

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-552998

(P2023-552998A)

(43)公表日 令和5年12月20日(2023.12.20)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 1 0 0	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	Z N A 4 C 0 8 4
C 1 2 N 5/0783(2010.01)	C 1 2 N 5/0783	4 C 0 8 7
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z	
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全273頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2023-533999(P2023-533999)	(71)出願人	520438914 ンカルタ・インコーポレイテッド N k a r t a , I n c . アメリカ合衆国94080カリフォルニア州サウス・サンフランシスコ、ベテランズ・ブルバード1150
(86)(22)出願日	令和3年12月2日(2021.12.2)	(74)代理人	100145403 弁理士 山尾 憲人
(85)翻訳文提出日	令和5年7月24日(2023.7.24)	(74)代理人	100122301 弁理士 富田 憲史
(86)国際出願番号	PCT/US2021/072715	(74)代理人	100157956 弁理士 稲井 史生
(87)国際公開番号	WO2022/120370	(74)代理人	100170520 弁理士 笹倉 真奈美
(87)国際公開日	令和4年6月9日(2022.6.9)	(74)代理人	100221545
(31)優先権主張番号	63/121,206		
(32)優先日	令和2年12月3日(2020.12.3)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(31)優先権主張番号	63/201,159		
(32)優先日	令和3年4月15日(2021.4.15)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(31)優先権主張番号	63/236,167		

最終頁に続く

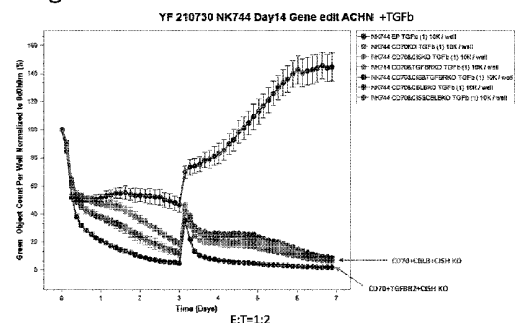
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 効力および持続性の増強のために免疫細胞を操作する方法、ならびに免疫療法における操作された細胞の使用

(57)【要約】

本明細書に開示される方法および組成物のいくつかの実施形態は、キメラ抗原受容体を発現するように操作された免疫細胞、ならびに別の免疫細胞が、操作された細胞に対して標的化し、細胞傷害性効果を誘導することができる有効性を改変するように遺伝子編集されたまたはその他の形で操作された免疫細胞に関する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法および組成物は、いくつかの例において、免疫細胞型の混合物を含む、治療細胞集団内のフラトリサイドを減少させる。さらに、本明細書に開示される方法および組成物は、細胞傷害性および／または持続性、ならびに移植片対宿主または宿主対移植片効果の減少を含む細胞免疫療法における免疫細胞の有効性の1つ以上の態様を増強する。

Figure 54B



10

20

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

遺伝子操作および遺伝子編集された免疫細胞集団であって、
細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞傷害性受容体を発現する、遺伝子操作された免疫細胞を含み、
細胞外リガンド結合ドメインは、標的腫瘍細胞によって発現される腫瘍マーカーを標的とし、

免疫細胞は、C I S タンパク質をコードする C I S H 遺伝子の 1 つ以上の標的位置で遺伝子編集され、編集は、C I S H 遺伝子における 1 つまたは複数の位置で編集されていない免疫細胞と比較して、C I S の減少した発現および／または機能をもたらし；

10

免疫細胞は、C B L B タンパク質をコードする C b l プロトオンコジーン B タンパク質 (C B L B) 遺伝子における 1 つ以上の標的位置で遺伝子編集され、編集は、C B L B 遺伝子における 1 つまたは複数の位置で編集されていない免疫細胞と比較して、C B L B タンパク質の減少した発現および／または機能をもたらし；

遺伝子操作および編集された免疫細胞は、C I S H および C B L B 遺伝子における前記遺伝子編集を含まない免疫細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの 1 つ以上を示す、遺伝子操作および遺伝子編集された免疫細胞集団。

【請求項 2】

遺伝子操作および遺伝子編集された免疫細胞集団であって、免疫細胞は、免疫細胞のゲノムにおける 1 つ以上のさらなる標的部位で編集されて、編集されていない免疫細胞と比較して、編集された標的部位を含む遺伝子によってコードされるタンパク質の減少したレベルの発現をもたらす、遺伝子操作および遺伝子編集された免疫細胞集団。

20

【請求項 3】

細胞が、トランスフォーミング増殖因子受容体ベータ 2 (T G F B R 2) 遺伝子のさらなる標的部位で編集される、請求項 2 に記載の遺伝子操作および遺伝子編集された免疫細胞集団。

【請求項 4】

細胞が T I G I T 遺伝子のさらなる標的部位で編集される、請求項 2 に記載の遺伝子操作および遺伝子編集された免疫細胞集団。

30

【請求項 5】

配列番号 1 5 3 ～ 1 5 7 または 5 6 2 ～ 5 6 5 のいずれかのガイド配列を使用して、C I S H 遺伝子を標的化する、請求項 1 に記載の遺伝子操作および遺伝子編集された免疫細胞集団。

【請求項 6】

配列番号 1 6 4 ～ 1 6 6 または 5 5 2 ～ 5 5 5 のいずれかのガイド配列を使用して、C B L B 遺伝子を標的化する、請求項 1 に記載の遺伝子操作および遺伝子編集された免疫細胞集団。

【請求項 7】

遺伝子操作された免疫細胞の少なくとも一部が、膜結合 I L - 1 5 を発現するように操作されている、請求項 1 に記載の遺伝子操作および遺伝子編集された免疫細胞集団。

40

【請求項 8】

配列番号 1 4 7 ～ 1 5 2 または 5 4 4 ～ 5 4 7 のいずれかのガイド配列を使用して、T G F B R 2 遺伝子を標的化する、請求項 3 に記載の遺伝子操作および遺伝子編集された免疫細胞集団。

【請求項 9】

配列番号 5 0 7 ～ 5 1 0 のいずれかのガイド配列を使用して、T I G I T 遺伝子を標的化する、請求項 4 に記載の遺伝子操作および遺伝子編集された免疫細胞集団。

【請求項 10】

免疫細胞が、ナチュラルキラー (N K) 細胞、T 細胞、またはそれらの組み合わせを含

50

む、請求項 1 に記載の遺伝子操作および遺伝子編集された免疫細胞集団。

【請求項 1 1】

細胞が、NKG2A、SOCS2、B2M、PD-1、TIM-3、またはTCRアルファをコードする遺伝子における1つ以上のさらなる標的部位でさらに編集されている、請求項 2 に記載の遺伝子操作および遺伝子編集された免疫細胞集団。

【請求項 1 2】

細胞がCD70 遺伝子標的部位で編集されていない、請求項 1 に記載の遺伝子操作および遺伝子編集された免疫細胞集団。

【請求項 1 3】

細胞傷害性受容体が、標的腫瘍細胞によって発現されるNKG2D、CD19、CD70、BCMA、CD38、GPRC5D、DLL3、EGFR、PSMA、FLT3のリガンドのうちの1つ以上、またはそれらの任意の組み合わせを標的とする、請求項 1 に記載の遺伝子操作および遺伝子編集された免疫細胞集団。

10

【請求項 1 4】

細胞が、CD70を標的とする細胞傷害性受容体複合体を発現するように操作されていない、請求項 1～12のいずれか一項に記載の遺伝子操作および遺伝子編集された免疫細胞集団。

【請求項 1 5】

細胞が、CD19を標的とする細胞傷害性受容体複合体を発現するように操作されていない、請求項 1～12のいずれか一項に記載の遺伝子操作および遺伝子編集された免疫細胞集団。

20

【請求項 1 6】

細胞が、NKG2D受容体のリガンドを標的とする細胞傷害性受容体複合体を発現するように操作されていない、請求項 1～12のいずれか一項に記載の遺伝子操作および遺伝子編集された免疫細胞集団。

【請求項 1 7】

細胞が、(i) 配列番号548～551のいずれかのガイド配列がNKG2A遺伝子を標的とするために使用される、NKG2Aをコードする遺伝子、(ii) 配列番号556～561のいずれかのガイド配列がSOCS2遺伝子を標的とするために使用される、SOCS2をコードする遺伝子、(iii) 配列番号199～208のいずれかのガイド配列がB2M遺伝子を標的とするために使用される、B2Mをコードする遺伝子、(iv) 配列番号511～514のいずれかのガイド配列がPD-1遺伝子を標的とするために使用される、PD-1をコードする遺伝子、(v) 配列番号515～518のいずれかのガイド配列がTIM-3遺伝子を標的とするために使用される、TIM-3をコードする遺伝子、および(vi) 配列番号566～568のいずれかのガイド配列がTCRアルファ遺伝子を標的とするために使用される、TCRアルファをコードする遺伝子のうちの1つ以上でさらに編集されている、前記請求項のいずれか一項に記載の遺伝子操作および遺伝子編集された免疫細胞集団。

30

【請求項 1 8】

細胞が、(i) 配列番号503～506のいずれかのガイド配列がアデノシンA2受容体遺伝子を標的とするために使用される、アデノシンA2受容体をコードする遺伝子、(ii) 配列番号491～493のいずれかのガイド配列がSMAD3遺伝子を標的とするために使用される、SMAD3をコードする遺伝子、(iii) 配列番号494～496のいずれかのガイド配列がMAPKAPK3遺伝子を標的とするために使用される、MAPKAPK3をコードする遺伝子、(iv) 配列番号497～499のいずれかのガイド配列がCEACAM1遺伝子を標的とするために使用される、CEACAM1をコードする遺伝子、(v) 配列番号500～502のいずれかのガイド配列がDDIT4遺伝子を標的とするために使用される、DDIT4をコードする遺伝子、および(vi) 配列番号519～522のいずれかのガイド配列がCD38遺伝子を標的とするために使用される、CD38をコードする遺伝子のうちの1つ以上でさらに編集されている、前記請求項の

40

50

いずれか一項に記載の遺伝子操作および遺伝子編集された免疫細胞集団。

【請求項 19】

遺伝子操作および編集された免疫細胞が、移植片対宿主疾患のリスクを減少させる同種異系がん細胞療法における使用に適している、前記請求項のいずれか一項に記載の遺伝子操作および遺伝子編集された免疫細胞集団。

【請求項 20】

前記請求項のいずれかに記載の免疫細胞集団の少なくとも一部を対象に投与することを含む、対象におけるがんを処置する方法。

【請求項 21】

がんを処置するための、請求項 1～19 のいずれか一項に記載の遺伝子操作および編集された免疫細胞の使用。

【請求項 22】

がんを処置するための医薬を調製するための、請求項 1～19 のいずれか一項に記載の遺伝子操作および編集された免疫細胞の使用。

【請求項 23】

がん免疫療法のための遺伝子編集された免疫細胞集団を製造する方法であって、
免疫細胞集団を第 1 の遺伝子編集複合体と接触させ、

第 1 の遺伝子編集複合体が、C I S H 遺伝子で編集されていない免疫細胞と比較して、C I S H 遺伝子によってコードされる C I S タンパク質の減少したレベルの発現をもたらすように、免疫細胞の C I S H 遺伝子における 1 つ以上の標的部位で編集すること；ならびに

免疫細胞集団を第 2 の遺伝子編集複合体と接触させ、

第 2 の遺伝子編集複合体が、C B L B 遺伝子で編集されていない免疫細胞と比較して、C B L B 遺伝子によってコードされる C B L B タンパク質の減少したレベルの発現をもたらすように、免疫細胞の C B L B 遺伝子における 1 つ以上の標的部位で編集することを含み、

遺伝子編集された免疫細胞は、前記遺伝子編集された 1 つまたは複数の標的部位を含まない免疫細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの 1 つ以上を示す、方法。

【請求項 24】

がん免疫療法のための遺伝子編集された免疫細胞集団を製造する方法であって、
免疫細胞集団を第 1 の遺伝子編集複合体と接触させ、

第 1 の遺伝子編集複合体が、C I S H 遺伝子で編集されていない免疫細胞と比較して、C I S H 遺伝子によってコードされる C I S タンパク質の減少したレベルの発現をもたらすように、免疫細胞の C I S H 遺伝子における 1 つ以上の標的部位で編集すること；ならびに

免疫細胞集団を第 2 の遺伝子編集複合体と接触させ、

第 2 の遺伝子編集複合体が、T G F B R 2 遺伝子で編集されていない免疫細胞と比較して、T G F B R 2 遺伝子によってコードされる T G F B R 2 タンパク質の減少したレベルの発現をもたらすように、免疫細胞の T G F B R 2 遺伝子における 1 つ以上の標的部位で編集することを含み、

遺伝子編集された免疫細胞は、前記遺伝子編集された 1 つまたは複数の標的部位を含まない免疫細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの 1 つ以上を示す、方法。

【請求項 25】

がん免疫療法のための遺伝子編集された免疫細胞集団を製造する方法であって、
免疫細胞集団を第 1 の遺伝子編集複合体と接触させ、

第 1 の遺伝子編集複合体が、C I S H 遺伝子で編集されていない免疫細胞と比較して、C I S H 遺伝子によってコードされる C I S タンパク質の減少したレベルの発現をもたらすように、免疫細胞の C I S H 遺伝子における 1 つ以上の標的部位で編集すること；なら

10

20

30

40

50

びに

免疫細胞集団を第２の遺伝子編集複合体と接触させ、

第２の遺伝子編集複合体が、ＴＩＧＩＴ遺伝子で編集されていない免疫細胞と比較して、ＴＩＧＩＴ遺伝子によってコードされるＴＩＧＩＴタンパク質の減少したレベルの発現をもたらすように、免疫細胞のＴＩＧＩＴ遺伝子における１つ以上の標的部位で編集することを含み、

遺伝子編集された免疫細胞は、前記遺伝子編集された１つまたは複数の標的部位を含まない免疫細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの１つ以上を示す、方法。

【請求項２６】

がん免疫療法のための遺伝子編集された免疫細胞集団を製造する方法であって、

免疫細胞集団を第１の遺伝子編集複合体と接触させ、

第１の遺伝子編集複合体が、ＣＩＳＨ遺伝子で編集されていない免疫細胞と比較して、ＣＩＳＨ遺伝子によってコードされるＣＩＳタンパク質の減少したレベルの発現をもたらすように、免疫細胞のＣＩＳＨ遺伝子における１つ以上の標的部位で編集すること；ならびに

免疫細胞集団を第２の遺伝子編集複合体と接触させ、

第２の遺伝子編集複合体が、さらなる遺伝子で編集されていない免疫細胞と比較して、さらなる遺伝子によってコードされるタンパク質の減少したレベルの発現をもたらすように、免疫細胞のさらなる遺伝子における１つ以上の標的部位で編集することを含み、

遺伝子編集された免疫細胞は、前記遺伝子編集された１つまたは複数の標的部位を含まない免疫細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの１つ以上を示す、方法。

【請求項２７】

免疫細胞集団を、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞傷害性受容体をコードするポリヌクレオチドを含むベクターと接触させることをさらに含む、請求項２３～２６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２８】

細胞傷害性受容体がＣＤ７０を標的としない、請求項２７に記載の方法。

【請求項２９】

ＣＤ７０をコードする遺伝子を編集することを含まない、請求項２３～２８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３０】

細胞傷害性受容体がＣＤ１９を標的としない、請求項２７に記載の方法。

【請求項３１】

細胞傷害性受容体がＮＫＧ２Ｄリガンドを標的としない、請求項２７に記載の方法。

【請求項３２】

ＮＫＧ２Ａ、ＳＯＣＳ２、Ｂ２Ｍ、ＰＤ－１、ＴＩＭ－３、またはＴＣＲアルファのうちの１つをコードする１つ以上の遺伝子においてさらなる編集を行うことをさらに含む、請求項２５～３１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３３】

細胞傷害性受容体が、標的腫瘍細胞によって発現されるＮＫＧ２Ｄ、ＣＤ１９、ＣＤ７０、ＢＣＭＡ、ＣＤ３８、ＧＰＲＣ５Ｄ、ＤＬＬ３、ＥＧＦＲ、ＰＳＭＡ、ＦＬＴ３のリガンドのうちの１つ以上、またはそれらの任意の組み合わせを標的とする、請求項２７に記載の方法。

【請求項３４】

免疫細胞が、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、Ｔ細胞、またはそれらの組み合わせを含む、請求項３３～４３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３５】

対象におけるがんを処置する方法であって、

10

20

30

40

50

遺伝子操作された免疫細胞集団を対象に投与することを含み、

免疫細胞は、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞傷害性受容体を発現し、

免疫細胞は、C I S タンパク質をコードするC I S H 遺伝子の1つ以上の標的位置で遺伝子編集され、編集は、C I S H 遺伝子における1つまたは複数の位置で編集されていない免疫細胞と比較して、C I S の減少した発現および／または機能をもたらす；

免疫細胞は、C B L B 遺伝子、T G F B R 2 遺伝子、および／またはT I G I T 遺伝子のうちの1つ以上で編集されて、C B L B 遺伝子、T G F B R 2 遺伝子、またはT I G I T 遺伝子で編集されていない免疫細胞と比較して、C B L B タンパク質、T G F B R 2 タンパク質、および／またはT I G I T タンパク質の減少したレベルの発現または活性をもたらす、

遺伝子操作および編集された免疫細胞は、前記遺伝子編集された1つまたは複数の標的部位を含まない免疫細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す、方法。

【請求項36】

免疫細胞を少なくとも1つのさらなる標的遺伝子で編集することをさらに含む、請求項35に記載の方法。

【請求項37】

少なくとも1つのさらなる標的遺伝子が、C D 7 0 をコードする遺伝子ではない、請求項36に記載の方法。

【請求項38】

細胞が、N K G 2 A 、S O C S 2 、B 2 M 、P D - 1 、T I M - 3 、またはT C R アルファをコードするさらなる標的遺伝子で編集される、請求項35～37のいずれか一項に記載の方法。

【請求項39】

免疫細胞によって発現される細胞傷害性受容体がC D 7 0 を標的としない、請求項35～38のいずれか一項に記載の方法。

【請求項40】

免疫細胞によって発現される細胞傷害性受容体がC D 1 9 を標的としない、請求項35～39のいずれか一項に記載の方法。

【請求項41】

免疫細胞によって発現される細胞傷害性受容体がN K G 2 D を標的としない、請求項35～40のいずれか一項に記載の方法。

【請求項42】

免疫細胞によって発現される細胞傷害性受容体が、C D 1 9 、C D 7 0 、B C M A 、C D 3 8 、G P R C 5 D 、D L L 3 、E G F R 、P S M A 、F L T 3 、K R E M E N 2 の1つ以上のエピトープ、またはそれらの組み合わせに結合する、請求項35～39のいずれか一項に記載の方法。

【請求項43】

免疫細胞が、ナチュラルキラー（NK）細胞、T細胞、またはそれらの組み合わせを含む、請求項35～42のいずれか一項に記載の方法。

【請求項44】

免疫細胞が、NK細胞とT細胞の混合物、またはi P S C 由来NK細胞とT細胞の混合物を含む、請求項43に記載の方法。

【請求項45】

投与される免疫細胞が、対象に対して同種異系である、請求項35～44のいずれか一項に記載の方法。

【請求項46】

I L 2 を投与することをさらに含む、請求項35～45のいずれか一項に記載の方法。

【請求項47】

10

20

30

40

50

遺伝子操作および遺伝子編集された免疫細胞集団であって、

細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞傷害性受容体を発現する、遺伝子操作された免疫細胞を含み、

細胞外リガンド結合ドメインは、標的腫瘍細胞によって発現される腫瘍マーカーを標的とし、

遺伝子操作された免疫細胞の少なくとも一部は、膜結合 I L - 1 5 を発現するように操作され、

免疫細胞は、編集されていない免疫細胞と比較して、編集された標的部位を含む遺伝子によってコードされるタンパク質の減少したレベルの発現をもたらすように、免疫細胞のゲノムにおける 1 つ以上の標的部位で遺伝子編集され、

遺伝子操作および編集された免疫細胞は、前記遺伝子編集された標的部位または複数の標的部位を含まない免疫細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの 1 つ以上を示す、遺伝子操作および遺伝子編集された免疫細胞集団。

【請求項 4 8】

免疫細胞が、編集されていない免疫細胞と比較して、減少したレベルのアデノシン受容体 A 2 発現をもたらすように、アデノシン A 2 受容体をコードする遺伝子における標的部位で遺伝子編集され、配列番号 5 0 3 ~ 5 0 6 のいずれかのガイド配列が、アデノシン受容体 A 2 遺伝子を標的とするために使用される、請求項 4 7 に記載の免疫細胞集団。

【請求項 4 9】

細胞が、C I S H、S M A D 3、M A P K A P K 3、C E A C A M 1、D D I T 4、T G F B R 2 R、N K G 2 A、S O C S 2、C B L B、B 2 M、T I G I T、P D - 1、T I M - 3、C D 3 8、および T C R アルファのうちの 1 つ以上をコードする遺伝子でさらに編集されている、請求項 4 7 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の免疫細胞集団。

【請求項 5 0】

細胞が、(i) 配列番号 5 6 2 ~ 5 6 5 のいずれかのガイド配列が C I S をコードする遺伝子を標的とするために使用される、C I S をコードする遺伝子、(i i) 配列番号 4 9 1 ~ 4 9 3 のいずれかのガイド配列が S M A D 3 遺伝子を標的とするために使用される、S M A D 3 をコードする遺伝子、(i i i) 配列番号 4 9 4 ~ 4 9 6 のいずれかのガイド配列が M A P K A P K 3 遺伝子を標的とするために使用される、M A P K A P K 3 をコードする遺伝子、(i v) C E A C A M 1 をコードする遺伝子、および配列番号 4 9 7 ~ 4 9 9 のいずれかのガイド配列、(v) 配列番号 5 0 0 ~ 5 0 2 のいずれかのガイド配列が D D I T 4 遺伝子を標的とするために使用される、D D I T 4 をコードする遺伝子、(v i) 配列番号 5 4 4 ~ 5 4 7 のいずれかのガイド配列が T G F B R 2 遺伝子を標的とするために使用される、T G F B R 2 をコードする遺伝子、(v i i) 配列番号 5 4 8 ~ 5 5 1 のいずれかのガイド配列が N K G 2 A 遺伝子を標的とするために使用される、N K G 2 A をコードする遺伝子、(v i i i) 配列番号 5 5 6 ~ 5 6 1 のいずれかのガイド配列が S O C S 2 遺伝子を標的とするために使用される、S O C S 2 をコードする遺伝子、(i x) 配列番号 5 5 2 ~ 5 5 5 のいずれかのガイド配列が C B L B 遺伝子を標的とするために使用される、C B L B をコードする遺伝子、(x) 配列番号 2 9 0 ~ 2 9 9 のいずれかのガイド配列が B 2 M 遺伝子を標的とするために使用される、B 2 M をコードする遺伝子、(x i) 配列番号 5 0 7 ~ 5 1 0 のいずれかのガイド配列が T I G I T 遺伝子を標的とするために使用される、T I G I T をコードする遺伝子、(x i i) 配列番号 5 1 1 ~ 5 1 4 のいずれかのガイド配列が P D - 1 遺伝子を標的とするために使用される、P D - 1 をコードする遺伝子、(x i i i) 配列番号 5 1 5 ~ 5 1 8 のいずれかのガイド配列が T I M - 3 遺伝子を標的とするために使用される、T I M - 3 をコードする遺伝子、(x i v) 配列番号 5 1 9 ~ 5 2 2 のいずれかのガイド配列が C D 3 8 遺伝子を標的とするために使用される、C D 3 8 をコードする遺伝子、および / または (x v) 配列番号 5 6 6 ~ 5 6 9 のいずれかのガイド配列が T C R アルファ遺伝子を標的とするために使用される、T C R アルファをコードする遺伝子でさらに編集される、請求項 4 9 に記載の免疫細胞

10

20

30

40

50

集団。

【請求項 5 1】

細胞外リガンド結合ドメインが、MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、ULBP5、およびULBP6からなる群から選択される腫瘍マーカーに対する指向性を有する受容体を含む、請求項 4 7～5 0 のいずれか一項に記載の免疫細胞集団。

【請求項 5 2】

NK細胞によって発現される細胞傷害性受容体が、(i) NKG2Dリガンド結合ドメイン、(ii) CD8膜貫通ドメイン、および(iii) OX40共刺激サブドメインとCD3ζ共刺激サブドメインを含むシグナル伝達複合体を含む、請求項 4 7～5 1 のいずれか一項に記載の免疫細胞集団。

10

【請求項 5 3】

細胞傷害性受容体が、標的腫瘍細胞によって発現されるNKG2D受容体リガンド、CD19、CD70、BCMA、CD38、GPRC5D、CD138、DLL3、EGFR、PSMA、FLT3、またはKREMEN2のうちの1つ以上を標的とする、請求項 4 7～5 2 のいずれか一項に記載の免疫細胞集団。

【請求項 5 4】

細胞傷害性シグナル伝達複合体が、OX40サブドメインまたは4-1BBドメイン、およびCD3ゼータサブドメインを含む、請求項 4 7～5 3 のいずれか一項に記載の免疫細胞集団。

20

【請求項 5 5】

免疫細胞が、ナチュラルキラー(NK)細胞、T細胞、誘導多能性幹細胞(iPSC)、iPSC由来NK細胞、NK-92細胞、またはそれらの組み合わせを含む、請求項 4 7～5 4 のいずれか一項に記載の免疫細胞集団。

【請求項 5 6】

遺伝子操作および編集された免疫細胞が、移植片対宿主疾患のリスクを減少させる同種異系がん細胞療法における使用に適している、および／または遺伝子操作された免疫細胞間の細胞傷害活性のリスクを減少させる同種異系がん細胞療法における使用に適している、請求項 4 7～5 5 のいずれか一項に記載の免疫細胞集団。

【請求項 5 7】

請求項 4 7～5 6 のいずれか一項に記載の免疫細胞集団の少なくとも一部を対象に投与することを含む、対象におけるがんを処置する方法。

30

【請求項 5 8】

がんを処置するためまたはがんを処置するための医薬を調製するための、請求項 4 7～5 6 のいずれか一項に記載の遺伝子操作および編集された免疫細胞の使用。

【請求項 5 9】

がん免疫療法のための遺伝子操作された免疫細胞集団を製造する方法であって、免疫細胞集団を、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞傷害性受容体をコードするポリヌクレオチドを含むベクターと接触させること；

40

免疫細胞集団を遺伝子編集複合体と接触させることを含み、

遺伝子編集複合体が免疫細胞のゲノムにおける1つ以上の標的部位で編集して、編集されていない免疫細胞と比較して、編集された標的部位を含む遺伝子によってコードされるタンパク質の減少したレベルの発現をもたらし、

遺伝子操作および編集された免疫細胞は、前記遺伝子編集された標的部位または複数の標的部位を含まない免疫細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す、方法。

【請求項 6 0】

編集が、CISH、ADARA2、SMAD3、MAPKAPK3、CEACAM1、DDIT4、TGFB2R、NKG2A、SOCS2、CBLB、B2M、TIGIT

50

、PD-1、TIM-3、CD38、およびTCRアルファのうちの1つ以上をコードする遺伝子において行われる、請求項59に記載の方法。

【請求項61】

細胞外リガンド結合ドメインが、標的腫瘍細胞によって発現されるMICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、ULBP5、およびULBP6、CD19、CD70、BCMA、CD38、GPRC5D、CD138、DLL3、EGFR、PSMA、FLT3、またはKREMEN2からなる群から選択される腫瘍マーカーに対する指向性を有する受容体を含む、請求項59または60に記載の方法。

【請求項62】

細胞傷害性シグナル伝達複合体が、OX40サブドメインまたは4-1BBドメイン、およびCD3ゼータサブドメインを含む、請求項59～61のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項63】

細胞傷害性シグナル伝達複合体をコードするポリヌクレオチドが、膜結合IL15をニシストロン性にコードする、請求項59～62のいずれか一項に記載の方法。

【請求項64】

ベクターがレトロウイルスベクターを含む、請求項59～63のいずれか一項に記載の方法。

【請求項65】

免疫細胞が、ナチュラルキラー（NK）細胞、T細胞、誘導多能性幹細胞（iPSC）、iPSC由来NK細胞、NK-92細胞、またはそれらの組み合わせを含む、請求項59～64のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項66】

対象におけるがんを処置する方法であって、
遺伝子操作された免疫細胞集団を対象に投与することを含み、
免疫細胞は、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞傷害性受容体を発現し、
細胞傷害性シグナル伝達複合体は、OX-40サブドメインおよびCD3ゼータサブドメインを含み、

細胞は膜結合IL-15を発現するように操作され、
免疫細胞は、編集されていない免疫細胞と比較して、編集された標的部位を含む遺伝子によってコードされるタンパク質の減少したレベルの発現をもたらすように、免疫細胞のゲノムにおける1つ以上の標的部位で遺伝子編集され、

30

遺伝子操作および編集された免疫細胞は、前記遺伝子編集された1つまたは複数の標的部位を含まない免疫細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す、方法。

【請求項67】

細胞が、CISH、ADAR2A、SMAD3、MAPKAPK3、CEACAM1、DDIT4、TGFBFR2R、NKG2A、SOCS2、CBLB、B2M、TIGIT、PD-1、TIM-3、CD38、およびTCRアルファのうちの2つ以上をコードする遺伝子で編集される、請求項66に記載の方法。

40

【請求項68】

細胞傷害性受容体が、（i）標的腫瘍細胞によって発現されるNKG2Dリガンド結合ドメイン、またはCD19、CD70、BCMA、CD38、GPRC5D、CD138、DLL3、EGFR、PSMA、FLT3、もしくはKREMEN2のうちの1つ以上のエピトープに結合する結合ドメイン、（ii）CD8膜貫通ドメイン、および（iii）OX40共刺激サブドメインおよびCD3 ζ 共刺激サブドメインを含むシグナル伝達複合体を含む、請求項66または67に記載の方法。

【請求項69】

免疫細胞が、ナチュラルキラー（NK）細胞、T細胞、誘導多能性幹細胞（iPSC）

50

、iPSC由来NK細胞、NK-92細胞、またはそれらの組み合わせを含む、請求項66～68のいずれか一項に記載の方法。

【請求項70】

投与される免疫細胞が、対象に対して同種異系である、請求項66～69のいずれか一項に記載の方法。

【請求項71】

がん免疫療法のための遺伝子操作された免疫細胞集団であって、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞傷害性受容体を発現する、遺伝子操作された免疫細胞を含み、遺伝子操作された免疫細胞の少なくとも一部は、膜結合IL-15を発現するように操作され、

遺伝子操作された免疫細胞は少なくとも1つの免疫抑制エフェクターを発現するように操作され、

少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは抑制細胞の望ましくない細胞傷害活性に対して抑制効果を発揮し、

遺伝子操作された免疫細胞は、前記免疫抑制エフェクターを含まない細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す、遺伝子操作された免疫細胞集団。

【請求項72】

遺伝子操作されたNK細胞および遺伝子操作されたT細胞のうちの1つ以上を含む、請求項71に記載の遺伝子操作された免疫細胞集団。

【請求項73】

抑制細胞が、宿主細胞、または操作されていないナチュラルキラー細胞、操作されていないT細胞、または操作された抑制細胞のうちの1つ以上を含む、請求項71または72に記載の遺伝子操作された免疫細胞集団。

【請求項74】

前記免疫抑制エフェクターを含まない細胞が、操作されていない細胞または操作された細胞のいずれかである、請求項71～73のいずれか一項に記載の遺伝子操作された免疫細胞集団。

【請求項75】

遺伝子操作された免疫細胞がまた、ベクター2ミクログロブリン(B2M)の発現を減少させるために遺伝子編集され、B2Mの減少した発現が、内因性レベルのB2Mを発現する免疫細胞と比較して、宿主対移植片拒絶を減少させる同種異系がん免疫療法において免疫細胞を使用することを可能にする、請求項71～74のいずれか一項に記載の遺伝子操作された免疫細胞集団。

【請求項76】

少なくとも1つの免疫抑制エフェクターが、レトロウイルスに由来してもよく、レトロウイルスのエンベロープタンパク質に由来してもよいウイルス由来ペプチドを含む、請求項71～75のいずれか一項に記載の遺伝子操作された免疫細胞集団。

【請求項77】

少なくとも1つの免疫抑制エフェクターが免疫細胞の細胞外膜に結合され、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターが膜貫通タンパク質を含み、膜貫通タンパク質がCD8 α 、CD4、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ζ 、CD28、CD137、グリコホリンA、グリコホリンD、ニコチン性アセチルコリン受容体、GABA受容体、Fc ϵ RI γ 、およびT細胞受容体から選択される、請求項72～76のいずれか一項に記載の遺伝子操作された免疫細胞集団。

【請求項78】

免疫抑制エフェクターが、配列番号199～215、219、220、223、225、228、230、235、238、240、243、250、または253のうちの1つ以上と少なくとも95%の配列同一性を有する1つ以上のペプチドを含む、請求項71

10

20

30

40

50

～ 76 のいずれか一項に記載の遺伝子操作された免疫細胞集団。

【請求項 79】

少なくとも 1 つの免疫抑制エフェクターが、ヒトタンパク質の少なくとも一部および／またはヒトタンパク質複合体の少なくとも一部を含む、請求項 71～76 のいずれか一項に記載の遺伝子操作された免疫細胞集団。

【請求項 80】

免疫抑制エフェクターが、配列番号 248、245、273、276、278、279、286、287、288、および 289 のうちの 1 つ以上と少なくとも 95 % の配列同一性を有するペプチドを含む、請求項 79 に記載の遺伝子操作された免疫細胞集団。

【請求項 81】

少なくとも 1 つの免疫抑制エフェクターが、少なくとも 1 つのウイルス由来ペプチド、ならびにヒトタンパク質の少なくとも一部および／またはヒトタンパク質複合体の少なくとも一部を含むキメラコンストラクトを含む、請求項 71～76 のいずれか一項に記載の遺伝子操作された免疫細胞集団。

【請求項 82】

キメラ免疫抑制エフェクターコンストラクトが、(i) 切断型ヒト CD47、p15E ペプチド、HIV ペプチド、および HTLV ペプチドのうちの 2 つ以上、(ii) 切断型ヒト CD47 ドメインおよび少なくとも 1 つの p15E ペプチド、HIV ペプチド、および HTLV ペプチド、(iii) 切断型ヒト CD47 ドメインおよび少なくとも 1 つの HIV ペプチド、(iv) 切断型ヒト CD47 ドメインおよび少なくとも 1 つの HTLV ペプチド、(v) 配列番号 256、259、262、265、268、271 のうちの 1 つ以上と少なくとも 95 % の配列同一性を有する配列、(vi) ウイルス UL18 タンパク質を含む、請求項 81 に記載の遺伝子操作された免疫細胞集団。

【請求項 83】

キメラ免疫抑制エフェクターコンストラクトが、ウイルス UL18 タンパク質を含み、配列番号 280 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する配列を有するか、またはキメラ免疫抑制エフェクターコンストラクトが、ウイルス UL18 タンパク質およびヒト B2M ドメインを含み、配列番号 283 または 285 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 82 に記載の遺伝子操作された免疫細胞集団。

【請求項 84】

免疫抑制エフェクターコンストラクトが、膜貫通ドメインと細胞外リガンド結合ドメインの間か、細胞外リガンド結合ドメイン内か、細胞外リガンド結合ドメインが scFv を含み、キメラ免疫抑制エフェクターコンストラクトが scFv のリンカー領域に組み込まれる場合は、scFv のリンカー領域の中にか、細胞外リガンド結合ドメインから遠位に位置する細胞傷害性受容体の N 末端領域内か、または細胞傷害性受容体の細胞外領域内の複数の位置で、細胞傷害性受容体に組み込まれる、請求項 71～83 のいずれか一項に記載の遺伝子操作された免疫細胞集団。

【請求項 85】

少なくとも 1 つのキメラ免疫抑制エフェクターコンストラクトが免疫細胞の細胞外膜に結合されている、請求項 71～83 のいずれか一項に記載の遺伝子操作された免疫細胞集団。

【請求項 86】

細胞傷害性受容体が少なくとも 1 つの免疫抑制エフェクターを含み、遺伝子操作された免疫細胞が少なくとも 1 つの膜結合免疫抑制エフェクターを発現する、請求項 71～85 のいずれか一項に記載の遺伝子操作された免疫細胞。

【請求項 87】

免疫細胞が、遺伝子操作されたナチュラルキラー (NK) 細胞、遺伝子操作された T 細胞、またはそれらの組み合わせを含む、請求項 71～86 のいずれか一項に記載の遺伝子操作された免疫細胞。

【請求項 88】

10

20

30

40

50

遺伝子操作された免疫細胞が、移植片対宿主疾患のリスクを減少させる同種異系がん細胞療法における使用に適している、請求項 7 1～8 7 のいずれか一項に記載の遺伝子操作された免疫細胞。

【請求項 8 9】

遺伝子操作された免疫細胞が、遺伝子操作された免疫細胞間の細胞傷害活性のリスクを減少させる同種異系がん細胞療法における使用に適している、請求項 7 1～8 8 のいずれか一項に記載の遺伝子操作された免疫細胞。

【請求項 9 0】

細胞傷害性受容体が、標的腫瘍細胞によって発現される N K G 2 D 受容体リガンド、C D 1 9、C D 7 0 および C D 3 8 のうちの 1 つ以上を標的とする、請求項 7 1～8 9 のいずれか一項に記載の遺伝子操作された免疫細胞。

10

【請求項 9 1】

細胞傷害性シグナル伝達複合体が、O X 4 0 サブドメインまたは 4 - 1 B B ドメイン、および C D 3 ゼータサブドメインを含む、請求項 7 1～9 0 のいずれか一項に記載の遺伝子操作された免疫細胞。

【請求項 9 2】

請求項 7 1～9 1 のいずれか一項に記載の遺伝子操作された免疫細胞を対象に投与することを含む、対象におけるがんを処置する方法。

【請求項 9 3】

がんを処置するためまたはがんを処置するための医薬を調製するための、請求項 7 1～9 1 のいずれかに記載の遺伝子操作された免疫細胞の使用。

20

【請求項 9 4】

がん免疫療法のための遺伝子操作された免疫細胞集団を製造する方法であって、免疫細胞集団を、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞傷害性受容体をコードするポリヌクレオチドと接触させること；

免疫細胞集団を、少なくとも 1 つの免疫抑制エフェクターをコードするさらなるポリヌクレオチドと接触させることを含み、

少なくとも 1 つの免疫抑制エフェクターは抑制細胞の細胞傷害活性に対して抑制効果を発揮し、

30

遺伝子操作された免疫細胞は、前記少なくとも 1 つの免疫抑制エフェクターを含まない細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの 1 つ以上を示す、方法。

【請求項 9 5】

がん免疫療法のための遺伝子操作された免疫細胞集団を操作する方法であって、免疫細胞集団を、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞傷害性受容体をコードし、少なくとも 1 つの免疫抑制エフェクターをコードするポリヌクレオチドと接触させることを含み、

少なくとも 1 つの免疫抑制エフェクターは抑制細胞の細胞傷害活性に対して抑制効果を発揮し、

40

遺伝子操作された免疫細胞は、前記少なくとも 1 つの免疫抑制エフェクターを含まない細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの 1 つ以上を示す、方法。

【請求項 9 6】

ポリヌクレオチドが、膜結合 I L 1 5 をさらにコードする、請求項 9 4 または 9 5 に記載の方法。

【請求項 9 7】

免疫細胞集団を、膜結合免疫抑制エフェクターをコードするポリヌクレオチドと接触させることをさらに含む、請求項 9 4～9 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 8】

50

がん免疫療法のための遺伝子操作された免疫細胞の混合集団の中でのフラトリサイドを減少させる方法であって、

混合免疫細胞集団由来の免疫細胞の第 1 の部分集団を、少なくとも 1 つの免疫抑制エフェクターをコードするポリヌクレオチドと接触させ、

免疫細胞の第 1 の部分集団による少なくとも 1 つの免疫抑制エフェクターの発現が、免疫細胞の第 1 の部分集団に対する指向性を有する免疫細胞の第 2 の部分集団の抑制活性を減少させること；ならびに

混合免疫細胞集団由来の第 2 の部分集団を、少なくともさらなる免疫抑制エフェクターをコードするポリヌクレオチドと接触させ、

免疫細胞の第 2 の部分集団による少なくともさらなる免疫抑制エフェクターの発現は、免疫細胞の第 2 の部分集団に対する指向性を有する免疫細胞の第 1 の部分集団の抑制活性を減少させることを含み、

第 1 の部分集団および第 2 の部分集団による免疫抑制エフェクターの発現は、遺伝子操作された免疫細胞集団の中でのフラトリサイドを減少させる、方法。

【請求項 99】

遺伝子操作された免疫細胞集団を、同種異系がん免疫療法の増強のために操作する方法であって、

免疫細胞の表面上のヒト白血球抗原（HLA）の発現を減少させるように、NK細胞とT細胞を含む免疫細胞の混合集団を遺伝子編集し、

免疫細胞の表面上のHLAの減少した発現が、編集された免疫細胞集団に対するT細胞媒介性細胞傷害性を減少させ、

細胞の表面上のHLAの減少した発現が、編集された免疫細胞集団を編集された免疫細胞に対するNK媒介性細胞傷害性に感受性にする；ならびに

免疫細胞の混合集団に対するNK媒介性細胞傷害性を減少させる1つ以上の免疫抑制エフェクターを発現するように、編集された細胞を遺伝子操作し、

1つ以上の免疫抑制エフェクターは、ウイルス免疫抑制ペプチド、HLAホモログであるウイルスタンパク質、HLA-E、HLA-G、細胞のファゴサイトーシスを減少させるヒタンパク質またはその断片、ウイルス免疫抑制ペプチドおよび細胞のファゴサイトーシスを減少させるヒタンパク質もしくはその断片を含むキメラコンストラクトのうちの1つ以上、またはそれらの組み合わせを含み、

減少されたT細胞媒介性細胞傷害性は、操作されたNK細胞に対する操作されたT細胞媒介性フラトリサイド型細胞傷害性を減少させ、投与時に、操作されたNK細胞に対する宿主T細胞媒介性細胞傷害性を減少させ、

減少したNK細胞媒介性細胞傷害性は、操作されたT細胞に対する操作されたNK細胞媒介性フラトリサイド型細胞傷害性を減少させ、投与時に、操作されたNKおよび操作されたT細胞に対する宿主NK細胞媒介性細胞傷害性を減少させ、それにより、同種異系の対象への投与時に免疫細胞の操作混合集団の持続性の増大を可能にし、同種異系がん免疫療法の増強を可能にする、方法。

【請求項 100】

CISH遺伝子、B2M遺伝子、CD70遺伝子、アデノシン受容体遺伝子、NKG2A遺伝子、CITTA遺伝子、TGFB β 遺伝子のうちの1つ以上、またはそれらの任意の組み合わせの発現を変更するように、遺伝子操作された免疫細胞のDNAを遺伝子編集することをさらに含む、請求項98または99のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2020年12月3日に提出された米国仮特許出願第63/121,206号、2021年4月15日に提出された米国仮特許出願第63/201,159号、2021年8月23日に提出された米国仮特許出願第63/236,167号、2021年1

10

20

30

40

50

1月17日に出願された米国仮特許出願第63／264,234号、および2021年1月17日に出願された米国仮特許出願第63／264,223号の優先権を主張し、各々の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

分野

本明細書に開示されるいくつかの実施形態は、がん免疫療法のために遺伝子操作された細胞、特に遺伝子操作された免疫細胞型の組み合わせを含む方法および組成物に関する。いくつかの実施形態では、本開示は、キメラ抗原受容体を発現するように操作された細胞に関する。いくつかの実施形態では、さらなる操作が行われ、細胞ががん免疫療法において使用される場合に、有効性を増大させおよび／または潜在的な副作用を減少させる。

10

【背景技術】

【0003】

種々のがんについて、およびがん性細胞を健常な細胞から特異的に区別するために用いることができるがん性細胞がどのような特性を有するかについてさらなる知識が得られるにつれて、がん性細胞の顕著な特徴を利用する治療薬が開発中である。操作された免疫細胞を用いる免疫療法は、がんを処置する1つのアプローチである。

【0004】

ASCIIテキストファイル中の情報の参照による組み込み

本出願は、同時に提出される次のASCIIテキストファイルに含まれる配列表を参照することにより組み込む：ファイル名：NK T068WO_ST25.txt；2021年12月2日に作製され、サイズは2,456,860バイトである。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

免疫療法は、疾患の処置における新たな技術的進歩を提供し、免疫細胞は、疾患または損傷細胞を特異的に識別し反応する特定の標的化および／またはエフェクター分子を発現するように操作されている。これは、少なくとも部分的には、全ての細胞が影響を受ける化学療法などのより伝統的なアプローチとは対照的に、疾患または損傷細胞を特異的に標的化する可能性に起因する有望な進歩を示し、所望の転帰は、患者が生存するのに十分な健常な細胞が生存することである。1つの免疫療法アプローチは、免疫細胞におけるキメラ受容体の組換え発現であり、さらに、目的の異常細胞の効率的で持続的な標的認識および破壊を達成するために、治療細胞に対する有害な免疫応答を回避するために細胞を操作または遺伝子編集することである。

30

【0006】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作および遺伝子編集された免疫細胞集団が提供され、標的腫瘍細胞により発現される腫瘍マーカーを標的とするものを含む細胞傷害性受容体を発現する、遺伝子操作された免疫細胞を含む、免疫細胞は、CISタンパク質をコードするCISH遺伝子の1つ以上の標的位置で遺伝子編集され、編集は、CISH遺伝子における1つまたは複数の位置で編集されていない免疫細胞と比較して、CISの減少した発現および／または機能をもたらし、免疫細胞は、さらなるタンパク質をコードするさらなる遺伝子における1つ以上の標的位置で遺伝子編集され、さらなる遺伝子への編集は、さらなる遺伝子における1つまたは複数の位置で編集されていない免疫細胞と比較して、さらなるタンパク質の減少した発現および／または機能をもたらし、ならびに遺伝子操作および編集された免疫細胞は、CISHおよびさらなる遺伝子で上記遺伝子編集を含まない免疫細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、増大した持続性、または他の有益な特徴のうちの1つ以上を示す。

40

【0007】

いくつかの実施形態では、細胞は、CblプロトオンコジーンBタンパク質(CBLB)遺伝子においてさらなる標的部位で編集されている。いくつかの実施形態では、細胞は、トランスフォーミング増殖因子受容体ベータ2(TGFR2)遺伝子におけるさらな

50

る標的部位で編集されている。いくつかの実施形態では、細胞は、TIGIT遺伝子においてさらなる標的部位で編集されている。同様に、CISH/CBLB/TGFB R2、CISH/CBLB/TIGIT、CISH/TGFB R2/TIGITなどで編集されている細胞などの編集の組み合わせが提供される。いくつかの実施形態では、配列番号153~157または562~565のいずれかのガイド配列を用いて、CISH遺伝子を標的化する。いくつかの実施形態では、配列番号164~166または552~555のいずれかのガイド配列を用いて、CBLB遺伝子を標的化する。いくつかの実施形態では、配列番号147~152または544~547のいずれかのガイド配列を用いて、TGFB R2遺伝子を標的化する。いくつかの実施形態では、配列番号507~510のいずれかのガイド配列を用いて、TIGIT遺伝子を標的化する。いくつかの実施形態では、細胞は、ADARA2、SMAD3、MAPKAPK3、CEACAM1、DDIT4、NKG2A、SOCS2、B2M、PD-1、TIM-3、CD38、またはTCRアルファをコードする遺伝子における1つ以上のさらなる標的部位でさらに編集されている。
【0008】

例えば、いくつかの実施形態では、細胞は、(i) 配列番号548~551のいずれかのガイド配列がNKG2A遺伝子を標的とするために使用される、NKG2Aをコードする遺伝子、(ii) 配列番号556~561のいずれかのガイド配列がSOCS2遺伝子を標的とするために使用される、SOCS2をコードする遺伝子、(iii) 配列番号199~208のいずれかのガイド配列がB2M遺伝子を標的とするために使用される、B2Mをコードする遺伝子、(iv) 配列番号511~514のいずれかのガイド配列がPD-1遺伝子を標的とするために使用される、PD-1をコードする遺伝子、(v) 配列番号515~518のいずれかのガイド配列がTIM-3遺伝子を標的とするために使用される、TIM-3をコードする遺伝子、および(vi) 配列番号566~568のいずれかのガイド配列がTCRアルファ遺伝子を標的とするために使用される、TCRアルファをコードする遺伝子のうちの1つ以上でさらに編集されている。いくつかの実施形態では、細胞は、(i) 配列番号503~506のいずれかのガイド配列がアデノシンA2受容体遺伝子を標的とするために使用される、アデノシンA2受容体をコードする遺伝子、(ii) 配列番号491~493のいずれかのガイド配列がSMAD3遺伝子を標的とするために使用される、SMAD3をコードする遺伝子、(iii) 配列番号494~496のいずれかのガイド配列がMAPKAPK3遺伝子を標的とするために使用される、MAPKAPK3をコードする遺伝子、(iv) 配列番号497~499のいずれかのガイド配列がCEACAM1遺伝子を標的とするために使用される、CEACAM1をコードする遺伝子、(v) 配列番号500~502のいずれかのガイド配列がDDIT4遺伝子を標的とするために使用される、DDIT4をコードする遺伝子、および(vi) 配列番号519~522のいずれかのガイド配列がCD38遺伝子を標的とするために使用される、CD38をコードする遺伝子のうちの1つ以上でさらに編集されている。いくつかの実施形態では、これらの遺伝子を標的とする他のガイド配列もまた使用される。いくつかの実施形態では、細胞は、CD70遺伝子標的部位で編集されていない。

【0009】

いくつかの実施形態では、細胞傷害性受容体は、標的腫瘍細胞によって発現されるNKG2D、CD19、CD70、BCMA、CD38、GPCR5D、CD138、DLL3、EGFR、PSMA、FLT3、KREMEN2のリガンドのうちの1つ以上、またはそれらの任意の組み合わせを標的とする。しかしながら、いくつかの実施形態では、細胞は、CD70を標的とする細胞傷害性受容体複合体を発現するように操作されていない。いくつかの実施形態では、細胞は、CD19を標的とする細胞傷害性受容体複合体を発現するように操作されていない。さらなる実施形態では、細胞は、NKG2D受容体のリガンドを標的とする細胞傷害性受容体複合体を発現するように操作されていない。

【0010】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作された免疫細胞の少なくとも一部は、膜結合IL-15を発現するように操作されている。いくつかの実施形態では、mbIL15と天然

10

20

30

40

50

受容体（例えば、IL-15受容体ユニットまたはサブユニット）の融合が提供される。いくつかの実施形態では、遺伝子操作および編集された免疫細胞は、移植片対宿主疾患のリスクを減少させ、および／または腫瘍細胞に対して指向されるより大きな細胞傷害性を有する（それにより、より効果的な治療をもたらす）同種異系がん細胞療法における使用に適している。

【0011】

対象におけるがんを処置する方法は、本明細書に提供され、いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるように、遺伝子操作および遺伝子編集された免疫細胞集団の少なくとも一部を対象に投与することを含む。また、がんを処置するためおよび／またはがんを処置するための医薬を調製するために、本明細書に提供されるように、遺伝子操作および編集された免疫細胞の使用が提供される。

10

【0012】

また、本明細書では、がん免疫療法のための遺伝子編集された免疫細胞集団を製造する方法が提供され、免疫細胞集団を第1の遺伝子編集複合体と接触させ、第1の遺伝子編集複合体が、CISH遺伝子で編集されていない免疫細胞と比較して、CISH遺伝子によってコードされるCISタンパク質の減少したレベルの発現をもたらすように、免疫細胞のCISH遺伝子における1つ以上の標的部位で編集すること；ならびに免疫細胞集団を第2の遺伝子編集複合体と接触させ、第2の遺伝子編集複合体が、さらなる遺伝子で編集されていない免疫細胞と比較して、さらなる遺伝子によってコードされるタンパク質の減少したレベルの発現をもたらすように、免疫細胞のさらなる遺伝子における1つ以上の標的部位で編集することを含み、遺伝子編集された免疫細胞は、上記遺伝子編集された1つまたは複数の標的部位を含まない免疫細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す。

20

【0013】

いくつかの実施形態では、第2の遺伝子編集複合体が、CBLB遺伝子で編集されていない免疫細胞と比較して、CBLB遺伝子によってコードされるCBLBタンパク質の減少したレベルの発現をもたらすように、免疫細胞のCBLB遺伝子における1つ以上の標的部位で編集する。いくつかの実施形態では、第2の遺伝子編集複合体が、TGFB β 2遺伝子で編集されていない免疫細胞と比較して、TGFB β 2遺伝子によってコードされるTGFB β 2タンパク質の減少したレベルの発現をもたらすように、免疫細胞のTGFB β 2遺伝子における1つ以上の標的部位で編集する。いくつかの実施形態では、第2の遺伝子編集複合体が、TIGIT遺伝子で編集されていない免疫細胞と比較して、TIGIT遺伝子によってコードされるTIGITタンパク質の減少したレベルの発現をもたらすように、免疫細胞のTIGIT遺伝子における1つ以上の標的部位で編集する。本明細書で検討されるように、編集の組み合わせも同様に提供される。いくつかの実施形態では、ADARA2、SMAD3、MAPKAPK3、CEACAM1、DDIT4、NKG2A、SOCS2、B2M、PD-1、TIM-3、CD38、またはTCRアルファのうちの1つをコードする1つ以上の遺伝子におけるさらなる編集。

30

【0014】

いくつかの実施形態では、本方法は、免疫細胞集団の少なくとも一部を、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞傷害性受容体をコードするポリヌクレオチドを含むベクターと接触させることをさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞傷害性受容体は、標的腫瘍細胞によって発現されるNKG2D、CD19、CD70、BCMA、CD38、GPRC5D、CD138、DLL3、EGFR、PSMA、FLT3、KREMEN2のリガンドのうちの1つ以上、またはそれらの任意の組み合わせを標的とする。しかしながら、いくつかの実施形態では、細胞傷害性受容体は、CD70を標的とせず、CD19を標的とせず、および／またはNKG2Dリガンドを標的としない。さらに、一部の実施形態では、本方法は、CD70をコードする遺伝子を編集することを含まない。

40

【0015】

50

いくつかの実施形態では、対象におけるがんを処置する方法が提供され、遺伝子操作された免疫細胞集団を対象に投与することを含み、免疫細胞は、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞傷害性受容体を発現し、免疫細胞は、C I Sタンパク質をコードするC I S H遺伝子の1つ以上の標的位置で遺伝子編集され、編集は、C I S H遺伝子における1つまたは複数の位置で編集されていない免疫細胞と比較して、C I Sの減少した発現および／または機能をもたらし、免疫細胞は、C B L B遺伝子、T G F B R 2遺伝子、および／またはT I G I T遺伝子のうちの1つ以上で編集され、C B L B遺伝子、T G F B R 2遺伝子、またはT I G I T遺伝子で編集されていない免疫細胞と比較して、C B L Bタンパク質、T G F B R 2タンパク質、および／またはT I G I Tタンパク質の減少したレベルの発現または活性をもたらし、遺伝子操作および編集された免疫細胞は、上記遺伝子編集された1つまたは複数の標的部位を含まない免疫細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す。

10

【0016】

いくつかの実施形態では、本方法は、免疫細胞を少なくとも1つのさらなる標的遺伝子で編集することをさらに含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのさらなる標的遺伝子は、C D 7 0をコードする遺伝子ではない。いくつかの実施形態では、さらなる標的遺伝子は、A D A R 2 A、S M A D 3、M A P K A P K 3、C E A C A M 1、D D I T 4、N K G 2 A、S O C S 2、B 2 M、P D - 1、T I M - 3、C D 3 8、またはT C R アルファをコードする。いくつかの実施形態では、免疫細胞によって発現される細胞傷害性受容体は、C D 1 9、C D 7 0、B C M A、C D 3 8、G P R C 5 D、C D 1 3 8、D L L 3、E G F R、P S M A、F L T 3、K R E M E N 2のうちの1つ以上のエピトープ、またはそれらの組み合わせに結合する。しかしながら、一部の実施形態では、免疫細胞によって発現される細胞傷害性受容体は、C D 1 9、C D 7 0、またはN K G 2 Dのリガンドのいずれも標的化しない。

20

【0017】

いくつかの実施形態では、免疫細胞は、ナチュラルキラー（NK）細胞、T細胞、誘導多能性幹細胞（i P S C）、i P S C由来NK細胞、NK-92細胞、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、NK細胞とT細胞の混合物、またはi P S C由来NK細胞とT細胞の混合物を含む。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、精製されたかまたは実質的に精製されたNK細胞集団を含む。いくつかの実施形態では、投与される免疫細胞は、対象に対して同種異系である。いくつかの実施形態では、本方法は、I L 2を投与することをさらに含む。

30

【0018】

いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞傷害性受容体を発現する、遺伝子操作された免疫細胞を含む、遺伝子操作および遺伝子編集された免疫細胞集団が提供され、細胞外リガンド結合ドメインは、標的腫瘍細胞によって発現される腫瘍マーカーを標的とし、遺伝子操作された免疫細胞の少なくとも一部は、膜結合I L - 1 5を発現するように操作され、免疫細胞は、編集されていない免疫細胞と比較して、編集された標的部位を含む遺伝子によってコードされるタンパク質の減少したレベルの発現をもたらすように、免疫細胞のゲノムにおける1つ以上の標的部位で遺伝子編集され、遺伝子操作および編集された免疫細胞は、上記遺伝子編集された1つまたは複数の標的部位を含まない免疫細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、編集されていない免疫細胞と比較して、減少したレベルのアデノシン受容体A 2発現をもたらすように、アデノシンA 2受容体をコードする遺伝子における標的部位で遺伝子編集され、配列番号503～506のいずれかのガイド配列が、アデノシン受容体A 2遺伝子を標的とするために使用される。いくつかの実施形態では、細胞は、C I S H、S M A D 3、M A P K A P K 3、C E A C A M 1、D D I T 4、T G F B R 2 R、N K G 2 A、S O C S 2、C B L B、B 2 M、T

40

50

I G I T、P D - 1、T I M - 3、C D 3 8、および T C R アルファのうちの 1 つ以上をコードする遺伝子でさらに編集されている。例えば、いくつかの実施形態では、細胞は、(i) 配列番号 5 6 2 ~ 5 6 5 のいずれかのガイド配列が C I S をコードする遺伝子を標的とするために使用される、C I S をコードする遺伝子、(i i) 配列番号 4 9 1 ~ 4 9 3 のいずれかのガイド配列が S M A D 3 遺伝子を標的とするために使用される、S M A D 3 をコードする遺伝子、(i i i) 配列番号 4 9 4 ~ 4 9 6 のいずれかのガイド配列が M A P K A P K 3 遺伝子を標的とするために使用される、M A P K A P K 3 をコードする遺伝子、(i v) C E A C A M 1 をコードする遺伝子、および配列番号 4 9 7 ~ 4 9 9 のいずれかのガイド配列、(v) 配列番号 5 0 0 ~ 5 0 2 のいずれかのガイド配列が D D I T 4 遺伝子を標的とするために使用される、D D I T 4 をコードする遺伝子、(v i) 配列番号 5 4 4 ~ 5 4 7 のいずれかのガイド配列が T G F B R 2 遺伝子を標的とするために使用される、T G F B R 2 をコードする遺伝子、(v i i) 配列番号 5 4 8 ~ 5 5 1 のいずれかのガイド配列が N K G 2 A 遺伝子を標的とするために使用される、N K G 2 A をコードする遺伝子、(v i i i) 配列番号 5 5 6 ~ 5 6 1 のいずれかのガイド配列が S O C S 2 遺伝子を標的とするために使用される、S O C S 2 をコードする遺伝子、(i x) 配列番号 5 5 2 ~ 5 5 5 のいずれかのガイド配列が C B L B 遺伝子を標的とするために使用される、C B L B をコードする遺伝子、(x) 配列番号 2 9 0 ~ 2 9 9 のいずれかのガイド配列が B 2 M 遺伝子を標的とするために使用される、B 2 M をコードする遺伝子、(x i) 配列番号 5 0 7 ~ 5 1 0 のいずれかのガイド配列が T I G I T 遺伝子を標的とするために使用される、T I G I T をコードする遺伝子、(x i i) 配列番号 5 1 1 ~ 5 1 4 のいずれかのガイド配列が P D - 1 遺伝子を標的とするために使用される、P D - 1 をコードする遺伝子、(x i i i) 配列番号 5 1 5 ~ 5 1 8 のいずれかのガイド配列が T I M - 3 遺伝子を標的とするために使用される、T I M - 3 をコードする遺伝子、(x i v) 配列番号 5 1 9 ~ 5 2 2 のいずれかのガイド配列が C D 3 8 遺伝子を標的とするために使用される、C D 3 8 をコードする遺伝子、および / または (x v) 配列番号 5 6 6 ~ 5 6 9 のいずれかのガイド配列が T C R アルファ遺伝子を標的とするために使用される、T C R アルファをコードする遺伝子でさらに編集されている。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 9 】

いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、M I C A、M I C B、U L B P 1、U L B P 2、U L B P 3、U L B P 4、U L B P 5、および U L B P 6 からなる群から選択される腫瘍マーカーに対する指向性を有する受容体を含む。例えば、一部の実施形態では、NK 細胞によって発現される細胞傷害性受容体は、(i) N K G 2 D リガンド結合ドメイン、(i i) C D 8 膜貫通ドメイン、および (i i i) O X 4 0 共刺激サブドメインと C D 3 z 共刺激サブドメインを含むシグナル伝達複合体を含む。

【 0 0 2 0 】

一部の実施形態では、細胞傷害性受容体は、標的腫瘍細胞によって発現される N K G 2 D 受容体リガンド、C D 1 9、C D 7 0、B C M A、C D 3 8、G P R C 5 D、C D 1 3 8、D L L 3、E G F R、P S M A、F L T 3、または K R E M E N 2 のうちの 1 つ以上を標的とする。いくつかの実施形態では、細胞傷害性シグナル伝達複合体は、O X 4 0 サブドメインまたは 4 - 1 B B ドメイン、および C D 3 ゼータサブドメインを含む。

【 0 0 2 1 】

いくつかの実施形態では、免疫細胞集団は、ナチュラルキラー (N K) 細胞、T 細胞、誘導多能性幹細胞 (i P S C)、i P S C 由来 N K 細胞、N K - 9 2 細胞、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、移植片対宿主疾患のリスクを減少させる同種異系がん細胞療法における使用に適しており、および / または遺伝子操作された免疫細胞間の細胞傷害活性のリスクを減少させる同種異系がん細胞療法における使用に適している。このような細胞を投与することによるがんを処置する方法は、がんを処置するためまたはがんを処置するための医薬を調製するためのこのような細胞の使用のように、本明細書において提供される。

【 0 0 2 2 】

本明細書では、がん免疫療法のために遺伝子操作された免疫細胞集団を製造する方法がさらに提供され、免疫細胞集団を、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞傷害性受容体をコードするポリヌクレオチドを含むベクターと接触させること；免疫細胞集団を遺伝子編集複合体と接触させることを含み、遺伝子編集複合体が免疫細胞のゲノムにおける1つ以上の標的部位で編集して、編集されていない免疫細胞と比較して、編集された標的部位を含む遺伝子によってコードされるタンパク質の減少したレベルの発現をもたらす、遺伝子操作および編集された免疫細胞は、上記遺伝子編集された1つまたは複数の標的部位を含まない免疫細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す。いくつかの実施形態では、編集（または複数の編集）は、C I S H、

10

【0023】

また、対象におけるがんを処置する方法が提供され、遺伝子操作された免疫細胞集団を対象に投与することを含み、免疫細胞は、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞傷害性受容体を発現し、細胞傷害性シグナル伝達複合体は、O X - 4 0 サブドメインおよびC D 3 ゼータサブドメインを含み、細胞は膜結合I L - 1 5 を発現するように操作され、免疫細胞は、編集されていない免疫細胞と比較して、編集された標的部位を含む遺伝子によってコードされるタンパク質の減少したレベルの発現をもたらすように、免疫細胞のゲノムにおける1つ以上の標的部位で遺伝子編集され、遺伝子操作および編集された免疫細胞は、上記遺伝子編集された1つまたは複数の標的部位を含まない免疫細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す。いくつかの実施形態では、細胞は、C I S H、A D A R 2 A、S M A D 3、M A P K A P K 3、C E A C A M 1、D D I T 4、T G F B R 2 R、N K G 2 A、S O C S 2、C B L B、B 2 M、T I G I T、P D - 1、T I M - 3、C D 3 8、およびT C R アルファをコードする遺伝子から選択される少なくとも2つの遺伝子で編集されている。いくつかの実施形態では、細胞傷害性受容体は、(i) 標的腫瘍細胞によって発現されるN K G 2 D リガンド結合ドメイン、またはC D 1 9、C D 7 0、B C M A、C D 3 8、G P R C 5 D、C D 1 3 8、D L L 3、E G F R、P S M A、F L T 3、もしくはK R E M E N 2 のうちの1つ以上のエピトープに結合する結合ドメイン、(i i) C D 8 膜貫通ドメイン、および(i i i) O X 4 0 共刺激サブドメインおよびC D 3 z 共刺激サブドメインを含むシグナル伝達複合体を含む。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、ナチュラルキラー (N K) 細胞、T 細胞、誘導多能性幹細胞 (i P S C)、i P S C 由来N K 細胞、N K - 9 2 細胞、またはそれらの組み合わせを含む。さらに、いくつかの実施形態では、投与される免疫細胞は、対象に対して同種異系である。

20

30

【0024】

いくつかの実施形態では、がん免疫療法のための遺伝子操作された免疫細胞集団が提供され、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞傷害性受容体を発現する、遺伝子操作された免疫細胞を含み、遺伝子操作された免疫細胞の少なくとも一部は、膜結合I L - 1 5 を発現するように操作され、遺伝子操作された免疫細胞は少なくとも1つの免疫抑制エフェクターを発現するように操作され、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは抑制細胞の望ましくない細胞傷害活性に対して抑制効果を発揮し、遺伝子操作された免疫細胞は、上記免疫抑制エフェクターを含まない細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す。いくつかの実施形態では、集団は、遺伝子操作されたN K 細胞および遺伝子操作されたT 細胞のうちの1つ以上を含む。いくつかの実施形態では、抑制細胞は、宿主細胞、または操作されていないナチュラルキラー細胞、操作

40

50

されていないT細胞、もしくは操作された抑制細胞のうちの1つ以上を含む。いくつかの実施形態では、上記免疫抑制エフェクターを含まない細胞は、操作されていない細胞または操作された細胞のいずれかである。

【0025】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作された免疫細胞はまた、ベーター2ミクログロブリン(B2M)の発現を減少させるために遺伝子編集され、B2Mの減少した発現は、内因性レベルのB2Mを発現する免疫細胞と比較して、宿主対移植片拒絶を減少させる同種異系がん免疫療法において免疫細胞を使用することを可能にする。

【0026】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、レトロウイルスに由来してもよく、レトロウイルスのエンベロープタンパク質に由来してもよいウイルス由来ペプチドを含む。一部の実施形態では、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは免疫細胞の細胞外膜に結合され、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターが膜貫通タンパク質を含み、膜貫通タンパク質がCD8 α 、CD4、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ζ 、CD28、CD137、グリコホリンA、グリコホリンD、ニコチン性アセチルコリン受容体、GABA受容体、Fc ϵ RI γ 、およびT細胞受容体から選択される。

【0027】

いくつかの実施形態では、免疫抑制エフェクターは、配列番号199~215、219、220、223、225、228、230、235、238、240、243、250、または253のうちの1つ以上と少なくとも90%の配列同一性を有する1つ以上のペプチドを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、ヒトタンパク質の少なくとも一部および／またはヒトタンパク質複合体の少なくとも一部を含む。いくつかの実施形態では、免疫抑制エフェクターは、配列番号248、245、273、276、278、279、286、287、288、および289のうちの1つ以上と少なくとも90%の配列同一性を有するペプチドを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、少なくとも1つのウイルス由来ペプチド、ならびにヒトタンパク質の少なくとも一部および／またはヒトタンパク質複合体の少なくとも一部を含むキメラコンストラクトを含む。いくつかの実施形態では、キメラ免疫抑制エフェクターコンストラクトは、(i)切断型ヒトCD47、p15Eペプチド、HIVペプチド、およびHTLVペプチドのうちの2つ以上、(ii)切断型ヒトCD47ドメインおよび少なくとも1つのp15Eペプチド、HIVペプチド、およびHTLVペプチド、(iii)切断型ヒトCD47ドメインおよび少なくとも1つのHIVペプチド、(iv)切断型ヒトCD47ドメインおよび少なくとも1つのHTLVペプチド、(v)配列番号256、259、262、265、268、271のうちの1つ以上と少なくとも95%の配列同一性を有する配列、(vi)ウイルスUL18タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、キメラ免疫抑制エフェクターコンストラクトは、ウイルスUL18タンパク質を含み、配列番号280と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を有するか、またはキメラ免疫抑制エフェクターコンストラクトが、ウイルスUL18タンパク質およびヒトB2Mドメインを含み、配列番号283または285と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、免疫抑制エフェクターコンストラクトは、膜貫通ドメインと細胞外リガンド結合ドメインの間か、細胞外リガンド結合ドメイン内か、細胞外リガンド結合ドメインがscFvを含み、キメラ免疫抑制エフェクターコンストラクトがscFvのリンカー領域に組み込まれる場合は、scFvのリンカー領域の中にか、細胞外リガンド結合ドメインから遠位に位置する細胞傷害性受容体のN末端領域内か、または細胞傷害性受容体の細胞外領域内の複数の位置で、細胞傷害性受容体に組み込まれる。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのキメラ免疫抑制エフェクターコンストラクトは免疫細胞の細胞外膜に結合される。いくつかの実施形態では、細胞傷害性受容体が少なくとも1つの免疫抑制エフェクターを含み、遺伝子操作された免疫細胞が少なくとも1つの膜結合免疫抑制エフェクターを発現する。

【0028】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、遺伝子操作された免疫細胞は、移植片対宿主疾患のリスクを減少させる同種異系がん細胞療法における使用に適している。さらなる実施形態では、遺伝子操作された免疫細胞は、遺伝子操作された免疫細胞間の細胞傷害活性のリスクを減少させる同種異系がん細胞療法における使用に適している。

【0029】

また、本明細書では、がん免疫療法のための遺伝子操作された免疫細胞集団を製造する方法が提供され、免疫細胞集団を、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞傷害性受容体をコードするポリヌクレオチドと接触させること、免疫細胞集団を、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターをコードするさらなるポリヌクレオチドと接触させることを含み、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは抑制細胞の細胞傷害活性に対して抑制効果を発揮し、遺伝子操作された免疫細胞は、上記少なくとも1つの免疫抑制エフェクターを含まない細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す。

10

【0030】

また、がん免疫療法のための遺伝子操作された免疫細胞集団を操作する方法が提供され、免疫細胞集団を、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞傷害性受容体をコードし、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターをコードするポリヌクレオチドと接触させることを含み、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは抑制細胞の細胞傷害活性に対して抑制効果を発揮し、遺伝子操作された免疫細胞は、上記少なくとも1つの免疫抑制エフェクターを含まない細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、膜結合IL15をさらにコードする。いくつかの実施形態では、本方法は、免疫細胞集団を、膜結合免疫抑制エフェクターをコードするポリヌクレオチドと接触させることをさらに含む。

20

【0031】

いくつかの実施形態では、がん免疫療法のための遺伝子操作された免疫細胞の混合集団の中でのフラトリサイド (fratricide) を減少させる方法が提供され、混合免疫細胞集団由来の免疫細胞の第1の部分集団を、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターをコードするポリヌクレオチドと接触させ、免疫細胞の第1の部分集団による少なくとも1つの免疫抑制エフェクターの発現が、免疫細胞の第1の部分集団に対する指向性を有する免疫細胞の第2の部分集団の抑制活性を減少させること；ならびに混合免疫細胞集団からの第2の部分集団を、少なくともさらなる免疫抑制エフェクターをコードするポリヌクレオチドと接触させ、免疫細胞の第2の部分集団による少なくともさらなる免疫抑制エフェクターの発現は、免疫細胞の第2の部分集団に対する指向性を有する免疫細胞の第1の部分集団の抑制活性を減少させることを含み、第1の部分集団および第2の部分集団による免疫抑制エフェクターの発現は、遺伝子操作された免疫細胞集団内の細胞の中でのフラトリサイドを減少させる。

30

【0032】

遺伝子操作された免疫細胞集団を、同種異系がん免疫療法の増強のために操作する方法もまた提供され、いくつかの実施形態では、免疫細胞の表面上のヒト白血球抗原 (HLA) の発現を減少させるように、NK細胞とT細胞を含む免疫細胞の混合集団を遺伝子編集し、免疫細胞の表面上のHLAの減少した発現が、編集された免疫細胞集団に対するT細胞媒介性細胞傷害性を減少させ、細胞の表面上のHLAの減少した発現が、編集された免疫細胞集団を編集された免疫細胞に対するNK媒介性細胞傷害性に感受性にする；ならびに免疫細胞の混合集団に対するNK媒介性細胞傷害性を減少させる1つ以上の免疫抑制エフェクターを発現させるように、編集された細胞を遺伝子操作し、1つ以上の免疫抑制エフェクターは、ウイルス免疫抑制ペプチド、HLAホモログであるウイルスタンパク質、HLA-E、HLA-G、細胞のファゴサイトーシスを減少させるヒトタンパク質またはその断片、ウイルス免疫抑制ペプチドおよび細胞のファゴサイトーシスを減少させる

40

50

ヒトタンパク質もしくはその断片を含むキメラコンストラクトのうちの1つ以上、またはそれらの組み合わせを含み、減少したT細胞媒介性細胞傷害性は、操作されたNK細胞に対する操作されたT細胞媒介性フラトリサイド型細胞傷害性を減少させ、投与時に、操作されたNK細胞に対する宿主T細胞媒介性細胞傷害性を減少させ、減少したNK細胞媒介性細胞傷害性は、操作されたT細胞に対する操作されたNK細胞媒介性フラトリサイド型細胞傷害性を減少させ、投与時に、操作されたNKおよび操作されたT細胞に対する宿主NK細胞媒介性細胞傷害性を減少させ、それにより、同種異系の対象への投与時に免疫細胞の操作混合集団の持続性の増大を可能にし、同種異系がん免疫療法の増強を可能にする。いくつかの実施形態では、本方法は、CISH遺伝子、B2M遺伝子、CD70遺伝子、アデノシン受容体遺伝子、NKG2A遺伝子、CITTA遺伝子、TGFB β 遺伝子のうちの1つ以上、またはそれらの任意の組み合わせの発現を変更するように、遺伝子操作された免疫細胞のDNAを遺伝子編集することをさらに含む。

10

【0033】

本明細書では、いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞傷害性受容体を発現する、遺伝子操作された免疫細胞を含む、遺伝子操作および遺伝子編集された免疫細胞集団が提供され、細胞外リガンド結合ドメインは、標的腫瘍細胞によって発現される腫瘍マーカーを標的とし、免疫細胞は、CISタンパク質をコードするCISH遺伝子の1つ以上の標的位置で遺伝子編集され、編集は、CISH遺伝子における1つまたは複数の位置で編集されていない免疫細胞と比較して、CISの減少した発現および／または機能をもたらし、免疫細胞は、免疫細胞のゲノムにおける1つ以上のさらなる標的部位で編集されて、編集されていない免疫細胞と比較して、編集された標的部位を含む遺伝子によってコードされるタンパク質の減少したレベルの発現をもたらす、CISH遺伝子および1つ以上のさらなる標的部位の編集は、Crispr/Cas9システム、Crispr/CasXシステム、Crispr/CasYシステム、または別のRNAガイドエンドヌクレアーゼを使用して行われ、遺伝子操作および編集された免疫細胞は、上記遺伝子編集された1つまたは複数の標的部位を含まない免疫細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す。いくつかの実施形態では、配列番号153～157または562～565のいずれかのガイド配列を用いて、CISH遺伝子を標的化する。

20

30

【0034】

いくつかの実施形態では、細胞は、CBLB遺伝子のさらなる標的部位で編集されて、少なくともCISHおよびCBLB内に編集を含む細胞をもたらす。いくつかの実施形態では、配列番号164～166または552～555のいずれかのガイド配列を用いて、CBLB遺伝子を標的化する。

【0035】

いくつかの実施形態では、細胞は、TGFB β 2遺伝子のさらなる標的部位で編集されて、少なくともCISHおよびTGFB β 2内に編集を含む細胞をもたらす。いくつかの実施形態では、配列番号147～152または544～547のいずれかのガイド配列を用いて、TGFB β 2遺伝子を標的化する。

40

【0036】

いくつかの実施形態では、細胞は、TIGIT遺伝子のさらなる標的部位で編集されて、少なくともCISHおよびTIGIT内に編集を含む細胞をもたらす。いくつかの実施形態では、配列番号507～510のいずれかのガイド配列を用いて、TIGIT遺伝子を標的化する。

【0037】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作および遺伝子編集された免疫集団は、CD70遺伝子標的部位で編集されていない。しかしながら、いくつかの実施形態では、それらはCD70で編集され、また、1つ以上のさらなる遺伝子、例えばCD70/CISH/CBLB、CD70/CISH/TGFB β 2、CD70/CISH/TIGITなどで編集

50

されている。標的遺伝子の任意の組み合わせは、本明細書に開示される実施形態に従って編集することができる。

【0038】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作された免疫細胞の少なくとも一部は操作されて、膜結合IL-15を発現する。

【0039】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作および遺伝子編集された免疫細胞集団は、CD70を標的とする細胞傷害性受容体複合体を発現するように操作されていない。いくつかの実施形態では、細胞は、CD19を標的とする細胞傷害性受容体複合体を発現するように操作されていない。いくつかの実施形態では、細胞は、NKGD2受容体のリガンドを標的とする細胞傷害性受容体複合体を発現するように操作されていない。しかしながら、いくつかの実施形態では、細胞は、配列番号300～382のうちの1つ以上と少なくとも95%同一のポリヌクレオチドによってコードされる抗CD70 CARを発現するように操作されている。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号383～465のうちの1つ以上と少なくとも95%同一のアミノ酸配列をコードする。いくつかの実施形態では、細胞は、配列番号912～985のうちの1つ以上と少なくとも95%同一の抗CD70 CARを発現するように操作されている。いくつかの実施形態では、細胞は、配列番号175、177、179、181、183、185、187、189、191、193、195、または197のうちの1つ以上と少なくとも95%同一のポリヌクレオチドによってコードされる抗CD19 CARを発現するように操作されている。いくつかの実施形態では、細胞は、配列番号900～911のうちの1つ以上と少なくとも95%同一の抗CD19 CARを発現するように操作されている。いくつかの実施形態では、細胞は、配列番号475と少なくとも95%同一のポリヌクレオチドによってコードされるNKGD2リガンドを標的とするキメラ受容体を発現するように操作されている。いくつかの実施形態では、細胞は、配列番号899と少なくとも95%同一のNKGD2リガンドを標的とするキメラ受容体を発現するように操作されている。

【0040】

いくつかの実施形態では、細胞は、アデノシンA2受容体、SMAD3、MAPKAPK3、CEACAM1、DDIT4、TGFB2R、NKGA2、SOCS2、B2M、TIGIT、PD-1、TIM-3、CD38、またはTCRアルファをコードする1つ以上の遺伝子でさらに編集されている。

【0041】

いくつかの実施形態では、細胞は、アデノシンA2受容体をコードする遺伝子でさらに編集され、ヌクレアーゼは、配列番号503～506のいずれかのアデノシンA2受容体標的配列にガイドされる。いくつかの実施形態では、細胞は、SMAD3をコードする遺伝子でさらに編集され、ヌクレアーゼは、配列番号491～493のいずれかの標的配列にガイドされる。いくつかの実施形態では、細胞は、MAPKAPK3をコードする遺伝子でさらに編集され、ヌクレアーゼは、配列番号494～496のいずれかの標的配列にガイドされる。いくつかの実施形態では、細胞は、CEACAM1をコードする遺伝子でさらに編集され、ヌクレアーゼは、配列番号497～499のいずれかの標的配列にガイドされる。いくつかの実施形態では、細胞は、DDIT4をコードする遺伝子でさらに編集され、ヌクレアーゼは、配列番号500～502のいずれかの標的配列にガイドされる。いくつかの実施形態では、細胞は、NKGA2をコードする遺伝子でさらに編集され、ヌクレアーゼは、配列番号548～551のいずれかの標的配列にガイドされる。いくつかの実施形態では、細胞は、SOCS2をコードする遺伝子でさらに編集され、ヌクレアーゼは、配列番号556～561のいずれかの標的配列にガイドされる。いくつかの実施形態では、細胞は、B2Mをコードする遺伝子でさらに編集され、ヌクレアーゼは、配列番号290～299のいずれかの標的配列にガイドされる。いくつかの実施形態では、細胞は、PD-1をコードする遺伝子でさらに編集され、ヌクレアーゼは、配列番号511～514のいずれかの標的配列にガイドされる。いくつかの実施形態では、細胞は、TI

M-3をコードする遺伝子でさらに編集され、ヌクレアーゼは、配列番号515～518のいずれかの標的配列にガイドされる。いくつかの実施形態では、細胞は、CD38をコードする遺伝子でさらに編集され、ヌクレアーゼは、配列番号519～522のいずれかの標的配列にガイドされる。いくつかの実施形態では、細胞は、TCRアルファをコードする遺伝子でさらに編集され、ヌクレアーゼは、配列番号566～569のいずれかの標的配列にガイドされる。

【0042】

実施形態に依存して、遺伝子操作および遺伝子編集された免疫細胞集団は、ナチュラルキラー（NK）細胞、T細胞、誘導多能性幹細胞（iPSC）、iPSC由来NK細胞、NK-92細胞、またはそれらの組み合わせを含み得る。いくつかの実施形態では、遺伝子操作および編集された免疫細胞は、移植片対宿主疾患のリスクを減少させる同種異系がん細胞療法における使用に適している。

【0043】

また、本明細書では、本明細書において検討される実施形態に従って、免疫細胞集団の少なくとも一部を対象に投与することを含む、対象におけるがんを処置する方法もまた提供される。同様に、がんを処置するためおよび／またはがんを処置するための医薬を調製するための、本明細書において提供される遺伝子操作および編集された免疫細胞の使用が提供される。

【0044】

本明細書では、がん免疫療法のための遺伝子編集された免疫細胞集団を製造する方法もまた提供され、免疫細胞集団を、第1のCas-gRNAリボ核タンパク質複合体（RNP）と接触させ、RNPが、CISH遺伝子で編集されていない免疫細胞と比較して、CISH遺伝子によってコードされるCISタンパク質の減少したレベルの発現をもたらすように、免疫細胞のCISH遺伝子における1つ以上の標的部位で編集し、RNPのCasが、Cas9、CasX、CasY、またはそれらの組み合わせを含むこと、ならびに免疫細胞集団を、第2のRNP複合体と接触させ、第2のRNPが、CBLB遺伝子で編集されていない免疫細胞と比較して、CBLB遺伝子によってコードされるCBLBタンパク質の減少したレベルの発現をもたらすように、免疫細胞のCBLB遺伝子における1つ以上の標的部位で編集し、RNPのCasが、Cas9、CasX、CasY、またはそれらの組み合わせを含み、遺伝子編集された免疫細胞が、上記遺伝子編集された1つまたは複数の標的部位を含まない免疫細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す。

【0045】

本明細書では、がん免疫療法のための遺伝子編集された免疫細胞集団を製造する方法もまた提供され、免疫細胞集団を、第1のCas-gRNAリボ核タンパク質複合体（RNP）と接触させ、RNPが、CISH遺伝子で編集されていない免疫細胞と比較して、CISH遺伝子によってコードされるCISタンパク質の減少したレベルの発現をもたらすように、免疫細胞のCISH遺伝子における1つ以上の標的部位で編集し、RNPのCasが、Cas9、CasX、CasY、またはそれらの組み合わせを含むこと、ならびに免疫細胞集団を、第2のRNP複合体と接触させ、第2のRNPが、TGFB2遺伝子で編集されていない免疫細胞と比較して、TGFB2遺伝子によってコードされるTGFB2タンパク質の減少したレベルの発現をもたらすように、免疫細胞のTGFB2遺伝子における1つ以上の標的部位で編集し、RNPのCasが、Cas9、CasX、CasY、またはそれらの組み合わせを含み、遺伝子編集された免疫細胞が、上記遺伝子編集された1つまたは複数の標的部位を含まない免疫細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す。

【0046】

本明細書では、がん免疫療法のための遺伝子編集された免疫細胞集団を製造する方法もまた提供され、免疫細胞集団を、第1のCas-gRNAリボ核タンパク質複合体（RNP

P)と接触させ、RNPが、CISH遺伝子で編集されていない免疫細胞と比較して、CISH遺伝子によってコードされるCISタンパク質の減少したレベルの発現をもたらすように、免疫細胞のCISH遺伝子における1つ以上の標的部位で編集し、RNPのCasが、Cas9、CasX、CasY、またはそれらの組み合わせを含むこと、ならびに免疫細胞集団を、第2のRNP複合体と接触させ、第2のRNPが、TIGIT遺伝子で編集されていない免疫細胞と比較して、TIGIT遺伝子によってコードされるTIGITタンパク質の減少したレベルの発現をもたらすように、免疫細胞のTIGIT遺伝子における1つ以上の標的部位で編集し、RNPのCasが、Cas9、CasX、CasY、またはそれらの組み合わせを含み、遺伝子編集された免疫細胞が、上記遺伝子編集された1つまたは複数の標的部位を含まない免疫細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す。

10

【0047】

本明細書では、がん免疫療法のための遺伝子編集された免疫細胞集団を製造する方法もまた提供され、免疫細胞集団を、第1のCas-gRNAリボ核タンパク質複合体(RNP)と接触させ、RNPが、CISH遺伝子で編集されていない免疫細胞と比較して、CISH遺伝子によってコードされるCISタンパク質の減少したレベルの発現をもたらすように、免疫細胞のCISH遺伝子における1つ以上の標的部位で編集し、RNPのCasが、Cas9、CasX、CasY、またはそれらの組み合わせを含むこと、ならびに免疫細胞集団を、第2のRNP複合体と接触させ、第2のRNPが、さらなる遺伝子で編集されていない免疫細胞と比較して、さらなる遺伝子によってコードされるタンパク質の減少したレベルの発現をもたらすように、免疫細胞のさらなる遺伝子における1つ以上の標的部位で編集し、RNPのCasが、Cas9、CasX、CasY、またはそれらの組み合わせを含み、遺伝子編集された免疫細胞が、上記遺伝子編集された1つまたは複数の標的部位を含まない免疫細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す。

20

【0048】

いくつかの実施形態では、本方法は、免疫細胞集団を、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞傷害性受容体をコードするポリヌクレオチドを含むベクターと接触させることをさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞傷害性受容体は、CD70を標的としない。他の実施形態では、細胞傷害性受容体は、CD70を標的とする。いくつかの実施形態では、本方法は、CD70をコードする遺伝子を編集することを含まない。一部の実施形態では、少なくともCD70が編集されている。いくつかの実施形態では、細胞傷害性受容体は、CD19を標的としない。いくつかの実施形態では、細胞傷害性受容体は、CD19を標的とする。いくつかの実施形態では、細胞傷害性受容体は、NKG2Dリガンドを標的としない。いくつかの実施形態では、細胞傷害性受容体は、NKG2Dリガンドを標的とする。

30

【0049】

いくつかの実施形態では、本方法は、ADARA2、SMAD3、MAPKAPK3、CEACAM1、DDIT4、TGFB2R、NKG2A、SOCS2、B2M、PD-1、TIM-3、CD38、またはTCRアルファのうちの1つをコードする1つ以上の遺伝子においてさらなる編集を行うことをさらに含む。

40

【0050】

いくつかの実施形態では、細胞傷害性受容体は、標的腫瘍細胞によって発現されるNKG2D、CD19、CD70、BCMA、CD38、GPRC5D、CD138、DLL3、EGFR、PSMA、FLT3、KREMEN2のリガンドのうちの1つ以上、またはそれらの任意の組み合わせを標的とする。実施形態に依存して、免疫細胞は、ナチュラルキラー(NK)細胞、T細胞、誘導多能性幹細胞(iPSC)、iPSC由来NK細胞、NK-92細胞、またはそれらの組み合わせを含むことができる。

【0051】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作された免疫細胞集団を対象に投与することを含む

50

、対象におけるがんを処置する方法が提供され、免疫細胞は、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞傷害性受容体を発現し、免疫細胞は、CISタンパク質をコードするCISH遺伝子における1つ以上の標的位置で遺伝子編集され、編集は、CISH遺伝子の1つまたは複数の位置で編集されていない免疫細胞と比較して、CISの減少したレベルの発現および／または機能をもたらすように、免疫細胞は、CBLB遺伝子、TGFB2遺伝子またはTIGIT遺伝子で編集されていない免疫細胞と比較して、CBLBタンパク質、TGFB2タンパク質および／もしくはTIGITタンパク質の減少したレベルの発現または活性をもたらすように、1つ以上のCBLB遺伝子、TGFB2遺伝子、および／またはTIGIT遺伝子で編集され、編集は、RNAガイドエンドヌクレアーゼを用いて行われ、遺伝子操作および編集された免疫細胞は、上記遺伝子編集された1つまたは複数の標的部位を含まない免疫細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す。

10

【0052】

いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、Crispr/CasX、Crispr/CasY、またはCrispr/Cas9システムである。いくつかの実施形態では、本方法は、少なくとも1つのさらなる標的遺伝子で免疫細胞を編集することをさらに含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのさらなる標的遺伝子は、CD70をコードする遺伝子ではない。いくつかの実施形態では、細胞は、ADAR2A、SMAD3、MAPKAPK3、CEACAM1、DDIT4、NKG2A、SOCS2、B2M、PD-1、TIM-3、CD38、またはTCRアルファをコードするさらなる標的遺伝子で編集されている。いくつかの実施形態では、免疫細胞によって発現される細胞傷害性受容体は、CD70を標的とせず、CD19を標的とせず、またはNKG2Dリガンドを標的としない。しかしながら、いくつかの実施形態では、免疫細胞によって発現される細胞傷害性受容体は、CD19、CD70、BCMA、CD38、GPRC5D、CD138、DLL3、EGFR、PSMA、FLT3、KREMEN2、またはそれらの組み合わせのうちの1つ以上のエピトープに結合する。

20

【0053】

いくつかの実施形態では、免疫細胞は、ナチュラルキラー（NK）細胞、T細胞、誘導多能性幹細胞（iPSC）、iPSC由来NK細胞、NK-92細胞、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、NK細胞とT細胞の混合物、またはiPSC由来NK細胞とT細胞の混合物を含む。いくつかの実施形態では、投与される免疫細胞は、対象に対して同種異系である。いくつかの実施形態では、本方法は、IL2を投与することをさらに含む。

30

【0054】

したがって、いくつかの実施形態では、がん免疫療法のための遺伝子操作された免疫細胞集団が提供され、細胞傷害性受容体を発現する、遺伝子操作された免疫細胞を含み、免疫細胞は、編集された遺伝子によってコードされるタンパク質の減少したレベルの発現をもたらすように、免疫細胞のゲノムにおける1つ以上の標的部位で遺伝子編集され、遺伝子操作された免疫細胞はまた、ナチュラルキラー細胞および／またはT細胞の細胞傷害活性に対して抑制効果を発揮する少なくとも1つの免疫抑制エフェクターを発現するように操作され、得られた遺伝子操作および編集された免疫細胞が、上記免疫抑制エフェクターおよび上記編集された遺伝子を含まない細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す。

40

【0055】

また、本明細書では、遺伝子操作されたNK細胞および遺伝子操作されたT細胞のうちの1つ以上を含む、がん免疫療法のための遺伝子操作された免疫細胞集団が提供され、遺伝子操作された免疫細胞は、細胞傷害性受容体を発現するように操作され、本明細書では、免疫細胞は、編集された遺伝子（または複数の遺伝子）によってコードされるタンパク質の減少したレベルの発現をもたらすように、免疫細胞のゲノムにおける1つ以上の標的

50

部位で遺伝子編集され、遺伝子操作された免疫細胞は、操作されていないナチュラルキラー細胞、操作されていないT細胞、または望ましくない操作された細胞などの望ましくない細胞の細胞傷害活性に対する抑制効果を発揮する少なくとも1つの免疫抑制エフェクターを発現するようにさらに遺伝子操作され、遺伝子操作および編集された免疫細胞は、上記免疫抑制エフェクターおよび上記編集された遺伝子を含まない細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す。

【0056】

さらに、本明細書では、遺伝子操作されたNK細胞および遺伝子操作されたT細胞のうちの1つ以上を含む、がん免疫療法のための遺伝子操作された免疫細胞集団が提供され、複数の遺伝子操作された免疫細胞は、細胞傷害性受容体を発現するように操作され、免疫細胞はまた、編集されていない免疫細胞と比較して、編集された標的部位を含む編集された遺伝子によってコードされるタンパク質の減少したレベルの発現をもたらすように、ゲノムにおける1つ以上の標的部位で遺伝子編集され、免疫細胞は、抑制細胞の望ましくない細胞傷害活性に対して抑制効果を生じるように構成された少なくとも1つの免疫抑制エフェクターを発現するようにさらに遺伝子操作され、遺伝子操作された免疫細胞は、上記免疫抑制エフェクターを含まない細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す。

【0057】

いくつかの実施形態では、抑制細胞は、宿主細胞を含む。いくつかの実施形態では、抑制細胞は、操作されていないナチュラルキラー細胞、操作されていないT細胞、または操作された抑制細胞のうちの1つ以上を含む。いくつかの実施形態では、操作された抑制細胞は、遺伝子操作された免疫細胞（例えば、治療に使用される細胞集団内の他の細胞）を含む。いくつかの実施形態では、上記免疫抑制エフェクターを含まない細胞は、操作されていない細胞（例えば、宿主細胞）または操作された細胞（免疫抑制エフェクターで編集または操作されなかった他の操作された細胞）のいずれかである。

【0058】

いくつかの実施形態では、細胞によって発現される細胞傷害性受容体は、キメラ抗原受容体、または細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む他のキメラ受容体である。いくつかの実施形態では、細胞傷害性シグナル伝達複合体は、OX40サブドメインまたは4-1BBドメイン、およびCD3ゼータサブドメインを含む。いくつかの実施形態では、細胞傷害性受容体は、標的腫瘍細胞によって発現されるNKGD2D、CD19、BCMA、CD70、およびCD38のうちの1つ以上を標的とする。

【0059】

いくつかの実施形態では、編集は、標的化されたエンドヌクレアーゼを用いて行われる。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、RNAガイドエンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、編集は、Crispr/Casシステムを用いて行われる。

【0060】

一部の実施形態によれば、遺伝子操作された免疫細胞はまた、ベクター2ミクログロブリン(B2M)の発現を減少させるように遺伝子編集されている。いくつかの実施形態では、B2Mの減少した発現は、内因性レベルのB2Mを発現する免疫細胞と比較して、宿主対移植片拒絶を減少させた同種異系がん免疫療法において免疫細胞を使用することを可能にする。

【0061】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、ウイルス由来ペプチドを含む。いくつかの実施形態では、免疫抑制エフェクターは、レトロウイルスのエンベロープタンパク質に由来するペプチドなどのレトロウイルスに由来するペプチドを含む。さらなる実施形態では、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、ヒトタンパク質

10

20

30

40

50

の少なくとも一部および／またはヒトタンパク質複合体の少なくとも一部を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、ヒトタンパク質の少なくとも一部を含む。さらに別の実施形態では、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、少なくとも1つのウイルス由来ペプチドおよびヒトタンパク質の少なくとも一部および／またはヒトタンパク質複合体の少なくとも一部を含むキメラコンストラクトを含む。

【0062】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、受容体内の1つ以上の位置で細胞傷害性受容体に組み込まれる。例えば、いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、膜貫通ドメインと細胞外リガンド結合ドメインの間の細胞傷害性受容体に組み込まれる。他の実施形態では、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、細胞外リガンド結合ドメイン内の細胞傷害性受容体に組み込まれる。さらに別の実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインがs c F vを含む場合、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、s c F vのリンカー領域に組み込まれる。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、細胞外リガンド結合ドメインから遠位に位置する細胞傷害性受容体のN末端領域内の細胞傷害性受容体に組み込まれる。一部の実施形態では、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、細胞傷害性受容体の細胞外領域内の複数の位置で細胞傷害性受容体に組み込まれ、例えば、エフェクターの複数のコピーが、受容体内の様々な位置に配置され、増強された免疫抑制効果を誘導する。

【0063】

受容体複合体に組み込まれたエフェクターに加えてまたはその代わりに、いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、免疫細胞の細胞外膜に結合される。いくつかのこのような実施形態では、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、膜貫通タンパク質を含む。本明細書に開示される実施形態に従って使用することができる膜貫通タンパク質の非限定的な例は、C D 8 α、C D 4、C D 3 ε、C D 3 γ、C D 3 δ、C D 3 ζ、C D 2 8、C D 1 3 7、グリコホリンA、グリコホリンD、ニコチン性アセチルコリン受容体、G A B A受容体、F c ε R I γ、およびT細胞受容体である。いくつかの実施形態に従って、膜貫通ドメインの組み合わせが使用される。いくつかの実施形態では、膜貫通タンパク質は、C D 8 α膜貫通タンパク質を含む。さらなる実施形態では、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、ジスルフィドトラップー本鎖三量体（d t S C T）によって免疫細胞上に発現される。

【0064】

いくつかの実施形態では、免疫抑制エフェクターは、核酸によってコードされるか、または配列番号683～894のヌクレオチドもしくはアミノ酸配列のうちの1つ以上と少なくとも85%の配列同一性を有するペプチドを含む。いくつかの実施形態では、免疫抑制エフェクターは、配列番号689と少なくとも95%の配列同一性を有するペプチドを含む。いくつかの実施形態では、免疫抑制エフェクターは、配列番号690と少なくとも95%の配列同一性を有する核酸によってコードされる。

【0065】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作された免疫細胞は、遺伝子操作されたナチュラルキラー（NK）細胞、遺伝子操作されたT細胞、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作された免疫細胞は、移植片対宿主疾患のリスクを減少させる同種異系がん細胞療法における使用に適している。さらに、いくつかの実施形態では、遺伝子操作された免疫細胞は、遺伝子操作された免疫細胞間の細胞傷害活性のリスクを減少させる同種異系がん細胞療法における使用に適している。いくつかの実施形態では、遺伝子操作された免疫細胞の少なくとも一部（例えば、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも75%、またはそれ以上）は、膜結合I L - 1 5を発現するように操作される。いくつかの実施形態では、NK細胞の少なくとも約60%は、N K G 2 Aに対して陽性である。いくつかの実施形態では、NK細胞の少なくとも約80%は、N K G 2 Aに対して陽性である。いくつかの実施形態では、上昇した発現レベルのN K G 2 Aは、対象に投与された集団の細胞内での細胞傷害性の減少により、がん免疫療法における操作お

10

20

30

40

50

よび編集された細胞の有効性を増強する。

【0066】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される実施形態に従って、遺伝子操作および編集された免疫細胞を対象に投与することを含む、対象におけるがんを処置する方法もまた提供される。いくつかの実施形態では、がんを処置するためまたはがんを処置するための医薬を調製するために、本明細書に記載される実施形態に従う、遺伝子操作および編集された免疫細胞の使用もまた提供される。

【0067】

いくつかの実施形態では、がん免疫療法のための遺伝子操作された免疫細胞集団を製造する方法が提供され、編集されていない免疫細胞と比較して、編集された標的部位を含む遺伝子によってコードされるタンパク質の減少したレベルの発現をもたらすように、免疫細胞集団を、RNAガイドエンドヌクレアーゼと接触させて、免疫細胞のゲノムにおける1つ以上の標的部位を遺伝子編集すること；免疫細胞集団を、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞傷害性受容体をコードするポリヌクレオチドと接触させること；免疫細胞集団を、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターをコードするさらなるポリヌクレオチドと接触させることを含み、免疫抑制エフェクターは、核酸によってコードされるか、または配列番号683～894のヌクレオチドもしくはアミノ酸配列のうちの1つ以上と少なくとも85%の配列同一性を有するペプチドを含み；少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、抑制細胞の細胞傷害活性に対して抑制効果を発揮し、遺伝子操作された免疫細胞は、上記少なくとも1つの免疫抑制エフェクターを含まない細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す。いくつかの実施形態では、遺伝子編集の標的は、CISH遺伝子、B2M遺伝子、CD70遺伝子、アデノシン受容体遺伝子、NKG2A遺伝子、CITTA遺伝子、TGFB β 遺伝子のうちの1つ以上、またはそれらの任意の組み合わせである。

【0068】

本明細書では、遺伝子操作された免疫細胞集団を、同種異系がん免疫療法の増強のために操作する方法もまた提供され、ペーター2ミクログロブリン(B2M)発現を破壊し、免疫細胞の表面上のヒト白血球抗原(HLA)の発現を協調的に減少させるように、NK細胞およびT細胞を含む免疫細胞の混合集団を遺伝子編集し、免疫細胞の表面上のHLAの減少した発現が、編集された免疫細胞集団に対するT細胞媒介性細胞傷害性を減少させ、細胞の表面上のHLAの減少した発現が、編集された免疫細胞集団を編集された免疫細胞に対するNK媒介性細胞傷害性に感受性にする；ならびに免疫細胞の混合集団に対するNK媒介性細胞傷害性を減少させる1つ以上の免疫抑制エフェクターを発現するように編集された細胞を遺伝子操作し、1つ以上の免疫抑制エフェクターは、ウイルス免疫抑制ペプチド、HLAホモログであるウイルスタンパク質、HLA-E、HLA-G、細胞のファゴサイトーシスを減少させるヒトタンパク質またはその断片、ウイルス免疫抑制ペプチドおよび細胞のファゴサイトーシスを減少させるヒトタンパク質もしくはその断片を含むキメラコンストラクトのうちの1つ以上、またはそれらの組み合わせを含み、減少したT細胞媒介性細胞傷害性は、操作されたNK細胞に対する操作されたT細胞媒介性フラトリサイド型細胞傷害性を減少させ、投与時に、操作されたNK細胞に対する宿主T細胞媒介性細胞傷害性を減少させ、減少したNK細胞媒介性細胞傷害性は、操作されたT細胞に対する操作されたNK細胞媒介性フラトリサイド型細胞傷害性を減少させ、投与時に、操作されたNKおよび操作されたT細胞に対する宿主NK細胞媒介性細胞傷害性を減少させ、それにより、同種異系の対象への投与時に免疫細胞の操作混合集団の持続性の増大を可能にし、同種異系がん免疫療法の増強を可能にする。いくつかの実施形態では、混合集団中のNK細胞の少なくとも約60%は、NKG2A発現に対して陽性である。

【0069】

いくつかの実施形態では、本方法は、免疫細胞の混合集団を、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞傷害性受容体を

コードするポリヌクレオチドと接触させることをさらに含む。実施形態に依存して、ポリヌクレオチドは、標的腫瘍細胞によって発現されるNK G 2 D、C D 1 9、C D 7 0、B C M A、およびC D 3 8のうちの1つ以上を標的とする細胞傷害性受容体をコードする。

【0070】

いくつかの実施形態では、本方法は、C I S H遺伝子、C D 7 0遺伝子、アデノシン受容体遺伝子、N K G 2 A遺伝子、C I I T A遺伝子、T G F B R遺伝子のうちの1つ以上、またはそれらの任意の組み合わせの発現を変更するように、遺伝子操作された免疫細胞のDNAを遺伝子編集することをさらに含む。いくつかの実施形態では、発現を減少させる遺伝子編集または発現を誘導する遺伝子編集は、C R I S P R - C a sシステムを用いて行われる。いくつかの実施形態では、C a sは、C a s 9、C a s 1 2、C a s 1 3、C a s XまたはC a s Yである。

10

【0071】

本明細書に開示される生成方法に基づいて、遺伝子操作されたNK細胞および遺伝子操作されたT細胞のうちの1つ以上を含む、遺伝子操作された免疫細胞集団も提供され、遺伝子操作されたNK細胞の少なくとも約70%はNK G 2 Aを発現し、複数の遺伝子操作された免疫細胞は、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞傷害性受容体を発現するように操作され、遺伝子操作された免疫細胞は、ヒト白血球抗原(HLA)に由来する少なくとも1つの免疫抑制エフェクターを発現するように遺伝子操作され、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、抑制細胞の望ましくない細胞傷害活性に対して抑制効果を発揮し、適宜、遺伝子操作された免疫細胞は、以下：I L - 1 5、m b I L - 1 5、細胞傷害性受容体の1つまたは複数の細胞外領域内に組み込まれた少なくとも1つのウイルス免疫抑制ペプチド、遺伝子操作された免疫細胞の細胞膜上に発現された少なくとも1つのウイルス免疫抑制ペプチド、細胞傷害性受容体の1つまたは複数の細胞外領域内に組み込まれたヒト免疫抑制タンパク質またはタンパク質複合体の少なくとも1つの部分、遺伝子操作された免疫細胞の細胞膜上に発現されたヒト免疫抑制タンパク質またはタンパク質複合体の少なくとも1つの部分、ならびに／または遺伝子操作された免疫細胞の細胞膜上に発現され、および／もしくは細胞傷害性受容体の1つ以上の細胞外領域に組み込まれた少なくとも1つのキメラウイルス-ヒト免疫抑制コンストラクトのうちの1つ以上を発現するようにさらに操作されている。いくつかの実施形態では、HLAに由来する免疫抑制エフェクターは、少なくとも1つのHLA-Eペプチドを含む。

20

30

【0072】

いくつかの実施形態では、本明細書では、遺伝子操作および遺伝子編集された免疫細胞集団が提供され、細胞は、1つ以上の点で遺伝子操作され、細胞はまた、1つ以上の点で遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、細胞は、標的腫瘍細胞によって発現される腫瘍マーカーを標的とする1つ以上の細胞傷害性受容体を発現するように遺伝子操作される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集された免疫細胞は、編集されていない免疫細胞と比較して、編集された標的部位を含む標的遺伝子によってコードされるタンパク質の減少したレベルの発現をもたらすように、免疫細胞の免疫細胞ゲノムの1つ以上の標的部位で遺伝子編集され、それによって、細胞の遺伝子型、表現型または機能のうちの1つ以上を変更する。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、ガイドされたヌクレアーゼを用いて行われる。

40

【0073】

いくつかの実施形態では、本明細書には、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞傷害性受容体を発現する、遺伝子操作された免疫細胞を含む、遺伝子操作および遺伝子編集された免疫細胞集団が提供され、細胞外リガンド結合ドメインは標的腫瘍細胞によって発現される腫瘍マーカーを標的とする。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、編集されていない免疫細胞と比較して、編集された標的部位を含む遺伝子によってコードされるタンパク質の減少したレベルの発現をもたらすように、免疫細胞のゲノムにおける1つ以上の標的部位で遺伝子編集されている

50

。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、C R I S P R / C a s X システムを用いて行われる。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、C R I S P R / C a s Y システムを用いて行われる。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、C R I S P R / C a s 9 システムを用いて行われる。いくつかの実施形態では、本明細書で使用される C R I S P R / C a s システムは、潜在的に有害なオフターゲット効果を減少させるように構成される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、非 C a s ガイドヌクレアーゼを用いて行われる。

【0074】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作された免疫細胞の少なくとも一部は、膜結合 I L - 1 5 を発現するように操作される。

【0075】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作および遺伝子編集された免疫細胞は、遺伝子編集された1つまたは複数の標的部位を含まない免疫細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す。

【0076】

いくつかの実施形態では、免疫細胞集団内で、細胞は、編集されていない免疫細胞と比較して、減少したレベルの発現をもたらすように、アデノシン A 2 受容体 C I S H、S M A D 3、M A P K A P K 3、C E A C A M 1、D D I T 4、T G F B R 2、N K G 2 A、S O C S 2、C B L B、B 2 M、T I G I T、P D - 1、T I M - 3、C D 3 8、および T C R アルファのうちの1つ以上をコードする遺伝子で編集されている。いくつかの実施形態では、免疫細胞集団内で、ヌクレアーゼは、配列番号 5 0 3 ~ 5 0 6 のいずれかのアデノシン A 2 受容体標的配列にガイドされる。いくつかの実施形態では、免疫細胞集団内で、細胞は、C I S をコードする遺伝子で編集され、ヌクレアーゼは、配列番号 5 6 2 ~ 5 6 5 のいずれかの標的配列にガイドされる。いくつかの実施形態では、免疫細胞集団内で、細胞は、S M A D 3 をコードする遺伝子で編集され、ヌクレアーゼは、配列番号 4 9 1 ~ 4 9 3 のいずれかの標的配列にガイドされる。いくつかの実施形態では、免疫細胞集団内で、細胞は、M A P K A P K 3 をコードする遺伝子で編集され、ヌクレアーゼは、配列番号 4 9 4 ~ 4 9 6 のいずれかの標的配列にガイドされる。いくつかの実施形態では、免疫細胞集団内で、細胞は、C E A C A M 1 をコードする遺伝子で編集され、ヌクレアーゼは、配列番号 4 9 7 ~ 4 9 9 のいずれかの標的配列にガイドされる。いくつかの実施形態では、免疫細胞集団内で、細胞は、D D I T 4 をコードする遺伝子で編集され、ヌクレアーゼは、配列番号 5 0 0 ~ 5 0 2 のいずれかの標的配列にガイドされる。いくつかの実施形態では、免疫細胞集団内で、細胞は、T G F B R 2 をコードする遺伝子で編集され、ヌクレアーゼは、配列番号 5 4 4 ~ 5 4 7 のいずれかの標的配列にガイドされる。いくつかの実施形態では、免疫細胞集団内で、細胞は、N K G 2 A をコードする遺伝子で編集され、ヌクレアーゼは、配列番号 5 4 8 ~ 5 5 1 のいずれかの標的配列にガイドされる。いくつかの実施形態では、免疫細胞集団内で、細胞は、S O C S 2 をコードする遺伝子で編集され、ヌクレアーゼは、配列番号 5 5 6 ~ 5 6 1 のいずれかの標的配列にガイドされる。いくつかの実施形態では、免疫細胞集団内で、細胞は、C B L B をコードする遺伝子で編集され、ヌクレアーゼは、配列番号 5 5 2 ~ 5 5 5 のいずれかの標的配列にガイドされる。いくつかの実施形態では、免疫細胞集団内で、細胞は、B 2 M をコードする遺伝子で編集され、ヌクレアーゼは、配列番号 2 9 0 ~ 2 9 9 のいずれかの標的配列にガイドされる。いくつかの実施形態では、免疫細胞集団内で、細胞は、T I G I T をコードする遺伝子で編集され、ヌクレアーゼは、配列番号 5 0 7 ~ 5 1 0 のいずれかの標的配列にガイドされる。いくつかの実施形態では、免疫細胞集団内で、細胞は、P D - 1 をコードする遺伝子で編集され、ヌクレアーゼは、配列番号 5 1 1 ~ 5 1 4 のいずれかの標的配列にガイドされる。いくつかの実施形態では、免疫細胞集団内で、細胞は、T I M - 3 をコードする遺伝子で編集され、ヌクレアーゼは、配列番号 5 1 5 ~ 5 1 8 のいずれかの標的配列にガイドされる。いくつかの実施形態では、免疫細胞集団内で、細胞は、C D 3 8 をコードする遺伝子で編集され、ヌクレアーゼは、配列番号 5 1 9 ~ 5 2 2 のいずれかの標的配列にガイドされる。いくつかの実施形態では、免疫細胞集団内で、細胞は、T C R アルファ

10

20

30

40

50

をコードする遺伝子で編集され、ヌクレアーゼは、配列番号 566～569 のいずれかの標的配列にガイドされる。

【0077】

いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、ULBP5、およびULBP6から選択される少なくとも1つの腫瘍マーカーに対する指向性を有する受容体を含む。いくつかの実施形態では、NK細胞によって発現される細胞傷害性受容体は、(i) NKG2Dリガンド結合ドメイン、(ii) CD8膜貫通ドメイン、および(iii) シグナル伝達複合体を含む。一部の実施形態では、細胞傷害性シグナル伝達複合体は、OX40サブドメインおよび／または4-1BBドメイン、およびCD3ゼータサブドメインを含む。

10

【0078】

いくつかの実施形態では、細胞傷害性受容体は、標的腫瘍細胞によって発現されるNKG2D、CD19、CD70、BCMA、CD38、GPRC5D、CD138、DLL3、EGFR、PSMA、FLT3、ALPPL2、CLDN4、CLDN6、またはKREMEN2のうちの1つ以上を標的とする。

【0079】

いくつかの実施形態では、免疫細胞集団は、ナチュラルキラー(NK)細胞、T細胞、誘導多能性幹細胞(iPSC)、iPSC由来NK細胞、NK-92細胞、またはそれらの組み合わせを含むことができる。いくつかの実施形態では、免疫細胞集団は、移植片対宿主疾患のリスクを減少させる同種異系がん細胞療法に使用するのに適した、操作および編集された免疫細胞を含む。いくつかの実施形態では、免疫細胞集団は、遺伝子操作された免疫細胞間の細胞傷害活性のリスクを減少させる同種異系がん細胞療法に使用するのに適した遺伝子操作および編集された免疫細胞を含む。いくつかの実施形態では、免疫細胞集団は、がんを処置するためまたはがんを処置するための医薬を調製するための、操作および編集された免疫細胞を含む。

20

【0080】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作および遺伝子編集された免疫細胞集団を対象に投与することを含む、対象におけるがんを処置する方法が提供される。

【0081】

いくつかの実施形態では、本明細書には、遺伝子操作および遺伝子編集された免疫細胞集団を製造する方法が提供され、細胞は、1つ以上の点で遺伝子操作され、細胞はまた、1つ以上の点で遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ベクターは、細胞傷害性受容体をコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、細胞傷害性受容体は、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、免疫細胞集団をCas-gRNAリボ核タンパク質複合体(RNP)と接触させることをさらに含む。いくつかの実施形態では、RNPは、編集されていない免疫細胞と比較して、編集された標的部位を含む遺伝子によってコードされるタンパク質の減少したレベルの発現をもたらすように、免疫細胞のゲノムにおける1つ以上の標的部位で編集する。

30

【0082】

また、本明細書では、がん免疫療法のための遺伝子操作された免疫細胞集団を製造する方法が提供され、免疫細胞集団を、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞傷害性受容体をコードするポリヌクレオチドを含むベクターと接触させ、免疫細胞集団をCas-gRNAリボ核タンパク質複合体(RNP)と接触させることを含み、RNPは、編集されていない免疫細胞と比較して、編集された標的部位を含む遺伝子によってコードされるタンパク質の減少したレベルの発現をもたらすように、免疫細胞のゲノムにおける1つ以上の標的部位で編集し、RNPのCasは、Cas9、CasX、CasY、またはそれらの組み合わせを含み、遺伝子操作および編集された免疫細胞は、遺伝子編集された標的部位を含まない免疫細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のう

40

50

ちの1つ以上を示す。

【0083】

いくつかの実施形態では、本方法は、CISH、ADARA2、SMAD3、MAPKAPK3、CEACAM1、DDIT4、TGFB2、NKG2A、SOCS2、CBLB、B2M、TIGIT、PD-1、TIM-3、CD38、およびTCRアルファのうちの1つ以上をコードする遺伝子において行われる遺伝子編集をさらに含む。いくつかの実施形態では、免疫細胞集団は、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞傷害性受容体をコードするポリヌクレオチドを含むベクターと接触され、細胞外リガンド結合ドメインは、MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、ULBP5、およびULBP6からなる群から選択される腫瘍マーカーに対する指向性を有する受容体を含む。いくつかの実施形態では、免疫細胞集団は、細胞傷害性受容体をコードするポリヌクレオチドを含むベクターと接触され、NK細胞によって発現される細胞傷害性受容体は、(i) NKG2Dリガンド結合ドメイン、(ii) CD8膜貫通ドメイン、および(iii) OX40共刺激サブドメインおよびCD3ζ共刺激サブドメインを含むシグナル伝達複合体を含む。いくつかの実施形態では、免疫細胞集団は、細胞傷害性受容体をコードするポリヌクレオチドを含むベクターと接触され、細胞傷害性受容体は、標的腫瘍細胞によって発現されるNKG2D、CD19、CD70、BCMA、CD38、GPRC5D、CD138、DLL3、EGFR、PSMA、FLT3、ALPPL2、CLDN4、CLDN6、またはKREMEN2のうちの1つ以上を標的とする。

10

20

【0084】

いくつかの実施形態では、本方法は、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞傷害性受容体をコードするポリヌクレオチドを含むベクターと免疫細胞集団を接触させることをさらに含み、細胞傷害性シグナル伝達複合体は、OX40サブドメインおよび／または4-1BBドメイン、およびCD3ゼータサブドメインを含む。

【0085】

いくつかの実施形態では、本方法は、ポリヌクレオチドを含むベクターと免疫細胞集団を接触させることをさらに含み、ポリヌクレオチドは、膜結合IL15をニシストロン性にコードする。いくつかの実施形態では、ベクターはレトロウイルスベクターである。

30

【0086】

いくつかの実施形態では、本方法は、免疫細胞集団を接触させることをさらに含み、免疫細胞は、ナチュラルキラー(NK)細胞、T細胞、誘導多能性幹細胞(iPSC)、iPSC由来NK細胞、NK-92細胞、またはそれらの組み合わせを含む。

【0087】

また、本明細書では、遺伝子操作および／または遺伝子編集された免疫細胞集団を対象に投与することを含む、対象におけるがんを処置する方法が提供される。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞傷害性受容体を発現する。一部の実施形態では、細胞傷害性シグナル伝達複合体は、OX-40サブドメインおよびCD3ゼータサブドメインを含む。一部の実施形態では、本方法は、細胞が、膜結合IL-15を発現するように操作される場合をさらに含む。一部の実施形態では、免疫細胞は遺伝子編集されている。一部の実施形態では、免疫細胞は、編集されていない免疫細胞と比較して、編集された標的部位を含む遺伝子によってコードされるタンパク質の減少したレベルの発現をもたらすように、免疫細胞のゲノムにおける1つ以上の標的部位で遺伝子編集されている。一部の実施形態では、編集は、Crispr/CasX、Crispr/CasY、またはCrispr/Cas9システム、またはそれらの組み合わせを使用して行われる。一部の実施形態では、遺伝子操作および編集された免疫細胞は、遺伝子編集された標的部位を伴わないかまたは含まない免疫細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す。

40

50

【0088】

一部の実施形態は、免疫細胞が、CISH、ADAR2A、SMAD3、MAPKAPK3、CEACAM1、DDIT4、TGFB2、NKG2A、SOCS2、CBLB、B2M、TIGIT、PD-1、TIM-3、CD38、およびTCRアルファのうちの1つ以上をコードする遺伝子で編集される方法に関する。

【0089】

いくつかの実施形態では、免疫細胞によって発現される細胞傷害性受容体は、(i) NKG2Dリガンド結合ドメイン、(ii) CD8膜貫通ドメイン、ならびに(iii) OX40共刺激サブドメインおよびCD3ζ共刺激サブドメインを含むシグナル伝達複合体を含む。いくつかの実施形態では、免疫細胞によって発現される細胞傷害性受容体は、(i) 標的腫瘍細胞によって発現されるCD19、CD70、BCMA、CD38、GPC5D、CD138、DLL3、EGFR、PSMA、FLT3、ALPPL2、CLDN4、CLDN6、またはKREMEN2のうちの1つ以上のエピトープに結合する結合ドメイン、(ii) CD8膜貫通ドメイン、ならびに(iii) OX40共刺激サブドメインおよびCD3ζ共刺激サブドメインを含むシグナル伝達複合体を含む。

【0090】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作された免疫細胞集団を対象に投与することを含む、対象におけるがんを処置する方法が提供され、免疫細胞は、ナチュラルキラー(NK)細胞、T細胞、誘導多能性幹細胞(iPSC)、iPSC由来NK細胞、NK-92細胞、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作された免疫細胞集団は、NK細胞とT細胞の混合物、またはiPSC由来のNK細胞とT細胞の混合物を含む。

【0091】

いくつかの実施形態では、本方法は、NK細胞および／もしくはiPSC由来NK細胞が少なくともCISH発現を減少させるように編集され、ならびに／またはT細胞がCD19もしくはNKG2Dを標的とすることをさらに提供する。いくつかの実施形態では、本方法は、免疫細胞を投与することを含み、免疫細胞は、対象に対して同種異系である。いくつかの実施形態では、本方法は、IL2をさらに投与することを含む。

【0092】

本明細書に開示されるように、投与される細胞(例えば、同種異系の操作される細胞)に対する宿主免疫応答は、投与される細胞の有効性及び持続性を制限することができる。一部の実施形態では、本明細書に開示されるように、免疫療法には、免疫細胞の混合集団が使用される。このような場合、宿主免疫応答は、チャレンジを提示するだけでなく、投与された細胞が、免疫療法の効力を抑制する様式で、ならびに宿主組織(例えば、オフターゲット効果)に対して互いに作用する可能性も提示する。いくつかの実施形態では、したがって、混合細胞免疫療法アプローチは、移植片対宿主効果、宿主対移植片拒絶、および治療における混合免疫細胞型間の適合性の維持を減少させるために、さらなる操作および／または遺伝子編集を必要とする。同種異系免疫療法関連において、CARを発現する操作されたT細胞は、T細胞が宿主細胞を非自己細胞として認識するため、移植片対宿主拒絶を引き起こす可能性がある。この認識は、宿主細胞HLAと相互作用する移植片T細胞受容体を介して起こる。したがって、いくつかの実施形態では、T細胞受容体を破壊するための遺伝子編集は、T細胞ベースの移植片対宿主拒絶を排除することができる。逆の状態、すなわち宿主対移植片拒絶では、宿主T細胞は移植片免疫細胞(例えば、NK細胞および／またはT細胞)を非自己として認識し、投与された細胞を破壊することにより、したがって、免疫療法の持続性及び有効性を減少させる。宿主細胞からT細胞受容体を編集することは実際的ではないため、本明細書に記載されるように、投与される免疫細胞の遺伝子編集を行うことができる。いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞上のHLA発現を減少／排除するための遺伝子編集によって、それらは宿主細胞によって非自己であると同定されることを回避することができる。ベーター2ミクログロブリン(B2M)遺伝子編集／ノックアウトは、本明細書に開示されるいくつかの実施形態に従って、

10

20

30

40

50

これを達成するために使用される。しかしながら、これは、B2Mノックアウトが完了すると、編集された細胞を、宿主NK細胞からだけでなく、投与された免疫細胞内のNK細胞からも、NK細胞の細胞傷害性を受けやすくする（宿主対移植片およびフラトリサイド）。これは、B2M発現を除去するための編集が、NK細胞活性を阻害するように機能する正常に発現されたシグナルを含む、全てのHLA分子の喪失を引き起こすからである（KIR分子）。したがって、以下により詳細に開示されるように、いくつかの実施形態では、さらなる修飾が、混合された免疫細胞産物中で宿主免疫系と他の免疫細胞からのフラトリサイドの両方から同種異系混合免疫細胞産物をマスクするために行われる。いくつかの実施形態では、種々のタンパク質は、それらがNK細胞（宿主細胞と同種異系細胞の両方）による標的であることを阻害する同種異系免疫細胞の表面上に発現させることができる。例えば、通常は細胞がマクロファージによる貪食を回避することを可能にする「私を食べないで」シグナルは、NK細胞による標的化を減少させるために、同種異系CARを発現するNKおよび／またはT細胞上で発現され得る。多数の利点を提供する他のアプローチ、例えば、NK細胞媒介性抑制を減少させる一方で、操作されたNK細胞の持続性も増強する他のアプローチもまた本明細書に開示される。以下でより詳細に検討するように、いくつかの実施形態では、免疫細胞（例えば、CAR発現T細胞）は、HLA-Eを発現するように操作され、これらの細胞に、NK細胞上に存在する阻害NKGD2A受容体（宿主または操作された同種異系）と相互作用する能力を与える。この相互作用は、宿主または操作された同種異系NK細胞にかかわらず、NK細胞活性の一時的な阻害を誘導する。宿主NK細胞に関して、この抑制は、T細胞に対する宿主NK細胞の活性を減少させ、T細胞が標的腫瘍細胞に対して作用することを可能にする。操作された同種異系NK細胞の一時的な抑制は、操作された同種異系NK細胞が減少した細胞傷害活性の期間（例えば休止期間）を有するため、NK細胞の消耗を防ぐのに役立つ。一時的な抑制が緩和した場合、操作された同種異系NK細胞は標的腫瘍細胞に対して細胞傷害性作用を発揮するように戻る。したがって、いくつかの実施形態では、抑制効果は、実際に、免疫療法のための混合免疫細胞集団における同種異系NK細胞の持続性を増強するのに役立つ。さらなる実施形態では、ウイルス由来のペプチドまたはタンパク質は、操作された同種異系細胞によって発現されて、NK細胞（宿主と混合集団内の操作されたNK細胞の両方）に対して一時的に抑制活性を発揮し、したがって、同種異系混合免疫細胞集団の全体的な持続性を増加させることができる。一部の実施形態では、操作されたNK細胞の急性活性（抑制期間を有する場合であっても）と、操作されたT細胞のより長い持続活性との組み合わせは、腫瘍細胞の細胞傷害性溶解をもたらす。結果として生じる腫瘍片は、宿主免疫細胞（例えば、樹状細胞）によって処理され、したがって腫瘍抗原がT細胞に提示され、それによって、宿主免疫細胞を動員して腫瘍と戦う。いくつかの実施形態では、操作された細胞は、一時的な抑制（例えば、減少された細胞傷害活性の期間または休止期間）を受けるように設計される。この抑制は、少なくとも10～90%（例えば、10～30%、30～50%、50～70%、70～90%およびその中の重複範囲）の細胞活性または他の活性の減少であり得る。一実施形態では、90%を超える抑制が達成される。一時的には、例えば、分、時、または日を含むことができる。細胞は、一実施形態では永久的に抑制され得る。

10

20

30

40

50

【0093】

本明細書には、いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞傷害性受容体を発現する、遺伝子操作された免疫細胞を含む、がん免疫療法のための遺伝子操作された免疫細胞集団が提供され、遺伝子操作された免疫細胞は、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターを発現するように操作され、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、ナチュラルキラー細胞および／またはT細胞の細胞傷害活性に対して抑制効果を発揮し、遺伝子操作された免疫細胞は、上記免疫抑制エフェクターを含まない細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す。

【0094】

また、本明細書では、遺伝子操作されたNK細胞および遺伝子操作されたT細胞のうちの1つ以上を含む、がん免疫療法のための遺伝子操作された免疫細胞集団が提供され、遺伝子操作された免疫細胞は、細胞傷害性受容体を発現するように操作され、遺伝子操作された免疫細胞は、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターを発現するように遺伝子操作され、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、望ましくない細胞の細胞傷害活性に対して抑制効果を発揮し、望ましくない細胞は、操作されていないナチュラルキラー細胞、操作されていないT細胞、または望ましくない操作された細胞のうちの1つ以上を含み、遺伝子操作された免疫細胞は、上記免疫抑制エフェクターを含まない細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す。

10

【0095】

さらに、本明細書には、いくつかの実施形態では、遺伝子操作されたNK細胞および遺伝子操作されたT細胞のうちの1つ以上を含む、がん免疫療法のための遺伝子操作された免疫細胞集団が提供され、複数の遺伝子操作された免疫細胞は、細胞傷害性受容体を発現するように操作され、遺伝子操作された免疫細胞は、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターを発現するように遺伝子操作され、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、抑制細胞の望ましくない細胞傷害活性に対して抑制効果を発揮し、遺伝子操作された免疫細胞は、上記免疫抑制エフェクターを含まない細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す。

20

【0096】

また、いくつかの実施形態では、本明細書には、遺伝子操作されたNK細胞および遺伝子操作されたT細胞のうちの1つ以上を含む、遺伝子操作された免疫細胞集団が提供され、複数の遺伝子操作された免疫細胞は、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞傷害性受容体を発現するように操作され、遺伝子操作された免疫細胞は、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターを発現するように遺伝子操作され、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、抑制細胞の望ましくない細胞傷害活性に対して抑制効果を発揮し、適宜、遺伝子操作された免疫細胞は、以下：IL-15、mbIL-15、細胞傷害性受容体の1つまたは複数の細胞外領域内に組み込まれた少なくとも1つのウイルス免疫抑制ペプチド、遺伝子操作された免疫細胞の細胞膜上に発現された少なくとも1つのウイルス免疫抑制ペプチド、細胞傷害性受容体の1つまたは複数の細胞外領域内に組み込まれたヒト免疫抑制タンパク質またはタンパク質複合体の少なくとも1つの部分、遺伝子操作された免疫細胞の細胞膜上に発現されたヒト免疫抑制タンパク質またはタンパク質複合体の少なくとも1つの部分、ならびに／または遺伝子操作された免疫細胞の細胞膜上に発現され、および／もしくは細胞傷害性受容体の1つ以上の細胞外領域に組み込まれた少なくとも1つのキメラウイルス-ヒト免疫抑制コンストラクトのうちの1つ以上を発現するようにさらに操作されている。

30

【0097】

いくつかの実施形態では、抑制細胞は、宿主細胞（例えば、NK細胞および／またはT細胞）を含む。いくつかの実施形態では、抑制細胞は、操作されていないナチュラルキラー細胞、操作されていないT細胞、または操作された抑制細胞のうちの1つ以上を含む。いくつかの実施形態では、操作された抑制細胞は、遺伝子操作された免疫細胞（例えば、がん免疫療法のために患者に投与されるもの）を含む。いくつかの実施形態では、上記免疫抑制エフェクターを含まない細胞は、操作されていない細胞または操作された細胞のいずれかである。いくつかの実施形態では、免疫抑制エフェクターは、一過性の免疫抑制効果を発揮する。いくつかの実施形態では、一過性の免疫抑制効果は、遺伝子操作された免疫細胞の1つ以上の潜在的消耗を減少させるために有益である。いくつかの実施形態では、1つの免疫抑制エフェクター（または複数のエフェクター）は、遺伝子操作された免疫細胞内の種々の細胞型にわたって一致した様式で発現されるように操作されない。例えば、いくつかの実施形態では、T細胞は、1つの特定の免疫抑制エフェクター（または複数のエフェクター）を発現するように操作され得るが、NK細胞は、そのように操作されず

40

50

、異なるプロファイルの1つの免疫抑制エフェクター（または複数のエフェクター）を発現する。

【0098】

いくつかの実施形態では、細胞傷害性受容体は、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む。いくつかの実施形態では、細胞傷害性受容体は、標的腫瘍細胞によって発現されるNKGD2D、CD19、およびCD70のうちの1つ以上を標的とする。いくつかの実施形態では、細胞傷害性シグナル伝達複合体は、OX40サブドメインまたは4-1BBドメイン、ならびにCD3ゼータサブドメイン、またはそれらの任意の組み合わせ（1つ以上のサブドメインの複製を含む）を含む。

10

【0099】

さらに、いくつかの実施形態では、遺伝子操作された免疫細胞の少なくとも一部は、膜結合IL15を発現するように操作される。いくつかの実施形態では、細胞の一部は、膜結合IL15を発現するように操作されない。いくつかの実施形態では、NK細胞は、mbIL15を発現するように操作されるが、T細胞は操作されない。いくつかの実施形態では、NK細胞とT細胞の両方は、mbIL15を発現するように操作される。いくつかの実施形態では、NK細胞ではなくT細胞は、mbIL15を発現するように操作されるが、NK細胞は操作されない。いくつかの実施形態では、NK細胞および／またはT細胞は、mbIL15に加えて、またはmbIL15の代わりに可溶性IL15を発現するように操作される。いくつかの実施形態では、mbIL15は、配列番号489の核酸配列、または配列番号489と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、mbIL15は、配列番号490のアミノ酸配列、または配列番号490と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有する配列を有する。

20

【0100】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作された免疫細胞はまた、ベーター2ミクログロブリン（B2M）の発現を減少させるように遺伝子編集されている。いくつかの実施形態では、B2Mの減少した発現は、内因性レベルのB2Mを発現する免疫細胞と比較して、宿主対移植片拒絶を減少させる同種異系がん免疫療法において免疫細胞を使用することを可能にする。

30

【0101】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、ウイルス由来ペプチドを含む。一部の実施形態では、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、レトロウイルス由来のペプチドを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、レトロウイルスのエンベロープタンパク質に由来するペプチドを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、ヒトタンパク質の少なくとも一部および／またはヒトタンパク質複合体の少なくとも一部を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、ヒトタンパク質の少なくとも一部を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、少なくとも1つのウイルス由来ペプチドならびにヒトタンパク質の少なくとも一部および／またはヒトタンパク質複合体の少なくとも一部を含むキメラコンストラクトを含む。いくつかの実施形態では、キメラ免疫抑制エフェクターコンストラクトは、切断型ヒトCD47、p15Eペプチド、HIVペプチド、およびHTLVペプチドのうちの2つ以上を含む。いくつかの実施形態では、キメラ免疫抑制エフェクターコンストラクトは、切断型ヒトCD47ドメインおよびp15Eペプチド、HIVペプチド、およびHTLVペプチドのうちの少なくとも1つを含む。いくつかの実施形態では、キメラ免疫抑制エフェクターコンストラクトは、切断型ヒトCD47ドメインおよび少なくとも1つのHIVペプチドを含む。いくつかの実施形態では、キメラ免疫抑制エフェクターコンストラクトは、切断型ヒトCD47ドメインおよび少なくともHTLVペプチドを含む。いくつかの実施形態では、

40

50

キメラ免疫抑制エフェクターコンストラクトは、ウイルスUL18タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、キメラ免疫抑制コンストラクトは、ヒトB2Mドメインを含む。

【0102】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、細胞傷害性受容体に組み込まれる。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、膜貫通ドメインと細胞外リガンド結合ドメインの間の細胞傷害性受容体に組み込まれる。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、細胞外リガンド結合ドメイン内の細胞傷害性受容体に組み込まれる。いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインはscFvを含み、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、scFvのリンカー領域に組み込まれる。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、細胞外リガンド結合ドメインから遠位に位置する細胞傷害性受容体のN末端領域内の細胞傷害性受容体に組み込まれる。実施形態に依存して、免疫抑制エフェクターは、細胞傷害性受容体の細胞外領域内の複数の位置で細胞傷害性受容体に組み込まれる。いくつかの実施形態では、第1の位置における免疫抑制エフェクターは、異なる位置（複数可）における免疫抑制エフェクターとは異なる。一部の実施形態では、同一の免疫抑制エフェクターは、複数の位置で組み込まれる。いくつかの実施形態では、異なる免疫抑制エフェクターは、様々な位置に組み込まれる。

10

【0103】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、免疫細胞の細胞外膜に結合される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、膜貫通タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、膜貫通タンパク質は、CD8 α 、CD4、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ζ 、CD28、CD137、グリコホリンA、グリコホリンD、ニコチン性アセチルコリン受容体、GABA受容体、Fc ϵ RI γ 、およびT細胞受容体から選択される。いくつかの実施形態では、膜貫通タンパク質は、CD8 α 膜貫通タンパク質を含む。

20

【0104】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作された免疫細胞は、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターおよび少なくとも1つの膜結合免疫抑制エフェクターを含む細胞傷害性受容体を含む。

【0105】

いくつかの実施形態では、膜がCARに結合するかまたはCARに組み込まれるかにかかわらず、スペーサー配列（ヒンジとも呼ばれる）を用いて、免疫抑制エフェクターまたはCARを膜貫通ドメインから分離する。いくつかの実施形態では、スペーサーは、CD8a、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、もしくはCD28スペーサーから選択されるか、またはCD8a、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、CD28に由来するか、または完全合成配列であり得る。いくつかの実施形態では、ヒンジ領域は、配列番号479～487のうちの1つ以上を含む。いくつかの実施形態では、ヒンジ領域は、配列番号479～486のいずれかと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を有するアミノ酸配列を含む。

30

40

【0106】

いくつかの実施形態では、免疫抑制エフェクターは、配列番号199～215のうちの1つ以上と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、または少なくとも約95%の配列同一性を有する1つ以上のペプチドを含む。いくつかの実施形態では、免疫抑制エフェクターは、配列番号199と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、または少なくとも約95%の配列同一性を有するペプチドを含む。いくつかの実施形態では、免疫抑制エフェクターは、配列番号219と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、または少なくとも約95%の配列同一性を有するアミノ酸

50

を含む。いくつかの実施形態では、免疫抑制エフェクターは、配列番号 220、225、230、235、および 250 のうちの 1 つ以上と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、または少なくとも約 95 % の配列同一性を有するペプチドを含む。いくつかの実施形態では、免疫抑制エフェクターは、配列番号 223、228、233、238、および 253 のうちの 1 つ以上と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、または少なくとも約 95 % の配列同一性を有するアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、免疫抑制エフェクターは、配列番号 240 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、または少なくとも約 95 % の配列同一性を有するペプチドを含む。いくつかの実施形態では、免疫抑制エフェクターは、配列番号 243 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、または少なくとも約 95 % の配列同一性を有するアミノ酸を含む。

10

【0107】

いくつかの実施形態では、免疫抑制エフェクターは、配列番号 245、273、276、278、279、286、287、288、および 289 のうちの 1 つ以上と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、または少なくとも約 95 % の配列同一性を有するペプチドを含む。いくつかの実施形態では、免疫抑制エフェクターは、配列番号 248 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、または少なくとも約 95 % の配列同一性を有するアミノ酸を含む。

20

【0108】

いくつかの実施形態では、免疫抑制エフェクターは、膜結合性であり、配列番号 256、259、262、265、268、および 271 のうちの 1 つ以上と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、または少なくとも約 95 % の配列同一性を有する配列を含むキメラ免疫抑制エフェクターコンストラクトを含む。

【0109】

いくつかの実施形態では、キメラ免疫抑制エフェクターコンストラクトは、ウイルス U L 18 タンパク質を含み、配列番号 280 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、または少なくとも約 95 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、キメラ免疫抑制エフェクターコンストラクトは、ウイルス U L 18 タンパク質およびヒト B 2 M ドメインを含み、配列番号 283 または 285 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、または少なくとも約 95 % の配列同一性を有する配列を含む。

30

【0110】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作された免疫細胞は、遺伝子操作されたナチュラルキラー（NK）細胞、遺伝子操作された T 細胞、またはそれらの組み合わせを含む。一部の実施形態では、他の免疫細胞も同様に含まれ得る。いくつかの実施形態では、遺伝子操作された免疫細胞は、移植片対宿主疾患のリスクを減少させる同種異系がん細胞療法における使用に適している。有利には、いくつかの実施形態では、遺伝子操作された免疫細胞は、遺伝子操作された免疫細胞間の細胞傷害活性のリスクを減少させる同種異系がん細胞療法における使用に適している。

40

【0111】

また、本明細書では、本開示の実施形態による、遺伝子操作された免疫細胞を対象に投与することを含む、対象におけるがんを処置する方法が提供される。また、がんを処置するための本開示の実施形態による、遺伝子操作された免疫細胞の使用、ならびにがんを処置するための医薬の調製におけるそれらの使用が提供される。

【0112】

さらに、いくつかの実施形態では、がん免疫療法のための遺伝子操作された免疫細胞集団を製造する方法が提供され、免疫細胞集団を、細胞傷害性受容体をコードするポリヌク

50

レオチドと接触させ、免疫細胞集団を、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターをコードするさらなるポリヌクレオチドと接触させることを含む。いくつかの実施形態では、がん免疫療法のための遺伝子操作された免疫細胞集団を操作する方法が提供され、免疫細胞集団を、細胞傷害性受容体をコードし、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターをコードするポリヌクレオチドと接触させることを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、抑制細胞の細胞傷害活性に対して抑制効果を発揮し、いくつかの実施形態では、遺伝子操作された免疫細胞は、上記少なくとも1つの免疫抑制エフェクターを含まない細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す。いくつかの実施形態では、本方法は、C I S H 遺伝子、B 2 M 遺伝子、C D 7 0 遺伝子、アデノシン受容体遺伝子、N K G 2 A 遺伝子、C I I T A 遺伝子、T G F B R 遺伝子のうちの1つ以上、またはそれらの任意の組み合わせの発現を変更するように、遺伝子操作された免疫細胞のD N A を遺伝子編集することをさらに含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、膜結合I L 1 5 をさらにコードしてもよい。いくつかの実施形態では、本方法は、免疫細胞集団を、膜結合免疫抑制エフェクターをコードするポリヌクレオチドと接触させることをさらに含む。

10

【0113】

また、本明細書では、がん免疫療法のために遺伝子操作された免疫細胞の混合集団中のフラトリサイドを減少する方法が提供され、混合免疫細胞集団由来の免疫細胞の第1の部分集団を、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターをコードするポリヌクレオチドと接触させること、および混合免疫細胞集団由来の第2の部分集団を、少なくとも1つのさらなる免疫抑制エフェクターをコードするポリヌクレオチドと接触させることを含み、第1の部分集団および第2の部分集団による免疫抑制エフェクターの発現は、遺伝子操作された免疫細胞集団の中でのフラトリサイドを減少させる。

20

【0114】

いくつかの実施形態では、免疫細胞の第1の部分集団による少なくとも1つの免疫抑制エフェクターの発現は、少なくとも一時的に、免疫細胞の第1の部分集団に対する指向性を有する免疫細胞の第2の部分集団の抑制活性を減少させ、免疫細胞の第2の部分集団による少なくともさらなる免疫抑制エフェクターの発現は、少なくとも一時的に、免疫細胞の第2の部分集団に対する指向性を有する免疫細胞の第1の部分集団の抑制活性を減少させる。いくつかの実施形態では、本方法は、免疫細胞集団を、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞傷害性受容体をコードするポリヌクレオチドと接触させることをさらに含む。いくつかの実施形態では、本方法は、C I S H 遺伝子、B 2 M 遺伝子、C D 7 0 遺伝子、アデノシン受容体遺伝子、N K G 2 A 遺伝子、C I I T A 遺伝子、T G F B R 遺伝子のうちの1つ以上、またはそれらの任意の組み合わせの発現を変更するように、遺伝子操作された免疫細胞のD N A を遺伝子編集することをさらに含んでもよい。

30

【0115】

いくつかの実施形態では、同種異系がん免疫療法の増強のための遺伝子操作された免疫細胞集団を操作する方法が提供され、N K 細胞およびT 細胞を含む免疫細胞の混合集団を遺伝子編集して、免疫細胞の表面上のヒト白血球抗原(H L A)の発現を減少させ、編集された細胞を遺伝子操作して、免疫細胞の混合集団に対するN K 媒介性細胞傷害性を減少させる1つ以上の免疫抑制エフェクターを発現させることを含む。いくつかの実施形態では、免疫細胞の表面上のH L A の減少した発現は、編集された免疫細胞集団に対するT 細胞媒介性細胞傷害性を減少させる。いくつかの実施形態では、細胞の表面上のH L A の減少した発現は、編集された免疫細胞集団を、編集された免疫細胞に対するN K 媒介性細胞傷害性に感受性にする。いくつかの実施形態では、1つ以上の免疫抑制エフェクターは、ウイルス免疫抑制ペプチド、H L A ホモログであるウイルスタンパク質、H L A - E 、H L A - G 、細胞のファゴサイトーシスを減少させるヒトタンパク質またはその断片、ウイルス免疫抑制ペプチドおよび細胞のファゴサイトーシスを減少させるヒトタンパク質もし

40

50

くはその断片を含むキメラコンストラクトのうちの1つ以上、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、減少したT細胞媒介性細胞傷害性は、少なくとも一時的に、操作されたNK細胞に対する、操作されたT細胞媒介性フラトリサイド型細胞傷害性を減少させ、投与時に、操作されたNK細胞に対する宿主T細胞媒介性細胞傷害性を減少させる。いくつかの実施形態では、減少したNK細胞媒介性細胞傷害性は、少なくとも一時的に、操作されたT細胞に対する、操作されたNK細胞媒介性フラトリサイド型細胞傷害性を減少させ、投与時に、操作されたNKおよび操作されたT細胞に対する宿主NK細胞媒介性細胞傷害性を減少させ、それにより、同種異系の対象への投与時に免疫細胞の操作混合集団の持続性の増大を可能にし、同種異系がん免疫療法の増強を可能にする。

【0116】

いくつかの実施形態では、本方法は、免疫細胞の混合集団を、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞傷害性受容体をコードするポリヌクレオチドと接触させることをさらに含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、標的腫瘍細胞によって発現されるNKGD2D、CD19、およびCD70のうちの1つ以上を標的とする細胞傷害性受容体をコードする。いくつかの実施形態では、細胞傷害性シグナル伝達複合体は、OX40サブドメインまたは4-1BBドメイン、およびCD3ゼータサブドメイン、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、本方法は、CISH遺伝子、B2M遺伝子、CD70遺伝子、アデノシン受容体遺伝子、NKGA遺伝子、CIITA遺伝子、TGFB β 遺伝子のうちの1つ以上、またはそれらの任意の組み合わせの発現を変更するように、遺伝子操作された免疫細胞のDNAを遺伝子編集することをさらに含む。いくつかの実施形態では、発現を減少させる遺伝子編集または発現を誘導する遺伝子編集は、CRISPR-Casシステムを用いて行われる。いくつかの実施形態では、CRISPR-Casシステムは、Cas9、Csn2、Cas4、Cpf1、C2c1、C2c3、Cas13a、Cas13b、Cas13c、CasX、CasY、およびそれらの組み合わせから選択されるCasを含む。いくつかの実施形態では、CasはCas9である。

【0117】

いくつかの実施形態では、免疫療法のための細胞は、より効果的な治療をもたらす細胞の1つ以上の特性を増大させるように遺伝子修飾されている。いくつかの実施形態では、遺伝子修飾された免疫細胞の拡大可能性、細胞傷害性および／または持続性のうちの1つ以上が増大する。いくつかの実施形態では、免疫細胞はまた、腫瘍を標的とする細胞傷害性受容体を発現するように操作されている。本明細書には、いくつかの実施形態では、複数のナチュラルキラー（NK）細胞を含む、がん免疫療法のための遺伝子操作されたNK細胞集団が提供され、複数のNK細胞は、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞傷害性受容体を発現するように操作され、NK細胞は、操作されていないNK細胞と比較して、CISH遺伝子によってコードされる、減少したレベルのサイトカイン誘導性SH2含有（CIS）タンパク質を発現するように遺伝子編集され、減少したCIS発現は、CISH遺伝子の編集を介して操作され、遺伝子操作されたNK細胞は、天然レベルのCISを発現するNK細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性を示す。いくつかの実施形態では、細胞傷害性シグナル伝達複合体は、OX-40サブドメインおよびCD3ゼータサブドメインを含む。いくつかの実施形態では、NK細胞は、膜結合IL-15を発現するように操作されている。一部の実施形態では、T細胞は、NK細胞の代わりにまたはNK細胞に加えて、操作され、使用される。いくつかの実施形態では、NK細胞は、操作された免疫細胞集団に含まれない。いくつかの実施形態では、免疫細胞集団は、操作されたNK細胞を含むか、それからなるか、または本質的にそれからなる。

【0118】

いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、ULBP5、およびULBP6からなる

10

20

30

40

50

群から選択される腫瘍マーカーに対する指向性を有する受容体を含む。いくつかの実施形態では、NK細胞によって発現される細胞傷害性受容体は、(i) NKG2Dリガンド結合ドメイン、(ii) CD8膜貫通ドメイン、および(iii) OX40共刺激サブドメインとCD3ζ共刺激サブドメインを含むシグナル伝達複合体を含むかまたは本質的にそれらからなる。いくつかの実施形態では、細胞傷害性受容体は、配列番号145と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、細胞傷害性受容体は、配列番号174または899と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する。

【0119】

いくつかの実施形態では、NK細胞によって発現される細胞傷害性受容体は、(i) 抗CD19抗体断片を含む腫瘍結合ドメイン、(ii) CD8膜貫通ドメイン、および(iii) OX40共刺激サブドメインとCD3ζ共刺激サブドメインを含むシグナル伝達複合体を含むかまたは本質的にそれらからなるキメラ抗原受容体(CAR)を含む。いくつかの実施形態では、抗CD19抗体は、一本鎖可変断片(scFv)の可変重鎖(VH)ドメイン、およびscFvの可変軽鎖(VL)ドメインを含み、VHドメインは、配列番号120のアミノ酸配列を含み、コードされたVLドメインは、配列番号118のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、T細胞により発現されるCARは、配列番号178または901に示されるアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、抗CD19抗体断片は、コードされたタンパク質の潜在的抗原性を減少させるように、および／またはコードされたタンパク質の1つ以上の特性(例えば、標的認識および／または結合特性)を増大させるように設計されている(例えば、操作されている)。したがって、いくつかの実施形態によれば、抗CD19抗体断片は、特定の配列を含まない。例えば、一部の実施形態によれば、抗CD19抗体断片は、配列番号116によってコードされず、配列番号105または107のVL領域も、配列番号104または106のVH領域も含まない。いくつかの実施形態では、抗CD19抗体断片は、配列番号108～115から選択される1つ以上のCDRを含まない。

【0120】

いくつかの実施形態では、CISの発現は、操作されていないNK細胞と比較して実質的に減少する。本明細書に提供される特定の実施形態によれば、遺伝子編集は、CIS(または本明細書に開示される他のもの)のような標的タンパク質の発現を、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約97%、約98%、約99%、またはそれ以上(列挙されたものの間の任意の量を含む)減少させることができる。いくつかの実施形態では、標的タンパク質の発現が検出できないように、遺伝子を完全にノックアウトする。したがって、いくつかの実施形態では、免疫細胞(例えば、NK細胞)は、検出可能なレベルのCISタンパク質を発現しない。

【0121】

いくつかの実施形態では、NK細胞は、操作されていないNK細胞と比較して、減少したレベルの形質転換増殖因子ベータ受容体(TGFR)を発現するようにさらに遺伝子操作されている。いくつかの実施形態では、NK細胞集団の少なくとも50%は、検出可能なレベルのTGFRを発現しない。いくつかの実施形態では、NK細胞は、操作されていないNK細胞と比較して、ベータ-2ミクログロブリン(B2M)の減少したレベルを発現するように、さらに遺伝子編集されている。いくつかの実施形態では、NK細胞集団の少なくとも50%は、検出可能なレベルのB2M表面タンパク質を発現しない。いくつかの実施形態では、NK細胞は、操作されていないNK細胞と比較して、減少したレベルのCITTA(クラスII主要組織適合性複合体トランスアクチベーター)を発現するようにさらに遺伝子編集されている。いくつかの実施形態では、NK細胞集団の少なくとも50%は、検出可能なレベルのCITTAを発現しない。いくつかの実施形態では、NK細胞は、操作されていないNK細胞と比較して、減少したレベルのナチュラルキラーグ

10

20

30

40

50

ループ2、メンバーA（NK G2A）受容体を発現するようにさらに遺伝子編集されている。いくつかの実施形態では、NK細胞集団の少なくとも50%は、検出可能なレベルのNK G2Aを発現しない。いくつかの実施形態では、NK細胞は、操作されていないNK細胞と比較して、CBLB遺伝子によってコードされる、減少したレベルのCblプロトオンコジーンBタンパク質を発現するようにさらに遺伝子編集されている。いくつかの実施形態では、NK細胞集団の少なくとも50%は、検出可能なレベルのCblプロトオンコジーンBタンパク質を発現しない。いくつかの実施形態では、NK細胞は、操作されていないNK細胞と比較して、TRIM29遺伝子によってコードされる、減少したレベルの三要素モチーフ含有タンパク質29タンパク質を発現するようにさらに遺伝子編集されている。いくつかの実施形態では、NK細胞集団の少なくとも50%は、検出可能なレベルのTRIM29タンパク質を発現しない。いくつかの実施形態では、NK細胞は、操作されていないNK細胞と比較して、SOCS2遺伝子によってコードされる、減少したレベルのサイトカインシグナル伝達2タンパク質の抑制因子を発現するようにさらに遺伝子編集されている。いくつかの実施形態では、NK細胞集団の少なくとも50%は、検出可能なレベルのSOCS2タンパク質を発現しない。実施形態に依存して、上記標的タンパク質／遺伝子の任意の組み合わせを、CISとの組み合わせを含めて、タンパク質が検出可能なレベルで発現されないようにすることを含めて、所望のレベルに編集することができる。いくつかの実施形態では、一部の量の検出可能なタンパク質が残存し得るが、タンパク質の機能は破壊されるか、実質的に破壊されるか、排除されるか、または実質的に排除される。いくつかの実施形態では、いくつかの機能性が残存するとしても、操作された免疫細胞（例えば、NK細胞またはT細胞）に付与された正の効果が残存し、細胞の1つ以上の抗がん側面を増大させるのに役立つ。

10

20

【0122】

いくつかの実施形態では、NK細胞をさらに遺伝子編集して、NK細胞による少なくとも1つの免疫チェックポイントタンパク質の発現を破壊する。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫チェックポイントタンパク質は、CTLA4、PD-1、リンパ球活性化遺伝子（LAG-3）、NK G2A受容体、KIR2DL-1、KIR2DL-2、KIR2DL-3、KIR2DS-1および／またはKIR2DA-2、ならびにそれらの組み合わせから選択される。

【0123】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、標的タンパク質の発現を「ノックインする」かまたは代わりに増大させるために使用される。いくつかの実施形態では、標的タンパク質の発現は、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約97%、約98%、約99%、またはそれ以上（列挙されたものの間の任意の量を含む）増大し得る。例えば、いくつかの実施形態では、NK細胞は、CD47を発現するようにさらに遺伝子編集されている。いくつかの実施形態では、NK細胞は、HLA-Eを発現するようにさらに遺伝子操作されている。ノックインされた遺伝子は、ノックアウトするかまたは代わりに破壊された遺伝子のいずれかと組み合わせてノックインすることができる。

30

【0124】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作されたNK細胞集団は、遺伝子操作されたT細胞集団をさらに含む。いくつかの実施形態では、T細胞集団は、実質的ではないにしても、少なくとも部分的に、非同種反応性である。いくつかの実施形態では、非同種反応性T細胞は、非同種反応性T細胞がレシピエント対象の細胞に対して同種反応性作用を示さないように、T細胞受容体（TCR）の少なくとも1つの遺伝子編集されたサブユニットを含む。いくつかの実施形態では、T細胞集団は、腫瘍マーカーに対する指向性を有するキメラ抗原受容体（CAR）を発現するように操作され、腫瘍マーカーは、CD19、CD123、CD70、Her2、メソテリン、クラウジン6、BCMA、PD-L1、EGFRのうちの1つ以上である。一部の実施形態では、これらの腫瘍マーカーのうちの2つ以上の組み合わせを標的化することができる。いくつかの実施形態では、T細胞によって発

40

50

現されるCARは、CD19に対する指向性を有する。いくつかの実施形態では、T細胞によって発現されるCARは、配列番号178または901に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、CARはCD19を標的化する。いくつかの実施形態では、CARは、コードされたタンパク質の潜在的抗原性を減少させ、および／またはコードされたタンパク質の1つ以上の特性（例えば、標的認識および／または結合特性）を増大させるように設計されている（例えば、操作されている）。したがって、いくつかの実施形態によれば、抗CD19 CARは、特定の配列を含まない。例えば、いくつかの実施形態によれば、抗CD19 CARは、配列番号116、配列番号105、107、104または106によって構成されない。いくつかの実施形態では、抗CD19抗体断片は、配列番号108～115から選択される1つ以上のCDRを含まない。

10

【0125】

いくつかの実施形態では、修飾されたT細胞のTCRサブユニットは、TCR α である。いくつかの実施形態では、T細胞のTCRへの修飾により、T細胞集団の少なくとも80%、85%、または90%が検出可能なレベルのTCRを発現しなくなる。本明細書に開示される編集されたNK細胞と同様に、いくつかの実施形態では、T細胞は、操作されていないT細胞と比較して、CIS、TGFB β 、B2M、CITTA、TRIM29およびSOCS2のうちの1つ以上の発現を減少させるか、またはCD47もしくはHLA-Eを発現させるためにさらに遺伝子編集されている。いくつかの実施形態では、T細胞は、T細胞による少なくとも1つの免疫チェックポイントタンパク質の発現を破壊するようにさらに遺伝子編集され、少なくとも1つの免疫チェックポイントタンパク質は、CTLA4、PD-1、およびリンパ球活性化遺伝子（LAG-3）から選択される。

20

【0126】

実施形態に依存して、発現を減少させるためのNK細胞および／またはT細胞の遺伝子編集、および／または発現を誘導するための遺伝子編集は、CRISPR-Casシステムを用いて行われる。一部の実施形態では、CRISPR-Casシステムは、Cas9、Csn2、Cas4、Cpf1、C2c1、C2c3、Cas13a、Cas13b、Cas13c、およびそれらの組み合わせから選択されるCasを含む。一部の実施形態では、CasはCas9である。一部の実施形態では、CRISPR-Casシステムは、Cas3、Cas8a、Cas5、Cas8b、Cas8c、Cas10d、Cse1、Cse2、Csy1、Csy2、Csy3、GSU0054、Cas10、Csm2、Cmr5、Cas10、Csx11、Csx10、Csfl、およびそれらの組み合わせから選択されるCasを含む。いくつかの実施形態では、発現を減少させるためのNK細胞および／またはT細胞の遺伝子編集、および／または発現を誘導するための遺伝子編集は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）を用いて行われる。いくつかの実施形態では、発現を減少させるためのNK細胞および／またはT細胞の遺伝子編集、および／または発現を誘導するための遺伝子編集は、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）を用いて行われる。

30

【0127】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作されたNK細胞および／または遺伝子操作されたT細胞は、配列番号5と少なくとも80%、85%、90%、または95%の配列同一性を有する配列によってコードされるOX40サブドメインを有する。いくつかの実施形態では、遺伝子操作されたNK細胞および／または遺伝子操作されたT細胞は、配列番号7と少なくとも80%、85%、90%、または95%の配列同一性を有する配列によってコードされるCD3ゼータサブドメインを有する。いくつかの実施形態では、遺伝子操作されたNK細胞および／または遺伝子操作されたT細胞は、配列番号11または489と少なくとも80%、85%、90%、または95%の配列同一性を有する配列によってコードされるmbIL15を有する。

40

【0128】

また、本明細書には、本明細書に開示されるように、遺伝子操作されたNK細胞集団（

50

および／または遺伝子操作されたT細胞集団)を対象に投与することを含む、対象におけるがんを処置する方法が提供される。また、本明細書には、がんの処置において本明細書に開示されるように、遺伝子操作されたNK細胞集団(および／または遺伝子操作されたT細胞集団)の使用が提供される。また、本明細書には、がんの処置のための医薬の製造において本明細書に開示されるように、遺伝子操作されたNK細胞集団(および／または遺伝子操作されたT細胞集団)の使用が提供される。

【0129】

がんを処置する方法もまた、本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、遺伝子操作された免疫細胞集団を対象に投与することを含む、対象におけるがんを処置する方法が提供され、(i)複数のNK細胞であって、複数のNK細胞が、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞傷害性受容体を発現するように操作され、NK細胞は、操作されていないNK細胞と比較して、細胞により、CISH遺伝子によってコードされる、減少したレベルのサイトカイン誘導性SH2含有(CIS)タンパク質を発現するように遺伝子編集され、減少したCIS発現は、CISH遺伝子の遺伝子編集を介して操作され、遺伝子操作されたNK細胞は、天然レベルのCISを発現するNK細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す複数のNK細胞と；適宜(ii)複数のT細胞とを含む。

【0130】

いくつかの実施形態では、細胞傷害性シグナル伝達複合体は、OX-40サブドメインおよびCD3ゼータサブドメインを含む。いくつかの実施形態では、NK細胞はまた、膜結合IL-15を発現するように操作されている。

【0131】

いくつかの実施形態では、含まれる場合、複数のT細胞は、実質的に非同種反応性である。有利には、いくつかの実施形態では、非同種反応性T細胞は、非同種反応性T細胞がレシピエント対象の細胞に対して同種反応性作用を示さないように、T細胞受容体(TCR)のサブユニットへの少なくとも1つの修飾を含む。いくつかの実施形態では、T細胞はまた、CD19、CD123、CD70、Her2、メソテリン、クラウジン6、BCMA、PD-L1、EGFR、およびそれらの組み合わせから選択され得る腫瘍マーカーに対する指向性を有するキメラ抗原受容体(CAR)を発現するように操作されている。

【0132】

いくつかの実施形態では、NK細胞によって発現される細胞傷害性受容体は、(i)NKGD2リガンド結合ドメイン、(ii)CD8膜貫通ドメイン、および(iii)OX40共刺激サブドメインとCD3ζ共刺激サブドメインを含むシグナル伝達複合体を含む。いくつかの実施形態では、細胞傷害性受容体は、配列番号145と少なくとも80%、85%、90%、または95%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、細胞傷害性受容体は、配列番号174または899と少なくとも80%、85%、90%、または95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、NK細胞によって発現される細胞傷害性受容体は、CD19に対する指向性を有する。いくつかの実施形態では、NK細胞によって発現される細胞傷害性受容体は、配列番号178または901に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、または95%の配列同一性を有する。一部の実施形態では、T細胞によって発現されるCARは、CD19に対する指向性を有する。いくつかの実施形態では、T細胞(およびNK細胞)によって発現されるCARは、(i)抗CD19抗体断片を含む腫瘍結合ドメイン、(ii)CD8膜貫通ドメイン、および(iii)OX40共刺激サブドメインとCD3ζ共刺激サブドメインを含むシグナル伝達複合体を含む。いくつかの実施形態では、CARをコードするポリヌクレオチドはまた、膜結合IL15をコードする。一部の実施形態では、抗CD19抗体断片は、一本鎖可変断片(scFv)の可変重鎖(VH)ドメインおよびscFvの可変軽鎖(VL)ドメインを含む。いくつかの実施形態では、VHドメインは配列番号120のアミノ酸配列を含み、VLドメインは配列番号118のア

10

20

30

40

50

ミノ酸配列を含む。

【0133】

いくつかの実施形態では、NK細胞および／またはT細胞は、操作されていないT細胞と比較して、CIS、TGFR、B2M、CIITA、TRIM29およびSOCS2のうちの1つ以上の発現を減少させるため、またはCD47もしくはHLA-Eを発現するためにさらに遺伝子編集されている。

【0134】

いくつかの実施形態では、NK細胞および／またはT細胞は、細胞による少なくとも1つの免疫チェックポイントタンパク質の発現を破壊するようにさらに遺伝子編集され、少なくとも1つの免疫チェックポイントタンパク質は、CTLA4、PD-1、およびリンパ球活性化遺伝子(LAG-3)、NKG2A受容体、KIR2DL-1、KIR2DL-2、KIR2DL-3、KIR2DS-1および／またはKIR2DA-2から選択される。

10

【0135】

いくつかの実施形態では、OX40サブドメインは、配列番号5と少なくとも80%、85%、90%、または95%の配列同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、CD3ゼータサブドメインは、配列番号7と少なくとも80%、85%、90%、または95%の配列同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、mbIL15は、配列番号11と少なくとも80%、85%、90%、または95%の配列同一性を有する配列によってコードされる。

20

【0136】

適用される本明細書に開示される方法の実施形態に応じて、発現を減少させるためのNK細胞および／もしくはT細胞の遺伝子編集、ならびに／または発現を誘導するための遺伝子編集は、CRISPR-Casシステムを用いて行われる。いくつかの実施形態では、CRISPR-Casシステムは、Cas9、Csn2、Cas4、Cpf1、C2c1、C2c3、Cas13a、Cas13b、Cas13c、およびそれらの組み合わせから選択されるCasを含む。一部の実施形態では、CasはCas9である。一部の実施形態では、CRISPR-Casシステムは、Cas3、Cas8a、Cas5、Cas8b、Cas8c、Cas10d、Cse1、Cse2、Csy1、Csy2、Csy3、GSU0054、Cas10、Csm2、Cmr5、Cas10、Csx11、Csx10、Csfl、およびそれらの組み合わせから選択されるCasを含む。いくつかの実施形態では、発現を減少させるためのNK細胞および／もしくはT細胞の遺伝子編集、ならびに／または発現を誘導するための遺伝子編集は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)を用いて行われる。いくつかの実施形態では、発現を減少させるためのNK細胞および／もしくはT細胞の遺伝子編集、ならびに／または発現を誘導するための遺伝子編集は、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)を用いて行われる。

30

【0137】

さらに、本明細書には、複数のNK細胞を含む、がん免疫療法のための操作された細胞の混合集団が提供され、複数のNK細胞は、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞傷害性受容体を発現するように操作され、NK細胞は、操作されていないNK細胞と比較して、細胞により、CISH遺伝子によってコードされる、減少したレベルのサイトカイン誘導性SH2含有(CIS)タンパク質を発現するように遺伝子編集され、減少したCIS発現は、CISH遺伝子の遺伝子編集を介して操作され、遺伝子操作されたNK細胞は、天然レベルのCISを発現するNK細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性を示し、複数のT細胞は、T細胞受容体(TCR)のサブユニットへの少なくとも1つの修飾を介して実質的に非同種反応性であり、T細胞集団は、CD19、CD123、CD70、Her2、メソテリン、クラウジン6、BCMA、PD-L1、およびEGFRのうちの1つ以上から選択される腫瘍マーカーに対する指向性を有するキメ

40

50

ラ抗原受容体（CAR）を発現するように操作されている。いくつかの実施形態では、細胞傷害性受容体および／またはCARの細胞傷害性シグナル伝達複合体は、OX-40サブドメインおよびCD3ゼータサブドメインを含む。いくつかの実施形態では、NK細胞および／またはT細胞は、膜結合IL-15を発現するように操作されている。いくつかの実施形態では、NK細胞によって発現される細胞傷害性受容体は、配列番号174または899と少なくとも80%、85%、90%、または95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、NK細胞によって発現される細胞傷害性受容体は、配列番号178または901に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、または95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、T細胞によって発現されるCARは、配列番号178または901に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、または95%の配列同一性を有する。

10

【0138】

本明細書には、いくつかの実施形態では、がん免疫療法のための遺伝子改変された免疫細胞集団が提供され、免疫細胞によるCISH遺伝子によってコードされるサイトカイン誘導性SH2含有タンパク質の発現を減少させるために遺伝子修飾され、免疫細胞による形質転換増殖因子ベータ受容体の発現を減少させるために遺伝子修飾され、免疫細胞によるナチュラルキラーグループ2、メンバーA（NKG2A）の発現を減少させるために遺伝子修飾され、免疫細胞によるCBLB遺伝子によってコードされるCblプロトオンコジーンBタンパク質の発現を減少させるために遺伝子修飾され、免疫細胞によるTRIM29遺伝子によってコードされる三要素モチーフ含有タンパク質29タンパク質の発現を減少させるために遺伝子修飾され、および／または免疫細胞によるSOCS2遺伝子によってコードされるサイトカインシグナル伝達2タンパク質の抑制因子の発現を減少させるために遺伝子修飾され、ならびに標的腫瘍細胞上に存在する腫瘍マーカーに対する指向性を有するキメラ抗原受容体（CAR）を発現するように遺伝子操作されている免疫細胞集団を含む。いくつかの実施形態では、集団は、ナチュラルキラー細胞を含むか、それからなるか、または本質的にそれからなる。いくつかの実施形態では、集団はT細胞をさらに含む。いくつかの実施形態では、CARはCD19に対する指向性を有する。いくつかの実施形態では、CARは、1つ以上のヒト化CDR配列を含む。いくつかの実施形態では、CARは、NKG2Dリガンドに対する指向性を有する。いくつかの実施形態では、細胞への遺伝子修飾は、CRISPR-Casシステムを用いて行われる。いくつかの実施形態では、CRISPR-Casシステムは、Cas9、Csn2、Cas4、Cpf1、C2c1、C2c3、Cas13a、Cas13b、Cas13c、およびそれらの組み合わせから選択されるCasを含む。いくつかの実施形態では、CasはCas9である。いくつかの実施形態では、修飾はCISHに対するものであり、CRISPR-Casシステムは、配列番号153、154、155、156、もしくは157の配列を含むものから選択される1つ以上のガイドRNAによってガイドされ；修飾はTGFB2に対するものであり、CRISPR-Casシステムは、配列番号147、148、149、150、151、もしくは152の配列を含むものから選択される1つ以上のガイドRNAによってガイドされ；修飾はNKG2Aに対するものであり、CRISPR-Casシステムは、配列番号158、159、もしくは160の配列を含むものから選択される1つ以上のガイドRNAによってガイドされ；修飾はCBLBに対するものであり、CRISPR-Casシステムは、配列番号164、165、もしくは166の配列を含むものから選択される1つ以上のガイドRNAによってガイドされ；修飾はTRIM29に対するものであり、CRISPR-Casシステムは、配列番号167、168、もしくは169の配列を含むものから選択される1つ以上のガイドRNAによってガイドされ；および／または修飾はSOCS2に対するものであり、CRISPR-Casシステムは、配列番号171、172、もしくは173の配列を含むものから選択される1つ以上のガイドRNAによってガイドされる。

20

30

40

【0139】

いくつかの実施形態では、遺伝子修飾（複数可）は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（

50

ZFN)を用いて行われる。いくつかの実施形態では、遺伝子修飾(複数可)は、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)を用いて行われる。

【0140】

いくつかの実施形態では、遺伝子改変された免疫細胞は、修飾されていない免疫細胞と比較して、増加した細胞傷害性、増加した生存率、および／または増加した抗腫瘍サイトカイン放出プロファイルを示す。いくつかの実施形態では、遺伝子改変された免疫細胞は、細胞のドナーでない対象に投与された場合に、細胞に対する同種反応性を減少させるためにさらに遺伝子修飾されている。

【0141】

また、本明細書には、がん免疫療法のための混合集団が提供され、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、およびTCR δ から選択されるT細胞受容体(TCR)のサブユニットに対する少なくとも1つの修飾を介して実質的に非同種反応性であるT細胞集団を含み、それにより、TCRは、免疫細胞の混合集団が投与されたレシピエント対象のT細胞間で主要組織適合遺伝子複合体の差異を認識せず、T細胞集団は、腫瘍マーカーに対する指向性を有するキメラ抗原受容体(CAR)を発現するように操作され、腫瘍マーカーは、CD19、CD123、CD70、メソテリン、クラウジン6、BCMA、PD-L1、EGFR、およびそれらの組み合わせからなる群から選択され、ナチュラルキラー(NK)細胞集団は、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞傷害性シグナル伝達複合体を含むキメラ受容体を発現するように操作され、ならびに細胞外リガンド結合ドメインは、MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、ULBP5、およびULBP6からなる群から選択される腫瘍マーカーに対する指向性を有する。いくつかの実施形態では、修飾されたTCRサブユニットはTCR α である。

【0142】

いくつかの実施形態では、T細胞および／またはNK細胞は、それらが減少したレベルのMHC Iおよび／またはMHC II分子を発現し、それにより、NK細胞およびT細胞が同種異系であるレシピエント対象の免疫系からの減少した免疫応答を誘導するように修飾されている。いくつかの実施形態では、MHC Iおよび／またはMHC II分子は、ベーターミクログロブリンおよび／またはCIITA(クラスII主要組織適合性複合体トランスアクチベーター)である。いくつかの実施形態では、T細胞および／またはNK細胞は、T細胞および／またはNK細胞による少なくとも1つの免疫チェックポイントタンパク質の発現を破壊する修飾をさらに含む。実施形態に依存して、少なくとも1つの免疫チェックポイントタンパク質は、CTLA4、PD-1、リンパ球活性化遺伝子(LAG-3)、NKG2A受容体、KIR2DL-1、KIR2DL-2、KIR2DL-3、KIR2DS-1および／またはKIR2DA-2、ならびにそれらの組み合わせから選択される。

【0143】

いくつかの実施形態では、NK細胞および／またはT細胞は、CISの発現および／または機能を減少させるかまたは実質的に排除するようにさらに修飾されている。いくつかの実施形態では、NK細胞は、膜結合IL-15を発現するようにさらに操作されている。

【0144】

いくつかの実施形態では、T細胞により発現されるCARは、(i)抗CD19抗体断片を含む腫瘍結合ドメイン、(ii)CD8膜貫通ドメイン、および(iii)OX40共刺激サブドメインとCD3 ζ 共刺激サブドメインを含むシグナル伝達複合体を含む。いくつかの実施形態では、T細胞はまた、膜結合IL15を発現する。いくつかの実施形態では、mbIL15は、CARをコードする同じポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、抗CD19抗体は、一本鎖可変断片(scFv)の可変重鎖(VH)ドメインおよびscFvの可変軽鎖(VL)ドメインを含む。いくつかのこのような実施形態では、VHドメインは、配列番号120のアミノ酸配列を含むか、それからなるか、または本質的にそれからなる。いくつかの実施形態では、コードされたVLドメ

インは、配列番号 118 のアミノ酸配列を含むか、それからなるか、または本質的にそれからなる。一部の実施形態では、OX40 サブドメインは、配列番号 5 と少なくとも 80 %、85 %、90 %、または 95 % の配列同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、CD3 ゼータサブドメインは、配列番号 7 と少なくとも 80 %、85 %、90 %、または 95 % の配列同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、mbIL15 は、配列番号 11 と少なくとも 80 %、85 %、90 %、または 95 % の配列同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、T 細胞により発現される CAR は、配列番号 178 または 901 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80 %、85 %、90 %、または 95 % の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、NK 細胞により発現されるキメラ受容体は、(i) NKG2D リガンド結合ドメイン、(ii) CD8 膜貫通ドメイン、および (iii) OX40 共刺激サブドメインと CD3 z 共刺激サブドメインを含むシグナル伝達複合体を含む。いくつかの実施形態では、NK 細胞は、膜結合 IL15 (キメラ受容体をコードする同じポリヌクレオチドによってコードされてもよい) を発現するようにさらに操作されている。いくつかの実施形態では、キメラ受容体は、配列番号 145 と少なくとも 80 %、85 %、90 %、または 95 % の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、キメラ受容体は、配列番号 174 または 899 と少なくとも 80 %、85 %、90 %、または 95 % の配列同一性を有する。

10

【0145】

いくつかの実施形態では、TCR への修飾により、T 細胞集団の少なくとも 80 % が検出可能なレベルの TCR を発現しなくなるが、T 細胞集団の少なくとも 70 % が検出可能なレベルの CAR を発現する。いくつかの実施形態では、T 細胞および／または NK 細胞は、B2M 表面タンパク質、CISH 遺伝子によってコードされるサイトカイン誘導性 SH2 含有タンパク質 (CIS)、形質転換増殖因子ベータ受容体、ナチュラルキラーグループ 2、メンバー A (NKG2A) 受容体、CBLB 遺伝子によってコードされる Cbl プロトオンコジーン B タンパク質、TRIM29 遺伝子によってコードされる三要素モチーフ含有タンパク質 29 タンパク質、T 細胞および／または NK 細胞による SOCS2 遺伝子によってコードされるサイトカインシグナル伝達 2 タンパク質の抑制因子のうちの 1 つ以上の発現を減少させるようにさらに修飾されている。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、これらの標的タンパク質のいずれかの発現を、約 30 %、約 40 %、約 50 %、約 60 %、約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、約 95 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99 %、またはそれ以上 (列挙されたものの間の任意の量を含む) 減少させることができる。いくつかの実施形態では、標的タンパク質の発現が検出できないように、遺伝子を完全にノックアウトする。いくつかの実施形態では、標的タンパク質発現は、約 30 %、約 40 %、約 50 %、約 60 %、約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、約 95 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、またはそれ以上 (列挙されたものの間の任意の量を含む) 増大し得る。例えば、いくつかの実施形態では、T 細胞および／または NK 細胞は、CD47 を発現するようにさらに遺伝子編集されている。いくつかの実施形態では、NK 細胞は、HLA-E を発現するようにさらに遺伝子操作されている。ノックインされる任意の遺伝子は、ノックアウトするかまたは代わりに破壊された遺伝子のいずれかと組み合わせてノックインすることができる。

20

30

40

【0146】

いくつかの実施形態では、TCR への修飾 (複数可)、または NK 細胞もしくは T 細胞のさらなる修飾は、CRISPR-Cas システムを用いて行われる。いくつかの実施形態では、CRISPR-Cas システムは、Cas9、Csn2、Cas4、Cpf1、C2c1、C2c3、Cas13a、Cas13b、Cas13c、およびそれらの組み合わせから選択される Cas を含む。いくつかの実施形態では、Cas は Cas9 である。いくつかの実施形態では、CRISPR-Cas システムは、Cas3、Cas8a、Cas5、Cas8b、Cas8c、Cas10d、Cse1、Cse2、Csy1、Csy2、Csy3、GSU0054、Cas10、Csm2、Cmr5、Cas10、C

50

s x 1 1、C s x 1 0、C s f 1、およびそれらの組み合わせから選択されるC a sを含む。一部の実施形態では、T C Rへの修飾（複数可）、またはN K細胞もしくはT細胞のさらなる修飾は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（Z F N）を用いて行われる。いくつかの実施形態では、T C Rへの修飾（複数可）、またはN K細胞もしくはT細胞のさらなる修飾は、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ（T A L E N）を用いて行われる。

【0147】

また、本明細書には、がん免疫療法のための免疫細胞の混合集団が提供され、T細胞受容体（T C R）のサブユニットへの少なくとも1つの修飾に起因して実質的に非同種反応性であるT細胞集団であって、それにより、非同種反応性T細胞は、レシピエント対象の細胞に対して同種反応性作用を示さず、T細胞集団は、C D 1 9、C D 1 2 3、C D 7 0、メソテリン、クラウジン6、B C M A、P D - L 1、E G F R、およびそれらの組み合わせから選択される腫瘍マーカーに対する指向性を有するキメラ抗原受容体（C A R）を発現するように操作されているT細胞集団と、ナチュラルキラー（N K）細胞集団であって、N K細胞集団は、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞傷害性シグナル伝達複合体を含むキメラ受容体を発現するように操作され、細胞外リガンド結合ドメインは、M I C A、M I C B、U L B P 1、U L B P 2、U L B P 3、U L B P 4、U L B P 5、およびU L B P 6からなる群から選択される腫瘍マーカーに対する指向性を有するN K細胞集団とを含む。

10

【0148】

また、本明細書には、本開示による免疫細胞の混合集団を対象に投与することを含む、移植片対宿主疾患を誘導することなく対象においてがんを処置する方法が提供される。本明細書には、がんの処置における本開示による免疫細胞の混合集団の使用が提供される。本明細書には、がんを処置するための医薬の製造における本開示による免疫細胞の混合集団の使用が提供される。

20

【0149】

いくつかの実施形態では、免疫細胞の混合集団の少なくとも第1の用量を対象に投与することを含む、対象におけるがんを治療するための方法が提供され、細胞の混合集団は、C D 1 9、C D 1 2 3、C D 7 0、H e r 2、メソテリン、クラウジン6、B C M A、P D - L 1、E G F R、およびそれらの組み合わせから選択される腫瘍マーカーに対する指向性を有するキメラ抗原受容体（C A R）を発現するように操作された実質的に非同種反応性のT細胞集団、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞傷害性シグナル伝達複合体を含むキメラ受容体を発現するように操作されたナチュラルキラー（N K）細胞集団とを含み、細胞外リガンド結合ドメインは、M I C A、M I C B、U L B P 1、U L B P 2、U L B P 3、U L B P 4、U L B P 5、およびU L B P 6からなる群から選択される腫瘍マーカーに対する指向性を有する。

30

【0150】

いくつかの実施形態では、非同種反応性T細胞は、非同種反応性T細胞がレシピエント対象の細胞に対して同種反応性作用を示さないように、T細胞受容体（T C R）のサブユニットへの少なくとも1つの修飾を含む。いくつかの実施形態では、T細胞によって発現されるC A Rは、C D 1 9に対する指向性を有する。いくつかの実施形態では、T細胞により発現されるC A Rは、（i）抗C D 1 9抗体断片を含む腫瘍結合ドメイン、（i i）C D 8 膜貫通ドメイン、および（i i i）O X 4 0 共刺激サブドメインとC D 3 z 共刺激サブドメインを含むシグナル伝達複合体を含む。いくつかの実施形態では、C A Rをコードするポリヌクレオチドはまた、膜結合I L 1 5をコードする。いくつかの実施形態では、抗C D 1 9抗体は、一本鎖可変断片（s c F v）の可変重鎖（V H）ドメインおよびs c F vの可変軽鎖（V L）ドメインを含む。いくつかの実施形態では、V Hドメインは、配列番号1 2 0のアミノ酸配列を含むか、それからなるか、または本質的にそれからなり、V Lドメインは、配列番号1 1 8のアミノ酸配列を含むか、それからなる、または本質的にそれからなる。いくつかの実施形態では、T細胞により発現されるC A Rは、配列番

40

50

号178または901に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、または95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、NK細胞によって発現されるキメラ受容体は、(i) NKG2Dリガンド結合ドメイン、(ii) CD8膜貫通ドメイン、および(iii) OX40共刺激サブドメインとCD3ζ共刺激サブドメインを含むシグナル伝達複合体を含む。いくつかの実施形態では、キメラ受容体をコードするポリヌクレオチドはまた、膜結合IL15をコードする。いくつかの実施形態では、キメラ受容体は、配列番号145と少なくとも80%、85%、90%、または95%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、キメラ受容体は、配列番号174または899と少なくとも95%80%、85%、90%、または95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、CARおよび／またはキメラ受容体のOX40サブドメインは、配列番号5と少なくとも80%、85%、90%、または95%の配列同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、CARおよび／またはキメラ受容体のCD3ゼータサブドメインは、配列番号7と少なくとも80%、85%、90%、または95%の配列同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、T細胞および／またはNK細胞によって発現されるmblIL15は、配列番号11と少なくとも80%、85%、90%、または95%の配列同一性を有する配列によってコードされる。

10

【0151】

いくつかの実施形態では、免疫細胞によって発現される細胞傷害性受容体は、CD19を標的とし、配列番号179、181、183、185、187、189、191、193、195、および／または197に示される核酸配列と少なくとも80%、85%、90%、または95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、免疫細胞により発現されるCARは、CD19を標的とし、配列番号180、182、184、186、188、190、192、194、196、198、および／または900～911のいずれかに記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、または95%の配列同一性を有する。

20

【0152】

いくつかの実施形態では、がん免疫療法のための免疫細胞の混合集団が提供され、混合集団は、腫瘍抗原に対する指向性を有するCARを発現するT細胞集団であって、T細胞が実質的に非同種反応性であるように遺伝子修飾されたT細胞集団と、同じ腫瘍抗原に対する指向性を有するCARを発現するNK細胞集団とを含む。いくつかの実施形態では、がん免疫療法のための免疫細胞の混合集団が提供され、混合集団は、腫瘍抗原に対する指向性を有するCARを発現するT細胞集団であって、T細胞が実質的に非同種反応性であるように遺伝子修飾されたT細胞集団と、さらなる腫瘍抗原に対する指向性を有するCARを発現するNK細胞集団とを含む。いくつかの実施形態では、がん免疫療法のための免疫細胞の混合集団が提供され、混合集団は、実質的に非同種反応性であるT細胞集団と、腫瘍リガンドを標的化するキメラ受容体を発現するNK細胞集団とを含む。

30

【0153】

いくつかの実施形態では、非同種反応性T細胞は、T細胞受容体(TCR)のサブユニットへの少なくとも1つの修飾を含み、それにより、TCRは、免疫細胞の混合集団が投与された対象のT細胞間で主要組織適合性複合体の差異を認識することなく抗原を認識する。いくつかの実施形態では、非同種反応性T細胞集団は、腫瘍マーカー(例えば、腫瘍関連抗原または腫瘍抗原)に対する指向性を有するキメラ抗原受容体(CAR)を発現するように操作されている。実施形態に依存して、CARは、CD19、CD123、CD70、Her2、メソテリン、クラウジン6(ただし、他のクラウジンではない)、BCMA、PD-L1、EGFRのうちの1つ以上を標的化するように操作することができる。

40

【0154】

いくつかの実施形態では、NK細胞集団は、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞傷害性シグナル伝達複合体を含むキメラ受容体を発現するように操作され、細

50

胞外リガンド結合ドメインは、MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、ULBP5、およびULBP6からなる群から選択される腫瘍マーカーに対する指向性を有する。いくつかの実施形態では、NK細胞はまた、CARを発現するように操作され得、CARは、CD19、CD123、CD70、Her2、メソテリン、クラウジン6（ただし、他のクラウジンではない）、BCMA、PD-L1、EGFR（またはT細胞とNK細胞の両方が目的の同じ抗原を標的化するような任意の他の抗原）のうちの1つ以上を標的化するように操作され得る。

【0155】

いくつかの実施形態では、T細胞は、T細胞による少なくとも1つの免疫チェックポイントタンパク質の発現を破壊する突然変異を含む。例えば、T細胞は、CTLA4、PD-1およびそれらの組み合わせから選択される免疫チェックポイントタンパク質に関して突然変異され得る。いくつかの実施形態では、CTLA4へのB7-1/B7-2の遮断はまた、不活性状態に維持されているT細胞を減少させるために使用される。したがって、いくつかの実施形態では、T細胞は、それらがミスマッチしたかまたは突然変異したCTLA4を発現するように改変されるが、いくつかの実施形態では、外因性物質を用いて、例えば、抗原提示細胞に結合し、および／または代わりに抗原提示細胞上のB7-1/B7-2のCTLA4と相互作用する能力を阻害することができる。同様に、いくつかの実施形態では、NK細胞を修飾して、少なくとも1つのチェックポイント阻害剤の発現を破壊することができる。いくつかの実施形態では、例えば、CDTLA4またはPD-1は、このようなチェックポイント阻害剤のNK細胞傷害性応答を減少させる能力を低下させるために修飾され、例えば、突然変異される。いくつかの実施形態では、リンパ球活性化遺伝子3（LAG-3、CD223）は、NK細胞（および／またはT細胞）において破壊される。いくつかの実施形態では、阻害NKG2A受容体は、例えば、抗体によって突然変異されるか、ノックアウトされるか、または阻害される。モノリズマブは、非限定的な例として、いくつかの実施形態では、NKG2A受容体による阻害シグナル伝達を破壊するために使用される。いくつかの実施形態では、NK細胞上の1つ以上のキラー阻害受容体（KIR）は、（例えば、遺伝子修飾を介して）破壊されおよび／または遮断される。例えば、いくつかの実施形態では、KIR2DL-1、KIR2DL-2、KIR2DL-3、KIR2DS-1および／またはKIR2DA-2のうちの1つ以上は、破壊されるかまたは遮断され、それによってHLA-C MHC分子へのそれらの結合を妨げる。さらに、いくつかの実施形態では、TIM3は、修飾され、突然変異され（例えば、遺伝子編集を介して）、または代わりに機能的に破壊されて（例えば、抗体によって遮断されて）、それにより、リガンド結合時の免疫細胞の応答を抑制するその正常な機能が破壊される。いくつかのこのような実施形態では、TIM3の発現または機能の破壊（例えば、CRISPRまたは本明細書に開示される他の方法による）、適宜1つ以上の免疫チェックポイントモジュレーターの破壊と組み合わせて、投与されたT細胞および／またはNK細胞は増大した抗腫瘍活性を有する。Tim-3はガレクチン-9分泌に関与し、後者はナチュラルキラー（NK）細胞を含む細胞傷害性リンパ系細胞の抗がん活性を損なうように機能する。TIM3はまた可溶性形態で発現され、インターロイキン-2（IL-2）の分泌を妨げる。したがって、いくつかの実施形態では、TIM3、発現、分泌、または経路機能性の破壊は、T細胞および／またはNK細胞活性の増大を提供する。

【0156】

いくつかの実施形態では、TIGIT（VSTM3とも呼ばれる）は、修飾され、突然変異され（例えば、遺伝子編集を介して）、または代わりに機能的に破壊され（例えば、抗体によって遮断される）、それにより、リガンド結合時の免疫細胞の応答を抑制するその正常な機能が破壊される。CD155はTIGITのリガンドである。いくつかの実施形態では、TIGIT発現は、減少するかまたはノックアウトされる。いくつかの実施形態では、TIGITは、非活性化リガンドによって遮断されるか、またはその活性が、CD155の競合的阻害剤を介して減少する（その阻害剤はTIGITを活性化しない）。TIGITは、阻害ITIMモチーフを含み、いくつかの実施形態では、例えば、CR

10

20

30

40

50

ISPRを用いた遺伝子編集、または本明細書に開示された他の方法を介して切り出される。このような実施形態では、TIGITの機能は減少し、T細胞および／またはNK細胞活性の増大を可能にする。

【0157】

いくつかの実施形態では、アデノシン受容体A1は、修飾され、突然変異され（例えば、遺伝子編集を介して）、または代わりに機能的に破壊され（例えば、抗体によって遮断される）、それにより、リガンド結合時の免疫細胞の応答を抑制するその正常な機能が破壊される。アデノシンシグナル伝達は、免疫抑制代謝産物としてその機能の結果として、腫瘍免疫に関与する。したがって、いくつかの実施形態では、アデノシン受容体A1発現は、減少するかまたはノックアウトされる。いくつかの実施形態では、アデノシン受容体A1は、非活性化リガンドによって遮断されるか、またはその活性が、アデノシンの競合的阻害剤を介して減少する（その阻害剤は、アデノシンシグナル伝達経路を活性化しない）。いくつかの実施形態では、アデノシン受容体は、例えば、CRISPRを用いた遺伝子編集、または本明細書に開示される他の方法によって修飾され、その機能または発現を減少させ、T細胞および／またはNK細胞活性の増大を可能にする。

10

【0158】

いくつかの実施形態では、修飾されたTCRサブユニットは、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、およびTCR δ から選択される。いくつかの実施形態では、修飾されたTCRサブユニットはTCR α である。

【0159】

いくつかの実施形態では、TCRへの修飾は、CRISPR-Casシステムを使用して行われる。いくつかの実施形態では、T細胞またはNK細胞による少なくとも1つの免疫チェックポイントタンパク質の発現の破壊は、CRISPR-Casシステムを用いて行われる。例えば、Casは、Cas9、Csn2、Cas4、Cpf1、C2c1、C2c3、Cas13a、Cas13b、Cas13c、およびそれらの組み合わせから選択され得る。いくつかの実施形態では、CasはCas9である。いくつかの実施形態では、CRISPR-Casシステムは、Cas3、Cas8a、Cas5、Cas8b、Cas8c、Cas10d、Cse1、Cse2、Csy1、Csy2、Csy3、GSU0054、Cas10、Csm2、Cmr5、Cas10、Csx11、Csx10、Csfl、およびそれらの組み合わせから選択されるCasを含む。

20

30

【0160】

いくつかの実施形態では、TCRへの修飾は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）を用いて行われる。いくつかの実施形態では、T細胞またはNK細胞による少なくとも1つの免疫チェックポイントタンパク質の発現の破壊は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）を用いて行われる。いくつかの実施形態では、TCRへの修飾は、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）を用いて行われる。いくつかの実施形態では、T細胞またはNK細胞による少なくとも1つの免疫チェックポイントタンパク質の発現の破壊は、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）を用いて行われる。ZFNおよびTALEN（および適宜CRISPR-Cas）の組み合わせは、いくつかの実施形態では、NK細胞およびT細胞のいずれかまたはその両方を修飾するために使用される。

40

【0161】

いくつかの実施形態によれば、NK細胞、非同種反応性T細胞のいずれか、またはその両方は、膜結合IL-15を発現するようにさらに操作されている。

【0162】

有利には、混合細胞集団は、本明細書に提供される方法において有用であり、対象におけるがんは、移植片対宿主疾患を誘導することなく処置することができる。いくつかの実施形態では、方法は、CARを発現する非同種反応性T細胞とキメラ受容体を発現する操作されたNK細胞の混合集団を対象に投与することを含む。また、がんの処置において、および／またはがんの処置のための薬剤の製造において、CARを発現する非同種反応性

50

T細胞とキメラ受容体を発現する操作されたNK細胞の混合集団の使用が提供される。なおさらなる実施形態では、NK細胞およびT細胞は、それらを受け取る対象に関して同種異系である。いくつかの実施形態では、このような組み合わせは、同じ標的抗原に対する指向性を有するNK細胞およびT細胞を伴う。例えば、いくつかの実施形態では、NK細胞とT細胞（例えば、非同種反応性T細胞）の両方は、それらを受け取る対象に関して同種異系であり、同じ抗原、例えば、CD19を標的化するCARを発現するように操作されている。一部の実施形態では、NK細胞およびT細胞は、別のマーカー、例えば、CD123、CD70、Her2、メソテリン、クラウジン6（ただし、他のクラウジンではない）、BCMA、PD-L1、EGFR（またはT細胞とNK細胞の両方が目的の同じ抗原を標的化するような任意の他の抗原）を発現する標的細胞の両方に構成される。

10

【0163】

いくつかの実施形態では、TCRへの修飾により、T細胞集団の少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%が検出可能なレベルのTCRを発現しなくなり、一方、同時にT細胞集団の少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、または少なくとも75%がCARの検出可能なレベルを発現する。したがって、これらの細胞は、主として非同種反応性であり、抗腫瘍指向性CARで作動可能化される。さらに、いくつかの実施形態では、同種異系T細胞からの免疫反応を制限するのに役立ち、少なくとも50%の操作されたT細胞は、検出可能なレベルのCARを発現し、検出可能なレベルのTCR表面タンパク質またはB2M表面タンパク質を発現しない。

20

【0164】

いくつかの実施形態では、NK細胞は、非自己NK細胞に対して同種異系宿主が発生し得る免疫応答を減少させるように遺伝子修飾されている。いくつかの実施形態では、NK細胞は、それらが1つ以上のMCHクラスIおよび／または1つ以上のMHCクラスII分子の減少した発現を示すように操作されている。いくつかの実施形態では、ベーターミクログロブリンの発現は、CD19（または本明細書に開示される任意の他の抗原）などの腫瘍抗原に対する指向性を有するCARを発現する（または発現するように修飾されている）NK細胞の少なくとも一部において、実質的に、有意に、または完全に減少する。いくつかの実施形態では、CIITA（クラスII主要組織適合性複合体トランスアクチベーター）の発現は、CD19（または本明細書に開示される任意の他の抗原）などの腫瘍抗原に対する指向性を有するCARを発現する（または発現するように修飾されている）NK細胞の少なくとも一部において、実質的に、有意に、または完全に減少する。いくつかの実施形態では、このような遺伝子修飾されたNK細胞は、CRISPR-Casシステム、TALEN、ジンクフィンガー、RNAiまたは他の遺伝子編集技術を用いて生成される。本明細書で検討されるように、いくつかの実施形態では、同種異系性が減少したNK細胞は、非同種反応性T細胞と組み合わせて使用される。いくつかの実施形態では、NK細胞は、修飾されたNK細胞において、レシピエントの内因性先天性免疫細胞による検出を回避するのに役立つCD47を発現するように修飾されている。いくつかの実施形態では、T細胞は同様の様式で修飾されている。いくつかの実施形態では、NK細胞とT細胞の両方は、レシピエントにおけるNKおよび／またはT細胞の持続性に役立ち、したがって、抗腫瘍効果を増大させるCD47を発現するように修飾されている。いくつかの実施形態では、NK細胞は、修飾されたNK細胞において、レシピエントの内因性先天性免疫細胞による検出を回避するのに役立つHLA-Gを発現するように修飾されている。いくつかの実施形態では、T細胞は同様の様式で修飾されている。いくつかの実施形態では、NK細胞とT細胞の両方は、レシピエントにおけるNKおよび／またはT細胞の持続性に役立ち、したがって、抗腫瘍効果を増大させるHLA-Gを発現するように修飾されている。いくつかの実施形態では、同種反応性が減少し、同じ抗原に対してCARを発現するように操作されたT細胞およびNK細胞は、同種異系患者におけるがんを処置するために使用される。

30

40

【0165】

50

いくつかの実施形態では、がん免疫療法のための遺伝子改変された免疫細胞集団が提供され、免疫細胞による形質転換増殖因子ベータ受容体の発現を減少させるように遺伝子修飾され、標的腫瘍細胞上に存在する腫瘍マーカーに対する指向性を有するキメラ抗原受容体（CAR）を発現するように遺伝子操作された免疫細胞集団を含む。さらなる実施形態では、がん免疫療法のための遺伝子改変された免疫細胞集団が提供され、免疫細胞によりナチュラルキラーグループ2、メンバーA（NKG2A）受容体の発現を減少させるように遺伝子修飾され、標的腫瘍細胞上に存在する腫瘍マーカーに対する指向性を有するキメラ抗原受容体（CAR）を発現するように遺伝子操作された免疫細胞集団を含む。さらなる実施形態では、がん免疫療法のための遺伝子改変された免疫細胞集団が提供され、免疫細胞によるCISH遺伝子によってコードされるサイトカイン誘導性SH2含有タンパク質の発現を減少させるように遺伝子修飾され、標的腫瘍細胞上に存在する腫瘍マーカーに対する指向性を有するキメラ抗原受容体（CAR）を発現するように遺伝子操作された免疫細胞集団を含む。CISHは、NK細胞媒介性細胞傷害性における阻害チェックポイントである。さらなる実施形態では、がん免疫療法のための遺伝子改変された免疫細胞集団が提供され、免疫細胞によるCBLB遺伝子によってコードされるCblプロトオンコジーンBタンパク質の発現を減少させるように遺伝子修飾され、標的腫瘍細胞上に存在する腫瘍マーカーに対する指向性を有するキメラ抗原受容体（CAR）を発現するように遺伝子操作された免疫細胞集団を含む。CBLBはE3ユビキチンリガーゼであり、NK細胞活性化の負の調節因子である。さらなる実施形態では、がん免疫療法のための遺伝子改変された免疫細胞集団が提供され、免疫細胞によりTRIM29遺伝子によってコードされる三要素モチーフ含有タンパク質29タンパク質の発現を減少させるように遺伝子修飾され、標的腫瘍細胞上に存在する腫瘍マーカーに対する指向性を有するキメラ抗原受容体（CAR）を発現するように遺伝子操作された免疫細胞集団を含む。TRIM29はE3ユビキチンリガーゼであり、活性化後のNK細胞機能の負の調節因子である。さらなる実施形態では、がん免疫療法のための遺伝子改変された免疫細胞集団が提供され、免疫細胞によりSOCS2遺伝子によってコードされるサイトカインシグナル伝達2タンパク質の抑制因子の発現を減少させるように遺伝子修飾され、標的腫瘍細胞上に存在する腫瘍マーカーに対する指向性を有するキメラ抗原受容体（CAR）を発現するように遺伝子操作された免疫細胞集団を含む。SOCS2はNK細胞機能の負の調節因子である。いくつかの実施形態では、遺伝子改変された免疫細胞集団は、NK細胞、T細胞、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、ガンマデルタT細胞、NK T細胞などのさらなる免疫細胞がまた含まれる。いくつかの実施形態では、CARは、CD19に対する指向性を有する。一部のこのような実施形態では、CARは、1つ以上のヒト化CDR配列を含む。さらなる実施形態では、CARは、CD123に対する指向性を有する。いくつかの実施形態では、遺伝子修飾された細胞は、1を超える標的に対する指向性を有する1を超えるCARを発現するように操作されている。場合により、T細胞およびNK細胞の混合集団が使用され、T細胞およびNK細胞は、各々、実施形態に依存して、同一のがんマーカーに対する指向性を有し得るかまたは指向性を有し得ない、少なくとも1つのCARを発現することができる。いくつかの実施形態では、細胞は、NKG2Dリガンドに対する指向性を有するCARを発現する。

10

20

30

40

50

【0166】

上記で検討したように、いくつかの実施形態では、細胞は、CRISPRに基づくアプローチを用いて編集されている。いくつかの実施形態では、修飾は、TGFB β 2に対するものであり、CRISPR-Casシステムは、配列番号147、148、149、150、151、もしくは152の配列、または配列番号147、148、149、150、151、もしくは152の配列を含む配列と少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の相同性を有する配列を含むものから選択される1つ以上のガイドRNAによってガイドされる。いくつかの実施形態では、修飾は、NKG2Aに対するものであり、CRISPR-Cas系は、配列番号158、159、もしくは

160の配列、または配列番号158、159、もしくは160の配列を含む配列と少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の相同性を有する配列を含むものから選択される1つ以上のガイドRNAによってガイドされる。いくつかの実施形態では、修飾は、CISHに対するものであり、CRISPR-Casシステムは、配列番号153、154、155、156、もしくは157の配列、または配列番号153、154、155、156、もしくは157の配列を含む配列と少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の相同性を有する配列を含むものから選択される1つ以上のガイドRNAによってガイドされる。いくつかの実施形態では、修飾は、CBLBに対するものであり、CRISPR-Casシステムは、配列番号164、165もしくは166の配列、または配列番号164、165、もしくは166の配列を含む配列と少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の相同性を有する配列を含むものから選択される1つ以上のガイドRNAによってガイドされる。いくつかの実施形態では、修飾はTRIM29に対するものであり、CRISPR-Casシステムは、配列番号167、168、もしくは169の配列、または配列番号167、168、もしくは169の配列を含む配列と少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の相同性を有する配列を含むものから選択される1つ以上のガイドRNAによってガイドされる。いくつかの実施形態では、修飾はSOCS2に対するものであり、CRISPR-Casシステムは、配列番号171、172、もしくは173の配列、または配列番号171、172、もしくは173の配列を含む配列と少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の相同性を有する配列を含むものから選択される1つ以上のガイドRNAによってガイドされる。一部の実施形態では、ガイドRNAは、長さが1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99または100ヌクレオチドである。

10

20

30

40

50

【0167】

いくつかの実施形態では、同種移植に適した操作されたT細胞を生成する方法が提供され、方法は、T細胞に、RNAガイドヌクレアーゼ、T細胞受容体遺伝子を標的化するgRNA、およびCARをコードする核酸を含むドナー鋳型を含むベクターを含み、CARは、(i)抗CD19抗体断片を含む腫瘍結合ドメイン、(ii)CD8膜貫通ドメイン、および(iii)OX40共刺激サブドメインとCD3z共刺激サブドメインを含むシグナル伝達複合体、および(iv)膜結合IL15を含み、CARをコードする核酸は、左右の相同アームによってT細胞受容体遺伝子座に隣接され、(b)培養において操作されたT細胞を拡大する。

【0168】

また、同種移植に適した操作されたT細胞についてのさらなる方法が提供され、方法は、TCRの少なくとも1つのサブユニットの発現を破壊するために、RNAガイドヌクレアーゼ、およびT細胞受容体遺伝子を標的化するgRNAをT細胞にデリバリーし、CARをコードする核酸を含む核酸ベクターをT細胞にデリバリーし、CARは、(i)抗CD19抗体断片を含む腫瘍結合ドメイン、(ii)CD8膜貫通ドメイン、および(iii)OX40共刺激サブドメインとCD3z共刺激サブドメインを含むシグナル伝達複

体、および (i v) 膜結合 I L 1 5 を含み、培養において操作された T 細胞を拡大することを含む。

【0169】

さらに、方法、例えば、同種移植に適した操作された T 細胞を生成する方法が提供され、方法は、T C R の少なくとも 1 つのサブユニットの発現を破壊するために、T 細胞受容体遺伝子の標的領域において標的化された二本鎖 D N A 切断を誘導することができるヌクレアーゼを T 細胞にデリバリーし、C A R をコードする核酸を含むベクターを T 細胞にデリバリーし、C A R は、(i) C D 1 9、C D 1 2 3、C D 7 0、H e r 2、メソテリン、クラウジン 6、B C M A、P D - L 1、および E G F R のうちの 1 つ以上を認識する抗体断片を含む腫瘍結合ドメイン、(i i) C D 8 膜貫通ドメイン、および (i i i) O X 4 0 共刺激サブドメインと C D 3 z 共刺激サブドメインを含むシグナル伝達複合体、ならびに (i v) 膜結合 I L 1 5 を含み、培養において操作された T 細胞を拡大することを含む。いくつかの実施形態では、本方法は、免疫チェックポイントタンパク質をコードする少なくとも第 1 の遺伝子を不活性化することによって、T 細胞を修飾することをさらに含む。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイント遺伝子は、P D 1、C T L A - 4、L A G 3、T i m 3、B T L A、B Y 5 5、T I G I T、B 7 H 5、L A I R 1、S I G L E C 1 0、および 2 B 4 からなる群から選択される。

10

【0170】

がんを処置する方法が提供され、方法は、本明細書に開示される実施形態に従い、同種異系移植に適した T 細胞を生成し、T 細胞はドナー由来であり、同じドナーから拡大させた N K 細胞集団に形質導入して、M I C A、M I C B、U L B P 1、U L B P 2、U L B P 3、U L B P 4、U L B P 5、および U L B P 6 からなる群から選択される腫瘍マーカーに対する指向性を有する細胞外リガンド結合ドメインを含む活性化キメラ受容体を発現させ、操作された N K 細胞集団を生成し、T 細胞および／または操作された N K 細胞集団をさらに拡大してもよく、同種異系移植に適した T 細胞を操作された N K 細胞集団と組み合わせ、合わせた N K 細胞および T 細胞集団を、ドナーに関して同種異系である対象に投与することを含む。

20

【0171】

がんを処置する方法が提供され、方法は、本明細書に開示される実施形態に従い、同種異系移植に適した T 細胞を生成し、T 細胞はドナー由来であり、C D 1 9、C D 1 2 3、C D 7 0、H e r 2、メソテリン、クラウジン 6 (ただし、他のクラウジンではない)、B C M A、P D - L 1、または E G F R に対する指向性を有する C A R を発現するように修飾され、同じドナーから拡大させた N K 細胞集団に形質導入して、C D 1 9、C D 1 2 3、C D 7 0、H e r 2、メソテリン、クラウジン 6 (ただし、他のクラウジンではない)、B C M A、P D - L 1、または E G F R に対する指向性を有する C A R を発現させ、操作された N K 細胞集団を生成し、T 細胞および／または操作された N K 細胞集団をさらに拡大してもよく、同種異系移植に適した T 細胞を操作された N K 細胞集団と組み合わせ、合わせた N K 細胞および T 細胞集団を、ドナーに関して同種異系である対象に投与することを含む。

30

【0172】

がんの対象を処置するためのさらなる方法もまた提供され、方法は、本明細書に開示される実施形態に従い、同種異系移植に適した T 細胞を生成し、T 細胞は第 1 のドナー由来であり、第 2 のドナーから拡大させた N K 細胞集団に形質導入して、M I C A、M I C B、U L B P 1、U L B P 2、U L B P 3、U L B P 4、U L B P 5、および U L B P 6 からなる群から選択される腫瘍マーカーに対する指向性を有する細胞外リガンド結合ドメインを含む活性化キメラ受容体を発現させ、操作された N K 細胞集団を生成し、T 細胞および／または操作された N K 細胞集団をさらに拡大してもよく、同種異系移植に適した T 細胞を操作された N K 細胞集団と組み合わせ、合わせた N K 細胞および T 細胞集団を、第 1 および第 2 のドナーに関して同種異系である対象に投与することを含む。

40

【0173】

50

いくつかの実施形態では、本明細書には、C D 1 9 指向性キメラ受容体を発現する免疫細胞、およびさらには免疫細胞集団が提供され、キメラ受容体は、細胞外抗 C D 1 9 結合部分、ヒンジおよび／または膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。また、本明細書には、C D 1 9 指向性キメラ抗原受容体、細胞外抗 C D 1 9 結合部分、ヒンジおよび／または膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド（ならびに、これを用いて細胞をトランスフェクトするためのベクター）が提供される。

【0174】

また、本明細書には、いくつかの実施形態では、C D 1 9 指向性キメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドが提供され、キメラ抗原受容体は、細胞外抗 C D 1 9 結合部分を含み、抗 C D 1 9 結合部分は、s c F v、ヒンジ、ヒンジは C D 8 アルファヒンジであり、膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメイン、細胞内シグナル伝達ドメインは C D 3 ゼータ I T A M を含む、を含む。

10

【0175】

本明細書には、いくつかの実施形態では、C D 1 9 指向性キメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドが提供され、キメラ抗原受容体は細胞外抗 C D 1 9 結合部分、抗 C D 1 9 結合部分は、s c F v の可変重鎖または s c F v の可変軽鎖を含み、ヒンジは C D 8 アルファヒンジであり、膜貫通ドメイン、膜貫通ドメインは C D 8 アルファ膜貫通ドメインを含み、細胞内シグナル伝達ドメイン、細胞内シグナル伝達ドメインは C D 3 ゼータ I T A M を含む、を含む。

20

【0176】

いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは C D 8 アルファ膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは N K G 2 D 膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは C D 2 8 膜貫通ドメインを含む。

【0177】

いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、C D 2 8 シグナル伝達ドメインを含むかまたはそれをさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、4-1 B B シグナル伝達ドメインを含むかまたはそれをさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、O X 4 0 ドメインを含むかまたはさらにそれを含む。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、4-1 B B シグナル伝達ドメインを含むかまたはそれをさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、I C O S、C D 7 0、C D 1 6 1、C D 4 0 L、C D 4 4、およびそれらの組み合わせから選択されるドメインを含むかまたはそれをさらに含む。

30

【0178】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドはまた、切断された上皮細胞増殖因子受容体（E G F R t）をコードする。いくつかの実施形態では、E G F R t は、可溶性因子として細胞内で発現される。いくつかの実施形態では、E G F R t は膜結合形態で発現される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドはまた、膜結合インターロイキン-15（m b I L 1 5）をコードする。また、本明細書には、本明細書に開示されるポリヌクレオチドによってコードされる C D 1 9 指向性キメラ抗原受容体を発現する操作された免疫細胞（例えば、N K もしくは T 細胞、またはそれらの混合物）が提供される。さらに、本明細書に開示されるキメラ抗原受容体を発現する操作された免疫細胞を、がんを有する対象に投与することを含む、対象におけるがんを処置する方法が提供される。いくつかの実施形態では、がんの処置において、および／またはがんの処置のための薬剤の製造において、本明細書に開示されるポリヌクレオチドの使用が提供される。

40

【0179】

いくつかの実施形態では、抗 C D 1 9 結合部分は、重鎖可変（V H）ドメインおよび軽鎖可変（V L）ドメインを含む。いくつかの実施形態では、V H ドメインは、配列番号 3 3 に示される V H ドメインアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % の同一性を有する。いくつかの実施形態では、V L ドメインは、配列番号 3 2 に示される V L ドメインアミノ酸配列と

50

少なくとも95%の同一性を有する。いくつかの実施形態では、抗CD19結合部分は、配列番号33または32のVHおよび／またはVL配列に由来する。例えば、いくつかの実施形態では、配列番号33および／または32のVHおよびVL配列は、ヒト化キャンペーンの対象であり、したがって、ヒト対象に投与した場合、より容易に発現されおよび／またはより免疫原性が低い。いくつかの実施形態では、抗CD19結合部分は、CD19を標的化するscFvを含み、scFvは、配列番号35の配列または配列番号35と少なくとも95%同一の配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、抗CD19結合部分は、CD19を標的化するscFvを含み、scFvは、配列番号36の配列または配列番号36と少なくとも95%同一の配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、抗CD19結合部分は、第1、第2および第3の相補性決定領域を含む軽鎖CDR（それぞれ、LC CDR1、LC CDR2、およびLC CDR3）、ならびに／または第1、第2および第3の相補性決定領域を含む重鎖CDR（それぞれ、HC CDR1、HC CDR2、およびHC CDR3）を含む。実施形態に応じて、LC CDRおよびHC CDRの種々の組み合わせが使用される。例えば、一実施形態では、抗CD19結合部分は、LC CDR1、LC CDR3、HC CDR2、およびHC CDR3を含む。一部の実施形態では、他の組み合わせが使用される。いくつかの実施形態では、LC CDR1は、配列番号37の配列、または配列番号37の配列と少なくとも約95%相同な配列を含む。いくつかの実施形態では、LC CDR2は、配列番号38の配列、または配列番号38の配列と少なくとも約95%相同な配列を含む。いくつかの実施形態では、LC CDR3は、配列番号39の配列、または配列番号39の配列と少なくとも約95%相同な配列を含む。いくつかの実施形態では、HC CDR1は、配列番号40の配列、または配列番号40の配列と少なくとも約95%相同な配列を含む。いくつかの実施形態では、HC CDR2は、配列番号41、42、もしくは43の配列、または配列番号41、42、もしくは43の配列と少なくとも約95%相同な配列を含む。いくつかの実施形態では、HC CDR3は、配列番号44の配列、または配列番号44の配列と少なくとも約95%相同な配列を含む。

10

20

【0180】

いくつかの実施形態では、軽鎖可変領域（VL）および重鎖可変領域（HL）を含む抗CD19結合部分も提供され、VL領域は、第1、第2および第3の相補性決定領域（それぞれVL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3）を含み、VH領域は第1、第2および第3の相補性決定領域（それぞれVH CDR1、VH CDR2、およびVH CDR3）を含む。いくつかの実施形態では、VL領域は、配列番号45、46、47、もしくは48の配列、または配列番号45、46、47、もしくは48の配列と少なくとも約95%相同な配列を含む。いくつかの実施形態では、VH領域は、配列番号49、50、51もしくは52の配列、または配列番号49、50、51もしくは52の配列と少なくとも約95%相同な配列を含む。

30

【0181】

いくつかの実施形態では、第1、第2および第3の相補性決定領域を含む軽鎖CDR（それぞれ、LC CDR1、LC CDR2、およびLC CDR3）を含む抗CD19結合部分も提供される。いくつかの実施形態では、抗CD19結合部分は、第1、第2および第3の相補性決定領域を含む重鎖CDR（それぞれ、HC CDR1、HC CDR2、およびHC CDR3）をさらに含む。いくつかの実施形態では、LC CDR1は、配列番号53の配列、または配列番号53の配列と少なくとも約95%相同な配列を含む。いくつかの実施形態では、LC CDR2は、配列番号54の配列、または配列番号54の配列と少なくとも約95%相同な配列を含む。いくつかの実施形態では、LC CDR3は、配列番号55の配列、または配列番号55の配列と少なくとも約95%相同な配列を含む。いくつかの実施形態では、HC CDR1は、配列番号56の配列、または配列番号56の配列と少なくとも約95%相同な配列を含む。いくつかの実施形態では、HC CDR2は、配列番号57の配列、または配列番号57の配列と少なくとも約95%相同な配列を含む。いくつかの実施形態では、HC CDR3は、配列番号58の配列

40

50

、または配列番号 58 の配列と少なくとも約 95 % 相同な配列を含む。

【0182】

いくつかの実施形態では、キメラ受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、OX40 サブドメインを含む。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3 ゼータサブドメインをさらに含む。いくつかの実施形態では、OX40 サブドメインは、配列番号 6 のアミノ酸配列（または配列番号 6 の配列と少なくとも約 95 % 相同な配列）を含み、CD3 ゼータサブドメインは、配列番号 8 のアミノ酸配列（または配列番号 8 の配列と少なくとも約 95 % 相同な配列）を含む。

【0183】

いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、CD8a ヒンジドメインを含む。いくつかの実施形態では、CD8a ヒンジドメインは、配列番号 2 のアミノ酸配列（または配列番号 2 の配列と少なくとも約 95 % 相同な配列）を含む。

【0184】

いくつかの実施形態では、免疫細胞はまた、膜結合インターロイキン-15 (mbIL15) を発現する。いくつかの実施形態では、mbIL15 は、配列番号 12 のアミノ酸配列、または配列番号 12 の配列と少なくとも約 95 % 相同な配列を含む。

【0185】

いくつかの実施形態では、キメラ受容体は、NKG2D 受容体の細胞外ドメインをさらに含む。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、NKG2D 受容体の細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞傷害性シグナル伝達複合体、および適宜 mbIL15 を含む第 2 のキメラ受容体を発現する。いくつかの実施形態では、NKG2D 受容体の細胞外ドメインは、配列番号 26 のアミノ酸配列、または配列番号 26 の配列と少なくとも約 95 % 相同な配列を含む NKG2D の機能的断片を含む。種々の実施形態では、本明細書に開示されるキメラ抗原受容体および／またはキメラ受容体を発現するように操作されている免疫細胞は、NK 細胞である。いくつかの実施形態では、T 細胞が使用される。いくつかの実施形態では、NK および T 細胞（および／または他の免疫細胞）の組み合わせが使用される。

【0186】

いくつかの実施形態では、本明細書には、本明細書に開示される CD19 を標的化する操作された免疫細胞を対象に投与することを含む、対象におけるがんを処置する方法が提供される。また、本明細書には、がんの処置のために、本明細書に開示される CD19 を標的化する免疫細胞の使用が提供される。同様に、本明細書には、がんの処置のための薬剤の調製における、本明細書に開示される CD19 を標的化する免疫細胞の使用が提供される。いくつかの実施形態では、処置されるがんは、急性リンパ性白血病である。

【0187】

本明細書に記載される方法および組成物の一部の実施形態は、免疫細胞に関する。一部の実施形態では、免疫細胞は、細胞外抗 CD19 部分、ヒンジおよび／または膜貫通ドメイン、および／または細胞内シグナル伝達ドメインを含む CD19 指向性キメラ受容体を発現する。一部の実施形態では、免疫細胞は、ナチュラルキラー (NK) 細胞である。一部の実施形態では、免疫細胞は T 細胞である。

【0188】

一部の実施形態では、ヒンジドメインは、CD8a ヒンジドメインを含む。一部の実施形態では、ヒンジドメインは、Ig4 SHドメインを含む。

【0189】

一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、CD8a 膜貫通ドメインを含む。一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、CD28 膜貫通ドメインを含む。一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、CD3 膜貫通ドメインを含む。

【0190】

一部の実施形態では、シグナル伝達ドメインは、OX40 シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態では、シグナル伝達ドメインは、4-1BB シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態では、シグナル伝達ドメインは、CD28 シグナル伝達ドメインを含む。

10

20

30

40

50

む。一部の実施形態では、シグナル伝達ドメインは、NKp80シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態では、シグナル伝達ドメインは、CD16 ICシグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態では、シグナル伝達ドメインは、CD3ゼータまたはCD3ζ ITAMシグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態では、シグナル伝達ドメインは、mbIL-15シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態では、シグナル伝達ドメインは、2A切断ドメインを含む。一部の実施形態では、mIL-15シグナル伝達ドメインは、2A切断ドメインによって、CD19指向性キメラ受容体の残りまたは別の部分から分離される。

【0191】

一部の実施形態は、本明細書に記載される免疫細胞を、必要とする対象に投与することを含む方法に関する。一部の実施形態では、対象はがんを有する。一部の実施形態では、投与は、がんを処置し、阻害し、またはその進行を妨げる。

【図面の簡単な説明】

【0192】

【図1】図1は、腫瘍指向性キメラ抗原受容体の非限定的な例を示す。

【0193】

【図2】図2は、腫瘍指向性キメラ抗原受容体のさらなる非限定的な例を示す。

【0194】

【図3】図3は、腫瘍指向性キメラ抗原受容体のさらなる非限定的な例を示す。

【0195】

【図4】図4は、腫瘍指向性キメラ抗原受容体のさらなる非限定的な例を示す。

【0196】

【図5】図5は、腫瘍指向性キメラ抗原受容体のさらなる非限定的な例を示す。

【0197】

【図6-1】図6は、腫瘍マーカーの非限定的な例に対する指向性を有する腫瘍指向性キメラ抗原受容体の非限定的な例を示す。

【図6-2】同上。

【0198】

【図7】図7は、腫瘍マーカーの非限定的な例に対する指向性を有する腫瘍指向性キメラ抗原受容体のさらなる非限定的な例を示す。

【0199】

【図8-1】図8A~8Iは、本明細書に開示される遺伝子編集技術を介して改変される種々の経路を概略的に示す。図8Aは、腫瘍微小環境における腫瘍細胞によるTGF-β放出の阻害効果の概略図を示す。図8Bは、IL-15機能に対するCIS/CISHの負の調節経路の概略図を示す。図8Cは、本明細書に開示されるいくつかの実施形態による、併用療法において使用するための、操作された非同種反応性T細胞および操作されたNK細胞を生成するための非限定的な概略的プロセスの流れを示す。図8Dは、移植片対宿主病をもたらし得るシグナル伝達経路の概略図を示す。図8Eは、本明細書に開示されるいくつかの実施形態が、移植片対宿主病を減少および／または排除する方法の概略図を示す。図8Fは、宿主対移植片拒絶をもたらし得るシグナル伝達経路の概略図を示す。図8Gは、宿主対移植片拒絶を減少および／または排除することができる、本明細書に開示されるいくつかの実施形態の概略図を示す。図8Hは、編集された免疫細胞が、混合細胞産物中の他の編集された免疫細胞に対してどのように作用し得るかの概略図を示す。図8Iは、本明細書に開示されるいくつかの実施形態が、編集された免疫細胞に対する宿主免疫効果を減少および／または排除することができる方法の概略図を示す。

【図8-2】同上。

【図8-3】同上。

【図8-4】同上。

【図8-5】同上。

【図8-6】同上。

【図 8-7】 同上。

【図 8-8】 同上。

【図 8-9】 同上。

【0200】

【図 9-1】 図 9A~9G は、NK 細胞による TGFBR2 の発現を減少させるための種々のガイド RNA の使用に関するフローサイトメトリーデータを示す。図 9A は、対照データを示す。図 9B はガイド RNA 1 の使用から得られたデータを示し；図 9C はガイド RNA 2 の使用から得られたデータを示し；図 9D はガイド RNA 3 の使用から得られたデータを示し；図 9E はガイド RNA 1 およびガイド RNA 2 の使用から得られたデータを示し；図 9F はガイド RNA 1 およびガイド RNA 3 の使用から得られたデータを示し；図 9G はガイド RNA 2 およびガイド RNA 3 の使用から得られたデータを示す。発現は、指示されたガイド RNA を用いたエレクトロポレーションの 7 日後に評価された。

10

【図 9-2】 同上。

【図 9-3】 同上。

【図 9-4】 同上。

【図 9-5】 同上。

【図 9-6】 同上。

【図 9-7】 同上。

【0201】

【図 10-1】 図 10A~10G は、種々のガイド RNA によるエレクトロポレーションに応答する NK 細胞による TGFBR2 の発現の減少に関する次世代配列データを示す。図 10A は、対照データを示す。図 10B はガイド RNA 1 の使用から得られたデータを示し；図 10C はガイド RNA 2 の使用から得られたデータを示し；図 10D はガイド RNA 3 の使用から得られたデータを示し；図 10E はガイド RNA 1 およびガイド RNA 2 の使用から得られたデータを示し；図 10F はガイド RNA 1 およびガイド RNA 3 の使用から得られたデータを示し；図 10G はガイド RNA 2 およびガイド RNA 3 の使用から得られたデータを示す。

20

【図 10-2】 同上。

【図 10-3】 同上。

【図 10-4】 同上。

【図 10-5】 同上。

【図 10-6】 同上。

【図 10-7】 同上。

【0202】

【図 11-1】 図 11A~11D は、CRISPR/Cas9 による TGFBR2 発現のノックダウン後の TGF ベータの存在下または非存在下における腫瘍細胞に対する NK 細胞の細胞傷害性を比較するデータを示す。図 11A は、ガイド RNA 1 および 2 を用いた TGFBR2 ノックダウン後の細胞傷害性の変化を示す。図 11B は、ガイド RNA 1 および 3 を用いた TGFBR2 ノックダウン後の細胞傷害性の変化を示す。図 11C は、ガイド RNA 2 および 3 を用いた TGFBR2 ノックダウン後の細胞傷害性の変化を示す。図 11D は、模擬 TGFBR2 ノックダウンに関するデータを示す。

30

40

【図 11-2】 同上。

【図 11-3】 同上。

【図 11-4】 同上。

【0203】

【図 12-1】 図 12A~12F は、さらなるガイド RNA による TGFBR2 の減少した発現に関するフローサイトメトリーデータを示す。図 12A は、TGFBR2 を発現する同じ細胞の染色されていない対照を示す。図 12B は、CRISPR/Cas9 遺伝子編集エレメントを用いたエレクトロポレーションの非存在下で、TGFBR2 を発現する NK 細胞についての陽性対照データを示す。図 12C は、ガイド RNA 4 を使用した場合

50

の T G F B R 2 発現のノックダウンを示す。図 1 2 D は、ガイド R N A 5 を使用した場合の T G F B R 2 発現のノックダウンを示す。図 1 2 E は、ガイド R N A 6 を使用した場合の T G F B R 2 発現のノックダウンを示す。図 1 2 F は、ガイド R N A 2 および 3 の 1 : 1 の比率を使用した場合の T G F B R 2 発現のノックダウンを示す。C R I S P r / C a s 9 遺伝子編集エレメントを用いたエレクトロポレーションの 4 日後にデータを収集した。

【図 1 2 - 2】 同上。

【図 1 2 - 3】 同上。

【図 1 2 - 4】 同上。

【図 1 2 - 5】 同上。

【図 1 2 - 6】 同上。

【0 2 0 4】

【図 1 3 - 1】 図 1 3 A ~ 1 3 F は、C R I S P r / C a s 9 を介した T G F B R 2 のノックダウンに供した場合の N K 細胞によるキメラ抗原受容体（ここでは、抗 C D 1 9 C A R、N K 1 9 - 1）の発現に関するフローサイトメトリーデータを示す。図 1 3 A は、N K 1 9 - 1 を発現するように操作されていない N K 細胞についての陰性対照を示す。図 1 3 B は、N K 1 9 - 1 を発現するように操作されたが、C R I S P r / C a s 9 遺伝子編集エレメントでエレクトロポレーションされなかった N K 細胞についての陽性対照データを示す。図 1 3 C は、T G F B R 2 発現をノックダウンするためにガイド R N A 4 を用いたエレクトロポレーションに供された N K 細胞における N K 1 9 - 1 発現に関するデータを示す。図 1 3 D は、ガイド R N A 5 を用いたエレクトロポレーションに供して、T G F B R 2 発現をノックダウンさせた N K 細胞における N K 1 9 - 1 発現に関するデータを示す。図 1 3 E は、ガイド R N A 6 を用いたエレクトロポレーションに供して、T G F B R 2 発現をノックダウンさせた N K 細胞における N K 1 9 - 1 発現に関するデータを示す。図 1 3 F は、ガイド R N A 2 および 3 を用いたエレクトロポレーションに供して、T G F B R 2 発現をノックダウンさせた N K 細胞における N K 1 9 - 1 発現に関するデータを示す。N K 1 9 - 1 をコードするベクターを用いて、形質導入の 4 日後にデータを収集した。

【図 1 3 - 2】 同上。

【図 1 3 - 3】 同上。

【図 1 3 - 4】 同上。

【図 1 3 - 5】 同上。

【図 1 3 - 6】 同上。

【0 2 0 5】

【図 1 4 - 1】 図 1 4 A ~ 1 4 D は、T G F B R 2 発現の単一ガイド R N A ノックダウンの結果としての、T G F ベータ阻害に対する C A R（ここでは、抗 C D 1 9 C A R、N K 1 9 - 1）の非限定的な例を発現する N K 細胞の抵抗性に関するデータを示す。図 1 4 A は、腫瘍微小環境を再現するために、N K 細胞を T G F ベータ中の N a l m 6 細胞とともに培養した N a l m 6 腫瘍細胞に対する N K 細胞の細胞傷害性を示す。図 1 4 B および 1 4 C は、T G F B 2 受容体がノックアウトされなかった対照データ（1 4 C）を示し、図 1 4 C は、選択された曲線をより明確に示すために、1 4 A から抽出された選択されたデータ曲線を示す。図 1 4 D は、N K 細胞の処理の概略図を示す。N K 細胞を、0 日目に C R I S P r / C a s 9 および単一ガイド R N A を用いたエレクトロポレーションに供し、高 I L - 2 培地中で 1 日間培養し、続いて、フィーダー細胞（例えば、4 - 1 B B L および / または m b I L 1 5 を発現する修飾された K 5 6 2 細胞）とともに低 I L - 2 培養を行った。7 日目に、N K 細胞に、N K 1 9 - 1 C A R コンストラクトをコードするウイルスを用いて形質導入した。1 4 日目に、得られた N K 細胞の細胞傷害性を評価した。

【図 1 4 - 2】 同上。

【図 1 4 - 3】 同上。

【図 1 4 - 4】 同上。

【0206】

【図15-1】図15A～15Dは、初代およびNK19-1を発現するNK細胞によるサイトカイン分泌の増大に関するデータを示す。図15Aは、IFNガンマの分泌に関するデータを示す。図15Bは、GM-CSFの分泌に関するデータを示す。図15CはグランザイムBの分泌に関するデータを示す。図15DはTNF-アルファの分泌に関するデータを示す。

【図15-2】同上。

【図15-3】同上。

【図15-4】同上。

【0207】

【図16-1】図16A～16Dは、CRISPr/Cas9の使用によるNK細胞によるNKG2A発現のノックアウトに関するデータを示す。図16Aは、模擬遺伝子編集プロトコルに供されたNK細胞によるNKG2Aの発現を示す。図16Bは、CRISPr/Cas9およびガイドRNA1を用いた編集後のNK細胞によるNKG2A発現を示す。図16Cは、CRISPr/Cas9およびガイドRNA2を用いた編集後のNK細胞によるNKG2A発現を示す。図16Dは、CRISPr/Cas9およびガイドRNA3を用いた編集後のNK細胞によるNKG2A発現を示す。

【図16-2】同上。

【図16-3】同上。

【図16-4】同上。

【0208】

【図17-1】図17A～17Bは、（模擬細胞と比較して）ノックアウトNKG2A発現を有するNK細胞の細胞傷害性に関するデータを示す。図17Aは、CRISPr/Cas9遺伝子編集エレメントを用いたエレクトロポレーションの7日後におけるREH細胞に対するNKG2A編集されたNK細胞の細胞傷害性を示す。図17Bは、REH細胞におけるHLA-E発現の程度に関するフローサイトメトリーデータを示す。

【図17-2】同上。

【0209】

【図18】図18は、模擬NK細胞、またはヒトにおけるCISをコードするCISH遺伝子の遺伝子編集により、サイトカイン誘導性SH2含有タンパク質（CIS）発現がノックアウトされたNK細胞の細胞傷害性に関するデータを示す。CISは、NK細胞媒介性細胞傷害性における阻害チェックポイントである。REH腫瘍細胞に対するNK細胞の細胞傷害性は、CRISPr/Cas9遺伝子編集エレメントを用いたエレクトロポレーションの7日後に測定された。

【0210】

【図19-1】図19A～19Eは、NK細胞によるキメラ抗原受容体コンストラクト（ここでは、抗CD19 CAR、NK19-1）の非限定的な例の発現に対するCISHノックアウトの影響に関するデータを示す。図19Aは、対照（未処理）NK細胞におけるCD19 CAR発現（検出目的でこのコンストラクトに含まれるFLAG発現によって測定され、一方、CARのさらなる実施形態は、タグを含まない）を示す。図19Bは、CRISPr/Cas9およびガイドRNA1を用いたCISHノックダウンに供されたNK細胞における抗CD19 CAR発現を示す。図19Cは、CRISPr/Cas9およびガイドRNA2を用いたCISHノックダウンに供されたNK細胞における抗CD19 CAR発現を示す。図19Dは、模擬遺伝子編集条件（エレクトロポレーションのみ）に供されたNK細胞における抗CD19 CAR発現を示す。図19Eは、35 kDaでCISタンパク質バンドの消失を示すウエスタンブロットを示し、CISH遺伝子のノックアウトを示す。

【図19-2】同上。

【図19-3】同上。

【図19-4】同上。

10

20

30

40

50

【図 19-5】 同上。

【0211】

【図 20-1】 図 20A~20B は、Na l m 6 腫瘍細胞に対して C A R を発現するように遺伝子編集を介した修飾されたおよび／または操作されたドナー N K 細胞を用いた細胞傷害性アッセイからのデータを示す。図 20A は、指示された C A R コンストラクトの形質導入の 7 日後に収集されたデータを用いた、1:2 エフェクター:標的比での一重チャレンジアッセイからのデータを示す。図 20B は、二重チャレンジモデルからのデータを示し、対照、編集、および／または編集／操作された N K 細胞に 2 つの時点で Na l m 6 腫瘍細胞を用いてチャレンジを行った。

【図 20-2】 同上。

【0212】

【図 21-1】 図 21A~21B は、培養における長期にわたる C I S H ノックアウト N K 細胞生存および細胞傷害性に関連したデータを示す。図 21A は、N K 細胞を指示されたように処理した場合の、経時的な N K 細胞生存データを示す。図 21B は、100 日間培養した後の腫瘍細胞に対する N K 細胞の細胞傷害性データを示す。

【図 21-2】 同上。

【0213】

【図 22-1】 図 22A~22E は、指示された対照、遺伝子編集、または C A R 状態を発現させるための遺伝子編集+操作により処理された N K 細胞によるサイトカイン放出データを示す。図 22A は、インターフェロンガンマ放出に関するデータを示す。図 22B は、腫瘍壊死因子アルファ放出に関するデータを示す。図 22C は、G M - C S F 放出に関するデータを示す。図 22D は、グランザイム B 放出に関するデータを示す。図 22E は、パーフォリン放出に関するデータを示す。

【図 22-2】 同上。

【図 22-3】 同上。

【0214】

【図 23-1】 図 23A~23C は、C b l プロトオンコジーン B (C B L B) または三要素モチーフ含有タンパク質 29 (T R I M 29) 発現のいずれかが C R I S P R / C a s 9 遺伝子編集によってノックアウトされた、模擬 N K 細胞または N K 細胞の細胞傷害性アッセイからのデータを示す。図 23A は、3 つの異なる C B L B g R N A、C I S H g R N A 5、または擬似 N K 細胞でノックアウトされた N K 細胞に関する細胞傷害性データを示す。図 23B は、3 つの異なる T R I M 19 g R N A、C I S H g R N A 5、または擬似 N K 細胞でノックアウトされた N K 細胞に関する細胞傷害性データを示す。図 23C は、エレクトロポレーションおよび細胞傷害性アッセイのタイムラインを示す。

【図 23-2】 同上。

【図 23-3】 同上。

【0215】

【図 24-1】 図 24A~24C は、サイトカインシグナル伝達 2 (S O C S 2) の抑制因子または C I S H 発現のいずれかが C R I S P R / C a s 9 遺伝子編集によってノックアウトされた、模擬 N K 細胞または N K 細胞の経時的な細胞傷害性アッセイからのデータを示す。図 24A は、M a x C y t e エレクトロポレーションシステムを用いて、3 つの異なる S O C S 2 g R N A、C I S H g R N A 2、または C D 45 g R N A でノックアウトされた N K 細胞の経時的な細胞傷害性データを示す。図 24B は、L o n z a エレクトロポレーションシステムを用いて、3 つの異なる S O C s 2 g R N A、C I S H g R N A 2 または C D 45 g R N A でノックアウトされた N K 細胞に関する経時的な細胞傷害性データを示す。図 24C は、エレクトロポレーションおよび細胞傷害性アッセイのタイムラインを示す。

【図 24-2】 同上。

【図 24-3】 同上。

【0216】

10

20

30

40

50

【図 25-1】図 25A～25D は、本明細書に開示される実施形態に従い、CAR に対して行われた非限定な修飾の概略図を示す。図 25A は、単一の免疫抑制エフェクターが CAR のヒンジドメインに組み込まれている非限定的な実施形態を示す。図 25B は、複数のドメインが CAR に組み込まれており、第 1 の免疫抑制エフェクターが第 2 の免疫抑制エフェクターとは異なるタイプのものである非限定的な実施形態を示す。一部の実施形態では、複数の免疫抑制エフェクターが含まれており（例えば、2、3、4、5 またはそれ以上）、免疫抑制エフェクターは、CAR における任意の他の免疫抑制エフェクターと同一であっても、または異なってもよい。図 25C は、免疫抑制エフェクターが標的結合領域に（例えば、scFv の重鎖と軽鎖の間のリンカーに）位置付けられている非限定的な実施形態を示す。図 25D は、免疫抑制エフェクターがキメラ抗原受容体の N 末端に位置付けられている非限定的な実施形態を示す。

10

【図 25-2】同上。

【図 25-3】同上。

【図 25-4】同上。

【0217】

【図 26-1】図 26A～26J は、免疫細胞に対して行われた非限定的な修飾の概略図を示し、免疫細胞は同種異系免疫細胞であってもよい。図 26A は、膜貫通タンパク質（またはその断片）に係留されていることに基づく膜結合形式で免疫抑制エフェクターを発現するように操作された免疫細胞を示す。図 26B は、膜結合形式で複数の免疫抑制エフェクターを発現するように操作された免疫細胞を示す。図 26C は、膜結合形式で複数の免疫抑制エフェクターを発現するように操作された免疫細胞を示し、2つのエフェクターはそれぞれ互いに異なっている。図 26D は、単一の膜貫通タンパク質に係留された複数の免疫抑制エフェクターを発現するように操作された免疫細胞を示す。図 26E は、単一の膜貫通タンパク質に係留された複数の免疫抑制エフェクターを発現するように操作された免疫細胞を示し、ドメインは互いに異なっている。図 26F は、膜結合形式で複数の免疫抑制エフェクターを発現するように操作された免疫細胞を示し、膜貫通タンパク質のうちの 1 つに係留された 2 つのエフェクターはそれぞれ互いに異なっている。図 26G は、1 つ以上の免疫抑制エフェクターを含む CAR（ただし、一部の実施形態では、CAR は免疫抑制エフェクタードメインを含まない）と併せて膜結合免疫抑制エフェクターを発現するように操作された免疫細胞を示す。図 26H は、1 つ以上の免疫抑制エフェクターを含む CAR と併せて膜結合形式で 2 つの免疫抑制エフェクターを発現するように操作された免疫細胞を示す。図 26I は、1 つ以上の免疫抑制エフェクターを含む CAR と併せて膜結合免疫抑制エフェクターを発現するように、また、HLA-E および／または HLA-G のうちの 1 つ以上を発現するように操作された免疫細胞を示す。概略的に示されたような一部の実施形態では、操作された細胞は、B2M 発現を破壊するように遺伝子編集された NK 細胞である。図 26J は、HLA-E および／または HLA-G、CD47、PD-L1、および／またはポリオウイルス受容体（PVR）と同様に、複数の免疫抑制エフェクター、少なくとも 1 つの免疫抑制エフェクターを含む CAR を発現するように操作された免疫細胞を示す。全てが単一細胞で示されるが、図面において示されるかまたは本明細書に開示される免疫抑制エフェクターの任意の組み合わせ、またはいずれか 1 つのみが使用されてもよい。

20

30

40

【図 26-2】同上。

【図 26-3】同上。

【0218】

【図 27-1】図 27A～27J は、本明細書に提供される免疫抑制エフェクターコンストラクトの非限定的な実施形態の概略図を示す。

【図 27-2】同上。

【図 27-3】同上。

【図 27-4】同上。

【図 27-5】同上。

50

【図 27-6】 同上。

【図 27-7】 同上。

【図 27-8】 同上。

【図 27-9】 同上。

【図 27-10】 同上。

【0219】

【図 28】 図 28 は、キメラ U L 18-B 2 M コンストラクトを発現するように操作された免疫細胞の非限定的な概略図を示す。

【0220】

【図 29-1】 図 29 A ~ 29 C は、本明細書に開示されるコンストラクトおよび実験設計に関連する模式図を示す。図 29 A は、免疫抑制編集が行われるかまたは免疫抑制コンストラクトが作製される種々のシナリオおよび得られた自己対非自己の結果の模式図を示す。図 29 B は、種々の免疫回避ペプチド (Hansen et al. Current Protocols in Immunology, 2009 から修正) を発現させるために使用されるジスルフィドトラップ単鎖三量体 (d t S C T) の概略図を示す。図 29 C は、本明細書に提供される低免疫コンストラクトの有効性を評価するための実験設計の概略図を示す。

【図 29-2】 同上。

【0221】

【図 30-1】 図 30 A ~ 30 C は、非限定的な抗 C D 19 C A R を発現するように操作された N K 細胞と共培養した後の B 2 M ノックアウト T 細胞の生存に関するデータ (生きた T 細胞のパーセンテージとして) を示す。図 30 A は、N K 細胞 : T 細胞の比が 1 : 4 での生存レベルを示す。図 30 B は、N K : T の比が 1 : 2 での生存を示す。図 30 C は、N K : T の比が 1 : 1 での生存を示す。

【図 30-2】 同上。

【0222】

【図 31-1】 図 31 A ~ 31 C は、H L A - E 発現およびさらなるドナー由来の T 細胞を使用して B 2 M 欠損 T 細胞の排除を減少させる有効性に関するさらなるデータを示す。図 31 A は、N K 細胞 : T 細胞の比が 1 : 4 での T 細胞の生存を示す。図 31 B は、N K 細胞 : T 細胞の比が 1 : 2 での T 細胞の生存を示す。図 31 C は、N K 細胞 : T 細胞の比が 1 : 1 での T 細胞の生存を示す。

【図 31-2】 同上。

【0223】

【図 32】 図 32 は、H L A - E が N K 細胞で作用する経路の概略図を示す。

【0224】

【図 33-1】 図 33 A ~ 33 D は、種々の比で N K 細胞と T 細胞を共培養した後の 2 名のドナーに関する N K 細胞における N K G 2 A の発現と T 細胞における B 2 M の発現に関するデータを示す。

【図 33-2】 同上。

【0225】

【図 34】 図 34 は、混合細胞産物中の適合性について試験される N K 細胞の特徴についての表現型の特徴を提供する。

【0226】

【図 35】 図 35 は、混合細胞産物中の適合性について試験される T 細胞の特徴についての表現型の特徴を提供する。

【0227】

【図 36-1】 図 36 A ~ 36 F は、本明細書に開示される実施形態に従い、抗 C D 19 C A R を発現し、免疫回避のために操作された T 細胞を種々の N K 細胞 : T 細胞の比で N K 細胞とともに培養した場合の、生きた T 細胞中の B 2 M 陰性細胞のパーセンテージに関するデータを示す。図 36 A は、N K : T の比が 0 : 1 でのデータを示し、図 36 B は、N K : T の比が 1 : 4 を示し、図 36 C は、N K : T の比が 1 : 2 を示し、図 36 D は、

NK : T の比が 1 : 1 を示し、図 3 6 E は、NK : T の比が 2 : 1 を示し、図 3 6 F は、NK : T の比が 4 : 1 を示す。

【図 3 6 - 2】同上。

【0 2 2 8】

【図 3 6 - 3】図 3 6 G ~ 3 6 L は、本明細書に開示される実施形態に従い、抗 CD 1 9 CAR を発現し、免疫回避のために操作された T 細胞を種々の NK 細胞 : T 細胞の比で、やはりまた抗 CD 1 9 CAR を発現する NK 細胞とともに培養した場合の、生きた T 細胞中の B 2 M 陰性細胞のパーセンテージに関するデータを示す。図 3 6 G は、NK : T の比が 0 : 1 でのデータを示し、図 3 6 H は、NK : T の比が 1 : 4 を示し、図 3 6 I は、NK : T の比が 1 : 2 を示し、図 3 6 J は、NK : T の比が 1 : 1 を示し、図 3 6 K は、NK : T の比が 2 : 1 を示し、図 3 6 L は、NK : T の比が 4 : 1 を示す。

10

【図 3 6 - 4】同上。

【0 2 2 9】

【図 3 7 - 1】図 3 7 A ~ 3 7 F は、本明細書に開示される実施形態に従い、抗 CD 1 9 CAR を発現し、免疫回避のために操作された T 細胞（第 1 のドナーから収集した）を種々の NK 細胞 : T 細胞の比で、やはりまた抗 CD 1 9 CAR を発現する NK 細胞とともに培養した場合の、生きた T 細胞中の B 2 M 陰性細胞のパーセンテージに関するデータを示す。図 3 7 A は、NK : T の比が 0 : 1 でのデータを示し、図 3 7 B は、NK : T の比が 1 : 4 を示し、図 3 7 C は、NK : T の比が 1 : 2 を示し、図 3 7 D は、NK : T の比が 1 : 1 を示し、図 3 7 E は、NK : T の比が 2 : 1 を示し、図 3 7 F は、NK : T の比が 4 : 1 を示す。

20

【図 3 7 - 2】同上。

【0 2 3 0】

【図 3 8 - 1】図 3 8 A ~ 3 8 F は、本明細書に開示される実施形態に従い、抗 CD 1 9 CAR を発現し、免疫回避のために操作された T 細胞（第 2 のドナーから収集した）を種々の NK 細胞 : T 細胞の比で、やはりまた抗 CD 1 9 CAR を発現する NK 細胞とともに培養した場合の、生きた T 細胞中の B 2 M 陰性細胞のパーセンテージに関するデータを示す。図 3 8 A は、NK : T の比が 0 : 1 でのデータを示し、図 3 8 B は、NK : T の比が 1 : 4 を示し、図 3 8 C は、NK : T の比が 1 : 2 を示し、図 3 8 D は、NK : T の比が 1 : 1 を示し、図 3 8 E は、NK : T の比が 2 : 1 を示し、図 3 8 F は、NK : T の比が 4 : 1 を示す。

30

【図 3 8 - 2】同上。

【0 2 3 1】

【図 3 9 - 1】図 3 9 A ~ 3 9 F は、本明細書に開示される実施形態に従い、抗 CD 1 9 CAR を発現し、免疫回避のために操作された T 細胞（第 3 のドナーから収集した）を種々の NK 細胞 : T 細胞の比で、やはりまた抗 CD 1 9 CAR を発現する NK 細胞とともに培養した場合の、生きた T 細胞中の B 2 M 陰性細胞のパーセンテージに関するデータを示す。図 3 9 A は、NK : T の比が 0 : 1 でのデータを示し、図 3 9 B は、NK : T の比が 1 : 4 を示し、図 3 9 C は、NK : T の比が 1 : 2 を示し、図 3 9 D は、NK : T の比が 1 : 1 を示し、図 3 9 E は、NK : T の比が 2 : 1 を示し、図 3 9 F は、NK : T の比が 4 : 1 を示す。

40

【図 3 9 - 2】同上。

【0 2 3 2】

【図 4 0 - 1】図 4 0 A ~ 4 0 F は、抗 CD 1 9 CAR を発現し、免疫回避（TCR ノックアウト、TCR ノックアウトと B 2 M ノックアウト、または B 2 M ノックアウトと H L A の再発現を伴う TCR ノックアウトのいずれかによる）のために操作された T 細胞（第 1 のドナーから収集した）を種々の NK 細胞 : T 細胞の比で、やはりまた抗 CD 1 9 CAR を発現する NK 細胞とともに培養した場合の、生きた T 細胞中の B 2 M 陰性細胞のパーセンテージに関するデータを示す。図 4 0 A は、NK : T の比が 0 : 1 でのデータを示し、図 4 0 B は、NK : T の比が 1 : 4 を示し、図 4 0 C は、NK : T の比が 1 : 2 を

50

示し、図 40D は、NK : T の比が 1 : 1 を示し、図 40E は、NK : T の比が 2 : 1 を示し、図 40F は、NK : T の比が 4 : 1 を示す。

【図 40-2】 同上。

【0233】

【図 41-1】 図 41A ~ 41F は、抗 CD19 CAR を発現し、免疫回避 (TCR ノックアウト、TCR ノックアウトと B2M ノックアウト、または B2M ノックアウトと HLA の再発現を伴う TCR ノックアウトのいずれかによる) のために操作された T 細胞 (第 1 のドナーから収集した) を種々の NK 細胞 : T 細胞の比で、やはりまた抗 CD19 CAR を発現する NK 細胞とともに培養した場合の、生きた T 細胞中の B2M 陰性細胞のパーセンテージに関するデータを示す。図 41A は、NK : T の比が 0 : 1 でのデータを示し、図 41B は、NK : T の比が 1 : 4 を示し、図 41C は、NK : T の比が 1 : 2 を示し、図 41D は、NK : T の比が 1 : 1 を示し、図 41E は、NK : T の比が 2 : 1 を示し、図 41F は、NK : T の比が 4 : 1 を示す。

10

【図 41-2】 同上。

【0234】

【図 42】 図 42A ~ 42B は、操作された治療細胞に対する免疫応答を低下させる種々のアプローチの概略図を示す。図 42A は、低免疫ドメイン (HYPO) および操作された治療細胞に対する免疫応答を低下させるために使用される種々のペプチドまたは HLA 配列を含む CAR の概略図を示す。図 42B は、操作された治療細胞に対する免疫応答を低下させるために使用される種々のペプチドおよびペプチドの組み合わせを示す。

20

【0235】

【図 43】 図 43 は、本明細書に開示される種々の低免疫を誘導する実施形態の評価を可能にする実験設計の概略図を示す。

【0236】

【図 44】 図 44 は、本明細書に提供される実施形態に従い、低免疫誘導コンストラクトを評価するための細胞傷害性データを示す。

【0237】

【図 45-1】 図 45A ~ 45C は、本明細書に提供される実施形態に従い、低免疫誘導コンストラクトを評価しながら収集したさらなる細胞傷害性データを示す。図 45A は、種々の低免疫コンストラクトを発現する K562 細胞に対して、第 1 のドナーに由来する NK 細胞を使用する細胞傷害性データを示す。図 45B は、種々の低免疫コンストラクトを発現する K562 細胞に対して、さらなるドナーに由来する NK 細胞を使用する細胞傷害性データを示す。図 45C は、種々の低免疫コンストラクトを発現する K562 細胞に対して、不死化 NK92 細胞を使用する細胞傷害性データを示す。

30

【図 45-2】 同上。

【図 45-3】 同上。

【0238】

【図 46】 図 46 は、ドナー NK 細胞による NK G2A 発現の分析を示す。

【0239】

【図 47-1】 図 47A ~ 47R は、本明細書に開示される実施形態において提供される種々の免疫コンストラクトの細胞傷害性に関する実験設定およびデータを示す。図 47A は、本明細書の実施形態において提供される種々のコンストラクトの免疫回避効果を評価するためのアッセイ手順の非限定的な概略図を示す。図 47B は、低免疫修飾 K562 細胞を第 1 のドナーに由来する活性化 NK 細胞と共培養した後の細胞傷害性曲線を示す。図 47C は、修飾 K562 細胞によって発現された GFP の検出を示し、指示された低免疫コンストラクトの発現の程度を表すヒストグラムを示す。図 47D は、低免疫修飾 K562 細胞を第 2 のドナーに由来する活性化 NK 細胞と共培養した後の細胞傷害性曲線を示す。図 47E は、修飾 K562 細胞によって発現された GFP の検出を示し、指示された低免疫コンストラクトの発現の程度を表すヒストグラムを示す。図 47F は、低免疫修飾 K562 細胞を第 3 のドナーに由来する活性化 NK 細胞と共培養した後の細胞傷害性曲線を

40

50

示す。図 4 7 G は、修飾 K 5 6 2 細胞によって発現された G F P の検出を示し、指示された低免疫コンストラクトの発現の程度を表すヒストグラムを示す。図 4 7 H は、低免疫修飾 K 5 6 2 細胞をドナーに由来する活性化 N K 細胞と共培養した後の細胞傷害性曲線を示す。図 4 7 I は、修飾 K 5 6 2 細胞によって発現された G F P の検出を示し、指示された低免疫コンストラクトの発現の程度を表すヒストグラムを示す。図 4 7 J は、低免疫修飾 K 5 6 2 細胞をドナーに由来する活性化 N K 細胞と共培養した後の細胞傷害性曲線を示す。図 4 7 K は、修飾 K 5 6 2 細胞によって発現された G F P の検出を示し、指示された低免疫コンストラクトの発現の程度を表すヒストグラムを示す。図 4 7 L は、低免疫修飾 K 5 6 2 細胞をドナーに由来する活性化 N K 細胞と共培養した後の細胞傷害性曲線を示す。図 4 7 M は、修飾 K 5 6 2 細胞によって発現された G F P の検出を示し、指示された低免疫コンストラクトの発現の程度を表すヒストグラムを示す。図 4 7 N は、低免疫修飾 K 5 6 2 細胞をドナーに由来する活性化 N K 細胞と共培養した後の細胞傷害性曲線を示す。図 4 7 O は、修飾 K 5 6 2 細胞によって発現された G F P の検出を示し、指示された低免疫コンストラクトの発現の程度を表すヒストグラムを示す。図 4 7 P は、指示された低免疫コンストラクトのスクリーニングを要約して表にまとめたものを示す。図 4 7 Q は、低免疫修飾 K 5 6 2 細胞をドナーに由来する活性化 N K 細胞と共培養した後の細胞傷害性曲線を示す。図 4 7 R は、修飾 K 5 6 2 細胞によって発現された G F P の検出を示し、指示された低免疫コンストラクトの発現の程度を表すヒストグラムを示す。

10

20

30

40

50

【図 4 7 - 2】 同上。
【図 4 7 - 3】 同上。
【図 4 7 - 4】 同上。
【図 4 7 - 5】 同上。
【図 4 7 - 6】 同上。
【図 4 7 - 7】 同上。
【図 4 7 - 8】 同上。
【図 4 7 - 9】 同上。
【図 4 7 - 1 0】 同上。
【図 4 7 - 1 1】 同上。
【図 4 7 - 1 2】 同上。
【図 4 7 - 1 3】 同上。
【図 4 7 - 1 4】 同上。
【図 4 7 - 1 5】 同上。
【図 4 7 - 1 6】 同上。
【図 4 7 - 1 7】 同上。
【図 4 7 - 1 8】 同上。

【0 2 4 0】

【図 4 8 - 1】 図 4 8 A ~ 4 8 B は、本明細書に提供される種々の低免疫コンストラクトからの細胞傷害性データを示す。図 4 8 A は、活性化されたドナー N K 細胞と共培養した指定された免疫回避コンストラクトを発現するように修飾された K 5 6 2 細胞に関する細胞傷害性曲線を示す。図 4 8 B は、修飾 K 5 6 2 細胞によって発現された G F P の検出を示し、指示された低免疫コンストラクトの発現の程度を表すヒストグラムを示す。

【図 4 8 - 2】 同上。

【0 2 4 1】

【図 4 9 - 1】 図 4 9 A ~ 4 9 C は、本明細書に提供される選択された低免疫コンストラクトの発現の程度が免疫保護と相関するデータを示す。図 4 9 A は、H L A - E を高度に発現する K 5 6 2 N R 細胞および H L A - E を低度が発現する K 5 6 2 N R 細胞に関する細胞傷害性曲線ならびに両細胞のセットによる H L A - E コンストラクトの相対的発現を反映する要約表を示す。図 4 9 B は、C D 4 7 を高度に発現する K 5 6 2 N R 細胞および C D 4 7 を低度が発現する K 5 6 2 N R 細胞に関する細胞傷害性曲線ならびに両細胞のセットによる C D 4 7 コンストラクトの相対的発現を反映する要約表を示す。図 4 9 C は、

C D 4 3 __ T Mを高度に発現するK 5 6 2 N R細胞およびC D 4 7 __ T Mを低度で発現するK 5 6 2 N R細胞に関する細胞傷害性曲線ならびに両細胞のセットによるC D 4 7 __ T Mコンストラクトの相対的発現を反映する要約表を示す。

【図 4 9 - 2】 同上。

【図 4 9 - 3】 同上。

【 0 2 4 2 】

【図 5 0 - 1】 図 5 0 A ~ 5 0 D は、NK細胞に対して行われた遺伝子編集の組み合わせの非限定的な実施形態からのデータおよび得られた細胞傷害性を示す。図 5 0 A は、NK細胞において行われた指示された編集に関するデータおよび編集が行われた14日後の標的786-O細胞に対する細胞傷害性の評価を示す。図 5 0 B は、図 5 0 A において示されるが、TGFbの存在下では示されていないものに対応するデータを示す。図 5 0 C は、NK細胞において行われた指示された編集に関するデータおよび編集が行われた21日後の標的786-O細胞に対する細胞傷害性の評価を示す。図 5 0 D は、図 9 C において示されるが、TGFbの存在下では示されていないものに対応するデータを示す。

【図 5 0 - 2】 同上。

【図 5 0 - 3】 同上。

【図 5 0 - 4】 同上。

【 0 2 4 3 】

【図 5 1 - 1】 図 5 1 A ~ 5 1 D は、NK細胞に対して行われた遺伝子編集の組み合わせの非限定的な実施形態からのデータおよび得られた細胞傷害性を示す。図 5 1 A は、NK細胞において行われた指示された編集に関するデータおよび編集が行われた14日後の標的786-O細胞に対する細胞傷害性の評価を示す。図 5 1 B は、図 5 1 A において示されるが、TGFbの存在下では示されていないものに対応するデータを示す。図 5 1 C は、NK細胞において行われた指示された編集に関するデータおよび編集が行われた21日後の標的ACHN細胞に対する細胞傷害性の評価を示す。図 5 1 D は、図 5 1 C において示されているが、TGFbの存在下では示されていないものに対応するデータを示す。

【図 5 1 - 2】 同上。

【図 5 1 - 3】 同上。

【図 5 1 - 4】 同上。

【 0 2 4 4 】

【図 5 2 - 1】 図 5 2 A ~ 5 2 B は、標的細胞に対して指示された遺伝子において編集されたNK細胞の細胞傷害性に関するデータを示す。図 5 2 A は、NK細胞において行われた指示された編集に関するデータおよび編集が行われた21日後の標的786-O細胞に対する細胞傷害性の評価を示す。図 5 2 B は、図 5 2 A において示されるが、アデノシンの存在下では示されていないものに対応するデータを示す。

【図 5 2 - 2】 同上。

【 0 2 4 5 】

【図 5 3 - 1】 図 5 3 A ~ 5 3 B は、複数の遺伝子標的において編集されたNK細胞の細胞傷害性に関するデータを示す。図 5 3 A は、指示された方法で編集されたNK細胞に関するデータおよび編集の14日後の標的786-O細胞に対する編集されたNK細胞の細胞傷害性を示す。図 5 3 B は、図 5 3 A におけるトレースの要約データを示す。図 5 3 C は、指示された方法で編集されたNK細胞に関するデータおよびTGFbの存在下で編集の14日後の標的786-O細胞に対する編集されたNK細胞の細胞傷害性を示す。図 5 3 D は、図 5 3 C におけるトレースの要約データを示す。

【図 5 3 - 2】 同上。

【図 5 3 - 3】 同上。

【図 5 3 - 4】 同上。

【 0 2 4 6 】

【図 5 4 - 1】 図 5 4 A ~ 5 4 B は、複数の遺伝子標的において編集されたNK細胞の細胞傷害性に関するデータを示す。図 5 3 A は、指示された方法で編集されたNK細胞に関

するデータおよび編集の14日後の標的ACHN細胞に対する編集されたNK細胞の細胞傷害性を示す。図54Bは、指示された方法で編集されたNK細胞に関するデータおよびTGFbの存在下で編集の14日後の標的ACHN細胞に対する編集されたNK細胞の細胞傷害性を示す。

【図54-2】同上。

【0247】

【図55-1】図55A~55Bは、複数の遺伝子標的において編集されたNK細胞の細胞傷害性に関するデータを示す。図55Aは、指示された方法で編集されたNK細胞に関するデータおよび編集の28日後の標的786-O細胞に対する編集されたNK細胞の細胞傷害性を示す。図55Bは、図55Aにおけるトレースの要約データを示す。図55Cは、指示された方法で編集されたNK細胞に関するデータおよびTGFbの存在下で編集の28日後の標的786-O細胞に対するそれらの細胞傷害性を示す。図55Dは、図55Cにおけるトレースの要約データを示す。

10

【図55-2】同上。

【図55-3】同上。

【図55-4】同上。

【0248】

【図56-1】図56A~56Dは、複数の遺伝子標的において編集されたNK細胞の細胞傷害性に関するデータを示す。図56Aは、指示された方法で編集されたNK細胞に関するデータおよび編集の28日後の標的ACHN細胞に対する編集されたNK細胞の細胞傷害性を示す。図56Bは、図56Aにおけるトレースの要約データを示す。図56Cは、指示された方法で編集されたNK細胞に関するデータおよびTGFbの存在下で編集の28日後の標的ACHN細胞に対する編集されたNK細胞の細胞傷害性を示す。図56Dは、図56Cにおけるトレースの要約データを示す。

20

【図56-2】同上。

【図56-3】同上。

【図56-4】同上。

【発明を実施するための形態】

【0249】

本明細書に提供される方法および組成物の一部の実施形態は、免疫療法における使用のための操作された免疫細胞およびその組み合わせに関する。いくつかの実施形態では、操作された細胞は、例えば、細胞傷害性誘導性受容体複合体を発現するために、複数の方法で操作される。本明細書で使用される場合、用語「細胞傷害性受容体複合体」は、その通常の意味を与えられるものとし、（特に断らない限り）、キメラ抗原受容体（CAR）、キメラ受容体（NKGD2Dキメラ受容体の場合、活性化キメラ受容体とも呼ばれる）に言及するものとする。いくつかの実施形態では、細胞は、非腫瘍組織に対する細胞の反応性の修飾を達成するようにさらに操作される。いくつかの実施形態は、得られたT細胞が減少および／または排除した同種反応性を有するような、種々の遺伝子工学的方法を介するT細胞の修飾に関する。このような非同種反応性T細胞はまた、非同種反応性T細胞が腫瘍細胞に対して細胞傷害効果を付与することを可能にするキメラ抗原受容体（CAR）を発現するように操作することができる。いくつかの実施形態では、ナチュラルキラー（NK）細胞はまた、都市誘導性受容体複合体（例えば、キメラ抗原受容体またはキメラ受容体）を発現するように操作される。いくつかの実施形態では、これらの操作された免疫細胞型の組み合わせが免疫療法において使用され、迅速（NK細胞ベース）と持続性（T細胞ベース）の抗腫瘍効果の両方がもたらされるが、いずれも有利には移植片対宿主疾患をほとんどまたは全く有さない。いくつかの実施形態は、免疫療法における組成物または細胞の使用方法を含む。

30

40

【0250】

用語「抗がん効果」とは、限定されないが、腫瘍容量の低下、がん細胞数の低下、転移数の低下、平均寿命の増加、がん細胞増殖の低下、がん細胞生存の低下、および／または

50

がん性状態に関連する種々の生理学的症状の軽快を含む、種々の手段によって発現し得る生物学的効果を指す。

【0251】

細胞型

本明細書に提供される方法および組成物の一部の実施形態は、免疫細胞などの細胞を指す例えば、T細胞などの免疫細胞は、CD19指向性キメラ受容体などのキメラ受容体を含むように操作され得るか、または本明細書に記載されるように、上記キメラ受容体をコードする核酸を含むように操作され得る。さらなる実施形態は、本明細書に開示されるNKGDキメラ受容体複合体などの別の細胞傷害性受容体複合体を発現させるために、第2のセットの細胞を操作することに関する。さらに追加の実施形態は、レシピエント細胞（移植片対宿主病）に対して同種反応性であるドナーT細胞の能力を減少させ、破壊し、最小化しおよび／または排除するためのT細胞（例えば、ドナーT細胞）のさらなる遺伝子操作に関する。

10

【0252】

伝統的な抗がん療法は、外科的アプローチ、放射線療法、化学療法、またはこれらの方法の組み合わせに依存していた。研究によってある種のがんのメカニズムの一部についての理解が深まるにつれて、この知見は標的化されたがん治療法の開発に利用された。標的療法は、がん細胞、またはがんの増殖を支持する細胞（血管細胞など）に見出される特定の遺伝子またはタンパク質を標的とする特定の薬物を用いて、がん細胞の増殖を抑制または阻止するがん処置である。より最近では、遺伝子工学によって、免疫系の特定の側面を利用してがんと戦うアプローチを開発することが可能になってきた。いくつかの場合では、患者自身の免疫細胞を修飾して、その患者のがんタイプを特異的に根絶する。以下により詳細に記載されるように、T細胞、ナチュラルキラー（NK細胞）、またはそれらの組み合わせなどの種々のタイプの免疫細胞を使用することができる。

20

【0253】

がん免疫療法を容易にするために、標的結合部分（例えば、リガンドの細胞外結合剤、またはがん細胞により発現される腫瘍マーカー指向性キメラ受容体）および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含むキメラ抗原受容体（CAR）をコードするポリヌクレオチド、ポリペプチド、およびベクターが本明細書において提供される。例えば、一部の実施形態は、がんに対する免疫細胞の標的化を促進し、がん細胞における細胞傷害効果を発揮するために、とりわけ、例えば、腫瘍マーカー、例えば、CD19、CD123、CD70、Her2、メソテリン、クラウジン6、BCMA、EGFRに対する指向性を有するキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、ポリペプチド、またはベクターを含む。また、このようなCARを発現する操作された免疫細胞（例えば、T細胞またはNK細胞）が提供される。また、本明細書には、いくつかの実施形態では、2つ以上のサブドメインを含む細胞外ドメインを含むコンストラクトをコードするポリヌクレオチド、ポリペプチド、およびベクターも提供され、例えば、第1のCD19標的化サブドメインは、本明細書に開示されるCD19結合部分を含み、および第2のサブドメインは、C型レクチン様受容体および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む。また、このような二重特異性コンストラクトを発現する操作された免疫細胞（例えば、T細胞またはNK細胞）が提供される。がんを処置する方法、およびがん免疫療法のためのこのような細胞の他の使用がまた、本明細書に提供される。

30

40

【0254】

また、がん免疫療法を容易にするために、標的結合部分（例えば、がん細胞により発現されるリガンドの細胞外結合剤）および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含むキメラ受容体をコードするポリヌクレオチド、ポリペプチド、およびベクターが本明細書において提供される。例えば、一部の実施形態は、がんへの免疫細胞の標的化を促進し、がん細胞に細胞傷害効果を及ぼすために、とりわけ、腫瘍マーカー、例えば、MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、ULBP5、およびULBP6に対する指向性を有するNKGD細胞外ドメインを含む活性化キメラ受容体をコードするポ

50

リヌクレオチド、ポリペプチド、またはベクターを含む。また、このようなキメラ受容体を発現する操作された免疫細胞（例えば、T細胞またはNK細胞）が提供される。また、本明細書には、いくつかの実施形態では、2つ以上のサブドメイン、例えば、第1および第2のリガンド結合受容体および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞外ドメインを含むコンストラクトをコードするポリヌクレオチド、ポリペプチド、およびベクターが提供される。また、このような二重特異性コンストラクトを発現する操作された免疫細胞（例えば、T細胞またはNK細胞）（いくつかの実施形態では、第1および第2のリガンド結合ドメインは、同じリガンドを標的とする）が提供される。がんを処置する方法、およびがん免疫療法のためのこのような細胞の他の使用もまた、本明細書に提供される。

【0255】

免疫療法のための操作された細胞

いくつかの実施形態では、免疫系の細胞は、腫瘍細胞などの標的細胞に対して増大した細胞傷害効果を有するように操作される。例えば、免疫系の細胞は、本明細書に記載されるように、腫瘍指向性キメラ受容体および／または腫瘍指向性CARを含むように操作され得る。いくつかの実施形態では、白血球（white blood cell）または白血球（leukocyte）は、それらの本来の機能は、異常な細胞の増殖および感染症に対して身体を防御することであるため使用される。ヒト免疫系において特定の役割を果たす種々のタイプの白血球が存在し、したがって、本明細書に開示される細胞の操作のための好ましい出発点である。白血球には、顆粒球および無顆粒球（それぞれ細胞質中の顆粒の存在または非存在）がある。顆粒球には、好塩基球、好酸球、好中球、および肥満細胞が含まれる。無顆粒球には、リンパ球および単球が含まれる。以下の細胞または他の、明細書に記載される細胞などの細胞は、キメラ受容体、例えば、NKGDキメラ受容体、および／またはCAR、例えば、CD19指向性CAR、またはキメラ受容体もしくはCARをコードする核酸を含むように操作することができる。いくつかの実施形態では、細胞は、膜結合インターロイキン15（mbIL15）共刺激ドメインを共発現するように操作されてもよい。以下でより詳細に検討されるように、いくつかの実施形態では、細胞、特にT細胞は、細胞の同種反応性を減少および／または排除するために、さらに遺伝子修飾される。

【0256】

免疫療法のための単球

単球は白血球の亜型である。単球は、マクロファージおよび骨髄系樹状細胞に分化することができる。単球は適応免疫系と関連しており、食作用、抗原提示、サイトカイン産生の主要な機能を担っている。食作用とは、細胞物質、または細胞全体の取込みと、その後の取り込まれた細胞物質の消化および破壊のプロセスである。いくつかの実施形態では、単球は、本明細書に開示されるように、1つ以上のさらなる操作された細胞と関連して使用される。本明細書に記載される方法および組成物の一部の実施形態は、腫瘍指向性CAR、または腫瘍指向性CARをコードする核酸を含む単球に関する。本明細書に開示される方法および組成物のいくつかの実施形態は、本明細書に開示されるその他のもののうちのいずれかの中で、腫瘍マーカー、例えば、CD19、CD123、CD70、Her2、メソテリン、クラウジン6、BCMA、EGFR、および膜結合インターロイキン15（mbIL15）共刺激ドメインを標的化するCARを発現するように操作された単球に関する。本明細書に開示される方法および組成物のいくつかの実施形態は、腫瘍細胞上のリガンド、例えば、MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、ULBP5、およびULBP6（とりわけ）、および適宜膜結合インターロイキン15（mbIL15）共刺激ドメインを標的化する活性化キメラ受容体を発現するように操作された単球に関する。

【0257】

免疫療法のためのリンパ球

リンパ球は、白血球の他の一次サブタイプであり、T細胞（細胞媒介性、細胞傷害性適応免疫）、ナチュラルキラー細胞（細胞媒介性、細胞傷害性先天性免疫）、およびB細胞

10

20

30

40

50

(体液性、抗体駆動性適応免疫)を含む。B細胞は、本明細書に開示されるいくつかの実施形態に従って操作されるが、いくつかの実施形態はまた、操作されたT細胞または操作されたNK細胞(T細胞とNK細胞の混合物が、一部の実施形態では、同じドナー由来または異なるドナー由来のいずれかで使用される)に関連する。本明細書に開示される方法および組成物の一部の実施形態は、本明細書に開示されるその他のもののうちのいずれかの中で、腫瘍マーカー、例えば、CD19、CD123、CD70、Her2、メソテリン、クラウジン6、BCMA、EGFR、および膜結合インターロイキン15(mbIL15)共刺激ドメインを標的化するCARを発現するように操作されたリンパ球に関する。本明細書に開示される方法および組成物のいくつかの実施形態は、腫瘍細胞上のリガンド、例えば、MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、ULBP5、およびULBP6(とりわけ)、および適宜膜結合インターロイキン15(mbIL15)共刺激ドメインを標的化する活性化キメラ受容体を発現するように操作されたリンパ球に関する。

10

20

30

40

50

【0258】

免疫療法のためのT細胞

T細胞は、細胞表面上のT細胞受容体の存在に基づいて、他のリンパ球サブタイプ(例えば、B細胞またはNK細胞)と区別することができる。T細胞は、エフェクターT細胞、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、記憶T細胞、調節性T細胞、ナチュラルキラーT細胞、粘膜関連不変T細胞およびガンマデルタT細胞を含む種々のサブタイプに分けられる。一部の実施形態では、特異的サブタイプのT細胞を操作する。一部の実施形態では、T細胞サブタイプの混合プールを操作する。一部の実施形態では、本明細書に開示される細胞傷害性受容体複合体を発現するように操作されるT細胞タイプの特異的選択は存在しない。いくつかの実施形態では、サイトカイン刺激の使用などの特異的技術を使用して、特異的マーカープロファイルを有するT細胞の拡大/収集を増大させる。例えば、いくつかの実施形態では、特定のヒトT細胞、例えば、CD4+T細胞、CD8+T細胞の活性化は、刺激分子としてのCD3および/またはCD28の使用によって達成される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、細胞傷害性受容体複合体および/またはホーミング部分を発現するT細胞の治療上有効量を投与することを含む、がんまたは感染症を処置または予防する方法が提供される。いくつかの実施形態では、操作されたT細胞は自己細胞であり、一方、一部の実施形態では、T細胞は同種異系細胞である。本明細書に開示される方法および組成物のいくつかの実施形態は、本明細書に開示されるその他のもののうちのいずれかの中で、腫瘍マーカー、例えば、CD19、CD123、CD70、Her2、メソテリン、クラウジン6、BCMA、EGFR、および膜結合インターロイキン15(mbIL15)共刺激ドメインを標的とするCARを発現するように操作されたT細胞に関する。本明細書に開示される方法および組成物のいくつかの実施形態は、腫瘍細胞上のリガンドを標的化する活性化キメラ受容体、例えば、MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、ULBP5、およびULBP6(とりわけ)、および適宜膜結合インターロイキン15(mbIL15)共刺激ドメインを発現するように操作されたT細胞に関する。

【0259】

免疫療法のためのNK細胞

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、細胞傷害性受容体複合体および/またはホーミング部分を発現する治療上有効量のナチュラルキラー(NK)細胞を投与することを含む、がんまたは感染症を処置または予防する方法が提供される。いくつかの実施形態では、操作されたNK細胞は自家細胞であり、一方、いくつかの実施形態では、NK細胞は同種異系細胞である。いくつかの実施形態では、NK細胞の天然の細胞傷害性ポテンシャルが比較的高いため、NK細胞が好ましい。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される操作された細胞が、NK細胞の細胞傷害活性をさらに上方制御することができ、標的細胞(例えば、腫瘍または他の疾患細胞)に対してさらに効果的な活性をもたらすことが予想外に有益である。本明細書に記載される方法および組成物のいくつかの

実施形態は、本明細書に開示されるその他のもののうちのいずれかの中で、腫瘍マーカー、例えば、CD19、CD123、CD70、Her2、メソテリン、クラウジン6、BCMA、EGFR、および適宜膜結合インターロイキン15（mbIL15）共刺激ドメインを標的とするCARを発現するように操作されたNK細胞に関する。本明細書に開示される方法および組成物のいくつかの実施形態は、腫瘍細胞上のリガンドを標的とする活性化キメラ受容体、例えば、MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、ULBP5、およびULBP6（とりわけ）、および適宜膜結合インターロイキン15（mbIL15）共刺激ドメインを発現するように操作されたNK細胞に関する。一部の実施形態では、NK細胞は、細胞系NK-92に由来する。NK-92細胞は、NK細胞に由来するが、正常なNK細胞によって提示される主要な阻害受容体を欠き、一方、活性化受容体の大多数を保持する。本明細書に記載されるNK-92細胞のいくつかの実施形態は、特定のさらなる阻害受容体、例えば、SMA D3をサイレンシングするように操作され、インターフェロン-γ（IFNγ）、グランザイムB、および／またはパーフォリン生成物の上方調節を可能にするNK-92細胞に関する。NK-92細胞系に関するさらなる情報は、WO1998/49268および米国特許出願公開第2002-0068044号に開示されており、これらはその全体が参照により本明細書に組み込まれる。NK-92細胞は、いくつかの実施形態では、本明細書に開示される他の細胞型の1つ以上と組み合わせて使用される。例えば、一実施形態では、NK-92細胞は、本明細書に開示されるNK細胞と組み合わせて使用される。さらなる実施形態では、NK-92細胞は、本明細書に開示されるT細胞と組み合わせて使用される。

10

20

【0260】

がん免疫療法のための造血幹細胞

一部の実施形態では、造血幹細胞（HSC）は、本明細書に開示される免疫療法の方法において使用される。いくつかの実施形態では、細胞は、ホーミング部分および／または細胞傷害性受容体複合体を発現するように操作される。HSCは、いくつかの実施形態では、長期間の血球産生のために生着するそれらの能力を利用するために使用され、例えば、がんの寛解と戦うために、標的化された抗がんエフェクター細胞の持続的な供給源をもたらし得る。いくつかの実施形態では、この継続的な産生は、例えば、腫瘍微小環境による他の細胞型のエネルギーまたは消耗を相殺するのを助ける。いくつかの実施形態では、同種異系HSCが使用されるが、一方、いくつかの実施形態では、自家HSCが使用される。いくつかの実施形態では、HSCは、本明細書に開示される1つ以上のさらなる操作された細胞型と組み合わせて使用される。本明細書に記載される方法および組成物の一部の実施形態は、本明細書に開示されるその他のもののうちのいずれかの中で、腫瘍マーカー、例えば、CD19、CD123、CD70、Her2、メソテリン、クラウジン6、BCMA、EGFR、および適宜膜結合インターロイキン15（mbIL15）共刺激ドメインを標的とするCARを発現するように操作された造血幹細胞などの幹細胞に関する。本明細書に開示される方法および組成物のいくつかの実施形態は、腫瘍細胞上のリガンド、例えば、MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、ULBP5、およびULBP6（とりわけ）、および適宜膜結合インターロイキン15（mbIL15）共刺激ドメインを標的とする活性化キメラ受容体を発現するように操作された造血幹細胞に関する。

30

40

【0261】

誘導多能性幹細胞

一部の実施形態では、誘導多能性幹細胞（iPSC）は、本明細書に開示される免疫療法の方法において使用される。iPSCを用いて、いくつかの実施形態では、iPSCの分化を通じて、選択部位で1つまたは複数の遺伝子修飾を含む、限定されないが、CD34細胞、造血性内皮細胞、HSC（造血性幹細胞および前駆細胞）、造血性多能性前駆細胞、T細胞前駆細胞、NK細胞前駆細胞、T細胞、NK T細胞、NK細胞、およびB細胞などの非多能性細胞に、または同選択部位で同じ遺伝子修飾を含む低分化細胞に分化および誘導するiPSCの能力を利用する。いくつかの実施形態では、iPSCは、iPSC

50

由来のNKまたはT細胞を生成するために使用される。いくつかの実施形態では、細胞は、ホーミング部分および／または細胞傷害性受容体複合体を発現するように操作される。いくつかの実施形態では、iPSCは、本明細書に開示される1つ以上のさらなる操作された細胞型と組み合わせて使用される。本明細書に記載される方法および組成物の一部の実施形態は、腫瘍マーカー、例えば、本明細書に開示される他のいずれかのうち、例えば、CD19、CD123、CD70、Her2、メソテリン、クラウジン6、BCMA、EGFR、および適宜膜結合インターロイキン15 (mbIL15) 共刺激ドメインを標的とするCARを発現するように操作された誘導多能性幹細胞などの幹細胞に関する。本明細書に開示される方法および組成物のいくつかの実施形態は、腫瘍細胞上のリガンドを標的とする活性化キメラ受容体、例えば、MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、ULBP5、およびULBP6 (とりわけ)、ならびに適宜膜結合インターロイキン15 (mbIL15) 共刺激ドメインを発現するように操作された誘導多能性幹細胞に関する。

10

【0262】

免疫細胞の遺伝子操作

上記で検討したように、種々の細胞型を細胞免疫療法に利用することができる。さらに、以下により詳細に説明され、実施例において示されるように、遺伝的修飾は、これらの細胞に対して、それらの有効性 (例えば、細胞傷害性) および／または持続性 (例えば、活性寿命) のうちの1つ以上の側面を増大させるために行うことができる。

【0263】

遺伝子編集の標的

同種異系CAR-T細胞および／または同種異系CAR-NK細胞などの同種異系細胞療法産物の持続性をさらに増強するのに役立つさらなる細胞工学的戦略が本明細書において提供される。本明細書には、いくつかの実施形態では、がん免疫療法のための遺伝子操作された免疫細胞集団が提供され、遺伝子操作された免疫細胞は、NK細胞および／またはT細胞などの細胞の細胞傷害活性、持続性、または他の特徴を増強するために、1つ、2つ、3つまたはそれ以上の遺伝子座で遺伝子修飾 (例えば、遺伝子編集) される。

20

【0264】

本明細書において検討されるように、いくつかの実施形態では、NK細胞は、免疫療法のために使用される。本明細書で提供されるいくつかの実施形態では、NK細胞の遺伝子編集は、有利には、編集されたNK細胞に、腫瘍微小環境において生成される種々の阻害シグナルに抵抗および／または克服する能力を付与することができる。腫瘍は、免疫細胞の抗腫瘍効果を減少させることを意図する種々のシグナル伝達分子を生成することが公知である。以下により詳細に検討するように、いくつかの実施形態では、NK細胞の遺伝子編集は、NK細胞、T細胞、NKとT細胞の組み合わせ、または本明細書で提供される任意の編集／操作された免疫細胞におけるこの腫瘍微小環境抑制効果を制限する。以下に検討するように、いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、例えば、タンパク質をコードする基礎遺伝子を破壊することによって、標的タンパク質の発現を減少またはノックアウトするために採用される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、標的タンパク質の発現を約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約97%、約98%、約99%、約99%、またはそれ以上 (列挙されたものの間の任意の量を含む) 減少させることができる。いくつかの実施形態では、標的タンパク質の発現が検出できないように、遺伝子を完全にノックアウトする。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、標的タンパク質の発現を「ノックイン」または代わりに増大させるために使用される。いくつかの実施形態では、標的タンパク質の発現は、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約97%、約98%、約99%、またはそれ以上 (列挙されたものの間の任意の量を含む) 増大し得る。別段の指示がない限り、デオキシリボヌクレオチドを用いて列挙されるガイドRNAに提供される配列は、標的DNAを指し、また、実際に使用されるガイドを参照するものとしてみなされなければならない (例えば、リボヌクレ

30

40

50

オチドを使用する場合は、リボヌクレオチドのウラシルがデオキシリボヌクレオチドチミンの代わりに使用され、またはその反対の場合は、チミンがウラシルの代わりに使用され、RNAまたはDNA配列のいずれかを列挙する場合、両方ともアデニンに相補的な塩基対になる)。例えば、配列A T G C T C A A T G C G T C (配列番号995)を有するgRNAはまた、以下の配列A U G C U C A A U G C G U C (配列番号996)を指すか、または配列A U G C U C A A U G C G U C (配列番号996)を有するgRNAはまた、以下の配列A T G C T C A A T G C G T C (配列番号995)を指す。

【0265】

非限定的な例として、TGF-βは、腫瘍微小環境内で免疫抑制をもたらす腫瘍細胞によって放出されるこのようなサイトカインの1つである。免疫抑制は、免疫細胞、たとえ操作されたCAR-免疫細胞であっても、腫瘍細胞を破壊する能力を減少させ、それによって腫瘍の進行を可能にする。いくつかの実施形態では、以下に詳細に検討されるように、免疫チェックポイント阻害剤は、遺伝子編集を介して破壊される。いくつかの実施形態では、腫瘍微小環境における免疫抑制サイトカインの遮断剤が使用され、これには、免疫細胞に結合し、阻害するシグナル伝達分子の能力を減少させるそれらの放出の遮断剤または競合的阻害剤が含まれる。このようなシグナル伝達分子には、限定されないが、TGF-β、IL10、アルギナーゼ、誘導性NOS、反応性NOS、Arg1、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ(IDO)、およびPGE₂が含まれる。しかしながら、さらなる実施形態では、所定の免疫抑制シグナル伝達分子に応答するNK細胞(または他の細胞)の能力が破壊および/または排除される、NK細胞などの免疫細胞が提供される。例えば、いくつかの実施形態では、NK細胞またはT細胞は、TGF-βに対する感受性が減少するように遺伝子編集されている。TGF-βは、少なくとも増殖および細胞傷害性のレベルに対するNK細胞機能の阻害剤である。例えば、TGF-βがNK細胞活性および/または増殖を減少させる阻害経路のいくつかを模式的に示す図8Aを参照されたい。したがって、一部の実施形態によれば、TGF-β受容体の発現は、編集されたNKが腫瘍微小環境におけるTGF-βの免疫抑制効果に抵抗性であるように、遺伝子編集を介してノックダウンまたはノックアウトされる。いくつかの実施形態では、TGFβ2受容体は、例えば、CRISPR-Cas編集の使用によって、遺伝子編集を介してノックダウンされるかまたはノックアウトされる。他の実施形態では、低分子干渉RNA、アンチセンスRNA、TALENまたはジンクフィンガーが使用される。TGF-β受容体の他のアイソフォーム(例えば、TGF-β1および/またはTGF-β3)は、一部の実施形態では編集される。一部の実施形態では、T細胞におけるTGF-β受容体は、遺伝子編集を介してノックダウンされる。

【0266】

さらなる実施形態に従って、NK細胞(またはT細胞)機能の1つ以上の側面の他の調節因子は、遺伝子編集を介して調節される。種々のサイトカインは、免疫細胞に(上記のTGF-βと同様に)負または正のシグナルを与える。非限定的な例として、IL15は、本明細書に開示されるように、NK細胞の正の調節因子であり、NK細胞のホーミング、NK細胞の遊走、NK細胞の拡大/増殖、NK細胞の細胞傷害性、および/またはNK細胞の持続性のうちの1つ以上を増大させることができる。正常な生理的環境下でNK細胞を抑制するために、サイトカイン誘導性SH2含有タンパク質(CIS、CISH遺伝子によってコードされる)は、NK細胞におけるIL-15シグナル伝達の重要な負の調節因子として作用する。本明細書で検討されるように、これは、IL15生物学が、限定されないが、とりわけ増殖/拡大、活性化、細胞傷害性、持続性、ホーミング、遊走などを含むNK細胞機能性の複数の側面に影響を与えるためである。したがって、いくつかの実施態様によれば、CISHの編集は、複数の機能にわたってNK細胞の機能性を増大させ、より効果的で長期持続するNK細胞治療をもたらす。いくつかの実施形態では、CISの阻害剤が、操作されたNK細胞投与と併せて使用される。いくつかの実施形態では、CIS発現は、例えば、CRISPR-Cas編集の使用によって、CISH遺伝子の遺伝子編集を介してノックダウンまたはノックアウトされる。他の実施形態では、低分

10

20

30

40

50

子干渉RNA、アンチセンスRNA、TALENまたはジンクフィンガーが使用される。一部の実施形態では、T細胞におけるCIS発現は、遺伝子編集を介してノックダウンされる。

【0267】

いくつかの実施形態では、CISH遺伝子編集は、NK細胞に、標的部位にホーミングする増大した能力を付与する。いくつかの実施形態では、CISH遺伝子編集は、NK細胞に、例えば組織内で、例えば化学誘引物質に応答して、または忌避剤から離れて、遊走する増大した能力を付与する。いくつかの実施形態では、CISH遺伝子編集は、NK細胞に、活性化され、したがって、例えば、抗腫瘍効果を発揮する増大した能力を付与する。いくつかの実施形態では、CISH遺伝子編集は、NK細胞に、増大した増殖能力を付与し、いくつかの実施形態では、ドナー血液試料からのロバストなNK細胞数の生成を可能にする。さらに、このような実施形態では、CISHのために編集され、CARを発現するように操作されたNK細胞は、より容易に、ロバストに、および一貫して培養において拡大される。いくつかの実施形態では、CISH遺伝子編集は、NK細胞に、増大した細胞傷害性を付与する。いくつかの実施形態では、CISHの編集は、CARを発現する操作されたNK細胞および／または操作されたT細胞の細胞傷害効果を相乗的に増大させる。

10

【0268】

いくつかの実施形態では、CISH遺伝子編集は、広範な経路を活性化するかまたは阻害する。CISタンパク質は、例えば、JAK-STATシグナル伝達経路を阻害することにより、IL15シグナル伝達の負の調節因子である。これらの経路は、典型的には、IL15応答性遺伝子（CISHを含む）の転写をもたらす。いくつかの実施形態では、CISHのノックダウンは、JAK-STAT（例えば、JAK1-STAT5）シグナル伝達を脱阻害し、IL15応答性遺伝子の転写を増大させる。いくつかの実施形態では、CISHのノックアウトは、哺乳動物のラパマイシン標的（mTOR）を介したシグナル伝達の増大をもたらし、それに対応して、細胞代謝および呼吸に関する遺伝子の発現が増加する。いくつかの実施形態では、CISHのノックアウトは、IL15誘導性のIL-2R α （CD25）の発現であるが、IL-15R α またはIL-2/15R β ではない発現の増加、IL15および／またはIL2のNK細胞膜結合の増加、STAT-3および／またはSTAT-5のリン酸化の増加、Bcl-2などの抗アポトーシスタンパク質の発現の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、CISHノックアウトは、ミトコンドリア機能（例えば、電子伝達鎖および細胞呼吸）および細胞周期に関する選択された遺伝子のIL15誘導性情報制御をもたらす。したがって、いくつかの実施形態では、遺伝子編集によるCISHのノックアウトは、少なくとも部分的には代謝リプログラミングを介して、NK細胞の細胞傷害性および／または持続性を増大させる。いくつかの実施形態では、TXNIPなどの細胞代謝の負の調節因子は、CISHノックアウトに応答して下方制御される。いくつかの実施形態では、BIRC5（スルビビン）、TOP2A、CKS2、およびRACGAP1を含む細胞生存および増殖のためのプロモーターは、CISHノックアウト後に上方制御されるが、一方、TGFB1、ATM、およびPTCH1などの抗増殖性またはプロアポトーシス性タンパク質は下方制御される。いくつかの実施形態では、CISHノックアウトは、CXCL-10、IL2、TNF、IFN γ 、IL13、IL4、Jnk、PRF1、STAT5、PRKCQ、IL2受容体ベータ、SOCS2、MYD88、STAT3、STAT1、TBX21、LCK、JAK3、IL&受容体、ABL1、IL9、STAT5A、STAT5B、Tcf7、PRDM1、および／またはEOMESのうちの1つ以上を介してまたはそれを通じてシグナル伝達の状態を変更させる（例えば、活性化または不活性化する）。

20

30

40

【0269】

いくつかの実施形態では、免疫細胞の遺伝子編集はまた、編集された免疫細胞の拡大、持続性および／または細胞傷害性における予想外の増大を提供することができる。本明細書に開示されるように、操作された細胞（例えば、CARを発現する細胞）もまた編集さ

50

れ得、その組み合わせは、免疫療法のためのロバストな細胞を提供する。いくつかの実施形態では、編集は、予想外に改善されたNK細胞の拡大、持続性および／または細胞傷害性を可能にする。いくつかの実施形態では、NK細胞におけるCISH発現のノックアウトは、NK細胞におけるIL15媒介性シグナル伝達の強力な負の調節因子を除去し、NK細胞を脱阻害し、増大したNK細胞ホーミング、NK細胞遊走、NK細胞の活性化、拡大、細胞傷害性および／または持続性のうちの1つ以上を可能にする。さらに、いくつかの実施形態では、編集は、他には抑制的な腫瘍微小環境におけるNK細胞および／またはT細胞機能を増大させることができる。いくつかの実施形態では、CISH遺伝子編集は、外因的に提供されるNotchリガンドを必要とせずに、増大したNK細胞拡大、持続性および／または細胞傷害性をもたらす。

10

【0270】

上記で検討したように、CARまたはキメラ受容体を発現するように操作されたT細胞は、いくつかの実施形態において採用される。また、上述したように、T細胞は、それらの表面にT細胞受容体(TCR)を発現する。本明細書に開示されるように、いくつかの実施形態では、自己免疫細胞は、細胞の元のドナーに戻される。このような実施形態では、NK細胞またはT細胞などの免疫細胞は、患者から得られ、拡大され、遺伝的に修飾され(例えば、CARまたはキメラ受容体を用いる)、および／またはさらに拡大されてもよく、患者に再導入される。本明細書に開示されるように、いくつかの実施形態では、同種異系免疫細胞は、細胞の元のドナーではない対象に移入される。このような実施形態では、NK細胞またはT細胞などの免疫細胞は、ドナーから得られ、拡大され、遺伝的に修飾され(例えば、CARまたはキメラ受容体を用いる)、および／またはさらに拡大されてもよく、対象に投与される。

20

【0271】

同種免疫療法には、克服すべきいくつかのハードルがある。免疫能宿主では、投与された同種異系細胞は急速に拒絶され、宿主対移植片拒絶(HvG)として公知である。これは、投与された細胞の有効性、特にそれらの持続性を実質的に制限する。免疫不能宿主では、同種異系細胞は生着することができる。しかしながら、投与された細胞がT細胞を含む場合(本明細書に開示されるいくつかの実施形態は、NK細胞およびT細胞の混合集団を用いる)、内因性T細胞受容体(TCR)特異性は、宿主組織を異物として認識し、移植片対宿主疾患(GvHD)をもたらす。GvHDは、宿主(細胞レシピエント)において重大な組織損傷を引き起こす可能性がある。本明細書に開示されるいくつかの実施形態は、これらのハードルの両方に対処し、それによって、効果的であり、安全な同種異系免疫療法を可能にする。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、移植片対宿主病(GvHD)を減少および／または回避するのに有利に役立つことができる。NK細胞およびT細胞の混合集団を使用するこのようなアプローチの非限定的実施形態は、図8Cに概略的に例示され、NK細胞はCARを発現するように操作され、T細胞はCARを発現するだけでなく、T細胞を非同種反応性にするように編集される。図8Dは、移植片対宿主病が起こるメカニズムを模式的に示す。同種異系T細胞および同種異系NK細胞はともに、腫瘍を標的化するCARを発現するように操作され、宿主に導入される。しかしながら、T細胞は、天然のT細胞受容体(TCR)をなおも有する。このTCRは、宿主細胞のHLA型を「非自己」として認識し、宿主細胞に対して細胞傷害性を発揮することができる。図8Eは、移植片対宿主病が、T細胞の遺伝子編集によってどのように減少させるかまたは代わりに回避することができるかの非限定的な実施形態を示す。簡単に述べると、このアプローチは、以下でより詳細に検討されるように、T細胞上の天然TCRをノックアウトするために、遺伝子編集を行うことができる。TCRが欠損すると、同種異系T細胞は宿主細胞の「非自己」HLAを検出することができず、したがって、宿主細胞に対して細胞傷害性を発揮するように誘発されない。したがって、いくつかの実施形態では、T細胞は、天然T細胞の機能性を減少させ、および／または天然T細胞の発現を減少もしくは排除するために、遺伝子編集に供される。いくつかの実施形態では、CRISPRは、TCRをノックアウトするために使用される。これらの実施形態および他の実施形態を以下におい

30

40

50

て検討する。

【0272】

T細胞受容体(TCR)は、抗原の提示に応答してT細胞の活性化に関与する細胞表面受容体である。TCRは、2つの異なるタンパク質鎖(それはヘテロ二量体である)からなる。ヒトT細胞の大多数は、アルファ(α)鎖とベータ(β)鎖(別々の遺伝子にコードされている)からなるTCRを有する。少ない割合のT細胞は、ガンマ鎖とデルタ鎖(γ/δ鎖)からなるTCRを有する(細胞はガンマ-デルタT細胞として公知である)。

【0273】

(免疫グロブリンのように)無傷な抗原を認識するのではなく、T細胞は、MHC分子と結合して、処理されたペプチド断片によって活性化される。これは、MHC制限として公知である。TCRがドナーMHCとレシピエントMHCの間の差異を認識した場合、その認識はT細胞増殖およびGVHDの潜在的発生を刺激する。一部の実施形態では、TCRα、TCRβ、TCRγ、および/またはTCEδのいずれかをコードする遺伝子は、ドナーT細胞がドナーMHCと宿主MHCの間の差異を認識する傾向を減少させ、それによって同種抗原およびGVHDの認識を減少させるように破壊されるかまたは代わりに修飾される。

10

【0274】

T細胞媒介性免疫は、免疫応答を微調整するのに役立つ共刺激シグナルと阻害シグナルの間のバランスを伴う。免疫チェックポイントとしても公知である阻害シグナルは、自己免疫(例えば、自己寛容)の回避を可能にし、また免疫媒介性損傷を制限する。免疫チェックポイントタンパク質発現は、しばしば腫瘍によって変化し、腫瘍細胞における免疫抵抗性を増大させ、免疫療法の有効性を制限する。CTLA4は、T細胞活性化の振幅を下方制御する。対照的に、PD1は、炎症応答中の末梢組織におけるT細胞エフェクター機能を制限し、自己免疫も制限する。免疫チェックポイント遮断は、いくつかの実施形態では、機能的細胞性免疫の活性化に対する障壁を克服するのを助ける。いくつかの実施形態では、細胞傷害性Tリンパ球関連抗原4(CTLA-4;CD152としても公知である)およびプログラムされた細胞死タンパク質1(PD1またはPDCD1、CD279としても公知である)を含むT細胞上の阻害リガンドに特異的な拮抗抗体が、免疫療法を増大させるために使用される。

20

【0275】

いくつかの実施形態では、非同種反応性であり、高活性である遺伝子修飾されたT細胞が提供される。いくつかの実施形態では、T細胞は、特定の免疫チェックポイント遺伝子が不活性化されるようにさらに修飾され、したがって、免疫チェックポイントタンパク質はT細胞によって発現されない。いくつかの実施形態では、これは、CD3ζシグナル伝達ドメインの操作または破壊の非存在下で行われる(例えば、TCRは、依然としてT細胞シグナル伝達を開始することができる)。

30

【0276】

いくつかの実施形態では、同種異系ドナー由来のTリンパ球における免疫チェックポイント遺伝子の不活化と組み合わせたTCRアルファおよび/またはTCRベータの遺伝的不活化は、GVHDのリスクを有意に減少させる。いくつかの実施形態では、これは、ドナー細胞とレシピエント細胞の間のMHC差異の認識に関与する1つ以上の置換タンパク質鎖(アルファ、ベータ、ガンマ、および/またはデルタ)の少なくとも一部を除去することによって行われる。一部の実施形態では、これは、T細胞の増殖および活性を依然として可能にしながら行われる。

40

【0277】

同種異系細胞が投与されるいくつかの実施形態では、受け入れた対象は、投与された免疫細胞の機能を支持するかまたは代わりに増大させるために、いくつかの他の補助処置を受ける場合がある。いくつかの実施形態では、対象は、前処理(例えば、放射線または化学療法を用いる)され得る。いくつかの実施形態では、補助処置は、リンパ球増殖因子(IL-2など)の投与を含む。

50

【0278】

さらに、いくつかの実施形態では、編集は、例えば、宿主免疫応答に対して細胞をマスクすることによって、投与された細胞（NK細胞、T細胞、またはその他のいずれか）の持続性を改善することができる。場合によっては、レシピエントの免疫細胞が、ドナー細胞、特に同種異系ドナーからのドナー細胞を攻撃し、これは宿主対移植片病（HvG）として公知である。図8Fは、宿主T細胞が、天然／機能性TCRとともに、ドナーTおよび／またはドナーNK細胞上のHLAを非自己として識別するHvGの概略図を示す。このような場合、宿主T細胞TCRが同種異系細胞HLAに結合すると、同種異系細胞が除去され、ドナーの操作されたNK／T細胞の持続性が減少する。HvGに関して、投与された同種異系T細胞の拒絶反応を防ぐために、細胞を受け取った対象は、それらの免疫系の抑制を必要とする。いくつかの実施形態では、糖質コルチコイドが使用され、限定されないが、とりわけ、ベクロメタゾン、ベタメタゾン、ブデソニド、コルチゾン、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、プレドニゾン、トリラムシノロンが含まれる。レシピエント自身のT細胞におけるグルココルチコイド受容体の活性化は、免疫応答に関与する遺伝子の発現を変化させ、サイトカイン産生のレベルの減少をもたらす、これは、T細胞のアネルギーおよびT細胞活性化への干渉（レシピエントにおける）につながる。他の実施形態は、レシピエント免疫細胞の特定のタイプを枯渇させることができる抗体の投与に関する。このような標的の1つはCD52であり、TおよびBリンパ球上で高レベルで発現され、単球上でより低レベルで発現されるが、顆粒球および骨髄前駆細胞上には存在しない。CD52に対する指向性を有する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レシピエントの処置または前処置は、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おり、これは、レシピエント免疫細胞の減少を考えると、HvGの可能性を減少させる。免疫抑制薬は、投与された同種異系の操作されたT細胞の有効性を制限する場合がある。したがって、本明細書に開示されるように、いくつかの実施形態は、免疫抑制治療に抵抗性である遺伝子操作された同種異系ドナー細胞に関する。いくつかの実施形態では、以下により詳細に検討されるように、NK細胞および／またはT細胞などの免疫細胞は、宿主免疫細胞からの細胞傷害性応答を回避することによって、それらの持続性が延長されるように（CARを発現するように操作されることに加えて）編集される。いくつかの実施形態では、1つ以上のHLA分子を同種異系NKおよび／またはT細胞から除去するための遺伝子編集は、宿主T細胞による除去を減少させる。いくつかの実施形態では、同種異系NKおよび／またはT細胞は、ベーター2ミクログロブリン（HLAクラスI分子）およびCIITA（HLAクラスII分子）のうちの1つ以上をノックアウトするように編集される。図8Gは、このアプローチを概略的に示す。

【0279】

混合同種異系細胞療法の実施形態では、操作された細胞集団は、例えば、HvGを回避するためにHLA分子を除去するように治療細胞が編集される場合に、互いを実際に標的化する。例えば、CAR T細胞のこのような編集は、編集された同種異系CAR T細胞の、CAR NK細胞による細胞傷害性攻撃および宿主NK細胞による除去に対する脆弱性をもたらす。これは、一般的にKIR分子が提示する「自己」阻害シグナルが欠けていることによって引き起こされる。図8Hは、このプロセスを概略的に示す。いくつかの実施形態では、遺伝子編集を用いて、宿主免疫系から、および他の投与された操作された細胞によるフラトリサイドから同種異系細胞をマスクする1つ以上の「マスキング」分子の発現をノックインすることができる。図8Iは、このアプローチを概略的に示す。いくつかの実施形態では、タンパク質を同種異系細胞の表面上に発現させて、NK（操作されたNKと宿主NKの両方）による標的化を阻害することができ、有利には、同種異系CAR-TとCAR-NKの両方の持続性を延長する。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、CD47をノックインするために使用され、その発現は、「私を食べないで」シグナルとして効果的に機能する。いくつかの実施形態では、遺伝子編集を用いてHLA-Eの発現をノックインする。HLA-Eは、NK細胞の表面にそれぞれ存在す

10

20

30

40

50

る阻害性および活性化受容体 NKG2A および NKG2C の両方に結合する。しかしながら、NKG2A は、大部分のヒト NK 細胞においてより高度に発現され、したがって、いくつかの実施形態では、HLA-E の操作された細胞上での発現は、HLA-E に編集された（または自然発現された）細胞に対する NK 細胞（宿主とドナーの両方）の阻害効果をもたらす。さらに、いくつかの実施形態では、1 つ以上のウイルス HLA 相同体が、それらが操作された NK および／または T 細胞によって発現されるようにノックインされ、したがって、ウイルスが宿主免疫系を回避する能力を細胞上に付与する。いくつかの実施形態では、これらのアプローチは、有利には、同種異系 CAR-T と CAR-NK の両方の持続性を延長する。

【0280】

いくつかの実施形態では、標的遺伝子（例えば、CISH、TGFB β 、TCR、B2M、CISH、CD47、HLA-E、または本明細書に開示される任意の他の標的遺伝子）のいずれかの遺伝子編集（ノックアウトまたはノックインのいずれか）は、DNA 切断の標的化導入、およびその後の DNA 修復メカニズムを介して達成される。いくつかの実施形態では、DNA の二本鎖切断は、非相同末端接続（NHEJ）によって修復され、酵素は、切断を修復するために、DNA 末端を互いに直接接続するために使用される。しかしながら、いくつかの実施形態では、二本鎖切断は、有利にはより正確である相同指向性修復（HDR）によって修復され、それによって、配列特異的切断および修復を可能にする。HDR は、二本鎖切断の隣接配列と相同である配列内の所望の遺伝因子（例えば、TCR のコード配列を破壊する挿入因子）を有するベクターなどの、切断点における欠損 DNA 配列の再生のための鋳型として相同配列を使用する。これは、DSB の部位に挿入される所望の変化（例えば、挿入）をもたらす。

【0281】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、種々の操作されたヌクレアーゼの 1 つ以上によって達成される。いくつかの実施形態では、制限酵素は、特に、二本鎖切断が複数の領域で所望される場合に使用される。いくつかの実施形態では、生物学処理されたヌクレアーゼが使用される。Zn α 2 フィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、メガヌクレアーゼおよび／またはクラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（CRISPR/Cas9）システムのうちの 1 つ以上を使用して、1 つ以上の TCR サブユニットをコードする遺伝子を実質的に編集する。

【0282】

メガヌクレアーゼは、大きな DNA 配列（14～40 塩基対）を認識し、切断するそれらの能力によって特徴付けられる。いくつかの実施形態では、LAGLIDADG ファミリーからのメガヌクレアーゼが使用され、突然変異誘発およびスクリーニングに供されて、TCR もしくは CISH、または本明細書に開示される任意の他の標的遺伝子における特定の部位などの固有の配列（複数可）を認識するメガヌクレアーゼ変異体が生成される。TCR の標的部位を容易に同定することができる。TCR の領域内の標的部位のさらなる情報は、米国特許出願公開第 2018/0325955 号、米国特許出願公開第 2015/0017136 号に見出すことができ、これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、2 つ以上のメガヌクレアーゼまたはそれらの機能的断片を融合させて、標的遺伝子（例えば、CISH）内の所望の標的配列を認識するハイブリッド酵素を作製する。

【0283】

メガヌクレアーゼとは対照的に、ZFN および TALEN は、ジンクフィンガーまたは転写アクチベーター様エフェクター（TALE）などのペプチドを認識する特異的 DNA 配列に連結された非特異的 DNA 切断触媒ドメインに基づく機能を有する。有利には、ZFN および TALEN は、このようにして、配列非依存的な DNA の切断を可能にし、標的認識において高程度の配列特異性を有する。ジンクフィンガーモチーフは、転写因子において自然に機能して、転写のための特異的 DNA 配列を認識する。各フィンガーの C 末

10

20

30

40

50

端部分は、DNA配列の特異的認識に関与する。ZFNによって認識される配列は比較的短い（例えば、約3塩基対）、いくつかの実施形態では、認識部位が特徴付けられている2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上のジンクフィンガーの組み合わせが使用され、それによって、TCR（または免疫チェックポイント阻害剤）の一部などの特異的配列の標的化を可能にする。次に、合わせたZFNは、標的化されたDNA切断を誘導するために、FokI（適宜FokIヘテロ二量体）などのエンドヌクレアーゼの触媒ドメイン（複数可）と融合させる。TCRおよび／または免疫チェックポイント阻害剤を編集するためのZFNの使用に関する追加情報は、米国特許第9,597,357号に見出すことができ、参照により本明細書に組み込まれる。

【0284】

転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）は、33または34アミノ酸反復のアレイを特徴とする特異的DNA結合タンパク質である。ZFNと同様に、TALENはヌクレアーゼのDNA切断ドメインをTALEDメインに融合させたものであり、配列に依存しない二本鎖DNA切断の導入が可能になり、非常に正確な標的部位の認識を可能にする。TALENは、標的部位に二本鎖切断を起こすことができ、これは誤りがちな非相同末端結合（NHEJ）によって修復され、小さな挿入または欠失を導入することによって遺伝子破壊をもたらす。有利には、TALENは、いくつかの実施形態では使用され、少なくとも部分的には、DNA結合におけるそれらのより高い特異性、減少了したオフターゲット効果、およびDNA結合ドメインの構築の容易さに起因する。

【0285】

CRISPR（クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート）は、細菌がウイルスに対する防御として使用する遺伝因子である。このリピートは、ウイルスゲノムに由来し、細菌ゲノムに組み込まれた短い配列である。Cas（CRISPR関連タンパク質）は、これらの配列を処理し、一致するウイルスDNA配列を切断する。Cas遺伝子を含むプラスミドを真核細胞に導入し、CRISPRを特異的に構築することにより、真核生物ゲノムを任意の所望の位置で切断することができる。CRISPRに関する追加情報は、米国特許公開第2014/0068797号に見出すことができ、これは参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、CRISPRは、例えば、CISH、TGFB2、TCR、B2M、CIITA、CD47、HLA-Eなどにおいてノックアウトまたはノックインされる標的遺伝子をコードする遺伝子（複数可）を操作するために使用される。いくつかの実施形態では、CRISPRは、T細胞のTCRの1つ以上、および／または1つ以上の免疫チェックポイント阻害剤をコードする遺伝子を編集するために使用される。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、CTLA4およびPD1のうちの1つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、CRISPRは、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、およびTCR δ のうちの1つ以上を切断するために使用される。いくつかの実施形態では、TCRは、TCRのCD3 ζ シグナル伝達ドメインの機能に影響を及ぼすことなく切断される。実施形態およびどの標的遺伝子が編集されるべきかに応じて、クラス1またはクラス2 Casが使用される。いくつかの実施形態では、クラス1 Casが使用され、Casタイプは、以下のタイプ：I、IA、IB、IC、ID、IE、IF、IU、III、IIIA、IIIB、IIIC、IIID、IV、IVA、IVB、およびそれらの組み合わせから選択される。いくつかの実施形態では、Casは、Cas3、Cas8a、Cas5、Cas8b、Cas8c、Cas10d、Cse1、Cse2、Csy1、Csy2、Csy3、GSU0054、Cas10、Csm2、Cmr5、Cas10、Csx11、Csx10、CsF1、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、クラス2 Casが使用され、Casタイプは、II、IIA、IIB、IIC、V、VI、およびそれらの組み合わせから選択される。いくつかの実施形態では、Casは、Cas9、Csn2、Cas4、Cpf1、C2c1、C2c3、Cas13a（以前はC2c2として知られていた）、Cas13b、Cas13c、CasX、CasY、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。一部の実施形態では、クラス2 CasXが使用され

、C a s Xはガイド核酸と複合体を形成することができ、複合体は標的DNAに結合することができ、標的DNAは非標的鎖および標的鎖を含む。一部の実施形態では、クラス2 C a s Yが使用され、C a s Yは標的核酸および／または標的核酸に関連付けられるポリペプチドを結合および修飾することができる。

【0286】

いくつかの実施形態では、上記で検討したように、C I S Hの編集は、編集された細胞、特に、編集されたNK細胞、増大した拡大、細胞傷害性および／または持続性を有利に与える。さらに、いくつかの実施形態では、T C Rへの修飾は、T C R α への修飾を含むが、C D 3複合体を介するシグナル伝達に影響を与えず、T細胞増殖を可能にする。一実施形態では、T C R α は、細胞におけるp r e - T α の発現によって不活性化され、したがって、機能的アルファ／ベータT C Rの非存在下で機能的C D 3複合体を回復させる。本明細書に開示されるように、非同種反応性修飾T細胞はまた、C A Rを発現して、非同種反応性T細胞特異性を腫瘍マーカーに向けるが、しかし、M H Cとは無関係であるように操作される。編集の組み合わせは、いくつかの実施形態では、非限定的な例として、例えば、組み合わせたT C RおよびC I S Hのノックアウト、またはC I S HのノックアウトおよびC D 4 7のノックインなどとして使用される。

【0287】

いくつかの実施形態では、A D O R A 2 A（アデノシン2 a受容体）の発現は、結果として生じるT細胞および／またはNK細胞、または本明細書に提供される他の細胞型における全体的な活性化を増加させるために、減少および／または除去される。いくつかの実施形態では、A D O R A 2 Aは、本明細書に開示される遺伝子編集方法の1つ以上を用いて破壊および／またはノックアウトされる。いくつかの実施形態では、A D O R A 2 Aは、以下のA D O R A 2 A特異的ガイドRNA：配列番号503～506のもう1つの使用によりガイドされるC a sヌクレアーゼを用いて、本明細書の他の箇所に開示されるC r i s p r - C a s媒介性アプローチ（例えば、C a s 9）を用いて破壊および／またはノックアウトされる。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、標的タンパク質の発現を、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約97%、約98%、約99%、またはそれ以上（列挙されたものの間の任意の量を含む）減少させることができる。A D O R A 2 Aの発現の喪失は、T細胞およびNK細胞に対する十分に確立された免疫抑制剤であるアデノシンに対する減少した感受性を誘導する。したがって、いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集A D O R A 2 Aは、操作されたNK細胞、T細胞、または本明細書に開示される他の細胞の細胞傷害性、持続性、免疫回避を増加させ、またはその他の形でその有効性を増強する。

【0288】

いくつかの実施形態では、結果として生じるT細胞および／もしくはNK細胞、または本明細書に提供される他の細胞型における全体的な活性化を増加させるために、T G F B R 2の発現を減少および／または除去する。いくつかの実施形態では、T G F B R 2は、本明細書に開示される遺伝子編集方法の1つ以上を用いて破壊および／またはノックアウトされる。いくつかの実施形態では、T G F B R 2は、以下のT G F B R 2特異的ガイドRNA：配列番号544～547のもう1つの使用によりガイドされるC a sヌクレアーゼを用いて、本明細書の他の箇所に開示されるC r i s p r - C a s媒介性アプローチ（例えば、C a s 9）を用いて破壊および／またはノックアウトされる。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、標的タンパク質の発現を、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約97%、約98%、約99%、またはそれ以上（列挙されたものの間の任意の量を含む）減少させることができる。NK細胞では、T G F B R 2はNK細胞媒介性腫瘍免疫における強力なチェックポイントであるが、T細胞では、T G F B R 2のノックアウトは、T G F - β 1によって誘導されるc a r T細胞の消耗を救済する。したがって、いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集T G F B R 2は、操作されたNK細胞、T細胞、または本明細書に開示される他の細胞の細胞傷害性、持続性、免疫回避を増加させ、またはその他の形でその有

効性を増強する。

【0289】

いくつかの実施形態では、NK G 2 Aの発現は、結果として生じるT細胞および／またはNK細胞、または本明細書に提供される他の細胞型における全体的な活性化を増加させるために、減少および／または除去される。いくつかの実施形態では、NK G 2 Aは、本明細書に開示される遺伝子編集方法の1つ以上を用いて破壊および／またはノックアウトされる。いくつかの実施形態では、NK G 2 Aは、以下のNK G 2 A特異的ガイドRNA：配列番号548～551のもう1つの使用によりガイドされるCasヌクレアーゼを用いて、本明細書の他の箇所に開示されるCr i s p r - C a s媒介性アプローチ（例えば、Cas9）を用いて破壊および／またはノックアウトされる。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、標的タンパク質の発現を、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約97%、約98%、約99%、またはそれ以上（列挙されたものの間の任意の量を含む）減少させることができる。NK G 2 AはHLA-Eに結合し、MHC認識受容体として認識される。NK G 2 Aは阻害受容体であるため、NK G 2 Aの発現の喪失は、構成細胞の増大した活性化を誘導する。NK細胞およびT細胞では、NK G 2 Aの喪失は、HLA-Eを発現する腫瘍細胞に対する活性化および細胞傷害性の増加をもたらす。したがって、いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集NK G 2 Aは、操作されたNK細胞、T細胞、または本明細書に開示される他の細胞の細胞傷害性、持続性、免疫回避を増加させ、またはその他の形でその有効性を増強する。

10

20

【0290】

いくつかの実施形態では、サイトカインシグナル伝達2（SOC S 2）の発現は、結果として生じるT細胞および／またはNK細胞、または本明細書に提供される他の細胞型における全体的な活性化を増加させるために、減少および／または除去される。いくつかの実施形態では、SOC S 2は、本明細書に開示される遺伝子編集方法の1つ以上を用いて破壊および／またはノックアウトされる。いくつかの実施形態では、SOC S 2は、以下のSOC S 2特異的ガイドRNA：配列番号556～561のもう1つの使用によりガイドされるCasヌクレアーゼを用いて、本明細書の他の箇所に開示されるCr i s p r - C a s媒介性アプローチ（例えば、Cas9）を用いて破壊および／またはノックアウトされる。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、標的タンパク質の発現を、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約97%、約98%、約99%、またはそれ以上（列挙されたものの間の任意の量を含む）減少させることができる。SOC S タンパク質はサイトカイン応答の負の制御因子であり、SOC S 2はJAK2活性の阻害を介してNK細胞の発生を特異的に負に制御する。NK細胞におけるSOC S 2の発現の喪失は、増加したNK細胞の発生および全体的な細胞傷害性を誘導する。したがって、いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集SOC S 2は、操作されたNK細胞、T細胞、または本明細書に開示される他の細胞の細胞傷害性、持続性、免疫回避を増加させ、またはその他の形でその有効性を増強する。

30

【0291】

いくつかの実施形態では、Cas i t a s B系列リンパ腫-b（C b l - b）の発現は、結果として生じるT細胞および／またはNK細胞、または本明細書に提供される他の細胞型における全体的な活性化を増加させるために、減少および／または除去される。いくつかの実施形態では、C b l - bは、本明細書に開示される遺伝子編集方法の1つ以上を用いて破壊および／またはノックアウトされる。いくつかの実施形態では、C b l - bは、以下のC b l - b特異的ガイドRNA：のもう1つの使用によりガイドされるCasヌクレアーゼを用いて、本明細書の他の箇所に開示されるCr i s p r - C a s媒介性アプローチ（例えば、Cas9）を用いて破壊および／またはノックアウトされる。いくつかの実施形態では、Cas i t a s B系列リンパ腫-b（C b l - b）の発現は、結果として生じるT細胞およびNK細胞における全体的な活性化を増加させるために、減少および／または除去される。いくつかの実施形態では、C b l - bは、本明細書の他の箇所

40

50

に開示されるCrispr-Cas媒介性アプローチ（例えば、Cas9）を用いるが、以下のCblb特異的ガイドRNA：配列番号552～555の1つ以上の使用のうち1つの使用によって、破壊および／またはノックアウトされる。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、標的タンパク質の発現を、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約97%、約98%、約99%、またはそれ以上（列挙されたものの間の任意の量を含む）減少させることができる。CblbはT細胞活性化を負に調節するE3ユビキチンリガーゼである。NK細胞およびT細胞におけるCblbの発現の喪失は、抗腫瘍免疫の増加を示す。さらに、Cblb欠損T細胞およびNK細胞はPD-L1/PD-1媒介性抑制に抵抗性である。したがっていくつかの実施形態によれば、遺伝子編集Cblbは、操作されたNK細胞、T細胞、または本明細書に開示される他の細胞の細胞傷害性、持続性、免疫回避を増加させ、またはその他の形でその有効性を増強する。

10

【0292】

いくつかの実施形態では、ベータ-2ミクログロブリン（B2-ミクログロブリン）の発現は、結果として生じるT細胞および／またはNK細胞、または本明細書に提供される他の細胞型における全体的な活性化を増加させるために、減少および／または除去される。いくつかの実施形態では、B2-ミクログロブリンは、本明細書に開示される遺伝子編集方法の1つ以上を用いて破壊および／またはノックアウトされる。いくつかの実施形態では、B2-ミクログロブリンは、以下のB2-ミクログロブリン特異的ガイドRNA：配列番号290～299のうち1つの使用によりガイドされるCasヌクレアーゼを用いて、本明細書の他の箇所に開示されるCrispr-Cas媒介性アプローチ（例えば、Cas9）を用いて破壊および／またはノックアウトされる。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、標的タンパク質の発現を、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約97%、約98%、約99%、またはそれ以上（列挙されたものの間の任意の量を含む）減少させることができる。B2-ミクログロブリンの発現の喪失は、MHCクラスI分子の顕著に減少したレベルを誘導し、NK細胞とT細胞の両方において、B2-ミクログロブリンの減少は、自己細胞および同種異系細胞の全体的な細胞認識をモジュレートすることができる。したがって、いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集B2-ミクログロブリンは、操作されたNK細胞、T細胞、または本明細書に開示される他の細胞の細胞傷害性、持続性、免疫回避を増加させ、またはその他の形でその有効性を増強する。

20

30

【0293】

いくつかの実施形態では、結果として得られるT細胞および／もしくはNK細胞、または本明細書に提供される他の細胞型における全体的な活性化を増加させるために、IgおよびITIMドメイン（TIGIT）を有するT細胞免疫受容体の発現を減少および／または除去する。いくつかの実施形態では、TIGITは、本明細書に開示される遺伝子編集方法の1つ以上を用いて破壊および／またはノックアウトされる。いくつかの実施形態では、TIGITは、以下のTIGIT特異的ガイドRNA：配列番号507～510のうち1つの使用によってガイドされるCasヌクレアーゼを用いて、本明細書の他の箇所に開示されるCrispr-Cas媒介性アプローチ（例えば、Cas9）を用いて破壊および／またはノックアウトされる。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、標的タンパク質の発現を、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約97%、約98%、約99%、またはそれ以上（列挙されたものの間の任意の量を含む）減少させることができる。TIGITは、T細胞およびNK細胞の消耗に関連するチェックポイント受容体である。NK細胞におけるTIGITの発現の喪失は、NK細胞の消耗を妨げ、NK細胞依存性腫瘍免疫を促進する。T細胞におけるTIGITの発現の喪失は、同様に、結果として生じるT細胞の下流活性化をもたらす。したがって、いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集TIGITは、操作されたNK細胞、T細胞、または本明細書に開示される他の細胞の細胞傷害性、持続性、免疫回避を増加させ、またはその他の形でその有効性を増強する。

40

50

【0294】

いくつかの実施形態では、プログラミングされた細胞死タンパク質-1 (PD-1) の発現は、結果として生じるT細胞および／またはNK細胞、または本明細書に提供される他の細胞型における全体的な活性化を増加させるために、減少および／または除去される。いくつかの実施形態では、PD-1は、本明細書に開示される遺伝子編集方法の1つ以上を用いて破壊および／またはノックアウトされる。いくつかの実施形態では、PD-1は、以下のPD-1特異的ガイドRNA：配列番号511～514のもう1つの使用によりガイドされるCasヌクレアーゼを用いて、本明細書の他の箇所に開示されるCrispr-Cas媒介性アプローチ（例えば、Cas9）を用いて破壊および／またはノックアウトされる。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、標的タンパク質の発現を、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約97%、約98%、約99%、またはそれ以上（列挙されたものの間の任意の量を含む）減少させることができる。PD-1は免疫調節において阻害的な役割を果たし、免疫細胞活性を抑制することにより全体的な機能を下方制御する。NK細胞におけるPD-1の発現の喪失は、インターフェローンガンマ、グランザイムB、およびパーフォリンの分泌の増加による全体的な細胞傷害性を増加させる。同様に、PD-1の発現が喪失したT細胞は、増加した細胞傷害性および全体的なカスパーゼ活性化を示す。したがって、いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集PD-1は、操作されたNK細胞、T細胞、または本明細書に開示される他の細胞の細胞傷害性、持続性、免疫回避を増加させ、またはその他の形でその有効性を増強する。

10

20

【0295】

いくつかの実施形態では、T細胞免疫グロブリンおよびムチンドメイン含有-3 (TIM-3) の発現は、結果として生じるT細胞および／またはNK細胞、または本明細書に提供される他の細胞型における全体的な活性化を増加させるために、減少および／または除去される。いくつかの実施形態では、TIM-3は、本明細書に開示される遺伝子編集方法の1つ以上を用いて破壊および／またはノックアウトされる。いくつかの実施形態では、TIM-3は、以下のTIM-3特異的ガイドRNA：配列番号515～518のもう1つの使用によりガイドされるCasヌクレアーゼを用いて、本明細書の他の箇所に開示されるCrispr-Cas媒介性アプローチ（例えば、Cas9）を用いて破壊および／またはノックアウトされる。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、標的タンパク質の発現を、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約97%、約98%、約99%、またはそれ以上（列挙されたものの間の任意の量を含む）減少させることができる。TIM-3は免疫チェックポイント機能に関与する阻害受容体である。TIM-3の発現の喪失は、操作されたNKおよびT細胞における全体的な細胞傷害性を増加させ、ならびにNK細胞およびT細胞の消耗を減少させ、TIM-3発現を欠損する構成細胞の増加したエフェクター機能をもたらす。したがって、いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集TIM-3は、操作されたNK細胞、T細胞、または本明細書に開示される他の細胞の細胞傷害性、持続性、免疫回避を増加させ、またはその他の形でその有効性を増強する。

30

【0296】

いくつかの実施形態では、CD38の発現は、結果として生じるT細胞および／またはNK細胞、または本明細書に提供される他の細胞型における全体的な活性化を増加させるために、減少および／または除去される。いくつかの実施形態では、CD38は、本明細書に開示される遺伝子編集方法の1つ以上を用いて破壊および／またはノックアウトされる。いくつかの実施形態では、CD38は、以下のCD38特異的ガイドRNA：配列番号519～522のもう1つの使用によりガイドされるCasヌクレアーゼを用いて、本明細書の他の箇所に開示されるCrispr-Cas媒介性アプローチ（例えば、Cas9）を用いて破壊および／またはノックアウトされる。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、標的タンパク質の発現を、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約97%、約98%、約99%

40

50

、またはそれ以上（列挙されたものの間の任意の量を含む）減少させることができる。CD38は免疫細胞の成熟サイクルにおいて役割を果たし、血液がんはしばしば上方制御されたCD38を提示することがある。構成NK細胞上のCD38発現の喪失は、フラトリサイドの減少によるより大きな細胞傷害性を可能にする。野生型NK細胞はCD38を自己発現し、野生型NK細胞において下流の自己標的化効果をもたらす。T細胞では、構成T細胞に対するCD38発現の喪失は、細胞傷害性の増加をもたらす。したがって、いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集CD38は、操作されたNK細胞、T細胞、または本明細書に開示される他の細胞の細胞傷害性、持続性、免疫回避を増加させ、またはその他の形でその有効性を増強する。

【0297】

いくつかの実施形態では、T細胞受容体アルファ（TCR α ）の発現は、結果として生じるT細胞および／またはNK細胞、または本明細書に提供される他の細胞型における全体的な活性化を増加させるために、減少および／または除去される。いくつかの実施形態では、TCR α は、本明細書に開示される遺伝子編集方法の1つ以上を用いて破壊および／またはノックアウトされる。いくつかの実施形態では、TCR α は、以下のTCR α 特異的ガイドRNA：配列番号566～569のもう1つの使用によりガイドされるCasヌクレアーゼを用いて、本明細書の他の箇所に開示されるCRISPR-Cas媒介性アプローチ（例えば、Cas9）を用いて破壊および／またはノックアウトされる。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、標的タンパク質の発現を、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約97%、約98%、約99%、またはそれ以上（列挙されたものの間の任意の量を含む）減少させることができる。T細胞受容体（TCR）は、MHC分子を認識するT細胞上に見出されるタンパク質複合体である。特定のTCRの喪失および他のTCRの優先的発現は、構成細胞による選択的な標的化および認識の増加により、操作された細胞における細胞傷害性の増加をもたらすことができる。したがって、いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集TCRは、操作されたNK細胞、T細胞、または本明細書に開示される他の細胞の細胞傷害性、持続性、免疫回避を増加させ、またはその他の形でその有効性を増強する。

【0298】

いくつかの実施形態では、結果として得られるT細胞および／もしくはNK細胞、または本明細書に提供される他の細胞型における全体的な活性化を増加させるために、CISHの発現を減少および／または除去する。いくつかの実施形態では、CISHは、本明細書に開示される遺伝子編集方法の1つ以上を用いて破壊および／またはノックアウトされる。いくつかの実施形態では、CISHは、以下のCISH特異的ガイドRNA：配列番号562～565、または本明細書に開示される他のガイドのもう1つの使用によってガイドされるCasヌクレアーゼを用いて、本明細書の他の箇所に開示されるCRISPR-Cas媒介性アプローチ（例えば、Cas9）を用いて破壊および／またはノックアウトされる。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、標的タンパク質の発現を、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約97%、約98%、約99%、またはそれ以上（列挙されたものの間の任意の量を含む）減少させることができる。CD8⁺ T細胞において、CISHは、腫瘍抵抗性を維持するためにTCRシグナル伝達を能動的にサイレンシングし、CISHは、IL-15受容体シグナル伝達の下流の負の制御因子であることが示されている。NK細胞およびT細胞において、CISHはチェックポイントの成熟および増殖において役割を果たす。したがって、いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集CISHは、操作されたNK細胞、T細胞、または本明細書に開示される他の細胞の細胞傷害性、持続性、免疫回避を増加させ、またはその他の形でその有効性を増強する。

【0299】

いくつかの実施形態では、CEACAM1の発現は、結果として生じるT細胞および／またはNK細胞、または本明細書に提供される他の細胞型における全体的な活性化を増加させるために、減少および／または除去される。いくつかの実施形態では、CEACAM

1 は、本明細書に開示される遺伝子編集方法の1つ以上を用いて破壊および／またはノックアウトされる。いくつかの実施形態では、CEACAM1は、以下のCEACAM1特異的ガイドRNA：配列番号497～499のもう1つの使用によりガイドされるCasヌクレアーゼを用いて、本明細書の他の箇所に開示されるCrispr-Cas媒介性アプローチ（例えば、Cas9）を用いて破壊および／またはノックアウトされる。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、標的タンパク質の発現を、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約97%、約98%、約99%、またはそれ以上（列挙されたものの間の任意の量を含む）減少させることができる。CEACAM1はNK細胞とT細胞の両方に対するチェックポイント阻害剤であり、CEACAM1を有する腫瘍細胞系の溶解を阻害することができる。CEACAM1発現の喪失は、NK細胞およびT細胞に対する全体的な細胞傷害性を増加させることができる。したがって、いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集CEACAM1は、操作されたNK細胞、T細胞、または本明細書に開示される他の細胞の細胞傷害性、持続性、免疫回避を増加させ、またはその他の形でその有効性を増強する。

10

20

30

40

50

【0300】

いくつかの実施形態では、DDIT4の発現は、結果として生じるT細胞および／もしくはNK細胞、または本明細書で提供される他の細胞型における全体的な活性化を増加させるために、減少および／または除去される。いくつかの実施形態では、DDIT4は、本明細書に開示される遺伝子編集方法のうちの1つ以上を用いて破壊および／またはノックアウトされる。いくつかの実施形態では、DDIT4は、以下のDDIT4特異的ガイドRNA：配列番号500～502のうちのもう1つの使用によってガイドされるCasヌクレアーゼを用いて、本明細書の他の箇所に開示されるCrispr-Cas媒介性アプローチ（例えば、Cas9）を用いて破壊および／またはノックアウトされる。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、標的タンパク質の発現を、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約97%、約98%、約99%、またはそれ以上（列挙されたものの間の任意の量を含む）減少させることができる。NKおよびT細胞では、DDIT4はmTORC1の負の制御因子であり、それ自体がIL-15を介したNK細胞の生存および増殖を増強する。さらに、DDIT4は、腫瘍微小環境において一般的であるように、酸化ストレス状態によって上方制御される。操作された細胞におけるDDIT4機能の喪失は、全体的なグルコース代謝を増加させ、増殖を促進し、ならびに全体的なNKまたはT細胞の細胞傷害性を増加させることができる。したがって、いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集DDIT4は、操作されたNK細胞、T細胞、または本明細書に開示される他の細胞の細胞傷害性、持続性、免疫回避を増加させ、またはその他の形でその有効性を増強する。

【0301】

いくつかの実施形態では、MAPKAPキナーゼ3（MAPKAPK3）の発現は、結果として生じるT細胞および／もしくはNK細胞、または本明細書で提供される他の細胞型における全体的な活性化を増加させるために、減少および／または除去される。いくつかの実施形態では、MAPKAPK3は、本明細書に開示される遺伝子編集方法のうちの1つ以上を用いて破壊および／またはノックアウトされる。いくつかの実施形態では、MAPKAPK3は、以下のMAPKAPK3特異的ガイドRNA：配列番号494～496のうちのもう1つの使用によりガイドされるCasヌクレアーゼを用いて、本明細書の他の箇所に開示されるCrispr-Cas媒介性アプローチ（例えば、Cas9）を用いて破壊および／またはノックアウトされる。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、標的タンパク質の発現を、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約97%、約98%、約99%、またはそれ以上（列挙されたものの間の任意の量を含む）減少させることができる。MAPKAPキナーゼ3はNK細胞とT細胞の両方において発現される。操作された細胞におけるMAPKAPK3の喪失は、細胞傷害性、サイトカイン分泌、および全体的なNKシグナル伝達を増加させることが予想される。したがって、いくつかの実施形態によれば

、遺伝子編集MAPKAPK3は、操作されたNK細胞、T細胞、または本明細書に開示される他の細胞の細胞傷害性、持続性、免疫回避を増加させ、またはその他の形でその有効性を増強する。

【0302】

いくつかの実施形態では、SMAD3の発現は、結果として生じるT細胞および／もしくはNK細胞、または本明細書で提供される他の細胞型における全体的な活性化を増加させるために、減少および／または除去される。いくつかの実施形態では、SMAD3は、本明細書に開示される遺伝子編集方法のうちの1つ以上を用いて破壊および／またはノックアウトされる。いくつかの実施形態では、SMAD3は、以下のSMAD3特異的ガイドRNA：配列番号491～493のうちのもう1つの使用によりガイドされるCasヌクレアーゼを用いて、本明細書の他の箇所に開示されるCRISPR-Cas媒介性アプローチ（例えば、Cas9）を用いて破壊および／またはノックアウトされる。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、標的タンパク質の発現を、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約97%、約98%、約99%、またはそれ以上（列挙されたものの間の任意の量を含む）減少させることができる。SMAD3は、TGF-βスーパーファミリーメンバーである。アクチビンAの阻害は、効果的な下流TGFβRノックアウトを提供する。Smad3サイレンシングされたNK細胞は、増殖および分化の増加、ならびに操作されたT細胞およびNK細胞における細胞傷害性の増加を示す。したがって、いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集SMAD3は、操作されたNK細胞、T細胞、または本明細書に開示される他の細胞の細胞傷害性、持続性、免疫回避を増加させ、またはその他の形でその有効性を増強する。

【0303】

上記で検討したように、遺伝子編集された細胞は、複数の位置で編集することができる。例えば、いくつかの実施形態では、細胞（例えば、NK細胞もしくはT細胞、またはそれらの混合物）は、2つの位置で編集されている。いくつかの実施形態では、遺伝子編集の1つは、CISH遺伝子における標的部位で行われる。いくつかの実施形態では、遺伝子編集の1つは、CBLB遺伝子における標的部位で行われる。いくつかの実施形態では、遺伝子編集の1つは、TGFβR2遺伝子における標的部位で行われる。いくつかの実施形態では、遺伝子編集の1つは、TIGIT遺伝子における標的部位で行われる。このような編集の任意の組み合わせはまた、提供される実施形態内にあり、例えば、二重TGFβR2/CBLB、二重TIGIT/TGFβR2、CISH/CBLB、CISH/TGFβR2、CISH/TIGITなどが挙げられる。さらに、一部の実施形態に従って、編集のための（例えば、CRISPRまたは他のヌクレアーゼによる）標的遺伝子のいずれかの編集の任意の組み合わせを行うことができる。さらに、遺伝子発現において所望の量の減少を達成するのに必要な範囲で、単一の標的遺伝子または複数の標的遺伝子内で複数の編集を行うことができる。

【0304】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、CISH遺伝子の標的部位およびCBLB遺伝子の標的部位で行われる。一部の実施形態では、二重編集、例えば、CISH/CBLBは、治療に使用するためにNK細胞および／またはT細胞において行われる。いくつかの実施形態では、組み合わせCISH/CBLB遺伝子編集は、CD70遺伝子での編集を含まないNK細胞において行われる。いくつかの実施形態では、組み合わせCISH/CBLB遺伝子編集は、いずれのさらなる遺伝子においても編集を含まないNK細胞において行われる。いくつかの実施形態では、組み合わせCISH/CBLB遺伝子編集は、抗CD70 CAR、抗CD19 CAR、または抗NKG2Dキメラ受容体のいずれかの任意の1つも組み合わせも発現しないNK細胞において行われる。一部の実施形態では、治療に使用するために、NK細胞および／またはT細胞において、三重編集、例えば、CD70/CISH/CBLBが行われる。一部の実施形態では、三重編集、例えば、CD70/CISH/CBLBは、腫瘍標的化CARを発現するように操作されたNK細胞

および／またはT細胞において行われる。

【0305】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、CISH遺伝子における標的部位およびTGFB2遺伝子における標的部位で行われる。一部の実施形態では、二重編集、例えば、CISH／TGFB2は、治療に使用するためにNK細胞および／またはT細胞において行われる。いくつかの実施形態では、組み合わせCISH／TGFB2遺伝子編集は、CD70遺伝子での編集を含まないNK細胞において行われる。いくつかの実施形態では、組み合わせCISH／TGFB2遺伝子編集は、いずれのさらなる遺伝子においても編集を含まないNK細胞において行われる。いくつかの実施形態では、組み合わせCISH／TGFB2遺伝子編集は、抗CD70 CAR、抗CD19 CAR、または抗NKGD2キメラ受容体のいずれかの任意の1つも組み合わせも発現しないNK細胞において行われる。一部の実施形態では、三重編集、例えば、CD70／CISH／TGFB2は、治療に使用するためにNK細胞および／またはT細胞において行われる。一部の実施形態では、トリプル編集、例えば、CD70／CISH／TGFB2は、腫瘍標的化CARを発現するように操作されたNK細胞および／またはT細胞において行われる。

10

【0306】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、CISH遺伝子の標的部位およびTIGIT遺伝子の標的部位で行われる。一部の実施形態では、二重編集、例えば、CISH／TIGITは、治療に使用するために、NK細胞および／またはT細胞において行われる。いくつかの実施形態では、組み合わせCISH／TIGIT遺伝子編集は、CD70遺伝子での編集を含まないNK細胞において行われる。いくつかの実施形態では、組み合わせCISH／TIGIT遺伝子編集は、いずれのさらなる遺伝子においても編集を含まないNK細胞において行われる。いくつかの実施形態では、組み合わせCISH／TIGIT遺伝子編集は、抗CD70 CAR、抗CD19 CAR、または抗NKGD2キメラ受容体のいずれかの任意の1つも組み合わせも発現しないNK細胞において行われる。一部の実施形態では、三重編集、例えば、CD70／CISH／TIGITは、治療に使用するために、NK細胞および／またはT細胞において行われる。一部の実施形態では、三重編集、例えば、CD70／CISH／TIGITは、腫瘍標的化CARを発現するように操作されたNK細胞および／またはT細胞において行われる。

20

【0307】

操作は免疫抑制エフェクターを介した持続性を増強した

同種異系CAR-T細胞および／または同種異系CAR-NK細胞などの同種異系細胞療法産物の持続性をさらに増強するのに役立つさらなる細胞工学的戦略が本明細書において提供される。本明細書において検討するように、宿主細胞媒介性移植片拒絶を誘導する同種異系細胞療法産物の傾向を減少させるために用いることができる種々の戦略がある。例えば、いくつかの実施形態では、B2Mの発現は、宿主媒介性移植片拒絶を減少させるために減少および／または除去される。いくつかの実施形態では、B2M発現は、本明細書の他の箇所に開示されるCrispr-Cas媒介性アプローチ（例えば、Cas9）を用いるが、以下のB2M特異的ガイドRNA：配列番号290-CGCGAGCACAGCTAAGGCCA；配列番号291-GAGTAGCGCGAGCACAGCTA；配列番号292-GCTACTCTCTCTTTCTGGCC；配列番号293-GGCGAGATGTCTCGCTCCG；配列番号294-GGCCACGGAGCGAGACATCT；配列番号295-CACAGCCCAAGATAGTTAAG；配列番号296-AGTCACATGGTTCACACGGC；配列番号297-AAGTCAACCTTCAATGTCGGA；配列番号298-ACCTTGCTTTTCAGCAAGGAC；および配列番号299-TGGGCTGTGACAAAGTCAACAのうちのもう1つの使用によって、破壊および／またはノックアウトされる。B2Mの発現の喪失は、HLA発現の完全な喪失を誘導し、宿主T細胞媒介性移植片拒絶を減少させることができる。しかしながら、これはまた、投与された細胞を宿主NK細胞媒介性移植片拒絶に感受性にすることができる（また、混合NK／T細胞

30

40

50

胞集団が使用される場合には、投与された操作されたNK細胞にも感受性にすることができる。これは、上記で検討したように、KIR阻害シグナルの喪失（例えば、「自己の欠損」シグナル）をもたらす。図8E～8Iを参照されたい。一部の実施形態では、種々のタンパク質は、投与されたNKおよび／またはT細胞を標的とすることから宿主（もしくはは投与された）NK細胞を阻害するために、同種異系レシピエントに投与される細胞の表面上に発現させることができる。いくつかの実施形態では、アプローチは、例えば、HLA-E／HLA-G発現、CD47、または1つ以上のウイルスペプチド／タンパク質、およびこれらの組み合わせ（本明細書中で開示されているものの中で）の発現を伴う。

【0308】

ウイルス免疫抑制ペプチド

多くのウイルス感染は、少なくとも部分的には、カモフラージュまたは宿主の免疫反応性の抑制のいずれかによって、宿主免疫系を回避するウイルスの能力に起因して起こる。インビトロ（*in vitro*）研究は、特定のウイルスの具体的な態様が、このような免疫抑制効果、例えば、p15Eタンパク質などのレトロウイルス膜貫通エンベロープタンパク質を有することを示した。さらに、研究は、複数のウイルス型にわたる配列の保存された領域が同定しており、例えば、17アミノ酸の保存配列、CKS-17（配列番号199）、および同じものをコードする核酸（配列番号216）を含む表1を参照されたい。

【表1】

表 1:ウイルスペプチド

配列番号	名称	配列
199	CKS-17	LQNRRGLDLLFLKEGGL
200	MoLV p15E	LQNRRGLDLLFLKEGGLCAALKEECCF
201	FLC p15E	LQNRRGLDLLFLKEGGLCAALKEECCF
202	AKV p15E	LQNRRGLDLLFLKEGGLCAALKEECCF
203	GLV p15E	LQNRRGLDLLFLKEGGLCAALKEECCF
204	MMCF p15E	LQNRRGLDLLFLKEGGLCAALKEECCF
205	AMCF p15E	LQNRRGLDLLFLKEGGLCAALKEECCF
206	FeLV p15E	LQNRRGLDLLFLQEGGLCAALKEECCF
207	MPMV gp20	LQNRRGLDLLTAEQGGICLALQEKCCF
208	REV-A GP20	LQNRRGLDLLTAEQGGICLALQEKCCF
209	HTLV-I gp21	AQNRRGLDLLFWEQGGGLCKALQECCRF
210	HTLV-II gp21	AQNRRGLDLLFWEQGGGLCKAIQECCCF
211	HIV-1 NEF	MTYKAAVDLSHFLKEKGGL
212	HIV-1 gp41	LQARVLAVERYLKDQQL
213	B26	LQNKRGDLLFLX ₁ X ₂ GGL (X ₁ =K/E, X ₂ =E/K)
214	BaEV	LQNRRGLDLLTAEQGGX ₁ (X ₁ =L/I)
215	ERV-9, 4-1	X ₁ QNRX ₂ X ₃ LX ₄ X ₅ X ₆ X ₇ AX ₈ X ₉ X ₁₀ GX ₁₁ (X ₁ =L/Y, X ₂ =*/L, X ₃ =G/A, X ₄ =D/N, X ₅ =L/Y, X ₆ =L/S, X ₇ =L/T, X ₈ =E/Q/A, X ₉ =E/K, X ₁₀ =G/E, X ₁₁ =L/V)
216	CKS-17	ctgcaaacagaaggggattagaccctgctttttcttaagaggaggagctc

【0309】

いくつかの実施形態では、1つ以上のこのようなウイルス免疫抑制ペプチド（ウイルスペプチドとも呼ばれる）は、宿主NK細胞による操作された免疫細胞の不活化に対する抵抗性を付与するために使用される。実施形態および使用される細胞型に応じて、種々のアプローチを行うことができる。

【0310】

いくつかの実施形態に従い、1つ以上のウイルス免疫抑制ペプチドは、キメラ抗原受容体に組み込まれ、次に患者を標的化する際に使用される免疫細胞の集団によって発現される。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、患者に対して同種異系である。いくつかの実施形態では、NK細胞とT細胞の組み合わせは、1つ以上のウイルス免疫抑制ペプチドを含む1つ以上のCARを発現するように操作される。図25Aは、CARに組み込まれたウイルス免疫抑制ペプチドの非限定的な実施形態を示す（別段に指定されていなければ、概して、ウイルス免疫抑制ペプチドまたは本明細書に開示される他の免疫抑制ペプチド／タンパク質のいずれかを指すものと理解される「免疫抑制エフェクタードメイン」として同定される）。図25Aに示されるように、ウイルス免疫抑制ペプチドは、標的結合因子を含むCARのヒンジ／スペーサードメイン（scFvなど）、ヒンジ（本明細書においてスペーサーとも称される）、膜貫通ドメインおよび1つ以上の細胞内シグナル伝達ドメインに組み込まれる。実施形態に依存して、1を超える（例えば、2、3、4、5、またはそれ以上の）ウイルス免疫抑制ペプチドが、CARのヒンジ／スペーサー領域に組み込まれ得る。いくつかのこのような実施形態では、図25Bにおいて概略的に示されるように、2つ（またはそれ以上の）ウイルス免疫抑制ペプチドが使用される場合、これらは異なる配列またはタイプのものであり得る。例えば、いくつかの実施形態では、CKS-17ペプチドは、例えば、REV-Aペプチドと併せて、CARのヒンジ領域に組み込まれる。いくつかの実施形態では、2つ以上のウイルス免疫抑制ペプチドを含むことにより、相乗的な免疫抑制効果が生みだされる。

【0311】

実施形態に依存して、ヒンジ／スペーサー領域の長さは改変され得る。いくつかの実施形態では、CD8アルファヒンジ／スペーサー領域が使用されるが、一部の実施形態では、より長いまたはより短いスペーサーが使用される。スペーサーは、実施形態に依存して、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、もしくはCD28スペーサードメインであり得るか、またはIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、CD28に由来し得るか、または完全な合成配列であり得る。いくつかの実施形態では、IgGベースのスペーサーは、スペーサーのFc受容体保有細胞を運ぶ能力を低下させるかまたは排除するように編集され、これは、免疫細胞（本明細書に開示される免疫抑制エフェクターを保有するものなど）のオフターゲット活性化を有利に低下させ得る。非限定的な編集アプローチとしては、以下に限定されないが、Fc受容体への結合を抑止するか、またはFc受容体結合に必須である特定のアミノ酸を突然変異させる重鎖定常2（CH2）ドメインの欠失が挙げられる。いくつかの実施形態では、より長いスペーサーは、がん細胞によって発現される特定の膜近位エピトープの標的化の増強および免疫抑制エフェクターの曝露を可能にするのに有利であり、その結果、宿主および／または投与された免疫細胞と相互作用し、治療細胞の望ましくない抑制を低下させることができる。いくつかの実施形態では、単一のヒンジ領域は、複数のヒンジをコードする配列、例えば、2、3、4、またはそれ以上のヒンジを含むことによってより長くされ得る。複数のヒンジ領域が使用されるいくつかの実施形態では、これらは同じタイプ（例えば、3つのCD8αヒンジ）のものであり得るか、または様々（例えば、1つのCD8αヒンジ、1つのCD28ヒンジ、およびIgG1ヒンジ）であり得る。いくつかの実施形態では、より短いヒンジが使用され、より短いヒンジは、宿主ホスファターゼ（CD45のような）の能力を制限し、操作された免疫細胞によって発現されるCARのシグナル伝達を減弱させる。いくつかの実施形態では、ヒンジ領域は、配列番号479～487のうちの1つ以上を含む。一部の実施形態では、ヒンジ領域は、配列番号479～487のいずれかと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約9

10

20

30

40

50

6 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、または少なくとも約 99 % の配列同一性、相同性および／または機能的等価性を有するアミノ酸配列を含む。

【0312】

図 25C は、本明細書に開示されるいくつかの実施形態に従い、さらなるアプローチ、すなわち、ウイルス免疫抑制ペプチドの s c F v の重鎖と軽鎖の間のリンカーへの工学的操作を示す。標的結合因子が s c F v（例えば、完全抗体）ではないさらなる実施形態では、ウイルス免疫抑制ペプチドは、ウイルス免疫抑制ペプチドの曝露および標的結合能の維持を可能にするその結合因子の任意の領域に組み込まれ得る。ヒンジ領域への組み込みと同様に、ウイルス免疫抑制ペプチドのリンカー領域への操作が、単一のペプチド、または複数のペプチドを用いて行われ得る。キメラ抗原受容体の N 末端領域に操作されたウイルス免疫抑制ペプチドに関するさらなるアプローチが図 25D に示される。他のアプローチと同様に、いくつかの実施形態では、複数のウイルス免疫抑制ペプチドを使用することができる。さらに、CAR 内のこれらの位置の組み合わせを使用することができる。例えば、ウイルス免疫抑制ペプチド（または 1 を超える）は、例えば、s c F v のリンカー領域および／または CAR の N 末端に位置付けられたウイルス免疫抑制ペプチド（または 1 を超える）と組み合わせ、ヒンジ領域に位置付けることができる。いくつかの実施形態では、この位置付けにより、ウイルス免疫抑制ペプチドが相互作用し得るようにそれらを曝露させることが可能になり、その後、宿主免疫細胞活性を抑制し、そうでなければ、CAR を発現する操作された免疫細胞の有効性を低下させることになる。

10

20

【0313】

いくつかの実施形態では、操作された CAR は、以下のアミノ酸または DNA 配列：配列番号 199～216、220～221、225～226、230～231、235～236、240～241、245～246、250～251、273～274、278、280、288、または 289 のうちの 1 つ以上の、1 つ以上のコピーを含む。上記で検討したように、これらの配列（または個々の配列）は、ヒンジ領域、N 末端領域に、または標的結合領域内（例えば、s c F v のリンカー内）に配置され得る。いくつかの実施形態では、CAR は、配列番号 199～216、220～221、225～226、230～231、235～236、240～241、245～246、250～251、273～274、278、280、288、または 289 のいずれかと少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を有するアミノ酸配列または DNA 配列を含む。

30

【0314】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される操作された細胞は、NKGD2D を標的とするキメラ受容体を含み、CAR は、配列番号 174 もしくは 899 のアミノ酸を含むか、または配列番号 174 もしくは 899 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性、相同性および／もしくは機能的同等性を有するアミノ酸配列を含み、配列番号 174 または 899 の配列に組み込まれる、以下のウイルス免疫抑制アミノ酸配列：配列番号 199～216、220、225、230、235、240、245、250、273、280、288 または 289 のうちの 1 つ以上の、1 つ以上のコピーを有する。組み込まれたウイルス免疫抑制アミノ酸に加えて、またはその代わりに、CAR は、配列番号 174 もしくは 899 のアミノ酸を含んでもよく、または配列番号 174 もしくは 899 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性、相同性および／もしくは機能的同等性を有するアミノ酸配列を含み、以下に検討するように、細胞上に発現される 1 つ以上のウイルス免疫抑制配列を膜結合形式で有する。

40

50

【0315】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される操作された細胞は、CD19を標的とするCARを含み、CARは、配列番号178もしくは901のアミノ酸を含むか、または配列番号178もしくは901と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／もしくは機能的同等性を有するアミノ酸配列を含み、配列番号178の配列に組み込まれる、以下のウイルス免疫抑制アミノ酸配列：配列番号199～216、220、225、230、235、240、245、250、273、280、288または289のうちの1つ以上の、1つ以上のコピーを有する。組み込まれたウイルス免疫抑制アミノ酸に加えて、またはその代わりに、CARは、配列番号178もしくは901のアミノ酸を含んでもよく、または配列番号178もしくは901と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を有するアミノ酸配列を含み、以下に検討するように、細胞上に発現される1つ以上のウイルス免疫抑制配列を膜結合形式で有する。

10

【0316】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される操作された細胞は、CD19を標的とするCARを含み、CARは、配列番号466を含む核酸配列によってコードされるか、または配列番号466と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性、相溶性、および／もしくは機能的同等性を有する核酸配列を含み、配列番号466によってコードされる配列に組み込まれる、以下のウイルス免疫抑制アミノ酸配列：配列番号199～216、220、225、230、235、240、245、250、273、280、288または289のうちの1つ以上の、1つ以上のコピーを有する。組み込まれたウイルス免疫抑制アミノ酸に加えて、またはその代わりに、CARは、配列番号466によってコードされるCARを含んでもよく、または配列番号466によってコードされる配列と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／もしくは機能的同等性を有するアミノ酸配列を含み、以下に検討するように、細胞上に発現される1つ以上のウイルス免疫抑制配列を膜結合形式で有する。

20

30

【0317】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される操作された細胞は、CD70を標的とするCARを含み、CARは、配列番号383～465もしくは912～994のいずれかのアミノ酸を含むか、または配列番号383～465もしくは912～994のいずれかと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／もしくは機能的同等性を有するアミノ酸配列を含み、配列番号383～465または912～994のいずれかの配列に組み込まれる、以下のウイルス免疫抑制アミノ酸配列：配列番号199～216、220、225、230、235、240、245、250、273、280、288または289のうちの1つ以上の、1つ以上のコピーを有する。組み込まれたウイルス免疫抑制アミノ酸に加えて、またはその代わりに、CARは、配列番号383～465もしくは912～994のいずれかのアミノ酸を含んでもよく、または配列番号383～465もしくは912～994と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／もし

40

50

くは機能的同等性を有するアミノ酸配列を含み、以下に検討するように、細胞上に発現される1つ以上のウイルス免疫抑制配列を膜結合形式で有する。

【0318】

CARに配置されるウイルス免疫抑制ペプチドの取り込みに加えて、ペプチドは、膜結合ウイルス免疫抑制ペプチドとして発現させることができるドメインに結合され得る。

【0319】

図26A～26Jは、本明細書に開示される実施形態の非限定的な概略図を示す。図26Aは、膜貫通タンパク質に結合した単一のウイルス免疫抑制ペプチドを示す。図26Bは、それぞれ膜貫通タンパク質に結合した2つ個々のウイルス免疫抑制ペプチドを示す。図26Cは、膜結合形式の複数のウイルス免疫抑制ペプチドを示す。示されており、本明細書に記載されるように、ウイルス免疫抑制ペプチドと膜貫通ドメインの両方は、様々であり得るか、または同一であり得る。言い換えれば、VIPX:TM Yを含むウイルス免疫抑制ペプチド(VIP)1:膜貫通タンパク質(TM)1、VIP2:TM1、VIP2:TM2、VIP3:TM1、VIP1:TM3など組み合わせが本明細書に提供される。

10

【0320】

図26Dは、複数のウイルス免疫抑制ペプチドが単一の膜貫通タンパク質に結合しており、これらのウイルス免疫抑制ペプチドが同一であるさらなる非限定的な実施形態を示す。図26Eは、複数のウイルス免疫抑制ペプチドが単一の膜貫通タンパク質に結合しており、これらのウイルス免疫抑制ペプチドが互いに異なっているさらなる非限定的な実施形態を示す。図26Fは、複数の膜結合コンストラクトが単一の免疫細胞で発現されており、一方が単一のウイルス免疫抑制ペプチドに結合しており、他方が複数のウイルス免疫抑制ペプチドに結合しているさらなる非限定的な実施形態を示す。例示されていないが、複数のコンストラクトが個々の細胞によって発現される場合、膜貫通ドメインが互いに異なっているてもよいことが認識される。

20

【0321】

CD8 α 、CD4、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ζ 、CD28、CD137、グリコホリンA、グリコホリンD、ニコチン性アセチルコリン受容体、GABA受容体、Fc ϵ RI γ 、およびT細胞受容体のうちの1つ以上などの種々の膜貫通タンパク質を使用することができる。いくつかの実施形態では、これらのドメイン(例えば、膜貫通ドメイン)のうちの1つ以上の一部を使用して、ウイルス免疫抑制ペプチドを免疫細胞の表面に固定するかまたはその他の形で係留する。いくつかの実施形態では、膜貫通タンパク質は、CD8 α 膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、CD8 α 膜貫通ドメインは、配列番号4のアミノ酸配列、または配列番号4と少なくとも約80%、少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%もしくは約99%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、CD8 α 膜貫通ドメインは、配列番号3の核酸配列、または配列番号3と少なくとも約80%、少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%もしくは約99%の配列同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ヒンジまたは他のリンカーを使用して、ウイルス免疫抑制ペプチドを膜貫通タンパク質に結合させる。いくつかの実施形態では、CD8 α が使用される。いくつかの実施形態では、CD8 α ヒンジは、配列番号2のアミノ酸配列、または配列番号2と少なくとも約80%、少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%もしくは約99%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、CD8 α ヒンジは、配列番号1のアミノ酸配列、または配列番号1と少なくとも約80%、少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%もしくは約99%の配列同一性を有する配列を含む。

30

40

【0322】

図26Gは、本明細書に提供される非限定的な実施形態のさらなる概略図を示す。この実施形態は、CARおよび膜結合ウイルス免疫抑制ペプチドを発現するように操作された免疫細胞を含む。図27Gは、免疫細胞が、膜貫通ドメインに結合した複数のウイルス免

50

疫抑制ペプチドとともにCARを発現する非限定的な実施形態を示す。CARおよび複数の膜結合ウイルス免疫抑制ペプチドを発現する免疫細胞（例えば、NK細胞、T細胞またはこれらの組み合わせ）も提供される（例えば、図26Fにおけるように）。いくつかの実施形態では、CARは、1つ以上のウイルス免疫抑制ペプチドを含むが、一部の実施形態は、ウイルス免疫抑制ペプチドを含まずに、CARの発現に関与する。これらの概略図に示されるように、操作された免疫細胞は、いくつかの実施形態では、同種異系細胞である。いくつかの実施形態では、同種異系NK細胞が使用される。いくつかの実施形態では、同種異系T細胞が使用される。いくつかの実施形態では、同種異系NK細胞と同種異系T細胞の組み合わせ（例えば、混合集団）が使用される。

【0323】

いくつかの実施形態では、合成CKS-17ウイルス免疫抑制ペプチドをコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号199を含むアミノ酸配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号199と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有する配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号216を有するか、または配列番号216と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、膜結合合成CKS-17ウイルス免疫抑制ペプチドが提供される。いくつかの実施形態では、合成CKS-17ウイルス免疫抑制ペプチドは、CD8α膜貫通タンパク質および／またはCD8αヒンジドメインに結合される。いくつかの実施形態では、膜結合合成CKS-17ウイルス免疫抑制ペプチドコンストラクトは、1つ以上のリンカー配列を含む。いくつかの実施形態では、膜結合合成CKS-17ウイルス免疫抑制ペプチドは、CD8αシグナルペプチド、合成CKS-17、CD8αヒンジ、およびCD8α膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、膜結合合成CKS-17ウイルス免疫抑制ペプチドコンストラクトは、配列番号218または配列番号693を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号218または配列番号693と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有する配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号219（もしくは配列番号694）を含むか、または配列番号219（もしくは配列番号694）と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性を共有する。適宜、ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、FLAGタグ）をコードし、および／または検出可能なタグ（例えば、GFP）などのさらなるタンパク質の発現を可能にする内部リボソーム侵入部位（IRES）を含み得る。いくつかの実施形態では、膜結合合成CKS-17およびGFPをコードするポリヌクレオチドは、配列番号217を含むか、または配列番号217と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、膜結合合成CKS-17、FLAGタグ、およびGFPをコードするポリヌクレオチドは、配列番号692を含むか、または配列番号692と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、膜結合合成CKS-17、FLAGタグ、およびGFP

10

20

30

40

50

Pをコードするポリヌクレオチドは、配列番号691のアミノ酸配列、または配列番号691と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有するアミノ酸配列をコードする。
【0324】

いくつかの実施形態では、p15Eウイルス免疫抑制ペプチドをコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号220を含むアミノ酸配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号220と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号221を含むか、または配列番号221と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、膜結合p15Eウイルス免疫抑制ペプチドが提供される。いくつかの実施形態では、p15Eウイルス免疫抑制ペプチドは、CD8α膜貫通タンパク質および／またはCD8αヒンジドメインに結合される。いくつかの実施形態では、膜結合p15Eウイルス免疫抑制ペプチドコンストラクトは、1つ以上のリンカー配列を含む。いくつかの実施形態では、膜結合p15Eウイルス免疫抑制ペプチドは、CD8αシグナルペプチド、p15E、CD8αヒンジ、およびCD8α膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、膜結合p15Eウイルス免疫抑制ペプチドコンストラクトは、配列番号223（または配列番号697）を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号223（または配列番号697）と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号224（もしくは配列番号698）を含むか、または配列番号224（もしくは配列番号698）と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。適宜、ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、FLAGタグ）をコードし、および／または検出可能なタグ（例えば、GFP）などのさらなるタンパク質の発現を可能にする内部リボソーム侵入部位（IRES）を含み得る。いくつかの実施形態では、mbp15EおよびGFPをコードするポリヌクレオチドは、配列番号222を含むか、または配列番号222と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、mbp15E、FLAGタグ、およびGFPをコードするポリヌクレオチドは、配列番号696を含むか、または配列番号696と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、GFPおよびFLAGタグを含む膜結合p15Eウイルス免疫抑制ペプチドコンストラクトは、配列番号695を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号695と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列をコードする。

【0325】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、H T L V ウイルス免疫抑制ペプチドをコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 2 2 5 を含むアミノ酸配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 2 2 5 と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 2 2 6 を含むか、または配列番号 2 2 6 と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、膜結合 H T L V ウイルス免疫抑制ペプチドが提供される。いくつかの実施形態では、H T L V ウイルス免疫抑制ペプチドは、C D 8 α 膜貫通タンパク質および／または C D 8 α ヒンジドメインに結合される。いくつかの実施形態では、膜結合 H T L V ウイルス免疫抑制ペプチドコンストラクトは、1 つ以上のリンカー配列を含む。いくつかの実施形態では、膜結合 H T L V ウイルス免疫抑制ペプチドは、C D 8 α シグナルペプチド、H T L V - 1 (G p 2 1)、C D 8 α ヒンジ、および C D 8 α 膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、膜結合 H T L V ウイルス免疫抑制ペプチドコンストラクトは、配列番号 2 2 8 (または配列番号 7 0 1) を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 2 2 8 (または配列番号 7 0 1) と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有するアミノ酸配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 2 2 9 (もしくは配列番号 7 0 2) を含むか、または配列番号 2 2 9 (もしくは配列番号 7 0 2) と少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、または少なくとも約 9 9 % の配列同一性を共有する。適宜、ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ (例えば、F L A G タグ) をコードし、および／または検出可能なタグ (例えば、G F P) などのさらなるタンパク質の発現を可能にする内部リボソーム侵入部位 (I R E S) を含み得る。いくつかの実施形態では、膜結合 H T L V および G F P をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 2 2 7 を含むか、または配列番号 2 2 7 と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、膜結合 H T L V、F L A G タグ、および G F P をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 7 0 0 を含むか、または配列番号 7 0 0 と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、膜結合 H T L V、F L A G タグ、G F P コンストラクトは、配列番号 6 9 9 のアミノ酸配列を含むか、または配列番号 6 9 9 と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性を共有する。

【 0 3 2 6 】

いくつかの実施形態では、修飾 H I V G p 4 1 ウイルス免疫抑制ペプチドをコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 2 3 0 を含むアミノ酸配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 2 3 0 と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、または少なくとも約 9 9 % の配列同一性、相同性および／または

機能的同等性を共有する配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 231 を含むか、または配列番号 231 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、膜結合修飾 HIV Gp41 ウイルス免疫抑制ペプチドが提供される。いくつかの実施形態では、修飾 HIV Gp41 ウイルス免疫抑制ペプチドは、CD8 α 膜貫通タンパク質および／または CD8 α ヒンジドメインに結合される。いくつかの実施形態では、膜結合修飾 HIV Gp41 ウイルス免疫抑制ペプチドコンストラクトは、1 つ以上のリンカー配列を含む。いくつかの実施形態では、膜結合修飾 HIV Gp41 ウイルス免疫抑制ペプチドは、CD8 α シグナルペプチド、修飾 HIV Gp41、CD8 α ヒンジ、および CD8 α 膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、膜結合修飾 HIV Gp41 ウイルス免疫抑制ペプチドコンストラクトは、配列番号 233（または配列番号 705）を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 233（または配列番号 705）と少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 234（もしくは配列番号 706）を含むか、または配列番号 234（もしくは配列番号 706）と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性を共有する。適宜、ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、FLAG タグ）をコードし、および／または検出可能なタグ（例えば、GFP）などのさらなるタンパク質の発現を可能にする内部リボソーム侵入部位（IRES）を含み得る。いくつかの実施形態では、膜結合修飾 HIV Gp41 および GFP をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 232 を含むか、または配列番号 232 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、膜結合修飾 HIV Gp41、FLAG タグ、GFP コンストラクトは、配列番号 704 を含むか、または配列番号 704 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、膜結合修飾 HIV Gp41、FLAG タグ、GFP コンストラクトは、配列番号 703 のアミノ酸配列、または配列番号 703 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、または少なくとも約 99 % の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

【0327】

いくつかの実施形態では、切断型 HIV Gp41 ウイルス免疫抑制ペプチドをコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 235 を含むアミノ酸配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 235 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 236 を含むか、または配列番号 236 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、膜結合 HIV Gp41 ウイルス免

10

20

30

40

50

疫抑制ペプチドが提供される。いくつかの実施形態では、H I V G p 4 1 ウイルス免疫抑制ペプチドは、C D 8 α 膜貫通タンパク質および／またはC D 8 α ヒンジドメインに結合される。いくつかの実施形態では、膜結合H I V G p 4 1 ウイルス免疫抑制ペプチドコンストラクトは、1つ以上のリンカー配列を含む。いくつかの実施形態では、膜結合H I V G p 4 1 ウイルス免疫抑制ペプチドは、C D 8 α シグナルペプチド、H I V G p 4 1、C D 8 α ヒンジ、およびC D 8 α 膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、膜結合H I V G p 4 1 ウイルス免疫抑制ペプチドコンストラクトは、配列番号238（または配列番号709）を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号238（もしくは配列番号709）と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有する配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号239（もしくは配列番号710）を含むか、または配列番号239（もしくは配列番号710）と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性を共有する。適宜、ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、F L A G タグ）をコードし、および／または検出可能なタグ（例えば、G F P）などのさらなるタンパク質の発現を可能にする内部リボソーム侵入部位（I R E S）を含み得る。いくつかの実施形態では、膜結合H I V G p 4 1 およびG F P をコードするポリヌクレオチドは、配列番号237を含むか、または配列番号237と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、膜結合H I V G p 4 1、F L A G タグ、およびG F P をコードするポリヌクレオチドは、配列番号708を含むか、または配列番号708と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、膜結合切断型H I V G p 4 1、F L A G タグ、G F P コンストラクトは、配列番号707のアミノ酸配列、または配列番号707と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

10

20

30

40

50

【0328】

いくつかの実施形態では、合成ウイルス免疫抑制ペプチドをコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号240を含むアミノ酸配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号240と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有する配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号241を含むか、または配列番号241と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、膜結合合成ウイルス免疫抑制ペプチドが提供される。いくつかの実施形態では、合成ウイルス免疫抑制ペプチドは、C D 8 α 膜貫通タンパク質および／またはC D 8 α ヒンジドメインに結合される。いくつかの実施形態では、膜結合合成ウイルス免疫抑制ペプチドコンストラクトは、1つ以上のリンカー配列を含む。いくつかの実施形態では、膜結合合成ウイルス免疫抑制ペプチドは、C D 8 α シグナルペプチド、合成ウイルス免疫抑制ペプチド三量体、C D 8 α ヒンジ、およびC D 8 α 膜貫通ドメイ

ンを含む。いくつかの実施形態では、膜結合合成ウイルス免疫抑制ペプチドコンストラクトは、配列番号 243（または配列番号 713）を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 243（もしくは配列番号 713）と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性、相
同性および／または機能的同等性を共有する配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 244（もしくは配列番号 714）を含むか、または配
列番号 244（もしくは配列番号 714）と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、
少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、
少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性を
共有する。適宜、ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、FLAG タグ）をコー
ドし、および／または検出可能なタグ（例えば、GFP）などのさらなるタンパク質の発
現を可能にする内部リボソーム侵入部位（IRES）を含み得る。いくつかの実施形態で
は、膜結合合成ウイルス免疫抑制ペプチドおよび GFP をコードするポリヌクレオチドは
、配列番号 242 を含むか、または配列番号 242 と少なくとも約 80%、少なくとも約
85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約
96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列
同一性を共有する。いくつかの実施形態では、膜結合合成ウイルス免疫抑制ペプチド、F
LAG タグおよび GFP をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 712 を含むか、ま
たは配列番号 712 と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、
少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、
少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性を共有する。いくつかの
実施形態では、膜結合合成ウイルス免疫抑制ペプチド、FLAG タグ、GFP コンストラ
クトは、配列番号 712 のアミノ酸を含むか、または配列番号 712 と少なくとも約 80
%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95
%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なく
とも約 99% の配列同一性を共有する。

10

20

30

40

50

【0329】

いくつかの実施形態では、ウイルス融合ペプチド、またはその変異体を使用される。例
として、HIV は、融合ペプチドを介して標的細胞に融合することによって免疫回避応答
を開始し、その一部は宿主 T 細胞上の T 細胞受容体と相互作用し、それらの活性化を抑制
する。いくつかの実施形態では、ウイルス融合ペプチドの一部が使用される。例えば、い
くつかの実施形態では、HIV 融合ペプチドの残基 5～13 を含むアミノ酸配列は、本明
細書に開示される免疫抑制エフェクターにおいて使用される（例えば、1 つ以上の細胞外
位置で CAR に組み込まれるか、または膜貫通ドメインに結合された 1 つ以上のコピーを
伴う）。いくつかの実施形態では、そのアミノ酸配列は、配列番号 467 を含む。いくつ
かの実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号 467 と少なくとも約 80%、少なくとも
約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも
約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配
列同一性、相
同性および／または機能的同等性を共有する。いくつかの実施形態では、修
飾ウイルス融合タンパク質は、本明細書に開示される免疫抑制エフェクターにおいて使用
される（例えば、1 つ以上の細胞外位置で CAR に組み込まれるか、または膜貫通ドメイ
ンに結合された 1 つ以上のコピーを伴う）。いくつかの実施形態では、そのアミノ酸配列
は配列番号 468 を含む。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号 468 と
少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、
少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、
もしくは少なくとも約 99% の配列同一性、相
同性および／または機能的同等性を共有す
る。いくつかの実施形態では、ウイルス融合タンパク質に由来する 1 つ以上のコンセンサ
スモチーフは、本明細書に開示される免疫抑制エフェクターにおいて使用される（例えば

、1つ以上の細胞外位置でCARに組み込まれるか、または膜貫通ドメインに結合された1つ以上のコピーを伴う)。いくつかの実施形態では、そのアミノ酸コンセンサス配列は、GXXXG（配列番号473）またはAXXXG（配列番号474）を含み、各Xは独立して任意のアミノ酸である。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は、コンセンサスモチーフを維持しつつ、配列番号473または474と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する。いくつかの実施形態では、これらのモチーフは、NKではなくT細胞に対して抑制性であるという点において特に有利である。したがって、いくつかの実施形態では、これらのペプチドは、遺伝子編集なしに、操作されたNK細胞を発生させて、B2M発現を減少／ノックアウトし、宿主対移植片拒絶における機能的減少を依然として効果的にすることを可能にする（例えば、T細胞抑制単独を介する）。

10

【0330】

いくつかの実施形態では、p15Eウイルス免疫抑制三量体ペプチドをコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号250を含むアミノ酸配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号250と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号251を含むか、または配列番号251と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、膜結合p15Eウイルス免疫抑制三量体ペプチドが提供される。いくつかの実施形態では、p15Eウイルス免疫抑制三量体ペプチドは、CD8α膜貫通タンパク質および／またはCD8αヒンジドメインに結合される。いくつかの実施形態では、膜結合p15Eウイルス免疫抑制三量体ペプチドコンストラクトは、1つ以上のリンカー配列（例えば、ペプチド反復間）を含む。いくつかの実施形態では、膜結合p15Eウイルス免疫抑制三量体ペプチドは、CD8αシグナルペプチド、第1のp15Eペプチド、リンカー（例えば、GSリンカー）、第2のp15Eペプチド、リンカー（例えば、第2のGSリンカー）、第3のp15Eペプチド、CD8αヒンジ、およびCD8α膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、膜結合p15Eウイルス免疫抑制ペプチドコンストラクトは、配列番号253（または配列番号721）を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号253（もしくは配列番号721）と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号254（もしくは配列番号722）を含むか、または配列番号254（もしくは配列番号722）と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性を共有する。適宜、ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、FLAGタグ）をコードし、および／または検出可能なタグ（例えば、GFP）などのさらなるタンパク質の発現を可能にする内部リボソーム侵入部位（IRES）を含み得る。いくつかの実施形態では、膜結合三量体p15EおよびGFPをコードするポリヌクレオチドは、配列番号252を含むか、または配列番号252と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも

20

30

40

50

約 99% の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、膜結合三量体 p15E、FLAG タグ、および GFP をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 720 を含むか、または配列番号 720 と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、膜結合三量体 p15E、FLAG タグ、GFP コンストラクトは、配列番号 719 のアミノ酸配列、または配列番号 719 と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

10

【0331】

いくつかの実施形態では、1 つ以上のウイルス免疫抑制ペプチドを含むキメラタンパク質もまた使用される。このようなキメラタンパク質の 1 つは、ヒトサイトメガロウイルスクラス I MHC ホモログ、UL18 を含む。以下により詳細に記載されるように、いくつかの実施形態では、UL18 は、NK 細胞阻害受容体 LIR-1 への UL18 の結合を介して宿主-NK 細胞の細胞傷害性を回避するために、CAR に組み込まれるか、またはその他の形で発現される（例えば、キメラ UL18-B2M を介して、または二量体/三量体コンストラクトにおいて）。

【0332】

さらに、ウイルス免疫抑制ペプチド内の特定の配列ドメインまたはさらには特定の残基は、キメラ抗原受容体およびそれらの発現のさらなる操作を容易にすることができる。例えば、特定の残基を用いて、例えばジスルフィド結合を介して、CAR 二量体を操作することができる。このようなアプローチは、二特異的 CAR の使用を補足または置換するために利用することができる。例えば、一例として、抗 CD19 結合剤および NKGD2 リガンドの結合剤を用いて単一の CAR を操作するのではなく、2 つの別々の CAR を操作し、各々が、2 つの CAR の間に二硫化物架橋を形成し、したがって、インビボ (in vivo) で二量体化された CAR の自己アセンブリーを可能にしたような方法でシステム残基を配置する。

20

【0333】

有利には、ウイルス免疫抑制ペプチドの使用は、投与された操作された細胞に対する宿主 NK 細胞応答のミュートを助けるのに役立つだけでなく、他の目的にも使用することができる。例えば、一部の実施形態では、ウイルスペプチドに対する指向性を有する抗体は、1 つ以上のウイルス免疫抑制ペプチドを含む CAR を発現する細胞産物で投薬された対象に投与される。抗体は、ウイルスペプチドに結合し、CAR を発現する細胞の枯渇を誘導する（例えば、抗体ベースの免疫応答を介して）ように機能し、したがって、安全メカニズム、または処置を終了する経路として役立つ。同様に、ウイルス免疫抑制ペプチドを含有する CAR を含む免疫細胞の製造中に、ウイルス免疫抑制ペプチドの抗体ベースの検出を使用して、CAR 発現レベルを決定することができる。

30

【0334】

CD47 および他の免疫抑制ペプチド、ならびにウイルス免疫抑制ペプチドとの組み合わせ

40

ウイルス免疫抑制ペプチドに加えて、他の免疫抑制ペプチドまたはポリペプチドが本明細書に提供される。ウイルス免疫抑制ペプチドと同様に、これらのポリペプチドは、CAR の 1 つ以上の領域に含まれ得るか、または膜結合様式で発現され得る。これらのさらなる免疫抑制ポリペプチドはまた、1 つ以上のウイルス免疫抑制ペプチドと関連して使用することもできる（例えば、図 25 および 26、ならびに上記のウイルスペプチドの記載を参照されたい）。

【0335】

いくつかの実施形態では、内因性「自己」シグナルは、操作された免疫細胞に免疫回避性を付与するために再目的とされる。このような「自己」タンパク質の 1 つは、食細胞受

50

容体 C D 1 7 2 a を介したシグナル伝達を介したファゴサイトーシス（例えば、マクロファージによる）を妨げる C D 4 7 である。いくつかの実施形態では、C D 4 7 の 1 つ以上のドメイン（またはサブドメイン）は、C A R に組み込まれ、および／または膜結合形態で免疫細胞において発現される。いくつかの実施形態では、C D 4 7 の発現（全体または一部）は、操作された免疫細胞に、宿主免疫細胞によるファゴサイトーシスを減少または回避する能力を付与し、それによって、操作された免疫細胞の持続性（したがって機能的寿命）を増強するように機能する。

【0336】

他の免疫抑制ペプチドがまた本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、P D - L 1（C D 2 7 4、P D L 1、または P D C D 1 L 1 としても公知である）またはその免疫抑制部分は、C A R への組み込みを介しておよび／または膜結合様式で、操作された免疫細胞によって発現される。いくつかの実施形態では、限定されないが、P V R（C D 1 5 5、N E C L 5、または N E C L - 5 としても公知である）および C D 1 1 3（P R O M 1 またはプロミン 1 としても公知である）またはその（o f）免疫抑制部分を含む 1 つ以上の T I G I T リガンドは、C A R への組み込みを介しておよび／または膜結合様式で、操作された免疫細胞によって発現される。いくつかの実施形態では、C D 2 0 0 またはその免疫抑制部分は、C A R への組み込みを介しておよび／または膜結合様式で、操作された免疫細胞によって発現される。いくつかの実施形態では、C D 2 7 6（B 7 - H 3 としても公知である）またはその免疫抑制部分は、C A R への組み込みを介しておよび／または膜結合様式で、操作された免疫細胞によって発現される。いくつかの実施形態では、B 7 - H 4（V T C N 1、B 7 S 1、または B 7 X としても公知である）またはその免疫抑制部分は、C A R への組み込みを介しておよび／または膜結合様式で、操作された免疫細胞によって発現される。いくつかの実施形態では、H V E M（T N F S F 1 4、C D 2 7 0 または A T A R としても公知である）またはその免疫抑制部分は、C A R への組み込みを介しておよび／または膜結合様式で、操作された免疫細胞によって発現される。いくつかの実施形態では、C E A C A M 5（C E A としても公知である）またはその免疫抑制部分は、C A R への組み込みおよび／または膜結合様式で、操作された免疫細胞によって発現される。いくつかの実施形態では、ガレクチン-9（L G A L S 9 としても公知である）またはその免疫抑制部分は、C A R への組み込みを介しておよび／または膜結合様式で、操作された免疫細胞によって発現される。いくつかの実施形態では、これらの免疫抑制タンパク質（全体または一部）の発現は、操作された免疫細胞に、宿主免疫細胞（または他の操作された免疫細胞）による免疫クリアランスを減少または回避する能力を付与し、それによって、操作された免疫細胞の持続性（したがって機能的寿命）を増強するように機能する。

【0337】

ウイルス免疫抑制ペプチドに関して上記で検討したように、いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は同種異系細胞である。いくつかの実施形態では、同種異系 N K 細胞が使用される。いくつかの実施形態では、同種異系 T 細胞が使用される。いくつかの実施形態では、同種異系 N K 細胞と同種異系 T 細胞の組み合わせ（例えば、混合集団）が使用される。

【0338】

いくつかの実施形態では、操作された C A R は、以下のアミノ酸配列：配列番号 2 4 5、2 8 0、2 8 5、2 8 6、2 8 8、または 2 8 9 のうちの 1 つ以上の、1 つ以上のコピーを含む。いくつかの実施形態では、C A R は、配列番号 2 8 7 の免疫抑制断片を含む。上記で検討したように、これらの配列（または個々の配列）は、ヒンジ領域、N 末端領域、または標的結合領域内（例えば、s c F v のリンカー内）に配置され得る。いくつかの実施形態では、C A R は、配列番号 2 4 5、2 8 0、2 8 5、2 8 6、2 8 8、もしくは 2 8 9 のいずれか、または配列番号 2 8 7 の免疫抑制断片と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 %

の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を有するアミノ酸配列を含む。

【0339】

CARに配置されるウイルス免疫抑制ペプチドの組み込みに加えて、これらの非ウイルス免疫抑制ポリペプチドは、それらが膜結合ポリペプチドとして発現されることを可能にするドメインに結合され得る。

【0340】

種々の膜貫通タンパク質を使用することができ、例えば、CD8 α 、CD4、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ζ 、CD28、CD137、グリコホリンA、グリコホリンD、ニコチン性アセチルコリン受容体、GABA受容体、Fc ϵ RI γ 、およびT細胞受容体のうちの1つ以上を使用することができる。いくつかの実施形態では、これらのドメイン（例えば、膜貫通ドメイン）のうちの1つ以上の一部は、免疫抑制ペプチド（複数可）を免疫細胞表面に固定するか、またはその他の形で係留するために使用される。いくつかの実施形態では、膜貫通タンパク質は、CD8 α 膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、CD8 α 膜貫通ドメインは、配列番号4のアミノ酸配列、または配列番号4と少なくとも約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%もしくは約99%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、CD8 α 膜貫通ドメインは、配列番号3の核酸配列、または配列番号3と少なくとも約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%もしくは約99%の配列同一性を有する配列によりコードされる。いくつかの実施形態では、ヒンジまたは他のリンカーを用いて、免疫抑制ペプチドを膜貫通タンパク質に結合させる。いくつかの実施形態では、CD8 α が使用される。いくつかの実施形態では、CD8 α ヒンジは、配列番号2のアミノ酸配列、または配列番号2と少なくとも約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%もしくは約99%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、CD8 α ヒンジは、配列番号1のアミノ酸配列、または配列番号1と少なくとも約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%もしくは約99%の配列同一性を有する配列を含む。

【0341】

いくつかの実施形態では、切断型CD47免疫抑制ペプチドをコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号245を含むアミノ酸配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号245と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号246を含むか、または配列番号246と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、膜結合切断型CD47免疫抑制ペプチドが提供される。いくつかの実施形態では、切断型CD47免疫抑制ペプチドは、CD8 α 膜貫通タンパク質および／またはCD8 α ヒンジドメインに結合される。いくつかの実施形態では、膜結合切断型CD47免疫抑制ペプチドコンストラクトは、1つ以上のリンカー配列を含む。いくつかの実施形態では、膜結合切断型CD47免疫抑制ペプチドは、CD8 α シグナルペプチド、切断型CD47ペプチド（例えば、細胞外ドメインの110～130位）、CD8 α ヒンジ、およびCD8 α 膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、膜結合合成切断型CD47免疫抑制ペプチドコンストラクトは、配列番号248（または配列番号717）を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号248（または配列番号717）と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共

10

20

30

40

50

有する配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 249（もしくは配列番号 718）を含むか、または配列番号 249（もしくは配列番号 718）と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性を共有する。適宜、ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、FLAG タグ）をコードし、および／または検出可能なタグ（例えば、GFP）などのさらなるタンパク質の発現を可能にする内部リボソーム侵入部位（IRES）を含み得る。いくつかの実施形態では、膜結合切断型 CD47 および GFP をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 247 を含むか、または配列番号 247 と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、膜結合切断型 CD47、FLAG タグおよび GFP をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 716 を含むか、または配列番号 716 と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、膜結合切断型 CD47、FLAG タグ、GFP コンストラクトは、配列番号 715 のアミノ酸配列、または配列番号 715 と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

10

20

【0342】

上記で検討したように、いずれのウイルス免疫抑制ペプチドも、1つ以上の非ウイルス免疫抑制ペプチドと組み合わせて使用することができる。

【0343】

いくつかの実施形態では、p15E ウイルス免疫抑制ペプチド切断型 CD47 コンストラクト（p15E__tCD47）をコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、膜結合 p15E__tCD47 コンストラクトが提供される。いくつかの実施形態では、切断型 CD47 ペプチドは、CD47 の細胞外ドメインの 110~130 位に対応するペプチドを含む。いくつかの実施形態では、p15E__tCD47 コンストラクトは、CD8 α 膜貫通タンパク質および／または CD8 α ヒンジドメインに結合される。いくつかの実施形態では、膜結合 p15E__tCD47 コンストラクトは、1つ以上のリンカー配列を含む。いくつかの実施形態では、膜結合 p15E__tCD47 コンストラクトは、CD8 α シグナルペプチド、p15E ペプチド、リンカー（例えば、GS リンカー）、切断型 CD47 ペプチド、CD8 α ヒンジ、および CD8 α 膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、膜結合 p15E__tCD47 コンストラクトは、配列番号 256（または配列番号 725）を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 256（または配列番号 725）と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 257（もしくは配列番号 726）を含むか、または配列番号 257（もしくは配列番号 726）と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性を共有する。適宜、ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、FLAG タグ）をコードし、および／または検出可能なタグ（例えば、GFP）などのさらなるタンパク質の発現を可能にする内部リボソーム侵入部位（IRES）を含み得る。いくつかの実施形態では、膜結合 p15E__tCD47 コンストラクトおよび GFP をコードするポリヌクレオチドは、配列番号

30

40

50

255を含むか、または配列番号255と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、膜結合p15E__tCD47コンストラクト、FLAGタグ、およびGFPをコードするポリヌクレオチドは、配列番号724を含むか、または配列番号724と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、膜結合p15E__tCD47、FLAGタグ、GFPコンストラクトは、配列番号723のアミノ酸配列、または配列番号723と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

10

【0344】

いくつかの実施形態では、上記コンストラクトのペプチドのスワップであるp15Eウイルス免疫抑制ペプチド切断型CD47コンストラクト(tCD47__p15E)をコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、膜結合tCD47__p15Eコンストラクトが提供される。いくつかの実施形態では、切断型CD47ペプチドは、CD47の細胞外ドメインの110~130位に対応するペプチドを含む。いくつかの実施形態では、tCD47__p15Eコンストラクトは、CD8 α 膜貫通タンパク質および／またはCD8 α ヒンジドメインに結合される。いくつかの実施形態では、膜結合tCD47__p15Eコンストラクトは、1つ以上のリンカー配列を含む。いくつかの実施形態では、膜結合tCD47__p15Eコンストラクトは、CD8 α シグナルペプチド、切断型CD47ペプチド、リンカー（例えば、GSリンカー）、p15Eペプチド、CD8 α ヒンジ、およびCD8 α 膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、膜結合tCD47__p15Eコンストラクトは、配列番号259（または配列番号729）を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号259（または配列番号729）と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号260（もしくは配列番号730）を含むか、または配列番号260（もしくは配列番号730）と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。適宜、ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、FLAGタグ）をコードし、および／または検出可能なタグ（例えば、GFP）などのさらなるタンパク質の発現を可能にする内部リボソーム侵入部位（IRES）を含み得る。いくつかの実施形態では、膜結合tCD47__p15EコンストラクトおよびGFPをコードするポリヌクレオチドは、配列番号258を含むか、または配列番号258と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、膜結合tCD47__p15E、FLAGタグ、GFPコンストラクトは、配列番号727のアミノ酸配列、または配列番号727と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なく

20

30

40

50

とも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99%の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

【0345】

いくつかの実施形態では、修飾 HIV Gp41 ウイルス免疫抑制ペプチド切断型 CD47 コンストラクト (HIV__L__tCD47) をコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、膜結合 HIV__L__tCD47 コンストラクトが提供される。いくつかの実施形態では、切断型 CD47 ペプチドは、CD47 の細胞外ドメインの 110~130 位に対応するペプチドを含む。いくつかの実施形態では、HIV__L__tCD47 コンストラクトは、CD8 α 膜貫通タンパク質および／または CD8 α ヒンジドメインに結合される。いくつかの実施形態では、膜結合 HIV__L__tCD47 コンストラクトは、1 つ以上のリンカー配列を含む。いくつかの実施形態では、膜結合 HIV__L__tCD47 コンストラクトは、CD8 α シグナルペプチド、修飾 HIV Gp41 ウイルス免疫抑制ペプチド、リンカー (例えば、GS リンカー)、切断型 CD47 ペプチド、CD8 α ヒンジ、および CD8 α 膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、膜結合 HIV__L__tCD47 コンストラクトは、配列番号 262 (または配列番号 733) を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 262 (または配列番号 733) と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 263 (もしくは配列番号 734) を含むか、または配列番号 263 (もしくは配列番号 734) と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99%の配列同一性を共有する。適宜、ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ (例えば、FLAG タグ) をコードし、および／または検出可能なタグ (例えば、GFP) などのさらなるタンパク質の発現を可能にする内部リボソーム侵入部位 (IRES) を含み得る。いくつかの実施形態では、膜結合 HIV__L__tCD47 コンストラクトおよび GFP をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 261 を含むか、または配列番号 261 と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99%の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、膜結合 HIV__L__tCD47 コンストラクト、FLAG タグ、および GFP をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 732 を含むか、または配列番号 732 と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99%の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、膜結合 HIV__L__tCD47、FLAG タグ、GFP コンストラクトは、配列番号 731 のアミノ酸配列、または配列番号 731 と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99%の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

【0346】

いくつかの実施形態では、HIV Gp41 ウイルス免疫抑制ペプチド切断型 CD47 コンストラクト (HIV__S__tCD47) をコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、膜結合 HIV__S__tCD47 コンストラクトが提供される。いくつかの実施形態では、切断型 CD47 ペプチドは、CD47 の細胞外ドメインの 110~130 位に対応するペプチドを含む。いくつかの実施形態では、HIV__S__tCD47 コンストラクトは、CD8 α 膜貫通タンパク質および／または CD8 α ヒンジドメインに結合される。いくつかの実施形態では、膜結合 HIV__S__tCD47 コンストラ

10

20

30

40

50

クトは、1つ以上のリンカー配列を含む。いくつかの実施形態では、膜結合HIV__S__tCD47コンストラクトは、CD8 α シグナルペプチド、HIV Gp41ウイルス免疫抑制ペプチド、リンカー（例えば、GSリンカー）、切断型CD47ペプチド、CD8 α ヒンジ、およびCD8 α 膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、膜結合HIV__S__tCD47コンストラクトは、配列番号265（または配列番号737）を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号265（または配列番号737）と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有する配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号266（もしくは配列番号738）を含むか、または配列番号266（もしくは配列番号738）と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。適宜、ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、FLAGタグ）をコードし、および／または検出可能なタグ（例えば、GFP）などのさらなるタンパク質の発現を可能にする内部リボソーム侵入部位（IRES）を含み得る。いくつかの実施形態では、膜結合HIV__S__tCD47コンストラクトおよびGFPをコードするポリヌクレオチドは、配列番号264を含むか、または配列番号264と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、膜結合HIV__S__tCD47コンストラクト、FLAGタグ、およびGFPをコードするポリヌクレオチドは、配列番号736を含むか、または配列番号736と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、膜結合HIV__S__tCD47、FLAGタグ、GFPコンストラクトは、配列番号735のアミノ酸配列、または配列番号735と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

10

20

30

40

50

【0347】

いくつかの実施形態では、HTLVウイルス免疫抑制ペプチド切断型CD47コンストラクト（HTLV__tCD47）をコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、膜結合HTLV__tCD47コンストラクトが提供される。いくつかの実施形態では、切断型CD47ペプチドは、CD47の細胞外ドメインの110～130位に対応するペプチドを含む。いくつかの実施形態では、HTLV__tCD47コンストラクトは、CD8 α 膜貫通タンパク質および／またはCD8 α ヒンジドメインに結合される。いくつかの実施形態では、膜結合HTLV__tCD47コンストラクトは、1つ以上のリンカー配列を含む。いくつかの実施形態では、膜結合HTLV__tCD47コンストラクトは、CD8 α シグナルペプチド、HTLVウイルス免疫抑制ペプチド、リンカー（例えば、GSリンカー）、切断型CD47ペプチド、CD8 α ヒンジ、およびCD8 α 膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、膜結合HTLV__tCD47コンストラクトは、配列番号268（または配列番号741）を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号268（または配列番号741）と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有する配列をコードする。いくつかの実施形態では

、ポリヌクレオチドは、配列番号 269（もしくは配列番号 742）を含むか、または配列番号 269（もしくは配列番号 742）と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性を共有する。適宜、ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、FLAG タグ）をコードし、および／または検出可能なタグ（例えば、GFP）などのさらなるタンパク質の発現を可能にする内部リボソーム侵入部位（IRES）を含み得る。いくつかの実施形態では、膜結合 HTLV__tCD47 コンストラクトおよび GFP をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 267 を含むか、または配列番号 267 と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、膜結合 HTLV__tCD47 コンストラクト、FLAG タグ、および GFP をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 740 を含むか、または配列番号 740 と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、膜結合 HTLV__tCD47、FLAG タグ、GFP コンストラクトは、配列番号 739 のアミノ酸配列、または配列番号 739 と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

10

20

【0348】

いくつかの実施形態では、切断された CD47-p15E 二量体ウイルス免疫抑制ペプチドが切断された CD47 コンストラクト（tCD47__p15Ex2）をコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、膜結合 tCD47__p15Ex2 コンストラクトが提供される。いくつかの実施形態では、切断された CD47 ペプチドは、CD47 の細胞外ドメインの 110～130 位に対応するペプチドを含む。いくつかの実施形態では、tCD47__p15Ex2 コンストラクトは、CD8 α 膜貫通タンパク質および／または CD8 α ヒンジドメインに結合される。いくつかの実施形態では、膜結合 tCD47__p15Ex2 コンストラクトは、1 つ以上のリンカー配列を含む。いくつかの実施形態では、膜結合 tCD47__p15Ex2 コンストラクトは、CD8 α シグナルペプチド、切断された CD47 ペプチド、リンカー（例えば、GS リンカー）、第 1 の p15E ペプチド、リンカー（例えば、GS リンカー）、第 2 の p15E ペプチド、CD8 α ヒンジ、および CD8 α 膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、膜結合 tCD47__p15Ex2 コンストラクトは、配列番号 271（または配列番号 745）を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 271（または配列番号 745）と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、または少なくとも約 99% の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 272（または配列番号 746）を含むかまたは配列番号 272（または配列番号 746）と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性を共有する。ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、FLAG タグ）をコードしてもよいおよび／またはさらなるタンパク質、例えば、検出可能なタグ（例えば、GFP）の発現を可能にする配列内リボソーム進入部位（IRES）を含み得る。いくつかの実施形態では、膜結合 tCD47__p15Ex2 コンストラクトおよび GFP をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 270 を含むかまたは配列番号 270 と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 9

30

40

50

4 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 %の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、膜結合 tCD47__p15Ex2 コンストラクト、FLAG タグ、および GFP をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 744 を含むかまたは配列番号 744 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 %の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、膜結合 tCD47__p15Ex2、FLAG タグ、GFP コンストラクトは、配列番号 743 のアミノ酸配列または配列番号 743 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 %の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

10

【0349】

さらに、いくつかの実施形態に従い、種々のウイルスペプチドの組み合わせおよび／または複製が提供される。例えば、図 42A および 42B を参照されたい。図 42A は、このようなコンストラクト（低免疫ドメインとも称される）を発現する細胞への細胞傷害効果を低下させるように設計されたドメインが、少なくとも膜貫通ドメインに結合されるかまたは（非限定的な概略図に示されるように）、一部の実施形態では、CAR コンストラクトに組み込まれる、本明細書に開示される実施形態に従ったコンストラクトの非限定的な概略図を示す。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるものなどのウイルスペプチドは、CAR（例えば、CKS-17、p15E-ロングを含む p15E、および／または HTLV）に組み込まれる。図 42B に示されるように、いくつかの実施形態では、p15E（p15E-ロングを含む）のダブレットまたはトリプレットなどの多量体形式が提供される。ウイルスおよび非ウイルスペプチドは、合成 TCR 遮断ペプチド、HIV TCR 遮断ペプチド（切断された形式を含む）、阻害受容体ペプチド（tCD47 など）のいずれかと本明細書に開示される他のウイルスペプチドのいずれかとなどの組み合わせで使用されてもよい。非限定的な例としては、p15E-tCD47、tCD47-p15E、HIV-ロング-TCR、HIV-ショート-tCD47、HTLV-tCD47、および tCD47-p15E（ダブレットまたはトリプレット、ロング形式でもよい）が挙げられる。

20

30

【0350】

いくつかの実施形態では、合成 CKS-17 ウイルス免疫抑制ペプチドをコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、膜結合合成 CKS-17 ウイルス免疫抑制ペプチドが提供される。いくつかの実施形態では、合成 CKS-17 ウイルス免疫抑制ペプチドは、CD8 α 膜貫通タンパク質および／または CD8 α ヒンジドメインに結合される。いくつかの実施形態では、膜結合合成 CKS-17 ウイルス免疫抑制ペプチドコンストラクトは、1つ以上のリンカー配列を含む。いくつかの実施形態では、膜結合合成 CKS-17 ウイルス免疫抑制ペプチドは、CD8 α シグナルペプチド、合成 CKS-17、CD8 α ヒンジ、および CD8 α 膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、膜結合合成 CKS-17 ウイルス免疫抑制ペプチドコンストラクトは、配列番号 749 を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 749 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、または少なくとも約 99 %の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 750 を含むかまたは配列番号 750 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 %の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、膜結合合成 CKS-17 をコードするポリヌクレオチドは、GFP もコードし（IRES またはリ

40

50

ンカーを含まない)、配列番号748を含むかまたは配列番号748と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、膜結合合成CKS-17-GFPコンストラクトは、配列番号747を含むかまたは配列番号747と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。

【0351】

いくつかの実施形態では、切断されたCD47免疫抑制ペプチドが採用される。いくつかの実施形態では、配列番号754を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号754と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号753を含むかまたは配列番号753と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、FLAGタグ）をコードしてもよいおよび／またはさらなるタンパク質、例えば、検出可能なタグ（例えば、GFP）の発現を可能にする配列内リボソーム進入部位（IRES）を含み得る。いくつかの実施形態では、切断されたCD47およびGFPをコードするポリヌクレオチドは、配列番号752を含むかまたは配列番号752と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、切断されたCD47-GFPコンストラクトは、配列番号751のアミノ酸配列または配列番号751と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

【0352】

いくつかの実施形態では、天然のHIV膜貫通ドメインを含むHIV Gp41ウイルス免疫抑制ペプチドコンストラクト（fGp41-HIVtm）をコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、HIV Gp41ウイルス免疫抑制ペプチドは、CD8 α シグナルペプチドに結合される（例えば、発現を目的として、その配列は、アミノ酸レベルでは、MALPVTAALLPLALLLHAARP（配列番号895）であり、ヌクレオチドレベルでは、ATGGCACTCCCCGTAACTGCTCTGCTGCTG CCGTTTGCAATTGCTCCTGCACGCCGCACGCCCG（配列番号896）である）。いくつかの実施形態ではHIV Gp41ウイルス免疫抑制コンストラクトは、CD8 α シグナルペプチドおよびHIV Gp41を含み、配列番号757を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号757と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号758を含むかまたは配列番号758と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。ポリヌクレオチドは、検出

10

20

30

40

50

可能なタグ（例えば、FLAGタグ）をコードしてもよいおよび／またはさらなるタンパク質、例えば、検出可能なタグ（例えば、GFP）の発現を可能にする配列内リボソーム進入部位（IRES）を含み得る。いくつかの実施形態では、リンカー（例えば、GSリンカー）は、Gp41ドメインとタグの間に位置付けられる。いくつかの実施形態では、HIV Gp41およびGFPをコードするポリヌクレオチドは、配列番号756を含むかまたは配列番号756と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、fGp41—HIVtm—GFPコンストラクトは、配列番号755のアミノ酸配列または配列番号755と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

10

【0353】

いくつかの実施形態では、p15E膜貫通ドメイン免疫抑制ペプチド（p15Etm—sf）をコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、p15E膜貫通ドメインは、CD8 α シグナルペプチドに結合される（例えば、発現を目的として、この配列は、本明細書において別々に提供される）。いくつかの実施形態では、p15E膜貫通ドメイン免疫抑制コンストラクトは、CD8 α シグナルペプチドおよびp15E膜貫通ドメインを含み、配列番号761を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号761と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号762を含むかまたは配列番号762と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、FLAGタグ）をコードしてもよいおよび／またはさらなるタンパク質、例えば、検出可能なタグ（例えば、GFP）の発現を可能にする配列内リボソーム進入部位（IRES）を含み得る。いくつかの実施形態では、リンカー（例えば、GSリンカー）は、p15E膜貫通ドメインとタグの間に位置付けられる。いくつかの実施形態では、p15E膜貫通ドメインおよびGFPをコードするポリヌクレオチドは、配列番号760を含むかまたは配列番号760と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、p15E膜貫通ドメイン—GFPコンストラクトは、配列番号759のアミノ酸配列または配列番号759と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

20

30

40

【0354】

いくつかの実施形態では、CD43由来の免疫抑制ペプチド（fCD43—TM）をコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、CD43ペプチドは、CD8 α シグナルペプチドに結合される（例えば、発現を目的として、この配列は、本明細書において別々に提供される）。いくつかの実施形態では、CD43免疫抑制コンストラクトは、CD8 α シグナルペプチドおよびCD43ペプチドを含み、配列番号765を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号765と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98

50

%、または少なくとも約 99 % の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 766 を含むかまたは配列番号 766 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性を共有する。ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、FLAG タグ）をコードしてもよいおよび／またはさらなるタンパク質、例えば、検出可能なタグ（例えば、GFP）の発現を可能にする配列内リボソーム進入部位（IRES）を含み得る。いくつかの実施形態では、リンカー（例えば、GS リンカー）は、CD43 とタグの間に位置付けられる。いくつかの実施形態では、fCD43 および GFP をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 764 を含むかまたは配列番号 764 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、CD43-GFP コンストラクトは、配列番号 763 のアミノ酸配列または配列番号 763 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

【0355】

いくつかの実施形態では、エプスタインバーウイルスの潜在膜タンパク質 1（LMP1）ペプチド（LMP1-TM）をコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、LMP1 ペプチドは、CD8 α シグナルペプチドに結合される（例えば、発現を目的として、この配列は、本明細書において別々に提供される）。いくつかの実施形態では、LMP1 免疫抑制コンストラクトは、CD8 α シグナルペプチドおよび LMP1 ペプチドを含み、配列番号 769 を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号 769 と少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、または少なくとも約 99 % の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 770 を含むかまたは配列番号 770 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性を共有する。ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、FLAG タグ）をコードしてもよいおよび／またはさらなるタンパク質、例えば、検出可能なタグ（例えば、GFP）の発現を可能にする配列内リボソーム進入部位（IRES）を含み得る。いくつかの実施形態では、リンカー（例えば、GS リンカー）は、LMP1 とタグの間に位置付けられる。いくつかの実施形態では、fLMP1 および GFP をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 768 を含むかまたは配列番号 768 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、LMP1-GFP コンストラクトは、配列番号 767 のアミノ酸配列または配列番号 767 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

【0356】

いくつかの実施形態では、単純ヘルペスウイルスの糖タンパク質（gD）（fgD-TM）をコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、gD ペプチドは、CD8 α シグナルペプチドに結合される（例えば、発現を目的として、この配列は、本明細書において別々に提供される）。いくつかの実施形態では、gD 免疫抑制コンストラクトは、CD8 α シグナルペプチドおよび gD ペプチドを含み、配列番号 773 を含

むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号 773 と少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、または少なくとも約 99 % の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 774 を含むかまたは配列番号 774 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性を共有する。ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、FLAG タグ）をコードしてもよいおよび／またはさらなるタンパク質、例えば、検出可能なタグ（例えば、GFP）の発現を可能にする配列内リボソーム進入部位（IRES）を含み得る。いくつかの実施形態では、リンカー（例えば、GS リンカー）は、gD とタグの間に位置付けられる。いくつかの実施形態では、gD および GFP をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 772 を含むかまたは配列番号 772 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、gD-GFP コンストラクトは、配列番号 771 のアミノ酸配列または配列番号 771 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

10

20

【0357】

いくつかの実施形態では、CD161 と相互作用した場合に、ナチュラルキラー細胞の活性化を阻害し、腫瘍細胞の免疫抑制特性に寄与するレクチン様転写物 1（LLT1）をコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、LLT1 ペプチドは、CD8 α シグナルペプチドに結合される（例えば、発現を目的として、この配列は、本明細書において別々に提供される）。いくつかの実施形態では、LLT1 免疫抑制コンストラクトは、CD8 α シグナルペプチドおよび LLT1 ペプチドを含み、配列番号 777 を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号 777 と少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、または少なくとも約 99 % の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 778 を含むかまたは配列番号 778 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性を共有する。ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、FLAG タグ）をコードしてもよいおよび／またはさらなるタンパク質、例えば、検出可能なタグ（例えば、GFP）の発現を可能にする配列内リボソーム進入部位（IRES）を含み得る。いくつかの実施形態では、リンカー（例えば、GS リンカー）は、LLT1 とタグの間に位置付けられる。いくつかの実施形態では、LLT1 および GFP をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 776 を含むかまたは配列番号 776 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、LLT1-GFP コンストラクトは、配列番号 775 のアミノ酸配列または配列番号 775 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

30

40

【0358】

いくつかの実施形態では、CD47 の細胞外ドメインおよび膜貫通ドメインの少なくとも一部（CD47 tm162）をコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの

50

実施形態では、CD47ドメインは、CD8 α シグナルペプチドに結合される（例えば、発現を目的として、この配列は、本明細書において別々に提供される）。いくつかの実施形態では、CD47免疫抑制コンストラクトは、CD8 α シグナルペプチドならびにCD47細胞外ドメインおよび膜貫通ドメイン（UniProtKB-Q08722の19～162位）を含み、配列番号781を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号781と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号782を含むかまたは配列番号782と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、FLAGタグ）をコードしてもよいおよび／またはさらなるタンパク質、例えば、検出可能なタグ（例えば、GFP）の発現を可能にする配列内リボソーム進入部位（IRES）を含み得る。いくつかの実施形態では、リンカー（例えば、GSリンカー）は、CD47ドメインとタグの間に位置付けられる。いくつかの実施形態では、CD47およびGFPをコードするポリヌクレオチドは、配列番号780を含むかまたは配列番号780と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、CD47tm162-GFPコンストラクトは、配列番号779のアミノ酸配列または配列番号779と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

10

20

30

40

50

【0359】

いくつかの実施形態では、エプスタインバーウイルスの潜在膜タンパク質（LMP）の少なくとも一部（LMP__L__CD8HTM）をコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、LMPドメインは、CD8 α シグナルペプチドに結合される（例えば、発現を目的として、この配列は、本明細書において別々に提供される）。いくつかの実施形態では、LMP免疫抑制コンストラクトは、CD8 α シグナルペプチド、LMP__Lドメイン、CD8 α ヒンジ、およびCD8 α 膜貫通ドメインを含み、配列番号785を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号785と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号786を含むかまたは配列番号786と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、FLAGタグ）をコードしてもよいおよび／またはさらなるタンパク質、例えば、検出可能なタグ（例えば、GFP）の発現を可能にする配列内リボソーム進入部位（IRES）を含み得る。いくつかの実施形態では、リンカー（例えば、GSリンカー）は、CD47ドメインとタグの間に位置付けられる。いくつかの実施形態では、LMP__LドメインおよびGFPをコードするポリヌクレオチドは、配列番号784を含むかまたは配列番号784と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、LMP__L__CD8HTM-GFPコンストラクトは、配列番号783のアミノ酸配列または配列番号783と少なくとも約80%、少なく

とも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

【0360】

いくつかの実施形態では、免疫抑制特性を有するペプチドの多量体リピート（例えば、二量体、三量体、クワトラマー（*quatermer*）、五量体など）を含む合成免疫抑制コンストラクト（*LALLFWLx5-CD8HTM*）をコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、合成ドメインは、*CD8α* シグナルペプチドに結合される（例えば、発現を目的として、この配列は、本明細書において別々に提供される）。いくつかの実施形態では、合成免疫抑制コンストラクトは、*CD8α* シグナルペプチド、合成ペプチドの 5 つのリピート、*CD8α* ヒンジ、および *CD8α* 膜貫通ドメインを含み、配列番号 789 を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号 789 と少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、または少なくとも約 99% の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 790 を含むかまたは配列番号 790 と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性を共有する。ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、*FLAG* タグ）をコードしてもよいおよび／またはさらなるタンパク質、例えば、検出可能なタグ（例えば、*GFP*）の発現を可能にする配列内リボソーム進入部位（*IRES*）を含み得る。いくつかの実施形態では、リンカー（例えば、*GS* リンカー）は、膜貫通ドメインとタグの間に位置付けられる。いくつかの実施形態では、合成免疫抑制ペプチドおよび *GFP* をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 788 を含むかまたは配列番号 788 と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、合成免疫抑制ペプチド-*GFP* コンストラクトは、配列番号 787 のアミノ酸配列または配列番号 787 と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

【0361】

いくつかの実施形態では、ヒト免疫不全ウイルス（*HIV*）-1 エンベロープ糖タンパク質（*Env*）*gp41* の N 末端融合ペプチド（*FP*）の少なくとも一部（*GP41fp*）をコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、*GP41fp* は、*CD8α* シグナルペプチドに結合される（例えば、発現を目的として、この配列は、本明細書において別々に提供される）。いくつかの実施形態では、*GP41fp* 免疫抑制コンストラクトは、*CD8α* シグナルペプチド、*GP41fp* ペプチド、および *GP41* 膜貫通ドメインの少なくとも一部を含み、配列番号 793 を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号 793 と少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、または少なくとも約 99% の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 794 を含むかまたは配列番号 794 と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性を共有する。ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、*FLAG* タグ）をコードしてもよいおよび／またはさらなるタンパク質、例えば、検出可能なタグ（例えば、*GFP*）の発現を可能にする配列内リボソーム進入部位（*IRES*）

を含み得る。いくつかの実施形態では、リンカー（例えば、GSリンカー）は、膜貫通ドメインとタグの間に位置付けられる。いくつかの実施形態では、GP41fpおよびGFPをコードするポリヌクレオチドは、配列番号792を含むかまたは配列番号792と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、GP41fp-GFPコンストラクトは、配列番号791のアミノ酸配列または配列番号791と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

10

【0362】

いくつかの実施形態では、CKS-17ウイルス免疫抑制ペプチドをコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、膜結合CKS-17ウイルス免疫抑制ペプチドが提供される。いくつかの実施形態では、CKS-17ウイルス免疫抑制ペプチドは、CD8 α 膜貫通タンパク質および／またはCD8 α ヒンジドメインに結合される。いくつかの実施形態では、膜結合CKS-17ウイルス免疫抑制ペプチドコンストラクトは、1つ以上のリンカー配列を含む。いくつかの実施形態では、膜結合CKS-17ウイルス免疫抑制ペプチドは、CD8 α シグナルペプチド、合成CKS-17、CD8 α ヒンジ、およびCD8 α 膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、膜結合CKS-17ウイルス免疫抑制ペプチドコンストラクトは、配列番号797を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号797と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有する配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号798を含むかまたは配列番号798と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、FLAGタグ）をコードしてもよいおよび／またはさらなるタンパク質、例えば、検出可能なタグ（例えば、GFP）の発現を可能にする配列内リボソーム進入部位（IRES）を含み得る。いくつかの実施形態では、膜結合合成CKS-17およびGFPをコードするポリヌクレオチドは、配列番号796を含むかまたは配列番号796と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、膜結合合成CKS-17-GFPコンストラクトは、配列番号795を含むかまたは配列番号795と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。

20

30

40

【0363】

いくつかの実施形態では、CKS-17ドメインおよびHTLV-1（Gp21）ドメインを含むキメラ免疫抑制コンストラクトをコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、CKS-17ドメインおよびHTLV-1（Gp21）ドメインを含む膜結合免疫抑制コンストラクトが提供される（CKS-HTLV-8aTM）。いくつかの実施形態では、CKS-HTLV免疫抑制ペプチドは、CD8 α 膜貫通タンパク質および／またはCD8 α ヒンジドメインに結合される。いくつかの実施形態では、膜結合CKS-HTLVウイルス免疫抑制ペプチドコンストラクトは、1つ以上のリンカー配列を含む。いくつかの実施形態では、膜結合CKS-HTLVウイルス免疫抑制ペプチドは、CD8 α シグナルペプチド、CKS-17ペプチド、HTLV（Gp21）ペプチ

50

ド、CD8 α ヒンジ、およびCD8 α 膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、膜結合CKS__HTLV免疫抑制ペプチドコンストラクトは、配列番号801を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号801と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有する配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号802を含むかまたは配列番号802と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、FLAGタグ）をコードしてもよいおよび／またはさらなるタンパク質、例えば、検出可能なタグ（例えば、GFP）の発現を可能にする配列内リボソーム進入部位（IRES）を含み得る。いくつかの実施形態では、膜結合CKS__HTLVおよびGFPをコードするポリヌクレオチドは、配列番号800を含むかまたは配列番号800と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、膜結合CKS__HTLV-GFPコンストラクトは、配列番号799のアミノ酸配列または配列番号799と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

10

20

30

40

50

【0364】

いくつかの実施形態では、CKS-17ドメインおよびLMPドメインを含むキメラ免疫抑制コンストラクトをコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、CKS-17ドメインおよびLMPドメインを含む膜結合免疫抑制コンストラクトが提供される（CKS__HTLV-8aTM）。いくつかの実施形態では、CKS__LMP免疫抑制ペプチドは、CD8 α 膜貫通タンパク質および／またはCD8 α ヒンジドメインに結合される。いくつかの実施形態では、膜結合CKS__LMPウイルス免疫抑制ペプチドコンストラクトは、1つ以上のリンカー配列を含む。いくつかの実施形態では、膜結合CKS__LMPウイルス免疫抑制コンストラクトは、CD8 α シグナルペプチド、CKS-17ペプチド、LMPペプチド、CD8 α ヒンジ、およびCD8 α 膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、膜結合CKS__LMP免疫抑制コンストラクトは、配列番号805を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号805と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有する配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号806を含むかまたは配列番号806と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、FLAGタグ）をコードしてもよいおよび／またはさらなるタンパク質、例えば、検出可能なタグ（例えば、GFP）の発現を可能にする配列内リボソーム進入部位（IRES）を含み得る。いくつかの実施形態では、膜結合CKS__LMPおよびGFPをコードするポリヌクレオチドは、配列番号804を含むかまたは配列番号804と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、膜結合CKS__LMP-GFPコンストラクトは、配列番号803のアミノ酸配列または配列

番号 803 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

【0365】

いくつかの実施形態では、CKS-17 ドメインおよび GP41fp ドメインを含むキメラ免疫抑制コンストラクトをコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、CKS-17 ドメインおよび GP41fp ドメインを含む膜結合免疫抑制コンストラクトが提供される (CKS__GP41fp tm)。いくつかの実施形態では、膜結合 CKS__GP41fp tm ウイルス免疫抑制ペプチドコンストラクトは、1 つ以上のリンカー配列を含む。いくつかの実施形態では、膜結合 CKS__GP41fp tm ウイルス免疫抑制コンストラクトは、CD8 α シグナルペプチド、GP41fp の第 1 の部分 (アミノ酸 1 ~ 16)、CKS-17 ペプチド、GP41fp の第 2 の部分 (アミノ酸 17 ~ 70)、および gp41 膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、膜結合 CKS__GP41fp tm 免疫抑制コンストラクトは、配列番号 809 を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 809 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、または少なくとも約 99 % の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有する配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 810 を含むかまたは配列番号 810 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性を共有する。ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ (例えば、FLAG タグ) をコードしてもよいおよび／またはさらなるタンパク質、例えば、検出可能なタグ (例えば、GFP) の発現を可能にする配列内リボソーム進入部位 (IRES) を含み得る。いくつかの実施形態では、膜結合 CKS__GP41fp tm および GFP をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 808 を含むかまたは配列番号 808 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、膜結合 CKS__GP41fp tm-GFP コンストラクトは、配列番号 807 のアミノ酸配列または配列番号 807 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

【0366】

いくつかの実施形態では、エプスタインバーウイルスの潜在膜タンパク質 1 (LMP1) ペプチドの切断された部分 (LMP__S) をコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、LMP__S ペプチドは、CD8 α シグナルペプチドに結合される (例えば、発現を目的として、この配列は、本明細書において別々に提供される)。いくつかの実施形態では、CD8 α 膜貫通タンパク質および／または CD8 α ヒンジドメインに結合された LMP__S ペプチドを含む膜結合 LMP__S 免疫抑制コンストラクトが提供される。いくつかの実施形態では、膜結合 LMP__S 免疫抑制コンストラクトは、1 つ以上のリンカー配列を含む。いくつかの実施形態では、膜結合 LMP__S 免疫抑制コンストラクトは、CD8 α シグナルペプチド、LMP__S ペプチド、HTLV (Gp21) ペプチド、CD8 α ヒンジ、および CD8 α 膜貫通ドメインを含み、配列番号 813 を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号 813 と少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、または少なくとも約 99 % の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 814 を含むかまたは配列番

10

20

30

40

50

号 8 1 4 と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性を共有する。ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、F L A G タグ）をコードしてもよいおよび／またはさらなるタンパク質、例えば、検出可能なタグ（例えば、G F P）の発現を可能にする配列内リボソーム進入部位（I R E S）を含み得る。いくつかの実施形態では、リンカー（例えば、G S リンカー）は、L M P __ S とタグの間に位置付けられる。いくつかの実施形態では、L M P __ S および G F P をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 8 1 2 を含むかまたは配列番号 8 1 2 と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、L M P __ S - G F P コンストラクトは、配列番号 8 1 1 のアミノ酸配列または配列番号 8 1 1 と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。
【 0 3 6 7 】

いくつかの実施形態では、まとめて L M P __ C D 4 7 t m 1 6 2 と称される、C D 4 7 の細胞外ドメインおよび膜貫通ドメイン（C D 4 7 t m 1 6 2）の少なくとも一部と結合したエプスタインバーウイルスの潜在膜タンパク質 1（L M P 1）の少なくとも一部（L M P __ L）を含む、キメラ免疫抑制コンストラクトをコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、L M P __ C D 4 7 t m 1 6 2 は、C D 8 α シグナルペプチドに結合される（例えば、発現を目的として、この配列は、本明細書において別々に提供される）。いくつかの実施形態では、L M P __ C D 4 7 t m 1 6 2 コンストラクトは、C D 4 7 膜貫通ドメインの一部を基礎として膜結合しており、1 つ以上のリンカー配列を含む。いくつかの実施形態では、膜結合 L M P __ C D 4 7 t m 1 6 免疫抑制コンストラクトは、C D 8 α シグナルペプチド、L M P __ L ペプチド、および C D 4 7 t m 1 6 2 ペプチドを含み、配列番号 8 1 7 を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号 8 1 7 と少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、または少なくとも約 9 9 % の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 8 1 8 を含むかまたは配列番号 8 1 8 と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性を共有する。ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、F L A G タグ）をコードしてもよいおよび／またはさらなるタンパク質、例えば、検出可能なタグ（例えば、G F P）の発現を可能にする配列内リボソーム進入部位（I R E S）を含み得る。いくつかの実施形態では、リンカー（例えば、G S リンカー）は、L M P __ C D 4 7 t m 1 6 2 とタグの間に位置付けられる。いくつかの実施形態では、L M P __ C D 4 7 t m 1 6 2 および G F P をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 8 1 6 を含むかまたは配列番号 8 1 6 と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、L M P __ C D 4 7 t m 1 6 2 - G F P コンストラクトは、配列番号 8 1 5 のアミノ酸配列または配列番号 8 1 5 と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。
【 0 3 6 8 】

いくつかの実施形態では、まとめて p 1 5 E __ C D 4 7 t m 1 6 2 と称される、C D 4 7 の細胞外ドメインおよび膜貫通ドメイン（C D 4 7 t m 1 6 2）の少なくとも一部と結

10

20

30

40

50

合した p 1 5 E ウイルスペプチドの少なくとも一部を含む、キメラ免疫抑制コンストラクトをコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、p 1 5 E __ C D 4 7 t m 1 6 2 は、C D 8 α シグナルペプチドに結合される（例えば、発現を目的として、この配列は、本明細書において別々に提供される）。いくつかの実施形態では、p 1 5 E __ C D 4 7 t m 1 6 2 コンストラクトは、C D 4 7 膜貫通ドメインの一部を基礎として膜結合しており、1 つ以上のリンカー配列を含む。いくつかの実施形態では、膜結合 p 1 5 E __ C D 4 7 t m 1 6 2 免疫抑制コンストラクトは、C D 8 α シグナルペプチド、p 1 5 E ペプチド、および C D 4 7 t m 1 6 2 ペプチドを含み、配列番号 8 2 1 を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号 8 2 1 と少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、または少なくとも約 9 9 % の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 8 2 2 を含むかまたは配列番号 8 2 2 と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性を共有する。ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、F L A G タグ）をコードしてもよいおよび／またはさらなるタンパク質、例えば、検出可能なタグ（例えば、G F P）の発現を可能にする配列内リボソーム進入部位（I R E S）を含み得る。いくつかの実施形態では、リンカー（例えば、G S リンカー）は、p 1 5 E __ C D 4 7 t m 1 6 2 とタグの間に位置付けられる。いくつかの実施形態では、p 1 5 E __ C D 4 7 t m 1 6 2 および G F P をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 8 2 0 を含むかまたは配列番号 8 2 0 と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、p 1 5 E __ C D 4 7 t m 1 6 2 - G F P コンストラクトは、配列番号 8 1 9 のアミノ酸配列または配列番号 8 1 9 と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

10

20

30

【 0 3 6 9 】

いくつかの実施形態では、H I V G p 4 1 に由来する少なくとも 1 つのドメインおよび C D 4 7 に由来する少なくとも 1 つのドメインを含むキメラ免疫抑制コンストラクト（C D 4 7 __ G P 4 1 f p t m）をコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、C D 4 7 __ G P 4 1 f p t m は、C D 8 α シグナルペプチドに結合される（例えば、発現を目的として、この配列は、本明細書において別々に提供される）。いくつかの実施形態では、C D 4 7 __ G P 4 1 f p t m コンストラクトは、g p 4 1 膜貫通ドメインを基礎として膜結合される。いくつかの実施形態では、膜結合 C D 4 7 __ G P 4 1 f p t m 免疫抑制コンストラクトは、C D 8 α シグナルペプチド、第 1 の G P 4 1 ドメイン（細胞外ドメインのアミノ酸 1 ~ 1 6）、C D 4 7 ドメイン（アミノ酸 2 ~ 1 4 1）、第 2 の G P 4 1 ドメイン（細胞外ドメインのアミノ酸 1 7 ~ 7 0）、および G P 4 1 膜貫通ドメインを含み、配列番号 8 2 5 を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号 8 2 5 と少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、または少なくとも約 9 9 % の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 8 2 6 を含むかまたは配列番号 8 2 6 と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性を共有する。ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、F L A G タグ）をコードしてもよいおよび／またはさらなるタンパク質、例えば、検出可能なタグ（例えば、G

40

50

F P) の発現を可能にする配列内リボソーム進入部位 (I R E S) を含み得る。いくつかの実施形態では、リンカー (例えば、G S リンカー) は、C D 4 7 _ G P 4 1 f p t m とタグの間に位置付けられる。いくつかの実施形態では、C D 4 7 _ G P 4 1 f p t m および G F P をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 8 2 4 を含むかまたは配列番号 8 2 4 と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、C D 4 7 _ G P 4 1 f p t m - G F P コンストラクトは、配列番号 8 2 3 のアミノ酸配列または配列番号 8 2 3 と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

10

【0370】

いくつかの実施形態では、樹状細胞、マクロファージ、単球および好中球で発現される先天性免疫チェックポイントであるシグナル調節タンパク質 α (S I R P α) を標的とする抗体の少なくとも一部を含む免疫抑制コンストラクト (抗 S I R P α アゴニスト _ v H L) をコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、コンストラクトは、膜結合するように操作される。いくつかの実施形態では、抗 S I R P α アゴニスト _ v H L は、C D 8 α シグナルペプチドに結合される (例えば、発現を目的として、この配列は、本明細書において別々に提供される)。いくつかの実施形態では、抗 S I R P α アゴニスト _ v H L コンストラクトは、C D 8 α ヒンジ領域および / または C D 8 α 膜貫通ドメインを基礎として膜結合される。いくつかの実施形態では、膜結合抗 S I R P α アゴニスト _ v H L 免疫抑制コンストラクトは、C D 8 α シグナルペプチド、抗 S I R P α 重鎖、リンカーおよび抗 S I R P α 軽鎖、C D 8 α ヒンジ領域、および C D 8 α 膜貫通ドメインを含み、配列番号 8 3 3 を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号 8 3 3 と少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、または少なくとも約 9 9 % の配列同一性、相溶性および / または機能的同等性を共有する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 8 3 4 を含むかまたは配列番号 8 3 4 と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性を共有する。ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ (例えば、F L A G タグ) をコードしてもよいおよび / またはさらなるタンパク質、例えば、検出可能なタグ (例えば、G F P) の発現を可能にする配列内リボソーム進入部位 (I R E S) を含み得る。いくつかの実施形態では、リンカー (例えば、G S リンカー) は、抗 S I R P α アゴニスト _ v H L とタグの間に位置付けられる。いくつかの実施形態では、抗 S I R P α アゴニスト _ v H L および G F P をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 8 3 2 を含むかまたは配列番号 8 3 2 と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、抗 S I R P α アゴニスト _ v H L - G F P コンストラクトは、配列番号 8 3 1 のアミノ酸配列または配列番号 8 3 1 と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

20

30

40

【0371】

いくつかの実施形態では、H T L V _ G P 2 1 に由来する少なくとも 1 つのドメインを含む免疫抑制コンストラクト (H T L V 1 _ G P 2 1) をコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、H T L V 1 _ G P 2 1 は、C D 8 α シグナルペプ

50

チドに結合される（例えば、発現を目的として、この配列は、本明細書において別々に提供される）。いくつかの実施形態では、HTLV1__GP21は、CD8 α シグナルペプチドおよびGP21膜貫通ドメインを含み、配列番号841を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号841と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号842を含むかまたは配列番号842と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、FLAGタグ）をコードしてもよいおよび／またはさらなるタンパク質、例えば、検出可能なタグ（例えば、GFP）の発現を可能にする配列内リボソーム進入部位（IRES）を含み得る。いくつかの実施形態では、リンカー（例えば、GSリンカー）は、HTLV1__GP21とタグの間に位置付けられる。いくつかの実施形態では、HTLV1__GP21およびGFPをコードするポリヌクレオチドは、配列番号840を含むかまたは配列番号840と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、HTLV1__fGP62-GFPコンストラクトは、配列番号839のアミノ酸配列または配列番号839と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

10

20

30

40

50

【0372】

いくつかの実施形態では、ラッサウイルス膜糖タンパク質2に由来する少なくとも1つのドメインを含む免疫抑制コンストラクト（LASV__fGP2）をコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、LASV__fGP2は、CD8 α シグナルペプチドに結合される（例えば、発現を目的として、この配列は、本明細書において別々に提供される）。いくつかの実施形態では、LASV__fGP2は、CD8 α シグナルペプチドおよび膜貫通領域を含むラッサウイルスGP2ドメインの少なくとも一部を含み、配列番号845を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号845と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号846を含むかまたは配列番号846と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、FLAGタグ）をコードしてもよいおよび／またはさらなるタンパク質、例えば、検出可能なタグ（例えば、GFP）の発現を可能にする配列内リボソーム進入部位（IRES）を含み得る。いくつかの実施形態では、リンカー（例えば、GSリンカー）は、HTLV1__GP21とタグの間に位置付けられる。いくつかの実施形態では、LASV__fGP2およびGFPをコードするポリヌクレオチドは、配列番号844を含むかまたは配列番号844と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、LASV__fGP2-GFPコンストラクトは、配列番号843のアミノ酸配列または配列番号843と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95

%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

【0373】

いくつかの実施形態では、スーダンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質に由来する少なくとも 1 つのドメインを含む免疫抑制コンストラクト (SEBOV__fGP) をコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、SEBOV__fGP は、CD8 α シグナルペプチドに結合される (例えば、発現を目的として、この配列は、本明細書において別々に提供される)。いくつかの実施形態では、SEBOV__fGP は、CD8 α シグナルペプチドおよびエボラウイルスエンベロープに由来する少なくとも 2 つのドメインを含む。いくつかの実施形態では、SEBOV__fGP は、完全 GP1 糖タンパク質配列と、それに続く GP1 の切断された形態 (GP2 として知られており、GP1 ドメインのタンパク質分解により得られる) を含む。いくつかの実施形態では、GP2 ドメインは、膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、SEBOV__fGP は、配列番号 849 を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号 849 と少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、または少なくとも約 99% の配列同一性、相溶性および/または機能的同等性を共有する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 850 を含むかまたは配列番号 850 と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性を共有する。ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ (例えば、FLAG タグ) をコードしてもよいおよび/またはさらなるタンパク質、例えば、検出可能なタグ (例えば、GFP) の発現を可能にする配列内リボソーム進入部位 (IRES) を含み得る。いくつかの実施形態では、リンカー (例えば、GS リンカー) は、SEBOV__fGP とタグの間に位置付けられる。いくつかの実施形態では、SEBOV__fGP および GFP をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 848 を含むかまたは配列番号 848 と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、SEBOV__fGP-GFP コンストラクトは、配列番号 847 のアミノ酸配列または配列番号 847 と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

【0374】

いくつかの実施形態では、スーダンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質に由来する少なくとも 1 つのドメインを含む免疫抑制コンストラクト (SEBOV__GP2) をコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、SEBOV__GP2 は、CD8 α シグナルペプチドに結合される (例えば、発現を目的として、この配列は、本明細書において別々に提供される)。いくつかの実施形態では、SEBOV__GP2 は、CD8 α シグナルペプチドおよび GP1 ドメインのタンパク質分解によって得られる GP2 ドメインを含む。いくつかの実施形態では、GP2 ドメインは、膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、SEBOV__GP2 は、配列番号 853 を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号 853 と少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、または少なくとも約 99% の配列同一性、相溶性および/または機能的同等性を共有する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 854 を含むかまたは配列番号 854 と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、も

しくは少なくとも約 99% の配列同一性を共有する。ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、FLAG タグ）をコードしてもよいおよび／またはさらなるタンパク質、例えば、検出可能なタグ（例えば、GFP）の発現を可能にする配列内リボソーム進入部位（IRES）を含み得る。いくつかの実施形態では、リンカー（例えば、GS リンカー）は、SEBOV__GP2 とタグの間に位置付けられる。いくつかの実施形態では、SEBOV__GP2 および GFP をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 852 を含むかまたは配列番号 852 と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、SEBOV__GP2-GFP コンストラクトは、配列番号 851 のアミノ酸配列または配列番号 851 と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

10

【0375】

いくつかの実施形態では、Sars-CoV-2 スパイクタンパク質に由来する少なくとも 1 つのドメインを含む免疫抑制コンストラクト（SCoV__S2）をコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、SCoV__S2 は、CD8 α シグナルペプチドに結合される（例えば、発現を目的として、この配列は、本明細書において別々に提供される）。いくつかの実施形態では、SCoV__S2 は、CD8 α シグナルペプチドおよび膜貫通ドメインを含む S2 スパイクタンパク質を含む。一部の実施形態では、SCoV__S2 は、配列番号 857 を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号 857 と少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、または少なくとも約 99% の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 858 を含むかまたは配列番号 858 と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性を共有する。ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、FLAG タグ）をコードしてもよいおよび／またはさらなるタンパク質、例えば、検出可能なタグ（例えば、GFP）の発現を可能にする配列内リボソーム進入部位（IRES）を含み得る。いくつかの実施形態では、リンカー（例えば、GS リンカー）は、SCoV__S2 とタグの間に位置付けられる。いくつかの実施形態では、SCoV__S2 および GFP をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 856 を含むかまたは配列番号 856 と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、SCoV__S2-GFP コンストラクトは、配列番号 855 のアミノ酸配列または配列番号 855 と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

20

30

40

【0376】

いくつかの実施形態では、ガレクチン-3-結合タンパク質の少なくとも一部を含む免疫抑制コンストラクト（LGALS3BP）をコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、コンストラクトは、膜結合するように操作される。いくつかの実施形態では、LGALS3BP は、CD8 α シグナルペプチドに結合される（例えば、発現を目的として、この配列は、本明細書において別々に提供される）。いくつかの実施形態では、LGALS3BP コンストラクトは、CD8 α ヒンジ領域および／または CD8 α 膜貫通ドメインを基礎として膜結合される。いくつかの実施形態では、膜結合 LG

50

A L S 3 B P 免疫抑制コンストラクトは、C D 8 α シグナルペプチド、ガレクチン 3 結合タンパク質、および C D 8 α 膜貫通ドメインを含み、配列番号 8 6 1 を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号 8 6 1 と少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、または少なくとも約 9 9 % の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 8 6 2 を含むかまたは配列番号 8 6 2 と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性を共有する。ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、F L A G タグ）をコードしてもよいおよび／またはさらなるタンパク質、例えば、検出可能なタグ（例えば、G F P）の発現を可能にする配列内リボソーム進入部位（I R E S）を含み得る。いくつかの実施形態では、リンカー（例えば、G S リンカー）は、L G A L S 3 B P とタグの間に位置付けられる。いくつかの実施形態では、L G A L S 3 B P および G F P をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 8 6 0 を含むかまたは配列番号 8 6 0 と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、L G A L S 3 B P - G F P コンストラクトは、配列番号 8 5 9 のアミノ酸配列または配列番号 8 5 9 と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

10

20

30

40

50

【0377】

いくつかの実施形態では、C D 2 4 の少なくとも一部を含む免疫抑制コンストラクトをコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、コンストラクトは、膜結合するように操作される。いくつかの実施形態では、C D 2 4 コンストラクトは、C D 2 4 シグナルペプチドおよび C D 2 4 タンパク質を含み、配列番号 8 6 5 を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号 8 6 5 と少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、または少なくとも約 9 9 % の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 8 6 6 を含むかまたは配列番号 8 6 6 と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性を共有する。ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、F L A G タグ）をコードしてもよいおよび／またはさらなるタンパク質、例えば、検出可能なタグ（例えば、G F P）の発現を可能にする配列内リボソーム進入部位（I R E S）を含み得る。いくつかの実施形態では、T 2 A ドメインは、C D 2 4 とタグの間に位置付けられる。いくつかの実施形態では、C D 2 4 および G F P をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 8 6 4 を含むかまたは配列番号 8 6 4 と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、C D 2 4 - G F P コンストラクトは、配列番号 8 6 3 のアミノ酸配列または配列番号 8 6 3 と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

【0378】

いくつかの実施形態では、C 型肝炎エンベロープ糖タンパク質の少なくとも一部を含む

免疫抑制コンストラクト（H C V __ E 2）をコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、H C V __ E 2は、C D 8 αシグナルペプチドに結合される（例えば、発現を目的として、この配列は、本明細書において別々に提供される）。いくつかの実施形態では、H C V __ E 2免疫抑制コンストラクトは、C D 8 αシグナルペプチド、およびH C VのE 2タンパク質を含み、配列番号869を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号869と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号870を含むかまたは配列番号870と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、F L A Gタグ）をコードしてもよいおよび／またはさらなるタンパク質、例えば、検出可能なタグ（例えば、G F P）の発現を可能にする配列内リボソーム進入部位（I R E S）を含み得る。いくつかの実施形態では、リンカー（例えば、G Sリンカー）は、H C V __ E 2とタグの間に位置付けられる。いくつかの実施形態では、H C V __ E 2およびG F Pをコードするポリヌクレオチドは、配列番号868を含むかまたは配列番号868と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、H C V __ E 2ーG F Pコンストラクトは、配列番号867のアミノ酸配列または配列番号867と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

【0379】

いくつかの実施形態では、シグナル調節タンパク質α（S I R P α）を標的とする抗体の少なくとも一部を含む免疫抑制コンストラクト（抗S I R P αアゴニスト__v L H）をコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、コンストラクトは、膜結合するように操作される。いくつかの実施形態では、抗S I R P αアゴニスト__v L Hは、C D 8 αシグナルペプチドに結合される（例えば、発現を目的として、この配列は、本明細書において別々に提供される）。いくつかの実施形態では、抗S I R P αアゴニスト__v L Hコンストラクトは、C D 8 αヒンジ領域および／またはC D 8 α膜貫通ドメインを基礎として膜結合される。いくつかの実施形態では、膜結合抗S I R P αアゴニスト__v L H免疫抑制コンストラクトは、C D 8 αシグナルペプチド、抗S I R P α軽鎖、リンカー、抗S I R P α重鎖、C D 8 αヒンジ領域、およびC D 8 α膜貫通ドメインを含み、配列番号873を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号873と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号874を含むかまたは配列番号874と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、F L A Gタグ）をコードしてもよいおよび／またはさらなるタンパク質、例えば、検出可能なタグ（例えば、G F P）の発現を可能にする配列内リボソーム進入部位（I R E S）を含み得る。いくつかの実施形態では、リンカー（例えば、G Sリンカー）は、抗S I R P αアゴニスト__v L Hとタグの間に位置付けられる。いくつかの実施形態では、抗S I R P αアゴニスト__v L HおよびG F Pをコードするポリヌクレオチドは、配列番号872を含むかまたは配列番号872と

10

20

30

40

50

少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、抗 S I R P a アゴニスト__v L H - G F P コンストラクトは、配列番号 871 のアミノ酸配列または配列番号 871 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

【0380】

いくつかの実施形態では、少なくとも C E A 細胞接着分子 1 由来のドメインを含む免疫抑制コンストラクト (C E A C A M 1) をコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、コンストラクトは、膜結合するように操作される。いくつかの実施形態では、C E A C A M 1 は、C D 8 α シグナルペプチドに結合される (例えば、発現を目的として、この配列は、本明細書において別々に提供される)。いくつかの実施形態では、C E A C A M 1 免疫抑制コンストラクトは、C D 8 α シグナルペプチドおよび C E A C A M 1 由来のタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、C E A C A M 1 免疫抑制コンストラクトは、配列番号 877 を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号 877 と少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、または少なくとも約 99 % の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 878 を含むかまたは配列番号 878 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性を共有する。ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ (例えば、F L A G タグ) をコードしてもよいおよび／またはさらなるタンパク質、例えば、検出可能なタグ (例えば、G F P) の発現を可能にする配列内リボソーム進入部位 (I R E S) を含み得る。いくつかの実施形態では、リンカー (例えば、G S リンカー) は、C E A C A M 1 とタグの間に位置付けられる。いくつかの実施形態では、C E A C A M 1 および G F P をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 876 を含むかまたは配列番号 876 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、C E A C A M 1 - G F P コンストラクトは、配列番号 875 のアミノ酸配列または配列番号 875 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

【0381】

いくつかの実施形態では、C D 1 5 5 膜貫通ドメインを含む免疫抑制コンストラクト (C D 1 5 5 t m__3 M) をコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、C D 1 5 5 t m__3 M は、C D 8 α シグナルペプチドに結合される (例えば、発現を目的として、この配列は、本明細書において別々に提供される)。いくつかの実施形態では、C D 1 5 5 t m__3 M 免疫抑制コンストラクトは、C D 8 α シグナルペプチドおよび C D 1 5 5 由来のタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、C D 1 5 5 t m__3 M は、配列番号 881 を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号 881 と少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、または少なくとも約 99 % の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 882 を含むかまたは配列番号 882 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なく

10

20

30

40

50

とも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、FLAGタグ）をコードしてもよいおよび／またはさらなるタンパク質、例えば、検出可能なタグ（例えば、GFP）の発現を可能にする配列内リボソーム進入部位（IRES）を含み得る。いくつかの実施形態では、リンカー（例えば、GSリンカー）は、CD155tm__3Mとタグの間に位置付けられる。いくつかの実施形態では、CD155tm__3MおよびGFPをコードするポリヌクレオチドは、配列番号880を含むかまたは配列番号880と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、CD155tm__3M-GFPコンストラクトは、配列番号879のアミノ酸配列または配列番号879と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

10

20

30

40

50

【0382】

いくつかの実施形態では、CD31膜貫通ドメインを含む免疫抑制コンストラクト（CD31tm）をコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、CD31tmは、CD8αシグナルペプチドに結合される（例えば、発現を目的として、この配列は、本明細書において別々に提供される）。いくつかの実施形態では、CD31tm免疫抑制コンストラクトは、CD8αシグナルペプチドおよびCD31由来のタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、CD31tmは、配列番号885を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号885と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号886を含むかまたは配列番号886と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、FLAGタグ）をコードしてもよいおよび／またはさらなるタンパク質、例えば、検出可能なタグ（例えば、GFP）の発現を可能にする配列内リボソーム進入部位（IRES）を含み得る。いくつかの実施形態では、リンカー（例えば、GSリンカー）は、CD31tmとタグの間に位置付けられる。いくつかの実施形態では、CD31tmおよびGFPをコードするポリヌクレオチドは、配列番号884を含むかまたは配列番号884と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、CD31tm-GFPコンストラクトは、配列番号883のアミノ酸配列または配列番号883と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

【0383】

いくつかの実施形態では、CD111膜貫通ドメインを含む免疫抑制コンストラクト（CD111tm）をコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、CD111tmは、CD8αシグナルペプチドに結合される（例えば、発現を目的として、この配列は、本明細書において別々に提供される）。いくつかの実施形態では、CD111tm免疫抑制コンストラクトは、CD8αシグナルペプチドおよびCD111tm由来のタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、CD111tmは、配列番号889を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実

施形態では、アミノ酸配列は、配列番号 889 と少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、または少なくとも約 99 % の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 890 を含むかまたは配列番号 890 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性を共有する。ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、FLAG タグ）をコードしてもよいおよび／またはさらなるタンパク質、例えば、検出可能なタグ（例えば、GFP）の発現を可能にする配列内リボソーム進入部位（IRES）を含み得る。いくつかの実施形態では、リンカー（例えば、GS リンカー）は、CD111tm とタグの間に位置付けられる。いくつかの実施形態では、CD111tm および GFP をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 888 を含むかまたは配列番号 888 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、CD111tm-GFP コンストラクトは、配列番号 887 のアミノ酸配列または配列番号 887 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

10

20

【0384】

いくつかの実施形態では、CD200 膜貫通ドメインを含む免疫抑制コンストラクト（CD200tm）をコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、CD200tm は、CD8 α シグナルペプチドに結合される（例えば、発現を目的として、この配列は、本明細書において別々に提供される）。いくつかの実施形態では、CD200tm 免疫抑制コンストラクトは、CD8 α シグナルペプチドおよび CD200tm 由来のタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、CD200tm 免疫抑制コンストラクトは、配列番号 893 を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号 893 と少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、または少なくとも約 99 % の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 894 を含むかまたは配列番号 894 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性を共有する。ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、FLAG タグ）をコードしてもよいおよび／またはさらなるタンパク質、例えば、検出可能なタグ（例えば、GFP）の発現を可能にする配列内リボソーム進入部位（IRES）を含み得る。いくつかの実施形態では、リンカー（例えば、GS リンカー）は、CD200tm とタグの間に位置付けられる。いくつかの実施形態では、CD200tm および GFP をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 892 を含むかまたは配列番号 892 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、CD200tm-GFP コンストラクトは、配列番号 891 のアミノ酸配列または配列番号 891 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

30

40

【0385】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される操作された細胞は、NKG2D を標的

50

とするキメラ受容体を含み、CARは、配列番号174のアミノ酸を含むか、または配列番号174と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／もしくは機能的同等性を有するアミノ酸配列ならびに以下の膜結合免疫抑制アミノ酸配列：配列番号218、223、228、233、238、243、248、253、256、259、262、265、268、および271のうちの1つ以上の、1つ以上のコピーを含む。

【0386】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される操作された細胞は、CD19を標的とするCARを含み、CARは、配列番号178のアミノ酸を含むか、または配列番号178と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／もしくは機能的同等性を有するアミノ酸配列ならびに以下の膜結合免疫抑制アミノ酸配列：配列番号218、223、228、233、238、243、248、253、256、259、262、265、268、および271のうちの1つ以上の、1つ以上のコピーを含む。

【0387】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される操作された細胞は、CD19を標的とするCARを含み、CARは、配列番号466によってコードされた配列を含むか、または配列番号466によってコードされた配列と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／もしくは機能的同等性を有するアミノ酸配列ならびに以下の膜結合免疫抑制アミノ酸配列：配列番号218、223、228、233、238、243、248、253、256、259、262、265、268、および271のうちの1つ以上の、1つ以上のコピーを含む。

【0388】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される操作された細胞は、CD70を標的とするCARを含み、CARは、配列番号383～465のいずれかのアミノ酸を含むか、または配列番号383～465のいずれかと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／もしくは機能的同等性を有するアミノ酸配列ならびに以下の膜結合免疫抑制アミノ酸配列：配列番号218、223、228、233、238、243、248、253、256、259、262、265、268、および271のうちの1つ以上の、1つ以上のコピーを含む。

H L A 修飾

いくつかの実施形態では、免疫細胞は、それらのH L A発現プロファイル、宿主免疫細胞の1つ以上の阻害受容体と相互作用する順序を改変するように操作される。いくつかの実施形態では、操作された細胞のH L A発現プロファイルの変更は、操作された免疫細胞に、細胞傷害性または宿主免疫細胞（または他の操作された免疫細胞）による他の免疫クリアランスを低減または回避させる能力を付与するように機能し、それによって、操作された免疫細胞の持続性（したがって、機能的寿命）を増大させる。

【0389】

ヒト白血球抗原-E（H L A-E）は、N K細胞で発現されるナチュラルキラー阻害受容体C D 9 4 / N K G 2 Aに対する主要なリガンドである。H L A-EがC D 9 4 / N K G 2 A複合体に結合すると、阻害シグナル伝達カスケードが開始し、N K細胞活性の低下をもたらされる。よって、H L A-Eの発現は、操作された免疫細胞（例えば、CARおよび／または免疫抑制ペプチドを発現する）に対する宿主N K細胞の細胞傷害効果を弱め得る。同様に、H L A-Gもまた、胎児と母体の免疫寛容の維持においてだけでなく、

臓器または組織の移植に関しても、ナチュラルキラー（NK）細胞の機能を阻害する際に重要な役割を果たす。これは、宿主免疫細胞からの腫瘍の免疫回避においても役割を果たす。HLA-Gは、免疫グロブリン様転写物2（ILT2）、ILT4およびキラー細胞免疫グロブリン様受容体2DL4（KIR2DL4）を含む細胞表面で発現される受容体に結合することによって、NK細胞、CD4+およびCD8+T細胞、ならびに樹状細胞などの多くの免疫細胞の機能を阻害し得る。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される免疫細胞は、操作された免疫細胞に対する宿主NK細胞（または投与される他の操作されたNK細胞）を抑制するために、HLA-Eおよび／またはHLA-Gを発現するように操作される。

【0390】

このようなアプローチの非限定的な実施形態は、図26I～26Jにおいて概略的に示される。図26Iは、免疫抑制ドメインを含むCARおよび膜結合免疫抑制コンストラクトを発現する、本明細書に開示される実施形態に従う操作された免疫細胞を示す。一部の実施形態では、HLA-Eおよび／またはHLA-Gの発現は、CARに関連するが膜結合免疫抑制コンストラクトには関連しないか、または免疫抑制ドメインを含まないCARに関連してもよい。図26Jは、HLA-Eおよび／またはHLA-Gが1つ以上の膜結合免疫抑制コンストラクトと、適宜CAR（組み込まれた免疫抑制ドメインを含むかまたは含まない）および適宜1つ以上のさらなる免疫抑制タンパク質（その非限定的な例として、CD47、PD-L1、およびポリオウイルス受容体（PVR、CD155としても公知）が挙げられるがこれらに限定されない）と同時発現する別の非限定的な実施形態を概略的に示す。上で検討したように、CD47、PD-L1およびCD155の各々は、免疫細胞（例えば、宿主免疫細胞および／または他の投与される操作された免疫細胞）の活性を低下させるように作用し得る。これらの分子、または本明細書に開示される任意の他の分子の任意の組み合わせを使用することができる。

【0391】

B2M発現が減少したかまたはノックアウトされた場合などのいくつかの実施形態では、内因性HLA発現が失われ、いくつかの実施形態では、HLA-Eおよび／またはHLA-Gの特定の再発現が、HLA-Eおよび／またはHLA-Gを発現するように操作された免疫細胞に対するNK細胞の活性を低下させるのに役立ち得る。いくつかの実施形態では、この再発現は、投与されるNK細胞でのNKG2A発現を減少させる遺伝子編集と関連し、治療細胞自体のHLA-Eの抑制効果を制限する。いくつかの実施形態では、HLA-E発現は、T細胞においてのみ特異的に導入される。いくつかの実施形態では、これらのT細胞は、NK細胞のNKG2A受容体との相互作用によりNK細胞の活性を抑制するように作用する。一部の実施形態では、操作された同種異系NK細胞の活性は、一時的に抑制される。いくつかの実施形態では、操作された同種異系NK細胞の活性の一時的な抑制は、NK細胞消耗のリスクを減少させ、操作された同種異系NK細胞の持続性を延長させる。

【0392】

いくつかの実施形態では、HLA-Eをコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号273を含むHLA-Eアミノ酸配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号273と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号274を含むかまたは配列番号274と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、コードされたHLA-Eは、カノニカルHLA-E結合ペプチド、成熟ヒトベータ2-マイクログロブリン、および成熟HLA-E重鎖から構成されるHLA-E単鎖三量体（SCT）（HLA-E三量

10

20

30

40

50

体__SS)である。いくつかの実施形態では、コンストラクトは、CD8 α シグナルペプチド、第1のB2M配列、HLGペプチドリーダー配列、リンカー（例えば、GSリンカー）、第2のB2M配列、リンカー（例えば、第2のGSリンカー）、およびHLA-E配列を含む。いくつかの実施形態では、HLA-E三量体__SSコンストラクトは、配列番号276または配列番号689を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号276または配列番号689と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有する配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号277（または配列番号690）を含むかまたは配列番号277または配列番号690と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、FLAGタグ）をコードしてもよいおよび／またはさらなるタンパク質、例えば、検出可能なタグ（例えば、GFP）の発現を可能にする配列内リボソーム進入部位（IRES）を含み得る。いくつかの実施形態では、HLA-E三量体__SSコンストラクトおよびGFPをコードするポリヌクレオチドは、配列番号275を含むかまたは配列番号275と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、HLA-E三量体__SSコンストラクト、FLAGタグ、およびGFPをコードするポリヌクレオチドは、配列番号688を含むかまたは配列番号688と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、FLAGタグを有するHLA-E三量体__SSコンストラクトおよびGFPは、配列番号687を含むか、または配列番号687と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。

10

20

30

【0393】

いくつかの実施形態では、HLA-Gについて同様のコンストラクトが提供され、HLA-G三量体__SSコンストラクトは、CD8 α シグナルペプチド、第1のB2M配列、HLGペプチドリーダー配列、リンカー（例えば、GSリンカー）、第2のB2M配列、リンカー（例えば、第2のGSリンカー）、およびHLA-G配列を含む。いくつかの実施形態では、HLA-G三量体__SSコンストラクトは、配列番号279を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号279と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有する配列をコードする。いくつかの実施形態では、HLA-Gポリペプチドは、配列番号278の機能的部分を含む。

40

【0394】

ウイルス感染に関して、MHCクラスI拘束CD8+細胞傷害性Tリンパ球が、ウイルス感染を制御するために動員される。これらの細胞傷害性Tリンパ球は、リンパ球T細胞受容体が、感染細胞の表面にウイルス抗原を提示するMHCクラスI分子と結合することにより、ウイルス感染細胞を認識し、溶解する。MHCクラスI重鎖は、ベーター2ミクログロブリン（B2M）と会合してヘテロ二量体を形成し、MHCクラスIペプチドローディング複合体の一部を構成する。ヒトサイトメガロウイルスは、US2、US3、US

50

6、および U S 1 1 という固有の短い領域のタンパク質のいくつかの遺伝子産物を進化させ、抗原提示および M H C クラス I 分子の細胞表面発現を妨害する。細胞表面における抗原提示の妨害と M H C クラス I の下方調節により、感染細胞はウイルス特異的細胞傷害性 T リンパ球を回避することが可能であるが、M H C クラス I 分子の下方調節により、ウイルス感染細胞は宿主 N K 細胞に対してより感受性が高くなる。これに対抗するために、ヒトサイトメガロウイルスは、N K を媒介する感染細胞の細胞溶解を回避するために機能する複数の遺伝子をコードしており、そのうちの 1 つが U L 1 8 である。U L 1 8 は、N K 細胞阻害受容体である L I R - 1 に結合する。U L 1 8 は、M H C クラス I と高レベルのアミノ酸配列同一性を共有し、それによって、U L 1 8 は、M H C I サロゲートとして作用し、B 2 M と会合し得る。したがって、いくつかの実施形態では、キメラ U L 1 8 - B 2 M コンストラクト（図 2 7 の非限定的な概略図を参照されたい）は、本明細書に開示される操作された細胞で発現され、U L 1 8 の、N K 細胞（宿主または投与されたかのいずれか）での L I R - 1 受容体との相互作用を可能にし、操作された U L 1 8 - 発現免疫細胞に対するこれらの N K 細胞の細胞傷害活性を低下させる。

10

【0395】

いくつかの実施形態では、U L 1 8 をコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、U L 1 8 をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 2 8 0 を含むアミノ酸配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 2 8 0 と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、または少なくとも約 9 9 % の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 2 8 1 を含むかまたは配列番号 2 8 1 と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、コードされた U L 1 8 は、カノニカル H L A - E 結合ペプチド、成熟ヒトベータ 2 - ミクログロブリン、および U L 1 8 から構成されるキメラ U L 1 8 - B 2 M 単鎖三量体（S C T）である。いくつかの実施形態では、キメラ U L 1 8 - B 2 M コンストラクトは、C D 8 α シグナルペプチド、第 1 の B 2 M 配列、H L G ペプチドリーダー配列、リンカー（例えば、G S リンカー）、第 2 の B 2 M 配列、リンカー（例えば、第 2 の G S リンカー）、および U L 1 8 配列を含む。いくつかの実施形態では、キメラ U L 1 8 - B 2 M コンストラクトは、配列番号 2 8 3 を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 2 8 3 または配列番号 6 8 6 と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、または少なくとも約 9 9 % の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 2 8 4（または配列番号 6 8 5）を含むかまたは配列番号 2 8 4（または配列番号 6 8 5）と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性を共有する。ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ（例えば、F L A G タグ）をコードしてもよいおよび／またはさらなるタンパク質、例えば、検出可能なタグ（例えば、G F P）の発現を可能にする配列内リボソーム進入部位（I R E S）を含み得る。いくつかの実施形態では、キメラ U L 1 8 - B 2 M コンストラクトおよび G F P をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 2 9 2 を含むかまたは配列番号 2 9 2 と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、キメラ U L 1 8 - B 2 M コンストラクト、F L A G タグおよび G F P をコードするポリヌクレオチドは番号 6 8 4 を含むかまたは配列

20

30

40

50

番号 684 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性を共有する。さらなる実施形態では、FLAG タグを含むキメラ UL18-B2M コンストラクトおよび GFP をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 684 のアミノ酸配列または配列番号 684 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性、相同性および／もしくは機能的同等性を共有する配列をコードする。いくつかの実施形態では、キメラ UL18-B2M コンストラクトをコードするポリヌクレオチドは、配列番号 285 のアミノ酸配列または配列番号 285 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性、相同性および／もしくは機能的同等性を共有する配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 281 を含むか、または配列番号 285 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性を共有する。

10

【0396】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される操作された細胞は、NK G2D を標的とするキメラ受容体を含み、CAR は、配列番号 174 のアミノ酸を含むか、または配列番号 174 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を有するアミノ酸配列、および以下の膜結合免疫抑制コンストラクト：配列番号 273、276、279、280 または 283 のうちの 1 つ以上の、1 つ以上のコピーを含む。

20

【0397】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される操作された細胞は、CD19 を標的とする CAR を含み、CAR は、配列番号 178 のアミノ酸を含むか、または配列番号 178 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を有するアミノ酸配列、および以下の膜結合免疫抑制コンストラクト：配列番号 273、276、279、280、もしくは 283 のうちの 1 つ以上の、1 つ以上のコピーを含む。

30

【0398】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される操作された細胞は、CD19 を標的とする CAR を含み、CAR は、配列番号 466 によってコードされるか、または配列番号 466 によってコードされる配列と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を有するアミノ酸配列、および以下の膜結合免疫抑制コンストラクト：配列番号 273、276、279、280 または 283 のうちの 1 つ以上の、1 つ以上のコピーを含む。

40

【0399】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される操作された細胞は、CD70 を標的とする CAR を含み、CAR は、配列番号 383～465 のいずれかのアミノ酸を含むか、または配列番号 383～465 のいずれかと少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を有するアミノ酸配列、および以下の膜結合免疫抑制

50

コンストラクト：配列番号 273、276、279、280 または 283 のうちの 1 つ以上の、1 つ以上のコピーを含む。

【0400】

本明細書において検討されるように、いくつかの実施形態では、B2M 発現のノックアウトは、編集された細胞上の MHC 発現の喪失をもたらす。しかしながら、いくつかの実施形態では、HLA、例えば HLA-E または HLA-G は再発現され得る。いくつかの実施形態では、HLA の再発現は、ジスルフィドトラップー本鎖三量体 (d t S C T) を用いて達成され、HLA-E および／または HLA-G、免疫抑制ペプチド、ならびに B2M (HLA-E __ S T E 20 または HLA-E __ S T E 15) を発現するために用いられる。本明細書において、いくつかの実施形態では、HLA-G ペプチド、成熟 B2M および成熟 HLA-E を含むキメラ免疫抑制コンストラクトをコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、このようなコンストラクトは、1 つ以上のリンカーを含む。いくつかの実施形態では、免疫抑制コンストラクトは、B2M シグナルペプチド、HLA-G ペプチド (HLA-G のアミノ酸 3-11)、ジスルフィド架橋含有リンカー (例えば、少なくとも 2 つのシステイン残基を含む GS リンカー)、成熟 B2M ドメイン、さらなるリンカー (例えば、GS リンカー)、および成熟 HLA-E ドメインを含む。いくつかの実施形態では、HLA-E __ S T E 20 は、配列番号 829 を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号 829 と少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 830 を含むか、または配列番号 830 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性を共有する。適宜、ポリヌクレオチドは、検出可能なタグ (例えば、FLAG タグ) をコードし、および／または検出可能なタグ (例えば、GFP) などのさらなるタンパク質の発現を可能にする内部リボソーム侵入部位 (IRES) を含み得る。いくつかの実施形態では、リンカー (例えば、GS リンカー) は、HLA-E __ S T E 20 とタグの間に配置される。いくつかの実施形態では、HLA-E __ S T E 20 および GFP をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 828 を含むか、または配列番号 828 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、HLA-E __ S T E 20 - GFP コンストラクトは、配列番号 827 のアミノ酸配列、または配列番号 827 と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 % の配列同一性を共有するアミノ酸を含む。

【0401】

細胞外ドメイン (腫瘍結合因子)

本明細書に記載される組成物および方法の一部の実施形態は、本明細書に記載されるように、腫瘍結合ドメイン (抗原結合タンパク質または抗原結合ドメインとも呼ばれる) を含む細胞外ドメインを含むキメラ抗原受容体に関する。腫瘍結合ドメインは、実施形態に依存して、とりわけ、例えば、CD19、CD123、CD70、Her2、メソテリン、クラウジン6、BCMA、EGFR を標的化する。本明細書に記載される組成物および方法のいくつかの実施形態は、本明細書に記載されるように、腫瘍細胞によって発現されるリガンドに結合するリガンド結合ドメインを含む細胞外ドメインを含むキメラ受容体 (活性化キメラ受容体とも呼ばれる) に関する。リガンド結合ドメインは、実施形態に依存して、例えば、MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、ULBP5、および ULBP6 (とりわけ) を標的化する。

【0402】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、抗体、抗体断片、s c F v、F v、F a b、(F a b')₂、単一ドメイン抗体(S D A B)、v Hもしくはv Lドメイン、ラクダV H Hドメイン、または非免疫グロブリン足場、例えば、D A R P I N、アフィボディ、アフィリン、アドネクチン、アフィチン、レボボディ、フィノマー、アルファボディ、アビマー、アトリマー、センチリン、プロネクチン、アンチカリン、クニッツドメイン、アルマジロリピートタンパク質、自己抗原、受容体またはリガンドの野生型もしくは非野生型配列に由来するかまたはそれを含む。一部の実施形態では、腫瘍結合ドメインは、1を超える抗原結合ドメインを含む。実施形態では、抗原結合ドメインは、T C Rドメイン(例えば、T C R-アルファ、T C R-ベータ1、T C R-ベータ2、p r e T C R-アルファ、p r e-T C R-アルファ-D e l 4 8、T C R-ガンマ、またはT C R-デルタの定常鎖)のN H 2末端に直接的にまたは任意のリンカーを介して操作可能に連結される。

10

【0403】

抗原結合タンパク質

いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質が提供される。本明細書で使用される場合、用語「抗原結合タンパク質」は、その通常の意味が与えられるものとし、また、抗原に結合する抗原結合断片、および、適宜、抗原結合断片が抗原への抗原結合タンパク質の結合を促進する立体構造をとることを可能にする足場またはフレームワーク部分を含むタンパク質をも指すものとする。一部の実施形態では、抗原は、がん抗原(例えば、C D 1 9)またはその断片である。一部の実施形態では、抗原結合断片は、抗原に結合する抗体由来の少なくとも1つのC D Rを含む。一部の実施形態では、抗原結合断片は、抗原に結合する抗体の重鎖由来の、または抗原に結合する抗体の軽鎖由来の3つの全てのC D Rを含む。さらに一部の実施形態では、抗原結合断片は、抗原に結合する抗体(重鎖由来の3つおよび軽鎖由来の3つ)由来の6つの全てのC D Rを含む。いくつかの実施形態では、抗原結合断片は、抗原に結合する抗体由来の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのC D Rを含み、いくつかの実施形態では、C D Rは、重鎖および／または軽鎖C D Rの任意の組み合わせであり得る。一部の実施形態における抗原結合断片は、抗体断片である。

20

【0404】

抗原結合タンパク質の非限定的な例としては、抗体、抗体断片(例えば、抗体の抗原結合断片)、抗体誘導体、および抗体類似体が挙げられる。さらなる具体的な例としては、限定されないが、一本鎖可変断片(s c F v)、ナノボディ(例えば、ラクダ重鎖抗体のV Hドメイン; V H H断片)、F a b断片、F a b'断片、F(a b')₂断片、F v断片、F d断片、および相補性決定領域(C D R)断片が挙げられる。これらの分子は、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、またはブタ、イヌ、またはラクダなどの任意の哺乳動物源に由来することができる。抗体断片は、無傷の(例えば、天然の)抗体と標的抗原の結合について競合し得、断片は、無傷の抗体の修飾(例えば、酵素的または化学的切断)または組換えD N A技術もしくはペプチド合成を用いてデノボ合成され得る。抗原結合タンパク質は、例えば、移植されたC D RまたはC D R誘導体を有する代替のタンパク質骨格または人工足場を含むことができる。このような足場は、限定されないが、例えば、抗原結合タンパク質の三次元構造を安定化するために導入された突然変異を含む抗体由来足場、ならびに、例えば、生体適合性ポリマーを含む完全に合成された足場を含む。さらに、ペプチド抗体模倣物(「P A M」)、ならびに足場としてフィブロネクチン成分を利用する抗体模倣物に基づく足場を使用することができる。

30

40

【0405】

一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、単一のポリペプチド鎖または複数のポリペプチド鎖に組み込まれた1つ以上の抗体断片を含む。例えば、抗原結合タンパク質は、限定されないが、ダイアボディ; 細胞内抗体; ドメイン抗体(単一のV LもしくはV Hドメイン、またはペプチドリinkerによって接続された2つ以上のV Hドメイン); マキシ

50

ボディ (maxibody) (Fc 領域に融合した 2 つの scFv) ; トリアボディ ; テトラボディ ; ミニボディ (CH3 ドメインに融合した scFv) ; ペプチボディ (Fc 領域に結合した 1 つ以上のペプチド) ; 線状抗体 (相補的な軽鎖ポリペプチドとともに 1 対の抗原結合領域を形成する 1 対のタンデム Fd セグメント (VH-CH1-VH-CH1)) ; 小モジュラー免疫医薬 ; および免疫グロブリン融合タンパク質 (例えば、IgG-scFv、IgG-Fab、2 scFv-IgG、4 scFv-IgG、VH-IgG、IgG-VH、および Fab-scFv-Fc) を含むことができる。

【0406】

一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、免疫グロブリンの構造を有する。本明細書で使用される場合、用語「免疫グロブリン」は、その通常の意味が与えられ、また、四量体分子を指すものとし、各四量体は 2 つの同一のポリペプチド鎖対を含み、各対は 1 つの「軽」鎖 (約 25 kDa) および 1 つの「重」鎖 (約 50~70 kDa) を有する。各鎖のアミノ末端部分は、抗原認識に主に関与する約 100~110 個以上のアミノ酸の可変領域を含む。各鎖のカルボキシ末端部分は、エフェクター機能に主に関与する定常領域を画定する。

【0407】

軽鎖および重鎖内では、可変領域 (V) および定常領域 (C) は、約 12 個以上のアミノ酸の「J」領域によって連結され、重鎖はまた、約 10 個以上のアミノ酸の「D」領域を含む。各軽鎖/重鎖対の可変領域は、無傷の免疫グロブリンが 2 つの結合部位を有するように抗体結合部位を形成する。

【0408】

免疫グロブリン鎖は、相補性決定領域または CDR と呼ばれる 3 つの超可変領域によって接続された、比較的保存されたフレームワーク領域 (FR) の同じ一般的構造を示す。N 末端から C 末端まで、軽鎖と重鎖の両方は、ドメイン FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 及び FR4 を含む。

【0409】

ヒトの軽鎖はカッパ軽鎖およびラムダ軽鎖に分類される。抗体「軽鎖」とは、抗体分子中にそれらの天然に存在する立体構造で存在する 2 つのタイプのポリペプチド鎖のうちの小さい方を指す。カッパ (K) およびラムダ (λ) 軽鎖は、2 つの主要な抗体軽鎖アイソタイプを指す。軽鎖は、アミノ末端からカルボキシル末端まで、単一免疫グロブリン軽鎖可変領域 (VL) および単一免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン (CL) を含むポリペプチドを含み得る。

【0410】

重鎖は、ミュー (μ)、デルタ (Δ)、ガンマ (γ)、アルファ (α)、およびイプシロン (ε) に分類され、抗体のアイソタイプをそれぞれ IgM、IgD、IgG、IgA、IgE として定義する。抗体「重鎖」とは、その天然に存在する立体構造で抗体分子に存在する 2 つのタイプのポリペプチド鎖のうち、より大きいものを指し、通常、抗体が属するクラスを決定する。重鎖は、アミノ末端からカルボキシル末端に、単一免疫グロブリン重鎖可変領域 (VH)、免疫グロブリン重鎖定常ドメイン 1 (CH1)、免疫グロブリンヒンジ領域、免疫グロブリン重鎖定常ドメイン 2 (CH2)、免疫グロブリン重鎖定常ドメイン 3 (CH3)、および、適宜免疫グロブリン重鎖定常ドメイン 4 (CH4) を含むポリペプチドを含み得る。

【0411】

IgG クラスは、サブクラス、すなわち、IgG1、IgG2、IgG3、および IgG4 にさらに分けられる。IgA クラスは、サブクラス、すなわち IgA1 および IgA2 にさらに分けられる。IgM は、限定されないが、IgM1 および IgM2 を含むサブクラスを有する。IgG、IgA、および IgD 抗体の重鎖は、3 つのドメイン (CH1、CH2、および CH3) を有し、IgM および IgE 抗体の重鎖は、4 つのドメイン (CH1、CH2、CH3、および CH4) を有する。免疫グロブリン重鎖定常ドメインは、サブタイプを含む任意の免疫グロブリンアイソタイプ由来であり得る。抗体鎖は、CL

10

20

30

40

50

ドメインとCH1ドメイン間（例えば、軽鎖と重鎖間）、および抗体重鎖のヒンジ領域間のポリペプチド間ジスルフィド結合を介して互いに連結される。

【0412】

一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は抗体である。用語「抗体」は、本明細書で使用される場合、抗原と特異的に結合する免疫グロブリン分子に由来するタンパク質またはポリペプチド配列を指す。抗体は、モノクローナル、またはポリクローナル、多重または一本鎖、または無傷の免疫グロブリンであり得、天然供給源または組換え供給源に由来し得る。抗体は、免疫グロブリン分子の四量体であり得る。抗体は、「ヒト化」、「キメラ」または非ヒトであり得る。抗体は、任意のアイソタイプの無傷の免疫グロブリンを含み得、例えば、キメラ、ヒト化、ヒト、および二重特異性抗体を含む。無傷抗体は、一般的に、少なくとも2つの全長重鎖および2つの全長軽鎖を含む。抗体配列は、単一の種からのみ誘導することができ、または「キメラ」であり得、すなわち、抗体の異なる部分は、以下にさらに記載するように、2つの異なる種に由来することができる。他に指示がない限り、用語「抗体」はまた、2つの実質的に全長の重鎖および2つの実質的に全長の軽鎖を含む抗体を含むが、ただし、抗体が2つの全長の軽鎖および重鎖で構成される抗体と同じかまたは類似した結合および／または機能を保持することを条件とする。例えば、重鎖および／または軽鎖のN末端および／またはC末端における1、2、3、4または5個のアミノ酸残基の置換、挿入または欠失を有する抗体は定義に含まれるが、抗体が2つの全長重鎖および2つの全長軽鎖を含む抗体と同じかまたは類似した結合および／または機能を保持することを条件とする。抗体の例としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、二重特異性抗体、および合成抗体が挙げられる。一部の実施形態では、モノクローナルおよびポリクローナル抗体が提供される。本明細書で使用される場合、用語「ポリクローナル抗体」は、その通常の意味が与えられるものとし、また、組成および結合特異性において典型的に広く変化する抗体集団を指すものとする。本明細書で使用される場合、用語「モノクローナル抗体」（「mAb」）は、その通常の意味が与えられるものとし、また、同一の配列を有する抗体集団の1つ以上を指すものとする。モノクローナル抗体は、抗原上の特定のエピトープで抗原に結合する。

【0413】

いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、抗体の断片または抗原結合断片である。用語「抗体断片」は、抗原のエピトープと特異的に相互作用する（例えば、結合、立体障害、安定化／不安定化、空間分布により）能力を保持する抗体の少なくとも1つの部分を指す。抗体断片の例としては、限定されないが、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv断片、scFv抗体断片、ジスルフィド結合Fvs(sdFv)、VHおよびCH1ドメインからなるFd断片、線状抗体、sdAb(vLまたはvHのいずれか)などの一重ドメイン抗体、ラクダVHHドメイン、ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む二価断片などの抗体断片から形成される多重特異性抗体、および抗体の単離されたCDRまたは他のエピトープ結合断片が挙げられる。抗原結合断片はまた、単一ドメイン抗体、マキシボディ、ミニボディ、ナノボディ、イントラボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、v-NARおよびbis-scFv（例えば、Hollinger and Hudson, Nature Biotechnology 23: 1126-1136, 2005を参照されたい）に組み込むことができる。抗原結合断片はまた、フィブロネクチンIII型(Fn3)などのポリペプチドに基づく足場に移植することもできる（例えば、フィブロネクチンポリペプチドミニボディを記載する米国特許第6,703,199号を参照されたい）。抗体断片は、がん抗原（例えば、CD19）への特異的抗原結合を付与するのに十分な免疫グロブリンの少なくとも1つのCDRを含むFab、Fab'、F(ab')₂、および／またはFv断片を含み得る。抗体断片は、組換えDNA技術によって、または無傷抗体の酵素的もしくは化学的切断によって生成され得る。

【0414】

いくつかの実施形態では、Fab断片が提供される。Fab断片は、VL、VH、CLおよびCH1ドメインを有する一価断片であり；F(ab')₂断片は、ヒンジ領域でジ

スルフィド架橋によって連結された2つのF a b断片を有する二価断片であり；F d断片は、V HおよびC H 1ドメインを有し；F v断片は、抗体の単一アームのV LおよびV Hドメインを有し；ならびにd A b断片は、V Hドメイン、V Lドメイン、またはV HもしくはV Lドメインの抗原結合断片を有する。いくつかの実施形態では、これらの抗体断片は、単ドメイン抗体、一本鎖抗体、マキシボディ、ミニボディ、体内抗体、イントラボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、v-N A Rおよびビス-s c F vに組み込むことができる。いくつかの実施形態では、抗体は、本明細書に記載されるように、少なくとも1つのC D Rを含む。

【0415】

本明細書には、いくつかの実施形態では、一本鎖可変断片も提供される。本明細書で使用される場合、用語「一本鎖可変断片」（「s c F v」）は、その通常の意味を与えられるものとし、また、リンカー（例えば、アミノ酸残基の合成配列）を介してV LおよびV H領域が接続されて連続タンパク質鎖を形成する融合タンパク質を指すものとし、リンカーは、タンパク質鎖がそれ自身で折り返し、一価抗原結合部位を形成するのに十分な長さである。明瞭にすることを目的として、他に指示がない限り、「一本鎖可変断片」は、本明細書中で定義される抗体または抗体断片ではない。ダイアボディは、2つのポリペプチド鎖を含む二価抗体であり、各ポリペプチド鎖は、同じ鎖上の2つのドメイン間の対合を減少させるかまたは許容しないように構成されたリンカーによって接続されたV HおよびV Lドメインを含み、したがって、各ドメインが別のポリペプチド鎖上の相補的ドメインと対合することを可能にする。いくつかの実施形態によれば、ダイアボディの2つのポリペプチド鎖が同一である場合、それらの対合から生じるダイアボディは、2つの同一の抗原結合部位を有する。異なる配列を有するポリペプチド鎖を用いて、2つの異なる抗原結合部位を有するダイアボディを作製することができる。同様に、トリボディおよびテトラボディは、それぞれ3つおよび4つのポリペプチド鎖を含む抗体であり、それぞれ、3つおよび4つの抗原結合部位を形成するが、これらは同じであるかまたは異なることができる。

【0416】

いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、1つ以上のC D Rを含む。本明細書で使用される場合、用語「C D R」は、その通常の意味を与えられるものとし、抗体可変配列内の相補性決定領域（「最小認識単位」または「超可変領域」とも呼ばれる）も指すものとする。C D Rは、抗原結合タンパク質が目的の特定の抗原に特異的に結合することを可能にする。3つの重鎖可変領域C D R（C D R H 1、C D R H 2およびC D R H 3）および3つの軽鎖可変領域C D R（C D R L 1、C D R L 2およびC D R L 3）がある。2つの鎖の各々におけるC D Rは、典型的には、フレームワーク領域によって整列され、標的タンパク質上の特定のエピトープまたはドメインに特異的に結合する構造を形成する。N末端からC末端に、天然に存在する軽鎖および重鎖可変領域はいずれも、典型的には、これらの要素：F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3およびF R 4の次の順に一致する。これらのドメインの各々において位置を占めるアミノ酸に番号を付ける番号付けシステムが考案されている。この番号付けシステムは、Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (1987 and 1991, NIH, Bethesda, MD)またはChothia & Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., 1989, Nature 342:878-883に定義される。所定の抗体の相補性決定領域（C D R）およびフレームワーク領域（F R）は、このシステムを用いて同定され得る。免疫グロブリン鎖中のアミノ酸の他の番号付けシステムには、I M G T（登録商標）（the international ImMunoGeneTics information system; Lefranc et al, Dev. Comp. Immunol. 29:185-203; 2005）、およびA H o（Honegger and Pluckthun, J. Mol. Biol. 309(3):657-670; 2001）が含まれる。1つ以上のC D Rを、共有結合的または非共有結合的に分子に組み込んで、それを抗原結合タンパク質とすることができる。

【0417】

いくつかの実施形態では、本明細書において提供される抗原結合タンパク質は、より大きなポリペプチド鎖の一部として1つ以上のCDR（複数可）を含む。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、1つ以上のCDR（複数可）を別のポリペプチド鎖に共有結合的に連結する。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質には、1つ以上のCDRが非共有結合的に組み込まれる。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、生体適合性フレームワーク構造に組み込まれた、本明細書に記載されるCDRの少なくとも1つを含み得る。いくつかの実施形態では、生体適合性フレームワーク構造は、局在化表面領域において抗原（例えば、CDR、可変領域など）に結合するアミノ酸の1つ以上の配列を提示することができる、立体構造的に安定な構造支持体、またはフレームワーク、または足場を形成するのに十分なポリペプチドまたはその一部を含む。このような構造は、天然に存在するポリペプチドもしくはポリペプチド「折り畳み」（構造モチーフ）であり得るか、または天然に存在するポリペプチドもしくは折り畳みに対して、アミノ酸の付加、欠失および／もしくは置換などの1つ以上の修飾を有し得る。実施形態に応じて、足場は、ヒト、非ヒト霊長類または他の哺乳動物、他の脊椎動物、無脊椎動物、植物、細菌もしくはウイルスなどの種々の異なる種（または1を超える種）のポリペプチドから誘導することができる。

10

【0418】

実施形態に応じて、生体適合性フレームワーク構造は、免疫グロブリンドメイン以外のタンパク質足場または骨格に基づく。一部のこのような実施形態では、これらのフレームワーク構造は、フィブロネクチン、アンキリン、リポカリン、ネオカルジノスタチン、チ

20

【0419】

いくつかの実施形態では、1を超える結合部位を有する抗原結合タンパク質もまた提供される。いくつかの実施形態では、結合部位は互いに同一であるが、いくつかの実施形態では、結合部位は互いに異なる。例えば、抗体は、典型的には、2つの同一の結合部位を有し、一方、「二重特異性」または「二機能的」抗体は、2つの異なる結合部位を有する。二重特異性抗原結合タンパク質または抗体の2つの結合部位は、同一または異なるタンパク質標的に存在し得る2つの異なるエпитープに結合する。いくつかの実施形態では、これは、二重特異性キメラ抗原受容体が、操作された細胞に、複数の腫瘍マーカーを標

30

的化する能力を付与することができるため、特に有利である。例えば、CD19およびさらなる腫瘍マーカー、とりわけ、例えば、CD123、CD70、Her2、メソテリン、クラウジン6、BCMA、EGFR、MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、ULBP5、およびULBP6、または本明細書に開示される

かしくは腫瘍特異的抗原または腫瘍関連抗原として当該技術分野において認識される任意の他のマーカーには、二重特異性抗体が結合し得る。

【0420】

本明細書で使用される場合、用語「キメラ抗体」は、その通常の意味を与えられるものとし、1つの抗体からの1つ以上の領域、および1つ以上の他の抗体からの1つ以上の領域を含む抗体をも指すものとする。一部の実施形態では、1つ以上のCDRは、抗がん抗原（例えば、CD19、CD123、CD70、Her2、メソテリン、PD-L1、クラウジン6、BCMA、EGFRなど）抗体に由来する。いくつかの実施形態では、CDRの全ては、抗がん抗原抗体（例えば、抗CD19抗体）に由来する。一部の実施形態では、1を超える抗がん抗原抗体由来のCDRは、混合され、キメラ抗体中で適合される。例えば、キメラ抗体は、第1の抗がん抗原抗体の軽鎖由来のCDR1、第2の抗がん抗原抗体の軽鎖由来のCDR2およびCDR3、および第3の抗がん抗原抗体由来の重鎖由来のCDRを含み得る。さらに、本明細書に開示される抗原結合タンパク質のフレームワーク領域は、同じ抗がん抗原（例えば、CD19、CD123、CD70、Her2、メソテリン、クラウジン6、BCMA、EGFRなど）抗体の1つ、ヒト抗体などの1つ以上の異なる抗体、またはヒト化抗体に由来し得る。キメラ抗体の1つの例において、重鎖お

40

50

よび／または軽鎖の一部は、特定の種由来の抗体、または特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体と同一であるか、それに相同であるか、またはそれに由来するが、一方、鎖（複数可）の残りは、別の種由来の抗体、または別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体と同一であるか、それに相同であるか、またはそれに由来する。また、本明細書には、所望の生物学的活性を示すこのような抗体の断片も提供される。

【0421】

いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、CD38（ADP-リボシルシラーゼ1、cADPrヒドロラーゼ1、サイクリックADP-リボースヒドロラーゼ1、またはT10としても公知である）に対する指向性を有する。一実施形態によれば、CD38抗原結合タンパク質は、膜貫通ドメイン、シグナル伝達ドメイン、および適宜本明細書に開示される共刺激ドメインを含むCARの抗原結合ドメインである。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、ヒトCD38のエピトープ、特にヒトCD38の細胞外ドメインのエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、CD38結合タンパク質は、VLおよびVHドメインを含むscFvを含む。いくつかの実施形態では、抗CD38VLドメインは、配列番号523の配列、または配列番号523と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／もしくは機能的同等性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗CD38VHドメインは、配列番号524の配列、または配列番号524と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／もしくは機能的同等性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗CD38結合タンパク質は、配列番号532の配列、または配列番号532と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／もしくは機能的同等性を有するアミノ酸配列を含むscFvである。いくつかの実施形態では、抗CD38CARは、配列番号525の配列、または配列番号525と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／もしくは機能的同等性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗CD38結合タンパク質は、配列番号526～531からの少なくとも1つのCDR、または配列番号526～531のいずれかと少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を有するCDRを含む。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、CD38への結合を増強するために親和性成熟される。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、タンパク質の発現および／または安定性を増強するためにコドン最適化される。

【0422】

いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、GPCR5Dに対する指向性を有する。一実施形態によれば、GPCR5D抗原結合タンパク質は、膜貫通ドメイン、シグナル伝達ドメイン、および適宜本明細書に開示される共刺激ドメインを含むCARの抗原結合ドメインである。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、ヒトGPCR5Dのエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、抗GPCR5Dは、配列番号621～630のいずれか1つのアミノ酸配列、または配列番号620～628のいずれかと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／もしくは機能的同等性を有するアミノ酸配列を含むscFvである。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、

GPRC5Dへの結合を増強するために親和性成熟される。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、タンパク質の発現および／または安定性を増強するためにコドン最適化される。

【0423】

いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、CD138に対する指向性を有する。いくつかの実施形態では、抗CD138結合タンパク質は、VLおよび／またはVH鎖を含む。いくつかの実施形態では、VL鎖は、配列番号533のアミノ酸配列、または配列番号533と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／もしくは機能的同等性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、VH鎖は、配列番号534のアミノ酸配列、または配列番号534と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／もしくは機能的同等性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗CD138結合タンパク質は、配列番号536～541からの少なくとも1つのCDR、または配列番号536～541のいずれかと少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／もしくは機能的同等性を有するCDRを含む。いくつかの実施形態では、抗CD138結合タンパク質は、配列番号542のアミノ酸配列、または配列番号542と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／もしくは機能的同等性を有するアミノ酸配列を含むscFvである。いくつかの実施形態では、抗CD138結合タンパク質は、膜貫通ドメイン、シグナル伝達ドメイン、および適宜本明細書に開示される共刺激ドメインを含むCARに組み込まれ、配列番号535もしくは543のアミノ酸配列、または配列番号535もしくは543との少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／もしくは機能的同等性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、CD138への結合を増強するために親和性成熟される。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、タンパク質の発現および／または安定性を増強するためにコドン最適化される。

【0424】

いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、DLL3に対する指向性を有する。いくつかの実施形態では、抗DLL3結合タンパク質は、膜貫通ドメイン、シグナル伝達ドメイン、および適宜本明細書に開示される共刺激ドメインを含むCARの抗原結合ドメインである。いくつかの実施形態では、抗DLL3抗原結合タンパク質は、配列番号570～581のいずれかのアミノ酸配列、または配列番号570～581のいずれかと少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／もしくは機能的同等性を有する配列を含むVH鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗DLL3抗原結合タンパク質は、配列番号582～593のいずれかのアミノ酸配列、または配列番号582～593のいずれかと少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／もしくは機能的同等性を有する配列を含むVL鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗DLL3結合タンパク質は、DLL3を標的とするポリペプチドを含み、配列番号594～595のいずれかのアミノ酸配列、または配列番号594～595のいずれかと少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／もしくは機能的同等性を有する配列を含む。いくつかの実施

形態では、抗 D L L 3 結合タンパク質は、配列番号 5 9 6 ~ 5 9 9 のいずれかの配列、または配列番号 5 9 6 ~ 5 9 9 のいずれかと少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性、相溶性および／もしくは機能的同等性を有する配列を含む s c F v を含む。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、D L L 3 への結合を増強するために親和性成熟される。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、タンパク質の発現および／または安定性を増強するためにコドン最適化される。

【0425】

いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、上皮細胞増殖因子受容体 E G F R に対する指向性を有する。いくつかの実施形態では、抗 E G F R 結合タンパク質は、膜貫通ドメイン、シグナル伝達ドメイン、および適宜本明細書に開示される共刺激ドメインを含む C A R の抗原結合ドメインである。いくつかの実施形態では、抗 E G F R 結合タンパク質は、配列番号 6 0 0、6 0 6 ~ 6 0 7 のいずれかのアミノ酸配列、または配列番号 6 0 0、6 0 6 ~ 6 0 7 のいずれかと少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性、相溶性および／もしくは機能的同等性を有する配列を含む v H 鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗 E G F R 結合タンパク質は、配列番号 6 0 1、6 0 8 ~ 6 0 9 のいずれかのアミノ酸配列、または配列番号 6 0 1、6 0 8 ~ 6 0 9 のいずれかと少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性、相溶性および／もしくは機能的同等性を有する配列を含む v L 鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗 E G F R 結合タンパク質は、配列番号 6 1 0 ~ 6 2 0 のいずれかのアミノ酸配列、または配列番号 6 1 0 ~ 6 2 0 のいずれかと少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性、相溶性および／もしくは機能的同等性を有する配列を含む s c F v である。いくつかの実施形態では、抗 E G F R 結合タンパク質は、配列番号 6 0 2 ~ 6 0 5 のいずれかの配列を有する C A R、または配列番号 6 0 2 ~ 6 0 5 のいずれかと少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性、相溶性および／もしくは機能的同等性を有する配列に組み込まれる。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、E G F R への結合を増強するために親和性成熟される。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、タンパク質の発現および／または安定性を増強するためにコドン最適化される。

【0426】

いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、P S M A に対する指向性を有する。いくつかの実施形態では、抗 P S M A 結合タンパク質は、膜貫通ドメイン、シグナル伝達ドメイン、および適宜、本明細書に開示される共刺激ドメインを含む C A R の抗原結合ドメインである。いくつかの実施形態では、抗 P S M A 結合タンパク質は、配列番号 6 3 4 のアミノ酸配列を含む v L 鎖、または配列番号 6 3 4 と少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性、相溶性および／もしくは機能的同等性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、抗 P S M A 結合タンパク質は、配列番号 6 3 5 のアミノ酸配列を含む v H 鎖、または配列番号 6 3 5 と少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性、相溶性および／もしくは機能的同等性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、抗 P S M A 結合タンパク質は、配列番号 6 3 2 もしくは 6 3 3 のアミノ酸配列を含む s c F v、または配列番号 6 3 2 もしくは 6 3 3 と少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性、相溶性および／もしくは機能的同等性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、抗 P S M A 結合タンパク質は、配列番号 6 3 1 のアミノ酸配列を含む抗体、または配列番号 6 3 1 と少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少な

くとも約 99% の配列同一性、相同性および／もしくは機能的同等性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、P S M A への結合を増大させるために親和性成熟される。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、タンパク質の発現および／または安定性を増大させるためにコドン最適化される。

【0427】

いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、F L T 3 に対する指向性を有する。いくつかの実施形態では、抗 F L T 3 結合タンパク質は、膜貫通ドメイン、シグナル伝達ドメイン、および適宜、本明細書に開示される共刺激ドメインを含む C A R の抗原結合ドメインである。いくつかの実施形態では、抗 F L T 3 結合タンパク質は、配列番号 636 ~ 644 から選択される V L および／もしくは V H 鎖由来の 1 つ以上の C D R、または配列番号 636 ~ 644 のいずれかと少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性、相同性および／もしくは機能的同等性を有する C D R を含む。いくつかの実施形態では、抗 F L T 3 結合タンパク質は、配列番号 645 のアミノ酸配列を含む V L 鎖、または配列番号 645 と少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性、相同性および／もしくは機能的同等性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、抗 F L T 3 結合タンパク質は、配列番号 646 のアミノ酸配列を含む V H 鎖、または配列番号 646 と少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性、相同性および／もしくは機能的同等性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、F L T 3 への結合を増大させるために親和性成熟される。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、タンパク質の発現および／または安定性を増大させるためにコドン最適化される。

【0428】

いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、K R E M E N 2 に対する指向性を有する。いくつかの実施形態では、抗 K R E M E N 2 結合タンパク質は、膜貫通ドメイン、シグナル伝達ドメイン、および適宜、本明細書に開示される共刺激ドメインを含む C A R の抗原結合ドメインである。いくつかの実施形態では、抗 K R E M E N 2 結合タンパク質は、配列番号 647 ~ 651 のいずれかのアミノ酸配列を含む V L 鎖、または配列番号 647 ~ 651 のいずれかと少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性、相同性および／もしくは機能的同等性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、抗 K R E M E N 2 結合タンパク質は、配列番号 652 ~ 656 のいずれかのアミノ酸配列を含む V H 鎖、または配列番号 652 ~ 656 のいずれかと少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性、相同性および／もしくは機能的同等性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、K R E M E N 2 への結合を増大させるために親和性成熟される。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、タンパク質の発現および／または安定性を増大させるためにコドン最適化される。

【0429】

いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、A L P P L 2 に対する指向性を有する。いくつかの実施形態では、抗 A L P P L 2 結合タンパク質は、膜貫通ドメイン、シグナル伝達ドメイン、および適宜、本明細書に開示される共刺激ドメインを含む C A R の抗原結合ドメインである。いくつかの実施形態では、抗 A L P P L 2 結合タンパク質は、配列番号 657 ~ 659 のいずれかのアミノ酸配列を含む V L 鎖、または配列番号 657 ~ 659 のいずれかと少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性、相同性および／もしくは機能的同等性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、抗 A L P P L 2 結合タンパク質は、配列番号 660 ~ 662 のいずれかのアミノ酸配列を含む V H 鎖、または配列番

号 6 6 0 ~ 6 6 2 のいずれかと少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性、相溶性および／もしくは機能的同等性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、抗 A L P P L 2 結合タンパク質は、配列番号 6 5 7 ~ 6 6 2 のいずれかのアミノ酸配列もしくは配列番号 6 5 7 ~ 6 6 2 のいずれかと少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性、相溶性および／もしくは機能的同等性を有する配列を含む v L ドメインと v H ドメインの 1 つ以上の組み合わせを含有する抗体、または s c F v である。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、A L P P L 2 への結合を増大させるために親和性成熟される。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、タンパク質の発現および／または安定性を増大させるためにコドン最適化される。

10

【 0 4 3 0 】

いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、C L D N 4 に対する指向性を有する。いくつかの実施形態では、抗 C L D N 4 結合タンパク質は、膜貫通ドメイン、シグナル伝達ドメイン、および適宜、本明細書に開示される共刺激ドメインを含む C A R の抗原結合ドメインである。いくつかの実施形態では、抗 C L D N 4 結合タンパク質は、配列番号 6 6 3、6 6 4、もしくは 6 6 7 のいずれかのアミノ酸配列を含む v L 鎖、または配列番号 6 6 3、6 6 4、もしくは 6 6 7 のいずれかと少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性、相溶性および／もしくは機能的同等性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、抗 C L D N 4 結合タンパク質は、配列番号 6 6 5、6 6 6、もしくは 6 6 8 のいずれかのアミノ酸配列を含む v H 鎖、または配列番号 6 6 5、6 6 6、もしくは 6 6 8 のいずれかと少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性、相溶性および／もしくは機能的同等性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、抗 C L D N 4 結合タンパク質は、配列番号 6 6 3 ~ 6 6 8 のいずれかのアミノ酸配列もしくは配列番号 6 6 3 ~ 6 6 8 のいずれかと少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性、相溶性および／もしくは機能的同等性を有する配列を含む v L ドメインと v H ドメインの 1 つ以上の組み合わせを含有する抗体、または s c F v である。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、C L D N 4 への結合を増大させるために親和性成熟される。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、タンパク質の発現および／または安定性を増大させるためにコドン最適化される。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、C L D N 4 に結合するが、他のクラウジンには結合しない。

20

30

【 0 4 3 1 】

いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、C L D N 6 に対する指向性を有する。いくつかの実施形態では、抗 C L D N 6 結合タンパク質は、膜貫通ドメイン、シグナル伝達ドメイン、および適宜、本明細書に開示される共刺激ドメインを含む C A R の抗原結合ドメインである。いくつかの実施形態では、抗 C L D N 6 結合タンパク質は、配列番号 6 6 9 ~ 6 7 8 のいずれかのアミノ酸配列を含む v L 鎖、または配列番号 6 6 9 ~ 6 7 8 のいずれかと少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性、相溶性および／もしくは機能的同等性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、抗 C L D N 6 結合タンパク質は、配列番号 6 7 9 ~ 6 8 2 のいずれかのアミノ酸配列を含む v H 鎖、または配列番号 6 7 9 ~ 6 8 2 のいずれかと少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性、相溶性および／もしくは機能的同等性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、抗 C L D N 6 結合タンパク質は、配列番号 6 6 9 ~ 6 8 2 のいずれかのアミノ酸配列もしくは配列番号 6 6 9 ~ 6 8 2 のいずれかと少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 9 9 % の配列同一性、相溶性および／もしくは機

40

50

能的同等性を有する配列を含むVLDメインとVHメインの1つ以上の組み合わせを含む抗体、またはscFvである。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、CLDN6への結合を増大させるために親和性成熟される。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、タンパク質の発現および／または安定性を増大させるためにコドン最適化される。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、CLDN6に結合するが、他のクラウジンには結合しない。

【0432】

一部の実施形態では、配列番号33に示されるVHメインアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有する重鎖可変ドメインを含む抗原結合タンパク質が提供される。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号33に示されるVHメインアミノ酸配列と少なくとも95%の同一性を有する重鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号33に示されるVHメインアミノ酸配列と少なくとも96、97、98、または99%の同一性を有する重鎖可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、重鎖可変ドメインは、配列番号33に示されるVHメインアミノ酸配列において、1つ以上のさらなる突然変異（例えば、ヒト化の目的のため）を有し得るが、がん抗原（例えば、CD19）に対する特異的結合を保持し得る。いくつかの実施形態では、重鎖可変ドメインは、配列番号33に示されるVHメインアミノ酸配列において、1つ以上のさらなる突然変異を有し得るが、がん抗原（例えば、CD19）に対する特異的結合が改善されている。

【0433】

一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号32に示されるVLDメインアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号32に示されるVLDメインアミノ酸配列と少なくとも95%の同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号32に示されるVLDメインアミノ酸配列と少なくとも96、97、98、または99%の同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、軽鎖可変ドメインは、配列番号32に示されるVLDメインアミノ酸配列において、1つ以上のさらなる突然変異（例えば、ヒト化の目的のため）を有し得るが、がん抗原（例えば、CD19）に対する特異的結合を保持し得る。いくつかの実施形態では、軽鎖可変ドメインは、配列番号32に示されるVLDメインアミノ酸配列における1つ以上のさらなる突然変異を有し得るが、がん抗原（例えば、CD19）に対する特異的結合が改善されている。

【0434】

一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号33に示されるVHメインアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有する重鎖可変ドメイン、および配列番号32に示されるVLDメインアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号33に示されるVHメインアミノ酸配列と少なくとも95%の同一性を有する重鎖可変ドメイン、および配列番号32に示されるVLDメインアミノ酸配列と少なくとも95%の同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号33に示されるVHメインアミノ酸配列と少なくとも96、97、98、または99%の同一性を有する重鎖可変ドメイン、および配列番号32に示されるVLDメインアミノ酸配列と少なくとも96、97、98、または99%の同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む。

【0435】

一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号33に示されるVHメインアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメイン、および配列番号32に示されるVLDメインアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、軽鎖可変ドメインは、配列番号32の軽鎖可変ドメインの配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、軽鎖可変ドメイン

は、配列番号 33 に従って、重鎖可変ドメインの配列と少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を含む。

【0436】

一部の実施形態では、軽鎖可変ドメインは、ポリヌクレオチド配列番号 32 と少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であるヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、軽鎖可変ドメインは、配列番号 32 の配列に従って軽鎖可変ドメインをコードするポリヌクレオチドの相補物と中程度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、軽鎖可変ドメインは、配列番号 32 の配列に従って軽鎖可変ドメインをコードするポリヌクレオチドの相補物とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を含む。

10

【0437】

一部の実施形態では、重鎖可変ドメインは、配列番号 33 の配列に従って重鎖可変ドメインの配列と少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、重鎖可変ドメインは、配列番号 33 の配列に従って重鎖可変ドメインをコードするポリヌクレオチドの相補物と中程度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、重鎖可変ドメインは、配列番号 33 の配列に従って重鎖可変ドメインをコードするポリヌクレオチドの相補物とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を含む。

20

【0438】

いくつかの実施形態では、さらなる抗 CD19 結合コンストラクトが提供される。例えば、いくつかの実施形態では、scFv が配列番号 35 の配列を含む重鎖可変領域を含む CD19 を標的化する scFv が提供される。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 35 に示される HCV ドメインアミノ酸配列と少なくとも 95% の同一性を有する重鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 35 に示される HCV ドメインアミノ酸配列と少なくとも 96%、97%、98%、または 99% の同一性を有する重鎖可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、重鎖可変ドメインは、配列番号 35 に示される HCV ドメインアミノ酸配列において、1 つ以上のさらなる突然変異（例えば、ヒト化の目的のため）を有し得るが、がん抗原（例えば、CD19）に対する特異的結合を保持し得る。いくつかの実施形態では、重鎖可変ドメインは、配列番号 35 に示される HCV ドメインアミノ酸配列において、1 つ以上のさらなる突然変異を有し得るが、がん抗原（例えば、CD19）に対する特異的結合が改善されている。

30

【0439】

さらに、いくつかの実施形態では、CD19 を標的化する scFv は、配列番号 36 の配列を含む軽鎖可変領域を含む。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 36 に示される LCV ドメインアミノ酸配列と少なくとも 95% の同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 36 に示される LCV ドメインアミノ酸配列と少なくとも 96%、97%、98%、または 99% の同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、軽鎖可変ドメインは、配列番号 36 に示される LCV ドメインアミノ酸配列において、1 つ以上のさらなる突然変異（例えば、ヒト化の目的のため）を有し得るが、がん抗原（例えば、CD19）に対する特異的結合を保持し得る。いくつかの実施形態では、軽鎖可変ドメインは、配列番号 36 に示される LCV ドメインアミノ酸配列において、1 つ以上のさらなる突然変異を有し得るが、がん抗原（例えば、CD19）に対する特異的結合が改善されている。

40

【0440】

いくつかの実施形態では、第 1、第 2 および第 3 の相補性決定領域を含む軽鎖 CDR（

50

それぞれ LC CDR1、LC CDR2、および LC CDR3)を含む抗 CD19 結合部分もまた提供される。いくつかの実施形態では、抗 CD19 結合部分は、第1、第2および第3の相補性決定領域を含む重鎖 CDR (それぞれ HC CDR1、HC CDR2、および HC CDR3)をさらに含む。いくつかの実施形態では、LC CDR1は、配列番号37の配列を含む。いくつかの実施形態では、LC CDR1は、配列番号37の配列と少なくとも約85%、約90%、約95%、または約98%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、LC CDR2は、配列番号38の配列を含む。いくつかの実施形態では、LC CDR2は、配列番号38の配列と少なくとも約85%、約90%、約95%、または約98%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、LC CDR3は、配列番号39の配列を含む。いくつかの実施形態では、LC CDR3は、配列番号39の配列と少なくとも約85%、約90%、約95%、または約98%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、HC CDR1は、配列番号40の配列を含む。いくつかの実施形態では、HC CDR1は、配列番号40の配列と少なくとも約85%、約90%、約95%、または約98%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、HC CDR2は、配列番号41、42、または43の配列を含む。いくつかの実施形態では、HC CDR2は、配列番号41、42、または43の配列と少なくとも約85%、約90%、約95%、または約98%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、HC CDR3は、配列番号44の配列を含む。いくつかの実施形態では、HC CDR3は、配列番号44の配列と少なくとも約85%、約90%、約95%、または約98%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

20

30

40

50

【0441】

いくつかの実施形態では、軽鎖可変領域 (VL) および重鎖可変領域 (HL) を含む抗 CD19 結合部分もまた提供され、VL 領域は第1、第2および第3の相補性決定領域 (それぞれ VL CDR1、VL CDR2、および VL CDR3) を含み、VH 領域は第1、第2および第3の相補性決定領域 (それぞれ VH CDR1、VH CDR2、および VH CDR3) を含む。いくつかの実施形態では、VL 領域は、配列番号45、46、47、または48の配列を含む。いくつかの実施形態では、VL 領域は、配列番号45、46、47、または48の配列と少なくとも約85%、約90%、約95%、または約98%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、VH 領域は、配列番号49、50、51または52の配列を含む。いくつかの実施形態では、VH 領域は、配列番号49、50、51または52の配列と少なくとも約85%、約90%、約95%、または約98%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0442】

いくつかの実施形態では、第1、第2および第3の相補性決定領域を含む軽鎖 CDR (それぞれ LC CDR1、LC CDR2、および LC CDR3) を含む抗 CD19 結合部分もまた提供される。いくつかの実施形態では、抗 CD19 結合部分は、第1、第2および第3の相補性決定領域を含む重鎖 CDR (それぞれ HC CDR1、HC CDR2、および HC CDR3) をさらに含む。いくつかの実施形態では、LC CDR1は、配列番号53の配列を含む。いくつかの実施形態では、LC CDR1は、配列番号53の配列と少なくとも約85%、約90%、約95%、または約98%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、LC CDR2は、配列番号54の配列を含む。いくつかの実施形態では、LC CDR2は、配列番号54の配列と少なくとも約85%、約90%、約95%、または約98%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、LC CDR3は、配列番号55の配列を含む。いくつかの実施形態では、LC CDR3は、配列番号55の配列と少なくとも約85%、約90%、約95%、または約98%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、HC CDR1は、配列番号56の配列を含む。いくつかの実施形態では、HC CDR1は、配列番号56の配列と少なくとも約85%、約90%、約95%、または約98%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、

H C C D R 2 は、配列番号 57 の配列を含む。いくつかの実施形態では、H C C D R 2 は、配列番号 57 の配列と少なくとも約 85 %、約 90 %、約 95 %、または約 98 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、H C C D R 3 は、配列番号 58 の配列を含む。いくつかの実施形態では、H C C D R 3 は、配列番号 58 の配列と少なくとも約 85 %、約 90 %、約 95 %、または約 98 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0443】

一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 104 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 104 に示される V H ドメインアミノ酸配列と少なくとも 90 % の同一性を有する重鎖可変領域を含む。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 104 に示される V H ドメインアミノ酸配列と少なくとも 95 % の配列同一性を有する重鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 104 に示される V H ドメインアミノ酸配列と少なくとも 96、97、98、または 99 % の配列同一性を有する重鎖可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、重鎖可変ドメインは、配列番号 104 に示される V H ドメインアミノ酸配列において、1 つ以上のさらなる突然変異（例えば、ヒト化の目的のため）を有し得るが、がん抗原（例えば、C D 19）に対する特異的結合を保持し得る。いくつかの実施形態では、重鎖可変ドメインは、配列番号 104 に示される V H ドメインアミノ酸配列において、1 つ以上のさらなる突然変異を有し得るが、がん抗原（例えば、C D 19）に対する特異的結合が改善されている。

【0444】

一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 105 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 105 に示される V L ドメインアミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 105 に示される V L ドメインアミノ酸配列と少なくとも 95 % の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 105 に示される V L ドメインアミノ酸配列と少なくとも 96、97、98、または 99 % の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、軽鎖可変ドメインは、配列番号 105 に示される V L ドメインアミノ酸配列において、1 つ以上のさらなる突然変異（例えば、ヒト化の目的のため）を有し得るが、がん抗原（例えば、C D 19）に対する特異的結合を保持し得る。いくつかの実施形態では、軽鎖可変ドメインは、配列番号 105 に示される V L ドメインアミノ酸配列において、1 つ以上のさらなる突然変異を有し得るが、がん抗原（例えば、C D 19）に対する特異的結合が改善されている。

【0445】

一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 104 に示される V H ドメインアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメイン、および配列番号 105 に示される V L ドメインアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、軽鎖可変ドメインは、配列番号 105 の軽鎖可変ドメインの配列と少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、重鎖可変ドメインは、配列番号 104 に従って、重鎖可変ドメインの配列と少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を含む。

【0446】

一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 106 のアミノ酸配列を含む重鎖可変部を含む。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 106 に示される V H アミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する重鎖可変部を含む。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 106 に示される V H アミノ酸配列と少なくとも 95 % の配列同一性を有する重鎖可変部を含む。一部の実施形態では、抗原結合

タンパク質は、配列番号 106 に示される V H アミノ酸配列と少なくとも 96、97、98、または 99% の同一性を有する重鎖可変部を含む。いくつかの実施形態では、重鎖可変部は、配列番号 106 に示される V H アミノ酸配列において、1 つ以上のさらなる突然変異（例えば、ヒト化の目的のため）を有し得るが、がん抗原（例えば、CD19）に対する特異的結合を保持し得る。いくつかの実施形態では、重鎖可変部は、配列番号 106 に示される V H アミノ酸配列において、1 つ以上のさらなる突然変異を有し得るが、がん抗原（例えば、CD19）に対する特異的結合が改善されている。

【0447】

一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 107 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変部を含む。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 107 に示される V L アミノ酸配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 107 に示される V L アミノ酸配列と少なくとも 95% の配列同一性を有する軽鎖可変部を含む。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 107 に示される V L アミノ酸配列と少なくとも 96、97、98、または 99% の同一性を有する軽鎖可変部を含む。いくつかの実施形態では、軽鎖可変部は、配列番号 107 に示される V L アミノ酸配列において、1 つ以上のさらなる突然変異（例えば、ヒト化の目的のため）を有し得るが、がん抗原（例えば、CD19）への特異的結合を保持し得る。いくつかの実施形態では、軽鎖可変部は、配列番号 107 に示される V L アミノ酸配列において、1 つ以上のさらなる突然変異を有し得るが、がん抗原（例えば、CD19）に対する特異的結合が改善されている。

【0448】

いくつかの実施形態では、第 1、第 2 および第 3 の相補性決定領域を含む軽鎖 C D R（それぞれ L C C D R 1、L C C D R 2、および L C C D R 3）を含む抗 C D 19 結合部分もまた提供される。いくつかの実施形態では、抗 C D 19 結合部分は、第 1、第 2 および第 3 の相補性決定領域を含む重鎖 C D R（それぞれ H C C D R 1、H C C D R 2、および H C C D R 3）をさらに含む。いくつかの実施形態では、L C C D R 1 は、配列番号 108 の配列を含む。いくつかの実施形態では、L C C D R 1 は、配列番号 108 号の配列と少なくとも約 85%、約 90%、約 95%、または約 98% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、L C C D R 2 は、配列番号 109 の配列を含む。いくつかの実施形態では、L C C D R 2 は、配列番号 109 の配列と少なくとも約 85%、約 90%、約 95%、または約 98% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、L C C D R 3 は、配列番号 110 の配列を含む。いくつかの実施形態では、L C C D R 3 は、配列番号 110 の配列と少なくとも約 85%、約 90%、約 95%、または約 98% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、H C C D R 1 は、配列番号 111 の配列を含む。いくつかの実施形態では、H C C D R 1 は、配列番号 111 の配列と少なくとも約 85%、約 90%、約 95%、または約 98% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、H C C D R 2 は、配列番号 112、113、または 114 の配列を含む。いくつかの実施形態では、H C C D R 2 は、配列番号 112、113、または 114 の配列と少なくとも約 85%、約 90%、約 95%、または約 98% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、H C C D R 3 は、配列番号 115 の配列を含む。いくつかの実施形態では、H C C D R 3 は、配列番号 115 の配列と少なくとも約 85%、約 90%、約 95%、または約 98% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗 C D 19 結合部分は、配列番号 116 を含むか、または配列番号 116 の配列と少なくとも約 85%、約 90%、約 95%、もしくは約 98% の配列同一性を有する配列である。

【0449】

一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 117、118、または 119 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変部を含む。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 117、118、または 119 に示される V L アミノ酸配列と少なくとも 90%

の同一性を有する軽鎖可変領域を含む。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 117、118、または 119 に示される VL アミノ酸配列と少なくとも 95 % の同一性を有する軽鎖可変部を含む。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 117、118、または 119 に示される VL アミノ酸配列と少なくとも 96、97、98、または 99 % の同一性を有する軽鎖可変部を含む。いくつかの実施形態では、軽鎖可変部は、配列番号 117、118、または 119 に示される VL アミノ酸配列において、1 つ以上のさらなる突然変異（例えば、ヒト化の目的のため）を有し得るが、がん抗原（例えば、CD19）に対する特異的結合を保持する。いくつかの実施形態では、軽鎖可変部は、配列番号 117、118、または 119 に示される VL アミノ酸配列において、1 つ以上のさらなる突然変異を有し得るが、がん抗原（例えば、CD19）に対する特異的結合が改善されている。

10

【0450】

一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 120、121、122、または 123 のアミノ酸配列を含む重鎖可変部を含む。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 120、121、122、または 123 に示される VH アミノ酸配列と少なくとも 90 % の同一性を有する重鎖可変部を含む。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 120、121、122、または 123 に示される VH アミノ酸配列と少なくとも 95 % の同一性を有する重鎖可変部を含む。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 120、121、122、または 123 に示される VH アミノ酸配列と少なくとも 96、97、98、または 99 % の同一性を有する重鎖可変部を含む。いくつかの実施形態では、重鎖可変部は、配列番号 120、121、122、または 123 に示される VH アミノ酸配列において、1 つ以上のさらなる突然変異（例えば、ヒト化の目的のため）を有し得るが、がん抗原（例えば、CD19）に対する特異的結合を保持する。いくつかの実施形態では、重鎖可変部は、配列番号 120、121、122、または 123 に示される VH アミノ酸配列において、1 つ以上のさらなる突然変異を有し得るが、がん抗原（例えば、CD19）に対する特異的結合が改善されている。

20

【0451】

いくつかの実施形態では、第 1、第 2 および第 3 の相補性決定領域を含む軽鎖 CDR（それぞれ LC CDR1、LC CDR2、および LC CDR3）を含む抗 CD19 結合部分もまた提供される。いくつかの実施形態では、抗 CD19 結合部分は、第 1、第 2 および第 3 の相補性決定領域を含む重鎖 CDR（それぞれ HC CDR1、HC CDR2、および HC CDR3）をさらに含む。いくつかの実施形態では、LC CDR1 は、配列番号 124、127、または 130 の配列を含む。いくつかの実施形態では、LC CDR1 は、配列番号 124、127、または 130 の配列と少なくとも約 85 %、約 90 %、約 95 %、または約 98 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、LC CDR2 は、配列番号 125、128、または 131 の配列を含む。いくつかの実施形態では、LC CDR2 は、配列番号 125、128、または 131 の配列と少なくとも約 85 %、約 90 %、約 95 %、または約 98 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、LC CDR3 は、配列番号 126、129、または 132 の配列を含む。いくつかの実施形態では、LC CDR3 は、配列番号 126、129、または 132 の配列と少なくとも約 85 %、約 90 %、約 95 %、または約 98 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、HC CDR1 は、配列番号 133、136、139、または 142 の配列を含む。いくつかの実施形態では、HC CDR1 は、配列番号 133、136、139、または 142 の配列と少なくとも約 85 %、約 90 %、約 95 %、または約 98 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、HC CDR2 は、配列番号 134、137、140、または 143 の配列を含む。いくつかの実施形態では、HC CDR2 は、配列番号 134、137、140、または 143 の配列と少なくとも約 85 %、約 90 %、約 95 %、または約 98 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、HC CDR3 は、配列番号 135、138、141、または 144 の配

30

40

50

列を含む。いくつかの実施形態では、H C C D R 3 は、配列番号 1 3 5、1 3 8、1 4 1、または 1 4 4 の配列と少なくとも約 8 5 %、約 9 0 %、約 9 5 %、または約 9 8 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0 4 5 2】

さらなる抗 C D 1 9 結合部分は、当該技術分野において公知であり、例えば、各々の全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第 8, 3 9 9, 6 4 5 号、米国特許出願公開第 2 0 1 8 / 0 1 5 3 9 7 7 号、米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 2 7 1 6 3 5 号、米国特許出願公開第 2 0 1 8 / 0 2 5 1 5 1 4 号、米国特許出願公開第 2 0 1 8 / 0 3 1 2 5 8 8 号、および W O 2 0 2 0 / 1 8 0 8 8 2 に開示されるものが挙げられる。

【0 4 5 3】

いくつかの実施形態は、クラウジン 6 に対する指向性を有し、クラウジン 3、4、または 9（または他のクラウジン）への結合をほとんど示さないかまたは全く示さない C A R に関する。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 8 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変部を含む。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 8 8 に示される V H アミノ酸配列と少なくとも 9 0 % の同一性を有する重鎖可変部を含む。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 8 8 に示される V H アミノ酸配列と少なくとも 9 5 % の同一性を有する重鎖可変部を含む。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 8 8 に示される V H アミノ酸配列と少なくとも 9 6、9 7、9 8、または 9 9 % の同一性を有する重鎖可変部を含む。いくつかの実施形態では、重鎖可変部は、配列番号 8 8 に示される V H アミノ酸配列において、1 つ以上のさらなる突然変異（例えば、ヒト化の目的のため）を有し得るが、がん抗原（例えば、C L D N 6）への特異的結合を保持し得る。いくつかの実施形態では、重鎖可変部は、配列番号 8 8 に示される V H アミノ酸配列において、1 つ以上のさらなる突然変異を有し得るが、がん抗原（例えば、C L D N 6）に対する特異的結合が改善されている。

【0 4 5 4】

一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 8 9、9 0 または 9 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変部を含む。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 8 9、9 0 または 9 1 に示される V L アミノ酸配列と少なくとも 9 0 % の同一性を有する軽鎖可変領域を含む。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 8 9、9 0 または 9 1 に示される V L アミノ酸配列と少なくとも 9 5 % の同一性を有する軽鎖可変部を含む。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 8 9、9 0 または 9 1 に示される V L アミノ酸配列と少なくとも 9 6、9 7、9 8、または 9 9 % の同一性を有する軽鎖可変部を含む。いくつかの実施形態では、軽鎖可変部は、配列番号 8 9、9 0 または 9 1 に示される V L アミノ酸配列において、1 つ以上のさらなる突然変異（例えば、ヒト化の目的のため）を有し得るが、がん抗原（例えば、C L D N 6）への特異的結合を保持する。いくつかの実施形態では、軽鎖可変部は、配列番号 8 9、9 0 または 9 1 に示される V L アミノ酸配列において、1 つ以上のさらなる突然変異を有し得るが、がん抗原（例えば、C L D N 6）に対する特異的結合が改善されている。

【0 4 5 5】

いくつかの実施形態では、第 1、第 2 および第 3 の相補性決定領域を含む軽鎖 C D R（それぞれ L C C D R 1、L C C D R 2、および L C C D R 3）を含む抗 C L D N 6 結合部分もまた提供される。いくつかの実施形態では、抗 C D 1 9 結合部分は、第 1、第 2 および第 3 の相補性決定領域を含む重鎖 C D R（それぞれ H C C D R 1、H C C D R 2、および H C C D R 3）をさらに含む。いくつかの実施形態では、L C C D R 1 は、配列番号 9 5、9 8、または 1 0 1 の配列を含む。いくつかの実施形態では、L C C D R 1 は、配列番号 9 5、9 8、または 1 0 1 の配列と少なくとも約 8 5 %、約 9 0 %、約 9 5 %、または約 9 8 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、L C C D R 2 は、配列番号 9 6、9 9、または 1 0 2 の配列を含む。いくつかの実施形態では、L C C D R 2 は、配列番号 9 6、9 9、または 1 0 2 の配列と少なくとも約 8 5 %、約 9 0 %、約 9 5 %、または約 9 8 % の配列同一性を有するアミノ酸配

10

20

30

40

50

列を含む。いくつかの実施形態では、LC CDR3は、配列番号97、100、または103の配列を含む。いくつかの実施形態では、LC CDR3は、配列番号97、100、または103の配列と少なくとも約85%、約90%、約95%、または約98%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、HC CDR1は、配列番号92の配列を含む。いくつかの実施形態では、HC CDR1は、配列番号92の配列と少なくとも約85%、約90%、約95%、または約98%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、HC CDR2は、配列番号93の配列を含む。いくつかの実施形態では、HC CDR2は、配列番号93の配列と少なくとも約85%、約90%、約95%、または約98%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、HC CDR3は、配列番号94の配列を含む。いくつかの実施形態では、HC CDR3は、配列番号94の配列と少なくとも約85%、約90%、約95%、または約98%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、CLDN6以外のクラウジンに結合しない。

10

【0456】

腫瘍リガンドに結合するナチュラルキラーグループドメイン

いくつかの実施形態では、NK細胞などの操作された免疫細胞は、腫瘍細胞を認識し、破壊するそれらの能力のために利用される。例えば、操作されたNK細胞は、CD19指向性キメラ抗原受容体、または上記キメラ抗原受容体をコードする核酸（または、例えば、CD123、CD70、Her2、メソテリン、クラウジン6、BCMA、EGFRなどのうちの1つ以上に対する指向性を有するCAR）を含み得る。NK細胞は、細胞表面に抑制性受容体と活性化受容体の両方を発現する。抑制性受容体は、健常細胞の表面に発現する自己分子と結合し（したがって、「自己」細胞に対する免疫応答を妨げる）、一方、活性化受容体は、腫瘍細胞などの異常な細胞上に発現するリガンドと結合する。抑制性受容体活性化と活性化受容体活性化の間のバランスが活性化受容体に有利な場合、NK細胞活性化が起こり、標的（例えば、腫瘍）細胞が溶解する。

20

【0457】

ナチュラルキラーグループ2メンバーD（NKG2D）は、細胞上に発現される種々のリガンドを認識するNK細胞活性化受容体である。種々のNKG2Dリガンドの表面発現は、一般的に健常細胞では低いが、例えば、悪性形質転換によって上方制御される。NKG2Dによって認識されるリガンドの非限定的な例としては、限定されないが、MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、ULBP5、およびULBP6、ならびにNK細胞の細胞溶解または細胞傷害性機能を制御する標的細胞上に発現される他の分子が挙げられる。いくつかの実施形態では、T細胞は、1つ以上の腫瘍リガンドに結合し、T細胞を活性化するために、細胞外ドメインを発現するように操作される。例えば、いくつかの実施形態では、T細胞は、結合因子／活性化部分としてNKG2D受容体を発現するように操作される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される操作された細胞は、NKG2ファミリーの別のメンバー、例えば、NKG2A、NKG2C、および／またはNKG2Eを発現するように操作される。一部の実施形態では、このような受容体の組み合わせが操作される。さらに、いくつかの実施形態では、キラー細胞免疫グロブリン様受容体（KIR）などの他の受容体が発現される。

30

40

【0458】

いくつかの実施形態では、細胞は、腫瘍細胞（例えば、肝細胞）の表面上のリガンドを認識するための細胞外成分としての全長NKG2Dを含む細胞傷害性受容体複合体を発現するように操作される。一実施形態では、全長NKG2Dは、配列番号27の核酸配列を有する。いくつかの実施形態では、全長NKG2D、またはその機能的断片は、ヒトNKG2Dである。本開示の方法および組成物において使用するためのキメラ受容体に関するさらなる情報は、PCT特許公開第2018/183385号に記載され、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0459】

いくつかの実施形態では、細胞は、腫瘍細胞または他の疾患細胞の表面上のリガンドを

50

認識するための細胞外成分としてのNKGD2Dの機能的断片を含む細胞傷害性受容体複合体を発現するように操作される。一実施形態では、NKGD2Dの機能的断片は、配列番号25の核酸配列を有する。いくつかの実施形態では、NKGD2Dの断片は、完全長野生型NKGD2Dと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%相同である。いくつかの実施形態では、断片は、配列番号25からの1つ以上のさらなる突然変異を有することができるが、リガンド結合機能を保持するか、またはいくつかの実施形態では、増大したリガンド結合機能を有する。いくつかの実施形態では、NKGD2Dの機能的断片は、配列番号26のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、NKGD2D断片は、二量体、三量体、または他のコンカテマー形式として提供され、このような実施形態は、増大したリガンド結合活性を提供する。いくつかの実施形態では、NKGD2D断片をコードする配列は、完全または部分的に最適化されたコドンであってもよい。一実施形態では、コドン最適化されたNKGD2D断片をコードする配列は、配列番号28の配列を含む。いくつかの実施形態によれば、有利には、機能的断片は、その天然の膜貫通ドメインまたは細胞内ドメインを欠いているが、NKGD2Dのリガンドに結合するその能力、ならびにリガンド結合時に活性化シグナルを変換する能力を保持する。このような断片のさらなる利点は、NKGD2Dを細胞膜に局在化させるためにDAP10を発現させる必要がないことである。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるポリペプチドによってコードされる細胞傷害性受容体複合体は、DAP10を含まない。いくつかの実施形態では、NKまたはT細胞などの免疫細胞（例えば、本明細書に開示される実施形態に従って操作された非同種反応性T細胞）は、例えば、CD19、CD123、CD70、Her2、メソテリン、クラウジン6、BCMA、EGFR、およびNKGD2Dリガンド、例えば、MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、ULBP5、および／またはULBP6を標的化する1つ以上のキメラ受容体を発現するように操作される。このような細胞は、いくつかの実施形態では、mbIL15も同時に発現する。

10

20

30

40

50

【0460】

いくつかの実施形態では、細胞傷害性受容体複合体は、二量体化するように構成される。二量体化は、実施形態に応じて、ホモ二量体またはヘテロ二量体を含み得る。いくつかの実施形態では、二量体化は、細胞傷害性受容体複合体（したがって、受容体を発現するNK細胞）によるリガンド認識の改善をもたらす、有害な毒性効果の減少（または欠如）をもたらす。いくつかの実施形態では、細胞傷害性受容体複合体は、内部二量体、または1つ以上の成分サブユニットの反復を採用する。例えば、いくつかの実施形態では、細胞傷害性受容体複合体は、第2のNKGD2D細胞外ドメインに結合した第1のNKGD2D細胞外ドメイン、および膜貫通／シグナル伝達領域（または別個のシグナル伝達領域とともに別個の膜貫通領域）を含み得てもよい。

【0461】

いくつかの実施形態では、種々のドメイン／サブドメインは、リンカー、例えば、使用されるGS3リンカー（配列番号15および16、それぞれヌクレオチドおよびタンパク質）（またはGSnリンカー）によって分離される。本明細書に開示される種々の実施形態に従って使用される他のリンカーは、限定されないが、配列番号17、19、21または23によってコードされるものを含む。これは、受容体複合体の発現、安定性、および／または機能性を増大させることができるポリヌクレオチドに沿って、受容体複合体の種々の成分部分を分離する可能性を提供する。

【0462】

細胞傷害性シグナル伝達複合体

本明細書に記載される組成物および方法の一部の実施形態は、細胞傷害性シグナル伝達複合体を含むキメラ抗原受容体（例えば、CD19、CD123、CD70、Her2、メソテリン、クラウジン6、BCMA、またはEGFR（とりわけ）に対する指向性を有するCAR）、またはMICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、ULBP5、および／もしくはULBP6などのNKGD2Dリガンドに対する指

向性を有するキメラ受容体に関する。本明細書に開示されるように、いくつかの実施形態によれば、提供される細胞傷害性受容体複合体は、標的細胞の表面上のリガンドに結合する細胞外ドメイン（複数可）上で細胞傷害性シグナル伝達カスケードを開始する1つ以上の膜貫通ドメインおよび／または細胞内ドメインを含む。

【0463】

いくつかの実施形態では、細胞傷害性シグナル伝達複合体は、少なくとも1つの膜貫通ドメイン、少なくとも1つの共刺激ドメイン、および／または少なくとも1つのシグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態では、1を超える成分部分は、所定のドメインを構成する—例えば、共刺激ドメインは2つのサブドメインを含むことができる。さらに、一部の実施形態では、ドメインは、複数の機能を果たすことができ、例えば、膜貫通ドメインは、シグナル伝達機能を提供するのに役立つことができる。

10

【0464】

膜貫通ドメイン

本明細書に記載される組成物および方法の一部の実施形態は、膜貫通ドメインを含むキメラ受容体（例えば、腫瘍抗原指向性CARおよび／またはリガンド指向性キメラ受容体）に関する。一部の実施形態は、NKGD2Dまたは別の膜貫通タンパク質からの膜貫通ドメインを含む。膜貫通ドメインが採用されるいくつかの実施形態では、採用される膜貫通タンパク質の部分は、その正常な膜貫通ドメインの少なくとも一部を保持する。

【0465】

しかしながら、いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、T細胞とNK細胞の両方に通常発現される膜貫通糖タンパク質であるCD8の少なくとも一部を含む。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインはCD8 α を含む。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、「ヒンジ」と呼ばれる。いくつかの実施形態では、CD8 α の「ヒンジ」は、配列番号1の核酸配列を有する。いくつかの実施形態では、CD8 α ヒンジは切断されるかまたは修飾され、配列番号1の配列を有するCD8 α と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%相同である。いくつかの実施形態では、CD8 α の「ヒンジ」は、配列番号2のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD8 α は、配列番号2の配列と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%相同であるように切断されるかまたは修飾され得る。

20

30

【0466】

いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインはCD8 α 膜貫通領域を含む。いくつかの実施形態では、CD8 α 膜貫通ドメインは、配列番号3の核酸配列を有する。いくつかの実施形態では、CD8 α ヒンジは切断されるかまたは修飾され、配列番号3の配列を有するCD8 α と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%相同である。いくつかの実施形態では、CD8 α 膜貫通ドメインは、配列番号4のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD8 α ヒンジは切断されるかまたは修飾され、配列番号4の配列を有するCD8 α と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%相同である。

40

【0467】

いくつかの実施形態では一緒になって、CD8ヒンジ／膜貫通複合体は、配列番号13の核酸配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、CD8ヒンジ／膜貫通複合体は切断されるかまたは修飾され、配列番号13の配列を有するCD8ヒンジ／膜貫通複合体と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%相同である。いくつかの実施形態では、CD8ヒンジ／膜貫通複合体は、配列番号14のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD8ヒンジ／膜貫通複合ヒンジは切断されるかまたは修飾され、配列番号14の配列を有するCD8ヒンジ／膜貫通複合体と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%相同である。

50

【0468】

一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、CD28膜貫通ドメインまたはその断片を含む。いくつかの実施形態では、CD28膜貫通ドメインは、配列番号30のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD28膜貫通ドメイン複合体ヒンジは切断されるかまたは修飾され、配列番号30の配列を有するCD28膜貫通ドメインと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%相同である。

【0469】

共刺激ドメイン

本明細書に記載される組成物および方法の一部の実施形態は、共刺激ドメインを含むキメラ受容体（例えば、腫瘍抗原指向性CARおよび／または腫瘍リガンド指向性キメラ受容体）に関する。さらに、いくつかの実施形態では、種々の膜貫通ドメインおよびシグナル伝達ドメイン（および膜貫通／シグナル伝達ドメインの組み合わせ）、追加の共活性化分子を提供することができる。これらは、例えば、免疫細胞の活性をさらに増大させる特定の分子であり得る。サイトカインは、一部の実施形態において使用され得る。例えば、非限定的な例として、IL-2および／またはIL-15などの特定のインターロイキンが使用される。一部の実施形態では、治療のための免疫細胞は、分泌型のような分子を発現するように操作される。さらなる実施形態では、このような共刺激ドメインは、自己分泌刺激分子（または隣接する細胞へのパラクリン刺激因子としてさえも）として作用する膜結合性であるように操作される。いくつかの実施形態では、NK細胞は、膜結合インターロイキン15（mbIL15）を発現するように操作される。このような実施形態では、NK上のmbIL15発現は、NK細胞の増殖および／または寿命を増大させることによって、操作されたNK細胞の細胞傷害効果を増大させる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される遺伝子操作された非同種反応性T細胞などのT細胞は、膜結合インターロイキン15（mbIL15）を発現するように操作される。このような実施形態では、T細胞上のmbIL15発現は、操作されたT細胞の活性および／または繁殖（例えば、寿命）を増大させることによって、操作されたT細胞の細胞傷害効果を増大させる。いくつかの実施形態では、mbIL15は、配列番号11の核酸配列を有する。いくつかの実施形態では、mbIL15は、配列番号11の配列と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%相同であるように切断されるかまたは修飾され得る。いくつかの実施形態では、mbIL15は、配列番号12のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、mbIL15は切断されるかまたは修飾され、配列番号12の配列を有するmbIL15と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%相同である。

【0470】

一部の実施形態では、腫瘍抗原指向性CARおよび／または腫瘍リガンド指向性キメラ受容体は、1つ以上の細胞質プロテアーゼ切断部位、例えば、T2A切断部位、P2A切断部位、E2A切断部位、および／またはF2A切断部位を含むポリヌクレオチドによってコードされる。このような部位は、細胞質プロテアーゼによって認識され、切断され、ポリヌクレオチドによってコードされる受容体の種々の成分部分の分離（および別々の発現）をもたらすことができる。結果として、実施形態に応じて、操作された細胞傷害性受容体複合体の種々の構成部分は、単一のベクターまたは複数のベクターによりNK細胞またはT細胞にデリバリーされ得る。したがって、図に概略的に示されるように、コンストラクトは、単一のポリヌクレオチドによってコードされ得るが、切断部位も含み、そのため、コンストラクトの下流要素は、別個のタンパク質として細胞により発現される（IL-15を有する一部の実施形態における場合のように）。いくつかの実施形態では、T2A切断部位が使用される。いくつかの実施形態では、T2A切断部位は、配列番号9の核酸配列を有する。いくつかの実施形態では、T2A切断部位は、配列番号9の配列と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90

10

20

30

40

50

%、少なくとも95%相同であるように切断されるかまたは修飾され得る。いくつかの実施形態では、T2A切断部位は、配列番号10のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、T2A切断部位は切断されるかまたは修飾され、配列番号10の配列を有するT2A切断部位と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%相同である。

【0471】

シグナル伝達ドメイン

本明細書に記載される組成物および方法の一部の実施形態は、シグナル伝達ドメインを含むキメラ受容体（例えば、腫瘍抗原指向性CARおよび／または腫瘍リガンド指向性キメラ受容体）に関する。例えば、本明細書に開示されるいくつかの実施形態に従って操作された免疫細胞は、CD3 T細胞受容体複合体（またはその断片）の少なくとも1つのサブユニットを含み得る。いくつかの実施形態では、シグナル伝達ドメインは、CD3ゼータサブユニットを含む。いくつかの実施形態では、CD3ゼータは、配列番号7の核酸配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、CD3ゼータは、配列番号7の配列を有するCD3ゼータと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%相同であるように切断されるかまたは修飾され得る。いくつかの実施形態では、CD3ゼータドメインは、配列番号8のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD3ゼータドメインは切断されるかまたは修飾され、配列番号8の配列を有するCD3ゼータドメインと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%相同である。

【0472】

いくつかの実施形態では、予期せぬ増大したシグナル伝達は、その活性が相乗的に作用する複数のシグナル伝達ドメインの使用によって達成される。例えば、いくつかの実施形態では、シグナル伝達ドメインは、OX40ドメインをさらに含む。いくつかの実施形態では、OX40ドメインは、細胞内シグナル伝達ドメインである。いくつかの実施形態では、OX40細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号5の核酸配列を有する。いくつかの実施形態では、OX40細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号5の配列を有するOX40と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%相同であるように切断されるかまたは修飾され得る。いくつかの実施形態では、OX40細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号6のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、OX40細胞内シグナル伝達ドメインは切断されるかまたは修飾され、配列番号6の配列を有するOX40細胞内シグナル伝達ドメインと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%相同である。いくつかの実施形態では、OX40は、コンストラクトにおける唯一の膜貫通／シグナル伝達ドメインとして使用されるが、いくつかの実施形態では、OX40は、1つ以上の他のドメインとともに使用することができる。例えば、いくつかの実施形態では、OX40およびCD3ゼータの組み合わせが使用される。さらなる例として、いくつかの実施形態では、CD28、OX40、4-1BB、および／またはCDゼータの組み合わせが使用される。

【0473】

いくつかの実施形態では、シグナル伝達ドメインは、4-1BBドメインを含む。いくつかの実施形態では、4-1BBドメインは、細胞内シグナル伝達ドメインである。いくつかの実施形態では、4-1BB細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号29のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、4-1BB細胞内シグナル伝達ドメインは、切断されるかまたは修飾され、配列番号29の配列を有する4-1BB細胞内シグナル伝達ドメインと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%相同である。いくつかの実施形態では、4-1BBは、コンストラクトにおける唯一の膜貫通／シグナル伝達ドメインとして使用されるが、いくつかの実施形態では、4-1BBは、1つ以上の他のドメインとともに使用され得

る。例えば、いくつかの実施形態では、4-1BBとCD3ゼータとの組み合わせが使用される。さらなる例として、いくつかの実施形態では、CD28、OX40、4-1BB、および／またはCD3ゼータの組み合わせが使用される。

【0474】

いくつかの実施形態では、シグナル伝達ドメインはCD28ドメインを含む。いくつかの実施形態では、CD28ドメインは、細胞内シグナル伝達ドメインである。いくつかの実施形態では、CD28細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号31のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD28細胞内シグナル伝達ドメインは切断されるかまたは修飾され、配列番号31の配列を有するCD28細胞内シグナル伝達ドメインと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%相同である。いくつかの実施形態では、CD28は、コンストラクトにおける唯一の膜貫通／シグナル伝達ドメインとして使用されるが、いくつかの実施形態では、CD28は、1つ以上の他のドメインとともに使用され得る。例えば、いくつかの実施形態では、CD28およびCD3ゼータの組み合わせが使用される。さらなる例として、いくつかの実施形態では、CD28、OX40、4-1BB、および／またはCD3ゼータの組み合わせが使用される。

10

【0475】

細胞傷害性受容体複合体コンストラクト

本明細書に記載される組成物および方法の一部の実施形態は、キメラ抗原受容体、例えば、CD19指向性キメラ受容体、ならびにNKG2Dのリガンドを標的化する活性化キメラ受容体(ACR)に関する。遺伝子修飾された非同種反応性T細胞および／またはNK細胞などの免疫細胞におけるこれらの細胞傷害性受容体複合体の発現は、がん性細胞などの特定の標的細胞の標的化および破壊を可能にする。このような細胞傷害性受容体複合体の非限定的な例は、以下でより詳細に検討される。

20

【0476】

キメラ抗原受容体細胞傷害性受容体複合体コンストラクト

いくつかの実施形態では、キメラ抗原受容体の一般的な構造とともに、種々の細胞傷害性受容体複合体(細胞傷害性受容体とも呼ばれる)が本明細書において提供される。図1~7は、がん細胞の表面上に発現され、キメラ抗原受容体を発現する操作された細胞を活性化する腫瘍抗原または腫瘍関連抗原に結合する腫瘍結合部分を含むコンストラクトの非限定的な概略図を模式的に示す。図6は、NKG2D活性化キメラ受容体を非限定的な例として有するキメラ受容体複合体の概略図を示す(NKG2D ACRaおよびACRbを参照されたい)。図6は、NKG2D活性化キメラ受容体を非限定的な例として有する二重特異性CAR／キメラ受容体複合体の概略図を示す(二重特異性CAR／ACRaおよびCAR／ACRbを参照されたい)。

30

【0477】

図に示されるように、キメラ受容体のいくつかの実施形態は、抗腫瘍結合因子、CD8aヒンジドメイン、Ig4 SHドメイン(またはヒンジ)、CD8a膜貫通ドメイン、CD28膜貫通ドメイン、OX40ドメイン、4-1BBドメイン、CD28ドメイン、CD3ζ ITAMドメインまたはサブドメイン、CD3ゼータドメイン、Nkp80ドメイン、CD16 ICドメイン、2A切断部位、および膜結合IL-15ドメインを含む(ただし、いくつかの実施形態では、可溶性IL-15が使用される)。いくつかの実施形態では、結合および活性化機能は、別々のドメインによって行われるように操作される。いくつかの実施形態は、1を超える腫瘍結合因子部分または他の結合因子／活性化部分との複合体に関する。一部の実施形態では、結合因子／活性化部分は、CD19以外の他のマーカー、例えば、本明細書に記載されるがん標的を標的化する。例えば、図6および7は、CD123、CLDN6、BCMA、HER2、CD70、メソテリア、PD-L1、およびEGFRなどの異なる抗原を標的化するCARコンストラクトの非限定的な例の概略図を示す。いくつかの実施形態では、キメラ抗原受容体コンストラクトの一般的な構造は、ヒンジおよび／または膜貫通ドメインを含む。一部の実施形態では、これらは、

40

50

単一のドメインによって達成され得るか、またはいくつかの実施形態では、複数のサブドメインが使用され得る。受容体複合体は、標的細胞へのホーミング部分の結合後にシグナルを変換し、最終的に標的細胞における細胞傷害効果をもたらすシグナル伝達ドメインをさらに含む。いくつかの実施形態では、複合体は、共刺激ドメインをさらに含み、いくつかの実施形態では、相乗的に作用して、シグナル伝達ドメインの機能を増大させる。T細胞および／またはNK細胞などの免疫細胞におけるこれらの複合体の発現は、所定の腫瘍マーカーを発現するがん性細胞などの特定の標的細胞の標的化および破壊を可能にする。このような受容体複合体の一部は、標的細胞の表面上のCD19に結合し、操作された細胞を活性化する抗CD19部分、またはCD19結合部分を含む細胞外ドメインを含む。CD3ゼータITAMサブドメインは、シグナル伝達ドメインとして協調して作用し得る。IL-15ドメイン、例えば、mbIL-15ドメインは、共刺激ドメインとして作用し得る。IL-15ドメイン、例えば、mbIL-15ドメインは、それを発現する免疫細胞（例えば、NKまたはT細胞）を、標的腫瘍細胞に対して特に有効にすることができる。mbIL-15ドメインなどのIL-15ドメインは、いくつかの実施形態に従って、別個のコンストラクトにコードされ得ることが承認される。さらに、各成分は、1つ以上の別々の構成要素にコードされ得る。一部の実施形態では、細胞傷害性受容体またはCD19指向性受容体は、配列番号34の配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはそれ以上、または前述のパーセンテージのいずれか2つによって定義される範囲で同一であるアミノ酸配列を含む。

10

20

【0478】

実施形態に応じて、種々の結合因子を用いてCD19を標的化することができる。いくつかの実施形態では、ペプチド結合因子が使用され、一方、一部の実施形態では、抗体またはその断片が使用される。抗体を採用するいくつかの実施形態では、抗体配列は、それらの天然型から最適化されるか、ヒト化されるか、または代わりに操作されるかもしくはは突然変異されて、抗体または断片の安定性、親和性、アビディティ、または他の特徴のうちの1つ以上が増加する。いくつかの実施形態では、CD19に特異的である抗体が提供される。いくつかの実施形態では、CD19に特異的であるscFvが提供される。いくつかの実施形態では、CD19に特異的な抗体またはscFvは、配列番号104または106のアミノ酸配列を含む重鎖可変部を含む。一部の実施形態では、重鎖可変部は、配列番号104または106の配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、重鎖可変部は、配列番号104または106の重鎖可変部をコードするポリヌクレオチドの相補物と中程度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、重鎖可変ドメインは、配列番号104または106の重鎖可変部をコードするポリヌクレオチドの相補物とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列である。

30

【0479】

いくつかの実施形態では、CD19に特異的な抗体またはscFvは、配列番号105または107のいずれかのアミノ酸配列を含む軽鎖可変部を含む。いくつかの実施形態では、軽鎖可変部は、配列番号105または107の配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であるヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、軽鎖可変部は、配列番号105または107の軽鎖可変部をコードするポリヌクレオチドの相補物と中程度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、軽鎖可変ドメインは、配列番号105または107の軽鎖可変ドメインをコードするポリヌクレオチドの相補物とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を含む。

40

50

【0480】

いくつかの実施形態では、抗CD19抗体またはs c F vは、1つ、2つ、または3つの重鎖相補性決定領域（CDR）および1つ、2つ、または3つの軽鎖CDRを含む。いくつかの実施形態では、第1の重鎖CDRは、配列番号111のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、第1の重鎖CDRは、配列番号111の配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第2の重鎖CDRは、配列番号112、113、または114のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、第2の重鎖CDRは、配列番号112、113、または114の配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第3の重鎖CDRは、配列番号115のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、第3の重鎖CDRは、配列番号の配列115と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を含む。

10

【0481】

いくつかの実施形態では、第1の軽鎖CDRは、配列番号108のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、第1の軽鎖CDRは、配列番号108の配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第2の軽鎖CDRは、配列番号109のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、第2の軽鎖CDRは、配列番号109の配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第3の軽鎖CDRは、配列番号110のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、第3の軽鎖CDRは、配列番号110の配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を含む。

20

【0482】

いくつかの実施形態では、配列番号116のアミノ酸配列を含む抗CD19 CARが提供される。一部の実施形態では、配列番号116の配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99%またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を含む抗CD19 CARが提供される。

30

【0483】

一実施形態では、腫瘍結合因子／CD8ヒンジーCD8TM／OX40／CD3ゼータキメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図1、CAR1cを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、腫瘍結合因子、CD8aヒンジ、CD8a膜貫通ドメイン、OX40ドメイン、およびCD3ゼータドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、本明細書に開示される配列の組み合わせから得られた配列を含む核酸分子によってコードされるか、または本明細書に開示される配列の組み合わせから得られたアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、構成部分の例として本明細書に含まれるものなどの本明細書に記載される1つ以上の配列番号に従う配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、本明細書に記載される1つ以上の配列番号の組み合わせから生じる配列と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。開示される配列の特定の配列変化、伸長、および／または

40

50

切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。

【0484】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合因子／CD8ヒンジ－CD8TM／OX40／CD3ゼータ／2A／mIL-15キメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図1、CAR 1dを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、腫瘍結合因子、CD8aヒンジ、CD8a膜貫通ドメイン、OX40ドメイン、CD3ゼータドメイン、2A切断部位、およびmIL-15ドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、本明細書に開示される配列の組み合わせから得られた配列を含む核酸分子によってコードされるか、または本明細書に開示される配列の組み合わせから得られたアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、構成部分の例として本明細書に含まれるものなどの本明細書に記載される1つ以上の配列番号に従う配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、本明細書に記載される1つ以上の配列番号の組み合わせから生じる配列と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。開示される配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。

10

20

【0485】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合因子／Ig4SH－CD8TM／4-1BB／CD3ゼータキメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図4、CAR 4aを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、腫瘍結合因子、Ig4SHドメイン、CD8a膜貫通ドメイン、4-1BBドメイン、およびCD3ゼータドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、本明細書に開示される配列の組み合わせから得られた配列を含む核酸分子によってコードされるか、または本明細書に開示される配列の組み合わせから得られたアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、構成部分の例として本明細書に含まれるものなどの本明細書に記載される1つ以上の配列番号に従う配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、本明細書に記載される1つ以上の配列番号の組み合わせから生じる配列と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。

30

【0486】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合因子／Ig4SH－CD8TM／4-1BB／CD3ゼータ／2A／mIL-15キメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図4、CAR 4bを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、腫瘍結合因子、Ig4SHドメイン、CD8a膜貫通ドメイン、4-1BBドメイン、CD3ゼータドメイン、2A切断部位、およびmIL-15ドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、本明細書に開示される配列の組み合わせから得られた配列を含む核酸分子によってコードされるか、または本明細書に開示される配列の組み合わせから得られたアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、構成部分の例として本明細書に含まれるものなどの本明細書に記載される1つ以上の配列番号に従う配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、本明細書に記載され

40

50

る1つ以上の配列番号の組み合わせから生じる配列と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。開示される配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。

【0487】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合因子／CD8ヒンジ-CD28TM／CD28／CD3ゼータキメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図1、CAR1eを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、腫瘍結合因子、CD8aヒンジ、CD28膜貫通ドメイン、CD28ドメイン、およびCD3ゼータドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、本明細書に開示される配列の組み合わせから得られた配列を含む核酸分子によってコードされるか、または本明細書に開示される配列の組み合わせから得られたアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、構成部分の例として本明細書に含まれるものなどの本明細書に記載される1つ以上の配列番号に従う配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、本明細書に記載される1つ以上の配列番号の組み合わせから生じる配列と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。開示される配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。

【0488】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合因子／CD8ヒンジ-CD28TM／CD28／CD3ゼータ／2A／mIL-15キメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図1、CAR1fを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、腫瘍結合因子、CD8aヒンジ、CD28膜貫通ドメイン、CD28ドメイン、CD3ゼータドメイン、2A切断部位、およびmIL-15ドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、本明細書に開示される配列の組み合わせから得られた配列を含む核酸分子によってコードされるか、または本明細書に開示される配列の組み合わせから得られたアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、構成部分の例として本明細書に含まれるものなどの本明細書に記載される1つ以上の配列番号に従う配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、本明細書に記載される1つ以上の配列番号の組み合わせから生じる配列と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。

【0489】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合因子／Ig4SH-CD28TM／CD28／CD3ゼータキメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図2、CAR2iを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、腫瘍結合因子、Ig4SHドメイン、CD28膜貫通ドメイン、CD28ドメイン、およびCD3ゼータドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、本明細書に開示される配列の組み合わせから得られた配列を含む核酸分子によってコードされるか、または本明細書に開示される配列の組み合わせから得られ

たアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、構成部分の例として本明細書に含まれるものなどの本明細書に記載される1つ以上の配列番号に従う配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、本明細書に記載される1つ以上の配列番号の組み合わせから生じる配列と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。

10

【0490】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合因子／Ig4SH-CD28TM／CD28／CD328／CD3ゼータ／2A／mIL-15キメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図2、CAR2jを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、腫瘍結合因子、Ig4SHドメイン、CD28膜貫通ドメイン、CD28ドメイン、CD3ゼータドメイン、2A切断部位、およびmIL-15ドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、本明細書に開示される配列の組み合わせから得られた配列を含む核酸分子によってコードされるか、または本明細書に開示される配列の組み合わせから得られたアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、構成部分の例として本明細書に含まれるものなどの本明細書に記載される1つ以上の配列番号に従う配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、本明細書に記載される1つ以上の配列番号の組み合わせから生じる配列と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。

20

【0491】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合因子／Ig4SH-CD8TM／OX40／CD3ゼータキメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図4、CAR4cを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、腫瘍結合因子、Ig4SHドメイン、CD8a膜貫通ドメイン、OX40ドメイン、およびCD3ゼータドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、本明細書に開示される配列の組み合わせから得られた配列を含む核酸分子によってコードされるか、または本明細書に開示される配列の組み合わせから得られたアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、構成部分の例として本明細書に含まれるものなどの本明細書に記載される1つ以上の配列番号に従う配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、本明細書に記載される1つ以上の配列番号の組み合わせから生じる配列と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。

30

40

【0492】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合因子／Ig4SH-CD8TM／OX40／CD3ゼータ／2A／mIL-15キメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図4、CAR4dを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、本明細書に記載さ

50

れるように、腫瘍結合因子、I g 4 S Hドメイン、C D 8 a膜貫通ドメイン、O X 4 0ドメイン、C D 3ゼータドメイン、2 A切断部位、およびm I L - 1 5ドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、本明細書に開示される配列の組み合わせから得られた配列を含む核酸分子によってコードされるか、または本明細書に開示される配列の組み合わせから得られたアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、構成部分の例として本明細書に含まれるものなどの本明細書に記載される1つ以上の配列番号に従う配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、本明細書に記載される1つ以上の配列番号の組み合わせから生じる配列と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。

10

20

30

40

50

【0493】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合因子／C D 8ヒンジ－C D 3α T M／C D 2 8／C D 3ゼータキメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図4、C A R 4 eを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、腫瘍結合因子、C D 8 aヒンジ、C D 3α膜貫通ドメイン、C D 2 8ドメイン、およびC D 3ゼータドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、本明細書に開示される配列の組み合わせから得られた配列を含む核酸分子によってコードされるか、または本明細書に開示される配列の組み合わせから得られたアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、構成部分の例として本明細書に含まれるものなどの本明細書に記載される1つ以上の配列番号に従う配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、本明細書に記載される1つ以上の配列番号の組み合わせから生じる配列と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。

【0494】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合因子／C D 8ヒンジ－C D 3α T M／C D 2 8／C D 3ゼータ／2 A／m I L - 1 5キメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図4、C A R 4 fを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、腫瘍結合因子、C D 8 aヒンジ、C D 3α膜貫通ドメイン、C D 2 8ドメイン、C D 3ゼータドメイン、2 A切断部位、およびm I L - 1 5ドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、本明細書に開示される配列の組み合わせから得られた配列を含む核酸分子によってコードされるか、または本明細書に開示される配列の組み合わせから得られたアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、構成部分の例として本明細書に含まれるものなどの本明細書に記載される1つ以上の配列番号に従う配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、本明細書に記載される1つ以上の配列番号の組み合わせから生じる配列と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。

【0495】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合因子／CD8ヒンジ－CD28TM／CD28／4－1BB／CD3ゼータキメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図4、CAR 4gを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、腫瘍結合因子、CD8aヒンジ、CD28膜貫通ドメイン、CD28ドメイン、4－1BBドメイン、およびCD3ゼータドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、本明細書に開示される配列の組み合わせから得られた配列を含む核酸分子によってコードされるか、または本明細書に開示される配列の組み合わせから得られたアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、構成部分の例として本明細書に含まれるものなどの本明細書に記載される1つ以上の配列番号に従う配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、本明細書に記載される1つ以上の配列番号の組み合わせから生じる配列と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。

10

【0496】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合因子／CD8ヒンジ－CD28TM／CD28／4－1BB／CD3ゼータ／2A／mIL－15キメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図4、CAR 4hを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、腫瘍結合因子、CD8aヒンジ、CD28膜貫通ドメイン、CD28ドメイン、4－1BBドメイン、CD3ゼータドメイン、2A切断部位、およびmIL－15ドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、本明細書に開示される配列の組み合わせから得られた配列を含む核酸分子によってコードされるか、または本明細書に開示される配列の組み合わせから得られたアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、構成部分の例として本明細書に含まれるものなどの本明細書に記載される1つ以上の配列番号に従う配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、本明細書に記載される1つ以上の配列番号の組み合わせから生じる配列と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。

20

30

【0497】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合因子／CD8アルファヒンジ／CD8アルファTM／4－1BB／CD3ゼータキメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図5、CAR 5aを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、抗CD19部分、CD8aヒンジ、CD8a膜貫通ドメイン、4－1BBドメイン、およびCD3ゼータドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、本明細書に開示される配列の組み合わせから得られた配列を含む核酸分子によってコードされるか、または本明細書に開示される配列の組み合わせから得られたアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、構成部分の例として本明細書に含まれるものなどの本明細書に記載される1つ以上の配列番号に従う配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、本明細書に記載される1つ以上の配列番号の組み合わせから生じる配列と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約9

40

50

6%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。

【0498】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合因子／CD8アルファヒンジ／CD8アルファTM／4-1BB／CD3ゼータ／2A／mIL-15キメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図5、CAR 5bを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、腫瘍結合因子、CD8aヒンジ、CD8a膜貫通ドメイン、4-1BBドメイン、CD3ゼータドメイン、2A切断部位、およびmIL-15ドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、本明細書に開示される配列の組み合わせから得られた配列を含む核酸分子によってコードされるか、または本明細書に開示される配列の組み合わせから得られたアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、構成部分の例として本明細書に含まれるものなどの本明細書に記載される1つ以上の配列番号に従う配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、本明細書に記載される1つ以上の配列番号の組み合わせから生じる配列と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。

【0499】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合因子／CD8アルファヒンジ／CD3 TM／4-1BB／CD3ゼータキメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図5、CAR 5c参照）。ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、腫瘍結合因子、CD8aヒンジ、CD3膜貫通ドメイン、4-1BBドメイン、およびCD3ゼータドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、本明細書に開示される配列の組み合わせから得られた配列を含む核酸分子によってコードされるか、または本明細書に開示される配列の組み合わせから得られたアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、構成部分の例として本明細書に含まれるものなどの本明細書に記載される1つ以上の配列番号に従う配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、本明細書に記載される1つ以上の配列番号の組み合わせから生じる配列と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。

【0500】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合因子／CD8アルファヒンジ／CD3 TM／4-1BB／CD3ゼータ／2A／mIL-15キメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図5、CAR 5dを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、腫瘍結合因子、CD8aヒンジ、CD8a膜貫通ドメイン、4-1BBドメイン、CD3ゼータドメイン、2A切断部位、およびmIL-15ドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、本明細書に開示される配列の組み合わせから得られた配列を含む核酸分子によってコードされるか、または本明細書に開示される配列の組み合わせから得られたアミノ酸配列を

含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、構成部分の例として本明細書に含まれるものなどの本明細書に記載される1つ以上の配列番号に従う配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、本明細書に記載される1つ以上の配列番号の組み合わせから生じる配列と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。

【0501】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合因子／CD8アルファヒンジ／CD3 T M／4-1 B B／NK p 8 0キメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図5、C A R 5 eを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、腫瘍結合因子、CD8 a ヒンジ、CD3 膜貫通ドメイン、4-1 B Bドメイン、およびNK p 8 0ドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、本明細書に開示される配列の組み合わせから得られた配列を含む核酸分子によってコードされるか、または本明細書に開示される配列の組み合わせから得られたアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、構成部分の例として本明細書に含まれるものなどの本明細書に記載される1つ以上の配列番号に従う配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、本明細書に記載される1つ以上の配列番号の組み合わせから生じる配列と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。

【0502】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合因子／CD8アルファヒンジ／CD3 T M／4-1 B B／NK p 8 0／2 A／m I L-1 5キメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図5、C A R 5 fを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、腫瘍結合因子、CD8 a ヒンジ、CD8 a 膜貫通ドメイン、4-1 B Bドメイン、NK p 8 0ドメイン、2 A切断部位、およびm I L-1 5ドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、本明細書に開示される配列の組み合わせから得られた配列を含む核酸分子によってコードされるか、または本明細書に開示される配列の組み合わせから得られたアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、構成部分の例として本明細書に含まれるものなどの本明細書に記載される1つ以上の配列番号に従う配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、本明細書に記載される1つ以上の配列番号の組み合わせから生じる配列と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。

【0503】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合因子／CD8アルファヒンジ／CD3 T M／CD 1 6細胞内ドメイン／4-1 B Bキメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図5、C A R 5 gを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、腫瘍結合因子、CD8 a ヒンジ、CD3 膜貫通ドメイン、CD 1 6細胞

10

20

30

40

50

内ドメイン、および4-1BBドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、本明細書に開示される配列の組み合わせから得られた配列を含む核酸分子によってコードされるか、または本明細書に開示される配列の組み合わせから得られたアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、構成部分の例として本明細書に含まれるものなどの本明細書に記載される1つ以上の配列番号に従う配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、本明細書に記載される1つ以上の配列番号の組み合わせから生じる配列と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等を共有する配列を含む。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。

10

【0504】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合因子／CD8アルファヒンジ／CD3 TM／CD16／4-1BB／2A／mIL-15キメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図5、CAR5hを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、腫瘍結合因子、CD8αヒンジ、CD8α膜貫通ドメイン、CD16細胞内ドメイン、4-1BBドメイン、2A切断部位、およびmIL-15ドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、本明細書に開示される配列の組み合わせから得られた配列を含む核酸分子によってコードされるか、または本明細書に開示される配列の組み合わせから得られたアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、構成部分の例として本明細書に含まれるものなどの本明細書に記載される1つ以上の配列番号に従う配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、本明細書に記載される1つ以上の配列番号の組み合わせから生じる配列と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。

20

30

【0505】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合因子／NKG2D細胞外ドメイン／CD8ヒンジ／CD8 TM／OX40／CD3ゼータキメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図5、二重特異性CAR／ACRaを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、腫瘍結合因子、NKG2D細胞外ドメイン（全長または断片のいずれか）、CD8αヒンジ、CD8α膜貫通ドメイン、OX40ドメイン、およびCD3ゼータドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、本明細書に開示される配列の組み合わせから得られた配列を含む核酸分子によってコードされるか、または本明細書に開示される配列の組み合わせから得られたアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、構成部分の例として本明細書に含まれるものなどの本明細書に記載される1つ以上の配列番号に従う配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、本明細書に記載される1つ以上の配列番号の組み合わせから生じる配列と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。

40

50

【0506】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合因子／NK G 2 D E Cドメイン／CD 8 ヒンジ－CD 8 T M／OX 4 0／CD 3 ゼータ／2 A／m I L－1 5 キメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図5、二重特異性CAR／ACR bを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、腫瘍結合因子、NK G 2 D 細胞外ドメイン（全長または断片のいずれか）、CD 8 a ヒンジ、CD 8 a 膜貫通ドメイン、OX 4 0 ドメイン、CD 3 ゼータドメイン、2 A 切断部位、およびm I L－1 5 ドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、本明細書に開示される配列の組み合わせから得られた配列を含む核酸分子によってコードされるか、または本明細書に開示される配列の組み合わせから得られたアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、構成部分の例として本明細書に含まれるものなどの本明細書に記載される1つ以上の配列番号に従う配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、本明細書に記載される1つ以上の配列番号の組み合わせから生じる配列と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。

10

【0507】

20

いくつかの実施形態では、腫瘍結合因子／CD 8 ヒンジ／CD 8 T M／4－1 B B／CD 3 ゼータキメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図1、CAR 1 aを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、腫瘍結合因子、CD 8 a ヒンジ、CD 8 a 膜貫通ドメイン、4－1 B B ドメイン、およびCD 3 ゼータドメインを含むかまたはそれらから構成される。非限定的な実施形態として、本明細書には、抗CD 1 9／CD 8 ヒンジ／CD 8 T M／4－1 B B／CD 3 ゼータキメラ抗原受容体複合体が提供される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、配列番号85の配列を有する核酸分子によってコードされる。いくつかの実施形態では、CAR 1 a キメラ抗原受容体をコードする核酸配列は、配列番号85と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。いくつかの実施形態では、キメラ受容体は、配列番号86のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CAR 1 a キメラ抗原受容体は、配列番号86と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有するアミノ酸配列を含む。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるように、m b I L 1 5 をさらに含むCAR 1 a コンストラクトが提供される（例えば、図1 CAR 1 bを参照されたい）。

30

40

【0508】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合因子／CD 8 ヒンジ／CD 8 T M／OX 4 0／CD 3 ゼータキメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図1、CAR 1 cを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、腫瘍結合因子、CD 8 a ヒンジ、CD 8 a 膜貫通ドメイン、OX 4 0 ドメイン、およびCD 3 ゼータドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、キメラ抗原受容体は、m b I L 1 5（図1、CAR 1 dを参照されたい）をさらに含む。非限定的な実施形態として、本明細書には、抗CD 1 9／CD 8 ヒンジ／CD 8 T M／OX 4 0／CD 3 ゼータ／2 A／m I L－1 5 キメラ抗原受容体が提供される。このような実施形態では、ポリヌクレオチドは、本

50

明細書に記載されるように、抗CD19 s c F v、CD8 a ヒンジ、CD8 a 膜貫通ドメイン、OX40ドメイン、CD3ゼータドメイン、2A切断部位、およびmbIL-15ドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、配列番号59の配列を有する核酸分子によってコードされる。いくつかの実施形態では、CAR1dキメラ抗原受容体をコードする核酸配列は、配列番号59と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。いくつかの実施形態では、キメラ受容体は、配列番号60のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、NK19キメラ抗原受容体は、配列番号60と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD19 s c F vはFlagタグを含まない。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。

10

20

30

40

50

【0509】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合因子／CD8ヒンジ／CD28TM／CD28／CD3ゼータキメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図1、CAR1eを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、腫瘍結合因子、CD8 a ヒンジ、CD28膜貫通ドメイン、CD28シグナル伝達ドメイン、およびCD3ゼータドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、キメラ抗原受容体は、mbIL15をさらに含む（図1、CAR1dを参照されたい）。非限定的な実施形態として、本明細書には、抗CD19部分／CD8ヒンジ／CD28TM／CD28／CD3ゼータ／2A／mbIL15キメラ抗原受容体複合体が提供される。このような実施形態では、ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、抗CD19 s c F v、CD8 a ヒンジ、CD28膜貫通ドメイン、CD28シグナル伝達ドメイン、CD3ゼータドメイン、2A切断部位、およびmbIL-15ドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、配列番号61の配列を有する核酸分子によってコードされる。いくつかの実施形態では、CAR1dキメラ抗原受容体をコードする核酸配列は、配列番号61と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。いくつかの実施形態では、キメラ受容体は、配列番号62のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CAR1dキメラ抗原受容体は、配列番号62と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD19 s c F vはFlagタグを含まない。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。

【0510】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合因子／CD8ヒンジ／CD8 a TM／ICOS／CD3ゼータキメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図1、CAR1gを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、腫瘍結合因子、CD8 a ヒンジ、CD8 a 膜貫通ドメイン、誘導性共刺激因子（ICOS）シグナル伝達ドメイン、およびCD3ゼータドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、キメラ抗原受容体は、mbIL15をさらに含む（図1、CAR1hを参照されたい）。非限定的な実施形態として、本明細書には、抗CD19部分／CD8ヒンジ／CD8 a TM／ICOS／CD3ゼータ／2A／mbIL15キメラ抗原受容体複合体が提供される。こ

のような実施形態では、ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、抗CD19 s c F v、CD8 a ヒンジ、CD8 a 膜貫通ドメイン、誘導性共刺激因子（ICOS）シグナル伝達ドメイン、CD3ゼータドメイン、2A切断部位、およびmbIL-15ドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、配列番号63の配列を有する核酸分子によってコードされる。いくつかの実施形態では、CAR1hキメラ抗原受容体をコードする核酸配列は、配列番号63と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。いくつかの実施形態では、キメラ受容体は、配列番号64のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CAR1hキメラ抗原受容体は、配列番号64と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CAR1h s c F vはFlagタグを含まない。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。

10

20

30

40

50

【0511】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合因子／CD8ヒンジ／CD8 a T M／CD28／4-1BB／CD3ゼータキメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図1、CAR1iを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、腫瘍結合因子、CD8 a ヒンジ、CD8 a 膜貫通ドメイン、CD28シグナル伝達ドメイン、4-1BBシグナル伝達ドメイン、およびCD3ゼータドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、キメラ抗原受容体は、mbIL15をさらに含む（図3A、NK19-4bを参照されたい）。非限定的な実施形態として、本明細書には、抗CD19部分／CD8ヒンジ／CD8 a T M／CD28／4-1BB／CD3ゼータ／2A／mIL-15が提供される。このような実施形態では、ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、抗CD19 s c F v、CD8 a ヒンジ、CD8 a 膜貫通ドメイン、CD28シグナル伝達ドメイン、4-1BBシグナル伝達ドメイン、CD3ゼータドメイン、2A切断部位、およびmbIL-15ドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、配列番号65の配列を有する核酸分子によってコードされる。いくつかの実施形態では、CAR1hキメラ抗原受容体をコードする核酸配列は、配列番号65と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。いくつかの実施形態では、キメラ受容体は、配列番号66のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CAR1hキメラ抗原受容体は、配列番号66と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CAR1h s c F vはFlagタグを含まない。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。

【0512】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合因子／CD8ヒンジ／NKG2D T M／OX40／CD3ゼータキメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図2、CAR2aを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、腫瘍結合因子、CD8 a ヒンジ、NKG2D膜貫通ドメイン、OX40シグナル伝達ドメイン、およびCD3ゼータドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、キメラ抗原受容体は、mbIL15（図2、CAR2bを参照されたい）をさらに含む。非限定的な実施形態

として、本明細書には、抗CD19部分／CD8ヒンジ／NKG2DTM／OX40／CD3ゼータ／2A／mIL-15キメラ抗原受容体複合体が提供される。このような実施形態では、ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、抗CD19 scFv、CD8aヒンジ、NKG2D膜貫通ドメイン、OX40シグナル伝達ドメイン、CD3ゼータドメイン、2A切断部位、およびmbIL-15ドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、配列番号67の配列を有する核酸分子によってコードされる。いくつかの実施形態では、CAR2bキメラ抗原受容体をコードする核酸配列は、配列番号67と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。いくつかの実施形態では、キメラ受容体は、配列番号68のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CAR2bキメラ抗原受容体は、配列番号68と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD19 scFvはFLAGタグを含まない。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。

10

20

30

40

50

【0513】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合因子／CD8ヒンジ／CD8aTM／CD40／CD3ゼータキメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図2、CAR2cを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、腫瘍結合因子、CD8aヒンジ、CD8a膜貫通ドメイン、CD40シグナル伝達ドメイン、およびCD3ゼータドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、キメラ抗原受容体は、mbIL15をさらに含む（図2、CAR2dを参照されたい）。非限定的な実施形態として、本明細書には、抗CD19部分／CD8ヒンジ／CD8aTM／CD40／CD3ゼータ／2A／mIL-15キメラ抗原受容体複合体が提供される。このような実施形態では、ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、抗CD19 scFv可変重鎖、CD8aヒンジ、CD8a膜貫通ドメイン、CD40シグナル伝達ドメイン、CD3ゼータドメイン、2A切断部位、およびmbIL-15ドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、配列番号69の配列を有する核酸分子によってコードされる。いくつかの実施形態では、CAR2dキメラ抗原受容体をコードする核酸配列は、配列番号69と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。いくつかの実施形態では、キメラ受容体は、配列番号70のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CAR2dキメラ抗原受容体は、配列番号70と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD19 scFvはFLAGタグを含まない。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。

【0514】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合因子／CD8ヒンジ／CD8aTM／OX40／CD3ゼータ／2A／EGFRtキメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図2、CAR2eを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、腫瘍結合因子、CD8aヒンジ、CD8a膜貫通ドメイン、OX40シグナル伝達ドメイン、CD3ゼー

タドメイン、2A切断部位 (side)、および上皮細胞増殖因子受容体 (EGFRt) の切断型を含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、キメラ抗原受容体は、mbIL15をさらに含む (図2、CAR2fを参照されたい)。非限定的な実施形態として、本明細書には、抗CD19部分/CD8ヒンジ/CD8aTM/OX40/CD3ゼータ/2A/mIL-15/2A/EGFRtキメラ抗原受容体複合体が提供される。このような実施形態では、ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、抗CD19 scFv、CD8aヒンジ、CD8a膜貫通ドメイン、OX40シグナル伝達ドメイン、CD3ゼータドメイン、2A切断部位、上皮細胞増殖因子受容体 (EGFRt) の切断型、追加の2A切断部位、およびmbIL-15ドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、配列番号71の配列を有する核酸分子によってコードされる。いくつかの実施形態では、CAR2fキメラ抗原受容体をコードする核酸配列は、配列番号71と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および/または機能的同等性を共有する配列を含む。いくつかの実施形態では、キメラ受容体は、配列番号72のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CAR2fキメラ抗原受容体は、配列番号72と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および/または機能的同等性を共有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD19 scFvはFlagタグを含まない。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および/または切断は、例えば、クローニング (例えば、制限部位の作製のための) の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。

10

20

30

40

50

【0515】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合因子/CD8ヒンジ/CD8aTM/CD40/CD3ゼータキメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される (図2、CAR2gを参照されたい)。ポリヌクレオチドは、腫瘍結合因子、CD8aヒンジ、CD8a膜貫通ドメイン、CD40シグナル伝達ドメイン、およびCD3ゼータドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、キメラ抗原受容体は、mbIL15をさらに含む (図2、CAR2hを参照されたい)。非限定的な実施形態として、本明細書には、抗CD19部分/CD8ヒンジ/CD8aTM/CD40/CD3ゼータ/2A/mIL-15キメラ抗原受容体複合体が提供される。このような実施形態では、ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、抗CD19 scFv可変軽鎖、CD8aヒンジ、CD8a膜貫通ドメイン、CD40シグナル伝達ドメイン、CD3ゼータドメイン、2A切断部位、およびmbIL-15ドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、配列番号73の配列を有する核酸分子によってコードされる。いくつかの実施形態では、CAR2hキメラ抗原受容体をコードする核酸配列は、配列番号73と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および/または機能的同等性を共有する配列を含む。いくつかの実施形態では、キメラ受容体は、配列番号74のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CAR2hキメラ抗原受容体は、配列番号74と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および/または機能的同等性を共有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD19 scFvはFlagタグを含まない。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および/または切断は、例えば、クローニング (例えば、制限部位の作製のための) の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。

【0516】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合因子／CD8ヒンジ／CD8aTM／CD27／CD3ゼータキメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図3、CAR3aを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、腫瘍結合因子、CD8aヒンジ、CD8a膜貫通ドメイン、CD27シグナル伝達ドメイン、およびCD3ゼータドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、キメラ抗原受容体は、mbIL15をさらに含む（図3、CAR3bを参照されたい）。非限定的な実施形態として、本明細書には、抗CD19部分／CD8ヒンジ／CD8aTM／CD27／CD3ゼータ／2A／mIL-15キメラ抗原受容体複合体が提供される。このような実施形態では、ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、抗CD19 scFv、CD8aヒンジ、CD8a膜貫通ドメイン、CD27シグナル伝達ドメイン、CD3ゼータドメイン、2A切断部位、およびmbIL-15ドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、配列番号75の配列を有する核酸分子によってコードされる。いくつかの実施形態では、CAR3bキメラ抗原受容体をコードする核酸配列は、配列番号75と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。いくつかの実施形態では、キメラ受容体は、配列番号76のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CAR3bキメラ抗原受容体は、配列番号76と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD19 scFvはFlagタグを含まない。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。

10

20

30

40

50

【0517】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合因子／CD8ヒンジ／CD8aTM／CD70／CD3ゼータキメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図3、CAR3cを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、腫瘍結合因子、CD8aヒンジ、CD8a膜貫通ドメイン、CD70シグナル伝達ドメイン、およびCD3ゼータドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、キメラ抗原受容体は、mbIL15をさらに含む（図3、CAR3dを参照されたい）。非限定的な実施形態として、本明細書には、抗CD19部分／CD8ヒンジ／CD8aTM／CD70／CD3ゼータ／2A／mIL-15キメラ抗原受容体複合体が提供される。このような実施形態では、ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、抗CD19 scFv、CD8aヒンジ、CD8a膜貫通ドメイン、CD70シグナル伝達ドメイン、CD3ゼータドメイン、2A切断部位、およびmbIL-15ドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、配列番号77の配列を有する核酸分子によってコードされる。いくつかの実施形態では、CAR3dキメラ抗原受容体をコードする核酸配列は、配列番号77と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。いくつかの実施形態では、キメラ受容体は、配列番号78のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CAR3dキメラ抗原受容体は、配列番号78と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD19 scFvは、Flagタグを含まない。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。

。

【0518】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合因子／CD8ヒンジ／CD8aTM／CD161／CD3ゼータキメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図3、CAR3eを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、腫瘍結合因子、CD8aヒンジ、CD8a膜貫通ドメイン、CD161シグナル伝達ドメイン、およびCD3ゼータドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、キメラ抗原受容体は、mbIL15をさらに含む（図3、CAR3fを参照されたい）。非限定的な実施形態として、本明細書には、抗CD19部分／CD8ヒンジ／CD8aTM／CD161／CD3ゼータ／2A／mIL-15キメラ抗原受容体複合体が提供される。このような実施形態では、ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、抗CD19 scFv、CD8aヒンジ、CD8a膜貫通ドメイン、CD161シグナル伝達ドメイン、CD3ゼータドメイン、2A切断部位、およびmbIL-15ドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、配列番号79の配列を有する核酸分子によってコードされる。いくつかの実施形態では、CAR3fキメラ抗原受容体をコードする核酸配列は、配列番号79と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。いくつかの実施形態では、キメラ受容体は、配列番号80のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CAR3fキメラ抗原受容体は、配列番号80と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD19 scFvはFLAGタグを含まない。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。

10

20

【0519】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合因子／CD8ヒンジ／CD8aTM／CD40L／CD3ゼータキメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図3、CAR3gを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、腫瘍結合因子、CD8aヒンジ、CD8a膜貫通ドメイン、CD40Lシグナル伝達ドメイン、およびCD3ゼータドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、キメラ抗原受容体は、mbIL15をさらに含む（図3、CAR3hを参照されたい）。非限定的な実施形態として、本明細書には、抗CD19部分／CD8ヒンジ／CD8aTM／CD40L／CD3ゼータ／2A／mIL-15キメラ抗原受容体複合体が提供される。このような実施形態では、ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、抗CD19 scFv、CD8aヒンジ、CD8a膜貫通ドメイン、CD40Lシグナル伝達ドメイン、CD3ゼータドメイン、2A切断部位、およびmbIL-15ドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、配列番号81の配列を有する核酸分子によってコードされる。いくつかの実施形態では、CAR3hキメラ抗原受容体をコードする核酸配列は、配列番号81と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。いくつかの実施形態では、キメラ受容体は、配列番号82のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CAR3hキメラ抗原受容体は、配列番号82と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相溶性および／または機能的同等性を共有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD19 scFvはFLAGタグを含まない。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容

30

40

50

易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。

【0520】

いくつかの実施形態では、腫瘍結合因子／CD8ヒンジ／CD8aTM／CD44／CD3ゼータキメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図3、CAR3iを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、腫瘍結合因子、CD8aヒンジ、CD8a膜貫通ドメイン、CD44シグナル伝達ドメイン、およびCD3ゼータドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、キメラ抗原受容体は、mbIL15をさらに含む（図3、CAR3jを参照されたい）。非限定的な実施形態として、本明細書には、抗CD19部分／CD8ヒンジ／CD8aTM／CD44／CD3ゼータ／2A／mIL-15キメラ抗原受容体複合体が提供される。このような実施形態では、ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、抗CD19 scFv、CD8aヒンジ、CD8a膜貫通ドメイン、CD44シグナル伝達ドメイン、CD3ゼータドメイン、2A切断部位、およびmbIL-15ドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、配列番号83の配列を有する核酸分子によってコードされる。いくつかの実施形態では、CAR3jキメラ抗原受容体をコードする核酸配列は、配列番号83と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。いくつかの実施形態では、キメラ受容体は、配列番号84のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CAR3jキメラ抗原受容体は、配列番号84と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD19 scFvはFlagタグを含まない。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。

【0521】

いくつかの実施形態では、抗CD123／CD8aヒンジ／CD8a膜貫通ドメイン／OX40／CD3ゼータキメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図6、CD123 CARaを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、抗CD123部分、CD8アルファヒンジ、CD8a膜貫通ドメイン、OX40ドメイン、およびCD3ゼータドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、本明細書に開示される配列の組み合わせから得られた配列を含む核酸分子によってコードされるか、または本明細書に開示される配列の組み合わせから得られたアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、構成部分の例として本明細書に含まれるものなどの本明細書に記載される1つ以上の配列番号に従う配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、本明細書に記載される1つ以上の配列番号の組み合わせから生じる配列と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じる得ることが承認されるものである。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるmbIL15をさらに含むCD123 CARコンストラクトが提供される（例えば、図6、CD123 CARbを参照されたい）。

【0522】

いくつかの実施形態では、抗CLDN6／CD8aヒンジ／CD8a膜貫通ドメイン／OX40／CD3ゼータキメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供さ

れる（図6、CLDN6 CARaを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、抗CLDN6結合部分、CD8アルファヒンジ、CD8a膜貫通ドメイン、OX40ドメイン、およびCD3ゼータドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、本明細書に開示される配列の組み合わせから得られた配列を含む核酸分子によってコードされるか、または本明細書に開示される配列の組み合わせから得られたアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、構成部分の例として本明細書に含まれるものなどの本明細書に記載される1つ以上の配列番号に従う配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、本明細書に記載される1つ以上の配列番号の組み合わせから生じる配列と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じる得ることが承認されるものである。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるmbIL15をさらに含むCLDN6 CARコンストラクトが提供される（例えば、図6、CLDN6 CARbを参照されたい）。

10

【0523】

実施形態に応じて、種々の結合因子を使用して、CLDN6を標的化することができる。いくつかの実施形態では、ペプチド結合因子が使用され、一方、いくつかの実施形態では、抗体またはその断片が使用される。抗体を採用するいくつかの実施形態では、抗体配列は、それらの天然型から最適化され、ヒト化され、または代わりに操作されもしくは突然変異されて、抗体または断片の安定性、親和性、アビディティ、または他の特徴のうちの1つ以上が増加する。いくつかの実施形態では、CLDN6に特異的な抗体が提供される。いくつかの実施形態では、CLDN6に特異的なscFvが提供される。いくつかの実施形態では、CLDN6に特異的な抗体またはscFvは、配列番号88のアミノ酸配列を含む重鎖可変部を含む。一部の実施形態では、重鎖可変部は、配列番号88の配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、重鎖可変部は、配列番号88の重鎖可変部をコードするポリヌクレオチドの相補物と中程度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、重鎖可変ドメインは、配列番号88の重鎖可変部をコードするポリヌクレオチドの相補物とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を含む。

20

30

【0524】

いくつかの実施形態では、CLDN6に特異的な抗体またはscFvは、配列番号89、90、または91のいずれかのアミノ酸配列を含む軽鎖可変部を含む。いくつかの実施形態では、軽鎖可変部は、配列番号89、90、または91の配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一のヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、軽鎖可変部は、配列番号89、90、または91の軽鎖可変部をコードするポリヌクレオチドの相補物と中程度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、軽鎖可変ドメインは、配列番号89、90、または91の軽鎖可変ドメインをコードするポリヌクレオチドの相補物とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を含む。

40

【0525】

いくつかの実施形態では、抗CLDN6抗体またはscFvは、1つ、2つ、または3つの重鎖相補性決定領域（CDR）および1つ、2つ、または3つの軽鎖CDRを含む。

50

いくつかの実施形態では、第1の重鎖CDRは、配列番号92のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、第1の重鎖CDRは、配列番号92の配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第2の重鎖CDRは、配列番号93のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、第2の重鎖CDRは、配列番号93の配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第3の重鎖CDRは、配列番号94のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、第3の重鎖CDRは、配列番号94の配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一のアミノ酸配列を含む。

10

【0526】

いくつかの実施形態では、第1の軽鎖CDRは、配列番号95、98、または101のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、第1の軽鎖CDRは、配列番号95、98、または101の配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第2の軽鎖CDRは、配列番号96、99、または102のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、第2の軽鎖CDRは、配列番号96、99、または102の配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第3の軽鎖CDRは、配列番号97、100、または103のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、第3の軽鎖CDRは、配列番号97、100、または103の配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一のアミノ酸配列を含む。

20

【0527】

有利には、いくつかの実施形態では、CLDN6 CARは、CLDN6に対して高度に特異的であり、CLDN3、4、または9のいずれにも実質的に結合しない。

【0528】

いくつかの実施形態では、抗BCMA/CD8αヒンジ/CD8α膜貫通ドメイン/OX40/CD3ゼータキメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される(図6、BCMA CARaを参照されたい)。ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、抗BCMA結合部分、CD8αヒンジ、CD8α膜貫通ドメイン、OX40ドメイン、およびCD3ゼータドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、本明細書に開示される配列の組み合わせから得られた配列を含む核酸分子によってコードされるか、または本明細書に開示される配列の組み合わせから得られたアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、構成部分の例として本明細書に含まれるものなどの本明細書に記載される1つ以上の配列番号に従う配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、本明細書に記載される1つ以上の配列番号の組み合わせから生じる配列と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および/または機能的同等性を共有する配列を含む。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および/または切断は、例えば、クローニング(例えば、制限部位の作製のための)の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるmbIL15をさらに含むBCMA CARコンストラクトが提供される(例えば、図6、BCMA CARbを参照されたい)。本開示の方法および組成物において使用するための抗BCMA CARについてのさらなる情報は、米国仮特許出願第62/960285号に見

30

40

50

出すことができ、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0529】

いくつかの実施形態では、抗HER2／CD8αヒンジ／CD8α膜貫通ドメイン／OX40／CD3ゼータキメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図6、HER2 CARaを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、抗HER2結合部分、CD8αヒンジ、CD8α膜貫通ドメイン、OX40ドメイン、およびCD3ゼータドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、本明細書に開示される配列の組み合わせから得られた配列を含む核酸分子によってコードされるか、または本明細書に開示される配列の組み合わせから得られたアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、構成部分の例として本明細書に含まれるものなどの本明細書に記載される1つ以上の配列番号に従う配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、本明細書に記載される1つ以上の配列番号の組み合わせから生じる配列と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるmbIL15をさらに含むHER2 CARコンストラクトが提供される（例えば、図6、HER2 CARbを参照されたい）。

10

20

【0530】

いくつかの実施形態では、NKG2D／CD8αヒンジ／CD8α膜貫通ドメイン／OX40／CD3ゼータ活性化キメラ受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図6、NKG2D ACRaを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、NKG2D受容体のリガンド、CD8αヒンジ、CD8α膜貫通ドメイン、OX40ドメイン、およびCD3ゼータドメインと結合することができるNKG2D受容体の断片を含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、配列番号145の核酸配列を含む核酸分子によってコードされる。さらに別の実施形態では、このキメラ受容体は、配列番号174のアミノ酸配列によってコードされる。一部の実施形態では、キメラ受容体の配列は、配列番号145と異なることができるが、実施形態に応じて、配列番号145と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%の相同性を残存する。いくつかの実施形態では、キメラ受容体は配列番号145とは異なることができるが、キメラ受容体は、NK細胞活性化および／または細胞傷害性機能を保持するか、または一部の実施形態では増大している。さらに、いくつかの実施形態では、このコンストラクトは、mbIL15と共発現され得るものであってもよい（図7、NKG2D ACRb）。本開示の方法および組成物において使用するためのキメラ受容体に関するさらなる情報は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるPCT特許公開第2018／183385号に見出すことができる。

30

40

【0531】

いくつかの実施形態では、抗CD70／CD8αヒンジ／CD8α膜貫通ドメイン／OX40／CD3ゼータキメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図7、CD70 CARaを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、抗CD70結合部分、CD8αヒンジ、CD8α膜貫通ドメイン、OX40ドメイン、およびCD3ゼータドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、本明細書に開示される配列の組み合わせから得られた配列を含む核酸分子によってコードされるか、または本明細書に開示される配列の組み合わせから得られたアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、構成部分の例として本明細書に含まれるものなどの本明細書に記

50

載される1つ以上の配列番号に従う配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、本明細書に記載される1つ以上の配列番号の組み合わせから生じる配列と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるmbIL15をさらに含むCD70 CARコンストラクトが提供される（例えば、図7、CD70 CARbを参照されたい）。本開示の方法および組成物において使用するための抗CD70 CARについてのさらなる情報は、米国仮特許出願第63／038645号および同第63／090041号に見出すことができ、その全体が参照により本明細書にそれぞれ組み込まれる。

10

【0532】

いくつかの実施形態では、抗メソセリン／CD8αヒンジ／CD8α膜貫通ドメイン／OX40／CD3ゼータキメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図7、メソセリンCARaを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、抗メソセリン結合部分、CD8αヒンジ、CD8α膜貫通ドメイン、OX40ドメイン、およびCD3ゼータドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、本明細書に開示される配列の組み合わせから得られた配列を含む核酸分子によってコードされるか、または本明細書に開示される配列の組み合わせから得られたアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、構成部分の例として本明細書に含まれるものなどの本明細書に記載される1つ以上の配列番号に従う配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、本明細書に記載される1つ以上の配列番号の組み合わせから生じる配列と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが承認されるものである。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるmbIL15をさらに含むメソセリンCARコンストラクトが提供される（例えば、図7、メソセリンCARbを参照されたい）。

20

30

【0533】

いくつかの実施形態では、抗PD-L1／CD8αヒンジ／CD8α膜貫通ドメイン／OX40／CD3ゼータキメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図7、PD-L1 CARaを参照されたい）。ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、抗PD-L1結合部分、CD8αヒンジ、CD8α膜貫通ドメイン、OX40ドメイン、およびCD3ゼータドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、本明細書に開示される配列の組み合わせから得られた配列を含む核酸分子によってコードされるか、または本明細書に開示される配列の組み合わせから得られたアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、構成部分の例として本明細書に含まれるものなどの本明細書に記載される1つ以上の配列番号に従う配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、本明細書に記載される1つ以上の配列番号の組み合わせから生じる配列と少なくとも約90%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生

40

50

じ得ることが承認されるものである。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される m b I L 1 5 をさらに含む P D - L 1 C A R コンストラクトが提供される（例えば、図 7、P D - L 1 C A R b を参照されたい）。

【0534】

いくつかの実施形態では、抗 E G F R / C D 8 α ヒンジ / C D 8 α 膜貫通ドメイン / O X 4 0 / C D 3 ゼータキメラ抗原受容体複合体をコードするポリヌクレオチドが提供される（図 7、E G F R C A R a を参照されたい）。ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、抗 E G F R 結合部分、C D 8 α ヒンジ、C D 8 α 膜貫通ドメイン、O X 4 0 ドメイン、および C D 3 ゼータドメインを含むかまたはそれらから構成される。いくつかの実施形態では、この受容体複合体は、本明細書に開示される配列の組み合わせから得られた配列を含む核酸分子によってコードされるか、または本明細書に開示される配列の組み合わせから得られたアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、構成部分の例として本明細書に含まれるものなどの本明細書に記載される 1 つ以上の配列番号に従う配列を含む。いくつかの実施形態では、コード核酸配列またはアミノ酸配列は、本明細書に記載される 1 つ以上の配列番号の組み合わせから生じる配列と少なくとも約 90 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、または少なくとも約 99 % の配列同一性、相同性および／または機能的同等性を共有する配列を含む。開示された配列の特定の配列変化、伸長、および／または切断は、例えば、クローニング（例えば、制限部位の作製のための）の容易さまたは効率の結果として、配列を組み合わせる場合に生じ得ることが理解されなければならない。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される m b I L 1 5 をさらに含む E G F R C A R コンストラクトが提供される（例えば、図 7、E G F R C A R b を参照されたい）。

【0535】

いくつかの実施形態では、M S C V - I R E S - G F P プラスミドなどの発現ベクターは、その非限定的な例が配列番号 87 に提供されるが、本明細書において提供されるキメラ抗原受容体のいずれかを発現するために使用される。

【0536】

処置方法

いくつかの実施形態は、本明細書に開示されているように、キメラ抗原受容体および／または活性化キメラ受容体を含む細胞または免疫細胞を用いて、がんを処置し、軽快させ、阻害し、または予防する方法に関する。一部の実施形態では、方法は、がんを処置または予防することを含む。一部の実施形態では、方法は、本明細書に記載されるように、腫瘍指向性キメラ抗原受容体および／または腫瘍指向性キメラ受容体を発現する、治療上有効量の免疫細胞を投与することを含む。このように処置され得るがんのタイプの例は、本明細書に記載される。

【0537】

特定の実施形態では、本明細書に記載される遺伝子操作された細胞（複数可）を用いた対象の処置は、以下の効果のうちの 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、またはそれ以上を達成し、例えば、（i）疾患またはそれに関連する症状の重症度の減少または軽快；（ii）疾患に関連する症状の持続期間の減少；（iii）疾患またはそれに関連する症状の進行に対する保護；（iv）疾患またはそれに関連する症状の退行；（v）疾患に関連する症状の発生または発症に対する保護；（vi）疾患に関連する症状の再発に対する保護；（vii）対象の入院の減少；（viii）入院期間の減少；（ix）疾患を有する対象の生存の増加；（x）疾患に関連する症状の数の減少；（xi）別の治療法の予防効果または治療効果の強化、改善、補足、補完、または増強が含まれる。有利には、本明細書に開示される非同種反応性の操作された T 細胞は、上記のうちの 1 つ以上をさらに増大させる。投与は、限定されないが、静脈内、動脈内、皮下、筋肉内、肝内、腹腔内、および／または患部組織への局所デリバリーなどの種々の経路によることができる。

【0538】

投与および用量

本明細書では、がんを有する対象を処置する方法であって、本明細書に開示される細胞傷害性受容体複合体を発現するように操作された免疫細胞（例えば、NK細胞および／またはT細胞）を含む組成物を対象に投与することを含む方法がさらに提供される。例えば、本明細書に記載される組成物および方法の一部の実施形態は、がん患者を処置するための、腫瘍指向性キメラ抗原受容体および／もしくは腫瘍指向性キメラ受容体の使用、または腫瘍指向性キメラ抗原受容体および／もしくは腫瘍指向性キメラ受容体を発現する細胞の使用に関する。がんを処置するためのこのような操作された免疫細胞の使用もまた提供される。

【0539】

特定の実施形態では、本明細書に記載される遺伝子操作された細胞（複数可）を用いた対象の処置は、以下の効果のうちの1つ、2つ、3つ、4つ、またはそれ以上を達成し、例えば、(i) 疾患またはそれに関連する症状の重症度の減少または軽快；(ii) 疾患に関連する症状の持続期間の減少；(iii) 疾患またはそれに関連する症状の進行に対する保護；(iv) 疾患またはそれに関連する症状の退行；(v) 疾患に関連する症状の発生または発症に対する保護；(vi) 疾患に関連する症状の再発に対する保護；(vii) 対象の入院の減少；(viii) 入院期間の減少；(ix) 疾患を有する対象の生存の増加；(x) 疾患に関連する症状の数の減少；(xi) 別の治療法の予防効果または治療効果の強化、改善、補足、補完、または増強が含まれる。これらの比較の各々は、例えば、本明細書に開示されるコンストラクトを発現しない細胞を用いた、疾患に対する細胞ベースの免疫療法を含む、疾患に対する異なる療法に対するものである。有利には、本明細書に開示される非同種反応性の操作されたT細胞は、上記のうちの1つ以上をさらに増大させる。

【0540】

投与は、限定されないが、静脈内、動脈内、皮下、筋肉内、肝内、腹腔内、および／または患部組織への局所デリバリーなどの種々の経路によることができる。NK細胞および／またはT細胞などの免疫細胞の用量は、所定の対象について、それらの体重、疾患タイプおよび状態、ならびに処置の所望の攻撃性に基いて容易に決定することができるが、実施形態に応じて、約 10^5 細胞/kg～約 10^{12} 細胞/kg（例えば、 10^5 ～ 10^7 、 10^7 ～ 10^{10} 、 10^{10} ～ 10^{12} 、およびその中の重複範囲）の範囲である。一実施形態では、用量漸増レジメンが使用される。いくつかの実施形態では、NKおよび／またはT細胞などの様々な免疫細胞が、例えば、約 1×10^6 細胞/kg～約 1×10^8 細胞/kgの間で投与される。実施形態に応じて、種々のタイプのがんを処置することができる。いくつかの実施形態では、肝細胞がん腫が処置される。本明細書において提供されるさらなる実施形態は、がんの以下の非制限的な例の処置または予防を含み、限定されないが、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、副腎皮質がん腫、カボジ肉腫、リンパ腫、胃腸がん、虫垂がん、中枢神経系がん、基底細胞がん、胆管がん、膀胱がん、骨がん、脳腫瘍（限定されないが、例えば、星状細胞腫、脊髄腫瘍、脳幹神経膠腫、神経膠芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣芽腫、上衣腫、髄芽腫、髄芽腫）、乳がん、気管支腫瘍、バーキットリンパ腫、頸部がん、結腸がん、慢性リンパ性白血病（CLL）、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性骨髄増殖性疾患、乳管がん、子宮内膜がん、食道がん、胃がん、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、有毛細胞白血病、腎細胞がん、白血病、口腔がん、鼻咽頭がん、肝臓がん、肺がん（限定されないが、例えば、非小細胞肺がん（NSCLC）および小細胞肺がん）、膵臓がん、腸がん、リンパ腫、黒色腫、眼がん、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、下垂体がん、子宮がん、および膣がんが含まれる。

【0541】

一部の実施形態では、本明細書には、配列番号1～174（または配列番号1～174のうちの2つ以上の組み合わせ）のそれぞれの核酸またはアミノ酸配列と比較して、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%（およびその

10

20

30

40

50

範囲)の配列同一性および／または相同性を有し、それぞれの配列番号1～174(または配列番号1～174のうちの2つ以上の組み合わせ)と比較して、限定されないが、(i)増大した増殖、(ii)増大した活性化、(iii)核酸およびアミノ酸配列によってコードされる受容体を有するNK細胞が結合するリガンドを提示する細胞に対する増大した細胞傷害活性、(iv)増大した腫瘍または感染部位へのホーミング、(v)減少した標的外の細胞傷害効果、(vi)増大した免疫刺激性サイトカインおよびケモカイン(限定されないが、IFN γ 、TNF α 、IL-22、CCL3、CCL4、およびCCL5を含む)の増大した分泌、(vii)さらなる先天性および適応性免疫応答を刺激する増大した能力、および(viii)それらの組み合わせを含む機能のうちの1つ以上も示す核酸およびアミノ酸配列もまた提供される。

10

【0542】

さらに、いくつかの実施形態では、核酸コードの縮重を主要因としながら、本明細書に開示される核酸のいずれかに対応するアミノ酸配列が提供される。さらに、本明細書に明示的に開示されたものとは異なるが、機能的類似性または同等性を有する配列(核酸またはアミノ酸のいずれか)もまた、本開示の範囲内で企図される。上記には、突然変異、切断、置換、または他のタイプの修飾が含まれる。

【0543】

いくつかの実施形態では、開示された細胞傷害性受容体複合体をコードするポリヌクレオチドはmRNAである。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドはDNAである。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、細胞傷害性受容体複合体の発現のために少なくとも1つの調節エレメントに作動可能に連結される。

20

【0544】

さらに、いくつかの実施形態によれば、本明細書において提供されるポリヌクレオチドのいずれかをコードするポリヌクレオチドを含むベクターが提供され、細胞傷害性受容体複合体の発現のために、ポリヌクレオチドが少なくとも1つの調節エレメントに作動可能に連結されてもよいベクターが提供される。いくつかの実施形態では、ベクターはレトロウイルスである。

【0545】

さらに、本明細書では、本明細書に開示されるポリヌクレオチド、ベクター、または細胞傷害性受容体複合体を含む、操作された免疫細胞(例えば、NKおよび／またはT細胞)が提供される。さらに、本明細書では、操作された免疫細胞(例えば、NK細胞および／または操作されたT細胞)の混合物を含む組成物が提供され、各集団は、本明細書に開示されるポリヌクレオチド、ベクター、または細胞傷害性受容体複合体を含む。さらに、本明細書には、操作された免疫細胞(例えば、NK細胞および／または遺伝子操作されたT細胞)の混合物を含む組成物が提供され、各集団は、本明細書において開示されるポリヌクレオチド、ベクター、または細胞傷害性受容体複合体を含み、T細胞集団は、g ν H Dおよび／またはH ν Dを減少／除去するために遺伝子修飾されている。一部の実施形態では、NK細胞およびT細胞は、同じドナー由来である。一部の実施形態では、NK細胞およびT細胞は、異なるドナー由来である。

30

【0546】

NK細胞および／またはT細胞などの免疫細胞の用量は、所定の対象について、それらの体重、疾患タイプおよび状態、ならびに処置の所望の攻撃性に基づいて容易に決定することができるが、実施形態に応じて、約 10^5 細胞/kg～約 10^{12} 細胞/kg(例えば、 10^5 ～ 10^7 、 10^7 ～ 10^{10} 、 10^{10} ～ 10^{12} 、およびその中の重複範囲)の範囲である。一実施形態では、用量漸増レジメンが使用される。いくつかの実施形態では、様々なNK細胞が、例えば、約 1×10^6 細胞/kg～約 1×10^8 細胞/kgの間で投与される。実施形態に応じて、種々のタイプのがんまたは感染症を処置することができる。

40

【0547】

がんの種類

50

10

30

40

50

e u 5 A c (2 - 3) b D C l a l p (1 - 4) b D G l c p (1 - 1) C e r) ; トランスグルタミナーゼ 5 (T G S 5) ; 高分子量 - 黒色腫関連抗原 (H M W M A A) ; o - アセチル - G D 2 ガングリオシド (O A c G D 2) ; 腫瘍内皮マーカー 1 (T E M 1 / C D 2 4 8) ; 腫瘍内皮マーカー 7 関連 (T E M 7 R) ; クラウジン 6 (C L D N 6) ; 甲状腺刺激ホルモン受容体 (T S H R) ; 染色体 X オープンリーディングフレーム 6 1 (C X O R F 6 1) ; C D 9 7 ; C D 1 7 9 a ; 未分化リンパ腫キナーゼ (A L K) ; ポリシアル酸 ; 胎盤特異的 1 (P L A C 1) ; g l o b o H グリコセラミド (G l o b o H) の六糖部分 ; 乳腺分化抗原 (N Y - B R - 1) ; ウロプラキン 2 (U P K 2) ; A 型肝炎ウイルス細胞受容体 1 (H A V C R 1) ; アドレナリン受容体ベータ 3 (A D R B 3) ; パネキシン 3 (P A N X 3) ; G タンパク質共役型受容体 2 0 (G P R 2 0) ; リンパ球抗原 6 複合体、遺伝子座 K 9 (L Y 6 K) ; 嗅覚受容体 5 1 E 2 (O R 5 1 E 2) ; T C R ガンマ代替リーディングフレームタンパク質 (T A R P) ; ウィルムス腫瘍タンパク質 (W T 1) ; がん / 精巣抗原 1 (N Y - E S O - 1) ; がん / 精巣抗原 2 (L A G E - 1 a) ; 黒色腫関連抗原 1 (M A G E - A 1) ; 染色体 1 2 p にある E T S 転座変異遺伝子 6 (E T V 6 - A M L) ; 精子タンパク質 1 7 (S P A 1 7) ; X 抗原ファミリー、メンバー 1 A (X A G E 1) ; アンジオポエチン結合細胞表面受容体 2 (T i e 2) ; 黒色腫がん精巣抗原 - 1 (M A D - C T - 1) ; 黒色腫がん精巣抗原 - 2 (M A D - C T - 2) ; F o s 関連抗原 1 ; 腫瘍タンパク質 p 5 3 (p 5 3) ; p 5 3 突然変異体 ; プロスタイン ; スルビビン ; テロメラゼ ; 前立腺がん腫瘍抗原 - 1 (P C T A - 1 またはガレクチン 8) 、 T 細胞によって認識される黒色腫抗原 1 (M e l a n A または M A R T I) ; ラット肉腫 (R a s) 突然変異体 ; ヒトテロメラゼ ; 逆転写酵素 (h T E R T) ; 肉腫転座ブレークポイント ; アポトーシスの黒色腫阻害剤 (M L - I A P) ; E R G (膜貫通プロテアーゼ、セリン 2 (T M P R S S 2) E T S 融合遺伝子) ; N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ V (N A 1 7) ; ペアードボックスプロテイン P a x - 3 (P A X 3) ; アンドロゲン受容体 ; サイクリン B 1 ; v - m y c トリ骨髄球腫症ウイルス発がん遺伝子神経芽細胞腫由来ホモログ (M Y C N) ; R a s ホモログファミリーメンバー C (R h o C) ; チロシナーゼ関連タンパク質 2 (T R P - 2) ; シトクロム P 4 5 0 I B 1 (C Y P I B 1) ; C C C T C 結合因子 (亜鉛フィンガータンパク質) 様 (B O R I S またはインプリント部位の調節因子の兄弟) 、 T 細胞によって認識される扁平上皮がん抗原 3 (S A R T 3) ; ペアードボックスプロテイン P a x - 5 (P A X 5) ; プロアクロシン結合タンパク質 s p 3 2 (O Y - T E S 1) ; リンパ球特異的プロテインチロシンキナーゼ (L C K) ; キナーゼアンカータンパク質 4 (A K A P - 4) ; 滑膜肉腫、X ブレークポイント 2 (S S X 2) ; 終末糖化産物の受容体 (R A G E - 1) ; 腎臓ユビキタス 1 (R U 1) ; 腎臓ユビキタス 2 (R U 2) ; レグマイン ; ヒトパピローマウイルス E 6 (H P V E 6) ; ヒトパピローマウイルス E 7 (H P V E 7) ; 腸カルボキシルエステラーゼ ; 熱ショックタンパク質 7 0 - 2 突然変異型 (m u t h s p 7 0 - 2) ; C D 7 9 a ; C D 7 9 b ; C D 7 2 ; 白血球関連免疫グロブリン様受容体 1 (L A I R 1) ; I g A 受容体の F c 断片 (F C A R または C D 8 9) ; 白血球免疫グロブリン様受容体サブファミリー A メンバー 2 (L I L R A 2) ; C D 3 0 0 分子様ファミリーメンバー f (C D 3 0 0 L F) ; C 型レクチンドメインファミリー 1 2 メンバー A (C L E C 1 2 A) ; 骨髄間質細胞抗原 2 (B S T 2) ; E G F 様モジュール含有ムチン様ホルモン受容体様 2 (E M R 2) ; リンパ球抗原 7 5 (L Y 7 5) ; グリピカン - 3 (G P C 3) ; F c 受容体様 5 (F C R L 5) ; および免疫グロブリンラムダ様ポリペプチド 1 (I G L L 1) 、 M P L 、 ビオチン、 c - M Y C エピトープタグ、 C D 3 4 、 L A M P 1 T R O P 2 、 G F R アルファ 4 、 C D H 1 7 、 C D H 6 、 N Y B R 1 、 C D H 1 9 、 C D 2 0 0 R 、 S l e a (C A 1 9 . 9 ; シアリルルイス抗原) ; フコシル - G M 1 、 P T K 7 、 g p N M B 、 C D H 1 - C D 3 2 4 、 C D 2 7 6 / B 7 H 3 、 I L 1 1 R a 、 I L 1 3 R a 2 、 C D 1 7 9 b - I G L L L 、 T C R ガンマ - デルタ、 N K G 2 D 、 C D 3 2 (F C G R 2 A) 、 T n a g 、 T i m l - / H V C R 1 、 C S F 2 R A (G M - C S F R - アルファ) 、 T G F ベータ R 2 、 L e w s A g 、 T C R - ベータ鎖、 T C R - ベータ 2 鎖、

10

20

30

40

50

TCR-ガンマ鎖、TCR-デルタ鎖、FITC、黄体形成ホルモン受容体（LHR）、卵胞刺激ホルモン受容体（FSHR）、ゴナドトロピンホルモン受容体（CGHRまたはGR）、CCR4、GD3、SLAMF6、SLAMF4、HIV1エンベロープ糖タンパク質、HTLV1-Tax、CMV pp65、EBV-EBNA3c、KSHV K8.1、KSHV-gH、インフルエンザA血球凝集素（HA）、GAD、PDL1、グアニリルシクラーゼC（GCC）、デスモグレイン3（Dsg3）に対する自己抗体、デスモグレイン1（Dsg1）に対する自己抗体、HLA、HLA-A、HLA-A2、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ、HLA-DR、HLA-G、IgE、CD99、Ras G12V、組織因子1（TF1）、AFP、GPRC5D、Claudin18.2（CLD18A2またはCLDN18A.2）、P-糖タンパク質、STEAP1、Livl、Nectin-4、Cripto、gpA33、BST1/CD157、低コンダクタンスクロライドチャネル、およびTNT抗体によって認識される抗原。

10

【実施例】

【0549】

以下は、下記に開示される実施例において使用された実験方法および材料の非限定的な記載である。

【0550】

【実施例1】

細胞機能を改変するための免疫細胞の遺伝子編集

20

本明細書に開示される種々の実施形態をさらに構築するために、異なる経路を介してNK機能を媒介するいくつかの遺伝子を選択して、遺伝子編集技術を介してそれらの発現を減少／排除する影響を評価した。これらの初期標的は、操作されたNK細胞、操作されたT細胞、またはそれらの組み合わせを利用するか否かにかかわらず、免疫細胞媒介性免疫療法の1つ以上の側面を増大させるために、本明細書に開示される実施形態に従って編集することができる遺伝子タイプの非限定的な例を表す。腫瘍微小環境（TME）は、名称から示唆されるように、腫瘍の周囲の環境であり、周囲の血管および毛細血管、その領域を循環するかまたはそれに保持される免疫細胞、線維芽細胞、腫瘍細胞、免疫細胞またはその領域の他の細胞によって関連する種々のシグナル伝達分子、ならびに周囲の細胞外マトリックスが含まれる。TMEの修飾を含む、宿主免疫細胞による検出および／または破壊を回避するために、種々の機構が腫瘍によって使用される。腫瘍は、細胞外シグナルを放出し、腫瘍血管新生を促進し、またはさらに免疫寛容を誘導することによって、一部には、TMEにおける免疫細胞の侵入を制限し、および／またはTMEにおける免疫細胞の増殖／拡大を制限することによって、TMEを変化させ得る。腫瘍はまた、ECMを修飾することができ、新たな部位への腫瘍の血液溢出を発生させることができる。形質転換増殖因子ベータ（TGFb）は、炎症を減少させ、自己免疫を防御する場合に有益な効果を有する。しかしながら、抗腫瘍免疫応答を阻害するように機能することも可能であり、したがって、TGFbの発現の上方制御は、腫瘍の進行および転移に関係していると考えられている。TGFbシグナル伝達は、NK細胞によって発現されるTGFb受容体、例えば、TGFb受容体アイソフォームII（TGFB R2）と相互作用することによって、NK細胞の細胞傷害性機能を阻害することができる。本明細書に開示されるいくつかの実施形態に従って、遺伝子編集を介するTGFB R2の発現の減少または排除（例えば、TGFB R2ガイドRNAによってガイドされるCRISPR/Cas9による）は、NK細胞におけるTGFbの阻害効果を中断する。

30

40

【0551】

上記で検討したように、CRISPR/Cas9システムを用いて、NK細胞によるTGFB R2の発現を特異的に標的化し、減少させた。以下に要約するガイドRNAの種々の非限定的な例を試験した。

50

【表 2】

表 2: TGFb 受容体 2 型アイソフォームガイド RNA

配列番号	名称	配列	標的
147	TGFBR2-1	CCCCTACCATGACTTTATTC	エクソン 4
148	TGFBR2-2	ATTGCACTCATCAGAGCTAC	エクソン 4
149	TGFBR2-3	AGTCATGGTAGGGGAGCTTG	エクソン 4
150	TGFBR2-4	TGCTGGCGATACGCGTCCAC	エクソン 1
151	TGFBR2-5	GTGAGCAATCCCCCGGGCGA	エクソン 4
152	TGFBR2-6	AACGTGCGGTGGGATCGTGC	エクソン 1

10

【0552】

簡単に説明すると、凍結保存された精製 NK 細胞を 0 日目に解凍し、CRISPr/Cas9 および 1 つの（または 2 つの）ガイド RNA（確立された市販のトランスフェクションガイドラインを用いて）によるエレクトロポレーションに供し、次に、400 IU/ml の IL-2 培地中で 1 日間培養し、続いて、フィーダー細胞（例えば、4-1BBL および／または mbIL15 を発現する修飾された K562 細胞）を用いて 400 IU/ml の IL-2 培養を行った。7 日目に、ノックアウト効率を決定し、NK 細胞に、NK19-1 CAR コンストラクトをコードするウイルス（CAR の非限定的な例として）を用いて形質導入した。14 日目に、ノックアウト効率をフローサイトメトリーまたは他の手段によって決定し、得られた NK 細胞の細胞傷害性を評価した。

20

【0553】

TGFBR2 発現のフローサイトメトリー分析を図 9A～9G に示す。図 9A は、NK 細胞を模擬 CRISPr/Cas9 遺伝子編集条件（ナンセンスまたは欠損ガイド RNA）に曝露した対照データを示す。示されるように、NK 細胞の約 21% は、TGFBR2 発現に対して陽性である。CRISPr/Cas9 装置をガイド RNA 1（配列番号 147）を用いてガイドした場合、TGFBR2 発現は減少しなかった（図 9B を参照されたい）。同様の結果が図 9C および 9D に示され、個々に使用されたガイド RNA 2（配列番号 148）およびガイド RNA 3（配列番号 149）は、TGFBR2 発現に限定的な影響を及ぼした。対照的に、ガイド RNA の組み合わせは、TGFBR2 発現の減少をもたらした。図 9E は、ガイド RNA 1（配列番号 147）とガイド RNA 2（配列番号 148）の組み合わせからの結果を示し、図 9F は、ガイド RNA 1（配列番号 147）とガイド RNA 3（配列番号 149）の組み合わせを使用した後の TGFBR2 の発現を示す。いずれの場合も、ガイド RNA 単独の使用（約 11～12% 発現）と比較して、TGFBR2 発現は約 50% 減少した。図 9G は、ガイド RNA 2（配列番号 148）とガイド RNA 3（配列番号 149）の両方を用いた場合の TGFBR2 発現の顕著な減少を示し、TGFBR2 を発現する NK 細胞はわずか約 1% である。次世代シーケンシングを用いて、フローサイトメトリー発現分析を確認した。これらのデータは、図 10A～10G に示され、図 9A～9G のそれぞれのガイド RNA に対応する。これらのデータは、CRISPr/Cas9 システムとともに使用されるガイド RNA が、NK 細胞上の TGFBR2 などの特定の標的分子の発現を減少させることができることを確認する。いくつかの実施形態によれば、TGFBR2 ガイド RNA 2 とガイド RNA 3 などのガイド RNA の組み合わせは、NK 細胞による TGFBR2 の発現を本質的に排除するために相乗的に協働する。

30

40

【0554】

これらの発現ノックアウト実験に基づき、TGFBR2 ノックアウト NK 細胞の細胞傷害性を阻害する TGFb の能力を評価した。そうするために、NK 細胞は、上記で検討し

50

たように T G F B R 2 遺伝子編集に供され、遺伝子編集装置を用いたエレクトロポレーションの 21 日後に、得られた細胞の細胞傷害性を、1 : 1 および 1 : 2 のエフェクター : 標的比で、T G F b の非存在下 (黒丸) または存在下 (20 ng / mL ; 白四角)、R E H 腫瘍細胞に対して評価した。データは、図 1 1 A ~ 1 1 D に要約される。図 1 1 A は、ガイド RNA 1 と 2 の組み合わせに関するデータを示す。T G F b の添加による 1 : 1 と 1 : 2 の両方の比で検出された細胞傷害性パーセントの減少によって証明されるように、これらのデータは、T G F B R 2 の存在 (受容体の発現の限定された減少による) が、T G F b が N K 細胞の細胞傷害性活性を阻害することを可能にするという点で、上記で検討した発現データと一致する。図 1 1 D は、模擬結果を示し、図 1 1 A に示されるものと同様の細胞傷害性パターンを有する。図 1 1 B は、ガイド RNA 1 および 3 を用いて T G F B R 2 発現をノックダウンした場合に、T G F b の存在が N K 細胞の細胞傷害性を 1 : 1 の標的比で減少させた、同様のデータを示す。1 : 2 の標的比では、N K 細胞は、T G F b が存在するか否かにかかわらず、同程度の細胞傷害性を示した (T G F B R 2 ノックダウン N K 細胞単独と比較して減少した)。他の実験条件とは対照的に、および発現データと一致して、図 1 1 C は、ガイド RNA 2 と 3 の両方を用いて C R I S P r で編集された N K 細胞の細胞傷害性を示す。試験した他の N K 細胞の細胞傷害性を減少させる濃度で T G F b が存在するにもかかわらず、遺伝子編集のために本質的に T G F B R 2 発現を欠くこれらの N K 細胞は、細胞傷害性において無視できる低下を示す。これらのデータは、本明細書に開示されるいくつかの実施形態によれば、例えば、免疫細胞活性の負の調節因子の発現を破壊するための遺伝子編集技術の使用は、本明細書に開示される免疫細胞の増大した細胞傷害性および / または持続性をもたらすことを示す。

10

20

【0555】

図 1 2 A ~ 1 2 F は、T G F B R 2 に対する指向性を有するさらなるガイド RNA に関連するフローサイトメトリーデータを提示する (表 2 を参照されたい)。図 1 2 A は、N K 細胞 (例えば、T G F B R 2 を発現しない N K 細胞) による T G F B R 2 の発現の陰性対照評価を示す。図 1 2 B は、C R I S P r / C a s 9 遺伝子編集装置でエレクトロポレーションされなかった N K 細胞についての陽性対照データを示し、したがって、N K 細胞による T G F B R 2 の約 37 % の発現をもたらした。図 1 2 C、1 2 D および 1 2 E は、C R I S P r / C a s 9 編集を受け、それぞれガイド RNA 4 (配列番号 150)、ガイド RNA 5 (配列番号 151)、またはガイド RNA 6 (配列番号 152) によってガイドされた N K 細胞による T G F B R 2 発現を示す。ガイド RNA 4 は、T G F B R 2 発現の中程度のノックダウン (陽性対照と比較して約 10 % 減少) をもたらした。対照的に、ガイド RNA 5 およびガイド RNA 6 は各々、T G F B R 2 発現を有意に減少させ、それぞれ約 33 % および 28 % 減少させた。これらの 2 つの単一ガイド RNA は、ガイド RNA 2 およびガイド RNA 3 (図 1 2 F に示される追加データ) の組み合わせで見られた (上記で検討した) 減少と同等であった。本明細書において検討されるいくつかの実施形態に従って、操作された免疫細胞は、得られた免疫細胞が、操作された細胞に増大した細胞傷害性を付与するキメラコンストラクトを発現するように操作されるように遺伝子編集に供さる。さらに、このような細胞は、例えば、免疫細胞の活性または持続性を減少させるように機能する阻害経路の少なくとも一部を破壊することによって、免疫細胞を脱阻害するように遺伝子修飾される。本明細書において検討されるように、細胞傷害性コンストラクトの遺伝子編集および発現が適合性であることを確認するために、C D 19 を標的化するキメラ抗原受容体コンストラクト (ここでは N K 19 - 1 として特定される) の非限定的な例の発現を、遺伝子編集後に T G F B R 2 発現をノックダウンするために評価した。これらのデータを図 1 3 A ~ 1 3 F に示す。

30

40

【0556】

図 1 3 A は、抗 C D 19 指向性 C A R (N K 19 - 1) の非限定的な例の発現の陰性対照評価を示す。ここでは、N K 細胞は、N K 19 - 1 コンストラクトで形質導入されなかった。対照的に、図 1 3 B は、エレクトロポレートされていない N K 細胞 (C R I S P r 遺伝子編集プロトコルを介する処理の欠如を説明するための対照として) による N K 19

50

ー1の陽性対照発現を示す。図13Cは、CRISPR/Cas9およびガイドRNA4の使用を介してTGFB β 2ノックダウンを受けたNK細胞によるNK19-1の発現を示す。示されるように、CRISPRによる遺伝子編集後には、NK19-1発現の見掛けの減少のみがある。いくつかの実施形態によれば、ガイドRNAおよび／または遺伝子編集のメカニズム（例えば、CRISPR対TALEN）に応じて、CAR発現のわずかな変化が減少および／または排除される。これは、例えば、図13Dに見ることができ、ガイドRNA5の使用は、NK細胞によるNK19-1発現のさらにより小さな変化をもたらした。図13Eおよび13Fは、ガイドRNA6単独、ならびにガイドRNA2+3に関するデータを示す（それぞれ）。総合すると、これらのデータは、本明細書に開示されるいくつかの実施形態に従って使用される2つのアプローチ、すなわち、キメラ受容体の発現を誘導する遺伝子編集および遺伝子修飾は、免疫細胞を編集して、免疫細胞機能の負の調節因子の発現を減少／除去するプロセスが、キメラ受容体コンストラクトのロバストな発現を妨げないという点で、互いに適合性であることを示す。実際、いくつかの実施形態では、免疫細胞の遺伝子編集および操作は、より効果的で、強力であり、および／またはより長く持続する細胞傷害性免疫細胞をもたらす。

10

20

30

40

50

【0557】

図14A～14Dは、遺伝子編集（例えば、遺伝子ノックアウト）および／または遺伝子操作（例えば、CAR発現）に供されるNK細胞の細胞傷害性の評価の方法および結果、ならびにそれらのそれぞれの対照を示す。最初に図14Dから開始して、0日目に、NK細胞は、指示されたガイドRNAの1つ（またはそれらの組み合わせ）とともに、遺伝子編集のためのCRISPR/Cas9成分を用いてエレクトロポレーションに供された。NK細胞を1日間、高IL2培地で培養し、続いて、低IL2およびフィーダー細胞（上記で検討される）を用いてさらに6日間培養した。7日目に、NK細胞は示された抗CD19 CARウイルスで形質導入された。7日後、20ng/mLのTGFB β の存在下でIncucyte細胞傷害性アッセイを行った。上記で検討したように、TGFB β は、腫瘍を排除する際の免疫細胞の有効性を減少させる試みにおいて、腫瘍細胞から放出され、インビボ（*in vivo*）で腫瘍微小環境に浸透する強力な免疫抑制因子である。結果を図14Aに示す。上のトレースで示されるように、NaLm6細胞は、単独で増殖し、実験期間中、ロバストに拡大する。エレクトロポレートされていないNK細胞（遺伝子編集またはCAR発現なし；UN-EP NK）は、NaLm6拡大の減少を引き起こした。NaLm6増殖を減少したのは、なおさらに、遺伝子編集と操作されたCAR発現（TGFB β 2 CAR19およびTGFB β 6 CAR19）の両方を受けたNK細胞であった。これらの結果は、最初に、これらの2つの技術（例えば、編集および操作）が互いに適合性であり、得られた免疫細胞において、特に、TGFB β のような腫瘍微小環境における免疫抑制因子に対する細胞内の抵抗性を生じさせることによって、細胞傷害性が増大し得ることを示す。エレクトロポレーションを受けたが、CAR（EP NK）を発現するように操作されなかったNK細胞は、NaLm6増殖を減少させた。しかしながら、最も注目すべきは、CAR19-1を発現するように操作されたNK細胞の使用（CARの非限定的な例として）に起因するNaLm6拡大の劇的な阻害であり、NK細胞はまた、ガイドRNA2とガイドRNA3（TGFB β 2+3 CAR19）の組み合わせ、または単一ガイドRNA、ガイドRNA5（TGFB β 5 CAR19）の使用のいずれかを介して、TGFB β 2発現のノックアウトを受けた。これらのデータは、本明細書に開示されたいくつかの実施形態によれば、免疫細胞の細胞傷害性のロバストな増大は、阻害経路の減少（例えば、遺伝子編集を介した免疫細胞上のTGFB β 2のノックアウトによるTGFB β の阻害効果の減少）と細胞傷害性シグナル伝達複合体の導入（例えば、CARを発現するための細胞の操作を介した）の相乗的な組み合わせによって実現することができることをさらに証明する。図14Bおよび14Cは、それぞれ、図14Aからの対照データおよび選択されたデータを示す。図14Bは、NaLm6細胞単独に対して試験された全てのコンストラクトの有意な細胞傷害効果を示す（例えば、腫瘍微小環境の免疫抑制効果を再現しない）。試験した各コンストラクトは、腫瘍細

胞増殖を効果的に排除した。図14Cにおいて、腫瘍微小環境を再現するために、 20 ng/mL のTGF- β の存在下で腫瘍チャレンジ実験を行った。図14Cは、TGF β 2受容体をノックアウトするための遺伝子編集の効果をより明確に示すために、14Aから選択されたデータである。NK19-1を発現するように操作された細胞(CARの非限定的な例として)は、対照と比較して腫瘍増殖を減少させる能力を示した。しかしながら、NK19-1を発現し、操作されたNK細胞(CRISPR/Cas9遺伝子編集およびガイドRNAの非限定的な例の使用を介して)は、腫瘍細胞の増殖においてさらにより有意な減少を示した。したがって、いくつかの実施形態によれば、図14A(および14C)に示されるような結果をもたらす、これらの遺伝子編集技術は、免疫抑制性腫瘍微小環境においてさえ、NK細胞の細胞傷害性を増大させるために使用され得る。いくつかの実施形態では、類似の技術をT細胞に使用することができる。さらに、いくつかの実施形態では、類似のアプローチがNK細胞とT細胞の両方で使用される。さらに、さらなる実施形態では、遺伝子編集を用いて、NK細胞、T細胞、または他のいずれの細胞であれ、編集された細胞に、腫瘍微小環境において見出される1つ以上の免疫抑制因子に対する耐性を生じさせる。

10

【0558】

修飾された免疫細胞がそれらの増加した細胞傷害活性を発揮する潜在的メカニズムを評価するために、試験された細胞の各タイプのサイトカイン放出プロファイルを評価し、データを図15A~15Dに示した。簡単に説明すると、各NK細胞群は、細胞傷害性アッセイ開始の一晩前に 20 ng/mL の濃度でTGF β 1で処理された。NK細胞を洗浄して、NaIm6腫瘍細胞とともにNK細胞を共培養する前に、TGF β を除去した。NK細胞を、1:1のE:T比(2×10^4 エフェクター: 2×10^4 標的細胞)で核赤色蛍光タンパク質(NaIm6-NR)を発現するNaIm6腫瘍細胞と共培養した。サイトカインは、Luminesxアッセイによって測定された。図15Aに示されるように、遺伝子編集によってTGF β 2発現が減少した場合、IFN γ の放出が中程度に増加した(例えば、「TGF β 2+3 NaIm6 NR」のヒストグラムバーを参照されたい)。抗CD19 CARの導入は、IFN γ 産生(EP+NK19-1 NaIm6-NR)の実質的な増加を誘導した。しかしながら、最も顕著には、抗CD19 CAR発現と組み合わせてCRISPR/Cas9を介したTGF β 2発現のノックダウンを導くための、単一のガイドRNAまたはガイドRNAの組み合わせのいずれかの使用を表す、図15Aに示される最後の4つのグループ(破線ボックスを参照されたい)である。これらの増加した量のIFN γ の放出は、少なくとも部分的には、これらの二重に修飾された免疫細胞を用いて見られる増大した細胞傷害性に関与する。IFN γ と同様に、GM-CSF放出はこれらの群において有意に増大した。GM-CSFは、骨髄細胞の分化を促進することができ、また、免疫刺激アジュバントとしても作用することができるため、放出の増加は、これらの細胞で見られる細胞傷害性の増加において役割を果たす可能性がある。同様のパターンは、グランザイムB(NK細胞によって放出される強力な細胞傷害性タンパク質)およびTNF α (別の強力なサイトカイン)の放出を評価する場合に見られる。これらのデータは、種々のサイトカインの放出の増加が、本明細書に開示されたいいくつかの実施形態に従って、腫瘍微小環境に見られる免疫抑制効果に抵抗する遺伝子編集助剤として、遺伝子編集および遺伝子修飾された免疫細胞で見られる細胞傷害性の実質的な増加を引き起こすのに役割を果たすことをさらに証明する。

20

30

40

【0559】

さらなる実施形態に従って、免疫細胞上の受容体、経路またはタンパク質の発現の破壊または排除は、標的がん細胞に対する免疫細胞の増大した活性(例えば、細胞傷害性、持続性など)をもたらすことができる。いくつかの実施形態では、これは、免疫細胞の脱阻害から生じる。ナチュラルキラー細胞は、種々の受容体、特に受容体のナチュラルキラーグループ2ファミリー内の受容体を発現する。本明細書に開示されるいくつかの実施形態に従う1つのこのような受容体であるNKG2D受容体を使用して、NK細胞によって発現され、このようなNK細胞の増大した抗がん活性をもたらす細胞傷害性シグナル伝達コ

50

ンストラクトを生成させる。さらに、NK細胞は阻害受容体であるNKG2A受容体を発現する。腫瘍が免疫細胞に対して抵抗性を発現する1つの機序は、ペプチド負荷されたHLAクラスI分子（HLA-E）の発現を介するものであり、HLA-EとNKG2A受容体とのライゲーションを介してNK細胞の活性を抑制する。したがって、1つのアプローチは、HLA-Eと、NK細胞上の発現されたNKG2A受容体との相互作用を遮断することであるが、本明細書に開示されるいくつかの実施形態によれば、NKG2Aの発現は破壊され、これは阻害経路を破綻させ、NK細胞の細胞傷害性の増大を可能にする。

【0560】

図16A～16Dは、NK細胞によるNKG2A発現の発現破壊に関連するデータを示す。TGFB β 2に関して上記で検討したように、CRISPR/Cas9を用いて、下記の表3に示されるガイドRNAの非限定的な例を用いて、NKG2A発現を破壊した。

【表3】

表3: NKG2A ガイド RNA

配列番号	名称	配列	標的
158	NKG2A-1	GGAGCTGATGGTAAATCTGC	エクソン 4
159	NKG2A-2	TTGAAGGTTTAATTCCGCAT	エクソン 3
160	NKG2A-3	AACAACATATCGTTACCACAG	エクソン 4

【0561】

図16Aは、NK細胞による対照NKG2A発現を示し、NK細胞の約70%がNKG2Aを発現する。図16Bは、NKG2A発現の有意な減少が達成され得ることを示し、ガイドRNA1の使用によりNKG2A発現の50%以上が減少する。図16Cは、ガイドRNA2を用いたNKG2A発現のより緩やかな減少を示し、このNK細胞の30%弱がNKG2Aを発現する。図16Dは、ガイドRNA3の使用が、NK細胞によるNKG2A発現の最もロバストな破壊を提供することを示し、NK細胞のわずか約12%がNKG2Aを発現する。

【0562】

図17Aは、遺伝子編集装置を用いたエレクトロポレーションの7日後におけるReh腫瘍細胞に対するNKG2A発現の減少したNK細胞に関連する細胞傷害性データの要約を示す。NK細胞を2:1のE:Tおよび1:1のE:T比の両方で試験した。1:1のE:Tでは、遺伝子編集されたNK細胞型の各々は、模擬NK細胞よりも強い程度の細胞傷害性を誘導した。ガイドRNA1およびガイドRNA2で処理されたNK細胞を用いて検出された改善された細胞傷害性は、模擬と比較してわずかに増大した。NK細胞上のNKG2A発現の最大の破壊を誘導したガイドRNAはまた、模擬に比べて細胞傷害性の最大の増加をもたらした（1:1のNKG2A-gRNA3を参照されたい）。2:1の比で、修飾されたNK細胞型の各々は、模擬NK細胞を有意に上回った。より低い比と同様に、CRISPR/Cas9を標的化するためにガイドRNA3を用いて編集されたNK細胞は、細胞傷害性の最もロバストな増加を示し、NKG2A発現破壊の程度と逆の関係を示した。上記で検討したように、腫瘍細胞上のHLA-EとNK細胞上のNKG2Aとの相互作用は、介入なしに、NK細胞活性を阻害し得る。図17Bは、Reh腫瘍細胞が実際にHLA-E分子を発現し、したがって、NK細胞上のNKG2A発現を破壊する遺伝子編集の非存在下では、NK細胞シグナル伝達を阻害することが予想されることを確認する（図17Aの模擬NK細胞群で見られるように）。

【0563】

HLA-E/NKG2A相互作用の破壊は、NK細胞の細胞傷害性に明確なプラスの影響を与えたが、免疫細胞シグナル伝達に影響を与える可能性のある他の経路を調査した。このような一例がCIS/CISH経路である。サイトカイン誘導性SH2含有タンパク

質（CISH）は、NK細胞におけるIL-15シグナル伝達の負の調節因子であり、ヒトにおいてはCISH遺伝子によってコードされる。IL-15シグナル伝達は、NK細胞の拡大、生存、細胞傷害性およびサイトカイン産生にプラスの影響を及ぼすことができる。したがって、CISHの破壊は、NK細胞をIL-15に対して感受性をより高くし、それによってそれらの抗腫瘍効果を増加させることができた。

【0564】

上記で検討したように、CRISPR/Cas9は、CISHの発現を破壊するために使用されたが、さらなる実施形態では、他の遺伝子編集アプローチを使用することができる。CISH標的化ガイドRNAの非限定的な例を下記の表4に示す。

【表4】

表4: CISH ガイド RNA

配列番号	名称	配列	標的
153	CISH-1	CTCACCAGATTCCCGAAGGT	エクソン2
154	CISH-2	CCGCCTTGTCATCAACCGTC	エクソン3
155	CISH-3	TCTGCGTTTCAGGGGTAAGCG	エクソン1
156	CISH-4	GCGCTTACCCCTGAACGCAG	エクソン1
157	CISH-5	CGCAGAGGACCATGTCCCCG	エクソン1

【0565】

NKG2AノックアウトNK細胞と同様に、CISHノックアウト（ガイドRNA1またはガイドRNA2を用いて（CISH-3-5についてデータは示さない））遺伝子編集されたNK細胞に、遺伝子編集装置でエレクトロポレートした7日後に、1：1および2：1のE：T比でReh腫瘍細胞を用いてチャレンジを行った。図18は、模擬NK細胞は、1：1でReh細胞に対して50%を超える細胞傷害性を示したが、遺伝子編集されたNK細胞群の各々は、ほぼ20%の改善された細胞傷害性を示し、Reh細胞に対して平均約70%の細胞傷害性を示した。増大した細胞傷害性は2：1の比でさらに顕著であった。模擬NK細胞はReh細胞の約65%を死滅させたが、CISHガイドRNA2で編集されたNK細胞はReh細胞の約85%を死滅させ、CISHガイドRNA1で編集されたNK細胞はReh細胞の90%超を死滅させた。これらのデータは、CISHノックアウトが、上記で検討されたような他のプラス効果の中でも、NK細胞の細胞傷害性にプラスの影響を及ぼすことを明確に示す。

【0566】

上記される実験と同様に、次に、CISH発現のノックダウンが、例えば、CAR（ここでは、抗CD19 CAR、CAR19-1）の非限定的な例を用いて形質導入することによって、NK細胞をさらに修飾する能力に悪影響を及ぼすかどうかを評価した。これらのデータを図19A～19Dに示す。図19Aは、CD19 CARの発現（その欠如）についての陰性対照データを示す（使用されるCAR19-1コンストラクトに含まれるFlagタグの検出に基づくが、いくつかの実施形態はFlagまたは他のタグを採用しない）。図19Bは、CISHガイドRNAによって標的化された遺伝子編集にあらかじめ供されたNK細胞によるCD19-1 CARのロバストな発現を示す。図19Cは、CISHガイドRNAによる遺伝子編集標的化を以前に受けたNK細胞についての同様のデータを示す。図19Dは、遺伝子編集エレクトロポレーションプロトコルに曝露されたが、実際の遺伝子編集を伴わないNK細胞のさらなる対照データを示し、したがって、遺伝子編集プロトコル自体が、CARをコードするウイルスコンストラクトを用いたNK細胞のその後の形質導入に悪影響を及ぼさないことを示す。図20Cは、CISH遺伝子編集が行われた後、CISタンパク質（CISHによってコードされる）の発現が

ないことを確認するウエスタンブロットを示す。したがって、一部の実施形態によれば、NK細胞（またはT細胞）はともに、IL15媒介性シグナル伝達を介して1つ以上のNK細胞（T細胞）特徴を増大させるために、例えば、CISH発現をノックアウトするように編集され、また、抗腫瘍CARを発現するように操作される。いくつかの実施形態では、操作および編集は、NK細胞機能（例えば、拡大、細胞傷害性、および／または持続性）に対して相乗的な増大をもたらす。

【0567】

NK細胞は、CISH発現を減少させるために遺伝子編集され得、また、その後、CARを発現するように操作することができることを確立したため、このような二重に修飾されたNK細胞の細胞傷害性を試験した。図20Aは、指示されたNK細胞型に1:2の比率でNaIm6細胞を用いてチャレンジを行った、Incucyte細胞傷害性アッセイの結果を示す。実験タイムラインに関して、0日目に、NK細胞を、上記で検討したように、CRISPR/Cas9および種々のCISHガイドRNAを用いてエレクトロポレーションに供した。NK細胞を高IL-2培地中で1日間培養し、次に低IL-2培地に移動させ、それらを拡大のために4-1BBおよび膜結合IL15を発現するように修飾されたK562細胞とともに共培養した。7日目に、NK細胞に、CAR19-1ウイルスコンストラクトを用いて形質導入し、さらに7日間培養し、14日目にIncucyte細胞傷害性アッセイを行った。

【0568】

図20Aに見られるように、エレクトロポレートされたNK細胞とエレクトロポレートされていないNK細胞（それぞれ、EP NK、UEP NK）はいずれも、NaIm6増殖の見掛けの減少を示した。遺伝子編集されたNK細胞を評価する場合、CISH-1およびCISH-2 NK細胞はいずれもNaIm6増殖の有意な妨げを示した。同様に、エレクトロポレートされたNK細胞とエレクトロポレートされていないNK細胞の両方が、CAR19-1を発現し、NaIm6増殖をさらに減少させた。最も顕著には、CAR19-1を発現する二重に修飾されたCISHノックアウトは、NaIm6細胞増殖の完全な制御／防御を示した。これらの結果は、実施された2つの修飾アプローチ間の相乗的活性を表し、CAR19-1を発現する遺伝子編集されたCISHノックアウトNK細胞は、本明細書に開示される実施形態に従って、ロバストな抗腫瘍活性を示す。

【0569】

これらの腫瘍制御効果は、二重チャレンジモデルでも再現された。この場合、実験タイムラインは、図20Aについて上記される通りであったが、Incucyteアッセイ（ここでは1:1のE:Tで実施）の開始から7日後に、ウェルを洗浄し、追加用量のNaIm6腫瘍細胞（ウェルあたり20K細胞）で再チャレンジを行った。データを図20Bに示す。単一の腫瘍細胞チャレンジと同様に、NaIm6細胞は実験期間を通して拡大を示し、EPおよびUEP NK細胞は、2回目のチャレンジ後に類似した全体的なNaIm6増殖を可能にした。NaIm6腫瘍細胞の2回目のチャレンジでさえ、NK細胞発現CAR19-1コンストラクト（EPCAR19およびUEPCAR19）は、NK細胞単独よりも多くNaIm6増殖を抑制した。興味深いことに、2回目のチャレンジでは、ノックアウトCISH発現のために遺伝子編集されたNK細胞は、CAR19-1を発現する細胞と比較して、NaIm6増殖を抑制する能力が中程度に高いことを示した。上記で検討したように、これはCISHノックアウトにより上方制御される種々の代謝経路を介したシグナル伝達の増大によるものであり得る。注目すべきことに、1回のチャレンジと同様に、CISH発現をノックアウトするように遺伝子編集され、CAR19-1を発現するように操作された二重に修飾されたNK細胞は、NaIm6細胞増殖を抑制する実質的な能力を示した。CISHガイドRNA1およびCISHガイドRNA2処理されたNK細胞は、実験の最終段階まで互いに同等であり、CISHガイドRNA2処理されたNK細胞は、NaIm6細胞数のわずかな増加を可能にした。それにもかかわらず、これらのデータは、二重に修飾されたNK細胞が腫瘍細胞に対して増大した細胞傷害性を有することを示す。上述したように、いくつかの実施形態における操作されたアプローチと組

10

20

30

40

50

み合わせた編集は、NK細胞機能に対する非複製的増大を有利にもたらし、NK細胞の1つ以上の側面（活性化、細胞傷害性、持続性など）を相乗的に増大させることができる。

【0570】

機構的には、理論に拘束されることなく、CISHのノックダウンの二重の修飾およびCAR19-1の発現は、NK細胞がより長い期間生存することを可能にし、したがって、腫瘍細胞に対する持続性が増大するようである。いくつかの実施形態では、これは、少なくとも部分的には、CISHのノックアウトに基づいて、編集された細胞における種々の代謝経路を介するシグナル伝達の増大に起因する。この分析のためのデータは、図21Aに示され、細胞数は、培養において74日間にわたって示された群について得られた。試験した8群のうち6群は、培養において約2～3週間から74日の時点まで、NK細胞数の着実な減少を示した。しかしながら、CISH発現をノックダウンし、CAR19-1を発現するために処理されたNK細胞の2つの群は、比較的安定した集団サイズを示した（ただし、24日目に一過性の増加のため）。これらのデータは、二重に修飾されたNK細胞は、1つの様式でのみ修飾された（または修飾されていない）NK細胞よりも良好に生存することができ、部分的に、図20Bに示される二次腫瘍細胞チャレンジのような、より長期の実験にわたってそれらの増大した効力をもたらす可能性があることを示唆する。さらに、図21Bは、対照NaIm6細胞、非修飾NK細胞、CISHノックアウトNK細胞、およびCD19 CARを発現するCISHノックアウトNK細胞についての細胞傷害性データを示す。この実験は、各細胞群を培養において100日間培養した後に行われた。NaIm6細胞のみが予想通り拡大を示した。対照ノックアウトNK細胞（エレクトロポレーションのみを受けた）は、初期段階でNaIm6の拡大を遅延したが、最終的にNaIm6細胞は拡大した。CISHノックアウトNK細胞は良好な抗腫瘍効果を示し、実験の後期段階ではNaIm6数のわずかな増加しか示さなかった。この培養後期におけるNK細胞の細胞傷害性は、対照NK細胞によって許容される増殖を考慮すると予想外である。上記で検討したように、いくつかの実施形態では、CISH発現のノックアウトは、NK（またはT）細胞増殖、細胞傷害性、および／または持続性の増大のうちの1つ以上をもたらす種々のIL15応答性経路を介したより大きなシグナル伝達を可能にする。

10

20

【0571】

これらの二重に修飾された細胞が、有意であり持続的な細胞傷害性を生じるメカニズムをさらに研究して、各群のサイトカイン放出プロファイルの評価した。これらのデータは、図22A～22Eに示され、CAR19-1を発現するように操作されたNK細胞のそれらの群は、各ヒストグラムの右側部分上の「CAR19」ラインの上に配置されることによって示される。

30

【0572】

図22Aは、CRISPr/Cas9およびガイドRNA1または2（ガイドRNAの非限定的実施形態として）のいずれかの使用を介してCISHをノックアウトした場合、特に増加するIFN γ 産生に関連するデータを示す。さらに興味深いことに、CISHノックアウトとCAR19-1発現の組み合わせは、CISHノックアウトよりもIFN γ 産生がほぼ2.5倍多く、他のいずれの群よりも4～5倍多くなる。TNF α 産生に関して、同様のデータを図22Bに示す。同様に、CISHノックアウト単独、およびCAR19-1を発現するCISH正常NKは、GM-CSFをいくぶん放出するが、二重に修飾されたCISHノックアウトおよびCAR19-1を発現するNK細胞は、GM-CSF放出の顕著な増加を示す。グランザイムB放出プロファイルは、図22Dに示されるように、二重に修飾された細胞が最も多くのサイトカインを放出することを再び示している。興味深いことに、グランザイムBの発現レベルは、CISH 1およびCISH 2 NK細胞群の細胞傷害性プロファイルと相関する。CISH 2 NK群とCISH 2/CAR19群はともに、それらのCISH 1対応物よりもグランザイムBの放出が少なく、図20Bの長期細胞傷害性データに反映されており、CISHの発現減少がグランザイムBの放出と逆相関している可能性があることを示唆する。最後に、図22Eは、

40

50

パーフォリンの放出を示し、全てのNK細胞群について有意に高く、図22A～22Dに見られるのと同じパターンを反映しておらず、パーフォリンは、これらの実施形態では、細胞傷害性を制限するサイトカインではないことを示唆する。しかしながら、これらのデータは、免疫細胞が、遺伝子編集（例えば、免疫細胞により発現される抑制因子の発現を減少させるため、または阻害因子に応答する免疫細胞の能力を減少させるため）と、キメラ細胞傷害性シグナル伝達複合体（例えば、CARを誘導する細胞傷害性など）を発現させるための細胞の操作の組み合わせに供されることを確認する。いくつかの実施形態では、二重に修飾された細胞は、本明細書に開示されるいくつかの態様に従って、よりロバストな（例えば、細胞傷害性誘導性の）サイトカインプロファイルを示し、および／または増加した生存性／持続性を示し、より大きな全体的な抗腫瘍効果を可能にする。いくつかの実施形態では、したがって、免疫細胞の二重修飾は、NK細胞、T細胞、またはそれらの組み合わせを使用するか否かにかかわらず、全体的により有効ながん免疫療法レジームをもたらす。さらに、上記で検討したように、いくつかの実施形態では、二重に修飾された細胞はまた、それらの同種反応性を減少させるために修飾され、それによって、より効果的な同種異系細胞療法レジメンを可能にする。

10

【0573】

CBLBは、T細胞活性化を制限することが公知であるE3ユビキチンリガーゼである。NK細胞によるCBLBの発現の破壊が、操作されたNK細胞からよりロバストな抗腫瘍応答を誘導し得るかどうかを決定するために、上記で検討したように、CRISPR/Cas9を用いて、CBLBの発現を破壊したが、さらなる実施形態では、他の遺伝子編集アプローチを用いることができる。

20

【0574】

CBLB標的化ガイドRNAの非限定的な例を以下の表5に示す。

【表5】

表5: CBLB ガイド RNA

配列番号	名称	配列	標的
164	CBLB-1	TAATCTGGTGGACCTCATGAAGG	エクソン5
165	CBLB-2	TCGGTTGGCAAACGTCGAAAGG	エクソン10
166	CBLB-3	AGCAAGCTGCCGCAGATCGCAGG	エクソン2

30

【0575】

NKG2AおよびCISHノックアウトNK細胞と同様に、CblプロトオンコジーンB（CBLB）ノックアウト（表5に示されるガイドRNA5〔配列番号164、165、166〕を使用する）、およびCISHノックアウト（CISHガイドRNA5〔配列番号157〕を使用する）遺伝子編集されたNK細胞に、遺伝子編集装置でエレクトロポレートした5日後に1：1および2：1のE：T比でReh腫瘍細胞でチャレンジを行った。簡単に説明すると、親NK細胞を、フィーダー細胞とともに低IL-2培地中に7日間維持し、7日目にエレクトロポレートし、7～10日目に高IL-2培地中でインキュベートし、10～12日目に低IL-2培地中でインキュベートし、次に12日目にReh腫瘍チャレンジアッセイに供した（図23C）。図23Aは、模擬NK細胞が1：1の比率でReh細胞に対して約45%の細胞傷害性を示したが、CBLB gRNAノックアウトNK細胞群の各々は、約20%高い細胞傷害性を示し、Reh細胞に対する細胞傷害性が平均約70%であることを示す。2：1の比では、対応する増大した細胞傷害性は1：1比の群と類似し、模擬NK細胞は約60%の細胞傷害性を示し、CBLBノックアウトNK細胞群の各々は、約20%高い細胞傷害性を示し、Reh細胞に対する細胞傷害性が平均80%である。CISH gRNA5ノックアウトNK細胞群はまた、同様の結果を示し、1：1比で約65%、2：1比で約80%であり、上記で検討されたgRNA

40

50

1 および 2 を用いた以前の C I S H ノックアウト実験と一致した。全体として、C B L B ノックアウト NK 細胞における細胞傷害性の増加は、C I S H ノックアウト NK 細胞と比例する。これらのデータは、本明細書に開示されるいくつかの実施形態による C B L B ノックアウトが、NK 細胞の細胞傷害性に対してプラスの影響を有することを示す。いくつかの実施形態では、C I S H ノックアウトと C B L B ノックアウトの組み合わせは、操作された NK 細胞の細胞傷害性をさらに増大させるために使用される。いくつかの実施形態では、C B L B ノックアウト NK 細胞は、サイトカイン刺激に対してより高い応答性を示し、その一部は、それらの増大した細胞傷害性をもたらす。いくつかの実施形態では、C B L B ノックアウトは、I F N - g および T N F - a のようなエフェクターサイトカインの分泌の増加および活性化マーカー C D 6 9 の上方制御をもたらす増加をもたらす。いくつかの実施形態では、C B L B のノックアウトは、C A R を発現するように NK 細胞を操作することとともに使用され、NK 細胞の細胞傷害性および／または持続性のさらなる増大をもたらす。

10

【0576】

別の E 3 ユビキチンリガーゼであるトリパータイトモチーフ含有タンパク質 2 9 (T R I M 2 9) は、NK 細胞機能の負の調節因子である。T R I M 2 9 は、一般的に、休止 NK 細胞によって発現されないが、活性化後（特に、I L - 1 2 / I L - 1 8 刺激によって）容易に上方制御される。上記で検討したように、C R I S P R / C a s 9 はまた、T R I M 2 9 の発現を破壊するために使用されたが、さらなる実施形態では、他の遺伝子編集アプローチを使用することができる。T R I M 2 9 標的化ガイド RNA の非限定的な例を以下の表 6 に示す。

20

【表 6】

表 6: TRIM29 ガイド RNA

配列番号	名称	配列	標的
167	TRIM29-1	GAACGGTAGGTCCCCTCTCGTGG	エクソン 4
168	TRIM29-2	AGCTGCCTTGGACGACGGGCAGG	エクソン 7
169	TRIM29-3	TGAGCCGTAACCTTCATTGAGAGG	エクソン 4

30

【0577】

T R I M 2 9 ノックアウト（表 6 に示される g R N A [配列番号 1 6 7、1 6 7、1 6 9] を用いる）遺伝子編集された NK 細胞に、遺伝子編集装置でエレクトロポレートした 5 日後に、1 : 1 および 2 : 1 の E : T 比で R e h 腫瘍細胞でチャレンジを行った。タイムラインおよび培養パラメータは、C B L B ノックアウトの実施例と同じであった（図 2 3 C）。図 2 3 B は、T R I M 2 9 ノックアウトが、C I S H ノックアウトまたは C B L B ノックアウトと比較して、細胞傷害性の増大に対して幾分ロバストさが劣る影響を有することを示す。T R I M 2 9 g R N A NK 細胞群は各々、模擬細胞よりも R e h 細胞に対する細胞傷害性がわずかに良好であった（1 : 1 比で約 5 0 % 対約 4 5 % の細胞傷害性、および 2 : 1 比で約 7 0 % 対約 6 0 % の細胞傷害性）。比較的に、C I S H g R N A 5 を用いてトランスフェクトされた NK 細胞は、1 : 1 と 2 : 1 の両方の比率で、模擬と T R I M 2 9 ノックアウト NK 細胞の両方と比較して、細胞傷害性を改善した。これらの結果は、T R I M 2 9 のみが、これらの条件下で NK 細胞の細胞傷害性において僅かな効果を有するかまたは効果がないことを示すが、これは、少なくとも部分的には標的細胞型に起因している可能性がある（例えば、T R I M 2 9 発現の変化にตอบสนองして変化した経路は、例えば、C B L B 発現の変化によって変更された経路ほど活性ではない）。さらに、いくつかの実施形態では、NK 細胞を C A R コンストラクト、例えば、C D 1 9 を標的とする C A R で操作し、T R I M 2 9 発現をノックアウトする組み合わせは、NK 細胞の細胞傷害性および／または持続性を有意に増大させる。いくつかの実施形態では、T R I

40

50

M29発現のノックアウトは、NK細胞によるインターフェロン放出を上方制御する。

【0578】

インターロイキン、特にインターロイキン-15は、NK細胞の機能および生存において重要である。サイトカインシグナル伝達タンパク質の抑制因子（SOCS）は、NK細胞によるサイトカイン放出の負の調節因子である。プロテインチロシンホスファターゼCD45は、Srcファミリーキナーゼ活性を介するNK細胞活性の重要な調節因子である。CD45発現は、ITAM特異的NK細胞機能、ならびに脱顆粒、サイトカイン産生、および拡大などのプロセスに関与する。したがって、CD45発現のノックアウトは、効果がより小さいNK細胞をもたらすはずである。上記で検討したように、CRISPR/Cas9が、CD45およびSOCS2の発現を破壊するために使用されたが、さらなる実施形態では、他の遺伝子編集アプローチを使用することができる。CD45およびSOCS2標的化ガイドRNAの非限定的な例を下記の表7に示す。

10

【表7】

表7: CD45 および SOCS2 ガイド RNA

配列番号	名称	配列	標的
170	CD45-1	AGTGCTGGTGTGGGCGCAC	エクソン 25
171	SOCS2-1	GTGAACAGTGCCGTTCCGGGGGG	エクソン 3
172	SOCS2-2	GGCACCAGGTACATTTGTTAATGG	エクソン 3
173	SOCS2-3	TTCGCCAGACGCGCCGCTGCGG	エクソン 2

20

【0579】

サイトカインシグナル伝達2の抑制因子（SOCS2）のノックアウト（表7に示されるgRNA〔配列番号171、172、173〕を用いる）遺伝子編集されたNK細胞を、遺伝子編集装置でエレクトロポレートした7日後に、時間経過の細胞傷害性アッセイにおいて評価した。簡単に説明すると、親NK細胞を、フィーダー細胞とともに低IL-2培地中に7日間維持し、7日目にエレクトロポレートし、7～11日目に高IL-2培地中でインキュベートし、11～14日目に低IL-2培地中でインキュベートし、次に14日目に1：1のE：T比でReh細胞に対するIncucyte細胞傷害性アッセイに供した（図24C）。図23Aは、第1のエレクトロポレーションシステムでエレクトロポレートされたNK細胞を用いた細胞傷害性アッセイの結果を示す。このシステムを用いて、SOCS2 gRNAの各々でトランスフェクトされたNK細胞は、CISH gRNA2 NK細胞群（上記に記載される）と同様の細胞傷害性活性を示した。SOCS2の3つのgRNA曲線を図24Aに重ね合わせる。CD45ノックアウトNK細胞を陰性対照として用いた（上記で検討したように、CD45はNK細胞活性の正の調節因子であるため、CD45ノックアウトは細胞傷害性の減少を示す必要がある）。図23Bは、同じスケジュールに従うが、第2のエレクトロポレーションシステムでエレクトロポレートされたNK細胞を用いた細胞傷害性アッセイの結果を示す。この場合、検討したSOCS2 gRNAのうち、SOCS2 gRNA1はReh細胞に対する細胞傷害性の改善をもたらした。SOCS2 gRNA2および3は、第1のエレクトロポレーションシステムよりも効果が少ないNK細胞を生じさせた。SOCS2 gRNA1ノックアウトNK細胞は、CISH gRNA2ノックアウトNK細胞と比較して、細胞傷害性においてわずかな増大を示した。これらの結果は、いくつかの実施態様によれば、SOCS2のノックアウトは、NK細胞の負の調節を減少させ、細胞傷害性が増大したNK細胞を生じさせることを示す。いくつかの実施形態では、特異的gRNAは、細胞傷害性NK細胞、例えば、SOCS2 gRNA1を増大させるために使用される。いくつかの実施形態では、SOCS2のノックアウトは、CARを発現するようにNK細胞を操作するとともに使用され、NK細胞の細胞傷害性および／または持続性のさらなる増大をもたらす。

30

40

50

【0580】

〔実施例2〕

低免疫治療細胞を生成するためのアプローチ

本明細書において検討されるように、いくつかの実施形態では、混合免疫細胞集団が治療において使用される。いくつかの実施形態では、T細胞とNK細胞の混合物が採用され、各々、腫瘍マーカーを標的化するCARを発現するように操作されてもよいおよび／または内因性遺伝子の発現を減少もしくは改変させるために編集されてもよい。いくつかの実施形態では、免疫細胞集団の一方、または両方（または2種を超える場合はそれより多く）によって発現された内因性マーカーとCARにより標的化されるがんマーカーとの重複またはそれらの間の類似性に起因して編集が必要とされる。このような状況下では、編集は行われず、治療細胞間のフラトリサイドがもたらされることとなった。一部の実施形態では、フラトリサイドは単一の細胞集団内でも同様に起こり得るため、1種の免疫細胞型のみが使用される場合にも編集が必要とされる。

10

【0581】

混合細胞集団内では、自己に関して考えられる場合、T細胞は、NK細胞が阻害受容体と活性化受容体の両方を発現するとしても、NK細胞受容体に対する阻害リガンドとして機能する自己ペプチドとの複合体においてMHC-Iを発現する。これに関して、MHC-I阻害シグナルは、NK細胞の活性化シグナルを圧倒する。したがって、同一のドナーから収集し、その後同一のドナーにデリバリーされるNK細胞とT細胞の混合集団を使用することは、適合性であるべきである。

20

【0582】

対照的に、同種異系の設定では、移植片と宿主T細胞の間で移植片対宿主拒絶が生じ得る。これに関して、宿主T細胞によって提示されたペプチド（宿主「自己」ペプチド）は、移植（操作された）T細胞受容体と相互作用することになり、宿主ペプチドは、移植T細胞に対して非自己となるため、移植T細胞は、宿主T細胞に対して細胞傷害的に作用することになる。本明細書に提供される一部の実施形態に従い、治療T細胞集団（移植細胞）におけるTCR発現／機能を除去する／枯渇させるための遺伝子編集は、宿主T細胞のペプチド提示によるそれらの活性化を妨げることになる。したがって、いくつかの実施形態では、治療T細胞は、TCRをノックアウトするために編集される（「TCR^{KO}」と称される）。逆の見方をすれば、移植T細胞は、編集されなければ、宿主T細胞に対して非自己であるドナーペプチドをMHC-I上に依然として提示し、宿主対移植片の効果をもたらすことになる。しかしながら、本明細書に開示される一部の実施形態に従い、治療T細胞におけるB2M発現を除去する／枯渇させるために遺伝子編集が実施され、治療T細胞による移植ペプチド提示が破壊される。したがって、いくつかの実施形態では、治療T細胞は、B2Mをノックアウトするために編集される（「B2M^{KO}」と称される）。治療T細胞による自己ペプチド提示の喪失によるこのB2Mノックアウトの副作用は、治療T細胞に対する治療NK細胞活性を妨げた以前の阻害シグナルが除去されたことである。したがって、B2Mノックアウトは治療T細胞を宿主T細胞から保護する一方、また、それらを治療NK細胞に対して感受性にする。この新たに生じた治療NK細胞に対する感受性に対峙するために、実験を行って、治療T細胞によるHLA再発現が治療NK細胞の活性に対する抵抗性を与え得るかどうかを決定した。いくつかの実施形態では、HLA-Eは、治療T細胞を保護するために再発現される。いくつかの実施形態では、HLA-Gは、治療T細胞を保護するために再発現される。いくつかの実施形態では、HLA-EおよびGは、治療T細胞を保護するために再発現される。いくつかの実施形態では、ジスルフィドトラップ単鎖三量体（dtSCT）を使用して、HLA-Eおよび／またはHLA-GならびにB2Mを発現させる（概略図として図29Bを参照されたい）。図29Cは、混合集団における種々の操作された／編集された免疫細胞の適合性を評価するための実験設定の概略図を示す。簡単に説明すると、T細胞は、B2Mをノックアウトするために本明細書に開示される実施形態に従って編集される。これらのB2M^{KO}細胞は分割され、その後、さらに編集されて、dtSCT:HLA-G（「B2M-KO__dtSCTG」

30

40

50

と称される)、HLA-E(「B2M-KO__dtSCTE15」と称されるペプチドを接続するための15アミノ酸リンカーを使用する)、HLA-E(「B2M-KO__dtSCTE20」と称されるペプチドを接続するための20アミノ酸リンカーを使用する)、またはtCD47(「B2M-KO__CD47」と称される)によって発現する。これらの得られた細胞群の各々は、その後、遺伝子修飾(B2Mノックアウトおよび種々のペプチドの発現)がどのように機能し細胞型間の免疫適合性を確立したかを評価するために、非限定的な例として、抗CD19 CARを発現するNK細胞と共培養した。

【0583】

種々のNK細胞:T細胞の比を試験し、得られたデータを図30A~30Cに示した。データは、共培養物に存在する生きたT細胞のうちのB2M^{KO} T細胞のパーセンテージとして経時的に表される。6日間共培養を行い、測定は、0、1、2、および6日目に行った。図30Aは、NK細胞:T細胞の比が1:4の場合のデータを示す。非修飾のT細胞とB2M^{KO} T細胞を対照として使用した。図30Aに示されるように、種々の遺伝子修飾および免疫抑制ペプチドの発現が、NK細胞との種々の程度の適合性を与え、HLA-Eの発現がB2M^{KO} T細胞のNK細胞に基づく排除の最も大きな阻害を示し、実際にT細胞のわずかな拡大を経時的に可能にする。1:2のNK細胞:T細胞の比では(図30B)、特にHLA-GおよびtCD47の発現に関してより大きな程度にB2M^{KO} T細胞が排除された。注目すべきことに、HLA-E(15または20アミノ酸リンカーを使用する)は、共培養においてより高い比率のNK細胞が存在したにもかかわらず、共培養中に相対的に一貫したレベルを維持した。図30Cは、共培養において1:1のNK細胞:T細胞の比が使用された場合の生存データを示す。1:2の比と同様に、HLA-Eの発現は、最も高い程度のNK細胞とT細胞の適合性を与え、他のコンストラクトは、実験経過にわたりT細胞数の低減を示した。図31A~31Cは、さらなるドナーに由来する対応するT細胞生存データを示し、これらのデータは、NK細胞との最終的適合性に関してある程度のドナー特異的効果があることを示す。例えば、これらのデータは、1:4のNK細胞:T細胞の比で、HLA-Eを発現するように修飾された細胞でさえも経時的に生存の低下を示し、より高い比率では(図31Bおよび31C)、共培養のより早い時点で修飾されたT細胞数の低減を示したことを示す。

【0584】

理論に拘束されることを望むものではないが、NK細胞によって認識される「自己」同一性を与えるHLA-Eの作用機序は(上で検討したように)、NK細胞の阻害受容体と活性化受容体のバランスによって達成される。NKG2Aは、阻害シグナルを伝達する受容体であるが、NKG2Cは、活性化シグナルを伝達する受容体である。したがって、いくつかの実施形態に従い、NK細胞によるNKG2Aおよび/またはNKG2Cの発現の程度は、NK細胞がT細胞に対して示す活性の程度に影響を与える場合がある(HLA-Eの再発現の非存在下であっても、またはHLA-Eの再発現を伴っても)。この可能性を評価するために、2名のドナーに由来する細胞(1つはHLA-Eベースの保護を有し、図30A~30C、1つはHLA-Eベースの保護の低下を示す、図31A~31C)を、共培養中の種々の点でのNKG2AおよびB2Mの発現の程度について評価した。図33Aは、HLA-Eベースの保護の低下を示すドナー(上の列)およびHLA-Eベースの保護を示すドナー(下の列)について、1:1のNK:T比での共培養0日目のデータを示す。両ドナーに由来するT細胞は、同様のレベルのB2M発現を示した(各ドナー由来の細胞の約60%がB2M陰性であった)が、NKG2A発現には顕著な差が存在した。上のドナー(非HLA-E保護)はNK細胞の約24%がNKG2A陽性であり、下のドナー(HLA-Eベースの保護を示す)はNK細胞の95%超がNKG2Aを発現した。図33Aは、1:4のNK:T比についての6日目のデータを示し、2名のドナー間で同様のパターンのNKG2A発現を示した。しかしながら、対照的に、6日目に存在したB2M^{KO} T細胞の程度は、非HLA-E保護ドナーのちょうど3%を超えたが、HLA-E保護ドナーについて存在するB2M^{KO} T細胞の程度は70%を超えていた。図32Cは、1:2の比についての対応するデータを示し、図32Dは、1:1のNK:T比に

10

20

30

40

50

ついでに対応するデータを示す。より高い比率でも（各「標的」T細胞についてより多くのNK細胞）、NK G2Aの程度がより低いことは、B2M^{KO} T細胞の程度がより低いことに正に相関し、対照的に、NK G2Aの程度がより高いことは、B2M^{KO} T細胞が生存する程度がより高いことに正に相関した。NK G2AがHLA-Eの阻害効果を和らげるとすれば、より高いレベルのNK G2Aを発現するドナーは、一部の実施形態に従い、治療細胞の混合NK/T集団においてHLA-Eを再発現するように修飾されたT細胞のフラトリサイドの低下を示した。

【0585】

T細胞が、混合治療細胞培養においてNK細胞の細胞傷害効果から保護され得る機序をさらに調査するために、単一のドナーに由来するNK細胞およびT細胞を収集し、表現型によって特徴付けした。図34は、形質導入されていない場合（上の列）と、CARの非限定的な実施形態として、抗CD19 CARを発現するよう操作された場合（下の列）のNK細胞の得られた特徴付けを示す。これらのデータは、細胞集団が有意に純粋なNK細胞であり（CD56陽性に基づく）、実験集団について高いパーセンテージのCARを発現するだけでなく、細胞のほぼ80%がNK G2A陽性であることを示す。図35は、T細胞について対応する特徴付けを示す。3つの群のT細胞の各々は、抗CD19 CARを発現するように操作され、T細胞の実質的に純粋な集団であった（CD3/CD56陰性またはCD4/CD8陽性に基づく）。集団の80%超がCD19 CARを発現し、TCRノックアウトの効率は99%以上であった。第1の実験群はB2Mをノックアウトするように編集されなかったが、群2および3は88%の効率的なB2Mノックアウトを示した。最後の実験群は、HLA-Eを再発現するように操作され、細胞の約45%がHLA-E陽性であった。実験群は、抗腫瘍CARを発現するB2M欠損T細胞（HLA-Eを再発現する細胞を含む）が未形質導入NK細胞と適合するかどうか、また、NK/T混合治療集団に関しては、抗腫瘍CARを発現するT細胞（HLA-Eを再発現する細胞を含む）がやはりまた抗腫瘍CAR（適宜、異なる腫瘍標的に対して）を発現するNK細胞と適合するかどうかを決定するのに役立つように設計した。

【0586】

図36A~36Fは、NK細胞（非修飾）を抗CD19 CARを発現するT細胞と共培養したデータを示し、これらは、TCR/B2Mノックアウト（「TX19.TCR^{KO}.B2M^{KO}」）または再発現されたHLA-Eを伴うTCR/B2M（「TX19.TCR^{KO}.B2M^{KO}.dtSCTE」）のいずれかである。NK細胞：T細胞の比は（それぞれ、A~F）、0:1、1:4、1:2、1:1、2:1、および4:1である。共培養は14日間行い、培養中に存在するB2M^{KO} T細胞のパーセンテージ（生きたT細胞のうち）を指示された時点で評価し、HLA-Eを再発現するデータ点を逆三角形によって示した。図36Aは、陽性対照データを示し、これは、NK細胞が全く存在しない指示されたT細胞の培養を表す。図36Bは、最も低いNK:T比のデータを示す。HLA-E保護されたドナーに関する以前のデータと同様に（相対的に高いNK G2Aを発現する）、T細胞集団は、7日間の共培養でも比較的安定であった。7日から14日の間に、B2M^{KO} T細胞のパーセンテージは両群で低下したが、HLA-Eが再発現したこれらの細胞は残存するT細胞の集団のほぼ40%を構成し、一方、HLA-Eが再発現していないものはほぼゼロに下降した。破線の円はこれらの2つのデータ点を囲み、T細胞の、NK細胞の細胞傷害効果からのHLA-Eに基づく保護を示す。同様のパターンは、図36Cに示される1:2のNK:T比でも見られた。NK細胞：T細胞の比が増加した場合（図36C~36F）、実験経過にわたるT細胞生存の基本パターンは相対的に維持されたが、HLA-E再発現群についての最終時点の生存数は控え目ながら連続して低減した。しかしながら、これらのデータは、比較的高いNK:T比でも（少なくとも4:1まで）、T細胞でのHLA-Eの再発現により、HLA-Eが再発現しないT細胞と比較して、NK細胞に対する保護効果がT細胞に与えられることを示す。

【0587】

HLA-Eが、やはりまたCARを発現するように操作された（例えば、混合細胞治療

の状況を表す) NK細胞に対して、T細胞に保護を与えることができるかどうかという問題に目を向けると、図36G~36Lは、抗CD19 CARを発現するNK細胞(NKX19)と、抗CD19 CARを発現し、TX19.TCRKO、B2M^{KO}またはTX19.TCRKO、B2M^{KO}、dtSCTEのいずれかであるT細胞との共培養に関する対応するデータを提供する。NK:T細胞の比は(それぞれ、G~L)、0:1、1:4、1:2、1:1、2:1、および4:1である。共培養は14日間行い、培養中に存在するB2M^{KO} T細胞のパーセンテージ(生きたT細胞のうち)を指示された時点で評価し、HLA-Eを再発現するデータ点を逆三角形によって示した。図36Gは、陽性対照データを示し、これは、操作されたNK細胞が全く存在しない指示されたT細胞の培養を表す。図36I~36Lは、NK細胞:T細胞の比の最も低いものから最も高いものへの移行を表し、NKX19 NK細胞とともに培養した場合に、B2M^{KO} T細胞のパーセンテージは低くなるようであるが、NK:Tの等量比かそれ以下では、HLA-Eを再発現するT細胞の保護が維持されるようである。NK:T比が高い場合のデータは、NK細胞の程度が高いとある程度の保護が依然として存在することを示唆するが、保護効果はいくらかは損なわれているようである。図37A~37Fは、さらなるドナーについて、種々の類似する時点での対応するデータ(NKX19:TX19)を示す。図38A~38Fは、さらなるドナーについて、種々の類似する時点での対応するデータ(NKX19:TX19)を示す。図39A~39Fは、さらなるドナーについて、対応するデータ(NKX19:TX19)を示す。図40A~40Fは、さらなるドナーについて、種々の類似する時点での対応するデータ(NKX19:TX19)を示し、対照としてTCRKO T細胞を含む。図41A~41Fは、さらなるドナーについて、種々の類似する時点での対応するデータ(NKX19:TX19)を示し、対照としてTCRKO T細胞を含む。HLA-E再発現によってT細胞にもたらされる保護については、ドナーによって多少のばらつきがあるが、一般的な傾向として、HLA-Eの再発現は共培養の早期時点で、特にNK:T比が低い時点で明確な保護効果をもたらし、NK細胞数がT細胞数を上回ると保護効果は低下する。それにもかかわらず、これらのデータは、約1:1以下の比率で、HLA-Eを再発現するT細胞のより良好な生存を実証する。一部の実施形態に従い、1:1のNK細胞:T細胞の比(またはそれより低い)は、混合細胞治療生成物の投与調製物において使用される。さらなる実施形態に従い、1:2、1:3、1:4、1:5、またはそれより低い(列挙された比の間の比を含む)比は、混合細胞治療生成物の投与調製物において使用される。さらに、本明細書に開示されるように、T細胞(またはNK細胞)に対するさらなる編集、またはその操作は、混合治療細胞コンテキストでの異なる細胞型間のフラトリサイドを低下させるために提供される。

10

20

30

40

【0588】

[実施例3]

さらなる免疫回避コンストラクトおよびその使用

本明細書において検討されるように、例えば、NK細胞とT細胞の混合治療集団におけるNK細胞またはT細胞の、他の治療細胞および宿主T細胞に対する免疫原性を低下させるために、種々の免疫抑制コンストラクトが提供される。いくつかの実施形態では、免疫抑制コンストラクトおよび得られる操作された(および/または編集された)細胞は、治療細胞集団の別のメンバーとのフラトリサイドが少なく、移植片対宿主および宿主対移植片の副作用のリスクも低減される。図42Aおよび42B(および図29C)ならびに図43は、本明細書に提供される実施形態に従った免疫抑制コンストラクトがどのように構築されるかについての非限定的な概略図を示す。表8は、本明細書に提供される特定の非限定的な免疫抑制コンストラクトに対する対応する配列番号を示す。

【表 8 - 1】

表 8: 選択された免疫抑制コンストラクトの配列識別子

配列 番号	コンストラクト識別子	配列 番号	コンストラクト識別子
683	UL18 三量体_SS VMAPRTLFL_IRES_GFP	791	GP41fptm_sfGFP_aa
684	UL18 三量体_SS VMAPRTLFL_IRES_GFP	792	GP41fptm_sfGFP
685	UL18 三量体_SS VMAPRTLFL - AA [Flag または GFP なし]	793	GP41fptm_aa_No-GFP
686	UL18 三量体_SS VMAPRTLFL - NT [Flag または GFP なし]	794	GP41fptm_NT_No_GFP
687	HLA-E 三量体_SS VMAPRTLFL_IRES_GFP	795	CKS17-8aTM_sfGFP_aa
688	HLA-E 三量体_SS VMAPRTLFL	796	CKS17-8aTM_sfGFP
689	HLA-E 三量体_SS VMAPRTLFL - AA - [flag または gfp なし]	797	CKS17-8aTM_aa_No_GFP
690	HLA-E 三量体_SS VMAPRTLFL [flag または gfp なし]	798	CKS17-8aTM_NT_No_GFP
691	CKS17-8aHTM_aa	799	CKS HTLV-8aTM_sfGFP_aa
692	CKS17-8aHTM	800	CKS HTLV-8aTM_NT_No_GFP
693	CKS17-8aHTM_aa [flag または gfp なし]	801	CKS HTLV-8aTM_aa_No_GFP
694	CKS17-8aHTM [flag または gfp なし]	802	CKS HTLV-8aTM_sfGFP
695	p15E-L-8aHTM_IRES_GFP	803	CKS LMP-8aTM_sfGFP_aa
696	p15E-L-8aHTM_IRES_GFP	804	CKS LMP-8aTM_sfGFP
697	p15E-L-8aHTM [flag/gfp なし]	805	CKS LMP-8aTM_aa_no_GFP
698	p15E-L-8aHTM [flag/gfp なし]	806	CKS LMP-8aTM_NT_No_GFP
699	HTLV-8aHTM_IRES_GFP	807	CKS GP41fptm_sfGFP_aa
700	HTLV-8aHTM_IRES_GFP	808	CKS GP41fptm_sfGFP
701	HTLV-8aHTM [flag/gfp なし]	809	CKS GP41fptm_aa_No_GFP
702	HTLV-8aHTM [flag/gfp なし]	810	CKS GP41fptm_NT_No_GFP
703	HIV_L-8aHTM_IRES_GFP	811	LMP_S-CD8HTM_sfGFP_aa
704	HIV_L-8aHTM_IRES_GFP	812	LMP_S-CD8HTM_sfGFP
705	HIV_L-8aHTM [flag/gfp なし]	813	LMP_S-CD8HTM_aa_No_GFP
706	HIV_L-8aHTM [flag/gfp なし]	814	LMP_S-CD8HTM_NT_No_GFP
707	HIV_S-8aHTM_IRES_GFP	815	LMP_CD47tm162_sfGFP_aa
708	HIV_S-8aHTM_IRES_GFP	816	LMP_CD47tm162_sfGFP
709	HIV_S-8aHTM_flag/gfp なし	817	LMP_CD47tm162_aa_No_GFP
710	HIV_S-8aHTM_no flag/gfp	818	LMP_CD47tm162_NT_No_GFP
711	TCR Synthetic 3x-8aHTM_IRES_GFP	819	p15E_CD47tm162_sfGFP_aa
712	TCR Synthetic 3x-8aHTM_IRES_GFP	820	p15E_CD47tm162_sfGFP
713	TCR Synthetic 3x-8aHTM_flag/gfp なし	821	p15E_CD47tm162_aa_No_GFP
714	TCR Synthetic 3x-8aHTM_flag/gfp なし	822	p15E_CD47tm162_NT_No_GFP
715	ICD47-8aHTM_IRES_GFP	823	CD47_GP41fptm_sfGFP_aa
716	ICD47-8aHTM_IRES_GFP	824	CD47_GP41fptm_sfGFP
717	ICD47-8aHTM_flag/gfp なし	825	CD47_GP41fptm_aa_No_GFP
718	ICD47-8aHTM_flag/gfp なし	826	CD47_GP41fptm_NT_No_GFP
719	p15Ex3-8aHTM_IRES_GFP	827	HLA-E_STE20_sfGFP_aa
720	p15Ex3-8aHTM_IRES_GFP	828	HLA-E_STE20_sfGFP
721	p15Ex3-8aHTM_flag/gfp なし	829	HLA-E_STE20_aa_NO_GFP
722	p15Ex3-8aHTM_flag/gfp なし	830	HLA-E_STE20_NT_NO_GFP
723	p15E_ICD47-8aHTM_IRES_GFP	831	抗 SIRPa アゴニスト vHL_sfGFP_aa
724	p15E_ICD47-8aHTM_IRES_GFP	832	抗 SIRPa アゴニスト vHL_sfGFP
725	p15E_ICD47-8aHTM_flag/gfp なし	833	抗 SIRPa アゴニスト vHL_aa_NO_GFP
726	p15E_ICD47-8aHTM_flag/gfp なし	834	抗 SIRPa アゴニスト vHL_NT_NO_GFP
727	ICD47_p15E-8aHTM_IRES_GFP	835	HTLV1_fGP62_sfGFP_aa
728	ICD47_p15E-8aHTM_IRES_GFP	836	HTLV1_fGP62_sfGFP
729	ICD47_p15E-8aHTM_flag gfp なし	837	HTLV1_fGP62_aa_NO_GFP

10

20

30

40

50

【表 8 - 2】

配列 番号	コンストラクト識別子	配列 番号	コンストラクト識別子
730	iCD47_p15E-8aHTM_flag/gfp なし	838	HTLV1 fGP62 NO GFP
731	HIV_L iCD47-8aHTM IRES GFP	839	HTLV1 GP21 sfGFP_aa
732	HIV_L iCD47-8aHTM IRES GFP	840	HTLV1 GP21 sfGFP
733	HIV_L iCD47-8aHTM_flag/gfp なし	841	HTLV1 GP21_aa NO GFP
734	HIV_L iCD47-8aHTM_flag/gfp なし	842	HTLV1 GP21 NO GFP
735	HIV_S iCD47-8aHTM IRES GFP	843	LASV fGP2 sfGFP_aa
736	HIV_S iCD47-8aHTM IRES GFP	844	LASV fGP2 sfGFP
737	HIV_S iCD47-8aHTM_flag/gfp なし	845	LASV fGP2_aa NO GFP -
738	HIV_S iCD47-8aHTM_flag/gfp なし	846	LASV fGP2 NT NO GFP
739	HTLV iCD47-8aHTM IRES GFP	847	SEBOV fGP sfGFP_aa
740	HTLV iCD47-8aHTM IRES GFP	848	SEBOV fGP sfGFP
741	HTLV iCD47-8aHTM_flag/gfp なし	849	SEBOV fGP_aa NO GFP
742	HTLV iCD47-8aHTM_flag/gfp なし	850	SEBOV fGP NT NO GFP
743	iCD47_p15Ex2-8aHTM IRES GFP	851	SEBOV GP2 sfGFP_aa
744	iCD47_p15Ex2-8aHTM IRES GFP	852	SEBOV GP2 sfGFP
745	iCD47_p15Ex2-8aHTM_noflag/gfp	853	SEBOV GP2_aa NO GFP
746	iCD47_p15Ex2-8aHTM_flag/gfp なし	854	SEBOV GP2 NT NO GFP
747	CKS17-8aHTM_eGFP_aa	855	SCoV S2 sfGFP_aa
748	CKS17-8aHTM_eGFP	856	SCoV S2 sfGFP
749	CKS17-8aHTM_aa GFP なし	857	SCoV S2_aa NO GFP
750	CKS17-8aHTM_NT GFP なし	858	SCoV S2 NT NO GFP
751	CD47-eGFP_aa	859	LGALS3BP sfGFP_aa
752	CD47-eGFP	860	LGALS3BP sfGFP
753	CD47- aa no GGFP	861	LGALS3BP_aa NO GFP
754	CD47-NT no GFP	862	LGALS3BP NT No GFP
755	fGP41 HIVtm sfGFP_aa	863	CD24 sfGFP_aa
756	fGP41 HIVtm sfGFP	864	CD24 sfGFP
757	fGP41 HIVtm_aa no GFP	865	CD24_aa NO GFP
758	fGP41 HIVtm_NT no GFP	866	CD24 NT NO GFP
759	p15Etm sfGFP_aa	867	HCV E2 sfGFP_aa
760	p15Etm sfGFP	868	HCV E2 sfGFP
761	p15Etm_aa no GFP	869	HCV E2_aa NO GFP
762	p15Etm_NT GFP なし	870	HCV E2 NT NO GFP
763	CD43_TM sfGFP_aa	871	抗 SIRPa アゴニスト vLH sfGFP_aa
764	CD43_TM sfGFP	872	抗 SIRPa アゴニスト vLH sfGFP
765	CD43_TM_aa No GFP	873	抗 SIRPa アゴニスト vLH_aa NO GFP
766	CD43_TM_NT no GFP	874	抗 SIRPa アゴニスト vLH_NT NO GFP
767	LMP1_TM-sfGFP_aa	875	CEACAM1 sfGFP_aa
768	LMP1_TM-sfGFP	876	CEACAM1 sfGFP
769	LMP1_TM_aa no GFP	877	CEACAM1_aa NO GFP
770	LMP1_TM-NT No-GFP	878	CEACAM1_NT NO GFP
771	fgD_TM sfGFP_aa	879	CD155tm 3M sfGFP_aa
772	fgD_TM sfGFP	880	CD155tm 3M sfGFP
773	fgD_TM_AA-NO GFP	881	CD155tm 3M_aa NO GFP
774	fgD_TM_NT NO GFP	882	CD155tm 3M_NT NO GFP
775	fLLT1_TM-sfGFP_aa	883	CD31tm sfGFP_aa
776	fLLT1_TM-sfGFP	884	CD31tm sfGFP
777	fLLT1_TM- aa No GFP	885	CD31tm_aa NO GFP
778	fLLT1_TM-NT No GFP	886	CD31tm_NT NO GFP
779	CD47tm162 sfGFP_aa	887	CD111tm sfGFP_aa
780	CD47tm162 sfGFP	888	CD111tm sfGFP
781	CD47tm162_aa No GFP	889	CD111tm_aa NO GFP
782	CD47tm162_NT NoGFP	890	CD111tm_NT NO GFP
783	LMP_L-CD8HTM sfGFP_aa	891	CD200tm sfGFP_aa
784	LMP_L-CD8HTM sfGFP	892	CD200tm sfGFP

10

20

30

40

50

【表 8 - 3】

配列 番号	コンストラクト識別子	配列 番号	コンストラクト識別子
785	LMP_L-CD8HTM_aa_No_GFP	893	CD200tm_aa_NO_GFP
786	LMP_L-CD8HTM_NT_No_GFP	894	CD200tm_NO_GFP
787	LALLFWLx5-CD8HTM_sfGFP_aa	895	CD8a シグナルペプチド AA
788	LALLFWLx5-CD8HTM_sfGFP	896	CD8a シグナルペプチド NT
789	LALLFWLx5-CD8HTM_aa_no_GFP		
790	LALLFWLx5-CD8HTM_NT_No_GFP		

10

【0589】

上で検討したように、治療細胞でのHLA-EまたはHLA-Gの再発現は、細胞に、同時投与された治療細胞（および宿主T細胞）からの免疫抑制細胞傷害性に対する能力を付与することになる。図43は、HLA再発現の免疫抑制効果を試験するための概略的プロセスを示す。簡単に述べると、核赤色色素を発現するK562細胞（K562NR）を本明細書に提供される種々の低免疫コンストラクトと同様に調製する。これらの試験コンストラクトはGFP（またはFLAGタグ）を含むように操作されるが、本明細書に提供される免疫抑制コンストラクトのいずれかもタグを含まずに作製され得ることが認識される。免疫抑制コンストラクトは、レトロウイルスベクターにパッケージングされ、K562細胞の少なくとも一部が免疫抑制コンストラクトおよびGFPを発現するようにK562NR細胞に形質導入するように使用される（K562NR Hypo GFP集団を得る）。さらなるK562NR細胞は、K562細胞の1:1の比を達成するように細胞に加えられ、低免疫コンストラクト（K562 50% GFP）を発現する（または発現しない）。これらは、ここで、アッセイにおける標的細胞と考えられる。その後、活性化したNK細胞をK562 50% GFP標的細胞と1:1の比で共培養し、K562 50% GFP標的細胞に対するNK細胞の細胞傷害効果を評価する。

20

【0590】

図44は、複数の免疫抑制コンストラクトおよび、NK細胞からの細胞傷害性に対して保護するそれらの能力を試験する1つの実験の結果を示す。K562NK細胞は単独で、対照としての赤色物体カウント（培養中の細胞数を表す）の増加を示した。観察することができるように、試験した免疫抑制コンストラクトの多くは、NK細胞に対する保護を与えなかった。注目すべき例外は、HLA-Eペプチドの三量体を含む免疫抑制HLA-Eコンストラクトである。図45Aは、他のドナーに由来するNK細胞に対する免疫抑制コンストラクトの保護効果を評価するさらなる実験複製を示す。図45Aでは、いくつかのコンストラクトでは、わずかながら免疫保護効果が認められたが、やはりHLA-E三量体コンストラクトは最も保護効果が高かった。図45Bでは、コンストラクトはいずれも、異なるドナーに由来する活性化NK細胞に対していかなる保護も与えなかった。図45Cは、不死化NK92細胞に対してさえも、HLA-E三量体コンストラクトが保護効果を有することを示す。上で検討したように、NK細胞活性化のHLA-E阻害の作用機序は、NK細胞での阻害受容体と活性化受容体のバランスによるものであり、NKG2Aは、HLAと結合する際にNK細胞阻害シグナルを生じる。図46は、ドナーによるHLA発現レベルを示す。観察することができるように、ドナー番号784およびドナー番号0317はいずれも、高レベルのNKG2Aを発現するNK細胞を有し、NK細胞の85%超は各ドナーについてNKG2A陽性である。これらのドナーは、図44および図45Aのそれらの実験結果に対応し、HLA-E三量体免疫抑制コンストラクトの使用によるHLA-Eの再発現が、K562「標的」細胞をドナー細胞から保護した。これらのデータは、一部の実施形態に従い、上昇したレベルのNKG2A（例えば、約60%、約70%、約80%、約85%、約90%を上回るかまたはそれを超える）を発現するドナーNK細胞は、予想外に、治療細胞の少なくとも一部が、高NKG2A細胞が他の治療細胞に対するフラトリサイドから阻害されるために、免疫抑制コンストラクトを発現するように操

30

40

50

作されている混合治療細胞集団において有用である。

【0591】

〔実施例4〕

選択された低免疫コンストラクトの細胞傷害性評価

本明細書において検討されるように、例えば、NK細胞とT細胞の混合治療集団におけるNK細胞またはT細胞の、他の治療細胞および宿主T細胞に対する免疫原性を低下させるために、種々の免疫抑制コンストラクトが提供される。本明細書に提供される選択された低免疫コンストラクトの、コンストラクトを発現する細胞に免疫回避の特徴を付与する能力を評価するために、いくつかの実験を実行した。

【0592】

図47Aは、図43に示されるものの修正であるHLA再発現の免疫抑制効果を試験するための概略的プロセスを示す。簡単に述べると、核赤色素を発現するK562細胞（K562NR）を本明細書に提供される種々の低免疫コンストラクトと同様に調製する。これらの試験コンストラクトはGFP（またはFLAGタグ）を含むように操作されるが、本明細書に提供される免疫抑制コンストラクトのいずれもタグを含まずに作製され得ることが認識される。免疫抑制コンストラクトは、レトロウイルスベクターにパッケージングされ、K562細胞の少なくとも一部が免疫抑制コンストラクトおよびGFPを発現するようにK562NR細胞に形質導入するように使用される（K562NR Hypo GFP集団を得る）。これらの細胞は、その後、細胞の100%がNR/GFP陽性であるように選別され、これは、全ての細胞が低免疫コンストラクトを発現することを意味する。上で検討したように、これらは、ここで、アッセイにおける標的細胞と考えられる。その後、活性化したNK細胞をK562NR標的細胞と1:1の比で共培養し、K562NR標的細胞に対するNK細胞の細胞傷害効果を評価する。

【0593】

図47Bは、指示された免疫回避コンストラクトを発現するように修飾された「標的」K562細胞と第1のドナーに由来する活性化NK細胞との共培養により得られた細胞傷害性トレースを示す。上のトレース（K562NR、核赤色を発現するように修飾されたが、いずれのGFPタグ付き免疫回避コンストラクトも発現しないK562）を単独で培養し（活性化ドナーNK細胞なし）、したがって、陽性対照を表し（最大の「標的」細胞成長）、結果として、所与の実験的細胞毒性トレースが陽性対照に近ければ近いほど、標的K562細胞に、より高度な免疫回避が与えられた。図47Bに示されるように、HLA-E三量体は、K562細胞に、より高度な免疫回避を与えた。これに、GP41-fptmコンストラクトが続いた。D155tm-3M、LKAGLS3SBP-8aTM、CD43__tmおよびCD47コンストラクトはいずれも比較的類似した性能であった。図47Cのデータは、K562細胞による指示された免疫回避コンストラクトの発現レベル（ヒストグラムのバーはNR+/GFP+細胞のMFIを表す）およびそれらの相対的細胞傷害性のランク付け（例えば、1~6）に関する。K562細胞は、免疫回避コンストラクトを発現せず、したがって、GFPを発現せず、比較的低いMFIを有する。この実験では、HLA-E三量体がK562細胞により最もロバストに発現され、活性化ドナーNK細胞の細胞傷害効果に対してK562細胞にとって最も免疫保護的でもあった。興味深いことに、免疫保護に関して次に最もよいパーフォーマーである、GP41-fptmコンストラクトは、K562細胞によって最も低レベルで発現した。

【0594】

第2のドナーに由来するNK細胞が活性化した場合の類似の細胞傷害性および発現のデータが図47D~47Eに与えられる。図47Bのデータと同様に、HLA-E三量体は、標的K562細胞に最も高度な免疫保護を与え、他の免疫回避コンストラクトも比較的類似した性能であった。図47Eは、HLA-Eコンストラクトが最もロバストに発現され、最も高い免疫保護も与えたことを再度明らかにする。再度、GP41-fptmコンストラクトは高度に発現しなかったが、標的K562細胞に免疫保護を与えるのに次に優れていた。図47Fは、免疫回避コンストラクトで修飾したK562細胞に、第3のドナ

10

20

30

40

50

ーに由来する活性化NK細胞を負荷した場合のさらなるデータを示す。興味深いことに、コンストラクトは、他の2名のドナーに由来する細胞を負荷したものと比較して、様々な量の免疫保護を与えた。HLA-E三量体の発現が最もロバストなままであったにもかかわらず（図47Gを参照されたい）、細胞傷害性を回避する点で明確なリーダーは存在しなかった。注目すべきことに、GP41-fptmコンストラクトは、免疫回避の付与において2番目に最良である位置を保持した。

【0595】

図47H～47Iは、さらなる免疫回避コンストラクトについて同様のデータを示す。図47Hは、種々のコンストラクトによって与えられた免疫保護の程度を示し、図47Iは、対応する発現データを示す。図47J～47Kは、さらなる免疫回避コンストラクトに関するデータを示す。図47Jは、種々のコンストラクトによって与えられた免疫保護の程度を示し、図47Kは、対応する発現データを示す。図47L～47Mは、さらなる免疫回避コンストラクトについて同様のデータを示す。図47Lは、種々のコンストラクトによって与えられた免疫保護の程度を示し、図47Mは、対応する発現データを示す。図47N～47Oは、さらなる免疫回避コンストラクトについて同様のデータを示す。図47Nは、種々のコンストラクトによって与えられた免疫保護の程度を示し、図47Oは、対応する発現データを示す。図47Pは、種々の免疫回避コンストラクトをランク付けするデータの要約を示す。図47H～47Oからのデータは、先行するランク付けコンストラクト（図47A～47Gのデータ）の試験をもたらしたスクリーニングデータである。図47Qおよび47Rは、指示されたコンストラクトを発現するK562細胞に与えられた免疫保護（47Q）およびコンストラクトの発現レベル（47R）の大規模比較を示す。

【0596】

図48Aは、指示された免疫コンストラクトおよびK562細胞に保護を与えるそれらの能力に関するさらなるデータを示す。この実験は、図47Dのデータを得るために使用したように、同一のドナーに由来する活性化NK細胞を使用した。図48Aに示されるように、HLA-E三量体は、標的K562NR細胞に最大の保護を与え、SEBOV-GP2コンストラクト、HLA-E-STE20およびCD47がそれに続いた。他のコンストラクトは、K562標的細胞にある程度の保護を与えなかったが、より低い割合での保護であった。図48Bは、コンストラクトのランク付けの順序（最大から最小の効果を上から下に）およびK562細胞によるそれらの発現の程度を示す。上で検討したデータに見られるように、HLA-E三量体はロバストに発現されたが、これは、K562細胞に最大の保護を与え、他のコンストラクトは、より低レベルで発現したにもかかわらず、有意な保護を与えた。

【0597】

図49A～49Cは、特定のコンストラクトの相対的発現およびコンストラクトを発現する細胞に与えられる関連する免疫保護に関するデータを示す。上のアプローチと同様に、K562NR細胞は、比較的高い存在量または比較的低い存在量で選択されたコンストラクトを発現するように操作された。図49Aは、HLA-Eに関するデータを示す。要約表で示したように、HLA-Eを高発現するK562NR細胞は、およそ2倍のHLA-Eコンストラクトの発現を有した。曲線に反映されたように、高発現するK562細胞は、活性化ドナーNK細胞からのより高度な免疫保護に恵まれた。同様のパターンがCD47発現について図49Bにおいて示され、また、CD43-TMコンストラクトについては図49Cにおいて示された。したがって、図47および48からのデータは、コンストラクトにわたり、発現レベルが免疫保護に相関しない場合があることを実証するが、図49によって、コンストラクトにおいて、所与のコンストラクトの発現の増加が免疫保護と相関するようであることが確認される。したがって、一部の実施形態に従い、治療細胞を1つ以上のステップに供し、1つ以上の免疫回避コンストラクトの発現を増大させる（例えば、より多量のベクター用量による感染、免疫コンストラクトペイロードを増加させるためのベクターへの再曝露、処理前に発現が増加したものについての細胞集団の濃縮）

。

【0598】

まとめると、これらのデータを総合すると、ある種の免疫回避コンストラクトは、状況に応じてより効果的、またはより効果的でない、別個の作用機序によって作用する可能性が示唆される。これらには、発現、活性、NK細胞との結合の遮断などのバリエーションが含まれるが、これらに限定されない。これらのデータは、特定のコンストラクトがロバストな発現および、一般に、ロバストな免疫回避を示す一方で、他のものは比較的発現に乏しいが、効率的な免疫回避を示すことも示唆する。したがって、いくつかの実施形態では、ヒト細胞による発現を改善するための免疫回避コンストラクトの修飾（例えば、コドン最適化）は、与えられる免疫保護を協調的に改善する。同様に、これらのデータは、操作されたNK細胞（例えば、CARを発現するように操作されたNK細胞）が標的細胞における活性化／阻害受容体シグナルに異なる応答を示し、操作された細胞の細胞傷害性を改変させる、ドナー間のばらつきが存在する可能性を示唆する。したがって、いくつかの実施形態では、特定のドナー細胞プロファイル（例えば、ドナーNK細胞またはT細胞の表現型）は、同種異系細胞治療に関して使用されるのが好ましい場合がある。有利なドナー細胞プロファイルに関するより多くの情報は、（それぞれ）2021年7月28日および2021年10月14日に出願された米国仮特許出願第63／203,703号および同第63／262,544号に見出すことができ、これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。本明細書に提供されるように、全体的な免疫回避戦略は、HLA-E発現修飾、1つ以上のウイルス免疫抑制ペプチドの発現、TCR活性化の破壊、および／または阻害性リガンドの使用などの免疫細胞に保護を与えるための1つ以上のアプローチを採用することができる。例えば、一部の実施形態では、免疫細胞に保護を与えるための1つ以上のアプローチは、HLA-E、HLA-E三量体、HLA-E STE 20、SEBOV-GP2、CD47、LMP、LGAL3S、SIRPa（vHまたはvL）、HTLV1、またはSCOVの発現および／またはモジュレーションに関与し得る。いくつかの実施形態では、全体的なアプローチにより、より効果的な同種異系細胞治療レジメンが可能となる。

10

20

【0599】

【実施例5】

細胞機能を改変するための免疫細胞のさらなる遺伝子編集

本明細書に提供されるように、NK細胞および／またはT細胞などの免疫細胞の機能性（例えば、持続性、細胞傷害性、および／または他の特徴）を増大させるために遺伝子編集（例えば、Crispr/Casシステム）が使用される。編集は、遺伝子によってコードされるタンパク質の発現および／または機能を減少させるか、実質的に減少させるか、または排除するために、単一の遺伝子に行われる場合がある。さらに、編集は、複数の遺伝子標的（例えば、2つ、3つ、4つ、またはそれ以上の標的）において行われ、編集された遺伝子の各々によってコードされるタンパク質の発現および／または機能を減少させるか、実質的に減少させるか、または排除することができ、複数のタンパク質の発現または機能の欠如は、持続性、細胞傷害性シグナル伝達の程度（量および／または持続時間のいずれか）、腫瘍微小環境抑制効果に対する抵抗性、または他の有益な特徴のいずれかの点で、予想外に効果的な表現型を編集細胞に付与する。

30

40

【0600】

例えば、本明細書において検討したように、いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、CISH遺伝子の標的部位およびCBLB遺伝子の標的部位で行われる。一部の実施形態では、二重編集、例えば、CISH/CBLBが、治療に使用するためにNK細胞および／またはT細胞において行われる。いくつかの実施形態では、CISH/CBLB遺伝子編集の組み合わせは、さらなる編集を含まないNK細胞において行われる。いくつかの実施形態では、CISH/CBLB遺伝子編集の組み合わせは、抗CD70 CAR、抗CD19 CAR、または抗NKG2Dキメラ受容体のいずれか1つまたはそれらのうちの任意の組み合わせを発現しないが、別の腫瘍標的を標的とするCARを発現するように操

50

作されてもよいNK細胞において行われる。

【0601】

例えば、本明細書において検討したように、いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、CISH遺伝子の標的部位およびTGFB β 2遺伝子の標的部位で行われる。一部の実施形態では、二重編集、例えば、CISH／TGFB β 2が、治療に使用するためにNK細胞および／またはT細胞において行われる。いくつかの実施形態では、CISH／TGFB β 2遺伝子編集の組み合わせは、さらなる編集を含まないNK細胞において行われる。いくつかの実施形態では、CISH／TGFB β 2遺伝子編集の組み合わせは、抗CD70 CAR、抗CD19 CAR、または抗NKGD2キメラ受容体のいずれか1つまたはそれらのうちの任意の組み合わせを発現しないが、別の腫瘍標的を標的とするCARを発現するように操作されてもよいNK細胞において行われる。

10

【0602】

例えば、本明細書において検討したように、いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、CISH遺伝子の標的部位およびTIGIT遺伝子の標的部位で行われる。一部の実施形態では、二重編集、例えば、CISH／TIGITが、治療に使用するためにNK細胞および／またはT細胞において行われる。いくつかの実施形態では、CISH／TIGIT遺伝子編集の組み合わせは、さらなる編集を含まないNK細胞において行われる。いくつかの実施形態では、CISH／TIGIT遺伝子編集の組み合わせは、抗CD70 CAR、抗CD19 CAR、または抗NKGD2キメラ受容体のいずれか1つまたはそれらのうちの任意の組み合わせを発現しないが、別の腫瘍標的を標的とするCARを発現するように操作されてもよいNK細胞において行われる。

20

【0603】

上で検討したように、CRISPR／Cas9を使用して、NK細胞において選択された遺伝子および遺伝子の組み合わせを特異的に標的化し、その発現を減少させ、編集された細胞について得られた細胞傷害性の評価を実施した。

【0604】

図50Aは、選択した遺伝子標的（複数可）で編集し、786-O腎細胞癌細胞と共培養したNK細胞についての細胞傷害性データを示す。786-O細胞が一般的な量のCD70を発現し、したがって、本明細書において検討した特定の実験が、抗腫瘍CAR（ここでは抗CD70 CAR）の非限定的な例を発現する編集細胞に関し、さらにCD70 CARの使用（およびフラトリサイドを回避／低減するために行われるCD70発現に対する任意の関連する編集）がこれらの実験に対して特異的であり、本明細書に提供される編集細胞がCD70以外の腫瘍マーカーを標的とするように操作されてもよいことが認識される。図50Aのデータは、指示された遺伝子編集が行われた14日後に、エフェクター：標的（1：2のE：T比）を使用して、収集した。図50Aに示されるように、編集は、全ての群についてCD70遺伝子に対して行った。CBLB単独、またはCBLBとCISHをまとめた編集は、この特定の実験においてNK細胞の細胞傷害性を増大させなかったようである。しかしながら、標的786-O細胞との共培養がTGFB β （腫瘍に対する免疫細胞の活性を抑制するためにTMEに放出される公知のサイトカイン）の存在下で実施された図50Bにおいて示されたように、CISH／CBLB編集の組み合わせは、これらの細胞の細胞傷害性に顕著な差を生じさせ、CBLB編集単独と比較してそれらの細胞傷害性を改善し、それらをCISH編集細胞と同等に効果的にした。このデータは、CISH／CBLBの二重編集が、TMEにおける特定の抑制エフェクターに対する抵抗性を二重編集細胞に付与し、それらの細胞傷害性プロファイルを向上させることを示す。図50Cは、指示された遺伝子（複数可）において編集し、編集の21日後に786-O細胞に対して評価した、別のドナーの細胞についての同様のデータを示す。示されるように、CISH編集、CBLB編集およびCISH／CBLB編集の組み合わせの各々は、1：4のE：Tでも、腫瘍細胞に対して有意な細胞傷害性をもたらした。図50Dは、TGFB β 存在下での印象的なさらなるデータを示し、CISHまたはCBLBのいずれかを単独で編集すると、腫瘍細胞成長を下方制御したが、CISH／CBLBの二重編集

30

40

50

により、ドナーNK細胞は標的細胞に対するロバストな細胞傷害効果を維持することが可能になった。これらのデータは、いくつかの実施形態では、CISH/CBLBの二重編集が標的腫瘍に対する免疫細胞機能の有意な改善を付与することを示す。いくつかの実施形態では、編集はNK細胞におけるものであるが、このような二重編集（または三重編集、またはそれ以上）はT細胞においても同様に可能である。

【0605】

図51Aは、CISH、TGFB β 2またはCISH/TGFB β 2を組み合わせて編集し、編集後の14日目に、標的786-O細胞に対する細胞傷害性を評価したドナーNK細胞に関するデータを示す（ここでも、CD70 CARおよびCD70編集の使用は、この実験設定に特異的である）。データは、CISH/TGFB β 2編集の組み合わせにより、CISHまたはTGFB β 2として編集された細胞よりもはるかにロバストな細胞傷害性プロファイルを有するNK細胞が得られることを示す。図51Bは、同様のデータを示すが、TGFB β の存在下では示さない。この実験では、TGFB β は、編集された細胞型の各々の効果を抑制することに成功したようであり、TMEにおける抑制効果を反映する。図51Cは、編集の21日後に収集し、編集されたNK細胞をACHN標的細胞と1:4のE:T比で共培養した関連データを示す。ACHN細胞がまた、一般的な量のCD70を発現し、したがって、これらの実験の特定の態様が、抗腫瘍CAR（ここでは抗CD70 CAR）の非限定的な例を発現する編集細胞に関し、さらにCD70 CARの使用（およびフラトリサイドを回避/低減するために行われるCD70発現に対する任意の関連する編集）がこれらの実験に対して特異的であり、本明細書に提供される編集細胞がCD70以外の腫瘍マーカーを標的とするように操作されてもよいことが認識される。図51Cは、CISH/TGFB β 2編集の組み合わせが、TGFB β 2またはCISHの編集と比較して、編集された細胞に最大の細胞傷害性を与えることを示す。図51Dは、TGFB β の存在下で共培養が行われた場合のさらなるデータを示す。この実験では、TGFB β がCISH/TGFB β 2編集細胞の細胞傷害性効果を無効にする能力が有意に低下し、このことは、一部の実施形態では、CISHおよびTGFB β 2で編集され、抗腫瘍CARを発現する免疫細胞が、細胞傷害性（および/または、一部の実施形態では、持続性）を増大したことを示した。

【0606】

図52Aおよび52Bは、TIGITに対して行われた編集に関する。ここで、1:4のE:T比を使用して、CISH、TIGIT、またはCISH/TIGITの組み合わせで編集したNK細胞を、編集後21日目に、786-O細胞と共培養した。CISH/CBLBおよびCISH/TGFB β 2編集と同様に、CISHとTIGITの組み合わせ編集により、標的細胞に対する優れた細胞傷害性がもたらされた。図52Bは、共培養が、免疫細胞機能の十分に確立されたサプレッサーであるアデノシンの存在下で実施された場合の実験データを示す。アデノシンは試験した編集細胞の各々の細胞傷害性を減少させたが、CISH/TIGIT編集細胞は最も細胞傷害性のままであり、TIGIT（または本明細書に開示される他のもの）のような別の遺伝子と組み合わせたCISHに対する編集が、編集されたNK細胞の細胞傷害活性（および/または持続性）を増大させることを強化する。

【0607】

図53A~53Dは、本明細書に提供される特定の編集の効果に関するさらなるデータを示す。図53Aは、編集の14日後の786-O標的細胞に対する種々の指示された編集に関する細胞傷害性曲線を示す。図53Bは、図53Aのデータの要約を反映するヒストグラムを示す。この実験における編集は、CD70（これは、上で検討したように、このモデルに対して特異的であり、CD70 CARの非限定的な例に基づいてフラトリサイドを回避する）、CISH、TGFB β 2、CBLB、CISH/TGFB β 2、またはCISH/CBLBに対するものであった。図53Bにおいて最もよく分かるように、CISH/CBLB（右端）とCISH/TGFB β 2（右から3番目）を含む編集は、試験した中で最も細胞傷害性の高いNK細胞のいくつかをもたらした。CBLBへの編集

もまた、編集されたNK細胞に有意な細胞毒性を付与する。図53Cは、共培養をTGFbの存在下で実施した場合の対応するデータを示す。図53Dにおける要約データは、TGFbの免疫抑制力と、この効果を低下させる編集の有効性を再び反映する。編集されたNK細胞の細胞傷害性は、TGFbの存在下で鈍化したが、CISH/TGFBR2およびCISH/CBLBの組み合わせ編集は、標的細胞に対して依然として比較的ロバストな細胞傷害効果を示した。

【0608】

代替の標的細胞であるACHN RCC細胞を使用して同様の実験を実施した。図54A～154Bは収集したデータを示す。図54に示したように、試験した編集細胞の各々は、1：4のE：Tで腫瘍成長の測定可能な制御を示した。CISH/TGFBR2およびCISH/CBLB（矢印）は、これらの組み合わせで編集されていない細胞よりも、良くはないとしても、同様の性能を示した。図54Bは、1：2のE：Tを使用するTGFb存在下での、関連する実験を示す。再度、CISH/TGFBR2およびCISH/CBLB（矢印）は、これらの組み合わせで編集されていない細胞よりも、良くはないとしても、同様の性能を示した。

【0609】

図55A～55Dは、本明細書に提供される特定の編集の効果に関するさらなるデータを示す。図55Aは、編集の28日後の786-O標的細胞に対する種々の指示された編集に関する細胞傷害曲線を示す。図55Bは、図55Aのデータの要約を反映するヒストグラムを示す。図55Bに示したように、CISH/CBLBまたはCISH/TGFBR2の組み合わせ編集は、試験した編集のいずれかの標的細胞に対して最もロバストな細胞傷害性をもたらした。図55C/55Dは、TGFbが共培養において存在する場合の対応するデータを示す。注目すべきことに、再度、CISH/CBLBまたはCISH/TGFBR2の組み合わせ編集は、TGFbの抑制効果にもかかわらず、試験した編集のいずれかの標的細胞に対して最もロバストな細胞傷害性をもたらした。

【0610】

図56A～56Dは、標的細胞としてACHN細胞を使用する、本細書に提供される特定の編集の効果に関するさらなるデータを示す。図56Aは、編集の28日後のACHN標的細胞に対する種々の指示された編集に関する細胞傷害性曲線を示す。図56Bは、図56Aのデータの要約を反映するヒストグラムを示す。図56Bに示したように、CISH/CBLBまたはCISH/TGFBR2の組み合わせ編集は、試験した編集のいずれかの標的細胞に対して最もロバストな細胞傷害性をもたらした。図56C/56Dは、TGFbが共培養において存在する場合の対応するデータを示す。注目すべきことに、再度、CISH/CBLBまたはCISH/TGFBR2の組み合わせ編集は、TGFbの抑制効果にもかかわらず、試験した編集のいずれかの標的細胞に対して最もロバストな細胞傷害性をもたらした。

【0611】

これらのデータを総合すると、複数の遺伝子標的で編集された場合には、NK細胞（またはT細胞）などの編集された免疫細胞の細胞傷害性が予想外に強力に増大されることが実証される。例えば、別の標的と組み合わせ、CISタンパク質の発現または機能を減少させるか、実質的に排除するか、または排除するための編集の組み合わせは、編集された細胞の細胞毒性および／または持続性の増大をもたらす。いくつかの実施形態では、CISHに対する編集およびCBLBの発現を減少させるか、実質的に排除するか、または排除する編集が提供され、腫瘍の種類に関係なく（例えば、腫瘍を標的とする任意のCARとともに使用される場合）、抗腫瘍効果の増大をもたらす。いくつかの実施形態では、CISH/CBLBの組み合わせ編集は、CD70遺伝子に対する編集なし、および／または抗CD70 CARの発現なしで使用される。いくつかの実施形態では、CISH/CBLBの組み合わせ編集は、抗CD19 CARの発現なしで使用される。いくつかの実施形態では、CISH/CBLBの組み合わせ編集は、抗CD19 CARのさらなる編集なし、およびその発現なしで使用される。

【0612】

さらなる実施形態では、別の標的と組み合わせ、CISタンパク質発現または機能を減少、実質的に除去、または除去するための編集の組み合わせは、編集された細胞の増強された細胞傷害性および／または持続性をもたらす。いくつかの実施形態では、CISHに対する編集、およびTGFB β 2発現を減少させ、実質的に除去し、または除去するための編集は、腫瘍のタイプ（例えば、腫瘍を標的とする任意のCARとともに使用される場合）に関係なく、増強された抗腫瘍効果について提供され、増強された抗腫瘍効果がもたらされる。いくつかの実施形態では、CISH／TGFB β 2の組み合わせ編集は、CD70遺伝子に対する編集なし、および／または抗CD70 CARの発現なしで使用される。いくつかの実施形態では、CISH／TGFB β 2の組み合わせ編集は、抗CD19 CARの発現なしで使用される。いくつかの実施形態では、CISH／TGFB β 2の組み合わせ編集は、さらなる編集なし、および抗CD19 CARの発現なしで使用される。

10

【0613】

さらなる実施形態では、別の標的と組み合わせ、CISタンパク質発現または機能を減少、実質的に除去、または除去するための編集の組み合わせは、編集された細胞の増強された細胞傷害性および／または持続性をもたらす。いくつかの実施形態では、CISHに対する編集およびTIGIT発現を減少、実質的に除去、または除去する編集は、腫瘍のタイプ（例えば、腫瘍を標的とする任意のCARとともに使用される場合）に関係なく、増強された抗腫瘍効果について提供され、増強された抗腫瘍効果がもたらされる。いくつかの実施形態では、CISH／TIGIT組み合わせ編集は、CD70遺伝子に対する編集なし、および／または抗CD70 CARの発現なしで使用される。いくつかの実施形態では、CISH／TIGIT組み合わせ編集は、抗CD19 CARの発現なしで使用される。いくつかの実施形態では、CISH／TIGIT組み合わせ編集は、さらなる編集なし、および抗CD19 CARの発現なしで使用される。

20

【0614】

さらなる実施形態

いくつかの実施形態では、遺伝子操作されたNK細胞および遺伝子操作されたT細胞のうちの1つ以上を含む、遺伝子操作された免疫細胞集団が提供され、複数の遺伝子操作された免疫細胞は、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞傷害性受容体を発現するように操作され、遺伝子操作された免疫細胞は、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターを発現するように遺伝子操作され、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは抑制細胞の望ましくない細胞傷害活性に対して抑制効果を発揮し、適宜、遺伝子操作された免疫細胞は、以下：IL-15、mbIL-15、細胞傷害性受容体の1つまたは複数の細胞外領域内に組み込まれた少なくとも1つのウイルス免疫抑制ペプチド、遺伝子操作された免疫細胞の細胞膜上に発現された少なくとも1つのウイルス免疫抑制ペプチド、細胞傷害性受容体の1つまたは複数の細胞外領域内に組み込まれたヒト免疫抑制タンパク質またはタンパク質複合体の少なくとも1つの部分、遺伝子操作された免疫細胞の細胞膜上に発現されたヒト免疫抑制タンパク質またはタンパク質複合体の少なくとも1つの部分、ならびに／または遺伝子操作された免疫細胞の細胞膜上に発現され、および／もしくは細胞傷害性受容体の1つ以上の細胞外領域に組み込まれた少なくとも1つのキメラウイルス-ヒト免疫抑制コンストラクトのうちの1つ以上を発現するようにさらに編集されている。

30

40

【0615】

いくつかの実施形態では、複数の遺伝子操作されたNK細胞および複数の遺伝子操作されたT細胞を含む、遺伝子操作された免疫細胞集団もまた提供され、複数の遺伝子操作されたNK細胞および複数の遺伝子操作されたT細胞の各々は、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞傷害性受容体を発現するように操作され、遺伝子操作されたNK細胞はまた、膜結合IL15を発現するように操作され、遺伝子操作された免疫細胞は、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターを

50

発現するように遺伝子操作され、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、抑制細胞の望ましくない細胞傷害活性に対して抑制効果を発揮し、複数の遺伝子操作されたT細胞によって発現される少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、HLA-Eまたはウイルス免疫抑制ペプチドを含み、HLA-Eまたはウイルス免疫抑制ペプチドは、遺伝子操作されたT細胞に対するNK細胞活性を一時的に抑制するように構成され、NK細胞活性は、対象への投与後に宿主NK細胞から、または複数の遺伝子操作されたNK細胞から生じ、また、遺伝子操作されたNK細胞の活性の一時的な抑制は、遺伝子操作されたNK細胞の消耗を減少させ、投与後の遺伝子操作された細胞集団の持続性を延長させる。

【0616】

いくつかの実施形態では、複数の遺伝子操作されたNK細胞を含む、がん免疫療法のための遺伝子操作された免疫細胞集団がさらに提供され、複数の遺伝子操作されたNK細胞は、細胞傷害性受容体を発現するように操作され、細胞傷害性受容体は、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含み、遺伝子操作されたNK細胞は、膜結合IL-15を発現するように操作され、遺伝子操作された免疫細胞は、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターを発現するように遺伝子操作され、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、抑制細胞の望ましくない細胞傷害活性に対して抑制効果を発揮し、遺伝子操作された免疫細胞は、上記免疫抑制エフェクターを含まない細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す。

【0617】

いくつかの実施形態では、集団は、第2のタイプの免疫細胞をさらに含む。いくつかの実施形態では、第2のタイプの免疫細胞は、遺伝子操作されたT細胞または他の免疫細胞を含む。

【0618】

いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞傷害性受容体を発現する、遺伝子操作された免疫細胞を含む、がん免疫療法のための遺伝子操作された免疫細胞集団もまた提供され、免疫細胞は、編集されていない免疫細胞と比較して、編集された標的部位を含む遺伝子によってコードされるタンパク質の減少したレベルの発現をもたらすように、免疫細胞のゲノムにおける1つ以上の標的部位で遺伝子編集され、編集は、CRISPR/Casシステムを用いて行われ、遺伝子操作された免疫細胞は、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターを発現するようにさらに操作され、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、ナチュラルキラー細胞および／またはT細胞の細胞傷害活性に対して抑制効果を発揮し、遺伝子操作および編集された免疫細胞は、上記免疫抑制エフェクターおよび上記編集された遺伝子を含まない細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す。

【0619】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作されたNK細胞および遺伝子操作されたT細胞のうちの1つ以上を含む、がん免疫療法のための遺伝子操作された免疫細胞集団もまた提供され、遺伝子操作された免疫細胞は、細胞傷害性受容体を発現するように操作され、細胞傷害性受容体は、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含み、免疫細胞は、編集されていない免疫細胞と比較して、編集された標的部位を含む遺伝子によってコードされるタンパク質の減少したレベルの発現をもたらすように、免疫細胞のゲノムの1つ以上の標的部位で遺伝子編集され、編集は、RNAガイドエンドヌクレアーゼを用いて行われ、遺伝子操作された免疫細胞は、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターを発現するようにさらに遺伝子操作され、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、望ましくない細胞の細胞傷害活性に対して抑制効果を発揮し、望ましくない細胞は、操作されていないナチュラルキラー細胞、操作されていないT細胞、または望ましくない操作された細胞のうちの1つ以上を含み、遺伝子操作された免疫細胞は、上記免疫抑制エフェクターおよび上記編集された遺伝子を含まない細胞と比較して、増

10

20

30

40

50

大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す。

【0620】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作されたNK細胞および遺伝子操作されたT細胞のうちの1つ以上を含む、がん免疫療法のための遺伝子操作された免疫細胞集団が提供され、複数の遺伝子操作された免疫細胞は、細胞傷害性受容体を発現するように操作され、細胞傷害性受容体は、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含み、免疫細胞は、編集されていない免疫細胞と比較して、編集された標的部位を含む遺伝子によってコードされるタンパク質の減少したレベルの発現をもたらすように、免疫細胞のゲノムの1つ以上の標的部位で遺伝子編集され、免疫細胞は、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターを発現するように遺伝子操作され、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは抑制細胞の望ましくない細胞傷害活性に対して抑制効果を発揮し、遺伝子操作された免疫細胞は、上記免疫抑制エフェクターを含まない細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す。

10

【0621】

いくつかの実施形態では、抑制細胞は、宿主細胞、操作されていないナチュラルキラー細胞、操作されていないT細胞、および／または操作された抑制細胞を含む。いくつかの実施形態では、操作された抑制細胞は、遺伝子操作された免疫細胞を含む。

20

【0622】

いくつかの実施形態では、上記免疫抑制エフェクターを含まない細胞は、操作されていない細胞または操作された細胞のいずれかである。

【0623】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作された免疫細胞はまた、ベーター2ミクログロブリン(B2M)の発現を減少させるように遺伝子編集され、B2Mの発現の減少は、内因性レベルのB2Mを発現する免疫細胞と比較して、宿主対移植片拒絶を減少させる同種異系がん免疫療法において免疫細胞を使用することを可能にする。

【0624】

いくつかの実施形態では、細胞傷害性受容体は、標的腫瘍細胞によって発現されるNKG2D、CD19、BCMA、CD70、およびCD38のうちの1つ以上を標的とし、細胞傷害性シグナル伝達複合体は、OX40サブドメインまたは4-1BBドメイン、およびCD3ゼータサブドメインを含む。

30

【0625】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、ウイルス由来ペプチド、レトロウイルス由来ペプチド、レトロウイルスのエンベロープタンパク質由来ペプチド、ヒトタンパク質の少なくとも一部および／またはヒトタンパク質複合体の少なくとも一部を含む。

【0626】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、少なくとも1つのウイルス由来ペプチド、およびヒトタンパク質の少なくとも一部および／またはヒトタンパク質複合体の少なくとも一部を含むキメラコンストラクトを含む。

40

【0627】

いくつかの実施形態では、免疫抑制エフェクターは、核酸によってコードされるか、または配列番号683～894のうちの1つ以上のヌクレオチドもしくはアミノ酸配列と少なくとも85%の配列同一性を有するペプチドを含む。

【0628】

いくつかの実施形態では、免疫抑制エフェクターは、配列番号689と少なくとも95%の配列同一性を有するペプチドを含む。

【0629】

いくつかの実施形態では、免疫抑制エフェクターは、配列番号690と少なくとも95

50

%の配列同一性を有する核酸によってコードされる。

【0630】

いくつかの実施形態では、免疫細胞は、遺伝子操作されたナチュラルキラー（NK）細胞、遺伝子操作されたT細胞、またはそれらの組み合わせを含む。

【0631】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作された免疫細胞は、移植片対宿主疾患のリスクを減少させる同種異系がん細胞療法における使用に適している。

【0632】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作された免疫細胞は、遺伝子操作された免疫細胞間の細胞傷害活性のリスクを減少させる同種異系がん細胞療法における使用に適している。

【0633】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作された免疫細胞の少なくとも一部は、膜結合IL-15を発現するように操作される。

【0634】

いくつかの実施形態では、NK細胞の少なくとも約60%は、NKG2Aに対して陽性である。

【0635】

いくつかの実施形態では、NK細胞の少なくとも約80%は、NKG2Aに対して陽性である。

【0636】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、細胞傷害性受容体に：（i）膜貫通ドメインと細胞外リガンド結合ドメインの間、（ii）細胞外リガンド結合ドメイン内、（iii）細胞外リガンド結合ドメインがscFvを含み、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターがscFvのリンカー領域に組み込まれる、（iv）細胞外リガンド結合ドメインから遠位に位置する細胞傷害性受容体のN末端領域内、および／または（v）細胞傷害性受容体の細胞外領域内の複数の位置で組み込まれる。

【0637】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、免疫細胞の細胞外膜に結合される。

【0638】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、膜貫通タンパク質を含み、膜貫通タンパク質は、CD8 α 、CD4、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ζ 、CD28、CD137、グリコホリンA、グリコホリンD、ニコチン性アセチルコリン受容体、GABA受容体、Fc ϵ RI γ 、およびT細胞受容体から選択される。

【0639】

いくつかの実施形態では、免疫抑制エフェクターは、ジスルフィドトラップー本鎖三量体（dtSCT）によって免疫細胞上に発現される。

【0640】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される実施形態のいずれかに従って、遺伝子操作された免疫細胞を対象に投与することを含む、対象におけるがんを処置する方法が提供される。いくつかの実施形態では、がんを処置するためまたはがんを処置するための医薬を調製するために、本明細書に開示される実施形態による遺伝子操作された免疫細胞の使用が提供される。

【0641】

いくつかの実施形態では、がん免疫療法のための遺伝子操作された免疫細胞集団を製造する方法が提供され、編集されていない免疫細胞と比較して、編集された標的部位を含む遺伝子によってコードされるタンパク質の減少したレベルの発現をもたらすように、免疫細胞集団を、RNAガイドエンドヌクレアーゼと接触させて、免疫細胞のゲノムにおける1つ以上の標的部位を遺伝子編集すること；免疫細胞集団を、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞傷害性受容体をコ

10

20

30

40

50

ードするポリヌクレオチドと接触させること；免疫細胞集団を、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターをコードするさらなるポリヌクレオチドと接触させることを含み、免疫抑制エフェクターは、核酸によってコードされるか、または配列番号683～894のヌクレオチドもしくはアミノ酸配列のうちの1つ以上と少なくとも85%の配列同一性を有するペプチドを含み；少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、抑制細胞の細胞傷害活性に対して抑制効果を発揮し、遺伝子操作された免疫細胞は、上記少なくとも1つの免疫抑制エフェクターを含まない細胞と比較して、増大した拡大能力、標的細胞に対する増大した細胞傷害性、および増大した持続性のうちの1つ以上を示す。

【0642】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集の標的は、CISH遺伝子、B2M遺伝子、CD70遺伝子、アデノシン受容体遺伝子、NKG2A遺伝子、CITTA遺伝子、TGFB_R遺伝子のうちの1つ以上、またはそれらの任意の組み合わせである。

【0643】

また、遺伝子操作された免疫細胞集団を、同種異系がん免疫療法の増強のために操作する方法が提供され、ベーター2ミクログロブリン（B2M）発現を破壊し、免疫細胞の表面上のヒト白血球抗原（HLA）の発現を協調的に減少させるように、NK細胞およびT細胞を含む免疫細胞の混合集団を遺伝子編集し、免疫細胞の表面上のHLAの減少した発現が、編集された免疫細胞集団に対するT細胞媒介性細胞傷害性を減少させ、細胞の表面上のHLAの減少した発現が、編集された免疫細胞集団を編集された免疫細胞に対するNK媒介性細胞傷害性に感受性にし；混合集団中のNK細胞の少なくとも約60%がNKG2A発現に対して陽性であること；ならびに免疫細胞の混合集団に対するNK媒介性細胞傷害性を減少させる1つ以上の免疫抑制エフェクターを発現するように編集された細胞を遺伝子操作し、1つ以上の免疫抑制エフェクターは、ウイルス免疫抑制ペプチド、HLAホモログであるウイルスタンパク質、HLA-E、HLA-G、細胞のファゴサイトーシスを減少させるヒトタンパク質またはその断片、ウイルス免疫抑制ペプチドおよび細胞のファゴサイトーシスを減少させるヒトタンパク質もしくはその断片を含むキメラコンストラクトのうちの1つ以上、またはそれらの組み合わせを含み、減少したT細胞媒介性細胞傷害性は、操作されたNK細胞に対する操作されたT細胞媒介性フラトリサイド型細胞傷害性を減少させ、投与時に、操作されたNK細胞に対する宿主T細胞媒介性細胞傷害性を減少させ、減少したNK細胞媒介性細胞傷害性は、操作されたT細胞に対する操作されたNK細胞媒介性フラトリサイド型細胞傷害性を減少させ、投与時に、操作されたNKおよび操作されたT細胞に対する宿主NK細胞媒介性細胞傷害性を減少させ、それにより、同種異系の対象への投与時に免疫細胞の操作混合集団の持続性の増大を可能にし、同種異系がん免疫療法の増強を可能にする。

【0644】

いくつかの実施形態では、本方法は、免疫細胞の混合集団を、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞傷害性受容体をコードするポリヌクレオチドと接触させることをさらに含む。

【0645】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、標的腫瘍細胞によって発現されるNKG2D、CD19、CD70、BCMA、およびCD38のうちの1つ以上を標的とする細胞傷害性受容体をコードする。

【0646】

いくつかの実施形態では、本方法は、CISH遺伝子、CD70遺伝子、アデノシン受容体遺伝子、NKG2A遺伝子、CITTA遺伝子、TGFB_R遺伝子のうちの1つ以上、またはそれらの任意の組み合わせの発現を変更するように、遺伝子操作された免疫細胞のDNAを遺伝子編集することをさらに含む。

【0647】

いくつかの実施形態では、発現を減少させる遺伝子編集または発現を誘導する遺伝子編集は、CRISPR-Casシステムを用いて行われ、Casは、Cas9、Cas12

10

20

30

40

50

、Cas13、CasXまたはCasYである。

【0648】

さらに、遺伝子操作されたNK細胞および遺伝子操作されたT細胞のうちの1つ以上を含む、遺伝子操作された免疫細胞集団も提供され、遺伝子操作されたNK細胞の少なくとも約70%はNKGAを発現し、複数の遺伝子操作された免疫細胞は、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞傷害性シグナル伝達複合体を含む細胞傷害性受容体を発現するように操作され、遺伝子操作された免疫細胞は、ヒト白血球抗原（HLA）に由来する少なくとも1つの免疫抑制エフェクターを発現するように遺伝子操作され、少なくとも1つの免疫抑制エフェクターは、抑制細胞の望ましくない細胞傷害活性に対して抑制効果を発揮し、適宜、遺伝子操作された免疫細胞は、以下：IL-15、mbIL-15、細胞傷害性受容体の1つまたは複数の細胞外領域内に組み込まれた少なくとも1つのウイルス免疫抑制ペプチド、遺伝子操作された免疫細胞の細胞膜上に発現された少なくとも1つのウイルス免疫抑制ペプチド、細胞傷害性受容体の1つまたは複数の細胞外領域内に組み込まれたヒト免疫抑制タンパク質またはタンパク質複合体の少なくとも1つの部分、遺伝子操作された免疫細胞の細胞膜上に発現されたヒト免疫抑制タンパク質またはタンパク質複合体の少なくとも1つの部分、ならびに／または遺伝子操作された免疫細胞の細胞膜上に発現され、および／もしくは細胞傷害性受容体の1つ以上の細胞外領域に組み込まれた少なくとも1つのキメラウイルス-ヒト免疫抑制コンストラクトのうちの1つ以上を発現するようにさらに操作されている。

【0649】

いくつかの実施形態では、HLAに由来する免疫抑制エフェクターは、HLA-Eペプチドを含む。

【0650】

上記に開示された実施形態の特定の特徴および態様の種々の組み合わせまたはサブ組み合わせを作製することができ、さらに、1つ以上の発明の範囲内に入ることができると企図される。さらに、実施形態に関連する任意の特定の特徴、態様、方法、性質、特性、品質、属性、要素などの本明細書における開示は、本明細書に記載する他の全ての実施形態において使用することができる。したがって、開示された実施形態の種々の特徴および態様は、開示された発明の種々のモードを形成するために、互いに組み合わせることができるかまたは互いに置き換えることができることを理解するべきである。したがって、本明細書に開示される本発明の範囲は、上記された特定の開示された実施形態によって制限されるべきではないことが意図される。さらに、本発明は種々の修飾、および代替形態に感受性が高いが、その具体例を図面に示し、本明細書において詳細に説明する。しかしながら、本発明は、開示された特定の形態または方法に限定されるものではなく、逆に、本発明は、記載された種々の実施形態および添付の請求の範囲の精神および範囲内に入る全ての修飾、均等物および代替物をカバーするものであることが理解されるべきである。本明細書に開示される任意の方法は、示される順序で行われる必要はない。本明細書に開示される方法は、実施者によって取られる特定の行為を含むが、しかしながら、それらは、明示的にまたは黙示的に、それらの行為の第三者の指示を含むこともできる。さらに、本開示の特徴または態様がマーカッシュ群に関して記載される場合、当業者は、本開示がまたそれによってマーカッシュ群の任意の個々のメンバーまたはメンバーのサブグループに関しても記載されていることを認識する。

【0651】

本明細書に開示される範囲はまた、任意のおよび全ての重複、サブ範囲、およびそれらの組み合わせを包含する。「最大（up to）」、「少なくとも」、「より大きい」、「より少ない」、「間」などの用語は、示された数字を含む。「約」または「ほぼ」などの用語の前にある数字は、示された数字を含む。例えば、「約90%」は、「90%」を含む。一部の実施形態では、少なくとも95%の配列同一性または相同性は、参照配列に対する96%、97%、98%、99%、および100%の配列同一性または相同性を含む。さらに、配列がヌクレオチドまたはアミノ酸配列を「含む」として開示される場合、

このような参考文献はまた、他に指示がない限り、配列が、示された配列「を含む」、「からなる」、または「から本質的になる」ことを含むものとする。本明細書で使用される任意のタイトルまたは小見出しは、組織目的であり、本明細書に開示される実施形態の範囲を制限するために使用されるべきではない。

【0652】

本明細書に引用される全ての参考文献は、限定されないが、公開および未公開の出願、特許、および参考資料を含み、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれ、本明細書の一部を構成する。参照によって組み込まれる刊行物および特許または特許出願が本明細書に含まれる開示に矛盾する限りにおいて、本明細書は、いずれのこのような矛盾する資料にも取って代わり、および／または優先することを意図している。

10

【0653】

配列

いくつかの実施形態では、核酸コードの縮重を主要因としながら、本明細書に開示される核酸のいずれかに対応するアミノ酸配列（および／または添付の配列表に含まれる）が提供される。さらに、本明細書に明示的に開示される配列（および／または添付の配列リストに含まれる）とは異なるが、機能的類似性または同等性を有する配列（核酸またはアミノ酸のいずれか）もまた本開示の範囲内で企図される。上記には、突然変異体、切断、置換、または他のタイプの修飾が含まれる。さらに、特定の核酸配列は、配列内に明示的に含まれていなくても、標準遺伝暗号において公知である3つの標準的な停止コドン（TAA、TAG、またはTGA）のうちの1つを含むことが承認されるものである。

20

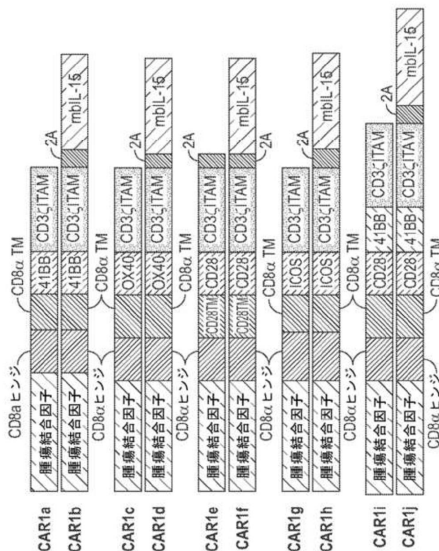
【0654】

本明細書に記載されるいくつかの実施形態に従って、配列のいずれかを使用することができるか、または本明細書に開示される配列（および／または添付の配列表に含まれる）のいずれかの切断または突然変異形態を使用することができ、任意の組み合わせで 사용할ことができる。

【図面】

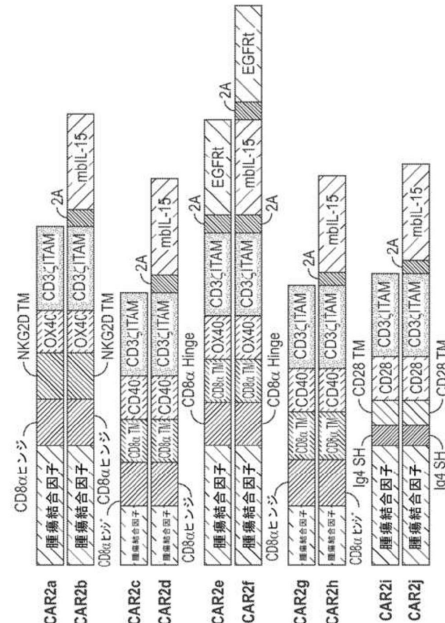
【図1】

【図1】



【図2】

【図2】



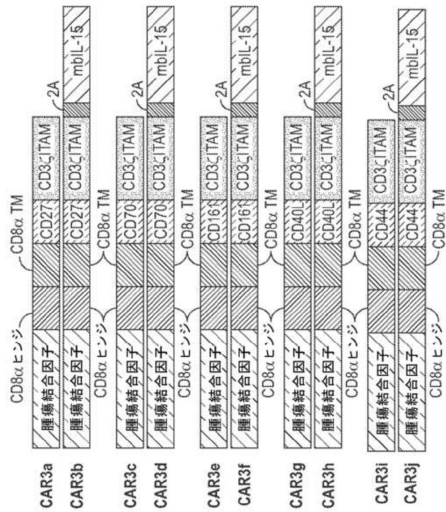
30

40

50

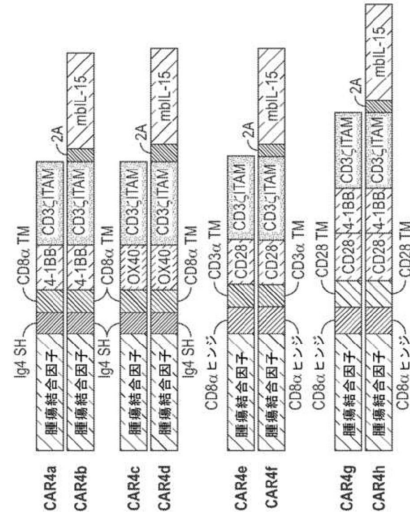
【図 3】

[図 3]



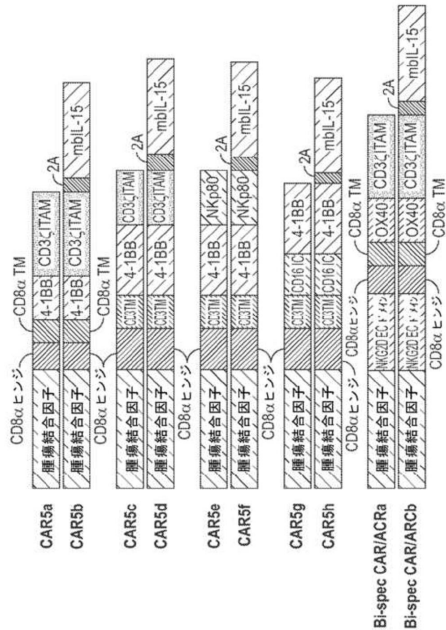
【図 4】

[図 4]



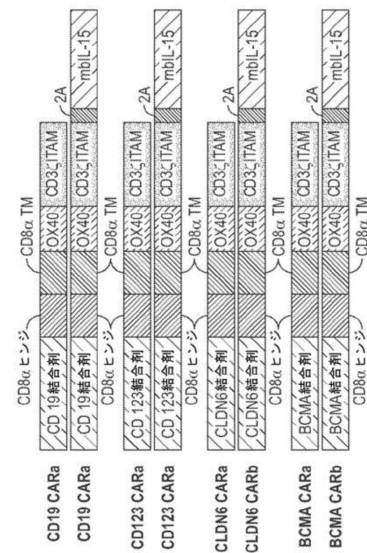
【図 5】

[図 5]



【図 6 - 1】

[図 6 - 1]



10

20

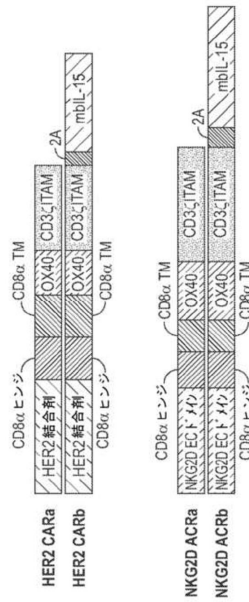
30

40

50

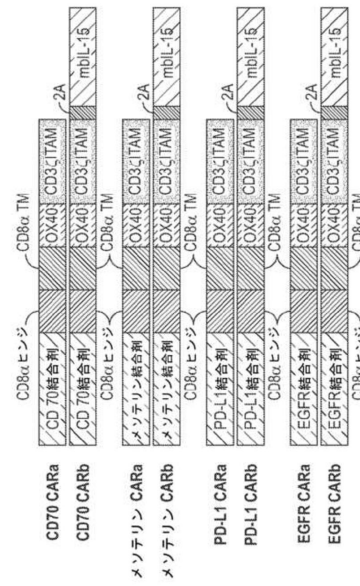
【図 6 - 2】

〔図 6 - 2〕



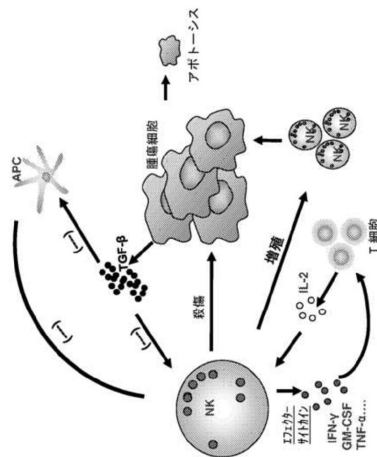
【図 7】

〔図 7〕



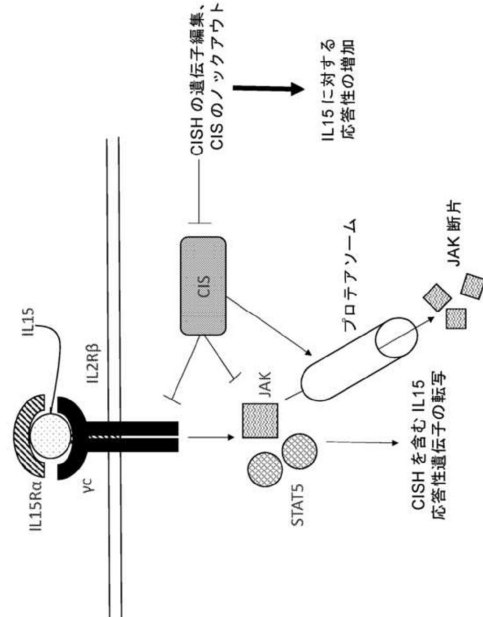
【図 8 - 1】

〔図 8 A〕



【図 8 - 2】

〔図 8 B〕



10

20

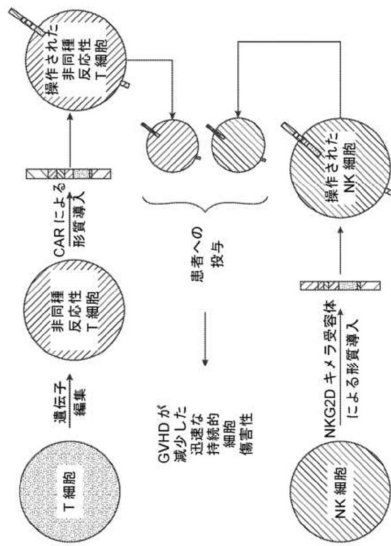
30

40

50

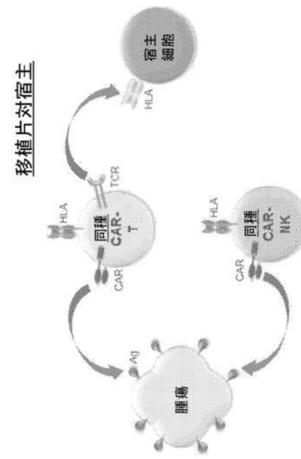
【図 8 - 3】

〔図 8 C〕



【図 8 - 4】

〔図 8 D〕

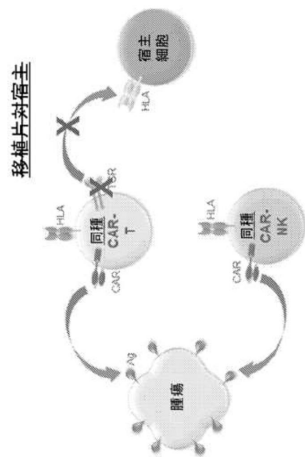


10

20

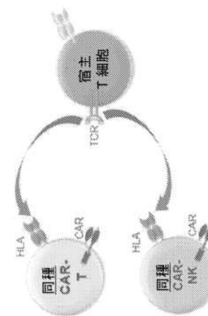
【図 8 - 5】

〔図 8 E〕



【図 8 - 6】

〔図 8 F〕



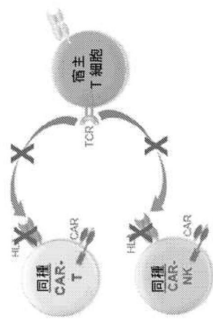
30

40

50

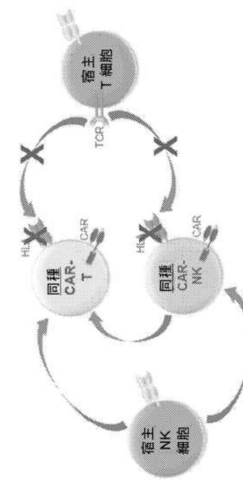
【図 8 - 7】

〔図 8 G〕



【図 8 - 8】

〔図 8 H〕

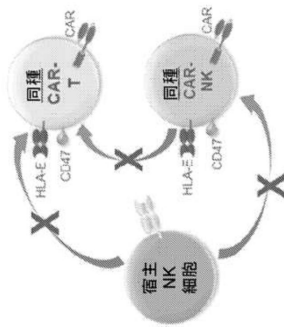


10

20

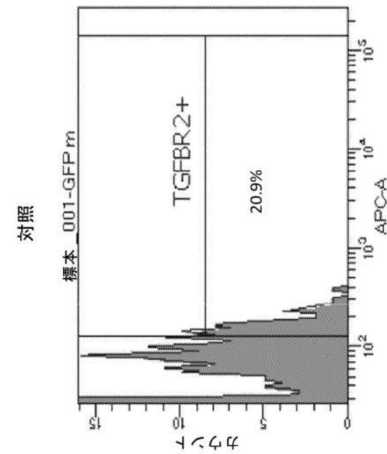
【図 8 - 9】

〔図 8 I〕



【図 9 - 1】

〔図 9 A〕



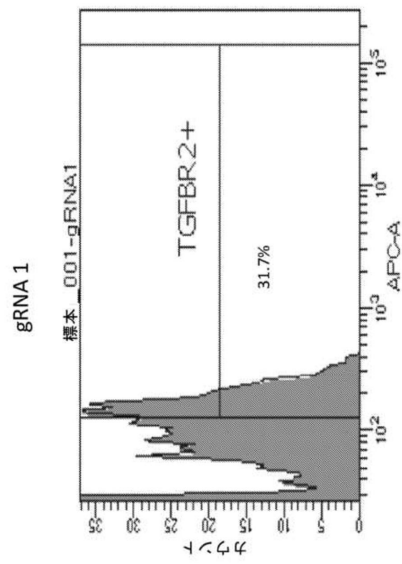
30

40

50

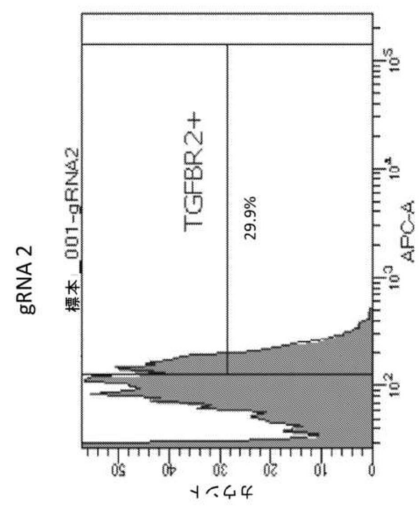
【図 9 - 2】

[図 9 B]



【図 9 - 3】

[図 9 C]

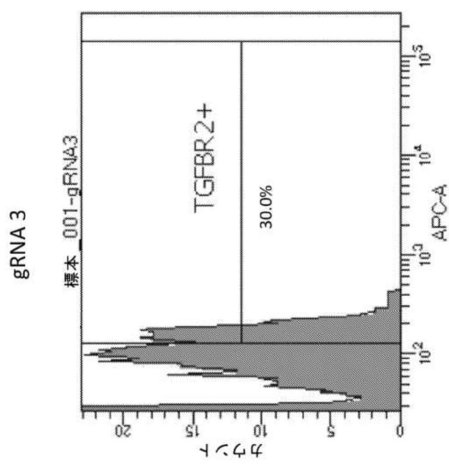


10

20

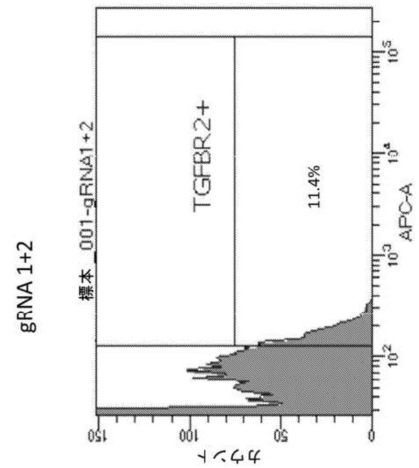
【図 9 - 4】

[図 9 D]



【図 9 - 5】

[図 9 E]



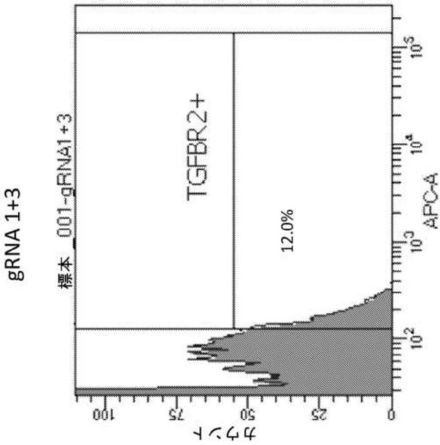
30

40

50

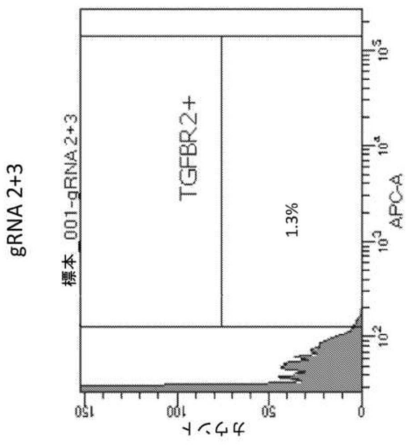
【図 9 - 6】

〔図 9 F〕



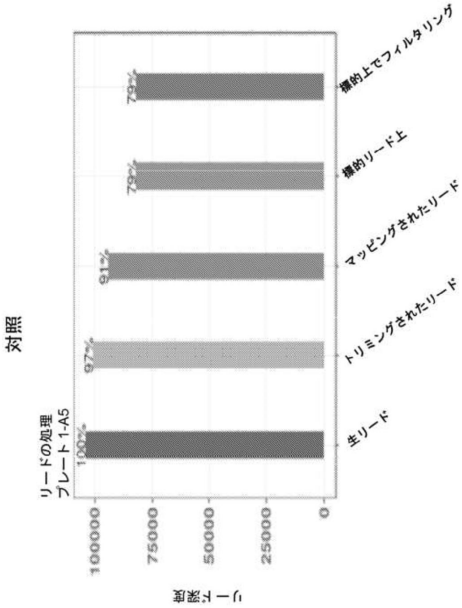
【図 9 - 7】

〔図 9 G〕



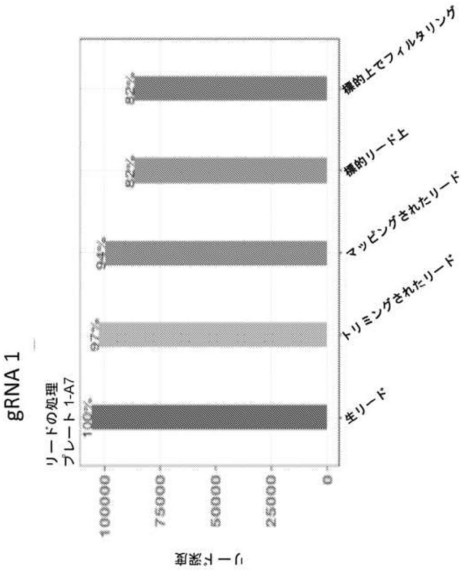
【図 10 - 1】

〔図 10 A〕



【図 10 - 2】

〔図 10 B〕



10

20

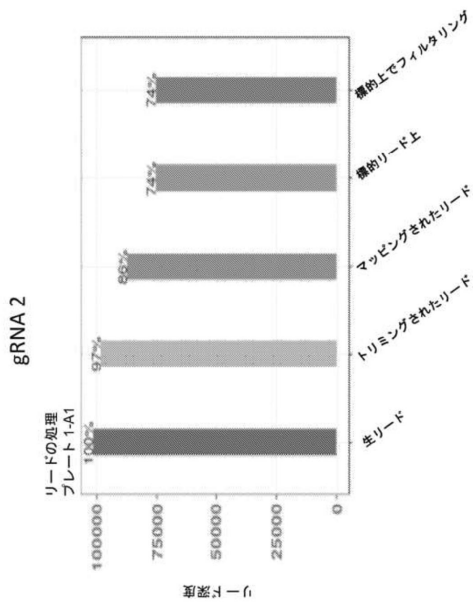
30

40

50

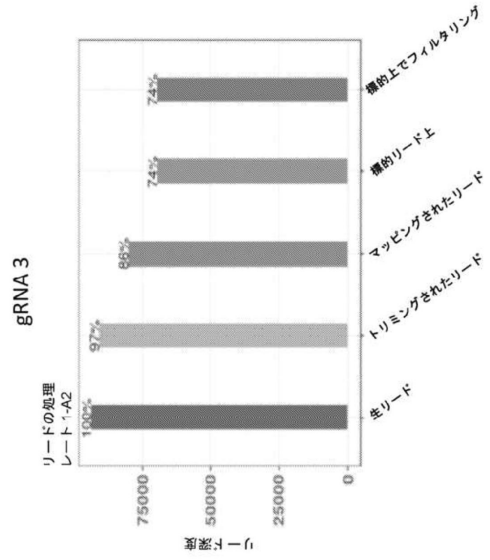
【図 10-3】

〔図 10 C〕



【図 10-4】

〔図 10 D〕

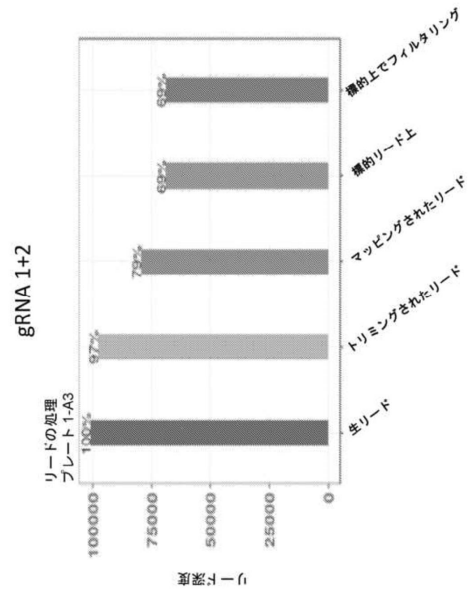


10

20

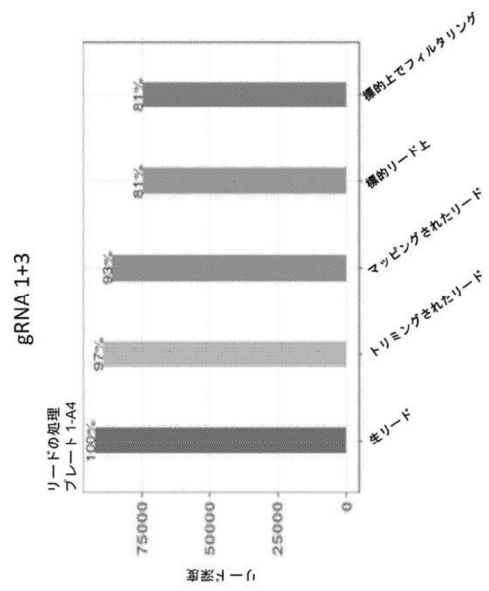
【図 10-5】

〔図 10 E〕



【図 10-6】

〔図 10 F〕



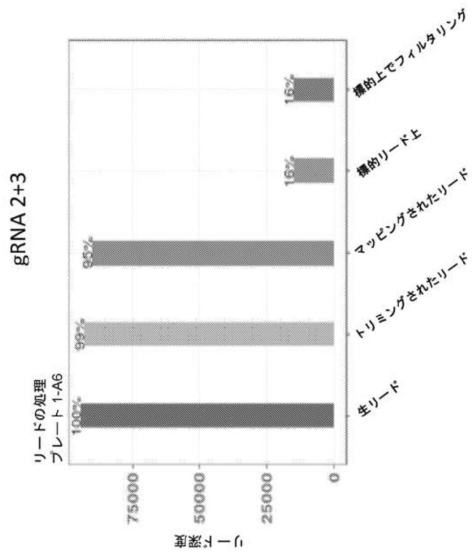
30

40

50

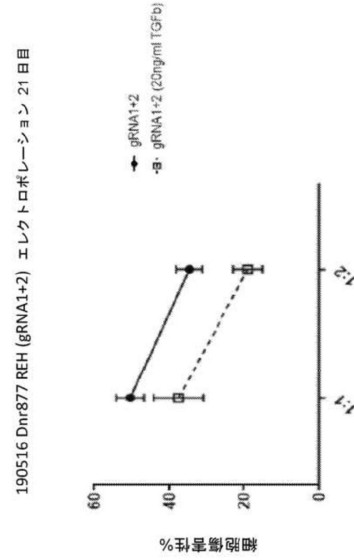
【図 10 - 7】

〔図 10 G〕



【図 11 - 1】

〔図 11 A〕

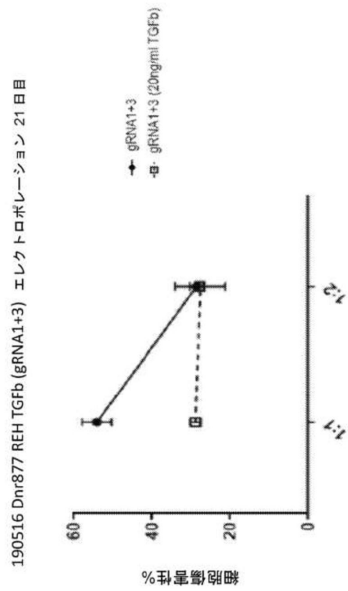


10

20

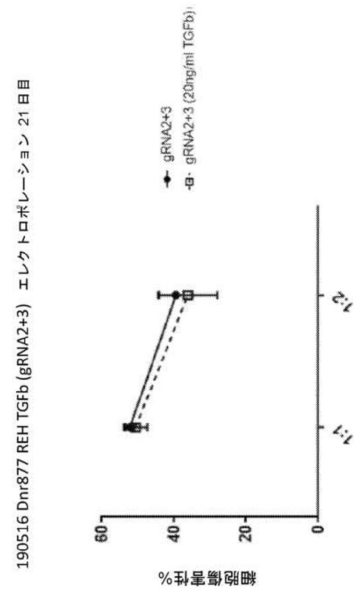
【図 11 - 2】

〔図 11 B〕



【図 11 - 3】

〔図 11 C〕



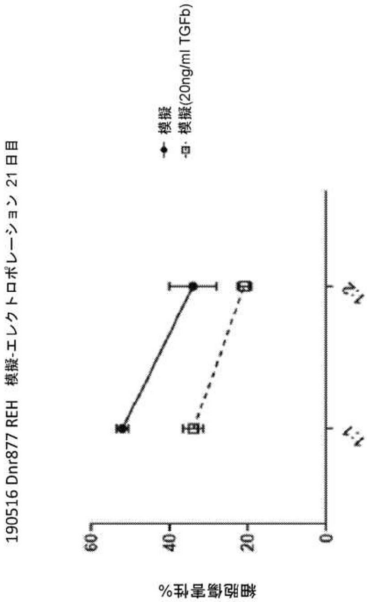
30

40

50

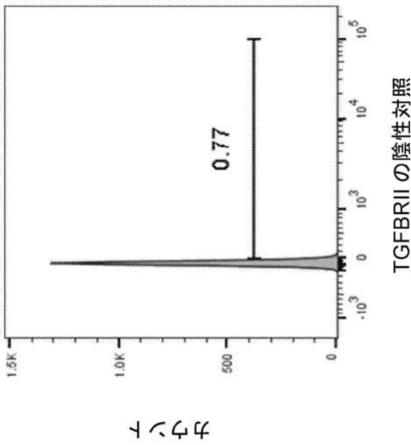
【図 1 1 - 4】

〔図 1 1 D〕



【図 1 2 - 1】

〔図 1 2 A〕

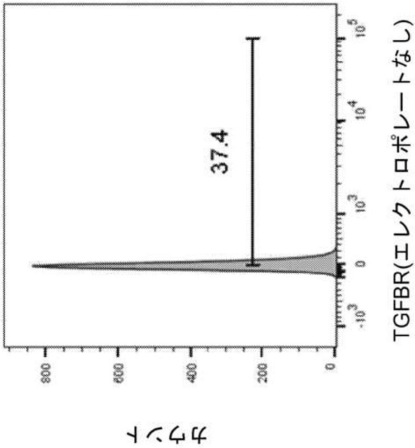


10

20

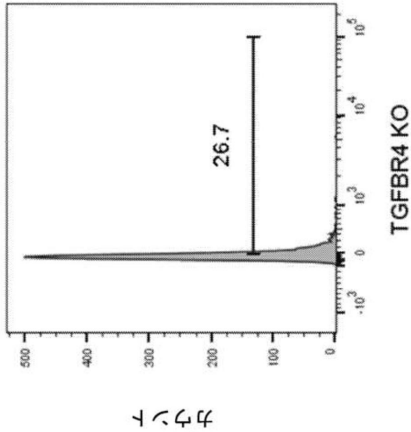
【図 1 2 - 2】

〔図 1 2 B〕



【図 1 2 - 3】

〔図 1 2 C〕



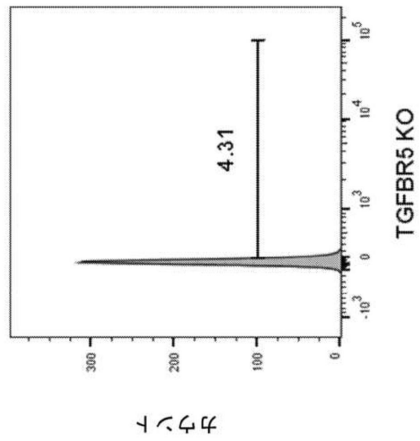
30

40

50

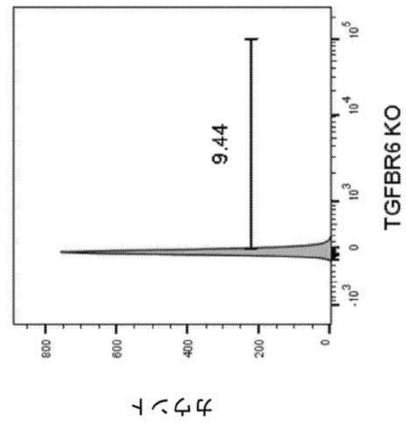
【図 1 2 - 4】

〔図 1 2 D〕



【図 1 2 - 5】

〔図 1 2 E〕

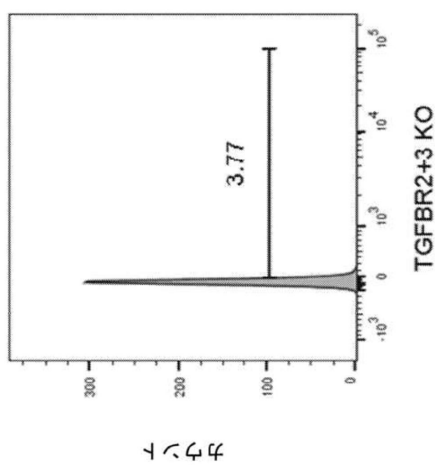


10

20

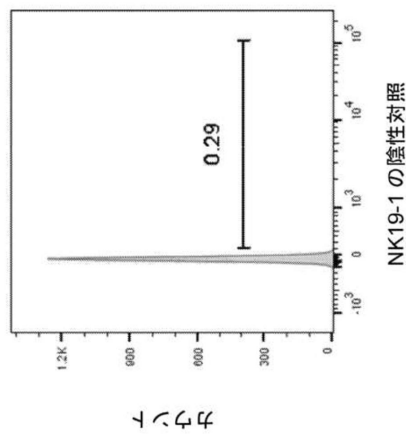
【図 1 2 - 6】

〔図 1 2 F〕



【図 1 3 - 1】

〔図 1 3 A〕



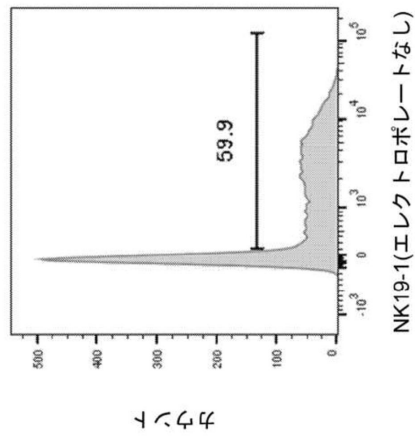
30

40

50

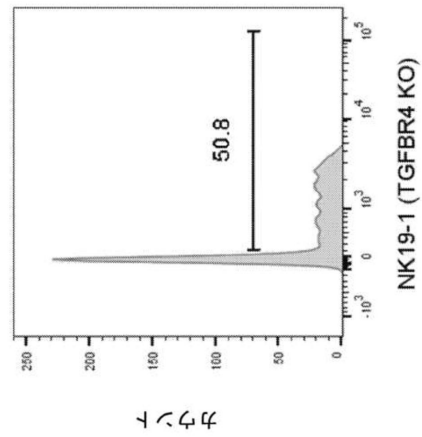
【図 13-2】

[図 13 B]



【図 13-3】

[図 13 C]

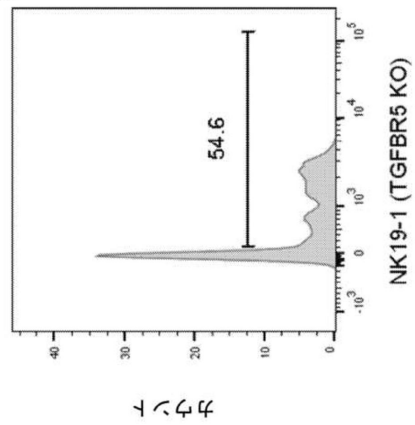


10

20

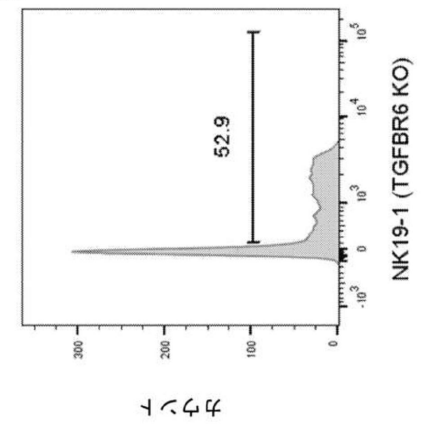
【図 13-4】

[図 13 D]



【図 13-5】

[図 13 E]



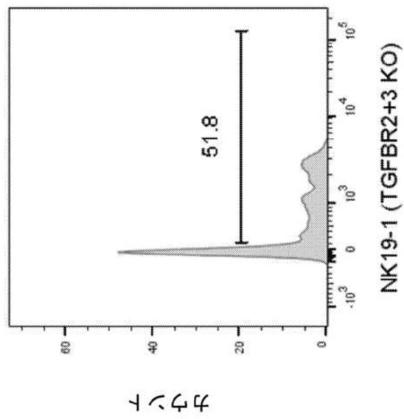
30

40

50

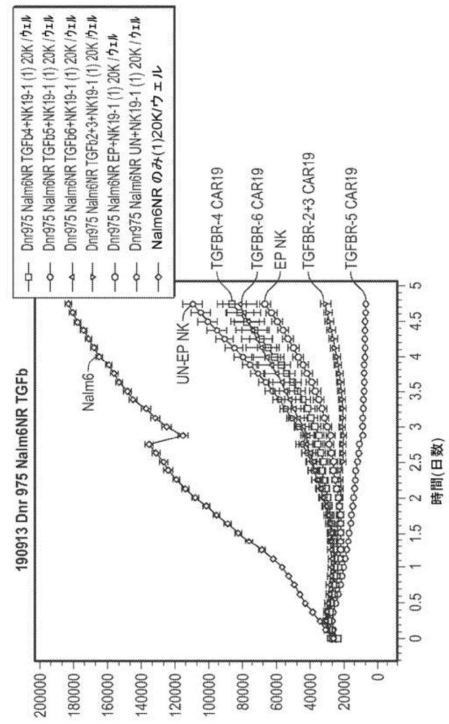
【図 1 3 - 6】

〔図 1 3 F〕



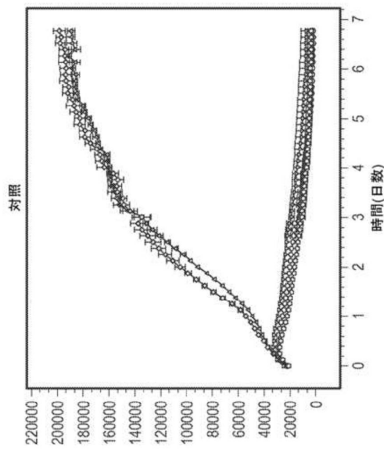
【図 1 4 - 1】

〔図 1 4 A〕



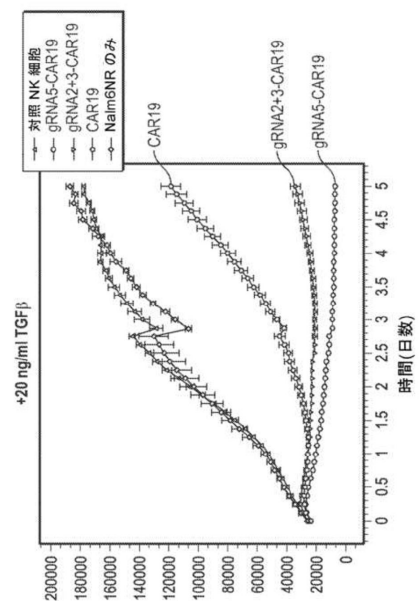
【図 1 4 - 2】

〔図 1 4 B〕



【図 1 4 - 3】

〔図 1 4 C〕



10

20

30

40

50

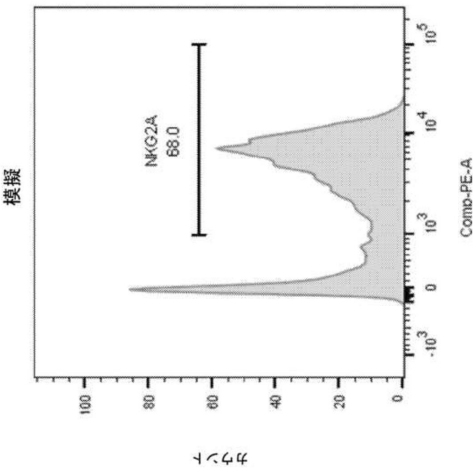
【図 15 - 4】

〔図 15 D〕



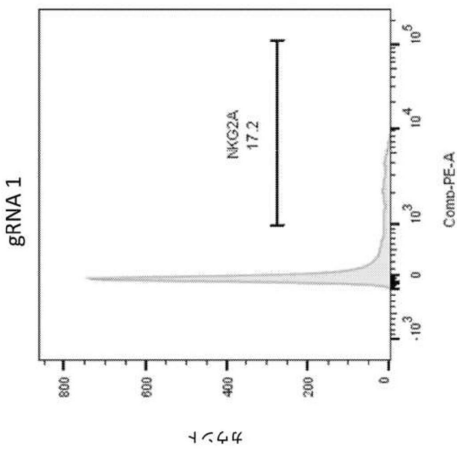
【図 16 - 1】

〔図 16 A〕



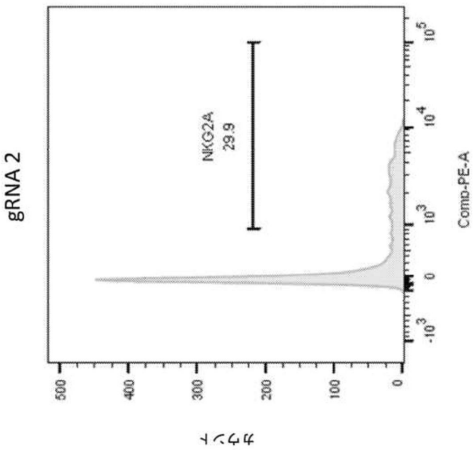
【図 16 - 2】

〔図 16 B〕



【図 16 - 3】

〔図 16 C〕



10

20

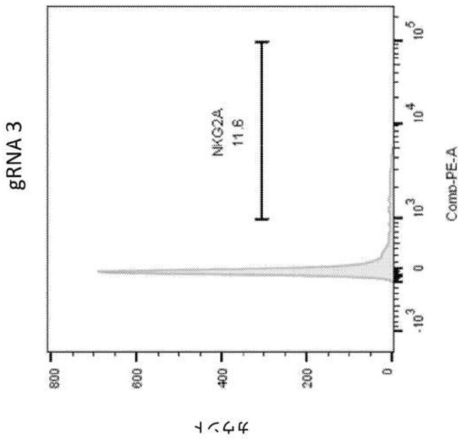
30

40

50

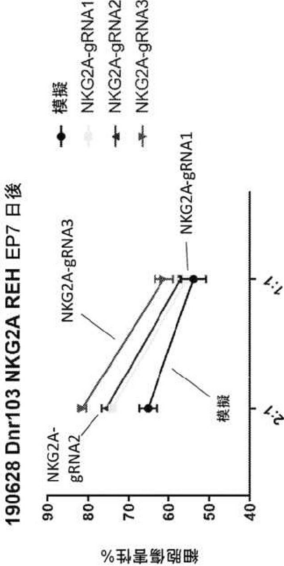
【図 1 6 - 4】

〔図 1 6 D〕



【図 1 7 - 1】

〔図 1 7 A〕

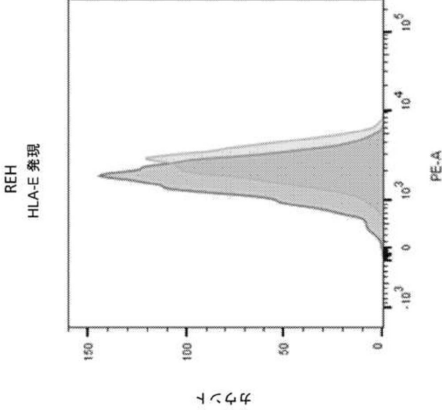


10

20

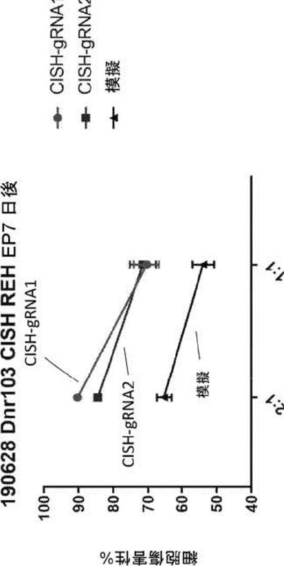
【図 1 7 - 2】

〔図 1 7 B〕



【図 1 8】

〔図 1 8〕



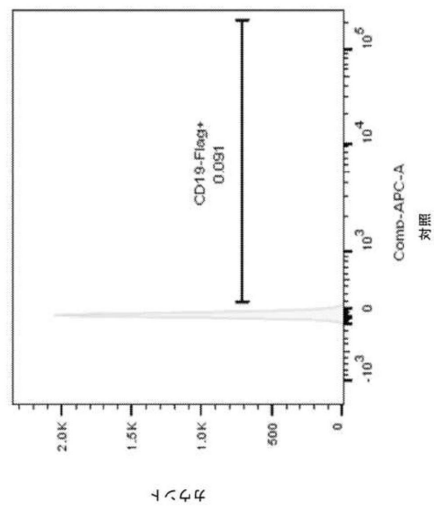
30

40

50

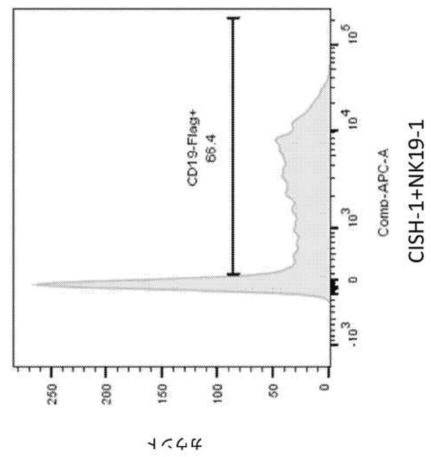
【図 19 - 1】

〔図 19 A〕



【図 19 - 2】

〔図 19 B〕

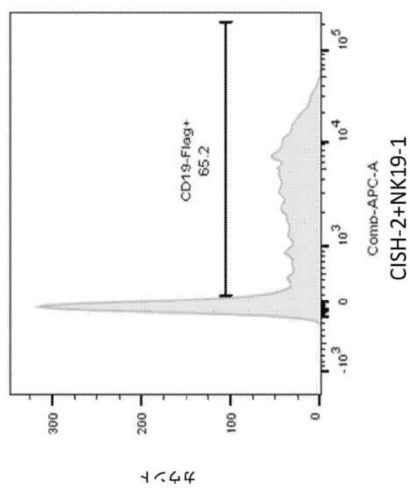


10

20

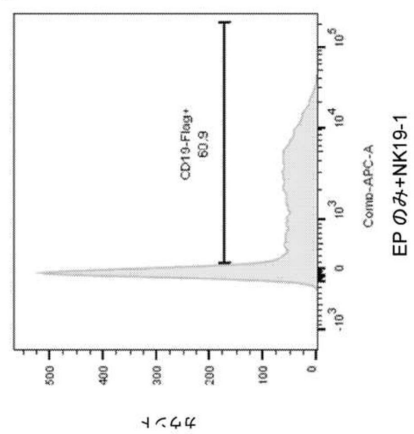
【図 19 - 3】

〔図 19 C〕



【図 19 - 4】

〔図 19 D〕



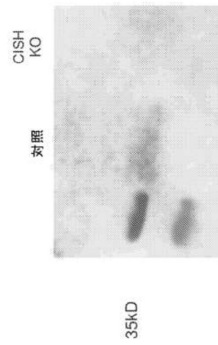
30

40

50

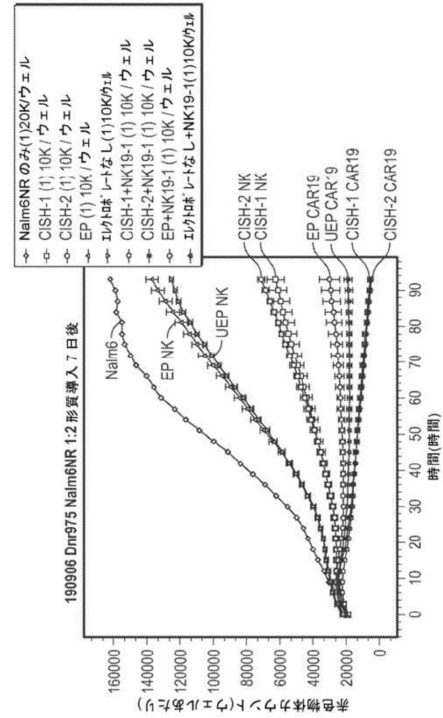
【図 19-5】

【図 19 E】



【図 20-1】

【図 20 A】

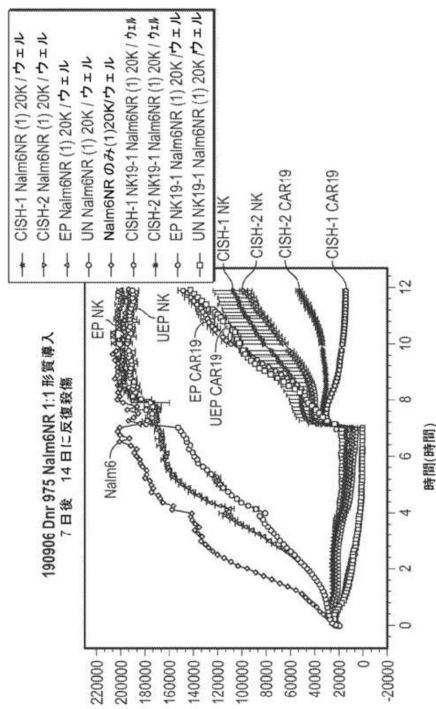


10

20

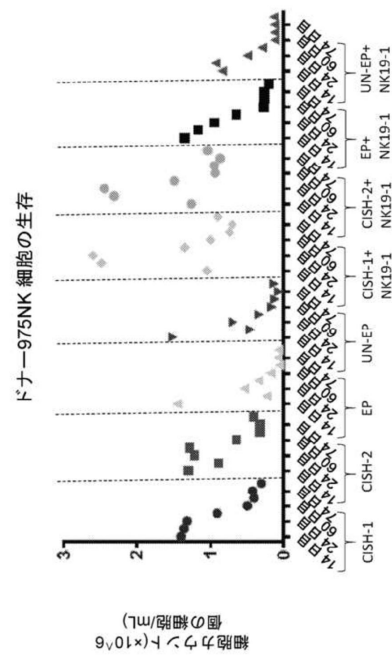
【図 20-2】

【図 20 B】



【図 21-1】

【図 21 A】



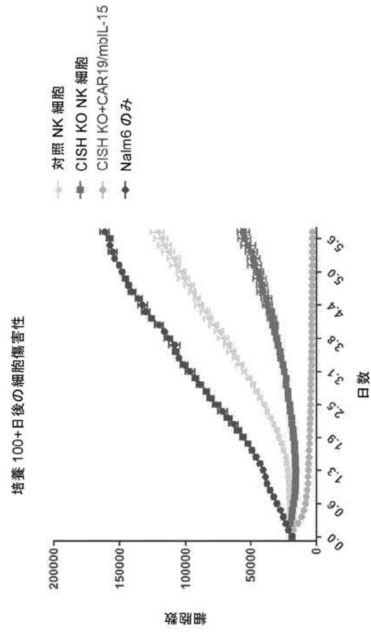
30

40

50

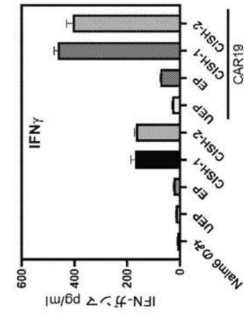
【図 2 1 - 2】

〔図 2 1 B〕

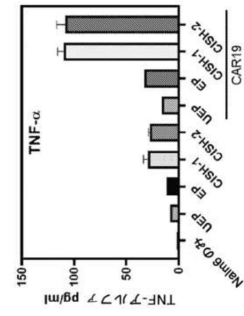


【図 2 2 - 1】

〔図 2 2 A〕

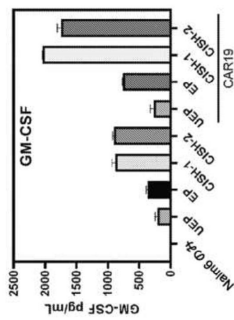


〔図 2 2 B〕

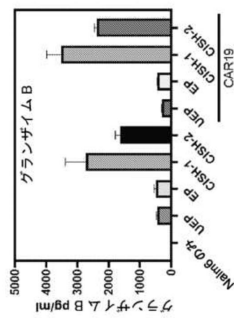


【図 2 2 - 2】

〔図 2 2 C〕

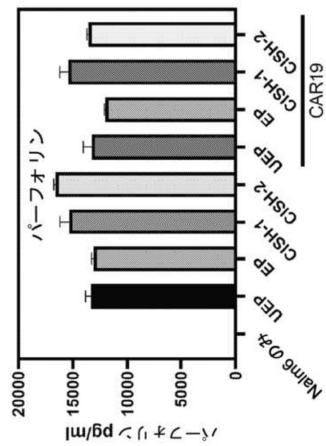


〔図 2 2 D〕



【図 2 2 - 3】

〔図 2 2 E〕



10

20

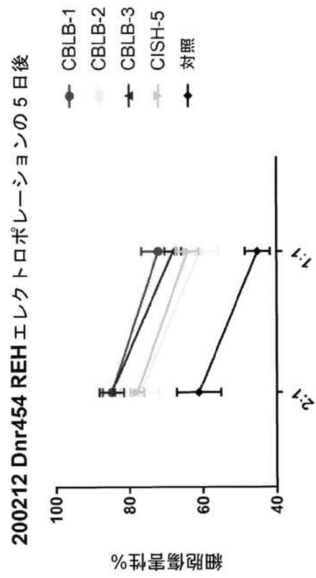
30

40

50

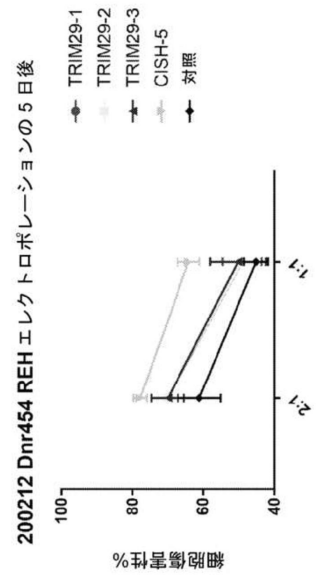
【図 2 3 - 1】

〔図 2 3 A〕



【図 2 3 - 2】

〔図 2 3 B〕

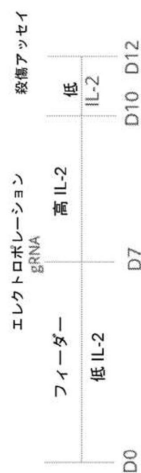


10

20

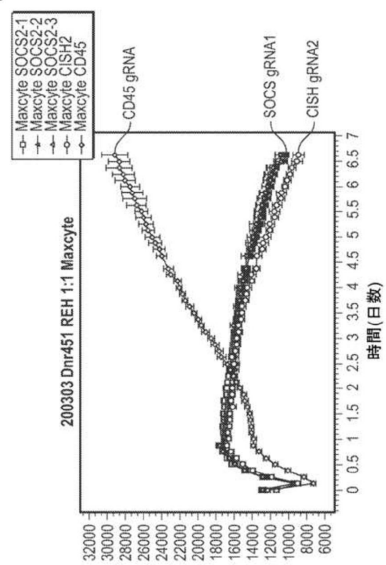
【図 2 3 - 3】

〔図 2 3 C〕



【図 2 4 - 1】

〔図 2 4 A〕



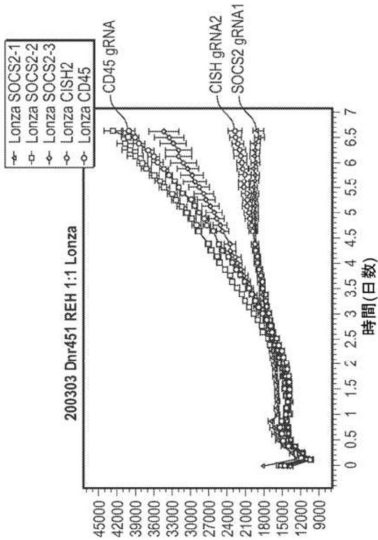
30

40

50

【図 2 4 - 2】

〔図 2 4 B〕



【図 2 4 - 3】

〔図 2 4 C〕

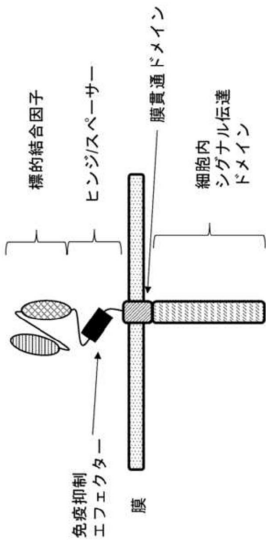


10

20

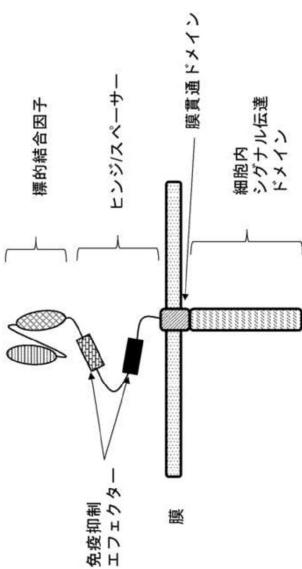
【図 2 5 - 1】

〔図 2 5 A〕



【図 2 5 - 2】

〔図 2 5 B〕



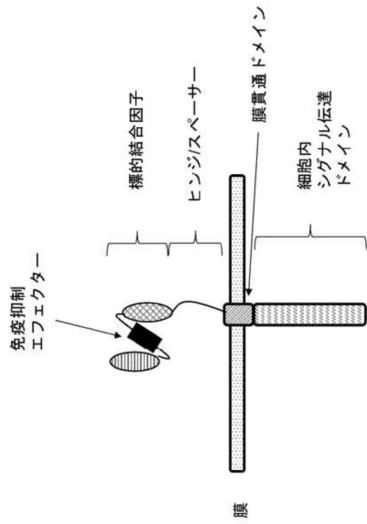
30

40

50

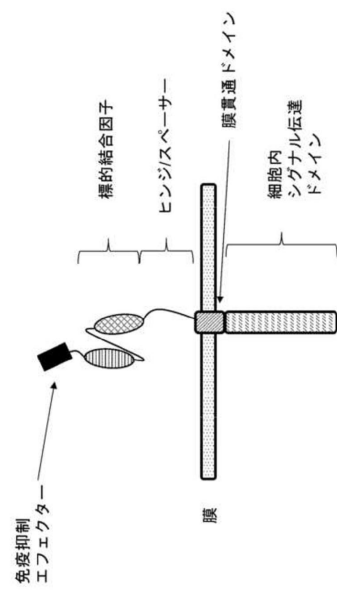
【図 25-3】

〔図 25 C〕



【図 25-4】

〔図 25 D〕

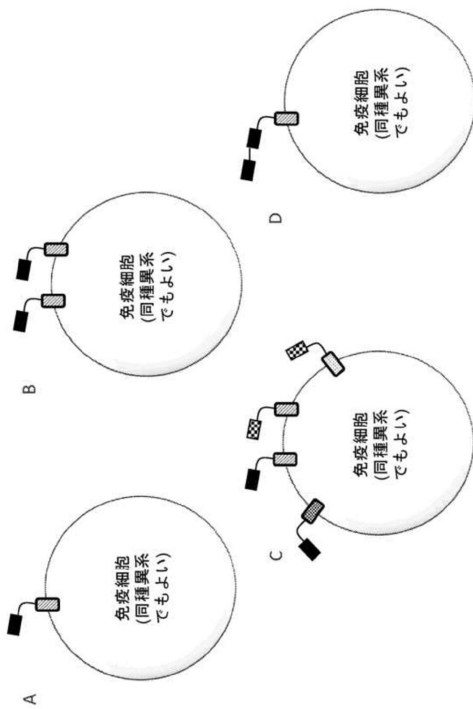


10

20

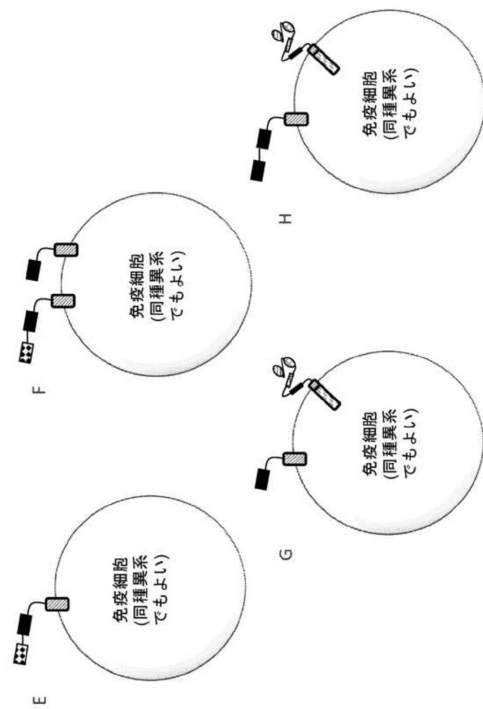
【図 26-1】

〔図 26 A-D〕



【図 26-2】

〔図 26 E-H〕



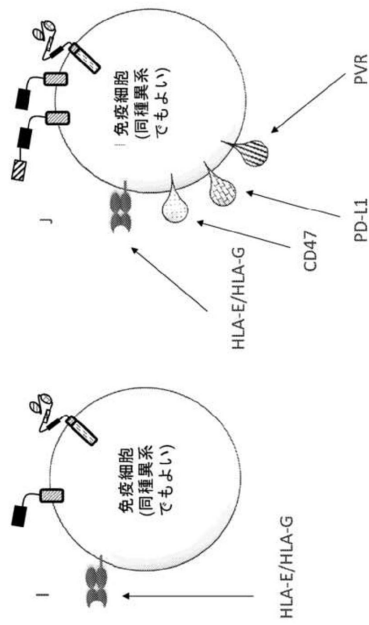
30

40

50

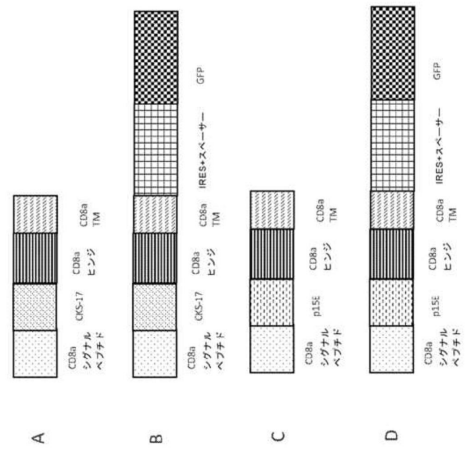
【図 26-3】

〔図 26 I-J〕



【図 27-1】

〔図 27 A-D〕

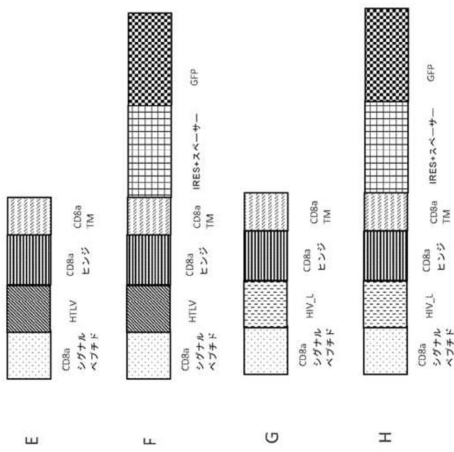


10

20

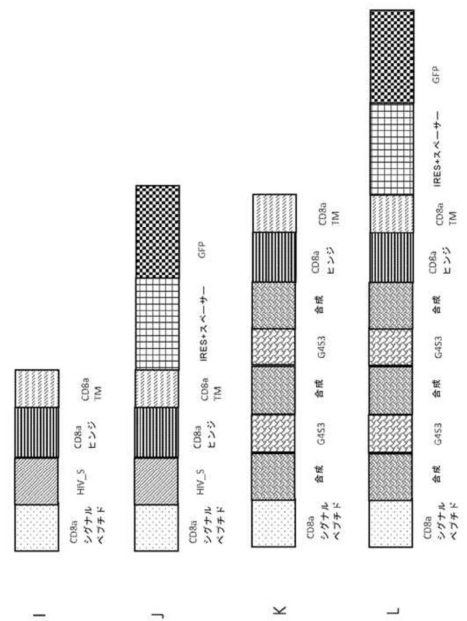
【図 27-2】

〔図 27 E-H〕



【図 27-3】

〔図 27 I-L〕



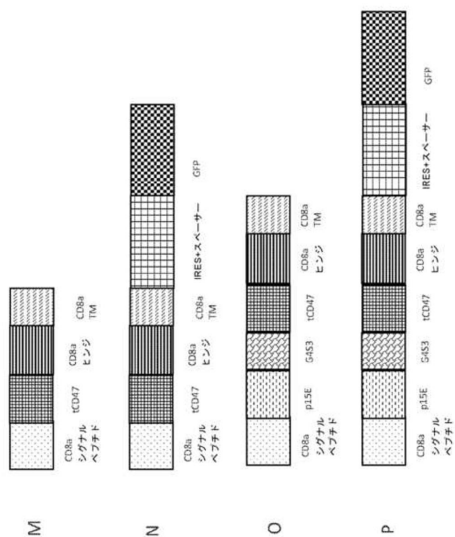
30

40

50

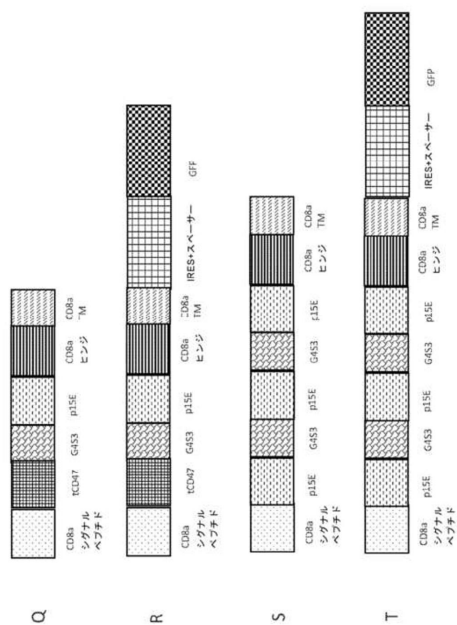
【圖 27-4】

[圖 27M-P]



【圖 27-5】

[图 27 Q-T]

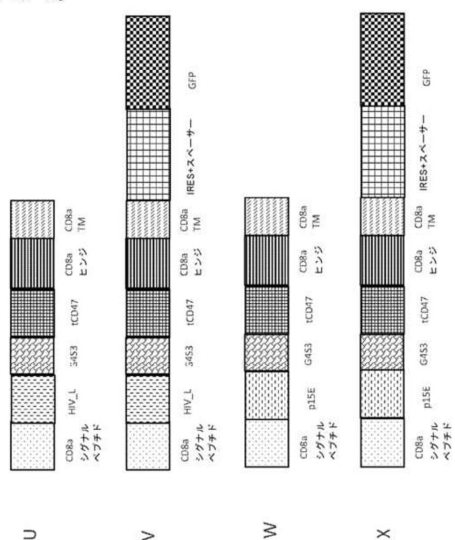


10

20

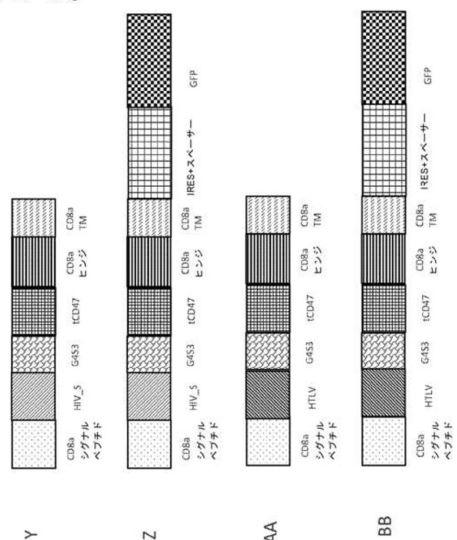
【圖 27-6】

[圖 27 U-X]



【圖 27-7】

[图 27Y-BB]

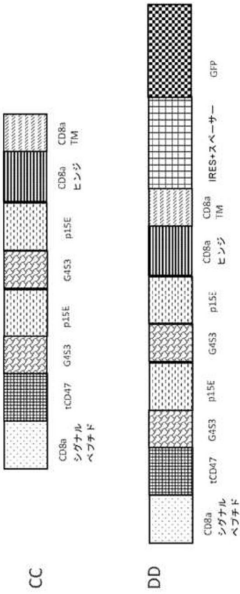


30

40

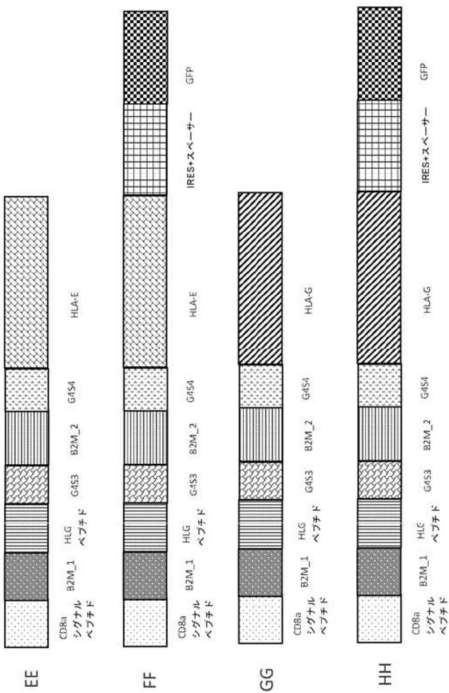
【図 27-8】

〔図 27CC-DD〕



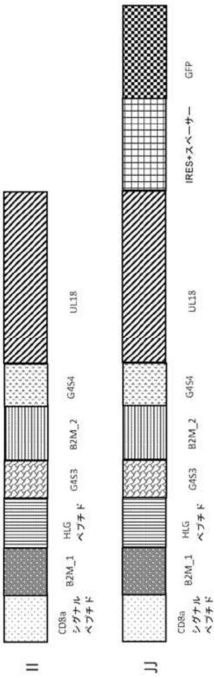
【図 27-9】

〔図 27EE-HH〕



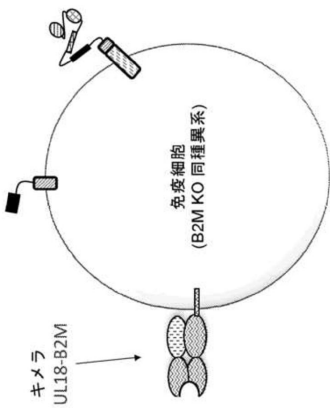
【図 27-10】

〔図 27II-JJ〕



【図 28】

〔図 28〕



10

20

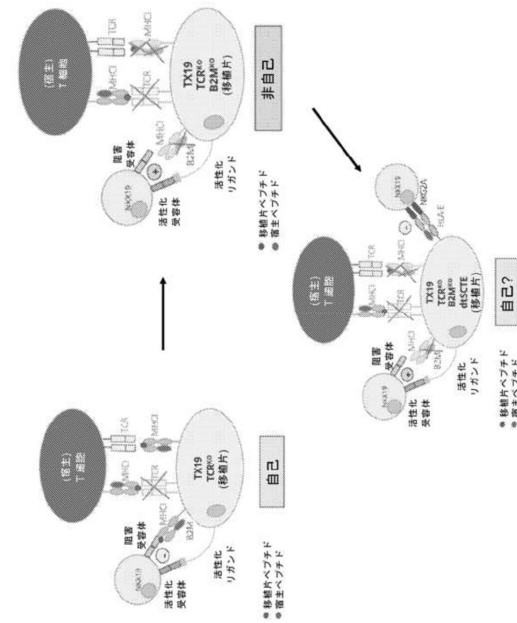
30

40

50

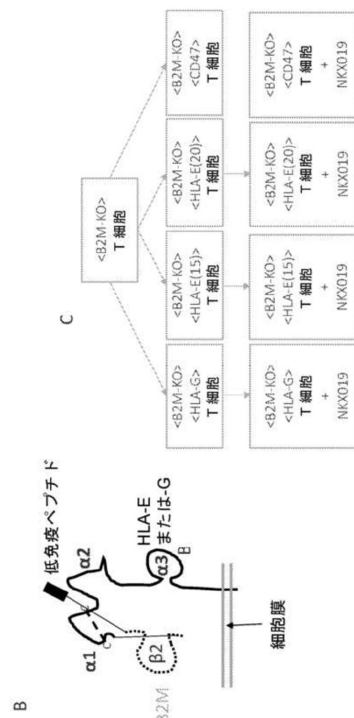
【図 29-1】

[図 29 A]



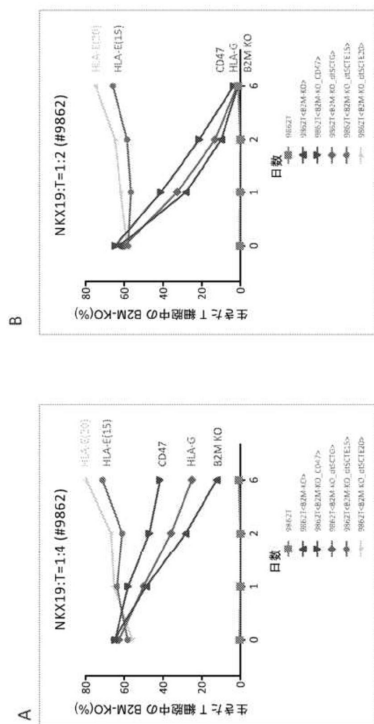
【図 29-2】

[図 29 B-C]



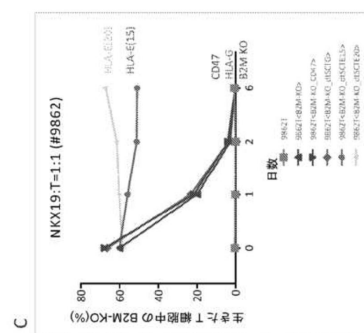
【図 30-1】

[図 30 A-B]



【図 30-2】

[図 30 C]



10

20

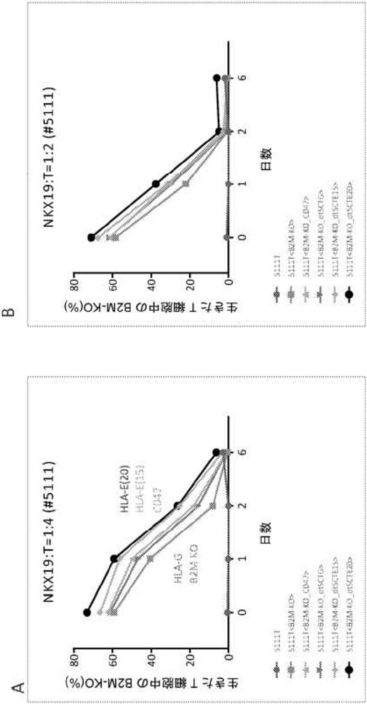
30

40

50

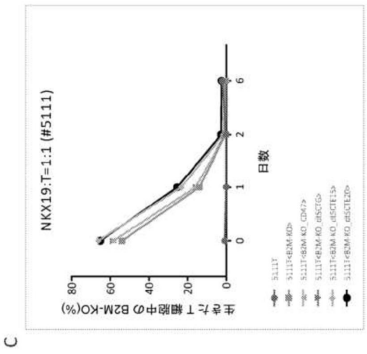
【図 3 1 - 1】

〔図 3 1 A - B〕



【図 3 1 - 2】

〔図 3 1 C〕

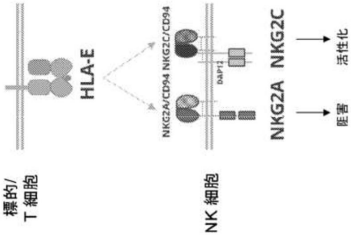


10

20

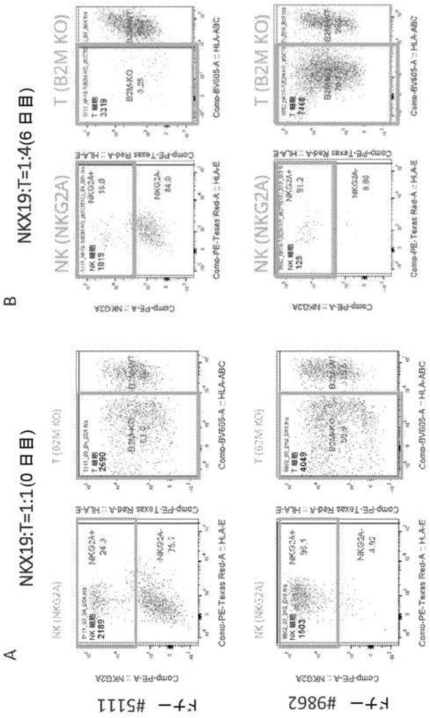
【図 3 2】

〔図 3 2〕



【図 3 3 - 1】

〔図 3 3 A - B〕



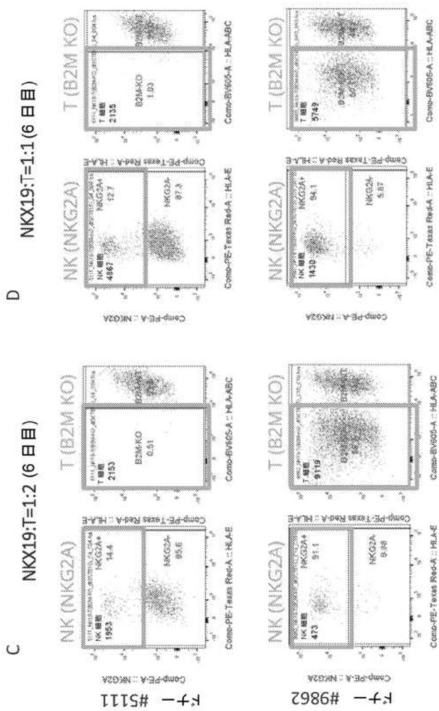
30

40

50

【図 3 3 - 2】

〔図 3 3 C - D〕



【図 3 4】

〔図 3 4〕

細胞	CD155	CD155+	CD155+
DNR #558 NK 調製物	98.0	98.2	98.2
未形質導入 NK 細胞	90.6	87.5	79.8

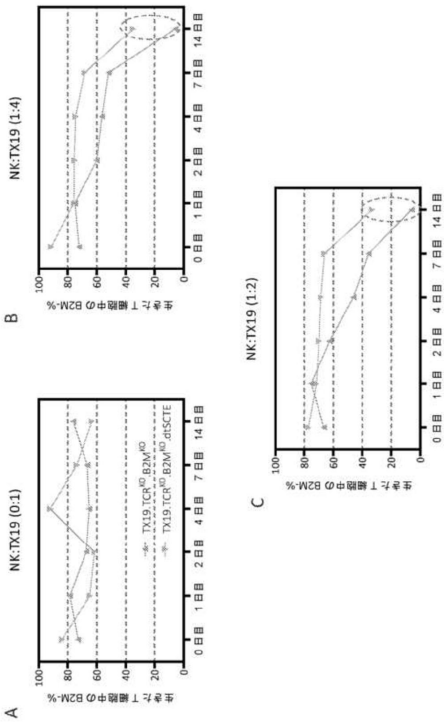
【図 3 5】

〔図 3 5〕

細胞	CD155	CD155+	CD155+
DNR #558 NK 調製物	99.5	99.4	99.6
TX19:TCR ^{hi} B2M ^{hi}	99.5	99.4	99.6
TX19:TCR ^{hi} B2M ^{hi} dSCTE	99.6	99.4	99.6

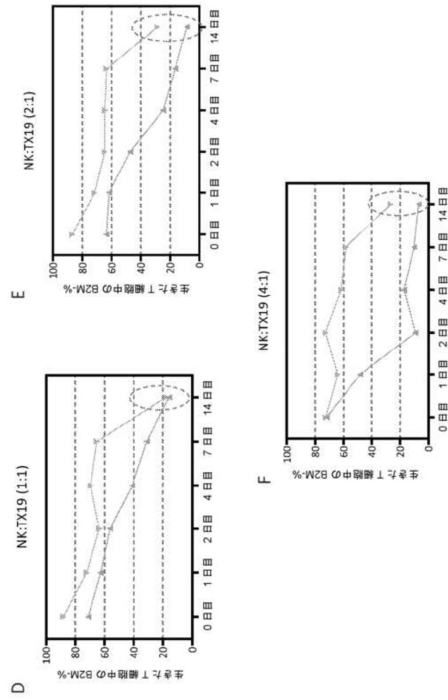
【図 3 6 - 1】

〔図 3 6 A - C〕



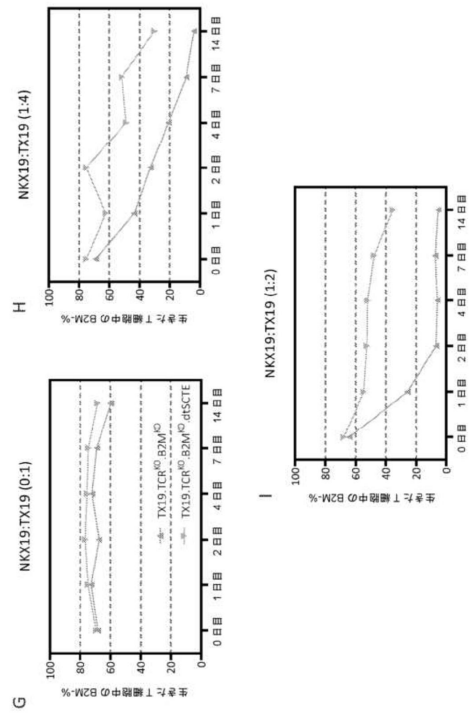
【図 36-2】

〔図 36 D-F〕



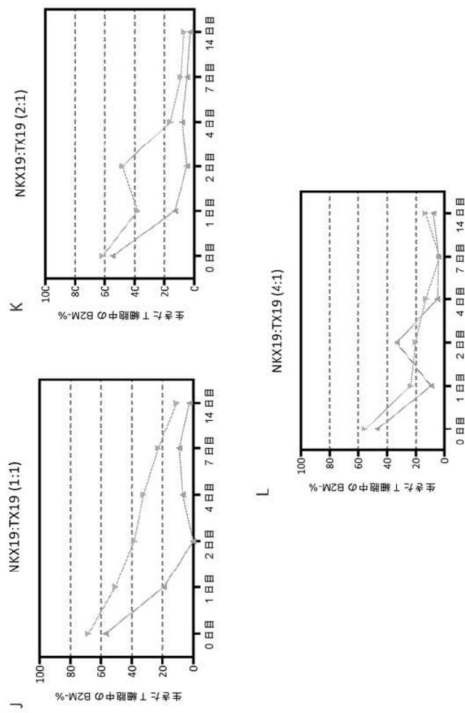
【図 36-3】

〔図 36 G-I〕



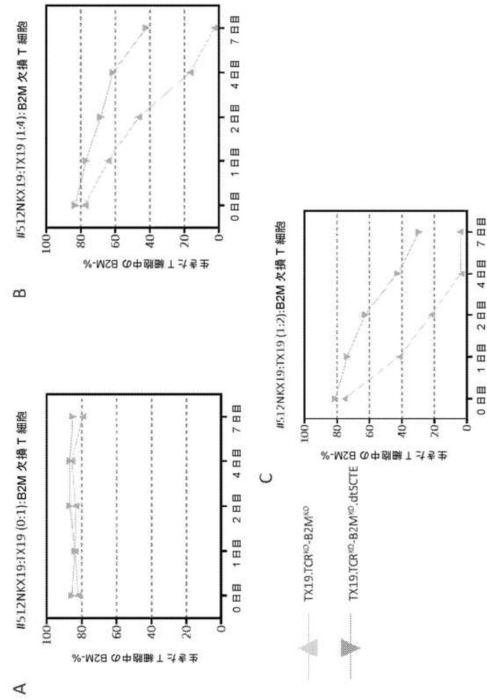
【図 36-4】

〔図 36 J-L〕



【図 37-1】

〔図 37 A-C〕



10

20

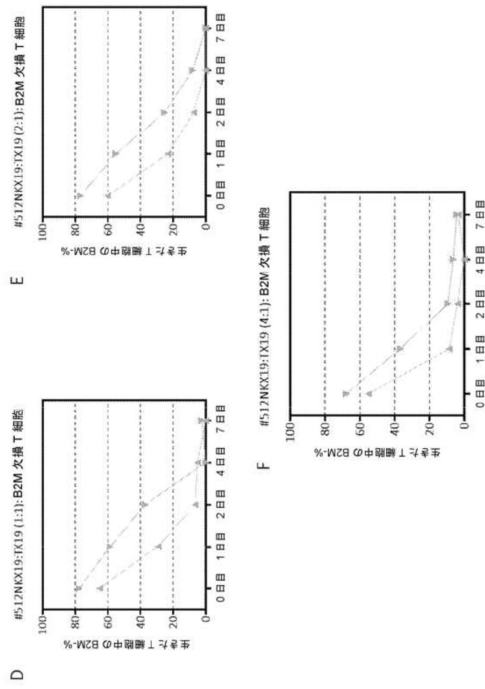
30

40

50

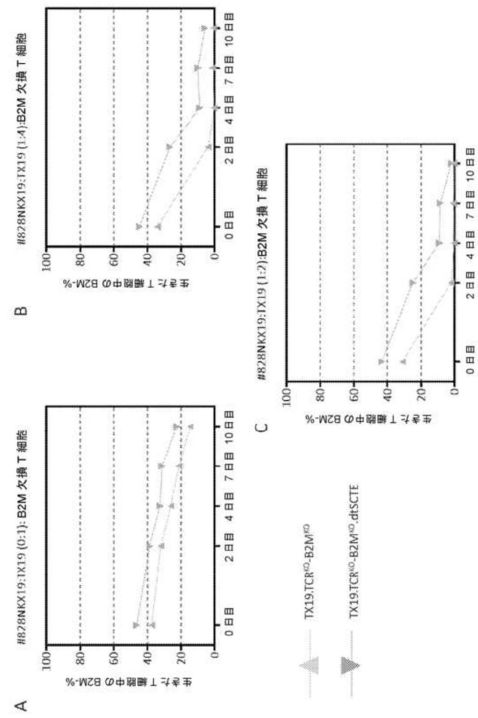
【図 37-2】

[図 37 D-F]



【図 38-1】

[図 38 A-C]

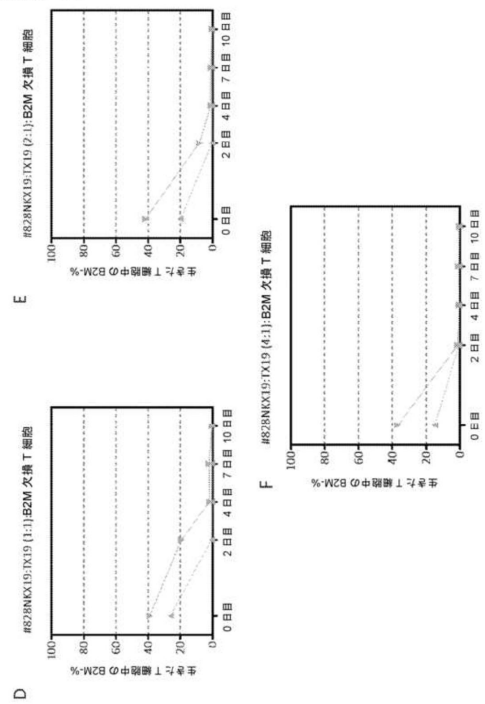


10

20

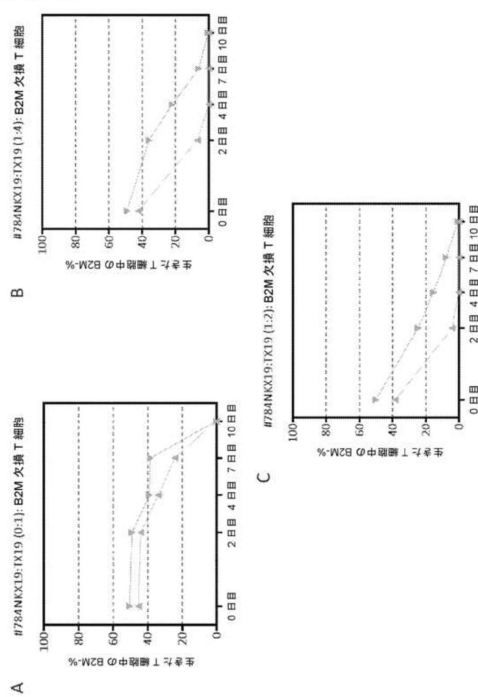
【図 38-2】

[図 38 D-F]



【図 39-1】

[図 39 A-C]



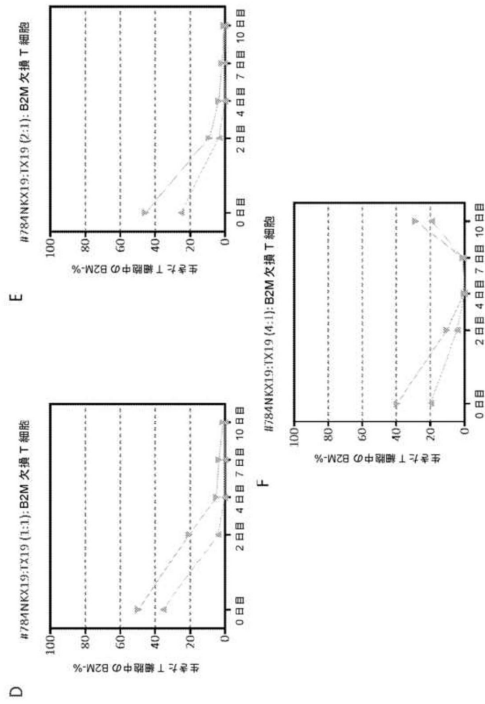
30

40

50

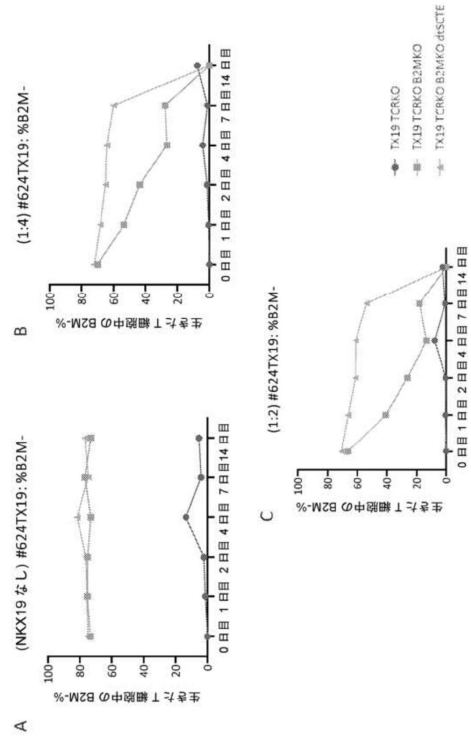
【図 39-2】

【図 39D-P】



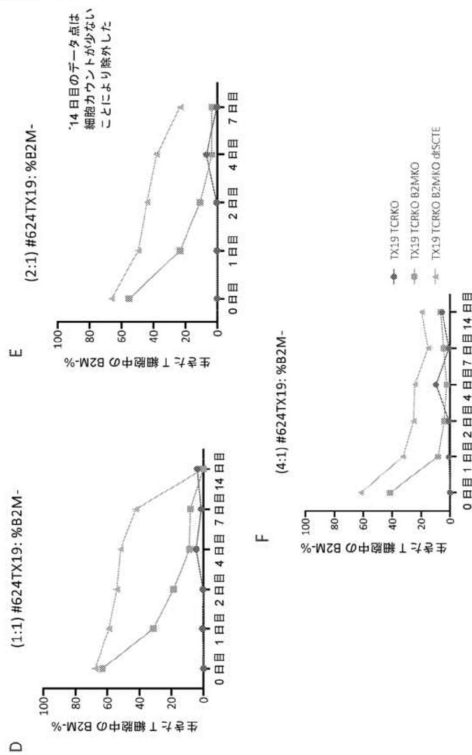
【図 40-1】

【図 40A-C】



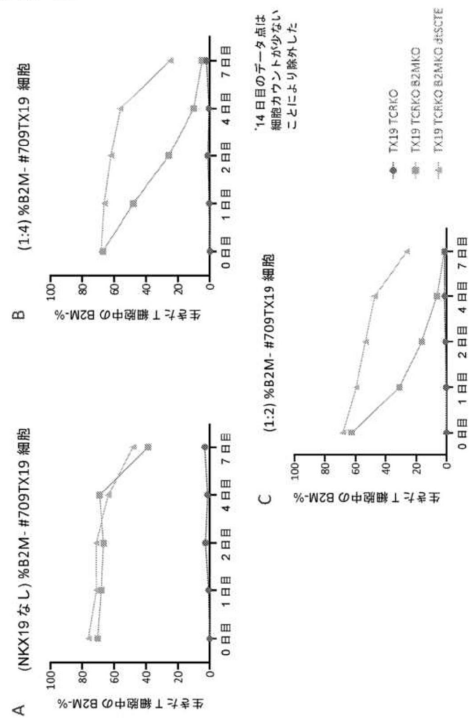
【図 40-2】

【図 40D-P】



【図 41-1】

【図 41A-C】



10

20

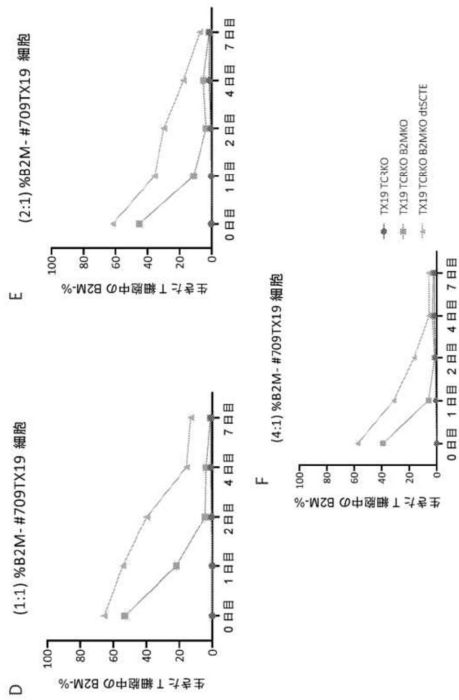
30

40

50

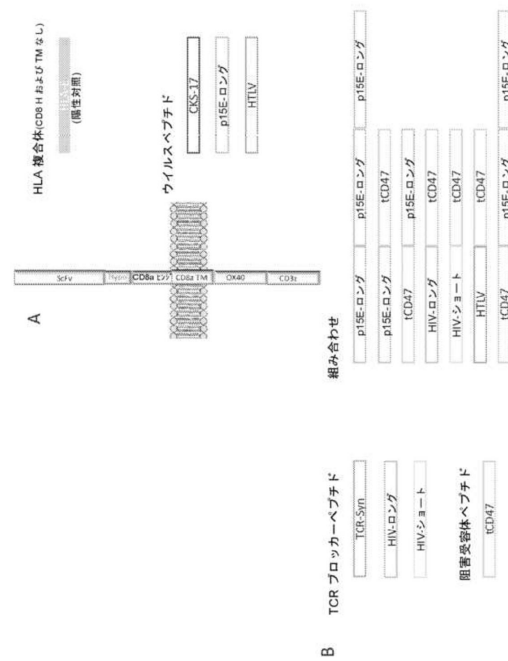
【圖 4 1 - 2】

[圖 4 1 D—F]



【圖 4 2】

[圖 4 2 A-B]

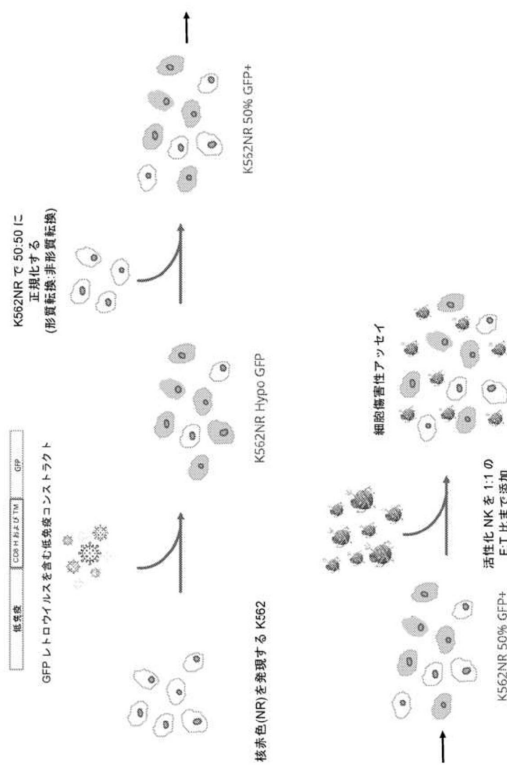


10

20

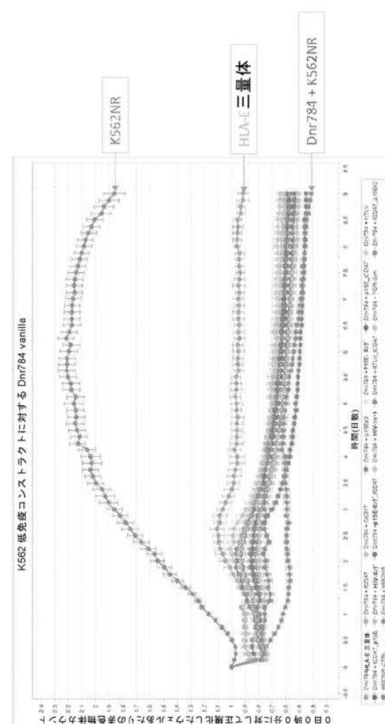
【図 4 3】

[圖 4 3]



【圖 44】

[图 4-4]



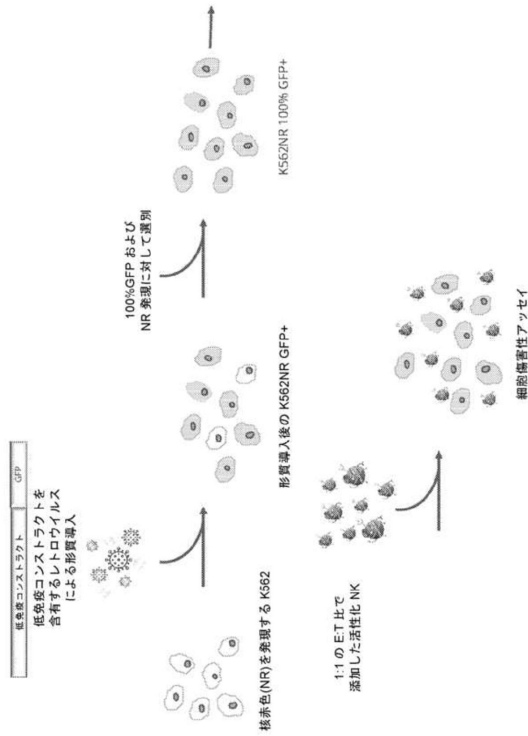
30

40

50

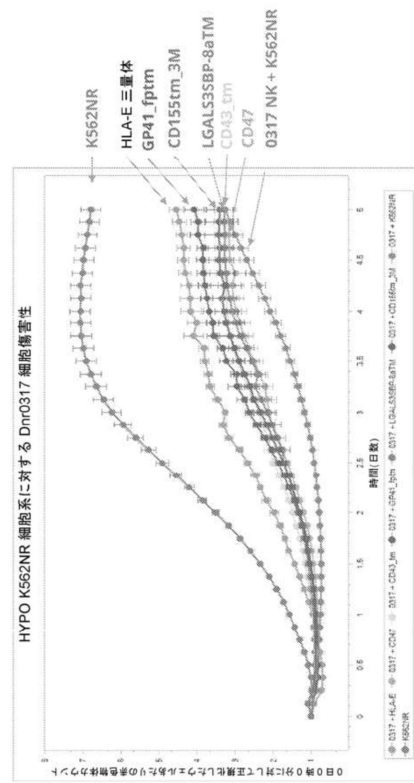
【図 4 7 - 1】

〔図 4 7 A〕



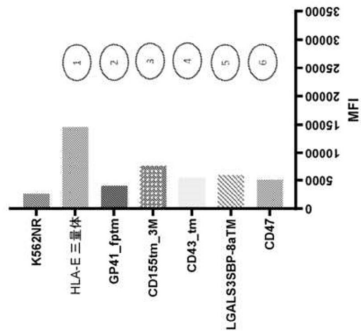
【図 4 7 - 2】

〔図 4 7 B〕



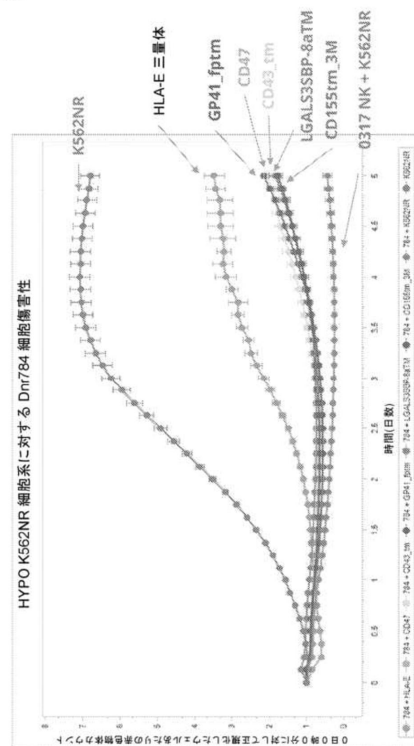
【図 4 7 - 3】

〔図 4 7 C〕



【図 4 7 - 4】

〔図 4 7 D〕



10

20

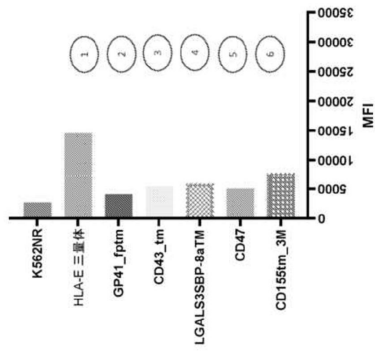
30

40

50

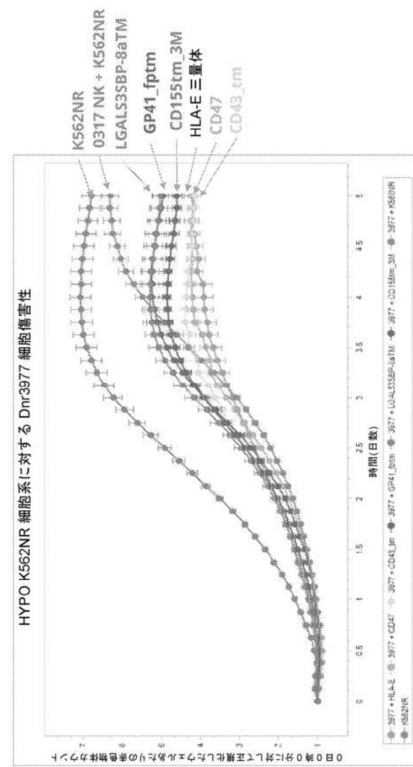
【図 4 7 - 5】

〔図 4 7 E〕



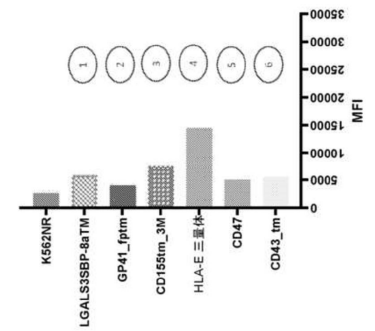
【図 4 7 - 6】

〔図 4 7 F〕



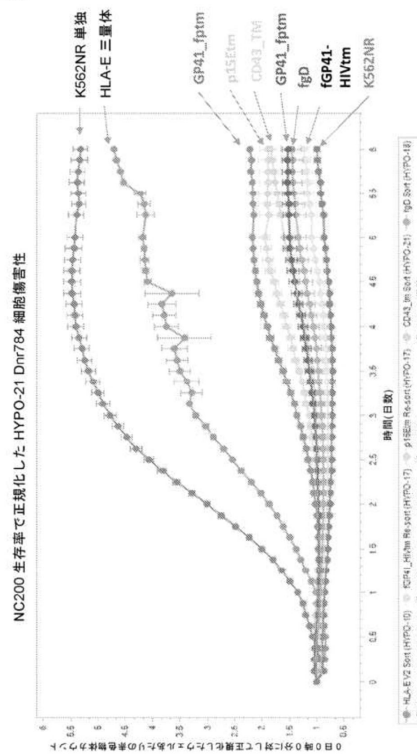
【図 4 7 - 7】

〔図 4 7 G〕



【図 4 7 - 8】

〔図 4 7 H〕



10

20

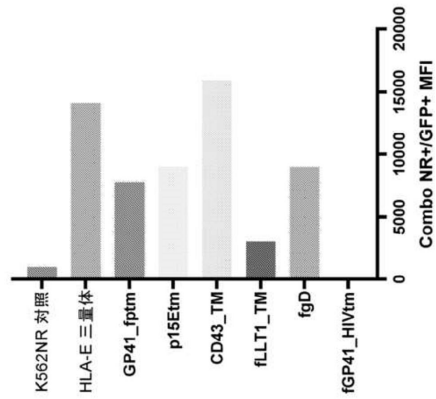
30

40

50

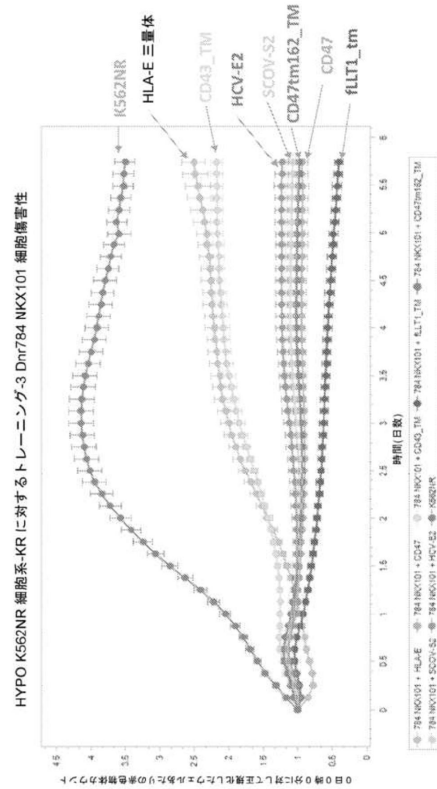
【図 47-9】

〔図 47 I〕



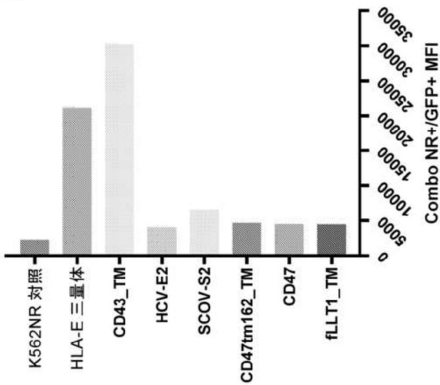
【図 47-10】

〔図 47 J〕



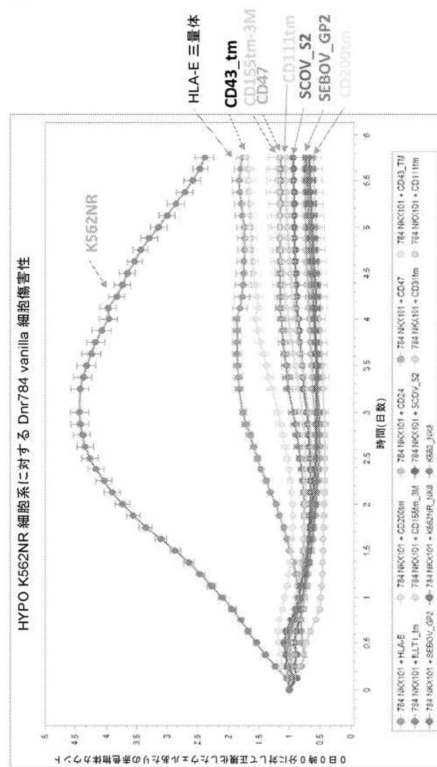
【図 47-11】

〔図 47 K〕



【図 47-12】

〔図 47 L〕



10

20

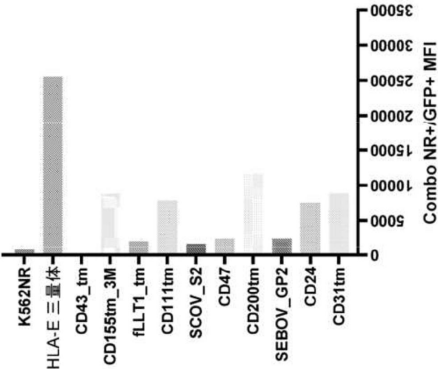
30

40

50

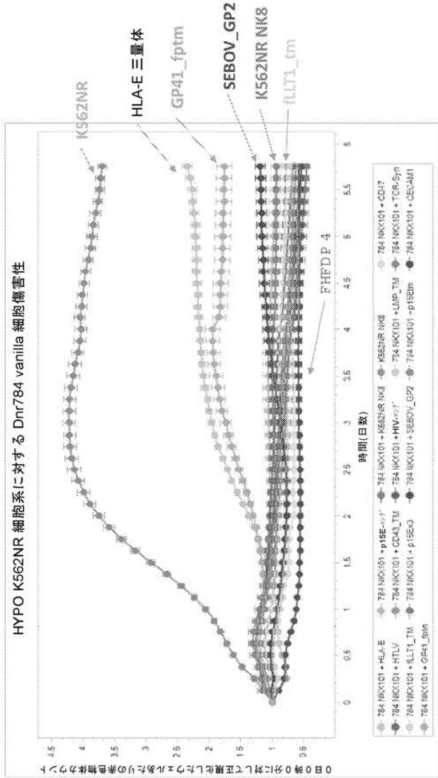
【図 4 7 - 1 3】

〔図 4 7 M〕



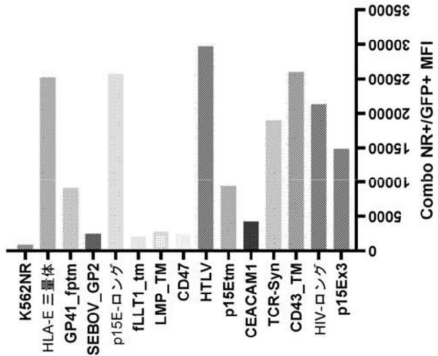
【図 4 7 - 1 4】

〔図 4 7 N〕



【図 4 7 - 1 5】

〔図 4 7 O〕



【図 4 7 - 1 6】

〔図 4 7 P〕

ランク	HYPO-021	HYPO-026/27	HYPO-026/27 トレニング3	HYPO-029	HYPO-030/31
1	GP41_fptm	SEBOV_GP2	CD43_tm	CD43_tm	GP41_fptm
2	p15Etm	CD47	HCV-E2	CD155tm_3M	SEBOV_GP2
3	fLLT1_tm	LMP_tm	SCOV-S2	fLLT1_tm	p15E-ロング
4	gD	LGALS3BP-8aTM	CD47tm162	CD111tm	fLLT1_tm
5	fgp41_HIVtm	抗 SIRPa vLH	CD47	SCOV-S2	LMP_tm

10

20

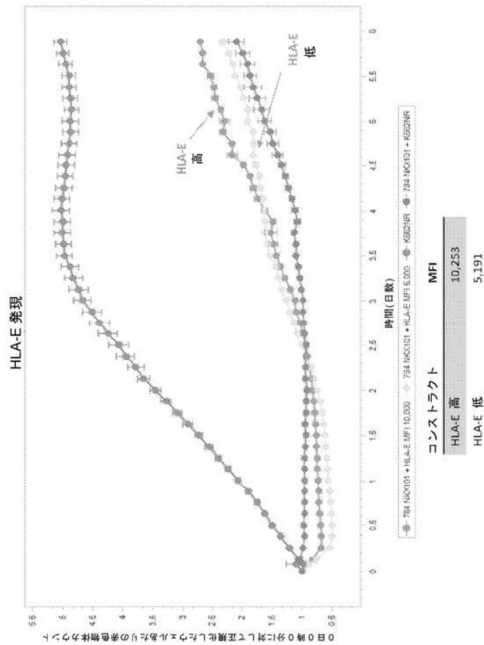
30

40

50

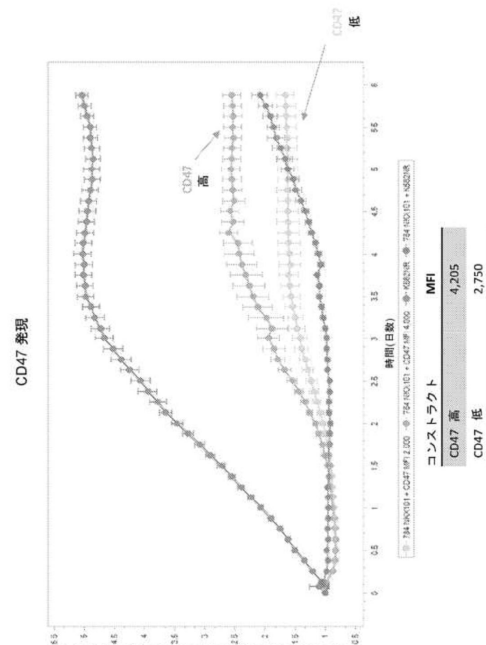
【図 49-1】

〔図 49 A〕



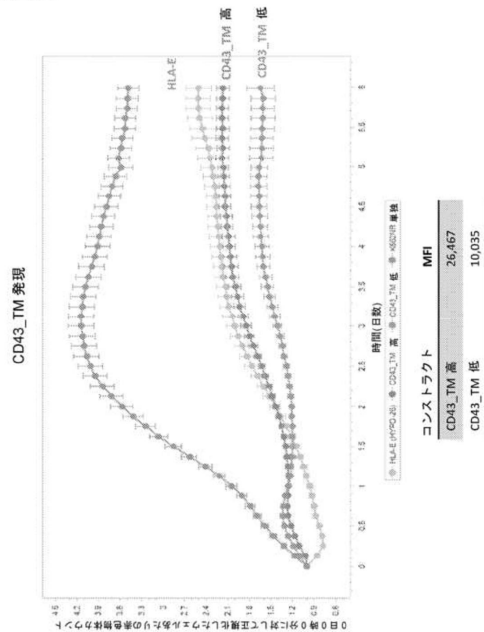
【図 49-2】

〔図 49 B〕



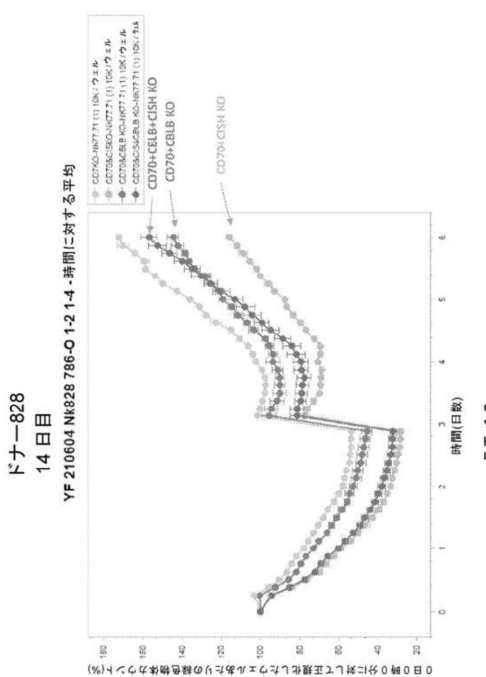
【図 49-3】

〔図 49 C〕



【図 50-1】

〔図 50 A〕



10

20

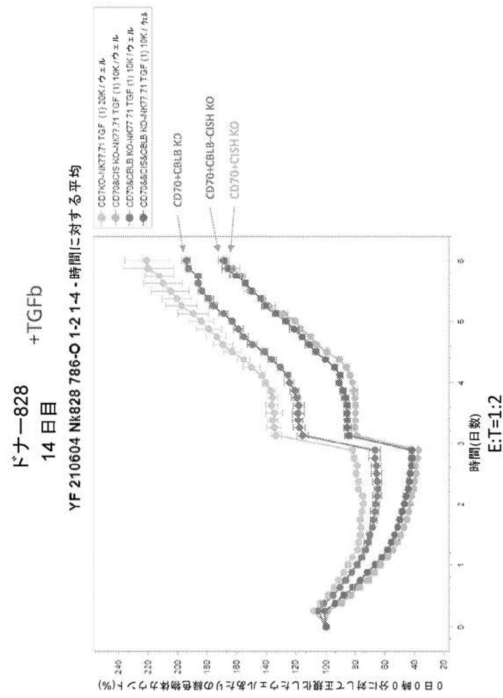
30

40

50

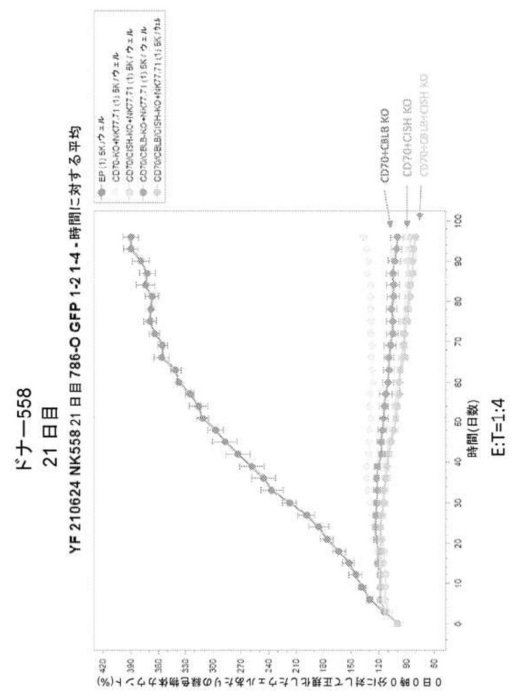
【図 50-2】

〔図 50 B〕



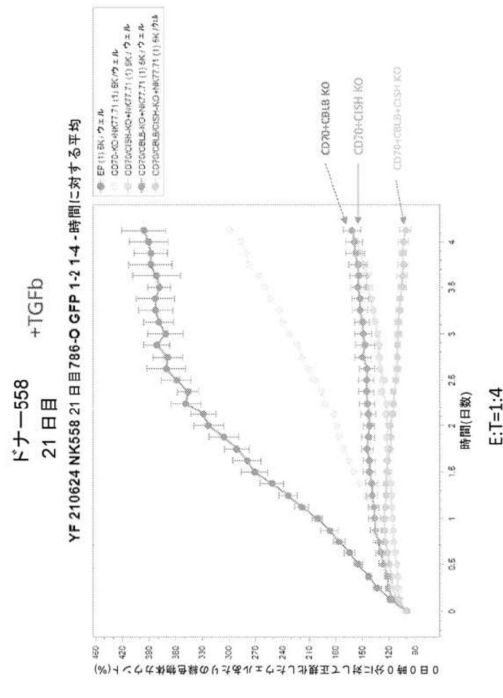
【図 50-3】

〔図 50 C〕



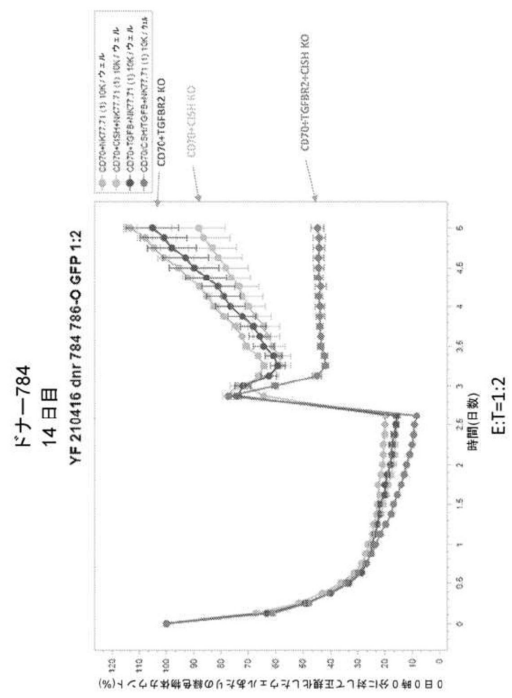
【図 50-4】

〔図 50 D〕



【図 51-1】

〔図 51 A〕



10

20

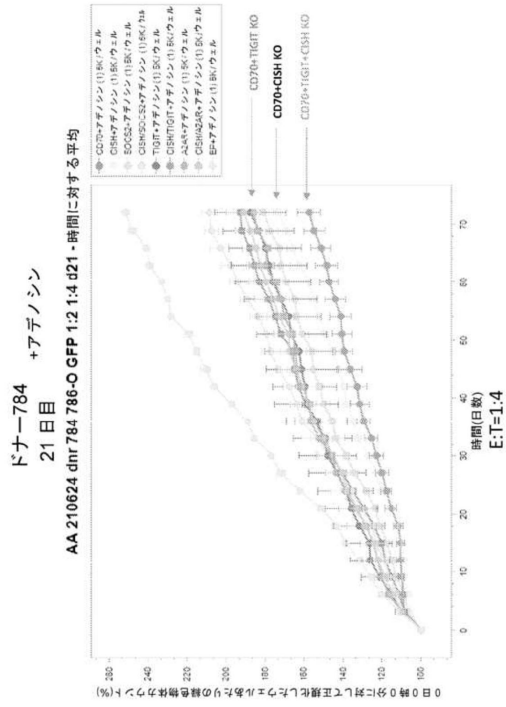
30

40

50

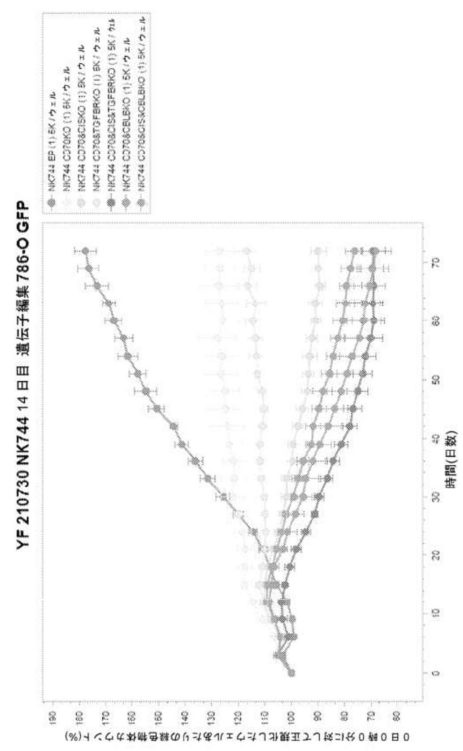
【図 5 2 - 2】

【図 5 2 B】



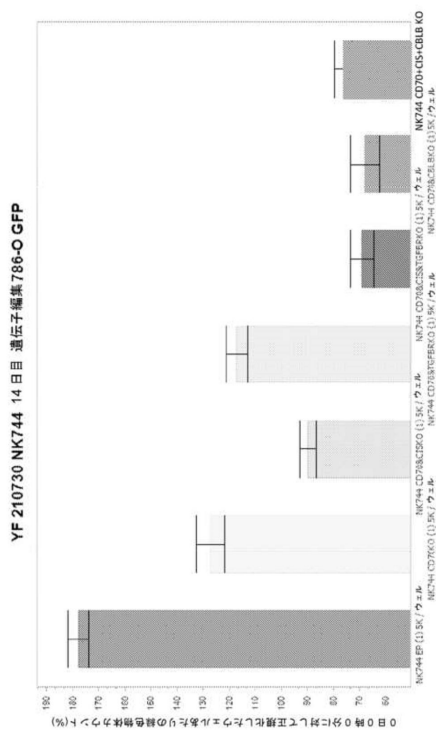
【図 5 3 - 1】

【図 5 3 A】



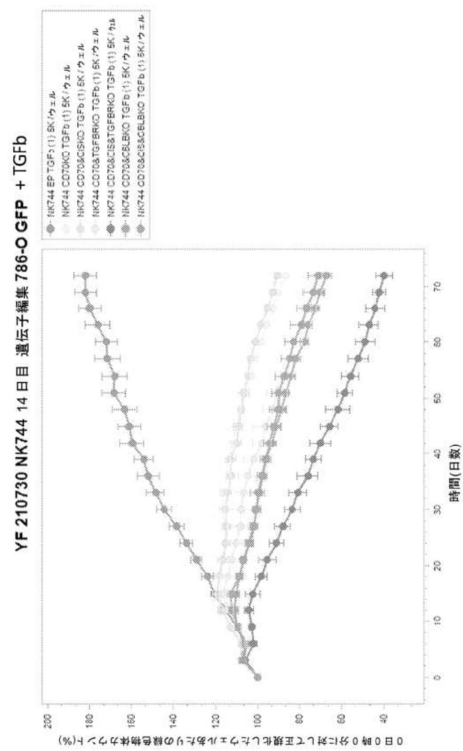
【図 5 3 - 2】

【図 5 3 B】



【図 5 3 - 3】

【図 5 3 C】



10

20

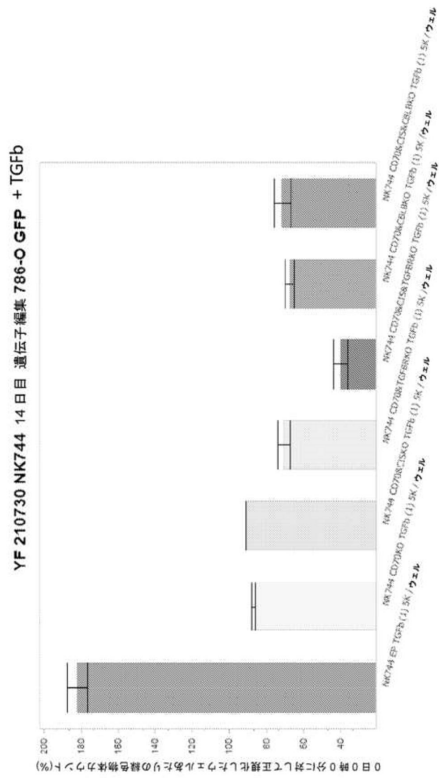
30

40

50

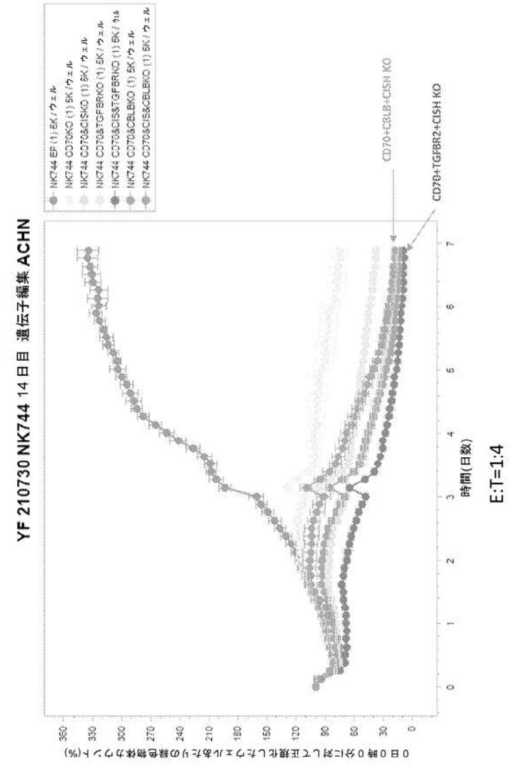
【圖 5 3 - 4】

[図 5 3 D]



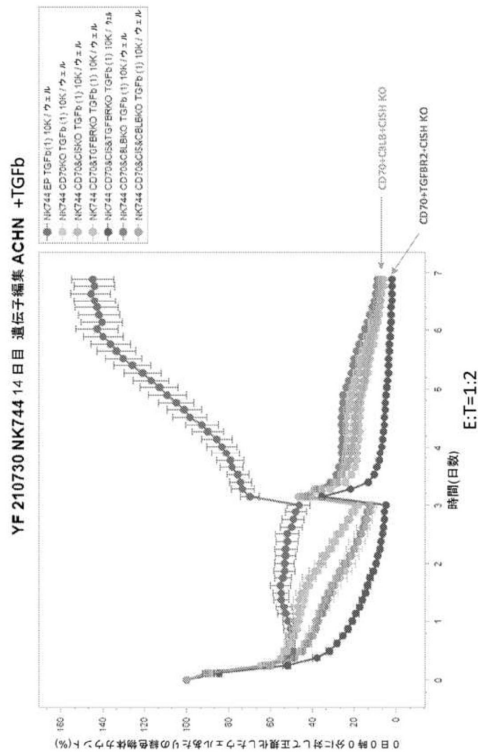
【圖 5 4 - 1】

[図 5 4 A]



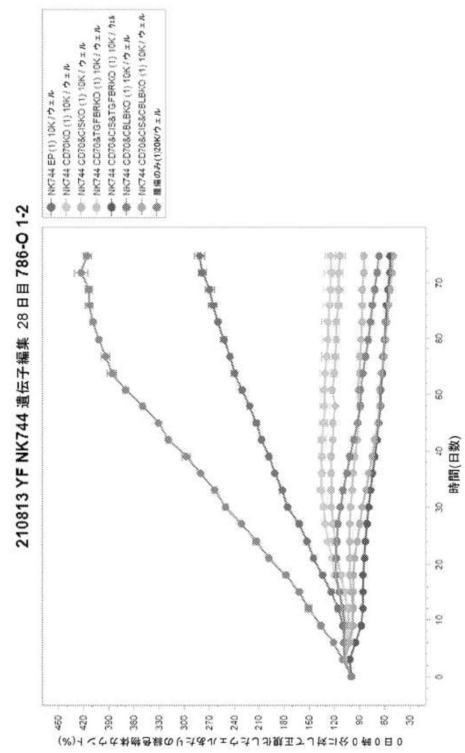
【図 5 4 - 2】

[図 5 4 B]



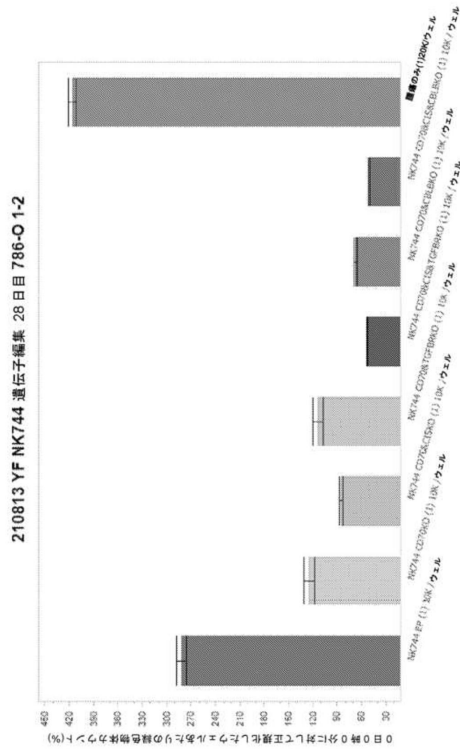
【図 5 5 - 1】

[図 5.5 A]



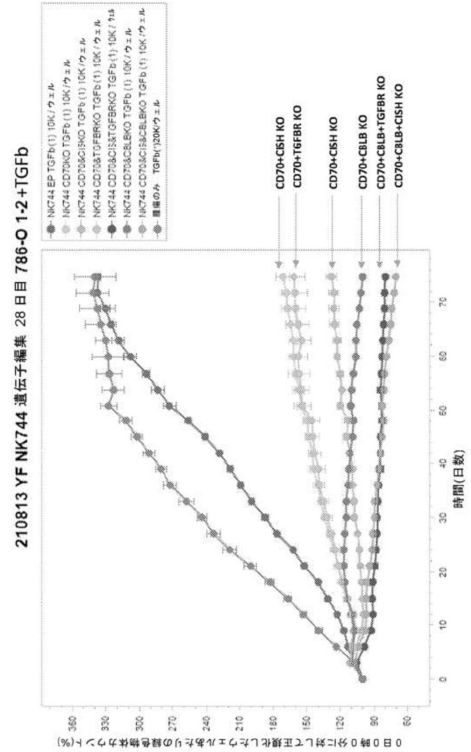
【図 5 5 - 2】

〔図 5 5 B〕



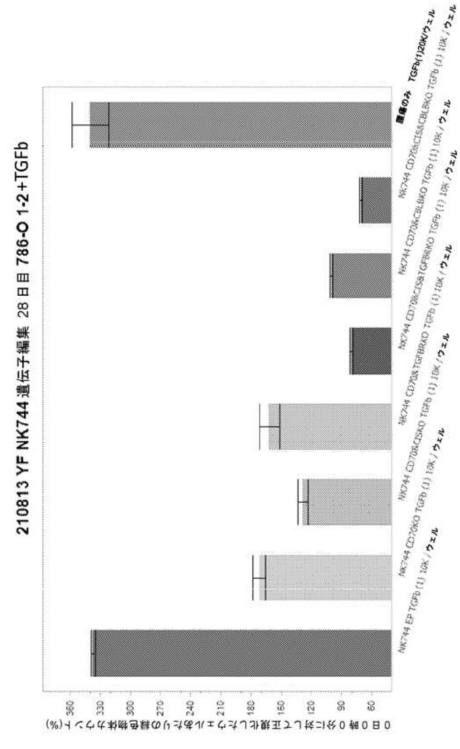
【図 5 5 - 3】

〔図 5 5 C〕



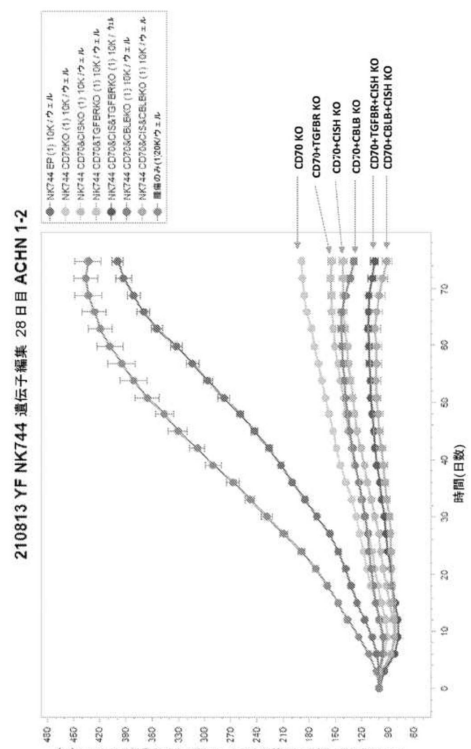
【図 5 5 - 4】

〔図 5 5 D〕



【図 5 6 - 1】

〔図 5 6 A〕



10

20

30

40

50

【配列表】

2023552998000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/072715

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 35/17; C12N 5/00; C12N 15/113 (2022.01)

CPC - A61K 35/17; C07K 2319/03; C12N 5/0636; C12N 2310/20 (2022.05)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

see Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

see Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

see Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2020/150534 A2 (BEAM THERAPEUTICS INC.) 23 July 2020 (23.07.2020) entire document	1, 2, 5, 6, 10, 23, 26, 27, 35, 59, 60
Y	US 2019/0062735 A1 (EDITAS MEDICINE INC. et al) 28 February 2019 (28.02.2019) entire document	1, 2, 5, 6, 10, 23, 26, 27, 35, 59, 60
A	US 2020/0318173 A1 (THE BROAD INSTITUTE INC. et al) 08 October 2020 (08.10.2020) entire document	1, 2, 5, 6, 10, 23, 26, 27, 35, 59, 60
P, X	WO 2020/247392 A1 (NKARTA INC.) 10 December 2020 (10.12.2020) entire document	1, 2, 5, 6, 10, 23, 26, 27, 35, 59, 60
E, X	US 2022/0002424 A1 (NKARTA INC.) 06 January 2022 (06.01.2022) entire document	1, 2, 5, 6, 10, 23, 26, 27, 35, 59, 60

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 May 2022

Date of mailing of the international search report

JUN 10 2022

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Harry Kim

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/072715

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

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

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

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

SEQ ID NOs: 147, 153, 164, 552, and 562 were searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/072715

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 17-22, 29, 32, 34, 39-48, 51-58, 62-65, 69, 70, 74-93, 97
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See extra sheet(s).

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1, 2, 5, 6, 10, 23, 26, 27, 35, 59, 60

Remark on Protest

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

International application No.
PCT/US2021/072715

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/072715

with a second gene editing complex, wherein the second gene editing complex edits at one or more target sites in a gene of the immune cell to yield reduced levels of expression of TIGIT protein encoded by the gene as compared to an immune cell not edited at the TIGIT gene, and wherein the genetically edited immune cells exhibit one or more of enhanced expansion capability, enhanced cytotoxicity against target cells, and enhanced persistence, as compared to immune cells that do not comprise said genetically edited target site or sites; a method of manufacturing a population of genetically edited immune cells for cancer immunotherapy, comprising: contacting the population of immune cells with a first gene editing complex, wherein the first gene editing complex edits at one or more target sites in a CISH gene of the immune cell to yield reduced levels of expression of CIS protein encoded by the CISH gene as compared to an immune cell not edited at the CISH gene; and contacting the population of immune cells with a second gene editing complex, wherein the second gene editing complex edits at one or more target sites in an additional gene of the immune cell to yield reduced levels of expression of a protein encoded by the additional gene as compared to an immune cell not edited at the additional gene, and wherein the genetically edited immune cells exhibit one or more of enhanced expansion capability, enhanced cytotoxicity against target cells, and enhanced persistence, as compared to immune cells that do not comprise said genetically edited target site or sites; a method for treating cancer in a subject comprising, administering to the subject a population of genetically engineered immune cells, wherein the immune cells express a cytotoxic receptor comprising an extracellular ligand binding domain, a transmembrane domain, and a cytotoxic signaling complex, wherein the immune cells are genetically edited at one or more target locations in a CISH gene that encodes a CIS protein, wherein the edits yield reduced expression and/or function of CIS as compared to an immune cell not edited at the location or locations in the CISH gene; wherein the immune cells are edited at one or more genes, to yield reduced levels of expression or activity as compared to an immune cell not edited and wherein the genetically engineered and edited immune cells exhibit one or more of enhanced expansion capability, enhanced cytotoxicity against target cells, and enhanced persistence, as compared to immune cells that do not comprise said genetically edited target site or sites; a method of manufacturing a population of genetically engineered immune cells for cancer immunotherapy, comprising: contacting a population of immune cells with a vector comprising a polynucleotide encoding a cytotoxic receptor comprising an extracellular ligand binding domain, a transmembrane domain, and a cytotoxic signaling complex; contacting the population of immune cells with a gene editing complex; wherein the gene editing complex edits at one or more target sites in the genome of the immune cell to yield reduced levels of expression of the protein which is encoded by a gene which comprises an edited target site as compared to a non-edited immune cell, and wherein the genetically engineered and edited immune cells exhibit one or more of enhanced expansion capability, enhanced cytotoxicity against target cells, and enhanced persistence, as compared to immune cells that do not comprise said genetically edited target site or sites. However, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

Specifically, WO 2020/150534 A2 to Beam Therapeutics Inc. discloses a population of genetically engineered and gene edited immune cells (a population of modified immune cells ... by multiplexed editing, the method comprising: modifying at least four gene sequences or regulatory elements thereof at a single target nucleobase in each thereof in a population of immune cells, Para. [0005]), comprising: genetically engineered immune cells that express a cytotoxic receptor comprising an extracellular ligand binding domain, a transmembrane domain, and a cytotoxic signaling complex (the polynucleotide that encodes the CAR is integrated in the genome of the immune cell, Para. [00114]; the population of immune cells are cytotoxic T cells, Para. [00151]; a modification in a second gene sequence or a regulatory sequence thereof, wherein the modification is an insertion of an exogenous chimeric antigen receptor (CAR), Para. [0234]; "chimeric antigen receptor" is meant a synthetic receptor comprising an extracellular antigen binding domain, a transmembrane domain, and an intracellular signaling domain that confers specificity for an antigen onto an immune cell, Para. [00344]), wherein the extracellular ligand binding domain targets a tumor marker expressed by a target tumor cell (the CAR specifically binds a marker associated with neoplasia, Para. [0076]), wherein the immune cells are genetically edited at one or more target locations in a CISH gene that encodes a CIS protein (at least 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, or more genes or regulatory elements thereof are modified in an immune cell with the base editing compositions and methods provided herein ... genes or regulatory elements thereof are selected from ... CISH, Para. [00532]), wherein the edits yield reduced expression and/or function of CIS as compared to an immune cell not edited at the location or locations in the CISH gene (at least 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, or more genes or regulatory elements thereof are modified in an immune cell with the base editing compositions and methods provided herein ... genes or regulatory elements thereof are selected from ... CISH, Para. [00532]; base editing may be used to achieve a gene disruption, such that the gene is not expressed, Para. [00533]); wherein the immune cells are genetically edited at one or more target locations in a Cbl proto-oncogene B protein (CBLB) gene that encodes CBLB protein, wherein the edits yield reduced expression and/or function of CBLB protein as compared to an immune cell not edited at the location or locations in the CBLB gene (producing a modified immune cell with increased anti-neoplasia activity, the method comprising: modifying a single target nucleobase in a Cbl Proto Oncogene B (CBLB) gene sequence or a regulatory element thereof in an immune cell, wherein the modification reduces an activation threshold of the immune cell compared with an immune cell lacking the modification; thereby generating a modified immune cell with increased anti-neoplasia activity, Para. [00253]; the CBLB is edited to knockout or knockdown expression, Para. [00575]); and wherein the genetically engineered and edited immune cells exhibit one or more of enhanced expansion capability, enhanced cytotoxicity against target cells, and enhanced persistence, as compared to immune cells that do not comprise said genetic edits at the CISH and CBLB genes (the engineered T cell induces an enhanced cytotoxic response against its target as compared to a non-engineered T cell, Para. [00810]; the CBLB is edited to knockout or knockdown expression, Para. [00575]); a method of manufacturing a population of genetically edited immune cells for cancer immunotherapy (a method for producing a population of modified immune cells with reduced immunogenicity and/or increased anti-neoplasia activity by multiplexed editing, Para. [0005]), comprising: contacting the population of immune cells with a first gene editing complex, wherein the first gene editing complex edits at one or more target sites in a CISH gene of the immune cell to yield reduced levels of expression of CIS protein encoded by the CISH gene as compared to an immune cell not edited at the CISH gene (at least 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, or more genes or regulatory elements thereof are modified in an immune cell with the base editing compositions and methods provided herein ... genes or regulatory elements thereof are selected from ... CISH, Para. [00532]; base editing may be used to achieve a gene disruption, such that the gene is not expressed, Para. [00533]); and contacting the population of immune cells with a second gene editing complex, wherein the second gene editing complex edits at one or more target sites in CBLB gene of the immune cell to yield reduced levels of expression of CBLB protein encoded by the CBLB gene as compared to an immune cell not edited at the CBLB gene (producing a modified immune cell with increased anti-neoplasia activity, the method comprising: modifying a single target nucleobase in a Cbl Proto Oncogene B (CBLB) gene sequence or a regulatory element thereof in an immune cell, wherein the modification reduces an activation threshold of the immune cell compared with an immune cell lacking the modification; thereby generating a modified immune cell with increased anti-neoplasia activity, Para. [00253]; the CBLB is edited to knockout or knockdown expression, Para. [00575]); and wherein the genetically edited immune cells exhibit one or more of enhanced expansion capability, enhanced cytotoxicity against target cells, and enhanced persistence, as compared to immune cells that do not comprise said genetically edited target site or sites (the engineered T cell induces an enhanced cytotoxic response against its target as compared to a non-engineered T cell, Para. [00810]; the CBLB is edited to knockout or knockdown expression, Para. [00575]); a method for treating cancer in a subject (a method of treating a neoplasia in a subject, Para. [00812]) comprising, administering to the subject a population of genetically engineered immune cells (immune cells, after modification to express a chimeric antigen receptor, are administered to a subject for treating a neoplasia, Para. [00541]), wherein

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/072715

the immune cells express a cytotoxic receptor comprising an extracellular ligand binding domain, a transmembrane domain, and a cytotoxic signaling complex (the polynucleotide that encodes the CAR is integrated in the genome of the immune cell, Para. [00114]; the population of immune cells are cytotoxic T cells, Para. [00151]; a modification in a second gene sequence or a regulatory sequence thereof, wherein the modification is an insertion of an exogenous chimeric antigen receptor (CAR), Para. [0234]; "chimeric antigen receptor" is meant a synthetic receptor comprising an extracellular antigen binding domain, a transmembrane domain, and an intracellular signaling domain that confers specificity for an antigen onto an immune cell, Para. [00344]), wherein the immune cells are genetically edited at one or more target locations in a CISH gene that encodes a CIS protein (at least 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, or more genes or regulatory elements thereof are modified in an immune cell with the base editing compositions and methods provided herein ...genes or regulatory elements thereof are selected from ...CISH, Para. [00532]), wherein the edits yield reduced expression and/or function of CIS as compared to an immune cell not edited at the location or locations in the CISH gene (at least 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, or more genes or regulatory elements thereof are modified in an immune cell with the base editing compositions and methods provided herein ...genes or regulatory elements thereof are selected from ...CISH, Para. [00532]; base editing may be used to achieve a gene disruption, such that the gene is not expressed, Para. [00533]); wherein the immune cells are edited at one or more a CBLB gene, a TGFBR2 gene, and/or a TIGIT gene, to yield reduced levels of expression or activity of a CBLB protein, a TGFBR2 protein and/or a TIGIT protein as compared to an immune cell not edited at a CBLB gene, a TGFBR2 gene or a TIGIT gene (producing a modified immune cell with increased anti-neoplasia activity, the method comprising: modifying a single target nucleobase in a Cbl Proto Oncogene B (CBLB) gene sequence or a regulatory element thereof in an immune cell, wherein the modification reduces an activation threshold of the immune cell compared with an immune cell lacking the modification; thereby generating a modified immune cell with increased anti-neoplasia activity, Para. [00253]; the CBLB is edited to knockout or knockdown expression, Para. [00575]), and wherein the genetically engineered and edited immune cells exhibit one or more of enhanced expansion capability, enhanced cytotoxicity against target cells, and enhanced persistence, as compared to immune cells that do not comprise said genetically edited target site or sites (the engineered T cell induces an enhanced cytotoxic response against its target as compared to a non-engineered T cell, Para. [00810]; the CBLB is edited to knockout or knockdown expression, Para. [00575]).

The inventions listed in Groups I+, II, and III therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical features.

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17	
A 6 1 K 35/545 (2015.01)	A 6 1 K 35/545	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	
C 1 2 N 15/24 (2006.01)	C 1 2 N 15/24	
A 6 1 K 38/20 (2006.01)	A 6 1 K 38/20	
(32)優先日 令和3年8月23日(2021.8.23)		
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)		
(31)優先権主張番号 63/264,223		
(32)優先日 令和3年11月17日(2021.11.17)		
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)		
(31)優先権主張番号 63/264,234		
(32)優先日 令和3年11月17日(2021.11.17)		
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)		
(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LV,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,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,T,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW)		
弁理士 白江 雄介		
(72)発明者 トレイガー, ジェイムズ バーナビー アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州サウス・サンフランシスコ、ショアライン・コート 6 0 0 0、スウィート 1 0 2		
(72)発明者 チャン, アイバン アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州サウス・サンフランシスコ、ショアライン・コート 6 0 0 0、スウィート 1 0 2		
(72)発明者 ワン, ドンホン アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州サウス・サンフランシスコ、ショアライン・コート 6 0 0 0、スウィート 1 0 2		
(72)発明者 リー, グアンナン アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州サウス・サンフランシスコ、ショアライン・コート 6 0 0 0、スウィート 1 0 2		
(72)発明者 ラゼティック, アレクサンドラ ライダ リアナ アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州サウス・サンフランシスコ、ショアライン・コート 6 0 0 0、スウィート 1 0 2		
(72)発明者 グオ, チャオ アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州サウス・サンフランシスコ、ショアライン・コート 6 0 0 0、スウィート 1 0 2		
F ターム (参考) 4B065 AA93X AB01 BA02		
4C084 AA02 DA12 NA05 NA12 ZB09 ZB26		
4C087 AA01 AA02 BB37 BB61 BB65 NA05 NA12 ZB09 ZB26		