

(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2018-509148

(P2018-509148A)

(43) 公表日 平成30年4月5日(2018.4.5)

(51) Int.Cl.

C 12 N 5/10 (2006.01)
C 12 Q 1/02 (2006.01)
C 12 N 15/09 (2006.01)
A 61 K 35/17 (2015.01)
A 61 P 35/00 (2006.01)

F 1

C 12 N 5/10
C 12 Q 1/02
C 12 N 15/00
A 61 K 35/17
A 61 P 35/00

テーマコード (参考)

4 B 06 3
4 B 06 5
4 C 08 7
4 H 04 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 77 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-547087 (P2017-547087)
(86) (22) 出願日 平成28年3月11日 (2016.3.11)
(85) 翻訳文提出日 平成29年10月16日 (2017.10.16)
(86) 國際出願番号 PCT/EP2016/055332
(87) 國際公開番号 WO2016/142532
(87) 國際公開日 平成28年9月15日 (2016.9.15)
(31) 優先権主張番号 PA201570138
(32) 優先日 平成27年3月11日 (2015.3.11)
(33) 優先権主張国 デンマーク(DK)

(71) 出願人 512213549
セレクティス
C E L L E C T I S
フランス、75013 パリ、リュード
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

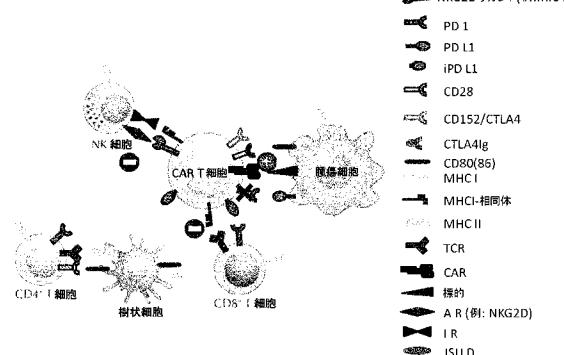
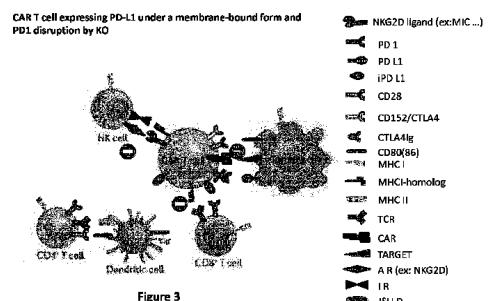
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】患者における持続性および/または生着を増加させるために同種T細胞を改変する方法

(57) 【要約】

本発明は、宿主生物における持続性および/または生着のより高い可能性を有する、免疫治療のための、T細胞のような操作された免疫細胞を開発する方法に関する。具体的には、この方法は、少なくとも1種の非内在性免疫抑制ポリペプチドとの接触の工程と組み合わせられた、自己/非自己認識に関与する少なくとも1種の遺伝子の不活化を含む。本発明は、それによってGVHのリスクが低下する、標準的でかつ入手可能な養子免疫治療の可能性を提供する。

既結合型のPD-L1を発現するCAR T細胞およびKOによるPD1破壊



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

以下の工程を含む、宿主免疫細胞の存在下での同種免疫細胞の持続性および/または生着を増加させる方法：

(a) 同種細胞を準備する工程；

(b) 自己抗原および非自己抗原の認識に対する応答に関するポリペプチドをコードする少なくとも1種の内在性遺伝子を不活性化することによって、該細胞を改変する工程；ならびに

(c) 同種免疫細胞との相互作用を防止する効果を有する少なくとも1種の非内在性免疫抑制ポリペプチドと、宿主免疫細胞を接触させる工程。

10

【請求項 2】

工程(b)におけるポリペプチドが、TCR、MHCクラスI成分、b-2ミクログロブリン(B2M)、TAP1、およびLMP(large multifunctional protease)2の中から選択される、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

工程(c)における免疫抑制ポリペプチドが、膜結合型および/または分泌型で存在する、請求項1または請求項2記載の方法。

【請求項 4】

工程(c)が、前記免疫細胞の膜表面結合型の1種の非内在性免疫抑制ポリペプチドをコードする少なくとも1種の非内在性ポリヌクレオチドの、前記免疫細胞における発現によって実施される、請求項1～3のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項 5】

前記免疫細胞の膜表面結合型の1種の非内在性免疫抑制ポリペプチドが、PD-L1リガンドである、請求項1～4のいずれか一項記載の方法。

【請求項 6】

発現される膜結合型のPD-L1リガンドをコードする核酸分子が、SEQ ID NO:18と少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは95%の同一性を有する、請求項5記載の方法。

【請求項 7】

免疫抑制ポリペプチドが分泌型で存在する、請求項1～3のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項 8】

工程(c)が、前記免疫細胞での分泌型の1種の非内在性免疫抑制ポリペプチドをコードする少なくとも1種の非内在性ポリヌクレオチドの、前記免疫細胞における発現によって実施される、請求項1～3または請求項7のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9】

発現されるCTLA-4免疫グロブリンをコードする核酸分子が、SEQ ID NO:16～17と少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは95%の同一性を有する、請求項8記載の方法。

40

【請求項 10】

工程(c)が、非内在性免疫抑制ポリペプチドであるPD-L1リガンドおよびCTLA-4免疫グロブリンの両方と宿主免疫細胞を接触させることによって実施される、請求項1～9のいずれか一項記載の方法。

【請求項 11】

工程(c)が、非内在性免疫抑制ポリペプチドであるPD-L1リガンドおよびCTLA-4免疫グロブリンの両方の免疫細胞における発現によって実施される、請求項10記載の方法。

【請求項 12】

少なくとも1種の非内在性免疫抑制ポリペプチドの分泌が分泌型のPD-L1リガンドである、請求項1～3のいずれか一項記載の方法。

【請求項 13】

同種免疫細胞において発現される膜結合型のPD-L1リガンドおよびCTLA-4免疫グロブリ

50

ンをコードする核酸分子が、それぞれ、SEQ ID NO:18およびSEQ ID NO:16～17と少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは95%の同一性を有する、請求項1～12のいずれか一項記載の方法。

【請求項14】

免疫細胞が初代細胞である、請求項1または請求項2記載の方法。

【請求項15】

工程(c)が、PD-1遺伝子の発現の不活化をさらに含有する、請求項1～14のいずれか一項記載の方法。

【請求項16】

工程(c)が、膜結合型のPD-L1リガンドをコードする少なくとも1種の非内在性ポリヌクレオチドの前記免疫細胞における発現によって実施され、前記同種細胞のさらなる改変が、PD-1遺伝子の発現の不活化によって実施される、請求項1～14のいずれか一項記載の方法。10

【請求項17】

工程(c)が、CTLA-4 Igの分泌を指示する少なくとも1種の非内在性ポリヌクレオチドの前記免疫細胞における発現によって実施され、前記同種細胞のさらなる改変が、PD-1遺伝子の発現の不活化によって実施される、請求項1～14のいずれか一項記載の方法。

【請求項18】

工程(c)が、非内在性免疫抑制ポリペプチドであるPD-L1リガンドおよびCTLA-4免疫グロブリンの両方の前記免疫細胞における発現によって実施され、前記同種免疫細胞のさらなる改変が、PD-1遺伝子の発現の不活化によって実施される、請求項1～14のいずれか一項記載の方法。20

【請求項19】

PD-1遺伝子の不活化が、SEQ ID NO:11～12および13～14のTALEヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを使用することによって実施される、請求項15～18のいずれか一項記載の方法。

【請求項20】

工程(c)におけるポリペプチドが、PD-L1、CTLA-4、ウイルスMHC相同意体、NKG2Dリガンド、ウイルスenv免疫抑制ドメイン(ISU)、またはウイルスFPタンパク質の中から選択される、請求項1～4のいずれか一項記載の方法。30

【請求項21】

工程(b)がB2Mの不活化によって実施され、工程(c)が同種免疫細胞におけるPD-L1リガンドの発現によって実施される、請求項1～19のいずれか一項記載の方法。

【請求項22】

工程(b)がTCRの不活化によって実施され、工程(c)が同種免疫細胞によるPD-L1リガンドの発現によって実施される、請求項1～19のいずれか一項記載の方法。

【請求項23】

工程(b)がB2Mの不活化によって実施され、工程(c)が同種免疫細胞によるNKG2Gリガンドの発現によって実施される、請求項1～19のいずれか一項記載の方法。

【請求項24】

工程(b)がB2Mの不活化によって実施され、工程(c)が同種免疫細胞によるウイルスMHC相同意体UL18タンパク質の発現によって実施される、請求項1～19のいずれか一項記載の方法。40

【請求項25】

工程(b)がTCRの不活化によって実施され、工程(c)が同種免疫細胞によるウイルスMHC相同意体UL18タンパク質の発現によって実施される、請求項1～19のいずれか一項記載の方法。

【請求項26】

工程(c)が、少なくとも1種の非内在性免疫抑制ポリヌクレオチドとの前記免疫のインキュベーションによって実施される、請求項1～25のいずれか一項記載の方法。50

【請求項 27】

非内在性免疫抑制ポリペプチドが抗CD80 mAbまたは抗CD86 mAbである、請求項26記載の方法。

【請求項 28】

工程(b)における遺伝子不活化が、TALヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、またはRNA誘導型エンドヌクレアーゼを使用することによって実施される、請求項1~27のいずれか一項記載の方法。

【請求項 29】

工程(b)における遺伝子不活化が、TALヌクレアーゼを使用して実施される、請求項28記載の方法。 10

【請求項 30】

工程(b)における遺伝子不活化が、TCRをコードする遺伝子の発現を阻害する核酸分子を使用することによって実施される、請求項2、22、または25のいずれか一項記載の方法。
。

【請求項 31】

TCR遺伝子の不活化が、SEQ ID NO:52~53、55~56、62~63、および65~66のTALEヌクレアーゼを使用することによって実施される、請求項30記載の方法。

【請求項 32】

工程(b)における遺伝子不活化が、B2Mをコードする遺伝子の発現を阻害する核酸分子を使用することによって実施される、請求項2または21~24のいずれか一項記載の方法。 20

【請求項 33】

B2M遺伝子の不活化が、SEQ ID NO:2~3、5~6、および8~9のTALEヌクレアーゼを使用することによって実施される、請求項32記載の方法。

【請求項 34】

(d) 悪性細胞または感染細胞の表面に発現された少なくとも1種の抗原に対するキメラ抗原受容体(CAR)をコードするヌクレオチド配列を含む外来性核酸分子を前記T細胞へ導入する工程をさらに含む、請求項1~33のいずれか一項記載の方法。

【請求項 35】

キメラ抗原受容体が、SEQ ID NO:67(CD19抗原)、SEQ ID NO:68(CD38抗原)、SEQ ID NO:69(CD123抗原)、SEQ ID NO:70(CS1抗原)、SEQ ID NO:71(BCMA抗原)、SEQ ID NO:72(FLT-3抗原)、SEQ ID NO:73(CD33抗原)、SEQ ID NO:74(CD70抗原)、SEQ ID NO:75(EGFR-3v抗原)、およびSEQ ID NO:76(WT1抗原)との80%超、好ましくは90%超、より好ましくは95%超の同一性を有する抗原性標的配列を有するscFv(VH鎖およびVL鎖)を含む、請求項34記載の方法。 30

40)(e)得られた操作されたT細胞を増殖させる工程をさらに含む、請求項1~4470のいずれか一項記載の方法。

【請求項 36】

請求項1~35のいずれか一項記載の方法を使用することによって入手可能な操作されたT細胞、好ましくは、単離された操作されたT細胞。

【請求項 37】

医薬として使用するための、請求項36記載の操作されたT細胞。 40

【請求項 38】

癌またはウイルス感染の処置において使用するための、請求項36または請求項37記載の操作されたT細胞。

【請求項 39】

処置される患者に由来する、請求項36~38のいずれか一項記載の操作されたT細胞。

【請求項 40】

ドナーに由来する、請求項36~39のいずれか一項記載の操作されたT細胞。

【請求項 41】

請求項36~40のいずれか一項記載の少なくとも1種の操作されたT細胞を含む組成物。 50

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】****発明の分野**

本発明は、免疫治療のための操作された非アロ反応性T細胞を開発する方法に関し、より具体的には、同種免疫細胞の持続性および/または生着を増加させる方法に関する。この方法は、好ましくは、特異的なレアカットエンドヌクレアーゼの使用によって、自己/非自己認識に関する遺伝子を不活性化する工程、その後、操作された免疫細胞を(PD-L1リガンドおよび/またはCTLA-4 Igのような)少なくとも1種の非内在性免疫抑制ポリペプチドと接触させる工程を少なくとも含む。本発明は、操作された免疫細胞およびその機能性誘導体、キメラ抗原受容体(CAR)、多鎖CAR、ならびに免疫治療の効率を強化するためのそれらの使用にも関する。本発明は、移植片対宿主病GvHDのリスクを低下させることによって、より安全な戦略の道を開き、入手可能な養子免疫治療を可能にする。

10

【背景技術】**【0002】****発明の背景**

エクスピボで生成された自己の抗原特異的T細胞の移入を含む養子免疫治療は、ウイルス感染および癌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、抗原特異的T細胞の増殖または遺伝子変換を通じた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)。ウイルス抗原特異的T細胞の移入は、移植に関連したウイルス感染および稀なウイルス関連悪性疾患の処置のために使用されている、よく確立された手法である。同様に、腫瘍特異的T細胞の単離および移入は、黒色腫の処置において成功が示されている。

20

【0003】

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。一般に、CARの結合モエティは、フレキシブルリンク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、单鎖抗体(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、CD3鎖またはFc受容体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、より長期間の増殖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細胞の生存を強化し、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)。

30

【0004】

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、エクスピボで選択され、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)の投与で操作されてもよい。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

40

50

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。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。同種異系細胞を効果的に使用するためには、これらの問題はいずれも克服しなければならない。

10

【0005】

免疫能力のある宿主では、同種異系細胞は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(Boni, Muranski et al. 2008)。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(Coutinho and Chapman 2011)。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、顆粒球および骨髓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。

20

【0006】

他方で、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本の鎖および鎖から作られ、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の鎖および鎖はそれぞれ、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、鎖および鎖の可変領域は、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を導入される。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 Klusen or 1990)。TCRまたはTCRを不活性化すると、T細胞表面からTCRが無くなり、それによって、アロ抗原の認識を阻止し、従って、GVHDを阻止することができる。しかしながら、TCRが破壊されるとCD3シグナル伝達成分が無くなり、さらなるT細胞増殖の手段が変化する。

30

40

50

【0007】

適応免疫応答は、多数の細胞成分が相互作用する複雑な生物系である。プロフェッショナル抗原提示細胞（APC）は、異物を処理し、それをMHCクラスII分子と共にヘルパーT細胞へ曝すことができる。活性化されたヘルパーT細胞は、次に、B細胞応答および細胞傷害性T（CTL）細胞応答を刺激するであろう。CTLは、MHCクラスI分子によって提示された外来ペプチドを認識するが、アロ反応性の場合には、外来MHCクラスIを保持する細胞を認識して死滅させる。MHCクラスI分子は、2種のエンティティ：高度に多形性の膜貫通重鎖と、小さい不变ポリペプチド、B2M遺伝子によってコードされた2ミクログロブリン（2m）とから構成される。細胞表面におけるMHCクラスI重鎖の発現は、2mとの会合を必要とする。従って、CAR T細胞における2m発現の消失は、MHCクラスI発現を損ない、それらを宿主CTLに対して不可視にするであろう。しかしながら、MHCクラスI欠損CAR T細胞は、MHCクラスI分子を欠く細胞を標的とする宿主NK細胞による溶解に対して感受性である（Ljunggren HG et al. (1990), Immunol Today. 11:237-244）。 10

【0008】

NK細胞は、種々の単形性または多形性の受容体を通して受容した活性化シグナルと阻害シグナルとの間のバランスに基づき、相互作用した細胞に対して細胞傷害機能を発揮する。ヒトNK細胞上の1種の中心的な活性化受容体は、NKG2Dであり、そのリガンドには、MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3のようなタンパク質が含まれる（Raulet DH, (2003), Nature Reviews Immunology 3(10):781-79）。他方、阻害シグナルは、LIR-1/ILT2のようなNK受容体とMHCクラスI分子との間の相互作用を通して媒介される（Ljunggren HG et al. (1990), Immunol Today. 11:237-244）。サイトメガロウイルスのようないくつかのウイルスは、NK細胞によって媒介される免疫監視を回避するための機序を獲得している。HCMVゲノムは、NKによって媒介される細胞溶解を阻止するためのデコイとして作用するMHCクラスI相同体タンパク質（UL18）を発現しながら、MHCクラスI表面発現を防止することができるタンパク質（即ち、US2、US3、US6、およびUS11）をコードする（Kim, Y et al. (2008), PLOS Pathogens. 4:e1000123 および Wilkinson G. et al. (2010). J Clin Virol. 41(3):206-212）。さらに、HCMVは、NKG2Dリガンドに結合し、表面発現を防止することができるタンパク質を分泌することによって、NKG2D経路に干渉する（Welte SA et al. (2003), Eur J Immunol. 33(1):194-203）。腫瘍細胞においては、ULBP2、MICB、またはMICAのようなNKG2Dリガンドを分泌することによって、NKG2D応答を回避するための、いくつかの機序が進化している（Waldhauer I, Steinle A (2003)。腫瘍細胞からの可溶性UL16結合タンパク質2のタンパク質分解による放出（Proteolytic release of soluble UL16-binding protein 2 from tumor cells.）Cancer Res 2006;66(5):2520-2526；Salih HR et al. (2006), Hum Immunol. 2006 Mar;67(3):188-95；Salih HR et al. (2003) Blood. 2003 Aug 15;102(4):1389-96；Salih HR et al. (2002) J Immunol. ;169(8):4098-102）。 20

【0009】

宿主免疫系から逃れるため、多くの戦略がウイルスによって使用される。レトロウイルスエンベロープを発現する腫瘍細胞は、インビオの免疫拒絶から逃れる（Mangeney M et al. (1998). Proc.Natl.Acad.Sci. 95:14920；Quintana F. et al. (2005). J.Clin.Invest. 115:2149；Bloch I. et al. (2007), FASEB J. 21:393）。モロニーマウス白血病ウイルスならびにレンチウイルス（HIV 1およびHIV 2）のようなレトロウイルスは、エンベロープタンパク質gp41を通して、免疫抑制活性を発揮することが示されている（Morozov V. et al. (2012), Retrovirology. 9:67；Denner J. et al. (2013), PLOS ONE. 8:e55199；Schlecht-Louf G et al (2014). J.Virology. 88:992）。このウイルスタンパク質の主な機能は、ウイルスと細胞膜との間の融合を促進することであるが、gp41の異なるドメインが、T細胞の活性化および増殖を阻害することができる。ISU（免疫抑制単位（ImmunoSuppressive Unit））と呼ばれる第1のものは、gp41のNヘリカルリピートのC末端部分に位置する（Mangeney M et al. (1998). Proc.Natl.Acad.Sci. 95:14920；Morozov V. et al. (2012), Retrovirology. 9:67；Denner J. et al. (2013), PLOS ONE. 8:e55199；Schlecht-Louf G et al (2014). J.Virology. 88:992）。その作用モードは、十分に確立されていないが、カルシウム流入およびP 30

KC(プロテインキナーゼC)機能に干渉するようである。FP(融合ペプチド(fusion peptide))と呼ばれる第2のものは、タンパク質のN末端部分に位置し、TCR鎖と直接相互作用して、TCR複合体の組み立てを防止する(Cohen T et al(2010), PLOS Pathogens. 6:e1001085; Faingold O et al, (2012), J.Biol.Chem. 287:33503)。ISUおよびFPの両方が、完全タンパク質、膜貫通タンパク質、短縮膜貫通タンパク質、または合成ペプチドとして免疫抑制性であることが示されている。

【0010】

T細胞性免疫は、免疫応答を微調整する、共刺激シグナルと阻害シグナルとのバランスによって調節される複数の連続した段階を含む。免疫チェックポイントと呼ばれる阻害シグナルは自己寛容の維持に重要であり、免疫を介した組織への付帯的損害を制限するにも重要である。腫瘍は免疫チェックポイントタンパク質の発現を調節解除することができる。腫瘍がこれらの阻害経路を勝手に使う能力は免疫耐性における重要な機構であり、免疫療法の成功を制限する。治療的T細胞免疫応答を活性化する有望なアプローチの1つは、これらの免疫チェックポイントの遮断である(Pardoll 2012)。免疫チェックポイントは、癌における機能的細胞免疫の活性化に対する大きな障壁であり、CTLA4およびprogrammed death-1(PD-1)を含むT細胞上にある阻害リガンドに特異的なアンタゴニスト抗体は、クリニックにおいて評価されている標的薬剤の例である。

10

【0011】

細胞傷害性Tリンパ球抗原4(CTLA-4; CD152とも知られる)はT細胞活性化の大きさ(amplitude)をダウンレギュレートする。黒色腫患者におけるアンタゴニストCTLA4抗体(イピリムマブ)による処置は生存利益を示した(Robert and Mateus 2011)。Programmed cell death protein 1(PD1またはPDCD1。CD279とも知られる)は、免疫療法のための、別の極めて有望な標的である(Pardoll and Drake 2012; Pardoll 2012)。CTLA-4とは対照的に、PD1は、感染症に対する炎症応答時に末梢組織におけるT細胞エフェクター機能を制限し、自己免疫を制限する。PD1抗体を用いた初の臨床試験は、いくつかの腫瘍退縮症例を示している(Brahmer, Drake et al. 2010)。複数のさらなる免疫チェックポイントタンパク質が、最近の研究に基づく治療的遮断のための有望な標的である。

20

【0012】

WO2013/173223A出願は、PD-1および/またはPD-L1に対する抗体の投与によってPD-1-PD-L1経路が破壊される免疫治療の方法を記載している。この阻害性免疫制御剤は、患者の選択を可能にし、かつオントリートメント管理をガイドするため、バイオマーカーとして使用される。

30

【0013】

Pegram et al.(2012)は、インターフェロンIL-12を分泌するよう改変された、腫瘍を標的とするT細胞が、照射、リンパ枯渇化学療法、および/または付加的なサイトカイン補助のような前処置の必要なしに、マウスモデルにおいて全身腫瘍を根絶し得ることを示した。

【0014】

Rong et al.(2014)は、CTLA-4 IgおよびPD-L1が、いずれも、単独では十分でなかったため、免疫防御を付与するためには、その両方の発現が、ヒト胚性幹細胞(hESC)において必要とされることを証明した。このアプローチは、ヒト胚性幹細胞のマウスへの同種移植を補助するために使用されている。

40

【0015】

前記の先行技術(WO2013/173223A、Pegram et al.、およびRong Z et al.)の3件全てにおいて、TCRのような自己認識系は機能性のまま維持されており、従って、生着させられた細胞の宿主における持続性が制限された。しかしながら、癌免疫治療または他の適応症における処置として同種CAR T細胞を使用し得るようにするためには、移植片対宿主病(GvHD)のリスクおよび患者による治療用細胞の拒絶のリスクを軽減しなければならない。同種細胞は、リンパ枯渇計画を受容した患者において生存することができるが、その治療活性は、リンパ枯渇の持続時間によって制限される。

50

【0016】

生存を延長し、治療活性を増強するため、本発明者らは、患者の免疫系が活性でありながら、治療用同種T細胞の拒絶を防止する方法を、本明細書に記載する。この方法は、細胞膜においてまたは細胞膜を通して、免疫抑制ポリペプチドを異所発現しかつ/または分泌するよう治療用細胞を操作することによる、局所的な免疫防御を生み出すことからなる。そのようなポリペプチドの様々なパネル、具体的には、免疫チェックポイントのアンタゴニスト、またはウイルスエンベロープに由来するもの、またはNKG2Dリガンドが、宿主における同種免疫細胞の持続性および/または生着を増強し得ることが見出された。よりよい効力のため、この局所的な免疫抑制効果は、自己/非自己認識に関する遺伝子の不活化によって完成し、それによって、生着のためのこれらの操作された免疫細胞は「既製の」生成物として入手可能となる。

10

【発明の概要】**【0017】**

本発明は、宿主生物における持続性を増加させかつ/または生着を容易にし、それによって、移植片対宿主病（GvHD）のリスクを低下させることによって免疫治療目的のために適当なものとするため、T細胞のような免疫細胞を操作する方法を開示する。より具体的には、本発明は、自己抗原および非自己抗原の認識に関するポリペプチドをコードする少なくとも1種の内在性遺伝子を1種の免疫細胞において不活化し、その後、少なくとも1種の非内在性免疫抑制ポリペプチドと操作された免疫細胞を接触させる方法に関する。

20

【0018】

一つの局面において、不活化は、好ましくは、TALEヌクレアーゼのような特異的なレアカットエンドヌクレアーゼを使用することによって、TCRおよび/または2M遺伝子に対して実施される。

【0019】

さらなる局面において、宿主対移植片（HvG）、即ち、同種移入された免疫細胞を攻撃する宿主免疫細胞による、養子移入された同種免疫細胞の枯渇を防止するため、接触工程は、不活性PD1および/またはCTLA-4リガンドの免疫細胞自体による発現によって実現される。本発明による別法は、ウイルスマHC相同事体、NKG2Dリガンド、および/またはウイルスenv免疫抑制ドメイン（ISU）、またはウイルスFPタンパク質の発現を提供する。

30

【0020】

また、本発明の範囲内で、少なくとも1種の非内在性免疫抑制ポリペプチドとの操作された免疫細胞のインキュベーションが、免疫抑制ポリペプチドの発現の代わりに使用されてもよい。CD80/CD86抗体は、インキュベーションにおいて使用される免疫抑制ポリペプチドとして好ましい。

【0021】

免疫治療のために適切な改変された免疫細胞は、特異的な細胞認識のためのキメラ抗原受容体（CAR）をコードする外来性組換えポリヌクレオチドをさらに含んでいてよい。本明細書に記載されたタンパク質、ポリペプチド、またはベクターのいずれかを含む、得られた単離された細胞または細胞株は、治療用生成物として、理想的には、低下した移植片対宿主病（GvHD）リスクおよび延長された寿命を有する「既製の」生成物として使用するためのものである。

40

【0022】

そのような操作された免疫細胞を投与することによって患者における癌または感染を処置するかまたは防止する方法も記載される。

【0023】**図面および表の簡単な説明**

前記のものに加えて、本発明は、以下の説明および添付の図面から明らかになるであろう特色をさらに含む。本発明およびその付随する利点の多くのより完全な理解は、下記の詳細な説明と共に以下の図面を参照することによってよりよく理解されるため、容易に入手されるであろう。

50

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】付加的な遺伝子改変を有しない同種CAR T細胞と、多様な宿主免疫細胞（CD8+ T細胞、CD4+ T細胞、樹状細胞のようなAPC、およびNK細胞）との間の可能性のある相互作用の模式図。記号（+）は活性化、記号（-）は阻害を表す。CAR T細胞は、CARのscFvによって認識される細胞表面抗原を提示する標的腫瘍細胞と遭遇することによって活性化される。同種CAR T細胞と宿主NK細胞との間の相互作用は、NK細胞の阻害剤によるMHC Iの認識によって阻害される。宿主細胞傷害性T細胞（CD8+T細胞）の活性化は、CAR T細胞のMHC I成分のTCRによる結合によって起こる。同種T CAR細胞に対する宿主NK細胞の作用も、MHC I認識を介して阻害される。

10

【図2】分泌型CTLA-4 Igを発現する同種CAR T細胞と、多様な宿主免疫細胞（CD8+ T細胞、CD4+ T細胞、樹状細胞のようなAPC、およびNK細胞）との間の可能性のある相互作用の模式図。記号（+）は活性化、記号（-）は阻害を表す。CAR T細胞は、CARのscFvによって認識される細胞表面抗原を提示する標的腫瘍細胞と遭遇することによって活性化される。NK細胞とCAR T細胞との間の相互作用は不变のままである。分泌されたCLTA-4 Igは、APC細胞および腫瘍細胞の表面上のCD80/CD86抗原に結合し、従って、（ここでの樹状細胞のような）APC細胞とCAR T細胞との間の相互作用を不活性化する。従って、CLTA-4 Igの分泌は局所的な免疫防御を生み出す。

20

【図3】膜結合型PD-L1を発現し、PD-1遺伝子がKOによって不活性化されている同種CAR T細胞と、多様な宿主免疫細胞（CD8+ T細胞、CD4+ T細胞、樹状細胞のようなAPC、およびNK細胞）との間の可能性のある相互作用の模式図。記号（+）は活性化、記号（-）は阻害を表す。CAR T細胞と腫瘍細胞およびNK細胞との間の可能性のある相互作用は不变のままである。同種CAR T細胞によるPD-L1の発現は、宿主CD8+T細胞のPD-1受容体とのPD-L1の結合のため、同種CAR T細胞を宿主CD8+T細胞に対して非感受性にする。従って、PD-L1は、患者のT細胞においてT細胞阻害経路を誘発し、この効果は、同種のPD-1遺伝子が不活性化される時、より顕著である。

30

【図4】分泌型PD-L1を発現し、PD-1遺伝子がKOによって不活性化されている同種CAR T細胞と、多様な宿主免疫細胞（CD8+ T細胞、CD4+ T細胞、樹状細胞のようなAPC、およびNK細胞）との間の可能性のある相互作用の模式図。記号（+）は活性化、記号（-）は阻害を表す。CAR T細胞と腫瘍細胞およびNK細胞との間の可能性のある相互作用は不变のままである。同種CAR T細胞によって分泌されたPD-L1は、PD-1受容体によって宿主のCD8+ T細胞およびCD4+T細胞に結合し、PD-L1/PD-1経路を阻害することができる。従って、PD-L1は、患者のT細胞においてT細胞阻害経路を誘発し、この効果は、同種のPD-1遺伝子が不活性化される時、より顕著である。

40

【図5】ウイルスenv免疫抑制ドメイン（ISU）を発現する同種CAR T細胞と、多様な宿主免疫細胞（CD8+ T細胞、CD4+ T細胞、樹状細胞のようなAPC、およびNK細胞）との間の可能性のある相互作用の模式図。記号（+）は活性化、記号（-）は阻害を表す。CAR T細胞と腫瘍細胞およびNK細胞との間の可能性のある相互作用は不变のままである。ウイルスISUの発現は、おそらく、IL-10インターロイキンの産生の低下によって、宿主T細胞およびAPC細胞による同種CAR T細胞の認識を阻害し、従って、免疫抑制効果を生みだすようである。

【図6】KOによって不活性化されたB2M遺伝子を有する同種CAR T細胞と、多様な宿主免疫細胞（CD8+ T細胞、CD4+ T細胞、樹状細胞のようなAPC、およびNK細胞）との間の可能性のある相互作用の模式図。記号（+）は活性化、記号（-）は阻害を表す。CAR T細胞と腫瘍細胞との間の可能性のある相互作用は不变のままである。MHC Iの1個の成分であるB2M遺伝子の不活性化は、宿主細胞傷害性T細胞（CD8+）およびNK細胞との相互作用に関して後者を非機能性にする。次いで、NK細胞は、NKG2D/NKG2Dリガンドのような活性化経路を介して同種CAR T細胞に対して活性化を発揮する。

【図7】KOによって不活性化されたB2M遺伝子を有し、ウイルスMHC I相同体を発現する同種CAR T細胞と、多様な宿主免疫細胞（CD8+ T細胞、CD4+T細胞、樹状細胞のようなAPC、およ

50

びNK細胞)との間の可能性のある相互作用の模式図。記号(+)は活性化、記号(-)は阻害を表す。CAR T細胞と腫瘍細胞との間の可能性のある相互作用は不变のままである。先の図面(B2M KOのみ)に関しては、CAR T細胞と宿主CD8+T細胞との間の相互作用が弱められる。この場合、ウイルスMHCⅠ相同体の発現は、MHCⅠ/阻害剤受容体を介してNK細胞との相互作用を非機能性にする。ウイルスMHCⅠ相同体の発現と組み合わせられたB2MのKOによる同種CAR T細胞の二重遺伝子改変は、免疫抑制性の防御を強化する。

【図8】KOによって不活化されたB2M遺伝子を有し、可溶性NKG2Dリガンドを発現する同種CAR T細胞と、多様な宿主免疫細胞(CD8+T細胞、CD4+T細胞、樹状細胞のようなAPC、およびNK細胞)との間の可能性のある相互作用の模式図。記号(+)は活性化、記号(-)は阻害を表す。CAR T細胞と腫瘍細胞との間の可能性のある相互作用は不变のままである。

先の図面(B2M KOのみ)に関しては、CAR T細胞と宿主CD8+T細胞との間の相互作用が弱められる。可溶性NKG2Dリガンドの発現は、NK細胞との相互作用を不活化する別的方式である。この場合、可溶性NKG2Dリガンドは、NK細胞上のNKG2D受容体に結合することができるが、阻害性の競合を発揮するCAR T細胞のNKG2Dリガンドとは対照的に、作用を発揮しない。可溶性NKG2Dリガンドの発現と組み合わせられたB2MのKOによる同種CAR T細胞の二重遺伝子改変は、免疫抑制性の防御を強化する。

【図9】可能性のある宿主対移植片反応(HvG)を例示する同種CAR T細胞養子免疫治療の一般的なスキーム。ここには、急性リンパ芽球性白血病(ALL)に罹患した患者を処置することを目標とした抗CD19キメラ抗原受容体(CAR)による例が表される。健常ドナーからの同種T細胞の精製、活性化および増殖、CAR形質導入、ならびに最終的なALL患者への注入の工程の後には、これらの同種CAR T細胞に対する宿主免疫攻撃(HvG)の高いリスクが存在する。

【図10】同種CAR T細胞養子移入の後に宿主患者において起こるHvG反応を防止するためのPD-L1の再発現を記載したスキーム。A.初代T細胞の細胞表面におけるPD-L1の再発現を介したHvG反応防止のスキーム。B.PD-L1発現の非存在下でのHvG反応のスキーム。

【図11】同種T細胞の存在下での活性化に関する受容体の名称と共に、宿主抗原提示細胞(APC)および宿主T細胞を含むHvG反応を記載したスキーム。A.HvG反応のスキーム。B.同種T細胞によるCTLA4-Igの排出におけるHvG防止のスキーム。

【図12A】T細胞またはCARツールT細胞の表面におけるPD-L1の発現のフローサイトメトリーによる特徴決定。

【図12B】T細胞またはCARツールT細胞の表面におけるPD-L1の発現のフローサイトメトリーによる特徴決定。

【図12C】T細胞またはCARツールT細胞の表面におけるPD-L1の発現のフローサイトメトリーによる特徴決定。

【図13】PD-L1を発現する操作されたCAR T細胞の関連腫瘍細胞および非関連腫瘍細胞(それぞれ、ダウディ細胞およびK562細胞)に対する特異的細胞溶解活性。AおよびBは異なる血液ドナーを示す。

【図14】培養培地中のCAR T細胞によるCTLA4a IgおよびCTLA4b Igの排出のELISA検出。A.培養培地中のCTLA4 Igの量を定量化するために使用された標準曲線。B.CTLA4a IgまたはCTLA4b Igのいずれかをコードする10 μgまたは20 μgのmRNAをトランスフェクトされた、操作されたCAR T細胞の培養培地上清中のCTLA4a IgおよびCTLA4b Igの検出。

【図15】CTLA4a Igを発現する操作されたCAR T細胞の関連腫瘍細胞および非関連腫瘍細胞(それぞれ、ダウディ細胞およびK562細胞)に対する特異的細胞溶解活性。

【図16】T細胞における2-m発現のFACS分析。トランスフェクトされていないT細胞(上)ならびにトランスフェクトされたT細胞(中央および下)を、生存度(左)および2-m発現(右)についてFACSによって分析する。

【図17】MOI=5で、対照LV(PD-L1)を形質導入された操作されたCAR T細胞、CTLA4 Ig LV単独を形質導入された改変CAR T細胞、またはPD-L1およびCTLA4 Ig LVによって同時形質導入された改変CAR T細胞の培養培地上清中のCTLA4 Igの検出。14日齢培養物由来の上清を、1/1000e希釈(斜線付きバー)または1/5000e希釈(黒色バー)で、ELISAによって試験

10

20

30

40

50

する。灰色バーは、両方の希釈からの平均力値を表す。

【図18】示された刺激に対する応答における、ドナー1由来のCFSE陰性T細胞の定量化（灰色バー）、CD3+ T細胞の定量化（黒色バー）、およびT細胞生存度（斜線付きバー）のための混合リンパ球反応。D1およびD2は、それぞれ、ドナー1およびドナー2に相当する。左から右へ：(a) 未処理のドナー1由来のPBMCを単独で培養した；(b) 増加する濃度のPHA（フィトヘマグルチニン - 10 µg/ml、T細胞分裂促進因子）による処理に供されたドナー1由来のPBMCを単独で培養する；(c) ドナー1由来のPBMCを、ドナー2由来の形質導入されていないT細胞と共に培養する；(d) ドナー1由来のPBMCを、ドナー2由来のPD-L1を形質導入されたT細胞と共に培養する；(e) ドナー1由来のPBMCを、ドナー2由来のCTLA4Igを形質導入されたT細胞と共に培養する；(f) ドナー1由来のPBMCを、ドナー2由来のPD-L1およびCTLA4Igによって同時形質導入されたT細胞と共に培養する。

【図19】（グラフの下に示される）示された異なる操作されたCAR T細胞を、特異的な標的細胞（MOLM-13；CD123抗原発現）および対照陰性細胞（ダウディ）と、10:1のE:T比で4時間インキュベートする細胞傷害アッセイ。標的細胞死を、フローサイトメトリーによって測定し、非特異的な死滅（ダウディ）に対して正規化する。

【図20】（グラフの下に示される）示された異なる操作されたCAR T細胞を、特異的な標的細胞（MOLM-13）および対照陰性細胞（ダウディ）と、10:1（斜線付きバー）、5:1（黒色バー）、および1:1（灰色バー）のE:T比で4時間インキュベートする細胞傷害アッセイ。標的細胞死を、フローサイトメトリーによって測定し、非特異的な死滅（ダウディ）に対して正規化する。

【図21】インビボ実験のアウトラインスキーム。NOGマウスに、まず、MOLM-13（luc/GFP）腫瘍細胞株を注射し、7日後に、操作されたCAR T細胞を注射する。腫瘍進行を生物発光（Biolum）分析および全体の生存を介してモニタリングする。

【図22】フローサイトメトリーによって、CAR CD123およびPD-L1の細胞表面発現について、操作されたT細胞をモニタリングする。

【図23A】図23は、NOGマウスにおける腫瘍を示すD-1～D14の生物発光イメージング。写真内の暗色スポットは腫瘍を表す。マウスへ注射されたT細胞の異なる群を、以下のように提示する。図23A：トランスフェクトされていないT細胞（CARなしT細胞）または抗CD123 CARをトランスフェクトされたT細胞（CAR T CD123）。

【図23B】図23は、NOGマウスにおける腫瘍を示すD-1～D14の生物発光イメージング。写真内の暗色スポットは腫瘍を表す。マウスへ注射されたT細胞の異なる群を、以下のように提示する。図23B：抗CD123 CARによってトランスフェクトされ、CTLA4Igを形質導入されたT細胞（CAR T CD123/CTLA4Ig）；抗CD123 CARによってトランスフェクトされ、PD-L1を形質導入されたT細胞（CAR T CD123/PDL1）；抗CD123 CARによってトランスフェクトされ、CTLA4IgおよびPD-L1を形質導入されたT細胞（CAR T CD123/PDL1/CTLA4Ig）。

【図24】成分：抗原に特異的VH鎖およびVL鎖、ヒンジ、膜貫通ドメイン(TM)、共刺激ドメイン（4-1BB）、ならびにシグナリング伝達ドメイン（CD3）を含み、任意で、リinkerを含む、異なる単鎖キメラ抗原受容体CAR構成（V1～V6）の模式図。

【発明を実施するための形態】

【0025】

表1：2m TALEヌクレアーゼ配列の説明

【0026】

表2：2種の異なるPDC1遺伝子標的についての2対のTALENのポリヌクレオチド配列が提示される。

【0027】

表3：CLTA-4a、CTLA-4b、およびPD-L1を発現するプラスミド構築物のポリヌクレオチド配列。

【0028】

表4：多様なウイルス由来のISUドメインバリエントのポリペプチド配列。

【0029】

10

20

30

40

50

表5：ウイルスMHC相同体(UL18)およびNKG2Dリガンドのパネルのポリペプチド配列。

【0030】

表6：天然起源および人工起源に由来するFPポリペプチドのアミノ酸配列。

【0031】

表7：TRACおよびTRBC TALEヌクレアーゼならびにヒトの対応する遺伝子におけるTALEヌクレアーゼ標的部位の配列の説明。

【0032】

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。

10

【0033】

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。

20

【0034】

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,Thir d Edition,(Sambrook et al,2001,Cold Spring Harbor,New York:Cold Spring Harbor La boratory 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 An imal Cells(R.I.Freshney,Alan R.Liss,Inc.,1987) ; Immobilized Cells And Enzymes(IR L 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.,Ne w York)、特に、第154巻および第155巻(Wu et al.ed.)および第185巻、"Gene Expressio n Technology"(D.Goeddel,ed.) ; Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells(J.H.Mill er and M.P.Calos eds.,1987,Cold Spring Harbor Laboratory) ; Immunochemical Method s 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, e ds.,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。

30

【0035】

一般的な局面において、本発明は、癌および感染症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。

40

【0036】

本発明は、以下の主要な態様に関する：

(1) 以下の工程を含む、同種免疫細胞の持続性および/または生着を増加させる方法：

(a) 同種細胞を準備する工程；

(b) 自己抗原および非自己抗原の認識に関与するポリペプチドをコードする少なくとも1種の内在性遺伝子を不活化することによって、該細胞を改変する工程；ならびに

(c) 少なくとも1種の非内在性免疫抑制ポリペプチドと免疫細胞を接触させる工程。

50

【 0 0 3 7 】

(2) 免疫細胞が造血細胞である、態様1の方法。

【 0 0 3 8 】

(3) 免疫細胞が初代細胞である、態様1または態様2の方法。

【 0 0 3 9 】

(4) 工程(c)における発現または接触がT制御性細胞を特異的に阻害しない、態様1~3のいずれかによる方法。

【 0 0 4 0 】

(5) 工程(c)における発現または接触がCD8+T細胞を特異的に阻害する、態様1~4のいずれかの方法。 10

【 0 0 4 1 】

(6) 工程(c)が、少なくとも1種の非内在性免疫抑制ポリペプチドの分泌を指示する少なくとも1種の非内在性ポリヌクレオチドの、免疫細胞における発現によって実施される、態様1~態様5による方法。

【 0 0 4 2 】

(7) 工程(c)が、PD-1をコードする遺伝子の発現の不活化をさらに含有する、態様1~態様6による方法。

【 0 0 4 3 】

(8) PD-1遺伝子の不活化が、SEQ ID NO:11~12および13~14のTALEヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを使用することによって実施される、態様7による方法。 20

【 0 0 4 4 】

(9) 工程(b)におけるポリペプチドが、TCR、MHCクラスI成分、b-2ミクログロブリン(B2M)、TAP1、およびLMP(large multifunctional protease)2の中から選択される、態様1~8のいずれかによる方法。

【 0 0 4 5 】

(10) 工程(c)におけるポリペプチドが、PDL-1、CTLA-4、ウイルスMHC相同体、NKG2Dリガンド、ウイルスenv免疫抑制ドメイン(ISU)、またはウイルスFPタンパク質の中から選択される、態様1~9のいずれかによる方法。

【 0 0 4 6 】

(11) 工程(b)がB2Mの不活化によって実施され、工程(c)が同種免疫細胞における不活性PDL-1リガンドの発現によって実施される、態様1~10のいずれかによる方法。 30

【 0 0 4 7 】

(12) 工程(c)における付加的な変更が、同種免疫細胞におけるCTLA-4免疫グロブリンの発現によって実施される、態様1~11のいずれかによる方法。

【 0 0 4 8 】

(13) 発現されるCTLA-4免疫グロブリンをコードする核酸分子が、SEQ ID NO:16~17と少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは95%の同一性を有する、態様12による方法。

【 0 0 4 9 】

(14) 工程(b)がTCRの不活化によって実施され、工程(c)が同種免疫細胞による不活性PDL-1リガンドの発現によって実施される、態様1~13のいずれかによる方法。 40

【 0 0 5 0 】

(15) 工程(c)が、FeLV、MLV、HERVより選択されるウイルスenv免疫抑制ドメイン(ISU)、またはウイルスFPタンパク質を発見させることによって実施される、態様1~10のいずれかによる方法。

【 0 0 5 1 】

(16) 工程(b)がB2Mの不活化によって実施され、工程(c)が同種免疫細胞によるウイルスenv免疫抑制ドメイン(ISU)の発現によって実施される、態様1~10のいずれかの方法。

【 0 0 5 2 】

10

20

30

40

50

(17) 工程 (b) がTCRの不活化によって実施され、工程 (c) が同種免疫細胞によるウイルスenv免疫抑制ドメイン (ISU) の発現によって実施される、態様1~10のいずれかの方法。

【0053】

(18) 発現されるウイルスenv免疫抑制ドメイン (ISU) をコードする核酸分子が、SEQ ID NO:19~38と少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは95%の同一性を有する、態様16または17による方法。

【0054】

(19) 工程 (b) がB2Mの不活化によって実施され、工程 (c) が同種免疫細胞によるウイルスFPタンパク質の発現によって実施される、態様1~10のいずれかの方法。

10

【0055】

(20) 工程 (b) がTCRの不活化によって実施され、工程 (c) が同種免疫細胞によるウイルスFPタンパク質の発現によって実施される、態様1~10のいずれかの方法。

【0056】

(21) 発現されるウイルスFPタンパク質をコードする核酸分子が、SEQ ID NO:48~50と少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは95%の同一性を有する、態様19または20による方法。

【0057】

(22) 工程 (b) がB2Mの不活化によって実施され、工程 (c) が同種免疫細胞によるNKG2Gリガンドの発現によって実施される、態様1~10のいずれかの方法。

20

【0058】

(23) 工程 (b) がTCRの不活化によって実施され、工程 (c) が同種免疫細胞によるNKG2Gリガンドの発現によって実施される、態様1~10のいずれかの方法。

【0059】

(24) 発現されるNKG2Gリガンドをコードする核酸分子が、SEQ ID NO:40~47と少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは95%の同一性を有する、態様22または23による方法。

【0060】

(25) 工程 (b) におけるウイルスマHC相同意体がUL18である、態様1~10のいずれかによる方法。

30

【0061】

(26) 工程 (b) がB2Mの不活化によって実施され、工程 (c) が同種免疫細胞によるウイルスマHC相同意体UL18タンパク質の発現によって実施される、態様1~10のいずれかの方法。

【0062】

(27) 工程 (b) がTCRの不活化によって実施され、工程 (c) が同種免疫細胞によるウイルスマHC相同意体UL18タンパク質の発現によって実施される、態様1~10のいずれかの方法。

【0063】

(28) 発現されるウイルスマHC相同意体UL18をコードする核酸分子が、SEQ ID NO:39と少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは95%の同一性を有する、態様26または27による方法。

【0064】

(29) 工程 (c) が、少なくとも1種の非内在性免疫抑制ポリペプチドとの免疫のインキュベーションによって実施される、態様1~5または態様8~9のいずれかによる方法。

【0065】

(30) 非内在性免疫抑制ポリペプチドが抗CD80 mAbまたは抗CD86 mAbである、態様29による方法。

【0066】

(31) 工程 (b) における遺伝子不活化が、TALヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、またはRNA誘導型エンドヌクレアーゼを使用することによって実施される、態様1または30のいずれかによる方法。

50

【 0 0 6 7 】

(32) 工程(b)における遺伝子不活化が、TALヌクレアーゼを使用して実施される、態様1または31のいずれかによる方法。

【 0 0 6 8 】

(33) 工程(b)における遺伝子不活化が、RNA誘導型エンドヌクレアーゼを使用することによって実施される、態様1～31のいずれかによる方法。

【 0 0 6 9 】

(34) RNA誘導型エンドヌクレアーゼがCas9である、態様33による方法。

【 0 0 7 0 】

(35) 工程(b)における遺伝子不活化が、TCRをコードする遺伝子の発現を阻害する核酸分子を使用することによって実施される、態様1～10、11～15、17～18、20～21、23～25、または27～34のいずれかによる方法。 10

【 0 0 7 1 】

(36) TCR遺伝子の不活化が、SEQ ID NO:52～53、55～56、62～63、および65～66のTALEヌクレアーゼを使用することによって実施される、態様32による方法。

【 0 0 7 2 】

(37) 工程(b)における遺伝子不活化が、B2Mをコードする遺伝子の発現を阻害する核酸分子を使用することによって実施される、態様1～12、13～16、18～19、21～22、24～26、または28～34のいずれかによる方法。

【 0 0 7 3 】

(38) B2M遺伝子の不活化が、SEQ ID NO:2～3、5～6、および8～9のTALEヌクレアーゼを使用することによって実施される、態様32による方法。 20

【 0 0 7 4 】

(39)(d) 悪性細胞または感染細胞の表面に発現された少なくとも1種の抗原に対するキメラ抗原受容体(CAR)をコードするヌクレオチド配列を含む外来性核酸分子をT細胞へ導入する工程：をさらに含む、態様1～38のいずれかによる方法。

【 0 0 7 5 】

(40) キメラ抗原受容体が、SEQ ID NO: 67(CD19抗原)、SEQ ID NO: 68(CD38抗原)、SEQ ID NO: 69(CD123抗原)、SEQ ID NO: 70(CS1抗原)、SEQ ID NO: 71(BCMA抗原)、SEQ ID NO: 72FLT-3抗原)、SEQ ID NO: 73(CD33抗原)、SEQ ID NO: 74(CD70抗原)、SEQ ID NO: 75(EGFR-3v抗原)、およびSEQ ID NO: 76(WT1抗原)との80%超、好ましくは90%超、より好ましくは95%超の同一性を有する抗原性標的配列を有するscFv(VH鎖およびVL鎖)を含む、態様39による方法。 30

【 0 0 7 6 】

(41)(d) 得られた操作されたT細胞を増殖させる工程をさらに含む、態様1～40のいずれかによる方法。

【 0 0 7 7 】

(42) 態様1～41のいずれかによる方法を使用することによって入手可能な改変T細胞、好ましくは、単離された操作されたT細胞。

【 0 0 7 8 】

(43) 医薬として使用するための、態様42による操作されたT細胞。 40

【 0 0 7 9 】

(44) 癌またはウイルス感染の処置において使用するための、態様42または態様43による操作されたT細胞。

【 0 0 8 0 】

(45) リンパ腫の処置において使用するための、態様42～44のいずれかによる操作されたT細胞。

【 0 0 8 1 】

(46) 処置される患者に由来する、態様42～45のいずれかによる操作されたT細胞。

【 0 0 8 2 】

(47) ドナーに由来する、態様42～45のいずれかによる操作されたT細胞。

【0083】

(48) 態様42～47のいずれかによる少なくとも1種の操作されたT細胞を含む組成物。

【0084】

本発明は、より具体的には、以下の態様に関する：

(1) 以下の工程を含む、宿主免疫細胞の存在下での同種免疫細胞の持続性および/または生着を増加させる方法：

(a) 同種細胞を準備する工程；

(b) 自己抗原および非自己抗原の認識に関与するポリペプチドをコードする少なくとも1種の内在性遺伝子を不活性化することによって、該細胞を改変する工程；ならびに 10

(c) 同種免疫細胞との相互作用を防止する効果を有する少なくとも1種の非内在性免疫抑制ポリペプチドと、免疫細胞を接触させる工程。

【0085】

(2) 工程(b)におけるポリペプチドが、TCR、MHCクラスI成分、b-2ミクログロブリン(B2M)、TAP1、およびLMP2の中から選択される、態様1による方法。

【0086】

(3) 工程(c)における免疫抑制ポリペプチドが、膜結合型および/または分泌型で存在する、態様1または2による方法。

【0087】

(4) 工程(c)が、前記免疫細胞の膜表面結合型の1種の非内在性免疫抑制ポリペプチドをコードする少なくとも1種の非内在性ポリヌクレオチドの、前記免疫細胞における発現によって実施される、態様1～3のいずれかの方法。 20

【0088】

(5) 前記免疫細胞の膜表面結合型の1種の内在性免疫抑制ポリペプチドが、PD-L1リガンドである、態様1～4のいずれかの方法。

【0089】

(6) 発現される膜結合型のPD-L1リガンドをコードする核酸分子が、SEQ ID NO:18と少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは95%の同一性を有する、態様5による方法。

【0090】

(7) 免疫抑制ポリペプチドが分泌型で存在する、態様1～3のいずれかの方法。 30

【0091】

(8) 工程(c)が、前記免疫細胞の分泌型の1種の非内在性免疫抑制ポリペプチドをコードする少なくとも1種の非内在性ポリヌクレオチドの、前記免疫細胞における発現によって実施される、態様1～3または態様7のいずれかによる方法。

【0092】

(9) 発現されるCTLA-4免疫グロブリンをコードする核酸分子が、SEQ ID NO:16～17と少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは95%の同一性を有する、態様8による方法。

【0093】

(10) 工程(c)が、非内在性免疫抑制ポリペプチドであるPD-L1リガンドおよびCTLA-4免疫グロブリンの両方と宿主免疫細胞を接触させることによって実施される、態様1～8のいずれかによる方法。 40

【0094】

(11) 工程(c)が、非内在性免疫抑制ポリペプチドであるPD-L1リガンドおよびCTLA-4免疫グロブリンの両方の免疫細胞における発現によって実施される、態様10による方法。

【0095】

(12) 少なくとも1種の非内在性免疫抑制ポリペプチドの分泌が、分泌型のPD-L1リガンドである、態様11による方法。

【0096】

10

20

30

40

50

(13) 同種免疫細胞において発現される膜結合型のPD-L1リガンドおよびCTLA-4免疫グロブリンをコードする核酸分子が、それぞれ、SEQ ID NO:18およびSEQ ID NO:16～17と少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは95%の同一性を有する、態様9～12のいずれかによる方法。

【0097】

(14) 免疫細胞が初代細胞である、態様1～13のいずれかによる方法。

【0098】

(15) 工程(c)における発現または接触が、T制御性細胞を特異的に阻害しない、態様1～3のいずれかによる方法。

【0099】

(16) 工程(c)における発現または接触が、宿主CD8+T細胞を特異的に阻害する、態様1～15のいずれかによる方法。

【0100】

(17) 工程(c)が、PD-1遺伝子の発現の不活化をさらに含有する、態様1～16のいずれかによる方法。

【0101】

(18) 工程(c)が、膜結合型のPD-L1リガンドをコードする少なくとも1種の非内在性ポリヌクレオチドの前記免疫細胞における発現によって実施され、前記同種細胞のさらなる改変が、PD-1遺伝子の発現の不活化によって実施される、態様1～3のいずれかによる方法。
。

10

【0102】

(19) 工程(c)が、CTLA-4 Igの分泌を指示する少なくとも1種の非内在性ポリヌクレオチドの前記免疫細胞における発現によって実施され、前記同種細胞のさらなる改変が、PD-1遺伝子の発現の不活化によって実施される、態様1～18のいずれかによる方法。

【0103】

(20) 工程(c)が、非内在性免疫抑制ポリペプチドであるPD-L1リガンドおよびCTLA-4免疫グロブリンの両方の前記免疫細胞における発現によって実施され、前記同種免疫細胞のさらなる改変が、PD-1遺伝子の発現の不活化によって実施される、態様1～19のいずれかによる方法。

【0104】

(21) PD-1遺伝子の不活化が、SEQ ID NO:11～12および13～14のTALEヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを使用することによって実施される、態様20記載の方法。

30

【0105】

(22) 工程(c)におけるポリペプチドが、PD-L1、CTLA-4、ウイルスMHC相同体、NKG2Dリガンド、ウイルスenv免疫抑制ドメイン(ISU)、またはウイルスFPタンパク質の中から選択される、態様1～16のいずれかによる方法。

【0106】

(23) 工程(b)がB2Mの不活化によって実施され、工程(c)が同種免疫細胞におけるPD-L1リガンドの発現によって実施される、態様1～4のいずれかによる方法。

【0107】

(24) 工程(b)がTCRの不活化によって実施され、工程(c)が同種免疫細胞によるPD-L1リガンドの発現によって実施される、態様1～4のいずれかによる方法。

40

【0108】

(25) 工程(c)が、FeLV、MLV、HERVより選択されるウイルスenv免疫抑制ドメイン(ISU)、またはウイルスFPタンパク質を発現させることによって実施される、態様1～4のいずれかによる方法。

【0109】

(26) 工程(b)がB2Mの不活化によって実施され、工程(c)が同種免疫細胞によるウイルスenv免疫抑制ドメイン(ISU)の発現によって実施される、態様1～4または態様25のいずれかによる方法。

50

【 0 1 1 0 】

(27) 工程 (b) がTCRの不活化によって実施され、工程 (c) が同種免疫細胞によるウイルスenv免疫抑制ドメイン (ISU) の発現によって実施される、態様1~4のいずれかによる方法。

【 0 1 1 1 】

(28) 発現されるウイルスenv免疫抑制ドメイン (ISU) をコードする核酸分子が、SEQ ID NO:19~38と少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは95%の同一性を有する、態様26または27による方法。

【 0 1 1 2 】

(29) 工程 (b) がB2Mの不活化によって実施され、工程 (c) が同種免疫細胞によるウイルスFPタンパク質の発現によって実施される、態様1~4のいずれかによる方法。 10

【 0 1 1 3 】

(30) 工程 (b) がTCRの不活化によって実施され、工程 (c) が同種免疫細胞によるウイルスFPタンパク質の発現によって実施される、態様1~4または態様29のいずれかによる方法。

【 0 1 1 4 】

(31) 発現されるウイルスFPタンパク質をコードする核酸分子が、SEQ ID NO:48~50と少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは95%の同一性を有する、態様29または30による方法。

【 0 1 1 5 】

(32) 工程 (b) がB2Mの不活化によって実施され、工程 (c) が同種免疫細胞によるNKG2Gリガンドの発現によって実施される、態様1~4のいずれかによる方法。 20

【 0 1 1 6 】

(33) 工程 (b) がTCRの不活化によって実施され、工程 (c) が同種免疫細胞によるNKG2Gリガンドの発現によって実施される、態様1~4または態様32のいずれかによる方法。

【 0 1 1 7 】

(34) 発現されるNKG2Gリガンドをコードする核酸分子が、SEQ ID NO:40~47と少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは95%の同一性を有する、態様32または33による方法。 20

【 0 1 1 8 】

(35) 工程 (b) におけるウイルスマHC相同体がUL18である、態様1~4のいずれかによる方法

【 0 1 1 9 】

(36) 工程 (b) がB2Mの不活化によって実施され、工程 (c) が同種免疫細胞によるウイルスマHC相同体UL18タンパク質の発現によって実施される、態様1~4または態様35のいずれかによる方法。

【 0 1 2 0 】

(37) 工程 (b) がTCRの不活化によって実施され、工程 (c) が同種免疫細胞によるウイルスマHC相同体UL18タンパク質の発現によって実施される、態様1~4または態様36のいずれかによる方法。 40

【 0 1 2 1 】

(38) 発現されるウイルスマHCホモログUL18をコードする核酸分子が、SEQ ID NO:39と少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは95%の同一性を有する、態様36または37による方法。

【 0 1 2 2 】

(39) 工程 (c) が、少なくとも1種の非内在性免疫抑制ポリヌクレオチドとの前記免疫のインキュベーションによって実施される、態様1~38のいずれかによる方法。

【 0 1 2 3 】

(40) 非内在性免疫抑制ポリペプチドが抗CD80 mAbまたは抗CD86 mAbである、態様39による方法。 50

【 0 1 2 4 】

(41) 工程 (b) における遺伝子不活化が、TALヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、またはRNA誘導型エンドヌクレアーゼを使用することによって実施される、態様1～40のいずれかによる方法。

【 0 1 2 5 】

(42) 工程 (b) における遺伝子不活化が、TALヌクレアーゼを使用して実施される、態様41記載の方法。

【 0 1 2 6 】

(43) 工程 (b) における遺伝子不活化が、RNA誘導型エンドヌクレアーゼを使用することによって実施される、態様41による方法。 10

【 0 1 2 7 】

(44) RNA誘導型エンドヌクレアーゼがCas9である、態様43による方法。

【 0 1 2 8 】

(45) 工程 (b) における遺伝子不活化が、TCRをコードする遺伝子の発現を阻害する核酸分子を使用することによって実施される、態様1～18、20～22、24～25、27～28、30～32、または34～41のいずれかによる方法。

【 0 1 2 9 】

(46) TCR遺伝子の不活化が、SEQ ID NO:52～53、55～56、62～63、および65～66のTALEヌクレアーゼを使用することによって実施される、態様45による方法。

【 0 1 3 0 】

(47) 工程 (b) における遺伝子不活化が、B2Mをコードする遺伝子の発現を阻害する核酸分子を使用することによって実施される、態様1～17、20～2、25～26、28～29、31～33、または35～41のいずれかによる方法。 20

【 0 1 3 1 】

(48) B2M遺伝子の不活化が、SEQ ID NO:2～3、5～6、および8～9のTALEヌクレアーゼを使用することによって実施される、態様47による方法。

【 0 1 3 2 】

(49) (d) 悪性細胞または感染細胞の表面に発現された少なくとも1種の抗原に対するキメラ抗原受容体 (CAR) をコードするヌクレオチド配列を含む外来性核酸分子を前記T細胞へ導入する工程：をさらに含む、態様1～48のいずれかによる方法。 30

【 0 1 3 3 】

(50) キメラ抗原受容体が、SEQ ID NO:67 (CD19抗原)、SEQ ID NO:68 (CD38抗原)、SEQ ID NO:69 (CD123抗原)、SEQ ID NO:70 (CS1抗原)、SEQ ID NO:71 (BCMA抗原)、SEQ ID NO:72 (FLT-3抗原)、SEQ ID NO:73 (CD33抗原)、SEQ ID NO:74 (CD70抗原)、SEQ ID NO:75 (EGFR-3v抗原)、およびSEQ ID NO:76 (WT1抗原)との80%超、好ましくは90%超、より好ましくは95%超の同一性を有する抗原性標的配列を有するscFv (VH鎖およびVL鎖) を含む、態様49による方法。

【 0 1 3 4 】

(51) 工程 (c) が、非内在性免疫抑制ポリペプチドであるPD-L1リガンドおよび/またはCTLA-4免疫グロブリンの同種免疫細胞における発現によって実施され、同種免疫細胞が、抗CD123キメラ抗原受容体の発現によってさらに改変されている、態様1～50のいずれかによる方法。 40

【 0 1 3 5 】

(52) 同種免疫細胞のさらなる改変が、PD-1遺伝子の発現の不活化によって実施される、態様51による方法。

【 0 1 3 6 】

(53) (d) 得られた操作されたT細胞を増殖させる工程：をさらに含む、態様1～52のいずれかによる方法。

【 0 1 3 7 】

(54) 態様1～35のいずれかによる方法を使用することによって入手可能な改変T細胞、好 50

ましくは、単離された操作されたT細胞。

【0138】

(55) 医薬として使用するための、態様54による操作されたT細胞。

【0139】

(56) 癌またはウイルス感染の処置において使用するための、態様54または態様55による操作されたT細胞。

【0140】

(57) リンパ腫または白血病の処置において使用するための、態様54～56のいずれかによる操作されたT細胞。

【0141】

(58) 処置される患者に由来する、態様54～57のいずれかによる操作されたT細胞。

【0142】

(59) ドナーに由来する、態様54～57のいずれかによる操作されたT細胞。

【0143】

(60) 態様54～59のいずれかによる少なくとも1種の操作されたT細胞を含む組成物。

【0144】

本発明の前記の局面に関するさらなる詳細が、以下の説明において提供される。

【0145】

免疫治療のための非アロ反応性かつ高度に持続性のT細胞

本発明の第1の局面によると、本発明者らは、いくつかの遺伝子が、同種免疫細胞において発現される時、よりよい効力のため、宿主生物における持続性の増加を可能にし得ることを示した。

【0146】

本発明は、以下の工程を含む、好ましくは宿主免疫細胞の存在下での、同種免疫細胞の持続性および/または生着を増加させる方法に関する：

(i) 同種細胞を準備する工程；

(ii) 自己抗原および非自己抗原の認識に対する応答に関するポリペプチドをコードする少なくとも1種の内在性遺伝子を不活化することによって、該細胞を改変する工程；ならびに

(iii) 少なくとも1種の非内在性免疫抑制ポリペプチドと宿主免疫細胞を接触させる工程。

【0147】

非内在性免疫抑制ポリペプチドは、宿主免疫細胞が同種免疫細胞と相互作用するのを防止する効果を有すると予想される。

【0148】

「持続性」とは、インビボで、拒絶に抵抗し、時間と共に（例えば、数日、数週間、数ヶ月、数年）、数を維持しつゝまたは増加させる細胞の能力をさす。一般に、本発明の操作された免疫細胞は、患者への注入の少なくとも10日後、好ましくは少なくとも20日後、より好ましくは少なくとも25日後、さらに好ましくは少なくとも30日後に、患者の血液中に見出され得る。

【0149】

「生着」とは、インビボの関心対象の既存の部位への細胞の接触および取り込みの過程をさす。

【0150】

「持続性および/または生着の増加」とは、持続性にするために操作された同種免疫細胞の数が、操作されていないもの（即ち、非持続性）が患者へ投与された場合と比較して、処置の過程で、より高いままであることを意味する。患者へ注射される同種免疫細胞（例えば、T細胞）の持続性および/または生着のそのような改善は、免疫細胞に対する宿主免疫系の非応答性の状態を記載する免疫寛容（または「寛容化」）の一部であるが、免疫細胞は、免疫応答を誘発する能力を保持する。

10

20

30

40

50

【0151】

自己抗原および非自己抗原の認識に関する遺伝子の不活化

「自己抗原および非自己抗原の認識」とは、細胞が外来生物に感染しているか否かを査定するため、宿主細胞によって主要組織適合性複合体（MHC）分子上にペプチドが提示される、細胞免疫系によって実施されるスクリーニングを意味する。このスクリーニングは、例えば、TCRまたはTAP1/TAP2またはプロテアーゼ2のような他の膜貫通構造を含む。

【0152】

遺伝子の不活化とは、関心対象の遺伝子が機能性のタンパク質型を発現しないことを意味する。具体的な態様において、方法の遺伝子改変は、レアカットエンドヌクレアーゼが1種の標的遺伝子において特異的に切断を触媒し、それによって、標的遺伝子を不活化するような、操作すべき準備された細胞における、1種のレアカットエンドヌクレアーゼの発現に頼る。レアカットエンドヌクレアーゼによって引き起こされた核酸鎖破損は、一般的には、相同組換えまたは非相同末端結合（NHEJ）という別個の機序を通して修復される。しかしながら、NHEJは、切断の部位におけるDNA配列の変化をしばしばもたらす不完全な修復過程である。機序は、直接再ライゲーションを通して（Critchlow and Jackson 1998）またはいわゆるマイクロホモロジー媒介末端結合を介して（Ma,Kim et al.2003）、2個のDNA末端のうちの残存するものを再接合することを含む。非相同末端結合（NHEJ）を介した修復は、しばしば、小さい挿入または欠失をもたらし、特異的な遺伝子ノックアウトの作製のために使用され得る。改変は、少なくとも1個のヌクレオチドの置換、欠失、または付加であり得る。切断によって誘導された変異誘発イベント、即ち、NHEJイベントに続く変異誘発イベントが起こった細胞は、当技術分野において周知の方法によって、同定されかつ/または選択され得る。

10

20

30

40

【0153】

ヌクレオチド鎖切断は、相同組換えの速度を刺激することが公知である。従って、別の態様において、方法の遺伝子改変工程は、標的核酸配列と外来性核酸との間に相同組換えが起こるよう、標的核酸配列の一部分に相同的な配列を少なくとも含む外来性核酸を細胞へ導入する工程をさらに含む。具体的な態様において、外来性核酸は、それぞれ、標的核酸配列の5'および3'の領域に相同的な第1および第2の部分を含む。これらの態様において、外来性核酸は、標的核酸配列の5'および3'の領域との相同性を含まない、第1の部分と第2の部分との間に位置する第3の部分も含む。標的核酸配列の切断の後、標的核酸配列と外来性核酸との間の相同組換えイベントが刺激される。好ましくは少なくとも50bp、好ましくは100bp超、より好ましくは200bp超の相同配列が、ドナーマトリックス内に使用される。従って、外来性核酸は、好ましくは200bp～6000bp、より好ましくは1000bp～2000bpである。実際、共有された核酸相同性は、切断の部位の上流および下流に隣接する領域に位置し、導入される核酸配列は、2個のアームの間に位置するべきである。

【0154】

好ましい態様によると、遺伝子不活化は、好ましくは、TALヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、またはCas9、Cpf1、もしくはアルゴノートのようなRNA/DNA誘導型エンドヌクレアーゼを使用することによって実施される。

【0155】

より好ましい態様によると、自己抗原および非自己抗原の認識に関する遺伝子の不活化は、TALEヌクレアーゼを使用することによって実施される。これは、特異的なTALEヌクレアーゼによって標的とされた正確なゲノム位置において達成され得、特異的なTALEヌクレアーゼが、相同領域と上記の群より選択される1種の標的遺伝子を不活化するための配列とを連続的に少なくとも含む外来性核酸切断を触媒する。それぞれ特異的に1種の定義された遺伝子を標的とする数種のTALEヌクレアーゼを使用することによって、数種の遺伝子が連続的にまたは同時に不活化されてもよい。TALEヌクレアーゼとは、TALEエフェクター（TALE）に由来するDNA結合ドメインと核酸標的配列を切断する1種のヌクレアーゼ触媒ドメインとからなる融合タンパク質を表す（Boch,Scholze et al.2009；Moscou and Bogdano 2009；Christian,Cermak et al.2010；Cermak,Doyle et al.2011；Geissler,Schol

50

ze et al.2011 ; Huang,Xiao et al.2011 ; Li,Huang et al.2011 ; Mahfouz,Li et al.2011 ; Miller,Tan et al.2011 ; Morbitzer,Romer et al.2011 ; Mussolino,Morbitzer et al.2011 ; Sander,Cade et al.2011 ; Tesson,Usal et al.2011 ; Weber,Gruetzner et al.2011 ; Zhang,Cong et al.2011 ; Deng,Yan et al.2012 ; Li,Piatek et al.2012 ; Mahfouz,Li et al.2012 ; Mak,Bradley et al.2012)。

【 0 1 5 6 】

別の好ましい態様によると、自己抗原および非自己抗原の認識に関与する遺伝子の不活性化は、Cas9のようなRNA誘導型エンドヌクレアーゼまたはWO2014189628に記載されるアルゴノートに基づく技術のようなDNA誘導型エンドヌクレアーゼによって実施される。

【 0 1 5 7 】

本発明は、自己/非自己認識に関与する少なくとも1種の遺伝子の不活性化の工程を含む、同種細胞の持続性および/または生着を増加させる方法に関する。「自己/非自己認識に関与する遺伝子」とは、免疫系による同種細胞の検出および破壊に必要であると見なされる、構造的に外部の受容体またはリガンドの一部であるポリペプチドをコードする遺伝子を意味する。そのような遺伝子は、好ましくは、TCR、MHC、具体的には、クラスI MHC、2ミクログロブリン(B2M)、TAP1、またはLMP2の少なくとも1種の成分をコードする。

【 0 1 5 8 】

好ましい態様において、不活性化される遺伝子は、TCRまたはB2M、より好ましくは、TCRである。

【 0 1 5 9 】

本発明において、養子免疫治療戦略のための適切な遺伝子を正確に標的とするための新しいTALEヌクレアーゼが設計された。本発明による好ましいTALEヌクレアーゼは、2mの不活性化のためのSEQ ID NO:2～3、5～6、および8～9、ならびにSEQ ID NO:52～53、55～56、62～63、および65～66(TCR)からなる群より選択される標的配列を認識し切断するものである。

【 0 1 6 0 】

ヒト 2mを切断するTALEヌクレアーゼ

ヒト 2m遺伝子のエクソンを標的とするTALEヌクレアーゼをコードするmRNAを、Cellentis Bioresearch(8,rue de la Croix Jarry,75013 PARIS)に注文した。以下の表1は、15bpスペーサーによって分離された(半標的と呼ぶ)2個の17bp長配列からなる標的配列の間に結合しそれを切断するよう改変されたリピート配列を各々含有している(半TALEヌクレアーゼと呼ぶ)2種の独立したエンティティの各々によって切断される標的配列を示す。

【 0 1 6 1 】

(表1) 2m TALEヌクレアーゼ配列の説明

標的名	SEQ ID NO:	半TALEヌクレアーゼの配列
T01 β2M 標的	1	TCTCGCTCCGTGGCCTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTTTCTGGCCTGGAGGCT A
T01 TALEN β2M	2	ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTATCGATTACCCATACGATGTTCCAGA TTACGCTATCGATATGCCGATCTACGCACGCTCGGCTACAGCCAGCAGCAACAGG AGAAGATCAAACCGAAGGTTCGACAGTGGCGCAGCACGAGGCACTGGT

10

20

30

40

左	<p>CGGCCACGGTTTACACACGCGCACATCGTCGTTAACGCAACACCCGGCAGCGT TAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGATCGCAGCGTTGCCAGAGGGCGAC ACACGAAGCGATCGTGGCGTGGCAAACAGTGGTCCGGCGACCGCTCTGGAG GCCCTGCTCACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCCACCGTTACAGTTGGACACAG GCCAACTTCTCAAGATTGCAAAACGTGGCGCGTGAACCGCAGTGGAGGCAGTGCA TGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCGCTCAACTTGACCCCCCAGCAGGTGG TGGCCATGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTGCCG GTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGGCCATGCCAGGCC GTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGGCCATGCCAGGCC ACGATGGCGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCGGCTTGCCGGTGTGCCAGGCC GCCAGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGGCCATGCCAGGCC CGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCGGCTTGCCGGTGTGCCAGGCC CACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGGCCATGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCCTG AGGCCTGGAGACGGTCCAGCGGCTTGCCGGTGTGCCAGGGCCACGGCTTGACCCCG GAGACGGTCCAGCGGCTTGCCGGTGTGCCAGGGCCACGGCTTGACCCCG AGCAGGTGGGCCATGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCCTGGAGACGG TGCAGGGCGCTTGCCGGTGTGCCAGGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGT GGTGGCCATGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCG GCTGTTGCCGGTGTGCCAGGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGGCC ATGCCAGGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTG CGGTGCTGTGCCAGGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGGCCATGCCAG CAATGGCGGTGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCGGCTTGCCGGTGTGCCAG GTGCCAGGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGGCCATGCCAGCAATAAT GGTGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCGGCTTGCCGGTGTGCCAG GCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGGCCATGCCAGCAATGGCGGTGGCA AGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCGGCTTGCCGGTGTGCCAGGGCCACGG CTTGACCCCGAGCAGGTGGGCCATGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGC CTGGAGACGGTCCAGCGGCTTGCCGGTGTGCCAGGGCCACGGCTTGACCC CGGAGCAGGTGGGCCATGCCAGGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCCTGGAGA CGGTCCAGCGGCTTGCCGGTGTGCCAGGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAG GTGGTGGCCATGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAG CGGCTGTTGCCGGTGTGCCAGGGCCACGGCTTGACCCCTCAGCAGGTGGTGG CCATGCCAGCAATGGCGGCGGAGGCCAGGGCTGGAGAGACATTGTTGCCAGTT ATCTGCCCTGATCCGGCGTTGGCCCGTGTGACCAACGACCACCTCGTCGCCCTGG CCTGCCCTGGCGGGCGTCTGCCAGGGCTGGAGTGCAGTGAAGGAAAGGGATTGGGGATCC TATCAGCCCTCCAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGAGGAGAAGAAATCCGAGTTG AGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATGCC GGAACAGCACCCAGGACCGTATCCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTTCATGAA GGTGTACGGTACAGGGCAAGCACCTGGCGGCTCCAGGAAGCCCAGGGC CATCTACACCGTGGCTCCCATCGACTACGGCGTGTGACGCCACCAAGGC ACTCCGGCGGCTACACCTGCCATGCCAGGCCAGAAATGCAGAGGTACGT GGAGGAGAACCAAGACCAAGAACATCAACCCCAACGAGTGGTGGAGGT GTACCCCTCCAGCGTGAACCGAGTTCAAGTCTGTTGTCGTCGGCACTTCAAGG GCAACTACAAGGCCAGCTGACCAAGGCTGAACCAACATCACCAACTGCAACGGCG GTGCTGTCGTGGAGGAGCTCTGATCGGGCGAGATGATCAAGGCCAGGG TGACCCCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACACGGCAGATCAACTCGCG</p>
---	--

		CCGACTGATAA
T01 TALEN β 2M 右	3	<p>ATGGGCATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTATCGATAAGGAGACCGCCGCTGCCA AGTCGAGAGACAGCACATGGACAGCATCGATATGCCGATCTACGCACGCTCG CTACAGCCAGCAACAGGAGAACGATCAAACCGAAGGTTCGTTCGACAGTGGCG CAGCACCAAGGCACTGGCGGCCACGGGTTACACACGCGCACATCGTTCGTT AAGCCAACACCCGGCAGCGTTAGGGACCCTGCTGTCAAGTATCAGGACATGATC GCAGCGTGCAGAGGGCAGACACGAAGCGATCGTGGCGTCGGCAAACAGTGGT CCGCGCAGCGCTCTGGAGGGCTTGCTCACGGTGGCGGGAGAGGTTGAGAGGTC ACCGTTACAGTTGGACACAGGCCAACTCTCAAGATTGAAAACGTGGCGCGTGA CCGCAGTGGAGGCAGTGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCCGCTCAA CTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCG CTGGAGACGGTGCAGGCCTGTTGCCGGTGTGCCCCAGGCTTGACCC CCCAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGAC GGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGCCCCAGGCTTGACCCGGAGCAGGTGG GTGGTGGCCATGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAG CGGCTGTTGCCGGTGTGCCCCAGGCTTGACCCGGAGCAGGTGGTGG CCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTT GCCGGTGTGTTGCCAGGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATGCC AGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTTGTGCCGGT CTGTGCCAGGGCCACGGCTTGACCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGGCCACG ATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTTGTGCCGGTGTGCCA GGCCCACGGCTTGACCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCCACGATGGCGG AAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTTGTGCCGGTGTGCCCCAGGCG GCTTGACCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGG GCTGGAGACGGTGCAGGCCTGTTGCCGGTGTGCCCCAGGCTTGACCC CCCAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGA CGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGCCCCAGGCTTGACCCCCAGCAG GTGGTGGCCATGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGC GGCTGTTGCCGGTGTGCCCCAGGCTTGACCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCC CATGCCAGGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTT CCGGTGCTGTGCCAGGGCCACGGCTTGACCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCC GCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTTGTGCCGGT GTGCCAGGGCCACGGCTTGACCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATAATT GGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGCGCTTGTGCCGGTGTGCCCC GCCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATAATGGTGGCA AGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTTGTGCCGGTGTGCCCCAGGCG CTTGACCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATAATTGGTGGCAAGCAGGCG CTGGAGACGGTGCAGGCCTGTTGCCGGTGTGCCCCAGGCTTGACCC CTCAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATGGCGGCGGCAAGGCCGGCTGGAGA GCATTGTTGCCAGTTATCTGCCCTGATCCGGCGTTGGCCGCGTGTGACCAACGAC CACCTCGTCGCCCTGGCCTGCCCTGGCGGGCGTCTGCCGCTGGATGCA GGGATTGGGGATCCTATCAGCCGTTCCAGCTGGTAAGTCCGAGCTGGAGGAG AAGAAATCCGAGTTGAGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCCCACGAGTACATCGAGC TGATCGAGATGCCCGAACAGCACCCAGGACCGTATCTGGAGATGAAGGTGAT GGAGTTCTCATGAAGGTGTACGGCTACAGGGCAAGCACCTGGCGGCTCCAGG AAGCCGACGGCGCCATCTACACCGTGGCTCCCATCGACTACGGCGTGTG GGACACCAAGGCCTACTCCGGCGGCTACAACCTGCCATCGGCCAGGCCAGGAA </p>

10

20

30

40

		ATGCAGAGGTACGTGGAGGAGAACGACAGGAACAAGCACATCAACCCAAACG AGTGGTGGAAAGGTGACCCCTCCAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCCTGTTGTGCC GGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGGCCAGCTGACCAGGCTGAACCACATCACCAA CTGCAACGGCGCCGTGCTGTCCGTGGAGGAGCTCTGATCGCGGGCAGATGATC AAGGCCGGCACCCCTGACCCCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAAACGGCGAG ATCAACTTCGCGGCCGACTGATAA	
T02 β 2M 標的	4	TCCAAAGATTCAAGGTTACTCACGTATCCAGCAGAGAATGGAAAGTCAA	10
T02 TALEN β 2M 左	5	ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTATCGATTACCCATACGATGTTCCAGA TTACGCTATCGATATGCCGATCTACGCACGCTCGGCTACAGCCAGCAGCAACAGG AGAAGATCAAACCGAAGGTTCTCGACAGTGGCGCAGCACCCAGGAGGCACTGGT CGGCCACGGGTTACACACGCGCACATCGTTCGTTAACGCAACACCCGGCAGCGT TAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGATCGCAGCGTTGCCAGAGGCGAC ACACGAAGCGATCGTGGCGTCGGAAACAGTGGTCCGGCGCACCGCTCTGGAG GCCTTGCTCACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCCACCGTTACAGTTGGACACAG GCCAACTTCTCAAGATTGCAAACAGTGGCGGTGACCCGAGTGGAGGAGTGC TGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCGCTCAACTTGACCCGGAGCAGGTG GTGGCCATGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGG CTGTTGCCGGTGTGCTGCCAGGCCACGGCTTGACCCGGAGCAGGTGGTGGCCA TCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGGCCTGTTGCC GGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGC AATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGGCCTGTTGCCGGTGTG GCCAGGCCACGGCTTGACCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATATTGG TGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGGCCTGTTGCCGGTGTGCCCCAGG CACGGCTTGACCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATATTGGTGGCAAGC AGGCCTGGAGACGGTGCAGGGCCTGTTGCCGGTGTGCCCCACGGCTTGACCCGG GACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCT GAGACGGTCCAGCGGCTTGCCGGTGTGCCCCACGGCTTGACCCGGAGCAGGTGG AGCAGGGTGGTGGCCATGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGG TGCAGGGCGCTGTTGCCGGTGTGCCCCACGGCTTGACCCGGTGTGCCCCACGG GGTGGCCATGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCG GCTGTTGCCGGTGTGCCCCACGGCTTGACCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCC ATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTT CGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAG CCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGT TGCCAGGCCACGGCTTGACCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATAATTG GTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGGCCTGTTGCCGGTGTGCCCCAGG CCCACGGCTTGACCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATAATGGTGGCAA GCAGGGCGCTGGAGACGGTCCAGGGCTGTTGCCGGTGTGCCCCACGGCTTGAC TTGACCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGC TGGAGACGGTCCAGGGCTGTTGCCGGTGTGCCCCACGGCTTGACCCGGAGCAG CCAGCAGGGTGGTGGCCATGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGAC GGTCCAGGGCTGTTGCCGGTGTGCCCCACGGCTTGACCCGGAGCAGGTGGCC GTGGTGGCCATGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGGCTGGAGACGGTCCAG CGGCTGTTGCCGGTGTGCCCCACGGCTTGACCCCTCAGCAGGTGGTGG CCATGCCAGCAATGGCGGCGGCAGGCCGGCAGGGCTGGAGAGCATTGTTGCCAGTT	20 30 40

		ATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCCGCGTTGACCAACGACCACCTCGTCGCCTTGG CCTGCCTCGGCGGGCGTCTGCGCTGGATGCAGTGAAAGGGATTGGGGATCC TATCAGCCGTTCCCAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGAGGAGAAGAAATCGAGTTG AGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCAACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATGCC GGAACAGCACCCAGGACCGTATCCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTCATGAA GGTGTACGGCTACAGGGCAAGCACCTGGCGCTCCAGGAAGCCCACGGCG CATCTACACCGTGGCTCCCCATCGACTACGGCGTATCGTGGACACCAAGGC ACTCCGGCGGCTACAACCTGCCATGGCCAGGCCAGCAAATGCAGAGGTACGT GGAGGAGAACAGACAGGAACAAGCACATCAACCCAAACGAGTGGTGGAGGT GTACCCCTCCAGCGTGACCGAGTTCAAGTCTGTGTCGGCCACTTCAAGG GCAACTACAAGGCCAGCTGACCAAGGACTCACCAACTGCAACGGCG GTGCTGTCCGTGGAGGAGCTCTGATCGGCGGAGATGATCAAGGCCGGCACCC TGACCCCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACACGGCGAGATCAACTCGCG CCGACTGATAA	10
T02 TALEN β 2M 右	6	ATGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTATCGATAAGGAGACCGCGCTGCCA AGTCGAGAGACAGCACATGGACAGCATCGATATGCCGATCTACGCACGCTCG CTACAGCCAGCAGCAACAGGAGAAGATCAAACCGAAGGTTCTCGACAGTGGCG CAGCACCACGAGGCACTGGTCGGCACGGGTTACACCGCGCACATCGTGC AAGCCAACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCGCTGCAAGTATCAGGACATGATC GCAGCGTTGCCAGAGGGCAGCACACGAAGCGATCGTGGCGTCGGCAAACAGTGGT CCGGCGCACCGCTCTGGAGGCCTGCTCACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCC ACCGTTACAGTTGGACACAGGCCAACCTCTCAAGATTGCAAACGTGGCGCG CCCGCAGTGGAGGCAGTGCATGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCGCTCAA CTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCATGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCG CTGGAGACGGTCCAGCGCTGTTGCCGGTCTGTGCCAGGCCACGGCTGACCCGGAGCA GGTGGTGGCCATGCCAGCCACGATGGCGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCA GCGGCTGTTGCCGGTCTGTGCCAGGCCACGGCTGACCCCCCAGCAGGTGGT GCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCGCTG TTGCCGGTCTGTGCCAGGCCACGGCTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCG CAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCGCTGTTGCC GCTGTGCCAGGCCACGGCTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAAT GGCGGTGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCGCTGTTGCCAGGCCACGG CAGGCCACGGCTGACCCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCCACGATGGCG GCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCGCTGTTGCCAGGCCACGGCTGCTGCC CGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCCACGATGGCGCAAGCAG GCGCTGGAGACGGTCCAGCGCTGTTGCCGGTCTGTGCCAGGCCACGGCTGA CCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATAATTGGTGGCAAGCAGGCCTGGA GACGGTGAGGCGCTGTTGCCGGTCTGTGCCAGGCCACGGCTGACCCCCCAG CAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCC CAGCGGCTGTTGCCGGTCTGTGCCAGGCCACGGCTGACCCCCCAGCAGGTGG TGGCCATGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCG TGTTGCCGGTCTGTGCCAGGCCACGGCTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCAT GCCAGGCCACGATGGCGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCGCTGTTGCC GGTGTGTGCCAGGCCACGGCTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGC AATGGCGGTGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTCTGT GCCAGGCCACGGCTGACCCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCCACGATGG	20 30 40

		CGGCAAGCAGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGCCAGGCC CACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGCCATGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGC AGGCCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGCCAGGCCACGGCTT GACCCCTCAGCAGGTGGCCATGCCAGCAATGGCGGCGCAGGCCGGCGCTG GAGAGCATTGTTGCCAGTTATCTGCCCTGATCCGGCGTGGCCCGTGTGACCAA CGACCACCTCGTCGCCCTGGCCTGCCCTGGCGGTCTCGCTGGATGCAGTGA AAAAGGGATTGGGGATCCTATCAGCCGTTCCAGCTGGTAAGTCCGAGCTGGA GGAGAAGAAAATCCGAGTTGAGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCACGAGTACATC GAGCTGATCGAGATGCCCGAACAGCACCCAGGACCGTATCTGGAGATGAAGG TGATGGAGTTCTCATGAAGGTGTACGGTACAGGGCAAGCACCTGGCGGCTC CAGGAAGCCGACGGGCCATCTACACCGTGGCTCCCCATCGACTACGGCGTG ATCGTGGACACCAAGGCCTACTCCGGCGCTACAACCTGCCATGCCAGGCCGA CGAAATGCAGAGGTACGTGGAGGAGAACAGACAGGAACAAGCACATCAACCCC AACGAGTGGTGGAGGGTGTACCCCTCCAGCGTGTGACCGAGTTCAAGTCCGT GTCCGGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGGCCAGCTGACCAGGCTGAACCACATCA CCAACGTCAACGGCGCGTGTGTCGTGGAGGAGCTCTGATGCCGGCGAGAT GATCAAGGCCGGCACCTGACCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACACGG CGAGATCAACTCGCGGCCACTGATAA	10
T03 β 2M 標的	7	TTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTTCTGGCCTGGAGGCTATCCA	20
T03 TALEN β 2M 左	8	ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTATCGATTACCCATACGATGTTCCAGA TTACGCTATCGATATGCCGATCTACGACCGCTGGCTACAGCCAGCAGCAACAGG AGAAGATCAAACCGAAGGTTCTCGACAGTGGCGCAGCACACAGGAGGCACTGGT CGGCCACGGTTTACACACGCGCACATCGTGTGTTAACGCAACACCCGGCAGCGT TAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGATCGCAGCGTGTGCCAGAGGCGAC ACACGAAGCGATCGTGGCGTGGCAAACAGTGGTCCGGCGCACCGCTCTGGAG GCCCTGCTACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCCACCGTTACAGTGGACACAG GCCAACTTCTCAAGATTGCAAAACGTTGGCGCGTGTGACCCGAGTGGAGGAGTGA TGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCGCTCAACTTGACCCGGAGCAGGTG GTGGCCATGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGCG CTGTTGCCGGTGTGTCGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCAT CGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTGCG GTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCC ACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTGCCGGTGT GCCAGGCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCATGCCAGCAATGGCG TGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGCCAGGCC CACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATAATGGTGGCAAGC AGGCCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGCCAGGCCACGGCTT GACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCT GAGACGGTCCAGCGGCTGTGCCCCGTGTGCCAGGCCACGGCTGACCCCCC AGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGG TCCAGCGGCTGTGCCCCGTGTGCCAGGCCACGGCTGACCCCCGGAGCAGGT GGTGGCCATGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCG GCTGTTGCCGGTGTGCCCCACGGCTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCC ATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTG CGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTGACCCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAG	30 40

		CCACGATGGCGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCGGCTTTGCCGGTCTG TGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATAATG GTGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCGGCTTTGCCGGTCTGTGCCAGGC CCACGGCTTGACCCCAGGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCCACGATGGCGGCAAG CAGGCCTGGAGACGGTCCAGCGGCTTTGCCGGTCTGTGCCAGGCCACGGCT TGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGC GGAGACGGTCCAGCGGCTGTGCCGGTCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCG GAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCCTGGAGACG GTCCAGCGGCTGTGCCGGTCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGT GGTGGCCATGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCG GCTGTTGCCGGTCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCTCAGCAGGTGGTGGCC ATCGCCAGCAATGGCGCGGCAGGCCGGCTGGAGAGCATTGTTGCCAGTTAT CTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCCGCTTGACCAACGACCACCTCGTCGCCCTGCC TGCCTCGGCGGGCGTCTGCGCTGGATGCAGTAAAAAGGGATTGGGGATCCTA TCAGCCGTTCCCAGCTGGTAAGTCCGAGCTGGAGGAAGAAATCCGAGTTGAG GCACAAGCTGAAGTACGTGCCAACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATGCCCG AACAGCACCCAGGACCGTATCCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTCATGAAGG TGTACGGCTACAGGGCAAGCACCTGGCGCTCCAGGAAGCCCAGGCCAT CTACACCGTGGGCTCCCCATCGACTACGGCGTGTGGACACCAAGGCCACT CCGGCGGCTACAACCTGCCATCGGCCAGGCCACGAAATGCAGAGGTACGTGG GGAGAACCAAGACCGAGAACAGCACATCAACCCAACGAGTGGTGGAGGTGTAC CCCTCCAGCGTGACCGAGTTCAAGTCTGTGTCGGCCACTTCAAGGGCAA CTACAAGGCCAGCTGACCGAGGCTGAACCACATCACCAACTGCAACGGCGCCGTG TGTCCGTGGAGGAGCTCTGATCGCGGCGAGATGATCAAGGCCGGCACCTGAC CCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACACGGCGAGATCAACTCGCGGCCGA CTGATAA	10
T03 TALEN β 2M 右	9	ATGGGCATCTAAAAAGAAACGTAAGGTATCGATAAGGAGACCGCCGTGCCA AGTTGAGAGACAGCACATGGACAGCATCGATATGCCGATCTACGACGCTCG CTACAGCCAGCAGCAACAGGAGAAGATCAAACCGAAGGTTCTCGACAGTGGCG CAGCACCACGAGGCACTGGCGGCCAGGGTTACACACGCGCACATCGTGC AAGCCAACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGATC GCAGCGTTGCCAGAGGGACACACGAAGCGATCGTGGCGTGGCAAACAGTGGT CCGGCGCACCGCTCTGGAGGCCTGCTACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCC ACCGTTACAGTGGACACAGGCCAACTCTCAAGATTGCAAACAGTGGCGCGTGA CCGCAGTGGAGGCAGTGCATGCGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCGCTCAA CTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGC CTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTGCCGGTCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCC CCCAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCCTGGAGAC GGTCCAGCGGCTGTGCCGGTCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCGGAGCAG GTGGTGGCCATGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTGCAG GCGCTGTTGCCGGTCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGG CCATGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCGCTGTT GCCGGTCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCC AGCAATAATTGGTGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTGCAGGCCACGGCTGTG TGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATAAT GGTGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTGCCGGTCTGTGCCAG GCCCAAGGCCACGGCTTGACCCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCCACG AGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTGCCGGTCTGTGCCAGGCCACGG	30 40

	<pre> CTTGACCCGGAGCAGGTGGTGGCATGCCAGCACGATGGCGGCAAGCAGGCG CTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCC CCCAGCAGGTGGTGGCATGCCAGCAATGGCGGTGCCAAGCAGGCGCTGGAGA CGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCGGAGCA GGTGGTGGCATGCCAGCACGATGGCGGAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCA GCGGCTGTTGCCGGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCGGAGCAGGTGGT GCCATGCCAGCACGATGGCGGAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTG TGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCGGAGCAGGTGGCATCGC CAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGCGCTTGCCAG CTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCATGCCAGCAAA TGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGCCAG GCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGCATGCCAGCAATAATGGTGGCA AGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGCCAGGCCACGG CTTGACCCGGAGCAGGTGGTGGCATGCCAGCACGATGGCGGAAGCAGGCG CTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCC CTCAGCAGGTGGTGGCATGCCAGCAATGGCGGCGGAGGCCGGCTGGAGA GCATTGTTGCCAGTTATCTGCCCTGATCCGGCGTTGGCGCTTGACCAACGAC CACCTCGTCGCCCTGGCCTGCCCTCGCGGGCGTCTGCGCTGGATGAGTGA GGGATTGGGGGATCCTATCAGCCGTTCCAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGAGGAG AAGAAATCCGAGTTGAGGACAAGCTGAAGTACGTGCCAACGAGTACATCGAGC TGATCGAGATGCCCGAACAGCACCCAGGACCGTATCCTGGAGATGAAGGTGAT GGAGTTCTCATGAAGGTGTACGGCTACAGGGCAAGCACCTGGCGGCTCCAGG AAGCCGACGGCGCCATCTACACCGTGGCTCCCCATCGACTACGGCGTATCGT GGACACCAAGGCCTACTCCGGCGGCTACAACCTGCCATGGCCAGGCCACGAA ATGCAGAGGTACGTGGAGGAGAACAGACCAGGAACAAGCACATCAACCCAAACG AGTGGTGGAGGTGTACCCCTCCAGCGTACCGAGTTCAAGTCTGTTGTCC GGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGGCCAGCTGACCAGGCTGAACCACATCACCA CTGCAACGGCGCCGTGCTGTCCGTGGAGGAGCTCTGATGGCGGCGAGATGATC AAGGCCGGCACCTGACCCCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAAACGGCGAG ATCAACTCGCGGCCGACTGATAA </pre>
--	--

10

20

30

【0162】

ヒトPD-1遺伝子を切断するTALEヌクレアーゼ

自己抗原および非自己抗原の認識に関する遺伝子の不活化に加えて、WO2014/184744に記載される免疫チェックポイントをコードする1種または数種の遺伝子の不活化のようなさらなる遺伝子改変が求められる場合がある。

【0163】

好ましい態様において、自己/非自己認識に関する少なくとも1種の遺伝子の不活化に対して付加的な不活化は、PD-1をコードする遺伝子に対して実施される。PD-1は、(PDCD1またはCD279(ヒト遺伝子のRefSeqアクセッション番号:NM_005018)としても公知の)ヒトプログラム死(Programmed Death)1に相当する。好ましくは、TALENによって媒介される破壊による、このPD-1阻害は、(CD274またはB7同型体1(B7-H1)としても公知であり、ヒト遺伝子のRefSeq NO:NM_001267706を有する)PD-L1による自己阻害または相互阻害に対して同種免疫細胞を抵抗性にするという目的を有する。

40

【0164】

好ましい態様によると、PD-1遺伝子の不活化は、以下の表2に提示されるTALEヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを使用することによって実施される。

【0165】

(表2)2種の異なるPDCD1(またはPD-1)遺伝子標的のための2対のTALENのポリヌクレオチド配列が提示される

標的	標的配列	半TALEヌクレアーゼ
PDCD1_T 01	TTCTCCCCAGCCCTG CT cgtggtgaccgaagg GGACAAACGCCACCTCA (SEQ ID NO : 10)	PDCD1_T01-L TALEN (SEQ ID NO: 11)
		PDCD1_T01-R TALEN (SEQ ID NO: 12)
PDCD1_T 03	TACCTCTGTGGGGC CAT ctccctggcccccaa GGCGCAGATCAAAGAGA (SEQ ID NO : 13)	PDCD1_T03-L TALEN (SEQ ID NO: 14)
		PDCD1_T03-R TALEN (SEQ ID NO: 15)

10

20

30

40

50

【0166】

本発明の一つの態様によると、方法の工程(c)は、膜結合型のPD-L1リガンドをコードする少なくとも1種の非内在性ポリヌクレオチドの免疫細胞における発現によって実施され、同種細胞のさらなる改変は、PD-1遺伝子の発現の不活化によって実施される。

【0167】

本発明の別の態様によると、工程(c)は、分泌型CTLA4免疫グロブリンに対応する少なくとも1種の非内在性ポリヌクレオチドの免疫細胞における発現によって実施され、同種細胞のさらなる改変は、PD-1をコードする遺伝子の発現の不活化によって実施される。

【0168】

本発明の好ましい態様によると、工程(c)は、非内在性免疫抑制ポリペプチドPD-L1リガンドおよびCTLA-4免疫グロブリンの両方の免疫細胞における発現によって実施され、同種免疫細胞のさらなる改変は、PD-1をコードする遺伝子の発現の不活化によって実施される。

【0169】

非内在性免疫抑制ポリペプチドの発現

好ましい態様によると、本発明の方法の工程(c)は、膜結合型の非内在性免疫抑制ポリペプチドをコードする少なくとも1種の非内在性ポリヌクレオチドの免疫細胞における発現によって実施される。

【0170】

一つの態様によると、非内在性免疫抑制ポリペプチドは、膜結合型および/または分泌型で存在する。

【0171】

「非内在性ポリペプチド」とは、ドナーの免疫細胞によって通常発現されないポリペプチド、好ましくは、免疫細胞ゲノムへ輸入された外来性ポリヌクレオチドによって発現されたポリペプチドを意味する。例えば、IL12は、ドナーの免疫細胞に由来する既存の遺伝子から発現されるため、本明細書において、非内在性ポリペプチドであるとは見なされない。

【0172】

「天然に発現されない」とは、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列が、免疫細胞のゲノムに最初に存在しないか(例えば：CTLA4 Ig)、または、ポリヌクレオチド配列はゲノムに存在するが、ポリペプチドが、はるかに低いレベルで、一般には、同一の実験条件または処理条件において操作された免疫細胞において観察される発現レベルよりも、少なくとも50%、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも100%、さら

に好ましくは200%低いレベルで、ネイティブの免疫細胞（即ち、操作されていない）において発現されることを意味する。

【0173】

「免疫抑制性」とは、非内在性ポリペプチドの発現が、ドナーの免疫細胞に対する患者宿主の免疫応答を弱める効果を有することを意味する。

【0174】

本発明の好ましい局面によると、非内在性免疫抑制ポリペプチドは、PD-L1、CTLA-4-Ig、ウイルスMHC相同体、NKG2Dリガンド、ウイルスenv免疫抑制ドメイン（ISU）、またはウイルスFPタンパク質の中から選択される。

【0175】

一つの態様によると、方法は、工程(c)非内在性分泌型免疫抑制ポリペプチドに対応する少なくとも1種の非内在性ポリヌクレオチドの免疫細胞における発現を含む。

【0176】

より好ましい態様によると、膜結合型の非内在性免疫抑制ポリペプチドは、膜結合型のPD-L1リガンドである。

【0177】

CTLA-4-Igの発現

一つの態様によると、同種免疫細胞において発現される非内在性免疫抑制ポリペプチドは、CTLA-4タンパク質のリガンド、好ましくは、CTLA4免疫グロブリンである。細胞傷害性Tリンパ球抗原4（CTLA-4）は、CD152（GenBankアクセスション番号AF414120.1）としても公知である。

【0178】

好ましい態様によると、同種免疫細胞において発現されるCTLA-4免疫グロブリンに対応するポリペプチドは、SEQ ID NO:16（CTLA-4a）もしくはSEQ ID NO:17（CTLA4b）を含むか、またはSEQ ID NO:16もしくはSEQ ID NO:17と少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは95%の同一性を有する。

【0179】

同種T細胞と宿主免疫細胞との間の相互作用は、図1の状況（発現なし）と比べて、図2（CTLA4-Igの発現）に概略的に表される。

【0180】

一つの好ましい態様によると、発現されるCTLA-4a IgおよびCTLA-4b Igをコードする核酸分子は、それぞれ、以下の表3に提示されるSEQ ID NO:16およびSEQ ID NO:17と少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは95%の同一性を有する。

【0181】

（表3）CLTA-4a、CTLA-4b、およびPD-L1を発現するプラスミド構築物のポリヌクレオチド配列

10

20

30

構築物の名称	発現	SEQ ID NO:	ポリペプチド配列
pCLS27068	CTLA4a 発現 プラスミド	16	MGGVLLTQRTLLSLVALLFPMASMAHVAQPAVVLAASSRGIAFVCEYAS PGKATEVRVTVLQRQADSVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVN LTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLGIGNGTQIYVIDPEPCPDSDQEPKSS DKTHTSPPSAPAEPLLGGSSVFLFPPPKDFTLMSIRTPEVTCVVVDVSHEDEVK FNWYVVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGKGS
pCLS27066	CTLA4b 発現 プラスミド	17	MGGVLLTQRTLLSLVALLFPMASMAHVAQPAVVLAASSRGIAFVCEYAS PGKYTEVRVTVLQRQADSVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVN LTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYEGIGNGTQIYVIDPEPCPDSDQEPKSS DKTHTSPPSAPAEPLLGGSSVFLFPPPKDFTLMSIRTPEVTCVVVDVSHEDEVK FNWYVVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGKGS
pCLS27069	PD-L1 発現 プラスミド	18	MGRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDA ALIVYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVKQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDV KLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPVTEHELTCQA EGYPKAEVIVTSSDHQVLSGKTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFR RLDPEENHTAELVIPELPLAHPPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMM DVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEETGS

【0182】

一つの態様によると、操作された免疫細胞は、抗CD80 mAbまたは抗CD86 mAbである非内在性免疫抑制ポリペプチドと共にインキュベートされる。

【0183】

PD-L1の発現

PD-L1(別名: CD274、プログラム細胞死1リガンド；ヒトポリペプチドのref.UniProt Q9NZQ7)は、Ig V様ドメイン、Ig C様ドメイン、疎水性膜貫通ドメイン、および30アミノ酸の細胞質テールからなる290アミノ酸のI型膜貫通タンパク質をコードする。

【0184】

本発明の好ましい態様によると、同種免疫細胞において発現される非内在性免疫抑制ポリペプチドは、PD-L1のリガンド、より具体的には、膜結合型である。

【0185】

そのようなPD-L1リガンドの膜結合型は、本発明において、ネイティブ型(野生型)、または、例えば、細胞内ドメインの除去による短縮型、または1個もしくは複数個の変異を含むものを意味する(Wang S et al, 2003, J Exp Med. 2003; 197(9):1083-1091)。PD1は、本発明によるPD-L1リガンドの膜結合型であるとは見なされない。

【0186】

より好ましい態様によると、発現される膜結合型のPD-L1リガンドをコードする核酸分子は、SEQ ID NO:18を有するか、または(PDL1リガンドの野生型に相当する)SEQ ID NO:18と少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは95%の同一性を有する。

【0187】

別の態様によると、少なくとも1種の非内在性免疫抑制ポリペプチドは、分泌型のPD-L1リガンドである。そのような組換え分泌型PD-L1(または可溶性PD-L1)は、PD-L1の細胞外ドメインを免疫グロブリンのFc部分と融合させることによって生成され得る(Haile ST

10

20

30

40

50

et al, 2014, Cancer Immunol Res. 2(7):610-615 ; Song MY et al, 2015, Gut. 64(2):260-71)。この組換えPD-L1は、PD-1を中和し、PD-1によって媒介されるT細胞阻害を消失させる。

【0188】

同種T細胞と宿主免疫細胞との間の相互作用は、図1の状況（発現なし）と比べて、図3（膜結合型PD-L1の発現）に概略的に表される。図3は、PD-1遺伝子がKOによって破壊される状況も表す。

【0189】

前出の態様の代替物によると、同種免疫細胞において発現される非内在性免疫抑制ポリペプチドは、分泌型のPD-L1リガンドである。同種T細胞と宿主免疫細胞との間の相互作用は、図1の状況（発現なし）と比べて、図4（分泌型PD-L1リガンドの発現）において概略的に表される。図4は、PD-1遺伝子がKOによって破壊される状況も表す。

10

【0190】

一つの好ましい態様によると、核酸分子は、SEQ ID NO:18を有するか、またはSEQ ID N 0:18と少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは95%の同一性を有する、発現される膜結合型PD-L1をコードする。

【0191】

PD-L1リガンドのCTLA4 Igとの共発現

本発明は、工程(c)が、非内在性免疫抑制ポリペプチドであるPD-L1リガンドおよびCTLA-4免疫グロブリンの両方と宿主免疫細胞を接触させることによって実施される、宿主免疫細胞の存在下での同種免疫細胞の持続性および/または生着を増加させる方法にも関する。

20

【0192】

好ましい態様によると、方法の工程(c)は、非内在性免疫抑制ポリペプチドであるPD-L1リガンドおよびCTLA-4免疫グロブリンの両方の免疫細胞における発現によって実施される。

【0193】

好ましい態様によると、核酸分子は、同種免疫細胞において方法の工程(c)において発現される膜結合型のPD-L1リガンドおよびCTLA-4免疫グロブリンをコードし、PD-L1リガンドおよびCTLA-4 Igは、それぞれ、SEQ ID NO:18およびSEQ ID NO:16～17を有するか、または、それぞれ、SEQ ID NO:18およびSEQ ID NO:16～17と少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは95%の同一性を有する。

30

【0194】

ISUドメインの発現

別の態様によると、同種免疫細胞において発現される非内在性免疫抑制ポリペプチドは、例えば、HIV-1、HIV-2、SIV、MoMuLV、HTLV-1、HTLV-1I、MPMV、SRV-1、シンシチン(Syncitin)1もしくは2、HERV-K、またはFELVに由来するウイルスenv免疫抑制ドメイン(ISU)である。

【0195】

同種T細胞と宿主免疫細胞との間の相互作用は、図1の状況（発現なし）と比べて、図5（ウイルスISUドメインの発現）に概略的に表される。

40

【0196】

以下の表4は、本発明において発現され得る多様なウイルスに由来するISUドメインのバリエントを示す。

【0197】

（表4）多様なウイルスに由来するISUドメインバリエント

SEQ ID #	位置													ウイルス	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
SEQ ID NO: 19-24	L	Q	A	R	I/V	L	A	V	E	R	Y	L	K/R/Q	D	HIV-1
SEQ ID NO: 25-30	L	Q	A	R	V	T	A	I	E	K	Y	L	K/A/Q	D/H	HIV-2
SEQ ID NO: 31	L	Q	A	R	L	L	A	V	E	R	Y	L	K	D	SIV
SEQ ID NO: 32	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	L	K	E	MoMuLV
SEQ ID NO: 33	A	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	W	E	Q	HTLV-I, -II
SEQ ID NO: 34	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	T	A	E	Q	MPMV, SRV-1
SEQ ID NO: 35	L	Q	N	R	R	A	L	D	L	L	T	A	E	R	シンシチン1
SEQ ID NO: 36	L	Q	N	R	R	G	L	D	M	L	T	A	A	Q	シンシチン2
SEQ ID NO: 37	L	A	N	Q	I	N	D	L	R	Q	T	V	I	W	HERV-K
SEQ ID NO: 38	L	Q	N	R	R	G	L	D	I	L	F	L	Q	E	FELV

【0198】

従って、ある種の態様において、同種免疫細胞において発現される非内在性免疫抑制ポリペプチドは、SEQ ID NO:19～38のISUドメインである。

【0199】

ウイルスMHC相同体の発現

別の態様によると、同種免疫細胞において発現される非内在性免疫抑制ポリペプチドは、例えば、UL18のようなウイルスMHC相同体である。

【0200】

一つの態様において、非内在性免疫抑制ポリペプチドは、SEQ ID NO:39を有するか、または、それぞれ、SEQ ID NO:39と少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは95%の同一性を有するキメラ 2m-UL18を含むMHC相同体である。

【0201】

同種T細胞と宿主免疫細胞との間の相互作用は、図6の状況（発現なし）と比べて、図7（ウイルスMHC相同体の発現）に概略的に表される。両方の図において、MHCクラスIは、2M遺伝子の破壊（KO）によって不活化されている。

【0202】

NKG2Dリガンドの発現

サイトメガロウイルスのようないくつかのウイルスは、NKG2Dリガンドに結合し、表面発現を防止することができるタンパク質を分泌することによって、NK細胞によって媒介される免疫監視を回避し、NKG2D経路に干渉する機序を獲得している（Welte,S.A. ; Sinzger,C. ; Lutz,S.Z. ; Singh-Jasuja,H. ; Sampaio,K.L. ; Eknigk,U. ; Rammensee,H.G. ; Steinle,A.2003「ヒトサイトメガロウイルスUL164糖タンパク質によるウイルスによって誘導されるNKG2Dリガンドの選択的な細胞内保持（Selective intracellular retention of virus-induced NKG2D ligands by the human cytomegalovirus UL16 glycoprotein）」Eur.J.Immunol.,33,194-203）。腫瘍細胞においては、ULBP2、MICB、またはMICAのようなNKG2Dリガンドを分泌することによってNKG2D応答から逃れるためのいくつかの機序が進化している（Salih HR, Antropius H, Gieseke F, Lutz SZ, Kanz L, et al. (2003)白血病における活性化免疫受容体NKG2Dのリガンドの機能的発現および放出（Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia）Blood 102:1389-1396）。

【0203】

別の態様によると、同種免疫細胞において発現される非内在性免疫抑制ポリペプチドは、NKG2Dリガンドである。同種T細胞と宿主免疫細胞との間の相互作用は、図6の状況（発現なし）と比べて、図8（可溶性NKG2Dリガンドの発現）に概略的に表される。両方の図において、MHCクラスIは、2M遺伝子の破壊（KO）によって不活化されている。

10

20

30

40

50

【0204】

以下の表5は、本発明によって発現されるウイルスMHC相同体（UL18）およびNKG2Dリガンドのパネルならびにそれらのポリペプチド配列を表す。

【0205】

（表5）ウイルスMHC相同体（UL18）およびNKG2Dリガンドのパネルのポリペプチド配列

	SEQ ID NO:	ポリペプチド配列
キメラ B2M-UL18	39	MALPV TALLPLA LLH AARPS RSV ALA VALL SLS GLEAI QRTPK I QV YSRH PAENG KSNFLN CYVSGF HPSDIEV DLLKNG ERIEK VEHSDLSFSK DW SFYLL YTEFTPT EKDEYACRV NHVTLS QPKIVK WDRDMGGGSGGGGGGGGGGGGGGGMTMW CLTF LVML RVGMH VLRY GYTG IFDDTSHMTLTVV GIFDGQH FFTYHV NSSDKASSRANGT ISW MANV SAAY PTYLDGE RAKG DLFN QTEQN LLEI ALGYRSQS VLTW THECN TENG SFVAGYEGFGWDGETL MELK DNLT LWTGP NYEIS WLK QNK TYIDG KIKN ISEGDTIQR NLYLKGN CTQWS VIYSGF QT PVT PVVK GGVRN QNDN RAE AFCTSYGF PG EIN ITFIY GNKA PDD SEP QCNP LLPT FDGT FHQG CYVA IF CNQNYTCRV THGN WTVEIP ISV TSPD DSSS GEVP DHPTANK RYNT MTI S VLL ALLL CALLFAFLHYFTTLKQYLRNLAF AWYRK VRSS
SP-MICAed	40	MGGVLLT QRTL LSVL ALLF PSMAS MPEHSL RY NLTVLS WDGS VQ SGFL TEV HLDG QPFL RC DRQK CRAK PQQG QWAEDV LGNKT WDRTR DLTG NGKDL RMTLA HIKDQ KEGL HSL QEIR CEIH EDNSTR SSQHF YYDG EFL SQN LETKEW TMPQ SSRA QTL AMVN RNF LKEDAM KTKT YHAM HADCLQ EL RRYL KSGV VLR RTVPPMV NVT RSEASEG NITV CRAS G FYPWN ITLS WR QDG VSL SHDT QQW GDVLPD GNGT YQT W VATRIC QGEE QRFT CYME HSGN HSTHP VP S KVL VLQS QHW
SP-MICBed	41	MGGVLLT QRTL LSVL ALLF PSMAS MPEHSL RY NLVLS QDES VQ SGFL AE GH LDG QPFL RY DRQK RRAK PQQG QWAEDV LGAKT WDT ETD E LTENG QDL RRTL THIKDQ KGG LHS L QEIR VCEIH EDSS TRGS RHF YYDG EFL SQN LETQ ESTV P QSSRA QTL AMVN TNFW KEDAM KTKT HYRAM QADCLQ K LQ RYL KSGV AIR RTVPPMV NVT CSEV SEG NITV CRASS F YPRN ITL WR QDG VSL SHNT QQW GDVLPD GNGT YQT W VATR IRQ GEE QRFT CYME HSGN HGT H VP S KVL VLQS QRTD
SP-ULBP1ed	42	MGGVLLT QRTL LSVL ALLF PSMAS MGS MG WVDTH CLCYDFIITPK SRPEP QWCEV QGLV D E R P FLHYDCV NH KAKA FASLG KK VNV KT WEE QT ET LRD VVDFL KGQ LLDI QV EN LIP EPLT LQA RMSCEHEAHGHGRGSWQFLFNGQKFLFD SNNR KWTALHPGAK KMTEKWEKN RDVT MF FQKISLG DCK MW LEEFL MYWE QML DP T
SP-ULBP2ed	43	MGGVLLT QRTL LSVL ALLF PSMAS MGRADPH SLCYD ITV PKFRPG PRWCAV QGQV DEKT FLHYDCGNK TVTPV S PLGKKL NVTT AWA KQNPV LREV DILTE QL RDQ ILEN YTPKEPLT LQA RMSCEQKAEGHSSGSWQFSFDGQ IFL FDSE KRMW TT VHPGARKM KEK WEND KVVAMS FHYFSMG DCIG WLED FLMG MD STLE P SAG
SP-ULBP3ed	44	MGGVLLT QRTL LSVL ALLF PSMAS MDAHL WYNFTI IHPRHG QQWCEV QSQVDQ KNFL SYDCG SDK VLS MGH LEEQ LYAT DAWG KQ LEML REV GQ RL RLE ADTE EDFTPS GPLT LQV RMSCECEADGYI RG SWQFSFDG RKF LLFD SNNR KWT VV HAGARR MKEK WEND KVVAMS MVS MRDCK SWL RD FLM HRKK RLE PT
SP-N2DL4ed	45	MGGVLLT QRTL LSVL ALLF PSMAS MHSLC FNFTI KSL RPG QP WCEAQVFLNKNL FLQ YNS DNNMV KPLG LLLG KKV YATSTW GEL TQL GEV GRDL RMLL CDIKP QIKT SDP STL QV EMFC Q REAER CTG ASWQ FATN GEK SLL FDAM NM TWT V INHE ASK I KETW KKDR GLE KYFR KLSKG DCDHW LREFL GHWE A MPEPTV SPV NASDIH WSSSL PD
SP-RET1Ged	46	MGGVLLT QRTL LSVL ALLF PSMAS MGLADPH SLCYD ITV PKFRPG PRWCAV QGQV DEKT LHYDCG SKT VTPV S PLGKKL NVTT AWA KQNPV LREV DILTE QL RDQ ILEN YTPKEPLT LQA MSCEQKAEGHSSGSWQFSIDG QTF LLFD SE KRMW TT VHPGARKM KEK WEND KDMT MS FHYISM GDCIG WLED FLMG MD STLE P SAG APPT MSSG TA QPR
SP-RAET1Led	47	MGGVLLT QRTL LSVL ALLF PSMAS MRR DDPH SLCYD ITV PKFRPG PRWCAV QGQV DEKT FLHYDCGNK TVTPV S PLGKKL NVTT MAW KQNPV LREV DILTE QL RDQ ILEN YTPKEPLT LQA ARMSCEQKAEGHSSGSWQFSIDG QTF LLFD SE KRMW TT VHPGARKM KEK WEND KD VAM SFHYISM GDCIG WLED FLMG MD STLE P SAG

【0206】

従って、ある種の態様において、操作された免疫細胞において発現される非内在性免疫抑制ポリペプチドは、SEQ ID NO:40～47を有するか、または、それぞれ、SEQ ID NO:40～47と少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは95%の同一性を有するNKG2Dリガ

10

20

30

40

50

ンドを含むかまたはそれからなる。

【0207】

FPポリペプチドの発現

別の態様によると、同種免疫細胞において発現される非内在性免疫抑制ポリペプチドは、gp41のようなFPポリペプチドである。以下の表6は、天然起源および人工起源に由来する数種のFPポリペプチドを表す。

【0208】

(表6) 天然起源および人工起源に由来するFPポリペプチドのアミノ酸配列

	位置									起源
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
SEQ ID NO: 48	G	A	L	F	L	G	F	L	G	HIV-1 gp41
SEQ ID NO: 49	A	G	F	G	L	L	L	G	F	合成
SEQ ID NO: 50	A	G	L	F	L	G	F	L	G	合成

【0209】

従って、ある種の態様において、操作された免疫細胞において発現される非内在性免疫抑制ポリペプチドは、SEQ ID NO:48～50を含むかもしくはそれからなるか、または、それぞれ、SEQ ID NO:48～50と少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは95%の同一性を有するFPポリペプチドである。

【0210】

非アロ反応性かつ免疫抑制剤耐性のT細胞

遺伝子不活化の遺伝子発現との組み合わせ

本発明者らは、一連の遺伝子改変を実施することができる、同種免疫細胞に適用するための持続性および/または生着を増加させる方法を、本明細書に提示する。それらには、自己/非自己認識に関与する遺伝子の少なくとも1種の不活化および非内在性免疫抑制ポリペプチドの少なくとも1種の発現の両方の多様な組み合わせが包含される。

【0211】

好ましい態様によると、遺伝子改変は、PD-L1リガンドおよび/またはCTLA-4免疫グロブリンおよび/またはウイルスenv免疫抑制ドメイン (ISU) および/またはウイルスFPタンパク質および/またはNKG2Gリガンド、例えば、UL18のようなウイルスMHC相同体の同種免疫細胞における発現と組み合わせられた、B2M遺伝子および/またはTCR遺伝子の不活化によって実施される。

【0212】

本発明による前記のレアカットエンドスクレアーゼをコードするポリヌクレオチド、ベクターも、本発明の範囲に含まれる。

【0213】

自己抗原および非自己抗原の認識に関するポリペプチドをコードする少なくとも1種の内在性遺伝子が不活化され、少なくとも1種の非内在性免疫抑制ポリペプチドが全ての同種免疫細胞と接触させられる、細胞、具体的には、T細胞のような同種免疫細胞を操作する方法によって入手可能な単離された細胞または細胞株も、本発明の範囲に包含される。

【0214】

具体的な局面において、本発明は、具体的には、免疫治療のため、T細胞のような免疫細胞を操作する方法に関する。

【0215】

具体的な態様において、方法は、以下の工程を含む：

(i) 同種細胞を準備する工程；

(ii) 自己抗原および非自己抗原の認識に関するポリペプチドをコードする少なくとも1種の内在性遺伝子を不活化することによって、該細胞を改変する工程；ならびに

(iii) 少なくとも1種の非内在性免疫抑制ポリペプチドと免疫細胞を接触させる工程。

10

20

30

40

50

【 0 2 1 6 】

別の具体的な局面において、本発明は、具体的には、免疫治療のため、T細胞のような免疫細胞を改変する方法に関する。

【 0 2 1 7 】

具体的な態様において、方法は、以下の工程を含む：

- (i) 同種細胞を準備する工程；
- (ii) 自己抗原および非自己抗原の認識に関与するポリペプチドをコードする少なくとも1種の内在性遺伝子を不活化することによって、該細胞を改変する工程；ならびに
- (iii) 少なくとも1種の非内在性免疫抑制ポリペプチドを免疫細胞において発現させる工程。

10

【 0 2 1 8 】

T細胞によって媒介される免疫は、抗原特異的な細胞のクローン選択、二次リンパ組織における活性化および増殖、抗原および炎症の部位への輸送、直接エフェクター機能の実行、ならびに多数のエフェクター免疫細胞の（サイトカインおよび膜リガンドを通した）支援の提供を含む、複数の連続する工程を含む。これらの工程の各々は、応答を微調整する刺激シグナルおよび阻害シグナルの均衡によって制御される。

【 0 2 1 9 】

例えば、CTLA-4は、ある種のCD4 T細胞およびCD8 T細胞において発現される細胞表面タンパク質であり；抗原提示細胞上のリガンド（B7-1およびB7-2）が会合した時、T細胞の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、免疫チェックポイントに関与する少なくとも1種のタンパク質、具体的には、PD1および/またはCTLA-4を不活化することによって、T細胞を遺伝子改変する工程を含む、具体的には、免疫治療のため、T細胞を操作する方法に関する。

20

【 0 2 2 0 】

別の態様において、方法の遺伝子改変工程は、2種を超える遺伝子の不活化に頼る。遺伝子改変は、好ましくは、エクスピボで操作される。

【 0 2 2 1 】**ヒトTCR遺伝子（TRACおよびTRBC）を切断するTALEヌクレアーゼ**

ヒトゲノムは、2種の機能性のT細胞受容体鎖（TRBC1およびTRBC2）を含有している。/ Tリンパ球の発達の間に、これらの2種の定常鎖のうちの1種が、TCRの可変領域へスプライシングされ、機能性の全長鎖を形成するよう、各細胞において選択される。対応するTALEヌクレアーゼがTRBC1およびTRBC2の両方を同時に切断するよう、TRBC1とTRBC2との間で保存された配列において、2種のTRBC標的が選択された。

30

【 0 2 2 2 】

ヒトTCR遺伝子は、WO2013176915において教示されるように、同種免疫細胞において破壊され得るが、本発明は、上記の自己/非自己認識遺伝子の不活化および上述の少なくとも1種の非内在性免疫抑制ポリペプチドの異所発現のいずれかと、そのような不活化を組み合わせる状況を包含する。

【 0 2 2 3 】

以下の表7は、5種のTRAC標的および2種のTRBC標的のヌクレオチド配列、ならびに対応する左TALENおよび右TALENのいくつかを提示する。付加的な配列は、出願WO2014/184741およびWO2014/184744に見出され得る。

40

【 0 2 2 4 】

（表7）TRACおよびTRBCのTALEヌクレアーゼ、ならびにヒトの対応する遺伝子におけるTALEヌクレアーゼ標的部位の配列の説明

標的	標的配列	半TALEヌクレアーゼ
TRAC_T00	TGATCCTCTTGTCCCACAGATATCC Agaaccctgaccctg	TRAC_T00-L TALEN (SEQ ID NO: 52)
	CCGTGTACCAGCTGAGAGA (SEQ ID NO 51)	TRAC_T00-R TALEN (SEQ ID NO: 53)
TRAC_T01	TTGTCCCACAGATATCC Agaaccctgaccctg	TRAC_T01-L TALEN (SEQ ID NO: 55)
	CCGTGTACCAGCTGAGA (SEQ ID NO: 54)	TRAC_T01-R TALEN (SEQ ID NO: 56)
TRAC_T02	TTTAGAAAGTTCTGTG atgtcaagctggtcg AGAAAAGCTTGAAACA (SEQ ID NO: 57)	
TRAC_T03	TCCAGTGACAAGTCTGT ctgcctattcaccga TTTGATTCTCAAACAA (SEQ ID NO: 58)	
TRAC_T04	TATATCACAGACAAAAAC tgtgctagacatgag GTCTATGGACTTCAAGA (SEQ ID NO: 59)	
TRAC_T05	TGAGGTCTATGGACTTC aagagcaacagtct GTGGCCTGGAGCAACAA (SEQ ID NO: 60)	
TRBC_T01	TGTGTTGAGCCATCAG aagcagagatctccc	TRBC_T01-L TALEN (SEQ ID NO: 62)
	ACACCCAAAAGGCCACA (SEQ ID NO: 61)	TRBC_T01-R TALEN (SEQ ID NO: 63)
TRBC_T02	TTCCCACCCGAGGTCGC tgttttgagccatca	TRBC_T02-L TALEN (SEQ ID NO: 65)
	GAAGCAGAGATCTCCA (SEQ ID NO: 64)	TRBC_T02-R TALEN (SEQ ID NO: 66)

【0225】

単鎖CAR

本発明の一つの局面によると、方法は、悪性細胞または感染細胞の表面に発現された少なくとも1種の抗原に対するキメラ抗原受容体（CAR）をコードするヌクレオチド配列を含む外来性核酸分子を、T細胞へ導入する工程を含む。それらは、単鎖または多鎖の構成に従って設計され得る。

【0226】

一つの態様において、キメラ抗原受容体（CAR）は、単鎖CARである。

【0227】

好ましい態様において、細胞外リガンド結合ドメインはscFvである。非限定的な例として、ラクダシングルドメイン抗体断片、または血管内皮増殖因子ポリペプチド、インテグリン結合ペプチド、ヘレグリン、もしくはIL-13ムテインのような受容体リガンド、抗体

10

20

30

40

50

結合ドメイン、抗体超可変ループ、またはCDRのような、scFv以外の結合ドメインも、リンパ球の予め定義されたターゲティングのために使用され得る。

【0228】

本発明によるscFvの好ましい例として、VH鎖およびVL鎖は、SEQ ID NO:67 (CD19抗原)、SEQ ID NO:68 (CD38抗原)、SEQ ID NO:69 (CD123抗原)、SEQ ID NO:70 (CS1抗原)、SEQ ID NO:71 (BCMA抗原)、SEQ ID NO:72 (FLT-3抗原)、SEQ ID NO:73 (CD33抗原)、SEQ ID NO:74 (CD70抗原)、SEQ ID NO:75 (EGFR-3v抗原)、およびSEQ ID NO:76 (WT1抗原)との80%超、好ましくは90%超、より好ましくは95%超の同一性を有する抗原性標的配列を有する。標的とされる腫瘍細胞の表面抗原の他の例は、CLL1、Hsp70、CD22、MUC16、PRAME、TSPAN10、ROR1、GD3、CT83、およびメソテリンである。

10

【0229】

一態様によると、本発明は、工程(c)が、非内在性免疫抑制ポリペプチドであるPD-L1リガンドおよび/またはCTLA-4免疫グロブリンの同種免疫細胞における発現によって実施され、同種免疫細胞が、抗CD123キメラ抗原受容体の発現によってさらに改変される、前記の方法に関する。

【0230】

好ましい態様によると、抗CD123 CAR/PD-L1リガンド/CTLA-4 Igを発現する同種免疫細胞が、PD-1遺伝子の発現の不活性化を受けるため、方法の工程(c)においてさらに改変される。

20

【0231】

好ましい態様において、a)の前記ポリペプチドは、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との間にストーク領域をさらに含む。本明細書で使用する「ストーク領域」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、ストーク領域は、細胞外リガンド結合ドメインにさらなる可動性および接近性を与えるために用いられる。ストーク領域は、300個までのアミノ酸、好ましくは10~100個のアミノ酸、最も好ましくは25~50個のアミノ酸を含んでもよい。ストーク領域は、天然分子の全てもしくは一部、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から得られてもよい。または、ストーク領域は天然ストーク配列に対応する合成配列でもよく、完全に合成のストーク配列でもよい。

30

【0232】

前記ポリペプチドは少なくとも1つのシグナル伝達ドメインをさらに含む。最も好ましい態様において、前記シグナル伝達ドメインは、CD28、OX40、ICOS、CD137、およびCD8からなる群より選択される。

【0233】

Fc RI 鎖、鎖、および/または鎖断片の前記C末端細胞質テールはTNFR関連因子2(TRAF2)結合モチーフをさらに含む。最も好ましい態様において、Fc RI 鎖、鎖、および/または鎖の前記C末端細胞質テールは共刺激TNFRメンバーファミリーの細胞質内テールと交換される。共刺激TNFRメンバーファミリーの細胞質テールは、メジャーな保存されたモチーフ(P/S/A)(Q/E)Eまたはマイナーモチーフ(PXQXXD)からなるTRAF2結合モチーフを含有する。式中、Xは任意のアミノ酸である。TRAFタンパク質は、受容体三量体形成に応答して多くのTNFRの細胞内テールに動員される。

40

【0234】

Fc RI 鎖、鎖、および/または鎖の前記細胞質内ドメインは、TCR 鎖(CD3とも呼ぶ)の細胞質内ドメインと交換される。別の好ましい態様において、Fc RI 鎖、鎖、および/または鎖の前記細胞質内ドメインは少なくとも1つのさらなる免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ(ITAM)を含む。ITAMは、syk/zap70クラスチロシンキナーゼの結合部位として働く、様々な受容体の細胞質内テールに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、TCR、FCR、FCR、CD3、CD3、CD3、CD5、CD22、CD79a、CD79b、およびCD66dに由来するITAMが

50

含まれる。

【0235】

例えば、単鎖CARの例は、SEQ ID NO:77によって示される。

【0236】

好ましい態様において、前記のCARは、抗CD123単鎖CAR、抗CS1単鎖CAR、抗CD38単鎖CAR、抗CLL1単鎖CAR、抗Hsp70単鎖CAR、抗EGFRvIII単鎖CAR、抗BCMA単鎖CAR、抗CD33単鎖CAR、抗FLT3単鎖CAR、抗CD70単鎖CAR、抗WT1単鎖CAR、抗MUC16単鎖CAR、抗PRAME単鎖CAR、抗TSPAN10単鎖CAR、抗ROR1単鎖CAR、抗GD3単鎖CAR、抗CT83単鎖CAR、およびメソテリン単鎖CARからなる群において選択される単鎖CARであり；

- 免疫細胞において発現されるCARは、図24に例示されるV1、V3、またはV5より選択されるポリペプチド構造のうちの一つを有し；

- 構造は、

- ・それぞれ、抗CD123 mAb、抗CS1 mAb、抗CD38 mAb、抗CLL1 mAb、抗Hsp70 mAb、抗EGFRvIII mAb、抗BCMA mAb、抗CD33 mAb、抗FLT3 mAb、抗CD70 mAb、抗WT1 mAb、抗MUC16 mAb、抗PRAME mAb、抗TSPAN10 mAb、抗ROR1 mAb、抗GD3 mAb、抗CT83 mAb、および抗メソテリンmAbからなる群において選択されるモノクローナル抗体に由来するVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメイン；

- ・CD8 、FcERIII 、およびIgG1からなる群において選択されるヒンジ；

- ・CD8 膜貫通ドメイン；

- ・CD3 シグナリングドメインを含む細胞質ドメイン；ならびに

- ・4-1BB共刺激ドメイン：を含む。

【0237】

膜貫通ドメイン（即ち、CD8 TM）、共刺激ドメイン（即ち、4-1BB）、ヒンジ（CD8 、FcERIII 、IgG1）、細胞質シグナリングドメイン（ITAM CD3 ）を含むCARの構成において選択される他の成分は、全て、前記のWO2015140268およびWO2015121454の出願において既に記載されたものであってよい。

【0238】

例として、VHおよびVLは、抗CD123については出願WO2015140268に、抗CS1および抗CD38についてはWO2015121454に記載されたものであってよい。

【0239】

多鎖キメラ抗原受容体（CAR）

別の態様において、本発明は、本発明のT細胞のような操作された免疫細胞の作製および増殖に特に適した多鎖キメラ抗原受容体（CAR）に関する。多鎖CARは以下の成分：

(a) Fc RI 鎮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個のポリペプチド、

(b) N末端およびC末端の細胞質テールの一部ならびにFc RI 鎮の膜貫通ドメインを含む1個のポリペプチド、ならびに/または

(c) 細胞質内テールの一部およびFc RI 鎮の膜貫通ドメインを各々含む2個のポリペプチド

のうちの少なくとも2個を含み、それによって異なるポリペプチドが、自然に共に多量体形成して、二量体、三量体、または四量体のCARを形成する。

【0240】

本発明のCARは、上述の「多鎖CAR」であってもよい。即ち、細胞外結合ドメインおよびシグナリングドメインは、好ましくは、異なるポリペプチド鎖上に置かれるが、共刺激ドメインは、同一のポリペプチド上に置かれてもよいしまたは第3のポリペプチド上に置かれてもよい。そのような多鎖CARは、Fc RI 鎮の高親和性IgE結合ドメインをsc Fvのような細胞外リガンド結合ドメインに交換することによって、Fc RI から導出され得るが（Ravetch et al, 1989）、Fc RI 鎮および/または鎖のN末端および/またはC末端のテールは、それぞれ、シグナル伝達ドメインおよび共刺激ドメインと融合している。細胞外リガンド結合ドメインは、T細胞の特異性を細胞標的に対して向け直す役割を有し、

10

20

30

40

50

シグナル伝達ドメインは、免疫細胞応答を活性化するかまたは低下させる。Fc RI由来のポリペプチド、ポリペプチド、およびポリペプチドに由来する異なるポリペプチドが膜近傍に位置する膜貫通ポリペプチドであるという事実は、より可動性の構成をCARに提供し、標的分子に対する特異性を改善し、免疫細胞のバックグラウンド活性化を低下させる。多鎖構成は、WO2014039523により具体的に開示されている。

【0241】

別の態様において、上記のような免疫細胞において発現されるCARは、抗CD123多鎖CAR、抗CS1多鎖CAR、抗CD38多鎖CAR、抗CLL1多鎖CAR、または抗Hsp70多鎖CARからなる群において選択される。

【0242】

別的好ましい態様において、前記のCARは、抗CD123多鎖CAR、抗CS1多鎖CAR、抗CD38多鎖CAR、抗CLL1多鎖CAR、抗Hsp70多鎖CAR、抗EGFRvIII多鎖CAR、抗BCMA多鎖CAR、抗CD33多鎖CAR、抗FLT3多鎖CAR、抗CD70多鎖CAR、抗WT1多鎖CAR、抗MUC16多鎖CAR、抗PRAME多鎖CAR、抗TSPAN10多鎖CAR、抗ROR1多鎖CAR、抗GD3多鎖CAR、抗CT83多鎖CAR、およびメソテリン多鎖CARからなる群において選択される多鎖CARである。

10

【0243】

そのような多鎖CAR構成は、参照によって本明細書に組み入れられる、WO2014/039523、具体的には、図2～4および14～21頁に開示されている。

【0244】

本明細書において使用される「～の一部」という用語は、分子のサブセット、即ち、より短いペプチドをさす。あるいは、ポリペプチドのアミノ酸配列機能性バリエントを、ポリペプチドをコードするDNAにおける変異によって調製することができる。そのような機能性バリエントは、例えば、アミノ酸配列内の残基の欠失または挿入または置換を含む。最終構築物が、所望の活性を保有する限り、具体的には、特異的な抗標的細胞免疫活性を示す限り、欠失、挿入、および置換の任意の組み合わせが、最終構築物に到達するために作成されてもよい。

20

【0245】

本発明による前記多鎖CARをコードするポリヌクレオチド、ベクターも本発明の範囲に含まれる。

【0246】

特定の態様において、本発明は、免疫療法のために免疫細胞、例えばT細胞を調製する方法に関し、本方法は、前記多鎖CARを含む異なるポリペプチドを前記T細胞に導入する工程、および前記細胞を増殖させる工程を含む。

30

【0247】

本発明はまた、細胞を操作する前記方法によって入手することができる、単離された細胞または細胞株に関する。特に、前記単離された細胞は、前記多鎖CARを含むポリペプチドをコードする外因性ポリヌクレオチド配列を含む。

【0248】

二重特異性抗体

さらなる態様によれば、以前に述べた様々な方法によって得られた操作された免疫細胞、例えばT細胞は、二重特異性抗体を用いてさらに曝露されてもよい。前記T細胞は、患者に投与される前にエクスピボで、または患者に投与された後でインビボで、二重特異性抗体に曝露されてもよい。前記二重特異性抗体は、別個の抗原特性をもつ2つの可変領域を含み、これにより、操作された細胞は標的抗原に近接することができる。非限定的な例として、前記二重特異性抗体は、腫瘍マーカーおよびリンパ球抗原、例えば、CD3に対して向けられ、腫瘍に対する任意の循環T細胞を再誘導および活性化する能力を有する。

40

【0249】

送達方法

前記の様々な方法は、pT またはその機能的変種、レアカッティングエンドヌクレアーゼ、TALE-ヌクレアーゼ、CARまたは多鎖CARを、任意で、DNA末端処理酵素または外因性核

50

酸と共に細胞に導入する工程を伴う。

【0250】

非限定的な例として、レアカッティングエンドヌクレアーゼ、TALE-ヌクレアーゼ、非内因性免疫抑制ポリペプチドをコードする遺伝子、CARまたは多鎖CARは、任意で、DNA末端処理酵素または外因性核酸と共に、1つのプラスミドベクターまたは異なるプラスミドベクターによってコードされるトランスジーンとして導入されてもよい。異なるトランスジーンが、リボソームスキップ(ribosomal skip)配列をコードする核酸配列、例えば、2Aペプチドをコードする配列を含む1つのベクターに入れられてもよい。ピコルナウイルスのアフトウイルス属(Aphthovirus)サブグループにおいて特定された2Aペプチドがあると、リボソームは、コドンによってコードされる2個のアミノ酸間にペプチド結合を形成することなく、あるコドンから次のコドンに「スキップ」する(Donnelly et al., J. of General Virology 82: 1013-1025 (2001); Donnelly et al., J. of Gen. Virology 78: 13-21 (1997); Doronina et al., Mol. And. Cell. Biology 28(13): 4227-4239 (2008); Atkins et al., RNA 13: 803-810 (2007)を参照されたい)。「コドン」とは、リボソームによって、1個のアミノ酸残基に翻訳される、mRNA上にある(またはDNA分子センス鎖上にある)3個のヌクレオチドを意味する。従って、ポリペプチドが、インフレームの2Aオリゴペプチド配列で分けられたとき、mRNAの中にある1つの連続したオープンリーディングフレームから2つのポリペプチドが合成される場合がある。このようなリボソームスキップ機構は当技術分野において周知であり、1つのメッセンジャーRNAによってコードされるいくつかのタンパク質を発現させるために、いくつかのベクターによって用いられることが知られている。非限定的な例として、本発明では、レアカッティングエンドヌクレアーゼおよびDNA末端処理酵素または多鎖CARの異なるポリペプチドを細胞内で発現させるために2Aペプチドが用いられた。

10

20

30

40

50

【0251】

前記プラスミドベクターは、前記ベクターを受け取った細胞を特定および/または選択する選択マーカーを含有してもよい。

【0252】

前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを細胞に導入した結果として、ポリペプチドはインサイチューで細胞内で合成されてもよい。または、前記ポリペプチドは細胞外で産生され、次いで、細胞に導入される場合がある。ポリヌクレオチド構築物を動物細胞に導入するための方法は当技術分野において公知であり、非限定的な例として、ポリヌクレオチド構築物が細胞ゲノムに組み込まれる安定形質転換法、ポリヌクレオチド構築物が細胞ゲノムに組み込まれない一過的形質転換法、およびウイルスを介した方法を含む。前記ポリヌクレオチドは、例えば、組換えウイルスベクター(例えば、レトロウイルス、アデノウイルス)、リボソームなどによって細胞に導入されてもよい。例えば、一過的形質転換法には、例えば、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、またはパーティクルポンバードメントが含まれる。前記ポリヌクレオチドは、細胞内で発現されることを考えて、ベクター、さらに詳細にはプラスミドまたはウイルスに含まれてもよい。

【0253】

エレクトロポレーション

本発明によるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、例えば、エレクトロポレーションによって、細胞に直接導入されるmRNAでもよい。本発明者らは、T細胞におけるmRNAエレクトロポレーションに最適な条件を確かめた。

【0254】

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。この技術は、PulseAgile(Cellecxisの所有権)エレクトロポレーション波形の使用に基づいており、パルス持続時間、強度、ならびにパルス間の間隔の正確な制御を与える(米国特許第6,010,613号および国際PCT出願WO2004083379)。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、これらのパラメータは全て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سف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。

【 0 2 5 5 】

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んでもよい。

【 0 2 5 6 】

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。

【0257】

非限定的な例として、前記RNAは、レアカッティングエンドヌクレアーゼ、レアカッティングエンドヌクレアーゼの1つの単量体、例えば、半TALEヌクレアーゼ、キメラ抗原受容体、多鎖キメラ抗原受容体の少なくとも1つの成分、外因性核酸、1つのさらなる触媒ドメインをコードする。

【 0 2 5 8 】

免疫細胞の活性化および増殖

遺伝子組換えする前でも遺伝子組換えした後でも、免疫細胞、例えばT細胞は、一般的に、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活性化および増殖することができる。T細胞はインビトロで増殖させてよく、インビボで増殖させてよい。

[0 2 5 9]

一般的に、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と、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ている表面と接触させることによって増殖する。

【0260】

特に、免疫細胞、例えば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抗体との接觸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觸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、免疫細胞増殖を刺激するのに適した条件下で、免疫細胞集団を抗CD3抗体および抗CD28抗体と接觸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、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細胞と接觸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- γ 、IL-4、IL-7、GM-CSF、-10、-2、IL-15、TGF β 、およびTNF- α 、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°C)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免疫細胞、例えばT細胞は異なる特徴を示す場合がある。

【0261】

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に培養することによって増殖させてもよい。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てもよい。

【0262】

操作された免疫細胞およびそれらの宿主細胞との相互作用

本発明の範囲には、以前に述べられた方法のいずれか一つに従って得られた単離された免疫細胞も包含される。本発明による前記免疫細胞は造血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、さらに詳細には、非ヒト幹細胞、臍帯血幹細胞、前駆細胞、骨髓幹細胞、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。

【0263】

一態様によると、免疫細胞は、造血細胞、より好ましくは、初代細胞である。

【0264】

好ましい態様によると、操作された同種免疫細胞は、少なくとも1種の非内在性免疫抑制ポリペプチドとの接觸の後、T制御性細胞の阻害を特異的に誘導しない。

10

20

30

40

50

【0265】

より好ましい態様によると、操作された同種免疫細胞は、少なくとも1種の非内在性免疫抑制ポリペプチドとの接触の後、CD8+T細胞の阻害を特異的に誘導する。

【0266】

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。免疫細胞、例えばT細胞は、末梢血単核球、骨髓、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。入手可能であり、かつ当業者に公知の任意の数の免疫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、癌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。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もよい。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免疫細胞、例えばT細胞から得られた細胞株も含まれる。免疫抑制処置に対して耐性があり、かつ前記の方法によって入手することができる改変された細胞が本発明の範囲に含まれる。

10

【0267】

別の態様において、本発明による単離された細胞は、TCR、MHCクラスI成分、b-2ミクログロブリン(B2M)、TAP1、およびLMP2のような、自己抗原および非自己抗原の認識に関するポリペプチドをコードする1種の不活性化された内在性遺伝子を含む。さらに、操作された同種免疫細胞は、少なくとも1種の分泌型非内在性免疫抑制ポリペプチドを発現させることによって、または少なくとも1種の非内在性免疫抑制ポリペプチドと共に免疫細胞をインキュベートすることによって、少なくとも1種の非内在性免疫抑制ポリペプチドと接触させられる。

20

【0268】**治療用途**

別の態様において、以前に述べられた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薬として使用することができる。別の態様において、前記医薬は、癌または感染症の処置を必要とする患者において癌または感染症を処置するのに使用することができる。別の態様において、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、癌またはウイルス感染症の処置を必要とする患者において癌またはウイルス感染症を処置するための医薬の製造において使用することができる。

30

【0269】

別の局面において、本発明は、処置を必要とする患者において患者を処置するための方法に依拠し、本方法は、

(a) 以前に述べた方法のいずれか1つによって入手可能な免疫細胞、例えばT細胞を準備する工程、

(b) 前記形質転換された免疫細胞、例えばT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。

【0270】

一態様において、本発明の前記免疫細胞、例えばT細胞は活発にインビボで免疫細胞、例えばT細胞増殖することができ、長期間にわたって持続することができる。

40

【0271】

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。

【0272】

本発明は、典型的にはドナーから得られた免疫細胞、例えばT細胞を形質転換して非ア

50

口反応性細胞にすることができる限り同種異系免疫療法に特に適している。これは標準的なプロトコール下で行われ、必要に応じて何回でも再現される場合がある。結果として得られた改変された免疫細胞はプールされ、1人または数人の患者に投与される場合があり、それによって「既製の」治療製品として利用可能になる。

【0273】

開示された方法と共に使用することができる細胞は前の項において説明されている。前記処置は、癌、ウイルス感染症、自己免疫障害、または移植片対宿主病(GvHD)と診断された患者を処置するのに使用することができる。処置され得る癌には、血管新生していない腫瘍、またはまだ実質的に血管新生していない腫瘍、ならびに血管新生した腫瘍が含まれる。癌は、非固体腫瘍(例えば、血液腫瘍、例えば、白血病、およびリンパ腫)を含んでもよく、固体腫瘍を含んでもよい。本発明のCARを用いて処置される癌のタイプには、癌腫、芽腫、および肉腫、ならびにある特定の白血病またはリンパ系腫瘍、良性腫瘍および悪性腫瘍、ならびに悪性疾患、例えば、肉腫、癌腫、および黒色腫が含まれるが、これに限定されない。成人腫瘍/癌および小児科腫瘍/癌も含まれる。

10

【0274】

それは、抗体治療、化学療法、サイトカイン治療、樹状細胞治療、遺伝子治療、ホルモン治療、レーザー光線治療、および放射線治療の群より選択される、癌に対する1種以上の治療との組み合わせ処置であり得る。

20

【0275】

本発明の好ましい態様によると、処置は、免疫抑制処置を受けている患者に施すことができる。実際、本発明は、好ましくは、そのような免疫抑制剤の受容体をコードする遺伝子の不活性化のため、少なくとも1種の免疫抑制剤に対して抵抗性にされた細胞または細胞の集団に依拠する。この局面において、免疫抑制処置は、患者における本発明によるT細胞の選択および増殖を支援するべきである。

20

【0276】

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。

30

【0277】

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。

40

【0278】

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。

【0279】

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

50

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、シクロスボリン、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、シクロスボリン、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（シクロスボリンおよび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 66:8 10
07-815, 11; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Citrr. Op in. 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、増殖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、増殖させた細胞は、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TCR 遺伝子および/またはTCR 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。
20

【0280】

他の定義

ポリペプチド配列内のアミノ酸残基は、1文字コードによって本明細書において表記され、例えば、QはGln、すなわちグルタミン残基を意味し、RはArg、すなわちアルギニン残基を意味し、DはAsp、すなわちアスパラギン酸残基を意味する。
30

【0281】

アミノ酸置換とは、あるアミノ酸残基の他のアミノ酸残基への交換を意味し、例えば、ペプチド配列内のアルギニン残基のグルタミン残基への交換は、アミノ酸置換である。

【0282】

ヌクレオチドは以下のように表記される：1文字コードがヌクレオシドの塩基を表記するために使用される：aはアデニンであり、tはチミンであり、cはシトシンであり、gはグアニンである。縮重ヌクレオチドのため、rはgまたはa（プリンヌクレオチド）を表し、kはgまたはtを表し、sはgまたはcを表し、wはaまたはtを表し、mはaまたはcを表し、yはtまたはc（ピリミジンヌクレオチド）を表し、dはg、a、またはtを表し、vはg、a、またはcを表し、bはg、t、またはcを表し、hはa、t、またはcを表し、nはg、a、t、またはcを表す。
40

【0283】

本明細書において使用されるように、「核酸」または「ポリヌクレオチド」とは、デオキシリボ核酸（DNA）またはリボ核酸（RNA）のようなヌクレオチドおよび/またはポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって生成された断片、ならびにライゲーション、切断、エンドヌクレアーゼ作用、およびエキソヌクレアーゼ作用のいずれかによって生成された断片をさす。核酸分子は、（DNAおよびRNAのような）天然に存在するヌクレオチド、または天然に存在するヌクレオチドの類似体（例えば、天然に存在するヌクレオチドの鏡像異性体）、または両方の組み合わせであるモノマーか
50

ら構成され得る。改変型ヌクレオチドは、糖モエティおよび／またはピリミジン塩基モエティもしくはプリン塩基モエティに変化を有し得る。糖修飾には、例えば、1つ以上のヒドロキシル基のハロゲン、アルキル基、アミン、およびアジド基への交換が含まれ、または糖がエーテルもしくはエステルとして官能化されていてもよい。さらに、糖モエティ全體が、アザ糖および炭素環式糖類似体のような立体的かつ電子的に類似した構造に交換されてもよい。塩基モエティの修飾の例には、アルキル化されたプリンおよびピリミジン、アシリ化されたプリンもしくはピリミジン、またはその他の周知の複素環式置換基が含まれる。核酸モノマーは、ホスホジエステル結合またはそのような結合の類似体によって連結され得る。核酸は、一本鎖または二本鎖のいずれかであり得る。

【0284】

10

「DNA標的」、「DNA標的配列」、「標的DNA配列」、「核酸標的配列」、「標的配列」、または「プロセシング部位」とは、本発明によるレアカッティングエンドヌクレアーゼによって標的化および処理することができるポリヌクレオチド配列を意図する。これらの用語は、細胞内にある特定のDNA場所、好ましくは、ゲノム場所だけでなく、遺伝物質の本体とは独立して存在することができる遺伝物質部分、例えば、非限定的な例として、プラスミド、エピソーム、ウイルス、トランスポゾン、またはミトコンドリアなどの細胞小器官の中にある遺伝物質部分も指す。TALE-ヌクレアーゼ標的の非限定的な例として、標的とするゲノム配列は、一般的に、15bpスペーサーで分けられた2つの17bp長の配列(半標的(half target)と呼ぶ)からなる。それぞれの半標的は、EF1- プロモーターまたはT7プロモーターの制御下でプラスミドにコードされる、非限定的な例として表2、表6、表7、および表11に列挙したTALE-ヌクレアーゼの反復によって認識される。核酸標的配列は、表2および表7に示したように、前記標的の一方の鎖の5' 3'配列によって規定される。

20

【0285】

キメラ抗原受容体(CAR)とは、特異的な抗標的細胞免疫活性を示すキメラタンパク質を生成するため、標的細胞上に存在する成分に対する結合ドメイン、例えば、所望の抗原(例えば、腫瘍抗原)に対する抗体に基づく特異性を、T細胞受容体を活性化する細胞内ドメインと組み合わせた分子を表す。一般に、CARは、細胞外単鎖抗体(scFvFc)がT細胞抗原受容体複合体鎖の細胞内シグナリングドメインに融合したもの(scFvFc:)からなり、T細胞において発現された時に、モノクローナル抗体の特異性に基づき、抗原認識を向け直す能力を有している。本発明において使用されるCARの一例は、CD19抗原に対するCARであり、非限定的な例として、アミノ酸配列: SEQ ID NO:6を含み得る。

30

【0286】

「送達ベクター」とは、本発明において必要とされる薬剤／化学物質および分子(タンパク質または核酸)を、細胞と接触させるため(即ち、「接触」)、または細胞もしくは細胞内区画へ送達するため(即ち、「導入」)、本発明において使用され得る送達ベクターを表す。それには、リポソーム送達ベクター、ウイルス送達ベクター、薬物送達ベクター、化学的担体、ポリマー担体、リポブレックス、ポリブレックス、デンドリマー、微小気泡(超音波造影剤)、ナノ粒子、乳濁液、またはその他の適切な移入ベクターが含まれるが、これらに限定されない。これらの送達ベクターは、分子、化学物質、高分子(遺伝子、タンパク質)、またはプラスミド、Diatosによって開発されたペプチドのようなその他のベクターの送達を可能にする。これらのケースにおいて、送達ベクターは分子担体である。「送達ベクター」とは、トランスフェクションを実施するための送達方法も表す。

40

【0287】

「ベクター」という用語は、それが連結された別の核酸を輸送することができる核酸分子をさす。本発明における「ベクター」には、ウイルスベクター、プラスミド、RNAベクター、または染色体核酸、非染色体核酸、半合成核酸、もしくは合成核酸からなり得る直鎖状もしくは環状のDNA分子もしくはRNA分子が含まれるが、これらに限定されない。好ましいベクターは、それらが連結された核酸の自律複製が可能なものの(エピソームベクター)および／または発現が可能なものの(発現ベクター)である。多数の適当なベクターが、当業者に公知であり、市販されている。

50

【0288】

ウイルスベクターには、レトロウイルス、アデノウイルス、パルボウイルス（例えば、アデノ随伴ウイルス）、コロナウイルス、オルソミクソウイルス（例えば、インフルエンザウイルス）、ラブドウイルス（例えば、狂犬病ウイルスおよび水疱性口内炎ウイルス）、パラミクソウイルス（例えば、麻疹およびセンダイ）のようなマイナス鎖RNAウイルス、ピコルナウイルスおよびアルファウイルスのようなプラス鎖RNAウイルス、ならびにアデノウイルス、ヘルペスウイルス（例えば、単純ヘルペスウイルス1型および2型、エプスタインバーウイルス、サイトメガロウイルス）、およびポックスウイルス（例えば、ワクシニア、鶏痘、およびカナリアポックス）を含む二本鎖DNAウイルスが含まれる。他のウイルスには、例えば、ノーウォークウイルス、トガウイルス、フラビウイルス、レオウイルス、パポーバウイルス、ヘパドナウイルス、および肝炎ウイルスが含まれる。レトロウイルスの例には、トリ白血病肉腫、哺乳動物C型、B型ウイルス、D型ウイルス、HTLV-BLV群、レンチウイルス、スプーマウイルスが含まれる (Coffin,J.M.,Retroviridae:The viruses and their replication,In Fundamental Virology,Third Edition,B.N.Fields,et al.,Eds.,Lippincott-Raven Publishers,Philadelphia,1996)。

10

【0289】

「レンチウイルスベクター」とは、比較的大きいパッケージング能力、低下した免疫原性、および広範囲の異なる細胞型を高い効率で安定的に形質導入する能力のため、遺伝子送達のために極めて有望である、HIVに基づくレンチウイルスベクターを意味する。レンチウイルスベクターは、一般的には、3種（パッケージング、エンベロープ、および移入）またはそれ以上のプラスマドを産生細胞に一過性トランスフェクションした後、生成される。HIVと同様に、レンチウイルスベクターは、ウイルス表面糖タンパク質の細胞表面上の受容体との相互作用を通して標的細胞に侵入する。侵入後、ウイルスRNAが、ウイルス逆転写酵素複合体によって媒介される逆転写を受ける。逆転写の産物は、感染細胞のDNAへのウイルス組み込みのための基質となる二本鎖の直鎖状ウイルスDNAである。「組込みレンチウイルスベクター（またはLV）」とは、非限定的な例として、標的細胞のゲノムに組み込まれ得るそのようなベクターを意味する。反対に、「非組込みレンチウイルスベクター（またはNILV）」とは、ウイルスインテグラーゼの作用を通して標的細胞のゲノムに組み込まれない効率的な遺伝子送達ベクターを意味する。

20

【0290】

30

送達ベクターおよびベクターは、ソノポレーション (sonoporation) もしくは電気穿孔のような細胞透過処理技術、またはこれらの技術の変法と関連しているかまたは組み合わせられていてよい。

【0291】

細胞とは、真核生物の生存細胞、初代細胞、およびインビトロ培養のためのこれらの生物に由来する細胞株を表す。

【0292】

40

「初代細胞」とは、集団倍化をほとんど受けておらず、従って、腫瘍形成性の連続細胞株または人為的に不死化された細胞株と比較して、それが由來した組織の主な機能的成分および特徴をよりよく表している、生存組織（即ち、生検材料）から直接採取され、インビトロでの増殖のために確立された細胞を表す。

【0293】

非限定的な例として、細胞株は、CHO-K1細胞；HEK293細胞；Caco2細胞；U2-OS 細胞；NIH 3T3細胞；NSO細胞；SP2細胞；CHO-S細胞；DG44細胞；K-562細胞、U-937細胞；MRC5細胞；IMR90細胞；ジャーカット細胞；HepG2細胞；HeLa細胞；HT-1080細胞；HCT-116細胞；Hu-h7細胞；Huvec細胞；Molt 4細胞からなる群より選択される。

【0294】

50

これらの細胞株は、全て、関心対象の遺伝子またはタンパク質を作製し、発現させ、定量化し、検出し、研究するための細胞株モデルを提供するため、本発明の方法によって改変され得；これらのモデルは、研究および作製、ならびに非限定的な例としての化学物質

、生物燃料、治療薬、および農学のような様々な領域において、関心対象の生理活性分子をスクリーニングするためにも使用され得る。

【0295】

「変異」とは、ポリヌクレオチド(cDNA、遺伝子)またはポリペプチドの配列における1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、20個、25個、30個、40個、50個、またはそれ以上までのヌクレオチド／アミノ酸の置換、欠失、挿入を表す。変異は、遺伝子のコード配列またはその制御配列に影響を与える場合がある。また、ゲノム配列の構造またはコードされたmRNAの構造／安定性に影響を与える場合もある。

【0296】

「バリエント」とは、親分子のアミノ酸配列における少なくとも1個の残基の変異または交換によって入手されたリピートバリエント、バリエント、DNA結合バリエント、TALEヌクレアーゼバリエント、ポリペプチドバリエントを表す。

【0297】

「機能的バリエント」とは、タンパク質またはタンパク質ドメインの触媒活性変異体を表し；そのような変異体は、その親のタンパク質またはタンパク質ドメインと比較して、同一の活性、または付加的な特性、またはより高いかもしくはより低い活性を有し得る。

【0298】

「遺伝子」とは、特定のタンパク質またはタンパク質セグメントをコードする、染色体に沿って直線的に並べられたDNAセグメントからなる遺伝の基本単位を意味する。遺伝子は、典型的に、プロモーター、5'非翻訳領域、1つまたは複数のコード配列(エキソン)、任意で、イントロン、3'非翻訳領域を含む。遺伝子は、ターミネーター、エンハンサー、および/またはサイレンサーをさらに含んでもよい。

【0299】

本明細書で使用する「遺伝子座」という用語は、染色体上にあるDNA配列(例えば、遺伝子)の特定の物理的な場所である。「遺伝子座」という用語は、染色体上にあるレアカッティングエンドヌクレアーゼ標的配列の特定の物理的な場所を指すことがある。このような遺伝子座は、本発明によるレアカッティングエンドヌクレアーゼによって認識および/または切断される標的配列を含んでもよい。本発明の関心対象の遺伝子座は、細胞の遺伝物質の本体(すなわち、染色体)に存在する核酸配列だけでなく、遺伝物質の前記本体とは独立して存在することができる遺伝物質部分、例えば、非限定的な例として、プラスミド、エピソーム、ウイルス、トランスポゾン、またはミトコンドリアなどの細胞小器官の中にある遺伝物質部分も適格にできる(qualify)ことが理解される。

【0300】

「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任意の野生型酵素または変種酵素を指す。エンドヌクレアーゼは、DNA分子もRNA分子もその配列とは無関係に切断せず、DNA分子またはRNA分子の特定のポリヌクレオチド配列を認識および切断する。この特定のポリヌクレオチド配列は「標的配列」または「標的部位」とさらに呼ばれる。エンドヌクレアーゼは、典型的に、長さ12塩基対(bp)を超える、より好ましくは14～55bpのポリヌクレオチド認識部位を有するときにレアカッティングエンドヌクレアーゼと分類することができる。レアカッティングエンドヌクレアーゼは、規定された遺伝子座においてDNA二本鎖切断(DSB)を誘導することによってHRを大幅に増加させる(Rouet, Smith et al. 1994; Choulika, Perrin et al. 1995; Pingoud and Silva 2007)。レアカッティングエンドヌクレアーゼは、例えば、ホーミングエンドヌクレアーゼ(Paques and Duchateau 2007)、操作されたジンクフィンガードメインとFokIなどの制限酵素の触媒ドメインとの融合に起因するキメラジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)(Porteus and Carroll 2005)、または化学的エンドヌクレアーゼ(Eisenschmidt, Lanio et al. 2005; Arimondo, Thomas et al. 2006)でもよい。化学的エンドヌクレアーゼにおいて、化学的クリーバー(cleaver)またはペプチドクリーバーは、核酸ポリマー、または特定の標的配列を認識する別

10

20

30

40

50

のDNAと結合され、それによって、切断活性を特定の配列に標的化する。化学的エンドヌクレアーゼはまた、特定のDNA配列に結合することが知られている、オルトフェナントロリン結合体のような合成ヌクレアーゼ、DNA切断分子、および三重鎖形成オリゴヌクレオチド(TFO)(Kalish and Glazer 2005)も包含する。このような化学的エンドヌクレアーゼは、本発明による「エンドヌクレアーゼ」という用語に含まれる。

【0301】

レアカッティングエンドヌクレアーゼはまた、例えば、FokI触媒ドメインと、ザントモナス属(Xanthomonas)の植物病原体が感染プロセスにおいて使用するタンパク質ファミリーである転写アクチベーター様エフェクター(TALE)に由来するDNA結合ドメインを用いる新たなクラスのキメラヌクレアーゼであるTALE-ヌクレアーゼでもよい(Boch, Scholze et al. 2009; Moscou and Bogdanove 2009; Christian, Cermak et al. 2010; Li, Huang et al.)。FokIベースのTALE-ヌクレアーゼ(TALE-ヌクレアーゼ)の機能レイアウトは本質的にZFNの機能レイアウトであり、ジンクフィンガーDNA結合ドメインがTALEドメインと交換されている。従って、TALE-ヌクレアーゼによるDNA切断には、不特定の中心領域に隣接する2つのDNA認識領域が必要である。本発明に包含されるレアカッティングエンドヌクレアーゼはまたTALE-ヌクレアーゼに由来してもよい。

【0302】

レアカッティング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DNA標的配列を認識し、一本鎖切断または二本鎖切断を生じる。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。

【0303】

「TALE-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(TALE)に由来する核酸結合ドメインと、核酸標的配列を切断する1つのヌクレアーゼ触媒ドメインからなる融合タンパク質を意図する。触媒ドメインは好ましくはヌクレアーゼドメインであり、より好ましくは、例えば、I-TevI、CoiE7、NucA、およびFok-Iのようなエンドヌクレアーゼ活性を有するドメインである。特定の態様において、TALEドメインは、例えば、I-CreIおよびI-OnuIのようなメガヌクレアーゼまたはその機能的変種と融合されてもよい。さらに好ましい態様において、前記ヌクレアーゼは単量体TALE-ヌクレアーゼである。単量体TALE-ヌクレアーゼは、特異的な認識および切断のために二量体化を必要としないTALE-ヌクレアーゼ、例えば、WO2012138927に記載の操作されたTAL反復とI-TevI触媒ドメインとの融合である。転写アクチベーター様エフェクター(TALE)は細菌種ザントモナス属に由来するタンパク質であり、複数の反復配列を含み、それぞれの反復が、位置12および13に、標的とする核酸配列のそれぞれのヌクレオチド塩基に特異的な、二残基(RVD)を含む。同様のモジュラー塩基対塩基核酸結合特性(modular base-per-base nucleic acid binding property)(MBBBD)を有する結合ドメインが、異なる細菌種において本出願人が最近発見した新たなモジュラータンパク質からも得ることができる。この新たなモジュラータンパク質には、TAL反復より大きな配列可変性を示すという利点がある。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、A、C、G、またはTを認識する場合はNS、Tを認識する場合はHG、Tを認識する場合はIG、Gを認識する場合はNK、Cを認識する場合はHA、Cを認識する場合はND、Cを認識する場合はHI、Gを認識する場合はHN、Gを認識する場合はNA、GまたはAを認識する場合はSN、およびTを認識する場合はYG、Aを認識する場合はTL、AまたはGを認識する場合はVT、およびAを認識する場合はSW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節するために、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

10

20

30

40

50

もよい。TALE-ヌクレアーゼは既に説明されており、遺伝子ターゲティングおよび遺伝子組換えを刺激するために用いられている(Boch, Scholze et al. 2009; Moscou and Bogданов 2009; Christian, Cermak et al. 2010; Li, Huang et al.)。操作されたTAL-ヌクレアーゼは商品名TALEN(商標)(Celllectis, 8 rue de la Croix Jarry, 75013 Paris, France)で市販されている。

【0304】

「切断」という用語は、ポリヌクレオチドの共有結合バックボーンの破壊を指す。ホスホジエステル結合の酵素的加水分解または化学的加水分解を含むが、これに限定されない様々な方法によって切断を開始することができる。一本鎖切断および二本鎖切断がいずれも可能であり、二本鎖切断は2つの別個の一本鎖切断事象の結果として発生してもよい。二本鎖DNA、RNA、またはDNA/RNAハイブリッド切断によって平滑末端または付着末端のいずれかが生じる可能性がある。10

【0305】

「融合タンパク質」とは、元々は別々のタンパク質またはその一部をコードする2種類以上の遺伝子を結合することにある当技術分野において周知のプロセスの結果を意図する。前記「融合遺伝子」が翻訳されると、元のタンパク質のそれぞれに由来する機能的特性を有する1本のポリペプチドが生じる。

【0306】

「同一性」とは、2種の核酸分子またはポリペプチドの間の配列同一性をさす。同一性は、比較の目的のために整列化され得る各配列の位置を比較することによって決定され得る。比較された配列のある位置が同一の塩基によって占有される時、それらの分子はその位置において同一である。核酸またはアミノ酸配列の間の類似性または同一性の程度は、核酸配列が共有している位置における同一または一致するヌクレオチドの数の関数である。GCG配列分析パッケージ(University of Wisconsin, Madison, Wis.)の一部として入手可能であるFASTAまたはBLASTを含む、様々なアライメントアルゴリズムおよび/またはプログラムが、2種の配列の間の同一性を計算するために使用され得、例えば、デフォルト設定で使用され得る。例えば、本明細書に記載された特定のポリペプチドとの少なくとも70%、85%、90%、95%、98%、または99%の同一性を有しており、好ましくは、実質的に同一の機能を示すポリペプチド、およびそのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが、企図される。20

【0307】

「類似性」とは、2種以上のポリペプチドのアミノ酸配列の間の関係を記載する。BLASTPも、BLOSUM45、BLOSUM62、またはBLOSUM80のような類似性マトリックスを使用して、参照アミノ酸配列との少なくとも70%、75%、80%、85%、87.5%、90%、92.5%、95%、97.5%、98%、99%の配列類似性を有するアミノ酸配列を同定するために使用され得る。他に示されない限り、類似性スコアは、BLOSUM62の使用に基づくであろう。BLASTPが使用される時、類似性の割合(%)は、BLASTP陽性スコアに基づき、配列同一性の割合(%)は、BLASTP同一性スコアに基づく。BLASTP「同一性」は、同一である高スコア配列対における全残基の数および画分を示し；BLASTP「陽性」は、アライメントスコアが正の値を有しており、相互に類似している残基の数および画分を示す。本明細書に開示されたアミノ酸配列との同一性もしくは類似性のこれらの程度または同一性もしくは類似性の中間の程度を有するアミノ酸配列が、本開示によって企図され包含される。類似したポリペプチドのポリヌクレオチド配列は、遺伝暗号を使用して推定され、従来の手段によって入手され得る。30

【0308】

「シグナル伝達ドメイン」または「共刺激リガンド」とは、T細胞上の同族共刺激分子に特異的に結合し、それによって、例えば、ペプチドが負荷されたMHC分子とのTCR/CD3複合体の結合によって提供される一次シグナルに加えて、増殖活性化、分化等を含むがこれらに限定されないT細胞応答を媒介するシグナルを提供する抗原提示細胞上の分子をさす。共刺激リガンドには、CD7、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX440

10

20

30

40

50

OL、誘導性共刺激リガンド (ICOS-L)、細胞間接着分子 (ICAM、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、M1CB、HVEM、リンホトキシン受容体、3/TR6、ILT3、ILT4、トール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に特異的に結合するリガンドが含まれ得るが、これらに限定されない。共刺激リガンドには、とりわけ、以下に限定されないが、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、CD83と特異的に結合するリガンドのような、T細胞上に存在する共刺激分子と特異的に結合する抗体も包含される。

【0309】

「共刺激分子」とは、共刺激リガンドと特異的に結合し、それによって、これに限定されないが、増殖のような、細胞による共刺激応答を媒介するT細胞上の同族結合パートナーをさす。共刺激分子には、MHCクラスI分子、BTLA、およびトールリガンド受容体が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0310】

「共刺激シグナル」とは、本明細書において使用されるように、TCR/CD3ライゲーションのような一次シグナルと組み合わせて、T細胞増殖および/または重要分子のアップレギュレーションもしくはダウンレギュレーションをもたらすシグナルをさす。

【0311】

「細胞外リガンド結合ドメイン」という用語は、本明細書において使用されるように、リガンドと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して定義される。好ましくは、ドメインは、細胞表面分子と相互作用することができるであろう。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した標的細胞上の細胞表面マーカーとして作用するリガンドを認識するよう選択され得る。従って、リガンドとして作用し得る細胞表面マーカーの例には、ウイルス、細菌、および寄生虫の感染、自己免疫疾患、ならびに癌細胞に関連したものが含まれる。

20

【0312】

「対象」または「患者」という用語には、本明細書において使用されるように、非ヒト靈長類およびヒトを含む動物界の全てのメンバーが含まれる。

【0313】

上記の本発明の説明は、当業者が本発明を作成し使用することが可能になるよう、本発明を作成し使用する様式および過程を提供するものであり、この可能性は、当初明細書の一部を構成する添付の特許請求の範囲の主題のために特に提供される。

30

【0314】

本明細書において数的な限度または範囲が記述される場合、その終点が含まれる。数的な限度または範囲に含まれる全ての値および部分範囲も、明示的に記載されたかのごとく、具体的に含まれる。

【0315】

上記の説明は、当業者が本発明を作成し使用することを可能にするために提示され、特定の適用およびその必要条件に関して提供される。好ましい態様に対する様々な改変は、当業者に容易に明白になり、本明細書において定義された一般原理は、本発明の本旨および範囲から逸脱することなく、他の態様および適用に適用され得る。従って、本発明は、示された態様に限定されず、本明細書に開示された原理および特色と一致する最も広い範囲を与えられるものとする。

40

【0316】

本発明を全般的に説明したが、ある種の具体例を参照することによって、さらなる理解を得ることができる。これらの具体例は、例示目的のために本明細書に提供されるに過ぎず、他に特記されない限り、限定するためのものではない。

【実施例】

【0317】

本発明者らは、HvGを介した同種CAR T細胞枯渇（図9）を防止するため、3種の異なる戦略を探究することを提唱する。実施例1に提示されるように、第1のものは、CAR T細胞の

50

表面にPD-L1を発現させることからなる。そのような抗原の存在は、PD1/PD-L1阻害経路を介して宿主T細胞を阻害し、従って、CAR T細胞に対する細胞溶解活性を減少させる可能性が高い(図10A)。そのようなデコイ系なしでは、一定時間の後、宿主T細胞が同種CAR T細胞を攻撃し枯渇させることが予想される(図10B)。第2の戦略は、IgGの定常領域と融合したCTLA4タンパク質から作成されたキメラ構築物、CTLA4 Igを排出するよう、CAR T細胞を操作することからなる。細胞外培地へのCTLA4 Igの放出は、抗原提示細胞(APC)の表面に露出したCD86/CD80に結合し、CD28/CD80またはCD28/CD86の相互作用を介した宿主T細胞の活性化を防止する可能性が高い。宿主APCおよび宿主T細胞の相互作用/活性化を含むHvG反応は、図11Aに示され、CTLA4 Igの排出を介したCAR T細胞拒絶の防止は、図11Bに示される。前記の2種の戦略の組み合わせからなる第3の戦略も、HvG反応を防止し、かつCAR T細胞が同種細胞養子移入の環境において増殖することを可能にするために使用され得る。

10

【0318】

以下の実施例3~7において、生存を延長し、治療活性を増強するため、本発明者らは、(i) UL18および2-mから構成されるキメラ単鎖分子(B2M-UL18)の発現または(ii) NK G2Dリガンドの分泌のいずれかと組み合わせられた、特異的なTALENを使用したB2M遺伝子の不活化を通して、同種T細胞を操作することによって、治療用同種T細胞のNK細胞によって媒介される拒絶を防止する方法を記載する。特殊性は、腫瘍細胞またはウイルス感染細胞において通常起こる機序を初代T細胞に適用することにある。従って、作用機序は、潜在的に異なる：腫瘍細胞においては、NKG2Dリガンドのシェディングが、表面における存在の減少に至るが、操作された細胞においては、分泌されたNKG2Dリガンドが、T細胞表面にまだ存在する可能性のある他の数種のNKG2Dリガンドのためのデコイとして働くであろう。

20

【0319】

患者のT細胞の阻害を可能にし、従って、患者へ注入された同種CAR T細胞の効率的な持続性を可能にする、ウイルスタンパク質由来の免疫抑制ポリペプチド(膜結合型ペプチドまたは分泌型ペプチドとしてのISUまたはFP)を発現するよう同種CAR T細胞が操作される方法が、以下の実施例8~11に提示される。

30

【0320】

一般法

初代T細胞培養物

フィコール勾配密度培地を使用して、EFS(Etablissement Francais du Sang, Paris, France)によって提供されたバフィーコート試料から、T細胞を精製した。PBMC層を回収し、T細胞を市販のT細胞濃縮キットを使用して精製した。精製されたT細胞を、20ng/mLヒトIL-2、5%ヒト、およびビーズ:細胞比1:1のDynabeadsヒトT活性化因子CD3/CD28(Life Technologies)が補足されたX-Vivo(商標)-15培地(Lonza)において活性化した。

40

【0321】

scCAR mRNAトランسف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سفェクションを行った。5百万個の細胞に、異なるscCAR構築物をコードする15μgのmRNAをトランسفェクトした。Cytopulseテクノロジーを使用し、「Cytoporation buffer T」(BTX Harvard Apparatus)の最終体積200μlで、0.4cmギャップキュベットにおいて、3000V/cmの2回の0.1mSパルスの後、325V/cmの4回の0.2mSパルスを適用することによって、T7 mRNAポリメラーゼトランسفェクションを使用して、scCAR mRNAを作製した。直後に、X-Vivo(商標)-15培地で細胞を希釈し、5%CO₂で37℃でインキュベートした。電気穿孔の2時間後に、20ng/mLのIL-2を添加した。

【0322】

細胞傷害アッセイ

T細胞を、同一ウェルにおいて10,000個の標的細胞(CD123発現)および10,000個の対照細胞(CD123陰性)と共に、96穴プレートにおいてインキュベートした(100,000細胞/ウ

50

エル）。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）によって標識した後、CD123 CAR+T細胞と共に培養した。共培養物を5%CO₂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の後、細胞を固定可能な生死判定色素によって標識し、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CD123対照細胞）の生存度を決定し、特異的細胞溶解の割合(%)を計算した。mRNAトランسفエクションの48時間後に細胞傷害アッセイを実施した。

【0323】

T細胞形質導入

scCARを発現する組換えレンチウイルスベクターによるT細胞の形質導入を、T細胞の精製/活性化の3日後に実施した。T細胞の表面におけるscCAR検出を、ヒトCD123タンパク質の細胞外ドメインとマウスIgG1 Fc断片との融合からなる組換えタンパク質を使用して行った。このタンパク質のscCAR分子との結合を、タンパク質のマウスFc部分を標的とする、蛍光色素とコンジュゲートされた二次抗体によって検出し、フローサイトメトリーによって分析した。

【0324】

実施例1. 初代T細胞およびCAR T細胞の表面におけるPD-L1のトランスジェニック発現

これらの実験において、PD-L1をコードするベクター（mRNAまたはレンチウイルス）をトランسفエクトされたまたは形質導入されたヒト活性化T細胞が、検出可能なレベルのPD-L1を細胞表面に発現することが示される。

【0325】

PD-L1の発現

この実施例は、T細胞またはCAR T細胞の表面におけるPD-L1の発現を、腫瘍細胞に対する細胞溶解活性に対するそのような発現の影響と共に記載する。初代T細胞の表面にPD-L1を発現させるため、まずバフィーコート試料から初代T細胞を精製し、活性化し、抗CD19 CARツール（pCLS23856、SEQ ID NO:77）を含有しているレンチウイルス粒子を形質導入し、Galletto R et al. (2014) Molecular Therapy-Methods & Clinical Development 1, Article number:14021 doi:10.1038/mtm.2014.2に記載された手法に従ってトランسفエクトした。形質導入に関して簡単に説明すると、DynabeadsヒトT活性化因子CD3/CD28による活性化の2日後に、MOI=5で、抗CD19 CARツールを含有しているレンチウイルス粒子と共にT細胞をインキュベートした。

【0326】

mRNAのトランسفエクション

トランسفエクションに関して、活性化の5日後に、500万個のCAR T細胞またはT細胞に、PD-L1をコードするmRNA（pCLS27069、SEQ ID NO:18）20 μgをトランسفエクトした。A gilpulseテクノロジーを使用し、0.4cmギャップキュベットにおいて、Cytoporation buffer T (BTX Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts) の最終体積200 μlで、3,000V/cmの2回の0.1mSパルスの後、325V/cmの4回の0.2mSパルスを適用することによって、トランسفエクションを実施した。次いで、直後に、20ng/ml IL-2（最終濃度）および5%ヒト血清ABが補足されたX-Vivo-15培地で細胞を希釈した。トランسفエクトされたT細胞を、最終的に 1×10^6 /mlに希釈し、さらなる特徴決定のため、5%CO₂および20ng/ml IL-2（最終濃度）および5%ヒトAB血清の存在下で、37℃で、培養物中に維持した。トランسفエクションの1日後、細胞表面におけるPD-L1の発現を特徴決定し、抗CD19ツールCARによって標的とされた関連腫瘍細胞に対する特異的細胞溶解活性に対するそのような発現の影響を決定するため、CAR T細胞を回収した。

【0327】

本発明者らの結果は、PD-L1をコードするmRNAをトランسفエクトされたCAR T細胞においては、PD-L1が発現する（細胞の>90%がPD-L1を発現する、図12）が、モックトランسفエクションを受けたT細胞またはCAR T細胞においては、発現が検出され得ないことを示した。形質導入されていないT細胞でも類似した結果が得られ、このことから、CAR T細胞およびT細胞においてPD-L1が成功裡に発現されることが示された（図12）。

10

20

30

40

50

【0328】

レンチウイルスベクター（LV）によるトランスフェクション

PD-L1 cDNAを含有しているLVベクターを作製した。まずバフィーコート試料から初代T細胞を精製し、活性化し、MOI=5で、PD-L1を含有しているレンチウイルス粒子（SEQ ID N 0:18のpCLS27062）を形質導入した。形質導入の3日後に、細胞表面におけるPD-L1の発現を特徴決定するため、形質導入されたT細胞を回収した。

【0329】

結果は、PD-L1をコードするLVベクター単独を形質導入されたT細胞においてはPD-L1が発現する（細胞の>70%がPD-L1を発現する、結果は示さない）が、形質導入されていないT細胞においては発現が検出され得ないことを示した。10

【0330】

特異的細胞溶解

Zhao,Y.et al.(2010)Cancer Res 70,9053-9061に記載されたフローベース（flow-based）アッセイを使用して決定された、関連腫瘍細胞（ダウディ）に対するCAR T細胞の特異的細胞溶解活性に関して、本発明者らの結果は、CAR T細胞の表面におけるPD-L1の再発現が活性に顕著には影響しないことを示した（図13）。この結果は、異なる血液ドナーから操作されたCAR T細胞によって再現可能である（図13、モックCAR T細胞BおよびPD-L1 CAR T細胞Bによって入手された結果を参照すること）。

【0331】

実施例2. 初代T細胞およびCAR T細胞によるアバタセプトおよびベラタセプト（CTLA4 Ig）のトランスジェニック発現および排出20

mRNAおよびレンチウイルスベクター（LV）によるトランスフェクション

（それぞれ、OrenciaおよびNuloxixとして市販されている）アバタセプトおよびベラタセプトは、CTLA-4の細胞外ドメインと融合した免疫グロブリンIgG1のFc領域から構成された融合タンパク質である。

【0332】

この実施例は、MOI=5での、CTLA4a IgおよびCTLA4b Ig（アバタセプトまたはベラタセプト、それぞれ、pCLS27068 SEQ ID NO:3およびpCLS27066 SEQ ID NO:4）、ならびにCTLA4Igを含有しているLV（SEQ ID NO:16のpCLS27064）の、初代T細胞による発現および培養培地への排出を記載する。アバタセプトは、Moreland L et al;(2006)Nature Reviews Drug Discovery 5,185-186に記載されている。ベラタセプトは、Larsen CP et al.(2005)「強力な免疫抑制特性を有するCTLA4-Igの高親和性バリエントであるLEA29Y（ベラタセプト）の合理的開発（Rational development of LEA29Y (belatacept), a high-affinity variant of CTLA4-Ig with potent immunosuppressive properties）」Am J Transplant.5(3):443-53によって記載されている。30

【0333】

CTLA4 a/b Ig発現

初代T細胞によってCTLA4 Igを発現させるため、まずバフィーコート試料から初代T細胞を精製し、活性化し、抗CD19 CARツール（pCLS23856、SEQ ID NO:77）を含有しているレンチウイルス粒子を形質導入し、実施例1に記載された手法に従ってトランスフェクトした。トランスフェクションに関して、活性化の5日後に、500万個のCAR T細胞またはT細胞に、20 μgのCTLA4a IgまたはCTLA4b IgをコードするmRNA（アバタセプトまたはベラタセプト、それぞれ、pCLS27068 SEQ ID NO:16およびpCLS27066 SEQ ID NO:17）をトランスフェクトし、実施例1に記載されたプロトコルに従って培養した。トランスフェクションの1日後、ELISAを介して培養培地中へCTLA4 Igを排出する能力を特徴決定し、標的とされた関連腫瘍細胞および非関連腫瘍細胞（それぞれ、ダウディおよびK562）に対する特異的細胞溶解活性に対するそのような発現/排出の影響を決定するため、CAR T細胞を回収した。40

【0334】

本発明者らの結果は、CTLA4a IgまたはCTLA4b IgをコードするmRNAによる初代T細胞のトランスフェクションが、対応する融合タンパク質の培養培地への出現をもたらすことを50

示した。培養培地中のCTLA4 Igの量は、本発明者らの実験条件において、トランスフェクトされたmRNAの量に近似的に比例しており、CTLA4a IgおよびCTLA4b Igの最大値は、それぞれ、2.1pg/mLおよび3.1pg/mLであった。予想通り、モックトランスフェクションを受けたT細胞の培養培地は、検出可能なCTLA4 Igタンパク質を含有していなかった。これらの結果は、CTLA4a IgおよびCTLA4b Igが、初代T細胞によって成功裡に発現され、培養培地に排出されることを示した。

【0335】

特異的細胞溶解活性

CAR T細胞の活性に対するCTLA4 Igの影響を研究するため、関連腫瘍細胞株および非関連腫瘍細胞株に対する細胞溶解活性を、実施例1に記載されたフローベースアッセイを使用して決定した。本発明者らの結果は、モックトランスフェクションを受けたCAR T細胞およびCTLA4 Ig CAR T細胞が、ダウディ細胞に対して有意な細胞溶解活性を示すことを示した。総合すると、これらの結果は、初代T細胞が、抗腫瘍活性を保持しながら、成功裡にCTLA4 Igを発現し、排出することを示した。

【0336】

実施例3. 初代T細胞によるCTLA4 IgおよびCTLA4 Ig/PD-L1リガンドのトランスジェニック発現および分泌

この実験においては、上記のPD-L1およびCTLA4IgをコードするLVベクターによってT細胞を同時形質導入した。図17は、CTLA4IgをコードするLVベクター単独を形質導入されたT細胞（平均 = 250pg / μl）、またはPD-L1およびCTLA4IgをコードするLVベクターによって同時形質導入されたT細胞（平均 = 270pg / μl）によって上清に分泌されたCTLA4 Igのレベルを示し、PD-L1を形質導入されたT細胞においては発現が検出され得なかった。結果は、PD-L1をコードするLVベクター単独を形質導入されたT細胞（細胞の > 70% がPD-L1を発現する、図17）、またはPD-L1およびCTLA4IgをコードするLVベクターによって同時形質導入されたT細胞（59%）においてPD-L1が発現され、形質導入されていないT細胞またはCTLA4 Igを形質導入されたT細胞においては発現が検出され得ないことを示した。

【0337】

実施例4：同種T細胞応答を試験する混合反応アッセイ（MLR）

実験の原理およびプロトコル

CAR T細胞によるPD-L1および/またはCTLA4Igの過剰発現が宿主免疫系に対して影響を及ぼすか否かを試験するため、ドナー1由来の未感作PBMCをHLA不適合ドナー2由来のT細胞と共に培養するインビトロアッセイをセットアップした。簡単に説明すると、PBMC（ドナー1）をCFSEによって標識し、マイトイマイシンによって処理されたまたは照射された、即ち、増殖することができない未標識の操作されたT細胞（ドナー2）と混合する。6日の期間の後、フローサイトメトリー分析を、以下のゲーティング戦略によって実施する：FSC/SSC->生存細胞->CD3+（ドナー1 PBMC由来のT細胞）->CFSE。CFSE染色の減少は、細胞分裂を示し、従って、HLA不適合ドナー2のT細胞の存在によるドナー1のT細胞の同種応答を示す。

【0338】

一連の実験を、図18の左から右へ、以下のように設定した：

- (a) 処理なしのドナー1由来のPBMCを単独で培養した；
- (b) 増加する濃度のPHA（フィトヘマグルチニン）T細胞分裂促進因子による処理に供されたドナー1由来のPBMCを単独で培養する；
- (c) ドナー1由来のPBMCを、ドナー2由来の形質導入されていないT細胞と共に培養する；
- (d) ドナー1由来のPBMCを、ドナー2由来のPD-L1を形質導入されたT細胞と共に培養する；
- (e) ドナー1由来のPBMCを、ドナー2由来のCTLA4Igを形質導入されたT細胞と共に培養する；
- (f) ドナー1由来のPBMCを、ドナー2由来のPD-L1およびCTLA4Igによって同時形質導入されたT細胞と共に培養する。

【0339】

結果

10

20

30

40

50

図18より、CD3+T細胞は、共培養されない時（a）または自己T細胞の存在下で（c）増殖しないようである。対照（b）ドナー1由来のPBMCとして、予想通り、CFSE陽性集団は、PHA濃度が増加につれて減少している。CD3+T細胞は、同種T細胞の存在下（c）で増殖する（CFSE陽性集団の消滅）。同種T細胞がPD-L1（d）、CTLA4Ig（e）、または両方（f）を発現するよう操作される時、応答するT細胞は明るいCFSE染色を維持することが観察されるため、操作されたT細胞によるPD-L1および/またはCTLA4Igの発現は応答細胞の増殖を阻害するという結論が得られる。従って、図18において得られた結果は、PD-L1、CTLA4Ig、または両方を発現する操作されたT細胞は、インビトロ混合リンパ球反応（MLR）アッセイにおいて同種T細胞応答を刺激する傾向がより低いことを示す。さらに、結果は、PD-L1、CTLA4Igの両方が発現された時の累積効果を示す。

10

【0340】

実施例5：PD-L1および/またはCTLA4Igを発現する抗CD123 CAR T細胞を、MOLM13標的細胞を死滅させる能力について試験する細胞傷害アッセイ

この実験は、PD-L1および/またはCTLA4Igを発現するT細胞を、CAR分子の発現を通して特異的な標的細胞を死滅させる能力について試験することを目標とする。

【0341】

PD-L1 LV、CTLA4IG、または両方を形質導入されたT細胞に、20 μgの抗CD123 CARをコードするmRNA（SEQ ID NO:69）をトランスフェクトした。2日の期間の後、特異的な標的細胞としてMOLM13細胞株を使用して、細胞傷害アッセイを実施する。

20

【0342】

細胞傷害アッセイからの結果、図19および図20は、PD-L1、CTLA4Ig、または両方を発現し、さらにCD123 CAR分子を発現するよう操作された、操作されたT細胞が、特異的な標的細胞を死滅させる能力を保持することを示す。さらに、これらのデータは、PD-L1、CTLA4Ig、または両方の発現が固有の細胞溶解活性を増加させることを示唆する。

【0343】

実施例6：インビボ実験

これらの実験の目標は、改変されたT細胞が、依然としてインビボで同族腫瘍細胞を根絶し得ることを確証することである。従って、PD-L1、CTLA4Ig、または両方の発現が、CAR T細胞の抗腫瘍活性に影響するか否かを調査するため、インビボ実験を実施した。プロトコルアウトラインは図21に示される。

30

【0344】

活性化T細胞を、以下の処理群について入手した：

- 形質導入されていないT細胞；
- CD123 CARレンチウイルス（LV）を形質導入されたT細胞；
- CD123 CAR LVおよびPD-L1 LVを形質導入されたT細胞；
- CD123 CAR LV、CTLA4Ig LVを形質導入されたT細胞；
- CD123 CAR LV、PD-L1 LV、およびCTLA4Ig LVを形質導入されたT細胞。

【0345】

2日間の形質導入の後、インビボ実験のため、T細胞をG-Rexにおいて増殖させた。19日後に、細胞を回収し計数した。

40

【0346】

図22は、PD-L1、CTLA4Ig、または両方を発現し、さらにCD123 CAR分子を発現するよう操作されている操作されたT細胞が、CAR CD123を操作されたT細胞と比較して、類似した増殖能を維持することを示す。

【0347】

このように入手されたT細胞を、インビボ実験のため、NOGマウスへ注射した。

【0348】

抗腫瘍マウスモデル

AML異種移植マウスモデルとして、免疫不全NOGマウスへ、CD123発現MOLM13-ルシフェラーゼ細胞を静脈内（iv）注射した。次いで、試験すべき異なる用量のCD123 CAR+T細胞、

50

またはCD123 CARレンチウイルスベクターを形質導入されていないT細胞を、マウスへiv注射した（腫瘍細胞株の注射の2日後または7日後）。異なる動物における腫瘍進行を追跡するため、T細胞注射の当日（D0）、T細胞注射後7日目および14日目に、生物発光シグナルを決定した。

【0349】

図23Aおよび図23Bからの生物発光分析結果は、操作されたCAR T細胞を注射されたマウスの群が、全て、対照群と比較して効率的に腫瘍を根絶することを示し、インビボの操作されたCAR T細胞の明白な抗腫瘍活性を示している。

【0350】

実施例7 特異的なB2M TALENを使用した効率的なB2M遺伝子ノックアウト

10

B2M遺伝子（GenBankアクセション番号NC_000015）の第1コーディングエクソン内の配列（SEQ ID NO:1）を標的とする特異的なTALENを作製した

（左DNA結合ドメインRVD：

SEQ ID NO:2について NN-NN-HD-HD-NG-NG-NI-NN-HD-NG-NN-NG-NN-HD-NG-NG

および右DNA結合ドメインRVD：

SEQ ID NO:3について NI-NN-HD-HD-NG-HD-HD-NI-NN-NN-HD-HD-NI-NN-NI-NG）。

【0351】

このB2M特異的なTALENの、B2M遺伝子座でエラーブローンNHEJイベントを促進する能力を試験するため、製造業者のプロトコルに従って、Pulse Agileテクノロジーを使用して、2 μgまたは10 μgのTALENをコードするmRNAを、初代T細胞へ電気穿孔した。トランスフェクションの3日後、細胞を回収し、PhycoErythrin蛍光色素にカップリングされた特異的な2ミクログロブリン抗体によって標識した。次いで、細胞を、生存度および 2-m発現についてフローサイトメトリーによって分析する。結果は図16に示される。上パネルにおいて、トランスフェクトされていないT細胞のほぼ100%が、 2-mを発現する（右上パネル）。それぞれ、2 μgまたは10 μgのTALEN mRNAをトランスフェクトされた時、T細胞の38%（中央右）および80%（右下パネル）が 2-m陰性になるため、特異的なB2M TALENによるT細胞のトランスフェクションは、 2-m発現を劇的に低下させる。これらのデータは、T細胞においてB2Mノックアウトが高い効力で達成されることを示す。

20

【0352】

実施例8：T細胞における単鎖分子B2M-UL18の作製および発現

30

HCMV UL18は、 2-mと会合し、内在性ペプチドに結合するMHCクラスI分子と高レベルのAA配列同一性を有するI型膜貫通糖タンパク質をコードする。本発明者らの目標は、B2M遺伝子が無効にされたT細胞においてこの分子を発現させることであるため、本発明者らの戦略は、単鎖ポリペプチドとして 2-mおよびUL18が融合したキメラ分子を作製することである。SEQ ID NO:39は、キメラタンパク質のアミノ酸配列を示す。キメラB2M-UL18を含有しているレンチウイルス粒子を、T細胞へ形質導入する。トランスジーンの発現を、 2-m抗体を使用して、FACS分析によってモニタリングする。この実験からの結果は、B2M-UL18キメラタンパク質がT細胞において効率的に発現されることを目標とする。

【0353】

実施例9：T細胞におけるNKG2Dリガンドの產生および発現

40

NKG2D天然リガンドは、膜貫通タンパク質またはGPIアンカータンパク質である。T細胞によるこれらの分子の分泌を達成するため、NKG2Dリガンドの細胞外ドメインを、分泌ペプチド型とN末端で融合させた。分泌型キメラNKG2Dリガンドのアミノ酸配列は、以下にリストされる（SEQ ID NO:40～SEQ ID NO:47）。キメラNKG2Dリガンドを含有しているレンチウイルス粒子を、T細胞へ形質導入する。培養上清におけるトランスジーンの発現を、特異的な抗体を使用したウエスタンプロット分析によってモニタリングする。この実験からの結果は、キメラNKG2Dリガンドタンパク質がT細胞において効率的に発現されることを示すことを目標とする。

【0354】

実施例10： 2-M欠損CAR T細胞は同種T細胞によって認識されない

50

健常ドナーA由来のPBMCを、ドナーB由来の照射されたまたはマイトマイシンによって処理された 2-m欠損の操作されたT細胞と共に培養する。対照として、健常ドナーA由来のPBM Cを、ドナーB由来の照射されたまたはマイトマイシンによって処理された 2-m陽性の操作されたT細胞と共に培養する。7日後、ドナーA由来の細胞の増殖を、XTT比色定量アッセイまたはCFSE希釈(FACS分析)によって測定する。対照においては細胞増殖が観察されるが、操作されたT細胞が 2-mを発現しない時には、細胞増殖が観察されないかまたは限定された細胞増殖が観察される。この実験からの結果は、アロ反応性T細胞が 2-m欠損T細胞に対して認識し増殖することができることを示すことを目標とする。

【0355】

実施例11：NKによって媒介される操作されたT細胞の溶解の効率的な阻害

10

健常ドナーAのPBMCからNK細胞を精製する。標的として、健常ドナーB由来の操作されたT細胞を作製し、以下にリストする。(a) 操作されたT細胞(陰性対照)、(b) 2-m欠損の操作されたT細胞(陽性対照)、(c) B2M-UL18(SEQ ID NO:39)を発現する 2-m欠損の操作されたT細胞、(d) ~ (k) それぞれ、SP-MICAed(SEQ ID NO: 40)、SP-MICBed(SEQ ID NO:41)、SP-ULBP1ed(SEQ ID NO: 42)、SP-ULBP2ed(SEQ ID NO: 43)、SP-ULBP3ed(SEQ ID NO:44)、SP-N2DL4ed(SEQ ID NO: 45)、SP-RET1Ged(SEQ ID NO:46)、SP-RAET1Led(SEQ ID NO:47)を発現する 2-m欠損の操作されたT細胞。NK細胞によって媒介される細胞傷害を、CFSE標識アッセイによって決定した。標的細胞をCFSEによって標識し、PBSで洗浄し、様々なE:T細胞比でNK細胞と混合し、37℃で4時間インキュベートした。次いで、細胞をフローサイトメトリーによって分析し、NK細胞の存在下での操作されたT細胞の生存を示す、CFSE陽性の操作されたT細胞の百分率を測定する。陽性対照(2-m欠損の操作されたT細胞)においてはNKによって媒介される細胞溶解が観察されるが、2-m欠損の操作されたT細胞が、B2M-UL18(SEQ ID NO:39)または分泌型NKG2Dリガンド(SP-MICAed(SEQ ID NO: 40)、SP-MICBed(SEQ ID NO: 41)、SP-ULBP1ed(SEQ ID NO: 42)、SP-ULBP2ed(SEQ ID NO: 43)、SP-ULBP3ed(SEQ ID NO: 44)、SP-N2DL4ed(SEQ ID NO: 45)、SP-RET1Ged(SEQ ID NO: 46)、SP-RAET1Led(SEQ ID NO: 47))を発現する時、NKによって媒介される細胞溶解は観察されないかまたは限定された細胞溶解が観察されることが意図される。この実験からの結果は、キメラ分子が、操作されたT細胞において発現され、阻害性シグナル受容体(B2M-UL18)または刺激性シグナル受容体(NKG2Dリガンド)のいずれかのデコイとして作用する時、同種NK細胞の細胞傷害活性が損なわれることを示すことを目標とする。

20

30

40

【0356】

実施例12：操作されたT細胞におけるISUの発現

モロニーマウス白血病ウイルス(MMLV)由来のエンベロープタンパク質(SEQ ID NO:78)、MMLV由来のエンベロープタンパク質の膜貫通短縮型(SEQ ID NO:79)、または分泌型14アミノ酸長ISUペプチド(HIV-1ウイルス由来の6種のバリアントSEQ ID NO:19~24; HIV-2ウイルス由来の6種のバリアントSEQ ID NO:25~30; それぞれ、SEQ ID NO:32、33、34、35、36、37、および38を有するSIV、MoMuLV、HTLV-1、MPMV、シンシチン1、シンシチン2、HERV-K、およびFELVウイルスに由来するもの)のいずれかを保持するレンチウイルス粒子を、T細胞へ形質導入する。膜結合型トランスジーンの発現はFACS分析によってモニタリングされ、分泌型ISUペプチドの発現はウエスタンプロットによって細胞培養上清においてモニタリングされる。この実験からの結果は、ISUの両方の型がT細胞において効率的に発現されることを示すことを目標とする。

【0357】

実施例13：操作されたT細胞におけるFPペプチドの発現

分泌型9アミノ酸長FPポリペプチド(それぞれ、SEQ ID NO:48および49~50を有する、HIV-1ウイルス由来の1種および人工配列由来の2種)を保持するレンチウイルス粒子を、T細胞へ形質導入する。分泌型FPペプチドの発現は、ウエスタンプロットによって細胞培養上清においてモニタリングされる。この実験からの結果は、分泌型FPペプチドがT細胞において効率的に発現されることを示すことを目標とする。

50

【 0 3 5 8 】**実施例14：ISUを発現する操作されたT細胞に対するT細胞増殖の効率的な阻害**

健常ドナーA由来のPBMCを、ISUを発現するドナーB由来の照射されたまたはマイトマイシンによって処理された操作されたT細胞と共に培養する。対照として、健常ドナーA由来のPBMCを、ISUを発現しないドナーB由来の照射されたまたはマイトマイシンによって処理された操作されたT細胞と共に培養する。7日後、ドナーA由来の細胞の増殖を、XTT比色定量アッセイまたはCFSE希釈（FACS分析）によって測定する。対照においては細胞増殖が観察されるが、操作されたT細胞が膜結合型または分泌型のISUを発現する時、細胞増殖は観察されないかまたは限定された細胞増殖が観察される。この実験からの結果は、操作されたT細胞がISUを発現する時、アロ反応性T細胞の増殖が阻害されることを目標とする。

10

【 0 3 5 9 】**実施例15：FPを発現する操作されたT細胞に対するT細胞の増殖の効率的な阻害**

健常ドナーA由来のPBMCを、FPを発現するドナーB由来の照射されたまたはマイトマイシンによって処理された操作されたT細胞と共に培養する。対照として、健常ドナーA由来のPBMCを、FPを発現しないドナーB由来の照射されたまたはマイトマイシンによって処理された操作されたT細胞と共に培養する。7日後、ドナーA由来の細胞の増殖を、XTT比色定量アッセイまたはCFSE希釈（FACS分析）によって測定する。対照においては細胞増殖が観察されるが、変形T細胞が分泌型FPを発現する時、細胞増殖は観察されないかまたは操作された細胞の増殖が観察される。この実験からの結果は、操作されたT細胞がFPを発現する時、アロ反応性T細胞の増殖が阻害されることを目標とする。

20

【 0 3 6 0 】

明細書中に引用された参考文献のリスト

- Arimondo, P. B., C. J. Thomas, et al. (2006). "Exploring the cellular activity of camptothecin-triple-helix-forming oligonucleotide conjugates." *Mol Cell Biol* **26**(1): 324-33.
- Arnould, S., P. Chames, et al. (2006). "Engineering of large numbers of highly specific homing endonucleases that induce recombination on novel DNA targets." *J Mol Biol* **355**(3): 443-58.
- Ashwell, J. D. and R. D. Klusner (1990). "Genetic and mutational analysis of the T-cell antigen receptor." *Annu Rev Immunol* **8**: 139-67.
- Boch, J., H. Scholze, et al. (2009). "Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors." *Science* **326**(5959): 1509-12.
- Boni, A., P. Muranski, et al. (2008). "Adoptive transfer of allogeneic tumor-specific T cells mediates effective regression of large tumors across major histocompatibility barriers." *Blood* **112**(12): 4746-54.
- Brahmer, J. R., C. G. Drake, et al. (2010). "Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates." *J Clin Oncol* **28**(19): 3167-75.
- Cermak, T., E. L. Doyle, et al. (2011). "Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting." *Nucleic Acids Res* **39**(12): e82.
- Choulika, A., A. Perrin, et al. (1995). "Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* **15**(4): 1968-73.
- Christian, M., T. Cermak, et al. (2010). "Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases." *Genetics* **186**(2): 757-61.
- Coutinho, A. E. and K. E. Chapman (2011). "The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights." *Mol Cell Endocrinol* **335**(1): 2-13.
- Crutchlow, S. E. and S. P. Jackson (1998). "DNA end-joining: from yeast to man." *Trends Biochem Sci* **23**(10): 394-8.
- Deng, D., C. Yan, et al. (2012). "Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors." *Science* **335**(6069): 720-3.
- Eisenschmidt, K., T. Lanio, et al. (2005). "Developing a programmed restriction endonuclease for highly specific DNA cleavage." *Nucleic Acids Res* **33**(22): 7039-47.
- Geissler, R., H. Scholze, et al. (2011). "Transcriptional activators of human genes with programmable DNA-specificity." *PLoS One* **6**(5): e19509.
- Huang, P., A. Xiao, et al. (2011). "Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs." *Nat Biotechnol* **29**(8): 699-700.
- Jena, B., G. Dotti, et al. (2010). "Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor." *Blood* **116**(7): 1035-44.
- Kalish, J. M. and P. M. Glazer (2005). "Targeted genome modification via triple helix formation." *Ann N Y Acad Sci* **1058**: 151-61.
- Li, L., M. J. Piatek, et al. (2012). "Rapid and highly efficient construction of TALE-based transcriptional regulators and nucleases for genome modification." *Plant Mol Biol* **78**(4-5): 407-16.
- Li, T., S. Huang, et al. (2011). "TAL nucleases (TALENs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain." *Nucleic Acids Res* **39**(1): 359-72.
- Li, T., S. Huang, et al. (2011). "Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes." *Nucleic Acids Res* **39**(14): 6315-25.
- 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.
- Mahfouz, M. M., L. Li, et al. (2012). "Targeted transcriptional repression using a chimeric TALE-SRDX repressor protein." *Plant Mol Biol* **78**(3): 311-21.

10

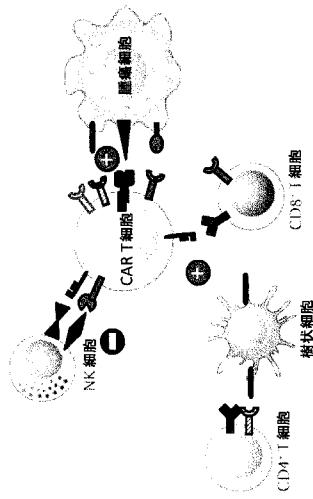
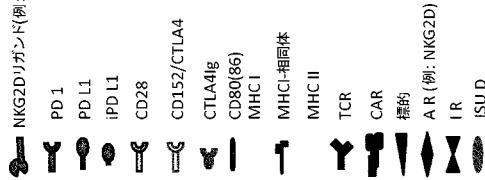
20

30

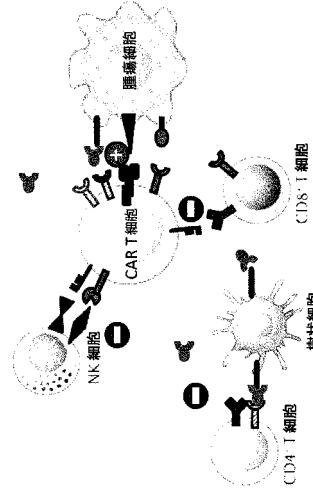
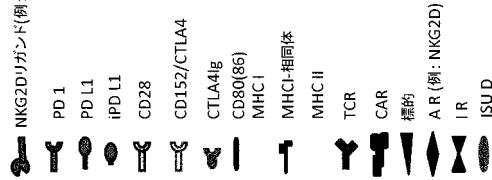
40

- Mahfouz, M. M., L. Li, et al. (2011). "De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(6): 2623-8.
- 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.
- Miller, J. C., S. Tan, et al. (2011). "A TALE nuclease architecture for efficient genome editing." *Nat Biotechnol* **29**(2): 143-8.
- Morbitzer, R., P. Romer, et al. (2011). "Regulation of selected genome loci using de novo-engineered transcription activator-like effector (TALE)-type transcription factors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(50): 21617-22.
- Moscou, M. J. and A. J. Bogdanove (2009). "A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors." *Science* **326**(5959): 1501.
- Mussolino, C., R. Morbitzer, et al. (2011). "A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity." *Nucleic Acids Res* **39**(21): 9283-93.
- Paques, F. and P. Duchateau (2007). "Meganucleases and DNA double-strand break-induced recombination: perspectives for gene therapy." *Curr Gene Ther* **7**(1): 49-66.
- Pardoll, D. and C. Drake (2012). "Immunotherapy earns its spot in the ranks of cancer therapy." *J Exp Med* **209**(2): 201-9.
- Pardoll, D. M. (2012). "The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy." *Nat Rev Cancer* **12**(4): 252-64.
- Park, T. S., S. A. Rosenberg, et al. (2011). "Treating cancer with genetically engineered T cells." *Trends Biotechnol* **29**(11): 550-7.
- Pegram HJ, Lee JC, Hayman EG, Imperato GH, Tedder TF, Sadelain M, Brentjens RJ. (2012) . "Tumor-targeted T cells modified to secrete IL-12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning" . *Blood* **119**(18):4133-41
- Pingoud, A. and G. H. Silva (2007). "Precision genome surgery." *Nat Biotechnol* **25**(7): 743-4.
- Porteus, M. H. and D. Carroll (2005). "Gene targeting using zinc finger nucleases." *Nat Biotechnol* **23**(8): 967-73.
- Robert, C. and C. Mateus (2011). "[Anti-CTLA-4 monoclonal antibody: a major step in the treatment of metastatic melanoma]." *Med Sci (Paris)* **27**(10): 850-8.
- Rong Z, Wang M, Hu Z, Stradner M, Zhu S, Kong H, Yi H, Goldrath A, Yang YG, Xu Y and Fu X. (2014). "An Effective Approach to Prevent Immune Rejection of Human ESC-Derived Allografts." *Cell Stem Cell*. **14**(1):121-30.
- Rouet, P., F. Smih, et al. (1994). "Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease." *Mol Cell Biol* **14**(12): 8096-106.
- Sander, J. D., L. Cade, et al. (2011). "Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs." *Nat Biotechnol* **29**(8): 697-8.
- Stoddard, B. L. (2005). "Homing endonuclease structure and function." *Q Rev Biophys* **38**(1): 49-95.
- Tesson, L., C. Usal, et al. (2011). "Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs." *Nat Biotechnol* **29**(8): 695-6.
- Waldmann, H. and G. Hale (2005). "CAMPATH: from concept to clinic." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **360**(1461): 1707-11.
- Weber, E., R. Gruetzner, et al. (2011). "Assembly of designer TAL effectors by Golden Gate cloning." *PLoS One* **6**(5): e19722.
- Zhang, F., L. Cong, et al. (2011). "Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription." *Nat Biotechnol* **29**(2): 149-53.

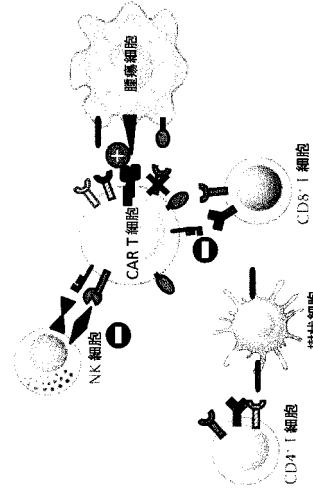
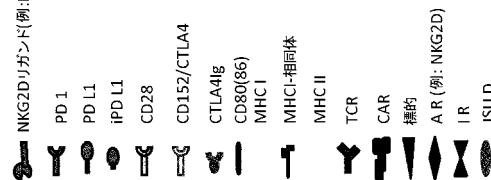
【図 1】



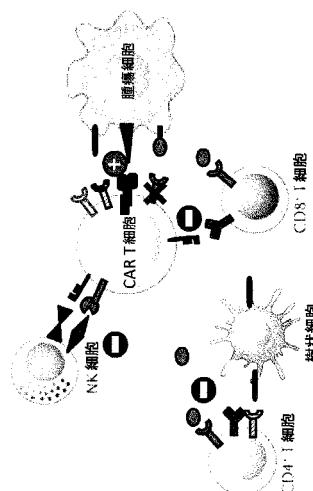
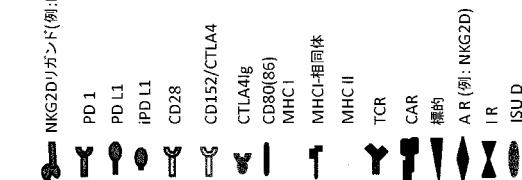
【図 2】



【図 3】



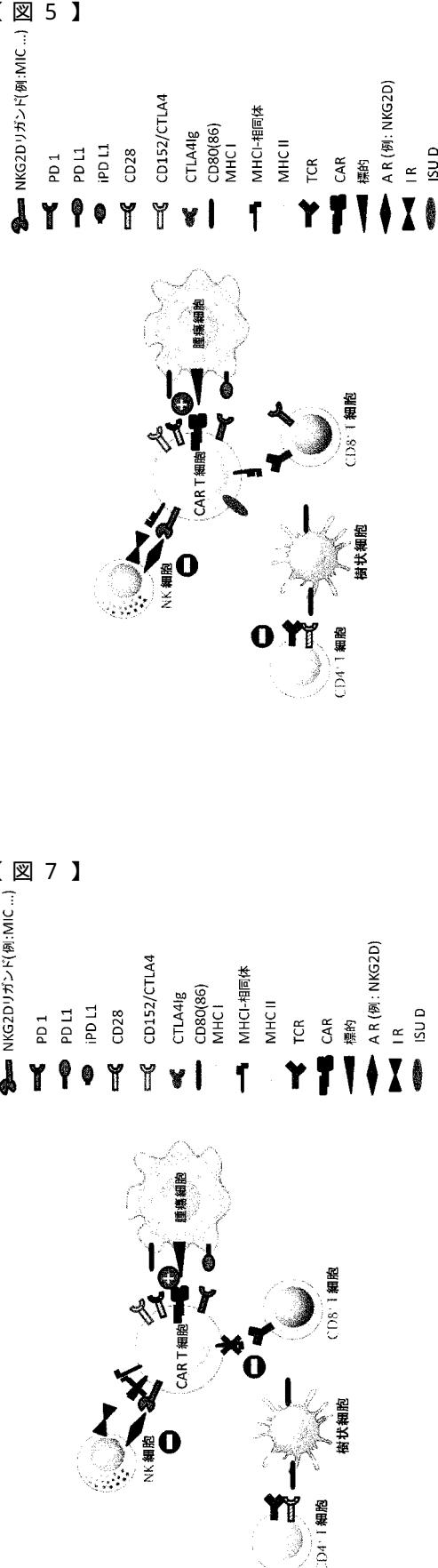
【図 4】



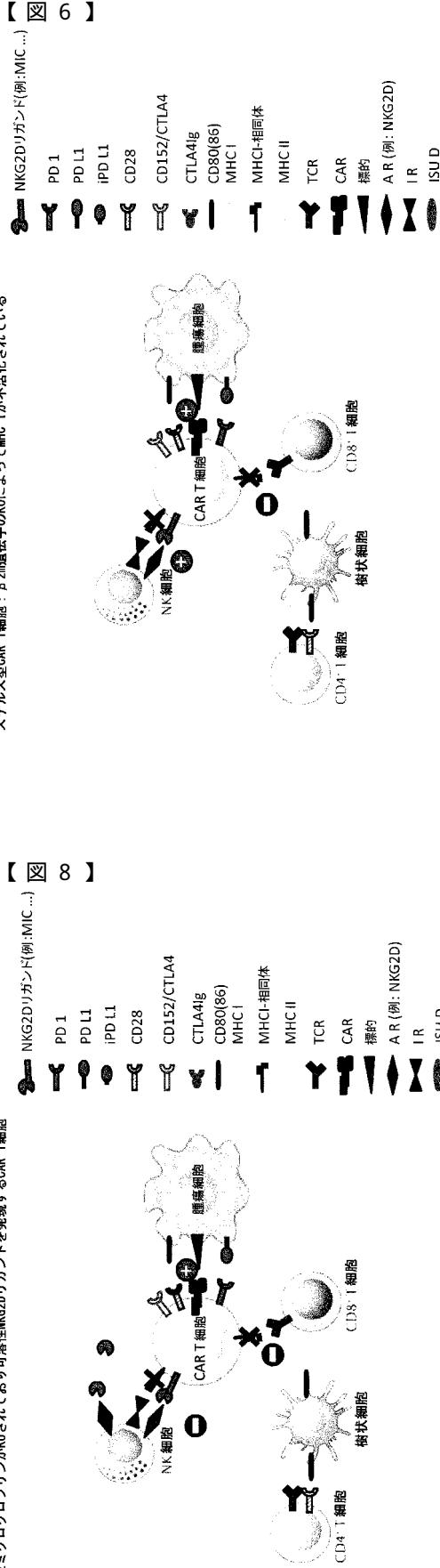
胶結合型のPD-L1を発現するCAR T細胞およびiKOによるPD1破壊

分泌型のPD-L1を発現するCAR T細胞およびiKOによるPD1破壊

【図5】



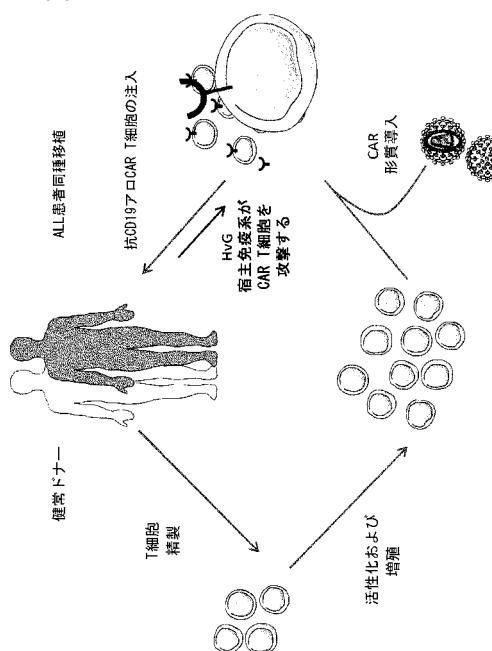
【図6】



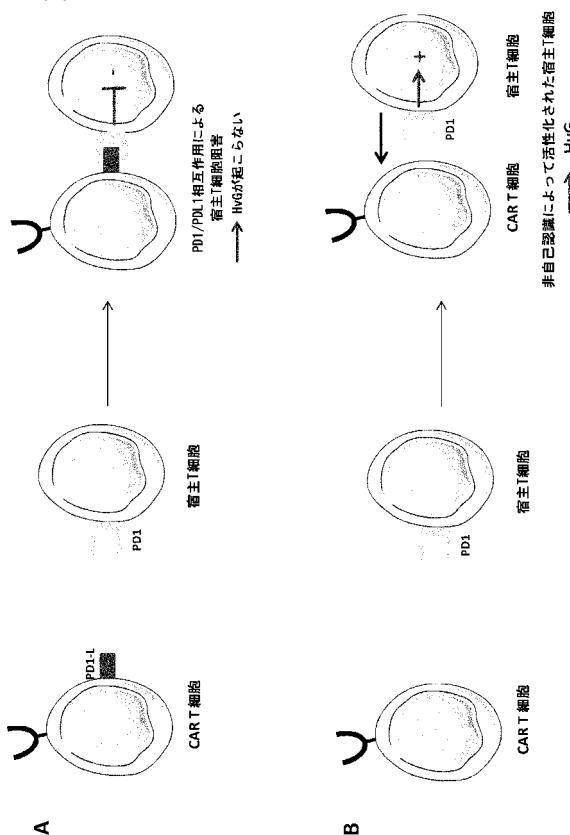
β2ミクログロブリンがKOされており可溶性NKG2Dリガンドを発現するCAR T細胞

ウイルスenv免疫抑制ドメイン (ISU) を発現するCAR T細胞

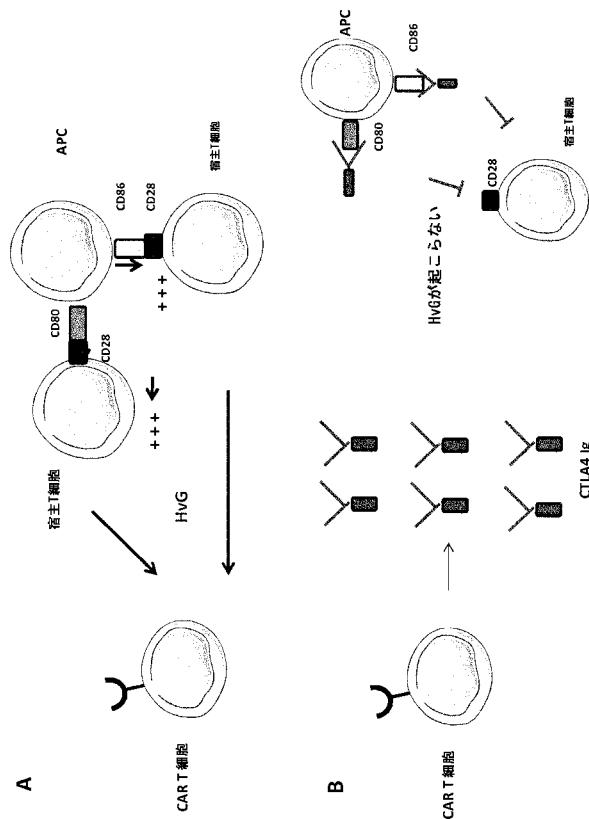
【図 9】



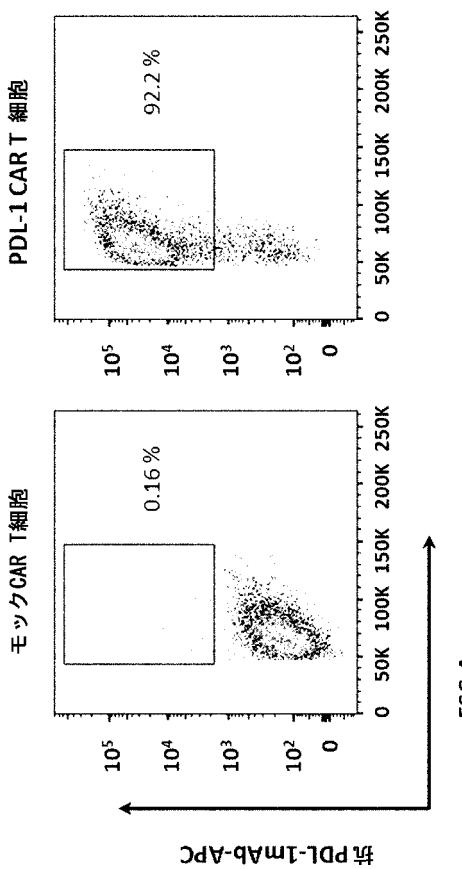
【図 10】



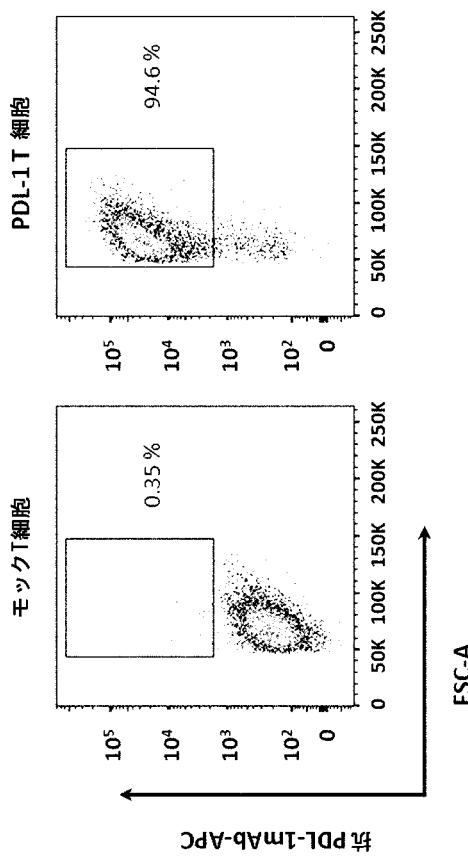
【図 11】



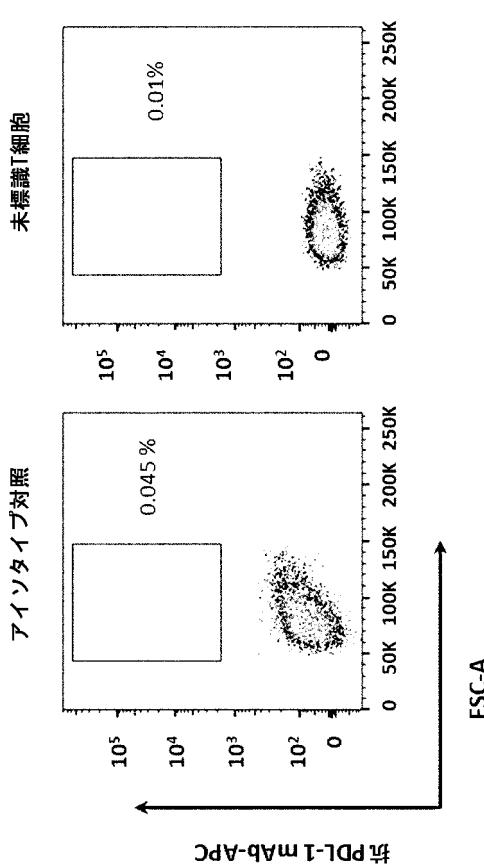
【図 12 A】



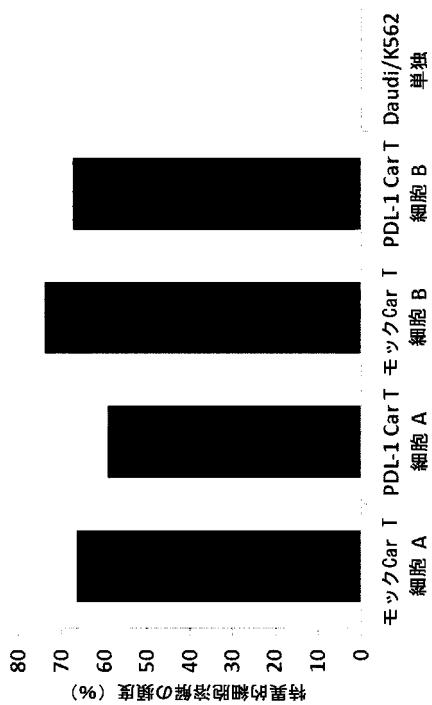
【図 1 2 B】



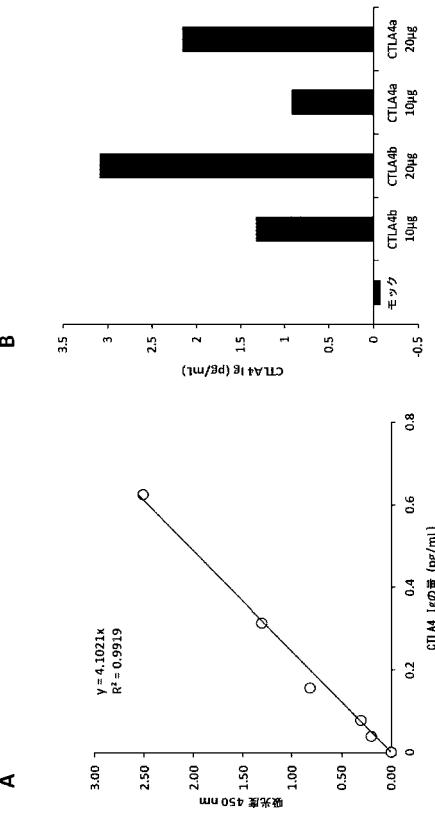
【図 1 2 C】



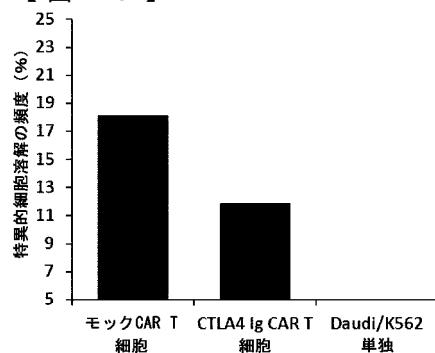
【図 1 3】



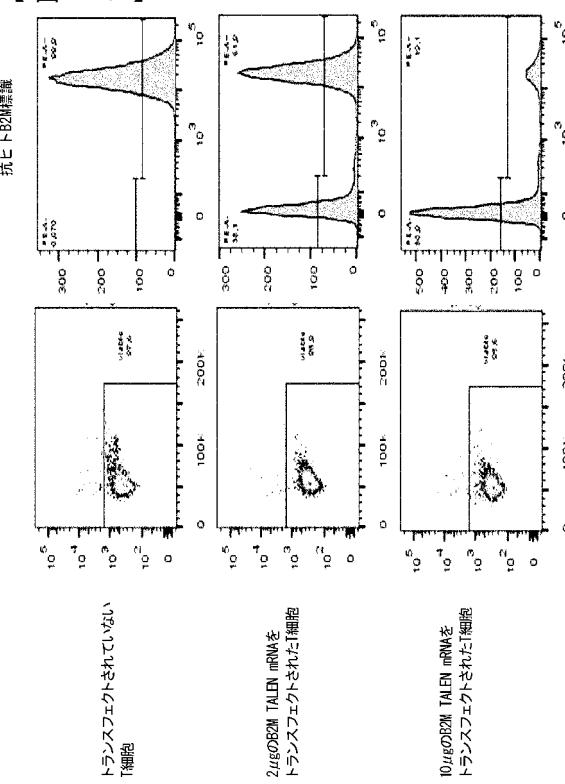
【図 1 4】



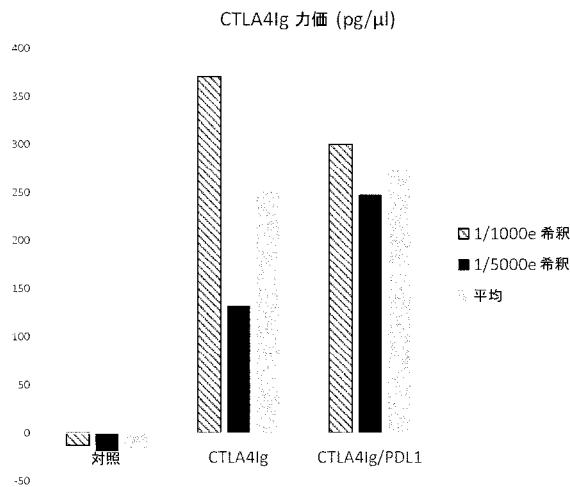
【 図 1 5 】



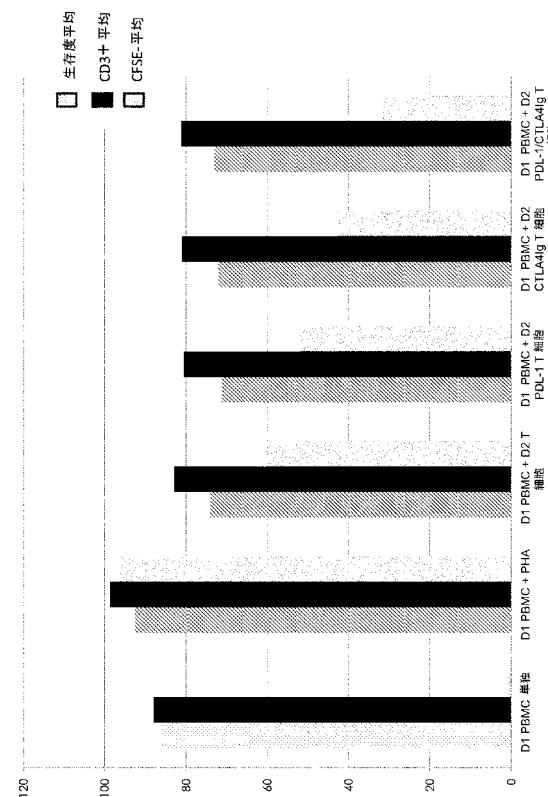
【 図 1 6 】



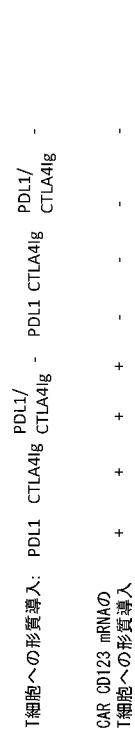
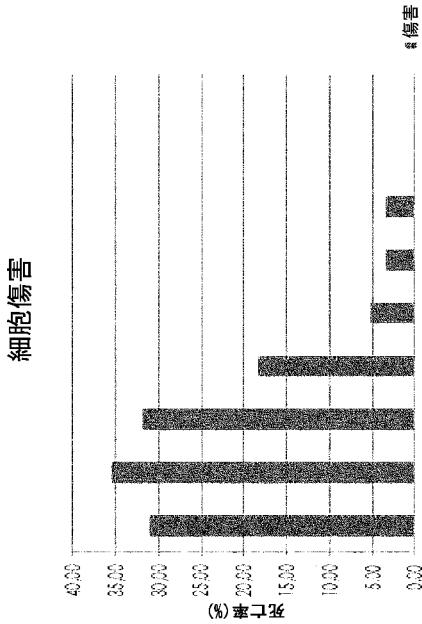
【 図 17 】



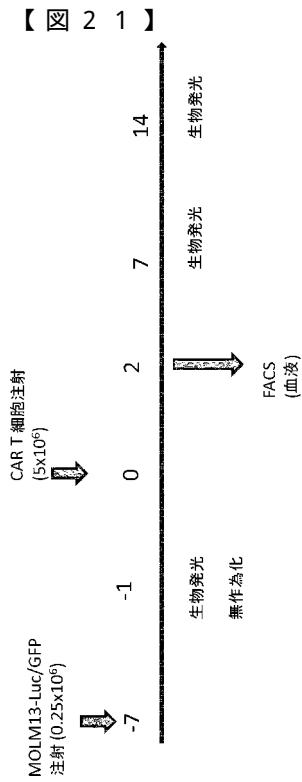
【 図 1 8 】



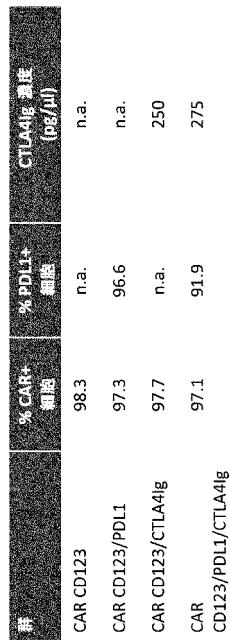
【図 19】



【図 21】

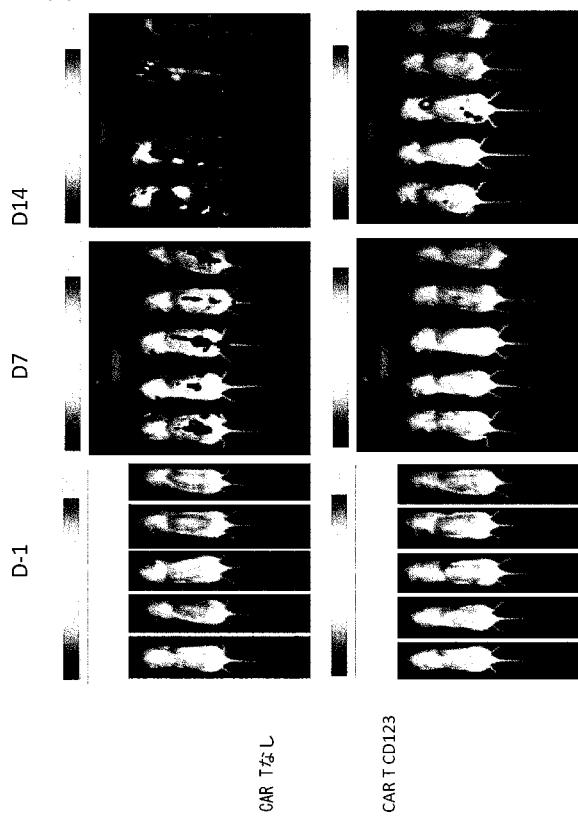


【図 22】

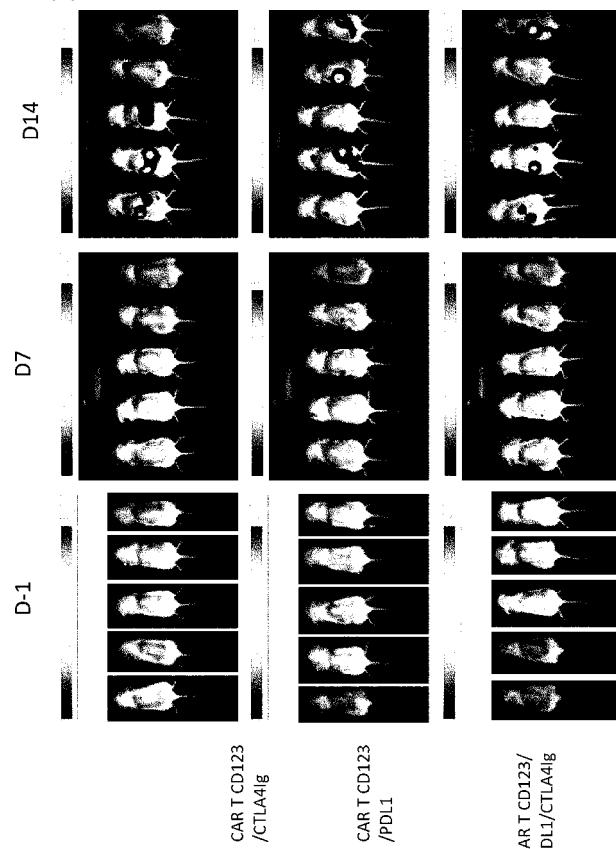


標的細胞
LT WT LT KO PD1
LT CAR CD123|KO PD1
LT CAR CD123|CTLA4Ig|KO PD1
LT CAR CD123|CTLA4Ig|PD-L1|KO PD1
LT CAR CD123|CTLAA4Ig|PD-L1|KO PD1

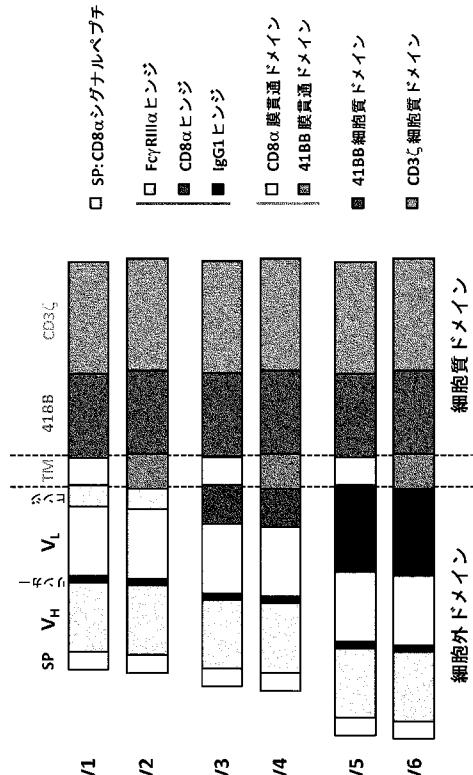
【図 2 3 A】



【図 2 3 B】



【図 2 4】



【配列表】

2018509148000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/EP2016/055332												
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/74 C12N5/0783 C12N15/85 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) 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, WPI Data														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">WO 95/17911 A1 (CELL GENESYS INC [US]) 6 July 1995 (1995-07-06) abstract page 10 - page 11 page 22 - page 23 page 33, paragraph 1 -----</td> <td style="padding: 2px;">1-41</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">M. A. CURRAN ET AL: "PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 107, no. 9, 2 March 2010 (2010-03-02), pages 4275-4280, XP055067204, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.0915174107 abstract -----</td> <td style="padding: 2px;">1-33, 36-41</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td style="padding: 2px;">-/-</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	WO 95/17911 A1 (CELL GENESYS INC [US]) 6 July 1995 (1995-07-06) abstract page 10 - page 11 page 22 - page 23 page 33, paragraph 1 -----	1-41	Y	M. A. CURRAN ET AL: "PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 107, no. 9, 2 March 2010 (2010-03-02), pages 4275-4280, XP055067204, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.0915174107 abstract -----	1-33, 36-41			-/-
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
Y	WO 95/17911 A1 (CELL GENESYS INC [US]) 6 July 1995 (1995-07-06) abstract page 10 - page 11 page 22 - page 23 page 33, paragraph 1 -----	1-41												
Y	M. A. CURRAN ET AL: "PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 107, no. 9, 2 March 2010 (2010-03-02), pages 4275-4280, XP055067204, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.0915174107 abstract -----	1-33, 36-41												
		-/-												
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> 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 20 May 2016	Date of mailing of the international search report 31/05/2016													
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Turri, Matteo													

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2016/055332

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2014/184744 A1 (CELLECTIS [FR]) 20 November 2014 (2014-11-20) page 2, line 6 - page 3, line 14; claim 6; figures 1, 2 ----- JOHN L B ET AL: "Anti-PD-1 antibody therapy potently enhances the eradication of established tumors by gene-modified T cells", CLINICAL CANCER RESEARCH, THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 19, no. 20, 15 October 2013 (2013-10-15), pages 5636-5646, XP002737460, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0458 [retrieved on 2013-07-19] abstract -----	34,35
Y	WO 2011/109789 A2 (UNIV JOHNS HOPKINS [US]; BEDI ATUL [US]; RAVI RAJANI [US]) 9 September 2011 (2011-09-09) sequences 47, 59 -----	6,9,13
A	WO 2005/097160 A2 (UNIV CALIFORNIA [US]; LANIER LEWIS L [US]; OGASAWARA KOETSU [US]; BLUE) 20 October 2005 (2005-10-20) claims 1-44; example 6 -----	1-41
A	H. TORIKAI ET AL: "A foundation for universal T-cell based immunotherapy: T cells engineered to express a CD19-specific chimeric-antigen-receptor and eliminate expression of endogenous TCR", BLOOD, vol. 119, no. 24, 14 June 2012 (2012-06-14), pages 5697-5705, XP055071623, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2012-01-405365 abstract -----	1-41
A	ZACHARY A. COOPER ET AL: "Combining checkpoint inhibitors and BRAF-targeted agents against metastatic melanoma", ONCOIMMUNOLOGY, vol. 2, no. 5, 1 May 2013 (2013-05-01), page e24320, XP055133315, ISSN: 2162-4011, DOI: 10.4161/onci.24320 the whole document ----- -/-	1-41
3		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2016/055332

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WILKINSON ET AL: "Modulation of natural killer cells by human cytomegalovirus", JOURNAL OF CLINICAL VIROLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 41, no. 3, 15 February 2008 (2008-02-15), pages 206-212, XP022483244, ISSN: 1386-6532, DOI: 10.1016/J.JCV.2007.10.027 paragraph [0001]</p> <p>-----</p>	1-41

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2016/055332

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9517911	A1 06-07-1995	AT 363919 T		15-06-2007
		AU 696372 B2		10-09-1998
		AU 1445695 A		17-07-1995
		CA 2180019 A1		06-07-1995
		DE 69434986 T2		07-02-2008
		EP 0742723 A1		20-11-1996
		JP 3734831 B2		11-01-2006
		JP H09507753 A		12-08-1997
		US 5574205 A		12-11-1996
		US 6139835 A		31-10-2000
		US 6514752 B1		04-02-2003
		WO 9517911 A1		06-07-1995
WO 2014184744	A1 20-11-2014	AU 2014266833 A1		24-12-2015
		CA 2912375 A1		20-11-2014
		CN 105378067 A		02-03-2016
		EP 2997133 A1		23-03-2016
		KR 20160030103 A		16-03-2016
		WO 2014184744 A1		20-11-2014
WO 2011109789	A2 09-09-2011	CA 2791383 A1		09-09-2011
		EP 2542590 A2		09-01-2013
		JP 2013521311 A		10-06-2013
		US 2013039911 A1		14-02-2013
		US 2015183881 A1		02-07-2015
		WO 2011109789 A2		09-09-2011
WO 2005097160	A2 20-10-2005	AT 435656 T		15-07-2009
		AU 2005231478 A1		20-10-2005
		AU 2009200269 A1		12-02-2009
		BR P10509620 A		18-09-2007
		CA 2563313 A1		20-10-2005
		CN 1984672 A		20-06-2007
		CN 102988959 A		27-03-2013
		DK 1732588 T3		12-10-2009
		EP 1732588 A2		20-12-2006
		EP 2248529 A1		10-11-2010
		EP 2289534 A1		02-03-2011
		ES 2328597 T3		16-11-2009
		JP 4667451 B2		13-04-2011
		JP 5693127 B2		01-04-2015
		JP 2007532549 A		15-11-2007
		JP 2011079826 A		21-04-2011
		KR 20070011441 A		24-01-2007
		KR 20080089677 A		07-10-2008
		KR 20090043618 A		06-05-2009
		US 2008260727 A1		23-10-2008
		WO 2005097160 A2		20-10-2005

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	

(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,R0,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 ドゥシャトー フィリップ フランス共和国 9 1 2 1 0 ドラヴェイユ ケ デ ダームス バトー ファウェン
(72) 発明者 カバニオル ジャン - ピエール フランス共和国 9 5 3 2 0 サン ロー ラ フォーレ リュ デ エグランティーヌ 1 7	(72) 発明者 ヴァルトン ジュリアン アメリカ合衆国 1 0 0 0 9 ニューヨーク州 ニューヨーク イースト トウェルフス スト リート 5 3 3
(72) 発明者 ポアロ ローラント フランス共和国 7 5 0 2 0 パリ リュー ドゥ ラ リユニオン 1 0	F ターム(参考) 4B063 QA20 QQ02 QQ08 QQ13 QQ42 QQ52 QQ79 QR32 QR35 QR48 QR72 QR77 QX01 4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA01 CA44 4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 BB64 BB65 NA14 ZB26 ZB33 4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA50 DA75 EA20 FA74