(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2018-522907
(P2018-522907A)
(43)公表日　平成30年8月16日(2018.8.16)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C07K 19/00	(2006.01)	C07K	19/00	ZNA	4B065
C07K 14/725	(2006.01)	C07K	14/725		4C084
C07K 16/28	(2006.01)	C07K	16/28		4C085
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/10		4C087
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00		4H045

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 108 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2018-506346 (P2018-506346)
(86)(22)出願日　平成28年7月26日 (2016.7.26)
(85)翻訳文提出日　平成30年3月19日 (2018.3.19)
(86)国際出願番号　PCT/EP2016/067800
(87)国際公開番号　WO2017/025323
(87)国際公開日　平成29年2月16日 (2017.2.16)
(31)優先権主張番号　PA201570518
(32)優先日　平成27年8月11日 (2015.8.11)
(33)優先権主張国　デンマーク(DK)
(31)優先権主張番号　PCT/EP2016/051467
(32)優先日　平成28年1月25日 (2016.1.25)
(33)優先権主張国　欧州特許庁(EP)

(71)出願人　512213549
セレクティス
ＣＥＬＬＥＣＴＩＳ
フランス、７５０１３　パリ、リュ　ドラ　クロワ　ジャリ　８
８　ｒｕｅ　ｄｅ　ｌａ　Ｃｒｏｉｘ　Ｊａｒｒｙ，　７５０１３　Ｐａｒｉｓ，Ｆｒａｎｃｅ
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志
(74)代理人　100102118
弁理士　春名　雅夫
(74)代理人　100160923
弁理士　山口　裕孝

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＣＤ３８抗原を標的とするためおよびＣＤ３８遺伝子を不活化するために操作された、免疫療法用の細胞

(57)【要約】
TALEN、Cas9、またはアルゴノートなどのレアカットエンドヌクレアーゼによって、病的細胞とCD38免疫細胞の両方に共通して見られる抗原マーカーをコードする遺伝子が前記免疫細胞において不活化されるという事実により、前記抗原マーカーを標的とするキメラ抗原受容体を備えることができる免疫療法用の遺伝子操作された免疫細胞を開発する方法を開示する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
図8に図示したようなV1、V2、およびV3より選択されるポリペプチド構造のうち1つを有する抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)であって、
該構造が、モノクローナル抗CD38抗体に由来するVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメイン、CD3ζシグナル伝達ドメインおよび4-1BB由来共刺激ドメインを含む細胞質ドメインを含み、
該V_HおよびV_Lが、それぞれ、SEQ ID NO.14および10(25A10)、SEQ ID NO.62および58(28F5)、SEQ ID NO.54および50(13F11)、SEQ ID NO.30および26(16B5)、SEQ ID NO.38および34(10F7)、SEQ ID NO.46および42(27B6)、またはSEQ ID NO.22および18(29B4)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む、
抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)。
【請求項２】
膜貫通ドメインが、SEQ ID NO.79(CD8αTM)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む、請求項1記載の抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)。
【請求項３】
V_HおよびV_Lが、それぞれ、SEQ ID NO.14および10(25A10)、SEQ ID NO.62および58(28F5)、SEQ ID NO.54および50(13F11)、またはSEQ ID NO.30および26(16B5)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む、請求項1または請求項2記載の抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)。
【請求項４】
V_HおよびV_Lが、それぞれ、SEQ ID NO.14および10(25A10)またはSEQ ID NO.62および58(28F5)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む、請求項1～3のいずれか一項記載の抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)。
【請求項５】
V_HおよびV_Lが、それぞれ、SEQ ID NO.15～17およびSEQ ID NO.11～13;それぞれ、SEQ ID NO.63～65およびSEQ ID NO.59～62;それぞれ、SEQ ID NO.55～57およびSEQ ID NO.51～53;それぞれ、SEQ ID NO.31～33およびSEQ ID NO.27～29;それぞれ、SEQ ID NO.39～42およびSEQ ID NO.35～37;それぞれ、SEQ ID NO.47～49およびSEQ ID NO.43～45;それぞれ、SEQ ID NO.23～25およびSEQ ID NO.19～22のCDR配列を含む、請求項1～4のいずれか一項記載の抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)。
【請求項６】
SEQ ID NO.82～84(25A10)、SEQ ID NO.100～102(28F5)、SEQ ID NO.97～99(13F11)、SEQ ID NO.88～90(16B5)、SEQ ID NO.91～93(10F7)、SEQ ID NO.94～96(27B6)、およびSEQ ID NO.85～87(29B4)より選択されるものと少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む、請求項1～5のいずれか一項記載の抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)。
【請求項７】
SEQ ID NO.82～84(25A10)、SEQ ID NO.100～102(28F5)、SEQ ID NO.97～99(13F11)、およびSEQ ID NO.88～90(16B5)より選択されるものと少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む、請求項6記載の抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)。
【請求項８】
SEQ ID NO.82～84(25A10)およびSEQ ID NO.100～102(28F5)より選択されるものと少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む、請求項6または請求項7記載の抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)。

【請求項９】
SEQ ID NO.82(25A10-v1)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む、請求項6～8のいずれか一項記載のCD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)。
【請求項１０】
細胞外結合ドメインが少なくとも1つのmAb特異的エピトープをさらに含む、請求項1～9のいずれか一項記載の抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)。
【請求項１１】
少なくとも1つのmAb特異的エピトープが、SEQ ID 114～121からなる群において選択されるアミノ酸配列を有する、請求項10記載の抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)。
【請求項１２】
細胞外リガンド結合ドメインに、SEQ ID NO.114の2つのCD20ミモトープが挿入されている、請求項10または請求項11記載の抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)。
【請求項１３】
細胞外リガンド結合ドメインのヒンジに、SEQ ID NO.114の2つのCD20ミモトープが挿入されている、請求項10記載の抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)。
【請求項１４】
細胞外リガンド結合ドメインに、SEQ ID NO.114の3つのCD20ミモトープと、SEQ ID NO.122または123のうち1つのCD34エピトープが挿入されている、請求項10記載の抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)。
【請求項１５】
そのポリペプチドがSEQ ID NO.76(FcεRIIIα)、SEQ ID NO.77(CD8α)、およびSEQ ID NO.78(IgG1)より選択されるものと少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すヒンジを含む、請求項1～14のいずれか一項記載の抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)。
【請求項１６】
そのポリペプチドがSEQ ID NO.77(CD8α)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すヒンジを含む、請求項1～15のいずれか一項記載の抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)。
【請求項１７】
そのポリペプチドがSEQ ID NO.76(FcεRIIIα)より選択されるものと少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示す膜貫通ドメインを含む、請求項1～15のいずれか一項記載の抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)。
【請求項１８】
病的細胞に対する免疫療法用の免疫細胞、好ましくは、T細胞を調製する方法であって、以下の工程を含む、方法:
(a)免疫細胞において、CD38抗原マーカーの発現または提示に関与する、CD38遺伝子をコードする遺伝子を遺伝子不活化するか、または変異させる工程であって、該CD38抗原マーカーが該免疫細胞の表面と病的細胞の表面の両方に存在する、工程;
(b)該免疫細胞の中で、該病的細胞の表面に存在する該CD38抗原マーカーに対して作られた請求項1～17のいずれか一項記載のキメラ抗原受容体をコードするトランスジーンを発現させる工程。
【請求項１９】
工程(a)がレアカットエンドヌクレアーゼを用いて行われる、請求項18記載の方法。
【請求項２０】
工程(a)がTAL-ヌクレアーゼを用いて行われる、請求項19記載の方法。
【請求項２１】
TAL-ヌクレアーゼがSEQ ID NO.1、4、または7の配列を標的とする、請求項20記載の方

法。
【請求項２２】
TAL-ヌクレアーゼがSEQ ID NO.4の配列(CD38-1標的)を標的とする、請求項21記載の方法。
【請求項２３】
CD38抗原の不活化が、SEQ ID NO.2～3、5～6、または8～9のTALE-ヌクレアーゼを用いることによって行われる、請求項19～21のいずれか一項記載の方法。
【請求項２４】
CD38抗原の不活化が、SEQ ID NO.5～6のTALE-ヌクレアーゼを用いることによって行われる、請求項23記載の方法。
【請求項２５】
免疫細胞を活性化および増殖させる、さらなる工程を含む、請求項18～24のいずれか一項記載の方法。
【請求項２６】
細胞表面にマーカー抗原を提示する細胞を排除することによって、結果として生じた免疫細胞を精製する、さらなる工程を含む、請求項18～25のいずれか一項記載の方法。
【請求項２７】
ドナーから免疫細胞を獲得する、先行する工程を含む、請求項18～26のいずれか一項記載の方法。
【請求項２８】
病的細胞の発生による影響を受けている患者から免疫細胞を獲得する、先行する工程を含む、請求項18～26のいずれか一項記載の方法。
【請求項２９】
免疫細胞が初代幹細胞、iPS、またはhES細胞に由来する、請求項18～28のいずれか一項記載の方法。
【請求項３０】
免疫細胞が、病的細胞の発生による影響を受けている患者から得られたiPS細胞に由来する、請求項29記載の方法。
【請求項３１】
工程(a)がRNAガイドエンドヌクレアーゼを用いて行われる、請求項18～30のいずれか一項記載の方法。
【請求項３２】
RNAガイドエンドヌクレアーゼがCas9である、請求項31記載の方法。
【請求項３３】
RNAガイドエンドヌクレアーゼが少なくとも2つのポリペプチドに分割され、1つのポリペプチドがRuvCを含み、別のポリペプチドがHNHを含む、請求項32記載の方法。
【請求項３４】
エンドヌクレアーゼが、トランスフェクトされたmRNAから発現される、請求項18～33のいずれか一項記載の方法。
【請求項３５】
T細胞受容体(TCR)の成分をコードする遺伝子を不活化する、さらなる工程を含む、請求項18～34のいずれか一項記載の方法。
【請求項３６】
T細胞受容体の成分がTCRαである、請求項35記載の方法。
【請求項３７】
HLAの成分をコードする遺伝子を不活化する、さらなる工程を含む、請求項18～36のいずれか一項記載の方法。
【請求項３８】
β2mをコードする遺伝子を不活化する、さらなる工程を含む、請求項18～36のいずれか一項記載の方法。

【請求項３９】
CTLA4、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、LAG3、HAVCR2、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、TGFBRII、TGFRBRI、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、およびGUCY1B3より選択される免疫チェックポイントタンパク質をコードする遺伝子を不活化する、さらなる工程を含む、請求項18～38のいずれか一項記載の方法。
【請求項４０】
遺伝子座がPD1遺伝子またはCTLA-4遺伝子の発現に関与する、請求項39記載の方法。
【請求項４１】
化学療法または免疫抑制薬物に対する免疫細胞の感受性を付与する遺伝子を不活化する、さらなる工程を含む、請求項18～40のいずれか一項記載の方法。
【請求項４２】
さらなる遺伝子がCD52をコードする、請求項41記載の方法。
【請求項４３】
さらなる遺伝子がヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HPRT)である、請求項41記載の方法。
【請求項４４】
さらなる遺伝子がグルココルチコイド受容体(GR)をコードする、請求項41記載の方法。
【請求項４５】
さらなる遺伝子がDCK調節経路、特にDCK発現に関与する、請求項41記載の方法。
【請求項４６】
工程(a)の免疫細胞が炎症性Tリンパ球、細胞傷害性Tリンパ球、制御性Tリンパ球、またはヘルパーTリンパ球に由来する、請求項18～45のいずれか一項記載の方法。
【請求項４７】
T細胞がCD4+Tリンパ球および/またはCD8+Tリンパ球に由来する、請求項46記載の方法。
【請求項４８】
形質転換された免疫細胞がインビトロで増殖される、請求項18～47のいずれか一項記載の方法。
【請求項４９】
形質転換された免疫細胞がインビボで増殖される、請求項18～47のいずれか一項記載の方法。
【請求項５０】
病的細胞が悪性細胞または感染細胞より選択される、請求項18～49のいずれか一項記載の方法。
【請求項５１】
医用薬剤として用いられる免疫細胞を調製するための、請求項18～50のいずれか一項記載の方法。
【請求項５２】
がん、免疫疾患、または感染症の処置を必要とする患者におけるがん、免疫疾患、または感染症を処置するための免疫細胞を調製するための、請求項51記載の方法。
【請求項５３】
医用薬剤が$CD38^+$血液悪性腫瘍の処置用に用いられる、請求項52記載の方法。
【請求項５４】
医用薬剤が、B細胞非ホジキンリンパ腫(NHL)、多発性骨髄腫(MM)、急性骨髄性白血病(AML)、急性リンパ芽球性白血病(B細胞ALL)、および/または慢性リンパ性白血病(CLL)、さらに具体的には多発性骨髄腫(MM)の処置用に用いられる、請求項53記載の方法。
【請求項５５】
医用薬剤が多発性骨髄腫(MM)の処置用に用いられる、請求項54記載の方法。

【請求項５６】
医用薬剤が、難治性/再発性多発性骨髄腫(RRMM)であるMMサブタイプの処置用に用いられる、請求項55記載の方法。
【請求項５７】
医用薬剤が急性リンパ芽球性白血病(ALL)の処置用に用いられる、請求項54記載の方法。
【請求項５８】
医用薬剤が、マントル細胞白血病(MCL)などのB細胞非ホジキンリンパ腫(NHL)患者の処置用に用いられる、請求項54記載の方法。
【請求項５９】
病的細胞が固形腫瘍細胞である、請求項18～53のいずれか一項記載の方法。
【請求項６０】
請求項1～17のいずれか一項記載の抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)を発現し、内因性CD38遺伝子が遺伝子不活化または変異されている、操作された免疫細胞(好ましくは、T細胞)。
【請求項６１】
内因性CD38遺伝子およびTCR遺伝子が遺伝子不活化または変異されている、請求項60記載の操作された免疫細胞。
【請求項６２】
内因性CD38遺伝子、TCR遺伝子、およびdCK遺伝子が遺伝子不活化または変異されている、請求項60または請求項61記載の操作された免疫細胞。
【請求項６３】
CD38遺伝子と、さらなる遺伝子が、特異的レアカットエンドヌクレアーゼを用いたノックアウト(KO)によって不活化されている、請求項60～62のいずれか一項記載の操作された免疫細胞。
【請求項６４】
請求項18～59のいずれか一項記載の方法によって入手可能な、操作された免疫細胞。
【請求項６５】
表現型$[CAR\ CD38]^{+}[CD38]^{-}$という結果になる、請求項60記載の操作された免疫細胞。
【請求項６６】
請求項60～65のいずれか一項記載の少なくとも2個の操作された免疫細胞を含む、免疫細胞集団。
【請求項６７】
患者を処置するための方法であって、以下の工程を含む、方法:
(a)免疫細胞と共通して見られる特定のCD38抗原マーカーを提示する病的細胞の存在について該患者を診断する工程;
(b)請求項60～65のいずれか一項記載の操作された免疫細胞の集団を調製する工程、または請求項18～59のいずれか一項記載の方法に従って、操作された免疫細胞の集団を調製する工程;および
(c)該操作された免疫細胞を、該病的細胞について診断された該患者に投与する工程。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
発明の分野
本発明は、病的細胞と免疫細胞の両方に共通して見られるCD38抗原マーカーを標的とするキメラ抗原受容体を備える、免疫療法のための遺伝子操作された、好ましくは、非アロ反応性の免疫細胞を開発する方法に関する。
【０００２】
前記方法は、前記抗原マーカーに対して向けられたCARを発現させる工程、および前記免疫細胞の表面に前記抗原マーカーが存在することに寄与する免疫細胞遺伝子を不活化す

る工程を含む。この不活化は、典型的には、RNAガイドエンドヌクレアーゼ（例えば、Cas9/クリスパー）、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、またはTALヌクレアーゼをコードするトランスジーンを用いて行われる。操作された免疫細胞、好ましくは、T細胞は、免疫活性を悪性の感染細胞または欠損のある免疫細胞に向けると同時に、これらの相互破壊、自己刺激、または凝集を回避する。本発明は、がん、感染症、自己免疫疾患を処置するための免疫細胞を用いた標準的で手頃な価格の養子免疫療法戦略への道を開く。

【背景技術】

【０００３】

発明の背景

エクスビボで生成された自己の抗原特異的免疫細胞の移入を含む養子免疫治療は、ウイルス感染およびがんを処置するための有望な戦略である。養子免疫治療のために使用されるT細胞は、例えば、抗原特異的T細胞の増大または遺伝子改変を通したT細胞の向け直しのいずれかによって生成され得る（Park,Rosenberg et al. 2011）。

【０００４】

T細胞における新規特異性は、トランスジェニックT細胞受容体またはキメラ抗原受容体（CAR）の遺伝子移入を通して、成功裡に生成された（Jena,Dotti et al.2010）。CARは、単一の融合分子として1つ以上のシグナリングドメインと会合したターゲティングモエティからなる合成受容体である。概してCARの結合モエティは、フレキシブルリンカーによって結合されたモノクローナル抗体の軽鎖可変断片を含む、単鎖抗体（scFv）の抗原結合ドメインからなる。受容体またはリガンドのドメインに基づく結合モエティも、成功裡に使用されている。第一世代CARのためのシグナリングドメインは、CD3ζ鎖またはFc受容体γ鎖の細胞質領域に由来する。第一世代CARは、T細胞の細胞傷害を成功裡に向け直すことが示されたが、より長期間の増大および抗腫瘍活性をインビボで提供することはできなかった。CARによって改変されたT細胞の生存を増強し、増殖を増加させるため、CD28、OX-40（CD134）、および4-1BB（CD137）を含む共刺激分子に由来するシグナリングドメインが、単独で（第二世代）または組み合わせて（第三世代）付加された。CARは、リンパ腫および固形腫瘍を含む様々な悪性疾患に由来する腫瘍細胞の表面に発現された抗原に対して、T細胞が向け直されることを、成功裡に可能にしている（Jena,Dotti et al.2010）。

【０００５】

養子免疫療法を用いて患者を処置する現行のプロトコールは自己細胞移入に基づいている。このアプローチでは、Tリンパ球が患者から回収され、遺伝子組換えされるか、エクスビボで選択され、必要に応じて細胞数を増幅するためにインビトロで培養され、最後に、患者に注入される。リンパ球注入に加えて、宿主は、T細胞の生着または免疫応答へのT細胞の関与を支援する他のやり方、例えば、（放射線または化学療法を用いた）プレコンディショニング（preconditioning）およびリンパ球増殖因子（例えば、IL-2）の投与で操作してもよい。各患者には、患者自身のリンパ球（すなわち、自家療法）を用いて、個々に作られた処置が与えられる。自家療法は、実際の適用に対して大きな技術的な障害および物流上の障害に直面している。作製するには、高価な専用施設および専門家が必要であり、患者を診断した後、短時間で作製しなければならない。多くの場合、患者の前処置によって免疫機能が低下し、患者のリンパ球は十分に機能せず、非常に少数で存在する可能性がある。これらの障害のために、各患者の自己細胞調製物は事実上新たな製品であり、その結果、効力および安全性の大幅なばらつきが生じる。

【０００６】

理想的には、同種異系治療用細胞を予め製造し、詳細に特徴付け、患者に即時に投与することができる標準化された療法を使用したい。同種異系とは、細胞が、同じ種に属する個体から得られているが、遺伝的に似ていないことを意味する。しかしながら、現在、同種異系細胞の使用には多くの欠点がある。免疫能力のある宿主では、同種異系細胞は素早く拒絶される。これは、宿主対移植片拒絶反応（HvG）と呼ばれるプロセスである。このため、導入された細胞の効力は大きく制限される。免疫能力のない宿主では、同種異系細

胞は生着することができるが、その内因性T細胞受容体（TCR）特異性は宿主組織を異物として認識し、その結果、移植片対宿主病（GvHD）が起こる。移植片対宿主病（GvHD）は重大な組織損傷および死亡につながる場合がある。

【０００７】

同種異系T細胞を提供するために、本発明者らは、T細胞を遺伝子操作する方法を以前に開示し、この方法では、登録商標TALEN（商標）（Cellectis, 8, rue de la Croix Jarry, 75013 PARIS）の方がよく知られている特異的TAL-ヌクレアーゼを用いることによって、様々なエフェクター遺伝子、特にT細胞受容体をコードする遺伝子が不活性化される。この方法は、プラットフォームの一部としてRNAトランスフェクションを使用し、初代細胞において高効率であることが分かっており、そのため同種異系T細胞を大量生産することができる（WO2013/176915）。

【０００８】

サイクリックADPリボース加水分解酵素としても知られるCD38（分化クラスター38）は、CD4+、CD8+、Bリンパ球、およびナチュラルキラー細胞を含む、多くの免疫細胞（白血球）、特に、T細胞の表面に見出される糖タンパク質である。CD38はまた細胞接着、シグナル伝達、およびカルシウムシグナル伝達においても機能する。このタンパク質についての構造情報はUniProtKB/Swiss-Protデータベースにリファレンス P28907で見られる。ヒトでは、CD38タンパク質は、4番染色体に位置するCD38遺伝子によってコードされる。CD38は、NAD+からサイクリックADP-リボース（cADPR）の合成およびADP-リボースへの加水分解を触媒する多機能エクトエンザイムである。これらの反応産物は細胞内Ca2+の調節に必要不可欠だと考えられている。また、CD38機能の喪失が免疫応答不全および代謝障害と関連づけられた（Malavasi F., et al. （2008）.「Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology」. Physiol. Rev. 88（3）： 841-86）。

【０００９】

他方で、CD38タンパク質は、HIV感染、白血病、骨髄腫、固形腫瘍、II型糖尿病、および骨代謝、ならびに他のいくつかの遺伝的に決定される状態のマーカーである。特に、CD38タンパク質は白血病の予後マーカーとして用いられてきた（Ibrahim, S. et al. （2001） CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Blood 98：181-186）。

【００１０】

Mihara et al(2009)は、TBH-7 scFvに基づく抗CD38キメラ抗原受容体について述べている。これらの操作されたT細胞は他のどの遺伝子組換えも含まない。この刊行物では生細胞の回収率は非常に低かったことが強調されている。

【００１１】

CD38発現細胞はCARに魅力的な標的だと考えることができるが、このような抗原マーカーが、ほとんどのT細胞の表面にも発現しているという事実があることから、免疫療法を行うために、これらのマーカーが選択されることは大きく妨げられてきた。

【００１２】

本発明者らは、本明細書において、T細胞の表面にも存在するCD38特異的抗原マーカーを発現する病的細胞が関与する免疫療法のための戦略を提供する。

【発明の概要】

【００１３】

本発明は、病的細胞を標的とすることを目的とするT細胞を操作するための方法であって、前記病的細胞が、T細胞表面にも存在するCD38マーカーを発現する方法を開示する。抗原マーカーとはタンパク質全体またはその免疫反応性断片を意味する。

【００１４】

さらに具体的には、本発明の操作された免疫細胞は、図8に図示したようなバージョンV1、V2、およびV3の特定の構造を有する抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)に関する。この抗CD38 CARは細胞質ドメインとしてCD3ζシグナル伝達ドメインおよび4-1BB由

来共刺激ドメインを有し、25A10、28F5、13F11、16B5、10F7、27B6、または29B4モノクローナル抗体に由来するVH鎖およびVL鎖を有する。

【００１５】

本発明の態様によれば、T細胞は、好ましくは、このようなCD38抗原マーカーをコードする遺伝子の発現を不活化するように操作される。この不活化は、好ましくは、ゲノム改変によって、さらに具体的には、前記CD38抗原マーカーの産生またはT細胞表面における提示に直接的または間接的に関与する遺伝子座を標的とすることができる特異的レアカットエンドヌクレアーゼをT細胞において発現させることによって行われる。メガヌクレアーゼ、TAL-ヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、またはCas9/クリスパーもしくはアルゴノート(argonaute)(Ago)のようなRNA/DNAガイドエンドヌクレアーゼなどの様々なタイプのレアカットエンドヌクレアーゼを使用することができる。本明細書では、CD38遺伝子を不活化するためにTALENの使用が特に適していることが見出された。模式図を図1に示した。

【００１６】

好ましい態様によれば、本発明の免疫細胞は、CD38表面抗原をコードするCD38遺伝子を不活化するように、また、特異的な抗CD38 CARを付与するようにも操作される。この二重遺伝子組換えは、これらの抗CD38 CAR免疫細胞が互いに殺し合うリスクを小さくしながら、特異的にCD38発現がん細胞を標的とすることを目的とする。

【００１７】

さらに好ましい態様によれば、前記の二重に遺伝子操作された抗CD38 CAR細胞は、V1、V2、またはV3、例えば、図8に示したV1、V2、またはV3のCAR構造を有し、この抗CD38 CARは細胞質ドメインとしてCD3ζシグナル伝達ドメインおよび4-1BB由来共刺激ドメインを有し、25A10、28F5、13F11、16B5、10F7、27B6、または29B4モノクローナル抗体に由来するVH鎖およびVL鎖を有する。

【００１８】

別の態様によれば、特に、自己認識に関与する遺伝子、例えば、T細胞受容体(TCR)またはHLA複合体の成分をコードする遺伝子を欠失させることによって、T細胞が同種異系になるようにさらに操作することができる。

【００１９】

別の態様によれば、必要な場合に、このような操作されたT細胞をインビボで枯渇させるために、キメラ抗原受容体の細胞外結合ドメインに少なくとも1つのエピトープまたはミモトープを組み込むようにT細胞をさらに操作することができる。

【００２０】

本発明は、詳細な説明、実施例、および図面に示した遺伝子組換えを含む、単離された細胞または細胞株、ならびに前記T細胞を操作するのに有用なタンパク質、ポリペプチド、またはベクターの全てを包含する。

【００２１】

本発明の結果として、操作されたT細胞は、がん、感染症、または自己免疫疾患を処置または予防するための方法において、治療製品として、理想的には「既製の(off the shelf)」製品として使用することができる。特に、操作されたT細胞は多発性骨髄腫(MM)または急性リンパ芽球性リンパ腫(ALL)の処置に最も適している。

【００２２】

本発明による好ましい免疫細胞は、治療製品として使用するための、好ましくは、同種異系治療製品として使用するための、表現型$[CAR\ CD38]^{+}[CD38]^{-}$になり、好ましくは、[TCR]ネガティブにもなる免疫細胞である。

【図面の簡単な説明】

【００２３】

【図１】CD38が破壊され、かつ抗原マーカーCD38を有する悪性細胞を標的とするキメラ抗原受容体(単鎖CARとして表した)を備える、本発明による操作されたT細胞の模式図。

【図２】A:制限酵素消化(インサート:SfaNI-BbvIおよびベクター:BsmBI)を用いる、それ

ぞれのTALE-ヌクレアーゼ構築物のサブクローニングに使用した、T7プロモーターの制御下にある哺乳動物発現ベクター(pCSL10794)の模式図。B:制限酵素消化(AscIおよびHindIII)を用いる、それぞれのCAR構築物のサブクローニングに使用した、T7プロモーターの制御下にある哺乳動物発現ベクター(pCLS9632)の模式図。

【図３】T細胞におけるCD38の発現:新鮮に単離したT細胞を、抗CD3-CD28コーティングマイクロビーズ(Dynabeads, Life Technologies)+20ng/mlヒトIL2(Miltenyi)と共に培養した。A:活性化後、6日目のT細胞によるCD38発現。B:活性化後、3週間にわたるT細胞によるCD38発現。

【図４】本発明において行った3つの実験のタイムスケール:A:T細胞におけるTalenによる内因性CD38不活化;B:WT T細胞における、CARをコードするmRNAのトランスフェクション;C:精製されたCD38欠損T細胞における、T細胞活性化後の、CARをコードするmRNAのトランスフェクション。

【図５】CD38抗原のエキソン1の配列と、TALENによるCD38 KOのために試験した3種類の標的の配列。3種類の標的CD38-1、CD38-2、およびCD38ex1-T2は、連続した、枠で囲った部分に対応する。

【図６】TALEN mRNAトランスフェクションの7日後のCD38陰性T細胞のパーセント。3組のTALEN CD38ex1-T2、CD38-1。

【図７】A:TALEN mRNAトランスフェクション後、17日間のIL-2との培養にわたるCD38陰性T細胞のパーセント。B: T細胞エレクトロポレーション後、6日目、およびT細胞活性化後、10日目に、CD38陰性T細胞を精製した後の、11日間のIL-2の存在下での培養にわたるT細胞増殖(すなわち、増殖率)[説明文:白抜きの丸:TALENなし;塗りつぶした丸:TALEN CD38-1、および三角:精製された陰性CD38(TALEN CD38-1);Nは、それぞれのケースで行った試験の回数を表す]。

【図８】使用したヒンジで分類した、3つのバージョン(V1、V2、およびV3)の設計および試験した抗CD38 CARの図。

【図９】抗CD38 CARサブクローニング用の構築物プラスミドと、それぞれのscFvのKd(nM)。

【図１０】キフィキット(Kifikit)法(Dako)を用いた、CD38抗原の量的発現を対象にした5種類の細胞株(MOLP8、Daudi、U266 CD38+、U266 CD38-、およびK562)の試験。A:FAC分析;B:CD38発現のパーセントおよび細胞1個あたりのCD38抗原の数。

【図１１】新鮮に単離したT細胞の5日後に、CARをコードするmRNAでトランスフェクトした後の、24個の異なる全てのCAR(8組のscFv X 3バージョンV1、V2、およびV3)のスクリーニング。プロテインL、抗Fab、またはCD38-Fcを用いたフローサイトメトリーによるCAR発現分析(N=1)。

【図１２】新鮮に単離されたT細胞を活性化して5日後に、CARをコードするmRNAでトランスフェクトした後の、24個の異なる全てのCAR(8組のscFv X 3バージョンV1、V2、およびV3)のスクリーニング。標的細胞株と(5時間)インキュベートした後のT細胞原形質膜におけるCD107a発現(N=1)。

【図１３】wt T細胞、CD38欠損T細胞、精製されたCD38欠損抗CD38 CAR T細胞の比較。A:LUNA細胞カウンターによって評価したT細胞生存率。B:CD38-Fc融合タンパク質を用いたmRNAトランスフェクション後、1日目および2日目のCAR発現(N=1)。

【図１４】wt T細胞、CD38欠損T細胞、精製されたCD38欠損抗CD38 CAR T細胞の比較。A:T細胞を標的細胞とインキュベートした後のCD107a+CD8 T細胞のパーセント。B:非CAR T細胞およびK562の溶解に基づいて正規化した標的細胞溶解(N=1)。

【図１５】CD38-Fc融合タンパク質を用いたmRNAトランスフェクション後の、精製されたCD38欠損抗CD38 CAR T細胞における1日目および2日目のCAR発現(N=3)。

【図１６】T細胞を標的細胞とインキュベートした後のCD107a+CD8 T細胞のパーセント(N=3。自家T細胞に対する脱顆粒(N=1または2)を除く)。

【図１７】非CAR T細胞およびK562の溶解に基づいて正規化した標的細胞溶解(N=3。LT自家に対する細胞傷害性(N=1または2)を除く)。

【図１８】本発明による多鎖CAR構造の元になったFcεRIの模式図。
【図１９】本発明によるCD38多鎖CARをコードするポリシストロニック構築物の一般的な構造。
【図２０】本発明によるCD38特異的多鎖CARの様々な構造。左から右に:ポリペプチドγ(CD3ζのITAMと融合)、ポリペプチドα(ScFvと融合)、ポリペプチドβ(CD28または41BBのいずれかに由来する共刺激ドメインと融合)。AおよびB:ポリペプチドβを41BB由来共刺激ドメインと融合した。VL断片およびVH断片は反対の順序である。CおよびD:ポリペプチドβをCD28由来共刺激ドメインと融合した。VL断片およびVH断片は反対の順序である。
【図２１Ａ】CAR陽性細胞の注射に関連する、起こり得る副作用を軽減するように設計した、T細胞枯渇のための様々なmAb-エピトープタギング、特に、CD20ミモトープを含む、本発明による例示的な抗CD38特異的CARの模式図。(A)細胞を選別するための、または枯渇させるためのエピトープタギング配列を含まない、本発明による抗CD38特異的CARプロトタイプ。V1およびV2は、それぞれ、CD38に結合する抗体のVH鎖またはVL鎖を表す。TM:膜貫通ドメイン、L:リンカー、TM:膜貫通ドメイン(好ましくはCD8α膜貫通ドメイン)、4-1BB:細胞内共刺激ドメイン、CD3 ITAM:活性化ドメイン。(B)CARの細胞外リガンド結合ドメインに挿入した少なくとも1つのエピトープをさらに含む、本発明による抗CD38特異的CAR構造。前記エピトープはVH鎖とVL鎖との間に挿入されている。前記エピトープは異なるリンカーと隣り合っている。(C)2つのエピトープがCARの細胞外リガンド結合ドメインに挿入されている、本発明による抗CD38特異的CAR構造。1つのエピトープはCARのN末端とVH鎖との間に挿入され、少なくとも1つまたは2つのリンカーと隣り合っている。2番目のエピトープはVH鎖とVL鎖との間に挿入され、これも少なくとも1つまたは2つのリンカーと隣り合っている。本明細書に図示した構造は、2番目のエピトープと隣り合っている、使用したリンカーの点で異なる。(D)2つのエピトープがCARの細胞外リガンド結合ドメインに挿入されている、本発明による抗CD38特異的CAR構造。一方のエピトープはVH鎖とVL鎖との間に挿入され、他方のエピトープはVL鎖とヒンジとの間に挿入され、前記のそれぞれのエピトープも少なくとも1つまたは2つのリンカーと隣り合っている。本明細書に図示した構造は、1番目のエピトープと隣り合っている、使用したリンカーの点で異なる。(E)2つのエピトープがCARの細胞外ドメインに挿入されている、本発明による抗CD38特異的CAR構造。1つのエピトープはCARのN末端とVH鎖との間に挿入され、少なくとも1つまたは2つのリンカーと隣り合っている。2番目のエピトープはVL鎖とヒンジとの間に挿入され、これも、このようなリンカーと隣り合っている。
【図２１Ｂ】CAR陽性細胞の注射に関連する、起こり得る副作用を軽減するように設計した、T細胞枯渇のための様々なmAb-エピトープタギング、特に、CD20ミモトープを含む、本発明による例示的な抗CD38特異的CARの模式図。(F)3つのエピトープがCARの細胞外ドメインに挿入されている、本発明による抗CD38特異的CAR構造。1つのエピトープはCARのN末端とVH鎖との間に挿入され、少なくとも1つまたは2つのリンカーと隣り合っている。2番目のエピトープはVH鎖とVL鎖との間に挿入され、これも、このようなリンカーと隣り合っている。3番目のエピトープはVL鎖とヒンジとの間に挿入されている。これらの2つの構造は、2番目のエピトープと隣り合っている、使用したリンカーの点で異なる。(G)少なくとも2つのエピトープ(好ましくはCD20エピトープ)が、細胞外リガンド結合ドメインにあるヒンジと抗CD38 VH鎖およびVL鎖の間に挿入されている、本発明による抗CD38特異的CAR構造。第3の例示的な構造では、1つのCD34エピトープが2つのCD20エピトープの間に含まれている。CD34が他の任意の以前のCD20エピトープに代わった、さらなる構造が考えられ得る。(H)本発明による抗CD38特異的CAR構造。少なくとも2つのエピトープが細胞外リガンド結合ドメインの末端に挿入されている。
【図２２Ａ】CD38ノックアウトを有し、かつ抗CD19 CARを備えるT細胞(CAR CD38-/-CAR-CD19 T細胞)のインビボ抗腫瘍活性の評価。(A)実験のタイムスケール。
【図２２Ｂ】CD38ノックアウトを有し、かつ抗CD19 CARを備えるT細胞(CAR CD38-/-CAR-CD19 T細胞)のインビボ抗腫瘍活性の評価。(B)7日目、14日目、および21日目に4つのマウス群においてバイオルミネセンスイメージングを評価した。T細胞投与なし;KO CD38があ

り、かつRQR8を発現するT細胞の投与(CD38-/-RQR8)；KO CD38があり、かつCD19 CARとRQR8を同時発現するT細胞の投与；およびWT CD38があり、かつCD19 CARとRQR8を同時発現するT細胞の投与。14日目および21日目にマウスがいないのは、特徴付けのために屠殺されたからである。

【図２２Ｃ】CD38ノックアウトを有し、かつ抗CD19 CARを備えるT細胞(CAR CD38-/-CAR-CD19 T細胞)のインビボ抗腫瘍活性の評価。(C)7日目、14日目および21日目での、上記の4つのマウス群におけるバイオルミネセンスイメージングによる腫瘍進行の評価。

【図２２Ｄ】CD38ノックアウトを有し、かつ抗CD19 CARを備えるT細胞(CAR CD38-/-CAR-CD19 T細胞)のインビボ抗腫瘍活性の評価。(D)上記の4つのマウス群における時間の関数での生存率パーセントの評価。

【図２３】2つの独立した実験におけるCD38-KO効力の評価。グラフは、エレクトロポレーションの5日後のCD38陰性細胞の割合（％）を表す(TpT:緩衝液T=陰性対照)。

【図２４】KO効率(A)およびT細胞増殖速度(B)に及ぼすCD38 TALEN mRNA量の影響の評価。グラフにあるmRNA量は、使用した全mRNAに対応する(各TALENの10μg、5μg、および2.5μgは、10^6個の細胞あたり2μg、1μg、および0.5μgのmRNAに相当する)。

【図２５】形質導入後、3日目でのCD38-fcまたはRQR8染色によって評価した形質導入効率の評価。抗CD38 CARをコードする4つの異なるrLV(25A10-V1およびV2、ならびに28F5 V1およびV2)について3種類のMOI(5、10、および15)を試験した。

【図２６】CD38/TRAC二重KOと抗CD38 CAR形質導入を受けたT細胞のスクリーニングプロセスのためのタイムスケーリング。

【図２７Ａ】T細胞におけるTALEN mRNAエレクトロポレーションによるCD38/TRAC KOと、培養プロセス終了時でのCARおよびRQR8同時発現の効率の評価。(A)RQR8およびCD38 Fcによる、CD38抗原の発現および抗CD38 CARの発現に対応する3つの一連のFAC。これらのアッセイは、CD38/TRAC二重KO(DKO)を受けた4種類の抗CD38 CAR(25A10-V1およびV2、ならびに28F5 V1およびV2)のそれぞれに対して行った。

【図２７Ｂ】T細胞におけるTALEN mRNAエレクトロポレーションによるCD38/TRAC KOと、培養プロセス終了時でのCARおよびRQR8同時発現の効率の評価。(B)CD38/TRAC二重KO(DKO)が成功した、生存可能なT細胞のパーセントの評価。

【図２７Ｃ】T細胞におけるTALEN mRNAエレクトロポレーションによるCD38/TRAC KOと、培養プロセス終了時でのCARおよびRQR8同時発現の効率の評価。(C)RQR8およびCD38 Fcに基づいた、上記の4種類のCARについての抗CD38 CAR発現の評価。NTD:形質導入なし。

【図２８】二重CD38/TRAC KOが成功し、かつ抗CD38 CARを発現するT細胞の表現型の特徴付け。(A)上記の4種類の抗CD38 CARそれぞれについての、RQR8を発現するT細胞におけるCD4/CD8比の決定。(B)上記の4種類の抗CD38 CARそれぞれについての、T細胞サブセット:エフェクターT細胞(Teff)、メモリーエフェクターT細胞(Tem)、セントラルメモリー(central memory)T細胞(Tcm)、幹細胞メモリーT細胞(Tscm)、別のカテゴリーのメモリーT細胞(Temra)、およびナイーブT細胞(Tn)の比の決定。

【図２９】4種類の抗CD38 CAR(25A10-V1およびV2、ならびに28F5 V1およびV2)の活性の評価。(A)MM細胞株:MOLP8、U266(CD38抗原を発現するか、または発現しない)、およびK562に対する脱顆粒、自家T細胞に対する脱顆粒、ならびに陽性対照として細胞株を使用しなかった場合(LTだけ)の脱顆粒の評価。(B)CD38発現MM細胞株に対する細胞傷害性の評価。CD38発現MM細胞株であるU266の値を、CD38を発現しないU266細胞株の値に対して正規化した。これらの2つのグラフについて、上から下に示したグラフの隣にある説明文は、左から右に示したバーに対応する。

【図３０】3種類のT急性リンパ芽球性白血病(T-ALL)細胞株(MOLT4、Loucy、およびCCFR-CEM)、ならびに2種類のMM細胞株(U266 CD38-およびMOLP8)の細胞表面にあるCD38発現の評価。

【図３１】精製前および精製後の、CCRF-CEM(T-ALL)細胞株中にあるCD38陰性T細胞のパーセントの決定によるKO CD38の確立の評価。

【図３２】25A10-V1の抗CD38 CAR活性の評価。(A)T ALL細胞株:CCRF-CEMオリジナル細胞

およびそのKO CD38 CCRF-CEM細胞、LoucyおよびMOLT4、ならびにCD38を発現するMM1S MM細胞株に対する脱顆粒と、陽性対照として細胞株を使用しなかった場合(LTだけ)の脱顆粒の評価。(B)上記のT ALL CD38発現細胞株に対する細胞傷害性の評価(CCRF-CEMの値を、対応するCD38を発現しない細胞株に対して基準化した)。これらの2つのグラフについて、上から下に示したグラフの隣にある説明文は、左から右に示したバーに対応する。

【発明を実施するための形態】

【００２４】

発明の詳細な説明

本明細書において特に定義されない限り、使用される技術用語および科学用語は、全て、遺伝子治療、生化学、遺伝学、および分子生物学の領域の当業者によって一般的に理解されるのと同一の意味を有する。

【００２５】

適当な方法および材料が本明細書に記載されるが、本明細書に記載されたものに類似しているかまたは等価である全ての方法および材料が、本発明の実施または試行において使用され得る。本明細書において言及された刊行物、特許出願、特許、およびその他の参照は全て、特に、参照が引用されている隣接する文章、段落、またはセクションにおける主題に関する各参照によって開示される主題について、参照によってその全体が組み入れられる。矛盾する場合には、定義を含む本明細書が優先されるであろう。さらに、材料、方法、および実施例は、他に特記されない限り、例示的なものに過ぎず、限定するためのものではない。

【００２６】

本発明の実施は、他に示されない限り、当技術分野の技術の範囲内にある細胞生物学、細胞培養、分子生物学、トランスジェニック生物学、微生物学、組換えDNA、および免疫学の従来の技術を利用するであろう。そのような技術は、文献中に完全に説明されている。例えば、Current Protocols in Molecular Biology（Frederick M.AUSUBEL,2000,Wiley and son Inc,Library of Congress,USA）；Molecular Cloning： A Laboratory Manual, Third Edition,（Sambrook et al,2001,Cold Spring Harbor,New York：Cold Spring Harbor Laboratory Press）；Oligonucleotide Synthesis（M.J.Gait ed.,1984）；Mullisら、米国特許第4,683,195号；Nucleic Acid Hybridization（B.D.Harries & S.J.Higgins eds.1984）；Transcription And Translation（B.D.Hames & S.J.Higgins eds.1984）；Culture Of Animal Cells（R.I.Freshney,Alan R.Liss,Inc.,1987）；Immobilized Cells And Enzymes（IRL Press,1986）；B.Perbal,A Practical Guide To Molecular Cloning（1984）；the series,Methods In ENZYMOLOGY（J.Abelson and M.Simon,eds.-in-chief,Academic Press,Inc.,New York）、特に、第154巻および第155巻（Wu et al.eds.）および第185巻、"Gene Expression Technology"（D.Goeddel,ed.）；Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells（J.H.Miller and M.P.Calos eds.,1987,Cold Spring Harbor Laboratory）；Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology（Mayer and Walker, eds., Academic Press,London,1987）；Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV（D. M. Weir and C.C.Blackwell,eds.,1986）；ならびにManipulating the Mouse Embryo,（Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor,N.Y.,1986）を参照されたい。

【００２７】

本発明は、さらに具体的には、図8に図示したようなV1、V2、およびV3より選択されるポリペプチド構造のうち1つを有する抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)であって、

前記構造が、モノクローナル抗CD38抗体に由来するVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメイン、CD3ζシグナル伝達ドメインおよび41BB由来共刺激ドメインを含む細胞質ドメインを含み、

前記V_HおよびV_Lが、それぞれ、SEQ ID NO.14および10(25A10)、SEQ ID NO.62および58(28F5)、SEQ ID NO.54および50(13F11)、SEQ ID NO.30および26(16B5)、SEQ ID NO.38およ

び34(10F7)、SEQ ID NO.46および42(27B6)、またはSEQ ID NO.22および18(29B4)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む、抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)に関する。

【００２８】

病的細胞に対するキメラ抗原受容体を発現する操作されたT細胞

本発明に従ってT細胞に導入されるキメラ抗原受容体は、単鎖CARまたは多鎖CARなどの異なる設計を採用することができる。これらの異なる設計を用いると、標的となった病的細胞に対する特異性および結合効率を改善するための様々な戦略が可能になる。これらの戦略の一部を本願の図に示した。単鎖CARは、当技術分野における最も古典的なバージョンである。特異性および強度の点でT細胞の活性の調整が可能になるので、多鎖CAR構造が出願人によって開発された。多サブユニットは、さらなる共刺激ドメインを保護することできるか、またはこのようなドメインを遠ざけることができ、同様に、他のタイプの受容体も保護することできるか、または遠ざけることができるのに対して、古典的な単鎖構造は、時として、多重特異性相互作用に対して感度が高すぎる、および許容性が低すぎるとみなされることがある。

【００２９】

単鎖CAR

養子免疫療法は、エクスビボで作製された抗原特異的自己T細胞の導入を伴い、ウイルス感染症およびがんを処置するのに有望な戦略である。養子免疫療法に用いられるT細胞は抗原特異的T細胞の増殖によって作製されてもよく、遺伝子工学によるT細胞の再誘導によって作製されてもよい（Park, Rosenberg et al. 2011）。ウイルス抗原特異的T細胞の導入は、移植に関連するウイルス感染症および稀なウイルス関連悪性疾患の処置に用いられる十分に確立した手順である。同様に、腫瘍特異的T細胞の単離および導入は黒色腫の処置においてうまくいくことが示されている。

【００３０】

T細胞における新たな特異性は、トランスジェニックT細胞受容体またはキメラ抗原受容体（CAR）を遺伝子導入することによって首尾良く作製されている（Jena, Dotti et al. 2010）。CARは、1つの融合分子の形をとる、1つまたは複数のシグナル伝達ドメインに結合した標的となる部分からなる合成受容体である。概してCARの結合部分は、可動性リンカーによってつながっているモノクローナル抗体の軽鎖可変断片を含む単鎖抗体（scFv）抗原結合ドメインからなる。受容体またはリガンドドメインをベースとする結合部分も首尾良く用いられている。第1世代CAR用のシグナル伝達ドメインはCD3ζまたはFc受容体γ鎖の細胞質領域に由来する。第1世代CARはT細胞の細胞傷害性を首尾良く再誘導することが示されている。しかしながら、それらは、インビボで長期増殖および抗腫瘍活性をもたらさなかった。CAR改変T細胞の生存率を向上させ、増殖を増やすために、CD28、OX-40（CD134）、および4-1BB（CD137）を含む共刺激分子に由来するシグナル伝達ドメインが単独で（第二世代）または組み合わせて（第三世代）加えられている。CARを用いると、リンパ腫および固形腫瘍を含む様々な悪性疾患に由来する腫瘍細胞の表面に発現している抗原にT細胞を首尾良く再誘導することができた（Jena, Dotti et al. 2010）。

【００３１】

ある態様によれば、抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、図8に図示したようなV1、V2、およびV3より選択されるポリペプチド構造のうち1つを有し、前記構造は、モノクローナル抗CD38抗体に由来するVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメイン、CD3ζシグナル伝達ドメインおよび4-1BB由来共刺激ドメインを含む細胞質ドメインを含み、

前記V_HおよびV_Lは、それぞれ、SEQ ID NO. 14および10 (25A10)、SEQ ID NO 62および58(28F5)、SEQ ID NO.54および50(13F11)、SEQ ID NO.30および26(16B5)、SEQ ID NO.38および34(10F7)、SEQ ID NO.46および42(27B6)、またはSEQ ID NO.22および18(29B4)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む。

【００３２】
好ましい態様によれば、抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、図8に図示したようなV1、V2、およびV3より選択されるポリペプチド構造のうち1つを有し、前記構造は、モノクローナル抗CD38抗体に由来するVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメイン、CD3ζシグナル伝達ドメインおよび4-1BB由来共刺激ドメインを含む細胞質ドメインを含み、
前記V_HおよびV_Lは、それぞれ、SEQ ID NO.14および10(25A10)ならびにSEQ ID NO62および58(28F5)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む。
【００３３】
より好ましい態様によれば、抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、図8に図示したようなV1およびV2より選択されるポリペプチド構造のうち1つを有し、前記構造は、モノクローナル抗CD38抗体に由来するVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメイン、CD3ζシグナル伝達ドメインおよび4-1BB由来共刺激ドメインを含む細胞質ドメインを含み、
前記VHおよびVLは、それぞれ、SEQ ID NO.14および10(25A10)ならびにSEQ ID NO.62および58(28F5)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む。
【００３４】
好ましい態様によれば、上記の抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)の前記膜貫通ドメインは、SEQ ID NO.79(CD8αTM)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む。
【００３５】
好ましい態様によれば、上記の抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)の前記V_HおよびV_Lは、それぞれ、SEQ ID NO.14および10(25A10)またはSEQ ID NO.62および58(28F5)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む。
【００３６】
好ましい態様によれば、前記抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)の前記V_HおよびV_Lに含まれるCDR配列は、それぞれ、SEQ ID NO.15～17およびSEQ ID NO.11～13;それぞれ、SEQ ID NO.63～65およびSEQ ID NO.59～62;それぞれ、SEQ ID NO.55～57およびSEQ ID NO.51～53;それぞれ、SEQ ID NO.31～33およびSEQ ID NO.27～29;それぞれ、SEQ ID NO.39～42およびSEQ ID NO.35～37;それぞれ、SEQ ID NO.47～49およびSEQ ID NO.43～45;それぞれ、SEQ ID NO.23～25およびSEQ ID NO.19～22である。
【００３７】
好ましい態様によれば、上記の抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)の前記ヒンジは、SEQ ID NO.76(FcεRIIIα)、SEQ ID NO.77(CD8α)、およびSEQ ID NO.78(IgG1)より選択されるものと少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示す配列を含む。
【００３８】
より好ましい態様によれば、上記の抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)の前記ヒンジは、SEQ ID NO.77(CD8α)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示す配列を含む。
【００３９】
好ましい態様によれば、上記の抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)の前記ヒンジは、SEQ ID NO.76(FcεRIIIα)より選択されるものと少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示す配列を含む。
【００４０】
一態様によれば、本発明の抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、SEQ ID NO.82～84(25A10)、SEQ ID NO.100～102(28F5)、SEQ ID NO.97～99(13F11)、SEQ ID NO.88～

90(16B5)、SEQ ID NO.91～93(10F7)、SEQ ID NO.94～96(27B6)、およびSEQ ID NO.85～87(29B4)より選択されるものと少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む。

【００４１】

本発明の範囲内に包含される抗CD38 CARの上記配列を全て以下の表1に示した(比較のためにツールCARとして使用したGMB005 CARを除く)。これらの構造(図8に従うV1、V2、およびV3バージョン)に使用した成分の配列も開示する。

【００４２】

(表１)図8のV1、V2、およびV3バージョンに基づく抗CD38 CARのポリペプチド配列と、これらを作るのに使用した対応する成分のポリペプチド配列

CARの名前	SEQ ID #	ポリペプチド配列
CD8αシグナルペプチド(SP)	74	MALPVTALLLPLALLLHAARP
FcεRI γシグナルペプチド(SP)	106	MIPAVVLLLLLLVEQAAA
FcεRI □シグナルペプチド(SP)	110	MAPAMESPTLLCVALLFFAPDGVLA
GSリンカー	75	GGGGSGGGGSGGGGS
FCRIIIαヒンジ	76	GLAVSTISSFFPPGYQ
CD8αヒンジ	77	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD
IgG1ヒンジ	78	EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
CD8α TMドメイン	79	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
4-1 BB共刺激ドメイン	80	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
CD28共刺激ドメイン(CD28-IC)	113	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS
CD3ζ活性化ドメイン	81	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
IgEのFc受容体、α鎖、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン(FcεRI □-TM-IC)	111	FFIPLLVVILFAVDTGLFISTQQQVTFLLKIKRTRKGFRLLNPHPKPNPKNN
IgEのFc受容体、γ鎖ITAMを含まない(FcεRI γ-□□ITAM)	107	LGEPQLCYILDAILFLYGIVLTLLYCRLKIQVRKAAITSYEKS

IgEの受容体、 β鎖 ITAMを含まない (FcεR1γ- ΔITAM)	112	MDTESNRRANLALPQEPSSVPAFEVLEISPQEVSSGRLLKSASSPPLHTWLTVLKKE QEFLGVTQILTAMICLCFGTVVCSVLDISHIEGDIFSSFKAGYPFWGAIFFSISGMLSI ISERRNATYLVRGSLGANTASSIAGGTGITILIINLKKSLAYIHIHSCQKFFETKCFMAS FSTEIVVMMLFLTILGLGSAVSLTICGAGEELKGNKVPE
GSG-P2A リボソーム スキップペプチド (GSG-P2A)	108	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP
GSG-T2A リボソーム スキップペプチド (GSG-T2A)	109	GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP
25A10-V1 CAR	82	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDSLIH WVKQRPEQGLEWIGWIDPEDDKTKYAPKFQDKATLTADTSSNTAYLQLSTLTSED TAIYYCVSRYINYYFAYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPSSLT VTAGEKVTMSCKSSQSLLHSGNQRNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPD RFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYDYPYTFGGGTKLEIKGLAVSTISSFF PPGYQIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLS TATKDTYDALHMQALPPR
25A10-V2 CAR	83	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDSLIH WVKQRPEQGLEWIGWIDPEDDKTKYAPKFQDKATLTADTSSNTAYLQLSTLTSED TAIYYCVSRYINYYFAYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPSSLT VTAGEKVTMSCKSSQSLLHSGNQRNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPD RFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYDYPYTFGGGTKLEIKTTTPAPRPPT PAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY CKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
25A10-V3 CAR	84	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDSLIH WVKQRPEQGLEWIGWIDPEDDKTKYAPKFQDKATLTADTSSNTAYLQLSTLTSED TAIYYCVSRYINYYFAYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPSSLT VTAGEKVTMSCKSSQSLLHSGNQRNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPD RFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYDYPYTFGGGTKLEIKEPKSPDKTHT CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE EEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPR
29B4-V1 CAR	85	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSDYFMY WVRQTPEKRLEWVAIISDGGIYTYYPDSVKGRFTISRDNAKNNLYLQMSSLKSEDT AMYYCARDGRDDYDGWYFDVWGAGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMT QSHKFMSTSVGDRVNITCKASQDVNTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHAGV PDRFTGSGSGTDYALTISSVQAEDLALYYCQQHYSTPRTFGGGTKLEIKGLAVSTISS FFPPGYQIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED

10 20 30 40

		GCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQALPPR
29B4-V2 CAR	86	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSDYFMY WVRQTPEKRLEWVAIISDGGIYTYYPDSVKGRFTISRDNAKNNLYLQMSSLKSEDT AMYYCARDGRDDYDGWYFDVWGAGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMT QSHKFMSTSVGDRVNITCKASQDVNTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHAGV PDRFTGSGSGTDYALTISSVQAEDLALYYCQQHYSTPRTFGGGTKLEIKTTTPAPRP PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVI TLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADA PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
29B4-V3 CAR	87	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSDYFMY WVRQTPEKRLEWVAIISDGGIYTYYPDSVKGRFTISRDNAKNNLYLQMSSLKSEDT AMYYCARDGRDDYDGWYFDVWGAGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMT QSHKFMSTSVGDRVNITCKASQDVNTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHAGV PDRFTGSGSGTDYALTISSVQAEDLALYYCQQHYSTPRTFGGGTKLEIKEPKSPDKT HTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCR FPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQALPPR
16B5-V1 CAR	88	MALPVTALLLPLALLLHAARPQAYLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTFTSYNLH WVKQTPGQGLEWIGYIYPGNGGTNYNQKFKGKATLTADTSSSTAYMQISSLTSED SAVYFCARGGIYYYGSSLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSNIVLTQSP ASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGTTFMYWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPA RFSGSGSGTDFTLTIDPVEADDAATYYCQQNKEDPWTFGGGTKLEIKGLAVSTISS FFPPGYQIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED GCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQALPPR
16B5-V2 CAR	89	MALPVTALLLPLALLLHAARPQAYLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTFTSYNLH WVKQTPGQGLEWIGYIYPGNGGTNYNQKFKGKATLTADTSSSTAYMQISSLTSED SAVYFCARGGIYYYGSSLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSNIVLTQSP ASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGTTFMYWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPA RFSGSGSGTDFTLTIDPVEADDAATYYCQQNKEDPWTFGGGTKLEIKTTTPAPRPP TPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITL YCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPA YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKD KMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
16B5-V3 CAR	90	MALPVTALLLPLALLLHAARPQAYLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTFTSYNLH WVKQTPGQGLEWIGYIYPGNGGTNYNQKFKGKATLTADTSSSTAYMQISSLTSED SAVYFCARGGIYYYGSSLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSNIVLTQSP ASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGTTFMYWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPA RFSGSGSGTDFTLTIDPVEADDAATYYCQQNKEDPWTFGGGTKLEIKEPKSPDKT HTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN

		YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCR FPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQALPPR
10F7-V1 CAR	91	MALPVTALLLPLALLLHAARPQAYLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTFTSYNM HWVKQTPGQGLEWIGYIYPGNGGTNYNQKFKDKATLTADTSSSTAYMQISSLTSE DSAVYFCARGGQLGRPWFAYWGQGTLVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSNIVLTQ SPASLAASPGQRATISCRASESVDSYGNTFMYWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGV PVRFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYYCQQNNEDPWTFGGGTKVEIKGLAVSTI SSFFPPGYQIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE DGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALPPR
10F7-V2 CAR	92	MALPVTALLLPLALLLHAARPQAYLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTFTSYNM HWVKQTPGQGLEWIGYIYPGNGGTNYNQKFKDKATLTADTSSSTAYMQISSLTSE DSAVYFCARGGQLGRPWFAYWGQGTLVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSNIVLTQ SPASLAASPGQRATISCRASESVDSYGNTFMYWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGV PVRFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYYCQQNNEDPWTFGGGTKVEIKTTTPAP RPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSL VITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSAD APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
10F7-V3 CAR	93	MALPVTALLLPLALLLHAARPQAYLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTFTSYNM HWVKQTPGQGLEWIGYIYPGNGGTNYNQKFKDKATLTADTSSSTAYMQISSLTSE DSAVYFCARGGQLGRPWFAYWGQGTLVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSNIVLTQ SPASLAASPGQRATISCRASESVDSYGNTFMYWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGV PVRFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYYCQQNNEDPWTFGGGTKVEIKEPKSPD KTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC RFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTA TKDTYDALHMQALPPR
27B6-V1 CAR	94	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTSYNIDW VRQSPGKGLEWLGVIWSGGSTDYNAAFISRLKISKDDSKSQVFFKMNSLQSDDTA IYYCARHSPLVSTPDWYFDVWGAGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQSP AIMSASPGEKVTMTCSTSSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFS GSGSGTSYSLTINNMEAEDAATYSCQQWSSYPPTFGGGTKLEIKGLAVSTISSFFPP GYQIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC RFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTA TKDTYDALHMQALPPR
27B6-V2 CAR	95	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTSYNIDW VRQSPGKGLEWLGVIWSGGSTDYNAAFISRLKISKDDSKSQVFFKMNSLQSDDTA IYYCARHSPLVSTPDWYFDVWGAGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQSP AIMSASPGEKVTMTCSTSSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFS GSGSGTSYSLTINNMEAEDAATYSCQQWSSYPPTFGGGTKLEIKTTTPAPRPPTPA PTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCK

		RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQ QGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
27B6-V3 CAR	96	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTSYNIDW VRQSPGKGLEWLGVIWSGGSTDYNAAFISRLKISKDDSKSQVFFKMNSLQSDDTA IYYCARHSPLVSTPDWYFDVWGAGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQSP AIMSASPGEKVTMTCSTSSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFS GSGSGTSYSLTINNMEAEDAATYSCQQWSSYPPTFGGGTKLEIKEPKSPDKTHTCP PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE EGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGG KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY DALHMQALPPR
13F11-V1 CAR	97	MALPVTALLLPLALLLHAARPQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFKKYGMN WVKQAPGKGLKWMGWINTNTGEPTYAEEFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNE DTATYFCARWYYGSTPSSYTMDYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSETTV TQSPASLSVATGEKVTIRCITSTDIDDDMNWYQQKPGEPPKVLISEGNTLRPGVPS RFSSSGYGTDFVFTIENTLSEDVADYYCLQSNNMPYTFGGGTKLEIKGLAVSTISSFF PPGYQIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLS TATKDTYDALHMQALPPR
13F11-V2 CAR	98	MALPVTALLLPLALLLHAARPQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFKKYGMN WVKQAPGKGLKWMGWINTNTGEPTYAEEFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNE DTATYFCARWYYGSTPSSYTMDYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSETTV TQSPASLSVATGEKVTIRCITSTDIDDDMNWYQQKPGEPPKVLISEGNTLRPGVPS RFSSSGYGTDFVFTIENTLSEDVADYYCLQSNNMPYTFGGGTKLEIKTTTPAPRPPT PAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY CKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
13F11-V3 CAR	99	MALPVTALLLPLALLLHAARPQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFKKYGMN WVKQAPGKGLKWMGWINTNTGEPTYAEEFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNE DTATYFCARWYYGSTPSSYTMDYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSETTV TQSPASLSVATGEKVTIRCITSTDIDDDMNWYQQKPGEPPKVLISEGNTLRPGVPS RFSSSGYGTDFVFTIENTLSEDVADYYCLQSNNMPYTFGGGTKLEIKEPKSPDKTHT CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE EEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPR
28F5-V1 CAR	100	MALPVTALLLPLALLLHAARPQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTKYGMN WVKQTPGKGLKWMGWINTNSGEPTYAEEFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNE DTATYFCARGAYYRYDGEVSYYAMDYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS QIILTQSPAIMSASLGERVTMTCTATSSLSSSYLHWYQQKPGSSPKLWIYSTSHLAS

		GVPARFSGGGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQYHLSPYTFGGGTKLEIKGLAVST ISSFFPPGYQIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE DGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALPPR
28F5-V2 CAR	101	MALPVTALLLPLALLLHAARPQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTKYGMN WVKQTPGKGLKWMGWINTNSGEPTYAEEFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNE DTATYFCARGAYYRYDGEVSYYAMDYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS QIILTQSPAIMSASLGERVTMTCTATSSLSSSYLHWYQQKPGSSPKLWIYSTSHLAS GVPARFSGGGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQYHLSPYTFGGGTKLEIKTTTPAP RPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSL VITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSAD APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
28F5-V3 CAR	102	MALPVTALLLPLALLLHAARPQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTKYGMN WVKQTPGKGLKWMGWINTNSGEPTYAEEFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNE DTATYFCARGAYYRYDGEVSYYAMDYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS QIILTQSPAIMSASLGERVTMTCTATSSLSSSYLHWYQQKPGSSPKLWIYSTSHLAS GVPARFSGGGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQYHLSPYTFGGGTKLEIKEPKSPD KTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC RFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTA TKDTYDALHMQALPPR
GMB005-V1 CAR	103	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFNSFAMS WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGGTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYFCAKDKILWFGEPVFDYWGQGTLVTVSSASGGGGSGGGGSGGGGSEIVL TQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIKGLAVSTISSF FPPGYQIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGL STATKDTYDALHMQALPPR
GMB005-V2 CAR	104	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFNSFAMS WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGGTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYFCAKDKILWFGEPVFDYWGQGTLVTVSSASGGGGSGGGGSGGGGSEIVL TQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPT PAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY CKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
GMB005-V3 CAR	105	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFNSFAMS WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGGTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYFCAKDKILWFGEPVFDYWGQGTLVTVSSASGGGGSGGGGSGGGGSEIVL TQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIKEPKSPDKTH TCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD

		GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG KIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATK DTYDALHMQALPPR

【００４３】

好ましい態様によれば、本発明の抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、SEQ ID NO.82～84(25A10)、SEQ ID NO.100～102(28F5)、SEQ ID NO.97～99(13F11)、およびSEQ ID NO.88～90(16B5)より選択されるものと少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む。

【００４４】

より好ましい態様によれば、本発明の抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、SEQ ID NO.82～84(25A10)およびSEQ ID NO.100～102(28F5)より選択されるものと少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む。

【００４５】

より好ましい態様によれば、本発明の抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、SEQ ID NO.82～84(25A10)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む。

【００４６】

さらにより好ましい態様によれば、本発明の抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、SEQ ID NO.82(25A10-v1)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む。

【００４７】

より好ましい態様によれば、本発明の抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、SEQ ID NO.100～102(28F5)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む。

【００４８】

より好ましい態様によれば、本発明の抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、SEQ ID NO.97～99(13F11)より選択されるものと少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む。

【００４９】

本発明は、さらに具体的には、本願に記載のCARと、いくらかの同一性を示すCARを備え、前記CARの標的である細胞マーカーをコードする遺伝子に、レアカットエンドヌクレアーゼによって誘導された変異をもつ免疫細胞に関する（すなわち、CARは、前記の不活化された遺伝子の産物と親和性を示す）。同一性とは、FASTA、またはGCG配列解析パッケージ（University of Wisconsin, Madison, Wis.）の一部として入手可能なBLASTなどのソフトウェアによって確かめられたときに、少なくとも70％、好ましくは80％、より好ましくは90％、さらにより好ましくは95％のポリヌクレオチド同一性またはポリペプチド同一性を意味する。BLASTP「同一性」は、全残基に対する、同一の高スコア配列ペアの数および割合を示す。本明細書において開示されたアミノ酸配列と、これらの程度の同一性もしくは類似性または任意の中間の程度の同一性もしくは類似性を有するアミノ酸配列が本開示により意図され、本開示に包含される。同じことが、BLASTNを用いたポリヌクレオチド配列について適用される。

【００５０】

本発明はまた、例えば、以前に述べられた抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)を発現し、内因性CD38遺伝子が遺伝子不活化または変異されている操作された免疫細胞(好ましくは、T細胞)であって、前記CD38抗原が前記免疫細胞の表面と病的細胞の表面の両

方に存在する、操作された免疫細胞(好ましくは、T細胞)に関する。

【００５１】

好ましい態様において、前記操作された免疫細胞は抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)を発現し、前記免疫細胞は内因性CD38遺伝子およびTCR遺伝子が遺伝子不活化または変異されている。

【００５２】

態様において、前記操作された免疫細胞は抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)を発現し、前記免疫細胞は内因性CD38遺伝子、TCR遺伝子、およびdCK遺伝子が遺伝子不活化または変異されている。

【００５３】

好ましい態様において、前記操作された免疫細胞は、図8に図示したようなV1、V2、およびV3より選択されるポリペプチド構造のうち1つを有する抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)を発現し、前記構造は、モノクローナル抗CD38抗体に由来するVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメイン、CD3ζシグナル伝達ドメインおよび4-1BB由来共刺激ドメインを含む細胞質ドメインを含み、

前記V_HおよびV_Lは、それぞれ、SEQ ID NO.14および10(25A10)、SEQ ID NO.62および58(28F5)、SEQ ID NO.54および50(13F11)、SEQ ID NO.30および26(16B5)、SEQ ID NO.38および34(10F7)、SEQ ID NO.46および42(27B6)、またはSEQ ID NO.22および18(29B4)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含み、

前記免疫細胞(好ましくは、T細胞)は内因性CD38遺伝子が遺伝子不活化または変異されており、前記CD38抗原は前記免疫細胞の表面と病的細胞の表面の両方に存在する。

【００５４】

さらに好ましい態様において、前記操作された免疫細胞は、図8に図示したようなV1、V2、およびV3より選択されるポリペプチド構造のうち1つを有する抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)を発現し、前記構造は、モノクローナル抗CD38抗体に由来するVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメイン、CD3ζシグナル伝達ドメインおよび4-1BB由来共刺激ドメインを含む細胞質ドメインを含み、

前記V_HおよびV_Lは、それぞれ、SEQ ID NO.14および10(25A10)、SEQ ID NO.62および58(28F5)、SEQ ID NO.54および50(13F11)、SEQ ID NO.30および26(16B5)、SEQ ID NO.38および34(10F7)、SEQ ID NO.46および42(27B6)、またはSEQ ID NO.22および18(29B4)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含み、

前記免疫細胞(好ましくは、T細胞)は内因性CD38遺伝子およびTCR遺伝子が遺伝子不活化または変異されており、前記CD38抗原は前記免疫細胞の表面と病的細胞の表面の両方に存在する。

【００５５】

上記の態様において、前記遺伝子不活化または変異は、好ましくは、本発明に記載のような特異的レアカットエンドヌクレアーゼを用いることによって行われる。

【００５６】

本発明はまた、例えば、以前に述べられた抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)を発現し、内因性CD38遺伝子が遺伝子不活化または変異されている少なくとも2つの操作された免疫細胞(好ましくは、T細胞)を含む集団であって、前記CD38抗原が前記免疫細胞の表面と病的細胞の表面の両方に存在する、集団にも関する。

【００５７】

好ましい態様において、前記集団は、図8に図示したようなV1、V2、およびV3より選択されるポリペプチド構造のうち1つを有する抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)を発現する2つの操作された免疫細胞を含み、前記構造は、モノクローナル抗CD38抗体に由来するVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメイン、CD3ζシグナル伝達ドメインおよび41BB由来共刺激ドメインを含む細胞質ドメインを含み、

前記V_HおよびV_Lは、それぞれ、SEQ ID NO.14および10(25A10)、SEQ ID NO.62および58(28F5)、SEQ ID NO.54および50(13F11)、SEQ ID NO.30および26(16B5)、SEQ ID NO.38および34(10F7)、SEQ ID NO.46および42(27B6)、またはSEQ ID NO.22および18(29B4)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含み、

前記免疫細胞(好ましくは、T細胞)は内因性CD38遺伝子が遺伝子不活化または変異されており、前記CD38抗原は前記免疫細胞の表面と病的細胞の表面の両方に存在する。

【００５８】

細胞外ドメイン

本明細書で使用する「細胞外リガンド結合ドメイン」という用語は、リガンドに結合することができるオリゴペプチドまたはポリペプチドと定義される。好ましくは、このドメインは細胞表面分子と相互作用することができる。例えば、細胞外リガンド結合ドメインは、特定の疾患状態に関連する標的細胞の表面にある細胞表面マーカーとして働くリガンドを認識するように選択されてもよい。

【００５９】

単鎖可変抗体(scFv)

本発明の抗CD38 CARの抗原結合ドメインは、モノクローナル抗体、組換え抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、およびその機能的断片を含むが、これに限定されない、オフティシュー(off-tissue)抗原に結合する任意のドメインでよい。

【００６０】

本明細書で使用する「組換え抗体」という用語は、組換えDNA技術を用いて作製された抗体または抗体断片、例えば、バクテリオファージ、酵母発現系、または哺乳動物細胞発現系によって発現された抗体または抗体断片、特に、抗体のCDR領域をコードする核酸配列を含むウイルスベクターが形質導入されたT細胞によって発現された抗体または抗体断片を意味する。この用語はまた、抗体または抗体断片をコードするDNA分子の合成によって作製された抗体または抗体断片を意味するとも解釈されるはずであり、このDNA分子は、抗体もしくは抗体断片タンパク質、または抗体もしくは抗体断片を指定するアミノ酸配列を発現し、このDNA配列またはアミノ酸配列は、当技術分野において利用可能な、かつ周知の組換え技術または合成DNA配列技術もしくは合成アミノ酸配列技術を用いて得られている。

【００６１】

ヒト化抗体は、CDRグラフティング(例えば、それぞれ、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、欧州特許番号EP239,400;国際公開番号WO91/09967;および米国特許第5,225,539号、同第5,530,101号、および同第5,585,089号を参照されたい)、ベニアリング(veneering)またはリサーフェシング(resurfacing)(例えば、それぞれ、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、欧州特許番号EP592,106およびEP519,596; Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, Protein Engineering, 7(6):805-814;およびRoguska et al., 1994, PNAS, 91:969-973を参照されたい)、鎖シャッフリング(例えば、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,565,332号を参照されたい)、ならびに、例えば、それぞれ、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許出願公開第US2005/0042664号、米国特許出願公開第US2005/0048617号、米国特許第6,407,213号、米国特許第5,766,886号、国際公開番号WO9317105、Tan et al., J. Immunol., 169: 1119-25 (2002)、Caldas et al., Protein Eng., 13(5):353-60 (2000)、Morea et al., Methods, 20(3):267-79 (2000)、Baca et al., J. Biol. Chem., 272(16): 10678-84 (1997)、Roguska et al., Protein Eng., 9(10):895-904 (1996)、Couto et al., Cancer Res., 55 (23 Supp):5973s-5977s (1995)、Couto et al., Cancer Res., 55(8): 1717-22 (1995)、Sandhu J S, Gene, 150(2):409-10 (1994)、および Pedersen et al., J. Mol. Biol., 235(3):959-73 (1994)に開示される技法を含むが、これに限定されない当技術分野において公知の様々な技法を用いて生成することができる。多くの場合、抗原結合を変えるために、例えば、抗原結合を改善するために、

フレームワーク領域にあるフレームワーク残基は、CDRドナー抗体に由来する対応する残基で置換される。これらのフレームワーク置換は、当技術分野において周知の方法によって、例えば、抗原結合に重要なフレームワーク残基を特定するためにCDRおよびフレームワーク残基の相互作用をモデル化し、特定の位置にある珍しいフレームワーク残基を特定するために配列比較することによって特定される(例えば、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、Queen et al., 米国特許第5,585,089号;および Riechmann et al., 1988, Nature, 332:323を参照されたい)。

【００６２】

保存的アミノ酸置換は、アミノ酸残基が、似た側鎖を有するアミノ酸残基と取り替えられる置換である。似た側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーが当技術分野において定義されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖を有するアミノ酸(例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖を有するアミノ酸(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、無電荷極性側鎖を有するアミノ酸(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン)、無極性側鎖を有するアミノ酸(例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン)、β分枝側鎖を有するアミノ酸(例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン)、および芳香族側鎖を有するアミノ酸(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)が含まれる。従って、本発明のCARの中にある1つまたは複数のアミノ酸残基は、同じ側鎖ファミリーからの他のアミノ酸残基と取り替えることができ、変化したCARは、本明細書に記載の機能アッセイを用いてGD3に結合する能力について試験することができる。

【００６３】

一態様によれば、本発明の抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)はV_H可変鎖およびV_L可変鎖を含み、このV_H可変鎖およびV_L可変鎖のポリペプチド配列は、それぞれ、SEQ ID NO.14および10(25A10)、SEQ ID NO.62および58(28F5)、SEQ ID NO.54および50(13F11)、SEQ ID NO.30および26(16B5)、SEQ ID NO.38および34(10F7)、SEQ ID NO.46および42(27B6)、またはSEQ ID NO.22および18(29B4)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示す。

【００６４】

抗CD38 VH鎖およびVL鎖ならびにそれぞれの対応するCDRの前記の上記配列を以下の表2に示した。

【００６５】

(表２)8組のscFv 抗CD38抗体のVH鎖およびVL鎖の配列ならびにそれぞれのCDRの配列

名前	VH鎖またはVL鎖	SEQ ID #	ポリペプチド配列または核酸配列
25A10	VL	10	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLHSGNQRNYLT WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTL TISSVQAEDLAVYYCQNDYDYPYTFGGGTKLEIK
	CDR1	11	QSLLHSGNQRNY
	CDR2	12	WAS
	CDR3	13	QNDYDYPYT
	VH	14	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDSLIHWVKQR PEQGLEWIGWIDPEDDKTKYAPKFQDKATLTADTSSNTA YLQLSTLTSEDTAIYYCVSRYINYYFAYWGQGTTLTVSS
	CDR1	15	GFNIKDSL
	CDR2	16	IDPEDDKT
	CDR3	17	VSRYINYYFAY
29B4	VL	18	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVNITCKASQDVNTAVAWYQ QKPGQSPKLLIYWASTRHAGVPDRFTGSGSGTDYALTISS VQAEDLALYYCQQHYSTPRTFGGGTKLEIK
	CDR1	19	QDVNTA
	CDR2	20	WAS
	CDR3	21	QQHYSTPRT
	VH	22	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSDYFMYWVRQ TPEKRLEWVAIISDGGIYTYYPDSVKGRFTISRDNAKNNLYL QMSSLKSEDTAMYYCARDGRDDYDGWYFDVWGAGTTV TVSS
	CDR1	23	GFTFSDYF
	CDR2	24	ISDGGIYT
	CDR3	25	ARDGRDDYDGWYFDV
16B5	VL	26	NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGTTFMYWY QQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTIDP VEADDAATYYCQQNKEDPWTFGGGTKLEIK
	CDR1	27	ESVDNYGTTF
	CDR2	28	LAS
	CDR3	29	QQNKEDPWT
	VH	30	QAYLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTFTSYNLHWVK QTPGQGLEWIGYIYPGNGGTNYNQKFKGKATLTADTSSS TAYMQISSLTSEDSAVYFCARGGIYYYGSSLDYWGQGTTL TVSS
	CDR1	31	GYTFTSYN

	CDR2	32	IYPGNGGT
	CDR3	33	ARGGIYYYGSSLDY
10F7	VL	34	NIVLTQSPASLAASPGQRATISCRASESVDSYGNTFMYWY QQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPVRFSGSGSRTDFTLTIDP VEADDAATYYCQQNNEDPWTFGGGTKVEIK
	CDR1	35	ESVDSYGNTF
	CDR2	36	LAS
	CDR3	37	QQNNEDPWT
	VH	38	QAYLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVK QTPGQGLEWIGYIYPGNGGTNYNQKFKDKATLTADTSSS TAYMQISSLTSEDSAVYFCARGGQLGRPWFAYWGQGTL VTVSA
	CDR1	39	GYTFTSYN
	CDR2	40	IYPGNGGT
	CDR3	41	ARGGQLGRPWFAY
27B6	VL	42	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSTSSSVSYMHWYQQKS GTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTINNMEA EDAATYSCQQWSSYPPTFGGGTKLEIK
	CDR1	43	SSVSY
	CDR2	44	DTS
	CDR3	45	QQWSSYPPT
	VH	46	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTSYNIDWVRQS PGKGLEWLGVIWSGGSTDYNAAFISRLKISKDDSKSQVFF KMNSLQSDDTAIYYCARHSPLVSTPDWYFDVWGAGTTV TVSS
	CDR1	47	GFSLTSYN
	CDR2	48	IWSGGST
	CDR3	49	ARHSPLVSTPDWYFDV
13F11	VL	50	ETTVTQSPASLSVATGEKVTIRCITSTDIDDDMNWYQQKP GEPPKVLISEGNTLRPGVPSRFSSSGYGTDFVFTIENTLSED VADYYCLQSNNMPYTFGGGTKLEIK
	CDR1	51	TDIDDD
	CDR2	52	EGN
	CDR3	53	LQSNNMPYT
	VH	54	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFKKYGMNWVKQ APGKGLKWMGWINTNTGEPTYAEEFKGRFAFSLETSAST AYLQINNLKNEDTATYFCARWYYGSTPSSYTMDYWGQG TSVTVSS
	CDR1	55	GYTFKKYG
	CDR2	56	INTNTGEP
	CDR3	57	ARWYYGSTPSSYTMDY
28F5	VL	58	QIILTQSPAIMSASLGERVTMTCTATSSLSSSYLHWYQQKP GSSPKLWIYSTSHLASGVPARFSGGGSGTSYSLTISSMEAE DAATYYCHQYHLSPYTFGGGTKLEIK
	CDR1	59	SSLSSSY
	CDR2	60	STS
	CDR3	61	HQYHLSPYT
	VH	62	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTKYGMNWVKQ TPGKGLKWMGWINTNSGEPTYAEEFKGRFAFSLETSAST AYLQINNLKNEDTATYFCARGAYYRYDGEVSYYAMDYWG

			QGTSVTVSS
	CDR1	63	GYTFTKYG
	CDR2	64	INTNSGEP
	CDR3	65	ARGAYYRYDGEVSYYAMDY
GMB005	VL	66	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDF AVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIK
	CDR1	67	QSVSSY
	CDR2	68	DAS
	CDR3	69	QQRSNWPPT
	VH	70	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFNSFAMSWVRQ APGKGLEWVSAISGSGGGTYYADSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYFCAKDKILWFGEPVFDYWGQGTL VTVSSAS
	CDR1	71	GFTFNSFA
	CDR2	72	ISGSGGGT
	CDR3	73	AKDKILWFGEPVFDY

【００６６】

好ましい態様によれば、本発明の抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)はV_H可変鎖およびV_L可変鎖を含み、このV_H可変鎖およびV_L可変鎖のポリペプチド配列は、それぞれ、SEQ ID NO.14および10(25A10)、SEQ ID NO.62および58(28F5)、SEQ ID NO.54および50(13F11)、またはSEQ ID NO.30および26(16B5)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示す。

【００６７】

さらに好ましい態様によれば、本発明の抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)はV_H可変鎖およびV_L可変鎖を含み、このV_H可変鎖およびV_L可変鎖のポリペプチド配列は、それぞれ、SEQ ID NO.14および10(25A10)またはSEQ ID NO.62および58(28F5)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示す。

【００６８】

一態様によれば、本発明の抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)はV_H可変領域およびV_L可変領域を含み、このV_H可変領域およびV_L可変領域は、それぞれ、SEQ ID NO.15～17およびSEQ ID NO.11～13;それぞれ、SEQ ID NO.63～65およびSEQ ID NO.59～62;それぞれ、SEQ ID NO.55～57およびSEQ ID NO.51～53;それぞれ、SEQ ID NO.31～33およびSEQ ID NO.27～29;それぞれ、SEQ ID NO.39～42およびSEQ ID NO.35～37;それぞれ、SEQ ID NO.47～49およびSEQ ID NO.43～45、またはそれぞれ、SEQ ID NO.23～25およびSEQ ID NO.19～22のCDR配列を含有する。

【００６９】

好ましい態様において、本発明の抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)はV_H可変領域およびV_L可変領域を含み、このV_H可変領域およびV_L可変領域は、それぞれ、SEQ ID NO.15～17およびSEQ ID NO.11～13;それぞれ、SEQ ID NO.63～65およびSEQ ID NO.59～62;それぞれ、SEQ ID NO.55～57およびSEQ ID NO.51～53、またはそれぞれ、SEQ ID NO.31～33のCDR配列を含有する。

【００７０】

さらに好ましい態様において、本発明の抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)はV_H可変領域およびV_L可変領域を含み、V_H可変領域およびV_L可変領域は、それぞれ、SEQ ID NO.15～17およびSEQ ID NO.11～13、またはそれぞれ、SEQ ID NO.63～65およびSEQ ID NO.59～62のCDR配列を含む。

【００７１】

病的細胞とT細胞に共通して見られる抗原マーカー、例えば、CD38を標的とするCARに加

えて、T細胞特異性を増強するために、必ずT細胞が発現するとは限らない他の抗原マーカーに対して向けられた、さらなるCARを発現させることが考えられる。

【００７２】

別の態様において、本発明は、それぞれが、異なる細胞外リガンド結合ドメインを含むCARの集団に関する。特定の態様において、本発明は、免疫細胞を準備する工程、および前記細胞の表面に、それぞれが、異なる細胞外リガンド結合ドメインを含むCARの集団を発現させる工程を含む、免疫細胞を操作する方法に関する。

【００７３】

多重特異性細胞を作り出すために、T細胞がさらに発現することができるキメラ抗原受容体の例は、多発性骨髄腫またはリンパ芽球性白血病の抗原マーカー、例えば、TNFRSF17（UNIPROT Q02223）、SLAMF7（UNIPROT Q9NQ25）、GPRC5D（UNIPROT Q9NZD1）、FKBP11（UNIPROT Q9NYL4）、KAMP3、ITGA8（UNIPROT P53708）、およびFCRL5（UNIPROT Q68SN8）に対して向けられた抗原受容体である。

【００７４】

CD38に加えて別の特異性を付与することに関するさらなる例として、標的の抗原は、分化分子（例えば、CD16、CD64、CD78、CD96、CLL1、CD116、CD117、CD71、CD45、CD71、CD123、およびCD138）、腫瘍関連表面抗原、例えば、ErbB2（HER2/neu）、がん胎児抗原（CEA）、上皮細胞接着分子（EpCAM）、上皮増殖因子受容体（EGFR）、EGFR変種III（EGFRvIII）、CD19、CD20、CD30、CD40、ジシアロガングリオシドGD2、管上皮ムチン（mucine）、gp36、TAG-72、スフィンゴ糖脂質、神経膠腫関連抗原、β-ヒト絨毛性ゴナドトロピン、αフェトプロテイン（AFP）、レクチン反応性AFP、チログロブリン、RAGE-1、MN-CA IX、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、RU1、RU2（AS）、腸カルボキシルエステラーゼ、mut hsp70-2、M-CSF、プロスターゼ（prostase）、プロスターゼ特異的抗原（PSA）、PAP、NY-ESO-1、LAGA-1a、p53、プロステイン（prostein）、PSMA、生存（surviving）およびテロメラーゼ、前立腺がん腫瘍抗原-1（PCTA-1）、MAGE、ELF2M、好中球エラスターゼ、エフリンB2、CD22、インシュリン増殖因子（IGF1）-I、IGF-II、IGFI受容体、メソテリン、腫瘍特異的ペプチドエピトープを提示する主要組織適合遺伝子複合体（MHC）分子、5T4、ROR1、Nkp30、NKG2D、腫瘍間質抗原、フィブロネクチンのエクストラドメイン（extra domain）A（EDA）およびエクストラドメインB（EDB）、ならびにテネイシン-CのA1ドメイン（TnC A1）および線維芽細胞関連タンパク質（fap）、細胞系列特異的抗原または組織特異的抗原、例えば、CD3、CD4、CD8、CD24、CD25、CD33、CD34、CD133、CD138、CTLA-4、B7-1（CD80）、B7-2（CD86）、GM-CSF、サイトカイン受容体、エンドグリン、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）分子、BCMA（CD269、TNFRSF17）、またはウイルス特異的表面抗原、例えば、HIV特異的抗原（例えば、HIV gp120）、EBV特異的抗原、CMV特異的抗原、HPV特異的抗原、ラッセ（Lasse）ウイルス特異的抗原、インフルエンザウイルス特異的抗原、ならびにこれらの表面マーカーの任意の誘導体または変種の任意のクラスターに由来してもよい。抗原は必ずしも表面マーカー抗原とは限らず、細胞表面においてHLAクラスIが提示する内因性の小さな抗原でもよい。

【００７５】

がん細胞では標的抗原のダウンレギュレーションまたは変異がよく観察され、抗原消失エスケープ変種(antigen loss escape variant)を作り出す。従って、腫瘍エスケープを相殺し、標的に対する免疫細胞の特異性をさらに大きくするために、本発明によるCD38特異的CARは、標的にある異なる要素に同時に結合し、それによって、免疫細胞の活性化および機能を高めるために別の細胞外リガンド結合ドメインを含んでもよい。

【００７６】

一態様において、細胞外リガンド結合ドメインは、同じ膜貫通ポリペプチド上にタンデムに置かれてもよく、任意で、リンカーによって分けられてもよい。別の態様において、前記の異なる細胞外リガンド結合ドメインは、CARを構成する異なる膜貫通ポリペプチド上に置かれてもよい。

【００７７】

CD38に対して低親和性のCAR

別の態様によれば、本発明の抗CD38は、CD38抗原に対して低親和性のscFvを含む。

【００７８】

このようなCARは、このような操作された免疫細胞のインビボでの使用に関連する、起こり得る毒性リスクを阻止するように設計されている。

【００７９】

「親和性」とは、抗体と単純なハプテンまたは抗原決定基との間の結合強度の尺度を意味する。理論に拘束されるものではないが、親和性は、抗体結合部位と抗原決定基との間の立体化学的なはまり具合の密接さ、これらの間の接触領域の大きさ、ならびに荷電基および疎水基の分布に左右される。親和性はまた、可逆的複合体が形成した後に結合した抗原-抗体の強度を指す「アビディティ」という用語も含む。抗原に対する抗体の親和性を計算するための方法は、親和性を計算するための結合実験の使用を含めて当技術分野において公知である。抗体(Ab)が抗原(Ag)に結合する場合、親和定数が用いられる(解離定数の逆数で表される)。AbAg=AbAgKa=[AbAca=1[Ab)][Ag]K。抗体結合の化学平衡はまた、オンレート(k forward)定数とオフレート(k back)定数の比でもある。2種類の抗体が同じ親和性を有する場合があるが、一方は高いオンレート定数とオフレート定数を有する場合があり、他方は低いオンレート定数とオフレート定数を有する場合がある。=k forward=オンレートk backオフレート。機能アッセイ(例えば、細胞溶解アッセイ)における抗体活性も抗体親和性を反映する。本発明の様々な態様において、抗原認識受容体の親和性が低い。低親和性はマイクロモルおよびナノモル親和性(例えば、10^{-5}、$5x10^{-6}$、10^{-6}、$5x10^{-7}$、10^{-7}、$5x10^{-8}$、10^{-8}、$5x10^{-9}$、10^{-9}M)を含む。抗体および親和性は機能アッセイ(例えば、細胞溶解アッセイ)を用いて表現型的に特徴付け、比較することができる。

【００８０】

本発明はまた、CD38抗原に対して低親和性の抗CD38 CAR、例えば、scFvの中に、モノクローナル2C2、5G9、9E2、28B9、26D8、15D1、および23F2抗体に対応するVH鎖およびVL鎖を含む抗CD38 CARも包含する。

【００８１】

好ましい一態様によれば、前記のCD38抗原に対して低親和性の抗CD38 CARは、scFvの中に、モノクローナル2C2抗体または5G9抗体(m2C2およびm5G9とも呼ぶ)に対応するVH鎖およびVL鎖を含む。

【００８２】

態様によれば、CD38抗原に対して低親和性を示す前記scFvのV_HおよびV_Lは、それぞれ、
SEQ ID NO. 132
(EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCATSGFTFSDYYMFWVRQTPEKRLEWVAYISNGDGNTYYPDTLKGRFTISRDNANNT
LYLQMSRLKSEDTAMYYCARSISRYFDVWGAGTTVTVSS) および SEQ ID NO. 133
(DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQSISDFLHWYQQKSHESPRLLIKYVSQSISGIPSRFSGSGSGSDFTLSINSVEPED
VGVYYCQNAHSFPSTFGGGTKLEIK)

のm2C2抗体のVH鎖およびVL鎖;または、それぞれ、
SEQ ID NO.134
(EIHLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDYNIYWVKQSHGESLEWVGYIDPYNGGAYYNQKFKAMATLTVDKSSST
AFMHLNSLTSEDSAVYYCARKGVYGLAYWGQGTLVTVSS) および SEQ ID NO.135
(DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASESIYSNLAWYQQKQGKSPQLLVYASTHLADGVPSRFSGSGSGAQYSLKINSLQ
SEDFGSYYCQHFWGTPYTFGGGTKLEIK)

のm5G9抗体のVH鎖およびVL鎖;または、それぞれ、

SEQ ID NO.142
(EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTDYNMNWVKQSNGKSLEWIGNIDPDYGGTTYNQKFKGKATLTVDKSSS
TAYMQLRSLTSEDSAVYYCARSGYRYGFVYWGQGTLVTVSA) および SEQ ID NO.143
(DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLHSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLRIS
RVEAEDVGVYYCAQNLELPWTFGGGTKLEIK)

のm9E2抗体のVH鎖およびVL鎖、または、それぞれ、
SEQ ID NO.144
(EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDDYLHWMKQRPEQGLEWIGRIDPANGNTKSDPKFQDKATIDADTSSN
TAYLQLNSLTSEDTAVYYCAKGPWFPYWGQGTLVTVSA) および SEQ ID NO.145
(DIQMTQSPASQSASLGESVTITCLASQTIGTWLAWYQQKPGKSPQLLIYAATSLADGVPSRFSGSGSGTKFSFKISSLQA
EDFVSYHCQQLYRTPLTFGGGTKLEIK)

のm28B9抗体のVH鎖およびVL鎖、または、それぞれ、
SEQ ID NO.146
(QVQLQQPGAEMVRPGASVKLSCKASGYTFTDYWMHWVKQRPGQGLEWIGKIDPSDSETHYHQKFKDKATLTVDKS
SSTAYLQFKSLTSEDSAVHYCAREGIWLRYAMDYWGQGTSVTVSS) および SEQ ID NO.147
(DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTDFTLTVSS
VQSEDLAEYFCQQYNSYPYTFGGGTKLEIK)

のm26D8抗体のVH鎖およびVL鎖、または、それぞれ、
SEQ ID NO.148
(EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCRASGYSITDYNMHWVKQSHGKSLEWIGYIDPDNGATNNNQKFKGKATLTVDKSS
STAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSEGYQYYYAMDYWGQGTSVTVSS) および SEQ ID NO.149
(DIVMTQAAFSNPVALGTSASISCSSSKSLLHSNGITYLHWYLQRPGQSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLRI
SRVEAEDVGVYYCAQMVERPWTFGGGTKLEIK)

のm15D1抗体のVH鎖およびVL鎖、または、それぞれ、
SEQ ID NO.150
(QVQVQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWINWVKQRPGQGLEWIGNIYPGSSSTNHNEKFKSKATLTVDTSSST
AYMQLSSLTSDDSAVYYCARRGSSPSYTMDYWGQGTSVTVSS) および SEQ ID NO.151
(DIVLTQSPASLAVALGQRATISCRASKSVSTFGYSYMHWYQQKPGQAPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLKIH
PVEEEDAATYYCLHSRELPWTFGGGTKLEIK)

のm23F2抗体のVH鎖およびVL鎖と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む。

【００８３】

好ましい態様によれば、CD38抗原に対して低親和性を示す前記scFvのV_HおよびV_Lは、それぞれ、

SEQ ID NO. 132
(EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCATSGFTFSDYYMFWVRQTPEKRLEWVAYISNGDGNTYYPDTLKGRFTISRDNANNT
LYLQMSRLKSEDTAMYYCARSISRYFDVWGAGTTVTVSS) および SEQ ID NO. 133
(DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQSISDFLHWYQQKSHESPRLLIKYVSQSISGIPSRFSGSGSGSDFTLSINSVEPED
VGVYYCQNAHSFPSTFGGGTKLEIK)

のm2C2抗体のVH鎖およびVL鎖;および、それぞれ、
SEQ ID NO.134
(EIHLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDYNIYWVKQSHGESLEWVGYIDPYNGGAYYNQKFKAMATLTVDKSSST
AFMHLNSLTSEDSAVYYCARKGVYGLAYWGQGTLVTVSS) および SEQ ID NO.135
(DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASESIYSNLAWYQQKQGKSPQLLVYASTHLADGVPSRFSGSGSGAQYSLKINSLQ
SEDFGSYYCQHFWGTPYTFGGGTKLEIK)

のm5G9抗体のVH鎖およびVL鎖と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む。

【００８４】

一態様によれば、本発明のCD38抗原に対して低親和性の抗CD38 CARは、モノクローナル抗CD38抗体に由来するVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメイン、シグナル伝達ドメイン、好ましくは、CD3ζシグナル伝達ドメイン、および共刺激ドメイン、好ましくは、4-1BBに由来する共刺激ドメインを含む細胞質ドメインを含み、

前記V_HおよびV_Lは、それぞれ、
SEQ ID NO. 132
(EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCATSGFTFSDYYMFWVRQTPEKRLEWVAYISNGDGNTYYPDTLKGRFTISRDNANNT
LYLQMSRLKSEDTAMYYCARSISRYFDVWGAGTTVTVSS) および SEQ ID NO. 133
(DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQSISDFLHWYQQKSHESPRLLIKYVSQSISGIPSRFSGSGSGSDFTLSINSVEPED
VGVYYCQNAHSFPSTFGGGTKLEIK)

のm2C2抗体のVH鎖およびVL鎖;ならびに、それぞれ、
NO.134
(EIHLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDYNIYWVKQSHGESLEWVGYIDPYNGGAYYNQKFKAMATLTVDKSSST
AFMHLNSLTSEDSAVYYCARKGVYGLAYWGQGTLVTVSS) および SEQ ID NO.135
(DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASESIYSNLAWYQQKQGKSPQLLVYASTHLADGVPSRFSGSGSGAQYSLKINSLQ
SEDFGSYYCQHFWGTPYTFGGGTKLEIK).

のm5G9抗体のVH鎖およびVL鎖と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む。

【００８５】

特定の態様によれば、抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、図8に図示したようなV1、V2、およびV3より選択されるポリペプチド構造のうち1つを有し、前記構造は、モノクローナル抗CD38抗体に由来するVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメイン、CD3ζシグナル伝達ドメインおよび4-1BB由来共刺激ドメインを含む細胞質ドメインを含み、

前記V_HおよびV_Lは、それぞれ、

SEQ ID NO. 132
(EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCATSGFTFSDYYMFWVRQTPEKRLEWVAYISNGDGNTYYPDTLKGRFTISRDNANNT
LYLQMSRLKSEDTAMYYCARSISRYFDVWGAGTTVTVSS) および SEQ ID NO. 133
(DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQSISDFLHWYQQKSHESPRLLIKYVSQSISGIPSRFSGSGSGSDFTLSINSVEPED
VGVYYCQNAHSFPSTFGGGTKLEIK)

のm2C2抗体のVH鎖およびVL鎖;ならびに、それぞれ、
SEQ ID NO.134
(EIHLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDYNIYWVKQSHGESLEWVGYIDPYNGGAYYNQKFKAMATLTVDKSSST
AFMHLNSLTSEDSAVYYCARKGVYGLAYWGQGTLVTVSS) および SEQ ID NO.135
(DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASESIYSNLAWYQQKQGKSPQLLVYASTHLADGVPSRFSGSGSGAQYSLKINSLQ
SEDFGSYYCQHFWGTPYTFGGGTKLEIK)

のm5G9抗体のVH鎖およびVL鎖と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む。

【００８６】

さらに特定の態様によれば、本発明の抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、SEQ ID NO.136～138(それぞれm5G9バージョンV1、V2、およびV3に対応する)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む。

【００８７】

別のさらに特定の態様によれば、本発明の抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、SEQ ID NO.139～141(それぞれm2C2バージョンV1、V2、およびV3に対応する)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む。

【００８８】

別の態様によれば、本発明の免疫細胞は、CD38抗原に対して低親和性の抗CD38 CARを発現するように操作されている。

【００８９】

別の態様によれば、CD38抗原に対して低親和性の抗CD38 CARを発現するように操作された免疫細胞は、ノックアウトによって、好ましくは、レアカットエンドヌクレアーゼを用いることによって内因性CD38遺伝子が不活化されるように、さらに操作されている。

【００９０】

膜貫通ドメイン

本発明によるCARは細胞の表面膜上に発現される。従って、このようなCARは膜貫通ドメインをさらに含む。適切な膜貫通ドメインの際立った特徴は、細胞、好ましくは本発明では免疫細胞、特に、リンパ球細胞またはナチュラルキラー(NK)細胞の表面に発現できることと、免疫細胞の細胞応答を予め規定された標的細胞に向けるように一緒に相互作用できることを含む。膜貫通ドメインは天然供給源に由来してもよく、合成供給源に由来してもよい。膜貫通ドメインは任意の膜結合タンパク質または膜貫通タンパク質に由来してよい。非限定的な例として、膜貫通ポリペプチドは、α、β、γ、またはεなどのT細胞受容体のサブユニット、CD3複合体を構成するポリペプチド、IL2受容体p55(α鎖)、p75(β鎖)、またはγ鎖、Fc受容体、特に、Fcγ受容体IIIまたはCDタンパク質のサブユニット鎖でもよい。または、膜貫通ドメインは合成でもよく、主として疎水性残基、例えば、ロイシンおよびバリンを含んでもよい。好ましい態様において、前記膜貫通ドメインはヒトCD8α鎖(例えば、NP_001139345.1)に由来する。

【００９１】

本発明によるCARは、一般的に、SEQ ID NO.79と少なくとも90％、少なくとも95％、少

なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示す、CD8αおよび4-1BB、さらに具体的にはCD8αなどの膜貫通ドメイン(TM)をさらに含む。

【００９２】

膜貫通ドメインは、前記細胞外リガンド結合ドメインと前記膜貫通ドメインの間にヒンジ領域をさらに含んでもよい。

【００９３】

ヒンジ

本明細書において用いられる「ヒンジ領域」という用語は、一般的に、膜貫通ドメインを細胞外リガンド結合ドメインに連結するように機能する任意のオリゴペプチドまたはポリペプチドを意味する。特に、ヒンジ領域は、細胞外リガンド結合ドメインの可動性および接近性を大きくするために用いられる。ヒンジ領域は、300アミノ酸まで、好ましくは10～100アミノ酸、最も好ましくは25～50アミノ酸を含んでもよい。ヒンジ領域は、天然分子の全てまたは一部、例えば、CD8、CD4、もしくはCD28の細胞外領域の全てもしくは一部、または抗体定常領域の全てもしくは一部に由来してもよい。または、ヒンジ領域は、天然ヒンジ配列に対応する合成配列でもよく、完全に合成のヒンジ配列でもよい。好ましい態様において、前記ヒンジドメインは、本明細書においてSEQ ID NO.77と呼ばれるヒトCD8α鎖、本明細書においてSEQ ID NO.76と呼ばれるFcγRIIIα受容体、もしくは本明細書においてSEQ ID NO.78と呼ばれるIgG1の一部、またはこれらのポリペプチドと好ましくは少なくとも80％、より好ましくは少なくとも90％、95％、97％、または99％の配列同一性を示すヒンジポリペプチドを含む。

【００９４】

細胞内ドメイン

本発明によるCARのシグナル伝達ドメインまたは細胞内シグナル伝達ドメインは、細胞外リガンド結合ドメインが標的に結合した後に、免疫細胞および免疫応答を活性化する細胞内シグナル伝達を担う。言い換えると、シグナル伝達ドメインは、CARが発現している免疫細胞の正常エフェクター機能の少なくとも1つの活性化を担う。例えば、T細胞のエフェクター機能は、細胞溶解活性、またはサイトカイン分泌を含むヘルパー活性でもよい。従って、「シグナル伝達ドメイン」という用語は、エフェクターシグナル機能シグナルを伝達し、特殊化した機能を実行するように細胞を方向付けるタンパク質部分を指す。

【００９５】

CARにおいて使用するためのシグナル伝達ドメインの好ましい例は、抗原受容体結合後にシグナル伝達を開始するために協調して働く、T細胞受容体および補助受容体の細胞質配列、ならびにこれらの配列の任意の誘導体または変種、および同じ機能をもつ任意の合成配列でもよい。シグナル伝達ドメインは、抗原依存的一次活性化を開始する細胞質シグナル伝達配列と、二次シグナルまたは共刺激シグナルを供給するように抗原非依存的に働く細胞質シグナル伝達配列である2つの別々のクラスの細胞質シグナル伝達配列を含む。一次細胞質シグナル伝達配列は、ITAMの免疫受容体チロシンベース活性化モチーフとして知られるシグナル伝達モチーフを含んでもよい。ITAMは、syk/zap70クラスチロシンキナーゼの結合部位として役立つ、様々な受容体の細胞質内テールにおいて発見された詳細に明らかにされたシグナル伝達モチーフである。本発明において用いられるITAMの例には、非限定的な例として、TCRζ、FcRγ、FcRβ、FcRε、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD5、CD22、CD79a、CD79b、およびCD66dに由来するITAMが含まれ得る。好ましい態様において、CARのシグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO:81のアミノ酸配列と少なくとも70％、好ましくは少なくとも80％、より好ましくは少なくとも90％、95％、97％、または99％の配列同一性を有するアミノ酸配列のアミノ酸配列を有するCD3ζシグナル伝達ドメインを含んでもよい。

【００９６】

特定の態様において、本発明のCARのシグナル伝達ドメインは共刺激シグナル分子を含む。共刺激分子は、効率的な免疫応答に必要な、抗原受容体またはそのリガンド以外の細胞表面分子である。「共刺激リガンド」とは、T細胞上のコグネイト共刺激分子に特異的

に結合し、それによって、一次シグナル、例えば、TCR/CD3複合体と、ペプチドが搭載されたMHC分子との結合によって供給される一次シグナルに加えて、増殖活性化、分化などを含むが、これに限定されないT細胞応答を媒介するシグナルを供給する抗原提示細胞上の分子を指す。共刺激リガンドには、CD7、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、誘導性共刺激リガンド(inducible costimulatory ligand)(ICOS-L)、細胞間接着分子(ICAM、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、M1CB、HVEM、リンホトキシンβ受容体、3/TR6、ILT3、ILT4、Tollリガンド受容体に結合するアゴニストまたは抗体、およびB7-H3と特異的に結合するリガンドが含まれ得るが、これに限定されない。共刺激リガンドはまた、特に、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LTGHT、NKG2C、B7-H3、およびCD83に特異的に結合するリガンドなどがあるが、これに限定されない、T細胞上に存在する共刺激分子に特異的に結合する抗体も包含する。

【００９７】

「共刺激分子」とは、共刺激リガンドに特異的に結合し、それによって、増殖などがあるが、これに限定されない細胞による共刺激応答を媒介する、T細胞上のコグネイト結合パートナーを指す。共刺激分子には、MHCクラスI分子、BTLA、およびTollリガンド受容体が含まれるが、これに限定されない。共刺激分子の例には、CD27、CD28、CD8、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、およびCD83に特異的に結合するリガンドなどが含まれる。

【００９８】

好ましい態様において、本発明のCARのシグナル伝達ドメインは、4-1BB(GenBank:AAA53133.)およびCD28(NP_006130.1)の断片からなる群より選択される共刺激シグナル分子の一部を含む。特に、本発明のCARのシグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO:80からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも70％、好ましくは少なくとも80％、より好ましくは少なくとも90％、95％、97％、または99％の配列同一性を含むアミノ酸配列を含む。

【００９９】

マルチサブユニットCAR

T細胞に導入される先行技術のキメラ抗原受容体は、シグナル伝達ドメインの連続付加を必要とする単鎖ポリペプチドから形成された。しかしながら、シグナル伝達ドメインがその自然の膜近傍位置から動くと、その機能が妨げられる可能性がある。この欠点を克服するために、出願人は、最近、全ての関係するシグナル伝達ドメインの正常な膜近傍位置を可能にするために、FcεRIに由来する多鎖CARを設計した（図18）。この新たな構造では、FcεRIα鎖の高親和性IgE結合ドメインは、T細胞特異性を細胞標的に再誘導するためにscFvなどの細胞外リガンド結合ドメインと交換され、共刺激シグナルを正常な膜近傍位置に配置するためにFcεRIβ鎖のN末端テールおよび/またはC末端テールが用いられる。多鎖CAR（mcCAR）構築物は図19に示されるようなポリシストロニックな構造を有していてもよい。

【０１００】

従って、本発明による操作されたT細胞が発現するCARは、特に、本発明の操作されたT細胞の作製および増殖に合わせられた多鎖キメラ抗原受容体（CAR）でもよい。このような多鎖CARは、以下の成分：

（a）FcεRIα鎖の膜貫通ドメインおよび細胞外リガンド結合ドメインを含む1つのポリペプチド、

（b）FcεRIβ鎖のN末端細胞質テールおよびC末端細胞質テールの一部ならびに膜貫通ドメインを含む1つのポリペプチド、ならびに/または

（c）それぞれが、FcεRIγ鎖の細胞質内テールの一部および膜貫通ドメイン含み、異なるポリペプチドが自発的に一緒になって多量体化して二量体CAR、三量体CAR、または四量体CARを形成する、少なくとも2つのポリペプチド

の少なくとも2つを含む。

【０１０１】

このような構造によれば、リガンド結合ドメインおよびシグナル伝達ドメインは、別個のポリペプチドに載って運ばれる。異なるポリペプチドは近接して膜内に固定されるので、互いに相互作用することが可能になる。このような構造では、シグナル伝達ドメインおよび共刺激ドメインは、膜近傍位置にあってもよい（すなわち、細胞膜に隣接し、細胞膜の内側にあってもよい）。これは、共刺激ドメインの機能の改善を可能にすると考えられる。このマルチサブユニット構造はまた、さらに大きな融通性と、T細胞活性化をさらに厳密に制御するCARを設計する可能性ももたらす。例えば、多重特異性CAR構造を得るために、異なる特異性を有するいくつかの細胞外抗原認識ドメインを含めることも可能である。多鎖CARの中に入る異なるサブユニット間の相対比を制御することも可能である。このタイプの構造は、最近、本出願人によってPCT/US2013/058005（WO2014/039523）で説明された。

【０１０２】

1つの多鎖CARの一部として異なる鎖を集合することは、例えば、シグナル伝達ドメインおよび共刺激ドメインと融合した、IgEの高親和性受容体（FcεRI）（Metzger, Alcaraz et al. 1986）の異なるα鎖、β鎖、およびγ鎖を用いることによって可能になる。γ鎖は、膜貫通領域と、1個の免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ（ITAM）（Cambier 1995）を含有する細胞質テールを含む。

【０１０３】

標的の中にある異なるエレメントに同時結合し、それによって、免疫細胞の活性化および機能を増強するために、多鎖CARは数種類の細胞外リガンド結合ドメインを含んでもよい。一態様において、細胞外リガンド結合ドメインは、同じ膜貫通ポリペプチド上で縦列に配置されてもよく、任意でリンカーによって分けられてもよい。別の態様において、前記異なる細胞外リガンド結合ドメインは、多鎖CARを構成する異なる膜貫通ポリペプチドに配置されてもよい。別の態様において、本発明は、それぞれが1つの異なる細胞外リガンド結合ドメインを含む多鎖CARからなる集団に関する。特に、本発明は、免疫細胞を操作する方法に関し、本方法は、免疫細胞を準備する工程、および前記細胞の表面に、それぞれが異なる細胞外リガンド結合ドメインを含む多鎖CARからなる集団を発現させる工程を含む。別の特定の態様において、本発明は、免疫細胞を操作する方法に関し、本方法は、免疫細胞を準備する工程、およびそれぞれが異なる細胞外リガンド結合ドメインを含む多鎖CARからなる集団を構成するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを前記細胞に導入する工程を含む。特定の態様において、前記免疫細胞を操作する方法は、前記細胞の表面に、少なくとも、シグナル伝達ドメインと融合したFcεRIβ鎖および/またはγ鎖の一部、ならびに異なる細胞外リガンド結合ドメインと融合したFcεRIα鎖のいくつかの部分を発現させる工程を含む。さらに詳細な態様において、前記方法は、シグナル伝達ドメインと融合したFcεRIβ鎖および/またはγ鎖の一部、ならびに異なる細胞外リガンド結合ドメインと融合したいくつかのFcεRIα鎖をコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドを前記細胞に導入する工程を含む。多鎖CARからなる集団とは、それぞれが異なる細胞外リガンド結合ドメインを含む、少なくとも2個、3個、4個、5個、6個の、またはそれより多い多鎖CARを意味する。本発明による異なる細胞外リガンド結合ドメインは、好ましくは、標的内の異なるエレメントに同時結合し、それによって、免疫細胞の活性化および機能を増強してもよい。

【０１０４】

本発明はまた、それぞれが異なる細胞外リガンド結合ドメインを含む多鎖CAR集団を含む、単離された免疫細胞に関する。

【０１０５】

本発明の多鎖CARのシグナル伝達ドメインまたは細胞内シグナル伝達ドメインは、細胞外リガンド結合ドメインが標的に結合した後に、免疫細胞および免疫応答の活性化をもたらす細胞内シグナル伝達を担う。言い換えると、シグナル伝達ドメインは、多鎖CARが発現している免疫細胞の正常エフェクター機能の少なくとも1つの活性化を担う。例えば、T細胞のエフェクター機能は、細胞溶解活性、またはサイトカイン分泌を含むヘルパー活性

でもよい。

【０１０６】

本願において、「シグナル伝達ドメイン」という用語は、エフェクターシグナル機能シグナルを伝達し、特殊化した機能を実行するように細胞を誘導するタンパク質部分を指す。

【０１０７】

単鎖CARまたは多鎖CARにおいて使用するためのシグナル伝達ドメインの好ましい例は、抗原受容体結合後にシグナル伝達を開始するために協調して働く、Fc受容体またはT細胞受容体および補助受容体の細胞質配列、ならびにこれらの配列の任意の誘導体または変種、および同じ機能をもつ任意の合成配列でもよい。シグナル伝達ドメインは、抗原依存的一次活性化を開始する細胞質シグナル伝達配列、および二次シグナルまたは共刺激シグナルを供給するように抗原非依存的に働く細胞質シグナル伝達配列である2つの別々のクラスの細胞質シグナル伝達配列を含む。一次細胞質シグナル伝達配列は、ITAMの免疫受容体チロシンベース活性化モチーフとして知られるシグナル伝達モチーフを含んでもよい。ITAMは、syk/zap70クラスチロシンキナーゼの結合部位として役立つ、様々な受容体の細胞質内テールにおいて発見された、詳細に明らかにされているシグナル伝達モチーフである。本発明において用いられるITAMの例には、非限定的な例として、TCRζ、FcRγ、FcRβ、FcRε、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD5、CD22、CD79a、CD79b、およびCD66dに由来するITAMが含まれ得る。好ましい態様において、多鎖CARのシグナル伝達ドメインは、CD3ζシグナル伝達ドメインを含んでもよく、FcεRIβ鎖またはγ鎖の細胞質内ドメインを含んでもよい。

【０１０８】

特定の態様において、本発明の多鎖CARのシグナル伝達ドメインは、共刺激シグナル分子を含む。共刺激分子は、効率的な免疫応答に必要な、抗原受容体またはそのリガンド以外の細胞表面分子である。

【０１０９】

リガンド結合ドメインは、文献において言及された単鎖CARに関して、以前に使用および言及された任意の抗原受容体、特に、モノクローナル抗体に由来するscFvであってもよい。WO2014/4011988に記載の二重特異性CARまたは多重特異性CARは、参照により組み込まれる。

【０１１０】

単鎖CARについて前述されたものと同様に、本発明は、特異的にCD38細胞表面マーカーを標的とする多鎖CARを備える免疫細胞を包含する。本発明の好ましい態様によれば、前記のCARは免疫細胞において発現されるのに対して、レアカットエンドヌクレアーゼの発現によって、前記表面マーカーをコードする内因性遺伝子の不活化が誘導される。

【０１１１】

好ましい態様によれば、本発明の多鎖CAR(mcCAR)は、細胞外CD38リガンド結合ドメインと融合した、高親和性IgE受容体(FcεRI)のα鎖に由来する膜貫通ポリペプチドを含む。

【０１１２】

より好ましい態様によれば、前記抗CD38多鎖CARは、シグナル伝達ドメインと融合した、FcεRIのγ鎖またはβ鎖に由来する第2の膜貫通ポリペプチドをさらに含む。

【０１１３】

さらにより好ましい態様によれば、前記抗CD38多鎖CARは、共刺激ドメインを含む、FcεRIのγ鎖またはβ鎖に由来する第3の膜貫通ポリペプチドを含む。

【０１１４】

好ましい態様によれば、FcεRIの前記α鎖と融合した、上記の抗CD38 mcCARの前記CD38リガンド結合ドメインは、CD38に対する特異性を付与する重鎖(V_H)および軽鎖(V_L)を含む単鎖可変断片(scFv)である。

【０１１５】

さらに好ましい態様において、上記の抗CD38 mcCARの前記V_Hは、SEQ ID NO.14、62、54

、および30より選択されるものと少なくとも90％の同一性を示すポリペプチド配列を含む。

【０１１６】

別のより好ましい態様において、上記の抗CD38 mcCARの前記V_Lは、SEQ ID NO.10、58、50、および26より選択されるものと少なくとも90％の同一性を示すポリペプチドを含む。

【０１１７】

態様において、上記の抗CD38 mcCARのFcεRIの前記α鎖は、CD8α、IgG1、またはFcRIIIαタンパク質に由来するヒンジによって前記細胞外リガンド結合ドメインと融合される。

【０１１８】

態様において、上記の抗CD38 mcCARの前記シグナル伝達ドメインはFcεRIのγ鎖もしくはβ鎖と融合されるか、TCRζ鎖、FCεRβ鎖、FcεRIγ鎖に由来するか、または免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ(ITAM)を含む。

【０１１９】

好ましい態様において、上記の抗CD38 mcCARの前記シグナル伝達ドメインはCD3ζに由来し、好ましくは、SEQ ID NO.81と少なくとも90％同一性を示すポリペプチド配列を含む。

【０１２０】

態様において、上記の抗CD38 mcCARの前記第2のポリペプチドまたは第3のポリペプチドは、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、CD8、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83に特異的に結合するリガンド、およびその任意の組み合わせより選択される共刺激分子の細胞質ドメインに由来する共刺激ドメインを含む。

【０１２１】

好ましい態様において、前記上記の共刺激ドメインは4-1BBに由来し、SEQ ID NO.80と少なくとも90％の同一性を示すポリペプチド配列を含む。

【０１２２】

本発明によるCD38特異的多鎖CARの様々な構造の例を図20に示した。

【０１２３】

3つのポリペプチドγ、α、およびβを含む例示的な抗CD38 mcCARの構築物を以下の表3に示した。

【０１２４】

(表３)抗CD38多鎖CARを形成する例示的なポリペプチド

多鎖CARの名称	前駆体BCMA多鎖CARポリペプチド構造												
	γポリペプチド				αポリペプチド							βポリペプチド	
	FcεRI γ-SP	FcεRI γ-ΔITAM	CD3ζ-IC	P2A	FcεRI α-SP	CD8α ヒンジ	VH	G4SX3 リンカー	VL	FcεRI α-TM-IC	T2A	FcεR1γΔITAM	共刺激ドメイン
25A10抗CD38mcCAR(4-1BB共刺激ドメイン)	SEQ ID NO.106	SEQ ID NO.107	SEQ ID NO.10	SEQ ID NO.108	SEQ ID NO.110	SEQ ID NO.77	SEQ ID NO.14	SEQ ID NO.75	SEQ ID NO.10	SEQ ID NO.111	SEQ ID NO.109	SEQ ID NO.112	SEQ ID NO.80
28F5抗CD38mcCAR(4-1BB共刺激ドメイン)	SEQ ID NO.106	SEQ ID NO.107	SEQ ID NO.10	SEQ ID NO.108	SEQ ID NO.110	SEQ ID NO.77	SEQ ID NO.62	SEQ ID NO.75	SEQ ID NO.58	SEQ ID NO.111	SEQ ID NO.109	SEQ ID NO.112	SEQ ID NO.80
13F11抗CD38mcCAR(4-1BB共刺激ドメイン)	SEQ ID NO.106	SEQ ID NO.107	SEQ ID NO.10	SEQ ID NO.108	SEQ ID NO.110	SEQ ID NO.77	SEQ ID NO.54	SEQ ID NO.75	SEQ ID NO.50	SEQ ID NO.111	SEQ ID NO.109	SEQ ID NO.112	SEQ ID NO.80
16B6抗CD38mcCAR(4-1BB共刺激ドメイン)	SEQ ID NO.106	SEQ ID NO.107	SEQ ID NO.10	SEQ ID NO.108	SEQ ID NO.110	SEQ ID NO.77	SEQ ID NO.30	SEQ ID NO.75	SEQ ID NO.26	SEQ ID NO.111	SEQ ID NO.109	SEQ ID NO.112	SEQ ID NO.80

25A10抗CD38mcCAR(CD28共刺激ドメイン)	SEQ ID NO.106	SEQ ID NO.107	SEQ ID NO.10	SEQ ID NO.108	SEQ ID NO.110	SEQ ID NO.77	SEQ ID NO.14	SEQ ID NO.75	SEQ ID NO.10	SEQ ID NO.111	SEQ ID NO.109	SEQ ID NO.112	SEQ ID NO.113
28F5抗CD38mcCAR(CD28共刺激ドメイン)	SEQ ID NO.106	SEQ ID NO.107	SEQ ID NO.10	SEQ ID NO.108	SEQ ID NO.110	SEQ ID NO.77	SEQ ID NO.62	SEQ ID NO.75	SEQ ID NO.58	SEQ ID NO.111	SEQ ID NO.109	SEQ ID NO.112	SEQ ID NO.113
13F11抗CD38mcCAR(CD28共刺激ドメイン)	SEQ ID NO.106	SEQ ID NO.107	SEQ ID NO.10	SEQ ID NO.108	SEQ ID NO.110	SEQ ID NO.77	SEQ ID NO.54	SEQ ID NO.75	SEQ ID NO.50	SEQ ID NO.111	SEQ ID NO.109	SEQ ID NO.112	SEQ ID NO.113
16B6抗CD38mcCAR(CD28共刺激ドメイン)	SEQ ID NO.106	SEQ ID NO.107	SEQ ID NO.10	SEQ ID NO.108	SEQ ID NO.110	SEQ ID NO.77	SEQ ID NO.30	SEQ ID NO.75	SEQ ID NO.26	SEQ ID NO.111	SEQ ID NO.109	SEQ ID NO.112	SEQ ID NO.113

【０１２５】

T細胞の活性化および増殖

本発明による方法は、一般的に、T細胞を活性化および/または増殖させる、さらなる工程を含む。これは、例えば、米国特許第6,352,694号；同第6,534,055号；同第6,905,680号；同第6,692,964号；同第5,858,358号；同第6,887,466号；同第6,905,681号；同第7,144,575号；同第7,067,318号；同第7,172,869号；同第7,232,566号；同第7,175,843号；同第5,883,223号；同第6,905,874号；同第6,797,514号；同第6,867,041号；および米国特許出願公開第20060121005号に記載の方法を用いて、T細胞の遺伝子組換えの前または後に行われてもよい。これらの方法によれば、本発明のT細胞は、CD3 TCR複合体関連シグナルを刺激する薬剤およびT細胞表面にある共刺激分子を刺激するリガンドが取り付けられた表面と接触させることによって増殖させることができる。

【０１２６】

特に、T細胞集団は、インビトロでは、例えば、表面に固定化された抗CD3抗体もしくはその抗原結合断片または抗CD2抗体との接触によって刺激されてもよく、プロテインキナーゼCアクチベーター（例えば、ブリオスタチン）とカルシウムイオノフォアとの接触によって刺激されてもよい。T細胞表面にあるアクセサリー分子を同時刺激するために、アクセサリー分子に結合するリガンドが用いられる。例えば、T細胞増殖を刺激するのに適した条件下で、T細胞集団を抗CD3抗体および抗CD28抗体と接触させることができる。CD4+T細胞またはCD8+T細胞の増殖を刺激するために、抗CD3抗体および抗CD28抗体。例えば、それぞれのシグナルを供給する薬剤が、溶解状態にあってもよく、表面に結合されてもよい。当業者が容易に理解することができるように、粒子と細胞との比は、標的細胞に対する粒径によって決まる場合がある。本発明のさらなる態様において、T細胞などの細胞は、薬剤コーティングビーズと組み合わされ、ビーズおよび細胞は後で分離され、次いで、細胞は培養される。別の態様では、培養前に薬剤コーティングビーズおよび細胞は分離されず、一緒に培養される。抗CD3および抗CD28が取り付けられている常磁性ビーズ（3x28ビーズ）がT細胞と接触するのを可能にすることで、細胞表面タンパク質が連結される場合がある。一態様では、細胞（例えば、4～10個のT細胞）およびビーズ（例えば、1：1比のDYNABEADS（登録商標）M-450 CD3/CD28 T常磁性ビーズ）が、緩衝液中、好ましくは、PBS（カルシウムおよびマグネシウムなどの二価カチオンを含まない）の中で組み合わされる。これもまた、任意の細胞濃度を使用できることを当業者は容易に理解することができる。混合物は、数時間（約3時間）～約14日間、培養されてもよく、その間の任意の整数値の時間にわたって培養されてもよい。別の態様では、混合物は21日間、培養されてもよい。T細胞培養に適した条件には、血清（例えば、胎仔ウシ血清ウシまたは胎児ヒト血清）、インターロイキン-2（IL-2）、インシュリン、IFN-g、1L-4、1L-7、GM-CSF、-10、-2、1L-15、TGFp、およびTNF-、または当業者に公知の細胞増殖のための他の任意の添加物を含む、増殖および生存に必要な因子を含有し得る適切な培地（例えば、最小必須培地またはRPMI培地1640またはX-vivo 5（Lonza））が含まれる。細胞増殖のための他の添加物には、界面活性剤、プラスマネート（plasmanate）、および還元剤、例えば、N-アセチル-システインおよび2-メルカプトエタノールが含まれるが、これに限定されない。培地には、アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム、およびビタミンが添加され、無血清の、あるいは適量の血清（もしくは血漿）、または規定された一組のホルモン、ならびに/またはT細胞の成長および増殖に十分な量のサイトカインが加えられた、RPMI 1640、A1M-V、DMEM、MEM、a-MEM、F-12、X-Vivo 1、およびX-Vivo 20、Optimizerが含まれ得る。抗生物質、例えば、ペニシリンおよびストレプトマイシンは、実験的培養物にだけ含まれ、対象に注入される細胞の培養物には含まれない。標的細胞は、増殖を支援するのに必要な条件、例えば、適切な温度（例えば、37℃）および雰囲気（例えば、空気+5％CO2）の下で維持される。異なる刺激時間に曝露されたT細胞は異なる特徴を示す場合がある。

【０１２７】

別の特定の態様において、前記細胞は、組織または細胞と共培養することによって増殖させることもできる。前記細胞はまた、インビボで増殖させてもよく、例えば、前記細胞を対象に投与した後に対象の血液中で増殖させることもできる。

【０１２８】

一態様において、本発明のT細胞は、インビボでの強固なT細胞増殖をもたらすことができ、かつ延長された時間に対して耐える事ができる。

【０１２９】

一態様によれば、本発明の前記T細胞は患者に投与されると活発にインビボでT細胞増殖することができ、長期間にわたって、好ましくは1週間、より好ましくは2週間、さらにより好ましくは少なくとも1ヶ月間、体液中で持続することができる。本発明によるT細胞はこれらの期間にわたって持続すると予想されるが、患者の体内での寿命は、1年を超えない、好ましくは6ヶ月、より好ましくは2ヶ月、さらにより好ましくは1ヶ月を超えないことが意図される。

【０１３０】

CD38抗原の遺伝子不活化

抗原マーカーCD38は、しばらくの間、診断方法、特に、白血病病的細胞の診断方法における特異的マーカーとして用いられてきたが、療法では用いられていなかった。実際に、このマーカーは極めて特異的なマーカーとして当技術分野において特定されたが、免疫療法用の標的として使用することができなかった。なぜなら、このマーカーに対して作られた抗体は患者のT細胞を破壊または妨害すると予想されたからである。

【０１３１】

第1の態様において、本発明の方法は、免疫療法に適した免疫細胞、好ましくは、T細胞を調製する方法であって、

(a)免疫細胞において、CD38抗原マーカーの発現または提示に関与する、CD38遺伝子をコードする遺伝子を遺伝子不活化するか、または変異させる工程であって、前記CD38抗原マーカーが前記免疫細胞の表面と病的細胞の表面の両方に存在する、工程;

(b)前記免疫細胞の中で、前記病的細胞の表面に存在する、前記CD38抗原マーカーに対して作られたキメラ抗原受容体をコードするトランスジーン、例えば、先行するセクションにおいて示されたキメラ抗原受容体をコードするトランスジーンを発現させる工程

を含む、方法に関する。

【０１３２】

別の態様において、CD38抗原が不活化され、かつCD38 CARを発現する、免疫療法に適した免疫細胞、好ましくはT細胞を操作するための前記方法は、

(a)本発明に記載のように、免疫細胞において、別の遺伝子または他の遺伝子の不活化または変異と組み合わせて、CD38遺伝子をコードする遺伝子を遺伝子不活化するか、または変異させる工程であって、前記遺伝子が、免疫チェックポイントとしての同種異系免疫細胞の生着、薬物耐性の付与、または免疫抑制剤に対する耐性の付与に関与する遺伝子からなる群において選択される、工程;

(b)前記免疫細胞の中で、前記CD38抗原マーカーに対して作られたキメラ抗原受容体、例えば、他のセクションおよび請求項1に記載のキメラ抗原受容体をコードするトランスジーンを発現させる工程

を含む。

【０１３３】

特定の態様において、細胞を操作するための前記方法は、以下の工程:

(a)血液試料から免疫細胞、好ましくは、T細胞を準備する工程;

(b)DNA切断、好ましくは、二本鎖切断によって、

-前記のCD38抗原をコードする遺伝子、および

-免疫チェックポイントとしての同種異系免疫細胞の生着、薬物耐性の付与、または免疫抑制剤に対する耐性の付与に関与する成分をコードする少なくとも1種類の遺伝子

をそれぞれ選択的に不活化することができるレアカットエンドヌクレアーゼを前記免疫細胞に導入する工程、

(c)前記細胞を増殖させる工程

の少なくとも1つを含む。

【０１３４】

好ましい態様において、工程(a)の間に不活化または変異される、前記のさらなる遺伝子は、TCR、β2M、PD-1、CTLA-4、dCK、DHFR、MGMT、IMPDH2、MDR1、CD52、GRであるか、またはTCR、β2M、PD-1、CTLA-4、dCK、DHFR、MGMT、IMPDH2、MDR1、CD52、GRからなる群において選択される。

【０１３５】

別の態様において、前記レアカットエンドヌクレアーゼは、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、TALE-ヌクレアーゼ、Casp9ヌクレアーゼ、またはCpf1ヌクレアーゼでもよい。好ましい態様において、前記レアカットエンドヌクレアーゼはTALE-ヌクレアーゼである。

【０１３６】

特定の態様において、CD38抗原と、免疫チェックポイントとしての同種異系免疫細胞の生着、薬物耐性の付与、または免疫抑制剤に対する耐性の付与に関与する遺伝子の不活化は、TALE-ヌクレアーゼなどの特異的レアカットエンドヌクレアーゼによって標的化される正確なゲノム位置において行うことができ、前記特異的エンドヌクレアーゼは切断を触媒し、外因性核酸は、少なくとも、相同性領域と、CD38標的遺伝子を不活化するための配列と、相同組換えによって組み込まれる前記の上記の他の遺伝子を連続して含む。別の態様では、いくつかの遺伝子は、特異的な遺伝子不活化のために、それぞれ、かつ特異的に、1つの規定された遺伝子を標的とする、いくつかの特異的レアカットエンドヌクレアーゼと、いくつかの特異的ポリヌクレオチドを用いることによって連続して、または同時に不活化することができる。

【０１３７】

好ましい態様において、KO CD38および抗CD38 CAR発現免疫細胞を操作するための前記方法は、

(a)免疫細胞において、SEQ ID 1、4、および7からなる群において選択される標的CD38の遺伝子を、それぞれ、SEQ 2～3、SEQ 5～6、およびSEQ 8～9の左TALEヌクレアーゼおよび右TALEヌクレアーゼを用いることによって遺伝子不活化する工程;

(b)前記免疫細胞の中で、CD38抗原に対して作られたキメラ抗原受容体をコードするトランスジーンを発現させる工程であって、前記特異的抗CD38 CARが、図8に図示したようなV1、V2、およびV3より選択されるポリペプチド構造のうち1つを有し、前記構造が、モノクローナル抗CD38抗体に由来するVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメイン、CD3ζシグナル伝達ドメインおよび4-1BB由来共刺激ドメインを含む細胞質ドメインを含み、

前記V_HおよびV_Lが、それぞれ、SEQ ID NO.14および10(25A10)、SEQ ID NO.62および58(28F5)、SEQ ID NO.54および50(13F11)、SEQ ID NO.30および26(16B5)、SEQ ID NO.38および34(10F7)、SEQ ID N0.46および42(27B6)、またはSEQ ID NO.22および18(29B4)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む、工程

を含む。

【０１３８】

別の好ましい態様において、KO CD38およびCD38+発現免疫細胞を操作するための前記方法は、

(a)免疫細胞において、SEQ ID 1、4、および7からなる群において選択される標的CD38の遺伝子を、それぞれ、SEQ 2～3、SEQ 5～6、およびSEQ 8～9の左TALEヌクレアーゼおよび右TALEヌクレアーゼを用いることによって遺伝子不活化する工程、

(b)前記免疫細胞の中で、抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)をコードするトランスジーンを発現させる工程であって、前記V_HおよびV_Lが、それぞれ、SEQ ID NO.15～17およびSEQ ID NO.11～13;それぞれ、SEQ ID NO.63～65およびSEQ ID NO.59～62;それぞれ、SEQ ID NO.55～57およびSEQ ID NO.51～53;それぞれ、SEQ ID NO.31～33およびSEQ ID NO.27～29、それぞれ、SEQ ID NO.39～41およびSEQ ID NO.35～37、それぞれ、SEQ ID NO.47～49およびSEQ ID NO.45～43、それぞれ、SEQ ID NO.55～57およびSEQ ID NO.51～53

、それぞれ、SEQ ID NO.63～65およびSEQ ID NO.59～61、それぞれ、SEQ ID NO.71～73およびSEQ ID NO.67～69のCDR配列を含む、工程
を含む。
【０１３９】
さらに好ましい態様において、KO CD38および抗CD38 CAR発現免疫細胞を操作するための前記方法は、
(a)免疫細胞において、SEQ ID 4である標的CD38の遺伝子を、それぞれ、SEQ 5～6の左TALEヌクレアーゼおよび右TALEヌクレアーゼを用いることによって遺伝子不活化する工程、
(b)前記免疫細胞の中で、SEQ ID NO.82～84(25A10)、SEQ ID NO.100～102(28F5)、SEQ ID NO.97～99(13F11)、およびSEQ ID NO.88～90(16B5)より選択されるものと少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む、抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)をコードするトランスジーンを発現させる工程
を含む。
【０１４０】
さらにより好ましい態様において、KO CD38および抗CD38 CAR発現免疫細胞を操作するための前記方法は、
(a)免疫細胞において、SEQ ID 4である標的CD38の遺伝子を、それぞれ、SEQ 5～6の左TALEヌクレアーゼおよび右TALEヌクレアーゼを用いることによって遺伝子不活化する工程、
(b)前記免疫細胞の中で、SEQ ID NO.82～84(25A10)およびSEQ ID N0.100～102(28F5)より選択されるものと少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む、抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)をコードするトランスジーンを発現させる工程
を含む。
【０１４１】
なおさらにより好ましい態様において、KO CD38および抗CD38 CAR発現免疫細胞を操作するための前記方法は、
(a)免疫細胞において、SEQ ID 4である標的CD38の遺伝子を、それぞれ、SEQ 5～6の左TALEヌクレアーゼおよび右TALEヌクレアーゼを用いることによって遺伝子不活化する工程、
(b)前記免疫細胞の中で、SEQ ID NO.82(25A10-v1 CAR)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む、抗CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)をコードするトランスジーンを発現させる工程
を含む。
【０１４２】
本発明による免疫細胞は、病的細胞と免疫細胞が共通して発現するか、または前記T細胞の表面に存在することが知られている抗原マーカーに対して向けられた抗CD38キメラ抗原受容体を備える。「存在することが知られている」という表現は、CD38抗原マーカーが、インビボで天然の状態で、特に、血中で増殖した免疫細胞の表面に見出されるが、インビトロで培養されたときには必ず見出されるとは限らないと報告されたことを意味する。いずれにしても、本発明の方法を用いると、免疫細胞の表面にCD38抗原マーカーが存在しなくなり、それによって、キメラ抗原受容体は、操作されたT細胞表面と反応しなくなるという結果になる。この点において、前記方法は、前記マーカー抗原を細胞表面に提示する細胞を排除することによって、結果として得られたT細胞を精製するさらなる工程を含んでもよい。
【０１４３】
遺伝子を不活化するとは、関心対象の遺伝子が機能的なタンパク質の形で発現されないことが意図される。特定の態様において、前記方法の遺伝子組換えは、レアカットエンドヌクレアーゼが、標的となるある遺伝子の切断を触媒し、それによって、この標的となる遺伝子を不活化するような、操作しようとする準備された細胞における前記レアカットエンドヌクレアーゼの発現に頼る。エンドヌクレアーゼによって引き起こされる核酸鎖切断

は、一般的に、相同組換え末端結合または非相同末端結合（NHEJ）の別々の機構によって修復される。しかしながら、NHEJは、切断部位のDNA配列を変えることが多い不完全な修復プロセスである。機構は、直接的な再連結（Critchlow and Jackson 1998）によって、または、いわゆるマイクロホモロジー媒介末端結合（Betts, Brenchley et al. 2003；Ma, Kim et al. 2003）を介して2つのDNA末端の残存物を再結合することを伴う。非相同末端結合（NHEJ）を介した修復は小さな挿入または欠失をもたらすことが多く、特異的遺伝子ノックアウトを作り出すことに使用することができる。前記組換えは少なくとも1つのヌクレオチドの置換、欠失、または付加でもよい。切断によって誘導される変異誘発事象、すなわち、NHEJ事象に続く変異誘発事象が起こった細胞は、当技術分野において周知の方法によって特定および/または選択することができる。

【０１４４】

本発明の好ましい態様によれば、上記の方法の工程(a)の遺伝子変異または不活化はレアカットエンドヌクレアーゼを用いて行われる。

【０１４５】

「レアカットエンドヌクレアーゼ」という用語は、DNA分子またはRNA分子、好ましくは、DNA分子の内部にある、核酸間の結合の加水分解（切断）を触媒することができる野生型酵素または変種酵素を指す。特に、前記ヌクレアーゼは、エンドヌクレアーゼ、より好ましくは、高度に特異的であり、長さが10～45塩基対（bp）、通常、長さが10～35塩基対、さらに通常、12～20塩基対の核酸標的部位を認識するレアカットエンドヌクレアーゼでもよい。本発明によるエンドヌクレアーゼは特定のポリヌクレオチド配列を認識し、前記エンドヌクレアーゼの分子構造に応じて、これらの標的配列の内部にある核酸、またはこれらの標的配列に隣接する配列の内部にある核酸を切断する。この特定のポリヌクレオチド配列は「標的配列」とさらに呼ばれる。レアカットエンドヌクレアーゼは、特定のポリヌクレオチド配列において一本鎖切断または二本鎖切断を認識および作製することができる。

【０１４６】

特定の態様において、本発明による前記レアカットエンドヌクレアーゼは、Cas9/クリスパー複合体などのRNAガイドエンドヌクレアーゼである。RNAガイドエンドヌクレアーゼは、エンドヌクレアーゼがRNA分子と結合する新世代のゲノム操作ツールを構成している。この系では、RNA分子ヌクレオチド配列によって標的特異性が決定され、エンドヌクレアーゼが活性化される（Gasiunas, Barrangou et al. 2012；Jinek, Chylinski et al. 2012；Cong, Ran et al. 2013；Mali, Yang et al. 2013）。

【０１４７】

TAL-ヌクレアーゼ

好ましい態様において、以前に示された方法の工程(a)におけるCD38遺伝子の不活化はTAL-ヌクレアーゼを用いて行われる。

【０１４８】

さらに好ましい態様において、前記TAL-ヌクレアーゼは、SEQ ID NO.1、4、または7のCD38遺伝子配列を標的とする。

【０１４９】

なおさらに好ましい態様によれば、前記CD38抗原の不活化は、SEQ ID NO.2～3、5～6、または8～9のTALE-ヌクレアーゼを用いて行われる。

【０１５０】

前記の上記CD38標的配列と、これらの対応する左TALEヌクレアーゼおよび右TALEヌクレアーゼを以下の表4に示した。

【０１５１】

(表４)他の2つのCD38標的の配列と、これらを不活化するための対応するTALENの配列

名前	SEQ ID #	核酸配列および反復配列
CD38ex1-T2 標的	1	TGAGGTGGGTTGGCGACtaaggcgcaccggTGGGCACTGCGGGGACA
CD38ex1-T2 左 TALEN	2	MGDPKKKRKVIDYPYDVPDYAIDIADLRTLGYSQQQQEKIKPKVRSTVAQHHEALV GHGFTHAHIVALSQHPAALGTVAVKYQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARAL EALLTVAGELRGPPLQLDTGQLLKIAKRGGVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPQQ VVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLP VLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNN GGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAH GLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQAL ETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQ VVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLL PVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASN NGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQA HGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQAL ETVQALLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGRPALESIVAQLSRPDPALAALTNDH LVALACLGGRPALDAVKKGLGDPISRSQLVKSELEEKKSELRHKLKYVPHEYIELIEIA RNSTQDRILEMKVMEFFMKVYGYRGKHLGGSRKPDGAIYTVGSPIDYGVIVDTKA YSGGYNLPIGQADEMQRYVEENQTRNKHINPNEWWKVYPSSVTEFKFLFVSGHF KGNYKAQLTRLNHITNCNGAVLSVEELLIGGEMIKAGTLTLEEVRRKFNNGEINFAA D 反復配列 **TALEN:** NN-NI-NN-NN-NG-NN-NN-NN-NG-NG-NN-NN-HD-NN-NI-NG
CD38ex1-T2 右 TALEN	3	MGDPKKKRKVIDKETAAAKFERQHMDSIDIADLRTLGYSQQQQEKIKPKVRSTVA QHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTVAVKYQDMIAALPEATHEAIVGVGKQ WSGARALEALLTVAGELRGPPLQLDTGQLLKIAKRGGVTAVEAVHAWRNALTGA PLNLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQ ALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPE QVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRL LPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASN NGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQA HGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQAL ETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQ VVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLL PVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHD GGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGRPALESIVAQLSRPDPALA ALTNDHLVALACLGGRPALDAVKKGLGDPISRSQLVKSELEEKKSELRHKLKYVPHE YIELIEIARNSTQDRILEMKVMEFFMKVYGYRGKHLGGSRKPDGAIYTVGSPIDYGV IVDTKAYSGGYNLPIGQADEMQRYVEENQTRNKHINPNEWWKVYPSSVTEFKFLF VSGHFKGNYKAQLTRLNHITNCNGAVLSVEELLIGGEMIKAGTLTLEEVRRKFNNG EINFAAD 反復配列 **TALEN :** NN-NG-HD-HD-HD-HD-NN-HD-NI-NN-NG-NN-HD-HD-HD-NG

CD38-1 標的	4	TGCGAGTTCAGCCCGGtgtccggggacaaacccTGCTGCCGGCTCTCTA
CD38-1 左 TALEN	5	MGDPKKKRKVIDYPYDVPDYAIDIADLRTLGYSQQQQEKIKPKVRSTVAQHHEALV GHGFTHAHIVALSQHPAALGTVAVKYQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARAL EALLTVAGELRGPPLQLDTGQLLKIAKRGGVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPQQ VVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQALL PVLCQAHGLTPQQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASN NGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAH GLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQAL ETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQ VVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNIGGKQALETVQRLL PVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASH DGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQA HGLTPQQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQA LETVQALLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQ VVAIASNGGGRPALESIVAQLSRPDPALAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKKGLG DPISRSQLVKSELEEKKSELRHKLKYVPHEYIELIEIARNSTQDRILEMKVMEFFMKV YGYRGKHLGGSRKPDGAIYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPIGQADEMQRYVE ENQTRNKHINPNEWWKVYPSSVTEFKFLFVSGHFKGNYKAQLTRLNHITNCNGA VLSVEELLIGGEMIKAGTLTLEEVRRKFNNGEINFAAD 反復配列 **TALEN:** NG-NN-HD-NN-NI-NN-NG-NG-HD-NI-NN-HD- HD-HD-NN-NN-NG
CD38- 1_右 TALEN	6	MGDPKKKRKVIDKETAAAKFERQHMDSIDIADLRTLGYSQQQQEKIKPKVRSTVA QHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTVAVKYQDMIAALPEATHEAIVGVGKQ WSGARALEALLTVAGELRGPPLQLDTGQLLKIAKRGGVTAVEAVHAWRNALTGA PLNLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQ ALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPE QVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQR LLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIAS HDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQ AHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPQQVVAIASHDGGKQ ALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQ QVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQR LLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIAS NGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNIGGRPALESIVAQLSRPDPAL AALTNDHLVALACLGGRPALDAVKKGLGDPISRSQLVKSELEEKKSELRHKLKYVPH EYIELIEIARNSTQDRILEMKVMEFFMKVYGYRGKHLGGSRKPDGAIYTVGSPIDYG VIVDTKAYSGGYNLPIGQADEMQRYVEENQTRNKHINPNEWWKVYPSSVTEFKF LFVSGHFKGNYKAQLTRLNHITNCNGAVLSVEELLIGGEMIKAGTLTLEEVRRKFNN GEINFAAD 反復配列 **TALEN:** NG-NN-HD-NG-NN-HD-HD-NN-NN-HD-NG-HD- NG-HD-NG-NI

CD38-2_標的	7	TGATCCTCGTCGTGGTgctcgcggtggtcgtccCGAGGTGGCGCCAGCA
CD38-2左 TALEN	8	MGDPKKKRKVIDYPYDVPDYAIDIADLRTLGYSQQQQEKIKPKVRSTVAQHHEALV GHGFTHAHIVALSQHPAALGTVAVKYQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARAL EALLTVAGELRGPPLQLDTGQLLKIAKRGGVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPQQ VVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQALL PVLCQAHGLTPQQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNG GGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAH GLTPQQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQAL ETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQ VVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRL LPVLCQAHGLTPQQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASN NGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQA HGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQA LETVQALLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGRPALESIVAQLSRPDPALAALTND HLVALACLGGRPALDAVKKGLGDPISRSQLVKSELEEKKSELRHKLKYVPHEYIELIEI ARNSTQDRILEMKVMEFFMKVYGYRGKHLGGSRKPDGAIYTVGSPIDYGVIVDTK AYSGGYNLPIGQADEMQRYVEENQTRNKHINPNEWWKVYPSSVTEFKFLFVSGH FKGNYKAQLTRLNHITNCNGAVLSVEELLIGGEMIKAGTLTLEEVRRKFNNGEINFA AD 反復配列 **TALEN:** NG-NN-NI-NG-HD-HD-NG-HD-NN-NG-HD-NN-NG-NN-NN-NG
CD38-2 右 TALEN	9	MGDPKKKRKVIDKETAAAKFERQHMDSIDIADLRTLGYSQQQQEKIKPKVRSTVA QHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTVAVKYQDMIAALPEATHEAIVGVGKQ WSGARALEALLTVAGELRGPPLQLDTGQLLKIAKRGGVTAVEAVHAWRNALTGA PLNLTPQQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQ ALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQ VVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLL PVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASN NGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQA HGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQA LETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQ VVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLP VLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDG GKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNIGGRPALESIVAQLSRPDPALAAL TNDHLVALACLGGRPALDAVKKGLGDPISRSQLVKSELEEKKSELRHKLKYVPHEYI ELIEIARNSTQDRILEMKVMEFFMKVYGYRGKHLGGSRKPDGAIYTVGSPIDYGVI VDTKAYSGGYNLPIGQADEMQRYVEENQTRNKHINPNEWWKVYPSSVTEFKFLF VSGHFKGNYKAQLTRLNHITNCNGAVLSVEELLIGGEMIKAGTLTLEEVRRKFNNG EINFAAD 反復配列 **TALEN:** HD-NN-NI-NN-NN-NG-NN-NN-HD-NN-HD-HD-NI-NN-HD-NI

【０１５２】

「TALE-ヌクレアーゼ」または「MBBBD-ヌクレアーゼ」とは、典型的には転写アクチベーター様エフェクタータンパク質（TALE）に由来するDNA結合ドメインまたはモジュラー塩基対塩基結合ドメイン（MBBBD）と、エンドヌクレアーゼ活性を有する触媒ドメインとの融合に起因する操作されたタンパク質を指す。このような触媒ドメインは、通常、例えばI-TevI、ColE7、NucA、およびFok-Iなどの酵素に由来する。TALE-ヌクレアーゼは、選択された触媒ドメインに応じて単量体または二量体の形で形成することができる（WO2012138927）。このような操作されたTALE-ヌクレアーゼは、商品名TALEN（商標）（Cellecti

s, 8 rue de la Croix Jarry, 75013 Paris, France）で市販されている。

【０１５３】

本発明の好ましい態様によれば、DNA結合ドメインは、配列特異性が、非限定的な例としてザントモナス属（Xanthomonas）またはラルストニア属（Ralstonia）の細菌タンパク質AvrBs3、PthXo1、AvrHah1、PthA、Tal1cに由来する一連の33～35アミノ酸の反復によって動かされる転写アクチベーター様エフェクター（TALE）に由来する。

【０１５４】

これらの反復は、本質的に、塩基対との相互作用を特定する2つのアミノ酸位置だけ異なる（Boch, Scholze et al. 2009；Moscou and Bogdanove 2009）。DNA標的内にあるそれぞれの塩基対には1個の反復が接触し、この特異性は反復の2つの変種アミノ酸（いわゆる反復可変ジペプチド（repeat variable dipeptide）、RVD）に起因する。TALE結合ドメインは、標的となる配列の1番目のチミン塩基（T0）の要求を担うN末端移行ドメイン（translocation domain）、および核移行シグナル（NLS）を含有するC末端ドメインをさらに含んでもよい。TALE核酸結合ドメインは、一般的に、複数のTALE反復配列を含む操作されたコアTALEスキャフォールドに対応し、それぞれの反復が、TALE認識部位のそれぞれのヌクレオチド塩基に特異的なRVDを含む。本発明において、前記コアスキャフォールドのそれぞれのTALE反復配列は、30～42個のアミノ酸、より好ましくは33個または34個のアミノ酸で作られ、位置12および13に配置された2つの重要なアミノ酸（いわゆる反復可変ジペプチド、RVD）が、前記TALE結合部位配列の1つのヌクレオチドの認識を媒介する。特に、33アミノ酸長または34アミノ酸長より長いTALE反復配列では、12および13以外の位置に等価な2つの重要なアミノ酸が配置されてもよい。好ましくは、異なるヌクレオチドの認識に関連するRVDは、Cを認識する場合はHD、Tを認識する場合はNG、Aを認識する場合はNI、GまたはAを認識する場合はNNである。別の態様において、ヌクレオチドA、T、C、およびGに対する特異性を調整するために、特に、この特異性を増強するために、重要なアミノ酸12および13は他のアミノ酸残基に変異されてもよい。TALE核酸結合ドメインは、通常、8～30個のTALE反復配列を含む。より好ましくは、本発明の前記コアスキャフォールドは8～20個のTALE反復配列を含み、より好ましくは15個のTALE反復配列を含む。本発明の前記コアスキャフォールドはまた、前記TALE反復配列セットのC末端に配置された20個のアミノ酸で作られた、さらなる1個の切断型TALE反復配列、すなわち、さらなるC末端半TALE反復配列も含んでもよい。

【０１５５】

他の操作されたDNA結合ドメインは、WO2014/018601に記載のように、いわゆる、モジュラー塩基対塩基特異的核酸結合ドメイン（MBBBD）を形成するために代替配列として使用することができる。前記MBBBDは、例えば、内部共生体菌類であるブルクホルデリア・リゾキシニカ（Burkholderia Rhizoxinica）の最近、配列決定されたゲノムに由来する新たに特定されたタンパク質、すなわち、EAV36_BURRH、E5AW43_BURRH、E5AW45_BURRH、およびE5AW46_BURRHタンパク質から操作されてもよい（Lackner, Moebius et al. 2011）。これらの核酸結合ポリペプチドは、塩基特異的な約31～33個のアミノ酸のモジュールを含む。これらのモジュールはザントモナス属TALE共通反復と40％未満の配列同一性を示し、ザントモナス属TALE共通反復より大きなポリペプチド配列可変性を示す。特定の核酸配列に対して結合特性を有する新たなタンパク質またはスキャフォールドを操作するために、ブルクホルデリア属（Burkholderia）およびザントモナス属に由来する上記タンパク質に由来する異なるドメイン（モジュール、N末端およびC末端）が有用であり、キメラTALE-MBBBDタンパク質を形成するために組み合わされてもよい。

【０１５６】

本発明は、特異的TALE-ヌクレアーゼを用いることによって、CD38 抗原マーカーをコードする遺伝子の発現を不活化するためにT細胞を操作するための方法を包含する。

【０１５７】

TALE-ヌクレアーゼ、例えば、CD38遺伝子についてはSEQ ID NO:2～3;5～6;8～9に示したTALE-ヌクレアーゼが本発明を実現するのに特に適している。これらの特異的TALE-ヌク

レアーゼ、その配列標的、および使用したプロトコールを以下の実施例1にさらに詳細に示した。

【０１５８】

Cas9

別の態様において、以前に示された方法の工程(a)におけるCD38の遺伝子不活化はCas9 RNAガイドエンドヌクレアーゼを用いて行われる。

【０１５９】

別の態様において、前記RNAガイドエンドヌクレアーゼは少なくとも2つのポリペプチドに分割され、1つのポリペプチドがRuvCを含み、別のポリペプチドがHNHを含む。

【０１６０】

Cas9はCsn1（COG3513）とも呼ばれ、crRNAの生合成および侵入DNAの破壊の両方に関与する大きなタンパク質である。Cas9は、S.サーモフィラス（S.thermophiles）、リステリア・イノクア（Listeria innocua）（Gasiunas, Barrangou et al. 2012；Jinek, Chylinski et al. 2012）、およびS.ピオゲネス（S. Pyogenes）（Deltcheva, Chylinski et al. 2011）などの様々な細菌種において述べられている。この大きなCas9タンパク質（>1200アミノ酸）は、タンパク質の中央にある2つの推定ヌクレアーゼドメイン、すなわち、HNH（McrA様）ヌクレアーゼドメインと、分割されたRuvC様ヌクレアーゼドメイン（RNアーゼHフォールド（RNase H fold））（Makarova, Grishin et al. 2006）を含有する。

【０１６１】

「Cas9」とは、標的核酸配列を処理することができる、操作されたエンドヌクレアーゼまたはCas9ホモログを意味する。特定の態様において、Cas9は、二本鎖切断または一本鎖切断のいずれかに対応し得る核酸標的配列の切断を誘導することができる。Cas9変種は、天然で自然界に存在しないCas9エンドヌクレアーゼ、およびタンパク質工学またはランダム変異誘発によって得られるCas9エンドヌクレアーゼでもよい。本発明によるCas9変種は、例えば変異、すなわちS.ピオゲネスCas9エンドヌクレアーゼのアミノ酸配列（COG3513）内にある、少なくとも1つの残基からの欠失または少なくとも1つの残基の挿入もしくは置換によって得ることができる。本発明のフレーム（frame）局面において、このようなCas9変種は機能的なままである、すなわち標的核酸配列を処理する能力を保持している。Cas9変種はまた、S.ピオゲネスCas9のアミノ酸配列内にある、少なくとも1つの残基からの欠失または少なくとも1つの残基の挿入もしくは置換を含んでもよい、S.ピオゲネスCas9ホモログでもよい。最終構築物が望ましい活性、特にガイドRNAまたは核酸標的配列に結合する能力をもつのであれば、最終構築物に到達するために、欠失、挿入、および置換の任意の組み合わせが作られてもよい。

【０１６２】

RuvC/RNアーゼHモチーフは、RNAおよびDNAに両方に働く幅広い核酸分解機能を示すタンパク質（RNアーゼH、RuvC、DNAトランスポザーゼ、およびレトロウイルスインテグラーゼ、およびアルゴノートタンパク質のPIWIドメイン）を含む。本発明では、Cas9タンパク質のRuvC触媒ドメインは、配列モチーフ：D-[I/L]-G-X-X-S-X-G-W-Aによって特徴付けることができ、式中、Xは20種類の天然アミノ酸のいずれか1つであり、[I/L]はイソロイシンまたはロイシンである。他の点で、本発明は、少なくともD-[I/L]-G-X-X-S-X-G-W-A配列を含み、式中、Xが20種類の天然アミノ酸のいずれか1つであり、[I/L]がイソロイシンまたはロイシンであるCas9変種に関する。

【０１６３】

HNHモチーフは、コリシン、制限酵素、およびホーミングエンドヌクレアーゼを含む二本鎖DNAに働く多くのヌクレアーゼに特有のものである。ドメインHNH（SMART ID： SM00507、SCOP名：HNHファミリー）は、広範囲のDNA結合タンパク質と結合し、様々な結合および切断機能を行う。機能が分かっているタンパク質は、細菌毒性、グループIおよびグループIIイントロンならびにインテインにおけるホーミング機能、組換え、発生により制御されるDNA再編成、ファージパッケージング、ならびに制限エンドヌクレアーゼ活性を含む広範囲の細胞プロセスに関与する（Dalgaard, Klar et al. 1997）。これらのタンパク

質は、ウイルス、古細菌、真正細菌、および真核生物において発見された。興味深いことに、LAGLI-DADGおよびGIY-YIGモチーフと同様に、HNHモチーフは、インテイン、グループIおよびグループIIイントロンのような自己増殖性エレメントのエンドヌクレアーゼドメインと結合していることが多い（Dalgaard, Klar et al. 1997）。HNHドメインは、保存されたHis（アミノ末端）およびHis/Asp/Glu（カルボキシ末端）残基がある程度の距離をとって隣接する保存されたAsp/His残基の存在によって特徴付けることができる。これらのタンパク質のかなりの数が中央Asp/His残基の両側にCX2Cモチーフも有する場合がある。構造上、HNHモチーフは、ねじれたβ鎖からなる中央ヘアピンとして現れ、その両側にαヘリックスが隣接する（Kleanthous, Kuhlmann et al. 1999）。Cas9の大きなHNHドメインはSEQ ID NO：5によって示される。本発明では、HNHモチーフは、配列モチーフ： Y-X-X-D-H-X-X-P-X-S-X-X-X-D-X-Sによって特徴付けることができ、式中、Xは20種類の天然アミノ酸のいずれか1つを表す。本発明は、少なくともY-X-X-D-H-X-X-P-X-S-X-X-X-D-X-S配列を含むCas9変種に関し、式中、Xは20種類の天然アミノ酸のいずれか1つを表す。

【０１６４】

標的とする多重遺伝子組換えを容易に行うために、およびガイドRNAをCas9細胞に導入することによって誘導性ヌクレアーゼ系を作り出すために、本発明は特に関心が高い可能性がある。本発明の目的のために、本発明者らは、ガイドRNAと一緒に、または別々に標的核酸配列を処理することができる2つの別個のスプリット（split）Cas9 RuvCドメインとHNHドメインに、Cas9タンパク質を分けることができると証明した。

【０１６５】

ヌクレアーゼ効率または特異性を改善するために、異なるRNAガイドエンドヌクレアーゼまたはCasホモログに由来するRuvCドメインおよびHNHドメインも集められ得る。異なる種に由来するドメインは2つのタンパク質に分割されてもよく、互いに融合して変種Casタンパク質を形成してもよい。Cas9スプリット系は、誘導性のゲノム標的化方法に特に適しており、細胞内でのCas9過剰発現の潜在的な毒性作用を回避すると考えられる。実際に、第1のスプリットCas9ドメインを細胞に導入してもよく、好ましくは、前記スプリットドメインをコードするトランスジーンで前記細胞を安定に形質転換することによって導入してもよい。次いで、2つのスプリット部分が望ましい時間で細胞内に再び集まって、機能的Cas9タンパク質を再構成するように、Cas9の相補スプリット部分を細胞に導入してもよい。

【０１６６】

野生型Cas9と比較してスプリットCas9のサイズを小さくすると、例えば、細胞透過性ペプチドを用いることによって、細胞に向けること（vectorization）および送達することが容易になる。異なるCasタンパク質に由来する再編成ドメイン（re-arranging domain）を用いると、例えば、S.ピオゲネスCas9とわずかに異なるPAMモチーフを標的とすることによって、特異性およびヌクレアーゼ活性を調節することが可能になる。

【０１６７】

スプリットCas9系

RuvCドメインおよびHNHドメインの以前の特徴付けに促されて、本発明者らはスプリットCas9タンパク質を作り出すようにCas9タンパク質を操作した。驚いたことに、本発明者らは、これらの2つのスプリットCas9が一緒になって、または別々に、核酸標的を処理できることを示した。この観察から、スプリットCas9タンパク質を用いて新たなCas9系を開発することが可能になる。それぞれのスプリットCas9ドメインは別々に調製および使用することができる。従って、このスプリット系は、さらに短い、および/または不活性のタンパク質の送達を可能にする、RNAガイドエンドヌクレアーゼをT細胞に向けかつ送達するための、いくつかの利点を示し、かつ望ましい時間でT細胞においてゲノム操作を誘導するのに特に適しており、従って、組み込まれたCas9ヌクレアーゼの潜在的な毒性を制限する。

【０１６８】

「スプリットCas9」とは、ここでは、RuvCドメインまたはHNHドメインのいずれかを含

むCas9タンパク質またはCas9変種の短縮型または切断型を意味し、これらの両ドメインを含むCas9タンパク質またはCas9変種の短縮型または切断型を意味しない。このような「スプリットCas9」は独立してガイドRNAと共に用いられてもよく、例えば、1つのスプリットCas9がRuvCドメインを提供し、別のスプリットCas9がHNHドメインを提供するように補完的に用いられてもよい。RuvCドメインおよび/またはNHNドメインのいずれかを有する異なるスプリットRNAガイドエンドヌクレアーゼが一緒に用いられてもよい。

【０１６９】

それぞれのCas9スプリットドメインは同じCas9ホモログに由来してもよく、異なるCas9ホモログに由来してもよい。多くのCas9ホモログがゲノムデータベースにおいて特定されている。

【０１７０】

前記Cas9スプリットドメイン（RuvCドメインおよびHNHドメイン）は細胞内の標的核酸配列を処理するように細胞に同時に導入されてもよく、または連続して導入されてもよい。前記Cas9スプリットドメインおよびガイドRNAは、他に記載するように、細胞透過性ペプチドまたは他のトランスフェクション方法を用いることによって細胞に導入されてもよい。

【０１７１】

本発明の別の局面において、コンパクト（compact）Cas9と呼ばれる、たった1つのスプリットCas9ドメインが前記細胞に導入される。実際に、驚いたことに、本発明者らは、前記のRuvCモチーフを含むスプリットCas9ドメインが、HNHモチーフを含むスプリットドメインとは独立して標的核酸配列を切断できることを示した。従って、本発明者らは、ガイドRNAが標的核酸配列に結合するのにHNHドメインの存在を必要とせず、RuvCスプリットドメインが結合するのに十分に安定していると証明することができた。好ましい態様において、前記スプリットCas9ドメインは単独で前記標的核酸配列をニッキングすることができる。

【０１７２】

それぞれのスプリットドメインは、N末端および/またはC末端において少なくとも1つの活性ドメインと融合されてもよい。前記活性ドメインは、ヌクレアーゼ（例えば、エンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼ）、ポリメラーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、メチラーゼ、デメチラーゼ、アセチラーゼ、デアセチラーゼ、トポイソメラーゼ、インテグラーゼ、トランスポザーゼ、リガーゼ、ヘリカーゼ、リコンビナーゼ、転写活性化因子（例えば、VP64、VP16）、転写阻害剤（例えば、KRAB）、DNA末端処理酵素（例えば、Trex2、Tdt）、レポーター分子（例えば、蛍光タンパク質、lacZ、ルシフェラーゼ）からなる群より選択されてもよい。

【０１７３】

HNHドメインは標的二本鎖DNAの一方の鎖のニッキングを担い、RuvC様RNアーゼHフォールドドメインは二本鎖核酸標的の（PAMモチーフを含む）他方の鎖のニッキングに関与する（Jinek, Chylinski et al. 2012）。しかしながら、野生型Cas9では、これらの2つのドメインは、PAMのすぐ近くにある、侵入DNAの同じ標的配列（プロトスペーサー）内に平滑末端切断をもたらす（Jinek, Chylinski et al. 2012）。Cas9はニッカーゼでもよく、様々な標的配列内においてニック事象を誘導する。

【０１７４】

非限定的な例として、様々な標的配列内でニック事象を誘導するために、Cas9またはスプリットCas9はHNHドメインまたはRuvC様ドメインのいずれかの触媒残基に変異を含んでもよい。非限定的な例として、Cas9タンパク質の触媒残基は、アミノ酸D10、D31、H840、H868、N882、およびN891、またはCasファミリーメンバーのホモログにあるCLUSTALW法を用いてアラインメントされた位置に対応する触媒残基である。これらの残基はいずれも、他の任意のアミノ酸、好ましくはアラニン残基と交換することができる。触媒残基の変異とは、cas9の触媒ドメインの少なくとも1つの不活性化を誘導する、別のアミノ酸による置換またはアミノ酸の欠失もしくは付加を意味する。（参照）。特定の態様において、Ca

s9またはスプリットCas9は前記変異の1つまたはいくつかを含んでもよい。別の特定の態様において、スプリットCas9は2つのRuvC触媒ドメインおよびHNH触媒ドメインのうち1つしか含まない。本発明では、異なる種に由来するCas9、Cas9ホモログ、操作されたCas9、およびその機能的変種を使用することができる。本発明は、関心対象の遺伝子配列における核酸切断を行うために、任意のRNAガイドエンドヌクレアーゼまたはスプリットRNAガイドエンドヌクレアーゼ変種の使用を考える。

【０１７５】

メガヌクレアーゼ

レアカットエンドヌクレアーゼは、メガヌクレアーゼの名前でも知られるホーミングエンドヌクレアーゼでもよい。このようなホーミングエンドヌクレアーゼは当業者に周知である（Stoddard 2005）。ホーミングエンドヌクレアーゼは高度に特異的であり、長さが12～45塩基対（bp）、通常、長さが14～40bpのDNA標的部位を認識する。本発明によるホーミングエンドヌクレアーゼは、例えば、LAGLIDADGエンドヌクレアーゼ、HNHエンドヌクレアーゼ、またはGIY-YIGエンドヌクレアーゼに対応してもよい。本発明による好ましいホーミングエンドヌクレアーゼはI-CreI変種でもよい。「変種」エンドヌクレアーゼ、すなわち、自然界で天然には存在せず、遺伝子工学またはランダム変異誘発によって得られるエンドヌクレアーゼは、野生型エンドヌクレアーゼが認識するDNA配列とは異なるDNA配列に結合することができる（国際出願WO2006/097854を参照されたい）。

【０１７６】

前記レアカットエンドヌクレアーゼはモジュラーDNA結合ヌクレアーゼでもよい。モジュラーDNA結合ヌクレアーゼとは、エンドヌクレアーゼの少なくとも1つの触媒ドメインと、少なくとも1つのDNA結合ドメインまたは核酸標的配列を特定するタンパク質を含む任意の融合タンパク質を意味する。DNA結合ドメインは、一般的に、二本鎖ポリヌクレオチドまたは一本鎖ポリヌクレオチドを認識する少なくとも1つのモチーフを含有する、独立して折りたたまれたポリペプチドまたはタンパク質ドメインによって形成されるRNA結合ドメインまたはDNA結合ドメインである。多くのこのようなポリペプチドは、当技術分野において、特定の核酸配列に結合する能力があると述べられている。このような結合ドメインは、非限定的な例として、ヘリックスターンヘリックスドメイン、ロイシンジッパードメイン、翼状（winged）ヘリックスドメイン、ヘリックス-ループ-ヘリックスドメイン、HMGボックスドメイン、イムノグロビン（Immunoglobin）ドメイン、B3ドメイン、または操作されたジンクフィンガードメインを含むことが多い。

【０１７７】

ジンクフィンガーヌクレアーゼ

当初、インビトロでDNAを切断するために開発された「ジンクフィンガーヌクレアーゼ」（ZFN）は、IIS型制限酵素であるFokIの切断ドメインと、3つ以上のC2H2ジンクフィンガーモチーフを含有するDNA認識ドメインとの融合である。2つのZFNそれぞれが正確な方向および間隔でDNAの特定の位置でヘテロ二量体化すると、DNAの二本鎖切断（DSB）が起こる。このようなキメラエンドヌクレアーゼの使用は、Urnov et al.（Genome editing with engineered zinc finger nucleases（2010） Nature reviews Genetics 11：636-646）により概説されるように当技術分野において広範囲にわたって報告されている。

【０１７８】

標準的なZFNは切断ドメインと各ジンクフィンガードメインのC末端とを融合する。2つの切断ドメインが二量体化して、DNAを切断できるようになるために、2つのZFNがそれぞれDNAの反対鎖に結合する。これらのC末端は、ある一定の距離をあけて離れている。ジンクフィンガードメインと切断ドメインとの間にある、最も一般的に用いられるリンカー配列は、それぞれの結合部位の5'末端が5～7bp隔てられていることを必要とする。

【０１７９】

新たなジンクフィンガーアレイを作製する最も簡単な方法は、特異性が分かっている小さなジンクフィンガー「モジュール」を組み合わせることである。最も一般的なモジュール集合プロセスは、それぞれが3塩基対DNA配列を認識することができる3つの別個のジン

クフィンガーを組み合わせて、9塩基対標的部位を認識することができる3フィンガーアレイを作製することを伴う。望ましい配列を標的とすることができるジンクフィンガーアレイを作製するために、非常に多くの選択方法が用いられてきた。初期の選択の取り組みでは、部分的にランダム化されたジンクフィンガーアレイの大きなプールから、ある特定のDNA標的に結合したタンパク質を選択するためにファージディスプレイが利用された。つい最近の取り組みでは、酵母1ハイブリッド系、細菌1ハイブリッド系および2ハイブリッド系、ならびに哺乳動物細胞が利用された。

【０１８０】

送達方法

本発明者らは、エンドヌクレアーゼを発現するポリヌクレオチド、この可能性のあるコエフェクター（例えば、Cas9またはアルゴノートヌクレアーゼに結合するガイドRNAまたはガイドDNA）、ならびにキメラ抗原受容体を細胞内に、または前記細胞の細胞下区画に送達するために当技術分野において公知の、あらゆる手段を考えた。これらの手段には、非限定的な例として、ウイルス形質導入、エレクトロポレーションが含まれ、リポソーム送達手段、ポリマー担体、化学的担体、リポプレックス、ポリプレックス、デンドリマー、ナノ粒子、エマルジョン、天然のエンドサイトーシスまたはファゴサイトース（phagocytose）経路も含まれる。

【０１８１】

本発明の好ましい態様として、一過的に発現させて、外来DNAの染色体組込みを回避するために、本発明のエンドヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドは、mRNAの形で、例えば、エレクトロポレーションによってトランスフェクトされる。本発明者らは、表1に示した、T細胞におけるmRNAエレクトロポレーションに最適な様々な条件を確かめた。本発明者は、パルス電場を用いることで、材料を細胞に送達するために生細胞を一過的に透過処理するのを可能にするcytoPulse技術を使用した（米国特許第6,010,613号およびWO2004/083379）。高いトランスフェクション効率と最低限の死のための最高条件に達するために、パルス持続期間、強度、ならびにパルス間の間隔を変更することができる。基本的には、最初の高電場パルスによって孔が形成するのに対して、その後の低電場パルスによってポリヌクレオチドは細胞内に移動する。本発明の一局面において、本発明者は、T細胞におけるmRNAの>95％トランスフェクション効率の達成につながった工程、およびT細胞において様々な種類のタンパク質を一過的に発現させるためのエレクトロポレーションプロトコールの使用について説明する。特に、本発明は、T細胞を形質転換する方法に関し、本方法は、前記T細胞をRNAと接触させる工程と、

（a）電圧範囲が2250～3000V/センチメートルであり、パルス幅が0.1msであり、工程（a）の電気パルスと（b）の電気パルスとの間のパルス間隔が0.2～10msである、1回の電気パルス、

（b）電圧範囲が2250～3000Vであり、パルス幅が100msであり、工程（b）の電気パルスと工程（c）の最初の電気パルスとの間のパルス間隔が100msである、1回の電気パルス、；および

（c）電圧が325Vであり、パルス幅が0.2msであり、4回それぞれの電気パルス間のパルス間隔が2msである、4回の電気パルス

からなる素早いパルスシーケンスをT細胞に適用する工程を含む。

【０１８２】

特定の態様において、T細胞を形質転換する方法は、前記T細胞をRNAと接触させる工程と、

（a）電圧が2250V、2300V、2350V、2400V、2450V、2500V、2550V、2400V、2450V、2500V、2600V、2700V、2800V、2900V、または3000V/センチメートルであり、パルス幅が0.1msであり、工程（a）の電気パルスと（b）の電気パルスとの間のパルス間隔が0.2ms、0.5ms、1ms、2ms、3ms、4ms、5ms、6ms、7ms、8ms、9ms、または10msである、1回の電気パルス、

（b）電圧範囲が2250V、2250V、2300V、2350V、2400V、2450V、2500V、2550V、2400V、

2450V、2500V、2600V、2700V、2800V、2900V、または3000Vであり、パルス幅が100msであり、工程（b）の電気パルスと工程（c）の最初の電気パルスとの間のパルス間隔が100msである、1回の電気パルス、および

（c）電圧が325Vであり、パルス幅が0.2msであり、4回それぞれの電気パルス間のパルス間隔が2msである、4回の電気パルス

からなる素早いパルスシーケンスをT細胞に適用する工程とを含む。

【０１８３】

前記の値の範囲に含まれる任意の値が本願において開示される。エレクトロポレーション培地は当技術分野において公知の任意の適切な培地でよい。好ましくは、エレクトロポレーション培地の伝導率は0.01～1.0ミリシーメンスの範囲である。

【０１８４】

（表５）PBMC由来T細胞におけるエレクトロポレーションに必要な最低電圧を求めるために使用した様々なcytopulseプログラム

	群１				群２				群３			
Cyto-pulse プログラム	パルス	V	持続時間 (ms)	間隔 (ms)	パルス	V	持続時間 (ms)	間隔 (ms)	パルス	V	持続時間 (ms)	間隔 (ms)
1	1	600	0.1	0.2	1	600	0.1	100	4	130	0.2	2
2	1	900	0.1	0.2	1	900	0.1	100	4	130	0.2	2
3	1	1200	0.1	0.2	1	1200	0.1	100	4	130	0.2	2
4	1	1200	0.1	10	1	900	0.1	100	4	130	0.2	2
5	1	900	0.1	20	1	600	0.1	100	4	130	0.2	2

【０１８５】

ウイルス形質導入

本発明によれば、キメラ抗原受容体をT細胞に入れて発現させるには、レトロウイルスベクター、より好ましくはレンチウイルスベクターの使用が特に適している。ウイルス形質導入のための方法は当技術分野において周知である（Walther et al.（2000） Viral Vectors for Gene Transfer. Drugs. 60（2）：249-271）。組込みウイルスベクターを用いると、T細胞ゲノムにポリヌクレオチドを安定して組み込み、長期間にわたってキメラ抗原受容体を発現させることが可能になる。

【０１８６】

別の態様によれば、選択された前記CD38 CARは、EF1aなどのプロモーターの制御下にある自殺遺伝子RQR8をコードするレンチウイルスベクターの中にクローニングされる。

【０１８７】

好ましい態様によれば、CD38 CARは、CD38欠損T細胞に、T細胞に形質導入される。CARの発現は、通常、フローサイトメトリーによって評価され、抗CD38 CAR T細胞の表現型および機能が試験される。これは下記でさらに詳細に説明される。

【０１８８】

非アロ反応性T細胞

本発明の方法は、遺伝子療法の一環として、例えば、血液循環中で、特異的レアカットエンドヌクレアーゼを発現する遺伝子配列と、CARを発現する他の遺伝子配列を含む、T細胞を標的とするウイルスベクターを用いることによってインビボで行うことができるが、本発明の方法は、さらに一般的には、患者またはドナーから入手可能な培養T細胞に対してエクスビボで実施されることが意図される。

【０１８９】

一態様によれば、本発明において操作される、例えば、本発明において示される免疫細胞は初代幹細胞、iPS、またはhES細胞に由来する。

【０１９０】

別の態様において、前記免疫細胞は、病的細胞の発生による影響を受けている患者から

得られる。

【０１９１】

エクスビボで操作された、操作されたT細胞は、自家処置の一環として、これが得られた患者に再移植されてもよく、同種異系処置の一環として用いられてもよい。この後者の場合では、細胞が確実に正しく生着するように非アロ反応性になるように細胞をさらに操作することが好ましい。従って、本発明の方法は、ドナーからT細胞を獲得し、例えば、WO2013/176915に記載のように、MHC認識に関与する、および/または免疫抑制薬物の標的であるT細胞遺伝子を不活化する、さらなる工程を含んでもよい。

【０１９２】

T細胞受容体（TCR）は、抗原提示に応答したT細胞活性化に関与する細胞表面受容体である。TCRは、一般的に、集合してヘテロ二量体を形成する2本のα鎖およびβ鎖から作られ、CD3伝達サブユニットと結合して、細胞表面に存在するT細胞受容体複合体を形成する。TCRのα鎖およびβ鎖はそれぞれ、免疫グロブリンに似たN末端可変（V）領域および定常（C）領域、疎水性膜貫通ドメイン、ならびに短い細胞質領域からなる。免疫グロブリン分子と同様に、α鎖およびβ鎖の可変領域は、T細胞集団内に抗原特異性の大きな多様性を生み出すV（D）J組換えによって生じる。しかしながら、インタクトな抗原を認識する免疫グロブリンとは対照的に、T細胞は、MHC分子と結合した処理ペプチド断片によって活性化される。これによって、MHC拘束と知られる、T細胞による抗原認識にさらなる要素が導入される。T細胞受容体を介してドナーとレシピエントとのMHC不一致が認識されると、T細胞が増殖し、場合によってはGVHDが発症する。正常なTCR表面発現は、複合体の7つ全ての成分の協調した合成および集合に依存することが示されている（Ashwell and Klusnor 1990）。TCRαまたはTCRβを不活化するとT細胞表面からTCRが無くなり、それによって、アロ抗原の認識が阻止され、従って、GVHDが阻止される。

【０１９３】

従って、さらに本発明によれば、T細胞の生着は、TCR成分をコードする少なくとも1つの遺伝子を不活化することによって改善され得る。TCRα遺伝子および/またはTCRβ遺伝子を不活化することによって、TCRは細胞内で機能しなくなる。

【０１９４】

Cas9/クリスパー系の使用に関して、本発明者らは、TCRをコードする3つのエキソンの中に適切な標的配列を確かめており、そのため、切断効率を保持しながら、生細胞において毒性を大幅に低減することが可能になった。好ましい標的配列は国際特許出願第WO2014/191128号の表2に示した。

【０１９５】

MHC抗原はまた、移植反応において主な役割を果たすタンパク質でもある。拒絶反応は、T細胞が、移植された組織の表面にある組織適合抗原と反応することによって媒介され、これらの抗原の大きなグループは主要組織適合抗原（MHC）である。これらのタンパク質は全ての高等脊椎動物の表面に発現しており、ヒト細胞ではHLA抗原（ヒト白血球抗原）と呼ばれる。TCRと同様に、MHCタンパク質はT細胞刺激において重要な役割を果たしている。抗原提示細胞（多くの場合、樹状細胞）は、細胞表面にあるMHCに載せて、外来タンパク質の分解産物であるペプチドを呈する。共刺激シグナルの存在下でT細胞は活性化され、同様に同じペプチド/MHC複合体を呈する標的細胞に作用する。例えば、刺激されたTヘルパー細胞が、抗原をMHCと共に呈するマクロファージを標的とするか、または細胞傷害性T細胞（CTL）が、外来ウイルスペプチドを呈するウイルス感染細胞に作用する。

【０１９６】

従って、アロ反応性の低いT細胞を提供するために、本発明の方法は、あるHLA遺伝子を不活化する、または変異させる工程をさらに含んでもよい。

【０１９７】

ヒトのクラスI HLA遺伝子クラスターは3つのメジャー遺伝子座B、C、およびAと、いくつかのマイナー遺伝子座を含む。クラスII HLAクラスターも3つのメジャー遺伝子座DP、DQ、およびDRを含み、クラスI遺伝子クラスターおよびクラスII遺伝子クラスターは両方と

も、集団内にクラスI遺伝子およびクラスII遺伝子両方のいくつかの異なるアレルがある点で多型である。同様にHLA機能において役割を果たす、いくつかのアクセサリータンパク質もある。Tap1およびTap2サブユニットは、ペプチド抗原をクラスI HLA複合体に装填するのに必要不可欠なTAP輸送体複合体の一部である。LMP2およびLMP7プロテオソームサブユニットは、HLAに載せて呈するために抗原からペプチドへのタンパク質分解において役割を果たしている。LMP7の低減は、おそらく、安定化の欠如により、細胞表面にあるMHCクラスIの量を低減することが示されている（Fehling et al. （1999） Science 265：1234-1237）。TAPおよびLMPの他に、その産物がTAP複合体とHLAクラスI鎖との架橋を形成し、ペプチドの装填を増強するタパシン遺伝子がある。タパシンが低減すると、MHCクラスI集合が損なわれ、MHCクラスIの細胞表面発現が低減し、免疫応答が損なわれた細胞が生じる（Grandea et al. （2000） Immunity 13：213-222 and Garbi et al. （2000） Nat. Immunol. 1：234-238）。上記の遺伝子はいずれも、開示されたように、例えば、WO2012/012667に開示されたように本発明の一部として不活化することができる。

【０１９８】

別の態様において、免疫細胞を調製する方法は、β2mをコードする遺伝子を不活化する、さらなる工程を含む。B2Mとも知られるβ-2ミクログロブリンはMHCクラスI分子の軽鎖であり、従って、主要組織適合遺伝子複合体の不可欠な部分である。ヒトでは、6番染色体に遺伝子クラスターとして位置する他のMHC遺伝子とは対照的に、B2Mは、15番染色体に位置するb2m遺伝子によってコードされる。このヒトタンパク質は119個のアミノ酸(SEQ ID NO:1)で構成され、11.800ダルトンの分子量を有する。β-2ミクログロブリンが欠損しているマウスモデルから、B2MはMHCクラスIの細胞表面発現と、ペプチド結合溝(groove)の安定性に必要なことが分かっている。さらに、正常な細胞表面MHC I発現が欠損しているマウスに由来する造血移植片はβ-2ミクログロブリン遺伝子に標的変異があるために、正常マウスではNK1.1+細胞によって拒絶されることが分かっている。このことから、MHC I分子発現が欠損していると骨髄細胞は宿主免疫系による拒絶反応を受けやすくなることが示唆される(Bix et al. 1991)。

【０１９９】

抗CD38-単鎖CARの細胞外ドメインへの少なくとも1つのエピトープの挿入

本発明の抗CD38 CARは、少なくとも、前記CARの細胞外ドメインへの少なくとも1つのエピトープの挿入を含んでもよい。これは、サイトカインストームなどのインビボ副作用の事象において、CARを備えた免疫細胞を引きつけて枯渇させることを目的とする。さらに、このようなエピトープ挿入、すなわち「エピトープタギング」は、製造プロセス中に、操作された免疫細胞をインビトロで選別または精製するのに有用な場合がある。前記の少なくとも1つのエピトープは、このようなペプチドを認識する特異的抗体が結合するのに十分な免疫原性がある任意の抗原性ペプチドでよい。例えば、これは、例えば、少なくとも1コピー、好ましくは2コピーのCD20ミモトープ、好ましくは、配列CPYSNPSLCS(SEQ ID NO.114)のCD20ミモトープをCARポリペプチド配列に挿入することによって得ることができる。以下で簡略化するために、N末端からC末端へのscFvの順序を以下のように、VH鎖、次に、VL鎖の順で示した。しかしながら、本発明の範囲では、この順序が、逆に、すなわち、VL鎖、次に、VL鎖の順になると想定することができる。

【０２００】

本発明の抗CD38 CAR内にある少なくとも1つのCD20ミモトープの様々な位置を図21Aおよび図21Bに図式化した。前記2コピーのCD20ミモトープをリンカーによって互いに連結し、V_Lにも連結することができる。これらを、任意のリンカーを用いて、抗CD38 scFvとヒンジ(例えば、CD8α)との間にも挿入することもできる。CD20ミモトープをリツキシマブなどの抗CD20抗体によって結合することができる(McLaughlin P, et al. 1998)。

【０２０１】

従って、本発明の抗CD38 CARは、CD38細胞表面抗原に結合することができ、任意で、ヒト化されたVH鎖およびVL鎖と、リンカーL、自殺ドメイン、ヒンジまたはその一部、膜貫通ドメイン、共刺激ドメインおよび刺激ドメインを含んでもよい。

【０２０２】
さらに具体的には、以下のように、エピトープを本発明のCARに含めることができる。
【０２０３】
一部の態様において、細胞外結合ドメインは、少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、または10個のmAb特異的エピトープを含む。
【０２０４】
一部の態様において、細胞外結合ドメインは少なくとも1個、2個、または3個のmAb特異的エピトープを含む。
【０２０５】
一部の態様において、細胞外結合ドメインが、いくつかのmAb特異的エピトープを含む時、mAb特異的エピトープは全て同一である。
【０２０６】
一部の態様において、細胞外結合ドメインが、いくつかのmAb特異的エピトープを含む時、mAb特異的エピトープは同一でない。例えば、細胞外結合ドメインは3つのmAb特異的エピトープを含んでもよいが、このうちの2つは同一であり、3つ目は異なる。
【０２０７】
一部の態様において、細胞外結合ドメインは、VHと、VLと、1つまたは複数のmAb特異的エピトープ、好ましくは1個、2個、または3個、より好ましくは2個または3個のmAb特異的エピトープを含む。
【０２０８】
一部の態様において、細胞外結合ドメインは、以下の配列(N末端は左側にある):
V_1-L_1-V_2-$(L)_x$-エピトープ1-$(L)_x$
V_1-L_1-V_2-$(L)_x$-エピトープ1-$(L)_x$-エピトープ2-$(L)_x$
V_1-L_1-V_2-$(L)_x$-エピトープ1-$(L)_x$-エピトープ2-$(L)_x$-エピトープ3-$(L)_x$;
$(L)_x$-エピトープ1-$(L)_x$-V_1-L_1-V_2;
$(L)_x$-エピトープ1-$(L)_x$-エピトープ2-$(L)_x$-V_1-L_1-V_2;
エピトープ1-$(L)_x$-エピトープ2-$(L)_x$-エピトープ3-$(L)_x$-V_1-L_1-V_2;
$(L)_x$-エピトープ1-$(L)_x$-V_1-L_1-V_2-$(L)_x$-エピトープ2-$(L)_x$;
$(L)_x$-エピトープ1-$(L)_x$-V_1-L_1-V_2-$(L)_x$-エピトープ2-$(L)_x$-エピトープ3-$(L)_x$;
$(L)_x$-エピトープ1-$(L)_x$-V_1-L_1-V_2-$(L)_x$-エピトープ2-$(L)_x$-エピトープ3-$(L)_x$-エピトープ4-$(L)_x$;
$(L)_x$-エピトープ1-$(L)_x$-エピトープ2-$(L)_x$-V_1-L_1-V_2-$(L)_x$-エピトープ3-$(L)_x$
$(L)_x$-エピトープ1-$(L)_x$-エピトープ2-$(L)_x$-V_1-L_1-V_2-$(L)_x$-エピトープ3-$(L)_x$-エピトープ4-$(L)_x$;
V_1-$(L)_x$-エピトープ1-$(L)_x$-V_2;
V_1-$(L)_x$-エピトープ1-$(L)_x$-V_2-$(L)_x$-エピトープ2-$(L)_x$;
V_1-$(L)_x$-エピトープ1-$(L)_x$-V_2-$(L)_x$-エピトープ2-$(L)_x$-エピトープ3-$(L)_x$;
V_1-$(L)_x$-エピトープ1-$(L)_x$-V_2-$(L)_x$-エピトープ2-$(L)_x$-エピトープ3-$(L)_x$-エピトープ4-$(L)_x$;
$(L)_x$-エピトープ1-$(L)_x$-V_1-$(L)_x$-エピトープ2-$(L)_x$-V_2
$(L)_x$-エピトープ1-$(L)_x$-V_1-$(L)_x$-エピトープ2-$(L)_x$-V_2-$(L)_x$-エピトープ3-$(L)_x$
V_1-L_1-V_2-L-エピトープ1;
V_1-L_1-V_2-L-エピトープ1-L;
V_1-L_1-V_2-L-エピトープ1-L-エピトープ2;
V_1-L_1-V_2-L-エピトープ1-L-エピトープ2-L;
V_1-L_1-V_2-L-エピトープ1-L-エピトープ2-L-エピトープ3;
V_1-L_1-V_2-L-エピトープ1-L-エピトープ2-L-エピトープ3-L;
V_1-L_1-V_2-エピトープ1;
V_1-L_1-V_2-エピトープ1-L;
V_1-L_1-V_2-エピトープ1-L-エピトープ2;

V_1-L_1-V_2-エピトープ1-L-エピトープ2-L;
V_1-L_1-V_2-エピトープ1-L-エピトープ2-L-エピトープ3;
V_1-L_1-V_2-エピトープ1-L-エピトープ2-L-エピトープ3-L;
エピトープ1-V_1-L_1-V_2;
エピトープ1-L-V_1-L_1-V_2;
L-エピトープ1-V_1-L_1-V_2;
L-エピトープ1-L-V_1-L_1-V_2;
エピトープ1-L-エピトープ2-V_1-L_1-V_2;
エピトープ1-L-エピトープ2-L-V_1-L_1-V_2;
L-エピトープ1-L-エピトープ2-V_1-L_1-V_2;
L-エピトープ1-L-エピトープ2-L-V_1-L_1-V_2;
エピトープ1-L-エピトープ2-L-エピトープ3-V_1-L_1-V_2;
エピトープ1-L-エピトープ2-L-エピトープ3-L-V_1-L_1-V_2;
L-エピトープ1-L-エピトープ2-L-エピトープ3-V_1-L_1-V_2;
L-エピトープ1-L-エピトープ2-L-エピトープ3-L-V_1-L_1-V_2;
V_1-L-エピトープ1-L-V_2;
L-エピトープ1-L-V_1-L-エピトープ2-L-V_2;
V_1-L-エピトープ1-L-V_2-L-エピトープ2-L;
V_1-L-エピトープ1-L-V_2-L-エピトープ2-L-エピトープ3;
V_1-L-エピトープ1-L-V_2-L-エピトープ2-エピトープ3;
V_1-L-エピトープ1-L-V_2-L-エピトープ2-L-エピトープ3-エピトープ4;
L-エピトープ1-L-V_1-L-エピトープ2-L-V_2-L-エピトープ3-L;
エピトープ1-L-V_1-L-エピトープ2-L-V_2-L-エピトープ3-L;
L-エピトープ1-L-V_1-L-エピトープ2-L-V_2-L-エピトープ3;
L-エピトープ1-L-V_1-L_1-V_2-L-エピトープ2-L;
L-エピトープ1-L-V_1-L_1-V_2-L-エピトープ2-L-エピトープ3;
L-エピトープ1-L-V_1-L_1-V_2-L-エピトープ2-エピトープ3、または
エピトープ1-L-V_1-L_1-V_2-L-エピトープ2-L-エピトープ3-エピトープ4
を含み、
式中、
V_1およびV_2は、ScFvのV_HおよびV_Lであり(すなわち、V_1はV_Lであり、V_2はV_Hである、またはV_1はV_Hであり、V_2はV_Lである)、
L_1は、ScFvの中でVH鎖をVL鎖に連結するのに適した任意のリンカーであり、
Lは、リンカー、好ましくは、グリシン残基およびセリン残基を含むリンカーであり、細胞外結合ドメインの中にある、Lのそれぞれの出現は、同じ細胞外結合ドメインの中にあるLの他の出現と同一でもよく、異なってもよい
xは0または1であり、xのそれぞれの出現は他のxとは独立しており、
エピトープ1、エピトープ2、およびエピトープ3はmAb特異的エピトープであり、同一でも異なってもよい。

【０２０９】

一部の態様において、細胞外結合ドメインは、以下の配列(N末端は左側にある):
V_H-L_1-V_L-L-エピトープ1-L-エピトープ2-L;
L-エピトープ1-L-V_H-L-エピトープ2-L-V_L-L-エピトープ3-L;
V_L-L^1-V_H-L-エピトープ1-L-エピトープ2-L;または
L-エピトープ1-L-V_L-L-エピトープ2-L-V_H-L-エピトープ3-L
を含み、式中、L、L1、エピトープ1、エピトープ2、およびエピトープ3は上記で定義された通りである。

【０２１０】

一部の態様において、L_1は、グリシンおよび/またはセリンを含むリンカーである。一部の態様では、L_1は、アミノ酸配列$(Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Ser)_n$または$(Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Ser)_n$を

含むリンカーである。式中、nは1、2、3、4、または5である。一部の態様において、L_1は$(Gly_4Ser)_4$または$(Gly_4Ser)_3$である。

【０２１１】

一部の態様では、Lは、可動性リンカー、好ましくは、グリシンおよび/またはセリンを含む可動性リンカーである。一部の態様において、Lは、

SGG, GGS, SGGS, SSGGS, GGGG, SGGGG,

GGGGS, SGGGGS, GGGGGS, SGGGGGS, SGGGGG, GSGGGGS, GGGGGGGS, SGGGGGGG, SGGGGGGGS, または

SGGGGSGGGGS

好ましくは

SGG, SGGS, SSGGS, GGGG, SGGGGS, SGGGGGS, SGGGGG, GSGGGGS または

SGGGGSGGGGS

より選択されるアミノ酸配列を有する。一部の態様では、細胞外結合ドメインが、Lのいくつかの出現を含む時、Lは全て同一である。一部の態様において、細胞外結合ドメインが、Lのいくつかの出現を含む時、Lは全て同一であるとは限らない。一部の態様において、LはSGGGGSである。一部の態様において、細胞外結合ドメインは、Lのいくつかの出現を含み、Lは全てSGGGGSである。

【０２１２】

一部の態様において、エピトープ1、エピトープ2、およびエピトープ3は同一であるか、または異なり、SEQ ID NO 114～SEQ ID NO 121のいずれか1つのアミノ酸配列、例えば、以下の表6に示した配列を有するmAb特異的エピトープより選択される。

【０２１３】

(表６)ミモトープおよびエピトープとこれらの対応する配列

リツキシマブ		
ミモトープ	SEQ ID NO 114	CPYSNPSLC
パリビズマブ		
エピトープ	SEQ ID NO 115	NSELLSLINDMPITNDQKKLMSNN
セツキシマブ		
ミモトープ 1	SEQ ID NO 116	CQFDLSTRRLKC
ミモトープ 2	SEQ ID NO 117	CQYNLSSRALKC
ミモトープ 3	SEQ ID NO 118	CVWQRWQKSYVC
ミモトープ 4	SEQ ID NO 119	CMWDRFSRWYKC
ニボルマブ		
エピトープ A	SEQ ID NO 120	SFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDR
エピトープ B	SEQ ID NO 121	SGTYLCGAISLAPKAQIKE

【０２１４】

一部の態様において、エピトープ1、エピトープ2、およびエピトープ3は同一であるか、または異なり、イブリツモマブ、チウキセタン、ムロモナブ-CD3、トシツモマブ、アブシキシマブ、バシリキシマブ、ブレンツキシマブベドチン(brentuximab vedotin)、セツキシマブ、インフリキシマブ、リツキシマブ、アレムツズマブ、ベバシズマブ、セルトリズマブペゴル、ダクリズマブ、エクリズマブ、エファリズマブ、ゲムツズマブ、ナタリズマブ、オマリズマブ、パリビズマブ、ラニビズマブ、トシリズマブ、トラスツズマブ、ベドリズマブ(vedolizumab)、アダリムマブ、ベリムマブ、カナキヌマブ、デノスマブ、ゴリムマブ、イピリムマブ、オファツムマブ、パニツムマブ、QBEND-10、アレムツズマブ、またはウステキヌマブによって特異的に認識されるmAb特異的エピトープより選択される。

【０２１５】

別の態様によれば、エピトープはミモトープである。エピトープの構造を摸倣する高分

子、多くの場合はペプチドとして、ミモトープは従来のエピトープより小さいという利点があり、従って、非コンホメーション配列にとって有益であり、このようなCARを長いポリペプチドの形で再現することが容易な場合がある。ミモトープは、薬として承認された、いくつかのmAb、例えば、セツキシマブ(Riemer et al., 2005)については2つの10アミノ酸ペプチド、またはパリビズマブ(Arbiza et al., 1992)については24のAAで知られている。これらのミモトープはファージディスプレイによって特定することができるので、同じmAbに対してscFvを混乱させない配列を得るために、これらのうちのいくつかを試してみることが可能である。さらに、これらのミモトープを用いると補体依存性細胞傷害(CDC)を高めることができる。

【０２１６】

好ましい態様において、キメラscFvの中に導入されたエピトープはCD20ミモトープ(SEQ ID NO.114)であり、選別および/または枯渇目的で、このミモトープに対して親和性を示す、注入されるmAbはリツキシマブである。

【０２１７】

一態様において、前記少なくとも1つのエピトープは、抗CD38 CARのVH鎖とVL鎖との間に挿入され、任意で、1つのリンカーによって前記VH鎖およびVL鎖に連結される。

【０２１８】

一部の態様では、「リンカー」という用語は、scFvの状況において用いられる時には、可変重鎖領域および可変軽鎖領域を連結して一緒にするために、単独で、または組み合わせて用いられるアミノ酸、例えば、グリシン残基および/またはセリン残基からなるペプチドリンカーを指す。一態様において、可動性ポリペプチドリンカーはグリシン/セリンリンカーであり、アミノ酸配列$(Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Ser)_n$または$(Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Ser)_n$を含む。式中、nは、1または1より大きな正の整数、例えば、n=1、n=2、n=3、n=4、n=5、n=6、n=7、n=8、n=9、およびn=10である。一態様において、可動性ポリペプチドリンカーには、$(Gly_4Ser)_4$または$(Gly_4Ser)_3$が含まれるが、これに限定されない。別の態様において、リンカーは、$(Gly_xSer)_n$の複数の反復、例えば、(GlySer)、(Gly_2Ser)、または(Gly_5Ser)の複数の反復を含み、式中、x=1、2、3、4、または5であり、nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10である。参照により本明細書に組み入れられる、WO2012/138475に記載のリンカーも本発明の範囲内に含まれる。

【０２１９】

態様において、前記CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、図8に図示したようなV1、V2、またはV3より選択されるポリペプチド構造のうち1つを有し、1つのCD20ミモトープが抗CD38 CARのVH鎖とVL鎖の間に挿入され、任意で、1つのリンカーによって前記VH鎖およびVL鎖に連結される。

【０２２０】

好ましい態様において、前記CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、図8に図示したようなV1、V2、およびV3より選択されるポリペプチド構造のうち1つを有し、前記構造は、モノクローナル抗CD38抗体に由来するVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメイン、CD3ζシグナル伝達ドメインおよび4-1BB由来共刺激ドメインを含む細胞質ドメインを含み、

前記V_HおよびV_Lは、それぞれ、SEQ ID NO.14および10(25A10)、SEQ ID NO.62および58(28F5)、SEQ ID NO.54および50(13F11)、SEQ ID NO.30および26(16B5)、SEQ ID NO.38および34(10F7)、SEQ ID NO.46および42(27B6)、またはSEQ ID NO.22および18(29B4)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含み、

1つのCD20ミモトープが抗CD38 CARのVH鎖とVL鎖の間に挿入され、任意で、1つのリンカーによって前記VH鎖およびVL鎖に連結される。

【０２２１】

別の態様において、前記少なくとも1つのエピトープは、CARのN末端、従って、scFvの先頭に挿入され、任意で、1つのリンカーによってCARのVH鎖およびN末端に連結される。

【０２２２】
別の態様において、前記少なくとも1つのエピトープはCARのscFvとヒンジとの間に挿入され、任意で、1つのリンカーによってVL鎖およびヒンジに連結される。
【０２２３】
好ましい態様において、前記CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、図8に図示したようなV1、V2、およびV3より選択されるポリペプチド構造のうち1つを有し、前記構造は、モノクローナル抗CD38抗体に由来するVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメイン、CD3ζシグナル伝達ドメインおよび4-1BB由来共刺激ドメインを含む細胞質ドメインを含み、
前記V_HおよびV_Lは、それぞれ、SEQ ID NO.14および10(25A10)、SEQ ID NO.62および58(28F5)、SEQ ID NO.54および50(13F11)、SEQ ID NO.30および26(16B5)、SEQ ID NO.38および34(10F7)、SEQ ID NO.46および42(27B6)、またはSEQ ID NO.22および18(29B4)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含み、1つのエピトープがCARのscFvとヒンジの間に挿入され、任意で、1つのリンカーによってVL鎖およびヒンジに連結される。
【０２２４】
さらに好ましい態様において、前記CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、図8に図示したようなV1、V2、およびV3より選択されるポリペプチド構造のうち1つを有し、前記構造は、モノクローナル抗CD38抗体に由来するVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメイン、CD3ζシグナル伝達ドメインおよび4-1BB由来共刺激ドメインを含む細胞質ドメインを含み、
前記V_HおよびV_Lは、それぞれ、SEQ ID NO.14および10(25A10)、SEQ ID NO.62および58(28F5)、SEQ ID NO.54および50(13F11)、SEQ ID NO.30および26(16B5)、SEQ ID NO.38および34(10F7)、SEQ ID NO.46および42(27B6)、またはSEQ ID NO.22および18(29B4)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含み、1つのエピトープがCARのscFvとヒンジの間に挿入され、任意で、1つのリンカーによってVL鎖およびヒンジに連結される。
【０２２５】
好ましい態様において、少なくとも2つのエピトープが本発明の抗CD38 CARの細胞外ドメインに挿入される。
【０２２６】
態様において、CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、図8に図示したようなV1、V2、およびV3より選択されるポリペプチド構造のうち1つを有し、前記構造は、モノクローナル抗CD38抗体に由来するVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメイン、CD3ζシグナル伝達ドメインおよび4-1BB由来共刺激ドメインを含む細胞質ドメインを含み、
前記V_HおよびV_Lは、それぞれ、SEQ ID NO.14および10(25A10)、SEQ ID NO.62および58(28F5)、SEQ ID NO.54および50(13F11)、SEQ ID NO.30および26(16B5)、SEQ ID NO.38および34(10F7)、SEQ ID NO.46および42(27B6)、またはSEQ ID NO.22および18(29B4)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含み、
前記細胞外結合(extra-binding)ドメインは、CD38に対して作られたVH鎖およびVL鎖と、FcγRIIIαまたはCD8αまたはIgG1ヒンジを含み、
前記2つのエピトープはscFvと前記ヒンジとの間にタンデムに挿入され、任意で、リンカーが2つのエピトープの間に、および/またはVHと2つのエピトープの間に置かれる。
【０２２７】
態様において、CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、図8に図示したようなV1、V2、およびV3より選択されるポリペプチド構造のうち1つを有し、前記構造は、モノクローナル抗CD38抗体に由来するVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメイン、ヒンジ、

膜貫通ドメイン、CD3ζシグナル伝達ドメインおよび41B-B由来共刺激ドメインを含む細胞質ドメインを含み、

前記V_HおよびV_Lは、それぞれ、SEQ ID NO.14および10(25A10)、SEQ ID NO.62および58(28F5)、SEQ ID NO.54および50(13F11)、SEQ ID NO.30および26(16B5)、SEQ ID NO.38および34(10F7)、SEQ ID NO.46および42(27B6)、またはSEQ ID NO.22および18(29B4)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列、ならびに2つのCD20ミモトープを含み、

前記細胞外結合ドメインは、CD38に対して作られたVH鎖およびVL鎖と、FcγRIIIαまたはCD8αまたはIgG1ヒンジを含み、

前記2つのエピトープはscFvの先頭に、すなわち、CARのN末端にタンデムに挿入され、

任意で、リンカーが2つのエピトープの間に、および/またはCARのN末端に置かれる。

【０２２８】

一態様によれば、細胞外ドメインの中に少なくとも2つのエピトープが、これらの間にVHがあるように挿入され、任意で、これらの成分は全て、少なくとも1つのリンカーが間に置かれる。

【０２２９】

別の態様によれば、細胞外ドメインの中に2つのエピトープが、これらの間にVLがあるように挿入され、任意で、これらの成分は全て、少なくとも1つのリンカーが間に置かれる。

【０２３０】

好ましい態様において、前記CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、図8に図示したようなV1、V2、およびV3より選択されるポリペプチド構造のうち1つを有し、前記構造は、モノクローナル抗CD38抗体に由来するVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメイン、CD3ζシグナル伝達ドメインおよび4-1BB由来共刺激ドメインを含む細胞質ドメインを含み、

前記V_HおよびV_Lは、それぞれ、SEQ ID NO.14および10(25A10)、SEQ ID NO.62および58(28F5)、SEQ ID NO.54および50(13F11)、SEQ ID NO.30および26(16B5)、SEQ ID NO.38および34(10F7)、SEQ ID NO.46および42(27B6)、またはSEQ ID NO.22および18(29B4)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含み、細胞外ドメインの中に2つのエピトープが、これらの間にVLがあるように挿入され、任意で、これらの成分は全て、少なくとも1つのリンカーが間に置かれる。

【０２３１】

さらに好ましい態様において、前記CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、図8に図示したようなV1、V2、およびV3より選択されるポリペプチド構造のうち1つを有し、前記構造は、モノクローナル抗CD38抗体に由来するVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメイン、CD3ζシグナル伝達ドメインおよび4-1BB由来共刺激ドメインを含む細胞質ドメインを含み、

前記V_HおよびV_Lは、それぞれ、SEQ ID NO.14および10(25A10)、SEQ ID NO.62および58(28F5)、SEQ ID NO.54および50(13F11)、SEQ ID NO.30および26(16B5)、SEQ ID NO.38および34(10F7)、SEQ ID NO.46および42(27B6)、またはSEQ ID NO.22および18(29B4)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含み、細胞外ドメインの中に2つのエピトープが、これらの間にVLがあるように挿入され、任意で、これらの成分は全て、少なくとも1つのリンカーが間に置かれる。

【０２３２】

別の態様によれば、前記CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は細胞外結合ドメインを含み、細胞外ドメインの中に少なくとも2つのエピトープが、これらの間にVH鎖およびVL鎖があるように挿入され、任意で、これらの成分は全て、少なくとも1つのリンカーが間に置かれる。

【０２３３】
好ましい態様において、前記CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、図8に図示したようなV1、V2、およびV3より選択されるポリペプチド構造のうち1つを有し、前記構造は、モノクローナル抗CD38抗体に由来するVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメイン、CD3ζシグナル伝達ドメインおよび4-1BB由来共刺激ドメインを含む細胞質ドメインを含み、
前記V_HおよびV_Lは、それぞれ、SEQ ID NO.14および10(25A10)、SEQ ID NO.62および58(28F5)、SEQ ID NO.54および50(13F11)、SEQ ID NO.30および26(16B5)、SEQ ID NO.38および34(10F7)、SEQ ID NO.46および42(27B6)、またはSEQ ID NO.22および18(29B4)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含み、細胞外ドメインの中に2つのエピトープが、これらの間にVH鎖およびVL鎖があるように挿入され、任意で、これらの成分は全て、少なくとも1つのリンカーが間に置かれる。
【０２３４】
さらに好ましい態様において、前記CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、図8に図示したようなV1、V2、およびV3より選択されるポリペプチド構造のうち1つを有し、前記構造は、モノクローナル抗CD38抗体に由来するVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメイン、CD3ζシグナル伝達ドメインおよび4-1BB由来共刺激ドメインを含む細胞質ドメインを含み、
前記V_HおよびV_Lは、それぞれ、SEQ ID NO.14および10(25A10)、SEQ ID NO.62および58(28F5)、SEQ ID NO.54および50(13F11)、SEQ ID NO.30および26(16B5)、SEQ ID NO.38および34(10F7)、SEQ ID NO.46および42(27B6)、またはSEQ ID NO.22および18(29B4)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含み、細胞外ドメインの中に2つのエピトープが、これらの間にVH鎖およびVL鎖があるように挿入され、任意で、これらの成分は全て、少なくとも1つのリンカーが間に置かれる。
【０２３５】
別の態様において、本発明の抗CD38 CARの細胞外ドメインの中に3つのエピトープが挿入される。
【０２３６】
特定の態様によれば、前記の本発明のCD38特異的CARは細胞外結合ドメインを含有し、細胞外ドメインの中に3つのエピトープが、これらの間にVH鎖およびVL鎖があるように挿入され、任意で、これらの成分は全て、少なくとも1つのリンカーが間に置かれる。
【０２３７】
好ましい態様において、前記CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、図8に図示したようなV1、V2、およびV3より選択されるポリペプチド構造のうち1つを有し、前記構造は、モノクローナル抗CD38抗体に由来するVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメイン、CD3ζシグナル伝達ドメインおよび4-1BB由来共刺激ドメインを含む細胞質ドメインを含み、
前記V_HおよびV_Lは、それぞれ、SEQ ID NO.14および10(25A10)、SEQ ID NO.62および58(28F5)、SEQ ID NO.54および50(13F11)、SEQ ID NO.30および26(16B5)、SEQ ID NO.38および34(10F7)、SEQ ID NO.46および42(27B6)、またはSEQ ID NO.22および18(29B4)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含み、細胞外ドメインの中に3つのエピトープが、これらの間にVH鎖およびVL鎖があるように挿入され、任意で、これらの成分は全て、少なくとも1つのリンカーが間に置かれる。
【０２３８】
さらに好ましい態様において、前記CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、図8に図示したようなV1、V2、およびV3より選択されるポリペプチド構造のうち1つを有し、前記構造は、モノクローナル抗CD38抗体に由来するVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合

ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメイン、CD3ζシグナル伝達ドメインおよび4-1BB由来共刺激ドメインを含む細胞質ドメインを含み、

前記V_HおよびV_Lは、それぞれ、SEQ ID NO.14および10(25A10)、SEQ ID NO.62および58(28F5)、SEQ ID NO.54および50(13F11)、SEQ ID NO.30および26(16B5)、SEQ ID NO.38および34(10F7)、SEQ ID NO.46および42(27B6)、またはSEQ ID NO.22および18(29B4)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含み、任意で、これらの成分は全て、少なくとも1つのリンカーが間に置かれる。

【０２３９】

別の態様において、CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、図8に図示したようなV1、V2、およびV3より選択されるポリペプチド構造のうち1つを有し、前記構造は、モノクローナル抗CD38抗体に由来するVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメイン、CD3ζシグナル伝達ドメインおよび4-1BB由来共刺激ドメインを含む細胞質ドメインを含み、

前記V_HおよびV_Lは、それぞれ、SEQ ID NO.14および10(25A10)、SEQ ID NO.62および58(28F5)、SEQ ID NO.54および50(13F11)、SEQ ID NO.30および26(16B5)、SEQ ID NO.38および34(10F7)、SEQ ID NO.46および42(27B6)、またはSEQ ID NO.22および18(29B4)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列、ならびに3つのCD20エピトープを含み、

前記細胞外結合ドメインは、CD38に対して作られたVH鎖およびVL鎖と、FcγRIIIαまたはCD8αまたはIgG1ヒンジを含み、

前記3つのエピトープはscFvと前記ヒンジとの間にタンデムに挿入され、

任意で、リンカーが3つのエピトープの間に、および/またはVHと3つのエピトープとの間に置かれる。

【０２４０】

別の態様において、CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、図8に図示したようなV1、V2、およびV3より選択されるポリペプチド構造のうち1つを有し、前記構造は、モノクローナル抗CD38抗体に由来するVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメイン、CD3ζシグナル伝達ドメインおよび4-1BB由来共刺激ドメインを含む細胞質ドメインを含み、

前記V_HおよびV_Lは、それぞれ、SEQ ID NO.14および10(25A10)、SEQ ID NO.62および58(28F5)、SEQ ID NO.54および50(13F11)、SEQ ID NO.30および26(16B5)、SEQ ID NO.38および34(10F7)、SEQ ID NO.46および42(27B6)、またはSEQ ID NO.22および18(29B4)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列、2つのCD20エピトープ、ならびに1つのCD34エピトープを含み、

前記細胞外結合ドメインは、CD38に対して作られたVH鎖およびVL鎖と、FcγRIIIαまたはCD8αまたはIgG1ヒンジを含み、

前記2つのエピトープはscFvと前記ヒンジとの間にタンデムに挿入され、

前記CD34エピトープは前記2つのCD20エピトープの間に挿入され、任意で、これらの成分は全てリンカーが間に置かれる。

【０２４１】

一部の態様では、エピトープ1は、SEQ ID NO 114または116～119のアミノ酸配列を有するmAb特異的エピトープである。

【０２４２】

一部の態様では、エピトープ2は、SEQ ID NO 114または116～119のアミノ酸配列を有するmAb特異的エピトープである。

【０２４３】

一部の態様では、エピトープ3およびエピトープ4は、SEQ ID NO 114または116～119のアミノ酸配列を有するmAb特異的エピトープである。

【０２４４】

一部の態様では、エピトープ1、エピトープ2、エピトープ3、およびエピトープ4の1つは、CD34エピトープ、好ましくは、SEQ ID NO122または123のエピトープである。一部の態様では、エピトープ1、エピトープ2、エピトープ3、およびエピトープ4の1つは、CD34エピトープ、好ましくは、SEQ ID NO122または123のエピトープであり、他のmAb特異的エピトープは、CD20ミモトープ、好ましくは、SEQ ID NO 114のミモトープである。

【０２４５】

好ましい態様において、CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、図8に図示したようなV1、V2、およびV3より選択されるポリペプチド構造のうち1つを有し、前記構造は、モノクローナル抗CD38抗体に由来するVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメイン、CD3ζシグナル伝達ドメインおよび4-1BB由来共刺激ドメインを含む細胞質ドメインを含み、

前記V_HおよびV_Lは、それぞれ、SEQ ID NO.14および10(25A10)、SEQ ID NO.62および58(28F5)、SEQ ID NO.54および50(13F11)、SEQ ID NO.30および26(16B5)、SEQ ID NO.38および34(10F7)、SEQ ID N0.46および42(27B6)、またはSEQ ID NO.22および18(29B4)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含み、2つのCD20エピトープは、SEQ ID NO 114または116～119からなる群において選択されるアミノ酸配列を有し、前記CD20エピトープは同一であるか、または異なる。

【０２４６】

好ましい態様において、CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、図8に図示したようなV2より選択されるポリペプチド構造のうち1つを有し、前記構造は、モノクローナル抗CD38抗体に由来するVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメイン、CD8αヒンジ、膜貫通ドメイン、CD3ζシグナル伝達ドメインおよび4-1BB由来共刺激ドメインを含む細胞質ドメインを含み、

前記V_HおよびV_Lは、それぞれ、SEQ ID NO.14および10(25A10)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含み、前記抗CD38 CARは、SEQ ID NO 114または116～119からなる群において選択されるアミノ酸配列を有する2つのCD20エピトープを含み、前記CD20エピトープは同一であるか、または異なる。

【０２４７】

さらに好ましい態様において、CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、それぞれ、SEQ ID NO.124と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む。

【０２４８】

好ましい態様において、CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、図8に図示したようなV1より選択されるポリペプチド構造のうち1つを有し、前記構造は、モノクローナル抗CD38抗体に由来するVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメイン、FcRIIIαヒンジ、膜貫通ドメイン、CD3ζシグナル伝達ドメインおよび4-1BB由来共刺激ドメインを含む細胞質ドメインを含み、

前記V_HおよびV_Lは、それぞれ、SEQ ID NO.62および58(28F5)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含み、前記抗CD38 CARは、SEQ ID NO 114または116～119からなる群において選択されるアミノ酸配列を有する2つのCD20エピトープを含み、前記CD20エピトープは同一であるか、または異なる。

【０２４９】

さらに好ましい態様において、CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、それぞれ、SEQ ID N0.126と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む。

【０２５０】

好ましい態様において、CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、図8に図示した

ようなV2より選択されるポリペプチド構造のうち1つを有し、前記構造は、モノクローナル抗CD38抗体に由来するVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメイン、CD8αヒンジ、膜貫通ドメイン、CD3ζシグナル伝達ドメインおよび4-1BB由来共刺激ドメインを含む細胞質ドメインを含み、

前記V_HおよびV_Lは、それぞれ、SEQ ID NO.14および10(25A10)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含み、前記抗CD38 CARは、SEQ ID NO 114または116～119からなる群において選択されるアミノ酸配列を有する2つのCD20エピトープを含み、前記CD20エピトープは同一であるか、または異なる。

【０２５１】

さらに好ましい態様において、CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、それぞれ、SEQ ID NO.126と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む。

【０２５２】

好ましい態様において、CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、図8に図示したようなV2より選択されるポリペプチド構造のうち1つを有し、前記構造は、モノクローナル抗CD38抗体に由来するVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメイン、FcRIIIαヒンジ、膜貫通ドメイン、CD3ζシグナル伝達ドメインおよび4-1BB由来共刺激ドメインを含む細胞質ドメインを含み、

前記V_HおよびV_Lは、それぞれ、SEQ ID NO.14および10(25A10)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含み、前記抗CD38 CARは、SEQ ID NO 114または116～119からなる群において選択されるアミノ酸配列を有する2つのCD20エピトープを含み、前記CD20エピトープは同一であるか、または異なる。

【０２５３】

さらに好ましい態様において、CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、それぞれ、SEQ ID NO.128と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む。

【０２５４】

一態様において、CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、図8に図示したようなV1、V2、およびV3より選択されるポリペプチド構造のうち1つを有し、前記構造は、モノクローナル抗CD38抗体に由来するVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメイン、CD3ζシグナル伝達ドメインおよび4-1BB由来共刺激ドメインを含む細胞質ドメインを含み、

前記V_HおよびV_Lは、それぞれ、SEQ ID NO.14および10(25A10)、SEQ ID NO.62および58(28F5)、SEQ ID NO.54および50(13F11)、SEQ ID NO.30および26(16B5)、SEQ ID NO.38および34(10F7)、SEQ ID NO.46および42(27B6)、またはSEQ ID NO.22および18(29B4)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列、SEQ ID NO 114または116～119からなる群において選択されるアミノ酸配列を有する3つのCD20エピトープ、ならびにSEQ ID NO.122または123のアミノ酸配列を有する1つのCD34エピトープを含み、前記CD20エピトープは同一であるか、または異なる。

【０２５５】

好ましい態様において、CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、図8に図示したようなV2より選択されるポリペプチド構造のうち1つを有し、前記構造は、モノクローナル抗CD38抗体に由来するVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメイン、CD8αヒンジ、膜貫通ドメイン、CD3ζシグナル伝達ドメインおよび4-1BB由来共刺激ドメインを含む細胞質ドメインを含み、

前記V_HおよびV_Lは、それぞれ、SEQ ID NO.62および58(28F5)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列、SEQ ID NO 114または116～119からなる群において選択されるアミノ酸配列を有する3つのCD

20エピトープ、ならびにSEQ ID NO.122または123のアミノ酸配列を有する1つのCD34エピトープを含み、前記CD20エピトープは同一であるか、または異なる。

【０２５６】

さらに好ましい態様において、CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、それぞれ、SEQ ID NO.125と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む。

【０２５７】

好ましい態様において、CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、図8に図示したようなV1より選択されるポリペプチド構造のうち1つを有し、前記構造は、モノクローナル抗CD38抗体に由来するVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメイン、FcRIIIαヒンジ、膜貫通ドメイン、CD3ζシグナル伝達ドメインおよび4-1BB由来共刺激ドメインを含む細胞質ドメインを含み、

前記V_HおよびV_Lは、それぞれ、SEQ ID NO.62および58(28F5)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列、SEQ ID NO 114または116～119からなる群において選択されるアミノ酸配列を有する3つのCD20エピトープ、ならびにSEQ ID NO.122または123のアミノ酸配列を有する1つのCD34エピトープを含み、前記CD20エピトープは同一であるか、または異なる。

【０２５８】

さらに好ましい態様において、CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、それぞれ、SEQ ID NO.127と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む。

【０２５９】

好ましい態様において、CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、図8に図示したようなV2より選択されるポリペプチド構造のうち1つを有し、前記構造は、モノクローナル抗CD38抗体に由来するVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメイン、CD8αヒンジ、膜貫通ドメイン、CD3ζシグナル伝達ドメインおよび4-1BB由来共刺激ドメインを含む細胞質ドメインを含み、

前記V_HおよびV_Lは、それぞれ、SEQ ID NO.14および10(25A10)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列、SEQ ID NO 114または116～119からなる群において選択されるアミノ酸配列を有する3つのCD20エピトープ、ならびにSEQ ID NO.122または123のアミノ酸配列を有する1つのCD34エピトープを含み、前記CD20エピトープは同一であるか、または異なる。

【０２６０】

さらに好ましい態様において、CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、それぞれ、SEQ ID NO.129と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む。

【０２６１】

好ましい態様において、CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、図8に図示したようなV1より選択されるポリペプチド構造のうち1つを有し、前記構造は、モノクローナル抗CD38抗体に由来するVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメイン、CD8αヒンジ、膜貫通ドメイン、CD3ζシグナル伝達ドメインおよび4-1BB由来共刺激ドメインを含む細胞質ドメインを含み、

前記V_HおよびV_Lは、それぞれ、SEQ ID NO.14および10(25A10)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含み、前記抗CD38 CARは、SEQ ID NO 114または116～119からなる群において選択されるアミノ酸配列を有する2つのCD20エピトープを含み、前記CD20エピトープは同一であるか、または異なる。

【０２６２】

さらに好ましい態様において、CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、それぞれ、SEQ ID NO.130と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくと

も99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む。

【０２６３】

好ましい態様において、CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、図8に図示したようなV1より選択されるポリペプチド構造のうち1つを有し、前記構造は、モノクローナル抗CD38抗体に由来するVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメイン、FcRIIIαヒンジ、膜貫通ドメイン、CD3ζシグナル伝達ドメインおよび4-1BB由来共刺激ドメインを含む細胞質ドメインを含み、

前記V_HおよびV_Lは、それぞれ、SEQ ID NO.14および10(25A10)と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列、SEQ ID NO 114または116～119からなる群において選択されるアミノ酸配列を有する3つのCD20エピトープ、ならびにSEQ ID NO.122または123のアミノ酸配列を有する1つのCD34エピトープを含み、前記CD20エピトープは同一であるか、または異なる。

【０２６４】

さらに好ましい態様において、CD38特異的キメラ抗原受容体(抗CD38 CAR)は、それぞれ、SEQ ID NO.131と少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む。

【０２６５】

薬物耐性T細胞を操作する方法

がん療法および同種異系T細胞の選択的生着を改善するために、操作されたT細胞に薬物耐性を付与して、操作されたT細胞を化学療法または免疫抑制剤の毒性副作用から保護することができる。実際に、本発明者らは、ほとんどの患者が、T細胞免疫療法を受ける前に治療の標準として化学療法および免疫枯渇剤（immune depleting agent）による処置を受けたことを観察した。本発明者らは、処置前に細胞をエクスビボで増殖させるために培養培地中に化学療法薬物を添加すること、または化学療法もしくは免疫抑制処置を受けている患者においてインビボで操作されたT細胞の選択的増殖物を得ることのいずれかによって、これらの処理を利用して操作されたT細胞の選択を助けることができることも発見した。

【０２６６】

薬物感受性細胞と比べて、薬物耐性遺伝子を発現するT細胞が生き残り、増殖するので、T細胞の薬物耐性はインビボまたはエクスビボでT細胞の濃縮も可能にする。特に、本発明は、

（a）T細胞を準備する工程、

（b）少なくとも1種類の薬物を選択する行程、

（c）薬物耐性を前記T細胞に付与するようにT細胞を改変する工程、

（d）前記操作されたT細胞を前記薬物の存在下で増殖させる工程

を含む、免疫療法のために同種異系かつ薬物耐性のT細胞を操作する方法に関し、任意で、前述の工程は、以前に述べたように、本方法の工程と組み合わせてもよい。

【０２６７】

薬物耐性は、薬物に対する細胞の感受性を担う1種または複数種の遺伝子（薬物感受性遺伝子）、例えばヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HPRT）遺伝子（GenBank： M26434.1）を不活性化することによって、T細胞に付与することができる。特に、細胞分裂停止性の代謝産物である6-チオグアニン（6TG）に対する耐性を付与するために、操作されたT細胞においてHPRTを不活性化することができる。6-チオグアニン（6TG）は、HPRTによって、現在、がん患者、特に白血病患者を処置するのに用いられている細胞傷害性チオグアニンヌクレオチドに変換される（Hacke, Treger et al. 2013）。別の例では、通常、T細胞表面に発現しているCD3を不活性化すると、テプリズマブなどの抗CD3抗体に対する耐性を付与することができる。

【０２６８】

態様において、不活化される耐性遺伝子は、デオキシシチジンキナーゼ(dCk)をコードする遺伝子である。デオキシシチジンキナーゼ(DCK)は、数種類のデオキシリボヌクレオ

シドとそのヌクレオシド類似体のリン酸化に必要とされる。DCK欠損は抗ウイルス剤および抗がん化学療法剤に対する耐性と関連する。逆に、デオキシシチジンキナーゼ活性の増加は、これらの化合物から細胞傷害性ヌクレオシド三リン酸誘導体への活性化の増加と関連する。DCKは薬物耐性および感受性との関連性があるために臨床上重要である(Hazra S, Szewczak A, Ort S, Konrad M, Lavie A (2011)「Post-translational phosphorylation of serine 74 of human deoxycytidine kinase favors the enzyme adopting the open conformation making it competent for nucleoside binding and release」. Biochemistry 50 (14): 2870-8)。

【０２６９】

薬物耐性はまた、薬物耐性遺伝子を発現させることによってT細胞に付与することができる。前記薬物耐性遺伝子とは、化学療法剤（例えば、メトトレキセート）などの薬剤に対する「耐性」をコードする核酸配列を指す。言い換えると、細胞内で薬物耐性遺伝子を発現させると、薬物耐性遺伝子のない対応する細胞を増殖させるより多量に、薬剤の存在下で細胞を増殖させることが可能になる。本発明の薬物耐性遺伝子は、代謝拮抗物質、メトトレキセート、ビンブラスチン、シスプラチン、アルキル化剤、アントラサイクリン、細胞傷害性抗生物質、抗イムノフィリン、その類似体または誘導体などに対する耐性をコードしてもよい。

【０２７０】

薬物耐性を細胞に付与する、いくつかの遺伝子、例えば、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）、イノシン一リン酸デヒドロゲナーゼ2（IMPDH2）、カルシニューリン、またはメチルグアニントランスフェラーゼ（MGMT）の変種対立遺伝子が同定されている。前記薬物耐性遺伝子は、前記遺伝子をコードするトランスジーンを細胞に導入することによって細胞内で発現されてもよく、相同組換えによって前記薬物耐性遺伝子を細胞ゲノムに組み込むことによって細胞内で発現されてもよい。標的とする細胞に薬物耐性を付与するのに潜在的に使用することができる、いくつかの他の薬物耐性遺伝子が同定されている（Takebe, Zhao et al. 2001；Sugimoto, Tsukahara et al. 2003；Zielske, Reese et al. 2003；Nivens, Felder et al. 2004；Bardenheuer, Lehmberg et al. 2005；Kushman, Kabler et al. 2007）。

【０２７１】

DHFRは、細胞内のテトラヒドロ葉酸量の調節に関与し、DNA合成に必須の酵素である。メトトレキセート（MTX）などの葉酸類似体は、DHFRを阻害し、従ってクリニックにおいて抗悪性腫瘍剤として用いられる。療法において用いられる葉酸代謝拮抗剤による阻害に対する耐性を高めた様々なDHFR変異型が述べられている。特定の態様において、本発明による薬物耐性遺伝子は、葉酸代謝拮抗剤処置、例えば、メトトレキセートに対する耐性を付与する少なくとも1つの変異を含む、ヒト野生型DHFRの変異型をコードする核酸配列（GenBank： AAH71996.1）でもよい。特定の態様において、DHFR変異型は、位置G15、L22、F31、またはF34、好ましくは、位置L22またはF31に少なくとも1つの変異アミノ酸を含む（（Schweitzer, Dicker et al. 1990）；国際出願 W094/24277；米国特許第6,642,043号）。

【０２７２】

本明細書で使用する「葉酸代謝拮抗剤」または「葉酸類似体」は、ある程度のレベルで葉酸代謝経路を妨害するように向けられた分子を指す。葉酸代謝拮抗剤の例には、例えば、メトトレキセート（MTX）；アミノプテリン；トリメトレキセート（Neutrexin（商標））；エダトレキサート；N10-プロパルギル-5,8-ジデアザ葉酸（CB3717）；ZD1694（Tumodex）、5,8-ジデアザイソ葉酸（IAHQ）；5,10-ジデアザテトラヒドロ葉酸（DDATHF）；5-デアザ葉酸；PT523（Nα-（4-アミノ-4-デオキシプテロイル）-Nδ-ヘミフタロイル-L-オルニチン）；10-エチル-10-デアザアミノプテリン（DDATHF、ロマトレキソール（lomatrexol））；ピリトレキシム；10-EDAM；ZD1694；GW1843；ペメトレキサート（Pemetrexate）およびPDX（10-プロパルギル-10-デアザアミノプテリン）が含まれる。

【０２７３】

薬物耐性遺伝子の別の例はまた、グアノシンヌクレオチド新規合成における律速酵素であるイオニシン（ionisine）-5'-一リン酸デヒドロゲナーゼII（IMPDH2）の変異型または改変型でもよい。IMPDH2の変異型または改変型はIMPDH阻害剤耐性遺伝子である。IMPDH阻害剤はミコフェノール酸（MPA）またはそのプロドラッグであるミコフェノール酸モフェチル（MMF）でもよい。変異IMPDH2は、野生型ヒトIMPDH2（NP_000875.2）のMAP結合部位に、IMPDH阻害剤耐性を大幅に高める少なくとも1つの変異、好ましくは2つの変異を含んでもよい。変異は、好ましくは、位置T333および/またはS351（Yam, Jensen et al. 2006；Sangiolo, Lesnikova et al. 2007；Jonnalagadda, Brown et al. 2013）にある。特定の態様において、位置333のスレオニン残基はイソロイシン残基と交換され、位置351のセリン残基はチロシン残基と交換される。

【０２７４】

別の薬物耐性遺伝子は変異型カルシニューリンである。カルシニューリン（PP2B）は、多くの生物学的プロセスに関与し、T細胞活性化の中心をなす広範に発現しているセリン/スレオニンプロテインホスファターゼである。カルシニューリンは、触媒サブユニット（CnA；3種類のアイソフォーム）および調節サブユニット（CnB；2種類のアイソフォーム）からなるヘテロ二量体である。T細胞受容体が結合した後に、カルシニューリンは転写因子NFATを脱リン酸化し、転写因子NFATは核およびIL2などの活発な重要標的遺伝子に移動できるようになる。FKBP12と複合体化したFK506、またはCyPAと複合体化したシクロスポリンA（CsA）は、カルシニューリン活性部位にNFATが接近するのをブロックし、NFATの脱リン酸を阻止し、それによってT細胞活性化を阻害する（Brewin, Mancao et al. 2009）。本発明の薬物耐性遺伝子は、FK506および/またはCsAなどのカルシニューリン阻害剤に対して耐性のカルシニューリン変異型をコードする核酸配列でもよい。特定の態様において、前記変異型は、野生型カルシニューリンヘテロ二量体aの位置：V314、Y341、M347、T351、W352、L354、K360に少なくとも1つの変異アミノ酸、好ましくは、位置T351およびL354またはV314およびY341に二重変異を含んでもよい。本明細書に記載のアミノ酸位置の対応は、野生型ヒトカルシニューリンヘテロ二量体のアミノ酸の位置で表されることが多い（GenBank： ACX34092.1）。

【０２７５】

別の特定の態様において、前記変異型は、野生型カルシニューリンヘテロ二量体bの位置：V120、N123、L124、またはK125に少なくとも1つの変異アミノ酸、好ましくは、位置L124およびK125に二重変異を含んでもよい。本明細書に記載のアミノ酸位置の対応は、野生型ヒトカルシニューリンヘテロ二量体bポリペプチドのアミノ酸の位置で表されることが多い（GenBank： ACX34095.1）。

【０２７６】

別の薬物耐性遺伝子は、ヒトアルキルグアニントランスフェラーゼ（hAGT）をコードするO（6）-メチルグアニンメチルトランスフェラーゼ（MGMT）である。AGTは、アルキル化剤、例えば、ニトロソ尿素およびテモゾロミド（TMZ）の細胞傷害作用に対する耐性を付与するDNA修復タンパク質である。6-ベンジルグアニン（6-BG）は、ニトロソ尿素の毒性を増強し、この薬剤の細胞傷害作用を増強するためにTMZと同時投与されるAGT阻害剤である。AGT変種をコードするいくつかのMGMT変異型は、6-BGによる不活性化に対して高度に耐性があるが、DNA損傷を修復する能力を保持している（Maze, Kurpad et al. 1999）。特定の態様において、AGT変異型は野生型AGT位置P140の変異アミノ酸を含んでもよい（UniProtKB： P16455）。

【０２７７】

別の薬物耐性遺伝子は多剤耐性タンパク質1（MDR1）遺伝子でもよい。この遺伝子は、細胞膜を通過する代謝副産物の輸送に関与するP-糖タンパク質（P-GP）として知られる膜糖タンパク質をコードする。P-Gpタンパク質は、構造が関係しない数種類の化学療法剤に対して広い特異性を示す。従って、MDR-1（NP_000918）をコードする核酸配列を発現させることによって薬物耐性を細胞に付与することができる。

【０２７８】

薬物耐性遺伝子はまた、ble遺伝子またはmcrA遺伝子などの細胞傷害性抗生物質でもよい。免疫細胞におけるble遺伝子またはmcrAの異所的発現は、それぞれ、化学療法剤であるブレオマイシンまたはマイトマイシンCに曝露されたときに選択上の利点をもたらす。

【０２７９】

T細胞は、免疫抑制剤に対して耐性にすることもできる。

免疫抑制剤は、いくつかの作用機序の1つによって免疫機能を抑制する薬剤である。言い換えると、免疫抑制剤は、免疫応答の程度および/または貪食を減らす能力によって示される化合物が果たす役割である。非限定的な例として、免疫抑制剤は、カルシニューリン阻害剤、ラパマイシン標的、インターロイキン-2α鎖遮断薬、イノシン一リン酸デヒドロゲナーゼ阻害剤、ジヒドロ葉酸還元酵素阻害剤、コルチコステロイド、または免疫抑制性代謝拮抗物質でもよい。古典的な細胞傷害性免疫抑制剤はDNA合成を阻害することによって作用する。その他の免疫抑制剤はT細胞を活性化することによって作用してもよく、ヘルパー細胞の活性化を阻害することによって作用してもよい。本発明による方法を用いると、T細胞内にある免疫抑制剤の標的を不活性化することによって、免疫療法のためにT細胞に免疫抑制耐性を付与することが可能になる。非限定的な例として、免疫抑制剤の標的は、免疫抑制剤の受容体、例えば、CD52、グルココルチコイド受容体（GR）、FKBPファミリー遺伝子メンバー、およびシクロフィリンファミリー遺伝子メンバーでもよい。

【０２８０】

免疫能力のある宿主では、同種異系細胞は通常、宿主免疫系によって素早く拒絶される。放射線照射されていない血液製剤に存在する同種異系白血球はわずか5～6日間しか残らないことが証明されている。従って、同種異系細胞の拒絶反応を阻止するためには、宿主免疫系を効果的に抑制しなければならない。免疫抑制のためにグルココルチコイドステロイドが治療に広く用いられる。このクラスのステロイドホルモンは、T細胞サイトゾルに存在するグルココルチコイド受容体（GR）に結合し、その結果、核に移行し、免疫プロセスに関与する多数の遺伝子の発現を調節する特定のDNAモチーフに結合する。T細胞をグルココルチコイドステロイドで処理するとサイトカイン産生レベルが低下し、それによって、T細胞アネルギーが発生し、T細胞活性化が妨害される。アレムツズマブはCAMPATH1-Hとしても知られ、12アミノ酸のグリコシルホスファチジル-イノシトール-（GPI）結合糖タンパク質であるCD52を標的とするヒト化モノクローナル抗体である（Waldmann and Hale, 2005）。CD52はTリンパ球およびBリンパ球において高レベルで発現し、単球では低レベルで発現しているのに対して、顆粒球および骨髄前駆体には存在しない。CD52に対して向けられたヒト化モノクローナル抗体であるアレムツズマブによる処置は循環リンパ球および単球の急速な枯渇を誘導することが示されている。アレムツズマブは、T細胞リンパ腫の処置において、ある特定の場合では移植のための移植前処置の一環として頻繁に用いられる。しかしながら、養子免疫療法の場合、免疫抑制薬物の使用は、導入された治療用T細胞に悪影響も及ぼすことがある。従って、これらの条件で養子免疫療法アプローチを効果的に使用するには、導入された細胞は免疫抑制処置に対して耐性になる必要があるだろう。

【０２８１】

上記工程の好ましい態様として、免疫抑制処置に特異的な、工程（b）の前記遺伝子はCD52であり、工程（d）の免疫抑制処置は、CD52抗原を標的とするヒト化抗体を含む。別の態様として、免疫抑制処置に特異的な、工程（b）の前記遺伝子はグルココルチコイド受容体（GR）であり、工程（d）の免疫抑制処置は、コルチコステロイド、例えば、デキサメタゾンを含む。別の態様として、免疫抑制処置に特異的な、工程（b）の前記遺伝子はFKBPファミリー遺伝子メンバーまたはその変種であり、工程（d）の免疫抑制処置は、タクロリムスまたはフジマイシン（fujimycin）としても知られるFK506を含む。別の態様として、前記FKBPファミリー遺伝子メンバーはFKBP12またはその変種である。別の態様として、免疫抑制処置に特異的な、工程（b）の前記遺伝子はシクロフィリンファミリー遺伝子メンバーまたはその変種であり、工程（d）の免疫抑制処置はシクロスポリンを含む。

【０２８２】

本発明の特定の態様において、前記方法の遺伝子組換え工程は、CD52およびGR、CD52およびTCRα、CDR52およびTCRβ、GRおよびTCRα、GRおよびTCRβ、TCRαおよびTCRβからなる群より選択される2種類の遺伝子の不活性化に依拠する。別の態様において、前記方法の遺伝子組換え工程は2種類を超える遺伝子の不活性化に依拠する。遺伝子組換えは、好ましくは異なる遺伝子を標的とする少なくとも2種類のRNAガイドを用いてエクスビボで行われる。

【０２８３】

遺伝子を不活性化することによって、関心対象の遺伝子が機能的なタンパク質の形態で発現されないことが意図される。

【０２８４】

免疫療法のための高活性T細胞を操作する

本発明によれば、T細胞は、炎症性Tリンパ球、細胞傷害性Tリンパ球、制御性Tリンパ球、またはヘルパーTリンパ球からなる群より選択することができる。別の態様において、前記細胞はCD4+Tリンパ球およびCD8+Tリンパ球からなる群に由来してもよい。前記細胞は血液から抽出されてもよく、幹細胞に由来してもよい。幹細胞は成人幹細胞、胚性幹細胞、さらに具体的には、非ヒト幹細胞、臍帯血幹細胞、前駆細胞、骨髄幹細胞、人工多能性幹細胞、全能性幹細胞、または造血幹細胞でもよい。代表的なヒト細胞はCD34+細胞である。本発明の細胞の増殖および遺伝子組換えの前に、様々な非限定的な方法によって対象から細胞供給源を得ることができる。T細胞は、末梢血単核球、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位に由来する組織、腹水、胸水、脾臓組織、および腫瘍を含む多数の非限定的な供給源から得ることができる。本発明のある特定の態様では、入手可能であり、かつ当業者に公知の任意の数のT細胞株を使用することができる。別の態様において、前記細胞は健常ドナーから得られてもよく、がんと診断された患者または感染症と診断された患者から得られてもよい。別の態様において、前記細胞は、異なる表現型特徴を示す細胞の混合集団の一部である。本発明の範囲には、以前に述べられた方法による形質転換T細胞から得られた細胞株も包含される。

【０２８５】

本発明のさらなる局面として、本発明によるT細胞は、特に、「免疫チェックポイント」と呼ばれる、T細胞調節全体に関与するタンパク質の発現を調整することによって、本発明によるT細胞の活性および/または活性化を増強するようにさらに操作されてもよく、好ましくは、遺伝子操作されてもよい。

【０２８６】

免疫チェックポイント

「免疫チェックポイント」という用語は、T細胞が発現する分子の一群を意味することが当業者により理解される。これらの分子は、免疫応答を下方制御または阻害するための「ブレーキ」として効果的に働く。免疫チェックポイント分子には、免疫細胞を直接阻害する、Programmed Death1（PD-1。PDCD1またはCD279としても知られる。アクセッション番号：NM_005018）、細胞傷害性Tリンパ球抗原4（CTLA-4。CD152としても知られる。GenBankアクセッション番号AF414120.1）、LAG3（CD223としても知られる。アクセッション番号：NM_002286.5）、Tim3（HAVCR2としても知られる。GenBankアクセッション番号：JX049979.1）、BTLA（CD272としても知られる。アクセッション番号：NM_181780.3）、BY55（CD160としても知られる。GenBankアクセッション番号：CR541888.1）、TIGIT（IVSTM3としても知られる。アクセッション番号：NM_173799）、LAIR1（CD305としても知られる。GenBankアクセッション番号：CR542051.1 （Meyaard, 1997 #122））、SIGLEC10（GeneBankアクセッション番号：AY358337.1）、2B4（CD244としても知られる。アクセッション番号：NM_001166664.1）、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、CD96、CRTAM、SIGLEC7（Nicoll, 1999 #123）、SIGLEC9（Zhang, 2000 #124；Ikehara, 2004 #125）、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、TGFBRII、TGFRBRI、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF（Quigley, 2010 #121）、GUCY1A2、GUCY1A3

、GUCY1B2、GUCY1B3が含まれるが、これに限定されない。例えば、CTLA-4は、ある特定のCD4 T細胞上およびCD8 T細胞上で発現する細胞表面タンパク質であり、抗原提示細胞上に、そのリガンド（B7-1およびB7-2）が結合すると、T細胞活性化およびエフェクター機能が阻害される。従って、本発明は、特に免疫療法のために、T細胞を操作する方法に関し、本方法は、免疫チェックポイントに関与する少なくとも1種類のタンパク質、特にPD1および/もしくはCTLA-4、または表3において言及した任意の免疫チェックポイントタンパク質を不活性化することによってT細胞を遺伝子組換えする工程を含む。

【０２８７】

（表７）免疫チェックポイントタンパク質をコードする遺伝子のリスト

経路		経路の中にある、不活性化することができる遺伝子
共抑制性受容体	CTLA4 (CD152)	CTLA4, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22
	PDCD1 (PD-1, CD279)	PDCD1
	CD223 (lag3)	LAG3
	HAVCR2 (tim3)	HAVCR2
	BTLA(cd272)	BTLA
	CD160(by55)	CD160
	IgSF ファミリー	TIGIT
		CD96
		CRTAM
	LAIR1(cd305)	LAIR1
	SIGLECs	SIGLEC7
		SIGLEC9
	CD244(2b4)	CD244
デスレセプター	TRAIL	TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7
	FAS	FADD, FAS
サイトカインシグナル伝達	TGF-βシグナル伝達	TGFBRII, TGFBRI, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1
	IL10 シグナル伝達	IL10RA, IL10RB, HMOX2
	IL6シグナル伝達	IL6R, IL6ST
アルギニン／トリプトファン飢餓		EIF2AK4
TCRシグナル伝達の阻止		CSK, PAG1
		SIT1
誘導性Treg	誘導性Treg	FOXP3
疲弊を制御する転写因子	疲弊を制御する転写因子	PRDM1 (=blimp1, ヘテロ接合性マウスは、野生型またはコンディショナルKOより良好に慢性ウイルス感染症を抑制する)
		BATF
低酸素を介した寛容	iNOS により誘導されるグアニル酸シクラーゼ	GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2, GUCY1B3

【０２８８】

治療用途

一般的な局面において、本発明は、がん、感染症、および自己免疫疾患などの病的細胞の発生と関連する疾患の処置における新たな養子免疫療法戦略のための方法に関する。

【０２８９】

本発明の主な目的は、T細胞と共通して見られる特定の抗原マーカーをもつ病的細胞を標的とする可能性である。病的細胞とは、健康の悪化を引き起こすと考えられる、患者に存在する、あらゆるタイプの細胞を意味する。

【０２９０】

一般的に、病的細胞は、患者の軽快を得るために低減または排除することが必要な悪性細胞または感染細胞である。

【０２９１】

これらの抗CD38 CAR免疫細胞は、特に、CD38遺伝子不活化を受けた時には、CD38発現細胞を介した病理学的状態またはCD38発現細胞の直接的もしくは間接的な活性を特徴とする状態、例えば、MM、MM、RRMM、ALL、NHLリンパ腫(上記で言及)、これらの関連する合併症、およびこれらの関連する状態を処置するための医用薬剤として有用である。

【０２９２】

態様において、CD8遺伝子が不活化された前記抗CD38 CAR免疫細胞は医用薬剤として用いられ、SEQ ID NO.82～84(25A10)、SEQ ID NO.100～102(28F5)、SEQ ID NO.97～99(13F11)、SEQ ID NO.88～90(16B5)、SEQ ID NO.91～93(10F7)、SEQ ID NO.94～96(27B6)、およびSEQ ID NO.85～87(29B4)、より好ましくはSEQ ID NO.82～84(25A10)、SEQ ID NO.100～102(28F5)、SEQ ID NO.97～99(13F11)、およびSEQ ID NO.88～90(16B5)、より好ましくは、SEQ ID NO.82～84(25A10)およびSEQ ID NO.100～102(28F5)より選択されるものと少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む。

【０２９３】

好ましい態様において、CD8遺伝子が不活化された前記抗CD38 CAR免疫細胞は医用薬剤として用いられ、SEQ ID NO.82～84(25A10)およびSEQ ID NO.100～102(28F5)より選択されるものと少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む。

【０２９４】

さらに好ましい態様において、CD8遺伝子が不活化された前記抗CD38 CAR免疫細胞は医用薬剤として用いられ、SEQ ID NO.82(25A10-V1 CAR)より選択されるものと少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99％の同一性を示すポリペプチド配列を含む。

【０２９５】

前記処置は、寛解させる処置でもよく、根治的処置でもよく、予防的処置でもよい。前記処置は自己由来免疫療法の一環でもよく、同種異系免疫療法処置の一環でもよい。自己由来とは、患者の処置に用いられる細胞、細胞株、または細胞集団が前記患者またはヒト白血球抗原（HLA）適合ドナーに由来することを意味する。同種異系とは、患者の処置に用いられる細胞または細胞集団が前記患者に由来しないが、ドナーに由来することを意味する。

【０２９６】

以前の方法の1つに従って操作された免疫細胞、例えば、T細胞はプールされてもよく、凍結されてもよく、1人または数人の患者に投与されてもよい。従って、本発明は、以前に述べられた操作されたT細胞を患者自身のT細胞に方向付けることによって免疫疾患を処置するための方法を包含する。以前の方法の1つに従って操作された免疫細胞は非アロ反応性にされた時に「既製の」治療製品として利用することができる。これは、前記方法の1つに従って操作された免疫細胞が、広く、これを必要とする患者に注入できることを意味する。

【０２９７】

一態様において、以前に述べられたように様々な方法によって得られた単離された細胞または前記単離された細胞に由来する細胞株は医用薬剤として使用することができる。

【０２９８】

好ましい態様において、本発明による前記単離された細胞または前記単離された細胞に

由来する細胞株は、がんの処置を必要とする患者においてがんを処置するための医用薬剤の製造において使用することができる。

【０２９９】

好ましい態様において、本発明の抗CD38 CAR発現細胞を用いて処置され得るがんは、白血病もしくはリンパ腫、白血病もしくはリンパ腫に関連する疾患、またはその合併症である。

【０３００】

特定の態様において、抗CD38 CAR発現T細胞は、CD38+血液悪性腫瘍を処置するための医用薬剤として、特に、標準療法を受けて、もしくは標準療法の後に進行してしまった人、または有効な標準療法がない人(難治性/再発性患者)に提供される。

【０３０１】

「再発性」とは、血液悪性腫瘍が処置され、改善したが、再発してしまった対象を指す。

【０３０２】

「難治性(Refracted)」とは、血液悪性腫瘍が処置されたが、全く改善されず、従って、進行してしまった対象を指す。

【０３０３】

本開示の文脈において、CD38+血液悪性腫瘍は、特に、非ホジキンリンパ腫(NHL)(例えば、バーキットリンパ腫(BL)およびT細胞リンパ腫(TCL)を含む)、多発性骨髄腫(MM)、慢性リンパ性白血病(CLL)(例えば、B慢性リンパ性白血病(B-CLL)または毛様細胞性白血病(HCL))、BおよびT急性リンパ性白血病(ALL)、急性骨髄性白血病(AML)、ホジキンリンパ腫(HL)、ならびに慢性骨髄性白血病(CML)からなる群より選択され、がん細胞はCD38+細胞であるか、またはCD38+細胞を含む。

【０３０４】

特に、CD38+血液悪性腫瘍は、B細胞非ホジキンリンパ腫(NHL)、多発性骨髄腫(MM)、急性骨髄性白血病(AML)、急性リンパ芽球性白血病(B細胞ALL)、および/または慢性リンパ性白血病(CLL)、さらに具体的には多発性骨髄腫(MM)、最も詳しくは再発性および/または難治性の多発性骨髄腫である。

【０３０５】

血液悪性腫瘍を特定する方法は当業者に公知であり、最初の段階として、全血球数(CBC)および末梢血スミア検査を含む。確定診断には、通常、形態検査(morphology study)のために十分な骨髄吸引液および/または生検材料が必要とされる。形態検査は、最終的には、フローサイトメトリー分析、細胞遺伝学によって、さらには、分子的技法によって補完される。この血液悪性腫瘍に由来する細胞が$CD38^{+}$であることを確かめる技法は当業者に公知であり、標準的な分子生物学法、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)および/または免疫化学的方法、例えば、ウエスタンブロット分析を含む。

【０３０６】

好ましい態様において、本発明は、60歳を超える患者または20歳未満の患者におけるCD38+血液悪性腫瘍、例えば、上記で示されたCD38+血液悪性腫瘍に対する処置を提供する。

【０３０７】

好ましい態様において、前記医用薬剤は、難治性/再発性多発性骨髄腫(RRMM)などのMMサブタイプの多発性骨髄腫(MM)の処置に使用することができる。

【０３０８】

別の態様において、前記医用薬剤は急性リンパ芽球性白血病(ALL)の処置に使用することができる。

【０３０９】

多発性骨髄腫

多発性骨髄腫はモノクローナルタンパク質(Mタンパク質)の存在によって検出される場合がある。「Mタンパク質」とはパラプロテイン(モノクローナルタンパク質、すなわちMタンパク質)を指す。このパラプロテインは、プラズマ細胞のクローン増殖によって過剰

に産生された免疫グロブリンまたは免疫グロブリン軽鎖である。ある特定の閾値を超える量が多発性骨髄腫を示す。通常、血清中ならびに尿中のMタンパク質が定量される。血清中のMタンパク質レベルは、典型的には、血清電気泳動によって、または、例えば、特異的免疫グロブリンアッセイによって測定される。しかしながら、特異的免疫グロブリン定量では、正常免疫グロブリンが結果に含まれるので、Mタンパク質は常に過大評価される。この理由から、Mタンパク質のベースラインおよび経過観察の測定は同じ方法によって行わなければならない(Riches P G et al., 1991)。

【０３１０】

投与量/処置されるMM患者群

一態様において、0.5g/dLを超える血清Mタンパク質は多発性骨髄腫を示す。

【０３１１】

一態様において、24時間尿で200mgを超える尿Mタンパク質は多発性骨髄腫(MM)を示す。

【０３１２】

別の態様において、約10mg/dLを超えるFLCと、異常なFLC比を伴う無血清軽鎖(FLC)の上昇は多発性骨髄腫を示す。さらに、MMは、尿中に見出される免疫グロブリン軽鎖によって特定される可能性がある。このパラプロテインはベンス・ジョーンズタンパク質と呼ばれ、遊離軽鎖で構成される尿パラプロテインである。軽鎖はラムダ(λ)および/またはカッパ(κ)遊離軽鎖である。これらの遊離軽鎖(FLC)は市販の検査によって測定される場合がある。遊離軽鎖の測定値とはFLCκおよびFLCλ遊離軽鎖の測定値を指し、これから、FLCκとFLCλとの遊離軽鎖比(FLC)(FLCκ/λ比)が得られる。正常なFLCκ/λ比は0.26～1.65である。

【０３１３】

多発性骨髄腫患者では、軽鎖κまたはλのいずれかが優勢に産生される場合があり、これによりFLCκ/λ比が変化する。従って、多発性骨髄腫を示す異常なFLCκ/λ比は、0.26より小さいか、または1.65より大きなFLCκ/λ比である。

【０３１４】

従って、一態様において、多発性骨髄腫を有する対象には、(a)約0.5g/dLを超える測定可能な血清Mタンパク質、および/または(b)約200mgを超える尿Mタンパク質(24時間尿)、および/または(c)約10mg/dLを超えるFLCと、異常なFLC比を伴う無血清軽鎖(FLC)の上昇がある。

【０３１５】

一態様において、本発明の操作された免疫細胞によって処置される対象には、多発性骨髄腫と、ある特定の遺伝子特徴、例えば、フィラデルフィア染色体として知られる9番染色体と22番染色体の間での転座;または4番染色体と11染色体の間での転座[t(4;11)(q21;q23)];高二倍性、例えば、三染色体性4、10、17、または染色体9p欠失がある。

【０３１６】

従って、一態様では、本発明の単離された細胞によって処置される対象には、17p欠失、t(4、14)、t(14、16)、t(14、20)、および/または3コピーを超える1q21がある。多発性骨髄腫と、ある特定の遺伝子特徴、例えば、染色体欠失17p、転座t(4、14)、t(14、16)、t(14、20)、または増幅、例えば、3コピーを超える1q21を有する対象が、良くないアウトカムと関連することは当技術分野において公知である(Avet-Loiseau H et al., 2011)。Van Laar et al.(2014)などの研究者は、多発性骨髄腫にかかっている対象に対するゲノムプロファイリング試験を開発した。このタイプの試験を用いると、医師は、多発性骨髄腫にかかっている対象を、単にいくつかの染色体異常ではなく、ゲノム発現プロファイルに基づいて分類することが可能になる。

【０３１７】

一態様において、対象はハイリスク遺伝子発現プロファイリング(GEP)シグネチャーを有してもよい。例えば、この話題はShaughnessy et al (2007)においてさらに詳細に述べられている。

【０３１８】

対象は、上記で述べた特徴の任意の組み合わせを有してもよい。

【０３１９】

急性リンパ芽球性白血病(ALL)

一態様において、本発明の医用薬剤によって処置することができる白血病は急性リンパ芽球性白血病(ALL)である。

【０３２０】

上記の任意の態様の別の態様において、白血病は小児科(小児)ALLである。

【０３２１】

上記の任意の態様の別の態様において、白血病は再発性ALLである。

【０３２２】

上記の任意の態様の別の態様において、白血病は難治性ALLである。

【０３２３】

上記の任意の態様の別の態様において、白血病は薬剤抵抗性ALLである。

【０３２４】

さらなる態様において、白血病はグルココルチコイド抵抗性ALLである。

【０３２５】

さらに別の態様において、前記医用薬剤は、マントル細胞白血病(MCL)などのB細胞非ホジキンリンパ腫(NHL)患者の処置に使用することができる。

【０３２６】

CD38を介した他の病理学的状態

別の態様によれば、本発明の操作された免疫細胞は、前立腺、精嚢、虫垂などのCD38+細胞性固形腫瘍、または糖尿病などの病態を処置するのに用いられる(Antonelli et al; 2004)。

【０３２７】

関連する処置

一部の態様において、対象は抗がん療法で以前に処置されたことがある。特に、前記の以前の抗がん療法は、化学療法、標的がん療法、放射線療法、骨髄移植および/または幹細胞移植、ならびに免疫療法で構成される群より選択されてもよい。さらに好ましい態様において、本発明は、小児科処置、特に、MM、RRMM、またはこれらに関連する疾患または合併症に対する小児科処置を提供する。

【０３２８】

一態様において、対象はボルテゾミブおよび/またはレナリドマイドで以前に処置されたことがある。

【０３２９】

「放射線療法」または「放射線」は、がん細胞を除去するために高エネルギー放射線を使用する。放射線療法は骨髄移植または末梢血幹細胞移植の前に用いられてもよい。

【０３３０】

「骨髄および/または幹細胞移植」とは、高線量の化学療法および/または放射線療法によって破壊された幹細胞を回復させることを目的とした細胞移植を指す。幹細胞の供給源には、骨髄、末梢血、または臍帯血が含まれる。移植される幹細胞の供給源に応じて、この手順は、骨髄移植(BMT)、または末梢血幹細胞移植(PBSCT)、または臍帯血移植(UCBT)に分類され得る。さらに、骨髄移植および/または幹細胞移植とは自家幹細胞移植および/または同種異系移植を指すことがある。

【０３３１】

薬物または免疫抑制剤に対する耐性

前記の操作されたT細胞は、治療標準として用いられる化学療法薬物および免疫抑制薬物、特に、メトトレキセートならびにフルダラビンおよびシクロホスファミドの組み合わせに対して耐性にされたときに、様々な形のがんを処置するのに特に適している。実際には、本発明は、好ましくは、細胞または細胞の集団に頼る。この局面において、化学療法および/または免疫抑制処置は、操作されたT細胞のインビボでの選択および増殖を助ける

はずだと予想される。

【０３３２】

本発明のある種の態様において、細胞は、抗ウイルス治療、シドホビル、およびインターロイキン2、シタラビン（ARA-Cとしても公知）のような薬剤による処置、またはMS患者のためのナタリズマブ処置、または乾癬患者のためのエファリズマブ処置、またはPML患者のためのその他の処置を含むが、これらに限定されない、多数の関連する処置モダリティと共に（例えば、前に、同時に、または後に）患者へ投与される。さらなる態様において、本発明のT細胞は、化学療法、放射線、シクロスポリン、アザチオプリン、メトトレキサート、ミコフェノール酸、およびFK506のような免疫抑制剤、抗体、またはCAMPATH、抗CD3抗体、もしくはその他の抗体治療のようなその他の免疫除去（immunoablative）剤、シトキシン（cytoxin）、フルダラビン、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノール酸、ステロイド、FR901228、サイトカイン、ならびに照射と組み合わせて使用されてもよい。これらの薬物は、カルシウム依存性ホスファターゼカルシニューリンを阻害するか（シクロスポリンおよびFK506）、または増殖因子によって誘導されるシグナリングにとって重要なp70S6キナーゼを阻害する（ラパマイシン）（Liu et al., Cell 66：807-815, １１；Henderson et al., Immun. 73：316-321, 1991；Bierer et al., Citrr. Opin. mm n. 5：763-773, 93）。さらなる態様において、本発明の細胞組成物は、骨髄移植、フルダラビン、外部照射治療（XRT）、シクロホスファミドのような化学療法剤、またはOKT3もしくはCAMPATHのような抗体のいずれかを使用したT細胞除去治療と共に（例えば、前に、同時に、または後に）患者へ投与される。別の態様において、本発明の細胞組成物は、CD20と反応する薬剤、例えば、リツキサンのようなB細胞除去治療の後に投与される。例えば、一つの態様において、対象は、高用量化学療法による標準的な処置を受けた後、末梢血幹細胞移植を受けることができる。ある種の態様において、移植の後、対象は、増大させた本発明の免疫細胞の注入を受ける。付加的な態様において、増大させた細胞は、手術の前または後に投与される。本明細書に記載の方法のいずれか1つによって得られた前記改変された細胞は、宿主対移植片（HvG）拒絶反応および移植片対宿主病（GvHD）に対する処置を必要とする患者を処置するために本発明の特定の局面において使用することができる。従って、宿主対移植片（HvG）拒絶反応および移植片対宿主病（GvHD）に対する処置を必要とする患者を処置する方法であって、不活性化されたTCRα遺伝子および/またはTCRβ遺伝子を含む有効量の改変された細胞を前記患者に投与することによって、前記患者を処置する工程を含む方法が本発明の範囲にある。

【０３３３】

投与

別の局面において、本発明は、処置を必要とする患者を処置するための方法であって、以下の工程:

(a)以前に述べられた方法のいずれか1つによって入手可能な免疫細胞を準備する工程;

(b)前記形質転換された免疫細胞を前記患者に投与する工程

の少なくとも1つを含む、方法に頼る。

【０３３４】

本発明による細胞または細胞の集団の投与は、エアロゾル吸入、注射、経口、輸液、植え込み、または移植を含む、便利な様式で実施され得る。本明細書に記載された組成物は、皮下に、皮内に、腫瘍内に、結節内に、髄内に、筋肉内に、静脈注射もしくはリンパ内注射によって、または腹腔内に、患者へ投与され得る。一つの態様において、本発明の細胞組成物は、好ましくは、静脈注射によって投与される。

【０３３５】

細胞または細胞の集団の投与は、これらの範囲内の細胞数の全ての整数値を含む、体重1kg当たり10^4～10^9個の細胞、好ましくは、体重1kg当たり10^5～10^6個の細胞の投与からなり得る。細胞または細胞の集団は、単回投与されてもよいしまたは複数回投与されてもよい。別の態様において、有効量の細胞が、単回投与される。別の態様において、有効量の細胞が、ある期間にわたり複数回投与される。投与のタイミングは、管理する医師の判断

にあり、患者の臨床状態に依る。細胞または細胞の集団は、血液バンクまたはドナーのような任意の起源から入手され得る。個々の必要性は変動するが、特定の疾患または状態のための所定の細胞型の有効量の最適範囲の決定は、当技術分野の技術の範囲内にある。有効量とは、治療的または予防的な利益を提供する量を意味する。投与される投薬量は、レシピエントの年齢、健康、および体重、もしあれば、同時処置の種類、処置の頻度、ならびに望まれる効果の性質に依存するであろう。

【０３３６】

別の態様において、有効量の細胞またはそれらの細胞を含む組成物は、非経口投与される。投与は、静脈内投与であり得る。投与は、腫瘍内への注射によって直接行われてもよい。

【０３３７】

本発明の態様は、患者を処置するための方法であって、

(a)免疫細胞と共通して見られるCD38特異的抗原マーカーを提示する病的細胞の存在について前記患者を診断する工程;

(b)以前に詳細に示された方法に従って、操作された免疫細胞の集団を調製する工程;および、

(c)前記操作された免疫細胞を、前記病的細胞について診断された前記患者に投与する工程

を含む、方法に関する。

【０３３８】

当業者に周知の診断工程については、例えば、Durig J, Naschar M, Schmucker U, Renzing-Kohler K, Holter T, Huttmann A, Duhrsen U, (2002)「CD38 expression is an important prognostic marker in chronic lymphocytic leukaemia」Leukemia.16(1):30-5を参照することができる。

【０３３９】

免疫療法のために本発明によるT細胞を操作する工程の例

本発明をさらに深く理解するために、白血病CD38陽性細胞に対して向けられたT細胞を生成するために従う工程の一例を以下に示した。

1．患者1人1人または血液バンクからの細胞培養物または血液試料からT細胞を準備し、抗CD3/C28アクチベータービーズ（Dynabeads（登録商標））を用いて前記T細胞を活性化する。このビーズは、T細胞の活性化および増殖に必要な一次シグナルおよび共刺激シグナルを両方とも供給する。

2．前記細胞に、抗CD38抗体の可変鎖をコードする配列と融合した、CD3ζ活性化ドメイン、4-1BB共刺激ドメイン、膜貫通ドメイン、およびCD28α、FcεIIIγ、またはIgG1に由来するヒンジの融合からなるキメラ抗原受容体をコードするトランスジーンを含むレトロウイルスベクターを形質導入する。形質転換されたT細胞の安全性を改善するために、リツキシマブに対して感受性のある自殺遺伝子が、WO2013/153391に記載のように、レンチウイルスベクターに、T2A分割配列で分けられて、さらに導入されてもよい。

3．（任意で）非アロ反応性および/または耐性のT細胞を操作する：

（a）WO2013/176915に示したプロトコールを従うことによって、前記細胞のTCRαを不活化して、TCRを前記細胞の表面から無くし、同種異系のTCRにより宿主組織が異物と認識されるのを阻止し、従って、GvHDを回避することができる。

（b）移植されたT細胞に影響を及ぼすことなく移植片拒絶反応を阻止するために、前記細胞が免疫抑制処置または化学療法処置に対して耐性になるように、免疫抑制剤または化学療法薬物の標的をコードする1種類の遺伝子を不活化することもできる。本実施例では、免疫抑制剤の標的はCD52であり、免疫抑制剤は、WO2013/176915に記載のようなヒト化モノクローナル抗CD52抗体（例えば、アレムツズマブ）である。

4．特異的TAL-エンドヌクレアーゼ（TALEN（商標）-Cellectis, 8 rue de la Croix Jarry, France）をコードするmRNAを用いてT細胞をエレクトロポレーション処理することによって、遺伝子不活化が行われる。不活化されたT細胞を、磁気ビーズを用いて分別する

。例えば、標的にされた遺伝子CD38を依然として発現するT細胞は固体表面に固定されることで除去することができ、不活化された細胞は、カラムを通過するストレスに曝露されない。この穏やかな方法によって、適切に操作されたT細胞の濃度が上昇する。

5．CD3複合体刺激によって、操作されたT細胞を患者に投与する前にインビトロで増殖させるか、または患者に投与した後にインビボで増殖させる。投与工程前に、患者は、ヒト化モノクローナル抗CD52抗体であるCAMPATH1-Hなどの免疫抑制治療剤に供することができる。

6．任意で、操作された細胞を標的抗原に接近させるために、患者に投与する前に、前記細胞を二重特異性抗体にエクスビボで曝露するか、または患者に投与した後に、前記細胞を二重特異性抗体にインビボで曝露する。

【０３４０】

一般的方法

-初代T細胞培養

EFS(Etablissement Francais du Sang, Paris, France)によって供給されたバフィーコート試料から、EasySep(商標) Direct Human T Cell Isolation Kit (Stem cells)を用いてT細胞を精製した。精製T細胞を、20ng/mLヒトIL-2、5％ヒト血清と、ビーズ:細胞比1:1のDynabeads Human T activator CD3/CD28(Life Technologies)を加えたX-Vivo(商標)-15培地(Lonza)に入れて活性化した。

【０３４１】

-CD38 TALENトランスフェクション

模式図を図8に示した。

【０３４２】

CD38遺伝子の中にある、15bpスペーサーで分けられた2つの17bp長配列(半標的(half target)と呼ぶ)を標的とするヘテロ二量体TALE-ヌクレアーゼを設計および作製した。それぞれの半標的は、表3に列挙した半TALE-ヌクレアーゼの反復によって認識される。CD38標的の配列を図5に示した。それぞれのTALE-ヌクレアーゼ構築物を、制限酵素消化(インサート:SfaNI-BbvIおよびベクター:BsmBI)を用いて哺乳動物発現ベクター(pCSL10794)の中にあるT7プロモーターの制御下にサブクローニングした。CD38ゲノム配列を切断するTALE-ヌクレアーゼをコードするmRNAを、mMESSAGE mMACHINE T7 Kit(Life Technologies)を用いて作製し、RNeasy Mini Spin Columns(Qiagen)を用いて精製した。トランスフェクションを、Cytopulse技術を用いて、最終体積200μlの「Cytoporation buffer T」(BTX Harvard Apparatus)が入っている0.4cmギャップキュベット(gap cuvette)の中で3000V/cmで2回の0.1mSパルスを加えた後に、325V/cmで4回の0.2mSパルスを加えることによって行った。すぐに細胞をX-Vivo(商標)-15培地(Lonza)で希釈し、5％CO_2、30℃でインキュベートした。エレクトロポレーションの2時間後に、20ng/mLのIL-2(Miltenyi Biotecから入手した)を添加した。18時間後に細胞を5％CO_2、37℃で移した。

【０３４３】

-CD38陰性T細胞の精製

CD38 TALENトランスフェクションの6日後に、CD38陰性細胞を、CD38マイクロビーズキットを用いた磁気分離によって製造業者の仕様書(Miltenyi)に従って精製した。

【０３４４】

-CAR mRNAトランスフェクション

T細胞の精製および活性化の後、4日目または11日目にトランスフェクションを行った。500万個の細胞に、異なるCAR構築物をコードするmRNA 15μgをトランスフェクトした。CAR mRNAを、mMESSAGE mMACHINE T7 Kit(Life Technologies)を用いて作製し、RNeasy Mini Spin Columns(Qiagen)を用いて精製した。トランスフェクションを、Cytopulse技術を用いて、最終体積200μlの「Cytoporation buffer T」(BTX Harvard Apparatus)が入っている0.4cmギャップキュベットの中で3000V/cmで2回の0.1mSパルスを加えた後に、325V/cmで4回の0.2mSパルスを加えることによって行った。すぐに細胞をX-Vivo(商標)-15培地(Lonza)で希釈し、5％CO_2、37℃でインキュベートした。エレクトロポレーションの2時間後に2

0ng/mLのIL-2(Miltenyi Biotecから入手した)を添加した。

【０３４５】

-脱顆粒アッセイ(CD107α動員)

T細胞を、96ウェルプレート(40,000個の細胞/ウェル)に入れて、様々なレベルのCD38タンパク質を発現する等量の細胞とインキュベートした。共培養物を、最終体積100μlのX-Vivo(商標)-15培地(Lonza)に入れて、5%CO_2、37℃で6時間維持した。細胞刺激中、共培養の初めに、1μg/mlの抗CD49d、1μg/mlの抗CD28、および1xモネンシン溶液と一緒に蛍光抗CD107a抗体を添加することによってCD107a染色を行った。5時間のインキュベーション期間後に、細胞をfixable viability dyeと蛍光色素結合抗CD8および抗CD3で染色し、フローサイトメトリーによって分析した。CD8+細胞中のCD107a染色の平均蛍光強度シグナル(MFI)を求めることによって、viable/CD3+/CD8+/CD107a+細胞の%として脱顆粒活性を確かめた。mRNAトランスフェクションの24時間後に脱顆粒アッセイを行った。

【０３４６】

-細胞傷害性アッセイ

T細胞を、96ウェルプレート(100,000個の細胞/ウェル)に入れて、同じウェルの中にある10,000個の標的細胞(CD38を発現する)および10,000個の対照(CD38陰性)細胞とインキュベートした。標的細胞および対照細胞を蛍光細胞内色素(CFSEまたはCell Trace Violet)で標識した後に、CAR+T細胞と共培養した。共培養物を5%CO_2で37℃で4時間インキュベートした。このインキュベーション期間後に、細胞をfixable viability dyeで標識し、フローサイトメトリーによって分析した。各細胞集団(標的細胞またはCD38陰性対照細胞)の生存率を求め、特異的細胞溶解の%を計算した。mRNAトランスフェクションの48時間後に細胞傷害性アッセイを行った。

【実施例】

【０３４７】

実施例1:TALEヌクレアーゼを用いたノックアウト(KO)によるT細胞におけるCD38抗原の不活化

CD38は活性化T細胞でも高発現している。CD3/CD28ビーズおよびIL-2を用いて活性化した後のT細胞によるCD38発現を17日間にわたって3～4日ごとにFACSによって分析した(図3A)。活性化後、6日目～17日目の間に、T細胞の90%超がCD38を発現することが観察された(図3B)。

【０３４８】

従って、抗CD38 CAR+T細胞による活性化T細胞の死滅を回避するために、T細胞におけるCD38表面発現を阻止する必要がある。これは、TALEヌクレアーゼを用いたCD38遺伝子の不活化によって成し遂げられ得る。この実験を図4Aに示したように行った。

【０３４９】

CD38遺伝子の中にある、13bpスペーサーで分けられた2つの17bp長配列を標的とするヘテロ二量体TALE-ヌクレアーゼを設計および作製した。それぞれの半標的は、表4および図5に列挙した半TALE-ヌクレアーゼの反復によって認識される。

【０３５０】

それぞれのTALE-ヌクレアーゼ構築物を、制限酵素消化を用いて哺乳動物発現ベクターの中にあるT7プロモーターの制御下にサブクローニングした。T7プロモーターの下流にコード配列を運ぶプラスミドから、CD38を切断するTALE-ヌクレアーゼをコードするmRNAを合成した。

【０３５１】

4日の間に、抗CD3/CD28コーティングビーズと組換えIL-2を用いて活性化した精製T細胞を、エレクトロポレーション(Cytopulse)によって、半TALE-ヌクレアーゼを両方ともをコードする2種類のmRNAでそれぞれ(各10ug)トランスフェクトした。CD38 KOを調べるために、7日目に、CD38陰性T細胞のパーセントをフローサイトメトリーによって評価した(図6)。3種類のTALENはCD38 KOを誘導することができたが、CD38-1が最も効率的であった(60.95%+/-7.6 $CD38^{neg}$T細胞)。

【０３５２】
CD38-1 TALENによって誘導されたCD38不活化は、3週間にわたる培養中に安定していた(図7A)。CD38欠損T細胞は抗CD38マイクロビーズ(Miltenyi)を用いて容易に選別することができた(図7A)。精製されたCD38欠損T細胞の増殖速度は、トランスフェクトされていないT細胞または精製されていないT細胞と同等であった(図7B)。
【０３５３】
2つの独立した実験では、10^6個のT細胞につき2μgのRNAを使用し、エレクトロポレーションを使用することによってCD38 TALENトランスフェクションを行った。図23には、このようなトランスフェクションによってCD38 KOが高頻度で誘導されることが示されている。別の実験では、100万個の細胞あたり2μgと1μgまたは0.5μgとの比較を試験した。mRNA TALENの量はT細胞の増殖速度を変えなかったが(図24B)、CD38陰性細胞の割合(%)を減少させた(図24A)。
【０３５４】
実施例2:WT T細胞におけるmRNAトランスフェクション後の抗CD38 CAR活性の研究
CAR構造
8組のscFvを試験した。対応するCDRを含む、これらの配列SEQ ID NO:10～73を表2に示した。
【０３５５】
各組のscFvについて3つの異なるCAR構築物を、41BB共刺激ドメイン、CD3ζ活性化ドメイン、CD8α膜貫通ドメインと、それぞれ、配列SEQ ID NO:76、77、および78の3つの異なるCARヒンジ:
V1:FcεRIIIαヒンジ
V2:CD8αヒンジ
V3:IgG1ヒンジ
を用いて設計した。
【０３５６】
図9および図2Aは、それぞれ、サブクローニング用に作り出した異なるバージョンのCARのプラスミドと、バックボーンとして使用したプラスミドの名前を示す。それぞれのscFvのKdの値も示した。
【０３５７】
表1は、24個の異なる抗CD38 CAR(8組のscFv X 3バージョンV1、V2、およびV3)全てと、これらの構成要素の配列SEQ ID NO:82～105を示す(表2に示したscFvを除く)。
【０３５８】
標的細胞の選択
T細胞をCAR mRNAで一過的にトランスフェクトした後に、CD38を発現する標的細胞株に対する脱顆粒および細胞傷害活性があるかどうか、作製したCAR分子をスクリーニングした。活性試験のために、様々な発現レベルのCD38を発現する標的細胞株(図3B)を使用した(図10Aおよび図10B)。
【０３５９】
以下の細胞株について、細胞1個あたりのCD38分子の数をキフィキット(Qifikit)アッセイ(DAKO Company)によって評価した。
-抗CD38マイクロビーズを用いて磁気分離によってU266B1細胞株(#ATCC(登録商標)TIB-196(商標))から入手した、U266 CD38+B細胞ミエローマ(48216個の分子/細胞)およびU266 CD38-(230個の分子/細胞);
-高レベルのCD38を発現する多発性骨髄腫細胞株であるMOLP8(#DSMZ ACC 569)(259889個の分子/細胞);
-高レベルのCD38を発現するバーキットリンパ腫由来細胞株であるDaudi(#ATCC(登録商標)CCL-213(商標));
-慢性骨髄性白血病に由来する細胞株CD38陰性細胞株であるK562(#ATCC(登録商標)CCL-243)

【０３６０】
T細胞活性化後、5日目でのWT T細胞におけるCAR mRNAトランスフェクション
バフィーコート試料からT細胞を精製し、抗CD3/CD28コーティングビーズを用いて活性化した。活性化の5日後に、細胞に15μgの抗CD38 CARコードmRNAをトランスフェクトした(実験のタイムスケールを図4Cに示した)。トランスフェクションの24時間後に、CAR T細胞のCAR発現および脱顆粒能力を評価した。
【０３６１】
T細胞上でのCD38発現にもかかわらず、5日目でのCAR mRNAトランスフェクション後に、有意なT細胞死亡率は観察されなかった。
【０３６２】
発現
活性化して5日後にトランスフェクトした細胞に対して3つの検出方法:抗Fab抗体、L-タンパク質染色、およびCD38-Fcタンパク質(LakePharmaによって作製された)染色を評価した(図11)。抗CD38 CAR 13F11-V2、16B5-V2&V3、25A10-V1&V2、28F5-V1&V2、GMB005-V1&V2&V3は少なくとも1つの方法によって検出することができた。一部のCARは、これらの方法のいずれでも検出できなかったが、CD38依存的に脱顆粒することができた(次のセクションを参照されたい)。
【０３６３】
脱顆粒能力
CAR T細胞脱顆粒をフローサイトメトリーによって評価した。読み取りは、標的細胞とインキュベートして5時間後のT細胞原形質膜におけるCD107a発現である(図12)。10F7、27B6、および29B4を除いて、scFvのほとんどがT細胞脱顆粒をCD38依存的に誘導する。
【０３６４】
12日目にスクリーニングのために、scFvの13F11、16B5、25A10、28F5の3バージョン(V1、V2、およびV3)と、ツールCAR GMB005-V1を選択した。
【０３６５】
実施例3:mRNAトランスフェクションによって得られた一連の抗CD38 CARの活性に対する、CD38 KOおよびCD38陰性T細胞精製の効果の評価
i.WT/CD38欠損/精製CD38欠損T細胞における比較CAR mRNAスクリーニング
バフィーコート試料からT細胞を精製し、抗CD3/CD28コーティングビーズを用いて活性化した(実験のタイムスケールを図4Bに示した)。活性化の12日後に細胞を15μgの抗CD38 CARコードmRNAでトランスフェクトした。CAR mRNAトランスフェクションの24時間後に、かなりのT細胞死亡率が観察された。
【０３６６】
CD38 KOおよびCD38陰性の精製を試験および評価した。抗CD3/CD28コーティングビーズを用いた活性化後、4日目に、T細胞においてCD38-1 TALEN mRNAをトランスフェクトした(またはトランスフェクトしなかった)。6日後に、CD38陰性細胞を、磁気分離(Miltenyiのプロトコール)を用いることによって精製した(または精製しなかった)。翌日、CAR mRNAを用いてトランスフェクションを行った。トランスフェクションの24時間後に、CAR T細胞のCAR発現および脱顆粒能力を評価した。トランスフェクションの48時間後に、CAR T細胞のCAR発現および細胞傷害能力を評価した。分析には抗CD38 CAR、13F11-V2および-V3を使用した。24時間のCAR mRNAトランスフェクション後に、CD38 KO T細胞においてT細胞生存率は増加し、精製されたCD38 KO T細胞は最も良い生存率を示した(図13A)。
【０３６７】
発現
CAR発現を、CD38-Fcタンパク質を用いたフローサイトメトリーによって分析した。CD38欠損T細胞では1日目および2日目にCAR発現を高レベルで検出することができた。精製されたCD38 KO T細胞または精製されていないCD38 KO T細胞の間で有意差は観察されなかった(図13B)。
【０３６８】

脱顆粒能力

標的細胞株とインキュベートした後に脱顆粒しているT細胞のパーセントはwt CAR T細胞ではCD38非依存的であるが、CAR T細胞がCD38を欠損している場合にはCD38依存的である(図14A)。精製工程は、試験した条件におけるCAR T細胞脱顆粒に影響を及ぼさない。

【０３６９】

細胞傷害活性

CAR mRNAトランスフェクションの48時間後に、標的細胞株に対するCAR T細胞の細胞傷害活性は無かった。CD38欠損CAR T細胞では、この細胞傷害活性は回復した。この細胞傷害活性はCD38依存的であったが、精製されたCD38欠損T細胞と、精製されていないCD38欠損T細胞との間には差異は観察されなかった(図14B)。

【０３７０】

概して言えば、これらの結果は、細胞傷害活性に対する、T細胞における抗CD38 CAR mRNAトランスフェクション前の(CD38-1 TALENによって誘導される)CD38不活化の効果の改善を示している。精製されたCD38欠損T細胞を用いることによって次の実験を行った。

【０３７１】

ii.精製されたCD38欠損T細胞における、T細胞活性化後、12日目でのCAR mRNAトランスフェクション

バフィーコート試料からT細胞を精製し、抗CD3/CD28コーティングビーズとIL-2を用いて活性化した。活性化後、4日目にT細胞をCD38-1 TALEN mRNAでトランスフェクトした。6日後に、CD38陰性細胞を、磁気分離(Miltenyi)を用いることによって精製した。翌日、CAR mRNAを用いてトランスフェクションを行った。トランスフェクションの24時間後に、CAR T細胞のCAR発現および脱顆粒能力を評価した。トランスフェクションの48時間後に、CAR T細胞のCAR発現および細胞傷害能力を評価した。

【０３７２】

発現

トランスフェクションの24時間後に、全てのCARが25A10-V3を除いて検出された。しかしながら、後者は抗CD38 CARを、バックグラウンドを上回って発現した。13F11-V2、25A10-V1、25A10-V2、および28F5-V2は高発現していた(80％超)。48時間で、CAR-V2および-V3の発現は-V1より安定性が高かった(図15)。

【０３７３】

脱顆粒能力

CAR T細胞のほとんどがCD38発現細胞株に対して脱顆粒することができた。低い脱顆粒能力を示すのは16B5-V3、28F5-V3、25A10-V3だけだった。U266 CD38+およびU266 CD38-に対する脱顆粒の最も良い比(>2)を示したCAR T細胞は、13F11-V1、-V3、16B5-V1、-2、25A10-V1、28F5-V1、-V2、およびGMB005-V1であった(図16)。自家T細胞CD38+に対しては、CAR-V1および-V3はCAR-V2よりも低いレベルで脱顆粒することができた。

【０３７４】

細胞傷害活性

CAR T細胞のほとんどがCD38+標的細胞株を効率的に死滅させることができた(4時間で20％超)(図17)。CD38+標的細胞株に対する細胞傷害性が極めて高い16B5-V2、25A10-V2、および28F5-V2は自家活性化T細胞に対しても細胞傷害性が極めて高い。興味深いことに、25A10および28F5の-V1バージョンは$CD38^{hi}$細胞株に対して細胞傷害性を示したが、自家T細胞に対しては低い細胞傷害活性を示した。

【０３７５】

試験した全てのCARからの、これらの全ての結果から、CAR 25A10-V1、25A10-V2、28F5-V1、および28F5-V2は、特に、CD38遺伝子が不活化された時には、T細胞(すなわち、同じドナーに由来する他の活性化CD38 T細胞)との相互作用において影響の低下を示しながら、CD38発現がん細胞に対する細胞傷害性の点で高い能力を示すように見える。

【０３７６】

実施例4:インビボでの抗CD19 CAR活性に対するCD38-KOの影響の評価

CAR活性に対するCD38-KOの影響を評価するために、T細胞を注射する8日前に、致死線量より少ない放射線をNOGマウスに照射した。(-7)日目に、マウス1匹につき5x10^{5}個のDaudiルシフェラーゼ細胞をiv注射した。次いで、マウスにwt T細胞またはCD38-/-CAR-CD19 RQR8 T細胞を注入した。FMC63 scfvを含むツールCD19 CARは、WO2014/184143に開示された配列SEQ ID NO.16を有するポリヌクレオチドに対応する。CAR-CD19 RQR8 T細胞は、Donnelly ML et al,(2001) J Gen Virol.;82(Pt 5):1027-1041などの先行技術に開示される方法に従って抗CD19とRQR8の両方を同時発現させることによって得られた。T細胞を注射した後、D(-1)、D7、D14、D21、およびD28に生物発光シグナルを評価した(図22Aおよび図22B)。腫瘍進行と生存率を評価した時に、CD38-/-CAR-CD19 RQR8細胞はインビボではCAR-CD19 RQR8 T細胞と同じ抗腫瘍活性を示し(図22C)、CD19 CARとKO CD38欠損を有するT細胞の方が長く生き残った(図22D)。従って、CD38-KOはインビボでCAR T細胞の抗腫瘍活性に影響を及ぼさない。

【０３７７】

実施例5:二重KO TRAC/CD38 T細胞におけるレンチウイルス形質導入によって得られた抗CD38 CARの活性の評価

発現プラスミドにおけるCARクローニング

制限酵素XmaIを用いて、4種類の抗CD38 CAR 25A10-v1、25A10-v2、28F5-v1、および28F5-v2を、RQR8を含む最終rLVバックボーンに、EF1aプロモーターの制御下でクローニングした(pCCL-RQR8-T2A-CAR)。これらのプラスミドの配列は分析されており、これらのプラスミドはrLV作製のためにVectalys(France)に送られた。

【０３７８】

rLV MOIの関数におけるrLV CD38 CAR形質導入

T細胞活性化後、7日目に、初代T細胞に形質導入するのに必要なCAR CD38 rLV用量を評価した。

【０３７９】

活性化後、3日目にT細胞をCD38 TALEN mRNAでトランスフェクトし、4日後に、4種類のCAR候補rLV(25A10-v1、-v2、28F5-v1、および-v2)をMOI 5、10、および15で形質導入した。

【０３８０】

形質導入の3日後に陽性CAR細胞または陽性RQR8細胞のパーセントを検出することによって形質導入効率を評価した。3種類のMOI間の形質導入効率の有意差は観察されなかった(それぞれ、図25Aおよび図25B)。MOI 5の形質導入を用いて以下のrLVスクリーニングを行う。

【０３８１】

CD38-KOおよびTCR-KOの特性を用いたスクリーニング

プロセスの概要を図26に示した。パラメータは以下の通りである。Dynabeads CD3-CD28を用いることによってT細胞を活性化し、培地Xvivo+5%ヒト血清熱失活+IL-2 20ng/mlを用いることによって培養物を作製し、2μgのTALEN mRNA/100万個の細胞(500万個の細胞/キュベット)の比を用いることによって二重KO(DKO)CD38-TRACを行った。MOI 5でVectalys(France)から入手したrLVを用いることによって形質導入を行った。

【０３８２】

CARの細胞傷害能力を評価するために、標的細胞として、mRNAスクリーニング中に以前に使用したMOLP8、Daudi、U266 CD38+、およびU266 CD38-を使用した。これらの細胞株は、大部分が、様々なレベルのCD38を発現する多発性骨髄腫細胞株である(Daudiを除く)。

【０３８３】

3つの異なる実験において、3つの異なるPBMCドナーを用いてrLV CARスクリーニングを行った。CAR発現、CAR形質導入後のCD38陰性細胞の濃縮、ならびに4種類のCAR 25A10-v1、-v2、28F5-v1、および-v2の細胞傷害能力を分析した。

【０３８４】

抗CD38 CAR発現およびCAR T表現型の評価

DKO T細胞におけるrLV形質導入後の、4種類のCAR 25A10-v1、-v2、28F5-v1、および-v2のスクリーニングから、CARは全てT細胞表面に高効率で発現し(>40％)、上記のうち3つは80％超であったことが分かった(図27C)。RQR8発現とCAR発現は相関関係があった(図27A)。T細胞がCD38 CARによって形質導入された時には、T細胞のほとんどがCD38陰性であった(図27A)。上記の4種類のCARを備えたT細胞の60～85％がDKO TRAC/CD38であることも示された(図27B)。

【０３８５】

DKO CD38 CAR T細胞は主にCD8+であり(図28A)、エフェクター/エフェクターメモリー表現型を示した。CAR構築物間に差異はなかった(図28B)。

【０３８６】

インビトロでのCAR活性の評価

CAR T脱顆粒をフローサイトメトリーによって評価した。読み取りは、標的細胞とインキュベートして5時間後のT細胞原形質膜におけるCD107a発現である。これらのCARはCD38+多発性骨髄腫細胞株ならびにCD38+T細胞に対して高効率で脱顆粒することができた(図29A)。4種類のCD38 CAR候補はCD38+多発性骨髄腫細胞株の溶解をCD38用量依存的に誘導することができた(図29B)。

【０３８７】

実施例6:T細胞急性リンパ芽球性白血病(T-ALL)に対する抗CD38 CAR T細胞の評価

図30に示したように、T-ALL細胞は高発現レベルのCD38を発現した。この病態は、患者への抗CD38 T細胞の投与に基づく処置の別の適用例となり得る。

【０３８８】

CD38-KOをもつ新たなT-ALL細胞株の開発

試験したT-ALL細胞株は全てCD38+であった。T-ALLに対するCAR活性を評価するために陰性細胞株が対照として必要であった。CD38-KO CCRF-CEM細胞株は、CCRF-CEM細胞をCD38 TALEN mRNAでトランスフェクトすることによって作製した。CD38陰性細胞を磁気分離(抗CD38マイクロビーズ、Miltenyi-図31)によって精製した。細胞傷害性アッセイ用の陰性対照として新たな細胞株が用いられた。

【０３８９】

T-ALL細胞株に対する抗CD38 CAR T細胞活性の評価

T-ALL細胞株に対する抗CD38 CAR T細胞の活性は、いくつかのCD38発現T-ALL細胞株と共培養した後の脱顆粒を分析することによって評価した。T-ALL CD38+細胞の存在下ではUCART38の大多数(>70％)が脱顆粒することができた(図32A)。インビトロでのT-ALL細胞に対するUCART38の細胞傷害性は、4時間にわたってUCART38をT-ALL細胞と共培養することによって評価した。UCART38細胞はCD38+T-ALL細胞の溶解を誘導することができた(図32B)。

【０３９０】

参考文献

Antonelli A, Ferrannini E.(2004) “CD38 autoimmunity: recent advances and relevance to human diabetes.” J Endocrinol Invest. 27(7):695-707.

Avet-Loiseau H, Malard F, Campion L, Magrangeas F, Sebban C, Lioure B, Decaux O, Lamy T, Legros L, Fuzibet JG, Michallet M, Corront B, Lenain P, Hulin C, Mathiot C, Attal M, Facon T, Harousseau JL, Minvielle S, Moreau P; Intergroupe Francophone du Myélome. (2011) ”Translocation t(14;16) and multiple myeloma: is it really an independent prognostic factor?” Blood. 2011 Feb 10;117(6):2009-11.

Bardenheuer, W., K. Lehmberg, et al. (2005). "Resistance to cytarabine and gemcitabine and in vitro selection of transduced cells after retroviral expression of cytidine deaminase in human hematopoietic progenitor cells." Leukemia **19**(12): 2281-8.

Betts, M. R., J. M. Brenchley, et al. (2003). "Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation." J Immunol Methods **281**(1-2): 65-78.

Boch, J., H. Scholze, et al. (2009). "Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors." Science **326**(5959): 1509-12.

Brewin, J., C. Mancao, et al. (2009). "Generation of EBV-specific cytotoxic T cells that are resistant to calcineurin inhibitors for the treatment of posttransplantation lymphoproliferative disease." Blood **114**(23): 4792-803.

Cambier, J.C. (1995) "Antigen and Fc Receptor Signaling:The Awesome Power of the Immunoreceptor Tyrosine- I Based Activation Motif (ITAM)" The Journal of Immunology **155** (7) 3281-3285.

Cong, L., F. A. Ran, et al. (2013). "Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems." Science **339**(6121): 819-23.

Critchlow, S. E. and S. P. Jackson (1998). "DNA end-joining: from yeast to man." Trends Biochem Sci **23**(10): 394-8.

Dalgaard, J. Z., A. J. Klar, et al. (1997). "Statistical modeling and analysis of the LAGLIDADG family of site-specific endonucleases and identification of an intein that encodes a site-specific endonuclease of the HNH family." Nucleic Acids Res **25**(22): 4626-38.

Deltcheva, E., K. Chylinski, et al. (2011). "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III." Nature **471**(7340): 602-7.

Garneau, J. E., M. E. Dupuis, et al. (2010). "The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA." Nature **468**(7320): 67-71.

Gasiunas, G., R. Barrangou, et al. (2012). "Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(39): E2579-86.

Hacke, K., J. A. Treger, et al. (2013). "Genetic modification of mouse bone marrow by lentiviral vector-mediated delivery of hypoxanthine-Guanine phosphoribosyltransferase short hairpin RNA confers chemoprotection against 6-thioguanine cytotoxicity." Transplant Proc **45**(5): 2040-4.

Jena, B., G. Dotti, et al. (2010). "Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor." Blood **116**(7): 1035-44.

Jinek, M., K. Chylinski, et al. (2012). "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity." Science **337**(6096): 816-21.

Jonnalagadda, M., C. E. Brown, et al. (2013). "Engineering human T cells for resistance to methotrexate and mycophenolate mofetil as an in vivo cell selection strategy." PLoS One **8**(6): e65519.

Kushman, M. E., S. L. Kabler, et al. (2007). "Expression of human glutathione S-transferase P1 confers resistance to benzo[a]pyrene or benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol mutagenesis, macromolecular alkylation and formation of stable N2-Gua-BPDE adducts in stably transfected V79MZ cells co-expressing hCYP1A1." Carcinogenesis **28**(1): 207-14.

Lackner, G., N. Moebius, et al. (2011). "Complete genome sequence of Burkholderia rhizoxinica, an Endosymbiont of Rhizopus microsporus." J Bacteriol **193**(3): 783-4.

Ma, J. L., E. M. Kim, et al. (2003). "Yeast Mre11 and Rad1 proteins define a Ku-independent mechanism to repair double-strand breaks lacking overlapping end sequences." Mol Cell Biol **23**(23): 8820-8.

Mak, A. N., P. Bradley, et al. (2012). "The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target." Science **335**(6069): 716-9.

Mali, P., L. Yang, et al. (2013). "RNA-guided human genome engineering via Cas9." Science **339**(6121): 823-6.

Metzger, H. et al. (1986) "The Receptor with High Affinity for Immunoglobulin E" Annual Review of Immunology. **4**: 419-470

Mihara, K., Yanagihara K., Takigahira, M., Imai, C., Kitanaka, A., Takihara, Y., Kimura A (2009) "Activated T-cell-mediated immunotherapy with a chimeric receptor against CD38 in B-cell non-Hodgkin lymphoma". J Immunother. 32(7):737-43

Moscou, M. J. and A. J. Bogdanove (2009). "A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors." Science **326**(5959): 1501.

Nivens, M. C., T. Felder, et al. (2004). "Engineered resistance to camptothecin and antifolates by retroviral coexpression of tyrosyl DNA phosphodiesterase-I and thymidylate synthase." Cancer Chemother Pharmacol **53**(2): 107-15.

Park, T. S., S. A. Rosenberg, et al. (2011). "Treating cancer with genetically engineered T cells." Trends Biotechnol **29**(11): 550-7.

Sangiolo, D., M. Lesnikova, et al. (2007). "Lentiviral vector conferring resistance to mycophenolate mofetil and sensitivity to ganciclovir for in vivo T-cell selection." Gene Ther **14**(21): 1549-54.

Schweitzer, B. I., A. P. Dicker, et al. (1990). "Dihydrofolate reductase as a therapeutic target." Faseb J **4**(8): 2441-52.

Shaughnessy JD Jr, Zhan F, Burington BE, Huang Y, Colla S, Hanamura I, Stewart JP, Kordsmeier B, Randolph C, Williams DR, Xiao Y, Xu H, Epstein J, Anaissie E, Krishna SG, Cottler-Fox M, Hollmig K, Mohiuddin A, Pineda-Roman M, Tricot G, van Rhee F, Sawyer J, Alsayed Y, Walker R, Zangari M, Crowley J, Barlogie B., (2007) " A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1.", Blood. 2007 Mar 15;109(6):2276-84

Sugimoto, Y., S. Tsukahara, et al. (2003). "Drug-selected co-expression of P-glycoprotein and gp91 in vivo from an MDR1-bicistronic retrovirus vector Ha-MDR-IRES-gp91." J Gene Med **5**(5): 366-76.

Takebe, N., S. C. Zhao, et al. (2001). "Generation of dual resistance to 4-hydroperoxycyclophosphamide and methotrexate by retroviral transfer of the human aldehyde dehydrogenase class 1 gene and a mutated dihydrofolate reductase gene." Mol Ther **3**(1): 88-96.

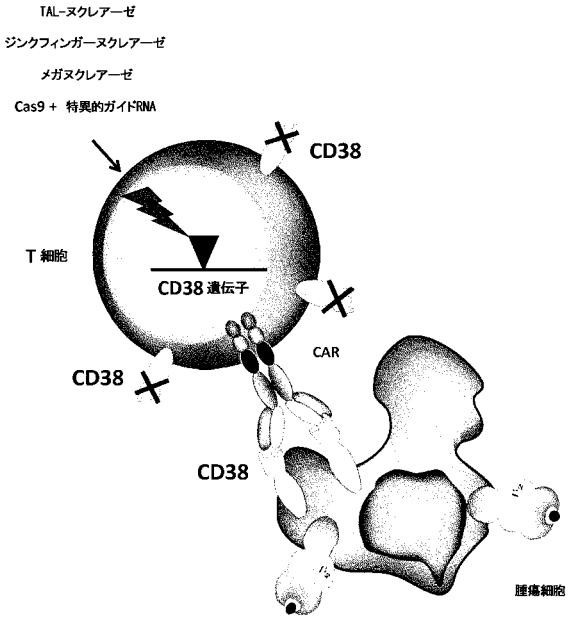
Van Laar, R., Flinchum, R**,** Brown' **N.,** Ramsey, J., Riccitelli, S., Heuck' **C.,** Barlogie, B. **and** Shaughnessy JD., (2014) "Translating a gene expression signature for multiple myeloma prognosis into a robust high-throughput assay for clinical use" BMC Medical Genomics, **7**:25

Waldmann H. and Hale G. (2005) "CAMPATH: from concept to clinic". Phil. Trans. R. Soc. B **360**: 1707-1711.

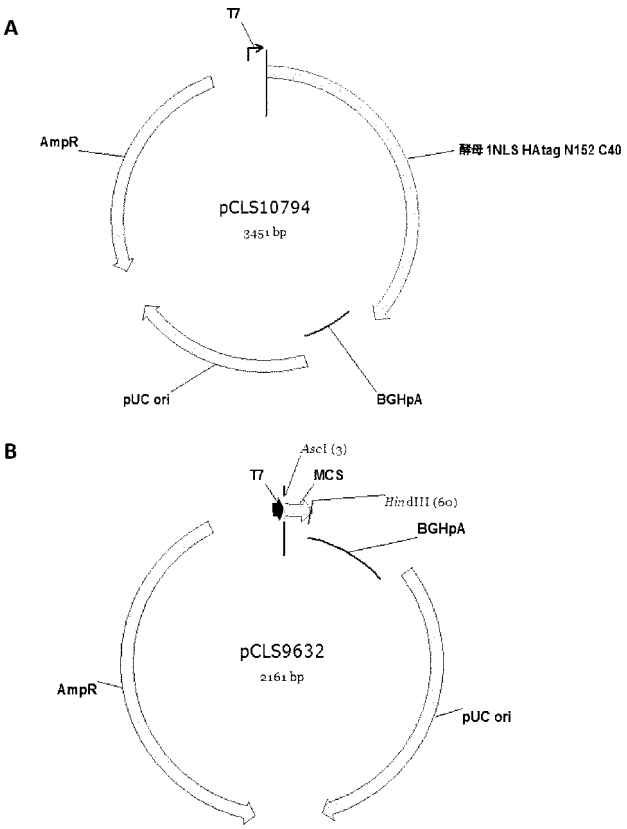
Yam, P., M. Jensen, et al. (2006). "Ex vivo selection and expansion of cells based on expression of a mutated inosine monophosphate dehydrogenase 2 after HIV vector transduction: effects on lymphocytes, monocytes, and CD34+ stem cells." Mol Ther **14**(2): 236-44.

Zielske, S. P., J. S. Reese, et al. (2003). "In vivo selection of MGMT(P140K) lentivirus-transduced human NOD/SCID repopulating cells without pretransplant irradiation conditioning." J Clin Invest 112(10): 1561-70.

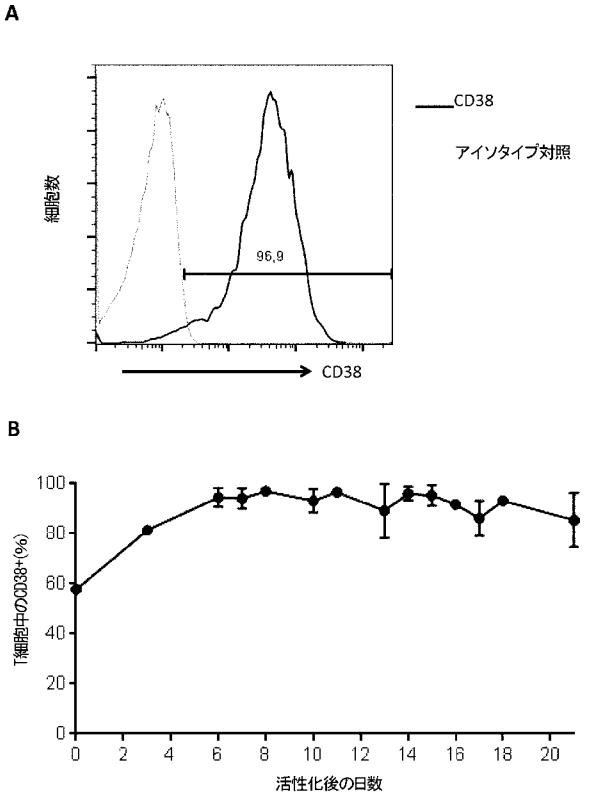
【図１】



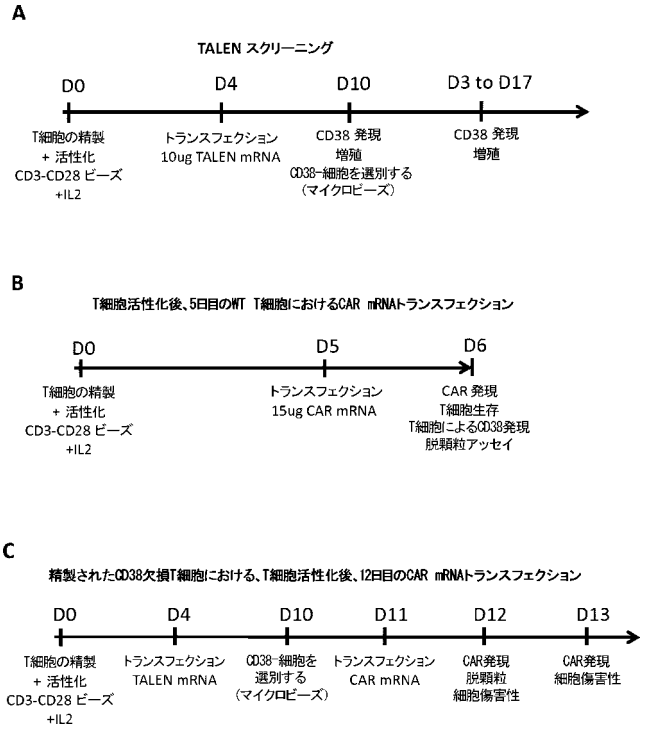
【図２】



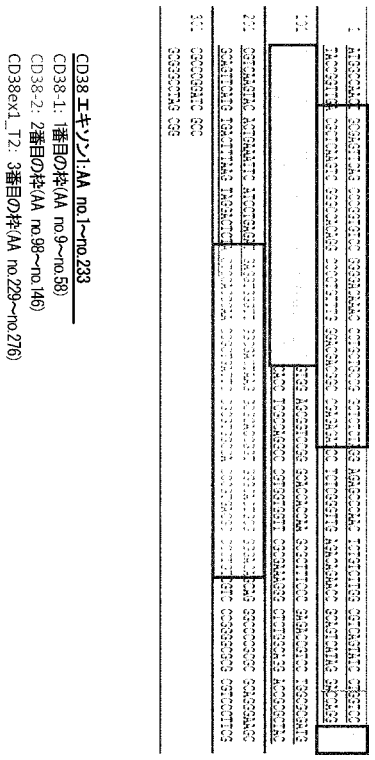
【図３】


A
細胞数
96,9
CD38
CD38
アイソタイプ対照
B
T細胞中のCD38-(%)
100
80
60
40
20
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20
活性化後の日数

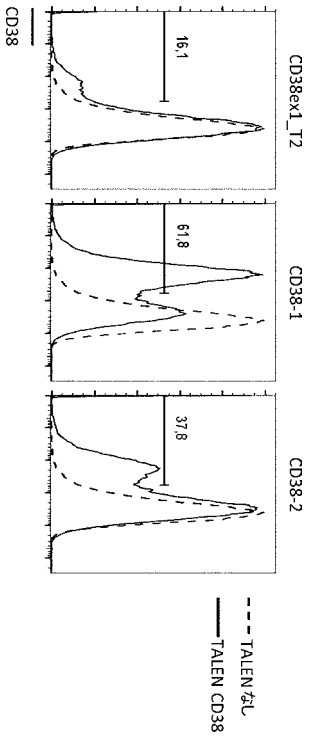
【図４】


A
TALEN スクリーニング
D0
D4
D10
D3 to D17
T細胞の精製
+ 活性化
CD3-CD28 ビーズ
+IL2
トランスフェクション
10ug TALEN mRNA
CD38 発現
増殖
CD38-細胞を選別する
（マイクロビーズ）
CD38 発現
増殖
B
T細胞活性化後、5日目のWT T細胞におけるCAR mRNAトランスフェクション
D0
D5
D6
T細胞の精製
+ 活性化
CD3-CD28 ビーズ
+IL2
トランスフェクション
15ug CAR mRNA
CAR 発現
T細胞生存
T細胞によるCD38発現
脱顆粒アッセイ
C
精製されたCD38欠損T細胞における、T細胞活性化後、12日目のCAR mRNAトランスフェクション
D0
D4
D10
D11
D12
D13
T細胞の精製
+ 活性化
CD3-CD28 ビーズ
+IL2
トランスフェクション
TALEN mRNA
CD38-細胞を
選別する
（マイクロビーズ）
トランスフェクション
CAR mRNA
CAR発現
脱顆粒
細胞傷害性
CAR発現
細胞傷害性

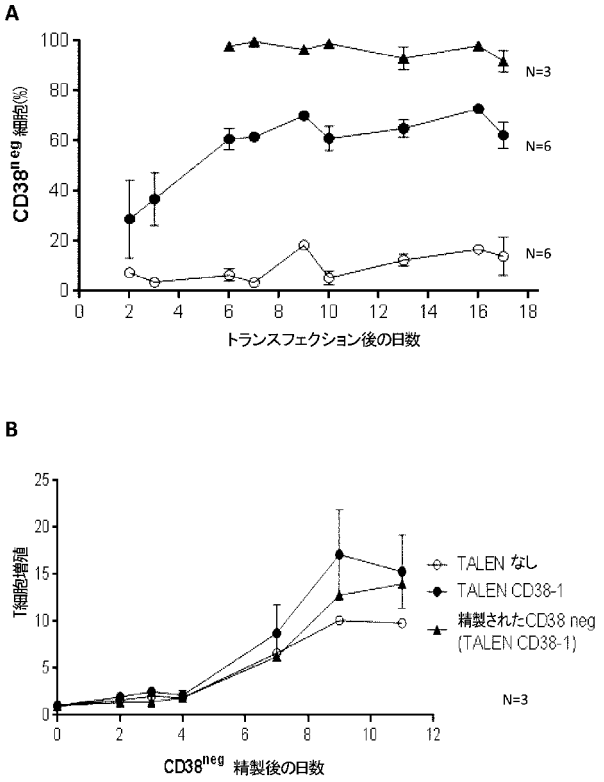
【図５】


CD38 エキソン1:AA no.1~no.233
CD38-1: 1番目の枠(AA no.9~no.58)
CD38-2: 2番目の枠(AA no.98~no.146)
CD38ex1_T2: 3番目の枠(AA no.229~no.276)

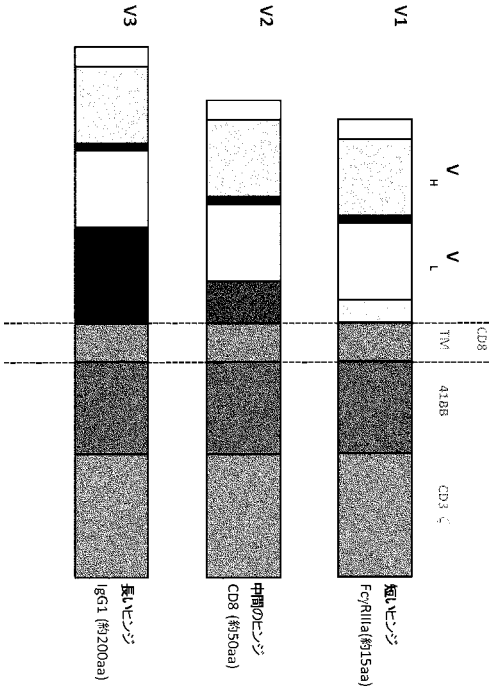
【図６】


CD38
16,1
CD38ex1_T2
61,8
CD38-1
37,8
CD38-2
TALEN なし
TALEN CD38

【図７】



【図８】

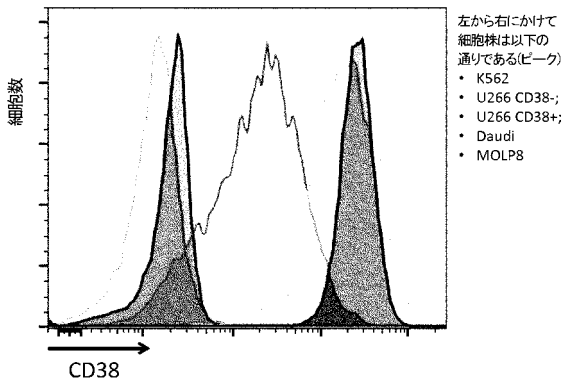


【図９】

プラスミド名	バックボーン	配列名	Kd (nM)
pCLS27540	pCLS9632	10F7-V1	30
pCLS27541	pCLS9632	10F7-V2	
pCLS27542	pCLS9632	10F7-V3	
pCLS27543	pCLS9632	13F11-V1	0,8
pCLS27544	pCLS9632	13F11-V2	
pCLS27545	pCLS9632	13F11-V3	
pCLS27546	pCLS9632	16B5-V1	3,2
pCLS27547	pCLS9632	16B5-V2	
pCLS27548	pCLS9632	16B5-V3	
pCLS27549	pCLS9632	25A10-V1	0,25
pCLS27550	pCLS9632	25A10-V2	
pCLS27551	pCLS9632	25A10-V3	
pCLS27552	pCLS9632	27B6-V1	2,2
pCLS27553	pCLS9632	27B6-V2	
pCLS27554	pCLS9632	27B6-V3	
pCLS27555	pCLS9632	28F5-V1	不明
pCLS27556	pCLS9632	28F5-V2	
pCLS27557	pCLS9632	28F5-V3	
pCLS27558	pCLS9632	29B4-V1	0,52
pCLS27559	pCLS9632	29B4-V2	
pCLS27560	pCLS9632	29B4-V3	
pCLS27561	pCLS9632	GMB005-V1	119
pCLS27562	pCLS9632	GMB005-V2	
pCLS27563	pCLS9632	GMB005-V3	

【図１０】

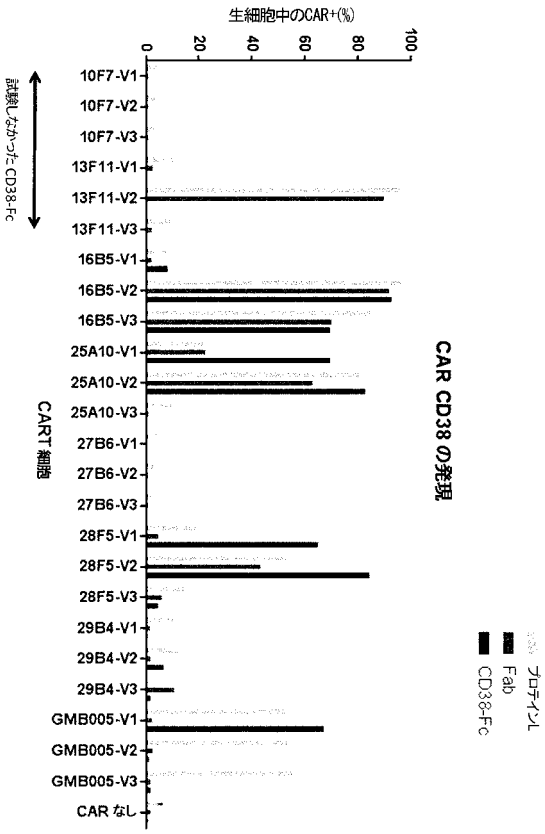
A



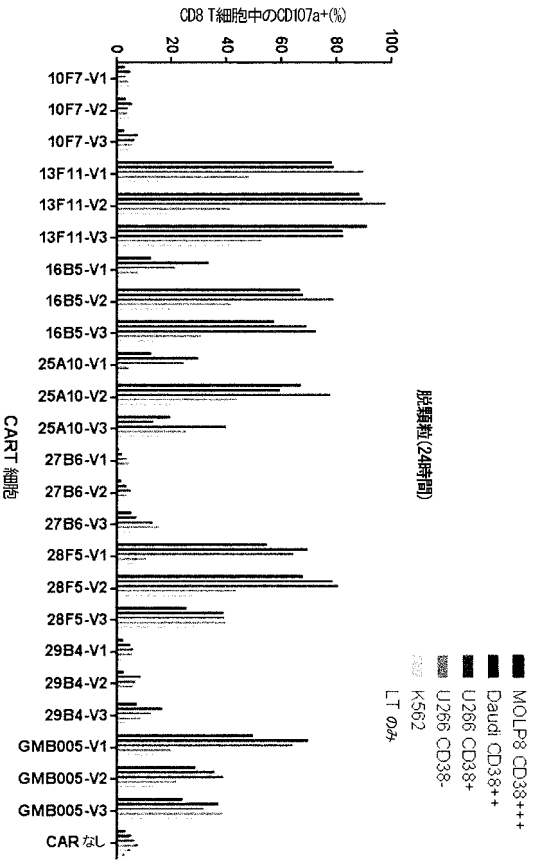
B

細胞株	疾患	CD38+(%)	CD38 分子 / 細胞
MOLP8	MM	97,34	482346
Daudi	バーキット リンパ腫	97,73	259889
U266 CD38+	MM	84,335	48216
U266 CD38-	MM	2,39	230
K562	CML	0	0

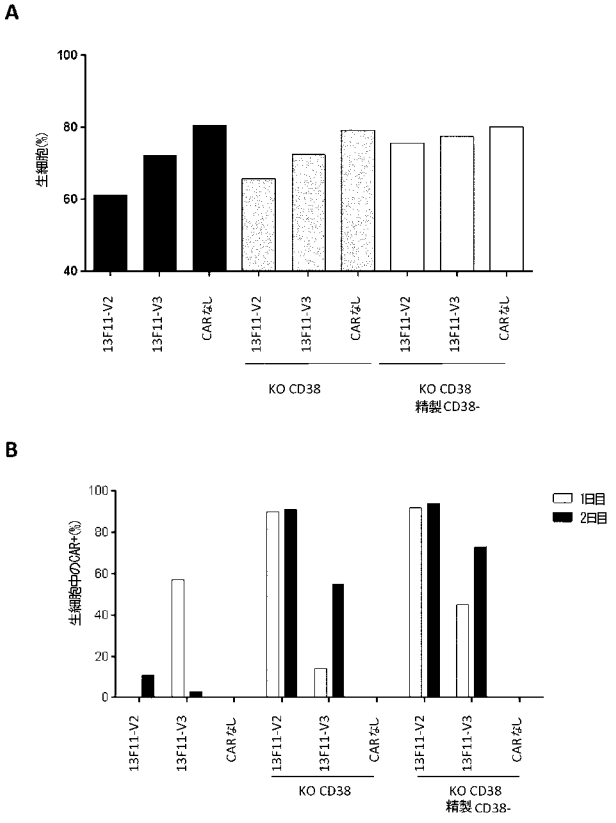
【図１１】



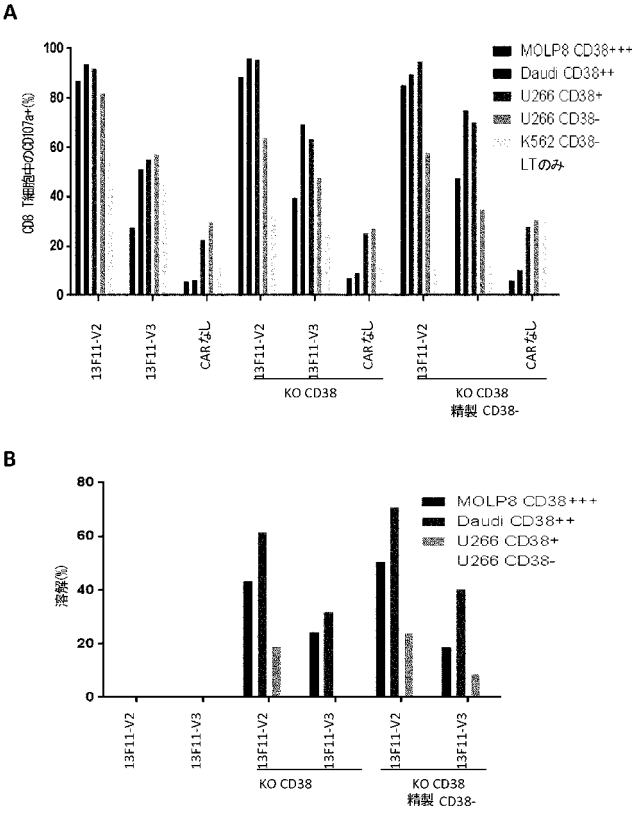
【図１２】



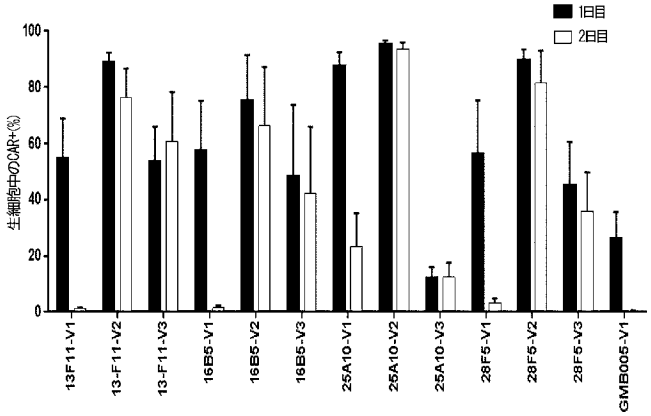
【図１３】



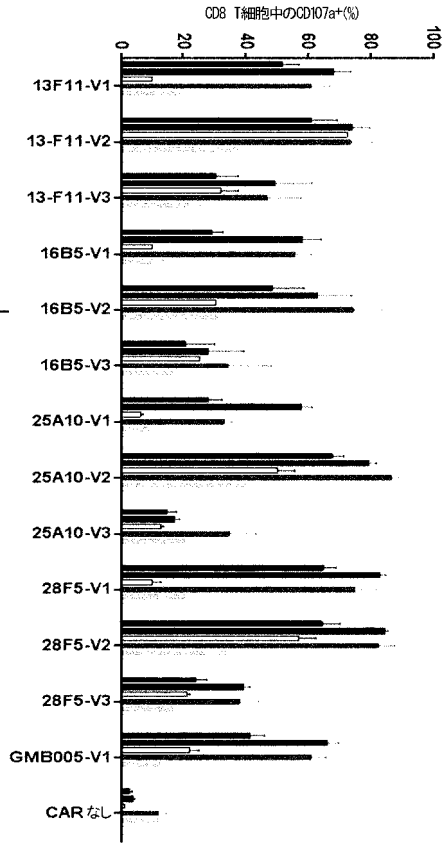
【図１４】



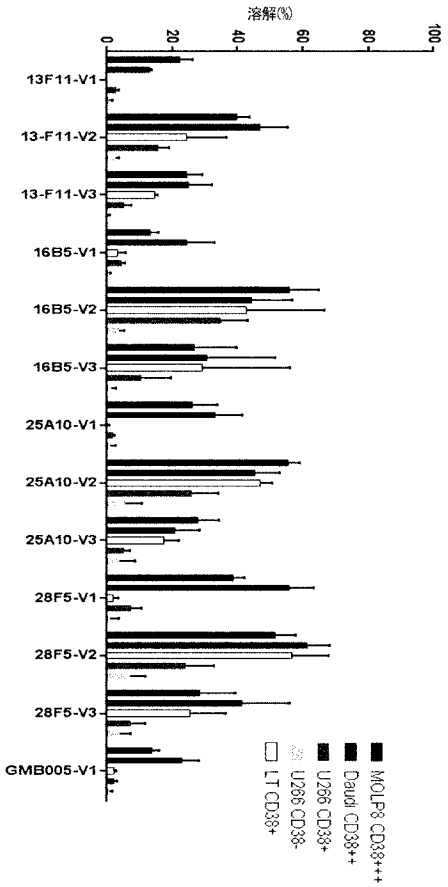
【図１５】



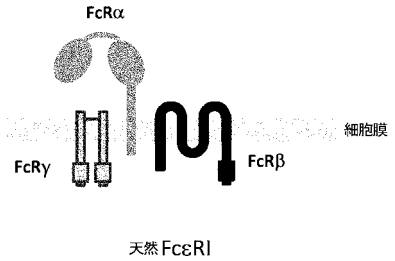
【図１６】



【図１７】

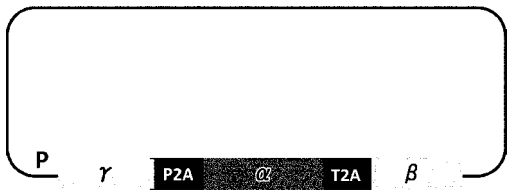


【図１８】



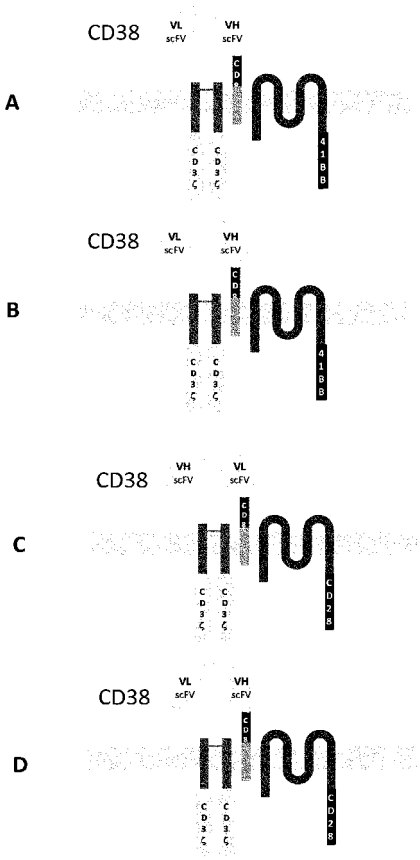
天然FcεRI

【図１９】

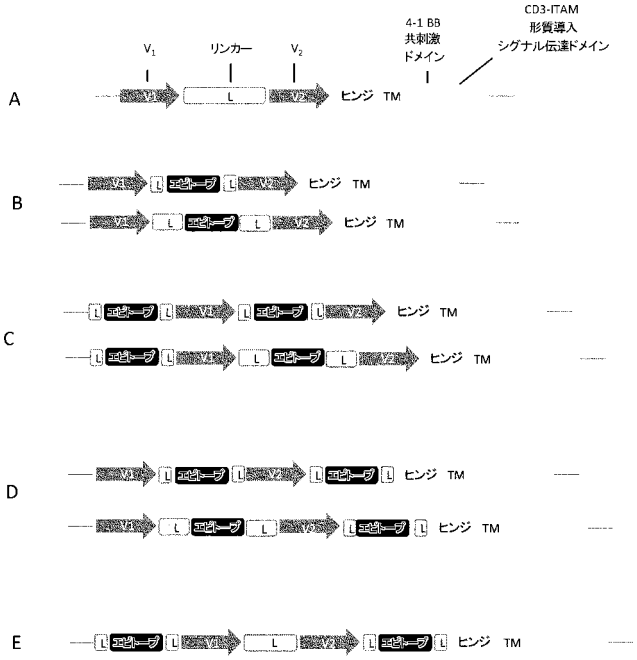


ポリシストロニックmcCAR構築物の構造

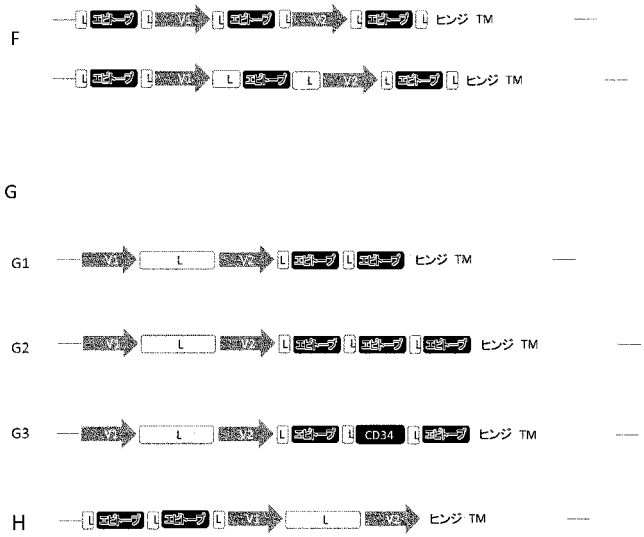
【図２０】



【図２１Ａ】



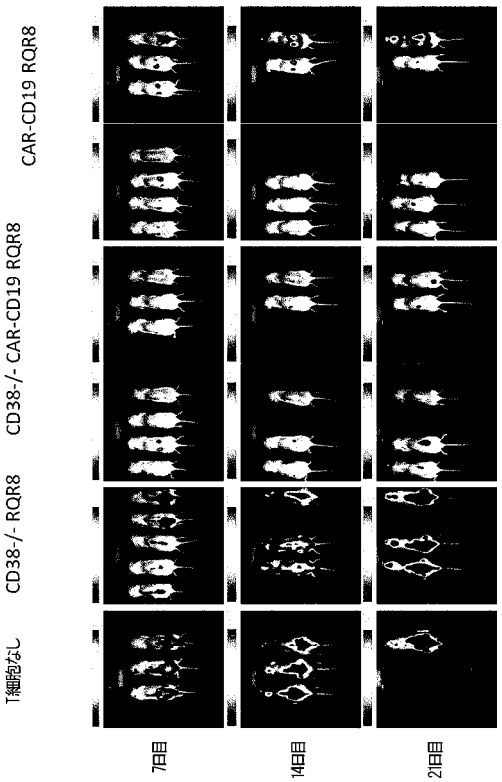
【図２１Ｂ】



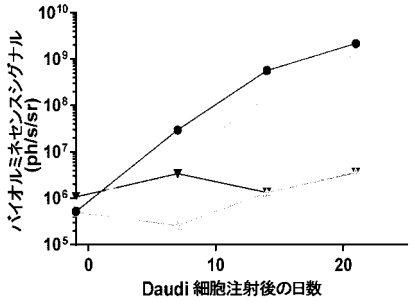
【図２２Ａ】



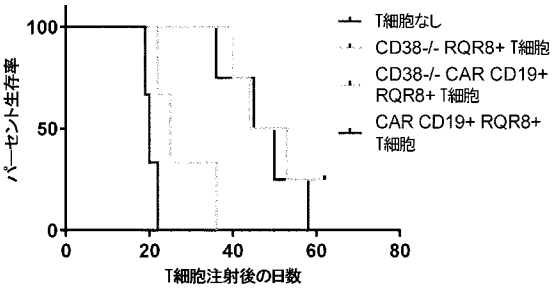
【図２２Ｂ】



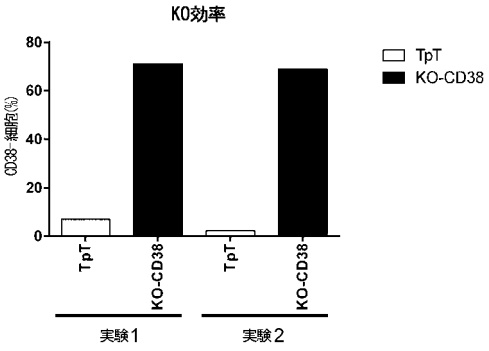
【図２２Ｃ】



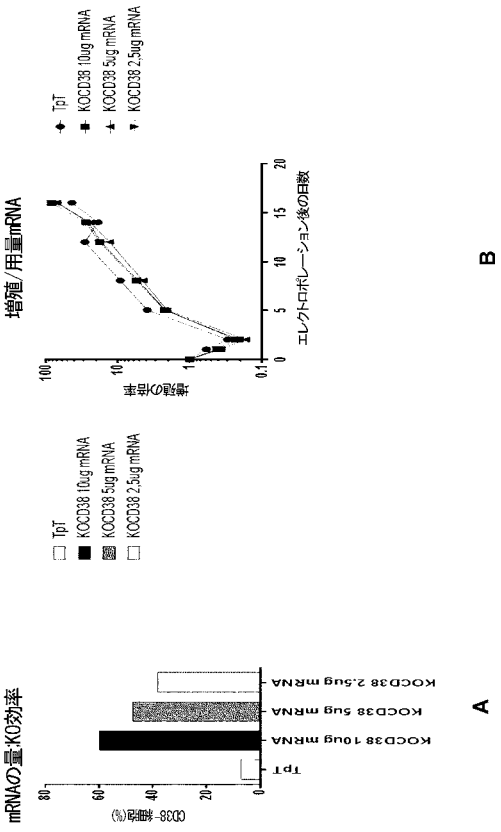
【図２２Ｄ】



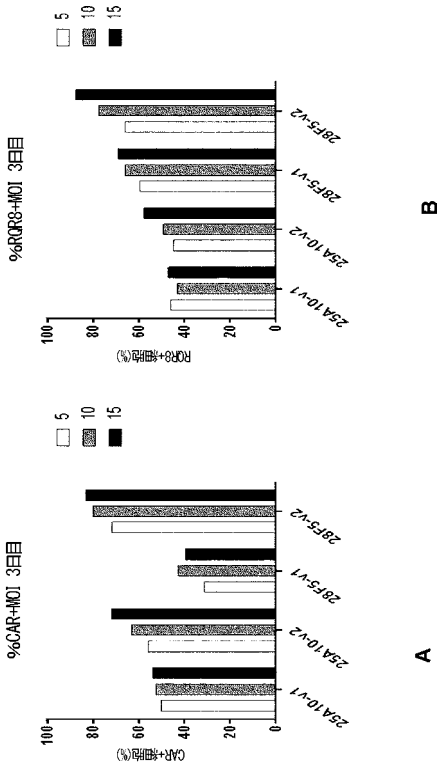
【図２３】



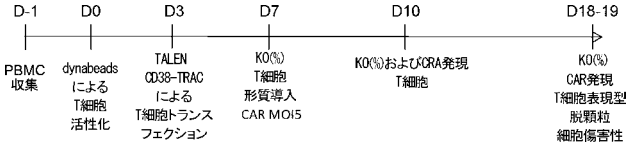
【図２４】



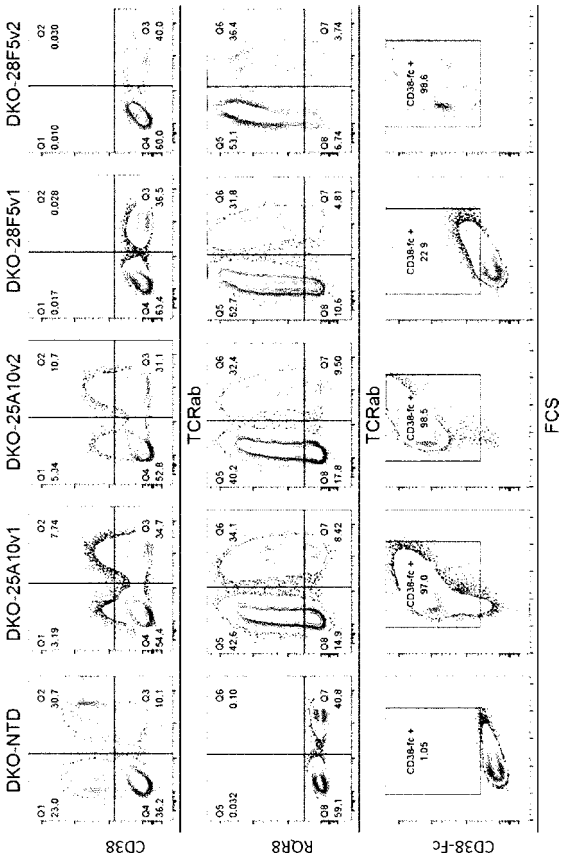
【図２５】



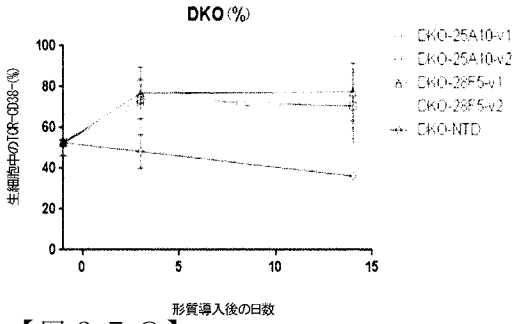
【図２６】



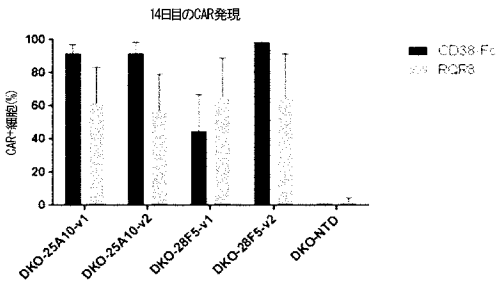
【図２７Ａ】



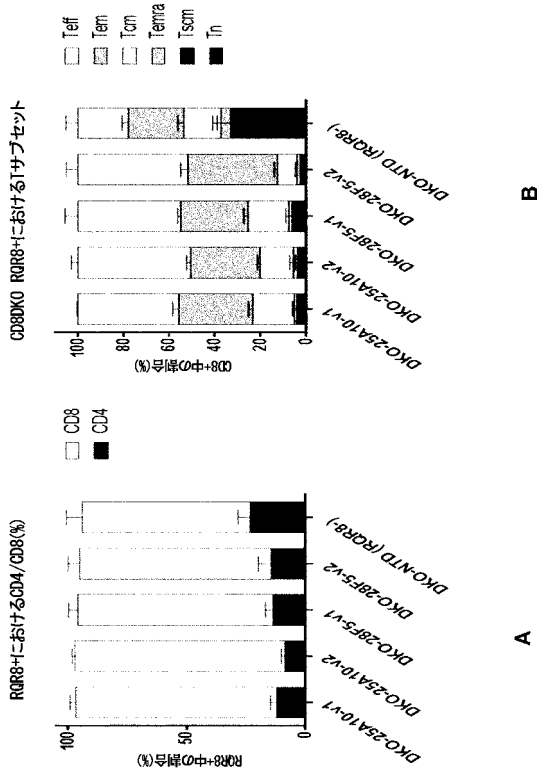
【図２７Ｂ】



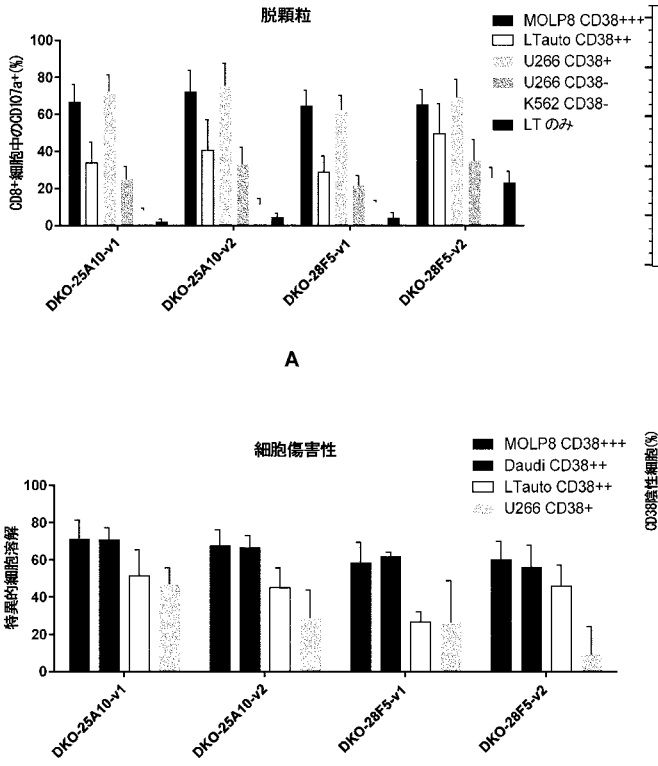
【図２７Ｃ】



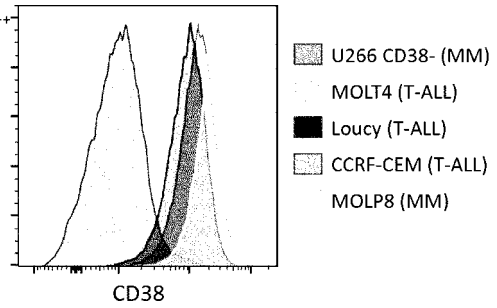
【図２８】



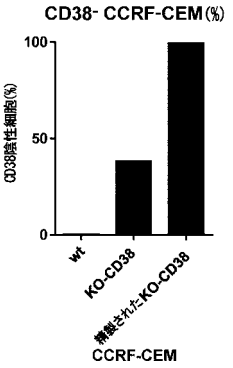
【図２９】



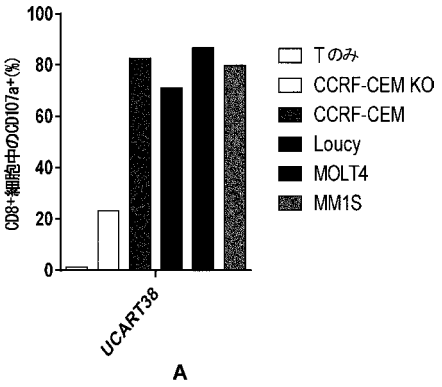
【図３０】

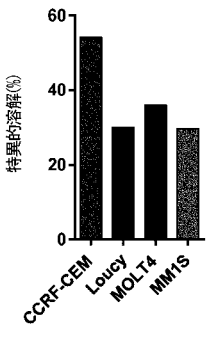


【図３１】



【図３２】





【配列表】
2018522907000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/067800

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K35/17 A61P35/00 C12N5/0783 A61K39/00 A61K39/395
C07K14/705
ADD.
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 C12N

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)
EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	J BHATTACHARYYA ET AL: "T-cell immunotherapy with a chimeric receptor against CD38 is effective in eradicating chemotherapy-resistant B-cell lymphoma cells overexpressing survivin induced by BMI-1", BLOOD CANCER JOURNAL, vol. 2, no. 6, 1 June 2012 (2012-06-01), page e75, XP55138165, DOI: 10.1038/bcj.2012.21 the whole document ----- -/--	1-67

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.
[X] 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	Date of mailing of the international search report
14 November 2016	25/11/2016

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Armandola, Elena

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/067800

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GARFALL AL ET AL: "Immunotherapy with chimeric antigen receptors for multiple myeloma", DISCOVERY MEDICINE: DISCOVERY CLASS OF MEDICINE, RESEARCH TECHNOLOGY, AND TOOLS, SOLARIZ, INC, US, vol. 17, no. 91, 1 January 2014 (2014-01-01), pages 37-46, XP009181586, ISSN: 1539-6509 the whole document	1-67
Y	MIHARA KEICHIRO ET AL: "Activated T-cell-mediated immunotherapy with a chimeric receptor against CD38 in B-cell non-Hodgkin lymphoma", JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY, RAVEN PRESS, NEW YORK, NY, US, vol. 32, no. 7, 1 September 2009 (2009-09-01), pages 737-743, XP009132660, ISSN: 1053-8550 the whole document	1-67
Y	KEICHIRO MIHARA ET AL: "Synergistic and persistent effect of T-cell immunotherapy with anti-CD19 or anti-CD38 chimeric receptor in conjunction with rituximab on B-cell non-Hodgkin lymphoma", BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY, vol. 151, no. 1, 1 October 2010 (2010-10-01), pages 37-46, XP055086001, ISSN: 0007-1048, DOI: 10.1111/j.1365-2141.2010.08297.x the whole document	1-67
Y	K MIHARA ET AL: "T-cell immunotherapy with a chimeric receptor against CD38 is effective in eliminating myeloma cells", LEUKEMIA, vol. 26, no. 2, 12 August 2011 (2011-08-12), pages 365-367, XP055138116, ISSN: 0887-6924, DOI: 10.1038/leu.2011.205 the whole document	1-67
Y	WO 2014/191128 A1 (CELLECTIS [FR]) 4 December 2014 (2014-12-04) cited in the application the whole document	1-67
Y,P	WO 2015/136001 A1 (CELLECTIS [FR]) 17 September 2015 (2015-09-17) the whole document	1-67
2	-/--	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/067800

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2013/176915 A1 (GALETTO ROMAN [FR]; GOUBLE AGNES [FR]; GROSSE STEPHANIE [FR]; MANNIOUI) 28 November 2013 (2013-11-28) cited in the application	1-67
A	WO 2014/039523 A1 (CELLECTIS [FR]) 13 March 2014 (2014-03-13) cited in the application page 1 - page 6	1-67
A	WO 2014/184143 A1 (CELLECTIS [FR]) 20 November 2014 (2014-11-20) cited in the application	1-67
A,P	WO 2015/140268 A1 (CELLECTIS [FR]) 24 September 2015 (2015-09-24)	1-67

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2016/067800

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. [X] forming part of the international application as filed:

      [X] 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 13*ter*.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 13*ter*.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2016/067800

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014191128 A1	04-12-2014	AU 2014273490 A1	17-12-2015
		CA 2913830 A1	04-12-2014
		JP 2016525888 A	01-09-2016
		US 2016272999 A1	22-09-2016
		WO 2014191128 A1	04-12-2014
WO 2015136001 A1	17-09-2015	AU 2015228844 A1	18-08-2016
		CA 2942113 A1	17-09-2015
		CN 106103475 A	09-11-2016
		WO 2015136001 A1	17-09-2015
WO 2013176915 A1	28-11-2013	AR 096274 A1	16-12-2015
		AU 2013266733 A1	15-01-2015
		AU 2013266734 A1	15-01-2015
		CA 2874609 A1	28-11-2013
		CA 2874611 A1	28-11-2013
		CN 104718284 A	17-06-2015
		EA 201492222 A1	29-05-2015
		EP 2855666 A1	08-04-2015
		EP 2855667 A1	08-04-2015
		HK 1208879 A1	18-03-2016
		JP 2015523064 A	13-08-2015
		JP 2015525065 A	03-09-2015
		KR 20150029651 A	18-03-2015
		SG 11201407802W A	29-01-2015
		US 2013315884 A1	28-11-2013
		US 2014134142 A1	15-05-2014
		US 2015203817 A1	23-07-2015
		US 2016120905 A1	05-05-2016
		US 2016145337 A1	26-05-2016
		WO 2013176915 A1	28-11-2013
		WO 2013176916 A1	28-11-2013
WO 2014039523 A1	13-03-2014	AU 2013312838 A1	12-03-2015
		CA 2883502 A1	13-03-2014
		CN 104769103 A	08-07-2015
		EP 2893004 A1	15-07-2015
		HK 1212728 A1	17-06-2016
		JP 2015528298 A	28-09-2015
		KR 20150083991 A	21-07-2015
		RU 2015112125 A	27-10-2016
		SG 11201501471V A	30-03-2015
		WO 2014039523 A1	13-03-2014
WO 2014184143 A1	20-11-2014	AU 2014267436 A1	12-11-2015
		CA 2911292 A1	20-11-2014
		CN 105431532 A	23-03-2016
		EA 201501109 A1	30-06-2016
		EP 2997141 A1	23-03-2016
		JP 2016520074 A	11-07-2016
		KR 20160030480 A	18-03-2016
		PH 12015502479 A1	22-02-2016
		SG 11201508805U A	27-11-2015
		TW 201502139 A	16-01-2015
		WO 2014184143 A1	20-11-2014
WO 2015140268 A1	24-09-2015	AU 2015233461 A1	25-08-2016
		CA 2943008 A1	24-09-2015

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2016/067800

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		WO 2015140268 A1	24-09-2015

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
A61P 35/02		*(2006.01)*	A61P	35/02		
A61P 7/00		*(2006.01)*	A61P	7/00		
A61P 31/00		*(2006.01)*	A61P	31/00		
A61K 35/17		*(2015.01)*	A61K	35/17	Z	
A61P 37/06		*(2006.01)*	A61P	37/06		
A61K 48/00		*(2006.01)*	A61K	48/00		
C12N 15/09		*(2006.01)*	C12N	15/09	１００	
C12N 15/55		*(2006.01)*	C12N	15/09	１１０	
A61K 39/395		*(2006.01)*	C12N	15/55		
			A61K	39/395	D	
			A61K	39/395	E	
			A61K	39/395	N	
			A61K	39/395	T	

(81)指定国 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,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,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74)代理人 100119507
弁理士 刑部 俊
(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72)発明者 ドゥセオ マシルデ
フランス共和国 ９４７００ メゾンーアルフォール ドメンヌ ド シャトー ガイヤール １９

Fターム(参考) 4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 BA03 BB25 BB34 CA25 CA31 CA44
4C084 AA13 NA14 ZA511 ZB021 ZB081 ZB261 ZB271
4C085 AA13 AA14 AA15 AA16 CC01 CC03 CC12 CC31 DD62 EE01

4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 BB64 BB65 CA04 CA12 CA16 NA14
ZA51 ZB02 ZB08 ZB26 ZB27
4H045 AA10 AA11 AA30 BA41 CA40 DA50 DA76 EA20 FA74