

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7378439号  
(P7378439)

(45)発行日 令和5年11月13日(2023.11.13)

(24)登録日 令和5年11月2日(2023.11.2)

(51)国際特許分類	F I	
A 6 1 K 35/28 (2015.01)	A 6 1 K 35/28	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	Z N A
A 6 1 K 35/51 (2015.01)	A 6 1 K 35/51	
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17	
請求項の数 17 (全54頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2021-65361(P2021-65361)	(73)特許権者	500429103 ザ トラスティーズ オブ ザ ユニバーシ ティ オブ ペンシルバニア アメリカ合衆国 1 9 1 0 4 ペンシルベ ニア州 フィラデルフィア シビック セ ンター プールパード 3 6 0 0 ナインス フロア
(22)出願日	令和3年4月7日(2021.4.7)	(74)代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(62)分割の表示	特願2018-543036(P2018-543036 ) )の分割	(74)代理人	100205707 弁理士 小寺 秀紀
原出願日	平成28年11月3日(2016.11.3)	(74)代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(65)公開番号	特開2021-106595(P2021-106595 A)	(74)代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(43)公開日	令和3年7月29日(2021.7.29)		
審査請求日	令和3年4月27日(2021.4.27)		
(31)優先権主張番号	62/250,561		
(32)優先日	平成27年11月4日(2015.11.4)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
前置審査			
最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 造血幹細胞における遺伝子編集のための方法および組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

CD123、CD19、またはCD22キメラ抗原受容体T細胞(CAR-T)療法に耐性である改変造血幹細胞および前駆細胞(HSPC)の集団を作製するための方法であって、該方法が、ガイド核酸と一本鎖オリゴヌクレオチドドナー(ssODN)配列を含む相同組換え修復(HDR)鑄型とを含むCRISPR系を該HSPC中へ導入する段階であって、該CRISPR系が、内因性のCD123、CD19、またはCD22をコードする配列中の核酸配列内に、CD123、CD19、またはCD22の遺伝子発現をダウンレギュレートすることができる単一Aヌクレオチド挿入をもたらす、段階を含み、それにより、改変ヒトHSPCの集団を作製する、前記方法。

【請求項2】

前記CRISPR系が、内因性のCD123をコードする配列中の核酸配列内に、前記挿入をもたらす、請求項1記載の方法。

【請求項3】

HSPCが、末梢血単核細胞、臍帯血細胞、骨髄、リンパ節、および脾臓からなる群より選択される供給源から入手されるヒト細胞であるか、または

HSPCがCD34+ HSPCである、請求項1または2記載の方法。

【請求項4】

CD123、CD19、またはCD22キメラ抗原受容体T細胞(CAR-T)療法に耐性である改変造

血幹細胞および前駆細胞(HSPC)の集団を作製するための方法であって、該方法が、CRISPR系を該HSPC中へ導入する段階であって、該CRISPR系が、

ガイド核酸、および

一本鎖オリゴヌクレオチドドナー(ssODN)配列

を含み、

該CRISPR系が、内因性のCD123、CD19、またはCD22をコードする配列中の核酸配列内に、CD123、CD19、またはCD22の遺伝子発現をダウンレギュレートすることができる単一Aヌクレオチド挿入をもたらす、

段階を含み、それにより、改変ヒトHSPCの集団を作製する、

前記方法。

10

【請求項5】

HSPCが、末梢血単核細胞、臍帯血細胞、骨髄、リンパ節、および脾臓からなる群より選択される供給源から入手されるヒト細胞であるか、または

HSPCがCD34+ HSPCである、

請求項4記載の方法。

【請求項6】

CD123、CD19、またはCD22キメラ抗原受容体T細胞(CAR-T)療法に耐性である改変ヒト造血幹細胞および前駆細胞(HSPC)の集団であって、該HSPCが、内因性のCD123、CD19、またはCD22をコードする配列の核酸配列内に単一Aヌクレオチド挿入を含み、該挿入が、ガイド核酸と一本鎖オリゴヌクレオチドドナー(ssODN)配列を含む相同組換え修復(HDR)鑄型とを含むCRISPR系によって媒介され、かつ該挿入が、CD123、CD19、またはCD22の遺伝子発現をダウンレギュレートすることができる、前記集団。

20

【請求項7】

前記HSPCが、内因性のCD123をコードする配列の核酸配列内に前記挿入を含む、請求項6記載の改変ヒトHSPCの集団。

【請求項8】

HSPCが、末梢血単核細胞、臍帯血細胞、骨髄、リンパ節、および脾臓からなる群より選択される供給源から入手される自家細胞であるか、または

HSPCがCD34+ HSPCである、

請求項6または7記載の改変ヒトHSPCの集団。

30

【請求項9】

CD123、CD19、またはCD22キメラ抗原受容体T細胞(CAR-T)、および

該CD123、CD19、またはCD22 CAR-TによるCD123、CD19、またはCD22 CAR-T療法に耐性である改変造血幹細胞および前駆細胞(HSPC)の集団

を組み合わせる、その必要のある対象におけるがんを処置するための医薬であって、該HSPCが、

内因性のCD123、CD19、またはCD22をコードする配列中の核酸配列内に単一Aヌクレオチド挿入を含み、該挿入が、ガイド核酸と一本鎖オリゴヌクレオチドドナー(ssODN)配列を含む相同組換え修復(HDR)鑄型とを含むCRISPR系によって導入されており、かつ該挿入が、CD123、CD19、またはCD22の遺伝子発現をダウンレギュレートすることができる、

40

前記医薬。

【請求項10】

CD123、CD19、またはCD22キメラ抗原受容体T細胞(CAR-T)療法に耐性である改変造血幹細胞および前駆細胞(HSPC)の集団を含み、該CAR-Tを含むCD123、CD19、またはCD22 CAR-T療法と併用される、その必要のある対象においてCD123、CD19、またはCD22キメラ抗原受容体(CAR)T細胞療法から造血幹細胞または前駆細胞を保護するための医薬であって、

該HSPCが、

内因性のCD123、CD19、またはCD22をコードする配列中の核酸配列内に単一Aヌクレオ

50

チド挿入を含み、該挿入が、ガイド核酸と一本鎖オリゴヌクレオチドドナー(ssODN)配列を含む相同組換え修復(HDR)鋳型とを含むCRISPR系によって導入されており、かつ該挿入が、CD123、CD19、またはCD22の遺伝子発現をダウンレギュレートすることができる、

前記医薬。

【請求項 1 1】

前記HSPCが、内因性のCD123をコードする配列中の核酸配列内に前記挿入を含む、請求項9または10に記載の医薬。

【請求項 1 2】

HSPCが、CAR-T療法より前に対象に投与されるように用いられることを特徴とする、請求項9～11のいずれか一項記載の医薬。

10

【請求項 1 3】

HSPCが、末梢血単核細胞、臍帯血細胞、骨髄、リンパ節、および脾臓からなる群より選択される供給源から入手される自家細胞である、請求項9～12のいずれか一項記載の医薬。

【請求項 1 4】

HSPCがCD34+ HSPCである、請求項9～13のいずれか一項記載の医薬。

【請求項 1 5】

がんが、乳がん、前立腺がん、卵巣がん、子宮頸がん、皮膚がん、膵臓がん、大腸がん、腎臓がん、肝臓がん、脳がん、リンパ腫、白血病、肺がん、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、請求項9記載の医薬。

20

【請求項 1 6】

がんが、白血病である、請求項9記載の医薬。

【請求項 1 7】

がんが、急性骨髄性白血病(AML)である、請求項9記載の医薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、米国特許法第119条(e)の下、2015年11月4日付で出願された米国仮特許出願第62/250,561号の優先権を有しており、その出願は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

30

【背景技術】

【0002】

発明の背景

キメラ抗原受容体(CAR)T細胞(CART細胞)、抗体-薬物コンジュゲートまたは二重特異性T細胞誘導抗体(BITE)などの強力な抗原特異的免疫療法は、がんの処置への新規のアプローチを示す。増加した効力は、B細胞悪性腫瘍のCART19処置に起因する長期B細胞形成不全などの、増加したオンターゲットオフ腫瘍毒性(on-target off-tumor toxicity)と関連する。本質的に、これは、これらの様式のいずれも、同じ細胞表面抗原を有する悪性細胞とそれらの正常な相当物とを識別することができないためである。CART細胞は、T細胞が、表面上に特異的抗原を発現する細胞を認識および殺傷するように遺伝子操作されている、新規の療法である。CARは、T細胞表面受容体の細胞内シグナル伝達ドメインと組み合わせられた抗体の抗原認識ドメインのハイブリッドである。CD19を標的とするCART細胞は、いくつかの第I相臨床試験においてB細胞悪性腫瘍に対する効能を示し(Grupp et al, New England Journal of Medicine. 2013;368: 1509-1518 (非特許文献1); Brentjens et al, Blood. 2011;118: 4817-4828 (非特許文献2); およびKochenderfer et al, Blood. 2010; 116: 4099-4102 (非特許文献3))、かつ正常なB細胞を除去する。長期にわたるBリンパ球減少はヒトによって十分に許容されるため、この特定の毒性はCART19後に用量制限的ではなかった。しかし、CD123またはCD33などの、急性骨髄性白

40

50

血病(AML)抗原を標的とするCART細胞は、白血病細胞を根絶し、結果的に、同じ表面抗原を有することから、正常な骨髄系前駆細胞を除去し、従って、骨髄形成不全へ至る。AML細胞上に選択的に発現され、正常な骨髄系細胞上には発現されない表面抗原が存在しないため、AMLおよび他の骨髄疾患(骨髄異形成および骨髄増殖性腫瘍を含む)におけるCART細胞の使用は制限される。

【0003】

従って、正常な骨髄系前駆細胞を除去することなく腫瘍細胞を選択的に標的とすることに対する必要性が存在する。本発明はこの必要性を満たす。

【先行技術文献】

【非特許文献】

10

【0004】

【文献】Grupp et al, New England Journal of Medicine. 2013;368: 1509-1518

【文献】Brentjens et al, Blood. 2011;118: 4817-4828

【文献】Kochenderfer et al, Blood. 2010: 116: 4099-4102

【発明の概要】

【0005】

本発明は、改変造血幹細胞または前駆細胞を作製する組成物および方法に関する。

【0006】

一局面において、本発明は、その必要のある対象においてキメラ抗原受容体(CAR)T細胞療法から造血幹細胞または前駆細胞を保護する方法を含む。本発明の方法は、改変造血幹細胞または前駆細胞を対象へ投与する段階を含み、ここで、該幹細胞または前駆細胞は、内因性遺伝子またはその一部の発現を減少させることができる核酸を含み、ここで、該内因性遺伝子は、CARに標的とされる抗原ドメインを含むポリペプチドをコードする。1つの態様において、本発明の方法は、CAR T細胞療法をその必要のある対象へ施す段階をさらに含む。別の態様において、改変細胞は、CARに標的とされる抗原ドメインを欠いている改変ポリペプチドをコードする改変内因性遺伝子をさらに含む。

20

【0007】

別の局面において、本発明は、改変造血幹細胞または前駆細胞を作製するための方法を含む。本発明の方法は、内因性遺伝子またはその一部の発現を減少させることができる核酸を細胞中へ導入する段階を含み、ここで、該内因性遺伝子は、キメラ抗原受容体(CAR)に標的とされる抗原ドメインを含むポリペプチドをコードする。1つの態様において、方法は、CAR T細胞療法の必要のある対象から細胞を得る段階を含む。別の態様において、方法は、改変細胞中へ改変内因性遺伝子を導入する段階をさらに含む、該改変内因性遺伝子は、CARに標的とされる抗原ドメインを欠いている改変ポリペプチドをコードする。

30

【0008】

1つの態様において、内因性遺伝子発現を減少させることができる核酸は、CRISPR系である。1つの態様において、CRISPR系は、Cas発現ベクターと、内因性遺伝子に対して特異的なガイド核酸配列とを含む。別の態様において、CRISPR系は、内因性遺伝子に対して特異的なガイド核酸配列と複合体化されたCas9タンパク質を含む。別の態様において、CRISPR系は誘導性プロモーターを含む。さらなる態様において、本明細書に記載されるような本発明の方法は、Cas発現ベクター中の誘導性プロモーターを活性化する作用物質へ造血幹細胞または前駆細胞を曝露する段階をさらに含む。

40

【0009】

1つの態様において、内因性遺伝子は腫瘍抗原をコードする。別の態様において、内因性遺伝子は、CARに標的とされる腫瘍細胞上に発現される。さらに別の態様において、内因性遺伝子はCD33またはCD123をコードする。

【0010】

1つの態様において、改変ポリペプチドは、内因性遺伝子によってコードされるポリペプチドの機能と同等である少なくとも1つの機能を含む。

【0011】

50

1つの態様において、細胞は、末梢血単核細胞、臍帯血細胞、骨髄、リンパ節、および脾臓からなる群より選択される供給源より入手される。

【0012】

1つの態様において、細胞はCD34+である。1つの態様において、本明細書に記載されるような本発明の方法は、細胞を増大させる段階を含む。別の態様において、増大させる段階は、核酸を導入する段階の前に行われる。別の態様において、本明細書に記載されるような本発明の方法は、細胞を凍結保存する段階を含む。さらに別の態様において、本明細書に記載されるような本発明の方法は、核酸を導入する前に、凍結保存された細胞を解凍する段階を含む。1つの態様において、核酸を導入する段階を、細胞に形質導入を行うこと、細胞にトランスフェクションを行うこと、および細胞にエレクトロポレーションを行うことからなる群より選択されるプロセスによって行う。別の態様において、改変細胞は、対象中で少なくとも1つの血液細胞型へ分化する。さらに別の態様において、改変細胞は、対象中への投与後に自己複製することができる。

10

【0013】

一局面において、本発明は、本明細書上記に記載される方法に従って作製された改変細胞を含む組成物を含む。

【0014】

別の局面において、本発明は、本明細書上記に記載される方法に従って作製された改変細胞および薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物を含む。

【0015】

別の局面において、本発明は、養子細胞移入療法のための方法を含む。この方法は、本明細書に記載される方法に従って作製された改変細胞を含む有効量の薬学的組成物を、その必要のある対象へ投与する段階を含み、ここで、該対象に、有効量の本明細書に記載される細胞と、内因性遺伝子によってコードされるポリペプチドの抗原ドメインを標的とするCAR療法とが施され、それによって対象を処置する。

20

【0016】

さらに別の局面において、本発明は、その必要のある対象における状態を処置する方法を含む。この方法は、対象に本明細書に記載される方法に従って作製された改変細胞を含む治療有効量の薬学的組成物を投与する段階と、CAR T細胞療法を施す段階であって、該CARが、内因性遺伝子によってコードされるポリペプチドの抗原ドメインを特異的に標的とする抗原結合ドメインを含む、前記段階、とを含み、それによって前記状態を処置する。

30

【0017】

1つの態様において、状態は、自己免疫疾患である。別の態様において、自己免疫疾患は、後天性免疫不全症候群（AIDS）、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質抗体症候群、自己免疫性アジソン病、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、内耳自己免疫病（AIED）、自己免疫性リンパ増殖症候群（ALPS）、自己免疫性血小板減少性紫斑病（ATP）、ベーチェット病、心筋症、セリアック病-疱疹状皮膚炎；慢性疲労免疫機能不全症候群（CFIDS）、慢性炎症性脱髄性多発神経炎（CIPD）、癩痕性類天疱瘡、寒冷凝集素症、クレスト症候群、クローン病、ドゴー病、若年性皮膚筋炎、円板状ループス、本態性混合型クリオグロブリン血症、線維筋痛-線維筋炎、グレープス病、ギラン・バレー症候群、橋本甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、IgA腎症、インスリン依存性糖尿病、若年性慢性関節炎（スティール病）、若年性関節リウマチ、メニエール病、混合性結合組織病、多発性硬化症、重症筋無力症、悪性貧血、結節性多発動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性症候群、リウマチ性多発筋痛症、多発性筋炎および皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象、ライター症候群、リウマチ熱、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症（進行性全身性硬化症（PSS）、これは全身性硬化症（SS）としても知られる）、シェーグレン症候群、スティッフマン症候群、全身性エリテマトーデス、高安動脈炎、側頭動脈炎/巨細胞性動脈炎、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、白斑、ヴェーゲナー肉芽腫症、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される。別の態様において、状態はがんである。さらに別の態様におい

40

50

て、がんは、乳がん、前立腺がん、卵巣がん、子宮頸がん、皮膚がん、膵臓がん、大腸がん、腎臓がん、肝臓がん、脳がん、リンパ腫、白血病、肺がん、ならびにそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される。

[本発明1001]

その必要のある対象においてキメラ抗原受容体(CAR)T細胞療法から造血幹細胞または前駆細胞を保護する方法であって、該方法が、改変造血幹細胞または前駆細胞を対象へ投与する段階を含み、ここで、該幹細胞または前駆細胞が、内因性遺伝子またはその一部の発現を減少させることができる核酸を含み、ここで、該内因性遺伝子が、CARに標的とされる抗原ドメインを含むポリペプチドをコードする、前記方法。

[本発明1002]

CAR T細胞療法をその必要のある対象へ施す段階をさらに含む、本発明1001の方法。

[本発明1003]

内因性遺伝子発現を減少させることができる核酸が、CRISPR系である、本発明1001の方法。

[本発明1004]

CRISPR系が、Cas発現ベクターと、内因性遺伝子に対して特異的なガイド核酸配列とを含む、本発明1003の方法。

[本発明1005]

CRISPR系が、内因性遺伝子に対して特異的なガイド核酸配列と複合体化されたCas9タンパク質を含む、本発明1003の方法。

[本発明1006]

CRISPR系が誘導性プロモーターを含む、本発明1003の方法。

[本発明1007]

Cas発現ベクター中の誘導性プロモーターを活性化する作用物質へ造血幹細胞または前駆細胞を曝露する段階をさらに含む、本発明1006の方法。

[本発明1008]

内因性遺伝子が腫瘍抗原をコードする、本発明1001の方法。

[本発明1009]

内因性遺伝子が、CARに標的とされる腫瘍細胞上に発現される、本発明1001の方法。

[本発明1010]

内因性遺伝子がCD33またはCD123をコードする、本発明1001の方法。

[本発明1011]

改変細胞が、CARに標的とされる抗原ドメインを欠いている改変ポリペプチドをコードする改変内因性遺伝子をさらに含む、本発明1001の方法。

[本発明1012]

前記改変ポリペプチドが、内因性遺伝子によってコードされるポリペプチドの機能と同等である少なくとも1つの機能を含む、本発明1011の方法。

[本発明1013]

改変造血幹細胞または前駆細胞を作製するための方法であって、該方法が、内因性遺伝子またはその一部の発現を減少させることができる核酸を細胞中へ導入する段階を含み、ここで、該内因性遺伝子が、キメラ抗原受容体(CAR)に標的とされる抗原ドメインを含むポリペプチドをコードする、前記方法。

[本発明1014]

CAR T細胞療法の必要のある対象から細胞を得る段階をさらに含む、本発明1013の方法。

[本発明1015]

細胞が、末梢血単核細胞、臍帯血細胞、骨髓、リンパ節、および脾臓からなる群より選択される供給源から入手される、本発明1013の方法。

[本発明1016]

細胞がCD34+である、本発明1013の方法。

10

20

30

40

50

[本発明1017]

内因性遺伝子発現を減少させることができる核酸が、CRISPR系である、本発明1013の方法。

[本発明1018]

CRISPR系が、内因性遺伝子に対して特異的なガイド核酸配列と複合体化されたCas9タンパク質を含む、本発明1017の方法。

[本発明1019]

CRISPR系が、Cas発現ベクターと、内因性遺伝子に対して特異的なガイド核酸配列とを含む、本発明1017の方法。

[本発明1020]

CRISPR系が誘導性プロモーターを含む、本発明1017の方法。

[本発明1021]

Cas発現ベクター中の誘導性プロモーターを活性化する作用物質へ造血幹細胞または前駆細胞を曝露する段階をさらに含む、本発明1020の方法。

[本発明1022]

内因性遺伝子が腫瘍抗原をコードする、本発明1013の方法。

[本発明1023]

内因性遺伝子が、CARに標的とされる腫瘍細胞上に発現される、本発明1013の方法。

[本発明1024]

内因性遺伝子が、CD33およびCD123からなる群より選択される、本発明1013の方法。

[本発明1025]

改変細胞中へ改変内因性遺伝子を導入する段階をさらに含み、該改変内因性遺伝子が、CARに標的とされる抗原ドメインを欠いている改変ポリペプチドをコードする、本発明1013の方法。

[本発明1026]

前記改変ポリペプチドが、内因性遺伝子によってコードされるポリペプチドの機能と同等である少なくとも1つの機能を含む、本発明1025の方法。

[本発明1027]

前記細胞を増大させる段階をさらに含む、本発明1013の方法。

[本発明1028]

前記増大させる段階を、前記核酸を導入する段階の前に行う、本発明1027の方法。

[本発明1029]

前記細胞を凍結保存する段階をさらに含む、本発明1013の方法。

[本発明1030]

前記核酸を導入する前に、凍結保存された細胞を解冻する段階をさらに含む、本発明1029の方法。

[本発明1031]

前記核酸を導入する段階を、細胞に形質導入を行うこと、細胞にトランスフェクションを行うこと、および細胞にエレクトロポレーションを行うことからなる群より選択されるプロセスによって行う、本発明1013の方法。

[本発明1032]

本発明1013の方法に従って作製された改変細胞を含む、組成物。

[本発明1033]

本発明1013の方法に従って作製された改変細胞および薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

[本発明1034]

養子細胞移入療法のための方法であって、該方法が、本発明1013の方法に従って作製された改変細胞を含む有効量の薬学的組成物を、その必要のある対象へ投与する段階を含み、ここで、該対象に、有効量の該細胞と、内因性遺伝子によってコードされるポリペプチドの抗原ドメインを標的とするCAR T細胞療法とが施され、それによって対象を処置す

10

20

30

40

50

る、前記方法。

[本発明1035]

前記改変細胞が、対象中で少なくとも1つの血液細胞型へ分化する、本発明1034の方法。

[本発明1036]

前記改変細胞が、対象中への投与後に自己複製することができる、本発明1034の方法。

[本発明1037]

その必要のある対象における状態を処置する方法であって、  
該方法が、

対象に本発明1013の方法に従って作製された改変細胞を含む治療有効量の薬学的組成物を投与する段階と、

CAR療法を施す段階であって、該CARが、内因性遺伝子によってコードされるポリペプチドの抗原ドメインを特異的に標的とする抗原結合ドメインを含む、前記段階とを含み、それによって状態を処置する、前記方法。

[本発明1038]

前記改変細胞が、対象中で少なくとも1つの血液細胞型へ分化する、本発明1037の方法。

[本発明1039]

前記改変細胞が、対象中への投与後に自己複製することができる、本発明1037の方法。

[本発明1040]

前記状態が自己免疫疾患である、本発明1037の方法。

[本発明1041]

自己免疫疾患が、後天性免疫不全症候群(AIDS)、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質抗体症候群、自己免疫性アジソン病、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、内耳自己免疫病(AIED)、自己免疫性リンパ増殖症候群(ALPS)、自己免疫性血小板減少性紫斑病(ATP)、ベーチェット病、心筋症、セリアック病-疱疹状皮膚炎；慢性疲労免疫機能不全症候群(CFIDS)、慢性炎症性脱髄性多発神経炎(CIPD)、癒痕性類天疱瘡、寒冷凝集素症、クレスト症候群、クローン病、ドゴー病、若年性皮膚筋炎、円板状ループス、本態性混合型クリオグロブリン血症、線維筋痛-線維筋炎、グレーブス病、ギラン・バレー症候群、橋本甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病(ITP)、IgA腎症、インスリン依存性糖尿病、若年性慢性関節炎(スティル病)、若年性関節リウマチ、メニエール病、混合性結合組織病、多発性硬化症、重症筋無力症、悪性貧血、結節性多発動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性症候群、リウマチ性多発筋痛症、多発性筋炎および皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象、ライター症候群、リウマチ熱、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症(進行性全身性硬化症(PSS)、これは全身性硬化症(SS)としても知られる)、シェーグレン症候群、スティッフマン症候群、全身性エリテマトーデス、高安動脈炎、側頭動脈炎/巨細胞性動脈炎、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、白斑、ヴェーグナー肉芽腫症、ならびにそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、本発明1040の方法。

[本発明1042]

状態ががんである、本発明1037の方法。

[本発明1043]

がんが、乳がん、前立腺がん、卵巣がん、子宮頸がん、皮膚がん、膵臓がん、大腸がん、腎臓がん、肝臓がん、脳がん、リンパ腫、白血病、肺がん、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、本発明1042の方法。

【図面の簡単な説明】

【0018】

本発明の好ましい態様の以下の詳細な説明は、添付の図面と併せて読むことにより、より良く理解されるであろう。本発明を実例で説明するために、現時点で好ましい態様を図面として示している。しかし、本発明は、図面中に示された態様の厳密な配置および手段

10

20

30

40

50



には限定されないことが理解されるべきである。

【0019】

【図1A】図1A~1Bは、CD33 gRNAスクリーニングを示す一連のプロットおよび画像である。Molm14細胞に、第1日にCas9 mRNAおよび第2日にgRNAv1~5のエレクトロポレーションを行った。図1Aは、エレクトロポレーションから5日後のフローサイトメトリーによるCD33発現を示すグラフである。

【図1B】図1A~1Bは、CD33 gRNAスクリーニングを示す一連のプロットおよび画像である。Molm14細胞に、第1日にCas9 mRNAおよび第2日にgRNAv1~5のエレクトロポレーションを行った。図1Bは、gRNA切断部位にわたるゲノムDNAのPCRのミスマッチ切断アッセイ(Surveyor)を示す画像である。対照細胞には、EMX1に対するgRNAのエレクトロポレーションを行った。インデル% =  $[1 - \{1 - (a+b)/(a+b+c)\}] * 100$  (a, b: 切断されたバンドの相対濃度、c: 完全長バンドの相対濃度)。

【図2】図2A~2Bは、2回(最初にCas9 mRNAおよびその後CD33を標的とするgRNA)エレクトロポレーションを行ったか、または代わりに1回(同じgRNAと複合体化されたCas9タンパク質)エレクトロポレーションを行った、動員末梢血由来のCD34+細胞を示す一連のプロットである。図2Aは、エレクトロポレーションから7日後の、フローサイトメトリーによるCD33発現の代表的なプロットを示す。図2Bは、異なるドナー(RNAについてn=4およびRNPについてn=2)について平均化された、gRNA標的部位にわたるPCRアンプリコンのTIDE分析によって測定されたインデル頻度を示すグラフである。

【図3】図3A~3Bは、CART33細胞がCD33陰性細胞を標的としないことを示す一連のグラフである。図3Aは、フローサイトメトリー脱顆粒アッセイからの結果を示す。図3Bは、ルシフェラーゼに基づく殺傷からの結果を示す。全ての場合において、エフェクターはCART33細胞である。TCM = T細胞培地のみ(陰性対照); P-I = PMAおよびイオノマイシン(陽性対照); MOLM14wt = 遺伝子改変を伴わないCD33発現性AML細胞株MOLM14; D6 = CD33についてのMOLM14 KO; Jurkat = CD33陰性細胞株(追加の陰性対照)。

【図4-1】図4A~4Dは、ヒトCD34+細胞中のCD33 KOを示す一群の画像である。図4Aは、CD33 KO CD34+細胞中のCD33およびCD38発現を示す一群のフローダイヤグラムである。図4Bは、surveyor DNA切断アッセイによるミスマッチ突然変異効率を示す画像である。図4Cは、TOPOクローニングによって決定されたような個々の突然変異のSangerシーケンシング結果を示す画像である。図4Dは、G-CSF動員末梢血(mPB)、臍帯血、および骨髄に由来するCD33 KO細胞のパーセンテージを示す。

【図4-2】図4-1の説明を参照のこと。

【図5A】図5A~5Cは、HSC中のCD33のKOがそれらの正常な増殖および分化を害しないことを示す一連のプロットおよび画像である。EMX1遺伝子座(対照)またはCD33遺伝子座のCRISPRを行った後、CD34+細胞を、7日間、SCF、Flt3L、TPO、およびIL-6と共に無血清培地において培養したか、または代わりに、エレクトロポレーション直後に半固体メチルセルロース培地(Methocult)上に平板培養した。図5Aは、インビトロ培養下での対照(EMX1)対CD33 KO HSCの増殖曲線を示すグラフである。図5Bは、メチルセルロース培地中での対照対CD33 KO HSCの骨髄系および赤血球系分化を示すグラフである。図5Cは、対照細胞と比較して典型的な単球および顆粒球形態を示す、CD33 KO HSCに由来するメチルセルロースコロニーからのサイトスピンされた細胞を示す。

【図5B】図5Aの説明を参照のこと。

【図5C】図5Aの説明を参照のこと。

【図6】CD33 KO HSCメチルセルロースコロニーおよびCD33+ HSCメチルセルロースコロニーの免疫表現型検査の一群のグラフであり、対照HSC由来コロニー、CD33KO HSC由来コロニー、およびCD33KO HSCからの残存CD33発現性コロニーにおける同一の単球および顆粒球分化を示す。

【図7A】図7A~7Bは、CART33細胞と共に共培養されたCD33 KO HSCの分析を示す一群のグラフである。図7Aは、対照HSCと比較した、CD33 KO HSC上のCD3およびCD45の発現を示し、CART33への曝露はCD33KO HSCに対してよりも対照HSCに対してより

有毒であることを実証しており、これは図7Bに定量化されている。

【図7B】図7Aの説明を参照のこと。

【図8】EMX1またはCD33 KO HSCのいずれかが生着されたマウスが正常な骨髄発達を示したことを示すグラフである。

【図9A】図9A~9Jは、CD33 KOヒトCD34+細胞が長期の多系列生着が可能であることを示す一連のプロットおよび画像である。図9Aは、G-CSF動員末梢血に由来する初代ヒトCD34+細胞におけるCD33 KOプロセスの概略図である。図9Bは、対照またはCD33 KO HSPCのmethocultコロニー形成アッセイからの結果を示す。両方の群中の、顆粒球コロニー形成単位(CFU-G)、マクロファージコロニー形成単位(CFU-M)、および赤芽球バースト形成単位(BFU-E)の代表的な画像を示す。図9Cは、 $1 \sim 5 \times 10^5$ 個の対照またはCD33-KO CD34+細胞が注射された8~12週齢のNSGマウスを示し、末梢血ヒトCD45+生着を12週間後に測定した( $n=68$ マウス; 6つの独立した実験; 異なる6ドナー)。図9Dは、図9CからのヒトCD45+細胞に対するゲーティングを示し; B細胞(CD19+)およびCD3+ T細胞(CD3+)を検出し、2つの群間で有意差はなかった。図9Eは、CD33 KO HSPC生着マウス中のヒト骨髄系細胞(hCD45+CD19-CD3-細胞に対するゲーティング)が、対照HSPC生着マウスと比較して、有意に低下したレベルのCD33発現を有するが、CD11b14+発現の差は有さないことを示し、これは、CD33の減少は骨髄系分化に影響を与えないことを確認する。図9Fは、16週間後に採取された骨髄が、対照およびCD33 KO HSPC生着マウスにおいて等レベルのヒトCD45+生着を示したことを示す。図9Gは、対照またはCD33 KO HSPCが生着されたマウスの骨髄中のヒト幹細胞(hCD45+lin-陰性CD34+38-)および骨髄系前駆細胞(hCD45+lin-陰性CD34+38+)のレベルを示す。図9Hは、16週間の最初の生着後に骨髄をNSGマウスから採取し、第2のレシピエントへ移し、さらに12週間後に分析し; 持続的CD33 KO表現型を伴う保持されたヒト生着が観察されることを示す表である。図9Iは、対照およびCD33 KO HSPCでの16週間の最初の生着後に採取された骨髄を示し、等レベルのヒトCD45発現(左上)ならびにリンパ系列および骨髄系列への分化(右上)があり、CD33の発現のみが異なり(左下)、他の骨髄系マーカーCD11bおよびCD14の差はなかった(右下)。図9Jは、16週間第1移植の終了時の非リンパ系ヒト細胞(非T非Bヒト細胞についてのゲーティングは示されず)上のCD33の発現を示し、これは、異種移植されたマウスの骨髄中のCD33の長期にわたる安定した非存在を示している。

【図9B】図9Aの説明を参照のこと。

【図9C】図9Aの説明を参照のこと。

【図9D】図9Aの説明を参照のこと。

【図9E】図9Aの説明を参照のこと。

【図9F】図9Aの説明を参照のこと。

【図9G】図9Aの説明を参照のこと。

【図9H】図9Aの説明を参照のこと。

【図9I】図9Aの説明を参照のこと。

【図9J】図9Aの説明を参照のこと。

【図10A】図10A~10Dは、CD33 KO HSPCがCART33に対して耐性であることを示す一連のプロットおよび画像である。図10Aは、対照またはCD33 KO HSPCが生着されたNSGマウスに、 $5 \times 10^6$ 個の自己CART33細胞を与え、4週間後に残存ヒト骨髄系細胞を評価したことを描写する概略図である( $n=30$ マウス; 2つの独立した実験; 異なる2ドナー)。図10Bは、CART33で処置されたマウスの末梢血においてCD33が無くなり、これは、対照HSPC生着マウスにおける骨髄系細胞(CD11b+CD14+)のアブレーションをもたらし、一方、CD33 KO HSPC生着マウスにおいては、骨髄系細胞は保持されることを示す。図10Cは、対照HSPC生着マウス中に見られた骨髄破壊とは対照的に、CART33処置後、CD33 KO HSPC生着マウスの末梢血、脾臓、および骨髄において、骨髄系細胞が検出されることを示す。図10Dは、ヒト前駆細胞が、対照と比較して、CART33処置後、CD33 KO HSPC生着マウスにおいて有意に増加することを示す。

【図10B】図10Aの説明を参照のこと。

【図10C】図10Aの説明を参照のこと。

【図10D】図10Aの説明を参照のこと。

【図11A】図11A~11Eは、CART33が、CD33 KO HSPCを見逃すと同時に、AMLを根絶することができることを示す一連のプロットおよび画像である。図11Aは、NSGマウスに、先ず、対照またはCD33 KO HSPCを生着させ、次いで、Molm14（緑色蛍光タンパク質およびルシフェラーゼを発現するように操作されたAML細胞株）を注射し、続いて、CART33処置を行ったことを説明する概略図である(n=8マウス)。AML疾患負荷量を生物発光イメージング(BLI)によって測定し、一方、ヒトHSPCを末梢血のフローサイトメトリーによって測定した。図11Bは、CART33処置後、対照およびCD33 KO HSPC生着マウスの両方がAML疾患寛解を達成することを示す一連のBLI画像である。図11Cは、BLIによって測定されたような経時的な全身腫瘍組織量を示し；各線は1匹のマウスを示す。点線は発光のバックグラウンドレベルを示す。図11Dは、CD 33 KO HSPC生着マウスが、対照とは対照的に、AMLのCART33処置後、末梢血(PB)、脾臓、および骨髄(BM)において持続的CD14+骨髄系細胞を示すことを示す。図11Eは、ヒト前駆細胞が、CD33 KO HSPC群においてのみ、CART33媒介性毒性から見逃されることを示す。

10

【図11B】図11Aの説明を参照のこと。

【図11C】図11Aの説明を参照のこと。

【図11D】図11Aの説明を参照のこと。

【図11E】図11Aの説明を参照のこと。

【図12A】図12A~12Fは、CD33 KO HSPC子孫が機能的欠陥を有さないことを示す一連のプロットおよび画像である。図12Aは、HSPC生着マウス骨髄から得られたヒト細胞のサイトスピンおよびDiff-Quick染色が、正常な幹細胞(芽細胞)、骨髄系前駆細胞(前骨髄球)、ならびにターミナルエフェクター細胞(単球および好中球)の特有の形態学的特徴を示すことを示す。図12Bは、骨髄系サイトカイン(SCF、TPO、Flt3L、IL-6、GM-CSF、IL-3)を用いてインビトロで分化させ、ファゴソームにおいて酸性化されると緑色蛍光を有するpHrodoグリーン大腸菌(E. coli)生体粒子と共にインキュベートした、対照またはCD33 KO HSPCを示し；ファゴサイトーシス(%)をフローサイトメトリーによって測定した。上部：対照およびCD33 KO細胞からの代表的なフロープロット；下部：異なる4ドナーを用いての2つの独立した実験からのファゴサイトーシスの定量化。図12C~12Dは、5人の異なる動員末梢血ドナーからの対照およびCD33 KO CD 34+細胞をインビトロで分化させ、遺伝子発現をRNA-seqによって分析したことを示す。図12Cは、ヒートマップとして表示される発現量の異なる遺伝子の変化倍率を示し、各行は遺伝子に対応し、各列は対照(ctrl)またはCD33 KO(KO)からの1つのサンプルを示し；番号は起源のドナーを示す。列および行は、階層的クラスタリングによって組織化され；樹状図の枝の長さは、サンプルおよびクラスター間の距離を表す。図12Dは、対照およびCD33 KOサンプルの平均遺伝子発現値の対数スケール散布図である。決定係数(R<sup>2</sup>)値が示される。図12Eは、対照またはCD33 KO HSPCが生着されたマウスにrhG-CSFを注射し、そして末梢血ヒト単球(CD11b+14+)および好中球(CD11b+14-)の絶対数を測定したことを示し；ベースラインレベルと比較した細胞数の変化倍率が示される。図12Fは、対照またはCD33 KO HSPCが生着されたマウスにリポ多糖類を注射し、ヒトサイトカインの血清レベルを測定したことを示す。

20

30

40

【図12B】図12Aの説明を参照のこと。

【図12C】図12Aの説明を参照のこと。

【図12D】図12Aの説明を参照のこと。

【図12E】図12Aの説明を参照のこと。

【図12F】図12Aの説明を参照のこと。

【図13A】図13A~13Bは、CD33 KO HSPCのオフターゲット評価を示す一連の画像である。図13Aは、2つのウェブベースのツールからのインシリコで予測される上位12個のオフターゲット部位を示す表である。図13B、上パネルは、偽遺伝子であるSIGLEC22PがCD33遺伝子に対して高度の相同性を有し、本明細書において使用されるCD33を標的

50

とするgRNAの結合部位が100%同一であることを示す。図13B、下パネルは、CD33およびSIGLEC22Pにおいて高度のオンターゲット突然変異が見られるが、他のSIGLEC遺伝子においてはSurveyorミスマッチアッセイによって突然変異が検出されなかったことを示す。

【図13B】図13Aの説明を参照のこと。

【図14A】図14A～14Bは、アカゲザル(Rhesus macaque)における自己CD33 KO幹細胞移植を示す一連のプロットおよび画像である。図14Aは、実験計画を示し、それによって、アカゲザルCD34+ HSPCを、G-CSFおよびプレリキサフォルを用いて動員し、アフレーシスによって取り出し、CD33のCRISPR/Cas9ベースの遺伝子ノックアウトで遺伝子を編集する。その一方で、サルを照射(TBI)でコンディショニングし、それに続いて、編集されたHSPCの再注入を受けさせる。右上パネルにおいて、インビトロで分化させたHSPC中のCD33発現のフローサイトメトリー評価を対照およびKO細胞において示し、CD33遺伝子座のシーケンシングのTIDE分析を右下パネルに示す。図14Bは、図14Aにおける移植された動物のPBから選択されたサブ集団上のCD33の発現を示す。

【図14B】図14Aの説明を参照のこと。

【発明を実施するための形態】

【0020】

詳細な説明

定義

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

【0021】

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

【0022】

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

【0023】

量、時間的持続時間などのような測定可能な値をいう場合に本明細書において用いられる「約」は、規定値から±20%または±10%、より好ましくは±5%、さらにより好ましくは±1%、なおより好ましくは±0.1%のバラツキを包含するよう意図されるが、これはそのようなバラツキが、開示された方法を実施するのに適切なためである。

【0024】

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

【0025】

本明細書において用いられる「抗原」または「Ag」という用語は、免疫応答を誘発する分子と定義される。この免疫応答には、抗体産生、または特異的免疫適格細胞の活性化の

10

20

30

40

50

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

10

**【0026】**

本明細書において用いられる「抗腫瘍効果」という用語は、腫瘍体積の減少、腫瘍細胞の数の減少、転移の数の減少、平均余命の増加、またはがん性病状に付随する様々な生理的症候の改善によって明らかになりうる生物学的効果をいう。「抗腫瘍効果」は、腫瘍のそもそもの発生の予防における、本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、細胞および抗体の能力によっても明らかになりうる。

**【0027】**

「自己抗原」という用語は、本発明によれば、免疫系によって外来性であると認識される任意の自己抗原を意味する。自己抗原には、細胞表面受容体を含めて、細胞タンパク質、リンタンパク質、細胞表面タンパク質、細胞脂質、核酸、糖タンパク質が含まれるが、これらに限定されることはない。

20

**【0028】**

本明細書において用いられる「自己免疫疾患」という用語は、自己免疫応答から生じる障害と定義される。自己免疫疾患は、自己抗原に対する不適切かつ過剰な応答の結果である。自己免疫疾患の例としては、とりわけ、アジソン病、円形脱毛症、強直性脊椎炎、自己免疫性肝炎、自己免疫性耳下腺炎、クローン病、糖尿病(1型)、栄養障害性表皮水疱症、精巣上体炎、糸球体腎炎、グレーブス病、ギラン・バレー症候群、橋本病、溶血性貧血、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、乾癬、リウマチ熱、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、脊椎関節症、甲状腺炎、血管炎、尋常性白斑、粘液水腫、悪性貧血、潰瘍性大腸炎が挙げられるが、これらに限定されることはない。

30

**【0029】**

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

**【0030】**

「同種」とは、同じ種の異なる動物に由来する移植片をいう。

**【0031】**

「異種」とは、異なる種の動物に由来する移植片をいう。

40

**【0032】**

本明細書において用いられる「がん」という用語は、異常細胞の急速かつ制御不能な増殖によって特徴付けられる疾患と定義される。がん細胞は局所的に広がることもあれば、または血流およびリンパ系を通じて身体の他の部分に広がることもある。様々ながんの例としては、乳がん、前立腺がん、卵巣がん、子宮頸がん、皮膚がん、膵臓がん、大腸がん、腎臓がん、肝臓がん、脳がん、リンパ腫、白血病、肺がんなどが挙げられるが、これらに限定されることはない。ある特定の態様において、がんは甲状腺髄様癌である。

**【0033】**

本明細書において用いられる「キメラ抗原受容体」または「CAR」という用語は、免疫

50

エフェクター細胞上で発現されるように操作され、抗原に特異的に結合する人工T細胞受容体をいう。CARは、養子細胞移入を伴う療法として用いられうる。T細胞を患者から取り出し、特定の形態の抗原に特異的な受容体を発現するように改変する。いくつかの態様において、CARは、例えば、腫瘍関連抗原に対する特異性をもって発現されている。CARは、細胞内活性化ドメイン、膜貫通ドメイン、および腫瘍関連抗原結合領域を含む細胞外ドメインも含みうる。いくつかの局面において、CARは、モノクローナル抗体に由来する一本鎖可変断片(scFv)由来を含む。CARデザインの特異性は、受容体のリガンド(例えば、ペプチド)に由来しうる。いくつかの態様において、CARは、腫瘍関連抗原に特異的なCARを発現するT細胞の特異性を再度方向付けることによって、がんを標的とすることができる。

10

## 【0034】

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

## 【0035】

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

20

30

## 【0036】

「CRISPR/CAS」、「クラスター化され規則的に間隔の空いた短い回文反復配列システム (clustered regularly interspaced short palindromic repeats system)」、または「CRISPR」という用語は、塩基配列の短い繰り返しを含むDNA遺伝子座のことを指す。各繰り返しの後に、ウイルスに対する過去の曝露によるスペーサーDNAの短いセグメントが続く。細菌および古細菌は、外来性核酸の分解を導く短いRNAを用いる、CRISPR-CRISPR関連 (Cas) システム、と呼ばれる適応免疫防御を発達させてきた。細菌において、CRISPR系は、RNAにガイドされるDNA切断によって、侵入する外来性DNAに対する獲得免疫をもたらす。

40

## 【0037】

II型CRISPR/Casシステムでは、「スペーサー」と名付けられた外来性DNAの短いセグメントがCRISPRゲノム遺伝子座に組み込まれ、転写され、プロセッシングを受けて短いCRISPR RNA (crRNA) となる。これらのcrRNAはトランス活性化crRNA (tracrRNA) にアニーリングして、Casタンパク質による病原性DNAの配列特異的切断およびサイレンシ

50

ングを導く。最近の研究により、Cas9タンパク質による標的認識は、crRNA内部の「シード」配列、およびcrRNA結合領域の上流にある保存されたジヌクレオチド含有プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列を必要とすることが示されている。

【0038】

関心対象の配列を切断するようにCas9を導くために、本明細書において以後は「ガイドRNA」または「gRNA」と称する、crRNA-tracrRNA融合転写物を、ヒトU6ポリメラーゼIIIプロモーターから設計することができる。CRISPR/CASを介したゲノム編集および調節は、基礎科学、細胞操作および治療法に対する変革性のあるその潜在能力に光を当てることとなった。

【0039】

「CRISPRi」という用語は、転写レベルなどでの、遺伝子発現の配列特異的遺伝子抑制または阻害のためのCRISPR系のことを指す。

【0040】

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

【0041】

本明細書で使用される「ダウンレギュレーション」という用語は、1つまたは複数の遺伝子またはその一部の発現の低下または消失の事を指す。

【0042】

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

【0043】

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

【0044】

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

【0045】

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

【0046】

本明細書において用いられる「増大させる」という用語は、細胞の数の増加のように、数が増加することをいう。1つの態様において、エクスピボで増大させた細胞は、培養物中に当初存在している数と比べて数が増加する。別の態様において、エクスピボで増大させた細胞は、培養物中の他の細胞型と比べて数が増加する。本明細書において用いられる「エクスピボ」という用語は、生物(例えば、ヒト)から取り出され、生物の外側で(例えば

10

20

30

40

50

、培養皿、試験管、またはバイオリアクタ中で)増殖された細胞をいう。

【0047】

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

【0048】

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

10

【0049】

「造血幹細胞」または「HSC」という用語は、全ての血液細胞型、骨髄系およびリンパ系細胞へ分化することができる未分化造血細胞をいう。HSCは、骨髄中に存在し得、または他のところに、例えば末梢血中に見られ得る。

【0050】

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

20

【0051】

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

30

【0052】

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

40

【0053】

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

50



## 【0054】

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

## 【0055】

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

10

## 【0056】

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

## 【0057】

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

20

## 【0058】

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

## 【0059】

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

30

## 【0060】

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

## 【0061】

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

40

## 【0062】

「過剰発現された」腫瘍抗原または腫瘍抗原の「過剰発現」という用語は、患者の特定の組織または臓器の内部にある固形腫瘍のような疾患領域からの細胞における腫瘍抗原の発現が、その組織または臓器からの正常細胞における発現のレベルと比べて異常なレベル

50

であることを示すよう意図される。腫瘍抗原の過剰発現によって特徴付けられる固形腫瘍または血液悪性腫瘍を有する患者は、当技術分野において公知の標準的なアッセイ法によって判定することができる。

【0063】

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

【0064】

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

【0065】

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

【0066】

「その一部」という用語は、全体の一部分または断片をいう。

【0067】

「造血前駆細胞」という用語は、HSCのように全ての血液細胞へではなく、少なくとも1つ~いくつかの血液細胞型へ分化することができる未分化造血細胞をいう。造血前駆細胞の例としては、骨髄系共通前駆細胞、巨核球-赤血球前駆細胞、顆粒球-マクロファージ前駆細胞、単球-樹状細胞前駆細胞、およびリンパ系共通前駆細胞が挙げられるが、これらに限定されることはない。

【0068】

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

【0069】

本明細書において用いられる場合、「プロモーター/調節配列」という用語は、プロモーター/調節配列に機能的に連結された遺伝子産物の発現のために必要とされる核酸配列を意味する。ある場合には、この配列はコアプロモーター配列であってよく、他の場合には、この配列はエンハンサー配列および遺伝子産物の発現に必要とされる他の調節エレメントを含んでもよい。プロモーター/調節配列は、例えば、組織特異的な様式で遺伝子産物を発現させるものであってもよい。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 0 】

「構成的」プロモーターは、遺伝子産物をコードまたは特定するポリヌクレオチドと機能的に連結された場合、細胞のほとんどまたは全ての生理学的条件の下で、遺伝子産物を細胞内で産生させるヌクレオチド配列である。

## 【 0 0 7 1 】

「誘導性」プロモーターは、遺伝子産物をコードまたは特定するポリヌクレオチドと機能的に連結された場合、実質的にはプロモーターに対応する誘導因子が細胞内に存在する場合にのみ遺伝子産物を細胞内で産生させるヌクレオチド配列である。

## 【 0 0 7 2 】

「組織特異的」プロモーターは、遺伝子をコードするまたは遺伝子によって特定されるポリヌクレオチドと機能的に連結された場合、実質的には細胞が、プロモーターに対応する組織型の細胞である場合にのみ遺伝子産物を細胞内で産生させるヌクレオチド配列である。

10

## 【 0 0 7 3 】

「センダイウイルス」とは、パラミクソウイルス科 (Paramyxoviridae) のある1つの属のことを指す。センダイウイルスは、宿主ゲノムに組み込まれることも宿主細胞の遺伝情報を変えることもない、影響力のない (negative) 一本鎖RNAウイルスである。センダイウイルスの宿主範囲は著しく広く、ヒトへの病原性もない。センダイウイルスは組換えウイルスベクターとして用いられ、一過性であるが強い遺伝子発現の能力がある。

## 【 0 0 7 4 】

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

20

## 【 0 0 7 5 】

抗体に関して本明細書において用いられる用語「特異的に結合する」とは、特異的抗原を認識するが、サンプル中の他の分子を実質的に認識または結合しない抗体を意味する。例えば、1つの種由来の抗原に特異的に結合する抗体が、1つまたは複数の種由来のその抗原に結合してもよい。しかし、そのような異種間反応性はそれ自体で、特異的としての抗体の分類を変化させることはない。別の例において、抗原に特異的に結合する抗体が、その抗原の異なる対立遺伝子型に結合してもよい。しかし、そのような交差反応性はそれ自体で、特異的としての抗体の分類を変化させることはない。場合によっては、「特異的結合」または「特異的に結合する」という用語を、抗体、タンパク質またはペプチドと第2の化学種との相互作用に関連して用い、相互作用が化学種上の特定の構造(例えば、抗原決定基またはエピトープ)の存在に依存することを意味してもよい; 例えば、抗体は、タンパク質全体ではなく特定のタンパク質構造を認識し、それに結合する。抗体がエピトープ「A」に特異的であるなら、エピトープAを含む分子(または遊離した、標識されていないA)の存在は、標識された「A」およびその抗体を含む反応において、その抗体に結合した標識されたAの量を減らすであろう。

30

## 【 0 0 7 6 】

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

40

## 【 0 0 7 7 】

本明細書において用いられる「実質的に相補的」とは、プライマー配列中の塩基の大部分または全部が相補的であるか、または1つもしくは複数の塩基が非相補的である、もしくは mismatches であるヌクレオチドの配列をいう。

## 【 0 0 7 8 】

50

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

【0079】

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

10

【0080】

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

【0081】

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

【0082】

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

20

【0083】

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

【0084】

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

30

【0085】

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

40

【0086】

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

50

、1、2、2.7、3、4、5、5.3および6を具体的に開示したものとみなされるべきである。これは、範囲の幅に関係なく適用される。

【0087】

説明

本明細書に記載される本発明は、内因性遺伝子またはその一部の減少した発現を有する改変造血幹細胞または前駆細胞を作製する組成物および方法を含む。内因性遺伝子は、CARによって、または任意の他の抗体ベースの様式、例えば、モノクローナル抗体、scFv、もしくは二重特異性抗体(例えばBITE)に標的とされる抗原ドメインを含むポリペプチドをコードする。内因性遺伝子またはその一部は遺伝子編集によってダウンレギュレートされ、その結果、改変造血幹細胞または前駆細胞に、CART細胞または他の抗原特異的療法に

10

【0088】

方法

本発明の一局面は、その必要のある対象においてキメラ抗原受容体(CAR)T細胞療法または他の抗原特異的療法から造血幹細胞または前駆細胞を保護する方法を含む。この方法は、改変造血幹細胞または前駆細胞を投与する段階を含む。該幹細胞または前駆細胞は、内因性遺伝子またはその一部の発現を減少させることができる核酸を含み、該内因性遺伝子は、CARに標的とされる抗原ドメインを含むポリペプチドをコードする。1つの態様において、本発明は、CART療法をその必要のある対象へ施す段階をさらに含み得る。

【0089】

改変細胞は、CARに標的とされる抗原ドメインを欠いている改変ポリペプチドをコードする改変内因性遺伝子をさらに含み得る。改変ポリペプチドは、内因性遺伝子によってコードされるポリペプチドの機能と同等である少なくとも1つの機能を含み得る。

20

【0090】

本発明はまた、改変造血幹細胞または前駆細胞を作製するための方法を含む。この方法は、内因性遺伝子またはその一部の発現を減少させることができる核酸を細胞中へ導入する段階を含み、ここで、該内因性遺伝子は、キメラ抗原受容体(CAR)に標的とされる抗原ドメインを含むポリペプチドをコードする。本発明は、CAR T細胞療法の必要のある対象から細胞を得る段階をさらに含み得る。細胞は、末梢血単核細胞、臍帯血細胞、骨髄、リンパ節、および/または脾臓から得てもよい。細胞はCD34+であり得る。

30

【0091】

本発明のある特定の態様において、内因性遺伝子発現を減少させることができる核酸は、CRISPR系である。CRISPR系は、Cas発現ベクター、および内因性遺伝子に対して特異的なガイド核酸配列、ならびに/または、内因性遺伝子に対して特異的なガイド核酸配列と複合体化されたCas9タンパク質を含み得る。CRISPR系は誘導性プロモーターを含み得る。造血幹細胞または前駆細胞を、Cas発現ベクター中の誘導性プロモーターを活性化する作用物質へ曝露してもよい。

【0092】

ある特定の態様において、内因性遺伝子は、腫瘍抗原をコードし得、かつ/または、CARに標的とされる腫瘍細胞上に発現され得、かつ/または、CD33、CD123、CD19、もしくはCD22をコードし得る。改変内因性遺伝子は改変細胞中へ導入され得、ここで、改変内因性遺伝子は、CARに標的とされる抗原ドメインを欠いている改変ポリペプチドをコードする。改変ポリペプチドは、内因性遺伝子によってコードされるポリペプチドの機能と同等である少なくとも1つの機能を含み得る。

40

【0093】

本発明のある特定の態様は、細胞を増大させる段階をさらに含む。増大は、核酸を導入する段階の前に行ってもよい。細胞は、凍結保存され得、次いで、核酸を導入する前に解凍され得る。核酸は、細胞に形質導入を行うこと、または細胞にトランスフェクションを行うこと、または細胞にエレクトロポレーションを行うことによって導入され得る。

【0094】

50

本発明はまた、本明細書に記載される方法に従って作製される改変細胞を含む。本明細書に記載される方法に従って作製された改変細胞および薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物もまた、本発明に含まれる。

【0095】

CRISPR/Cas

プログラム可能なヌクレアーゼを使用するゲノム編集は、特定のゲノム遺伝子座での正確な編集を可能にし、これは、有害突然変異を除去するかまたは保護突然変異を挿入するために使用され得る。現在までのところ、以下の3つの主要なクラスのヌクレアーゼがある：ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、およびクラスター化され規則的に間隔の空いた短い回文反復配列(CRISPR)関連ヌクレアーゼ。これらのうち、CRISPR関連ヌクレアーゼは、使用が容易かつ単純である点で他のものより著しく優れていることが分かった。

10

【0096】

CRISPR/Casシステムは、ターゲティングされた遺伝子変化を誘導するための手軽で効率的なシステムである。Cas9タンパク質による標的認識は、ガイドRNA(gRNA)内部の「シード」配列、およびgRNA結合領域の上流にある保存されたジヌクレオチド含有プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列を必要とする。Cas9タンパク質は、gRNAからの指示の下で、その標的DNA配列へ結合し、特定の遺伝子座でDNAの両方の鎖を切断する。この二本鎖DNA切断は、非相同末端結合(NHEJ)または相同組換え修復(HDR)のいずれかによって修復される。NHEJは、切断部位で小さな挿入または欠失(インデル)を頻繁に引き起こし、これは、遺伝子によってコードされるタンパク質のフレームシフト突然変異をもたらすことが可能である。HDRは、遺伝子中へコピーされる修復鋳型を利用し、従って、特定の突然変異の操作を行う。

20

【0097】

CRISPR/CASシステムはそのため、細胞株(293T細胞など)、初代細胞、CAR T細胞、ならびに幹細胞および前駆細胞においてgRNAを再設計することによって、事実上あらゆるDNA配列を切断するように操作することができる。一局面において、本発明は、内因性遺伝子またはその一部の発現を減少させることができる核酸を含む改変造血幹細胞または前駆細胞を含み、ここで、内因性遺伝子は、キメラ抗原受容体(CAR)に標的とされる抗原ドメインを含むポリペプチドをコードする。

30

【0098】

遺伝子発現を阻害するために用いられるCRISPR/Casシステムの一例であるCRISPRiは、米国特許出願公開第2014/0068797号に記載されている。CRISPRiは、RNAにガイドされるCas9エンドヌクレアーゼを利用する永続的な遺伝子破壊を誘導してDNA二本鎖切断を導入し、それは誤りがちの(error-prone)修復経路の引き金となり、結果的にフレームシフト突然変異をもたらす。触媒として作用のない(catalytically dead)Cas9は、エンドヌクレアーゼ活性を欠く。ガイドRNAと共発現されると、転写伸長、RNAポリメラーゼ結合、または転写因子結合に特異的に干渉するDNA認識複合体が生成される。このCRISPRiシステムは、標的とされた遺伝子の発現を効率的に抑制する。

【0099】

CRISPR/Cas遺伝子破壊は、標的遺伝子に対して特異的なガイド核酸配列、およびCas9エンドヌクレアーゼが細胞に導入され、Cas9エンドヌクレアーゼが標的遺伝子の箇所で二本鎖切断を導入することを可能にする複合体を形成した場合に起こる。CRISPR/CASシステムはまた、単一のCAS9タンパク質を2種類またはそれを上回るgRNAと共発現させることによって、複数のゲノム遺伝子座を同時に標的とすることができ、このことはこのシステムを、多重遺伝子編集または標的遺伝子の相乗的活性化のために比類なく適するものとしている。一局面において、改変造血幹細胞または前駆細胞は、内因性遺伝子またはその一部の発現を減少させることができる核酸を細胞中へ導入することによって作製され、ここで、内因性遺伝子は、キメラ抗原受容体(CAR)に標的とされる抗原ドメインを含むポリペプチドをコードする。そのような態様において、内因性遺伝子またはその一部の発現を

40

50

減少させることができる核酸は、CRISPR系である。いくつかの態様において、CRISPR系は、Cas発現ベクターと、内因性遺伝子に対して特異的なガイド核酸配列とを含む。別の態様において、Cas発現ベクターは、Cas9エンドヌクレアーゼの発現を誘導する。T7、Cas3、Cas8a、Cas8b、Cas10d、Cse1、Csy1、Csn2、Cas4、Cas10、Csm2、Cmr5、Fok1、当技術分野において公知の他のヌクレアーゼ、およびそれらの任意の組み合わせを非限定的に含む、他のエンドヌクレアーゼを用いることもできる。

#### 【0100】

1つの態様において、CRISPR系を導入することは、誘導性CRISPR系を導入することを含む。CRISPR系は、CRISPR系（例えば、Cas発現ベクター）中の誘導性プロモーターを活性化する作用物質へ造血幹細胞または前駆細胞を曝露することによって誘導され得る。そのような態様において、Cas発現ベクターは、誘導性プロモーター、例えば、抗生物質への曝露によって（例えば、テトラサイクリン、またはテトラサイクリンの誘導体、例えばドキシサイクリンによって）誘導可能であるものなどを含む。しかし、他の誘導性プロモーターも使用できることが理解される必要がある。誘導因子は、誘導性プロモーターの誘導をもたらす選択的条件（例えば、作用物質、例えば抗生物質への曝露）であってもよい。これはCas発現ベクターの発現をもたらす。

10

#### 【0101】

ガイド核酸配列は、ある遺伝子に対して特異的であり、Casエンドヌクレアーゼにより誘導される二本鎖切断のためにその遺伝子を標的とする。ガイド核酸配列の配列は、その遺伝子の遺伝子座内であってもよい。1つの態様において、ガイド核酸配列は、長さが少なくとも10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40ヌクレオチドであるか、またはそれを上回る。

20

#### 【0102】

ガイド核酸配列は、免疫原性を低下させるかまたはCART療法に対する感受性を低下させると考えられる内因性遺伝子といった、任意の遺伝子に対して特異的であってもよい。本発明の内因性遺伝子は、CARに標的とされる抗原ドメインを含むポリペプチドをコードする。1つの態様において、ガイド核酸配列は、腫瘍抗原をコードする内因性遺伝子に対して特異的である。さらに別の態様において、ガイド核酸配列は、CD33またはCD123をコードする内因性遺伝子に対して特異的である。

30

#### 【0103】

ガイド核酸配列には、RNA配列、DNA配列、それらの組み合わせ（RNA-DNA複合配列）、または合成ヌクレオチドを有する配列が含まれる。ガイド核酸配列は、単一分子または二重分子であってもよい。1つの態様において、ガイド核酸配列は単一のガイドRNAを含む。

#### 【0104】

##### 内因性遺伝子標的

CARは、養子細胞移入における療法として典型的に用いられる。CARは、抗原へ特異的に結合し、そして免疫エフェクター細胞としてT細胞を活性化するように操作されている、T細胞上に発現される人工受容体である。多くの場合において、CART細胞に標的とされる抗原は、正常細胞および罹患細胞上に発現される内因性遺伝子である。従って、CART細胞は、正常細胞および罹患細胞の両方を排除の標的とする。

40

#### 【0105】

本発明のCARの標的は、細胞上に発現される抗原ドメインを含む内因性(細胞にとって)ポリペプチドをコードする。CARは、通常、抗原結合ドメインを含む細胞外ドメインを含む。いくつかの態様において、CARの抗原結合ドメインは、標的細胞上の抗原へ特異的に結合する。他の態様において、CARの抗原結合ドメインは、腫瘍抗原へ特異的に結合する。1つの態様において、内因性遺伝子は、CARに標的とされる腫瘍細胞上に発現される。いくつかの態様において、内因性遺伝子は、CARに標的とされる抗原ドメインを含む細胞表面分子をコードする。細胞表面分子は、ウイルス、細菌および寄生虫感染と関連する結

50

合パートナーとして作用し得る内因性分子を含む。

【 0 1 0 6 】

内因性遺伝子の例は、以下をコードする遺伝子を含み得るがこれらに限定されない：CD 19；CD123；CD22；CD30；CD171；CS-1（CD2サブセット1、CRACC、SLAMF7、CD319および19A24とも称される）；C型レクチン様分子-1（CLL-1またはCLECL1）；CD33；上皮増殖因子受容体変異体III（EGFRvIII）；ガングリオシドG2（GD2）；ガングリオシドGD3（aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer）；TNF受容体ファミリーメンバーB細胞成熟（BCMA）；Tn抗原（（Tn Ag）または（GalNAc-Ser/Thr））；プロテアーゼ特異的膜抗原（PSMA）；受容体チロシンキナーゼ様オープン受容体1（ROR1）；Fms様チロシンキナーゼ3（FLT3）；腫瘍関連糖タンパク質72（TAG72）；CD38；CD44v6；がん胎児性抗原（CEA）；上皮細胞接着分子（EPCAM）；B7H3（CD276）；KIT（CD117）；インターロイキン-13受容体サブユニット-2（IL-13Ra2またはCD213A2）；メソテリン；インターロイキン11受容体（IL-11Ra）；前立腺幹細胞抗原（PSCA）；プロテアーゼセリン21（テストシン（Testisin）またはPRSS21）；血管内皮増殖因子受容体2（VEGFR2）；ルイス（Y）抗原；CD24；血小板由来増殖因子受容体（PDGFR-）；ステージ特異的胎児抗原-4（SSEA-4）；CD20；葉酸受容体；受容体チロシン-プロテインキナーゼERBB2（Her2/neu）；ムチン1、細胞表面関連（MUC1）；上皮増殖因子受容体（EGFR）；神経細胞接着分子（NCAM）；プロスターゼ（Prostase）；前立腺酸性ホスファターゼ（PAP）；伸長因子2突然変異型（ELF2M）；エフリンB2；線維芽細胞活性化タンパク質（FAP）；インスリン様増殖因子1受容体（IGF-I受容体）、炭酸脱水酵素IX（CAIX）；プロテアソーム（プロソーム、マクロパイン）サブユニット、型、9（LMP2）；糖タンパク質100（gp100）；切断点クラスター領域（BCR）およびエーベルソンマウス白血病ウイルスがん遺伝子ホモログ1（Abl）からなるがん遺伝子融合タンパク質（bcr-abl）；チロシナーゼ；エフリンA型受容体2（EphA2）；フコシルGM1；シアリルルイス接着分子（sLe）；ガングリオシドGM3（aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer）；トランスグルタミナーゼ5（TGS5）；高分子量黒色腫関連抗原（HMWMAA）；o-アセチル-GD2ガングリオシド（OAcGD2）；葉酸受容体；腫瘍内皮マーカー1（TEM1/CD248）；腫瘍内皮マーカー7関連物（TEM7R）；クローディン6（CLDN6）；甲状腺刺激ホルモン受容体（TSHR）；Gタンパク質共役受容体クラスCグループ5、メンバーD（GPRC5D）；染色体Xオープンリーディングフレーム61（CXORF61）；CD97；CD179a；未分化リンパ腫キナーゼ（ALK）；ポリシアル酸；胎盤特異的1（PLAC1）；globoHグリコセラミド（GloboH）の六糖部分；乳腺分化抗原（NY-BR-1）；ウロプラキン2（UPK2）；A型肝炎ウイルス細胞受容体1（HAVCR1）；アドレナリン受容体3（ADRB3）；パンネキシン3（PANX3）；Gタンパク質共役受容体20（GPR20）；リンパ球抗原6複合体、座位K9（LY6K）；嗅覚受容体51E2（OR51E2）；TCR選択的リーディングフレームタンパク質（TARP）；ウィルムス腫瘍タンパク質（WT1）；がん/精巣抗原1（NY-ESO-1）；がん/精巣抗原2（LAGE-1a）；黒色腫関連抗原1（MAGE-A1）；染色体12pに位置するETS転座変異体遺伝子6（ETV6-AML）；精子タンパク質17（SPA17）；X抗原ファミリー、メンバー1A（XAGE1）；アンジオポエチン結合細胞表面受容体2（Tie2）；黒色腫がん精巣抗原-1（MAD-CT-1）；黒色腫がん精巣抗原-2（MAD-CT-2）；Fos関連抗原1；腫瘍タンパク質p53（p53）；p53突然変異体；プロステイン；サバイビン（surviving）；テロメラーゼ；前立腺がん腫瘍抗原-1（PCTA-1またはガレクチン8）、T細胞1によって認識される黒色腫抗原（メランAまたはMART1）；ラット肉腫（Ras）突然変異体；ヒトテロメラーゼ逆転写酵素（hTERT）；肉腫転座切断点；アポトーシスの黒色腫阻害因子（ML-IAP）；ERG（膜貫通型プロテアーゼ、セリン2（TMPRSS2）ETS融合遺伝子）；N-アセチルグルコサミニル-トランスフェラーゼV（NA17）；ペアードボックスタンパク質Pax-3（PAX3）；アンドロゲン受容体；サイクリンB1；v-mycトリ骨髄細胞腫ウイルスがん遺伝子神経芽腫由来ホモログ（MYCN）；RasホモログファミリーメンバーC（RhoC）；チロシナーゼ関連タンパク質2（TRP-2）；シトクロムP450 1B1（CYP1B1）；CCCTC結合因子（ジ

10

20

30

40

50



ンクフィンガータンパク質)様 (BORISまたはBrother of the Regulator of Imprinted Sites)、T細胞3によって認識される扁平上皮細胞がん抗原 (SART3) ; ペアードボックスタンパク質Pax-5 (PAX5) ; プロアクロシン結合タンパク質sp32 (OY-TE51) ; リンパ球特異的タンパク質チロシンキナーゼ (LCK) ; Aキナーゼアンカータンパク質4 (AKAP-4) ; 滑膜肉腫、X切断点2 (SSX2) ; 終末糖化産物受容体 (RAGE-1) ; 腎臓ユビキタス1 (RU1) ; 腎臓ユビキタス2 (RU2) ; レグマイン ; ヒト乳頭腫ウイルスE6 (HPV E6) ; ヒト乳頭腫ウイルスE7 (HPV E7) ; 腸管カルボキシルエステラーゼ ; 熱ショックタンパク質70-2突然変異型 (mut hsp70-2) ; CD79a ; CD79b ; CD72 ; 白血球関連免疫グロブリン様受容体1 (LAIR1) ; IgA受容体のFc断片 (FCARまたはCD89) ; 白血球免疫グロブリン様受容体サブファミリーAメンバー2 (LILRA2) ; CD300分子様ファミリーメンバーf (CD300LF) ; C型レクチンドメインファミリー12メンバーA (CLEC12A) ; 骨髄間質細胞抗原2 (BST2) ; EGF様モジュール含有ムチン様ホルモン受容体様2 (EMR2) ; リンパ球抗原75 (LY75) ; グリピカン-3 (GPC3) ; Fc受容体様5 (FCRL5) ; および免疫グロブリン 様ポリペプチド1 (IGLL1)。

#### 【0107】

内因性遺伝子の選択は、正常細胞中の内因性遺伝子の発現、正常細胞の表面上における発現された内因性遺伝子産物の存在、およびCART療法が正常細胞に対して有する影響に依存する。例えば、内因性遺伝子は、罹患細胞上に高度に発現され得、正常細胞では限定された発現を有し得る。

#### 【0108】

別の例において、内因性遺伝子は、正常な血液細胞において広く発現される場合があり、CART療法は、罹患細胞に加えて、全てのそれらの細胞を潜在的に標的とするだろう。そのような状況において、改変内因性遺伝子の導入は有用であり得る。改変内因性遺伝子の導入は、内因性遺伝子の発現が造血幹細胞または前駆細胞のような非罹患細胞の健康にとって重要である場合に、特に有用であり得る。1つの態様において、本明細書に記載される改変細胞を作製する方法は、CARに標的とされる抗原ドメインを含む部分のような、内因性遺伝子の一部の発現を減少させる段階を含む。そのような態様において、この方法は、CARに標的とされる抗原ドメインを欠いている改変ポリペプチドをコードする改変内因性遺伝子を導入する段階を含み得る。別の態様において、本明細書に記載される改変細胞は、CARに標的とされる抗原ドメインを欠いている改変ポリペプチドをコードする改変内因性遺伝子を含む。さらに別の態様において、改変ポリペプチドは、内因性遺伝子によってコードされるポリペプチドの機能と同等である少なくとも1つの機能を含む。従って、改変細胞は、CAR T細胞療法に対する耐性を維持しながら、改変内因性遺伝子を発現する。

#### 【0109】

##### 核酸の導入

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

#### 【0110】

関心対象のポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための生物学的方法には、DNAおよ

10

20

30

40

50

びRNAベクターの使用が含まれる。ウイルスベクター、および特にレトロウイルスベクターは、哺乳動物、例えば、ヒト細胞に遺伝子を挿入するための最も広く使われている方法となっている。他のウイルスベクターは、レンチウイルス、ポックスウイルス、単純ヘルペスウイルスI、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスなどに由来しうる。例えば、米国特許第5,350,674号および同第5,585,362号を参照されたい。

【0111】

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

10

【0112】

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

20

【0113】

核酸を細胞に導入するために用いられる方法にかかわらず、細胞における核酸の存在を確認するために、種々のアッセイ法が実施されうる。そのようなアッセイ法には、例えば、サザンおよびノザンプロットティング、RT-PCRおよびPCRのような、当業者に周知の「分子生物学的」アッセイ法; 例えば、免疫学的手段(ELISAおよびウエスタンブロット)によって、または本発明の範囲に入る作用物質を同定するための本明細書において記述されるアッセイ法によって、特定のペプチドの存在または非存在を検出するような「生化学的」アッセイ法が含まれる。

30

【0114】

一局面において、本発明は、内因性遺伝子発現を減少させることができる核酸を細胞中へ導入する段階を含む、改変造血幹細胞または前駆細胞を作製するための方法を含み、ここで、該内因性遺伝子は、キメラ抗原受容体(CAR)に標的とされる予定の抗原ドメインを含むポリペプチドをコードする。1つの態様において、この方法は、改変細胞中へ改変内因性遺伝子を導入する段階をさらに含み、該改変内因性遺伝子は、CARに標的とされる抗原ドメインを欠いている改変ポリペプチドをコードする。そのような態様において、1つの核酸は、細胞中へ改変内因性遺伝子を導入するために使用される方法と同じまたは異なる方法を使用して、導入され得る。

40

【0115】

RNA

1つの態様において、細胞に導入される核酸はRNAを含む。別の態様において、CRISPR系の少なくとも1つの成分はRNAを含む。さらに別の態様において、ガイド核酸配列はRN

50

Aである。別の態様において、RNAは、インビトロで転写されたRNAまたは合成RNAを含む。RNAは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)生成された鋳型を用いたインビトロ転写によって産生される。任意の供給源由来の関心対象のDNAは、適切なプライマーおよびRNAポリメラーゼを用いてインビトロmRNA合成のための鋳型にPCRによって直接変換することができる。DNA供給源は、例えば、ゲノムDNA、プラスミドDNA、ファージDNA、cDNA、合成DNA配列または任意の他の適切なDNA供給源であることができる。

#### 【0116】

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

#### 【0117】

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

#### 【0118】

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

#### 【0119】

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

10

20

30

40

50

来することができる。他の態様において、RNAのエキソヌクレアーゼ分解を妨げるために、様々なヌクレオチド類似体を3'または5' UTRにおいて用いることができる。

#### 【0120】

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

10

#### 【0121】

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

#### 【0122】

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

20

#### 【0123】

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

30

#### 【0124】

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

40

#### 【0125】

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

#### 【0126】

50

5'キャップもRNA分子に安定性をもたらす。好ましい態様において、本明細書において開示される方法により産生されるRNAは、5'キャップを含む。5'キャップは、当技術分野において知られ、本明細書において記述されている技法を用いて提供される(Cougot, et al., Trends in Biochem. Sci., 29:436-444 (2001); Stepinski, et al., RNA, 7:146 8-95 (2001); Elango, et al., Biochim. Biophys. Res. Commun., 330:958-966 (2005))。

【0127】

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

10

【0128】

本明細書に記載されるRNAは、当技術分野において公知の種々の方法によって細胞中へ導入され得る。いくつかの態様において、RNAを細胞中にエレクトロポレーションする。1つの態様において、CRISPR系は、細胞中にエレクトロポレーションされるRNAを含む。さらに別の態様において、CRISPR系は、RNAでありかつ細胞中にエレクトロポレーションされる少なくとも1つのガイド核酸配列を含む。

【0129】

開示される方法は、がん、急性および慢性感染症、ならびに自己免疫疾患の分野において、対象へ療法を提供するために、細胞活性の調節へ適用され得る。開示される方法は、幹細胞を標的とすることを伴い得、さらに、標的がん細胞を殺傷する遺伝子改変細胞の能力を評価するための方法を含み得る。

20

【0130】

本方法はまた、例えば、プロモーターまたは投入RNAの量を変化させることにより、広範囲にわたって発現レベルを制御する能力を提供し、発現レベルを個別に調節することを可能にする。

【0131】

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

30

【0132】

インビトロで転写されたRNA (IVT-RNA)を用いた細胞の遺伝的改変では、2つの異なる戦略を利用し、そのどちらも様々な動物モデルにおいて逐次的に試験されている。リポフェクションまたはエレクトロポレーションによって細胞に、インビトロで転写されたRNAをトランスフェクションする。移入されたIVT-RNAの長期発現を達成するために、様々な改変を用いてIVT-RNAを安定化することが望ましい。

40

【0133】

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

50

セットは、転写産物中の後のポリ(A)配列に対応する。この手順の結果として、一部のヌクレオチドは、線状化後に酵素切断部位の一部として残り、3'末端でポリ(A)配列を伸長またはマスクする。この非生理的な突出部が、そのような構築体から細胞内に産生されるタンパク質の量に影響を与えるかどうかは、明らかではない。

#### 【0134】

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

#### 【0135】

HSCまたは前駆細胞の供給源

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

#### 【0136】

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

#### 【0137】

このように単離された臍帯血単核細胞は、CD4、CD5、CD8、CD11b、CD14、CD19、CD24、CD45、CD56、およびCD66bを含むが、これらに限定されない、特定の抗原を

発現する細胞を枯渇させることができる。これらの細胞の枯渇は、単離された抗体、腹水のような、抗体を含む生体サンプル、物理的支持体に結合した抗体、および細胞結合抗体を用いて達成することができる。

【0138】

陰性選択による細胞集団の濃縮は、陰性選択細胞に特有の表面マーカーに向けられた抗体の組み合わせを用いて達成することができる。好ましい方法は、陰性選択された細胞上に存在する細胞表面マーカーに向けられたモノクローナル抗体のカクテルを用いる陰性磁気免疫接着またはフローサイトメトリーによる細胞選別および/または選択である。例えば、陰性選択によりCD34+細胞を濃縮するために、モノクローナル抗体カクテルは、典型的には、CD4、CD5、CD8、CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR、およびCD8に対する抗体を含む。

10

【0139】

陽性または陰性選択による所望の細胞集団の単離のため、細胞および表面(例えば、ビーズのような粒子)の濃度を変えることができる。ある特定の態様において、細胞およびビーズの最大の接触を確実にするために、ビーズおよび細胞と一緒に混合される体積を有意に減少させる(すなわち、細胞の濃度を増加させる)ことが望ましい場合がある。例えば、1つの態様において、20億個の細胞/mlの濃度が用いられる。1つの態様において、10億個の細胞/mlの濃度が用いられる。さらなる態様において、1億個超の細胞/mlが用いられる。さらなる態様において、10、15、20、25、30、35、40、45、または50百万個の細胞/mlの細胞濃度が用いられる。さらに別の態様において、75、80、85、90、95、または100百万個の細胞/mlの細胞濃度が用いられる。さらなる態様において、125または150百万個の細胞/mlの濃度を用いることができる。高濃度を用いることで、細胞収量、細胞活性化、および細胞増大の増加をもたらすことができる。

20

【0140】

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

30

【0141】

1つの態様において、細胞は、末梢血単核細胞、臍帯血細胞、骨髄、リンパ節、および脾臓からなる群より選択される細胞から得られる。別の態様において、細胞はCD34+である。

【0142】

HSCまたは前駆細胞の増大

本発明は、本明細書に記載される改変細胞を含む細胞の集団を含む。1つの態様において、本明細書に記載される改変細胞を作製するための方法はまた、細胞または改変細胞を増大させる段階を含む。1つの態様において、増大は、核酸を導入する段階の前である。さらに別の態様において、増大は、核酸を導入する段階の前である。いくつかの態様において、本明細書に開示される細胞は、約10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍、2000倍、3000倍、4000倍、5000倍、6000倍、7000倍、8000倍、9000倍、10,000倍、100,000倍、1,000,000倍、10,000,000倍、またはそれを上回って、ならびにそれらの間のいずれかおよびすべての全体的および部分的な整数倍に増大させることができる。1つの態様では、細胞を約20倍~約50倍の範囲で増大させる。

40

【0143】

50

細胞を培養装置内にて細胞培地中で、ある期間にわたって、または細胞が最適な継代のために高い細胞密度に達するまでインキュベートし、その後別の培養装置への細胞の継代を行うことができる。培養装置は、インビトロで細胞を培養するために一般的に用いられる任意の培養装置であってよい。細胞培地の入れ替えは、細胞の培養中にどの時点に行ってもよい。好ましくは、細胞培地を約2~3日毎に入れ替える。続いて細胞を培養装置から採取し、その上で細胞を直ちに用いるか、または後に用いるための貯蔵のために凍結保存することができる。1つの態様において、本発明は、増大させた細胞を凍結保存する段階を含む。凍結保存された細胞は、細胞に核酸を導入する前に解凍される。

【0144】

別の態様において、方法は、細胞を単離する段階、および細胞を増大させる段階をさらに含む。別の態様において、本発明は、増大の前に細胞を凍結保存する段階をさらに含む。さらに別の態様において、本発明は、核酸を導入する前に、凍結保存された細胞を解凍する段階をさらに含む。

10

【0145】

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

20

【0146】

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

【0147】

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

30

【0148】

1つの態様において、細胞は数時間(約3時間)~約14日間、またはその間の任意の時間単位の整数値の間、培養されうる。HSCまたは前駆細胞培養に適切な条件には、例えば血清(例えば、ウシ胎仔血清もしくはヒト血清)、GM-CSFインスリン、IFN- $\gamma$ 、インターロイキン-1 (IL-1)、IL-3、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、SCF、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、およびTPO、または当業者に公知の細胞増殖のための任意の他の添加剤であるがこれらに限定されない、増殖および生存に必要な因子を含有しうる適切な培地(例えば、最小必須培地もしくはRPMI培地1640または、X-vivo 15, (Lonza))が含まれる。1つの態様において、細胞培養は、IL-3、IL-6、GM-CSF、SCF、およびTPOを含む。細胞増殖のための他の添加剤には、界面活性剤、プラスマネート、ならびにN-アセチル-システインおよび2-メルカプトエタノールのような還元剤が含まれるが、これらに限定されることはない。培地は、RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、 $\alpha$ -MEM、F-12、X-Vivo 15、および

40

50



X-Vivo 20、Optimizerにアミノ酸、ピルビン酸ナトリウムおよびビタミンを添加したものであって、無血清であるか、適切な量の血清(もしくは血漿)もしくは規定のホルモン群、ならびに/またはHSCもしくは前駆細胞の増殖および増大に十分な量のサイトカインを補充したかのいずれかのものを含むことができる。抗生物質、例えば、ペニシリンおよびストレプトマイシンは、実験的培養物にのみ含まれ、対象に注入しようとする細胞の培養物には含まれない。標的細胞は、増殖を支持するのに必要な条件、例えば、適切な温度(例えば、37 )および雰囲気(例えば、空気に加えて5% CO<sub>2</sub>)の下で維持される。

【0149】

細胞を培養するために用いられる培地は、改変細胞を刺激して増大させることができる作用物質を含みうる。本明細書において開示される方法によって改変された細胞を、約10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍、2000倍、3000倍、4000倍、5000倍、6000倍、7000倍、8000倍、9000倍、10,000倍、100,000倍、1,000,000倍、10,000,000倍、またはそれ以上増大させることができる。1つの態様において、改変細胞は、改変細胞を培養することにより約20倍～約50倍、またはそれ以上の範囲内で増大する。

10

【0150】

治療

本明細書において記述される改変細胞は、治療のための組成物中に含まれうる。組成物は、薬学的組成物を含み、薬学的に許容される担体をさらに含みうる。改変細胞を含む薬学的組成物の治療の有効量が投与されうる。

20

【0151】

一局面において、本発明は、その必要のある対象においてキメラ抗原T細胞(CART)療法から造血幹細胞または前駆細胞を保護する方法を含み、この方法は、改変造血幹細胞または前駆細胞を投与する段階を含み、ここで、該幹細胞または前駆細胞は、内因性遺伝子の発現を減少させることができる核酸を含み、該内因性遺伝子は、キメラ抗原受容体(CAR)に標的とされる抗原ドメインを含むポリペプチドをコードする。

【0152】

別の局面において、本発明は、養子細胞移入療法のための方法を含み、この方法は、本明細書に記載される方法に従って作製された改変細胞を含む有効量の薬学的組成物を、その必要のある対象へ投与する段階を含み、ここで、対象に、有効量の本明細書に記載される細胞と、内因性遺伝子によってコードされるポリペプチドの抗原ドメインを標的とするCAR療法とが施され、それによって対象を処置する。

30

【0153】

別の局面において、本発明は、その必要のある対象における状態を処置する方法を含み、この方法は、対象に本明細書に記載される方法に従って作製された改変細胞を含む治療有効量の薬学的組成物を投与する段階と、CAR療法を施す段階であって、該CARが、内因性遺伝子によってコードされるポリペプチドの抗原ドメインを特異的に標的とする抗原結合ドメインを含む、前記段階、とを含み、それによって状態を処置する。

【0154】

本明細書に記載される改変細胞は、対象、好ましくは哺乳動物、さらにより好ましくはヒトへ投与することができる。1つの態様において、改変細胞は、対象中で少なくとも1つの血液細胞型へ分化する。別の態様において、改変細胞は、対象中への投与後に自己複製することができる。

40

【0155】

1つの態様において、状態はがんである。様々ながんの例としては、乳がん、前立腺がん、卵巣がん、子宮頸がん、皮膚がん、膵臓がん、大腸がん、腎臓がん、肝臓がん、脳がん、リンパ腫、白血病、肺がんなどが挙げられるが、これらに限定されることはない。ある特定の態様において、がんは、白血病、例えば、急性骨髄性白血病である。

【0156】

50

さらに、改変細胞は、免疫反応を抑制するために、対象、好ましくは哺乳動物、さらに好ましくはヒトに投与することができる。改変細胞は、糖尿病、乾癬、関節リウマチ、多発性硬化症、GVHD、同種移植寛容誘導増強、移植片拒絶反応などの自己免疫疾患に共通する免疫反応等の免疫反応を抑制するために、投与することができる。さらに、本発明の細胞は、疾患を処置または緩和するために、減弱されたまたはさもなければ阻害された免疫応答、特に細胞媒介性免疫応答が望ましい任意の状態の処置に用いることができる。

【0157】

さらに、改変細胞を、例えば自己免疫疾患などの状態を処置するために、対象、好ましくは哺乳動物、さらにより好ましくはヒトに投与することができる。様々な自己免疫疾患の例としては、後天性免疫不全症候群(AIDS、これは自己免疫成分を伴うウイルス性疾患である)、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質抗体症候群、自己免疫性アジソン病、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、内耳自己免疫病(AIED)、自己免疫性リンパ増殖症候群(ALPS)、自己免疫性血小板減少性紫斑病(ATP)、ベーチェット病、心筋症、セリアック病-疱疹状皮膚炎;慢性疲労免疫機能不全症候群(CFIDS)、慢性炎症性脱髄性多発神経炎(CIPD)、癩痕性類天疱瘡、寒冷凝集素症、クレスト症候群、クローン病、ドゴー病、若年性皮膚筋炎、円板状ループス、本態性混合型クリオグロブリン血症、線維筋痛-線維筋炎、グレープス病、ギラン・バレー症候群、橋本甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病(ITP)、IgA腎症、インスリン依存性糖尿病、若年性慢性関節炎(スティール病)、若年性関節リウマチ、メニエール病、混合性結合組織病、多発性硬化症、重症筋無力症、悪性貧血、結節性多発動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性症候群、リウマチ性多発筋痛症、多発性筋炎および皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象、ライター症候群、リウマチ熱、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症(進行性全身性硬化症(PSS)、これは全身性硬化症(SS)としても知られる)、シェーグレン症候群、スティッフマン症候群、全身性エリテマトーデス、高安動脈炎、側頭動脈炎/巨細胞性動脈炎、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、白斑ならびにヴェーゲナー肉芽腫症が挙げられるが、これらに限定されることはない。

【0158】

本明細書において記述されるように作製された細胞は、炎症性障害を処置するために改変され使用されることもできる。炎症性障害の例としては、慢性および急性炎症性障害が挙げられるが、これらに限定されることはない。炎症性障害の例としては、アルツハイマー病、喘息、アトピー性アレルギー、アレルギー、アテローム性動脈硬化症、気管支喘息、湿疹、糸球体腎炎、移植片対宿主病、溶血性貧血、骨関節炎、敗血症、卒中、組織および臓器の移植、血管炎、糖尿病性網膜症ならびに人工呼吸器誘発肺損傷が挙げられる。

【0159】

別の態様において、本明細書において記述される改変細胞は、その必要のある対象における免疫応答の処置のための医薬の製造に用いられうる。

【0160】

本発明の細胞は、適切な前臨床および臨床の実験および試験において判定される投与量および経路でならびに時間で投与することができる。細胞組成物は、これらの範囲内の投与量で複数回投与されうる。本発明の細胞の投与は、当業者によって判定される所望の疾患または状態を処置するのに有用な他の方法と組み合わせられてもよい。

【0161】

投与される本発明の細胞は、治療を受けている対象に関して自家、同種異系または異種でありうる。

【0162】

本発明の細胞の投与は、当業者に公知の任意の簡便な様式で行われうる。本発明の細胞はエアロゾル吸入、注射、摂取、輸血、植込みまたは移植により対象に投与されうる。本明細書において記述される組成物は患者へ経動脈的に、皮下に、皮内に、腫瘍内に、リンパ節内に(intranodally)、髄内に、筋肉内に、静脈内(i.v.)注射により、または腹腔内に投与されうる。他の例では、本発明の細胞は、対象における炎症部位、対象における局所

10

20

30

40

50

疾患部位、リンパ節、臓器、腫瘍などに直接注射される。

【0163】

薬学的組成物

本発明の薬学的組成物は、本明細書において記述される改変T細胞を、1つまたは複数の薬学的にまたは生理学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤と組み合わせる。そのような組成物は、中性緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水などのような緩衝液；グルコース、マンノース、スクロースまたはデキストランのような炭水化物、マンニトール；タンパク質；ポリペプチドまたはグリシンのようなアミノ酸；抗酸化剤；EDTAまたはグルタチオンのようなキレート剤；アジュバント(例えば、水酸化アルミニウム)；および保存料を含みうる。本発明の組成物は、好ましくは、静脈内投与のために製剤化される。

10

【0164】

本発明の薬学的組成物は、処置される(または予防される)疾患に適切な様式で投与される。臨床試験によって適切な投与量が判定されうるが、投与の量および頻度は、患者の状態、ならびに患者の疾患のタイプおよび重症度のような因子によって判定されよう。

【0165】

「免疫学的に有効な量」、「抗免疫応答に有効な量」、「免疫応答を阻害する有効量」または「治療量」が示されている場合、投与される本発明の組成物の正確な量は、患者(対象)の年齢、体重、免疫応答、および状態の個体差を考慮して、医師により決定され得る。本明細書において記述される改変細胞を含む薬学的組成物は、 $10^4 \sim 10^9$ 個の細胞/kg体重、好ましくは $10^5 \sim 10^6$ 個の細胞/kg体重の投与量で、それらの範囲内の全ての整数値を含めて、投与されうると一般に言及することができる。細胞組成物はまた、これらの投与量で複数回投与される。細胞は、免疫療法において一般に知られている注入技法を用いることにより投与することができる(例えば、Rosenberg et al., *New Eng. J. of Med.* 319:1676, 1988を参照のこと)。特定の患者に対する最適な投与量および処置計画は、疾患の徴候について患者を監視し、それに応じて処置を調整することにより、医学分野の当業者によって容易に判定されることができ。

20

【0166】

本発明のある特定の態様において、細胞は、本明細書において記述される方法、または細胞を治療レベルにまで増大させる当技術分野において公知の他の方法を用いて増大および改変されて、抗ウイルス療法、シドフォビルおよびインターロイキン-2、シタラビン(A RA-Cとしても公知)またはMS患者に対するナタリズマブ処置もしくは乾癬患者に対するエファリズマブ処置もしくはPML患者に対する他の処置のような薬剤による処置を含むが、これらに限定されない任意の数の関連処置法と一緒に(例えば、その前に、それと同時にまたはその後)患者に投与される。さらなる態様において、本発明の改変細胞は、化学療法、放射線、免疫抑制剤、例えばサイクロスポリン、アザチオプリン、メトトレキサート、ミコフェノレートおよびFK506、抗体、または他の免疫除去剤、例えばCAMPATH、抗CD3抗体もしくは他の抗体療法、サイトキシン(cytotoxin)、フルダリビン(fludarabine)、サイクロスポリン、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、ならびに放射線照射と併用されてもよい。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し(サイ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ル伝達に重要なp70S6キナーゼを阻害する(ラパマイシン)。(Liu et al., *Cell* 66:807-815, 1991; Henderson et al., *Immun.* 73:316-321, 1991; Bierer et al., *Curr. Opin. Immun.* 5:763-773, 1993)。さらなる態様において、本発明の細胞組成物は、骨髄移植、化学療法剤、例えばフルダラビンをういたT細胞除去療法、外部ビーム放射線療法(XRT)、シクロホスファミド、または抗体、例えばOKT3もしくはCAMPATHと一緒に(例えば、その前に、それと同時にまたはその後)患者に投与される。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細胞除去療法の後に投与される。例えば、1つの態様において、対象は、高用量化学療法を用いた標準的な処置の後に末梢血幹細胞移植を受けてもよい。ある特定の態様において、移植後に、対象は本発明の増大した免疫細胞の注入を受ける

30

40

50

。さらなる態様において、外科手術の前または後に、増大させた細胞が投与される。

【0167】

患者に投与される前記処置の投与量は、処置される状態および処置のレシピエントの正確な性質によって変化する。ヒト投与のための投与量の拡大縮小は、当技術分野において認められている実践にしたがって行うことができる。CAMPATHの用量は、例えば、一般的に、成人患者については1～約100 mgの範囲であり、通常、1～30日間、毎日投与される。好ましい一日用量は1～10 mg/日であるが、場合によっては、40 mg/日までの高用量が用いられてもよい(米国特許第6,120,766号に記述されている)。

【0168】

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

10

【0169】

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

20

【実施例】

【0170】

実験的实施例

本発明は、以下の実験的实施例を参照して、さらに詳細に説明される。これらの実施例は、例示のみを目的として提供されており、特記しない限り、限定することを意図したものではない。したがって、本発明は、以下の実施例に限定されると解釈されるべきではなく、むしろ、本明細書で提供された教示の結果として明らかになる、ありとあらゆる変形を包含すると解釈されるべきである。

30

【0171】

さらなる説明なしに、当業者は、上記の説明および以下の実施例を用いて、本発明の化合物を作製して利用し、かつ特許請求の範囲に記載の方法を実施することができると考えられる。したがって、以下の実施例は、本発明の好ましい態様を具体的に指し示したものであり、本開示の残りの部分を多少なりとも限定するものとして解釈されるべきではない。

40

【0172】

これらの実験に用いた材料および方法を以下に説明する。

【0173】

構築物クローニング

T7プロモーター下で発現されるヒトコドン最適化Cas9は、Yangbing Zhao博士によって善意で提供された。Cas9 mRNAを、mMessage mMachine T7 Ultraキット(Ambion, AM1345)を用いてインビトロで転写した。ガイドRNA(gRNA)を、標準分子生物学技法を用いてpUC57-sgRNAプラスミド(Addgene 51132)中へクローニングした。gRNAを、T7-Scribe Standard RNA IVTキット(Cellscrip, C-AS2607)を用いてインビトロで転写

50

した。RNAを、RNeasy Mini Kit (Qiagen, 74104)を用いて精製した。

#### 【0174】

##### 初代CD34+細胞単離

凍結されたCD34+細胞を、ペンシルバニア大学のStem Cell and Xenograft Coreから購入した。あるいは、自己幹細胞ドナーからのG-CSF動員末梢血を、ペンシルバニア大学病院でもはや使用されてなくなった臨床検体から得、CD34+選択を、CD34 Microbead Kit (Miltenyi, 130-046-702)を用いて行った。CD34+細胞純度は、フローサイトメトリーによって 95%であると確認された。細胞をエレクトロポレーション前に一晩休ませた。

#### 【0175】

##### 細胞培養

Molm14細胞を、10% FBSを補充したRPMI-1640培地(R10)中に培養した。CD34+細胞を、ヒトサイトカイン(SCF 100ng/ul、Flt3リガンド100ng/ul、TPO 50ng/ul、IL-6 50ng/ul)を補充したStemSpan SFEM (Stem Cell Technologies, 09650)中で培養した。

#### 【0176】

##### エレクトロポレーション

Molm14またはCD34+細胞を、1回洗浄し、Opti-MEM中に再懸濁し、そして、400Vおよび5msecの単一パルスを用いてBTX ECM 830 Square Wave Electroporation System(Harvard Apparatus)でCas9 mRNAのエレクトロポレーションを行った。細胞を32 で一晩インキュベートし、翌日、同じ機器および設定を用いてgRNAの再エレクトロポレーションを行った。細胞を翌日まで32 で維持し、その後、それらを分析まで37 で培養した。あるいは、CD34+細胞に、同じ設定を用いて、CD33を標的とするgRNAと複合体化されたCas9タンパク質(PNA Bio, CP02)のエレクトロポレーションを1回行った。細胞を32 で一晩インキュベートし、次いで、NSGマウス中へ注射したか、またはさらなる分析まで37 で維持した。

#### 【0177】

##### マウス移植研究

インビボ研究のために、8~12週齢のNOD-SCID-IL2rg<sup>-/-</sup>(NSG)マウスを、元はJackson Laboratoriesから得、ペンシルバニア大学のStem Cell and Xenograft Coreから購入した。マウスに、ブスルファン30mg/kgを注射し、翌日、1~5x10<sup>5</sup>個の対照またはCD33 KO HSPCを注射した。4週間毎にマウスの眼窩後方から採血し、ヒト生着プロフィールをモニタリングした。12週間の生着後、マウスに1~5x10<sup>6</sup>個の自己由来のCD33を標的とするCAR T細胞を注射した。実験の終了時に、骨髄および脾臓を採取し、系列組成について評価した。

#### 【0178】

##### コロニー形成細胞(CFC)アッセイ

エレクトロポレーションから1日後に、1000個のCD34+細胞を、2つ組で6ウェルプレート上の1.1mlのメチルセルロース(MethoCult H4435 Enriched, Stem Cell Technologies)中に平板培養し、37 °C、5% CO<sub>2</sub>、95%湿度で2週間培養した。次いで、コロニーをカウントおよびスコアリングした。個々のコロニーを取り出して、50mM NaOHおよび0.2 mM EDTAを含有する溶解バッファ40 μl中に溶解させた。サンプルを20分間95 °Cへ加熱し、次いで冷却し、その後、1 μlの1M TrisClを添加した。2 μlの反応物を、製造業者の説明書に従ってAccuPrime Pfx SuperMix (Invitrogen, 12344-040)を用いてPCRのために使用した。さらに、MethoCultウェルを、一晩、R10培地で可溶化し、フローサイトメトリーを単個細胞浮遊液に対して行った。細胞形態をCytospinによって分析し、DiffQuik染色手順で染色した。

#### 【0179】

##### フローサイトメトリー

以下の抗-ヒト抗体を使用し、エレクトロポレーションから7日後にCD34+細胞を評価し

10

20

30

40

50

た：CD34-APC(BioLegend, 343510)、CD38-BV711(BioLegend, 303528)、CD33-PE(eBioscience, 12-0339-41)、CD45-BV421(BioLegend, 304032)、およびLive/Dead Fixable Aqua(Life Technologies, L34957)。FMO対照を陰性細胞パーセンテージのゲーティングに用いた。MethoCult分化細胞について、CD11b-FITC(BioLegend, 301329)、CD14-APC(BD, 340436)を、上記のCD45-BV421、CD33-PEおよびLive/Dead Fixable Aquaに加えて用いた。マウス末梢血分析のために、マウスCD45-APC/Cy7、ヒトCD45-BV421、CD3-BV605、CD19-PE/Cy7、CD33-PE、CD11b-FITC、およびCD14-APCを用いた。

#### 【0180】

##### DNA分析

High Pure PCR Template Preparation Kit(Roche, 11796828001)を用いて、ゲノムDNAをMolm14およびCD34+細胞から抽出した。以下のプライマーを用いて、PCRを行った：

CD33F: 5'-AGCTGCTTCCTCAGACATGC-3', SEQ ID NO: 1.

CD33R: 5'-CTGTATTTGGTACTTCCTCTCTCCA-3', SEQ ID NO: 2.

#### 【0181】

Surveyor Mutation Detectionキット(Transgenomics)を用いて突然変異を検出し、バンド強度を、ImageJソフトウェアを用いて分析した。PCRアンプリコンをSangerシーケンシングによって分析し、対立遺伝子改変頻度を、TIDE(Tracking of In/dels by Decomposition)ソフトウェアを用いて計算した。

#### 【0182】

##### 細胞傷害性

対照(EMX1)を用いて、またはCD33を標的とするgRNAを用いてエレクトロポレーションが行われたCD34+細胞を、72時間、T細胞と共に1:1の比でインキュベートした。培養下で残っているT細胞およびCD34+細胞の数を、以下の抗体を用いてフローサイトメトリーによって分析した：CD3-PE Cy7(eBioscience, 24-0038-42)、CD34-APC(BioLegend, 343510)、CD38-BV711(BioLegend, 303528)、CD33-PE(eBioscience, 12-0339-41)、CD45-BV421(BioLegend, 304032)、およびLive/Dead Fixable Aqua。Countbright絶対数計数用ビーズ(Invitrogen, C36950)を添加し、細胞フラクションの絶対数を定量化した。

#### 【0183】

実験の結果について以下に説明する。

#### 【0184】

##### 実施例1：CD33ノックアウト(KO)HSPCの作製および造血の再生

ヒトHSCのCRISPR/Cas9媒介性遺伝子編集の以前の研究は、CCR5遺伝子の30%ホモ接合性ノックアウトを達成し、本明細書に記載されるアプローチの実行可能性を実証している(Mandal et al. Cell Stem Cell. 2014; 15: 643-652)。以前の研究は、G-CSF動員末梢血CD34+細胞中へCas9およびsgRNAを導入するためにプラスミドヌクレオフェクションを使用した。本明細書に記載される研究は、CD34+細胞の複数の供給源中へのCas9およびgRNAの異なる送達方法を利用することによって、HSCにおけるCRISPR/Cas9を用いた遺伝子編集への洞察を深める。

#### 【0185】

原理証明として、CD33遺伝子がノックアウトされているヒト造血幹細胞(CD33 KO HSC)を試験した。CD33は、骨髄系列の細胞上および大抵のAML上において発現される細胞表面受容体である。それは、シアル化糖タンパク質を認識する、シアル酸結合免疫グロブリン様レクチンのファミリー(シグレック)に属する。これらのタンパク質は、それらの細胞質ドメイン内に免疫受容抑制性チロシンモチーフ(ITIM)を運び、これは、抑制性シグナル伝達機能を示唆している。造血系におけるCD33の正確な役割はよく知られておらず、それは骨髄系細胞機能に必須ではない場合がある。CD33減少の影響を理解するために、C

10

20

30

40

50

D33 KO HSCの機能的能力を評価した。

【0186】

Doench et al, (Nat Biotechnol.2014;32: 1262-1267)によって同定された、CD33 に対する4つの高活性gRNAを、Molm14細胞株においてスクリーニングした。CD33 CART細胞が非CD33発現性細胞を認識および標的とするかどうかを決定するために、Molm14細胞に、第1日にCas9 mRNAおよび第2日にgRNAv1~5のエレクトロポレーションを行った。gRNAv5は、フローサイトメトリーおよびSurveyorヌクレアーゼアッセイによって測定されたように、CD33の表現型減少を生じさせることにおいて最も高い有効性を有した(図1A~1B)。

【0187】

動員末梢血由来のCD34+細胞に、2回(最初にCas9 mRNAおよびその後CD33を標的とするgRNA)エレクトロポレーションを行ったか、または代わりに1回(同じgRNAと複合体化されたCas9タンパク質)エレクトロポレーションを行った。図2Aは、エレクトロポレーションから7日後の、フローサイトメトリーによるCD33発現の代表的なプロットを示す。図2Bは、異なるドナー(RNAについてn=4およびRNPについてn=2)について平均化された、gRNA標的部位にわたるPCRアンプリコンのTIDE分析によって測定されたインデル頻度を示すグラフである。

【0188】

CD33陽性(D6およびJurkat細胞)ならびに陰性細胞(Molm14細胞)を、CD33 CART細胞と共に共培養した。図3A~3Bは、CD33がCD33陽性細胞を選択的に標的としたが、CD33陰性細胞は脱顆粒も溶解も示さなかったことを示している。

【0189】

このgRNAを使用し、Cas9 mRNAおよびgRNAのRNAエレクトロポレーションを用いて、G-CSF動員末梢血(mPB)CD34+細胞からCD33ノックアウト(KO)HSCを作製した(図4A~4D)。CD33 KO HSCは、CD33発現の減少を示した。4ドナー由来の細胞を用いて、この方法によって、30~50%の生存度を伴う、30~60%の編集された細胞が作製された。

【0190】

CD33 KO HSCコロニーのSangerシーケンシングによって、突然変異クローンの大部分がCas9切断部位で単一Aヌクレオチド挿入(+A突然変異)を有したことが明らかとなった(図4C)。このフレームシフト突然変異体は、CD33タンパク質コード配列において初期に終止コドンを生じさせ、従って、CD33が発現されないことを確実にした。無傷の姉妹染色体ではなく、代替の修復鋳型を提供することに恐らく起因して、Cas9/gRNAへの相同組換え修復(HDR)鋳型の付加は、突然変異の頻度を増加させ得るという報告がある。従って、CD33 KO HSCの数をさらに増加させる目的で、+A突然変異を有する一本鎖DNAオリゴヌクレオチドHDR修復鋳型を、最も効果的なエレクトロポレーション法へ付加した。

【0191】

臨床現場において、CD34+細胞の異なる供給源(mPB、臍帯血、および骨髄)が、HLA適合ドナーの入手可能性に基づいて利用される必要がある。各供給源は独特の特徴を有し、CRISPR媒介性遺伝子編集の有効性は供給源によって異なる。CD34+細胞の異なる供給源を用いる場合のCD33 KO HSCを生じさせる有効性を比較した。本明細書において用いられた本発明のプロトコールは、供給源にかかわらず、CD34+細胞中のCD33 KOの高いパーセンテージを生じさせた(図4D)。

【0192】

CD33 KO HSCは、RNAエレクトロポレーションを用いて最大60%の有効性で作製された。この方法の制限は、2回のエレクトロポレーション後の細胞の生存度であり、これは、インビボ生着実験について十分な数の細胞を得るために大きな出発集団を必要とする。代わりに、同じgRNAと複合体化されたCas9タンパク質を用いた単回のエレクトロポレーションを用いて、細胞生存度の増加を伴う高効率エレクトロポレーションを生じさせた(図2A~2B)。

【0193】

10

20

30

40

50

現在までのところ、CD33 KO HSCが対照HSCと比較して何らかの欠陥があるという証拠は見つかっていない。対照として、細胞に、脳発達に關与する転写因子をコードする遺伝子である、EMX1を標的とするgRNAのエレクトロポレーションを行った。EMX1およびCD33 KO HSCは両方とも、培養下で同様の速度で増殖し(図5A)、メチルセルロースコロニー形成アッセイは、骨髄系および赤血球系コロニーの両方の同等の数を示した(図5Bおよび6)。CD33 KO細胞のサイトスピンは、好中球およびマクロファージ細胞の正常な形態を示した(図5C)。

【0194】

CD33 KO HSCの分析は、細胞が対照HSCと同等のCD3およびCD45発現を有したことを示した(図7A)。対照HSCをインビトロでCART33と共にインキュベートした場合、数日間のインビトロ培養後は大多数の細胞であったCD33陽性細胞集団の、CART33媒介性殺傷に起因して、細胞個数が顕著に減少した。対照的に、CD33 KO HSCは、CART33処置後も残存する、かなりの数の残存細胞を有した(図7B)。

10

【0195】

CD33 KO HSCのより詳細な機能評価を、対照KO HSCと比較して行った。NSGマウスに、EMX1またはCD33 KO HSCのいずれかを生着させた。EMX1またはCD33 KO HSCのいずれかが生着されたマウスは、正常な骨髄発達を示した。CD33 KO HSCは、成熟した骨髄系細胞(好中球およびマクロファージ)へ分化した。細胞形態をサイトスピンによって、特徴的な細胞表面マーカー(CD11b、CD15、CD14、CD16、CD45、CD66b、およびHLA-DR)をフローサイトメトリーによって、分析した(図8)。

20

【0196】

CD33 KOヒトCD34+細胞は、長期間の複数系列の生着が可能であった(図9A~9H)。初代ヒトCD34+細胞は、G-CSF動員末梢血に由来し(図9A)、同等の数および形態の造血骨髄系および赤血球系コロニーをもたらした(図9B)。8~12週齢のNSGマウスに対照またはCD33-KO CD34+細胞のいずれかを注射した。12週間後、末梢血中のhCD45のパーセンテージ(生着)を測定した(図9C)。B細胞(CD19+)、CD3+ T細胞(CD3+)、および非リンパ系細胞を検出し、2つの群間で有意差はなかった(図9D)。CD33 KO HSPC生着マウス中のヒト骨髄系細胞は、対照HSPC生着マウスと比較して、有意に低下したレベルのCD33発現を有したが、CD11b+14+発現の差は観察されなかった(図9Eおよび9I)。さらに、16週間後に採取された骨髄は、対照およびCD33 KO HSPC生着マウスにおいて等レベルのヒトCD45+生着を示した(図9F)。対照またはCD33 KO HSPCのいずれかが生着されたマウスの骨髄においてヒト幹細胞および骨髄系前駆細胞のレベルの有意差はなかった(図9G)。16週間の最初の生着後に骨髄をNSGマウスから採取し、次いで、第2のレシピエントへ移し、さらに12週間後に分析した。持続的CD33 KO表現型を伴う保持されたヒト生着が観察された(図9H)。骨髄において、CD33KOまたはCD33WT群間の総ヒト生着の差は観察されず(図9I、左上)、リンパ系列および骨髄系列への分化を伴い(図9I、右上)、例外としてCD33発現が減少した(図9I、左下)。CD33KOからの骨髄系細胞は、対照と同等のレベルでCD11bおよびCD14の発現を有した(図9I、右下)。16週間第1移植の終了時に、非リンパ系ヒト細胞上のCD33の発現は、異種移植されたマウスの骨髄中のCD33の長期にわたる安定した非存在を示した(図9J)。

30

40

【0197】

実施例2：CD33 KO HSPCはCD33を標的とする療法に対して耐性である

対照またはCD33 KO HSPCが生着されたNSGマウスに、自己CART33細胞を与え、4週間後に残存ヒト骨髄系細胞を評価した(図10A)。CART33で処置されたマウスの末梢血においてCD33は無くなり、これは、対照HSPC生着マウス中の骨髄系細胞(CD11b14+)のアブレーションをもたらし、一方、CD33 KO HSPC生着マウスにおいては、骨髄系細胞は保持された(図10B)。対照HSPC生着マウス中に見られた骨髄破壊とは対照的に、CART33処置後、CD33 KO HSPC生着マウスの末梢血、脾臓、および骨髄において、骨髄系細胞が検出された(図10C)。ヒト前駆細胞は、対照と比較して、CART33処置後、CD33 KO HSPC生着マウスにおいて有意に増加した(図10D)。

50



## 【0198】

さらに、CART33は、CD33 KO HSPCを見逃すと同時に、AMLを根絶することができたことが、本明細書において実証された。NSGマウスに、先ず、対照またはCD33 KO HSPCを生着させ、次いで、Molm14 (緑色蛍光タンパク質およびルシフェラーゼを発現するように操作されたAML細胞株)を注射し、続いて、CART33処置を行った(図11A)。AML疾患負荷量を生物発光イメージング(BLI)によって測定し、一方、ヒトHSPCを末梢血のフローサイトメトリーによって測定した。CART33処置後、対照およびCD33 KO HSPC生着マウスは両方ともAML疾患寛解へ向かった(図11B)。全身腫瘍組織量は、CART33処置後1~2週間以内に、対照およびCD33 KO HSPC生着マウスの両方において減少した(図11C)。CD33 KO HSPC生着マウスは、対照とは対照的に、AMLのCART33処置後、末梢血(PB)、脾臓、および骨髄(BM)において持続的CD14+骨髄系細胞を示した(図11D)。ヒト前駆細胞は、CD33 KO HSPC群においてのみ、CART33媒介性毒性から見逃された(図11E)。

10

## 【0199】

実施例3：CD33 KO骨髄系細胞は正常な機能を保持することができる

本明細書に記載される実験は、CD33 KO HSPC子孫が機能的欠陥を有さないことを実証した(図12A~12F)。HSPC生着マウス骨髄から得られたヒト細胞は、正常な幹細胞(芽細胞)、骨髄系前駆細胞(前骨髄球)、ならびにターミナルエフェクター細胞(単球および好中球)の特有の形態学的特徴を示した(図12A)。対照またはCD33 KO HSPCを、骨髄系サイトカイン(SCF、TPO、Flt3L、IL-6、GM-CSF、IL-3)を用いてインビトロで分化させ、ファゴソームにおいて酸性化されると緑色蛍光を有するpHrodoグリーン大腸菌生体粒子と共にインキュベートした(図12B)。ファゴサイトーシスパーセンテージの有意差は、対照およびCD33 KO HSPC間で見られなかった(図12B)。発現量の異なる遺伝子が図12Cに示され、各行は遺伝子に対応し、各列は対照(ctrl)またはCD33 KO (KO)からの1つのサンプルを示し；番号は起源のドナーを示す。これらの結果は、CD33単独のKOでは個々の遺伝子のまたは経路の有意な混乱は存在しないことを示す。対照およびCD33 KOサンプルの遺伝子発現値は、互いと強く相関した(図12D)。マウスに対照またはCD33 KO HSPCを生着させ、rhG-CSFを注射した。末梢血ヒト単球(CD11b+14+)および好中球(CD11b+14-)の絶対数を測定した。ベースラインレベルと比較して細胞数の有意な変化はなかった(図12E)。マウスに対照またはCD33 KO HSPCを生着させ、リポ多糖類を注射した。ヒトサイトカインの血清レベルは2つの群間で類似していた(図12F)。

20

30

## 【0200】

CD33 KOプロトコールによって生じる潜在的なオフターゲット突然変異を調べた。2つのウェブツール(<http://crispr.mit.edu>、<http://crispr.cos.uni-heidelberg.de/>)を用いて、インシリコで予測される上位12個のオフターゲット部位を同定した(図13A)。偽遺伝子であるSIGLEC22Pが、CD33遺伝子に対して高度の相同性を有し、CD33を標的とするgRNAの結合部位が100%同一であることが発見された(図13B)。その他の点では、CD33およびSIGLEC22Pにおける高度のオンターゲット突然変異にもかかわらず、他のSIGLEC遺伝子においてはSurveyorミスマッチアッセイによって突然変異は検出されなかった(図13B)。

40

## 【0201】

実施例4：アカゲザルにおける自己CD33 KO幹細胞移植

アカゲザルCD34+ HSPCを、G-CSFおよびプレリキサフォルを用いて動員し、アフエレーシスによって取り出し、CD33のCRISPR/Cas9ベースの遺伝子ノックアウトで遺伝子を編集する。その一方で、サルを照射(TBI)でコンディショニングし、それに続いて、編集されたHSPCの再注入を受けさせる。インビトロで分化させたHSPCのCD33発現を、対照およびKO細胞において測定する。CD33遺伝子座のシーケンシングのTIDE分析も行う。移植された動物のPBから選択されたサブ集団上のCD33の発現を分析する。

## 【0202】

本明細書に記載される組成物および方法は、CART療法および他の強力な抗体ベースの

50

治療薬（例えばBITE）が、罹患細胞上に選択的に発現される識別可能な細胞表面マーカー無しで疾患を処置することを可能にする。本明細書に記載される組成物および方法は、遺伝子操作処置において急速な進歩を提供する。

【0203】

他の態様

本明細書における変数の定義における要素のリストの記述は、単一の要素または列記された要素の組み合わせ（または部分的組み合わせ）としての、その変数の定義を含む。本明細書における態様の記述は、単一の態様としての、または他の態様もしくはその一部分と組み合わせられた、その態様を含む。

【0204】

本明細書で引用した各特許、特許出願および刊行物の開示は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。本発明は特定の態様に関連して開示されているが、本発明の他の態様および変形は、本発明の真の精神および範囲から逸脱することなく、当業者によって考案され得ることが明らかである。添付の特許請求の範囲は、全てのそのような態様および同等の変形を包含するように解釈されることが意図される。

10

20

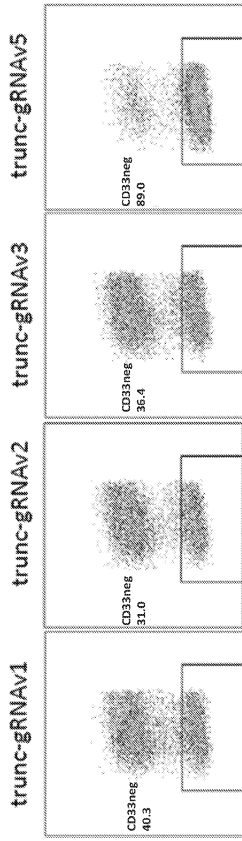
30

40

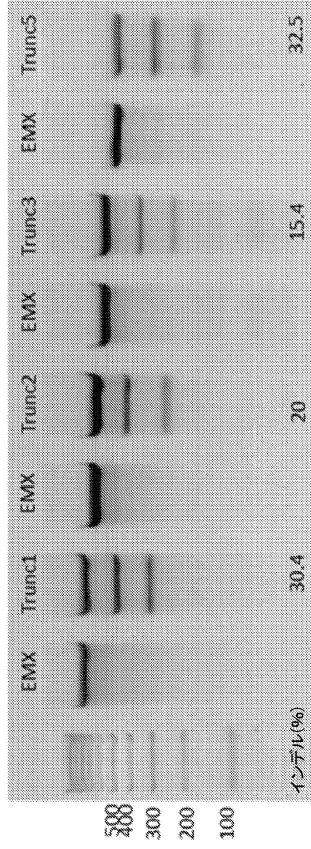
50

【図面】

【図 1 A】



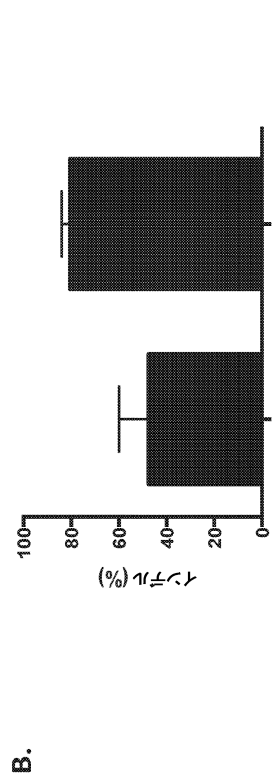
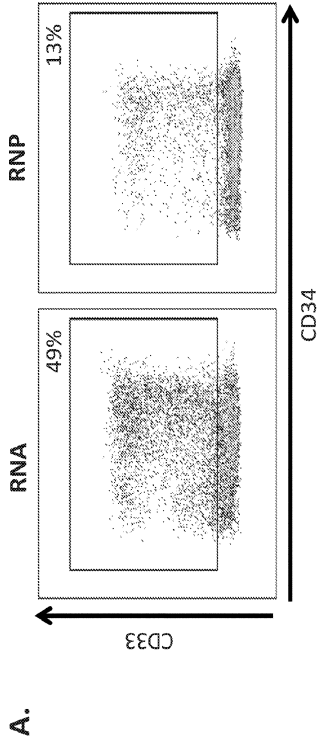
【図 1 B】



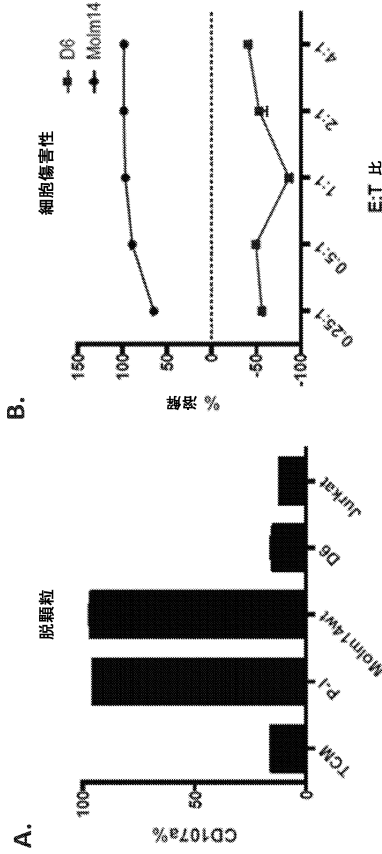
10

20

【図 2】



【図 3】

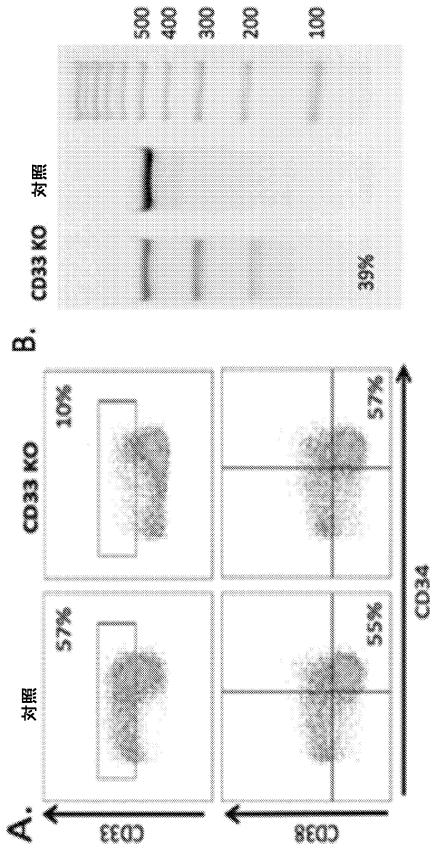


30

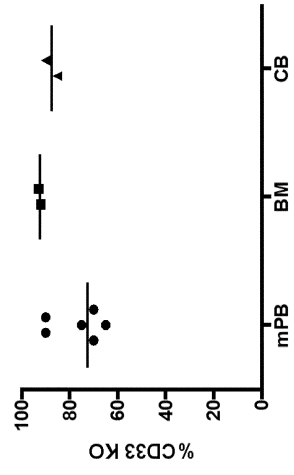
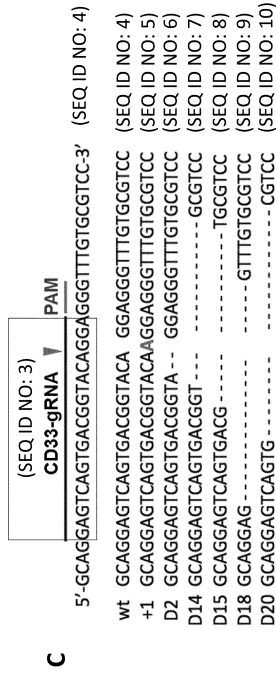
40

50

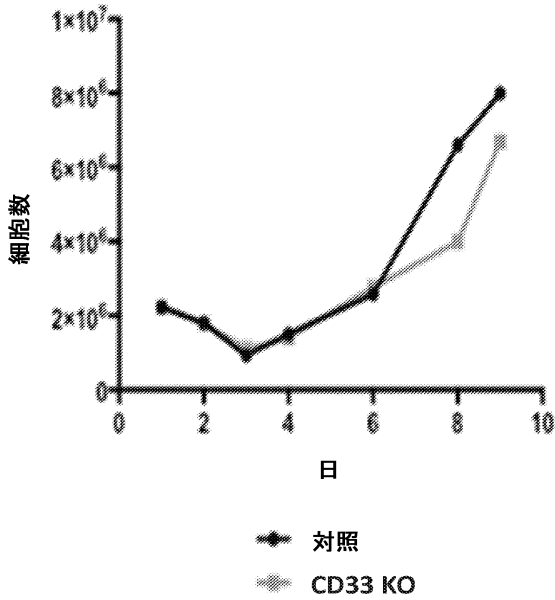
【 図 4 - 1 】



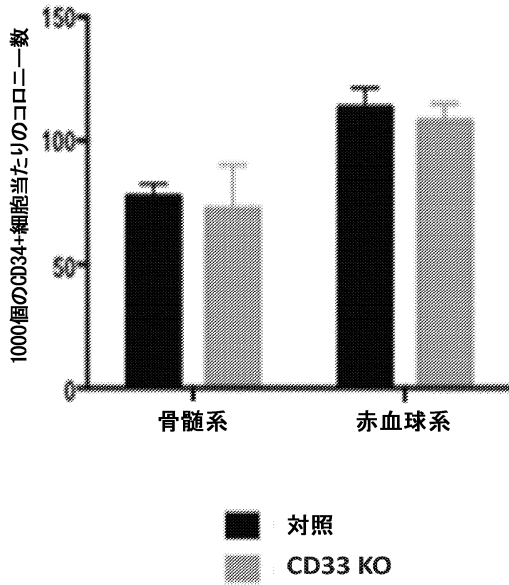
【 図 4 - 2 】



【 図 5 A 】



【 図 5 B 】



10

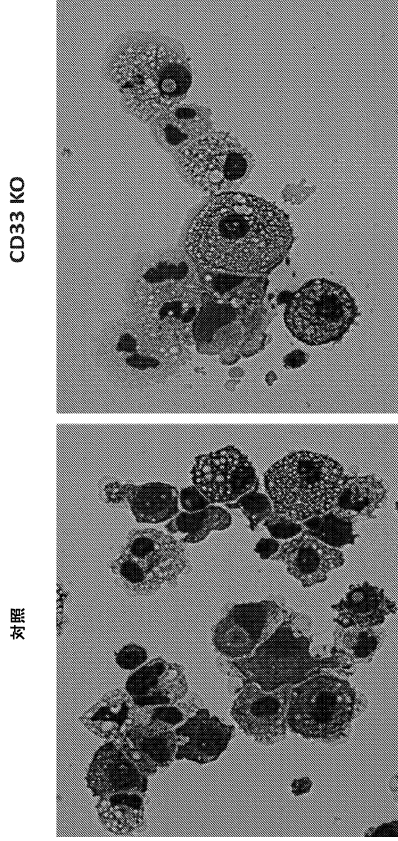
20

30

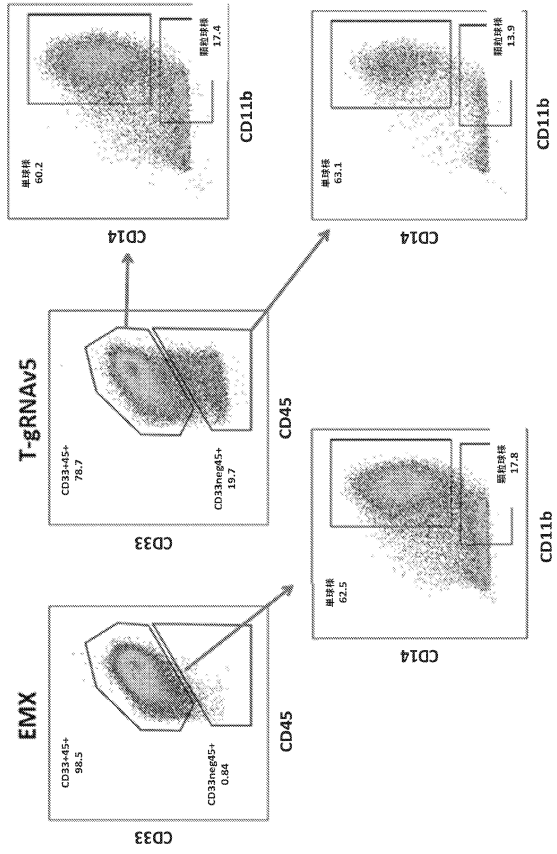
40

50

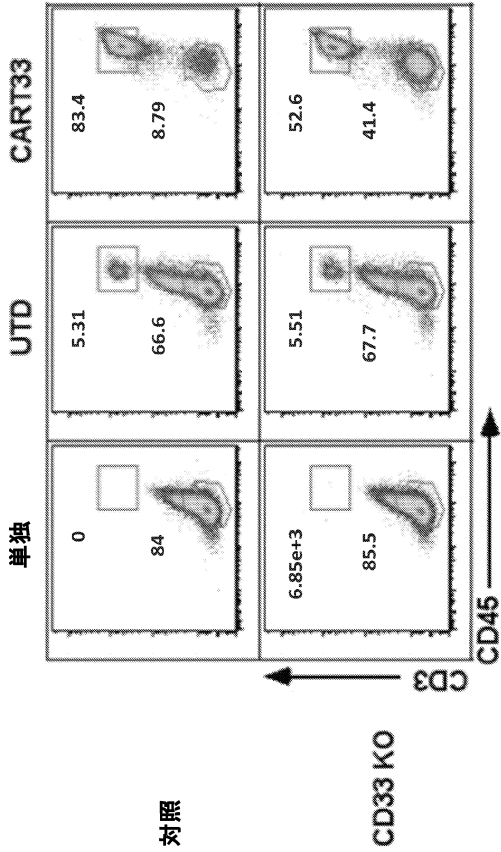
【 5 C 】



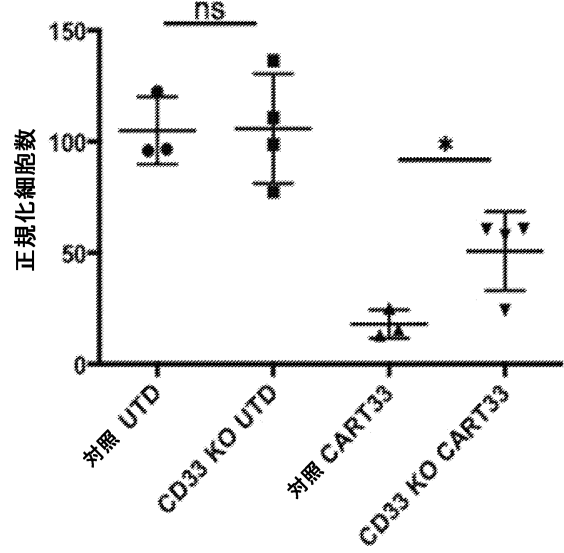
【 6 】



【 7 A 】



【 7 B 】



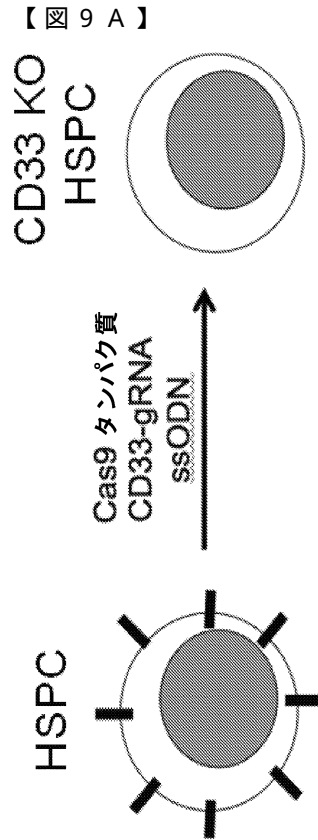
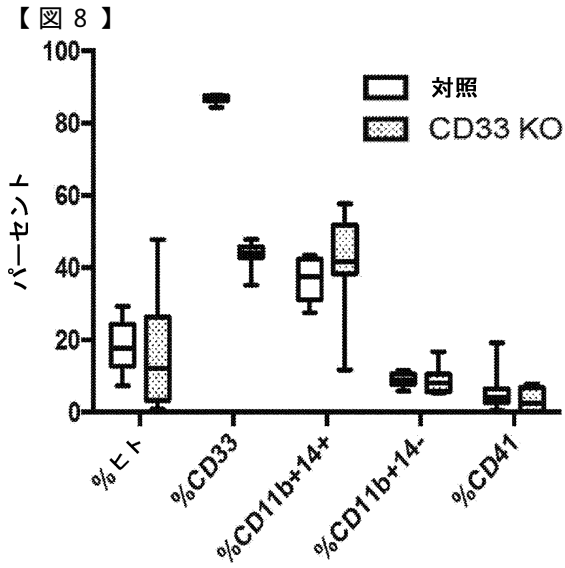
10

20

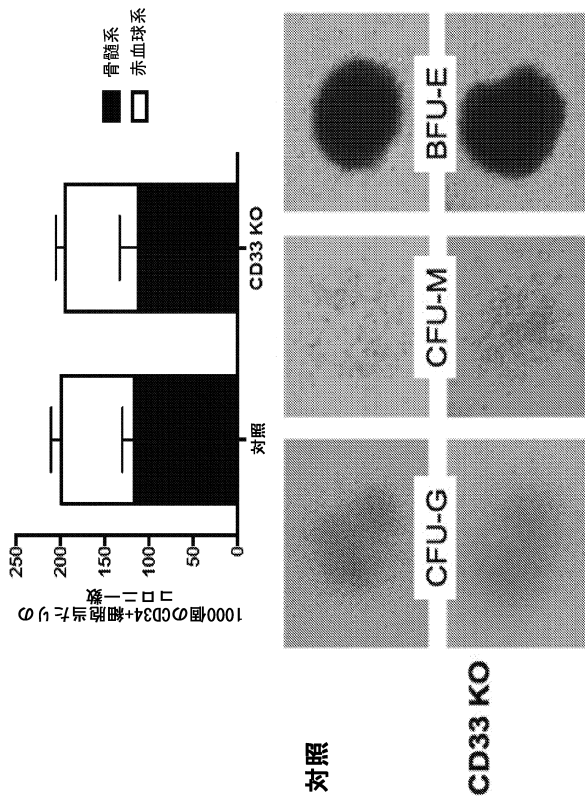
30

40

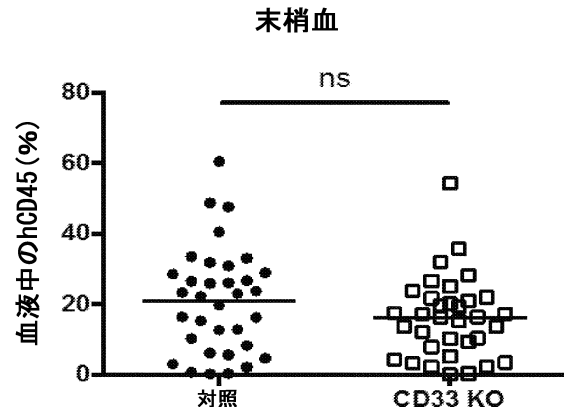
50



【図 9 B】



【図 9 C】



10

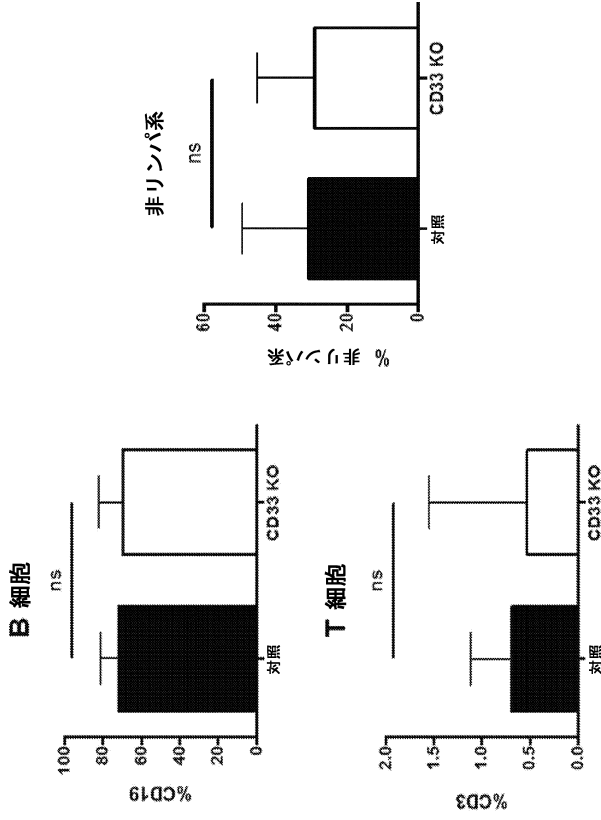
20

30

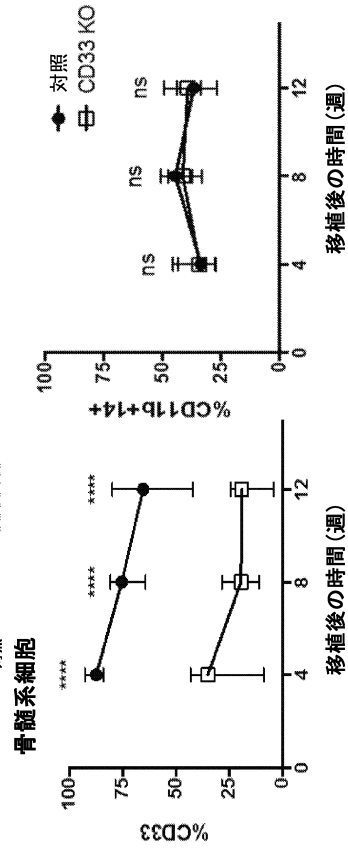
40

50

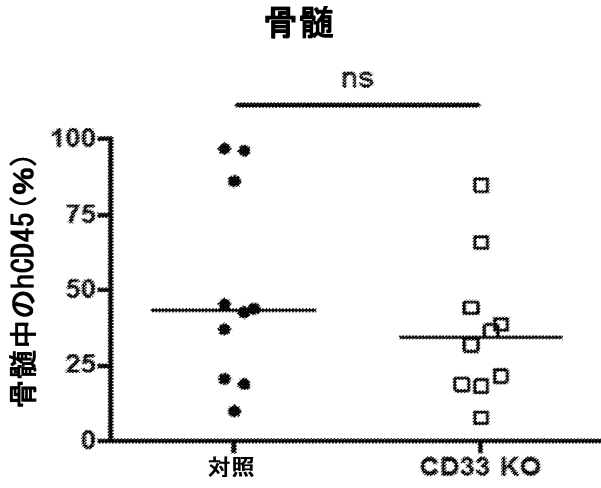
【図 9 D】



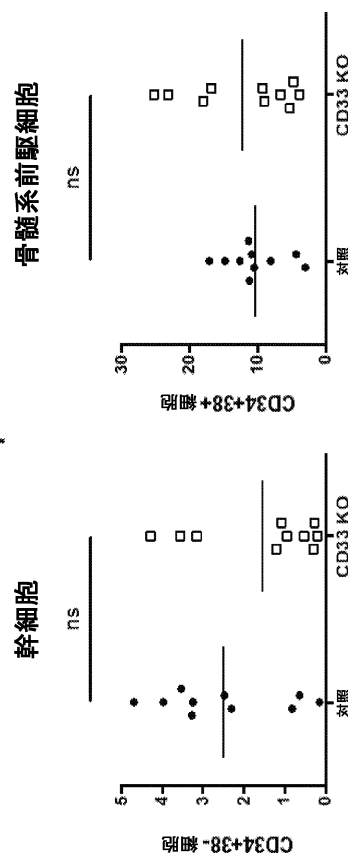
【図 9 E】



【図 9 F】



【図 9 G】



10

20

30

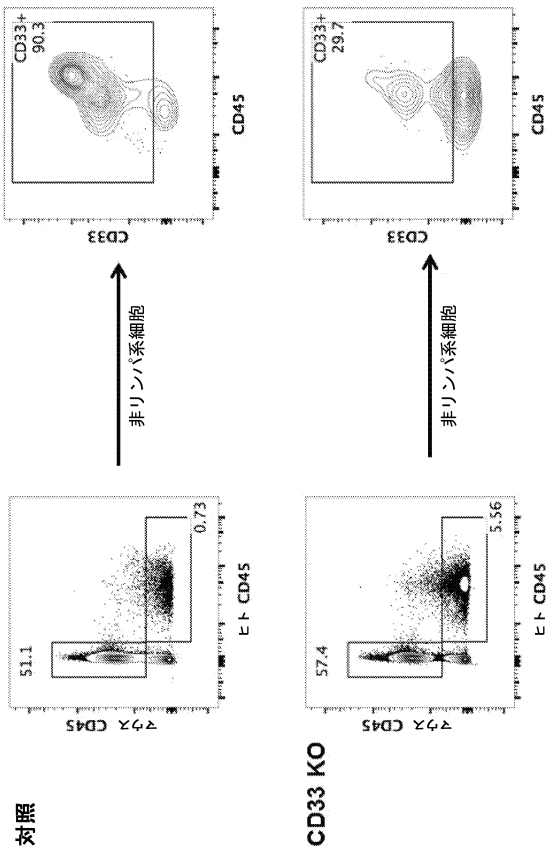
40

50

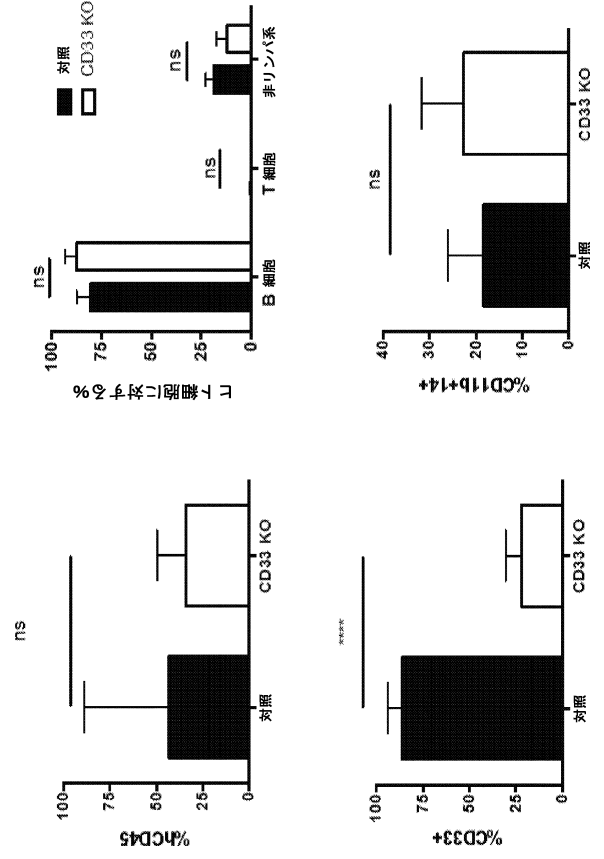
【図 9 H】

	1° hCD45%	CD33 KO	2° hCD45%	CD33 KO
EMX	49.1	0	1.45	0
EMX	20.1	0	0.04	0
CD33	35.1	61%	8.6	66%
CD33	30.3	72%	0.10	84%

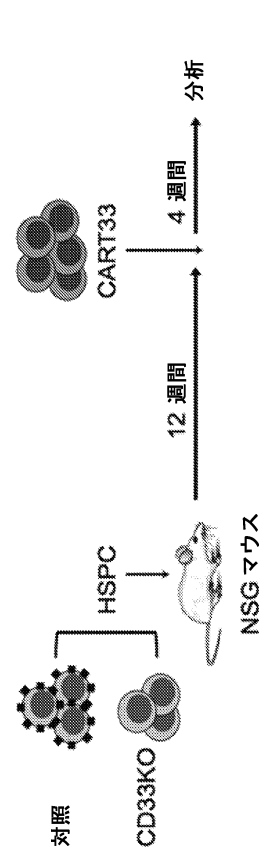
【図 9 J】



【図 9 I】



【図 10 A】



10

20

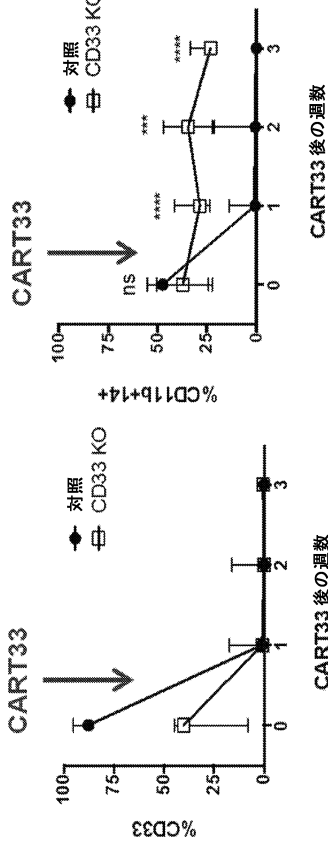
30

40

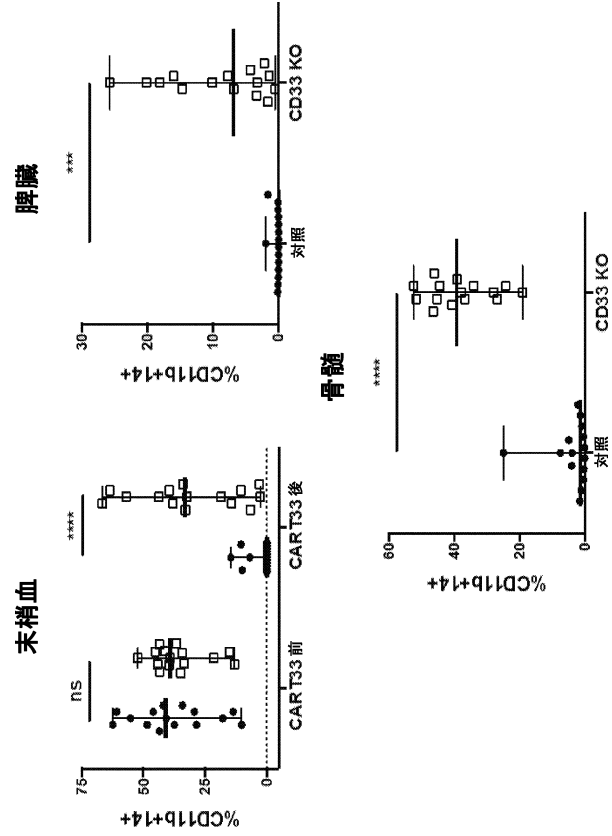
50



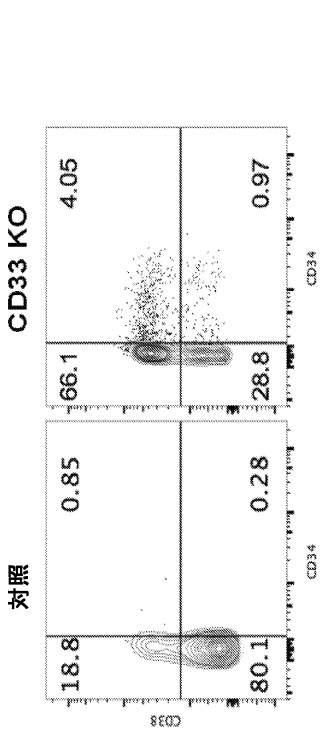
【図 10 B】



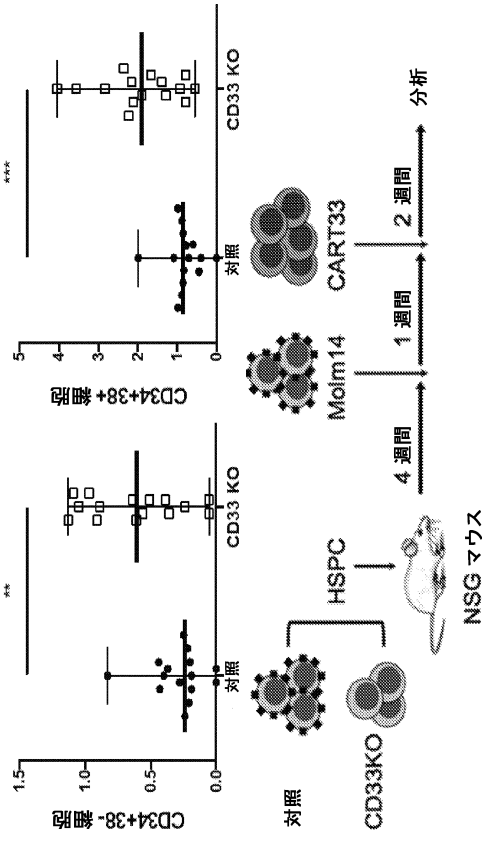
【図 10 C】



【図 10 D】



【図 11 A】



10

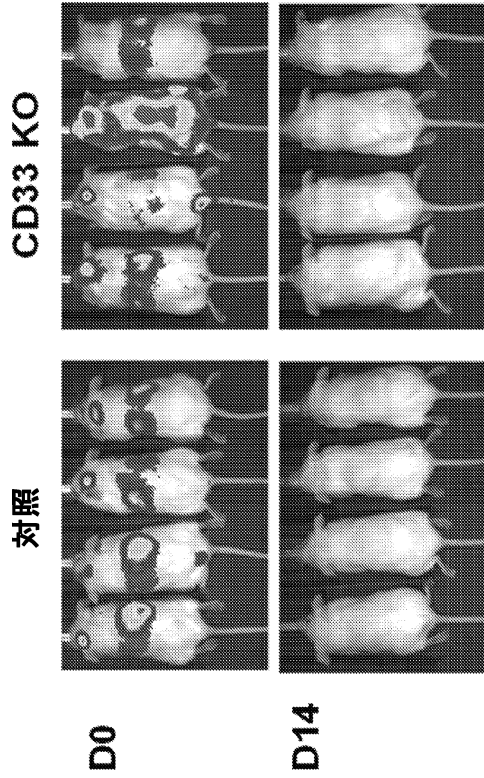
20

30

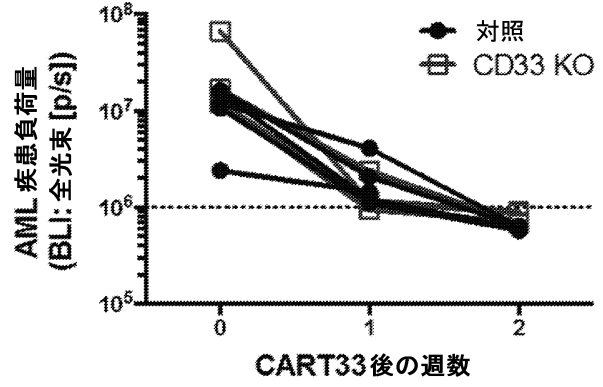
40

50

【図 1 1 B】



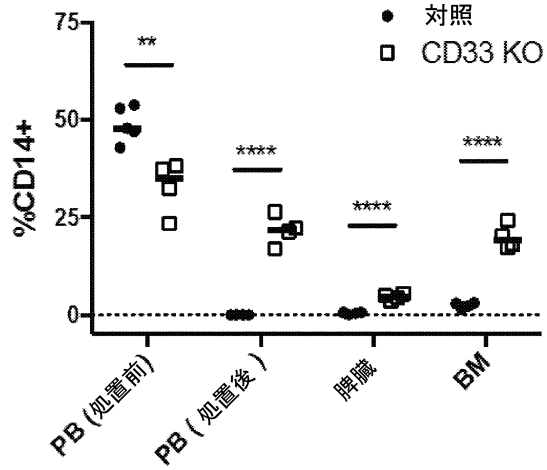
【図 1 1 C】



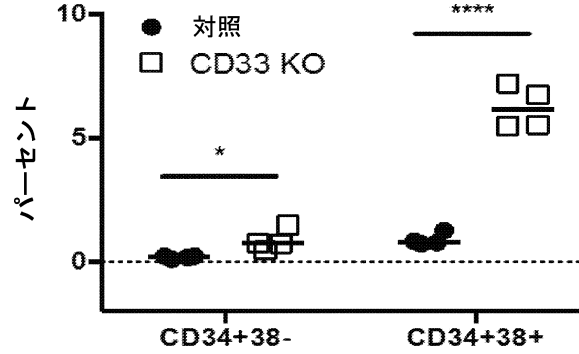
10

20

【図 1 1 D】



【図 1 1 E】

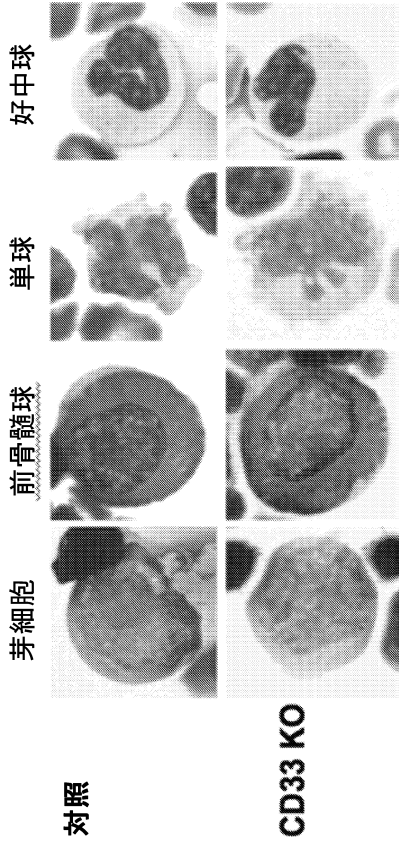


30

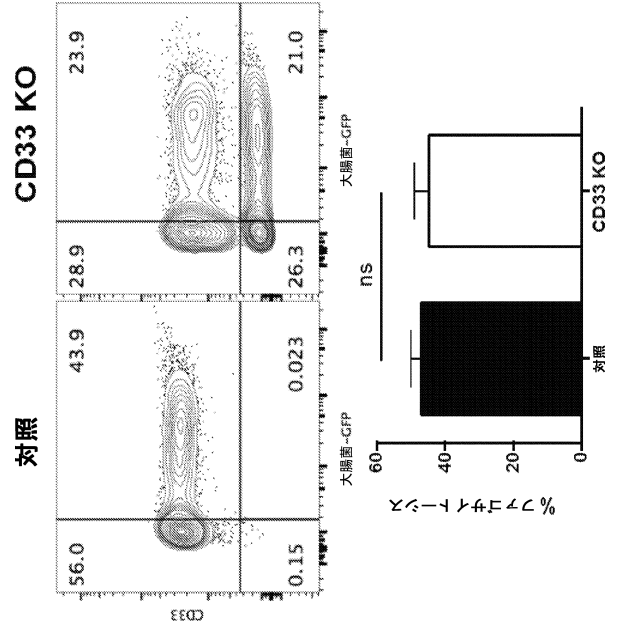
40

50

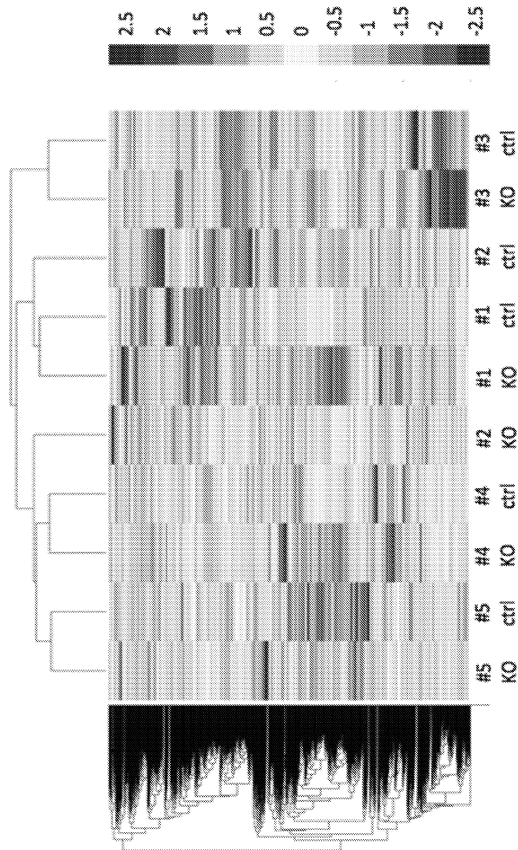
【図 1 2 A】



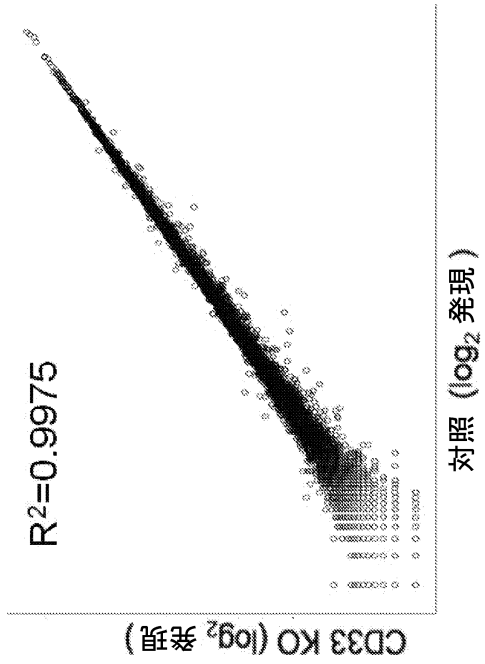
【図 1 2 B】



【図 1 2 C】



【図 1 2 D】



10

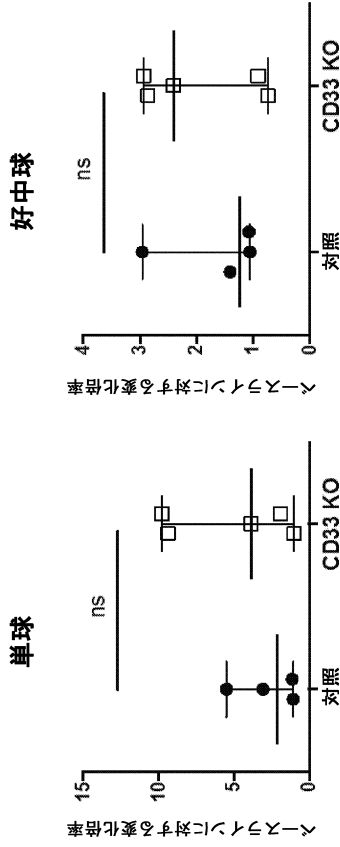
20

30

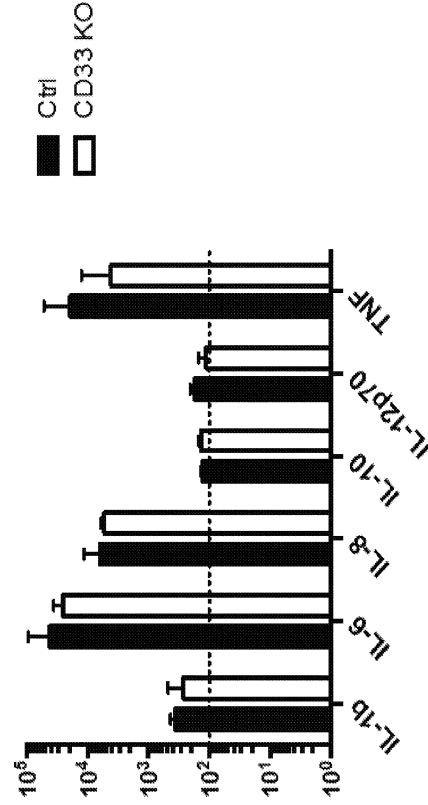
40

50

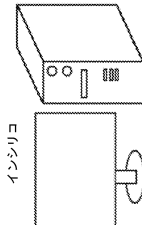
【図 1 2 E】



【図 1 2 F】

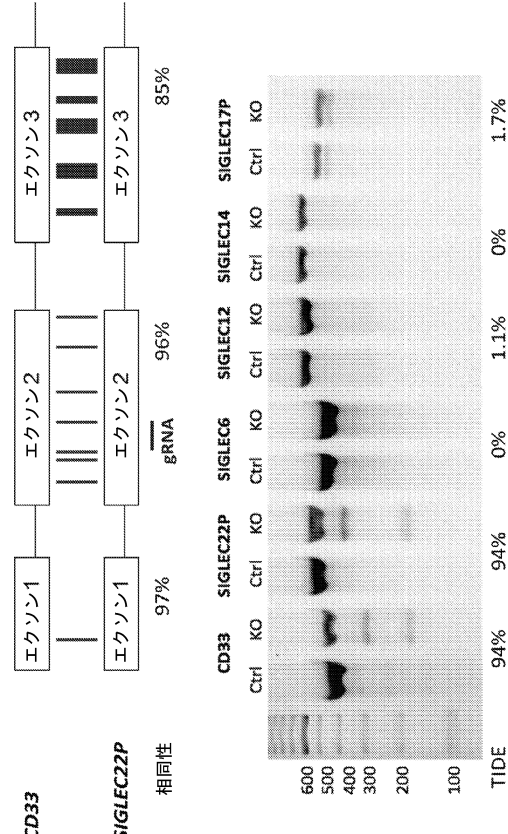


【図 1 3 A】

インシリコ  MIT (<http://crispr.mit.edu/>)  
 CCTop (<http://crispr.cos.uni-heidelberg.de/>)

場所	#MM	MITスコア	CCTopランク	位置
CD33	0	100	1	エクソン
SIGLEC22P	0	100	2	エクソン
Chr18	3	1.56		遺伝子間
ARHGGEF10				
L	3	1.52	3	イントロン
SIGLEC6	2	1.38	7	エクソン
SIGLEC17P	2	1.31	5	エクソン
GHDC	4	0.77		エクソン
SIGLEC5	3	0.51	8	エクソン
SIGLEC12	3	0.51	10	エクソン
SIGLEC14	3	0.51	9	エクソン
VMO1	4	0.38		エクソン
Chr2	3	0.29	6	遺伝子間
Chr1	3	0	4	遺伝子間

【図 1 3 B】



10

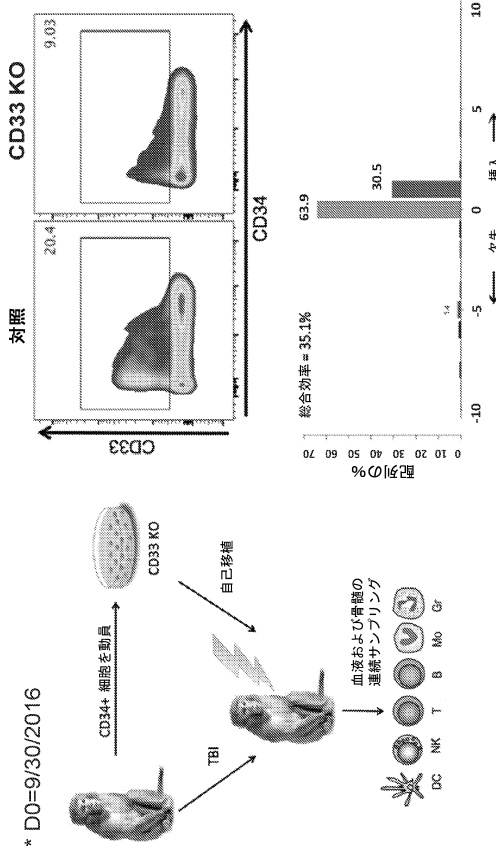
20

30

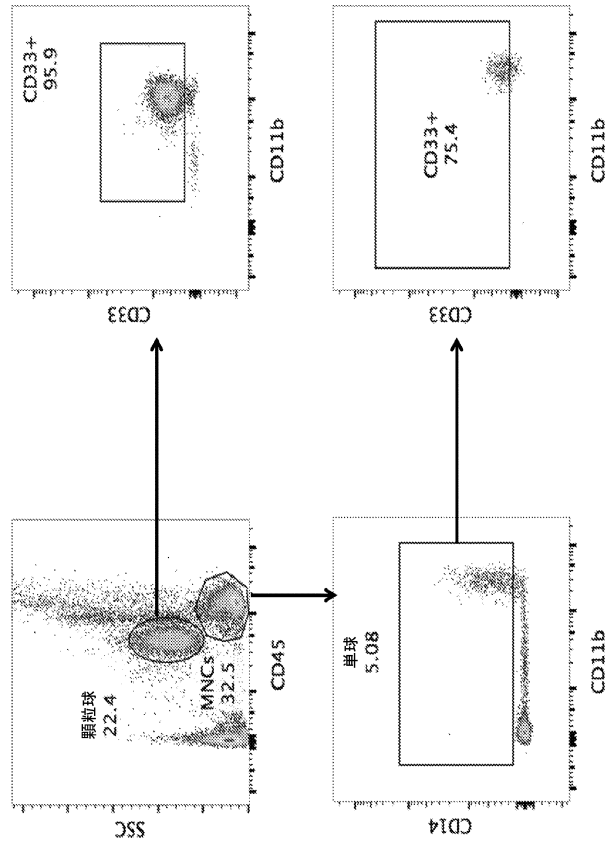
40

50

【図 14 A】



【図 14 B】



【配列表】

0007378439000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

A 6 1 P 43/00 (2006.01)  
 A 6 1 P 37/06 (2006.01)  
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)  
 C 1 2 N 15/09 (2006.01)

## F I

A 6 1 P 43/00 1 0 5  
 A 6 1 P 37/06  
 A 6 1 P 35/00  
 C 1 2 N 15/09 1 1 0

(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 100188433

弁理士 梅村 幸輔

(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 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100214396

弁理士 塩田 真紀

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(74)代理人 100221741

弁理士 酒井 直子

(74)代理人 100114926

弁理士 枝松 義恵

(72)発明者 ジル ザール

アメリカ合衆国 1 9 1 0 6 ペンシルバニア州 フィラデルフィア ノース サード ストリート 3  
 0 アpartment 4エイ

(72)発明者 キム ミリアム

アメリカ合衆国 1 9 1 0 3 ペンシルバニア州 フィラデルフィア チェスナット ストリート 2  
 4 0 0 アpartment 2 6 0 4

審査官 大島 彰公

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 7 / 0 6 6 7 6 0 ( W O , A 1 )

F Ann RAN et al. , Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system , Nature Protocols ,  
 2013年10月24日 , Vol. 8 , No. 11 , , p.2281-2308 , DOI: 10.1038/nprot.2013.143

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B名)

A 6 1 K、C 1 2 N、A 6 1 P

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T  
 N )