

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-548467

(P2023-548467A)

(43)公表日 令和5年11月17日(2023.11.17)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	Z N A	4 B 0 6 5
A 6 1 K	35/12 (2015.01)	A 6 1 K	35/12		4 C 0 8 4
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00		4 C 0 8 5
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1	4 C 0 8 6
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	T	4 C 0 8 7
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求
				(全115頁)	最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-526068(P2023-526068)		(71)出願人	523111348	
(86)(22)出願日	令和3年11月4日(2021.11.4)			フェイト セラピューティクス, インコ	
(85)翻訳文提出日	令和5年4月27日(2023.4.27)			ーポレイティド	
(86)国際出願番号	PCT/US2021/058118			アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2	
(87)国際公開番号	WO2022/098914			1 3 1, サンディエゴ, スクリップス	
(87)国際公開日	令和4年5月12日(2022.5.12)			サミット ドライブ 1 2 2 7 8	
(31)優先権主張番号	63/109,828		(74)代理人	100099759	
(32)優先日	令和2年11月4日(2020.11.4)			弁理士 青木 篤	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		(74)代理人	100123582	
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA			弁理士 三橋 真二	
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(		(74)代理人	100117019	
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A			弁理士 渡辺 陽一	
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR		(74)代理人	100141977	
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,			弁理士 中島 勝	
	最終頁に続く		(74)代理人	100138210	
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 操作された i P S C 及び持続性免疫エフェクター細胞

(57)【要約】

ゲノム操作された i P S C の指向性分化から得られる機能的に増強された誘導エフェクター細胞を取得するための方法及び組成物が提供される。本明細書において提供される i P S C 由来細胞は、改善又は増強された治療効果をもたらす安定した機能的なゲノム編集を有する。機能的に増強された派生エフェクター細胞を単独で、又は組み合わせ療法において抗体若しくはチェックポイント阻害剤とともに含む、治療組成物及びその使用も提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞又はその集団であって、(a) 前記細胞が、組換えサイトカインシグナル伝達複合体及び必要に応じてキメラ抗原受容体 (CAR) をコードするポリヌクレオチドを含み、(b) 前記細胞が、真核細胞、動物細胞、ヒト細胞、免疫細胞、フィーダ細胞、人工多能性細胞 (iPSC)、又はそれから分化した派生細胞であり、(c) 前記サイトカインシグナル伝達複合体が、(i) 完全又は部分的なサイトカイン、及び (ii) 完全又は部分的な IL 7 受容体、IL 2 受容体、IL 4 受容体、IL 9 受容体、IL 21 受容体、又は γ C 受容体を含む、細胞又はその集団。

【請求項 2】

前記サイトカインシグナル伝達複合体が、別個の構築物内で、又はバイシストロン性構築物内で、前記 CAR と共発現されている、請求項 1 に記載の細胞又はその集団。

【請求項 3】

前記 iPSC が、クローン iPSC、単一細胞解離 iPSC、iPSC 細胞株細胞、又は iPSC マスター細胞バンク (MCB) 細胞であるか、あるいは、前記派生細胞が、(i) 派生 CD 3 4⁺ 細胞、派生造血幹前駆細胞、派生造血多能性前駆細胞、派生 T 細胞前駆体、派生 NK 細胞前駆体、派生 T 系統細胞、派生 NK T 系統細胞、派生 NK 系統細胞、若しくは派生 B 系統細胞、又は (ii) 対応する初代 T、NK、NK T、及び／若しくは B 細胞には存在しない 1 つ以上の機能的特質を有する派生エフェクター細胞、を含む、請求項 1 に記載の細胞又はその集団。

【請求項 4】

前記サイトカインシグナル伝達複合体が、IL 7 及び IL 7 受容体の部分的若しくは完全なペプチドを含み、前記サイトカインシグナル伝達複合体が、

(a)

- (i) 自己切断ペプチドを使用することによって共発現された IL 7 及び IL 7 R α 、
- (ii) IL 7 と IL 7 R α との融合タンパク質 (IL 7 RF)、
- (iii) IL 7 R α の細胞内ドメインが短縮化若しくは排除された IL 7 / IL 7 R α 融合タンパク質、
- (iv) IL 7 と IL 7 R β との融合タンパク質、
- (v) IL 7 と共通受容体 γ C との融合タンパク質であって、前記共通受容体 γ C が、天然であるか若しくは改変されている、融合タンパク質、及び
- (vi) IL 7 R β のホモ二量体、のうちの少なくとも 1 つを含み、
- (i) ~ (vi) のうちのいずれか 1 つが、必要に応じて、別個の構築物内で、若しくはバイシストロン性構築物内で、CAR と共発現され、必要に応じて、

(b) 一過的に発現されている、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の細胞又はその集団。

【請求項 5】

前記細胞が、

- (i) CD 3 8 ノックアウト、
- (ii) HLA - I の欠損及び／若しくは HLA - II の欠損、
- (iii) HLA - G 若しくは非切断性 HLA - G の導入された発現、又は CD 5 8 及び CD 5 4 の一方若しくは両方のノックアウト、
- (iv) 外因性 CD 1 6 若しくはそのバリエーション、
- (v) キメラ融合受容体 (CFR)、
- (vi) 細胞表面発現外因性サイトカイン及び／若しくはその受容体の部分的若しくは完全なペプチド、
- (vii) 表 1 に列挙される遺伝子型のうちの少なくとも 1 つ、
- (viii) B 2 M、CIITA、TAP 1、TAP 2、タパシン、NLRC 5、RF

10

20

30

40

50

XANK、RFX5、RFXAP、TCR、NKG2A、NKG2D、CD25、CD69、CD44、CD56、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、及びTIGITのうちの少なくとも1つの欠失若しくは破壊、又は

(ix) HLA-E、4-1BBL、CD3、CD4、CD8、CD16、CD47、CD113、CD131、CD137、CD80、PDL1、A2AR、抗原特異的TCR、Fc受容体、抗体又はその機能的バリエーション若しくは断片、チェックポイント阻害剤、エンゲージャ、及びアゴニストとカップリングするための表面トリガー受容体のうちの少なくとも1つの導入、のうちの1つ以上を更に含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の細胞又はその集団。

【請求項6】

前記細胞が、同じ遺伝子編集を有しない末梢血、臍帯血、又は任意の他のドナー組織から得られたその対応する初代細胞と比較して、

- (i) 増加された細胞傷害性、
- (ii) 改善された持続性及び／又は生存率、
- (iii) 腫瘍部位にバイスタンダー免疫細胞を遊走させる、及び／又は活性化させる、若しくは動員する増強された能力、
- (iv) 改善された腫瘍浸透、
- (v) 腫瘍免疫抑制を低下させる増強された能力、
- (vi) 腫瘍抗原エスケープを救済する改善された能力、
- (vii) 制御されたアポトーシス、
- (viii) 増強又は獲得されたADCC、並びに
- (ix) フラトリサイドを回避する能力、

のうちの1つ以上を含む治療特性を有する、請求項4に記載の細胞又はその集団。

【請求項7】

前記外因性CD16又はそのバリエーションが、

- (a) 高親和性の非切断性CD16(hnCD16)、
- (b) CD16の外部ドメインにおけるF176V及びS197P、
- (c) CD64に由来する完全又は部分的な外部ドメイン、
- (d) 非天然(又は非CD16)の膜貫通ドメイン、
- (e) 非天然(又は非CD16)の細胞内ドメイン、
- (f) 非天然(又は非CD16)のシグナル伝達ドメイン、
- (g) 非天然の刺激ドメイン、並びに
- (h) CD16に由来せず、かつ同じ又は異なるポリペプチドに由来する膜貫通、シグナル伝達、及び刺激ドメイン、のうちの少なくとも1つを含む、請求項5に記載の細胞又はその集団。

【請求項8】

前記派生エフェクター細胞が、前記サイトカインシグナル伝達複合体を有しないその対応する細胞と比較して、

- (a) 改善された相対的細胞増殖、
- (b) CAR発現の増加したパーセンテージ、
- (c) 増加したCD69発現、及び
- (d) 減少したPD-1発現、

のうちの少なくとも1つを含む、請求項4に記載の細胞又はその集団。

【請求項9】

前記CARが、

- (i) T細胞特異的若しくはNK細胞特異的なもの、
- (ii) 二重特異性抗原結合CAR、
- (iii) 切り替え可能なCAR、
- (iv) 二量体化されたCAR、
- (v) スプリットCAR、

(v i) 多重鎖 C A R、

(v i i) 誘導可能な C A R、

(v i i i) 不活性化 C A R、

(i x) 必要に応じて別個の構築物内で、若しくはバイシストロン性構築物内で、チェックポイント阻害剤と共発現されたもの、

(x) C D 1 9、B C M A、C D 2 0、C D 2 2、C D 3 8、C D 1 2 3、H E R 2、C D 5 2、E G F R、G D 2、M I C A / B、M S L N、V E G F - R 2、P S M A、及び P D L 1 のうちの少なくとも 1 つに特異的なもの、並びに / 又は

(x i) A D G R E 2、炭酸脱水酵素 I X (C A I X)、C C R 1、C C R 4、がん胎児性抗原 (C E A)、C D 3、C D 5、C D 7、C D 8、C D 1 0、C D 2 0、C D 2 2、C D 3 0、C D 3 3、C D 3 4、C D 3 8、C D 4 1、C D 4 4、C D 4 4 V 6、C D 4 9 f、C D 5 6、C D 7 0、C D 7 4、C D 9 9、C D 1 2 3、C D 1 3 3、C D 1 3 8、C D S、C L E C 1 2 A、サイトメガロウイルス (C M V) 感染細胞の抗原、上皮糖タンパク質-2 (E G P - 2)、上皮糖タンパク質-4 0 (E G P - 4 0)、上皮細胞接着分子 (E p C A M)、E G F R v I I I、受容体チロシントランスポーターキナーゼ e r b - B 2、3、4、E G F I R、E G F R - V I I I、E R B B 葉酸結合タンパク質 (F B P)、胎児のアセチルコリン受容体 (A C h R)、葉酸受容体- α 、ガングリオシド G 2 (G D 2)、ガングリオシド G 3 (G D 3)、ヒト上皮増殖因子受容体 2 (H E R 2)、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (h T E R T)、I C A M - 1、インテグリン B 7、インターロイキン-1 3 受容体サブユニットアルファ-2 (I L - 1 3 R α 2)、 κ -軽鎖、キナーゼ挿入ドメイン受容体 (K D R)、ルイス A (C A 1 9 . 9)、ルイス Y (L e Y)、L 1 細胞接着分子 (L 1 - C A M)、L I L R B 2、黒色腫抗原ファミリー A 1 (M A G E - A 1)、M I C A / B、ムチン 1 (M u c - 1)、ムチン 1 6 (M u c - 1 6)、メソセリン (M S L N)、N K C S I、N K G 2 D リガンド、c - M e t、がん-精巣抗原 N Y - E S O - 1、腫瘍胎児性抗原 (h 5 T 4)、P R A M E、前立腺幹細胞抗原 (P S C A)、P R A M E 前立腺特異的膜抗原 (P S M A)、腫瘍関連糖タンパク質 7 2 (T A G - 7 2)、T I M - 3、T R B C I、T R B C 2、血管内皮増殖因子 R 2 (V E G F - R 2)、ウィルムス腫瘍タンパク質 (W T - 1)、及び病原体抗原のうちのいずれか 1 つに特異的なもの、であり、必要に応じて、

前記 (i) ~ (x i) のうちのいずれか 1 つの C A R が、T C R 遺伝子座に挿入されている、及び / 又は T C R の内因性プロモータによって駆動されている、かつ / あるいは前記 T C R が、前記 C A R 挿入によってノックアウトされている、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の細胞又はその集団。

【請求項 1 0】

前記不活性化 C A R が、活性化されたレシピエント免疫細胞において上方制御された表面タンパク質を標的とする、請求項 9 に記載の細胞又はその集団。

【請求項 1 1】

前記不活性化 C A R が、C D 3 8 - C A R、4 - 1 B B - C A R、O X 4 0 - C A R、及び C D 4 0 L - C A R のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 1 0 に記載の細胞又はその集団。

【請求項 1 2】

前記 C F R が、膜貫通ドメインに融合した外部ドメインを含み、前記膜貫通ドメインが、内部ドメインに作動可能に接続されており、前記外部ドメイン、膜貫通ドメイン、及び前記内部ドメインが、いかなる小胞体 (E R) 保持シグナルもエンドサイトーシスシグナルも含まない、請求項 5 に記載の細胞又はその集団。

【請求項 1 3】

前記 C F R の前記外部ドメインが、C D 3 ϵ 、C D 3 γ 、C D 3 δ 、C D 2 8、C D 5、C D 1 6、C D 6 4、C D 3 2、C D 3 3、C D 8 9、N K G 2 C、N K G 2 D、それらの任意の機能的バリエーション、及びそれらの組み合わせ又はキメラのうちの少なくとも 1 つを含むシグナル伝達タンパク質の細胞外部分の全長又は部分長を含む、請求項 1 2 に記

10

20

30

40

50

載の細胞又はその集団。

【請求項 14】

前記 C F R の前記外部ドメインが、C D 3、C D 28、C D 5、C D 16、C D 64、C D 32、C D 33、C D 89、N K G 2 C、N K G 2 D、若しくはそれらの任意の機能的バリエーションの細胞外部分に特異的な結合ドメインを少なくとも含む選択されたアゴニストに結合するとシグナル伝達を開始するか、又は前記選択されたアゴニストが、B 7 H 3、B C M A、C D 10、C D 19、C D 20、C D 22、C D 24、C D 30、C D 33、C D 34、C D 38、C D 44、C D 79 a、C D 79 b、C D 123、C D 138、C D 179 b、C E A、C L E C 12 A、C S-1、D L L 3、E G F R、E G F R v I I I、E P C A M、F L T-3、F O L R 1、F O L R 3、G D 2、g p A 33、H E R 2、H M 1.24、L G R 5、M S L N、M C S P、M I C A/B、P S M A、P A M A、P-カドヘリン、若しくは R O R 1 を含む少なくとも 1 つの腫瘍抗原に特異的な結合ドメインを含む、請求項 12 に記載の細胞又はその集団。

10

【請求項 15】

前記 C F R の前記内部ドメインが、C D 3ζ、2 B 4、D A P 10、D A P 12、D N A M 1、C D 137 (4-1 B B)、I L 21、I L 7、I L 12、I L 15、N K p 30、N K p 44、N K p 46、N K G 2 C、若しくは N K G 2 D ポリペプチドの少なくとも全長若しくは一部分を含む細胞傷害性ドメインを含み、必要に応じて、前記内部ドメインが、

(i) C D 2、C D 27、C D 28、C D 40 L、4-1 B B、O X 40、I C O S、P D-1、L A G-3、2 B 4、B T L A、D A P 10、D A P 12、C T L A-4、若しくは N K G 2 D ポリペプチド、若しくはそれらの任意の組み合わせの全長若しくは一部分を含む共刺激ドメイン、

20

(i i) C D 28、4-1 B B、C D 27、C D 40 L、I C O S、C D 2、若しくはそれらの組み合わせの全長若しくは一部分を含む共刺激ドメイン、

(i i i) I L 7 R、I L 15 R、I L 18 R、I L 12 R、I L 23 R、若しくはそれらの組み合わせを含むサイトカイン受容体の内部ドメインの全長若しくは一部分を含む持続性シグナル伝達ドメイン、及び／又は、

(i v) 受容体チロシンキナーゼ (R T K)、腫瘍壊死因子受容体 (T N F R)、E G F R、若しくは F A S 受容体の完全若しくは部分的な細胞内部分、のうちの 1 つ以上を更に含む、請求項 12 ~ 14 のいずれか一項に記載の細胞又はその集団。

30

【請求項 16】

前記チェックポイント阻害剤が、P D-1、P D L-1、T I M-3、T I G I T、L A G-3、C T L A-4、2 B 4、4-1 B B、4-1 B B L、A 2 A R、B A T E、B T L A、C D 39、C D 47、C D 73、C D 94、C D 96、C D 160、C D 200、C D 200 R、C D 274、C E A C A M 1、C S F-1 R、F o x p 1、G A R P、H V E M、I D O、E D O、T D O、L A I R-1、M I C A/B、N R 4 A 2、M A F B、O C T-2、R a r a (レチノイン酸受容体アルファ)、T L R 3、V I S T A、N K G 2 A/H L A-E、及び抑制性 K I R を含む 1 つ以上のチェックポイント分子に対するアンタゴニストである、請求項 5 に記載の細胞又はその集団。

40

【請求項 17】

前記細胞が、

(i) セーフハーバー遺伝子座若しくは選択された遺伝子座に組み込まれた 1 つ以上の外因性ポリヌクレオチド、又は

(i i) 異なるセーフハーバー遺伝子座若しくは 2 つ以上の選択された遺伝子座に組み込まれた 3 つ以上の外因性ポリヌクレオチド、を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の細胞又はその集団。

【請求項 18】

前記セーフハーバー遺伝子座が、A A V S 1、C C R 5、R O S A 26、コラーゲン、H T R P、H 11、G A P D H、若しくは R U N X 1 のうちの少なくとも 1 つを含むか、

50

又は前記選択された遺伝子座が、B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、CITA、RFXANK、RFX5、RFXAP、TCR、NKG2A、NKG2D、CD38、CD25、CD44、CD58、CD54、CD56、CD69、CD71、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、若しくはTIGITのうちの1つであり、かつ／又は前記外因性ポリヌクレオチドの前記組み込みが、前記遺伝子座における遺伝子の発現をノックアウトする、請求項17に記載の細胞又はその集団。

【請求項19】

前記TCR遺伝子座が、TCRアルファ及び／又はTCRベータの定常領域である、請求項18に記載の細胞又はその集団。

【請求項20】

前記派生エフェクター細胞が、T系統のものであり、外因性IL15を含有しない培養培地中で増殖されている、請求項3又は4に記載の細胞又はその集団。

【請求項21】

前記培養培地が、外因性IL2及びIL7の一方又は両方を含む、請求項20に記載の細胞又はその集団。

【請求項22】

前記培養培地が、IL2又はIL7のいずれも含有しない、請求項20に記載の細胞又はその集団。

【請求項23】

前記派生エフェクター細胞が、CD69⁺、及び／又はPD1⁻若しくはPD1^低である、請求項20～22のいずれか一項に記載の細胞又はその集団。

【請求項24】

前記派生エフェクター細胞が、サイトカイン支持の不在下で前記サイトカインシグナル伝達複合体を有しないその対応する細胞と比較して、増加した抗腫瘍機能及び／又は持続性を有する、請求項20～22のいずれか一項に記載の細胞又はその集団。

【請求項25】

T系統細胞の増殖並びに／又は腫瘍細胞の制御及びクリアランスを改善するための方法であって、IL7サイトカインシグナル伝達複合体を前記T系統細胞に導入し、それによって、前記サイトカインシグナル伝達複合体を有しない対応する細胞と比較して改善された細胞増殖並びに／又は腫瘍細胞の制御及びクリアランスを有するT系統細胞を産生することを含み、前記T系統細胞が、必要に応じて、キメラ抗原受容体(CAR)を更に含む、方法。

【請求項26】

前記導入するステップが、(i)人工多能性細胞(iPSC)を操作して、前記IL7サイトカインシグナル伝達複合体及び必要に応じてCARをコードするポリヌクレオチドを含むゲノム編集されたiPSCを産生することと、(ii)前記ゲノム編集されたiPSCを、前記IL7シグナル伝達複合体を含む派生T系統細胞に分化させることと、を含む、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

前記ゲノム編集されたiPSCが、同じ遺伝子編集を有しない末梢血、臍帯血、又は任意の他のドナー組織から得られたその対応する初代細胞と比較して、

(i) CD38ノックアウト、

(ii) HLA-Iの欠損及び／若しくはHLA-IIの欠損、

(iii) HLA-G若しくは非切断性HLA-Gの導入された発現、又はCD58及びCD54の一方若しくは両方のノックアウト、

(iv) 外因性CD16若しくはそのバリエント、

(v) キメラ融合受容体(CFR)、

(vi) 細胞表面発現外因性サイトカイン及び／若しくはその受容体の部分的若しくは完全なペプチド、

10

20

30

40

50

(v i i) 表 1 に列挙される遺伝子型のうちの少なくとも 1 つ、

(v i i i) B 2 M、C I I T A、T A P 1、T A P 2、タパシン、N L R C 5、R F X A N K、R F X 5、R F X A P、T C R、N K G 2 A、N K G 2 D、C D 2 5、C D 6 9、C D 4 4、C D 5 6、C I S、C B L - B、S O C S 2、P D 1、C T L A 4、L A G 3、T I M 3、及び T I G I T のうちの少なくとも 1 つの欠失若しくは破壊、又は

(i x) アゴニストとカップリングさせるための、H L A - E、4 - 1 B B L、C D 3、C D 4、C D 8、C D 1 6、C D 4 7、C D 1 1 3、C D 1 3 1、C D 1 3 7、C D 8 0、P D L 1、A₂A R、抗原特異的 T C R、F c 受容体、抗体又はその機能的バリエーション若しくは断片、チェックポイント阻害剤、エンゲージャ、及び表面トリガー受容体のうちの少なくとも 1 つの導入、

をもたらす 1 つ以上の編集を更に含む、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

外因性 I L 1 5 を含有しない培養培地中で前記 I L 7 サイトカインシグナル伝達複合体を含む前記 T 系統細胞を増殖させることを更に含む、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記培養培地が、外因性 I L 2 及び I L 7 の一方又は両方を含む、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記培養培地が、I L 2 又は I L 7 のいずれも含有しない、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記 T 系統細胞が、C D 6 9⁺、及び／又は P D 1⁻若しくは P D 1^低である、請求項 2 8 ～ 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記改善された細胞増殖並びに／又は腫瘍細胞の制御及びクリアランスが、インビトロ及び／又はインビボである、請求項 2 5 ～ 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 3】

請求項 2 5 ～ 3 0 のいずれか一項に記載の方法に従って、C A R - T 細胞のインビボ抗腫瘍機能を改善する方法。

【請求項 3 4】

請求項 1 ～ 2 4 のいずれか一項に記載の細胞又はその集団を含む、組成物。

【請求項 3 5】

請求項 1 ～ 2 4 のいずれか一項に記載のクローン i P S C を含む、マスター細胞バンク (M C B)。

【請求項 3 6】

請求項 1 ～ 2 4 のいずれか一項に記載の i P S C 派生エフェクター細胞と、1 つ以上の治療剤と、を含む、治療的使用のための組成物。

【請求項 3 7】

前記 1 つ以上の治療剤が、ペプチド、サイトカイン、チェックポイント阻害剤、抗体又はその機能的バリエーション若しくは断片、マイトジェン、増殖因子、低分子 R N A、d s R N A (二本鎖 R N A)、単核血球、フィーダ細胞、フィーダ細胞成分若しくはそれらの補充因子、1 つ以上の目的のポリ核酸を含むベクター、化学療法剤若しくは放射性部分、あるいは免疫調節薬 (I M i D) を含む、請求項 3 6 に記載の組成物。

【請求項 3 8】

(a) 前記チェックポイント阻害剤が、

(i) P D - 1、P D L - 1、T I M - 3、T I G I T、L A G - 3、C T L A - 4、2 B 4、4 - 1 B B、4 - 1 B B L、A₂A R、B A T E、B T L A、C D 3 9、C D 4 7、C D 7 3、C D 9 4、C D 9 6、C D 1 6 0、C D 2 0 0、C D 2 0 0 R、C D 2 7 4、C E A C A M 1、C S F - 1 R、F o x p l、G A R P、H V E M、I D O、E D O、T D O、L A I R - 1、M I C A / B、N R 4 A 2、M A F B、O C T - 2、R a r a (レチノイン酸受容体アルファ)、T L R 3、V I S T A、N K G 2 A / H L A - E、

10

20

30

40

50

若しくは抑制性 K I R を含む 1 つ以上のアンタゴニストチェックポイント分子、

(i i) アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、イピリムマブ、I P H 4 1 0 2、I P H 4 3、I P H 3 3、リリムマブ、モナリズマブ、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、及びそれらの派生体若しくは機能的同等物のうちの 1 つ以上、又は

(i i i) アテゾリズマブ、ニボルマブ、及びペンブロリズマブのうちの少なくとも 1 つ、を含むか、あるいは

(b) 前記治療薬が、ベネトクラクス、アザシチジン、及びポマリドマイドのうちの 1 つ以上を含む、請求項 3 7 に記載の組成物。

【請求項 3 9】

前記抗体又はその機能的バリエーション若しくは断片が、

(a) 抗 C D 2 0、抗 C D 2 2、抗 H E R 2、抗 C D 5 2、抗 E G F R、抗 C D 1 2 3、抗 G D 2、抗 P D L 1、及び／若しくは抗 C D 3 8 抗体、

(b) リツキシマブ、ベルツズマブ、オフアツムマブ、ウブリツキシマブ、オカラツズマブ、オビヌツズマブ、イブリツモマブ、オクレリズマブ、イノツズマブ、モキセツモマブ、エブラツズマブ、トラスツズマブ、ベルツズマブ、アレムツズマブ、セツキシマブ、ジヌツキシマブ、アベルマブ、ダラツムマブ、イサツキシマブ、M O R 2 0 2、7 G 3、C S L 3 6 2、エロツズマブ、及びそれらのヒト化若しくは F c 改変されたバリエーション又は断片、並びにそれらの機能的同等物及びバイオシミラーのうちの 1 つ以上、又は

(c) ダラツムマブを含み、前記派生エフェクター細胞が、C D 3 8 ノックアウト、及び必要に応じて C D 1 6 又はそのバリエーションの発現を含む、請求項 3 7 に記載の組成物。

【請求項 4 0】

前記サイトカインが、I L 2 である、請求項 3 7 に記載の組成物。

【請求項 4 1】

請求項 3 4、又は 3 6 ~ 4 0 のいずれか一項に記載の組成物を養子細胞療法に好適な対象に導入することによる前記組成物の治療的使用であって、前記対象が、自己免疫障害、血液悪性腫瘍、固形腫瘍、がん、又はウイルス感染を有する、治療的使用。

【請求項 4 2】

前記対象が、治療的処置中にサイトカイン支持を必要としない、請求項 4 1 に記載の治療的使用。

【請求項 4 3】

サイトカインシグナル伝達複合体及び必要に応じて C A R を含む派生エフェクター細胞を製造する方法であって、前記方法が、(i) 遺伝子操作された i P S C を前記派生エフェクター細胞に分化させることであって、前記 i P S C が、前記サイトカインシグナル伝達複合体及び必要に応じて前記 C A R をコードするポリヌクレオチドを含む、分化させることと、(i i) 外因性 I L 1 5 を含有しない培養培地中で前記派生エフェクター細胞を増殖させることであって、前記派生エフェクター細胞が、外因性 I L 1 5 を含有する培養培地中で培養された細胞と比較して、

(a) 増加された細胞傷害性、

(b) 改善された持続性及び／又は生存率、

(c) 腫瘍部位にバースタンダー免疫細胞を遊走させる、及び／又は活性化させる、若しくは動員する増強された能力、

(d) 改善された腫瘍浸透、

(e) 腫瘍免疫抑制を低下させる増強された能力、

(f) 腫瘍抗原エスケープを救済する改善された能力、

(g) 制御されたアポトーシス、

(h) 増強又は獲得された A D C C、並びに

(i) フラトリサイドを回避する能力、

のうちの 1 つ以上を含む治療特性を有する、増殖させることと、を含む、方法。

【請求項 4 4】

前記培養培地が、外因性 I L 2 及び I L 7 の一方又は両方を含む、請求項 4 3 に記載の

10

20

30

40

50

方法。

【請求項 45】

前記培養培地が、I L 2 又は I L 7 のいずれも含有しない、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 46】

前記サイトカインシグナル伝達複合体が、I L 7 受容体融合体 (I L 7 R F) を含む、請求項 43 ～ 45 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 47】

前記 i P S C が、末梢血、臍帯血、又は任意の他のドナー組織から得られたその対応する初代細胞と比較して、

(i) C D 3 8 ノックアウト、

(i i) H L A - I の欠損及び／若しくは H L A - I I の欠損、

(i i i) H L A - G 若しくは非切断性 H L A - G の導入された発現、又は C D 5 8 及び C D 5 4 の一方若しくは両方のノックアウト、

(i v) 外因性 C D 1 6 若しくはそのバリエーション、

(v) キメラ融合受容体 (C F R) 、

(v i) 細胞表面発現外因性サイトカイン及び／若しくはその受容体の部分的若しくは完全なペプチド、

(v i i) 表 1 に列挙される遺伝子型のうちの少なくとも 1 つ、

(v i i i) B 2 M、C I I T A、T A P 1、T A P 2、タパシン、N L R C 5、R F X A N K、R F X 5、R F X A P、T C R、N K G 2 A、N K G 2 D、C D 2 5、C D 6 9、C D 4 4、C D 5 6、C I S、C B L - B、S O C S 2、P D 1、C T L A 4、L A G 3、T I M 3、及び T I G I T のうちの少なくとも 1 つの欠失若しくは破壊、あるいは

(i x) アゴニストとカップリングさせるための、H L A - E、4 - 1 B B L、C D 3、C D 4、C D 8、C D 1 6、C D 4 7、C D 1 1 3、C D 1 3 1、C D 1 3 7、C D 8 0、P D L 1、A 2 A R、抗原特異的 T C R、F c 受容体、抗体又はその機能的バリエーション若しくは断片、チェックポイント阻害剤、エンゲージャ、及び表面トリガー受容体のうちの少なくとも 1 つの導入、

をもたらす 1 つ以上の編集をコードするポリヌクレオチドを更に含む、請求項 43 ～ 46 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 48】

前記外因性 C D 1 6 又はそのバリエーションが、

(a) 高親和性の非切断性 C D 1 6 (h n C D 1 6) 、

(b) C D 1 6 の外部ドメインにおける F 1 7 6 V 及び S 1 9 7 P 、

(c) C D 6 4 に由来する完全又は部分的な外部ドメイン、

(d) 非天然 (又は非 C D 1 6) の膜貫通ドメイン、

(e) 非天然 (又は非 C D 1 6) の細胞内ドメイン、

(f) 非天然 (又は非 C D 1 6) のシグナル伝達ドメイン、

(g) 非天然の刺激ドメイン、並びに

(h) C D 1 6 に由来せず、かつ同じ又は異なるポリペプチドに由来する膜貫通、シグナル伝達、及び刺激ドメイン、のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 47 に記載の方法

【請求項 49】

前記 C A R が、

(i) T 細胞特異的若しくは N K 細胞特異的なもの、

(i i) 二重特異性抗原結合 C A R 、

(i i i) 切り替え可能な C A R 、

(i v) 二量体化された C A R 、

(v) スプリット C A R 、

(v i) 多重鎖 C A R 、

(v i i) 誘導可能な C A R 、

10

20

30

40

50

(v i i i) 不活性化 C A R、

(i x) 必要に応じて別個の構築物内で、若しくはバイシストロン性構築物内で、細胞表面発現外因性サイトカイン及び／若しくはその受容体の部分的若しくは完全なペプチドと共発現されたもの、

(x) 必要に応じて別個の構築物内で、若しくはバイシストロニックな構築物内で、チェックポイント阻害剤と共発現されたもの、

(x i) C D 1 9、B C M A、C D 2 0、C D 2 2、C D 3 8、C D 1 2 3、H E R 2、C D 5 2、E G F R、G D 2、M I C A / B、M S L N、V E G F - R 2、P S M A、及び P D L 1 のうちの少なくとも 1 つに特異的なもの、並びに／又は

(x i i) A D G R E 2、炭酸脱水酵素 I X (C A I X)、C C R 1、C C R 4、がん胎児性抗原 (C E A)、C D 3、C D 5、C D 7、C D 8、C D 1 0、C D 2 0、C D 2 2、C D 3 0、C D 3 3、C D 3 4、C D 3 8、C D 4 1、C D 4 4、C D 4 4 V 6、C D 4 9 f、C D 5 6、C D 7 0、C D 7 4、C D 9 9、C D 1 2 3、C D 1 3 3、C D 1 3 8、C D S、C L E C 1 2 A、サイトメガロウイルス (C M V) 感染細胞の抗原、上皮糖タンパク質-2 (E G P - 2)、上皮糖タンパク質-4 0 (E G P - 4 0)、上皮細胞接着分子 (E p C A M)、E G F R v I I I、受容体チロシンタンパク質キナーゼ e r b - B 2、3、4、E G F I R、E G F R - V I I I、E R B B 葉酸結合タンパク質 (F B P)、胎児のアセチルコリン受容体 (A C h R)、葉酸受容体- α 、ガングリオシド G 2 (G D 2)、ガングリオシド G 3 (G D 3)、ヒト上皮増殖因子受容体 2 (H E R 2)、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (h T E R T)、I C A M - 1、インテグリン B 7、インターロイキン-1 3 受容体サブユニットアルファ-2 (I L - 1 3 R α 2)、 κ -軽鎖、キナーゼ挿入ドメイン受容体 (K D R)、ルイス A (C A 1 9 . 9)、ルイス Y (L e Y)、L 1 細胞接着分子 (L 1 - C A M)、L I L R B 2、黒色腫抗原ファミリー A 1 (M A G E - A 1)、M I C A / B、ムチン 1 (M u c - 1)、ムチン 1 6 (M u c - 1 6)、メソセリン (M S L N)、N K C S I、N K G 2 D リガンド、c - M e t、がん-精巣抗原 N Y - E S O - 1、腫瘍胎児性抗原 (h 5 T 4)、P R A M E、前立腺幹細胞抗原 (P S C A)、P R A M E 前立腺特異的膜抗原 (P S M A)、腫瘍関連糖タンパク質 7 2 (T A G - 7 2)、T I M - 3、T R B C I、T R B C 2、血管内皮増殖因子 R 2 (V E G F - R 2)、ウィルムス腫瘍タンパク質 (W T - 1)、及び病原体抗原のうちのいずれか 1 つに特異的なもの、であり、必要に応じて、

前記 (i) ~ (x i i) のうちのいずれか 1 つの C A R が、T C R 遺伝子座に挿入されている、及び／又は T C R の内因性プロモータによって駆動されている、かつ／あるいは前記 T C R が、前記 C A R 挿入によってノックアウトされている、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記不活性化 C A R が、C D 3 8 - C A R、4 - 1 B B - C A R、O X 4 0 - C A R、及び C D 4 0 L - C A R のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記 C A R をコードするポリヌクレオチドをノックインするために、かつ、必要に応じて、

(i) C D 3 8 をノックアウトするために、

(i i) B 2 M 及び／若しくは C I I T A をノックアウトするために、

(i i i) 一方若しくは両方の C D 5 8 及び C D 5 4 をノックアウトするために、並びに／あるいは、

(i v) H L A - G 若しくは非切断性 H L A - G、高親和性の非切断性 C D 1 6 若しくはそのバリエーション、C F R、及び／又は細胞表面発現外因性サイトカイン及び／若しくはその受容体の部分的若しくは完全なペプチドの発現を導入するために、クローン i P S C をゲノム操作することを更に含む、請求項 4 7 ~ 5 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記ゲノム操作することが、標的化された編集を含む、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 53】

前記標的化された編集が、欠失、挿入、又はインデルを含み、前記標的化された編集が、CRISPR、ZFN、TALEN、ホーミングヌクレアーゼ、相同組換え、又はこれらの方法の任意の他の機能的バリエーションによって行われる、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 54】

クローン iPSC の CRISPR 媒介性編集を使用してクローンマスター操作 iPSC 株を産生する方法であって、前記編集が、サイトカインシグナル伝達複合体及び必要に応じて CAR をコードするポリヌクレオチドの前記クローン iPSC へのノックインを含み、前記サイトカインシグナル伝達複合体が、IL7 受容体融合 (IL7RF) を含み、それによって前記クローンマスター操作 iPSC 株を産生する産生する方法。

10

【請求項 55】

(a) 前記クローン iPSC の前記編集が、TCR をノックアウトすることを更に含むか、又は

(b) 前記 CAR が、B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、CITTA、RFXANK、RFX5、RFXAP、TCR、NKG2A、NKG2D、CD38、CD25、CD69、CD44、CD58、CD54、CD56、CD69、CD71、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、若しくは TIGIT を含む遺伝子座のうちの 1 つに挿入され、前記挿入が、前記遺伝子座における遺伝子の発現をノックアウトする、請求項 54 に記載の方法。

20

【請求項 56】

疾患又は状態を治療する方法であって、それを必要とする対象に、請求項 36～40 のいずれか一項に記載の組成物を投与することを含む、方法。

【請求項 57】

前記対象が、治療中にサイトカイン支持を必要としない、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 58】

前記組成物の前記細胞が、抗体又はその機能的バリエーション若しくは断片、あるいはエンゲージを発現する、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 59】

前記組成物の前記細胞が、iPSC 由来エフェクター細胞であり、前記 iPSC 由来エフェクター細胞が、

30

(i) CD38 ノックアウト、

(ii) TCR^{neg}、

(iii) 外因性 CD16 若しくはそのバリエーション、

(iv) HLA-I 及び／若しくは HLA-II の欠損、

(v) HLA-G 若しくは非切断性 HLA-G の導入された発現、又は CD58 及び CD54 の一方若しくは両方のノックアウト、

(vi) CFR の導入された発現、及び／又は

(vii) 細胞表面発現外因性サイトカイン若しくはその受容体の部分的若しくは完全なペプチド、のうちの 1 つ以上を更に含む、請求項 56 に記載の方法。

40

【請求項 60】

前記組成物の前記細胞の投与が、サイトカイン支持の不在下で、それらの対応する初代細胞と比較して、

(i) 増加された細胞傷害性、

(ii) 改善された持続性及び／又は生存率、

(iii) 腫瘍部位にバイスタンダー免疫細胞を遊走させる、及び／又は活性化させる、若しくは動員する増強された能力、

(iv) 改善された腫瘍浸透、

(v) 腫瘍免疫抑制を低下させる増強された能力、

(vi) 腫瘍抗原エスケープを救済する改善された能力、

50

(v i i) 制御されたアポトーシス、
(v i i i) 増強又は獲得されたA D C C、並びに
(i x) フラトリサイドを回避する能力、
のうちの1つ以上をもたらす、請求項56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11月4日に出願された米国特許仮出願第63／109,828号の優先権を主張し、その開示は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0002】

本開示は、既製の免疫細胞製品の分野に広く関する。より具体的には、本開示は、インビボで治療に適切な特性を送達することができる多機能エフェクター細胞を開発するための戦略に関する。本開示の下で開発された細胞製品は、患者由来の細胞療法の重大な限界に対処する。

【0003】

電子的に提出された配列表への言及

本出願は、本出願とともに提出された、作成日2021年10月26日、サイズ36,486バイト、名称184143-631601__SequenceListing__ST25である、ASCIIテキスト形式の配列表のコンピュータ可読形式(Computer Readable Form、CRF)を参照により組み込む。

20

【背景技術】

【0004】

養子細胞療法の分野は現在、患者由来及びドナー由来の細胞を使用することに焦点が当てられているため、がん免疫療法の一貫した製造を達成することと、恩恵を受ける可能性のある全ての患者に療法を提供することが特に困難なものとなっている。養子移入されたリンパ球の有効性及び持続性を改善して、患者の良好な転帰を促進する必要性も存在する。T細胞及びナチュラルキラー(natural killer、NK)細胞などのリンパ球は、自然免疫及び適応免疫に重要な役割を果たす強力な抗腫瘍エフェクターである。しかしながら、養子細胞療法のためにこれらの免疫細胞を使用することは、依然として困難であり、改善に対する満たされていない要求が存在する。したがって、養子免疫療法においてT細胞及びNK細胞、又は他の免疫エフェクター細胞の潜在能力を最大限に活用するための大きなチャンスがある。

30

【発明の概要】

【0005】

応答率、細胞の消耗、輸注された細胞の損失(生存率及び／又は持続性)、標的の喪失又は系統転換による腫瘍エスケープ、腫瘍の標的化の精度、標的外毒性、腫瘍外効果、固形腫瘍に対する有効性、すなわち腫瘍微小環境及び関連する免疫抑制、動員、輸送、及び浸潤など、様々な問題に対処する機能的に改善されたエフェクター細胞が必要である。

【0006】

40

本発明の目的は、単一細胞由来のiPSC(induced pluripotent stem cell、人工多能性幹細胞)クローン株から分化した派生非多能性細胞を生成する方法及び組成物を提供することであり、このiPSCは、そのゲノムに1つ又はいくつかの遺伝子改変を含む。前述の1つ又はいくつかの遺伝子改変には、DNA挿入、欠失、及び置換が含まれ、これらの改変は、分化、増殖、継代及び／又は移植の後、その後の由来細胞において保持され、機能し続ける。

【0007】

本出願のiPSC由来非多能性細胞には、CD34細胞、造血内皮細胞、HSC(hematopoietic stem and progenitor cell、造血幹前駆細胞)、造血多能性前駆細胞、T細胞前駆体、NK細胞前駆体、T細胞、NK T細胞

50

、NK細胞、B細胞、並びに初代NK、T、及び／又はNK T細胞には存在しない1つ以上の機能的特質を有する免疫エフェクター細胞が含まれるが、これらに限定されない。本出願のiPSC由来の非多能性細胞は、同一の遺伝子改変を含むiPSCからの分化を通じて、それらのゲノムに1つ又はいくつかの遺伝子改変を含む。遺伝子操作された派生細胞を得るための操作されたクローンiPSC分化戦略では、分化におけるiPSCの発生能が、iPSCの操作されたモダリティによって悪影響を受けないこと、及び操作されたモダリティが派生細胞で意図したとおりに機能することも必要である。更に、この戦略は、末梢血から取得されたT細胞又はNK細胞などの初代リンパ球を操作する際の現在の障壁、すなわち、そのような細胞はしばしば、再現性と均一性を欠き、高い細胞死と低い細胞増殖を伴う不十分な細胞の持続性を呈する細胞をもたらす、そのような細胞を操作することが困難であることに起因する障壁を克服する。更に、この戦略は、最初は不均質である初代細胞源を使用して別の方法で得られる不均質のエフェクター細胞集団の生成を回避する。

10

【0008】

本発明のいくつかの態様は、リプログラミングプロセスに続いて、同時に、及びその前に、それぞれ、ゲノム操作の戦略を反映する(I)、(II)、又は(III)を含む方法を使用して得られたゲノム操作されたiPSCを提供する。

【0009】

(I)：以下の(i)及び(ii)の一方又は両方を任意の順序で実施してiPSCを遺伝子操作する：(i) iPSCに1つ以上の構築物を導入して、選択された部位での標的化組み込みを可能にし、(ii) (a) 選択された部位を認識することができる1つ以上のエンドヌクレアーゼを使用して、選択された部位における1つ以上の二本鎖切断をiPSCに導入し、(b) ステップ(I) (ii) (a) のiPSCを培養して、内因性DNA修復が、選択された部位に標的化インデルを同時に又は順次生成することを可能にし、それによって、部分又は完全分化細胞に分化することができるゲノム操作されたiPSCを得る。

20

【0010】

(II)：非多能性細胞を遺伝子操作リプログラミングしてゲノム操作されたiPSCを得る。これには、(i) 非多能性細胞を1つ以上のリプログラミング因子、並びに必要に応じて、TGFβ受容体／ALK阻害剤、MEK阻害剤、GSK3阻害剤、及び／又はROCK阻害剤を含む小分子組成物と接触させて、非多能性細胞のリプログラミングを開始することと、(ii) 以下の(a)及び(b)の一方又は両方を任意の順序でステップ(II) (i) のリプログラミング非多能性細胞に導入することと、が含まれる：(a) 選択された部位での標的化組み込みを可能にする1つ以上の構築物、(b) 選択された部位を認識することができる少なくとも1つのエンドヌクレアーゼを使用する、選択された部位での1つ以上の二本鎖切断、次いで、ステップ(II) (ii) (b) の細胞を培養して、内因性DNA修復が、選択された部位に標的化インデルを生成することを可能にする。したがって、得られたゲノム操作されたiPSCは、少なくとも1つの機能的な標的化ゲノム編集を含み、前述のゲノム操作されたiPSCは、部分又は完全分化細胞に分化することができる。

30

40

【0011】

(III)：リプログラミングしてゲノム操作されたiPSCを得るために、非多能性細胞を遺伝子操作する。これには、以下の(i)及び(ii)が含まれる：(i) 以下の(a)及び(b)の一方又は両方を任意の順序で非多能性細胞に導入すること：(a) 選択された部位での標的化組み込みを可能にする1つ以上の構築物、(b) 選択された部位を認識することができる少なくとも1つのエンドヌクレアーゼを使用する、選択された部位での1つ以上の二本鎖切断、であって、ステップ(III) (i) (b) の細胞を培養して、内因性DNA修復が、選択された部位に標的化インデルを生成することを可能にする、導入することと、(ii) ステップ(III) (i) の細胞を、1つ以上のリプログラミング因子、並びに必要に応じて、TGFβ受容体／ALK阻害剤、MEK阻害剤、G

50

S K 3 阻害剤、及び／又は R O C K 阻害剤を含む小分子組成物と接触させて、選択された部位での標的化編集を含むゲノム操作された i P S C を得ること。それによって、少なくとも1つの機能的な標的化ゲノム編集を含むゲノム操作された i P S C を得、前述のゲノム操作された i P S C は、部分分化細胞又は完全分化細胞に分化することができる。

【0012】

上述の方法の一実施形態では、1つ以上の選択された部位での少なくとも1つの標的化されたゲノム編集は、安全スイッチタンパク質、標的化モダリティ、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、薬学的に活性なタンパク質及びペプチド、薬物標的候補、あるいは、ゲノム操作された i P S C 又はそれからの派生細胞の生着、輸送、ホーミング、生存能力、自己複製、持続性、及び／又は生存率を促進するタンパク質をコードする1つ以上の外因性ポリヌクレオチドの挿入を含む。いくつかの実施形態では、挿入のための外因性ポリヌクレオチドは、(1) C M V、E F 1 α 、P G K、C A G、U B C、又は他の構成的、誘導性、時間特異的、組織特異的、若しくは細胞型特異的プロモータを含む1つ以上の外因性プロモータ、又は(2) A A V S 1、C C R 5、R O S A 2 6、コラーゲン、H T R P、H 1 1、ベータ2ミクログロブリン、C D 3 8、G A P D H、T C R 若しくは R U N X 1、又はゲノムセーフハーバーの基準を満たす他の遺伝子座を含む選択された部位に含まれる1つ以上の内因性プロモータに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、上述の方法を使用して生成されたゲノム操作された i P S C は、カスパーゼ、チミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、改変 E G F R、又は B 細胞 C D 2 0 を含むタンパク質をコードする1つ以上の異なる外因性ポリヌクレオチドを含み、ゲノム操作された i P S C が2つ以上の自殺遺伝子を含む場合、自殺遺伝子は、A A V S 1、C C R 5、R O S A 2 6、コラーゲン、H T R P、H 1 1、ベータ2ミクログロブリン、C D 3 8、G A P D H、T C R、又は R U N X 1 を含む異なるセーフハーバー遺伝子座に組み込まれている。一実施形態では、外因性ポリヌクレオチドは、I L 2、I L 4、I L 6、I L 7、I L 9、I L 1 0、I L 1 1、I L 1 2、I L 1 5、I L 1 8、I L 2 1、及び／又はそれらのそれぞれの受容体の部分長又は全長ペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、外因性ポリヌクレオチドによってコードされる I L 2、I L 4、I L 6、I L 7、I L 9、I L 1 0、I L 1 1、I L 1 2、I L 1 5、I L 1 8、I L 2 1、及び／又はそのそれぞれの受容体の部分的又は完全なペプチドは、融合タンパク質の形態である。

【0013】

いくつかの他の実施形態では、本明細書で提供される方法を使用して生成されたゲノム操作された i P S C は、標的化モダリティ、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、薬物標的候補、免疫応答調節及び修飾、あるいは i P S C 若しくはそれからの派生細胞の生着、輸送、ホーミング、生存能力、自己複製、持続性、及び／又は生存率を抑制するタンパク質と関連する1つ以上の内因性遺伝子におけるインデルを含む。いくつかの実施形態では、破壊のための内因性遺伝子は、C D 3 8、B 2 M、T A P 1、T A P 2、タパシン、N L R C 5、P D 1、L A G 3、T I M 3、R F X A N K、C I I T A、R F X 5、R F X A P、R A G 1、及び染色体 6 p 2 1 領域の任意の遺伝子のうちの少なくとも1つを含む。

【0014】

更にいくつかの他の実施形態では、本明細書で提供される方法を使用して生成されるゲノム操作された i P S C は、A A V S 1 遺伝子座に外因性ポリヌクレオチドをコードするカスパーゼ、及び H 1 1 遺伝子座に外因性ポリヌクレオチドをコードするチミジンキナーゼを含む。

【0015】

更にいくつかの他の実施形態では、アプローチ (I)、(II) 及び／又は (III) は、ゲノム操作された i P S C を、M E K 阻害剤、G S K 3 阻害剤、及び R O C K 阻害剤を含む小分子組成物と接触させて、ゲノム操作された i P S C の多能性を維持することを更に含む。一実施形態では、少なくとも1つの標的化されたゲノム編集を含む取得されたゲノム操作された i P S C は機能的であり、分化能があり、同一の機能のゲノム編集を含

む非多能性細胞に分化することができる。

【0016】

したがって、一態様では、本発明は、細胞又はその集団であって、(a)細胞が、組換えサイトカインシグナル伝達複合体及び必要に応じてキメラ抗原受容体(chimeric antigen receptor、CAR)をコードするポリヌクレオチドを含み、(b)細胞が、真核細胞、動物細胞、ヒト細胞、免疫細胞、フィーダ細胞、人工多能性細胞(iPSC)、又はそれから分化した派生細胞であり、(c)サイトカインシグナル伝達複合体が、(i)完全又は部分的なサイトカイン、及び(ii)完全又は部分的なIL7受容体、IL2受容体、IL4受容体、IL9受容体、IL21受容体、又はγC受容体を含む、細胞又はその集団を提供する。いくつかの実施形態では、サイトカインシグナル伝達複合体は、別個の構築物内で、又はバイシストロン性構築物内で、CARと共発現されている。いくつかの実施形態では、iPSCは、クローンiPSC、単一細胞解離iPSC、iPSC細胞株細胞、又はiPSCマスター細胞バンク(master cell bank、MCB)細胞である。いくつかの実施形態では、派生細胞は、派生CD34⁺細胞、派生造血幹前駆細胞、派生造血多能性前駆細胞、派生T細胞前駆体、派生NK細胞前駆体、派生T系統細胞、派生NK T系統細胞、派生NK系統細胞、又は派生B系統細胞である。他の実施形態では、派生細胞は、対応する初代T、NK、NKT、及び／又はB細胞には存在しない1つ以上の機能的特質を有する派生エフェクター細胞を含む。様々な実施形態では、サイトカインシグナル伝達複合体は、IL7及びIL7受容体の部分的又は完全なペプチドを含み、サイトカインシグナル伝達複合体は、(a)(i)自己切断ペプチドを使用することによって共発現されたIL7及びIL7Rα、(ii)IL7とIL7Rαとの融合タンパク質(IL7RF)、(iii)IL7Rαの細胞内ドメインが短縮化又は排除されたIL7／IL7Rα融合タンパク質、(iv)IL7とIL7Rβとの融合タンパク質、(v)IL7と共通受容体γCとの融合タンパク質であって、共通受容体γCが、天然であるか又は改変されている、融合タンパク質、及び(vi)IL7Rβのホモ二量体、のうちの少なくとも1つを含み、(i)～(vi)のうちのいずれか1つは、必要に応じて、別個の構築物内で、又はバイシストロン性構築物内で、CARと共発現され、必要に応じて、(b)一過的に発現されている。いくつかの実施形態では、細胞は、(i)CD38ノックアウト、(ii)その対応する初代細胞と比較して、HLA-Iの欠損及び／若しくはHLA-IIの欠損、(iii)HLA-G若しくは非切断性HLA-Gの導入された発現、又はCD58及びCD54の一方若しくは両方のノックアウト、(iv)外因性CD16若しくはそのバリエーション、(v)キメラ融合受容体(chimeric fusion receptor、CFR)、(vi)細胞表面発現外因性サイトカイン及び／若しくはその受容体の部分的若しくは完全なペプチド、(vii)表1に列挙される遺伝子型のうちの少なくとも1つ、(viii)B2M、CIITA、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、RFXANK、RFX5、RFXAP、TCR、NKG2A、NKG2D、CD25、CD69、CD44、CD56、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、及びTIGITのうちの少なくとも1つの欠失若しくは破壊、あるいは(ix)HLA-E、4-1BBL、CD3、CD4、CD8、CD16、CD47、CD113、CD131、CD137、CD80、PDL1、A2AR、抗原特異的TCR、Fc受容体、抗体又はその機能的バリエーション若しくは断片、チェックポイント阻害剤、エンゲージャ、及びアゴニストとカップリングするための表面トリガー受容体のうちの少なくとも1つの導入、のうちの1つ以上を更に含む。いくつかの実施形態では、細胞は、同じ遺伝子編集を有しない末梢血、臍帯血、又は任意の他のドナー組織から得られたその対応する初代細胞と比較して、(i)増加された細胞傷害性、(ii)改善された持続性及び／又は生存率、(iii)腫瘍部位にバイスタンダー免疫細胞を遊走させる、及び／又は活性化させる、若しくは動員する増強された能力、(iv)改善された腫瘍浸透、(v)腫瘍免疫抑制を低下させる増強された能力、(vi)腫瘍抗原エスケープを救済する改善された能力、(vii)制御されたアポトーシス、(viii)増強又は獲得されたADCC、並びに(ix)フラトリサイドを回避する能力、のうちの1つ以上を含む治

10

20

30

40

50

療特性を有する。

【0017】

細胞又はその集団が外因性CD16又はそのバリエーションを含むそれらの実施形態では、そのCD16バリエーションは、(a)高親和性の非切断性CD16 (high affinity non-cleavable CD16、hncd16)、(b)CD16の外部ドメインにおけるF176V及びS197P、(c)CD64に由来する完全又は部分的な外部ドメイン、(d)非天然(又は非CD16)の膜貫通ドメイン、(e)非天然(又は非CD16)の細胞内ドメイン、(f)非天然(又は非CD16)のシグナル伝達ドメイン、(g)非天然の刺激ドメイン、並びに(h)CD16に由来せず、かつ同じ又は異なるポリペプチドに由来する膜貫通、シグナル伝達、及び刺激ドメイン、のうちの少なくとも1つを含んでもよい。

10

【0018】

細胞又はその集団が派生エフェクター細胞である実施形態では、派生エフェクター細胞は、サイトカインシグナル伝達複合体を有しないその対応する細胞と比較して、(a)改善された相対的細胞増殖、(b)CAR発現の増加したパーセンテージ、(c)増加したCD69発現、及び(d)減少したPD-1発現、のうちの少なくとも1つを含む。

【0019】

細胞又はその集団がCARを含むそれらの実施形態では、実施形態では、CARは、(i)T細胞特異的若しくはNK細胞特異的なもの、(ii)二重特異性抗原結合CAR、(iii)切り替え可能なCAR、(iv)二量体化されたCAR、(v)スプリットCAR、(vi)多重鎖CAR、(vii)誘導可能なCAR、(viii)不活性化CAR、(ix)必要に応じて別個の構築物内で、若しくはバイシストロン性構築物内で、チェックポイント阻害剤と共発現されたもの、(x)CD19、BCMA、CD20、CD22、CD38、CD123、HER2、CD52、EGFR、GD2、MICA/B、MSLN、VEGF-R2、PSMA、及びPDL1のうちの少なくとも1つに特異的なもの、並びに／又は、(xi)ADGRE2、炭酸脱水酵素IX (carbonic anhydrase IX、CAIX)、CCR1、CCR4、がん胎児性抗原 (carcinoembryonic antigen、CEA)、CD3、CD5、CD7、CD8、CD10、CD20、CD22、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD44V6、CD49f、CD56、CD70、CD74、CD99、CD123、CD133、CD138、CDS、CLEC12A、サイトメガロウイルス (cytomegalovirus、CMV) 感染細胞の抗原、上皮糖タンパク質-2 (epithelial glycoprotein-2、EGP-2)、上皮糖タンパク質-40 (epithelial glycoprotein-40、EGP-40)、上皮細胞接着分子 (epithelial cell adhesion molecule、EPCAM)、EGFRvIII、受容体チロシンタンパク質キナーゼerbB-2、3、4、EGFR、EGFR-VIII、ERBB葉酸結合タンパク質 (folate-binding protein、FBP)、胎児のアセチルコリン受容体 (acetylcholine receptor、AChR)、葉酸受容体-α、ガングリオシドG2 (Ganglioside G2、GD2)、ガングリオシドG3 (Ganglioside G3、GD3)、ヒト上皮増殖因子受容体2 (human Epidermal Growth Factor Receptor2、HER2)、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (human telomerase reverse transcriptase、hTERT)、ICAM-1、インテグリンB7、インターロイキン-13受容体サブユニットアルファ-2 (Interleukin-13 receptor subunit alpha-2、IL-13Rα2)、κ-軽鎖、キナーゼ挿入ドメイン受容体 (kinase insert domain receptor、KDR)、ルイスA (CA19.9)、ルイスY (Lewis Y、LeY)、L1細胞接着分子 (L1 cell adhesion molecule、L1-CAM)、LILRB2、黒色腫抗原ファミリーA1 (melanoma antigen family A1、MAGE-A1)、MICA/B、ムチン1 (Mucin1、Muc-1)、ムチン16 (Mucin16、Muc-16)、メソセリン (Mesothelin、MSLN)、NKCSI、NKG2Dリガンド、c-Met、がん-精巣抗原NY-ESO-1、腫瘍胎児性抗原 (h5T4)、PRAME、前立腺幹細胞抗原 (prostate stem cell antigen、PSCA)、PRAME前立腺特異的膜抗原 (prostate-specific membrane antigen、PSMA)、腫瘍関連糖

20

30

40

50

タンパク質 72 (tumor-associated glycoprotein 72、TAG-72)、TIM-3、TRBC1、TRBC2、血管内皮増殖因子 R2 (vascular endothelial growth factor R2、VEGF-R2)、ウィルムス腫瘍タンパク質 (Wilms tumor protein、WT-1)、及び病原体抗原のうちのいずれか 1 つに特異的なもの、であり得、(i) ~ (xi) のうちのいずれか 1 つの CAR は、TCR 遺伝子座に挿入されている、及び／又は TCR の内因性プロモータによって駆動されている、かつ／あるいは TCR は、CAR 挿入によってノックアウトされている。CAR が不活性化 CAR であるいくつかの実施形態では、不活性化 CAR は、活性化されたレシピエント免疫細胞において上方制御された表面タンパク質を標的とする。特定の実施形態では、不活性化 CAR は、CD38-CAR、4-1BB-CAR、OX40-CAR、及び CD40L-CAR のうちの少なくとも 1 つを含む。

10

【0020】

細胞又はその集団が CFR を含む実施形態では、CFR は、膜貫通ドメインに融合した外部ドメインを含み、膜貫通ドメインは、内部ドメインに作動可能に接続されており、外部ドメイン、膜貫通ドメイン及び内部ドメインは、いかなる小胞体 (endoplasmic reticulum、ER) 保持シグナルもエンドサイトーシスシグナルも含まない。いくつかの実施形態では、CFR の外部ドメインは、CD3ε、CD3γ、CD3δ、CD28、CD5、CD16、CD64、CD32、CD33、CD89、NKG2C、NKG2D、それらの任意の機能的バリエーション、及びそれらの組み合わせ若しくはキメラのうちの少なくとも 1 つを含むシグナル伝達タンパク質の細胞外部分の全長又は部分長を含む。いくつかの実施形態では、CFR の外部ドメインは、CD3、CD28、CD5、CD16、CD64、CD32、CD33、CD89、NKG2C、NKG2D、若しくはそれらの任意の機能的バリエーションの細胞外部分に特異的な結合ドメインを少なくとも含む選択されたアゴニストに結合するとシグナル伝達を開始するか、又は選択されたアゴニストは、B7H3、BCMA、CD10、CD19、CD20、CD22、CD24、CD30、CD33、CD34、CD38、CD44、CD79a、CD79b、CD123、CD138、CD179b、CEA、CLEC12A、CS-1、DLL3、EGFR、EGFRvIII、EPCAM、FLT-3、FOLR1、FOLR3、GD2、gpA33、HER2、HM1.24、LGR5、MSLN、MCSP、MICA/B、PSMA、PAMPA、P-カドヘリン、若しくは ROR1 を含む少なくとも 1 つの腫瘍抗原に特異的な結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、CFR の内部ドメインは、CD3ζ、2B4、DAP10、DAP12、DNAM1、CD137 (4-1BB)、IL21、IL7、IL12、IL15、Nkp30、Nkp44、Nkp46、NKG2C、若しくは NKG2D ポリペプチドの少なくとも全長若しくは一部分を含む細胞傷害性ドメインを含み、必要に応じて、内部ドメインは、(i) CD2、CD27、CD28、CD40L、4-1BB、OX40、ICOS、PD-1、LAG-3、2B4、BTLA、DAP10、DAP12、CTLA-4、若しくは NKG2D ポリペプチド、又はそれらの任意の組み合わせの全長又は一部分を含む共刺激ドメイン、(ii) CD28、4-1BB、CD27、CD40L、ICOS、CD2、若しくはそれらの組み合わせの全長若しくは一部分を含む共刺激ドメイン、(iii) IL7R、IL15R、IL18R、IL12R、IL23R、若しくはそれらの組み合わせを含むサイトカイン受容体の内部ドメインの全長若しくは一部分を含む持続性シグナル伝達ドメイン、及び／又は (iv) 受容体チロシンキナーゼ (receptor tyrosine kinase、RTK)、腫瘍壊死因子受容体 (tumor necrosis factor receptor、TNFR)、EGFR、若しくは FAS 受容体の完全若しくは部分的な細胞内部分、のうちの 1 つ以上を更に含む。

20

30

40

【0021】

細胞又はその集団がチェックポイント阻害剤の導入された又は増加した発現を含むそれらの実施形態では、チェックポイント阻害剤は、PD-1、PDL-1、TIM-3、TIGIT、LAG-3、CTLA-4、2B4、4-1BB、4-1BBL、A2AR、BATE、BTLA、CD39、CD47、CD73、CD94、CD96、CD160

50

、CD200、CD200R、CD274、CEACAM1、CSF-1R、Foxp1、GARP、HVEM、IDO、EDO、TDO、LAIR-1、MICA/B、NR4A2、MAFB、OCT-2、Rara (retinoic acid receptor alpha、レチノイン酸受容体アルファ)、TLR3、VISTA、NKG2A/HLA-E、及び抑制性KIRを含む1つ以上のチェックポイント分子に対するアンタゴニストであってもよい。

【0022】

細胞又はその集団の様々な実施形態では、細胞は、(i) セーフハーバー遺伝子座若しくは選択された遺伝子座に組み込まれた1つ以上の外因性ポリヌクレオチド、又は(ii) 異なるセーフハーバー遺伝子座若しくは2つ以上の選択された遺伝子座に組み込まれた3つ以上の外因性ポリヌクレオチド、を含んでもよい。いくつかの実施形態では、セーフハーバー遺伝子座は、AAVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HTRP、H11、GAPDH、若しくはRUNX1のうちの少なくとも1つを含むか、又は選択された遺伝子座は、B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、CIITA、RFXANK、RFX5、RFXAP、TCR、NKG2A、NKG2D、CD25、CD38、CD25、CD69、CD44、CD58、CD54、CD56、CD71、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、若しくはTIGITのうちの1つであり、かつ／又は外因性ポリヌクレオチドの組み込みが、遺伝子座における遺伝子の発現をノックアウトする。特定の実施形態では、TCR遺伝子座は、TCRアルファ及び／又はTCRベータの定常領域である。

【0023】

細胞又はその集団が派生エフェクター細胞であるそれらの実施形態では、派生エフェクター細胞は、T系統のものであってもよく、外因性IL15を含有しない培養培地中で増殖されている。いくつかの実施形態では、培養培地は、外因性IL2及びIL7の一方又は両方を含む。いくつかの実施形態では、培養培地は、IL2又はIL7のいずれも含有しない。いくつかの実施形態では、派生エフェクター細胞は、CD69⁺、及び／又はPD1⁻若しくはPD1^低である。いくつかの実施形態では、派生エフェクター細胞は、サイトカイン支持の不在下で、サイトカインシグナル伝達複合体を有しないその対応する細胞と比較して、増加した抗腫瘍機能及び／又は持続性を有する。

【0024】

別の態様では、本発明は、T系統細胞の増殖並びに／又は腫瘍細胞の制御及びクリアランスを改善するための方法であって、IL7サイトカインシグナル伝達複合体をT系統細胞に導入し、それによって、サイトカインシグナル伝達複合体を有しない対応する細胞と比較して改善された細胞増殖並びに／又は腫瘍細胞の制御及びクリアランスを有するT系統細胞を産生することを含み、T系統細胞が、キメラ抗原受容体(CAR)を必要に応じて更に含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、導入するステップは、(i) 人工多能性細胞(iPSC)を操作して、IL7サイトカインシグナル伝達複合体及び必要に応じてCARを必要に応じてポリヌクレオチドを含むゲノム編集されたiPSCを産生することと、(ii) ゲノム編集されたiPSCを、IL7シグナル伝達複合体を含む派生T系統細胞に分化させることと、を含む。いくつかの実施形態では、ゲノム編集されたiPSCは、同じ遺伝子編集を有しない末梢血、臍帯血、又は任意の他のドナー組織から得られたその対応する初代細胞と比較して、(i) CD38ノックアウト、(ii) その対応する初代細胞と比較して、HLA-Iの欠損及び／若しくはHLA-IIの欠損、(iii) HLA-G若しくは非切断性HLA-Gの導入された発現、又はCD58及びCD54の一方若しくは両方のノックアウト、(iv) CD16若しくはそのバリエーション、(v) キメラ融合受容体(CFR)、(vi) 細胞表面発現外因性サイトカイン及び／若しくはその受容体の部分的若しくは完全なペプチド、(vii) 表1に列挙される遺伝子型のうちの少なくとも1つ、(viii) B2M、CIITA、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、RFXANK、RFX5、RFXAP、TCR、NKG2A、NKG2D、CD25、CD69、CD44、CD56、CIS、CBL-B、SOCS2、

P D 1、C T L A 4、L A G 3、T I M 3、及び T I G I T のうちの少なくとも1つの欠失若しくは破壊、又は (i x) H L A - E、4 - 1 B B L、C D 3、C D 4、C D 8、C D 1 6、C D 4 7、C D 1 1 3、C D 1 3 1、C D 1 3 7、C D 8 0、P D L 1、A 2 A R、抗原特異的 T C R、F c 受容体、抗体又はその機能的バリエーション若しくは断片、チェックポイント阻害剤、エンゲージャ、及びアゴニストとカップリングするための表面トリガー受容体のうちの少なくとも1つの導入、をもたらし1つ以上の編集を更に含む。

【 0 0 2 5 】

様々な実施形態では、方法は、外因性 I L 1 5 を含有しない培養培地中で I L 7 サイトカインシグナル伝達複合体を含む T 系統細胞を増殖させることを更に含む。いくつかの実施形態では、培養培地は、外因性 I L 2 及び I L 7 の一方又は両方を含む。いくつかの実施形態では、培養培地は、I L 2 又は I L 7 のいずれも含有しない。特定の実施形態では、T 系統細胞は、C D 6 9 ⁺、及び／又は P D 1 ⁻ 若しくは P D 1 ^低 である。いくつかの実施形態では、改善された細胞増殖並びに／又は腫瘍細胞の制御及びクリアランスは、インビトロ及び／又はインビボである。実施形態では、本発明はまた、本明細書に開示される方法に従って C A R - T 細胞のインビボ抗腫瘍機能を改善する方法を提供する。

【 0 0 2 6 】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載される細胞又はその集団を含む、組成物を提供する。更に別の態様では、本発明は、本明細書に開示されるクローン i P S C を含む、マスター細胞バンク (M C B) を提供する。

【 0 0 2 7 】

更に別の態様では、本発明は、本明細書に記載の i P S C 派生エフェクター細胞と、1つ以上の治療剤と、を含む、治療的使用のための組成物を提供する。いくつかの実施形態では、1つ以上の治療剤は、ペプチド、サイトカイン、チェックポイント阻害剤、抗体又はその機能的バリエーション若しくは断片、マイトジェン、増殖因子、低分子 R N A、d s R N A (d o u b l e s t r a n d e d R N A、二本鎖 R N A)、単核血球、フィーダ細胞、フィーダ細胞成分若しくはそれらの補充因子、1つ以上の目的のポリ核酸を含むベクター、化学療法剤若しくは放射性部分、あるいは免疫調節薬 (i m m u n o m o d u l a t o r y d r u g、I M i D) を含む。1つ以上の治療剤がチェックポイント阻害剤を含む実施形態では、チェックポイント阻害剤は、(a) P D - 1、P D L - 1、T I M - 3、T I G I T、L A G - 3、C T L A - 4、2 B 4、4 - 1 B B、4 - 1 B B L、A 2 A R、B A T E、B T L A、C D 3 9、C D 4 7、C D 7 3、C D 9 4、C D 9 6、C D 1 6 0、C D 2 0 0、C D 2 0 0 R、C D 2 7 4、C E A C A M 1、C S F - 1 R、F o x p 1、G A R P、H V E M、I D O、E D O、T D O、L A I R - 1、M I C A / B、N R 4 A 2、M A F B、O C T - 2、R a r a (レチノイン酸受容体アルファ)、T L R 3、V I S T A、N K G 2 A / H L A - E、若しくは抑制性 K I R を含む1つ以上のアンタゴニストチェックポイント分子、(i i) アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、イピリムマブ、I P H 4 1 0 2、I P H 4 3、I P H 3 3、リリムマブ、モナリズマブ、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、及びそれらの派生体若しくは機能的同等物のうちの1つ以上、又は (i i i) アテゾリズマブ、ニボルマブ、及びペンブロリズマブ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、治療剤は、ベネトクラクス、アザシチジン、及びボマリドマイドのうちの1つ以上を含む。治療剤が抗体又はその機能的バリエーション若しくは断片であるそれらの実施形態では、抗体又はその機能的バリエーション若しくは断片は、(a) 抗 C D 2 0、抗 C D 2 2、抗 H E R 2、抗 C D 5 2、抗 E G F R、抗 C D 1 2 3、抗 G D 2、抗 P D L 1、及び／若しくは抗 C D 3 8 抗体、(b) リツキシマブ、ベルツズマブ、オフアツムマブ、ウブリツキシマブ、オカラツズマブ、オビヌツズマブ、イブリツモマブ、オクレリズマブ、イノツズマブ、モキセツモマブ、エブラツズマブ、トラスツズマブ、ペルツズマブ、アレムツズマブ、セツキシマブ、ジヌツキシマブ、アベルマブ、ダラツムマブ、イサツキシマブ、M O R 2 0 2、7 G 3、C S L 3 6 2、エロツズマブ、及びそれらのヒト化若しくは F c 改変されたバリエーション又は断片、並びにそれらの機能的同等物及びバイオシミラーのうちの1つ以上、又は (c) ダラツムマブを含み得、派生エフェ

10

20

30

40

50

クター細胞は、CD38ノックアウト、及び必要に応じてCD16又はそのバリエーションの発現を含み得る。

【0028】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載の組成物を養子細胞療法に好適な対象に導入することによる組成物の治療的使用であって、対象が、自己免疫障害、血液悪性腫瘍、固形腫瘍、がん、又はウイルス感染を有する、治療的使用を提供する。いくつかの実施形態では、対象は、治療的処置の間にサイトカイン支持を必要としない。

【0029】

別の態様では、本発明は、サイトカインシグナル伝達複合体及び必要に応じてCARを含む派生エフェクター細胞を製造する方法であって、(i) 遺伝子操作されたiPSCを派生エフェクター細胞に分化させることであって、iPSCが、サイトカインシグナル伝達複合体及び必要に応じてCARをコードするポリヌクレオチドを含む、分化させることと、(ii) 外因性IL15を含有しない培養培地中で派生エフェクター細胞を増殖させることであって、派生エフェクター細胞が、外因性IL15を含有する培養培地中で培養された細胞と比較して、(a) 増加した細胞傷害性、(b) 改善された持続性及び／又は生存率、(c) 腫瘍部位にバイスタンダー免疫細胞を遊走させる、及び／又は活性化させる、若しくは動員する増強された能力、(d) 改善された腫瘍浸透、(e) 腫瘍免疫抑制を低下させる増強された能力、(f) 腫瘍抗原エスケープを救済する改善された能力、(g) 制御されたアポトーシス、(h) 増強又は獲得されたADCC、並びに(i) フラトリサイドを回避する能力、のうちの1つ以上を含む治療特性を有する、増殖させることと、を含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、培養培地は、外因性IL2及びIL7の一方又は両方を含む。いくつかの実施形態では、培養培地は、IL2又はIL7のいずれも含有しない。特定の実施形態では、サイトカインシグナル伝達複合体は、IL7受容体融合体(IL7 receptor fusion、IL7RF)を含む。

【0030】

様々な実施形態では、CARは、(i) T細胞特異的若しくはNK細胞特異的なもの、(ii) 二重特異性抗原結合CAR、(iii) 切り替え可能なCAR、(iv) 二量体化されたCAR、(v) スプリットCAR、(vi) 多重鎖CAR、(vii) 誘導可能なCAR、(viii) 不活性化CAR、(ix) 必要に応じて別個の構築物内で、若しくはバイシストロン性構築物内で、細胞表面発現外因性サイトカイン及び／若しくはその受容体の部分的若しくは完全なペプチドと共発現されたもの、(x) 必要に応じて別個の構築物内で、若しくはバイシストロニックな構築物内で、チェックポイント阻害剤と共発現されたもの、(xi) CD19、BCMA、CD20、CD22、CD38、CD123、HER2、CD52、EGFR、GD2、MICA／B、MSLN、VEGFR2、PSMA、及びPDL1のうちの少なくとも1つに特異的なもの、並びに／又は、(xii) ADGRE2、炭酸脱水酵素IX(CAIX)、CCR1、CCR4、がん胎児性抗原(CEA)、CD3、CD5、CD7、CD8、CD10、CD20、CD22、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD44V6、CD49f、CD56、CD70、CD74、CD99、CD123、CD133、CD138、CDS、CLEC12A、サイトメガロウイルス(CMV)感染細胞の抗原、上皮糖タンパク質-2(EGP-2)、上皮糖タンパク質-40(EGP-40)、上皮細胞接着分子(EpCAM)、EGFRvIII、受容体チロシンタンパク質キナーゼerbB-2、3、4、EGFR、EGFR-VIII、ERBB葉酸結合タンパク質(FBP)、胎児のアセチルコリン受容体(AChR)、葉酸受容体-α、ガングリオシドG2(GD2)、ガングリオシドG3(GD3)、ヒト上皮増殖因子受容体2(HER2)、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)、ICAM-1、インテグリンB7、インターロイキン-13受容体サブユニットアルファ-2(IL-13Rα2)、κ-軽鎖、キナーゼ挿入ドメイン受容体(KDR)、ルイスA(CA19.9)、ルイスY(LeY)、L1細胞接着分子(L1-CAM)、LILRB2、黒色腫抗原ファミリーA1(MAGE-A1)、MICA／B、ムチン1(Muc-1)、ムチン16(Muc-16)、メソセ

リン (MSLN)、NKCSI、NKG2Dリガンド、c-Met、がん-精巣抗原NY-ESO-1、腫瘍胎児性抗原 (h5T4)、PRAME、前立腺幹細胞抗原 (PSCA)、PRAME前立腺特異的膜抗原 (PSMA)、腫瘍関連糖タンパク質72 (TAG-72)、TIM-3、TRBC1、TRBC2、血管内皮増殖因子R2 (VEGF-R2)、ウィルス腫瘍タンパク質 (WT-1)、及び病原体抗原のうちのいずれか1つに特異的なもの、であり、(i)~(xii)のうちのいずれか1つのCARは、TCR遺伝子座に挿入されている、及び／又はTCRの内因性プロモータによって駆動されている、かつ／あるいはTCRは、CAR挿入によってノックアウトされている。CARが不活性化CARである実施形態では、不活性化CARは、CD38-CAR、4-1BB-CAR、OX40-CAR、及びCD40L-CARのうちの少なくとも1つを含み得る。

10

【0031】

派生エフェクター細胞を製造する方法のいくつかの実施形態では、iPSCは、末梢血、臍帯血、又は任意の他のドナー組織から得られたその対応する初代細胞と比較して、(i)CD38ノックアウト、(ii)その対応する初代細胞と比較して、HLA-Iの欠損及び／若しくはHLA-IIの欠損、(iii)HLA-G若しくは非切断性HLA-Gの導入された発現、又はCD58及びCD54の一方若しくは両方のノックアウト、(iv)CD16若しくはそのバリエーション、(v)キメラ融合受容体(CFR)、(vi)細胞表面発現外因性サイトカイン及び／若しくはその受容体の部分的若しくは完全なペプチド、(vii)表1に列挙される遺伝子型のうちの少なくとも1つ、(viii)B2M、CIITA、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、RFXANK、RFX5、RFXAP、TCR、NKG2A、NKG2D、CD25、CD69、CD44、CD56、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、及びTIGITのうちの少なくとも1つの欠失若しくは破壊、又は(ix)HLA-E、4-1BBL、CD3、CD4、CD8、CD16、CD47、CD113、CD131、CD137、CD80、PDL1、A2AR、抗原特異的TCR、Fc受容体、抗体又はその機能的バリエーション若しくは断片、チェックポイント阻害剤、エンゲージャ、及びアゴニストとカップリングするための表面トリガー受容体のうちの少なくとも1つの導入、をもたらし1つ以上の編集をコードするポリペプチドを更に含む。iPSCがCD16又はそのバリエーションをもたらし1つ以上の編集をコードするポリペプチドを含むそれらの実施形態では、CD16又はそのバリエーションは、(a)高親和性の非切断性CD16(hnCD16)、(b)CD16の外部ドメインにおけるF176V及びS197P、(c)CD64に由来する完全又は部分的な外部ドメイン、(d)非天然(又は非CD16)の膜貫通ドメイン、(e)非天然(又は非CD16)の細胞内ドメイン、(f)非天然(又は非CD16)のシグナル伝達ドメイン、(g)非天然の刺激ドメイン、並びに(h)CD16に由来せず、かつ同じ又は異なるポリペプチドに由来する膜貫通、シグナル伝達、及び刺激ドメイン、のうちの少なくとも1つを含んでもよい。

20

30

【0032】

派生エフェクター細胞を製造する方法のいくつかの実施形態では、方法は、CARをコードするポリヌクレオチドをノックインするために、かつ、必要に応じて、(i)CD38をノックアウトするために、(ii)B2M及び／若しくはCIITAをノックアウトするために、(iii)一方若しくは両方のCD58及びCD54をノックアウトするために、並びに／あるいは、(iv)HLA-G若しくは非切断性HLA-G、高親和性の非切断性CD16若しくはそのバリエーション、CFR、及び／又は細胞表面発現外因性サイトカイン及び／若しくはその受容体の部分的若しくは完全なペプチドの発現を導入するために、クローンiPSCをゲノム操作することを更に含む。いくつかの実施形態では、ゲノム操作は、標的化された編集を含む。特定の実施形態では、標的化された編集は、欠失、挿入、又はインデルを含み、標的化された編集は、CRISPR、ZFN、TALEN、ホーミングヌクレアーゼ、相同組換え、又はこれらの方法の任意の他の機能的バリエーションによって行われる。一態様では、本発明は、クローンiPSCのCRISPR媒介性編集を使用してクローンマスター操作iPSC株を産生する方法であって、編集が、サ

40

50

イトカインシグナル伝達複合体及び必要に応じてCARをコードするポリヌクレオチドのクローンiPSCへのノックインを含み、サイトカインシグナル伝達複合体が、IL7受容体融合(IL7RF)を含み、それによってクローンマスター操作iPSC株を産生する産生する、方法を提供する。クローンマスター操作iPSC株を産生する方法のいくつかの実施形態では、(a)クローンiPSCの編集は、TCRをノックアウトすることを更に含むか、又は(b)CARは、B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、CIITA、RFXANK、RFX5、RFXAP、TCR、NKG2A、NKG2D、CD38、CD25、CD69、CD44、CD58、CD54、CD56、CD71、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、若しくはTIGITを含む遺伝子座のうちの1つに挿入され、挿入は、遺伝子座における遺伝子の発現をノックアウトする。

10

【0033】

更に別の態様では、本発明は、疾患又は状態を治療する方法であって、それを必要とする対象に、本明細書に記載の組成物を投与することを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、対象は、治療中にサイトカイン支持を必要としない。いくつかの実施形態では、組成物の細胞は、抗体又はその機能的バリエーション若しくは断片、あるいはエンゲージを発現する。いくつかの実施形態では、組成物の細胞は、iPSC由来エフェクター細胞であり、iPSC由来エフェクター細胞は、(i)CD38ノックアウト、(ii)TCR^{neg}、(iii)外因性CD16若しくはそのバリエーション、(iv)HLA-I及び／若しくはHLA-IIの欠損、(v)HLA-G若しくは非切断性HLA-Gの導入された発現、又はCD58及びCD54の一方若しくは両方のノックアウト、(vi)CFRの導入された発現、及び／又は(vii)細胞表面発現外因性サイトカイン若しくはその受容体の部分的若しくは完全なペプチド、のうちの1つ以上を更に含む。いくつかの実施形態では、組成物の細胞の投与は、サイトカイン支持の不在下でそれらの対応する初代細胞と比較して、(i)増加された細胞傷害性、(ii)改善された持続性及び／又は生存率、(iii)腫瘍部位にバイスタンダー免疫細胞を遊走させる、及び／又は活性化させる、若しくは動員する増強された能力、(iv)改善された腫瘍浸透、(v)腫瘍免疫抑制を低下させる増強された能力、(vi)腫瘍抗原エスケープを救済する改善された能力、(vii)制御されたアポトーシス、(viii)増強又は獲得されたADCC、並びに(ix)フラトリサイドを回避する能力、のうちの1つ以上をもたらす。

20

30

【0034】

本明細書で提供される組成物及び方法の様々な目的及び利点は、例示及び例として本発明の特定の実施形態が示される添付の図面と併せて以下の説明から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1】iPSC由来細胞における細胞表面発現サイトカインのためのいくつかの構築物設計の図解である。IL7は、他の望ましいサイトカインで置き換えることができる例示的な例として使用される。

【0036】

【図2A】IL7RFを発現するように操作されたCAR-iT細胞が、特定の増殖条件において改善された増殖及び生存能力を示すことを実証した。図2Aは、様々なサイトカインの組み合わせによって支持された培地中のIL7RF/CAR-iT細胞又は対照CAR-iT細胞(形質導入されたIL7RFを含まない)の増殖倍率を示し、図2Bは、様々なサイトカインの組み合わせによって支持された培地中のIL7RF/CAR-iT細胞又は対照CAR-iT細胞(形質導入されたIL7RFを含まない)の増殖プロセスの終了時の生存能力を示す。

40

【図2B】IL7RFを発現するように操作されたCAR-iT細胞が、特定の増殖条件において改善された増殖及び生存能力を示すことを実証した。図2Aは、様々なサイトカインの組み合わせによって支持された培地中のIL7RF/CAR-iT細胞又は対照C

50

A R - i T細胞（形質導入されたI L 7 R Fを含まない）の増殖倍率を示し、図2 Bは、様々なサイトカインの組み合わせによって支持された培地中のI L 7 R F / C A R - i T細胞又は対照C A R - i T細胞（形質導入されたI L 7 R Fを含まない）の増殖プロセスの終了時の生存能力を示す。

【0037】

【図3 A】連続刺激アッセイにおいて試験された異なる増殖条件から産生されたエフェクター細胞（C A R - i T又はI L 7 R F / C A R - i T）を示す。図3 A～図3 Bは、I L 7 R Fで操作されたエフェクターC A R - i T細胞では、特に特定の増殖条件において、連続刺激アッセイにより、細胞数の保持が改善されていることを示す。

【図3 B】連続刺激アッセイにおいて試験された異なる増殖条件から産生されたエフェクター細胞（C A R - i T又はI L 7 R F / C A R - i T）を示す。図3 A～図3 Bは、I L 7 R Fで操作されたエフェクターC A R - i T細胞では、特に特定の増殖条件において、連続刺激アッセイにより、細胞数の保持が改善されていることを示す。

【図3 C】連続刺激アッセイにおいて試験された異なる増殖条件から産生されたエフェクター細胞（C A R - i T又はI L 7 R F / C A R - i T）を示す。図3 C～図3 Dは、C A R発現が、C A R - i T細胞と比較して、I L 7 R F / C A R - i T細胞においてより良好に維持されたことを示す。

【図3 D】連続刺激アッセイにおいて試験された異なる増殖条件から産生されたエフェクター細胞（C A R - i T又はI L 7 R F / C A R - i T）を示す。図3 C～図3 Dは、C A R発現が、C A R - i T細胞と比較して、I L 7 R F / C A R - i T細胞においてより良好に維持されたことを示す。

【0038】

【図4 A】活性化マーカーC D 6 9の発現について染色することにより、各サイトカイン増殖条件下でI L 7 R F / C A R - i T細胞におけるC D 6 9発現がより長く保持されることを示す。

【図4 B】活性化マーカーC D 6 9の発現について染色することにより、各サイトカイン増殖条件下でI L 7 R F / C A R - i T細胞におけるC D 6 9発現がより長く保持されることを示す。

【0039】

【図5 A】枯渇マーカーP D - 1について染色することにより、I L 7 R F / C A R - i T細胞では、各サイトカイン増殖条件下で連続刺激に応答してP D - 1上方制御が低減されていることを示す。

【図5 B】枯渇マーカーP D - 1について染色することにより、I L 7 R F / C A R - i T細胞では、各サイトカイン増殖条件下で連続刺激に応答してP D - 1上方制御が低減されていることを示す。

【0040】

【図6 A】増殖培地中の任意のサイトカインの不在下でのI L 7 R F / C A R - i T細胞の増殖が、改善された腫瘍増殖制御をもたらし得ることを示す。図6 Aは、培地中に3つのサイトカインを含む標準条件下で増殖させたI L 7 R F / C A R - i T細胞の腫瘍増殖制御を示す。

【図6 B】増殖培地中の任意のサイトカインの不在下でのI L 7 R F / C A R - i T細胞の増殖が、改善された腫瘍増殖制御をもたらし得ることを示す。図6 Bは、いかなるサイトカインも含まない培地中で増殖させたI L 7 R F / C A R - i T細胞及びC A R - i T細胞の腫瘍増殖制御を示す。

【図6 C】増殖培地中の任意のサイトカインの不在下でのI L 7 R F / C A R - i T細胞の増殖が、改善された腫瘍増殖制御をもたらし得ることを示す。図6 Cは、標準条件下で増殖させたI L 7 R F / C A R - i T細胞及び対照細胞、並びにサイトカインを含まない培地中で増殖させたI L 7 R F / C A R - i T細胞及び対照細胞の10日目までの曲線下面積（Area Under the Curve、A C U）データの概要を提供する。

【図6 D】増殖培地中の任意のサイトカインの不在下でのI L 7 R F / C A R - i T細胞

の増殖が、改善された腫瘍増殖制御をもたらし得ることを示す。図 6 D 及び図 6 E は、0 ~ 250 IU/ml の範囲の様々な濃度で IL2 を補充した培地中の IL7RF/CAR-iT 及び CAR-iT 細胞の腫瘍増殖制御及び細胞増殖を示す。

【図 6 E】増殖培地中の任意のサイトカインの不在下での IL7RF/CAR-iT 細胞の増殖が、改善された腫瘍増殖制御をもたらし得ることを示す。図 6 D 及び図 6 E は、0 ~ 250 IU/ml の範囲の様々な濃度で IL2 を補充した培地中の IL7RF/CAR-iT 及び CAR-iT 細胞の腫瘍増殖制御及び細胞増殖を示す。

【0041】

【図 7 A】10 日間のアッセイにわたる、標準条件下、IL2 のみの存在下、IL7 のみの存在下、並びに IL2 及び IL7 の両方の存在下で増殖させた IL7RF/CAR-iT 細胞及び対照細胞による腫瘍増殖制御を示す。

10

【図 7 B】10 日間のアッセイにわたる、標準条件下、IL2 のみの存在下、IL7 のみの存在下、並びに IL2 及び IL7 の両方の存在下で増殖させた IL7RF/CAR-iT 細胞及び対照細胞による腫瘍増殖制御を示す。

【0042】

【図 8】異なる条件で増殖させた CAR-iT 細胞又は IL7RF/CAR-iT 細胞で処置したマウス (NALM6 iv/iv、サイトカイン支援あり) の異なる群における平均腫瘍負荷を示す 22 日目の BLI データを提供する。

【0043】

【図 9】マウスにサイトカイン支持を与えなかった場合のマウスモデルにおける CAR-iT 細胞と比較して、IL7RF/CAR-iT 細胞によりインビボ腫瘍増殖阻害 (tumor growth inhibition, TGI) が改善されていることを示す、経時的な BLI データを提供する。

20

【発明を実施するための形態】

【0044】

iPSC (誘導多能性幹細胞) のゲノム改変には、ポリヌクレオチドの挿入、欠失、置換が含まれる。ゲノム操作された iPSC での外因性遺伝子発現は、元のゲノム操作された iPSC の長期のクローン増殖後、細胞分化後、及びゲノム操作された iPSC に由来する細胞からの脱分化細胞型において、遺伝子サイレンシング、又は低下した遺伝子発現などの問題にしばしば遭遇する。一方、T 細胞又は NK 細胞などの初代免疫細胞を直接操作することは困難であり、養子細胞療法のための操作された免疫細胞の調製及び送達に障害をもたらす。本発明は、自殺遺伝子及び他の機能的モダリティを含む 1 つ以上の外因性遺伝子を安定的に組み込むための効率的で信頼できる標的化アプローチを提供し、これは生着、輸送、ホーミング、遊走、細胞傷害性、生存能力、維持、増殖、寿命、自己複製、持続性、及び/又は生存率に関する改善された治療的特性を、HSC (造血幹前駆細胞)、T 細胞前駆細胞、NK 細胞前駆細胞、T 系統細胞、NKT 系統細胞、NK 系統細胞、並びに初代 NK、T、及び/若しくは NKT 細胞には存在しない 1 つ以上の機能的特質を有する免疫エフェクター細胞を含むが、これらに限定されない iPSC 派生細胞にもたらす。

30

【0045】

定義

40

【0046】

本明細書で特に定義されない限り、本出願に関連して使用される科学用語及び技術用語は、当業者によって一般に理解される意味を有するものとする。更に、文脈で特に必要とされない限り、単数形用語は複数形を含み、複数形用語は単数形を含むものとする。

【0047】

本発明は、本明細書に記載される特定の方法論、プロトコル、及び試薬などに限定されず、したがって変化し得ることが理解されるべきである。本明細書で使用する用語は、特定の実施形態を説明するためのみのものであり、特許請求の範囲によってのみ定義される本発明の範囲を限定することを意図しない。

50

【0048】

本明細書で使用されるとき、冠詞「a」、「an」、及び「the」は、本明細書において、冠詞の文法的な対象の、1又は1を超えるもの（すなわち、少なくとも1）を指すために本明細書において使用される。例として、「要素（an element）」は、1つの要素又は1つを超える要素を意味する。

【0049】

代替（例えば、「又は」）の使用は、代替の一方、両方、又はそれらの任意の組み合わせのいずれかを意味すると理解されるべきである。

【0050】

「及び／又は」という用語は、代替の一方又は両方のいずれかを意味すると理解されるべきである。

【0051】

本明細書で使用されるとき、「約」又は「およそ」という用語は、参照の量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量、又は長さと比較して、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、又は1%もの量で変動する、量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量、又は長さを指す。一実施形態では、「約」又は「およそ」という用語は、参照の量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量、又は長さの、およそ、±15%、±10%、±9%、±8%、±7%、±6%、±5%、±4%、±3%、±2%、又は±1%の、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量、又は長さの範囲を指す。

【0052】

本明細書で使用されるとき、「実質的に」又は「本質的に」という用語は、参照の量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量、又は長さと比較して、約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%以上である量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量、又は長さを指す。一実施形態では、「実質的に同じ」又は「本質的に同じ」という用語は、参照の量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量、又は長さとはほぼ同一である、参照の量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量、又は長さの範囲を指す。

【0053】

本明細書で使用されるとき、「実質的に含まない」及び「本質的に含まない」という用語は互換可能に使用され、細胞集団又は培養培地などの組成物を記載するために使用されるとき、例えば、特定の物質又はその供給源の、95%を含まない、96%を含まない、97%を含まない、98%を含まない、99%を含まないなど、又は従来の手段で測定して検出できないなどのように、特定の物質又はその供給源を含まない組成物を指す。組成物中の特定の成分又は物質を「含まない」又は「本質的に含まない」という用語はまた、そのような成分又は物質が（1）任意の濃度で組成物に含まれない、又は（2）組成物に含まれるが低密度であり機能的に不活性であることも意味する。同様の意味が、「存在しない」という用語に適用され得、組成物の特定の物質又はその供給源が存在しないことを指す。

【0054】

本明細書全体を通して、文脈がそうでないことを必要としない限り、「含む（comprise）」、「含む（comprises）」、及び「含むこと（comprising）」は、述べられたステップ、若しくは要素、又はステップ若しくは要素の群を含むことを意味するが、任意の他のステップ、若しくは要素、又はステップ若しくは要素の群を排除することを意味しないことが理解されるであろう。特定の実施形態では、「含む（include）」、「有する」、「含む（contain）」、及び「含む（comprise）」という用語は、同義的に使用される。

【0055】

10

20

30

40

50

「～からなる (consisting of)」とは、「～からなる」という語句に続く全てのものを含み、かつそれに限定されることを意味する。したがって、「～からなる」という語句は、列挙された要素が必要又は必須であり、かつ他の要素が存在し得ないことを示す。

【0056】

「～から本質的になる (consisting essentially of)」とは、語句の後に列挙された任意の要素を含むことを意味し、列挙された要素の開示で指定された活性又は動作を妨害しないか、又はそれらに寄与しない他の要素に限定される。したがって、「～から本質的になる」という語句は、列挙された要素が必要又は必須であることを示すが、他の要素は必要に応じたものではなく、列挙された要素の活性又は動作に影響するか否かに応じて存在し得るか、又は存在し得ないことを示す。

【0057】

本明細書全体を通して、「一実施形態」、「実施形態」、「特定の実施形態」、「関連する実施形態」、「特定の実施形態」、「追加の実施形態」、若しくは「更なる実施形態」又はそれらの組み合わせへの言及は、実施形態に関連して記載された特定の特質、構造、又は特性が、本発明の少なくとも1つの実施形態に含まれることを意味する。したがって、本明細書全体にわたる様々な場所での前述の語句の出現は、必ずしも全てが同一の実施形態を参照しているとは限らない。更に、特定の特質、構造、又は特性は、1つ以上の実施形態において任意の好適な様式で組み合わせることができる。

【0058】

「エキスピボ」という用語は、一般に、好ましくは自然条件の変化を最小限に抑えて、生体外の人工環境内の生体組織内又は生体組織上で行われる実験又は測定など、生体外で行われる活動を指す。特定の実施形態では、「エキスピボ」手順は、生体から採取され、通常無菌条件下で、典型的には数時間又は約24時間まで、しかしながら状況に応じて最大48時間若しくは72時間以上を含む、実験装置で培養される生細胞又は組織を含む。特定の実施形態では、そのような組織又は細胞は、収集及び凍結され得、エキスピボ処理のために後に解凍され得る。生細胞又は組織を使用して数日より長く続く組織培養実験又は手順は、典型的には「インビトロ」であると考えられるが、特定の実施形態では、この用語はエキスピボと互換可能に使用され得る。

【0059】

「インビボ」という用語は、一般に、生体内部で起こる活動を指す。

【0060】

本明細書で使用する場合、「リプログラミング」又は「脱分化」又は「細胞能力の増加」又は「発生能力の増加」という用語は、細胞の能力を増加させるか、又は細胞をより分化していない状態に脱分化する方法を指す。例えば、細胞能力が増加した細胞は、リプログラミングされていない状態の同じ細胞と比較して、より多くの発生可塑性を有する（すなわち、より多くの細胞型に分化することができる）。言い換えると、リプログラミングされた細胞は、リプログラミングされていない状態の同じ細胞よりも分化が進んでいない状態の細胞である。

【0061】

本明細書で使用时、「分化」という用語は、特殊化していない（「コミットされていない」）又はあまり特殊化していない細胞が、例えば、血液細胞又は筋細胞などの特殊化細胞の特質を獲得するプロセスである。分化した又は分化誘導された細胞は、細胞の系統内でより特殊化された（「コミットされた」）位置を呈する細胞である。「コミットされた」という用語は、分化のプロセスに適用されるとき、通常の下で特定の細胞型又は細胞型のサブセットに分化し続ける位置まで分化経路を進み、通常の下では、異なる細胞型に分化し、又は分化度の低い細胞型に戻ることをできない細胞を指す。本明細書で使用时、「多能性」という用語は、生体又は体細胞の全ての系統を形成する細胞（すなわち、胚そのもの）の能力を指す。例えば、胚性幹細胞は、3つの胚葉、外胚葉、中胚葉、及び内胚葉の各々から細胞を形成することができる多能性幹細胞の一種である。多能性は、完全な生物を生じさせることができない不完全又は部分的な多能性細胞

10

20

30

40

50

(例えば、エピブラスト幹細胞又はE p i S C) から、完全な生物を生じさせることができるより原始的でより多能性の細胞(例えば、胚性幹細胞)までの範囲に及ぶ一連の発生能である。

【0062】

本明細書で使用されるとき、「人工多能性幹細胞」又はi P S Cという用語は、幹細胞が、リプログラミング因子及び／又は小分子の化学的駆動法を使用して、誘導又は変更されている、分化した成人、新生児又は胎児細胞からインビトロで産生される、すなわち、3つの全ての胚葉又は真皮層：中胚葉、内胚葉、及び外胚葉の全ての組織に分化することができる細胞にリプログラミングされることを意味する。産生されたi P S Cは、天然に存在する細胞を指していない。

10

【0063】

本明細書で使用されるとき、「胚性幹細胞」という用語は、胚盤胞の内部細胞塊の天然に存在する多能性幹細胞を指す。胚性幹細胞は多能性であり、発生時に3つの一次胚葉、すなわち、外胚葉、内胚葉、及び中胚葉の全ての派生体を発生させる。それらは、胚体外膜又は胎盤に寄与しない、すなわち、全能性ではない。

【0064】

本明細書で使用されるとき、「多能性幹細胞」という用語は、1つ以上の胚葉(外胚葉、中胚葉、及び内胚葉)の細胞に分化するが、3つ全てには分化しない発生能を有する細胞を指す。したがって、多能性細胞はまた、「部分分化細胞」と呼ぶこともできる。多能性細胞は当該技術分野で周知であり、多能性細胞の例には、例えば造血幹細胞及び神経幹細胞などの成体幹細胞が含まれる。「多能性」は、細胞が特定の系統の多くの型の細胞を形成し得るが、他の系統の細胞は形成しないことを示す。例えば、多能性造血細胞は多くの異なる型の血液細胞(赤、白、血小板など)を形成することができるが、ニューロンを形成することはできない。したがって、「多分化能」という用語は、全能性及び多能性よりも低い発生能の程度を有する細胞の状態を指す。

20

【0065】

多能性は、細胞の多能性特徴を評価することにより、部分的に決定することができる。多能性の特徴としては、(i)多能性幹細胞形態、(ii)無制限自己再生の潜在能力、(iii)SSEA1(マウスのみ)、SSEA3/4、SSEA5、TRA1-60/81、TRA1-85、TRA2-54、GCTM-2、TG343、TG30、CD9、CD29、CD133/プロミン、CD140a、CD56、CD73、CD90、CD105、OCT4、NANOG、SOX2、CD30及び／又はCD50を含むが、これらに限定されない、多能性幹細胞マーカーの発現、(iv)3つ全ての体細胞系統(外胚葉、中胚葉及び内胚葉)に分化する能力、(v)3つの体細胞系統からなる奇形腫形成、並びに(vi)3つの体細胞系統からの細胞からなる胚様体の形成が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0066】

これまでに2つのタイプの多能性が説明されており、後期胚盤胞の胚盤葉上層幹細胞(epiblast stem cell、E p i S C)に類似した「プライミング」又は「準安定」状態の多能性と、多能性初期／着床前の胚盤胞の内部細胞塊に類似した「ナイーブ」又は「基底」状態である。両方の多能性状態が上記のような特徴を示す一方で、ナイーブ状態又は基底状態は、(i)雌性細胞におけるX染色体の前不活性化又は再活性化、(ii)単一細胞培養中のクローン性及び生存率の改善、(iii)DNAメチル化の全体的な減少、(iv)発生調節遺伝子プロモータ上のH3K27me3抑制クロマチンマーク沈着の低減、並びに(v)プライミング状態多能性細胞と比較しての分化マーカーの発現低下を更に示す。外因性多能性遺伝子が体細胞に導入され、発現され、その後、得られる多能性細胞からサイレンシングされるか又は除去されるかのいずれかである細胞リプログラミングの標準的な方法論は、一般に、多能性の準備状態の特徴を有するようである。標準的な多能性細胞培養条件下で、そのような細胞は、外因性導入遺伝子発現が維持されない限り、準備状態に留まり、基底状態の特徴が観察される。

40

50

【0067】

本明細書で使用される場合、「多能性幹細胞形態」という用語は、胚性幹細胞の古典的な形態学的特質を指す。正常な胚性幹細胞の形態は、高い核対細胞質比を有し、核小体が顕著に存在し、典型的な細胞間間隔がある、形状が丸く小さいことを特徴とする。

【0068】

本明細書で使用されるとき、「対象」という用語は、任意の動物、好ましくはヒト患者、家畜、又は他の飼育動物を指す。

【0069】

「多能性因子」又は「リプログラミング因子」は、単独で又は他の薬剤と組み合わせて、細胞の発生能を増加させることができる薬剤を指す。多能性因子には、細胞の発生能を増加させることができるポリヌクレオチド、ポリペプチド、及び小分子が含まれるが、これらに限定されない。例示的な多能性因子には、例えば、転写因子及び小分子リプログラミング剤が含まれる。

【0070】

「培養」又は「細胞培養」は、インビトロ環境における細胞の維持、増殖及び／又は分化を指す。「細胞培養培地」、「培養培地」（いずれの場合も単数の「培地」）、「補充分」及び「培地補充分」は、細胞培養を培養する栄養組成物を指す。

【0071】

「培養する」又は「維持する (maintain)」とは、例えば滅菌プラスチック（又はコーティングされたプラスチック）細胞培養皿又はフラスコ内で、組織又は体外の細胞を維持 (sustaining)、増殖 (propagating)（増殖 (growing)）、及び／又は分化させることを指す。「培養」又は「維持すること」は、細胞の増殖及び／又は維持に役立つ栄養素、ホルモン、及び／又は他の因子の供給源として培地を利用することができる。

【0072】

本明細書で使用されるとき、「中胚葉」という用語は、初期胚発生中に出現し、循環系の血液細胞、筋肉、心臓、真皮、骨格、その他の支持組織と結合組織を含む様々な特殊化された細胞型を生じさせる、3つの胚葉のうちの1つを指す。

【0073】

本明細書で使用される場合、「決定的な造血内皮」 (hemogenic endothelium、HE) 又は「多能性幹細胞由来の決定的な造血内皮」 (pluripotent stem cell-derived definitive hemogenic endothelium、iHE) という用語は、内皮造血転換と呼ばれるプロセスにおいて造血幹細胞及び前駆細胞を生じさせる内皮細胞のサブセットを指す。胚における造血細胞の発生は、側板中胚葉から血管芽細胞を経て決定的な造血内皮細胞及び造血前駆体へと順次進行する。

【0074】

「造血幹細胞及び前駆細胞」、「造血幹細胞」、「造血前駆細胞」、又は「造血前駆体細胞」という用語は、造血系統にコミットしているが、更なる造血分化が可能であり、多能性造血幹細胞（血球）、骨髓前駆体、巨核球前駆体、赤血球前駆体、及びリンパ球前駆体を含む細胞を指す。造血幹細胞及び前駆細胞 (Hematopoietic stem and progenitor cell、HSC) は、骨髓系（単球及びマクロファージ、好中球、好塩基球、好酸球、赤血球、巨核球／血小板、樹状細胞）、及びリンパ系（T細胞、B細胞、NK細胞）を含む全ての血液細胞型を生じる多能性幹細胞である。本明細書で使用されるとき、「二次造血幹細胞」という用語は、T系統細胞、NK系統細胞、及びB系統細胞を含む成熟骨髓性とリンパ性細胞型の両方を生じさせることができるCD34⁺造血細胞を指す。造血細胞はまた、原始赤血球、巨核球、及びマクロファージを生じさせる原始造血細胞の様々なサブセットを含む。

【0075】

本明細書で使用されるとき、「Tリンパ球」及び「T細胞」という用語は互換可能に使用され、胸腺での成熟を完了し、体内の特定の外来抗原の同定、並びにMHCクラスI拘束性での他の免疫細胞の活性化及び不活性化を含む免疫系における様々な役割を有する主

10

20

30

40

50

要なタイプの白血球を指す。T細胞は、任意のT細胞、例えば、培養T細胞、例えば、初代T細胞、又は培養T細胞株、例えば、Jurkat、SupT1などからのT細胞、又は哺乳動物から取得されたT細胞であり得る。T細胞は、CD3⁺細胞であり得る。T細胞は、CD4⁺/CD8⁺二重陽性T細胞、CD4⁺ヘルパーT細胞（例えば、Th1及びTh2細胞）、CD8⁺T細胞（例えば、細胞傷害性T細胞）、末梢血単核細胞（peripheral blood mononuclear cell、PBMC）、末梢血白血球（peripheral blood leukocyte、PBL）、腫瘍浸潤リンパ球（tumor infiltrating lymphocyte、TIL）、メモリT細胞、ナイーブT細胞、制御性T細胞、ガンマデルタT細胞（gamma delta T cell、 $\gamma\delta$ T細胞）、などを含むが、これらに限定されない、任意のタイプのT細胞であることができ、任意の発生段階のものであることができる。追加のタイプのヘルパーT細胞には、Th3（Treg）、Th17、Th9、又はTfh細胞などの細胞が含まれる。追加のタイプのメモリT細胞には、セントラルメモリT細胞（central memory T cell、Tcm細胞）、エフェクターメモリT細胞（Tem細胞及びTEMRA細胞）などの細胞が含まれる。T細胞は、T細胞受容体（T cell receptor、TCR）又はキメラ抗原受容体（CAR）を発現するように改変されたT細胞などの遺伝子操作されたT細胞を指すこともできる。T細胞又はT細胞様エフェクター細胞はまた、幹細胞又は前駆細胞（「派生（derived）T細胞」若しくは「派生T細胞様エフェクター細胞」、又は集合的に「派生（derivative）T系統細胞」）から分化され得る。T細胞様派生エフェクター細胞は、いくつかの点でT細胞系統を有し得るが、同時に、初代T細胞には存在しない1つ以上の機能的特質を有する。本出願において、T細胞、T細胞様エフェクター細胞、派生T細胞、派生T細胞様エフェクター細胞、又は派生T系統細胞は、集合的に「T系統細胞」と呼ばれる。

10

20

【0076】

「CD4⁺T細胞」は、それらの表面でCD4を発現し、細胞性免疫応答と関連するT細胞のサブセットを指す。それらは刺激後の分泌プロファイルによって特徴付けられ、IFN- γ 、TNF- α 、IL2、IL4、及びIL10などのサイトカインの分泌が含まれ得る。「CD4」は、もともとTリンパ球の分化抗原として定義された55-kDの糖タンパク質であるが、単球/マクロファージを含む他の細胞にも見出される。CD4抗原は免疫グロブリンスーパー遺伝子ファミリーのメンバーであり、MHC（major histocompatibility complex、主要組織適合性複合体）クラスII拘束性免疫応答の関連認識要素として関与している。Tリンパ球では、ヘルパー/インデューサのサブセットを定義する。

30

【0077】

「CD8⁺T細胞」は、それらの表面上でCD8を発現し、MHCクラスI拘束性であり、細胞傷害性T細胞として機能するT細胞のサブセットを指す。「CD8」分子は、胸腺細胞と細胞傷害性及びサプレッサTリンパ球に見られる分化抗原である。CD8抗原は免疫グロブリンスーパー遺伝子ファミリーのメンバーであり、主要組織適合性複合体クラスI拘束性相互作用の関連認識要素である。

【0078】

本明細書で使用されるとき、「NK細胞」又は「ナチュラルキラー細胞」という用語は、CD56又はCD16の発現及びT細胞受容体（CD3）の不在によって定義される末梢血リンパ球のサブセットを指す。本明細書で使用されるとき、「適応NK細胞」及び「メモリNK細胞」という用語は互換可能であり、表現型的にCD3⁻及びCD56⁺であり、NKG2C及びCD57のうちの少なくとも1つ、並びに必要に応じてCD16を発現するが、PLZF、SYK、Fc ϵ R γ 、及びEAT-2のうちの1つ以上の発現を欠く、NK細胞のサブセットを指す。いくつかの実施形態では、CD56⁺NK細胞の単離された亜集団は、CD16、NKG2C、CD57、NKG2D、NCRリガンド、NKp30、NKp40、NKp46、活性化及び抑制性KIR、NKG2A、並びに/又はDNAM-1の発現を含む。CD56⁺は、弱陽性（dim）又は強陽性（bright）発現であり得る。NK細胞又はNK細胞様エフェクター細胞は、幹細胞又は前駆細胞（

40

50

「派生NK細胞」若しくは「派生NK細胞様エフェクター細胞」、又は集合的に「派生NK系統細胞」)から分化され得る。派生NK細胞様エフェクター細胞は、いくつかの点でNK細胞系統を有し得るが、同時に、初代NK細胞には存在しない1つ以上の機能的特質を有する。本出願において、NK細胞、NK細胞様エフェクター細胞、派生NK細胞、派生NK細胞様エフェクター細胞、又は派生NK系統細胞は、集合的に「NK系統細胞」と呼ばれる。

【0079】

本明細書で使用されるとき、「NKT細胞」又は「ナチュラルキラーT細胞」という用語は、T細胞受容体(TCR)を発現するCD1d拘束性T細胞を指す。従来の主要組織適合性(major histocompatibility, MHC)分子によって提示されるペプチド抗原を検出する従来のT細胞とは異なり、NKT細胞は、非古典的MHC分子であるCD1dによって提示される脂質抗原を認識する。2つの型のNKT細胞が認識される。インバリアント又はI型NKT細胞は、非常に限られたTCRレパートリー限定された範囲のβ鎖(ヒトではVβ11)と関連する正規のα鎖(ヒトではVα24-Jα18)を発現する。非古典的又は非インバリアントのII型NKT細胞と呼ばれるNKT細胞の第2の集団は、より不均一なTCRαβの使用を提示する。I型NKT細胞は免疫療法に好適であると考えられている。適応又はインバリアント(I型)NKT細胞は、TCR Vα24-Jα18、Vβ11、CD1d、CD3、CD4、CD8、αGalCer、CD161、及びCD56のマーカーのうちの少なくとも1つ以上の発現によって識別され得る。

【0080】

「エフェクター細胞」という用語は、一般に、刺激及び／又は活性化に応答して特定の活性を実行する免疫系における特定の細胞、又は活性化の際に特異的機能をもたらす細胞に適用される。本明細書で使用されるとき、「エフェクター細胞」という用語は、免疫細胞、分化した免疫細胞、並びに刺激及び／又は活性化に応答して特定の活性を実行するように編集及び／又は調節された初代細胞又は分化した細胞を含み、いくつかの文脈ではそれらと交換可能である。エフェクター細胞の非限定的な例としては、初代由来又はiPSC由来のT細胞、NK細胞、NKT細胞、B細胞、マクロファージ、及び好中球が挙げられる。

【0081】

本明細書で使用されるとき、「単離された」などの用語は、元の環境から分離されている細胞、又は細胞の集団を指し、すなわち、単離された細胞の環境は、「単離されていない」参照細胞が存在する環境に見出される少なくとも1つの成分を実質的に含まない。この用語は、例えば、組織又は生検試料から単離された、その天然環境で見出されるようないくつか又は全ての成分から取り出される細胞を含む。この用語はまた、細胞が非天然環境、例えば、細胞培養物又は細胞懸濁液から単離された環境で見出されるため、少なくとも1つ、いくつか、又は全ての成分から取り出される細胞を含む。したがって、単離された細胞は、天然で見出される場合、又は非天然の環境で増殖、保管、又は存続する場合、他の物質、細胞、又は細胞集団を含む少なくとも1つの成分から部分的又は完全に分離される。単離された細胞の具体例には、部分的に純粋な細胞組成物、実質的に純粋な細胞組成物、及び天然に存在しない培地で培養された細胞が含まれる。単離された細胞は、所望の細胞又はその集団を、環境中の他の物質又は細胞から分離することから、又は環境から1つ以上の他の細胞集団又は垂集団を取り除くことから取得することができる。

【0082】

本明細書中で使用されるとき、「精製する」などの用語は、純度を増加することを指す。例えば、純度は少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、又は100%に増加させることができる。

【0083】

本明細書で使用されるとき、「コードすること」という用語は、ヌクレオチド(すなわち、rRNA、tRNA、及びmRNA)の定義された配列又はアミノ酸の定義された配列及びそれらから生じる生物学的特性を有する生物学的プロセスにおける他のポリマー及

10

20

30

40

50

び巨大分子の合成のためのテンプレートとして機能する、遺伝子、cDNA、又はmRNAなどのポリヌクレオチド中のヌクレオチドの特定の配列の固有の特性を指す。したがって、その遺伝子に対応するmRNAの転写及び翻訳が細胞又は他の生物学的システムでタンパク質を産生する場合、その遺伝子はタンパク質をコードする。ヌクレオチド配列がmRNA配列と同一であり、通常は配列表に記載されているコード鎖と、遺伝子又はcDNAの転写のテンプレートとして使用される非コード鎖の両方を、その遺伝子又はcDNAのタンパク質又は他の産物をコードしていると称され得る。

【0084】

「構築物」は、インビトロ又はインビボのいずれかで宿主細胞に送達されるポリヌクレオチドを含む高分子又は分子の複合体を指す。本明細書で使用されるとき、「ベクター」は、外来遺伝物質の標的細胞への送達又は移入を誘導することができ、標的細胞で複製及び／又は発現することができる任意の核酸構築物を指す。本明細書で使用されるとき、「ベクター」という用語は、送達される構築物を含む。ベクターは、線状又は環状分子であり得る。ベクターは、組み込まれることも組み込まれないこともできる。ベクターの主なタイプには、プラスミド、エピソードベクター、ウイルスベクター、コスミド、及び人工染色体が含まれるが、これらに限定されない。ウイルスベクターには、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、センダイウイルスベクターなどが含まれるが、これらに限定されない。

【0085】

「組み込み」とは、構築物の1つ以上のヌクレオチドが細胞ゲノムに安定して挿入される、すなわち、細胞の染色体DNA内の核酸配列に共有結合されることを意味する。「標的化組み込み」とは、構築物のヌクレオチドが、予め選択された部位又は「組み込み部位」で細胞の染色体又はミトコンドリアDNAに挿入されることを意味する。本明細書で使用されるとき、「組み込み」という用語は、組み込み部位での内因性配列又はヌクレオチドの欠失を伴うか又は伴わない、構築物の1つ以上の外因性配列又はヌクレオチドの挿入を含むプロセスを更に指す。挿入部位に欠失がある場合、「組み込み」は、内因性配列又は1つ以上の挿入されたヌクレオチドで欠失されたヌクレオチドの置換を更に含み得る。

【0086】

本明細書で使用されるとき、「外因性」という用語は、参照分子又は参照活性が宿主細胞に導入されるか、又は宿主細胞に対して非天然であることを意味することを意図している。分子は、例えば、コード核酸を宿主の遺伝物質に導入することにより、例えば、宿主の染色体に組み込むことにより、又は非染色体の遺伝物質、例えば、プラスミドとして導入することができる。したがって、コード核酸の発現に関して使用される用語は、コード核酸を発現可能な形態で細胞に導入することを指す。「内因性」という用語は、宿主細胞に存在する参照分子又は活性を指す。同様に、この用語は、コード核酸の発現に関して使用されるとき、細胞内に含まれ、外因的に導入されていないコード核酸の発現を指す。

【0087】

本明細書で使用されるとき、「目的の遺伝子」又は「目的のポリヌクレオチド配列」は、適切な調節配列の制御下に置かれると、RNAに転写され、場合によってはインビボでポリペプチドに翻訳されるDNA配列である。目的の遺伝子又はポリヌクレオチドは、原核生物配列、真核生物のmRNAからのcDNA、真核生物（例えば、哺乳動物）のDNAからのゲノムDNA配列、及び合成DNA配列を含み得るが、これらに限定されない。例えば、目的の遺伝子は、miRNA、shRNA、天然ポリペプチド（すなわち、天然に見出されるポリペプチド）又はその断片、バリエーションポリペプチド（すなわち、天然ポリペプチドとの100%未満の配列同一性を有する天然ポリペプチドの変異体）又はその断片、操作されたポリペプチド又はペプチド断片、治療用ペプチド又はポリペプチド、造影用マーカー、選択マーカーなどをコードし得る。

【0088】

本明細書で使用されるとき、「ポリヌクレオチド」という用語は、デオキシリボヌクレオチド若しくはリボヌクレオチド、又はそれらの類似体のいずれかである、任意の長さの

10

20

30

40

50

ポリマー形態のヌクレオチドを指す。ポリヌクレオチドの配列は、4つのヌクレオチド塩基：アデニン（A）、シトシン（C）、グアニン（G）、チミン（T）から構成され、ポリヌクレオチドがRNAである場合、チミンはウラシル（U）である。ポリヌクレオチドには、遺伝子又は遺伝子断片（例えば、プローブ、プライマー、EST、又はSAGEタグ）、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA（mRNA）、トランスファRNA、リボソームRNA、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分岐鎖ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離DNA、任意の配列の単離RNA、核酸プローブ及びプライマーが含まれ得る。ポリヌクレオチドはまた、二本鎖分子及び一本鎖分子の両方を指す。

【0089】

本明細書で使用されるとき、「ペプチド」、「ポリペプチド」、及び「タンパク質」という用語は互換可能に使用され、ペプチド結合によって共有結合されたアミノ酸残基を有する分子を指す。ポリペプチドは少なくとも2つのアミノ酸を含まなければならない、ポリペプチドのアミノ酸の最大数に制限はない。本明細書で使用されるとき、これらの用語は、例えば、当該技術分野では一般にペプチド、オリゴペプチド及びオリゴマーとも称される短い鎖と、一般に当該技術分野でポリペプチド又はタンパク質と称される長い鎖の両方を指す。「ポリペプチド」には、例えば、とりわけ、生物学的に活性な断片、実質的に相同なポリペプチド、オリゴペプチド、ホモ二量体、ヘテロ二量体、ポリペプチドのバリエーション、改変ポリペプチド、派生体、類似体、融合タンパク質が含まれる。ポリペプチドは、天然ポリペプチド、組換えポリペプチド、合成ポリペプチド、又はそれらの組み合わせを含む。

【0090】

本明細書で使用されるとき、「サブユニット」という用語は、本明細書で使用されるとき、タンパク質複合体の各別個のポリペプチド鎖を指し、各別個のポリペプチド鎖は、それ自体で安定な折り畳み構造を形成することができる。多くのタンパク質分子は、2つ以上のサブユニットから構成され、ここで、アミノ酸配列は、各サブユニットについて同一であるか、又は類似しているか、又は完全に異なるかのいずれかであり得る。例えば、CD3複合体は、CD3 α 、CD3 ϵ 、CD3 δ 、CD3 γ 、及びCD3 ζ サブユニットから構成され、これらは、CD3 ϵ /CD3 γ 、CD3 ϵ /CD3 δ 、及びCD3 ζ /CD3 δ 二量体を形成する。単一のサブユニット内で、ポリペプチド鎖の連続した部分は、「ドメイン」と呼ばれるコンパクトで局所的な半独立単位に折り畳まれることが多い。多くのタンパク質ドメインは、ドメインの共通機能に寄与する、サブドメインとも呼ばれる独立した「構造サブユニット」を更に含み得る。したがって、本明細書で使用されるとき、「サブドメイン」という用語は、より大きなドメインの内側のタンパク質ドメイン、例えば、細胞表面受容体の外部ドメイン内の結合ドメイン、又は細胞表面受容体の内部ドメインの刺激ドメイン若しくはシグナル伝達ドメインを指す。

【0091】

「作動可能に連結された（operably-linked）」又は「作動可能に連結された（operatively linked）」は、「作動可能に接続された（operably connected）」又は「作動可能に接続された（operatively connected）」と交換可能であり、一方の機能が他方によって影響を受けるような、単一の核酸断片上の核酸配列（又は複数のドメインを有するポリペプチド中のアミノ酸）の会合を指す。例えば、プロモータは、そのコード配列又は機能的RNAの発現に影響を与えることができる場合、コード配列又は機能的RNAと作動可能に連結している（すなわち、コード配列又は機能的RNAがプロモータの転写制御下にある）。コード配列は、センス又はアンチセンス方向で調節配列に作動可能に連結することができる。更なる例として、受容体結合ドメインは、リガンドへの受容体の結合が当該結合に応答するシグナルを変換するように、細胞内シグナル伝達ドメインに作動可能に接続され得る。

【0092】

「融合タンパク質」又は「キメラタンパク質」は、本明細書で使用されるとき、別々の

タンパク質をコードする配列をコードする2つ以上の部分的又は完全なポリヌクレオチドを接合するための遺伝子操作を介して作製されるタンパク質であり、これらの接合されたポリヌクレオチドの発現は、元のタンパク質又はその断片の各々に由来する機能的特性を有する単一のペプチド又は複数のポリペプチドを生じる。融合タンパク質における異なる供給源の2つの隣接するポリペプチド間に、リンカー（又はスペーサ）ペプチドを付加することができる。本明細書に記載のキメラ融合受容体（CFR）は、融合タンパク質又はキメラタンパク質である。

【0093】

本明細書で使用されるとき、「遺伝的インプリント」という用語は、ソース細胞又はiPSCの優先的な治療属性に寄与し、ソース細胞由来iPSC及び／又はiPSC由来造血系統細胞で保持可能な遺伝的又はエピジェネティックな情報を指す。本明細書で使用されるとき、「ソース細胞」は、リプログラミングを通じてiPSCを生成するために使用され得る非多能性細胞であり、ソース細胞由来iPSCは、任意の造血系統細胞を含む特定の細胞型に更に分化し得る。ソース細胞由来iPSC、及びそれから分化した細胞は、文脈に応じて、「由来（derived）」細胞又は「派生（derivative）」細胞と総称し得る。例えば、本出願全体で使用されるとき、派生エフェクター細胞、又は派生NK系統細胞若しくは派生T系統細胞は、末梢血、臍帯血、又は他のドナー組織などの天然（natural）／天然（native）供給源から取得されたそれらの対応する初代細胞と比較して、iPSCから分化した細胞である。本明細書で使用されるとき、優先的な治療属性を付与する遺伝的インプリントは、ドナー、疾患、又は治療応答に特異的である選択されたソース細胞をリプログラミングすることにより、又はゲノム編集を使用してiPSCに遺伝子組換えモダリティを導入することにより、iPSCに組み込まれる。特異的に選択されたドナー、疾患、又は治療状況から取得されたソース細胞の態様では、優先的な治療属性に寄与する遺伝的インプリントには、根本的な分子事象が同定されているかどうかに関係なく、選択されたソース細胞のiPSC由来細胞に渡される、保持可能な表現型、すなわち優先的な治療属性を表す、状況特異的な遺伝的又はエピジェネティックな改変を含み得る。ドナー、疾患、若しくは治療応答に特異的であるソース細胞は、iPSC及び由来造血系統細胞において保持可能な遺伝的インプリントを含んでいてもよく、この遺伝的インプリントには、例えば、ウイルス特異的T細胞又はインバリアントナチュラルキラーT（invariant natural killer T、iNKT）細胞からの、予め配置された単一特異的TCR、追跡可能で望ましい遺伝子多型、例えば、選択されたドナーにおける高親和性CD16受容体をコードする点変異のホモ接合、及び所定のHLA要件、すなわち、増加した集団でハプロタイプを示す選択されたHLA適合ドナー細胞が含まれるが、これらに限定されない。本明細書で使用されるとき、優先的な治療属性には、由来細胞の、改善された生着、輸送、ホーミング、生存能力、自己複製、持続性、免疫応答の調節と修飾、生存率、及び細胞傷害性が含まれる。優先的な治療属性はまた、抗原標的化受容体発現、HLA提示又はその欠如、腫瘍微小環境に対する耐性、バイスタンダー免疫細胞及び免疫修飾の誘導、低減された腫瘍外効果を伴う改善されたオンターゲット特異性、化学療法などの治療に対する耐性を指し得る。優先的な治療属性を付与する遺伝的インプリントが組み込まれているiPSCを分化させることから、1つ以上の治療属性を有する派生細胞が得られる場合、そのような派生細胞はまた「合成細胞」とも呼ばれる。一般に、合成細胞は、その最も近い対応する初代細胞と比較した場合、合成細胞が、操作された多能性細胞から分化されるか、又は末梢血、臍帯血、若しくは他のドナー組織などの天然／天然供給源由来の初代細胞を操作することによって取得されるかにかかわらず、1つ以上の非天然細胞機能を有する。

【0094】

本明細書で使用されるとき、「増強された治療特性」という用語は、同じ一般的な細胞型の典型的な免疫細胞と比較して増強された細胞の治療特性を指す。例えば、「増強された治療特性」を有するNK細胞は、典型的な未改変及び／又は天然に存在するNK細胞と比較して、増強され、改善され、及び／又は増加された治療特性を有する。免疫細胞の治

10

20

30

40

50

療特性には、細胞の生着、輸送、ホーミング、生存能力、自己複製、持続性、免疫応答の調節と修飾、生存率、及び細胞傷害性が含まれ得るが、これらに限定されない。免疫細胞の治療特性はまた、抗原標的化受容体発現、HLA提示又はその欠如、腫瘍微小環境に対する耐性、バイスタンダー免疫細胞及び免疫修飾の誘導、低減された腫瘍外効果を伴う改善されたオンターゲット特異性、化学療法などの治療に対する耐性によって明らかにされる。

【0095】

本明細書で使用されるとき、「エンゲージャ」という用語は、免疫細胞（例えば、T細胞、NK細胞、NKT細胞、B細胞、マクロファージ、又は好中球）と、腫瘍細胞との間の連結を形成することができ、免疫細胞を活性化することができる分子、例えば、融合ポリペプチドを指す。エンゲージャの例には、二重特異性T細胞エンゲージャ（bi-specific T cell engager、BiTE）、二重特異性キラー細胞エンゲージャ（bi-specific killer cell engager、BiKE）、三重特異性キラー細胞エンゲージャ、又は多重特異性キラー細胞エンゲージャ、及び複数の免疫細胞型と適合し得るユニバーサルエンゲージャが含まれるが、これらに限定されない。

【0096】

本明細書で使用されるとき、「表面トリガー受容体」という用語は、免疫応答、例えば、細胞傷害性応答を誘発又は開始することができる受容体を指す。表面トリガー受容体を操作することができ、エフェクター細胞、例えば、T細胞、NK細胞、NKT細胞、B細胞、マクロファージ、好中球で発現させることができる。いくつかの実施形態では、表面トリガー受容体は、エフェクター細胞の天然受容体及び細胞型とは無関係に、エフェクター細胞と特異的な標的細胞（例えば、腫瘍細胞）との間の二重特異性抗体又は多重特異性抗体の結合を促進する。このアプローチを使用すると、ユニバーサル表面トリガー受容体を含むiPSCを生成し、そのようなiPSCをユニバーサル表面トリガー受容体を発現する様々なエフェクター細胞型の集団に分化させることができる。「ユニバーサル」とは、表面トリガー受容体が細胞型に関係なく任意のエフェクター細胞で発現及び活性化できることを意味し、ユニバーサル受容体を発現する全てのエフェクター細胞は、エンゲージャの腫瘍結合特異性に関係なく、表面トリガー受容体によって認識できるエンゲージャに結合又は連結され得る。いくつかの実施形態では、同じ腫瘍標的化特異性を有するエンゲージャを使用して、ユニバーサル表面トリガー受容体と結合する。いくつかの実施形態では、異なる腫瘍標的化特異性を有するエンゲージャを使用して、ユニバーサル表面トリガー受容体と結合する。したがって、1つ又は複数のエフェクター細胞型を使用して、ある特異的な型の腫瘍細胞を殺傷する場合もあれば、2つ以上の型の腫瘍を殺傷する場合もある。表面トリガー受容体は一般に、エフェクター細胞の活性化のための共刺激ドメインと、エンゲージャのエピトープ結合領域に特異的なエピトープと、を含む。二重特異性エンゲージャは、一方の端の表面トリガー受容体のエピトープに特異的であり、もう一方の端の腫瘍抗原に特異的である。

【0097】

本明細書で使用されるとき、「安全スイッチタンパク質」という用語は、細胞療法の潜在的な毒性又はその他の有害作用を防止するように設計された操作されたタンパク質を指す。いくつかの例では、安全スイッチタンパク質の発現は条件付きで制御され、安全スイッチタンパク質をコードする遺伝子をゲノムに永久的に組み込んだ移植された操作された細胞の安全性の懸念に対処する。この条件付き調節は変動する可能性があり、小分子を介した翻訳後活性化及び組織特異的及び／又は一過性の転写調節による制御が含まれる可能性がある。安全スイッチは、アポトーシスの誘導、タンパク質合成の阻害、DNA複製、増殖停止、転写及び転写後の遺伝子調節及び／又は抗体媒介性枯渇を媒介する可能性がある。いくつかの例において、安全スイッチタンパク質は、外因性分子、例えば、プロドラッグによって活性化され、活性化されると、治療用細胞のアポトーシス及び／又は細胞死を誘発する。安全スイッチタンパク質の例には、カスパーゼ9（又はカスパーゼ3若しくは7）、チミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、B細胞CD20、改変EGFR、及

10

20

30

40

50

びそれらの任意の組み合わせなどの自殺遺伝子が含まれるが、これらに限定されない。この戦略では、有害事象の発生時に投与されるプロドラッグが自殺遺伝子産物によって活性化され、形質導入された細胞を殺傷する。

【0098】

本明細書で使用されるとき、「薬学的に活性なタンパク質又はペプチド」という用語は、生物に対して生物学的及び／又は薬学的効果を達成することができるタンパク質又はペプチドを指す。薬学的に活性なタンパク質は、疾患に対する治療的又は緩和的特性を有し、疾患の重症度を改善、軽減（relieve）、緩和、逆転又は軽減（lessen）するために投与することができる。薬学的に活性なタンパク質はまた、予防特性を有し、疾患の発症を予防するために、又はそれが出現した場合にそのような疾患又は病的状態の重症度を軽減するために使用される。薬学的に活性なタンパク質には、タンパク質又はペプチド全体又はその薬学的に活性な断片が含まれる。それはまた、タンパク質若しくはペプチドの薬学的に活性な類似体又はタンパク質若しくはペプチドの断片の類似体を含む。薬学的に活性なタンパク質という用語はまた、協調的又は相乗的に作用して治療効果をもたらす複数のタンパク質又はペプチドを指す。薬学的に活性なタンパク質又はペプチドの例には、受容体、結合タンパク質、転写及び翻訳因子、腫瘍増殖抑制タンパク質、抗体又はその断片、増殖因子、及び／又はサイトカインが含まれるが、これらに限定されない。

【0099】

本明細書で使用されるとき、「シグナル伝達分子」という用語は、細胞シグナル伝達を調整、関与、阻害、活性化、低減、又は増大させる任意の分子を指す。シグナル伝達とは、細胞内で最終的に生化学的事象を引き起こす経路に沿ったタンパク質複合体の動員による化学改変の形態での分子シグナルの伝達を指す。シグナル伝達経路は当該技術分野で周知であり、Gタンパク質共役受容体シグナル伝達、チロシンキナーゼ受容体シグナル伝達、インテグリンシグナル伝達、トールゲートシグナル伝達、リガンド依存性イオンチャネルシグナル伝達、ERK／MAPKシグナル伝達経路、Wntシグナル伝達経路、cAMP依存経路、及びIP3／DAGシグナル伝達経路が含まれるが、これらに限定されない。

【0100】

本明細書で使用されるとき、「標的化モダリティ」という用語は、細胞に遺伝的に組み込まれて、i) 固有のキメラ抗原受容体（CAR）又はT細胞受容体（TCR）に関連するときの抗原特異性、ii) モノクローナル抗体又は二重特異性エンゲージャに関連するときのエンゲージャ特異性、iii) 形質転換細胞の標的化、iv) がん幹細胞の標的化、及びv) 特異的な抗原又は表面分子の不在下でのその他の標的化戦略を含むがこれらに限定されない、抗原及び／又はエピトープの特異性を促進する分子、例えば、ポリペプチドを指す。

【0101】

本明細書で使用されるとき、「特異的」又は「特異性」という用語は、非特異的又は非選択的な結合とは対照的に、標的分子に選択的に結合する分子、例えば受容体又はエンゲージャの能力を指すために使用され得る。

【0102】

本明細書で使用されるとき、「養子細胞療法」という用語は、当該輸注の前にエクスピボで増殖している、遺伝子改変された、又は改変されていない、T又はB細胞として同定される、自家性又は同種異系のリンパ球の輸注に関連する細胞ベースの免疫療法を指す。

【0103】

本明細書で使用されるとき、「治療上十分な量」は、その意味の範囲内で、それが参照する特定の治療及び／又は医薬組成物の非毒性であるが十分かつ／又は有効な量を含み、所望の治療効果を提供する。必要とされる正確な量は、患者の全体的な健康状態、患者の年齢、並びに状態の段階及び重症度などの要因に応じて、対象ごとに異なる。特定の実施形態では、治療的に十分な量は、治療されている対象の疾患又は状態に関連する少なくとも1つの症状を改善、軽減、及び／又は改善するのに十分及び／又は有効である。

【0104】

多能性幹細胞の分化には、培養液中の刺激剤及び細胞の物理的状態の変化など、培養系の変化が必要とされる。最も一般的な戦略は、系統特異的な分化を開始するための共通かつ重要な中間体として胚様体（embryoid body、EB）の形成を利用する。「胚様体」とは、胚の発生を模倣することが示されている三次元のクラスタであり、三次元領域内で多数の系統を発生させる。典型的には数時間から数日である分化プロセスを通じて、単純なEB（例えば、分化を誘発された凝集多能性幹細胞）は成熟を続け、嚢胞性EBにまで成長し、典型的には数日から数週間であるこのとき、それらは、更に分化を続けるように処理される。EB形成は、多能性幹細胞を細胞の三次元多層クラスタ内で互いに近接させることによって開始さ、これは典型的には、多能性細胞を液滴として沈降させ、細胞を「U」底ウェルプレートに沈降させること、又は機械的攪拌によるものを含むいくつかの方法の1つによって実現される。多能性培養維持培地で維持された凝集体は適切なEBを形成しないため、EBの成長を促進するために、多能性幹細胞の凝集体には更に分化の手掛かりが必要である。そのため、多能性幹細胞の凝集体は、選択した系統へのキュー誘発を提供する分化培地に移す必要がある。多能性幹細胞のEBベースの培養は、典型的には、EB細胞クラスタ内の中程度の増殖（proliferation）の分化した細胞集団（外胚葉、中胚葉、及び内胚葉の胚葉）を生成する。EBは、細胞分化を促進することが証明されているが、環境からの分化のキューに対する三次元構造の細胞の露出に一貫性がないため、様々な分化状態の異種細胞を生じさせる。加えて、EBは作成と維持が面倒である。更に、EB形成による細胞分化には適度な細胞増殖が伴い、分化効率の低下にもつながる。

10

20

【0105】

対照的に、「凝集体形成」は、「EB形成」とは異なり、多能性幹細胞由来細胞の集団を増殖させるために使用することができる。例えば、凝集体に基づく多能性幹細胞の増殖の間、培養培地は、増殖及び多能性を維持するように選択される。細胞増殖は一般に、より大きな凝集体を形成する凝集体のサイズを増加させ、これらの凝集体は、日常的に機械的又は酵素的に小さな凝集体に解離して、培養内の細胞増殖を維持し、細胞数を増やすことができる。EB培養とは異なり、維持培養で凝集体内で培養された細胞は、多能性のマーカーを維持する。多能性幹細胞凝集体は、分化を誘導するために更なる分化のキューを必要とする。

【0106】

本明細書で使用されるとき、「単層分化」は、細胞の三次元多層クラスタにわたる分化、すなわち「EB形成」とは異なる分化方法を指す用語である。単層分化は、本明細書に開示される他の利点の中でも特に、EB形成が分化を開始する必要性を回避する。単層培養はEB形成などの胚発生を模倣しないため、特定の系統への分化は、EBの3つ全ての胚葉分化と比較して最小限とみなされる。

30

【0107】

本明細書で使用されるとき、「解離した細胞」又は「単一の解離した細胞」は、他の細胞から又は表面（例えば、培養プレート表面）から実質的に分離又は精製されている細胞をいう。例えば、細胞は、機械的又は酵素的方法によって動物又は組織から解離され得る。代替的に、インビトロで凝集する細胞は、例えば、クラスタの懸濁液、単一の細胞又は単一の細胞とクラスタの混合物への酵素的又は機械的な解離によって、互いに解離され得る。更に別の代替的な実施形態では、付着細胞は培養プレート又は別の表面から解離され得る。したがって、解離には、細胞外マトリックス（extracellular matrix、ECM）及び基質（培養面など）との細胞相互作用を破壊すること、又は細胞間のECMを破壊することが含まれる。

40

【0108】

本明細書で使用されるとき、「マスター細胞バンク」又は「MCB」は、1つ以上の治療属性を含むように操作されており、特徴付けられ、試験され、適格化され、拡大されており、かつ製造環境における指向性分化による細胞ベースの治療剤の産生のための出発細胞材料として確実に役立つことが示されているiPSCのクローン集団であるクローンマ

50

スター操作 i P S C 株を指す。様々な実施形態では、M C B は、製造プロセス中に i P S 細胞株が継代され、解凍され、又は取り扱われる合計回数を低減及び／又は排除することによって、遺伝的変異及び／又は潜在的な汚染を防止するために、複数の容器中で維持、貯蔵、及び／又は凍結保存される。

【0109】

本明細書で使用されるとき、「フィーダ細胞」又は「フィーダ」は、第2の型の細胞と共培養されて、第2の型の細胞が増殖、増殖、又は分化することができる環境を提供する、1つの型の細胞を表す用語であり、フィーダ細胞は刺激、増殖因子、栄養素を提供し、第2の細胞型を支持する。フィーダ細胞は、それらが支持している細胞とは異なる種に由来してもよい。例えば、幹細胞を含む特定の型のヒト細胞は、マウス胚性線維芽細胞又は不死化マウス胚性線維芽細胞の初代培養によって支持することができる。別の例では、末梢血由来細胞又は形質転換白血病細胞は、ナチュラルキラー細胞の増殖及び成熟を支持する。フィーダ細胞は、他の細胞と共培養されるときに、それらが支持している細胞よりも増殖するのを防ぐために、照射又はマイトマイシンなどの拮抗有糸分裂剤での処理によって、典型的には不活性化され得る。フィーダ細胞は、内皮細胞、間質細胞（例えば、上皮細胞又は線維芽細胞）、及び白血病細胞を含み得る。前述を限定することなく、1つの特定のフィーダ細胞型は、ヒト皮膚線維芽細胞などのヒトフィーダであり得る。別のフィーダ細胞型は、マウス胚性線維芽細胞（mouse embryonic fibroblast、MEF）であり得る。一般に、様々なフィーダ細胞を一部使用して、多能性を維持し、特定の系統に分化を指示し、増殖能力を高め、エフェクター細胞などの特殊化した細胞型への成熟を促進することができる。

10

20

【0110】

本明細書で使用されるとき、「フィーダフリー」（feeder-free、FF）環境とは、フィーダ又は間質細胞を本質的に含まない、及び／又はフィーダ細胞の培養によって前処理されていない、培養条件、細胞培養又は培養培地などの環境を指す。「前処理された」培地とは、フィーダ細胞が培地内で少なくとも1日などの期間培養された後に採取された培地を指す。前処理された培地には、培地で培養されたフィーダ細胞から分泌された増殖因子及びサイトカインを含む、多くのメディエータ物質が含まれる。いくつかの実施形態では、フィーダフリー環境は、フィーダ細胞又は間質細胞の両方を含まず、フィーダ細胞の培養によって前処理もされていない。

30

【0111】

i P S C 及びそれから分化した派生非多能性細胞のゲノム編集若しくは改変、又は非多能性細胞及びそれからリプログラミングされた由来 i P S C のゲノム編集若しくは改変との関連で使用される「機能的」とは、（1）遺伝子レベルでは、ノックイン、ノックアウト、ノックダウン遺伝子発現、直接ゲノム編集若しくは改変によって、又は最初にゲノム操作された出発細胞からの分化若しくはリプログラミングを介した「継代」によって達成される、所望の細胞発生段階での誘導性若しくは一時的発現などのトランスジェニック若しくは制御された遺伝子発現の成功、あるいは（2）細胞レベルでは、（i）直接ゲノム編集を通して当該細胞において得られる遺伝子発現改変、（ii）最初にゲノム操作された出発細胞からの分化若しくはそのリプログラミングを介した「継代」を通して当該細胞において維持される遺伝子発現改変、（iii）当該細胞のより初期の発生段階においてのみ出現するか、又は分化若しくはリプログラミングを介して当該細胞を生じる出発細胞においてのみ出現する遺伝子発現改変の結果としての、当該細胞における下流遺伝子調節、又は（iv）i P S C、前駆体若しくは脱分化した細胞起源で行われたゲノム編集若しくは改変に最初に由来する成熟細胞産物内に示される、増強された若しくは新たに達成された細胞機能若しくは属性による、細胞機能／特徴の除去、付加又は改変の成功を指す。

40

【0112】

H L A クラス I 欠損若しくは H L A クラス I I 欠損、又はその両方を含む「H L A 欠損」とは、H L A クラス I タンパク質ヘテロ二量体及び／又は H L A クラス I I ヘテロ二量体を含む完全な M H C 複合体の表面発現のレベルが不足している、又はもはや維持されて

50

いない、又は低減している細胞を指し、減少又は低減したレベルが、他の細胞又は合成方法によって自然に検出可能なレベルよりも低くなっている。

【0113】

本明細書で使用されるとき、「改変されたHLA欠損iPSC」は、改善された分化能、抗原標的化、抗原提示、抗体認識、持続性、免疫回避、抑制に対する耐性、増殖、共刺激、サイトカイン刺激、サイトカイン産生（オートクリン又はパラクリン）、走化性、及び細胞傷害性、例えば、非古典的HLAクラスIタンパク質（例えば、HLA-E及びHLA-G）、キメラ抗原受容体（CAR）、T細胞受容体（TCR）、CD16 Fc受容体、BCL11b、NOTCH、RUNX1、IL15、4-1BB、DAP10、DAP12、CD24、CD3ζ、4-1BBL、CD47、CD113、及びPDL1に
10
関連するがこれらに限定されないタンパク質を発現する遺伝子を導入することによって更に改変されるHLA欠損iPSCを指す。「改変されたHLA欠損」の細胞には、iPSC以外の細胞も含まれる。

【0114】

「リガンド」という用語は、標的分子と複合体を形成して、標的上の部位に結合することによってシグナルを生じる物質を指す。リガンドは、標的に特異的に結合することができる天然又は人工物質であってもよい。リガンドは、タンパク質、ペプチド、抗体、抗体複合体、コンジュゲート、核酸、脂質、多糖、単糖、小分子、ナノ粒子、イオン、神経伝達物質、又は標的に特異的に結合することができる任意の他の分子実体の形態であってもよい。リガンドが結合する標的は、タンパク質、核酸、抗原、受容体、タンパク質複合体、又は細胞であり得る。標的に結合してその機能を変化させ、シグナル伝達応答を誘発するリガンドは、「アゴニスト（agonistic）」又は「アゴニスト（agonist）」と呼ば
20
れる。標的に結合し、シグナル伝達応答を遮断又は低減するリガンドは、「拮抗」又は「アンタゴニスト」である。

【0115】

「抗体」という用語は、本明細書において最も広い意味で使用され、一般に、標的に特異的に結合する少なくとも1つの結合部位を含有する免疫応答生成分子を指し、標的は、抗原、又はある特定の抗体と相互作用することができる受容体であり得る。例えば、NK細胞は、抗体又は抗体のFc領域のそのFc-ガンマ受容体（Fc-gamma receptor、FcγR）への結合によって活性化され、それによって、ADCC（抗体依存性細胞傷害）媒介性エフェクター細胞活性化を誘発することができる。抗体が結合する抗原若しくは受容体の特定の断片若しくは部分、又は一般に標的は、エピトープ又は抗原決定基として知られている。「抗体」という用語は、天然抗体及びそのバリエーション、天然抗体及びそのバリエーションの断片、ペプチド及びそのバリエーション、並びに一本鎖抗体及びその断片を含む、抗体又はその特定の断片若しくは部分の構造及び／又は機能を模倣する抗体模倣体を含むが、これらに限定されない。抗体は、マウス抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダIgG、単一可変新規抗原受容体（single variable new antigen receptor、VNAR）、サメ重鎖抗体（Ig-NAR）、キメラ抗体、組換え抗体、単ドメイン抗体（single-domain antibody、dAb）、抗イディオタイプ抗体、二重特異性、多重特異性、若しくは多量体抗体、又はその断片であってもよい。抗イディオタイプ抗体は、別の抗体のイディオトープへの結合に特異的であり、イディオトープは、抗体の抗原決定基である。二重特異性抗体は、BiTE（二重特異性T細胞エンゲージャ）又はBiKE（二重特異性キラー細胞エンゲージャ）であってもよく、多重特異性抗体は、TriKE（tri-specific killer cell engager、三重特異性キラー細胞エンゲージャ）であってもよい。抗体断片の非限定的な例には、Fab、Fab'、F(ab')₂、F(ab')₃、Fv、Fab₃、pFc、Fd、一本鎖抗原結合断片（single chain fragment variable、scFv）、タンデムscFv（scFv）₂、一本鎖Fab（single chain Fab、scFab）、ジスルフィド安定化Fv（disulfide stabilized Fv、dsFv）、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、単ドメイン抗原結合断片（single-domain antigen binding fragment、
30
40
50

s d A b)、ラクダ重鎖 I g G 及び N a n o b o d y (登録商標)断片、組換え重鎖のみ抗体 (recombinant heavy-chain-only antibody、V H H)、及び抗体全体の結合特異性を維持する他の抗体断片が含まれる。

【0116】

「F c 受容体」は F c R と略され、認識される抗体の種類に基づいて分類される。例えば、最も一般的なクラスの抗体 I g G に結合するものは F c -ガンマ受容体 (F c γ R) と呼ばれ、I g A に結合するものは F c -アルファ受容体 (Fc-alpha receptor、F c α R) と呼ばれ、I g E に結合するものは F c -イプシロン受容体 (Fc-epsilon receptor、F c ε R) と呼ばれる。F c R のクラスは、それらを発現する細胞 (マクロファージ、顆粒球、ナチュラルキラー細胞、T 及び B 細胞) と各受容体のシグナル伝達特性によっても区別される。F c -ガンマ受容体 (F c γ R) には、F c γ R I (C D 6 4)、F c γ R I I A (C D 3 2)、F c γ R I I B (C D 3 2)、F c γ R I I I A (C D 1 6 a)、及び F c γ R I I I B (C D 1 6 b) など、分子構造が異なるために抗体親和性が異なるいくつかのメンバーが含まれる。

10

【0117】

「キメラ受容体」は、少なくとも 2 つの異なるタンパク質に由来するアミノ酸配列の 2 つ以上の部分を含むように作製される、操作された人工又はハイブリッド受容体タンパク質分子を記載するために使用される一般用語である。キメラ受容体タンパク質は、シグナル伝達を開始し、受容体へのアゴニストリガンドの結合時に下流機能を実施する能力を細胞に与えるように操作されている。例示的な「キメラ受容体」としては、キメラ抗原受容体 (C A R)、キメラ融合受容体 (C F R)、キメラ F c 受容体 (chimeric F c receptor、C F c R)、並びに 2 つ以上の受容体の融合体が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0118】

C F c R と略される「キメラ F c 受容体」は、天然の膜貫通及び／又は細胞内シグナル伝達ドメインが改変されたか、又は非天然の膜貫通及び／又は細胞内シグナル伝達ドメインで置き換えられた、操作された F c 受容体を記載するために使用される用語である。キメラ F c 受容体のいくつかの実施形態では、膜貫通及びシグナル伝達ドメインの一方又は両方が非天然であることに加えて、1 つ以上の刺激ドメインを操作された F c 受容体の細胞内部分に導入して、受容体の誘発による細胞活性化、増殖、及び機能を増強することができる。標的抗原への抗原結合ドメインを含むキメラ抗原受容体 (C A R) とは異なり、キメラ F c 受容体は、F c 断片、又は抗体の F c 領域、又はエンゲージャ又はしくは結合分子に含まれる F c 領域に結合し、標的細胞を近傍に近づけるか、又は近づけなくとも、分子に結合して細胞機能を活性化する。例えば、F c γ 受容体は、細胞外ドメインでの I g G の結合に応答し、それにより C F c R を生成する細胞内領域において選択された膜貫通ドメイン、刺激ドメイン、及び／又はシグナル伝達ドメインを含むように操作され得る。一例では、C F c R は、その膜貫通ドメイン及び／又は細胞内ドメインを置き換えることにより、F c γ 受容体である C D 1 6 を操作することによって産生される。C D 1 6 ベースの C F c R の結合親和性を更に改善させるために、C D 6 4 の細胞外ドメイン又は C D 1 6 の高親和性バリエーション (例えば、F 1 7 6 V) を組み込むことができる。高親和性 C D 1 6 細胞外ドメインが含まれる C F c R のいくつかの実施形態では、1 9 7 位にセリンを含むタンパク質分解性切断部位が除去されているか、又は受容体の細胞外ドメインが非切断性であるように置き換えられて、すなわち、シェディングされないようになり、これにより、h n C D 1 6 ベースの C F c R が取得される。

30

40

【0119】

F c γ R 受容体である C D 1 6 には、F c 受容体 F c γ R I I I a (C D 1 6 a) と F c γ R I I I b (C D 1 6 b) の 2 つのアイソフォームがあることが確認されている。C D 1 6 a は、標的細胞に付着した単量体 I g G に結合して N K 細胞を活性化し、抗体依存性細胞傷害 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity、A D C C) を促進する、N K 細胞によって発現された膜貫通タンパク質である。本明細書で使用されると

50

き、「高親和性CD16」、「非切断性CD16」、又は「高親和性の非切断性CD16」(h nCD16と略される)は、CD16の天然又は非天然バリエーションを指す。野生型CD16は親和性が低く、NK細胞が活性化されると、白血球上の様々な細胞表面分子の細胞表面密度を調節するタンパク質分解切断プロセスである外部ドメインシェディングに供される。F176V及びF158Vは、高い親和性を有する例示的なCD16多型バリエーションである。膜近位領域(189位~212位)における切断部位(195位~198位)が変更又は排除されたCD16バリエーションは、シェディングしない。切断部位及び膜近位領域は、国際公開第2015/148926号に詳細に記載されており、その完全な開示は参照により本明細書に組み込まれる。CD16のS197Pバリエーションは、CD16の非切断性バージョンである。F158VとS197Pの両方を含むCD16バリエーションは親和性が高く、非切断性である。別の例示的な高親和性非切断性CD16(h nCD16)バリエーションは、CD64外部ドメインの3つのエクソンの1つ以上に由来する外部ドメインを含む操作されたCD16である。

10

【0120】

I. 増強された特性を有する養子細胞療法に有用な細胞及び組成物

本明細書において提供されるのは、iPSCから分化した派生細胞の治療特性を増強しながら、iPSCの分化能並びにiPSC及びその派生細胞の細胞発生生物学に影響を与えることなくクローンiPSCの調節回路を体系的に操作する戦略である。iPSC由来細胞は機能的に改善されており、選択的モダリティの組み合わせがゲノム操作を通じてiPSCレベルで細胞に導入された後の養子細胞療法に好適である。以前には、提供された1つ以上の遺伝子編集を含む改変されたiPSCが調節された活性及び／若しくは特性を保持しながら依然として細胞発生に入る能力、並びに／又は成熟して機能的分化細胞を生成する能力を有するかどうかは不明であった。iPSCから指示された細胞分化中の予期しない失敗は、発生段階の特定の遺伝子発現又はその欠如、HLA複合体提示の要件、導入された表面発現モダリティのタンパク質シェディング、及び細胞の表現型及び／又は機能の変化を可能にする分化プロトコルの再構成の必要性を含むがこれらに限定されない側面に起因する。本出願は、本明細書において提供される1つ以上の選択されたゲノム改変がiPSC分化能に悪影響を及ぼさないこと、並びに操作されたiPSCに由来する機能エフェクター細胞が、iPSC分化後にエフェクター細胞に保持される、個々の又は組み合わせたゲノム改変に起因する増強及び／又は獲得した治療特性を有することを示す。更に、iPSC及びiPSC由来エフェクター細胞の文脈において記載され得る全てのゲノム改変及びそれらの組み合わせは、培養されているか増殖されているかにかかわらず、T細胞、NK細胞、又は免疫調節細胞などの初代免疫細胞を含む初代由来細胞に適用可能であり、その改変は、養子細胞療法に有用な操作された免疫細胞をもたらす。

20

30

【0121】

1. 外因的に導入されたサイトカイン及び／又はサイトカインシグナル伝達

本出願では、臨床的に適切なサイトカインの全身的高用量投与を回避することにより、そのような行為による用量制限毒性のリスクが減少し、サイトカイン媒介性細胞自律性が確立されることが提供される。IL7R(インターロイキン7受容体サブユニットアルファ)は、インターロイキン7のための受容体であり、IL7媒介性シグナル伝達経路、細胞形態形成、細胞数恒常性、細胞増殖、免疫応答、及び免疫グロブリン産生に関与する。本明細書において提供されるように、IL7受容体の部分長又は全長ペプチドが細胞に導入されて、サイトカイン自体の発現を伴って又は伴わずに、サイトカインのシグナル伝達を可能にして、可溶性サイトカインを投与せずにリンパ球の自律性を達成し、それによってサイトカインの毒性のリスクを低減して、細胞の増殖(growth)、増殖(proliferation)、増殖(expansion)、持続性、及び／又はエフェクター機能を維持又は改善し得る。いくつかの実施形態では、サイトカインシグナル伝達のための導入されたサイトカイン及び／又はそのそれぞれの天然又は改変された受容体(サイトカインシグナル伝達複合体)は、細胞表面上で発現する。いくつかの実施形態では、サイトカインシグナル伝達は構成的に活性化される。いくつかの実施形態では、サイトカインシグナル伝達の活性

40

50

化は誘導可能である。いくつかの実施形態では、サイトカインシグナル伝達の活性化は、一過性及び／又は一時的である。

【0122】

図1は、サイトカイン（IL2、IL4、IL7、IL9、及びIL21が挙げられるが、これらに限定されない）のシグナル伝達のためのタンパク質複合体（サイトカインシグナル伝達複合体）を細胞に導入するためのいくつかの例示的な構築物設計を示す。様々な実施形態では、サイトカインシグナル伝達複合体は、IL7の全長又は部分長、及びIL7受容体の全長又は部分長を含むIL7受容体融合体（IL7RF）を含む。説明のためにIL7シグナル伝達を使用した図1の設計のうちのいずれかの膜貫通（transmembrane、TM）ドメインは、IL7受容体に対して天然であり得るか、又は任意の他の膜結合タンパク質の膜貫通ドメインで改変若しくは置換されてもよい。

10

【0123】

図1の設計に示されるように、天然（又は野生型）又は改変IL7Rは、リンカーを介してC末端でIL7に融合されてもよく、構成的シグナル伝達を可能にし、膜結合IL7を維持する。そのような構築物は、配列番号1と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%又は99%同一のアミノ酸配列を含み、膜貫通ドメイン、シグナルペプチド及びリンカーは柔軟であり、長さ及び／又は配列は様々である。いくつかの実施形態では、配列同一性は、少なくとも80%である。いくつかの実施形態では、配列同一性は、少なくとも90%である。いくつかの実施形態では、配列同一性は、少なくとも95%である。いくつかの実施形態では、配列同一性は、100%である。

20

【化1】

配列番号1

```
MDWTWILFLVAAATRVHSDCDIEGKDGKQYESVLMVSIQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFK
RHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTILLNCTGQVKGRKPAAL
GEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLQLQEIKTCWNKILMGTKEHSGGGSGGGSGGG
GSGGGSGGGSLQESGYAQNGDLEDAELDDYSFSCYSQLEVNGSQHSLTCAFEDPDVNITN
LEFEICGALVEVKCLNFRKLQEIIYFIETKKFLIGKSNICVKVGEKSLTCKKIDLTIVKP
EAPFDLSVVYREGANDFVVTFTNTSHLQKKYVKVLMHDVAYRQEKDENKWTHTVNLSSTKLTL
LQRKLQPAAMYIEIKVRSIPDHYFKGFWESEWSPSYFRTPEINNSSGEMDPILLTISILSFF
SVALLVILACVLWKKRIKPIVWPSLPDHHKKTLEHLCKKPRKNLNVSEFNPESFLDCQIHRVD
DIQARDEVEGFLQDTFPQQLSESEKQRLGGDVQSPNCPSEDVVITPESFGRDSSLTCLAGN
VSACDAPILSSSRSLDCRESGKNQPHVYQDLLLLSLGTNTNSTLPPPSLQSGILTLPVQAQG
QPILTSLSGNSQEEAYVTMSSFYQNG
```

30

（シグナルペプチドーIL7ーリンカーーIL7R；膜貫通ドメイン（TM）、シグナルペプチド及びリンカーは、長さ及び配列は様々であり得る。）

【0124】

当業者は、上述のシグナルペプチド及びリンカー配列が例示であり、シグナルペプチド又はリンカーとしての使用に好適なそれらのバリエーションを決して限定しないことを理解するであろう。当業者には既知であり利用可能な多くの好適なシグナルペプチド又はリンカー配列が存在する。当業者は、シグナルペプチド及び／又はリンカー配列が、シグナルペプチドによって導かれるか、又はリンカーによって連結される機能性ペプチドの活性を変えることなく、別の配列で置換され得ることを理解する。

40

【0125】

図1の設計2に示されるように、天然又は改変された共通受容体γCは、構成的及び膜結合サイトカインシグナル伝達複合体のために、リンカーを介してC末端でIL7に融合される。共通受容体γCは、共通ガンマ鎖又はCD132とも呼ばれ、IL2受容体サブユニットガンマ又はIL2RGとしても知られている。γCは、IL2、IL4、IL7、IL9、及びIL21受容体を含むが、これらに限定されない、多くのインターロイキン受容体の受容体複合体に共通するサイトカイン受容体サブユニットである。

【0126】

50

図1の設計3に示されるように、IL7の不在下でホモ二量体を形成する操作されたIL7Rは、サイトカインの構成的シグナル伝達を生成するのにも有用である。

【0127】

いくつかの実施形態では、サイトカインIL7及び／又はその受容体は、図1に示される設計のうちの1つ以上を使用してiPSCに導入されてもよく、iPSC分化時にその派生細胞に導入されてもよい。いくつかの実施形態では、IL7の細胞表面発現及びシグナル伝達は、図1の設計1又は2のいずれか1つに示される構築物を介する。いくつかの実施形態では、IL7の細胞表面発現及びシグナル伝達は、共通受容体又はサイトカイン特異的受容体（すなわち、IL7R）のいずれかを使用することにより、図1の設計1～3に示される構築物を介する。図1の設計のうちのいずれかの膜貫通(TM)ドメインは、サイトカイン受容体に対して天然であり得るか、又は任意の他の膜結合タンパク質の膜貫通ドメインで改変若しくは置換されてもよい。

10

【0128】

人工多能性細胞(iPSC)に加えて、本明細書に開示される少なくとも1つの操作されたモダリティを含むクローンiPSC、クローンiPS細胞株、又はiPSC由来細胞が提供される。また、提供されるのは、本セクションに記載されるような外因的に導入されたサイトカイン及び／若しくはサイトカイン受容体シグナル伝達を少なくとも有する、ソーティングされた単一細胞及び増殖されたクローン操作iPSCを含むマスター細胞バンクであり、この細胞バンクは、更なるiPSC操作のためのプラットフォームと、組成が明確かつ均一であり、費用効果の高い様式で大規模に大量生産することができる、既製の操作された均質な細胞療法製品を製造するための再生可能な供給源とを提供する。

20

【0129】

2. キメラ抗原受容体(CAR)発現

遺伝子操作されたiPSC及びその誘導エフェクター細胞に適用可能なものは、当該技術分野で知られている任意のCARの設計であり得る。CARは、抗原認識領域、膜貫通ドメイン、及び内部ドメインを含む外部ドメインを一般に含む融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、外部ドメインは、シグナルペプチド若しくはリーダー配列及び／又はスペーサを更に含むことができる。いくつかの実施形態では、内部ドメインは、CARを発現するエフェクター細胞を活性化するシグナル伝達ペプチドを更に含むことができる。いくつかの実施形態では、抗原認識ドメインは、抗原に特異的に結合することができる。いくつかの実施形態では、抗原認識ドメインは、疾患又は病原体に関連する抗原に特異的に結合することができる。いくつかの実施形態では、疾患関連抗原は腫瘍抗原であり、腫瘍は液体腫瘍又は固形腫瘍であってもよい。いくつかの実施形態では、CARは、当該CARを発現するT系統細胞又はNK系統細胞のいずれかを活性化するのに好適である。いくつかの実施形態では、CARは、NK特異的シグナル伝達成分を含むNK細胞特異的である。特定の実施形態では、当該T細胞は、CAR発現iPSCから派生し、派生T系統細胞は、Tヘルパー細胞、細胞傷害性T細胞、メモリT細胞、制御性T細胞、ナチュラルキラーT細胞、 $\alpha\beta$ T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、又はそれらの組み合わせを含み得る。特定の実施形態では、当該NK細胞は、CAR発現iPSCに由来する。

30

【0130】

特定の実施形態では、上記抗原認識領域は、マウス抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダIg、単一可変新規抗原受容体(VNAR)、サメ重鎖のみ抗体(IgNAR)、キメラ抗体、組換え抗体、又はその抗体断片を含む。抗体断片の非限定的な例には、Fab、Fab'、F(ab')₂、F(ab')₃、Fv、一本鎖抗原結合断片(scFv)、(scFv)₂、ジスルフィド安定化Fv(dsFv)、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、単ドメイン抗原結合断片(sdAb、ナノボディ)、組換え重鎖のみ抗体(VHH)、及び抗体全体の結合特異性を維持するその他の抗体断片が含まれる。CARによって標的化され得る抗原の非限定的な例には、ADGRE2、炭酸脱水酵素IX(CALX)、CCR1、CCR4、がん胎児性抗原(CEA)、CD3、CD5、CD7、CD8、CD10、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、C

40

50

D 3 4、C D 3 8、C D 4 1、C D 4 4、C D 4 4 V 6、C D 4 9 f、C D 5 6、C D 7 0、C D 7 4、C D 9 9、C D 1 2 3、C D 1 3 3、C D 1 3 8、C D 2 6 9 (B C M A)、C D S、C L E C 1 2 A、サイトメガロウイルス (C M V) 感染細胞の抗原 (例えば、細胞表面抗原)、上皮糖タンパク質-2 (E G P-2)、上皮糖タンパク質-40 (E G P-40)、上皮細胞接着分子 (E p C A M)、E G F R v I I I、受容体チロシンタンパク質キナーゼ e r b-B 2、3、4、E G F I R、E G F R-V I I I、E R B B 葉酸結合タンパク質 (F B P)、胎児のアセチルコリン受容体 (A C h R)、葉酸受容体-a、ガングリオシド G 2 (G D 2)、ガングリオシド G 3 (G D 3)、ヒト上皮増殖因子受容体 2 (H E R 2)、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (h T E R T)、I C A M-1、インテグリン B 7、インターロイキン-13 受容体サブユニットアルファ-2 (I L-13 R α 2)、κ-軽鎖、キナーゼ挿入ドメイン受容体 (K D R)、ルイス A (C A 1 9 . 9)、ルイス Y (L e Y)、L 1 細胞接着分子 (L 1-C A M)、L I L R B 2、黒色腫抗原ファミリー A 1 (M A G E-A 1)、M I C A/B、ムチン 1 (M u c-1)、ムチン 1 6 (M u c-1 6)、メソテリン (M S L N)、N K C S I、N K G 2 D リガンド、c-M e t、がん-精巢抗原 N Y-E S O-1、腫瘍胎児性抗原 (h 5 T 4)、P R A M E、前立腺幹細胞抗原 (P S C A)、P R A M E 前立腺特異的膜抗原 (P S M A)、腫瘍関連糖タンパク質 7 2 (T A G-7 2)、T I M-3、T R B C I、T R B C 2、血管内皮増殖因子 R 2 (V E G F-R 2)、ウィルムス腫瘍タンパク質 (W T-1)、及び当該技術分野で既知の様々な病原体抗原が含まれる。病原体の非限定的な例には、疾患を引き起こす可能性のある、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫、及び原生動物が含まれる。

10

20

【0131】

いくつかの実施形態では、C A R の膜貫通ドメインは、C D 3 δ、C D 3 ε、C D 3 γ、C D 3 ζ、C D 4、C D 8、C D 8 a、C D 8 b、C D 2 7、C D 2 8、C D 4 0、C D 8 4、C D 1 6 6、4-1 B B、O X 4 0、I C O S、I C A M-1、C T L A-4、P D-1、L A G-3、2 B 4、B T L A、C D 1 6、I L 7、I L 1 2、I L 1 5、K I R 2 D L 4、K I R 2 D S 1、N K p 3 0、N K p 4 4、N K p 4 6、N K G 2 C、N K G 2 D、又は T 細胞受容体ポリペプチドの天然又は改変された膜貫通領域の全長又は少なくとも一部分を含む。

【0132】

いくつかの実施形態では、内部ドメイン (又は細胞内ドメイン) のシグナル伝達ペプチドは、C D 3 ζ、2 B 4、D A P 1 0、D A P 1 2、D N A M 1、C D 1 3 7 (4-1 B B)、I L 2 1、I L 7、I L 1 2、I L 1 5、N K p 3 0、N K p 4 4、N K p 4 6、N K G 2 C、又は N K G 2 D のポリペプチドの全長又は少なくとも一部分を含む。一実施形態では、C A R のシグナル伝達ペプチドは、C D 3 ζ の少なくとも 1 つの I T A M (i m m u n o r e c e p t o r t y r o s i n e-b a s e d a c t i v a t i o n m o t i f、免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ) に対して、少なくとも約 8 5 %、約 9 0 %、約 9 5 %、約 9 6 %、約 9 7 %、約 9 8 %、又は約 9 9 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

30

【0133】

特定の実施形態では、当該内部ドメインは、少なくとも 1 つの共刺激シグナル伝達領域を更に含む。当該共刺激シグナル伝達領域は、C D 2 7、C D 2 8、4-1 B B、O X 4 0、I C O S、P D-1、L A G-3、2 B 4、B T L A、D A P 1 0、D A P 1 2、C T L A-4、若しくは N K G 2 D、又はそれらの任意の組み合わせのポリペプチドの全長又は少なくとも一部分を含むことができる。

40

【0134】

一実施形態では、本明細書において提供される細胞に適用可能な C A R は、C D 2 8 から派生する共刺激ドメイン、及び配列番号 2 と少なくとも約 8 5 %、約 9 0 %、約 9 5 %、約 9 6 %、約 9 7 %、約 9 8 %、又は約 9 9 % 同一のアミノ酸配列によって表される C D 3 ζ の天然又は改変 I T A M 1 を含むシグナル伝達ドメインを含む。更なる実施形態では、C D 2 8 から派生する共刺激ドメイン及び C D 3 ζ の天然又は改変 I T A M 1 を含む

50

CARはまた、CD28から派生するヒンジドメイン及び膜貫通ドメインを含み、scFvはヒンジを介して膜貫通ドメインに接続され得、CARは、配列番号3と少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、配列同一性は、少なくとも80%である。いくつかの実施形態では、配列同一性は、少なくとも90%である。いくつかの実施形態では、配列同一性は、少なくとも95%である。いくつかの実施形態では、配列同一性は、100%である。

【化2】

配列番号2

RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNO
LYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGFLNELQKDKMAEAFSEIGMKGE
RRRGKGDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR

10

(153アミノ酸のCD28共刺激+CD3ζITAM)

【化3】

配列番号3

IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTV
FIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAY
QQGQNOQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGFLNELQKDKMAEAFSE
IGMKGERRRGKGDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR

20

(219アミノ酸のCD28ヒンジ+CD28 TM+CD28共刺激+CD3ζITAM)

【0135】

別の実施形態では、本明細書において提供される細胞に適用可能なCARは、NKG2Dから派生する膜貫通ドメイン、2B4から派生する共刺激ドメイン、及び配列番号4と少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%同一のアミノ酸配列によって表される天然又は改変CD3ζを含むシグナル伝達ドメインを含む。NKG2Dから派生する膜貫通ドメイン、2B4から派生する共刺激ドメイン、及び天然又は改変されたCD3ζを含むシグナル伝達ドメインを含む当該CARは、CD8ヒンジを更に含み得、そのような構造のアミノ酸配列は、配列番号5と少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%同一である。いくつかの実施形態では、配列同一性は、少なくとも80%である。いくつかの実施形態では、配列同一性は、少なくとも90%である。いくつかの実施形態では、配列同一性は、少なくとも95%である。いくつかの実施形態では、配列同一性は、100%である。

30

【化4】

配列番号4

SNLFVASWIAVMIIFRIGMAVAIFCCFFFPSSWRRKRKEKQSETSPKEFLTIIYEDVKDLKT
RRNHEQEQTFFGGGSTIYSMIQSQSSAPTSQEPAYTLYSLIQPSRKSGSRKRNHSPSFNS
TIYEVIGKSQPKAQNPRLSRKELENFDVYSRVKFSRSADAPAYKQGQNOQLYNELNLGR
EEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGL
YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

40

(263アミノ酸の、NKG2D TM+2B4+CD3ζ)

【化 5】

配列番号 5

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDSNLFVASWIAVMIIF
 RIGMAVAIFCCFFPSWRRKRKEKQSETSPKEFLTIIYEDVKDLKTRRNHEQEQTFFGGGS
 TIYSMIQSQSSAPTSQEPAYTLYSLIQPSRKSGSRKRNHSPSFNSTIYEVIGKSQPKAQN
 PARLSRKELFNFDVYSRVKFSRSADAPAYKQGQNLNLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPE
 MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDAL
 HMQALPPR

(308アミノ酸の、CD8ヒンジ+NKG2D IM+2B4+CD3ζ)

【0136】

非限定的なCAR戦略としては、一对の細胞内ドメインの二量体化によるヘテロ二量体
 条件的活性化CAR（例えば、米国特許第9,587,020号を参照されたい）；スプ
 リットCAR（CARを生成するための抗原結合、ヒンジ、及び内部ドメインの相同組換
 え（例えば、米国特許出願公開第2017/0183407号を参照されたい））；それ
 ぞれ抗原結合ドメイン及びシグナル伝達ドメインに接続された2つの膜貫通ドメイン間の
 非共有結合を可能にする多重鎖CAR（例えば、米国特許出願公開第2014/0134
 142号を参照されたい）；二重特異性抗原結合ドメインを有するCAR（例えば、米国
 特許第9,447,194号を参照されたい）、又は同じ若しくは異なる抗原若しくはエ
 ピトープを認識する一对の抗原結合ドメインを有するCAR（例えば、米国特許第8,4
 09,577号を参照されたい）、又はタンデムCAR（例えば、Hegde et al., J Clin Invest. 2016;126(8):3036-3052）；
 誘導性CAR（例えば、米国特許出願公開第2016/0046700号、同第2016
 /0058857号、及び同第2017/0166877号を参照されたい）；スイッチ
 可能なCAR（例えば、米国特許出願公開第2014/0219975号を参照されたい
 ）；並びに当該技術分野で既知の任意の他の設計が更に含まれる。

【0137】

したがって、本発明の態様は、ゲノム操作されたiPSCを分化させることから得られ
 る派生細胞であって、iPSC及び派生細胞の両方が、サイトカインシグナル伝達複合体
 及び1つ以上のCARを、追加の改変されたモダリティとともに含む、派生細胞を提供す
 る。本出願において更に提供されるのは、シグナル伝達複合体、必要に応じてCAR及び
 TCR^{neg}と外因性CD16の一方又は両方を少なくとも有する、ソーティングされた
 単一細胞及び増殖されたクローン操作iPSCを含むマスター細胞バンクであり、この細
 胞バンクは、更なるiPSC操作のためのプラットフォームと、既製の操作された均質な
 細胞療法製品を製造するための再生可能な供給源と、を提供する。

【0138】

アルファベータT細胞受容体(αβTCR)は、免疫応答に必須の抗原特異的受容体
 であり、αβTリンパ球の細胞表面に存在する。ペプチド-主要組織適合性複合体(pep
 tide-major histocompatibility complex、pMHC)へのTCRαβの結合は、
 TCR-CD3細胞内活性化、多数のシグナル伝達分子の動員、並びにシグナル伝達経路
 の分岐及び統合を開始し、遺伝子発現並びにT細胞増殖及び機能獲得に重要な転写因子の
 動員をもたらす。T細胞の直接編集によって、又は改変された派生T系統細胞を得るため
 の供給源としてのゲノムiPSC編集及び分化によってのいずれかで、TCRアルファ又
 はTCRベータの定常領域(TRA C又はTRBC)を破壊することは、TCR^{neg}T
 細胞を産生するためのアプローチのうちの1つである。TCR^{neg}T細胞は、同種異系
 養子細胞療法において使用される場合、アロ反応性が減少し、GvHD(Graft v
 ersus Host Disease、移植片対宿主病)を予防することができる。更
 なる実施形態では、サイトカインシグナル伝達複合体及びCARを含むiPSC及びその
 派生エフェクター細胞は、TCR定常領域(TRA C又はTRBC)に挿入されたCAR
 を有し、TCRノックアウトをもたらす、CAR発現を内因性TCRプロモータの制御下
 に置く。追加の挿入部位には、AAVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HT

RP、H11、GAPDH、RUNX1、B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLR5、CIITA、RFXANK、RFX5、RFXAP、NKG2A、NKG2D、CD25、CD38、CD44、CD54、CD56、CD58、CD69、CD71、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、及びTIGITが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、操作されたiPSCに由来するIL/TCR^{neg}/CAR/T細胞は、CD16（F176V及び/又はS197P）に天然な、又はCD64に由来する外部ドメイン、並びに天然又は非天然の膜貫通、刺激、及びシグナル伝達ドメインを有する外因性CD16を更に含む。別の実施形態では、iPSC及びその派生NK細胞は、サイトカインシグナル伝達複合体及びCARを含み、CARをNKG2A遺伝子座又はNKG2D遺伝子座に挿入する場合、NKG2A又はNKG2Dノックアウトをもたらし、それにより、CAR発現を内因性NKG2A又はNKG2Dプロモータの制御下に置く。

10

【0139】

CARと外因性サイトカイン及び/又はサイトカイン受容体シグナル伝達（シグナル伝達複合体、又は「IL」）の両方を含むiPSC及びそれからの派生細胞では、CAR及びILは、別々の構築物内で発現され得るか、CAR及びILの両方を含むバイシストロン性構築物内で共発現され得る。いくつかの更なる実施形態では、IL7サイトカインシグナル伝達複合体は、図1の構築物設計のうちのいずれかによって表される形態であり、自己切断2Aコード配列を介してCAR発現構築物の5'又は3'末端のいずれかに連結され得る。したがって、IL7サイトカインシグナル伝達複合体及びCARは、単一のオープンリーディングフレーム（open reading frame、ORF）内であってもよい。一実施形態では、IL7サイトカインシグナル伝達複合体は、図1の設計1を含み、CAR-2A-IL又はIL-2A-CAR構築物に更に含まれる。別の実施形態では、CAR-2A-IL又はIL-2A-CAR構築物は、図1の設計2に示されるようなIL7サイトカインシグナル伝達複合体を含む。更に別の実施形態では、CAR-2A-IL又はIL-2A-CAR構築物は、図1の設計3に示されるようなIL7サイトカインシグナル伝達複合体を含む。CAR-2A-IL7又はIL7-2A-CARが発現されている場合、自己切断2Aペプチドは、発現されたCAR及びIL7が解離することを可能にし、次いで、解離したIL7は、膜貫通ドメインが細胞膜に固定された状態で細胞表面に提示され得る。CAR-2A-IL7又はIL7-2A-CARのバイシストロン性設計により、タイミングと数量の両方で、例えば、単一のORFの発現のための誘導可能なプロモータ又は時間的若しくは空間的特異性を持つプロモータなどの、組み込むために選択され得る同一の制御メカニズムの下で、CARとIL7サイトカインシグナル伝達複合体の協調された発現を可能にする。自己切断ペプチドは、口蹄疫ウイルス（foot-and-mouth disease virus、FMDV）、ウマ鼻炎Aウイルス（equine rhinitis A virus、ERAV）、Thosea asignaウイルス（Thosea asigna virus、TaV）、及びブタテシオウイルス1（porcine tescho virus-1、PTV-1）（Donnelly, ML, et al., J. Gen. Virol., 82, 1027-101 (2001) ; Ryan, MD, et al., J. Gen. Virol., 72, 2727-2732 (2001)）などのアフトウイルス属、並びにタイロウイルス（例えば、タイラーマウス脳脊髄炎ウイルス）及び脳心筋炎ウイルスなどのカルジオウイルス属を含む、ピコルナウイルス科（Picornaviridae virus family）のメンバーにおいて見出される。FMDV、ERAV、PTV-1、及びTaVに由来する2Aペプチドは、それぞれ「F2A」、「E2A」、「P2A」、及び「T2A」と称されることもある。

20

30

40

【0140】

IL7について本明細書に開示されるバイシストロン性CAR-2A-IL又はIL-2A-CARは、本明細書において提供される任意の他のサイトカイン、例えばIL2、IL4、IL6、IL9、IL10、IL11、IL12、IL15、IL18、及びIL21の発現も企図される。いくつかの実施形態では、バイシストロン性CAR-2A-IL又はIL-2A-CARは、IL2、IL4、IL7、IL9、及びIL21のうち

50

の1つ以上の発現のためのものである。いくつかの実施形態では、IL7の細胞表面発現及びシグナル伝達は、図1の設計1～3のうちのいずれかに示される構築物を介する。いくつかの他の実施形態では、IL7の細胞表面発現及びシグナル伝達は、共通受容体及び／又はサイトカイン特異的受容体のいずれかを使用する、図1の設計1、2、又は3に示される構築物を介し得る。

【0141】

CARと、IL7を含むがこれに限定されない外因性サイトカイン及び／又はサイトカイン受容体シグナル伝達との両方を含むiPSC及びそれからの派生細胞において、iPSC及び派生細胞は、CFR、TCR^{neg}、及び／又は外因性CD16のうちの1つ以上を更に含み得る。

10

【0142】

3. 細胞表面CFR（キメラ融合受容体）

本明細書において提供されるCFRの設計は、エフェクター細胞が、CFRを発現するエフェクター細胞の増強された治療特性のために選択されたアゴニストとのCFR結合を介して適切なシグナル伝達カスケードを開始することを可能にする。このような増強されたエフェクター細胞治療特性としては、増加された活性化及び細胞傷害性、獲得された二重標的化能力、延長された持続性、改善された輸送及び腫瘍浸透、腫瘍部位にバイスタンダー免疫細胞をプライミングする、活性化させる又は動員する増強された能力、免疫抑制に抵抗する増強された能力、腫瘍抗原エスケープをレスキューする改善された能力、並びに／又は制御された細胞シグナル伝達フィードバック、代謝及びアポトーシスが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0143】

したがって、様々な態様では、iPSC及び派生細胞は、内部ドメインに作動可能に接続された膜貫通ドメインに融合した外部ドメインを一般に含むCFRを更に含み得、CFRは、外部ドメイン、膜貫通、又は内部ドメインのいずれにおいても、ER（小胞体）保持シグナルもエンドサイトーシスシグナルも有しない。CFRの外部ドメインは、エンゲージャに結合するとシグナル伝達を開始するためのものであり、膜貫通ドメインは、CFRの膜固定のためのものであり、内部ドメインは、腫瘍殺傷、持続性、移動性、分化、TMEの打ち消し、及び／又は制御されたアポトーシスを含むがこれらに限定されない細胞治療特性を増強するために選択されるシグナル伝達経路を調節する（すなわち、活性化又は不活性化させる）少なくとも1つのシグナル伝達ドメインを含む。CFRからのER保持シグナルの排除は、発現された場合に、それ自体によるCFR細胞表面提示を可能にし、CFRからのエンドサイトーシスシグナルの排除は、CFR内在化及び表面下方制御を減少させる。ER保持もエンドサイトーシスシグナルも有しないドメイン成分を選択するか、又は分子工学ツールを使用してCFRの選択された成分からER保持若しくはエンドサイトーシスシグナルを除去することが重要である。加えて、本明細書において提供されるCFRのドメインはモジュール式であり、これは、CFRの所与の内部ドメインについては、CFRの外部ドメインが、当該CFRとともに使用される選択されたアゴニスト、例えば抗体、BiTE、TRiKE、又は任意の他のタイプのエンゲージャの結合特異性に依拠して切り替え可能であり、所与の外部ドメイン及び特異性マッチングアゴニストについては、内部ドメインが、活性化される所望のシグナル伝達経路に依拠して切り替え可能であることを意味する。

30

40

【0144】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるCFRの外部ドメインは、細胞-細胞シグナル伝達又は相互作用に関与するタンパク質の細胞外部分の全長又は部分長を含む。いくつかの実施形態では、CFRの外部ドメインは、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD28、CD5、CD16、CD64、CD32、CD33、CD89、NKG2C、NKG2D、又はそれらの任意の機能的バリエーション、若しくは組み合わせ及びキメラの細胞外部分の全長又は部分長を含む。いくつかの実施形態では、CFRの外部ドメインは、少なくともアゴニスト、例えば、CFRの外部ドメインに含まれるエピトープに特異的な結

50

合ドメインを含む抗体又はエンゲージャ（例えば、B i T E、B i K E又はT r i K E）によって認識される。いくつかの実施形態では、C F R発現細胞とともに使用される抗体又はエンゲージャは、C F Rの少なくとも1つの細胞外エピトープに結合し、C F Rは、C D 3 ε、C D 3 γ、C D 3 δ、C D 2 8、C D 5、C D 1 6、C D 6 4、C D 3 2、C D 3 3、C D 8 9、N K G 2 C、N K G 2 D、又はそれらの任意の機能的バリエーション若しくは組み合わせた／キメラ形態の細胞外部分の全長又は部分長を含む。いくつかの実施形態では、エンゲージャは、B 7 H 3、B C M A、C D 1 0、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 2、C D 2 4、C D 3 0、C D 3 3、C D 3 4、C D 3 8、C D 4 4、C D 7 9 a、C D 7 9 b、C D 1 2 3、C D 1 3 8、C D 1 7 9 b、C E A、C L E C 1 2 A、C S - 1、D L L 3、E G F R、E G F R v I I I、E P C A M、F L T - 3、F O L R 1、F O L R 3、G D 2、g p A 3 3、H E R 2、H M 1 . 2 4、L G R 5、M S L N、M C S P、M I C A / B、P S M A、P A M A、P - カドヘリン、若しくはR O R 1を含む少なくとも1つの腫瘍抗原を認識する。特定の実施形態では、E R保持シグナル及びエンドサイトーシスシグナルの両方が存在しないか、又は遺伝子操作法を使用してC F R外部ドメインから除去若しくは排除される。

10

20

30

40

50

【0145】

いくつかの実施形態では、C F Rの外部ドメインは、C D 3ベースのアゴニストを利用するために、C D 3 ε、C D 3 γ、C D 3 δ又はそれらの任意の機能的バリエーション若しくは組み合わせ／キメラ形態の細胞外部分の全長又は部分長を含む。抗体又はエンゲージャを含むがこれらに限定されない非限定的な例示的C D 3ベースのアゴニストは、C D 3 × C D 1 9、C D 3 × C D 2 0、C D 3 × C D 3 3、ブリナツモマブ、カツマキソマブ、エルツマキソマブ、R O 6 9 5 8 6 8 8、A F M 1 1、M T 1 1 0 / A M G 1 1 0、M T 1 1 1 / A M G 2 1 1 / M E D I - 5 6 5、A M G 3 3 0、M T 1 1 2 / B A Y 2 0 1 0 1 1 2、M O R 2 0 9 / E S 4 1 4、M G D 0 0 6 / S 8 0 8 8 0、M G D 0 0 7、及び／又はF B T A 0 5を含む。いくつかの実施形態では、C F Rの外部ドメインは、N K G 2 Cベースのアゴニストを利用するために、N K G 2 C若しくはその任意の機能的バリエーションの細胞外部分の全長又は部分長を含む。抗体又はエンゲージャを含むがこれらに限定されない非限定的な例示的N K G 2 Cベースのアゴニストは、N K G 2 C - I L 1 5 - C D 3 3、N K G 2 C - I L 1 5 - C D 1 9、及び／又はN K G 2 C - I L 1 5 - C D 2 0を含む。いくつかの他の実施形態では、C F Rの外部ドメインは、C D 2 8ベースのアゴニストを利用するために、C D 2 8若しくはその任意の機能的バリエーションの細胞外部分の全長又は部分長を含む。抗体又はエンゲージャを含むがこれらに限定されない非限定的な例示的C D 2 8ベースのアゴニストは、1 5 E 8、C D 2 8 . 2、C D 2 8 . 6、Y T H 9 1 3 . 1 2、3 7 . 5 1、9 D 7 (T G N 1 4 1 2)、5 . 1 1 A 1、A N C 2 8 . 1 / 5 D 1 0、及び／又は3 7 4 0 7のうちの少なくとも1つを含む。

【0146】

いくつかの実施形態では、C F Rの外部ドメインは、C D 1 6又はC D 6 4ベースのアゴニストを利用するために、C D 1 6、C D 6 4、又はそれらの任意の機能的バリエーション若しくは組み合わせ／キメラ形態の細胞外部分の全長又は部分長を含む。抗体又はエンゲージャを含むがこれらに限定されない非限定的な例示的C D 1 6又はC D 6 4ベースのアゴニストは、I g G抗体、又はC D 1 6若しくはC D 6 4ベースのエンゲージャを含む。I g G抗体のF c部分がC D 1 6又はC D 6 4ベースのC F Rに結合すると、それは、C F Rの内部ドメインに含まれるシグナル伝達ドメインによって付与される他の増強された治療特性とともに、C F R発現細胞における抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（A D C C）を活性化させる。非限定的な例示的C D 1 6又はC D 6 4ベースのアゴニスト（抗体又はエンゲージャが挙げられるが、これらに限定されない）は、C D 1 6 × C D 3 0、C D 6 4 × C D 3 0、C D 1 6 × B C M A、C D 6 4 × B C M A、C D 1 6 - I L - E P C A M若しくはC D 6 4 - I L - E P C A M、C D 1 6 - I L - C D 3 3、又はC D 6 4 - I L - C D 3 3のうちの少なくとも1つを含み、T r i K Eに含まれる「I L」は、I L 2、I L 4、I L 6、I L 7、I L 9、I L 1 0、I L 1 1、I L 1 2、I L 1 5、I L 1 8

、IL21、又はそれらの任意の機能的バリエーション若しくは組み合わせ／キメラ形態を含む少なくとも1つのサイトカインの全て又は一部分を含む。

【0147】

一般に、膜貫通ドメインは、生体膜（例えば、細胞又は細胞小胞の膜）のリン脂質二重層などの膜において熱力学的に安定である三次元タンパク質構造である。したがって、いくつかの実施形態では、本発明のCFRの膜貫通ドメインは、単一のアルファヘリックス、いくつかの膜貫通アルファヘリックスの安定な複合体、膜貫通ベータバレル、グラミシジンAのベータヘリックス、又はそれらの任意の組み合わせを含む。様々な実施形態では、CFRの膜貫通ドメインは、膜内にある「膜貫通タンパク質」又は「膜タンパク質」の全て又は一部分を含む。本明細書で使用されるとき、「膜貫通タンパク質」又は「膜タンパク質」は、膜に及び／又は膜内に位置するタンパク質である。本発明のCFRに含まれる膜貫通ドメインを提供するのに好適な膜貫通タンパク質の例としては、受容体、リガンド、免疫グロブリン、グリコホリン、又はそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、CFRに含まれる膜貫通ドメインは、CD3ε、CD3γ、CD3δ、CD3ζ、CD4、CD8、CD8a、CD8b、CD27、CD28、CD40、CD84、CD137、CD166、FcεRIγ、4-1BB、OX40、ICOS、ICAM-1、CTLA-4、PD-1、LAG-3、2B4、BTLA、CD16、IL7、IL12、IL15、KIR2DL4、KIR2DS1、NKG2C、NKG2D、NKp30、NKp44、NKp46、NKG2C、NKG2D、T細胞受容体（例えば、TCRα及び／又はTCRβ）、ニコチン性アセチルコリン受容体、GABA受容体、又はそれらの組み合わせの膜貫通ドメインの全て又は一部分を含む。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、IgG、IgA、IgM、IgE、IgD、又はそれらの組み合わせの膜貫通ドメインの全部又は一部分を含む。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、グリコホリンA、グリコホリンD、又はそれらの組み合わせの膜貫通ドメインの全部又は一部分を含む。CFR膜貫通ドメインの特定の実施形態では、ER保持及びエンドサイトーシスシグナルの両方が存在しないか、又は遺伝子操作を使用して除去される。様々な実施形態では、ER保持シグナル及びエンドサイトーシスシグナルの両方が存在しないか、又は遺伝子操作法を使用してCFR膜貫通ドメインから除去若しくは排除される。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、CD28、CD8、又はCD4の膜貫通ドメインの全部又は一部分を含む。

【0148】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のCFRの内部ドメインは、選択された細胞内シグナル伝達経路を活性化する少なくとも1つのシグナル伝達ドメインを含む。CFR内部ドメインの様々な実施形態では、ER保持及びエンドサイトーシスシグナルの両方が存在しないか、又は遺伝子操作法を使用してそれから除去若しくは排除される。いくつかの実施形態では、内部ドメインは、少なくとも細胞傷害性ドメインを含む。いくつかの他の実施形態では、内部ドメインは、必要に応じて、細胞傷害性ドメインに加えて、共刺激ドメイン、持続性シグナル伝達ドメイン、死誘導シグナル伝達ドメイン、腫瘍細胞制御シグナル伝達ドメイン、又はそれらの任意の組み合わせのうちの1つ以上を含み得る。いくつかの実施形態では、CFRの細胞傷害性ドメインは、CD3ζ、2B4、DAP10、DAP12、DNAM1、CD137（4-1BB）、IL21、IL7、IL12、IL15、NKp30、NKp44、NKp46、NKG2C、又はNKG2Dのポリペプチドの少なくとも全長又は一部分を含む。一実施形態では、CFRの細胞傷害性ドメインは、CD3ζの少なくとも1つのITAM（免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ）に対して、少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、CFRの細胞傷害性ドメインは、改変CD3ζを含む（例えば、国際公開第2019/133969号を参照されたい）。

【0149】

いくつかの実施形態では、CFRは、細胞傷害性シグナル伝達ドメインに加えて共刺激

ドメインを更に含む内部ドメインを含む。CFRでの使用に好適な共刺激ドメインは、CD2、CD27、CD28、CD40L、4-1BB、OX40、ICOS、PD-1、LAG-3、2B4、BTLA、DAP10、DAP12、CTLA-4、若しくはNKGD2、又はそれらの任意の組み合わせのポリペプチドの全長又は少なくとも一部分を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、CFRの共刺激ドメインは、CD28、4-1BB、CD27、CD40L、ICOS、CD2、若しくはそれらの組み合わせのポリペプチドの全長又は少なくとも一部分を含む。いくつかの実施形態では、CFRは、CD28の共刺激ドメインと、CD3ζ（「28ζ」とも称される）の細胞傷害性ドメインと、を含む内部ドメインを含む。いくつかの実施形態では、CFRの内部ドメインの-CD28-CD3ζ部分は、配列番号2と少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%同一のアミノ酸配列によって表される。

10

【0150】

いくつかの実施形態では、CFRは、細胞傷害性シグナル伝達ドメイン及び／又は共刺激ドメインに加えて持続性シグナル伝達ドメインを更に含む内部ドメインを含む。CFRでの使用に好適な持続性シグナル伝達ドメインとしては、IL7R、IL15R、IL18R、IL12R、IL23R、又はそれらの組み合わせなどのサイトカイン受容体の内部ドメインの全部又は一部が挙げられるが、これらに限定されない。加えて、EGFRなどの受容体チロシンキナーゼ（RTK）の内部ドメインは、腫瘍細胞制御を提供するか、又はFASなどの腫瘍壊死因子受容体（TNFR）は、制御された細胞死を提供する。

20

【0151】

様々な実施形態では、例示的なCFRは、CD3サブユニットCD3ε、CD3δ、若しくはCD3γ、又はCD28の少なくとも1つの細胞外部分と、配列番号6、配列番号7、及び配列番号8と少なくとも約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%同一のアミノ酸配列によってそれぞれ表される、CD28、CD8、又はCD4の膜貫通ドメインと、外部ドメイン、膜貫通ドメイン、及び／又は内部ドメイン中のER保持モチーフ及び／又はエンドサイトーシスモチーフが排除された、CD3ε、CD3γ、CD3δ、又はCD28の内部ドメインと、を含む。例えば、CD3ε野生型内部ドメイン配列（配列番号9）へのR183S変異の導入は、ER保持モチーフを排除し、配列番号10と少なくとも約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%同一のアミノ酸配列によって表されるCD3ε内部ドメインバリエーションをもたらす。CD3δ野生型内部ドメイン配列（配列番号11）へのL142A及びR169A変異の導入は、WT配列からエンドサイトーシスモチーフ及びER保持モチーフを排除し、配列番号12と少なくとも約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%同一のアミノ酸配列によって表されるCD3δ内部ドメインバリエーションをもたらす。更に、CD3γ野生型内部ドメイン配列（配列番号13）へのL131A及びR158A変異の導入は、WT配列からER保持モチーフを排除し、配列番号14と少なくとも約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%同一のアミノ酸配列によって表されるCD3γ内部ドメインバリエーションをもたらす。CD28野生型内部ドメインは、ER保持モチーフもエンドサイトーシスモチーフも有さず、配列番号15と少なくとも約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%同一のアミノ酸配列によって表される。様々な実施形態では、本明細書において提供されるCFRは、CFR外部ドメインのN末端にシグナルペプチドを更に含む。非限定的な例示的シグナルペプチドとしては、配列番号16と少なくとも約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%同一のアミノ酸配列によって表されるものが挙げられる。

30

40

【化6】

配列番号6

FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV

(TM-CD28)

50

【化 7】

配列番号 7

IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT

(TM- CD8)

【化 8】

配列番号 8

MALIVLGGVAGLLLFIGLGIFF

(TM- CD4)

10

【化 9】

配列番号 9

KNRKAKAKPVTRGAGAGGRQGRQNKERPPFVNPDPYEPKRGQRDLYSGLNQRRRI

(endo- CD3ε WT)

【化 10】

配列番号 10

KNRKAKAKPVTRGAGAGGRQGRQNKERPPFVNPDPYEPKRGQRDLYSGLNQSRI(endo- CD3ε_{mut})

20

【化 11】

配列番号 11

GHETGRLSGAADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK

(endo- CD3δ WT)

30

【化 12】

配列番号 12

GHETGRLSGAADTQAAALRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWAANK(endo- CD3δ_{mut})

【化 13】

配列番号 13

GQDGVRQSRASDKQTLLPNDQLYQPLKDREDDQYSHLQGNQLRRN

(endo- CD3γ WT)

40

【化 14】

配列番号 14

GQDGVRQSRASDKQTALPNDQLYQPLKDREDDQYSHLQGNQLARN(endo- CD3γ_{mut})

50

【化 1 5】

配列番号 1 5

RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS

(endo- CD28)

【化 1 6】

配列番号 1 6

MLRLLLALNLFPSIQVT

10

【0 1 5 2】

いくつかの例示的な実施形態では、CFRは、1つのCD3サブユニットの外部ドメインを含み、いくつかの他の実施形態では、CFRは、CD3 δ 又はCD3 γ （それぞれ、配列番号17又は配列番号18）の外部ドメインと連結されたCD3 ε の外部ドメインを含む単鎖ヘテロ二量体外部ドメインを含む。単鎖ヘテロ二量体外部ドメインにおけるリンカーのタイプ及び長さは、様々であり得る。

【化 1 7】

配列番号 1 7

DGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLS
LKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDGSADDAKKDAAKKDDAKK
DDAKKDGSKFIPIEELEDRVFVNCNTSITWVEGTGVTLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCN
GTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPATVA

20

(3 ε —リンカー—3 δ ; リンカーの配列及び長さは様々であり得る。)

【化 1 8】

配列番号 1 8

DGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSL
KEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDGSADDAKKDAAKKDDAKKDD
AKKDGSKSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAAKNITWFKDGKMIGFLTEDKKKWNLGSNA
KDPRGMYQCKGSQNKSKPLQVYRMCQNCIELNAATIS

30

(3 ε —リンカー—3 γ ; リンカーの配列及び長さは様々であり得る。)

【0 1 5 3】

本明細書に記載される様々な構築物中の細胞表面発現CFR（CD3ベースのCFRを含み、cs-CD3とも呼ばれる）は、選択された結合特異性を有する分子と結合するための細胞表面トリガー受容体として機能することができ、この分子には、抗体、エンゲージャ、及び／又はCARが含まれる。本発明のシグナル伝達複合体、並びに必要に応じてCAR及び／又は1つ以上のCFRをコードするポリヌクレオチドを含む細胞は、ヒト細胞及び非ヒト細胞、多能性細胞若しくは非多能性細胞、免疫細胞若しくは免疫調節細胞、APC（antigen presenting cell、抗原提示細胞）若しくはフィーダ細胞、初代供給源（例えば、PMBC）由来の細胞、又は培養若しくは操作された細胞（例えば、細胞株、細胞、及び／又はiPSCから分化した派生細胞）由来の細胞を含む、任意のタイプの細胞であり得る。いくつかの実施形態において、シグナル伝達複合体、並びに必要に応じてCAR及び／又は1つ以上のCFRをコードするポリヌクレオチドを含む細胞は、初代若しくは派生CD34細胞、造血幹前駆細胞、造血多能性前駆細胞、T細胞前駆体、NK細胞前駆体、T系統細胞、NKT系統細胞、NK系統細胞、又はB系統細胞を含む。いくつかの実施形態では、サイトカインシグナル伝達複合体並びに必要に応じてCAR及び／又は1つ以上のCFRをコードするポリヌクレオチドを含む派生細胞は、サイトカインシグナル伝達複合体、並びに必要に応じてCAR及び／又は1つ以上のCFRをコードするポリヌクレオチドを含むiPSCを分化させることから得られるエ

40

50

フェクター細胞である。いくつかの実施形態では、サイトカインシグナル伝達複合体並びに必要な応じてCAR及び／又は1つ以上のCFRをコードするポリヌクレオチドを含む派生エフェクター細胞は、iPSCから派生エフェクター細胞を生成した後に、シグナル伝達複合体、並びに必要な応じてCAR及び／又は1つ以上のCFRを組み込むように派生エフェクター細胞を操作することから得られる。

【0154】

更に提供されるように、シグナル伝達複合体、並びに必要な応じてCAR及び／又は1つ以上のCFRをコードするポリヌクレオチドを含む細胞又はその集団は、本明細書に記載されるTCRノックアウト、CD16ノックイン、B2Mノックアウト又はノックダウン、CIITAノックアウト又はノックダウン、HLA-G又は非切断性HLA-Gの導入された発現、CD38ノックアウト、及び追加の操作されたモダリティ、のうちの1つ以上を更に含み得る。本出願において更に提供されるのは、IL7RF、CAR、CFR、TCR^{neg}、CD16、CD38陰性、追加の外因性サイトカイン又はその融合バリエーション、B2M^{-/-}、CIITA^{-/-}、HLA-G、及びそれらの任意の組み合わせを含むがこれらに限定されない、本明細書において提供されるような少なくとも1つの表現型を有するソーティングされた単一細胞及び増殖されたクローン操作iPSCを含むマスター細胞バンクであり、この細胞バンクは、更なるiPSC操作のためのプラットフォームと、組成が明確かつ均一であり、費用効果の高い様式で大規模に大量生産することができる、既製の操作された均質なエフェクター細胞を製造するための再生可能な供給源と、を提供する。

【0155】

4. CD16ノックイン

CD16は、2つのアイソフォーム、Fc受容体FcγRIIIa (CD16a; NM_000569.6) 及びFcγRIIIb (CD16b; NM_000570.4) として同定されている。CD16aは、標的細胞に付着した単量体IgGに結合してNK細胞を活性化し、抗体依存性細胞傷害(ADCC)を促進する、NK細胞によって発現された膜貫通タンパク質である。CD16bはヒト好中球によって排他的に発現する。本明細書で使用されるとき、「高親和性CD16」、「非切断性CD16」、又は「高親和性非切断性CD16」は、様々なCD16バリエーションを指す。野生型CD16は親和性が低く、NK細胞が活性化されると、白血球上の様々な細胞表面分子の細胞表面密度を調節するタンパク質分解切断プロセスである外部ドメインシェディングを含む下方制御に供される。F176V(いくつかの刊行物ではF158Vとも呼ばれる)は、高親和性を有する例示的なCD16多型アレル／バリエーションであり、一方、S197Pバリエーションは、CD16の遺伝子操作された非切断性バージョンの一例である。F176VとS197Pの両方を含む操作されたCD16バリエーションは、高い親和性を有し、非切断性であり、これは、国際公開第2015/148926号により詳細に記載されており、その完全な開示は、参照により本明細書に組み込まれる。加えて、CD16の外部ドメインがCD64の外部ドメインの少なくとも一部分で本質的に置き換えられたキメラCD16受容体は、ADCCを実行することができるCD16受容体の望ましい高親和性と切断不可能な特質も実現することができる。いくつかの実施形態では、キメラCD16の置換外部ドメインは、CD64(UniProtKB_P12314又はそのアイソフォーム又は多型バリエーション)のEC1、EC2、及びEC3エクソンのうちの1つ以上を含む。

【0156】

したがって、細胞に導入された外因性CD16の様々な実施形態は、機能的CD16バリエーション及びそのキメラ受容体を含む。いくつかの実施形態では、機能的CD16バリエーションは、高親和性の非切断性CD16受容体(hnCD16)である。いくつかの実施形態では、hnCD16は、F176VとS197Pの両方を含み、いくつかの実施形態では、F176Vを含み、切断領域が排除されている。いくつかの他の実施形態では、hnCD16は、例示的な配列である、各々がCD64外部ドメインの少なくとも一部分を含む配列番号19、20、及び21のうちのいずれかと比較されるとき、少なくとも50%

、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、100%、又はその間の任意のパーセンテージの同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、配列同一性は、少なくとも80%である。いくつかの実施形態では、配列同一性は、少なくとも90%である。いくつかの実施形態では、配列同一性は、少なくとも95%である。いくつかの実施形態では、配列同一性は、100%である。配列番号19、20、及び21は、それぞれ、配列番号22～24によってコードされる。本明細書及び本出願全体で使用されるように、2つの配列間の同一性パーセントは、2つの配列の最適なアライメントのために導入する必要のあるギャップの数と各ギャップの長さを考慮して、配列によって共有される同一位置の数の関数（すなわち、同一性%＝同一位置の数／位置の総数×100）である。配列の比較と2つの配列間の同一性パーセントの決定は、当該技術分野で認識されている数学的アルゴリズムを使用して実行され得る。

10

【化19】

配列番号19

MWELTTLLLLWVPVDGQVDTTKAVITLQPPWVSVFQEETVTLHCEVLHLPGSSSTQWFLNG
TATQTSTPSYRITSASVNDSGEYRCQRGLSGRSDPIQLEIHRGWLLLQVSSRVFTEGEPL
ALRCHAWKDKLVYNVLYYRNGKAFKFFHWNSNLTILKTNISHNGTYHCSGMGKHRYTSAG
ISVTVKELFPAPVLNASVTSPLLEGNLVTLSCETKLLLQRPGLQLYFSFYMGSKTLRGRN
TSSEYQILTARREDSGLYWCEAATEDGNVLKRSPELELQVLGLQLPTPVWFHYQVSFCLV
MVLLFAVDTGLYFSVKTNIRSSTRDWKDHKFKWRKDPQDK

(340アミノ酸のCD64ドメインベースのコンストラクション、CD16TM、CD16ICD)

20

【化20】

配列番号20

MWELTTLLLLWVPVDGQVDTTKAVITLQPPWVSVFQEETVTLHCEVLHLPGSSSTQWFLNGT
ATQTSTPSYRITSASVNDSGEYRCQRGLSGRSDPIQLEIHRGWLLLQVSSRVFTEGEPLAL
RCHAWKDKLVYNVLYYRNGKAFKFFHWNSNLTILKTNISHNGTYHCSGMGKHRYTSAGISV
TVKELFPAPVLNASVTSPLLEGNLVTLSCETKLLLQRPGLQLYFSFYMGSKTLRGRNTSSE
YQILTARREDSGLYWCEAATEDGNVLKRSPELELQVLGLFFPPGYQVSFCLVMVLLFAVDT
GLYFSVKTNIRSSTRDWKDHKFKWRKDPQDK

(336アミノ酸のCD64エクソンベースのコンストラクション、CD16TM、CD16ICD)

30

【化21】

配列番号21

MWELTTLLLLWVPVDGQVDTTKAVITLQPPWVSVFQEETVTLHCEVLHLPGSSSTQWFLNG
TATQTSTPSYRITSASVNDSGEYRCQRGLSGRSDPIQLEIHRGWLLLQVSSRVFTEGEPL
ALRCHAWKDKLVYNVLYYRNGKAFKFFHWNSNLTILKTNISHNGTYHCSGMGKHRYTSAG
ISVTVKELFPAPVLNASVTSPLLEGNLVTLSCETKLLLQRPGLQLYFSFYMGSKTLRGRN
TSSEYQILTARREDSGLYWCEAATEDGNVLKRSPELELQVLGFFPPGYQVSFCLVMVLLF
AVDTGLYFSVKTNIRSSTRDWKDHKFKWRKDPQDK

(335アミノ酸のCD64エクソンベースのコンストラクション、CD16TM、CD16ICD)

40

【化 2 2】

配列番号 2 2

```

cttgagagaca acatgtgggtt cttgacaaact ctgctccttt gggttccagt tgatggggcaa
gtggacacca caaaggcagt gatcactttg cagcctccat gggtcagcgt gttccaagag
gaaaccgtaa ccttgcattg tgaggtgctc catctgcctg ggagcagctc tacacagtgg
tttctcaatg gcacagccac tcagacctcg acccccagct acagaatcac ctctgccagt
gtcaatgaca gtggtgaata caggtgccag agaggtctct cagggcgaag tgaccccata
cagctggaaa tccacagagg ctggctacta ctgcaggctc ccagcagagt cttcacggaa
ggagaacctc tggccttgag gtgtcatgcg tggaaaggata agctgggtga caatgtgctt
tactatcgaa atggcaaagc ctttaagttt ttccactgga attctaacct caccattctg
aaaaccaaca taagtcaaca tggcacctac cattgctcag gcatgggaaa gcatcgctac
acatcagcag gaatatctgt cactgtgaaa gagctatttc cagctccagt gctgaatgca
tctgtgacat cccactcct ggaggggaat ctggtcaccc tgagctgtga aacaaagttg
ctcttgacga ggcttggtt gcagctttac ttctccttct acatgggcag caagaccctg
cgaggcagga acacatcctc tgaataccaa atactaactg ctagaagaga agactctggg
ttatactggg gcgaggctgc cacagaggat ggaaatgtcc ttaagcgag cctgagttg
gagcttcaag tgcttggtt ccagttacca actcctgtct ggtttcatta ccaagtctct
ttctgcttgg tgatggtact cttttttgca gtggacacag gactatattt ctctgtgaag
acaaacattc gaagctcaac aagagactgg aaggaccata aatttaaatg gagaaaggac
cctcaagaca aa

```

10

【化 2 3】

配列番号 2 3

```

cttgagagaca acatgtgggtt cttgacaaact ctgctccttt gggttccagt tgatggggcaa
gtggacacca caaaggcagt gatcactttg cagcctccat gggtcagcgt gttccaagag
gaaaccgtaa ccttgcattg tgaggtgctc catctgcctg ggagcagctc tacacagtgg
tttctcaatg gcacagccac tcagacctcg acccccagct acagaatcac ctctgccagt
gtcaatgaca gtggtgaata caggtgccag agaggtctct cagggcgaag tgaccccata
cagctggaaa tccacagagg ctggctacta ctgcaggctc ccagcagagt cttcacggaa
ggagaacctc tggccttgag gtgtcatgcg tggaaaggata agctgggtga caatgtgctt
tactatcgaa atggcaaagc ctttaagttt ttccactgga attctaacct caccattctg
aaaaccaaca taagtcaaca tggcacctac cattgctcag gcatgggaaa gcatcgctac
acatcagcag gaatatctgt cactgtgaaa gagctatttc cagctccagt gctgaatgca
tctgtgacat cccactcct ggaggggaat ctggtcaccc tgagctgtga aacaaagttg
ctcttgacga ggcttggtt gcagctttac ttctccttct acatgggcag caagaccctg
cgaggcagga acacatcctc tgaataccaa atactaactg ctagaagaga agactctggg
ttatactggg gcgaggctgc cacagaggat ggaaatgtcc ttaagcgag cctgagttg
gagcttcaag tgcttggtt gttctttcca cctgggtacc aagtctcttt ctgcttggtg
atggtactcc tttttgcagt ggacacagga ctatatttct ctgtgaagac aaacattcga
agctcaacaa gagactggaa ggaccataaa ttttaaatgga gaaaggacc ccaagacaaa

```

20

30

40

50

【化 2 4】

配列番号 2 4

```

atgtggttct tgacaactct gctcctttgg gttccagttg atgggcaagt ggacaccaca
aaggcagtga tcacttttgc gccctccatgg gtcagcgtgt tccaagagga aacogtaacc
ttgcactgtg aggtgctcca tctgcctggg agcagctcta cacagtgggt totcaatggc
acagccactc agacctcgac cccagctac agaatacct ctgccagtgt caatgacagt
ggtgaataca ggtgccagag aggtctctca gggcgaagtg acccataca gctggaaatc
cacagaggtt ggctactact gcaggtctcc agcagagtct tcacggaagg agaacctctg
gccttgaggt gtcattgctg gaaggataag ctgggtgtaca atgtgcttta ctatcgaaat
ggcaaagcct ttaagttttt ccactggaac totaacctca ccattctgaa aaccaacata
agtcacaatg gcacctacca ttgctcaggc atgggaaagg atcgctacac atcagcagga
atatctgtca ctgtgaaaga gctatttcca gctccagtgc tgaatgcac tgtgacatcc
ccactctctg aggggaatct ggtcaccttg agctgtgaaa caaagttgct cttgcagagg
cctggttttg agctttactt ctctctctac atgggcagca agacctgog aggcaggaac
acatctctctg aataccaaat actaactgct agaagagaag actctgggtt atactggtgc
gaggtgtcca cagaggatgg aaatgtcctt aagcgcagcc ctgagttgga gcttcaagtg
cttggtctct ttcacactgg gtaccaagtc tctttctgct tgggtgatgt actccttttt
gcagtggaca caggactata tttctctgtg aagacaaaca ttcgaagctc aacaagagac
tggaaggacc ataaatttaa atggagaaag gacctcaag acaaa

```

10

【0 1 5 7】

したがって、本明細書で提供されるのは、本明細書で企図及び説明されている他の編集の中でも特に、外因性CD16、すなわち、高親和性非切断性CD16受容体(hnCD16)を含むように遺伝子操作されたクローンiPSCであり、遺伝子操作されたiPSCは、iPSCに導入されたhnCD16を含むエフェクター細胞に分化することができる。いくつかの実施形態では、hnCD16を含む派生エフェクター細胞は、NK細胞である。いくつかの実施形態では、hnCD16を含む派生エフェクター細胞は、T細胞である。いくつかの実施形態では、hnCD16は、CD64の全長又は部分長細胞外ドメインを含む。iPSC又は派生細胞に含まれる外因性hnCD16又はその機能的バリエーションは、ADCC抗体又はその断片だけでなく、当該hnCD16のCD16又はCD64の細胞外結合ドメインを認識する二重特異性、三重特異性、又は多重特異性のエンゲージャ又はバインダへの結合にも高い親和性を有する。二重特異性、三重特異性、又は多重特異性のエンゲージャ又はバインダについては、本出願で以下で更に説明する。このように、本出願の態様のうちの少なくとも1つは、本出願で更に詳述する状態、疾患、又は感染症の治療における治療的使用に十分な量で、派生エフェクター細胞上で発現する外因性CD16を介して1つ以上の予め選択されたADCC抗体が予めロードされた、派生エフェクター細胞又はその細胞集団を提供し、上記外因性CD16は、CD64の、又はF176V及びS197Pを有するCD16の細胞外結合ドメインを含む。

20

30

【0 1 5 8】

いくつかの他の実施形態では、外因性CD16は、CD16又はそのバリエーションをベースとするCFcRを含む。キメラFc受容体(chimeric Fc receptor、CFcR)は、天然CD16膜貫通及び／又は細胞内ドメインを改変又は置換することによって、非天然膜貫通ドメイン、非天然刺激ドメイン及び／又は非天然シグナル伝達ドメインを含むように産生される。本明細書で使用される「非天然」という用語は、膜貫通ドメイン、刺激ドメイン、又はシグナル伝達ドメインが、細胞外ドメインを提供する受容体以外の異なる受容体から派生することを意味する。本明細書での例示では、CD16又はそのバリエーションをベースとするCFcRは、CD16から派生する膜貫通ドメイン、刺激ドメイン、又はシグナル伝達ドメインを有しない。いくつかの実施形態では、外因性のCD16ベースのCFcRは、CD3δ、CD3ε、CD3γ、CD3ζ、CD4、CD8、CD8a、CD8b、CD27、CD28、CD40、CD84、CD166、4-1BB、OX40、ICOS、ICAM-1、CTLA-4、PD-1、LAG-3、2B4、BTLA、CD16、IL7、IL12、IL15、KIR2DL4、KIR2DS1、NKP3

40

50

0、NKp44、NKp46、NKG2C、NKG2D、又はT細胞受容体ポリペプチドに由来する非天然の膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、外因性のCD16ベースのCFcRは、CD27、CD28、4-1BB、OX40、ICOS、PD-1、LAG-3、2B4、BTLA、DAP10、DAP12、CTLA-4、又はNKG2Dポリペプチドに由来する非天然の刺激／阻害ドメインを含む。いくつかの実施形態では、外因性のCD16ベースのCFcRは、CD3ζ、2B4、DAP10、DAP12、DNAM1、CD137（4-1BB）、IL21、IL7、IL12、IL15、NKp30、NKp44、NKp46、NKG2C、又はNKG2Dポリペプチドに由来する非天然のシグナル伝達ドメインを含む。CD16ベースのCFcRの一実施形態では、提供されるキメラFc受容体は、IL7、IL12、IL15、NKp30、NKp44、NKp46、NKG2C、又はNKG2Dポリペプチドのうちの1つから両方が派生する膜貫通ドメイン及びシグナル伝達ドメインを含む。CD16ベースのキメラFc受容体の特定の例示的な一実施形態は、NKG2Dの膜貫通ドメイン、2B4の刺激ドメイン、及びCD3ζのシグナル伝達ドメインを含み、CFcRの細胞外ドメインは、CD64又はCD16の細胞外ドメインの全長又は部分配列に由来し、CD16の細胞外ドメインは、F176V及びS197Pを含む。CD16ベースのキメラFc受容体の別の例示的な実施形態は、CD3ζの膜貫通ドメイン及びシグナル伝達ドメインを含み、CFcRの細胞外ドメインは、CD64又はCD16の細胞外ドメインの全長又は部分配列に由来し、CD16の細胞外ドメインは、F176V及びS197Pを含む。

10

20

30

40

50

【0159】

上述のようなCD16ベースのキメラFc受容体の様々な実施形態は、抗体又はその断片のFc領域に、又は、二重特異性、三重特異性、若しくは多重特異性のエンゲージャ若しくはバインダに、高い親和性で結合することができる。結合すると、キメラ受容体の刺激ドメイン及び／又はシグナル伝達ドメインは、エフェクター細胞の活性化及びサイトカイン分泌、並びに抗体が、又は腫瘍抗原結合成分及びFc領域を有する上記の二重特異性、三重特異性、若しくは多重特異性のエンゲージャ若しくはバインダが標的とする腫瘍細胞の殺傷を可能にする。理論に制限されることなく、CD16ベースのキメラFc受容体の、非天然の膜貫通、刺激及び／若しくはシグナル伝達ドメインを通じて、又は外部ドメインへのエンゲージャの結合を通じて、CFcRはエフェクター細胞の殺傷能力に寄与し得、エフェクター細胞の増殖及び／又は増殖能を増加させる。抗体とエンゲージャは、抗原を発現している腫瘍細胞とCFcRを発現しているエフェクター細胞を近接させることができ、これも増強された腫瘍細胞の殺傷に寄与する。二重特異性、三重特異性、多重特異性エンゲージャ又はバインダのための例示的な腫瘍抗原には、B7H3、BCMA、CD10、CD19、CD20、CD22、CD24、CD30、CD33、CD34、CD38、CD44、CD79a、CD79b、CD123、CD138、CD179b、CEA、CLEC12A、CS-1、DLL3、EGFR、EGFRvIII、EPCAM、FLT-3、FOLR1、FOLR3、GD2、gpA33、HER2、HM1.24、LGR5、MSLN、MCSP、MICA／B、PSMA、PAMA、P-カドヘリン、及びROR1が含まれるが、これらに限定されない。腫瘍細胞を攻撃する際にCD16ベースのCFcRを発現するエフェクター細胞を結合させるのに好適ないくつかの非限定的な例示的な二重特異性、三重特異性、多重特異性のエンゲージャ又はバインダには、CD16（又はCD64）-CD30、CD16（又はCD64）-BCMA、CD16（又はCD64）-IL15-EPCAM、及びCD16（又はCD64）-IL15-CD33が含まれる。

【0160】

NK細胞活性化に続いて細胞表面から切断される初代NK細胞によって発現された内因性CD16とは異なり、派生NK細胞の様々な非切断性バージョンのCD16は、CD16のシェディングを回避し、一定の発現を維持する。誘導NK細胞では、非切断性CD16は、改善した細胞機能の指標であるTNFα及びCD107aの発現を増加させる。非切断性CD16はまた、抗体依存性細胞傷害（ADCC）、及び二重、三重、又は多重特

異的エンゲージャの結合も増強する。ADCCは、抗体でコーティングされた標的細胞へのCD16の結合を介したNK細胞媒介性溶解のメカニズムである。由来NK細胞に導入されたhnCD16の追加の高親和性特性により、細胞療法を必要とする対象に細胞を投与する前に、hnCD16を介したADCC抗体のNK細胞へのインビトロローディングも可能になる。本明細書において提示されるように、hnCD16は、いくつかの実施形態では、F176V及びS197Pを含み得、又は配列番号19、20、若しくは21によって例示されるようにCD64に由来する全長又は部分長の外部ドメインを含み得、又は非天然の膜貫通ドメイン、刺激ドメイン、及びシグナル伝達ドメインのうちの少なくとも1つを更に含み得る。開示されるように、本出願はまた、本出願で更に詳しく説明するように、状態、疾患、又は感染症の治療における治療的使用に十分な量の1つ以上の予め選択されたADCC抗体が予めロードされた、派生NK細胞又はその細胞集団を提供する。

10

【0161】

初代NK細胞とは異なり、初代供給源（すなわち、末梢血、臍帯血、又は他のドナー組織などの天然／天然源）由来の成熟T細胞はCD16を発現しない。発現した外因性の非切断性CD16を含むiPSCが、T系統細胞の発生生物学を損なうことなく、外因性CD16を発現するだけでなく、獲得したADCCメカニズムを通じて機能を実行することができる機能的な派生T細胞に分化することができることは予想外であった。派生T系統細胞で獲得したこのADCCは、二重標的化、及び／又はCAR-T細胞療法でよく発生する、低下若しくは消失したCAR-T標的抗原の発現、若しくはCARによる認識を回避する変異抗原の発現を伴って腫瘍が再発する、抗原エスケープを救済するためのアプローチとして更に使用され得る。当該派生T系統細胞が、外因性CD16（機能的バリエーション及びCD16ベースのCFcRを含む）発現を介して獲得したADCCを含み、抗体が、CARが標的とする腫瘍抗原とは異なる腫瘍抗原を標的とする場合、抗体を使用してCAR-T抗原エスケープを救済し、CAR-T治療でよく見られる標的腫瘍の再発又は再発を軽減又は防止することができる。二重標的化を達成しながら抗原エスケープを低減及び／又は防止するこのような戦略は、1つ以上のCARを発現するNK細胞にも同様に適用可能である。この抗原エスケープの低減及び防止戦略で使用され得る様々なCARについて、以下で更に説明する。

20

【0162】

したがって、本発明の実施形態は、本明細書において提供されるサイトカインシグナル伝達複合体及びCARに加えて、外因性CD16を含む派生T系統細胞を提供する。いくつかの実施形態では、派生T系統細胞に含まれるCD16は、F176V及びS197Pを含むCD16外部ドメインを含むhnCD16である。いくつかの他の実施形態では、派生T系統細胞に含まれるhnCD16は、配列番号19、20又は21によって例示されるような、CD64に由来する全長又は部分長の外部ドメインを含むか、又は非天然の膜貫通ドメイン、刺激ドメイン及びシグナル伝達ドメインのうちの少なくとも1つを更に含み得る。本明細書で説明されているように、そのような派生T系統細胞は、抗体の治療効果を高めるためにADCCによって媒介されたモノクローナル抗体で腫瘍を標的とする獲得されたメカニズムを有する。開示されるように、本出願はまた、以下で更に詳しく説明するように、状態、疾患、又は感染症の治療における治療的使用に十分な量の1つ以上の予め選択されたADCC抗体が予めロードされた、派生T系統細胞又はその細胞集団を提供する。

30

40

【0163】

本出願において更に提供されるのは、外因性CD16を含むがこれに限定されない、本明細書において提供されるような少なくとも1つの表現型を有する、ソーティングされた単一細胞及び増殖されたクローンの操作されたiPSCを含むマスター細胞バンクであり、この細胞バンクは、更なるiPSC操作のためのプラットフォームと、組成が明確かつ均一であり、費用効果の高い様式で大規模に大量生産することができる、誘導NK及びT細胞を含むがこれに限定されない、既製の操作された均質な細胞療法製品を製造するため

50

の再生可能な供給源を提供する。

【0164】

5. CD38ノックアウト

細胞表面分子CD38は、多発性骨髄腫及びCD20陰性B細胞性悪性腫瘍を含む、リンパ系と骨髄系の両方に由来する多発性血液系悪性腫瘍で高度に上方制御されており、これによりがん細胞を枯渇させる抗体治療の魅力的な標的となっている。抗体を介したがん細胞の枯渇は、通常、直接的な細胞アポトーシスの誘導とADCC（抗体依存性細胞傷害）などの免疫エフェクターメカニズムの活性化との組み合わせに起因する。ADCCに加えて、治療用抗体と連携した免疫エフェクターメカニズムには、食作用（ADCP）及び／又は補体依存性細胞傷害性（complement-dependent cytotoxicity、CDC）も含まれ得る。

10

【0165】

CD38はまた、悪性細胞で高度に発現する以外に、形質細胞並びにNK細胞、活性化T細胞及びB細胞にも発現する。造血中、CD38は、CD34⁺幹細胞と、リンパ系、赤血球系、及び骨髄系の系統にコミットした前駆細胞、並びに形質細胞段階まで続く成熟の最終段階中に発現する。II型膜貫通型糖タンパク質であるCD38は、受容体及びヌクレオチド代謝産物の生産に関与する多機能酵素の両方として細胞機能を果たす。酵素として、CD38は合成及びNAD⁺からADP-リボースへの反応の加水分解を触媒し、これによって、カルシウム依存性である、細胞接着のプロセスに重要である、小胞体及びリソソームからのカルシウムの放出を刺激する二次メッセンジャCADPR及びNAADPを産生する。CD38は受容体としてCD31を認識し、活性化されたNK細胞のサイトカイン放出及び細胞傷害性を調節する。CD38は、脂質ラフトの細胞表面タンパク質と会合し、細胞質のCa²⁺フラックスを調節し、リンパ系及び骨髄系細胞のシグナル伝達を媒介することも報告されている。

20

【0166】

悪性腫瘍の治療では、CD38抗原結合受容体で形質導入されたT細胞を全身的に使用すると、CD34⁺造血前駆細胞、単球、NK細胞、T細胞、及びB細胞のCD38⁺画分が溶解し、レシピエントの免疫エフェクター細胞機能が損なわれるため、治療応答が不完全になり、効力が低下又は排除されることが示されている。加えて、CD38特異的抗体であるダラツムマブで治療された多発性骨髄腫患者では、骨髄と末梢血の両方でNK細胞の減少が観察されたが、T細胞やB細胞などの他の免疫細胞型は、CD38の発現にもかかわらず影響を受けなかった（Casneuf et al., Blood Advances, 2017; 1(23): 2105-2114）。理論に拘束されることなく、本出願は、CD38特異的抗体及び／又はCD38抗原結合ドメインが誘導するフラトリサイドを通じたエフェクター細胞の枯渇又は減少を克服することにより、CD38標的化がん治療の潜在能力を最大限に活用する戦略を提供する。加えて、CD38はT細胞又はB細胞などの活性化リンパ球で上方制御されるため、同種異系エフェクター細胞のレシピエントでダラツムマブなどのCD38特異的抗体を使用してこれらのレシピエントリンパ球の活性化を抑制することにより、これらのエフェクター細胞に対する同種拒絶反応が減少及び／又は防ぎ、それによってエフェクター細胞の生存率と持続性を増加させる。

30

40

【0167】

このように、本出願はまた、多くの場合、養子細胞移入の前に、レシピエントT細胞及びB細胞の活性化、すなわち、活性化されたT細胞及びB細胞のリンパ球枯渇に対するCD38特異的抗体、分泌型CD38特異的エンゲージャ又はCD38 CAR（キメラ抗原受容体）を使用することによる同種拒絶反応の低減又は防止を通じてエフェクター細胞の持続性及び／又は生存率を増強する戦略を提供する。具体的には、提供される戦略は、CD38ノックアウトiPSC株、ソーティングされた単一細胞及び増殖されたクローンCD38陰性iPSCを含むマスター細胞バンクを生成すること、並びに操作されたiPSC株の指向性分化を通じてCD38陰性（CD38^{neg}）派生エフェクター細胞を得ることを含み、派生エフェクター細胞は、CD38標的化治療部分がエフェクター細胞と

50

ともに用いられる場合、他の利点の中でもとりわけ、フラトリサイド及び同種拒絶反応から保護される。加えて、抗CD38モノクローナル抗体療法は、患者の造血幹細胞区画に悪影響を及ぼすことなく、患者の活性化免疫系を有意に枯渇させる。CD38陰性派生細胞は、CD38抗体媒介性枯渇に抵抗する能力を有し、毒性コンディショニング剤を使用せずに抗CD38又はCD38-CARと組み合わせて有効に投与することができ、したがって化学療法に基づくリンパ球枯渇を低減及び／又は置換することができる。

【0168】

本明細書で提供される一実施形態では、iPSC株におけるCD38ノックアウトは、二対立遺伝子ノックアウトである。本明細書に開示されるように、提供されるCD38陰性iPSC株は、少なくともサイトカインシグナル伝達複合体と、必要に応じてCAR、TCR^{neg}、CFR、CD16、外因性サイトカイン若しくはそのバリエーション、並びにHLA I及びIIの欠損のうちの1つ以上と、を更に含み、当該iPSCは、限定されないが、決定的な造血内皮(HE)能を有する中胚葉細胞、運命確定HE、CD34造血細胞、造血幹前駆細胞、造血多能性前駆体(multipotent progenitor、MPP)、T細胞前駆体、NK細胞前駆体、共通骨髄前駆細胞、共通リンパ前駆細胞、赤血球、骨髄細胞、好中球前駆体、T細胞、NKT細胞、NK細胞、B細胞、好中球、樹状細胞、マクロファージ、並びに初代NK、T及び／若しくはNKT細胞には存在しない1つ以上の機能的特質を有する派生免疫エフェクター細胞を含む、機能的派生エフェクター細胞を産生するように分化誘導することができる。いくつかの実施形態では、抗CD38抗体を使用してADCCを誘導するか、又は抗CD38 CARを標的化細胞殺傷に使用する場合、CD38^{neg}iPSC及び／又はその派生エフェクター細胞は抗CD38抗体、抗CD38 CAR、又はレシピエント活性化T細胞若しくはB細胞によって排除されず、これにより、そのような治療部分の存在下及び／又は曝露後のiPSC及びそのエフェクター細胞の持続性及び／又は生存率を増加させる。いくつかの実施形態では、エフェクター細胞は、そのような治療部分の存在下で、及び／又は曝露後の、インビボでの持続性及び／又は生存率が増加している。

【0169】

6. HLA-I-及びHLA-II-の欠損

同種拒絶の問題を回避するために、複数のHLAクラスI及びクラスIIタンパク質は、同種異系レシピエントの組織適合性のために一致している必要がある。本明細書で提供されるのは、HLAクラスI及びHLAクラスIIタンパク質の両方の発現が排除又は実質的に減少したiPSC細胞株及びそれから分化したその派生細胞である。HLAクラスI欠損は、HLAクラスI遺伝子座(染色体6p21)の任意の領域の機能的欠失、又はベータ2ミクログロブリン(beta-2 microglobulin、B2M)遺伝子、TAP1遺伝子、TAP2遺伝子、及びタパシンを含むが、これらに限定されない、HLAクラスI関連遺伝子の欠失若しくは破壊によって達成され得る。例えば、B2M遺伝子は、全てのHLAクラスIヘテロ二量体の細胞表面発現に不可欠な共通のサブユニットをコードする。B2M陰性細胞はHLA-I欠損である。HLAクラスII欠損は、RFXANK、CIITA、RFX5、及びRFXAPを含むがこれらに限定されないHLA-II関連遺伝子の機能的欠失又は破壊によって達成され得る。CIITAは転写コアクチベータであり、クラスIIタンパク質の発現に必要な転写因子RFX5の活性化を通じて機能する。CIITA陰性細胞はHLA-II欠損である。本明細書で提供されるのは、例えばB2M及びCIITA発現の両方を欠いたHLA-I及びHLA-II欠損の両方を有するiPSC系統とその派生細胞であり、取得された派生エフェクター細胞は、MHC(主要組織適合性複合体)マッチングの必要性を排除して宿主の(同種異系)T細胞による認識と殺傷を回避することによって、同種異系細胞治療を可能にする。

【0170】

一部の細胞型では、クラスI発現の欠如がNK細胞による溶解を引き起こす。この「自己喪失」応答を克服するために、HLA-Gを必要に応じてノックインして、操作されたiPSCに由来するHLA-I欠損エフェクター細胞のNK細胞の認識と殺傷を回避する

ことができる。一実施形態では、HLA-I欠損iPSC及びその派生細胞は、HLA-Gノックインを更に含む。いくつかの実施形態では、提供されるHLA-I欠損iPSC及びその派生細胞は、CD58ノックアウト及びCD54ノックアウトの一方又は両方を更に含む。CD58（又はLFA-3）及びCD54（又はICAM-1）は、シグナル依存性細胞相互作用を開始し、免疫細胞を含む、細胞の遊走を促進する接着タンパク質である。CD58ノックアウトは、CD54ノックアウトよりも同種異系NK細胞活性化の低減において高い効率を有するが、一方、CD58及びCD54の両方の二重ノックアウトは、NK細胞活性化の最も増強された低減を有することが示された。いくつかの観察において、CD58及びCD54二重ノックアウトは、「自己喪失」効果を克服することにおいて、HLA-I欠損細胞に対するHLA-G過剰発現よりも更に効果的である。

10

【0171】

本明細書で提供されるように、いくつかの実施形態では、HLA-I及びHLA-II欠損iPSC並びにその派生細胞は、HLA-Gをコードする外因性ポリヌクレオチドを有する。いくつかの実施形態では、HLA-I及びHLA-II欠損iPSC並びにその派生細胞は、CD58 nullである。いくつかの他の実施形態では、HLA-I及びHLA-II欠損iPSC並びにその派生細胞は、CD54 nullである。更にいくつかの他の実施形態では、HLA-I及びHLA-II欠損iPSC並びにその派生細胞は、CD58 null及びCD54 nullである。

【0172】

いくつかの実施形態では、活性化されたレシピエント免疫細胞において上方制御された表面タンパク質を標的とする不活性化CARを発現させることによって、HLA-I及び／又はHLA-IIの欠損のための操作をバイパスするか又はインタクトなままにして、同種拒絶反応を回避することができる。いくつかの実施形態では、当該活性化されたレシピエント免疫細胞において上方制御される表面タンパク質には、CD38、CD25、CD69、CD44、4-1BB、OX40、又はCD40Lが含まれるが、これらに限定されない。細胞がそのような不活性化CARを発現する場合、細胞は、CARによって標的化される同じ表面タンパク質を発現しないか、又はそのノックアウトを有することが好ましい。いくつかの実施形態では、不活性化CARは、CD38-CAR、4-1BB-CAR、OX40-CAR、及びCD40L-CARのうちの少なくとも1つを含む。

20

【0173】

7. 更なる改変

いくつかの実施形態では、表1の遺伝子型のうちのいずれか1つを含むiPSC及びその派生エフェクター細胞は、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、PD1、LAG3、TIM3、RFXANK、RFX5、RFXAP、RAG1、及び染色体6p21領域内の任意の遺伝子のうちの少なくとも1つの欠失、破壊、若しくは発現低下、又はHLA-E、4-1BBL、CD4、CD8、CD47、CD113、CD131、CD137、CD80、PD11、A2AR、TCR、Fc受容体、抗体、エンゲージャ、及び二重特異性、多重特異性、若しくはユニバーサルエンゲージャとカップリングするための表面トリガー受容体のうちの少なくとも1つの導入、を更に含み得る。

30

【0174】

二重特異性又は多重特異性エンゲージャは、異なる抗体の2つ以上の単鎖可変断片（scFv）、又は他の機能的バリエーションからなる融合タンパク質であり、少なくとも1つのscFvがエフェクター細胞表面分子又は表面トリガー受容体に結合し、少なくとも別の1つが腫瘍特異的表面分子を介して腫瘍細胞に結合する。いくつかの実施形態では、表面トリガー受容体は、エフェクター細胞の天然受容体及び細胞型とは無関係に、エフェクター細胞と特異的な標的細胞、例えば腫瘍細胞との間の二重特異性抗体又は多重特異性抗体の結合を促進する。いくつかの他の実施形態では、本明細書において提供される方法及び組成物を使用して、すなわち、iPSCを操作し、必要に応じて、ソーティングされた単一細胞及び増殖されたクローン操作iPSCを含むマスター細胞バンクを生成し、その後、T細胞、NK細胞、又はソースiPSCと同一の遺伝子型を含む任意の他のエフェクタ

40

50

一細胞へのiPSCの分化を指示することによって、1つ以上の外因性表面トリガー受容体をエフェクター細胞に導入することができる。

【0175】

このアプローチを使用すると、ユニバーサル表面トリガー受容体を含むiPSCを生成し、そのようなiPSCをユニバーサル表面トリガー受容体を発現する様々なエフェクター細胞型の集団に分化させることもできる。いくつかの実施形態では、同じ腫瘍標的化特異性を有するエンゲージャを使用して、異なるユニバーサル表面トリガー受容体とカップリングする。いくつかの実施形態では、異なる腫瘍標的化特異性を有するエンゲージャを使用して、同じユニバーサル表面トリガー受容体とカップリングする。したがって、1つ以上のエフェクター細胞型を使用して、ある特異的な型の腫瘍細胞を殺傷する場合もあれば、2つ以上の型の腫瘍を殺傷する場合もある。表面トリガー受容体は、一般に、エフェクター細胞活性化のための共刺激ドメインと、エンゲージャのエピトープに特異的な抗エピトープと、を含むか、又はその逆であり、表面トリガー受容体は、エンゲージャの抗エピトープに認識可能又は特異的なエピトープを含む。例えば、二重特異性エンゲージャは、一方の端の表面トリガー受容体の抗エピトープに特異的であり、もう一方の端の腫瘍抗原に特異的である。

10

【0176】

二重若しくは多重特異性エンゲージャ認識、又はカップリング、又は結合のために使用することができる例示的なエフェクター細胞表面分子、又は表面トリガー受容体としては、CD3、CD28、CD5、CD16、CD64、CD32、CD33、CD89、NKG2C、NKG2D、又は本明細書に開示されるそれらの任意の機能的バリエーション若しくはキメラ受容体形態が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、エンゲージャ認識のためにエフェクター細胞の表面に発現するCD16は、本明細書に記載されるような、CD16(F176V及び必要に応じてS197Pを含む)又はCD64細胞外ドメイン、並びに天然又は非天然の膜貫通、刺激及び／又はシグナル伝達ドメインを含むhncD16である。いくつかの実施形態では、エンゲージャ認識のためにエフェクター細胞の表面に発現するCD16は、CD16ベースのキメラFc受容体(CFcR)である。いくつかの実施形態では、CD16ベースのCFcRは、NKG2Dの膜貫通ドメイン、2B4の刺激ドメイン、及びCD3ζのシグナル伝達ドメインを含み、CD16の細胞外ドメインは、CD64又はCD16の細胞外ドメインの全長又は部分配列に由来し、必要に応じて、CD16の細胞外ドメインは、F176V及び必要に応じてS197Pを含む。

20

30

【0177】

二重特異性又は多重特異性エンゲージャ認識のための例示的な腫瘍細胞表面分子には、B7H3、BCMA、CD10、CD19、CD20、CD22、CD24、CD30、CD33、CD34、CD38、CD44、CD79a、CD79b、CD123、CD138、CD179b、CEA、CLEC12A、CS-1、DLL3、EGFR、EGFRvIII、EPCAM、FLT-3、FOLR1、FOLR3、GD2、gpA33、HER2、HM1.24、LGR5、MSLN、MCSP、MICA/B、PSMA、PAMA、P-カドヘリン、及びROR1が含まれるが、これらに限定されない。一実施形態では、二重特異性抗体はCD3-CD19であり、別の実施形態では、二重特異性抗体はCD3-CD33である。エフェクター細胞上のCD16に係合するために、二重特異性抗体は、CD16-CD30又はCD64-CD30である。別の実施形態では、二重特異性抗体は、CD16-BCMA又はCD64-BCMAである。更に別の実施形態では、二重特異性抗体は、エフェクター細胞と腫瘍細胞抗原結合ドメインの間にリンカーを更に含み、例えば、改変IL15を、エフェクター細胞増殖を促進するエフェクターNK細胞のリンカーとして(いくつかの刊行物では、TriKE、又は三重特異性キラーエンゲージャと呼ばれる)使用してもよい。一実施形態では、TriKEはCD16-IL15-EPCAM又はCD64-IL15-EPCAMである。別の実施形態では、TriKEはCD16-IL15-CD33又はCD64-IL15-CD33である。更に

40

50

別の実施形態では、TriKEはNKG2C-IL15-CD33である。TriKEにおけるIL15はまた、IL2、IL4、IL6、IL7、IL9、IL10、IL11、IL12、IL18、及びIL21を含むが、これらに限定されない、他のサイトカインに由来し得る。

【0178】

いくつかの実施形態では、二重特異性又は多重特異性のエンゲージャのための表面トリガー受容体は、ときには細胞型に応じて、エフェクター細胞に対して内因性であり得る。いくつかの他の実施形態では、本明細書において提供される方法及び組成物を使用して、すなわち、表1に列挙された遺伝子型を含むiPSCを更に操作し、ソースiPSCと同一の遺伝子型と表面トリガー受容体を含むエフェクター細胞へのiPSCの分化を指示することによって、1つ以上の外因性表面トリガー受容体をエフェクター細胞に導入することができる。

【0179】

8. 本明細書において提供される遺伝子操作されたiPSC株及びiPSC由来細胞
上記を考慮して、本出願は、細胞又はそれらの集団、及び当該iPSCを分化させることから得られる派生エフェクター細胞を提供し、各細胞は、少なくとも、サイトカインシグナル伝達複合体及び場合に応じてCARをコードするポリヌクレオチドを含み、細胞は、真核細胞、動物細胞、ヒト細胞、人工多能性細胞(iPSC)、iPSC由来エフェクター細胞、免疫細胞、又はフィード細胞である。また、本明細書に記載される表現型を有するソーティングされた単一細胞及び増殖されたクローン操作iPSCを含むマスター細胞バンクも提供され、この細胞バンクは、組成が明確かつ均一であり、費用効率の高い様式で大規模に大量生産することができる、既製の操作された均質な細胞療法製品を製造するための再生可能な供給源を提供する。いくつかの実施形態では、iPSC由来細胞は造血細胞であり、決定的な造血内皮(HE)能を有する中胚葉細胞、決定的なHE、CD34造血細胞、造血幹前駆細胞、造血多能性前駆体(MPP)、T細胞前駆体、NK細胞前駆体、骨髓細胞、好中球前駆体を含むがこれらに限定されず、かつ／又はT細胞、NKT細胞、NK細胞、B細胞、好中球、樹状細胞、及びマクロファージと特質を共有する。いくつかの実施形態では、iPSC由来造血細胞は、少なくともサイトカインシグナル伝達複合体及び必要に応じてCARを発現する免疫エフェクター細胞を含む。本明細書では、サイトカインシグナル伝達複合体及び必要に応じてCARをコードするポリヌクレオチドと、TCR^{neg}、外因性CD16、CFR、サイトカイン及び／若しくはその受容体又はそれらのバリエーションを含む追加のサイトカインシグナル伝達複合体、並びにCD38ノックアウト、のうちの1つ以上と、を含む細胞が更に提供され、iPSCは、分化誘導されて、機能的派生造血細胞を産生することができる。いくつかの実施形態では、機能的派生造血細胞は、免疫エフェクター細胞である。いくつかの実施形態では、機能的派生免疫エフェクター細胞は、NK細胞及び／又はT細胞と特質を共有する。いくつかの実施形態では、NK細胞及び／又はT細胞と特質を共有する機能的派生免疫エフェクター細胞は、NK細胞又はT細胞ではない。

【0180】

サイトカインシグナル伝達複合体及び必要に応じてCARをコードするポリヌクレオチドを少なくとも含む細胞のいくつかの実施形態では、細胞は、TCR^{neg}である。本明細書で使用されるとき、TCR^{neg}は、TCR陰性、TCR^{-/-}、「TCRヌル」、又はTCRノックアウトとも称され、天然に(例えば、NK細胞又はiPSC由来NK細胞)、遺伝子発現調節によって、又はiPSC細胞(例えば、iPSC、T細胞からリプログラミングされたiPSC(iPSC reprogrammed from T cell、TiPSC))若しくは内因性TCR又はその1つ以上のサブユニットをノックアウトするためのT細胞のゲノム編集によって、あるいはTCRがノックアウトされたiPSCから分化したTCR陰性派生細胞を得ることによって、内因性TCRを発現しない細胞を含む。したがって、開示される細胞においてノックアウトされるTCRは、内因性TCR複合体である。細胞中のTCRのTCR α 又はTCR β のいずれかの定常領域の発現を破壊することは、細

10

20

30

40

50

胞の内因性TCR複合体をノックアウトする多くの方法のうちの1つである。TCR^{neg}細胞は、TCR^{neg}細胞において全てのCD3サブユニットを発現しているにもかかわらず、細胞表面にCD3複合体を提示することができないことが発見され、これは、細胞表面CD3認識、結合及び／又はシグナル伝達を必要とする細胞機能に悪影響を及ぼす。シグナル伝達複合体、CAR、及びCFRをコードするポリヌクレオチドを含むTCR^{neg}細胞のいくつかの実施形態では、CFRは、CD3ベースである。いくつかの実施形態では、サイトカインシグナル伝達複合体及び必要に応じてCARをコードするポリヌクレオチドを含むTCR^{neg}細胞は、発現された場合、細胞表面CD3複合体、又はその1つ以上のサブユニット若しくはサブドメイン(c s-CD3)も含む。

【0181】

いくつかの実施形態では、サイトカインシグナル伝達複合体及び必要に応じてCARを含む細胞は、TCR^{neg}である。いくつかの実施形態では、サイトカインシグナル伝達複合体及び必要に応じてCARを含む細胞は、TCRの定常領域に挿入されたCARを含む。いくつかの実施形態では、サイトカインシグナル伝達複合体及び必要に応じてCARを含む細胞は、TCR^{neg}であり、TCRの定常領域に挿入されたCARを含み、CARの発現は、内因性TCRプロモータによって駆動される。いくつかの実施形態では、サイトカインシグナル伝達複合体及び必要に応じてCARを含む細胞は、IL2、IL4、IL7、IL9、IL21、又はそれらの任意の組み合わせの外因性サイトカインシグナル伝達を含む。いくつかの実施形態では、外因性サイトカインシグナル伝達は、細胞膜に結合している。いくつかの実施形態では、外因性サイトカインシグナル伝達は、サイトカイン及び／又はそのそれぞれの受容体の導入された部分的若しくは完全なペプチド、又はその変異若しくは短縮化バリエーションを含む。いくつかの実施形態では、サイトカインシグナル伝達は構造的に活性化される。いくつかの実施形態では、サイトカインシグナル伝達の活性化は誘導可能である。いくつかの実施形態では、サイトカインシグナル伝達の活性化は、一過性及び／又は一時的である。いくつかの実施形態では、細胞表面サイトカインシグナル伝達の一過性／一時的発現は、レトロウイルス、センダイウイルス、アデノウイルス、エピソード、ミニサークル、又はmRNAを含むRNAを介する。いくつかの実施形態では、外因性細胞表面サイトカインシグナル伝達は、IL2シグナル伝達を可能にする。いくつかの実施形態では、外因性細胞表面サイトカインシグナル伝達は、IL4シグナル伝達を可能にする。いくつかの実施形態では、外因性細胞表面サイトカインシグナル伝達は、IL7シグナル伝達を可能にする。いくつかの実施形態では、外因性細胞表面サイトカインシグナル伝達は、IL9シグナル伝達を可能にする。いくつかの実施形態では、外因性細胞表面サイトカインシグナル伝達は、IL21シグナル伝達を可能にする。いくつかの実施形態では、サイトカインシグナル伝達複合体及び必要に応じてCARを含む細胞は、外因性CD16又はその機能的バリエーション若しくはキメラ受容体を更に含む。いくつかの実施形態では、外因性CD16は、F176V及びS197Pを含む外部ドメインを含む。いくつかの実施形態、外因性CD16は、CD64の外部ドメインの全長又は部分長を含む。いくつかの他の実施形態では、外因性CD16は、キメラFc受容体を含む。外因性CD16は、ADCCによる細胞殺傷を可能にし、それによって、例えば、CARを発現するエフェクター細胞に二重標的化メカニズム(mechanism)を提供する。

【0182】

いくつかの実施形態では、サイトカインシグナル伝達複合体及び必要に応じてCARを含む細胞は、CD38ノックアウトを更に含む。細胞表面分子CD38は、多発性骨髄腫及びCD20陰性B細胞性悪性腫瘍を含む、リンパ系と骨髄系の両方に由来する多発性血液系悪性腫瘍で高度に上方制御されており、これによりがん細胞を枯渇させる抗体治療の魅力的な標的となっている。CD38はまた、悪性細胞で高度に発現する以外に、形質細胞並びにNK細胞、活性化T細胞及びB細胞にも発現する。いくつかの実施形態では、CD38^{-/-}であるエフェクター細胞は、CD38誘導性フラクトリサイド(fractricide)を回避することができる。いくつかの実施形態では、抗CD38抗体、CD38結合

10

20

30

40

50

CAR、又は抗CD38 s c F Vを含むCD3エンゲージャを使用してADCC及び／又は腫瘍細胞標的化を誘導する場合、CD38⁺／⁺iPSC及び／又はその派生エフェクター細胞は、エフェクター細胞の排除、すなわち、CD38発現エフェクター細胞の減少又は枯渇を引き起こすことなく、CD38発現（腫瘍）細胞を標的化し、それによってiPSCとそのエフェクター細胞の持続性及び／又は生存率を増加させることができる。

【0183】

サイトカインシグナル伝達複合体及び必要に応じてCARをコードするポリヌクレオチドを含む細胞のいくつかの実施形態では、細胞は、B2Mノックアウト及び／又はCIITAノックアウト、並びに必要に応じて、HLA-G又はHLA-Eをコードするポリヌクレオチドを更に含む。

10

【0184】

上記を考慮して、本明細書では、サイトカインシグナル伝達複合体及び必要に応じてCARをコードするポリヌクレオチドと、更に必要に応じて、TCR^{neg}、CD16、CFR、外因性IL、CD38ノックアウト、及びB2M／CIITAノックアウトのうちの1つ、2つ、3つ、若しくはそれ超、又は全てと、を含むiPSCが提供され、B2Mがノックアウトされる場合、HLA-G、又は代替的に、CD58及びCD54ノックアウトの一方又は両方をコードするポリヌクレオチドが必要に応じて導入され、iPSCが分化誘導されて機能的派生造血細胞を産生することが可能である。

【0185】

したがって、本出願は、表1の以下の遺伝子型のうちのいずれか1つを含むiPSC及びその機能的派生造血細胞を提供する。iPSCの分化能及び派生エフェクター細胞の機能に悪影響を及ぼすことなく、表1の以下の遺伝子型のうちのいずれか1つを含む、すなわち、サイトカインシグナル伝達複合体及び必要に応じてCARと、TCR^{neg}、CD16、CFR、外因性IL、CD38ノックアウト、並びにHLA-I及び／又はHLA-I欠損のうちの1つ以上とを有する、ソーティングされた単一細胞及び増殖されたクローン操作iPSCを含む、マスター細胞バンクも本明細書において提供される。当該細胞バンクは、更なるiPSC操作のためのプラットフォーム、及び既製の操作された均質な細胞療法製品を製造するための再生可能な供給源を提供する。

20

【0186】

表1に提供される「IL」は、どの特定のサイトカイン／受容体又は組み合わせ発現が選択されるかに応じてIL2、IL4、IL7、IL9、及びIL21のうちの1つを表し、IL7が選択される場合、ILは、IL7R α 及びIL7R β を含むIL7を表す。いくつかの実施形態は、細胞表面発現外因性サイトカイン及び／又はその受容体は、自己切断ペプチドを使用することによるIL7とIL7R α との共発現、IL7とIL7R α との融合タンパク質、IL7R α の細胞内ドメインが短縮化又は排除されたIL7／IL7R α 融合タンパク質、IL7とIL7R β との融合タンパク質、IL7と共通受容体 γ Cとの融合タンパク質（共通受容体 γ Cは天然であるか若しくは改変されている）、及びIL7R β のホモ二量体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、IL7／IL7R α 融合タンパク質は、配列番号1と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、又は99%同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、IL7／IL7R α 融合タンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列を含む。更に、iPSCとその機能的派生造血細胞がCARとILの両方を含む遺伝子型を有する場合、CARとILは、必要に応じて、2A配列を含むバイシストロン性発現カセットに含まれ得る。対照的に、いくつかの他の実施形態では、CAR及びILは、iPSC及びその機能的派生造血細胞に含まれる別々の発現カセット中にある。

30

40

【表 1 - 1】

表 1：提供される細胞の該当する遺伝子型：

IL	TCR ^{neg}	CD16	CAR	CFR	CD38 ^{+/}	B2M ^{+/} CIITA ^{+/}	HLA-G又は(CD54 ^{-/-} を伴う又は伴わないCD58 ^{-/-})	遺伝子型
✓	✓							1. IL TCR ^{neg}
✓		✓						2. IL CD16
✓			✓					3. IL CAR
✓				✓				4. IL CFR
✓					✓			5. IL CD38 ^{+/}
✓						✓		6. IL B2M ^{+/} CIITA ^{+/}
✓						✓	✓	7. IL B2M ^{+/} CIITA ^{+/} CD58 ^{+/}
								8. IL B2M ^{+/} CIITA ^{+/} CD54 ^{+/}
								9. IL B2M ^{+/} CIITA ^{+/} CD58 ^{+/} CD54 ^{+/}
								10. IL B2M ^{+/} CIITA ^{+/} HLA-G
✓	✓	✓						11. IL TCR ^{neg} CD16
✓	✓		✓					12. IL TCR ^{neg} CAR
✓	✓			✓				13. IL TCR ^{neg} CFR
✓	✓				✓			14. IL TCR ^{neg} CD38 ^{+/}
✓	✓					✓		15. IL TCR ^{neg} B2M ^{+/} CIITA ^{+/}
✓	✓					✓	✓	16. IL TCR ^{neg} B2M ^{+/} CIITA ^{+/} CD58 ^{+/}
								17. IL TCR ^{neg} B2M ^{+/} CIITA ^{+/} CD54 ^{+/}
								18. IL TCR ^{neg} B2M ^{+/} CIITA ^{+/} CD58 ^{+/} CD54 ^{+/}
								19. IL TCR ^{neg} B2M ^{+/} CIITA ^{+/} HLA-G
✓		✓	✓					20. IL CD16 CAR
✓		✓		✓				21. IL CD16 CFR
✓		✓			✓			22. IL CD16 CD38 ^{+/}
✓		✓				✓		23. IL CD16 B2M ^{+/} CIITA ^{+/}
✓		✓				✓	✓	24. IL CD16 B2M ^{+/} CIITA ^{+/} CD58 ^{+/}
								25. IL CD16 B2M ^{+/} CIITA ^{+/} CD54 ^{+/}
								26. IL CD16 B2M ^{+/} CIITA ^{+/} CD58 ^{+/} CD54 ^{+/}
								27. IL CD16 B2M ^{+/} CIITA ^{+/} HLA-G
✓			✓	✓				28. IL CAR CFR
✓			✓		✓			29. IL CAR CD38 ^{+/}

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

(表 1 の続き)

IL	TCR ^{neg}	CD16	CAR	CFR	CD38 ⁺	B2M ⁺ /CIITA ⁺	HLA-G又は(CD54 ⁺ を伴う又は伴わないCD58 ⁺)	遺伝子型
✓			✓			✓		30. IL CAR B2M ⁺ /CIITA ⁺
✓			✓			✓	✓	31. IL CAR B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD58 ⁺
								32. IL CAR B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD54 ⁺
								33. IL CAR B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD58 ⁺ CD54 ⁺
								34. IL CAR B2M ⁺ /CIITA ⁺ HLA-G
✓				✓	✓			35. IL CFR CD38 ⁺
✓				✓		✓		36. IL CFR B2M ⁺ /CIITA ⁺
✓				✓		✓	✓	37. IL CFR B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD58 ⁺
								38. IL CFR B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD54 ⁺
								39. IL CFR B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD58 ⁺ CD54 ⁺
								40. IL CFR B2M ⁺ /CIITA ⁺ HLA-G
✓					✓	✓		41. IL CD38 ⁺ B2M ⁺ /CIITA ⁺
✓					✓	✓	✓	42. IL CD38 ⁺ B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD58 ⁺
								43. IL CD38 ⁺ B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD54 ⁺
								44. IL CD38 ⁺ B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD58 ⁺ CD54 ⁺
								45. IL CD38 ⁺ B2M ⁺ /CIITA ⁺ HLA-G
✓	✓	✓	✓					46. IL TCR ^{neg} CD16 CAR
✓	✓	✓		✓				47. IL TCR ^{neg} CD16 CFR
✓	✓	✓			✓			48. IL TCR ^{neg} CD16 CD38 ⁺
✓	✓	✓				✓		49. IL TCR ^{neg} CD16 B2M ⁺ /CIITA ⁺
✓	✓	✓				✓	✓	50. IL TCR ^{neg} B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD58 ⁺
								51. IL TCR ^{neg} B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD54 ⁺
								52. IL TCR ^{neg} B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD58 ⁺ CD54 ⁺
								53. IL TCR ^{neg} B2M ⁺ /CIITA ⁺ HLA-G
✓	✓		✓	✓				54. IL TCR ^{neg} CAR CFR
✓	✓		✓		✓			55. IL TCR ^{neg} CAR CD38 ⁺
✓	✓		✓			✓		56. IL TCR ^{neg} CAR B2M ⁺ /CIITA ⁺
✓	✓		✓			✓	✓	57. IL TCR ^{neg} CAR B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD58 ⁺
								58. IL TCR ^{neg} CAR B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD54 ⁺
								59. IL TCR ^{neg} CAR B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD58 ⁺ CD54 ⁺
								60. IL TCR ^{neg} CAR B2M ⁺ /CIITA ⁺ HLA-G

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

(表 1 の続き)

IL	TCR ^{neg}	CD16	CAR	CFR	CD38 ⁺	B2M ⁺ /CIITA ⁺	HLA-G又は(CD54 ⁺ を伴う又は伴わない)CD58 ⁺	遺伝子型
✓	✓			✓	✓			61. IL TCR ^{neg} CFR CD38 ⁺
✓	✓			✓		✓		62. IL TCR ^{neg} CFR B2M ⁺ /CIITA ⁺
✓	✓			✓		✓	✓	63. IL TCR ^{neg} CFR B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD58 ⁺
								64. IL TCR ^{neg} CFR B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD54 ⁺
								65. IL TCR ^{neg} CFR B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD58 ⁺ CD54 ⁺
								66. IL TCR ^{neg} CFR B2M ⁺ /CIITA ⁺ HLA-G
✓	✓				✓	✓		67. IL TCR ^{neg} CD38 ⁺ B2M ⁺ /CIITA ⁺
✓	✓				✓	✓	✓	68. IL TCR ^{neg} CD38 ⁺ B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD58 ⁺
								69. IL TCR ^{neg} CD38 ⁺ B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD54 ⁺
								70. IL TCR ^{neg} CD38 ⁺ B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD58 ⁺ CD54 ⁺
								71. IL TCR ^{neg} CD38 ⁺ B2M ⁺ /CIITA ⁺ HLA-G
✓		✓	✓	✓				72. IL CD16 CAR CFR
✓		✓	✓		✓			73. IL CD16 CAR CD38 ⁺
✓		✓	✓			✓		74. IL CD16 CAR B2M ⁺ /CIITA ⁺
✓		✓	✓			✓	✓	75. IL CD16 CAR B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD58 ⁺ /
								76. IL CD16 CAR B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD54 ⁺
								77. IL CD16 CAR B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD58 ⁺ CD54 ⁺
								78. IL CD16 CAR B2M ⁺ /CIITA ⁺ HLA-G
✓		✓		✓	✓			79. IL CD16 CFR CD38 ⁺
✓		✓		✓		✓		80. IL CD16 CFR B2M ⁺ /CIITA ⁺
✓		✓		✓		✓	✓	81. IL B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD58 ⁺
								82. IL B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD54 ⁺
								83. IL B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD58 ⁺ CD54 ⁺
								84. IL B2M ⁺ /CIITA ⁺ HLA-G
✓		✓			✓	✓		85. IL CD16 CD38 ⁺ B2M ⁺ /CIITA ⁺
✓		✓			✓	✓	✓	86. IL CD16 CD38 ⁺ B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD58 ⁺
								87. IL CD16 CD38 ⁺ B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD54 ⁺
								88. IL CD16 CD38 ⁺ B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD58 ⁺ CD54 ⁺
								89. IL CD16 CD38 ⁺ B2M ⁺ /CIITA ⁺ HLA-G
✓			✓	✓	✓			90. IL CAR CFR CD38 ⁺
✓			✓	✓	✓	✓		91. IL CAR CFR B2M ⁺ /CIITA ⁺

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

(表 1 の続き)

IL	TCR ^{neg}	CD16	CAR	CFR	CD38 ⁺	B2M ⁺ /CIITA ⁺	HLA-G又は(CD54 ⁺ /-を伴う又は伴わないCD58 ⁺ /-)	遺伝子型
✓			✓	✓		✓	✓	92. IL CAR CFR B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD58 ⁺ 93. IL CAR CFR B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD54 ⁺ 94. IL CAR CFR B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD58 ⁺ CD54 ⁺ 95. IL CAR CFR B2M ⁺ /CIITA ⁺ HLA-G
✓			✓		✓	✓		96. IL CAR CD38 ⁺ /B2M ⁺ /CIITA ⁺
✓			✓		✓	✓	✓	97. IL CAR CD38 ⁺ /B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD58 ⁺
								98. IL CAR CD38 ⁺ /B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD54 ⁺ 99. IL CAR CD38 ⁺ /B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD58 ⁺ CD54 ⁺ 100. IL CAR CD38 ⁺ /B2M ⁺ /CIITA ⁺ HLA-G
✓				✓	✓	✓		101. IL CFR CD38 ⁺ /B2M ⁺ /CIITA ⁺
✓				✓	✓	✓	✓	102. IL CFR CD38 ⁺ /B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD58 ⁺ 103. IL CFR CD38 ⁺ /B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD54 ⁺ 104. IL CFR CD38 ⁺ /B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD58 ⁺ CD54 ⁺ 105. IL CFR CD38 ⁺ /B2M ⁺ /CIITA ⁺ HLA-G
✓	✓	✓	✓	✓				106. IL TCR ^{neg} CD16 CAR CFR
✓	✓	✓	✓		✓			107. IL TCR ^{neg} CD16 CAR CD38 ⁺
✓	✓	✓	✓		✓	✓		108. IL TCR ^{neg} CD16 CAR B2M ⁺ /CIITA ⁺
✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	109. IL TCR ^{neg} CD16 B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD58 ⁺ 110. IL TCR ^{neg} CD16 B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD54 ⁺ 111. IL TCR ^{neg} CD16 B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD58 ⁺ CD54 ⁺ 112. IL TCR ^{neg} CD16 B2M ⁺ /CIITA ⁺ HLA-G
✓		✓	✓	✓	✓			113. IL CD16 CAR CFR CD38 ⁺
✓		✓	✓	✓		✓		114. IL CD16 CAR CFR B2M ⁺ /CIITA ⁺
✓		✓	✓	✓		✓	✓	115. IL CD16 CAR CFR B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD58 ⁺ 116. IL CD16 CAR CFR B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD54 ⁺ 117. IL CD16 CAR CFR B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD58 ⁺ CD54 ⁺ 118. IL CD16 CAR CFR B2M ⁺ /CIITA ⁺ HLA-G
✓		✓		✓	✓	✓		119. IL CD16 CFR CD38 ⁺ /B2M ⁺ /CIITA ⁺
✓		✓		✓	✓	✓	✓	120. IL CD16 CFR CD38 ⁺ /B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD58 ⁺ 121. IL CD16 CFR CD38 ⁺ /B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD54 ⁺ 122. IL CD16 CFR CD38 ⁺ /B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD58 ⁺ CD54 ⁺ 123. IL CD16 CFR CD38 ⁺ /B2M ⁺ /CIITA ⁺ HLA-G
✓			✓	✓	✓	✓		124. IL CAR CFR CD38 ⁺ /B2M ⁺ /CIITA ⁺

10

20

30

40

50

【表 1 - 5】

IL	TCR ^{neg}	CD16	CAR	CFR	CD38 ⁺	B2M ⁺ /CIITA ⁺	HLA-G又は(CD54 ⁺ を伴う又は、伴わない)CD58 ⁺	遺伝子型
✓			✓	✓	✓	✓	✓	125. IL CAR CFR CD38 ⁺ B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD58 ⁺ 126. IL CAR CFR CD38 ⁺ B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD54 ⁺ 127. IL CAR CFR CD38 ⁺ B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD58 ⁺ CD54 ⁺ 128. IL CAR CFR CD38 ⁺ B2M ⁺ /CIITA ⁺ HLA-G 129. IL TCR ^{neg} CD16 CAR CFR CD38 ⁺ 130. IL TCR ^{neg} CD16 CAR CFR B2M ⁺ /CIITA ⁺ 131. IL TCR ^{neg} CD16 CAR CFR B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD58 ⁺ 132. IL TCR ^{neg} CD16 CAR CFR B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD54 ⁺ 133. IL TCR ^{neg} CD16 CAR CFR B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD58 ⁺ CD54 ⁺ 134. IL TCR ^{neg} CD16 CAR CFR B2M ⁺ /CIITA ⁺ HLA-G 135. IL CD16 CAR CFR CD38 ⁺ B2M ⁺ /CIITA ⁺ 136. IL CD16 CAR CFR CD38 ⁺ B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD58 ⁺ 137. IL CD16 CAR CFR CD38 ⁺ B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD54 ⁺ 138. IL CD16 CAR CFR CD38 ⁺ B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD58 ⁺ CD54 ⁺ 139. IL CD16 CAR CFR CD38 ⁺ B2M ⁺ /CIITA ⁺ HLA-G 140. IL TCR ^{neg} CD16 CAR CFR CD38 ⁺ B2M ⁺ /CIITA ⁺ 141. IL TCR ^{neg} CD16 CAR CFR CD38 ⁺ B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD58 ⁺ 142. IL TCR ^{neg} CD16 CAR CFR CD38 ⁺ B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD54 ⁺ 143. IL TCR ^{neg} CD16 CAR CFR CD38 ⁺ B2M ⁺ /CIITA ⁺ CD58 ⁺ CD54 ⁺ 144. IL TCR ^{neg} CD16 CAR CFR CD38 ⁺ B2M ⁺ /CIITA ⁺ HLA-G

(表 1 の続き)

【 0 1 8 7 】

10. 免疫療法のための抗体

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるゲノム操作されたエフェクター細胞に加えて、状態、疾患、又は指標と関連する抗原を標的とする抗体又はその抗体断片を含む追加の治療剤をこれらのエフェクター細胞とともに併用療法にて使用することができる。いくつかの実施形態では、抗体はモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は、ヒト化抗体、ヒト化モノクローナル抗体、又はキメラ抗体である。いくつかの実施形態では、抗体又は抗体断片は、ウイルス抗原に特異的に結合する。他の実施形態では、抗体又は抗体断片は、腫瘍抗原に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、腫瘍又

10

20

30

40

50

はウイルス特異的抗原は、投与された i P S C 由来エフェクター細胞を活性化して、それらの殺傷能力を増強する。いくつかの実施形態では、投与された i P S C 由来エフェクター細胞に対する追加の治療剤として、併用治療に好適な抗体は、抗 C D 2 0 (リツキシマブ、ベルツズマブ、オフアツムマブ、ウブリツキシマブ、オカラツズマブ、オビヌツズマブ、イブリツモマブ、オクレリズマブ)、抗 C D 2 2 (イノツズマブ、モキセツモマブ、エブラツズマブ)、抗 H E R 2 (トラスツズマブ、ペルツズマブ)、抗 C D 5 2 (アレムツズマブ)、抗 E G F R (セツキシマブ)、抗 G D 2 (ジヌツキシマブ)、抗 P D L 1 (アベルマブ)、抗 C D 3 8 (ダラツムマブ、イサツキシマブ、M O R 2 0 2)、抗 C D 1 2 3 (7 G 3、C S L 3 6 2)、抗 S L A M F 7 (エロツズマブ)、並びにそれらのヒト化又は F c 改変されたバリエーション若しくは断片、又はそれらの機能的同等物及びバイオシミラーを含むがそれらに限定されない。いくつかの実施形態では、投与された i P S C 由来エフェクター細胞に対する追加の治療剤としての併用治療に好適な抗体は、標的細胞上の 2 つ以上の抗原若しくはエピトープを標的とするか、又は標的細胞を標的としながらエフェクター細胞 (例えば、T 細胞、N K 細胞、若しくはマクロファージ細胞) を標的細胞に向けて動員する、二重特異性抗体又は多重特異性抗体を更に含む。このような二重特異性又は多重特異性抗体は、エフェクター細胞 (例えば、T 細胞、N K 細胞、N K T 細胞、B 細胞、マクロファージ、及び／又は好中球) を腫瘍細胞に誘導し、免疫エフェクター細胞を活性化することができるエンゲージャとして機能し、抗体療法の利益を最大化する大きな潜在能力を示している。エンゲージャは、少なくとも 1 つの腫瘍抗原に特異的であり、免疫エフェクター細胞の少なくとも 1 つの表面トリガー受容体に特異的である。エンゲージャの例には、二重特異性 T 細胞エンゲージャ (B i T E)、二重特異性キラー細胞エンゲージャ (B i K E)、三重特異性キラー細胞エンゲージャ (T r i K E)、若しくは多重特異性キラー細胞エンゲージャ、又は複数の免疫細胞型と適合し得るユニバーサルエンゲージャが含まれるが、これらに限定されない。

【0188】

いくつかの実施形態では、i P S C 由来エフェクター細胞は、表 1 に列挙された遺伝子型を含む造血系統細胞を含む。いくつかの実施形態では、i P S C 由来エフェクター細胞は、表 1 に列挙された遺伝子型を含む N K 細胞を含む。いくつかの実施形態では、i P S C 由来エフェクター細胞は、表 1 に列挙された遺伝子型を含む T 細胞を含む。

【0189】

液体腫瘍又は固形腫瘍を治療するのに有用な組み合わせのいくつかの実施形態では、組み合わせは、本明細書において提供されるような、サイトカインシグナル伝達複合体と、必要に応じて C A R と、を少なくとも含む i P S C 由来エフェクター細胞を含む。液体腫瘍又は固形腫瘍の治療に有用な組み合わせのいくつかの他の実施形態では、組み合わせは、予め選択されたモノクローナル抗体と、i P S C 由来エフェクター細胞と、を含み、i P S C 由来エフェクター細胞は、サイトカインシグナル伝達複合体と、必要に応じて C A R 及び外因性 C D 1 6 のうちの 1 つ以上と、を少なくとも含む。液体腫瘍又は固形腫瘍の治療に有用な組み合わせのいくつかの実施形態では、組み合わせは、モノクローナル抗体と、i P S C 由来エフェクター細胞と、を含み、i P S C 由来エフェクター細胞は、少なくともサイトカインシグナル伝達複合体と、必要に応じて C A R と、必要に応じて T C R n e g、外因性 C D 1 6、C F R、サイトカイン及び／又はその受容体若しくはそれらのバリエーションを含む追加のサイトカインシグナル伝達複合体、及び C D 3 8 ノックアウト、のうちの 1 つ以上と、を含む。様々な実施形態では、外因性 C D 1 6 は、h n C D 1 6 である。理論によって制限されることなく、h n C D 1 6 は、モノクローナル抗体の増強された A D C C を提供するが、C A R は、特異的腫瘍抗原を標的とするだけでなく、異なる腫瘍抗原を標的とするモノクローナル抗体と組み合わせる二重標的化戦略を使用して腫瘍抗原エスケープも防止する。

【0190】

いくつかの更なる実施形態では、ダラツムマブとの組み合わせに含まれる i P S C 由来 N K 細胞は、I L 7 R と、必要に応じて C A R と、必要に応じて外因性 C D 1 6、I L 7

のうちの1つ以上と、を含み、CARは、MICA／B、又はCD19、BCMA、CD20、CD22、CD123、HER2、CD52、EGFR、GD2、MSLN、VEGF-R2、PSMA、及びPD-L1のうちの少なくとも1つを標的とし、IL7は、CARと共発現されているか、又は別々に発現され、IL7は、図1の構築物1～3に示される形態のうちのいずれか1つである。

【0191】

11. チェックポイント阻害剤

チェックポイントは、阻害されていない場合に免疫応答を抑制又は下方制御することができる細胞分子、しばしば細胞表面分子である。腫瘍が特定の免疫チェックポイント経路を、特に腫瘍抗原に特異的なT細胞に対する免疫抵抗性の主要なメカニズムとして選択していることが明らかになっている。チェックポイント阻害剤（checkpoint inhibitor、CI）は、チェックポイント遺伝子の発現若しくは遺伝子産物を減少させるか、又はチェックポイント分子の活性を低下させ、それにより阻害性チェックポイントをブロックし、免疫系機能を回復させることができるアンタゴニストである。PD1／PD-L1又はCTLA4を標的化するチェックポイント阻害剤の開発により、腫瘍学の展望が変わり、これらの薬剤は複数の適応症で長期の寛解をもたらしている。しかしながら、多くの腫瘍サブタイプはチェックポイント遮断療法に耐性があり、再発は依然として重大な懸念事項である。したがって、本出願の一態様は、CIとの併用療法に、本明細書で提供されるようなゲノム操作された機能性iPSC由来細胞を含めることにより、CI耐性を克服するための治療アプローチを提供する。併用療法の一実施形態では、iPSC由来細胞は、NK細胞である。併用療法の別の実施形態では、派生細胞はT細胞である。直接的な抗腫瘍能力を示すことに加えて、本明細書で提供される派生NK細胞は、PD-L1－PD1媒介阻害に抵抗し、かつT細胞遊走を増強し、T細胞を腫瘍微小環境に動員し、腫瘍部位でのT細胞活性化を増強する能力を有することが示されている。したがって、機能的に強力なゲノム操作された派生NK細胞によって促進されるT細胞の腫瘍浸潤は、当該NK細胞がチェックポイント阻害剤を含むT細胞標的免疫療法と相乗作用して、局所免疫抑制を緩和し、腫瘍負荷を低減することができることを示している。

【0192】

一実施形態では、チェックポイント阻害剤併用療法のための派生TCR^{neg} NK細胞は、シグナル伝達複合体と、必要に応じて、CAR発現、外因性CD16発現、CFR発現、B2M／CIITAノックアウト、CD38ノックアウト、並びに外因性細胞表面サイトカイン及び／又は受容体発現のうちの1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、又は6つ全てと、を含み、B2Mがノックアウトされている場合、HLA-Gをコードするポリヌクレオチド、又はCD58及びCD54の一方若しくは両方のノックアウトが必要に応じて含まれる。いくつかの実施形態では、派生NK細胞は、表1に列挙された遺伝子型のいずれか1つを含む。いくつかの実施形態では、上記の派生NK細胞は、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、PD1、LAG3、TIM3、RFXANK、RFX5、RFXAP、RAG1、及び染色体6p21領域内の任意の遺伝子のうちの少なくとも1つにおける欠失、破壊、又は発現低下、又はHLA-E、4-1BBL、CD3、CD4、CD8、CD47、CD113、CD131、CD137、CD80、PD-L1、A2AR、CAR、Fc受容体、エンゲージャ、及び二重特異性、多重特異性、若しくはユニバーサルエンゲージャとカップリングするための表面トリガー受容体のうちの少なくとも1つの導入、を更に含む。

【0193】

別の実施形態では、チェックポイント阻害剤併用療法のための派生TCR^{neg} T細胞は、シグナル伝達複合体と、必要に応じて、CAR発現、外因性CD16発現、CFR発現、B2M／CIITAノックアウト、CD38ノックアウト、並びに外因性細胞表面サイトカイン及び／又は受容体発現のうちの1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、又は6つ全てと、を含み、B2Mがノックアウトされている場合、HLA-Gをコードするポリヌクレオチド、又はCD58及びCD54の一方若しくは両方のノックアウトが必要に応じて含

まれる。いくつかの実施形態では、派生エフェクター細胞は、表1に列挙された遺伝子型のうちのいずれか1つを含む。いくつかの実施形態では、上記の派生エフェクター細胞は、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、PD1、LAG3、TIM3、RFXANK、RFX5、RFXAP、RAG1、及び染色体6p21領域内の任意の遺伝子のうちの少なくとも1つにおける欠失、破壊、又は発現低下、又はHLA-E、4-1BBL、CD3、CD4、CD8、CD47、CD113、CD131、CD137、CD80、PDL1、A2AR、CAR、Fc受容体、エンゲージャ、及び二重特異性、多重特異性、若しくはユニバーサルエンゲージャとカップリングするための表面トリガー受容体のうちの少なくとも1つの導入、を更に含む。

【0194】

様々な実施形態では、派生エフェクター細胞は、シグナル伝達複合体と、必要に応じて、CAR発現、外因性CD16発現、B2M/CITANCKアウト、CD38ノックアウト、及び外因性細胞表面サイトカイン発現のうちの1つ、2つ、3つ、4つ、又は5つ全てと、を含むTCR^{neg}iPSCクローン株を分化させることから得られ、B2Mがノックアウトされている場合、HLA-Gをコードするポリヌクレオチド、又はCD58及びCD54の一方若しくは両方のノックアウトが必要に応じて導入される。いくつかの実施形態では、上記のiPSCクローン株は、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、PD1、LAG3、TIM3、RFXANK、RFX5、RFXAP、RAG1、及び染色体6p21領域内の任意の遺伝子のうちの少なくとも1つにおける欠失、破壊、又は発現低下、又はHLA-E、4-1BBL、CD3、CD4、CD8、CD47、CD113、CD131、CD137、CD80、PDL1、A2AR、CAR、Fc受容体、エンゲージャ、及び二重特異性、多重特異性、若しくはユニバーサルエンゲージャとカップリングするための表面トリガー受容体のうちの少なくとも1つの導入、を更に含む。

【0195】

本明細書において提供されるような派生エフェクター細胞との併用療法に好適なチェックポイント阻害剤には、PD-1 (Pdcd1、CD279)、PDL-1 (CD274)、TIM-3 (Havcr2)、TIGIT (WUCAM及びVstm3)、LAG-3 (Lag3、CD223)、CTLA-4 (Ctla4、CD152)、2B4 (CD244)、4-1BB (CD137)、4-1BBL (CD137L)、A2AR、BATE、BTLA、CD39 (Entpd1)、CD47、CD73 (NT5E)、CD94、CD96、CD160、CD200、CD200R、CD274、CEACAM1、CSF-1R、Foxp1、GARP、HVEM、IDO、EDO、TDO、LAIR-1、MICA/B、NR4A2、MAFB、OCT-2 (Pou2f2)、レチノイン酸受容体アルファ (Rara)、TLR3、VISTA、NKG2A/HLA-E、及び抑制性KIR (例えば、2DL1、2DL2、2DL3、3DL1、及び3DL2) のアンタゴニストが含まれるが、これらに限定されない。

【0196】

いくつかの実施形態では、上述のチェックポイント分子のいずれかを阻害するアンタゴニストは抗体である。いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害抗体は、マウス抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダIg、単一可変新規抗原受容体 (VNAR)、サメ重鎖のみ抗体 (IgNAR)、キメラ抗体、組換え抗体、又はそれらの抗体断片であり得る。抗体断片の非限定的な例には、Fab、Fab'、F(ab')₂、F(ab')₃、Fv、一本鎖抗原結合断片 (scFv)、(scFv)₂、ジスルフィド安定化Fv (dsFv)、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、単ドメイン抗原結合断片 (sdAb、ナノボディ)、組換え重鎖のみ抗体 (VHH)、及び抗体全体の結合特異性を維持するその他の抗体断片が含まれ、それらは、抗体全体よりも、製造するのに費用対効果が高く、より簡単に使用することができ、又は感度が高くあり得る。いくつかの実施形態では、1つ又は2つ又は3つ又はそれ超のチェックポイント阻害剤は、アテゾリズマブ (抗PDL1 mAb)、アベルマブ (抗PDL1 mAb)、デュルバルマ

ブ（抗PDL1 mAb）、トレメリムマブ（抗CTLA4 mAb）、イピリムマブ（抗CTLA4 mAb）、IPH4102（抗KIR）、IPH43（抗MICA）、IPH33（抗TLR3）、リリムマブ（抗KIR）、モナリズマブ（抗NKG2A）、ニボルマブ（抗-PD1 mAb）、ペンブロリズマブ（抗PD1 mAb）、及びそれらの派生体、機能的同等物、又はそれらのバイオシミラーの少なくとも1つを含む。

【0197】

いくつかの実施形態では、多くのmiRNAが免疫チェックポイントの発現を制御する調節因子として見出されるため、上述のチェックポイント分子のいずれかを阻害するアンタゴニストはマイクロRNAベースである（Dragomir et al., Cancer Biol Med. 2018, 15 (2) : 103-115）。いくつかの実施形態では、チェックポイント拮抗miRNAは、miR-28、miR-15/16、miR-138、miR-342、miR-20b、miR-21、miR-130b、miR-34a、miR-197、miR-200c、miR-200、miR-17-5p、miR-570、miR-424、miR-155、miR-574-3p、miR-513、及びmiR-29cを含むがこれらに限定されない。

【0198】

提供されるiPSC由来エフェクター細胞を含む併用療法のいくつかの実施形態は、チェックポイント分子を標的化する少なくとも1つの阻害剤を含み、iPSC由来細胞は、表1に列挙された遺伝子型を有する。提供される派生エフェクター細胞との組み合わせ療法のいくつかの他の実施形態は、2つ、3つ以上のチェックポイント分子が標的とされるように、2つ、3つ以上のチェックポイント阻害剤を含む。少なくとも1つのチェックポイント阻害剤及び表1に列挙された遺伝子型を有するiPSC由来細胞を含む組み合わせ療法のいくつかの実施形態では、当該チェックポイント阻害剤は、抗体、又はヒト化若しくはFc改変バリエーション若しくは断片、又はそれらの機能的同等物若しくはバイオシミラーであり、当該チェックポイント阻害剤は、上記抗体、又はその断片若しくはバリエーションをコードする外因性ポリヌクレオチド配列を発現することにより、iPSC由来細胞により産生される。いくつかの実施形態では、抗体をコードする外因性ポリヌクレオチド配列、又はチェックポイントを阻害するその断片若しくはバリエーションは、別個の構築物内、又はCARと抗体若しくはその断片をコードする配列の両方を含むバイシストロン性構築物内のいずれかで、CARと共発現されている。いくつかの更なる実施形態では、抗体又はその断片をコードする配列は、例えば、CAR-2A-CI又はCI-2A-CARのように例示される自己切断2Aコード配列を介してCAR発現構築物の5'又は3'末端のいずれかに連結され得る。したがって、チェックポイント阻害剤とCARのコード配列は、単一のオープンリーディングフレーム（ORF）にあり得る。チェックポイント阻害剤が送達され、腫瘍微小環境（tumor microenvironment、TME）に浸潤することができ誘導エフェクター細胞によってペイロードとして発現及び分泌されると、それは、TMEに結合すると阻害性チェックポイント分子を打ち消し、CARなどのモダリティを活性化するか、又は受容体を活性化することによって、エフェクター細胞を活性化する。いくつかの実施形態では、CARと共発現するチェックポイント阻害剤は、チェックポイント分子、PD-1、PDL-1、TIM-3、TIGIT、LAG-3、CTLA-4、2B4、4-1BB、4-1BBL、A2AR、BATE、BTLA、CD39（Entpd1）、CD47、CD73（NT5E）、CD94、CD96、CD160、CD200、CD200R、CD274、CEACAM1、CSF-1R、Foxp1、GARP、HVEM、IDO、EDO、TDO、LAIR-1、MICA/B、NR4A2、MAFB、OCT-2（Pou2f2）、レチノイン酸受容体アルファ（Rara）、TLR3、VISTA、NKG2A/HLA-E、又は抑制性KIRのうちの少なくとも1つを阻害する。いくつかの実施形態では、表1に列挙される遺伝子型を有する誘導細胞においてCARと共発現するチェックポイント阻害剤は、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、トレメリムマブ、イピリムマブ、IPH4102、IPH43、IPH33、リリムマブ、モナリズマブ、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、及びそれらのヒト化、又

10

20

30

40

50

はFc改変バリエーション、断片、及びそれらの機能的同等物又はバイオシミラーを含む群から選択される。いくつかの実施形態では、CARと共発現するチェックポイント阻害剤は、アテゾリズマブ、又はそのヒト化、又はFc改変バリエーション、断片又はそれらの機能的同等物又はバイオシミラーである。いくつかの他の実施形態では、CARと共発現するチェックポイント阻害剤は、ニボルマブ、又はそのヒト化、又はFc改変バリエーション、断片又はそれらの機能的同等物又はバイオシミラーである。いくつかの他の実施形態では、CARと共発現するチェックポイント阻害剤は、ペンブロリズマブ、又はそのヒト化、又はFc改変バリエーション、断片又はそれらの機能的同等物又はバイオシミラーである。

【0199】

本明細書において提供されるiPSC由来細胞及びチェックポイント分子を阻害する少なくとも1つの抗体を含む併用療法のいくつかの他の実施形態では、当該抗体は、iPSC由来細胞によって、又はiPSC由来細胞内で産生されず、表1に列挙されている遺伝子型を有するiPSC由来細胞の投与の前、それと同時に、又はその後に更に投与される。いくつかの実施形態では、提供される派生エフェクター細胞との組み合わせ療法における1つ、2つ、3つ以上のチェックポイント阻害剤の投与は、同時又は逐次的である。表1に列挙された遺伝子型を有する誘導NK細胞又は誘導T細胞を含む組み合わせ治療の一実施形態では、治療に含まれるチェックポイント阻害剤は、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、トレメリムマブ、イピリムマブ、IPH4102、IPH43、IPH33、リリムマブ、モナリズマブ、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、及びそれらのヒト化、又はFc改変バリエーション、断片、及びそれらの機能的同等物又はバイオシミラーのうち1つ以上である。表1に列挙された遺伝子型を有する派生NK細胞又は派生T細胞を含む組み合わせ治療のいくつかの実施形態では、治療に含まれるチェックポイント阻害剤は、アテゾリズマブ、又はそのヒト化若しくはFc改変バリエーション、断片及びその機能的同等物若しくはバイオシミラーである。表1に列挙された遺伝子型を有する派生NK細胞又は派生T細胞を含む組み合わせ治療のいくつかの実施形態では、治療に含まれるチェックポイント阻害剤は、ニボルマブ、又はそのヒト化若しくはFc改変バリエーション、断片及びその機能的同等物若しくはバイオシミラーである。表1に列挙された遺伝子型を有する派生NK細胞又は派生T細胞を含む組み合わせ治療のいくつかの実施形態では、治療に含まれるチェックポイント阻害剤は、ペンブロリズマブ、又はそのヒト化若しくはFc改変バリエーション、断片及びその機能的同等物若しくはバイオシミラーである。

【0200】

II. iPSCの選択された遺伝子座における標的化ゲノム編集のための方法

本明細書で互換可能に使用されるゲノム編集、又はゲノム編集、又は遺伝子編集は、標的細胞のゲノムにDNAが挿入、欠失、及び／又は置換される一種の遺伝子工学である。標的化ゲノム編集（「標的化ゲノム編集」又は「標的化遺伝子編集」と互換可能である）は、ゲノム内の事前に選択された部位での挿入、欠失、置換を可能にする。標的化編集に挿入部位で内因性配列が欠失すると、影響を受けた配列を含む内因性遺伝子は、配列欠失によりノックアウト又はノックダウンされる可能性がある。したがって、標的化編集を使用して、内因性遺伝子発現を正確に破壊することもできる。本明細書で同様に使用される用語「標的化組み込み」は、挿入部位での内因性配列の欠失を伴うか又は伴わない、1つ以上の外因性配列の挿入を含むプロセスを指す。対照的に、ランダムに組み込まれた遺伝子は位置効果とサイレンシングの影響を受けやすく、その発現は信頼できず、予測できない。例えば、セントロメア及びサブテロメア領域は、特に導入遺伝子サイレンシングを起こしやすい。相互に新しく組み込まれた遺伝子は、周囲の内因性遺伝子とクロマチンに影響を与え、細胞の挙動を変え、又は細胞の形質転換を促進する潜在能力がある。したがって、セーフハーバー遺伝子座やゲノムセーフハーバー（genomic safe harbor、GSH）などの事前に選択された遺伝子座に外来性DNAを挿入することは、安全性、効率、コピー数制御、及び信頼性の高い遺伝子応答制御にとって重要である。

【0201】

標的化編集は、ヌクレアーゼに依存しないアプローチ、又はヌクレアーゼに依存するア

ブローチのいずれかによって実現され得る。ヌクレアーゼに依存しない標的化編集アプローチでは、相同組換えは、宿主細胞の酵素機構を介して、挿入される外因性ポリヌクレオチドに隣接する相同配列によって導かれる。

【0202】

代替的に、特異的なレアカットエンドヌクレアーゼによる二本鎖切断 (double strand break、DSB) の特異的な導入により、より高い頻度で標的化編集を実現することができる。このようなヌクレアーゼ依存の標的化編集は、DSBに応答して発生する非同末端結合 (non-homologous end joining、NHEJ) を含むDNA修復メカニズムを利用する。外因性の遺伝物質を含むドナーベクターがない場合、NHEJは少数の内因性ヌクレオチドのランダムな挿入又は欠失 (インデル) をしばしば引き起こす。対照的に、一対のホモロジームと隣接する外因性遺伝物質を含むドナーベクターが存在する場合、相同組換えによる相同指向性修復 (homology directed repair、HDR) 中に外因性遺伝物質がゲノムに導入され得、「標的化組み込み」がもたらされる。いくつかの状況において、標的化組み込み部位は、選択された遺伝子のコード領域内にあることが意図され、したがって、標的化組み込みは、遺伝子発現を破壊し、1つの単一編集ステップにおいて同時ノックイン及びノックアウト (knock-in and knockout、KI/KO) をもたらし得る。

【0203】

目的の遺伝子座 (gene locus of interest、GOI) における選択位置に1つ以上の導入遺伝子を挿入して、同時に遺伝子をノックアウトすることを達成することができる。同時ノックイン及びノックアウト (KI/KO) に好適な遺伝子座には、B2M、TAP1、TAP2、タバシン、NLRC5、CIITA、RFXANK、RFX5、RFXAP、TCR α 又は β 定常領域、NKG2A、NKG2D、CD25、CD38、CD44、CD58、CD54、CD56、CD69、CD71、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、及びTIGITが含まれるが、これらに限定されない。位置選択的挿入のためのそれぞれの部位特異的標的化ホモロジームにより、導入遺伝子が、部位の内因性プロモータ下又は構築物に含まれる外因性プロモータ下のいずれかで発現されることが可能になる。2つ以上の導入遺伝子が、選択された位置 (例えば、CD38遺伝子座) に挿入される場合、リンカー配列、例えば2Aリンカー又はIRESは、任意の2つの導入遺伝子の間に配置される。2Aリンカーは、FMDV、ERAV、PTV-1、又はTaVに由来する自己切断ペプチド (それぞれ「F2A」、「E2A」、「P2A」、及び「T2A」と称される) をコードし、単一の翻訳から別々のタンパク質を産生することを可能にする。いくつかの実施形態では、導入遺伝子及び/又は外因性プロモータサイレンシングのリスクを低減するために、構築物にインスレータが含まれる。外因性プロモータは、CAG、又はCMV、EF1 α 、PGK、及びUBCを含むがこれらに限定されない他の構成的、誘導性、時間特異的、組織特異的、若しくは細胞型特異的プロモータであり得る。

【0204】

特異的な標的化DSBを導入することができる利用可能なエンドヌクレアーゼには、ジンクフィンガヌクレアーゼ (zinc-finger nuclease、ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (transcription activator-like effector nuclease、TALEN)、RNA誘導CRISPR (Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats、クラスタ化等間隔短鎖回分リピート) システムが含まれるが、これらに限定されない。加えて、phiC31及びBxb1インテグラーゼを利用するDICE (dual integrase cassette exchange、デュアルインテグラーゼカセット交換) システムも、標的化組み込みのための有望なツールである。

【0205】

ZFNは、ジンクフィンガDNA結合ドメインに融合したヌクレアーゼを含む標的化ヌクレアーゼである。「ジンクフィンガDNA結合ドメイン」又は「zinc finger DNA b

10

20

30

40

50

inding domain、Z F B D」とは、1つ以上のジンクフィンガを介して配列特異的な様式でDNAに結合するポリペプチドドメインを意味する。ジンクフィンガは、亜鉛イオンの配位により構造が安定化されるジンクフィンガ結合ドメイン内の約30アミノ酸のドメインである。ジンクフィンガの例には、C₂H₂ジンクフィンガ、C₃Hジンクフィンガ、及びC₄ジンクフィンガが含まれるが、これらに限定されない。「設計された」ジンクフィンガドメインは、天然に存在しないドメインであり、その設計／構成は主に合理的な基準、例えば、既存のZFP設計と結合データの情報を保存するデータベースの情報を処理するための置換ルールとコンピュータ化アルゴリズムの適用に起因する。例えば、米国特許第6,140,081号、同第6,453,242号及び同第6,534,261号を参照されたい。また、国際公開第98/53058号、同第98/53059号、同第98/53060号、同第02/016536号及び同第03/016496号も参照されたい。「選択された」ジンクフィンガドメインは、その生産が主にファージディスプレイ、相互作用トラップ、又はハイブリッド選択などの経験的プロセスから生じる天然では見られないドメインである。ZFNは、米国特許第7,888,121号及び同第7,972,854号で詳細に説明されており、それらの完全な開示は参照により本明細書に組み込まれる。当該技術分野で最も認識されているZFNの例は、FokIヌクレアーゼとジンクフィンガDNA結合ドメインとの融合である。

10

20

30

40

50

【0206】

TAL ENは、TALエフェクターDNA結合ドメインに融合したヌクレアーゼを含む標的化ヌクレアーゼである。「転写活性化因子様エフェクターDNA結合ドメイン」、「TALエフェクターDNA結合ドメイン」、又は「TAL E DNA結合ドメイン」とは、TALエフェクタータンパク質のDNAへの結合に関与するTALエフェクタータンパク質のポリペプチドドメインを意味する。TALエフェクタータンパク質は、感染時にXanthomonas属の植物病原体によって分泌される。これらのタンパク質は植物細胞の核に入り、それらのDNA結合ドメインを介してエフェクター特異的なDNA配列に結合し、トランス活性化ドメインを介してこれらの配列で遺伝子転写を活性化する。TALエフェクターDNA結合ドメインの特異性は、反復可変残基(repeat variable-dir esidue、RVD)と呼ばれる選択された反復位置に多型を含む不完全な34アミノ酸リピートのエフェクター可変数に依存する。TAL ENについては、米国特許出願公開第2011/0145940号により詳細に記載されており、参照により本明細書に組み込まれる。当該技術分野で最も認識されているTAL ENの例は、TALエフェクターDNA結合ドメインへのFokIヌクレアーゼの融合ポリペプチドである。

【0207】

本発明の方法で使用される標的化ヌクレアーゼの別の例は、標的化Spo11ヌクレアーゼ、目的のDNA配列に特異性を有するDNA結合ドメイン、例えばジンクフィンガDNA結合ドメイン、TALエフェクターDNA結合ドメインなどに融合したヌクレアーゼ活性を有するSpo11ポリペプチドを含むポリペプチドである。

【0208】

本発明に好適な標的化ヌクレアーゼの更なる例には、個別に又は組み合わせて使用されるかどうかにかかわらず、Bxb1、phiC31、R4、PhiBT1、及びWβ/SPBc/TP901-1が含まれるが、これらに限定されない。

【0209】

標的化ヌクレアーゼの他の非限定的な例には、天然に存在するヌクレアーゼ及び組換えヌクレアーゼ、cas、cpf、cse、csy、csn、csd、cst、csh、csa、csm、及びcmrを含むファミリーからのCRISPR関連のヌクレアーゼ、制限エンドヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、ホーミングエンドヌクレアーゼなどが挙げられる。

【0210】

一例としてCas9を使用すると、CRISPR/Cas9は、2つの主要な成分：(1) Cas9エンドヌクレアーゼと(2) crRNA-tracrRNA複合体とを必要

とする。共発現すると、2つの成分が複合体を形成し、PAM及びPAM近位のシーディング領域 (seeding region) を含む標的DNA配列に動員される。crRNAとtracrRNAを組み合わせてキメラガイドRNA (gRNA) を形成し、Cas9を選択した配列を標的に導くことができる。次いで、これら2つの成分は、トランスフェクション又は形質導入を介して哺乳動物細胞に送達され得る。CRISPR/Cpf系を使用すると、選択された配列を標的化するようにCpfエンドヌクレアーゼをガイドするために、Cpfエンドヌクレアーゼ (Cpf1、MAD7、及び当該技術分野において既知の更に多くのもの) 及び(2) gNA (これは、多くの場合、tracrRNAを必要としない) が必要とされる。

【0211】

DICEを介した挿入は、例えば、phiC31とBxb1などのリコンビナーゼの1対を使用して、各酵素自体の小さなattB及びattP認識部位に厳しく制限されている外因性DNAの一方の組み込みを提供する。これらの標的化att部位は哺乳類のゲノムには天然に存在しないため、最初に所望の組み込み部位のゲノムに導入する必要がある。例えば、米国特許出願公開第2015/0140665号 (その開示は参照により本明細書に組み込まれる) を参照されたい。

【0212】

本発明の一態様は、標的化されたゲノム組み込みのための1つ以上の外因性ポリヌクレオチドを含む構築物を提供する。一実施形態では、構築物は、所望の組み込み部位に特異的な1対の相同アームを更に含み、標的化組み込みの方法は、構築物を細胞に導入して、細胞宿主酵素機構による部位特異的相同組換えを可能にすることを含む。別の実施形態では、細胞における標的化組み込みの方法は、1つ以上の外因性ポリヌクレオチドを含む構築物を細胞に導入することと、所望の組み込み部位に特異的なDNA結合ドメインを含むZFN発現カセットを細胞に導入してZFNを介した挿入を可能にすることと、を含む。更に別の実施形態では、細胞における標的化組み込みの方法は、1つ以上の外因性ポリヌクレオチドを含む構築物を細胞に導入することと、所望の組み込み部位に特異的なDNA結合ドメインを含むTALEN発現カセットを細胞に導入してTALENを介した挿入を可能にすることと、を含む。別の実施形態では、細胞における標的化組み込みの方法は、1つ以上の外因性ポリヌクレオチドを含む構築物を細胞に導入することと、Cas9発現カセット及び所望の組み込み部位に特異的なガイド配列を含むgRNAを細胞に導入してCas9を介した挿入を可能にすることと、を含む。更に別の実施形態では、細胞における標的化組み込みの方法は、1対のDICEリコンビナーゼの1つ以上のatt部位を含む構築物を細胞内の所望の組み込み部位に導入することと、1つ以上の外因性ポリヌクレオチドを含む構築物を細胞に導入することと、DICEリコンビナーゼ用の発現カセットを導入し、DICEを介した標的化組み込みを可能にすることと、を含む。

【0213】

標的化組み込みのための有望な部位には、ヒトのゲノムの遺伝子内又は遺伝子外領域であり、理論的には、宿主細胞又は生物に悪影響を与えることなく、新たに組み込まれたDNAの予測可能な発現に対応できる、セーフハーバー遺伝子座、又はゲノムセーフハーバー (GSH) が含まれるが、これらに限定されない。有用なセーフハーバーは、ベクターにコードされたタンパク質又は非コードRNAの望ましいレベルを生成するために十分な導入遺伝子発現を可能にする必要がある。セーフハーバーはまた、細胞を悪性形質転換しやすくし、又は細胞機能を変化させるものであってはならない。組み込み部位が、潜在的なセーフハーバー遺伝子座であるためには、理想的には、以下を含むがこれらに限定されない基準を満たす必要がある：配列アノテーションによって判断されるような、調節エレメント又は遺伝子の破壊が存在しないこと、遺伝子密集領域内の遺伝子間領域、又は反対方向に転写された2つの遺伝子の間の収束位置であること、ベクターにコードされた転写活性化因子と、隣接する遺伝子、特にがん関連遺伝子及びマイクロRNA遺伝子のプロモーターとの間の長距離相互作用の可能性を最小限にする距離を保つこと、並びに遍在的な転写活性を示す、広範な空間的及び時間的発現配列タグ (expressed sequence tag、E

10

20

30

40

50

S T) 発現パターンによって反映されるような、明らかに遍在的な転写活性を有すること。この後者の特質は幹細胞で特に重要であり、幹細胞では、分化中にクロマチンのリモデリングが通常、いくつかの遺伝子座のサイレンシングと他の遺伝子座の潜在的な活性化をもたらす。外因性挿入に好適な領域内では、挿入のために選択された正確な遺伝子座は、反復要素と保存された配列を欠き、ホモロジアームの増幅用のプライマーを簡単に設計することができるはずである。

【0214】

ヒトゲノム編集、又は具体的には標的化組み込みに好適な部位には、アデノ随伴ウイルス部位1 (adeno-associated virus site 1、AAVS1)、ケモカイン (CCモチーフ) 受容体5 (CCR5) 遺伝子座、及びマウスROSA26遺伝子座のヒトのオルソログが含まれるが、これらに限定されない。加えて、マウスH11遺伝子座のヒトオルソログはまた、本明細書に開示される標的化組み込みの組成物及び方法を使用して挿入するための好適な部位であり得る。更に、コラーゲンとHTRP遺伝子座は、標的化組み込みのためのセーフハーバーとしても使用され得る。しかしながら、選択した各部位の検証は、特定の組み込み事象のために特に幹細胞で必要であることが示されており、プロモータの選択、外因性遺伝子の配列と配置、構築物の設計などの挿入戦略の最適化がしばしば必要である。

【0215】

標的化されたインデルのために、編集部位はしばしばその発現及び／又は機能が破壊されることが意図されている内因性遺伝子に含まれている。一実施形態では、標的化されたインデルを含む内因性遺伝子は、免疫応答の調節及び調整と関連する。いくつかの他の実施形態では、標的化インデルを含む内因性遺伝子は、標的化モダリティ、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、薬物標的候補、免疫応答調節及び修飾、あるいは幹細胞及び／又は前駆細胞、並びにそれらに由来する細胞の生着、輸送、ホーミング、生存能力、自己複製、持続性、及び／又は生存率を抑制するタンパク質と関連する。

【0216】

したがって、本発明の別の態様は、ゲノムセーフハーバーを含む選択された遺伝子座、又は本明細書において提供されるような、B2M、TAP1、TAP2、タパシン、TRAC、若しくはCD38遺伝子座などの継続的又は一時的な遺伝子発現について安全かつ十分に調節されていることがわかっている若しくは証明された事前に選択された遺伝子座における標的化組み込みの方法を提供する。一実施形態では、標的化組み込みの方法のためのゲノムセーフハーバーは、AAVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HTRP、H11、ベーター2ミクログロブリン、CD38、GAPDH、TCR、若しくはRUNX1、又はゲノムセーフハーバーの基準を満たす他の遺伝子座を含む、1つ以上の望ましい組み込み部位を含む。いくつかの実施形態では、標的化組み込みは、組み込みの結果としての遺伝子のノックダウン又はノックアウトが望まれる、1つ以上の遺伝子座にあり、そのような遺伝子座には、B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、CIITA、RFXANK、RFX5、RFXAP、TCR α 又は β 定常領域、NKG2A、NKG2D、CD25、CD38、CD44、CD58、CD54、CD56、CD69、CD71、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、及びTIGITが含まれるが、これらに限定されない。

【0217】

一実施形態では、細胞における標的化組み込みの方法は、1つ以上の外因性ポリヌクレオチドを含む構築物を細胞に導入することと、所望の組み込み部位に特異的なホモロジアームの対及び1つ以上の外因性配列を含む構築物を導入して、細胞宿主酵素機構による部位特異的相同組換えを可能にすることと、を含み、所望の組み込み部位は、AAVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HTRP、H11、GAPDH、RUNX1、B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、CIITA、RFXANK、RFX5、RFXAP、TCR α 若しくは β 定常領域、NKG2A、NKG2D、CD25、CD38、CD44、CD58、CD54、CD56、CD69、CD71、CIS、CB

L-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、又はTIGITを含む。

【0218】

別の実施形態では、細胞における標的化組み込みの方法は、1つ以上の外因性ポリヌクレオチドを含む構築物を細胞に導入することと、所望の組み込み部位に特異的なDNA結合ドメインを含むZFN発現カセットを細胞に導入して、ZFN媒介挿入を可能にすることと、を含み、所望の組み込み部位は、AAVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HTRP、H11、GAPDH、RUNX1、B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、CIITA、RFXANK、RFX5、RFXAP、TCR α 若しくは β 定常領域、NKG2A、NKG2D、CD25、CD38、CD44、CD58、CD54、CD56、CD69、CD71、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、又はTIGITを含む。更に別の実施形態では、細胞における標的化組み込みの方法は、1つ以上の外因性ポリヌクレオチドを含む構築物を細胞に導入することと、所望の組み込み部位に特異的なDNA結合ドメインを含むTALEN発現カセットを細胞に導入して、TALEN媒介挿入を可能にすることと、を含み、所望の組み込み部位は、AAVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HTRP、H11、GAPDH、RUNX1、B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、CIITA、RFXANK、RFX5、RFXAP、TCR α 若しくは β 定常領域、NKG2A、NKG2D、CD25、CD38、CD44、CD58、CD54、CD56、CD69、CD71、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、又はTIGITを含む。別の実施形態では、細胞における標的化組み込みの方法は、1つ以上の外因性ポリヌクレオチドを含む構築物を細胞に導入することと、所望の組み込み部位に特異的なCas9発現カセット、及びガイド配列を含むgRNAを細胞に導入して、Cas9媒介挿入を可能にすることと、を含み、所望の組み込み部位は、AAVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HTRP、H11、GAPDH、RUNX1、B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、CIITA、RFXANK、RFX5、RFXAP、TCR α 若しくは β 定常領域、NKG2A、NKG2D、CD25、CD38、CD44、CD58、CD54、CD56、CD69、CD71、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、又はTIGITを含む。更に別の実施形態では、細胞における標的化組み込みの方法は、DICEレコンビナーゼの対の1つ以上のatt部位を含む構築物を細胞における所望の組み込み部位に導入することと、1つ以上の外因性ポリヌクレオチドを含む構築物を細胞に導入することと、DICEレコンビナーゼの発現カセットを導入して、DICE媒介標的化組み込みを可能にすることと、を含み、所望の組み込み部位は、AAVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HTRP、H11、GAPDH、RUNX1、B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、CIITA、RFXANK、RFX5、RFXAP、TCR α 若しくは β 定常領域、NKG2A、NKG2D、CD25、CD38、CD44、CD58、CD54、CD56、CD69、CD71、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、又はTIGITを含む。

【0219】

更に、本明細書で提供されるように、セーフハーバーでの標的化組み込みのための上述の方法は、目的のポリヌクレオチド、例えば、安全スイッチタンパク質、標的化モダリティ、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、薬学的に活性なタンパク質及びペプチド、薬物標的候補、及び幹細胞及び／又は前駆細胞の生着、輸送、ホーミング、生存能力、自己複製、持続性、及び／又は生存率を促進するタンパク質をコードするポリヌクレオチドを挿入するために使用される。いくつかの他の実施形態では、1つ以上の外因性ポリヌクレオチドを含む構築物は、1つ以上のマーカー遺伝子を更に含む。一実施形態では、本発明の構築物中の外因性ポリヌクレオチドは、安全スイッチタンパク質をコードする自殺遺伝子である。誘導された細胞死のための好適な自殺遺伝子系としては、カスパーゼ9（又はカスパーゼ3若しくは7）及びAP1903、チミジンキナーゼ（thymidine kinase

10

20

30

40

50

、TK) 及びガンシクロビル (ganciclovir、GCV)、シトシンデアミナーゼ (cytosine deaminase、CD) 及び5-フルオロシトシン (5-fluorocytosine、5-FC) が挙げられるが、これらに限定されない。加えて、一部の自殺遺伝子系は細胞型に特異的であり、例えば、B細胞分子CD20によるTリンパ球の遺伝子改変は、mAbリツキシマブの投与時にそれらを排除することができる。更に、セツキシマブによって認識されるエピトープを含む改変されたEGFRは、細胞がセツキシマブに曝露されたときに遺伝子操作された細胞を枯渇させるために使用することができる。したがって、本発明の一態様は、カスパーゼ9 (カスパーゼ3又は7)、チミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、改変EGFR、及びB細胞CD20から選択される安全スイッチタンパク質をコードする1つ以上の自殺遺伝子の標的化組み込みの方法を提供する。

10

【0220】

いくつかの実施形態では、本明細書の方法によって組み込まれた1つ以上の外因性ポリヌクレオチドは、標的化組み込みのための構築物に含まれる作動可能に連結された外因性プロモータによって駆動される。プロモータは、誘導性又は構成的であり得、時間特異的、組織特異的又は細胞型特異的であり得る。本発明の方法に好適な構成的プロモータには、サイトメガロウイルス (CMV)、伸長因子1 α (elongation factor 1 α 、EF1 α)、ホスホグリセリン酸キナーゼ (phosphoglycerate kinase、PGK)、ハイブリッドCMVエンハンサ／ニワトリ β -アクチン (CAG)、及びユビキチンC (ubiquitin C、UBC) プロモータが含まれるが、これらに限定されない。一実施形態では、外因性プロモータはCAGである。

20

【0221】

本明細書において提供される方法によって組み込まれた外因性ポリヌクレオチドは、組み込み部位において、宿主ゲノム中の内因性プロモータによって駆動され得る。一実施形態では、本発明の方法は、細胞のゲノムにおけるAAVS1遺伝子座における1つ以上の外因性ポリヌクレオチドの標的化組み込みのために使用される。一実施形態では、少なくとも1つの組み込まれたポリヌクレオチドは、内因性AAVS1プロモータによって駆動される。別の実施形態では、本発明の方法は、細胞のゲノムにおけるROSA26遺伝子座での標的化組み込みのために使用される。一実施形態では、少なくとも1つの組み込まれたポリヌクレオチドは、内因性ROSA26プロモータによって駆動される。更に別の実施形態では、本発明の方法は、細胞のゲノムにおけるH11遺伝子座での標的化組み込みのために使用される。一実施形態では、少なくとも1つの組み込まれたポリヌクレオチドは、内因性H11プロモータによって駆動される。別の実施形態では、本発明の方法は、細胞のゲノムにおけるコラーゲン遺伝子座での標的化組み込みのために使用される。一実施形態では、少なくとも1つの組み込まれたポリヌクレオチドは、内因性コラーゲンプロモータによって駆動される。更に別の実施形態では、本発明の方法は、細胞のゲノムにおけるHTRP遺伝子座での標的化組み込みのために使用される。一実施形態では、少なくとも1つの組み込まれたポリヌクレオチドは、内因性HTRPプロモータによって駆動される。理論的には、所望の位置での正しい挿入のみが、内因性プロモータによって駆動される外因性遺伝子の遺伝子発現を可能にするであろう。

30

【0222】

いくつかの実施形態では、標的化組み込みの方法のための構築物に含まれる1つ以上の外因性ポリヌクレオチドは、1つのプロモータによって駆動される。いくつかの実施形態では、構築物は、同じプロモータによって駆動される2つの隣接するポリヌクレオチド間に1つ以上のリンカー配列を含み、部分間の物理的分離を高め、酵素機構へのアクセスを最大にする。リンカー配列のリンカーペプチドは、関連する機能に応じて、部分 (外因性ポリヌクレオチド、及び／又はそこからコードされるタンパク質又はペプチド) 間の物理的分離をより柔軟又はより堅くするように選択されたアミノ酸からなり得る。リンカー配列は、プロテアーゼにより切断可能であり得るか、又は化学的に切断可能であり、別個の部分を生じ得る。リンカーにおける酵素的切断部位の例には、エンテロキナーゼ、第Xa因子、トリプシン、コラーゲナーゼ、及びトロンビンなどのタンパク質分解酵素による切断

40

50

のための部位が含まれる。いくつかの実施形態では、プロテアーゼは、宿主によって天然に産生されるものであるか、又は外因的に導入される。代替的に、リンカー中の切断部位は、選択された化学物質又は条件、例えば臭化シアン、ヒドロキシルアミン、又は低 pH への曝露時に切断され得る部位であり得る。必要に応じたリンカー配列は、切断部位の提供以外の目的を果たし得る。リンカー配列は、部分が適切に機能するために、別の隣接部分に対する部分の効果的な配置を可能にするべきである。リンカーはまた、部分間のあらゆる立体障害を防ぐのに十分な長さの単純なアミノ酸配列であってもよい。加えて、リンカー配列は、例えば、リン酸化部位、ビオチン化部位、硫酸化部位、γ-カルボキシル化部位などを含むがこれらに限定されない翻訳後改変を提供することができる。いくつかの実施形態では、リンカー配列は、生物学的に活性なペプチドを単一の望ましくない立体配座に保持しないように柔軟である。リンカーは、柔軟性を提供するために、グリシン、アラニン、及びセリンなどの小さな側鎖を有するアミノ酸から主になってもよい。いくつかの実施形態では、リンカー配列の約 80 又は 90 パーセント以上が、グリシン、アラニン、又はセリン残基、特にグリシン及びセリン残基を含む。いくつかの実施形態では、G4S リンカーペプチドは、融合タンパク質の末端プロセシング及びエンドヌクレアーゼドメインを分離する。他の実施形態では、2A リンカー配列は、2つの別個のタンパク質が単一の翻訳から産生されることを可能にする。好適なリンカー配列は、経験的に容易に同定することができる。加えて、リンカー配列の好適なサイズ及び配列はまた、従来のコンピュータモデリング技術によって決定され得る。一実施形態では、リンカー配列は、自己切断ペプチドをコードする。一実施形態では、自己切断ペプチドは 2A である。いくつかの他の実施形態では、リンカー配列は、配列内リボソーム進入部位 (Internal Ribosome Entry Sequence、IRES) を提供する。いくつかの実施形態では、任意の 2 つの連続するリンカー配列は異なる。

10

20

30

40

50

【0223】

標的化組み込みのための外因性ポリヌクレオチドを含む構築物を細胞に導入する方法は、それ自体既知の細胞への遺伝子移入の方法を使用して達成することができる。一実施形態では、構築物は、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、センダイウイルスベクターなどのウイルスベクターの骨格を含む。いくつかの実施形態では、プラスミドベクターは、外因性ポリヌクレオチドを標的細胞（例えば、pA1-11、pXT1、pRC/CMV、pRC/RSV、pCDNA1/Neo）などに送達及び／又は発現するために使用される。いくつかの他の実施形態では、エピソームベクターは、外因性ポリヌクレオチドを標的細胞に送達するために使用される。いくつかの実施形態では、組換えアデノ随伴ウイルス (recombinant adeno-associated virus、rAAV) を遺伝子操作に使用して、相同組換えを介して挿入、欠失、又は置換を導入することができる。レンチウイルスとは異なり、rAAV は宿主ゲノムに組み込まれない。加えて、エピソーム rAAV ベクターは、従来の標的化プラスミドのトランスフェクションと比較して、相同指向性遺伝子標的化をはるかに高い割合で仲介する。いくつかの実施形態では、AAV6 又は AAV2 ベクターを使用して、iPSC のゲノム中の標的部位に挿入、欠失、又は置換を導入する。いくつかの実施形態では、本明細書の方法及び組成物を使用して取得されたゲノム改変された iPSC 及びその派生細胞は、表 1 に列挙された少なくとも 1 つの遺伝子型を含む。

【0224】

III. ゲノム操作された iPSC を取得及び維持する方法

本発明は、1 つ以上の所望の部位での 1 つ以上の標的化編集を含むゲノム操作された iPSC を取得及び維持する方法であって、標的化編集が、増殖されたゲノム操作された iPSC 又は iPSC 派生非多能性細胞において、それぞれの選択した編集部位で無傷で機能的であり続ける、方法を提供する。標的化編集は、iPSC 及びそれからの派生細胞のゲノムに、挿入、欠失、及び／又は置換を導入、すなわち、選択した部位での標的化組み込み及び／又はインデルを導入する。患者由来の末梢血由来一次エフェクター細胞の直接操作と比較して、本明細書において提供される iPSC の編集及び分化を通じてゲノム操

作された i P S C 由来エフェクター細胞を得ることの多くの利点としては、操作されたエフェクター細胞の供給源が無制限であること、特に複数の操作された様式が関与する場合、エフェクター細胞の反復操作の必要がないこと、得られたエフェクター細胞が、伸長したテロメアを有し、消耗が少ないために若返っていること、エフェクター細胞集団は、編集部位、コピー数、並びに対立遺伝子変異、ランダム変異及び発現多様性 (variegation) の欠如に関して均質であり、これは主に、本明細書において提供される操作された i P S C におけるクローン選択が可能であること、に起因する。

【0225】

特定の実施形態では、1つ以上の選択された部位に1つ以上の標的化編集を含むゲノム操作された i P S C は、運命維持培地 (Fate Maintenance Medium、FMM) として表2に示される細胞培養培地で長期間単一細胞として維持、継代、及び増殖され、i P S C は、選択された部位で標的化編集と機能改変を保持する。培地の成分は、表2に示される最適範囲内の量で培地中に存在し得る。FMM中で培養された i P S C は、それらの未分化プロファイル及び基底プロファイル又はナイーブプロファイルを維持し続けること、培養洗浄又は選択を必要としないゲノム安定性及び胚様体又は単層を介するインビトロ分化である (胚様体の形成を伴わない) 3つの体細胞系統全てを容易に生じること、及びテラトーマ形成によるインビボ分化、が示されている。例えば、国際公開第2015/134652号 (その開示が参照により本明細書に組み込まれる) を参照されたい。

【表2】

表2：i P S C のリプログラミング及び維持のための例示的な培地

従来のhESC培地 (Conv.)	運命リプログラミング培地 (Fate Reprogramming Medium、FRM)	運命維持培地 (FMM)
DMEM/F12	DMEM/F12	DMEM/F12
ノックアウト血清交換 (20%)	ノックアウト血清交換 (20%)	ノックアウト血清交換 (20%)
	N2	
	B27	
グルタミン	グルタミン	グルタミン (1倍)
非必須アミノ酸 (1倍)	非必須アミノ酸 (1倍)	非必須アミノ酸 (1倍)
β -メルカプトエタノール (100 μ M)	β -メルカプトエタノール (100 μ M)	β -メルカプトエタノール (100 μ M)
bFGF (0.2~50ng/mL)	bFGF (2~500ng/mL)	bFGF (2~500ng/mL)
	LIF (0.2~50ng/mL)	LIF (0.2~50ng/mL)
	チアゾピピン (0.1~25 μ M)	チアゾピピン (0.1~25 μ M)
	PD0325901 (0.005~2 μ M)	PD0325901 (0.005~2 μ M)
	CHIR99021 (0.02~5 μ M)	CHIR99021 (0.02~5 μ M)
	SB431542 (0.04~10 μ M)	
MEFフィーダ細胞との組み合わせ	フィーダを含まない、Matrigel (商標) 又はビトロネクチンとの組み合わせ	

【0226】

いくつかの実施形態では、1つ以上の標的化組み込み及び／又はインデルを含むゲノム操作された i P S C は、MEK阻害剤、GSK3阻害剤、及びROCK阻害剤を含む培地中で維持され、継代され、増殖され、TGF β 受容体／ALK5阻害剤を含まないか、又は本質的に含まず、i P S C は、選択された部位において無傷で機能的な標的化編集を保持する。

【0227】

本明細書に提示されるように、サイトカイン受容体融合 (receptor fusion、RF) 導入遺伝子を含有するCAR-i T細胞は、RF導入遺伝子を欠くCAR-i T細胞と比較して、外因性サイトカイン支持に依存せずに分化及び増殖させた場合に、増強された持続性を付与することが見出された。したがって、いくつかの実施形態では、1つ以上の標的化組み込み及び／又はインデルを含むゲノム操作 i P S C は、外因性IL15を含有しない培地中で維持され、継代され、増殖されている。いくつかの実施形態では、1つ以上

の標的化組み込み及び／又はインデルを含むゲノム操作 i P S C は、外因性 I L 2 及び I L 7 の一方又は両方を含む培地中で維持され、継代され、増殖されている。いくつかの実施形態では、1つ以上の標的化組み込み及び／又はインデルを含むゲノム操作 i P S C は、外因性サイトカインを含有しない培地中で維持され、継代され、増殖されている。

【0228】

本発明の別の態様は、i P S C の標的化編集を通じて、あるいは最初に標的化編集によりゲノム操作非多能性細胞を生成し、次に選択／分離されたゲノム操作非多能性細胞をリプログラミングして非多能性細胞と同じ標的化編集を含む i P S C を取得することを通じて、ゲノム操作された i P S C を生成する方法を提供する。本発明の更なる態様は、標的化組み込み及び／又は標的化インデルを細胞に導入することによって同時にリプログラミングを受けているゲノム操作非多能性細胞を提供し、接触した非多能性細胞はリプログラミングに十分な条件下にあり、リプログラミングの条件は、非多能性細胞を1つ以上のリプログラミング因子及び小分子と接触させることを含む。同時のゲノム操作及びリプログラミングのための方法の様々な実施形態では、非多能性細胞を1つ以上のリプログラミング因子及び任意に小分子と接触させることによりリプログラミングを開始する前に、又は本質的に同時に、非標的多能性細胞に標的化組み込み及び／又は標的化インデルを導入することができる。

10

【0229】

いくつかの実施形態では、非多能性細胞を同時にゲノム操作及びリプログラミングするために、標的化組み込み及び／又はインデルはまた、非多能性細胞を1つ以上のリプログラミング因子及び小分子と接触させることによりリプログラミングの複数日のプロセスが開始された後に非多能性細胞に導入され得、リプログラミング細胞が S S E A 4、T r a 1 8 1 及び C D 3 0 を含むがこれらに限定されない1つ以上の内因性多能性遺伝子の安定した発現を示す前に、構築物を担持するベクターが導入される。

20

【0230】

いくつかの実施形態では、リプログラミングは、非多能性細胞を少なくとも1つのリプログラミング因子、及び必要に応じて T G F β 受容体／A L K 阻害剤、M E K 阻害剤、G S K 3 阻害剤、及び R O C K 阻害剤の組み合わせ (F R M ; 表 2) と接触させることにより開始される。いくつかの実施形態では、上述の任意の方法によるゲノム操作された i P S C は、M E K 阻害剤、G S K 3 阻害剤、及び R O C K 阻害剤の組み合わせを含む混合物 (F M M ; 表 2) を使用して更に維持及び増殖されている。いくつかの実施形態では、ゲノム操作 i P S C は、外因性 I L 1 5 を含有しない培地中で維持され、継代され、増殖されている。いくつかの実施形態では、ゲノム操作 i P S C は、外因性 I L 2 及び I L 7 の一方又は両方を含む培地中で維持され、継代され、増殖されている。いくつかの実施形態では、ゲノム操作 i P S C は、外因性サイトカインを含有しない培地中で維持され、継代され、増殖されている。

30

【0231】

ゲノム操作された i P S C を生成する方法のいくつかの実施形態では、方法は、i P S C に1つ以上の標的化組み込み及び／又はインデルを導入して i P S C をゲノム操作し、表 1 に列挙された少なくとも1つの遺伝子型を有するゲノム操作された i P S C を取得することを含む。代替的に、ゲノム操作された i P S C を生成する方法は、(a) 1つ以上の標的化編集を非多能性細胞に導入して、選択した部位で標的化組み込み及び／又はインデルを含むゲノム操作非多能性細胞を取得することと、(b) ゲノム操作された非多能性細胞を1つ以上のリプログラミング因子、及び任意に T G F β 受容体／A L K 阻害剤、M E K 阻害剤、G S K 3 阻害剤及び／又は R O C K 阻害剤を含む小分子組成物と接触させて、選択された部位で標的化組み込み及び／又はインデルを含むゲノム操作された i P S C を取得することと、を含む。代替的に、ゲノム操作された i P S C を生成する方法は、(a) 非多能性細胞を、1つ以上のリプログラミング因子、並びに必要に応じて、T G F β 受容体／A L K 阻害剤、M E K 阻害剤、G S K 3 阻害剤及び／又は R O C K 阻害剤を含む小分子組成物と接触させて、非多能性細胞のリプログラミングを開始することと、(b)

40

50

ゲノム操作のためにリプログラミング非多能性細胞に1つ以上の標的組込み及び／又は挿入／欠失を導入することと、(c)選択された部位に標的組込み及び／又は挿入／欠失を含むゲノム操作されたiPSCを得ることと、を含む。上記の方法のいずれかは、クローンiPSCを得るために、ゲノム操作されたiPSCの単一細胞ソーティングを更に含む得る。外因性IL15を含有しない培地中でのこのゲノム操作iPSCのクローン増殖を通じて、又は外因性IL2及びIL7の一方若しくは両方を含む培地中で、又は外因性サイトカインを含有しない培地中で、本明細書において表1に提供される少なくとも1つの表現型を有するソーティングされた単一細胞及び増殖されたクローン操作iPSCを含むようにマスター細胞バンクが生成される。マスター細胞バンクは、続いて凍結保存され、更なるiPSC操作のためのプラットフォーム、及び既製の操作された均質な細胞療法製品を製造するための再生可能な供給源を提供し、これらの製品は、組成が明確かつ均一であり、費用効果の高い様式で大規模に大量生産することができる。

10

【0232】

リプログラミング因子は、国際公開第2015/134652号及び同第2017/066634号に開示されているような、OCT4、SOX2、NANOG、KLF4、LIN28、C-MYC、ECAT1、UTF1、ESRRB、SV40LT、HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3、L1TD1、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択され、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。1つ以上のリプログラミング因子は、ポリペプチドの形態であり得る。リプログラミング因子はまた、ポリヌクレオチドの形態であり得、したがって、レトロウイルス、センダイウイルス、アデノウイルス、エピソード、プラスミド、及びミニサークルなどのベクターによって非多能性細胞に導入される。特定の実施形態では、少なくとも1つのリプログラミング因子をコードする1つ以上のポリヌクレオチドは、レンチウイルスベクターによって導入される。いくつかの実施形態では、1つ以上のポリヌクレオチドはエピソードベクターによって導入される。様々な他の実施形態では、1つ以上のポリヌクレオチドは、センダイウイルスベクターによって導入される。いくつかの実施形態では、1つ以上のポリヌクレオチドは、プラスミドの組み合わせによって導入される。例えば、国際公開第2019/075057号（その開示が参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

20

【0233】

いくつかの実施形態では、非多能性細胞は、同一の又は異なる選択された部位での標的化組み込みのための複数のベクターによって、異なる外因性ポリヌクレオチド及び／又は異なるプロモータを含む複数の構築物で移入される。これらの外因性ポリヌクレオチドは、自殺遺伝子、又は標的化モダリティ、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、薬学的に活性なタンパク質及びペプチド、薬物標的候補、又はiPSC若しくはそれからの派生細胞の生着、輸送、ホーミング、生存能力、自己複製、持続性、及び／又は生存率を促進するタンパク質をコードする遺伝子を含む得る。いくつかの実施形態では、外因性ポリヌクレオチドは、siRNA、shRNA、miRNA、及びアンチセンス核酸を含むがこれらに限定されないRNAをコードする。これらの外因性ポリヌクレオチドは、構成的プロモータ、誘導性プロモータ、時間特異的プロモータ、及び組織特異的又は細胞型特異的プロモータからなる群から選択される1つ以上のプロモータによって駆動され得る。したがって、ポリヌクレオチドは、プロモータを活性化する条件下で、例えば、誘導剤の存在下で、又は特定の分化した細胞型で発現可能である。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、iPSC及び／又はiPSCから分化した細胞で発現されている。一実施形態では、1つ以上の自殺遺伝子は、構成的プロモータにより駆動され、例えば、CAGにより駆動されるキャパーゼ9である。異なる外因性ポリヌクレオチド及び／又は異なるプロモータを含むこれらの構築物は、同時又は連続的に非多能性細胞に移入することができる。複数の構築物の標的化組み込みに供される非多能性細胞は、1つ以上のリプログラミング因子に同時に接触させて、ゲノム操作と同時にリプログラミングを開始することができ、これにより、同じ細胞のプールに複数の標的化組み込みを含むゲノム操作されたiP

30

40

50

SCを取得することができる。このように、この堅牢な方法により、同時のリプログラミングと操作戦略により、選択された1つ以上の標的部位に組み込まれた複数のモダリティを持つクローンゲノム操作hiPSCを派生させることができる。いくつかの実施形態では、本明細書の方法及び組成物を使用して取得されたゲノム改変されたiPSC及びその派生細胞は、表1に列挙された少なくとも1つの遺伝子型を含む。

【0234】

IV. ゲノム操作されたiPSCを分化させることにより遺伝子操作されたエフェクター細胞を取得する方法

本発明の更なる態様は、奇形腫形成によるゲノム操作されたiPSCのインビボ分化の方法を提供し、ゲノム操作されたiPSCからインビボで誘導された分化細胞は、所望の部位で標的化組み込み及び／又はインデルを含む無傷で機能的な標的化編集を保持する。いくつかの実施形態では、奇形腫を介してゲノム操作されたiPSCからインビボで誘導された分化細胞は、AAVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HTRP、H11、ベータ2ミクログロブリン、CD38、GAPDH、TCR、若しくはRUNX1、又はゲノムセーフハーバーの基準を満たす他の遺伝子座を含む、1つ以上の望ましい部位に組み込まれた1つ以上の誘導性自殺遺伝子を含む。いくつかの他の実施形態では、奇形腫を介してゲノム操作されたiPSCからインビボで誘導された分化細胞は、標的化モダリティをコードするポリヌクレオチド、又は幹細胞及び／若しくは前駆細胞の輸送、ホーミング、生存能力、自己複製、持続性、及び／若しくは生存率を促進するタンパク質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、1つ以上の誘導性自殺遺伝子を含む奇形腫を介してゲノム操作されたiPSCからインビボで派生した分化細胞は、免疫応答の調節及び媒介と関連する内因性遺伝子の1つ以上のインデルを更に含む。いくつかの実施形態では、インデルは、1つ以上の内因性チェックポイント遺伝子に含まれる。いくつかの実施形態では、インデルは、1つ以上の内因性T細胞受容体遺伝子に含まれる。いくつかの実施形態では、インデルは、1つ以上の内因性MHCクラスIサブレッサ遺伝子に含まれる。いくつかの実施形態では、インデルは、主要組織適合性複合体と関連する1つ以上の内因性遺伝子に含まれる。いくつかの実施形態では、インデルは、AAVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HTRP、H11、GAPDH、RUNX1、B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、CIITA、RFXANK、RFX5、RFXAP、TCR α 又は β 定常領域、NKG2A、NKG2D、CD25、CD38、CD44、CD58、CD54、CD56、CD69、CD71、CIS、CBLB、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、又はTIGITを含むが、これらに限定されない、1つ以上の内因性遺伝子に含まれる。一実施形態では、選択された部位に1つ以上の外因性ポリヌクレオチドを含むゲノム操作されたiPSCは、B2M（ベータ2ミクログロブリン）をコードする遺伝子における標的化編集を更に含む。

【0235】

特定の実施形態では、本明細書で提供される1つ以上の遺伝子改変を含むゲノム操作されたiPSCは、造血細胞系統又は他の特定の細胞型をインビトロで誘導するために使用され、誘導された非多能性細胞は、選択された部位で標的化編集を含む機能的遺伝子改変を保持する。いくつかの実施形態では、造血細胞系統又は他の特定の細胞型をインビトロで誘導するために使用されるゲノム操作されたiPSCは、凍結保存され、それらの使用直前に解凍される、マスター細胞バンク細胞である。一実施形態では、ゲノム操作されたiPSC由来細胞は、決定的な造血内皮（HE）能を有する中胚葉細胞、決定的なHE、CD34造血細胞、造血幹細胞及び前駆細胞、造血多能性前駆細胞（MPP）、T細胞前駆細胞、NK細胞前駆細胞、骨髓細胞、好中球前駆細胞、T細胞、NKT細胞、NK細胞、B細胞、好中球、樹状細胞、及びマクロファージを含むがこれらに限定されず、ゲノム操作されたiPSCに由来するこれらの細胞は、所望の部位で標的化編集を含む機能的な遺伝子改変を保持する。

【0236】

i P S C 由来造血細胞系統を得るための適用可能な分化方法及び組成物には、例えば、国際公開第 2 0 1 7 / 0 7 8 8 0 7 号に示されるものが含まれ、その開示は、参照により本明細書に組み込まれる。提供されるように、造血細胞系統を生成するための方法と組成物は、無血清、フィーダを含まない、及び／又は間質を含まない条件下で、スケーラブルで単層の E B 形成を必要としない培養プラットフォームにおいて、h i P S C を含む、多能性幹細胞に由来する決定的な造血内皮 (H E) を介する。提供された方法に従って分化され得る細胞は、多能性幹細胞から、特定の最終分化細胞及び分化転換細胞にコミットした前駆細胞、及び多能性中間体を經由せずに造血運命に直接移行した様々な系統の細胞にまで及ぶ。同様に、幹細胞を分化させることによって産生される細胞は、多能性幹細胞又は前駆細胞から、最終分化細胞まで、及び全ての介在する造血細胞系統にまで及ぶ。

10

【0237】

単層培養において造血系統の細胞を多能性幹細胞から分化及び増殖させる方法は、多能性幹細胞を B M P 経路活性化因子、及び必要に応じて b F G F と接触させることを含む。提供されるように、多能性幹細胞由来の中胚葉細胞が得られ、多能性幹細胞から胚様体を形成することなく増殖される。次いで、中胚葉細胞を B M P 経路活性化因子、b F G F、及び W N T 経路活性化因子との接触に供して、多能性幹細胞から胚様体を形成することなく、決定的な造血内皮 (H E) 能を有する増殖中胚葉細胞を取得する。その後の b F G F との接触、及び必要に応じて R O C K 阻害剤、及び／又は W N T 経路活性化因子との接触により、決定的な H E 能を有する中胚葉細胞は、同様に分化中に増殖される、決定的な H E 細胞に分化する。

20

【0238】

本明細書において提供される造血系統の細胞を取得するための方法は E B 媒介の多能性幹細胞分化より優れているが、これは、E B 形成が適度な増殖から最小限の細胞増殖をもたらし、均一な増殖を必要とする多くの用途で重要な単層培養、及び集団内の細胞の均一な分化を可能にせず、骨が折れ、効率が低くなるためである。

【0239】

提供されている単層分化プラットフォームは、造血幹細胞及び T 細胞、B 細胞、N K T 細胞、及び N K 細胞などの分化した子孫の誘導をもたらす決定的な造血内皮への分化を促進する。単層分化戦略は、増強された分化効率と大規模な増殖を組み合わせ、様々な治療用途のための多能性幹細胞由来造血細胞の治療上適切な数の送達を可能にする。更に、本明細書において提供される方法を使用した単層培養は、インビトロ分化、エクスピボ修飾、及びインビボ長期造血自己複製、再構成及び生着の全範囲を可能にする機能的造血系統細胞をもたらす。提供されるように、i P S C 由来造血系統細胞には、決定的な造血内皮、造血多能性前駆細胞、造血幹細胞及び前駆細胞、T 細胞前駆体、N K 細胞前駆体、T 細胞、N K 細胞、N K T 細胞、B 細胞、マクロファージ、並びに好中球が含まれるがこれらに限定されない。

30

【0240】

決定的な造血系統の細胞への多能性幹細胞の分化を指示するための方法であって、方法は、(i) 多能性幹細胞を、B M P 活性化因子、及び必要に応じて b F G F を含む組成物と接触させて、多能性幹細胞からの中胚葉細胞の分化及び増殖を開始させることと、(i i) 中胚葉細胞を、B M P 活性化因子、b F G F、及び G S K 3 阻害剤を含む組成物と接触させて、中胚葉細胞からの決定的な H E 能を有する中胚葉細胞の分化及び増殖を開始させることであって、組成物は、必要に応じて T G F β 受容体 / A L K 阻害剤を含まない、ことと、(i i i) 決定的な H E 能を有する中胚葉細胞を、R O C K 阻害剤、b F G F、V E G F、S C F、I G F、E P O、I L 6、及び I L 1 1 からなる群から選択される 1 つ以上の増殖因子及びサイトカイン、並びに必要に応じて W n t 経路活性化因子を含む組成物と接触させて、決定的な造血内皮能を有する多能性幹細胞由来中胚葉細胞からの決定的な造血内皮の分化及び増殖を開始させることであって、組成物は、必要に応じて T G F β 受容体 / A L K 阻害剤を含まない、ことと、を含む。

40

【0241】

50

いくつかの実施形態では、方法は、多能性幹細胞を、MEK阻害剤、GSK3阻害剤、及びROCK阻害剤を含み、TGFβ受容体／ALK阻害剤を含まない組成物と接触させ、多能性幹細胞を播種及び増殖させることを更に含む。いくつかの実施形態では、多能性幹細胞は、iPSC、又はナীব iPSC、又は1つ以上の遺伝的インプリントを含むiPSCであり、iPSCに含まれる1つ以上の遺伝的インプリントは、そこから分化した造血細胞に保持される。多能性幹細胞の造血系統の細胞への分化を指示するための方法のいくつかの実施形態では、多能性幹細胞の造血系統の細胞への分化は、胚様体の生成がなく、単層培養形態である。

【0242】

上述の方法のいくつかの実施形態では、取得された多能性幹細胞由来の決定的な造血内皮細胞は、CD34⁺である。いくつかの実施形態では、取得された決定的な造血内皮細胞は、CD34⁺CD43⁻である。いくつかの実施形態では、決定的な造血内皮細胞は、CD34⁺CD43⁻CXCR4⁻CD73⁻である。いくつかの実施形態では、決定的な造血内皮細胞は、CD34⁺CXCR4⁻CD73⁻である。いくつかの実施形態では、決定的な造血内皮細胞は、CD34⁺CD43⁻CD93⁻である。いくつかの実施形態では、決定的な造血内皮細胞は、CD34⁺CD93⁻である。

【0243】

上述の方法のいくつかの実施形態では、方法は、(i)多能性幹細胞由来の決定的な造血内皮を、ROCK阻害剤と、VEGF、bFGF、SCF、Flt3L、TPO、及びIL7からなる群から選択される1つ以上の増殖因子及びサイトカインと、必要に応じてBMP活性化因子とを含む組成物と接触させて、プレT細胞前駆体への決定的な造血内皮の分化を開始させることと、必要に応じて、(ii)プレT細胞前駆体を、SCF、Flt3L、及びIL7からなる群から選択される1つ以上の増殖因子及びサイトカインを含むが、VEGF、bFGF、TPO、BMP活性化因子及びROCK阻害剤のうちの1つ以上を含まない組成物と接触させて、T細胞前駆体又はT細胞へのプレT細胞前駆体の分化を開始させることと、を更に含む。上記方法のいくつかの実施形態では、ステップ(i)は、プレT細胞前駆体を、外因性IL15を含有しない組成物、又は外因性IL2及びIL7の一方若しくは両方を含む組成物、又は外因性サイトカインを含有しない組成物と接触させるステップを含む。方法のいくつかの実施形態では、多能性幹細胞由来T細胞前駆体は、CD34⁺CD45⁺CD7⁺である。方法のいくつかの実施形態では、多能性幹細胞由来T細胞前駆体は、CD45⁺CD7⁺である。

【0244】

多能性幹細胞の造血系統の細胞への分化を指示するための上記方法の更にいくつかの実施形態では、方法は、(i)多能性幹細胞由来の決定的な造血内皮を、ROCK阻害剤、VEGF、bFGF、SCF、Flt3L、TPO、IL3、IL7、及びIL15からなる群から選択される1つ以上の増殖因子及びサイトカイン、並びに必要に応じてBMP活性化因子を含む組成物と接触させ、決定的な造血内皮のプレNK細胞前駆体への分化を開始することと、必要に応じて(ii)多能性幹細胞由来のプレNK細胞前駆体を、SCF、Flt3L、IL3、IL7、及びIL15からなる群から選択される1つ以上の増殖因子及びサイトカインを含み、VEGF、bFGF、TPO、BMP活性化因子、及びROCK阻害剤の1つ以上を含まない組成物と接触させ、プレNK細胞前駆体からNK細胞前駆体又はNK細胞への分化を開始することと、を更に含む。上記方法のいくつかの実施形態では、ステップ(ii)は、多能性幹細胞由来のプレNK細胞前駆体を、外因性IL15を含有しない組成物、又は外因性IL2及びIL7の一方若しくは両方を含む組成物、又は外因性サイトカインを含有しない組成物と接触させるステップを含む。いくつかの実施形態では、多能性幹細胞由来NK前駆体は、CD3⁻CD45⁺CD56⁺CD7⁺である。いくつかの実施形態では、多能性幹細胞由来NK細胞は、CD3⁻CD45⁺CD56⁺であり、必要に応じて、NKp46⁺、CD57⁺及びCD16⁺であることによって更に規定される。

【0245】

したがって、上記の分化方法を使用すると、以下のiPSC由来造血細胞の1つ以上の集団を取得し得る：(i) iMPP-A、iTc-A2、iTc-B2、iNK-A2、及びiNK-B2から選択される1つ以上の培養培地を使用する、CD34⁺HE細胞(iCD34)、(ii) iMPP-A、iTc-A2、iTc-B2、iNK-A2、及びiNK-B2から選択される1つ以上の培養培地を使用する、決定的な造血内皮(iHE)、(iii) iMPP-A、iTc-A2、iTc-B2、iNK-A2、及びiNK-B2から選択される1つ以上の培養培地を使用する、決定的なHSC、(iv) iMPP-Aを使用する、多能性前駆細胞(iMPP)、(v) iTc-A2、及びiTc-B2から選択される1つ以上の培養培地を使用する、T細胞前駆体(ipro-T)、(vi) iTc-B2を使用する、T細胞(iTC)、(vii) iNK-A2、及びiNK-B2から選択される1つ以上の培養培地を使用する、NK細胞前駆体(ipro-NK)、並びに／又は(viii) NK細胞(iNK)、及びiNK-B2。いくつかの実施形態では、培地は以下である：

10

a. iCD34-Cは、ROCK阻害剤と、bFGF、VEGF、SCF、IL6、IL11、IGF、及びEPOからなる群から選択される1つ以上の増殖因子及びサイトカインと、必要に応じて、Wnt経路活性化因子とを含み、TGFβ受容体／ALK阻害剤を含まない。

b. iMPP-Aは、BMP活性化因子と、ROCK阻害剤と、TPO、IL3、GM-CSF、EPO、bFGF、VEGF、SCF、IL6、Flt3L、及びIL11からなる群から選択される1つ以上の増殖因子及びサイトカインとを含む。

20

c. iTc-A2は、ROCK阻害剤と、SCF、Flt3L、TPO、及びIL7からなる群から選択される1つ以上の増殖因子及びサイトカインと、必要に応じてBMP活性化因子と、を含む。

d. iTc-B2は、SCF、Flt3L、及びIL7からなる群から選択される1つ以上の増殖因子及びサイトカインを含む。

e. iNK-A2は、ROCK阻害剤と、SCF、Flt3L、TPO、IL3、IL7、及びIL15からなる群から選択される1つ以上の増殖因子及びサイトカインと、必要に応じて、BMP活性化因子とを含む。

f. iNK-B2は、SCF、Flt3L、IL7、及びIL15からなる群から選択される1つ以上の増殖因子及びサイトカインを含む。

30

【0246】

いくつかの実施形態では、上記に列挙した組成物のうちの1つ以上は、操作されたエフェクター細胞の導入された特性に応じて、一部又は全部の列挙した外因性サイトカインを含有しない。いくつかの実施形態では、操作されたエフェクター細胞は、増加した細胞傷害性、改善された持続性、及び／又は生存率、腫瘍部位にバイスタンダー免疫細胞を遊走させる、及び／又は活性化させる、若しくは動員する増強された能力、改善された腫瘍浸透、腫瘍免疫抑制を低下させる増強された能力、腫瘍抗原エスケープを救済する改善された能力、制御されたアポトーシス、増強又は獲得されたADCC、並びに列挙された外因性サイトカインのうちの1つ以上又は全てを伴わずに増殖し、活性化する能力、のうちの1つ以上を含む治療特性を有する。

40

【0247】

いくつかの実施形態では、上記の方法から得られるゲノム操作iPSC由来細胞は、AVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HTRP、H11、GAPDH、RUNX1、B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、CIITA、RFXANK、RFX5、RFXAP、TCRα若しくはβ定常領域、NKG2A、NKG2D、CD25、CD38、CD44、CD58、CD54、CD56、CD69、CD71、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、又はTIGIT、又はゲノムセーフハーバーの基準を満たす他の遺伝子座を含む、1つ以上の所望の組み込み部位で組み込まれる1つ以上の誘導性自殺遺伝子を含む。いくつかの他の実施形態では、ゲノム操作されたiPSC由来細胞は、安全スイッチタンパク質、標的化モダリ

50

ティ、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、薬学的に活性なタンパク質及びペプチド、薬物標的候補、又は幹細胞及び／若しくは前駆細胞の輸送、ホーミング、生存能力、自己複製、持続性、及び／若しくは生存率を促進するタンパク質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、1つ以上の自殺遺伝子を含むゲノム操作されたiPSC派生細胞は、チェックポイント遺伝子、内因性T細胞受容体遺伝子、及びMHCクラスIIサブレッサ遺伝子を含むがこれに限定されない、免疫応答調節及び媒介と関連する1つ以上の内在性遺伝子に含まれる1つ以上のインデルを更に含む。一実施形態では、1つ以上の自殺遺伝子を含むゲノム操作されたiPSC派生細胞は、B2M遺伝子にインデルを含み、B2Mがノックアウトされている。

【0248】

10

加えて、第1の運命のゲノム操作造血細胞から第2の運命のゲノム操作造血細胞を取得するための適用可能な脱分化方法及び組成物は、例えば、その開示が参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2011/159726号に示されているものを含む。その中で提供される方法及び組成物は、リプログラミング中に内因性Nanog遺伝子の発現を制限することによって、開始非多能性細胞を非多能性中間細胞に部分的にリプログラミングすることを可能にし、非多能性中間細胞を、中間細胞を所望の細胞型に分化させるための条件に供する。いくつかの実施形態では、本明細書の方法及び組成物を使用して取得されたゲノム改変されたiPSC及びその派生細胞は、表1に列挙された少なくとも1つの遺伝子型を含む。

【0249】

20

V. 遺伝子操作されたiPSCから分化した機能的モダリティを有する派生免疫細胞の治療的使用

本発明は、いくつかの実施形態では、開示される方法及び組成物を使用してゲノム操作されたiPSCから分化されている機能的に増強された派生免疫細胞の単離された集団又は亜集団を含む組成物を提供する。いくつかの実施形態では、iPSCは、iPSC由来免疫細胞中に保持可能な1つ以上の標的化遺伝子編集を含み、遺伝子操作されたiPSC及びそれらからの派生細胞は、細胞ベースの養子療法に好適である。一実施形態では、遺伝子操作免疫細胞の単離された集団又は亜集団は、iPSC由来CD34細胞を含む。一実施形態では、遺伝子操作免疫細胞の単離された集団又は亜集団は、iPSC由来HSC細胞を含む。一実施形態では、遺伝子操作免疫細胞の単離された集団又は亜集団は、iPSC由来プロT細胞又はT系統細胞を含む。一実施形態では、遺伝子操作免疫細胞の単離された集団又は亜集団は、iPSC由来プロNK細胞又はNK系統細胞を含む。一実施形態では、遺伝子操作免疫細胞の単離された集団又は亜集団は、iPSC由来免疫調節細胞又は骨髓由来サプレッサ細胞(myeloid derived suppressor cell、MDSC)を含む。いくつかの実施形態では、iPSC由来遺伝子操作免疫細胞は、改善された治療の潜在能力のために、エキスピボで更に調整される。一実施形態では、iPSCに由来している遺伝子操作免疫細胞の単離された集団又は亜集団は、ナイーブT細胞、幹細胞メモリT細胞、及び／又はセントラルメモリT細胞の数又は比率の増加を含む。一実施形態では、iPSCに由来している遺伝子操作免疫細胞の単離された集団又は亜集団は、I型NK細胞の数又は比率の増加を含む。別の実施形態では、iPSCに由来している遺伝子操作免疫細胞の単離された集団又は亜集団は、適応NK細胞の数又は比率の増加を含む。いくつかの実施形態では、iPSCに由来する、遺伝子操作CD34細胞、HSC細胞、T系統細胞、NK系統細胞、又は骨髓由来サプレッサ細胞の単離された集団又は亜集団は、同種異系である。いくつかの他の実施形態では、iPSCに由来する、遺伝子操作されたCD34細胞、HSC細胞、T系統細胞、NK系統細胞、又はMDSCの単離された集団又は亜集団は、自家性である。

30

40

【0250】

いくつかの実施形態では、分化のためのiPSCは、エフェクター細胞において望ましい治療属性を伝えるために選択された遺伝子インプリントを含み、分化中の細胞発生生物学が破壊されず、当該iPSCに由来する分化造血細胞において遺伝子インプリントが保

50

持され、機能的であることを条件とする。

【0251】

いくつかの実施形態では、多能性幹細胞の遺伝的インプリントは、(i) 非多能性細胞をiPSCにリプログラミング中若しくはその後に、多能性細胞のゲノムにおけるゲノム挿入、欠失若しくは置換を通じて得られる1つ以上の遺伝子組換えモダリティ、又は(ii) ドナー、疾患、若しくは治療応答に特異的である、供給源特異的免疫細胞の1つ以上の保持可能な治療属性を含み、多能性細胞は、供給源特異的免疫細胞からリプログラミングされ、iPSCは、供給源治療属性を保持し、供給源治療属性はまた、iPSC由来造血系統細胞にも含まれている。

【0252】

いくつかの実施形態では、遺伝子組換えモダリティは、安全スイッチタンパク質、標的化モダリティ、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、薬学的に活性なタンパク質及びペプチド、薬物標的候補、又はiPSC若しくはそれからの派生細胞の生着、輸送、ホーミング、生存能力、自己複製、持続性、免疫応答調節及び修飾、並びに／若しくは生存率を促進するタンパク質、のうちの1つ以上を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子改変されたiPSC及びそれからの派生細胞は、表1に列挙された遺伝子型を含む。いくつかの他の実施形態では、表1に列挙された遺伝子型を含む遺伝子改変iPSC及びそれからの派生細胞は、(1) TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、PD1、LAG3、TIM3、RFXANK、CIITA、RFX5、又はRFXAP、RAG1、及び染色体6p21領域の任意の遺伝子の1つ以上の欠失、破壊又は発現低下、並びに(2) HLA-E、4-1BBL、CD3、CD4、CD8、CD47、CD113、CD131、CD137、CD80、PDL1、A2AR、CAR、Fc受容体、又は二重特異性若しくは多重特異性若しくはユニバーサルエンゲージメントのカップリングのための表面トリガー受容体のうちの少なくとも1つの導入、を含む追加の遺伝子改変モダリティを更に含む。

【0253】

更にいくつかの他の実施形態では、造血系統細胞は、以下のうちの少なくとも2つの組み合わせに関する供給源特異的免疫細胞の治療属性を含む：(i) 1つ以上の抗原標的化受容体発現、(ii) 改変されたHLA、(iii) 腫瘍微小環境に対する耐性、(iv) バイスタンダー免疫細胞及び免疫修飾の動員、(v) 低減された腫瘍外効果を伴う改善されたオンターゲット特異性、並びに(v) 改善されたホーミング、持続性、細胞傷害性、又は抗原エスケープ救済。

【0254】

いくつかの実施形態では、iPSC由来造血細胞は、表1に列挙される遺伝子型を含み、当該細胞は、IL2、IL4、IL6、IL7、IL9、IL10、IL11、IL12、IL15、IL18、若しくはIL21を含む少なくとも1つのサイトカイン及び／若しくはその受容体、又はそれらの任意の改変タンパク質を発現し、少なくともCARを発現する。いくつかの実施形態では、細胞は、IL2、IL4、IL7、IL9、及びIL21を含む少なくとも1つのサイトカイン及び／又はその受容体を発現する。いくつかの実施形態では、細胞は、IL7を含む少なくとも1つのサイトカイン及び／又はその受容体を発現する。いくつかの実施形態では、細胞は、IL7RFを発現する。いくつかの実施形態では、サイトカイン及びCARの操作された発現は、NK細胞特異的である。いくつかの他の実施形態では、サイトカイン及びCARの操作された発現は、T系統細胞特異的である。一実施形態では、CARは、CD38結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、iPSC由来造血エフェクター細胞は、抗原特異的である。いくつかの実施形態では、抗原特異的派生エフェクター細胞は、液体腫瘍を標的とする。いくつかの実施形態では、抗原特異的派生エフェクター細胞は、固形腫瘍を標的とする。いくつかの実施形態では、抗原特異的iPSC由来造血エフェクター細胞は、腫瘍抗原エスケープを救済することができる。

【0255】

本発明の免疫細胞を養子細胞療法に好適な対象に導入することにより、種々の疾患を改

善することができる。いくつかの実施形態では、提供される i P S C 由来造血細胞は、同種異系養子細胞療法のためのものである。加えて、本発明は、いくつかの実施形態において、養子細胞療法に好適な対象に組成物を導入することによる、上記治療用組成物の治療的使用であって、対象が、自己免疫障害、血液悪性腫瘍、固形腫瘍、又は H I V、R S V、E B V、C M V、アデノウイルス、若しくは B K ポリオーマウイルスと関連する感染を有する、治療的使用を提供する。血液悪性腫瘍の例には、急性及び慢性白血病（急性骨髄性白血病（acute myelogenous leukemia、A M L）、急性リンパ性白血病（acute lymphoblastic leukemia、A L L）、慢性骨髄性白血病（chronic myelogenous leukemia、C M L）、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（non-Hodgkin lymphoma、N H L）、ホジキン病、多発性骨髄腫、及び骨髄異形成症候群が含まれるが、これらに限定されない。固形がんの例には、脳、前立腺、乳房、肺、結腸、子宮、皮膚、肝臓、骨、膵臓、卵巣、精巣、膀胱、腎臓、頭、首、胃、子宮頸、直腸、喉頭、及び食道のがんが含まれるが、これらに限定されない。様々な自己免疫疾患の例には、円形脱毛症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、皮膚筋炎、糖尿病（1 型）、若年性特発性関節炎のいくつかの形態、糸球体腎炎、グレーブス病、ギランバレー症候群、特発性血小板減少性紫斑病、重症筋無力症、いくつかの形態の心筋炎、多発性硬化症、類天疱瘡／類天疱瘡、悪性貧血、結節性多発動脈炎、多発性筋炎、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、リウマチ様関節炎、強皮症／全身性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデス、甲状腺炎のいくつかの形態、ブドウ膜炎のいくつかの形態、白斑、多発血管炎を伴う肉芽腫症（ウェゲナー病）が含まれるが、これらに限定されない。ウイルス感染症の例には、H I V－（human immunodeficiency virus、ヒト免疫不全ウイルス）、H S V－（herpes simplex virus、単純ヘルペスウイルス）、K S H V－（Kaposi's sarcoma-associated herpes virus、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス）、R S V－（Respiratory Syncytial Virus、呼吸器合胞体ウイルス）、E B V－（Epstein-Barr virus、エプスタインバーウイルス）、C M V－（サイトメガロウイルス）、V Z V（Varicella zoster virus、水痘带状疱疹ウイルス）、アデノウイルス、レンチウイルス、B K ポリオーマウイルス、関連疾患が含まれるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0256】

本明細書に開示されている実施形態の派生造血系統細胞を使用する治療は、症状に基づいて、又は再燃防止のために行うことができる。「治療すること」、「治療」などの用語は、本明細書では、概して、所望の薬理学的及び／又は生理学的効果を取得することを意味するために使用される。効果は、疾患を完全に若しくは部分的に予防することに関して予防的であり得、かつ／又は疾患及び／若しくは疾患に起因する有害作用の部分的若しくは完全な治療に関して治療的であり得る。本明細書で使用されるとき、「治療」は、対象における疾患のあらゆる介入を網羅し、以下を含む：疾患にかかりやすい可能性があるが、まだそれを有していると診断されていない対象において疾患が生じることを予防すること、疾患を阻害すること、すなわちその発症を阻止すること、又は疾患を緩和する、すなわち疾患を後退させること。治療剤又は組成物は、疾患又は傷害の発症前、発症中又は発症後に投与することができる。治療が患者の望ましくない臨床症状を安定化又は軽減させる進行中の疾患の治療もまた、特に重要である。特定の実施形態では、治療を必要とする対象は、細胞療法により少なくとも1つの関連する症状を抑制、改善、及び／又は改善することができる疾患、状態、及び／又は傷害を有する。特定の実施形態は、細胞療法を必要とする対象が、骨髄又は幹細胞移植の候補、化学療法又は放射線療法を受けた対象、過剰増殖性障害又はがん、例えば、造血系の過剰増殖性障害又はがんを有するか又は有するリスクがある対象、腫瘍、例えば、固形腫瘍を有するか又は発症するリスクがある対象、ウイルス感染又はウイルス感染と関連する疾患を有するか又は有するリスクがある対象を含むが、これらに限定されないことを企図する。

【0257】

本明細書に開示された実施形態の派生造血系統細胞を含む治療に対する応答性を評価するとき、応答は、臨床的利益率、死亡までの生存率、病理学的完全奏功、病理学的応答の版定量的測定、臨床的完全寛解、臨床的部分寛解、臨床的安定疾患、無再発生存、無転移生存、無病生存、循環腫瘍細胞減少、循環マーカー応答、及びRECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors、固形腫瘍における応答評価基準) 基準、のうちの少なくとも1つによって測定され得る。

【0258】

開示されるような派生造血系統細胞を含む治療用組成物は、他の治療の前、間、及び／又は後に対象に投与することができる。したがって、併用療法の方法は、追加の治療剤の使用前、使用中、及び／又は使用後のiPSC由来免疫細胞の投与又は調製を含み得る。上述のように、1つ以上の追加の治療剤は、ペプチド、サイトカイン、チェックポイント阻害剤、マイトジェン、増殖因子、低分子RNA、dsRNA (二本鎖RNA)、単核血球、フィーダ細胞、フィーダ細胞成分又はその補充因子、1つ以上の目的のポリ核酸を含むベクター、抗体、化学療法剤又は放射性部分、又は免疫調節薬 (IMiD) を含む。iPSC派生免疫細胞の投与は、追加の治療剤の投与から、時間、日、又は更には週単位によって時間的に分離することができる。追加的又は代替的に、投与は、抗腫瘍剤、手術などの非薬物療法などであるがこれらに限定されない他の生物活性剤又はモダリティと組み合わせることができる。

【0259】

組み合わせ細胞療法のいくつかの実施形態では、治療的組み合わせは、本明細書で提供されるiPSC由来造血系統細胞及び抗体又は抗体断片である追加の治療剤を含む。いくつかの実施形態では、抗体はモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は、ヒト化抗体、ヒト化モノクローナル抗体、又はキメラ抗体であってもよい。いくつかの実施形態では、抗体又は抗体断片は、ウイルス抗原に特異的に結合する。他の実施形態では、抗体又は抗体断片は、腫瘍抗原に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、腫瘍又はウイルス特異的抗原は、投与されたiPSC由来造血系統細胞を活性化して、それらの殺傷能力を増強する。いくつかの実施形態では、投与されたiPSC由来造血系統細胞に対する追加の治療剤として併用治療に好適な抗体は、抗CD20 (例えば、リツキシマブ、ベルツズマブ、オフアツムマブ、ウブリツキシマブ、オカラツズマブ、オビヌツズマブ、イブリツモマブ、オクレリズマブ)、抗CD22 (イノツズマブ、モキセツモマブ、エブラツズマブ)、抗HER2 (例えば、トラスツズマブ、ベルツズマブ)、抗CD52 (例えば、アレムツズマブ)、抗EGFR (例えば、セツキシマブ)、抗GD2 (例えば、ジヌツキシマブ)、抗PDL1 (例えば、アベルマブ)、抗CD38 (例えば、ダラツムマブ、イサツキシマブ、MOR202)、抗CD123 (例えば、7G3、CSL362)、抗SLAMF7 (エロツズマブ)、及びそれらのヒト化又はFc改変バリエーション若しくは断片、又はそれらの機能的同等物若しくはバイオシミラーを含むがこれらに限定されない。

【0260】

いくつかの実施形態では、追加の治療剤は、1つ以上のチェックポイント阻害剤を含む。チェックポイントは、阻害されていない場合に免疫応答を抑制又は下方制御することができる細胞分子、しばしば細胞表面分子を指す。チェックポイント阻害剤は、チェックポイントの遺伝子発現又は遺伝子産物を減少させるか、又はチェックポイント分子の活性を低下させることができるアンタゴニストである。本明細書で提供される誘導、NK系統を含む派生エフェクター細胞又はT系統細胞との併用療法に好適なチェックポイント阻害剤には、PD-1 (Pdcd1、CD279)、PDL-1 (CD274)、TIM-3 (Havcr2)、TIGIT (WUCAM及びVs tm3)、LAG-3 (Lag3、CD223)、CTLA-4 (Ctla4、CD152)、2B4 (CD244)、4-1BB (CD137)、4-1BBL (CD137L)、A2AR、BATE、BTLA、CD39 (Entpd1)、CD47、CD73 (NT5E)、CD94、CD96、CD160、CD200、CD200R、CD274、CEACAM1、CSF-1R、F

10

20

30

40

50

oxpl、GARP、HVEM、IDO、EDO、TDO、LAIR-1、MICA/B、NR4A2、MAFB、OCT-2 (Pou2f2)、レチノイン酸受容体アルファ (Rara)、TLR3、VISTA、NKG2A/HLA-E、及び抑制性KIR (例えば、2DL1、2DL2、2DL3、3DL1、及び3DL2) のアンタゴニストが含まれるが、これらに限定されない。

【0261】

提供される派生エフェクター細胞を含む併用療法のいくつかの実施形態は、チェックポイント分子を標的化する少なくとも1つの阻害剤を更に含む。提供される派生エフェクター細胞との併用療法のいくつかの他の実施形態は、2つ、3つ以上のチェックポイント分子が標的とされるように、2つ、3つ以上の阻害剤を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の併用療法のためのエフェクター細胞は、提供されるような派生NK系統細胞である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の併用療法のためのエフェクター細胞は、派生T系統細胞である。いくつかの実施形態では、併用療法のための派生NK系統細胞又はT系統細胞は、本明細書において提供されるように機能的に増強されている。いくつかの実施形態では、2つ、3つ以上のチェックポイント阻害剤は、派生エフェクター細胞の投与と同時、前、又は後に併用療法で投与することができる。いくつかの実施形態では、2つ以上のチェックポイント阻害剤は、同時に、又は一度に1つ (逐次的に) 投与される。

【0262】

いくつかの実施形態では、上述のチェックポイント分子のいずれかを阻害するアンタゴニストは抗体である。いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害抗体は、マウス抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダIg、単一可変新規抗原受容体 (VNAR)、サメ重鎖のみ抗体 (IgNAR)、キメラ抗体、組換え抗体、又はそれらの抗体断片であり得る。抗体断片の非限定的な例には、Fab、Fab'、F(ab')₂、F(ab')₃、Fv、一本鎖抗原結合断片 (scFv)、(scFv)₂、ジスルフィド安定化Fv (dsFv)、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、単一ドメイン抗原結合断片 (sdAb、ナノボディ)、組換え重鎖のみ抗体 (VHH)、及び抗体全体の結合特異性を維持するその他の抗体断片が含まれ、それらは、抗体全体よりも、製造するのに費用対効果が高く、より簡単に使用することができ、又は感度が高くあり得る。いくつかの実施形態では、1つ又は2つ又は3つ又はそれ超のチェックポイント阻害剤は、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、イピリムマブ、IPH4102、IPH43、IPH33、リリムマブ、モナリズマブ、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、及びそれらの派生体又は機能的同等物のうちの少なくとも1つを含む。

【0263】

派生エフェクター細胞及び1つ以上のチェック阻害剤を含む併用療法は、皮膚T細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫 (NHL)、菌状息肉症、パジェット様細網症、セザリー症候群、肉芽腫様弛緩皮膚、リンパ腫様丘疹症、慢性苔癬状剝離疹、急性痘瘡状苔癬状剝離疹、CD30⁺皮膚T細胞リンパ腫、二次皮膚CD30⁺大細胞リンパ腫、非菌状息肉症CD30皮膚大T細胞リンパ腫、多形性T細胞リンパ腫、レンネルトリリンパ腫、皮下T細胞リンパ腫、血管中心性リンパ腫、芽球性NK細胞リンパ腫、B細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫 (hodgkins lymphoma、HL)、頭頸部腫瘍；扁平上皮がん、横紋筋肉腫、ルイス肺がん (Lewis lung carcinoma、LLC)、非小細胞肺がん、食道扁平上皮がん、食道腺がん、腎細胞がん (renal cell carcinoma、RCC)、結腸直腸がん (colorectal cancer、CRC)、急性骨髄性白血病 (AML)、乳がん、胃がん、前立腺小細胞神経内分泌がん (small cell neuroendocrine carcinoma、SCNC)、肝臓がん、膠芽腫、肝臓がん、口腔扁平上皮がん、膵臓がん、甲状腺乳頭がん、肝内胆管細胞がん、肝細胞がん、骨がん、転移、及び鼻咽頭がんを含むがこれらに限定されない、液性及び固形がんの治療に適用可能である。

【0264】

本明細書において提供されるような派生エフェクター細胞以外のいくつかの実施形態で

は、治療的使用のための組み合わせは、化学療法剤又は放射性部分を含む1つ以上の追加の治療剤を含む。化学療法剤とは、細胞傷害性抗腫瘍剤、すなわち、腫瘍細胞を優先的に殺傷するか、又は急速に増殖する細胞の細胞周期を破壊するか、又は幹がん細胞を根絶することが見出され、腫瘍性細胞の増殖を防止又は低減するために治療的に使用される化学剤を指す。化学療法剤はまた、抗腫瘍性又は細胞傷害性の薬物又は薬剤と称されることもあり、当該技術分野で周知である。

【0265】

いくつかの実施形態では、化学療法剤は、アントラサイクリン、アルキル化剤、スルホン酸アルキル、アジリジン、エチレンイミン、メチルメラミン、ナイトロジェンマスタード、ニトロソウレア、抗生物質、代謝拮抗剤、葉酸類似体、プリン類似体、ピリミジン類似体、酵素、ポドフィロトキシン、白金含有薬剤、インターフェロン、及びインターロイキンを含む。例示的な化学療法剤には、アルキル化剤（シクロホスファミド、メクロレタミン、メファリン、クロラムブシル、ヘアメチルメラミン、チオテパ、ブスルファン、カルムスチン、ロムスチン、セムスチン）、代謝拮抗剤（メトトレキサート、フルオロウラシル、フロクスウリジン、シタラビン、6-メルカプトプリン、チオグアニン、ペントスタチン）、ピンカアルカロイド（ピンクリスチン、ピンブラスチン、ビンデシン）、エピポドフィロトキシン（エトポシド、エトポシドオルトキノン、及びテニポシド）、抗生物質（ダウノルビシン、ドキソルビシン、ミトキサントロン、ビスアントレン、アクチノマイシンD、プリカマイシン、ピューロマイシン、及びグラミシジンD）、パクリタキセル、コルヒチン、サイトカラシンB、エメチン、メイタンシン、並びにアムサクリンが含まれるが、これらに限定されない。追加の薬剤には、アミングルテチミド、シスプラチン、カルボプラチン、マイトマイシン、アルトレタミン、シクロホスファミド、ロムスチン（CCNU）、カルムスチン（BCNU）、イリノテカン（CPT-11）、アレムツザマブ、アルトレタミン、アナストロゾール、L-アスパラギナーゼ、アザシチジン、ベバシズマブ、ベキサロテン、ブレオマイシン、ボルテゾミブ、ブスルファン、カルステロン、カペシタビン、セレコキシブ、セツキシマブ、クラドリビン、クロフラビン、シタラビン、ダカルバジン、デニロイキンジフチトクス、ジエチルスチルベストロール、ドセタキセル、ドロモスタノロン、エピルビシン、エルロチニブ、エストラムスチン、エトポシド、エチニルエストラジオール、エキセメスタン、フロクスウリジン、5-フルオロウラシル、フルダラビン、フルタミド、フルベストラント、ゲフィチニブ、ゲムシタビン、ゴセレリン、ヒドロキシウレア、イブリツモマブ、イダルビシン、イフォスファミド、イマチニブ、インターフェロンアルファ（2a、2b）、イリノテカン、レトロゾール、ロイコボリン、ロイプロリド、レバミゾール、メクロレタミン、メゲストロール、メルファリン、メルカプトプリン、メトトレキサート、メトキサレン、マイトマイシンC、ミトタン、ミトキサントロン、ナンドロロン、ノフェツモマブ、オキサリプラチン、パクリタキセル、パミドロネート、ペメトレキセド、ペガデマラーゼ、ペガスパルガーゼ、ペントスタチン、ピボプロマン、プリカマイシン、ポリフェプロサン、ポルフィマー、プロカルバジン、キナクリン、リツキシマブ、サルグラモスチム、ストレプトゾシン、タモキシフェン、テモゾロマイド、テニポシド、テストラクトン、チオグアニン、チオテパ、トペテカン、トレミフェン、トシツモマブ、トラスツズマブ、トレチノイン、ウラシルマスタード、バルルビシン、ビノレルビン、及びゾレドロネートが含まれる。他の好適な薬剤は、化学療法剤又は放射線療法剤として承認され、当該技術分野で知られているものを含む、ヒトへの使用が承認されているものである。そのような薬剤は、多くの標準的な医師や腫瘍学者の参考文献（例えば、Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ninth Edition, McGraw-Hill, N.Y., 1995）又はNational Cancer Instituteウェブサイト（fda.gov/cder/cancer/druglistfrarne.htm）のいずれかを参照することができ、どちらも随時更新される。

【0266】

サリドマイド、レナリドマイド、ポマリドマイドなどの免疫調節薬（IMiD）は、NK細胞及びT細胞の両方を刺激する。本明細書において提供されるように、IMiDは、がん治療のためにiPSC派生治療用免疫細胞とともに使用され得る。

【0267】

治療組成物に含まれるiPSC由来造血系統細胞の単離された集団以外に、患者への投与に好適な組成物は、1つ以上の薬学的に許容される担体（添加物）及び／又は希釈剤（例えば、薬学的に許容される媒体、例えば、細胞培養培地）、又は他の薬学的に許容される成分を更に含むことができる。薬学的に許容される担体及び／又は希釈剤は、部分的には、投与される特定の組成物によって、並びに治療用組成物を投与するために使用される特定の方法によって決定される。したがって、本発明の治療用組成物の多種多様な好適な製剤が存在する（例えば、その開示は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed. 1985を参照されたい）。

【0268】

一実施形態では、治療用組成物は、本明細書に開示される方法及び組成物によって作製された多能性細胞由来T細胞を含む。一実施形態では、治療用組成物は、本明細書に開示される方法及び組成物によって作製された多能性細胞由来NK細胞を含む。一実施形態では、治療用組成物は、本明細書に開示される方法及び組成物によって作製された多能性細胞由来CD34⁺HE細胞を含む。一実施形態では、治療用組成物は、本明細書に開示される方法及び組成物によって作製された多能性細胞由来HSCを含む。一実施形態では、治療用組成物は、本明細書に開示される方法及び組成物によって作製された多能性細胞由来MDS細胞を含む。本明細書に開示されるiPSC由来造血系統細胞の集団を含む治療用組成物は、静脈内、腹腔内、経腸、又は気管投与方法によって個別に、又は他の好適な化合物と組み合わせて投与して、所望の治療目標に影響を与えることができる。

【0269】

これらの薬学的に許容される担体及び／又は希釈剤は、治療用組成物のpHを約3～約10に維持するのに十分な量で存在することができる。このように、緩衝液は、全組成物の重量対重量ベースで約5%もの多さであり得る。限定されないが、塩化ナトリウム及び塩化カリウムなどの電解質もまた、治療用組成物に含まれ得る。一態様では、治療用組成物のpHは、約4～約10の範囲である。代替的に、治療用組成物のpHは、約5～約9、約6～約9、又は約6.5～約8の範囲である。別の実施形態では、治療用組成物は、当該pH範囲のうちの1つのpHを有する緩衝液を含む。別の実施形態では、治療用組成物は、約7のpHを有する。代替的に、治療用組成物は、約6.8～約7.4の範囲のpHを有する。更に別の実施形態では、治療用組成物は、約7.4のpHを有する。

【0270】

本発明はまた、部分的に、本発明の特定の組成物及び／又は培養物における薬学的に許容される細胞培養培地の使用を提供する。そのような組成物は、ヒト対象への投与に好適である。一般的に言えば、本発明の実施形態によるiPSC由来免疫細胞の維持、増殖、及び／又は健康を支持する任意の培地は、医薬細胞培養培地としての使用に好適である。特定の実施形態では、薬学的に許容される細胞培養培地は、無血清及び／又はフィードを含まない培地である。様々な実施形態では、無血清培地は動物成分を含まず、必要に応じて無タンパク質であり得る。必要に応じて、培地は、生物薬学的に許容される組換えタンパク質を含み得る。動物成分を含まない培地は、成分が非動物源に由来する培地を指す。組換えタンパク質は、動物を含まない培地で天然の動物タンパク質に取って代わり、栄養素は、合成、植物、又は微生物の供給源から取得される。対照的に、無タンパク質培地は、実質的にタンパク質を含まないと定義される。当業者は、上述の培地の例は例示であり、本発明での使用に好適な培地の配合を決して限定するものではなく、当業者に既知であり利用可能な多くの好適な培地があることを理解するであろう。

【0271】

分離された多能性幹細胞派生造血系統細胞は、少なくとも50%、60%、70%、8

10

20

30

40

50

0%、90%、95%、98%、又は99%のT細胞、NK細胞、NKT細胞、プロT細胞、プロNK細胞、CD34⁺HE細胞、HSC、B細胞、骨髄由来サプレッサ細胞(MDSC)、調節性マクロファージ、調節性樹状細胞、又は間葉系間質細胞を有することができる。いくつかの実施形態では、単離された多能性幹細胞派生造血系統細胞は、約95%~約100%のT細胞、NK細胞、プロT細胞、プロNK細胞、CD34⁺HE細胞、又は骨髄由来サプレッサ細胞(MDSC)を有する。いくつかの実施形態では、本発明は、細胞治療を必要とする対象を治療するための、約95%のT細胞、NK細胞、プロT細胞、プロNK細胞、CD34⁺HE細胞、又は骨髄由来サプレッサ細胞(MDSC)の単離された集団を有する組成物などの、精製T細胞又はNK細胞を有する治療用組成物を提供する。

10

【0272】

一実施形態では、組み合わせ細胞療法は、治療用タンパク質又はペプチドと、表1に列挙される遺伝子型を含むゲノム操作iPSCに由来するエフェクター細胞の集団と、を含み、派生エフェクター細胞は、本明細書に記載されるように、サイトカインシグナル伝達複合体と、必要に応じてCARと、を含む。いくつかの実施形態では、組み合わせ細胞療法は、ブリナツモマブ、カツマキソマブ、エルツマキソマブ、RO6958688、AFM11、MT110/AMG110、MT111/AMG211/MEDI-565、AMG330、MT112/BAY2010112、MOR209/ES414、MGD006/S80880、MGD007、及び/又はFBTA05のうちの1つと、表1に列挙される遺伝子型を含むゲノム操作iPSCに由来するエフェクター細胞の集団と、を含み、派生エフェクター細胞は、サイトカインシグナル伝達複合体と、必要に応じてCARと、必要に応じてCD16と、を含む。更にいくつかの他の実施形態では、組み合わせ細胞療法は、ブリナツモマブ、カツマキソマブ、及びエルツマキソマブのうちの1つと、表1に列挙される遺伝子型を含むゲノム操作iPSCに由来するエフェクター細胞の集団と、を含み、派生エフェクター細胞は、サイトカインシグナル伝達複合体と、必要に応じてCAR、CD16、及びCFRと、を含む。更にいくつかの追加の実施形態では、組み合わせ細胞療法は、ブリナツモマブ、カツマキソマブ、及びエルツマキソマブのうちの1つと、表1に列挙された遺伝子型を含むゲノム操作iPSCに由来するエフェクター細胞の集団と、を含み、派生エフェクター細胞は、サイトカインシグナル伝達複合体と、必要に応じてCAR、TCR^{neg}、CD16、CFR、及び1つ以上の外因性サイトカインと、を含む。

20

30

【0273】

当業者が理解するように、本明細書の方法及び組成物に基づくiPSCに由来する自己と同種異系の造血系統細胞の両方は、上述のような細胞療法で使用するすることができる。自家移植の場合、派生造血系統細胞の単離された集団は、患者と完全又は部分的にHLA一致する。別の実施形態では、派生造血系統細胞は、対象とHLAが一致せず、派生造血系統細胞は、HLA I null及びHLA II nullを有するNK細胞又はT細胞である。

【0274】

いくつかの実施形態では、治療組成物中の派生造血系統細胞の数は、1用量当たり、少なくとも 0.1×10^5 細胞、少なくとも 1×10^5 細胞、少なくとも 5×10^5 細胞、少なくとも 1×10^6 細胞、少なくとも 5×10^6 細胞、少なくとも 1×10^7 細胞、少なくとも 5×10^7 細胞、少なくとも 1×10^8 細胞、少なくとも 5×10^8 細胞、少なくとも 1×10^9 細胞、又は少なくとも 5×10^9 細胞である。いくつかの実施形態では、治療用組成物中の派生造血系統細胞の数は、1用量当たり、約 0.1×10^5 細胞~約 1×10^6 細胞、1用量当たり、約 0.5×10^6 細胞~約 1×10^7 細胞、1用量当たり、約 0.5×10^7 細胞~約 1×10^8 細胞、1用量当たり、約 0.5×10^8 細胞~約 1×10^9 細胞、1用量当たり、約 1×10^9 細胞~約 5×10^9 細胞、1用量当たり、約 0.5×10^9 細胞~約 8×10^9 細胞、1用量当たり、約 3×10^9 細胞~約 3×10^{10} 細胞、又はその間の任意の範囲である。一般に、60kgの患者の場合、 1×1

40

50

0.8 細胞／用量は 1.67×10^6 細胞／kg に変換される。

【0275】

一実施形態では、治療組成物中の派生造血系統細胞の数は、血液の部分的又は単一の脾臓中の免疫細胞の数であるか、又は少なくとも 0.1×10^5 細胞／kg 体重、少なくとも 0.5×10^5 細胞／kg 体重、少なくとも 1×10^5 細胞／kg 体重、少なくとも 5×10^5 細胞／kg 体重、少なくとも 10×10^5 細胞／kg 体重、少なくとも 0.75×10^6 細胞／kg 体重、少なくとも 1.25×10^6 細胞／kg 体重、少なくとも 1.5×10^6 細胞／kg 体重、少なくとも 1.75×10^6 細胞／kg 体重、少なくとも 2×10^6 細胞／kg 体重、少なくとも 2.5×10^6 細胞／kg 体重、少なくとも 3×10^6 細胞／kg 体重、少なくとも 4×10^6 細胞／kg 体重、少なくとも 5×10^6 細胞／kg 体重、少なくとも 10×10^6 細胞／kg 体重、少なくとも 15×10^6 細胞／kg 体重、少なくとも 20×10^6 細胞／kg 体重、少なくとも 25×10^6 細胞／kg 体重、少なくとも 30×10^6 細胞／kg 体重、 1×10^8 細胞／kg 体重、 5×10^8 細胞／kg 体重、又は 1×10^9 細胞／kg 体重である。

【0276】

一実施形態では、ある用量の派生造血系統細胞が対象に送達される。例示的な一実施形態では、対象に提供される細胞の有効量は、少なくとも 2×10^6 細胞／kg、少なくとも 3×10^6 細胞／kg、少なくとも 4×10^6 細胞／kg、少なくとも 5×10^6 細胞／kg、少なくとも 6×10^6 細胞／kg、少なくとも 7×10^6 細胞／kg、少なくとも 8×10^6 細胞／kg、少なくとも 9×10^6 細胞／kg、又は少なくとも 10×10^6 細胞／kg 以上の細胞／kg であり、介在する全ての細胞用量を含む。

【0277】

別の例示的な実施形態では、対象に提供される細胞の有効量は、約 2×10^6 細胞／kg、約 3×10^6 細胞／kg、約 4×10^6 細胞／kg、約 5×10^6 細胞／kg、約 6×10^6 細胞／kg、約 7×10^6 細胞／kg、約 8×10^6 細胞／kg、約 9×10^6 細胞／kg、又は約 10×10^6 細胞／kg 以上の細胞／kg であり、介在する全ての細胞用量を含む。

【0278】

別の例示的な実施形態では、対象に提供される細胞の有効量は、約 2×10^6 細胞／kg ～ 約 10×10^6 細胞／kg、約 3×10^6 細胞／kg ～ 約 10×10^6 細胞／kg、約 4×10^6 細胞／kg ～ 約 10×10^6 細胞／kg、約 5×10^6 細胞／kg ～ 約 10×10^6 細胞／kg、 2×10^6 細胞／kg ～ 約 6×10^6 細胞／kg、 2×10^6 細胞／kg ～ 約 7×10^6 細胞／kg、 2×10^6 細胞／kg ～ 約 8×10^6 細胞／kg、 3×10^6 細胞／kg ～ 約 6×10^6 細胞／kg、 3×10^6 細胞／kg ～ 約 7×10^6 細胞／kg、 3×10^6 細胞／kg ～ 約 8×10^6 細胞／kg、 4×10^6 細胞／kg ～ 約 6×10^6 細胞／kg、 4×10^6 細胞／kg ～ 約 7×10^6 細胞／kg、 4×10^6 細胞／kg ～ 約 8×10^6 細胞／kg、 5×10^6 細胞／kg ～ 約 6×10^6 細胞／kg、 5×10^6 細胞／kg ～ 約 7×10^6 細胞／kg、 5×10^6 細胞／kg ～ 約 8×10^6 細胞／kg、又は 6×10^6 細胞／kg ～ 約 8×10^6 細胞／kg であり、介在する全ての細胞用量を含む。

【0279】

いくつかの実施形態では、派生造血系統細胞の治療的使用は、単回投与治療である。いくつかの実施形態では、派生造血系統細胞の治療的使用は、複数回投与治療である。いくつかの実施形態では、複数回投与治療は、毎日、3日ごと、7日ごと、10日ごと、15日ごと、20日ごと、25日ごと、30日ごと、35日ごと、40日ごと、45日ごと、50日ごとの1回の投与、又はその間の任意の日数の任意の回数の投与である。いくつかの実施形態では、複数回投与治療は、3回、又は4回、又は5回の週1回用量を含む。3回又は4回又は5回を含む複数回投与治療のいくつかの実施形態では、週1回用量は、追加の単回用量又は複数回用量が必要かどうかを決定するための観察期間を更に含む。

【0280】

本発明の派生造血系統細胞の集団を含む組成物は、無菌であり得、ヒト患者への投与に好適であり、すぐに投与され得る（すなわち、更なる処置を伴わずに投与され得る）。すぐに投与される細胞ベースの組成物は、組成物が、対象への移植又は投与の前に、いずれかの更なる処理又は操作を必要としないことを意味する。他の実施形態では、本発明は、1つ以上の薬剤の投与前に増殖及び／又は調整される、派生造血系統細胞の単離された集団を提供する。サイトカインシグナル伝達複合体及び／又はCARを発現するように遺伝子操作された派生造血系統細胞については、例えば、米国特許第6,352,694号に記載されている方法を使用して細胞を活性化及び増殖させることができる。

【0281】

特定の実施形態では、由来造血系統細胞に対する一次刺激シグナル及び共刺激シグナルは、異なるプロトコルによって提供することができる。例えば、各シグナルを提供する薬剤は、溶液中にあるか、又は表面に結合することができる。表面に結合される場合、薬剤は、同じ表面に（すなわち、「シス」形成で）又は別個の表面に（すなわち、「トランス」形成で）結合され得る。代替的に、一方の薬剤を表面に結合させ、他方の薬剤を溶液中に存在させることができる。一実施形態では、共刺激シグナルを提供する薬剤は、細胞表面に結合することができ、一次活性化シグナルを提供する薬剤は、溶液中にあるか、又は表面に結合される。特定の実施形態では、両方の薬剤が溶液中にあり得る。別の実施形態では、薬剤は、可溶性形態であり得、次いで、本発明の実施形態におけるTリンパ球の活性化及び増殖における使用が企図される人工抗原提示細胞（artificial antigen presenting cell、aAPC）について、米国特許出願公開第2004/0101519号及び同第2006/0034810号に開示されるもののよう、Fc受容体を発現する細胞又は抗体若しくは薬剤に結合する他の結合剤などの表面に架橋されてもよい。

【0282】

投与量、頻度、及びプロトコルのいくらかの変動は、治療されている対象の状態に応じて必然的に発生する。投与の責任者は、いずれにしても、個々の対象に対しての適切な用量、頻度及びプロトコルを決定する

【実施例】

【0283】

次の例は、例示のために提供されるものであり、限定のためのものではない。

【0284】

実施例1－材料及び方法

様々なプロモータの制御下で自殺系を効果的に選択し、様々なセーフハーバー遺伝子座組み込み戦略と組み合わせるために、単一細胞の継代と高スループットの96ウェルプレートベースのフローサイトメトリソートリングを可能にする、出願人独自のhiPSCプラットフォームを使用し、単一又は複数の遺伝子調整によるクローンhiPSCの導出を可能にした。

【0285】

小分子培養におけるhiPSCの維持：hiPSCは、培養のコンフルエンスが75%～90%に達すると、単一細胞として日常的に継代された。単細胞解離の場合、hiPSCをPBS（Mediatech）で1回洗浄し、Accutase（Millipore）で37℃において3～5分間処理した後、ピペティングして単細胞解離を確実にした。次いで、単細胞懸濁液を従来の培地と等量で混合し、225×gで4分間遠心分離し、FMMに再懸濁し、マトリゲルでコーティングした表面に播種した。継代は通常1：6～1：8で、37℃で2～4時間マトリゲルで前もってコーティングされた組織培養プレートに移し、2～3日ごとにFMMを供給した。細胞培養は、37℃、5%CO₂に設定された加湿インキュベーターで維持された。

【0286】

ZFNによるヒトのiPSC操作、目的のモダリティの標的化編集のためのCRISPR：ROSA26標的化挿入を例として使用して、ZFNを介したゲノム編集では、200万個のiPSCが2.5µgのZFN-L（FTV893）、2.5µgのZFN-R

(FTV894)の混合物及びAAVS1標的化挿入用の5 μ gのドナー構築物でトランスフェクトされた。CRISPRを介したゲノム編集では、200万個のiPSCが、5 μ gのROSA26-gRNA/Cas9(FTV922)とROSA26標的化挿入用の5 μ gドナー構築物の混合物でトランスフェクトされた。トランスフェクションは、パラメータ1500V、10ms、3パルスを使用するNeonトランスフェクションシステム(Life Technologies)を使用して行われた。トランスフェクション後の2日目又は3日目に、プラスミドに人工プロモータードライバGFP及び／又はRFP発現カセットが含まれている場合、フローサイトメトリを使用してトランスフェクション効率を測定した。トランスフェクション後4日目に、ピューロマイシンを最初の7日間0.1 μ g/mlの濃度で、7日後に0.2 μ g/mlの濃度で培地に添加して、標的細胞を選択した。ピューロマイシンの選択中、細胞は10日目に新鮮なマトリゲルコーティングされたウェルに継代された。ピューロマイシン選択の16日目以降に、生存細胞をGFP⁺iPSC細胞のパーセンテージについてフローサイトメトリで分析した。

10

【0287】

ゲノム編集されたiPSCの一括ソーティング及びクローンソーティング：ZFN又はCRISPR-Cas9を使用したゲノム標的化編集を含むiPSCは、ピューロマイシン選択の20日後にGFP⁺SSEA4⁺TRA181⁺iPSCについて一括ソーティング及びクローンソーティングされた。単一細胞解離標的化iPSCプールを、最適な性能のために新規に作製した、ハンス平衡塩溶液(Media Tech)、4%ウシ胎児血清(Invitrogen)、1 $\times$ ペニシリン/ストレプトマイシン(Media Tech)、及び10mMのHepes(Media Tech)を含む冷却染色緩衝液に再懸濁した。SSEA4-PE、TRA181-Alexa Fluor-647(BD Biosciences)を含むコンジュゲート一次抗体を細胞溶液に加え、氷上で15分間インキュベートした。全ての抗体は、100万細胞当たり100 μ Lの染色緩衝液中に7 μ Lで使用した。溶液を染色緩衝液で1回洗浄し、225gで4分間スピンドウンし、10 μ Mチアゾピブを含む染色緩衝液に再懸濁し、フローサイトメトリでのソーティングのために氷上で維持した。フローサイトメトリによるソーティングは、FACS Aria II(BD Biosciences)で行った。一括ソーティングでは、GFP⁺SSEA4⁺TRA181⁺細胞にゲートをかけ、7mlのFMMで満たされた15mlの標準チューブにソーティングした。クローンソーティングでは、100 μ Mノズルを使用して、1ウェル当たり3イベントの濃度で、ソーティングされた細胞を96ウェルプレートに直接排出した。各ウェルには、5 μ g/mlフィブロネクチンと1 $\times$ ペニシリン/ストレプトマイシン(Media Tech)が補充された200 μ LのFMMが予め充填されており、予め5 $\times$ マトリゲルで一晩コーティングされていた。5 $\times$ マトリゲルプレコーティングには、1アリコートマトリゲルを5mlのDMEM/F12に追加し、4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートして適切に再懸濁させ、最後にウェル当たり50 μ Lで96ウェルプレートに加え、37 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートする。5 $\times$ マトリゲルは、各ウェルに培地を加える直前に吸引される。ソーティングが完了したら、96ウェルプレートを225gで1～2分間遠心分離してからインキュベーションした。プレートを7日間静置した。7日目に、150 μ Lの培地を各ウェルから除去し、100 μ LのFMMと交換した。ウェルは、ソーティング後10日目に追加の100 μ LのFMMを再供給した。コロニー形成は早くも2日目に検出され、ほとんどのコロニーはソーティング後7～10日の間に増殖した。最初の継代では、ウェルをPBSで洗浄し、30 μ Lのアキュターゼで37 $^{\circ}$ Cにおいて約10分間解離させた。長期間のアキュターゼ処理の必要性は、長期間培養で遊ばなかったコロニーのコンパクトさを反映している。細胞が解離しているのが認められた後、200 μ LのFMMを各ウェルに加え、数回ピペッティングしてコロニーを破壊する。解離したコロニーを、予め5 $\times$ マトリゲルでコーティングした96ウェルプレートの別のウェルに移し、インキュベーション前に225gで2分間遠心分離する。この1対1の継代は、増殖前の初期のコロニーを広げるために行われる。その後の継代は、3～5分間のアキュターゼ処理と、予めFMMの1 $\times$ マトリゲルでコーティングされた大きなウェルへの

20

30

40

50

75～90%のコンフルエンスでの1：4～1：8の増殖で日常的に行われた。各クローン細胞株をGFP蛍光レベル及びTRA1-81発現レベルについて分析した。100%に近いGFP⁺及びTRA1-81⁺のクローン株を、更なるPCRスクリーニング及び分析のために選択し、マスター細胞バンクとして凍結保存した。フローサイトメトリ分析はGuava EasyCyte 8 HT (Millipore) で実行され、Flowjo (Flowjo, LLC) を使用して分析された。

【0288】

CAR19-2A サイトカインRF iT細胞の生成

【0289】

本出願人の所有する細胞リプログラミング及び操作プラットフォーム並びにステージ特異的T細胞分化プロトコルを利用して、iPSCを単一細胞レベルで操作して、完全に特徴付けられたクローンiPSC株を生成することができ、次いでこれにアクセスして、高度にスケーラブルな製造プロセスにおいてCAR発現T系統細胞(CAR-iT)を得ることができる(>100,000倍の増殖)ことが実証されている。CARのT細胞受容体アルファ定常(T cell receptor alpha constant、TRAC)領域への二対立遺伝子標的化及び操作されたiPSCの分化を通じて、CD19に特異的なキメラ抗原受容体を発現するiT細胞を、均一なCAR発現(99.0±0.5% CAR⁺)及びT細胞受容体(TCR)発現の完全な排除により生成して、同種異系の状況における移植片対宿主病(GvHD)のリスクを軽減することができる。本出願において提供されるようなCD3ζ1XXを含む内部ドメインを有する1XX-CAR配置を、例示の目的のために選択した。iT細胞に導入した場合、CD19-CARは、抗原特異性の増強を示した。外因性サイトカイン支持に依存することなく持続性を試験するために、IL7受容体融合(IL7RF)を含む1つ以上のシグナル伝達-融合複合体をiPSCに操作し、導入したサイトカインシグナル伝達複合体の、CAR-iT細胞表現型、持続性、及び有効性に対する影響を研究した。

【0290】

実施例2-サイトカイン受容体融合導入遺伝子はCAR-iT細胞の持続性を増強するiPSCからT系統細胞への細胞分化は、一般に、分化の異なる段階にある細胞を様々な増殖因子及び／又はサイトカインに曝露することを含む。本明細書に提示されるように、サイトカイン受容体融合(RF)導入遺伝子を含有するCAR-iT細胞は、RF導入遺伝子を欠くCAR-iT細胞と比較して、外因性サイトカイン支持に依存せずに分化及び増殖させた場合に、増強された持続性を付与することが見出された。

【0291】

サイトカイン組み合わせのマトリックスを、IL-7受容体融合(IL7RF)を含む操作されたシグナル伝達-融合複合体を有する及び有しないiCD34⁺細胞からのiT細胞の増殖及び成熟について試験し、iT細胞の相対的増殖を比較した。図3A～図3Dに示されるように、IL7RF導入遺伝子(IL7RF KIプール)を含有するiT細胞は、3つ全てのサイトカインの存在下でより良好な増殖及び生存能力が見られる対照iT細胞(すなわち、IL7RF導入遺伝子を含まない)とは対照的に、サイトカインの不在にもかかわらず、改善された細胞増殖を示した(図3A～図3B)。更に、IL7RF導入遺伝子を含有するiT細胞はまた、同じ条件下での対照iT細胞と比較して、IL2のみの条件下で増強された増殖を示し、このことは、任意のサイトカイン添加とは独立して、又はIL2添加と相乗的に、細胞増殖を増強するIL7RFの能力を示している。

【0292】

連続刺激アッセイにおける経時的な集団における相対的なCAR-iT細胞増殖、CAR発現iT細胞、CD69(T細胞初期活性化マーカー)発現iT細胞、又はPD-1発現iT細胞のパーセンテージもまた、様々なサイトカイン条件下でのIL7RFの影響を評価するために行った。5×10⁵のエフェクター細胞及び5×10⁵の標的細胞を、容器内において1：1のエフェクター：標的(E：T)比で混合し、5×10⁵の新鮮な標的細胞を連続刺激アッセイにおいて毎日添加し、腫瘍増殖及びエフェクターの毎日の読み

出しをフローサイトメトリによって得た。図 3 A～図 3 Bに示されるように、IL7RFを発現するCAR-iT細胞の細胞増殖は、外因性サイトカイン曝露がない場合、連続刺激で長期間にわたって持続するが、IL7RFを含まないCAR-iT細胞の長期持続性は、サイトカインの存在又は組み合わせにかかわらず、連続刺激下でほぼ存在せず、このことは、繰り返し刺激された場合に枯渇を克服しながら持続性を維持することにおけるIL7RFの独特の機能を示している。

【0293】

図 3 A～図 3 Bの観察は、同様に反映され、図 3 C～図 3 Dに示されるように、連続刺激の過程にわたるIL7RF/CAR-iT細胞パーセンテージのサイトカイン不存性増加の実証と一致する。サイトカイン増殖条件の各々について、CD69⁺IL7RF/CAR-iT細胞と比較したCD69発現(CD69⁺)CAR-iT細胞のパーセントを図 4 A～図 4 Bに示すが、これは、CAR-iT細胞がIL7RFも発現する場合、活性化されたCAR-iT細胞の比較的高い増殖及び持続性が、任意の特定のサイトカイン(IL2、IL7、IL15)又はそれらの任意の組み合わせに依存しないことを示唆する。CAR-iT及びIL7RF/CAR-iT細胞における活性化マーカーCD69の発現についての染色は、IL7RF/CAR-iT細胞においてCD69発現がより長く保持されることを示した。

【0294】

PD1は免疫抑制受容体であり、T細胞上のPD-1過剰発現は、がんにおける免疫回避に関与する。各サイトカイン増殖条件下でのPD1⁺IL7RF/CAR-iT細胞と比較したPD1⁺CAR-iT細胞のパーセントを図 5 A～図 5 Bに示す。PD1発現の抑制は、IL7RFを発現するCAR-iT細胞において、示されたサイトカイン条件(不在又は様々な組み合わせで存在)のうちのいずれかの下でIL7RF導入遺伝子を有しないものと比較して有意である。また、サイトカイン非依存性であること以外に、CAR⁺、CD69⁺、及び/又はPD1⁻若しくはPD1^低であるIL7RF-iT細胞の増殖及び持続性は、任意のサイトカイン単独の存在下で、又は任意の組み合わせで、IL7RF導入遺伝子を含まないCAR-iT細胞よりも優れていることも示されている。例えば、外因性サイトカインIL2又はIL7単独の存在下での増殖も、対照細胞と比較して、IL7RF導入遺伝子を含有するCAR-iT細胞について改善された。また、CAR-iT細胞へのRF導入遺伝子の組み込みは、外因性IL-15支持を欠く培養培地(すなわち、外因性サイトカインを含有しない培養培地、外因性IL2のみを含有する培養培地、外因性IL7のみを含有する培養培地、又は外因性IL2及びIL7のみを含有する培養培地)中で増殖させた場合に、RF導入遺伝子を欠くCAR-iT細胞よりも高い持続性を細胞に付与する。

【0295】

実施例 3-サイトカイン受容体融合導入遺伝子はCAR-iT細胞の機能をインビトロで増強する

連続刺激/殺傷アッセイを実行して、IL7RF導入遺伝子を含有するCAR-iT細胞の機能性を評価した。このアッセイでは、新鮮な腫瘍細胞を培養中のCAR-iT細胞に毎日添加し、AUC(area under the curve、曲線下面積)データを初期(0～1日目)、中期(0～4日目)、及び後期(0～10日目)に評価して、エフェクター細胞による腫瘍増殖制御を示した。

【0296】

図 6 Aに示されるように、標準条件(すなわち、IL2、IL7、及びIL15の外因性サイトカインの組み合わせを有する培地)で増殖させたTRAC遺伝子座にIL7RF導入遺伝子を含有するCAR-iT細胞の腫瘍増殖制御は、対照CAR-iT細胞の腫瘍増殖制御に近似した。しかしながら、図 6 Bに示されるように、培地中のサイトカインの不在下で増殖させた場合、IL7RF導入遺伝子を含有するCAR-iT細胞は、IL7RFを欠くCAR-iTと比較して、任意の時点及びアッセイ期間全体を通して有意に改善された腫瘍増殖制御を示した。図 6 Cは、培地中にIL2、IL7及びIL15を含む

又は含まない I L 7 R F C A R - i T 細胞及び対照細胞の 10 日目までの曲線下面積 (AUC) データの概要を提供し、これは、標準条件 (すなわち、サイトカイン組み合わせを含む) での増殖が C A R - i T 対照細胞の腫瘍制御能力を増加させるのに対して、I L 7 R F / C A R - i T は、補足的サイトカイン組み合わせなしで増殖させた場合にはるかに良好な腫瘍制御を有することを示している。10 日目の AUC は、以下に示すように、インビボデータと相関することが更に示された。

【0297】

別個の実験において、標準条件 (すなわち、I L 2、I L 7、及び I L 15 の外因性サイトカインの組み合わせを含む培地) で増殖させた T R A C 遺伝子座に I L 7 R F 導入遺伝子を含む C A R - i T 細胞を、増殖制御に対する外因性 I L 2 腫瘍の効果を評価するための連続腫瘍再刺激アッセイに供した。このアッセイでは、I L 7 R F / C A R - i T 及び C A R - i T 対照細胞を、約 10 I U / m l ~ 約 250 I U / m l の外因性 I L 2 を含む培地中で 2 日ごとに腫瘍標的細胞で再刺激し、培地に外因性サイトカインを添加していない (「サイトカインなし」) 同じ細胞の腫瘍増殖対照と比較した。図 6 D 及び図 6 E に示されるように、サイトカインなしの対照群において、I L 7 R F / C A R - i T 細胞は、C A R - i T 対照細胞よりも腫瘍増殖を良好に制御し、より高い C A R + i T 数を有した。更に、より高い I L 2 濃度 (50 及び 250 I U / m l) では、I L 7 R F / C A R - i T 及び C A R - i T 対照細胞は同様に機能し、アッセイの終わりまでに標的腫瘍細胞をほぼ完全に排除した。しかしながら、より低い I L 2 濃度 (10 I U / m l) では、I L 7 R F / C A R - i T 細胞は、C A R - i T 対照細胞よりも高い C A R + i T 数及びはるかに良好な腫瘍増殖阻害を維持し、このことは、I L 2 補充に対するより低い依存性を実証している。

【0298】

図 7 A ~ 図 7 B に示されるように、サイトカインなしでの増殖に加えて、培養培地内で I L 2 のみ、I L 7 のみ、並びに I L 2 及び I L 7 の両方の存在下で増殖させた I L 7 R F 導入遺伝子を含む C A R - i T 細胞もまた、対照細胞と比較して、10 日間のアッセイにわたって有意な腫瘍増殖制御をもたらした。科学的理論に束縛されるものではないが、増殖条件がサイトカインなし、I L 7 のみ、I L 2 のみ、又は I L 7 に加えて I L 2 である場合、I L 7 R F は、C A R - i T 細胞を差次的サイトカイン処置に対して感作させ、腫瘍細胞殺傷及び／又は制御の増強をもたらすようである。したがって、増殖／成熟培地内で使用されるサイトカインを変化させると、I L 7 R F / C A R - i T 細胞の機能的性能を改変することができるが、差次的サイトカイン処置は、I L 7 R F 導入遺伝子を含まない C A R - i T 細胞に対して明らかな影響を有しない。

【0299】

実施例 4 - サイトカイン受容体融合導入遺伝子は C A R - i T 細胞の機能をインビボで増強する

0 日目の 3 日前に N a l m 6 - ルシフェラーゼ細胞を静脈内注射した N S G 雌マウスに、腫瘍注射後 3 日目、6 日目、及び 9 日目に 3 回用量の 2×10^6 の I L 7 R F / C A R - i T 細胞、又は対照として 1 回用量の 2×10^6 の C A R - i T 細胞を注射した。適用可能な場合、サイトカイン支持をマウスに与えた。腫瘍の進行を、腫瘍注射後 7、14、22、及び 28 日目に生物発光イメージング (bioluminescent imaging, B L I) によってモニターした。図 8 に示すように、腫瘍移植後 22 日目に、I L 7 R F / C A R - i T は、サイトカインの不在下で増殖したか、又は I L 2 のみ、I L 7 のみ、若しくは I L 2 及び I L 7 の両方の存在下で、3 日目に開始して 3 週間にわたって週 2 回、I L 2 及び I L 15 の腹腔内注射を与えられたマウスにおいて、インビボ抗腫瘍機能を示し、これもまた対照 C A R - i T 細胞のものよりも優れている。サイトカインの不在下又は I L 7 のみの存在下で増殖させた I L 7 R F / C A R - i T 細胞は、サイトカイン支持を与えられていないマウスにおいて、インビボ抗腫瘍機能を示し、これもまた、対照 C A R - i T 細胞のものよりも優れている。示されるように、図 9 における経時的なインビボ B L I データは、図 6 B に示される 10 日目のインビトロ AUC データとよく相関し、C A R -

i T 対照細胞は、腫瘍のみの群と比較して腫瘍負荷を低下させたが、I L 7 R F / C A R - i T 細胞は、サイトカイン支援が提供されなかったマウスモデルにおいて、C A R - i T 対照細胞と比較して改善されたインビボ機能を実証したことを示した。

【0300】

実施例 5 - i P S C の段階的操作と改変派生エフェクター細胞の検証

次に、サイトカイン受容体融合導入遺伝子を含む C A R i T 細胞に多抗原標的化能を組み込むために、高親和性の非切断性 C D 1 6 (h n C D 1 6) F c 受容体を、i P S C 操作及び分化によって I L 7 R F / C A R - i T 細胞に導入した。h n C D 1 6 と腫瘍抗原特異的 C A R との組み合わせは、C A R - T 細胞でしばしば見られる抗原エスケープに取り組むためのモノクローナル抗体との組み合わせ使用を通じて、細胞に多抗原特異性を与える。C D 1 9 陰性白血病細胞を標的として利用して、優れた抗体依存性細胞傷害 (A D C C) が、h n C D 1 6 C A R i T とリツキシマブとの組み合わせによって実証された (E : T = 1 : 1 での % 特異的細胞傷害性、h n C D 1 6 群 + リツキシマブ : 7 5 . 6 4 ± 2 . 1 2 ; 対照群 + リツキシマブ : 1 6 . 9 8 ± 3 . 8 7 、 P < 0 . 0 0 1) 。

【0301】

T 細胞適合性に対処するために、T 細胞における C D 3 8 ノックアウト (knockout 、 K O) の役割も調査され、これは、酸化ストレス誘導性アポトーシスに対する N K 細胞耐性を媒介することが以前に示されている。C D 3 8 遺伝子を i P S C 段階で破壊して、C D 3 8 発現を欠く C A R - i T 細胞を生成した (% C D 3 8 + 集団、C D 3 8 W T 群 : 6 9 . 6 7 ± 2 4 . 3 4 ; C D 3 8 K O 群 : 0 . 1 2 ± 0 . 1 1) 、抗原媒介刺激時に、C D 3 8 K O C A R i T 細胞は、より高い脱顆粒パーセンテージ (C D 1 0 7 a / b に おいて 2 . 3 倍増加) 、並びに I F N γ (4 . 1 倍増加) 及び T N F α (2 . 5 倍増加) 産生を示した。抗原特異的インビトロ腫瘍殺傷もまた、C D 3 8 K O C A R i T 細胞において増強された (E C 5 0 、 3 . 2 倍減少) 。最後に、潜在的な宿主媒介性拒絶反応を回避するために、宿主媒介性拒絶反応を有意に減少させることが示されている不活性化 C A R (いくつかの文脈では同種異系防御受容体 (allogeneic defense receptor 、 A D R) と呼ばれる) の包含を試験した。A D R 又は i n A c t - C A R は、アロ再活性化細胞の 4 - 1 B B 、 O X 4 0 、及び C D 4 0 L などの上方制御された表面タンパクに特異的な結合ドメインを含むキメラ受容体であり、当該キメラ受容体による結合は、a l l o r e a c t i v e a t e d 細胞を不活性化させるか、又はその活性化を減少させる。

【0302】

当業者は、本明細書に記載の方法、組成物、及び製品が例示的な実施形態の代表であり、本発明の範囲に対する限定として意図されていないことを容易に理解するであろう。本発明の範囲及び趣旨から逸脱することなく、本明細書に開示された本開示に対して様々な置換及び修正を行うことができることは、当業者には容易に明らかであろう。

【0303】

本明細書で言及される全ての特許及び刊行物は、本開示が関係する当業者の技術水準を示している。全ての特許及び刊行物は、個々の刊行物が参照により組み込まれるものとして具体的かつ個別に示されたかのように、参照により本明細書に組み込まれる。

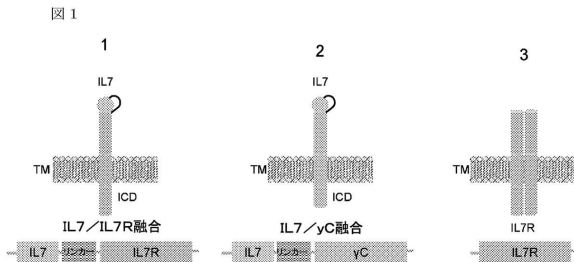
【0304】

本明細書に例示的に記載された本開示は、本明細書に具体的に開示されていない任意の 1 つ又は複数の要素、限定又は複数の限定がなくとも実施することができる。したがって、例えば、本明細書の各例において、「含む」、「から本質的になる」、及び「からなる」という用語はいずれも、他の 2 つの用語のいずれかに置き換えることができる。使用されている用語及び表現は、限定ではなく説明の用語として用いられており、そのような用語及び表現の使用において、示され説明された特質又はその一部のいずれかの均等物を除外する意図はないが、特許請求される本開示の範囲内で様々な修正が可能であると認識される。したがって、本開示は、好ましい実施形態及び必要に応じた特質によって具体的に開示されているが、本明細書で開示される概念の修正及び変形は、当業者によってしばしば想到され得、そのような修正及び変形は、添付の特許請求の範囲によって定義される本

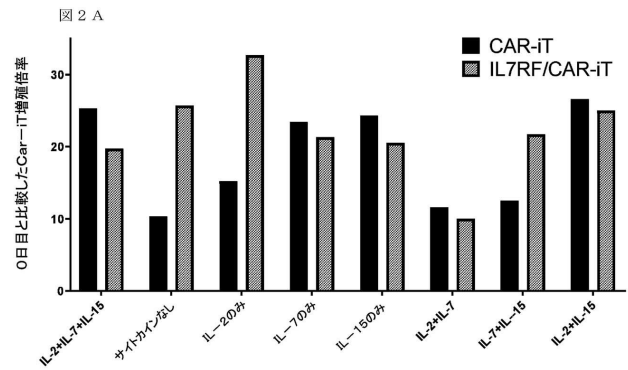
発明の範囲内であることが理解されるべきである。

【図面】

【図 1】

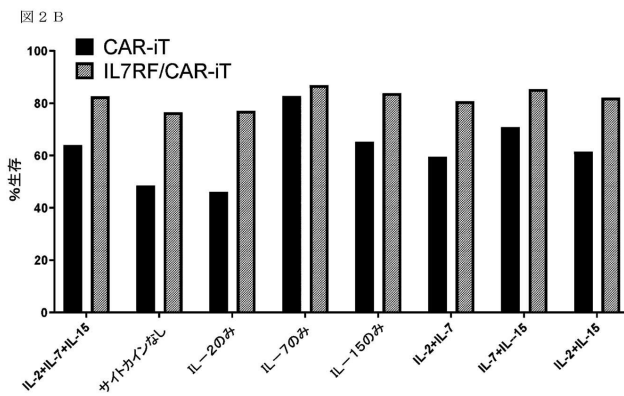


【図 2 A】

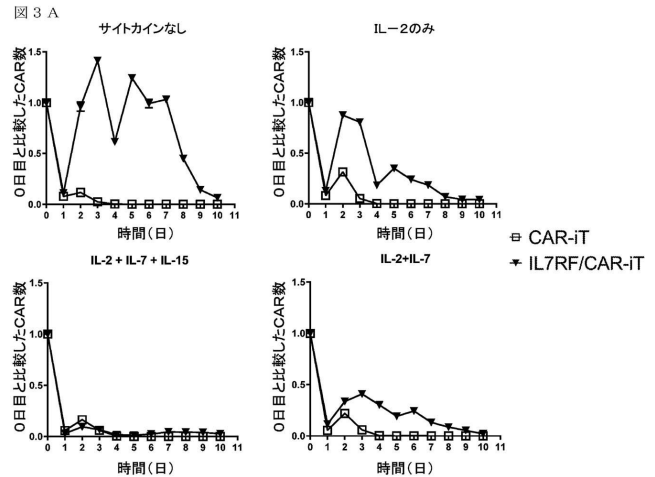


10

【図 2 B】



【図 3 A】



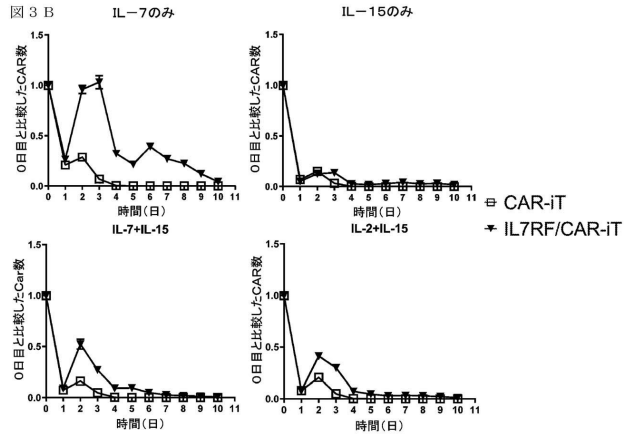
20

30

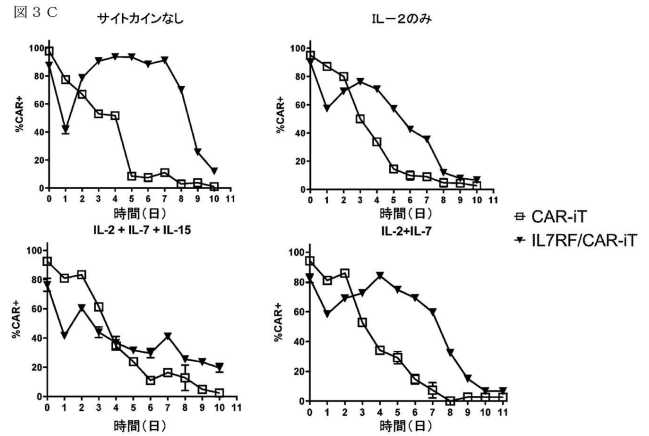
40

50

【図 3 B】

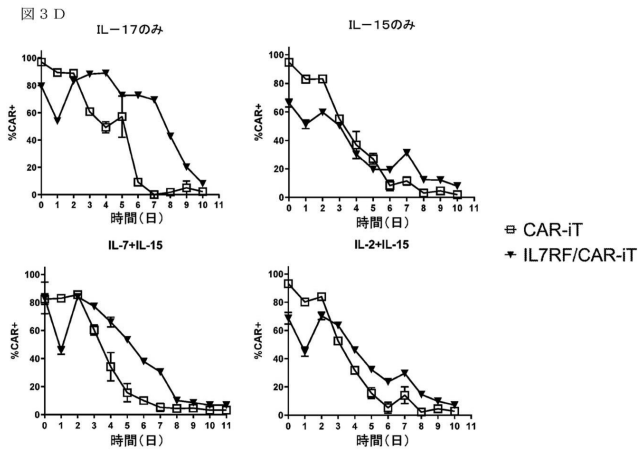


【図 3 C】

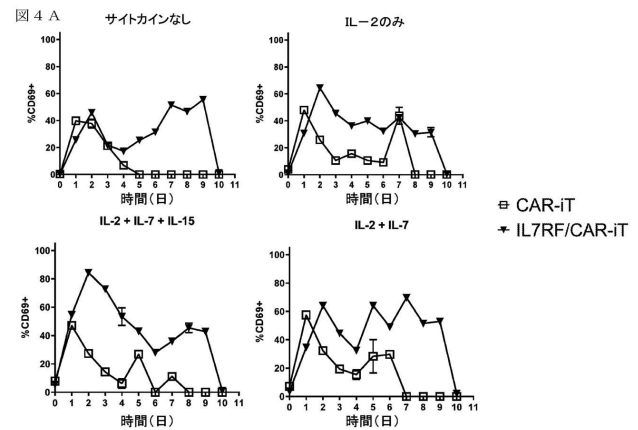


10

【図 3 D】



【図 4 A】



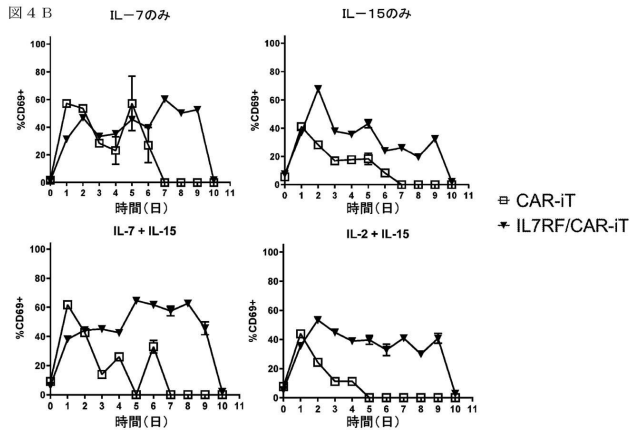
20

30

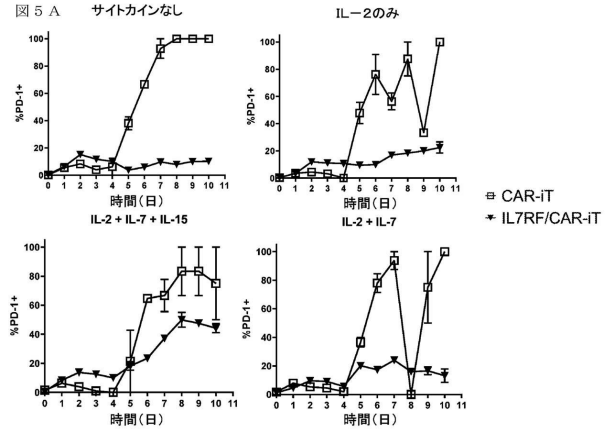
40

50

【図 4 B】

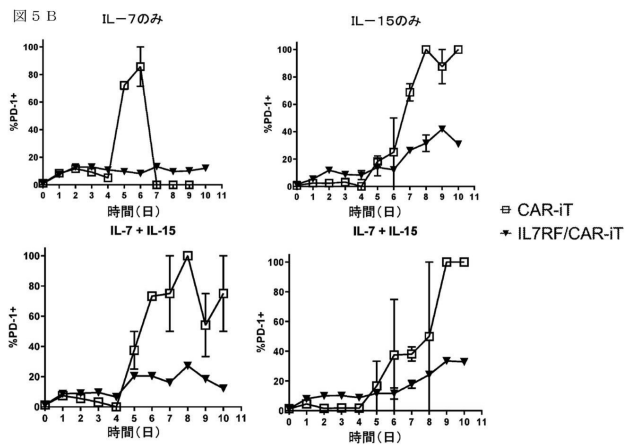


【図 5 A】

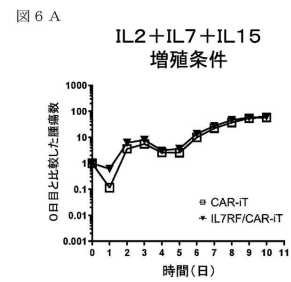


10

【図 5 B】

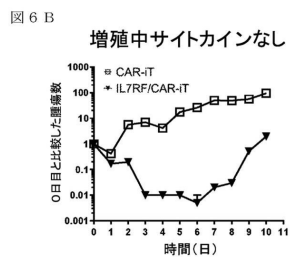


【図 6 A】

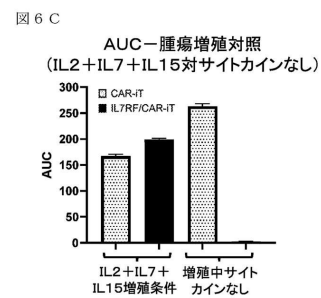


20

【図 6 B】



【図 6 C】

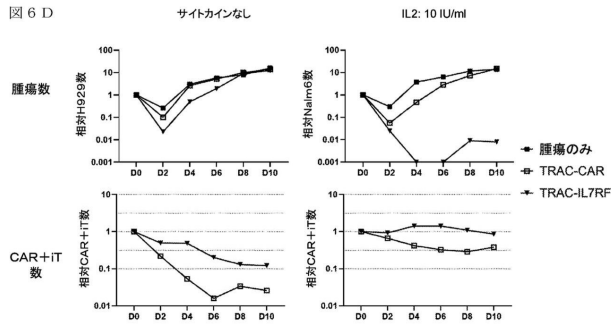


30

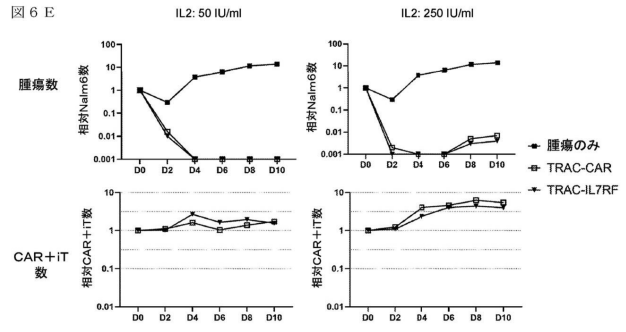
40

50

【図 6 D】

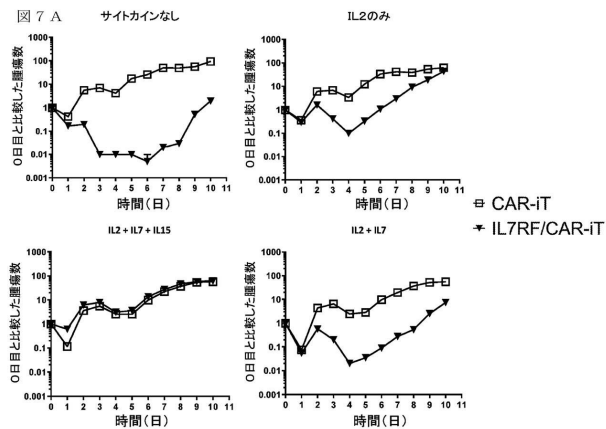


【図 6 E】

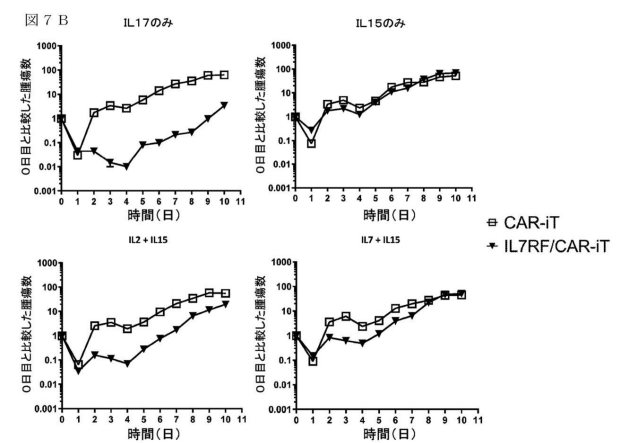


10

【図 7 A】

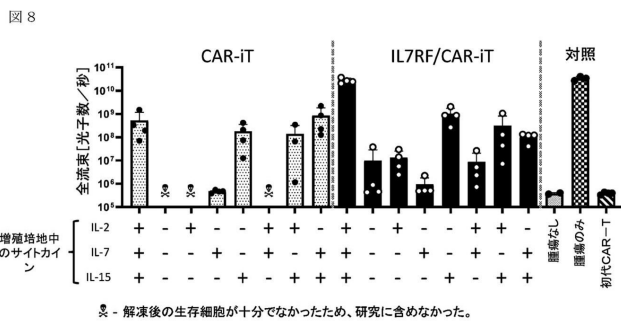


【図 7 B】

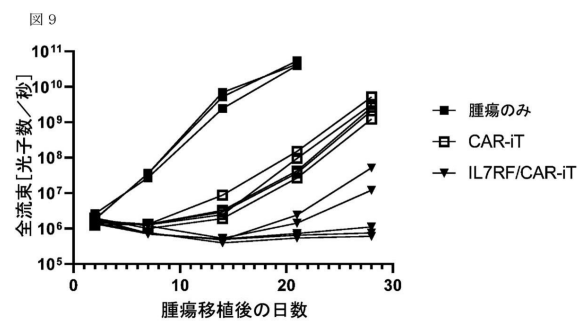


20

【図 8】



【図 9】



30

40

50

【配列表】

2023548467000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2021/058118
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 5/0783(2010.01)i; C07K 14/705(2006.01)i; C07K 14/715(2006.01)i; A61K 35/17(2014.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 5/0783(2010.01); C07K 14/54(2006.01); C07K 14/705(2006.01); C07K 14/725(2006.01); C07K 16/00(2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: engineered induced pluripotent cell, IL7, IL7 receptor, cytokine signaling complex, effector cell, T lineage		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019-112899 A2 (FATE THERAPEUTICS, INC.) 13 June 2019 (2019-06-13) claims 1, 4, 7, 8, 12, 22, 26; paragraphs [0024], [0051], [0143], [0157], [0168], [0170], [0175], [0288], [0306]; figure 1	1-4,6,8,43-46,49,54,55
Y		25-31,50
Y	MANAGLIA, E. Z. et al., 'Interleukin-7 signalling is sufficient to phenotypically and functionally prime human CD4+ naïve T cells', Immunology, 2005, Vol. 114, pp. 322-335 abstract; page 322, right column	25-31
Y	WO 2019-197676 A1 (LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH LTD et al.) 17 October 2019 (2019-10-17) claims 1, 13, 16, 19; paragraph [0005]	50
X	WO 2020-117526 A1 (FATE THERAPEUTICS, INC.) 11 June 2020 (2020-06-11) claims 1-27; paragraphs [0131], [0144], [0150]; figure 1	1-4,6,8,43-46,49,54,55
Y		25-31,50
☒ 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 16 February 2022		Date of mailing of the international search report 16 February 2022
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer HEO, Joo Hyung Telephone No. +82-42-481-5373

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/058118

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NIANIAS, A. et al., 'Induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived lymphocytes for adoptive cell immunotherapy: recent advances and challenges', Current Hematologic Malignancy Reports, 2019, Vol. 14, pp. 261-268 the whole document	1-4,6,8,25-31,4 3-46,49,50,54,55

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/058118

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☒ forming part of the international application as filed:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/058118

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.: **32,33,56-60**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 32, 33 and 56-60 pertain to a method for treatment of the human body by therapy or surgery, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv), to search. 10
2. ☒ Claims Nos.: **7,10-14,16,18,19,21,22,37-40,42,48,52,53,57-60**
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:

Claims 7, 10-14, 16, 18, 19, 21, 22, 37-40, 42, 48, 52, 53 and 57-60 are referring to the multiple dependent claims which do not comply with PCT Rule 6.4(a). 20
3. ☒ Claims Nos.: **5,9,15,17,20,23,24,34-36,41,47,51,56**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). 30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US2021/058118

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2019-112899	A2	13 June 2019	AU	2018-381191	A1	04 June 2020
				BR	112020010597	A2	27 October 2020
				CA	3083109	A1	13 June 2019
				CN	111556892	A	18 August 2020
				EP	3720946	A2	14 October 2020
				IL	275180	A	30 July 2020
				JP	2021-505131	A	18 February 2021
				KR	10-2020-0097749	A	19 August 2020
				SG	11202004833	A	29 June 2020
				US	2021-0015859	A1	21 January 2021
				WO	2019-112899	A3	18 July 2019
				WO	2019-112899	A8	13 June 2019
WO	2019-197676	A1	17 October 2019	EP	3774866	A1	17 February 2021
				US	2021-0113615	A1	22 April 2021
WO	2020-117526	A1	11 June 2020	AU	2019-392265	A1	03 June 2021
				CA	3121128	A1	11 June 2020
				CN	113166232	A	23 July 2021
				EP	3891177	A1	13 October 2021
				IL	283607	A	29 July 2021
				KR	10-2021-0099601	A	12 August 2021
				SG	11202105480	A	29 June 2021

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2019)

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 K	31/496 (2006.01)	A 6 1 K	31/496	4 H 0 4 5	
A 6 1 K	31/706 (2006.01)	A 6 1 K	31/706		
A 6 1 K	31/335 (2006.01)	A 6 1 K	31/335		
A 6 1 K	38/20 (2006.01)	A 6 1 K	38/20		
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02		
A 6 1 P	31/12 (2006.01)	A 6 1 P	31/12		
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00		
C 0 7 K	14/715 (2006.01)	C 0 7 K	14/715		
C 0 7 K	14/52 (2006.01)	C 0 7 K	14/52		
C 1 2 N	5/0783(2010.01)	C 1 2 N	5/0783		
C 1 2 N	5/0789(2010.01)	C 1 2 N	5/0789		
C 1 2 N	5/0781(2010.01)	C 1 2 N	5/0781		
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12		
C 1 2 N	15/19 (2006.01)	C 1 2 N	15/19		
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 0 0	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N
G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士 池田 達則

(74)代理人 100197169

弁理士 柴田 潤二

(72)発明者 バーラム バラメール

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 1 3 1, サンディエゴ, スクリップス サミット ドライブ
1 2 2 7 8

(72)発明者 エイゲン ペラルタ

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 1 3 1, サンディエゴ, スクリップス サミット ドライブ
1 2 2 7 8

(72)発明者 チアーウェイ チャン

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 1 3 1, サンディエゴ, スクリップス サミット ドライブ
1 2 2 7 8

F ターム (参考) 4B065 AA94X AB01 AC14 BA01 CA24 CA25 CA44

4C084 AA02 AA19 DA14 NA14 ZB07 ZB26 ZB33

4C085 AA14 BB11 EE01 EE03

4C086 AA01 AA02 CA01 CB05 EA16 MA01 MA02 MA04 NA14 ZB07
ZB26 ZB33 ZC75

4C087 AA01 AA02 BB65 NA14 ZB07 ZB26 ZB33 ZC75

4H045 AA10 AA11 AA30 BA41 DA02 DA50 DA76 EA22 EA28 FA72
FA74