

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和2年11月19日(2020.11.19)

【公表番号】特表2019-535240(P2019-535240A)

【公表日】令和1年12月12日(2019.12.12)

【年通号数】公開・登録公報2019-050

【出願番号】特願2019-520527(P2019-520527)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/55	(2006.01)
C 1 2 N	9/16	(2006.01)
C 1 2 N	15/62	(2006.01)
C 1 2 N	15/63	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 1 2 N	15/31	(2006.01)
A 6 1 P	35/00	(2006.01)
A 6 1 P	35/02	(2006.01)
A 6 1 P	31/00	(2006.01)
A 6 1 P	37/06	(2006.01)
A 6 1 P	29/00	(2006.01)
A 6 1 P	37/02	(2006.01)
A 6 1 K	35/12	(2015.01)
A 6 1 K	35/17	(2015.01)
A 6 1 K	35/15	(2015.01)
A 6 1 K	48/00	(2006.01)
C 1 2 N	15/864	(2006.01)
C 1 2 N	15/867	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/55	Z N A
C 1 2 N	9/16	Z
C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	15/09	1 0 0
C 1 2 N	15/31	
A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	31/00	
A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	37/02	
A 6 1 K	35/12	
A 6 1 K	35/17	
A 6 1 K	35/15	
A 6 1 K	35/17	A
A 6 1 K	48/00	
C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z
C 1 2 N	15/867	Z

**【手続補正書】**

【提出日】令和2年10月9日(2020.10.9)

**【手続補正1】**

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

**【補正の内容】**

【特許請求の範囲】

**【請求項1】**

ヒト形質転換成長因子ベータ受容体2(TGF-R2)遺伝子内の標的部位を切断するI-OnuIホーミングエンドヌクレアーゼ(HE)バリアントを含む、ポリペプチド。

**【請求項2】**

前記ポリペプチドが、

(a) 前記I-OnuI HEバリアントの生物学的に活性な断片；

(b) 対応する野生型I-OnuI HEと比較して、1、2、3、4、5、6、7、または8個のN末端アミノ酸を欠いている、前記I-OnuI HEバリアントの生物学的に活性な断片；または

(c) 対応する野生型I-OnuI HEと比較して、1、2、3、4、または5個のC末端アミノ酸を欠いている、前記I-OnuI HEバリアントの生物学的に活性な断片を含む、請求項1に記載のポリペプチド。

**【請求項3】**

前記I-OnuI HEバリアントが、TGF-R2標的部位を切断し、配列番号：1～5またはそれらの生物学的に活性な断片のいずれか1つの以下のアミノ酸置換：L26M、N32R、K34Q、S35R、S36K、V37A、G38N、S40G、E42S、G44V、Q46E、T48G、V68K、A70R、N75G、A76S、S78R、K80S、V116L、L138M、T143N、S159P、F168L、E178D、C180S、F182G、N184D、S188R、S190R、S190G、L192T、G193T、Q195G、Q197G、V199R、T203S、K207R、Y223R、Y223H、K225Y、K227R、F232N、T240R、およびE264Kのうちの少なくとも35、または好ましくは少なくとも40個以上を含む、請求項1または請求項2に記載のポリペプチド。

**【請求項4】**

前記I-OnuI HEバリアントが、TGF-R2標的部位を切断し、配列番号：1～5またはそれらの生物学的に活性な断片のいずれか1つの以下のアミノ酸置換：

(a) L26M、N32R、K34Q、S35R、S36K、V37A、G38N、S40G、E42S、G44V、Q46E、T48G、V68K、A70R、N75G、A76S、S78R、K80S、V116L、L138M、T143N、S159P、F168L、E178D、C180S、F182G、N184D、S188R、S190R、L192T、G193T、Q195G、Q197G、V199R、T203S、K207R、Y223R、K225Y、K227R、F232N、およびT240R；または

(b) L26M、N32R、K34Q、S35R、S36K、V37A、G38N、S40G、E42S、G44V、Q46E、T48G、V68K、A70R、N75G、A76S、S78R、K80S、V116L、L138M、T143N、S159P、F168L、E178D、C180S、F182G、N184D、S188R、S190R、L192T、G193T、Q195G、Q197G、V199R、T203S、K207R、Y223H、K225Y、K227R、F232N、T240R、およびE264K

のうちの少なくとも35、または好ましくは少なくとも40個以上を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載のポリペプチド。

**【請求項5】**

前記I-OnuI HEバリアントが、配列番号：6もしくは7に記載されるアミノ酸

配列、またはそれらの生物学的に活性な断片と少なくとも 80%、好ましくは少なくとも 85%、より好ましくは少なくとも 90%、またはさらにより好ましくは少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

#### 【請求項 6】

前記ポリペプチドが、配列番号：11に記載されるポリヌクレオチド配列に結合し、それを切断する、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

#### 【請求項 7】

T A L E D N A 結合ドメイン、好ましくは約 9.5 の T A L E 繰り返し単位 ~ 約 15.5 の T A L E 繰り返し単位を含む T A L E D N A 結合ドメインをさらに含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

#### 【請求項 8】

前記 T A L E D N A 結合ドメインが、配列番号：12に記載されるポリヌクレオチド配列に結合する、請求項 7 に記載のポリペプチド。

#### 【請求項 9】

前記ポリペプチドが、配列番号：13に記載されるポリヌクレオチド配列に結合し、それを切断する、請求項 8 に記載のポリペプチド。

#### 【請求項 10】

(a) ペプチドリンカーまたはウイルス自己切断型 2A ペプチド、および (b) T r e x 2 5' - 3' エクソヌクレアーゼ またはそれらの生物学的に活性な断片をさらに含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

#### 【請求項 11】

請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、必要に応じて前記ポリヌクレオチドが m R N A または c D N A である、ポリヌクレオチド。

#### 【請求項 12】

請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、ベクター。

#### 【請求項 13】

請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載のポリペプチド、請求項 11 に記載のポリヌクレオチド、または請求項 12 に記載のベクターを含む、細胞。

#### 【請求項 14】

遺伝子操作された抗原受容体をコードするポリヌクレオチドを含み、必要に応じて前記遺伝子操作された抗原受容体が、遺伝子操作された T 細胞受容体 (T C R)、キメラ抗原受容体 (C A R)、D a r i c、またはゼータカインである、請求項 13 に記載の細胞。

#### 【請求項 15】

前記細胞が、造血細胞、T 細胞、C D 3<sup>+</sup> 細胞、C D 4<sup>+</sup> 細胞、C D 8<sup>+</sup> 細胞、免疫エフェクター細胞、細胞傷害性 T リンパ球 (C T L)、腫瘍浸潤リンパ球 (T I L)、ヘルパー T 細胞、ナチュラルキラー (N K) 細胞またはナチュラルキラー T (N K T) 細胞である、請求項 13 または請求項 14 に記載の細胞。

#### 【請求項 16】

請求項 13 ~ 15 のいずれか一項に記載の 1 つ以上の細胞を含む組成物であって、必要に応じて生理学的に許容可能な担体を含む、組成物。

#### 【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0134

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0134】

追加の実施形態において、血液学的悪性腫瘍は、白血病、リンパ腫、または多発性骨髄

腫である。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

ヒト形質転換成長因子ベータ受容体2 (TGF-R2) 遺伝子内の標的部位を切断するホーミングエンドヌクレアーゼ (HE) バリアントを含む、ポリペプチド。

(項目2)

前記HEバリアントが、LAGLIDADGホーミングエンドヌクレアーゼ (LHE) バリアントである、項目1に記載のポリペプチド。

(項目3)

前記ポリペプチドが、前記HEバリアントの生物学的に活性な断片を含む、項目1または項目2に記載のポリペプチド。

(項目4)

前記生物学的に活性な断片が、対応する野生型HEと比較して、1、2、3、4、5、6、7、または8個のN末端アミノ酸を欠いている、項目3に記載のポリペプチド。

(項目5)

前記生物学的に活性な断片が、対応する野生型HEと比較して、4個のN末端アミノ酸を欠いている、項目4に記載のポリペプチド。

(項目6)

前記生物学的に活性な断片が、対応する野生型HEと比較して、8個のN末端アミノ酸を欠いている、項目4に記載のポリペプチド。

(項目7)

前記生物学的に活性な断片が、対応する野生型HEと比較して、1、2、3、4、または5個のC末端アミノ酸を欠いている、項目3に記載のポリペプチド。

(項目8)

前記生物学的に活性な断片が、対応する野生型HEと比較して、C末端アミノ酸を欠いている、項目7に記載のポリペプチド。

(項目9)

前記生物学的に活性な断片が、対応する野生型HEと比較して、2個のC末端アミノ酸を欠いている、項目7に記載のポリペプチド。

(項目10)

前記HEバリアントが、I-AabMI、I-AaeMI、I-AniI、I-ApaMI、I-CapIII、I-CapIV、I-CkaMI、I-CpaMI、I-CpaMI、I-CpamII、I-CpamIV、I-CpamV、I-Cpav、I-CramI、I-EjeMI、I-GpeMI、I-GpiI、I-GzeMI、I-GzemII、I-GzemIII、I-HjeMI、I-LtrII、I-LtrI、I-LtrWI、I-MpeMI、I-MveMI、I-NcrII、I-NcrI、I-NcrMI、I-OheMI、I-OnuI、I-OsoMI、I-OsoMI、I-OsoMII、I-OsoMIV、I-PanMI、I-PanMII、I-PanMIII、I-PanMIV、I-ScumI、I-SmaMI、I-SscMI、およびI-Vdi141Iからなる群から選択されるLHEのバリアントである、項目1～9のいずれか一項に記載のポリペプチド。

(項目11)

前記HEバリアントが、I-CpaMI、I-HjeMI、I-OnuI、I-PanMI、およびSmaMIからなる群から選択されるLHEのバリアントである、項目1～10のいずれか一項に記載のポリペプチド。

(項目12)

前記HEバリアントが、I-OnuI LHEバリアントである、項目1～11のいずれか一項に記載のポリペプチド。

(項目13)

前記HEバリアントが、配列番号：1～5に記載のI-OnuI LHEアミノ酸配列

またはそれらの生物学的に活性な断片の 19、24、26、28、30、32、34、35、36、37、38、40、42、44、46、48、59、68、70、72、75、76、77、78、80、82、168、180、182、184、186、188、189、190、191、192、193、195、197、199、201、203、223、225、227、229、231、232、234、236、238、および240からなる群から選択されるアミノ酸位置にあるDNA認識インターフェースにおいて1つ以上のアミノ酸置換を含む、項目1～12のいずれか一項に記載のポリペプチド。

(項目14)

前記HEバリアントが、配列番号：1～5に記載のI-OnuILHEアミノ酸配列またはそれらの生物学的に活性な断片の19、24、26、28、30、32、34、35、36、37、38、40、42、44、46、48、59、68、70、72、75、76、77、78、80、82、168、180、182、184、186、188、189、190、191、192、193、195、197、199、201、203、223、225、227、229、231、232、234、236、238、および240からなる群から選択されるアミノ酸位置にあるDNA認識インターフェースにおいて少なくとも5、少なくとも15、好ましくは少なくとも25、より好ましくは少なくとも35、またはさらにより好ましくは少なくとも40個以上のアミノ酸置換を含む、項目1～13のいずれか一項に記載のポリペプチド。

(項目15)

前記HEバリアントが、TGF R2標的部位を切断し、配列番号：1～5またはそれらの生物学的に活性な断片のいずれか1つの位置：26、32、34、35、36、37、38、40、42、44、46、48、68、70、75、76、78、80、116、138、143、159、168、178、180、182、184、188、190、192、193、195、197、199、203、207、223、225、227、232、240、および264からなる位置群から選択される少なくとも1つの位置において少なくとも5、少なくとも15、好ましくは少なくとも25、より好ましくは少なくとも35、またはさらにより好ましくは少なくとも40個以上のアミノ酸置換を含む、項目1～14のいずれか一項に記載のポリペプチド。

(項目16)

前記HEバリアントが、TGF R2標的部位を切断し、配列番号：1～5またはそれらの生物学的に活性な断片のいずれか1つの以下のアミノ酸置換：L26M、N32R、K34Q、S35R、S36K、V37A、G38N、S40G、E42S、G44V、Q46E、T48G、V68K、A70R、N75G、A76S、S78R、K80S、V116L、L138M、T143N、S159P、F168L、E178D、C180S、F182G、N184D、S188R、S190RもしくはS190G、L192T、G193T、Q195G、Q197G、V199R、T203S、K207R、Y223R、Y223H、K225Y、K227R、F232N、T240R、およびE264Kのうちの少なくとも5、少なくとも15、好ましくは少なくとも25、より好ましくは少なくとも35、またはさらにより好ましくは少なくとも40個以上を含む、項目1～15のいずれか一項に記載のポリペプチド。

(項目17)

前記HEバリアントが、TGF R2標的部位を切断し、配列番号：1～5またはそれらの生物学的に活性な断片のいずれか1つの以下のアミノ酸置換：L26M、N32R、K34Q、S35R、S36K、V37A、G38N、S40G、E42S、G44V、Q46E、T48G、V68K、A70R、N75G、A76S、S78R、K80S、V116L、L138M、T143N、S159P、F168L、E178D、C180S、F182G、N184D、S188R、S190R、L192T、G193T、Q195G、Q197G、V199R、T203S、K207R、Y223R、K225Y、K227R、F232N、およびT240Rのうちの少なくとも5、少なくとも15、好ましくは少なくとも25、より好ましくは少なくとも35、またはさらにより好ましくは

少なくとも 40 個以上を含む、項目 1 ~ 15 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

(項目 18)

前記 H E バリアントが、T G F R 2 標的部位を切断し、配列番号：1 ~ 5 またはそれらの生物学的に活性な断片のいずれか 1 つ以下のアミノ酸置換：L 2 6 M、N 3 2 R、K 3 4 Q、S 3 5 R、S 3 6 K、V 3 7 A、G 3 8 N、S 4 0 G、E 4 2 S、G 4 4 V、Q 4 6 E、T 4 8 G、V 6 8 K、A 7 0 R、N 7 5 G、A 7 6 S、S 7 8 R、K 8 0 S、V 1 1 6 L、L 1 3 8 M、T 1 4 3 N、S 1 5 9 P、F 1 6 8 L、E 1 7 8 D、C 1 8 0 S、F 1 8 2 G、N 1 8 4 D、S 1 8 8 R、S 1 9 0 R、L 1 9 2 T、G 1 9 3 T、Q 1 9 5 G、Q 1 9 7 G、V 1 9 9 R、T 2 0 3 S、K 2 0 7 R、Y 2 2 3 H、K 2 2 5 Y、K 2 2 7 R、F 2 3 2 N、T 2 4 0 R、および E 2 6 4 K のうちの少なくとも 5、少なくとも 15、好ましくは少なくとも 25、より好ましくは少なくとも 35、またはさらにより好ましくは少なくとも 40 個以上を含む、項目 1 ~ 15 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

(項目 19)

前記 H E バリアントが、配列番号：6 もしくは 7 に記載されるアミノ酸配列、またはそれらの生物学的に活性な断片と少なくとも 80%、好ましくは少なくとも 85%、より好ましくは少なくとも 90%、またはさらにより好ましくは少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を含む、項目 1 ~ 18 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

(項目 20)

前記 H E バリアントが、配列番号：6 に記載されるアミノ酸配列またはそれらの生物学的に活性な断片を含む、項目 1 ~ 19 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

(項目 21)

前記 H E バリアントが、配列番号：7 に記載されるアミノ酸配列またはそれらの生物学的に活性な断片を含む、項目 1 ~ 19 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

(項目 22)

前記ポリペプチドが、配列番号：11 に記載されるポリヌクレオチド配列に結合する、項目 1 ~ 21 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

(項目 23)

D N A 結合ドメインをさらに含む、項目 1 ~ 22 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

(項目 24)

前記 D N A 結合ドメインが、T A L E D N A 結合ドメインおよび亜鉛フィンガー D N A 結合ドメインからなる群から選択される、項目 23 に記載のポリペプチド。

(項目 25)

前記 T A L E D N A 結合ドメインが、約 9.5 の T A L E 繰り返し単位 ~ 約 15.5 の T A L E 繰り返し単位を含む、項目 24 に記載のポリペプチド。

(項目 26)

前記 T A L E D N A 結合ドメインが、前記 T G F R 2 遺伝子内のポリヌクレオチド配列に結合する、項目 24 または項目 25 に記載のポリペプチド。

(項目 27)

前記 T A L E D N A 結合ドメインが、配列番号：12 に記載されるポリヌクレオチド配列に結合する、項目 24 ~ 26 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

(項目 28)

前記ポリペプチドが、配列番号：13 に記載されるポリヌクレオチド配列に結合し、それを切断する、項目 27 に記載のポリペプチド。

(項目 29)

前記亜鉛フィンガー D N A 結合ドメインが、2、3、4、5、6、7、または 8 つの亜鉛フィンガーモチーフを含む、項目 24 に記載のポリペプチド。

(項目 30)

ペプチドリンカーおよびエンドプロセシング酵素またはそれらの生物学的に活性な断片

をさらに含む、項目1～29のいずれか一項に記載のポリペプチド。

(項目31)

ウイルス自己切断型2Aペプチドおよびエンドプロセシング酵素またはそれらの生物学的に活性な断片をさらに含む、項目1～30のいずれか一項に記載のポリペプチド。

(項目32)

前記エンドプロセシング酵素またはその生物学的に活性な断片が、5' - 3'エクソヌクレアーゼ、5' - 3'アルカリ性エクソヌクレアーゼ、3' - 5'エクソヌクレアーゼ、5' フラップエンドヌクレアーゼ、ヘリカーゼ、またはテンプレート非依存性DNAポリメラーゼ活性を有する、項目30または項目31に記載のポリペプチド。

(項目33)

前記エンドプロセシング酵素が、TreX2またはその生物学的に活性な断片を含む、項目30～32のいずれか一項に記載のポリペプチド。

(項目34)

前記ポリペプチドが、配列番号：8もしくは配列番号：9に記載されるアミノ酸配列またはそれらの生物学的に活性な断片を含む、項目1～33のいずれか一項に記載のポリペプチド。

(項目35)

前記ポリペプチドが、配列番号：8に記載されるアミノ酸配列またはそれらの生物学的に活性な断片を含む、項目34に記載のポリペプチド。

(項目36)

前記ポリペプチドが、配列番号：9に記載されるアミノ酸配列またはそれらの生物学的に活性な断片を含む、項目34に記載のポリペプチド。

(項目37)

前記ポリペプチドが、配列番号：11または13に記載されるポリヌクレオチド配列で前記ヒトTGF-R2遺伝子を切断する、項目1～36のいずれか一項に記載のポリペプチド。

(項目38)

項目1～37のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド。

(項目39)

項目1～37のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードする、mRNA。

(項目40)

項目1～37のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードする、cDNA。

(項目41)

項目1～37のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、ベクター。

(項目42)

項目1～37のいずれか一項に記載のポリペプチドを含む、細胞。

(項目43)

項目1～37のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、細胞。

(項目44)

項目41に記載のベクターを含む、細胞。

(項目45)

項目1～37のいずれか一項に記載のポリペプチドによって導入された1つ以上のゲノム修飾を含む、細胞。

(項目46)

前記細胞が、免疫力エンハンサー、免疫抑制シグナルダンパー、または遺伝子操作された抗原受容体のうちの1つ以上をコードするポリヌクレオチドを含む、項目42～45のいずれか一項に記載の細胞。

(項目47)

前記ポリヌクレオチドが、前記免疫力エンハンサー、免疫抑制シグナルダンパー、または遺伝子操作された抗原受容体をコードする前記ポリヌクレオチドに作動可能に連結されたRNAポリメラーゼIIプロモーターをさらに含む、項目46に記載の細胞。

(項目48)

前記RNAポリメラーゼIIプロモーターが、短EF1プロモーター、長EF1プロモーター、ヒトROSA26遺伝子座、ユビキチンC(UBC)プロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ-1(PGK)プロモーター、サイトメガロウイルスエンハンサー/ニワトリ-アクチン(CAG)プロモーター、-アクチンプロモーター、および骨髄増殖性肉腫ウイルスエンハンサー、負の制御領域の欠失、d1587revプライマー結合部位置換(MND)プロモーターからなる群から選択される、項目47に記載の細胞。

(項目49)

前記ポリヌクレオチドが、前記免疫力エンハンサー、免疫抑制シグナルダンパー、または遺伝子操作された抗原受容体に作動可能に連結され、それらの間に散在し、および/またはそれらに隣接する1つ以上の自己切断型ウイルスペプチドをさらにコードする、項目46~48のいずれか一項に記載の細胞。

(項目50)

前記自己切断型ウイルスペプチドが、2Aペプチドである、項目49に記載の細胞。

(項目51)

前記ポリヌクレオチドが、異種ポリアデニル化シグナルをさらに含む、項目46~50のいずれか一項に記載の細胞。

(項目52)

前記免疫抑制シグナルダンパーが、免疫抑制因子に対抗する酵素機能を含む、項目46~51のいずれか一項に記載の細胞。

(項目53)

前記免疫抑制シグナルダンパーが、キヌレニナーゼ活性を含む、項目52に記載の細胞。

(項目54)

前記免疫抑制シグナルダンパーが、

(a) 免疫抑制因子に結合し、任意に抗体もしくはその抗原結合断片である細胞外ドメイン、

(b) 免疫抑制因子および膜貫通ドメインに結合する細胞外ドメイン、または

(c) 免疫抑制因子に結合する細胞外ドメインと、膜貫通ドメインと、免疫抑制シグナルを前記細胞に伝達不可能である修飾細胞内ドメインと、を含む、項目46~51のいずれか一項に記載の細胞。

(項目55)

前記免疫抑制シグナルダンパーの前記細胞外ドメインおよび/または膜貫通ドメインが、前記TGF-R2細胞外ドメインおよび/または膜貫通ドメインである、項目54に記載の細胞。

(項目56)

前記免疫力エンハンサーが、二重特異性T細胞エンゲイジャー分子(BiTE)、免疫賦活因子、およびフリップ受容体からなる群から選択される、項目46~51のいずれか一項に記載の細胞。

(項目57)

前記免疫賦活因子が、サイトカイン、ケモカイン、細胞毒素、サイトカイン受容体、およびそれらのバリアントからなる群から選択される、項目56に記載の細胞。

(項目58)

前記フリップ受容体が、TGF-R2細胞外ドメインと、TGF-R2膜貫通ドメインと、前記TGF-R2膜貫通ドメインの前記C末端終端にフレーム内で融合されたCD28、CD134、CD137、CD278、および/またはCD3からの細胞内ドメイ

ンと、を含む、項目 5 6 に記載の細胞。

(項目 5 9)

前記フリップ受容体が、T G F R 2 細胞外ドメインと、C D 3 ポリペプチド、C D 4 、C D 8 、C D 2 8 、C D 1 3 4 、またはC D 1 3 7 から単離された膜貫通ドメインと、前記T G F R 2 細胞外ドメインの前記C末端終端にフレーム内で融合されたC D 2 8 、C D 1 3 4 、C D 1 3 7 、C D 2 7 8 、および／またはC D 3 からの細胞内ドメインと、を含む、項目 5 6 に記載の細胞。

(項目 6 0)

前記フリップ受容体が、T G F R 2 細胞外ドメインと、前記T G F R 2 細胞外ドメインの前記C末端終端にフレーム内で融合されたC D 3 ポリペプチド、C D 4 、C D 8 、C D 2 8 、C D 1 3 4 、またはC D 1 3 7 から単離された膜貫通ドメインと、同じく単離された細胞内ドメインと、を含む、項目 5 6 に記載の細胞。

(項目 6 1)

前記遺伝子操作された抗原受容体が、遺伝子操作されたT C R 、C A R 、D a r i c 、またはゼータカイン(z e t a k i n e)からなる群から選択される、項目 4 6 ～ 5 1 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 6 2)

前記遺伝子操作された受容体が、前記T G F R 2 遺伝子に一体化されない、項目 6 1 に記載の細胞。

(項目 6 3)

免疫力エンハンサー、免疫抑制シグナルダンパー、または遺伝子操作された抗原受容体のうちの1つ以上をコードする前記ポリヌクレオチドが、前記T G F R 2 遺伝子に一体化される、項目 4 6 ～ 5 1 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 6 4)

免疫力エンハンサー、免疫抑制シグナルダンパー、または遺伝子操作された抗原受容体のうちの1つ以上をコードする前記ポリヌクレオチドを含むドナー修復テンプレートが、項目 1 ～ 3 7 のいずれか一項に記載のポリペプチドによって導入されたD N A 2 本鎖の破断部位で前記T G F R 2 遺伝子に一体化される、項目 4 6 ～ 5 1 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 6 5)

前記細胞が、造血細胞である、項目 4 2 ～ 6 4 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 6 6)

前記細胞が、T 細胞である、項目 4 2 ～ 6 5 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 6 7)

前記細胞が、C D 3 + 、C D 4 + 、および／またはC D 8 + 細胞である、項目 4 2 ～ 6 6 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 6 8)

前記細胞が、免疫エフェクター細胞である、項目 4 2 ～ 6 7 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 6 9)

前記細胞が、細胞傷害性Tリンパ球(C T L)、腫瘍浸潤リンパ球(T I L)、またはヘルパーT細胞である、項目 4 2 ～ 6 8 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 7 0)

前記細胞が、ナチュラルキラー(N K)細胞またはナチュラルキラーティ(N K T)細胞である、項目 4 2 ～ 6 8 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 7 1)

前記細胞の源が、末梢血単核細胞、骨髓、リンパ節組織、臍帯血、胸腺問題、感染部位由来組織、腹水、胸水、脾臓組織、または腫瘍である、項目 4 2 ～ 7 0 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 7 2)

前記細胞が、1つ以上の修飾されたTGF-R2対立遺伝子を含む、項目42～71のいずれか一項に記載の細胞。

(項目73)

前記1つ以上の修飾されたTGF-R2対立遺伝子が、機能不全であるか、または実質的に低減されたTGF-R2機能および/もしくは細胞内シグナル伝達を有する、項目72に記載の細胞。

(項目74)

前記細胞が、前記1つ以上の修飾されたTGF-R2対立遺伝子内に導入された免疫力エンハンサーまたは免疫抑制シグナルダンパーをコードする核酸を含み、かつ前記細胞が、前記1つ以上の修飾TGF-R2対立遺伝子内に導入されていない遺伝子操作された抗原受容体をさらに含む、項目46～51のいずれか一項に記載の細胞。

(項目75)

項目42～74のいずれか一項に記載の1つ以上の細胞を含む、複数の細胞。

(項目76)

項目42～74のいずれか一項に記載の1つ以上の細胞を含む、組成物。

(項目77)

項目42～74のいずれか一項に記載の1つ以上の細胞と、生理学的に許容可能な担体と、を含む、組成物。

(項目78)

細胞内のヒトTGF-R2遺伝子を編集する方法であって、前記細胞内に項目1～37のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを導入することを含み、前記ポリペプチドの発現が、ヒトTGF-R2遺伝子内の標的部位で2本鎖の破断を作成する、方法。

(項目79)

細胞内のヒトTGF-R2遺伝子を編集する方法であって、前記細胞内に項目1～37のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを導入することを含み、前記ポリペプチドの発現が、ヒトTGF-R2遺伝子内の標的部位で2本鎖の破断を作成し、前記破断が、非相同末端結合(NHEJ)によって修復される、方法。

(項目80)

細胞内のヒトTGF-R2遺伝子を編集する方法であって、前記細胞内に項目1～37のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよびドナー修復テンプレートを導入することを含み、前記ポリペプチドの発現が、ヒトTGF-R2遺伝子内の標的部位で2本鎖の破断を作成し、前記ドナー修復テンプレートが、前記2本鎖の破断(DSB)の前記部位で相同組換え修復(HDR)によって前記ヒトTGF-R2遺伝子内に組み込まれる、方法。

(項目81)

前記細胞が、造血細胞である、項目78～80のいずれか一項に記載の方法。

(項目82)

前記細胞が、T細胞である、項目78～81のいずれか一項に記載の方法。

(項目83)

前記細胞が、CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、および/またはCD8<sup>+</sup>細胞である、項目78～82のいずれか一項に記載の方法。

(項目84)

前記細胞が、免疫エフェクター細胞である、項目78～83のいずれか一項に記載の方法。

(項目85)

前記細胞が、細胞傷害性Tリンパ球(CTL)、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)、またはヘルパーT細胞である、項目78～84のいずれか一項に記載の方法。

(項目86)

前記細胞が、ナチュラルキラー(NK)細胞またはナチュラルキラーT(NKT)細胞

である、項目 78～84 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 87)

前記細胞の源が、末梢血単核細胞、骨髓、リンパ節組織、臍帯血、胸腺問題、感染部位由来組織、腹水、胸水、脾臓組織、または腫瘍である、項目 78～86 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 88)

前記ポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドが、mRNA である、項目 78～87 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 89)

5' - 3' エクソヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドが、前記細胞内に導入されている、項目 78～88 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 90)

Trex 2 またはその生物学的に活性な断片をコードするポリヌクレオチドが、前記細胞内に導入されている、項目 78～89 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 91)

前記ドナー修復テンプレートが、TGF R2 遺伝子、または前記野生型 TGF R2 遺伝子と比較して、1つ以上の変異を含むその部分をコードする、項目 80～90 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 92)

前記ドナー修復テンプレートが、免疫力エンハンサー、免疫抑制シグナルダンパー、または遺伝子操作された抗原受容体のうちの1つ以上をコードする、項目 80～91 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 93)

前記ドナー修復テンプレートが、前記免疫力エンハンサー、免疫抑制シグナルダンパー、または遺伝子操作された抗原受容体に作動可能に連結された RNA ポリメラーゼ II プロモーターをさらに含む、項目 92 に記載の方法。

(項目 94)

前記 RNA ポリメラーゼ II プロモーターが、短 E F 1 プロモーター、長 E F 1 プロモーター、ヒト ROSA 26 遺伝子座、ユビキチン C (UBC) プロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ -1 (PGK) プロモーター、サイトメガロウイルスエンハンサー / ニワトリ - アクチン (CAG) プロモーター、- アクチンプロモーター、および骨髓増殖性肉腫ウイルスエンハンサー、負の制御領域の欠失、d1587rev プライマー結合部位置換 (MND) プロモーターからなる群から選択される、項目 93 に記載の方法。

(項目 95)

前記ドナー修復テンプレートが、前記免疫力エンハンサー、免疫抑制シグナルダンパー、または遺伝子操作された抗原受容体に作動可能に連結され、それらの間に散在し、および / またはそれらに隣接する1つ以上の自己切断型ウイルスペプチドをさらにコードする、項目 92～94 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 96)

前記自己切断型ウイルスペプチドが、2A ペプチドである、項目 95 に記載の方法。

(項目 97)

前記ドナー修復テンプレートが、異種ポリアデニル化シグナルをさらに含む、項目 92～96 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 98)

前記免疫抑制シグナルダンパーが、免疫抑制因子に対抗する酵素機能を含む、項目 92～97 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 99)

前記免疫抑制シグナルダンパーが、キヌレニナーゼ活性を含む、項目 98 に記載の方法。

(項目100)

前記免疫抑制シグナルダンパーが、

(a) 免疫抑制因子に結合し、任意に抗体もしくはその抗原結合断片である細胞外ドメイン、

(b) 免疫抑制因子および膜貫通ドメインに結合する細胞外ドメイン、または

(c) 免疫抑制因子に結合する細胞外ドメインと、膜貫通ドメインと、免疫抑制シグナルを前記細胞に伝達不可能である修飾細胞内ドメインと、を含む、項目92～97のいずれか一項に記載の方法。

(項目101)

前記免疫抑制シグナルダンパーの前記細胞外ドメインおよび/または膜貫通ドメインが、前記TGF-R2細胞外ドメインおよび/または膜貫通ドメインである、項目100に記載の方法。

(項目102)

前記免疫力エンハンサーが、二重特異性T細胞エンゲイジャー分子(BiTE)、免疫賦活因子、およびフリップ受容体からなる群から選択される、項目92～97のいずれか一項に記載の方法。

(項目103)

前記免疫賦活因子が、サイトカイン、ケモカイン、細胞毒素、サイトカイン受容体、およびそれらのバリエントからなる群から選択される、項目102に記載の方法。

(項目104)

前記フリップ受容体が、TGF-R2細胞外ドメインと、TGF-R2膜貫通ドメインと、前記TGF-R2膜貫通ドメインの前記C末端終端にフレーム内で融合されたCD28、CD134、CD137、CD278、および/またはCD3からの細胞内ドメインと、を含む、項目102に記載の方法。

(項目105)

前記フリップ受容体が、TGF-R2細胞外ドメインと、CD3ポリペプチド、CD4、CD8、CD28、CD134、またはCD137から単離された膜貫通ドメインと、前記TGF-R2細胞外ドメインの前記C末端終端にフレーム内で融合されたCD28、CD134、CD137、CD278、および/またはCD3からの細胞内ドメインと、を含む、項目102に記載の方法。

(項目106)

前記フリップ受容体が、TGF-R2細胞外ドメインと、前記TGF-R2細胞外ドメインの前記C末端終端にフレーム内で融合されたCD3ポリペプチド、CD4、CD8、CD28、CD134、またはCD137から単離された膜貫通ドメインと、同じく単離された細胞内ドメインと、を含む、項目102に記載の方法。

(項目107)

前記遺伝子操作された抗原受容体が、遺伝子操作されたTCR、CAR、Darcic、またはゼータカインからなる群から選択される、項目92～97のいずれか一項に記載の方法。

(項目108)

前記ドナー修復テンプレートが、前記DSBのヒトTGF-R2遺伝子配列5'に対して相同な5'相同アームと、前記DSBのヒトTGF-R2遺伝子配列3'に対して相同な3'相同アームと、を含む、項目80～107のいずれか一項に記載の方法。

(項目109)

前記5'および3'相同アームの長さが、約100bp～約2500bpから独立して選択される、項目108に記載の方法。

(項目110)

前記5'および3'相同アームの長さが、約600bp～約1500bpから独立して選択される、項目108または項目109に記載の方法。

(項目111)

前記 5' 相同アームが約 1500 bp であり、前記 3' 相同アームが約 1000 bp である、項目 108 ~ 110 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 112)

前記 5' 相同アームが約 600 bp であり、前記 3' 相同アームが約 600 bp である、項目 108 ~ 111 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 113)

ウイルスベクターが、前記細胞内に前記ドナー修復テンプレートを導入するために使用される、項目 80 ~ 112 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 114)

前記ウイルスベクターが、組換えアデノ随伴ウイルスベクター (rAAV) またはレトロウイルスである、項目 113 に記載の方法。

(項目 115)

前記 rAAV が、AAV2 由来の 1 つ以上の ITR を有する、項目 114 に記載の方法。

(項目 116)

前記 rAAV が、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、および AAV10 からなる群から選択される血清型を有する、項目 114 または項目 115 に記載の方法。

(項目 117)

前記 rAAV が、AAV2 または AAV6 血清型を有する、項目 114 ~ 116 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 118)

前記レトロウイルスが、レンチウイルスである、項目 114 に記載の方法。

(項目 119)

前記レンチウイルスが、インテグラーゼ欠損レンチウイルス (IDLV) である、項目 118 に記載の方法。

(項目 120)

有効量の項目 76 または項目 77 に記載の組成物を対象に投与することを含む、癌、感染性疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患、および免疫不全、またはそれらに関連する状態の少なくとも 1 つの症状を治療、予防、または緩和する、方法。

(項目 121)

有効量の項目 76 または項目 77 に記載の組成物を前記対象に投与することを含む、 固形癌を治療する方法。

(項目 122)

前記 固形癌が、肝臓癌、脾臓癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、精巣癌、膀胱癌、脳癌、肉腫、頭頸部癌、骨癌、甲状腺癌、腎臓癌、または皮膚癌を含む、項目 121 に記載の方法。

(項目 123)

有効量の項目 76 または項目 77 に記載の組成物を前記対象に投与することを含む、 血液学的悪性腫瘍を治療する方法。

(項目 124)

前記 血液学的悪性腫瘍が、白血病、リンパ腫、または多発性骨髄腫である、項目 123 に記載の方法。