

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)公開番号

特開2023-116510

(P2023-116510A)

(43)公開日 令和5年8月22日(2023.8.22)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

Z N A

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

C 1 2 N 15/62

Z

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/12

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 0 7 K 19/00

審査請求 有 請求項の数 3 O L 外国語出願 (全167頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2023-85262(P2023-85262)

(22)出願日 令和5年5月24日(2023.5.24)

(62)分割の表示 特願2021-559084(P2021-559084

)の分割

原出願日 令和2年4月3日(2020.4.3)

(31)優先権主張番号 62/828,794

(32)優先日 平成31年4月3日(2019.4.3)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/843,804

(32)優先日 令和1年5月6日(2019.5.6)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/900,126

(32)優先日 令和1年9月13日(2019.9.13)

最終頁に続く

(71)出願人 508117721

プレシジョン バイオサイエンシズ、イ
ンク。アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 2
7 7 0 1, ダーラム, スイート エー
1 0 0, ディブレル ビルディング, イ
ースト ペティグリューストリート 3
0 2

(74)代理人 110000659

弁理士法人広江アソシエイツ特許事務所

(72)発明者 マーティン, アーロン

アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 2
7 5 1 0, カーボロ, ワイルド オーク
レーン 2 0 8

(72)発明者 チャタートン, ジョン イー。

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 マイクロRNA適合SHRNA (SHRNAMIR)を含む遺伝子改変免疫細胞

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 標的タンパク質の発現を低下させるマイクロRNA適合shRNA (shRNAmiR)を発現する遺伝子改変免疫細胞(およびその集団)を提供する。

【解決手段】 そのゲノム内に、5'から3'に：(a)プロモータ；(b)キメラ抗原受容体(CAR)または外因性T細胞受容体(TCR)をコードする核酸配列；(c)2AまたはIRES配列；(d)HLAクラスI組織適合抗原、アルファ鎖E(HLA-E)融合タンパク質をコードする核酸配列；(e)終結シグナルを含み、前記CARまたは前記外因性TCRをコードする前記核酸配列、前記HLA-E融合タンパク質をコードする前記核酸配列、およびshRNAmiRをコードする前記核酸配列が、前記プロモータに作動可能に連結されているカセットを含み、且つ、前記カセットが、TCRアルファ定常領域遺伝子内に配置される、遺伝子改変ヒトT細胞を提供する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

そのゲノム中に、マイクロRNA適合shRNA (shRNAmiR) をコードする核酸配列を含む遺伝子改変免疫細胞であって、該shRNAmiRが該遺伝子改変免疫細胞において発現され、該shRNAmiRが該遺伝子改変免疫細胞における標的タンパク質の発現を低下させる、遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 2】

遺伝子改変T細胞またはそれに由来する細胞である、請求項 1 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 3】

遺伝子改変ナチュラルキラー (NK) 細胞またはそれに由来する細胞である、請求項 1 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 4】

遺伝子改変B細胞またはそれに由来する細胞である、請求項 1 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 5】

遺伝子改変された単球もしくはマクロファージ、またはそれに由来する細胞である、請求項 1 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 6】

前記shRNAmiRが、5' から3' に：

- (a) 5' miR 足場ドメイン；
- (b) 5' miR 基底ステムドメイン；
- (c) パッセンジャー鎖；
- (d) miR ループドメイン；
- (e) ガイド鎖；
- (f) 3' miR 基底ステムドメイン；および
- (g) 3' miR 足場ドメイン；

を含む、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 7】

前記miR ループドメインがmiR-30a ループドメインである、請求項 6 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 8】

前記miR-30a ループドメインが、配列番号 3 と少なくとも 80% の配列同一性を有する核酸配列を含む、請求項 7 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 9】

前記miR-30a ループドメインが配列番号 3 の核酸配列を含む、請求項 8 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 10】

前記shRNAmiRが、マイクロRNA-E (miR-E) 足場、miR-30 (例えば、miR-30a) 足場、miR-15 足場、miR-16 足場、miR-155 足場、miR-22 足場、miR-103 足場、またはmiR-107 足場を含む、請求項 6 ～ 9 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 11】

前記shRNAmiRがmiR-E 足場を含む、請求項 10 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 12】

(a) 前記5' miR 足場ドメインが、配列番号 1 と少なくとも 80% の配列同一性を有する核酸配列を含み；

(b) 前記5' miR 基底ステムドメインが、配列番号 2 と少なくとも 80% の配列同一性を有する核酸配列を含み；

10

20

30

40

50

(c) 前記 3' miR 基底ステムドメインが、配列番号 4 と少なくとも 80% の配列同一性を有する核酸配列を含み；および

(d) 前記 3' miR 足場ドメインが、配列番号 5 と少なくとも 80% の配列同一性を有する核酸配列を含む、

請求項 6 ～ 11 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 13】

(a) 前記 5' miR 足場ドメインが配列番号 1 の核酸配列を含み；

(b) 前記 5' miR 基底ステムドメインが配列番号 2 の核酸配列を含み；

(c) 前記 3' miR 基底ステムドメインが配列番号 4 の核酸配列を含み；および

(d) 前記 3' miR 足場ドメインが配列番号 5 の核酸配列を含む、

請求項 12 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 14】

そのゲノム中に、キメラ抗原受容体 (CAR) または外因性 T 細胞受容体 (TCR) をコードする核酸配列を含み、該 CAR または該外因性 TCR を発現させる、請求項 1 ～ 13 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 15】

そのゲノム中に、HLA クラス I 組織適合抗原、アルファ鎖 E (HLA-E) 融合タンパク質をコードする核酸配列を含む、請求項 1 ～ 14 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 16】

前記 HLA-E 融合タンパク質が、配列番号 66 と少なくとも 80% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 15 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 17】

前記 HLA-E 融合タンパク質が、配列番号 66 のアミノ酸配列を含む、請求項 15 または請求項 16 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 18】

前記 shRNA miR をコードする前記核酸配列が、前記 CAR または前記外因性 TCR をコードする前記核酸配列とは異なる遺伝子内に位置する、請求項 14 ～ 17 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 19】

前記 shRNA miR をコードする前記核酸配列、または前記 CAR もしくは前記外因性 TCR をコードする前記核酸配列が、TCR アルファ遺伝子または TCR アルファ定常領域遺伝子内に位置する、請求項 18 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 20】

前記 shRNA miR をコードする前記核酸配列が、前記 CAR または前記外因性 TCR をコードする前記核酸配列と同じ遺伝子内に位置する、請求項 14 ～ 17 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 21】

前記遺伝子が TCR アルファ遺伝子または TCR アルファ定常領域遺伝子である、請求項 20 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 22】

前記 shRNA miR をコードする前記核酸配列および前記 CAR または前記外因性 TCR をコードする前記核酸配列が前記遺伝子中のカセット内にある、請求項 20 または請求項 21 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 23】

前記 shRNA miR をコードする前記核酸配列および前記 CAR または前記外因性 TCR をコードする前記核酸配列が同じプロモータに作動可能に連結されている、請求項 20 ～ 22 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 24】

そのゲノム中に、5' から 3' に：

10

20

30

40

50

(a) 前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列；および

(b) 前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列

を含むカセットを含む、請求項 20～23 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 25】

そのゲノム中に、5' から 3' に：

(a) 前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列；および

(b) 前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列

を含むカセットを含む、請求項 20～23 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 26】

前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列と、前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列とが、2A または I R E S 配列によって分離される、請求項 20～25 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 27】

前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列と同じ向きである、請求項 20～26 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 28】

前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列と逆向きである、請求項 20～26 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 29】

イントロン配列が、前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列内に配置され、前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、該イントロン配列内に配置される、請求項 20～23 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 30】

前記カセットが、前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列および前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列に作動可能に連結されたプロモータを含む、請求項 22～29 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 31】

前記カセットが終結シグナルを含む、請求項 22～30 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 32】

前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列と同じ遺伝子内に位置する、請求項 15～17 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 33】

前記遺伝子が T C R アルファ遺伝子または T C R アルファ定常領域遺伝子である、請求項 32 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 34】

前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列および前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列が、前記遺伝子中のカセット内にある、請求項 32 または請求項 33 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 35】

前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列および前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする核酸配列が、同じプロモータに作動可能に連結されている、請求項 32～34 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 36】

そのゲノム中に、5' から 3' に：

10

20

30

40

50

(a) 前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列；および

(b) 前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列

を含むカセットを含む、請求項 3 2 ～ 3 5 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 3 7】

そのゲノム中に、5' から 3' に：

(a) 前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列；および

(b) 前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列

を含むカセットを含む、請求項 3 2 ～ 3 5 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 3 8】

前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列と、前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列とが、2 A または I R E S 配列によって分離される、請求項 3 2 ～ 3 7 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 3 9】

イントロン配列が、前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列内に配置され、前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、該イントロン配列内に配置される、請求項 3 2 ～ 3 5 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 4 0】

前記カセットがプロモータを含み、前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列および前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする核酸配列が該プロモータに作動可能に連結されている、請求項 3 4 ～ 3 9 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 4 1】

前記カセットが終結シグナルを含む、請求項 3 4 ～ 4 0 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 4 2】

前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列、前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列、および前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列が同じ遺伝子内に位置する、請求項 1 5 ～ 1 7 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 4 3】

前記遺伝子が T C R アルファ遺伝子または T C R アルファ定常領域遺伝子である、請求項 4 2 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 4 4】

前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列、前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列、および前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列が、前記遺伝子中のカセット内にある、請求項 4 2 または請求項 4 3 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 4 5】

前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列、前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列、および前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列が、同じプロモータに作動可能に連結されている、請求項 4 2 ～ 4 4 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 4 6】

そのゲノム中に：

(a) 前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列；

(b) 2 A または I R E S 配列；

(c) 前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列；および

(d) 前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列

を含むカセットを含む、請求項 4 2 ～ 4 5 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞

10

20

30

40

50

。

【請求項 47】

イントロン配列が、前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列内に配置され、前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、該イントロン配列内に配置される、請求項 42～46 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 48】

イントロン配列が、前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列内に配置され、前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、該イントロン配列内に配置される、請求項 42～46 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 49】

前記カセットが、前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列、前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列、および前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列に作動可能に連結されたプロモータを含む、請求項 44～48 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 50】

前記カセットが終結シグナルを含む、請求項 44～49 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 51】

そのゲノム内に、5' から 3' に：

(a) プロモータ；

(b) 前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列；

(c) 2 A または I R E S 配列；

(d) 前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列であって、イントロン配列が前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列内に配置され、前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が該イントロン配列内に配置される核酸配列；および

(e) 任意選択的に、終結シグナル

を含み、

前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列、前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列、および前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、該プロモータに作動可能に連結されているカセットを含む、請求項 45 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 52】

そのゲノム内に、5' から 3' に：

(a) プロモータ；

(b) 前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列であって、イントロン配列が前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列内に配置され、前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が該イントロン配列内に配置される核酸配列；

(c) 2 A または I R E S 配列；

(d) 前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列；および

(e) 任意選択的に、終結シグナル

を含み、

前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列、前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列、および前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、該プロモータに作動可能に連結されているカセットを含む、請求項 45 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 53】

そのゲノム内に、5' から 3' に：

(a) プロモータ；

(b) 前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列であって、イント

10

20

30

40

50

ロン配列が前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列内に配置され、前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が該イントロン配列内に配置される核酸配列；

(c) 2 A または I R E S 配列；

(d) 前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列；および

(e) 任意選択的に、終結シグナル

を含み、

前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列、前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列、および前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、該プロモータに作動可能に連結されているカセットを含む、請求項 4 5 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

10

【請求項 5 4】

そのゲノム内に、5' から 3' に：

(a) プロモータ；

(b) 前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列；

(c) 2 A または I R E S 配列；

(d) 前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列であって、イントロン配列が前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列内に配置され、前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が該イントロン配列内に配置される核酸配列；および

20

(e) 任意選択的に、終結シグナル

を含み、

前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列、前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列、および前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、該プロモータに作動可能に連結されているカセットを含む、請求項 4 5 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 5 5】

前記イントロン配列が合成イントロン配列である、請求項 2 9 ~ 3 1、3 9 ~ 4 1、4 7 ~ 5 0、または 5 1 ~ 5 4 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 5 6】

前記イントロン配列が、配列番号 6 9 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する核酸配列を含む、請求項 2 9 ~ 3 1、3 9 ~ 4 1、4 7 ~ 5 0、または 5 1 ~ 5 4 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

30

【請求項 5 7】

前記イントロン配列が配列番号 6 9 の核酸配列を含む、請求項 2 9 ~ 3 1、3 9 ~ 4 1、4 7 ~ 5 0、または 5 1 ~ 5 4 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 5 8】

前記終結シグナルがポリ A 配列またはウシ成長ホルモン (B G H) 終結シグナルである、請求項 3 1、4 1、5 0 または 5 1 ~ 5 7 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

40

【請求項 5 9】

前記ポリ A 配列が、配列番号 6 8 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する核酸配列を含む、請求項 5 8 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 6 0】

前記ポリ A 配列が配列番号 6 8 の核酸配列を含む、請求項 5 8 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 6 1】

前記 B G H 終結シグナルが、配列番号 7 1 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する核酸配列を含む、請求項 5 8 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 6 2】

50

前記 B G H 終結シグナルが配列番号 7 1 の核酸配列を含む、請求項 5 8 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 6 3】

前記プロモータが、配列番号 6 7 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する核酸配列を含む、請求項 2 3 ~ 3 1、3 5 ~ 4 1、または 4 5 ~ 6 2 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 6 4】

前記プロモータが配列番号 6 7 の核酸配列を含む、請求項 2 3 ~ 3 1、3 5 ~ 4 1、または 4 5 ~ 6 2 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 6 5】

前記 2 A 配列が、配列番号 7 0 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する核酸配列を含む P 2 A / フューリン部位である、請求項 2 6 ~ 2 8、3 0、3 1、3 8、4 0、4 1 または 4 6 ~ 6 4 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 6 6】

前記 2 A 配列が、配列番号 7 0 の核酸配列を含む P 2 A / フューリン部位である、請求項 2 6 ~ 2 8、3 0、3 1、3 8、4 0、4 1 または 4 6 ~ 6 4 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 6 7】

前記 C A R が、配列番号 7 3 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むシグナルペプチドを含む、請求項 1 4 ~ 6 6 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 6 8】

前記 C A R が、配列番号 7 3 のアミノ酸配列を含むシグナルペプチドを含む、請求項 1 4 ~ 6 6 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 6 9】

そのゲノム中に、5' から 3' に：

(a) 配列番号 6 7 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する核酸配列を含むプロモータ；

(b) 前記 C A R をコードする前記核酸配列であって、前記 C A R が配列番号 7 3 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むシグナルペプチドを含む核酸配列；

(c) 配列番号 7 0 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する核酸配列を含む P 2 A / フューリン部位；

(d) 前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列であって、前記 H L A - E 融合タンパク質が配列番号 6 6 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、イントロン配列が前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列内に配置され、該イントロン配列が配列番号 6 9 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する核酸配列を含み、前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が該イントロン配列内に配置される核酸配列；および

(e) 任意選択的に、配列番号 6 8 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する核酸配列を含む終結シグナル

を含み、

前記 C A R をコードする前記核酸配列、前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列、および前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、該プロモータに作動可能に連結されているカセットを含む、請求項 4 5 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 7 0】

そのゲノム中に、5' から 3' に：

(a) 配列番号 6 7 の核酸配列を含むプロモータ；

(b) 前記 C A R をコードする前記核酸配列であって、前記 C A R が配列番号 7 3 のアミノ酸配列を含むシグナルペプチドを含む核酸配列；

10

20

30

40

50

(c) 配列番号 70 の核酸配列を含む P2A / フューリン部位；

(d) 前記 HLA-E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列であって、前記 HLA-E 融合タンパク質が配列番号 66 のアミノ酸配列を含み、イントロン配列が前記 HLA-E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列内に配置され、該イントロン配列が配列番号 69 の核酸配列を含み、前記 shRNAmiR をコードする前記核酸配列が該イントロン配列内に配置される核酸配列；および

(e) 任意選択的に、配列番号 68 の核酸配列を含む終結シグナルを含み、

前記 CAR をコードする前記核酸配列、前記 HLA-E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列、および前記 shRNAmiR をコードする前記核酸配列が、該プロモータに作動可能に連結されているカセットを含む、請求項 45 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

10

【請求項 71】

そのゲノム中に、配列番号 74 と少なくとも 80 % の配列同一性を有する核酸配列を含むカセットを含み、該カセットが、TCR アルファ 定常領域 遺伝子内のゲノム中に配置される、請求項 69 または請求項 70 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 72】

そのゲノム中に、配列番号 74 の核酸配列を含むカセットを含み、該カセットが、TCR アルファ 定常領域 遺伝子内のゲノム中に配置される、請求項 69 または請求項 70 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 73】

前記 shRNAmiR をコードする前記核酸配列および前記 CAR または前記 外因性 TCR をコードする前記核酸配列が、異なるプロモータに作動可能に連結されている、請求項 20 ~ 22 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

20

【請求項 74】

そのゲノム中に、5' から 3' に：

(a) 第 1 のプロモータ；

(b) 該第 1 のプロモータに作動可能に連結された、前記 CAR または 外因性 TCR をコードする前記核酸配列；

(c) 第 2 のプロモータ；および

(d) 該第 2 のプロモータに作動可能に連結された、前記 shRNAmiR をコードする前記核酸配列

30

を含むカセットを含む、請求項 73 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 75】

そのゲノム中に、5' から 3' に：

(a) 第 1 のプロモータ；

(b) 該第 1 のプロモータに作動可能に連結された、前記 shRNAmiR をコードする前記核酸配列；

(c) 第 2 のプロモータ；および

(d) 該第 2 のプロモータに作動可能に連結された、前記 CAR または 外因性 TCR をコードする前記核酸配列

40

を含むカセットを含む、請求項 73 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 76】

前記 shRNAmiR をコードする前記核酸配列が、前記 CAR または 外因性 TCR をコードする前記核酸配列と同じ向きである、請求項 73 ~ 75 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 77】

前記 shRNAmiR をコードする前記核酸配列が、前記 CAR または 外因性 TCR をコードする前記核酸配列と逆向きである、請求項 83 ~ 85 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 78】

50

前記第 1 のプロモータおよび前記第 2 のプロモータが同一である、請求項 74～77 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 79】

前記第 1 のプロモータと前記第 2 のプロモータとが異なる、請求項 74～77 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 80】

前記カセットが 1 つまたは複数の終結シグナルを含む、請求項 74～79 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 81】

前記 shRNA miR をコードする前記核酸配列および前記 HLA-E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列が、異なるプロモータに作動可能に連結されている、請求項 20～22 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 82】

そのゲノム中に、5' から 3' に：

(a) 第 1 のプロモータ；

(b) 該第 1 のプロモータに作動可能に連結された、前記 HLA-E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列；

(c) 第 2 のプロモータ；および

(d) 該第 2 のプロモータに作動可能に連結された、前記 shRNA miR をコードする前記核酸配列

を含むカセットを含む、請求項 81 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 83】

そのゲノム中に、5' から 3' に：

(a) 第 1 のプロモータ；

(b) 該第 1 のプロモータに作動可能に連結された、前記 shRNA miR をコードする前記核酸配列；

(c) 第 2 のプロモータ；および

(d) 該第 2 のプロモータに作動可能に連結された、前記 HLA-E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列

を含むカセットを含む、請求項 81 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 84】

前記第 1 のプロモータおよび前記第 2 のプロモータが同一である、請求項 80～82 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 85】

前記第 1 のプロモータと前記第 2 のプロモータとが異なる、請求項 80～82 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 86】

前記カセットが 1 つまたは複数の終結シグナルを含む、請求項 82～85 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 87】

そのゲノム内に：

(a) 前記 CAR または前記外因性 TCR をコードする前記核酸配列；

(b) 前記 HLA-E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列；および

(c) 前記 shRNA miR をコードする前記核酸配列

を含み、

前記 CAR または前記外因性 TCR をコードする前記核酸配列が第 1 のプロモータに作動可能に連結されており、前記 HLA-E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列および前記 shRNA miR をコードする前記核酸配列が第 2 のプロモータに作動可能に連結されているカセットを含む、請求項 42～44 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 88】

そのゲノム内に：

- (a) 前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列；
- (b) 前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列；および
- (c) 前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列

を含み、

前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列および前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が第 1 のプロモータに作動可能に連結されており、前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列が第 2 のプロモータに作動可能に連結されているカセットを含む、請求項 42～44 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

10

【請求項 89】

イントロン配列が、前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列内に配置され、前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、該イントロン配列内に配置される、請求項 87 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 90】

イントロン配列が、前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列内に配置され、前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、該イントロン配列内に配置される、請求項 88 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 91】

前記カセットが、前記 C A R または前記外因性 T C R の転写を終結させることができる第 1 の終結シグナル、および前記 H L A - E 融合タンパク質の転写を終結させることができる第 2 の終結シグナルを含む、請求項 87～90 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

20

【請求項 92】

前記カセットが、前記 H L A - E 融合タンパク質の転写を終結させることができる第 1 の終結シグナル、および前記 C A R または前記外因性 T C R の転写を終結させることができる第 2 の終結シグナルを含む、請求項 87～90 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 93】

30

そのゲノム内に、5' から 3' に：

- (a) 第 1 のプロモータ；
- (b) 前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列；
- (c) 任意選択的に、第 1 の終結シグナル；
- (d) 第 2 のプロモータ；

(e) 前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列であって、イントロン配列が前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列内に配置され、前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が該イントロン配列内に配置される核酸配列；および

- (f) 任意選択的に、第 2 の終結シグナル

40

を含み、

前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列が該第 1 のプロモータに作動可能に連結されており、前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列および前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が該第 2 のプロモータに作動可能に連結されているカセットを含む、請求項 42～44 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 94】

そのゲノム内に、5' から 3' に：

- (a) 第 1 のプロモータ；
- (b) 前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列であって、イントロン

50

配列が前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列内に配置され、前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が該イントロン配列内に配置される核酸配列；

- (c) 任意選択的に、第 1 の終結シグナル；
- (d) 第 2 のプロモータ；
- (e) 前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする核酸配列；および
- (f) 任意選択的に、第 2 の終結シグナル

を含み、

前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列および前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が該第 1 のプロモータに作動可能に連結されており、前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列が該第 2 のプロモータに作動可能に連結されているカセットを含む、請求項 4 2 ~ 4 4 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

10

【請求項 9 5】

そのゲノム内に、5' から 3' に：

- (a) 第 1 のプロモータ；
- (b) 前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列であって、イントロン配列が前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列内に配置され、前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が該イントロン配列内に配置される核酸配列；

- (c) 任意選択的に、第 1 の終結シグナル；
- (d) 第 2 のプロモータ；
- (e) 前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列；および
- (f) 任意選択的に、第 2 の終結シグナル

20

を含み、

前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列および前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が該第 1 のプロモータに作動可能に連結されており、前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列が該第 2 のプロモータに作動可能に連結されているカセットを含む、請求項 4 2 ~ 4 4 2 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 9 6】

30

そのゲノム内に、5' から 3' に：

- (a) 第 1 のプロモータ；
- (b) 前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列；
- (c) 任意選択的に、第 1 の終結シグナル；
- (d) 第 2 のプロモータ；
- (e) 前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列であって、イントロン配列が前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列内に配置され、前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が該イントロン配列内に配置される核酸配列；および

- (f) 任意選択的に、第 2 の終結シグナル

40

を含み、

前記 H L A - E 融合タンパク質コードする前記核酸配列が該第 1 のプロモータに作動可能に連結されており、前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列および前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が該第 2 のプロモータに作動可能に連結されているカセットを含む、請求項 4 2 ~ 4 4 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 9 7】

前記イントロン配列が合成イントロン配列である、請求項 8 9 ~ 9 6 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 9 8】

50

前記イントロン配列が、配列番号 69 と少なくとも 80 % の配列同一性を有する核酸配列を含む、請求項 89 ～ 96 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 99】

前記イントロン配列が、配列番号 69 の核酸配列を含む、請求項 89 ～ 96 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 100】

前記 1 つまたは複数の終結シグナルがポリ A 配列または B G H 終結シグナルである、請求項 80 または請求項 86 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 101】

前記第 1 の終結シグナルが前記第 2 の終結シグナルと同一である、請求項 91 ～ 99 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 102】

前記第 1 の終結シグナルおよび前記第 2 の終結シグナルがポリ A 配列または B G H 終結シグナルである、請求項 101 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 103】

前記第 1 の終結シグナルが前記第 2 の終結シグナルとは異なる、請求項 91 ～ 99 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 104】

前記第 1 の終結シグナルがポリ A 配列であり、前記第 2 の終結シグナルが B G H 終結シグナルである、請求項 103 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 105】

前記第 1 の終結シグナルが B G H 終結シグナルであり、前記第 2 の終結シグナルがポリ A 配列である、請求項 103 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 106】

前記ポリ A 配列が、配列番号 68 と少なくとも 80 % の配列同一性を有する核酸配列を含む、請求項 100、102、104 または 105 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 107】

前記ポリ A 配列が配列番号 68 の核酸配列を含む、請求項 100、102、104 または 105 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 108】

前記 B G H 終結シグナルが、配列番号 71 と少なくとも 80 % の配列同一性を有する核酸配列を含む、請求項 100、102 または 104 ～ 107 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 109】

前記 B G H 終結シグナルが配列番号 71 の核酸配列を含む、請求項 100、102 または 104 ～ 107 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 110】

前記第 1 のプロモータおよび前記第 2 のプロモータが同一である、請求項 74 ～ 80 または 82 ～ 109 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 111】

前記第 1 のプロモータおよび前記第 2 のプロモータが J e T プロモータまたは E F 1 アルファコアプロモータである、請求項 110 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 112】

前記第 1 のプロモータが前記第 2 のプロモータとは異なる、請求項 74 ～ 80 または 82 ～ 109 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 113】

前記第 1 のプロモータが J e T プロモータであり、前記第 2 のプロモータが E F 1 アルファコアプロモータである、請求項 112 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 114】

10

20

30

40

50

前記第 1 のプロモータが E F 1 アルファコアプロモータであり、前記第 2 のプロモータが J e T プロモータである、請求項 1 1 2 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 1 5】

前記 J e T プロモータが、配列番号 6 7 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する核酸配列を含む、請求項 1 1 1、1 1 3 または 1 1 4 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 1 6】

前記 J e T プロモータが配列番号 6 7 の核酸配列を含む、請求項 1 1 1、1 1 3 または 1 1 4 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 1 7】

前記 E F 1 アルファコアプロモータが、配列番号 7 2 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する核酸配列を含む、請求項 1 1 1 または 1 1 3 ～ 1 1 6 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 1 8】

前記 E F 1 アルファコアプロモータが配列番号 7 2 の核酸配列を含む、請求項 1 1 1 または 1 1 3 ～ 1 1 6 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 1 9】

前記 C A R が、配列番号 7 3 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むシグナルペプチドを含む、請求項 7 3 ～ 1 1 8 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 2 0】

前記 C A R が、配列番号 7 3 のアミノ酸配列を含むシグナルペプチドを含む、請求項 7 3 ～ 1 1 8 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 2 1】

そのゲノム中に、5' から 3' に：

(a) 配列番号 6 7 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する核酸配列を含む第 1 のプロモータ；

(b) 前記 C A R をコードする前記核酸配列であって、前記 C A R が配列番号 7 3 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むシグナルペプチドを含む核酸配列；

(c) 任意選択的に、配列番号 7 0 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する核酸配列を含む第 1 の終結シグナル；

(d) 配列番号 7 2 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する核酸配列を含む第 2 のプロモータ；

(e) 前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列であって、前記 H L A - E 融合タンパク質が配列番号 6 6 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、イントロン配列が前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列内に配置され、該イントロン配列が、配列番号 6 9 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する核酸配列を含み、前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が該イントロン配列内に配置される核酸配列；および

(f) 任意選択的に、配列番号 7 1 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する核酸配列を含む第 2 の終結シグナル

を含み、

前記 C A R をコードする前記核酸配列が該第 1 のプロモータに作動可能に連結されており、前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列および前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が該第 2 のプロモータに作動可能に連結されているカセットを含む、請求項 4 2 ～ 4 4 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 2 2】

そのゲノム中に、5' から 3' に：

(a) 配列番号 6 7 の核酸配列を含む第 1 のプロモータ；

10

20

30

40

50

(b) 前記 C A R をコードする前記核酸配列であって、前記 C A R が配列番号 7 3 のアミノ酸配列を含むシグナルペプチドを含む核酸配列；

(c) 任意選択的に、配列番号 7 0 の核酸配列を含む第 1 の終結シグナル；

(d) 配列番号 7 2 の核酸配列を含む第 2 のプロモータ；

(e) 前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列であって、前記 H L A - E 融合タンパク質が配列番号 6 6 のアミノ酸配列を含み、イントロン配列が前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列内に配置され、該イントロン配列が配列番号 6 9 の核酸配列を含み、前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が該イントロン配列内に配置される核酸配列；および

(f) 任意選択的に、配列番号 7 1 の核酸配列を含む第 2 の終結シグナルを含み、

前記 C A R をコードする前記核酸配列が該第 1 のプロモータに作動可能に連結されており、前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列および前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、該第 2 のプロモータに作動可能に連結されているカセットを含む、請求項 4 2 ~ 4 4 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 2 3】

そのゲノム中に、配列番号 7 5 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する核酸配列を含むカセットを含み、該カセットが、T C R アルファ定常領域遺伝子内のゲノム中に配置される、請求項 1 2 1 または請求項 1 2 2 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 2 4】

そのゲノム中に、配列番号 7 5 の核酸配列を含むカセットを含み、該カセットが、T C R アルファ定常領域遺伝子内のゲノム中に配置される、請求項 1 2 1 または請求項 1 2 2 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 2 5】

前記標的タンパク質の発現が、対照細胞と比較して少なくとも約 1 0 %、約 2 0 %、約 3 0 %、約 4 0 %、約 5 0 %、約 5 5 %、約 6 0 %、約 6 5 %、約 7 0 %、約 7 5 %、約 8 0 %、約 8 5 %、約 9 0 %、約 9 5 %、または最大約 9 9 % 低下する、請求項 1 ~ 1 2 4 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 2 6】

前記標的タンパク質が、ベータ-2 ミクログロブリン、C S 1、トランスフォーミング増殖因子ベータ受容体 2 (T G F B R 2)、C b l 癌原遺伝子 B (C B L - B)、C D 5 2、T C R アルファ遺伝子、T C R アルファ定常領域遺伝子、C D 7、グルココルチコイド受容体 (G R)、デオキシシチジンキナーゼ (D C K)、核内受容体サブファミリー 2 グループ F メンバー 6 (N R 2 F 6)、細胞傷害性 T リンパ球関連タンパク質 4 (C T L A - 4)、または C - C ケモカイン受容体 5 型 (C C R 5) である、請求項 1 ~ 1 2 5 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 2 7】

前記標的タンパク質がベータ-2 ミクログロブリンである、請求項 1 2 6 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 2 8】

ベータ-2 ミクログロブリンの細胞表面発現が、対照細胞と比較して少なくとも約 1 0 %、約 2 0 %、約 3 0 %、約 4 0 %、約 5 0 %、約 5 5 %、約 6 0 %、約 6 5 %、約 7 0 %、約 7 5 %、約 8 0 %、約 8 5 %、約 9 0 %、約 9 5 %、または最大約 9 9 % 低下する、請求項 1 2 7 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 2 9】

M H C クラス I 分子の発現が、対照細胞と比較して細胞表面上で少なくとも約 1 0 %、約 2 0 %、約 3 0 %、約 4 0 %、約 5 0 %、約 5 5 %、約 6 0 %、約 6 5 %、約 7 0 %、約 7 5 %、約 8 0 %、約 8 5 %、約 9 0 %、約 9 5 %、または最大約 9 9 % 低下する、請求項 1 2 7 または請求項 1 2 8 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 3 0】

10

20

30

40

50

対照細胞と比較して同種異系性が低下している、請求項 1 2 7 ~ 1 2 9 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 3 1】

(a) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 1 7 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 1 8 の核酸配列を含む；

(b) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 7 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 8 の核酸配列を含む；

(c) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 9 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 1 0 の核酸配列を含む；

(d) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 1 1 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 1 2 の核酸配列を含む；

(e) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 1 3 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 1 4 の核酸配列を含む；または

(f) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 1 5 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 1 6 の核酸配列を含む

請求項 1 2 7 ~ 1 3 0 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 3 2】

前記パッセンジャー鎖が配列番号 1 7 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 1 8 の核酸配列を含む、請求項 1 2 7 ~ 1 3 1 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 3 3】

前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、配列番号 4 6 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 1 2 7 ~ 1 3 2 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 3 4】

前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が配列番号 4 6 の配列を含む、請求項 1 3 3 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 3 5】

前記標的タンパク質が C S 1 である、請求項 1 2 6 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 3 6】

C S 1 の細胞表面発現が、対照細胞と比較して少なくとも約 1 0 %、約 2 0 %、約 3 0 %、約 4 0 %、約 5 0 %、約 5 5 %、約 6 0 %、約 6 5 %、約 7 0 %、約 7 5 %、約 8 0 %、約 8 5 %、約 9 0 %、約 9 5 %、または最大約 9 9 % 低下する、請求項 1 3 5 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 3 7】

C S 1 に対する特異性を有する C A R を発現する、請求項 1 3 5 または請求項 1 3 6 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 3 8】

対照細胞と比較して、C S 1 に対する特異性を有する C A R を発現する遺伝子改変免疫細胞によるフラトリサイドを受けにくい、請求項 1 3 5 ~ 1 3 7 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 3 9】

(a) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 2 1 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 2 2 の核酸配列を含む；

(b) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 2 3 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 2 4 の核酸配列を含む；または

(c) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 2 5 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 2 6 の核酸配列を含む、

請求項 1 3 5 ~ 1 3 8 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 4 0】

前記パッセンジャー鎖が配列番号 2 5 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 2 6

の核酸配列を含む、請求項 1 3 5 ～ 1 3 9 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 4 1】

前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、配列番号 5 0 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 1 3 5 ～ 1 4 0 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 4 2】

前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が配列番号 5 0 の配列を含む、請求項 1 4 1 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 4 3】

前記標的タンパク質が T G F B R 2 である、請求項 1 2 6 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

10

【請求項 1 4 4】

T G F B R 2 の細胞表面発現が、対照細胞と比較して少なくとも約 1 0 %、約 2 0 %、約 3 0 %、約 4 0 %、約 5 0 %、約 5 5 %、約 6 0 %、約 6 5 %、約 7 0 %、約 7 5 %、約 8 0 %、約 8 5 %、約 9 0 %、約 9 5 %、または最大約 9 9 % 低下する、請求項 1 4 3 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 4 5】

対照細胞と比較して、トランスフォーミング増殖因子 B 1 (T G F B 1) による免疫抑制を受けにくい、請求項 1 4 3 または請求項 1 4 4 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 4 6】

20

(a) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 2 7 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 2 8 の核酸配列を含む；

(b) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 2 9 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 3 0 の核酸配列を含む；

(c) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 3 1 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 3 2 の核酸配列を含む；

(d) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 3 3 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 3 4 の核酸配列を含む；または

(e) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 3 5 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 3 6 の核酸配列を含む、

30

請求項 1 4 3 ～ 1 4 5 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 4 7】

前記パッセンジャー鎖が配列番号 3 1 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 3 2 の核酸配列を含む、請求項 1 4 3 ～ 1 4 6 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 4 8】

前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、配列番号 5 3 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 1 4 3 ～ 1 4 7 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 4 9】

前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が配列番号 5 3 の配列を含む、請求項 1 4 8 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

40

【請求項 1 5 0】

前記標的タンパク質が C B L - B である、請求項 1 2 6 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 5 1】

C B L - B の細胞表面発現が、対照細胞と比較して少なくとも約 1 0 %、約 2 0 %、約 3 0 %、約 4 0 %、約 5 0 %、約 5 5 %、約 6 0 %、約 6 5 %、約 7 0 %、約 7 5 %、約 8 0 %、約 8 5 %、約 9 0 %、約 9 5 %、または最大約 9 9 % 低下する、請求項 1 5 0 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 5 2】

対照細胞と比較して、下流シグナリングタンパク質の分解による T 細胞受容体 (T C R

50

）シグナル伝達の抑制を受けにくい、請求項 1 5 0 または請求項 1 5 1 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 5 3】

前記標的タンパク質が C D 5 2 である、請求項 1 2 6 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 5 4】

C D 5 2 の細胞表面発現が、対照細胞と比較して少なくとも約 1 0 %、約 2 0 %、約 3 0 %、約 4 0 %、約 5 0 %、約 5 5 %、約 6 0 %、約 6 5 %、約 7 0 %、約 7 5 %、約 8 0 %、約 8 5 %、約 9 0 %、約 9 5 %、または最大約 9 9 % 低下する、請求項 1 5 3 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 5 5】

C D 5 2 抗体誘導細胞死を受けにくい、請求項 1 5 3 または請求項 1 5 4 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 5 6】

(a) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 3 7 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 3 8 の核酸配列を含む；または

(b) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 3 9 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 4 0 の核酸配列を含む、

請求項 1 5 3 ～ 1 5 5 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 5 7】

前記パッセンジャー鎖が配列番号 3 7 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 3 8 の核酸配列を含む、請求項 1 5 3 ～ 1 5 6 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 5 8】

前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、配列番号 5 6 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 1 5 3 ～ 1 5 7 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 5 9】

前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が配列番号 5 6 の配列を含む、請求項 1 5 8 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 6 0】

前記標的タンパク質が D C K である、請求項 1 2 6 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 6 1】

D C K の細胞表面発現が、対照細胞と比較して少なくとも約 1 0 %、約 2 0 %、約 3 0 %、約 4 0 %、約 5 0 %、約 5 5 %、約 6 0 %、約 6 5 %、約 7 0 %、約 7 5 %、約 8 0 %、約 8 5 %、約 9 0 %、約 9 5 %、または最大約 9 9 % 低下する、請求項 1 6 0 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 6 2】

細胞増殖に対するプリンヌクレオシド類似体の影響を受けにくい、請求項 1 6 0 または請求項 1 6 1 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 6 3】

(a) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 7 6 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 7 7 の核酸配列を含む；

(b) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 7 8 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 7 9 の核酸配列を含む；

(c) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 8 0 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 8 1 の核酸配列を含む；

(d) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 8 2 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 8 3 の核酸配列を含む；または

(e) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 8 4 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 8 5 の核酸配列を含む、

請求項 1 6 0 ～ 1 6 2 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 1 6 4】

前記パッセンジャー鎖が配列番号 7 6 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 7 7 の核酸配列を含む、請求項 1 6 0 ～ 1 6 3 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 6 5】

前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、配列番号 8 6 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 1 6 0 ～ 1 6 4 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 6 6】

前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が配列番号 8 6 の配列を含む、請求項 1 6 5 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 6 7】

前記標的タンパク質が G R である、請求項 1 2 6 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 6 8】

G R の細胞表面発現が、対照細胞と比較して少なくとも約 1 0 %、約 2 0 %、約 3 0 %、約 4 0 %、約 5 0 %、約 5 5 %、約 6 0 %、約 6 5 %、約 7 0 %、約 7 5 %、約 8 0 %、約 8 5 %、約 9 0 %、約 9 5 %、または最大約 9 9 % 低下する、請求項 1 6 7 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 6 9】

細胞増殖に対するグルココルチコイドの影響を受けにくい、請求項 1 6 7 または請求項 1 6 8 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 7 0】

(a) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 9 1 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 9 2 の核酸配列を含む；

(b) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 9 3 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 9 4 の核酸配列を含む；

(c) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 9 5 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 9 6 の核酸配列を含む；

(d) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 9 7 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 9 8 の核酸配列を含む；

(e) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 9 9 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 1 0 0 の核酸配列を含む；

(f) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 1 0 1 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 1 0 2 の核酸配列を含む；

(g) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 1 0 3 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 1 0 4 の核酸配列を含む；

(h) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 1 0 5 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 1 0 6 の核酸配列を含む；または

(i) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 1 0 7 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 1 0 8 の核酸配列を含む、

請求項 1 6 7 ～ 1 6 9 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 7 1】

前記パッセンジャー鎖が配列番号 9 5 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 9 6 の核酸配列を含む、請求項 1 6 7 ～ 1 7 0 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 7 2】

前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、配列番号 1 1 1 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 1 6 7 ～ 1 7 1 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 1 7 3】

前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が配列番号 1 1 1 の配列を含む、請求項 1 7 2 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 174】

免疫細胞における内因性タンパク質の発現を低下させる方法であって、shRNA miRをコードする核酸配列を含む鑄型核酸を該免疫細胞に導入して、該鑄型核酸が該免疫細胞のゲノムに挿入され、該shRNA miRが該免疫細胞において内因性標的タンパク質の発現を低下させることを含む、方法。

【請求項 175】

前記免疫細胞がT細胞またはそれに由来する細胞である、請求項174に記載の方法。

【請求項 176】

前記免疫細胞がナチュラルキラー（NK）細胞またはそれに由来する細胞である、請求項174に記載の方法。

【請求項 177】

前記免疫細胞がB細胞またはそれに由来する細胞である、請求項174に記載の方法。

【請求項 178】

前記免疫細胞が単球もしくはマクロファージ、またはそれに由来する細胞である、請求項174に記載の方法。

【請求項 179】

前記鑄型核酸が、ランダムな組み込みによって前記免疫細胞のゲノムに挿入される、請求項174～178のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 180】

レンチウイルスベクターを使用して前記鑄型核酸を前記免疫細胞に導入する、請求項174～179のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 181】

前記免疫細胞がCARまたは外因性TCRを発現する、請求項174～180のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 182】

前記免疫細胞のゲノム中の認識配列に特異性を有する操作されたヌクレアーゼをコードする第2の核酸を前記免疫細胞に導入し、該操作されたヌクレアーゼが前記免疫細胞において発現し、該認識配列に切断部位を生成し、前記鑄型核酸が該切断部位において前記免疫細胞のゲノムに挿入されることをさらに含む、請求項174～178のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 183】

前記鑄型核酸が、前記認識配列に隣接する配列と相同性を有する相同アームに隣接し、前記鑄型核酸が相同組換えによって前記切断部位に挿入される、請求項182に記載の方法。

【請求項 184】

前記鑄型核酸がウイルスベクターによって前記免疫細胞に導入される、請求項182または請求項183に記載の方法。

【請求項 185】

前記ウイルスベクターが組換えAAVベクターである、請求項184に記載の方法。

【請求項 186】

前記組換えAAVベクターがAAV2またはAAV6の血清型を有する、請求項185に記載の方法。

【請求項 187】

前記認識配列が標的遺伝子内にある、請求項182～186のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 188】

前記標的遺伝子によってコードされるタンパク質の発現が前記免疫細胞において破壊される、請求項187に記載の方法。

【請求項 189】

前記標的遺伝子が、TCRアルファ遺伝子およびTCRアルファ定常領域遺伝子からな

10

20

30

40

50

る群から選択される、請求項 187 または請求項 188 に記載の方法。

【請求項 190】

前記標的遺伝子が TCR アルファ 定常領域 遺伝子であり、前記免疫細胞が内因性 TCR の検出可能な細胞表面発現を有さない、請求項 189 に記載の方法。

【請求項 191】

前記操作されたヌクレアーゼが、操作されたメガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、TALEN、コンパクト TALEN、CRISPR システムヌクレアーゼ、または megal である、請求項 182 ～ 190 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 192】

前記操作されたヌクレアーゼが操作されたメガヌクレアーゼである、請求項 182 ～ 191 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 193】

前記操作されたヌクレアーゼをコードする前記第 2 の核酸が mRNA を使用して導入される、請求項 182 ～ 192 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 194】

前記免疫細胞が、そのゲノム中に、CAR または外因性 TCR をコードする核酸配列を含む、請求項 174 ～ 193 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 195】

前記免疫細胞が、そのゲノム中に HLA-E 融合タンパク質をコードする核酸配列を含む、請求項 174 ～ 194 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 196】

前記鑄型核酸が、CAR または外因性 TCR をコードする核酸配列を含み、前記 CAR または前記外因性 TCR が前記免疫細胞によって発現される、請求項 174 ～ 193 または 195 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 197】

前記 shRNA miR をコードする前記核酸配列および前記 CAR または前記外因性 TCR をコードする前記核酸配列が、前記切断部位に前記鑄型核酸を導入した後に、前記免疫細胞中で同じプロモータに作動可能に連結される、請求項 196 に記載の方法。

【請求項 198】

前記鑄型核酸が、5' から 3' に：

(a) 前記 CAR または前記外因性 TCR をコードする前記核酸配列；および

(b) 前記 shRNA miR をコードする前記核酸配列

を含む、請求項 196 または請求項 197 に記載の方法。

【請求項 199】

前記鑄型核酸が、5' から 3' に：

(a) 前記 shRNA miR をコードする前記核酸配列；および

(b) 前記 CAR または前記外因性 TCR をコードする前記核酸配列

を含む、請求項 196 または請求項 197 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 200】

前記 CAR または前記外因性 TCR をコードする前記核酸配列および前記 shRNA miR をコードする前記核酸配列が、2A または IRES 配列によって分離される、請求項 196 ～ 199 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 201】

前記 shRNA miR をコードする前記核酸配列が、前記 CAR または前記外因性 TCR をコードする前記核酸配列と同じ向きである、請求項 196 ～ 200 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 202】

前記 shRNA miR をコードする前記核酸配列が、前記 CAR または前記外因性 TCR をコードする前記核酸配列と逆向きである、請求項 196 ～ 200 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 203】

イントロン配列が、前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列内に配置され、前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、該イントロン配列内に配置される、請求項 196 または請求項 197 に記載の方法。

【請求項 204】

前記鑄型核酸がプロモータを含み、該プロモータが、前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列および前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列に作動可能に連結される、請求項 196 ～ 203 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 205】

前記鑄型核酸が終結シグナルを含む、請求項 196 ～ 204 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 206】

前記鑄型核酸が、H L A - E 融合タンパク質をコードする核酸配列を含み、前記 H L A - E 融合タンパク質が前記免疫細胞によって発現される、請求項 174 ～ 194 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 207】

前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列および前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列が、前記切断部位に前記鑄型核酸を導入した後、前記免疫細胞中で同じプロモータに作動可能に連結される、請求項 206 に記載の方法。

【請求項 208】

20

前記鑄型核酸が、5' から 3' に：

(a) 前記前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列；および

(b) 前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列

を含む、請求項 206 または請求項 207 に記載の方法。

【請求項 209】

前記鑄型核酸が、5' から 3' に：

(a) 前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列；および

(b) 前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列

を含む、請求項 206 または請求項 207 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 210】

30

前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列および前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、2 A または I R E S 配列によって分離される、請求項 206 ～ 209 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 211】

イントロン配列が、前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列内に配置され、前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、該イントロン配列内に配置される、請求項 206 または請求項 207 に記載の方法。

【請求項 212】

前記鑄型核酸がプロモータを含み、該プロモータが、前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列および前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列に作動可能に連結される、請求項 206 ～ 211 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 213】

前記鑄型核酸が終結シグナルを含む、請求項 206 ～ 212 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 214】

前記鑄型核酸が、C A R または外因性 T C R をコードする核酸配列および H L A - E 融合タンパク質をコードする核酸配列を含み、該 C A R または該外因性 T C R および該 H L A - E 融合タンパク質が前記免疫細胞によって発現される、請求項 174 ～ 193 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 215】

50

前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列、前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列、および前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列が、前記切断部位に前記鑄型核酸を導入した後に同じプロモータに作動可能に連結される、請求項 2 1 4 に記載の方法。

【請求項 2 1 6】

前記鑄型核酸が：

- (a) 前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列；
- (b) 2 A または I R E S 配列；
- (c) 前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列；および
- (d) 前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列

を含む、請求項 2 1 5 に記載の方法。

10

【請求項 2 1 7】

イントロン配列が、前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列内に配置され、前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、該イントロン配列内に配置される、請求項 2 1 6 に記載の方法。

【請求項 2 1 8】

イントロン配列が、前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列内に配置され、前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、該イントロン配列内に配置される、請求項 2 1 6 に記載の方法。

【請求項 2 1 9】

前記鑄型核酸が、前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列、前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列、および前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列に作動可能に連結されたプロモータを含む、請求項 2 1 6 に記載の方法。

20

【請求項 2 2 0】

前記鑄型核酸が終結シグナルを含む、請求項 2 1 5 ～ 2 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 2 1】

前記鑄型核酸が、5' から 3' に：

- (a) プロモータ；
- (b) 前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列；
- (c) 2 A または I R E S 配列；
- (d) 前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列であって、イントロン配列が前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列内に配置され、前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が該イントロン配列内に配置される核酸配列；および

30

(e) 任意選択的に、終結シグナルを含む、

前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列、前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列、および前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、該プロモータに作動可能に連結されている、請求項 2 1 5 に記載の方法。

40

【請求項 2 2 2】

前記鑄型核酸が、5' から 3' に：

- (a) プロモータ；
- (b) 前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列であって、イントロン配列が前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列内に配置され、前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が該イントロン配列内に配置される核酸配列；
- (c) 2 A または I R E S 配列；
- (d) 前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列；および
- (e) 任意選択的に、終結シグナル

50

を含み、

前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列、前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列、および前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、該プロモータに作動可能に連結されている、請求項 2 1 5 に記載の方法。

【請求項 2 2 3】

前記鋳型核酸が、5' から 3' に：

(a) プロモータ；

(b) 前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列であって、イントロン配列が前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列内に配置され、前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が該イントロン配列内に配置される核酸配列；

(c) 2 A または I R E S 配列；

(d) 前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列；および

(e) 任意選択的に、終結シグナル

を含み、

前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列、前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列、および前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、該プロモータに作動可能に連結されている、請求項 2 1 5 に記載の方法。

【請求項 2 2 4】

前記鋳型核酸が、5' から 3' に：

(a) プロモータ；

(b) 前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列；

(c) 2 A または I R E S 配列；

(d) 前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列であって、イントロン配列が前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列内に配置され、前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が該イントロン配列内に配置される核酸配列；および

(e) 任意選択的に、終結シグナル

を含み、

前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列、前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列、および前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、該プロモータに作動可能に連結されている、請求項 2 1 5 に記載の方法。

【請求項 2 2 5】

前記イントロン配列が合成イントロン配列である、請求項 2 0 3 ~ 2 0 5、2 1 1 ~ 2 1 3 または 2 1 7 ~ 2 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 2 6】

前記イントロン配列が、配列番号 6 9 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する核酸配列を含む、請求項 2 0 3 ~ 2 0 5、2 1 1 ~ 2 1 3 または 2 1 7 ~ 2 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 2 7】

前記イントロン配列が、配列番号 6 9 の核酸配列を含む、請求項 2 0 3 ~ 2 0 5、2 1 1 ~ 2 1 3 または 2 1 7 ~ 2 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 2 8】

前記終結シグナルがポリ A 配列またはウシ成長ホルモン (B G H) 終結シグナルである、請求項 2 0 5、2 1 3 または 2 2 0 ~ 2 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 2 9】

前記ポリ A 配列が、配列番号 6 8 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する核酸配列を含む、請求項 2 2 8 に記載の方法。

【請求項 2 3 0】

前記ポリ A 配列が配列番号 6 8 の核酸配列を含む、請求項 2 2 8 に記載の方法。

【請求項 2 3 1】

前記 B G H 終結シグナルが、配列番号 7 1 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する核酸配列を含む、請求項 2 2 8 に記載の方法。

【請求項 2 3 2】

前記 B G H 終結シグナルが配列番号 7 1 の核酸配列を含む、請求項 2 2 8 に記載の方法。

【請求項 2 3 3】

前記プロモータが、配列番号 6 7 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する核酸配列を含む、請求項 1 9 7 ~ 2 0 5、2 0 7 ~ 2 1 3、または 2 1 5 ~ 2 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 3 4】

前記プロモータが配列番号 6 7 の核酸配列を含む、請求項 1 9 7 ~ 2 0 5、2 0 7 ~ 2 1 3、または 2 1 5 ~ 2 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 3 5】

前記 2 A 配列が、配列番号 7 0 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する核酸配列を含む P 2 A / フューリン部位である、請求項 2 0 0 ~ 2 0 2、2 0 4、2 0 5、2 1 0、2 1 2、2 1 3、または 2 1 6 ~ 2 3 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 3 6】

前記 2 A 配列が、配列番号 7 0 の核酸配列を含む P 2 A / フューリン部位である、請求項 2 0 0 ~ 2 0 2、2 0 4、2 0 5、2 1 0、2 1 2、2 1 3、または 2 1 6 ~ 2 3 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 3 7】

前記 H L A - E 融合タンパク質が、配列番号 6 6 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 2 0 6 ~ 2 3 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 3 8】

前記 H L A - E 融合タンパク質が、配列番号 6 6 のアミノ酸配列を含む、請求項 2 0 6 ~ 2 3 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 3 9】

前記 C A R が、配列番号 7 3 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むシグナルペプチドを含む、請求項 1 8 1 または 1 9 4 ~ 2 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 4 0】

前記 C A R が、配列番号 7 3 のアミノ酸配列を含むシグナルペプチドを含む、請求項 1 8 1 または 1 9 4 ~ 2 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 4 1】

前記鋳型核酸が、5' から 3' に：

(a) 配列番号 6 7 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する核酸配列を含むプロモータ；

(b) 前記 C A R をコードする前記核酸配列であって、前記 C A R が配列番号 7 3 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むシグナルペプチドを含む核酸配列；

(c) 配列番号 7 0 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する核酸配列を含む P 2 A / フューリン部位；

(d) 前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列であって、前記 H L A - E 融合タンパク質が配列番号 6 6 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、イントロン配列が前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列内に配置され、該イントロン配列が配列番号 6 9 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する核酸配列を含み、前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が該イントロン配列内に配置される核酸配列；および

(e) 任意選択的に、配列番号 6 8 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する核酸配列

10

20

30

40

50

を含む終結シグナル

を含み、

前記 C A R をコードする前記核酸配列、前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列、および前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、該プロモータに作動可能に連結されている、請求項 2 1 5 に記載の方法。

【請求項 2 4 2】

前記鑄型核酸が、5' から 3' に：

- (a) 配列番号 6 7 の核酸配列を含むプロモータ；
- (b) 前記 C A R をコードする前記核酸配列であって、前記 C A R が配列番号 7 3 のアミノ酸配列を含むシグナルペプチドを含む核酸配列；
- (c) 配列番号 7 0 の核酸配列を含む P 2 A / フューリン部位；
- (d) 前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列であって、前記 H L A - E 融合タンパク質が配列番号 6 6 のアミノ酸配列を含み、イントロン配列が前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列内に配置され、該イントロン配列が配列番号 6 9 の核酸配列を含み、前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が該イントロン配列内に配置される核酸配列；および
- (e) 任意選択的に、配列番号 6 8 の核酸配列を含む終結シグナル

を含み、

前記 C A R をコードする前記核酸配列、前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列、および前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、該プロモータに作動可能に連結されている、請求項 2 1 5 に記載の方法。

【請求項 2 4 3】

前記鑄型核酸が、配列番号 7 4 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する核酸配列を含み、前記鑄型核酸が、T C R アルファ定常領域遺伝子内のゲノムに挿入されている、請求項 2 4 1 または請求項 2 4 2 に記載の方法。

【請求項 2 4 4】

前記鑄型核酸が配列番号 7 4 の核酸配列を含み、前記鑄型核酸が T C R アルファ定常領域遺伝子内のゲノムに挿入されている、請求項 2 4 1 または請求項 2 4 2 に記載の方法。

【請求項 2 4 5】

前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列および前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列が、前記切断部位に前記鑄型核酸を導入した後に、前記免疫細胞中で異なるプロモータに作動可能に連結される、請求項 1 9 6 に記載の方法。

【請求項 2 4 6】

前記鑄型核酸が、5' から 3' に：

- (a) 第 1 のプロモータ；
- (b) 該第 1 のプロモータに作動可能に連結された前記 C A R または外因性 T C R をコードする前記核酸配列；
- (c) 第 2 のプロモータ；および
- (d) 該第 2 のプロモータに作動可能に連結された前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列

を含む、請求項 2 4 5 に記載の方法。

【請求項 2 4 7】

前記鑄型核酸が、5' から 3' に：

- (a) 第 1 のプロモータ；
- (b) 該第 1 のプロモータに作動可能に連結された前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列；
- (c) 第 2 のプロモータ；および
- (d) 該第 2 のプロモータに作動可能に連結された前記 C A R または外因性 T C R をコードする前記核酸配列

を含む、請求項 2 4 5 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 2 4 8】

前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、前記 C A R または外因性 T C R をコードする前記核酸配列と同じ向きである、請求項 2 4 5 ～ 2 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 4 9】

前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、前記 C A R または外因性 T C R をコードする前記核酸配列と逆向きである、請求項 2 4 5 ～ 2 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5 0】

前記第 1 のプロモータおよび前記第 2 のプロモータが同一である、請求項 2 4 5 ～ 2 4 9 のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 2 5 1】

前記第 1 のプロモータと前記第 2 のプロモータとが異なる、請求項 2 4 5 ～ 2 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5 2】

前記鑄型核酸が 1 つまたは複数の終結シグナルを含む、請求項 2 4 5 ～ 2 5 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5 3】

前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列および前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列が、前記切断部位に前記鑄型核酸を導入した後、前記免疫細胞中で異なるプロモータに作動可能に連結される、請求項 2 0 6 に記載の方法。 20

【請求項 2 5 4】

前記鑄型核酸が、5' から 3' に：

(a) 第 1 のプロモータ；

(b) 該第 1 のプロモータに作動可能に連結された前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列；

(c) 第 2 のプロモータ；および

(d) 該第 2 のプロモータに作動可能に連結された前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列

を含む、請求項 2 5 3 に記載の方法。 30

【請求項 2 5 5】

前記鑄型核酸が、5' から 3' に：

(a) 第 1 のプロモータ；

(b) 該第 1 のプロモータに作動可能に連結された前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列；

(c) 第 2 のプロモータ；および

(d) 該第 2 のプロモータに作動可能に連結された前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列

を含む、請求項 2 5 3 に記載の方法。 40

【請求項 2 5 6】

前記第 1 のプロモータおよび前記第 2 のプロモータが同一である、請求項 2 5 3 ～ 2 5 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5 7】

前記第 1 のプロモータと前記第 2 のプロモータとが異なる、請求項 2 5 3 ～ 2 5 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5 8】

前記鑄型核酸が 1 つまたは複数の終結シグナルを含む、請求項 2 5 3 ～ 2 5 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5 9】

前記鑄型核酸が、

- (a) 前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列；
- (b) 前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列；および
- (c) 前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列

を含み、

前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列が第 1 のプロモータに作動可能に連結されており、前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列および前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が第 2 のプロモータに作動可能に連結されている、請求項 2 1 4 に記載の方法。

【請求項 2 6 0】

前記鑄型核酸が、

- (a) 前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列；
- (b) 前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列；および
- (c) 前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列

を含み、

前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列および前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が第 1 のプロモータに作動可能に連結されており、前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列が第 2 のプロモータに作動可能に連結されている、請求項 2 1 4 に記載の方法。

【請求項 2 6 1】

イントロン配列が、前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列内に配置され、前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、該イントロン配列内に配置される、請求項 2 5 9 に記載の方法。

【請求項 2 6 2】

イントロン配列が、前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列内に配置され、前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、該イントロン配列内に配置される、請求項 2 6 0 に記載の方法。

【請求項 2 6 3】

前記鑄型核酸が、前記 C A R または前記外因性 T C R の転写を終結させることができる第 1 の終結シグナル、および前記 H L A - E 融合タンパク質の転写を終結させることができる第 2 の終結シグナルを含む、請求項 2 5 9 ～ 2 6 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 6 4】

前記鑄型核酸が、前記 H L A - E 融合タンパク質の転写を終結させることができる第 1 の終結シグナル、および前記 C A R または前記外因性 T C R の転写を終結させることができる第 2 の終結シグナルを含む、請求項 2 5 9 ～ 2 6 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 6 5】

前記鑄型核酸が、5' から 3' に：

- (a) 第 1 のプロモータ；
- (b) 前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列；
- (c) 任意選択的に、第 1 の終結シグナル；
- (d) 第 2 のプロモータ；

(e) 前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列であって、イントロン配列が前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列内に配置され、前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が該イントロン配列内に配置される核酸配列；および

- (f) 任意選択的に、第 2 の終結シグナル

を含み、

前記 C A R または前記外因性 T C R をコードする前記核酸配列が該第 1 のプロモータに作動可能に連結されおり、前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列および前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が該第 2 のプロモータに作動可能に連結されている、請求項 2 1 4 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 2 6 6】

前記鋳型核酸が、5'から3'に：

- (a) 第1のプロモータ；
- (b) 前記HLA-E融合タンパク質をコードする前記核酸配列であって、イントロン配列が前記HLA-E融合タンパク質をコードする前記核酸配列内に配置され、前記shRNAmiRをコードする前記核酸配列が該イントロン配列内に配置される核酸配列；
- (c) 任意選択的に、第1の終結シグナル；
- (d) 第2のプロモータ；
- (e) 前記CARまたは前記外因性TCRをコードする核酸配列；および
- (f) 任意選択的に、第2の終結シグナル

10

を含み、

前記HLA-E融合タンパク質をコードする前記核酸配列および前記shRNAmiRをコードする前記核酸配列が該第1のプロモータに作動可能に連結されており、前記CARまたは前記外因性TCRをコードする前記核酸配列が該第2のプロモータに作動可能に連結されている、請求項214に記載の方法。

【請求項 2 6 7】

前記鋳型核酸が、5'から3'に：

- (a) 第1のプロモータ；
- (b) 前記CARまたは前記外因性TCRをコードする前記核酸配列であって、イントロン配列が前記CARまたは前記外因性TCRをコードする前記核酸配列内に配置され、前記shRNAmiRをコードする前記核酸配列が該イントロン配列内に配置される核酸配列；
- (c) 任意選択的に、第1の終結シグナル；
- (d) 第2のプロモータ；
- (e) 前記HLA-E融合タンパク質をコードする前記核酸配列；および
- (f) 任意選択的に、第2の終結シグナル

20

を含み、

前記CARまたは前記外因性TCRをコードする前記核酸配列および前記shRNAmiRをコードする前記核酸配列が該第1のプロモータに作動可能に連結されており、前記HLA-E融合タンパク質をコードする前記核酸配列が該第2のプロモータに作動可能に連結されている、請求項214に記載の方法。

30

【請求項 2 6 8】

前記鋳型核酸が、5'から3'に：

- (a) 第1のプロモータ；
- (b) 前記HLA-E融合タンパク質をコードする前記核酸配列；
- (c) 任意選択的に、第1の終結シグナル；
- (d) 第2のプロモータ；
- (e) 前記CARまたは前記外因性TCRをコードする前記核酸配列であって、イントロン配列が前記CARまたは前記外因性TCRをコードする前記核酸配列内に配置され、前記shRNAmiRをコードする前記核酸配列が該イントロン配列内に配置される核酸配列；および
- (f) 任意選択的に、第2の終結シグナル

40

を含み、

前記HLA-E融合タンパク質をコードする前記核酸配列が該第1のプロモータに作動可能に連結されており、前記CARまたは前記外因性TCRをコードする前記核酸配列および前記shRNAmiRをコードする前記核酸配列が該第2のプロモータに作動可能に連結されている、請求項214に記載の方法。

【請求項 2 6 9】

前記イントロン配列が合成イントロン配列である、請求項261～268のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 270】

前記イントロン配列が、配列番号 69 と少なくとも 80 % の配列同一性を有する核酸配列を含む、請求項 261 ～ 268 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 271】

前記イントロン配列が、配列番号 69 の核酸配列を含む、請求項 261 ～ 268 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 272】

前記 1 つまたは複数の終結シグナルがポリ A 配列または B G H 終結シグナルである、請求項 252 または請求項 258 に記載の方法。

【請求項 273】

前記第 1 の終結シグナルが前記第 2 の終結シグナルと同一である、請求項 263 ～ 271 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 274】

前記第 1 の終結シグナルが前記第 2 の終結シグナルとは異なる、請求項 263 ～ 271 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 275】

前記第 1 の終結シグナルがポリ A 配列であり、前記第 2 の終結シグナルが B G H 終結シグナルである、請求項 274 に記載の方法。

【請求項 276】

前記第 1 の終結シグナルが B G H 終結シグナルであり、前記第 2 の終結シグナルがポリ A 配列である、請求項 274 に記載の遺伝子改変免疫細胞。

【請求項 277】

前記ポリ A 配列が、配列番号 68 と少なくとも 80 % の配列同一性を有する核酸配列を含む、請求項 272、275 または 276 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 278】

前記ポリ A 配列が配列番号 68 の核酸配列を含む、請求項 272、275 または 276 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 279】

前記 B G H 終結シグナルが、配列番号 71 と少なくとも 80 % の配列同一性を有する核酸配列を含む、請求項 272、275 または 276 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 280】

前記 B G H 終結シグナルが配列番号 71 の核酸配列を含む、請求項 272、275 または 276 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 281】

前記第 1 のプロモータおよび前記第 2 のプロモータが同一である、請求項 246 ～ 252 または 254 ～ 280 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 282】

前記第 1 のプロモータが前記第 2 のプロモータとは異なる、請求項 246 ～ 252 または 254 ～ 280 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 283】

前記第 1 のプロモータが J e T プロモータであり、前記第 2 のプロモータが E F 1 アルファコプロモータである、請求項 282 に記載の方法。

【請求項 284】

前記第 1 のプロモータが E F 1 アルファコプロモータであり、前記第 2 のプロモータが J e T プロモータである、請求項 282 に記載の方法。

【請求項 285】

前記 J e T プロモータが、配列番号 67 と少なくとも 80 % の配列同一性を有する核酸配列を含む、請求項 283 または請求項 284 に記載の方法。

【請求項 286】

前記 J e T プロモータが配列番号 67 の核酸配列を含む、請求項 283 または請求項 2

10

20

30

40

50

84に記載の方法。

【請求項287】

前記EF1アルファコアプロモータが、配列番号72と少なくとも80%の配列同一性を有する核酸配列を含む、請求項283～286のいずれか一項に記載の方法。

【請求項288】

前記EF1アルファコアプロモータが配列番号72の核酸配列を含む、請求項283～286のいずれか一項に記載の方法。

【請求項289】

前記HLA-E融合タンパク質が、配列番号66と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項253～288のいずれか一項に記載の方法。

【請求項290】

前記HLA-E融合タンパク質が、配列番号66のアミノ酸配列を含む、請求項253～288のいずれか一項に記載の方法。

【請求項291】

前記CARが、配列番号73と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むシグナルペプチドを含む、請求項245～290のいずれか一項に記載の方法。

【請求項292】

前記CARが、配列番号73のアミノ酸配列を含むシグナルペプチドを含む、請求項245～290のいずれか一項に記載の方法。

【請求項293】

前記鋳型核酸が、5'から3'に：

(a) 配列番号67と少なくとも80%の配列同一性を有する核酸配列を含む第1のプロモータ；

(b) 前記CARをコードする前記核酸配列であって、前記CARが配列番号73と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むシグナルペプチドを含む核酸配列；

(c) 任意選択的に、配列番号70と少なくとも80%の配列同一性を有する核酸配列を含む第1の終結シグナル；

(d) 配列番号72と少なくとも80%の配列同一性を有する核酸配列を含む第2のプロモータ；

(e) 前記HLA-E融合タンパク質をコードする前記核酸配列であって、前記HLA-E融合タンパク質が配列番号66と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、イントロン配列が前記HLA-E融合タンパク質をコードする前記核酸配列内に配置され、該イントロン配列が、配列番号69と少なくとも80%の配列同一性を有する核酸配列を含み、前記shRNAmiRをコードする前記核酸配列が該イントロン配列内に配置される核酸配列；および

(f) 任意選択的に、配列番号71と少なくとも80%の配列同一性を有する核酸配列を含む第2の終結シグナル

を含み、

前記CARをコードする前記核酸配列が該第1のプロモータに作動可能に連結されており、前記HLA-E融合タンパク質をコードする前記核酸配列および前記shRNAmiRをコードする前記核酸配列が該第2のプロモータに作動可能に連結されている、請求項214記載の方法。

【請求項294】

前記鋳型核酸が、5'から3'に：

(a) 配列番号67の核酸配列を含む第1のプロモータ；

(b) 前記CARをコードする前記核酸配列であって、前記CARが配列番号73のアミノ酸配列を含むシグナルペプチドを含む核酸配列；

(c) 任意選択的に、配列番号70の核酸配列を含む第1の終結シグナル；

(d) 配列番号72の核酸配列を含む第2のプロモータ；

10

20

30

40

50

(e) 前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列であって、前記 H L A - E 融合タンパク質が配列番号 66 のアミノ酸配列を含み、イントロン配列が前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列内に配置され、該イントロン配列が配列番号 69 の核酸配列を含み、前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が該イントロン配列内に配置される核酸配列；および

(f) 任意選択的に、配列番号 71 の核酸配列を含む第 2 の終結シグナルを含み、

前記 C A R をコードする前記核酸配列が該第 1 のプロモータに作動可能に連結されており、前記 H L A - E 融合タンパク質をコードする前記核酸配列および前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、該第 2 のプロモータに作動可能に連結されている、請求項 214 に記載の方法。

10

【請求項 295】

前記鋳型核酸が、配列番号 75 と少なくとも 80 % の配列同一性を有する核酸配列を含み、前記カセットが、T C R アルファ定常領域遺伝子内のゲノムに挿入されている、請求項 293 または請求項 294 に記載の方法。

【請求項 296】

前記鋳型核酸が配列番号 75 の核酸配列を含み、前記カセットが T C R アルファ定常領域遺伝子内のゲノムに挿入されている、請求項 293 または請求項 294 に記載の方法。

【請求項 297】

前記 s h R N A m i R が、5' から 3' に：

20

- (a) 5' m i R 足場ドメイン；
- (b) 5' m i R 基底ステムドメイン；
- (c) パッセンジャー鎖；
- (d) m i R ループドメイン；
- (e) ガイド鎖；
- (f) 3' m i R 基底ステムドメイン；および
- (g) 3' m i R 足場ドメイン

を含む、請求項 174 ~ 296 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 298】

前記 m i R ループドメインが m i R - 30 a ループドメインである、請求項 297 に記載の方法。

30

【請求項 299】

前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、配列番号 3 と少なくとも 80 % の配列同一性を有する m i R - 30 a ループドメインコード配列を含む、請求項 298 に記載の方法。

【請求項 300】

前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、配列番号 3 の m i R - 30 a ループドメインコード配列を含む、請求項 298 に記載の方法。

【請求項 301】

前記 s h R N A m i R が、マイクロ R N A - E (m i R - E) 足場、m i R - 30 (例えば、m i R - 30 a) 足場、m i R - 15 足場、m i R - 16 足場、m i R - 155 足場、m i R - 22 足場、m i R - 103 足場または m i R - 107 足場を含む、請求項 174 ~ 300 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 302】

前記 s h R N A m i R が m i R - E 足場を含む、請求項 301 に記載の方法。

【請求項 303】

(a) 前記 5' m i R 足場ドメインが、配列番号 1 と少なくとも 80 % の配列同一性を有する核酸配列を含み；

(b) 前記 5' m i R 基底ステムドメインが、配列番号 2 と少なくとも 80 % の配列同一性を有する核酸配列を含み；

50

(c) 前記 3' miR 基底ステムドメインが、配列番号 4 と少なくとも 80% の配列同一性を有する核酸配列を含み；および

(d) 前記 3' miR 足場ドメインが、配列番号 5 と少なくとも 80% の配列同一性を有する核酸配列を含む、

請求項 297～302 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 304】

a) 前記 5' miR 足場ドメインが配列番号 1 の核酸配列を含み；

(b) 前記 5' miR 基底ステムドメインが配列番号 2 の核酸配列を含み；

(c) 前記 3' miR 基底ステムドメインが配列番号 4 の核酸配列を含み；および

(d) 前記 3' miR 足場ドメインが配列番号 5 の核酸配列を含む、

請求項 297～303 に記載の方法。

【請求項 305】

前記標的タンパク質の発現が、対照細胞と比較して、少なくとも約 10%、約 20%、約 30%、約 40%、約 50%、約 55%、約 60%、約 65%、約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、または最大約 99% 低下する、請求項 174～304 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 306】

前記標的タンパク質が、ベータ-2 ミクログロブリン、CS1、トランスフォーミング増殖因子受容体 2 (TGFR2)、Cbl 癌原遺伝子 B (CBL-B)、CD52、TCR アルファ 遺伝子、TCR アルファ 定常領域 遺伝子、CD7、グルコシルコイド受容体 (GR)、デオキシシチジンキナーゼ (DCK)、核内受容体サブファミリー 2 グループ F メンバー 6 (NR2F6)、細胞傷害性 T リンパ球関連タンパク質 4 (CTLA-4)、または C-C ケモカイン受容体 5 型 (CCR5) である、請求項 174～305 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 307】

前記標的タンパク質がベータ-2 ミクログロブリンである、請求項 306 に記載の方法。

【請求項 308】

ベータ-2 ミクログロブリンの細胞表面発現が、対照細胞と比較して、少なくとも約 10%、約 20%、約 30%、約 40%、約 50%、約 55%、約 60%、約 65%、約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、または最大約 99% 低下する、請求項 307 に記載の方法。

【請求項 309】

MHC クラス I 分子の発現が、対照細胞と比較して細胞表面上で少なくとも約 10%、約 20%、約 30%、約 40%、約 50%、約 55%、約 60%、約 65%、約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、または最大約 99% 低下する、請求項 307 または請求項 308 に記載の方法。

【請求項 310】

前記免疫細胞が、対照細胞と比較して同種異系性が低下している、請求項 307～309 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 311】

(a) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 17 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 18 の核酸配列を含む；

(b) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 7 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 8 の核酸配列を含む；

(c) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 9 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 10 の核酸配列を含む；

(d) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 11 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 12 の核酸配列を含む；

(e) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 13 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番

10

20

30

40

50

号 1 4 の核酸配列を含む；または

(f) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 1 5 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 1 6 の核酸配列を含む；

請求項 3 0 7 ～ 3 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 1 2】

前記パッセンジャー鎖が配列番号 1 7 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 1 8 の核酸配列を含む、請求項 3 0 7 ～ 3 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 1 3】

前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、配列番号 4 6 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 3 0 7 ～ 3 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 1 4】

前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が配列番号 4 6 の配列を含む、請求項 3 0 7 ～ 3 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 1 5】

前記標的タンパク質が C S 1 である、請求項 3 0 6 に記載の方法。

【請求項 3 1 6】

C S 1 の細胞表面発現が、対照細胞と比較して少なくとも約 1 0 %、約 2 0 %、約 3 0 %、約 4 0 %、約 5 0 %、約 5 5 %、約 6 0 %、約 6 5 %、約 7 0 %、約 7 5 %、約 8 0 %、約 8 5 %、約 9 0 %、約 9 5 %、または最大約 9 9 % 低下する、請求項 3 1 5 に記載の方法。

【請求項 3 1 7】

前記免疫細胞が、C S 1 に対する特異性を有する C A R を発現する、請求項 3 1 5 または請求項 3 1 6 に記載の方法。

【請求項 3 1 8】

前記免疫細胞が、対照細胞と比較して C S 1 に対する特異性を有する C A R を発現する免疫細胞によるフラトリサイドに対する感受性が低い、請求項 3 1 5 ～ 3 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 1 9】

(a) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 2 1 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 2 2 の核酸配列を含む；

(b) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 2 3 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 2 4 の核酸配列を含む；または

(c) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 2 5 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 2 6 の核酸配列を含む、

請求項 3 1 5 ～ 3 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 2 0】

前記パッセンジャー鎖が配列番号 2 5 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 2 6 の核酸配列を含む、請求項 3 1 5 ～ 3 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 2 1】

前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、配列番号 5 0 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 3 1 5 ～ 3 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 2 2】

前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が配列番号 5 0 の配列を含む、請求項 3 1 5 ～ 3 2 1 に記載の方法。

【請求項 3 2 3】

前記標的タンパク質が T G F B R 2 である、請求項 3 0 6 に記載の方法。

【請求項 3 2 4】

T G F B R 2 の細胞表面発現が、対照細胞と比較して、少なくとも約 1 0 %、約 2 0 %、約 3 0 %、約 4 0 %、約 5 0 %、約 5 5 %、約 6 0 %、約 6 5 %、約 7 0 %、約 7 5 %、約 8 0 %、約 8 5 %、約 9 0 %、約 9 5 %、または最大約 9 9 % 低下する、請求項 3 2

10

20

30

40

50

3 に記載の方法。

【請求項 3 2 5】

前記免疫細胞が、対照細胞と比較して、トランスフォーミング増殖因子 B 1 (T G F B 1) による免疫抑制を受けにくい、請求項 3 2 3 または請求項 3 2 4 に記載の方法。

【請求項 3 2 6】

(a) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 2 7 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 2 8 の核酸配列を含む；

(b) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 2 9 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 3 0 の核酸配列を含む；

(c) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 3 1 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 3 2 の核酸配列を含む；

(d) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 3 3 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 3 4 の核酸配列を含む；または

(e) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 3 5 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 3 6 の核酸配列を含む、

請求項 3 2 3 ～ 3 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 2 7】

前記パッセンジャー鎖が配列番号 3 1 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 3 2 の核酸配列を含む、請求項 3 2 3 ～ 3 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 2 8】

前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、配列番号 5 3 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 3 2 3 ～ 3 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 2 9】

前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が配列番号 5 3 の配列を含む、請求項 3 2 3 ～ 3 2 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 3 0】

前記標的タンパク質が C B L - B である、請求項 3 0 6 に記載の方法。

【請求項 3 3 1】

C B L - B の細胞表面発現が、対照細胞と比較して、少なくとも約 1 0 % 、約 2 0 % 、約 3 0 % 、約 4 0 % 、約 5 0 % 、約 5 5 % 、約 6 0 % 、約 6 5 % 、約 7 0 % 、約 7 5 % 、約 8 0 % 、約 8 5 % 、約 9 0 % 、約 9 5 % 、または最大約 9 9 % 低下する、請求項 3 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 3 2】

前記免疫細胞が、対照細胞と比較して、下流シグナル伝達タンパク質の分解による T 細胞受容体 (T C R) シグナル伝達の抑制を受けにくい、請求項 3 3 0 または請求項 3 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3 3】

前記標的タンパク質が C D 5 2 である、請求項 3 0 6 に記載の方法。

【請求項 3 3 4】

C D 5 2 の細胞表面発現が、対照細胞と比較して、少なくとも約 1 0 % 、約 2 0 % 、約 3 0 % 、約 4 0 % 、約 5 0 % 、約 5 5 % 、約 6 0 % 、約 6 5 % 、約 7 0 % 、約 7 5 % 、約 8 0 % 、約 8 5 % 、約 9 0 % 、約 9 5 % 、または最大約 9 9 % 低下する、請求項 3 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 3 5】

前記免疫細胞が C D 5 2 抗体誘導細胞死を受けにくい、請求項 3 3 3 または請求項 3 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 3 6】

(a) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 3 7 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 3 8 の核酸配列を含む；または

(b) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 3 9 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号

10

20

30

40

50

号 40 の核酸配列を含む、

請求項 333 ～ 335 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 337】

前記パッセンジャー鎖が配列番号 37 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 38 の核酸配列を含む、請求項 333 ～ 336 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 338】

前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、配列番号 56 と少なくとも 80 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 333 ～ 337 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 339】

前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が配列番号 56 の配列を含む、請求項 333 ～ 338 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 340】

前記標的タンパク質が D C K である、請求項 306 に記載の方法。

【請求項 341】

D C K の細胞表面発現が、対照細胞と比較して、少なくとも約 10 %、約 20 %、約 30 %、約 40 %、約 50 %、約 55 %、約 60 %、約 65 %、約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、約 95 %、または最大約 99 % 低下する、請求項 340 に記載の方法。

【請求項 342】

前記免疫細胞が、細胞増殖に対するプリンヌクレオシド類似体の影響を受けにくい、請求項 340 または請求項 341 に記載の方法。

20

【請求項 343】

(a) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 76 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 77 の核酸配列を含む；

(b) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 78 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 79 の核酸配列を含む；

(c) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 80 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 81 の核酸配列を含む；

(d) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 82 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 83 の核酸配列を含む；または

30

(e) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 84 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 85 の核酸配列を含む、

請求項 340 ～ 342 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 344】

前記パッセンジャー鎖が配列番号 76 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 77 の核酸配列を含む、請求項 340 ～ 343 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 345】

前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、配列番号 86 と少なくとも 80 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 340 ～ 344 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 346】

前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が配列番号 86 の配列を含む、請求項 340 ～ 345 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 347】

前記標的タンパク質が G R である、請求項 306 に記載の方法。

【請求項 348】

G R の細胞表面発現が、対照細胞と比較して少なくとも約 10 %、約 20 %、約 30 %、約 40 %、約 50 %、約 55 %、約 60 %、約 65 %、約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、約 95 %、または最大約 99 % 低下する、請求項 347 に記載の方法。

【請求項 349】

50

前記免疫細胞が、細胞増殖に対するグルコルチコイドの影響を受けにくい、請求項 3 4 7 または請求項 3 4 8 に記載の方法。

【請求項 3 5 0】

(a) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 9 1 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 9 2 の核酸配列を含む；

(b) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 9 3 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 9 4 の核酸配列を含む；

(c) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 9 5 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 9 6 の核酸配列を含む；

(d) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 9 7 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 9 8 の核酸配列を含む；

(e) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 9 9 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 1 0 0 の核酸配列を含む；

(f) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 1 0 1 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 1 0 2 の核酸配列を含む；

(g) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 1 0 3 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 1 0 4 の核酸配列を含む；

(h) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 1 0 5 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 1 0 6 の核酸配列を含む；または

(i) 前記パッセンジャー鎖が配列番号 1 0 7 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 1 0 8 の核酸配列を含む、

請求項 3 4 7 ～ 3 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 5 1】

前記パッセンジャー鎖が配列番号 9 5 の核酸配列を含み、前記ガイド鎖が配列番号 9 6 の核酸配列を含む、請求項 3 4 7 ～ 3 5 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 5 2】

前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が、配列番号 1 1 1 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 3 4 7 ～ 3 5 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 5 3】

前記 s h R N A m i R をコードする前記核酸配列が配列番号 1 1 1 の配列を含む、請求項 3 4 7 ～ 3 5 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 5 4】

請求項 1 7 4 ～ 3 0 6 のいずれか一項に記載の方法によって作製された免疫細胞。

【請求項 3 5 5】

請求項 3 0 7 ～ 3 1 4 のいずれか一項に記載の方法によって作製された免疫細胞。

【請求項 3 5 6】

請求項 3 1 5 ～ 3 2 2 のいずれか一項に記載の方法によって作製された免疫細胞。

【請求項 3 5 7】

請求項 3 2 3 ～ 3 2 9 のいずれか一項に記載の方法によって作製された免疫細胞。

【請求項 3 5 8】

請求項 3 3 0 ～ 3 3 2 のいずれか一項に記載の方法によって作製された免疫細胞。

【請求項 3 5 9】

請求項 3 3 3 ～ 3 3 9 のいずれか一項に記載の方法によって作製された免疫細胞。

【請求項 3 6 0】

請求項 3 4 0 ～ 3 4 6 のいずれか一項に記載の方法によって作製された免疫細胞。

【請求項 3 6 1】

請求項 3 4 7 ～ 3 5 3 のいずれか一項に記載の方法によって作製された免疫細胞。

【請求項 3 6 2】

複数の請求項 1 ～ 1 7 3 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞または複数の請求

10

20

30

40

50

項 3 5 4 ～ 3 6 1 のいずれか一項に記載の免疫細胞を含む、細胞の集団。

【請求項 3 6 3】

前記集団中の細胞の少なくとも約 2 0 %、約 3 0 %、約 4 0 %、約 5 0 %、約 5 5 %、約 6 0 %、約 6 5 %、約 7 0 %、約 7 5 %、約 8 0 %、約 8 5 %、約 9 0 %、約 9 5 %、または最大 1 0 0 %が、請求項 1 ～ 1 7 3 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞または請求項 3 5 4 ～ 3 6 1 のいずれか一項に記載の免疫細胞である、請求項 3 6 2 に記載の細胞の集団。

【請求項 3 6 4】

薬学的に許容される担体と、請求項 1 ～ 1 7 3 のいずれか一項に記載の遺伝子改変免疫細胞または請求項 3 5 4 ～ 3 6 1 のいずれか一項に記載の免疫細胞とを含む、医薬組成物。

10

【請求項 3 6 5】

薬学的に許容される担体と、請求項 3 6 2 または請求項 3 6 3 に記載の細胞の集団とを含む、請求項 3 2 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 6 6】

それを必要とする対象において疾患を治療するための免疫療法の方法であって、有効量の請求項 3 6 4 または請求項 3 6 5 に記載の医薬組成物を前記対象に投与することを含む、方法。

【請求項 3 6 7】

それを必要とする対象においてがんを治療するための免疫療法であって、前記遺伝子改変免疫細胞または前記免疫細胞が、遺伝子改変ヒト T 細胞もしくはそれに由来する細胞、または遺伝子改変 N K 細胞もしくはそれに由来する細胞であり、前記遺伝子改変免疫細胞または前記免疫細胞が、C A R または外因性 T C R を含み、前記 C A R または前記外因性 T C R が、腫瘍特異的抗原に対する特異性を有する細胞外リガンド結合ドメインを含む、請求項 3 6 6 に記載の方法。

20

【請求項 3 6 8】

前記遺伝子改変免疫細胞または前記免疫細胞が、不活性化 T C R アルファ遺伝子または不活性化 T C R アルファ定常領域遺伝子を含む、請求項 3 6 6 または請求項 3 6 7 に記載の方法。

【請求項 3 6 9】

前記遺伝子改変免疫細胞または前記免疫細胞が、内因性アルファ／ベータ T C R の検出可能な細胞表面発現を有さない、請求項 3 6 6 ～ 3 6 8 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 3 7 0】

前記がんが、癌腫、リンパ腫、肉腫、芽細胞腫および白血病のがんからなる群から選択される、請求項 3 6 7 ～ 3 6 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 7 1】

前記がんが、B 細胞起源のがん、乳がん、胃がん、神経芽細胞腫、骨肉腫、肺がん、黒色腫、前立腺がん、結腸がん、腎細胞癌腫、卵巣がん、横紋筋肉腫、白血病、およびホジキンリンパ腫からなる群から選択される、請求項 3 6 7 ～ 3 7 0 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 3 7 2】

前記 B 細胞起源のがんが、B 系列急性リンパ芽球性白血病、B 細胞慢性リンパ球性白血病、B 細胞非ホジキンリンパ腫、および多発性骨髄腫からなる群から選択される、請求項 3 7 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、腫瘍学、がん免疫療法、分子生物学および組換え核酸技術の分野に関する。特に、本発明は、特定の標的遺伝子の安定なノックダウンを可能にするマイクロ R N A 適合 s h R N A (s h R N A m i R) 分子を含む遺伝子改変免疫細胞に関する。本発明はさ

50

らに、対象における内因性タンパク質の発現を低下させ、がんを含む疾患を治療するための、このような遺伝子改変免疫細胞の使用に関する。

【0002】

EFS-WE Bを介してテキストファイルとして提出された配列表の参照

本出願は、EFS-Webを介してASCI形式で提出された配列表を含み、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。2020年4月3日に作成されたASCIコピーは、PBIO-037WO__Seq__List__4-20と名付けられ、サイズが58,911バイトである。

【背景技術】

【0003】

T細胞養子免疫療法は、がん治療のための有望なアプローチである。本明細書に開示される免疫療法治療方法は、特定の腫瘍関連抗原に対する特異性を高めるために遺伝子改変された単離ヒトT細胞を利用する。遺伝子改変は、抗原特異性をT細胞に移植するためのキメラ抗原受容体または外因性T細胞受容体の発現を含み得る。外因性T細胞受容体とは対照的に、キメラ抗原受容体は、モノクローナル抗体の可変ドメインからそれらの特異性を得る。したがって、キメラ抗原受容体を発現するT細胞(CAR T細胞)は、主要組織適合遺伝子複合体非拘束性様式で腫瘍免疫反応性を誘導する。T細胞養子免疫療法は、B細胞悪性腫瘍(例えば、急性リンパ芽球性白血病、B細胞非ホジキンリンパ腫、急性骨髄性白血病、および慢性リンパ球性白血病)、多発性骨髄腫、神経芽細胞腫、神経膠芽腫、進行性神経膠腫、卵巣がん、中皮腫、黒色腫、前立腺がん、膵臓がんなどを含む多くのがんの臨床療法として利用されている。

【0004】

がん治療としての潜在的有用性にもかかわらず、CAR T細胞による養子免疫療法は、部分的には、細胞表面上の内因性T細胞受容体の発現によって制限されてきた。内因性T細胞受容体を発現するCAR T細胞は、同種異系患者への投与後に主要組織適合抗原および副組織適合抗原を認識し得、移植片対宿主病(GVHD)の発症をもたらし得る。結果として、臨床試験は、患者のT細胞を単離し、キメラ抗原受容体を組み込むように遺伝子改変し、次いで同じ患者に再注入する自己CAR T細胞の使用に主に焦点を当ててきた。自己アプローチは、投与されたCAR T細胞に免疫寛容を提供するが、このアプローチは、患者のがんが診断された後に患者特異的CAR T細胞を作製するのに必要な時間および費用の両方によって制約される。

【0005】

したがって、内因性T細胞受容体(例えば、アルファ/ベータT細胞受容体)の発現が低下しているか、または検出可能な細胞表面発現を有さず、投与時にGVHDを発症しない、第三者健常ドナー由来のT細胞を使用して調製された「既製の」CAR T細胞を開発することが有利であると思われる。このような製品は、診断の前に作製および検証することができ、必要に応じてすぐに患者に利用可能にすることができる。したがって、GVHDの発生を防止するために、内因性T細胞受容体を欠く同種異系CAR T細胞の開発が必要とされている。

【0006】

この目的のために、ベーター2ミクログロブリン(B2M)タンパク質発現の発現を完全にノックアウトするために、ベーター2ミクログロブリン遺伝子に特異性を有する操作されたメガヌクレアーゼが生成されている(例えば、特許文献1を参照されたい)。B2Mは主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラスI分子の成分であり、B2Mが存在しなければこの分子は細胞表面に構築されない。したがって、B2Mのノックアウトは、CAR T細胞を同種異系患者に投与した場合にGVHDを軽減するはずの、MHCクラスI分子を排除するための手段である。

【0007】

しかしながら、CAR T細胞の細胞表面上のB2MおよびMHCクラスI分子発現を完全に排除した結果により、CAR T細胞は、それらを非自己と見なすナチュラルキ

10

20

30

40

50

ー（NK）細胞による標的化をより受けやすくなる。この現象を考慮して、B2Mの不完全なノックダウンを生じるための、CAR T細胞に対するノックダウンアプローチが開発された（例えば、特許文献2を参照されたい）。本質的に、B2M標的shRNAコード配列を含むカセットが、ヌクレアーゼ媒介標的挿入によってT細胞のT細胞受容体アルファ定常領域遺伝子に導入された。shRNAコード配列は、CARコード配列も含むカセットに含まれ、TCR陰性、CAR陽性であり、細胞表面B2Mの部分的ノックダウンを有するCAR T細胞の生成を可能にした。このプロジェクトのデータは、これらのCAR T細胞が実際に、B2Mの完全なノックアウトを示したCAR T細胞よりもNK細胞による殺滅を受けにくいことを実証した。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】国際公開第2017／112859号パンフレット

【特許文献2】国際公開第2018／208837号パンフレット

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

しかしながら、本明細書に記載されるように、さらなる実験は、shRNAコード配列を含むカセットが安定ではなく、B2Mノックダウンが一過性であることを示した。最終的に、細胞はゲノムからshRNAコード配列を除去し、B2M発現の回復を引き起こした。したがって、B2Mなどの内因性タンパク質の安定なノックダウンを維持することができるCAR T細胞の作製が依然として必要とされている。当技術分野におけるこの問題に対する答えの探求に際して、免疫細胞において目的のタンパク質のさまざまな程度の遺伝子ノックダウンを生じさせるために使用できる技術が本明細書において発見された。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、標的タンパク質の発現を低下させるマイクロRNA適合shRNA（shRNAmiR）を発現する遺伝子改変免疫細胞（およびその集団）を提供する。標的タンパク質の発現をノックダウンするためのshRNAmiRの使用は、タンパク質発現の安定なノックダウンを可能にし、これは、ノックアウトではなくノックダウンが好ましい標的タンパク質に理想的である。例えば、ベーター2ミクログロブリン（B2M）標的shRNAmiRの発現を介して、B2Mの発現レベルが低下した免疫細胞は、B2M発現が遺伝子不活性化によってノックアウトされた細胞よりもナチュラルキラー（NK）細胞による細胞溶解に対する感度が低い。したがって、細胞のゲノムに挿入され、内因性タンパク質の発現を低下させるために発現されるshRNAmiRをコードする核酸配列を含む鑄型核酸を導入することによって、免疫細胞における内因性タンパク質の発現を低下させる方法がさらに提供される。

【0011】

したがって、一態様では、本発明は、そのゲノム中にマイクロRNA適合shRNA（shRNAmiR）をコードする核酸配列を含む遺伝子改変免疫細胞を提供する。shRNAmiRは、遺伝子改変免疫細胞中で発現され、遺伝子改変免疫細胞における標的タンパク質の発現を低下させる。標的タンパク質発現の低下は、shRNAmiRガイド配列が標的タンパク質をコードするmRNAへ結合することによって媒介される。

【0012】

いくつかの実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、遺伝子改変T細胞、またはそれに由来する細胞である。ある実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、遺伝子改変ナチュラルキラー（NK）細胞、またはそれに由来する細胞である。他の実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、遺伝子改変B細胞、またはそれに由来する細胞である。さまざまな実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、遺伝子改変された単球もしくはマクロファージ、またはそれに由来する細胞である。

10

20

30

40

50

【0013】

いくつかの実施形態では、shRNAmiRは、5'から3'に：(a) 5' miR足場ドメイン；(b) 5' miR基底ステム(basal stem)ドメイン；(c) パッセンジャー鎖；(d) miRループドメイン；(e) ガイド鎖；(f) 3' miR基底ステムドメイン；および(g) 3' miR足場ドメインを含む。

【0014】

いくつかの実施形態では、miRループドメインは、miR-30aループドメイン、miR-15ループドメイン、miR-16ループドメイン、miR-155ループドメイン、miR-22ループドメイン、miR-103ループドメインまたはmiR-107ループドメインである。特定の実施形態では、miRループドメインはmiR-30aループドメインである。

10

【0015】

ある実施形態では、miR-30aループドメインが、配列番号3と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含む。特定の実施形態では、miR-30aループドメインは、配列番号3の核酸配列を含む。

【0016】

いくつかの実施形態では、shRNAmiRは、マイクロRNA-E(miR-E)足場、miR-30(例えば、miR-30a)足場、miR-15足場、miR-16足場、miR-155足場、miR-22足場、miR-103足場、またはmiR-107足場を含む。ある実施形態では、shRNAmiRはmiR-E足場を含む。

20

【0017】

いくつかの実施形態では、shRNAmiRは以下の構造を含む：(a) 5' miR足場ドメインが、配列番号1と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含み；(b) 5' miR基底ステムドメインが、配列番号2と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含み；(c) 3' miR基底ステムドメインが、配列番号4と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含み；および/または(d) 3' miR足場ドメインが、配列番号5と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含む。

30

【0018】

ある実施形態では、shRNAmiRは以下の構造を含む：(a) 5' miR足場ドメインが配列番号1の核酸配列を含み；(b) 5' miR基底ステムドメインが配列番号2の核酸配列を含み；(c) 3' miR基底ステムドメインが配列番号4の核酸配列を含み；および(d) 3' miR足場ドメインが配列番号5の核酸配列を含む。

【0019】

いくつかの実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、そのゲノム中に、キメラ抗原受容体(CAR)または外因性T細胞受容体(TCR)をコードする核酸配列を含み、CARまたは外因性TCRは遺伝子改変免疫細胞によって発現される。

40

【0020】

いくつかの実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、そのゲノム中に、HLAクラスI組織適合抗原、アルファ鎖E(HLA-E)融合タンパク質をコードする核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、HLA-E融合タンパク質は、配列番号66と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、HLA-E融合タンパク質は配列番号66のアミノ酸配列を含む。

【0021】

いくつかの実施形態では、shRNAmiRをコードする核酸配列は、CARまたは外

50

因性TCRをコードする核酸配列とは異なる遺伝子内に位置する。ある実施形態では、shRNAmiRをコードする核酸配列、またはCARもしくは外因性TCRをコードする核酸配列は、TCRアルファ遺伝子またはTCRアルファ定常領域遺伝子内に位置する。特定の実施形態では、shRNAmiRをコードする核酸配列、またはCARもしくは外因性TCRをコードする核酸配列は、配列番号58を含む配列内のTCRアルファ定常領域遺伝子内に位置する。

【0022】

いくつかの実施形態では、shRNAmiRをコードする核酸配列は、CARまたは外因性TCRをコードする核酸配列と同じ遺伝子内に位置する。ある実施形態では、遺伝子は、TCRアルファ遺伝子またはTCRアルファ定常領域遺伝子である。特定の実施形態では、shRNAmiRをコードする核酸配列およびCARまたは外因性TCRをコードする核酸配列は、配列番号58を含む配列内のTCRアルファ定常領域遺伝子内に位置する。ある実施形態では、shRNAmiRをコードする核酸配列およびCARまたは外因性TCRをコードする核酸配列は、遺伝子中のカセット内にある。いくつかのこのような実施形態では、shRNAmiRをコードする核酸配列およびCARまたは外因性TCRをコードする核酸配列は、同じプロモータに作動可能に連結されている。いくつかのこのような実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、そのゲノム中に、5'から3'に：(a) CARまたは外因性TCRをコードする核酸配列；および(b) shRNAmiRをコードする核酸配列を含むカセットを含む。他のこのような実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、そのゲノム中に、5'から3'に：(a) shRNAmiRをコードする核酸配列；および(b) CARまたは外因性TCRをコードする核酸配列を含むカセットを含む。いくつかのこのような実施形態では、CARまたは外因性TCRをコードする核酸配列と、shRNAmiRをコードする核酸配列とは、2AまたはIRES配列によって分離される。特定 of このような実施形態では、shRNAmiRをコードする核酸配列は、CARまたは外因性TCRをコードする核酸配列と同じ向きである。他のこのような実施形態では、shRNAmiRをコードする核酸配列は、CARまたは外因性TCRをコードする核酸配列と逆向きである。いくつかのこのような実施形態では、イントロン配列がCARまたは外因性TCRをコードする核酸配列内に配置され、shRNAmiRをコードする核酸配列はイントロン配列内に配置される。いくつかのこのような実施形態では、カセットは、shRNAmiRをコードする核酸配列およびCARまたは外因性TCRをコードする核酸配列に作動可能に連結されたプロモータを含む。いくつかのこのような実施形態では、カセットは終結シグナルを含む。

【0023】

ある実施形態では、shRNAmiRをコードする核酸配列は、HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列と同じ遺伝子内に位置する。いくつかの実施形態では、遺伝子はTCRアルファ遺伝子またはTCRアルファ定常領域遺伝子である。いくつかの実施形態では、shRNAmiRをコードする核酸配列およびHLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列は、遺伝子中のカセット内にある。いくつかのこのような実施形態では、shRNAmiRをコードする核酸配列およびHLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列は、同じプロモータに作動可能に連結されている。いくつかのこのような実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、そのゲノム中に、5'から3'に：(a) HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列；および(b) shRNAmiRをコードする核酸配列を含むカセットを含む。いくつかのこのような実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、そのゲノム中に、5'から3'に：(a) shRNAmiRをコードする核酸配列；および(b) HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列を含むカセットを含む。いくつかのこのような実施形態では、HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列と、shRNAmiRをコードする核酸配列とは、2AまたはIRES配列によって分離される。特定 of このような実施形態では、イントロン配列がHLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列内に配置され、shRNAmiRをコードする核酸配列はイントロン配列内に配置される。いくつかのこのような実施形態では、カセットはプロモータを含み、shRN

A m i Rをコードする核酸配列およびH L A－E融合タンパク質をコードする核酸配列はプロモータに作動可能に連結されている。いくつかのこのような実施形態では、カセットは終結シグナルを含む。

【0024】

いくつかの実施形態では、s h R N A m i Rをコードする核酸配列、C A Rまたは外因性T C Rをコードする核酸配列、およびH L A－E融合タンパク質をコードする核酸配列は、同じ遺伝子内に位置する。いくつかの実施形態では、遺伝子はT C Rアルファ遺伝子またはT C Rアルファ定常領域遺伝子である。いくつかの実施形態では、s h R N A m i Rをコードする核酸配列、C A Rまたは外因性T C Rをコードする核酸配列、およびH L A－E融合タンパク質をコードする核酸配列は、遺伝子中のカセット内にある。いくつかのこのような実施形態では、s h R N A m i Rをコードする核酸配列、C A Rまたは外因性T C Rをコードする核酸配列、およびH L A－E融合タンパク質をコードする核酸配列は、同じプロモータに作動可能に連結されている。いくつかのこのような実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、そのゲノム内に：（a）C A Rまたは外因性T C Rをコードする核酸配列；（b）2 AまたはI R E S配列；（c）H L A－E融合タンパク質をコードする核酸配列；および（d）s h R N A m i Rをコードする核酸配列を含むカセットを含む。いくつかのこのような実施形態では、イントロン配列がC A Rまたは外因性T C Rをコードする核酸配列内に配置され、s h R N A m i Rをコードする核酸配列はイントロン配列内に配置される。他のこのような実施形態では、イントロン配列は、H L A－E融合タンパク質をコードする核酸配列内に配置され、s h R N A m i Rをコードする核酸配列は、イントロン配列内に配置される。いくつかのこのような実施形態では、カセットは、C A Rまたは外因性T C Rをコードする核酸配列、H L A－E融合タンパク質をコードする核酸配列、およびs h R N A m i Rをコードする核酸配列に作動可能に連結されたプロモータを含む。いくつかのこのような実施形態では、カセットは終結シグナルを含む。

10

20

【0025】

いくつかのこのような実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、そのゲノム内に、5'から3'に：（a）プロモータ；（b）C A Rまたは外因性T C Rをコードする核酸配列；（c）2 AまたはI R E S配列；（d）H L A－E融合タンパク質をコードする核酸配列であって、イントロン配列がH L A－E融合タンパク質をコードする核酸配列内に配置され、s h R N A m i Rをコードする核酸配列がイントロン配列内に配置される核酸配列；および（e）任意選択的に、終結シグナルを含み、C A Rまたは外因性T C Rをコードする核酸配列、H L A－E融合タンパク質をコードする核酸配列、およびs h R N A m i Rをコードする核酸配列が、プロモータに作動可能に連結されているカセットを含む。

30

【0026】

いくつかのこのような実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、そのゲノム内に、5'から3'に：（a）プロモータ；（b）H L A－E融合タンパク質をコードする核酸配列であって、イントロン配列がH L A－E融合タンパク質をコードする核酸配列内に配置され、s h R N A m i Rをコードする核酸配列がイントロン配列内に配置される核酸配列；（c）2 AまたはI R E S配列；（d）C A Rまたは外因性T C Rをコードする核酸配列；および（e）任意選択的に、終結シグナルを含み、C A Rまたは外因性T C Rをコードする核酸配列、H L A－E融合タンパク質をコードする核酸配列、およびs h R N A m i Rをコードする核酸配列が、プロモータに作動可能に連結されているカセットを含む。

40

【0027】

いくつかのこのような実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、そのゲノム内に、5'から3'に：（a）プロモータ；（b）C A Rまたは外因性T C Rをコードする核酸配列であって、イントロン配列がC A Rまたは外因性T C Rをコードする核酸配列内に配置され、s h R N A m i Rをコードする核酸配列がイントロン配列内に配置される核酸配列；（c）2 AまたはI R E S配列；（d）H L A－E融合タンパク質をコードする核酸配列；および（e）任意選択的に、終結シグナルを含み、C A Rまたは外因性T C Rをコードする核酸配列、H L A－E融合タンパク質をコードする核酸配列、およびs h R N A m i R

50

をコードする核酸配列が、プロモータに作動可能に連結されているカセットを含む。

【0028】

いくつかのこのような実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、そのゲノム内に、5'から3'に：(a)プロモータ；(b)HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列；(c)2AまたはIRES配列；(d)CARまたは外因性TCRをコードする核酸配列であって、イントロン配列がCARまたは外因性TCRをコードする核酸配列内に配置され、shRNAmiRをコードする核酸配列がイントロン配列内に配置される核酸配列；および(e)任意選択的に、終結シグナルを含み、CARまたは外因性TCRをコードする核酸配列、HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列、およびshRNAmiRをコードする核酸配列が、プロモータに作動可能に連結されているカセットを含む。

10

【0029】

上記のいくつかの実施形態では、イントロン配列は合成イントロン配列である。ある実施形態では、イントロン配列は、配列番号69と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含む。特定の実施形態では、イントロン配列は、配列番号69の核酸配列を含む。

【0030】

上記のいくつかの実施形態では、終結シグナルはポリA配列またはウシ成長ホルモン(BGH)終結シグナルである。ある実施形態では、ポリA配列は、配列番号68と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含む。特定の実施形態では、ポリA配列は、配列番号68の核酸配列を含む。ある実施形態では、BGH終結シグナルは、配列番号71と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含む。特定の実施形態では、BGH終結シグナルは配列番号71の核酸配列を含む。

20

【0031】

上記のいくつかの実施形態では、プロモータは、配列番号67と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含む。特定の実施形態では、プロモータは、配列番号67の核酸配列を含む。

【0032】

上記のいくつかの実施形態では、2A配列は、配列番号70と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含むP2A／フューリン部位である。特定の実施形態では、2A配列は、配列番号70の核酸配列を含むP2A／フューリン部位である。

30

【0033】

上記のいくつかの実施形態では、CARは、配列番号73と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有するアミノ酸配列を含むシグナルペプチドを含む。特定の実施形態では、CARは、配列番号73のアミノ酸配列を含むシグナルペプチドを含む。

【0034】

特定の実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、そのゲノム中に、5'から3'に：(a)配列番号67と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含むプロモータ；(b)CARをコードする核酸配列であって、CARが配列番号73と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有するアミノ酸配列を含むシグナルペプチドを含む核酸配列；(c)配列番号70と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含むP2A／フューリン部位；(d)HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列であって、HLA-E融合タンパク質が配列番号66と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれ

40

50

を超える配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、イントロン配列がHLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列内に配置され、イントロン配列が配列番号69と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含み、shRNAmiRをコードする核酸配列がイントロン配列内に配置される核酸配列；および(e)任意選択的に、配列番号68と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含む終結シグナルを含み、CARをコードする核酸配列、HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列、およびshRNAmiRをコードする核酸配列が、プロモータに作動可能に連結されているカセットを含む。

【0035】

特定の実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、そのゲノム中に、5'から3'に：(a)配列番号67の核酸配列を含むプロモータ；(b)CARをコードする核酸配列であって、CARが配列番号73のアミノ酸配列を含むシグナルペプチドを含む核酸配列；(c)配列番号70の核酸配列を含むP2A／フューリン部位；(d)HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列であって、HLA-E融合タンパク質が配列番号66のアミノ酸配列を含み、イントロン配列がHLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列内に配置され、イントロン配列が配列番号69の核酸配列を含み、shRNAmiRをコードする核酸配列がイントロン配列内に配置される核酸配列；および(e)任意選択的に、配列番号68の核酸配列を含む終結シグナルを含み、CARをコードする核酸配列、HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列、およびshRNAmiRをコードする核酸配列が、プロモータに作動可能に連結されているカセットを含む。

【0036】

特定の実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、そのゲノム中に、配列番号74と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含み、TCRアルファ定常領域遺伝子内のゲノム中に配置されているカセットを含む。特定の実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、そのゲノム中に、配列番号74の核酸配列を含み、TCRアルファ定常領域遺伝子内のゲノム中に配置されているカセットを含む。

【0037】

上記のいくつかの実施形態では、カセットは、shRNAmiRをコードする2つ以上の核酸を含む。ある実施形態では、2つ以上の核酸は同じshRNAmiRをコードすることができる。いくつかの実施形態では、2つ以上の核酸は、同じ標的タンパク質の発現を低下させる異なるshRNAmiRをコードすることができる。他の実施形態では、2つ以上の核酸は、異なる標的タンパク質の発現を低下させる異なるshRNAmiRをコードする。ある実施形態では、カセットは、本明細書に記載の異なるshRNAmiRをコードする2つ以上の核酸を含むことができる。特定の実施形態では、カセットは、B2Mの発現を低下させるshRNAmiRをコードする核酸配列、およびCD52の発現を低下させるshRNAmiRをコードする核酸配列を含み得る。

【0038】

いくつかの実施形態では、shRNAmiRをコードする核酸配列およびCARまたは外因性TCRをコードする核酸配列は、同じ遺伝子に位置し、異なるプロモータに作動可能に連結されている。いくつかのこのような実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、そのゲノム中に、5'から3'に：(a)第1のプロモータ；(b)第1のプロモータに作動可能に連結された、CARまたは外因性TCRをコードする核酸配列；(c)第2のプロモータ；および(d)第2のプロモータに作動可能に連結された、shRNAmiRをコードする核酸配列を含むカセットを含む。他のこのような実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、そのゲノム中に、5'から3'に：(a)第1のプロモータ；(b)第1のプロモータに作動可能に連結された、shRNAmiRをコードする核酸配列；(c)第2のプロモータ；および(d)第2のプロモータに作動可能に連結された、CARまたは外因性TCRをコードする核酸配列を含むカセットを含む。いくつかのこのような実施形態で

は、s h R N A m i Rをコードする核酸配列は、C A Rまたは外因性T C Rをコードする核酸配列と同じ向きである。他のこのような実施形態では、s h R N A m i Rをコードする核酸配列は、C A Rまたは外因性T C Rをコードする核酸配列と逆向きである。あるこのような実施形態では、第1のプロモータおよび第2のプロモータは同一である。他の実施形態では、第1のプロモータと第2のプロモータとは異なる。いくつかのこのような実施形態では、カセットは1つまたは複数の終結シグナルを含む。

【0039】

いくつかの実施形態では、s h R N A m i Rをコードする核酸配列およびH L A - E 融合タンパク質をコードする核酸配列は、異なるプロモータに作動可能に連結されている。いくつかのこのような実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、そのゲノム中に、5'から3'に：(a) 第1のプロモータ；(b) 第1のプロモータに作動可能に連結された、H L A - E 融合タンパク質をコードする核酸配列；(c) 第2のプロモータ；および(d) 第2のプロモータに作動可能に連結された、s h R N A m i Rをコードする核酸配列を含むカセットを含む。他のこのような実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、そのゲノム中に、5'から3'に：(a) 第1のプロモータ；(b) 第1のプロモータに作動可能に連結された、s h R N A m i Rをコードする核酸配列；(c) 第2のプロモータ；および(d) 第2のプロモータに作動可能に連結された、H L A - E 融合タンパク質をコードする核酸配列を含むカセットを含む。あるこのような実施形態では、第1のプロモータおよび第2のプロモータは同一である。他のこのような実施形態では、第1のプロモータと第2のプロモータとは異なる。いくつかのこのような実施形態では、カセットは1つまたは複数の終結シグナルを含む。

【0040】

いくつかの実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、そのゲノム内に：(a) C A Rまたは外因性T C Rをコードする核酸配列；(b) H L A - E 融合タンパク質をコードする核酸配列；および(c) s h R N A m i Rをコードする核酸配列を含み、C A Rまたは外因性T C Rをコードする核酸配列が第1のプロモータに作動可能に連結されており、H L A - E 融合タンパク質をコードする核酸配列およびs h R N A m i Rをコードする核酸配列が第2のプロモータに作動可能に連結されているカセットを含む。いくつかのこのような実施形態では、イントロン配列がH L A - E 融合タンパク質をコードする核酸配列内に配置され、s h R N A m i Rをコードする核酸配列はイントロン配列内に配置される。いくつかの実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、そのゲノム内に：(a) C A Rまたは外因性T C Rをコードする核酸配列；(b) H L A - E 融合タンパク質をコードする核酸配列；および(c) s h R N A m i Rをコードする核酸配列を含み、C A Rまたは外因性T C Rをコードする核酸配列およびs h R N A m i Rをコードする核酸配列が第1のプロモータに作動可能に連結されており、H L A - E 融合タンパク質をコードする核酸配列が第2のプロモータに作動可能に連結されているカセットを含む。いくつかのこのような実施形態では、イントロン配列がC A Rまたは外因性T C Rをコードする核酸配列内に配置され、s h R N A m i Rをコードする核酸配列はイントロン配列内に配置される。いくつかのこのような実施形態では、カセットは、C A Rまたは外因性T C Rの転写を終結させることができる第1の終結シグナル、およびH L A - E 融合タンパク質の転写を終結させることができる第2の終結シグナルを含む。他のこのような実施形態では、カセットは、H L A - E 融合タンパク質の転写を終結させることができる第1の終結シグナル、およびC A Rまたは外因性T C Rの転写を終結させることができる第2の終結シグナルを含む。

【0041】

いくつかのこのような実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、そのゲノム内に、5'から3'に：(a) 第1のプロモータ；(b) C A Rまたは外因性T C Rをコードする核酸配列；(c) 任意選択的に、第1の終結シグナル；(d) 第2のプロモータ；(e) H L A - E 融合タンパク質をコードする核酸配列であって、イントロン配列がH L A - E 融合タンパク質をコードする核酸配列内に配置され、s h R N A m i Rをコードする核酸配列がイントロン配列内に配置される核酸配列；および(f) 任意選択的に、第2の終結シグ

ナルを含み、CARまたは外因性TCRをコードする核酸配列が第1のプロモータに作動可能に連結されており、HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列およびshRNAmiRをコードする核酸配列が第2のプロモータに作動可能に連結されているカセットを含む。

【0042】

いくつかのこのような実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、そのゲノム内に、5'から3'に：(a)第1のプロモータ；(b)HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列であって、イントロン配列がHLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列内に配置され、shRNAmiRをコードする核酸配列がイントロン配列内に配置される核酸配列；(c)任意選択的に、第1の終結シグナル；(d)第2のプロモータ；(e)CARまたは外因性TCRをコードする核酸配列；および(f)任意選択的に、第2の終結シグナルを含み、HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列およびshRNAmiRをコードする核酸配列が第1のプロモータに作動可能に連結されており、CARまたは外因性TCRをコードする核酸配列が第2のプロモータに作動可能に連結されているカセットを含む。

10

【0043】

いくつかのこのような実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、そのゲノム内に、5'から3'に：(a)第1のプロモータ；(b)CARまたは外因性TCRをコードする核酸配列であって、イントロン配列がCARまたは外因性TCRをコードする核酸配列内に配置され、shRNAmiRをコードする核酸配列がイントロン配列内に配置される核酸配列；(c)任意選択的に、第1の終結シグナル；(d)第2のプロモータ；(e)HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列；および(f)任意選択的に、第2の終結シグナルを含み、CARまたは外因性TCRをコードする核酸配列およびshRNAmiRをコードする核酸配列が第1のプロモータに作動可能に連結されており、HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列が第2のプロモータに作動可能に連結されているカセットを含む。

20

【0044】

いくつかのこのような実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、そのゲノム内に、5'から3'に：(a)第1のプロモータ；(b)HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列；(c)任意選択的に、第1の終結シグナル；(d)第2のプロモータ；(e)CARまたは外因性TCRをコードする核酸配列であって、イントロン配列がCARまたは外因性TCRをコードする核酸配列内に配置され、shRNAmiRをコードする核酸配列がイントロン配列内に配置される核酸配列；および(f)任意選択的に、第2の終結シグナルを含み、HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列が第1のプロモータに作動可能に連結されており、CARまたは外因性TCRをコードする核酸配列およびshRNAmiRをコードする核酸配列が第2のプロモータに作動可能に連結されているカセットを含む。

30

【0045】

上記のいくつかの実施形態では、イントロン配列は合成イントロン配列である。ある実施形態では、イントロン配列は、配列番号69と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含む。特定の実施形態では、イントロン配列は、配列番号69の核酸配列を含む。

40

【0046】

上記のいくつかの実施形態では、1つまたは複数の終結シグナルは、ポリA配列またはBGH終結シグナルである。

【0047】

上記のいくつかの実施形態では、第1の終結シグナルは第2の終結シグナルと同一である。いくつかのこのような実施形態では、第1の終結シグナルおよび第2の終結シグナルは、ポリA配列またはBGH終結シグナルである。

【0048】

50

上記のいくつかの実施形態では、第1の終結シグナルは第2の終結シグナルとは異なる。いくつかの実施形態では、第1の終結シグナルはポリA配列であり、第2の終結シグナルはBGH終結シグナルである。いくつかの実施形態では、第1の終結シグナルはBGH終結シグナルであり、第2の終結シグナルはポリA配列である。

【0049】

上記のいくつかの実施形態では、ポリA配列は、配列番号68と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含む。ある実施形態では、ポリA配列は、配列番号68の核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、BGH終結シグナルは、配列番号71と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含む。ある実施形態では、BGH終結シグナルが配列番号71の核酸配列を含む。

10

【0050】

上記のいくつかの実施形態では、第1のプロモータおよび第2のプロモータは同一である。いくつかのこのような実施形態では、第1のプロモータおよび第2のプロモータは、JeTプロモータまたはEF1アルファコアプロモータである。

【0051】

上記のいくつかの実施形態では、第1のプロモータは第2のプロモータとは異なる。ある実施形態では、第1のプロモータはJeTプロモータであり、第2のプロモータはEF1アルファコアプロモータである。ある実施形態では、第1のプロモータはEF1アルファコアプロモータであり、第2のプロモータはJeTプロモータである。

20

【0052】

上記のある実施形態では、JeTプロモータは、配列番号67と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含む。特定の実施形態では、JeTプロモータは、配列番号67の核酸配列を含む。ある実施形態では、EF1アルファコアプロモータは、配列番号72と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、EF1アルファコアプロモータは、配列番号72の核酸配列を含む。

【0053】

上記のいくつかの実施形態では、CARは、配列番号73と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有するアミノ酸配列を含むシグナルペプチドを含む。特定の実施形態では、CARは、配列番号73のアミノ酸配列を含むシグナルペプチドを含む。

30

【0054】

特定の実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、そのゲノム中に、5'から3'に：(a) 配列番号67と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含む第1のプロモータ；(b) CARをコードする核酸配列であって、CARが配列番号73と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有するアミノ酸配列を含むシグナルペプチドを含む核酸配列；(c) 任意選択的に、配列番号70と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含む第1の終結シグナル；(d) 配列番号72と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含む第2のプロモータ；(e) HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列であって、HLA-E融合タンパク質が配列番号66と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、イントロン配列がHLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列内に配置され、イントロン配列が、配列番号69と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、

40

50

またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含み、shRNAmiRをコードする核酸配列がイントロン配列内に配置される核酸配列；および（f）任意選択的に、配列番号71と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含む第2の終結シグナルを含み、CARをコードする核酸配列が第1のプロモータに作動可能に連結されており、HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列およびshRNAmiRをコードする核酸配列が第2のプロモータに作動可能に連結されているカセットを含む。

【0055】

特定の実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、そのゲノム中に、5'から3'に：（a）配列番号67の核酸配列を含む第1のプロモータ；（b）CARをコードする核酸配列であって、CARが配列番号73のアミノ酸配列を含むシグナルペプチドを含む核酸配列；（c）任意選択的に、配列番号70の核酸配列を含む第1の終結シグナル；（d）配列番号72の核酸配列を含む第2のプロモータ；（e）HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列であって、HLA-E融合タンパク質が配列番号66のアミノ酸配列を含み、イントロン配列がHLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列内に配置され、イントロン配列が配列番号69の核酸配列を含み、shRNAmiRをコードする核酸配列がイントロン配列内に配置される核酸配列；および（f）任意選択的に、配列番号71の核酸配列を含む第2の終結シグナルを含み、CARをコードする核酸配列が第1のプロモータに作動可能に連結されており、HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列およびshRNAmiRをコードする核酸配列が、第2のプロモータに作動可能に連結されているカセットを含む。

10

20

【0056】

特定の実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、そのゲノム中に、配列番号75と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含み、TCRアルファ定常領域遺伝子内のゲノム中に配置されているカセットを含む。特定の実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、そのゲノム中に、配列番号75の核酸配列を含み、TCRアルファ定常領域遺伝子内のゲノム中に配置されているカセットを含む。

【0057】

上記のいくつかの実施形態では、カセットは、shRNAmiRをコードする2つ以上の核酸を含む。ある実施形態では、2つ以上の核酸は同じshRNAmiRをコードすることができる。いくつかの実施形態では、2つ以上の核酸は、同じ標的タンパク質の発現を低下させる異なるshRNAmiRをコードすることができる。他の実施形態では、2つ以上の核酸は、異なる標的タンパク質の発現を低下させる異なるshRNAmiRをコードする。ある実施形態では、カセットは、本明細書に記載の異なるshRNAmiRをコードする2つ以上の核酸を含むことができる。特定の実施形態では、カセットは、B2Mの発現を低下させるshRNAmiRをコードする核酸配列、およびCD52の発現を低下させるshRNAmiRをコードする核酸配列を含み得る。

30

【0058】

いくつかの実施形態では、標的タンパク質の発現は、対照細胞と比較して、少なくとも約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、または最大約99%低下する。

40

【0059】

いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、ベーター2ミクログロブリン、CS1、トランスフォーミング増殖因子ベータ受容体2（TGFR2）、Cbl癌原遺伝子B（CBL-B）、CD52、TCRアルファ遺伝子、TCRアルファ定常領域遺伝子、CD7、グルコシルチコイド受容体（GR）、デオキシシチジンキナーゼ（DCK）、核内受容体サブファミリー2グループFメンバー6（NR2F6）、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4（CTLA-4）、またはC-Cケモカイン受容体5型（CCR5）である

50

。

【0060】

いくつかの実施形態では、標的タンパク質はベーター2ミクログロブリンである。いくつかのこのような実施形態では、ベーター2ミクログロブリンの細胞表面発現は、対照細胞と比較して少なくとも約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、または最大約99%低下する。さらなる実施形態では、MHCクラスI分子の発現は、対照細胞と比較して、細胞表面上で少なくとも約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、または最大約99%低下する。いくつかのこのような実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、対照細胞と比較して同種異系性が低下している。

10

【0061】

いくつかのこのような実施形態では、shRNAmiRは以下の構造を有する：(a) パッセンジャー鎖が配列番号17の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号18の核酸配列を含む；(b) パッセンジャー鎖が配列番号7の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号8の核酸配列を含む；(c) パッセンジャー鎖が配列番号9の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号10の核酸配列を含む；(d) パッセンジャー鎖が配列番号11の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号12の核酸配列を含む；(e) パッセンジャー鎖が配列番号13の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号14の核酸配列を含む；または(f) パッセンジャー鎖が配列番号15の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号16の核酸配列を含む。あるこのような実施形態では、パッセンジャー鎖は配列番号17の核酸配列を含み、ガイド鎖は配列番号18の核酸配列を含む。特定のこのような実施形態では、shRNAmiRをコードする核酸配列は、配列番号46と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する配列を含む。さらなるこのような実施形態では、shRNAmiRをコードする核酸配列は、配列番号46の配列を含む。

20

【0062】

いくつかの実施形態では、標的タンパク質はCS1である。いくつかのこのような実施形態では、CS1の細胞表面発現は、対照細胞と比較して、少なくとも約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、または最大約99%低下する。いくつかのこのような実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、CS1に対する特異性を有するCARを発現する。さらなるこのような実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、対照細胞と比較して、CS1に対する特異性を有するCARを発現する遺伝子改変免疫細胞によるフラトリサイドを受けにくい。

30

【0063】

いくつかのこのような実施形態では、shRNAmiRは以下の構造を有する：(a) パッセンジャー鎖が配列番号21の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号22の核酸配列を含む；(b) パッセンジャー鎖が配列番号23の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号24の核酸配列を含む；または(c) パッセンジャー鎖が配列番号25の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号26の核酸配列を含む。あるこのような実施形態では、パッセンジャー鎖は配列番号25の核酸配列を含み、ガイド鎖は配列番号26の核酸配列を含む。特定のこのような実施形態では、shRNAmiRは、配列番号50と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する配列を含む。さらなるこのような実施形態では、shRNAmiRは配列番号50の配列を含む。

40

【0064】

いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、TGFB2である。いくつかのこのような実施形態では、TGFB2の細胞表面発現は、対照細胞と比較して、少なくとも約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約55%、約60%、約65%、約

50

70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、または最大約99%低下する。さらなる実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、対照細胞と比較して、トランスフォーミング増殖因子B1 (TGFB1) による免疫抑制を受けにくい。

【0065】

いくつかのこのような実施形態では、shRNAmiRは以下の構造を有する：(a) パッセンジャー鎖が配列番号27の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号28の核酸配列を含む；(b) パッセンジャー鎖が配列番号29の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号30の核酸配列を含む；(c) パッセンジャー鎖が配列番号31の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号32の核酸配列を含む；(d) パッセンジャー鎖が配列番号33の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号34の核酸配列を含む；または(e) パッセンジャー鎖が配列番号35の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号36の核酸配列を含む。あるこのような実施形態では、パッセンジャー鎖は配列番号31の核酸配列を含み、ガイド鎖は配列番号32の核酸配列を含む。特定のこのような実施形態では、shRNAmiRをコードする核酸配列は、配列番号53と少なくとも80%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する配列を含む。さらなるこのような実施形態では、shRNAmiRをコードする核酸配列は、配列番号53の配列を含む。

10

【0066】

いくつかの実施形態では、標的タンパク質はCBL-Bである。いくつかのこのような実施形態では、CBL-Bの細胞表面発現は、対照細胞と比較して、少なくとも約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、または最大約99%低下する。さらなるこのような実施形態では、免疫細胞は、対照細胞と比較して、下流シグナル伝達タンパク質の分解によるT細胞受容体(TCR)シグナル伝達の抑制を受けにくい。

20

【0067】

いくつかの実施形態では、標的タンパク質はCD52である。いくつかのこのような実施形態では、CD52の細胞表面発現は、対照細胞と比較して、少なくとも約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、または最大約99%低下する。さらなる実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、CD52抗体誘導細胞死を受けにくい。

30

【0068】

いくつかのこのような実施形態では、shRNAmiRは以下の構造を有する：(a) パッセンジャー鎖が配列番号37の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号38の核酸配列を含む；または(b) パッセンジャー鎖が配列番号39の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号40の核酸配列を含む。あるこのような実施形態では、パッセンジャー鎖は配列番号37の核酸配列を含み、ガイド鎖は配列番号38の核酸配列を含む。特定のこのような実施形態では、shRNAmiRをコードする核酸配列は、配列番号56と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する配列を含む。さらなるこのような実施形態では、shRNAmiRをコードする核酸配列は、配列番号56の配列を含む。

40

【0069】

いくつかの実施形態では、標的タンパク質はDCKである。いくつかのこのような実施形態では、DCKの細胞表面発現は、対照細胞と比較して、少なくとも約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、または最大約99%低下する。さらなるこのような実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、細胞増殖に対するプリンヌクレオシド類似体(例えば、フルダラビン)の影響を受けにくい。

【0070】

いくつかのこのような実施形態では、shRNAmiRは以下の構造を有する：(a) パッセンジャー鎖が配列番号76の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号77の核酸配列

50

を含む；（b）パッセンジャー鎖が配列番号78の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号79の核酸配列を含む；（c）パッセンジャー鎖が配列番号80の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号81の核酸配列を含む；（d）パッセンジャー鎖が配列番号82の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号83の核酸配列を含む；または（e）パッセンジャー鎖が配列番号84の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号85の核酸配列を含む。特定のこのような実施形態では、パッセンジャー鎖は配列番号76の核酸配列を含み、ガイド鎖は配列番号77の核酸配列を含む。特定のこのような実施形態では、shRNAmiRをコードする核酸配列は、配列番号86と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する配列を含む。さらなるこのような実施形態では、shRNAmiRをコードする核酸配列は、配列番号86の配列を含む。

10

【0071】

いくつかの実施形態では、標的タンパク質はGRである。いくつかのこのような実施形態では、GRの細胞表面発現は、対照細胞と比較して、少なくとも約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、または最大約99%低下する。さらなるこのような実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、増殖の低下などのグルココルチコイド（例えば、デキサメタゾン）の影響を受けにくい。

【0072】

いくつかのこのような実施形態では、shRNAmiRは以下の構造を有する：（a）パッセンジャー鎖が配列番号91の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号92の核酸配列を含む；（b）パッセンジャー鎖が配列番号93の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号94の核酸配列を含む；（c）パッセンジャー鎖が配列番号95の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号96の核酸配列を含む；（d）パッセンジャー鎖が配列番号97の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号98の核酸配列を含む；（e）パッセンジャー鎖が配列番号99の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号100の核酸配列を含む；（f）パッセンジャー鎖が配列番号101の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号102の核酸配列を含む；（g）パッセンジャー鎖が配列番号103の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号104の核酸配列を含む；（h）パッセンジャー鎖が配列番号105の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号106の核酸配列を含む；または（i）パッセンジャー鎖が配列番号107の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号108の核酸配列を含む。特定のこのような実施形態では、パッセンジャー鎖は配列番号95の核酸配列を含み、ガイド鎖は配列番号96の核酸配列を含む。特定のこのような実施形態では、shRNAmiRをコードする核酸配列は、配列番号111と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する配列を含む。さらなるこのような実施形態では、shRNAmiRをコードする核酸配列は、配列番号111の配列を含む。

20

30

【0073】

別の態様では、本発明は、免疫細胞における内因性タンパク質の発現を低下させる方法であって、shRNAmiRをコードする核酸配列を含む鑄型核酸を免疫細胞に導入して、鑄型核酸が免疫細胞のゲノムに挿入されることを含む、方法を提供する。shRNAmiRは、免疫細胞中で発現され、免疫細胞における内因性標的タンパク質の発現を低下させる。標的タンパク質発現の低下は、shRNAmiRガイド配列が標的タンパク質をコードするmRNAへ結合することによって媒介される。

40

【0074】

本方法のいくつかの実施形態では、免疫細胞はT細胞またはそれに由来する細胞である。ある実施形態では、免疫細胞は、ナチュラルキラー（NK）細胞またはそれに由来する細胞である。他の実施形態では、免疫細胞は、B細胞またはそれに由来する細胞である。さまざまな実施形態では、免疫細胞は、単球もしくはマクロファージ、またはそれに由来する細胞である。

50

【0075】

上記方法のいくつかの実施形態では、鑄型核酸は、ランダムな組み込みによって免疫細胞のゲノム内に挿入される。本方法のいくつかのこのような実施形態では、鑄型核酸は、ウイルスベクター（すなわち、組換えウイルス）、例えばレンチウイルスベクター（すなわち、組換えレンチウイルス）を使用して免疫細胞に導入される。

【0076】

本方法のいくつかの実施形態では、免疫細胞はCARまたは外因性TCRを発現する。

【0077】

いくつかの実施形態では、本方法は、免疫細胞のゲノム中の認識配列に特異性を有する操作されたヌクレアーゼをコードする第2の核酸を免疫細胞に導入することをさらに含む。操作されたヌクレアーゼは、免疫細胞において発現され、認識配列に切断部位を生成する。shRNAmiRをコードする核酸配列を含む鑄型核酸は、切断部位において免疫細胞のゲノム内に挿入される。本方法のいくつかのこのような実施形態では、鑄型核酸は、認識配列に隣接する配列と相同性を有する相同アームに隣接し、鑄型核酸は、相同組換えによって切断部位に挿入される。本方法のいくつかのこのような実施形態では、鑄型核酸は、ウイルスベクター（すなわち、組換えウイルス）を使用して免疫細胞に導入される。いくつかのこのような実施形態では、ウイルスベクターは組換えAAVベクター（すなわち、組換えAAV）である。特定の実施形態では、AAVベクターは、AAV2またはAAV6の血清型を有する。本方法のいくつかのこのような実施形態では、認識配列は標的遺伝子内にある。本方法のいくつかのこのような実施形態では、標的遺伝子によってコードされるタンパク質の発現は、免疫細胞において破壊される。本方法のあるこのような実施形態では、標的遺伝子がTCRアルファ遺伝子またはTCRアルファ定常領域遺伝子であり、免疫細胞が内因性TCR（例えば、アルファ／ベータTCR）の検出可能な細胞表面発現を有さない。本方法のいくつかのこのような実施形態では、操作されたヌクレアーゼは、操作されたメガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、TALEN、コンパクトTALEN、CRISPRシステムヌクレアーゼ、またはmegaTALENである。本方法の特定のこのような実施形態では、操作されたヌクレアーゼは、操作されたメガヌクレアーゼである。本方法のあるこのような実施形態では、操作されたヌクレアーゼをコードする第2の核酸は、mRNAを使用して導入される。

【0078】

本方法のいくつかの実施形態では、鑄型核酸が導入される免疫細胞は、そのゲノム中に、CARまたは外因性TCRをコードする核酸配列をさらに含む。本方法のある実施形態では、鑄型核酸が導入される免疫細胞は、そのゲノム中に、HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列をさらに含む。

【0079】

本方法のいくつかの実施形態では、鑄型核酸が、CARまたは外因性TCRをコードする核酸配列をさらに含み、CARまたは外因性TCRが免疫細胞によって発現される。いくつかのこのような実施形態では、shRNAmiRをコードする核酸配列およびCARまたは外因性TCRをコードする核酸配列は、切断部位に鑄型核酸が導入された後、免疫細胞中で同じプロモータに作動可能に連結される。本方法のいくつかのこのような実施形態では、鑄型核酸は、5'から3'に：（a）CARまたは外因性TCRをコードする核酸配列；および（b）shRNAmiRをコードする核酸配列を含む。本方法の他のこのような実施形態では、鑄型核酸は、5'から3'に：（a）shRNAmiRをコードする核酸配列および；（b）CARまたは外因性TCRをコードする核酸配列を含む。本方法のあるこのような実施形態では、CARまたは外因性TCRをコードする核酸配列と、shRNAmiRをコードする核酸配列とは、2AまたはIRES配列によって分離される。本方法のいくつかのこのような実施形態では、shRNAmiRをコードする核酸配列は、CARまたは外因性TCRをコードする核酸配列と同じ向きである。本方法の他のこのような実施形態では、shRNAmiRをコードする核酸配列は、CARまたは外因性TCRをコードする核酸配列と逆向きである。本方法のいくつかのこのような実施形態

10

20

30

40

50

では、イントロン配列がCARまたは外因性TCRをコードする核酸配列内に配置され、shRNAmiRをコードする核酸配列はイントロン配列内に配置される。本方法のあるこのような実施形態では、鋳型核酸はプロモータを含み、プロモータがCARまたは外因性TCRをコードする核酸配列およびshRNAmiRをコードする核酸配列に作動可能に連結される。本方法のいくつかのこのような実施形態では、鋳型核酸は終結シグナルを含む。

【0080】

本方法のいくつかの実施形態では、鋳型核酸は、HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列を含み、HLA-E融合タンパク質は免疫細胞によって発現される。本方法のいくつかのこのような実施形態では、shRNAmiRおよびHLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列は、切断部位に鋳型核酸が導入された後、免疫細胞中で同じプロモータに作動可能に連結される。本方法のあるこのような実施形態では、鋳型核酸は、5'から3'に：(a) HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列；および(b) shRNAmiRをコードする核酸配列を含む。本方法の他のこのような実施形態では、鋳型核酸は、5'から3'に：(a) shRNAmiRをコードする核酸配列；および(b) HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列を含む。本方法のいくつかのこのような実施形態では、HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列と、shRNAmiRをコードする核酸配列とは、2A配列またはIRES配列によって分離される。本方法のあるこのような実施形態では、イントロン配列がHLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列内に配置され、shRNAmiRをコードする核酸配列はイントロン配列内に配置される。本方法のいくつかのこのような実施形態では、鋳型核酸はプロモータを含み、プロモータがHLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列およびshRNAmiRをコードする核酸配列に作動可能に連結される。本方法のあるこのような実施形態では、鋳型核酸は終結シグナルを含む。

【0081】

本方法のいくつかの実施形態では、鋳型核酸は、CARまたは外因性TCRをコードする核酸配列、およびHLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列を含み、CARまたは外因性TCRおよびHLA-E融合タンパク質は免疫細胞によって発現される。本方法のいくつかの実施形態では、shRNAmiRをコードする核酸配列、CARまたは外因性TCRをコードする核酸配列、およびHLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列は、切断部位に鋳型核酸が導入された後、同じプロモータに作動可能に連結される。本方法のいくつかのこのような実施形態では、鋳型核酸は：(a) CARまたは外因性TCRをコードする核酸配列；(b) 2AまたはIRES配列；(c) HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列；および(d) shRNAmiRをコードする核酸配列を含む。本方法のあるこのような実施形態では、イントロン配列がHLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列内に配置され、shRNAmiRをコードする核酸配列はイントロン配列内に配置される。本方法の他のこのような実施形態では、イントロン配列がCARまたは外因性TCRをコードする核酸配列内に配置され、shRNAmiRをコードする核酸配列はイントロン配列内に配置される。本方法のいくつかのこのような実施形態では、鋳型核酸は、CARまたは外因性TCRをコードする核酸配列、HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列、およびshRNAmiRをコードする核酸配列に作動可能に連結されたプロモータを含む。本方法のあるこのような実施形態では、鋳型核酸は終結シグナルを含む。

【0082】

本方法のいくつかのこのような実施形態では、鋳型核酸は、5'から3'に：(a) プロモータ；(b) CARまたは外因性TCRをコードする核酸配列；(c) 2AまたはIRES配列；(d) HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列であって、イントロン配列がHLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列内に配置され、shRNAmiRをコードする核酸配列がイントロン配列内に配置される核酸配列、および(e) 任意選択的に、終結シグナルを含み、CARまたは外因性TCRをコードする核酸配列、HLA

ー E 融合タンパク質をコードする核酸配列、および s h R N A m i R をコードする核酸配列は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0083】

本法のいくつかのこのような実施形態では、鋳型核酸は、5' から 3' に：(a) プロモータ；(b) H L A - E 融合タンパク質をコードする核酸配列であって、イントロン配列が H L A - E 融合タンパク質をコードする核酸配列内に配置され、s h R N A m i R をコードする核酸配列がイントロン配列内に配置される核酸配列；(c) 2 A または I R E S 配列；(d) C A R または外因性 T C R をコードする核酸配列；および (e) 任意選択的に、終結シグナルを含み、C A R または外因性 T C R をコードする核酸配列、H L A - E 融合タンパク質をコードする核酸配列、および s h R N A m i R をコードする核酸配列は、プロモータに作動可能に連結されている。

10

【0084】

本方法のいくつかのこのような実施形態では、鋳型核酸は、5' から 3' に：(a) プロモータ；(b) C A R または外因性 T C R をコードする核酸配列であって、イントロン配列が C A R または外因性 T C R をコードする核酸配列内に配置され、s h R N A m i R をコードする核酸配列がイントロン配列内に配置される核酸配列；(c) 2 A または I R E S 配列；(d) H L A - E 融合タンパク質をコードする核酸配列；および (e) 任意選択的に、終結シグナルを含み、C A R または外因性 T C R をコードする核酸配列、H L A - E 融合タンパク質をコードする核酸配列、および s h R N A m i R をコードする核酸配列は、プロモータに作動可能に連結されている。

20

【0085】

本方法のいくつかのこのような実施形態では、鋳型核酸は、5' から 3' に：(a) プロモータ；(b) H L A - E 融合タンパク質をコードする核酸配列；(c) 2 A または I R E S 配列；(d) C A R または外因性 T C R をコードする核酸配列であって、イントロン配列が C A R または外因性 T C R をコードする核酸配列内に配置され、s h R N A m i R をコードする核酸配列がイントロン配列内に配置される核酸配列；および (e) 任意選択的に終結シグナルを含み、C A R または外因性 T C R をコードする核酸配列、H L A - E 融合タンパク質をコードする核酸配列、および s h R N A m i R をコードする核酸配列は、プロモータに作動可能に連結されている。

30

【0086】

上記方法のいくつかの実施形態では、イントロン配列は合成イントロン配列である。本方法のある実施形態では、イントロン配列は、配列番号 69 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含む。本方法の特定の実施形態では、イントロン配列は、配列番号 69 の核酸配列を含む。

【0087】

上記方法のいくつかの実施形態では、終結シグナルはポリ A 配列またはウシ成長ホルモン (B G H) 終結シグナルである。本方法のある実施形態では、ポリ A 配列は、配列番号 68 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含む。本方法の特定の実施形態では、ポリ A 配列は、配列番号 68 の核酸配列を含む。本方法のある実施形態では、B G H 終結シグナルは、配列番号 71 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含む。本方法の特定の実施形態では、B G H 終結シグナルは配列番号 71 の核酸配列を含む。

40

【0088】

上記方法のある実施形態では、プロモータは、配列番号 67 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含む。本方法の特定の実施形態では、プロモータは配列番号 67 の核酸配列を含む。

【0089】

50

上記方法のある実施形態では、2A配列は、配列番号70と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含むP2A／フューリン部位である。本方法の特定の実施形態では、2A配列は、配列番号70の核酸配列を含むP2A／フューリン部位である。

【0090】

上記方法のある実施形態では、HLA-E融合タンパク質は、配列番号66と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。本方法の特定の実施形態では、HLA-E融合タンパク質は配列番号66のアミノ酸配列を含む。

【0091】

上記方法のある実施形態では、CARは、配列番号73と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有するアミノ酸配列を含むシグナルペプチドを含む。本方法の特定の実施形態では、CARは、配列番号73のアミノ酸配列を含むシグナルペプチドを含む。

【0092】

本方法の特定の実施形態では、鑄型核酸は、5'から3'に：(a)配列番号67と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含むプロモータ；(b)CARをコードする核酸配列であって、CARが配列番号73と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有するアミノ酸配列を含むシグナルペプチドを含む核酸配列；(c)配列番号70と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含むP2A／フューリン部位；(d)HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列であって、HLA-E融合タンパク質が配列番号66と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、イントロン配列がHLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列内に配置され、イントロン配列が配列番号69と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含み、shRNAmiRをコードする核酸配列がイントロン配列内に配置される核酸配列；および(e)任意選択的に、配列番号68と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含む終結シグナルを含み、CARをコードする核酸配列、HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列、およびshRNAmiRをコードする核酸配列は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0093】

本方法の特定の実施形態では、鑄型核酸は、5'から3'に：(a)配列番号67の核酸配列を含むプロモータ；(b)CARをコードする核酸配列であって、CARが配列番号73のアミノ酸配列を含むシグナルペプチドを含む核酸配列；(c)配列番号70の核酸配列を含むP2A／フューリン部位；(d)HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列であって、HLA-E融合タンパク質が配列番号66のアミノ酸配列を含み、イントロン配列がHLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列内に配置され、イントロン配列が配列番号69の核酸配列を含み、shRNAmiRをコードする核酸配列がイントロン配列内に配置される核酸配列；ならびに(e)任意選択的に、配列番号68の核酸配列を含む終結シグナルを含み、CARをコードする核酸配列、HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列、およびshRNAmiRをコードする核酸配列は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0094】

本方法の特定の実施形態では、鑄型核酸は、配列番号74と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含み、TCRアルファ定常領域遺伝子内のゲノム中に挿入される。本方法

10

20

30

40

50

の特定の実施形態では、鑄型核酸は、配列番号 74 の核酸配列を含み、TCR アルファ 常領域遺伝子内のゲノム中に挿入される。

【0095】

上記方法のいくつかの実施形態では、鑄型核酸は、shRNAmiR をコードする 2 つ以上の核酸を含む。本方法のある実施形態では、2 つ以上の核酸は同じ shRNAmiR をコードすることができる。本方法のいくつかの実施形態では、2 つ以上の核酸は、同じ標的タンパク質の発現を低下させる異なる shRNAmiR をコードすることができる。本方法の他の実施形態では、2 つ以上の核酸は、異なる標的タンパク質の発現を低下させる異なる shRNAmiR をコードする。本方法のある実施形態では、鑄型核酸は、本明細書に記載の異なる shRNAmiR をコードする 2 つ以上の核酸を含むことができる。本方法の特定の実施形態では、鑄型核酸は、B2M の発現を低下させる shRNAmiR をコードする核酸配列、および CD52 の発現を低下させる shRNAmiR をコードする核酸配列を含むことができる。

10

【0096】

本方法のいくつかの実施形態では、shRNAmiR をコードする核酸配列および CAR または外因性 TCR をコードする核酸配列は、切断部位に鑄型核酸が導入された後、免疫細胞中で異なるプロモータに作動可能に連結される。本方法のいくつかのこのような実施形態では、鑄型核酸は、5' から 3' に：(a) 第 1 のプロモータ；(b) 第 1 のプロモータに作動可能に連結された CAR または外因性 TCR をコードする核酸配列；(c) 第 2 のプロモータ；および (d) 第 2 のプロモータに作動可能に連結された shRNAmiR をコードする核酸配列を含む。本方法の他のこのような実施形態では、鑄型核酸は、5' から 3' に：(a) 第 1 のプロモータ；(b) 第 1 のプロモータに作動可能に連結された shRNAmiR をコードする核酸配列；(c) 第 2 のプロモータ；および (d) 第 2 のプロモータに作動可能に連結された CAR または外因性 TCR をコードする核酸配列を含む。本方法のあるこのような実施形態では、shRNAmiR をコードする核酸配列は、CAR または外因性 TCR をコードする核酸配列と同じ向きである。本方法の他のこのような実施形態では、shRNAmiR をコードする核酸配列は、CAR または外因性 TCR をコードする核酸配列と逆向きである。本方法の特定のこのような実施形態では、第 1 のプロモータおよび第 2 のプロモータは同一である。本方法の他のこのような実施形態では、第 1 のプロモータと第 2 のプロモータとは異なる。本方法のいくつかのこのような実施形態では、鑄型核酸は、1 つまたは複数の終結シグナルを含む。

20

30

【0097】

上記方法のいくつかの実施形態では、shRNAmiR をコードする核酸配列および HLA-E 融合タンパク質をコードする核酸配列は、切断部位に鑄型核酸が導入された後、免疫細胞中で異なるプロモータに作動可能に連結される。本方法の特定のこのような実施形態では、鑄型核酸は、5' から 3' に：(a) 第 1 のプロモータ；(b) 第 1 のプロモータに作動可能に連結された、HLA-E 融合タンパク質をコードする核酸配列；(c) 第 2 のプロモータ；および (d) 第 2 のプロモータに作動可能に連結された、shRNAmiR をコードする核酸配列を含む。本方法のいくつかのこのような実施形態では、鑄型核酸は、5' から 3' に：(a) 第 1 のプロモータ；(b) 第 1 のプロモータに作動可能に連結された、shRNAmiR をコードする核酸配列；(c) 第 2 のプロモータ；および (d) 第 2 のプロモータに作動可能に連結された、HLA-E 融合タンパク質をコードする核酸配列を含む。本方法のあるこのような実施形態では、第 1 のプロモータおよび第 2 のプロモータは同一である。本方法の他のこのような実施形態では、第 1 のプロモータと第 2 のプロモータとは異なる。本方法のいくつかのこのような実施形態では、鑄型核酸は、1 つまたは複数の終結シグナルを含む。

40

【0098】

本方法のいくつかの実施形態では、鑄型核酸は：(a) CAR または外因性 TCR をコードする核酸配列；(b) HLA-E 融合タンパク質をコードする核酸配列；および (c) shRNAmiR をコードする核酸配列を含み、CAR または外因性 TCR をコードす

50

る核酸配列が第1のプロモータに作動可能に連結されており、HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列およびshRNAmiRをコードする核酸配列が第2のプロモータに作動可能に連結されている。本方法のいくつかの実施形態では、イントロン配列がHLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列内に配置され、shRNAmiRをコードする核酸配列はイントロン配列内に配置される。本方法のいくつかの実施形態では、鋳型核酸は：(a) CARまたは外因性TCRをコードする核酸配列；(b) HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列；および(c) shRNAmiRをコードする核酸配列を含み、CARまたは外因性TCRをコードする核酸配列およびshRNAmiRをコードする核酸配列が第1のプロモータに作動可能に連結されており、HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列が第2のプロモータに作動可能に連結されている。本方法のいくつかの実施形態では、イントロン配列がCARまたは外因性TCRをコードする核酸配列内に配置され、shRNAmiRをコードする核酸配列はイントロン配列内に配置される。

10

【0099】

本方法のいくつかのこのような実施形態では、鋳型核酸は、CARまたは外因性TCRの転写を終結させることができる第1の終結シグナル、およびHLA-E融合タンパク質の転写を終結させることができる第2の終結シグナルを含む。本方法のいくつかのこのような実施形態では、鋳型核酸は、HLA-E融合タンパク質の転写を終結させることができる第1の終結シグナル、およびCARまたは外因性TCRの転写を終結させることができる第2の終結シグナルを含む。

20

【0100】

本方法のいくつかのこのような実施形態では、鋳型核酸は、5'から3'に：(a) 第1のプロモータ；(b) CARまたは外因性TCRをコードする核酸配列；(c) 任意選択的に、第1の終結シグナル；(d) 第2のプロモータ；(e) HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列であって、イントロン配列がHLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列内に配置され、shRNAmiRをコードする核酸配列がイントロン配列内に配置される核酸配列；および(f) 任意選択的に、第2の終結シグナルを含み、CARまたは外因性TCRをコードする核酸配列が第1のプロモータに作動可能に連結されており、HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列およびshRNAmiRをコードする核酸配列が第2のプロモータに作動可能に連結されている。

30

【0101】

本方法のいくつかのこのような実施形態では、鋳型核酸は、5'から3'に：(a) 第1のプロモータ；(b) HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列であって、イントロン配列がHLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列内に配置され、shRNAmiRをコードする核酸配列がイントロン配列内に配置される核酸配列；(c) 任意選択的に、第1の終結シグナル；(d) 第2のプロモータ；(e) CARまたは外因性TCRをコードする核酸配列；および(f) 任意選択的に、第2の終結シグナルを含み、HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列、およびshRNAmiRをコードする核酸配列が第1のプロモータに作動可能に連結されており、CARまたは外因性TCRをコードする核酸配列が第2のプロモータに作動可能に連結されている。

40

【0102】

本方法のいくつかのこのような実施形態では、鋳型核酸は、5'から3'に：(a) 第1のプロモータ；(b) CARまたは外因性TCRをコードする核酸配列であって、イントロン配列がCARまたは外因性TCRをコードする核酸配列内に配置され、shRNAmiRをコードする核酸配列がイントロン配列内に配置される核酸配列；(c) 任意選択的に、第1の終結シグナル；(d) 第2のプロモータ；(e) HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列；および(f) 任意選択的に、第2の終結シグナルを含み、CARまたは外因性TCRをコードする核酸配列およびshRNAmiRをコードする核酸配列が第1のプロモータに作動可能に連結されており、HLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列が第2のプロモータに作動可能に連結されている。

50

【0103】

本方法のいくつかのこのような実施形態では、鑄型核酸は、5'から3'に：(a) 第1のプロモータ；(b) H L A－E 融合タンパク質をコードする核酸配列；(c) 任意選択的に、第1の終結シグナル；(d) 第2のプロモータ；(e) C A Rまたは外因性T C Rをコードする核酸配列であって、イントロン配列がC A Rまたは外因性T C Rをコードする核酸配列内に配置され、s h R N A m i Rをコードする核酸配列がイントロン配列内に配置される核酸配列；および(f) 任意選択的に、第2の終結シグナルを含み、H L A－E 融合タンパク質をコードする核酸配列が第1のプロモータに作動可能に連結されており、C A Rまたは外因性T C Rをコードする核酸配列およびs h R N A m i Rをコードする核酸配列が第2のプロモータに作動可能に連結されている。

10

【0104】

上記方法のいくつかの実施形態では、イントロン配列は合成イントロン配列である。本方法のある実施形態では、イントロン配列は、配列番号69と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含む。本方法の特定の実施形態では、イントロン配列は、配列番号69の核酸配列を含む。

【0105】

上記の方法のいくつかの実施形態では、1つまたは複数の終結シグナルは、ポリA配列またはB G H終結シグナルである。

【0106】

上記方法のいくつかの実施形態では、第1の終結シグナルは第2の終結シグナルと同一である。本方法の他の実施形態では、第1の終結シグナルは第2の終結シグナルとは異なる。本方法のある実施形態では、第1の終結シグナルはポリA配列であり、第2の終結シグナルはB G H終結シグナルである。本方法のある実施形態では、第1の終結シグナルはB G H終結シグナルであり、第2の終結シグナルはp o l y A配列である。

20

【0107】

上記方法のある実施形態では、ポリA配列は、配列番号68と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含む。本方法の特定の実施形態では、ポリA配列は、配列番号68の核酸配列を含む。本方法のある実施形態では、B G H終結シグナルは、配列番号71と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含む。本方法の特定の実施形態では、B G H終結シグナルは配列番号71の核酸配列を含む。

30

【0108】

上記方法のいくつかの実施形態では、第1のプロモータおよび第2のプロモータは同一である。本方法の他の実施形態では、第1のプロモータは第2のプロモータとは異なる。本方法のある実施形態では、第1のプロモータはJ e Tプロモータであり、第2のプロモータはE F 1アルファコアプロモータである。本方法のある実施形態では、第1のプロモータはE F 1アルファコアプロモータであり、第2のプロモータはJ e Tプロモータである。

40

【0109】

上記方法のある実施形態では、J e Tプロモータは、配列番号67と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含む。本方法の特定の実施形態では、J e Tプロモータは、配列番号67の核酸配列を含む。本方法のある実施形態では、E F 1アルファコアプロモータは、配列番号72と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含む。特定の実施形態では、E F 1アルファコアプロモータは、配列番号72の核酸配列を含む。

【0110】

上記方法のいくつかの実施形態では、H L A－E 融合タンパク質は、配列番号66と少

50

なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、またはそれを超える配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。本方法の特定の実施形態では、HLA-E 融合タンパク質は配列番号 66 のアミノ酸配列を含む。

【0111】

上記方法のいくつかの実施形態では、CAR は、配列番号 73 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、またはそれを超える配列同一性を有するアミノ酸配列を含むシグナルペプチドを含む。本方法の特定の実施形態では、CAR は、配列番号 73 のアミノ酸配列を含むシグナルペプチドを含む。

【0112】

本方法の実施形態では、鋳型核酸は、5' から 3' に：(a) 配列番号 67 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含む第 1 のプロモータ；(b) CAR をコードする核酸配列であって、CAR が配列番号 73 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、またはそれを超える配列同一性を有するアミノ酸配列を含むシグナルペプチドを含む核酸配列；(c) 任意選択的に、配列番号 70 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含む第 1 の終結シグナル；(d) 配列番号 72 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含む第 2 のプロモータ；(e) HLA-E 融合タンパク質をコードする核酸配列であって、HLA-E 融合タンパク質が配列番号 66 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、またはそれを超える配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、イントロン配列が HLA-E 融合タンパク質をコードする核酸配列内に配置され、イントロン配列が配列番号 69 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含み、shRNAmiR をコードする核酸配列がイントロン配列内に配置される核酸配列；および (f) 任意選択的に、配列番号 71 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含む第 2 の終結シグナルを含み、CAR をコードする核酸配列が第 1 のプロモータに作動可能に連結されており、HLA-E 融合タンパク質をコードする核酸配列および shRNAmiR をコードする核酸配列が第 2 のプロモータに作動可能に連結されている。

【0113】

本方法の特定の実施形態では、鋳型核酸は、5' から 3' に：(a) 配列番号 67 の核酸配列を含む第 1 のプロモータ；(b) CAR をコードする核酸配列であって、CAR が配列番号 73 のアミノ酸配列を含むシグナルペプチドを含む核酸配列；(c) 任意選択的に、配列番号 70 の核酸配列を含む第 1 の終結シグナル；(d) 配列番号 72 の核酸配列を含む第 2 のプロモータ；(e) HLA-E 融合タンパク質をコードする核酸配列であって、HLA-E 融合タンパク質が配列番号 66 のアミノ酸配列を含み、イントロン配列が HLA-E 融合タンパク質をコードする核酸配列内に配置され、イントロン配列が配列番号 69 の核酸配列を含み、shRNAmiR をコードする核酸配列がイントロン配列内に配置される核酸配列；および (f) 任意選択的に、配列番号 71 の核酸配列を含む第 2 の終結シグナル；を含み、CAR をコードする核酸配列が第 1 のプロモータに作動可能に連結されており、HLA-E 融合タンパク質をコードする核酸配列および shRNAmiR をコードする核酸配列が第 2 のプロモータに作動可能に連結されている。

【0114】

本方法の特定の実施形態では、鋳型核酸は、配列番号 75 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含み、TCR アルファ 定常領域 遺伝子内のゲノム中に挿入される。本方法の特定の実施形態では、鋳型核酸が配列番号 75 の核酸配列を含み、カセットが TCR アルファ 定常領域 遺伝子内のゲノムに挿入される。

【0115】

上記方法のいくつかの実施形態では、鑄型核酸は、shRNAmiRをコードする2つ以上の核酸を含む。本方法のある実施形態では、2つ以上の核酸は同じshRNAmiRをコードすることができる。本方法のいくつかの実施形態では、2つ以上の核酸は、同じ標的タンパク質の発現を低下させる異なるshRNAmiRをコードすることができる。本方法の他の実施形態では、2つ以上の核酸は、異なる標的タンパク質の発現を低下させる異なるshRNAmiRをコードする。本方法のある実施形態では、鑄型核酸は、本明細書に記載の異なるshRNAmiRをコードする2つ以上の核酸を含むことができる。本方法の特定の実施形態では、鑄型核酸は、B2Mの発現を低下させるshRNAmiRをコードする核酸配列、およびCD52の発現を低下させるshRNAmiRをコードする核酸配列を含むことができる。

10

【0116】

本方法のいくつかの実施形態では、shRNAmiRは、5'から3'に：(a) 5' miR足場ドメイン；(b) 5' miR基底ステムドメイン；(c) パッセンジャー鎖；(d) miRループドメイン；(e) ガイド鎖；(f) 3' miR基底ステムドメイン；および(g) 3' miR足場ドメインを含む。

【0117】

本方法のいくつかの実施形態では、miRループドメインは、miR-30aループドメイン、miR-15ループドメイン、miR-16ループドメイン、miR-155ループドメイン、miR-22ループドメイン、miR-103ループドメインまたはmiR-107ループドメインである。本方法の特定の実施形態では、miRループドメインはmiR-30aループドメインである。

20

【0118】

本方法のある実施形態では、miR-30aループドメインが、配列番号3と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含む。本方法の特定の実施形態では、miR-30aループドメインは、配列番号3の核酸配列を含む。

【0119】

本方法のいくつかの実施形態では、shRNAmiRは、マイクロRNA-E (miR-E) 足場、miR-30 (例えば、miR-30a) 足場、miR-15足場、miR-16足場、miR-155足場、miR-22足場、miR-103足場、またはmiR-107足場を含む。本方法のある実施形態では、shRNAmiRはmiR-E足場を含む。

30

【0120】

本方法のいくつかの実施形態では、shRNAmiRは以下の構造を含む：(a) 5' miR足場ドメインが、配列番号1と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含み；(b) 5' miR基底ステムドメインが、配列番号2と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含み；(c) 3' miR基底ステムドメインが、配列番号4と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含み；および／または(d) 3' miR足場ドメインが、配列番号5と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含む。

40

【0121】

本方法のある実施形態では、shRNAmiRは以下の構造を含む：(a) 5' miR足場ドメインが配列番号1の核酸配列を含み；(b) 5' miR基底ステムドメインが配列番号2の核酸配列を含み；(c) 3' miR基底ステムドメインが配列番号4の核酸配列を含み；および(d) 3' miR足場ドメインが配列番号5の核酸配列を含む。

【0122】

50

本方法のいくつかの実施形態では、標的タンパク質の発現は、対照細胞と比較して、少なくとも約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、または最大約99%低下する。

【0123】

本方法のいくつかの実施形態では、標的タンパク質は、ベーター2ミクログロブリン、CS1、トランスフォーミング増殖因子ベータ受容体2 (TGFR2)、Cbl癌原遺伝子B (CBL-B)、CD52、TCRアルファ遺伝子、TCRアルファ定常領域遺伝子、CD7、グルコシルチコイド受容体 (GR)、デオキシシチジンキナーゼ (DCK)、核内受容体サブファミリー2グループFメンバー6 (NR2F6)、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4 (CTLA-4)、またはC-Cケモカイン受容体5型 (CCR5) である。

10

【0124】

上記方法のいくつかの実施形態では、標的タンパク質はベーター2ミクログロブリンである。本方法のいくつかのこのような実施形態では、ベーター2ミクログロブリンの細胞表面発現は、対照細胞と比較して、少なくとも約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、または最大約99%低下する。本方法のさらなるこのような実施形態では、MHCクラスI分子の発現は細胞表面において、対照細胞と比較して、少なくとも約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、または最大約99%低下する。本方法のいくつかのこのような実施形態では、免疫細胞は、対照細胞と比較して同種異性が低下している。

20

【0125】

本方法のいくつかのこのような実施形態では、shRNAmiRは以下の構造を有する：(a) パッセンジャー鎖が配列番号17の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号18の核酸配列を含む；(b) パッセンジャー鎖が配列番号7の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号8の核酸配列を含む；(c) パッセンジャー鎖が配列番号9の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号10の核酸配列を含む；(d) パッセンジャー鎖が配列番号11の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号12の核酸配列を含む；(e) パッセンジャー鎖が配列番号13の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号14の核酸配列を含む；または(f) パッセンジャー鎖が配列番号15の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号16の核酸配列を含む。本方法のあるこのような実施形態では、パッセンジャー鎖は配列番号17の核酸配列を含み、ガイド鎖は配列番号18の核酸配列を含む。本方法の特定のこのような実施形態では、shRNAmiRをコードする核酸配列は、配列番号46と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する配列を含む。本方法のさらなるこのような実施形態では、shRNAmiRをコードする核酸配列は、配列番号46の配列を含む。

30

【0126】

本方法のいくつかの実施形態では、標的タンパク質はCS1である。本方法のいくつかのこのような実施形態では、CS1の細胞表面発現は、対照細胞と比較して、少なくとも約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、または最大約99%低下する。本方法のいくつかのこのような実施形態では、免疫細胞は、CS1に対する特異性を有するCARを発現する。本方法のさらなるこのような実施形態では、免疫細胞は、対照細胞と比較して、CS1に対する特異性を有するCARを発現する免疫細胞によるフラトリサイドを受けにくい。

40

【0127】

本方法のいくつかのこのような実施形態では、shRNAmiRは以下の構造を有する：(a) パッセンジャー鎖が配列番号21の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号22の

50

核酸配列を含む；（b）パッセンジャー鎖が配列番号23の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号24の核酸配列を含む；または（c）パッセンジャー鎖が配列番号25の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号26の核酸配列を含む。本方法のあるこのような実施形態では、パッセンジャー鎖は配列番号25の核酸配列を含み、ガイド鎖は配列番号26の核酸配列を含む。本方法の特定のこのような実施形態では、shRNAmiRは、配列番号50と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する配列を含む。本方法のさらなるこのような実施形態では、shRNAmiRは配列番号50の配列を含む。

【0128】

本方法のいくつかの実施形態では、標的タンパク質はTGFB2である。本方法のいくつかのこのような実施形態では、TGFB2の細胞表面発現は、対照細胞と比較して、少なくとも約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、または最大約99%低下する。本方法のさらなるこのような実施形態では、免疫細胞は、対照細胞と比較して、トランスフォーミング増殖因子B1（TGFB1）による免疫抑制を受けにくい。

【0129】

本方法のいくつかのこのような実施形態では、shRNAmiRは以下の構造を有する：（a）パッセンジャー鎖が配列番号27の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号28の核酸配列を含む；（b）パッセンジャー鎖が配列番号29の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号30の核酸配列を含む；（c）パッセンジャー鎖が配列番号31の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号32の核酸配列を含む；（d）パッセンジャー鎖が配列番号33の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号34の核酸配列を含む；または（e）パッセンジャー鎖が配列番号35の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号36の核酸配列を含む。本方法のあるこのような実施形態では、パッセンジャー鎖は配列番号31の核酸配列を含み、ガイド鎖は配列番号32の核酸配列を含む。本方法の特定のこのような実施形態では、shRNAmiRをコードする核酸配列は、配列番号53と少なくとも80%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える配列同一性を有する配列を含む。本方法のさらなるこのような実施形態では、shRNAmiRをコードする核酸配列は、配列番号53の配列を含む。

【0130】

本方法のいくつかの実施形態では、標的タンパク質はCBL-Bである。本方法のいくつかのこのような実施形態では、CBL-Bの細胞表面発現は、対照細胞と比較して、少なくとも約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、または最大約99%低下する。本方法のさらなるこのような実施形態では、免疫細胞は、対照細胞と比較して、下流シグナル伝達タンパク質の分解によるT細胞受容体（TCR）シグナル伝達の抑制を受けにくい。

【0131】

本方法のいくつかの実施形態では、標的タンパク質はCD52である。本方法のいくつかのこのような実施形態では、CD52の細胞表面発現は、対照細胞と比較して、少なくとも約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、または最大約99%低下する。本方法のさらなるこのような実施形態では、免疫細胞は、CD52抗体誘導細胞死を受けにくい。

【0132】

本方法のいくつかのこのような実施形態では、shRNAmiRは以下の構造を有する：（a）パッセンジャー鎖が配列番号37の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号38の核酸配列を含む；または（b）パッセンジャー鎖が配列番号39の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号40の核酸配列を含む。本方法のあるこのような実施形態では、パッセン

10

20

30

40

50

ジャー鎖は配列番号 37 の核酸配列を含み、ガイド鎖は配列番号 38 の核酸配列を含む。本方法の特定のこのような実施形態では、shRNAmiR をコードする核酸配列は、配列番号 56 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、またはそれを超える配列同一性を有する配列を含む。本方法のさらなるこのような実施形態では、shRNAmiR をコードする核酸配列は、配列番号 56 の配列を含む。

【0133】

本方法のいくつかの実施形態では、標的タンパク質は DCK である。いくつかのこのような実施形態では、DCK の細胞表面発現は、対照細胞と比較して、少なくとも約 10 %、約 20 %、約 30 %、約 40 %、約 50 %、約 55 %、約 60 %、約 65 %、約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、約 95 %、または最大約 99 % 低下する。本方法のさらなるこのような実施形態では、免疫細胞は、細胞増殖に対するプリンヌクレオシド類似体（例えば、フルダラビン）の影響を受けにくい。

10

【0134】

本方法のいくつかのこのような実施形態では、shRNAmiR は以下の構造を有する：（a）パッセンジャー鎖が配列番号 76 の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号 77 の核酸配列を含む；（b）パッセンジャー鎖が配列番号 78 の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号 79 の核酸配列を含む；（c）パッセンジャー鎖が配列番号 80 の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号 81 の核酸配列を含む；（d）パッセンジャー鎖が配列番号 82 の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号 83 の核酸配列を含む；または（e）パッセンジャー鎖が配列番号 84 の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号 85 の核酸配列を含む。本方法の特定のこのような実施形態では、パッセンジャー鎖は配列番号 76 の核酸配列を含み、ガイド鎖は配列番号 77 の核酸配列を含む。本方法の特定のこのような実施形態では、shRNAmiR をコードする核酸配列は、配列番号 86 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、またはそれを超える配列同一性を有する配列を含む。本方法のさらなるこのような実施形態では、shRNAmiR をコードする核酸配列は、配列番号 86 の配列を含む。

20

【0135】

本方法のいくつかの実施形態では、標的タンパク質は GR である。本方法のいくつかのこのような実施形態では、GR の細胞表面発現は、対照細胞と比較して、少なくとも約 10 %、約 20 %、約 30 %、約 40 %、約 50 %、約 55 %、約 60 %、約 65 %、約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、約 95 %、または最大約 99 % 低下する。さらなるこのような実施形態では、免疫細胞は、増殖の低下などのグルココルチコイド（例えば、デキサメタゾン）の影響を受けにくい。

30

【0136】

本方法のいくつかのこのような実施形態では、shRNAmiR は以下の構造を有する：（a）パッセンジャー鎖が配列番号 91 の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号 92 の核酸配列を含む；（b）パッセンジャー鎖が配列番号 93 の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号 94 の核酸配列を含む；（c）パッセンジャー鎖が配列番号 95 の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号 96 の核酸配列を含む；（d）パッセンジャー鎖が配列番号 97 の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号 98 の核酸配列を含む；（e）パッセンジャー鎖が配列番号 99 の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号 100 の核酸配列を含む；（f）パッセンジャー鎖が配列番号 101 の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号 102 の核酸配列を含む；（g）パッセンジャー鎖が配列番号 103 の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号 104 の核酸配列を含む；（h）パッセンジャー鎖が配列番号 105 の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号 106 の核酸配列を含む；または（i）パッセンジャー鎖が配列番号 107 の核酸配列を含み、ガイド鎖が配列番号 108 の核酸配列を含む。本方法の特定のこのような実施形態では、パッセンジャー鎖は配列番号 95 の核酸配列を含み、ガイド鎖は配列番号 96 の核酸配列を含む。本方法の特定のこのような実施形態では、shRNAmiR をコードする核酸配列は、配列番号 111 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、またはそれを超える配列同一性を有する

40

50

配列を含む。本方法のさらなるこのような実施形態では、shRNA miRをコードする核酸配列は、配列番号111の配列を含む。

【0137】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載の方法のいずれかによって作製された免疫細胞を提供する。いくつかの実施形態では、標的タンパク質はベーター2ミクログロブリンであり、本方法によって作製された免疫細胞は、ベーター2ミクログロブリンおよび／またはMHCクラスIタンパク質の細胞表面発現が低下している。いくつかの実施形態では、標的タンパク質はCS1であり、本方法によって作製された免疫細胞はCS1の細胞表面発現が低下している。いくつかの実施形態では、標的タンパク質はTGFRB2であり、本方法によって作製された免疫細胞は、TGFRB2の発現が低下している。いくつかの実施形態では、標的タンパク質はCBL-Bであり、本方法によって作製された免疫細胞はCBL-Bの発現が低下している。いくつかの実施形態では、標的タンパク質はCD52であり、本方法によって作製された免疫細胞は、CD52の細胞表面発現が低下している。いくつかの実施形態では、標的タンパク質はDCKであり、本方法によって作製された免疫細胞は、DCKの発現が低下している。いくつかの実施形態では、標的タンパク質はGRであり、本方法によって作製された免疫細胞はGRの発現が低下している。

10

【0138】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載の複数の遺伝子改変免疫細胞、または複数の免疫細胞を含む細胞の集団を提供する。いくつかの実施形態では、集団中の細胞の少なくとも約20%、約30%、約40%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、または最大100%が、本明細書に記載の遺伝子改変免疫細胞、または本明細書に記載の免疫細胞である。

20

【0139】

別の態様では、本発明は、薬学的に許容される担体と、本明細書に記載の複数の遺伝子改変免疫細胞、または本明細書に記載の複数の免疫細胞とを含む医薬組成物を提供する。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、本明細書に記載の細胞の集団を含む。

【0140】

別の態様では、本発明は、それを必要とする対象において疾患を治療するための免疫療法の方法であって、有効量の本明細書に記載の医薬組成物を対象に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、本方法は、それを必要とする対象においてがんを治療するための免疫療法であって、遺伝子改変免疫細胞または免疫細胞が、遺伝子改変ヒトT細胞もしくはそれに由来する細胞、または遺伝子改変NK細胞もしくはそれに由来する細胞であり、遺伝子改変免疫細胞または免疫細胞が、CARまたは外因性TCRを含み、CARまたは外因性TCRが、腫瘍特異的抗原に対する特異性を有する細胞外リガンド結合ドメインを含む免疫療法である。本方法のいくつかの実施形態では、遺伝子改変免疫細胞または免疫細胞は、不活性化TCRアルファ遺伝子または不活性化TCRアルファ定常領域遺伝子を含む。本方法のさらなる実施形態では、遺伝子改変免疫細胞または免疫細胞は、内因性TCR（例えば、アルファ／ベータTCR）の検出可能な細胞表面発現を有さない。本方法のいくつかの実施形態では、がんは、癌腫、リンパ腫、肉腫、芽細胞腫および白血病のがんからなる群から選択される。本方法のある実施形態では、がんは、B細胞起源のがん、乳がん、胃がん、神経芽細胞腫、骨肉腫、肺がん、黒色腫、前立腺がん、結腸がん、腎細胞癌腫、卵巣がん、横紋筋肉腫、白血病、およびホジキンリンパ腫からなる群から選択される。本方法の特定の実施形態では、B細胞起源のがんは、B系列急性リンパ芽球性白血病、B細胞慢性リンパ球性白血病、B細胞非ホジキンリンパ腫、および多発性骨髄腫からなる群から選択される。

30

40

【0141】

本方法の特定の実施形態では、対象は、ヒトなどの哺乳動物であり得る。

【0142】

別の態様では、本発明は、それを必要とする対象においてがんなどの疾患を治療する方法であって、内因性デオキシシチジンキナーゼ（DCK）の発現を低下させるshRNA

50

m i Rをコードする核酸配列をそのゲノム中に含む本明細書に記載の任意の遺伝子改変免疫細胞（例えば、C A Rまたは外因性T C Rを発現する遺伝子改変ヒトT細胞またはN K細胞）の集団の治療有効量を、プリンヌクレオシドの投与前、投与中、または投与後に対象に投与することを含む方法を提供する。s h R N A m i RによるD C K発現の低下は、遺伝子改変免疫細胞の増殖またはインビボ持続性に対するプリンヌクレオシドの効果を低下させる。

【0143】

本方法の特定の実施形態では、遺伝子改変免疫細胞の集団およびプリンヌクレオシドは、プリンヌクレオシドが投与されるとき、またはプリンヌクレオシドが有効レベルで対象中に存在する間に、遺伝子改変免疫細胞が対象中に存在する（すなわち、宿主によって除去されていない）ように投与される。上記方法のいくつかの実施形態では、プリンヌクレオシドはフルダラビンである。本方法のいくつかのこのような実施形態では、フルダラビンは、免疫療法のためのリンパ球枯渇レジメンの一部として、単独で、または別の化学療法化合物と組み合わせて投与される。

【0144】

本方法の特定の実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、標的がん細胞上の抗原に対して特異性を有するC A Rまたは外因性T C Rを発現する、遺伝子改変ヒトT細胞または遺伝子改変N K細胞である。

【0145】

別の態様では、本発明は、それを必要とする対象においてがんなどの疾患を治療する方法であって、内因性グルココルチコイド受容体（G R）の発現を低下させるs h R N A m i Rをコードする核酸配列をゲノムに含む本明細書に記載の任意の遺伝子改変免疫細胞（例えば、C A Rまたは外因性T C Rを発現する遺伝子改変ヒトT細胞またはN K細胞）の集団の治療有効量を、コルチコステロイドの投与前、投与中、または投与後に対象に投与することを含む方法を提供する。s h R N A m i RによるG R発現の低下は、遺伝子改変免疫細胞の増殖またはインビボ持続性に対するコルチコステロイドの効果を低下させる。

【0146】

本方法の特定の実施形態では、遺伝子改変免疫細胞の集団およびコルチコステロイドは、コルチコステロイドが投与されるとき、またはコルチコステロイドが有効レベルで対象中に存在する間に、遺伝子改変免疫細胞が対象中に存在する（すなわち、宿主によって除去されていない）ように投与される。本方法のいくつかの実施形態では、コルチコステロイドはデキサメタゾンまたはメチルプレドニゾロンである。本方法のいくつかのこのような実施形態では、コルチコステロイドは、免疫療法中のサイトカイン放出症候群を低下させるための治療の一部として、単独で、または別の化合物と組み合わせて投与される。

【0147】

本方法の特定の実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、標的がん細胞上の抗原に対して特異性を有するC A Rまたは外因性T C Rを発現する、遺伝子改変ヒトT細胞または遺伝子改変N K細胞である。

【0148】

別の態様では、本発明は、医薬として使用するための、本明細書に記載の遺伝子改変免疫細胞もしくはその集団、または本明細書に記載の免疫細胞もしくはその集団を提供する。本発明はさらに、それを必要とする対象において疾患を治療するための医薬の製造における、本明細書に記載の遺伝子改変免疫細胞もしくはその集団、または本明細書に記載の免疫細胞もしくはその集団の使用を提供する。このような一態様では、医薬はがんの治療に有用である。

【0149】

別の態様では、本発明は、疾患の治療、好ましくはがんの治療に使用するための、本明細書に記載の遺伝子改変細胞もしくはその集団、または本明細書に記載の免疫細胞もしくはその集団を提供する。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

【0150】

【図1】shRNA472の単一コピーをCARと3'から5'への頭-尾(head-to-tail)配置で発現する構築物7056を含むAAVにより形質導入されたT細胞上のベータ-2ミクログロブリンの発現またはHLA-A、B、およびCの発現(すなわち、MHCクラスI分子発現)を示す。

【図1A】対照培養物由来のshRNAを発現しないメガヌクレアーゼ編集細胞と比較した、CD3-/CAR+細胞におけるB2Mの表面レベルを示す。

【図1B】同じ培養物中のCD3-/CAR+対CD3+/CAR-集団のB2Mレベルを示す。

【図1C】対照培養物由来のshRNAを発現しないメガヌクレアーゼ編集細胞と比較した、CD3-/CAR+細胞におけるHLA-ABC(すなわち、MHCクラスI分子)の表面レベルを示す。

【図1D】同じ培養物中のCD3+/CAR+対CD3+/CAR-集団のHLA-ABCレベルを示す。

【図2】AAV7056を用いて産生された培養物におけるCD3-/CAR+細胞の頻度およびB2Mのノックダウンを示す。

【図2A】4日目のCD3-/CAR+細胞の頻度を示す。

【図2B】4日目のB2Mのノックダウンを示す。

【図2C】7日目のCD3-/CAR+細胞の頻度を示す。

【図2D】7日目のB2Mのノックダウンを示す。

【図2E】10日目のCD3-/CAR+細胞の頻度を示す。

【図2F】10日目のB2Mのノックダウンを示す。

【図3】AAV7206、AAV7056またはAAV7282による形質導入の3日後に産生された培養物における、CD3-/CAR+細胞の頻度およびB2Mのノックダウンを示す。

【図3A】7206-形質導入細胞におけるCD3-/CAR+細胞の頻度を示す。

【図3B】7206-形質導入細胞におけるB2Mのノックダウンを示す。

【図3C】7282-形質導入細胞におけるCD3-/CAR+細胞の頻度を示す。

【図3D】7282-形質導入細胞におけるB2Mのノックダウンを示す。

【図3E】7056-形質導入細胞におけるCD3-/CAR+細胞の頻度を示す。

【図3F】7056-形質導入細胞におけるB2Mのノックダウンを示す。

【図4】AAV7206、AAV7056またはAAV7282を用いた形質導入の7日後に産生された培養物における、CD3-/CAR+細胞の頻度およびB2Mのノックダウンを示す。

【図4A】7206-形質導入細胞におけるCD3-/CAR+細胞の頻度を示す。

【図4B】7206-形質導入細胞におけるB2Mのノックダウンを示す。

【図4C】7282-形質導入細胞におけるCD3-/CAR+細胞の頻度を示す。

【図4D】7282-形質導入細胞におけるB2Mのノックダウンを示す。

【図4E】7056-形質導入細胞におけるCD3-/CAR+細胞の頻度を示す。

【図4F】7056-形質導入細胞におけるB2Mのノックダウンを示す。

【図5】AAV7206、AAV7056またはAAV7282による形質導入の11日後に産生された培養物における、CD3-/CAR+細胞の頻度およびB2Mのノックダウンを示す。

【図5A】7206-形質導入細胞におけるCD3-/CAR+細胞の頻度を示す。

【図5B】7206-形質導入細胞におけるB2Mのノックダウンを示す。

【図5C】7282-形質導入細胞におけるCD3-/CAR+細胞の頻度を示す。

【図5D】7282-形質導入細胞におけるB2Mのノックダウンを示す。

【図5E】7056-形質導入細胞におけるCD3-/CAR+細胞の頻度を示す。

【図5F】7056-形質導入細胞におけるB2Mのノックダウンを示す。

【図6】同種抗原特異的細胞傷害性リンパ球(CTL)またはNK細胞による細胞溶解に

10

20

30

40

50

対する C A R T 細胞の感受性についての、B 2 M のノックアウトまたはノックダウン効果を示す。

【図 6 A】B 2 M ノックアウトおよび B 2 M ノックダウン C A R T 細胞集団に対する、プライムされた同種抗原特異的 C T L の細胞溶解活性を示す。

【図 6 B】B 2 M ノックアウトおよび B 2 M ノックダウン C A R T 細胞集団に対する N K 細胞の細胞溶解活性を示す。

【図 7】操作されたメガヌクレアーゼおよび H L A - E ポリペプチドのコード配列を含むドナー鑄型の標的挿入を用いた、B 2 M のノックアウトを示す図である。

【図 7 A】標的挿入なしの B 2 M ノックアウトを示す。

【図 7 B】A A V 7 3 4 6 を使用した B 2 M ノックアウトおよびドナー鑄型の標的挿入を示す。

【図 8】B 2 M ノックアウトおよび挿入されたドナー鑄型によってコードされる H L A - E の細胞表面発現による T 細胞集団の精製を示す。

【図 8 A】B 2 M 陰性の細胞集団を示す。

【図 8 B】精製された B 2 M 陰性集団を示す。

【図 8 C】H L A - E 陽性である細胞集団を示す。

【図 8 D】精製された H L A - E 陽性細胞集団を示す。

【図 9】同種抗原プライム C T L による C A R T 細胞殺滅およびナチュラルキラー (N K) 細胞による細胞殺滅を示す。

【図 9 A】エフェクター：標的比の漸増時の、同種抗原プライム C T L による B 2 M 陽性、B 2 M ノックアウトおよび B 2 M ノックアウト / H L A - E ノックイン、C A R T 細胞の殺滅を示す。

【図 9 B】エフェクター：標的比の漸増時の、B 2 M 陽性、B 2 M ノックアウトおよび B 2 M ノックアウト / H L A - E ノックイン、C A R T 細胞の N K 細胞殺滅を示す。

【図 10】C A R T 細胞における B 2 M の s h R N A m i R 誘導ノックダウンのインビボ有効性および安定性を示す。

【図 10 A】N A L M - 6 細胞を移植し、ビヒクルで処置したマウス（黒色の線で三角形を付して示す）、C D 1 9 指向性 C A R T 細胞で処置したマウス（濃い灰色の線で丸を付して示す）、または統合された B 2 M 標的化 s h R N A m i R を含む C D 1 9 指向性 C A R T 細胞で処置したマウス（薄い灰色の線で三角形を付して示す）における経時的な総フラックスの生物発光イメージングを示す。

【図 10 B】統合された B 2 M 標的化 s h R N A m i R を含む C D 1 9 指向性 C A R T 細胞（薄い灰色のヒストグラムとして示される）または対照 C D 1 9 指向性 C A R T 細胞（濃い灰色のヒストグラムとして示される）のいずれかを投与した 1 4 日後のヒト C D 4 5 + 細胞における B 2 M 発現についてのフローサイトメトリ染色を示す。

【図 11】C A R T 細胞における C S 1 の s h R N A m i R 誘導安定的ノックダウンを示す。C S 1 / S L A M F 7 s h R N A m i R の 3 つの候補ガイド鎖配列およびパッセンジャー鎖配列を m i R - E 足場内に構築し、B C M A 特異的 C A R の終止コドンの後に配置した。構築物を A A V 7 2 1 0 1 ~ 7 2 1 0 3 と命名し、ドナー T 細胞の形質導入に使用した。

【図 11 A】B C M A C A R をコードするが s h R N A m i R 構築物をコードしない A A V による形質導入の 7 日後の C A R および C S 1 染色を示す。

【図 11 B】A A V 7 2 1 0 1 による形質導入の 7 日後の C A R および C S 1 染色を示す。

【図 11 C】A A V 7 2 1 0 2 による形質導入の 7 日後の C A R および C S 1 染色を示す。

【図 11 D】A A V 7 2 1 0 3 による形質導入の 7 日後の C A R および C S 1 染色を示す。

【図 12】C A R T 細胞における T G F R B 2 の s h R N A m i R 誘導安定的ノックダウンを示す。T G F R B 2 s h R N A m i R の複数の候補ガイド鎖配列およびパッセン

10

20

30

40

50

ジャー鎖配列をmiR-E足場内に構築し、CD19特異的CARの終止コドンの後に配置した。構築物をAAV 72110～72114と命名し、ドナーT細胞の形質導入に使用した。

【図12A】モック形質導入後のCARおよびTGFB β 2染色を示す。

【図12B】AAV 72110による形質導入の14日後のCARおよびTGFB β 2染色を示す。

【図12C】AAV 72111による形質導入の14日後のCARおよびTGFB β 2染色を示す。

【図12D】AAV 72112による形質導入の14日後のCARおよびTGFB β 2染色を示す。

【図12E】AAV 72113による形質導入の14日後のCARおよびTGFB β 2染色を示す。

【図12F】AAV 72114による形質導入の14日後のCARおよびTGFB β 2染色を示す。

【図13】2つの操作されたメガヌクレアーゼを使用したT細胞におけるTGFB β 2のノックアウトを検出するフローサイトメトリを示す。

【図13A】陰性染色対照を示す。

【図13B】モックトランスフェクトT細胞を示す。

【図13C】TGFB β 1-2 x. 5メガヌクレアーゼをコードするmRNAをトランスフェクトしたT細胞を示す。

【図13D】TGFB β 1-2 L. 296メガヌクレアーゼをコードするmRNAをトランスフェクトしたT細胞を示す。

【図14】TGFB β 1で処理したTGFB β 2陽性T細胞および陰性T細胞におけるリン酸化SMAD2/3のフローサイトメトリ染色を示す。

【図15】TGFB β 2陽性CAR T細胞、タンパク質発現をノックダウンするために抗TGFB β 2 shRNAmiRを発現するCAR T細胞、およびTGFB β 2発現をノックアウトするために操作されたメガヌクレアーゼで処理されたT細胞におけるリン酸化SMAD2/3のフローサイトメトリを示す。

【図16】未処理対照BCMA CAR T細胞(A)、TGFB β 1で処理されたBCMA CAR T細胞(B)、TGFB β 1-2 L. 296メガヌクレアーゼを用いてTGFB β 2がノックアウトされた、TGFB β 1で処理されたBCMA CAR T細胞(C)、または72112 TGFB β 2 shRNAmiRを用いてTGFB β 2がノックダウンされた、TGFB β 1で処理されたBCMA CAR T細胞(D)、におけるリン酸化SMAD2/3のフローサイトメトリを示す。

【図17】正常なK562細胞、BCMAを安定に発現するようにトランスフェクトされたK562細胞(KBCMA)、またはBCMAを安定に発現し、活性TGFB β 1を構成的に分泌するK562細胞(KBCMA-TGFB)と共培養した後の、経時的なBCMA CAR T細胞数を示す。BCMA CAR T細胞を、shRNAmiRを使用してTGFB β 2をノックダウンするように改変(TGFB β 2 KD)するか、またはshRNAmiRを用いてB2Mをノックダウンするように改変(CTRL KD)した。

【図18】BCMAを安定に発現するようにトランスフェクトされたK562細胞(KBCMA)、またはBCMAを安定に発現し、活性TGFB β 1を構成的に分泌するK562細胞(KBCMA-TGFB)と共培養した後の、経時的な標的細胞数を示す。BCMA CAR T細胞を、shRNAmiRを使用してTGFB β 2をノックダウンするように改変(TGFB β 2 KD)するか、またはshRNAmiRを用いてB2Mをノックダウンするように改変(CTRL KD)した。

【図19】正常なK562細胞、BCMAを安定に発現するようにトランスフェクトされたK562細胞、およびBCMAを安定に発現し、活性TGFB β 1を構成的に分泌するK562細胞と共培養した後の、経時的なBCMA CAR T細胞数を示す。BCMA CAR T細胞を、shRNAmiRを使用してTGFB β 2をノックダウンするように

10

20

30

40

50

改変 (72154) し、shRNAmiRを用いてB2Mをノックダウンするように改変 (72155) し、または操作されたメガヌクレアーゼを用いてTGFB β 2をノックアウトするように改変 (dKO) した。

【図20】BCMAを安定に発現するようにトランスフェクトされたK562細胞、およびBCMAを安定に発現し、活性TGFB β 1を構成的に分泌するK562細胞と共培養した後の、経時的なBCMA CAR T細胞のCD4:CD8比を示す。BCMA CAR T細胞を、shRNAmiRを使用してTGFB β 2をノックダウンするように改変 (72154) し、shRNAmiRを用いてB2Mをノックダウンするように改変 (72155) し、または操作されたメガヌクレアーゼを用いてTGFB β 2をノックアウトするように改変 (dKO) した。

10

【図21】正常なU266細胞、または活性TGFB β 1を構成的に分泌するU266細胞と共培養した後の、経時的なBCMA CAR T細胞数を示す。BCMA CAR T細胞を、shRNAmiRを使用してTGFB β 2をノックダウンするように改変 (72154) し、shRNAmiRを用いてB2Mをノックダウンするように改変 (72155) し、または操作されたメガヌクレアーゼを用いてTGFB β 2をノックアウトするように改変 (dKO) した。

【図22】U266細胞、または活性TGFB β 1を構成的に分泌するU266細胞と共培養した後の、経時的なBCMA CAR T細胞数を示す。BCMA CAR T細胞を、shRNAmiRを使用してTGFB β 2をノックダウンするように改変 (72154) し、shRNAmiRを用いてB2Mをノックダウンするように改変 (72155) し、または操作されたメガヌクレアーゼを用いてTGFB β 2をノックアウトするように改変 (dKO) した。

20

【図23】U266細胞と共培養した異なる時点での、CD4+CAR T細胞の数のフローサイトメトリプロットを示す。

【図23A】72154構築物を組み込んだCAR T細胞を示す。

【図23B】72155構築物を組み込んだCAR T細胞を示す。

【図23C】HLA-E融合タンパク質がB2M遺伝子にノックインされたCAR T細胞を示す。

【図24】BCMA CAR T細胞変異体と16日間共培養した後の、U266細胞の生細胞対死細胞のフローサイトメトリプロットを示す。

30

【図24A】U266細胞と、shRNAmiRを使用してTGFB β 2をノックダウンするように改変 (TGFB β 2 RKD) されたBCMA CAR T細胞との共培養を示す。

【図24B】U266細胞と、shRNAmiRを使用してB2Mをノックダウンするように改変 (Ctrl KD) されたBCMA CAR T細胞との共培養を示す。

【図24C】U266細胞と、操作されたメガヌクレアーゼを用いてTGFB β 2をノックアウトするように改変 (TGFB β 2 KO) されたBCMA CAR T細胞との共培養を示す。

【図24D】活性TGFB β 1を分泌するU266細胞と、shRNAmiRを使用してTGFB β 2をノックダウンするように改変 (TGFB β 2 RKD) されたBCMA CAR T細胞との共培養を示す。

40

【図24E】活性TGFB β 1を分泌するU266細胞と、shRNAmiRを使用してB2Mをノックダウンするように改変 (Ctrl KD) されたBCMA CAR T細胞との共培養を示す。

【図24F】活性TGFB β 1を分泌するU266細胞と、操作されたメガヌクレアーゼを用いてTGFB β 2をノックアウトするように改変 (TGFB β 2 KO) されたBCMA CAR T細胞との共培養を示す。

【図25】CAR T細胞におけるCD52のshRNAmiR誘導安定的ノックダウンを示す。CD52 shRNAmiRの複数の候補ガイド鎖配列およびパッセンジャー鎖配列をmiR-E足場内に構築し、CD19特異的CARの終止コドンの後に配置した。構築物をAAV 72123およびAAV 72124と命名し、ドナーT細胞の形質導

50

入に使用した。

【図25A】AAV形質導入後のCD3- / CAR+ T細胞集団の染色を示す。

【図25B】AAV 72123による形質導入の10日後のCD3- / CAR+ T細胞におけるCD52のノックダウンを示す。

【図25C】AAV 72124による形質導入の10日後のCD3- / CAR+ T細胞におけるCD52のノックダウンを示す。

【図26】B2M標的化shRNAmiRおよびCD52標的化shRNAmiRを発現するT細胞におけるB2MおよびCD52についてのフローサイトメトリ染色を示す。

【図27】B2M標的化shRNAmiRおよびCD52標的化shRNAmiRを発現するCAR T集団のCD52枯渇後に回収されたCAR+ T細胞のパーセンテージを示す。

10

【図28】構築物73161、73162、73163、および73164の図を示す。

【図28A】JeTプロモータ、CD19 CAR遺伝子、P2A / フューリン部位、B2M標的化shRNAmiRを含む合成イントロンを含むHLA-E遺伝子、およびSV40双方向性ポリA配列を含む構築物73161を示す。

【図28B】JeTプロモータ、B2M標的化shRNAmiRを含む合成イントロンを含むCD19 CAR遺伝子、SV40双方向性ポリA配列、第2のJeTプロモータ、HLA-E遺伝子、およびウシ成長ホルモン (BGH) 終結シグナルを含む構築物73162を示す。

【図28C】JeTプロモータ、CD19 CAR遺伝子、SV40双方向ポリA配列、EF1アルファコアプロモータ、B2M標的化shRNAmiRを含む合成イントロンを含むHLA-E遺伝子、およびBGH終結シグナルを含む構築物73163を示す。

20

【図28D】JeTプロモータ、CD19 CAR遺伝子、SV40双方向ポリA配列、第2のJeTプロモータ、B2M標的化shRNAmiRを含む合成イントロンを含むHLA-E遺伝子、およびBGH終結シグナルを含む73164構築物を示す。

【図29】同定された構築物がAAVによって導入され、TRAC遺伝子座のみに挿入されたT細胞 (7206および73161~73164)、またはCAR遺伝子がTRAC遺伝子座に挿入され、HLA-E遺伝子がB2M遺伝子座に挿入された細胞 (dKO dKI) のCAR表現型を要約する表を示す。この表は、7206構築物を使用して導入されたCARと比較した場合の、CD3- / CAR+であった細胞のパーセンテージ、CARノックインを有したCD3ノックアウト細胞のパーセンテージ、発現したCARの平均蛍光強度 (MFI)、および各CARのMFIの比較を提供する。

30

【図30】同定された構築物がAAVによって導入され、TRAC遺伝子座のみに挿入されたT細胞 (7206および73161~73164)、またはCAR遺伝子がTRAC遺伝子座に挿入され、HLA-E遺伝子がB2M遺伝子座に挿入された細胞 (dKO dKI) のHLA-ABCおよびHLA-E表現型を要約する表を示す。この表は、CD3- / CAR+集団における野生型と比較したHLA-ABC発現のパーセンテージ、野生型ゲーティングアウトによるHLA-ABCノックダウンのパーセンテージ、CD3- / CAR+集団におけるHLA-Eを発現する細胞のパーセンテージ、このような細胞におけるHLA-E発現のMFI、およびCAR-集団におけるHLA-E+であった細胞のパーセンテージを提供する。

40

【図31】同定された構築物がAAVによって導入され、TRAC遺伝子座のみに挿入されたCAR T細胞 (7206および73161~73164)、またはCAR遺伝子がTRAC遺伝子座に挿入され、HLA-E遺伝子がB2M遺伝子座に挿入された細胞 (dKO dKI) の特徴を要約する表を示す。

【図32】2種の異なるドナー (K3212またはK2916) 由来の同種抗原プライムCTLと共培養した場合の、第1のドナー (HC6366) 由来のT細胞を用いて調製したCD19 CAR T変異体の細胞溶解を示す。

【図32A】K3212同種抗原プライムCTLによるCAR T細胞の殺滅を示す。

【図32B】K2916同種抗原プライムCTLによるCAR T細胞の殺滅を示す。

50

【図 3 3】 1 : 1 の比で共培養した CD 1 9 C A R T 変異体のナチュラルキラー (N K) 細胞による細胞溶解を複数の時点において示す。

【図 3 3 A】 2 4 時間での細胞溶解を示す。

【図 3 3 B】 4 8 時間での細胞溶解を示す。

【図 3 3 C】 1 2 0 時間での細胞溶解を示す。

【図 3 4】 N A L M / 6 白血病細胞を移植した免疫不全マウスにおける CD 1 9 C A R T 変異体のインビボ有効性を実証する発光測定を示す。

【図 3 5】 CD 1 9 C A R T 変異体で処置した、N A L M / 6 白血病細胞を移植した免疫不全マウスの生存を示す。

【図 3 6】 異なる濃度のフルダラビンとインキュベーションした後の CD 3 ノックアウト T 細胞における、D C K s h R N A m i R を含む、または含まない CD 1 9 C A R 配列のノックインパーセントの変化を示す。 10

【図 3 7】 D C K s h R N A m i R を含む、または含まない CD 1 9 C A R T 細胞変異体と共にインキュベートしたフルダラビンの濃度に対する CD 3 - / C A R + 集団の事象 / u L を示す。

【図 3 8】 D C K s h R N A m i R を含む、または含まない異なる CD 1 9 C A R T 細胞変異体を異なる濃度のフルダラビンで処理した後 4 日目の生細胞数 / m L を示す。

【図 3 9】 D C K s h R N A m i R を含む、または含まない異なる CD 1 9 C A R T 細胞変異体を異なる濃度のフルダラビンで処理した後 8 日目の生細胞数 / m L を示す。

【図 4 0】 異なる濃度のフルダラビンの存在下で、D C K s h R N A m i R を欠く CD 1 9 C A R T 細胞 (エフェクター) と共培養された CD 1 9 発現 H E K 2 9 3 細胞 (標的) の細胞溶解パーセントを示す。細胞を 2 : 1、1 : 2、および 1 : 4 の E : T 比で共培養した。 20

【図 4 1】 異なる濃度のフルダラビンの存在下で、D C K s h R N A m i R (7 2 1 3 8) を含む CD 1 9 C A R T 細胞 (エフェクター) と共培養された CD 1 9 発現 H E K 2 9 3 細胞 (標的) の細胞溶解パーセントを示す。細胞を 2 : 1、1 : 2、および 1 : 4 の E : T 比で共培養した。

【図 4 2】 異なる濃度のフルダラビンの存在下で、D C K s h R N A m i R (7 2 1 3 6) を含む CD 1 9 C A R T 細胞 (エフェクター) と共培養された CD 1 9 発現 H E K 2 9 3 細胞 (標的) の細胞溶解パーセントを示す。細胞を 2 : 1、1 : 2、および 1 : 4 の E : T 比で共培養した。 30

【図 4 3】 異なる濃度のデキサメタゾンとのインキュベーション後の CD 3 ノックアウト T 細胞における、G R s h R N A m i R を含む、または含まない CD 1 9 C A R 配列のノックインパーセントの変化を示す。

【図 4 4】 G R s h R N A m i R を含む、または含まない CD 1 9 C A R T 細胞変異体と共にインキュベートしたデキサメタゾンの濃度に対する CD 3 - / C A R + 集団の事象 / u L を示す図である。

【0 1 5 1】

配列の簡単な説明

【0 1 5 2】

配列番号 1 は、5 ' m i R - E 足場ドメインコード配列の核酸配列を示す。

【0 1 5 3】

配列番号 2 は、5 ' m i r - E 基底ステムドメインコード配列の核酸配列を示す。

【0 1 5 4】

配列番号 3 は、m i R - 3 0 a ループドメインコード配列の核酸配列を示す。

【0 1 5 5】

配列番号 4 は、3 ' m i R - E 基底ステムドメインコード配列の核酸配列を示す。

【0 1 5 6】

配列番号 5 は、3 ' m i R - E 足場ドメインコード配列の核酸配列を示す。

【0 1 5 7】

40

50

配列番号 6 は、s h R N A 4 7 2 をコードする核酸配列を示す。

【0158】

配列番号 7 は、7 2 8 2 ベーター 2 ミクログロブリン (B 2 M) s h R N A m i R のパッセンジャー鎖をコードする核酸配列を示す。

【0159】

配列番号 8 は、7 2 8 2 B 2 M s h R N A m i R のガイド鎖をコードする核酸配列を示す。

【0160】

配列番号 9 は、7 2 8 5 B 2 M s h R N A m i R のパッセンジャー鎖をコードする核酸配列を示す。

【0161】

配列番号 10 は、7 2 8 5 B 2 M s h R N A m i R のガイド鎖をコードする核酸配列を示す。

【0162】

配列番号 11 は、7 2 8 6 B 2 M s h R N A m i R のパッセンジャー鎖をコードする核酸配列を示す。

【0163】

配列番号 12 は、7 2 8 6 B 2 M s h R N A m i R のガイド鎖をコードする核酸配列を示す。

【0164】

配列番号 13 は、7 2 8 7 B 2 M s h R N A m i R のパッセンジャー鎖をコードする核酸配列を示す。

【0165】

配列番号 14 は、7 2 8 7 B 2 M s h R N A m i R のガイド鎖をコードする核酸配列を示す。

【0166】

配列番号 15 は、7 2 8 8 B 2 M s h R N A m i R のパッセンジャー鎖をコードする核酸配列を示す。

【0167】

配列番号 16 は、7 2 8 8 B 2 M s h R N A m i R のガイド鎖をコードする核酸配列を示す。

【0168】

配列番号 17 は、7 2 8 9 B 2 M s h R N A m i R のパッセンジャー鎖をコードする核酸配列を示す。

【0169】

配列番号 18 は、7 2 8 9 B 2 M s h R N A m i R のガイド鎖をコードする核酸配列を示す。

【0170】

配列番号 19 は、7 2 9 0 B 2 M s h R N A m i R のパッセンジャー鎖をコードする核酸配列を示す。

【0171】

配列番号 20 は、7 2 9 0 B 2 M s h R N A m i R のガイド鎖をコードする核酸配列を示す。

【0172】

配列番号 21 は、7 2 1 0 1 C S 1 s h R N A m i R のパッセンジャー鎖をコードする核酸配列を示す。

【0173】

配列番号 22 は、7 2 1 0 1 C S 1 s h R N A m i R のガイド鎖をコードする核酸配列を示す。

【0174】

10

20

30

40

50

配列番号 23 は、72102 CS1 shRNAmiR のパッセンジャー鎖をコードする核酸配列を設定する。

【0175】

配列番号 24 は、72102 CS1 shRNAmiR のガイド鎖をコードする核酸配列を設定する。

【0176】

配列番号 25 は、72103 CS1 shRNAmiR のパッセンジャー鎖をコードする核酸配列を設定する。

【0177】

配列番号 26 は、72103 CS1 shRNAmiR のガイド鎖をコードする核酸配列を示す。

【0178】

配列番号 27 は、72110 トランスフォーミング増殖因子ベータ受容体 2 (TGFB R2) shRNAmiR のパッセンジャー鎖をコードする核酸配列を示す。

【0179】

配列番号 28 は、72110 TGFB R2 shRNAmiR のガイド鎖をコードする核酸配列を示す。

【0180】

配列番号 29 は、72111 TGFB R2 shRNAmiR のパッセンジャー鎖をコードする核酸配列を示す。

【0181】

配列番号 30 は、72111 TGFB R2 shRNAmiR のガイド鎖をコードする核酸配列を示す。

【0182】

配列番号 31 は、72112 TGFB R2 shRNAmiR のパッセンジャー鎖をコードする核酸配列を示す。

【0183】

配列番号 32 は、72112 TGFB R2 shRNAmiR のガイド鎖をコードする核酸配列を示す。

【0184】

配列番号 33 は、72113 TGFB R2 shRNAmiR のパッセンジャー鎖をコードする核酸配列を示す。

【0185】

配列番号 34 は、72113 TGFB R2 shRNAmiR のガイド鎖をコードする核酸配列を示す。

【0186】

配列番号 35 は、72114 TGFB R2 shRNAmiR のパッセンジャー鎖をコードする核酸配列を示す。

【0187】

配列番号 36 は、72114 TGFB R2 shRNAmiR のガイド鎖をコードする核酸配列を示す。

【0188】

配列番号 37 は、72123 CD52 shRNAmiR のパッセンジャー鎖をコードする核酸配列を示す。

【0189】

配列番号 38 は、72123 CD52 shRNAmiR のガイド鎖をコードする核酸配列を示す。

【0190】

配列番号 39 は、72124 CD52 shRNAmiR のパッセンジャー鎖をコードする核酸配列を示す。

10

20

30

40

50

【0191】

配列番号40は、72124 CD52 shRNAmiRのガイド鎖をコードする核酸配列を示す。

【0192】

配列番号41は、7282 B2M shRNAmiRをコードする核酸配列を示す。

【0193】

配列番号42は、7285 B2M shRNAmiRをコードする核酸配列を示す。

【0194】

配列番号43は、7286 B2M shRNAmiRをコードする核酸配列を示す。

【0195】

配列番号44は、7287 B2M shRNAmiRをコードする核酸配列を示す。

【0196】

配列番号45は、7288 B2M shRNAmiRをコードする核酸配列を示す。

【0197】

配列番号46は、7289 B2M shRNAmiRをコードする核酸配列を示す。

【0198】

配列番号47は、7290 B2M shRNAmiRをコードする核酸配列を示す。

【0199】

配列番号48は、72101 CS1 shRNAmiRをコードする核酸配列を示す。

【0200】

配列番号49は、72102 CS1 shRNAmiRをコードする核酸配列を示す。

【0201】

配列番号50は、72103 CS1 shRNAmiRをコードする核酸配列を示す。

【0202】

配列番号51は、72110 TGFBR2 shRNAmiRをコードする核酸配列を示す。

【0203】

配列番号52は、72111 TGFBR2 shRNAmiRをコードする核酸配列を示す。

【0204】

配列番号53は、72112 TGFBR2 shRNAmiRをコードする核酸配列を示す。

【0205】

配列番号54は、72113 TGFBR2 shRNAmiRをコードする核酸配列を示す。

【0206】

配列番号55は、72114 TGFBR2 shRNAmiRをコードする核酸配列を示す。

【0207】

配列番号56は、72123 CD52 shRNAmiRをコードする核酸配列を示す。

【0208】

配列番号57は、72124 CD52 shRNAmiRをコードする核酸配列を示す。

【0209】

配列番号58は、TRC 1-2 認識配列（センス）の核酸配列を示す。

【0210】

10

20

30

40

50

- 配列番号 59 は、T R C 1 - 2 認識配列（アンチセンス）の核酸配列を示す。
【0211】
- 配列番号 60 は、B 2 M 1 3 - 1 4 認識配列（センス）の核酸配列を示す。
【0212】
- 配列番号 61 は、B 2 M 1 3 - 1 4 認識配列（アンチセンス）の核酸配列を示す。
【0213】
- 配列番号 62 は、T G F 1 - 2 認識配列（センス）の核酸配列を示す。
【0214】
- 配列番号 63 は、T G F 1 - 2 認識配列（アンチセンス）の核酸配列を示す。
【0215】
- 配列番号 64 は、T G F 1 - 2 x . 5 メガヌクレアーゼのアミノ酸配列を示す。
【0216】
- 配列番号 65 は、T G F 1 - 2 L . 2 9 6 メガヌクレアーゼのアミノ酸配列を示す。
【0217】
- 配列番号 66 は、H L A クラス I 組織適合抗原、アルファ鎖 E（H L A - E）融合ポリペプチドのアミノ酸配列を示す。
【0218】
- 配列番号 67 は、J e T プロモータの核酸配列を示す。
【0219】
- 配列番号 68 は、双方向 S V 4 0 ポリ A シグナルの核酸配列を示す。
【0220】
- 配列番号 69 は、合成イントロンの核酸配列を示す。
【0221】
- 配列番号 70 は、P 2 A / フューリン部位の核酸配列を示す。
【0222】
- 配列番号 71 は、ウシ成長ホルモン終結シグナルの核酸配列を示す。
【0223】
- 配列番号 72 は、E F 1 アルファコアプロモータの核酸配列を示す。
【0224】
- 配列番号 73 は、シグナルペプチドのアミノ酸配列を示す。
【0225】
- 配列番号 74 は、構築物 7 3 1 6 1 に含まれるカセットの核酸配列を示す。
【0226】
- 配列番号 75 は、構築物 7 3 1 6 3 に含まれるカセットの核酸配列を示す。
【0227】
- 配列番号 76 は、7 2 1 3 6 D C K s h R N A m i R のパッセンジャー鎖をコードする核酸配列を示す。
【0228】
- 配列番号 77 は、7 2 1 3 6 D C K s h R N A m i R のガイド鎖をコードする核酸配列を示す。
【0229】
- 配列番号 78 は、7 2 1 3 7 D C K s h R N A m i R のパッセンジャー鎖をコードする核酸配列を示す。
【0230】
- 配列番号 79 は、7 2 1 3 7 D C K s h R N A m i R のガイド鎖をコードする核酸配列を示す。
【0231】
- 配列番号 80 は、7 2 1 3 8 D C K s h R N A m i R のパッセンジャー鎖をコードする核酸配列を示す。
【0232】

10

20

30

40

50

配列番号 81 は、7 2 1 3 8 D C K s h R N A m i R のガイド鎖をコードする核酸配列を示す。

【0 2 3 3】

配列番号 82 は、7 2 1 3 9 D C K s h R N A m i R のパッセンジャー鎖をコードする核酸配列を示す。

【0 2 3 4】

配列番号 83 は、7 2 1 3 9 D C K s h R N A m i R のガイド鎖をコードする核酸配列を示す。

【0 2 3 5】

配列番号 84 は、7 2 1 4 0 D C K s h R N A m i R のパッセンジャー鎖をコードする核酸配列を示す。

【0 2 3 6】

配列番号 85 は、7 2 1 4 0 D C K s h R N A m i R のガイド鎖をコードする核酸配列を示す。

【0 2 3 7】

配列番号 86 は、7 2 1 3 6 D C K s h R N A m i R をコードする核酸配列を示す。

【0 2 3 8】

配列番号 87 は、7 2 1 3 7 D C K s h R N A m i R をコードする核酸配列を示す。

【0 2 3 9】

配列番号 88 は、7 2 1 3 8 D C K s h R N A m i R をコードする核酸配列を示す。

【0 2 4 0】

配列番号 89 は、7 2 1 3 9 D C K s h R N A m i R をコードする核酸配列を示す。

【0 2 4 1】

配列番号 90 は、7 2 1 4 0 D C K s h R N A m i R をコードする核酸配列を示す。

【0 2 4 2】

配列番号 91 は、7 2 1 4 2 G R s h R N A m i R のパッセンジャー鎖をコードする核酸配列を示す。

【0 2 4 3】

配列番号 92 は、7 2 1 4 2 G R s h R N A m i R のガイド鎖をコードする核酸配列を示す。

【0 2 4 4】

配列番号 93 は、7 2 1 4 3 G R s h R N A m i R のパッセンジャー鎖をコードする核酸配列を示す。

【0 2 4 5】

配列番号 94 は、7 2 1 4 3 G R s h R N A m i R のガイド鎖をコードする核酸配列を示す。

【0 2 4 6】

配列番号 95 は、7 2 1 4 5 G R s h R N A m i R のパッセンジャー鎖をコードする核酸配列を示す。

【0 2 4 7】

配列番号 96 は、7 2 1 4 5 G R s h R N A m i R のガイド鎖をコードする核酸配列を示す。

【0 2 4 8】

配列番号 97 は、7 2 1 4 6 G R s h R N A m i R のパッセンジャー鎖をコードする核酸配列を示す。

10

20

30

40

50

【0249】

配列番号98は、72146 GR shRNAmiRのガイド鎖をコードする核酸配列を示す。

【0250】

配列番号99は、72148 GR shRNAmiRのパッセンジャー鎖をコードする核酸配列を示す。

【0251】

配列番号100は、72148 GR shRNAmiRのガイド鎖をコードする核酸配列を示す。

【0252】

配列番号101は、72149 GR shRNAmiRのパッセンジャー鎖をコードする核酸配列を示す。

【0253】

配列番号102は、72149 GR shRNAmiRのガイド鎖をコードする核酸配列を示す。

【0254】

配列番号103は、72150 GR shRNAmiRのパッセンジャー鎖をコードする核酸配列を示す。

【0255】

配列番号104は、72150 GR shRNAmiRのガイド鎖をコードする核酸配列を示す。

【0256】

配列番号105は、72151 GR shRNAmiRのパッセンジャー鎖をコードする核酸配列を示す。

【0257】

配列番号106は、72151 GR shRNAmiRのガイド鎖をコードする核酸配列を示す。

【0258】

配列番号107は、72152 GR shRNAmiRのパッセンジャー鎖をコードする核酸配列を示す。

【0259】

配列番号108は、72152 GR shRNAmiRのガイド鎖をコードする核酸配列を示す。

【0260】

配列番号109は、72142 GR shRNAmiRをコードする核酸配列を示す。

【0261】

配列番号110は、72143 GR shRNAmiRをコードする核酸配列を示す。

【0262】

配列番号111は、72145 GR shRNAmiRをコードする核酸配列を示す。

【0263】

配列番号112は、72146 GR shRNAmiRをコードする核酸配列を示す。

【0264】

配列番号113は、72148 GR shRNAmiRをコードする核酸配列を示す。

【0265】

配列番号114は、72149 GR shRNAmiRをコードする核酸配列を示す。

10

20

30

40

50

。

【0266】

配列番号115は、72150 GR shRNA mi Rをコードする核酸配列を示す

。

【0267】

配列番号116は、72151 GR shRNA mi Rをコードする核酸配列を示す

。

【0268】

配列番号117は、72152 GR shRNA mi Rをコードする核酸配列を示す

。

【0269】

配列番号118は、HLA-E-01:03タンパク質のアミノ酸配列を示す。

【0270】

配列番号119は、ベータ-2ミクログロブリンタンパク質のアミノ酸配列を示す。

【0271】

配列番号120は、HLA-Gリーダーペプチドのアミノ酸配列を示す。

【0272】

配列番号121は、(GGGGS)3リンカーペプチドのアミノ酸配列を示す。

【0273】

配列番号122は、(GGGGS)4リンカーペプチドのアミノ酸配列を示す。

【0274】

配列番号123は、クラミドモナス・レインハルディ (Chlamydomonas reinhardtii) 由来の野生型I-CreIホーミングエンドヌクレアーゼのアミノ酸配列を示す。

【発明を実施するための形態】

【0275】

発明の詳細な説明

1.1 参照および定義

本明細書で言及される特許および科学文献は、当業者に利用可能な知識を確立する。本明細書に引用される発行された米国特許、許可された出願、公開された外国出願、および GenBank データベース配列を含む参考文献は、それぞれが参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示されているのと同程度に、参照により本明細書に組み込まれる

。

【0276】

本発明は、異なる形態で具体化することができ、本明細書に記載の実施形態に限定されると解釈されるべきではない。むしろ、これらの実施形態は、本開示が徹底的かつ完全であり、本発明の範囲を当業者に十分に伝えるように提供される。例えば、一実施形態に関して例示された特徴は、他の実施形態に組み込むことができ、特定の実施形態に関して例示された特徴は、その実施形態から削除することができる。さらに、本明細書で提案される実施形態に対する多数の変形および追加は、本開示に照らして当業者には明らかであると思われ、本発明から逸脱するものではない。

【0277】

別段の定義がない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書における本発明の説明で使用される用語は、特定の実施形態のみを説明するためのものであり、本発明を限定することを意図するものではない。

【0278】

本明細書で言及されるすべての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0279】

10

20

30

40

50

本明細書で使用される場合、「1つの(a)」、「1つの(an)」、または「その(the)」は、1つまたは複数を意味することができる。例えば、「a」細胞は、単一の細胞または多数の細胞を意味し得る。

【0280】

本明細書で使用される場合、特に明記しない限り、「または」という単語は、「および／または」の包括的な意味で使用され、「いずれか／または」の排他的な意味では使用されない。

【0281】

本明細書で使用される場合、ヌクレオチド配列またはアミノ酸配列に関して「外因性」または「異種」という用語は、純粋に合成されている、外来種に由来する、または同じ種に由来する場合、意図的なヒトの介入によって組成および／またはゲノム遺伝子座においてその天然の形態から実質的に改変されている配列を意味することを意図している。

【0282】

本明細書で使用される場合、ヌクレオチド配列またはタンパク質に関して「内因性」という用語は、細胞内に天然に含まれるかまたは細胞によって発現される配列またはタンパク質を意味することを意図している。

【0283】

本明細書で使用される場合、「ヌクレアーゼ」および「エンドヌクレアーゼ」という用語は互換的に使用され、ポリヌクレオチド鎖内のホスホジエステル結合を切断する、天然に存在する酵素または操作された酵素を指す。

【0284】

本明細書で使用される場合、「shRNA」または「短鎖ヘアピンRNA」という用語は、RNA干渉を介して遺伝子発現をサイレンシングするために使用可能なヘアピンを含む人工RNA分子を指す。

【0285】

本明細書で使用される場合、「miRNA」または「マイクロRNA」または「miR」という用語は、標的遺伝子の発現を転写後に低下させる約22nt長の内因的にコードされる成熟マイクロRNA(miRNA)を指す。miRNAは、植物、動物、および一部のウイルスに見られ、一般に、高度に組織特異的または発達段階特異的な様式で発現される。

【0286】

「ステムループ構造」は、主に一本鎖ヌクレオチドの領域(ループ部分)によって片側に連結された二本鎖(ステム部分)を形成することが知られている、または予測されるヌクレオチド領域を含む二次構造を有する核酸を指す。いくつかの場合、ループは非常に短く、それによってDicerによって認識されず、Dicer非依存性shRNA(内因性miR0431に匹敵する)をもたらし得る。用語「ヘアピン」はまた、ステムループ構造を指すために本明細書で使用される。ステムループ構造内のヌクレオチドの実際の一次配列は、二次構造が存在する限り、説明の実施にとって重要ではない。当技術分野で公知のように、二次構造は、正確な塩基対形成を必要としない。したがって、ステムは、1つまたは複数の塩基ミスマッチを含んでもよい。あるいは、塩基対形成は正確であり得る(すなわち、いかなるミスマッチも含まない)。

【0287】

本明細書で使用される場合、「shRNAmiR」および「マイクロRNA適合shRNA」という用語は、マイクロRNA足場にはめ込まれたshRNA配列を指す。shRNAmiR分子は、それらが効率的なプロセッシングに必要な配列に隣接するヘアピンを含むという点で、天然に存在するpri-miRNA分子を模倣し、Drosha酵素によってpre-miRNAにプロセッシングされ、細胞質に輸送され、Dicerによって切断され、その後、成熟miRNAがRISCに入ることができる。マイクロRNA足場は、天然に存在するマイクロRNA、pre-miRNA、もしくはpri-miRNAまたはその変異体に由来し得る。いくつかの実施形態では、shRNAmiRが基づくsh

10

20

30

40

50

RNA配列は、miRNA（22ヌクレオチド長である）とは異なる長さであり、したがって、miRNA足場は、より長いまたはより短いshRNA配列長に適應するために改変されなければならない。

【0288】

本明細書で使用される場合、「マイクロRNA隣接配列」という用語は、マイクロRNAプロセシングエレメントを含むヌクレオチド配列を指す。マイクロRNAプロセシングエレメントは、一次マイクロRNAまたは前駆体マイクロRNAからの成熟マイクロRNAの生成に寄与する最小核酸配列である。多くの場合、これらのエレメントは、マイクロRNAステムループ構造に隣接する40ヌクレオチド配列内に位置する。いくつかの例では、マイクロRNAプロセシングエレメントは、マイクロRNAステムループ構造に隣接する5〜4,000ヌクレオチド長のヌクレオチド配列のストレッチ内に見出される。shRNA miR分子に使用されるマイクロRNA隣接配列は、天然に存在するマイクロRNAに隣接する天然に存在する配列であり得るか、またはその変異体であり得る。マイクロRNA隣接配列には、miR足場ドメインおよびmiR基底ステムドメインが含まれる。

10

【0289】

ここに開示される組成物および方法において使用されるshRNA miR分子は、5'から3'方向に：(a) 5' miR足場ドメイン；(b) 5' miR基底ステムドメイン；(c) パッセンジャー鎖；(d) miRループドメイン；(e) ガイド鎖；(f) 3' miR基底ステムドメイン；(g) 3' miR足場ドメインを含む。

20

【0290】

本明細書で使用される場合、shRNA miRに関する「miR足場ドメイン」という用語は、shRNA miR分子中のマイクロRNAまたはshRNAの5'または3'末端のいずれかに隣接することができ、天然に存在するマイクロRNA隣接配列またはその変異体に由来し得るヌクレオチド配列を指す。一般に、miR基底ステムドメイン配列は、shRNA配列（パッセンジャー鎖およびガイド鎖、ならびにmiRループドメイン）と足場ドメインとを分離する。5' miR足場ドメインは、その3'末端またはその近くに制限酵素（例えば、IIS型制限酵素）認識配列を含むことができ、3' miR足場ドメインは、その5'末端またはその近くに制限酵素認識配列を含むことができ、したがって、shRNA配列の挿入が容易になる。いくつかの実施形態では、miR足場ドメインの二次構造は、その実際の配列よりも重要である。

30

【0291】

本明細書で使用される場合、shRNA miRに関する「miR基底ステムドメイン」という用語は、パッセンジャー：ガイド二重鎖の下のアピンステムの塩基を含む、パッセンジャー鎖配列およびガイド鎖配列に直接隣接する配列を指す。したがって、5'および3' miR基底ステムドメインは、配列が互いに（完全にまたは部分的に）相補的である。いくつかの実施形態では、5'および3' miR基底ステムドメインは、互いにハイブリダイズした場合に、それぞれが1つまたは2つのミスマッチ塩基対を含む2つのミスマッチバブルを形成する配列を含む。

【0292】

本明細書で使用される場合、shRNA miRに関する「パッセンジャー鎖」という用語は、ガイド配列に（完全にまたは部分的に）相補的であるshRNA miRの配列を指す。

40

【0293】

本明細書で使用される場合、shRNA miRに関する「ガイド鎖」という用語は、発現の低下が望まれる標的mRNA配列と（完全または部分的）相補性を有するshRNA miRの配列を指す。

【0294】

本明細書で使用される場合、shRNA miRに関する「miRループドメイン」は、shRNA miRのパッセンジャー：ガイド二重鎖の一端における一本鎖ループ配列を指

50

す。miR ループドメインは、天然に存在する pre-マイクロRNA ループ配列またはその変異体に由来し得る。

【0295】

本明細書で使用される場合、「切断する」または「切断」という用語は、標的配列内の二本鎖切断をもたらす、本明細書で「切断部位」と呼ばれる標的配列内の認識配列骨格内のホスホジエステル結合の加水分解を指す。

【0296】

本明細書で使用される場合、「メガヌクレアーゼ」という用語は、12塩基対を超える認識配列において二本鎖DNAに結合するエンドヌクレアーゼを指す。いくつかの実施形態では、本開示のメガヌクレアーゼの認識配列は22塩基対である。メガヌクレアーゼは、I-CreI（配列番号123）に由来するエンドヌクレアーゼであり得、例えば、DNA結合特異性、DNA切断活性、DNA結合親和性、または二量体化特性に関して天然のI-CreIと比較して改変された、I-CreIの操作された変異体を指し得る。I-CreIのこのような改変された変異体を作製するための方法は、当技術分野で公知である（例えば、参照によりその全体が組み込まれる国際公開第2007/047859号）。本明細書で使用されるメガヌクレアーゼは、ヘテロ二量体として二本鎖DNAに結合する。メガヌクレアーゼはまた、一对のDNA結合ドメインがペプチドリンカーを使用して単一のポリペプチドに連結されている「単鎖メガヌクレアーゼ」であり得る。「ホーミングエンドヌクレアーゼ」という用語は、「メガヌクレアーゼ」という用語と同義である。本開示のメガヌクレアーゼは、細胞、特にヒト免疫細胞で発現された場合実質的に非毒性であり、本明細書に記載の方法を使用して測定した場合、細胞生存率への有害な影響またはメガヌクレアーゼ切断活性の有意な低下を観察することなく、細胞をトランスフェクトし、37℃で維持することができる。

【0297】

本明細書で使用される場合、「単鎖メガヌクレアーゼ」という用語は、リンカーによって連結された一对のヌクレアーゼサブユニットを含むポリペプチドを指す。単鎖メガヌクレアーゼは、N末端サブユニット-リンカー-C末端サブユニットという構成を有する。2つのメガヌクレアーゼサブユニットは、一般に、アミノ酸配列が同一ではなく、同一ではないDNA配列に結合する。したがって、単鎖メガヌクレアーゼは、典型的には、疑似パリンドロームまたは非パリンドローム認識配列を切断する。単鎖メガヌクレアーゼは、実際には二量体ではないが、「単鎖ヘテロ二量体」または「単鎖ヘテロ二量体メガヌクレアーゼ」と呼ばれることがある。明確にするために、特に明記しない限り、「メガヌクレアーゼ」という用語は、二量体または単鎖メガヌクレアーゼを指すことができる。

【0298】

本明細書で使用される場合、「リンカー」という用語は、2つのヌクレアーゼサブユニットを単一のポリペプチドに連結するために使用される外因性ペプチド配列を指す。リンカーは、天然タンパク質に見られる配列を有していてもよく、またはいずれの天然タンパク質にも見られない人工配列であってもよい。リンカーは、可動性であり、二次構造を欠いていてもよく、または生理学的条件下で特定の三次元構造を形成する傾向を有していてもよい。リンカーは、限定するものではないが、米国特許第8,445,251号、同第9,340,777号、同第9,434,931号および同第10,041,053号明細書に包含されるものを含むことができ、これらの各々は参照によりその全体が組み込まれる。いくつかの実施形態では、リンカーは、配列番号65の残基154~195と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、またはそれを超える配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、配列番号65の残基154~195を含むアミノ酸配列を有し得る。

【0299】

本明細書で使用される場合、「TALEN」という用語は、限定するものではないが、

制限エンドヌクレアーゼ、ホーミングエンドヌクレアーゼ、S1ヌクレアーゼ、マングビーンヌクレアーゼ、腓臓DNAse I、マイクロコッカスヌクレアーゼ、および酵母HOエンドヌクレアーゼを含むエンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼに由来するヌクレアーゼドメインまたはその活性部分に融合された複数のTALドメインリピートを含むDNA結合ドメインを含むエンドヌクレアーゼを指す。例えば、Christian et al. (2010) Genetics 186: 757-761を参照されたい（当該文献は参照によりその全体が組み込まれる）。TALENの設計に有用なヌクレアーゼドメインには、限定するものではないが、FokI、FomI、StsI、HhaI、HindIII、NodI、BbvCI、EcoRI、BglI、およびAlwIを含むII型制限エンドヌクレアーゼに由来するものが含まれる。さらなるII型制限エンドヌクレアーゼは、国際公開第2007/014275号パンフレットに記載されており、当該文献は参照によりその全体が組み込まれる。いくつかの実施形態では、TALENのヌクレアーゼドメインはFokIヌクレアーゼドメインまたはその活性部分である。TALドメインリピートは、キサントモナス(Xanthomonas)属の植物病原体による感染過程で使用されるタンパク質のTALE（転写活性化因子様エフェクター）ファミリーに由来し得る。TALドメインリピートは、12番目および13番目に多様なアミノ酸を有する33~34個のアミノ酸配列である。リピート可変ジペプチド(RVD)と呼ばれるこれらの2つの位置は非常に可变的であり、特異的ヌクレオチド認識と強い相関を示す。DNA標的配列中の各塩基対は、RVDから生じる特異性を有する単一のTALリピートに接触される。いくつかの実施形態では、TALENは、16~22個のTALドメインリピートを含む。TALENによるDNA切断は、非特異的中央領域（すなわち、「スペース」）に隣接する2つのDNA認識領域（すなわち、「ハーフサイト」）を必要とする。TALENに関して「スペース」という用語は、TALENを構成する各モノマーによって認識および結合される2つの核酸配列を分離する核酸配列を指す。TALドメインリピートは、天然に存在するTALEタンパク質由来の天然配列であり得るか、または所定のDNA配列に結合するタンパク質を生成するために合理的または実験的手段によって再設計することができる（例えば、Boch et al. (2009) Science 326 (5959): 1509-1512およびMoscou and Bogdanove (2009) Science 326 (5959): 1501、これらはそれぞれその全体が参照により組み込まれる）。特定の配列を認識して結合するようにTALENを操作する方法、ならびにRVDおよびそれらの対応する標的ヌクレオチドの例については、米国特許出願公開第20110145940号および国際公開第2010/079430号パンフレットも参照されたい。いくつかの実施形態では、各ヌクレアーゼ（例えば、FokI）モノマーは、異なるDNA配列を認識して結合するTALEエフェクター配列に融合することができ、2つの認識部位が近接している場合にのみ、不活性モノマーが一緒になって機能性酵素を生成する。用語「TALEN」は、TALENスペース配列に隣接する上流および下流のハーフサイトに結合し、スペース配列内に切断部位を生成するために協調して働く、単一のTALENタンパク質、あるいは、一対のTALENタンパク質（すなわち、左TALENタンパク質および右TALENタンパク質）を指し得ることが理解されよう。所定のDNA遺伝子座またはスペース配列が与えられると、上流および下流のハーフサイトは、当技術分野で公知のいくつかのプログラム(Kornel Labun; Tessa G. Montague; James A. Gagnon; Summer B. Thyme; Eivind Valen. (2016). CHOPCHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering. Nucleic Acids Research; doi:10.1093/nar/gkw398; Tessa G. Montague; Jose M. Cruz; James A. Gagnon; George M. Church; Eivind Valen. (2014). CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. Nucleic Acids Res. 42. W401-W407)

10

20

30

40

50

を使用して同定することができる。T A L E N 認識配列は、単一のT A L E Nタンパク質のDNA結合配列（すなわち、ハーフサイト）として、または代替的に、上流ハーフサイト、スペーサ配列、および下流ハーフサイトを含むDNA配列として定義され得ることも理解されよう。

【0300】

本明細書で使用される場合、「コンパクトT A L E N」という用語は、I - T e v I ホーミングエンドヌクレアーゼの任意の部分、または米国特許出願公開第20130117869号明細書（その全体が参照により組み込まれる）の表2に列挙されているエンドヌクレアーゼのいずれかに任意の方向で融合した1つまたは複数のT A L Dメインリピートを有するDNA結合ドメインを含むエンドヌクレアーゼを指し、M m e I、E n d A、E n d 1、I - B a s I、I - T e v I I、I - T e v I I I、I - T w o I、M s p I、M v a I、N u c A、およびN u c Mを含むがこれらに限定されない。コンパクトT A L E Nは、DNAプロセッシング活性のために二量体化を必要とせず、介在するDNAスペーサを有する二重標的部位の必要性を軽減する。いくつかの実施形態では、コンパクトT A L E Nは、16～22個のT A L Dメインリピートを含む。

10

【0301】

本明細書で使用される場合、「m e g a T A L」という用語は、転写活性化因子様エフェクター（T A L E）DNA結合ドメインおよび操作された配列特異的ホーミングエンドヌクレアーゼを含む単鎖エンドヌクレアーゼを指す。

20

【0302】

本明細書で使用される場合、「ジンクフィンガーヌクレアーゼ」または「Z F N」という用語は、限定するものではないが、制限エンドヌクレアーゼ、ホーミングエンドヌクレアーゼ、S 1ヌクレアーゼ、マングベーンヌクレアーゼ、腭臓DNAse I、ミクロコッカスヌクレアーゼ、および酵母H Oエンドヌクレアーゼを含むエンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼに由来するヌクレアーゼドメインに融合されたジンクフィンガーDNA結合ドメインを含むキメラタンパク質を指す。ジンクフィンガーヌクレアーゼの設計に有用なヌクレアーゼドメインには、限定するものではないが、F o k I、F o M、およびS t s I制限酵素を含むI I型制限エンドヌクレアーゼに由来するものが含まれる。さらなるI I型制限エンドヌクレアーゼは、国際公開第2007/014275号パンフレットに記載されており、当該文献は参照によりその全体が組み込まれる。ジンクフィンガードメインの構造は、亜鉛イオンの配位によって安定化される。1つまたは複数のジンクフィンガードメインを含むDNA結合タンパク質は、配列特異的にDNAに結合する。ジンクフィンガードメインは、天然配列であり得るか、2～10塩基対で分離された一対の9塩基対ハーフサイトを含む長さが約18塩基対の所定のDNA配列に結合するタンパク質を産生するように、合理的または実験的手段によって再設計されてもよい。例えば、米国特許第5,789,538号、同第5,925,523号、同第6,007,988号、同第6,013,453号、同第6,200,759号明細書、および国際公開第95/19431号、同第96/06166号、同第98/53057号、同第98/54311号、同第00/27878号、同第01/60970号、同第01/88197号、同第02/099084号パンフレットを参照されたく、これらの各々はその全体が参照により組み込まれる。この操作されたタンパク質ドメインをF o k Iヌクレアーゼなどのヌクレアーゼドメインに融合することにより、ゲノムレベルの特異性でDNA切断を標的化することが可能である。標的部位、ジンクフィンガータンパク質の選択、ならびにジンクフィンガーヌクレアーゼの設計および構築のための方法は、当業者に公知であり、米国特許出願公開第20030232410号、同第20050208489号、同第2005064474号、同第20050026157号、同第20060188987号明細書および国際公開第07/014275号パンフレットに詳細に記載されており、これらの各々は、その全体が参照により組み込まれる。ジンクフィンガーの場合、DNA結合ドメインは、典型的には、2～10塩基対の「スペーサ配列」によって分離された一対の9塩基対「ハーフサイト」を含む18bp認識配列を認識し、ヌクレアーゼによる切断は、平

30

40

50

滑末端または可変長の 5' オーバーハング（多くの場合、4 塩基対）を作り出す。「ジンクフィンガーヌクレアーゼ」という用語は、ジンクフィンガーヌクレアーゼスペーサ配列に隣接する上流および下流のハーフサイトに結合し、スペーサ配列内に切断部位を生成するために協調して働く、単一のジンクフィンガータンパク質、あるいは、一対のジンクフィンガータンパク質（すなわち、左 ZFN タンパク質および右 ZFN タンパク質）を指し得ることが理解されよう。所定の DNA 遺伝子座またはスペーサ配列が与えられると、上流および下流のハーフサイトは、当技術分野で公知の多くのプログラム（Mandell JG, Barbas CF 3rd. Zinc Finger Tools: custom DNA-binding domains for transcription factors and nucleases. *Nucleic Acids Res.* 2006 Jul 1; 34 (Web Server issue): W516-23）を使用して同定することができる。また、ジンクフィンガーヌクレアーゼ認識配列は、単一のジンクフィンガーヌクレアーゼタンパク質の DNA 結合配列（すなわち、ハーフサイト）、または代替的に、上流ハーフサイト、スペーサ配列、および下流ハーフサイトを含む DNA 配列として定義され得ることも理解されよう。

10

20

30

40

【0303】

本明細書で使用される場合、「CRISPRヌクレアーゼ」または「CRISPRシステムヌクレアーゼ」という用語は、ポリヌクレオチド中の認識部位にハイブリダイズすることによって関連エンドヌクレアーゼによる核酸切断を指示する、ガイドRNAと会合する Cas9 などの CRISPR（クラスター化して規則的な配置の短いパリンドロームリピート）関連（Cas）エンドヌクレアーゼまたはその変異体を指す。ある実施形態では、CRISPRヌクレアーゼはクラス2 CRISPR 酵素である。これらの実施形態のいくつかでは、CRISPRヌクレアーゼはクラス2のII型酵素、例えば Cas9 である。他の実施形態では、CRISPRヌクレアーゼは、クラス2のV型酵素、例えば Cpf1 である。ガイドRNAは、ダイレクトリピートと、標的認識部位に相補的なガイド配列（内因性 CRISPR システムの文脈ではしばしばスペーサと呼ばれる）とを含む。ある実施形態では、CRISPR システムは、ガイドRNA上に存在するダイレクトリピート（tracr-mite 配列と呼ばれることもある）に（完全にまたは部分的に）相補的である tracrRNA（トランス活性化 CRISPR RNA）をさらに含む。特定の実施形態では、CRISPRヌクレアーゼは、酵素が、標的ポリヌクレオチドの一本の鎖を切断する能力を欠き、ニッカーゼとして機能して、標的DNAの単一の鎖のみを切断するように、対応する野生型酵素に対して変異させることができる。ニッカーゼとして機能する CRISPR 酵素の非限定的な例としては、RuvC I 触媒ドメイン内に D10A 変異を有するか、または H840A、N854A もしくは N863A 変異を有する Cas9 酵素が挙げられる。所定の DNA 遺伝子座が与えられると、認識配列は、当技術分野で公知のいくつかのプログラム（Kornel Labun; Tessa G. Montague; James A. Gagnon; Summer B. Thyme; Eivind Valen. (2016). CHOPCHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering. *Nucleic Acids Research*; doi: 10.1093/nar/gkw398; Tessa G. Montague; Jose M. Cruz; James A. Gagnon; George M. Church; Eivind Valen. (2014). CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. *Nucleic Acids Res.* 42. W401-W407) を使用して同定することができる。

50

【0304】

本明細書で使用される場合、「鑄型核酸」は、細胞のゲノム内の切断部位に挿入されることが望ましい核酸（すなわち、ポリヌクレオチド）を指す。

【0305】

50

本明細書で使用される場合、タンパク質に関して「組換え」または「操作された」という用語は、タンパク質をコードする核酸およびタンパク質を発現する細胞または生物への遺伝子操作技術の適用の結果として変更されたアミノ酸配列を有することを意味する。核酸に関して、「組換え」または「操作された」という用語は、遺伝子操作技術の適用の結果として変更された核酸配列を有することを意味する。遺伝子操作技術には、限定するものではないが、PCRおよびDNAクローニング技術；トランスフェクション、形質転換および他の遺伝子移入技術；相同組換え；部位特異的突然変異誘発；および遺伝子融合が挙げられる。この定義によれば、天然に存在するタンパク質と同一のアミノ酸配列を有するが、異種宿主でのクローニングおよび発現によって産生されるタンパク質は、組換えまたは操作されていると見なされない。

10

【0306】

本明細書で使用される場合、「野生型」という用語は、野生型対立遺伝子によってコードされるポリペプチドがその元の機能を有する、同じタイプの遺伝子の対立遺伝子集団における最も一般的な天然対立遺伝子（すなわち、ポリヌクレオチド配列）を指す。「野生型」という用語はまた、野生型対立遺伝子によってコードされるポリペプチドを指す。野生型対立遺伝子（すなわち、ポリヌクレオチド）およびポリペプチドは、野生型配列と比較して1つまたは複数の突然変異および／または置換を含む突然変異体または変異体の対立遺伝子およびポリペプチドとは区別可能である。野生型対立遺伝子またはポリペプチドは生物において正常な表現型を付与することができるが、突然変異体または変異体の対立遺伝子またはポリペプチドは、場合によっては、変更された表現型を付与し得る。野生型ヌクレアーゼは、組換えヌクレアーゼまたは天然に存在しないヌクレアーゼと区別可能である。「野生型」という用語はまた、特定の遺伝子の野生型対立遺伝子を有する細胞、生物、および／または対象、または比較目的で使用される細胞、生物、および／または対象を指すことができる。

20

【0307】

本明細書で使用される場合、「遺伝子改変」という用語は、ゲノムDNA配列が組換え技術によって意図的に改変されている、またはその先祖においてゲノムDNA配列が組換え技術によって意図的に改変されている細胞または生物を指す。本明細書で使用される場合、「遺伝子改変」という用語は、「遺伝子導入」という用語を包含する。

【0308】

組換えタンパク質に関して本明細書で使用される場合、「改変」という用語は、参照配列（例えば、野生型配列または天然配列）に対する組換え配列内のアミノ酸残基の任意の挿入、欠失、または置換を意味する。

30

【0309】

本明細書で使用される場合、「認識配列」または「認識部位」という用語は、ヌクレアーゼによって結合および切断されるDNA配列を指す。メガヌクレアーゼの場合、認識配列は、4塩基対によって分離された一対の逆位9塩基対「ハーフサイト」を含む。単鎖メガヌクレアーゼの場合、タンパク質のN末端ドメインは第1のハーフサイトと接触し、タンパク質のC末端ドメインは第2のハーフサイトと接触する。メガヌクレアーゼによる切断は、4塩基対の3'オーバーハングを生じる。「オーバーハング」または「粘着末端」は、二本鎖DNA配列のエンドヌクレアーゼ切断によって生成することができる短い一本鎖DNAセグメントである。I-CreI由来のメガヌクレアーゼおよび単鎖メガヌクレアーゼの場合、オーバーハングは、22塩基対の認識配列の塩基10～13を含む。コンパクトTALENの場合、認識配列は、I-TevIドメインによって認識される第1のC N N G N配列、それに続く長さ4～16塩基対の非特異的スペーサ、それに続くTALE-エフェクタードメインによって認識される長さ16～22bpの第2の配列（この配列は典型的には5'T塩基を有する）を含む。コンパクトTALENによる切断は、2塩基対の3'オーバーハングを生じる。CRISPRヌクレアーゼの場合、認識配列は、ガイドRNAが結合して切断を指示する、典型的には16～24塩基対の配列である。ガイド配列と認識配列との間の完全な相補性は、切断をもたらすために必ずしも必要ではない

40

50

。C R I S P Rヌクレアーゼによる切断は、C R I S P Rヌクレアーゼに応じて、平滑末端（例えばクラス2、I I型C R I S P Rヌクレアーゼによる）またはオーバーハング末端（例えばクラス2、V型C R I S P Rヌクレアーゼによる）を生じ得る。C p f I C R I S P Rヌクレアーゼが利用される実施形態では、C p f I C R I S P Rヌクレアーゼを含むC R I S P R複合体による切断は、5'オーバーハングをもたらす。ある実施形態では、5'ヌクレオチドの5'オーバーハングをもたらす。各C R I S P Rヌクレアーゼ酵素はまた、ガイドRNAに相補的な認識配列の近くにあるPAM（プロトスペーサ隣接モチーフ）配列の認識も必要とする。PAMの正確な配列、長さ要件、および標的配列からの距離は、C R I S P Rヌクレアーゼ酵素に応じて異なるが、PAMは、典型的には、標的／認識配列に隣接する2～5塩基対の配列である。特定のC R I S P Rヌクレアーゼ酵素に対するPAM配列は当技術分野で公知であり（例えば、米国特許第8,697,359号および米国特許出願公開第20160208243号明細書を参照されたい、これらの各々は、参照によりその全体が組み込まれる）、新規または操作されたC R I S P Rヌクレアーゼ酵素に対するPAM配列は、PAM枯渇アッセイなどの当技術分野で公知の方法を使用して同定することができる（例えば、Karvelis et al. (2017) Methods 121-122:3-8を参照されたい、当該文献はその全体が本明細書に組み込まれる）。ジンクフィンガーの場合、DNA結合ドメインは、典型的には、2～10塩基対によって分離された一対の9塩基対「ハーフサイト」を含む18bpの認識配列を認識し、ヌクレアーゼによる切断は、平滑末端または可変長の5'オーバーハング（多くの場合、4塩基対）を作り出す。

10

20

【0310】

本明細書で使用される場合、「標的部位」または「標的配列」という用語は、ヌクレアーゼの認識配列を含む細胞の染色体DNAの領域を指す。

【0311】

本明細書で使用される場合、「DNA結合親和性」または「結合親和性」という用語は、ヌクレアーゼが参照DNA分子（例えば、認識配列または任意の配列）と非共有結合する傾向を意味する。結合親和性は、解離定数K_dによって測定される。本明細書で使用される場合、参照認識配列に対するヌクレアーゼのK_dが、参照ヌクレアーゼに対して統計的に有意なパーセント変化で増加または減少する場合、ヌクレアーゼは「変更された」結合親和性を有する。

30

【0312】

本明細書で使用される場合、「特異性」という用語は、認識配列と呼ばれる塩基対の特定の配列においてのみ、または認識配列の特定のセットにおいてのみ、ヌクレアーゼが二本鎖DNA分子に結合して切断する能力を意味する。認識配列のセットは、特定の保存された位置または配列モチーフを共有するが、1つまたは複数の位置で縮重し得る。高度に特異的なヌクレアーゼは、1つのみまたはごく少数の認識配列を切断することができる。特異性は、当技術分野で公知の任意の方法によって決定することができる。

【0313】

本明細書で使用される場合、「相同組換え」または「HR」という用語は、二本鎖DNA切断が、修復鋳型として相同DNA配列を使用して修復される天然の細胞プロセスを指す（例えば、Cahill et al. (2006), Front. Biosci. 11:1958-1976を参照されたい）。相同DNA配列は、細胞に送達された内因性染色体配列または外因性核酸であり得る。

40

【0314】

本明細書で使用される場合、「非相同末端結合」または「NHEJ」という用語は、二本鎖DNA切断が2つの非相同DNAセグメントの直接結合によって修復される天然の細胞プロセスを指す（例えば、Cahill et al. (2006), Front. Biosci. 11:1958-1976を参照されたい）。非相同末端結合によるDNA修復はエラーを起こしやすく、修復部位でのDNA配列の鋳型なしの付加または欠失を頻繁にもたらす。いくつかの例では、標的認識配列での切断が、標的認識部位においてNH

50

E J)をもたらす。遺伝子のコード配列中の標的部位のヌクレアーゼ誘導切断とそれに続くNHEJによるDNA修復は、遺伝子機能を破壊する突然変異、例えばフレームシフト突然変異をコード配列に導入し得る。したがって、操作されたヌクレアーゼを使用して、細胞集団中の遺伝子を効果的にノックアウトすることができる。

【0315】

本明細書で使用される場合、「破壊された」または「破壊する」または「発現を破壊する」または「標的配列を破壊すること」という用語は、遺伝子機能に干渉し、ポリペプチド／それによってコードされる発現産物の発現および／または機能を妨げる突然変異（例えばフレームシフト突然変異）の導入を指す。例えば、遺伝子のヌクレアーゼ媒介破壊は、切断型タンパク質の発現および／または野生型機能を保持しないタンパク質の発現をもたらし得る。さらに、遺伝子への鋳型核酸の導入は、コードされたタンパク質の非発現、切断型タンパク質の発現、および／または野生型機能を保持していないタンパク質の発現をもたらし得る。

10

【0316】

本明細書で使用される場合、「キメラ抗原受容体」または「CAR」という用語は、免疫エフェクター細胞（例えば、ヒトT細胞）上に抗原に対する特異性を付与または移植する操作された受容体を指す。キメラ抗原受容体は、少なくとも1つの細胞外リガンド結合ドメインまたは部分、膜貫通ドメイン、ならびに1つまたは複数のシグナル伝達ドメインおよび／または共刺激ドメインを含む細胞内ドメインを含む。

20

【0317】

いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインまたは部分は、抗体または抗体断片である。これに関連して、「抗体断片」という用語は、抗原のエピトープと、（例えば、結合、立体障害、安定化／不安定化、空間分布によって）特異的に相互作用する能力を保持する、抗体の少なくとも一部を指すことができる。抗体断片の例には、限定するものではないが、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv断片、scFv抗体断片、ジスルフィド結合Fv(sdFv)、VHおよびCH1ドメインからなるFd断片、線状抗体、単ドメイン抗体、例えばsdAb(VLまたはVHのいずれか)、ラクダ科VHHドメイン、抗体断片から形成された多重特異性抗体、例えばヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む二価断片、および抗体の単離されたCDRまたは他のエピトープ結合断片が含まれる。抗原結合断片はまた、単ドメイン抗体、マキシボディ、ミニボディ、ナノボディ、イントラボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、v-NARおよびビス-scFvに組み込むことができる（例えば、Hollinger and Hudson, Nature Biotechnology 23:1126-1136, 2005を参照されたい）。抗原結合断片はまた、III型フィブロネクチン(Fn3)などのポリペプチドに基づく足場に移植することもできる（フィブロネクチンポリペプチドミニボディを記載する米国特許第6,703,199号明細書を参照されたい）。

30

【0318】

いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインまたは部分は、特定のエピトープまたは抗原（例えば、がん細胞または他の疾患を引き起こす細胞もしくは粒子などの、細胞表面に優先的に存在するエピトープまたは抗原）に対する特異性を提供する、モノクローナル抗体に由来する単鎖可変断片(scFv)の形態である。いくつかの実施形態では、scFvは、リンカー配列を介して結合している。いくつかの実施形態では、scFvは、ネズミ、ヒト化、または完全ヒトである。

40

【0319】

キメラ抗原受容体の細胞外リガンド結合ドメインはまた、Bリンパ球上の自己抗原特異的B細胞受容体によって認識され得る自己抗原を含むことができ(Payne et al., (2016), Science 353(6295):179-184を参照されたい)、したがって抗体媒介自己免疫疾患において自己反応性Bリンパ球を特異的に標的化して殺滅するようにT細胞に指示する。このようなCARはキメラ自己抗体受容体(CAA

50

R)と呼ぶことができ、それらの使用は本発明に包含される。キメラ抗原受容体の細胞外リガンド結合ドメインはまた、目的の抗原に対する天然に存在するリガンド、または目的の抗原に結合する能力を保持する天然に存在するリガンドの断片を含むことができる。

【0320】

細胞内刺激ドメインは、抗原結合後に活性化シグナルをT細胞に伝達する1つまたは複数の細胞質シグナル伝達ドメインを含み得る。このような細胞質シグナル伝達ドメインとしては、限定するものではないが、CD3ゼータシグナル伝達ドメインを挙げることができる。

【0321】

細胞内刺激ドメインはまた、リガンド結合後に増殖および／または細胞生存シグナルを伝達する1つまたは複数の細胞内共刺激ドメインを含み得る。このような細胞内共刺激ドメインは、当技術分野で公知のもののいずれかであり得、限定するものではないが、例えば、Novel6などの国際公開第2018/067697号パンフレットに開示されている共刺激ドメインを挙げることができる。共刺激ドメインのさらなる例としては、4-1BB(CD137)、CD27、CD28、CD8、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83と特異的に結合するリガンド、またはそれらの任意の組み合わせを挙げることができる。

【0322】

キメラ抗原受容体は、ヒンジまたはスペーサ配列を介して細胞外リガンド結合ドメインに結合している膜貫通ドメインを含む、さらなる構造エレメントをさらに含む。膜貫通ドメインは、任意の膜結合タンパク質または膜貫通タンパク質に由来し得る。例えば、膜貫通ポリペプチドは、T細胞受容体(例えば、CD3複合体を構成する α 、 β 、 γ または δ ポリペプチド)、IL2受容体p55(α 鎖)、p75(β 鎖)もしくは γ 鎖、Fc受容体(例えば、Fc γ 受容体III)のサブユニット鎖、またはCD8アルファ鎖などのCDタンパク質のサブユニットであり得る。ある例では、膜貫通ドメインは、CD8アルファドメインである。あるいは、膜貫通ドメインは合成であり得、ロイシンおよびバリンなどの疎水性残基を主に含み得る。

【0323】

ヒンジ領域は、膜貫通ドメインを細胞外リガンド結合ドメインに連結するように機能する任意のオリゴペプチドまたはポリペプチドを指す。例えば、ヒンジ領域は、最大300個のアミノ酸、好ましくは10~100個のアミノ酸、最も好ましくは25~50個のアミノ酸を含み得る。ヒンジ領域は、天然に存在する分子の全部もしくは一部、例えばCD8、CD4もしくはCD28の細胞外領域の全部もしくは一部、または抗体定常領域の全部もしくは一部に由来し得る。あるいは、ヒンジ領域は、天然に存在するヒンジ配列に対応する合成配列であってもよく、または完全に合成されたヒンジ配列であってもよい。特定の例では、ヒンジドメインは、ヒトCD8アルファ鎖、Fc γ RIIIa受容体またはIgG1の一部を含み得る。ある例では、ヒンジ領域はCD8アルファドメインであり得る。

【0324】

本明細書で使用される場合、「外因性T細胞受容体」または「外因性TCR」という用語は、その配列が免疫細胞(例えば、ヒトT細胞)のゲノムに導入されるTCRを指し、TCRは内因的に発現されてもされなくてもよい。免疫細胞上の外因性TCRの発現は、特定のエピトープまたは抗原(例えば、がん細胞または他の疾患を引き起こす細胞もしくは粒子の表面に優先的に存在するエピトープまたは抗原)に対する特異性を付与することができる。このような外因性T細胞受容体は、アルファ鎖およびベータ鎖を含むことができ、あるいはガンマ鎖およびデルタ鎖を含むことができる。本発明において有用な外因性TCRは、目的の任意の抗原またはエピトープに対する特異性を有し得る。

【0325】

本明細書で使用される場合、「HLAクラスI組織適合抗原、アルファ鎖E融合タンパ

10

20

30

40

50

ク質」または「HLA-E融合タンパク質」という用語は、細胞表面上でのHLA-Eタンパク質の発現を可能にする少なくとも1つのさらなるタンパク質に融合したHLA-Eタンパク質を含むタンパク質を指す。HLA-Eタンパク質としては、例えば、HLA-E-01:01またはHLA-E-01:03タンパク質（例えば、配列番号118）を挙げることができる。HLA-E融合タンパク質は、例えば、細胞表面上でのHLA-Eタンパク質の発現を可能にするベータ-2ミクログロブリンタンパク質（例えば、配列番号119）に融合したHLA-Eタンパク質を含み得る。さらなる例では、HLA-E融合タンパク質は、ベータ-2ミクログロブリンタンパク質と、例えば、HLA-Gリーダーペプチド（例えば、配列番号120）および当技術分野で公知の他のものなどの提示のためにHLA-Eタンパク質にロードされるさらなるタンパク質との両方に融合したHLA-Eタンパク質を含み得る。HLA-E融合タンパク質のタンパク質は、ポリペプチドリンカー、例えば、配列番号121（すなわち、（GGGGS）3リンカー）または配列番号122（すなわち、（GGGGS）4リンカー）などを含むリンカーによって融合され得る。

10

【0326】

本明細書で使用される場合、標的タンパク質（すなわち、内因的に発現されるタンパク質）に関して「発現低下」という用語は、対照細胞と比較した場合の、遺伝子改変細胞による内因性タンパク質の発現の任意の低下を指す。低下したという用語はまた、対照細胞集団と比較した場合の、本開示のshRNAmiRによって標的化される内因性タンパク質を野生型レベルで発現する細胞の、細胞集団中のパーセンテージの低下を指すことができる。標的内因性タンパク質を完全に発現する細胞の、集団中のパーセンテージのこのような低下は、最大5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または最大100%であり得る。本開示の文脈において、「低下した」という用語は、標的または内因性タンパク質の部分的または不完全なノックダウンを包含し、ヌクレアーゼによる遺伝子不活性化によって達成されるものなどの完全なノックダウンとは区別されることが理解されよう。

20

【0327】

本明細書で使用される場合、アミノ酸配列および核酸配列の両方に関して、「同一性パーセント」、「配列同一性」、「類似性パーセンテージ」、「配列類似性」などの用語は、アライメントしたアミノ酸残基またはヌクレオチド間の類似性を最大にし、同一または類似の残基またはヌクレオチドの数、残基またはヌクレオチドの総数、ならびに配列アライメントにおけるギャップの存在および長さの関数である、配列のアライメントに基づく2つの配列の類似性の程度の尺度を指す。標準的なパラメータを使用して配列類似性を決定するために、さまざまなアルゴリズムおよびコンピュータプログラムが利用可能である。本明細書で使用される場合、配列類似性は、アミノ酸配列についてのBLASTpプログラムおよび核酸配列についてのBLASTnプログラムを使用して測定され、これらは両方とも国立生物工学情報センターを介し利用可能であり（www.ncbi.nlm.nih.gov/）、例えば、Altschul et al. (1990), J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish and States (1993), Nature Genet. 3:266-272; Madden et al. (1996), Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul et al. (1997), Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang et al. (2000), J. Comput. Biol. 7 (1-2):203-14に記載されている。本明細書で使用される場合、2つのアミノ酸配列の類似性パーセントは、BLASTpアルゴリズムについての以下のパラメータに基づくスコアである：ワードサイズ=3；ギャップオープニングペナルティ=-11；ギャップ拡張ペナルティ=-1；およびスコア行列=BLOSUM62。本明細書で使用される場合、2つの核酸配列の類似性パーセントは、BLASTnアルゴリズムについての以下のパラメータに基づくスコアである：ワードサイズ=11；ギャップオープニングペナルティ=5；ギャップ拡張ペナルティ=2；マッチリワード=1；およびミスマッチペ

30

40

50

ナルティ＝－３。

【０３２８】

本明細書で使用される場合、２つのタンパク質またはアミノ酸配列の改変に関する「に対応する」という用語は、第１のタンパク質の指定の改変が第２のタンパク質の改変と同じアミノ酸残基の置換であること、および２つのタンパク質が標準的な配列アラインメントに（例えば、ＢＬＡＳＴプログラムを使用して）供される場合、第１のタンパク質の改変のアミノ酸位置が第２のタンパク質の改変のアミノ酸位置に対応するか整列することを示すために使用される。したがって、第１のタンパク質における残基「X」のアミノ酸「A」への改変は、残基XおよびYが配列アラインメントにおいて互いに対応する場合、XおよびYが異なる数であり得るという事実にもかかわらず、第２のタンパク質における残基「Y」のアミノ酸「A」への改変に対応する。

10

【０３２９】

本明細書で使用される場合、「T細胞受容体アルファ遺伝子」または「TCRアルファ遺伝子」という用語は、T細胞受容体アルファサブユニットをコードするT細胞内の遺伝子座を指す。T細胞受容体アルファ遺伝子は、再編成の前後に、NCBI遺伝子ID番号6955を指し得る。再編成に続いて、T細胞受容体アルファ遺伝子は、内因性プロモータ、再編成されたVセグメントおよびJセグメント、内因性スプライスドナー部位、イントロン、内因性スプライスアクセプター部位、ならびにサブユニットコードエクソンを含むT細胞受容体アルファ定常領域遺伝子座を含む。

【０３３０】

本明細書で使用される場合、「T細胞受容体アルファ定常領域」または「TCRアルファ定常領域」という用語は、T細胞受容体アルファ遺伝子のコード配列を指す。TCRアルファ定常領域は、NCBI遺伝子ID番号28755によって同定される野生型配列およびその機能的変異体を含む。

20

【０３３１】

本明細書で使用される場合、「T細胞受容体ベータ遺伝子」または「TCRベータ遺伝子」という用語は、T細胞受容体ベータサブユニットをコードするT細胞内の遺伝子座を指す。T細胞受容体ベータ遺伝子は、NCBI遺伝子ID番号6957を指し得る。

【０３３２】

本明細書で使用される場合、「組換えDNA構築物」、「組換え構築物」、「カセット」、「発現カセット」、「発現構築物」、「キメラ構築物」、「構築物」、および「組換えDNA断片」という用語は、本明細書で互換的に使用され、一本鎖または二本鎖ポリヌクレオチドである。組換え構築物は、限定するものではないが、天然には一緒に見られない調節配列およびコード配列を含む核酸断片の人工的な組み合わせを含む。例えば、組換えDNA構築物は、異なる供給源に由来する調節配列およびコード配列、または同じ供給源に由来し、天然に見られるものとは異なる様式で編成された調節配列およびコード配列を含み得る。このような構築物は、単独で使用されてもよく、またはベクターと併せて使用されてもよい。

30

【０３３３】

本明細書で使用される場合、「ベクター」または「組換えDNAベクター」という用語は、所与の宿主細胞においてポリペプチドコード配列の転写および翻訳が可能な複製システムおよび配列を含む構築物であり得る。ベクターが使用される場合、ベクターの選択は、当業者に周知のように、宿主細胞を形質転換するために使用される方法に依存する。ベクターとしては、限定するものではないが、プラスミドベクターおよび組換えAAVベクター、または遺伝子を標的細胞に送達するのに適した当技術分野で公知の任意の他のベクターを挙げることができる。当業者は、本発明の単離されたヌクレオチドまたは核酸配列のいずれかを含む、宿主細胞の形質転換、選択および増殖を成功させるためにベクター上に存在しなければならない遺伝子エレメントを十分に認識している。

40

【０３３４】

本明細書で使用される場合、「ベクター」はウイルスベクター（すなわち、組換えウイ

50

ルス)を指すこともできる。ウイルスベクターとしては、限定するものではないが、レトロウイルスベクター(すなわち、組換えレトロウイルス)、レンチウイルスベクター(すなわち、組換えレンチウイルス)、アデノウイルスベクター(すなわち、組換えアデノウイルス)、およびアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)(すなわち、組換えAAV)を挙げることができる。

【0335】

本明細書で使用される場合、「免疫細胞」という用語は、免疫系(自然および/または適応)の一部であり、造血起源の任意の細胞を指す。免疫細胞の非限定的な例としては、リンパ球、B細胞、T細胞、単球、マクロファージ、樹状細胞、顆粒球、巨核球、単球、マクロファージ、ナチュラルキラー細胞、骨髄系由来サブレッサー細胞、自然リンパ球系細胞、血小板、赤血球、胸腺細胞、白血球、好中球、肥満細胞、好酸球、好塩基球および顆粒球が挙げられる。

10

【0336】

本明細書で使用される場合、「ヒトT細胞」または「T細胞」または「単離ヒトT細胞」は、ドナー、特にヒトドナーから単離されたT細胞を指す。T細胞およびそれに由来する細胞には、培養で継代されていない単離T細胞、不死化せずに細胞培養条件下で継代および維持されたT細胞、ならびに不死化され、細胞培養条件下で無期限に維持され得るT細胞が含まれる。

【0337】

本明細書で使用される場合、「ヒトNK細胞」または「NK細胞」は、ドナー、特にヒトドナーから単離されたNK細胞を指す。NK細胞およびそれに由来する細胞には、培養で継代されていない単離NK細胞、不死化せずに細胞培養条件下で継代および維持されたNK細胞、ならびに不死化され、細胞培養条件下で無期限に維持され得るNK細胞が含まれる。

20

【0338】

本明細書で使用される場合、「ヒトB細胞」または「B細胞」は、ドナー、特にヒトドナーから単離されたB細胞を指す。B細胞およびそれに由来する細胞には、培養で継代されていない単離T細胞、不死化せずに細胞培養条件下で継代および維持されたB細胞、ならびに不死化され、細胞培養条件下で無期限に維持され得るB細胞が含まれる。

【0339】

本明細書で使用される場合、「対照」または「対照細胞」という用語は、遺伝子改変細胞の遺伝子型または表現型の変化を測定するための基準点を提供する細胞を指す。対照細胞は、例えば、(a)野生型細胞、すなわち、遺伝子改変細胞をもたらした遺伝子変更のための出発物質と同じ遺伝子型の野生型細胞；(b)遺伝子改変細胞と同じ遺伝子型であるが、ヌル構築物を用いて(すなわち、目的の形質に公知の影響を及ぼさない構築物を用いて)形質転換された細胞；または(c)遺伝子改変細胞と遺伝的に同一であるが、変更された遺伝子型または表現型の発現を誘導する条件もしくは刺激またはさらなる遺伝子改変に曝露されていない細胞を含み得る。

30

【0340】

本明細書で使用される場合、「治療」または「対象を治療する」という用語は、疾患を有する対象への本発明の遺伝子改変免疫細胞または遺伝子改変免疫細胞の集団の投与を指す。例えば、対象はがんなどの疾患を有することができ、治療は疾患を治療するための免疫療法を表し得る。治療の望ましい効果としては、限定するものではないが、疾患の発症または再発の予防、症状の緩和、疾患の任意の直接的または間接的な病理学的結果の減少、疾患進行の速度の低下、疾患状態の改善または緩和、および寛解または予後の改善が挙げられる。いくつかの態様では、本明細書に記載の遺伝子改変免疫細胞または遺伝子改変免疫細胞の集団は、治療中に本発明の医薬組成物の形態で投与される。

40

【0341】

「有効量」または「治療有効量」という用語は、有益または望ましい生物学的および/または臨床的結果をもたらすのに十分な量を指す。治療有効量は、使用される製剤または

50

組成物、疾患およびその重症度、ならびに治療される対象の年齢、体重、体調および応答性に応じて変化する。特定の実施形態では、有効量の本発明の遺伝子改変免疫細胞もしくは遺伝子改変免疫細胞の集団、または本明細書に開示の医薬組成物は、対象における疾患の少なくとも1つの症状を軽減する。疾患ががんである実施形態では、本明細書に開示の医薬組成物の有効量は、がんの増殖もしくは転移のレベルを低下させ、がんの部分的もしくは完全な応答もしくは寛解を引き起こし、または対象におけるがんの少なくとも1つの症状を軽減する。

【0342】

本明細書で使用される場合、「がん」という用語は、悪性の増殖または腫瘍を引き起こす異常で制御されない細胞分裂を特徴とする任意の新生物性疾患（浸潤性または転移性にかかわらず）を包含すると理解されるべきである。

10

【0343】

本明細書で使用される場合、「癌腫」という用語は、上皮細胞で構成される悪性増殖を指す。

【0344】

本明細書で使用される場合、「白血病」という用語は、造血器官／造血系の悪性腫瘍を指し、一般に、血液および骨髄における白血球およびその前駆体の異常な増殖および発達を特徴とする。

【0345】

本明細書で使用される場合、「肉腫」という用語は、胚性結合組織のような物質で構成され、一般に線維性、不均一または均一な物質に埋め込まれた密集した細胞で構成される腫瘍を指す。

20

【0346】

本明細書で使用される場合、「黒色腫」という用語は、皮膚および他の器官のメラニン細胞系から生じる腫瘍を指す。

【0347】

本明細書で使用される場合、「リンパ腫」という用語は、リンパ球から発生する血液細胞腫瘍の群を指す。

【0348】

本明細書で使用される場合、「芽細胞腫」という用語は、前駆細胞または芽球（未成熟または胚性組織）の悪性腫瘍によって引き起こされるがんのタイプを指す。

30

【0349】

本明細書で使用される場合、変数の数値範囲の列挙は、その範囲内の値のいずれかに等しい変数で本発明が実施され得ることを伝えることを意図している。したがって、本質的に離散的な変数の場合、この変数は、範囲の終点を含む数値範囲内の任意の整数値に等しくなり得る。同様に、本質的に連続的な変数の場合、この変数は、範囲の終点を含む数値範囲内の任意の実数値に等しくなり得る。例として、限定するものではないが、0と2との間の値を有すると記載されている変数は、その変数が本質的に離散的である場合、0、1または2の値をとることができ、その変数が本質的に連続的である場合、0.0、0.1、0.01、0.001の値、または0以上2以下の任意の他の実数値をとることができる。

40

【0350】

2.1 発明の原理

本発明は、一部には、マイクロRNA適合shRNA (shRNAmiR) 分子が、内因性タンパク質の発現の安定した低下を有する遺伝子改変免疫細胞を作製するために使用することができるという発見に基づく。本明細書では、shRNAmiRをコードする核酸配列をT細胞のゲノムに挿入することにより、例えば、ベーター2ミクログロブリン (B2M)、CS1、トランスフォーミング増殖因子ベータ受容体II (TGFB2)、Cbl癌原遺伝子B (CBL-B)、デオキシシチジンキナーゼ (DCK)、グルココルチコイド (GR)、および分化抗原群52 (CD52) の安定かつ効果的なノックダウン

50

を含む、一連の内因性タンパク質の安定なノックダウンが提供されることが実証される。内因性タンパク質のノックダウンは、いくつかの例では、遺伝子不活性化によるノックアウトと比較して有利であり得る特性を付与し得る。例えば、shRNA miRによるB2Mノックダウンは、B2Mの完全なノックアウトを示すCAR T細胞よりも同種異系でなく、ナチュラルキラー（NK）細胞による殺滅を受けにくいCAR T細胞を産生する。さらに、免疫細胞のゲノムへのshRNA miR分子の組み込みは、shRNA分子をコードするカセットの挿入により観察される安定性および毒性の問題を解決することが実証されている。

【0351】

shRNA miR分子が複数の内因性タンパク質の発現を低下させるために使用され得るという実証を考慮すると、本開示の組成物および方法は、免疫細胞内のB2Mタンパク質だけでなく任意の目的の内因性タンパク質の発現をさまざまな程度で安定にノックダウンするために使用することができる。

【0352】

2.2 マイクロRNA適応shRNA (shRNA miR)

RNA干渉 (RNAi) またはRNAサイレンシングは、遺伝子発現がマイクロRNAなどの非コードRNAによって負に調節されるプロセスを指す。負の調節は、以下の3つの可能な機序のうちの1つまたは複数により生じ得る：(1) 標的mRNAの翻訳を抑制することによる、(2) 転写産物の脱アデニル化および不安定化による、および(3) mRNAの切断および分解による。RNAiは、通常、二本鎖RNA (dsRNA) または内因性マイクロRNA前駆体 (pri-miRNA / pre-miRNA) によって誘発される。

【0353】

内因性マイクロRNA分子の生成は、RNAポリメラーゼII (Pol II) プロモータからの一次miRNA (pri-miRNA) の転写から始まる。各pri-miRNAは、1~6個のpre-miRNAを含有し得る。pre-miRNAは、約70ヌクレオチドで構成されるヘアピンループ構造であり、各ヘアピンは、効率的なプロセッシングに必要な配列に隣接している。酵素Droshaは、ヘアピン塩基から約11ヌクレオチドのRNAを切断することによって、pri-miRNAからヘアピンを遊離させる。Drosha切断によって生成されるpre-miRNAは、3'末端に2ヌクレオチドのオーバーハングを含む。この2ヌクレオチドのオーバーハングは、核から細胞質へのpre-miRNAの搬出を媒介するExportin-5タンパク質によって結合される。細胞質において、pre-miRNAヘアピンは、ヘアピンの5'末端および3'末端との相互作用を介してDicerによって切断される。Dicerは、pre-miRNAヘアピンをループ領域において切断して、約22ヌクレオチド長である不完全なmiRNA:miRNA二重鎖を生成する。miRNA:miRNA二重鎖 (成熟miRNA) の単一の鎖は、miRNAおよびそのmRNA標的が相互作用するRNA誘導サイレンシング複合体 (RISC) に組み込まれる。

【0354】

その発見以来、RNAiは、哺乳動物細胞における遺伝子発現を抑制するための強力な遺伝子ツールとして浮上した。遺伝子ノックダウンは、pre-miRNAを模倣し、Dicerによってプロセッシングされ、RISCに供給される合成短鎖ヘアピンRNA (shRNA) の発現によって達成され得る。しかしながら、本明細書に記載のように、shRNAは、免疫細胞におけるタンパク質発現を長期低下させることができない。対照的に、本発明のマイクロRNA適応shRNA (shRNA miR) 分子の発現は、タンパク質発現の持続的な低下および毒性効果の低下をもたらす。shRNA miR分子は、それらが効率的なプロセッシングに必要な配列に隣接するヘアピンを含むという点でpri-miRNA分子を模倣し、Drosha酵素によってpri-miRNAにプロセッシングされ、細胞質に輸送され、Dicerによって切断され、その後、成熟miRNAがRISCに入ることができる。

【0355】

本発明は、内因性タンパク質の存在量を減少させる、shRNAmiR分子を発現する遺伝子改変免疫細胞を提供する。

【0356】

shRNAmiR分子は、shRNAmiR分子の構造が天然に存在するマイクロRNA（またはpri-miRNAもしくはpre-miRNA）またはその変異体の構造を模倣することができるという点で、マイクロRNA足場を含むことができる。マイクロRNA（ならびにpri-miRNAおよびpre-miRNA）の配列は、当技術分野で公知である。本開示のshRNAmiRのための好適なmiR足場の非限定的な例としては、miR-E、miR-30（例えば、miR-30a）、miR-15、miR-16、miR-155、miR-22、miR-103およびmiR-107が挙げられる。特定の実施形態では、本開示の組成物および方法で使用されるshRNAmiRは、miR-E足場を含む。miR-E足場は、miR-30aの合成由来変異体であり、その起源は国際公開第2014/117050号パンフレットに記載されており、当該文献は参照によりその全体が組み込まれる。

【0357】

本開示のshRNAmiR分子は、5'から3'方向に以下のドメインを含み得る：（a）5' miR足場ドメイン；（b）5' miR基底ステムドメイン；（c）パッセンジャー鎖；（d）miRループドメイン；（e）ガイド鎖；（f）3' miR基底ステムドメイン；および（g）3' miR足場ドメイン。miR足場ドメインおよび基底ステムドメインは、miRNAステムループに隣接し、本明細書では、マイクロRNAプロセシングエレメント（一次マイクロRNAまたは前駆体マイクロRNAからの成熟マイクロRNAの生成に寄与する最小核酸配列）を含むマイクロRNA隣接配列と称される。多くの場合、これらのエレメントは、マイクロRNAステムループ構造に隣接する40ヌクレオチド配列内に位置する。いくつかの例では、マイクロRNAプロセシングエレメントは、マイクロRNAステムループ構造に隣接する5～4,000ヌクレオチド長のヌクレオチド配列のストレッチ内に見出される。

【0358】

いくつかの実施形態では、miRNA隣接配列は、約3～約4,000 nt長であり、shRNAmiR分子の5'末端および3'末端のいずれか、または両方に存在し得る。他の実施形態では、shRNAmiR分子のマイクロRNA隣接配列の最小長は、約10、約20、約30、約40、約50、約60、約70、約80、約90、約100、約125、約126、約127、約128、約129、約130、約131、約132、約133、約134、約135、約136、約137、約138、約139、約140、約150、約200、およびその間の任意の整数である。他の実施形態では、shRNAmiR分子のマイクロRNA隣接配列の最大長は、約2,000、約2,100、約2,200、約2,300、約2,400、約2,500、約2,600、約2,700、約2,800、約2,900、約3,000、約3,100、約3,200、約3,300、約3,400、約3,500、約3,600、約3,700、約3,800、約3,900、約4,000、およびそれらの間の任意の整数である。

【0359】

マイクロRNA隣接配列は、天然マイクロRNA隣接配列または人工マイクロRNA隣接配列であり得る。天然マイクロRNA隣接配列は、マイクロRNA配列と共に天然に存在する系内に通常含まれるヌクレオチド配列である（すなわち、これらの配列は、インビボで最小マイクロRNAヘアピンを取り囲むゲノム配列内に見出される）。人工マイクロRNA隣接配列は、天然に存在する系においてマイクロRNA配列に隣接していることが見出されないヌクレオチド配列である。人工マイクロRNA隣接配列は、他のマイクロRNA配列との関連において天然に見出される隣接配列であり得る。あるいは、それらは、天然に存在する隣接配列内に見出され、天然には隣接配列として存在しないか、または天然の隣接配列として部分的にのみ存在する他のランダム核酸配列に挿入される最小のマイ

クロRNAプロセシングエレメントから構成され得る。

【0360】

いくつかの実施形態では、5' miR足場ドメインは、約10～約150ヌクレオチド長であり、限定するものではないが、約10、約20、約30、約40、約50、約60、約70、約80、約90、約100、約110、約120、約130、約140および約150ヌクレオチド長を含む。これらの実施形態のいくつかでは、5' miR足場ドメインは約111ヌクレオチド長である。5' miR足場ドメインは、IIS型制限酵素に対する認識配列である3'配列を含み得る。これらの実施形態のいくつかでは、5' miR足場ドメインは、その3'末端にXhoI認識配列を含む。特定の実施形態では、5' miR足場ドメインは、配列番号1として示される配列と少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、またはそれを超える配列同一性を有する。ある実施形態では、5' miR足場ドメインは、配列番号1として示される配列を有する。

10

【0361】

shRNAmiRの5' miR基底ステムドメインは約5～約30ヌクレオチド長であり得、いくつかの実施形態では、限定するものではないが、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29および約30ヌクレオチド長を含む。これらの実施形態のいくつかでは、5' miR基底ステムドメインは約20ヌクレオチド長である。特定の実施形態では、5' miR基底ステムドメインは、配列番号2として示される配列と少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、またはそれを超える配列同一性を有する。ある実施形態では、5' miR基底ステムドメインは、配列番号2として示される配列を有する。

20

30

【0362】

本開示の組成物および方法のshRNAmiR分子は、ステムループ構造を含み、ステムはハイブリダイズしたパッセンジャー鎖およびガイド鎖から構成され、ループは一本鎖である。miRループドメインは、天然に存在するpre-miRNAまたはpri-miRNAループ配列またはその変異体に由来し得る。いくつかの実施形態では、miRループドメインは、miR-30（例えば、miR-30a）、miR-15、miR-16、miR-155、miR-22、miR-103およびmiR-107のいずれか1つに由来するループドメインの配列を有する。特定の実施形態では、shRNAmiRはmiR-30aループドメインを含み、その配列は配列番号3として示される。

40

【0363】

ある実施形態では、miRループドメインは約5～約30ヌクレオチド長であり得、限定するものではないが、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29および約30ヌクレオチド長を含む。これらの実施形態のいくつかでは、miRループドメインは約15ヌクレオチド長である。特定の実施形態では、miRループドメインは、配列番号3として示される配列と少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、

50

少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、またはそれを超える配列同一性を有する。ある実施形態では、miR ループドメインは、配列番号 3 として示される配列を有する。

【0364】

shRNAmiR の 3' miR 基底ステムドメインは約 5 ～ 約 30 ヌクレオチド長であり得、いくつかの実施形態では、限定するものではないが、約 5、約 6、約 7、約 8、約 9、約 10、約 11、約 12、約 13、約 14、約 15、約 16、約 17、約 18、約 19、約 20、約 21、約 22、約 23、約 24、約 25、約 26、約 27、約 28、約 29 および約 30 ヌクレオチド長を含む。これらの実施形態のいくつかでは、3' miR 基底ステムドメインは約 18 ヌクレオチド長である。特定の実施形態では、3' miR 基底ステムドメインは、配列番号 4 として示される配列と少なくとも約 50%、少なくとも約 55%、少なくとも約 60%、少なくとも約 65%、少なくとも約 70%、少なくとも約 75%、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 91%、少なくとも約 92%、少なくとも約 93%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、またはそれを超える配列同一性を有する。ある実施形態では、3' miR 基底ステムドメインは、配列番号 4 として示される配列を有する。

【0365】

いくつかの実施形態では、3' miR 足場ドメインは、約 50 ～ 約 150 ヌクレオチド長であり、限定するものではないが、約 10、約 20、約 30、約 40、約 50、約 60、約 70、約 80、約 90、約 100、約 110、約 120、約 130、約 140 または約 150 ヌクレオチド長を含む。これらの実施形態のいくつかでは、3' miR 足場ドメインは約 116 ヌクレオチド長である。特定の実施形態では、3' miR 足場ドメインは、配列番号 5 として示される配列と少なくとも約 50%、少なくとも約 55%、少なくとも約 60%、少なくとも約 65%、少なくとも約 70%、少なくとも約 75%、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 91%、少なくとも約 92%、少なくとも約 93%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、またはそれを超える配列同一性を有する。ある実施形態では、3' miR 足場ドメインは、配列番号 5 として示される配列を有する。

【0366】

shRNAmiR のガイド鎖は、mRNA を標的とする配列であり、mRNA によってコードされるタンパク質の存在量の減少をもたらす。ガイド鎖がその標的 mRNA に結合した後、RISC は、標的転写物を分解するか、および／または標的転写物が翻訳のためにリボソームに取り込まれるのを防ぐ。ガイド鎖は、標的 mRNA の発現の低下をもたらすために、標的 mRNA と十分な相補性を有する。いくつかの実施形態では、ガイド鎖は、標的 mRNA 配列に対して少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 80%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99% または 100% 相補的である。ある実施形態では、ガイド鎖は、コード配列内の標的 mRNA とハイブリダイズする。ガイド鎖は、標的 mRNA 配列と 1、2、3、4、5 またはそれを超えるミスマッチヌクレオチドを含み得る。他の実施形態では、ガイド鎖は、5' または 3' 非翻訳領域 (UTR) などの非コード領域において標的 mRNA とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、ガイド鎖は、約 15 ～ 約 25 ヌクレオチド長であり、限定するものではないが、約 15、約 16、約 17、約 18、約 19、約 20、約 21、約 22、約 23、約 24 および約 25 ヌクレオチド長を含む。これらの実施形態のいくつかでは、ガイド鎖は約 22 ヌクレオチド長である。shRNAmiR が由来する shRNA 配列が、ほとんどの天然に存在するマイクロ RNA の長さである 22 ヌクレオチド長未満である特定の実施形態では、追加のヌクレオチドが shRNA 配列に付加され、ある実施形態では、この追加のヌクレオチドは、標的 mRNA 内の対応する位置と相補的なものである。

【0367】

s h R N A m i R の パッセンジャー鎖は、ガイド鎖配列と完全または部分的に相補的な配列である。いくつかの実施形態では、パッセンジャー鎖は、約 15 ～ 約 25 ヌクレオチド長であり、限定するものではないが、約 15 ～ 約 25 ヌクレオチド長を含み、限定するものではないが、約 15、約 16、約 17、約 18、約 19、約 20、約 21、約 22、約 23、約 24 および 約 25 ヌクレオチド長を含む。これらの実施形態のいくつかでは、パッセンジャー鎖は約 22 ヌクレオチド長である。パッセンジャー鎖は、ガイド鎖に対して少なくとも約 50 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 % または 100 % 相補的であり得る。パッセンジャー鎖は、ガイド鎖と 1、2、3、4、5 またはそれを超える mismatches ヌクレオチドを含み得る。しかしながら、ある実施形態では、ガイド：パッセンジャー鎖二重鎖は、いかなる mismatches ヌクレオチドも含まない。一般に、ガイド／パッセンジャー鎖配列は、それ自体の中にいかなる二次構造も形成しないように選択されるべきである。さらに、一塩基多型を含む m R N A 内の部位を標的とするガイド／パッセンジャー鎖配列の使用は避けるべきである。標的 m R N A に特異的なガイド／パッセンジャー鎖配列は、オフターゲット効果（すなわち、非標的 m R N A の発現の低下）を回避するために好ましい。

10

【0368】

適切な s h R N A m i R ガイド／パッセンジャー鎖、または他の s h R N A m i R ドメインの配列の選択を助けるために、RNA 分子の予測二次構造をモデル化する当技術分野で公知の任意のプログラム、限定するものではないが、M f o l d、R N A f o l d、および U N A F o l d などを使用することができる。特定の m R N A を標的とする s h R N A または m i R N A ガイド／パッセンジャー配列の効率を予測することができる当技術分野で公知の任意のプログラム、限定するものではないが、例えば、以下に開示されているものを使用して適切なガイド／パッセンジャー鎖配列を選択することができる：A g a r w a l e t a l . (2 0 1 5) e L i f e 4 : e 0 5 0 0 5 ; および K n o t t e t a l . (2 0 1 4) M o l C e l l 5 6 (6) : 7 9 6 - 8 0 7、これらの各文献はその全体が本明細書に組み込まれる。

20

【0369】

2.3 遺伝子改変免疫細胞

本発明は、遺伝子改変免疫細胞およびその集団、ならびにそれらを作製するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本開示の組成物および方法の遺伝子改変免疫細胞はヒト免疫細胞である。いくつかの実施形態では、免疫細胞は T 細胞、またはそれに由来する細胞である。他の実施形態では、免疫細胞はナチュラルキラー（NK）細胞またはそれに由来する細胞である。さらに他の実施形態では、免疫細胞は、B 細胞、またはそれに由来する細胞である。さらに他の実施形態では、免疫細胞は、単球もしくはマクロファージ細胞、またはそれに由来する細胞である。

30

【0370】

免疫細胞（例えば、T 細胞）は、末梢血単核細胞、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位からの組織、腹水、胸水、脾臓組織および腫瘍を含む多くの供給源から得ることができる。本開示のある実施形態では、当技術分野で利用可能な任意の数の T 細胞株、NK 細胞株、B 細胞株、単球細胞株またはマクロファージ細胞株を使用することができる。本開示のいくつかの実施形態では、免疫細胞（例えば、T 細胞）は、当業者に公知の任意の数の技術を使用して、対象から採取された血液単位から得られる。一実施形態では、個体の循環血液由来の細胞はアフエーシスによって得られる。本発明の免疫細胞はまた、機能的免疫細胞（例えば、T 細胞、NK 細胞、B 細胞）に分化した人工多能性幹細胞（i P S C）由来細胞であり得る。

40

【0371】

本開示の組成物および方法の遺伝子改変免疫細胞は、細胞のゲノム中に s h R N A m i R をコードする核酸配列を含み、標的タンパク質の発現の低下をもたらす。

50

【0372】

内因性タンパク質の発現が s h R N A m i R によって低下する実施形態のいくつかにおいて、内因性タンパク質の発現は、対照細胞（例えば、s h R N A m i R を発現しない細胞）と比較して、少なくとも約 10 %、約 20 %、約 30 %、約 40 %、約 50 %、約 55 %、約 60 %、約 65 %、約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、約 95 %、または最大約 99 % 低下する。当技術分野で公知の任意の方法、限定するものではないが、E L I S A、フローサイトメトリ、ウェスタンブロット、免疫細胞化学および免疫沈降などを使用して、s h R N A m i R によって標的化される内因性タンパク質の発現レベルを決定することができる。

【0373】

集団内の細胞によって s h R N A m i R を発現させると、対照細胞の集団と比較した場合、s h R N A m i R が標的とする内因性タンパク質を完全に発現する細胞の、集団中の細胞のパーセンテージの低下をもたらし得る。このような低下は、集団中の細胞の最大 5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または最大 100 % であり得る。

【0374】

s h R N A m i R をコードする核酸配列は、遺伝子改変免疫細胞のゲノム、例えばカセットに存在し得る。このようなカセットは、例えば、ランダムな組み込み（例えば、レンチウイルス形質導入）、または選択された部位への標的挿入（例えば、ヌクレアーゼ媒介標的挿入によって）のいずれかによって本発明の鑄型核酸を導入することによって、ゲノムに内に挿入することができる。s h R N A m i R コード配列を含むカセットは、例えば、本明細書に記載されるもの（例えば、C A R、外因性 T C R、融合タンパク質）などの追加のタンパク質をコードする核酸配列を含むことができ、プロモータおよび終結配列などの制御配列も含み得る。s h R N A m i R をコードする核酸配列は、s h R N A m i R の発現を可能にするカセットまたは鑄型核酸内の任意の数の位置に配置することができる。いくつかの例では、s h R N A m i R をコードする核酸配列は、別の導入遺伝子（例えば、C A R、外因性 T C R または融合タンパク質をコードする核酸配列）の終止コドンと終結シグナルとの間に配置される。他の例では、カセットまたは鑄型核酸中に存在する別の導入遺伝子（例えば、C A R、外因性 T C R または融合タンパク質をコードする核酸配列）は、導入遺伝子配列内に配置されるイントロンを含む。ここで、「配置される」とは、得られた配列が導入遺伝子の 5' 部分、イントロン配列および導入遺伝子の 3' 部分を含むように、イントロン配列が導入遺伝子配列に挿入されることを意味することを意図している。いくつかのこのような例では、s h R N A m i R をコードする核酸配列は、このようなイントロン内に配置することができる。ここで、「配置される」とは、得られた配列がイントロン配列の 5' 部分、s h R N A m i R コード配列、およびイントロン配列の 3' 部分を含むように、s h R N A m i R コード配列がイントロン配列に挿入されることを意味することを意図している。このような場合、導入遺伝子が発現されると、s h R N A m i R が発現され、イントロン配列が細胞によってスプライシングで切り出される。この様式で含めることができるイントロンは、天然に存在するイントロンまたは代替的に合成イントロンであり得る。本発明に有用な合成イントロンの特定の例は、配列番号 69 によってコードされる。

【0375】

ある実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、そのゲノム中に C A R または外因性 T C R をコードする核酸配列をさらに含むことができる。いくつかの実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、そのゲノム中に、免疫細胞表面上に発現され得る H L A - E 融合タンパク質をコードする核酸配列をさらに含むことができる。

【0376】

C A R / T C R コード核酸配列および／または H L A - E 融合タンパク質をコードする核酸配列は、s h R N A m i R コード配列と同じ遺伝子内に位置し得る。あるいは、C A R / T C R コード核酸配列および／または H L A - E 融合タンパク質をコードする核酸配

10

20

30

40

50

列は、shRNAmiRコード配列とは異なる遺伝子内に位置し得る。

【0377】

各コード配列は、異なるプロモータに作動可能に連結され得る。他の実施形態では、shRNAmiRコード配列は、CARもしくは外因性TCRをコードする核酸配列および／またはHLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列と同じプロモータに作動可能に連結されている。いくつかの具体例では、shRNAmiRをコードする核酸配列、CARまたは外因性TCRをコードする核酸配列、およびHLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列がすべて同じ遺伝子内に位置する場合、核酸配列の2つは第1のプロモータに作動可能に連結されており、第3の核酸配列は第2のプロモータに作動可能に連結されている。他の具体例では、shRNAmiRをコードする核酸配列、CARまたは外因性TCRをコードする核酸配列、およびHLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列がすべて同じ遺伝子内に位置する場合、核酸配列の3つすべてが同じプロモータに作動可能に連結されている。さまざまな実施形態では、核酸配列は、ゲノム内への挿入後に内因性プロモータに作動可能に連結され得る。いくつかのこのような場合、本発明のカセットまたは鑄型核酸は、コードされた配列を発現させるために外因性プロモータを必要としない場合がある。さらに、このような場合、カセットまたは鑄型核酸は、核酸が内因性プロモータに作動可能に連結されるのに必要なエレメント（例えば、スプライスアクセプター配列、2AまたはIRES配列など）を含み得る。他の実施形態では、本発明のカセットまたは鑄型核酸は、核酸配列に作動可能に連結された、shRNAmiR、CARもしくは外因性TCR、および／またはHLA-E融合タンパク質の発現を駆動する1つまたは複数の外因性プロモータを含む。

【0378】

コード配列の各々は、ゲノム中に同じ向きで、または互いに異なる向きで存在し得る。例えば、1つのコード配列は二本鎖DNAのプラス鎖上にあり得、別のコード配列はマイナス鎖上にあり得る。いくつかの実施形態では、shRNAmiRコード核酸配列は、CARもしくは外因性TCRをコードする核酸配列および／またはHLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列の3'下流にある。代替的な実施形態では、shRNAmiRコード配列は、CAR／TCRコード配列および／またはHLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列の5'上流にある。

【0379】

ある実施形態では、CARもしくは外因性TCR、shRNAmiR、および／またはHLA-E融合タンパク質をコードする核酸配列などの核酸配列は、同じプロモータに作動可能に連結され、同じ核酸分子からの2つ以上の遺伝子（すなわち、シストロン）の翻訳を可能にするために当技術分野で公知の任意のエレメントによって分離される。このような要素としては、限定するものではないが、IRESエレメント、T2Aエレメント、P2Aエレメント（例えば、P2A／フューリン）、E2Aエレメント、およびF2Aエレメントを挙げることができる。

【0380】

ある実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、免疫細胞をNK細胞殺滅から保護する細胞表面タンパク質をコードする核酸配列を含む。いくつかの例では、核酸配列は、非古典的MHC Iタンパク質をコードする。非古典的MHCクラスIタンパク質としては、限定するものではないが、HLA-E、HLA-F、HLA-GおよびHLA-Hを挙げることができる。特定の例では、核酸配列はHLA-Eタンパク質をコードする。HLA-Eタンパク質の例としては、限定するものではないが、HLA-E-01:01タンパク質またはHLA-E-01:03タンパク質（例えば、配列番号118）が挙げられる。本発明の特定の例では、核酸配列は、非古典的MHCクラスIタンパク質（例えば、HLA-E）と、免疫細胞の細胞表面上のMHCクラスIタンパク質の発現を可能にする少なくとも1つの追加のタンパク質とを含む融合タンパク質をコードする。融合タンパク質は、例えば、細胞表面上でのMHCクラスIタンパク質の発現を可能にするベーター2ミクログロブリンタンパク質（例えば、配列番号119）に融合したMHCクラスIタンパク質

(HLA-E)を含み得る。内因性ベータ-2ミクログロブリンの発現を阻害し、ベータ-2ミクログロブリンを含む融合タンパク質の発現を阻害しないために、融合タンパク質中のベータ-2ミクログロブリンコード配列を、変更された配列に対してshRNA-miRが特異性を有さないように変更することができる(例えば、コドン最適化)。さらなる例では、融合タンパク質は、ベータ-2ミクログロブリンタンパク質と非古典的MHCによって細胞外に提示される追加のタンパク質との両方に融合した非古典的MHCクラスIIタンパク質(例えば、HLA-E)を含み得る。このような追加のタンパク質としては、例えば、HLA-Gリーダーペプチド(例えば、配列番号120)を挙げることができる。融合タンパク質の個々のタンパク質は、ポリペプチドリンカー、例えば、配列番号121(すなわち、(GGGGS)3リンカー)または配列番号122(すなわち、(GGGGS)4リンカー)などを含むリンカーによって融合され得る。

10

【0381】

特定の実施形態では、融合タンパク質は、HLA-Eタンパク質、ベータ-2ミクログロブリンタンパク質、およびHLA-Gリーダーペプチドを含むHLA-E融合タンパク質である。いくつかのこのような実施形態では、HLA-Eタンパク質はHLA-E-01:01タンパク質またはHLA-E-01:03タンパク質であり、特定の実施形態では、HLA-Eタンパク質は配列番号118のアミノ酸配列を有するHLA-E-01:03タンパク質である。いくつかのこのような実施形態では、ベータ-2ミクログロブリンタンパク質は、配列番号119のアミノ酸配列を有し、HLA-Gリーダーペプチドは、配列番号120のアミノ酸配列を有する。さらなるこのような実施形態では、HLA-Eタンパク質、ベータ-2ミクログロブリンタンパク質、およびHLA-Gリーダータンパク質は、配列番号121(すなわち、(GGGGS)3リンカー)または配列番号122(すなわち、(GGGGS)4リンカー)を含むポリペプチドリンカーによって融合される。特定の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号66と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または最大少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号66のアミノ酸配列を含む。

20

【0382】

ある実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする核酸配列を含む。一般に、本開示のCARは、少なくとも細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインを含む。いくつかの実施形態では、細胞外ドメインは、細胞外リガンド結合ドメインまたは部分とも称される標的特異的結合エレメントを含む。いくつかの実施形態では、細胞内ドメインまたは細胞質ドメインは、少なくとも1つの共刺激ドメインおよび1つまたは複数のシグナル伝達ドメインを含む。

30

【0383】

いくつかの実施形態では、本発明において有用なCARは、細胞外リガンド結合ドメインを含む。リガンド結合ドメインの選択は、標的細胞の表面を規定するリガンドのタイプおよび数に依存する。例えば、リガンド結合ドメインは、特定の疾患状態に関連する標的細胞上の細胞表面マーカーとして作用するリガンドを認識するように選択され得る。したがって、CARにおいてリガンド結合ドメインに対するリガンドとして作用し得る細胞表面マーカーのいくつかの例としては、ウイルス、細菌および寄生虫感染、自己免疫疾患、ならびにがん細胞に関連するものが含まれ得る。いくつかの実施形態では、CARは、がん(すなわち、腫瘍)細胞上の抗原に特異的に結合する所望のリガンド結合部分を操作することによって、目的のがん特異的抗原を標的とするように操作される。本開示の文脈において、「がん抗原」、「腫瘍抗原」、「がん特異的抗原」または「腫瘍特異的抗原」は、がんなどの特定の過剰増殖性障害に共通の抗原を指す。

40

【0384】

いくつかの実施形態では、CARの細胞外リガンド結合ドメインは、目的の任意の抗原またはエピトープ、特に目的の任意の腫瘍抗原またはエピトープに特異的である。非限定

50

的な例として、いくつかの実施形態では、標的の抗原は、主要関連表面抗原、例えば、ErbB2 (HER2/neu)、癌胎児性抗原 (CEA)、上皮細胞接着分子 (EpCAM)、上皮増殖因子受容体 (EGFR)、EGFR変異体III (EGFRvIII)、CD19、CD20、CD22、CD30、CD40、CD79B、IL1RAP、グリピカン3 (GPC3)、CLL-1、ジシアロガングリオシドGD2、管上皮ムチン、gp36、TAG-72、グリコスフィンゴ脂質、神経膠腫関連抗原、B-ヒト絨毛性ゴナドトロピン、アルファフェトプロテイン (AFP)、レクチン反応性AFP、サイログロブリン、RAGE-1、MN-CAIX、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、RU1、RU2 (AS)、腸カルボキシルエステラーゼ、mut hsp70-2、M-CSF、プロスターゼ、プロスターゼ特異的抗原 (PSA)、PAP、NY-ESO-1、LAGA-l a、p53、プロスタイン (prostain)、PSMA、生存およびテロメラーゼ、前立腺癌腫瘍抗原-1 (PCTA-1)、MAGE、ELF2M、好中球エラスターゼ、エフリンB2、インスリン成長因子 (IGF1)-1、IGF-II、IGFI受容体、メソセリン、腫瘍特異的ペプチドエピトープを提示する主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 分子、5T4、ROR1、Nkp30、NKG2D、腫瘍間質抗原、フィブロネクチンのエクストラドメインA (EDA) とエクストラドメインB (EDB)、テネイシンCのAドメイン (TnCAl)、および線維芽細胞関連タンパク質 (fap)；系列特異的または組織特異的抗原、例えば、CD3、CD4、CD8、CD24、CD25、CD33、CD34、CD38、CD123、CD133、CD138、CTLA-4、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、エンドグリン、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 分子、BCMA (CD269、TNFRSF17)、CS1；またはウイルス特異的表面抗原、例えば、HIV特異的抗原 (HIV gp120など)、EBV特異的抗原、CMV特異的抗原、E6もしくはE7腫瘍性タンパク質などのHPV特異的抗原、ラッセウイルス特異的抗原、インフルエンザウイルス特異的抗原、ならびにこれらの表面マーカーの誘導体または変異体である。

10

20

30

40

50

【0385】

いくつかの例において、細胞外リガンド結合ドメインまたは部分は、抗体または抗体断片である。抗体断片は、例えば、抗原のエピトープと（例えば、結合、立体障害、安定化／不安定化、空間分布によって）特異的に相互作用する能力を保持する、抗体の少なくとも一部であり得る。抗体断片の例には、限定するものではないが、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv断片、scFv抗体断片、ジスルフィド結合Fv (sdFv)、VHおよびCH1ドメインからなるFd断片、線状抗体、単ドメイン抗体、例えばsdAb (VLまたはVHのいずれか)、ラクダ科VHHドメイン、抗体断片から形成された多重特異性抗体、例えばヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む二価断片、および抗体の単離されたCDRまたは他のエピトープ結合断片が含まれる。抗原結合断片はまた、単ドメイン抗体、マキシボディ、ミニボディ、ナノボディ、イントラボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、v-NARおよびビス-scFvに組み込むことができる（例えば、Hollinger and Hudson, Nature Biotechnology 23:1126-1136, 2005を参照されたい）。抗原結合断片はまた、III型フィブロネクチン (Fn3) などのポリペプチドに基づく足場に移植することもできる（フィブロネクチンポリペプチドミニボディを記載する米国特許第6,703,199号明細書を参照されたい）。

【0386】

いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインまたは部分は、特定のエピトープまたは抗原（例えば、がん細胞または他の疾患を引き起こす細胞もしくは粒子などの、細胞表面に優先的に存在するエピトープまたは抗原）に対する特異性を提供する、モノクローナル抗体に由来する単鎖可変断片 (scFv) の形態である。いくつかのこのような実施形態では、scFvは、抗原に対する特異性を有するモノクローナル抗体由来の重鎖可変 (VH) ドメインおよび軽鎖可変 (VL) ドメインを含むことができる。いくつかの実施形態では、scFvは、リンカー配列を介して結合している。いくつかの実施形態で

は、s c F v は、ネズミ、ヒト化、または完全ヒトである。

【0387】

キメラ抗原受容体の細胞外リガンド結合ドメインはまた、Bリンパ球上の自己抗原特異的B細胞受容体によって認識され得る自己抗原を含むことができ(Payne et al. (2016), Science 353 (6295): 179-184を参照されたい)、したがって抗体媒介自己免疫疾患において自己反応性Bリンパ球を特異的に標的化して殺滅するようにT細胞に指示する。このようなCARはキメラ自己抗体受容体(CAAR)と呼ぶことができ、それらの使用は本発明に包含される。

【0388】

いくつかの実施形態では、キメラ抗原受容体の細胞外ドメインは、目的の抗原に対する天然に存在するリガンド、または目的の抗原に結合する能力を保持する天然に存在するリガンドの断片を含むことができる。

【0389】

CARは、ヒンジ領域またはスペーサ配列を介して細胞外リガンド結合ドメインを細胞内シグナル伝達ドメインおよび共刺激ドメインと連結する膜貫通ドメインを含み得る。膜貫通ドメインは、任意の膜結合タンパク質または膜貫通タンパク質に由来し得る。例えば、膜貫通ポリペプチドは、T細胞受容体(例えば、CD3複合体を構成する α 、 β 、 γ または δ ポリペプチド)、IL2受容体p55(α 鎖)、p75(β 鎖)もしくは γ 鎖、Fc受容体(例えば、Fc γ 受容体III)のサブユニット鎖、またはCD8アルファ鎖などのCDタンパク質のサブユニットであり得る。ある例では、膜貫通ドメインは、CD8アルファドメインである。あるいは、膜貫通ドメインは合成であり得、ロイシンおよびバリンなどの疎水性残基を主に含み得る。

【0390】

ヒンジ領域は、膜貫通ドメインを細胞外リガンド結合ドメインに連結するように機能する任意のオリゴペプチドまたはポリペプチドを指す。例えば、ヒンジ領域は、最大300個のアミノ酸、好ましくは10~100個のアミノ酸、最も好ましくは25~50個のアミノ酸を含み得る。ヒンジ領域は、天然に存在する分子の全部もしくは一部、例えばCD8、CD4もしくはCD28の細胞外領域の全部もしくは一部、または抗体定常領域の全部もしくは一部に由来し得る。あるいは、ヒンジ領域は、天然に存在するヒンジ配列に対応する合成配列であってもよく、または完全に合成されたヒンジ配列であってもよい。特定の例では、ヒンジドメインは、ヒトCD8アルファ鎖、Fc γ RL1a受容体またはIgG1の一部を含み得る。ある例では、ヒンジ領域はCD8アルファドメインであり得る。

【0391】

CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、CARが配置された細胞の正常なエフェクター機能の少なくとも1つの活性化ならびに／または増殖および細胞生存経路の活性化を担う。「エフェクター機能」という用語は、細胞の特殊化された機能を指す。T細胞のエフェクター機能は、例えば、細胞溶解活性またはサイトカインの分泌を含むヘルパー活性であり得る。細胞内刺激ドメインは、抗原結合後に活性化シグナルをT細胞に伝達する1つまたは複数の細胞質シグナル伝達ドメインを含み得る。このような細胞質シグナル伝達ドメインとしては、限定するものではないが、CD3ゼータシグナル伝達ドメインを挙げることができる。

【0392】

細胞内刺激ドメインはまた、リガンド結合後に増殖および／または細胞生存シグナルを伝達する1つまたは複数の細胞内共刺激ドメインを含み得る。場合によっては、共刺激ドメインは、1つまたは複数のTRAF結合ドメインを含み得る。このような細胞内共刺激ドメインは、当技術分野で公知のもののいずれかであり得、限定するものではないが、例えば、Novel 6(「N6」)などの国際公開第2018/067697号パンフレットに開示されている共刺激ドメインを挙げることができる。共刺激ドメインのさらなる例としては、4-1BB(CD137)、CD27、CD28、CD8、OX40、CD

10

20

30

40

50

30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1（LFA-1）、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83と特異的に結合するリガンド、またはそれらの任意の組み合わせを挙げることができる。特定の実施形態では、共刺激ドメインはN6ドメインである。別の特定の実施形態では、共刺激ドメインは4-1BB共刺激ドメインである。

【0393】

他の実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、外因性T細胞受容体（TCR）をコードする核酸配列を含む。このような外因性T細胞受容体は、アルファ鎖およびベータ鎖を含むことができ、あるいはガンマ鎖およびデルタ鎖を含むことができる。本発明において有用な外因性TCRは、限定するものではないが、本明細書に開示の任意の抗原またはエピトープなどの目的の任意の抗原またはエピトープに対する特異性を有し得る。

【0394】

特定の実施形態では、CARまたは外因性TCRは、任意のタイプのがん細胞に特異的であり得る。このようながんとしては、限定するものではないが、癌腫、リンパ腫、肉腫、芽細胞腫、白血病、B細胞起源のがん、乳がん、胃がん、神経芽細胞腫、骨肉腫、肺がん、黒色腫、前立腺がん、結腸がん、腎細胞癌腫、卵巣がん、横紋筋肉腫、白血病およびホジキンリンパ腫を挙げることができる。特定の実施形態では、がんおよび障害としては、限定するものではないが、プレB ALL（小児適応症）、成人ALL、マンツル細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、同種骨髄移植後のサルベージなどが挙げられる。これらのがんは、例えば、CD19、CD20、CD22および／またはROR1を標的とするCARの組み合わせを使用して治療することができる。いくつかの非限定的な例では、本開示の遺伝子改変免疫細胞またはその集団は、癌腫、リンパ腫、肉腫、黒色腫、芽細胞腫、白血病、および胚細胞腫瘍を標的とし、限定するものではないが、B細胞起源のがん、神経芽細胞腫、骨肉腫、前立腺がん、腎細胞癌腫、肝がん、胃がん、骨がん、膵臓がん、皮膚がん、頭頸部がん、乳がん、肺がん、皮膚または眼内の悪性黒色腫、腎がん、子宮がん、卵巣がん、結腸直腸がん、結腸がん、直腸がん、肛門部がん、胃がん、精巣がん、子宮がん、卵管の癌腫、子宮内膜の癌腫、子宮頸部の癌腫、膣の癌腫、外陰部の癌腫、非ホジキンリンパ腫、食道のがん、小腸のがん、内分泌系のがん、甲状腺のがん、副甲状腺のがん、副腎のがん、軟部組織の肉腫、尿道のがん、陰茎のがん、小児の固形腫瘍、リンパ球性リンパ腫、膀胱のがん、腎臓または尿管のがん、腎盂の癌腫、中枢神経系（CNS）の新生物、原発性CNSリンパ腫、腫瘍血管新生、脊髄軸腫瘍、脳幹神経膠腫、下垂体腺腫、カボジ肉腫、類表皮がん、扁平上皮がん、アスベストによって誘発されるがんを含む環境誘発がん、多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、急性骨髄性リンパ腫、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、免疫芽球性大細胞リンパ腫、急性リンパ芽球性白血病、真菌症、未分化大細胞リンパ腫、およびT細胞リンパ腫、ならびに前記がんの任意の組み合わせなどを標的とする。ある実施形態では、B細胞起源のがんには、限定するものではないが、B系列急性リンパ芽球性白血病、B細胞慢性リンパ球性白血病、B細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、プレB ALL（小児適応症）、マンツル細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、バーキットリンパ腫、多発性骨髄腫およびB細胞非ホジキンリンパ腫が含まれる。いくつかの例では、がんには、限定するものではないが、B細胞起源のがんまたは多発性骨髄腫が含まれ得る。いくつかの例では、B細胞起源のがんは、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、小リンパ球性リンパ腫（SLL）、または非ホジキンリンパ腫（NHL）である。いくつかの例では、B細胞起源のがんは、マンツル細胞リンパ腫（MCL）またはびまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）である。

【0395】

いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子改変免疫細胞は、不活性化TCRアルファ遺伝子および／または不活性化TCRベータ遺伝子を含む。本発明の遺伝子改変細胞を作製するためのTCRアルファ遺伝子および／またはTCRベータ遺伝子の不活性化は、TCRアルファ遺伝子および／またはTCRベータ遺伝子が発現されている少なくとも一方ま

たは両方の対立遺伝子において起こる。したがって、一方または両方の遺伝子の不活性化は、内因性TCRアルファ鎖または内因性TCRベータ鎖タンパク質の発現を妨げる。これらのタンパク質の発現は、細胞表面上の内因性アルファ／ベータTCRの構築に必要である。したがって、TCRアルファ遺伝子および／またはTCRベータ遺伝子の不活性化は、内因性アルファ／ベータTCRの検出可能な細胞表面発現を有さない遺伝子改変免疫をもたらす。内因性アルファ／ベータTCRはCD3を組み込んでいる。したがって、不活性化TCRアルファ遺伝子および／またはTCRベータ鎖を有する細胞は、CD3の検出可能な細胞表面発現を有し得ない。特定の実施形態では、不活性化遺伝子は、TCRアルファ定常領域（TRAC）遺伝子である。

【0396】

10

いくつかの例では、TCRアルファ遺伝子、TRAC遺伝子、またはTCRベータ遺伝子は、遺伝子の切断部位への鑄型核酸の挿入によって不活性化される。鑄型核酸の挿入は、内因性TCRアルファ鎖またはTCRベータ鎖の発現を破壊し、したがってT細胞表面上の内因性アルファ／ベータTCRの構築を妨げる。いくつかの例において、鑄型核酸は、TRAC遺伝子内に挿入される。特定の例では、鑄型核酸は、配列番号58（すなわち、TRC 1-2認識配列）を含む操作されたメガヌクレアーゼ認識配列においてTRAC遺伝子内に挿入される。特定の例では、CAR導入遺伝子は、配列番号58内のヌクレオチド位置13と14との間に挿入される。

【0397】

20

遺伝子改変免疫細胞がCARまたは外因性TCRを発現する実施形態のいくつかでは、このような細胞は内因性T細胞受容体（例えば、アルファ／ベータT細胞受容体）の検出可能な細胞表面発現を有さない。したがって、本発明はさらに、shRNAmiRを発現し、内因性T細胞受容体（例えば、アルファ／ベータT細胞受容体）の検出可能な細胞表面発現を有さず、いくつかの実施形態ではさらにCARまたは外因性TCRを発現する遺伝子改変免疫細胞の集団を提供する。例えば、この集団は、CARを発現し（すなわち、CAR+である）、または外因性T細胞受容体を発現し（すなわち、exotCR+）、内因性T細胞受容体の細胞表面発現を有さない（すなわち、TCR-である）、本発明の複数の遺伝子改変免疫細胞を含み得る。

【0398】

30

本明細書で使用される場合、「内因性TCRの検出可能な細胞表面発現」とは、標準的な実験方法を使用して免疫細胞の細胞表面上のTCR複合体（例えば、アルファ／ベータTCR複合体）の1つまたは複数の成分を検出する能力を指す。このような方法としては、例えば、TCRアルファ鎖もしくはTCRベータ鎖などのTCR自体の成分、またはCD3などの構築された細胞表面TCR複合体の成分に特異的な免疫染色および／またはフローサイトメトリを挙げることができる。免疫細胞上の内因性TCR（例えば、アルファ／ベータTCR）の細胞表面発現を検出する方法としては、本明細書の実施例に記載の方法、および例えば、MacLeod et al. (2017) Molecular Therapy 25 (4) : 949-961に記載されている方法が挙げられる。

【0399】

40

2.4 shRNAmiR標的タンパク質

本開示の組成物および方法の遺伝子改変免疫細胞は、任意の内因性タンパク質の発現を低下させるshRNAmiRを含み、発現することができる。shRNAmiRを用いて発現を低下させることができる内因性タンパク質の非限定的な例には、ベータ-2ミクログロブリン（B2M）、トランスフォーミング増殖因子ベータ受容体2（TGFB2）、Cblがん原遺伝子B（CBL-B）、CS1、CD52、デオキシシチジンキナーゼ（DCK）、グルココルチコイド受容体（GR）、T細胞受容体アルファ遺伝子、およびT細胞受容体アルファ定常領域遺伝子が含まれる。

【0400】

A. ベータ-2ミクログロブリン

いくつかの実施形態では、shRNAmiR分子の発現の結果として発現レベルが低下

50

する内因性タンパク質は、B 2 Mである。B 2 Mは主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラス I 分子の成分であり、B 2 Mが存在しなければこの分子は細胞表面に構築されない。MHC クラス I 分子は、B 2 Mに加えて、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、および $\alpha 3$ タンパク質から構成される。MHC クラス I 分子内で、B 2 Mタンパク質は、 $\alpha 3$ タンパク質の横に位置し、細胞表面の $\alpha 1$ タンパク質の下に位置する。B 2 Mは膜貫通領域を欠き、MHC クラス I 分子のペプチド結合溝の安定性に必要である。

【0401】

s h R N A m i R 分子は、B 2 M mRNA の任意の領域を標的とし得る。代表的な B 2 M mRNA およびタンパク質の配列は、当技術分野で公知である。B 2 M mRNA 配列の非限定的な例は、NCBI アクセッション番号 NM_004048.3 であり、B 2 M タンパク質配列は NCBI アクセッション番号 NP_004039.1 である。

10

【0402】

B 2 M の発現が s h R N A m i R によって低下するそれらの実施形態のいくつかでは、B 2 M の細胞表面発現は、対照細胞 (例えば、B 2 M 標的化 s h R N A m i R を発現しない細胞) と比較して、少なくとも約 10%、約 20%、約 30%、約 40%、約 50%、約 55%、約 60%、約 65%、約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、または最大約 99% 低下する。

【0403】

B 2 M が細胞表面上の MHC クラス I 分子の構築に必要であることを考えると、B 2 M の発現が低下した細胞はまた、細胞表面上の MHC クラス I 分子の減少を示す。これらの実施形態のいくつかでは、細胞表面上の MHC クラス I 分子の発現は、対照細胞 (例えば、B 2 M 標的化 s h R N A m i R を発現しない細胞) と比較して、少なくとも約 10%、約 20%、約 30%、約 40%、約 50%、約 55%、約 60%、約 65%、約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、または最大約 99% 低下する。

20

【0404】

B 2 M を標的とする s h R N A m i R 分子は、B 2 M 遺伝子内の配列に (完全または部分的に) 相補的な任意のパッセンジャー配列および対応するガイド配列を含み得る。いくつかの実施形態では、s h R N A m i R のパッセンジャー配列およびガイド配列は、それぞれ配列番号 17 および 18 として示される配列を含む (例えば、B 2 M 7289 s h R N A m i R)。特定の実施形態では、s h R N A m i R のパッセンジャー配列およびガイド配列は、それぞれ配列番号 7 および 8 として示される配列を含む (例えば、B 2 M 7282 s h R N A m i R)。他の実施形態では、s h R N A m i R のパッセンジャー配列およびガイド配列は、それぞれ配列番号 9 および 10 として示される配列を含む (例えば、B 2 M 7285 s h R N A m i R)。さらに他の実施形態では、s h R N A m i R のパッセンジャー配列およびガイド配列は、それぞれ配列番号 11 および 12 として示される配列を含む (例えば、B 2 M 7286 s h R N A m i R)。さらに他の実施形態では、s h R N A m i R のパッセンジャー配列およびガイド配列は、それぞれ配列番号 13 および 14 として示される配列を含む (例えば、B 2 M 7287 s h R N A m i R)。特定の実施形態では、s h R N A m i R のパッセンジャー配列およびガイド配列は、それぞれ配列番号 15 および 16 として示される配列を含む (例えば、B 2 M 7288 s h R N A m i R)。ある実施形態では、s h R N A m i R のパッセンジャー配列およびガイド配列は、それぞれ配列番号 19 および 20 として示される配列を含む (例えば、B 2 M 7290 s h R N A m i R)。

30

40

【0405】

B 2 M 標的化 s h R N A m i R は、配列番号 41 ~ 47 のいずれか 1 つに示される核酸配列と少なくとも 50%、少なくとも 55%、少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、またはそれを超える配列同一性を有する配列を含み得る。特定の実施形態では

50

、shRNAmiRは、配列番号41～47のいずれか1つに示される配列を含む。いくつかの実施形態では、shRNAmiRは、配列番号41に示される配列を含む。いくつかの実施形態では、shRNAmiRは、配列番号42に示される配列を含む。いくつかの実施形態では、shRNAmiRは、配列番号43に示される配列を含む。いくつかの実施形態では、shRNAmiRは、配列番号44に示される配列を含む。いくつかの実施形態では、shRNAmiRは、配列番号45に示される配列を含む。いくつかの実施形態では、shRNAmiRは、配列番号46に示される配列を含む。いくつかの実施形態では、shRNAmiRは、配列番号47に示される配列を含む。

【0406】

B2MおよびMHCクラスI分子のレベルが低下した細胞は、対照細胞（例えば、B2M標的化shRNAmiRを発現しない細胞）と比較して、同種異系性の低下を示し得る。本明細書で使用される場合、「同種異系性」という用語は、細胞が「他の」または自己ではないものとして免疫系によって認識され作用される能力を指す。同種異系性は、プライミングされた同種異系抗原特異的CTLまたはNK細胞とのインキュベーション後に生細胞のパーセンテージを定量した本明細書の他の箇所に記載される方法を含む、当技術分野で公知の任意の方法を使用して測定することができる。

【0407】

B.CS1

いくつかの実施形態では、shRNAmiR分子の発現の結果として発現レベルが低下する内因性タンパク質は、CS1（CCND3サブセット1、CRACC、CD319、およびSLAMF7としても知られている）である。CS1は、シグナル伝達リンパ球活性化分子（SLAM）関連受容体ファミリーのメンバーであり、正常なNK細胞、B細胞、T細胞、樹状細胞、NK-T細胞、および単球の表面上に発現される。CS1は、多発性骨髄腫細胞によって過剰発現され、多発性骨髄腫の免疫療法標的として機能する。

【0408】

shRNAmiR分子は、CS1 mRNAの任意の領域を標的とし得る。代表的なCS1 mRNAおよびタンパク質の配列は、当技術分野で公知である。CS1 mRNA配列の非限定的な例は、NCBIアクセッション番号NM_021181であり、CS1タンパク質配列はNCBIアクセッション番号NP_067004.3である。

【0409】

CS1の発現がshRNAmiRによって低下する実施形態のいくつかでは、CS1の細胞表面発現は、対照細胞（例えば、CS1標的化shRNAmiRを発現しない細胞）と比較して、少なくとも約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、または最大約99%低下する。

【0410】

CS1を標的とするshRNAmiR分子は、CS1遺伝子内の配列に（完全または部分的に）相補的な任意のパッセンジャー配列および対応するガイド配列を含み得る。いくつかの実施形態では、shRNAmiRのパッセンジャー配列およびガイド配列は、それぞれ配列番号21および22として示される配列を含む。いくつかの実施形態では、shRNAmiRのパッセンジャー配列およびガイド配列は、それぞれ配列番号23および24として示される配列を含む。いくつかの実施形態では、shRNAmiRのパッセンジャー配列およびガイド配列は、それぞれ配列番号25および26として示される配列を含む。

【0411】

CS1標的化shRNAmiRは、配列番号48～50のいずれか1つに示される核酸配列と少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくと

10

20

30

40

50

も 99%、またはそれを超える配列同一性を有する配列を含み得る。特定の実施形態では、shRNAmiRは、配列番号48～50のいずれか1つに示される配列を含む。いくつかの実施形態では、shRNAmiRは、配列番号48に示される配列を含む。いくつかの実施形態では、shRNAmiRは、配列番号49に示される配列を含む。いくつかの実施形態では、shRNAmiRは、配列番号50に示される配列を含む。

【0412】

遺伝子改変細胞がCS1の発現を低下させるshRNAmiRを発現する実施形態のいくつかでは、遺伝子改変免疫細胞はCS1に対する特異性を有するCARを含む。CS1に対する特異性を有するCARの非限定的な例としては、限定するものではないが、国際公開第2014/179759号パンフレット、国際公開第2015121454号パンフレットおよび国際公開第2016/090369号パンフレットに記載のものが挙げられる。

【0413】

shRNAmiR発現を介してCS1の発現がノックダウンされた細胞は、対照細胞（例えば、CS1標的化shRNAmiRを発現しない細胞）と比較して、CS1に対する特異性を有するCARを発現する遺伝子改変免疫細胞によるフラトリサイドを受けにくい可能性がある。これは、多発性骨髄腫などの疾患の治療のためにCS1に対する特異性を有するCAR発現細胞を使用する場合に有用であり、この場合、CAR発現細胞の長期存在、したがって、疾患細胞（例えば、多発性骨髄腫細胞）の殺滅が望まれる。本明細書で使用される場合、「フラトリサイド」という用語は、同様の遺伝子型および／または表現型の細胞による細胞の殺滅を指す。CS1特異的CARを発現する遺伝子改変免疫細胞によるフラトリサイドは、限定するものではないが、CS1特異的shRNAmiRを発現する免疫細胞とCS1特異的CARを発現する免疫細胞とのインキュベーション、および生存shRNAmiR発現細胞の数の定量を含む、当技術分野で公知の任意の方法を使用して測定することができる。

【0414】

C. TGFB R2

いくつかの実施形態では、shRNAmiR分子の発現の結果として発現レベルが低下する内因性タンパク質は、トランスフォーミング増殖因子ベータ受容体2（TGFB R2）である。TGFB R2は、トランスフォーミング増殖因子ベータ（TGFB）に結合する膜貫通受容体である。TGFB R2は、セリン／トレオニンタンパク質キナーゼドメインを含み、他のTGFB受容体とヘテロ二量体化する。

【0415】

shRNAmiR分子は、TGFB R2 mRNAの任意の領域を標的とし得る。代表的なB2M mRNAおよびタンパク質の配列は、当技術分野で公知である。TGFB R2 mRNA配列の非限定的な例はNM_001024847.2であり、TGFB R2タンパク質配列はNCBIアクセッション番号NP_001020018.1である。

【0416】

TGFB R2の発現がshRNAmiRによって低下する実施形態のいくつかでは、TGFB R2の細胞表面発現は、対照細胞（例えば、TGFB R2標的化shRNAmiRを発現しない細胞）と比較して、少なくとも約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、または最大約99%低下する。

【0417】

TGFB R2を標的とするshRNAmiR分子は、TGFB R2遺伝子内の配列に（完全または部分的に）相補的な任意のパッセンジャー配列および対応するガイド配列を含み得る。いくつかの実施形態では、shRNAmiRのパッセンジャー配列およびガイド配列は、それぞれ配列番号27および28として示される配列を含む（例えば、TGFB R2 721110 shRNAmiR）。他の実施形態では、shRNAmiRのパッセンジャー配列およびガイド配列は、それぞれ配列番号29および30として示される配

列を含む（例えば、T G F B R 2 7 2 1 1 1 1 s h R N A m i R）。さらに他の実施形態では、s h R N A m i Rのパッセンジャー配列およびガイド配列は、それぞれ配列番号31および32として示される配列を含む（例えば、T G F B R 2 7 2 1 1 1 2 s h R N A m i R）。さらに他の実施形態では、s h R N A m i Rのパッセンジャー配列およびガイド配列は、それぞれ配列番号33および34として示される配列を含む（例えば、T G F B R 2 7 2 1 1 1 3 s h R N A m i R）。特定の実施形態では、s h R N A m i Rのパッセンジャー配列およびガイド配列は、それぞれ配列番号35および36として示される配列を含む（例えば、T G F B R 2 7 2 1 1 1 4 s h R N A m i R）。

【0418】

T G F B R 2 標的化 s h R N A m i R は、配列番号51～55のいずれか1つに示される核酸配列と少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、またはそれを超える配列同一性を有する配列を含み得る。特定の実施形態では、s h R N A m i R は、配列番号51～55のいずれか1つに示される配列を含む。いくつかの実施形態では、s h R N A m i R は、配列番号51に示される配列を含む。いくつかの実施形態では、s h R N A m i R は、配列番号52に示される配列を含む。いくつかの実施形態では、s h R N A m i R は、配列番号53に示される配列を含む。いくつかの実施形態では、s h R N A m i R は、配列番号54に示される配列を含む。いくつかの実施形態では、s h R N A m i R は、配列番号55に示される配列を含む。

【0419】

遺伝子改変免疫細胞が T G F B R 2 の発現を低下させる s h R N A m i R を発現する実施形態のいくつかでは、遺伝子改変免疫細胞は、対照細胞（例えば、T G F B R 2 標的化 s h R N A m i R を発現しない免疫細胞）と比較して、トランスフォーミング増殖因子 B 1（T G F B 1）による免疫抑制を受けにくい。本明細書で使用される場合、「免疫抑制」という用語は、免疫系の活性化または有効性の低下を指す。T G F B 1 による免疫抑制は、限定するものではないが、T 細胞の分化および／またはサイトカイン産生に対する T G F B 1 の効果の測定を含む、当技術分野で公知の任意の方法を使用して測定することができる。

【0420】

D. C B L - B

いくつかの実施形態では、s h R N A m i R 分子の発現の結果として発現レベルが低下する内因性タンパク質は、C b l がん原遺伝子 B（C B L - B）である。C B L - B は、ユビキチンのタンパク質への結合を触媒し、したがって分解のためにタンパク質を標的化する E 3 ユビキチンリガーゼである。

【0421】

s h R N A m i R 分子は、C B L - B m R N A の任意の領域を標的とし得る。代表的な C B L - B m R N A およびタンパク質の配列は、当技術分野で公知である。C B L - B m R N A 配列の非限定的な例は、N C B I アクセッション番号 N M _ 1 7 0 6 6 2 . 5 であり、C B L - B タンパク質配列は N C B I アクセッション番号 N P _ 7 3 3 7 6 2 . 2 である。

【0422】

C B L - B の発現が s h R N A m i R によって低下する実施形態のいくつかでは、C B L - B の細胞表面発現は、対照細胞（例えば、C B L - B 標的化 s h R N A m i R を発現しない細胞）と比較して、少なくとも約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、または最大約99%低下する。

【0423】

C B L - B を標的とする s h R N A m i R 分子は、C B L - B 遺伝子内の配列に（完全

または部分的に) 相補的な任意のパッセンジャー配列および対応するガイド配列を含み得る。

【0424】

遺伝子改変免疫細胞がCBL-Bの発現を低下させるshRNAmiRを発現する実施形態のいくつかでは、遺伝子改変免疫細胞は、対照細胞(例えば、CBL-B標的化shRNAmiRを発現しない免疫細胞)と比較して、下流シグナル伝達タンパク質の分解によるT細胞受容体(TCR)シグナル伝達の抑制を受けにくい。CBLタンパク質は、p85(PI3Kの調節サブユニット)、ホスホリパーゼC- γ 、ならびにLck、FynおよびZAP70などのチロシンキナーゼのターンオーバーを調節し、これらはすべてTCRシグナル伝達に関与する(Lee et al. (2003) Science 302:1218-1222)。下流シグナル伝達タンパク質の分解によるTCRシグナル伝達の抑制に対する感受性は、限定するものではないが、ELISA、フローサイトメトリ、ウェスタンブロット、免疫細胞化学、および免疫沈降を含む当技術分野で公知の任意の方法を使用して測定することができる。

【0425】

E. CD52

いくつかの実施形態では、shRNAmiR分子の発現の結果として発現レベルが低下する内因性タンパク質は、CAMPATH-1抗原としても知られているCD52(分化抗原群52)である。CD52は、成熟リンパ球の表面ならびに単球および樹状細胞上に存在する糖タンパク質である。可溶性CD52分子は、シアル酸結合免疫グロブリン様レクチン10(Siglec10)と相互作用して、T細胞の増殖および活性化を阻害する(Zhao et al. (2017) Inflamm Res 66(7):571-578)。

【0426】

shRNAmiR分子は、CD52 mRNAの任意の領域を標的とし得る。代表的なCD52 mRNAおよびタンパク質の配列は、当技術分野で公知である。CD52 mRNA配列の非限定的な例は、NCBIアクセッション番号NM_001803.3であり、CD52タンパク質配列はNCBIアクセッション番号NP_001794.2である。

【0427】

CD52の発現がshRNAmiRによって低下する実施形態のいくつかでは、CD52の細胞表面発現は、対照細胞(例えば、CD52標的化shRNAmiRを発現しない細胞)と比較して、少なくとも約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、または最大約99%低下する。

【0428】

CD52を標的とするshRNAmiR分子は、CD52遺伝子内の配列に(完全または部分的に)相補的な任意のパッセンジャー配列および対応するガイド配列を含み得る。いくつかの実施形態では、shRNAmiRのパッセンジャー配列およびガイド配列は、それぞれ配列番号37および38として示される配列を含む(例えば、CD52 72123 shRNAmiR)。他の実施形態では、shRNAmiRのパッセンジャー配列およびガイド配列は、それぞれ配列番号39および40として示される配列を含む(例えば、CD52 72124 shRNAmiR)。

【0429】

CD52標的化shRNAmiRは、配列番号56または57として示される核酸配列と少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、またはそれを超える配列同一性を有する配列を含み得る。特定の実施形態では、s

hRNA miRは、配列番号56または57として示される配列を含む。いくつかの実施形態では、shRNA miRは、配列番号56に示される配列を含む。いくつかの実施形態では、shRNA miRは、配列番号57に示される配列を含む。

【0430】

遺伝子改変免疫細胞がCD52の発現を低下させるshRNA miRを発現する実施形態のいくつかでは、遺伝子改変免疫細胞はCD52抗体誘導細胞死を受けにくい。

【0431】

F. デオキシシチジンキナーゼ (DCK)

いくつかの実施形態では、shRNA miR分子の発現の結果として発現レベルが低下する内因性タンパク質は、デオキシシチジンキナーゼ (DCK) である。DCKは、主にデオキシシチジンをリン酸化し、デオキシシチジナーリン酸に変換する。

【0432】

shRNA miR分子は、DCK mRNAの任意の領域を標的とし得る。代表的なDCK mRNAおよびタンパク質の配列は、当技術分野で公知である。DCK mRNA配列の非限定的な例は、NCBIアクセッション番号NM_000788.3であり、DCKタンパク質配列はNCBIアクセッション番号NP_000779.1である。

【0433】

DCKの発現がshRNA miRによって低下する実施形態のいくつかでは、DCKの細胞表面発現は、対照細胞 (例えば、DCK標的化shRNA miRを発現しない細胞) と比較して、少なくとも約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、または最大約99%低下する。

【0434】

DCKを標的とするshRNA miR分子は、DCK遺伝子内の配列に (完全または部分的に) 相補的な任意のパッセンジャー配列および対応するガイド配列を含み得る。いくつかの実施形態では、shRNA miRのパッセンジャー配列およびガイド配列は、それぞれ配列番号76および77として示される配列を含む (例えば、DCK 72136 shRNA miR)。他の実施形態では、shRNA miRのパッセンジャー配列およびガイド配列は、それぞれ配列番号78および79として示される配列を含む (例えば、DCK 72137 shRNA miR)。他の実施形態では、shRNA miRのパッセンジャー配列およびガイド配列は、それぞれ配列番号80および81として示される配列を含む (例えば、DCK 72138 shRNA miR)。他の実施形態では、shRNA miRのパッセンジャー配列およびガイド配列は、それぞれ配列番号82および83として示される配列を含む (例えば、DCK 72139 shRNA miR)。他の実施形態では、shRNA miRのパッセンジャー配列およびガイド配列は、それぞれ配列番号84および85として示される配列を含む (例えば、DCK 72140 shRNA miR)。

【0435】

DCK標的化shRNA miRは、配列番号86~90のいずれか1つに示される核酸配列と少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、またはそれを超える配列同一性を有する配列を含み得る。特定の実施形態では、shRNA miRは、配列番号86~90のいずれか1つに示される配列を含む。いくつかの実施形態では、shRNA miRは、配列番号86に示される配列を含む。いくつかの実施形態では、shRNA miRは、配列番号87に示される配列を含む。いくつかの実施形態では、shRNA miRは、配列番号88に示される配列を含む。いくつかの実施形態では、shRNA miRは、配列番号89に示される配列を含む。いくつかの実施形態では、shRNA miRは、配列番号90に示される配列を含む。

10

20

30

40

50

【0436】

遺伝子改変免疫細胞がDCKの発現を低下させるshRNAmiRを発現する実施形態のいくつかでは、遺伝子改変免疫細胞は、細胞増殖に対するプリンヌクレオシド類似体（例えば、フルダラビン）の影響を受けにくい。実際、DCKの発現が低下した遺伝子改変免疫細胞は、細胞集団と、フルダラビンなどのプリンヌクレオシド類似体とのインキュベーションによって濃縮することができる。さらに、DCKの発現が低下した遺伝子改変免疫細胞（例えば、CAR T細胞）は、治療の経過中にフルダラビンなどのプリンヌクレオシド類似体を投与した場合、免疫療法中にインビボでより高い持続性を有し得る。

【0437】

G. グルココルチコイド受容体 (GR)

いくつかの実施形態では、shRNAmiR分子の発現の結果として発現レベルが低下する内因性タンパク質は、グルココルチコイド受容体 (GR) である。コルチゾールまたはデキサメタゾンなどのグルココルチコイドの結合は、細胞におけるトランス活性化またはトランス抑制につながり得る、ヒートショックタンパク質などのタンパク質の放出を誘導する可能性がある。

【0438】

shRNAmiR分子は、GR mRNAの任意の領域を標的とし得る。代表的なGR mRNAおよびタンパク質の配列は、当技術分野で公知である。GR mRNA配列の非限定的な例は、NCBIアクセッション番号AM183262.1である。

【0439】

GRの発現がshRNAmiRによって低下する実施形態のいくつかでは、GRの発現は、対照細胞（例えば、GR標的化shRNAmiRを発現しない細胞）と比較して、少なくとも約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、または最大約99%低下する。

【0440】

GRを標的とするshRNAmiR分子は、GR遺伝子内の配列に（完全または部分的に）相補的な任意のパッセンジャー配列および対応するガイド配列を含み得る。いくつかの実施形態では、shRNAmiRのパッセンジャー配列およびガイド配列は、それぞれ配列番号91および92として示される配列を含む（例えば、GR 72142 shRNAmiR）。他の実施形態では、shRNAmiRのパッセンジャー配列およびガイド配列は、それぞれ配列番号93および94として示される配列を含む（例えば、GR 72143 shRNAmiR）。他の実施形態では、shRNAmiRのパッセンジャー配列およびガイド配列は、それぞれ配列番号95および96として示される配列を含む（例えば、GR 72145 shRNAmiR）。他の実施形態では、shRNAmiRのパッセンジャー配列およびガイド配列は、それぞれ配列番号97および98として示される配列を含む（例えば、GR 72146 shRNAmiR）。他の実施形態では、shRNAmiRのパッセンジャー配列およびガイド配列は、それぞれ配列番号99および100として示される配列を含む（例えば、GR 72148 shRNAmiR）。他の実施形態では、shRNAmiRのパッセンジャー配列およびガイド配列は、それぞれ配列番号101および102として示される配列を含む（例えば、GR 72149 shRNAmiR）。他の実施形態では、shRNAmiRのパッセンジャー配列およびガイド配列は、それぞれ配列番号103および104として示される配列を含む（例えば、GR 72150 shRNAmiR）。他の実施形態では、shRNAmiRのパッセンジャー配列およびガイド配列は、それぞれ配列番号105および106として示される配列を含む（例えば、GR 72151 shRNAmiR）。他の実施形態では、shRNAmiRのパッセンジャー配列およびガイド配列は、それぞれ配列番号107および108として示される配列を含む（例えば、GR 72152 shRNAmiR）。

【0441】

GR標的化shRNAmiRは、配列番号109~117のいずれか1つに示される核

10

20

30

40

50

酸配列と少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、またはそれを超える配列同一性を有する配列を含み得る。特定の実施形態では、shRNAmiRは、配列番号109~117のいずれか1つに記載の配列を含む。いくつかの実施形態では、shRNAmiRは、配列番号109に示される配列を含む。いくつかの実施形態では、shRNAmiRは、配列番号110に示される配列を含む。いくつかの実施形態では、shRNAmiRは、配列番号111に示される配列を含む。いくつかの実施形態では、shRNAmiRは、配列番号112に示される配列を含む。いくつかの実施形態では、shRNAmiRは、配列番号113に示される配列を含む。いくつかの実施形態では、shRNAmiRは、配列番号114に示される配列を含む。いくつかの実施形態では、shRNAmiRは、配列番号115に示される配列を含む。いくつかの実施形態では、shRNAmiRは、配列番号116に示される配列を含む。いくつかの実施形態では、shRNAmiRは、配列番号117に示される配列を含む。

10

【0442】

遺伝子改変免疫細胞がGRの発現を低下させるshRNAmiRを発現する実施形態のいくつかでは、遺伝子改変免疫細胞は、コルチゾールまたはデキサメタゾンなどのグルココルチコイドの影響、例えば増殖の低下を受けにくい。実際、GRの発現が低下した遺伝子改変免疫細胞は、細胞集団とグルココルチコイドとのインキュベーションによって濃縮することができる。さらに、GRの発現が低下した遺伝子改変免疫細胞（例えば、CAR T細胞）は、治療の経過中にグルココルチコイド（例えば、ステロイド）を投与した場合、免疫療法中にインビボでより高い持続性を有し得る。

20

【0443】

2.5 内因性タンパク質の発現を低下させる方法

本発明は、shRNAmiRをコードする核酸配列を含む鑄型核酸を細胞に導入し、それによって鑄型核酸がゲノムに挿入され、発現されることによって、免疫細胞において内因性タンパク質の発現を低下させる方法を提供する。

【0444】

鑄型核酸は、ランダムな組み込みによって免疫細胞のゲノム内に挿入することができる。あるいは、鑄型核酸は、ヌクレアーゼ媒介標的挿入によって標的遺伝子内に挿入することができ、操作されたヌクレアーゼは、免疫細胞のゲノム内の認識配列に対して特異性を有し、認識配列に切断部位を生成し、免疫細胞のゲノム内への鑄型核酸の挿入を切断部位において可能にする。

30

【0445】

操作されたメガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、TALEN、コンパクトTALEN、CRISPRシステムヌクレアーゼ、またはmegaTALを含む任意の操作されたヌクレアーゼを、鑄型核酸の標的挿入に使用することができる。

【0446】

例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）は、ゲノム中の所定の部位を認識および切断するように操作することができる。ZFNは、エンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼ（例えば、FokI制限酵素などのII型制限エンドヌクレアーゼ）由来のヌクレアーゼドメインに融合されたジンクフィンガーDNA結合ドメインを含むキメラタンパク質である。ジンクフィンガードメインは、天然配列であり得るか、長さが約18塩基対の所定のDNA配列に結合するタンパク質を産生するように、合理的または実験的手段によって再設計されてもよい。この操作されたタンパク質ドメインをヌクレアーゼドメインに融合することにより、ゲノムレベルの特異性でDNA切断を標的化することが可能である。ZFNは、広範囲の真核生物における遺伝子の付加、除去および置換を標的とするために広く使用されている（S. Durai et al., Nucleic Acids Res 33, 5978 (2005) に概説されている）。

40

50

【0447】

同様に、T A L-エフェクターヌクレアーゼ（T A L E N）を作製して、ゲノムDNAの特定の部位を切断することができる。Z F Nと同様に、T A L E Nは、エンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼ（例えば、F o k I制限酵素などのII型制限エンドヌクレアーゼ）に融合された操作された部位特異的DNA結合ドメインを含む（M a k , e t a l . (2013) C u r r O p i n S t r u c t B i o l . 23:93-9に概説されている）。しかしながら、この場合、DNA結合ドメインは、それぞれが単一のDNA塩基対を特異的に認識するT A L-エフェクタードメインのタンデムアレイを含む。

【0448】

コンパクトT A L E Nは、二量体化の必要性を回避する代替的なエンドヌクレアーゼアーキテクチャである（B e u r d e l e y , e t a l . (2013) N a t C o m m u n . 4:1762）。コンパクトT A L E Nは、I-T e v Iホーミングエンドヌクレアーゼまたは米国特許出願公開第20130117869号明細書の表2に列挙されているエンドヌクレアーゼのいずれかに由来するヌクレアーゼドメインに融合された、操作された部位特異的T A L-エフェクターDNA結合ドメインを含む。コンパクトT A L E Nは、DNAプロセシング活性のために二量体化を必要としないので、コンパクトT A L E Nは単量体として機能的である。

【0449】

C R I S P R / C a s システムに基づく操作されたエンドヌクレアーゼも当技術分野で公知である（R a n , e t a l . (2013) N a t P r o t o c . 8:2281-2308; M a l i e t a l . (2013) N a t M e t h o d s . 10:957-63）。C R I S P R システムは、2つの構成要素：（1）C R I S P Rヌクレアーゼ；（2）ヌクレアーゼをゲノム中の目的の位置に指向させる約20ヌクレオチドの標的化配列を含む短鎖「ガイドRNA」、を含む。C R I S P R システムはまた、t r a c r R N Aを含み得る。各々が異なる標的化配列を有する複数のガイドRNAを同じ細胞内で発現させることにより、DNA切断をゲノム内の複数の部位に同時に標的化することが可能である。

【0450】

12塩基対を超える認識配列において二本鎖DNAに結合する操作されたメガヌクレアーゼを、本開示の方法に使用することができる。メガヌクレアーゼは、I-C r e Iに由来するエンドヌクレアーゼであり得、例えば、DNA結合特異性、DNA切断活性、DNA結合親和性、または二量体化特性に関して天然のI-C r e Iと比較して改変された、I-C r e Iの操作された変異体を指し得る。I-C r e Iのこのような改変された変異体を作製するための方法は、当技術分野で公知である（例えば、国際公開第2007/047859号パンフレット、当該文献は参照によりその全体が組み込まれる）。本明細書で使用されるメガヌクレアーゼは、ヘテロ二量体として二本鎖DNAに結合する。メガヌクレアーゼはまた、一对のDNA結合ドメインがペプチドリinkerを使用して単一のポリペプチドに連結されている「単鎖メガヌクレアーゼ」であり得る。

【0451】

m e g a T A Lと呼ばれるヌクレアーゼは、転写活性化因子様エフェクター（T A L E）DNA結合ドメインおよび操作された配列特異的ホーミングエンドヌクレアーゼを含む単鎖エンドヌクレアーゼである。

【0452】

特定の実施形態では、操作されたヌクレアーゼの認識配列は標的遺伝子内にある。標的遺伝子は、配列が変更されること（例えば、ヌクレオチドの付加もしくは削除、ヌクレオチドの置換、または異種もしくは外因性配列の挿入）が望ましい任意の遺伝子であり得る。例えば、遺伝子不活性化による標的遺伝子のノックアウトが望ましい場合がある。いくつかの実施形態では、標的遺伝子はT C Rアルファ遺伝子またはT C Rベータ遺伝子である。特定の実施形態では、標的遺伝子は、T C Rアルファ定常領域（T R A C）遺伝子で

10

20

30

40

50

あり得る。いくつかの具体的な実施形態では、標的遺伝子は T R A C 遺伝子であり、認識配列は配列番号 58 に示される T R C 1-2 認識配列である。

【0453】

これらの実施形態のいくつかでは、鋳型核酸の標的遺伝子への挿入は、標的遺伝子によってコードされる完全長内因性タンパク質の発現の破壊をもたらす。したがって、標的遺伝子が T C R アルファ遺伝子、T R A C 遺伝子、または T C R ベータ遺伝子である実施形態のいくつかでは、内因性 T C R が、これらの遺伝子によってコードされる内因性タンパク質の非存在下で細胞表面に適切に構築されないため、遺伝子改変免疫細胞は、アルファ／ベータ T C R などの内因性 T C R の検出可能な細胞表面発現を有さない。

【0454】

遺伝子改変免疫細胞が、アルファ／ベータ T C R の成分をコードする遺伝子の不活性化に起因して、内因性 T C R（例えば、アルファ／ベータ T C R）の検出可能な細胞表面発現を有さない特定の実施形態では、遺伝子改変免疫細胞は、C A R または外因性 T C R および／または H L A - E 融合タンパク質をさらに発現する。C A R または外因性 T C R および／または H L A - E 融合タンパク質は、鋳型核酸内に含まれる配列によってコードされ得る。これらの実施形態のいくつかでは、C A R / T C R コード配列および／または H L A - E 融合タンパク質コード配列は、s h R N A m i R コード配列とは異なるプロモータに作動可能に連結されている。代替的な実施形態では、C A R / T C R コード配列および／または H L A - E 融合タンパク質コード配列は、s h R N A m i R コード配列と同じプロモータまたは異なるプロモータに作動可能に連結されている。C A R / T C R コード配列および／または H L A - E 融合タンパク質コード配列は、s h R N A m i R コード配列の 5' または 3' であり得、コード配列は、同じ向きまたは異なる向き、例えば 5' から 3' または 3' から 5' であり得る。さらに、コード配列は、同じ核酸分子からの 2 つ以上の遺伝子（すなわち、シストロン）の翻訳を可能にするために、当技術分野で公知のエレメント、限定するものではないが、I R E S エレメント、T 2 A エレメント、P 2 A エレメント（例えば、P 2 A / フューリン）、E 2 A エレメント、および F 2 A エレメントなどによって分離され得る。

【0455】

内因性 T C R の発現を破壊するためのヌクレアーゼの使用、例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（Z F N）、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（T A L E N）、メガ T A L、および C R I S P R システムの使用が開示されている（例えば、O s b o r n e t a l . (2016), M o l e c u l a r T h e r a p y 24 (3): 570-581; E y q u e m e t a l . (2017), N a t u r e 543: 113-117; 米国特許第 8,956,828 号明細書; 米国特許出願公開第 2014/0301990 号明細書; 米国特許出願公開第 2012/0321667 号明細書）。ヒト T R A C 遺伝子の D N A 標的を切断するための操作されたメガヌクレアーゼの具体的な使用も以前に開示されている。例えば、国際公開第 2014/191527 号パンフレットがあり、これは T C R アルファ定常領域遺伝子のエクソン 1 内の認識配列を標的とするように操作された E - O n u I メガヌクレアーゼの変異体を開示した。

【0456】

さらに、国際公開第 2017/062439 号パンフレットおよび国際公開第 2017/062451 号パンフレットにおいて、出願人らは、T C R アルファ定常領域（T R A C）遺伝子のエクソン 1 中の認識配列に対して特異性を有する操作されたメガヌクレアーゼを開示した。これらには、T R A C 遺伝子のエクソン 1 中の T R C 1-2 認識配列（配列番号 58）に特異性を有する「T R C 1-2 メガヌクレアーゼ」が含まれた。公報 '439 および '451 はまた、C A R コード配列または外因性 T C R コード配列を T C R 1-2 メガヌクレアーゼ切断部位へ標的挿入するための方法を開示した。

【0457】

特定の実施形態では、本発明を実施するために使用されるヌクレアーゼは、単鎖メガヌクレアーゼである。単鎖メガヌクレアーゼは、リンカーペプチドによって連結された N 末

10

20

30

40

50

端サブユニットおよびC末端サブユニットを含む。2つのドメインの各々は、認識配列の半分（すなわち、認識ハーフサイト）を認識し、DNA切断の部位は、2つのサブユニットの界面付近の認識配列の中央にある。DNA鎖切断は、メガヌクレアーゼによるDNA切断が一对の4塩基対の3'一本鎖オーバーハングを生成するように、4塩基対によってオフセットされる。

【0458】

操作されたヌクレアーゼは、タンパク質の形態で、または好ましくは操作されたヌクレアーゼをコードする核酸として細胞に送達され得る。このような核酸は、DNA（例えば、環状または線状化プラスミドDNAまたはPCR産物）またはRNA（例えば、mRNA）であり得る。操作されたヌクレアーゼコード配列がDNA形態で送達される実施形態の場合、それは、ヌクレアーゼ遺伝子の転写を促進するためにプロモータに作動可能に連結されなければならない。本発明に適した哺乳動物プロモータには、サイトメガロウイルス初期（CMV）プロモータ（Thomsen et al. (1984), Proc Natl Acad Sci USA. 81 (3): 659-63）またはSV40初期プロモータ（Benoit and Chambon (1981), Nature. 290 (5804): 304-10）などの構成的プロモータ、ならびにテトラサイクリン誘導性プロモータなどの誘導性プロモータ（Dingermann et al. (1992), Mol Cell Biol. 12 (9): 4038-45）が含まれる。操作されたヌクレアーゼをコードする核酸はまた、合成プロモータに作動可能に連結され得る。合成プロモータとしては、限定するものではないが、JcTプロモータ（国際公開第2002/012514号パンフレット）を挙げることができる。

【0459】

ある実施形態では、操作されたヌクレアーゼをコードする核酸配列は、組換えDNA構築物または発現カセット上に送達される。例えば、組換えDNA構築物は、プロモータと本明細書に記載の操作されたヌクレアーゼをコードする核酸配列とを含む発現カセット（すなわち、「カセット」）を含むことができる。

【0460】

いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼをコードするmRNAは、これが、操作されたヌクレアーゼをコードする遺伝子が細胞のゲノムに統合される可能性を低減するので、細胞に送達される。

【0461】

操作されたヌクレアーゼをコードするmRNAは、インビトロ転写などの当技術分野で公知の方法を使用して作製することができる。いくつかの実施形態では、mRNAは、改変された5'キャップを含む。このような改変5'キャップは当技術分野で公知であり、限定するものではないが、アンチリバースキャップ類似体（ARCA）（米国特許第7074596号）、7-メチルグアノシン、CleanCap（登録商標）類似体、例えばCap 1類似体（Trilink; San Diego, CA）を挙げることができ、または例えばワクシニアキャップ酵素などを使用して酵素的にキャップされる。いくつかの実施形態では、mRNAはポリアデニル化され得る。mRNAは、コードされた操作されたヌクレアーゼの発現および／またはmRNA自体の安定性を増強するために、さまざまな5'および3'非翻訳配列エレメントを含有し得る。このようなエレメントには、例えば、ウッドチャック肝炎ウイルス翻訳後調節エレメントなどの翻訳後調節エレメントが含まれ得る。

【0462】

mRNAは、プソイドウリジン、5-メチルシチジン、N6-メチルアデノシン、5-メチルウリジンまたは2-チオウリジンなどのヌクレオシド類似体または天然に存在するヌクレオシドを含有し得る。さらなるヌクレオシド類似体としては、例えば、米国特許第8,278,036号明細書に記載のものが挙げられる。

【0463】

別の特定の実施形態では、操作されたヌクレアーゼをコードする核酸は、一本鎖DNA

鋳型を使用して細胞に導入することができる。一本鎖DNAは、操作されたヌクレアーゼをコードする配列の上流および／または下流に5'および／または3' AAV逆位末端反復配列(ITSR)をさらに含むことができる。他の実施形態では、一本鎖DNAは、操作されたヌクレアーゼをコードする配列の上流および／または下流に5'および／または3' 相同アームをさらに含むことができる。

【0464】

別の特定の実施形態では、ヌクレアーゼをコードする遺伝子は、線状化DNA鋳型を使用して細胞に導入することができる。いくつかの例では、ヌクレアーゼをコードするプラスミドDNAは、環状プラスミドDNAが細胞に導入される前に線状化されるように、1つまたは複数の制限酵素によって消化され得る。

【0465】

精製されたヌクレアーゼタンパク質を細胞内に送達してゲノムDNAを切断することができ、これにより、本明細書で以下にさらに詳述するものを含む、当技術分野で公知のさまざまな異なる機序によって、切断部位における目的の配列との相同組換えまたは非同相末端結合が可能になる。

【0466】

いくつかの実施形態では、ヌクレアーゼタンパク質、またはヌクレアーゼをコードするDNA/mRNAは、細胞取り込みを促進するために細胞透過性ペプチドまたは標的化リガンドに結合される。当技術分野で公知の細胞透過性ペプチドの例としては、ポリアルギニン(Jearawiriyapaisarn, et al. (2008) Mol Ther. 16:1624-9)、HIVウイルス由来のTATペプチド(Hudecz et al. (2005), Med. Res. Rev. 25:679-736)、MPG(Simeoni, et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31:2717-2724)、Pep-1(Deshayes et al. (2004) Biochemistry 43:7698-7706)、およびHSV-1 VP-22(Deshayes et al. (2005) Cell Mol Life Sci. 62:1839-49)が挙げられる。代替的な実施形態では、ヌクレアーゼタンパク質、またはヌクレアーゼをコードするDNA/mRNAは、標的細胞上に発現される特異的細胞表面受容体を認識する抗体に共有結合または非共有結合して、ヌクレアーゼタンパク質/DNA/mRNAが標的細胞に結合し、標的細胞によって内在化されるようにする。あるいは、ヌクレアーゼタンパク質/DNA/mRNAは、このような細胞表面受容体の天然リガンド(または天然リガンドの一部)に共有結合または非共有結合することができる。(McCall, et al. (2014) Tissue Barriers. 2(4):e944449; Dinda, et al. (2013) Curr Pharm Biotechnol. 14:1264-74; Kang, et al. (2014) Curr Pharm Biotechnol. 15(3):220-30; Qian et al. (2014) Expert Opin Drug Metab Toxicol. 10(11):1491-508)。

【0467】

いくつかの実施形態では、ヌクレアーゼタンパク質、またはヌクレアーゼをコードするDNA/mRNAは、当技術分野で公知の方法(Sharma, et al. (2014) Biomed Res Int. 2014)を使用して、ナノ粒子に共有結合もしくは好ましくは非共有結合されるか、またはこのようなナノ粒子内に封入される。ナノ粒子は、長さスケールが1μm未満、好ましくは100nm未満であるナノスケール送達システムである。このようなナノ粒子は、金属、脂質、ポリマー、または生物学的高分子で構成されたコアを使用して設計することができ、複数コピーのヌクレアーゼタンパク質、mRNA、またはDNAをナノ粒子コアに付着させる、または封入することができる。これは、各細胞に送達されるタンパク質/mRNA/DNAのコピー数を増加させ、したがって、各ヌクレアーゼの細胞内発現を増加させて、標的認識配列が切断される可能性を最大にする。このようなナノ粒子の表面は、ポリマーまたは脂質(例えば、キトサン、カチオン

10

20

30

40

50

性ポリマーまたはカチオン性脂質)でさらに改変されて、コア-シェルナノ粒子を形成することができ、その表面に細胞送達およびペイロードの取り込みを増強するための追加の機能性が付与される(Jian et al. (2012) Biomaterials. 33(30):7621-30)。ナノ粒子は、ナノ粒子を適切な細胞型に指向させるため、および/または細胞取り込みの可能性を高めるために、標的化分子にさらに有利に結合され得る。このような標的化分子の例としては、細胞表面受容体に特異的な抗体および細胞表面受容体の天然リガンド(または天然リガンドの一部)が挙げられる。

【0468】

いくつかの実施形態では、ヌクレアーゼタンパク質またはヌクレアーゼをコードするDNA/mRNAは、リボソーム内に封入されるか、またはカチオン性脂質を使用して複合体化される(例えば、Lipofectamine(商標)、Life Technologies Corp., Carlsbad, CA; Zuris et al. (2015) Nat Biotechnol. 33:73-80; Mishra et al. (2011) J Drug Deliv. 2011:863734を参照されたい)。リボソームおよびリボプレックス製剤は、ペイロードを分解から保護し、標的細胞の細胞膜との融合および/または細胞膜の破壊を通じて細胞取り込みおよび送達効率を促進することができる。

【0469】

いくつかの実施形態では、ヌクレアーゼタンパク質、またはヌクレアーゼをコードするDNA/mRNAは、ポリマー足場(例えば、PLGA)内に封入されるか、またはカチオン性ポリマー(例えば、PEI、PLL)を使用して複合体化される(Tamboli et al. (2011) Ther Deliv. 2(4):523-536)。ポリマー担体は、ポリマー侵食および薬物拡散の制御によって調整可能な薬物放出速度を提供するように設計することができ、高い薬物封入効率は、所望の標的細胞集団への細胞内送達まで治療用ペイロードの保護を提供することができる。

【0470】

いくつかの実施形態では、ヌクレアーゼタンパク質、または組換えヌクレアーゼをコードするDNA/mRNAは、ミセル内に自己集合する両親媒性分子と組み合わせられる(Tong et al. (2007) J Gene Med. 9(11):956-66)。ポリマーミセルは、凝集を防止し、電荷相互作用をマスクし、非特異的相互作用を低減することができる親水性ポリマー(例えば、ポリエチレングリコール)で形成されたミセルシェルを含み得る。

【0471】

いくつかの実施形態では、ヌクレアーゼタンパク質、またはメガヌクレアーゼをコードするDNA/mRNAは、標的細胞への投与および/または送達のためにエマルジョンまたはナノエマルジョン(すなわち、1nm未満の平均粒径を有する)に製剤化される。「エマルジョン」という用語は、限定するものではないが、水不混和性相が水相と混合された場合に、無極性残基(例えば、長鎖炭化水素)を水から遠ざけ、極性頭部基を水に向けた疎水力の結果として形成することができる脂質構造を含む、任意の水中油型、油中水型、水中油中水型、または油中水中油型の分散液または液滴を指す。これらの他の脂質構造としては、限定するものではないが、単層、少層、および多層の脂質小胞、ミセル、およびラメラ相が挙げられる。エマルジョンは、水相および親油性相(典型的には油および有機溶媒を含有する)から構成される。エマルジョンはまた、1つまたは複数の界面活性剤を含むことが多い。ナノエマルジョン製剤は周知であり、例えば、米国特許出願公開第2002/0045667号および同第2004/0043041号明細書、ならびに米国特許第6,015,832号、同第6,506,803号、同第6,635,676号および同第6,559,189号明細書に記載されており、これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0472】

いくつかの実施形態では、ヌクレアーゼタンパク質、またはヌクレアーゼをコードする

DNA/mRNAは、多機能ポリマーコンジュゲート、DNAデンドリマー、およびポリマーデンドリマーに共有結合または非共有結合する(Mastorakos et al., (2015) Nanoscale, 7(9): 3845-56; Cheng et al., (2008) J Pharm Sci, 97(1): 123-43)。デンドリマー生成は、ペイロードの容量およびサイズを制御することができ、高い薬物ペイロード容量を提供することができる。さらに、複数の表面基の表示を利用して、安定性を改善し、非特異的相互作用を低減させ、細胞特異的標的化および薬物放出を増強することができる。

【0473】

いくつかの実施形態では、ヌクレアーゼをコードする遺伝子は、ウイルスベクター（すなわち、組換えウイルス）を使用して送達される。このようなベクターは当技術分野で公知であり、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、およびアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターが含まれる(Vannucci, et al., (2013) New Microbiol, 36: 1-22)。本発明で有用な組換えAAVベクターは、細胞へのウイルスの形質導入および細胞ゲノムへのヌクレアーゼ遺伝子の挿入を可能にする任意の血清型を有することができる。特定の実施形態では、組換えAAVベクターは、AAV2またはAAV6の血清型を有する。AAVベクターはまた、自己相補的であり得、したがって、宿主細胞において第2鎖DNA合成を必要としない(McCarty, et al., (2001) Gene Ther, 8: 1248-54)。本明細書に開示の鑄型核酸を送達するものを含む組換えAAVベクターによって送達されるポリヌクレオチドは、左(5')および右(3')逆位末端反復配列を含み得る。

【0474】

ヌクレアーゼ遺伝子がDNA形態（例えば、プラスミド）で、および／またはウイルスベクター（例えばAAV）を介して送達される場合、それらはプロモータに作動可能に連結されなければならない。いくつかの実施形態では、これは、ウイルスベクター（例えばレンチウイルスベクターのLTR）由来の内因性プロモータ、または周知のサイトメガロウイルスプロモータもしくはSV40ウイルス初期プロモータなどのウイルスプロモータであり得る。好ましい実施形態では、ヌクレアーゼ遺伝子は、標的細胞（例えば、T細胞）において遺伝子発現を優先的に駆動するプロモータに作動可能に連結される。

【0475】

CAR/TCRコード配列および／またはHLA-E融合タンパク質コード配列は、さらなる制御配列をさらに含むことができる。例えば、配列は、相同組換えエンハンサー配列、コザック配列、ポリアデニル化配列、転写終結配列、選択マーカー配列（例えば、抗生物質耐性遺伝子）、複製起点などを含み得る。操作されたヌクレアーゼをコードする配列はまた、少なくとも1つの核局在化シグナルを含み得る。核局在化シグナルの例は、当技術分野で公知である（例えば、Lange et al., J. Biol. Chem., 2007, 282: 5101-5105を参照されたい）。

【0476】

本発明はさらに、標的遺伝子への鑄型核酸の導入を提供する。いくつかの実施形態では、鑄型核酸は、インサートの要素に隣接する5'相同アームおよび3'相同アームを含む。このような相同アームは、切断部位が生成されるヌクレアーゼ認識配列の5'上流および3'下流の対応する配列と配列相同性を有する。一般に、相同アームは、少なくとも50塩基対、好ましくは少なくとも100塩基対、最大2000塩基対以上の長さを有することができ、ゲノム中のそれらの対応する配列と少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、またはそれを超える配列相同性を有することができる。

【0477】

本明細書に開示の鑄型核酸（例えば、shRNA/miRをコードするもの、CARもしくは外因性TCRをコードする核酸、および／またはHLA-E融合タンパク質をコードする核酸）は、前述の手段のいずれかによって細胞に導入することができる。特定の実施形態では、鑄型核酸は、ウイルスベクター（すなわち、組換えウイルス）、例えば組換え

レンチウイルス、組換えレトロウイルス、組換えアデノウイルス、または好ましくは組換え A A V ベクター（すなわち、組換え A A V）によって導入される。外因性核酸（例えば、鑄型核酸）を導入するのに有用な組換え A A V ベクターは、ウイルスの細胞への形質導入および外因性核酸配列の細胞ゲノムへの挿入を可能にする任意の血清型を有することができる。特定の実施形態では、組換え A A V ベクターは、A A V 2 または A A V 6 の血清型を有する。組換え A A V ベクターはまた、自己相補的であり得、したがって、宿主細胞において第 2 鎖 D N A 合成を必要としない。

【0478】

別の特定の実施形態では、本明細書に開示の鑄型核酸（例えば、s h R N A m i R をコードするもの、C A R もしくは外因性 T C R をコードする核酸、および／または H L A - E 融合タンパク質をコードする核酸）は、一本鎖 D N A 鑄型を使用して細胞に導入することができる。一本鎖 D N A は、目的の外因性配列を含むことができ、好ましい実施形態では、相同組換えによってメガヌクレアーゼ切断部位への核酸配列の挿入を促進するために 5' および 3' 相同アームを含むことができる。一本鎖 D N A は、5' 相同アームの 5' 上流に 5' A A V 逆位末端反復（I T R）配列、および 3' 相同アームの 3' 下流に 3' A A V I T R 配列をさらに含むことができる。

【0479】

別の特定の実施形態では、本明細書に開示の鑄型核酸（例えば、s h R N A m i R をコードするもの、C A R もしくは外因性 T C R をコードする核酸、および／または H L A - E 融合タンパク質をコードする核酸）は、線状化 D N A 鑄型を用いて細胞に導入することができる。いくつかの例では、プラスミド D N A は、環状プラスミド D N A が細胞にトランスフェクトされる前に線状化されるように、1 つまたは複数の制限酵素によって消化され得る。

【0480】

本発明によって改変された免疫細胞（例えば、T 細胞）は、目的のヌクレアーゼおよび／または外因性配列の導入前に活性化を必要とし得る。例えば、T 細胞は、可溶性であるか、または支持体（すなわち、ビーズ）にコンジュゲートされている抗 C D 3 および抗 C D 2 8 抗体と、細胞を活性化するのに十分な期間接触させることができる。

【0481】

本発明の遺伝子改変免疫細胞は、1 つまたは複数の誘導性自殺遺伝子を発現するようにさらに改変することができ、その誘導は細胞死を引き起こし、インビトロまたはインビボでの細胞の選択的破壊を可能にする。いくつかの例では、自殺遺伝子は、細胞傷害性ポリペプチド、非毒性プロドラッグを細胞傷害性薬物に変換する能力を有するポリペプチド、および／または細胞内の細胞傷害性遺伝子経路を活性化するポリペプチドをコードすることができる。すなわち、自殺遺伝子は、単独で、または他の化合物の存在下で細胞死を引き起こす産物をコードする核酸である。このような自殺遺伝子の代表例は、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼをコードするものである。さらなる例は、水痘帯状疱疹ウイルスのチミジンキナーゼをコードする遺伝子および 5-フルオロシトシンを高毒性化合物 5-フルオロウラシルに変換することができる細菌遺伝子シトシンデアミナーゼである。自殺遺伝子には、非限定的な例として、カスパーゼ-9、カスパーゼ-8 またはシトシンデアミナーゼをコードする遺伝子も含まれる。いくつかの例では、カスパーゼ-9 は、特定の二量体化化学誘導物質（C I D）を使用して活性化され得る。自殺遺伝子はまた、治療用および／または細胞傷害性モノクローナル抗体に対して細胞を敏感にする、細胞の表面で発現されるポリペプチドをコードし得る。さらなる例では、自殺遺伝子は、抗 C D 2 0 m A b のリツキシマブによって認識される抗原モチーフおよび自殺遺伝子を発現する細胞の選択を可能にするエピトープを含む組換え抗原性ポリペプチドをコードすることができる。例えば、2 つのリツキシマブ結合エピトープおよび Q B E n d 1 0 結合エピトープを含む、国際公開第 2 0 1 3 1 5 3 3 9 1 号パンフレットに記載の R Q R 8 ポリペプチドを参照されたい。このような遺伝子の場合、リツキシマブを対象に投与して、必要に応じて細胞枯渇を誘導することができる。さらなる例では、自殺遺伝子は、切断型 E G F R

10

20

30

40

50

ポリペプチドと組み合わせて発現される Q B E n d 1 0 結合エピトープを含み得る。

【0482】

天然に存在するヌクレアーゼおよびマイクロRNA配列 (pre-miRNAおよびpri-miRNA配列を含む) の変異体を、本開示の組成物および方法に使用することができる。本明細書で使用される場合、「変異体」は、実質的に類似の配列を意味することを意図している。「変異体」ポリペプチドは、天然タンパク質の1つまたは複数の内部部位での1つまたは複数のアミノ酸の欠失もしくは付加、および／または天然ポリペプチドの1つまたは複数の部位での1つまたは複数のアミノ酸の置換による、「天然」ポリペプチドに由来するポリペプチドを意味することを意図している。本明細書で使用される場合、「天然」ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、変異体が由来する親配列を含む。実施形態に包含される変異体ポリペプチドは、生物学的に活性である。すなわち、それらは天然タンパク質の所望の生物学的活性を保持し続ける。このような変異体は、例えば、ヒトの操作により生じ得る。天然ポリペプチドの生物学的に活性な変異体は、本明細書の他の箇所に記載されている配列アラインメントプログラムおよびパラメータによって決定される場合、天然ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、または約99%の配列同一性を有すると思われる。ポリペプチドの生物学的に活性な変異体は、そのポリペプチドまたはサブユニットと、わずか約1~40個のアミノ酸残基、わずか約1~20個、わずか約1~10個、わずか約5個、わずか4個、3個、2個、またはさらには1個のアミノ酸残基だけ異なり得る。

【0483】

ポリペプチドは、アミノ酸の置換、欠失、切断および挿入を含むさまざまな方法で変更され得る。このような操作のための方法は、当技術分野で一般的に知られている。例えば、アミノ酸配列変異体は、DNA中の突然変異によって調製することができる。突然変異誘発およびポリヌクレオチド変更のための方法は、当技術分野で周知である。例えば、Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492; Kunkel et al. (1987) Methods in Enzymol. 154:367-382; 米国特許第4,873,192号明細書; Walker and Gastra, eds. (1983) Techniques in Molecular Biology (MacMillan Publishing Company, New York)、およびそこに引用されている参考文献を参照されたい。目的のタンパク質の生物学的活性に影響を及ぼさない適切なアミノ酸置換に関する指針は、Dayhoff et al. (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.) のモデルに見出すことができ、当該文献は参照により本明細書に組み込まれる。1つのアミノ酸を類似の特性を有する別のアミノ酸と交換するなどの保存的置換が最適であり得る。

【0484】

ポリヌクレオチドの場合、「変異体」は、天然ポリヌクレオチド内の1つまたは複数の部位における1つまたは複数のヌクレオチドの欠失および／または付加を含む。当業者は、実施形態の核酸の変異体が、オープンリーディングフレームが維持されるように構築されることを認識されよう。ポリヌクレオチドの場合、保存的変異体は、遺伝暗号の縮重のために、実施形態のポリペプチドのうちの1つのアミノ酸配列をコードする配列を含む。変異体ポリヌクレオチドには、例えば部位特異的突然変異誘発を使用することによって生成されるが、依然としてポリペプチドまたはRNAをコードするものなどの合成由来ポリヌクレオチドが含まれる。一般に、実施形態の特定のポリヌクレオチドの変異体は、本明細書の他の箇所に記載されている配列アラインメントプログラムおよびパラメータによって決定される場合、その特定のポリヌクレオチドと少なくとも約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約9

0%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、またはそれを超える配列同一性を有すると思われる。特定のポリヌクレオチド（すなわち、参照ポリヌクレオチド）の変異体は、変異体ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドと、参照ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドとの間の配列同一性パーセントの比較によって評価することもできる。

【0485】

本明細書に包含されるタンパク質配列の欠失、挿入および置換は、ポリペプチドの特徴に根本的な変化をもたらすことは予期されない。しかしながら、置換、欠失または挿入の正確な効果を事前に予測することが困難である場合、当業者は、ポリペプチドをその生物学的活性についてスクリーニングすることによって、その効果が評価されることを理解されよう。

【0486】

2.6 医薬組成物

いくつかの実施形態では、本発明は、本発明の遺伝子改変免疫細胞、または本発明の遺伝子改変免疫細胞の集団と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物を提供する。このような医薬組成物は、公知の技術に従って調製することができる。例えば、Remington, The Science and Practice of Pharmacy (21st ed., 2005)を参照されたい。本発明による医薬製剤の製造では、細胞を典型的には薬学的に許容される担体と混合し、得られた組成物を対象に投与する。担体は、当然のことながら、製剤中の任意の他の成分と適合性であるという意味で許容されなければならない、対象に有害であってはならない。いくつかの実施形態では、本発明の医薬組成物は、対象の疾患の治療に有用な1つまたは複数の追加の薬剤をさらに含むことができる。さらなる実施形態では、本発明の医薬組成物は、遺伝子改変T細胞のインビボ細胞増殖および生着を促進するサイトカイン（例えば、IL-2、IL-7、IL-15および／またはIL-21）などの生物学的分子をさらに含むことができる。本発明の遺伝子改変免疫細胞を含む医薬組成物は、追加の薬剤または生物学的分子と同じ組成物中で投与することができ、あるいは別個の組成物で同時投与することができる。

【0487】

本開示はまた、医薬として使用するための、本明細書に記載の遺伝子改変免疫細胞またはその集団を提供する。本開示はさらに、それを必要とする対象において疾患を治療するための医薬の製造における、本明細書に記載の遺伝子改変免疫細胞またはその集団の使用を提供する。このような一態様では、医薬は、それを必要とする対象におけるがん免疫療法に有用である。

【0488】

本発明の医薬組成物は、養子免疫療法、特にT細胞養子免疫療法によって標的化され得る任意の疾患状態を治療するのに有用であり得る。特定の実施形態では、本発明の医薬組成物および医薬は、がんの治療に有用である。本開示の医薬組成物および医薬で治療することができるがんの非限定的な例には、限定するものではないが、CARまたは外因性TCRによって標的とされ得る本明細書に記載のさまざまな種類のがんが含まれる。

【0489】

がんが本開示の遺伝子改変免疫細胞またはその集団で治療される実施形態のいくつかでは、遺伝子改変免疫細胞またはその集団を投与された対象に、放射線、外科手術、または化学療法剤などの追加の治療法をさらに投与する。

【0490】

本発明はさらに、そのゲノム中にshRNAmiRをコードする核酸配列を含む本明細書に記載の複数の遺伝子改変免疫細胞を含む遺伝子改変免疫細胞の集団であって、shRNAmiRをコードする外因性核酸分子をTCRアルファ遺伝子またはTRAC遺伝子などの標的遺伝子に挿入し、したがって細胞が内因性TCR（例えば、アルファ／ベータTCR）の検出可能な細胞表面発現を有さないようにすることができる遺伝子改変免疫細胞の集団を提供する。したがって、本発明のさまざまな実施形態では、免疫細胞の集団であ

10

20

30

40

50

って、集団中の細胞の少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または最大100%が、本明細書に記載の遺伝子改変免疫細胞である免疫細胞の集団が提供される。本発明のいくつかの実施形態では、免疫細胞の集団であって、集団中の細胞の約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または最大100%が、本明細書に記載の遺伝子改変免疫細胞である免疫細胞の集団が提供される。本発明のさらなる実施形態では、免疫細胞の集団であって、集団中の細胞の少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または最大100%が、CARもしくは外因性TCRをさらに発現し、および／またはHLA-E融合タンパク質をさらに発現する本明細書に記載の遺伝子改変免疫細胞である免疫細胞の集団が提供される。本発明のある実施形態では、免疫細胞の集団であって、集団中の細胞の約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または最大100%が、CARもしくは外因性TCR、および／またはHLA-E融合タンパク質をさらに発現する本明細書に記載の遺伝子改変免疫細胞である免疫細胞の集団が提供される。

10

20

30

40

50

【0491】

2.7 遺伝子改変免疫細胞の投与方法

本明細書に開示の別の態様は、有効量の本開示の遺伝子改変免疫細胞またはその集団の、それを必要とする対象への投与である。特定の実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、それを必要とする対象に投与される。例えば、有効量の細胞集団を、疾患を有する対象に投与することができる。特定の実施形態では、疾患はがんであり得、本発明の遺伝子改変免疫細胞の投与は免疫療法を表す。投与された細胞は、レシピエントにおける標的細胞の増殖を低下させ、数を減少させ、または殺滅することができる。抗体療法とは異なり、本開示の遺伝子改変免疫細胞は、インビボで複製および増殖することができ、疾患の持続的制御につながり得る長期持続性をもたらす。

【0492】

可能な投与経路の例としては、非経口（例えば、静脈内（IV）、筋肉内（IM）、皮下（SC）、または注入）投与が挙げられる。さらに、投与は、連続注入によって、または単回もしくは複数回のボラス投与によるものであり得る。特定の実施形態では、薬剤は、約12時間未満、6時間、4時間、3時間、2時間、または1時間の期間にわたって注入される。さらに他の実施形態では、注入は最初はゆっくり行われ、次いで経時的に増加される。

【0493】

いくつかの実施形態では、本開示の遺伝子改変免疫細胞またはその集団は、がんを治療する目的で腫瘍抗原を標的とする。このようながんとしては、限定するものではないが、CARまたは外因性TCRによって標的とされ得る本明細書に記載のさまざまな種類のがんを挙げることができる。

【0494】

「有効量」または「治療量」が示される場合、投与される正確な量は、患者（対象）の年齢、体重、腫瘍サイズ（存在する場合）、感染または転移の程度、および状態の個人差

を考慮して医師が決定することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の遺伝子改変免疫細胞またはその集団を含む医薬組成物は、それらの範囲内のすべての整数値を含めて、 $10^4 \sim 10^9$ 細胞/kg 体重の投与量で投与される。さらなる実施形態では、投与量は、それらの範囲内のすべての整数値を含めて、 $10^5 \sim 10^6$ 細胞/kg 体重である。いくつかの実施形態では、細胞組成物は、これらの投与量で複数回投与される。細胞は、免疫療法において一般に知られている注入技術を使用することによって投与することができる（例えば、Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988を参照されたい）。特定の患者に対する最適な投与量および治療計画は、疾患の徴候について患者を監視し、それに応じて治療を調整することによって、医学の当業者が容易に決定することができる。

10

【0495】

いくつかの実施形態では、本開示の遺伝子改変免疫細胞またはその集団の投与は、標的疾患または状態の少なくとも1つの症状を軽減する。例えば、本開示の遺伝子改変T細胞またはその集団の投与は、がんの少なくとも1つの症状を軽減することができる。がんの症状は当技術分野で周知であり、公知の技術によって決定することができる。

【実施例】

【0496】

本発明は、以下の実施例によってさらに説明されるが、これらは限定として解釈されるべきではない。当業者は、日常的な実験のみを使用して、本明細書に記載の特定の物質および手順に対する多数の等価物を認識するか、または確認することができるであろう。このような等価物は、以下の実施例に続く特許請求の範囲に包含されることが意図される。

20

【0497】

実施例 1

shRNAカセットを抗CD19 CAR T細胞のゲノムに挿入した場合の、ベクター-2ミクログロブリンの一過性ノックダウン

【0498】

これらの実験では、T細胞受容体アルファ定常 (TRAC) 遺伝子座にCAR遺伝子と同時送達されるshRNAの単一コピーを使用して、ベクター-2ミクログロブリン (B2M) を効率的にノックダウンできるかどうかを評価した。アフレーシスサンプルを健康ドナーから採取し、CD3陽性選択キットIIを製造者の説明書 (Stem Cell Technologies) に従って使用して、T細胞を濃縮した。T細胞を、ImmunoCult (商標) T細胞刺激因子 (抗CD2/CD3/CD28, Stem Cell Technologies) を使用して、5%ウシ胎児血清および10 ng/ml IL-2 (Gibco) を補充したX-VIVO (商標) 15培地 (Lonza) において活性化した。刺激の3日後、細胞を収集し、 1×10^6 細胞のサンプルに、TRAC遺伝子中のTRC 1-2認識配列 (配列番号58) を認識して切断するTRC 1-2 L. 1592メガヌクレアーゼをコードするRNA 1 μ gをエレクトロポレーションし、構築物7056をパッケージングしたAAVを25,000ウイルスゲノム/細胞のMOIで用いて形質導入した。AAV 7056は、TRACオープンリーディングフレームと反対向きのCAR (抗CD19 FMC63 scFv、CD8ヒンジおよび膜貫通ドメイン、Novel 6 (N6) 共刺激ドメイン、ならびにCD3ゼータ細胞内シグナル伝達ドメインから構成される) をコードする。転写はJcTプロモータによって開始され、双方向ポリA配列によって終結される。CAR発現を制御するJcTプロモータの上流には、やはりTRAC ORFに対して反対の転写配向でshRNA発現カセットが位置している。shRNAの転写は、U6プロモータによって開始され、中央ポリピリミジントラクトによって終結される。いくつかのshRNA配列を、B2M発現のノックダウン効力について評価した。AAV 7056は、shRNA 472と略されるshRNA配列TRCN0000381472を含み、その配列は配列番号6として示される。

30

40

【0499】

細胞培養物を、5% FBSおよび30 ng/mlのIL-2を補充したX-VIVO

50

(商標) 15 培地中でさらに最大 x 日間維持した。ヌクレオフェクション後 4、7 および / または 10 日目に、培養物をサンプリングし、CD3 (抗 CD3-PE、BioLegend)、CAR (抗 FMC63 抗 CAR、AlexaFluor 488 にコンジュゲートされたクローン VM16)、B2M (抗 B2M-APC または PE、クローン TU99 BD Biosciences) ならびに HLA-A、B および C (クローン W6 / 32、BV605、BioLegend) の表面発現について分析した。フローサイトメトリデータを、Beckman-Coulter CytoFLEX-LX で取得した。細胞表面 CD3 の検出は、細胞表面上の内因性 T 細胞受容体の指標である。したがって、CD3 + または CD3 - である遺伝子改変細胞は、それぞれ TCR + および TCR - であることが理解されよう。

10

【0500】

B2M および HLA-ABC レベルを、構築物 7056 を発現するサンプルおよび対照集団において測定した。図 1A は、対照培養物由来の shRNA を発現しない TRAC 編集細胞と比較した、CD3 - / CAR + 細胞における B2M の表面レベルを示す。図 1B は、同じ培養物中の CD3 - / CAR + 対 CD3 + / CAR - 集団の B2M レベルを示す。図 1C および 1D は、HLA-ABC 表面レベルの表示において同じそれぞれの比較を行う。AAV-7056 により形質導入された細胞の CD3 - / CAR + 画分は、対照集団と比較して 90% 超低下した B2M および HLA-ABC のレベルを示した。

【0501】

導入遺伝子送達後の最も早い時点で、CAR + 細胞は、マーカーおよび比較によって、HLA-ABC および B2M の表面レベルの 90 ~ 95% の低下を示す。培養をより長期間行くと、CAR + 事象の頻度が低下し、B2M 表面発現がほぼ正常レベルまで回復する (図 2A ~ 2F)。

20

【0502】

このノックダウン効力の喪失の根本原因を明らかにするために、生存 CAR + 細胞のゲノム中の遺伝子導入インサートを形質導入の 10 日後 (d10) に配列決定した。7056 配列の TRAC 相同アームにハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを使用して、配列決定反応をプライミングした。B2M 転写産物を標的とすることを意図した自己相補的ヘアピン構造の配列は、d10 ゲノムでは回収されなかった。しかし、この配列は、AAV 調製物またはパッケージングプラスミドを鋳型として使用した反応から回収した。U6 プロモータおよび cPPT を含む隣接配列が乱されなかったため、配列喪失はヘアピン配列に限定されるように見えた。

30

【0503】

これらの研究は、事前スクリーニングされた B2M 標的化 shRNA が、(T 細胞受容体アルファ定常領域遺伝子座への標的挿入を介して) 構築物が送達された細胞の表面上の B2M 発現レベルをノックダウンできることを示している。この効果は CAR + 集団 (すなわち、TRAC 遺伝子座への標的化された組み込みが起こった細胞) に特異的である。この実験は、TRAC 遺伝子座および同じ AAV 鋳型上の CAR 遺伝子に同時送達された shRNA 472 の単一コピーを使用して、B2M を効率的にノックダウンできることを実証する。結果は初期の時点で有望であるように見えたが、ノックダウン効果は一過性であり、CAR + 集団における毒性または成長停止に関連すると判定された。ノックダウン効果が弱まるにつれて、生存 T 細胞のゲノムからの shRNA 配列の喪失が観察された。これは、shRNA 472 がゲノムから切除され、統合された単一コピーにより媒介される B2M または潜在的に他の内因性タンパク質のノックダウンには適していないことを示唆した。

40

【0504】

実施例 2

ベクター 2 ミクログロブリン shRNA miR の設計、構築および特性評価

【0505】

shRNA を使用した B2M 発現の標的化は、おそらくゲノムからのヘアピン配列の喪

50

失のために、CAR T産物における一過性ノックダウン効果および毒性によって妨げられた。短鎖ヘアピンを含むガイド鎖およびパッセンジャー鎖の配列を、より大きく、より高度に構造化されたマイクロRNA足場(miR)に適合させた。shRNAおよびmiRNAの技術のこの組み合わせは、本明細書ではマイクロRNA適合shRNAまたはshRNA miRと呼ばれる。

【0506】

shRNA miRを作製するために選択されるmiR足場はmiR-Eと呼ばれ、miR-30と呼ばれるヒトゲノム中の天然に存在するmiRの操作された誘導体である(国際公開第2014/117050号パンフレットを参照されたく、当該文献は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。マイクロRNAは核内の細胞のRNAi経路に入り、そこでDroshaによってプロセッシングされ、エキスポーチン複合体によってサイトゾルに輸送され、その後DicerおよびArgonautと相互作用して、RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)にロードされる。

【0507】

この研究において使用されるmiR-E足場の配列は、配列番号1(5' miR-E足場ドメイン)、配列番号2(5' miR-E基底ステムドメイン)、配列番号3(miR-30aループドメイン)、配列番号4(3' miR-E基底ステムドメイン)および配列番号5(3' miR-E足場ドメイン)として示される。それぞれ配列番号7および8として示されるB2M標的化パッセンジャー鎖配列およびガイド鎖配列を、終止コドンの下流であるがポリA転写ターミネータの上流である抗CD19 CAR(実施例1に記載されるものと同じ)ベクター内にクローニングした。このベクター(7282)をAAV6キャプシドにパッケージングし、B2Mノックダウンの規模および持続期間を決定するための研究に使用した。

【0508】

この研究では、アフェレーシスサンプルを健常ドナーから採取し、CD3陽性選択キットIIを製造者の説明書(Stem Cell Technologies)に従って使用して、T細胞を濃縮した。T細胞を、ImmunoCult(商標)T細胞刺激因子(抗CD2/CD3/CD28、Stem Cell Technologies)を使用して、5%ウシ胎児血清および10 ng/ml IL-2(Gibco)を補充したX-VIVO(商標)15培地(Lonza)において活性化した。刺激の3日後、細胞を収集し、 1×10^6 細胞のサンプルに、TRAC遺伝子中のTRC 1-2認識配列を認識して切断するTRC 1-2 L. 1592メガヌクレアーゼをコードするRNA 1 μ gをエレクトロポレーションし、構築物 7282をパッケージングしたAAVを25,000ウイルスゲノム/細胞のMOIで用いて形質導入した。RNAiの特徴を有さないCAR T細胞(7206)またはshRNA-472を有するCAR T細胞(7056)を対照として含めた。

【0509】

編集およびAAV形質導入の3、7、および11日後に、これらの培養物由来の細胞を、TCRノックアウト(抗CD3-BB515クローンSK7、BD Biosciencesを使用)について、CAR導入遺伝子ノックイン(抗FMC63-AlexaFluor647、クローンVM16、自社生産を使用)について、および抗B2M-PE(クローンTU-99、BD Biosciences)を使用してB2Mノックダウンについて分析した。B2Mレベル(PEチャネル中の平均蛍光強度によって測定)を、同じ培養物由来の細胞のCD3-/CAR+集団とCD3+/CAR-集団との間で比較した。

【0510】

編集/形質導入の3日後、AAV 7282を使用して産生されたCAR T細胞は、CAR+の頻度に関してAAV 7206に比肩したが、AAV 7056を使用して産生された培養物は、CAR+細胞の頻度がより低かった。CD3-/CAR+細胞の頻度は、AAV 7206またはAAV 7282を用いて産生された培養物では増加または

同じままであったが、AAV 7056により形質導入された培養物では全細胞の5%未満に減少した。

【0511】

shRNA (AAV 7056)を発現するCAR T細胞は、3日目にB2Mの表面レベルを急速に91.9%下方制御した。B2M shRNAmiRは、この時点でB2M表面レベルを77.4%下方制御した(図3)。培養物をさらに数日間保持すると、shRNAによって媒介されるノックダウンの規模は、7および11日目にそれぞれ84.3%および65.1%に低下した(図4および5)。さらに、これらの時点で、正常レベルまたはほぼ正常レベルのB2Mを再発現し始めたCAR+事象がAAV 7056形質導入培養物に存在した。比較すると、shRNAmiRによって媒介されるノックダウンの大きさは、驚くべきことに、7日目および11日目に、両方の時点で約85%に増加し、B2M発現の上方制御は観察されなかった。

10

【0512】

したがって、B2M発現に干渉するためのshRNAmiRの使用は、実施例1に記載の以前に評価されたshRNAと比較した場合、より遅いノックダウン速度論およびわずかに低いノックダウン規模を有利にもたらししたが、より安定な表現型および毒性の大幅な低下をもたらした。この研究で観察された優れた結果は、CAR T細胞における内因性タンパク質発現を下方制御するためのshRNAmiRの使用のための初期概念実証を提供し、これは特定の状況における遺伝子ノックアウトよりも有利であり得る。

20

【0513】

実施例3

さらなるB2M shRNAmiR構築物の設計および特性評価

【0514】

6つのさらなるB2Mガイド鎖配列およびパッセンジャー鎖配列を同定し、miR-E骨格にクローニングし、実施例2に記載の抗CD19 CAR構築物のCARの終止コードとポリA転写ターミネータとの間に挿入した。B2M 7285 shRNAmiRのパッセンジャー鎖およびガイド鎖は、それぞれ配列番号9および10として示される。B2M 7286 shRNAmiRのパッセンジャー鎖およびガイド鎖は、それぞれ配列番号11および12として示される。B2M 7287 shRNAmiRのパッセンジャー鎖およびガイド鎖は、それぞれ配列番号13および14として示される。B2M 7288 shRNAmiRのパッセンジャー鎖およびガイド鎖は、それぞれ配列番号15および16として示される。B2M 7289 shRNAmiRのパッセンジャー鎖およびガイド鎖は、それぞれ配列番号17および18として示される。B2M 7290 shRNAmiRのパッセンジャー鎖およびガイド鎖は、それぞれ配列番号19および20として示される。これらのさらなるB2M shRNAmiR配列を、B2M発現をノックダウンする能力について試験した。

30

【0515】

この研究では、アフェレーシスサンプルをドナーから採取し、CD3陽性選択キットIを製造者の説明書(Stem Cell Technologies)に従って使用して、T細胞を濃縮した。T細胞を、ImmunoCult(商標)T細胞刺激因子(抗CD2/CD3/CD28、Stem Cell Technologies)を使用して、5%ウシ胎児血清および10ng/ml IL-2(Gibco)を補充したX-VIVO(商標)15培地(Lonza)において活性化した。刺激の3日後、細胞を収集し、 1×10^6 細胞のサンプルに、T細胞受容体アルファ定常遺伝子座のTRC 1-2認識配列を認識して切断するTRC 1-2 L. 1592メガヌクレアーゼをコードするRNA 1μgをエレクトロポレーションした。6つのCAR-shRNAmiR構築物(構築物7285~7290)を、ヌクレオフェクション中にTRC 1-2 RNAと同時に線状化DNA(2μg/サンプル)としてT細胞に送達した。あるいは、T細胞に、ヒトB2M遺伝子中のB2M 13-14認識配列(配列番号60)を認識して切断するB2M 13-14 x. 479ヌクレアーゼをヌクレオフェクトした(国際公開第2017

40

50

112859号パンフレットを参照されたい)。これは、B2Mノックアウト細胞上に存在するバックグラウンドシグナルを定義することによって、shRNAmiRノックダウンに存在するB2M表面シグナルの量の状況を説明するために含めた。

【0516】

ヌクレオフェクション後4および11日目に、培養物のサンプルを抗CD3-BB515（クローンSK7、BD Biosciences）、抗FMC63-AlexaFluor647（クローンVM16、自社生産）、抗B2M-PE（クローンTU-99、BD Biosciencesを使用）で染色した。B2Mレベル（PEチャネル中の平均蛍光強度によって測定）を、同じ培養物由来の細胞のCD3-／CAR+集団とCD3+／CAR-集団との間で比較した。

10

【0517】

CD3-／CAR+集団およびCD3+CAR-集団の平均蛍光強度（MFI）を、下記の表1において対応するshRNAmiRの横に列挙する。ノックダウンのパーセントを、 $(\text{shRNAmiR} + \text{集団のMFI} / \text{参照集団のMFI}) \times 100$ として定義する。表にしたデータは、ヌクレオフェクション後11日目に取得した。構築物7289および7290は、試験した7つの構築物の中で最大のB2M干渉を示した。B2Mノックアウト細胞上に存在するバックグラウンドシグナルは、参照集団の2%未満である（列挙せず）。

【0518】

【表1】

20

表1. 候補配列によるB2Mのノックダウン

構築物	B2M MFI CD3-／CAR+	B2M MFI 対照集団	ノックダウン%
7002	208469	219415	5
7282	41478	218647	81
7285	125840	199812	37
7286	76390	228482	67
7287	90590	222648	60
7288	31937	222326	86
7289	23676	228838	89
7290	23190	213868	89

30

【0519】

この研究で試験した7つの構築物はすべて、ある程度の安定したB2MノックダウンおよびCAR発現を示した。興味深いことに、この研究は、内因性タンパク質ノックダウンの程度が、異なるガイド鎖およびパッセンジャー鎖の選択によって調節され得ることを実証した。shRNAmiRアプローチによって提供されるこの柔軟性は、さまざまな程度の内因性タンパク質ノックダウンがほぼ完全なノックアウトよりも好ましい場合に有利であり得る。7282、7288、7289、および7290でコードされた候補配列をさらなる実験で調査した。

40

【0520】

実施例4

shRNAmiR B2M CAR T細胞の同種異系性およびナチュラルキラー（NK）細胞殺滅に対する感受性

【0521】

これらの研究では、同種抗原特異的細胞傷害性リンパ球（CTL）またはNK細胞による細胞溶解に対する細胞の感受性についての、shRNAmiRを使用した不完全であるが安定したノックダウンと比較して、遺伝子アブレーションによるB2Mのノックアウトの効果を評価した。非血縁健常ドナー由来の単球由来樹状細胞を使用してCTLをプライ

50

ミングして、同種抗原特異的CD8+T細胞集団を活性化および増殖させた。

【0522】

アフエレーシスサンプルを2人の非血縁健常ドナーから採取し、CD3陽性選択キットIIを製造者の説明書(Stem Cell Technologies)に従って使用して、T細胞を濃縮した。樹状細胞を調製するために、アフエレーシスサンプルからの未分画単核細胞をポリスチレン細胞培養フラスコにプレーティングし、1~2時間接着させた。非接着細胞を捨て、接着細胞を、単球を樹状細胞様細胞に分化させるサイトカイン混合物(800U/ml GM-CSFおよび500U/ml IL-4、いずれもPeproTech製)中で6日間培養した。樹状細胞(DC)を収集し、非血縁ドナー由来のT細胞と共にさまざまな比率でプレーティングした。最初の24時間の共培養は、外因性サイトカインの非存在下で行った。その後、IL-2を10ng/mlで培養物に添加した。

10

【0523】

共培養を5日間行い、Miltenyi ClinMACS CD4マイクロビーズおよびLSカラムを使用してCD4+T細胞を枯渇させることによってCD8+T細胞を濃縮した。CD3-PE(クローンUCHT1、BioLegend)およびCD8-BV421(クローンRPA-T8、BioLegend)を使用して純度を評価した。次いで、プライミングされたCTLを、DCを生成したのと同じドナー由来の標的T細胞と共培養した。標的T細胞を、ImmunoCult(商標)T細胞刺激因子(抗CD2/CD3/CD28、Stem Cell Technologies)を使用して、5%ウシ胎児血清および10ng/ml IL-2(Gibco)を補充したX-VIVO(商標)15培地(Lonza)において活性化した。刺激の3日後、標的T細胞を、メグヌクレアーゼB2M13-14x.479を使用してB2M遺伝子座で編集(B2M KO)するか、またはTRC1-2L.1592を使用してTRAC遺伝子座で編集した。TRAC編集標的T細胞に、AAV 7206(対照CAR T)またはAAV 7289(B2M shRNAmiR)のいずれかを25,000ウイルスゲノム/細胞のMOIで形質導入した。

20

【0524】

FACSMelodyセルソーター(Becton-Dickinson)および抗B2M-PE(クローンTU-99、BD Biosciences)、CD3-PE(クローンUCHT1、BioLegend)および抗FMC63-BV421(自社生産のクローンVM16)を使用して、B2M-画分またはCAR+画分を99%超の純度にFACS選別した。選別した標的細胞を1μMのCell Trace Violet(ThermoFisher)で標識し、1:5~5:1の範囲のエフェクター:標的(E:T)比で同種抗原感作CTLと共に培養物中に入れた。培養セットアップの18時間後、サンプルを色素陽性生標的細胞について分析し、生存標的細胞の数を「エフェクターなし」対照と比較することによって殺滅パーセントを計算した。

30

【0525】

ナチュラルキラー(NK)応答も測定した。NK細胞を、CD56陽性選択キット(Stem Cell Technologies)を使用してPBMCサンプルから磁気的に濃縮した。濃縮されたNK細胞を、Cell Trace Violet標識CAR-T細胞(AAV6-7206で作製)、B2MノックダウンCAR-T細胞(B2M shRNAmiRを含有するAAV6-7289で作製)、またはB2MノックアウトT細胞と18時間共培養した。18時間の共培養後、色素陽性生存標的細胞を計数し、殺滅パーセントを計算した。

40

【0526】

正常レベルのB2M表面発現を有するCAR T細胞を、プライミングされた同種抗原特異的CTLによって殺滅させた(図6A)。E:T比が上昇するにつれて、それに応じて殺滅パーセントが増加し、2:1のE:T比で最大74%の殺滅があった。B2M遺伝子座で遺伝子編集され、B2Mタンパク質の表面発現を完全に欠いているT細胞は、各E

50

：T比でB2M+対照ほど効率的に殺滅されなかった。B2M shRNAmiRをコードし、正常なB2M表面レベルの5～10%を発現するCAR T細胞で観察された殺滅レベルは、同様に、プライミングされたCTLによって、B2M KOによって観察されたものよりも低いパーセンテージで非効率的に殺滅された。

【0527】

B2Mノックアウト細胞は、E：T比と相関してNK細胞によって殺滅され、5：1のE：T比で最大50%の殺滅に達したことがさらに観察された（図6B）。操作されていないレベルのB2M発現を有するCAR T細胞は、NK細胞によって効率的に殺滅されなかったが、いくつかのバックグラウンド殺滅が最も高いE：T比で観察された。注目すべきことに、B2Mノックダウン細胞は、NK細胞によって非効率的に殺滅されたが、最も高いE：T比でいくつかの殺滅（28%）が観察された。

10

【0528】

メガヌクレアーゼによるB2M発現の遺伝子アブレーションは、プライミングされた同種抗原特異的CTLによる殺滅に対して高度に耐性の細胞をもたらしたが、それらはNK細胞によって容易に殺滅された。shRNAmiRアプローチを使用して内因性B2Mを正常レベルの5～10%に安定にノックダウンすると、CTLに対して同様に耐性であるが、NK細胞溶解に対して実質的に感度が低い細胞が得られた。これは、これらの細胞が、B2Mの完全なノックアウトを有する同種異系CAR T細胞よりもインビボでNK細胞殺滅を回避する可能性が高いことを示唆している。

【0529】

B2MのshRNAmiR媒介ノックダウンに加えて、第2の遺伝子編集アプローチをNK細胞回避について評価した。第2のアプローチは、B2M遺伝子に切断部位を生成するように操作されたメガヌクレアーゼの使用、および切断部位へのドナー鋳型の導入を含んだ。このドナー鋳型は、HLAクラスI組織適合抗原、アルファ鎖E（HLA-E）ポリペプチド（配列番号66）をコードした。細胞表面に発現された場合、HLA-Eは、NK細胞上のCD94/NKG2A阻害受容体に結合することが知られており、NK細胞媒介溶解からHLA-E+細胞を保護することが示されている。ここでは、HLA-Eコード配列のB2M遺伝子への標的挿入がB2M発現を同時にノックアウトし、したがってCAR T細胞の同種異系性を低下させ、NK細胞殺滅を阻害するためにHLA-Eを発現することができるかどうかを調べた。

20

【0530】

この研究では、アフェレーシスサンプルを健常で、情報を知らされ、補償されたドナーから採取し、CD3陽性選択キットIIを製造者の説明書（Stem Cell Technologies）に従って使用して、T細胞を濃縮した。T細胞を、ImmunoCult T細胞刺激因子（抗CD2/CD3/CD28-Stem Cell Technologies）を使用して、5%ウシ胎児血清および10ng/ml IL-2（Gibco）を補充したX-VIVO15培地（Lonza）において活性化した。刺激の3日後、細胞を収集し、1e6細胞のサンプルに、B2M遺伝子座中のB2M 13-14認識配列（配列番号60）を認識して切断するB2M 13-14x. 479メガヌクレアーゼをコードするRNA 1ugをエレクトロポレーションした。

30

【0531】

エレクトロポレーションの直後に、グリシン-セリンリンカーによって連結された3つのポリペプチドを含むHLA-E融合タンパク質（配列番号66）をコードするAAV7346を用いて細胞に形質導入した。第1のポリペプチドは、HLA-Gリーダーペプチド（配列番号120）とそれに続く（GGGGS）3リンカー（配列番号121）とを含む九量体である。第2のポリペプチドは、完全長コドン最適化ヒトB2M遺伝子（配列番号119をコードする）とそれに続く（GGGGS）4リンカー（配列番号122）である。第3のポリペプチドは、ヒトHLA-E-01：03配列（配列番号118）である。導入遺伝子はJebプロモータの制御下にあり、双方向ポリA配列によって終結する。導入遺伝子は、導入遺伝子をB2M 13-14切断部位に挿入するように指向させる相同

40

50

アームに隣接している。

【0532】

30 ng/ml IL-2を含有する完全X-VIVO15培地で少なくとも6日間培養した後、細胞を抗HLA-ABC-PE (BioLegend、クローンW6/32-B2M編集細胞を検出するため) および抗HLA-E-BV421 (BioLegend クローン3D12) で染色した。Beckman-Coulter CytoFLEX-SまたはLXを使用して、細胞をノックアウト/ノックイン頻度について分析した。HLA-ABC⁻HLA-E⁺細胞を、Beckton-Dickinson FACSMelodyを使用してFACSによって精製した。形質導入されていないHLA-ABC- (B2M編集され、AAVなし) を対照として選別した。この実施例において以前に記載されたように、CTLおよびNK細胞による殺滅に対する感受性について、選別された細胞を測定した。

10

【0533】

B2M13-14x.479 RNAをトランスフェクトしたT細胞は、標準的なMHC Iタンパク質HLA-A、BおよびCならびにHLA-Eの表示を欠く集団を発達させた (図7A)。B2M編集細胞にAAV7346を用いて形質導入すると、高レベルのHLA-E導入遺伝子を発現するHLA-ABC-細胞の集団が現れる (図7B)。これらの集団を99%超の純度で選別した (図8)。

【0534】

図9Aに示されるように、B2M編集されていないCAR T細胞は、同種抗原プライムCTLによって殺滅され、E:T比の上昇につれて、CAR T殺滅の増加が観察された (最大で約75%に達した)。対照的に、B2Mノックアウト細胞およびHLA-E導入遺伝子を発現するB2Mノックアウト細胞は両方とも効率的に殺滅されず (10%以下)、E:T比の上昇による殺滅の増加は観察されなかった。

20

【0535】

図9Bに示すように、NK細胞による殺滅を測定した場合、B2Mが十分なCAR T細胞はNK細胞によって効率的に標的化されなかったが、B2MノックアウトT細胞は効率的に殺滅された (最大約50%)。HLA-ABC発現を欠くにもかかわらず、HLA-E⁺細胞は、B2Mが十分な細胞で観察される程度に匹敵する程度までNK細胞溶解から保護された。これらのデータは、内因性B2M遺伝子の遺伝子破壊が、同種抗原プライムCTLによる細胞溶解からT細胞を保護し、HLA-E導入遺伝子が、NK細胞溶解の自己機序の喪失を防止することを示している。

30

【0536】

実施例5

shRNAmiRによるB2Mのノックダウンを有するCAR T細胞のインビボ有効性およびB2Mノックダウンの安定性

【0537】

これらの研究は、対照CD19 CAR T細胞を標的細胞に曝露し、インビボで活性化した後の細胞と比較した、shRNAmiRによるB2Mのノックダウンを有するCD19 CAR T細胞の有効性を評価するため、およびインビボでのB2Mノックダウンの安定性を決定するために行った。

40

【0538】

凍結保存したCD3⁺T細胞を、前述のように解凍し、静置し、活性化した。活性化後3日目に、細胞に、TRAC特異的ヌクレアーゼ (TRC1-2L.1592) をコードするmRNAをエレクトロポレーションし、直ちに、CD19指向性CAR配列を担持する7206 AAVベクター、またはCARの終止コドンとポリアデニル化配列との間にコードされるB2M標的化shRNAmiRを有するCD19 CARを担持する7289 AAVベクターを用いて形質導入した。両群由来の残存CD3⁺ (未編集) CAR T細胞を、CD3磁気濃縮キットを使用して枯渇させ、処分し、両群由来の細胞を、前述のように枯渇後の増殖後に凍結保存した。

50

【0539】

雌NSGマウスに、ホタルルシフェラーゼを発現するNALM-6ヒト急性リンパ芽球性白血病細胞株を接種し、1週間後、ビヒクルコントロール、CD19指向性CAR T細胞、またはCD19 CAR-B2M shRNAmiR細胞のいずれかを5e6 CAR T細胞／マウスの用量で静脈内（i.v.）注射した（n＝動物5匹／群）。

【0540】

ルシフェラーゼ活性を、遮光性のサンプル室に取り付けられたCCDカメラを備えたIVIS Spectrum（Perkin Elmer、MA）イメージングシステムを使用して、生きた動物において測定した。

【0541】

イメージングの当日に、動物にルシフェリン基質を注射し、麻酔誘導室に入れた。鎮静の後、ルシフェリン基質後に一定の間隔で画像を取得するために、生理学的温度に加熱したステージを備えたイメージングチャンバー内に動物を背臥位で置いた。取得時間は、Living Imageソフトウェアによって自動的に決定された。目的の領域を各マウスの周りに引き、フラックスを定量化し、光子／秒（p/s）として報告した。Living Imageソフトウェア4.5.2（Perkin Elmer、MA）を使用してデータを分析し、エクスポートした。

【0542】

マウス血液中に存在するヒトT細胞上のB2M発現の分析のために、CAR T細胞の投与後14日目に個々のマウスから血液サンプルを採取した。赤血球を溶解し、次いでサンプルを洗浄し、ヒトCD45およびB2Mの存在について染色し、前述のようにフローサイトメトリによって分析した。

【0543】

図10Aに示すように、NALM-6細胞を移植し、ビヒクル（三角形の黒い線）で処置したマウスは、生物発光イメージングによって測定されるように、研究の経過にわたって腫瘍成長の増加を示し、経時的に総フラックスが着実に増加した。対照的に、ビヒクル処置動物と比較して総フラックスの減少によって観察されるように、CD19指向性CAR T細胞（丸のついた濃い灰色の線）または統合されたB2M標的化shRNAmiR（三角形のついた薄い灰色の線）を含むCD19指向性CAR T細胞のいずれかで処置したマウスは、研究の経過にわたって迅速かつ持続可能な抗腫瘍活性を媒介した。

【0544】

CAR T投与の14日後に、血液サンプルを採取して、ヒトCD45+細胞上のB2Mの発現を評価した。図10Bに示すように、B2M発現のMFIは、統合されたB2M標的化shRNAmiRを有するCD19指向性CAR T細胞では、対照CD19指向性CAR T細胞と比較して90%を超えて減少しており、活性化され、標的細胞のクリアランスを媒介しているB2M shRNAmiR保有細胞が、ゲノムに統合されたB2M shRNAmiRを有さない対照細胞と比較してB2M発現レベルが依然として低下していることを示した。

【0545】

CARを発現する細胞におけるB2M発現の標的ノックダウンを可能にする構築物の一方にshRNAmiRベクターが含まれることのみが異なる、CD19指向性CAR T細胞の2つの群を作製した。両方の群のCAR T細胞は、白血病の異種移植モデルにおいて腫瘍負荷を軽減することができた。マウスから採取した血液サンプルにより、B2M shRNAmiRを有するヒトT細胞が、対照CD19 CAR T細胞群のマウスの血液中のT細胞よりも細胞表面上のB2M発現レベルが低いことが確認され、B2Mのノックダウンが、ヒト白血病の関連するマウスモデルにおいて活性化され、標的細胞の殺滅を媒介している細胞においてさえ安定であることを示している。

【0546】

実施例6

CAR T細胞におけるCS1の安定なノックダウン

10

20

30

40

50

【0547】

これらの研究は、shRNAmiR配列を使用してCS1を安定にノックダウンすることができるかどうかを決定するために開始した。CS1／SLAMF7 shRNAmiRの3つの候補ガイド鎖配列およびパッセンジャー鎖配列をmiR-E足場内に構築し、BCMA特異的CAR（BCMA特異的scFv、CD8ヒンジおよび膜貫通ドメイン、N6共刺激ドメイン、およびCD3ゼータ細胞内シグナル伝達ドメインを含む）の終止コドンの後に配置した。これらを構築物72101、72102、および72103と命名した。

【0548】

この研究では、アフェレーシスサンプルを健常で、情報を知らされ、補償されたドナーから採取し、CD3陽性選択キットIIを製造者の説明書（Stem Cell Technologies）に従って使用して、T細胞を濃縮した。T細胞を、ImmunoCult T細胞刺激因子（抗CD2／CD3／CD28－Stem Cell Technologies）を使用して、5%ウシ胎児血清および10ng/ml IL-2（Gibco）を補充したX-VIVO15培地（Lonza）において活性化した。刺激の3日後、細胞を収集し、1e6細胞のサンプルに、TRAC遺伝子中のTRC 1-2認識配列を認識して切断するTRC 1-2L. 1592メガヌクレアーゼをコードするRNA 1ugをエレクトロポレーションした。ヌクレオフェクションを、CARをコードする線状化DNAの2ug／1e6細胞および候補CS1／SLAMF7 shRNAmiRのうちの1つの存在下で行った。この実験では、個々のサンプルに、上記のようなTRC 1-2L. 1592、およびRNAiの特徴をコードしないBCMA CAR構築物をヌクレオフェクションした。ヌクレオフェクションの7日後、培養物を抗CD3（クローンUCHT1、BD Biosciences）、抗CS1（クローン162. 1、BioLegend）およびビオチン化BCMA（ACRO Biosystems）で染色して、CAR（ストレプトアビジン－APCまたはBV421、BioLegendを用いて対比染色）を検出した。

【0549】

CAR＋細胞上のCS1表面発現レベルを、同じ培養物中のCAR－細胞上に表示されるレベルと比較することによって、相対的なノックダウンの大きさを測定することができた。構築物72101および72102は、CS1発現を目に見えるように変化させなかったが、平均蛍光強度は、それぞれ26%および30%のノックダウンを示唆した。72103を使用して産生されたCAR T細胞は、目に見えるほど低いレベルのCS-1を示し、高発現細胞はほとんどなく、36%のノックダウンと計算された（図11）。

【0550】

これらの実験は、内因性CS1の発現がCAR T細胞において安定に低下され得ることを実証した。産生中のフラトリサイド活性を防止するために、CS1特異的CAR T細胞上のCS1をノックダウンするという目的で、候補72103をさらに調べることになる。

【0551】

実施例7

CAR T細胞におけるトランスフォーミング増殖因子ベータ受容体2（TGFB R2）の安定なノックダウン

【0552】

これらの研究は、shRNAmiR配列を使用してさらなる内因性遺伝子のTGFB R2を安定にノックダウンすることができるかどうかを決定するために開始した。TGFB R2 shRNAmiRのための候補ガイド鎖配列およびパッセンジャー鎖配列を同定し、miR-E足場に組み込み、（実施例1に記載されるように）FMC63に基づく抗CD19 CARの終止コドンの後に配置した。TGFB R2 72110 shRNAmiRのパッセンジャー鎖およびガイド鎖は、それぞれ配列番号27および28として示される。TGFB R2 72111 shRNAmiRのパッセンジャー鎖およびガイド鎖

は、それぞれ配列番号 29 および 30 として示される。TGFB R2 72112 shRNAmi R のパッセンジャー鎖およびガイド鎖は、それぞれ配列番号 31 および 32 として示される。TGFB R2 72113 shRNAmi R のパッセンジャー鎖およびガイド鎖は、それぞれ配列番号 33 および 34 として示される。TGFB R2 72114 shRNAmi R のパッセンジャー鎖およびガイド鎖は、それぞれ配列番号 35 および 36 として示される。

【0553】

アフエーシスサンプルを健常ドナーから採取し、CD3 陽性選択キット II を製造者の説明書 (Stem Cell Technologies) に従って使用して、T 細胞を濃縮した。T 細胞を、ImmunoCult (商標) T 細胞刺激因子 (抗 CD2 / CD3 / CD28、Stem Cell Technologies) を使用して、5% ウシ胎児血清および 10 ng / ml IL-2 (Gibco) を補充した X-VIVO (商標) 15 培地 (Lonza) において活性化した。

【0554】

刺激の 3 日後、細胞を収集し、 1×10^6 細胞のサンプルに、TRAC 遺伝子中の TRC 1-2 認識配列を認識して切断する TRC 1-2 L. 1592 メガヌクレアーゼをコードする RNA 1 μ g をエレクトロポレーションした。ヌクレオフェクションを、CAR をコードする線状化 DNA の 2 μ g / 1×10^6 細胞および候補 TGFB R2 shRNAmi R のうちの 1 つの存在下で行った。この実験では、個々のサンプルに上記の TRC 1-2 L. 1592 をヌクレオフェクションし、FMC63 抗 CD19 CAR をコードするが RNAi の特徴を含まない AAV 7206 を用いて形質導入した。

【0555】

細胞を、抗 TGFB R2 抗体 MM0056-4F14 (Abcam) および PE にコンジュゲートされた抗マウス κ 軽鎖二次抗体 (BioLegend) を使用して、ヌクレオフェクション後 7、10 および 14 日目に TGFB R2 発現について分析した。CAR+ 細胞を、自社で作製した抗 FMC63-ALx647 を使用して同定した。CAR+ 上の TGFB R2 シグナルの平均蛍光強度 (MFI) を CAR- 細胞上のものと比較し、ノックダウンパーセントを計算した。CAR+ 事象の頻度は、異なる構築物にわたって一貫しており、4.9% ~ 6.7% の範囲であった (図 12)。

【0556】

TGFB R2 表面レベルは、CAR+ 集団ではサンプルごとに変動したが、TRAC 遺伝子座に組み込まれた CAR-shRNAmi R 構築物を有さない CAR- 集団では比較的一貫していた。配列 72111、72112 および 72113 は、実験全体を通して最も堅固なノックダウンを支援するように思われた (TGFB R2 MFI による測定、以下の表 2 に要約する)。これらの 3 つの配列をさらなる研究のために選択した。

【0557】

【表 2】

表 2. 候補配列による TGFB R2 のノックダウン

構築物	ノックダウン% (7 日目)	ノックダウン% (14 日目)
7206	0	0
72110	55	63
72111	64	67
72112	64	75
72113	65	63
72114	10	52

【0558】

TGFB R2 特異的 shRNAmi R 配列のこのスクリーニングにより、さまざまなレ

ベルの TGFBR2 の安定なノックダウンを有する CAR T 細胞を調製可能であることが実証された。特に、構築物 72111、72112 および 72113 は、CAR-shRNAmiR 配列が首尾よく組み込まれた細胞における表面 TGFBR2 の堅固な減少を支援した。

【0559】

本明細書に記載の shRNAmiR 媒介ノックダウンアプローチを、TGFBR2 遺伝子のヌクレアーゼ媒介ノックアウトと比較するために、さらなる研究を行った。

【0560】

この研究では、アフェレーシスサンプルを健常で、情報を知らされ、補償されたドナーから採取し、CD3 陽性選択キット II を製造者の説明書 (Stem Cell Technologies) に従って使用して、T 細胞を濃縮した。T 細胞を、ImmunoCult T 細胞刺激因子 (抗 CD2 / CD3 / CD28-Stem Cell Technologies) を使用して、5% ウシ胎児血清および 10 ng / ml IL-2 (Gibco) を補充した X-VIVO15 培地 (Lonza) において活性化した。刺激の 3 日後、細胞を収集し、1e6 細胞のサンプルに、TRC1-2L.1592 をコードする RNA 1 ug、または TGFBR2 遺伝子を標的とする 2 つのヌクレアーゼ候補: TGF1-2x.5 (配列番号 64) または TGF1-2L.296 (配列番号 65) のうちの 1 つをエレクトロポレーションした。エレクトロポレーションした細胞を、30 ng / ml の IL-2 を補充した完全 X-VIVO15 培地中で 6 日間培養し、その後編集効率を分析した。これは、細胞を抗 TGFβRII 抗体 (Abcam クローン MM0056-4F14) で染色し、続いて PE にコンジュゲートされた抗マウス IgGκ 軽鎖 (BioLegend クローン RMK45) で染色することによって達成した。データを、Beckman-Coulter CyttoFLEX-S または LX で取得した。

【0561】

TRC1-2L.1592 をエレクトロポレーションした T 細胞に、AAV72112 (実施例 1 に記載の抗 CD19 FMC63 CAR をコードし、CAR 終止コドンの後および TGFBR2 特異的 shRNAmiR がポリ A 配列の前に挿入されている) または AAV7206 (RNAi を含まない対照 FMC63 CAR をコードする) を用いて直ちに形質導入した。培養の 6 日間後、CD3-CAR+細胞を、上記の方法を使用して FACS によって精製した。さらに、TGF1-2L.296 編集培養物由来の TGFβRII-細胞をこの様式で選別した。選別した細胞を無血清培地中で一晩静置した後、500 ng / ml の組換えヒト TGFβ1 (TGFBR2 のリガンド) (PeproTech) で刺激した。TGFβ1 添加の 30 分後、細胞を回収し、Phos-Flow lysis-fix 緩衝液および Phos-Flow Fix-Perm 緩衝液 III (BD Biosciences) を製造者の説明書に従って使用して、染色のために直ちに調製した。固定された細胞を抗 pSMAD2 / 3-PE (BD Biosciences) で染色し、データを Beckman-Coulter CyttoFLEX-LX で取得した。

【0562】

モックヌクレオフェクト T 細胞を抗 TGFβRII 抗体および二次抗体で、または二次抗体単独で染色して、それぞれ、TGFβRII の表面検出の陽性対照および陰性対照として役立てた。

【0563】

モックヌクレオフェクト細胞と比較して、TGF1-2x.5 の導入は培養物中の細胞の 38.6% において TGFBR2 ノックアウトをもたらしたが、TGF1-2L.296 の導入は 69% のより高いノックアウト頻度をもたらした (図 13)。

【0564】

TGFβRII 発現が破壊された T 細胞 (メガヌクレアーゼ対 RNAi) を選別し、TGFβ1 で刺激して、TGFβR の下流シグナル伝達物質である SMAD2 / 3 のリン酸化を評価した。TGFβ1 の非存在下で低い pSMAD2 / 3 シグナルおよび TGFβ1 曝露後により高い pSMAD シグナルを示す TRAC 編集 T 細胞と比較して、TGFBR

10

20

30

40

50

2 KO細胞はリガンド曝露にほとんど応答しない(図14)。TGFB β 2編集サンプルにおいて事象のある小さな集団が、サイトカイン曝露後にSMAD2/3リン酸化を示すが、これはおそらく選別不純物を表す。TGFB β 1に应答してSMAD2/3をリン酸化する選別されたTGFB β RII⁺ T細胞(7206 CAR⁺ T)、およびTGFB β 1に应答してSMAD2/3をリン酸化しない選別されたTGFB β 2 KO細胞と比較して、TGFB β 2指向性shRNAmiRを発現するCAR⁺ T細胞は、SMAD2/3を陽性対照および陰性対照によって線引きされる範囲にわたるレベルにリン酸化する(図15)。

【0565】

TGFB β 2のメガヌクレアーゼ媒介ノックアウトおよびshRNAmiR媒介ノックダウンが、(実施例6に記載されるBCMA特異的CARを発現する)BCMA特異的CAR⁺ T細胞におけるpSMAD2/3シグナル伝達を低下させることができるかどうかを決定するために、さらなる実験を行った。BCMA CAR⁺ T細胞の4つの実験群を調製し、pSMAD2/3レベルについて試験した。第1および第2の群には、それぞれ未処理対照およびTGFB β 1処理BCMA CAR⁺ T細胞が含まれた。第3および第4の群には、それぞれ、TGFB β 1-2L.296メガヌクレアーゼでノックアウトされたTGFB β 2、または72112 TGFB β 2 shRNAmiRでノックダウンされたTGFB β 2のいずれかを有するTGFB β 1で処理されたBCMA CAR⁺ T細胞が含まれた。

【0566】

CAR⁺ T細胞の各群を、TRC 1-2認識配列を認識して切断するTRC1-2L.1592メガヌクレアーゼを使用して調製し、BCMA特異的CARをコードするDNA構築物を上記のようにこの認識配列内に挿入した。TGFB β 2のノックアウトを有するBCMA CAR⁺ T細胞を、TGFB β 1-2L.296メガヌクレアーゼを用いて調製し、TGFB β 2のノックダウンを有する細胞を、上記のように72112 TGFB β 2 shRNAmiRを用いて調製した。それぞれのBCMA CAR⁺ T細胞群をTGFB β 1(500 ng/ml)で処理し、すべての細胞群を回収し、上記のように分析した。TGFB β 2ノックアウト細胞については、TGFB β 2陰性細胞集団についてフローサイトメトリをゲーティングした。

【0567】

図16に示されるように、未処理BCMA CAR⁺ T細胞は低レベルのpSMAD2/3を有し、これに対して、TGFB β 1による処理はこれらのレベルを増大させた。TGFB β 1-2L.296メガヌクレアーゼによるBCMA CAR⁺ T細胞におけるTGFB β 2のノックアウトは、pSMAD2/3を未処理BCMA CAR⁺ T細胞対照と同等またはそれより低いレベルまで低下させた。72112 TGFB β 2 shRNAmiRによるBCMA CAR⁺ T細胞におけるTGFB β 2のノックアウトはまた、pSMAD2/3を未処理BCMA CAR⁺ T細胞対照と同等のレベルまで低下させた。

【0568】

したがって、これらの研究は、遺伝子編集またはshRNAmiRのいずれかによるTGFB β 2破壊が、CAR⁺ T細胞のSMAD2/3をリン酸化する能力の低下をもたらすことを実証した。SMADリン酸化は、障害されたTGFB β 2遺伝子を有するCAR⁺ T細胞では検出されなかったが、shRNAmiRを発現する細胞は不均一であり、細胞はさまざまな程度でSMAD2/3をリン酸化する。

【0569】

実施例8

CAR⁺ T細胞におけるTGFB β 2のノックダウン対ノックアウトの比較

【0570】

TGFB β 経路に対するさまざまな変更の後でCAR⁺ T細胞の活性を評価するさらなる研究を行った。TRAC遺伝子のTRC 1-2部位に挿入されたBCMA特異的CAR(実施例6に記載)を使用して、CAR⁺ T細胞を、健常な補償されたドナーのT細胞が

10

20

30

40

50

ら生成した（他の箇所に記載）。いくつかの変異体では、shRNAmiRをコードする配列も、CARと同じカセット中のTRC 1-2部位（CAR終止コドンとポリA配列との間に配置される）に導入された。一変異体では、shRNAmiRはTGFB β 2特異的shRNAmiR（構築物72154）であったが、別の変異体では、TGFB β 機能に関連しないshRNAmiR（B2Mを標的とする－構築物72155）を導入した。CAR T細胞の第3の変異体を、構築物72155を使用して作製したが、TGFB β 2遺伝子をノックアウトするために、それらを、上記のTGFB β 1-2 L296ヌクレアーゼを使用してTGFB β 2遺伝子座において編集した。TGFB β 2 KO群のCAR T細胞は60%のKOを含んでいた。

【0571】

10

CAR T細胞の各群に、さまざまな腫瘍標的：K562陰性対照細胞、BCMAを安定に発現するようにトランスフェクトしたK562細胞、およびBCMAを安定に発現し、活性TGFB β 1を構成的に分泌するK562細胞（C223S C225S点変異）を負荷した。1つの実験では、CAR T細胞および標的を1：1の比でプレATINGした。図17に示す時点において、T細胞および任意の生存標的を計数し、各時点で1：1の比が再確立されるように新鮮な標的を培養物に添加した。時間に対する培養中のT細胞の数を図17に示す。陰性対照K562細胞に応答して増殖するCAR T細胞は観察されなかった。

【0572】

20

正常レベルのTGFB β 2発現を有するCAR T細胞は、BCMA+標的を負荷した場合、共培養の6日目までに15倍超増殖したが、TGFB分泌標的細胞の存在下では5倍しか増殖しなかった。比較すると、TGFB β 2ノックダウン細胞は、BCMA+標的に応答して同様に増殖するが、TGFB分泌標的による阻害は少ない（15倍対10倍）。別の実験では、CAR T細胞を1：9のE：T比で標的と共にプレATINGし、生存標的細胞を5日目および7日目に計数した。7日目までに、TGFB β 2ノックダウン細胞は、それらのTGFB分泌能にかかわらず、BCMA+標的細胞を実質的に根絶した。対照CAR T細胞は、対照BCMA+標的を根絶しただけであり、TGFB分泌BCMA+標的を排除しなかった（図18）。

【0573】

30

TGFB β 1-2 L296ヌクレアーゼで編集してTGFB β 2をノックアウトしたCAR T細胞は、対照、または標的細胞によるTGFB分泌に関連しなかったTGFB β 1ノックダウンCAR T細胞を上回る機能的利点を示した。図19に示されるように、TGFB β 2ノックアウトCAR T細胞を含有する培養物は、実験の17日間にわたって連続的な増殖を示した。これは、TGFB β 2ノックアウトCAR T細胞を含有する培養物における、CD4：CD8比の持続的な上昇に関連していた（図20）。

【0574】

まとめると、これらのデータは、TGFB β 1-2 L296による編集、またはTGFB β 2-特異的（sepcific）shRNAmiRの包含が、CAR T細胞が抑制量のTGFB β 1の存在下でエフェクター機能を維持および実行可能にすることを示している。

【0575】

40

実施例 9

CAR T細胞におけるTGFB β 2のノックダウン対ノックアウトの比較

【0576】

実施例8に記載のCAR T変異体に多発性骨髄腫細胞株U266、または活性TGFB β 1を分泌するように操作されたU266細胞をさらに繰り返し（上記のように）負荷した。K562実験からの知見と一致して、対照CAR T細胞の増殖ピークは、対照U266標的と比較して、TGFB分泌U266標的に応答して約50%低下した（図21）。TGFB β 2特異的shRNAmiRを発現するCAR T細胞は、TGFB β 1分泌U266標的によって阻害されなかった。TGFB β 1-2 L296ヌクレアーゼで編集してTGFB β 2をノックアウトしたCAR T細胞は、他のCAR T変異体よりも多数に増

50

殖し、この実験の19日間、多数を維持した(図22)。これに伴い、CD4+T細胞の頻度も上昇した(図23)。図23のヒストグラムは共培養の16日目に得られ、対照CAR T培養物(72154、CD4+約16%)と比較して、TGFB β R2ノックダウンCAR T培養物はわずかにCD4頻度(23%)が上昇したが、培養された二重編集CAR Tは63%のCD4+細胞を含んでいたことを示している。

【0577】

増殖のピーク後の、培養物中の標的細胞を根絶するCAR T細胞の能力に関してさらなる観察を行った。16日目の時点の、BCMA(y軸)またはTGFB-GFP導入遺伝子(x軸)を発現する生存標的細胞を示すドットプロットを図24に示す。13日目の再チャレンジ後の16日目にT細胞数の減少が観察されたにもかかわらず、対照およびTGFB β R2ノックダウンCAR T細胞の両方がU266標的を根絶することができた。T細胞数の減少を示さなかった二重編集CAR T細胞もまた、13日目と16日目との間にU266標的を根絶した。重要なことに、TGFB耐性を有する(TGFB β R2 shRNAmiRを発現するか、またはTGFI-2L296ヌクレアーゼで編集された)CAR T細胞のみが、TGFB分泌U266標的を排除することができた。対照CAR T細胞は、TGFB分泌U266標的を殺滅させることができなくなり、13日目から16日目までに共培養物の90%超を占めるように増殖した。

【0578】

これらのデータは、shRNAmiRノックダウンまたは遺伝子ノックアウトのいずれかによって、TGFB β R2の発現が乱されたCAR T細胞が、抑制レベルのTGFBサイトカインの存在下で増殖し、標的細胞を排除することができるという実施例8における結論を裏付けている。

【0579】

実施例10

CAR T細胞におけるCD52の安定なノックダウン

【0580】

これらの研究は、shRNAmiR配列を使用してさらなる内因性遺伝子のCD52を安定にノックダウンすることができるかどうかを決定するために開始した。CD52 72123 shRNAmiRのパッセンジャー鎖およびガイド鎖は、それぞれ配列番号37および38として示される。CD52 72124 shRNAmiRのパッセンジャー鎖およびガイド鎖は、それぞれ配列番号39および40として示される。

【0581】

アフエーシスサンプルを健常ドナーから採取し、CD3陽性選択キットIIを製造者の説明書(Stem Cell Technologies)に従って使用して、T細胞を濃縮した。T細胞を、ImmunoCult(商標)T細胞刺激因子(抗CD2/CD3/CD28、Stem Cell Technologies)を使用して、5%ウシ胎児血清および10ng/ml IL-2(Gibco)を補充したX-VIVO(商標)15培地(Lonza)において活性化した。刺激の3日後、細胞を収集し、 1×10^6 細胞のサンプルに、TRAC遺伝子中のTRCI-2認識配列を認識して切断するTRCI-2L.1592メガヌクレアーゼをコードするRNA 1 μ gをエレクトロポレーションした。線状化DNAのサンプルも、ヌクレオフェクション時に最終濃度2 μ g/ 1×10^6 細胞まで細胞に添加した。この実験では、それぞれが7206の変異体であり、それぞれがFMC63 CAR遺伝子の終止コドンの下流であるがポリA転写ターミネータの上流に異なるCD52特異的shRNAmiRをコードする、2つの異なる線状化構築物を使用した。

【0582】

ヌクレオフェクション後10日目に、細胞の培養物を抗CD3-BV711(クローンUCHT1、BD Biosciences)、抗FMC63-Alex647(クローンVM16、自社生産)および抗CD52-PEクローン4C8 BD Biosciences)で染色した。CD52の強度を、CD3-CAR+細胞と未編集のCD3+/C

10

20

30

40

50

A R-細胞との間で比較した。

【0583】

ヌクレオフェクション後10日目に、TRAC編集CAR+細胞上のCD52強度を、同じ培養物中の未編集(CD3+CAR-)細胞上のCD52強度に対してプロットした。構築物72123および72124をヌクレオフェクトされた培養物からのCAR+集団(影のないヒストグラム)は、対応する参照集団(影のあるヒストグラム)よりも約1log低いCD52シグナルを発現し、CAR+集団で約90%の安定した低下を表した(図25)。

【0584】

この研究は、shRNAmiRアプローチが、CAR T細胞集団における内因性CD52タンパク質を効率的かつ安定に約90%ノックダウンするために活用できることを実証する。

【0585】

実施例11

CAR T細胞におけるshRNAmiRによるタンパク質の多重ノックダウン

【0586】

さらなる研究を、多重アプローチにおいてCAR T細胞でのshRNAmiR媒介ノックダウンを使用することの実現可能性を決定するために行った。これらの研究では、B2MおよびCD52の両方を、ゲノムから安定に発現された異なるshRNAmiRによる、同じT細胞中でのノックダウンのために標的化した。

【0587】

これらの実験のために、アフェレーシスサンプルを健常ドナーから採取し、CD3陽性選択キットIIを製造者の説明書(Stem Cell Technologies)に従って使用して、T細胞を濃縮した。T細胞を、ImmunoCult(商標)T細胞刺激因子(抗CD2/CD3/CD28、Stem Cell Technologies)を使用して、5%ウシ胎児血清および10ng/ml IL-2(Gibco)を補充したX-VIVO(商標)15培地(Lonza)において活性化した。刺激の3日後、細胞を収集し、 1×10^6 細胞のサンプルに、TRAC遺伝子中のTRC 1-2認識配列を認識して切断するTRC 1-2 L. 1592メガヌクレアーゼをコードするRNA 1μgをエレクトロポレーションした。

【0588】

線状化DNAのサンプルも、ヌクレオフェクション時に最終濃度1μg/ 1×10^6 細胞まで細胞に添加した。この実験では、3つの異なる線状化構築物を使用し、それぞれがJeT駆動抗CD19 CARを発現する7206の変異体であった。クローン7290と呼ばれる1つの配列は、CARの3'非翻訳領域(UTR)にB2M特異的shRNAmiRを含む。72124と呼ばれる第2の構築物は、同じ位置にCD52特異的shRNAmiRを含有し、72156と呼ばれる第3の構築物は、CARの3'UTRにCD52 shRNAmiR、そのすぐ後にB2M shRNAmiRを含有する。

【0589】

エレクトロポレーション後、細胞を、30ng/ml IL-2を補充した完全X-VIVO15中で7日間インキュベートした。この時点で、T細胞を、上に詳述したように、TRAC編集およびCAR挿入、ならびにCD52およびB2M発現について分析した。

【0590】

CAR+CD3-細胞の集団を、CD52およびB2M発現について各サンプル中の未編集CD3+CAR-細胞と比較した。7290DNAを投与したサンプルでは、CAR T細胞は、CD3+CAR-細胞と比較して、B2Mの表面レベル(平均蛍光強度によって測定)の91%の低下を示した。両集団は、同等レベルの表面CD52を示した。72124DNAを投与したサンプルでは、CAR+集団は未編集集団と比較してCD52レベルの90%の低下を示したが、B2Mレベルの低下は示さなかった。72156DN

10

20

30

40

50

Aを含有するCAR⁺細胞は、参照集団と比較して、両方のレベル低下、CD52（89%）およびB2M（88%）を示した（図26）。さらに、ビオチン化抗CD52試薬を、依然として高レベルのCD52を発現するCAR⁺細胞を枯渇させるための陰性選択アプローチに使用して、CD52発現が低下したCAR⁺細胞の集団を濃縮できることが実証された（図27）。

【0591】

これらの知見は、2つの異なる転写物に対して指向する2つの操作されたshRNAmiRが、単一コピー標的挿入を介してT細胞に送達可能なこと、および両方のshRNAmiR遺伝子が、一方のshRNAmiR遺伝子のみを発現する対照と比較して、性能にほとんどまたは全く差がなく同時に機能し得ることを示す。

10

【0592】

実施例12

CAR、HLA-EおよびshRNAmiRをコードする構築物の単一ゲノム遺伝子座への標的挿入

【0593】

同種異系CAR⁺T細胞持続性を改善し、潜在的なNK細胞殺滅に対するそれらの感受性を低下させるためのアプローチにおける、shRNAmiR構築物の使用をさらに評価する研究を行った。これらの研究では、前述のTRC1-2L.1592メガヌクレアーゼを使用して、4つの候補構築物をTRC1-2認識部位においてT細胞に挿入した。各構築物は、腫瘍抗原標的化のためのCD19特異的CAR遺伝子（実施例1に記載されているが、配列番号73のシグナルペプチドを含むように改変されている）、MHC I発現を低下させ、アロ反応性T細胞を回避するように最適化されたB2M特異的shRNAmiR（前述の7289構築物で使用するものと同じもの）、およびNK細胞溶解を阻害するためのHLA-E融合タンパク質遺伝子を含んでいた。図28に示す構築物73161~73164は、プロモータ使用および転写終結の点で違いのある異なる構成でこれらの3つのエレメントを組み込んでいる。

20

【0594】

構築物73161（図28A）は、JcTプロモータ（配列番号67）を使用して、CAR、HLA-E融合タンパク質（配列番号66）、およびshRNAmiR遺伝子の発現を、双方向SV40ポリAシグナル（標識BipA；配列番号68）で終結する単一転写物として駆動する。shRNAmiRは、HLA-E 03-01対立遺伝子のエクソン接合部に挿入された合成イントロン（配列番号69）にコードされている。イントロンはスプライシングで切り出され、核マイクロRNA生合成機序によってプロセッシングされるが、CAR-HLA-E転写物の残りはサイトゾルに輸送され、タンパク質に翻訳される。P2A／フューリン部位（配列番号70）は、CARおよびHLA-E融合ポリペプチドの分離を可能にする。

30

【0595】

構築物73162~164（図28B~図28D）は、P2A／フューリン切断部位を使用しないが、CARおよびHLA-Eの発現を駆動するために別々のプロモータに依存する。73162では、shRNAmiRイントロンはCAR遺伝子に移動し、その両方がJcTプロモータによって制御され、BipAによって終結し、HLA-Eは別個のJcTプロモータによって制御され、ウシ成長ホルモン（BGH）ポリAシグナルによって終結する（配列番号71）。73163および73164の構築物では、shRNAmiRイントロンは場合もまたHLA-Eにコードされ、CARおよびHLA-Eの発現は別々のプロモータおよびターミネータによって制御される。73163では、CAR遺伝子はJcTプロモータによって制御され、BipAによって終結し、HLA-E発現はEF1αコアプロモータ（配列番号72）およびBGHターミネータによって制御される。73164では、両方の遺伝子は、別個のJcTプロモータ、およびBipA（CAR）またはBGH（HLA-E）ターミネータのいずれかによって制御される。4つすべての構築物において、CAR遺伝子は、編集されたT細胞の表面上のCAR密度を増加させ

40

50

るように最適化されたシグナルペプチド（配列番号 73）を含む。

【0596】

凍結保存した CD3+T 細胞を、前述のように解凍し、静置し、活性化した。活性化後 3 日目に、細胞に、TRAC 特異的ヌクレアーゼ（TRC 1-2 L. 1592）をコードする mRNA をエレクトロポレーションし、直後に 25000 ウイルスゲノム／細胞の MOI で AAV ベクターを用いて形質導入した。細胞に、AAV7206 または 73161 ~ 73164 のうちの 1 つを投与した。さらに、刺激された T 細胞の他のサンプルに、TRC 1-2 L. 1592、および内因性 B2M 遺伝子座を標的とするヌクレアーゼ B2M 13-14 x. 479 の両方をコードする mRNA をエレクトロポレーションした。これらの細胞に、JeT 駆動 HLA-E 遺伝子をコードし、B2M13-14 部位に隣接する領域に相同な挿入を指向させる AAV7206 および AAV7346（前述）を用いて形質導入した。これらの細胞は、ダブルノックアウト、ダブルノックイン（dKO dKI）と呼ばれる。

10

【0597】

編集および AAV 形質導入の 6 日後、細胞を、先に記載された試薬、ハードウェア、ソフトウェアおよび手順を使用して、CAR、HLA-ABC、HLA-E および CD3 の表面発現についてフローサイトメトリによって分析した。

【0598】

TRAC 編集 CAR T 細胞の頻度、ならびに CAR 染色の強度を評価し、図 29 の表にまとめた。CD19 特異的 CAR のみを発現する 7206 対照と比較して、構築物 73161 および 73163 は遜色がなかったが、構築物 73162 および 73164 は CD3- / CAR+ 集団を産生したが、効率的ではなかった。すべての実験構築物は、7206 よりも高い CAR 表面発現レベルが確認された（任意の蛍光単位で列挙した MFI ならびに 7206 シグナルのパーセンテージ）。これは、リーダーペプチド配列に対して行われた改善に起因する可能性がある。

20

【0599】

すべての実験構築物は、B2M shRNA miR の発現および可変レベルの HLA-E 発現から生じる、HLA-ABC の等しく効率的なノックダウン（89 ~ 90 %、図 30）が確認された。注目すべきことに、73162 および 73164 の構築物は、HLA-E を発現する CD3- / CAR- 集団の集団を生じさせた。この観察結果は、これらのサンプルにおける CD3- / CAR+ 細胞のより低い相対頻度と相まって、ベクターの左半分（CAR をコードする）または右半分（HLA-E）のいずれかを欠く不完全なインサートが産生され、AAV キャプシドにパッケージングされたことを示す。配列分析（図示せず）により、組換え事象が、ベクター中に存在し得る同一の配列によって駆動されたことが確認される。断片化は、2 つの JeT プロモータを含むベクター 73162 および 73164 で観察されたが、同様のサイズのベクター、例えば反復同一配列を含まない 73163 からはインタクトなインサートのみが検出される。HLA-ABC の効率的なノックダウンはまた、shRNA miR をイントロンに配置することが許容され、RNAi 機能を損なわないことを示唆する。

30

【0600】

要約すると、これらの研究は、CAR T 細胞において 3 つの異なる機能を支援するいくつかの構築物の有効性を実証している（すなわち、CAR の高発現、HLA-E の高発現、および HLA-ABC の効率的なノックダウン）。HLA-E の発現および B2M（したがって、HLA-ABC）のノックダウンの両方が、CAR T 細胞を NK 細胞殺滅から保護するように潜在的に作用し得る。重要なことに、これらの多成分構築物のそれぞれは、単一のヌクレアーゼを使用してゲノム内の単一の遺伝子座に挿入することができ、第 1 のヌクレアーゼを使用して CAR 遺伝子を TRAC 遺伝子座に挿入し、第 2 のヌクレアーゼを使用して HLA-E 遺伝子を B2M 遺伝子座に別々に挿入するための多重遺伝子編集の必要性を回避する。さらに、HLA-E 染色のシグナル強度は、HLA-E 遺伝子が B2M13-14 部位に挿入されている本発明者らの以前に記載された dKO dKI

40

50

細胞よりも多遺伝子実験サンプル（構築物 73161～73164）において大きいことが分かった（図 30 の表の第 5 列に報告されている MFI を参照されたい）。本発明者らは、dKO/dKI 細胞で観察される HLA-E 発現レベルにより NK 細胞溶解からの保護を達成できることを知っているため、本発明者らは、構築物 73161 および 73163 によって支持される HLA-E 発現レベルが保護も付与すると予想する。

【0601】

最後に、これらの実験は、均質なベクター、AAV 調製、および細胞表現型を達成するために、導入遺伝子における同一の反復配列の使用を回避することによって、部分的なベクター喪失をもたらす分子内相同性によって駆動される組換え事象を最小化しなければならないことをさらに示す。

【0602】

実施例 13

CAR/HLA-E/B2M shRNAmiR 構築物の評価

【0603】

この研究では、CAR T 細胞を調製し、実施例 12 に記載されるように CAR、HLA-ABC および HLA-E の表面発現について評価した。ここで、構築物 7206、73161、または 73163 を TRAC 遺伝子の TRC 1-2 部位に挿入した。HLA-ABC および HLA-E の発現レベルの比較として、さらなる対照細胞（dKO/dKI）を含めた。これらの対照 dKO/dKI 細胞は、TRAC 遺伝子の TRC 1-2 部位に挿入された CD19-CAR 7206 構築物と、B2M 遺伝子の B2M 13-14 部位に挿入された HLA-E 構築物とを有していた。

【0604】

表にしたフローサイトメトリデータを図 31 に示す。73161 および 73163 で調製した培養物中の CD3-CAR+ 細胞の頻度は、導入遺伝子を発現する TRAC 編集細胞（KO 中の KI）の頻度と同様に、対照（7206）に比肩した。CAR シグナルの MFI は、73161 および 73163 で生成されたサンプルでは、7206 または dKO/dKI サンプルよりも約 2.5 倍高く現れた。73161 および 73163 で生成された CAR+ 細胞は、HLA-ABC MFI の 90% 超の減少を示し、それらの大部分は HLA-E も発現する。HLA-E+CAR T 細胞の頻度および MFI の両方が、73161 の調製物でより高かった。まとめると、これらの結果は、ベクター 73161 および 73163 が、7206 よりも高い CAR 発現、高度の HLA-ABC ノックダウン、および dKO/dKI アプローチよりも高い HLA-E レベルを支援することを示し、これはインビボでの NK 細胞殺滅からのより大きな回避をもたらし得る。

【0605】

実施例 14

セクション 3.2 の実験 - アロ反応性 T 細胞に対する保護のインビトロ評価

【0606】

この研究では、B2M shRNAmiR および HLA-E 導入遺伝子を備えている場合、CAR T 細胞がナチュラルキラー（NK）および細胞傷害性リンパ球（CTL）殺滅から逃れる能力を評価した。最初に、CAR T 細胞を、他の箇所に記載のベクター 7206、7289、73161 または 73163 を使用して作製した。B2M KO T 細胞および B2M KO/HLA-E KI 細胞は、B2M 特異的メガヌクレアーゼと、JeT プロモータによって駆動される HLA-E 融合タンパク質をコードする B2M 特異的修復ベクターとを使用して作製した。すべての CAR T 変異体を、同じドナーから収集された細胞（HC6366）から作製した。

【0607】

次に、2 人の非血縁ドナー由来のナイーブ T 細胞（K2916 および K3212）を HC6366 アロ抗原に対して感作した。簡潔には、HC6366 由来の単球を、組換えヒト GM-CSF（800 U/ml - PeproTech）および IL-4（400 U/ml - PeproTech）の存在下で 6 日間培養して、樹状細胞様 APC に分化させた。A

10

20

30

40

50

PCを収集し、K3212およびK2916由来のナイーブT細胞と5:1のT:APC比で共培養した。IL-2 (Gibco) を24時間後に10 ng/mlの最終濃度まで培養物に添加した。プレATINGの1週間後、同種抗原感作T細胞を収集し、CD4枯渇によってCTLを濃縮した (CliniMACS CD4マイクロビーズ、Miltenyi)。CAR T変異体を1 μM CellTrace Violet (ThermoFisher) で標識し、次いで、図32に示す比で各ドナー由来の同種抗原プライムCTLと共にプレATINGした。この共培養を20~24時間行い、その時点でサンプルを1 μg/mlのヨウ化プロピジウム (Sigma) で標識し、Beckman-Coulter CytOFLEX-Sを用いて各サンプル中の色素陽性生細胞の数を計数した。ゼロエフェクター対照を使用して殺滅パーセントを決定した。

10

【0608】

図32では、K3212 (パネルA) またはK2916 (パネルB) のCTLによるCAR T細胞の殺滅が示されている。広範な殺滅が、対照 (7206) CAR T細胞に対して観察された。低いE:T比 (1:1未満) は25~50%の殺滅をもたらしたが、1を超えるE:Tはこのアッセイでの最大殺滅: 50~60%を支援した。B2M特異的shRNAmiRを発現するCAR T細胞はCTL殺滅を受けにくく、73163 CAR T細胞において最大20%、73161 CAR T細胞において最大10%であった。

【0609】

CAR T変異体に対するNK活性を評価するために、CD56陽性選択キット (StemCell Technologies) を使用して、同じドナー (HC6366) および非血縁ドナー (K799) 由来のPBMCからNK細胞を磁気的に濃縮し、10 ng/ml IL-15 (Gibco) 中で48時間培養した。CAR T標的細胞をCellTrace Violet (上記) で標識し、図33に指定された比でNK細胞と一緒にプレATINGした。共培養を、XVIVO15+5% FBSおよび10 ng/ml IL-2中で4~5日間行った。プレATINGの4~5日後、培養物を1 μg/mlのヨウ化プロピジウムで標識し、生存CAR T標的を上記のように計数した。B2MKO細胞および7289 CAR T細胞 (shRNAmiR単独) は、ドナー一致NK細胞および不一致NK細胞の両方によってほぼ根絶され (90%超の殺滅)、殺滅を、正常なHLA-ABCレベルまたはHLA-E導入遺伝子のいずれかの欠如に関連づけられる。正常なHLA-ABC発現を有するCAR T細胞 (7206) のNK殺滅は非常に低かった (10%未満) か、または検出されなかった。HLA-ABCを欠くが、HLA-E導入遺伝子を発現するCAR T変異体は、NK細胞溶解に対する感受性が変化した。自己NK細胞と共に培養した場合、73163 CAR T細胞およびB2MKO/HLA-E+細胞は中程度に保護され (30~40%の殺滅)、73161 CAR T細胞は堅固に保護された (10%未満の殺滅)。同種異系NK細胞を用いて行った実験では、B2MKO/HLA-E+細胞および73161細胞の殺滅は検出されなかった。

20

30

【0610】

これらの観察は、構築物73161および73163が、細胞をNK殺滅に対して感作することなく、同種抗原特異的CTLに対する保護を付与することを示している。さらに、この保護は、単一の遺伝子編集を使用してTRAC遺伝子座に挿入される単一の組換えAAVベクターによって提供され得る。

40

【0611】

実施例15

B2M shRNAmiR/HLA-E CAR T細胞のインビボ活性

【0612】

shRNAmiRおよびHLA-E導入遺伝子の包含がCAR T細胞の殺腫瘍活性を損なわないことを実証するために、本発明者らは、NALM/6白血病細胞を移植した免疫不全マウスにおいて腫瘍殺滅を経時的にモニターするインビボ実験を行った。NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJマウス (NOD.scid

50

・ γ 鎖 KOまたはNSG)マウスをJackson Laboratoryから購入し、ホタルシフェラーゼを発現する 5×10^5 個のNALM/6細胞(Imanis)を尾静脈を介して注射した。腫瘍移植の6日後、動物にd-フルシフェリンを注射し、IVIS imager (Perkin-Elmer)を用いて発光を測定した。腫瘍生着を確認した後、マウスを、7206対照導入遺伝子(CD19 CARのみ)、7289導入遺伝子、73161導入遺伝子または73163導入遺伝子のいずれかを担持する 1×10^6 個または 5×10^6 個のCAR T細胞(他の箇所に記載されるように作製される)で処置した。動物の1つの群にビヒクル対照(2%ヒト血清アルブミンを補充した生理食塩水)を投与した。マウスを、発光については縦方向で、および体重についてモニターした。IACUC承認のヒューマンエンドポイントを使用して生存期間を決定した。発光測定値を図34に示し、生存率を図35にプロットする。

10

【0613】

ビヒクル対照を投与された動物は、NALM/6の生着後およそ27日目にエンドポイントに達するまで、処置後に発光の増加を示した。CAR T介入を施されたマウスは、CAR T用量に比例する持続時間および大きさで、一時的に発光の低下を示した。これは延命効果を伴い、 1×10^6 個のCAR T細胞を投与されたマウスは35~42日生存し、 5×10^6 個の細胞を投与されたマウスは52日から60日を超えて生存する。用量サイズ以外に、処置群間の発光または生存に対する有意な寄与は観察されなかった。この研究は、構築物73161および73163を使用して作製されたCAR T細胞が、7206 CAR T細胞と同等の有効性を有することを示す。

20

【0614】

実施例16

CAR/shRNAmiR構築物の非ウイルスDNAトランスフェクションによるDCK shRNAmiRのスクリーニング

【0615】

これらの研究は、DCKを安定にノックダウンするためのshRNAmiRとしての異なるガイド配列およびパッセンジャー配列を評価するために開始した。この目的は、CAR T細胞におけるDCKのノックダウンが、CAR Tリンパ球枯渇レジメンにおいて一般的に使用されるフルダラビンなどのプリンヌクレオシド類似体の存在下でのCD3-/CAR+集団の濃縮を可能にするかどうかを決定することであった。

30

【0616】

この研究で利用された導入遺伝子は、CD19 CARの発現を駆動するJcTプロモータ(実施例1で前述)と、双方向SV40ポリAシグナルで終結する単一転写物としてのshRNAmiR遺伝子とを含んでいた。導入遺伝子は、導入遺伝子をTRAC遺伝子のTRC1-2切断部位に挿入するように指向させる相同アームによって両側で挟まれていた。shRNAmiRについては、5つのDCKガイド鎖配列およびパッセンジャー鎖配列を同定し、miR-E骨格にクローニングし、CARの終止コドンと双方向SV40ポリA転写ターミネータとの間でCD19-CAR構築物に挿入した。別個の実験では、この研究で評価されたDCK shRNAmiRは、DCK標的化shRNAmiRを含まないCD19 CAR発現対照細胞の内因性DCKレベルと比較した場合、70%(72136)、40%(72137)、35%(72138)、60%(72140)の低下を示した(7206)。これらのDCK shRNAmiR配列を、フルダラビンで処理した場合のCD3-/CAR+集団を濃縮する能力について試験した。

40

【0617】

凍結保存したCD3+T細胞を解凍し、静置した。CD3+T細胞を、ImmunoCult(商標)T細胞刺激因子(抗CD2/CD3/CD28、Stem Cell Technologies)を使用して、5%ウシ胎児血清および10ng/ml IL-2(Gibco)を補充したX-VIVO(商標)15培地(Lonza)において活性化した。刺激の3日後、細胞を収集し、 1×10^6 細胞のサンプルに、TRAC遺伝子中のTRC1-2認識配列を認識して切断するTRC1-2L.1592メガヌクレア

50

ーゼをコードするRNA 1 μ gをエレクトロポレーションした。5つのCAR-s hRNA miR構築物（構築物72136～72140）を、ヌクレオフェクション中にTRC 1-2ヌクレアーゼ RNAと同時に線状化DNA（1 μ g / 1×10^6 細胞）としてT細胞に送達した。エレクトロポレーションした細胞を、5%ウシ胎児血清および30 ng / mL IL-2を添加したX-VIVO（商標）15培地で培養した。

【0618】

ヌクレオフェクション後4日目に、2.5e5の生存細胞を、96丸底プレート中で広範囲の用量のフルダラビンで処理した；10 ng / mLのIL-15、IL-21（Gibco）を補充した完全XVIVO（商標）15培地中50 μ M、5 μ M、0.5 μ M、0.05 μ M、0.005 μ M、および未処理対照。未処理対照には、最高用量のフルダラビンに等しい体積のDMSOを投与した。処理の2日後、96ウェルプレートを遠心沈殿させ、薬物を含む培地を捨て、細胞を96ウェルプレートから48ウェルプレートに移し、新鮮な完全XVIVO（商標）15培地、サイトカインおよびフルダラビン（いかなる薬物も与えなかった未処理対照は除いて）で処理した。フルダラビンによる処理後6日目に、200 μ Lのサンプルを染色のために各ウェルから取り出し、残りの細胞を遠心沈殿させ、10 ng / mLのIL-15、IL-21（Gibco）およびフルダラビン（いかなる薬物も与えなかった未処理対照は除いて）を補充した新鮮な完全XVIVO（商標）15培地で処理した。フルダラビンによる処理後6日目および10日目に、200 μ Lの培養物のサンプルを抗CD3-PE（BioLegend Clone UCHT1）、抗FMC63-AlexaFluor647（クローンVM16、自社生産）で染色した。

【0619】

図36は、フローサイトメトリによって試験した異なる用量のフルダラビンでプロットしたKO中のKI%を示し、表3の対応するshRNA miRの下にも列挙する。KO中のKIパーセントは、 $(CD3- / CAR+ \%) / (総CD3- \%) \times 100$ として定義される。表にしたデータは、フルダラビンによる処理後10日目に取得した。DCK shRNA miRを発現するCARでは、漸増用量のフルダラビンによる処理は、CD3- / CAR+集団の濃縮をもたらし、KO中のKIパーセントの増加によって表3で観察することができる。72139を除いて、すべてのDCKノックダウン構築物は、5 μ Mのフルダラビン用量で70%を超えるKO中のKIを示した。用量50 μ Mのフルダラビンは、細胞に対して毒性が高すぎた。図37は、CD3- / CAR+集団の事象 / μ L対フルダラビンの濃度（ μ M）を示し、KO中のKI%と相関する。最も高いKO中のKIパーセントおよび事象 / μ Lは、フルダラビン用量5 μ Mにおいて見られた。

【0620】

【表3】

表3. フルダラビンによる処理後の、候補配列によるDCKのノックダウンによって見られるKO中のKIパーセント。

フルダラビンの用量 (μ M)	7206	72136	72137	72138	72139	72140
未処理 (DMSO)	23.06	17.71	18.40	16.58	15.72	14.46
0.005	23.32	20.60	21.93	19.15	17.34	17.61
0.05	22.71	21.12	23.43	18.69	17.72	16.85
0.5	27.60	39.03	41.25	41.13	27.57	33.94
5	33.27	70.70	72.87	80.70	43.69	70.02
50	4.35	43.14	7.69	8.33	7.49	4.76

【0621】

72136、72138にコードされた候補配列を、AAVを使用してさらなる実験で

調査した。

【0622】

この実験は、shRNAmiRを使用してDCKをノックダウンすることにより、フルダラビンの存在下でCD3- / CAR+細胞の濃縮が可能になることを実証した。この非ウイルスアプローチによって試験された5つのDCK shRNAmiR構築物のうち4つは、用量5 uMのフルダラビンによる10日間の処理が70%を超えるKO中のKIをもたらしたことを示した。フルダラビンは、CAR Tの投与前に患者をリンパ球枯渇させるためにシクロホスファミドと共に一般的に使用される。この研究は、shRNAmiRでDCKをノックダウンすることにより、CAR T細胞がフルダラビンに対して耐性になり、それらの濃縮が可能になるという概念実証を提供する。臨床的には、DCK shRNAmiRの包含は、同種異系フルダラビン耐性CAR Tの投与後の患者へのフルダラビンの継続的投与を可能にし、したがって宿主免疫応答を抑制し、これらの薬物耐性CAR T細胞がインビボでより大きな増殖および持続性を有することを可能にし得る。したがって、DCKをノックダウンする潜在的な臨床的利点は、同種異系薬物耐性CAR T細胞の活性の治療域の拡大を可能にし得るが、同時に、フルダラビンとCAR T療法との相乗的抗腫瘍活性も可能にし得る。

10

【0623】

実施例17

CAR T細胞の表現型および抗腫瘍活性に対する、shRNAmiRによるDCKノックダウンの効果

20

【0624】

これらの研究は、AAV形質導入後にDCKを安定にノックダウンするためのshRNAmiR（構築物72136および72138）としての異なるガイド配列およびパッセンジャー配列を評価するために開始した。この目的は、CAR T細胞の表現型および抗腫瘍活性に対するDCKノックダウンの効果を決定することであった。

【0625】

凍結保存したCD3+T細胞を、前述のように解凍し、静置し、活性化した。活性化後3日目に、細胞に、TRAC特異的ヌクレアーゼであるTRC 1-2L. 1592をコードするmRNAをエレクトロポレーションし、直後に20000ウイルスゲノム/細胞のMOIでAAVベクターを用いて形質導入した。細胞に、AAV7206、または72136もしくは72138を投与したか、またはAAVを与えなかった（TRC 1-2L. 1592のみを投与した）。形質導入の3日後、CAR T表現型を、抗CD3-PE（BioLegend、クローンUCHT1）、抗FMC63-AlexaFluor 647（クローンVM16、自社生産）、抗CD4-BV711（BioLegend、クローンOKT4）、抗CD8a-BV785（BioLegend、クローンSK1）、抗CD62L-BS515（BD Pharmingen、クローンDREG-56）、抗CD45RO-PE/シアニン7（BioLegend、クローンUCHL1）、抗CD27-BV421（BioLegend、クローンO323）で染色することによって研究した。サンプルをフローサイトメトリによって試験し、CytoFLEX-Sでデータを取得した。

30

【0626】

2.5e5の生存細胞を48ウェルプレートにおいて以下の用量のフルダラビンで処理した：10 ng/mLのIL-15、IL-21（Gibco）を補充した完全Xuri培地中、12 uM、6 uM、3 uMおよび未処理対照。注：未処理対照には、最高用量のフルダラビンに等しい体積のDMSOを投与した。処理後4日目に、細胞数を得て（図38に示す）、1e6生存細胞を遠心沈殿させ、上清を捨て（6 uMおよび12 uMのフルダラビンで処理したサンプルTRCおよび7206を除く）、細胞を新しい48ウェルプレートに移し、新鮮な完全Xuri培地、サイトカイン、+/-フルダラビンで処理した。フルダラビンによる処理後8日目に、上記のようにCAR T表現型染色のためにサンプルを採取した。残りの細胞は、EasySep Human Release CD3

40

50

陽性選択キットを使用してCD3を枯渇させた。CD3－画分を保持し、10 ng/mLのIL-15、IL-21（Gibco）を補充した完全Xuri培地で培養し、フルダラビンによるさらなる処理を行わなかった。形質導入後14日目、CAR T表現型染色のためにサンプルを採取し、その後ACEAアッセイをセットアップした（上記のパネル参照）。これは、CD3－CAR+の%が、エフェクターとして加えるべきCAR Tの正確な数を決定するために必要とされるからである。形質導入後15日目に、エフェクター細胞として3または6 μMのフルダラビンで未処理の、または処理した72136または72138（DCKノックダウンCD19－CAR T）または7206（CD19 CAR T）、および標的細胞としてCD19を発現するHEK 293を使用して、ACEA殺滅アッセイを設定した。細胞溶解の陽性対照としてTriton X-100を使用し、陰性対照としてTRCを使用した。実験を、エフェクター：標的（E：T）比2：1、1：2および1：4で設定した。

10

【0627】

形質導入（フルダラビンによる前処理）後3日目のCAR T表現型をフローサイトメトリによって試験し、以下の表4に要約する。KO中のKIパーセントは、（CD3－/CAR+ %）／（総CD3－%）×100として定義される。Tナイーブ（Tn）、Tセントラルメモリー（Tcm）／Tトランジションメモリー（Ttm）、TEフェクターメモリー（Tem）についてのCD4：CD8比および頻度を表4に報告する。TnはCD62L+CD45RO－（低）であり、一方、TcmはCD62L+、CD45RO+（中）であり、TtmはCD62L+、CD45RO+（高）であり、TemはCD62L－、CD45RO+である。フルダラビンによる処理前のCAR T表現型は、以下に示すように、7206（CD19－CAR）と72136、72138（DCK shRNA miRを発現するCD19－CAR）との間で変化しないままである。

20

【0628】

【表4】

表4. CD45ROおよびCD62Lゲーティングに基づくCAR T表現型（フルダラビンによる前処理）

			染色およびCD62L、CD45ROによるゲーティングによって誘導されるT細胞表現型							
			CD4				CD8			
AAV	KO中のKIパーセント	CD4:CD8	Tn	Tcm	Ttm	Tem	Tn	Tcm	Ttm	Tem
7206	67.87	1.1	0.74	83.56	11.55	2.88	2.01	94.74	3.22	0.55
72136	69.31	1.2	0.56	84.22	11.17	2.94	1.98	95.65	2.86	0.55
72138	68.25	1.19	0.7	84.66	10.98	2.53	2.65	95.76	2.92	0.38

30

40

【0629】

図38は、フルダラビンによる処理後4日目に得た生細胞数/mLを示す。TRCのみ（AAVなし）または7206（CD19－CAR AAV）では、72136および72138（DCK shRNA miRを発現するCD19－CAR AAV）と比較して、漸増用量のフルダラビンによる処理後に細胞数の50%以上の減少が見られた。

【0630】

フルダラビンによる処理後8日目のCAR T表現型をフローサイトメトリによって試験し、下記の表5に報告する。図39は、フルダラビンによる処理後8日目に得た生細胞

50

数／mLを示す。DCKノックダウンにより、DCK shRNAmiRを発現するCAR T細胞は、TRCヌクレアーゼのみ(AAVなし)および7206(CD19-CAR AAV)と比較して、フルダラビンの存在下でより生存可能であった。DCK shRNAmiRを発現するCAR Tでは、漸増用量のフルダラビンによる処理はCD3-CAR+集団の濃縮をもたらし、KO中のKIパーセントの増加によって表5において観察することができる。Tナイーブ(Tn)、Tセントラルメモリー(Tcm)／Tトランジションメモリー(Ttm)、Tエフェクターメモリー(Tem)についてのCD4:CD8比および頻度もまた報告する。未処理またはフルダラビンで処理したサンプルの間で、DCK shRNAmiRを発現するCD19-CARのCAR T表現型に有意差は観察されなかった。しかしながら、CD19 CAR(7206)では、フルダラビンによる処理時のCD4およびCD8表現型は、セントラルメモリーからトランジションメモリーへ移行し、およびエフェクターメモリー表現型に移行する。これは、DCKノックダウンおよびフルダラビンによる処理がCAR T細胞表現型に対して有意な効果を全く有さなかったことを示す。

【0631】

10

20

30

40

50

【表 5】

表 5. CD45ROおよびCD62Lゲーティングに基づくCAR T表現型（フルダラビンによる処理後 8 日目）

			染色および CD62L、CD45RO によるゲーティングによって誘導される T 細胞表現型							
			CD4				CD8			
AAV	KO 中の KI パーセント	CD4:CD8	Tn	Tcm	Ttm	Tem	Tn	Tcm	Ttm	Tem
7206 未処理	74.09	0.63	0.2	60.15	28.29	8.56	0.86	96.19	2.31	0.53
7206 3uM フルダラビン	72.51	0.68	0.04	25.78	56.91	13.55	0.28	86.38	9.76	1.79
7206 6uM フルダラビン	74.21	1.7	0.05	16.42	60.53	20.22	0.09	74.18	16.4 2	4.29
72136 未処理	69.27	0.7	0.34	55.95	29.5	11.17	1.61	95.4	2.36	0.89
72136 3uM フルダラビン	70.59	0.6	0.8	60.09	25.84	10.6	3.44	96.93	1.52	0.49
72136 6uM フルダラビン	75.12	0.61	0.48	55.49	29.42	11.5	2.36	95.83	2.17	0.64
72138 未処理	72.70	0.66	0.14	56.24	32.47	8.75	0.53	95.52	3.02	0.6
72138 3uM フルダラビン	80.38	0.53	0.23	55.18	28.72	11.35	1.88	96.9	1.79	0.48
72138 6uM フルダラビン	84.15	0.54	0.19	51.29	32.74	12.01	1.33	96.21	2.46	0.56

10

20

30

【0632】

図 40 は、ACEA アッセイにおけるエフェクター細胞として、未処理または 3 および 6 uM のフルダラビンで処理した 7206 (CD19-CAR) を使用した (TRC に対して正規化した) 細胞溶解 % を示す。CD19 を発現する HEK293 を標的細胞とした。実験を、E:T 比 2:1、1:2 および 1:4 で設定した。細胞溶解の陽性対照として Triton を使用し、陰性対照として TRC を使用した。フルダラビンによる処理の＋／－にかかわらず、最も効率的な殺滅は、E:T 比 2:1 で見られた。E:T 比 1:2、1:4 では、未処理と比較して、漸増用量のフルダラビンの存在下では効率の悪い殺滅が見られた。

40

【0633】

図 41 は、ACEA アッセイにおけるエフェクター細胞として、未処理、または 3 uM もしくは 6 uM のフルダラビンで処理した 72138 (DCK-shRNA miR を発現

50

するCD19-CAR)を使用した(TRCに対して正規化した)細胞溶解%を示す。CD19を発現するHEK293を標的細胞とした。実験を、E:T比2:1、1:2および1:4で設定した。細胞溶解の陽性対照としてTritonを使用し、陰性対照としてTRCを使用した。フルダラビン処理の有無にかかわらず、E:T比2:1、次いで1:2、次いで1:4で最も効率的な殺滅が見られたことが観察された。図42は、ACEAアッセイにおけるエフェクター細胞として、未処理、または3μMもしくは6μMのフルダラビンで処理した72136(DCK shRNAmiRを発現するCD19-CAR)を使用した(TRCに対して正規化した)細胞溶解%を示す。CD19を発現するHEK293を標的細胞とした。実験を、E:T比2:1、1:2および1:4で設定した。細胞溶解の陽性対照としてTritonを使用し、陰性対照としてTRCを使用した。フルダラビン処理の有無にかかわらず、E:T比2:1、次いで1:2、次いで1:4で最も効率的な殺滅が見られたことが観察された。

10

【0634】

最後に、DCK shRNAmiRを発現するCD19-CAR(72136、72138)は、フルダラビンで処理した場合、E:T比1:2でCD19-CARよりもより効率的な殺滅を示した。これは、shRNAmiRを使用するDCKノックダウンおよびフルダラビンによる処理が、CD19-CARの抗腫瘍活性に対して相乗効果を有することを実証した。

【0635】

実施例18

20

CAR/shRNAmiR構築物の非ウイルスDNAトランスフェクションによるグルココルチコイド受容体shRNAmiRのスクリーニング

【0636】

これらの研究は、グルココルチコイド受容体(GR)を安定にノックダウンするためのshRNAmiRとしての異なるガイド配列およびパッセンジャー配列を評価するために開始した。目的は、CAR-T細胞におけるGRのノックダウンが、CAR-T細胞療法に関連し得るサイトカイン放出症候群の治療において一般に使用されるデキサメタゾンなどのコルチコステロイドの存在下でのCD3-/CAR+集団の濃縮を可能にするかどうかを決定することであった。

【0637】

30

この研究で利用された導入遺伝子は、CD19-CARの発現を駆動するJcTプロモータと、双方向SV40ポリAシグナルで終結する単一転写物としてのshRNAmiR遺伝子とを含んでいた。導入遺伝子は、導入遺伝子をTRAC遺伝子のTRC1-2切断部位に挿入するように指向させる相同アームによって両側で挟まれていた。shRNAmiRについては、9つのGRガイド鎖配列およびパッセンジャー鎖配列を同定し、miR-E骨格にクローニングし、CARの終止コドンと双方向SV40ポリA転写ターミナータとの間でCD19-CAR構築物に挿入した。別個の実験では、この研究で評価されたGR shRNAmiRは、CD19-CARを発現したがGR標的化shRNAmiRを含まない対照細胞(7206)の内因性GRレベルと比較した場合、37%(72142)、45%(72143)、50%(72145)および56%(72149)の低下を示した。これらのGR shRNAmiR配列を、デキサメタゾンで処理した場合のCD3-/CAR+集団を濃縮する能力について試験した。

40

【0638】

凍結保存したCD3+T細胞を解凍し、静置した。T細胞を、ImmunoCult(商標)T細胞刺激因子(抗CD2/CD3/CD28、Stem Cell Technologies)を使用して、5%ウシ胎児血清および10ng/ml IL-2(Gibco)を補充したX-VIVO(商標)15培地(Lonza)において活性化した。刺激の3日後、細胞を収集し、1×10⁶細胞のサンプルに、T細胞受容体アルファ定常遺伝子中のTRC1-2認識配列を認識して切断するTRC1-2L.1592メガヌクレアーゼをコードするRNA 1μgをエレクトロポレーションした。9つのCAR

50

ー s h R N A m i R 構築物（構築物 7 2 1 4 2、7 2 1 4 3、7 2 1 4 5、7 2 1 4 6、7 2 1 4 8～7 2 1 5 2）を、ヌクレオフェクション中に T R C 1－2ヌクレアーゼ R N Aと同時に、線状化 D N A（ $1 \mu\text{g} / 1 \times 10^6$ 細胞）として T細胞に送達した。エレクトロポレーションした細胞を、5 %ウシ胎児血清および $30 \text{ ng} / \text{mL}$ I L－2を添加した X－V I V O（商標）15培地で培養した。

【0639】

ヌクレオフェクション後8日目に、 2.5×10^5 の生存細胞を、96丸底プレート中で広範囲の用量のデキサメタゾンで処理した； $10 \text{ ng} / \text{mL}$ の I L－15、I L－21（G i b c o）を補充した完全 X V I V O（商標）15培地中 $100 \mu\text{M}$ 、 $10 \mu\text{M}$ 、 $1 \mu\text{M}$ 、 $0.1 \mu\text{M}$ 、 $0.01 \mu\text{M}$ 、および未処理対照。注：未処理対照には、最高用量のデキサメタゾンに等しい体積の95 %エタノールを投与した。処理の3日後、96ウェルプレートを遠心沈殿させ、薬物を含む培地を捨て、細胞を96ウェルプレートから48ウェルプレートに移し、新鮮な完全 X V I V O（商標）15培地、サイトカインおよびデキサメタゾン（いかなる薬物も与えなかった未処理対照は除いて）で処理した。デキサメタゾンによる処理後7日目に、染色のために各ウェルから $200 \mu\text{L}$ のサンプルを取り出した。サンプルを、抗 C D 3－P E（B i o L e g e n d、クローン U C H T 1）、抗 F M C 6 3－A l e x a F l u o r 6 4 7（クローン V M 1 6、自社生産）で染色し、C y t o F L E X－L Xでフローサイトメトリによって試験した。

10

【0640】

図43は、フローサイトメトリによって試験した異なる用量のデキサメタゾンでの K O中の K Iパーセントを示し、表6の対応する s h R N A m i Rの下に列挙する。K O中の K Iパーセントは、 $(\text{C D 3－} / \text{C A R+ \%}) / (\text{総 C D 3－ \%}) \times 100$ として定義される。表にしたデータは、デキサメタゾンによる処理後7日目に取得した。G R s h R N A m i Rを発現する C A Rでは、漸増用量のデキサメタゾンによる処理は C D 3－ / C A R+集団の濃縮をもたらし、K O中の K Iパーセントの増加によって表6において観察することができる。7 2 1 4 8を除いて、すべての G Rノックダウン構築物は、用量1、 $10 \mu\text{M}$ のデキサメタゾンで35～50 %の K O中の K Iを示した。図44は、デキサメタゾンの濃度（ μM ）に対してプロットされた C D 3－ / C A R+の事象 / μL を示す。K O中の K Iパーセントは、事象 / μL と相関する。

20

【0641】

30

【表6】

表6：デキサメタゾンによる処理後の、候補配列による G Rのノックダウンによって見られた

K O中の K Iパーセント。

デキサメタゾン (μM)	7206	72142	72143	72145	72146	72148	72149	72150	72151	72152
未処理 (エタノール)	19.98	25.28	20.4	15.45	15.23	19.17	12.45	15.99	16.11	16.76
0.01	15.58	37.25	34.3	24.94	26.49	21.98	25.61	23.95	24.75	25.25
0.1	8.55	39.22	41.69	33.24	41.85	22.71	40.84	40.33	31.87	33.88
1	16.17	46.84	44.21	40.27	38.85	21.69	42.64	39.74	32.54	35.24
10	14.96	44.14	41.4	38.07	39.5	20.19	43.44	40.58	34.46	34.13
100	13.7	28.77	24.48	23.94	27.25	21.05	15.21	23.24	17.49	17.42

40

【0642】

この実験は、s h R N A m i Rを使用して G Rをノックダウンすることにより、コルチコステロイド様デキサメタゾンの存在下で C D 3－ / C A R+細胞の濃縮が可能になることを実証した。非ウイルスアプローチによって試験した9つの G R s h R N A m i Rの

50

うち8つは、用量1 μ Mまたは10 μ Mのデキサメタゾンによる7日間の処理が35～50%のKO中のKIをもたらしたことを示した。

【0643】

したがって、これらの実験により、shRNAmiRによるGRのノックダウンがCAR T細胞をデキサメタゾンに対して耐性にし、それらの濃縮を可能にすることが確認された。臨床的には、コルチコステロイドは、がんのための養子T細胞療法の投与後に時折見られる、潜在的に生命を脅かす毒性であるサイトカイン放出症候群（CRS）の治療においてトシリズマブと併せて一般に使用される。サイトカイン放出症候群は、いくつかのサイトカインの循環レベルの上昇に関連する。しかしながら、高用量のコルチコステロイドの投与は、CAR T療法の臨床的有効性を低下させ得る。CAR T細胞をコルチコステロイドに対して耐性にすることによって、CAR T細胞に対するHvG応答を、CAR T機能に影響を及ぼすことなく抑制することができ、それによって、活性に対する可能性の枠を増大させ、安全性を改善する。

10

【図面】

【図1】

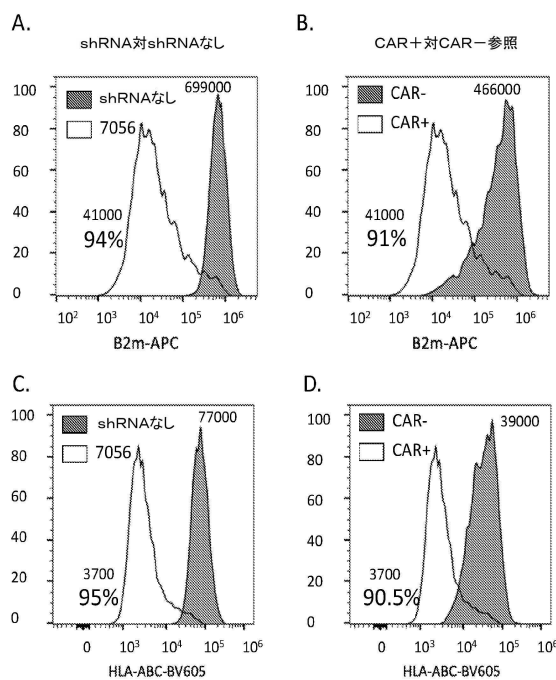


FIGURE 1

【図2】

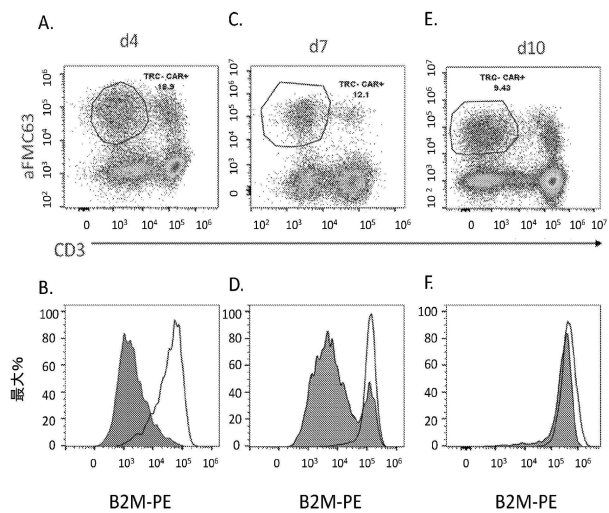


FIGURE 2

20

30

40

50

【図 3】

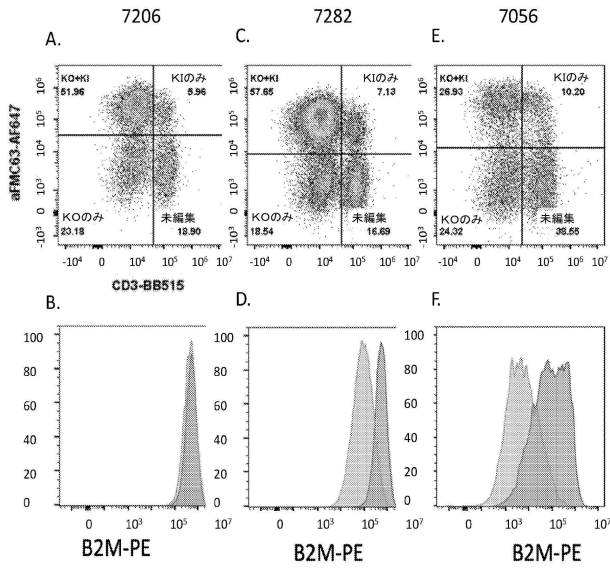


FIGURE 3

【図 4】

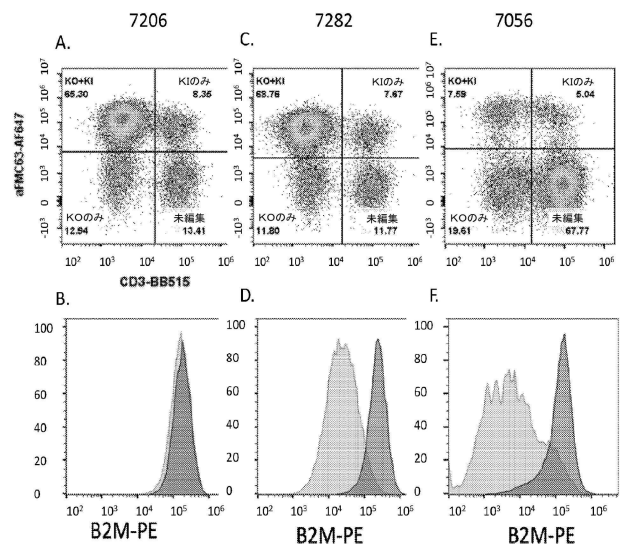


FIGURE 4

【図 5】

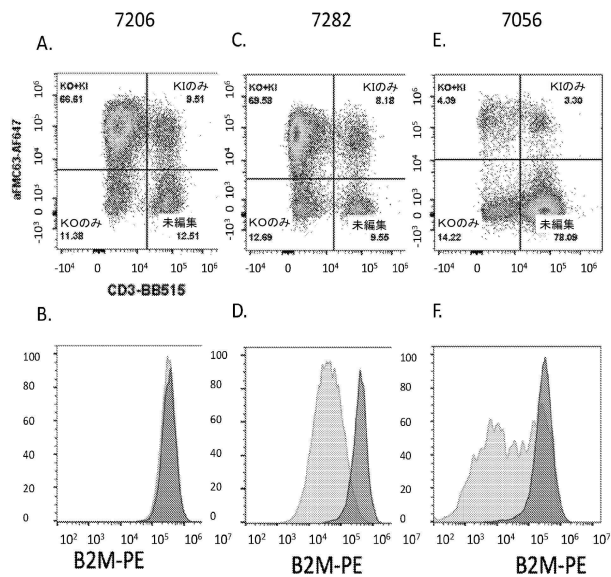


FIGURE 5

【図 6】

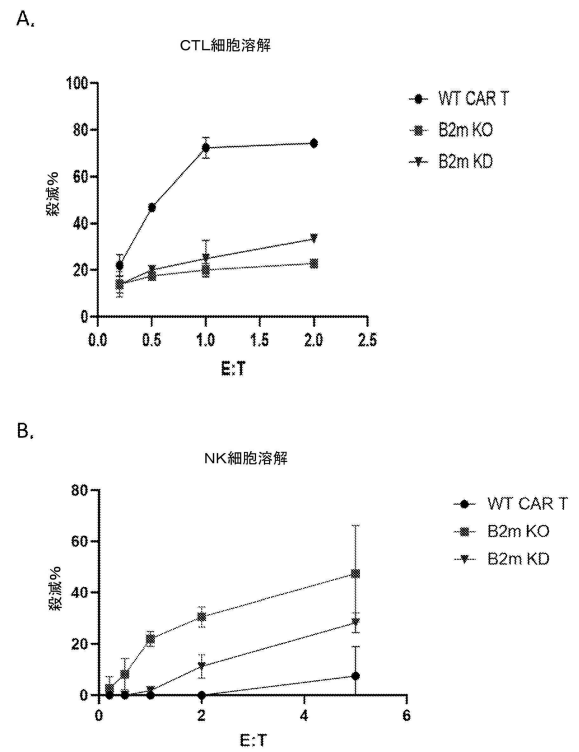


FIGURE 6

10

20

30

40

50

【図 7】

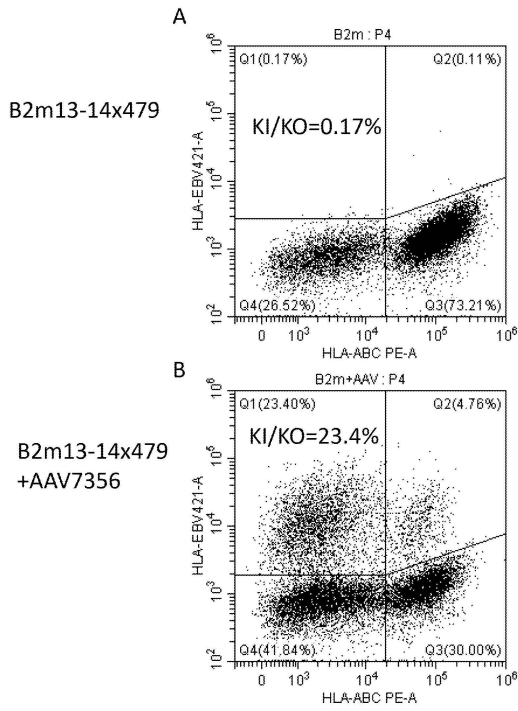


FIGURE 7

【図 8】

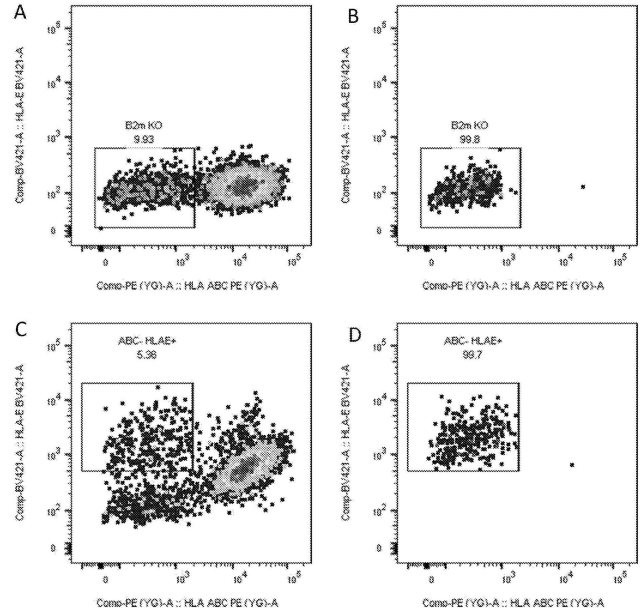


FIGURE 8

【図 9 A】

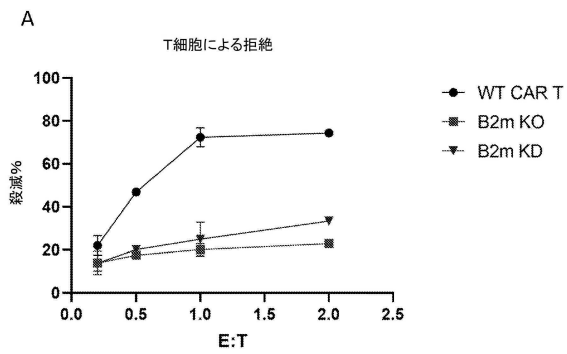


FIGURE 9

【図 9 B】

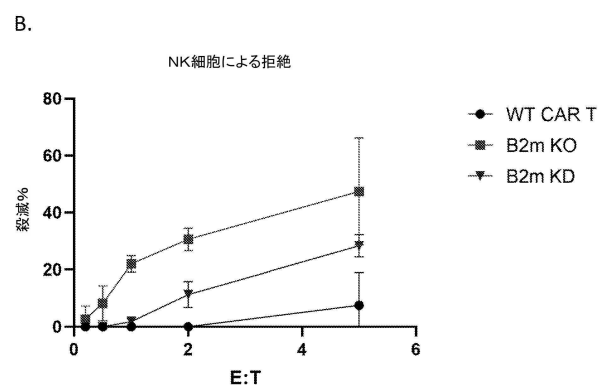


FIGURE 9 (cont.)

10

20

30

40

50

【図 10】

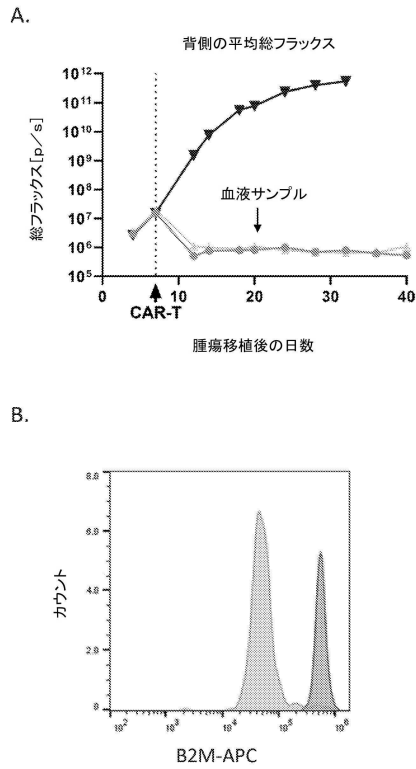


FIGURE 10

【図 11】

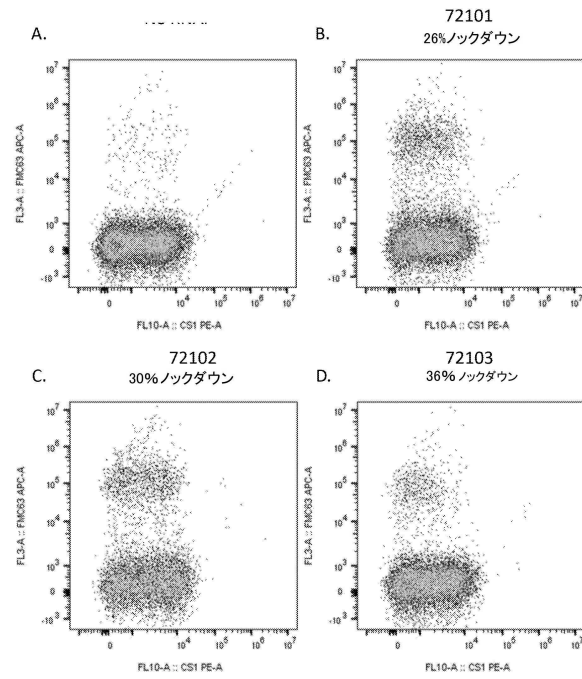


FIGURE 11

【図 12 A】

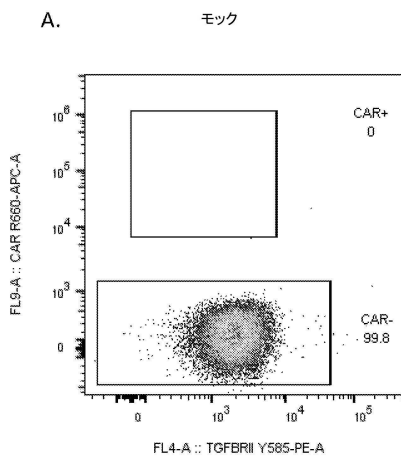
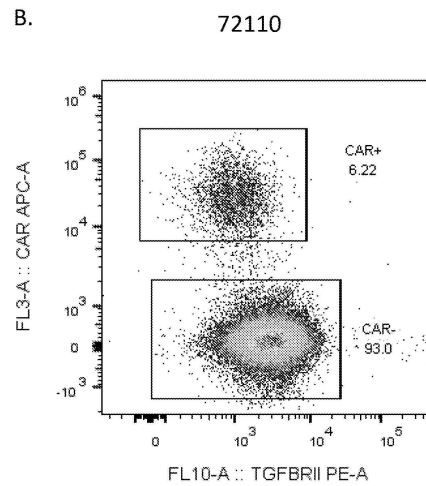


FIGURE 12

【図 12 B】



CAR+ MFI = 1019
CAR- MFI = 2760

63% KD

FIGURE 12 (cont.)

10

20

30

40

50

【図 1 2 C】

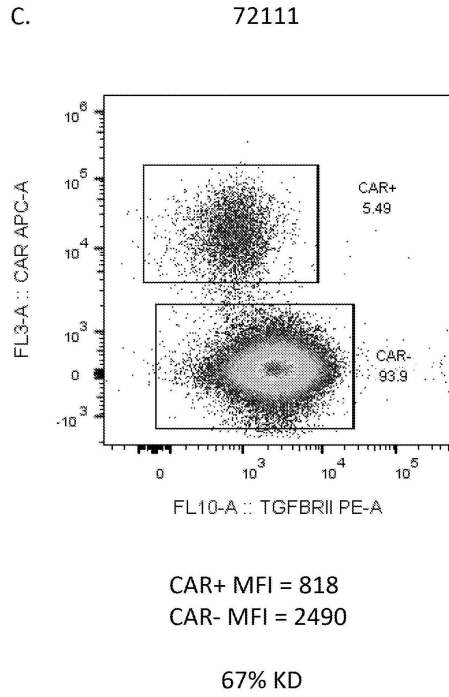


FIGURE 12 (cont.)

【図 1 2 D】

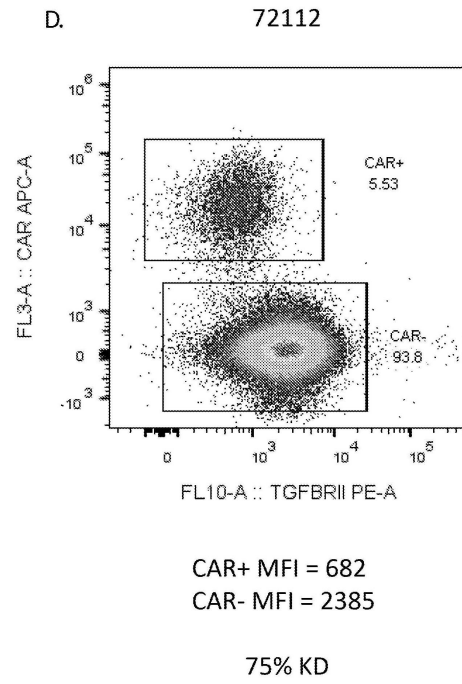


FIGURE 12 (cont.)

【図 1 2 E】

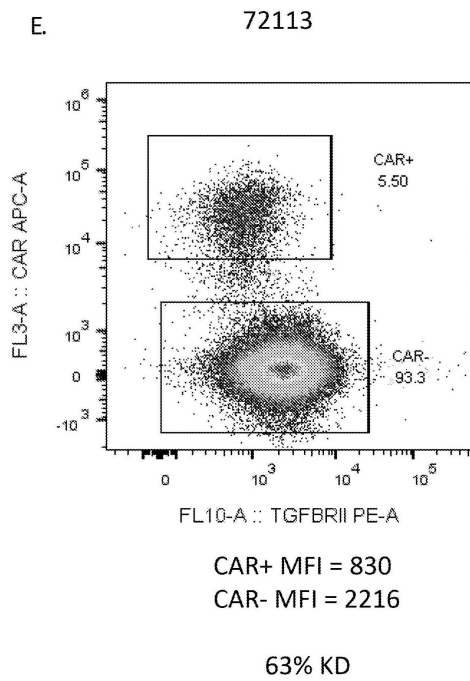


FIGURE 12 (cont.)

【図 1 2 F】

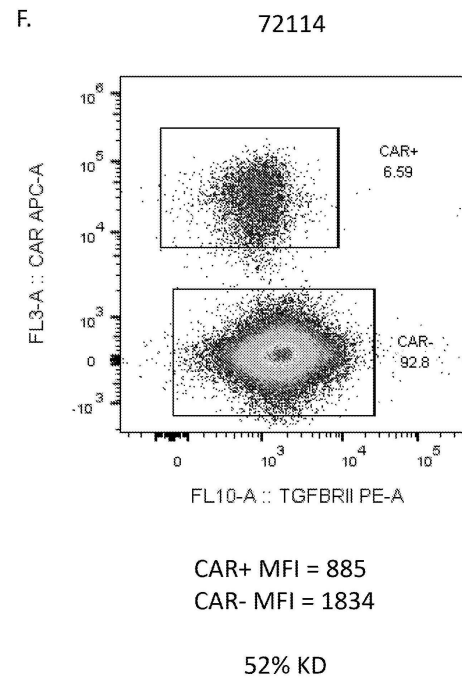


FIGURE 12 (cont.)

10

20

30

40

50

【図 13】

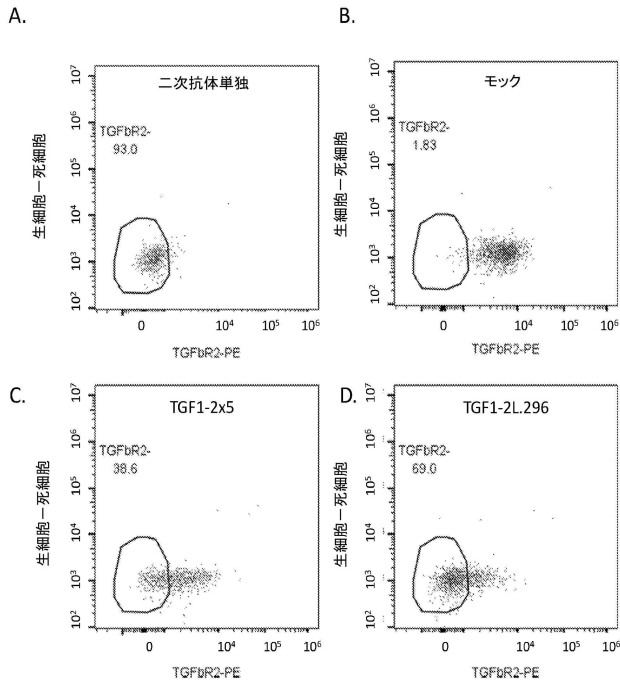


FIGURE 13

【図 14】

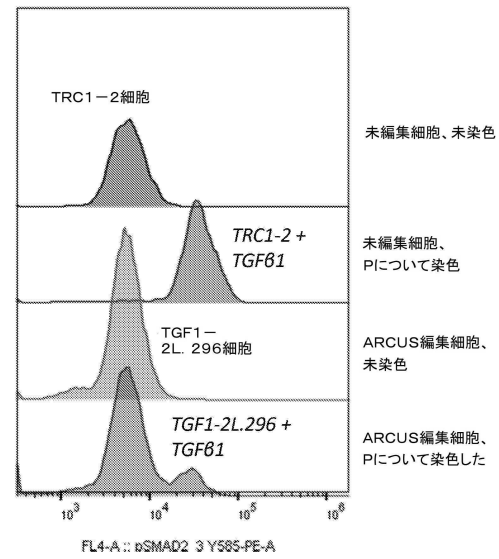


FIGURE 14

10

20

【図 15】

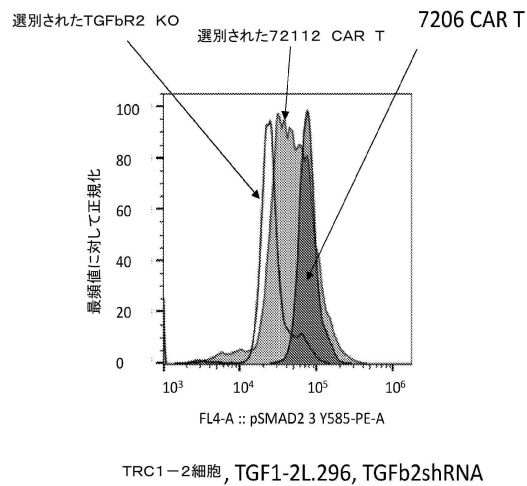


FIGURE 15

【図 16】

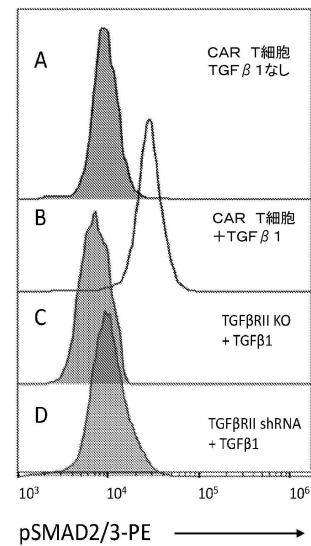


FIGURE 16

30

40

50

【図 17】

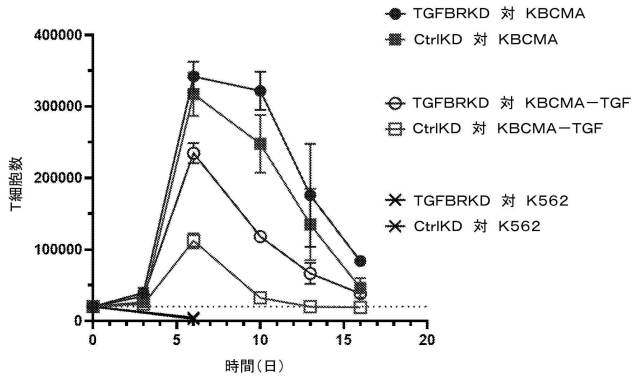


FIGURE 17

【図 18】

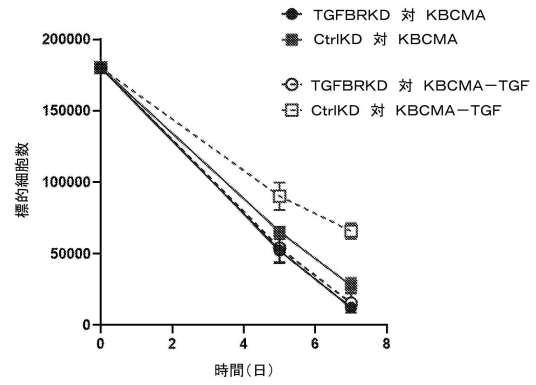


FIGURE 18

10

【図 19】

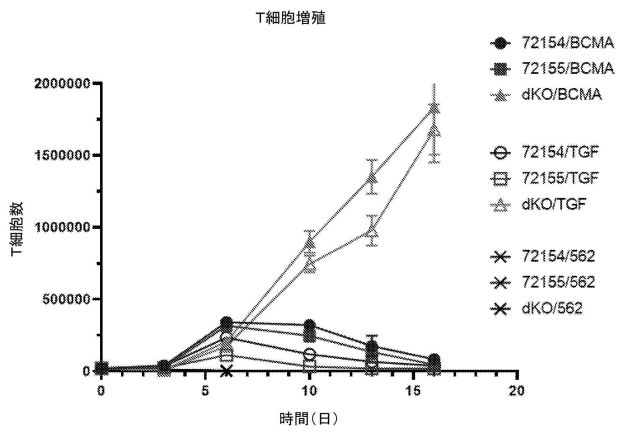


FIGURE 19

【図 20】

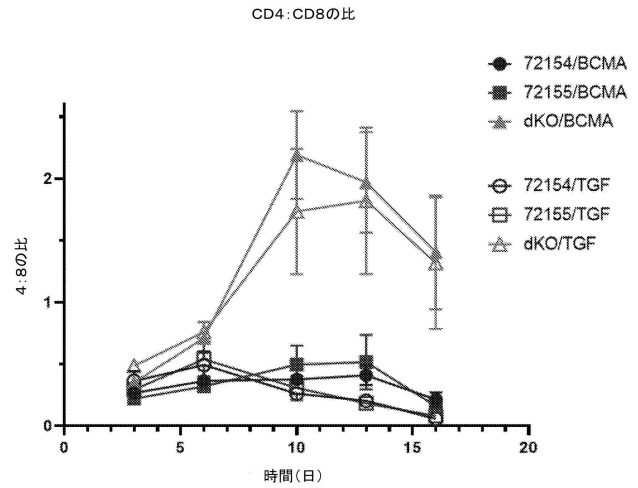


FIGURE 20

20

30

40

50

【図 2 1】

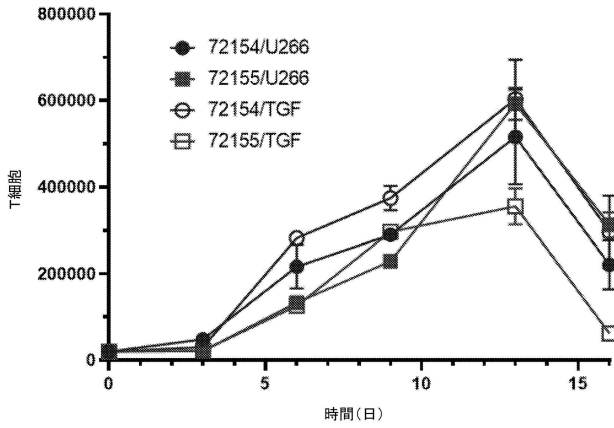


FIGURE 21

【図 2 2】

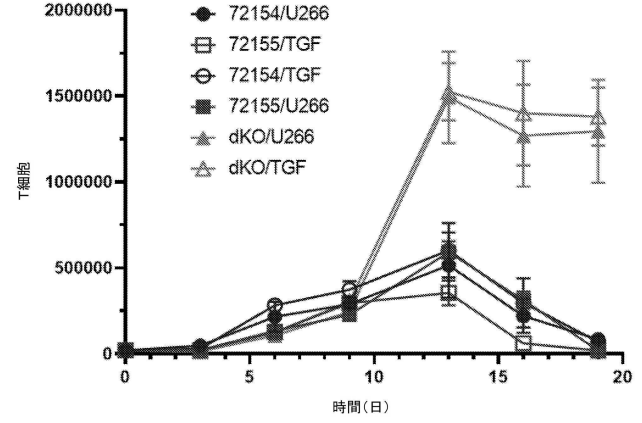


FIGURE 22

【図 2 3】

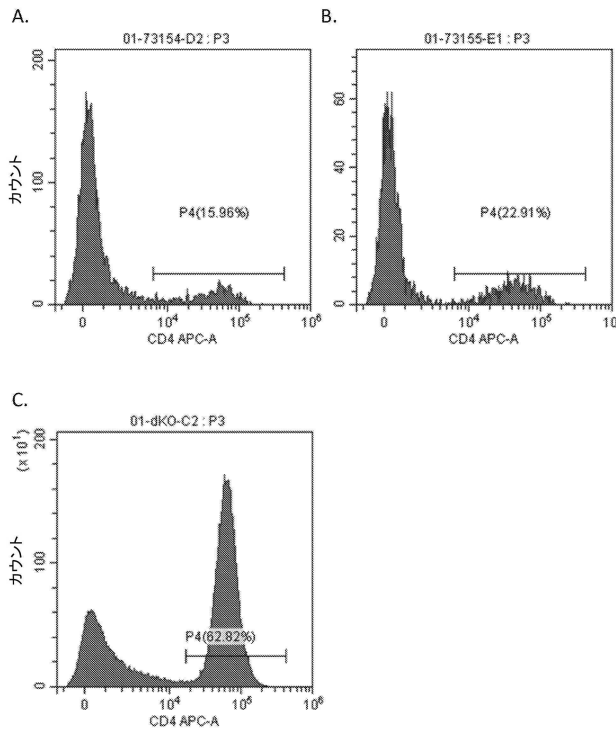


FIGURE 23

【図 2 4 A】

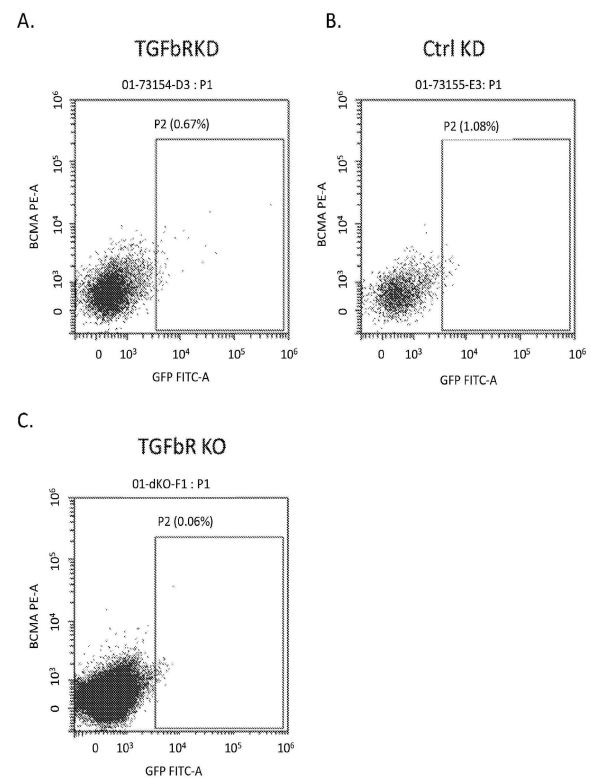


FIGURE 24

【図 2 4 B】

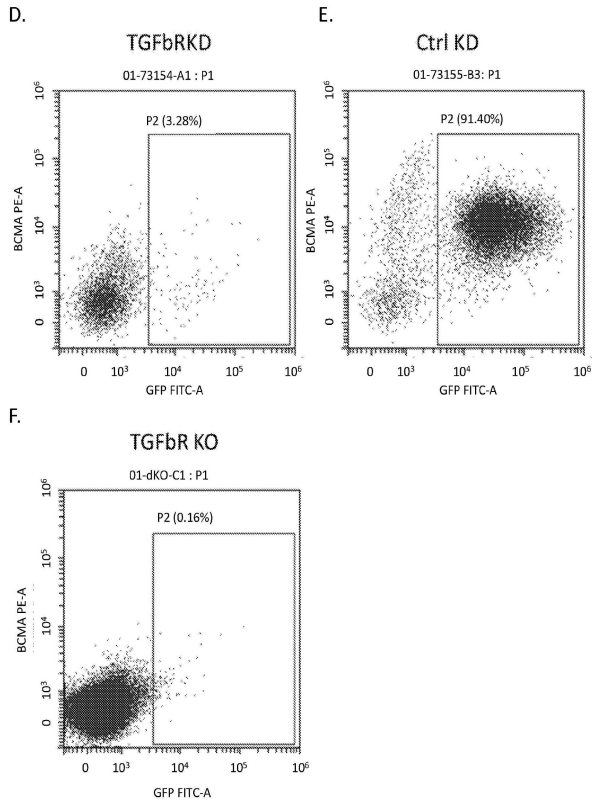


FIGURE 24 (cont.)

【図 2 5】

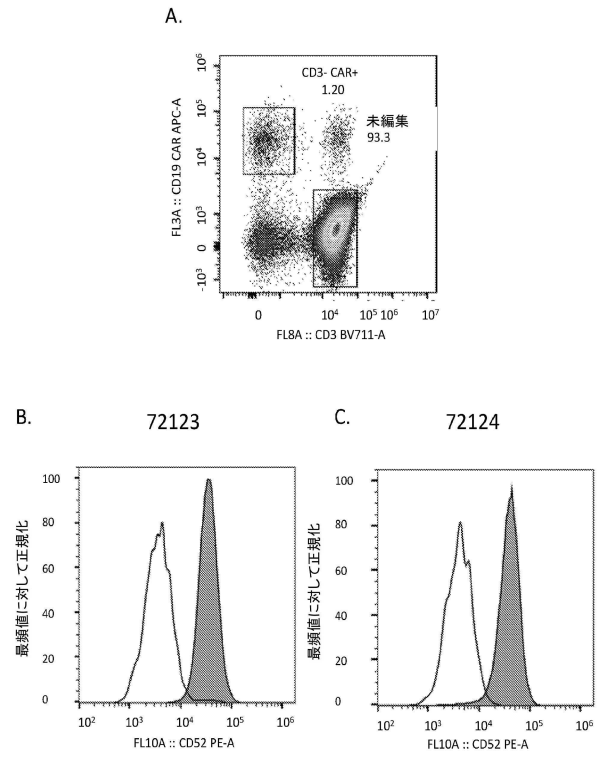


FIGURE 25

【図 2 6】

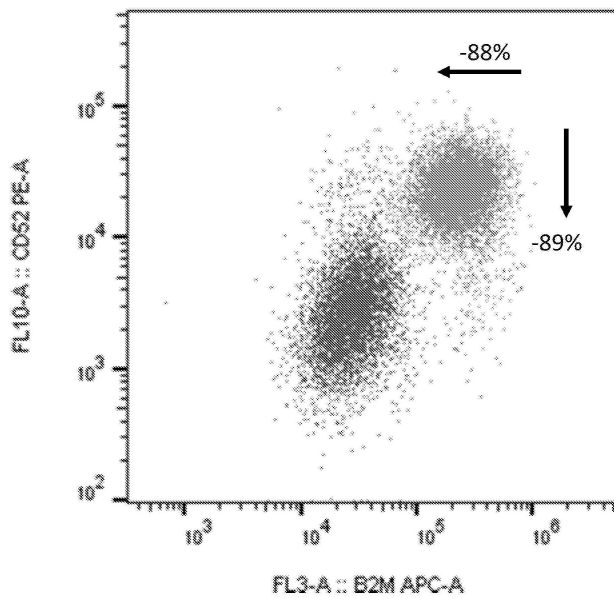


FIGURE 26

【図 2 7】

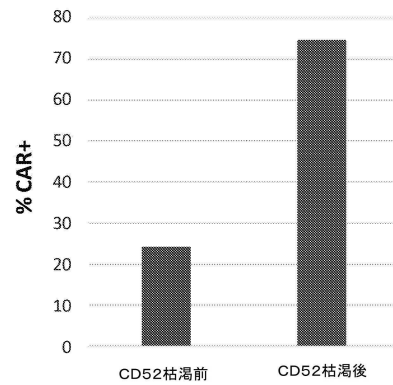


FIGURE 27

10

20

30

40

50

【図 28】

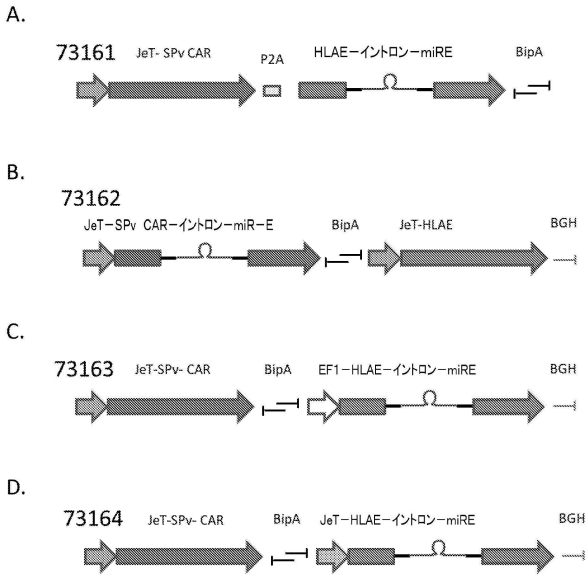


FIGURE 28

【図 29】

AAV	CD3-CAR+ %	KI中のKO	CAR+ MFI	7206のMFI
7206	53%	69%	2.9e5	100%
73161	48%	64%	5.4e5	186%
73162	22%	32%	4.4e5	152%
73163	42%	59%	6.6e5	228%
73164	28%	41%	4.3e5	148%
dKO dKI	37%	70%	2.3e5	79%

FIGURE 29

【図 30】

AAV	HLA WT% (CD3-CAR +集団)	HLA KD (WTゲーティングアウト)	HLA-E+ (CD3-CAR +中の)	HLA-E のMFI	CAR-中の HLA-E+
7206	99%	-	0.9%	6.7e3	0.3%
73161	3%	90%	96.3%	5.4e4	0.3%
73162	7%	90%	86.3%	6.6e4	24.3%
73163	11%	90%	86.8%	2.0e4	0.8%
73164	6%	89%	92.8%	1.3e5	20%
dKO dKI	32%	-	21.3%	3.2e3	0.2%

FIGURE 30

【図 31】

AAV/構築物	CD3-CAR+ %	KI中のKO	CAR+ のMFI	7206の MFI%	HLA WT% (CD3-CAR +集団)	HLA KD (WTゲーティングアウト)	HLA-E+ (CD3-CAR +中の)	HLA-E のMFI
7206	56%	72%	1.8e5	100%	97%	-	0.9%	1.2e3
73161	52%	72%	4.6e5	256%	0.4%	92%	98%	7.7e3
73163	45%	65%	4.1e5	228%	3.5%	92%	77%	1.5e3
dKO dKI	39%	72%	1.6e5	89%	46%	-	34%	1.2e3
臨界値		>40%	>1.8e5	>100%		>90%		>1.2e3
目標値	~50%				~0%		~100%	

FIGURE 31

10

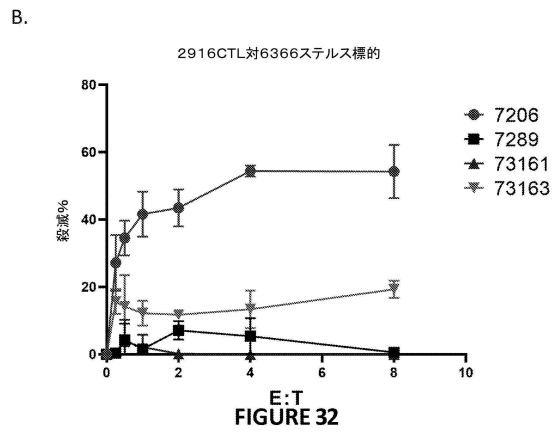
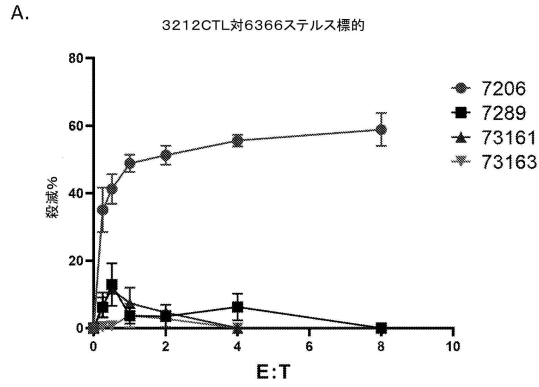
20

30

40

50

【図 3 2】



【図 3 3】

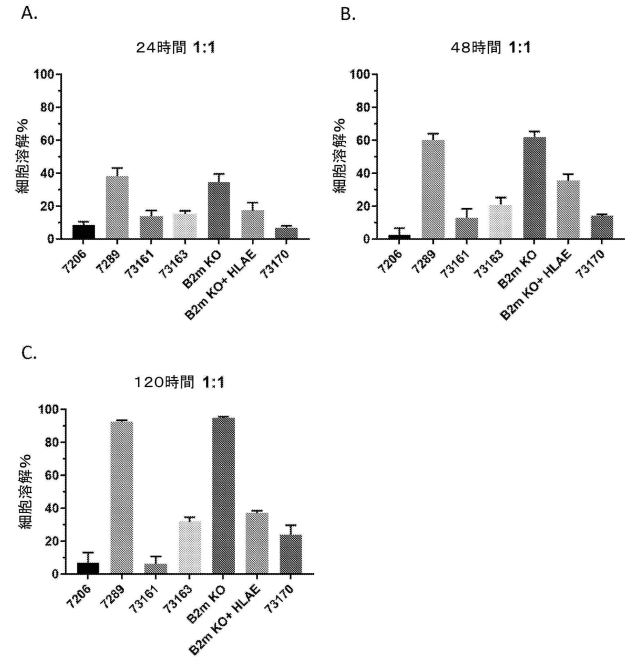


FIGURE 33

【図 3 4】

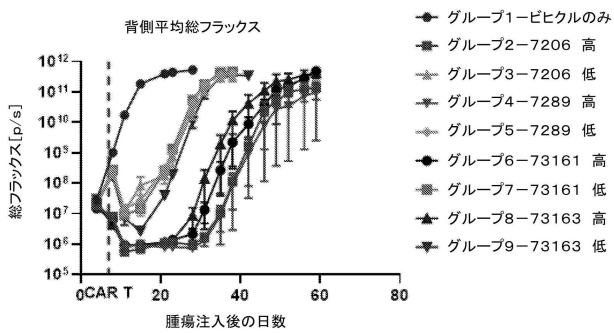


FIGURE 34

【図 3 5】

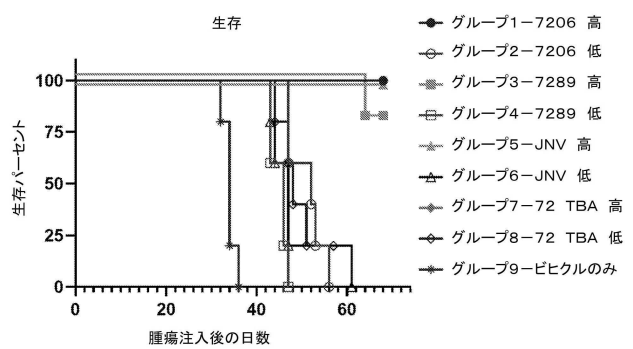


FIGURE 35

10

20

30

40

50

【図 3 6】

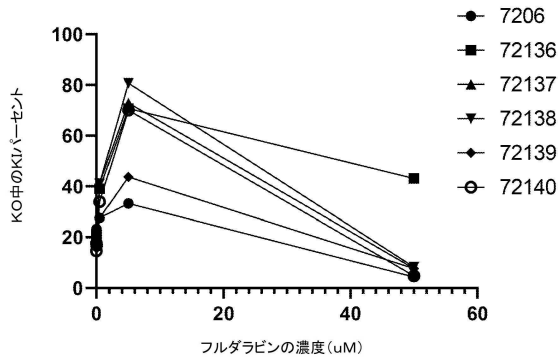


FIGURE 36

【図 3 7】

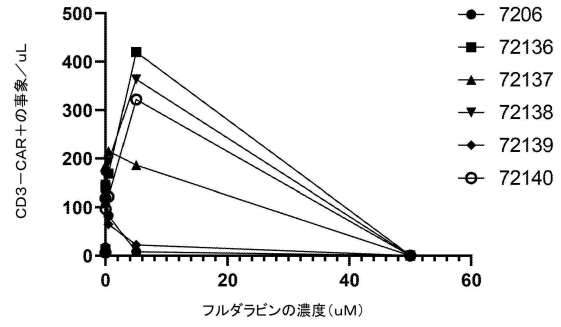


FIGURE 37

【図 3 8】

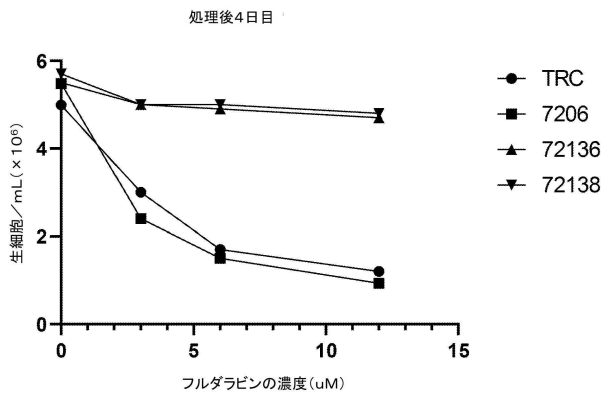


FIGURE 38

【図 3 9】

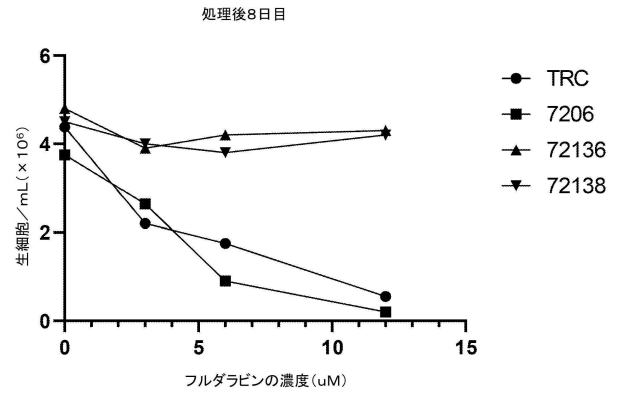


FIGURE 39

10

20

30

40

50

【図 40】

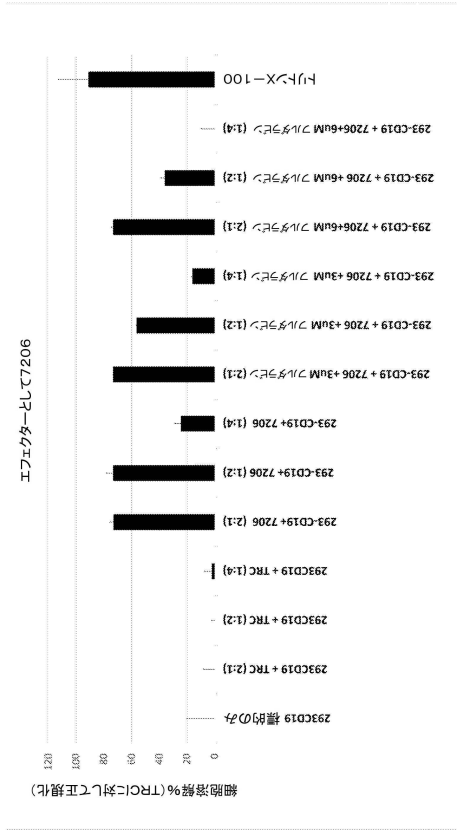


FIGURE 40

【図 41】

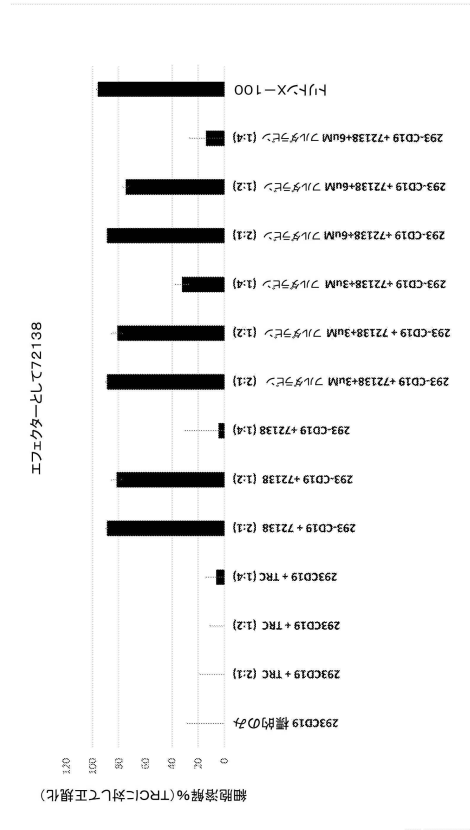


FIGURE 41

【図 42】

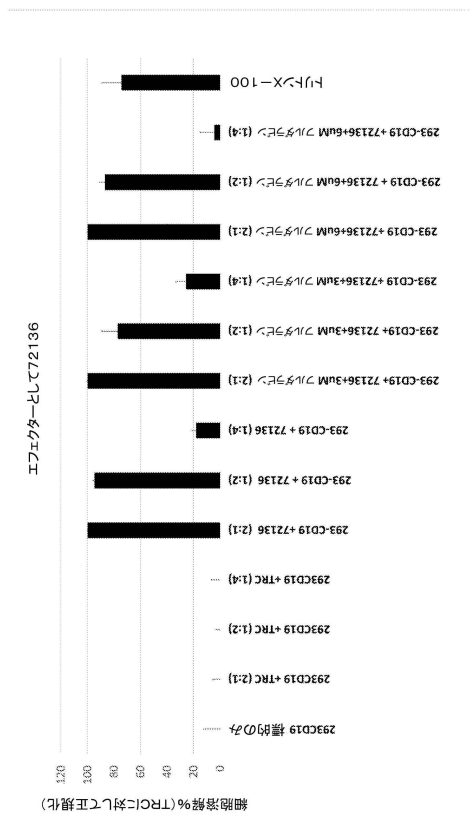


FIGURE 42

【図 43】

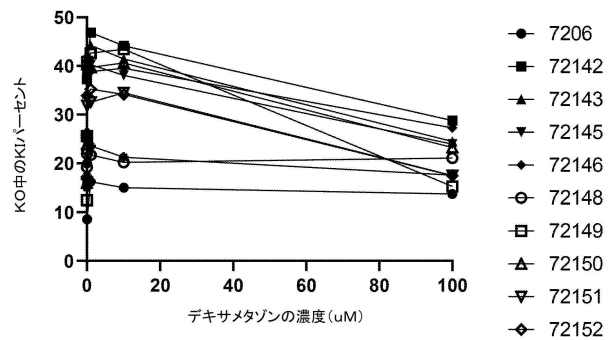


FIGURE 43

10

20

30

40

50

【図 4 4】

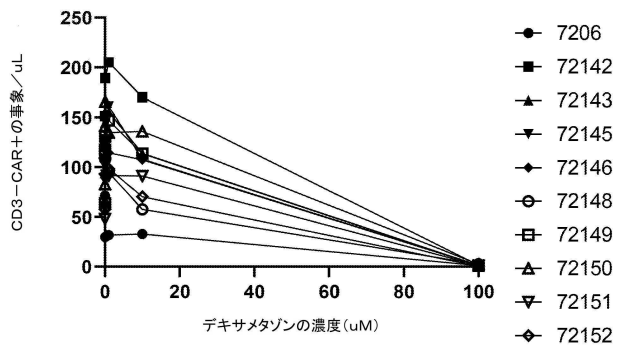


FIGURE 44

【配列表】

2023116510000001.xml

10

20

30

40

50

【手続補正書】

【提出日】令和5年6月22日(2023.6.22)

【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】

そのゲノム内に、5'から3'に：

(a) プロモータ；

(b) キメラ抗原受容体(CAR)または外因性T細胞受容体(TCR)をコードする核酸配列；

(c) 2AまたはIRES配列；

(d) HLAクラスI組織適合抗原、アルファ鎖E(HLA-E)融合タンパク質をコードする核酸配列であって、イントロン配列が前記HLA-E融合タンパク質をコードする前記核酸配列内に配置され、およびマイクロRNA適合shRNA(shRNAmiR)をコードする核酸配列が前記イントロン配列内に配置され、前記shRNAmiRをコードする前記核酸配列が配列番号46の配列を含み；並びに

(e) 終結シグナル

を含み、前記CARまたは前記外因性TCRをコードする前記核酸配列、前記HLA-E融合タンパク質をコードする前記核酸配列、および前記shRNAmiRをコードする前記核酸配列が、前記プロモータに作動可能に連結されているカセットを含み、且つ、前記カセットが、TCRアルファ定常領域遺伝子内に配置される、遺伝子改変ヒトT細胞

。

【請求項2】

前記カセットが、前記TCRアルファ定常領域遺伝子内の配列番号58からなる配列内に配置される、請求項1に記載の遺伝子改変ヒトT細胞。

【請求項3】

前記カセットが、配列番号58内のヌクレオチド位置13と14との間に配置される、請求項2に記載の遺伝子改変ヒトT細胞。

【外国語明細書】

2023116510000058.pdf

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C O 7 K 16/28 (2006.01)

C O 7 K 16/28

C O 7 K 14/74 (2006.01)

C O 7 K 14/74

C O 7 K 14/725 (2006.01)

C O 7 K 14/725

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/930,905

(32)優先日 令和1年11月5日(2019.11.5)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 63/000,774

(32)優先日 令和2年3月27日(2020.3.27)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T R I T O N

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 4 9 2, ニーダム, ハイゲート ストリート 1 4

(72)発明者 ビレス, ミシェル ブレンダ

アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 2 7 5 2 3, エイベックス, セイラム ポインテ プレイス
8 3 7