

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-527539
(P2024-527539A)

(43)公表日 令和6年7月25日(2024.7.25)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 C 0 8 6
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113	1 4 0 Z	4 C 0 8 7
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 1 0	4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全96頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-580404(P2023-580404)			(71)出願人	522261558
(86)(22)出願日	令和4年6月30日(2022.6.30)				寧波茂行生物医薬科技有限公司
(85)翻訳文提出日	令和6年2月8日(2024.2.8)				中華人民共和国浙江省寧波市杭州湾新区
(86)国際出願番号	PCT/CN2022/103037				啓源路39号1号楼212-11
(87)国際公開番号	WO2023/274380			(74)代理人	110000796
(87)国際公開日	令和5年1月5日(2023.1.5)				弁理士法人三枝国際特許事務所
(31)優先権主張番号	202110749536.3			(72)発明者	尚 小云
(32)優先日	令和3年7月1日(2021.7.1)				中華人民共和国315336浙江省寧波
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)				杭州湾新区啓源路39号1号楼212-11室
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,最終頁に続く			(72)発明者	李 甲▲ルウ▼
					中華人民共和国315336浙江省寧波
					杭州湾新区啓源路39号1号楼212-11室
				(72)発明者	蔣 海娟
					最終頁に続く

(54)【発明の名称】 I L 1 3 R α 2 を標的としたユニバーサルC A R－T細胞及びその製造方法と使用

(57)【要約】

本出願は、修飾された免疫エフェクター細胞に関し、そのうち、上記修飾された免疫エフェクター細胞におけるT細胞抗原受容体（T C R）及び主要組織適合性複合体（M H C I、M H C I I）のT細胞における機能が阻害され、且つ上記修飾された免疫エフェクター細胞は、I L 1 3 R α 2 を標的とするキメラ抗原受容体（C A R）を含む。本出願の修飾された免疫エフェクター細胞は、腫瘍細胞表面抗原を認識すると同時に、細胞によって発現されるT C R及びH L A－A遺伝子をノックアウトすることで、C A R－T細胞の抗腫瘍効果を向上させ、細胞の生存時間を延長し、同時に同種異系細胞療法によって引き起こされる免疫拒絶反応の多重効果を低減する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫エフェクター細胞であって、前記免疫エフェクター細胞における T 細胞抗原受容体 (TCR) 及び主要組織適合性複合体 (MHC I、MHC II) の細胞における機能が阻害され、且つ前記免疫エフェクター細胞は、IL13R α 2 を標的とするキメラ抗原受容体 (CAR) を含む、免疫エフェクター細胞。

【請求項 2】

前記の IL13R α 2 を標的とするキメラ抗原受容体 (CAR) は標的部分を含み、前記標的部分は、抗体重鎖可変領域 (VH) の少なくとも 1 つの相補性決定領域 (CDR) を含み、前記 VH は配列番号 18 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の免疫エフェクター細胞。

10

【請求項 3】

前記 VH は配列番号 16 又は配列番号 17 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 4】

前記の IL13R α 2 を標的とするキメラ抗原受容体 (CAR) は、VH を含む標的部分を含み、前記 VH は、重鎖相補性決定領域 1 (HCDR1)、重鎖相補性決定領域 2 (HCDR2)、及び重鎖相補性決定領域 3 (HCDR3) を含み、前記 HCDR3 は配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1～3 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

20

【請求項 5】

前記 HCDR2 は配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 4 に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 6】

前記 HCDR1 は配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 4 又は 5 に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 7】

前記 VH は、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を有する HCDR1、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を有する HCDR2 及び配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を有する HCDR3 を含む、請求項 4～6 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

30

【請求項 8】

前記 VH は、重鎖フレームワーク領域 1 (HFR1)、重鎖フレームワーク領域 2 (HFR2)、重鎖フレームワーク領域 3 (HFR3) 及び重鎖フレームワーク領域 4 (HFR4) を含み、前記 HFR1 は配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 4～7 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 9】

前記 HFR1 は配列番号 8 又は配列番号 12 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 8 に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 10】

前記 HFR2 は配列番号 5 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 8 又は 9 に記載の免疫エフェクター細胞。

40

【請求項 11】

前記 HFR2 は配列番号 9 又は配列番号 13 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 8～10 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 12】

前記 HFR3 は配列番号 6 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 8～11 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 13】

前記 HFR3 は配列番号 10 又は配列番号 14 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 8～12 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

50

【請求項 14】

前記 HFR4 は配列番号 7 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 8～13 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 15】

前記 HFR4 は配列番号 11 又は配列番号 15 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 8～14 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 16】

前記 VH は HFR1、HFR2、HFR3 及び HFR4 を含み、且つ前記 HFR1、HFR2、HFR3 及び HFR4 は、

i) 配列番号 8 に示されるアミノ酸配列を含む HFR1、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列を含む HFR2、配列番号 10 に示されるアミノ酸配列を含む HFR3、配列番号 11 に示されるアミノ酸配列を含む HFR4、及び

ii) 配列番号 12 に示されるアミノ酸配列を含む HFR1、配列番号 13 に示されるアミノ酸配列を含む HFR2、配列番号 14 に示されるアミノ酸配列を含む HFR3、配列番号 15 に示されるアミノ酸配列を含む HFR4、から選ばれる、請求項 4～15 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 17】

前記 VH は配列番号 18 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 4～16 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 18】

前記 VH は配列番号 16 又は配列番号 17 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 4～17 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 19】

前記標的部分は、抗体軽鎖可変領域 (VL) の少なくとも 1 つの CDR を更に含み、前記 VL は配列番号 36 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 2～19 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 20】

前記 VL は配列番号 34 又は配列番号 35 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 19 に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 21】

前記標的部分は、VH の少なくとも 1 つの CDR 及び VL の少なくとも 1 つの CDR を含み、且つ前記 VH 及び VL は、

i) 配列番号 16 に示されるアミノ酸配列を含む VH、配列番号 34 に示されるアミノ酸配列を含む VL、及び

ii) 配列番号 17 に示されるアミノ酸配列を含む VH、配列番号 35 に示されるアミノ酸配列を含む VL、から選ばれる、請求項 20 に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 22】

前記の IL13R α 2 を標的とするキメラ抗原受容体 (CAR) は、VL を含む標的部分を含み、前記 VL は、軽鎖相補性決定領域 1 (LCDR1)、軽鎖相補性決定領域 2 (LCDR2)、及び軽鎖相補性決定領域 3 (LCDR3) を含み、前記 LCDR1 は配列番号 19 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 4～21 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 23】

前記 LCDR2 は配列番号 20 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 4～22 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 24】

前記 LCDR3 は配列番号 21 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 4～23 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 25】

前記 VL は、配列番号 19 に示されるアミノ酸配列を有する LCDR1、配列番号 20

10

20

30

40

50

に示されるアミノ酸配列を有する L C D R 2 及び配列番号 2 1 に示されるアミノ酸配列を有する L C D R 3 を含む、請求項 4 ～ 2 4 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 2 6】

前記 V L は、軽鎖フレームワーク領域 1 (L F R 1)、軽鎖フレームワーク領域 2 (L F R 2)、軽鎖フレームワーク領域 3 (L F R 3) 及び軽鎖フレームワーク領域 4 (L F R 4) を含み、前記 L F R 1 は配列番号 2 2 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 4 ～ 2 5 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 2 7】

前記 L F R 1 は配列番号 2 6 又は配列番号 3 0 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 6 に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 2 8】

前記 L F R 2 は配列番号 2 3 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 6 又は 2 7 に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 2 9】

前記 L F R 2 は配列番号 2 7 又は配列番号 3 1 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 6 ～ 2 8 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 3 0】

前記 L F R 3 は配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 6 ～ 2 9 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 3 1】

前記 L F R 3 は配列番号 2 8 又は配列番号 3 2 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 6 ～ 3 0 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 3 2】

前記 L F R 4 は配列番号 2 5 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 6 ～ 3 1 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 3 3】

前記 L F R 4 は配列番号 2 9 又は配列番号 3 3 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 6 ～ 3 2 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 3 4】

前記 V L は L F R 1、L F R 2、L F R 3 及び L F R 4 を含み、且つ前記 L F R 1、L F R 2、L F R 3 及び L F R 4 は、

i) 配列番号 2 6 に示されるアミノ酸配列を含む L F R 1、配列番号 2 7 に示されるアミノ酸配列を含む L F R 2、配列番号 2 8 に示されるアミノ酸配列を含む L F R 3、配列番号 2 9 に示されるアミノ酸配列を含む L F R 4、及び

i i) 配列番号 3 0 に示されるアミノ酸配列を含む L F R 1、配列番号 3 1 に示されるアミノ酸配列を含む L F R 2、配列番号 3 2 に示されるアミノ酸配列を含む L F R 3、配列番号 3 3 に示されるアミノ酸配列を含む L F R 4、から選ばれる、請求項 2 2 ～ 3 3 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 3 5】

前記 V L は配列番号 3 6 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 2 ～ 3 4 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 3 6】

前記 V L は配列番号 3 4 又は配列番号 3 5 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 2 ～ 3 5 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 3 7】

前記標的部分は V H 及び V L を含み、そのうち、前記 V H は配列番号 1 8 に示されるアミノ酸配列を含み、前記 V L は配列番号 3 6 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 ～ 3 6 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 3 8】

前記 V H 及び V L は、

10

20

30

40

50

i) 配列番号 16 に示されるアミノ酸配列を含む V H、配列番号 34 に示されるアミノ酸配列を含む V L、及び

i i) 配列番号 17 に示されるアミノ酸配列を含む V H、配列番号 35 に示されるアミノ酸配列を含む V L、から選ばれる、請求項 37 に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 39】

前記標的部分は、全長抗体、F a b、単鎖可変断片 (s c F v) 又は単ドメイン抗体 (V H H) を含む、請求項 2 ～ 38 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 40】

前記標的部分は s c F v を含む、請求項 2 ～ 39 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 41】

前記標的部分は、配列番号 41 又は配列番号 44 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 ～ 40 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 42】

前記標的部分は、配列番号 39、配列番号 40、配列番号 42 又は配列番号 43 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 ～ 41 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 43】

前記の I L 1 3 R α 2 を標的とするキメラ抗原受容体 (C A R) は標的部分を含み、前記標的部分は、抗体重鎖可変領域 (V H) の少なくとも 1 つの相補性決定領域 (C D R) を含み、前記 V H は配列番号 56 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 ～ 42 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 44】

前記の I L 1 3 R α 2 を標的とするキメラ抗原受容体 (C A R) は、V H を含む標的部分を含み、前記 V H は、重鎖相補性決定領域 1 (H C D R 1)、重鎖相補性決定領域 2 (H C D R 2)、及び重鎖相補性決定領域 3 (H C D R 3) を含み、前記 H C D R 3 は配列番号 55 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 43 に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 45】

前記 H C D R 2 は配列番号 54 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 44 に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 46】

前記 H C D R 1 は配列番号 53 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 44 又は 45 に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 47】

前記 V H は、配列番号 53 に示されるアミノ酸配列を有する H C D R 1、配列番号 54 に示されるアミノ酸配列を有する H C D R 2 及び配列番号 55 に示されるアミノ酸配列を有する H C D R 3 を含む、請求項 44 ～ 46 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 48】

前記 V H は配列番号 56 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 44 ～ 47 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 49】

前記標的部分は、抗体軽鎖可変領域 (V L) の少なくとも 1 つの C D R を更に含み、前記 V L は配列番号 60 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 43 ～ 48 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 50】

前記標的部分は V H の少なくとも 1 つの C D R 及び V L の少なくとも 1 つの C D R を含み、且つ前記 V H は配列番号 56 に示されるアミノ酸配列を含み、前記 V L は配列番号 60 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 43 ～ 49 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 5 1】

前記の I L 1 3 R α 2 を標的とするキメラ抗原受容体 (C A R) は、V L を含む標的部分を含み、前記 V L は、軽鎖相補性決定領域 1 (L C D R 1)、軽鎖相補性決定領域 2 (L C D R 2)、及び軽鎖相補性決定領域 3 (L C D R 3) を含み、前記 L C D R 1 は配列番号 5 7 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 4 4 ~ 5 0 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 5 2】

前記 L C D R 2 は配列番号 5 8 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 5 1 に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 5 3】

前記 L C D R 3 は配列番号 5 9 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 5 2 に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 5 4】

前記 V L は、配列番号 5 7 に示されるアミノ酸配列を有する L C D R 1、配列番号 5 8 に示されるアミノ酸配列を有する L C D R 2 及び配列番号 5 9 に示されるアミノ酸配列を有する L C D R 3 を含む、請求項 5 1 ~ 5 3 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 5 5】

前記 V L は配列番号 6 0 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 5 1 ~ 5 4 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 5 6】

前記標的部分は V H 及び V L を含み、そのうち、前記 V H は配列番号 5 6 に示されるアミノ酸配列を含み、前記 V L は配列番号 6 0 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 4 4 ~ 5 5 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 5 7】

前記標的部分は、全長抗体、F a b、単鎖可変断片 (s c F v) 又は単ドメイン抗体 (V H H) を含む、請求項 4 3 ~ 5 6 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 5 8】

前記標的部分は s c F v を含む、請求項 4 3 ~ 5 7 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 5 9】

前記標的部分は配列番号 6 1 又は配列番号 6 2 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 4 3 ~ 5 8 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 6 0】

前記 C A R は、膜貫通ドメインを含み、前記膜貫通ドメインは、C D 8 A、C D 8 B、C D 2 8、C D 3 ε (C D 3 e)、4 - 1 B B、C D 4、C D 2 7、C D 7、P D - 1、T R A C、T R B C、C D 3 ζ、C T L A - 4、L A G - 3、C D 5、I C O S、O X 4 0、N K G 2 D、2 B 4、C D 2 4 4、F c ε R I γ、B T L A、C D 3 0、G I T R、H V E M、D A P 1 0、C D 2、N K G 2 C、L I G H T、D A P 1 2、C D 4 0 L (C D 1 5 4)、T I M 1、C D 2 2 6、D R 3、C D 4 5、C D 8 0、C D 8 6、C D 9、C D 1 6、C D 2 2、C D 3 3、C D 3 7、C D 6 4 及び S L A M からなる群より選ばれる 1 つ又は複数のタンパク質に由来する膜貫通ドメインを含む、請求項 4 3 ~ 5 9 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 6 1】

前記膜貫通ドメインは C D 8 A に由来する膜貫通ドメインを含む、請求項 6 0 に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 6 2】

前記膜貫通ドメインは配列番号 6 9 ~ 配列番号 1 1 7 の何れか 1 項に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 6 0 又は 6 1 に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 6 3】

前記CARは、細胞内共刺激シグナル伝達ドメインを含み、前記細胞内共刺激シグナル伝達ドメインは、CD28、4-1BB(CD137)、CD27、CD2、CD7、CD8A、CD8B、OX40、CD226、DR3、SLAM、CDS、ICAM-1、NKG2D、NKG2C、B7-H3、2B4、FcεRIγ、BTLA、GITR、HVEM、DAP10、DAP12、CD30、CD40、CD40L、TIM1、PD-1、LFA-1、LIGHT、JAML、CD244、CD100、ICOS、CD40及びMyD88からなる群より選ばれる1つ又は複数のタンパク質に由来する細胞内共刺激シグナル伝達ドメインを含む、請求項60～62の何れか1項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項64】

前記細胞内共刺激シグナル伝達ドメインは4-1BBに由来する共刺激シグナル伝達ドメインである、請求項63に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項65】

前記細胞内共刺激シグナル伝達ドメインは配列番号118～配列番号150の何れか1項に示されるアミノ酸配列を含む、請求項63又は64に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項66】

前記CARは、細胞内シグナル伝達ドメインを含み、前記細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3ζ、CD3δ、CD3γ、CD3ε、CD79a、CD79b、FcεRIγ、FcεRIβ、FcγRIIIa、ウシ白血病ウイルスgp30、Epstein-Barrウイルス(EBV)LMP2A、サル免疫不全ウイルスPBj14Nef、DAP10、DAP-12及び少なくとも1つのITAMを含むドメインからなる群より選ばれる1つ又は複数のタンパク質に由来する細胞内シグナル伝達ドメインを含む、請求項60～65の何れか1項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項67】

前記細胞内シグナル伝達ドメインはCD3ζに由来するシグナル伝達ドメインを含む、請求項66に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項68】

前記細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号134、配列番号138、配列番号139、配列番号151～配列番号161の何れか1項に示されるアミノ酸配列を含む、請求項66又は67に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項69】

前記CARは、標的部分と膜貫通ドメインとの間にヒンジ領域を含み、前記ヒンジ領域は、CD28、IgG1、IgG4、IgD、4-1BB、CD4、CD27、CD7、CD8A、PD-1、ICOS、OX40、NKG2D、NKG2C、FcεRIγ、BTLA、GITR、DAP10、TIM1、SLAM、CD30及びLIGHTからなる群より選ばれる1つ又は複数のタンパク質に由来するヒンジ領域を含む、請求項60～68の何れか1項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項70】

前記ヒンジ領域はCD8Aに由来するヒンジ領域を含む、請求項69に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項71】

前記ヒンジ領域は配列番号162～配列番号183の何れか1項に示されるアミノ酸配列を含む、請求項69又は70に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項72】

前記キメラ抗原受容体の非標的部分は、CD8A分子膜貫通ドメイン、CD8Aのヒンジ領域、4-1BBの細胞内共刺激シグナル伝達ドメイン及びCD3ζ細胞内シグナル伝達ドメインを含む、請求項60～71の何れか1項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項73】

前記キメラ抗原受容体の非標的部分は配列番号67に示されるアミノ酸配列を含む、請求項72に記載の免疫エフェクター細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 7 4】

前記キメラ抗原受容体は、C末端が前記標的部分のN末端に連結するシグナルペプチド断片を更に含む、請求項 6 0～7 3 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 7 5】

前記シグナルペプチド断片は C D 8 A シグナルペプチド断片を含む、請求項 7 4 に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 7 6】

前記シグナルペプチド断片は配列番号 1 8 4 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 7 4 又は 7 5 に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 7 7】

前記キメラ抗原受容体は、配列番号 4 5 又は配列番号 4 6 の何れか 1 項に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1～7 6 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 7 8】

前記免疫エフェクター細胞はヒト細胞を含む、請求項 1～7 7 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 7 9】

前記免疫エフェクター細胞は、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞（NK細胞）、マクロファージ、NK T細胞、単核細胞、樹状細胞、顆粒球、リンパ球、白血球及び／又は末梢血単核細胞を含む、請求項 1～7 8 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 8 0】

自己又は非自己の免疫エフェクター細胞を含む、請求項 1～7 9 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 8 1】

前記免疫エフェクター細胞は、修飾された免疫エフェクター細胞を含み、そのうち、前記修飾は、免疫拒絶に関連する 1 つ又は複数の遺伝子の発現及び／又は活性がダウンレギュレーションされることを含む、請求項 1～8 0 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 8 2】

前記免疫拒絶に関連する遺伝子は、T R A C、T R B C、H L A - A、H L A - B、B 2 M 及び C I I T A からなる群より選ばれる 1 つ又は複数の遺伝子である、請求項 8 1 に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 8 3】

前記修飾された免疫エフェクター細胞は、修飾されていない対応する細胞と比較して、T R A C 遺伝子及び H L A - A 遺伝子の発現及び／又は活性がダウンレギュレーションされる、請求項 8 1 又は 8 2 に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 8 4】

前記修飾された免疫エフェクター細胞は、前記修飾されていない対応する細胞と比較して、C I I T A 遺伝子の発現及び／又は活性がダウンレギュレーションされていない、請求項 8 1～8 3 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 8 5】

前記修飾された免疫エフェクター細胞は、前記修飾されていない対応する細胞と比較して、B 2 M 遺伝子の発現及び／又は活性がダウンレギュレーションされていない、請求項 8 1～8 4 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 8 6】

前記修飾された免疫エフェクター細胞は対応する野生型細胞と比較して、T R A C 遺伝子及び H L A - A 遺伝子の発現及び／又は活性はダウンレギュレーションされる、請求項 8 1～8 5 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 8 7】

前記修飾された免疫エフェクター細胞は対応する野生型細胞と比較して、B 2 M 遺伝子の発現及び／又は活性がダウンレギュレーションされていない、請求項 8 1～8 6 の何れ

10

20

30

40

50

か 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 88】

前記修飾された免疫エフェクター細胞は対応する野生型細胞と比較して、C I I T A 遺伝子の発現及び／又は活性がダウンレギュレーションされていない、請求項 81～87 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 89】

前記遺伝子の発現レベル及び／又は活性のダウンレギュレーションは、前記遺伝子をコードする核酸分子の発現及び／又は活性のダウンレギュレーション、及び／又は、前記遺伝子によってコードされるタンパク質産物の発現及び／又は活性のダウンレギュレーションを含む、請求項 81～88 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

10

【請求項 90】

前記修飾は、遺伝子ノックアウト、遺伝子変異及び／又は遺伝子サイレンシングを含む、請求項 81～89 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 91】

前記修飾は、前記免疫エフェクター細胞における 2 つの T R A C 対立遺伝子のうちの何れか 1 つがノックアウトされると共に、2 つの H L A - A 対立遺伝子のうちの何れか 1 つがノックアウトされることを含む、請求項 81～90 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 92】

前記修飾は、前記免疫細胞における 2 つの T R A C 対立遺伝子がノックアウトされると共に、2 つの H L A - A 対立遺伝子のうちの何れか 1 つがノックアウトされることを含む、請求項 81～91 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

20

【請求項 93】

前記修飾は、前記免疫細胞における T R A C 遺伝子エクソンがノックアウトされると共に、H L A - A 遺伝子エクソンがノックアウトされることを含む、請求項 81～92 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 94】

前記修飾は、アンチセンス R N A、s i R N A、s h R N A 及び C R I S P R / C a s 9 システムからなる群より選ばれる 1 つ又は複数の物質を前記免疫エフェクター細胞に投与することを含む、請求項 81～93 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

30

【請求項 95】

前記修飾は C R I S P R / C a s 9 システムを前記免疫エフェクター細胞に投与することを含む、請求項 81～94 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 96】

前記修飾は、前記 T R A C 遺伝子エクソン部分を標的とする s g R N A を前記免疫エフェクター細胞に投与することを更に含む、請求項 95 に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 97】

前記 T R A C 遺伝子エクソン部分を標的とする前記 s g R N A は、配列番号 186～配列番号 200 の何れか 1 項に示されるヌクレオチド配列を含む、請求項 96 に記載の免疫エフェクター細胞。

40

【請求項 98】

前記修飾は、前記 H L A - A 遺伝子エクソン部分を標的とする s g R N A を前記免疫エフェクター細胞に投与することを含む、請求項 95～97 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 99】

前記 H L A - A 遺伝子エクソン部分を標的とする前記 s g R N A は、配列番号 201～配列番号 241 の何れか 1 項に示されるヌクレオチド配列を含む、請求項 98 に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 100】

前記修飾は、C a s 酵素を前記細胞に投与することを更に含む、請求項 95～99 の何

50

れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 101】

Cas 酵素は Cas9 タンパク質を含む、請求項 100 に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 102】

前記アンチセンス RNA は配列番号 242 ～配列番号 245 の何れか 1 項に示されるヌクレオチド配列を含む、請求項 94 に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 103】

前記免疫エフェクター細胞は HLA-B ホモ接合体細胞である、請求項 1 ～102 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 104】

前記 HLA-A ホモ接合体は、HLA-B*40 ホモ接合体、HLA-B*15 ホモ接合体、HLA-B*46 ホモ接合体、HLA-B*13 ホモ接合体、HLA-B*51 ホモ接合体、HLA-B*58 ホモ接合体、HLA-B*07 ホモ接合体、HLA-B*35 ホモ接合体、HLA-B*44 ホモ接合体、HLA-B*52 ホモ接合体、HLA-B*57 ホモ接合体、HLA-B*54 ホモ接合体、HLA-B*55 ホモ接合体を含む、請求項 103 に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 105】

前記免疫エフェクター細胞は HLA-A ホモ接合体又はヘテロ接合体細胞である、請求項 1 ～104 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 106】

前記 HLA-A ホモ接合体又はヘテロ接合体は、HLA-A*02 ホモ接合体、HLA-A*11 ホモ接合体、HLA-A*02/A*11 ヘテロ接合体又は HLA-A*24 ホモ接合体を含む、請求項 105 に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 107】

免疫エフェクター細胞を製造する方法であって、免疫エフェクター細胞に、請求項 1 ～106 の何れか 1 項に記載の IL13R α 2 を標的とする CAR をコードするポリヌクレオチド配列、又は請求項 1 ～106 の何れか 1 項に記載の IL13R α 2 を標的とする CAR をコードするポリヌクレオチド配列を含むベクターを導入する前／後に、前記免疫エフェクター細胞が修飾されることを含み、前記修飾は、免疫拒絶に関連する 1 つ又は複数の遺伝子の発現及び／又は活性のダウンレギュレーションを含む、方法。

【請求項 108】

前記ベクターは発現ベクターである、請求項 107 に記載の方法。

【請求項 109】

前記ベクターは、DNA ベクター、RNA ベクター、プラスミド、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター及びレトロウイルスベクターから選ばれる、請求項 107 又は 108 に記載の方法。

【請求項 110】

前記免疫拒絶に関連する遺伝子は、TRAC、TRBC、HLA-A、HLA-B、B2M 及び CIIITA からなる群より選ばれる 1 つ又は複数の遺伝子である、請求項 107 ～109 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 111】

前記修飾されていない対応する細胞における対応する遺伝子の発現及び／又は活性と比較して、前記免疫エフェクター細胞における TRAC 遺伝子及び HLA-A 遺伝子の発現及び／又は活性はダウンレギュレーションされる、請求項 107 ～110 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 112】

前記修飾されていない対応する細胞における対応する遺伝子の発現及び／又は活性と比較して、CIIITA 遺伝子の発現及び／又は活性はダウンレギュレーションされていない、請求項 107 ～111 の何れか 1 項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1 3】

前記修飾されていない対応する細胞における対応する遺伝子の発現及び／又は活性と比較して、B 2 M 遺伝子の発現及び／又は活性はダウンレギュレーションされていない、請求項 1 0 7 ～ 1 1 2 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 1 4】

対応する野生型細胞と比較して、前記免疫エフェクター細胞の T R A C 遺伝子及び H L A - A 遺伝子の発現及び／又は活性はダウンレギュレーションされる、請求項 1 0 7 ～ 1 1 3 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 1 5】

対応する野生型細胞と比較して、C I I T A 遺伝子の発現及び／又は活性はダウンレギュレーションされていない、請求項 1 0 7 ～ 1 1 4 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 1 6】

対応する野生型細胞と比較して、B 2 M 遺伝子の発現及び／又は活性はダウンレギュレーションされていない、請求項 1 0 7 ～ 1 1 5 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 1 7】

前記遺伝子の発現レベル及び／又は活性のダウンレギュレーションは、前記遺伝子をコードする核酸分子の発現及び／又は活性のダウンレギュレーション、及び／又は、前記遺伝子によってコードされるタンパク質産物の発現及び／又は活性のダウンレギュレーションを含む、請求項 1 0 7 ～ 1 1 6 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 1 8】

前記修飾は、遺伝子ノックアウト、遺伝子変異及び／又は遺伝子サイレンシングを含む、請求項 1 0 7 ～ 1 1 7 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 1 9】

前記修飾は、前記免疫エフェクター細胞における 2 つの T R A C 対立遺伝子のうちの何れか 1 つがノックアウトされると共に、2 つの H L A - A 対立遺伝子のうちの何れか 1 つがノックアウトされることを含む、請求項 1 0 7 ～ 1 1 8 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 0】

前記修飾は、前記免疫細胞における 2 つの T R A C 対立遺伝子がノックアウトされると共に、2 つの H L A - A 対立遺伝子のうちの何れか 1 つがノックアウトされることを含む、請求項 1 0 7 ～ 1 1 9 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 1】

前記修飾は、前記免疫細胞における T R A C 遺伝子エクソンがノックアウトされると共に、H L A - A 遺伝子エクソンがノックアウトされることを含む、請求項 1 0 7 ～ 1 2 0 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 2】

前記修飾は、アンチセンス RNA、s i RNA、s h RNA 及び C R I S P R / C a s 9 システムからなる群より選ばれる 1 つ又は複数の物質を前記免疫エフェクター細胞に投与することを含む、請求項 1 0 7 ～ 1 2 1 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 3】

前記修飾は C R I S P R / C a s 9 システムを前記免疫エフェクター細胞に投与することを含む、請求項 1 0 7 ～ 1 2 2 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 4】

前記修飾は、前記 T R A C 遺伝子エクソン部分を標的とする s g RNA を前記免疫エフェクター細胞に投与することを含む、請求項 1 2 3 に記載の方法。

【請求項 1 2 5】

前記 T R A C 遺伝子エクソン部分を標的とする前記 s g RNA は、配列番号 1 8 6 ～ 配列番号 2 0 0 の何れか 1 項に示されるヌクレオチド配列を含む、請求項 1 2 4 に記載の方法。

【請求項 1 2 6】

前記修飾は、前記 H L A - A 遺伝子エクソン部分を標的とする s g RNA を前記免疫エ

10

20

30

40

50

フェクター細胞に投与することを含む、請求項 1 2 3 ～ 1 2 5 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 7】

前記 H L A - A 遺伝子エクソン部分を標的とする前記 s g R N A は、配列番号 2 0 1 ～ 配列番号 2 4 1 の何れか 1 項に示されるヌクレオチド配列を含む、請求項 1 2 6 に記載の方法。

【請求項 1 2 8】

前記修飾は、C a s 酵素を前記細胞に投与することを更に含む、請求項 1 2 3 ～ 1 2 7 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 9】

C a s 酵素は C a s 9 タンパク質を含む、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 3 0】

前記アンチセンス R N A は配列番号 2 4 2 ～ 配列番号 2 4 5 の何れか 1 項に示されるヌクレオチド配列を含む、請求項 1 2 2 に記載の方法。

【請求項 1 3 1】

前記免疫エフェクター細胞はヒト細胞を含む、請求項 1 0 7 ～ 1 3 0 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3 2】

前記免疫エフェクター細胞は、T 細胞、B 細胞、ナチュラルキラー細胞（NK 細胞）、マクロファージ、N K T 細胞、単核細胞、樹状細胞、顆粒球、リンパ球、白血球及び／又は末梢血単核細胞を含む、請求項 1 0 7 ～ 1 3 1 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3 3】

前記免疫エフェクター細胞は自己又は非自己の免疫エフェクター細胞を含む、請求項 1 0 7 ～ 1 3 2 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3 4】

前記細胞は H L A - B ホモ接合体細胞である、請求項 1 0 7 ～ 1 3 3 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3 5】

前記 H L A - B ホモ接合体は、H L A - B * 4 0 ホモ接合体、H L A - B * 1 5 ホモ接合体、H L A - B * 4 6 ホモ接合体、H L A - B * 1 3 ホモ接合体、H L A - B * 5 1 ホモ接合体、H L A - B * 5 8 ホモ接合体、H L A - B * 0 7 ホモ接合体、H L A - B * 3 5 ホモ接合体、H L A - B * 4 4 ホモ接合体、H L A - B * 5 2 ホモ接合体、H L A - B * 5 7 ホモ接合体、H L A - B * 5 4 ホモ接合体、H L A - B * 5 5 ホモ接合体を含む、請求項 1 3 4 に記載の方法。

【請求項 1 3 6】

前記細胞は H L A - A ホモ接合体又はヘテロ接合体細胞である、請求項 1 0 7 ～ 1 3 5 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3 7】

前記 H L A - A ホモ接合体又はヘテロ接合体は、H L A - A * 0 2 ホモ接合体、H L A - A * 1 1 ホモ接合体、H L A - A * 0 2 / A * 1 1 ヘテロ接合体又は H L A - A * 2 4 ホモ接合体を含む、請求項 1 3 6 に記載の方法。

【請求項 1 3 8】

請求項 1 ～ 1 0 6 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞の C A R - T 細胞の製造における使用。

【請求項 1 3 9】

請求項 1 ～ 1 0 6 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞、及び任意選択に薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 1 4 0】

I L 1 3 R α 2 の発現に関連する疾患又は病状の治療における、請求項 1 ～ 1 0 6 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞及び／又は請求項 1 3 9 に記載の医薬組成物の使

10

20

30

40

50

用。

【請求項 1 4 1】

前記 I L 1 3 R α 2 の発現に関連する疾患又は病状は、I L 1 3 R α 2 の発現アップレギュレーションに関連する疾患又は病状を含む、請求項 1 4 0 に記載の使用。

【請求項 1 4 2】

前記 I L 1 3 R α 2 の発現に関連する疾患又は病状は癌を含む、請求項 1 4 0 又は 1 4 1 に記載の使用。

【請求項 1 4 3】

前記癌は I L 1 3 R α 陽性腫瘍を含む、請求項 1 4 2 に記載の使用。

【請求項 1 4 4】

前記 I L 1 3 R α 陽性腫瘍は、悪性神経膠腫、結腸直腸癌、子宮頸癌、膵臓癌、皮膚黒色腫、卵巣癌、乳癌、副腎皮質癌、胸腺腫、子宮癌、膀胱癌、食道癌、頭頸部扁平上皮癌又は胃癌を含む、請求項 1 4 3 に記載の使用。

【請求項 1 4 5】

請求項 1 ～ 1 0 6 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞及び／又は請求項 1 3 9 に記載の医薬組成物の I L 1 3 R α 2 の発現に関連する疾患又は病状の治療用の医薬の製造における使用。

【請求項 1 4 6】

前記 I L 1 3 R α 2 の発現に関連する疾患又は病状は、I L 1 3 R α 2 の発現アップレギュレーションに関連する疾患又は病状を含む、請求項 1 4 5 に記載の使用。

【請求項 1 4 7】

前記 I L 1 3 R α 2 の発現に関連する疾患又は病状は癌を含む、請求項 1 4 5 又は 1 4 6 に記載の使用。

【請求項 1 4 8】

前記癌は I L 1 3 R α 陽性腫瘍を含む、請求項 1 4 7 に記載の使用。

【請求項 1 4 9】

前記 I L 1 3 R α 陽性腫瘍は、悪性神経膠腫、結腸直腸癌、子宮頸癌、膵臓癌、皮膚黒色腫、卵巣癌、乳癌、副腎皮質癌、胸腺腫、子宮癌、膀胱癌、食道癌、頭頸部扁平上皮癌又は胃癌を含む、請求項 1 4 8 に記載の使用。

【請求項 1 5 0】

I L 1 3 R α 2 の発現に関連する疾患又は病状を予防又は治療するための方法であって、それを必要とする対象に有効量の請求項 1 ～ 1 0 6 の何れか 1 項に記載の免疫エフェクター細胞及び／又は請求項 1 3 9 に記載の医薬組成物を投与することを含む、方法。

【請求項 1 5 1】

前記 I L 1 3 R α 2 の発現に関連する疾患又は病状は、I L 1 3 R α 2 の発現アップレギュレーションに関連する疾患又は病状を含む、請求項 1 5 0 に記載の方法。

【請求項 1 5 2】

前記 I L 1 3 R α 2 の発現に関連する疾患又は病状は癌を含む、請求項 1 5 0 又は 1 5 1 に記載の方法。

【請求項 1 5 3】

前記癌は I L 1 3 R α 陽性腫瘍を含む、請求項 1 5 2 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 5 4】

前記 I L 1 3 R α 陽性腫瘍は、悪性神経膠腫、結腸直腸癌、子宮頸癌、膵臓癌、皮膚黒色腫、卵巣癌、乳癌、副腎皮質癌、胸腺腫、子宮癌、膀胱癌、食道癌、頭頸部扁平上皮癌又は胃癌を含む、請求項 1 5 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本出願は、生物医学の分野に関し、具体的には I L 1 3 R α 2 を標的としたユニバーサル C A R - T 細胞及びその製造方法と使用に関する。

10

20

30

40

50

【背景技術】

【0002】

IL-13R α 2は、悪性神経膠腫、膵臓癌、卵巣癌、乳癌、結腸癌などの様々なにおいて高度に発現している。このうち、神経膠腫は、神経膠細胞に由来する腫瘍を指し、最も一般的な原発性頭蓋内腫瘍である。過去30年間、原発性悪性脳腫瘍の発生率は年々増加している。中枢神経系原発悪性腫瘍において、膠芽腫（Glioblastoma、GBM、WHO IVグレード）の発生率が最も高く、46.1%を占める。神経膠腫では、IL-13R α 2の発現は神経膠腫の悪性度と正の相関を呈し、高悪性度の神経膠腫ではIL-13R α 2の発現が高く、低悪性度又は正常な脳組織ではIL-13R α 2の発現が低いか又は発現しなく、かつIL-13R α 2の高発現は予後不良と関連する。神経膠腫では、高発現のIL-13R α 2は、神経膠腫細胞の増殖、遊走、浸潤を促進し、この効果はSRC/PI3K/ATK/mTOR経路の活性化によって実現される。神経膠腫の治療は、手術による腫瘍切除を主とし、放射線療法、化学療法などの総合的な治療法を組み合わせる。神経膠腫の化学療法は、常に単剤と複数の薬物の併用の方案を用いる。しかしながら、現在の神経膠腫は全体として治療効果が乏しく、成人の高悪性度神経膠腫の1年と5年の生存率はそれぞれ30%と13%であり、退形成性神経膠腫とGBMの生存期間中央値はそれぞれ2~3年と1年である。従って、神経膠腫の新たな治療法の確立が臨床上必要とされている。

10

【0003】

米国のKatarzyna C. Pituch研究チームとベイラー医科大学は、共同でIL-13R α 2 CAR-Tを標的とする前臨床研究を展開し、その研究は、インビトロ腫瘍細胞モデル殺傷実験において、IL-13R α 2 CAR-Tは、IL-13R α 2発現陽性の腫瘍細胞を特異的に殺傷することが発見され、同時に、研究チームは、IL-13R α 2 CAR-Tを投与された担腫瘍マウスの実験群の生存率が他の実験群より明らかに高いことを発見した。また、Christine E. Brownのチームは、NEJM雑誌において、IL-13R α 2 CAR-T治療を受けた症例を報告した。原発巣が右側頭葉に位置する再発性悪性神経膠腫の患者は、その後研究者の臨床研究に参加し、患者はIL-13R α 2 CAR-T病巣腔注射を6回連続して受け、全治療は約7.5ヶ月続き、患者の病状が制御され、病巣の進行も再発もなく、治療期間全体において、患者は3グレード以上の有害反応が起こらず、脳脊髄液中の免疫細胞数とサイトカインレベルが顕著に増加し、IL-13R α 2 CAR-Tの良好な安全性および臨床治療への使用の見通しが示された。

20

30

【0004】

しかしながら、患者の自己由来T細胞は、体外での増幅が困難であり、又は機能が低下するため、製造されたCAR-T細胞産物の量が不十分であり、又は品質が低くなる。ユニバーサルCAR-T細胞は健常ドナーから単離されたT細胞であり、製造されたCAR-T細胞は、増幅効率が高く、活性が高いだけでなく、感染陽性率も向上しているが、ユニバーサルCAR-T細胞は移植物対宿主病（GVHD）及び免疫拒絶の問題も直面している。CRISPR/Cas9システムは、TCR欠損及びHLAクラスI分子欠損のT細胞を産生し、同種異系細胞療法によって引き起こされる免疫拒絶反応を低減するために、最も一般的に使用されている遺伝子編集方法である。従来のCAR-T細胞製品と比較して、同種異系ユニバーサルCAR-T細胞は製造コストを大幅に削減し、製造周期を短縮する。ユニバーサルCAR-Tは、抗原の認識範囲を拡大するだけでなく、遺伝子ノックアウトを通じて免疫抑制微小環境を変化させ、悪性血液腫瘍や固形腫瘍の治療にも適用できる。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明の目的は、腫瘍細胞表面抗原を認識すると同時に、細胞によって発現されるTCR及びHLA-A遺伝子をノックアウトすることで、CAR-T細胞の抗腫瘍効果を向上

50

させ、細胞の生存時間を延長し、同時に同種異系細胞療法によって引き起こされる免疫拒絶反応の多重効果を低減する、 $IL-13R\alpha 2$ を標的とするユニバーサルCAR-T細胞を製造することである。

【0006】

一態様では、本出願は、免疫エフェクター細胞であって、上記免疫エフェクター細胞におけるT細胞抗原受容体(TCR)及び主要組織適合性複合体(MHCI、MHCII)の細胞における機能が阻害され、且つ上記免疫エフェクター細胞は、 $IL13R\alpha 2$ を標的とするキメラ抗原受容体(CAR)を含む、免疫エフェクター細胞を提供する。

【0007】

幾つかの実施形態において、上記の $IL13R\alpha 2$ を標的とするキメラ抗原受容体(CAR)は標的部分を含み、上記標的部分は、抗体重鎖可変領域(VH)の少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)を含み、上記VHは配列番号18に示されるアミノ酸配列を含む。

10

【0008】

幾つかの実施形態において、上記VHは配列番号16又は配列番号17に示されるアミノ酸配列を含む。

【0009】

幾つかの実施形態において、上記の $IL13R\alpha 2$ を標的とするキメラ抗原受容体(CAR)は、VHを含む標的部分を含み、上記VHは、重鎖相補性決定領域1(HCDR1)、重鎖相補性決定領域2(HCDR2)、及び重鎖相補性決定領域3(HCDR3)を含み、上記HCDR3は配列番号3に示されるアミノ酸配列を含む。

20

【0010】

幾つかの実施形態において、上記HCDR2は配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む。

【0011】

幾つかの実施形態において、上記HCDR1は配列番号1に示されるアミノ酸配列を含む。

【0012】

幾つかの実施形態において、上記VHは、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するHCDR1、配列番号2に示されるアミノ酸配列を有するHCDR2及び配列番号3に示されるアミノ酸配列を有するHCDR3を含む。

30

【0013】

幾つかの実施形態において、上記VHは、重鎖フレームワーク領域1(HFR1)、重鎖フレームワーク領域2(HFR2)、重鎖フレームワーク領域3(HFR3)及び重鎖フレームワーク領域4(HFR4)を含み、上記HFR1は配列番号4に示されるアミノ酸配列を含む。

【0014】

幾つかの実施形態において、上記HFR1は配列番号8又は配列番号12に示されるアミノ酸配列を含む。

【0015】

幾つかの実施形態において、上記HFR2は配列番号5に示されるアミノ酸配列を含む。

40

【0016】

幾つかの実施形態において、上記HFR2は配列番号9又は配列番号13に示されるアミノ酸配列を含む。

【0017】

幾つかの実施形態において、上記HFR3は配列番号6に示されるアミノ酸配列を含む。

【0018】

幾つかの実施形態において、上記HFR3は配列番号10又は配列番号14に示される

50

アミノ酸配列を含む。

【0019】

幾つかの実施形態において、上記HFR4は配列番号7に示されるアミノ酸配列を含む。

【0020】

幾つかの実施形態において、上記HFR4は配列番号11又は配列番号15に示されるアミノ酸配列を含む。

【0021】

幾つかの実施形態において、上記VHはHFR1、HFR2、HFR3及びHFR4を含み、且つ上記HFR1、HFR2、HFR3及びHFR4は、

i) 配列番号8に示されるアミノ酸配列を含むHFR1、配列番号9に示されるアミノ酸配列を含むHFR2、配列番号10に示されるアミノ酸配列を含むHFR3、配列番号11に示されるアミノ酸配列を含むHFR4、及び

ii) 配列番号12に示されるアミノ酸配列を含むHFR1、配列番号13に示されるアミノ酸配列を含むHFR2、配列番号14に示されるアミノ酸配列を含むHFR3、配列番号15に示されるアミノ酸配列を含むHFR4、から選ばれる。

【0022】

幾つかの実施形態において、上記VHは配列番号18に示されるアミノ酸配列を含む。

【0023】

幾つかの実施形態において、上記VHは配列番号16又は配列番号17に示されるアミノ酸配列を含む。

【0024】

幾つかの実施形態において、上記標的部分は、抗体軽鎖可変領域(VL)の少なくとも1つのCDRを更に含み、上記VLは配列番号36に示されるアミノ酸配列を含む。

【0025】

幾つかの実施形態において、上記VLは配列番号34又は配列番号35に示されるアミノ酸配列を含む。

【0026】

幾つかの実施形態において、上記標的部分は、VHの少なくとも1つのCDR及びVLの少なくとも1つのCDRを含み、且つ上記VH及びVLは、

i) 配列番号16に示されるアミノ酸配列を含むVH、配列番号34に示されるアミノ酸配列を含むVL、及び

ii) 配列番号17に示されるアミノ酸配列を含むVH、配列番号35に示されるアミノ酸配列を含むVL、から選ばれる。

【0027】

幾つかの実施形態において、上記のIL13R α 2を標的とするキメラ抗原受容体(CAR)は、VLを含む標的部分を含み、上記VLは、軽鎖相補性決定領域1(LCDR1)、軽鎖相補性決定領域2(LCDR2)、及び軽鎖相補性決定領域3(LCDR3)を含み、上記LCDR1は配列番号19に示されるアミノ酸配列を含む。

【0028】

幾つかの実施形態において、上記LCDR2は配列番号20に示されるアミノ酸配列を含む。

【0029】

幾つかの実施形態において、上記LCDR3は配列番号21に示されるアミノ酸配列を含む。

【0030】

幾つかの実施形態において、上記VLは、配列番号19に示されるアミノ酸配列を有するLCDR1、配列番号20に示されるアミノ酸配列を有するLCDR2及び配列番号21に示されるアミノ酸配列を有するLCDR3を含む。

【0031】

10

20

30

40

50

幾つかの実施形態において、上記 V L は、軽鎖フレームワーク領域 1 (L F R 1)、軽鎖フレームワーク領域 2 (L F R 2)、軽鎖フレームワーク領域 3 (L F R 3) 及び軽鎖フレームワーク領域 4 (L F R 4) を含み、上記 L F R 1 は配列番号 2 2 に示されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 3 2 】

幾つかの実施形態において、上記 L F R 1 は配列番号 2 6 又は配列番号 3 0 に示されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 3 3 】

幾つかの実施形態において、上記 L F R 2 は配列番号 2 3 に示されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 3 4 】

幾つかの実施形態において、上記 L F R 2 は配列番号 2 7 又は配列番号 3 1 に示されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 3 5 】

幾つかの実施形態において、上記 L F R 3 は配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 3 6 】

幾つかの実施形態において、上記 L F R 3 は配列番号 2 8 又は配列番号 3 2 に示されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 3 7 】

幾つかの実施形態において、上記 L F R 4 は配列番号 2 5 に示されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 3 8 】

幾つかの実施形態において、上記 L F R 4 は配列番号 2 9 又は配列番号 3 3 に示されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 3 9 】

幾つかの実施形態において、上記 V L は L F R 1、L F R 2、L F R 3 及び L F R 4 を含み、且つ上記 L F R 1、L F R 2、L F R 3 及び L F R 4 は、

i) 配列番号 2 6 に示されるアミノ酸配列を含む L F R 1、配列番号 2 7 に示されるアミノ酸配列を含む L F R 2、配列番号 2 8 に示されるアミノ酸配列を含む L F R 3、配列番号 2 9 に示されるアミノ酸配列を含む L F R 4、及び

i i) 配列番号 3 0 に示されるアミノ酸配列を含む L F R 1、配列番号 3 1 に示されるアミノ酸配列を含む L F R 2、配列番号 3 2 に示されるアミノ酸配列を含む L F R 3、配列番号 3 3 に示されるアミノ酸配列を含む L F R 4、から選ばれる。

【 0 0 4 0 】

幾つかの実施形態において、上記 V L は配列番号 3 6 に示されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 4 1 】

幾つかの実施形態において、上記 V L は配列番号 3 4 又は配列番号 3 5 に示されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 4 2 】

幾つかの実施形態において、上記標的部分は V H 及び V L を含み、そのうち、上記 V H は配列番号 1 8 に示されるアミノ酸配列を含み、上記 V L は配列番号 3 6 に示されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 4 3 】

幾つかの実施形態において、上記 V H 及び V L は、

i) 配列番号 1 6 に示されるアミノ酸配列を含む V H、配列番号 3 4 に示されるアミノ酸配列を含む V L、及び

i i) 配列番号 1 7 に示されるアミノ酸配列を含む V H、配列番号 3 5 に示されるアミノ酸配列を含む V L、から選ばれる。

【 0 0 4 4 】

10

20

30

40

50

幾つかの実施形態において、そのうち、上記標的部分は、全長抗体、F a b、単鎖可変断片（s c F v）又は単ドメイン抗体（V H H）を含む。

【0045】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記標的部分はs c F vを含む。

【0046】

幾つかの実施形態において、上記標的部分は、配列番号41又は配列番号44に示されるアミノ酸配列を含む。

【0047】

幾つかの実施形態において、上記標的部分は、配列番号39、配列番号40、配列番号42又は配列番号43に示されるアミノ酸配列を含む。

【0048】

幾つかの実施形態において、上記のI L 1 3 R α 2を標的とするキメラ抗原受容体（C A R）は標的部分を含み、上記標的部分は、抗体重鎖可変領域（V H）の少なくとも1つの相補性決定領域（C D R）を含み、上記V Hは配列番号56に示されるアミノ酸配列を含む。

【0049】

幾つかの実施形態において、上記のI L 1 3 R α 2を標的とするキメラ抗原受容体（C A R）は、V Hを含む標的部分を含み、上記V Hは、重鎖相補性決定領域1（H C D R 1）、重鎖相補性決定領域2（H C D R 2）、及び重鎖相補性決定領域3（H C D R 3）を含み、上記H C D R 3は配列番号55に示されるアミノ酸配列を含む。

【0050】

幾つかの実施形態において、上記H C D R 2は配列番号54に示されるアミノ酸配列を含む。

【0051】

幾つかの実施形態において、上記H C D R 1は配列番号53に示されるアミノ酸配列を含む。

【0052】

幾つかの実施形態において、上記V Hは、配列番号53に示されるアミノ酸配列を有するH C D R 1、配列番号54に示されるアミノ酸配列を有するH C D R 2及び配列番号55に示されるアミノ酸配列を有するH C D R 3を含む。

【0053】

幾つかの実施形態において、上記V Hは配列番号56に示されるアミノ酸配列を含む。

【0054】

幾つかの実施形態において、上記標的部分は、抗体軽鎖可変領域（V L）の少なくとも1つのC D Rを更に含み、上記V Lは配列番号60に示されるアミノ酸配列を含む。

【0055】

幾つかの実施形態において、上記標的部分はV Hの少なくとも1つのC D R及びV Lの少なくとも1つのC D Rを含み、且つ上記V Hは配列番号56に示されるアミノ酸配列を含み、上記V Lは配列番号60に示されるアミノ酸配列を含む。

【0056】

幾つかの実施形態において、上記のI L 1 3 R α 2を標的とするキメラ抗原受容体（C A R）は、V Lを含む標的部分を含み、上記V Lは、軽鎖相補性決定領域1（L C D R 1）、軽鎖相補性決定領域2（L C D R 2）、及び軽鎖相補性決定領域3（L C D R 3）を含み、上記L C D R 1は配列番号57に示されるアミノ酸配列を含む。

【0057】

幾つかの実施形態において、上記L C D R 2は配列番号58に示されるアミノ酸配列を含む。

【0058】

幾つかの実施形態において、上記L C D R 3は配列番号59に示されるアミノ酸配列を含む。

10

20

30

40

50

【0059】

幾つかの実施形態において、上記VLは、配列番号57に示されるアミノ酸配列を有するLCDR1、配列番号58に示されるアミノ酸配列を有するLCDR2及び配列番号59に示されるアミノ酸配列を有するLCDR3を含む。

【0060】

幾つかの実施形態において、上記VLは配列番号60に示されるアミノ酸配列を含む。

【0061】

幾つかの実施形態において、上記標的部分はVH及びVLを含み、そのうち、上記VHは配列番号56に示されるアミノ酸配列を含み、上記VLは配列番号60に示されるアミノ酸配列を含む。

【0062】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記標的部分は、全長抗体、Fab、単鎖可変断片(scFv)又は単ドメイン抗体(VHH)を含む。

【0063】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記標的部分はscFvを含む。

【0064】

幾つかの実施形態において、上記標的部分は配列番号61又は配列番号62に示されるアミノ酸配列を含む。

【0065】

幾つかの実施形態において、上記CARは、膜貫通ドメインを含み、上記膜貫通ドメインは、CD8A、CD8B、CD28、CD3ε(CD3e)、4-1BB、CD4、CD27、CD7、PD-1、TRAC、TRBC、CD3ζ、CTLA-4、LAG-3、CD5、ICOS、OX40、NKG2D、2B4、CD244、FcεRIγ、BTLA、CD30、GITR、HVEM、DAP10、CD2、NKG2C、LIGHT、DAP12、CD40L(CD154)、TIM1、CD226、DR3、CD45、CD80、CD86、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64及びSLAMからなる群より選ばれる1つ又は複数のタンパク質に由来する膜貫通ドメインを含む。

【0066】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記膜貫通ドメインはCD8Aに由来する膜貫通ドメインを含む。

【0067】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記膜貫通ドメインは配列番号69～配列番号117の何れか1項に示されるアミノ酸配列を含む。

【0068】

幾つかの実施形態において、上記CARは、細胞内共刺激シグナル伝達ドメインを含み、上記細胞内共刺激シグナル伝達ドメインは、CD28、4-1BB(CD137)、CD27、CD2、CD7、CD8A、CD8B、OX40、CD226、DR3、SLAM、CDS、ICAM-1、NKG2D、NKG2C、B7-H3、2B4、FcεRIγ、BTLA、GITR、HVEM、DAP10、DAP12、CD30、CD40、CD40L、TIM1、PD-1、LFA-1、LIGHT、JAML、CD244、CD100、ICOS、CD40及びMyD88からなる群より選ばれる1つ又は複数のタンパク質に由来する細胞内共刺激シグナル伝達ドメインを含む。

【0069】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記細胞内共刺激シグナル伝達ドメインは4-1BBに由来する共刺激シグナル伝達ドメインである。

【0070】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記細胞内共刺激シグナル伝達ドメインは配列番号118～配列番号150の何れか1項に示されるアミノ酸配列を含む。

【0071】

10

20

30

40

50

幾つかの実施形態において、上記CARは、細胞内シグナル伝達ドメインを含み、上記細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3 ζ 、CD3 δ 、CD3 γ 、CD3 ϵ 、CD79a、CD79b、Fc ϵ RI γ 、Fc ϵ RI β 、Fc γ RIIa、ウシ白血病ウイルスgp30、Epstein-Barrウイルス(EBV) LMP2A、サル免疫不全ウイルスPBj14Nef、DAP10、DAP-12及び少なくとも1つのITAMを含むドメインからなる群より選ばれる1つ又は複数のタンパク質に由来する細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【0072】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記細胞内シグナル伝達ドメインはCD3 ζ に由来するシグナル伝達ドメインを含む。

【0073】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号134、配列番号138、配列番号139、配列番号151～配列番号161の何れか1項に示されるアミノ酸配列を含む。

【0074】

幾つかの実施形態において、上記CARは、標的部分と膜貫通ドメインとの間にヒンジ領域を含み、上記ヒンジ領域は、CD28、IgG1、IgG4、IgD、4-1BB、CD4、CD27、CD7、CD8A、PD-1、ICOS、OX40、NKG2D、NKG2C、Fc ϵ RI γ 、BTLA、GITR、DAP10、TIM1、SLAM、CD30及びLIGHTからなる群より選ばれる1つ又は複数のタンパク質に由来するヒンジ領域を含む。

【0075】

幾つかの実施形態において、上記ヒンジ領域はCD8Aに由来するヒンジ領域を含む。

【0076】

幾つかの実施形態において、上記ヒンジ領域は配列番号162～配列番号183の何れか1項に示されるアミノ酸配列を含む。

【0077】

幾つかの実施形態において、上記キメラ抗原受容体の非標的部分は、CD8A分子膜貫通ドメイン、CD8Aのヒンジ領域、4-1BBの細胞内共刺激シグナル伝達ドメイン及びCD3 ζ 細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【0078】

幾つかの実施形態において、上記キメラ抗原受容体の非標的部分は配列番号67に示されるアミノ酸配列を含む。

【0079】

幾つかの実施形態において、C末端が上記標的部分のN末端に連結するシグナルペプチド断片を更に含む。

【0080】

幾つかの実施形態において、上記シグナルペプチド断片はCD8Aシグナルペプチド断片を含む。

【0081】

幾つかの実施形態において、上記シグナルペプチド断片は配列番号184に示されるアミノ酸配列を含む。

【0082】

幾つかの実施形態において、上記キメラ抗原受容体は、配列番号45又は配列番号46の何れか1項に示されるアミノ酸配列を含む。

【0083】

幾つかの実施形態において、上記免疫エフェクター細胞はヒト細胞を含む。

【0084】

幾つかの実施形態において、上記免疫エフェクター細胞は、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞(NK細胞)、マクロファージ、NKT細胞、単核細胞、樹状細胞、顆粒球

10

20

30

40

50

、リンパ球、白血球及び／又は末梢血単核細胞を含む。

【0085】

幾つかの実施形態において、上記免疫エフェクター細胞は自己又は非自己の免疫エフェクター細胞を含む。

【0086】

幾つかの実施形態において、上記免疫エフェクター細胞は、修飾された免疫エフェクター細胞を含み、そのうち、上記修飾は、免疫拒絶に関連する1つ又は複数の遺伝子の発現及び／又は活性がダウンレギュレーションされることを含む。

【0087】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記免疫拒絶に関連する遺伝子は、TRAC、TRBC、HLA-A、HLA-B、B2M及びCIITAからなる群より選ばれる1つ又は複数の遺伝子である。

【0088】

幾つかの実施形態において、上記修飾された免疫エフェクター細胞は、修飾されていない対応する細胞と比較して、TRAC遺伝子及びHLA-A遺伝子の発現及び／又は活性がダウンレギュレーションされる。

【0089】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記修飾された免疫エフェクター細胞は、上記修飾されていない対応する細胞と比較して、CIITA遺伝子の発現及び／又は活性がダウンレギュレーションされていない。

【0090】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記修飾された免疫エフェクター細胞は、上記修飾されていない対応する細胞と比較して、B2M遺伝子の発現及び／又は活性がダウンレギュレーションされていない。

【0091】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記修飾された免疫エフェクター細胞は対応する野生型細胞と比較して、TRAC遺伝子及びHLA-A遺伝子の発現及び／又は活性がダウンレギュレーションされる。

【0092】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記修飾された免疫エフェクター細胞は対応する野生型細胞と比較して、B2M遺伝子の発現及び／又は活性がダウンレギュレーションされていない。

【0093】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記修飾された免疫エフェクター細胞は対応する野生型細胞と比較して、CIITA遺伝子の発現及び／又は活性がダウンレギュレーションされていない。

【0094】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記遺伝子の発現レベル及び／又は活性のダウンレギュレーションは、上記遺伝子をコードする核酸分子の発現及び／又は活性のダウンレギュレーション、及び／又は、上記遺伝子によってコードされるタンパク質産物の発現及び／又は活性のダウンレギュレーションを含む。

【0095】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記修飾は、遺伝子ノックアウト、遺伝子変異及び／又は遺伝子サイレンシングを含む。

【0096】

幾つかの実施形態において、上記修飾は、上記免疫エフェクター細胞における2つのTRAC対立遺伝子のうちの何れか1つがノックアウトされると共に、2つのHLA-A対立遺伝子のうちの何れか1つがノックアウトされることを含む。

【0097】

幾つかの実施形態において、上記修飾は、上記免疫細胞における2つのTRAC対立遺

10

20

30

40

50

伝子がノックアウトされると共に、2つのHLA-A対立遺伝子のうちの何れか1つがノックアウトされることを含む。

【0098】

幾つかの実施形態において、上記修飾は、上記免疫細胞におけるTRAC遺伝子エクソンがノックアウトされると共に、HLA-A遺伝子エクソンがノックアウトされることを含む。

【0099】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記修飾は、アンチセンスRNA、siRNA、shRNA及びCRISPR/Cas9システムからなる群より選ばれる1つ又は複数の物質を上記免疫エフェクター細胞に投与することを含む。

【0100】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記修飾はCRISPR/Cas9システムを上記免疫エフェクター細胞に投与することを含む。

【0101】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記修飾は、上記TRAC遺伝子エクソン部分を標的とするsgRNAを上記免疫エフェクター細胞に投与することを更に含む。

【0102】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記TRAC遺伝子エクソン部分を標的とする上記sgRNAは、配列番号186～配列番号200の何れか1項に示されるヌクレオチド配列を含む。

【0103】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記修飾は、上記HLA-A遺伝子エクソン部分を標的とするsgRNAを上記免疫エフェクター細胞に投与することを含む。

【0104】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記HLA-A遺伝子エクソン部分を標的とする上記sgRNAは、配列番号201～配列番号241の何れか1項に示されるヌクレオチド配列を含む。

【0105】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記修飾は、Cas酵素を上記細胞に投与することを更に含む。

【0106】

幾つかの実施形態において、そのうち、Cas酵素はCas9タンパク質を含む。

【0107】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記アンチセンスRNAは配列番号242～配列番号245の何れか1項に示されるヌクレオチド配列を含む。

【0108】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記免疫エフェクター細胞はHLA-Bホモ接合体細胞である。

【0109】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記HLA-Bホモ接合体は、HLA-B*40ホモ接合体、HLA-B*15ホモ接合体、HLA-B*46ホモ接合体、HLA-B*13ホモ接合体、HLA-B*51ホモ接合体、HLA-B*58ホモ接合体、HLA-B*07ホモ接合体、HLA-B*35ホモ接合体、HLA-B*44ホモ接合体、HLA-B*52ホモ接合体、HLA-B*57ホモ接合体、HLA-B*54ホモ接合体、HLA-B*55ホモ接合体を含む。

【0110】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記免疫エフェクター細胞はHLA-Aホモ接合体又はヘテロ接合体細胞である。

【0111】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記HLA-Aホモ接合体又はヘテロ接合体は

10

20

30

40

50

、H L A - A * 0 2 ホモ接合体、H L A - A * 1 1 ホモ接合体、H L A - A * 0 2 / A * 1 1 ヘテロ接合体又はH L A - A * 2 4 ホモ接合体を含む。

【0112】

別の態様において、本発明は、前述の免疫エフェクター細胞を製造する方法であって、免疫エフェクター細胞に、前述のI L 1 3 R α 2を標的とするC A Rをコードするポリヌクレオチド配列、又は前述のI L 1 3 R α 2を標的とするC A Rをコードするポリヌクレオチド配列を含むベクターを導入する前／後に、上記免疫エフェクター細胞が修飾されることを含み、上記修飾は、免疫拒絶に関連する1つ又は複数の遺伝子の発現及び／又は活性のダウンレギュレーションを含む、方法を提供する。

【0113】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記ベクターは発現ベクターである。

【0114】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記ベクターは、D N Aベクター、R N Aベクター、プラスミド、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター及びレトロウイルスベクターから選ばれる。

【0115】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記免疫拒絶に関連する遺伝子は、T R A C、T R B C、H L A - A、H L A - B、B 2 M及びC I I T Aからなる群より選ばれる1つ又は複数の遺伝子である。

【0116】

幾つかの実施形態において、上記修飾されていない対応する細胞における対応する遺伝子の発現及び／又は活性と比較して、上記免疫エフェクター細胞におけるT R A C遺伝子及びH L A - A遺伝子の発現及び／又は活性はダウンレギュレーションされる。

【0117】

幾つかの実施形態において、上記修飾されていない対応する細胞における対応する遺伝子の発現及び／又は活性と比較して、C I I T A遺伝子の発現及び／又は活性はダウンレギュレーションされていない。

【0118】

幾つかの実施形態において、上記修飾されていない対応する細胞における対応する遺伝子の発現及び／又は活性と比較して、B 2 M遺伝子の発現及び／又は活性はダウンレギュレーションされていない。

【0119】

幾つかの実施形態において、対応する野生型細胞と比較して、上記免疫エフェクター細胞のT R A C遺伝子及びH L A - A遺伝子の発現及び／又は活性はダウンレギュレーションされる。

【0120】

幾つかの実施形態において、対応する野生型細胞と比較して、C I I T A遺伝子の発現及び／又は活性はダウンレギュレーションされていない。

【0121】

幾つかの実施形態において、対応する野生型細胞と比較して、B 2 M遺伝子の発現及び／又は活性はダウンレギュレーションされていない。

【0122】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記遺伝子の発現レベル及び／又は活性のダウンレギュレーションは、上記遺伝子をコードする核酸分子の発現及び／又は活性のダウンレギュレーション、及び／又は、上記遺伝子によってコードされるタンパク質産物の発現及び／又は活性のダウンレギュレーションを含む。

【0123】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記修飾は、遺伝子ノックアウト、遺伝子変異及び／又は遺伝子サイレンシングを含む。

【0124】

10

20

30

40

50

幾つかの実施形態において、上記修飾は、上記免疫エフェクター細胞における2つのT R A C対立遺伝子のうちの何れか1つがノックアウトされると共に、2つのH L A - A対立遺伝子のうちの何れか1つがノックアウトされることを含む。

【0125】

幾つかの実施形態において、上記修飾は、上記免疫細胞における2つのT R A C対立遺伝子がノックアウトされると共に、2つのH L A - A対立遺伝子のうちの何れか1つがノックアウトされることを含む。

【0126】

幾つかの実施形態において、上記修飾は、上記免疫細胞におけるT R A C遺伝子エクソンがノックアウトされると共に、H L A - A遺伝子エクソンがノックアウトされることを含む。

【0127】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記修飾は、アンチセンスRNA、s i RNA、s h RNA及びC R I S P R / C a s 9システムからなる群より選ばれる1つ又は複数の物質を上記免疫エフェクター細胞に投与することを含む。

【0128】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記修飾はC R I S P R / C a s 9システムを上記免疫エフェクター細胞に投与することを含む。

【0129】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記修飾は、上記T R A C遺伝子エクソン部分を標的とするs g RNAを上記免疫エフェクター細胞に投与することを含む。

【0130】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記T R A C遺伝子エクソン部分を標的とする上記s g RNAは、配列番号186～配列番号200の何れか1項に示されるヌクレオチド配列を含む。

【0131】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記修飾は、上記H L A - A遺伝子エクソン部分を標的とするs g RNAを上記免疫エフェクター細胞に投与することを含む。

【0132】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記H L A - A遺伝子エクソン部分を標的とする上記s g RNAは、配列番号201～配列番号241の何れか1項に示されるヌクレオチド配列を含む。

【0133】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記修飾は、C a s酵素を上記細胞に投与することを更に含む。

【0134】

幾つかの実施形態において、そのうち、C a s酵素はC a s 9タンパク質を含む。

【0135】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記アンチセンスRNAは配列番号242～配列番号245の何れか1項に示されるヌクレオチド配列を含む。

【0136】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記免疫エフェクター細胞はヒト細胞を含む。

【0137】

幾つかの実施形態において、上記免疫エフェクター細胞は、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞（NK細胞）、マクロファージ、NK T細胞、単核細胞、樹状細胞、顆粒球、リンパ球、白血球及び／又は末梢血単核細胞を含む。

【0138】

幾つかの実施形態において、上記免疫エフェクター細胞は自己又は非自己の免疫エフェクター細胞を含む。

【0139】

10

20

30

40

50

幾つかの実施形態において、そのうち、上記細胞はHLA-Bホモ接合体細胞である。

【0140】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記HLA-Bホモ接合体は、HLA-B*40ホモ接合体、HLA-B*15ホモ接合体、HLA-B*46ホモ接合体、HLA-B*13ホモ接合体、HLA-B*51ホモ接合体、HLA-B*58ホモ接合体、HLA-B*07ホモ接合体、HLA-B*35ホモ接合体、HLA-B*44ホモ接合体、HLA-B*52ホモ接合体、HLA-B*57ホモ接合体、HLA-B*54ホモ接合体、HLA-B*55ホモ接合体を含む。

【0141】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記細胞はHLA-Aホモ接合体又はヘテロ接合体細胞である。

10

【0142】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記HLA-Aホモ接合体又はヘテロ接合体は、HLA-A*02ホモ接合体、HLA-A*11ホモ接合体、HLA-A*02/A*11ヘテロ接合体又はHLA-A*24ホモ接合体を含む。

【0143】

別の態様において、本出願は、前述の免疫エフェクター細胞のCAR-T細胞の製造における使用を更に提供する。

【0144】

別の態様において、本出願は、前述の免疫エフェクター細胞、及び任意選択に薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を更に提供する。

20

【0145】

別の態様において、本出願は、IL13R α 2の発現に関連する疾患又は病状の治療における、前述の免疫エフェクター細胞及び／又は前述の医薬組成物の使用を更に提供する。

【0146】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記IL13R α 2の発現に関連する疾患又は病状は、IL13R α 2の発現アップレギュレーションに関連する疾患又は病状を含む。

【0147】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記IL13R α 2の発現に関連する疾患又は病状は癌を含む。

30

【0148】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記癌はIL13R α 陽性腫瘍を含む。

【0149】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記IL13R α 陽性腫瘍は、悪性神経膠腫、結腸直腸癌、子宮頸癌、膵臓癌、皮膚黒色腫、卵巣癌、乳癌、副腎皮質癌、胸腺腫、子宮癌、膀胱癌、食道癌、頭頸部扁平上皮癌又は胃癌を含む。

【0150】

別の態様において、本出願は、前述の免疫エフェクター細胞及び／又は前述の医薬組成物のIL13R α 2の発現に関連する疾患又は病状の治療用の医薬の製造における使用を更に提供する。

40

【0151】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記IL13R α 2の発現に関連する疾患又は病状は、IL13R α 2の発現アップレギュレーションに関連する疾患又は病状を含む。

【0152】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記IL13R α 2の発現に関連する疾患又は病状は癌を含む。

【0153】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記癌はIL13R α 陽性腫瘍を含む。

【0154】

50

幾つかの実施態様において、そのうち、上記 I L 1 3 R α 陽性腫瘍は、悪性神経膠腫、結腸直腸癌、子宮頸癌、膵臓癌、皮膚黒色腫、卵巣癌、乳癌、副腎皮質癌、胸腺腫、子宮癌、膀胱癌、食道癌、頭頸部扁平上皮癌又は胃癌を含む。

【0155】

別の態様において、本出願は、それを必要とする対象に有効量の前述の免疫エフェクター細胞及び／又は前述の医薬組成物を投与することを含む、I L 1 3 R α 2 の発現に関連する疾患又は病状を予防又は治療するための方法を更に提供する。

【0156】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記 I L 1 3 R α 2 の発現に関連する疾患又は病状は、I L 1 3 R α 2 の発現アップレギュレーションに関連する疾患又は病状を含む。

【0157】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記 I L 1 3 R α 2 の発現に関連する疾患又は病状は癌を含む。

【0158】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記癌は I L 1 3 R α 陽性腫瘍を含む。

【0159】

幾つかの実施態様において、そのうち、上記 I L 1 3 R α 陽性腫瘍は、悪性神経膠腫、結腸直腸癌、子宮頸癌、膵臓癌、皮膚黒色腫、卵巣癌、乳癌、副腎皮質癌、胸腺腫、子宮癌、膀胱癌、食道癌、頭頸部扁平上皮癌又は胃癌を含む。

【0160】

当業者は、以下の詳細な説明から本出願の他の態様及び利点を容易に洞察することができる。以下の詳細な説明には、本出願の例示的な実施形態のみが示され、説明される。当業者に明らかなように、本出願の内容により、当業者は、本出願にかかる発明の精神及び範囲から逸脱することなく、開示された具体的な実施形態を変更することができる。対応的には、本出願の図面及び明細書における説明は、限定的なものではなく、単に例示的なものである。

【図面の簡単な説明】

【0161】

本願にかかる発明の具体的な特徴は、添付の特許請求の範囲に記載される通りである。以下に詳細に説明する例示的な実施形態及び図面を参照することで、本出願にかかる発明の特徴及び利点をよりよく理解することができる。図面の簡単な説明は以下の通りである。

【図1】本出願に記載の a n t i - I L 1 3 R α 2 C A R の概略構造図を示す。

【図2】本出願に記載の a n t i - I L 1 3 R α 2 U C A R - T 細胞の構築戦略を示す。

【図3A-3C】本出願に記載の a n t i - I L 1 3 R α 2 U C A R - T 細胞（マウス由来）の表現型検出結果を示す。

【図4】本出願に記載の標的細胞に対する a n t i - I L 1 3 R α 2 U C A R - T 細胞（マウス由来）の殺傷結果を示す。

【図5A-5C】本出願に記載の I L 1 3 R α 2 U C A R - T 細胞（マウス由来）と標的細胞の共培養によるサイトカイン分泌の検出結果を示す。

【図6】本出願に記載の本出願に記載の a n t i - I L 1 3 R α 2 U C A R - T 細胞（マウス由来）の体内抗腫瘍効果を示す。

【図7】本出願に記載の a n t i - I L 1 3 R α 2 U C A R - T 細胞のインビボ半減期検出結果を示す。

【図8】本出願に記載の a n t i - I L 1 3 R α 2 U C A R - T 細胞のインビトロ G V H D の結果を示す。

【図9】本出願に記載の a n t i - I L 1 3 R α 2 U C A R - T 細胞のインビトロ拒絶反応の結果を示す。

【図10A-10D】本出願に記載の a n t i - I L 1 3 R α 2 U C A R - T 細胞のインビボ G V H D の結果を示す。

10

20

30

40

50

【図 1 1 - 1 2】本出願に記載の $\text{anti-IL13R}\alpha 2$ UCAR-T 細胞のインビトロ拒絶反応の結果を示す。

【図 1 3】本出願に記載の $\text{anti-IL13R}\alpha 2$ UCAR-T 細胞のオフターゲット分析を示す。

【図 1 4】本出願に記載の $\text{anti-IL13R}\alpha 2$ UCAR-T 細胞の染色体転座分析を示す。

【図 1 5】本出願に記載の $\text{anti-IL13R}\alpha 2$ UCAR-T 細胞の核型分析を示す。

【図 1 6】本出願に記載の $\text{anti-IL13R}\alpha 2$ UCAR-T 細胞の Cas 9 残基分析を示す。

【図 1 7】本出願における Sg 9 RNA 編集後の TRAC 遺伝子の Sanger シークエンシングの結果を示す。

【図 1 8】本出願における Sg 9 RNA 編集後の TRAC 遺伝子の TA クローン検出の結果を示す。

【図 1 9】本出願における Sg 9 RNA 編集後の TRAC 遺伝子のフローサイトメトリー検出の結果を示す。

【図 2 0】本出願における Sg 2 RNA 編集後の HLA-A 02 遺伝子の Sanger シークエンシングの結果を示す。

【図 2 1】本出願における Sg 5 RNA 編集後の HLA-A 02 遺伝子の Sanger シークエンシングの結果を示す。

【図 2 2】本出願における Sg 21 RNA 編集後の HLA-A 11 遺伝子の Sanger シークエンシングの結果を示す。

【図 2 3】本出願における Rsg 2 RNA 編集後の HLA-A 11 遺伝子の Sanger シークエンシングの結果を示す。

【図 2 4 A - 2 4 B】本出願にかかる修飾された免疫エフェクター細胞における HLA-A 02 及び TRAC の同時ノックアウトの結果を示す。

【図 2 5 A - 2 5 B】本出願にかかる修飾された免疫エフェクター細胞における HLA-A 02 及び TRAC のタンパク質レベルを示す。

【図 2 6】本出願にかかる修飾された免疫エフェクター細胞における TRAC、HLA-A、B 2 M 及び C I I T A の mRNA レベルを示す。

【図 2 7 A - 2 7 B】本出願にかかる修飾された免疫エフェクター細胞における B 2 M 及び C I I T A のタンパク質レベルを示す。

【図 2 8 A - 2 8 D】本出願にかかる修飾された免疫エフェクター細胞における TRAC、HLA-A、B 2 M 及び C I I T A のタンパク質レベルを示す。

【図 2 9 A - 2 9 B】本出願にかかる修飾された免疫エフェクター細胞における TRAC 及び HLA-A mRNA レベルのノックアウト状況を示す。

【図 3 0 A - 3 0 B】本出願にかかる修飾された免疫エフェクター細胞における CD 6 9 及び CD 1 3 7 のタンパク質レベルを示す。

【図 3 1】本出願にかかる修飾された免疫エフェクター細胞と NK 細胞の共培養の状況を示す。

【図 3 2】本出願にかかる修飾された免疫エフェクター細胞による IFN- γ の発現レベルを示す。

【図 3 3 A - 3 3 D】本出願にかかる修飾された免疫エフェクター細胞における TRAC、HLA-A、B 2 M 及び C I I T A のタンパク質レベルを示す。

【図 3 4】本出願にかかる修飾された免疫エフェクター細胞の CAR に対する感染効率を示す。

【図 3 5】本出願にかかる修飾された免疫エフェクター細胞の増幅倍率を示す。

【図 3 6】本出願にかかる修飾された免疫エフェクター細胞の CD 1 9 陽性標的細胞に対する殺傷効果を示す。

【図 3 7】本出願にかかる修飾された免疫エフェクター細胞を投与する投与計画を示す。

10

20

30

40

50

【図 38】本出願にかかる修飾された免疫エフェクター細胞のマウス体内腫瘍に対する殺傷効果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0162】

以下、特定の具体的な実施例により、本出願の発明の実施形態を説明し、当業者は、本明細書に開示された内容から本出願の発明の他の利点及び効果を容易に理解することができる。

【0163】

用語の定義

本出願において、「キメラ抗原受容体」又は「CAR」という用語は通常、一連のポリペプチドを指し、最も簡単な実施形態において通常2種類があり、免疫エフェクター細胞にある場合、標的細胞（通常は癌細胞である）に対する細胞の特異性を提供し、細胞内シグナルを生成する。幾つかの実施形態において、CARは、少なくとも1つの細胞外抗原結合ドメイン（例えば、VHH、scFv又はその一部）、膜貫通ドメイン、並びに以下に定義する刺激分子及び／又は共刺激分子に由来する機能性シグナル伝達ドメインを含む細胞質シグナル伝達ドメイン（本明細書において、「細胞内シグナル伝達ドメイン」とも呼ばれる）を含む。幾つかの実施形態において、当該一連のポリペプチドは同じポリペプチド鎖にある（例えば、キメラ融合タンパク質を含む）。幾つかの実施形態において、当該一連のポリペプチドは互いに連続せず、例えば異なるポリペプチド鎖にある。幾つかの態様において、当該一連のポリペプチドは二量体化スイッチを含み、二量体化分子の存在下でポリペプチドを互いに結合させることができ、例えば抗原結合ドメインを細胞内シグナル伝達ドメインに結合させることができる。一態様において、CARの刺激分子はT細胞受容体複合体に関連する鎖である。一態様において、細胞質シグナル伝達ドメインは一次シグナル伝達ドメイン（例えば、CD3-ζの一次シグナル伝達ドメイン）を含む。一態様において、細胞質シグナル伝達ドメインは、以下に定義する少なくとも1つの共刺激分子に由来する1つ又は複数の機能性シグナル伝達ドメインを更に含む。一態様において、共刺激分子は、4-1BB（即ち、CD137）、CD27、ICOS及び／又はCD28から選ばれてもよい。一態様において、CARは、細胞外抗原認識ドメイン、膜貫通ドメイン、並びに刺激分子に由来する機能性シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含んでもよいキメラ融合タンパク質を含む。一態様において、CARは、細胞外抗原認識ドメイン、膜貫通ドメイン、並びに共刺激分子に由来する機能性シグナル伝達ドメイン及び刺激分子に由来する機能性シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含んでもよいキメラ融合タンパク質を含む。一態様において、CARは、細胞外抗原認識ドメイン、膜貫通ドメイン、並びに1つ又は複数の共刺激分子に由来する機能性シグナル伝達ドメイン及び刺激分子に由来する機能性シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含んでもよいキメラ融合タンパク質を含む。一態様において、CARは、細胞外抗原認識ドメイン、膜貫通ドメイン、並びに1つ又は複数の共刺激分子に由来する少なくとも2つの機能性シグナル伝達ドメイン及び刺激分子に由来する機能性シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含んでもよいキメラ融合タンパク質を含む。一態様において、CARは、CAR融合タンパク質のアミノ末端（N-ter）における任意選択のリーダー配列を含む。一態様において、CARは、細胞外抗原認識ドメインのN末端におけるリーダー配列を更に含み、そのうち、リーダー配列は任意選択に細胞加工プロセスにおいて抗原認識ドメイン（例えばVHH）から除去され、且つCARを細胞膜に局在化させる。

【0164】

本出願において、「インターロイキン-13受容体サブユニットα-2（IL-13Rα2）」という用語（CD213A2、213A2分化クラスタとも呼ばれる）は、通常及び常規の意味を有し、例えば、ヒトにおいてIL-13RA2遺伝子によってコードされる膜結合タンパク質を含み得るが、これらに限定されない。IL-13Rα2は、インターロイキン-13受容体複合体のサブユニットであるIL-13Rα1と密接に関連し

10

20

30

40

50

ている。IL-13R α 2は通常、高い親和性でIL-13に結合するが、任意の明らかな細胞質ドメインを欠いており、シグナルメディエーターとして作用しないようである。しかしながら、それが後者に直接結合できないが、IL-13とIL-4の両方の効果を調節することができる。また、IL-13の内在化にも関与していることが報告されている。

【0165】

本出願において、「抗体」という用語は通常、最も広い意味で使用され、所望の生物活性を示す限り、具体的にモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、二量体、多量体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、及び抗体断片を包含する（Miller et al (2003) Jour. of Immunology 170: 4854-4861）。抗体は、マウス、ヒト、ヒト化、キメラ抗体、又は他の種に由来するものであってもよい。

10

【0166】

全長抗体は、典型的には2つの「全長抗体重鎖」及び2つの「全長抗体軽鎖」からなる抗体を指す。「全長抗体重鎖」は通常、N末端からC末端への方に抗体重鎖可変ドメイン（VH）、抗体定常重鎖ドメイン1（CH1）、抗体ヒンジ領域（HR）、抗体重鎖定常ドメイン2（CH2）、及び抗体重鎖定常ドメイン3（CH3）からなり、VH-CH1-HR-CH2-CH3と略称されるポリペプチドであり、IgEサブクラス抗体の場合、任意選択に抗体重鎖定常ドメイン4（CH4）を更に含む。幾つかの実施形態において、「全長抗体重鎖」は、N末端からC末端への方にVH、CH1、HR、CH2及びCH3からなるポリペプチドである。「全長抗体軽鎖」は通常、N末端からC末端への方に抗体軽鎖可変ドメイン（VL）及び抗体軽鎖定常ドメイン（CL）からなるポリペプチドであり、VL-CLと略称される。上記抗体軽鎖定常ドメイン（CL）は κ （kappa）又は λ （lambda）であってもよい。2つの全長抗体鎖は、CLドメインとCH1ドメインとの間のポリペプチド間ジスルフィド結合、及び全長抗体重鎖のヒンジ領域間のポリペプチド間ジスルフィド結合によって連結される。典型的な全長抗体の実例は、IgG（例えば、IgG1及びIgG2）、IgM、IgA、IgD、及びIgEなどの天然抗体である。

20

【0167】

本出願において、「抗原結合断片」（本明細書において「標的部分」又は「抗原結合部分」とも呼ばれる）という用語は通常、抗体と抗原との間の特異的結合を担うアミノ酸を含む抗体分子の一部を指す。抗体によって特異的に認識され、結合される抗原の部分は、上記のように「エпитープ」と呼ばれる。抗原結合ドメインは、典型的に抗体軽鎖可変領域（VL）及び抗体重鎖可変領域（VH）を含んでもよいが、必ずしも両方を含む必要とは限らない。Fd断片は、例えば2つのVH領域を有し、通常、完全な抗原結合ドメインの抗原結合機能の一部を保持する。抗体の抗原結合断片の実例は、以下のものを含む：（1）Fab断片であって、VL、VH、定常軽鎖（CL）及びCH1ドメインを有する一価断片、（2）F(ab')₂断片であって、ヒンジ領域のジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を有する二価断片、（3）2つのVH及びCH1ドメインを有するFd断片、（4）抗体単一アームを有するVL及びVHドメインを有するFv断片、（5）VHドメインを有するdAb断片（Wardら、「Binding Activities of a Repertoire of Single Immunoglobulin Variable Domains Secreted From *Escherichia coli*,」Nature 341: 544-546 (1989)、その全体が参照により本出願に組み込まれる）、（6）単離された相補性決定領域（CDR）、（7）例えばscFvライブラリーに由来する単鎖Fv（scFv）であって、Fv断片の2つのドメインVL及びVHは、独立した遺伝子によってコードされるが、組換え方法を使用してリンカーの合成によって接合することができ、リンカーの合成によりVL及びVH領域が対になって一価分子を形成する単一タンパク質鎖として製造され（単鎖Fv（scFv）と呼ばれる）（例えばHoustonら、「Protein Engi

30

40

50

neering of Antibody Binding Sites: Recovery of Specific Activity in an Anti-Digoxin Single-Chain Fv Analogue Produced in *Escherichia coli*,」Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883 (1988)を参照することができる)、並びに(8) VHHであって、「VHH」はラクダ科(ラクダ、ヒトコブラクダ、ラマ、アルパカなど)重鎖抗体に由来する可変抗原結合ドメインに関する(Nguyen V. K.ら、2000、The EMBO Journal、19、921-930; Muyldermans S.、2001、J Biotechnol.、74、277-302及びレビュー論文であるVan Landschoot P.ら、2011、Antiviral Research 92、389-407を参照)。VHHは、ナノ抗体(Nanobody)(Nb)及び／又は単ドメイン抗体とも呼ばれ得る。これらの抗体断片は、当業者に公知の従来技術を用いて得られ、且つ完全抗体と同じ方式で上記断片の機能を評価する。IL13R α 2を標的とする抗原結合断片はまた、国際特許出願公開WO2014072888A1およびWO2021041725A1に記載されており、その中のそれぞれは、参照によりその全体が本出願に組み込まれる。

10

【0168】

本出願において、「単ドメイン抗体」又は「VHH」という用語は通常、抗体軽鎖を欠失するが、重鎖可変領域のみを有する抗体のクラスを指す。幾つかの場合において、単ドメイン抗体は、フタコブラクダ、ヒトコブラクダ、アルパカ、ラマ、コモリザメ、ホシザメ又はエイに由来することができる(例えば、バイオテクノロジー学術誌、2018、34(12): 1974-1984を参照)。例えば、単ドメイン抗体はアルパカに由来することができる。単ドメイン抗体は重鎖可変領域(VH)で構成することができる。「重鎖可変領域」という用語は通常、抗原結合断片の重鎖のアミノ末端ドメインを指す。重鎖可変領域は、相補性決定領域(CDR)と呼ばれる高可変領域に更に区別されてもよく、それらはフレームワーク領域(FR)となるより保存的領域に散在する。各重鎖可変領域は、3つのCDR及び4つのFR領域で構成され、それらは、アミノ末端からカルボキシル末端へ、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及びFR4の順に配列されてもよい。重鎖可変領域は、抗原が相互作用する結合ドメインを含む。

20

【0169】

本出願において、「単鎖可変断片」又は「scFv」という用語は、その通常及び常規の意味を有し、例えば、短いリンカーペプチドで互いに連結された、免疫グロブリンの重鎖(VH)可変領域及び軽鎖(VL)可変領域を含む融合タンパク質を含み得るが、これらに限定されない。限定されるものではないが、リンカーはグリシン(柔軟性のため)及び親水性アミノ酸(例えば、セリン又はトレオニン)(溶解性のため)を含み得る。リンカーは、VHのN末端をVLのC末端に連結してもよいし、VHのC末端をVLのN末端に連結してもよい。幾つかの代替形態において、CAR上に存在するリガンド結合ドメインは、単鎖可変断片(scFv)である。本出願のCARは、VH-VL又はVL-VH構成に構築することができ、リンカー、ヒンジ、膜貫通ドメイン、共刺激ドメイン及び／又は伝導ドメインに変異を持ち、当該CARは依然としてその効果を維持する。幾つかの実施形態において、CAR上に存在するscFvドメインは、腫瘍細胞上に存在するIL-13 α 2受容体(IL13R α 2)に対して特異的である。

30

40

【0170】

本出願のCARは、分子の適切な間隔及び立体配座のために個々のドメイン間に付加されるリンカー残基、例えば、得られるポリペプチドが、同じ軽鎖及び重鎖可変領域を含む抗体と同じ標的分子に対する特異的結合親和性を維持するように、VHドメインとVLドメインを連結し、2つのサブ結合ドメインの相互作用に適合するスペーサー機能を提供するアミノ酸配列を含むリンカーを含み得る。本出願のCARは、1つ、2つ、3つ、4つ又は5つ以上のリンカーを含み得る。特定の実施形態において、リンカーは、約1～約25アミノ酸長、約5～約20アミノ酸長、又は約10～約20アミノ酸長、又は任意の介

50

在長さのアミノ酸長である。リンカーの例示的な実例は、グリシンポリマー、グリシンーセリンポリマー、グリシンーアラニンポリマー、アラニンーセリンポリマー、ウィットロー（Whitlow）リンカーなどの当分野で公知の他の柔軟なリンカーを含む。グリシン及びグリシンーセリンポリマーは比較的非構造化であり、従って、融合タンパク質のドメイン（例えば、本出願のCAR）間の中性テザーとして作用することができる。

【0171】

本出願において、「相補性決定領域」（CAR）という用語は通常、抗原結合断片の可変領域内の相補性決定領域を指す。本出願において、上記重鎖可変領域には、可変領域毎にHCDR1、HCDR2及びHCDR3と命名される3つのCDRsが存在する。これらのCDRsの正確な境界は、異なるシステムに応じて異なるように定義されている。Kabab（Kababら、Sequences of Proteins of Immunological Interest（National Institutes of Health、Bethesda、Md.（1987）と（1991））により記載されるシステムは、抗原結合断片の任意の可変領域に適用できる明確な残基番号付けシステムを提供するだけでなく、3つのCDRsを限定する正確な残基境界を更に提供する。これらのCDRsは、Kabab CDRsと呼ばれ得る。Chothiaと同僚（ChothiaとLesk、J. Mol. Biol. 196：901-917（1987）及びChothiaら、Nature 342：877-883（1989））は、アミノ酸配列レベルでの大きな多様性にもかかわらず、Kabab CDRs内の特定のサブ部分は、ほぼ同一のペプチド主鎖立体配座を採用することが発見された。これらのサブ部分は、L1、L2及びL3、又はH1、H2及びH3と命名され、そのうち、「L」及び「H」は、それぞれ軽鎖領域及び重鎖領域を指す。これらの領域は、Kabab CDRsと重複する境界を有するChothia CDRsと呼ばれ得る。Kabab CDRsと重複するCDRsを限定する他の境界は、Padlan（FASEBJ. 9：133-139（1995））及びMacCallum（J Mol Biol 262（5）：732-45（1996））により記載されている。また、他のCDR境界の定義は、上記システムの1つに厳密に従っていない可能性があり、特定の残基若しくは残基のセット、又はひいてはCDRs全体が抗原結合に顕著な影響を及ぼさないという予測又は実験結果に従って、それらが短縮又は延長されるが、依然としてKabab CDRsと重複する。本出願において、IMGT番号付けシステムが使用される。

【0172】

本出願において、「FR」という用語は通常、フレームワーク領域と呼ばれる、抗体可変ドメインのより高度な保存的部分を指す。例えば、天然重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、それぞれ4つのFR領域、即ちVHにおける4つ（H-FR1、H-FR2、H-FR3及びH-FR4）、及びVLにおける4つ（L-FR1、L-FR2、L-FR3及びL-FR4）を含んでもよい。「フレームワーク領域」は通常、分岐性のより高い（即ち超可変）CDRの間に存在する、当分野で認識される抗体可変領域の部分に指す。そのようなフレームワーク領域は、典型的にフレームワーク1～4（FR1、FR2、FR3及びFR4）と呼ばれ、且つ3次元空間において6つのCDR（重鎖から3つ、且つ軽鎖から3つ）を提示するための骨格を提供することにより、抗原結合表面を形成する。

【0173】

本出願において、「相同性」という用語は通常、配列「同一性」と同等であってもよい。相同配列は、対象配列と少なくとも80%、85%、90%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%又は99.9%同一であることができるアミノ酸配列を含んでもよい。通常、相同体は、対象のアミノ酸配列と同じ活性部位などを含む。相同性は、類似性（即ち、類似の化学的性質／機能を有するアミノ酸残基）によって考慮されてもよいが、配列同一性の観点から相同性を発現してもよい。本出願において、言及されたアミノ酸配列又はヌクレオチド配列の配列番号のうちの何れか1項に対するパーセント同一性を有する配列とは、言及された配列番号の全長にわたって、上記パーセント同一性を有する配列を指す。

【0174】

配列同一性を決定するために、配列アラインメントを行うことができ、それは、当業者に知られている様々な方法、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、NEEDLE又はMegalign (DNASTAR) ソフトウェアなどを用いて行うことができる。当業者は、比較される全長配列において最適なアラインメントを達成するために必要とする任意のアルゴリズムを含む、アラインメントのための適切なパラメータを決定することができる。

【0175】

本出願において、「KD」という用語は、「KD」と互換的に使用されてもよく、通常、特定の抗体-抗原相互作用の解離平衡定数を $M(\text{mol/L})$ の単位で指す。KDは、物質ABと、その解離によって得られた物質A及び物質Bの濃度から、 $KD = c(A) * c(B) / c(AB)$ として計算することができる。この式から、KD値が大きいほど、解離が多く、物質A、B間の親和性が弱いことを示し、逆にKD値が小さいほど、解離が少なく、物質A、B間の親和性が強いことを示す。

【0176】

本出願において、「単離された核酸分子」という用語は通常、天然環境から単離されるか、又は人工的に合成される、任意の長さの単離形態のヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、又はリボヌクレオチド、或いはそれらの類似体を指す。

【0177】

本出願において、「ベクター」という用語は通常、挿入される核酸分子を宿主細胞内及び／又は宿主細胞間に転移させる、適切な宿主において自己複製できる核酸分子を指す。上記ベクターは、主にDNA又はRNAを細胞内に挿入するためのベクター、主にDNA又はRNAを複製するためのベクター、及び主にDNA又はRNAの転写及び／又は翻訳を発現するためのベクターを含んでもよい。上記ベクターは、複数種の上記機能を有するベクターを更に含んでもよい。上記ベクターは、適切な宿主細胞に導入された場合に、ポリペプチドに転写と翻訳できるポリヌクレオチドであってもよい。一般的に、上記ベクターを含む適切な宿主細胞を培養することにより、上記ベクターは所望の発現産物を産生することができる。

【0178】

本出願において、「ウイルスベクター」という用語は、核酸分子（例えば、転移プラスミド）又は核酸転移を介在するウイルス粒子を指すために広く使用され、核酸分子は、核酸分子の転移又は細胞ゲノムへの組み込みを通常促進するウイルス由来の核酸要素を含む。ウイルス粒子は通常、様々なウイルス成分を含み、核酸以外の宿主細胞成分を更に含む場合もある。ウイルスベクターは、核酸を細胞内に転移することができるウイルス若しくはウイルス粒子、又は転移される核酸自体を指してもよい。

【0179】

本出願において、「レンチウイルス」という用語は通常、複雑なレトロウイルスの群（又は属）を指す。例示的レンチウイルスは、HIV（HIV1型及びHIV2型を含むヒト免疫不全ウイルス）、ビスナーマエディウイルス（visna-maedi virus、VMV）ウイルス、ヤギ関節炎-脳炎ウイルス（CAEV）、馬伝染性貧血ウイルス（EIAV）、ネコ免疫不全ウイルス（FIV）、ウシ免疫不全ウイルス（BIV）、及びサル免疫不全ウイルス（SIV）を含むが、これらに限定されない。一実施形態において、HIVに基づくベクター骨格（即ち、HIVシス作用性配列エレメント）が好ましい。特別な実施形態において、レンチウイルスは、CARを含むポリヌクレオチドを細胞に送達するために使用される。

【0180】

本出願において、「宿主細胞」若しくは「細胞」という用語は通常、本出願に記載の単離された核酸分子を含むベクターを含んでもよいか又は既に含んだ、或いは、本出願に記載の単離された抗原結合断片を発現することができる個体細胞、細胞株又は細胞培養物を指す。上記宿主細胞は、単一の宿主細胞の娘細胞を含んでもよい。天然、予想外又は意図

10

20

30

40

50

的な変異により、娘細胞は、元の親細胞と形態又はゲノムにおいて必ずしも完全に同じであるとは限らないが、本出願に記載の単離された抗原結合断片を発現することができればよい。上記宿主細胞は、本出願に記載のベクターを利用してインビトロで細胞をトランスフェクトすることにより得ることができる。上記宿主細胞は、原核細胞（例えば、大腸菌）であってもよく、真核細胞（例えば酵母細胞、例えばCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、HeLa細胞、HEK293細胞、COS-1細胞、NS0細胞又は骨髓腫細胞）であってもよい。例えば、上記宿主細胞は大腸菌細胞であってもよい。例えば、上記宿主細胞は酵母細胞であってもよい。例えば、上記宿主細胞は哺乳動物細胞であってもよい。例えば、上記哺乳動物細胞はCHO-K1細胞であってもよい。

【0181】

本出願において、「T細胞」又は「Tリンパ球」という用語は、任意のT細胞、例えば培養T細胞、例えば初代T細胞、又はJurkat、SupT1等のような培養T細胞株由来のT細胞、或いは哺乳動物（好ましくはサル、イヌ又はヒトを含む種の霊長類）から得られるT細胞であってもよい。哺乳動物から得られる場合、T細胞は、血液、骨髓、リンパ節、胸腺又は他の組織若しくは流体を含むがこれらに限定されない、様々な供給源から得ることができる。T細胞は、濃縮されてもよく、又は、精製されてもよい。T細胞は、インビトロ又はインビボで造血幹細胞をT細胞に成熟させることによって得ることができる。例示的な態様において、T細胞はヒトT細胞である。例示的な態様において、T細胞は、ヒトから単離されたT細胞である。T細胞は、NK細胞を含む任意の種類のT細胞であってもよく、CD4+/CD8+二重陽性T細胞、Th1及びTh2細胞などのCD4+ヘルパーT細胞、CD8+T細胞（例えば、細胞傷害性T細胞）、末梢血単核球（PBMC）、末梢血白血球（PBL）、腫瘍浸潤細胞（TIL）、記憶T細胞、未処理T細胞などを含むが、これらに限定されない、任意の発生段階のものであってもよい。好ましくは、T細胞は、CD8+T細胞又はCD4+T細胞である。幾つかの代替形態において、T細胞は、受容細胞又は受容すべき細胞（例えば、治療組成物の形態にある上記細胞）を有する受容対象と同種異系（同じ種からの異なるドナー）であり、幾つかの代替形態において、T細胞は自己由来であり（ドナー及びレシピエントは同じであり）、幾つかの代替形態において、T細胞は、同質遺伝子型（syngeneic）である（ドナー及びレシピエントは異なるが、一卵性双生児である）。

【0182】

本出願において、「免疫エフェクター細胞」という用語は通常、免疫応答に関与し、エフェクター機能を果たす免疫細胞を指す。例えば、エフェクター機能を果たすことは、異物抗原の除去又は免疫エフェクター応答の促進などを含んでもよい。免疫エフェクター細胞は、形質細胞、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、ナチュラルキラーT（NKT）細胞、マスト細胞及び骨髓由来食細胞を含んでもよい。

【0183】

本出願の免疫エフェクター細胞は、自己/自体的（autologous/autogeneic）（「独自の」）又は非自己的（「非独自の」、例えば同種異系、同質遺伝子型又は異種遺伝子型）であってもよい。本出願において、「自己的」という用語は通常、同じ対象からの細胞を指す。「同種異系」は通常、それと比較して同じ種であるが遺伝的に異なる細胞を指す。「同質遺伝子型」は通常、比較される細胞と遺伝的に同一である異なる対象の細胞を指す。「異種遺伝子型」は通常、比較される細胞と異なる種の細胞を指す。幾つかの実施形態において、本出願の細胞は、自己的又は同種異系である。

【0184】

本出願において、「修飾」という用語は通常、細胞の状態若しくは構造を変えること、及び/又は、細胞の状態若しくは構造の改変を指す。上記改変は通常、上記修飾されていない対応する細胞の状態若しくは構造と比較して、上記改変が内因性遺伝子発現レベル又は機能の変化、例えば、相同組換え、CRISPR/Cas9システム遺伝子編集などを含んでもよい遺伝子工学的手段による細胞の内因性遺伝子発現レベルのダウンレギュレーション、アップレギュレーション又は非発現を含んでもよく、上記改変は、細胞タンパク

10

20

30

40

50

質発現、構造又は機能の変化、例えば、上記内因性遺伝子発現レベル又は機能の変化によって達成される対応するタンパク質発現の変化、構造又は機能の変化、例えば、タンパク質翻訳、翻訳後修飾の調節によって達成されるタンパク質発現の変化、構造又は機能の変化を更に含んでもよく、上記改変は、外来遺伝子の導入、外来タンパク質の発現などを含んでもよい。

【0185】

本出願において、「TRAC」という用語は通常、T細胞受容体α鎖定常領域（T cell receptor alpha constant）を指す。T細胞受容体（TCR）は通常、主要組織適合性複合体（MHC）分子に結合する抗原を認識することができる、T細胞の表面に位置する特異的受容体を指す。TCRは通常、2つの異なるタンパク質鎖（即ち、ヘテロ二量体）からなる。ヒトにおいて、多くのT細胞におけるTCRは、1本のα鎖と1本のβ鎖（それぞれTRA及びTRBによってコードされる）からなり、かかるT細胞はαβ T細胞と呼ばれ、少数のT細胞におけるTCRはγ鎖とδ鎖（それぞれTRG及びTRDによってコードされる）からなり、かかるT細胞はγδ T細胞と呼ばれる。一般的には、αβ T細胞はT細胞の総数の約95%を占め、γδ T細胞はT細胞の総数の約5%を占め、当該比率は個体の発生過程及び疾患状態（例えば、白血病）で変化し、種によっても異なっている。TCRを構成する各鎖は何れも、可変領域及び定常領域を有し、ヒトにおいて、α鎖をコードする遺伝子（TRA、例えばHGNC：12027に示される情報）は14番染色体に位置し、可変セグメント（V）、連結セグメント（J）及び定常領域（C）を含む多遺伝子断片から構成され、TRAC遺伝子は通常、14番染色体（14q11.2、14：22、547、505-22、552、131）に位置する、T細胞受容体のα鎖定常領域（C）をコードする遺伝子配列（例えば、HGNC：12029に示される情報）を指す。通常、Nセグメントの抗原認識ドメインをコードする可変セグメント（V）遺伝子の1つが、連結セグメント（J）のうちの1つと再配列されて機能的V領域エクソンを生成し、当該エクソンが転写され、且つ定常領域（C）にスプライシングによって連結され、これによりT細胞受容体α鎖コード配列を形成する。

【0186】

本出願において、「主要組織適合性複合体抗原」（「MHC」、ヒトの場合では、「ヒト白血球抗原」（「HLA」）とも呼ばれる）という用語は通常、細胞表面に発現された、細胞に独自の抗原性を付与するタンパク質を指す。MHC／HLA抗原は、T細胞及びNK細胞によって、免疫エフェクター細胞と同じ造血幹細胞の供給源（「自己」）に由来するものとして認識されるか、又は別の造血再構築細胞の供給源（「非自己」）に由来するものとして認識される標的分子である。HLAクラスI及びHLAクラスIIというHLA抗原の2つの主要なクラスが認識される。HLAクラスI抗原（ヒトにおけるA、B、C）は、各細胞を「自己」として認識できるが、HLAクラスII抗原（ヒトにおけるDR、DP及びDQ）は、リンパ球と抗原提示細胞との反応に関与する。両者とも移植臓器の拒絶に関与している。HLA遺伝子系の重要な態様は、その多型である。MHCクラスI（A、BとC）及びMHCクラスII（DP、DQとDR）の各遺伝子は、異なる対立遺伝子を有する。HLA対立遺伝子は、数字及び下付き文字によって表される。例えば、2つの非相関な個体はそれぞれ、HLA-BクラスI遺伝子B5及びBw41を保有する可能性がある。対立遺伝子産物は、α及び／又はβドメインの1つ又は複数のアミノ酸において異なる。大量の特異的抗体又は核酸試薬は、クラスI及びクラスII分子を発現する白血球を用いて個体のHLAハプロタイプ型を決定するために使用される。通常HLA型決定に使用される遺伝子は、MHCクラスI及びクラスIIの6つのタンパク質、即ちHLA-Aであり、HLA-B及びHLA-DRは、それぞれ2つの対立遺伝子を有する。HLA遺伝子は、染色体6p21位に存在する「スーパー遺伝子座」にクラスター化され、上記「スーパー遺伝子座」は、免疫系及び幾つかの他の基本的な分子と細胞プロセスの調節において重要な役割を有する6つの古典的な移植HLA遺伝子と少なくとも132個のタンパク質コード遺伝子をコードする。完全な遺伝子座の大まかな測定は、3.

6 Mbであり、少なくとも224個の遺伝子座を有する。このクラスター化の効果は「ハプロタイプ」であり、即ち、単一の染色体上に存在し、1つの親から受け継がれ、セットとして受け継がれる傾向にある。各親から受け継がれた対立遺伝子のセットはハプロタイプを形成し、そのうち、一部の対立遺伝子は互いに結合する傾向にある。一部の対立遺伝子及びハプロタイプが他の対立遺伝子及びハプロタイプよりも一般的であり、そして、それらが異なる種及び民族において異なる頻度で分布するため、患者のハプロタイプを同定することは、マッチドナーが見つかる確率を予測することを助けると共に、検索戦略を策定することを助けることもできる。

【0187】

本出願において、「HLA-A」は通常、ヒト染色体6p21.3に位置するHLA-A遺伝子（例えば、HGNC:4931に示される情報）によってコードされる、ヒト白血球抗原（human leukocyte antigens）ポリペプチド鎖のクラスを指す。HLA-Aは、ヒト細胞表面のMHCクラスI分子を構成する3つの主要なポリペプチドタイプの1つであり、他にはHLA-B及びHLA-Cも含まれる。HLA-A遺伝子によってコードされるα鎖及びB2M遺伝子によってコードされるβ鎖（β2-ミクログロブリン）からなるヘテロ二量体は、HLA-AクラスMHC I分子である。上記のHLA-A遺伝子によってコードされるα鎖は、α1ドメイン、α2ドメイン、α3ドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインを含んでもよく、そのうち、α1ドメイン、α2ドメインはペプチドセグメントに結合することができるため、MHC I分子（例えばHLA-Aクラス）によって上記ペプチドセグメントが免疫系細胞に提示される。ヒトにおいて、ほとんどの哺乳動物と類似するように、MHC I分子のα鎖は多型であり、一次構造が多くの変化があり、2013年12月までに、1740個の活性タンパク質及び117個の不活性タンパク質をコードする、合計2432個のHLA-A対立遺伝子が知られている。本出願において、HLA-A対立遺伝子は、IMGT/HLAデータベース3.38.0バージョン（<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>）に格納され、WHO HLA因子命名委員会によって命名された異なるHLA-A対立遺伝子の配列情報を含んでもよい。

【0188】

本出願において、「HLA-B」という用語は通常、ヒト白血球抗原（HLA）複合体の遺伝子ファミリーの一部を指す。HLAは、主要組織適合性複合体（MHC）のヒトバージョンであり、MHCは、多くの種に存在する遺伝子ファミリーである。この複雑な遺伝子は、クラスI、クラスII及びクラスIIIという3つの基本的な群に分類される。ヒトにおいて、HLA-B遺伝子及びHLA-AとHLA-Cという関連する2つの遺伝子はMHCクラスIの主要な遺伝子である。HLA-B遺伝子は、6番染色体の短い（p）アームの細胞帯21.3の、塩基対31,353,871から31,357,211までに位置する。HLA-Bは、ドナーとレシピエントとの間でマッチすべき3つの主要なHLAの1つである。これらは、HLA-A、HLA-B（両方ともMHCクラスI）及びHLA-DR（MHCクラスII）である。この2つの組織には、この3つのHLAをコードする同じ遺伝子がある場合、拒絶の可能性及び重症度は最小限となる。HLA-Bは数百のバージョン（対立遺伝子）が知られており、各バージョンは特定の番号（例えば、HLA-B27）を有する。密接に関連した対立遺伝子と一緒に分類されており、例えば、少なくとも28個の非常に類似した対立遺伝子がHLA-B27のアイソフォームである。これらのアイソフォームは、HLA-B*2701~HLA-B*2728と指定される。

【0189】

本出願において、「HLAがマッチする」という用語は、ドナーとレシピエントとの間のHLA抗原にマッチしないドナー-レシピエント対がないことを指し、上記ドナーは、例えば造血幹細胞移植療法を必要とするレシピエントに造血幹細胞移植物を提供するドナーである。HLAがマッチした（即ち、そのうちの6つの対立遺伝子の全てがマッチした）ドナー-レシピエント対は、移植物を拒絶するリスクが低減し、その理由は、内因性T

10

20

30

40

50

細胞及びNK細胞が、侵入した移植物を外来として認識する可能性が低く、且つ、そのため移植物に対する免疫応答を生じる可能性が低いである。

【0190】

本出願において、「HLAがマッチしない」という用語は、ドナーとレシピエントとの間の少なくとも1つのHLA抗原（特に、HLA-A、HLA-B及びHLA-DRの場合）がマッチしないドナー-レシピエント対であることを指し、上記ドナーは、例えば造血幹細胞移植療法を必要とするレシピエントに造血幹細胞移植物を提供するドナーである。幾つかの実施形態において、一方のハプロタイプはマッチし、他方はマッチしない。HLAがマッチしないドナー-レシピエント対はHLAがマッチしたドナー-レシピエント対と比較して、HLAがマッチしないドナー-レシピエント対の場合、内因性T細胞及びNK細胞が、侵入した移植物を外来として認識する可能性が高く、そして、そのようなT細胞及びNK細胞が移植物に対する免疫応答を生じる可能性が高いため、移植物を拒絶するリスクが増加する可能性がある。

10

【0191】

本出願において、「B2M」という用語は通常、MHCクラスI分子の構成要素の1つであるβ2ミクログロブリン（β2-microglobulin）を指す。β2ミクログロブリン（β鎖とも呼ばれる）は、HLAによってコードされたα鎖と共にMHCクラスI分子を構成することができる。B2Mは通常、全ての有核細胞において発現される。ヒトにおいて、β2ミクログロブリンは、15q21.1に位置するB2M遺伝子（例えば、HGNC：914に示される情報）によってコードされる。

20

【0192】

本出願において、「CIITA」という用語は通常、主要組織適合性複合体クラスII（MHCII）のトランス活性化因子を指す。上記トランス活性化因子は、酸性転写活性化ドメイン、4つのLRR（ロイシンに富化した反復配列）及びGTP結合ドメインを有するタンパク質であってもよい。上記タンパク質は、細胞核内に位置し、主要組織適合性複合体クラスII（MHCII）遺伝子転写のための正の調節因子として、これらの遺伝子を発現する「主制御因子」と呼ばれる。当該タンパク質はまた、GTPに結合すると共に、GTPへの結合を利用してそれ自体を細胞核に輸送することができ、細胞核において、通常、コアクチベーターのような方法でアセチルトランスフェラーゼ（AT）活性によって作用する。ヒトにおいて、上記タンパク質は、16p13.13に位置する遺伝子（例えば、HGNC：7067に示される情報）によってコードされ、異なるアイソフォームをコードする幾つかの転写産物変異体を産生することができる。

30

【0193】

本出願において、「野生型細胞」という用語は通常、自然に存在するか又は自然に由来する細胞を指す。

【0194】

本出願において、「核酸」又は「ポリヌクレオチド」又は「核酸分子」という用語は通常、デオキシリボ核酸（DNA）又はリボ核酸（RNA）及びその単鎖形態又は二本鎖形態のポリマーを指す。特に限定されない限り、当該用語は、天然ヌクレオチドの類似体を含む核酸を含んでもよく、上記核酸は、参照核酸（例えば、配列情報を示すもの）と類似する結合特性を有し、天然に存在するヌクレオチドと類似する方式で代謝される。特に明記しない限り、核酸の配列は、その保存的に修飾された変異体、例えば、縮重コドン置換、対立遺伝子、直接相同体、SNPと相補配列、及び明示的に示された配列を含んでもよい。

40

【0195】

本出願において、「発現」という用語は通常、特定のヌクレオチド配列の転写及び／又は翻訳を指す。

【0196】

本出願において、「遺伝子変異」という用語は通常、遺伝子の構造上で生じる塩基対の構成又は配列順序の変化を指す。例えば、単一塩基の変化による点変異、又は複数の塩基

50

の欠失、重複及び挿入などである。

【0197】

本出願において、「遺伝子サイレンシング」という用語は通常、調節メカニズムによる特定の遺伝子の発現を抑制することを指す。主に、DNAメチル化、ヘテロクロマチン化及び位置効果などの要因によって引き起こされる転写レベルでの遺伝子サイレンシング (transcriptional gene silencing、TGS)、及び遺伝子転写後レベルでの標的RNAへの特異的介入による遺伝子発現に影響を与える転写後遺伝子サイレンシング (post-transcriptional gene silencing、PTGS) の2つを含んでもよい。通常の場合、遺伝子がサイレンシングされると、対応する遺伝子発現は、ダウンレギュレーション／減少される。一方、遺伝子が

10

【0198】

本出願において、「内因性」という用語は、生物、細胞、組織又はシステムから生じるか、又はその内部で生成される任意の物質を指す。

【0199】

本出願において、「外因性」という用語は、生物、細胞、組織又はシステムの外部から導入されるか、又はその外部で生成される任意の物質を指す。

20

【0200】

本出願において、「アンチセンスRNA」という用語は通常、転写産物mRNA (メッセンジャーRNA) に相補的な単鎖RNAを指す。アンチセンスRNAは、mRNAとの結合により遺伝子の発現を阻害することができる。例えば、アンチセンスRNAが標的mRNAに結合すると、当該二本鎖RNA分子のRNA酵素IIIに対する感受性が増加して、分解される。例えば、アンチセンスRNAは、mRNAの上流の非コード領域に結合することにより、標的mRNAの翻訳を直接阻害する。

【0201】

本出願において、「siRNA」という用語は通常、Small interfering RNA (低分子干渉RNA) 又はshort interfering RNA (短分子干渉RNA) の略称を指す。siRNAは、mRNAとの相補的結合によりmRNAを分解して特定の遺伝子の発現を妨害することができる、長さが約18～28塩基対の二本鎖非コードRNA分子のクラスである。幾つかの実施形態において、siRNAは、Dicer酵素で処理された長い二本鎖RNA又はshRNAの産物であってもよい。幾つかの実施形態において、siRNAは、細胞に入り、他のタンパク質とRNA誘導サイレンシング複合体 (RISC) を形成し、センス鎖は分解され、アンチセンス鎖は相補的標的配列に結合することにより、遺伝子サイレンシングを達成することができる。

30

【0202】

本出願において、「shRNA」という用語は通常、short hairpin RNAの略称、即ち「短いヘアピンRNA」を指す。shRNAは通常、2つの短い逆方向反復配列を含み、その間にループ (loop) 配列によって分離され、ヘアピン構造を形成する。通常、RNAポリメラーゼIIIの転写終結因子として、5個～6個のT塩基を含んでもよい。幾つかの実施形態において、shRNAは、ウイルスベクター又はプラスミドを介して細胞に入り、ポリメラーゼIII又はポリメラーゼIIIの作用下で転写され、転写産物は細胞核から輸出された後 (通常Exportin5を介して)、Dicer処理後にRISCに輸送され、センス鎖は分解され、アンチセンス鎖は相補的標的配列に結合して遺伝子サイレンシングを達成することができる。

40

【0203】

本出願において、「CRISPR／Casシステム」という用語は通常、RNA誘導性

50

ヌクレアーゼ又は他のエフェクター分子及び gRNA 分子を含む一連の分子を指し、上記分子は、RNA 誘導性ヌクレアーゼ又は他のエフェクター分子が標的配列で核酸を修飾するように引導して修飾することを可能にする、例えば標的配列の分解を引き起こすことができる。幾つかの実施形態において、CRISPR システムは、gRNA 及び Cas タンパク質などの Cas タンパク質を含む。Cas 9 又はその機能的変異体を含むシステムは、本出願において「Cas 9 システム」又は「CRISPR / Cas システム」と呼ばれる。幾つかの実施形態において、gRNA 分子と Cas 分子は、リボ核タンパク質 (RNP) 複合体を形成するように、複合体化することができる。

【0204】

本出願において、「gRNA 分子」又は「ガイド RNA」、「指向 RNA」、「引導 RNA」、「ガイド RNA 分子」、「gRNA」は互換的に使用され、通常、RNA 誘導性ヌクレアーゼ又は他のエフェクター分子 (通常、gRNA 分子と複合する) の標的配列への特異的誘導を促進する核酸分子を指す。幾つかの実施形態において、gRNA の一部の DNA へのハイブリダイゼーション (例えば、gRNA ガイドドメインを介して)、及び gRNA 分子の一部の RNA 誘導性ヌクレアーゼ又は他のエフェクター分子への結合 (例えば、少なくとも gRNA tracr を介して) によって上記誘導を達成する。幾つかの実施形態において、gRNA 分子は、単一の連続したポリヌクレオチド分子からなり、本明細書において「単一ガイド RNA」又は「sgRNA」など呼ばれる。他の実施形態において、gRNA 分子は、それ自体が会合 (通常、ハイブリダイゼーションによって) 可能である複数 (例えば、2 つ) のポリヌクレオチド分子からなり、本明細書において「二重ガイド RNA」又は「dgRNA」など呼ばれる。

【0205】

本出願において、「Cas タンパク質」という用語は通常、CRISPR / Cas システムにおいて DNA 切断を担う酵素を指す。I 型、II 型、III 型 CRISPR / Cas システム由来の酵素を含んでもよい。例えば、Cas 3、Cas 9、Cas 10 である。

【0206】

本出願において、「Cas 9 タンパク質」という用語は通常、DNA 切断を担う細菌 I 型 CRISPR / Cas システム由来の酵素を指す。Cas 9 は、野生型タンパク質及びその機能的変異体を含んでもよい。

【0207】

本出願において、「対立遺伝子」という用語は通常、遺伝子座における遺伝子配列が持つ可能性のある異なる変化形態を指す。遺伝子座は、遺伝子部位又は部位とも呼ばれ、染色体上の固定位置、例えばある遺伝子の位置を指す。ゲノム内の遺伝子座の配置位置は、遺伝子マップ (genetic map) と呼ばれる。

【0208】

本出願において、「ホモ接合体」という用語は通常、相同染色体の同一遺伝子座における 2 つの対立遺伝子が同一である遺伝子型個体を指す。一对の相対する遺伝子には、AA 及び aa という 2 つの遺伝子型を有する個体が存在する可能性がある。

【0209】

本出願において、「ヘテロ接合体」という用語は通常、二倍体中の相同染色体の同一部位における 2 つの対立遺伝子が同一でない遺伝子型個体、例えば Aa を指す。ヘテロ接合遺伝子型は通常、ホモ接合優性遺伝子型又はホモ接合劣性遺伝子型の何れよりも適合性が高く、この現象はヘテロ接合優位性と呼ばれる。

【0210】

本出願において、「腫瘍」及び「癌」という用語は互換的に使用されてもよく、通常、異常細胞の急速且つ無秩序な増殖を特徴とする疾患を指す。癌細胞は、局所的に、又は血流及びリンパ系を通じて身体他の部分に拡散することができる。本明細書において、様々な癌の例を記載しているが、それらには、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、皮膚癌、膵臓癌、結腸直腸癌、腎臓癌、肝臓癌、脳癌、リンパ腫、白血病、肺癌などが含まれる

10

20

30

40

50

が、これらに限定されない。「癌」又は「腫瘍」という用語は、前悪性及び悪性の癌並びに腫瘍を含み、固形腫瘍及び非固形腫瘍を更に包含する。

【0211】

高レベルのインターロイキン13受容体アルファ2 (IL-13R α 2) は、多くの癌細胞で (膀胱癌、乳癌及び卵巣癌、又は膠芽腫などの悪性神経膠腫を含む) 発見される。IL-13R α 2 はまた、高悪性度星状細胞腫を有するヒト患者の大部分において過剰発現される (PLOS One, 2013 Oct 16; 8 (10): e77719 を参照し、その全体が参照により本明細書に明示的に組み入れられる)。また、癌細胞における IL13RA2 発現量の減少により、モデルにおける腫瘍増殖が顕著に遅らせることができる (Breast Cancer Research, 2015; 17 (1)、その全体が参照により本明細書に明示的に組み入れられる)。IL13R α 2 を発現する正常組織の種類はほとんどなく、そのような場合、低レベルでしか発現しないことが予想される。多形性膠芽腫 (GBM) の場合、IL13R α 2 の高発現は、腫瘍の進行と患者の生存率低下の予後マーカーとなる可能性がある。

10

【0212】

本出願において、「薬学的に許容される」という用語は通常、合理的な利益／リスク比に見合った、過度の毒性、刺激、アレルギー応答又は他の問題若しくは合併症を伴わずに、合理的な医学的判断の範囲内でヒト及び動物の組織と接触させて使用するのに適した化合物、材料、組成物及び／又は剤形を指す。

【0213】

本出願において、「薬学的に許容される担体」という用語は通常、従来使用される担体の何れか1つを指し、物理化学的考慮要因 (溶解性及び活性結合剤との反応性の欠如など) によってのみ制限され、投与経路によって制限される。本明細書に記載される薬学的に許容される担体、例えば、ビヒクル、アジュバント、賦形剤及び希釈剤は、当業者に周知であり、容易に入手可能である。一態様において、薬学的に許容される担体は、医薬組成物の活性成分に対して化学的不活性を有する担体であり、使用条件下で有害な副作用又は毒性を有しない担体である。幾つかの実施形態において、担体は、動物又はヒトに投与される場合に、有害反応、アレルギー反応又は他の不適切な反応を生じない。幾つかの態様において、医薬組成物は、発熱性物質及びヒト又は動物に有害である他の不純物を含まない。薬学的に許容される担体は、任意及び全ての溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤などを含み、その用途は当該分野で周知である。

20

30

【0214】

許容される担体、賦形剤又は安定剤は、レシピエントに毒性がなく、且つ好ましくは、使用される用量及び濃度で不活性であり、リン酸塩、クエン酸塩又は他の有機酸などの緩衝液、アスコルビン酸などの抗酸化剤、低分子量ペプチド、血清アルブミン、ゼラチン又は免疫グロブリンなどのタンパク質、ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリジンなどのアミノ酸、単糖、二糖、及びグルコース、マンノース又はデキストリンを含む他の炭水化物、EDTAなどのキレート剤、マンニトール又はソルビトールなどの糖アルコール、ナトリウムなどの塩形成対イオン、及び／又は Tween、Pluronic 又はポリエチレングリコール (PEG) などの非イオン性界面活性剤を含む。

40

【0215】

本出願において、「有効量」又は「有効用量」という用語は通常、所望の効果を達成するのに、又は少なくとも部分的に達成するのに十分な量を指す。薬物又は治療剤の「治療有効量」又は「治療有効用量」は通常、単独で又は別の治療剤と組み合わせて使用される場合に、疾患の退行を促進する (疾患症状の重症度の低下、疾患無症候期間の頻度及び持続期間の増加、又は疾患に罹患していることにより引き起こされる損傷若しくは障害の予防によって証明される) 薬物の任意の量である。

【0216】

抗 IL-13R α 2 CAR-T 細胞の「治療有効量」又は「有効量」は、治療上有益

50

な効果が、CRSなどの抗IL-13R α 2 CAR-T細胞の任意の毒性又は有害作用を上回る量又は用量でもある。「治療有効量」という用語は、対象（例えば、患者）を「治療する」のに有効な量を含む。一実施例において、治療有効用量は、対象における多発性骨髄腫を治療するための抗IL-13R α 2 CAR-T細胞の最小有効用量（MED）である。一実施例において、治療有効用量は、対象がCRSを治療できない状態にならない、抗IL-13R α 2 CAR-T細胞の最大許容用量（MTD）である。

【0217】

本発明において、「発現のアップレギュレーション」という用語は通常、核酸mRNAレベルの発現の増加又はポリペプチドレベルの発現の増加を指す。この用語は、例えば、糖部分の付加、リン酸化など、ポリペプチドの活性及び／又は機能の増加に必要な翻訳後修飾にも関係し得る。

10

【0218】

本出願において、「含む」という用語は通常、包含すること、まとめること、含有すること又は網羅の意味を指す。幾つかの場合において、「である」、「……からなる」の意味も表す。

【0219】

本出願において、「約」という用語は通常、指定値の0.5%～10%の以上又は以下の範囲内の変化、例えば、指定値の0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、又は10%の以上又は以下の範囲内の変化を指す。

20

【0220】

本出願において、「対象」という用語は通常、ヒト又は非ヒト動物を指し、ネコ、イヌ、ウマ、ブタ、ウシ、ヒツジ、ウサギ、マウス、ラット又はサルなどを含むが、これらに限定されない。

【0221】

発明の詳細な説明

本明細書で提供される方法及び組成物の幾つかの実施形態は、インターロイキン13受容体サブユニット α 2（IL-13R α 2）に特異的に結合することができ、又はインターロイキン13受容体サブユニット α 2（IL-13R α 2）に特異的に結合するように構成されるキメラ抗原受容体（CAR）に関する。幾つかの実施形態において、そのようなCARをコードする核酸、そのようなCARを含む免疫エフェクター細胞、並びに例えば、それを必要とする対象に、例えば、インターロイキン-13受容体サブユニット α -2（IL-13R α 2）によって媒介される疾患又は病状、例えば、癌（例えば、神経膠腫及び膠芽腫を含むIL-13R α 2陽性悪性腫瘍）を治療又はは阻害するための薬物として、そのような細胞を提供することによって、そのようなCARを有する免疫エフェクター細胞を利用する治療方法を含む。

30

【0222】

免疫エフェクター細胞

一態様では、本出願は、免疫エフェクター細胞であって、上記免疫エフェクター細胞におけるT細胞抗原受容体（TCR）及び主要組織適合性複合体（MHC I、MHC II）の細胞における機能が阻害され、且つ上記免疫エフェクター細胞は、IL13R α 2を標的とするキメラ抗原受容体（CAR）を含む、免疫エフェクター細胞を提供する。

40

【0223】

幾つかの実施態様において、そのうち、上記IL13R α 2を標的とするキメラ抗原受容体（CAR）は、抗体重鎖可変領域（VH）の少なくとも1つの相補性決定領域（CDR）を含む標的部分を含み、上記VHは、配列番号18に示されるアミノ酸配列と少なくとも約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.5%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0224】

幾つかの実施形態において、上記VHは、配列番号16又は配列番号17に示されるア

50

ミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む。例えば、上記 VH は配列番号 16 又は配列番号 17 に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

【0225】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記 IL13R α 2 を標的とするキメラ抗原受容体 (CAR) は、VH を含む標的部分を含み、上記 VH は、重鎖相補性決定領域 1 (HCDR1)、重鎖相補性決定領域 2 (HCDR2) 及び重鎖相補性決定領域 3 (HCDR3) を含み、上記 HCDR3 は、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む。例えば、上記 HCDR3 は配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

10

【0226】

幾つかの実施形態において、上記 HCDR2 は、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む。例えば、上記 HCDR2 は配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

【0227】

幾つかの実施形態において、上記 HCDR1 は、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む。例えば、上記 HCDR1 は配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

20

【0228】

幾つかの実施形態において、上記 VH は、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む HCDR1、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む HCDR2、及び配列番号 3 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む HCDR3、を含む。

30

【0229】

例えば、上記免疫エフェクター細胞内の T 細胞抗原受容体 (TCR) 及び主要組織適合性複合体 (MHC I、MHC II) の細胞における機能が阻害され、且つ上記免疫エフェクター細胞は、標的部分を有する IL13R α 2 を標的とするキメラ抗原受容体 (CAR) を含み、上記標的部分は、抗体重鎖可変領域 (VH) を含み、上記 VH は、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を有する HCDR1、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を有する HCDR2、及び配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を有する HCDR3 を含んでもよい。

40

【0230】

幾つかの実施形態において、上記 VH は、重鎖フレームワーク領域 1 (HFR1)、重鎖フレームワーク領域 2 (HFR2)、重鎖フレームワーク領域 3 (HFR3) 及び重鎖フレームワーク領域 4 (HFR4) を含み、上記 HFR1 は、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0231】

幾つかの実施形態において、上記 HFR1 は、配列番号 8 又は配列番号 12 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95

50

%、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 %の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0232】

幾つかの実施形態において、上記 HFR2 は、配列番号 5 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 %の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0233】

幾つかの実施形態において、上記 HFR2 は、配列番号 9 又は配列番号 13 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 %の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

【0234】

幾つかの実施形態において、上記 HFR3 は、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 %の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0235】

幾つかの実施形態において、上記 HFR3 は、配列番号 10 又は配列番号 14 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 %の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

20

【0236】

幾つかの実施形態において、上記 HFR4 は、配列番号 7 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 %の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0237】

幾つかの実施形態において、上記 HFR4 は、配列番号 11 又は配列番号 15 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 %の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0238】

幾つかの実施形態において、上記 VH は HFR1、HFR2、HFR3 及び HFR4 を含み、且つ上記 HFR1、HFR2、HFR3 及び HFR4 は、

30

i) 配列番号 8 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 %の同一性を有するアミノ酸配列を含む HFR1、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 %の同一性を有するアミノ酸配列を含む HFR2、配列番号 10 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 %の同一性を有するアミノ酸配列を含む HFR3、配列番号 11 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 %の同一性を有するアミノ酸配列を含む HFR4、及び

40

ii) 配列番号 12 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 %の同一性を有するアミノ酸配列を含む HFR1、配列番号 13 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 %の同一性を有するアミノ酸配列を含む HFR2、配列番号 14 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 %の同一性を有するアミノ酸配列を含む HFR3、配列番号 15 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 %の同一性を有するアミノ酸配列を含む HFR4、及び

50

９９．５％の同一性を有するアミノ酸配列を含むＨＦＲ３、配列番号１５に示されるアミノ酸配列と少なくとも約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、約９９．５％の同一性を有するアミノ酸配列を含むＨＦＲ４、から選ばれる。

【０２３９】

幾つかの実施形態において、上記ＶＨは、配列番号１８に示されるアミノ酸配列と少なくとも約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、約９９．５％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０２４０】

例えば、上記免疫エフェクター細胞内のＴ細胞抗原受容体（ＴＣＲ）及び主要組織適合性複合体（ＭＨＣⅠ、ＭＨＣⅡ）の細胞における機能が阻害され、且つ上記免疫エフェクター細胞は、標的部分を有するＩＬ１３Ｒα２を標的とするキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含み、上記標的部分は、抗体重鎖可変領域（ＶＨ）を含み、上記ＶＨは、配列番号１８に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

【０２４１】

幾つかの実施形態において、上記ＶＨは、配列番号１６又は配列番号１７に示されるアミノ酸配列と少なくとも約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、約９９．５％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０２４２】

幾つかの実施形態において、上記標的部分は抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）の少なくとも１つのＣＤＲを更に含み、上記ＶＬは、配列番号３６に示されるアミノ酸配列と少なくとも約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、約９９．５％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０２４３】

幾つかの実施形態において、上記ＶＬは、配列番号３４又は配列番号３５に示されるアミノ酸配列と少なくとも約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、約９９．５％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０２４４】

幾つかの実施形態において、上記標的部分は、ＶＨの少なくとも１つのＣＤＲ及びＶＬの少なくとも１つのＣＤＲを含み、且つ上記ＶＨ及びＶＬは、

ｉ）配列番号１６に示されるアミノ酸配列と少なくとも約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、約９９．５％の同一性を有するアミノ酸配列を含むＶＨ、配列番号３４に示されるアミノ酸配列と少なくとも約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、約９９．５％の同一性を有するアミノ酸配列を含むＶＬ、及び

ｉｉ）配列番号１７に示されるアミノ酸配列と少なくとも約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、約９９．５％の同一性を有するアミノ酸配列を含むＶＨ、配列番号３５に示されるアミノ酸配列と少なくとも約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、約９９．５％の同一性を有するアミノ酸配列を含むＶＬ、から選ばれる。

【０２４５】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記ＩＬ１３Ｒα２を標的とするキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）は、ＶＬを含む標的部分を含み、上記ＶＬは、軽鎖相補性決定領域１（ＬＣＤＲ１）、軽鎖相補性決定領域２（ＬＣＤＲ２）及び軽鎖相補性決定領域３（ＬＣＤＲ３）を含み、上記ＬＣＤＲ１は、配列番号１９に示されるアミノ酸配列と少なくとも約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約

10

20

30

40

50

8 %、約 99 %、約 99.5 %の同一性を有するアミノ酸配列を含む。例えば、上記 L C D R 1 は配列番号 19 に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

【0246】

幾つかの実施形態において、上記 L C D R 2 は、配列番号 20 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 %の同一性を有するアミノ酸配列を含む。例えば、上記 L C D R 2 は配列番号 20 に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

【0247】

幾つかの実施形態において、上記 L C D R 3 は、配列番号 21 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 %の同一性を有するアミノ酸配列を含む。例えば、上記 L C D R 3 は配列番号 21 に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

【0248】

幾つかの実施形態において、上記 V L は、配列番号 19 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 %の同一性を有するアミノ酸配列を含む L C D R 1、配列番号 20 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 %の同一性を有するアミノ酸配列を含む L C D R 2、及び配列番号 21 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 %の同一性を有するアミノ酸配列を含む L C D R 3、を含む。

【0249】

例えば、上記免疫エフェクター細胞内の T 細胞抗原受容体 (T C R) 及び主要組織適合性複合体 (M H C I、M H C I I) の細胞における機能が阻害され、且つ上記免疫エフェクター細胞は、標的部分を有する I L 13 R α 2 を標的とするキメラ抗原受容体 (C A R) を含み、上記標的部分は、V H 及び V L を含み、上記 V H は、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を有する H C D R 1、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を有する H C D R 2、及び配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を有する H C D R 3 を含んでもよく、上記 V L は、配列番号 19 に示されるアミノ酸配列を有する L C D R 1、配列番号 20 に示されるアミノ酸配列を有する L C D R 2、及び配列番号 21 に示されるアミノ酸配列を有する L C D R 3 を含んでもよい。

【0250】

幾つかの実施形態において、上記 V L は、軽鎖フレームワーク領域 1 (L F R 1)、軽鎖フレームワーク領域 2 (L F R 2)、軽鎖フレームワーク領域 3 (L F R 3) 及び軽鎖フレームワーク領域 4 (L F R 4) を含み、上記 L F R 1 は、配列番号 22 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 %の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0251】

幾つかの実施形態において、上記 L F R 1 は、配列番号 26 又は配列番号 30 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 %の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0252】

幾つかの実施形態において、上記 L F R 2 は、配列番号 23 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 %の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0253】

幾つかの実施形態において、上記 L F R 2 は、配列番号 27 又は配列番号 31 に示され

10

20

30

40

50

るアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0254】

幾つかの実施形態において、上記 LFR3 は、配列番号 24 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0255】

幾つかの実施形態において、上記 LFR3 は、配列番号 28 又は配列番号 32 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

【0256】

幾つかの実施形態において、上記 LFR4 は、配列番号 25 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0257】

幾つかの実施形態において、上記 LFR4 は、配列番号 29 又は配列番号 33 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

20

【0258】

幾つかの実施形態において、上記 VL は LFR1、LFR2、LFR3 及び LFR4 を含み、且つ上記 LFR1、LFR2、LFR3 及び LFR4 は、

i) 配列番号 26 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む LFR1、配列番号 27 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む LFR2、配列番号 28 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む LFR3、配列番号 29 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む LFR4、及び

30

ii) 配列番号 30 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む LFR1、配列番号 31 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む LFR2、配列番号 32 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む LFR3、配列番号 33 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む LFR4、から選ばれる。

40

【0259】

幾つかの実施形態において、上記 VL は、配列番号 36 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

50

【0260】

例えば、上記免疫エフェクター細胞内のT細胞抗原受容体（TCR）及び主要組織適合性複合体（MHC I、MHC II）の細胞における機能が阻害され、且つ上記免疫エフェクター細胞は、標的部分を有するIL13R α 2を標的とするキメラ抗原受容体（CAR）を含み、上記標的部分は、VH及びVLを含み、上記VHは、配列番号18に示されるアミノ酸配列を含んでもよく、上記VLは、配列番号36に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

【0261】

幾つかの実施形態において、上記VLは、配列番号34又は配列番号35に示されるアミノ酸配列と少なくとも約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.5%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

【0262】

幾つかの実施形態において、上記標的部分は、VH及びVLを含み、そのうち、上記VHは、配列番号18に示されるアミノ酸配列と少なくとも約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.5%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記VLは、配列番号36に示されるアミノ酸配列と少なくとも約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.5%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

20

【0263】

例えば、上記VH及びVLは、

i) 配列番号16に示されるアミノ酸配列を含むVH、配列番号34に示されるアミノ酸配列を含むVL、及び

ii) 配列番号17に示されるアミノ酸配列を含むVH、配列番号35に示されるアミノ酸配列を含むVL、から選ばれ得る。

【0264】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記標的部分は、全長抗体、Fab、単鎖可変断片（scFv）又は単ドメイン抗体（VHH）を含む。例えば、上記標的部分はscFvを含む。

30

【0265】

幾つかの実施形態において、上記標的部分は、VHとVLとの間に位置するリンカーポリペプチドを含む。

【0266】

幾つかの実施形態において、上記リンカーポリペプチドは、Gly-Serリンカー（配列番号37）、ウィットロー（Whitlow）リンカー（配列番号38）、及び配列番号37又は配列番号38に示されるアミノ酸配列と少なくとも約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.5%の同一性を有するアミノ酸配列を含むリンカーから選ばれる。

【0267】

幾つかの実施形態において、上記標的部分は、配列番号41又は配列番号44に示されるアミノ酸配列と少なくとも約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.5%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

40

【0268】

例えば、そのうち、上記標的部分は配列番号41又は配列番号44に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

【0269】

また例えば、そのうち、上記標的部分は配列番号39、配列番号40、配列番号42又は配列番号43に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

50

【0270】

更に例えば、上記免疫エフェクター細胞内のT細胞抗原受容体（TCR）及び主要組織適合性複合体（MHC I、MHC II）の細胞における機能が阻害され、且つ上記免疫エフェクター細胞は、標的部分を有するIL13R α 2を標的とするキメラ抗原受容体（CAR）を含み、上記標的部分は、配列番号39、配列番号40、配列番号42又は配列番号43に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

【0271】

幾つかの実施態様において、そのうち、上記IL13R α 2を標的とするキメラ抗原受容体（CAR）は、抗体重鎖可変領域（VH）の少なくとも1つの相補性決定領域（CDR）を含む標的部分を含み、上記VHは、配列番号56に示されるアミノ酸配列と少なくとも約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.5%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。例えば、上記VHは配列番号56に示されるアミノ酸配列を含む。

10

【0272】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記IL13R α 2を標的とするキメラ抗原受容体（CAR）は、VHを含む標的部分を含み、上記VHは、重鎖相補性決定領域1（HCDR1）、重鎖相補性決定領域2（HCDR2）及び重鎖相補性決定領域3（HCDR3）を含み、上記HCDR3は、配列番号55に示されるアミノ酸配列と少なくとも約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.5%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。例えば、上記HCDR3は配列番号55に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

20

【0273】

幾つかの実施形態において、上記HCDR2は、配列番号54に示されるアミノ酸配列と少なくとも約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.5%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。例えば、上記HCDR2は配列番号54に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

【0274】

幾つかの実施形態において、上記HCDR1は、配列番号53に示されるアミノ酸配列と少なくとも約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.5%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。例えば、上記HCDR1は配列番号53に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

30

【0275】

幾つかの実施形態において、上記VHは、配列番号53に示されるアミノ酸配列と少なくとも約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.5%の同一性を有するアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号54に示されるアミノ酸配列と少なくとも約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.5%の同一性を有するアミノ酸配列を含むHCDR2、及び配列番号55に示されるアミノ酸配列と少なくとも約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.5%の同一性を有するアミノ酸配列を含むHCDR3、を含む。

40

【0276】

例えば、上記VHは、配列番号53に示されるアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号54に示されるアミノ酸配列を含むHCDR2、及び配列番号55に示されるアミノ酸配列を含むHCDR3、を含んでもよい。

【0277】

幾つかの実施形態において、上記VHは、配列番号56に示されるアミノ酸配列と少なくとも約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.5%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。例えば、上記VHは配列番号56に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

50

【0278】

また例えば、上記免疫エフェクター細胞内のT細胞抗原受容体（TCR）及び主要組織適合性複合体（MHC I、MHC II）の細胞における機能が阻害され、且つ上記免疫エフェクター細胞は、標的部分を有するIL13R α 2を標的とするキメラ抗原受容体（CAR）を含み、上記標的部分はVHを含み、上記VHは、配列番号56に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

【0279】

幾つかの実施態様において、上記標的部分は抗体軽鎖可変領域（VL）の少なくとも1つのCDRを更に含み、上記VLは、配列番号60に示されるアミノ酸配列と少なくとも約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.5%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

【0280】

幾つかの実施態様において、上記標的部分は、VHの少なくとも1つのCDR及びVLの少なくとも1つのCDRを含み、且つ上記VHは、配列番号56に示されるアミノ酸配列と少なくとも約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.5%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記VLは、配列番号60に示されるアミノ酸配列と少なくとも約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.5%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0281】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記IL13R α 2を標的とするキメラ抗原受容体（CAR）は、VLを含む標的部分を含み、上記VLは、軽鎖相補性決定領域1（LCDR1）、軽鎖相補性決定領域2（LCDR2）及び軽鎖相補性決定領域3（LCDR3）を含み、上記LCDR1は、配列番号57に示されるアミノ酸配列と少なくとも約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.5%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。例えば、上記LCDR1は配列番号57に示されるアミノ酸配列を含む。

20

【0282】

幾つかの実施形態において、上記LCDR2は、配列番号58に示されるアミノ酸配列と少なくとも約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.5%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。例えば、上記LCDR2は配列番号58に示されるアミノ酸配列を含む。

30

【0283】

幾つかの実施形態において、上記LCDR3は、配列番号59に示されるアミノ酸配列と少なくとも約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.5%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。例えば、上記LCDR3は配列番号59に示されるアミノ酸配列を含む。

【0284】

幾つかの実施形態において、上記VLは、配列番号57に示されるアミノ酸配列と少なくとも約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.5%の同一性を有するアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号58に示されるアミノ酸配列と少なくとも約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.5%の同一性を有するアミノ酸配列を含むLCDR2、及び配列番号59に示されるアミノ酸配列と少なくとも約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.5%の同一性を有するアミノ酸配列を含むLCDR3、を含む。

40

【0285】

例えば、上記免疫エフェクター細胞内のT細胞抗原受容体（TCR）及び主要組織適合性複合体（MHC I、MHC II）の細胞における機能が阻害され、且つ上記免疫エフェ

50

クター細胞は、標的部分を有する I L 1 3 R α 2 を標的とするキメラ抗原受容体 (C A R) を含み、上記標的部分は、V H 及び V L を含み、上記 V H は、配列番号 5 3 に示されるアミノ酸配列を有する H C D R 1、配列番号 5 4 に示されるアミノ酸配列を有する H C D R 2、及び配列番号 5 5 に示されるアミノ酸配列を有する H C D R 3 を含んでもよく、上記 V L は、配列番号 5 7 に示されるアミノ酸配列を有する L C D R 1、配列番号 5 8 に示されるアミノ酸配列を有する L C D R 2、及び配列番号 5 9 に示されるアミノ酸配列を有する L C D R 3 を含んでもよい。

【0286】

幾つかの実施形態において、上記 V L は、配列番号 6 0 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 9 0 %、約 9 1 %、約 9 2 %、約 9 3 %、約 9 4 %、約 9 5 %、約 9 6 %、約 9 7 %、約 9 8 %、約 9 9 %、約 9 9 . 5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

【0287】

幾つかの実施態様において、上記標的部分は、V H 及び V L を含み、そのうち、上記 V H は、配列番号 5 6 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 9 0 %、約 9 1 %、約 9 2 %、約 9 3 %、約 9 4 %、約 9 5 %、約 9 6 %、約 9 7 %、約 9 8 %、約 9 9 %、約 9 9 . 5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記 V L は、配列番号 6 0 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 9 0 %、約 9 1 %、約 9 2 %、約 9 3 %、約 9 4 %、約 9 5 %、約 9 6 %、約 9 7 %、約 9 8 %、約 9 9 %、約 9 9 . 5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

20

【0288】

例えば、上記免疫エフェクター細胞内の T 細胞抗原受容体 (T C R) 及び主要組織適合性複合体 (M H C I、M H C I I) の細胞における機能が阻害され、且つ上記免疫エフェクター細胞は、標的部分を有する I L 1 3 R α 2 を標的とするキメラ抗原受容体 (C A R) を含み、上記標的部分は、V H 及び V L を含み、上記 V H は、配列番号 5 6 に示されるアミノ酸配列を含んでもよく、上記 V L は、配列番号 6 0 に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

【0289】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記標的部分は、全長抗体、F a b、単鎖可変断片 (s c F v) 又は単一ドメイン抗体 (V H H) を含む。

【0290】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記標的部分は s c F v を含む。

30

【0291】

幾つかの実施態様において、上記標的部分は、V H と V L との間に位置するリンカーポリペプチドを含む。

【0292】

幾つかの実施形態において、上記リンカーポリペプチドは、G l y - S e r リンカー (配列番号 3 7)、ウィットロー (W h i t l o w) リンカー (配列番号 3 8)、及び配列番号 3 7 又は配列番号 3 8 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 9 0 %、約 9 1 %、約 9 2 %、約 9 3 %、約 9 4 %、約 9 5 %、約 9 6 %、約 9 7 %、約 9 8 %、約 9 9 %、約 9 9 . 5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含むリンカーから選ばれる。

40

【0293】

幾つかの実施形態において、上記標的部分は、配列番号 6 1 又は配列番号 6 2 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 9 0 %、約 9 1 %、約 9 2 %、約 9 3 %、約 9 4 %、約 9 5 %、約 9 6 %、約 9 7 %、約 9 8 %、約 9 9 %、約 9 9 . 5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0294】

また例えば、上記免疫エフェクター細胞内の T 細胞抗原受容体 (T C R) 及び主要組織適合性複合体 (M H C I、M H C I I) の細胞における機能が阻害され、且つ上記免疫エフェクター細胞は、標的部分を有する I L 1 3 R α 2 を標的とするキメラ抗原受容体 (C A R) を含み、上記標的部分は、配列番号 6 1 又は配列番号 6 2 に示されるアミノ酸配列

50

を含んでもよい。

【0295】

幾つかの実施形態において、上記CARは、膜貫通ドメインを含み、上記膜貫通ドメインは、CD8A、CD8B、CD28、CD3 ϵ (CD3e)、4-1BB、CD4、CD27、CD7、PD-1、TRAC、TRBC、CD3 ζ 、CTLA-4、LAG-3、CD5、ICOS、OX40、NKG2D、2B4、CD244、Fc ϵ RI γ 、BTLA、CD30、GITR、HVEM、DAP10、CD2、NKG2C、LIGHT、DAP12、CD40L (CD154)、TIM1、CD226、DR3、CD45、CD80、CD86、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64及びSLAMからなる群より選ばれる1つ又は複数のタンパク質に由来する膜貫通ドメインを含む。

10

【0296】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記膜貫通ドメインはCD8Aに由来する膜貫通ドメインを含む。例えば、上記膜貫通ドメインは、CD8Aに由来する膜貫通ドメインを含んでもよい。

【0297】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記膜貫通ドメインは、配列番号69～配列番号117の何れか1項に示されるアミノ酸配列と少なくとも約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.5%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。例えば、上記膜貫通ドメインは配列番号69に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

20

【0298】

幾つかの実施形態において、上記CARは、細胞内共刺激シグナル伝達ドメインを含み、上記細胞内共刺激シグナル伝達ドメインは、CD28、4-1BB (CD137)、CD27、CD2、CD7、CD8A、CD8B、OX40、CD226、DR3、SLAM、CDS、ICAM-1、NKG2D、NKG2C、B7-H3、2B4、Fc ϵ RI γ 、BTLA、GITR、HVEM、DAP10、DAP12、CD30、CD40、CD40L、TIM1、PD-1、LFA-1、LIGHT、JAML、CD244、CD100、ICOS、CD40及びMyD88からなる群より選ばれる1つ又は複数のタンパク質に由来する細胞内共刺激シグナル伝達ドメインを含む。

30

【0299】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記細胞内共刺激シグナル伝達ドメインは4-1BBに由来する共刺激シグナル伝達ドメインである。

【0300】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記細胞内共刺激シグナル伝達ドメインは、配列番号118～配列番号150の何れか1項に示されるアミノ酸配列と少なくとも約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.5%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。例えば、上記細胞内共刺激シグナル伝達ドメインは、配列番号119に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

40

【0301】

幾つかの実施形態において、上記CARは、細胞内シグナル伝達ドメインを含み、上記細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3 ζ 、CD3 δ 、CD3 γ 、CD3 ϵ 、CD79a、CD79b、Fc ϵ RI γ 、Fc ϵ RI β 、Fc γ RIIa、ウシ白血病ウイルスgp30、Epstein-Barrウイルス (EBV) LMP2A、サル免疫不全ウイルスPBj14Nef、DAP10、DAP-12及び少なくとも1つのITAMを含むドメインからなる群より選ばれる1つ又は複数のタンパク質に由来する細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【0302】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記細胞内シグナル伝達ドメインはCD3 ζ に

50

由来するシグナル伝達ドメインを含む。

【0303】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号134、配列番号138、配列番号139、配列番号151～配列番号161の何れか1項に示されるアミノ酸配列と少なくとも約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.5%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。例えば、上記細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号151に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

【0304】

幾つかの実施形態において、上記CARは、標的部分と膜貫通ドメインとの間にヒンジ領域を含み、上記ヒンジ領域は、CD28、IgG1、IgG4、IgD、4-1BB、CD4、CD27、CD7、CD8A、PD-1、ICOS、OX40、NKGD2、NKG2C、FcεRIγ、BTLA、GITR、DAP10、TIM1、SLAM、CD30及びLIGHTからなる群より選ばれる1つ又は複数のタンパク質に由来するヒンジ領域を含む。

【0305】

幾つかの実施形態において、上記ヒンジ領域はCD8Aに由来するヒンジ領域を含む。

【0306】

幾つかの実施形態において、上記ヒンジ領域は、配列番号162～配列番号183の何れか1項に示されるアミノ酸配列と少なくとも約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.5%の同一性を有するアミノ酸配列を有する。例えば、ヒンジ領域は、配列番号170に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

【0307】

幾つかの実施形態において、上記キメラ抗原受容体の非標的部分は、CD8A分子膜貫通ドメイン、CD8Aのヒンジ領域、4-1BBの細胞内共刺激シグナル伝達ドメイン及びCD3ζ細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【0308】

幾つかの実施形態において、上記キメラ抗原受容体の非標的部分は、配列番号67に示されるアミノ酸配列と少なくとも約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.5%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。例えば、上記キメラ抗原受容体の非標的部分は配列番号67に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

【0309】

幾つかの実施形態において、C末端が上記標的部分のN末端に連結するシグナルペプチド断片を更に含む。例えば、上記キメラ抗原受容体は、シグナルペプチド、抗IL13Rα2 scFv、CD8Aヒンジドメイン、CD8A膜貫通ドメイン、4-1BB共刺激ドメイン及びCD3ζ主シグナル伝達ドメインを含むCARを含んでもよい。

【0310】

幾つかの実施形態において、上記シグナルペプチド断片はCD8Aシグナルペプチド断片を含む。

【0311】

幾つかの実施形態において、上記シグナルペプチド断片は、配列番号184に示されるアミノ酸配列と少なくとも約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.5%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。例えば、上記シグナルペプチド断片は配列番号184に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

【0312】

幾つかの実施形態において、上記キメラ抗原受容体は、配列番号45又は配列番号46の何れか1項に示されるアミノ酸配列と少なくとも約90%、約91%、約92%、約9

10

20

30

40

50

3%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.5%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。例えば、上記キメラ抗原受容体は、配列番号45又は配列番号46の何れか1項に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

【0313】

幾つかの実施形態において、上記免疫エフェクター細胞はヒト細胞を含む。

【0314】

幾つかの実施形態において、上記免疫エフェクター細胞は、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞（NK細胞）、マクロファージ、NKT細胞、単核細胞、樹状細胞、顆粒球、リンパ球、白血球及び／又は末梢血単核細胞を含む。例えば、上記免疫エフェクター細胞は、ヒトT細胞などのT細胞であってもよい。

10

【0315】

幾つかの実施形態において、上記免疫エフェクター細胞は自己又は非自己の免疫エフェクター細胞を含む。例えば、上記免疫エフェクター細胞は、非自己のヒトT細胞であってもよい。

【0316】

幾つかの実施形態において、上記免疫エフェクター細胞は、修飾された免疫エフェクター細胞を含み、そのうち、上記修飾は、免疫拒絶に関連する1つ又は複数の遺伝子の発現及び／又は活性がダウンレギュレーションされることを含む。

【0317】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記免疫拒絶に関連する遺伝子は、TRAC、TRBC、HLA-A、HLA-B、B2M及びCIITAからなる群より選ばれる1つ又は複数の遺伝子である。

20

【0318】

幾つかの実施形態において、上記修飾された免疫エフェクター細胞は、修飾されていない対応する細胞と比較して、TRAC遺伝子及びHLA-A遺伝子の発現及び／又は活性がダウンレギュレーションされる。

【0319】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記修飾された免疫エフェクター細胞は、上記修飾されていない対応する細胞と比較して、CIITA遺伝子の発現及び／又は活性がダウンレギュレーションされていない。

30

【0320】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記修飾された免疫エフェクター細胞は、上記修飾されていない対応する細胞と比較して、B2M遺伝子の発現及び／又は活性がダウンレギュレーションされていない。

【0321】

例えば、上記修飾された免疫エフェクター細胞は、上記修飾されていない対応する細胞と比較して、TRAC遺伝子及びHLA-A遺伝子の発現及び／又は活性がダウンレギュレーションされ、CIITA遺伝子及びB2M遺伝子の発現及び／又は活性がダウンレギュレーションされなくてもよい。

【0322】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記修飾された免疫エフェクター細胞は対応する野生型細胞と比較して、TRAC遺伝子及びHLA-A遺伝子の発現及び／又は活性がダウンレギュレーションされる。

40

【0323】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記修飾された免疫エフェクター細胞は対応する野生型細胞と比較して、B2M遺伝子の発現及び／又は活性がダウンレギュレーションされていない。

【0324】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記修飾された免疫エフェクター細胞は対応する野生型細胞と比較して、CIITA遺伝子の発現及び／又は活性がダウンレギュレーション

50

ョンされていない。

【0325】

例えば、上記修飾された免疫エフェクター細胞は対応する野生型細胞と比較して、T R A C 遺伝子及びH L A - A 遺伝子の発現及び／又は活性がダウンレギュレーションされてもよく、C I E T A 遺伝子及びB 2 M 遺伝子の及び／又は活性がダウンレギュレーションされなくてもよい。

【0326】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記遺伝子の発現レベル及び／又は活性のダウンレギュレーションは、上記遺伝子をコードする核酸分子の発現及び／又は活性のダウンレギュレーション、及び／又は、上記遺伝子によってコードされるタンパク質産物の発現及び／又は活性のダウンレギュレーションを含む。

10

【0327】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記修飾は、遺伝子ノックアウト、遺伝子変異及び／又は遺伝子サイレンシングを含む。

【0328】

幾つかの実施形態において、上記修飾は、上記免疫エフェクター細胞における2つのT R A C 対立遺伝子のうちの何れか1つがノックアウトされると共に、2つのH L A - A 対立遺伝子のうちの何れか1つがノックアウトされることを含む。

【0329】

幾つかの実施形態において、上記修飾は、上記免疫細胞における2つのT R A C 対立遺伝子がノックアウトされると共に、2つのH L A - A 対立遺伝子のうちの何れか1つがノックアウトされることを含む。

20

【0330】

幾つかの実施形態において、上記修飾は、上記免疫細胞におけるT R A C 遺伝子エクソンがノックアウトされると共に、H L A - A 遺伝子エクソンがノックアウトされることを含む。

【0331】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記修飾は、アンチセンスRNA、s i RNA、s h RNA 及びC R I S P R / C a s 9 システムからなる群より選ばれる1つ又は複数の物質を上記免疫エフェクター細胞に投与することを含む。

30

【0332】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記修飾はC R I S P R / C a s 9 システムを上記免疫エフェクター細胞に投与することを含む。

【0333】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記修飾は、上記T R A C 遺伝子エクソン部分を標的とするs g RNAを上記免疫エフェクター細胞に投与することを更に含む。

【0334】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記T R A C 遺伝子エクソン部分を標的とする上記s g RNAは、配列番号186～配列番号200の何れか1項に示されるヌクレオチド配列と少なくとも約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.5%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

40

【0335】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記修飾は、上記H L A - A 遺伝子エクソン部分を標的とするs g RNAを上記免疫エフェクター細胞に投与することを含む。

【0336】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記H L A - A 遺伝子エクソン部分を標的とする上記s g RNAは、配列番号201～配列番号241の何れか1項に示されるヌクレオチド配列と少なくとも約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.5%の同一性を有するアミノ酸配列

50

を含む。

【0337】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記修飾は、Cas酵素を上記細胞に投与することを更に含む。

【0338】

幾つかの実施形態において、そのうち、Cas酵素はCas9タンパク質を含む。

【0339】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記アンチセンスRNAは、配列番号242～配列番号245の何れか1項に示されるヌクレオチド配列と少なくとも約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.5%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

【0340】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記免疫エフェクター細胞はHLA-Bホモ接合体細胞である。

【0341】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記HLA-Bホモ接合体は、HLA-B*40ホモ接合体、HLA-B*15ホモ接合体、HLA-B*46ホモ接合体、HLA-B*13ホモ接合体、HLA-B*51ホモ接合体、HLA-B*58ホモ接合体、HLA-B*07ホモ接合体、HLA-B*35ホモ接合体、HLA-B*44ホモ接合体、HLA-B*52ホモ接合体、HLA-B*57ホモ接合体、HLA-B*54ホモ接合体、HLA-B*55ホモ接合体を含む。

20

【0342】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記免疫エフェクター細胞はHLA-Aホモ接合体又はヘテロ接合体細胞である。

【0343】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記HLA-Aホモ接合体又はヘテロ接合体は、HLA-A*02ホモ接合体、HLA-A*11ホモ接合体、HLA-A*02/A*11ヘテロ接合体又はHLA-A*24ホモ接合体を含む。

【0344】

例えば、免疫エフェクター細胞はヒトT細胞であってもよく、且つ上記ヒトT細胞はHLA-Bホモ接合体細胞であってもよい。

30

【0345】

免疫エフェクター細胞の製造方法

別の態様において、本発明は、前述の免疫エフェクター細胞を製造する方法であって、免疫エフェクター細胞に、前述のIL13R α 2を標的とするCARをコードするポリヌクレオチド配列、又は前述のIL13R α 2を標的とするCARをコードするポリヌクレオチド配列を含むベクターを導入する前／後に、上記免疫エフェクター細胞が修飾されることを含み、上記修飾は、免疫拒絶に関連する1つ又は複数の遺伝子の発現及び／又は活性のダウンレギュレーションを含む、方法を提供する。

【0346】

例えば、上記免疫エフェクター細胞を製造する方法は、
(1) 前述の核酸分子又は前述のベクターを免疫エフェクター細胞に導入することと、
(2) 上記免疫エフェクター細胞を修飾することと、を含んでもよく、上記修飾は免疫拒絶に関連する1つ又は複数の遺伝子の発現及び／又は活性のダウンレギュレーションを含む。

40

【0347】

例えば、上記免疫エフェクター細胞を製造する方法は、
(1) 健常者の末梢血を採取し、PBMC単離を行い、比率に従ってCD3磁気ビーズを加えてインキュベートし、CD3+T細胞の選別を行い、CD3/CD28抗体結合磁気ビーズを均一に混合し、計算された量に応じて適切な量の磁気ビーズ懸濁液を取ってT

50

細胞培養系に添加し、T細胞を活性化し、一晚培養することと、

(2) IL13R α 2 CARウイルスの力価に従ってT細胞を感染させることと、

(3) TRAC遺伝子及びHLA-A遺伝子を同時にノックアウトすることと、

(4) 比率に応じてCD3磁気ビーズを加え、CD3-T細胞（磁気ビーズに結合していない細胞）を収集するように、CD3陰性T細胞を選別することと、を含んでもよい。

【0348】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記ベクターは発現ベクターである。

【0349】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記ベクターは、DNAベクター、RNAベクター、プラスミド、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター及びレトロウイルスベクターから選ばれる。

【0350】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記ベクターはEF-1 α プロモーターを更に含む。

【0351】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記ベクターは、ウッドチャック肝炎ウイルスの転写後調節エレメント(WPRE)を更に含む。

【0352】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記免疫拒絶に関連する遺伝子は、TRAC、TRBC、HLA-A、HLA-B、B2M及びCIITAからなる群より選ばれる1つ又は複数の遺伝子である。例えば、上記免疫拒絶に関連する遺伝子は、TRAC及び／又はHLA-Aを含んでもよい。

【0353】

幾つかの実施形態において、上記修飾されていない対応する細胞における対応する遺伝子の発現及び／又は活性と比較して、上記免疫エフェクター細胞におけるTRAC遺伝子及びHLA-A遺伝子の発現及び／又は活性はダウンレギュレーションされる。

【0354】

幾つかの実施形態において、上記修飾されていない対応する細胞における対応する遺伝子の発現及び／又は活性と比較して、CIITA遺伝子の発現及び／又は活性はダウンレギュレーションされていない。

【0355】

幾つかの実施形態において、上記修飾されていない対応する細胞における対応する遺伝子の発現及び／又は活性と比較して、B2M遺伝子の発現及び／又は活性はダウンレギュレーションされていない。

【0356】

例えば、上記修飾された免疫エフェクター細胞は、上記修飾されていない対応する細胞と比較して、TRAC遺伝子及びHLA-A遺伝子の発現及び／又は活性がダウンレギュレーションされ、CIITA遺伝子及びB2M遺伝子の発現及び／又は活性がダウンレギュレーションされなくてもよい。

【0357】

幾つかの実施形態において、対応する野生型細胞と比較して、上記免疫エフェクター細胞のTRAC遺伝子及びHLA-A遺伝子の発現及び／又は活性はダウンレギュレーションされる。

【0358】

幾つかの実施形態において、対応する野生型細胞と比較して、CIITA遺伝子の発現及び／又は活性はダウンレギュレーションされていない。

【0359】

幾つかの実施形態において、対応する野生型細胞と比較して、B2M遺伝子の発現及び／又は活性はダウンレギュレーションされていない。

【0360】

10

20

30

40

50

幾つかの実施形態において、そのうち、上記遺伝子の発現レベル及び／又は活性のダウンレギュレーションは、上記遺伝子をコードする核酸分子の発現及び／又は活性のダウンレギュレーション、及び／又は、上記遺伝子によってコードされるタンパク質産物の発現及び／又は活性のダウンレギュレーションを含む。

【0361】

例えば、上記修飾された免疫エフェクター細胞は対応する野生型細胞と比較して、TRAC遺伝子及びHLA-A遺伝子の発現及び／又は活性がダウンレギュレーションされてもよく、CIITA遺伝子及びB2M遺伝子の及び／又は活性がダウンレギュレーションされなくてもよい。

【0362】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記修飾は、遺伝子ノックアウト、遺伝子変異及び／又は遺伝子サイレンシングを含む。

【0363】

幾つかの実施形態において、上記修飾は、上記免疫エフェクター細胞における2つのTRAC対立遺伝子のうちの何れか1つがノックアウトされると共に、2つのHLA-A対立遺伝子のうちの何れか1つがノックアウトされることを含む。

【0364】

幾つかの実施形態において、上記修飾は、上記免疫細胞における2つのTRAC対立遺伝子がノックアウトされると共に、2つのHLA-A対立遺伝子のうちの何れか1つがノックアウトされることを含む。

【0365】

幾つかの実施形態において、上記修飾は、上記免疫細胞におけるTRAC遺伝子エクソンがノックアウトされると共に、HLA-A遺伝子エクソンがノックアウトされることを含む。

【0366】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記修飾は、アンチセンスRNA、siRNA、shRNA及びCRISPR/Cas9システムからなる群より選ばれる1つ又は複数の物質を上記免疫エフェクター細胞に投与することを含む。

【0367】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記修飾はCRISPR/Cas9システムを上記免疫エフェクター細胞に投与することを含む。

【0368】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記修飾は、上記TRAC遺伝子エクソン部分を標的とするsgRNAを上記免疫エフェクター細胞に投与することを含む。

【0369】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記TRAC遺伝子エクソン部分を標的とする上記sgRNAは、配列番号186～配列番号200の何れか1項に示されるヌクレオチド配列と少なくとも約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.5%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0370】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記修飾は、上記HLA-A遺伝子エクソン部分を標的とするsgRNAを上記免疫エフェクター細胞に投与することを含む。

【0371】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記HLA-A遺伝子エクソン部分を標的とする上記sgRNAは、配列番号201～配列番号241の何れか1項に示されるヌクレオチド配列と少なくとも約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.5%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0372】

10

20

30

40

50

幾つかの実施形態において、そのうち、上記修飾は、C a s 酵素を上記細胞に投与することを更に含む。

【0373】

幾つかの実施形態において、そのうち、C a s 酵素はC a s 9タンパク質を含む。

【0374】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記アンチセンスRNAは、配列番号242～配列番号245の何れか1項に示されるヌクレオチド配列と少なくとも約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.5%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0375】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記免疫エフェクター細胞はヒト細胞を含む。

【0376】

幾つかの実施形態において、上記免疫エフェクター細胞は、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞（NK細胞）、マクロファージ、NK T細胞、単核細胞、樹状細胞、顆粒球、リンパ球、白血球及び／又は末梢血単核細胞を含む。例えば、上記免疫エフェクター細胞は、ヒトT細胞などのT細胞であってもよい。

【0377】

幾つかの実施形態において、上記免疫エフェクター細胞は自己又は非自己の免疫エフェクター細胞を含む。

【0378】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記細胞はHLA-Bホモ接合体細胞である。例えば、上記免疫エフェクター細胞はヒト細胞であってもよく、且つ上記ヒト細胞はHLA-Bホモ接合体細胞であってもよい。また例えば、上記免疫エフェクター細胞はヒト細胞であってもよく、且つ上記ヒト細胞はHLA-Bホモ接合体細胞であってもよい。

【0379】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記HLA-Bホモ接合体は、HLA-B*40ホモ接合体、HLA-B*15ホモ接合体、HLA-B*46ホモ接合体、HLA-B*13ホモ接合体、HLA-B*51ホモ接合体、HLA-B*58ホモ接合体、HLA-B*07ホモ接合体、HLA-B*35ホモ接合体、HLA-B*44ホモ接合体、HLA-B*52ホモ接合体、HLA-B*57ホモ接合体、HLA-B*54ホモ接合体、HLA-B*55ホモ接合体を含む。

【0380】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記細胞はHLA-Aホモ接合体又はヘテロ接合体細胞である。

【0381】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記HLA-Aホモ接合体又はヘテロ接合体は、HLA-A*02ホモ接合体、HLA-A*11ホモ接合体、HLA-A*02/A*11ヘテロ接合体又はHLA-A*24ホモ接合体を含む。

【0382】

用途、医薬組成物、治療方法

別の態様において、本出願は、前述の免疫エフェクター細胞のCAR-T細胞の製造における使用を更に提供する。

【0383】

別の態様において、本出願は、前述の免疫エフェクター細胞、及び任意選択に薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を更に提供する。

【0384】

別の態様において、本出願は、IL13R α 2の発現に関連する疾患又は病状の治療における、前述の免疫エフェクター細胞及び／又は前述の医薬組成物の使用を更に提供する。

【0385】

10

20

30

40

50

幾つかの実施形態において、そのうち、上記 I L 1 3 R α 2 の発現に関連する疾患又は病状は、I L 1 3 R α 2 の発現アップレギュレーションに関連する疾患又は病状を含む。

【0386】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記 I L 1 3 R α 2 の発現に関連する疾患又は病状は癌を含む。

【0387】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記癌は I L 1 3 R α 陽性腫瘍を含む。

【0388】

幾つかの実施態様において、そのうち、上記 I L 1 3 R α 陽性腫瘍は、悪性神経膠腫、結腸直腸癌、子宮頸癌、膵臓癌、皮膚黒色腫、卵巣癌、乳癌、副腎皮質癌、胸腺腫、子宮癌、膀胱癌、食道癌、頭頸部扁平上皮癌又は胃癌を含む。

【0389】

別の態様において、本出願は、前述の免疫エフェクター細胞及び／又は前述の医薬組成物の I L 1 3 R α 2 の発現に関連する疾患又は病状の治療用の医薬の製造における使用を更に提供する。

【0390】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記 I L 1 3 R α 2 の発現に関連する疾患又は病状は、I L 1 3 R α 2 の発現アップレギュレーションに関連する疾患又は病状を含む。

【0391】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記 I L 1 3 R α 2 の発現に関連する疾患又は病状は癌を含む。

【0392】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記癌は I L 1 3 R α 陽性腫瘍を含む。

【0393】

幾つかの実施態様において、そのうち、上記 I L 1 3 R α 陽性腫瘍は、悪性神経膠腫、結腸直腸癌、子宮頸癌、膵臓癌、皮膚黒色腫、卵巣癌、乳癌、副腎皮質癌、胸腺腫、子宮癌、膀胱癌、食道癌、頭頸部扁平上皮癌又は胃癌を含む。

【0394】

別の態様において、本出願は、それを必要とする対象に有効量の前述の免疫エフェクター細胞及び／又は前述の医薬組成物を投与することを含む、I L 1 3 R α 2 の発現に関連する疾患又は病状を予防又は治療するための方法を更に提供する。

【0395】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記 I L 1 3 R α 2 の発現に関連する疾患又は病状は、I L 1 3 R α 2 の発現アップレギュレーションに関連する疾患又は病状を含む。

【0396】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記 I L 1 3 R α 2 の発現に関連する疾患又は病状は癌を含む。

【0397】

幾つかの実施形態において、そのうち、上記癌は I L 1 3 R α 陽性腫瘍を含む。

【0398】

幾つかの実施態様において、そのうち、上記 I L 1 3 R α 陽性腫瘍は、悪性神経膠腫、結腸直腸癌、子宮頸癌、膵臓癌、皮膚黒色腫、卵巣癌、乳癌、副腎皮質癌、胸腺腫、子宮癌、膀胱癌、食道癌、頭頸部扁平上皮癌又は胃癌を含む。

【0399】

何れの理論にも限定されることなく、以下の実施例は、本出願にかかるキメラ抗原受容体、免疫エフェクター細胞、製造方法及び使用などを解釈するためのものに過ぎず、本出願の発明の範囲を限定するものではない。

【0400】

実施例

実施例 1

10

20

30

40

50

1. 1 抗IL13R α 2キメラ抗原受容体(CAR)の設計

図1に示すように、抗IL13R α 2 CAR VLVH(マウス由来)の構造は、一個のIL13R α 2抗原結合領域(抗IL13R α 2マウスモノクローナル抗体Scfvに由来する)、一個のCD8A細胞外ヒンジ領域、一個のCD8A膜貫通領域、一個の4-1BB細胞内共刺激ドメイン及び一個のCD3 ζ 活性化シグナルドメインを含み、そのDNA配列は配列番号51に示され、アミノ酸配列は配列番号45に示された。

【0401】

抗IL13R α 2 CAR VHVL(ヒト由来)の構造は、一個のIL13R α 2抗原結合領域(抗IL13R α 2ヒト由来モノクローナル抗体Scfvに由来する)、一個のCD8A細胞外ヒンジ領域、一個のCD8A膜貫通領域、一個の4-1BB細胞内共刺激ドメイン及び一個のCD3 ζ 活性化シグナルドメインを含み、そのDNA配列は配列番号52に示され、アミノ酸配列は配列番号46に示された。

【0402】

1. 2 IL13R α 2 CARのレンチウイルスベクターの構築

IL13R α 2配列情報及びCARベクターの構造に従って、IL13R α 2 CARレンチウイルス発現ベクターを構築した(ベクターの模式図は図1を参照)。最適化は、市販のレンチウイルス発現ベクターpCDH-CMV-MCS-EF1-copGFPを骨格として選択し、このベクターに基づいて要素を改造した。まず、ベクターにカナマイシン耐性を持たせるように、ベクターのアンピシリン耐性遺伝子である β -ラクタマーゼをTn5由来のアミノグリコシドホスホトランスフェラーゼで置換した。次に、体内での適用において潜在的脅威を有するCMVプロモーター及びその隣接する下流のポリクローナル部位を削除した。最後に、プロトベクターからEF1プロモーターにより発現を開始したcopGFP遺伝子を削除し、SalI切断部位を保持し、且つSalI 5'末端にベクター構築用SmaI切断部位を付加して目的とする最終ベクターを形成した。添加したSmaI切断部位は、目的とする最終ベクターの単一切断部位であり、ベクターの他の配列部分は、当該切断部位を有しなかった。キメラ抗原受容体レンチウイルス発現ベクターを最適化した後に構築し、sangerシーケンシングにより配列が誤らないことを確認した後、レンチウイルスのパッケージングを行った。

【0403】

1. 3 ガイドRNAの設計

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>というウェブサイトを通して、対応する遺伝子配列を検索してダウンロードし、SnapGeneソフトウェアを用いて遺伝子配列を開くことによって、目的遺伝子の異なるエクソン上にsgRNAを設計することができた。本実施例で使用されるCRISPR/Cas9システムのsgRNA非限定的な設計原理は、5'-NNN(20)-NGG-3'であり、NGGはプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)と呼ばれ、そのうち、NはA、T、C又はGを表した。sgRNAは同じエクソン上により多く設計され得、且つ20ヌクレオチド配列からなるsgRNAがゲノム内で繰り返し出現する可能性があるため、<http://crispr.cos.uni-heidelberg.de>というウェブサイトを用いてsgRNAを設計して評価し、そのウェブサイトにエクソン配列を貼り付け、ウェブサイトでsgRNAを設計し、予測して評価し、評価のスコアが高いほど編集効率が高く、オフターゲットリスクが低い可能性があることを示し、より高いスコアのsgRNAを選択して試験した。TRAC遺伝子を標的とするsgRNAは、配列番号186~配列番号200に示され、HLA-A02遺伝子を標的とするsgRNAは、配列番号201~配列番号222に示され、HLA-A11遺伝子を標的とするsgRNAは、配列番号223~配列番号233に示され、HLA-A24遺伝子を標的とするsgRNAは、配列番号234~配列番号241に示され、ジェンスクリプトバイオテクノロジー社により合成された。

【0404】

実施例2

2. 1 ドナーのスクリーニング

受容体のHLA-B型決定に基づいて、受容体のHLA-B型決定とマッチするHLA-Bホモ接合体を選択した。

【0405】

まず、ドナーの供給源は集団内のHLA-Bホモ接合体に基づき、患者のHLA-Bの1つの対立遺伝子はドナーのHLA-Bホモ接合体と一致し、これらのドナー由来の細胞は、多数の患者集団をカバーすることができた。HLA-Bアイソフォームの不一致による拒絶反応が低減された。HLA-Bは主に、集団における頻度の高いB*40ホモ接合体、B*15ホモ接合体、B*46ホモ接合体、B*13ホモ接合体、B*51ホモ接合体、B*58ホモ接合体、B*07ホモ接合体、B*35ホモ接合体、B*44ホモ接合体、B*52ホモ接合体、B*57ホモ接合体、B*54ホモ接合体、B*55ホモ接合体が選択された。HLA-Aは、集団における頻度の比較的高いA*02ホモ接合体、A*11ホモ接合体及びA*02/A11ヘテロ接合体が選択された。

10

【0406】

2.2 CD3+T細胞の製造

(1) 末梢血からのPBMCの分離

健常ドナーから末梢血を採取し、PBS緩衝液で1:1に末梢血を希釈した。新しい50mLの遠心分離管に、まず希釈された血液量1/3の細胞分離液(Ficoll)を加え、次に血球希釈液を管壁に沿って非常にゆっくりと加え、800gで常温で20min遠心分離した(遠心分離機は、上昇速度を1、下降速度を0に設定した)。遠心分離後の遠心分離管内の液体は上から下へ、PBSと血清層、白血球層、リンパ球分離液、赤血球層に分けられた。PBS及び血清層を除去し、白血球層を新しい50mLの遠心分離管に移し、PBSを40mLになるまで加えて細胞を洗浄し、450gで10min遠心分離した。遠心分離後に上清を捨てると、末梢血単核細胞が得られた。細胞を再懸濁した後に細胞をカウントした。

20

【0407】

(2) 凍結保存された健常者PBMCの蘇生

凍結保存された健常者PBMC細胞を37℃の水浴釜で蘇生させ、完全に融解した後に10%のFBSを含むX-VIVO15培地(LONZAから購入)10mLを含有する15mLの遠心分離管に細胞を吸引し、400gで8min遠心分離し、上清を除去し、X-VIVO15培地(10%のFBS及び最終濃度100µg/mLのDNase Iを含む)2mLを添加し、室温で15minインキュベートし、インキュベートプロセスにおいて振動を続け、インキュベート終了後の溶液を40µmのフィルターでろ過し、PBS緩衝液10mLを吸い取って底の細胞を再懸濁して再びフィルターに加え、ろ過後に400gで8min遠心分離し、遠心分離後に上清を捨て、細胞を再懸濁した後に細胞をカウントした。

30

【0408】

(3) CD3+T細胞の選別

EasySep(登録商標)ヒトT細胞選別試薬キット(StemCell Technologiesから購入、カタログ番号は17951)を用いて、末梢血単核細胞(PBMC)中のT細胞を抽出した。PBMC密度を 5×10^7 細胞/mLに調整し、PBS緩衝液を0.25mL~2mLの範囲で添加し、まずcocktailを加えて均一に混合し、次に50µL/mLでisolation cocktailを加え、均一に混合した後に室温で5min放置し、ボルテックスシェーカーでRapidSpheresを30sボルテックスした後、細胞に40µL/mLで加えて均一に混合し、2.5mLの倍数まで緩衝液を追加し、上下に2~3回軽く吹き飛ばし、各チューブ2.5mLで冷凍保存管にそれぞれ加え、該冷凍保存管を磁気ホルダーに設置し、室温で3min放置し、冷凍保存蓋を軽く開き、磁石ホルダーを両端で注意深く持ち、逆転して2s~3s保持し、細胞液を新しい遠心分離管に一度に注入し、10mL~20mLの緩衝液で(細胞量に応じた)細胞を再懸濁した後、300gで10min遠心分離し、上清を捨て、CD3+T細胞が得られた。

40

50

【0409】

(4) T細胞の活性化

活性化試薬は、体積比が培地：Transact＝99：1で設定され、培地はX－VIVO15培地（5％のFBS、200U／mLのIL2、10ng／mLのIL7及び5ng／mLのIL15を含む）であり、Transactはミルテニーから購入した。T細胞を 1×10^6 細胞当たり1mLの活性化試薬（10μLのTransactを含む）で十分に再懸濁した後、37℃、5％のCO₂インキュベーターに置いて1日間インキュベートした。

【0410】

実施例3

図1に示すように、anti－IL13RA2 UCAR－Tは、遺伝子編集技術によりT細胞TCRとHLA－Aをノックアウトし、レンチウイルスのトランスフェクションによりT細胞にanti－IL13Rα2 CAR分子を発現させる。

【0411】

3.1 ウイルスのトランスフェクション

実施例2の方法でCD3＋T細胞（D0日）を得て、且つCD3／CD28抗体磁気ビーズで活性化し、活性化後、D1日にレンチウイルスベクター（実施例1で製造したIL13Rα2 CARレンチウイルス発現ベクター）をトランスフェクトし、D2日にレンチウイルスベクターを洗い流し、D3日にエレクトロトランスフェクトした。

【0412】

3.2 遺伝子ノックアウト

エレクトロトランスフェクション試薬キット（LONZAから購入、カタログ番号はV4XXP－3024）を用いてエレクトロトランスフェクションによって、RNP複合体を、3.1で製造した活性化後T細胞（D3日のCAR－T細胞を初期細胞として採取した）にトランスフェクトした。サンプリング及びカウント後、細胞を収集して遠心分離し、細胞沈殿物をPBSで再懸濁した。30min前にウェルプレート内で培地（X－VIVO15培地＋10％のFBS＋IL2（200U／mL）＋IL7（10ng／mL）＋IL15（5ng／mL））を予熱した。エレクトロトランスフェクション緩衝液の準備：Nucleofector Solution：Supplementを82：18で製造し、各エレクトロトランスフェクションシステムに応じて 1×10^7 の細胞を用いてRNP複合体（Cas9：sgRNA＝2：1）を配分し、まず10μgのsgRNAをPCRチューブ（RNA酵素なし）に加え、更に20μgのCas9タンパク質（thermoから購入、カタログ番号はA36499）を加え、均一に軽く混合した後、室温で12minインキュベートした。上記細胞をカウントし、300gで8min遠心分離して上清を捨て、PBSを加えて細胞を再懸濁し、1E7個の細胞を吸引して300gで8min再度遠心分離し、上清を捨てた後、100μLの製造されたエレクトロトランスフェクション緩衝液で細胞を再懸濁した。上記細胞懸濁液に、インキュベートしたRNP複合体を加え、均一に軽く混合し、次に混合物を電気回転カップに静かに移した。電気回転カップをLonza－4D電気回転計に置き、EO－115電気回転プログラムを用いてエレクトロトランスフェクションさせた。予熱した培地を電気回転カップに加え、次にセットのピペットを用いて細胞をウェルプレート内の予熱した培地に移し、次いで37℃、5％のCO₂のインキュベーターに48時間置いた後に細胞を収集し、sangerシーケンシングにより編集効率を検出し、同時に細胞を収集してノックアウト効率を検出した。

【0413】

そのうち、sgRNA配列は、TRAC sgRNA：AGAGTCTCTCAGCTGGTACA（配列番号186）、A02 sgRNA：CTGACCATGAAGCCACCCCTG（配列番号203）、A11 sgRNA：GGCCCCCTCCTGCTCTATCCA（配列番号233）であった。

【0414】

3.3 CD3 陰性 T 細胞の選別

CD3 陰性 T 細胞の選別を行い、細胞をカウントした後に遠心分離し、上清を捨て、細胞を buffer で再懸濁して均一に混合し、CD3 磁気ビーズ / 10^7 の細胞 $20 \mu\text{L}$ に CD3 磁気ビーズを加え、均一に混合した後に 4°C の冷蔵庫でインキュベートし、buffer を加えて細胞を洗浄して遠心分離した後に磁気ビーズを分離し、まず column を磁極に置き、次に対応する遠心分離管を置き、buffer で column (LD) を浸潤し、泡が生じないように細胞を column に加え、buffer で column を 2 回洗浄し、洗浄後の液体 (CD3-T) を 15mL の遠心分離管に収集し、細胞の一部を取って細胞をカウントした。

【0415】

10

3.4 細胞の培養

細胞の状態を顕微鏡下で観察し、細胞を希釈してカウントし、完全培地を補充して細胞密度を 3×10^5 個 / $\text{mL} \sim 1 \times 10^6$ 個 / mL に維持し、中間液を補充 / 交換し、 37°C 、5% の CO_2 で培養した。細胞の収集：遠心分離管に収集して遠心分離した後に上清を捨て、生理食塩水で細胞を再度洗浄し、遠心分離して凍結保存液を製造し、遠心分離後の細胞を凍結保存液に再懸濁し、注射器で最終製品用細胞凍結保存バッグに細胞懸濁液を吸い取って、細胞凍結保存バッグにラベルを貼付し、次の凍結保存を行った。

【0416】

3.5 遺伝子ノックアウト効率の検出

(1) Sanger シークエンシングの検出

細胞をカウントし、 $3 \sim 5 \times 10^4$ の細胞を採取し、 $2000\text{r} / \text{min}$ で 5min 遠心分離し、できる限り上清を除去し、次に各チューブに $20 \mu\text{L}$ の DE 溶解液を加え、細胞溶解後に PCR チューブに加え、一過性遠心分離後に PCR 装置にセットし、マシン設定条件： 65°C で 30min 、 4°C で 30s 、 95°C で 2min 、 16°C で無限であった。プライマー対 TRAC-For / TRAC-Rev、又は HLA-A For / HLA-A Rev を用いて、溶解産物をテンプレートとして PCR を行い、PCR 産物を GENEWIZ に送って Sanger シークエンシングを行った。sanger シークエンシングの結果を得た後、https://moriaritylab.shinyapps.io/editr_v10/ というウェブサイトの EditR エディタを用いて、編集が起こる位置及び編集効率を予測した。

20

30

【0417】

(2) フローサイトメトリーによる細胞カウント

$10^5 \sim 10^8$ 細胞を採取し、 2000rpm で 5min 遠心分離し、上清を捨て、次に各チューブに $100 \mu\text{L}$ の PBS 緩衝液を加えて細胞を再懸濁し、更に anti-human AB TCR-APC (eBioscience から購入) 抗体 $5 \mu\text{L}$ 、HLA-A02 Monoclonal Antibody (BB7.2)、APC、eBioscience (登録商標) (invitrogen から購入) 抗体 $5 \mu\text{L}$ を添加し、均一に混合した後に室温で 10min インキュベートした。 2000rpm で 5min 遠心分離した後、更に PBS 緩衝液で 2 回洗浄し、細胞を再懸濁して BD FACSAria フローサイトメーターにより測定したところ、細胞表面 TCR、HLA-A02 発現陽性率が得られた。ノックアウト効率 = $(A - B) / A \times 100\%$ 、A は対照群の発現陽性率であり、B はノックアウト群の発現陽性率であった。

40

【0418】

結果は、図 3A ~ 図 3C に示すように、anti-IL13R α 2 UCAR-T 細胞 CAR 陽性率は 45% 以上に達し (図 3A)、anti-IL13R α 2 UCAR-T 細胞中心記憶比率は 43% 程度に達し (図 3B)、anti-IL13R α 2 UCAR-T 細胞ダブルノックアウト効率は 94% 以上に高かった (図 3C)。

【0419】

実施例 4 anti-IL13R α 2 UCAR-T 細胞 (IL13R α 2 CAR マウス由来) のインビトロ細胞毒性分析

50

4.1 anti-IL13R α 2 UCAR-T細胞による標的細胞の殺傷

(1) IL13R α 2 標的細胞：U251-LG、Luciferase+GFP、標的細胞状態を対数増殖期になるように調整し、実験を行う前に連続的に2回継代を必要とした。

【0420】

(2) IL13R α 2 UCAR-T細胞及び対照群IL13R α 2 CAR-T、T細胞を製造し、フローサイトメトリーによりノックアウト効率、トランスフェクション効率、CD3-T選別効率及び記憶T細胞の比率を検出し、増幅倍率を統計した。

【0421】

(3) 製造した細胞の幾つかの群を各群 6×10^6 細胞で遠心分離により収集した。

【0422】

(4) 標的細胞を1640+10%のFBSに再懸濁し、各標的部位に24ウェルプレート3枚を採取し、標的細胞を 2×10^5 /ウェルの量で接種した。(標的細胞及びエフェクター細胞の両方が、 2×10^6 /mLの密度で接種した)。次にE/T比(エフェクター標的比、エフェクター細胞：標的細胞)でエフェクター細胞を添加した。各ウェルに最大体積(例えば600 μ L)まで液体を補充した。対照は、エフェクター細胞(600 μ L)を添加せず、同じ数の標的細胞を接種した。ウェルプレートを5%のCO₂、37℃のインキュベーターに入れ、24時間培養した。E/T：1：2、1：1、2：1、5：1、10：1で3回繰り返しプレーティングした。

【0423】

(5) 24時間培養し、ウェルプレートをインキュベーターから取り出し、上清200 μ Lを収集した。次にLuciferase活性の検出によって標的細胞に対する組換えCAR-T細胞の溶解能を反映した。

【0424】

標的細胞溶解パーセントの計算式：

【数1】

$$Lysis\% = \left(1 - \frac{Luc\text{活性}_{混合サンプル}}{Luc\text{活性}_{対照サンプル}}\right) \times 100\%$$

結果分析(図4)：Anti-IL13RA2 UCAR-T細胞、T細胞及び標的細胞U251をそれぞれ共インキュベートしたところ、エフェクター標的比が2：1の場合、90%以上の殺傷効率が達成された。

【0425】

4.2 IL13R α 2 UCAR-T細胞と標的細胞との共培養におけるサイトカイン分泌の検出

【0426】

上記共培養系の上清を収集し、サイトカイン分泌レベルを検出した。

結果分析(図5A～図5C)：anti-IL13R α 2 UCAR-Tが顕著に活性化され、IL-2、IFN- γ 及びTNF- α サイトカインを多量に分泌した。

【0427】

実施例5 anti-IL13R α 2 UCAR-T細胞(IL13R α 2 CARマウス由来)のインビボ抗腫瘍効果

8～10週齢のNSGマウスに腫瘍細胞U251-LG(5×10^6)を皮下注射し、マウスを各群5匹で3群に分け、腫瘍形成時間は一般的に2～4週間であった。各群のマウス腫瘍にIL13R α 2 UCAR-T細胞、IL13R α 2 CAR-T細胞、遺伝子ノックアウト無しのT細胞5E6を、50 μ Lの注射体積でシングルポイント注射した。ルシフェラーゼによってマウス腫瘍退縮をモニターした。

【0428】

結果分析(図6)：anti-IL13R α 2 UCAR-T細胞及びanti-IL

10

20

30

40

50

13R α 2 CAR-T細胞を再注入したマウスは、腫瘍増殖速度が明らかに遅くなった。
【0429】

実施例6 anti-IL13R α 2 UCAR-T細胞 (IL13R α 2 CARマウス由来) のインビボ半減期検出

ヒト免疫系マウス (hHSC-NCG) 15匹を準備し、3群に分けた。実験群をIL13R α 2 UCAR-T細胞 (TRAC+HLA-A02ノックアウト) とし、対照群1をIL13R α 2 CAR-Tとし、対照群2をIL13R α 2 UCAR-T細胞 (TRAC+B2Mノックアウト) とするように細胞を製造し、各マウスに 1×10^7 細胞を注射し、異なる時点D0、2h、D3、D7、D14、D21、D28、D35、D42、D49、D56、D60で採血した。異なる時点での血液サンプルからゲノムを抽出し、QPCR絶対定量法を用いてcopy/ng genome DNAを計算し、陽性対照は14日目に採取したUCAR-T細胞を用い、陰性対照はDEPC水を用いた。

10

【0430】

結果分析 (図7) : anti-IL13R α 2 UCAR-T細胞 (TRAC+HLA-A02ノックアウト) は、マウス内で約70日間の生存期間を有し、week4-week8で2回増幅された。

【0431】

実施例7 ユニバーサルT細胞のインビボ安全性検証

(1) GVHD反応: TRAC、HLA-AダブルノックアウトT細胞、遺伝子ノックアウト無しのT細胞を製造し、同種異系PBMCを照射し、製造された2群の細胞をそれぞれ刺激し、IFN- γ レベルを検出した。

20

【0432】

結果分析 (図8) : TRAC、HLA-AダブルノックアウトT細胞群のIFN- γ 分泌レベルが非常に低く、TRACノックアウトがGVHD反応を低下させることを示した。

【0433】

(2) 同種異系反応: 同種異系PBMCは照射後の2群の細胞を刺激し、IFN- γ のレベルを検出した。

【0434】

結果分析 (図9) は、TRAC、HLA-AダブルノックアウトT細胞群のIFN- γ 分泌レベルが非常に低く、HLA-Aノックアウトが同種異系反応を低下させることを示した。

30

【0435】

実施例8 ユニバーサルT細胞のインビボ安全性検証

(1) GVHD反応: TRAC、HLA-AダブルノックアウトT細胞、遺伝子ノックアウト無しのT細胞を製造した。8~10週のNSGマウスを取ってそれぞれ 1×10^7 注射し、生存率、毛皮のキメ、皮膚の完全性などの臨床指標により移植対宿主反応を観察した。サイトカイン検出: 末梢血の血清を採取し、IL6、IL-2、TNF- α 、IFN- γ などのサイトカインのレベルを検出した。採血時点: 再注入前、24h、D3、D7、D14、D28、2M。

40

【0436】

結果分析 (図10A~図10D) : ノックアウト効率が80%を超える3群のUCAR-T、特にノックアウト効率が90%を超える2群は、サイトカイン分泌レベルが全て非常に低く、TRAC、HLA-AダブルノックアウトT細胞群は、GVHD反応を大きく減少させることが示された。

【0437】

(2) 同種異系反応: TRAC、HLA-AダブルノックアウトCAR-T細胞を製造し、NSGマウス体内に、 1×10^7 のTCR-HLA-AダブルノックアウトCAR-T細胞 (放射線照射) 及び 2×10^6 の同種異系T細胞を同時注射した。対照群1:

50

5×10^6 の TCR-B2M anti-IL13RA2 UCAR-T 細胞と 5×10^6 の同種異系 T 細胞を NSG マウス体内に注射した。対照群 2 : 5×10^6 の TCR-IL13RA2 UCAR-T 細胞と 5×10^6 の同種異系 T 細胞を NSG マウス体内に注射した。

【0438】

異なる時点で採血し、CAR コピー数を測定した。2 群の CAR コピー数の変化を比較した。時点 : D1、D5、D7、D10、D14。

【0439】

結論 : D24 日に、2 群の対照群のマウスでは、拒絶反応が明らかであり、コピー数は基本的に検出されず、一方、実験群のコピー数は、依然として比較的高いレベルにあり、このことは、拒絶反応が明らかに弱くなり、マウス体内での実験群細胞の生存期間が延長されたことが示された。(図 11 ~ 図 12 を参照)。

10

【0440】

実施例 9 遺伝子編集の安全性分析

TRAC、HLA-A ダブルノックアウト T 細胞、遺伝子ノックアウト無しの T 細胞を製造し、ノックアウト効率を検出した後、以下の分析を行った。

【0441】

(1) オフターゲット :

対照群 : トランスフェクト CAS9 + ODN タグ

実験群 : トランスフェクト CAS9 + sgRNA (TRAC + HLA-A) + ODN タグ

20

On-target and off-target-WGS : (Whole genome sequencing) : 遺伝子ノックアウト無しの T 細胞、TRAC、HLA-A ダブルノックアウト T 細胞をそれぞれ 1×10^6 採取し、蘇州 GENEWIZ バイオテクノロジー有限公司に送って検出した。

【0442】

結果分析 : 実験群のオフターゲット率が非常に低く、そしてオフターゲットは主に遺伝子間やイントロンに集中し、遺伝子機能への影響は少なかった(図 13 を参照)。

【0443】

(2) 染色体転座 : qPCR 法を用いて、TRAC 及び HLA 遺伝子座を同時に編集した場合に起こり得る再構成を定量した。2 回の転座は TRAC : HLA、HLA : TRAC と標識された。合成したテンプレートプラスミド中の陽性参照サンプルを、検出対照として評価した。HLA ゲノム標的領域の両側の増幅断片を内部対照とした。ゲノム DNA を抽出してリアルタイム定量 PCR を行い、標準曲線及び Cq 値からゲノム DNA の遺伝子コピー数を計算した。

30

【0444】

結果分析 : ダブルノックアウト T 細胞 (TRAC + HLA-A) は、D14 (採取) に染色体転座の発生の有無を検出した。検出結果 : 2 つの転座方式の検出値が何れもゼロに近く、遺伝子座が再構成されていないことを示唆した(図 14 を参照)。

【0445】

(3) 核型の型決定 : 70% ~ 80% の遺伝子ノックアウト無しの T 細胞、TRAC、HLA-A ダブルノックアウト T 細胞をそれぞれ 1×10^6 採取して 2 個の T25 瓶に入れ、培養液で満たし、完全に密封された蓋で覆い、密封フィルムで包み、浙江如耀バイオテクノロジー有限公司に送って検出した。

40

【0446】

結果分析 : 対照群と比較して、実験群の核型が正常であった(15 を参照)。

【0447】

(4) Cas9 タンパク質の残留 : 細胞を製造する時、ノックアウト前、ノックアウト後及び採取前の 3 時点でそれぞれ 1×10^6 の細胞を採取して溶解し、続いてタンパク質定量キット (NOVATEIN BIO、カタログ番号 NB-E1372PR) で定量し

50

、各群のサンプルを同じサンプリング量 $2 \mu\text{g}$ に調整し、説明書に従って C R I S P R / C a s 9 タンパク質 E L I S A キットで検出した。サンプル中の C a s 9 タンパク質は試験紙ウェル上にしっかりと安定してスポットされた。次に、検出抗体を用いてバインディングされた C a s 9 タンパク質を認識し、次に現像剤を用いて現像させた。C a s 9 比は吸光度に正比例し、C a s 9 対照品との比較によって C a s 9 タンパク質の絶対量を定量した。

【0448】

結果分析：ダブルノックアウト T 細胞 (T R A C + H L A - A) は、エレクトロトランスフェクション前 (D 3)、エレクトロトランスフェクション後液体交換前 (D 5)、D 9、D 14 (採取) の 4 時点で s p C a s 9 残留をそれぞれ検出したところ、エレクトロトランスフェクション後液体交換前 (D 5) に微量な残留を検出することを除いて、残りの 3 時点で何れも検出されなかった。(図 16 を参照)。

10

【0449】

実施例 10. シングルノックアウト T 細胞の製造

エレクトロトランスフェクション試薬キット (L O N Z A から購入、カタログ番号は V 4 X X P - 3 0 2 4) を用いてエレクトロトランスフェクションによって、RNP 複合体を、実施例 2 で製造した活性化後 T 細胞にトランスフェクトした。30 min 前にウェルプレート内で培地 (X - V I V O 1 5 培地 + 10 % の F B S + I L 2 (200 U / mL) + I L 7 (10 ng / mL) + I L 1 5 (5 ng / mL)) を予熱した。エレクトロトランスフェクション緩衝液は N u c l e o f e c t o r S o l u t i o n : S u p p l e m e n t = 8 2 : 1 8 で調製された。RNP 複体の準備：T R A C の s g R N A 配列は s g 9、H L A - A の s g R N A 配列は H L A - A 0 2 S g 2 又は H L A - A 0 2 S g 5 又は H L A - A 1 1 s g 2 1 又は H L A - A 1 1 R s g 2 であり、まず $20 \mu\text{g}$ の s g R N A を P C R チューブ (R N A 酵素なし) に加え、更に $10 \mu\text{g}$ の C a s 9 タンパク質 (t h e r m o から購入、カタログ番号は A 3 6 4 9 9) を加え、均一に軽く混合した後、室温で 12 min インキュベートした。実施例 2 で培養した活性化後 T 細胞をカウントし、300 g で 8 min 遠心分離して上清を捨て、P B S を加えて細胞を再懸濁し、 1×10^7 個の細胞を吸い取って 300 g で 8 min 再度遠心分離し、上清を捨てた後、 $100 \mu\text{L}$ の調製したエレクトロトランスフェクション緩衝液で細胞を再懸濁した。上記細胞懸濁液に、インキュベートした RNP 複合体を加え、均一に軽く混合し、次に混合物を電気回転カップに静かに移した。電気回転カップを L o n z a - 4 D 電気回転計に置き、E O - 1 1 5 電気回転プログラムを用いてエレクトロトランスフェクションさせた。予熱した培地を電気回転カップに加え、次いでセットのピペットを用いて細胞をウェルプレート内の予熱した培地に移し、次いで 37°C 、5 % の CO_2 のインキュベーターに置いて培養した。

20

30

【0450】

実施例 11. 遺伝子ノックアウト効率検出方法の比較

(1) S a n g e r シークエンシングの検出

細胞をカウントし、 $3 \sim 5 \times 10^4$ の細胞を採取し、 $2000 \text{ r} / \text{min}$ で 5 min 遠心分離し、できる限り上清を除去し、次いで各チューブに $20 \mu\text{L}$ の D E 溶解液を加え、細胞溶解後に P C R チューブに加え、一過性遠心分離後に P C R 装置にセットし、マシン設定条件： 65°C で 30 min、 4°C で 30 s、 95°C で 2 min、 16°C で無限であった。プライマー対 T R A C - F o r / T R A C - R e v、又は H L A - A F o r / H L A - A R e v を用いて、溶解産物をテンプレートとして P C R を行い、P C R 産物を G E N E W I Z に送って S a n g e r シークエンシングを行った。s a n g e r シークエンシングの結果を得た後、https://moriaritylab.shinyapps.io/editr_v10/ というウェブサイトの E d i t R エディタを用いて、編集が起こる位置及び編集効率を予測した。

40

【0451】

(2) T A クローンシークエンシングの検出

50

AxyPrep™ PCR産物洗浄試薬キット（AXYGENから購入）を用いてPCR産物を精製し、次いで試薬キット（DNA A-Tailing Kit、TaKaRaから購入）を用いて精製後のPCR産物を接着末端に貼り付け、DNA Ligation Kit Ver 2.1（TaKaRaから購入）を介して産物をTベクター（pMDTM19-T Vector Cloning Kit、TaKaRaから購入）に連結し、それをコンピテント細胞（DH5 alpha）に形質転換し、次いでアンピシリン耐性を有するLBプレートに塗布し、37℃のインキュベーターで約12時間培養した後にシングルコロニーを摘出し、シングルコロニー菌液をGENEWIZに送ってシーケンシングを行った。ノックアウト効率＝変異クローン数／全クローン数。

【0452】

10

（3）フローサイトメトリーによる細胞カウント

1.0E5～1.0E8細胞を採取し、2000rpmで5min遠心分離し、上清を捨て、次に各チューブに100μLのPBS緩衝液を加えて細胞を再懸濁し、更にanti-human AB TCR-APC（eBioscienceから購入）抗体5μL、HLA-A02 Monoclonal Antibody（BB7.2）、APC、eBioscience（登録商標）（invitrogenから購入）抗体5μLを添加し、均一に混合した後に室温で10minインキュベートした。2000rpmで5min遠心分離した後、更にPBS緩衝液で2回洗浄し、細胞を再懸濁してBD FACSAriaフローサイトメーターにより測定したところ、細胞表面TCR、HLA-A02発現陽性率が得られた。ノックアウト効率＝（A－B）／A×100％、Aは対照群の発現陽性率であり、Bはノックアウト群の発現陽性率であった。

20

【0453】

TRACシングルノックアウトの3つの検出結果は図17～図19に示され、ノックアウト効率の計算結果は表1に示され、3つの検出方法は基本的に同じであり、後続の試験ではSangerシーケンシング法のみを用いて編集効率を検出した。

【0454】

表1 遺伝子ノックアウト効率検出方法の結果

標的遺伝子	s g RNA	検出方法	ノックアウト効率％
TRAC	S g 9	Sangerシーケンシング	90
		TAクローンシーケンシング	95
		フローサイトメトリー	93

30

【0455】

HLA-A02遺伝子編集のためのSangerシーケンシング法の結果は図20～図21に示され、編集効率は、何れも90％であり、HLA-A11遺伝子編集のためのSangerシーケンシング法の結果は図22～図23に示された。

【0456】

40

実施例12. TRAC遺伝子及びHLA-A遺伝子のダブルノックアウトT細胞の製造
エレクトロトランスフェクション試薬キット（LONZAから購入、カタログ番号はV4XXP-3024）を用いてエレクトロトランスフェクションによって、RNP複合体を、実施例2で製造した活性化後T細胞にトランスフェクトした。30min前にウェルプレート内で培地（X-VIVO15培地＋10％のFBS＋IL2（200U／mL）＋IL7（10ng／mL）＋IL15（5ng／mL））を予熱した。エレクトロトランスフェクション緩衝液はNucleofector Solution：Supplement＝82：18で調製された。RNP複合体の準備：20μgのTRAC sgRNA（TRAC Sg9）、20μgのHLA-A sgRNA（HLA-A02 Sg2又はHLA-A02 Sg5又はHLA-A11 s g 2 1又はHLA-A＊24：0

50

2 : 0 1、H L A - A * 3 0 : 0 1 : 0 1 : 0 1、H L A - A * 3 3 : 0 1 : 0 1 : 0 1、H L A - A * 0 3 : 0 1 : 0 1 : 0 1、H L A - A * 0 1 : 0 1 : 0 1 : 0 1 若しくは H L A - A * 2 6 : 0 1 : 0 1 : 0 1 を標的とする s g R N A) を P C R チューブ (R N A 無し) にそれぞれ加え、更に 1 0 μ g の C a s 9 タンパク質 (t h e r m o から購入、カタログ番号は A 3 6 4 9 9) をそれぞれ加え、均一に軽く混合した後、室温で 1 2 m i n インキュベートした。実施例 2 で培養した活性化後 T 細胞をカウントし、3 0 0 g で 8 m i n 遠心分離して上清を捨て、P B S を加えて細胞を再懸濁し、1 E 7 個の細胞を吸い取って 3 0 0 g で 8 m i n 再度遠心分離し、上清を捨てた後、1 0 0 μ L の調製したエレクトロトランスフェクション緩衝液で細胞を再懸濁した。上記細胞懸濁液に、インキュベートした T R A C 及び H L A - A の R N P 複合体を加え、均一に軽く混合し、次いで混合物を電気回転カップに静かに移した。電気回転カップを L o n z a - 4 D 電気回転計に置き、E O - 1 1 5 電気回転プログラムを用いてエレクトロトランスフェクションさせた。予熱した培地を電気回転カップに加え、次いでセットのピペットを用いて細胞をウェルプレート内の予熱した培地に移し、次いで 3 7 ° C、5 % の C O ₂ のインキュベーターに置いて培養した。

10

【 0 4 5 7 】

シーケンシングにより、ダブルノックアウト効率を検出すると、ダブルノックアウト効率が 8 0 % 以上の T R A C 陰性、H L A - A 陰性 T 細胞が得られた。結果は図 2 4 ~ 図 2 5 に示された。そのうち、図 2 4 A は、H L A - A 0 2 S g 5 による H L A - A 0 2 ノックアウトの結果を示し、そのうち、前の行は、対照群の結果 (即ち、H L A - A 0 2 S g 5 を用いてノックアウトを行わなかった) を示し、次の行は、H L A - A 0 2 及び T R A C の同時ノックアウトの結果を示した。そのうち、図 2 4 B は、T R A C S g 9 による T R A C ノックアウトの結果を示し、そのうち、前の行は、対照群の結果 (即ち、T R A C S g 9 によるノックアウトを行わなかった) を示し、次の行は、H L A - A 0 2 及び T R A C の同時ノックアウトの結果を示した。図 2 5 A ~ 図 2 5 B は、H L A - A 0 2 及び T R A C タンパク質レベルをノックアウトするノックアウト状況を示し、そのうち N E G は陰性対照を指し、W T はノックアウト処理を一切行っていない場合を指し、T R A C + H L A - A ダブルノックアウトは H L A - A 0 2 及び T R A C の同時ノックアウトの結果を指した。

20

【 0 4 5 8 】

実施例 1 3 . ダブルノックアウト T 細胞における T R A C 遺伝子、H L A - A 遺伝子、B 2 M 遺伝子及び C I I T A 遺伝子の発現と、対応する細胞における対応する遺伝子の発現との区別

30

(1) 実施例 2 で製造した活性化後 T 細胞を用いて、2 群に分け、一群は対照とし、他群は実施例 5 の方法に従って T R A C 遺伝子及び H L A - A 遺伝子のダブルノックアウト T 細胞を製造し、実施例 4 のステップ (1) の方法に従って S a n g e r シーケンシングを行った。シーケンシングの結果により、T R A C 及び H L A - A のダブルノックアウト細胞を得た。製造したダブルノックアウト T 細胞を、対応する T R A C 及び H L A - A 抗体とインキュベートし、フローサイトメトリー選別又は磁気ビーズ選別によって、ダブルノックアウト細胞株が得られた。

40

【 0 4 5 9 】

(2) 対照群と比較したダブルノックアウト T 細胞の m R N A 発現レベルの変化を検出した。R N A 抽出試薬キット (Q I A G E N から購入、カタログ番号は 7 4 0 0 4) を用いて R N A を抽出し、逆転写試薬キット (A p p l i e d B i o s y s t e m s から購入、カタログ番号は 4 3 6 8 8 1 4) を用いて R N A を逆転写して c D N A を得て、c D N A をテンプレートとして定量 P C R 検出を行った。

【 0 4 6 0 】

(3) 対照群と比較したダブルノックアウト T 細胞のタンパク質発現レベルの変化を検出した。全タンパク質抽出試薬 (T h e r m o S c i e n t i f i c から購入、カタログ番号は 8 7 7 8 7) を用いてタンパク質を抽出し、W e s t e r n B l o t 法又はフ

50

ローサイトメトリーによりタンパク質発現レベルを検出し、使用される抗体は、それぞれ T R A C 抗体 (e B i o s c i e n c e から購入、カタログ番号は 1 7 - 9 9 8 6 - 4 2)、H L A - A 抗体 (M e r c k から購入、カタログ番号は 1 7 - 9 8 7 6 - 4 1)、B 2 M 抗体 (I n v i t r o g e n から購入、カタログ番号は A 1 5 7 7 0) 及び C I I T A 抗体 (O r i G e n e から購入、カタログ番号は C F 8 1 2 2 0 0) であった。

【 0 4 6 1 】

S a n g e r シークエンシングによって、対照群と比較して、ダブルノックアウト T 細胞における T R A C 及び／又は H L A - A 遺伝子のヌクレオチド配列における変化が検出された。定量 P C R は、ダブルノックアウト T 細胞における T R A C 及び／又は H L A - A 遺伝子の m R N A の発現量がダウンレギュレーションされる一方、B 2 M 及び／又は C I I T A 遺伝子の m R N A 発現量がダウンレギュレーションされていないことが示された。F A C S 及び W e s t e r n B l o t の結果は、ダブルノックアウト T 細胞におけるタンパク質発現量がダウンレギュレーションされ、B 2 M 及び／又は C I I T A タンパク質発現量がダウンレギュレーションされていないことが示された。

10

【 0 4 6 2 】

結果は図 2 7 ~ 図 2 8 に示された。そのうち、図 2 6 は、遺伝子発現の m R N A レベル測定を示し、そのうち、図 2 6 は、T R A C、H L A - A、B 2 M 及び C I I T A の m R N A レベルを示し、そのうち、W T はノックアウト処理を一切行っていない場合を指し、ダブルノックアウト群は T R A C 遺伝子及び H L A - A 遺伝子のダブルノックアウト T 細胞の結果を指す。図 2 7 は、遺伝子発現のタンパク質レベル測定を示し、そのうち、図 2 7 A ~ 図 2 7 B は、それぞれ B 2 M 及び C I I T A のタンパク質発現レベルを示し、そのうち、N E G は陰性対照を指し、W T はノックアウト処理を一切行っていない場合を指し、T R A C + H L A - A ダブルノックアウトは T R A C 遺伝子及び H L A - A 遺伝子のダブルノックアウト T 細胞の結果を指す。

20

【 0 4 6 3 】

実施例 1 4 . T R A C 遺伝子、H L A - A / B 2 M 遺伝子及び C I I T A 遺伝子のトリプルノックアウト T 細胞の製造、且つ対応する 3 つの遺伝子発現変化の検証

(1) 実施例 1 5 ステップ (1) の方法に従って、対照群と T R A C 遺伝子、H L A - A 遺伝子と C I I T A 遺伝子のトリプルノックアウト細胞、及び T R A C 遺伝子、B 2 M 遺伝子と C I I T A 遺伝子のトリプルノックアウト細胞を準備した。

30

【 0 4 6 4 】

(2) 実施例 1 5 ステップ (3) の方法に従って、F A C S 及び W e s t e r n B l o t 法によりタンパク質発現レベルの変化を検出した。

【 0 4 6 5 】

対照群の細胞と比較して、T R A C、H L A - A 及び C I I T A のトリプルノックアウト T 細胞における T R A C、H L A - A 及び C I I T A 遺伝子のタンパク質発現量がダウンレギュレーションされ、対照群の細胞と比較して、T R A C、B 2 M 及び C I I T A のトリプルノックアウト T 細胞における T R A C、H L A - A 及び C I I T A 遺伝子のタンパク質発現量がダウンレギュレーションされた。

【 0 4 6 6 】

40

(3) T R A C (e B i o s c i e n c e から購入、カタログ番号は 1 7 - 9 9 8 6 - 4 2)、H L A - A (M e r c k から購入、カタログ番号は 1 7 - 9 8 7 6 - 4 1)、B 2 M (I n v i t r o g e n から購入、カタログ番号は A 1 5 7 7 0) 抗体を用いてフローサイトメトリーにより実施例 1 3 のダブルノックアウト細胞及び本実施例の 2 つのトリプルノックアウト細胞のノックアウト効率を検出した結果、単一細胞レベルで多重遺伝子ノックアウト効率を同時に達成し、トリプルノックアウトよりもダブルノックアウトの方が明らかに高いことが示された。

【 0 4 6 7 】

結果は図 2 8 A ~ 図 2 8 D に示された。そのうち、図 2 8 A ~ 図 2 8 C は、順に T R A C、H L A - A 及び B 2 M タンパク質レベルのノックアウト状況であった。そのうち、W

50

Tはノックアウト処理を一切行っていない場合を指し、TRAC+HLA-AダブルノックアウトはTRAC遺伝子及びHLA-A遺伝子のダブルノックアウトT細胞の結果を指し、TRAC+HLA-A+CIITAトリプルノックアウトはTRAC、HLA-A及びCIITAのトリプルノックアウトT細胞の結果を指し、そのうち、TRAC+B2M+CIITAトリプルノックアウトはB2M、CIITA及びTRACのトリプルノックアウトT細胞の結果を指し、TRAC+HLA-Aノックダウンは実施例18で製造されたTRAC遺伝子及びHLA-A遺伝子ノックダウンT細胞の結果を指す。図28DはCIITAタンパク質レベルのノックアウト状況を示した。

【0468】

図28の結果は、WT対照群と比較して、TRAC、HLA-A、CIITA及びB2Mのタンパク質レベルがダウンレギュレーションされることが示された。同時に、TRAC+HLA-Aダブルノックアウトのノックアウト効率は、TRAC+HLA-A+CIITAトリプルノックアウト又はTRAC+B2M+CIITAトリプルノックアウトよりも高い。

【0469】

実施例15 アンチセンスRNA配列の設計

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>又はwww.ensembl.org/というデータベースによって、対応する遺伝子（TRAC遺伝子及びHLA-A遺伝子）の転写RNA配列を得て、以下の原則を参照してsiRNAを設計した。

【0470】

開始コドンの下流50～100ヌクレオチド及び終止コドンの上流100ヌクレオチドの配列をできる限り回避し、長さが30ヌクレオチド未満である配列を選択し、4個以上の連続した同一塩基を回避し、イントロン領域を回避し、反復配列を回避し、一塩基多型（SNP）部位を回避し、配列GCの含有量が30%～60%の間で、配列パターンAA（N_{sub>}19）、NA（N_{sub>}21）又はNAR（N_{sub>}17）YNNを優先的に選択した。Aはアデニル酸、Tはチミジル酸、Rはアデニル酸又はグアニル酸（プリン）、Yはチミジル酸又はシチジル酸（ピリミジン）、Nはアデニル酸、チミジル酸、グアニル酸又はシチジル酸であった。選択した配列に対して相同性比較分析を実行し、アンチセンスRNAと他の遺伝子又は配列との間に顕著な相同性を有することでオフターゲット効果が生じることを回避した。相同性分析は、NCBI Blast tool: Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn)、UCSC Blat tool又はEnsembl Blastを使用して行われた。

【0471】

設計して得られたアンチセンスRNA配列は、HLA-A-homo-551、HLA-A-homo-NEG、TRAC-homo-375及びTRAC-homo-NEGを含んだ。

【0472】

実施例16 TRAC遺伝子及びHLA-A遺伝子ノックダウンT細胞の製造

実施例17により設計されたアンチセンスRNAを用いてダブルノックダウンを行った。会社がTRAC遺伝子及びHLA-A遺伝子のアンチセンスRNA配列のレンチウイルス（GEMMA）を製造した。実施例2の方法に従ってCD3⁺T細胞を製造し（D0日）、CD3/CD28抗体磁気ビーズを用いて活性化し、TRAC遺伝子及びHLA-A遺伝子を担持するアンチセンスRNA配列のレンチウイルスを活性化されたT細胞にトランスフェクトし（D1日）、D2にレンチウイルスベクターを洗い流し、D5日まで培養し続けた。D5まで培養したT細胞を収集し、定量PCR又はWestern Blot法などによって遺伝子ノックダウン効率を検出した。得られたT細胞に対して対応するTRAC及びHLA-A抗体を標識し、フローサイトメトリー選別又は磁気ビーズ選別の方法によりTRAC遺伝子及びHLA-A遺伝子ノックダウンT細胞が得られた。結果は、TRAC及びHLA-A遺伝子ノックダウン群におけるTRAC及びHLA-AのmRN

A及びタンパク質発現レベルが何れもダウンレギュレーションされることが示された。そのうち、図29A～図29Bは、順にTRAC及びHLA-A mRNAレベルのノックアウト状況であった。そのうち、WTはノックアウト処理を一切行っていない場合を指し、TRAC+HLA-AダブルノックアウトはTRAC遺伝子及びHLA-A遺伝子のダブルノックアウトT細胞の結果を指す。そのうち、TRAC及びHLA-Aタンパク質レベルのノックアウトレベルは図28の結果を参照することができる。

【0473】

実施例17 異なるT細胞活性の区別

実施例2、14、16及び18の遺伝子ノックアウト無し、ダブルノックアウト、トリプルノックアウト及びダブルノックダウンのT細胞を製造し、幾つかのT細胞の活性を比較し、各群の細胞をカウントし、 1×10^6 細胞をそれぞれ取って24ウェルプレートに接種し、各ウェルの細胞にPHA ($0.3 \mu\text{g}/\text{mL}$) (イオノマイシン+)又は $5 \text{ ng}/\text{mL}$ のPMA及び $50 \text{ ng}/\text{mL}$ のionomycinを加え、5時間培養し続けた後、CD69 (初期活性化) (BD Biosciencesから購入、カタログ番号はFN50)、CD137 (やや後期) (BD Biosciencesから購入、カタログ番号は4B4-1)抗体を用いてフローサイトメトリーにより細胞の活性化状態を検出した。結果は、ダブルノックアウト、ダブルノックアウトT細胞の活性がトリプルノックアウトT細胞より優れることが示された。

10

【0474】

CD69及びCD137のタンパク質レベルの発現状態はそれぞれ図30A～図30Bを参照する。そのうち、WTはノックアウト処理を一切行っていない場合を指し、TRAC+HLA-AダブルノックアウトはTRAC遺伝子及びHLA-A遺伝子のダブルノックアウトT細胞の結果を指し、TRAC+HLA-A+CIITAトリプルノックアウトはTRAC、HLA-A及びCIITAのトリプルノックアウトT細胞の結果を指し、そのうち、TRAC+B2M+CIITAトリプルノックアウトはB2M、CIITA及びTRACのトリプルノックアウトT細胞の結果を指し、TRAC+HLA-Aノックダウンは実施例18で製造されたTRAC遺伝子及びHLA-A遺伝子ノックダウンT細胞の結果を指す。

20

【0475】

実施例18 異系NK細胞に対する異なるT細胞の反応性の区別

実施例2、14、16及び18の遺伝子ノックアウト無し、ダブルノックアウト、トリプルノックアウト及びダブルノックアウトのT細胞に対してCFSE (invitrogen、C34554) 標識を行い、細胞をカウントし、 1×10^6 細胞をそれぞれ取って1:1の比率でNK細胞 (NK92MI) と共培養し、24時間後に共培養した各群の細胞を収集し、フローサイトメトリーにより混合細胞におけるCFSE陽性細胞の比率を検出した。

30

【0476】

結果は、NK細胞によるダブルノックアウト、ダブルノックアウトT細胞の殺傷毒性がトリプルノックアウトT細胞よりも低いことが示された。結果は図31に示された。そのうち、NK+TはNK細胞をノックアウト処理が一切行っていないT細胞と共培養する場合を指し、NK+TRAC+HLA-AノックダウンはNK細胞を実施例18で製造されたTRAC遺伝子及びHLA-A遺伝子ノックダウンT細胞と共培養する場合を指し、NK+TRAC+HLA-AダブルノックアウトはNK細胞をTRAC遺伝子及びHLA-A遺伝子のダブルノックアウトT細胞と共培養する場合を指し、NK+TRAC+HLA-A+CIITAトリプルノックアウトはNK細胞をTRAC、HLA-A及びCIITAトリプルノックアウトT細胞と共培養する場合を指し、NK+TRAC+B2M+CIITAトリプルノックアウトはNK細胞をB2M、CIITA及びTRACトリプルノックアウトT細胞と共培養する場合を指す。

40

【0477】

実施例19 異なるT細胞の異系免疫拒絶反応の区別

50

ドナー１由来の末梢血を用いて実施例２、１４、１６及び１８の遺伝子ノックアウト無し、ダブルノックアウト、トリプルノックアウト及びダブルノックダウンＴ細胞を製造した。ドナー２由来の末梢血を用いてＣＤ３⁺Ｔ細胞を製造した。ドナー１の末梢血を用いて製造した各群の細胞を、ドナー２の末梢血を用いて実施例２により製造したＣＤ３⁺Ｔ細胞と等しい比率で混合し、２４時間後に細胞混合系におけるＩＦＮ- γ の発現レベルを検出した。結果は、ダブルノックアウトＴ細胞群ＩＦＮ- γ の発現レベルがトリプルノックアウトＴ細胞群よりも低いことが示された。

【０４７８】

結果は図３２に示され、ＷＴはノックアウト処理を一切行っていない場合を指し、ＴＲＡＣ＋ＨＬＡ－ＡダブルノックアウトはＴＲＡＣ遺伝子及びＨＬＡ－Ａ遺伝子のダブルノックアウトＴ細胞の結果を指し、ＴＲＡＣ＋ＨＬＡ－Ａ＋ＣＩＩＴＡトリプルノックアウトはＴＲＡＣ、ＨＬＡ－Ａ及びＣＩＩＴＡトリプルノックアウトＴ細胞の結果を指し、そのうち、ＴＲＡＣ＋Ｂ２Ｍ＋ＣＩＩＴＡトリプルノックアウトはＢ２Ｍ、ＣＩＩＴＡ及びＴＲＡＣトリプルノックアウトＴ細胞の結果を指し、ＴＲＡＣ＋ＨＬＡ－Ａノックダウンは実施例１６で製造されたＴＲＡＣ遺伝子及びＨＬＡ－Ａ遺伝子ノックダウンＴ細胞の結果を指す。

10

【０４７９】

実施例２０．ＴＲＡＣ遺伝子及びＨＬＡ－Ａ遺伝子のダブルノックアウトＣＡＲ－Ｔ細胞、ＴＲＡＣ遺伝子、ＨＬＡ－Ａ遺伝子及びＣＩＩＴＡ遺伝子のトリプルノックアウトＣＡＲ－Ｔ細胞、並びに、ＴＲＡＣ遺伝子、Ｂ２Ｍ遺伝子及びＣＩＩＴＡ遺伝子ノックアウトＣＡＲ－Ｔ細胞の製造

20

（１）実施例２の方法に従ってＣＤ３⁺Ｔ細胞を得て（Ｄ０日）、ＣＤ３／ＣＤ２８抗体磁気ビーズを用いて活性化し、活性化後のＤ１日にレンチウイルスベクター（ＣＤ１９－ＣＡＲ、ＣＤ２０－ＣＡＲ又はＢＣＭＡ－ＣＡＲなどのレンチウイルス）のトランスフェクションを行い、Ｄ２日にレンチウイルスベクターを洗い流し、Ｄ３日にＣＡＲ陽性のＴ細胞を選別し、Ｄ５日まで培養し続けた。

【０４８０】

（２）Ｄ５日のＣＡＲ－Ｔ細胞を初期細胞として、それぞれ実施例１４及び実施例１６の方法に従ってＴＲＡＣ遺伝子及びＨＬＡ－Ａ遺伝子のダブルノックアウト細胞、ＴＲＡＣ遺伝子、ＨＬＡ－Ａ遺伝子及びＣＩＩＴＡ遺伝子のトリプルノックアウトＣＡＲ－Ｔ細胞、並びに、ＴＲＡＣ遺伝子、Ｂ２Ｍ遺伝子及びＣＩＩＴＡ遺伝子のトリプルノックアウトＣＡＲ－Ｔ細胞を製造した。

30

【０４８１】

（３）フローサイトメトリー検出によって、上記ダブルノックアウト及びトリプルノックアウトＣＡＲ－Ｔ細胞が得られることができ、そのうち、ダブルノックアウトＣＡＲ－Ｔ細胞の収率がトリプルノックアウトＣＡＲ－Ｔ細胞よりも高かった。

【０４８２】

結果は図３３Ａ～図３３Ｄに示された。そのうち、図３３Ａ～図３３Ｃは、順にＴＲＡＣ、ＨＬＡ－Ａ及びＢ２Ｍタンパク質レベルのノックアウト状況であった。図３３ＤはＣＩＩＴＡタンパク質レベルのノックアウト状況を示した。そのうち、ＷＴはノックアウト処理を一切行っていない場合を指し、ＴＲＡＣ＋ＨＬＡ－ＡダブルノックアウトはＴＲＡＣ遺伝子及びＨＬＡ－Ａ遺伝子のダブルノックアウトＣＡＲ－Ｔ細胞の結果を指し、ＴＲＡＣ＋ＨＬＡ－Ａ＋ＣＩＩＴＡトリプルノックアウトはＴＲＡＣ、ＨＬＡ－Ａ及びＣＩＩＴＡトリプルノックアウトＣＡＲ－Ｔ細胞の結果を指し、そのうちＴＲＡＣ＋Ｂ２Ｍ＋ＣＩＩＴＡトリプルノックアウトはＢ２Ｍ、ＣＩＩＴＡ及びＴＲＡＣトリプルノックアウトＣＡＲ－Ｔ細胞の結果を指す。

40

【０４８３】

そのうち、ＣＤ１９ＣＡＲのトランスフェクション効率は図３４に示された。そのうち、ＣＡＲ３０％＋はＣＤ１９ＣＡＲのトランスフェクション効率を表した。

【０４８４】

50

図35は、異なる細胞の増幅倍率を示した。そのうち、TRAC遺伝子及びHLA-A遺伝子のダブルノックアウトのCAR-T細胞は最も高い増幅倍数を示した。

【0485】

実施例21. TRAC遺伝子及びHLA-A遺伝子のダブルノックアウトCAR-T細胞の抗腫瘍効果

実施例23のTRAC遺伝子及びHLA-A遺伝子のダブルノックアウトCAR-T細胞を製造し(CD19、CD20又はBCMAを標的とする)、ルシフェラーゼ遺伝子を発現する標的細胞(Raji、Jurkat、MM1Sなどの標的遺伝子陽性の白血病又はリンパ腫細胞株)をウェルプレートに接種し、更に異なるエフェクター標的比(1:2、5、1:1、5:1、10:1)でダブルノックアウトCAR-T細胞、トリプルノックアウトCAR-T細胞又は遺伝子ノックアウト無しのT細胞を加え、24時間共培養した後に細胞を検出用ウェルプレートに移し、ルシフェラーゼ基質を加え、マイクロプレートリーダーにより蛍光値を検出した。殺傷効率=1-標的細胞とT細胞とを共培養する蛍光値/標的細胞を単独培養する蛍光値。

10

【0486】

結果は、TRAC遺伝子及びHLA-A遺伝子のダブルノックアウトCAR-T細胞に対する腫瘍細胞の殺傷効果が顕著であることが示された。

【0487】

図36は、CD19標的細胞Raji-Luciferaseの殺傷効果を示し、そのうちTRAC遺伝子及びHLA-A遺伝子のダブルノックアウトCAR-T細胞の殺傷効果が最も顕著であった。そのうち、各E/T比で、左から右へ順にA~Dの図示に対応する結果であった。

20

【0488】

実施例22. TRAC遺伝子及びHLA-A遺伝子のダブルノックアウトCAR-T細胞の抗腫瘍効果

NSGマウスに腫瘍細胞を静脈注射し、腫瘍が成功に確立した後、マウス体内にTRAC遺伝子及びHLA-A遺伝子のダブルノックアウトCAR-T細胞、トリプルノックアウトCAR-T細胞又は遺伝子ノックアウト無しのT細胞を再注入し、マウス腫瘍体積をモニターした。

【0489】

ダブルノックアウトCAR-T細胞を再注入したマウスは、腫瘍増殖速度が明らかに遅くなった。

30

【0490】

結果は図37~図38に示された。そのうち、図37はマウスへの投与方法を示し、i.v.は静脈注射を表し、CAR-T細胞はCD19 CARを発現するダブルノックアウトCAR-T細胞、トリプルノックアウトCAR-T細胞を表した。図38は、CAR-T細胞投与後のマウス体内腫瘍の体積を示した。そのうち、図38は左から右へ、生理食塩水、改変されていないT細胞、TRAC遺伝子及びHLA-A遺伝子のダブルノックアウトCD19 CAR-T細胞、TRAC、HLA-A及びCIITAトリプルノックアウトCD19 CAR-T細胞、B2M、CIITA及びTRACトリプルノックアウトCD19 CAR-T細胞をそれぞれ投与した後のマウス体内腫瘍の体積を順に示した。結果から、TRAC遺伝子及びHLA-A遺伝子のダブルノックアウトCAR-T細胞を再注入したマウスは、腫瘍増殖速度が明らかに遅くなることが分かった。

40

【0491】

以上のようにして、

1. 本出願は、高効率ダブルノックアウトTCR、HLA-AのIL13Rα2-UCAR-T細胞を初めて構築し、安全な棚式即時使用型治療剤を実現し、抗腫瘍効果を向上させ、脳神経腫などの腫瘍の治療に用いる。

【0492】

2. 本出願は、レンチウイルス発現ベクターを提供する。pCDH-CMV-MCS-

50

EF1-copGFPを骨格として、ベクターにカナマイシン耐性を持たせるように、ベクターのアンピシリン耐性遺伝子であるβ-ラクタマーゼをTn5由来のアミノグリコシドホストトランスフェラーゼで置換し、インビボでの適用において潜在的脅威を有するCMVプロモーター及びそれに隣接する下流のポリクロナル部位を削除し、プロトベクターからEF1プロモーターにより発現を開始したcopGFP遺伝子を削除し、SalI切断部位を保持し、SalI 5'末端にベクター構築用SmaI切断部位を付加して目的とする最終ベクターを形成する。

【0493】

3. 本出願は、タンパク質RNA複合体のエレクトロトランスフェクション技術を最適化する。初代T細胞における90%以上のダブルロックアウト効率を得る。

【0494】

4. 本出願において、ドナーは集団において高頻度で出現するHLA-Bホモ接合体に基づくものであり、患者HLA-Bの対立遺伝子の1つがドナーのホモ接合体と一致すればよく、これらのドナー由来の細胞が多数の患者集団をカバーすることができ、且つHLA-Bにより引き起こされる拒絶反応を低減することができる。

【0495】

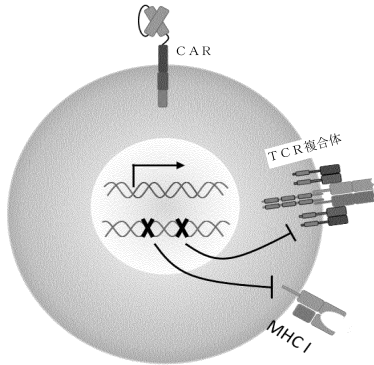
5. 本出願は、拒絶に高度に関連するHLA-A分子を選別してロックアウトし、他のHLA-Eクラス分子を保持することで、異系細胞による拒絶を低減するだけでなく、HLA分子が完全にロックアウトされ、NK細胞に除去されることを回避し、同種異系CAR-T細胞のインビボでの半減期を大幅に延長する。

【図面】

【図1】



【図2】



10

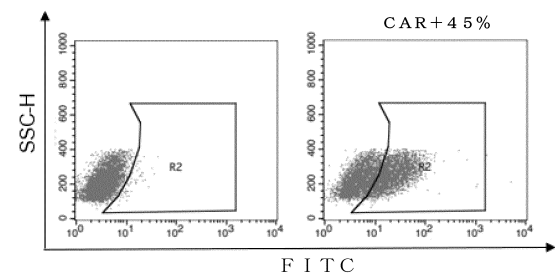
20

30

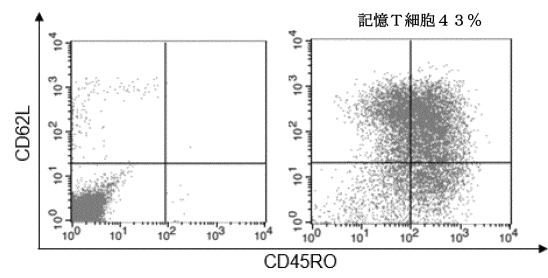
40

50

【図 3 A】

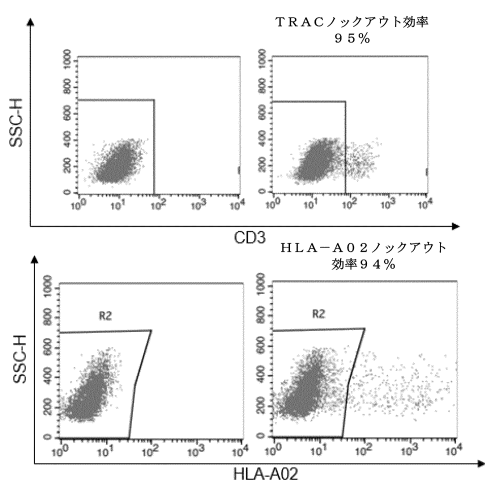


【図 3 B】

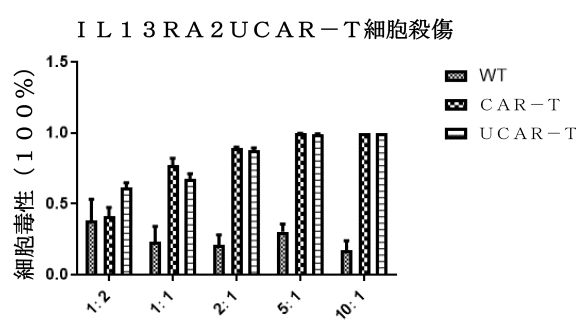


10

【図 3 C】

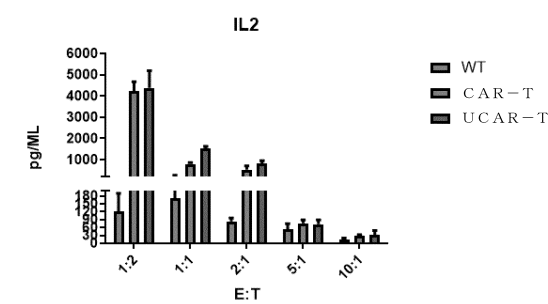


【図 4】

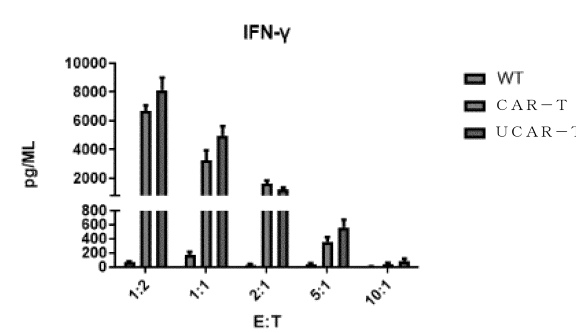


20

【図 5 A】



【図 5 B】

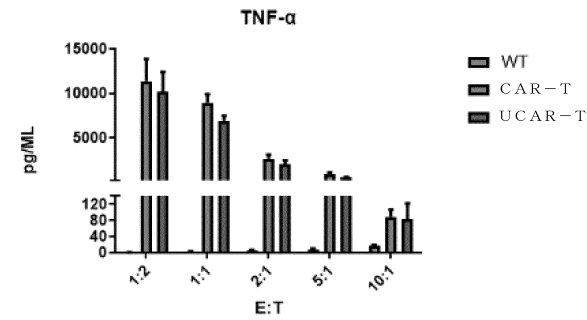


30

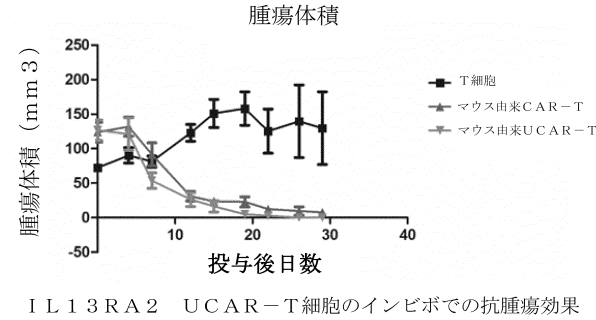
40

50

【図 5 C】



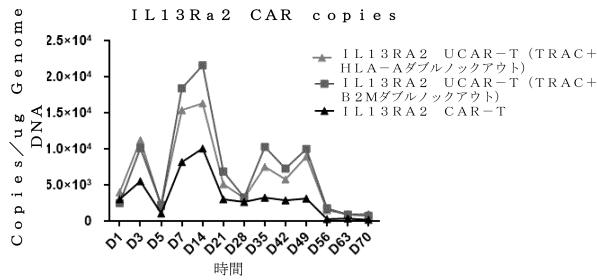
【図 6】



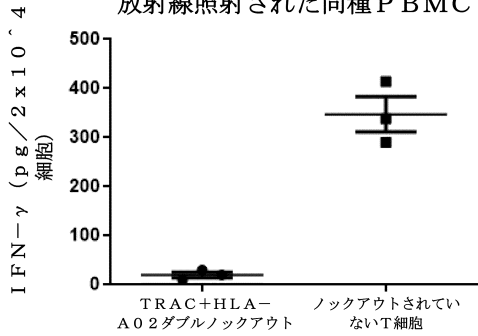
IL13RA2 UCAR-T細胞のインビボでの抗腫瘍効果

10

【図 7】

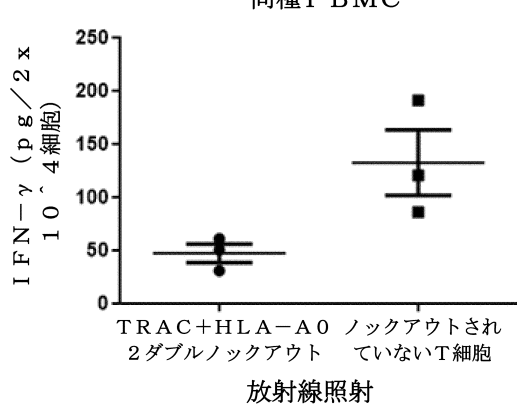


【図 8】

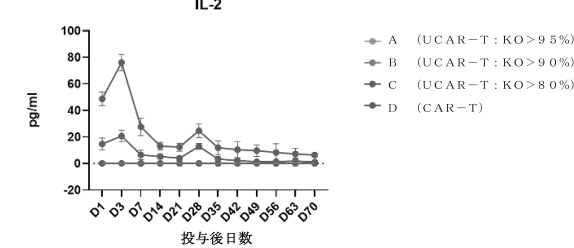


20

【図 9】



【図 10 A】

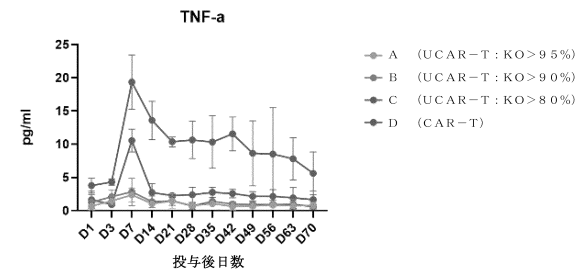


30

40

50

【図 10B】



【図】

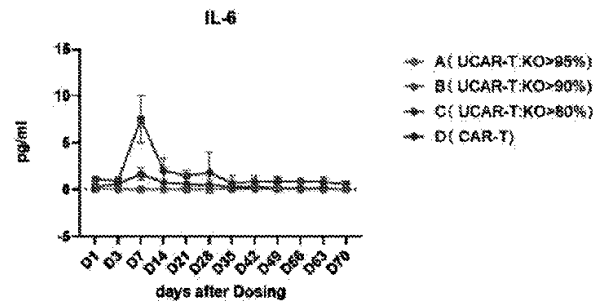
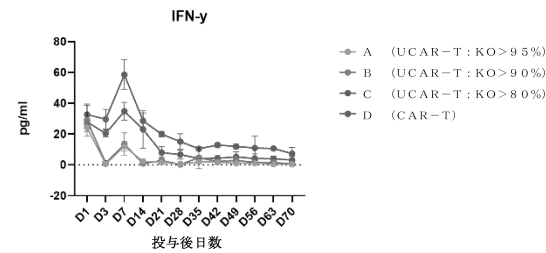
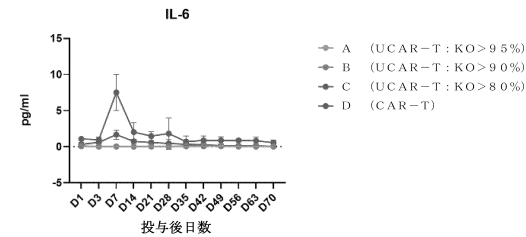


図 10B

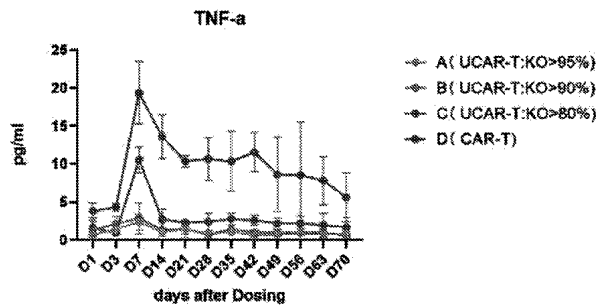
【図 10C】



【図 10D】



【図】



【図 11】

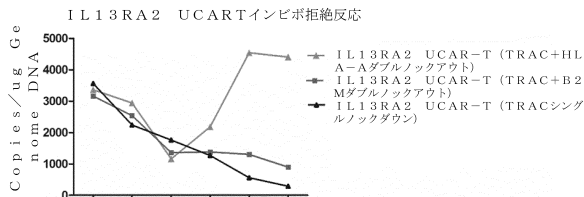


図 10D

10

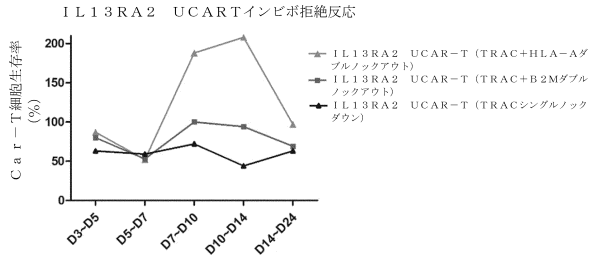
20

30

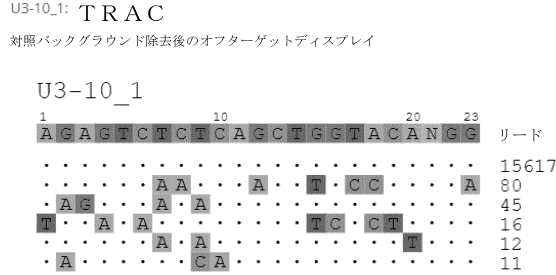
40

50

【図 1 2】

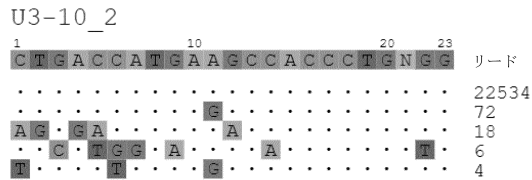


【図 1 3】

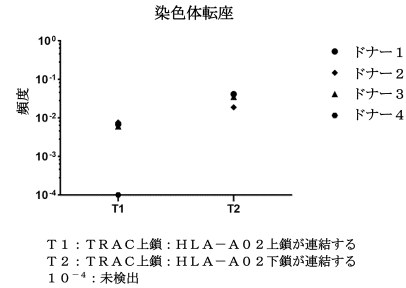


U3-10_2: HLA-A02

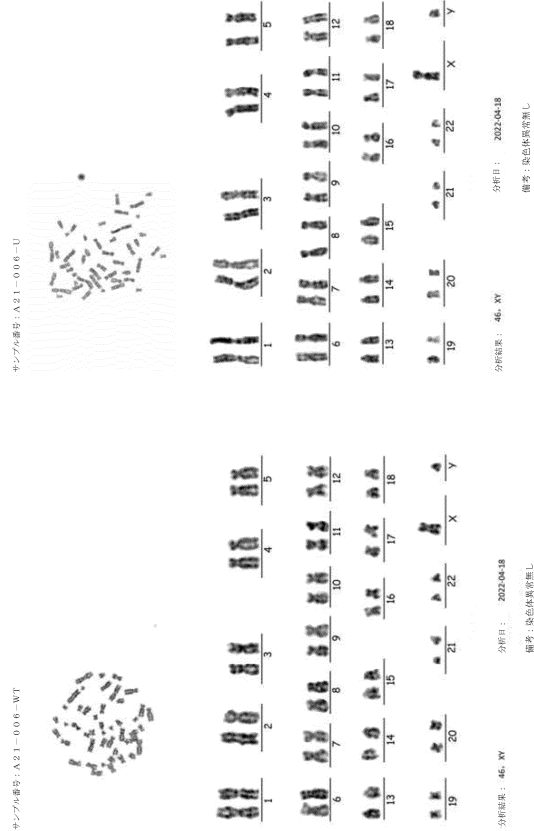
対照バックグラウンド除去後のオフターゲットディスプレイ



【図 1 4】



【図 1 5】



10

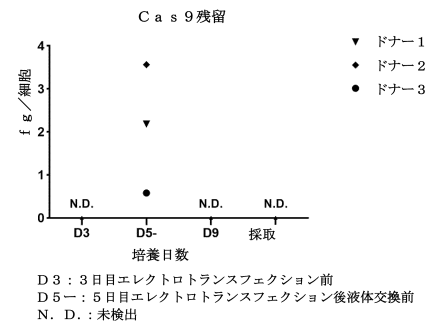
20

30

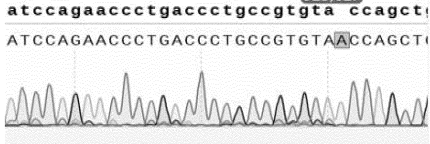
40

50

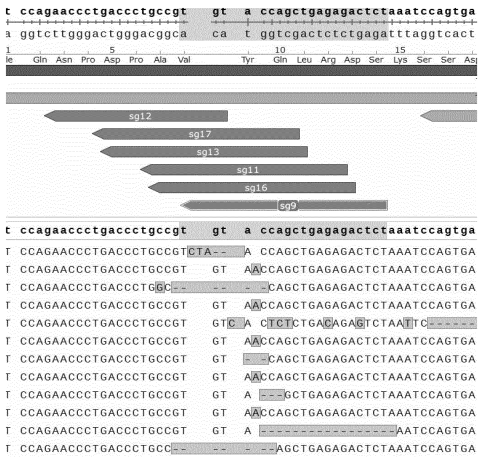
【図 16】



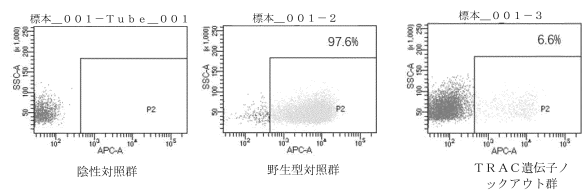
【図 17】



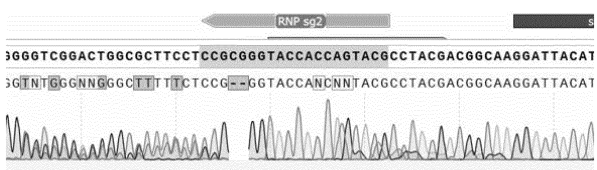
【図 18】



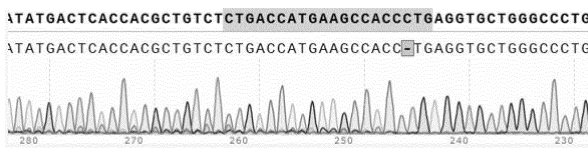
【図 19】



【図 20】



【図 21】



10

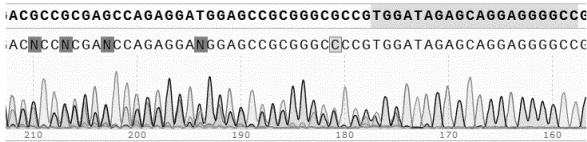
20

30

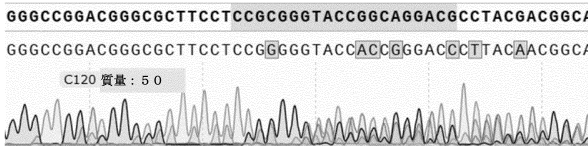
40

50

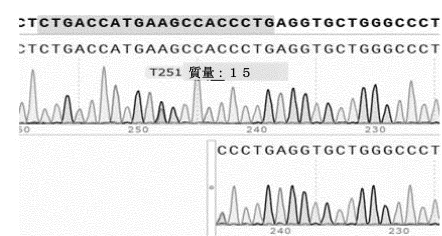
【図 2 2】



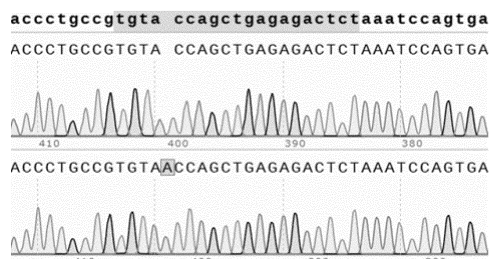
【図 2 3】



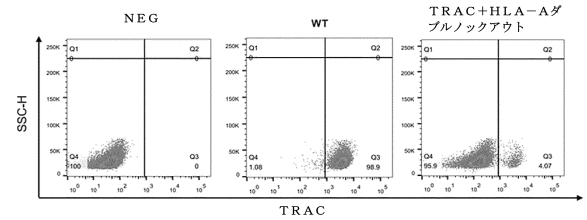
【図 2 4 A】



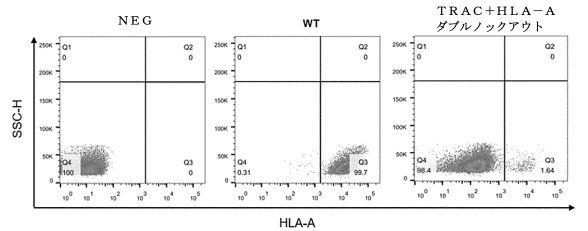
【図 2 4 B】



【図 2 5 A】



【図 2 5 B】



10

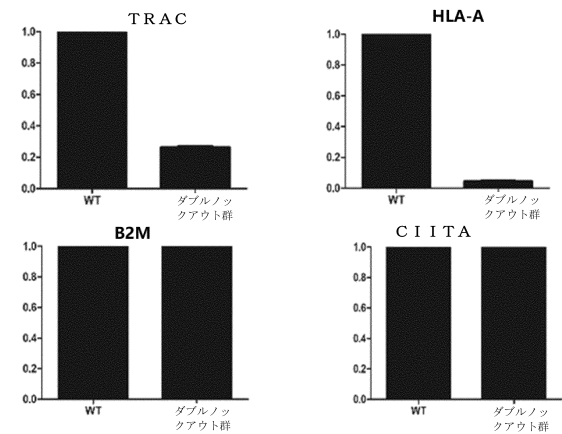
20

30

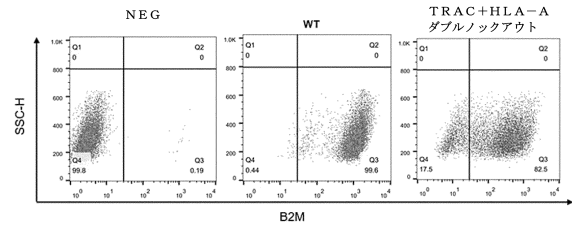
40

50

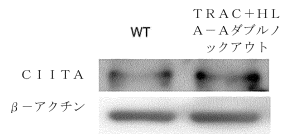
【図 2 6】



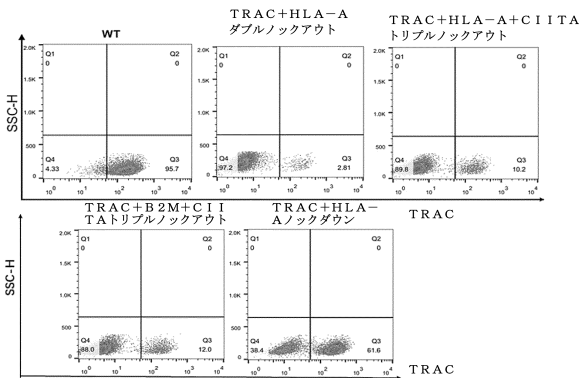
【図 2 7 A】



【図 2 7 B】



【図 2 8 A】



10

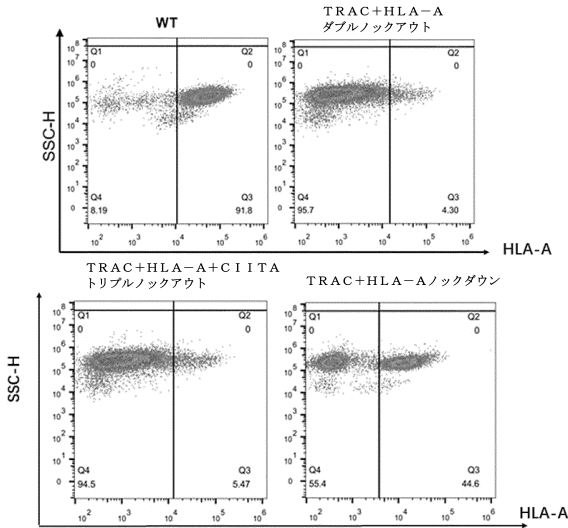
20

30

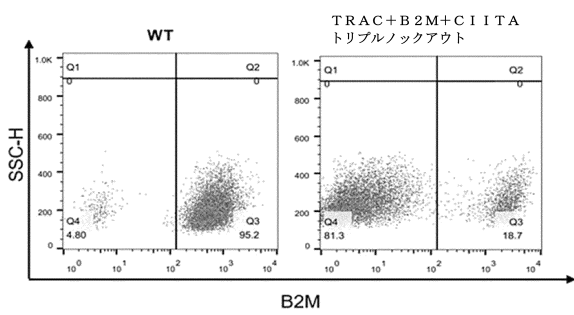
40

50

【図 28 B】

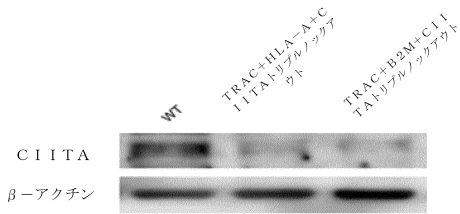


【図 28 C】

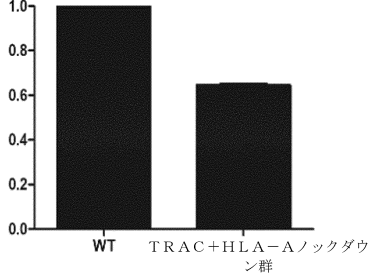


10

【図 28 D】



【図 29 A】



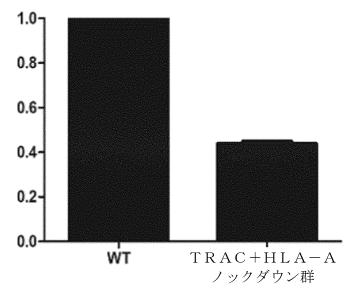
20

30

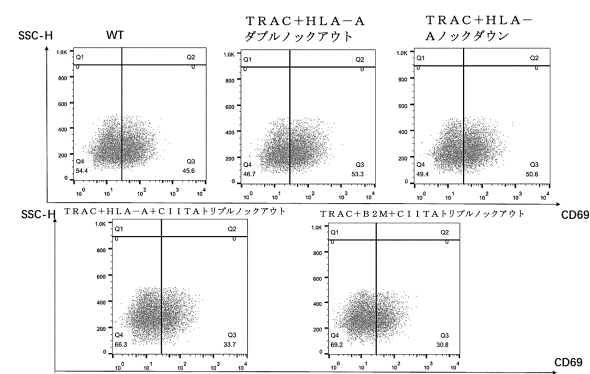
40

50

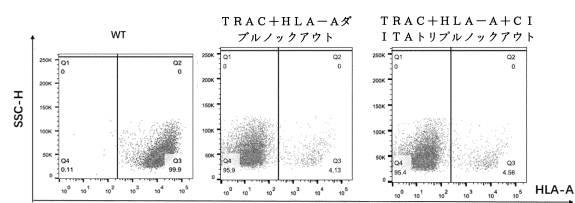
【図 29 B】



【図 30 A】



【図 30 B】



【図 30 C】

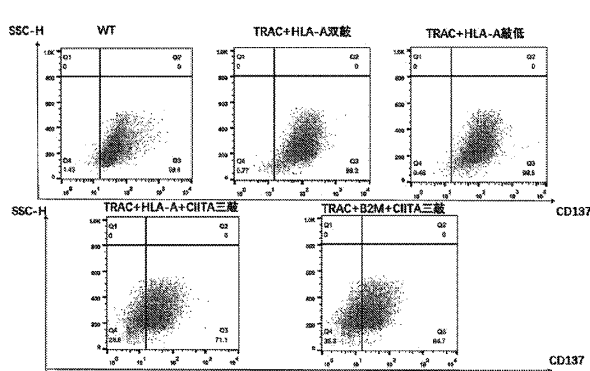
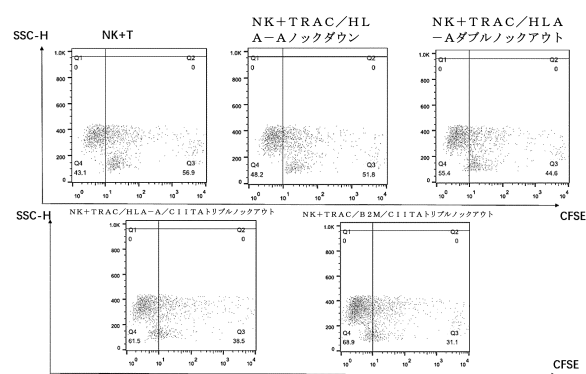
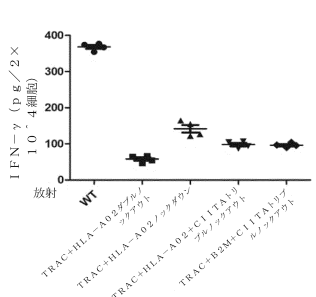


図 30B

【図 31】



【図 32】



10

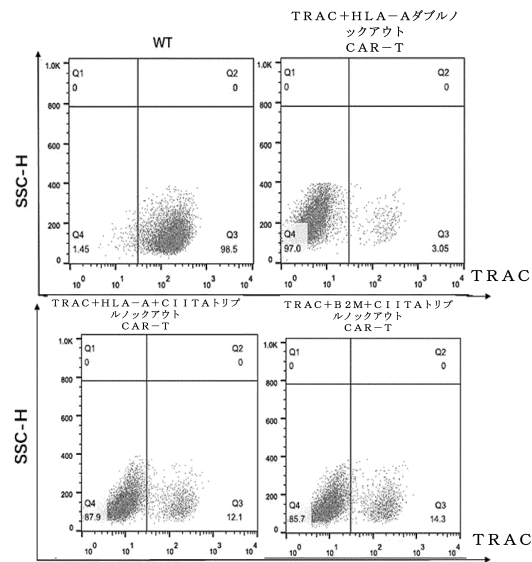
20

30

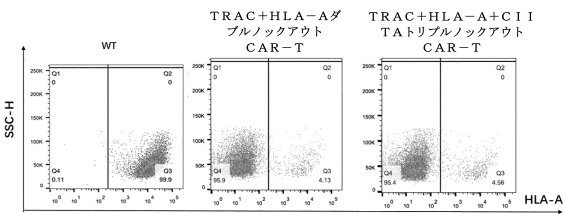
40

50

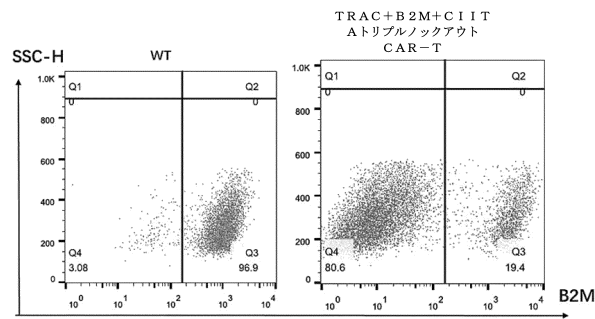
【図 3 3 A】



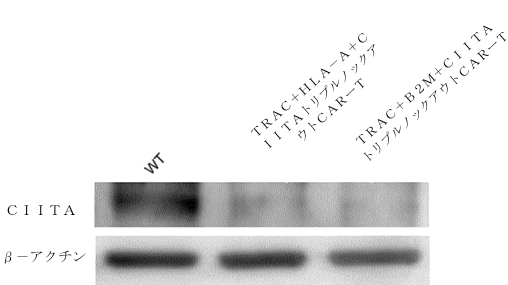
【図 3 3 B】



【図 3 3 C】



【図 3 3 D】



10

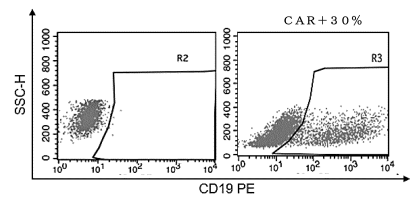
20

30

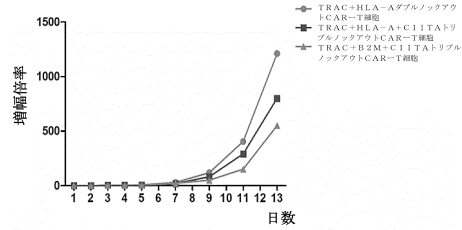
40

50

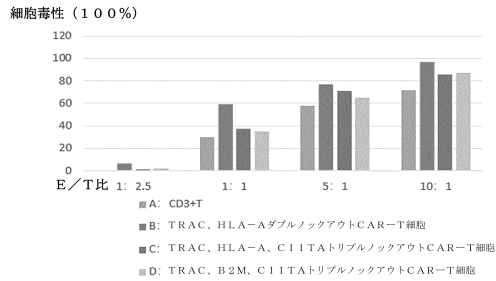
【図 3 4】



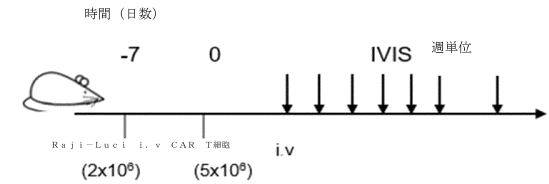
【図 3 5】



【図 3 6】



【図 3 7】



【図 3 8】



【配列表】

2024527539000001.app

【 国际调查报告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2022/103037
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 35/17(2015.01)i; C07K 14/54(2006.01)i 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) A61K; C07K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNTXT, ENTXT, VEN, ISI, CNKI, 万方数据库, WANFANG DATABASE, ISI, NCBI, STN, 百度学术, BAIDU SCHOLAR: 序列检索, Sequence search, CAR, 嵌合抗原受体, CAR-T, 免疫效应细胞, TCR, MHC, HLA-A, 敲除, 抑制, knockout, deficient, 免疫排斥, GVHD, IL13Rα2		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 112236151 A (SEATTLE CHILDREN'S HOSPITAL (DBA SEATTLE CHILDREN'S RESEARCH INSTITUTE)) 15 January 2021 (2021-01-15) claims 1-66, description, paragraphs 7-45, 113-114, 135, 140-141, and 172, and table 2	1-154
Y	CN 104936621 A (PFIZER INC.) 23 September 2015 (2015-09-23) description, paragraphs 106 and 162-168	2-154
Y	CN 107723275 A (CHONGQING PRECISION BIOTECH CO., LTD.) 23 February 2018 (2018-02-23) claims 1-20, and description, paragraphs 7-11	1-154
Y	CN 111094345 A (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES et al.) 01 May 2020 (2020-05-01) tables A, SEQ ID NOs: 21-24	60-154
Y	CN 109456943 A (GRACELL BIOTECHNOLOGIES (SHANGHAI) CO., LTD.) 12 March 2019 (2019-03-12) claims 1-10, and description, paragraph 125	1-154
☒ 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 "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 14 September 2022		Date of mailing of the international search report 10 October 2022
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China		Authorized officer
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2022/103037
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2014349402 A1 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 27 November 2014 (2014-11-27) embodiments 8 and 9	1-154
Y	方雅玲 等 (FANG, Yaling et al.). "同种异体CAR-T细胞的研究进展 (Research Progress in Allogeneic CAR-T Cells)" <i>肿瘤 (Tumor)</i> , Vol. 41, 31 May 2021 (2021-05-31), pp. 363-370	1-154
Y	LIU, Xiaojuan et al. "CRISPR-Cas9-Mediated Multiplex Gene Editing in CAR-T Cells" <i>Cell Research</i> , Vol. 27, 02 December 2016 (2016-12-02), pp. 154-157	1-154

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2022/103037	
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: ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file. ☐ on paper or in the form of an image file. b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file. c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)). ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713). 2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished. 3. Additional comments:			10
			20
			30
			40
			50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2022/103037	
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.: 150-154 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: [1] Claims 150-154 relate to a method for preventing or treating diseases or disorders related to expression of IL13R α 2. That is, claims 150-154 relate to the subject matter defined in PCT Rule 39.1 that does not warrant a search conducted by the international searching authority: (4) methods for the treatment of a human or animal body by surgery or therapy, as well as diagnostic methods implemented on a human or animal body. An international search was conducted on the basis of a use of an effective amount of the immune effector cell according to any one of claims 1-106 and/or the pharmaceutical composition according to claim 139 in the preparation of a drug for preventing or treating the diseases or disorders related to the expression of IL13R α 2.	10	
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:	20	
3.	☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	30	
			40
			50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/103037

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	112236151	A	15 January 2021	AU	2019234573	A1	08 October 2020
				US	2021000875	A1	07 January 2021
				IL	277267	A	29 October 2020
				WO	2019178078	A1	19 September 2019
				EA	202091982	A1	10 June 2021
				EP	3765041	A1	20 January 2021
				SG	11202008795 S	A	29 October 2020
				KR	20200131279	A	23 November 2020
				CA	3093810	A1	19 September 2019
				JP	2021518108	A	02 August 2021
				BR	112020018670	A2	05 January 2021
CN	104936621	A	23 September 2015	JP	2016503295	A	04 February 2016
				MX	2015005582	A	14 August 2015
				HK	1214161	A1	22 July 2016
				CA	2890256	A1	15 May 2014
				SG	11201503431 T	A	28 May 2015
				PE	20150891	A1	11 June 2015
				EP	2916875	A1	16 September 2015
				KR	20150060980	A	03 June 2015
				PH	12015500977	A1	13 July 2015
				WO	2014072888	A1	15 May 2014
				US	2015266962	A1	24 September 2015
				IL	238566	A	30 June 2015
				AU	2013343111	A1	14 May 2015
				RU	2015116485	A	27 December 2016
CN	107723275	A	23 February 2018	EP	3699268	A1	26 August 2020
				WO	2019076149	A1	25 April 2019
CN	111094345	A	01 May 2020	JP	2020529841	A	15 October 2020
				WO	2019006072	A1	03 January 2019
				AU	2018291128	A1	23 January 2020
				SG	11201913175 T	A	30 January 2020
				US	2020138865	A1	07 May 2020
				IL	271597	A	27 February 2020
				KR	20200049757	A	08 May 2020
				EP	3645568	A1	06 May 2020
CN	109456943	A	12 March 2019	CA	3068444	A1	03 January 2019
				CN	111051502	A	21 April 2020
				WO	2019047899	A1	14 March 2019
US	2014349402	A1	27 November 2014	EP	3680328	A1	15 July 2020
				WO	2013074916	A1	23 May 2013
				US	2019388472	A1	26 December 2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

10

20

30

40

50

国际检索报告		国际申请号
		PCT/CN2022/103037
A. 主题的分类		
A61K 35/17(2015.01)i; C07K 14/54(2006.01)i		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
A61K; C07K		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
CNTXT, ENTXT, VEN, ISI, CNKI, 万方数据库, ISI, NCBI, STN, 百度学术:序列检索, CAR, 嵌合抗原受体, CAR-T, 免疫效应细胞, TCR, MHC, HLA-A, 敲除, 抑制, knockout, deficient, 免疫排斥, GVHD, IL13R α 2		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 112236151 A (西雅图儿童医院DBA西雅图儿童研究所) 2021年1月15日 (2021 - 01 - 15) 权利要求1-66、说明书第7-45、113-114、135、140-141、172段、表2	1-154
Y	CN 104936621 A (辉瑞公司) 2015年9月23日 (2015 - 09 - 23) 说明书第106、162-168段	2-154
Y	CN 107723275 A (重庆精准生物技术有限公司) 2018年2月23日 (2018 - 02 - 23) 权利要求1-20、说明书第7-11段	1-154
Y	CN 111094345 A (美国卫生和人力服务部 等) 2020年5月1日 (2020 - 05 - 01) 表A, SEQ ID NO: 21-24	60-154
Y	CN 109456943 A (亘喜生物科技上海有限公司) 2019年3月12日 (2019 - 03 - 12) 权利要求1-10、说明书第125段	1-154
Y	US 2014349402 A1 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 2014年11月27日 (2014 - 11 - 27) 实施例8、9	1-154
Y	方雅玲 等. "同种异体CAR-T细胞的研究进展" 肿瘤, 第41卷, 2021年5月31日 (2021 - 05 - 31), 第363-370页	1-154
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期
2022年9月14日		2022年10月10日
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		罗洋 电话号码 86-(10)-53961959

PCT/ISA/210 表(第2页) (2015年1月)

10

20

30

40

50

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/103037

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
Y	LIU, X. 等. "CRISPR-Cas9-mediated multiplex gene editing in CAR-T cells" CELL RESEARCH, 第27卷, 2016年12月2日 (2016 - 12 - 02), 第154-157页	1-154

PCT/ISA/210 表(第2页) (2015年1月)

10

20

30

40

50

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2022/103037
第I栏	核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)	
1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的: a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的: ☒ 附件C/ST. 25文本文件形式 ☐ 纸件或图形文件形式 b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的: c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的: ☐ 附件C/ST. 25文本文件形式 (细则13之三. 1(a)) ☐ 纸件或图形文件形式 (细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段) 2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。 3. 补充意见:		
		10
		20
		30
		40
		50

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2022/103037
第II栏	某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第I页第2项)	
根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：		
1.	☒ 权利要求： 150-154 因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即： [1] 权利要求150-154涉及预防或治疗与IL13R α 2的表达相关的疾病或病症的方法，也即权利要求150-154涉及PCT细则39.1定义的不要国际检索单位检索的主题：（4）通过外科手术或治疗对人体或动物体进行处置的方法及在人体或动物体上实施的诊断方法。国际检索基于有效量的权利要求1-106中任一项所述的免疫效应细胞和/或权利要求139所述的药物组合物在制备用于预防或治疗与IL13R α 2的表达相关的疾病或病症的药物中的用途作出。	10
2.	☐ 权利要求： 因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：	
3.	☐ 权利要求： 因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。	20
		30
		40
		50

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/103037

检索报告引用的专利文件				公布日 (年/月/日)		同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	112236151	A	2021年1月15日	AU	2019234573	A1	2020年10月8日
				US	2021000875	A1	2021年1月7日
				IL	277267	A	2020年10月29日
				WO	2019178078	A1	2019年9月19日
				EA	202091982	A1	2021年6月10日
				EP	3765041	A1	2021年1月20日
				SG	11202008795S	A	2020年10月29日
				KR	20200131279	A	2020年11月23日
				CA	3093810	A1	2019年9月19日
				JP	2021518108	A	2021年8月2日
CN	104936621	A	2015年9月23日	BR	112020018670	A2	2021年1月5日
				JP	2016503295	A	2016年2月4日
				MX	2015005582	A	2015年8月14日
				HK	1214161	A1	2016年7月22日
				CA	2890256	A1	2014年5月15日
				SG	11201503431T	A	2015年5月28日
				PE	20150891	A1	2015年6月11日
				EP	2916875	A1	2015年9月16日
				KR	20150060980	A	2015年6月3日
				PH	12015500977	A1	2015年7月13日
CN	107723275	A	2018年2月23日	WO	2014072888	A1	2014年5月15日
				US	2015266962	A1	2015年9月24日
				IL	238566	A	2015年6月30日
				AU	2013343111	A1	2015年5月14日
				RU	2015116485	A	2016年12月27日
				EP	3699268	A1	2020年8月26日
				WO	2019076149	A1	2019年4月25日
				JP	2020529841	A	2020年10月15日
				WO	2019006072	A1	2019年1月3日
				AU	2018291128	A1	2020年1月23日
CN	111094345	A	2020年5月1日	SG	11201913175T	A	2020年1月30日
				US	2020138865	A1	2020年5月7日
				IL	271597	A	2020年2月27日
				KR	20200049757	A	2020年5月8日
				EP	3645568	A1	2020年5月6日
				CA	3068444	A1	2019年1月3日
				CN	111051502	A	2020年4月21日
				WO	2019047899	A1	2019年3月14日
				EP	3680328	A1	2020年7月15日
				US	2014349402	A1	2014年11月27日
US	2014349402	A1	2014年11月27日	WO	2013074916	A1	2013年5月23日
				US	2019388472	A1	2019年12月26日

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2015年1月)

10

20

30

40

50

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 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17
A 6 1 K	35/12 (2015.01)	A 6 1 K	35/12
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76
A 6 1 K	35/761 (2015.01)	A 6 1 K	35/761
A 6 1 K	31/7105 (2006.01)	A 6 1 K	31/7105
A 6 1 K	31/713 (2006.01)	A 6 1 K	31/713
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
C 1 2 N	5/0783 (2010.01)	C 1 2 N	5/0783
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28
C 0 7 K	14/705 (2006.01)	C 0 7 K	14/705

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,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,
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,J
O,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,M
Z,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,
TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

2. P L U R O N I C

中華人民共和国 3 1 5 3 3 6 浙江省寧波杭州湾新区啓源路 3 9 号 1 号楼 2 1 2 - 1 1 室

(72)発明者 王 丹

中華人民共和国 3 1 5 3 3 6 浙江省寧波杭州湾新区啓源路 3 9 号 1 号楼 2 1 2 - 1 1 室

(72)発明者 馬 少文

中華人民共和国 3 1 5 3 3 6 浙江省寧波杭州湾新区啓源路 3 9 号 1 号楼 2 1 2 - 1 1 室

(72)発明者 沈 慧

中華人民共和国 3 1 5 3 3 6 浙江省寧波杭州湾新区啓源路 3 9 号 1 号楼 2 1 2 - 1 1 室

(72)発明者 徐 凡麗

中華人民共和国 3 1 5 3 3 6 浙江省寧波杭州湾新区啓源路 3 9 号 1 号楼 2 1 2 - 1 1 室

(72)発明者 王 世臣

中華人民共和国 3 1 5 3 3 6 浙江省寧波杭州湾新区啓源路 3 9 号 1 号楼 2 1 2 - 1 1 室

(72)発明者 陳 偉杰

中華人民共和国 3 1 5 3 3 6 浙江省寧波杭州湾新区啓源路 3 9 号 1 号楼 2 1 2 - 1 1 室

F ターム (参考) 4B065 AA90X AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44

4C084 AA13 NA14 ZB26

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26

4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 BB65 CA12 CA20 NA14 ZB26

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA76 EA20

FA74