示したデータでは、T細胞の存在下で培養した場合に、CD19+のαCD19-ePCが排除されたことが示された。CD19は形質細胞の機能にとって重要ではなく^{48,49}、長命の形質細胞ではCD19はダウンレギュレートされることから^{48,50,51}、CD19のノックアウトとαCD19 BTCEの発現を同時に行うという本明細書に開示した組換え方法は、組換えにより得られるePCの機能や寿命に負の影響を与えないと考えられる。一方で、有用なePC産物では、腫瘍原性のEμ転座を回避するため⁵²⁻⁵⁵、CD19座位においてαCD19 BTCEを発現させるための単一の編集により組換えが行われる可能性が高いと考えられる。ePCは、B細胞に発現される数種類の腫瘍標的をBTCEまたはモノクローナル抗体により標的化できるように組換えることができる。CD19のノックアウトや除去と同様に、リンパ腫や骨髄腫の標的であるMS4A1（CD20としても知られている）⁵⁶⁻⁵⁹やCD38^{60,61}を形質細胞においてノックアウトまたは除去しても、形質細胞により分泌される抗体の力価の長期耐久性、それに付随する抗体の長期寿命、および形質細胞の分泌能力には大きな影響は生じない。一方で、マウスにおいてTNFRSF17（BCMAとしても知られている）をノックアウトすると、形質細胞の生存率が低下し、抗体産生応答が消失することから⁶²、TNFRSF17のノックアウトは、恐らくはePC産物の寿命および／または機能を妨げると考えられる。したがって、B細胞上に発現される受容体を標的とする生物学的製剤を発現するePCの組換えは実現可能であると考えられ、慢性リンパ球性リンパ腫（CD20；グロフィタマブ⁶³）、非ホジキンリンパ腫（CD20；リツキシマブ⁶⁴、オドロネクスタマブ⁶⁵、モスネツズマブ⁶⁶）および多発性骨髄腫（CD38；ダラツムマブ⁶⁷、Bi38⁶⁸）での使用におけるBTCE用またはモノクローナル抗体用のePCの作製も可能であると考えられる。

【0209】

生物学的製剤の送達にePCを使用することの主な利点は、高用量の生物学的製剤の全身送達により健康な組織において生じるオンターゲットな薬物効果が軽減されることにある。ePCは骨髄中に局在することができ¹⁸、骨髄に局在するB-ALL細胞を機能的に排除することができるが²⁶、その他の種類の液性がん、さらには固形腫瘍においても、ePCを局所送達できると考えられる。B-ALL以外にも、いくつかの形態のB細胞リンパ腫^{69,70}および骨髄性白血病⁷¹は、インビボにおいてePCが生着する^{18,72}骨髄やその他のリンパ組織（脾臓、リンパ節）に病原巣を有する。CD33標的化剤やCD123標的化剤⁷³⁻⁷⁵などの、正常細胞に対するオンターゲット効果が詳しく説明されている急性骨髄性白血病用のBTCEに関して、形質細胞の組織局在性は、BTCEの局所送達に特に有用であると考えられる。さらに、形質細胞は、一般に、肺上皮や腸上皮⁷⁶、さらには固形腫瘍⁷⁷⁻⁸⁰などのその他の組織にも常在することが知られている。実際に、乳児期に産生されたドナー特異的かつ微生物叢特異的IgAを固形臓器移植レシピエントにおいて追跡したところ、抗体産生する形質細胞が腸内で数十年間にわたり生存することが示されており^{81,82}、このことから、粘膜部位の固形腫瘍に送達されたePCは、同程度の寿命で生存可能であることが示唆される。固形腫瘍用に初めて承認されたBTCE様の生物学的製剤であるテベントアプスブの半減期は7.5時間しかなく、血管新生が盛んなブドウ膜がんの治療では週1回の輸注が必要とされることから⁸³、BTCEは固形腫瘍用の効果的な治療戦略であると言える。一方で、EGFRなどの重要な固形腫瘍標的を標的とするBTCEの全身送達は、有害なオンターゲット・オフ腫瘍毒性を引き起こすことがある⁸⁴。将来的に活発な研究が行われる分野では、腫瘍部位に直接送達した後の、固形腫瘍用生物学的製剤を分泌するePCの局在とオンターゲット・オフ腫瘍効果の評価が行われるであろう。

【0210】

治療用タンパク質からなる生物学的製剤は、2009年から2017年まで2番目に多く承認された薬剤であったが⁸⁵、その多くにおいて半減期が最適以下であるという課題があ

る。臨床適用では半減期が短いと使用や採用が見送られるが、ePCはインビボでの寿命が延長されていることから¹⁸、臨床適用における薬物の利用性も拡張されていると考えられる。慢性治療において使用される生物学的製剤は、生涯にわたって頻回の投与（場合によっては毎日投与）が必要とされることから特に課題が多く、このような半減期の短い生物学的製剤として、酵素置換療法（アガルシダーゼベータ；56～76分⁸⁶、第IX因子；18～40時間⁸⁷、ラロニダーゼ；1.5～3.6時間⁸⁸）、慢性自己免疫疾患（インフリキシマブ；9.5日⁸⁹、エタネルセプト；80時間⁹⁰）、糖尿病（リラグルチド；13時間⁹¹）、およびヒト免疫不全ウイルス（エンビルチド；3.4時間⁹²）に使用されるものが挙げられる。本明細書に記載のBTCE組換え細胞の表現型（CD38++CD138+）は、ヒト骨髓由来の長命の形質細胞の表現型と類似しており⁵⁰、ヒト化マウスにおいて1年を超えて生存を維持したことが過去に示されている¹⁸。長期間にわたり生存し、外因性タンパク質を強力に産生するというePCの能力は、薬物動態が劣ることから有効性が不十分な多数の生物学的製剤や治療用ペプチドの治療有効性を引き出す鍵となると考えられる。

10

【0211】

実験方法

AAV6 HDR CRISPR Cas9の作製

CCR5、JCHAIN、IgG1、E μ ¹²またはCD19を標的とするCRISPR RNA (crRNA) は、ウェブ上のツール (<http://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgrna-design>) を利用して同定した。これらのcrRNAを以下の表9に示す。

20

【表9】

ガイドの標的	配列番号	配列
CCR5	配列番号 22	CAATGTGTCAACTCTTGACA
JCHAIN	配列番号 23	AAGAACCATTTGCTTTTCTG
IgHG1	配列番号 2	TGAGTTTTGTCACAAGATTT
E μ	配列番号 1	GTCTCAGGAGCGGTGTCTGT
CD19	配列番号 24	CCTCGGGCCTGACTTCCATG

30

【0212】

ホスホロチオエート結合と2' O-メチル修飾を含むcrRNAを合成した（IDT社）。crRNAとトランス活性化crRNA (tracrRNA；IDT社) からなるシングルガイドハイブリッドを、3 μ MのCas9ヌクレアーゼ（Berkeley Labs社）と1.2：1の比率で混合し、ロンザ社製3D（CA-137）またはMaxcyte GTX（B細胞3）を用いたエレクトロポレーションにより細胞に送達した。エレクトロポレーション後、相同DNA修復鋳型を含むAAV6ベクター（20体積%のAAV）の存在下において、細胞（150万個/mL）を活性化培地に移した。AAV6投与の24時間後に培地を交換した。既報に従ってAAVベクターを産生させた¹⁹。

40

【0213】

インビトロ傷害アッセイ（K562、PBMC、自己殺傷）

K562細胞殺傷アッセイを行うため、ATCCからK562細胞を入手し、自己切断P2Aを介してGFP（標的）に対してシスに連結されたCD19、またはBFP（参照）に対してシスに連結されたBCMAを発現するようにレンチウイルスで形質導入し、フローサイトメトリでソートすることにより形質導入細胞を精製した。5 $\times$ 10³個の標的細胞と、5 $\times$ 10³個の参照細胞と、5 $\times$ 10⁴個のCD8+T細胞の混合物に、ゲノム組換え細胞由来の上清

50

を様々な倍率で希釈したもの、または様々な濃度の組換えBTCE (Invivogen社、bimab-hcd19cd3) を含む培地を添加して、48時間インキュベートした (図13F、図13H、図15G~15I)。また、PBMC殺傷アッセイを行うため、 2×10^5 個のPBMCと 4×10^4 個の自家CD8+T細胞の混合物に、ゲノム組換え細胞由来の上清、または組換えBTCE (Invivogen社、bimab-hcd19cd3、AMG330) を含む培地を加えて48時間インキュベートした (図14D~14G)。さらに、自己殺傷アッセイを行うため、 2×10^5 個のゲノム組換えB細胞と自家T細胞を様々なエフェクター：標的比でインキュベートし、24時間培養した (図15B、図15E、図15F)。各アッセイは、96ウェルプレートの1ウェルあたり $200 \mu\text{L}$ とし、10%FBSを添加したRPMI-1640を基礎培地として、 37°C 、5% CO_2 において二連で行った。各アッセイの最後に、二連のウェルをプールし、PBSで洗浄し、染色し、フローサイトメトリーで分析した。

10

【0214】

NSGマウスモデル

NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ-c (NSG) マウスはジャクソン研究所から購入した。皮下脇腹モデル (図16A~16C) を作製するため、 2.5×10^5 個のePCと 5×10^4 個の自家T細胞と 2.5×10^4 個のRajiルシフェラーゼ細胞を右脇腹の皮下に送達した。播種性NL482 PDXモデルの作製では (図16D~16G)、 2.5×10^6 個~ 15×10^6 個のGFP-ePCまたはBTCE-ePCを静脈内注射した。翌日に、 1×10^5 個のNL482.ffLuc ALL細胞をマウスに静脈内投与した。翌日および3日後に、 1×10^5 個または 10×10^5 個のT細胞をマウスに後眼窩投与した。ルシフェリン (75~150mg/kg) を皮下注射した後、IVIS Lumina S5 (パーキンエルマー社) を使用した生物発光イメージングにより、腫瘍の生着をモニターした。顎下腺血管から採血して末梢血を採取し、血清を得た (BD社、2290057)。マウスを安楽死させた後、骨髄および脾臓を摘出し、赤血球を溶解した後 (ACK溶解バッファ)、フローサイトメトリーにより表現型分析を行った (図23A~23C)。マウスの飼育は、周囲温度および周囲湿度で行った。

20

【0215】

統計分析およびデータの利用率

統計分析は、Prism7 (GraphPad社、カリフォルニア州サンディエゴ) を使用して行った。すべてのデータは正規分布していると思われた。

【0216】

30

細胞株

K562細胞およびRaji細胞はATCCから入手し、10%ウシ胎児血清を添加したRPMI 1640中で培養した。GFPに対してシスに配置されたCD19、またはBFPに対してシスに配置されたBCMA (NP_001183) を含むVSV-gシュードタイプウイルスを用いて、K562細胞にレトロウイルス形質導入を行った後、蛍光活性化セルソーティング (FACS) を使用して精製することにより、K562 CD19⁺ GFP⁺ 標的細胞株と、K562 BCMA⁺ BFP⁺ 参照細胞株をそれぞれ作製した。また、レンチウイルスにより、ホタルルシフェラーゼ (AB261984.1) と高感度緑色蛍光タンパク質 (HM640279.1) をRaji細胞に形質導入し、FACSで精製した。

【0217】

40

フローサイトメトリー

適切な抗体で細胞を染色した。フローサイトメトリー分析は、LSR IIフローサイトメーター (BDバイオサイエンス社) で行い、イベントは、FlowJoソフトウェア (Tree Star社) で分析した。

【0218】

B細胞の培養および形質細胞への分化

B細胞は、EasySepヒトB細胞単離キット (Stem Cell Technologies社) を用いて健常ヒトドナーのPBMCから単離した。CD3陰性率とCD19陽性率により定義した95%を上回る純度のB細胞が得られた。2-メルカプトエタノール ($55 \mu\text{M}$) と10%FBSを添加したイスコフ改変ダルベッコ培地 (Gibco社) において、単離したB細胞を培養し

50

た。細胞は、（活性化および増殖を行うため）100ng/mL megaCD40L（Enzo Life Science社）、1μg/ml CpG ODN2006（インビトロジェン社）、50ng/ml IL-2、50ng/ml IL-10（Peprotech社）および10ng/ml IL-15（ミルテニー社）を含む培地中で7日間培養するか；（分化誘導するため）50ng/ml IL-6（Peprotech社）、50ng/ml IL-2、50ng/ml IL-10および10ng/ml IL-15を含む培地中で3日間培養するか；または（形質細胞に最終分化させるため）50ng/ml IL-6、10ng/ml IL-15および15ng/ml インターフェロンα2B（シグマ アルドリッチ社）を含む培地中で2日間培養した。細胞の濃度は、生きた細胞の濃度が1mlあたり5～15×10⁵個になるように維持した。インビボ実験用の細胞は、注射前にCD3ビーズ除去カラム（ミルテニー社）で精製した。

10

参考文献

1. Mullard, A. Nat. Rev. Drug Discov. 16, 669 (2017).
2. Waldman, A. D., et al. Nat. Rev. Immunol. 20, 651-668 (2020).
3. Siegel, R. L., et al. CA Cancer J. Clin. 71, 7-33 (2021).
4. Kantarjian, H. et al. N. Engl. J. Med. 376, 836-847 (2017).
5. Przepiorka, D. et al. Clin. Cancer Res. 21, 4035-4039 (2015).
6. Halford, Z., et al. Ann. Pharmacother. 55, 1236-1253 (2021).
7. Zhu, M. et al. Clin. Pharmacokinet. 55, 1271-1288 (2016).
8. Toksvang, L. N., et al. Leukemia 36, 1749-1758 (2022).
9. Apostolidou, E. et al. Lymphoma Myeloma Leuk. 21, e895-e902 (2021).
10. Strohl, W. R. BioDrugs 29, 215-239 (2015).
11. Subklewe, M. et al. Blood 134, 833-833 (2019).
12. Moffett, H. F. et al. Sci Immunol 4, (2019).
13. Huang, D. et al. Vaccine Elicitation of HIV Broadly Neutralizing Antibodies from Engineered B cells.
14. Voss, J. E. et al. eLife vol. 8 Preprint at (2019).
15. Hartweger, H. et al. J. Exp. Med. 216, 1301-1310 (2019).
16. Nahmad, A. D. et al. Nat. Commun. 11, 5851 (2020).
17. Luo, B. et al. Cell Death Dis. 11, 973 (2020).
18. Cheng, R. Y.-H. et al. Nat. Commun. 13, 6110 (2022).
19. Hung, K. L. et al. Mol. Ther. 26, 456-467 (2018).
20. Manz, R. A., et al. Nature 388, 133-134 (1997).
21. Amanna, I. J., et al. N. Engl. J. Med. 357, 1903-1915 (2007).
22. Eyer, K. et al. Nat. Biotechnol. 35, 977-982 (2017).
23. Radbruch, A. et al. Nat. Rev. Immunol. 6, 741-750 (2006).
24. Marchand, T. & Pinho, S. Front. Immunol. 12, 775128 (2021).
25. Benet, Z., et al. Cell Rep. 34, 108733 (2021).
26. Tasian, S. K., et al. Biomedicines 6, (2018).
27. Robbins, P. B. et al. J. Virol. 71, 9466-9474 (1997).
28. Fleischer, L. C., et al. J. Hematol. Oncol. 12, 141 (2019).
29. Gower, M. & Tikhonova, A. N. Blood vol. 140 3-4 (2022).
30. Keating, A. K. et al. Blood Adv 3, 1926-1929 (2019).
31. Pawinska-Wasikowska, K. et al. Cancers 14, (2022).
32. Bargou, R. et al. Science 321, 974-977 (2008).
33. Molhoj, M. et al. Mol. Immunol. 44, 1935-1943 (2007).
34. Dreier, T. et al. Int. J. Cancer 100, 690-697 (2002).
35. Dreier, T. et al. J. Immunol. 170, 4397-4402 (2003).
36. Bride, K. L. et al. Haematologica 107, 1746-1757 (2022).
37. Maude, S. L. et al. Blood 120, 3510-3518 (2012).
38. Kunz, T. et al. Cancers 14, (2022).

20

30

40

50

39. Wiseman, D. H. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 17, 771-789 (2011).
40. Ferrara, F. & Picardi, A. *Cancers* 12, (2019).
41. Fujimoto, A. & Suzuki, R. *Cancers* 12, (2020).
42. Roddie, C., et al. *Cytotherapy* 21, 327-340 (2019).
43. Jiang, H., et al. *Biomark Res* 8, 66 (2020).
44. Cao, X.-Y. et al. *Blood* 140, 4802-4803 (2022).
45. Cooper, M. L. et al. *Leukemia* 32, 1970-1983 (2018).
46. Mamonkin, M., et al. *Blood* 126, 983-992 (2015).
47. Gomes-Silva, D. et al. *Blood* 130, 285-296 (2017).
48. Mei, H. E. et al. *Blood* 125, 1739-1748 (2015).
49. Bhoj, V. G. et al. *Blood* 128, 360-370 (2016).
50. Halliley, J. L. et al. *Immunity* 43, 132-145 (2015).
51. Arumugakani, G. et al. *J. Immunol.* 198, 4618-4628 (2017).
52. Yan, Y., et al. *A. Genes Chromosomes Cancer* 46, 950-959 (2007).
53. Gostissa, M. et al. *Nature* 462, 803-807 (2009).
54. Park, S. S. et al. *Cancer Res.* 65, 1306-1315 (2005).
55. Hecht, J. L. & Aster, J. C. *J. Clin. Oncol.* 18, 3707-3721 (2000).
56. Hammarlund, E. et al. *Nat. Commun.* 8, 1781 (2017).
57. Kuijpers, T. W. et al. *J. Clin. Invest.* 120, 214-222 (2010).
58. Kozlova, V. et al. *PLoS One* 15, e0229170 (2020).
59. Langley, W. A. et al. *J. Virol.* 96, e0002622 (2022).
60. Hotchandani, N., et al. *Am. J. Clin. Pathol.* 146, (2016).
61. Postigo, J. et al. *PLoS One* 7, e33534 (2012).
62. O' Connor, B. P. et al. *J. Exp. Med.* 199, 91-98 (2004).
63. Papazoglou, D. et al. *HemaSphere* 6, 42 (2022).
64. Bannerji, R. et al. *Lancet Haematol* 9, e327-e339 (2022).
65. Dotan, E., et al. *P T* 35, 148-157 (2010).
66. Budde, L. E. et al. *J. Clin. Oncol.* 40, 481-491 (2022).
67. Abdallah, N. & Kumar, S. K. *Ther. Adv. Hematol.* 10, 2040620719894871 (2019).
68. Mei, H. et al. *J. Hematol. Oncol.* 14, 161 (2021).
69. Macintyre, E. A. et al. *Blood* 86, 4691-4698 (1995).
70. Martinez-Climent, J. A., et al. *Haematologica* 95, 293-302 (2010).
71. Lane, S. W., et al. *Blood* 114, 1150-1157 (2009).
72. Hill TF, et al. *Molecular Therapy*, 2022
73. Kenderian, S. S. et al. *Leukemia* 29, 1637-1647 (2015).
74. Guy, D. G. & Uy, G. L. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 13, 417-425 (2018).
75. Lamble, A. J. et al. *J. Clin. Oncol.* 40, 252-261 (2022).
76. Kiyono, H. & Fukuyama, S. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 699-710 (2004).
77. Fristedt, R. et al. *J. Gastrointest. Oncol.* 7, 848-859 (2016).
78. Wouters, M. C. A. & Nelson, B. H. *Clin. Cancer Res.* 24, 6125-6135 (2018).
79. Yeong, J. et al. *Front. Immunol.* 9, 1209 (2018).
80. Hao, D. et al. *Cancer Discov.* 12, 2626-2645 (2022).
81. Jahnsen, F. L., et al. *Trends Immunol.* 39, 196-208 (2018).
82. Landsverk, O. J. B. et al. *J. Exp. Med.* 214, 309-317 (2017).
83. Hua, G., et al. *J Adv Pract Oncol* 13, 717-723 (2022).
84. Rosenthal, M. A. et al. *Neuro. Oncol.* 21, vi283 (2019).
85. Batta, A., et al. *J Family Med Prim Care* 9, 105-114 (2020).
86. Clarke, J. T. R., et al. *Genet. Med.* 9, 504-509 (2007).

10

20

30

40

50

87. Chhabra, A. et al. Blood Coagul. Fibrinolysis 31, 186-192 (2020).
88. Jameson, E., et al. T. Cochrane Database Syst. Rev. 6, CD009354 (2019).
89. Cornillie, F. et al. Aliment. Pharmacol. Ther. 15, 463-473 (2001).
90. Nestorov, I. et al. Br. J. Clin. Pharmacol. 62, 435-445 (2006).
91. Sisson, E. M. Pharmacotherapy 31, 896-911 (2011).
92. Cheng, S. et al. Eur. J. Med. Chem. 121, 232-237 (2016).

【0219】

本明細書で使用されている「含む (comprising)」という用語は、「含む (including)」、「含む (containing)」または「特徴とする (characterized by)」という用語と同義であるとともに、オープンエンドで包括的な意味であり、本明細書には記載されていないさらなる要素や工程を除外するものではない。

10

【0220】

前述の説明は、本発明のいくつかの方法および材料を開示するものである。本発明の方法および材料は、変更することができ、製造方法および器具も変更することができる。このような変更は、本開示または本明細書に開示された本発明の実施を考慮に入れて、当業者であれば容易に理解することができる。したがって、本発明は、本明細書に開示された特定の実施形態に限定されず、本発明の真の範囲および要旨において可能なあらゆる変更およびその他の態様を包含する。

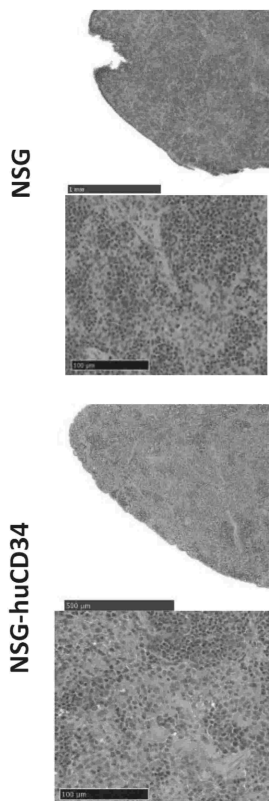
【0221】

本明細書において引用された公開特許出願、非公開特許出願、特許および学術文献を含む（ただしこれらに限定されない）すべての参考文献は、引用によりその全体が本明細書に援用され、本明細書の一部を構成する。引用により援用された文献、特許または特許出願が本明細書の開示内容と矛盾する場合、このような矛盾事項よりも本明細書の記載が採用および／または優先される。

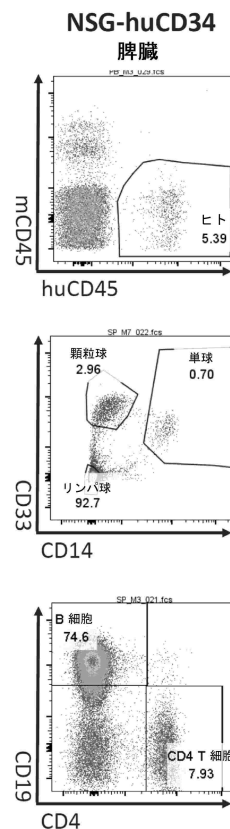
20

【図面】

【図1A】



【図1B】

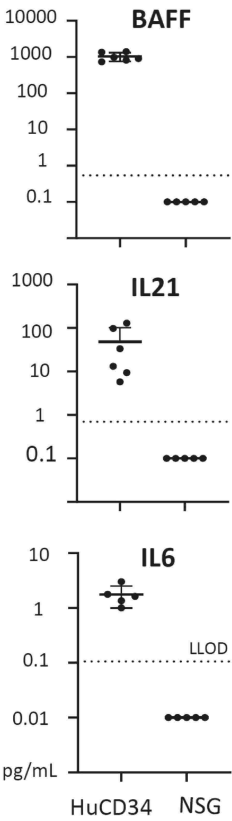


30

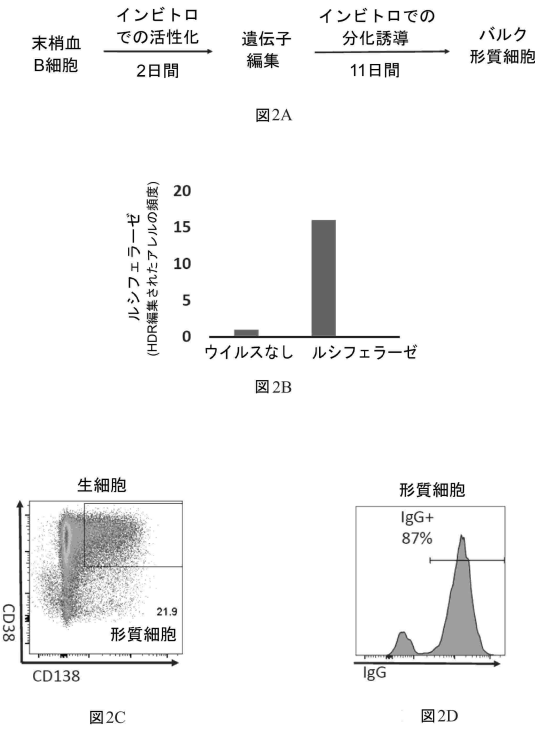
40

50

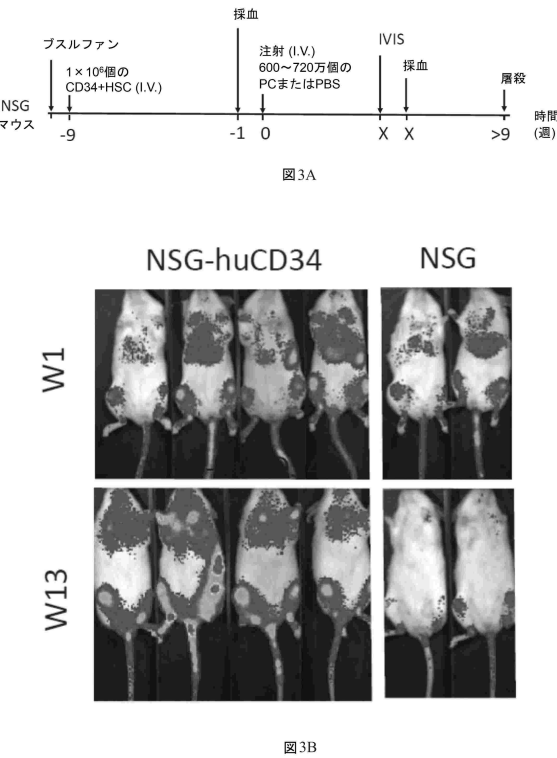
【図 1 C】



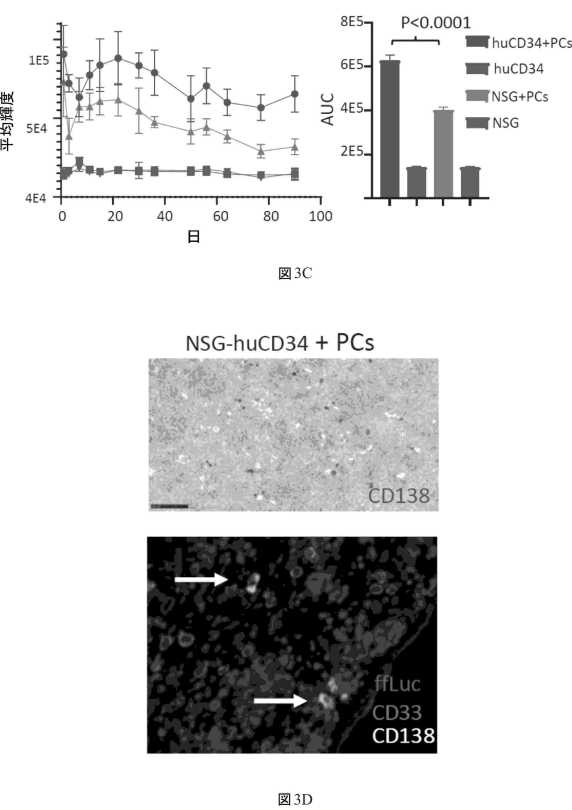
【図 2 A – 2 D】



【図 3 A – 3 B】



【図 3 C – 3 D】



10

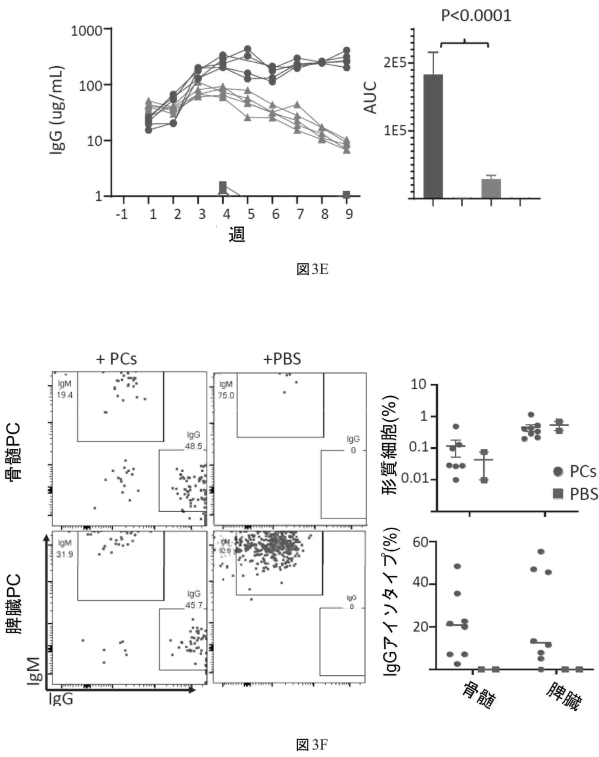
20

30

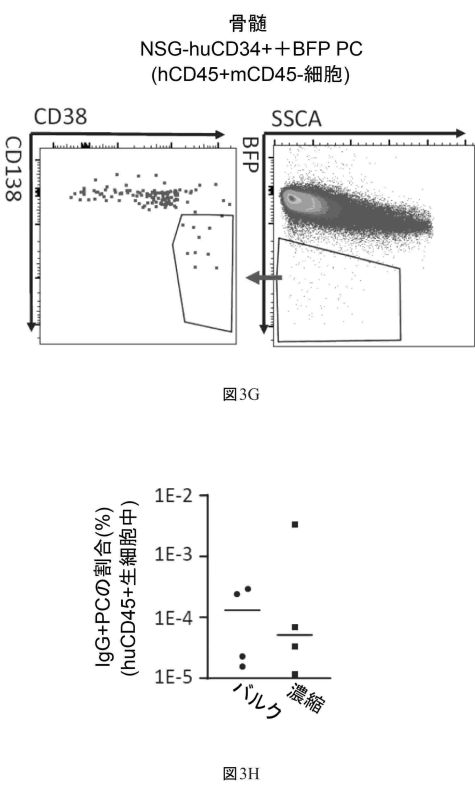
40

50

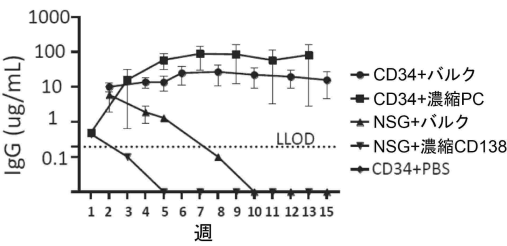
【図 3 E - 3 F】



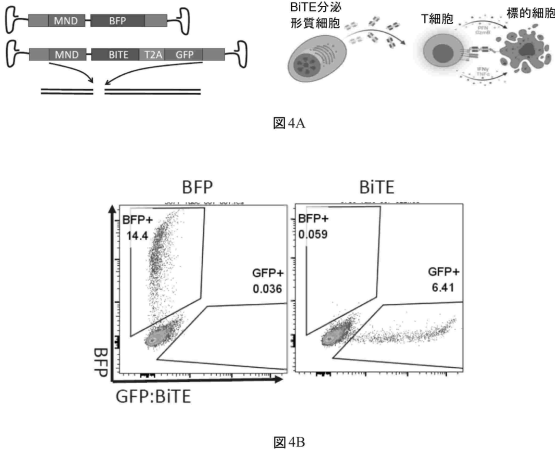
【図 3 G - 3 H】



【図 3 I】



【図 4 A - 4 B】



10

20

30

40

50

【図 4 C - 4 D】

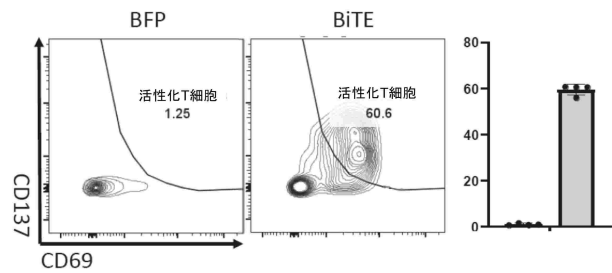


図4C

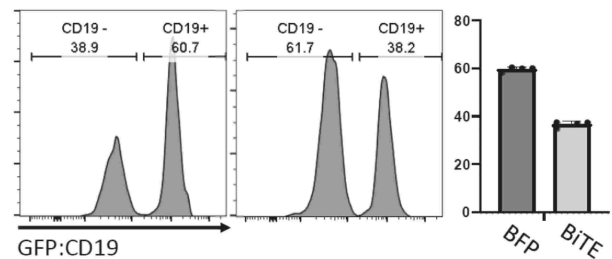


図4D

【図 5 A - 5 B】

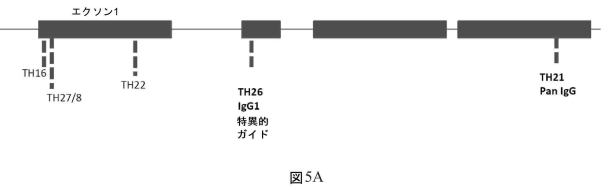


図 5A

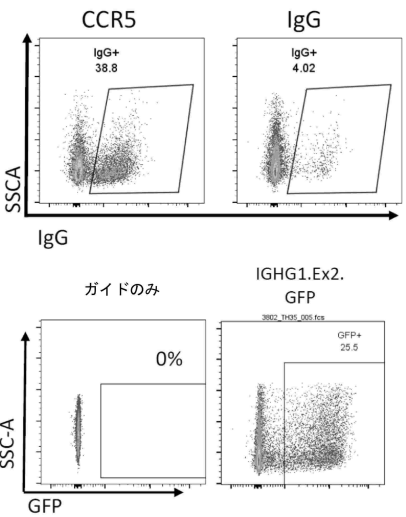


図 5B

【図 6 A - 6 B】

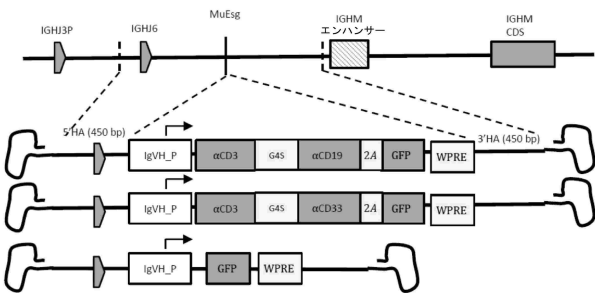


図 6A

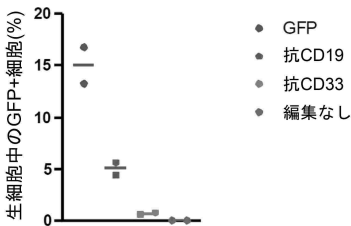
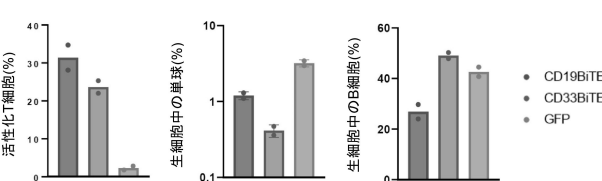


図 6B

【図 7】



10

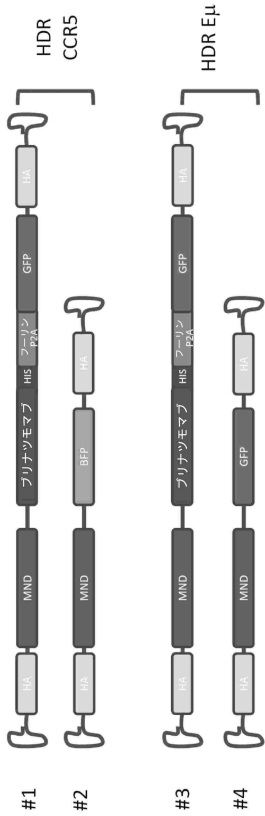
20

30

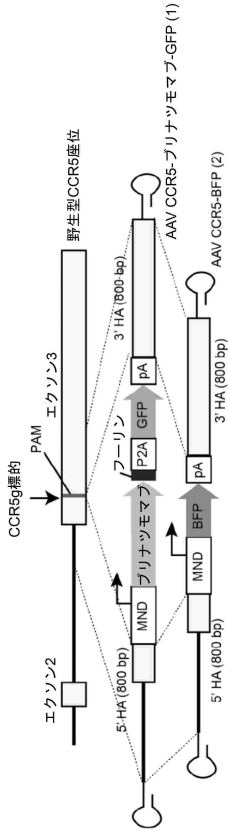
40

50

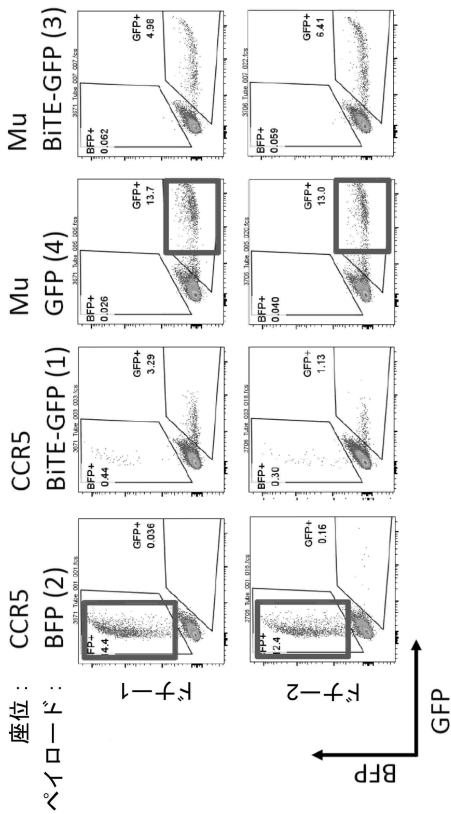
【図 8 A】



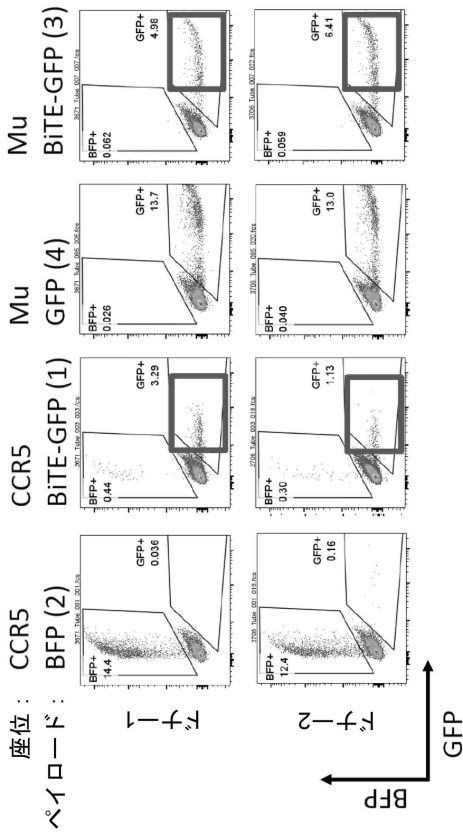
【図 8 B】



【図 8 C】



【図 8 D】



10

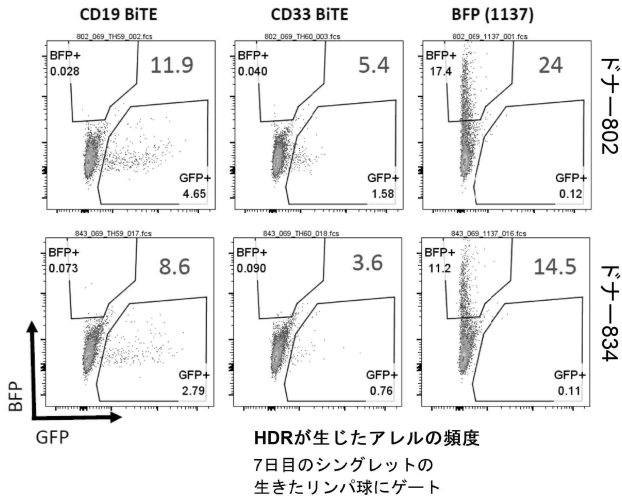
20

30

40

50

【図 8 E】



【図 9 A - 9 B】

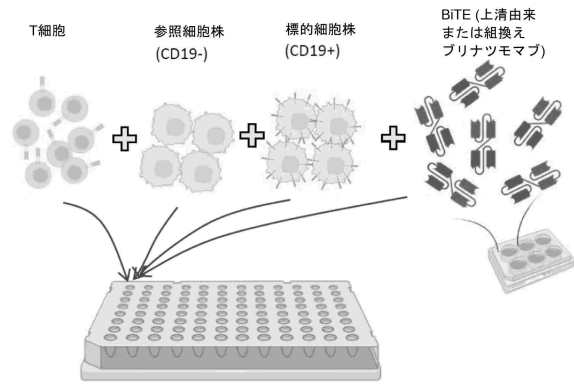


図9A

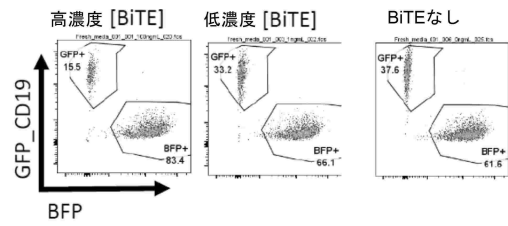


図9B

【図 9 C - 9 D】

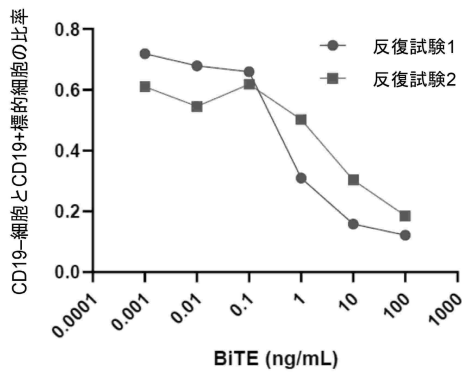


図9C

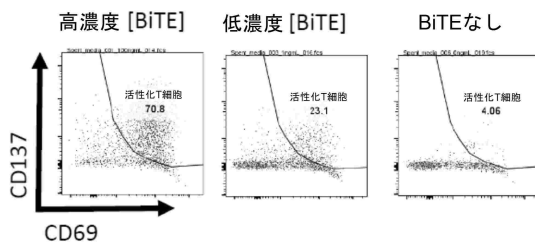


図9D

【図 9 E - 9 F】

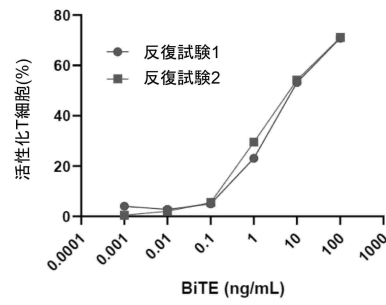


図9E

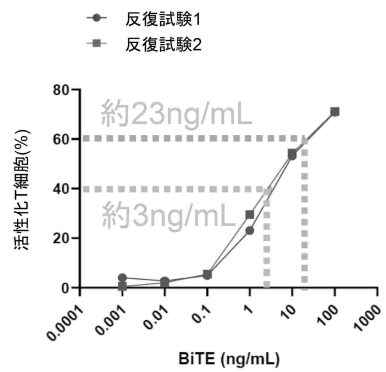


図9F

10

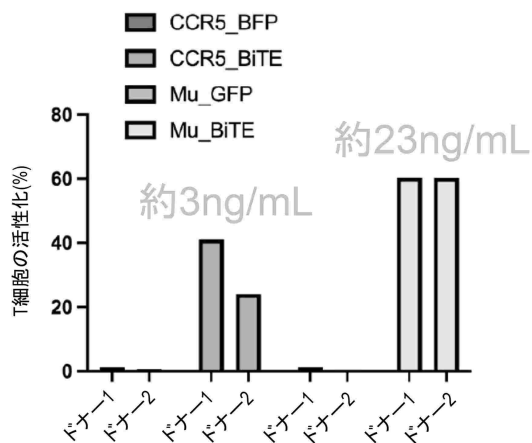
20

30

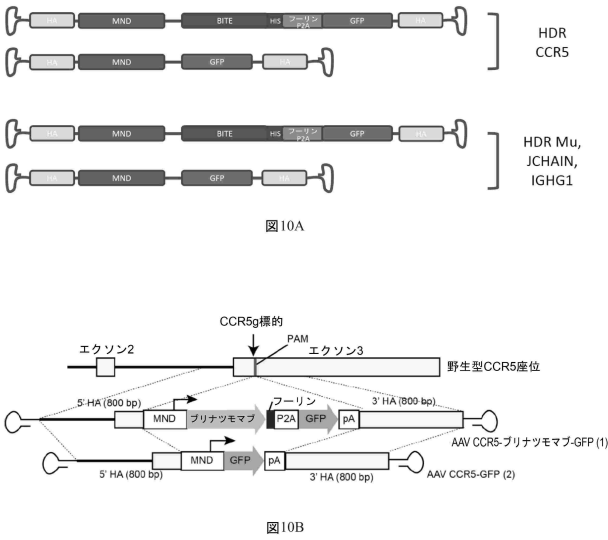
40

50

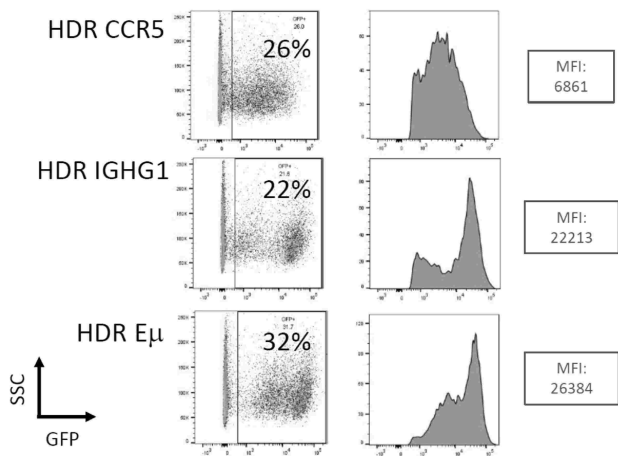
【図 9 G】



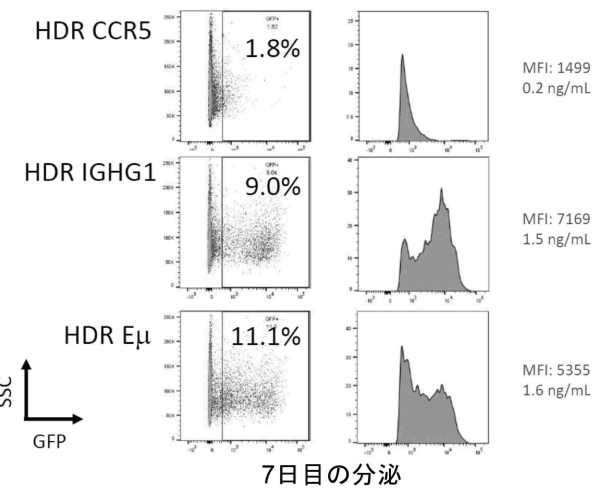
【図 10 A - 10 B】



【図 10 C】



【図 10 D】



10

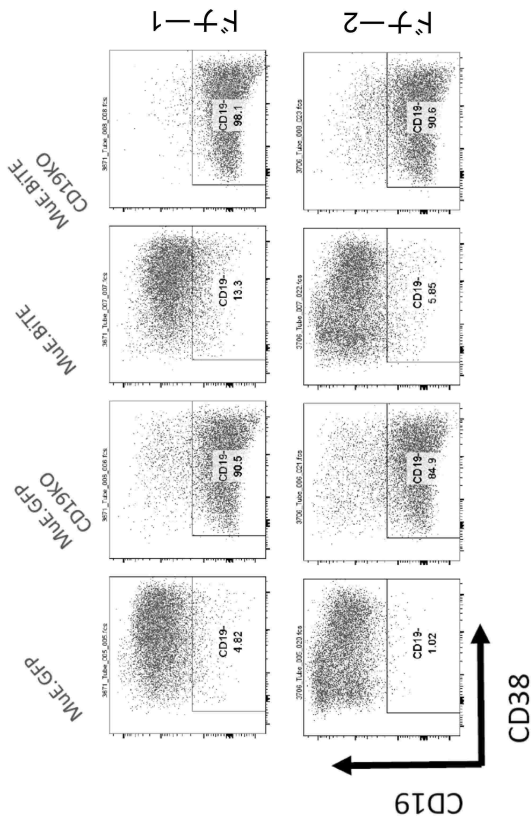
20

30

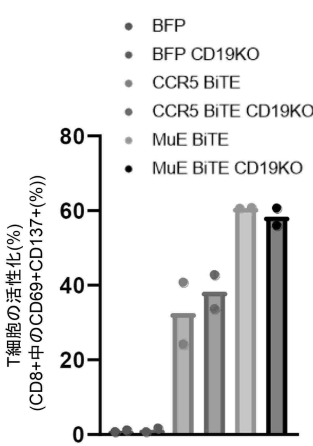
40

50

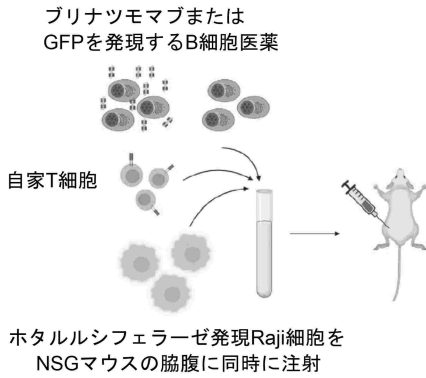
【図 1 1 A】



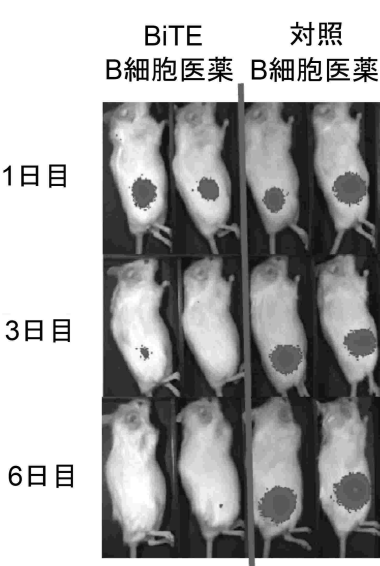
【図 1 1 B】



【図 1 2 A】



【図 1 2 B】



10

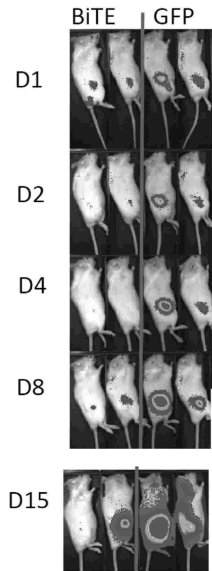
20

30

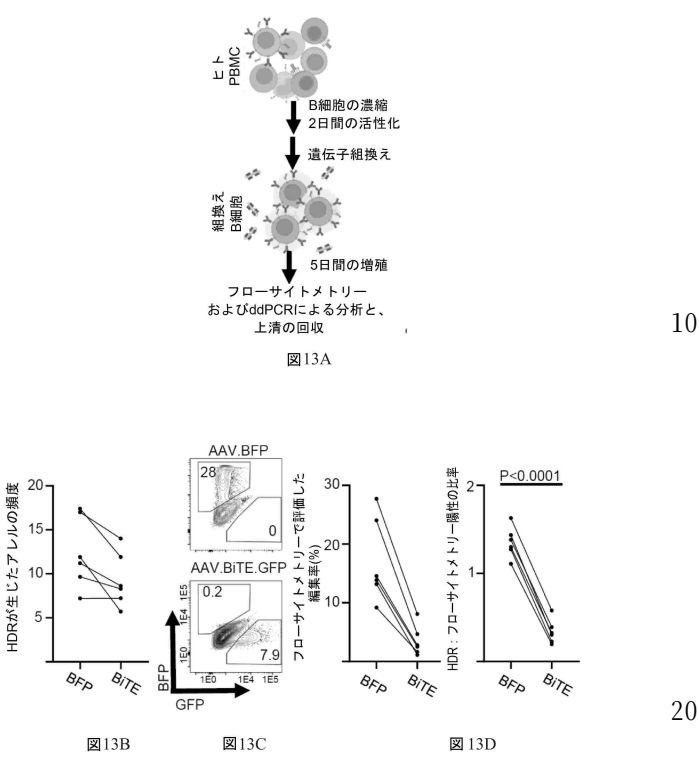
40

50

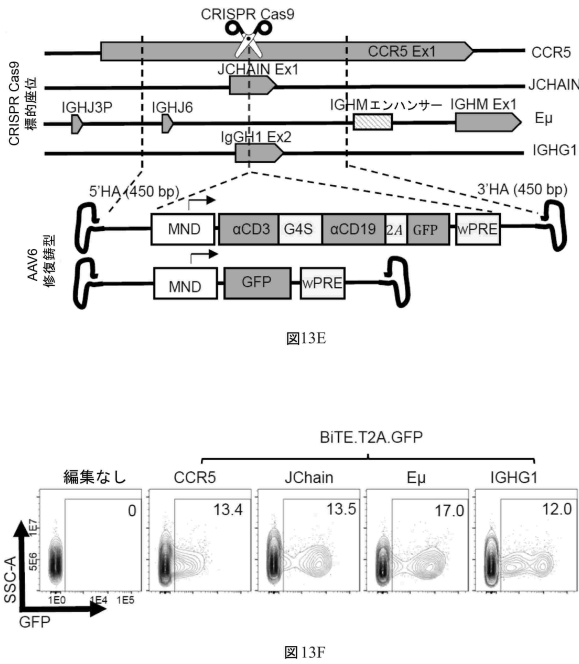
【図 1 2 C】



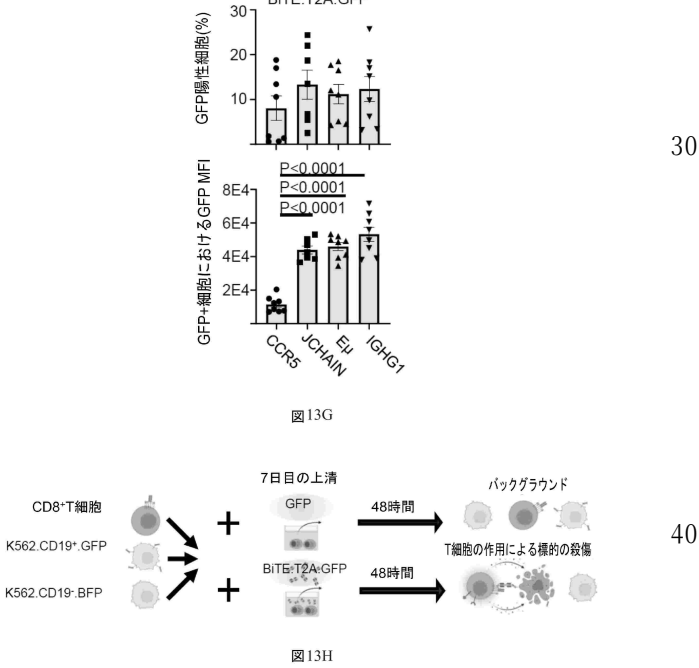
【図 1 3 A – 1 3 D】



【図 1 3 E – 1 3 F】



【図 1 3 G – 1 3 H】



10

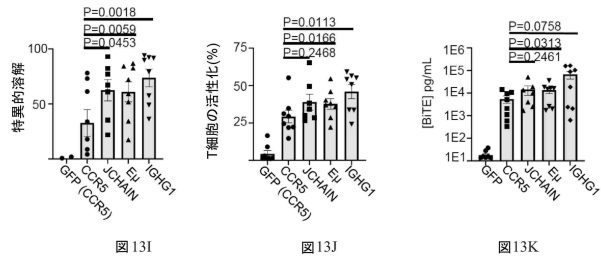
20

30

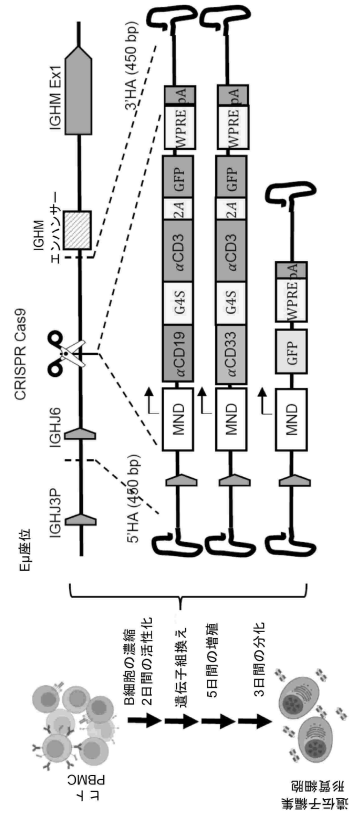
40

50

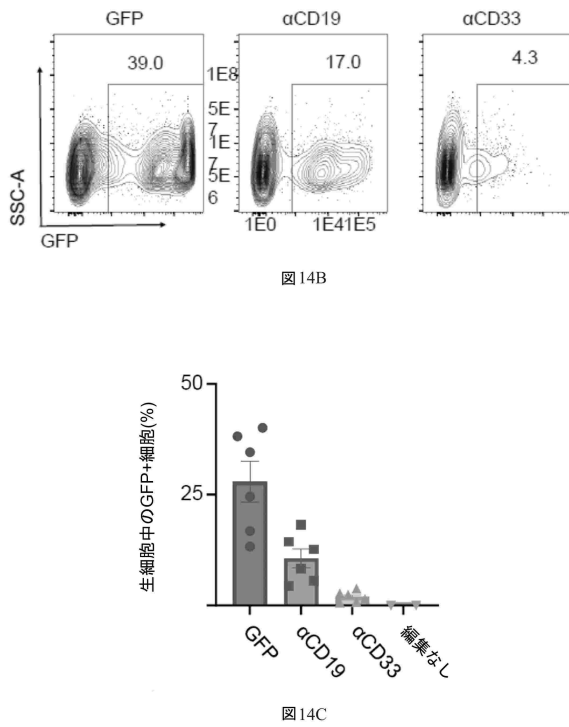
【図 1 3 I - 1 3 K】



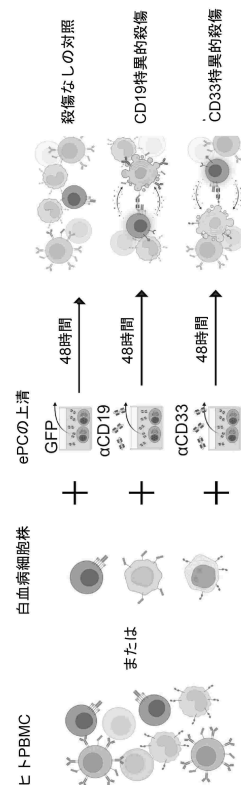
【図 1 4 A】



【図 1 4 B - 1 4 C】



【図 1 4 D】



10

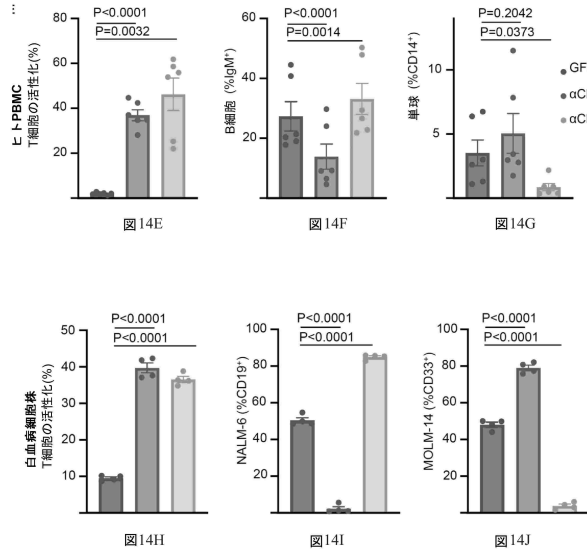
20

30

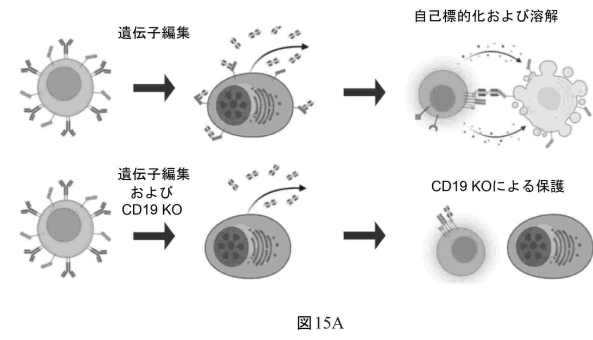
40

50

【図 14 E - 14 J】



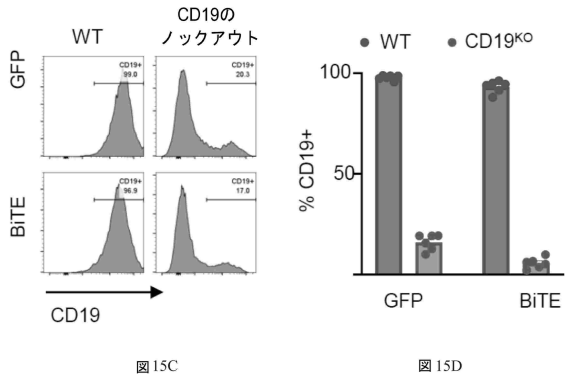
【図 15 A - 15 B】



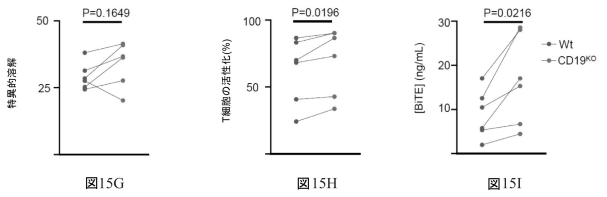
10

20

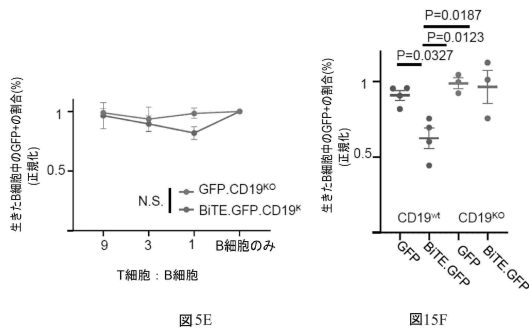
【図 15 C - 15 F】



【図 15 G - 15 I】



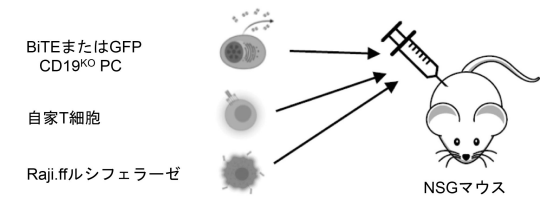
30



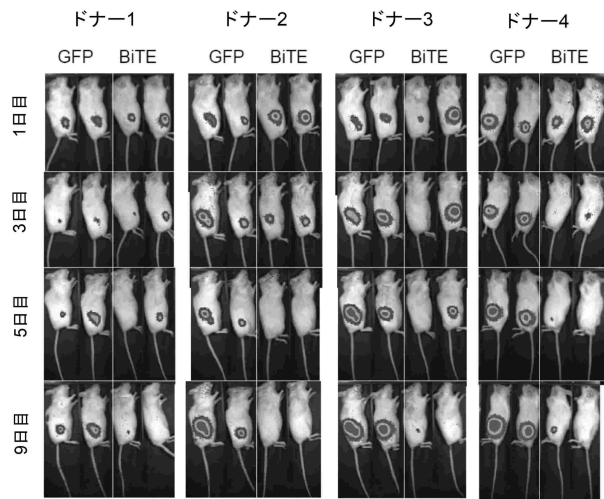
40

50

【図 1 6 A】

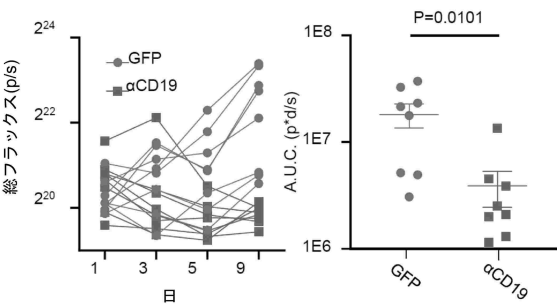


【図 1 6 B】

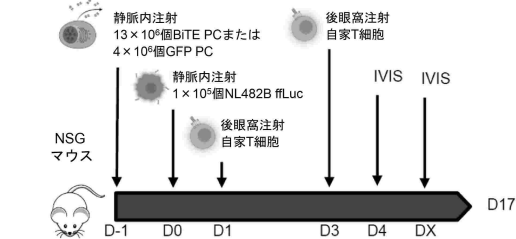


10

【図 1 6 C】



【図 1 6 D】



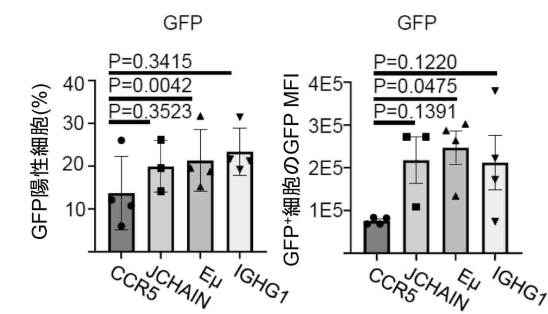
20

30

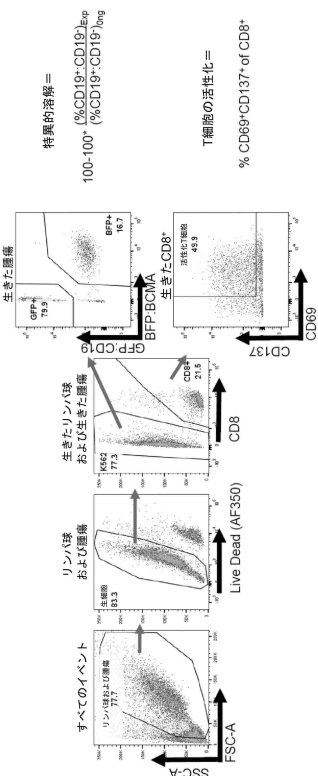
40

50

【図 1 7 D】



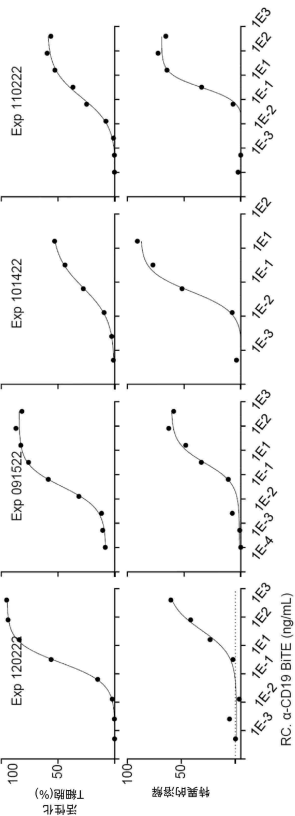
【図 1 8 A】



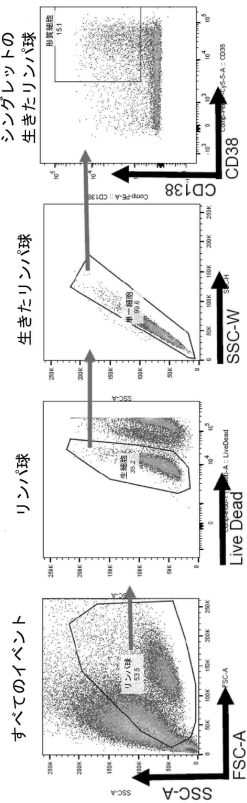
10

20

【図 1 8 B】



【図 1 9 A】

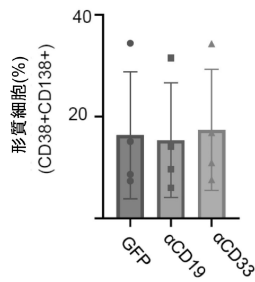


30

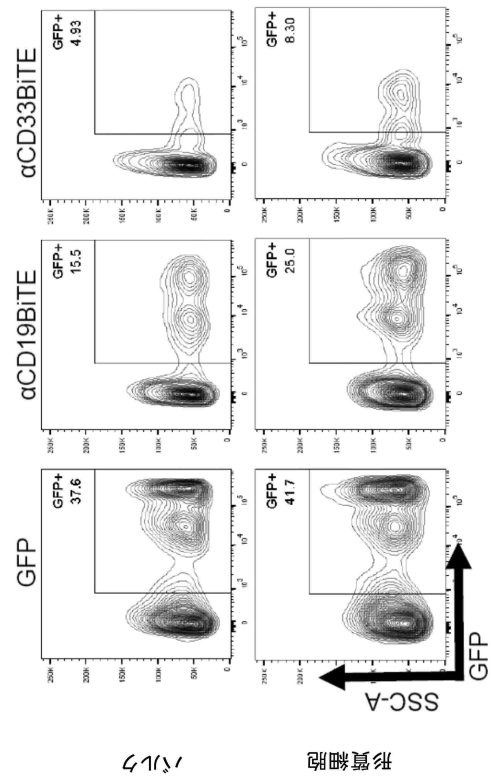
40

50

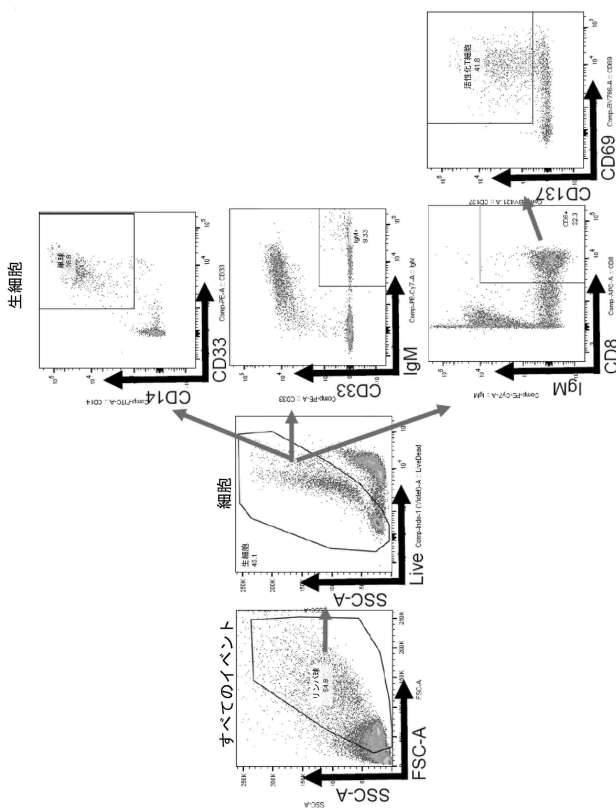
【図 19 B】



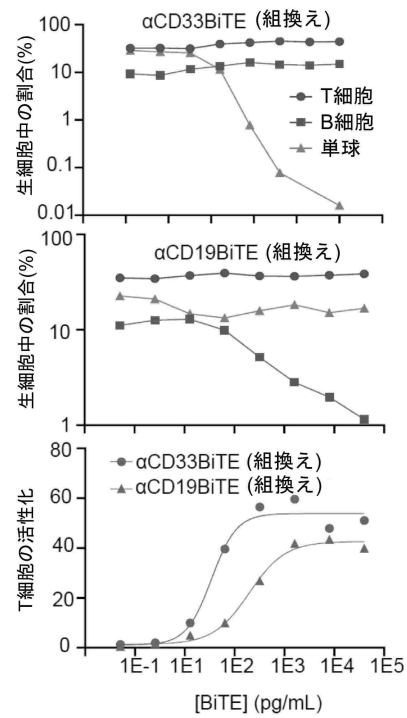
【図 19 C】



【図 19 D】



【図 19 E】



10

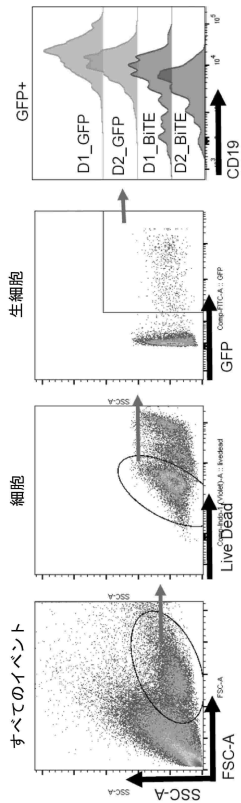
20

30

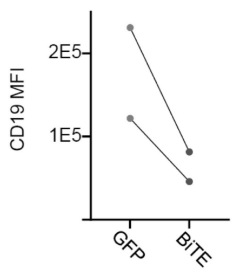
40

50

【図 2 0 A】

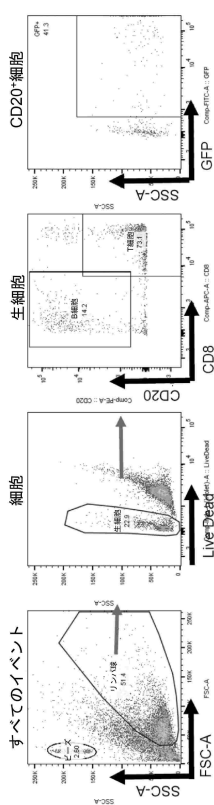


【図 2 0 B】

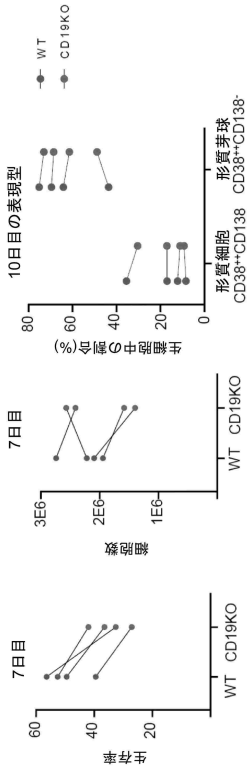


10

【図 2 1】



【図 2 2 A - 2 2 C】



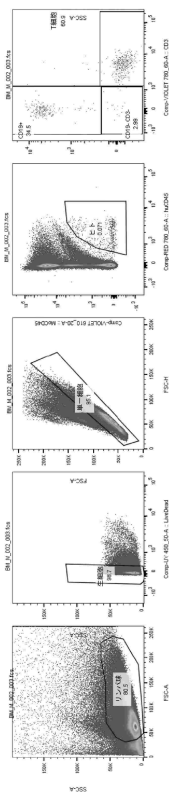
20

30

40

50

【図 2 3 A】



【図 2 3 B - 2 3 C】

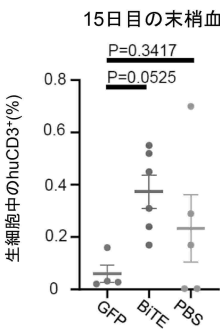


図 23B

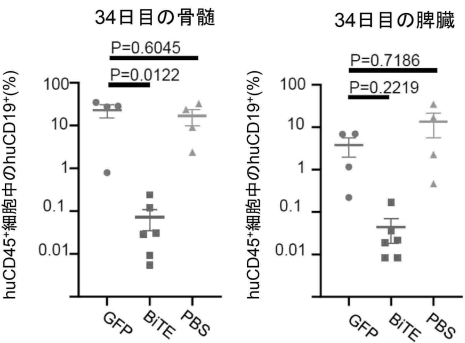


図 23C

【配列表】

2025520225000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/86760

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - INV. C12N 15/90, C12N 9/22, C07K 16/46, C12N 15/85, A61K 35/17 (2023.01) ADD. CPC - INV. C12N 15/907, C12N 9/22, C07K 16/46, C12N 15/85, A61K 35/17 ADD. C12N 2310/20, C07K 2317/31, C07K 2319/70 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2022/099297 A1 (FATE THERAPEUTICS, INC.) 12 May 2022 (12.05.2022) abstract; para [0008]-[0007], [00018], [00099], [000114], [000178], [000243], [000245]-[000246], [000255], [000259], [000326], [000328]	1-4, 34-38
A	WO 2020/206162 A1 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 08 October 2020 (08.10.2020); entire document	1-4, 34-38
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 August 2023		Date of mailing of the international search report SEP 14 2023
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Kari Rodriguez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/66760

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☐ forming part of the international application as filed.

b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☒ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/66760

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 5-33, 39-70
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z
A 6 1 K	40/13 (2025.01)	A 6 1 K	40/13	
A 6 1 K	40/33 (2025.01)	A 6 1 K	40/33	
A 6 1 K	40/42 (2025.01)	A 6 1 K	40/42	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02	
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 N	5/0781(2010.01)	C 1 2 N	5/0781	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28	
C 0 7 K	16/30 (2006.01)	C 0 7 K	16/30	

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

弁理士 上田 ▲茂▼

(74)代理人 100213779

弁理士 小川 有佳子

(74)代理人 100077012

弁理士 岩谷 龍

(72)発明者 ローリングス, デイヴィッド ジェイ.

アメリカ合衆国 9 8 1 0 1 ワシントン州, シアトル, ナインス アベニュー 1 9 0 0 シアトル
チルドレンズ ホスピタル (ディービーエイ シアトル チルドレンズ リサーチ インスティテュー
ト) 内

(72)発明者 ジェイムズ, リチャード ジー.

アメリカ合衆国 9 8 1 0 1 ワシントン州, シアトル, ナインス アベニュー 1 9 0 0 シアトル
チルドレンズ ホスピタル (ディービーエイ シアトル チルドレンズ リサーチ インスティテュー
ト) 内

F ターム (参考) 4B065 AA94X AB01 AC14 BA02 CA25 CA44
4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 BB64 BB65 CA04 NA14 ZB02 ZB09
ZB26 ZB27
4H045 AA11 AA30 BA41 DA76 EA22 EA28