

【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)バリエーションを含む、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バリエーション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バリエーション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バリエーション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バリエーションが、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バリエーションが、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バリエーションが、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 DNA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 DNA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 DNA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mRNAまたはcDNA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(TCR)、キメラ抗原受容体(CAR)、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、CD3<sup>+</sup>細胞、CD4<sup>+</sup>細胞、CD8<sup>+</sup>細胞、免疫エフェクター細胞、細胞傷害性Tリンパ球(CTL)、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)、ヘルパーT細胞、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、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) バリエントを含む、ポリペプチド。

(項目2)

前記HEバリエントが、LAGLIDADGホーミングエンドヌクレアーゼ (LHE) バリエントである、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バリエ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バリエントが、I - A a b M I、I - A a e M I、I - A n i I、I - A p a M I、I - C a p I I I、I - C a p I V、I - C k a M I、I - C p a M I、I - C p a M I I、I - C p a M I I I、I - C p a M I V、I - C p a M V、I - C p a V、I - C r a M I、I - E j e M I、I - G p e M I、I - G p i I、I - G z e M I、I - G z e M I I、I - G z e M I I I、I - H j e M I、I - L t r I I、I - L t r I、I - L t r W I、I - M p e M I、I - M v e M I、I - N c r I I、I - N c r I、I - N c r M I、I - O h e M I、I - O n u I、I - O s o M I、I - O s o M I I、I - O s o M I I I、I - O s o M I V、I - P a n M I、I - P a n M I I、I - P a n M I I I、I - P n o M I、I - S c u M I、I - S m a M I、I - S s c M I、およびI - V d i 1 4 1 Iからなる群から選択されるLHEのバリエントである、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バリエントが、I - C p a M I、I - H j e M I、I - O n u I、I - P a n M I、およびS m a M Iからなる群から選択されるLHEのバリエントである、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バリエントが、I - O n u I LHEバリエントである、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バリエントが、配列番号：1～5に記載のI - O n u I 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 バリエーションが、配列番号：1 ~ 5 に記載の I - Onu I 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 バリエーションが、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 バリエーションが、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 バリエーションが、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HEバリエーションが、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、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19)

前記HEバリエーションが、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HEバリエーションが、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HEバリエーションが、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)

DNA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DNA結合ドメインが、TALE DNA結合ドメインおよび亜鉛フィンガーDNA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TALE DNA結合ドメインが、約9.5のTALE繰り返し単位～約15.5のTALE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TALE DNA結合ドメインが、前記TGF R2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TALE DNA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DNA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inker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 ~ 2 9 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

(項目 3 1)

ウイルス自己切断型 2 A 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 ~ 3 0 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

(項目 3 2)

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 3 0 または項目 3 1 に記載のポリペプチド。

(項目 3 3)

前記エンドプロセシング酵素が、T r e x 2 またはその生物学的に活性な断片を含む、項目 3 0 ~ 3 2 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

(項目 3 4)

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 ~ 3 3 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

(項目 3 5)

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 3 4 に記載のポリペプチド。

(項目 3 6)

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 3 4 に記載のポリペプチド。

(項目 3 7)

前記ポリペプチドが、配列番号：1 1 または 1 3 に記載されるポリヌクレオチド配列で前記ヒト T G F R 2 遺伝子を切断する、項目 1 ~ 3 6 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

(項目 3 8)

項目 1 ~ 3 7 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 3 9)

項目 1 ~ 3 7 のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードする、m R N A。

(項目 4 0)

項目 1 ~ 3 7 のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードする、c D N A。

(項目 4 1)

項目 1 ~ 3 7 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 4 2)

項目 1 ~ 3 7 のいずれか一項に記載のポリペプチドを含む、細胞。

(項目 4 3)

項目 1 ~ 3 7 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 4 4)

項目 4 1 に記載のベクターを含む、細胞。

(項目 4 5)

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 1 つ以上のゲノム修飾を含む、細胞。

(項目 4 6)

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 4 2 ~ 4 5 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 4 7)

前記ポリヌクレオチドが、前記免疫カエンハンサー、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、前記免疫カエンハンサー、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 $\beta$ 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)

前記免疫カエンハンサーが、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エーション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 $\beta$ R2細胞外ドメインと、TGF $\beta$ R2膜貫通ドメインと、前記TGF $\beta$ R2膜貫通ドメインの前記C末端末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



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 )

免疫カエンハンサー、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 )

免疫カエンハンサー、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 <sup>+</sup>、C D 4 <sup>+</sup>、および / またはC D 8 <sup>+</sup> 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T ( 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 T G F R 2 対立遺伝子を含む、項目 4 2 ~ 7 1 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 7 3)

前記 1 つ以上の修飾された T G F R 2 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 T G F R 2 機能および / もしくは細胞内シグナル伝達を有する、項目 7 2 に記載の細胞。

(項目 7 4)

前記細胞が、前記 1 つ以上の修飾された T G F R 2 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 T G F R 2 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 4 6 ~ 5 1 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 7 5)

項目 4 2 ~ 7 4 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 7 6)

項目 4 2 ~ 7 4 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 7 7)

項目 4 2 ~ 7 4 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 7 8)

細胞内のヒト T G F R 2 遺伝子を編集する方法であって、前記細胞内に項目 1 ~ 3 7 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 T G F R 2 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 7 9)

細胞内のヒト T G F R 2 遺伝子を編集する方法であって、前記細胞内に項目 1 ~ 3 7 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 T G F R 2 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 ( N H E J ) によって修復される、方法。

(項目 8 0)

細胞内のヒト T G F R 2 遺伝子を編集する方法であって、前記細胞内に項目 1 ~ 3 7 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 T G F R 2 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 ( D S B ) の前記部位で相同組換え修復 ( H D R ) によって前記ヒト T G F R 2 遺伝子内に組み込まれる、方法。

(項目 8 1)

前記細胞が、造血細胞である、項目 7 8 ~ 8 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 8 2)

前記細胞が、T 細胞である、項目 7 8 ~ 8 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 8 3)

前記細胞が、C D 3 <sup>+</sup>、C D 4 <sup>+</sup>、および / または C D 8 <sup>+</sup> 細胞である、項目 7 8 ~ 8 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 8 4)

前記細胞が、免疫エフェクター細胞である、項目 7 8 ~ 8 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 8 5)

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 7 8 ~ 8 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 8 6)

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 T ( N K 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 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、胸腺組織、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)

Trex2 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 $\beta$ 2 遺伝子、または前記野生型 TGF $\beta$ 2 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、免疫リエンハンサー、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、前記免疫リエンハンサー、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 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、 $\beta$  - 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、d1587 rev 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、前記免疫リエンハンサー、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 1 0 0 )

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 9 2 ~ 9 7 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 1 0 1 )

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 T G F R 2 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 1 0 0 に記載の方法。

( 項目 1 0 2 )

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 ( B i T E )、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 9 2 ~ 9 7 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 1 0 3 )

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ーションからなる群から選択される、項目 1 0 2 に記載の方法。

( 項目 1 0 4 )

前記フリップ受容体が、T G F R 2 細胞外ドメインと、T G F R 2 膜貫通ドメインと、前記 T G F R 2 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 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 1 0 2 に記載の方法。

( 項目 1 0 5 )

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 1 0 2 に記載の方法。

( 項目 1 0 6 )

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 1 0 2 に記載の方法。

( 項目 1 0 7 )

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からなる群から選択される、項目 9 2 ~ 9 7 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 1 0 8 )

前記ドナー修復テンプレートが、前記 D S B のヒト T G F R 2 遺伝子配列 5 ' に対して相同な 5 ' 相同アームと、前記 D S B のヒト T G F R 2 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 8 0 ~ 1 0 7 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 1 0 9 )

前記 5 ' および 3 ' 相同アームの長さが、約 1 0 0 b p ~ 約 2 5 0 0 b p から独立して選択される、項目 1 0 8 に記載の方法。

( 項目 1 1 0 )

前記 5 ' および 3 ' 相同アームの長さが、約 6 0 0 b p ~ 約 1 5 0 0 b p から独立して選択される、項目 1 0 8 または項目 1 0 9 に記載の方法。

( 項目 1 1 1 )

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、膵臓癌、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。